

· 环境矿物学 ·

我国四大矿区温石棉粉尘诱导 A549 细胞凋亡和周期阻滞的对比研究

黄凤德¹, 王玉琳², 冯晨旭⁴, 霍婷婷^{3,4}, 董发勤^{3,4}, 刘琬薰², 杨洁²,
曾娅莉¹, 邓建军^{1,2}

(1. 四川绵阳四〇四医院 四川 绵阳 621000; 2. 西南医科大学临床医学院 四川 泸州 646000; 3. 西南科技大学 固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010; 4. 西南科技大学 环境与资源学院, 四川 绵阳 621010)

摘要: 通过 FT-IR 和 XRD 对四川新康、陕西陕南、甘肃阿克塞和青海茫崖四大矿区温石棉的物相成分、谱学特征进行测试分析, 利用 MTT 法、流式细胞术检测了 4 种温石棉纤维粉尘染毒 A549 细胞后的细胞存活率、凋亡率和细胞周期分布, 比较和探讨了四大矿区温石棉纤维粉尘抑制细胞增殖能力的大小及其对细胞凋亡和周期阻滞的影响。研究结果显示, 四大矿区温石棉的主要物相是斜纤蛇纹石, 新康温石棉成分比其他 3 种温石棉的复杂, 阿克塞和茫崖温石棉的成分相似; 四大矿区的温石棉化学基团基本相同, 阿克塞和茫崖温石棉纤维的表面结构较陕南和新康温石棉的完善。4 种温石棉均能不同程度地抑制 A549 细胞增殖, 诱导细胞凋亡和周期阻滞: 茫崖组凋亡率最大(22.56 ± 2.56)%, 陕南组凋亡率最小(19.57 ± 3.07)%; 细胞周期阻滞均以 G2/M 期阻滞为主, 新康、陕南、阿克塞和茫崖组处于 G2/M 期细胞比例分别增加 8.90%、8.58%、9.13% 和 10.44%。4 种温石棉导致细胞凋亡和周期阻滞的能力: 茫崖 > 新康 > 阿克塞 > 陕南。

关键词: 温石棉; A549 细胞; 凋亡; 周期阻滞

中图分类号: P619.27¹; P579; Q2-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2018)06-0967-08

A comparative study of A549 cell apoptosis and cell cycle arrest induced by chrysotile asbestos dust in four major mining areas of China

HUANG Feng-de¹, WANG Yu-lin², FENG Chen-xu⁴, HUO Ting-ting^{3,4}, DONG Fa-qin^{3,4}, LIU Wan-xun²,
YANG Jie², ZENG Ya-li¹ and DENG Jian-jun^{1,2}

(1. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 2. Clinical Medical College of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 4. Environment and Resource College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: The compositions of chrysotile asbestos in four major mining areas of Xinkang in Sichuan, Shannan in Shaanxi, Akesaic in Gansu and Mangya in Qinghai were analyzed by FTIR, their cell viability was detected by MTT assay, and their cell apoptosis rate and cell cycle arrest were tested by flow cytometry. The authors compared and discussed the effects of chrysotile asbestos dust on cell proliferation, cell apoptosis and cell cycle arrest in four mining areas. The results show that the main phase of chrysotile asbestos in four mining areas was oblique fiber serpentine, the composition of Xinkang chrysotile asbestos was more complex than that of the other three kinds of chryso-

收稿日期: 2017-08-31; 接受日期: 2018-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046, 41602033); 四川绵阳市科技计划项目(13S002-5)

作者简介: 黄凤德(1967-), 男, 汉族, 学士学位, 主治医师, 研究方向: 温石棉粉尘的毒理学机制, E-mail: 759383240@qq.com;

通讯作者: 邓建军(1972-), 硕士, 主任技师, E-mail: jianjundeng0801@163.com。

tile asbestos, and the composition of Akesai is similar to that of the Mangya chrysotile asbestos. The chemical groups of chrysotile asbestos in the four major mining areas are basically the same, and the surface structure of Akesai and Mangya chrysotile fibers is better than that of Shannan and Xinkang. Four kinds of chrysotile asbestos can inhibit the proliferation of A549 cells in different degrees, inducing apoptosis and cell cycle arrest: the maximum apoptosis rate is $(22.56 \pm 2.56)\%$ in Mangya group, the lowest apoptosis rate is $(19.57 \pm 3.07)\%$ in the Shannan group; and the cell cycle arrest is mainly at G2/M stage. The proportions of G2/M stage (Xinkang, Shannan, Akesai, Mangya) are increased by 8.90%, 8.58%, 9.13% and 10.44% respectively. The capability of four kinds of chrysotile asbestos for inducing cell apoptosis and cell cycle arrest is in order of Mangya > Xinkang > Akesai > Shannan.

