DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201503002

· 论著 ·

耳蜗细胞死亡方式的鉴别

丁大连[1,2,3],李　鹏[2,3],高可雷[1,3],蒋海燕[3],孙　虹[1,3],陈成芳[4],Richard Salvi[1,3]

(1. 中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科,湖南 长沙　410008; 2. 中山大学附属第三医院 耳鼻咽喉头颈外科,广东 广州　510630; 3. Center for Hearing and Deafness, University at Buffalo,USA; 4. 山东省立医院 耳鼻咽喉科,山东 济南　250014)

摘　要:　目的　通过几种不同耳毒性药物离体培养实验和活体动物实验,以观察耳蜗细胞死亡的不同方式。**方法**　应用 Apoptosis-Necrosis Quantification Kit 对正常或耳毒性药物处理过的离体培养耳蜗组织和活体耳蜗组织进行了染色。试剂盒中含有 3 种不同荧光标记的探针,其中绿色荧光标记的 annexin V 可鉴别活细胞内出现的凋亡改变,红色荧光标记的 Ethidium homodimer III 可鉴别活细胞内出现的坏死改变,蓝色荧光标记的 Hoechst 33342 则可鉴别出健康细胞。**结果**　在耳蜗离体培养实验中,细胞凋亡信号和坏死信号几乎同时出现在顺铂或庆大霉素处理的耳蜗外植体;在活体动物实验中,细胞凋亡信号和坏死信号也同时出现在急性卡那霉素损害模型和慢性卡那霉素损害模型。**结论**　在细胞受损后的变性过程中,凋亡因子和坏死因子可同时出现而导致细胞的死亡。细胞凋亡的过程一般比较迅速而常常发生在急性损害阶段,而细胞坏死的过程往往比较缓慢而多见于细胞的慢性损害过程。在细胞死亡的最后阶段,细胞的最终破坏一般取决于哪种死亡方式抢先完成,但无论是哪种死亡方式占据了主导地位,都不能排除另外一种细胞死亡方式对细胞降解过程的协同作用。

关　键　词:耳蜗;细胞凋亡;细胞坏死;细胞死亡;耳毒性药物

中图分类号:R764　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1007－1520(2015)03－0178－06

Identification of cochlear cell death

DING Da-lian, LI Peng, GAO Ke-lei, JIANG Hai-yan, SUN Hong, CHEN Cheng-fang, Richard Salvi

(*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410008, *China*)

Abstract:　Objective　We identified cochlear cells undergoing apoptosis and necrosis in vitro and in vivo after treatment with several ototoxic drugs. Cochlear explants were treated with gentamicin (0.5 mM) for 24 h or cisplatin (50 μM) for 48 h. In adult rats, acute cell death was investigated after co-administration of kanamycin (KM, 800 mg/kg, I.M.) plus ethacrynic acid (EA, 50 mg/kg, I.V.); chronic cell death in adults rats was investigated by treating adult rats for 8 d with daily injection of KM (800 mg/kg, I.M.). **Methods**　Cochlea hair cell death was identified using an Apoptosis-Necrosis Quantification Kit. Apoptotic cells were identified by annexin V conjugated with FITC (green fluorescence) which specifically binds to the phosphatidylserine exposed on the outer membrane leaflet. Necrotic cells were identified by labeling with ethidium homodimer III (EthD-III, red fluorescence), a highly charged nucleic acid probe. Healthy cells were labeled with the membrane-permeant blue fluorescent DNA dye, Hoechst 33342. **Results**　In vitro studies, both apoptotic and necrotic signals were detected in cisplatin treated cochlear cultures and also in gentamicin treated cochlear explants. In vivo studies, apoptotic and necrotic signals were also found in degenerating hair cells in both acute damage model and chronic damage model. **Conclusions**　In the process of cell degeneration, both apoptotic factors and necrotic factors can be activated leading to the cell death. Apoptotic process is relatively fast which often occurs in acute damage. In contrast, necrotic process is relatively slow which usually involves chronic damage. In the final moment of cell death, cell destructions may depend on which death way is preemptive fatal. However, no matter which death way dominates, we cannot rule out the synergistic effects on cell degradation by other death pathway.

