

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.006

## 二十二碳六烯酸对豚鼠顺铂所致耳毒性的影响\*

郭文杰<sup>1</sup>, 陈焱<sup>2</sup>, 王跃琦<sup>1</sup>, 蔡佩玲<sup>1</sup>

(1. 成都大学医护学院解剖教研室, 成都 610106; 2. 四川大学第二附属医院生殖内分泌科, 成都 610000)

**[摘要]** **目的** 通过动物实验, 研究二十二碳六烯酸(DHA)全身给药对顺铂所致豚鼠耳毒性的保护作用。**方法** 将健康豚鼠 24 只分为正常对照组、DHA 加顺铂组、顺铂组, DHA 加顺铂组连续给予植物油稀释后的 DHA 灌胃,  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 共 30 d。在灌胃 22 d 时, 开始生理盐水稀释后的  $0.25 \text{ mg/mL}$  的顺铂溶液腹腔注射, 连续 9 d, 正常对照组和顺铂组只给予相同剂量植物油灌胃。**结果** 顺铂造模后, 顺铂组和 DHA 加顺铂组 ABR 阈值明显高于正常对照组, DHA 加顺铂组明显低于顺铂组。DHA 加顺铂组外毛细胞残存数明显高于顺铂组, 组织形态优于顺铂组, 螺旋神经节细胞形态顺铂组差于 DHA 加顺铂组。**结论** DHA 灌胃给药对临床顺铂化疗耳毒性并发症有一定的保护作用。

**[关键词]** 顺铂; 二十二碳六烯酸(DHA); 耳毒性**[中图分类号]** R764.43**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)09-1171-03**Hearing damage and DHA protection on cochlea cell after cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs\***Guo Wenjie<sup>1</sup>, Chen Yan<sup>2</sup>, Wang Yueqi<sup>1</sup>, Cai Peiling<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy, Medical and Nursing College of Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Department of Endocrine, the Second Affiliated Hospital of Sichuan University, Chengdu 610000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protection of DHA on the cisplatin cochlear injured modal animals, and to explore the effect mechanism of DHA. **Methods** The animals were grouped randomly: control group, DHA-treated group, and cisplatin group. DHA-treated group at the doses of  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Control group and cisplatin group just treated vegetable oil at same doses, all group's treatment were lasting 30 day. Cisplatin intraperitoneal injection doses of  $0.25 \text{ mg/mL}$ , lasting 9 day, begin with after DHA-treated 22 day. The intraperitoneal injections just do to DHA + cisplatin group and cisplatin group. Control group given in normal saline only. ABR was detected before the injection and after. Count the number of hair cells of cochlea after injection 9 day and detected the spiral ganglion of cochlea. **Results** After treatment, ABR threshold of DHA-treated group was lower than that of the cisplatin group ( $P < 0.05$ ). DHA-treated group hair cell survival rate was significantly higher than that of cisplatin group ( $P < 0.05$ ). The spiral ganglion cells (SGCs) were severely damaged of cisplatin group than DHA-treated group. **Conclusion** DHA intake may protect the cochlear from antioxidant injury of experiment animals; these results may contribute to the treatments of cisplatin caused deafness in clinic.

**[Key words]** cisplatin; docosahexenoic acid(DHA); ototoxicity

顺铂具有肾毒性、耳毒性、神经毒性和骨髓抑制等多种不良反应<sup>[1]</sup>, 尤其易造成神经性耳聋, 使用顺铂进行化疗的患者 75%~100% 会发生不同程度的听力损失<sup>[2]</sup>, 因而限制了其临床抗肿瘤的广泛使用。研究显示顺铂造成的耳毒性与过量的氧自由基有关<sup>[3]</sup>, 可诱导耳蜗细胞凋亡<sup>[4]</sup>, 主要在 Corti 器、螺旋神经节、血管纹<sup>[5]</sup>。目前, 顺铂耳毒性防治主要使用抗氧化剂<sup>[6]</sup>、抗凋亡剂进行治疗<sup>[7]</sup>。二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是 n-3 系列多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acids, n-3 PUFA), 具有抗炎、抗氧化作用<sup>[8]</sup>, 抑制血栓形成、降低血黏度等作用<sup>[9]</sup>。基于顺铂的临床耳毒性、动物实验毒理及 DHA 在细胞抗氧化、抗炎、改善血液流变学等方面的研究证据, 本实验以豚鼠为实验动物, 观察 DHA 灌胃给药对顺铂所致耳蜗损伤的干预作用, 为顺铂化疗并发症的临床防治提供基础研究参考。

