

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.23.003

顺铂耳毒性大鼠耳聋模型的研究*

胡鹏刚¹ 田克勇¹ 毛小波² 王人凤¹ 查定军^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院耳鼻咽喉-头颈外科 陕西 西安 710032;

2 解放军联勤保障部队第928医院五官科 海南 海口 571159)

摘要 目的:探讨顺铂对大鼠造成的听力损伤及耳蜗细胞形态学变化。**方法:**体内实验,运用顺铂腹腔注射的方法,连续七天注射,通过听性脑干反应检测,观察顺铂对不同日龄的大鼠听力损伤情况;测听后取耳蜗,通过基底膜铺片和冰冻切片的免疫荧光染色,观察听力损伤后对耳蜗毛细胞和螺旋神经元的影响。体外实验,耳蜗器官培养免疫荧光染色,观察顺铂对耳蜗毛细胞和螺旋神经元的影响。**结果:**顺铂具有耳毒性,会对大鼠听力造成损伤,高频听力损伤更加严重,而且对不同日龄的大鼠造成的听力损失不同,小日龄的大鼠对顺铂耳毒性更加敏感。体内实验,顺铂耳毒性造成听力损失,会引起大鼠耳蜗毛细胞的缺失,但未观察到明显的螺旋神经元缺失,也没有观察到明显的 Cleaved caspase-3 阳性螺旋神经元细胞。体外实验,可以观察到顺铂同时引起毛细胞和螺旋神经元产生明显的损伤。**结论:**体、内外实验,都可以建立稳定的顺铂耳毒性大鼠耳聋模型,对研究顺铂损伤耳蜗毛细胞的发生机制和保护奠定了实验基础。

关键词:顺铂;感音神经性聋;毛细胞;螺旋神经元

中图分类号:R-33;R764.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)23-4412-05

A Study on Cisplatin-induced Hearing Loss in a Rat Model*

HU Peng-gang¹, TIAN Ke-yong¹, MAO Xiao-bo², WANG Ren-feng¹, ZHA Ding-jun^{1Δ}

(1 Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Otolaryngology, 928 Hospital of the PLA Joint Logistic Support Force, Haikou, Hainan, 571159, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the hearing loss and morphological changes caused by cisplatin in rats. **Methods:** In vivo, cisplatin was injected intraperitoneally for seven consecutive days to observe the hearing loss of different age through the detection of auditory brainstem reaction. Cochleae were taken after hearing measurement, and the morphological changes of the cochlear hair cells and spiral ganglion neurons were observed by immunofluorescence staining of the basilar membrane and cochlear frozen section. In vitro, the effects of cisplatin on hair cells and spiral ganglion neurons were observed by immunofluorescence staining of cochlear organotypic cultures. **Results:** Cisplatin had ototoxicity and could cause hearing loss in rats. The damage of high-frequency hearing performance was more serious. Moreover, the hearing loss was different in the rats of different postnatal days, and the rats of younger days were more sensitive to cisplatin ototoxicity. In vivo, hearing loss induced by cisplatin resulted in loss of cochlear hair cells in rats, but no significant loss of spiral ganglion neurons was observed, nor were Cleaved caspase-3 positive spiral ganglion neurons found. In vitro, cisplatin ototoxicity caused significant damage to both hair cells and spiral ganglion neurons. **Conclusion:** Both in vivo and in vitro experiments can establish a stable cisplatin-induced hearing loss model in rats, which will lay a foundation for the study on the mechanism and protection of cisplatin induced cochlear hair cells.

Key words: Cisplatin; Sensorineural hearing loss; Hair cell; Spiral ganglion neuron

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R764.43 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)23-4412-05

前言

感音神经性耳聋是耳科的常见病,药物、噪声、老龄等是其发病的主要原因。顺铂作为一线化疗药广泛应用于头颈部等上皮性肿瘤,主要的副作用是造成不可逆的、双侧的感音神经性聋,在接受顺铂治疗的患者中发生率在 50%到 70%^[1,2]。食品药

品监督管理局目前没有批准任何的食物、药物保护顺铂等造成的感音神经性聋^[3]。所以,我们要研究顺铂耳毒性发生的过程和机制,从而更好的保护听力。Sprague-Dawley(SD)大鼠生长发育快,产仔多,抗病能力强,听觉系统发达,且耳蜗结构与人类相似,是理想的动物模型,广泛应用于听力的基础研究^[4,5]。王海波教授课题组近年来关注顺铂损伤的机制研究,多篇文章中运