作者简介:丁大连,男,博士,教授。
通信作者:丁大连,Email: dding@buffalo.edu

Key words: Cochlea; Apoptosis; Necrosis; Cell death; Ototoxic drugs

细胞的死亡方式主要可以分为两大类,一类是被称之为凋亡(apoptosis)的程序化死亡方式(programmed cell death);另一类是被称之为坏死(necrosis)的非程序化死亡方式(unprogrammed cell death)。近年来由 Biotium 公司推出的新产品 Apoptotic, Necrotic & Healthy Cells Quantification Kit 可以同时鉴定正常细胞和凋亡细胞以及坏死细胞,本实验首次应用该检测方法观察了耳毒性药物引起的耳蜗组织细胞中出现的凋亡信号和坏死信号,发现在耳蜗细胞的病变过程中,实际上两种死亡方式即细胞凋亡和细胞坏死的信号均有不同程度表达,说明细胞在濒临死亡阶段的破坏方式并非简单的单一模式。现报道如下。

1 材料与方法

在 Apoptotic, Necrotic & Healthy Cells Quantification Kit 中含有 3 种不同的荧光染料,它们分别是绿色荧光标记的可特异性显示细胞凋亡引起的外侧暴露磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine)的 Annexin V、红色荧光标记的可特异性显示细胞坏死引起的细胞膜屏障破裂的溴乙非啶同型二聚体 III(Ethidium homodimer III)以及蓝色荧光标记的可显示正常细胞 DNA 的烟酸己可碱 33342 (Hoechst 33342)荧光染料[1]。在细胞内部悄悄发生拆卸的凋亡过程往往首先造成细胞质膜表面小叶上磷脂发生改变,使位于其内部的磷脂酰丝氨酸被翻转到细胞质膜的表面。Annexin V 是一种能与翻转到质膜表面磷脂酰丝氨酸发生特异结合的 35 kD 钙依赖磷脂蛋白(Ca^{2+}-dependent phospholipids protein),因此,绿色荧光标记的 Annexin V 一旦出现在病变细胞,则说明该受损细胞正处于细胞凋亡过程。损害因素造成的细胞坏死往往首先造成细胞质膜及其内膜系统的损害,这种破坏不仅改变了质膜和内膜系统的通透性,而且还会造成细胞质和细胞器的泄漏。Ethidium homodimer III 是一种不能进入正常细胞和凋亡细胞的带有高电荷的核酸探针(highly charged nucleic acid probe),但是 Ethidium homodimer III 却可以进入坏死细胞并将其标记成红色荧光。该试剂盒还包含着可以穿越细胞屏障的蓝色荧光标记 DNA 染料的 Hoechst 33342,因此正常细胞可被该染料标记成蓝色荧光。

由于该试剂盒染色方法只能标记活细胞,因此整个染色标记过程必须在组织固定前完成。将试剂盒提供的 5X Binding buffer 稀释成 1X Binding buffer,然后依次加入 5 μl FITC-Annexin V、5 μl Ethidium homodimer III、5 μl Hoechst 33342,制备成探测液。

在耳蜗器官培养实验中,可将耳蜗组织直接移入探测液在 37℃二氧化碳培养箱内作用 60 min,经 1X Binding buffer 充分漂洗后 再用 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液固定数小时;在活体动物实验中,将麻醉动物的中耳腔打开并在蜗尖和蜗底各钻一小孔,然后将探测液从蜗底小孔灌入并经蜗尖小孔流出,保留耳蜗腔内的染色液作用 60 min,经 1X Binding buffer 充分漂洗后 再用 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液固定耳蜗,最后断头处死动物,取出颞骨浸入固定液继续固定数小时。在解剖显微镜下,常规取出耳蜗基底膜并制备成耳蜗基底膜铺片[2-3]。在共聚焦显微镜下,应用不同的激发光分别探测绿色荧光标记的 Annexin V 信号($\lambda_{abc}/\lambda_{em}$ = 492/514 nm)和红色荧光标记的 Ethidium homodimer III 信号($\lambda_{abc}/\lambda_{em}$ = 528/617 nm)以及蓝色荧光标记的 Hoechst 33342 信号($\lambda_{abc}/\lambda_{em}$ = 350/461 nm)。应用 Confocal LSM Image Examiner 和 Adobe Photoshop 5.5 软件系统对共聚焦图像资料进行不同图像层次和不同荧光信号的采集、合并及处理。

