

caspase-3 基因在染铝小鼠神经细胞凋亡中的作用

李娜, 王晓燕, 刘春长, 张勤丽*, 牛侨*

摘要: [目的] 通过观察染铝小鼠海马的线粒体膜电位、组织形态以及脑组织内活化的 *caspase-3* 蛋白含量表达的变化, 研究 *caspase-3* siRNA 在铝致神经细胞凋亡中的作用。[方法] 取 3 月龄雄性昆明小鼠, 按体重随机分为 4 组, 即空白对照组 (生理盐水 4 μ L)、染铝组 (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 μ L)、Al+RNAi 组 (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μ L + 目的 siRNA 表达载体 1 μ L)、空载体组 (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μ L + 对照 siRNA 表达载体 1 μ L), 通过侧脑室注射进行染毒, 连续染毒 5 d, 各组小鼠海马的凋亡率用流式细胞术检测; 线粒体膜电位用罗丹明 123 (Rh123) 染色流式方法检测; 观察小鼠组织学变化; 脑组织中活化的 *caspase-3* 蛋白的含量用蛋白印迹 (Western blot) 技术检测。[结果] 凋亡率结果显示: 与空白对照组相比, 染铝组、空载体组的细胞凋亡率升高有统计学意义 ($P < 0.05$), Al+RNAi 组凋亡率尚无差别 ($P > 0.05$); 线粒体经 Rh123 染色呈现明亮绿色的荧光, 染铝组和空载体组荧光强度较对照组明显减弱 ($P < 0.05$), Al+RNAi 组与空白对照组差异无统计学意义; 常规 HE 染色镜下可见空白对照组小鼠海马神经元排列整齐, 染铝组细胞排列零乱, 细胞连接松解, 空载体组细胞数量减少, siRNA 处理后细胞状态与空白对照组相似; 活化的 *caspase-3* 蛋白表达量结果显示染铝组高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空白对照组、空载体组、Al+RNAi 组之间尚无差别 ($P > 0.05$)。[结论] RNA 能通过下调 *caspase-3* 基因的表达, 从而对铝致小鼠神经细胞凋亡产生抑制作用。

关键词: 铝; siRNA; *caspase-3*; 凋亡; 神经细胞

Effect of *caspase-3* Gene on Aluminum Induced Neuronal Apoptosis in Mice LI Na, WANG Xiao-yan, LIU Chun-chang, ZHANG Qin-li*, NIU Qiao* (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). *Address correspondence to ZHANG Qin-Li, E-mail: Zhangql930611@163.com; NIU Qiao, E-mail: niuqiao55@163.com

Abstract: [Objective] To investigate the effect of *caspase-3* siRNA on apoptosis of neurons in mice induced by aluminum through observation of mitochondrial membrane potential, tissue morphology and protein expression level of activated *caspase-3*. [Methods] Three-month-old male Kunming mice were divided into 4 groups randomly by weight: blank control group (normal saline 4 μ L), emptyvector group (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 μ L), aluminum exposed group (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μ L + the purpose of siRNA expression vector 1 μ L) and Al+RNAi group (0.5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μ L + control siRNA expression vector 1 μ L). Every group was treated by lateral cerebral ventricle micro-injection for 5 days. The apoptosis rate of hippocampus cells was measured by fluorescent analysis, and mitochondrial membrane potential by Rhodamine 123 (Rh123) staining. The histological changes in mice were observed; the expression of activated *caspase-3* in mice brain was detected by Western-blot. [Results] The results of fluorescent analysis in the aluminum exposed group and the empty vector group were significantly higher than the blank control group ($P < 0.05$), but the Al+RNAi group showed no change ($P > 0.05$); light green mitochondria were found in Rh123 staining. The mitochondrial membrane potentials in the aluminum group and empty vector group were lower than the blank control group ($P < 0.05$), but there was no difference between the Al+RNAi group and the blank control group; the morphosis of mice hippocamp neuron of the blank control group were lining up in order in HE staining. The cell alignment became disrupted in the aluminium exposed group. Loose cell junctions were also found in the aluminum exposed group. The amount of cells in empty vector group decreased compared to the blank control group, but no difference was found after treated with siRNA. The *caspase-3* expression level increased after aluminum exposed ($P < 0.05$), but no significant changes in the empty vector group and the Al+RNAi group ($P > 0.05$). [Conclusion] RNA interference technology can turn down the expression of *caspase-3* gene to inhibit apoptosis induced by aluminum in nerve cell of mice.

