

姜黄素诱导鼻咽癌 NCE 细胞凋亡 机制的研究

杨甫文 黄金中 林晓岚 甄泽年 陈贤明

【摘要】 目的 探讨姜黄素诱导人鼻咽癌 NCE 细胞凋亡的分子机制。方法 通过吖啶橙-溴化乙锭复合染色、原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶分析法检测、电镜和 DNA 片段化分析法分析姜黄素对 NCE 细胞凋亡的影响,并应用流式细胞术、Western Blot、RT-PCR 方法探讨姜黄素对细胞线粒体膜电位、半胱氨酸蛋白酶-3 (cysteine proteases-3, caspase-3) 酶活性、胞质 CytC、Fas mRNA 及蛋白表达的影响。结果 终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素可诱导 NCE 细胞凋亡;与姜黄素共孵育 12、24、48 h,凋亡细胞的阳性率分别为 25.6%、40.3%、54.5%。姜黄素处理后 NCE 细胞线粒体膜电位下降,12、24、48 h 的线粒体膜电位下降的阳性率分别是 26.8%、42.3%、68.2%。caspase-3 酶活性增强,12、24、48 h 表达 caspase-3 酶活性细胞的阳性率分别是 80.5%、100%、100%。胞质 CytC 含量显著增强,Fas mRNA 及蛋白表达水平上升,Fas 蛋白阳性率由 33.6% 上升到 89.9%。结论 姜黄素可能通过线粒体途径与死亡受体途径诱导鼻咽癌 NCE 细胞凋亡。

【关键词】 姜黄素; 鼻咽肿瘤; 病理学; 脱噬作用

Apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cell line NCE induced by curcumin and its molecular mechanism YANG Fu-wen*, HUANG Jin-zhong, LIN Xiao-lan, ZHEN Ze-nian, CHEN Xian-ming.
* Department of Otorhinolaryngology, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: YANG Fu-wen, Email: puwenyang@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism underlying the curcumin-induced apoptosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line NCE cells. **Methods** The characteristics of apoptosis were identified by observation acridine orange and ethidium bromide stains, ultrastructure assay, DNA fragmentation assay and TdT-mediated dUTP nick end labeling method (TUNEL). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$), activity of caspase-3, cytosol cytochrome C and expression of gene Fas were determined by flow cytometry (FCM), Western Blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Several evidences of apoptosis were obtained from curcumin-treated NCE cells by acridine orange and ethidium bromide stains, ultrastructure identification, DNA fragmentation assay and TUNEL staining. And the mean TUNEL-positive rates increased significantly at the 3 different time points (12 h, 24 h and 48 h; 25.6%, 40.3% and 54.5%, respectively). In the curcumin-treated-groups, $\Delta\psi\text{m}$ altered significantly and the positive rates increased in a time-dependent manner. At the 3 different time points, the mean positive rates were 26.8%, 42.3% and 68.2%, respectively. When caspase-3 activity was detected, 80.5% cells presented proteases activities after 12 h incubation with curcumin. Western Blot analysis showed that cytoplasmic cytochrome C increased significantly after incubation with curcumin. Flow cytometry and RT-PCR analysis showed that curcumin could up-regulate the Fas expression in time-depended manner, the positive rates of Fas protein increased from 33.6% to 89.9%. **Conclusions** Curcumin induced apoptosis of NCE cells both through mitochondria-dependent pathway and death receptor pathway.

【Key words】 Curcumin; Nasopharyngeal neoplasms; Pathology; Apoptosis

姜黄素 (curcumin, Cur) 是从中药姜黄的根茎中

提取出来的一种脂溶性酚类色素,是一种天然的食品添加剂,具有抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、抗 HIV 病毒等多种药理作用。研究表明,姜黄素能抑制体内外多种肿瘤细胞的生长,如对白血病 HL-60 细胞、K562 细胞、胃癌 SGC-7901 细胞、MGC803 细胞、肝癌 Bel-7402 细胞等多种肿瘤细胞

