

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201603001

· 专家论坛 ·

## 内耳病理学研究技术的进展

丁大连<sup>1,2,3</sup>, 亓卫东<sup>4</sup>, 杨琨<sup>1,5</sup>, 李鹏<sup>1,3</sup>, 孙虹<sup>1,2</sup>, Richard Salvi<sup>1,2</sup>

(1. Center for Hearing & Deafness, University at Buffalo, NY 14214, USA; 2. 中南大学附属湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410008; 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. 复旦大学附属华山医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200040; 5. 武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖北武汉 430060)



**专家简介** 丁大连, 生命科学博士, 现任美国纽约州立大学布法罗大学听力耳聋研究中心教授, 兼任中南大学附属湘雅医院耳鼻咽喉科客座教授和博士生导师、上海交通大学耳鼻咽喉科研究所副所长、中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科客座教授、广西中医药大学客座教授, 中华耳科学杂志编委、中国耳鼻咽喉颅底外科杂志副主编。主要致力于内耳形态学、内耳生理学、内耳感觉器官及神经元离体培养、内耳基因转染和干细胞植入、内耳药物性损害的机理及防治、内耳微循环障碍、内耳缺氧、内耳重金属损害、老年性耳聋以及特殊基因缺陷性耳聋等方面的研究。作为课题负责人或主要成员完成多项中国国家自然科学基金课题、美国全国卫生研究所(National Institutes of Health, NIH)研究课题、中国卫生部和上海高教局以及美国其他经费来源资助的多项研究项目。迄今为止在国内外杂志共发表339篇论文和200余篇国际会议摘要。出版3本有关内耳研究科学的专著, 并为国内外耳科基础科学研究教科书编写过20余篇章节。于2004年获得1项有关Minocycline内耳保护的美国科学专利。多次在美国和欧洲以及中国举行的国际听力学研讨会作为演讲人发言。在国内外举办过20多次全国内耳实验技术学习班, 在美国作为导师接受并培训了50余名中国博士后访问学者, 并在国内发动和参与主办了5次国际听力学研讨会, 为中国听力学研究领域培养出大批专业人才, 为在内耳研究领域架设中美两国之间的国际合作桥梁做出一定贡献。

**摘要:**内耳病理学是一门从组织形态学角度研究内耳疾病的发生原因和发展过程及其损害机制的边缘医学基础学科。内耳病理学的样品制备观察技术包括颞骨切片技术、膜迷路切片技术、耳蜗和前庭膜迷路取材铺片技术、内耳组织学和组织化学技术、内耳扫描电镜和透射电镜样品制备技术、以及电镜下的超微细胞化学技术等。通过分析各项内耳病理研究技术的发生、发展和现状, 并结合实践经验和技术革新经验, 深入讨论上述各项技术的优缺点和技术细节。

**关键词:**内耳; 病理学; 组织形态学; 研究进展

中图分类号: R764.3 文献标识码: C 文章编号: 1007-1520(2016)03-0169-10

## Technical evolution of pathology in the inner ear

DING Da-lian, QI Wei-dong, YANG Kun, LI Peng, SUN Hong, Richard Salvi  
(Center for Hearing & Deafness, University at Buffalo, NY 14214, USA)

**Abstract:** Pathology of the inner ear is a research branch of otology using morphological experimental techniques to study the causes, the development process and damage mechanisms of the inner ear diseases. The general field of pathology of the inner ear includes sectioning of the temporal bone or membranous labyrinth, cochlear and vestibular micro-dissections and surface preparations, histology and histochemistry, preparations of membranous labyrinth for observation under

基金项目: 上海市科学技术委员会资助(15140900900)。

作者简介: 丁大连, 男, 教授。

通信作者: 丁大连, Email: dding@buffalo.edu

scanning and transmission electron microscope, and electron microscopic cytochemistry, etc. This article has described in detail the occurrence, development and current status of above-mentioned techniques for pathological studies in the inner ear. Based on our own experiences and many years of innovative practices, the advantages and disadvantages of each technology and their technical details were also discussed.

**Key words:** Inner ear; Pathology; Morphological experimental technique; Study

## 1 病理学与内耳病理学

病理学是一门从组织形态学角度研究疾病或病变的发生原因和发展过程及其损害机制的医学基础学科。由于组织细胞病理学是在显微镜下对组织细胞内发生的病变做出精准的判断,因此病理学在临床上又被认为是具有宣判性质的权威诊断方法。病理学研究的开展最早可以追溯到十八世纪中叶,其代表是 Morgagni 用尸检材料创立的器官病理学<sup>[1]</sup>。大约 100 年后, Virchow<sup>[2]</sup>将最初的普通光学显微镜应用于组织病理学检查并首创了细胞病理学。随后,电镜技术的问世和分子生物学技术的发展以及大量化学染色标记方法的开发,病理学的研究逐渐从细胞水平到亚细胞水平并进一步达到了分子水平。由此可见,现代病理学研究技术的突飞猛进显然与其他基础自然科学飞速发展有着非常密切的关系。随着病理学的发展,内耳病理学也在耳科疾病研究领域应运而生。内耳又被称为迷路,是一个像迷宫一样复杂的立体腔隙结构存在于颞骨中,包括骨迷路和膜迷路。膜迷路深埋于充满液体的骨迷路腔内。由于内耳结构复杂,其样品制备技术较机体其他器官的样品制备特殊,且对于特定检测指标的定位及定量评判需要更加专业的知识。因此,内耳病理学在临床病理学发展的基础上自成流派,并逐渐发展成耳科学的一门边缘独立分支<sup>[3-8]</sup>。

## 2 内耳切片技术的发展

组织切片技术主要包括徒手切片法、石蜡包埋切片法、碳蜡包埋切片法、火棉胶包埋切片法、环氧树脂包埋切片法、以及冰冻切片法等。在上述诸多切片法中,徒手切片属于手技操作,因难以确保切片的厚度和质量而很少被采用;石蜡切片和碳蜡切片由于容易造成组织细胞收缩变形而且仅适合切取小块组织,同时又因为其损害组织内酶活性及抗原活性等多种原因,在内耳病理学研究中较少被采用;火棉胶适用于大块组织切片,可以保持组织细胞原有结构并避免因组织收缩而引起的组织细胞结构失真