Key words: chrysotile asbestos; A549 cell; apoptosis; cell cycle arrest

Fund support: Projects of National Natural Science Foundation of China (41472046, 41602033); Project of Science and Technology of Mianyang, Sichuan Province 13S002-5

温石棉是一种天然的富镁硅酸盐矿物纤维材料,因具有耐高温、耐腐蚀、电绝缘等优良性能,早在19世纪70年代起就被大量开采和广泛使用(Wang *et al.*, 2013),目前温石棉相关制品大约有3 000种(Fox, 2015; Castleman, 2017)。据不完全统计,我国温石棉矿产资源主要分布在15个省(区)的45处矿区,总储量约有9 000多万吨(樊晶光等, 2016),但温石棉总产量的90%以上集中在青海茫崖、甘肃阿克塞、陕西陕南和四川新康四大矿区(Marsili *et al.*, 2016; 樊晶光等, 2016)。因其致癌、致突变作用显著,我国从2002年7月开始全面禁止角闪石石棉的开采、使用和进口,而对于温石棉的致癌风险性及使用安全性问题却一直存有争议(杨方明, 2002)。

温石棉具有良好的劈分性能,可劈分成最小直径为1~2 μm 的丝状纤维。随呼吸进入体内的温石棉纤维粉尘,大部分经机体的廓清体系排出体外,小部分滞留纤维对机体的长期刺激可导致以喉部和肺部为代表的呼吸系统肿瘤、肺纤维化和胸腹膜间皮瘤等,潜伏期长达20~40年(Baumann *et al.*, 2015; Roggli *et al.*, 2016; 宋平平等, 2016)。20世纪80年代以来,因温石棉的大量开采和广泛使用,温石棉接触暴露人群达100万人以上,温石棉暴露相关性疾病因具有较长的潜伏期,其对机体的致病机制随着疾病的出现而备受关注(Courtice *et al.*, 2016; Soeberg *et al.*, 2016)。温石棉对机体的毒性机制一直是国内外研究的重点,其中温石棉对靶细胞凋亡和细胞周期的影响是近几年的研究热点。众多体内外实验表明,温石棉纤维可通过机械作用或触发胞内特定的信号传导系统导致细胞凋亡和周期阻滞,是温石棉遗传毒性的基础(Peng *et al.*, 2015; Glover

et al., 2015; Acencio *et al.*, 2015; 霍婷婷等, 2016)。由于不同石棉矿区的地理位置不同,温石棉的生成条件不同,所生成的温石棉的种类和属性也不尽相同(宋鹏程等, 2013),因此,本文选取我国四大矿区温石棉为研究对象,对比分析不同矿区温石棉的理化特性及其对A549细胞凋亡和周期的影响,以期对我国不同产地温石棉矿产资源的特性认识和合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

主要试剂:改良型RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司)、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、胰蛋白酶消化液、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/Propidium Iodide, Annexin V-FITC/PI)、碘化丙啶(碧云天生物技术有限公司)、二甲基亚砜(四川生科力科技有限公司)。

主要仪器:卧式行星球磨机(QM-3SP4J,南京大学仪器厂)、红外光谱仪(Spectrum One,美国PE仪器公司)、X射线衍射仪(X'Pert PRO,荷兰PANalytical公司)、倒置相差荧光显微镜(Axio Observer A1,德国Zeiss公司)、流式细胞仪(FACS Calibur,美国Becton Dickinson公司)、微孔板分光光度计(BioTek PowerWave XS2,美国BioTek公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 粉尘的制备及特性分析

4种温石棉分别采自青海茫崖(简称茫崖)、甘肃阿克塞(简称阿克塞)、陕西陕南(简称陕南)和四

川新康(简称新康),经剪短、碾压和劈分后使用卧式球磨机湿磨 10 h,洗出、抽滤、烘干后再次研磨过 300 目筛,制成超细粉尘,封装待用。

由西南科技大学分析测试中心采用荷兰 PANalytical 公司 X'Pert PRO 型 X 射线衍射仪对样品进行晶体结构分析,测试条件:陶瓷 Cu 靶,管压 40 kV,管流 40 mA,狭缝系统:DS 1/2°,SS 0.04 rad,AAS 5.5 mm。扫描范围(2θ) $3^{\circ} \sim 80^{\circ}$,连续扫描。采用美国 PE 仪器公司 Spectrum One 红外光谱仪对样品进行 FT-IR 分析,扫描范围 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 。

1.2.2 细胞培养及粉尘悬液制备

人肺上皮细胞株(A549 细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院。调整细胞浓度后接种于培养瓶中,使用含有 10% 胎牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基(含 1% 的 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素),置于 37°C 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,每 3 d 按 1:3 比例传代。

实验前将已制备的温石棉纤维粉尘经高温高压蒸汽灭菌后,采用无血清改良型 RPMI-1640 培养基配制成 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,使用前需用超声振荡仪振荡 20 min。

