

正常菌与可吸入矿物细颗粒作用致突变性研究

马 骥¹,董发勤²,邓建军¹,曾娅莉¹

(1. 四川绵阳四〇四医院检验科, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010)

摘要: 采用 Ames 试验分别对蒙脱石、石英、方解石、钠长石 4 种可吸入矿物细颗粒及其与大肠杆菌、表皮葡萄球菌相互作用 48 h 后的混悬液作为受试物进行检测, 分析 IMG 是否具有致突变性, 及其与人体正常细菌群作用后, IMG/正常菌复合体是否有致突变性毒力改变。结果显示石英以及石英/大肠杆菌复合体对 TA98、TA100 菌株 Ames 试验呈阳性反应; 石英/表皮葡萄球菌复合体对 TA98 菌株 Ames 试验呈阳性反应; 而蒙脱石、方解石、钠长石纯矿及其与正常菌作用后的复合体 Ames 试验结果均为阴性。结果表明石英具有直接致突变作用; 石英与正常菌作用后复合体依然具有致突变性, 但石英表现出的碱基置换突变作用在与表皮葡萄球菌作用后消失, 其机制有待进一步研究。

关键词: 可吸入矿物细颗粒(IMG); Ames 试验; 表皮葡萄球菌; 大肠杆菌; 致突变性

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2017)06-0903-06

A study of the mutagenicity of normal bacteria interacted with inhalable mineral granules

MA Ji¹, DONG Fa-qin², DENG Jian-jun¹ and ZENG Ya-li²

(1. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 2. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: The mutagenicity of inhalable mineral granules (IMG) and interaction with Epidermis staphylococcus, *E. coli* were studied by Ames test to analyze whether IMG and IMG/body normal flora complex has mutagenicity. The results show that Ames test of the quartz and quartz/*E. coli* complex on TA98 and TA100 strains assumes positive reaction, Ames test of quartz/epidermis staphylococcus complex on TA98 strains assumes position reaction, whereas Ames test of montmorillonite, calcite, albite and complex from interaction with body normal flora exhibits negative reaction, which suggests that the quartz has direct mutagenic effect, quartz/body normal flora complex still has mutagenicity, but the mechanism of the phenomenon that base replacement mutation effects of quartz disappeared after interaction with Epidermis staphylococcus needs further research.

Key words: inhalable mineral granules (IMG); Ames test; Epidermis staphylococcus; *Escherichia coli*; mutagenicity

Fund support: The State Key Program of National Natural Science Foundation of China (41130746); The National Natural Science Fund Project (41472046)

收稿日期: 2017-08-30; 接受日期: 2017-10-18

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41130746); 国家自然科学基金面上项目(41472046)

作者简介: 马 骥(1981-), 男, 主管检验技师, 医学检验专业, E-mail: docma404@163.com; 通讯作者: 邓建军(1972-), 女, 硕士, 教授, E-mail: jianjundeng0801@163.com。

矿物细颗粒物和微生物个体都是大气颗粒物(PM)的重要组成部分,可吸入矿物细颗粒(IMG)是指空气动力学直径小于或等于 $2.5\ \mu\text{m}$ 的矿物颗粒物。研究表明沙尘大气中的颗粒物主要为硅铝酸盐颗粒(61.59%)、方解石和石英颗粒(13.59%)(陈雁菊等,2007),董发勤等(2005)对我国北方及四川北部粉尘物相形态进行了研究,结果表明我国北方部分地区大气粉尘主要以石英、钠长石、方解石、绢云母矿物相为主。

在 $\text{PM}_{2.5}$ 的生物毒性研究中,国内外已有大量流行病学研究,都指出大气 $\text{PM}_{2.5}$ 浓度升高会导致人群肺癌死亡率升高(Pope *et al.*, 2002; 殷文军等, 2009; Turner *et al.*, 2011; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013)。国际癌症研究中心(IARC)已在2013年10月宣布已有足够研究证据表明长期暴露于室外空气污染环境中可导致肺癌,并确定室外空气污染为人类新的致癌物(Loomis *et al.*, 2013),且颗粒物越小对人体健康的危害越大。现阶段人们越来越重视环境超细颗粒物的健康效应,已经对沙尘和非沙尘大气 PM_{10} 或 $\text{PM}_{2.5}$ 的生物安全性做出了初步评估,提出了相关颗粒物或超细颗粒物的致毒机理(吕森林等, 2003; 董发勤等, 2005, 2009; Maurizio *et al.*, 2010)。