变形,但主要缺点是耗时较长;环氧树脂包埋切片是一种可以保持组织细胞良好结构的制备透射电镜样品超薄切片的方法,不仅可以切取片厚在 0.5 ~ 2  $\mu\text{m}$  的半薄切片用于光镜观察,还可获取厚度在几十纳米的超薄切片用于透射电镜观察,其主要缺点是仅限于切取小块组织因而不能制备整个颞骨切片,同时在环氧树脂聚合过程也会造成抗原结构的破坏;冰冻切片是一种使组织快速冷却的低温切片方法,具有快速、适用于较大块组织切片且保持组织细胞中脂肪、类脂、酶类活性及抗原活性等优点,其主要缺点是切片较厚而且容易产生冰结晶。通过对上述几种常用组织切片的优缺点比较,不难看出,火棉胶包埋切片和环氧树脂包埋切片以及冰冻切片更适合于内耳病理学研究<sup>[6-7, 9-25]</sup>。作为源远流长的颞骨病理研究的火棉胶包埋切片技术,其起源已被漫长的历史长河所淹没,也许这项技术的开发是在上世纪 30 年代或更早,但更为详细的颞骨火棉胶切片技术报道被认为是在 Schuknecht 的著作“Pathology of the ear”<sup>[3]</sup>。为了克服制备颞骨火棉胶切片耗时的缺点,我们对颞骨火棉胶切片技术进行了两项重大改良,我们首先将火棉胶切片的逐片染色法更改为整体颞骨染色法,将颞骨脱钙后直接浸入 Ehrlich 氏稀释苏木素染液在 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中浸染 3 d 施行整体颞骨染色,这样在获取切片时就可直接封片用于显微镜观察<sup>[6-7, 12, 14, 19]</sup>;另一项改良措施是采用火棉胶溶解与渗透同时进行的方法替代了传统的梯度火棉胶渗透法,将原先至少需时 2 个月的豚鼠颞骨梯度火棉胶渗透时间缩短为约 10 d<sup>[6-7, 14, 26-27]</sup>。在诸多切片方法中,唯有火棉胶颞骨包埋切片技术可以获取整个颞骨的连续切片并且保持内耳原有膜性结构不变,因此火棉胶颞骨切片方法至今仍然被认为是人类颞骨切片和膜迷路积水实验动物模型颞骨切片的最可靠制片技术。环氧树脂包埋切片技术可同时获得高质量的小块组织半薄切片和超薄切片,因此,适用于将内耳局部组织细胞的光镜观察结果与透射电镜观察结果进行对比,并从显微结构水平和亚显微结构水平进行分析<sup>[7, 14, 18, 28-34]</sup>。冰冻切片技术虽然有利于保持组织细胞的各种反应性,但对内耳组织而言,在经过化学固定和脱钙处理的颞骨

组织细胞中必定会发生许多酶的活性丧失和抗原抗体反应能力的丧失。为了避免化学固定和脱钙处理对内耳冰冻切片组织中酶活性和抗原抗体反应性的影响,我们在解剖显微镜下取出耳蜗螺旋韧带并立刻将螺旋韧带夹持在两片肝脏组织厚片中施行冷冻替代,此举不仅使组织细胞快速通过 $0^{\circ}\text{C}$ 到 $-40^{\circ}\text{C}$ 的组织冰结晶阶段使组织结构保持良好的生前状态,而且避免了醛类固定剂和脱钙对细胞内酶活性和抗原抗体反应性的影响,将菲薄的内耳膜性组织用肝脏组织包埋,有利于组织冷冻替代并避免了各种其他化学包埋剂对组织细胞反应性的不良影响。当把肝脏包埋的螺旋韧带冰冻切片浸入到酶组织化学孵育液或一抗反应溶液时,酶蛋白或其他蛋白质即可从低温干燥的“冬眠”状态“苏醒”过来,从而在靶蛋白部位如实表达出酶的活性或各种抗原抗体的免疫反应性。另外,如果在同一块肝脏组织中同时包埋正常血管纹和其他条件处理后的病变血管纹,可以确保不同处理条件的组织切片具备相同的切片厚度并在相同的反应液中作用相同的时间,因而有利于对酶活性或组织化学反应产物显色程度的半定量比较<sup>[6-7, 14, 16, 34-36]</sup>。该样品制备方法同样可以适用于球囊斑和椭圆囊斑及壶腹嵴的酶组织化学研究和免疫组织化学研究,但由于耳蜗 Corti 器呈“空心”结构,若将耳蜗基底膜取出后移放到肝脏厚片中进行包埋将很难保持 Corti 器的形态结构。因此,肝脏包埋内耳膜迷路冷冻替代的方法并不适用于对耳蜗 Corti 器的观察。

### 3 内耳膜迷路取材铺片技术的发展

耳蜗铺片技术的出现可以追溯到 1882 年, Retzius 被认为是最早开发出耳蜗基底膜铺片的组织学家。后来, Kolmer 于 1927 年应用镀银法也制备了耳蜗铺片,这项技术在当时未能引起人们的重视。直到 1962 年, Engstrom<sup>[5]</sup>重新倡用耳蜗基底膜硬铺片术以来,这一技术才逐渐得到广泛应用和持续发展<sup>[37-40]</sup>。Bohne 和 Spoenclin 先后报道了用合成树脂包埋耳蜗沿耳蜗旋转平面切片后再将磨片抛光的样品制备方法<sup>[41-42]</sup>。Axelsson 于 1974 年推出的脱钙后铺片的“软铺片法”对传统的不经脱钙的“硬铺片法”进行了改良<sup>[43]</sup>。戴树宏<sup>[44]</sup>是将该“软铺片法”引入中国的第一位中国学者。我们在学习前人经验的基础上,摸索出一套沿着耳蜗膜迷路和骨迷路组织间隙分离解剖豚鼠耳蜗基底膜的改良方

法<sup>[6, 45]</sup>,随后又摸索出南美栗鼠、豚鼠、大鼠、小鼠、沙土鼠、兔、猴等多种实验动物的耳蜗基底膜“软铺片法”和“硬铺片法”<sup>[7, 14]</sup>。在熟练掌握各种实验动物耳蜗取材和铺片技术的基础上,我们又进一步开发出全耳蜗螺旋韧带的取材铺片技术<sup>[6-7, 14, 46-48]</sup>和前庭各个终器的取材铺片方法及毛细胞定量观察技术<sup>[6-7, 14, 49]</sup>。将上述全内耳膜迷路取材方法与铺片技术和切片技术相结合,使我们有可能对整个内耳膜迷路各个感觉终器和耳蜗前庭神经纤维及其周边神经元的各种病理学改变进行精确定位和定量评估<sup>[6-7, 14, 17, 28, 33, 47, 49-66]</sup>。制备耳蜗图是对全耳蜗铺片的毛细胞定量评估最有效方法,不少应用耳蜗基底膜铺片观察耳蜗毛细胞损害的发表文章往往采用显微镜下拍摄的局部照片来反映全耳蜗观察结果,须知药物引起的耳蜗毛细胞损害常常是从耳蜗底回开始逐渐向顶回扩展,窄带噪声引起的耳蜗毛细胞损害也往往首先出现在耳蜗基底膜对应于特殊频率噪声能量集中的部位及其 1.5 到 2 个倍频程的部位,可见耳蜗毛细胞的损害在不同的实验模型并不均匀,因此那种以点带面仅用局部照片来说明耳蜗毛细胞损害程度的办法并不能如实反映全耳蜗基底膜对应于不同频率各个部位的毛细胞损害情况。耳蜗图的制备是对全耳蜗毛细胞进行计数,在放大 400 倍的光学显微镜下,以目镜中实际长度为 0.24 mm 的显微测微尺做为定量观察毛细胞在基底膜上每一个位点的缺损情况,在获取耳蜗基底膜各个部位毛细胞计数结果的同时也完成了对基底膜长度的测量并使每一个位点对应于不同的声音响应对应频率。耳蜗图的下缘横坐标表示基底膜全长,上缘横坐标指示不同种属实验动物耳蜗基底膜对应于不同频率声音刺激的相应位置,纵坐标则表示毛细胞在基底膜各个不同位点的缺损百分比<sup>[7, 14, 17, 54, 56, 67-68]</sup>。前庭终器的毛细胞定量观察比较简单,只要在小视野范围对前庭毛细胞进行计数从而获取毛细胞的密度即可,需要注意的是,毛细胞的密度在球囊斑和椭圆囊斑的微纹区和周边区并不相同,因此需要对微纹区和周边区分别进行毛细胞密度的测定<sup>[14, 28, 33, 49, 69-70]</sup>。早年那个应用戊二醛四氧化钨双重固定和 EDTA 脱钙及相差显微镜观察的经典“软铺片法”和合成树脂包埋磨片法因其各自应用的局限性而被我们摸索出的这些新方法所替代,我们建立的内耳各个终器铺片的系列研究方法通过学习班的传授和国际会议的交流以及国际国内合作研究项目的实施,目前已得到中国和美国广大耳科