1.2.3 MTT 法检测细胞存活率

将指数生长期的 A549 细胞调整计数为 1×10^5 个/mL,以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板中。待细胞长至 85% 时,弃培养基后分别加入浓度为 0、12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 4 种温石棉纤维粉尘悬液 200 μL 。培养 24 h 后,向每孔中加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL)。避光孵育 4 h 后弃上清,加入 200 μL 二甲基亚砜,震荡 10 min,使用微孔板分光光度计在 490 nm 波长处测量吸光度值(A)。每个浓度组设 6 个平行孔。同时设置阴性对照组(仅接种细胞)和粉尘对照组(加温石棉粉尘悬液而不接种细胞)。根据如下公式计算细胞相对存活率:细胞相对存活率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{粉尘对照组}}) / A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的细胞调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL 后,每孔 2 mL 接种到 6 孔板中,置于培养箱中培养。次日,弃上清,PBS 洗涤 3 次后,分别向孔板中加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 4 种温石棉纤维粉尘悬液 2 mL,同时设立空白对照组。共同孵育 24 h 后,消化、离心收集细胞,根据凋亡检测试剂盒的操作说

明,依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 混匀。室温、避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,空白对照组和实验组均设 3 个平行孔。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞接种、实验分组及 4 种温石棉悬液染毒 A549 细胞流程同 1.2.4。染毒 24 h 后消化细胞,离心去上清。PBS 洗涤、离心收集细胞,在预冷的 70% 乙醇中固定 30 min(4°C)。再用 PBS 洗涤 2 次,根据细胞周期检测试剂盒的操作说明,加入 300 μL 核糖核酸酶存储液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)于 37°C 水浴 30 min,加入 300 μL 碘化丙啶(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)避光染色 10 ~ 15 min,用流式细胞仪检测,计数至少 30 000 个细胞,空白对照组和实验组均设 3 个平行孔。

1.3 统计学分析

使用 EXCEL 和 SPSS22.0 进行数据整理和统计学分析,利用 GraphPad Prism 5.0 及 Origin 8.0 进行图形绘制。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 实验结果与数据分析

2.1 温石棉的 XRD 分析

由四大矿区温石棉 XRD 结果(图 1)可知,新康温石棉主要物相为斜纤蛇纹石,并含有石英、滑石、绿泥石和白云母;陕南温石棉主要物相为斜纤蛇纹石和水镁石,含有少量菱镁矿;阿克塞温石棉和茫崖温石棉主要物相为斜纤蛇纹石,含少量滑石和绿泥石。四大矿区温石棉物相均以斜纤蛇纹石为主,都不含有已禁用的闪石类石棉纤维。

2.2 温石棉的 FT-IR 分析

在图 2 中,四大矿区温石棉样品的 FT-IR 图谱的吸收峰的峰位峰形基本相同,4 种温石棉均为纤蛇纹石。 $3\ 695 \sim 3\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带是—OH 的吸收峰,主要由内外—OH 伸缩振动引起; $1\ 050 \sim 950\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带主要由 Si—O 伸缩振动引起; $650 \sim 600\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带主要由 Mg—O 伸缩振动引起, $600 \sim 550\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收谱带主要由 Mg—O 弯曲振动引起。陕南温石棉在 $1\ 466\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带发生了偏移,阿克塞和茫崖温石棉在 $1\ 050 \sim 950\ \text{cm}^{-1}$ 附近的 Si—O 伸缩振动峰吸收带分裂比陕南和新康温石棉明显,表明这两种温石棉纤维的表面结构较陕南和新康温石棉的完善。