Ames体外细胞遗传突变试验(Ames Test)是目前常用的一种环境致突变性检测手段,是检测具有遗传毒性的化合物对DNA碱基损伤的一种灵敏、快速、简便方法。该试验可根据受试物使突变型沙门氏菌株在无组氨酸的培养基上的生长能力来衡量该物质的致突变能力(毛旭等, 2015)。有研究表明, $\text{PM}_{2.5}$ 携带的有机化合物均可显著提高TA98和TA100的突变活性(Swartz *et al.*, 2009; Traversi *et al.*, 2011; De Brito *et al.*, 2013),提示Ames试验可较敏感地检测出PM的致突变性(文海若等, 2014)。但此类研究对象大多采用可吸入颗粒物部分提取物,如半挥发性多环芳烃(PAHs)等有机物或重金属;此外,对微生物及其与IMG的复合颗粒物毒性研究不够,基本不涉及天然矿物颗粒物。IMG与大气直接相通的鼻腔、口腔等器官和皮肤表面的正常菌群作用后,其复合体是否具有致突变性,以及毒力是否改变目前也尚不明确。本研究选取了蒙脱石、石英、方解石、钠长石4种常见IMG与大肠杆菌、表皮葡萄球菌两种人体正常细菌作为研究对象,采用Ames试验分别对以上4种IMG以及IMG与大肠杆菌、表皮葡萄球菌相互作用48h后复合体的

致突变性进行检测。

1 材料与方法

1.1 试验菌株准备

Ames试验组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株(TA97、TA98、TA100、TA102)购自四川大学华西医学院公共卫生学院,均已完成其生物学特性鉴定,结果与菌株鉴定的判断标准相符。大肠杆菌、表皮葡萄球菌两种人体正常细菌由四川绵阳四〇四医院检验科培养分离并鉴定。

1.2 矿物颗粒制备

钠长石购自河北灵寿川石矿业有限公司,石英购自四川南联矿业有限公司,蒙脱石、方解石由西南科技大学提供。石英、钠长石、方解石破碎后使用卧式球磨机湿磨10h,洗出,马尔文激光粒度分析仪测定粒度,其粒径均主要分布于 $2.5\ \mu\text{m}$ 。烘干样品再次研磨过200目,封装待用。通过XRD分析IMG物相结构。试验前将矿物在 $110\ ^\circ\text{C}$ 烘箱烘干,并在紫外灯下平铺照射24h。

1.3 仪器及试剂

X'Pert Pro X射线衍射仪、DQM-WS卧式行星球磨机、马尔文激光粒度分析仪、恒温水浴槽、恒温培养箱、pH计、振荡水浴摇床、压力蒸汽消毒器、干热烤箱、低温冰箱($-80\ ^\circ\text{C}$)、普通冰箱、天平($0.0001\ \text{g}$)、混匀振荡器、玻璃器皿等以及Ames试验所需培养基成分分析纯试剂。

1.4 Ames试验

Ames试验及相关试剂均严格按照中华人民共和国医疗行业标准:Ames试验(YY/T 0127.10-2009)进行操作和配制。

1.4.1 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株准备

取已灭菌营养肉汤培养基各100 mL,分别加入4个150 mL无菌锥形瓶中,将主平板TA97、TA98、TA100、TA102菌株分别接种于营养肉汤培养基内, $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡(100次/min)培养12h。使该菌株培养物应每毫升不少于 $1\times 10^9\sim 2\times 10^9$ 活菌数。按总菌液量的10%加入二甲亚砜,再分装于1.5 mL无菌EP管中,使菌液以下部分插入泡沫板中,直接放入 $-80\ ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。每次试验时, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴快速复苏后当天使用。

1.4.2 人体正常菌准备

Ames试验对组氨酸含量要求严格,受试物及溶

剂均不能含有组氨酸。故大肠杆菌、表皮葡萄球菌接种于不含氨基酸的 M9 无机盐培养基中,置 37℃ 恒温培养箱中增菌分别培养 24 h、48 h 后使用(大肠杆菌在 M9 培养基中生长速度较快、表皮葡萄球菌在 M9 培养基中生长速度较慢)。

1.4.3 IMG 纯矿 Ames 试验

将已灭菌纯矿用灭菌蒸馏水配制成 100、50、25、8、4、1.6 mg/mL 剂量。按每皿 0.1 mL 添加,剂量即为: 10、5、2.5、0.8、0.4、0.16 mg/皿。用 Ames 试验标准菌株 TA97、TA98、TA100、TA102,在不加 S9 混合液的条件(-S9),以平板掺入法进行 Ames 试验;各菌株每剂量做 3 个平行皿,所有试验要求在不同时间重复进行一次。