作者单位:510280 广州,南方医科大学珠江医院耳鼻咽喉科中心[杨甫文(现在南京军区福州总医院耳鼻咽喉科,邮政编码:350025)、黄金中];福建医科大学检验系(林晓岚);南京军区福州总医院耳鼻咽喉科(甄泽年、陈贤明)

通讯作者:杨甫文,Email: puwenyang@163.com

具有明显的抑制作用^[1,2],由于其具有无毒、无副作用等特点,作为天然的抗肿瘤药而成为研究热点^[3,4],美国国立癌症所已将其列为第 3 代癌化学预防药^[5]。姜黄素在肿瘤发展的不同阶段,都有显著的抗肿瘤作用,其中抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡是其主要抗肿瘤机制^[6]。姜黄素可诱导低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 凋亡^[7],但诱导凋亡的机制还未阐明。现报道我们在 2003 年 3 月至 2005 年 6 月期间研究其诱导鼻咽癌 NCE 细胞凋亡作用机制的结果。

材料与方 法

一、药品与试剂

姜黄素购自上海第三试剂厂(批号 980825),纯度为 99%,吖啶橙(acridine orange, AO;美国 Fluka 公司),溴化乙锭(ethidium bromide, EB;华美公司),RPMI 1640 培养液(美国 GIBCO 公司),胎牛血清(杭州四季青生物制品研究所)。

二、细胞株及 NCE 细胞培养

鼻咽癌 NCE 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所(国际认证细胞系编号:TCHu13)。培养条件:含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 37℃,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。采集 70%~80% 融合、处于对数生长期、存活细胞百分率(台盼蓝拒染法)>95% 的细胞,以备实验。NCE 细胞与终浓度为 100 μmol/L 姜黄素共同孵育;对照组 NCE 细胞与等量溶剂共同孵育。分别于 12、24 与 48 h 取 1 组细胞检测凋亡指标。

三、细胞凋亡的检测

1. 荧光显微镜下观察凋亡细胞^[8]:将细胞行 AO-EB 染色,在 490 nm 激发波长的荧光显微镜(德国 Leica 公司)下观察,胞核及胞质呈均匀黄绿色荧光者为正常细胞;胞核或胞质呈致密浓染或碎片黄绿色荧光者为凋亡细胞;胞核呈红色荧光者为坏死细胞。

2. TUNEL 计数细胞凋亡阳性率:采用 DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System 盒(美国 Promega 公司),按试剂盒说明书操作。细胞核呈棕黄色颗粒者为凋亡细胞,人工选择细胞分布比较均匀部位,油镜视野下连续分类 1000 个细胞,计算阳性率。

3. 细胞透射电镜超微结构观察:日立 HU-12A 型透射电镜观察细胞的超微结构。

4. DNA 片段化检测细胞凋亡:操作参考

文献[9]。

四、检测对 NCE 细胞线粒体膜电位与半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine proteases-3, caspase-3)酶活性

1. 细胞线粒体膜电位检测:采用线粒体凋亡试剂盒 MitoCapture™(美国 Biovision 公司),按试剂盒说明书操作。检测的原理是:阳离子染料 MitoCapture™ 在健康细胞与凋亡细胞中发出不同的荧光。在健康细胞中, MitoCapture™ 蓄积在线粒体中形成聚合物,发出红色荧光;在凋亡细胞中,由于线粒体膜电位的改变, MitoCapture™ 无法在线粒体中形成聚合物,以单体形式存在于胞质,发出绿色荧光。所以细胞中出现绿色荧光者表示发生线粒体膜电位改变。

2. caspase-3 酶活性检测:采用活性 caspase-3 荧光标记染色试剂盒 CaspGLOW™(美国 Biovision 公司),按试剂盒说明书操作。检测的原理是: FITC 标记 caspase-3 抑制剂 DEVD-FMK (FITC-DEVD-FMK), FITC-DEVD-FMK 是细胞通透性的、无细胞毒的,可以不可逆地与凋亡细胞的活性 caspase-3 酶结合。FITC 标记染色的活性 caspase-3 可直接在流式细胞仪上分析,细胞中出现绿色荧光者为表达活性 caspase-3。