研究机构的认可,并在内耳实验研究领域得到推广和应用<sup>[6-7, 14-18, 21-23, 28-31, 35, 45-57, 59-61, 63, 65-68, 70-140]</sup>。

#### 4 内耳组织化学技术的发展

最初的颞骨火棉胶切片技术采用的只是常规苏木素/依红染色法,随着组织学和染料学及组织化学技术的发展,内耳病理学观察样品的染色方法也从最初的仅显示胞核胞浆结构的苏木素依红染色逐渐发展到应用特殊染料来显示核糖体、内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体、脂肪、髓鞘及膜表面结构等的特殊染色方法(特染技术)<sup>[6-7]</sup>,这种特染技术可以被理解为是组织化学早期发展阶段名称,随后各种组织化学新方法的开发使内耳病理学研究进入到一个新的阶段,这些组织化学方法包括显示核酸的组织化学、显示糖类的组织化学、显示各种酶类的组织化学以及显示各种蛋白质的免疫组织化学<sup>[6-7, 10, 14-16, 36, 100, 107-108, 111, 130, 135]</sup>。近年来发展的各种生物探针技术,使人们在组织细胞发生明显病理形态学改变之前就可以应用各种生物探针检测到受损细胞内早期出现的各种异常的代谢障碍,并可区分细胞的各种死亡径路及其每一步退行性改变的步骤<sup>[7, 14, 105]</sup>。例如应用特殊的生物探针技术可以显示早期病变细胞内出现的各种氧自由基活动状态<sup>[61, 83-84, 89, 141-142]</sup>、探测凋亡链反应中各个凋亡酶的启动顺序并发现出现在细胞病理学改变之前的凋亡信号“启动子”<sup>[14, 62-63, 72-74, 76]</sup>、证明噪音引起的突触前膜和突触后膜病变等<sup>[143]</sup>,甚至可以直接从陈旧的火棉胶颞骨切片上实现DNA提取、PCR扩增、原位杂交、原位PCR和免疫蛋白染色以探测某些陈旧的组分和结构<sup>[25]</sup>。目前已经建立的各种化学标记技术可以显示绝大多数细胞内或细胞膜表面的靶目标。因此,正是由于病理学和化学染色标记技术及分子生物学检测技术的飞速发展,才使内耳病理学的研究进展发生着日新月异的变化。每出现一个新的组织化学或分子生物学探测技术,在内耳病理学领域就必定会紧跟着出现一个新的重大发现和对内耳细胞病理学改变认识上的显著提高。

#### 5 内耳样品电镜技术的发展

分辨率是指分辨两个质点中间距离的能力。人类肉眼的分辨率一般可分辨直径约0.1 mm的物体。光在波长大于物体两倍的情况下发生衍射,即

光波偏离直线传播绕过物体使物体无法被“看见”的现象。由于可见光的最短波长是4 000 Å,虽然光学显微镜分辨率的极限能达到1 600 Å,但实际上光学显微镜不可能分辨直径小于2 000 Å的物体。因此,提高分辨率的唯一办法是使用短波长光源。上世纪二十年代发现了电子射线的波动性和短波长特点并在上世纪三十年代末生产出第一台电子显微镜,由于电子射线波长比可见光的波长小十万倍,而电镜的最大放大率又比光镜最大放大率高出至少1 500倍,因此最先进的电子显微镜可分辨直径小于2 Å的物体,从而使人们可以观察到细胞的微观世界。最早将电镜技术成功应用于内耳研究的报道大约可追溯到1958年<sup>[144]</sup>,随后电镜技术被广泛应用于内耳亚显微结构病变的研究,使耳科研究工作者对内耳细胞的微细病理学改变有了更新的认识和更深刻的理解<sup>[6-7, 9, 14, 18, 29, 32, 34, 40, 76, 98, 111, 113, 145-166]</sup>。扫描电子显微镜的工作原理是将高能入射电子束轰击样品表面使之激发二次电子、背反射电子、吸收电子、X射线、俄歇电子、阴极电子和透射电子等,这些信号被相应的接收器接收后经放大逐点成像,因此扫描电镜在内耳研究的应用主要适用于观察细胞表面的亚显微结构,但不能观察发生在细胞内的病变。内耳样品扫描电镜样品的常规制备步骤与其他组织的样品制备方法基本相同,包括固定、取材、暴露、脱水、零界点干燥和镀碳镀金等步骤。内耳扫描电镜样品制备除了取材需要有专业的内耳膜迷路解剖技术之外,还要特别注意对膜迷路样品的两次暴露,其中第一次暴露是在取材时打开迷路腔暴露内耳各个终器,第二次暴露则是在临界点干燥之后打开各个囊泡清除内耳各终器表面的覆盖物,如清除覆盖在耳蜗基底膜表面的盖膜和覆盖在球囊斑和椭圆囊斑表面的耳石膜以及覆盖在壶腹嵴表面的终帽。如果在第一次暴露时就把所有覆盖在内耳各终器表面的物质清除干净,则难免造成内耳膜性组织在脱水和临界点干燥时发生卷曲,因此制备内耳膜迷路扫描电镜样品的表面暴露应该是有两次暴露,而且两次暴露必须安排在样品制备的两个不同阶段。透射电子显微镜的工作原理是将经加速和聚集的电子束投射到超薄切片,电子与样品中原子碰撞后产生立体角散射从而显示细胞内亚显微结构的微区显微电子图像,因此透射电镜在内耳研究的应用主要适用于观察细胞内的超微病理改变。内耳样品透射电镜样品的常规制备步骤与其他组织的样品制备方法基本相同,包括固定、取材、脱水、包埋、超薄切片和重金