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81870732);海南省自然科学基金项目(817407);陕西省科技重点项目(2018PT-01);

陕西省科技重点项目(2017ZDXM-SF-061);西京学科助推科研项目(XJZT19MJ05)

作者简介:胡鹏刚(1980-),男,学士,主治医师,研究方向:耳鼻咽喉头颈疾病,电话:18191865215, E-mail: hupenggang1011@163.com

Δ 通讯作者:查定军(1973-),男,博士,主任医师,主要研究方向:耳科的临床与基础研究, E-mail: zhadjun@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2021-01-28 接受日期:2021-02-25)

用连续一周腹腔注射顺铂,造成小鼠耳蜗毛细胞(Hair cells, HCs)和螺旋神经元(Spiral ganglion neurons, SGNs)损伤,模型稳定,造模时间短^[6,7]。因此,本研究选用SD大鼠作为实验对象,运用此模型方法,建立顺铂耳毒性损伤的大鼠模型,为后续深入研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SD大鼠,雌雄不限,外耳道检查无异常,由空军军医大学实验动物中心提供。

实验分为三组进行:对照组(Control)为连续7天腹腔注射相应量的生理盐水(0.3 mL 生理盐水/100 g 大鼠体重);顺铂组(Cisplatin)为从出生后14天(Postnatal 14, P14)到P20连续7天腹腔注射顺铂(3 mg/kg, Sigma, P4394);顺铂2组为从P49到P55连续7天腹腔注射顺铂(3 mg/kg)。每组3只,测听后取耳蜗进行免疫荧光染色观察。顺铂组为听力发育完善阶段大鼠,顺铂2组为性成熟大鼠(与王教授课题组所用小鼠天数相同),分两个不同阶段大鼠进行观察。

体外实验分为两组:新生仔鼠(P3)耳蜗器官培养,对照组给予相应量的PBS,顺铂组给予10 μ M顺铂,连续培养48小时。每组3只,体外培养后进行免疫荧光染色观察。

1.2 听性脑干反应检测

三组实验动物于药物注射结束后一天,在隔声屏蔽室中使用听觉诱发电位工作站(美国TDT)进行听性脑干反应(Auditory brainstem response, ABR)检测^[8]。15%水合氯醛(450 mg/kg)腹腔注射麻醉,置于保温板。颅顶正中骨缝置记录电极,测试耳后和鼠尾根部分别置入参考和接地电极,正对大鼠测试耳外耳道约2 cm处放置扬声器。设置刺激声为短纯音,强度90 dB SPL,频率20次/s,扫描时间10 ms,上升下降时间0.5 ms,间隔时间45.5 ms,滤波范围100-3000 Hz,叠加1024次。ABR反应阈采用能引出Ⅲ波的最小刺激强度,依次检测Click、4、8、16、24、32 kHz反应阈。

1.3 免疫荧光染色

ABR检测后断头,取耳蜗,在4%多聚甲醛中用胶头滴管反复吹打固定,而后置于多聚甲醛中过夜。10%乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA)脱钙5-7天,每天更换EDTA。

1.3.1 基底膜铺片 取脱钙后的耳蜗,显微镊去掉蜗壳、螺旋韧带、盖膜等,剥离基底膜。0.01 M的PBS漂洗后,1% TritonX-100打孔10分钟,而后Phalloidine(1:200, Cytoskeleton, PHDR1)和DAPI(1:1000, 美国Sigma, D9542)孵育30 min, PBS充分漂洗后85%甘油封片,共聚焦显微镜(日本Olympus FV 1000)观察。

1.3.2 耳蜗切片 耳蜗脱钙后,30%蔗糖过夜脱水(耳蜗沉于液体底部),OCT胶(美国Tissue-Tek, 4583)过夜浸润,切片机(德国莱卡, CM1850)10 μ m切片,置于挂胶的载玻片,室温晾干10 min, -20 $^{\circ}$ C保存。

耳蜗切片室温复温, PBS漂洗OCT胶, 1% TritonX-100打孔10分钟。PBS漂洗, 5%牛血清白蛋白(Amresco, 0332)室温封闭30 min, 加入一抗: Tubulin(1:200, GeneTex, GTX631836)