五、Western Blot 检测胞质 CytC 蛋白^[10]

聚丙烯酰胺凝胶为 5% 浓缩胶,12% 分离胶。显色按 Protein Detector™ LumiGLO Western Blot Kit(美国 KPL 公司)说明书进行操作。CytC 单克隆抗体(相对分子质量 15 000)与 β-actin 单克隆抗体(相对分子质量 43 000)购自美国 NEOMARKERS 公司。SDS-PAGE 次高分子量标准蛋白质购自上海西巴斯生物技术有限公司。

六、检测姜黄素对 NCE 细胞 Fas 基因表达的影响

1. RT-PCR 检测姜黄素对 NCE 细胞 Fas mRNA 表达的影响:收集上述各种细胞,采用 TRIZOL(美国 Life Technology 公司)提取总 RNA。用紫外分光光度计(DU640 型,美国 BEKMAN 公司)准确定量,要求 A₂₆₀:A₂₈₀ > 1.8,取 1 μg 加适量溴酚蓝在含 EB (0.5 μg/ml)的 1% 琼脂糖凝胶上点样,5 V/cm 电压下电泳 30 min,紫外光下显示明亮清晰的 18 s 与 28 s 两条 rRNA 带,说明提取的 RNA 完整。按逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)说明书进行。PCR 参考文献[11],反应体系如下:cDNA 2.0 μL, dNTPs 0.2 mmol/L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, 上下游引物各 25 pmol, TaqDNA 聚合酶(美国 Promega

公司)1 U, 去离子水(ddH₂O)加至 25 μL, 置 DNA 扩增仪(2400 型, 美国 PE 公司)进行扩增。所用引物为能扩增目的基因的特异性片段, 同时选用 β-actin 的 mRNA 扩增为内参照。β-actin 引物序列为上游引物: 5'-GGCATGGCTCAGAAGGATTCC-3', 下游引物: 5'-ATGTCACGCAGGATTTCCCG-3', 扩增片段长度为 500 bp, 退火温度为 54℃。Fas 引物序列为上游引物: 5'-GACTGACATCAACTCCAAG-3', 下游引物 5'-TGTTGCTGGTGAGTGTG-3', 扩增片段长度为 309 bp, 退火温度为 50℃。制备含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶, 取 10 μL 反应产物加适量溴酚蓝点样电泳 10 min, 凝胶图像分析仪(Gel Doc1000 型, 美国 Bio-Rad 公司)分析, 比较各组扩增产物荧光强度。PCR 扩增的有关参数如下: 94℃ 变性 5 min 后进入下列循环: 94℃ 30 s, 退火温度 40 s, 72℃ 50 s 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

2. 流式细胞仪检测姜黄素对 NCE 细胞 Fas 蛋白表达的影响: 收集细胞用 PBS 洗涤后, 与小鼠抗人 Fas 单抗(美国 COULTER 公司)共同孵育后, 再和 FITC 标记兔抗小鼠二抗(美国 COULTER 公司)孵育。Fas 蛋白就被 FITC 标记, 因此在流式细胞仪上可以检测 Fas 蛋白表达。出现绿色荧光的细胞为 Fas 蛋白表达者。

结 果

一、姜黄素诱导 NCE 细胞凋亡

1. AO-EB 复合染色结果: 对照组细胞大小、形态较均一, 胞核及胞质呈均匀黄绿色荧光; 姜黄素处理后的前 12 h, 细胞形态均无明显改变; 12 h 后, 细胞形态开始变化; 随着时间延长, 细胞大小、形态的不均一性逐渐明显; 胞核呈致密浓染或碎片黄绿色荧光者, 即凋亡细胞逐渐增加; 同时出现胞核呈致密浓染或碎片红色荧光者, 即凋亡晚期的坏死细胞。

2. 凋亡细胞阳性率: TUNEL 检测, 在任何时间

段对照组均未见或仅偶见阳性细胞。实验组 12、24、48 h 时间段的凋亡细胞阳性率分别为 25.6%、40.3%、54.5%。

3. 细胞透射电镜超微结构观察: 对照组细胞体积较大, 呈圆形, 核质比例大, 常染色质丰富, 可见核仁, 细胞器正常。姜黄素处理后, 出现凋亡细胞, 核内染色质集中于核膜下为早期凋亡细胞; 凋亡细胞中可见无核的凋亡小体(图 1)。

