

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.05.006

## 热休克蛋白 70 基因 rs1008438 多态性与高原肺水肿的相关性\*

吴艾霖<sup>1,2</sup>,熊怡淞<sup>2</sup>,王艳艳<sup>2</sup>,曲远青<sup>2</sup>,吴丽娟<sup>2△</sup>(1. 第三军医大学研究生管理大队,重庆 400038;2. 成都军区总医院临床  
实验医学研究与保障中心,成都 610083)

**摘要:**目的 探讨热休克蛋白(HSP)70 基因启动子区 rs1008438 位点单核苷酸多态性(SNP)与高原肺水肿(HAPE)之间的关系。方法 采用 PCR-DNA 直接测序法检测 100 例 HAPE 组、200 例健康对照组个体基因组 rs1008438 位点的基因分布,分析不同基因型与 HAPE 的关系;运用 ELISA 法检测不同基因型 HAPE 组和健康对照组白细胞细胞质和细胞核 HSP70 蛋白含量变化;应用蛋白质芯片技术和 EVIDENCE180 全自动芯片仪分析 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平。结果 HAPE 组,健康对照组 rs1008438 的 TT、GT、GG 的基因型频率分别是 76.0%、20.0%、4.0%、93.0%、6.5%、0.5%。统计处理显示,HAPE 组 TT 基因型频率明显低于健康对照组( $P < 0.05$ );GT、GG 基因型患 HAPE 的危险性是 TT 基因型的 4.195 倍,G 等位基因相对 T 等位基因也能明显增加 HAPE 的发病风险( $OR = 4.178$ );ELISA 检测结果显示,不同基因型 HAPE 组 HSP70 含量均高于健康对照组,且 HSP70 细胞核/细胞质比值 TT 基因型高于 GT/GG 基因型;蛋白质芯片检测表明,HAPE 组血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平均明显高于健康对照组。结论 rs1008438 位点多态性与 HAPE 易感性相关,这种相关性可能是由于突变型在基因转录水平通过影响启动子活性而增强 HSP70 表达,从而导致 HAPE 的发生。

**关键词:**多态性;单核苷酸;高原肺水肿;rs1008438;热休克蛋白 70;启动子

中图分类号:R394.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)05-0593-04

## The relationship between rs1008438 polymorphism of HSP70 gene and high altitude pulmonary edema\*

Wu Ailin<sup>1,2</sup>, Xiong Yisong<sup>2</sup>, Wang Yanyan<sup>2</sup>, Qu Yuanqing<sup>2</sup>, Wu Lijuan<sup>2△</sup>

(1. Postgraduate Management Agency, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Research and Service Center of Laboratory Medicine, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between the single nucleotide polymorphisms (SNP) of rs1008438 in HSP70 promoter and the susceptibility of high altitude pulmonary edema (HAPE). **Methods** The PCR-DNA sequencing method was used to analyze gene distribution of rs1008438 in 100 HAPE patients and 200 healthy people, and the relationship between different genotypes and HAPE was evaluated. Meanwhile, HSP70 protein in cytoplasm and nuclei of white blood cells were detected by ELISA in patient group and healthy group. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels were analyzed by protein chip technology and EVIDENCE180 automatic chip reader. **Results** The TT, GT, and GG genotype frequencies of rs1008438 in HAPE patients and healthy controls were 76.0%, 20.0%, 4.0%, and 93.0%, 6.5%, 0.5%, respectively. The TT genotype frequency in HAPE patients was significantly lower than that in healthy control ( $P < 0.05$ ). The HAPE incidence rate in GT/GG genotype was 4.195 times higher than that in TT genotype, and the allele G can also significantly increase the prevalence of HAPE compared to T allele ( $OR = 4.178$ ). ELISA showed that HSP70 were higher in HAPE group of all genotypes than those in healthy control of the same genotype. And the nuclei/cytoplasm ratio of HSP70 in TT genotype was higher than that in GT/GG genotype. Protein chip showed that the levels of TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in HAPE group were significantly higher than those in healthy control. **Conclusion** The polymorphism of rs1008438 is related to susceptibility of HAPE. Mutate genotype may change the promoter activity and increase the expression of HSP70, which induced HAPE.