1.4.4 IMG/人体正常菌复合体 Ames 试验

所选人体正常细菌与各矿物颗粒构成 IMG/细菌作用体系,以 M9 无机盐培养基作为主要液相环境,配成 50、25、8、4、1.6、0.8 mg/mL 剂量。37℃ 振荡(150 r/min)培养 48 h 取混悬液进行测试。其后试验步骤同 IMG 纯矿 Ames 试验。

1.4.5 对照选择

每次试验均设阴性(溶剂)对照、阳性对照、空白(自发回变)对照。TA97、TA98 菌株的阳性对照为: 2,4,7-三硝基-9-芴酮(0.2 μg/皿);TA100 菌株的阳性对照为: 叠氮化钠(1.5 μg/皿);TA102 菌株的阳性对照为: 丝裂霉素 C(0.05 μg/皿)。

1.4.6 结果判断

记录受试物各剂量组、对照组的每皿回变菌落数,以平均值和标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。如受试物的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的 2 倍或 2 倍以上,并呈剂量-反应关系者,则该受试物判定为致突变阳性。如果受试物经 4 个试验菌株检测后均为阴性,则可报告该受试物为致突变阴性。

2 结果与分析

2.1 4 种可吸入矿物细颗粒 XRD 分析

图 1 中 a、b、c、d 分别表示 4 种矿物粉尘,即方解石、石英、蒙脱石、钠长石样品。从 XRD 图谱分析可知,方解石、石英样本纯度高,而蒙脱石与钠长石样本中含有一定的石英杂质。

2.2 IMG 纯矿 Ames 试验(-S9)

从表 1 可知,蒙脱石、方解石、钠长石各剂量组回变菌落数均小于阴性对照组 2 倍,且无剂量-效应

关系,可判定此 3 种受试物无直接致突变性作用。

石英各剂量组 TA98 菌株回变菌落数均大于溶剂对照 2 倍以上,0.16~2.5 mg/皿剂量间存在剂量-效应关系,5、10 mg/皿剂量回变菌落数减少,提示 5 mg/皿及以上剂量对 TA98 菌株有毒性作用,导致回变菌落数显著减少;对 TA100 菌株,石英在 5.0 mg/皿剂量以上的回变菌落数在溶剂对照的 2 倍以上,且有剂量-效应关系。因此,可判定低剂量石英即对 TA98 菌株产生致突变作用,石英在 5 mg/皿及以上剂量对 TA100 菌株产生致突变作用。

