

我国温石棉与其 4 种代用品致 V79 细胞肿瘤蛋白谱表达的影响

曾娅莉¹, 王洪州², 董发勤², 王利民¹, 邓建军¹

(1. 四川绵阳四〇四医院 川北医学院附属第二医院 检验科, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学, 四川 绵阳 621000)

摘要: 将中国仓鼠肺细胞(Chinese Hamster Lung Cell, V79 细胞)分别暴露于不同浓度的温石棉及代用品粉体悬液中 48 h 后, MTT 检测细胞存活率, 免疫组化法检测 V79 细胞中 Survivin、Cap43、Bcl-2、p16 和 p53 肿瘤相关蛋白的分布及表达, 分析我国两大主产区的温石棉及 4 种主要人工代用品对 V79 细胞的增殖抑制率与肿瘤相关蛋白谱的影响, 以探讨我国温石棉及人工代用品是否是导致肿瘤的高危因素之一。结果表明: ① 在 6 种粉体中, 四川新康及陕西陕南温石棉对细胞生长抑制最强, 岩棉纤维粉体对细胞生长抑制最弱。各粉体对 V79 细胞的存活率影响不同, 随着暴露粉体浓度的增加, 细胞的存活率降低, 呈现剂量效应关系。② 各染毒组细胞的癌基因 Survivin、Cap43、Bcl-2 表达的蛋白上调, 抑癌基因 p16 和 p53 表达的蛋白下调, 以胞浆阳性为主。综合以上结果, 发现我国不同地区温石棉及其代用品均不同程度抑制 V79 细胞生长, 上调肿瘤相关蛋白 Survivin、Cap43 及 Bcl-2, 下调 p16 和 p53, 从而诱导癌症的发展。

关键词: 温石棉; 代用品; 肿瘤基因; V79 细胞; 肿瘤蛋白谱

中图分类号: P619.27⁺1; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2013)06-0803-06

The effects of chrysotile and its four substitutes from two major production areas of China on the expression of oncoprotein in V79 cells

ZENG Ya-li¹, WANG Hong-zhou², DONG Fa-qin², WANG Li-min¹ and DENG Jian-jun¹

(1. Mianyang No. 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 2. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China)

Abstract: Chinese hamster lung cells (V79 cells) were exposed to the powder suspensions of chrysotile and its substitutes with different concentrations, and the survival rate of cells was monitored by MTT. After 48 h, the location, distribution and expression of Survivin, Cap43, Bcl-2, p16 and p53 in V79 cell were comparatively examined by immunohistochemistry. The effects of chrysotile and four main artificial substitutes from China's two major production areas on the expression of oncoprotein in V79 cells were studied to investigate the factors of lung cancer. Some conclusions have been reached: ① In the six kinds of powder, the inhibition action of rockwool on the growth of cells was the weakest, whereas the inhibition action of chrysotile from Xinkang of Sichuan and Southern Shaanxi on the growth of cells was the strongest. Chrysotile from Xinkang of Sichuan, chrysotile from southern Shaanxi, glass fiber, ceramic fiber, rockwool and wollastonite have certain degrees of influence on the survival rate of V79 cells. With the increase of the concentration of powder, the survival rate of cells decreases,

收稿日期: 2013-08-29; 修订日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41130746); 中哈国际合作项目(2006020021); 四川省科技厅科研基金项目(2010S20037)

作者简介: 曾娅莉(1972-), 女, 硕士, 副主任检验师, 主要从事职业病防治研究, E-mail: 631734429@qq.com; 通讯作者: 王利民(1954-), 男, 主任医师, 从事职业病防治研究, E-mail: wlm404@yahoo.cn

suggesting dose-effect relationship. ② The expression of Survivin, Cap43 and Bcl-2 is upward regulated and the expression of p16 and p53 was downward regulated in V79 cells, which is obvious in the powder suspension of chrysotile from southern Shaanxi and Xinkang of Sichuan and glass fiber. The expression is mainly in cytoplasm. The results prove that the influence of different kinds of powder on the cells differs in degree. Chrysotile and its substitutes can induce the development of cancer by upward regulating the expression of Survivin, Cap43 and Bcl-2 and downward regulating the expression of p16 and p53.