和Cleaved Caspase-3(1:100, 美国Cell signaling technology; #9661)在4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜孵育。PBS充分漂洗,加入二抗:驴抗鼠594(1:500, Invitrogen, A21203)和驴抗兔488(1:500, Invitrogen, A21202)。PBS充分漂洗, DAPI(1:1000)孵育10 min, 85%甘油充分漂洗, 85%甘油封片观察。

1.4 耳蜗器官培养

新生SD仔鼠,取基底膜保留螺旋神经节区域体外培养^[9,10]。取耳蜗器官在冰Hank's平衡盐溶液中进行,置于凝好的凝胶(2%碳酸钠、10 $\times$ Basal Medium Eagle及I型胶原凝胶按照1:1:9配制)上于5%二氧化碳的37 $^{\circ}$ C培养箱中培养过夜。换无血清培养液,加入顺铂,继续连续培养48小时。结束培养,4%多聚甲醛固定, Myosin7a(Proteus Bioscience, 25-6790)和Tubulin作为一抗免疫荧光染色,染色步骤同1.3.2。

1.5 统计学分析

实验统计数据为计量资料,用均数 $\pm$ 标准差表示。统计软件使用GraphPad Prism5.0软件,统计方法为双因素方差分析(two-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验三组大鼠药物注射后的听力情况

为了检测顺铂耳毒性对SD大鼠听力的影响,我们运用连续7天腹腔注射的方法进行顺铂耳毒性损伤造模^[6]。实验分为三组进行:对照组为连续7天腹腔注射生理盐水;顺铂组为从P14到P20连续7天腹腔注射顺铂;顺铂2组为从P49到P55连续7天腹腔注射顺铂。注射完一天进行ABR检测,如图1所示:对照组听力正常,无损伤;顺铂组和顺铂2组出现明显的ABR值升高、听力下降($P < 0.001$),而且高频听力损失较低频更加严重;而顺铂2组与顺铂组相比,ABR显著降低($P < 0.001$)。

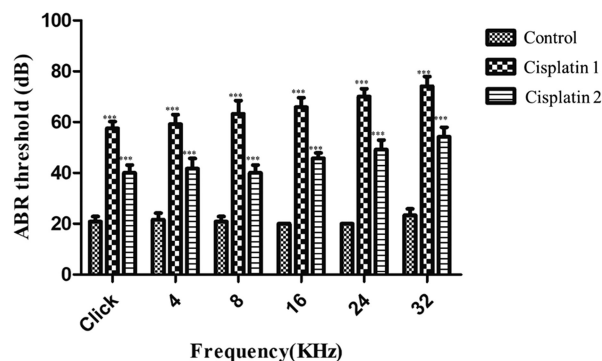


图1 体内实验顺铂引起大鼠听力功能损伤的情况

Fig. 1 Hearing loss induced by cisplatin in rats in vivo.

Note: Data were expressed as means $\pm$ SD, $n=6$. *** $P < 0.001$, Cisplatin 1 group compared with control group, and cisplatin 2 group compared with cisplatin 1 group. ABR is measured in decibels (dB).

2.2 体内实验免疫荧光染色观察耳蜗细胞形态变化

ABR检测后,选取对照组和顺铂组进行免疫荧光染色观察。Phalloidine标记HCs纤毛,DAPI染核,基底膜铺片观察,如图2显示:对照组一排内HCs和三排外HCs排列整齐,无缺失;而顺铂组一排内HCs完好,外HCs则出现大量缺失。