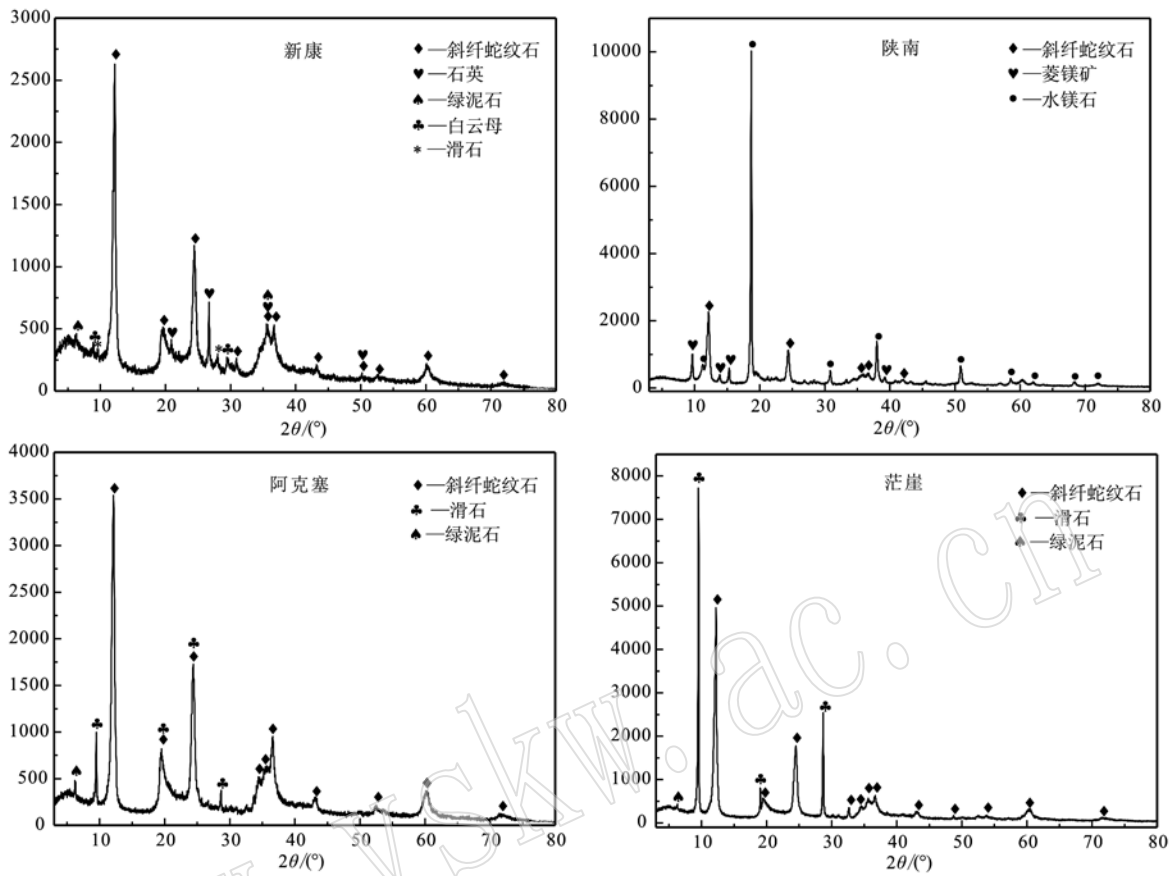


图1 四大矿区温石棉的XRD光谱图

Fig. 1 XRD patterns of chrysotile asbestos from four major mining areas

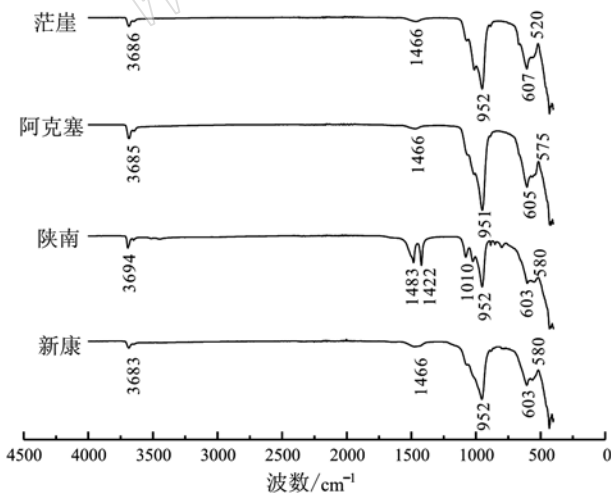


图2 四大矿区温石棉的FT-IR光谱图

Fig. 2 FTIR patterns of chrysotile asbestos from four major mining areas

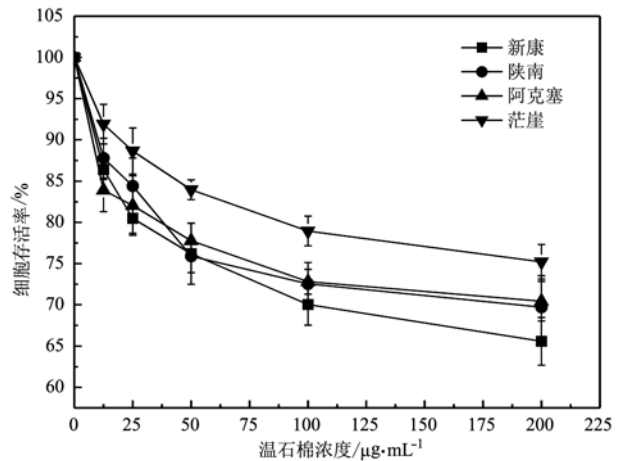


图3 四大矿区温石棉对A549细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect of chrysotile asbestos from four major mining areas on the survival rate of A549 cells

2.3 温石棉对细胞存活率的影响

四大矿区温石棉染毒 A549 细胞 24 h 后,与对照组(0 μg/mL)相比,如图 3 所示,细胞存活率随着

温石棉染毒浓度的增加均呈递减趋势,存在剂量依赖效应。在 0 ~ 100 μg/mL 的浓度范围内细胞存活率的下降约 30%, 100 ~ 200 μg/mL 的浓度范围内下

