

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202424331

· 论著 ·

正常小鼠颞骨矢状面切片与内耳神经密度测定技术

丁大连^{1,2,3,4}, 石林⁵, 邢雅智², 李鹏³, 亓卫东⁶, 张建辉⁴, 蒋海燕¹, 时海波²

(1. 纽约州立大学布法罗大学, 纽约 布法罗 14214; 2. 上海交通大学医学院附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200233; 3. 中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510630; 4. 成都市第三人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610014; 5. 大连医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科, 辽宁 大连 116011; 6. 复旦大学附属华山医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200040)

摘要: **目的** 从颞骨矢状面切片的观察角度, 建立定量观察内耳毛细胞、神经元及其神经纤维的新方法。**方法** 采用4只出生后45 d CBA/CaJ小鼠的颞骨, 将2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液灌入内耳腔并将颞骨浸泡固定6 h, 再将颞骨浸入2%四氧化锇溶液中浸泡2 h。颞骨经脱钙、脱水及包埋后, 沿着颞骨矢状面切取半薄切片(2 μm)并用0.5%甲苯胺蓝染色。在光学显微镜下的小视野范围内, 对毛细胞、神经元及神经纤维进行定量观察。**结果** 从平行颞骨内侧壁的平面切片开始收集与观察。当切开颞骨内侧壁进入耳蜗神经孔和前庭上神经孔时, 即可得到对应神经束及前庭下神经束中枢端神经纤维的横断切片。当切到椭圆囊斑和上半规管壶腹嵴及外半规管壶腹嵴的横断截面时, 获得上述结构所含毛细胞的横断面切片, 同时也获得前庭上神经元细胞体及其两端神经纤维的横断面切片。当切到球囊斑和后半规管壶腹嵴的横断截面时, 获得其中所含毛细胞的横断面切片, 同时也获得前庭下神经元的细胞体及其两端神经纤维的横断面切片。切到耳蜗骨性螺旋板的横断截面时, 获得螺旋神经节外周端神经纤维的横断面切片。在切到蜗轴的横断截面, 可获得耳蜗毛细胞和螺旋神经节的横断面切片。本实验发现正常小鼠各个前庭感觉上皮区的毛细胞平均密度为(18.67 ± 1.88)/180 μm。耳蜗底回中部单个疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维的数量为(57.83 ± 9.09)根。耳蜗螺旋神经节和前庭上神经元及前庭下神经元的平均密度为(20.39 ± 2.23)/0.007 5 mm²。耳蜗神经束和前庭下神经束及前庭上神经束的中枢端神经纤维的平均密度为(497.06 ± 25.28)/0.007 5 mm²。**结论** 颞骨矢状面切片的观察角度有利于对内耳神经系统做出全方位的细胞学定量评估。

关键词: 颞骨; 矢状面切片; 耳蜗; 前庭; 神经

中图分类号: R764

Sagittal sectioning of temporal bones and quantitative measurement of neural densities in the inner ear in normal mice

DING Dalian^{1,2,3,4}, SHI Lin⁵, XING Yazhi², LI Peng³, QI Weidong⁶, ZHANG Jianhui⁴, JIANG Haiyan¹, SHI Haibo²

(1. State University of New York at Buffalo, NY 14214, USA; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 4. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014, China; 5. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China; 6. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: **Objective** To establish a new method for quantitative observation of inner ear hair cells, neurons and nerve fibers from sagittal sections of temporal bones. **Methods** Temporal bones of four CBA/CaJ mice at 45 days of age were removed under deep anesthesia. The inner ear cavity was perfused with 2.5% glutaraldehyde and then immersed in the fixative for 6 hours. The temporal bones were rinsed with PBS, and immersed in 2% osmium tetroxide for 2 hours.

基金项目: 国家自然科学基金项目(82171147, 82071050, 81973913); 科技部国家重点研发计划(2023YFC2410205); 四川省自然科学基金(2023NSFC0621)。