同时,我们进行耳蜗冰冻切片免疫荧光染色,观察顺铂损伤听力对SGNs的影响。Tubulin标记SGNs^[6,11],DAPI染核,如

图3所示,对照组与顺铂组未见明显区别,顺铂组未见明显 SGNs 缺失。Cleaved caspase-3 标记细胞凋亡^[9,11],是 SGNs 损伤

缺失的重要方式,通过 Cleaved caspase-3 染色,我们发现两组均没有明显的 Cleaved caspase-3 阳性细胞。

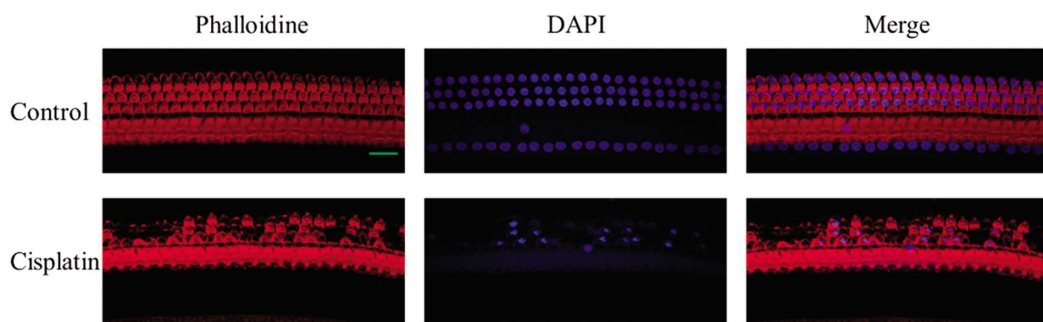


图2 体内实验顺铂损伤听力引起的毛细胞缺失

Fig. 2 Lose of hair cells caused by cisplatin injury in vivo

Note: Scale bars = 20 μ m.

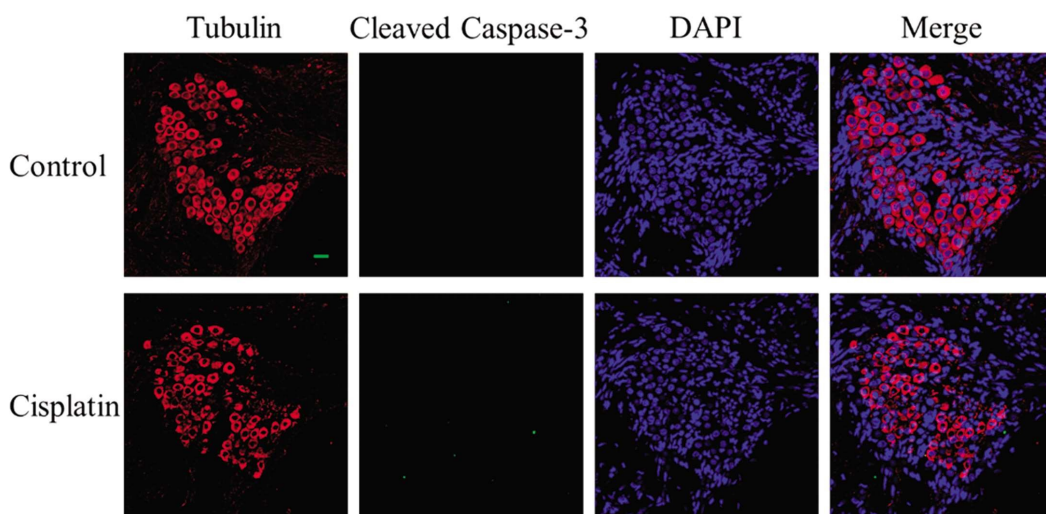


图3 体内实验顺铂损伤听力对螺旋神经元的影响

Fig. 3 Effect of cisplatin damage on spiral ganglion neurons in vivo

Note: Scale bars = 20 μ m.

2.3 体外实验免疫荧光染色观察耳蜗细胞形态变化

我们进行体外耳蜗器官培养,观察体外培养中顺铂对耳蜗细胞的影响。Myosin7a 标记 HCs^[10,12,13],Tubulin 标记 SGNs,如图4所示,对照组 HCs 排列整齐,SGNs 完好,神经纤维呈簇状排列,而加入顺铂后,出现大量 HCs 缺失,SGNs 和神经纤维明显损失。表明体外培养中顺铂同时损伤 HCs 和 SGNs。

3 讨论

顺铂耳毒性副作用已被广泛研究,但目前尚无有效的治疗方法^[14]。SD 大鼠是科研中常用的鼠种,于 1925 美国 Sprague Dawley 农场中由 Wistar 大鼠培育而成,其毛色白化,产仔多,生长发育快,对疾病的抵抗力强,广泛应用于听力^[15-17]、药理、肿瘤、营养、代谢、神经、内分泌、老年学等多学科领域的科学研究。查阅文献表明,顺铂对小鼠体内、外研究均损伤耳蜗 HCs 和 SGNs^[6,7,18]。于是,本研究应用 SD 大鼠研究体内、体外顺铂耳毒性损伤耳蜗细胞的情况,发现 SD 大鼠在此模型中引起中重度听力损失,主要引起耳蜗 HCs 缺失,而 SGNs 未见明显缺失,可能与实验鼠的种属有关。