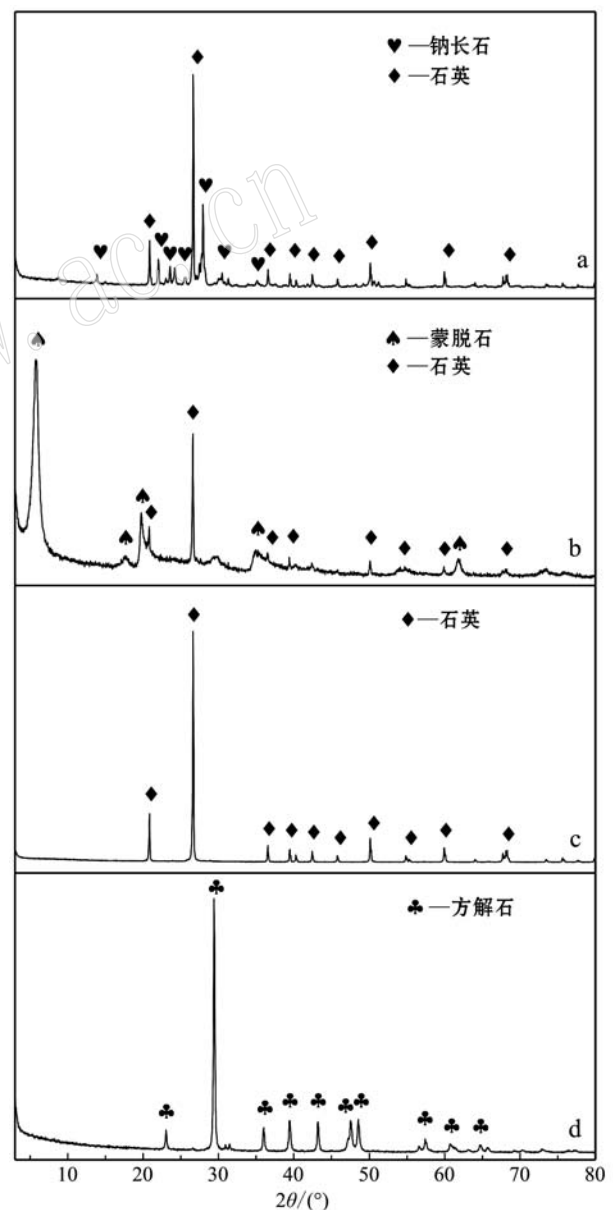


图 1 4 种可吸入矿物细颗粒 XRD 分析

Fig. 1 X-ray diffractometer analysis diagram of IMG

表1 石英纯矿 Ames 试验结果 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 1 Ames test result of quartz ($\bar{X} \pm SD$)

受试物	剂量(mg/皿)	TA97	TA98	TA100	TA102
石英	0.16	97 ± 10.78	113 ± 16.89*	79 ± 21.01	28 ± 4.59
	0.4	91 ± 10.65	124 ± 30.27*	73 ± 17.22	29 ± 8.48
	0.8	79 ± 18.99	222 ± 59.99*	79 ± 15.79	23 ± 8.16
	2.5	71 ± 20.55	602 ± 77.16*	86 ± 30.34	20 ± 8.14
	5.0	66 ± 15.73	373 ± 68.69*	158 ± 55.47*	28 ± 5.91
	10.0	78 ± 18.26	258 ± 88.62*	221 ± 50.61*	25 ± 4.02
自发回变		90 ± 5.66	18 ± 4.51	86 ± 39.55	139 ± 26.16
溶剂对照		74 ± 6.85	18 ± 5.01	68 ± 17.31	136 ± 33.81
阳性对照		>1 000	>1 000	>1 000	>1 000

注: * 与溶剂对照组相比,测试菌株回变菌落数大于或等于其2倍。

表2 石英/大肠杆菌 Ames 试验结果 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 2 Ames test result of quartz / E. coli complex ($\bar{X} \pm SD$)

受试物	剂量(mg/皿)	TA97	TA98	TA100	TA102
石英/大肠杆菌	0.08	50 ± 12.73	21 ± 2.49	289 ± 15.56*	24 ± 2.83
	0.16	63 ± 7.78	60 ± 7.78	306 ± 31.11*	30 ± 1.41
	0.4	61 ± 18.38	162 ± 19.79*	367 ± 24.04*	31 ± 4.24
	0.8	52 ± 5.66	226 ± 54.45*	76 ± 16.97	22 ± 4.95
	2.5	47 ± 12.73	513 ± 65.05*	61 ± 4.95	19 ± 2.12
	5.0	53 ± 4.95	36 ± 3.54	67 ± 2.12	15 ± 4.95
自发回变		87 ± 9.89	32 ± 2.31	71 ± 9.89	145 ± 13.44
溶剂对照		75 ± 2.12	58 ± 4.95	70 ± 2.83	144 ± 8.49
阳性对照		>1 000	>1 000	>1 000	>1 000

注: * 与溶剂对照组相比,测试菌株回变菌落数大于或等于其2倍。

2.3 IMG/人体正常菌复合体 Ames 试验(-S9)

石英/大肠杆菌作用 48 h 后进行 Ames 试验结果显示(见表 2):对 TA98 菌株,在 0.4~2.5 mg/皿剂量间,其回变菌落数大于阴性对照回变菌落数 2 倍以上,并存在剂量-效应关系;对 TA100 菌株,在 0.08~0.4 mg/皿剂量间,其回变菌落数大于阴性对照回变菌落数 2 倍以上,并存在剂量-效应关系。因此,可判定石英/大肠杆菌复合体对 TA98、TA100 菌

株具有致突变作用。

石英与表皮葡萄球菌作用 48 h 后进行 Ames 试验结果显示(见表 3):对 TA98 菌株,所有剂量组回变菌落数均大于阴性对照 2 倍以上,在 0.08~2.5 mg/皿剂量间存在剂量-效应关系;对 TA100 菌株,未检出致突变性。因此,可判定石英/表皮葡萄球菌复合体对 TA98 菌株具有致突变作用。

表3 石英/表皮葡萄球菌 Ames 试验结果 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 3 Ames test result of quartz/epidermis staphylococcus complex ($\bar{X} \pm SD$)