属电子染色等步骤。内耳透射电镜样品制备除了取材需要有专业的内耳膜迷路解剖技术之外,除非对观察角度有其他特殊要求,还要注意耳蜗和前庭包埋组织的定位,使之在随后施行的超薄切片可以确保切片角度与毛细胞的长轴垂直,例如:切取 Corti 器毛细胞超薄切片时应该使切片角度垂直于基底膜的平面;切取囊斑毛细胞超薄切片时应该垂直于囊斑的平面;切取壶腹嵴毛细胞切片时则应该使切片刀平行于半规管从而确保切片角度垂直于壶腹嵴。此外,对硝酸银浸润的基底膜铺片样品在光镜下观察之后,再经镀金移放到扫描电镜下观察,可以将光学显微镜下观察到的耳蜗毛细胞表面病变与扫描电镜下毛细胞表面的亚显微结构改变相互对应<sup>[122, 167]</sup>。同样,在扫描电镜下观察了耳蜗毛细胞的表面病变之后,可再将样品直接浸入丙酮然后经包埋制作成超薄切片用于透射电镜观察,这种先后观察毛细胞表面和毛细胞内部亚显微结构病变的方法有助于评估病变是始发于同一毛细胞的细胞内还是始发于毛细胞的表面<sup>[9]</sup>。透射电镜与冰冻蚀刻样品制备技术相结合,可以从双层细胞膜之间断裂面的 P 面山嵴状条纹和 E 面的沟状条纹观察毛细胞膜与支持细胞膜之间连接装置的亚显微结构变化<sup>[7, 14, 153, 168]</sup>。透射电镜与放射性同位素标记相结合的放射自显影技术则可证实耳毒性药物在毛细胞细胞器内的确切积聚部位,此举有助于发现耳毒性药物的主要攻击靶细胞器并探讨其特异性损害机制<sup>[7, 14, 58, 109, 152]</sup>。

## 6 内耳电镜细胞化学技术的发展

随着组织化学和电镜技术的发展,内耳电镜细胞化学技术也步入内耳病理学研究领域。从字面上理解,组织化学(histochemistry)和细胞化学(cytochemistry)应该是两个不同的概念,前者应该是指在组织结构水平的化学染色方法,后者则应该是指在细胞结构水平的化学染色方法,显然两者之间的不同并不取决于染色标记方法而应该是关系到显微镜的分辨率和放大率。我们认为,在光学显微镜下观察组织化学染色结果仅仅属于组织化学,而在透射电镜下观察组织化学反应产物在细胞亚显微结构上的精确定位及其变化才堪称细胞化学。光学显微镜由于其分辨率的限制,只可能看到显色产物在不同组织和细胞的大致定位,但却无法看清显色产物的精确定位。与光镜相比,透射显微镜可显示呈现高

电子密度的组织化学反应产物在细胞亚显微结构上的精确定位及其变化,使人们有可能在超微结构水平认识和理解各种病变的实际表现和意义。为了使组织化学反应产物能够在电子显微镜下得到清晰显示,必须在组织化学产物上连接重金属使投射电子束发生立体角散射而成像。一般来说,所有用铅法或钙钴法显示的酶蛋白组织化学反应产物,如硫化铅沉淀或硫化钴沉淀都已经在组化反应产物部位形成了重金属沉淀,因此只要继续按照透射电镜样品制备方法常规进行脱水、渗透、包埋和超薄切片而无需另外的醋酸铅或醋酸铀电子染色,就可以在透射电镜下看到呈高电子密度的存在于细胞器内或特殊亚显微结构中的特异性酶组织化学重金属反应产物。我们曾经应用这种技术在透射电镜下成功观察了一系列耳蜗毛细胞内的酶细胞化学反应产物及其变化,例如特异性显示定位于毛细胞质膜和内膜系统的碱性磷酸酶、钙离子、镁离子及钠钾离子激活的 ATP 酶,显示定位于溶酶体内的酸性磷酸酶,显示定位于内质网的葡萄糖-6-磷酸酶和腺苷二磷酸酶,显示定位于高尔基体的硫胺素焦磷酸酶,显示定位于细胞浆膜的腺苷酸环化酶,显示定位于传出神经末梢的乙酰胆碱酯酶,以及显示定位在线粒体的琥珀酸脱氢酶和细胞色素氧化酶,等等<sup>[7, 14, 58, 76, 111, 150, 157]</sup>。用生物素标记的免疫组织化学反应产物经四氧化锇作用后则可在二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)标记的组化反应产物部位形成重金属锇的高电子密度,因此只要将完成生物素标记免疫组织化学反应的样品漂洗后再用 1% 四氧化锇作用 2 h,即可在透射电镜下看到免疫组织化学反应产物在细胞亚显微结构中的精确定位及其变化<sup>[14, 58, 76, 145, 109]</sup>。此外,免疫电镜(immunoelectron microscopy)技术以免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术或免疫胶体金技术使抗原抗体反应产物直接在透射电镜下形成高电子密度<sup>[169]</sup>,这种高电子密度标记的抗体显然有助于在亚显微结构水平定位细胞内的抗原抗体反应的精确部位。因此,电镜细胞化学技术在内耳病理学研究中要比单纯观察亚显微结构和单纯观察组织化学具有更高的应用价值和更好的发展前景。

### 参考文献:

- [1] Morgagni GB. Founders of Modern Medicine: Giovanni Battista Morgagni. (1682 - 1771) [J]. Med Library Hist J, 1903, 1(4):