第一作者简介: 丁大连, 男, 博士, 教授。

通信作者: 邢雅智, Email: yazhi_0807@hotmail.com; 李鹏, Email: lp76@163.net

After routine decalcification, dehydration, and epoxy resin embedding, semi-thin sections ($2\ \mu\text{m}$) were prepared along the sagittal plane of the temporal bones and stained with 0.5% toluidine blue. Quantitative observations of hair cells, neurons and nerve fibers were performed in a small field of view under an optical microscope. **Results** Collection and observations began with planar sections parallel to the medial wall of the temporal bone. Upon sectioning through the medial wall to access the cochlear nerve canal and superior vestibular nerve canal, cross-sections of the central nerve fibers of the corresponding cochlear nerve bundles and inferior vestibular nerve bundles were obtained. Sections through the macula of the utricle, the crista ampullae of the superior and lateral semicircular canals revealed cross-sectional profiles of hair cells in these structures, as well as the soma of superior vestibular neurons and their peripheral and central nerve fibers. Similarly, sections through the macula of the saccule and the crista ampulla of the posterior semicircular canal were also profiled cross-sectional views of their hair cells, along with the soma of inferior vestibular neurons and their peripheral and central nerve fibers. Cross-sections of the bony spiral lamina of the cochlea exposed the peripheral nerve fibers of the spiral ganglion, while sections through the center axis of modiolus revealed the cross-section of cochlear hair cells and the soma of spiral ganglion neurons. Quantitative analysis demonstrated that the average density of hair cells in vestibular sensory epithelium of normal mice was $(18.67 \pm 1.88)/180\ \mu\text{m}$. The number of peripheral nerve fibers within a single habenula perforata in the middle turn of cochlea was 57.83 ± 9.09 . The average density of spiral ganglion neurons of the cochlea, superior and inferior vestibular ganglion neurons was $(20.39 \pm 2.23)/0.0075\ \text{mm}^2$. The average density of central nerve fibers in the cochlear nerve, inferior and superior vestibular nerve was $(497.06 \pm 25.28)/0.0075\ \text{mm}^2$. **Conclusion** The sagittal plane of the temporal bone provides a favorable perspective for comprehensive cytological and quantitative assessments of the inner ear nervous system.

Keywords: Temporal bone; Sagittal section; Cochlea; Vestibule; Nerve

组织病理学观察主要包括冠状面、矢状面和横断面3种角度。在哺乳类实验动物内耳感觉上皮及其外周神经系统的组织病理学研究中,一般认为颞骨切片的标准方向是将切片平面平行于外耳道和内听道,从上鼓室朝着下鼓室方向依次收集上半规管壶腹嵴和外半规管壶腹嵴切片、椭圆囊斑切片和前庭上神经元切片、球囊斑切片和前庭下神经元切片、耳蜗中轴切片、内淋巴管和内淋巴囊切片,以及后半规管壶腹嵴切片,如此收集到的颞骨横断面连续切片被认为是颞骨组织病理学研究的规范样本^[1-3]。虽然从颞骨横断面连续切片可以观察内耳感觉上皮及其外周神经元和外周端神经纤维,但是由于该切片与外周神经元的中枢端神经纤维束近乎平行,因此无法从横截面角度对中枢端神经纤维的密度进行定量分析。鉴于耳蜗神经孔和前庭上神经孔是耳神经进入中枢的通路,因此从颞骨矢状面切片可望对耳蜗和前庭的中枢端神经纤维做出精确定量评估。本文旨在研究小鼠颞骨矢状面切片并建立内耳神经系统的细胞学定量评估新技术。

1 材料与方法

1.1 受试动物

本研究以出生后45 d、体重22~24 g的2只CBA/CaJ雄性小鼠和2只CBA/CaJ雌性小鼠(Charlese River)作为受试对象。本实验条件得到上

海市第六人民医院动物伦理委员会的审查批准。

1.2 颞骨的样品制备

CBA/CaJ小鼠在深度麻醉下取出颞骨。在解剖显微镜下迅速在耳蜗尖、圆窗和卵圆窗开孔,通过这3处开放小孔向内耳腔内灌入2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液之后再将其浸入在上述固定液中浸泡固定6 h。用0.1 M磷酸盐缓冲液充分漂洗颞骨,然后将颞骨浸入2%四氧化锇溶液中浸泡2 h。用磷酸盐缓冲液再次充分漂洗颞骨后,将颞骨浸入10%乙二胺四乙酸-钠盐(EDTA)脱钙液中浸泡脱钙5 d。完成脱钙后,将颞骨依次浸入70%、80%、90%、95%和100%乙醇溶液脱水各10 min,将颞骨浸入100%乙醇和100%丙酮各半的溶液中脱水10 min之后再浸入100%丙酮溶液10 min。最后将颞骨浸入含有以1:1比例混合的100%丙酮和Epon-812渗透过夜。次日将颞骨移至盛满Epon-812的样品包埋槽并调整颞骨在Epon-812中的位置,使正对后颅窝的颞骨内侧表面位于样品包埋槽的一端,以确保随后获取的连续切片均处于颞骨的矢状面切片角度。最后将样品槽放入60℃的恒温箱中48 h使环氧树脂聚合变硬。将Epon-812包埋的颞骨固定在超薄切片机的样品台上,用玻璃刀沿着颞骨内侧表面的平面开始逐片切取并收集厚度为 $2\ \mu\text{m}$ 的颞骨矢状面半薄切片,直至切到镮骨底板平面。将收集到的连续切片依次置放在载玻片上的蒸馏水滴中,