Key Words: aluminum; siRNA; *caspase-3*; apoptosis; neuronal cells

[基金项目] 教育部博士点基金 (编号: 200801140002); 国家自然科学基金 (编号: 30972512); 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30671777)

[作者简介] 李娜 (1984—), 女, 硕士生; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: enen30304@163.com

[*通信作者] 张勤丽副教授, E-mail: zhangql930611@163.com; 牛侨教授, E-mail: niuqiao55@163.com

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

铝广泛地存在于自然界,是地球上第三大元素,地壳表面铝含量约为 8.8%,仅次于氧和硅。铝于 1825 年被发现,一直被视为无害元素,广泛地用于食品添加剂、药物、处理水的混凝剂及各种炊具、容器等。直到上世纪 20 年代年才有铝中毒造成记忆丧失、颤抖的报道。现今铝已被认为是一种慢性蓄积性神经毒物,可以在多个层面上通过多种途径对神经系统造成损伤,尤其是学习与记忆功能。有研究表明,铝可以引起神经细胞凋亡,而神经细胞凋亡和认知功能、学习记忆障碍有关^[1]。caspase 家族在细胞凋亡中起了重要作用,其中 caspase-3 被认为是所有凋亡途径的最后效应子。本课题组已证实 caspase-3, bax 等均参与了铝致神经细胞的凋亡机制^[2]。

RNA 干扰(RNAi)是近年来发现的一种高效、特异性阻断体内特定基因表达,促使 mRNA 降解,从而阻断目标基因的活性,最终影响其生物学功能,siRNA 是 RNAi 途径中的中间产物,是 RNAi 发挥效应所必需的因子。我们拟用三氯化铝(AlCl_3)侧脑室注射建立小鼠铝中毒模型,并构建针对小鼠 caspase-3 基因的特异性的发卡结构的 RNAi 质粒(即 siRNA),以慢病毒为载体,并转染至小鼠铝中毒模型,研究其抑制神经细胞凋亡的作用效果,为进一步研究神经退行性疾病的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 caspase-3 siRNA 表达载体 PGC FU-RNAi-NC 和 caspase-3-RNAi-LV 载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

1.1.2 实验动物及分组 健康 3 月龄雄性昆明小鼠 32 只,体重 25~30 g,活动能力相近,由山西医科大学动物中心提供。在动物室适应性喂养 1 周后,按体重随机分为 4 组,每组 8 只,即空白对照组(生理盐水 4 μL),空载体组(质量分数为 0.5%的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μL +对照 siRNA 表达载体 1 μL),染铝组(质量分数为 0.5%的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 μL),Al+RNAi 组(质量分数为 0.5%的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 μL +目的 siRNA 表达载体 1 μL)。

1.1.3 主要试剂 Aluminiumchlorid Hexahydrat(购自美国 Sigma 公司,为白色晶体,纯度 99%,密封避光保存);caspase-3 p17 山羊单克隆抗体 IgG(购自美国 Santa cruz 公司);兔抗山羊(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.1.4 主要仪器 ZH-蓝星 B 立体定位仪(由淮北正华生物仪器设备有限公司生产);微量注射泵(购自美国 Stoelting 公司);微量进样器(购自美国 Stoelting 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 染毒方法^[3] 小鼠腹腔注射 5% 水合氯醛(0.006 mL/g)麻醉后,固定于小鼠脑立体定位仪上,调节定位仪使动物头部左右对称,前后囟处于同一水平面上,沿颅顶正中剪开前囟周围头皮并刮去骨膜,以两眼珠连线为底边作等边三角形,以其顶点旁开 2.0~2.5 mm 为注射位点,进针深度为 3 mm,注射剂量为 4 μL ,连续染毒 5 d。隔天腹腔注射青霉素以抗感染。观察记录动物的一般情况,将实验前 3 d 体重下降大于 6 g 的动物排除实验^[4]。整个染毒期间,动物室以自然节律采光,温度 18~23 $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~60%,清洁,安静,所有动物饲以普通饲