**Key words:** polymorphism; single nucleotide; high altitude pulmonary edema; rs1008438; HSP70; promoter

高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)是指近期抵达高原(一般指海拔 3 000 m 以上),出现静息时呼吸困难、胸闷压迫感、咳嗽、咳白色或粉红色泡沫痰,患者感觉全身乏力或活动能力减低的疾病,是遗传和环境因素共同作用的结果。近年来,对于 HAPE 的研究热点涉及体内多个系统,如细胞离子转运系统、内皮系统等<sup>[1-4]</sup>。热休克蛋白(HSP)是一组

细胞在应激环境诱导下生成的一组蛋白质。人快速进入高原环境时,体内的 HSP 会迅速增高来提高细胞的应激能力,抵抗外部的不利因素,其中一个机制为调节 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性,防止水分进入肺泡,引起 HAPE<sup>[5]</sup>。Qi 等<sup>[6]</sup>对修建青藏铁路的中国工人进行了调查,观察了 148 名 HAPE 患者和 438 名健康者,结果表明 HSP70 的 rs1061581、rs1043618 和

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302596);成都军区总医院创新科研基金资助项目(2011YG-A23,2013YG-B064)。作者简介:吴艾霖(1982-),主管技师,在读硕士,主要从事 siglec-1 介导组织巨噬细胞炎症反应参与类风湿关节炎发病机制研究。△ 通讯作者, E-mail: wulijuan1638@126.com。

rs1008438 位点的多态性可能与 HAPE 易感性相关,尤其 rs1008438 通过改变 HSPA1A 的启动子活性对 HAPE 的发生、发展起重要作用。

作者通过生物信息学分析的方法发现 HSP70 基因启动子区 rs1008438 位点位于转录因子结合区域,且在国际人类基因组单体型图计划(www. Hapmap. org)中查询到在中国汉族人群中中等位基因频率大于 12%,推测其可能影响 HSP70 基因的表达,从而导致 HAPE 的发生。本研究通过对临床 HAPE 病例及健康人群的研究,探讨 rs1008438 多态性与 HAPE 的关系,以深入认识 HAPE 发生、发展的遗传基础,为临床 HAPE 患者的预防提供客观依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 新入伍战士 1 200 人,汉族,所有研究对象均为男性,年龄 18~20 岁,入伍前经体检身体健康。分别从 23、110、396 m 和 891 m 的 4 个不同海拔地乘火车抵达海拔 505 m (成都)集结地,休整 7 d 后乘飞机到达海拔 3 658 m 高原(拉萨)。除非特指,本研究中平原海拔高度为 505 m,高原海拔高度为 3 658 m。从本次受试者符合急性高原反应评分量表(AMS Lake Louise)评分诊断标准的 HAPE 患者中选取 100 名患者作为 HAPE 组,从未达到诊断标准的人群中随机选取 200 名作为健康对照组,两组人员除观察因素外其他一般资料(服役时间、身高、体质量、身体状况、祖籍地)基本均衡。

**1.2 主要实验材料** 高保真 PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR 试剂盒、PrimeScript RT(逆转录)PCR 试剂盒、SYBR premix EX taq 荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);DNA 胶回收纯化试剂盒、柱式总 RNA 提取试剂盒及所有引物合成(上海生工生物技术有限公司);HSP70 ELISA 试剂盒(Stressgen Biotechnologies, Canada);蛋白质芯片试剂盒和 EVIDENCE180 全自动芯片仪(Randox, UK)。

## 1.3 基因分型

**1.3.1 基因组 DNA 提取** 清晨空腹状态下采集各组成员外周静脉全血,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝。基因组 DNA 提取使用酚-氯仿法, nano 2000 微量分光光度计测定 A260 及 A280,判断基因组 DNA 的纯度和浓度。

**1.3.2 目的基因的 PCR 扩增及纯化** ABI 2720 PCR 仪用于目的片段的扩增,上游引物 5'-GTG ACA CTC TGC TCC AAA CTT CT-3',下游引物 5'-CCC CTT GTC TAT TTC TGC TCA C-3'。反应体系含 2×PrimeSTAR GC Buffer 25.0 μL,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL,2.5 mM dNTPs Mixture 4.0 μL,10.0 μM 引物各 1.0 μL,DNA 模板 1.0 μL,双蒸水补足 50.0 μL。反应条件:预变性 95 °C 3 min,变性 94 °C 30 s,退火 59 °C 35 s,延伸 72 °C 50 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物,用柱式