漂浮在蒸馏水滴表面的半薄切片在加温条件下展平,半薄切片随着加热水的蒸发最后平整地粘贴在载玻片上。在半薄切片的表面滴上0.5%甲苯胺蓝染色液,加温染色5 min,用蒸馏水冲洗掉多余的染色液后加温烘干,最后在载玻片上的切片表面滴上中性树胶并盖上盖玻片封片^[4,6]。

1.3 内耳不同层面的矢状面连续切片收集

在普通光学显微镜下,从由内向外逐片收集的颞骨矢状面连续切片的不同层次,可依次观察前庭上神经的中枢端和外周端神经纤维束和面神经纤维束以及耳蜗神经和前庭下神经的中枢端和外周端神经纤维束、球囊斑和椭圆囊斑以及3个半规管壶腹嵴的横断面切片、耳蜗骨性螺旋板疆孔内的耳蜗外周端神经纤维、耳蜗螺旋器和蜗轴螺旋管内螺旋神经节的横断面切片。

1.4 内耳神经元密度及其外周端和中枢端神经纤维密度的测量

对耳蜗螺旋神经节数量的定量观察是从耳蜗中轴切片的横断面对每张蜗轴螺旋管切片中耳蜗底回中部的螺旋神经节数量进行计数^[4,7-9]。对耳蜗骨性螺旋板疆孔内螺旋神经节外周端神经纤维数量的定量观察是对每个疆孔切片中的神经纤维数量进行计数^[7-8,10-11]。对前庭感觉毛细胞横断面切片的定量观察是在放大400倍的光学显微镜下首先测量1张前庭终器切片中感觉毛细胞所占据的实际长度,然后对该长度范围内的毛细胞进行计数,从而获得该区间的毛细胞密度^[12]。对耳蜗神经孔内的中枢端听神经纤维密度的定量观察同样是首先拍摄放大400倍光学显微镜下的照片,然后测量并计算出摄影取景框中1/4将用于神经纤维计数的面积,然后在同样放大倍数下拍摄螺旋神经节中枢端神经束的横断面切片,并对取景框1/4面积范围内的神经纤维数量进行计数。对前庭上神经元和前庭下神经元的外周端及中枢端神经纤维数量的定量观察也是在测量出放大400倍显微镜下的摄影取景框1/4面积的基础上,分别对占取景框视野1/4范围内的前庭上神经元和前庭下神经元的数量以及前庭神经元外周端和中枢端的神经纤维数量进行计数,从而获得前庭神经元的密度及其外周端和中枢端的神经纤维密度。

1.5 统计学方法

应用单因素方差分析评估细胞和神经纤维的计数结果,然后使用GraphPad Prism(ver.5)软件中的one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc comparison进行统计学分析。

2 结果

2.1 常用实验动物颞骨的内侧面观

猴子、南美栗鼠、豚鼠、大鼠和小鼠颞骨内侧骨壁表面结构的组合图见图1。从图1中可以看出,这些常用实验动物通向颅内的耳蜗和前庭神经束分别从颞骨内侧壁表面的耳蜗神经孔和前庭上神经孔直接进入颅内。因此只要沿着平行颞骨内侧骨壁的平面实施颞骨矢状面切片就可以获得理想的耳蜗中枢端和前庭中枢端神经纤维束的横断面切片。

2.2 正常CBA/CaJ小鼠的颞骨矢状面切片

当平行颞骨内侧骨壁的矢状面切开颞骨内侧骨壁进入到小鼠耳蜗神经孔和前庭上神经孔的横断截面的平面时,即可看到前庭上神经的中枢端神经纤维束和面神经的神经纤维束以及耳蜗神经束和前庭下神经的中枢端神经纤维束;当平行颞骨内侧骨壁的矢状面切片切到耳蜗蜗轴的骨性螺旋板时,可见疆孔内通向耳蜗螺旋器的螺旋神经节外周端神经纤维的横断面;当平行颞骨内侧骨壁的矢状面切片推进到耳蜗中轴切片的截面时,可见耳蜗螺旋器和蜗轴螺旋管的理想横断切片;当平行颞骨内侧骨壁的矢状面切片切到前庭池的椭圆囊斑和上壶腹嵴横断面时,可见椭圆囊斑和上壶腹嵴的横断切片;在球囊斑横断面切片的层面,可见球囊斑感觉上皮和前庭下神经元的细胞体及其外周端和中枢端的神经纤维。在椭圆囊斑横断面切片的层面,可见椭圆囊斑感觉上皮和前庭上神经元的细胞体及其外周端和中枢端的神经纤维。见图2~4。