料,自由饮水和进食。

1.2.2 流式细胞术检测法 将 32 只小鼠全部断头取脑,分离一侧小鼠海马和皮质,皮质用于蛋白的测定,剪碎海马,用 0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化成单细胞悬液,于 $5310 \times g$ 离心 5 min。悬浮细胞的染色:将悬浮细胞($0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$)用磷酸缓冲液(PBS)洗 2 次,加入 Annexin-V(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)5 μL ,避光反应 15 min 后,加入 400 μL 结合缓冲液。立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测(一般不超过 1 h),同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。

1.2.3 罗丹明(Rhodamine, Rh)123 荧光标记法检测海马细胞线粒体膜电位的变化 将 32 只小鼠全部断头取脑,分离一侧小鼠海马和皮质,皮质用于蛋白的测定,剪碎海马,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化成单细胞悬液,用细胞培养液终止消化,于 $5310 \times g$ 离心 5 min,再加入 1 mL 的细胞培养液(该培养液按照 1 mg/mL 的剂量加入 5 μL Rh),使其终浓度为 0.2 mg/mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,然后以 $5310 \times g$ 离心 5 min,弃上清,用 PBS 清洗 1 次,然后加入适量 PBS 吹打均匀即可,用流式细胞仪检测平均荧光强度,最大激发波长为 507 nm,最大发射波长为 529 nm。

1.2.4 常规苏木精-伊红(HE)病理切片 常规石蜡包埋,切片 HE 染色,进行病理学观察。

1.2.5 活化的 caspase-3 蛋白表达量的测定 将冷冻的脑组织加入细胞裂解液(0.1 mol/L 氯化钠,0.01 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液, pH=7.6, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯甲基磺酰氟, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽),冰上超声破碎细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$, $14007 \times g$ 离心 15 min,取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行总蛋白定量,调蛋白浓度一致,与等体积的 $2 \times$ 上样缓冲液混匀,沸水浴煮沸 10 min。根据浓度确定上样体积,每孔上样 25 μg ,10% 的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离样品,80 V 电压电泳 2 h 左右。湿式转膜,恒流 400 mA,40 min 将蛋白转至聚偏氟乙烯膜(PVDF)上,用 5% 的牛奶封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 3 h,将膜置于一抗稀释液(1/1 000)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗 4 次,15 min/次,将膜置于生物素化二抗稀释液(1/2 000)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗 4 次,15 min/次,将膜置于辣根酶标记生物亲和素稀释液(1/2 000)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗 4 次,15 min/次,将清洗后的膜与的化学发光(ECL)检测试剂(用量为 0.20 mL/ cm^2)共同孵育 1 min,曝光 1~10 min 不等,获得蛋白条带。采用捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对 Western blot 检测的样本活化的 caspase-3 蛋白和 β -Actin 内参的结果进行定量分析,然后计算待测蛋白与 β -Actin 光密度(D)的比值,比较两组: $D_{\text{活化的 caspase-3}}/D_{\beta\text{-Actin}}$ 值的大小。

1.2.6 统计学方法 全部数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, LSD 法做组间比较,结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差不齐的进行数据转换后进行方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞凋亡率和线粒体膜电位

与空白对照组小鼠海马细胞凋亡率相比,染铝组、空载体组的凋亡率明显升高,差别有统计学意义($P<0.05$),Al+RNAi

组差别无统计学意义($P>0.05$);与染铝组相比,Al+RNAi 组的凋亡率降低。与空白对照组相比,染铝组荧光强度减弱($P<0.05$),Al+RNAi 组荧光强度较染铝组、空载体组高($P<0.05$),组与空白对照组尚无差别($P>0.05$),见表 1。