DNA 胶回收试剂盒进行切胶纯化回收。PCR 纯化产物测序美国 ABI 公司 3730 测序列分析仪测序。

**1.4 HSP70 含量测定** 患者和健康组均取清晨空腹血 2 mL (EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝)用于 HSP70 检测。血样标本用红细胞裂解液破坏红细胞并用 PBS 洗涤 1 次(1 000 r/min,10 min),计数 5×10<sup>6</sup> 个细胞,用蛋白提取试剂盒(Pierce)分别抽提细胞质蛋白和细胞核蛋白,置于-70 °C 待测。HSP70 用 ELISA 试剂盒检测,具体操作严格按试剂盒说明书进行。

**1.5 细胞因子检测** 运用蛋白质芯片技术和 Evidence180 全自动芯片仪检测并分析 HAPE 组和健康对照组血清中细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平。两组人群清晨空腹抽血 5 mL 于分离胶管(BD 公司生产),室温放置 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,置于-80 °C 冰箱贮存待检。具体方法及操作过程参见文献[7]。

**1.6 统计学处理** 各组均采用 χ<sup>2</sup> 检验进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验;采用 SPSS13.0 行统计学分析,采用 χ<sup>2</sup> 检验及 Fisher 精确检验分析病例对照之间的基因型分布并计算优势比 OR 值和 95%CI。荧光定量 PCR 数据通过 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法[4]换算成相对含量并进行分析,HSP70 表达及细胞因子间比较利用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 rs1008438 基因型分布

**2.1.1 RT-PCR 直接测序法分型结果** 如图 1 所示,测序峰清晰,无明显杂峰,结果稳定,能明显区分 TT、GT、GG 3 种基因型。健康对照组 200 例标本中,HSP70 启动子 rs1008438 位点基因型为 GG 的 1 例(0.5%)、GT 的 13 例(6.5%)、TT 的 186 例(93.0%);HAPE 组 100 例标本中,HSP70 启动子 rs1008438 位点基因型为 GG 的 4 例(4.0%)、GT 的 20 例(20.0%)、TT 的 76 例(76.0%)。由 Hardy-Weinberg 平衡计算得到两组的 *P* 值分别为 0.31、0.16,均大于 0.05,说明各组成员人群都符合 Hardy-Weinberg,样本选择具有代表性。

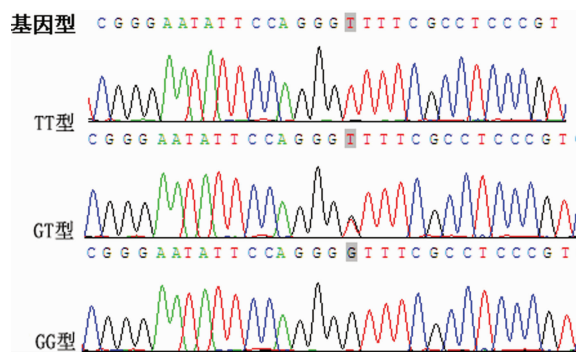


图 1 HSP70 基因启动子区 rs1008438 位点测序峰图

表 1 各组 HSP70 基因 rs1008438 位点基因型及等位基因频率分布[n(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	GT	GG	T	G
HAPE 组	100	76(76.0) <sup>a</sup>	20(20.0) <sup>a</sup>	4(4.0) <sup>a</sup>	172(86.0) <sup>a</sup>	28(14.0) <sup>a</sup>
健康对照组	200	186(93.0)	13(6.5)	1(0.5)	385(96.3)	15(3.7)