降约 10%。4 种温石棉染毒组除 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这一浓度组细胞存活率与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其他浓度组细胞存活率呈现出显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当温石棉染毒浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,茫崖组细胞存活率最高 (75.22 ± 4.16)%,新康组细胞存活率最低 (65.57 ± 4.99)%,陕南组和阿克塞细胞存活率无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 温石棉对细胞凋亡率的影响

4 种温石棉分别以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度染毒 A549 细胞 24 h 后,采用流式细胞术检测细胞凋亡结果如图 4 所示。与对照组相比,4 种温石棉染毒后细胞凋亡率均明显增大,细胞凋亡率呈现出显著差异 ($P < 0.01$)。茫崖组细胞凋亡率最大 (22.56 ± 2.56)%,陕南组细胞凋亡率最小 (19.57 ± 3.07)%。4 种温石棉对 A549 细胞凋亡率的影响由大到小排序为:茫崖 > 新康 > 阿克塞 > 陕南。

2.5 温石棉对细胞周期阻滞的影响

四大矿区温石棉分别以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度染毒

A549 细胞 24 h 后,采用流式细胞术对细胞周期进行检测,结果如图 5 所示。4 种温石棉均可导致 G0/G1 期和 S 期的细胞比例减少及 G2/M 期的细胞比例增加。茫崖组处于 G2/M 期的细胞比例最高 (15.59 ± 2.16)%,陕南组的最低 (13.73 ± 3.31)%,新康、陕南、阿克塞和茫崖组处于 G2/M 期细胞比例分别增加 8.9%、8.58%、9.13% 和 10.44%。与对照组相比,G2/M 期细胞比例呈现出显著差异,表明 4 种温石棉染毒后细胞周期处于 G2/M 期的比例明显增大 ($P < 0.01$)。4 种温石棉诱导的细胞周期阻滞均以 G2/M 期阻滞为主,其导致细胞周期阻滞的能力:茫崖 > 新康 > 阿克塞 > 陕南。