2.3 正常CBA/CaJ小鼠前庭毛细胞和耳蜗螺旋神经节及前庭神经元的密度值

从正常CBA/CaJ小鼠球囊斑切片和椭圆囊斑切片及壶腹嵴切片测量出的毛细胞平均密度分别为 $(19.00 \pm 1.30)/180$ 、 $(18.43 \pm 1.87)/180$ 、 $(18.57 \pm 2.30)/180 \mu\text{m}$,鉴于小鼠前庭各个感觉上皮区的毛细胞密度无显著差异($P > 0.05$),前庭感觉毛细胞的平均密度初步被确定为 $(18.67 \pm 1.88)/180 \mu\text{m}$ 。从耳蜗底回中部骨性螺旋板切片计数到的穿越单个疆孔的神经纤维平均数量是 (57.83 ± 9.09) 根。从耳蜗底回中部单张蜗轴螺旋管切片得到螺旋神经节细胞的平均数量是 (53.57 ± 5.54) 个。根据单位面积内的神经元数量来计算,正常小鼠耳蜗螺旋神经节的平均密度为 $(21.67 \pm 2.41)/0.0075 \text{ mm}^2$,前庭下神经元的平均密度为 $(19.83 \pm 1.58)/0.0075 \text{ mm}^2$,前庭上神经元的平均密度为 $(19.67 \pm 2.00)/0.0075 \text{ mm}^2$,鉴于小鼠耳蜗螺旋神经节和前庭上及

前庭下神经元的密度无显著差异 ($P > 0.05$), 内耳神经元的平均密度被确定为 $(20.39 \pm 2.23) / 0.0075 \text{ mm}^2$ 。从耳蜗神经孔切片测量出的耳蜗中枢端神经纤维密度和前庭下神经元中枢端神经纤维密度分别为 $(500.33 \pm 21.09) / 0.0075 \text{ mm}^2$ 和 $(496.06 \pm 14.57) / 0.0075 \text{ mm}^2$, 从前庭上神经管切片测量出的前庭上神经元中枢端神经纤维密度为

$(494.67 \pm 24.52) / 0.0075 \text{ mm}^2$, 鉴于小鼠耳蜗和前庭的中枢端神经纤维的密度无显著差异 ($P > 0.05$), 内耳中枢端神经纤维的平均密度初步被确定为 $(497.06 \pm 25.28) / 0.0075 \text{ mm}^2$ 。这些定量观察结果将为我们今后继续开展的内耳神经损害实验研究提供可参考的数据。