<sup>a</sup>: *P*<0.05,与健康对照组比较。

**2.1.2 各基因型及等位基因频率分布情况** 各组等位基因均以 T 等位基因最为常见,突变型 GT 基因型及 GG 基因型罕见。HAPE 组 TT 基因型频率明显低于健康对照组 ( $P < 0.05$ ),而 GT 和 GG 基因型则明显高于健康对照组(均  $P < 0.05$ );等位基因频率分析同样显示 HAPE 组 G 等位基因频率明显高于健康对照组( $P < 0.05$ ),见表 1。对基因易感性分析发现,GT、GG 基因型患 HAPE 的危险性是 TT 基因型的 4.195 倍( $OR = 4.195, 95\% CI: 3.767 \sim 4.622$ ),G 等位基因相对 T 等位基因也能明显增加 HAPE 的发病风险( $OR = 4.178, 95\% CI: 3.750 \sim 4.606$ )。

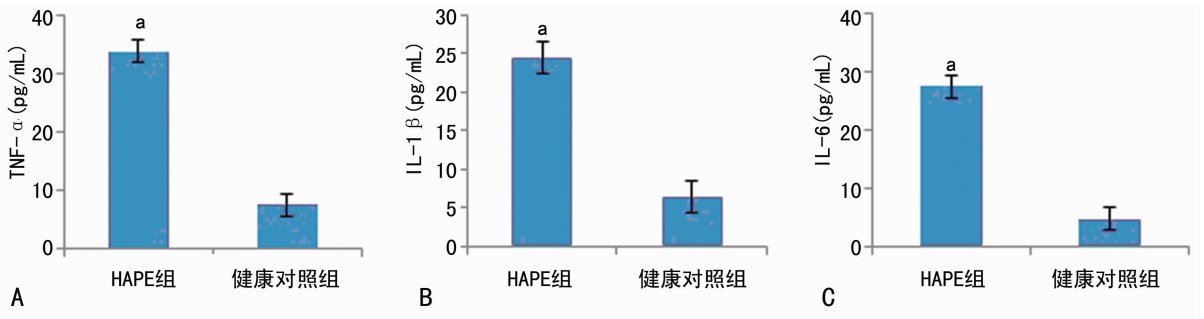
**2.2 HSP70 含量测定实验** 不同基因型 HAPE 组和健康对照组白细胞细胞质和细胞核 HSP70 蛋白含量测定结果见表 2。对于 HAPE 组,HSP70 含量在细胞核和细胞质中的比值(细胞核/细胞质),TT 基因型明显高于 GT、GG 基因型;并且 TT、GT、GG 在细胞核中的绝对含量也均高于细胞质,GT、GG 基因型与 TT 基因型比较,表现尤为明显。对于健康对照组,

则没有上述表现。另外,健康对照组与 HAPE 组比较,GT、GG 基因型 HSP70 含量明显低于 TT 型。

**表 2 不同基因型 HAPE 组和健康对照组白细胞细胞质和细胞核 HSP70 蛋白比较( $\bar{x} \pm s, ng/mL$ )**

基因型	HAPE 组	健康对照组
TT(野生型)		
细胞质	1.54 ± 0.46	2.61 ± 0.58
细胞核	5.98 ± 0.55	2.72 ± 0.57
GT、GG(突变型)		
细胞质	4.92 ± 0.54	1.14 ± 0.54
细胞核	13.76 ± 0.51	1.32 ± 0.49

**2.3 细胞因子水平表达** 健康组与 HAPE 组比较,HAPE 组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平明显增高,见图 2。



A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-1 $\beta$ ; C: IL-6; \*:  $P < 0.05$ , 与健康对照组比较。