**1 材料与方**

**1.1 材料与试剂** 健康豚鼠 24 只(成都达硕生物科技有限公司提供), 体质量 250~350 g, 均为雄性, 检查均耳廓反应灵敏,

外耳道无炎症异物。ABR 检测仪(BQ603EP15 公司, 丹麦)。光学显微镜(奥林巴斯 BX53, 日本), 切片机(Leica RM2245), 解剖显微镜(舜宇 ST-60 20X-40X)。顺铂(江苏豪森药业), 75% DHA(山东荣成百合生物技术公司), 硝酸银(重庆川东化工有限公司)。

**1.2 方法**

**1.2.1 实验动物处理** 动物适应性喂养 5 d 后进行实验, 随机分为正常对照组( $n=8$ )、顺铂加 DHA 组( $n=8$ )、顺铂组( $n=8$ )。顺铂加 DHA 组给予玉米油稀释的 DHA,  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 灌胃体积  $2 \text{ mL/kg}$ , 正常对照组、顺铂组给予等体积玉米油灌胃, 均持续 30 d。顺铂用生理盐水配制成  $0.25 \text{ mg/mL}$  溶液, 除正常对照组外均腹部注射顺铂溶液  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 于 DHA 灌胃 22 d 时开始, 每日 1 次, 每日定时灌胃, 腹腔注射延后 3 min, 持续 8 d。常规饮食, 避免其他听力损伤因素的干扰。顺铂注射前 1 d 与第 9 天各组分行脑干诱发电位(ABR)阈值双耳检测。随后处死取右侧耳蜗基底膜行染色铺片, 左侧耳蜗行耳蜗纵轴石蜡切片 HE 染色。共 48 只耳蜗,

各 24 只分别行耳蜗铺片毛细胞残余计数和耳蜗组织学切片, 正常对照组 8 只, 模型组 8 只, 干预组 8 只。

**1.2.2 ABR 检测** 开始用药前 1 d 和开始用药后第 9 天分别测试 ABR 阈值, 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 体质量腹部注射麻醉。受试动物颅顶正中皮下为正极, 给声侧耳廓后下为负极, 接地电极于对侧耳廓后下。发出 2 000 Hz 为主的短声刺激信号, 间隔 90 ms, 带通滤波 50~3 000 Hz, 叠加 200 次, 扫描时程 20 ms。声刺激强度从 95 dB SPL 开始, 以 5 dB 逐次递减, 观察 P3 波以判定两侧耳的 ABR 阈值。

**1.2.3 耳蜗组织切片及耳蜗铺片** 开始用药后第 9 天处死动物, 取双侧听泡。左侧听泡石蜡切片制备, 于蜗尖钻孔后灌注 10% 甲醛溶液 0.5~1.0 mL 并同种固定液中 4 ℃ 过夜。10% EDTA 脱钙 1 周后, 常规石蜡包埋, 平行蜗轴方向连续切片, 切片厚度约 6 μm。行苏木精-伊红 (HE) 染色, 封片, 400 倍光学显微镜下观察螺旋神经节形态学情况, 摄片。目镜加网格片, 在 400 倍光学显微镜下直接计数蜗螺旋管中有核神经节细胞数, 从底回至顶回取 7 段, 分别计数后相加取均值, 即为每张切片每高倍视野均值计数, 每只耳蜗连续计数 5 张中轴切片, 再取其均值即为样品每高倍计数均值。右侧听泡打开, 蜗尖钻孔, 开放卵圆窗和圆窗。蜗尖 0.5% 硝酸银溶液 2~3 次, 确保从蜗窗处流出, 25 mL/L 戊二醛同法灌入固定后自然光下曝光 2~3 h, 取基底膜, 分段平铺, 甘油封片。400 倍光学显微镜下观察毛细胞组织结构及计数, 毛细胞计数逐级从底回段到顶回段基底膜, 毛细胞计数输入计算机进行统计处理。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析处理,