3 讨论

在课题组前期对温石棉矿物毒性研究的基础上,本实验通过对比研究我国不同产地温石棉的理化特性及诱导细胞凋亡和周期阻滞的能力,探究温

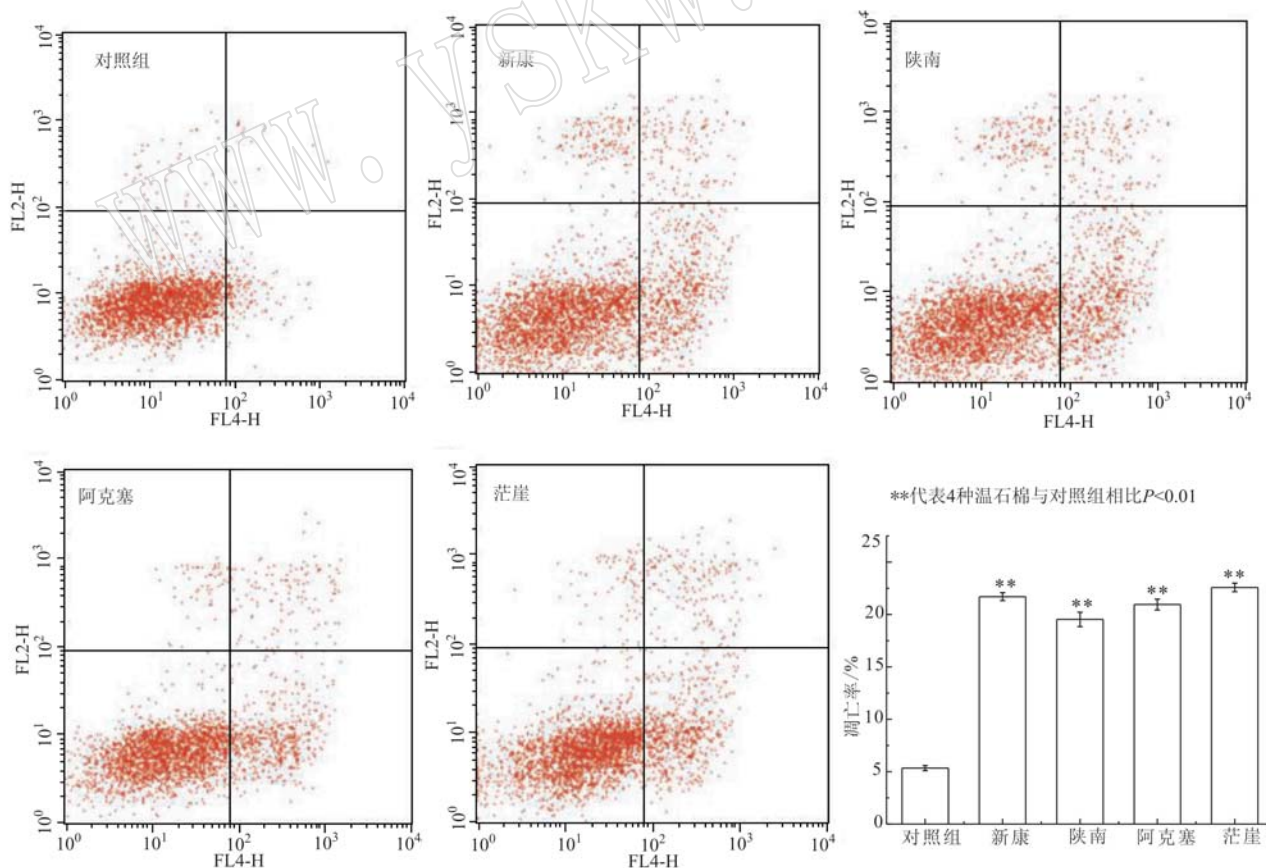


图 4 四大矿区温石棉对细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Effect of chrysotile asbestos from four major mining areas on apoptosis of cells

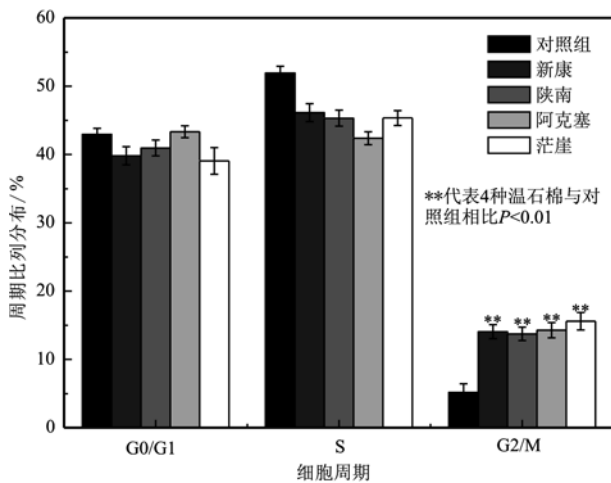


图5 四大矿区温石棉对细胞周期的影响

Fig. 5 Effect of chrysotile asbestos from four major mining areas on cell cycle

石棉纤维粉尘的可能致病机理和不同矿区温石棉间致病性的差异。

本研究显示,四大矿区温石棉均为纤蛇纹石,主要物相成分为斜纤蛇纹石,化学基团基本相同,新康温石棉成分比其他3种温石棉的复杂,阿克塞和茫崖温石棉的成分相似,且阿克塞和茫崖温石棉的表面结构较陕南和新康温石棉的完善。已有的研究结果显示,温石棉的纤维完整性、化学成分和金属离子与其细胞毒性和致癌性相关(Sarlinova *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016)。在本实验中,4种温石棉纤维可不同程度地抑制A549细胞增值,随着染尘浓度增加、孵育时间延长,细胞存活率呈下降趋势。在0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内细胞存活率的下降趋势较100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围显著,提示在一定的中低浓度下,温石棉纤维粉尘可与细胞壁膜充分接触,进一步活化细胞膜上的信号识别相关蛋白,激活胞内的信号传导系统,从而对细胞的损伤更明显。4种温石棉中又以新康温石棉对细胞存活率抑制作用最大,陕南和阿克塞温石棉次之,茫崖温石棉最小,推测温石棉对细胞的毒性作用与其纤维表面完整性和成分有关,纤维表面结构越完整、成分越单一,相对的细胞毒性越小。

凋亡是指在特定基因调控下的细胞程序性死亡的过程,在机体的新陈代谢、内环境稳态的维持以及机体病理改变中起着重要作用。研究表明,温石棉可导致细胞线粒体功能障碍、氧化应激、核酸损伤和p53磷酸化等,这些均可导致细胞凋亡,是石棉的毒

性机制之一(张敏等, 2013; Lee *et al.*, 2015; Escamilla-Rivera *et al.*, 2016)。早期研究发现,低浓度的温石棉可扰乱细胞周期进程而不诱导细胞凋亡,而较高浓度的温石棉主要诱导细胞凋亡(Urso *et al.*, 2016)。本实验中,四大矿区温石棉分别以较高浓度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)体外和A549细胞共同孵育24 h后,均导致A549细胞凋亡的发生(图6)。4种温石棉诱导细胞凋亡的能力不全相同,其中茫崖温石棉诱导细胞凋亡的能力最强,新康温石棉次之,阿克塞温石棉再次,陕南温石棉最弱。叶薇等(2015)通过微核实验和彗星实验证实了我国四大矿区温石棉可不同程度地损伤DNA和增加染色体的不稳定性,这可能就导致了4种矿区温石棉不同程度地诱导细胞凋亡,具体机制还有待进一步研究。