Key words: chrysotile; substitute; oncogene; V79 cells; oncoprotein

温石棉以其高强度、耐高温的独特性能成为工业发展的重要原料,被广泛应用于各个领域,在我们的生活空间中无处不在。我国是一个产石棉大国,储量居世界第三,用量居世界第一。然而国际上对温石棉的生物安全性存在较大争议(Bernstein and Hoskin, 2006; Loomis *et al.*, 2012)。纤维粉尘对人体最大的危害是进入呼吸系统,引起人体肺组织损伤。资料显示极其微小的石棉纤维如果漂浮在空中,被吸入到人体的肺后,经过 20 到 40 年的潜伏期,很容易诱发肺癌等肺部疾病(David *et al.*, 2013)。这就是受到世界各国不同程度关注的石棉公害。我国的温石棉及代用品的具体危害目前尚不清楚,因此对它的研究十分必要。本课题选择我国两大主产矿区的温石棉以及 4 种主要应用广泛的温石棉人工代用品(玻璃纤维、陶瓷纤维、岩棉和硅灰石)作为研究对象,观察其对中国仓鼠肺细胞的增殖抑制作用,检测肺部肿瘤相关蛋白谱变化,从分子水平探讨其是否会导致肿瘤的发生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源

中国仓鼠肺细胞(Chinese Hamster Lung Cell, V79 细胞)购买自四川大学华西医学中心生物医学实验室。

1.1.2 温石棉及代用品

四川新康温石棉、陕西陕南温石棉、玻璃纤维、陶瓷纤维、岩棉和硅灰石均来自西南科技大学。先将温石棉原矿放在陶瓷研钵中碾压,使纤维充分劈分,用不锈钢剪刀将纤维剪短至 2~3 mm 左右,之后将短纤维放入研钵中进行研磨,使纤维进一步劈分,随后用 GSDM 精细研磨机于酒精中研磨 12 h,取出过 400 目筛,过滤,95% 以上的纤维粒径约 0.5~2 μm,长度约 210 μm,然后于 100℃ 烘干,最后将

烘干样研磨成粉体。

1.1.3 试剂

改良型 RPMI 1640 培养液(GIBCO BRL 公司);胎牛血清(Hyclone);青霉素;链霉素;噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(Sigma USA);PBS 缓冲液、二甲亚砜、5% 胰蛋白酶(华美公司);兔抗鼠 Survivin、Cap43、Bcl-2、p16 和 p53 多克隆抗体(武汉博士德公司);免疫组化 SABC 试剂盒(SA1022)(武汉博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 培养液配制

无菌环境中配制含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液,临用时加入青霉素和链霉素,使其药物浓度为 100 kU/L。

1.2.1.2 培养方法

购买的 V79 细胞分装在细胞培养瓶中,添加一定量的细胞培养液,将培养瓶半封口状态放在 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养,细胞贴壁后继续培养 2~3 d,待培养液变黄时将培养液倒掉,用 0.25% 的胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化,离心收集细胞,分瓶后加入新的细胞培养液,传代。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞存活率

1.2.2.1 实验分组与粉尘悬液配制

实验共分 7 组,包括 1 个细胞阴性对照组和 6 个样品组(四川新康温石棉组(A 组)、陕西陕南温石棉组(B 组)、玻璃纤维组(C 组)、陶瓷纤维组(D 组)、硅灰石组(E 组)和岩棉组(F 组)。细胞阴性对照组未加处理因素,作为参照。为消除各粉体对吸光度的影响,另设置 1 个不加细胞的 96 孔培养板粉体对照,分组如上。用细胞培养液配制成 2 000 μg/mL 粉体悬液储存液。