2 离体培养实验模型及其结果

将 9 只出生 3 d 的 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)双侧耳蜗取出,常规制备成耳蜗基底膜培养样品[4-6]。耳蜗基底膜经预培养 24 h 后,1/3 的样品(6 条耳蜗基底膜)用不含耳毒性药物的标准培养液继续培养 24 h 作为正常对照组,另外 1/3 的样品(6 条耳蜗基底膜)用含有 50 μM 顺铂的培养液继续培养 48 h 作为顺铂耳毒性实验组,剩下的 1/3 样品(6 条耳蜗基底膜)用含有 500 μM 庆大霉素的培养液继续培养 24 h 作为庆大霉素耳毒性实验组。在终止实验之前,将耳蜗培养组织移入探测液染色 60 min,再用 1X Binding buffer 充分漂洗后浸入 10% 福尔马林溶液固定 3 h,最后移到载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片。正常对照组的耳蜗 Corti 器细胞大都仅显示蓝色荧光信号,偶见个别细胞中出现红色坏死信号和绿色

凋亡信号(图 1A)。经 50 μM 顺铂处理 48 h 的耳蜗 Corti 器大都出现毛细胞的缺损,在 Corti 器周围的残存支持细胞中可见红色坏死信号和绿色凋亡信号并存(图 1B)。经 500 μM 庆大霉素处理24 h的耳蜗 Corti 器大都处于严重的病理改变状态,在变性的耳蜗毛细胞中同时显示红色的坏死信号和绿色的凋亡信号,内侧螺旋沟支持细胞中也出现红色坏死信号和绿色凋亡信号(图 1C)。

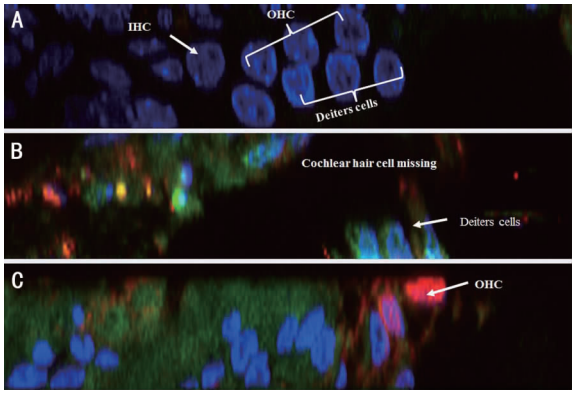

图 1　耳蜗器官培养实验的测试结果　A:正常对照组;B:顺铂耳毒性实验组;C:庆大霉素耳毒性实验组

3　急性耳中毒活体动物实验及其结果

将 4 只成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)按照每公斤体重 50 mg 的剂量静脉注射利尿酸钠,然后按照每公斤体重 800 mg 的剂量立刻肌肉注射卡那霉素。受试动物在联合注射利尿酸钠和卡那霉素后 24 h 施行活体耳蜗灌流探测液并作用 60 min,经耳蜗灌流漂洗后再用 10% 福尔马林溶液灌流固定[7]。另取 2 只同龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠的耳蜗基底膜做正常对照染色。完成组织固定后,在解剖显微镜下分离取出全耳蜗基底膜并制备成耳蜗基底膜铺片,在共聚焦显微镜下观察[8]。正常对照耳蜗 Corti 器细胞显示蓝色荧光信号,偶见个别细胞中出现微弱的绿色凋亡信号或红色坏死信号(图 2A ~ D)。注射利尿酸钠和卡那霉素后 24 h,耳蜗内外毛细胞中出现明显的绿色凋亡信号和红色坏死信号(图 2E ~ G)。将图 2E ~ G 合并后的耳蜗组织病现学图像可见耳蜗内外毛细胞中同时出现红色荧光标记的坏死信号和绿色荧光标记的凋亡信号(黄色箭头标记)。