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 配对 *t* 检验前后比较推断造模是否成功, 组间比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

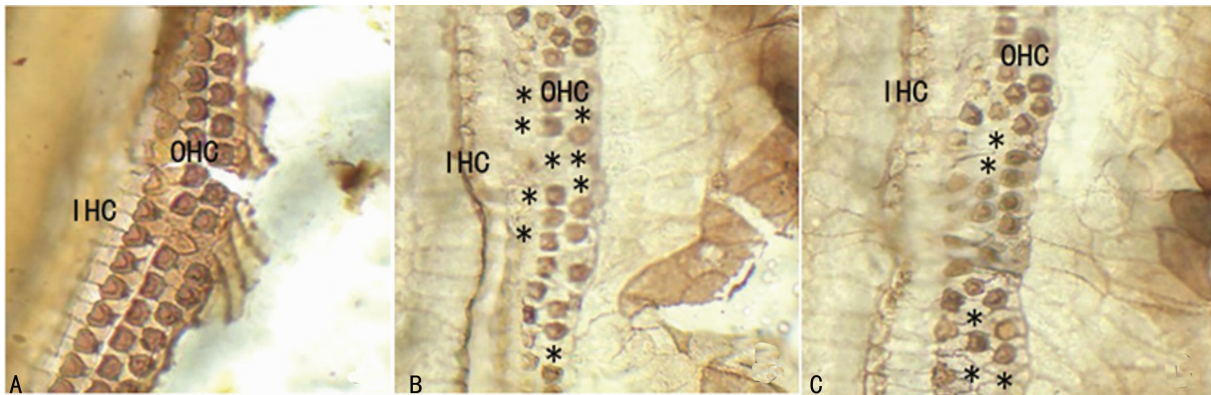
**2.1 ABR 阈值测试结果** 顺铂组 ABR 阈值明显较正常对照组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示造模成功; 顺铂加 DHA 组 ABR 阈值明显低于顺铂组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 顺铂加 DHA 组与顺铂组给药后 ABR 阈值明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 3 组实验动物耳蜗实验前、后 ABR 检测比较 ( $n=16, \bar{x} \pm s$ )

组别	ABR 阈值 (dB SPL)	
	顺铂给药前 1 d	顺铂给药后第 9 天
正常对照组	21.80 ± 3.42	21.200 ± 1.427
顺铂加 DHA 组	20.58 ± 3.39	39.634 ± 3.122*△
顺铂组	22.32 ± 3.16	47.690 ± 5.34*▲

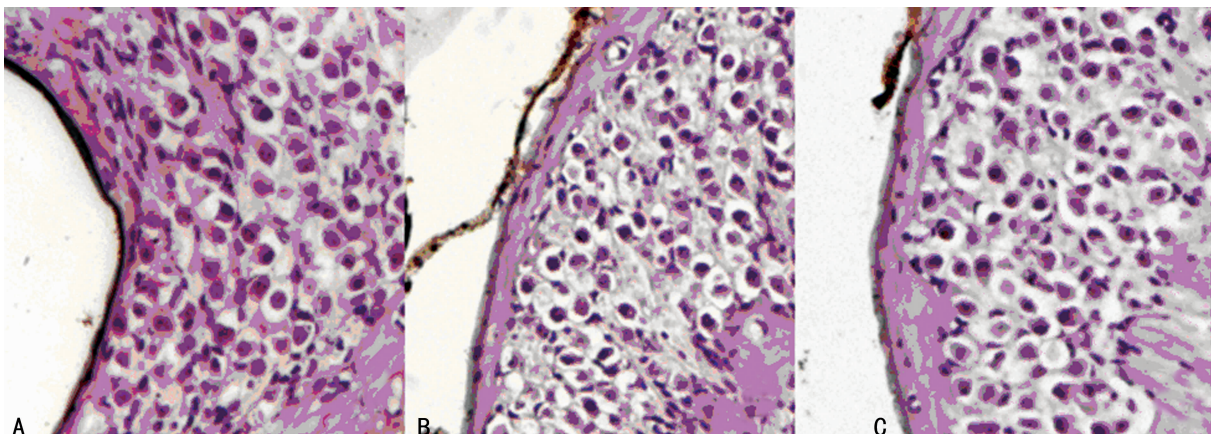
△:  $P < 0.05$ , 与顺铂组比较; \* :  $P < 0.05$ , 与同组给药前 1 d 比较; ▲ :  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较。