1.2.2.2 方法

调整细胞浓度至 2×10^5 /mL,加入 100 μL 细胞培养液到 96 孔板;每孔加入 100 μL 细胞培养液至

粉体对照板,放入 5% 的 CO₂ 细胞培养箱,37℃ 继续培养 24 h 待贴壁。加入各粉体悬液至样品组和粉体对照板,至终浓度分别为 100、200、400、600、800、1 000 μg/mL,阴性对照组加细胞培养液,每孔重复 3 次,置入 5% 的 CO₂ 细胞培养箱,37℃ 继续培养 48 h,加入 20 μL MTT 到每孔,继续培养 2 h。吸出各孔培养液,每孔加入二甲亚砜 200 μL,振荡混匀,酶标仪上测定各孔吸光度,测定波长 492 nm。根据 $P = A_{测}/A_{阴} \times 100\%$ (P 为细胞存活率, $A_{测}$ 为测定孔的吸光度值, $A_{阴}$ 为未加处理因素的细胞生长孔吸光度值),计算细胞存活率。

1.2.3 免疫组化法检测肿瘤蛋白

1.2.3.1 肿瘤蛋白的选择

本实验选择的 Survivin、Cap43、Bcl-2、p16 和 p53 肿瘤相关蛋白,是一组癌基因与抑癌基因表达蛋白,与肺癌的发生密切相关。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族的新成员,具有肿瘤特异性,只表达于肿瘤和胚胎组织,且与肿瘤细胞的增殖及浸润转移密切相关。Cap43 在正常组织中表达量非常低,而在许多肿瘤中都有表达,人肺癌细胞株 A549 中 Cap43 基因的转录、表达水平超过正常细胞的 30 倍,其高表达与肺癌密切相关。Bcl-2 蛋白抗是转恶性肿瘤永生性的最重要的分子靶点。Bcl-2 蛋白的功能并不是正常细胞必须的,但是肿瘤细胞如小细胞肺癌 100% Bcl-2 基因高表达。p16 基因直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂,它的表达一旦失灵则会细胞恶性增殖,导致恶性肿瘤发生。p16 蛋白的表达在肺癌中阳性率为 45%,对肺癌的发生发展有重要意义。p53 是肿瘤抑制基因,如果 p53 基因失活,细胞生长的检测和平衡都会无法进行,细胞积累突变以至于最终导致癌症的发生。

1.2.3.2 检测方法

实验分组如上,调整 V79 细胞浓度至 $2 \times 10^5/L$

mL,加入培养皿,在 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃ 继续培养 24 h 待贴壁,爬片。将调整好的粉体悬液加入已培养皿,至终浓度分别为 100、200、400、600、800、1 000 μg/mL,将染毒的细胞放到 CO₂ 细胞培养箱中继续培养 48 h 后,滴入丙酮处理 30 min,吸尽,蒸馏水冲洗 3 次,30% 的 H₂O₂ 1 份 + 纯甲醇 50 份混合,室温浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水冲洗 3 次,滴加山羊血清封闭液,室温 20 min。甩干后每孔滴入一坑,Survivin、Cap43、Bcl-2、p16 和 p53 稀释度均为 1:200。37℃ 下孵育 60 min,然后置 4℃ 冰箱过夜,室温下复温 20 min,PBS 冲洗 3 次,滴加生物素化羊抗兔 IgG 37℃ 20 min。PBS 洗 3 次;滴加试剂 SABC,37℃ 20 min。PBS 洗 4 次;显色 5 min;自来水冲洗后苏木素复染,常规脱水封片;以 PBS 代替一抗作为阴性对照,阳性结果为细胞浆、细胞膜或细胞核呈棕黄色。随机选取 3 个视野(10 × 40),用 Image-ProPlus 专业图像分析系统检测其平均光密度值(OD)值,再统计学分析处理。以上蛋白表达显色棕黄色为阳性,其颜色与表达量成正比,定位于胞浆或者细胞核,检测采用组织化学染色根据 SABC 法进行。