本研究首先分为三组进行,对照组听力正常,顺铂组和顺铂 2 组听力损失,高频听力损失显著,成功建立了稳定的顺铂损伤大鼠听力的药物性聋模型。而且顺铂组和顺铂 2 组相比,顺铂组损失明显加重,表明不同日龄的大鼠对顺铂耳毒性的敏感性不同。顺铂耳毒性的表现可能是损伤耳蜗 HCs、SGNs、血管纹等,这与哺乳动物的种属、年龄、用药时间、用药剂量等相关^[16,7,14,18]。而且,不同日龄动物耳蜗对损伤的敏感性不同,恢复能力也不同^[9]。在大鼠活动期给予顺铂对耳毒性的影响较小,这一发现与动物在黑暗的时间使用顺铂治疗时肾毒性较低是一致,其表明昼夜时间对顺铂耳毒性的易感性有很大的影响^[20]。

顺铂诱导的细胞毒性通常是由于顺铂与细胞核 DNA 结合,导致细胞的下游通路,特别是在增殖细胞中,细胞内通路的破坏和与各种蛋白的结合,都可能导致细胞失调和细胞死亡^[21]。体外实验,顺铂损伤小鼠的耳蜗 HCs 和 SGNs^[18]。体内实验,连续 7 天腹腔注射顺铂造成耳蜗 HCs 和 SGNs 损失^[6,7]。本实验选择对照组和顺铂组应用免疫荧光染色观察顺铂损伤大鼠耳蜗细胞的表现。基底膜铺片染色显示对照组三排外 HCs 和一排内 HCs 排列整齐,细胞完好,顺铂组表现为内 HCs 完好,外

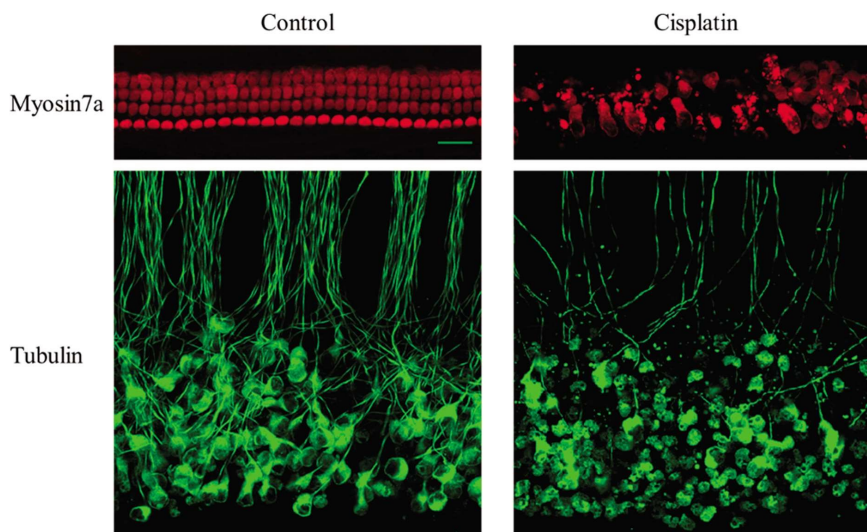


图4 体外实验顺铂损伤听力对耳蜗毛细胞和螺旋神经元的影响

Fig. 4 Effect of cisplatin damage on cochlear hair cells and spiral ganglion neurons in vitro.

Note: Scale bars = 20 μ m.