**2.2 耳蜗铺片形态学观察** 耳蜗硝酸银染色第二转基底膜铺片, 显示顺铂组外毛细胞数明显较正常对照组下降, 细胞排列紊乱, 提示造模成功; 顺铂加 DHA 组毛细胞数高于顺铂组, 细胞排列相对整齐, 见图 1。



A: 正常对照组; B: 顺铂组; C: 顺铂加 DHA 组; \* : 外毛细胞缺失部位。

图 1 各组耳蜗铺片及毛细胞形态学观察 (硝酸银染色, ×400)



A: 正常对照组; B: 顺铂组; C: 顺铂加 DHA 组。

图 2 螺旋神经节组织切片 (HE, ×400)

**2.3 耳蜗外毛细胞残存率比较** 外毛细胞残存计数顺铂组较正常对照组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。顺铂加 DHA 组外毛细胞残存计数高于顺铂组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**表 2 各实验组豚鼠耳蜗外毛细胞残存计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	耳数 ( $n$ )	毛细胞计数
正常对照组	8	1 042.650 ± 33.690
顺铂加 DHA 组	8	725.029 ± 116.640*▲
顺铂组	8	576.560 ± 153.100*

\*:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; ▲:  $P < 0.05$ , 与顺铂组比较。

**2.4 耳蜗组织切片观察** 耳蜗螺旋神经节组织切片观察 正常对照组未见明显异常; 顺铂组螺旋神经节细胞数目减少, 细胞退变明显, 胞核变小; 顺铂加 DHA 组螺旋神经节细胞轻度退变, 细胞核大小基本同正常对照组, 见图 2。

**2.5 螺旋神经节细胞变化数量比较** 顺铂组和顺铂加 DHA 组耳蜗中轴神经节细胞变化数量比较, 顺铂组与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。顺铂加 DHA 组螺旋神经节有核细胞变化数量高于顺铂组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**表 3 神经节细胞变化数量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	耳数 ( $n$ )	神经节细胞变化数
正常对照组	8	51.970 ± 3.840
顺铂加 DHA 组	8	44.660 ± 1.870*▲
顺铂组	8	41.083 ± 2.960*

\*:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; ▲:  $P < 0.05$ , 与顺铂组比较。

### 3 讨论

顺铂化学名为顺二氨二氯络铂, 为铂的金属络合物, 为目前临床常见、应用广泛的抗肿瘤药物之一, 但其耳肾毒性却是临床此类药物使用中最棘手的问题, 给患者生存质量带来了严重威胁, 并严重限制了此类药物的广泛使用。动物研究发现顺铂可通过耗竭耳蜗内的谷胱甘肽和抗氧化酶<sup>[10]</sup>, 经过多氧自由基的损伤作用产生耳毒性<sup>[9,11]</sup>, 顺铂还可以引发细胞凋亡<sup>[12]</sup>, 降低耳蜗血流, 导致内耳缺血, 并致螺旋神经节损伤改变, 进而导致听力丧失<sup>[13]</sup>。耳毒性成为顺铂最严重的不良反应之一。目前, 防治顺铂耳毒性的药物主要为抗氧化维生素和神经营养物质, 以及一些中医传统药物, 疗效和安全性并不明确。基于顺铂耳毒性机理的多样性, 目前并无单一靶向的药物来防治其耳毒性, 因此, 探寻新的防治顺铂耳毒性的新药物将成为必然。DHA 是属于不饱和脂肪酸一类而大量存在于体内的物质, 成为内生性的抗氧化剂之一, 发现外源性 DHA 摄入会显著提高实验动物脑内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平, 降低丙二醛(MDA)水平<sup>[14]</sup>。而且 DHA 还可以通过降低血脂和抑制血小板降低血液黏稠度, 进而改善器官微循环。目前, 通过细胞保护, 增加器官血供, 改善血液流变学参数, 保护内耳过氧化损伤成为神经性听力损伤的主要防治方法。基于顺铂耳毒性机理及 DHA 的已有研究证据, 本实验通过顺铂耳蜗损伤动物模型, 观察 DHA 摄入对顺铂所致耳蜗损伤的保护效果。结果显示, 顺铂加 DHA 组的 ABR 阈值明显低于顺铂组, 耳蜗 Corti 器基底膜的组织形态学改变也明显轻于顺铂组, 耳蜗外毛细胞残存数也高于顺铂组, 耳蜗螺旋神经节细胞形态学改变优于顺