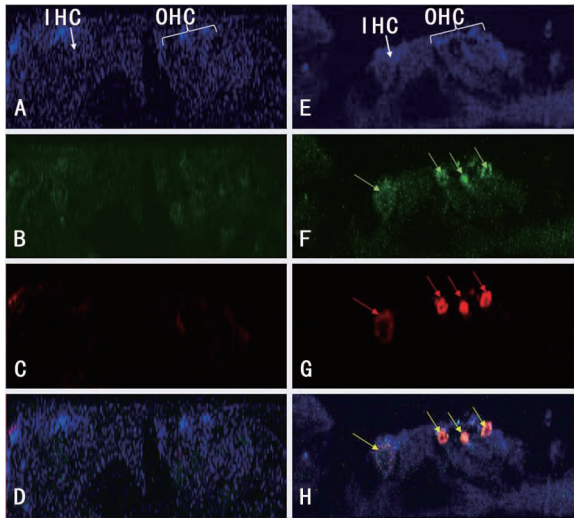

图 2　卡那霉素引起的急性毛细胞损害测试结果　A:单纯探测蓝色荧光信号的正常对照耳蜗切片样品;B:单纯探测绿色荧光凋亡信号的正常对照耳蜗切片样品;C:单纯探测红色荧光坏死信号的正常对照耳蜗切片样品;D:将 A、B 及 C 合并后的正常对照耳蜗切片图像,说明在正常对照耳蜗样品中偶见微弱的红色或绿色荧光信号;E:注射卡那霉素和利尿酸钠后 24 h,单纯探测蓝色荧光信号的耳蜗切片样品;F:注射卡那霉素和利尿酸钠后 24 h,单纯探测绿色荧光标记凋亡信号的耳蜗切片样品(绿色箭头标记);G:注射卡那霉素和利尿酸钠后 24 h,单纯探测红色荧光标记坏死信号的耳蜗切片样品(红色箭头标记);H:将 E、F 及 G 合并后的耳蜗组织病理学图像

4　慢性耳中毒活体动物实验及其结果

按照每公斤体重 800 mg 的剂量对 5 只成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠肌肉注射卡那霉素,每天 1 次,连续用药 8 d。受试动物在连续用药的第 9 天施行活体耳蜗灌流探测液并作用 60 min,经耳蜗灌流漂洗后再用 10% 福尔马林溶液灌流固定。另取 2 只同龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠的耳蜗基底膜做正常对照染色。完成组织固定后,在解剖显微镜下分离取出全耳蜗基底膜并制备成耳蜗基底膜铺片,在共聚焦显微镜下观察。正常对照耳蜗 组织中偶见微弱的红色坏死信号或绿色凋亡信号(图 3A ~ D)。在连续注射卡那霉素 8 d 的耳蜗毛细胞发现明显的绿色凋亡信号和红色坏死信号(图 3E ~ G)。将图 3E ~ F 合并后的耳蜗组织病理学图像可见大部分变性的耳蜗内外毛细胞中由于同时出现的红色荧光标记的坏死信号和绿色荧光标记的凋亡信号,其荧光信号被转变成黄色(黄色圆圈标记),但也有一些外毛细胞仅出现红色荧光标记的坏死信号(红