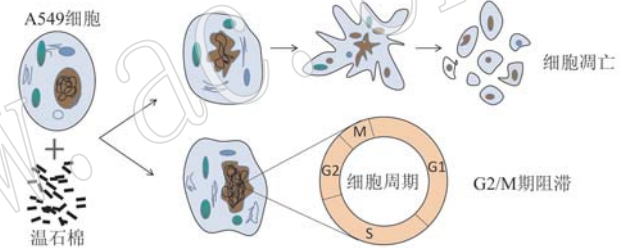


图6 温石棉诱导细胞凋亡和周期阻滞示意图

Fig. 6 The schematic diagram of cell apoptosis and cell cycle arrest induced by chrysotile asbestos

本实验中,四大矿区温石棉均导致细胞周期阻滞在G2/M期,处于S期的细胞比例明显减少(图6),其中茫崖温石棉对细胞周期阻滞最明显,陕南温石棉最弱。有研究显示,石棉暴露下,石棉纤维可通过机械干扰细胞有丝分裂过程中的染色体分离,使正常的细胞周期循环无法进行(Urso *et al.*, 2016)。石棉中所含的金属元素或作为污染物附着纤维表面的金属离子,特别是铁、铜等过渡金属元素,促使细胞中游离脂肪酸、磷脂和氨基酸等大分子物质发生生物过氧化,并释放出大量ROS,使DNA双键断裂、DNA碱基错配,导致细胞染色体复制、转录错误或终止,影响细胞周期的进程(Hiraku *et al.*, 2014; Daisuke *et al.*, 2015)。4种不同矿区温石棉因矿床的地理位置差异,温石棉形成的外部条件不同,温石棉纤维结构的完整性不同,纤维表面负载的金属离子也有差异,这可能导致了4种温石棉对细胞周期阻滞的不同影响。

本文实验结果表明茫崖温石棉诱导细胞凋亡及周期阻滞的能力最强,新康温石棉次之,这一结果与

图3中MTT法检测细胞存活率的实验结果茫崖温石棉对细胞增殖抑制能力最弱、新康温石棉最强不一致。体内外研究显示,矿物颗粒粉尘暴露还可导致氧化应激、自噬、炎症反应等一系列应激损伤,都会直接对细胞存活率产生影响(Miller *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014; Benvenuto *et al.*, 2016)。因此,这种不一致的现象提示温石棉除了会诱导细胞凋亡和周期阻滞外,还可能会有其他类型的细胞损伤方式。这是本课题组对石棉毒性作用机制后期研究的方向之一,有待进一步探索。

4 结论

(1) 四大矿区温石棉纤维粉尘可不同程度地抑制 A549 细胞增殖,均可诱导细胞凋亡和周期阻滞。

(2) 四大矿区温石棉因矿区位置不同,温石棉形成的外在条件差异,所形成的温石棉在物相组成、含量以及纤维完整性存在差异,对细胞凋亡和周期阻滞的不同影响为:茫崖 > 新康 > 阿克塞 > 陕南。

References

- Acencio M M, Soares B, Marchi E, *et al.* 2015. Inflammatory cytokines contribute to asbestos-induced injury of mesothelial cells[J]. *Lung*, 193(5): 831 ~ 837.
- Baumann F, Buck B J, Metcalf R V, *et al.* 2015. The presence of asbestos in the natural environment is likely related to mesothelioma in young individuals and women from Southern Nevada[J]. *Journal of Thoracic Oncology Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(5): 731 ~ 737.
- Benvenuto M, Mattera R, Taffera G, *et al.* 2016. The potential protective effects of polyphenols in asbestos-mediated inflammation and carcinogenesis of mesothelium[J]. *Nutrients*, 8(5): 275.
- Castleman B. 2017. Criminality and asbestos in industry[J]. *New Solutions A Journal of Environmental & Occupational Health Policy* Ns, 26(4): 557.
- Courtice M N, Berman D W, Yano E, *et al.* 2016. Size- and type-specific exposure assessment of an asbestos products factory in China[J]. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 26(1): 63 ~ 69.
- Daisuke M, Nagio T, Yuka K, *et al.* 2015. Downregulation of TBXAS1 in an iron-induced malignant mesothelioma model[J]. *Cancer Sci.*, 106(10): 1 296 ~ 1 302.
- Escamilla-Rivera V, Uribe-Ramirez M, Gonzalez-Pozos S, *et al.* 2016. Cytotoxicity of semiconductor nanoparticles in A549 cells is attributable to their intrinsic oxidant activity[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(4): 1 ~ 12.
- Fan Jingguang, Wang Haishu and Feng Lingyun. 2016. Fatal asbestos fiber[J]. *Labour Protection*, (2): 12 ~ 14(in Chinese).
- Fox M. 2015. Asbestos in recycled materials - modern risks and future concerns[J]. *Construction Materials*, 169(2): 1 ~ 5.
- Glover A R, Zhao J T, Gill A J, *et al.* 2015. microRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma[J]. *Oncotarget*, 6(34): 36 675 ~ 36 688.
- Hiraku Y, Sakai K, Shibata E, *et al.* 2014. Formation of the nitrative DNA lesion 8-nitroguanine is associated with asbestos contents in human lung tissues: A pilot study[J]. *J. Occup. Health*, 56(3): 186 ~ 196.
- Huo Tingting, Dong Faqin, Deng Jianjun, *et al.* 2016. Research development on surface activity and bio-persistence of chrysotile asbestos [J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society*, 44(5): 763 ~ 768(in Chinese).
- Hu G, Li P, Li Y, *et al.* 2016. Methylation levels of P16 and TP53 that are involved in DNA strand breakage of 16HBE cells treated by hexavalent chromium[J]. *Toxicology Letters*, 249: 15 ~ 21.
- Lee Y J, Lee Y J, Park I S, *et al.* 2015. Quercetin exerts preferential cytotoxic effects on malignant mesothelioma cells by inducing p53 expression, caspase-3 activation, and apoptosis[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 11(3): 295 ~ 305.
- Lin Z, Liu T, Kamp D W, *et al.* 2014. AKT/mTOR and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways are required for chrysotile asbestos-induced autophagy[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 72: 296 ~ 307.
- Marsili D, Terracini B, Santana V S, *et al.* 2016. Prevention of asbestos-related disease in countries currently Using asbestos[J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 13(5): 494.
- Miller J, Thompson J and Shukla A. 2014. Asbestos-induced Oxidative Stress in Lung Pathogenesis[M]. Springer Berlin Heidelberg.
- Peng L I, Liu T, Kamp D W, *et al.* 2015. The c-Jun N-terminal kinase signaling pathway mediates chrysotile asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 11(5): 3 626 ~ 3 634.
- Rogli V L, Sharma A, Butnor K J, *et al.* 2016. Malignant mesothelioma and occupational exposure to asbestos: a clinicopathological correlation of 1445 cases[J]. *Ultrastructural Pathology*, 26(2): 55 ~ 65.