铂组, 细胞残存率数于顺铂组。提示外源性 DHA 摄入对顺铂所致的豚鼠耳蜗损伤有一定的保护作用, 可改善顺铂所致的耳蜗形态学改变, 可能对临床顺铂耳毒性的防治有一定的意义。本实验中 DHA 对顺铂耳毒性的影响可能是通过其对实验动物全身及耳蜗局部自由基代谢的影响, 增强了机体的抗自由基的能力, 从而降低了顺铂所致过多自由基对耳蜗毛细胞和螺旋神经节的损伤, 并通过降低血液黏稠度, 改善血液流变学参数, 增加耳蜗血流及降低炎症反应等产生综合保护性作用。DHA 的作用可能类似一些天然抗氧化中药, 具有广泛的间接或直接性作用, 但 DHA 对耳蜗的保护作用是否存在器官特异性的直接作用还需进一步深入研究。从本实验研究结果可推测 DHA 可能对临床顺铂等抗肿瘤药物的耳毒性防治有一定的意义, 其作用机制和量效控制还需进一步深入的探讨。

### 参考文献

- [1] McAlpine D, Johnstone BM. The ototoxic mechanism of cisplatin[J]. *Hear Res*, 1990, 47(3): 191-203.
- [2] Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, et al. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention[J]. *Hear Res*, 2007, 226(1/2): 157-167.
- [3] Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, et al. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin[J]. *Pharmacogenomics J*, 2008, 8(1): 23-28.
- [4] Tabuchi K, Nishimura B, Nakamagoe M, et al. Ototoxicity: mechanisms of cochlear impairment and its prevention[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(31): 4866-4871.
- [5] Alam SA, Ikeda K, Oshima T, et al. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlear[J]. *Hear Res*, 2000, 141(1/2): 28-31.
- [6] Teranishi M, Nakashima T, Wakabayashi T. Effects of alphatocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs[J]. *Hear Res*, 2001, 151(1/2): 61-65.
- [7] Wang J, Ladrech S, Pujol R, et al. Caspase inhibitors, but-notc-JunNH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 9217-9224.
- [8] Takayama F, Nakamoto K, Totani N, et al. Effects of docosahexaenoic acid in an experimental rat model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Oleo Sci*, 2010, 59(8): 407-414.
- [9] Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance[J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(3): 455-463.
- [10] Watanabe K, Hess A, Michel O, et al. Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin treated cochlear of guinea pigs[J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(9): 731-738.
- [11] Ramirez-Camacho R, Citores MJ, Trinidad A, et al. HSP70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(6): 564-567.
- [12] Watanabe K, Jinnouchi K, Yagi T. Detection of single stranded DNA (SSDNA) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatinum(CDDP)[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A): 35.

乳腺癌中 BRCA1 基因的突变非常罕见,但有研究发现在散发性乳腺癌中 BRCA1 mRNA 和蛋白表达水平的下降或缺失。这些结果表明,有突变之外的其他机制参与了散发性乳腺癌中 BRCA1 基因在转录水平和(或)转录后水平的抑制。

近年来研究发现 DNA 启动子甲基化模式的改变,尤其是某些抑癌基因局部甲基化水平的异常增高,在肿瘤的发生和发展的过程中起到了不容忽视的作用<sup>[9]</sup>。启动子异常甲基化是肿瘤发生的早期事件,主要发生在启动子 CpG 岛内 5'-端胞嘧啶碱基上,这些位点在正常情况下处于未甲基化状态。发生异常甲基化往往会改变基因的表达模式,导致抑癌基因的转录抑制或沉默,失活的抑癌基因不能负调控细胞周期增殖,从而导致细胞恶性改变<sup>[10]</sup>。P16、NOEY2、TIMP3、RASSF1A 等基因是目前已经得到证实的发生 DNA 甲基化的乳腺癌相关基因<sup>[11-13]</sup>。