- 270 - 277.
- [2] Virchow R. An Address on the Value of Pathological Experiments [J]. *Br Med J*, 1881, 1075(2): 198 - 203.
- [3] Schucnect HF. Pathology of the ear [M]. Massachussts Cambridge: Harvard University Press, 1974.
- [4] Engstrom H. Microscopic anatomy of the inner ear [J]. *ActaOtolaryngol*, 1951, 40(1 - 2): 5 - 22.
- [5] Engstrom H. Structural pattern of the organ of Corti [M]. Uppsala; Almqvist & WiksellsBoktryckeri AB, 1966.
- [6] 丁大连. 豚鼠内耳解剖检验技术手册 [M]. 上海: 学林出版社, 1989.
- [7] 丁大连. 内耳形态学 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001.
- [8] 丁大连. 内耳科学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010.
- [9] 姜泗长. 耳解剖学与颞骨组织病理学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1999.
- [10] Ding D, McFadden SL, Wang J, et al. Age-and strain-related differences in dehydrogenase activity and glycogen level in CBA and C57 mouse cochleas [J]. *Audiology and Neuro-Otology*, 1999, 4(1): 55 - 63.
- [11] McFadden SL, Ding D, Jiang H, et al. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla [J]. *Brain Res*, 2004, 997(1): 40 - 51.
- [12] 丁大连. 内耳膜迷路积水动物模型//丁大连. 内耳科学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 183 - 188.
- [13] 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.
- [14] 亓卫东, 曲雁, Richard J. Salvi. 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.
- [15] 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]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 1986, 21(2): 121 - 123.
- [16] 丁大连, 李浩民, 赵纪余, 等. 豚鼠内耳血管纹的酶组织化学切片技术 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1987, 1(3): 173 - 174.
- [17] 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.
- [18] 丁大连, 王坚, 郑向阳, 等. 卡铂对灰鼠螺旋神经节的早期损害 [J]. *听力学与言语疾病杂志*, 1998, 6(2): 65 - 67.
- [19] 丁大连, 皇甫慕三, 金西铭, 等. 豚鼠内耳冰冻切片技术 [J]. *蚌埠医学院学报*, 1987, 12(3): 222.
- [20] 丁大连, 罗德峰, 皇甫慕三. 豚鼠内耳胚胎发育 [J]. *上海实验动物科学*, 1991, 11(1): 45 - 46.
- [21] 丁大连, 郑向阳, 王坚, 等. 灰鼠疆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.
- [22] 付勇, 丁大连, Richard Salvi. 大鼠耳蜗疆孔内听神经纤维的定量观察 [J]. *听力学与言语疾病杂志*, 2010, 18(5): 470 - 473.
- [23] 付勇, 丁大连, Richard Salvi. 大鼠耳蜗螺旋神经节细胞的定量观察 [J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2011, 19(1): 1 - 5.
- [24] 夏国庆, 丁大连. 豚鼠化脓性迷路炎的病理改变 [J]. *耳鼻喉科学报*, 1992, 6(2): 84 - 86.
- [25] 戴朴, 邹艺辉, 姜泗长, 等. 颞骨病理学研究的新技术应用 [J]. *中华耳科学杂志*, 2004, 3(3): 224 - 226.
- [26] 吴大正, 曾兆麟, 丁大连. 实验性膜迷路积水早期耳蜗电活动的变化 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1993, 28(1): 8 - 10.
- [27] 耿惠, 丁大连. 豚鼠颞骨火棉胶制片技术 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1996, 31(5): 262.
- [28] Ding D, Wang J, Salvi R. Early damage in the chinchilla vestibular sensory epithelium from carboplatin [J]. *AudiolNeurotol*, 1997, 2(3): 155 - 167.
- [29] Ding D, Wang J, Salvi R, et al. Selective loss of inner hair cells and type-I ganglion neurons in carboplatin-treated chinchillas. Mechanisms of damage and protection [J]. *Ann N Y AcadSci*, 1999, 884(2): 152 - 170.
- [30] Wang J, Ding D, Salvi R. Carboplatin-induced early cochlear lesion in chinchillas [J]. *Hear Res*, 2003, 181(1 - 2): 65 - 72.
- [31] Wang J, Ding D, Shulman A, et al. Leupeptin protects sensory hair cells from acoustic trauma [J]. *Neuroreport*, 1999, 10(4): 811 - 816.
- [32] 丁大连, 罗德峰, 郭毓卿, 等. 氨基糖苷类抗生素耳毒性机制探讨 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1991, 26(3): 154 - 155.
- [33] 丁大连, 蒋海燕, 王家东, 等. 卡铂损害灰鼠前庭神经元和 I 型毛细胞的定量观察 [J]. *听力学与言语疾病杂志*, 2002, 10(3): 170 - 183.
- [34] Sun H, Hashino E, Ding D, et al. Reversible and irreversible damage to cochlear afferent neurons by kainic acid excitotoxicity [J]. *J Comp Neurol*, 2001, 430(2): 172 - 181.
- [35] 丁大连, 蒋海燕, Sandra LM, 等. 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.
- [36] 赵纪余, 丁大连, 皇甫慕三. 利尿酸对豚鼠耳蜗血管纹酶活性的影响 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1988, 2(1): 65 - 67.
- [37] Engstrom H. The pathological sensory cell in the cochlea [J]. *ActaOtolaryngol*, 1967, 63(2 Suppl): 20 - 26.
- [38] Lindeman HH. Studies on the morphology of the sensory regions of the vestibular apparatus with 45 figures [J]. *ErgebAnatEntwicklungsgesch*, 1969, 42(1): 1 - 113.
- [39] Johnsson LG, Hawkins JE. A direct approach to cochlear anatomy and pathology in man [J]. *Arch Otolaryngol*, 1967, 85(6): 599 - 613.
- [40] Bredberg G, Lindeman HH, Ades HW, et al. Scanning electron microscopy of the organ of Corti [J]. *Science*, 1970, 170(3960): 861 - 863.
- [41] Bohne BA. Location of small cochlear lesions by phase contrast microscopy prior to thin sectioning [J]. *Laryngoscope*, 1972, 82(1): 1 - 16.
- [42] Spoendlin H. Sensory neural organization of the cochlea [J]. *J Laryngol Otol*, 1979, 93(9): 853 - 877.
- [43] Axelsson A. The vascular anatomy of the rhesus monkey cochlea [J]. *ActaOtolaryngol*, 1974, 77(6): 381 - 392.
- [44] 戴树宏. 全耳蜗铺片术 [J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1981, 16