**图 2 HAPE 组和健康对照组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量比较**

**3 讨论**

HSP70 是进化上最保守的蛋白质之一,相对分子质量约  $70 \times 10^3$ ,主要由一个 N 端高度保守的 44 ku ATPase 功能域(ATPbindingdomain)和一个相对分子质量为 25 ku 的 C 端区域组成<sup>[8]</sup>。其具有(1)分子伴侣功能:在细胞中执行最基本的生理功能,如蛋白质折叠、伸展、转运、寡聚体的形成和解聚等,维持细胞的生存和功能,在应激的不利条件下,提高细胞的抵抗力,起到应激保护作用;(2)协同免疫作用:正常情况下 HSP70 在细胞内呈基础表达,表达水平较低;而在高温及各种有害应激状态下,HSP70 的合成速度明显增加,一般数分钟内即可达到最高水平,而原来的蛋白质合成则减少,以提高生物体的抗应激能力<sup>[9-12]</sup>。Qi 等<sup>[6]</sup>的研究证实正常情况下 HSP70 位于细胞质内,当细胞遭受应激作用时,如高温、高湿等极端环境,体会迅速动员细胞质中的 HSP70 到细胞核内并包围核仁,细胞质内只有少量存在,以此来抵御外来的不利因素,维持人体正常的功能。本研究表明 HAPE 患者 HSP70 含量细胞核/细胞质,TT 基因型明显高于 GT、GG 基因型。这可能提示突变型 GT、GG 基因型及 G 等位基因更易患 HAPE。同时,在 HAPE 组中,细胞核中的 HSP70 的绝对含量也明显高于细胞质,这可能是由于人为了适应高原的极端环境,在极短时间内,人体动员大量细胞质中的 HSP70 到细胞核以此抵御外来不利因素而产生的一种自卫表现。同时,蛋白质芯片技术检测表明,HAPE 组和健康对照组血清中细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达水平存在明显差异,前者远远高于后者( $P <$

0.05)。这可能是因为 HAPE 组的 HSP70 增高所致。Asea 等<sup>[13-14]</sup>研究表明 HSP70 会上调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等细胞因子的表达水平。这进一步证明了 HSP70 与 HAPE 有很大的关联。这也表明 HAPE 患者为了抵御外来的不利因素,在短时间内,迅速动员相关细胞因子,激活或者沉默某些免疫途径,以此来维护生命的稳定。

借助病例-对照试验,作者还分析了 HAPE 组和健康对照组基因型 rs1008348 位点的多态性,结果显示健康对照组 T 等位基因频率 96.3%,与 Hapmap 中记录的 CHB 人群 T 等位基因频率接近<sup>[15]</sup>;且病例组无论在基因型频率还是在等位基因频率分布上与健康组相比均有明显差异,野生型 TT 纯合子频率明显低于健康组。而且从基因型频率的易感性分析发现,GT/GG 基因型及 G 等位基因明显增加 HAPE 发生的风险。上述发现表明 rs1008348 位点 G 等位基因与 HAPE 的发生密切相关。

综上所述,HSP70 启动子 rs1008438 GT、GG 基因型及 G 等位基因与 HAPE 的发生明显相关,且经过对 HAPE 组和健康对照组血清中细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量测定,初步分析验证上过观点,为更深入认识 HAPE 发生的分子机制在基因和蛋白水平上奠定了基础。

**参考文献:**

[1] Saxena S, Kumar R, Madan T, et al. Association of polymorphisms in pulmonary surfactant protein A1 and A2

- genes with high-altitude pulmonary edema[J]. *Chest*, 2005,128(3):1611-1619.
- [2] Meyer S,Z'graggen BR,Blumenthal S,et al. Hypoxia attenuates effector-target cell interaction in the airway and pulmonary vascular compartment[J]. *Clin Exp Immunol*, 2007,150(2):358-367.
- [3] Qi Y,Niu W,Zhou W,et al. Correlation between angiotensinogen gene polymorphisms and essential hypertension in Chinese population[J]. *J Hum Hypertens*, 2008, 22(2):147-150.
- [4] Manuguerra M,Matullo G,Veglia F,et al. Multi-factor dimensionality reduction applied to a large prospective investigation on gene-gene and gene-environment interactions[J]. *Carcinogenesis*, 2007,28(2):414-422.
- [5] Munro S,Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein[J]. *Cell*, 1986, 46(2):291-300.
- [6] Qi Y,Niu WQ,Zhu TC,et al. Genetic interaction of Hsp70 family genes polymorphisms with high-altitude pulmonary edema among Chinese railway constructors at altitudes exceeding 4000 meters[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 405(1/2):17-22.
- [7] 郭广宏,田亚平. 生物蛋白芯片技术在细胞因子检测上的应用[J]. *军医进修学院学报*, 2005,26(5):338-339.
- [8] 邱烈,管勤,袁英. HSP70 对组织细胞的保护[J]. *重庆医学*, 2009,38(15):1977-1980.
- [9] 李霞绯. 细胞外热休克蛋白 70 的释放、受体及功能[J]. *重庆医学*, 2011,40(14):1448-1450.
- [10] 孙运良,徐灿,苏长青,等. 重组腺病毒介导 Hsp70 基因表达对胰腺癌荷瘤小鼠的免疫功能影响[J]. *重庆医学*, 2012,41(32):3353-3355,3359.
- [11] Wu YR,Wang CK,Chen CM,et al. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease[J]. *Hum Genet*, 2004,114(3):236-241.
- [12] Li JX,Tang BP,Sun HP,et al. Interacting contribution of the five polymorphisms in three genes of Hsp70 family to essential hypertension in Uygur ethnicity[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009,14(4):355-362.
- [13] Asea A,Kraeft SK,Kurt-Jones EA,et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway,demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine[J]. *Nat Med*, 2000,6(4):435-442.
- [14] Asea A,Rehli M,Kabingu E,et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70:role of toll-like receptor(TLR) 2 and TLR4[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(17):15028-15034.
- [15] Lorenzo VF,Yang Y,Simonson TS,et al. Genetic adaptation to extreme hypoxia:study of high-altitude pulmonary edema in a three-generation Han Chinese family[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2009,43(3):221-225.