表 1 海马细胞凋亡率和线粒体膜电位检测荧光强度检测结果

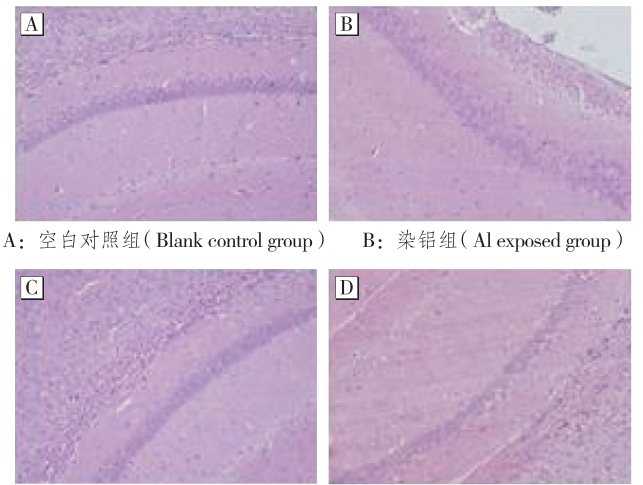
Table 1 Results of apoptosis rate of hippocampus cells and fluorescence intensity of mitochondrial membrane potential

组别 Group	动物数量 Number	凋亡率(%) Apoptosis rate	荧光强度 Fluorescence intensity
空白对照组 (Blank control group)	8	0.44 ± 0.03	5.37 ± 0.11
染铝组 (Al exposed group)	8	44.63 ± 0.62 [△]	3.68 ± 0.43 [△]
空载体组 (Empty vector group)	8	35.86 ± 0.46 [△]	4.48 ± 0.66
Al+RNAi 组 (Al+RNAi group)	8	8.43 ± 0.98 [*]	6.35 ± 0.45 [•]

[注][△]:与空白对照组相比(Compared with the blank control group), $P<0.05$; ^{*}:与染铝组相比(Compared with the Al exposed group), $P<0.05$; [•]:与空载体组相比(Compared with the empty vector group), $P<0.05$ 。

2.2 常规 HE 病理切片结果

镜下可见空白对照组小鼠海马神经元排列整齐,染铝组细胞排列零乱,细胞连接松解,而空载体组细胞数量减少,经 siRNA 干扰后细胞排列重新变整齐,细胞数量也未减少,见图 1。

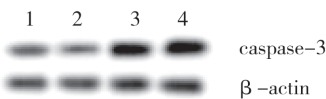


A: 空白对照组 (Blank control group) B: 染铝组 (Al exposed group)
C: Al+RNAi 组 (Al+RNAi group) D: 空载体组 (Empty vector group)
图 1 海马区 HE 染色 (×200)

Figure 1 Hippocampus region of selected mice (HE staining)

2.3 活化的 caspase-3 蛋白的表达结果

Western blot 结果显示,与空白对照组 caspase-3 蛋白的表达(0.29 ± 0.12)相比,染铝组(0.49 ± 0.12)活化的 caspase-3 蛋白表达明显增高($P<0.05$),空载体组(0.31 ± 0.02)和 Al+RNAi 组(0.19 ± 0.09)差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。



[注]1:空白对照组 (Blank control group); 2: RNAi 组 (Al+RNAi group); 3: 空载体组 (Empty vector group); 4: 染铝组 (Al exposed group)。

图 2 活化的 caspase-3 蛋白表达水平

Figure 2 Expression of activated caspase-3 protein

3 讨论

铝是一种对人体有害的元素,可在脑组织中蓄积,干扰脑细胞活动,破坏神经元结构,导致中枢神经功能障碍,它在阿尔茨海默病(AD)、透析性脑病、脊髓侧索硬化等老年性神经退行性疾病中的毒性作用已被大多数学者肯定,铝的神经毒性导致的神经细胞损害以神经退行性改变为突出特征。阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病的最终结局都是神经细胞死亡,其中重要的死亡方式是凋亡。本实验结果可知,与空白对照组相比,染铝组小鼠的细胞凋亡率显著增加。说明铝对海马神经细胞有损伤作用,能够导致凋亡的发生。

细胞凋亡的主要信号转导途径有①死亡受体途径,②线粒体途径,它们通过一系列分子和生物化学途径导致 2 条途径共同的“中央处理器”分子即 caspase 的活化^[5],二者通过 caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应,从而活化 caspase-3,最终导致细胞凋亡。对于凋亡细胞的死亡来说, caspase-3 由于其易变的底物的特殊性而尤其重要,而活化的 caspase-3 是凋亡的直接执行者,因而本次实验中选择活化的 caspase-3 为检测指标更有意义,染铝小鼠大脑皮质内的活化的 caspase-3 蛋白表达量比空白对照小鼠高,再结合凋亡率的增加,提示铝作为一种刺激因素,可能是由 caspase 家族的级联放大反应将凋亡信号传递至 caspase-3,从而活化 caspase-3,最终使神经细胞发生凋亡,当被特异的 siRNA 作用后,即降低 caspase-3 的表达,干扰铝致凋亡的发生。