乳腺癌易感基因 BRCA1 启动子甲基化近年来在散发性乳腺癌中也受到广泛关注。Rice 等<sup>[14]</sup>检测 6 个散发性乳腺癌细胞系的 BRCA1 启动子的甲基化水平及 mRNA 表达水平,发现有 1 个细胞系的 BRCA1 的 CpG 位点 60% 以上发生甲基化,其 mRNA 表达水平仅为正常乳腺上皮细胞水平的 1/8。其他 5 个细胞系的 BRCA1 mRNA 表达也有不同程度的下降,但均未检测到甲基化。说明 BRCA1 mRNA 的表达水平与乳腺癌发生有关,mRNA 表达水平可能受启动子甲基化水平调控。本研究检测了 60 例散发性乳腺癌组织、与之配对癌旁组织以及 30 例乳腺良性病变组织中 BRCA1 基因表达水平及启动子甲基化情况。结果显示 BRCA1 mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中表达水平明显低于癌旁组织及乳腺良性病变组织。这表明乳腺癌中 BRCA1 基因在转录水平发生了下调。根据亚硫酸盐测序结果显示 BRCA1 启动子在部分乳腺癌组织中发生了甲基化,而癌旁正常乳腺组织和乳腺良性病变组织中均未发生甲基化。进一步分析发现,在乳腺癌组织中 BRCA1 蛋白的表达与其启动子 CpG 岛甲基化状态呈负相关。发生启动子甲基化的 BRCA1 蛋白在乳腺癌组织中多为阴性表达,而未发生启动子甲基化的 BRCA1 蛋白多呈阳性表达。因此,推测在散发性乳腺癌中,BRCA1 基因启动子的甲基化是导致其表达显著下调的主要机制。

#### 参考文献

- [1] Zakhartseva LM, Gorovenko NG, Podolskaya SV, et al. Breast cancer immunohistochemical features in young women with BRCA 1/2 mutations[J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(3):174-178.
- [2] King MC, Marks JH, Mandell JB, et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2[J]. *Science*, 2003, 302(5645):643-646.
- [3] Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, et al. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of a known clinical significance [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4):2019-2027.
- [4] Bonatti F, Pepe C, Tancredi M, et al. RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 170(2):93-101.
- [5] 任婕,魏敏杰,金峰,等.散发性乳腺癌中影响 BRCA1 蛋白失表达的参数分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(2):99-103.
- [6] De Siervi A, De Luca P, Byun JS, et al. Transcriptional autoregulation by BRCA1[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):532-542.
- [7] Morris JR, Boutell C, Keppler M, et al. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress[J]. *Nature*, 2009, 462(7275):886-890.
- [8] Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22 Suppl 1:i11-7.
- [9] Fulan D, Sahnane N, Bernasconi B, et al. APC alterations are frequently involved in the pathogenesis of acinar cell carcinoma of the pancreas, mainly through gene loss and promoter hypermethylation[J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(5):553-564.
- [10] Fiolka R, Zubor P, Janusicova V, et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes RASSF1A, GSTP1 and CDH1 in endometrial cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6):2878-2886.
- [11] Lee JJ, Ko E, Cho J, et al. Methylation and Immunoeexpression of p16(INK4a) Tumor Suppressor Gene in Primary Breast Cancer Tissue and Their Quantitative p16(INK4a) Hypermethylation in Plasma by Real-Time PCR [J]. *Korean J Pathol*, 2012, 46(6):554-561.
- [12] Yu Y, Luo R, Lu Z, et al. Biochemistry and biology of ARHI(DIRAS3), an imprinted tumor suppressor gene whose expression is lost in ovarian and breast cancers [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 407:455-468.
- [13] Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I, et al. RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(3):297-304.
- [14] Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, et al. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(9):1761-1767.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-15)

(上接第 1173 页)

- [13] 黄世勇,陶泽璋,肖伯奎.连翘酯苷对顺铂耳毒性防护作用的实验研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(2):152-156.
- [14] 蒋利和,马博,谢正轶.二十二碳六烯酸对老年大鼠脑组

织抗氧化和脂肪酸的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(13):284-287.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-10)