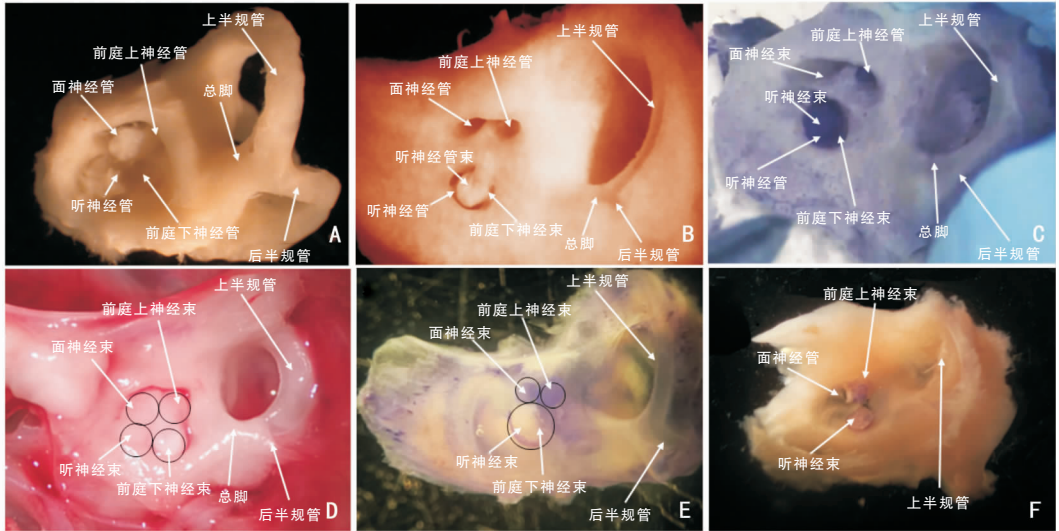


图1 不同实验动物颞骨内侧骨壁的神经结构 A:猴子;B:南美栗鼠;C:豚鼠;D、E:大鼠;F:小鼠

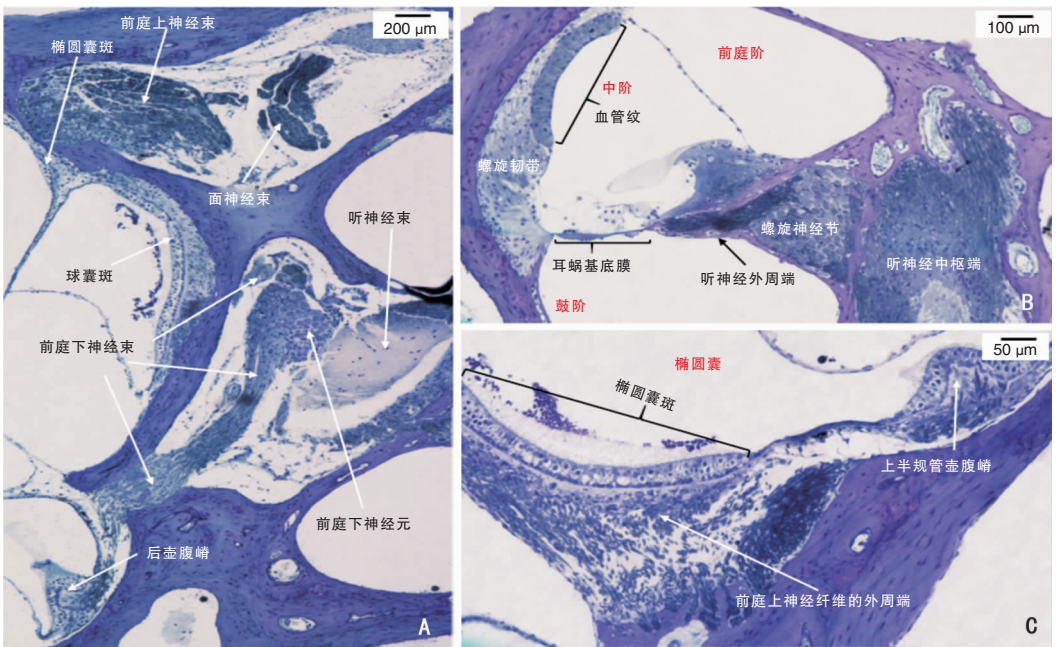


图2 CBA小鼠颞骨的矢状面切片 (甲苯胺蓝 $\times 400$) A:切片显示面神经管、前庭上神经管和听神经管横断面,以及前庭上、下神经和听神经中枢端神经束;B:切片显示耳蜗中轴,包括螺旋韧带血管纹、基底膜上螺旋器和蜗轴螺旋管内螺旋神经节横截面;C:切片显示椭圆囊斑和上半规管壶腹嵴,包括前庭毛细胞和前庭上神经外周纤维横截面

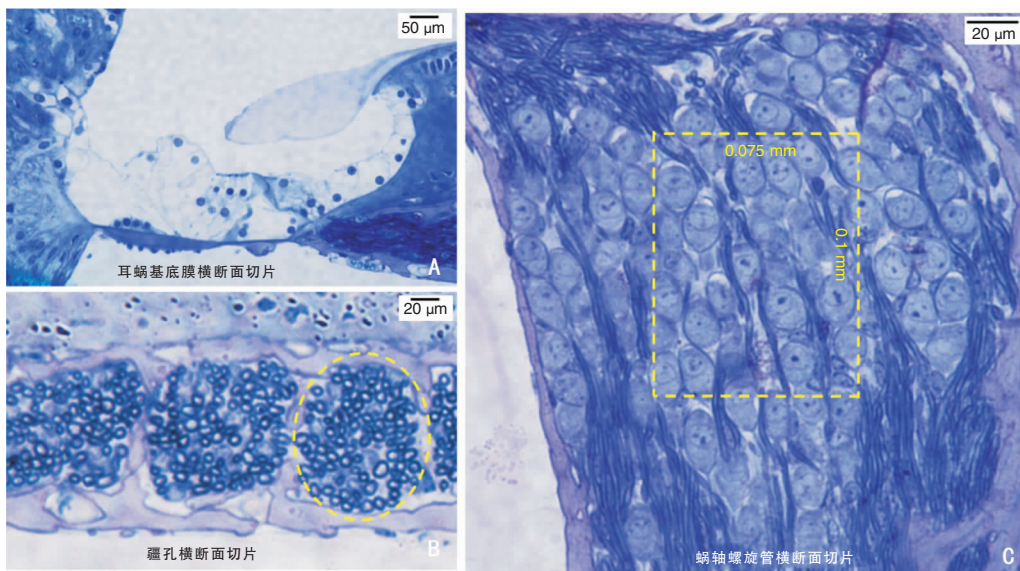


图3 耳蜗半薄切片的结构 (甲苯胺蓝 ×400) A:基底膜横断面切片显示螺旋器;B:疆孔横断面切片显示通向耳蜗螺旋器的外周端神经纤维,黄色圆圈标出1个疆孔和穿越这个疆孔的外周端神经纤维;C:蜗轴螺旋管横断面切片展示螺旋神经节细胞体,长方形虚线指示螺旋神经节密度的测量区域

