doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.004

靶向沉默 HIF-1α 信号通路抑制百草枯中毒诱导的肺泡上皮细胞上皮间质转化 *

王晓芬 李福祥△ 黎俊雅 朱忠立 祝国芸

（成都军区总医院重症医学科 四川 成都 610083）

摘要 目的：探讨 HIF-1α 信号通路在百草枯(paraquat, PQ) 诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)中的作用机制。**方法**：使用 20 μmol /L 浓度的百草枯溶剂对大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞干预 24 h，随后在倒置光学显微镜观察各组细胞形态学变化；用 real-time PCR 与 Western blot 法检测 RLE-6TN 细胞中 HIF-1α、上皮表型标记蛋白 E-cadherin 及间质表型标记蛋白 Vimentin 的表达，Transwell 侵袭实验检测各处理组细胞侵袭能力的改变；使用 HIF-1α 靶向 siRNA 抑制其表达后，进一步采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 HIF-1α、E-cadherin 和 Vimentin 的表达水平，Transwell 法检测细胞侵袭能力变化。**结果**：体外百草枯溶液可显著诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 RLE-6TN 细胞 HIF-1α 表达升高和上皮间质转化的发生，同时细胞的体外侵袭能力也增强。靶向沉默 HIF-1α 基因后，百草枯诱导的上皮间质转化过程被逆转，同时细胞侵袭能力显著减弱。**结论**：百草枯通过调控 HIF-1α 信号通路来诱导 RLE-6TN 细胞上皮间质转化的发生，进而促进肺纤维化的形成。

关键词：百草枯；肺纤维化；缺氧诱导因子 -1A；上皮 - 间质转化

中图分类号：R-33；R595.4；R322.35 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2018)13-2419-05

Paraquat Promotes Epithelial-mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells through HIF-1α Signaling Pathway*

WANG Xiao-fen, LI Fu-xiang△, LI Jun-ya, ZHU Zhong-li, ZHU Guo-yun

(Departent of Critical Care, Chengdu General Hospital, Chengdu, Sichuan, 610083, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of HIF-1α signaling pathway on paraquat (PQ)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in rat alveolar type II cells (RLE-6TN) and explore the underlying molecular mechanisms. **Methods:** RLE-6TN cells were treated by 20 μmol /L PQ, then the morphology was observed by invert light microscope; RT-PCR and Western blot were performed to detect the expression level of EMT related markers, E-cadherin and vimentin as well as HIF-1α signaling. Then the Transwell invasion assays was performed to detect the ability of cell invasion. **Results:** PQ was able to induce the transition of RLE-6TN cells from epithelial morphology to fibroblast-like morphology, associated with the acquisition of migratory properties. Phenotypically, PQ induced-EMT was characterized by loss of epithelial cell markers including E-cadherin, while upregulation of mesenchymal cell markers including vimentin, concurrent with the activation of HIF-1α signaling pathway. Furthermore, knockdown of HIF-1α by using specific siRNA could reverse PQ triggered EMT process and attenuated cell migration ability. **Conclusion:** PQ promoted EMT in rat alveolar type II cells (RLE-6TN) by upregulating the expression of HIF-1α.

Key words: Paraquat; Pulmonary fibrosis; HIF-1α; Epithelial--mesenchymal transition

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R595.4; R322.35 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)13-2419-05

前言

目前我国对农药的管理日趋严格，但是在日常生产生活中仍旧经常发生农药中毒事件[1]。百草枯(Paraquat, PQ) 是一种日常农业生产活动中经常用到的有机杂环类速效型除草剂，该药物具有对农作物毒性低且在土壤中能够快速降解，因此在农业生产活动中应用极其广泛[2]。百草枯可经多种途径，如皮肤、黏膜以及呼吸道吸收进入人体，其能够被人体肺组织特异性吸收且毒性极大尚无有效解毒药物，最终导致多脏器功能受损[3,4]。无论百草枯毒素经由何种途径进入人体，起很快被人体内多个器官吸收，其中肺组织的吸收速率明显强于其他组织，这是因为肺泡Ⅰ、Ⅱ型上皮细胞具有特殊的多胺转运系统有关，而百草枯的结构和多胺相似，因此肺泡能够特异性摄取百草枯毒素[5]。百草枯毒素被人体吸收后，可迅速引起急性肺损伤所致的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 以及多器官功能障碍综合征(MODS)导致患者死亡，小剂量百草枯毒素被吸收也会出现不可逆转的迟发性肺纤维化，肺功能衰竭病人晚期的主要死因[6,7]。因此，肺纤维化已成为临床治疗的难点。

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81170281)