4. DNA 片段化检测细胞凋亡: 在任何时间段, 对照组均未出现 DNA 降解现象, 而实验组均有凋亡特征的 DNA 改变, 即呈典型的 DNA 降解“梯状”条带片段(图 2)。

二、姜黄素对细胞线粒体膜电位与 caspase-3 酶活性的影响

在任何时间段, 对照组细胞线粒体膜电位的阳性率均 ≤ 1.0%, caspase-3 酶活性的阳性率均 < 1.0%, 而实验组的阳性率均明显提高。姜黄素作用 12 h、24 h、48 h 后, NCE 细胞线粒体膜电位的阳性率分别为 26.8%、42.3%、68.2%; caspase-3 酶活性的阳性率分别为 80.5%、100%、100%。

三、Western Blot 检测姜黄素对胞质 CytC 蛋白表达的影响

姜黄素作用后, 胞质 CytC 蛋白表达逐渐增强, 48 h 达到峰值, 见图 3。

四、姜黄素对 Fas mRNA 及蛋白表达的影响

姜黄素作用后, 流式细胞仪检测 Fas 蛋白表达逐渐增强, 对照组阳性率为 33.6%, 处理后 48 h 阳性率达到 89.9%。

姜黄素处理组 NCE 细胞 Fas mRNA 表达较对照组增强, 并随作用时间的延长表达上调, 见图 4。

讨 论

诱导肿瘤细胞凋亡是许多抗癌成分十分重要的抗癌机制之一^[12]。通过诱导或促进肿瘤细胞凋亡

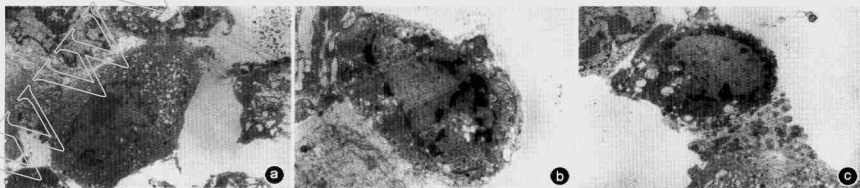
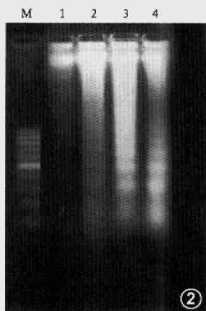
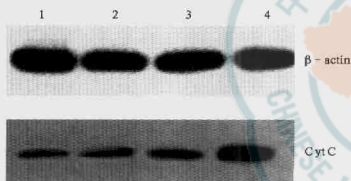


图 1 透射电镜下鼻咽癌细胞超微结构特征。a: 对照组细胞 ×4800; b 与 c 为姜黄素处理后出现的凋亡细胞, b: 核内染色质集中于核膜下 ×7000; c: 凋亡细胞边缘可见无核的凋亡小体 ×7000



1: 对照组; 2: 姜黄素处理 12 h; 3: 姜黄素处理 24 h; 4: 姜黄素处理 48 h; M: PUC 8 Mix 标记物

图 2 NCE 细胞 DNA 电泳结果。姜黄素处理后出现典型的 DNA 降解“梯状”条带片段。

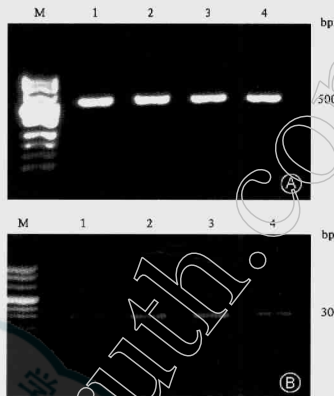


1: 对照组; 2: 姜黄素处理 12 h; 3: 姜黄素处理 24 h; 4: 姜黄素处理 48 h

图 3 Western Blot 检测姜黄素对胞质 Cyt c 蛋白表达的影响。姜黄素作用后, 胞质 Cyt c 蛋白表达逐渐增强。

正成为肿瘤防治的新思路。研究表明姜黄素诱导肿瘤细胞发生凋亡和抑制增殖比其对正常细胞的作用更为有效^[13-15]。我们从 AO-EB 复合染色、TUNEL 检测、透射电镜、DNA 片段化检测 4 个不同层面证实姜黄素可以诱导鼻咽癌细胞凋亡, 并在 48 h 呈时间依赖性。