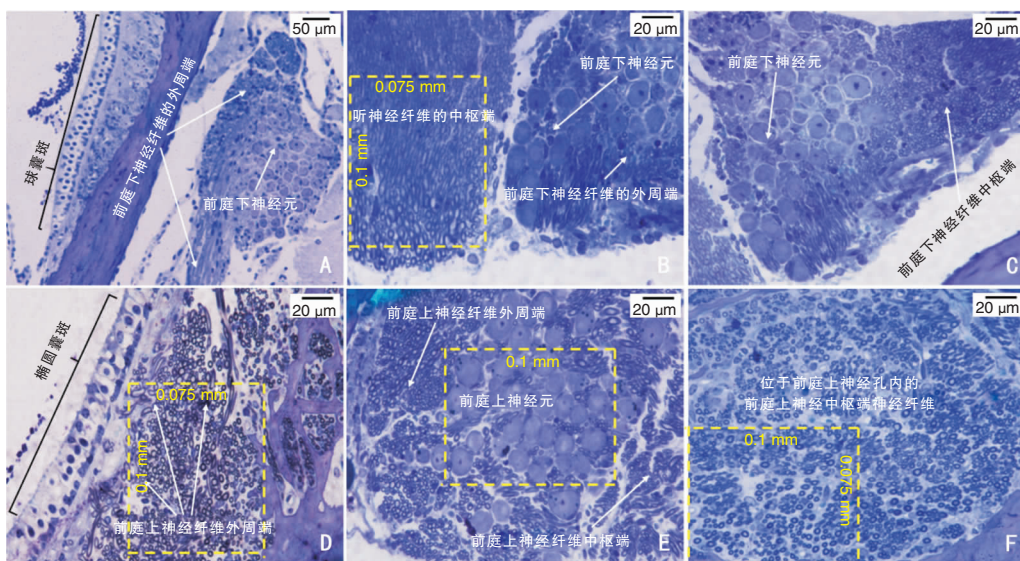


图4 前庭感觉毛细胞和前庭下神经元及前庭上神经元的外周端和中枢端神经纤维 (甲苯胺蓝 ×400) A:球囊斑矢状面切片显示毛细胞和前庭下神经元;B:听神经管矢状面切片显示螺旋神经节和前庭下神经元纤维束,黄色框定测量神经纤维密度的区域;C:前庭下神经束切片显示前庭下神经元中枢端神经纤维束;D:椭圆囊斑矢状面切片显示毛细胞和前庭上神经元周边纤维束,黄色框定测量周边纤维密度的区域;E:前庭上神经管矢状面切片显示前庭上神经元及其神经纤维,黄色框定测量神经元密度的区域;F:前庭上神经管切片显示前庭上神经元中枢端神经纤维束,黄色框定测量中枢纤维密度的区域

3 讨论

3.1 小鼠内耳神经通路与人耳蜗和前庭神经通路的异同

开口于后颅窝外侧壁的成人内耳道的长度约 8.5 mm,直径约 4 mm^[13]。内耳道靠近外侧的部分

被称之为内耳道底,被骨壁分隔出 3 个管道。位于上方的两个骨管从前向后依次是面神经管和前庭上神经管,分别有同名神经束通过;位于下方的骨管是耳蜗神经管,有听神经束和前庭下神经束通行。外周听觉信号经耳蜗螺旋神经节、内耳道段听神经传入到脑干耳蜗核,从前庭下神经节和前庭上神经节传入的平衡感觉信号分别经内耳道段前庭下和前庭

上神经进入颅内后汇合,继而上行至中枢^[1]。从橄榄复合体发出的传出神经纤维也分别经听神经管和前庭上神经管进入内耳,再分别分布至耳蜗毛细胞和前庭毛细胞。除此之外,供应内耳的迷路动脉和从内耳回流的迷路静脉也都是经内耳道进出内耳。因此,内耳道是人类内耳与中枢结构相联系的唯一通道。但是,猴子、南美栗鼠、豚鼠、大鼠和小鼠等动物的耳蜗和前庭神经通路却与人类不同,其听神经束和前庭神经束均直接通向颅内及其相对应的中枢核团,并不像人类颞骨那样首先汇集到狭长的内耳道再通向颅内。

3.2 颞骨矢状面切片与横断面切片的异同

传统的颞骨横断面切片由于其切片角度与耳蜗螺旋神经节和前庭神经节中枢端的神经纤维束平行,因而无法获得中枢端神经纤维的横断面切片^[2]。颞骨矢状面切片可以很好满足垂直切断内耳中枢端神经纤维束的观察需求。我们发现颞骨矢状面连续切片不仅可以获得垂直于内耳中枢端神经纤维束的理想观察角度,还可以获得平行于耳蜗蜗轴的中轴切片,从而不仅可以对蜗轴螺旋管内的螺旋神经节细胞和疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维及耳蜗螺旋器上的感觉毛细胞进行病理学评估,而且还可以对前庭上神经元和前庭下神经元以及前庭神经元外周端的神经纤维及前庭各个感觉上皮区的感觉毛细胞进行病理学检查。因此,颞骨矢状面切片的观察角度要比颞骨横断面切片更有利于对内耳神经损害模型做出全方位的神经营养评估。