色箭头标记)或绿色荧光标记(绿色箭头标记),黄色圆圈标记说明坏死与凋亡并存,红者箭头指示细胞死亡以坏死方式为主,绿色箭头指示细胞死亡以凋亡方式为主。

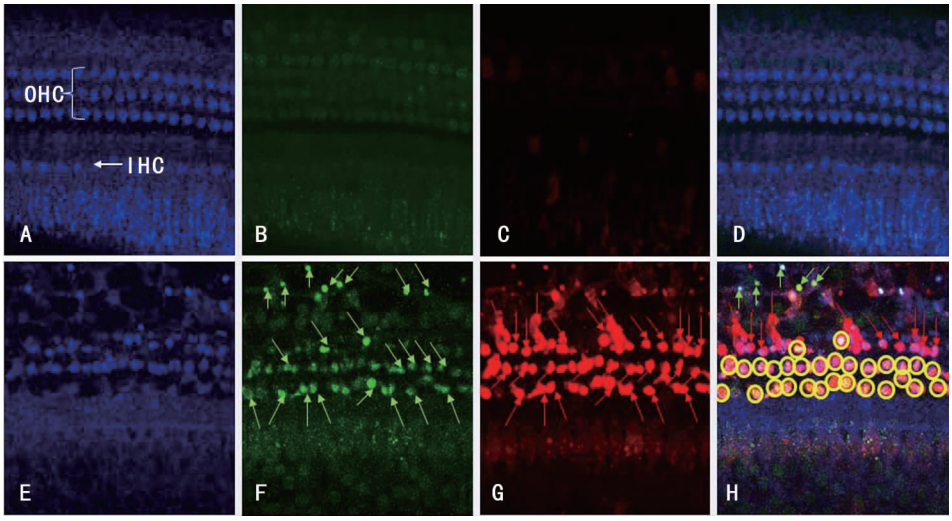

图 3　卡那霉素引起的慢性毛细胞损害测试结果　A:单纯探测蓝色荧光信号的正常对照耳蜗铺片样品;B:单纯单纯探测绿色荧光凋亡信号的正常对照耳蜗铺片样品;C:单纯探测红色荧光坏死信号的正常对照耳蜗样品;D:将 A 和 B 及 C 合并后的正常对照耳蜗铺片图像,可见正常对照耳蜗样品中偶见微弱的红色或绿色荧光信号;E:连续注射卡那霉素 8 d 后,单纯探测蓝色荧光信号的耳蜗铺片样品;F:连续注射卡那霉素 8 d 后,单纯探测绿色荧光标记凋亡信号的耳蜗铺片样品(绿色箭头标记);G:连续注射卡那霉素 8 d 后,单纯探测红色荧光标记坏死信号的耳蜗铺片样品(红色箭头标记);H:将 E、F 及 G 合并后的耳蜗组织病理学图像

5　讨论

细胞凋亡的发生是由于细胞在各种损害刺激条件下主动启动了其预先设置的细胞自毁装置,其主要特征表现为质膜的疱疹样变(blebbing)、细胞收缩(shrinkage)、核破裂(nuclear fragmentation)、染色质凝聚(chromatin condensation)、以及染色体 DNA 破碎(chromosomal DNA fragmentation)等等,但并不造成周围组织的炎性反应。与细胞凋亡过程截然不同的是,细胞坏死则被认为是因病理原因而发生的被动死亡过程,其主要特征表现为细胞膜的通透性增高、细胞肿胀、细胞器变形积水、降解酶释放引起自溶、最终导致细胞膜破裂和细胞内容物流出并引起周围组织的炎性反应等等。为了便于理解和区分上述两种细胞死亡方式,有人用刑警术语将细胞凋亡看作为是细胞的“自杀”行动,而将细胞坏死看作为是“他杀”。查明细胞的死亡方式,对于了解“作案手段”和“作案过程”以及进一步查明“作案动机”并锁定“作案嫌疑犯”都具有重要的作用。但是如果不去了解细胞死亡的过程和方式,这些细胞的死亡将很可能成为“无头悬案”。鉴别细胞的死亡方式,除了根据病理学改变特征之外,还有很多种不同的检查技术,但那些技术大多是一种方法只能探测一种细胞死亡的方式[9-20]。

大量实验证实,无论是在离体培养实验还是在活体动物实验,顺铂对内耳毛细胞和周边神经元的破坏都是通过启动细胞自毁装置来实现细胞的自我毁灭[9,11,15,21-22]。因此,顺铂耳中毒模型总是被看作为一个典型的内耳细胞凋亡模型,却完全没有考虑细胞坏死也许在其中同样起到了一定的协同破坏作用。本实验意外发现,细胞凋亡信号和坏死信号都清清楚楚出现在顺铂引起的病变细胞内,说明虽然顺铂引起的耳蜗细胞死亡可能由于凋亡的快速进程而使细胞凋亡成为其死亡主线,但是细胞坏死因子在变性细胞中“趁火打劫”也必定使细胞病变面临着“雪上加霜”。尽管我们目前对凋亡和坏死在顺铂耳中毒过程中的协同作用还缺乏足够的认识,但是这很可能是一个值得我们进一步研究的课题方向。

在氨基糖苷类抗生素的耳毒性实验研究中,有如下几个方面的结论和观点得到了大多数研究者的赞同。①氨基糖苷类抗生素对内耳毛细胞的主要攻击靶目标是细胞内与细菌蛋白质合成方式完全相同