1.2.4 统计学处理

以上实验均重复 3 次,所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS11.0 统计学软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞存活率

表 1 可见,6 组粉体悬液对 V79 细胞生长均有不同程度抑制,四川新康与陕西陕南组温石棉对细胞抑制率最大,岩棉组对细胞抑制率最低,温石棉之

表 1 不同浓度的粉体悬液染毒 V79 细胞 48 h 后的细胞存活率

Table 1 V79 cell survival rate exposed in dust suspensions of different concentrations

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	四川新康组	陕西陕南组	玻璃纤维组	陶瓷纤维组	硅灰石组	岩棉组
100	35.95 ± 1.31 ^{★△}	35.62 ± 0.98 ^{★△}	52.61 ± 6.04 ^{*△}	66.50 ± 10.95 ^{*△}	69.44 ± 5.88 ^{*△}	74.67 ± 0.98 ^{*△}
200	25.00 ± 1.63 ^{★△}	24.67 ± 0.82 ^{★△}	32.03 ± 3.92 ^{*△}	34.48 ± 0.82 ^{*△}	43.46 ± 3.27 ^{*△}	55.23 ± 2.94 ^{*△}
400	17.97 ± 0.98 ^{★△}	17.16 ± 1.14 ^{★△}	22.88 ± 2.45 ^{*△}	26.14 ± 1.62 ^{*△}	31.54 ± 3.95 ^{*△}	37.91 ± 2.28 ^{*△}
600	11.44 ± 0.82 ^{★△}	9.97 ± 4.74 ^{★△}	14.05 ± 1.14 ^{*△}	17.32 ± 0.99 ^{*△}	23.04 ± 0.65 ^{*△}	32.03 ± 2.12 ^{*△}
800	5.23 ± 1.79 ^{★△}	4.25 ± 3.43 ^{★△}	9.64 ± 2.45 ^{*△}	14.38 ± 4.91 ^{*△}	16.34 ± 0.32 ^{*△}	20.59 ± 2.27 ^{*△}
1 000	1.96 ± 0.65 ^{★△*}	0.16 ± 0.000 ^{*△}	5.07 ± 1.47 ^{*△}	8.50 ± 1.46 ^{★△}	9.15 ± 0.29 ^{★△}	11.60 ± 0.49 ^{*△}

注: * 与其它各组相比 $P < 0.05$ ★四川新康组与陕西陕南组相比 $P > 0.05$; △表示各组内比较, $P < 0.05$ 。

间比较细胞抑制率无统计学意义($P > 0.05$);温石棉与人工代用品之间抑制率比较,具有统计学意义($P < 0.05$),人工代用品显著低于温石棉组。

2.2 免疫组化

免疫组化染色结果显示,空白对照组未见 Survivin、Cap43 和 Bcl-2 阳性表达;而 p53 及 p16 在空白对照组中表达阳性。Survivin 蛋白主要分布于 V79 细胞浆,在细胞膜和细胞核亦有部分;Cap43 和 Bcl-2

的蛋白分布于 V79 细胞浆,在细胞核亦有少量;p16 和 p53 的蛋白分布于细胞浆,在细胞膜和细胞核,不同种类和浓度粉尘作用 V79 细胞后免疫组化显色结果趋势类似,显色强弱不同。四川新康温石棉作用 V79 细胞后的免疫组化结果见图 1(A、B、C、D、E 为 Survivin、Bcl-2、Cap43、p53、p16 阳性表达;f、g、h 表示空白组 Survivin、p53、Cap43 阴性)。