- (2): 72-74.
- [45] 丁大连, 赵纪余, 皇甫慕三, 等. 改良耳蜗铺片术[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1981, 16(4): 207-209.
- [46] 丁大连, 王家瑜, 何永照, 等. 耳蜗螺旋韧带硬铺片术[J]. 上海医学, 1984, 7(11): 657-658.
- [47] 丁大连, 赵纪余, 罗德峰. 血管纹微循环的静态定量观察[J]. 耳鼻喉学报, 1990, 4(1): 1-2.
- [48] 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]. *Hear Res*, 2002, 173(1-2): 1-9.
- [49] 丁大连, 陈学明, 金西铭. 前庭终器小视野定量观察技术[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1992, 27(4): 202-203.
- [50] 丁大连, 骆松明, 金西铭. 豚鼠内耳前庭终器分离取材术[J]. 上海医学, 1986, 9(3): 153-154.
- [51] 李明, 姜泗长. 全内耳膜迷路铺片技术//丁大连. 内耳形态学[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2001: 24-37.
- [52] 丁大连, 赵纪余, 罗德峰, 等. 豚鼠全内耳膜迷路取材术[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1987, 1(1): 9-11.
- [53] 丁大连, 郭毓卿, 罗德峰, 等. 豚鼠全内耳终器硝酸银染色法[J]. 上海第二医科大学学报, 1989, 9(4): 326.
- [54] 亓卫东, 丁大连, 蒋海燕, 等. 全耳蜗毛细胞定量分析系统[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(2): 158-160.
- [55] Ding D, Jiang H, Fu Y. Ototoxic effects of carboplatin in cochlear organotypic cultures in chinchillas and rats[J]. *Journal of Otolology*, 2012, 7(2): 92-101.
- [56] Ding D, McFadden S, Salvi R. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques//James F, Willott. *Handbook of Mouse Auditory Research*[M]. Florida: CRS Press. 2001: 189-204.
- [57] 丁大连, 王坚, 付勇, 等. 对灰鼠延迟性神经元死亡模型中螺旋神经节细胞缺损的评估[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2010, 3(3): 169-175.
- [58] 丁大连, 亓卫东, 曲雁. 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.
- [59] 丁大连, 蒋海燕, 王家东, 等. 定量观察卡铂引起的灰鼠耳蜗毛细胞和神经纤维的早期损害过程[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2002, 8(4): 241-244.
- [60] 丁大连, 郑向阳. 耳蜗 Corti 氏隧道中传出神经纤维的定量观察方法[J]. 耳鼻喉学报, 1998, 12(2): 65-69.
- [61] Ding D, Qi W, Yu D, et al. NAD<sup>+</sup> prevents mefloquine-induced neuroaxonal and hair cell degeneration through reduction of caspase-3-mediated apoptosis[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e79817.
- [62] Ding D, Allman Brain, Shankai Yin, et al. Cisplatin ototoxicity.// Dupont, Jason P. *Hearing Loss Classification, Causes and Treatment*[M]. New York: Nova Science Publishers, Inc. 2011: 39-63.
- [63] Ding D, Allman B, Salvi R. Review: ototoxic characteristics of platinum antitumor drugs[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, 295(11): 1851-1867.
- [64] Ding D, He J, Allman BL, et al. Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures[J]. *Hear Res*, 2011, 282(1-2): 196-203.
- [65] 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]. *Hear Res*, 2003, 185(1-2): 90-96.
- [66] Ding D, Stracher A, Salvi R. et al. Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity[J]. *Hear Res*, 2002, 164(1-2): 115-126.
- [67] 丁大连, 李明, 郑向阳, 等. 卡铂导致毛细胞及其传出神经纤维损害的耳蜗分析图[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1999, 13(11): 510-512.
- [68] 刘洪, 丁大连, 孙虹, 等. CBA 小鼠内耳感觉上皮的参考数据[J]. 中华耳科学杂志, 2011, 9(2): 224-231.
- [69] Li M, Ding D, Zheng XY, et al. Vestibular destruction by slow infusion of gentamicin into semicircular canals[J]. *Acta Otolaryngol Suppl*, 2004, 552(1): 35-41.
- [70] 于栋祯, 丁大连, 殷善开, 等. 硫酸链霉素对体外培养大鼠前庭毛细胞的损害作用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 44(1): 53-56.
- [71] Ding D, Jiang H, Fu Y, et al. Ototoxic model of oxaliplatin and protection from nocitnamide adenine dinucleotide[J]. *Journal of Otolology*, 2013, 8(1): 22-30.
- [72] Ding D, Jiang H, Salvi R. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid[J]. *Hear Res*, 2010, 259(1-2): 16-23.
- [73] Ding D, Jiang H, Wang P, et al. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid[J]. *Hear Res*, 2007, 226(1-2): 129-139.
- [74] Ding D, Qi W, Yu D, et al. Ototoxic effects of mefloquine in cochlear organotypic cultures[J]. *Journal of Otolology*, 2009, 4(2): 29-38.
- [75] Ding D, Roth J, Salvi R. Manganese is toxic to spiral ganglion neurons and hair cells in vitro[J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32(2): 233-241.
- [76] Ding D, Salvi R. Review of cellular changes in the cochlea due to aminoglycoside antibiotics[J]. *The Volta Review*, 2005, 105(3): 407-438.
- [77] Ding D, Salvi R, Roth JA. Cellular localization and developmental changes of Zip8, Zip14 and transferrin receptor 1 in the inner ear of rats[J]. *Biomaterials*, 2014, 27(4): 731-744.
- [78] Ding D, Salvi R, Roth JA. Cellular localization and developmental changes of the different isoforms of divalent metal transporter 1 (DMT1) in the inner ear of rats[J]. *Biomaterials*, 2014, 27(1): 125-134.
- [79] Ding D, Seigel D, Salvi R. Migration of R28 retinal precursor cells into cochlear and vestibular organs[J]. *Journal of Otolology*. 2006, 1(1): 51-56.
- [80] Ding D, Someya S, Jiang HY, et al. Detection of apoptosis by RT-PCR array in mefloquine-induced cochlear damage[J]. *Journal of Otolology*, 2011, 6(1): 1-8.
- [81] Ding D, Wang J, Yu ZP, et al. Spontaneous proliferation in orga-