受试物	剂量(mg/皿)	TA97	TA98	TA100	TA102
石英/表葡	0.08	81 ± 5.66	78 ± 5.65	50 ± 9.19	13 ± 4.24
	0.16	81 ± 0.71	67 ± 16.26	52 ± 7.78	12 ± 4.95
	0.4	71 ± 4.24	151 ± 10.61*	61 ± 11.31	12 ± 3.06
	0.8	60 ± 20.51	156 ± 25.46*	46 ± 2.83	26 ± 2.89
	2.5	60 ± 13.44	480 ± 45.25*	61 ± 8.49	22 ± 0.58
	5.0	78 ± 6.36	96 ± 28.28*	61 ± 2.83	24 ± 3.46
自发回变		88 ± 4.95	22 ± 6.36	68 ± 4.95	140 ± 26.16
溶剂对照		79 ± 10.61	20 ± 2.08	72 ± 10.61	121 ± 6.24
阳性对照		>1 000	>1 000	>1 000	>1 000

注: * 与溶剂对照组相比,测试菌株回变菌落数大于或等于其2倍。

3 讨论

在4种 Ames 试验菌株中,TA98 可检测各种移码突变型诱变剂,TA100 可检测引起碱基置换突变的诱变剂。本研究结果表明石英、石英/大肠杆菌复合体为引起移码突与碱基置换突变诱变剂,石英/表皮葡萄球菌复合体为引起移码突变诱变剂。研究还发现,石英与表皮葡萄球菌作用48 h后,其复合体对TA100 菌株致突变性转为阴性,石英表现出的碱基置换突变作用消失机制有待进一步研究。但根据 Ames 试验结果判定规则,受试物只要对一种试验菌株测试结果为阳性,则可判定该受试物具有致突变性。因此,可认为石英、石英/正常菌复合体均具有致突变性。

污染大气的致癌性虽已得到确认,但其机制目前仍不明确。在各种致病机制假说中,自由基介导的DNA氧化损伤被广泛接受。有研究表明,石英能导致微生物出现拉伸、凹陷、破裂等现象,且矿物细颗粒与微生物作用均会导致细菌胞内活性氧自由基升高,且呈浓度-剂量效应(李帅,2016)。可吸入石英粉尘本身也可在磷酸盐环境中释放活性氧自由基(ROS),而其中羟自由基($\cdot\text{OH}$)是目前已知活性最强的ROS(王明翠等,2015)。这提示介导DNA损伤的自由基主要来源于:导致细菌胞内活性氧自由基升高,并破坏胞体释放;石英粉尘本身在模拟人体介质环境中释放。

石英的遗传毒性主要是由自由基介导的,而DNA分子是该类自由基攻击的重要靶分子(刘宏等,2008)。由此可见,石英粉尘通过释放ROS,诱导DNA移码突变和碱基置换突变,从而导致DNA损伤。而DNA损伤也是诱导基因突变,或进而恶性转化为肿瘤细胞的重要因素。

4 结论

(1) 石英作为PM中重要组成成分,能通过释放自由基引起细胞DNA移码突变和基置换突变,从而导致DNA损伤的发生。

(2) 石英与正常菌作用后,其复合体任然具有致突变性。

(3) 石英表现出的碱基置换突变作用在与表皮葡萄球菌作用后消失,其机制有待进一步研究。

References

- Chen Yanju, Shi Zongbo, He Kebin, *et al.* 2007. Physico-chemical characteristics of individual mineral particles collected during dust storm periods in Beijing[J]. *Research of Environmental Sciences*, 20(1): 52~57(in Chinese).
- De Brito K C, De Lemos C T, Rocha J A, *et al.* 2013. Comparative geno-toxicity of airborne particulate matter(PM_{2.5}) using Salmonella, plants and mammalian cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 8(94): 14~20.
- Dong Faqin, Dai Qunwei, He Xiaochun, *et al.* 2009. The interaction between inhalable mineral granules and microorganisms[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 28(6): 611~616(in Chinese).
- Dong Faqin, He Xiaochun, Li Guowu, *et al.* 2005. Study on the basic characteristics of several atmospheric dusts in the norther China [J]. *J. Mineral Petrol.*, 25(3): 114~117(in Chinese).
- Li Shuai. 2016. Research Mineral PM_{2.5} on vivo bacteria in recent film role and activity[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 1~89(in Chinese).
- Liu Hong and Zhao Jinyuan. 2008. Role of free radicals in lung cancer induced by physical and chemical factors[J]. *J. Environ Health*, 25(1): 85~87(in Chinese).
- Lü Senlin, Shao Longyi, Shi Zongbo, *et al.* 2003. Mineral study of inhalable particles in environmental atmosphere[J]. *Journal of Liaoning Technical University*, 22(5): 707~710(in Chinese).
- Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, *et al.* 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution[J]. *The Lancet Oncology*, 14(13): 1 262~1 263.
- Maurizio Gualtieri, Johan Øvrevik and Jørn A Holme. 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells[J]. *Toxicology in Vitro*, 24: 29~39.
- Mao Xu and Shi Chunzhen. 2015. Research progress of PM_{2.5} toxicity mechanism and health effect[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 7: 205~207(in Chinese).
- Pope C A, Burnett R T, Thun M J, *et al.* 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution[J]. *JAMA*, 287(9): 1 132~1 141.
- Raaschou-Nielsen O, Andersen Z J, Beelen R, *et al.* 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective

- analyses from the European Study of Cohorts for Air pollution Effects(ESCAPE)[J]. *Lancet Oncol*, 14(9): 813~822.
- Swartz C D, King L C, Nesnow S, *et al.* 2009. Mutagenicity, stable DNA adducts, and abasic sites induced in Salmonella by phenanthro[3,4-b]-and phenanthro[4,3-b] thiophenes, sulfur analogs of benzo[*c*] phenanthrene[J]. *Mutat Res.*, 661 (1~2): 47~56.
- Traversi D, Schilirò T, Degan R, *et al.* 2011. Involvement of nitro-compounds in the mutagenicity of urban $PM_{2.5}$ and PM_{10} in Turin [J]. *Mutat Res.*, 726(1): 54~59.
- Turner M C, Krewski D, Pope C A III, *et al.* 2011. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers[J]. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 184(12): 1374~1381.
- Wang Mingcui, Dong Faqin, Wang Bin, *et al.* 2015. Release of hydroxyl radicals from inhalable quartz dust in phosphate buffer solution[J]. *Journal of Central South University*, 46(5): 1967~1972(in Chinese).
- Wen Hairuo and Zhou Wenshan. 2014. The research progress of atmospheric $PM_{2.5}$ toxicity and carcinogenic mechanism[J]. *Journal of Pub. Health and Prev. Med.*, 25(6): 70~73 (in Chinese).
- Yin Wenjun, Peng Xiaowu and Song Shizhen. 2009. The research methods of Air pollution on cardiovascular and cerebrovascular diseases epidemiological affect [J]. *Journal of Pub. Health and Prev. Med.*, 21(3): 55~57(in Chinese).
- ### 附中文参考文献
- 陈雁菊, 石宗波, 贺克斌, 等. 2007. 北京市沙尘天气中矿物单颗粒的物理化学特征[J]. *环境科学研究*, 20(1): 52~57.
- 董发勤, 代群威, 贺小春, 等. 2009. 可吸入矿物细颗粒物与微生物的相互作用[J]. *岩石矿物学杂志*, 28(6): 611~616.
- 董发勤, 贺小春, 李国武. 2005. 我国北方部分地区大气粉尘的特征研究[J]. *矿物岩石*, 25(3): 114~117.
- 李 帅. 2016. 矿物 $PM_{2.5}$ 对活体菌近膜物质作用及活性研究[D]. 绵阳: 西南科技大学, 1~89.
- 刘 宏, 赵金垣. 2008. 自由基在理化因素致肺癌中的作用[J]. *环境与健康杂志*, 25(1): 85~87.
- 吕森林, 邵龙义, 石宗波, 等. 2003. 环境大气可吸入颗粒物的矿物学研究[J]. *辽宁工程技术大学学报*, 22(5): 707~710.
- 毛 旭, 史纯珍. 2015. $PM_{2.5}$ 毒性机理与健康效应研究进展[J]. *绿色科技*, 7: 205~207.
- 王明翠, 董发勤, 王 彬, 等. 2015. 可吸入石英粉尘中的羟自由基在磷酸盐缓冲溶液中的释放规律[J]. *中南大学学报*, 46(5): 1967~1972.
- 文海若, 周文珊. 2014. 大气 $PM_{2.5}$ 毒性及致癌性作用机制的研究进展[J]. *公共卫生与预防医学*, 25(6): 70~73.
- 殷文军, 彭晓武, 宋世震. 2009. 大气污染对心脑血管疾病影响的流行病学研究方法[J]. *公共卫生与预防医学*, 21(3): 55~57.