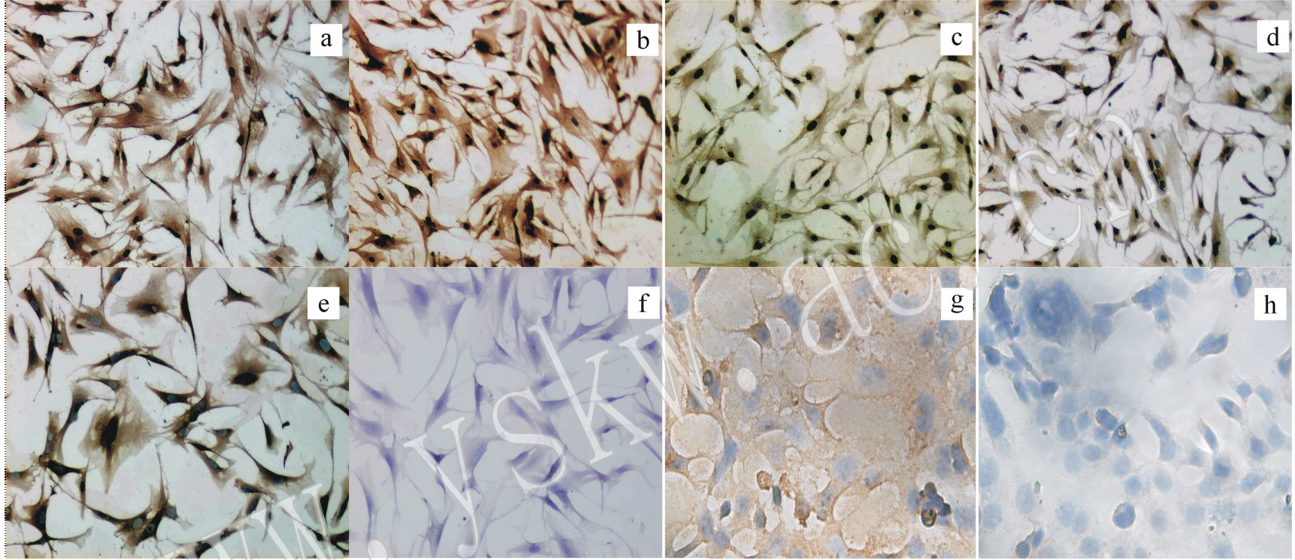


图 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四川新康温石棉作用 V79 细胞的 Survivin、Cap43、Bcl-2 p53 及 p16 的表达(10×20)

Fig. 1 The expression of oncoprotein in V79 cells of Survivin, Cap43, Bcl-2, p53 and p16 treated with chrysotile dusts from Xinkang of Sichuan

2.3 Survivin、Cap43 和 Bcl-2 蛋白定量

不同浓度温石棉及其代用品粉体悬液染毒 V79 细胞后,随着粉尘浓度增加,V79 细胞的 Survivin、Cap43 和 Bcl-2 表达增高,与粉尘浓度呈正相关;相同剂量各组粉尘作用 V79 细胞后 Survivin、Cap43 和 Bcl-2 的表达量比较,以陕南温石棉组最高,岩棉组最低;由高到低排序为:陕西陕南温石棉组 > 四川新康温石棉组 > 玻璃纤维组 > 陶瓷纤维组 > 硅灰石组 > 岩棉组;组间比较除 A 和 B 组外,其余各组之间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),结果分别见图 2、图 3、图 4。

2.4 p53 及 p16 蛋白定量

不同浓度温石棉及其代用品粉体悬液染毒 V79 细胞后,p53 及 p16 的表达却随粉尘作用浓度增加而降低,呈负相关;剂量相同的粉尘各组作用 V79 细胞后 p53 及 p16 的表达量以陕南温石棉组最低,岩棉