越来越多的研究证明,细胞凋亡的调控核心^[6]是线粒体。细胞在正常的生理状况下,线粒体内膜存在相当大的跨膜电位,是线粒体发挥正常生理功能所必需的,一旦膜完整性遭到破坏,将致使线粒体膜电位下降直至崩溃,接下来将会使线粒体氧化还原状态失常,引发呼吸链的解耦等。这些因素足以使细胞在无法得到正常能量供给的情况下发生凋亡或坏死^[7]。Rh123 是一种携带正电荷的阳离子染料,进入细胞后主要富集于带负电荷的细胞器,主要是线粒体,富集的程度取决于线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的高低。 $\Delta\Psi_m$ 越高,细胞内的 Rh123 含量就越高,细胞的绿色荧光也就越强(不考虑熄灭的情况),反之则越低、越弱。当细胞凋亡时, $\Delta\Psi_m$ 崩溃,细胞也就丧失了摄取和富集 Rh123 的动力,胞内 Rh123 的含量降低,其荧光强度减弱,通过荧光信号的强弱来检测线粒体膜电位的变化和凋亡的发生,本实验结果中染铝小鼠的凋亡增加,相应的线粒体膜电位就会下降,线粒体富集 Rh123 的能力降低,因而荧光强度会减弱,那么峰值也会随之向左移,但在 RNAi 的作用下,凋亡的发生减少,线粒体损伤程度降低,荧光强度的峰值就向右移。

众所周知,铝具有明显的神经毒性,但其具体机制尚不清楚。铝可以通过多种凋亡信号转导途径的汇聚点 caspase-3,使神经细胞产生凋亡,最后导致神经元大量丢失,而神经元丢失和老年斑、神经纤维缠结共同形成 AD 的主要病理改变^[8],铝致凋亡与 AD 的发生、发展关系密切。有研究证实,铝过负荷能导致海马神经元核固缩和神经元丢失等神经退行性变,并且呈剂量依赖性和时间依赖性^[9],而细胞凋亡在神经元的丢失中扮演重要角色。

与此同时,由于可以简单方便地“敲除”某个基因的表达,

RNAi 技术已经成为研究基因功能的最热门的有力工具, RNA 干扰技术具有高效性、稳定性、特异性、可遗传性等特点, 而蛋白质转染目前远远不如 DNA 或者 RNA 转染那么广泛, 原因有很多, 比如蛋白质纯化比 DNA 纯化困难, 转染蛋白的持续性和稳定性等等, 所以我们针对 *caspase-3* 基因设计了 siRNA, 它能够通过沉默 *caspase-3* 基因, 抑制凋亡的发生, 降低铝对大脑的毒性作用, 干扰了铝和凋亡之间的联系, 从而减少神经元丢失, 那么, 在一定程度上就能减少神经元退行性改变的发生, 这一作用在 AD 等退行性疾病的发生、发展中有重要意义, 并且为进一步研究遗传因素和环境因素的交互作用提供基础依据, 对 AD 等退行性疾病的基因水平治疗方法有提示作用。

参考文献:

- [1] 李凡, 张中乐, 马书玲, 等. 慢性乙醇中毒大鼠神经细胞凋亡和学习记忆能力下降的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(7): 1441-1444.
- [2] 张勤丽, 牛丕业, 石樱桃, 等. Bcl-2 和 Bax 蛋白及基因在铝致神经细胞毒性作用中的表达[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24

(10): 582-586.