- Sarlinova M, Majerova L, Matakova T, *et al.* 2016. Polymorphisms of DNA repair genes and lung cancer in chromium exposure[J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 833: 1.
- Soeberg M J, Leigh J and Van Z N. 2016. Malignant mesothelioma in Australia 2015: Current incidence and asbestos exposure trends[J]. *J. Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, 19(5~6): 173~189.
- Song Pengcheng, Peng Tongjiang, Xian Haiyang, *et al.* 2013. Mineralogical characteristics, development and utilization of chrysotile asbestos tailing from the Aksay ore district[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 32(6): 905~910(in Chinese with English abstract).
- Song Pingping, Wang Yan, Sun Jianling, *et al.* 2016. The incidence of asbestos-related diseases about on asbestos enterprises in Qingdao from 1988 to 2014[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 34(3): 203~205(in Chinese).
- Urso L, Calabrese F, Favaretto A, *et al.* 2016. Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment[J]. *Critical Reviews in Oncology*, 97(8 428): 220.
- Wang X, Courtice M N and Lin S. 2013. Mortality in chrysotile asbestos workers in China[J]. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 19(2): 169~173.
- Yang Fangming. 2002. State economic and trade commission announces the elimination of backward production capacity, processes and products[J]. *China Plant Engineering*, 1(7): 56~57(in Chinese).
- Ye Wei, Huo Tingting, Deng Jianjun, *et al.* 2015. Study on the mutagenicity of four kinds of chrysotile[J]. *Journal of Toxicology*, (5): 369~372(in Chinese).
- Zhang Min, Zhu Lijin, Xiao Yun, *et al.* 2013. Effects of p38 mitogen-activated protein kinases on the apoptosis of human bronchial epithelial cells induced by refractory ceramic fibers in vitro[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 31(5): 347~350(in Chinese).

附中文参考文献

- 樊晶光, 王海淑, 冯灵云. 2016. 致命的石棉纤维[J]. *劳动保护*, (2): 12~14.
- 霍婷婷, 董发勤, 邓建军, 等. 2016. 蛇纹石石棉纤维表面活性及生物持久性研究进展[J]. *硅酸盐学报*, 44(5): 763~768.
- 宋鹏程, 彭同江, 鲜海洋, 等. 2013. 阿克塞石棉尾矿矿物学特征及开发利用研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 32(6): 905~910.
- 宋平平, 王艳, 孙建岭, 等. 2016. 1988至2014年青岛市某石棉厂石棉相关疾病发病情况[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 34(3): 203~205.
- 杨方明. 2002. 国家经贸委公布淘汰落后生产能力、工艺和产品的目录[J]. *中国设备工程*, 1(7): 56~57.
- 叶薇, 霍婷婷, 邓建军, 等. 2015. 四种温石棉致突变性研究[J]. *毒理学杂志*, (5): 369~372.
- 张敏, 朱丽瑾, 肖芸, 等. 2013. p38丝裂原活化蛋白激酶对耐火陶瓷纤维诱导人支气管上皮细胞凋亡的作用[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 31(5): 347~350.