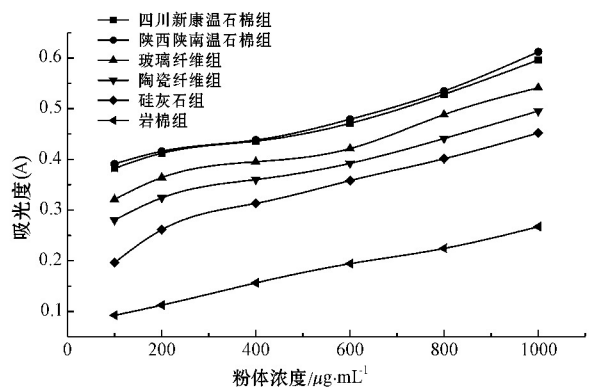


图 2 Survivin 蛋白在不同种类与浓度的温石棉及代用品粉体悬液作用细胞 48 h 的表达

Fig. 2 Survivin protein in V79 cells treated with chrysotile dusts of different concentrations and its substitutes after 48 h

组最高;各组肿瘤蛋白表达量由低到高排序为:陕西陕南温石棉组 < 四川新康温石棉组 < 玻璃纤维组

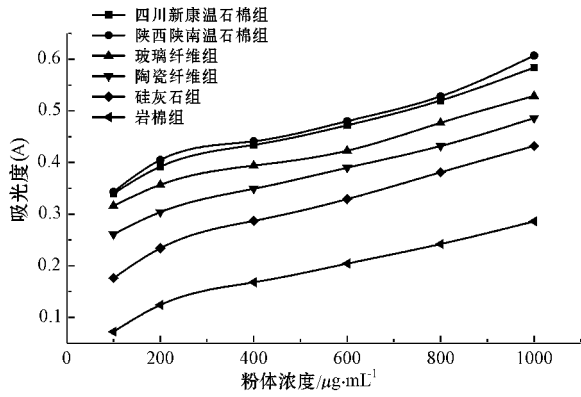


图 3 Cap43 蛋白在不同种类与浓度的温石棉及代用品粉体悬液作用细胞 48 h 的表达

Fig. 3 Cap43 protein in V79 cells treated with chrysotile dusts of different concentrations and its substitutes after 48 h

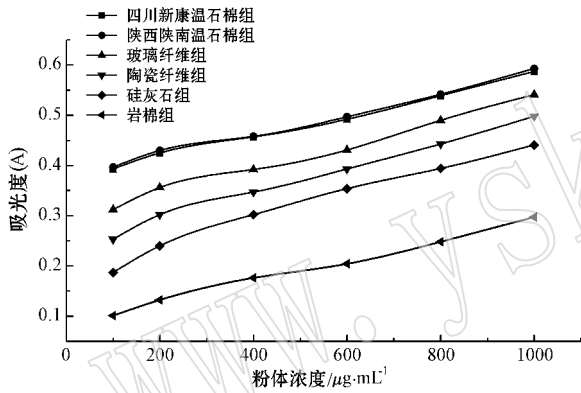


图 4 Bcl-2 蛋白在不同种类与浓度的温石棉及代用品粉体悬液作用细胞 48 h 的表达

Fig. 4 Bcl-2 protein in V79 cells treated with chrysotile dusts of different concentrations and its substitutes after 48 h

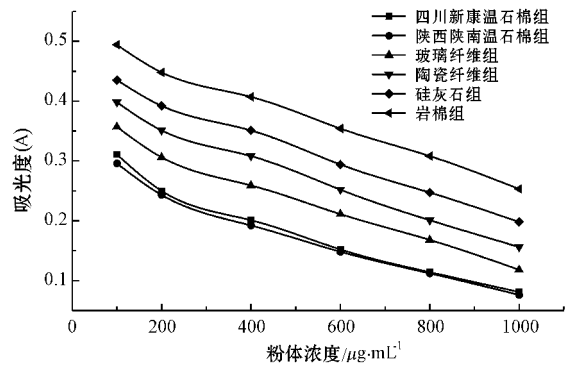


图 5 p16 蛋白在不同种类与浓度的温石棉及代用品粉体悬液作用细胞 48 h 的表达

Fig. 5 p16 protein in V79 cells treated with chrysotile dusts of different concentrations and its substitutes after 48 h