的线粒体[13,20,23-25]；②某类氨基糖苷类抗生素的耳毒性作用与药物在内耳液中的高浓度积聚和排泄延缓有关[10,13,20,23,26-30]；③细胞凋亡模式在氨基糖苷类抗生素急性损害过程中占据主导地位，其原因是因为线粒体膜的破裂引起细胞色素C的释放，释放到细胞质的细胞色素C与Apaf-1结合后形成的凋亡小体终于激发了Caspase凋亡通路的一系列自我破坏行动[10,13,20,30]；④细胞坏死在氨基糖苷类抗生素慢性损害过程中占据主导地位，其主要原因一方面是由于线粒体受损造成细胞内能量危机而发生细胞内积水，另一方面是因为进入细胞内的氨基糖苷类抗生素和遭到破坏的线粒体被溶酶体吞噬后发生超载破裂，从而引起细胞的自溶性坏死[13,19,24,31]。从上述氨基糖苷类抗生素耳毒性作用的主线不难看出，损害的关键基本上就是围绕着线粒体。一旦线粒体受到攻击，只要线粒体膜未发生破裂，细胞内的需能功能障碍就是造成细胞内积水的唯一原因，而溶酶体对外来毒性分子的异噬作用和对细胞内老废细胞器的自噬作用则是导致溶酶体最终膨胀和破裂的致命性坏死原因。但是如果线粒体膜在未被溶酶体吞噬之前就发生了破裂，被释放到细胞质中的细胞色素C则不可避免地激发细胞凋亡信号而立刻启动细胞的自毁装置。我们过去总是误认为细胞的死亡要么是坏死，要么是凋亡，二者必居其一，但是我们却很少考虑坏死和凋亡信号的同时出现。本实验第一次发现在变性的毛细胞中，坏死信号和凋亡信号并存，说明在细胞死亡之前，实际上正在遭受着坏死和凋亡的双重破坏。由于凋亡进程远比坏死进程发生得迅速，因而在多数情况下，受损细胞可能在来不及实现坏死之前就已经完成了其自我毁灭程序。尽管最终的结局不外乎就是细胞死亡，但是了解坏死与凋亡之间的内在联系，对我们判定细胞损害的复杂机制和针对性采取有效的防护措施，无疑可以增加一些更全面和更有深度的思考。

参考文献：

[1] Ding D, Jiang H, Li P, et al. Richard SalviSalvi R. Apoptotic and necrotic cell death in cochlea treated with kanamycin or kanamycin plus ethacrynic acid[J]. Abstr Assoc Res Otolaryngol, 2015, 38(1): 19-20.

[2] Ding D, McFadden S, Salvi RJ. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques[C]. James F Willott Handbook of Mouse Auditory Research CRS Press Florida, 2001: 189-204.

[3] 丁大连，亓卫东，曲雁，等. 内耳形态学研究方法//丁大连. 内耳科学[M]. 北京：中国科学技术出版社，2010：50-88.

[4] Ding D, He J, Allman BL, et al. Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures[J]. Hearing research, 2011, 282(1-2): 196-203.

[5] Ding D, Jiang H, Fu Y, et al. Ototoxic effects of carboplatin in cochlear organotypic cultures in chinchillas and rats[J]. Journal of otology, 2012, 7(2): 92-101.

[6] 丁大连，亓卫东，曲雁，等. 内耳组织体外培养方法//丁大连. 内耳科学[M]. 北京：中国科学技术出版社，2010：39-49.

[7] 李鹏，丁大连，高可雷，等. 大鼠耳科常规手术径路[J]. 中华耳科学杂志，2015，13(1)：12-17.

[8] 高可雷，李鹏，蒋海燕，等. 大鼠内耳解剖结构及其取材技术[J]. 中华耳科学杂志，2015，13(1)：18-24.

[9] Ding D, Allman BL, Salvi R. Review: ototoxic characteristics of platinum antitumor drugs[J]. Anat Rec (Hoboken), 2012, 295(11): 1851-1867.

[10] Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid[J]. Hearing research, 2010, 259(1-2): 16-23.

[11] Ding D, Jiang H, Wang P, et al. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid[J]. Hearing research, 2007, 226(1-2): 129-139.

[12] Ding D, Qi W, Yu D, et al. Addition of exogenous NAD+ prevents mefloquine-induced neuroaxonal and hair cell degeneration through reduction of caspase-3-mediated apoptosis[J]. In cochlear organoty pic cultures, 2013,8(11):79817.

[13] Ding D, Salvi R. Review of cellular changes in the cochlea due to aminoglycoside antibiotics[J]. The Volta Review, 2005, 105(3): 407-438.

[14] Ding D, Someya S, Jiang H, et al. Detection of apoptosis by RT-PCR array in mefloquine-induced cochlear damage[J]. Journal of otology, 2011, 6(1): 1-9.

[15] Ding D, Wang P, Jiang H, et al. Gene expression in cisplatin ototoxicity and protection with p53 inhibitor[J]. Journal of otology, 2009, 4(2): 15-24.

[16] Fu Y, Ding D, Wei L, et al. Ouabain-induced apoptosis in cochlear hair cells and spiral ganglion neurons in vitro[J]. Bio Med research international, 2013, 2013: 628064.