3.3 对颞骨矢状面切片的定量观察

耳蜗基底膜铺片技术是定位定量研究全耳蜗毛细胞的方法^[4-5,14-15],前庭感觉上皮铺片技术是定位定量研究前庭各个感觉上皮区域毛细胞的方法^[12,16-19],但是全内耳膜迷路铺片技术却无法用来定量评估耳蜗和前庭的神经元病变及其外周端和中枢端的神经纤维病变。本研究未能实现对耳蜗毛细胞的定位定量观察。相信如果将受试动物的一侧颞骨制备成全内耳膜迷路铺片用来定位定量研究内耳感觉毛细胞^[10,16],另一侧颞骨制备成颞骨矢状面切片用来定位定量研究内耳神经系统,将会有助于对整个内耳做出更全面的病理学评估^[2,10,20]。前期实验对出生后2个月的SOD1野生型小鼠颞骨横断面切片中单个疆孔内的螺旋神经节外周端神经纤维的计数结果是 (58.4 ± 4.43) 根^[20],本实验从CBA/CaJ小鼠颞骨矢状面切片中得到的计数结果是 (57.83 ± 9.09) 根,2种切片角度获得的结果无显著差异($P >$

0.05),说明两者均准确可靠。颞骨矢状面切片的观察角度虽然与横断面相差 45° ,但是并不影响对聚集在前庭上神经孔内的前庭上神经元和聚集在耳蜗神经孔底部的前庭下神经元在小视野范围内的神经元密度测量结果。与颞骨横断面切片相比,矢状面切片的独特优势是其垂直于耳蜗和前庭神经元中枢端神经纤维束的观察角度,从而精确评估中枢端神经纤维。

3.4 穿越耳蜗神经孔和前庭上神经孔的各种神经纤维

哺乳类实验动物穿越疆孔内的神经纤维包含I型和II型传入神经纤维以及耳蜗传出神经纤维,其中I型传入神经纤维数量约占每个疆孔内的神经纤维总数的 $6/7$,II型传入神经纤维和耳蜗传出神经约占 $1/7$ ^[11,21]。内耳的传入神经元都是双极神经元,意味着耳蜗管内的螺旋神经节中枢端传入神经束中的I型传入神经纤维和II型传入神经纤维的比例很可能同样是 $>6:1$ 。本实验采用的甲苯胺蓝染色法可以清晰显示细胞轮廓和细胞核及神经髓鞘,有助于辨别是否发生脱髓鞘病变^[22-25]。然而,甲苯胺蓝染色却不能区分两类传入神经纤维,也无法区分传出神经纤维。至于在前庭上神经管和前庭下神经管内两类传入神经纤维和传出神经纤维的分布情况,目前还没有明确答案。我们在下一步的研究中,打算应用抗Tublin抗体和抗Peripherin抗体的双重免疫组织化学染色法来区分两种传入神经纤维及其末梢^[26-27],同时应用抗乙酰胆碱酯酶抗体特异性标记传出神经纤维及其突触^[28],以期明确各种神经纤维分布的生理特征,为相关组织病理学研究提供技术和数据支持。

参考文献:

- [1] Schuknecht H. Pathology of the ear[M]. Cambridge: Harvard University Press, 1974:40-72.
- [2] 丁大连,于进涛,李鹏,等. 实验动物标准颞骨切片规范[J]. 中华耳科学杂志,2015,13(1):1-6.
- [3] Birkner R. The horizontal tomographic section of the temporal bone[J]. Klin Wochenschr, 1948, 26(35-36): 568.
- [4] Ding D, Jiang H, Salvi R. Cochlear spiral ganglion neuron degeneration following cyclodextrin-induced hearing loss[J]. Hear Res, 2021, 400:108125.
- [5] Ding D, Manohar S, Kador P, et al. Multifunctional redox modulator prevents blast-induced loss of cochlear and vestibular hair cells and auditory spiral ganglion neurons[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 15296.