HCs 大量缺失。表明在体内实验，顺铂损伤大鼠耳蜗的的外 HCs。这与另一类广泛应用于临床的耳毒性药物，氨基糖苷类抗生素引起的 HCs 损失表现相同^[10,12,14,22,23]。SGNs 对听力的产生同样重要^[24]，我们利用耳蜗冰冻切片免疫荧光染色，进一步观察 SGNs 的损伤情况。结果显示对照组和顺铂组无明显区别，未观察到顺铂组出现明显的 SGNs 损伤。最新研究表明，体内、外实验均表明在顺铂耳毒性引起的耳蜗细胞损失过程中凋亡发挥着重要的作用^[25]。Cleaved caspase-3 标记细胞凋亡，我们同时进行 Cleaved caspase-3 染色，对照组和顺铂组均未观察到明显的 Cleaved caspase-3 阳性细胞。再次验证顺铂体内注射对大鼠耳蜗 SGNs 没有明显损伤作用。但是，本实验观察 SGNs，是采用冰冻切片的方法，只能观察到螺旋神经节的部分切面，无法观察螺旋神经节的立体结构，即全部的 SGNs，方法具有局限性，无法像基底膜铺片观察 HCs 一样，即使点状缺失都可以发现。目前体内实验研究顺铂对耳蜗细胞的损伤，明确了对 HCs 造成的损伤，但对于 SGNs 无法得出一致的结论^[26-30]，所以体内实验顺铂对大鼠 SGNs 的损伤还有待进一步研究。我们进一步行体外实验，发现与丁大连等人的研究结果相同^[18]，体外实验中，可以明显的观察到顺铂同时损伤耳蜗 HCs 和 SGNs。

总之，本实验成功的建立了顺铂损伤大鼠听力的药物性聋模型，模型稳定，体内实验中不同日龄损伤程度不同，可根据不同的实验需求选择合适的听力损伤模型。同时，我们发现体内实验顺铂损伤大鼠听力主要损伤耳蜗 HCs，而 SGNs 没有观察到明显缺失，体外实验顺铂同时损伤 HCs 和 SGNs。顺铂诱导大鼠药物性聋模型的建立，为我们研究顺铂耳毒性的发生及机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Knight K R, Chen L, Freyer D, et al. Group-Wide, Prospective Study of Ototoxicity Assessment in Children Receiving Cisplatin Chemotherapy (ACCL05C1): A Report From the Children's Oncology Group[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35(4): 440-445
- [2] Sheth S, Mukherjea D, Rybak L P, et al. Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2017, 11: 338
- [3] Teitz T, Fang J, Goktug A N, et al. CDK2 inhibitors as candidate therapeutics for cisplatin- and noise-induced hearing loss [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2018, 215(4): 1187-1203
- [4] 张心怡, 何亚, 王娟, 等. 大鼠耳蜗雪旺细胞的体外培养和纯化[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(18): 3412-3415
- [5] 易星, 刘兴发, 石琳钰, 等. 变压器噪声暴露对 SD 大鼠听力及应激状态的影响研究[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(20): 3836-3841
- [6] Liu W, Xu X, Fan Z, et al. Wnt Signaling Activates TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator and Protects Against Cisplatin-Induced Spiral Ganglion Neuron Damage in the Mouse Cochlea[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2019, 30(11): 1389-1410
- [7] Yang Q, Sun G, Yin H, et al. PINK1 Protects Auditory Hair Cells and Spiral Ganglion Neurons from Cisplatin-induced Ototoxicity via Inducing Autophagy and Inhibiting JNK Signaling Pathway [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 120: 342-355
- [8] 田克勇, 宋勇莉, 孙菲, 等. 热休克蛋白 60 在药物性聋大鼠模型中的表达变化[J]. *中华耳科学杂志*, 2016, 14(02): 251-254
- [9] Tian K, Chang H, Wang J, et al. Inhibition of DHCR24 increases the cisplatin-induced damage to cochlear hair cells in vitro [J]. *Neuroscience Letters*, 2019, 706: 99-104
- [10] Qi M, Qiu Y, Zhou X, et al. Regional up-regulation of NOX2 contributes to the differential vulnerability of outer hair cells to neomycin[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2018, 500(2): 110-116
- [11] Wang W, Li D, Ding X, et al. N -Acetylcysteine protects inner ear hair cells and spiral ganglion neurons from manganese exposure by regulating ROS levels[J]. *Toxicology Letters*, 2017, 279: 77-86
- [12] He Z, Guo L, Shu Y, et al. Autophagy protects auditory hair cells against neomycin-induced damage [J]. *Autophagy*, 2017, 13 (11): 1884-1904
- [13] Yin H, Sun G, Yang Q, et al. NLRX1 accelerates cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 cells via promoting generation of ROS and activation of JNK signaling pathway [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7