姜黄素抗诱变抗癌作用机制复杂^[16]。某些细胞毒物作用于肿瘤细胞, 通过活化 caspase 而促其凋亡, 目前多种化疗药物正是通过活化 caspase 系统诱导凋亡的^[17]。姜黄素如何发挥细胞毒作用? 近年来, 国内外许多学者都对姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡进行了研究, 郑丽端等^[18] 研究表明, 姜黄素能显著抑制卵巢癌细胞的体外生长, 上调 caspase-3、下调 NF- κ B 蛋白表达。赵敬等^[19] 发现姜黄素使 Bcl-2、Bcl-XL 等凋亡调控蛋白表达下调, caspase-3 的表达增强, 由此促进宫颈癌细胞凋亡。黄冬生



A 为 β -actin, B 为 Fas。1: 对照组; 2: 姜黄素处理 12 h; 3: 姜黄素处理 24 h; 4: 姜黄素处理 48 h; M: PUC 8 Mix Marker

图 4 RT-PCR 检测姜黄素对 Fas mRNA 表达的影响

等^[20] 发现姜黄素诱导肺癌细胞凋亡时, cAMP 浓度升高, caspase-8 表达增高, 可能是姜黄素诱导凋亡的主要机制之一。Bush 等^[21] 发现姜黄素可激活 caspase-8、caspase-3, 通过 caspase-8、caspase-3 激活 Bcl-2 家族促凋亡基因裂解, 细胞色素 C 释放的线粒体途径来诱导凋亡。可见 caspase-3、8 的激活在姜黄素诱导凋亡中发挥重要作用。

凋亡与细胞增殖、分化一样, 是维持生物体平衡的重要调控机制。细胞凋亡受到胞内、外多种信号系统的诱导和细胞内多种基因级联反应的调控, 促凋亡和抗凋亡因子可作用于凋亡级联反应的不同环节。一些促凋亡因子引起线粒体释放“凋亡原”样物质, 如细胞色素 C 和 CPP32 蛋白水解酶类物质等, caspases 的激活依赖细胞色素 C 释放; 而一旦依赖于 caspases 的细胞水解过程被激活和启动, 细胞凋亡将不可逆转。目前较为明确的凋亡信号转导途径主要有两条: 一条是线粒体途径, 在射线、氧化剂、高浓度 Ca^{2+} 及 Bax 等作用下, 早期即出现线粒体通透性改变, 线粒体膜电位降低, 细胞色素 C 及凋亡诱导因子释放, 引发 caspase-9 及下游 caspase 级联反应。另一条是膜死亡受体 Fas、TNFR 途径, 由它们相应的配体 FasL、TNF α 诱导, caspase-8 和 caspase-10 作为最上游的启动酶, 接受信号并激活 caspase 级联反应^[20-22]。引起细胞凋亡。这两条途径彼此不完全独立, 而是最终都汇集到线粒体或与

线粒体相关联的 caspases-3 等的激活阶段,进而进入细胞凋亡的共同通道。其中线粒体是处于细胞凋亡信号转导的“交叉点”和细胞凋亡发展过程中的“决定”性阶段。

本实验通过对姜黄素诱导肿瘤细胞凋亡的研究表明,姜黄素处理后的 NCE 细胞在出现凋亡的若干特征的同时,细胞线粒体膜电位下降,线粒体释放 CytC 增多, caspase-3 酶活性增强,导致细胞凋亡的级联反应,启动线粒体凋亡途径;同时,经姜黄素诱导后, NCE 细胞的 Fas 基因在转录与翻译水平上的表达均显著增强,提示姜黄素也可以通过 Fas 系统发挥作用。吴勇等^[24]也发现相似的结果,姜黄素抑制淋巴瘤 CA-46 细胞增殖、诱导凋亡时, Fas 蛋白以及 Fas mRNA 表达显著增高。