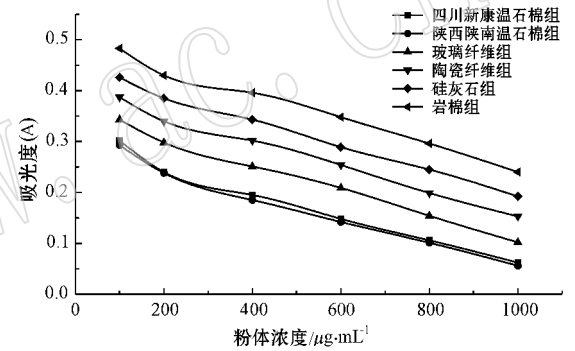


图 6 p53 蛋白在不同种类与浓度的温石棉及代用品粉体悬液作用细胞 48 h 的表达

Fig. 6 p53 protein in V79 cells treated with chrysotile dusts of different concentrations and its substitutes after 48 h

<陶瓷纤维组<硅灰石组<岩棉组,除四川新康组和陕西陕南组之间比较外,其余各组之间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)结果见图 5、图 6。

3 讨论

3.1 温石棉及代用品均抑制细胞生长

由 MTT 结果可见,6 种粉体对 V79 细胞均有不同程度抑制作用,抑制率从大至小为:陕西陕南温石棉>四川新康温石棉>玻璃纤维>陶瓷纤维>硅灰石>岩棉,以陕西陕南温石棉组最高,随着粉体浓度增加,细胞的抑制率上升,呈剂量效应关系。随着暴露粉体浓度的增加,细胞的存活率降低,

呈现剂量效应关系。这可能与它们之间不同理化性质相关,前期研究(Poser *et al.*, 2004 ; Gazzano *et al.*, 2007 ; Courtice *et al.*, 2012)显示温石棉的生物安全性与其产地、纯度、表面电荷以及金属离子的含量等相关。本实验结果与国内甘四洋等(2009)实验结果基本相似。

3.2 人工代用品相对于温石棉安全

相同浓度,不同温石棉组与人工代用品组之间细胞抑制率比较,温石棉组的细胞抑制作用显著强于人工代用品($P < 0.05$),人工代用品相对于温石棉安全性更高,人工代用纤维之间生长抑制率比较以岩棉的抑制作用最弱,玻璃纤维组最强。从免疫组化蛋白定量结果可见:人工代用品作用 V79 细胞时癌基因蛋白 Survivin、Cap43 和 Bcl-2 表达量显著低于温石棉组,抑癌基因蛋白 p53 及 p16 显著高于温

石棉组,温石棉组肿瘤蛋白谱失衡更为显著($P < 0.05$)这也说明温石棉比人工代用品更容易促进肿瘤发生,人工代用品较温石棉安全。人工代用纤维之间肿瘤相关蛋白谱表达以玻璃纤维组最大,岩棉组最小,与细胞抑制率结果相似,本实验结果为人工代用品的安全性选择提供参考。

3.3 肿瘤相关蛋白谱的失衡可能增加细胞癌变风险

癌基因和抑癌基因是细胞正常的基因,在调节细胞增殖和分化的过程中具有拮抗作用,机体借着这一对立统一的机制,调节细胞的生长与凋亡。Survivin、Bcl-2 与 Cap43 是凋亡抑制基因。Survivin 的表达与肺癌的分化程度有关,分化程度越低,其表达率越高,抑制细胞凋亡的作用越强(Shen *et al.*, 2012)。免疫组化结果表明,不同浓度 6 种粉体处理 V79 细胞 48 h 后,温石棉与其人工代用品粉体均可诱导 V79 细胞抑癌基因 Survivin、Bcl-2 和 Cap43 蛋白表达显著增加,癌基因 p16 和 p53 蛋白表达明显降低,呈现浓度依赖性(Matsugaki *et al.*, 2009; Porebska *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2010)。这种癌基因和抑癌基因的协同失衡可能是导致 V79 细胞向肿瘤发展的风险因素之一。国外学者(Wang *et al.*, 2011)通过研究发现石棉可激活鼠细胞多种癌基因从而致癌,本实验所检测结果与国外学者研究结论一致。