- [6] Ding D, Wang J, Salvi R. Early damage in the chinchilla vestibular sensory epithelium from carboplatin [J]. *Audiol Neurootol*, 1997,2(3):155-167.
- [7] 丁大连,李鹏,亓卫东,等. 耳蜗听神经纤维和耳蜗螺旋神经节的定量观察[A]//内耳组织病理学图谱[M]. 北京:中国出版集团有限公司,世界图书出版公司,2024:173-181.
- [8] Ding D, Jiang H, Manohar S, et al. Spatiotemporal developmental upregulation of prestin correlates with the severity and location of cyclodextrin-induced outer hair cell loss and hearing loss[J]. *Front Cell Dev Biol*,2021,9:643709.
- [9] Lidén G, Engström H, Hall J. Audiological and morphological assessment of effect of noise on cochlea and brain stem in cat[J]. *Acta Otolaryngol*, 1973,75(4):325-328.
- [10] 丁大连,王坚,郑向阳,等. 耳蜗毛细胞和螺旋神经节及其神经纤维的联合定量观察[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,1998,4(4):200-204.
- [11] 丁大连,郑向阳,王坚,等. 灰鼠颞孔内听神经纤维的定量观察[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*,1998,33(1):30-31.
- [12] 丁大连,李鹏,亓卫东,等. 前庭感觉上皮的定量观察技术[A]//内耳组织病理学图谱[M]. 北京:中国出版集团有限公司,世界图书出版公司,2024:67-80.
- [13] Fatterpekar GM, Mukherji SK, Lin Y, et al. Normal canals at the fundus of the internal auditory canal: CT evaluation[J]. *J Comput Assist Tomogr*,1999,23(5):776-780.
- [14] Ding D, McFadden SL, Salvi R. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques [A]//Willott JF. *Handbook of mouse auditory research from behavior to molecular biology* [M]. Boca Raton:CRC Press, 2001:189-204.
- [15] Ylikoski J. Guinea-pig hair cell pathology from ototoxic antibiotics [J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1974,326:5-22.
- [16] 丁大连,李鹏,亓卫东,等. 实验动物前庭感觉毛细胞的定量观察[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2022,28(6):11-18.
- [17] Ye H, Xing Y, Zhang L, et al. Bilirubin-induced neurotoxic and ototoxic effects in rat cochlear and vestibular organotypic cultures [J]. *Neurotoxicology*,2019,71:75-86.
- [18] Desai SS, Ali H, Lysakowski A. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. II. Cristae ampullares [J]. *J Neurophysiol*,2005,93(1):267-280.
- [19] Desai SS, Zeh C, Lysakowski A. Comparative morphology of rodent vestibular periphery. I. Saccular and utricular maculae[J]. *J Neurophysiol*,2005,93(1):251-266.
- [20] 丁大连,蒋海燕,McFadden SL,等. SOD 1 基因缺陷型小鼠耳蜗毛细胞和螺旋神经节及神经纤维的定量观察[J]. *耳鼻喉学报*,1999,13(1):1-3.
- [21] Spoendlin H. Innervation densities of the cochlea[J]. *Acta Otolaryngol*, 1972,73(2):235-248.
- [22] El-Badry MM, Ding D, McFadden SL, et al. Physiological effects of auditory nerve myelinopathy in chinchillas[J]. *Eur J Neurosci*, 2007,25(5):1437-1446.
- [23] Wang J, Ding D, Salvi R. Carboplatin-induced early cochlear lesion in chinchillas[J]. *Hear Res*, 2003,181(1-2):65-72.
- [24] Ylikoski J, House JW. Demyelinating disease as the assumed cause of hearing loss and vertigo. A case report with light- and electron-microscopic findings[J]. *Arch Otorhinolaryngol*,1981,230(2):161-170.
- [25] Xing Y, Samuvel DJ, Stevens SM, et al. Age-related changes of myelin basic protein in mouse and human auditory nerve[J]. *PLoS One*,2012,7(4):e34500.
- [26] 丁大连,李鹏,亓卫东,等. 几种常用于评估内耳病理损害的组织化学染色技术[A]//内耳组织病理学图谱[M]. 北京:中国出版集团有限公司,世界图书出版公司,2024:183-208.
- [27] Gao K, Ding D, Sun H, et al. Kanamycin damages early postnatal, but not adult spiral ganglion neurons [J]. *Neurotox Res*, 2017,32(4):603-613.
- [28] 丁大连,张建辉,杨琨,等. 大鼠耳蜗传出神经系统发育中降钙素基因相关肽和乙酰胆碱酯酶的时空分布[J]. *听力学及言语疾病杂志*,2020,28(6):662-668.

(收稿日期:2024-08-28)

本文引用格式:丁大连,石林,邢雅智,等. 正常小鼠颞骨矢状面切片与内耳神经密度测定技术[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2024,30(6):69-75. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202424331

Cite this article as: DING Dalian, SHI Lin, XING Yazhi, et al. Sagittal sectioning of temporal bones and quantitative measurement of neural densities in the inner ear in normal mice[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2024,30(6):69-75. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202424331