- (1): 44311
- [14] Kros C J, Steyger P S. Aminoglycoside- and Cisplatin-Induced Ototoxicity: Mechanisms and Otoprotective Strategies [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2019, 9(11): a33548
- [15] Song Y L, Tian K Y, Mi W J, et al. Decreased expression of TERT correlated with postnatal cochlear development and proliferation reduction of cochlear progenitor cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4): 6077-6083
- [16] Chen J, Liu Z, Yan H, et al. miR-182 prevented ototoxic deafness induced by co-administration of kanamycin and furosemide in rats[J]. Neuroscience Letters, 2020, 723: 134861
- [17] Chang H, Sun F, Tian K, et al. Caspase inhibitor z-VAD-FMK increases the survival of hair cells after Actinomycin-D-induced damage in vitro[J]. Neuroscience Letters, 2020, 732: 135089
- [18] Ding D, He J, Allman B L, et al. Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures[J]. Hearing Research, 2011, 282(1-2): 196-203
- [19] Ebert J, Fink S, Koitschev A, et al. Recovery of mechano-electrical transduction in rat cochlear hair bundles after postnatal destruction of the stereociliar cross-links [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2010, 277(1692): 2291-2299
- [20] Bielefeld E C, Markle A, Debacker J R, et al. Chronotolerance for cisplatin ototoxicity in the rat[J]. Hearing research, 2018, 370: 16-21
- [21] Karasawa T, Sibrian-Vazquez M, Strongin R M, et al. Identification of cisplatin-binding proteins using agarose conjugates of platinum compounds[J]. PloS one, 2013, 8(6): e66220
- [22] Gao K, Ding D, Sun H, et al. Kanamycin Damages Early Postnatal, but Not Adult Spiral Ganglion Neurons [J]. Neurotoxicity Research, 2017, 32(4): 603-613
- [23] Yu X, Liu W, Fan Z, et al. c-Myb knockdown increases the neomycin-induced damage to hair-cell-like HEI-OC1 cells in vitro[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 41094
- [24] Sun F, Zhou K, Wang S, et al. Expression patterns of atrial natriuretic peptide and its receptors within the cochlear spiral ganglion of the postnatal rat[J]. Hearing Research, 2014, 309: 103-112
- [25] Ruhl D, Du T, Wagner E L, et al. Necroptosis and Apoptosis Contribute to Cisplatin and Aminoglycoside Ototoxicity [J]. The Journal of Neuroscience, 2019, 39(15): 2951-2964
- [26] Tanyeli T T, Karadas H, Akyildiz I, et al. Effect of Folic Acid on Cisplatin-Induced Ototoxicity: A Functional and Morphological Study [J]. The Journal of International Advanced Otology, 2019, 15 (2): 237-246
- [27] Choi M, Kang H, Lee Y Y, et al. Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats Is Driven by RIP3-Dependent Necroptosis [J]. Cells, 2019, 8(5): 409
- [28] Callejo A, Durochat A, Bressieux S, et al. Dose-dependent cochlear and vestibular toxicity of trans-tympanic cisplatin in the rat [J]. NeuroToxicology, 2017, 60: 1-9
- [29] Soyaliç H, Gevrek F, Koç S, et al. Intraperitoneal curcumin and vitamin E combination for the treatment of cisplatin-induced ototoxicity in rats [J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2016, 89: 173-178
- [30] Kaur T, Borse V, Sheth S, et al. Adenosine A1 Receptor Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Suppressing the NOX3/STAT1 Inflammatory Pathway in the Cochlea [J]. The Journal of Neuroscience, 2016, 36(14): 3962-3977

(上接第 4600 页)

- [26] Muraru D, Niero A, Rodriguez-Zanella H, et al. Three-dimensional speckle-tracking echocardiography: benefits and limitations of integrating myocardial mechanics with three-dimensional imaging [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2018, 8(1): 101-117
- [27] 姚丙南, 仇萍, 王玉芳, 等. 三维斑点追踪技术对冠状动脉慢血流患者左心室收缩功能的评价 [J]. 中国心血管杂志, 2016, 21(06): 466-469
- [28] 厉宣本. 左前降支慢血流患者心肌功能改变及尼可地尔的治疗作用[D]. 2018, 青岛大学
- [29] 姜沙沙. 冠脉慢血流患者心肌超声造影的临床观察 [D]. 2019, 河南科技大学
- [30] Shi J, Xing Y, Qian J, et al. Early Assessment of Left Ventricular Function by Layer-Specific Strain and Its Relationship to Pulsatile Arterial Load in Patients with Coronary Slow Flow [J]. Int Heart J, 2019, 60(3): 586-592