- notypic cultures of mouse cochleae[J]. *Journal of Otology*, 2008, 3(2): 76-83.
- [82] Ding D, Wang P, Jiang HY, et al. Gene expression in cisplatin ototoxicity and protection with p53 inhibitor[J]. *Journal of Otology*, 2009, 4(2): 61-70.
- [83] Fu Y, Ding D, Jiang H, et al. Ouabain-induced cochlear degeneration in rat[J]. *Neurotox Res*, 2012, 22(2): 158-169.
- [84] Fu Y, Ding D, Wei L, et al. Ouabain-induced apoptosis in cochlear hair cells and spiral ganglion neurons in vitro[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 628064.
- [85] Kane KL, Longo-Guess CM, Gagnon LH, et al. Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice[J]. *Hear Res*, 2012, 283(1-2): 80-88.
- [86] Qi W, Ding D, Salvi RJ. Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures[J]. *Hear Res*, 2008, 236(1-2): 52-60.
- [87] Ding D, Salvi R. Ototoxic effects of mefloquine in cochlear organotypic cultures[J]. *Journal of Otology*, 2009, 4(2): 76-85.
- [88] Salvi RJ, Ding D, Wang J, et al. A review of the effects of selective inner hair cell lesions on distortion product otoacoustic emissions, cochlear function and auditory evoked potentials[J]. *Noise Health*, 2000, 2(6): 9-26.
- [89] Wang L, Ding D, Salvi R, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide prevents neuroaxonal degeneration induced by manganese in cochlear organotypic cultures[J]. *Neurotoxicology*, 2014, 40(1): 65-74.
- [90] Wu XW, Ding DL, Sun H, et al. Neurotoxicity of lead in rat cochlear organotypic cultures[J]. *Journal of Otology*, 2011, 6(2): 44-49.
- [91] Yu D, Ding D, Jiang H, et al. Mefloquine damage vestibular hair cells in organotypic cultures[J]. *Neurotox Res*, 2011, 20(1): 51-58.
- [92] Yu J, Ding D, Sun H, et al. Neurotoxicity of trimethyltin in rat cochlear organotypic cultures[J]. *Neurotoxicity Research*, 2015, 28(1): 43-54.
- [93] 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.
- [94] Zheng QY, Ding D, Yu H, et al. A locus on distal chromosome 10 (ahl4) affecting age-related hearing loss in A/J mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1693-1705.
- [95] 丁大连, 金西铭, 张志坚, 等. 红目和黑目豚鼠对庆大霉素不同易感性的研究[J]. *耳鼻喉学报*, 1995, 9(2): 70-74.
- [96] 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.
- [97] 丁大连, 张志坚, 朱巧英. 乌拉坦和硫酸链霉素对听觉传导的联合阻滞作用[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 1995, 3(1): 36-38.
- [98] 丁大连, 曲雁, 亓卫东, 等. 缺氧性内耳损害[J]. *中华耳科学杂志*, 2008, 43(4): 468-474.
- [99] 丁大连, 王坚, Philip Hofstetter, 等. Carboplatin 对灰鼠前庭系统的影响[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 6(1): 1-5.
- [100] 丁大连, 李明, 王坚, 等. 小鼠自然老化过程中耳蜗的糖代谢障碍[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 12(1): 6-8.
- [101] 丁大连, 蒋海燕, 李明, 等. SOD1 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.
- [102] 丁大连, 李明, 郑向阳, 等. 卡铂导致毛细胞及其传出神经损害的耳蜗分析图[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1999, 13(11): 510-512.
- [103] 丁大连, 李明, 王坚, 等. Calpain 参噪声损害毛细胞中的角色[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 8(4): 157-159.
- [104] 丁大连, 蒋海燕, Salvi R, 等. 庆大霉素对离体培养小鼠前庭终器的损害[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2003, 11(1): 1-4.
- [105] 丁大连, 李鹏, 高可雷, 等. 耳蜗细胞死亡方式的鉴别[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2015, 21(3): 178-183.
- [106] 丁大连, 王坚, 胡博华, 等. 衰老小鼠 Corti 器中脱氢酶活性的变化和意义[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 12(2): 78-80.
- [107] 丁大连, 王坚, 胡博华, 等. 灰鼠耳蜗毛细胞脱氢酶活性在卡铂耳中毒中的早期变化[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 1998, 6(1): 20-23.
- [108] 丁大连, 皇甫慕三. 耳蜗灌流活组织染色法在豚鼠耳蜗切片中的应用[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 1992, 6(2): 109-110.
- [109] 丁大连, 蒋海燕, 王家东, 等. 内毛细胞缺损对噪声引起外毛细胞损害的潜在影响[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2005, 12(6): 413-415.
- [110] 丁大连, 赵纪余. 听毛细胞表皮板的光镜与电镜联合观察[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 1994, 2(1): 28-31.
- [111] 丁大连, 郑向阳, 王坚, 等. 卡铂引起的毛细胞四种酶的活性改变[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 1999, 7(4): 200-202.
- [112] 丁大连, 金晓杰, 皇甫慕三. 硫酸链霉素对听觉传导的阻滞作用[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 1993, 1(1): 29-31.
- [113] 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.
- [114] 于栋祯, 丁大连, 殷善开, 等. 灰鼠畸变产物耳声发射改变和外毛细胞缺失程度的相关分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(2): 145-149.
- [115] 于进涛, 丁大连, 李鹏, 等. 幼鼠内耳单个器官培养步骤及分类方法[J]. *中华耳科学杂志*, 2015, 13(1): 64-70.
- [116] 亓卫东, 丁大连, Salvi R. 海仁酸的耳毒性作用// 丁大连. *内耳科学*[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 287-296.
- [117] 付勇, 丁大连, Salvi Richard. 大鼠耳蜗器官培养及其组织学检查技术[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2009, 16(11): 604-607.
- [118] 何景春, 于栋祯, 丁大连, 等. 硫酸链霉素引起的大鼠体外培养耳蜗毛细胞凋亡[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(6): 494-498.