综上所述,凋亡的两条途径都在姜黄素诱导鼻咽癌细胞凋亡中发挥重要作用:姜黄素诱导鼻咽癌细胞凋亡可能与改变线粒体跨膜电位,释放 CytC,上调 Fas 基因表达,激活 caspase-3 酶有关。以后,我们将进一步深入研究 caspases-8 在姜黄素诱导凋亡中的作用。

参 考 文 献

- 崔淑香,金东庆,周玲,等. 姜黄素抗肿瘤作用试验观察. 肿瘤防治杂志, 2002, 9: 50-52.
- 许建华,赵蓉,柯丹如. 姜黄素的体外抗癌作用及其水溶液的稳定性. 中国药理学通报, 1998, 14: 415-417.
- 沃兴德,洪行球,高承贤,等. 姜黄素长期毒性试验. 浙江中医学院学报, 2000, 24: 61-65.
- Chauhan DP. Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Curr Pharm Des*, 2002, 8: 1695-1705.
- Chemoprevention Branch and Agent Development Committee. Clinical development plan: curcumin. *J Cell Biochem Suppl*, 1996, 26: 72-85.
- 马晓华,沃兴德,梁海曼. 姜黄素抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡的研究概况. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26: 21-23.
- 梁统,陈美璐,周克元,等. 姜黄素诱导低分化鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 的凋亡. 癌症, 2004, 23: 1651-1654.
- Roger R, Issaad C, Pallardy M, et al. BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. *Blood*, 1996, 87: 1113-1122.
- Huang HF, Chen YZ, Wu Y. ZnPcS2P2-based photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in K562 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37: 488-494.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, 275: 1129-1132.
- Chen YZ, Gu XF, Caen JP, et al. Interleukin-3 is an autocrine growth factor of human megakaryoblasts, the DAMI and MEG-O1 cells. *Br J Haematol*, 1994, 88: 481-487.
- Jiang MC, Yang-Yen HF, Yen JJ, et al. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 1996, 26: 111-120.
- Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 5292-5296.
- Samaha HS, Kelloff CJ, Steele V, et al. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res*, 1997, 57: 1301-1305.
- Huang MT, Lou YR, Xie JG, et al. Effect of dietary curcumin and dibenzylmethane on formation of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 1697-1700.
- 张建清. 姜黄素抗诱变、抗癌作用研究进展. 国外医学卫生学分册, 2000, 27: 161-164.
- 王申五,武莎莎. 凋亡与肿瘤. 中华肿瘤杂志, 1999, 21: 308-309.
- 郑丽端,董强松,吴翠环. 姜黄素诱导人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡及其分子机制的研究. 癌症, 2002, 21: 1296-1300.
- 赵敬,赵涌. 姜黄素对人宫颈癌细胞株 Hela 细胞抑制及凋亡的影响. 重庆医科大学学报, 2004, 29: 296-314.
- 黄冬生,陈金和. 姜黄素诱导人肺癌细胞凋亡的作用机制初步研究. 中国药理学通报, 2003, 19: 880-882.
- Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res*, 2001, 271: 305-314.
- Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res*, 2001, 21: 873-878.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281: 1305-1308.
- 吴勇,陈元仲,许建华,等. 姜黄素对人类 Burkitt 淋巴瘤抗癌作用的研究. 中华肿瘤杂志, 2002, 24: 348-351.

(收稿日期: 2005-09-06)

(本文编辑: 李静)

下期要目

医源性功能性失音的诊治及预防(嗓音医学)

以发声困难为首发症状的重症肌无力患者的临床特点(嗓音医学)

双侧声带麻痹不同术式疗效分析(嗓音医学)

声带运动不良的喉肌电图特征(嗓音医学)

儿童声带小结的病因和干预(文献综述)