4 结论

(1) 温石棉及人工代用品均存在生物性,对人体并非安全,体外实验显示,人工代用品的生物安全性比温石棉高,不同产地温石棉之间的生物安全性也不同,其大小与产地相关。

(2) 温石棉及人工代用品均会抑制细胞的生长,改变细胞肿瘤蛋白谱,抑制癌基相关蛋白和促进癌基因的表达,这种失调使细胞更易于向肿瘤发展,可增加肿瘤发生的风险。

References

Bernstein D M and Hoskins J A. 2006. The health effects of chrysotile : current perspective based upon recent data [J]. Regul Toxicol Phar-

macol , 45 (3): 252 ~ 264.

Courtice M N , Lin S and Wang X. 2012. An updated review on asbestos and related diseases in China [J]. Int. J. Occup. Environ. Health , 18 (3): 247-53.

David B , Jacques D , Thomas H , *et al.* 2013. Health risk of chrysotile revisited [J]. Crit. Rev. Toxicol , 43 (2): 154 ~ 183.

Gan Siyang , Dong Faqin , Zeng Yali , *et al.* 2009. Research on cell toxicity of chrysotile , nano-silica , wollastonite and 3 kinds of artificial mineral fibers [J]. Journal of Safety and Environment , 9 (4): 13 ~ 16 (in Chinese).

Gazzano E , Turci F , Foresti E , *et al.* 2007. Iron-loaded synthetic chrysotile : a new model solid for studying the role of iron in asbestos toxicity [J]. Chem. Res. Toxicol , 20 (3): 380 ~ 387.

Lawson M H , Cummings N M , Rassl D M , *et al.* 2010. Bcl-2 and β 1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer [J]. British Journal of Cancer , 103 (11): 1710 ~ 1715.

Loomis D , Dement J M and Elliott L. 2012. Increased lung cancer mortality among chrysotile asbestos textile workers is more strongly associated with exposure to long thin fibres [J]. Occup Environ. Med. , 69 (8): 564 ~ 568.

Matsugaki T , Zenmyo M , Hiraoka , *et al.* 2009. N-myc downstream-regulated gene 1/Cap43 expression promotes cell differentiation of human osteosarcoma cells [J]. Dalton Transactions , 28 (9): 5523 ~ 5534.

Porebska I , Sobanska E , Kosacka M , *et al.* 2010. Apoptotic regulators : P53 and Survivin expression in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Genomics & Proteomics , 7 (6): 331 ~ 335.

Poser I , Rahman Q , Lohani M , *et al.* 2004. Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers , metal chelators and a glutathione precursor [J]. Mutat. Res. , 559 (1 ~ 2): 19 ~ 27.

Shen J , Yin Q , Chen L , *et al.* 2012. Co-delivery of paclitaxel and survivin shRNA by pluronic P85-PEI/TPGS complex nanoparticles to overcome drug resistance in lung cancer [J]. Biomaterials , 33 (33): 8613 ~ 8624.

Wang D , Wang J , Li Y , *et al.* 2011. The influence of anthracosis and p16 ink4a gene aberrant methylation on small-sized pulmonary adenocarcinoma [J]. Exp. Mol. Pathol. , 90 (1): 131 ~ 136.

附中文参考文献

甘四洋,董发勤,曾娅莉,等. 2009. 温石棉、纳米 SiO₂、硅灰石及人造纤维粉尘的细胞毒性研究 [J]. 安全与环境学报 , 9 (4): 13 ~ 16.