- [119] 侯秋来,丁大连,蒋海燕,等. 庆大霉素对小鼠耳蜗毛细胞损害的离体培养试验模型[J]. 中华耳科学杂志, 2005, 3(3): 191-193.
- [120] 周义德,丁大连,郑宏良,等. 强脉冲噪声导致的豚鼠耳蜗毛细胞凋亡及 P53 蛋白的表达[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 46(1): 54-58.
- [121] 宣伟军,丁大连. 小鼠耳蜗毛细胞体外培养研究方法[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2005, 13(3): 121-122.
- [122] 张松志,丁大连. 听毛细胞表皮板病变的观察[J]. 耳鼻咽喉头颈外科, 1995, 2(4): 243-245.
- [123] 李春晖,杜波,丁大连,等. 小鼠耳蜗的形态学发育过程[J]. 解剖科学进展, 2008, 14(2): 148-150.
- [124] 李永奇,丁大连,李鹏,等. 小鼠顺铂耳蜗毛细胞损伤模型[C]. 全国耳鼻咽喉头颈外科中青年学术会议论文汇编, 2012.
- [125] 李永奇,丁大连,蒋海燕,等. 速尿引起的小鼠耳蜗血管纹缺血缺氧性病变[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2010, 18(3): 123-127.
- [126] 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.
- [127] 杜波,丁大连,蒋海燕,等. C57BL/10J 小鼠内耳形态学观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(1): 57-60.
- [128] 杨军,丁大连,吴皓,等. 卡铂引起的灰鼠耳蜗内毛细胞缺损模式[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19(10): 457-460.
- [129] 王坚,丁大连. Salvi Richard J. 耳蜗急性纯音损伤后下丘及耳蜗核快速功能重组[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1997, 32(4): 218-221.
- [130] 王家瑜,丁大连,赵纪余,等. 耳蜗琥珀酸脱氢酶显示方法的改进[J]. 生理学报, 1984, 36(4): 393-396.
- [131] 赵纪余,丁大连,王家瑜,等. 利尿酸对豚鼠耳蜗血管纹微循环的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 1988, 8(1): 34-37.
- [132] 邹嘉平,丁大连. 速尿对耳蜗血管纹微循环的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志, 1993, 1(2): 48.
- [133] 郭毓卿,丁大连,王泉良,等. 庆大霉素前庭损害报警耳聋的实验研究[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2000, 8(3): 108-110.
- [134] 金晓杰,丁大连. 高强度微波辐射损害内耳的实验研究[J]. 听力学及言语疾病杂志, 1995, 3(4): 199-201.
- [135] 陆书昌,丁大连,陈海明. 豚鼠耳蜗组织化学研究方法的若干问题[J]. 实验动物学, 1987, 7(4): 206-209.
- [136] 韩东一,丁大连,赵纪余,等. 脑干诱发电位测听在豚鼠耳实验性药物中毒中的意义[J]. 上海第二医科大学学报, 1983, 1(1): 68-70.
- [137] 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.
- [138] Qi W, Ding D, Zhu H, et al. Efficient siRNA transfection to the inner ear through the intact round window by a novel proteidic delivery technology in the chinchilla[J]. Gene Ther, 2014, 21(1): 10-18.
- [139] Liu H, Ding D, Sun H, et al. Cadmium-induced ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures[J]. Neurotox Res, 2014, 26(2): 179-189.
- [140] Liu H, Ding D, Jiang H, et al. Ototoxic destruction by co-administration of kanamycin and ethacrynic acid in rats[J]. J Zhejiang UnivSci B, 2011, 12(10): 853-861.
- [141] Deng L, Ding D, Su J, et al. Salicylate selectively kills cochlear spiral ganglion neurons by paradoxically up-regulating superoxide[J]. Neurotox Res, 2013, 24(3): 307-319.
- [142] Dong Y, Ding D, Jiang H, et al. Ototoxicity of paclitaxel in rat cochlear organotypic cultures[J]. ToxicolApplPharmacol, 2014, 280(3): 526-533.
- [143] Shi L, Guo X, Shen P, et al. Noise-induced damage to ribbon synapses without permanent threshold shifts in neonatal mice[J]. Neuroscience, 2015, 304(5): 368-377.
- [144] Engstrom H, Wersall J. The ultrastructural organization of the organ of Corti and of the vestibular sensory epithelia[J]. Exp Cell Res, 1958, 14(Suppl 5): 460-492.
- [145] Ding D, McFadden SL, Salvi R. Calpain immunoreactivity and morphological damage in chinchilla inner ears after carboplatin[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2002, 3(1): 68-79.
- [146] 丁大连, Salvi Richard J. 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.
- [147] 丁大连, 亓卫东, 曲雁, 等. 卡铂及其耳毒性[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(2): 134-144.
- [148] 丁大连, 亓卫东, 张梅, 等. 顺铂及其耳毒性[J]. 中华耳科学杂志, 2008, 6(2): 125-133.
- [149] 丁大连, 金晓杰, 皇甫慕三. 缺氧豚鼠耳蜗功能及结构的改变[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(5): 265-267.
- [150] 丁大连, 罗德峰, 皇甫慕三, 等. 内耳酶细胞化学电镜技术[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1989, 3(3): 183-184.
- [151] 丁大连, 范静平, 龚志萍, 等. 皇甫慕三扫描电镜和透射电镜对豚鼠耳蜗的联合观察[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 1992, 6(1): 8-10.
- [152] 丁大连, 金晓杰, 赵纪余. 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.
- [153] 周梁,丁大连,皇甫慕三. 前庭感受器冰冻蚀刻标本制备技术[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 1994, 8(2): 116-118.
- [154] 徐凤仙, 严凌鹤, 孙银强, 等. 豚鼠内耳前庭终器的扫描电镜观察[J]. 上海医学, 1986, 9(7): 405-406.
- [155] 戚庭乐,丁大连. 卡铂致灰鼠前庭器官损害的扫描电镜观察[J]. 耳鼻喉学报, 1998, 12(1): 1-3.
- [156] 戚庭乐,丁大连. 豚鼠内耳结构的死后变化[J]. 耳鼻喉学报, 1998, 12(2): 73-76.
- [157] 罗德峰,丁大连,皇甫慕三. 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.
- [158] 金西铭,丁大连,骆松明,等. 正常豚鼠前庭终器的扫描电镜观察[J]. 上海第二医科大学学报, 1986, 6(4): 287-289.
- [159] 马建,丁大连,池玉芬,等. Carboplatin 致灰鼠内毛细胞损害的扫描电镜观察[J]. 耳鼻喉学报, 1998, 12(1): 70-72.
- [160] 骆松明,丁大连,金西铭,等. 9370 兆赫微波对豚鼠内耳

- 显微结构影响的观察[J]. 耳鼻咽喉头颈外科, 1996, 3(2): 134.
- [161] 高文元, 丁大连, 郑向阳, 等. 脉冲噪声暴露后耳蜗螺旋器超微结构的变化[J]. 第二军医大学学报, 1991, 12(4): 349-353.
- [162] 高文元, 丁大连, 阮芳铭, 等. 弱冲击波对豚鼠耳蜗表面结构损伤的扫描电镜观察[J]. 中华创伤杂志, 1991, 5(2): 135-138.
- [163] 丁大连. 缺氧性内耳损害//丁大连. 内耳科学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 173-182.
- [164] Gao W, Ding D, Zheng X, et al. Changes in the stereocilia and non-monotonic pattern of threshold shift after exposure to impulse noise[J]. Hear Res, 1991, 54(2): 296-304.
- [165] Gao W, Ding D, Zheng X, et al. A comparison of changes in the stereocilia between temporary and permanent hearing losses in acoustic trauma[J]. Hear Res, 1992, 62(1): 27-41.
- [166] 赵纪余, 丁大连, 蒋海燕, 等. 缺氧致内耳超微结构改变的实验研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1991, 26(2): 83-84.
- [167] 丁大连, 赵纪余. 听毛细胞表皮版的光镜与电镜联合观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 1994, 2(1): 28-31.
- [168] 周梁, 丁大连, 皇甫慕三, 等. 人胚胎前庭上皮细胞间连接装置的观察[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(3): 134-135.
- [169] Hashino E, Shero M, Salvi RJ. Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells [J]. Brain Res, 1997, 777(1-2): 75-85.

(收稿日期: 2015-12-12)

## · 消息 ·

### 《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》实行优质论文网上优先数字出版

为进一步提高期刊学术质量,缩短出刊周期,及时有效地传播优秀学术成果,提高作者学术成果的认可、传播和利用价值,作者可尽快发表成果,争取成果首发权,也为广大学者提供良好的文献查阅条件,我刊已加入“中国知网”学术期刊优先数字出版平台。并于2014年5月开始对优质稿件实行优先数字出版。

优先出版是数字化出版的一种创新与革命,凡已达到本刊正式出版水平的论文,在正式按期次成册印刷出版前,均可在“中国知网”学术期刊以单篇论文为单位、以PDF文档的形式在线优先发表。优先出版通常比印刷出版提前几周或几个月。作者所投本刊论文在通过外审、定稿及编辑加工后,能够第一时间在“中国知网”上发表。

如果作者同意所投本刊的论文于期刊印刷出版前在中国学术期刊(光盘版)电子杂志社主办的“中国知网”上进行优先数字出版,并许可“中国知网”在全球范围内使用该文的信息网络传播权,作者可在本刊远程投稿系统“作者投稿查稿”中下载“中国知网”优先出版授权书,签字后寄回。优先数字出版期刊的名称与印刷版期刊相同,其编辑单位是期刊编辑部。论文的网上优先数字出版由编辑部完成。