- [3] 李美琴, 郭卫力, 张勤丽, 等. 铝对 apoE 基因敲除小鼠认知能力及相关蛋白的影响[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(4): 209-211.
- [4] 唐秋实. 孕哺期铝暴露对仔鼠海马及含量和受体活性的影响[D]. 中国医科大学硕士论文, 2007.
- [5] NUNEZ G, BENEDICT MA, HU Y, et al. Caspase: The proteases of the apoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3237-3245.
- [6] BRENNER C, MARZO I, KROEMER G, et al. A revolution in apoptosis: from a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective[J]. *Exp Oerontol*, 1998, 33(10): 543-553.
- [7] 林俊山, 李笃妙, 傅冷西, 等. CD437 诱导 HepG2 细胞凋亡及机制的初步研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2009, 9(30): 630-634.
- [8] 吴惠玲, 王国强, 王冰雁. 阿尔茨海默病的细胞凋亡机制[J]. 海南医学, 2010, 21(1): 30-31.
- [9] 吴柯, 周歧新. 铝过负荷致小鼠脑神经元退变与脑单胺氧化酶 B 的关系[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(2): 125-133.

(收稿日期: 2010-09-03)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)

(上接第 136 页)

烟与烹调油烟之间的交互作用。而本研究结果提示吸烟、室内烹调油烟、居住房屋类型等存在交互作用, 但由于 MDR 模型构建的局限性, 未能具体分析到底是哪两个或哪些因素间存在交互作用, 还需要更多的研究加以验证。

综上所述, 戒烟、减少室内油烟污染、改善室内通风条件及装修后等刺激性气味消散后入住、减少农药接触等可减少肺癌发病风险, *BRCA2* 基因 *rs144848* 多态性可能与肺癌易感性有关, 但仍需要更深入的研究加以论证。当然, 本研究也存在不足之处, 如未对吸烟因素(吸烟量、吸烟时间长短等)进行更细致的分析, 未对居住环境空气成分进行量化分析, 只是以问卷形式调查, 可能存在一定的偏倚。但是, 本研究还是在一定程度上揭示了吸烟、环境危险因素及基因多态性与肺癌发病风险的关联。

参考文献:

- [1] PRASAD R, AHUJA RC, SINGHAL S, et al. A case-control study of bidi smoking and bronchogenic carcinoma[J]. *Ann Thorac Med*, 2010, 5(4): 238-241.
- [2] WALLER LL, WEAVER KE, PETTY WJ, et al. Effects of continued tobacco use during treatment of lung cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(10): 1569-1575.
- [3] TSENG RC, HSIEH FJ, SHIH CM, et al. Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes: a multiple genotype-phenotype study[J]. *Cancer*, 2009, 115(13): 2939-2948.
- [4] DANOY P, MICHELIS S, DESSEN P, et al. Variants in DNA double-strand break repair and DNA damage-response genes and susceptibility to lung and head and neck cancers[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 457-463.

- [5] 黄敏, 缪泽鸿, 丁健. DNA 双链断裂损伤修复系统研究进展[J]. 生理科学进展, 2007, 38(4): 295-300.
- [6] 李磊, 陈志勇. 吸烟与肺癌发生的关系[J]. 循证医学, 2009, 9(4): 206-212.
- [7] 张同梅, 赖百塘. 烟草特有亚硝胺 NNK 与肺癌的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(2): 140-142.
- [8] 施海龙, 何钦成, 戴晓淳, 等. 非吸烟女性肺癌危险因素的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(4): 279-282.
- [9] 柯冰, 涂亚庭, 姚鹏, 等. 室内装修后空气中挥发性有机物污染状况调查分析[J]. 中国社会医学杂志, 2007, 24(1): 55-57.
- [10] 翟敏, 邵珠艳, 岳喜同. 室内装修甲醛污染的研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2006, 29(1): 69-70.
- [11] 孙喜文, 戴旭东, 石于波, 等. 室内环境污染、神经精神等因素与肺癌关系的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2002, 5(2): 101-103.
- [12] 何钦成, 陈佳鹏, 周宝森. 环境农药暴露与人群肺癌发病、死亡的相关分析[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 401-402.
- [13] RAMUS SJ, VIERKANT RA, JOHNNATTY SE, et al. Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 380-388.
- [14] 沈孝兵. 职业暴露烹调油烟人群致突变性危害监测[J]. 癌变·畸变·突变, 2001, 13(4): 257.
- [15] 李雪莲, 关鹏, 尹智华, 等. 人乳头瘤病毒感染与非吸烟女性肺癌关系[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(5): 513-515.
- [16] 韩仁强, 赵金扣, 刘爱民, 等. 绿茶及与相关因素的交互作用对大丰市居民肺癌发生的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(3): 354-349.

(收稿日期: 2010-02-08)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 徐新春)