[17] 丁大连，朱曦，陈海明. 豚鼠卡那霉素耳中毒耳蜗内酸性磷酸酶的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，1986，21(2)：121-123.

[18] 陈海明，丁大连. 酸性磷酸酶在豚鼠耳蜗中的显示[J]. 动物学杂志，1988，23(6)：11.

[19] 罗德峰，丁大连. 豚鼠卡那霉素中毒内耳毛细胞中溶酶体的电镜细胞化学观察[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，1990，25(5)：281-282.

[20] 丁大连，Salvi R. 氨基糖苷类抗生素耳毒性研究[J]. 中华耳科学杂志，2007，5(2)：125-131.

[21] 丁大连，亓卫东，Salvi R. 顺铂及其耳毒性//丁大连. 内耳科学[M]. 北京：中国科学技术出版社，2010：232-250.

[22] Zhang M, Liu W, Ding D, et al. Pifithrin-alpha suppresses p53

and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis[J]. Neuroscience, 2003, 120(1): 191-205.
[23] 丁大连, 亓卫东, 曲雁,等. 氨基糖苷类抗生素及其耳毒性//丁大连. 内耳科学[M]. 北京:中国科学技术出版社, 2010: 204-231.
[24] 丁大连, 金晓杰. 卡那霉素与硫酸链霉素在耳蜗毛细胞中的结合部位探讨[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1995, 9(6): 346-347.
[25] 丁大连, 金晓杰, 赵纪余. 卡那霉素在耳蜗毛细胞中的积聚部位[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1997, 32(6): 348-349.
[26] Ding D, Jiang H, McFadden S, et al. Ethacrynic acid is the key for opening of the blood-labyrinth barrier[J]. Chinese Journal of Otology, 2004, 2(1): 42-47.
[27] Ding D, McFadden SL, Browne RW, et al. Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells[J]. Hearing research, 2003, 185(1-2): 90-96.
[28] Ding D, McFadden SL, Woo JM, et al. Ethacrynic acid rapidly and selectively abolishes blood flow in vessels supplying the lateral wall of the cochlea[J]. Hearing research, 2002, 173(1-2): 1-9.
[29] 丁大连, 张志坚. 利尿酸与庆大霉素耳毒作用协同影响的实验研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 1995, 3(2): 76-79.
[30] 丁大连, 蒋海燕. 利尿酸是打开血-迷路屏障的钥匙[J]. 中华耳科学杂志, 2004, 2(1): 42-47.
[31] 丁大连,朱曦,陈海明,等. 豚鼠卡那霉素耳中毒耳蜗内酸性磷酸酶的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,1986,21(2):121-123.

(修回日期:2015-04-01)

·消息·

沉痛悼念陶正德教授

中国著名耳鼻咽喉-头颈外科专家、教授、博士生导师、《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》创始人之一、中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科教授陶正德因病医治无效,于2015年5月12日凌晨,在美国加州奥克兰市逝世,享年84岁。

陶正德,男,1931年生,湖南省保靖县人,1954年毕业于湖南医学院(现中南大学湘雅医学院)临床医学专业,留校后一直在湖南医学院附属湘雅医院耳鼻咽喉科工作,1958~1983年任耳鼻咽喉科副教授、副主任,1983年起担任耳鼻咽喉科教授、主任,1988年起任博士生导师,1994年移居美国。陶正德教授曾担任中华医学会耳鼻咽喉科专业委员会委员、鼻咽癌学组副组长,湖南省医学会耳鼻咽喉专业委员会主任委员,《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》名誉主编,并享受中华人民共和国国务院政府特殊津贴。陶正德教授长期从事以鼻咽癌为主的头颈肿瘤基础和临床研究,在耳鼻咽喉科基础和临床研究中具有很深的造诣,主译俄文版教材《耳鼻咽喉科学》,主编《耳鼻咽喉科理论与实践》大型专著,主持国家和美国中华医学基金会等多个国际、国内科研项目,获国家级和省部级多项科研成果奖。陶正德教授为耳鼻咽喉科领域培养了大批杰出医学人才,他们遍布海内外,有的在美国担任教授、临床医师,有的成为国内著名大学和医院的主要领导人和著名专家学者。陶正德教授的一生是为中国医学事业奋斗不息的一生,他深得广大医务工作者和患者的爱戴,他的逝世,是我国医学界的巨大损失。

陶正德教授永远活在我们心中!

中国耳鼻咽喉颅底外科杂志编辑部

2015年5月