(收稿日期:2014-09-13 修回日期:2014-10-10)

(上接第 592 页)

氟后期 RBC 仍减少,Hb、HCT、MCV、MCH 却均增高,MCHC 正常,显示染氟后期的氟中毒表现为大 RBC 高色素性形态改变,这与巨幼细胞性贫血的 RBC 形态分类特点很相似,提示氟中毒晚期可能影响叶酸、VitB<sub>12</sub> 吸收,使其造血原料不足,RBC DNA 合成减慢,细胞核分裂迟缓,造成细胞分裂障碍而引起大 RBC 高色素性贫血,这未见文献报道,还需要研究进一步证实。

**3.6 氟中毒对 PLT 的影响** 氟中毒对雌鼠 PLT 无明显毒性作用,这与采国敬等<sup>[4]</sup>用 NaCl 溶液连续灌胃 5 d,观察獭兔氟中毒后 PLT 数目明显减少的报道不相吻合,这可能与研究对象、造模方式、染氟时间不同有关。

综上所述,氟中毒对 SD 雌鼠的血细胞有不同程度的影响,尤其对 RBC 系统的影响最大,染氟早、中期氟中毒表现为小 RBC 高色素性贫血的改变。染氟晚期氟中毒表现为大 RBC 高色素性贫血的改变。

#### 参考文献:

- [1] 陈学敏. 环境卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004: 34-35.
- [2] 王平贵,王俊玲,刚亚栋,等. 氟和铝对大鼠血常规和血生化指标的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 2010,29(1):42-45.
- [3] 吴岩,吴德清. 氟对机体的免疫毒性作用[J]. *中国地方病学杂志*, 1995,14(5):298-300.
- [4] 采国敬,何玉琴,许然. 氟中毒对獭兔血液生理指标的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009,37(26):1254-1255.
- [5] 李兴霞,黎晓敏. 氟中毒鸡微核率的研究[J]. *四川畜牧兽医*, 2004,25(1):117-119.
- [6] 莫非,渠巍,夏曙华,等. 大豆、硒和螺旋藻对氟铝联合中毒大鼠血红蛋白的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 2010,29(4):384-386.
- [7] 王述柏,锁守丽,吕永艳,等. 高氟饲料对鸡血液某些生理生化指标的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2001,37(4):23-25.
- [8] 余永新,纪素玲,边索,等. 家兔氟中毒的血液学及病理学变化观察[J]. *中国兽医杂志*, 2003,39(5):25-26.
- [9] 莫志亚,郭英杰,李晓惠. 氟中毒人群及大鼠体内微量元素测定分析[J]. *中国地方病防治杂志*, 2006,21(1):44-45.
- [10] 魏赞道,周琳业,张华,等. 近年来国外氟研究进展[J]. *中国地方病防治杂志*, 1990,5(1):49-51.
- [11] 肖开棋,于燕妮,李若庭,等. 慢性氟中毒患者及大鼠红细胞扫描电镜研究[J]. *地方病通报*, 1988,3(2):1-3.

(收稿日期:2014-09-08 修回日期:2014-10-10)