作者简介：王晓芬(1986-)，女，本科，住院医师，主要研究方向：危重症相关研究，电话：028-86571244，E-mail: shenlan_123_w@126.com

△ 通讯作者：李福祥(1970-)，男，副主任医师

(收稿日期：2017-11-26 接受日期：2017-12-25)

新近研究表明上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肺纤维化的发病中扮演重要角色[8]。II 型肺泡上皮细胞能够通过启动 EMT 程序来使原本的肺泡上皮细胞从上皮细胞表型向间质细胞表型转化,从而促进肺纤维化的发生和发展,但其具体发病机制仍不十分清楚[9]。另有文献指出,EMT 过程受多种信号通路的调控,其中 HIF-1α 信号通路作为 EMT 启动的关键调控信号通路[10],也参与了肺纤维化的发生发展[11,12]。本研究旨在探讨百草枯(paraquat, PQ)对大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 RLE-6TN 细胞 EMT 过程的调控及其可能分子机制,进一步揭示百草枯诱导肺纤维化的作用机制,为肺纤维化的临床诊断及治疗提供新的理论依据和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 材料

大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 RLE-6TN 细胞株购自北京中山金桥生物科技公司;百草枯溶液购自川东农药化工有限公司(生产许可证号:XKl3-003-00058);Trizol RNA 提取试剂购自日本 Takara 生物有限公司;RT-PCR 引物序列合成由上海擎科生物科技公司完成;多克隆兔抗人 E-cadherin 和 Vimentin 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 多克隆鼠抗人 HIF-1α 和 β-actin 抗体购自美国 Affinity 公司,辣根酶标记羊抗小鼠或抗兔 IgG 均购自武汉博士德生物科技公司; 中分子量 Protein marker 购自美国 Thermo Fisher 公司;超敏型 ECL 化学发光试剂盒购自武汉谷歌生物科技公司; 去除内毒素胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;细胞及组织蛋白裂解液(RIPA)购自上海禾元生物科技公司;BCA 超敏型蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所;0.45 mm PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;6 孔板、25 cm^2 塑料培养瓶以及 24 孔 transwell 小室(孔径 8 μm)均购自海狸生物科技有限公司;基质胶(Matrigel)购自美国 BD 公司;倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);水平电泳槽、垂直电泳槽、转移电泳槽(北京六一电子仪器公司)。

1.2 细胞培养

RLE-6TN 细胞株在 37℃、5% CO_2 以及饱和湿度条件的细胞培养箱中用含 10%去 FBS、1%青 - 链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基进行细胞培养。当贴壁细胞覆盖 90~95%时,采用 0.25%胰蛋白酶消化传代,取第 2 或 3 代处于对数生长期的细胞进行后续实验。细胞培养至铺壁 60%-70%后,换用无血清培养基饥饿 4 h,随后将细胞按实验要求进行干预处理。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

β-actin 引物序列:上游 5'- ACGTCACTATGCAGATCATG -3', 下游 5'- TGTTCTATCTTTCTTTGGTCTG -3';HIF-1α 引物序列:上游 5'- AAACCACCTATGACCTGC-3,下游 5'- GTCGTGCTGAATAATACCACTC-3';E-cadherin 引物序列: 上游 5'-ATTTTTCCCTCGACACCCGAT-3',下游 5'- TCCCAGGCGTAGACCAAGA-3';Vimentin 引物序列: 上游 5'- AGTCCACTGAGTACCGGAGAC-3', 下游 5'-CATTTCACGCATCTGGCGTTC-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃ 变性 20 s,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 30 s,共进行 32 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,PCR 产物放置于 -20 ℃ 长期保存。

1.4 Western blot 检测

用 20 μmol /L 浓度的 PQ 对 RLE-6TN 细胞刺激 24 小时,随后用 PBS 洗涤 3 次随后加入 RIPA 裂解液并用细胞刮刀刮下来放入 1.5 Ml EP 管中冰上裂解 30 min。随后于 12 000 rpm 离心 10 min 并将蛋白上清液冻存于 -20℃。使用 5X 蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清后于 95℃中加热 10 min,待其充分变性。上机跑电泳,随后转膜并置于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h。封闭结束后使用 TBST 洗膜 5 min× 3 次, 随后将膜置于多克隆兔抗人的 E-cadherin (浓度 1:1 000)、Vimentin (浓度 1:750)、HIF-1α (浓度 1:1000)多克隆兔抗人 β-actin(浓度 1:3000)中 4℃孵育过夜。次日,洗膜 5 min× 3 次后,置于辣根酶标记羊抗兔 IgG 中室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min× 3 次后,采用 ECL 化学发光法金鼎显影。应用 Quantity One 软件分析条带灰度值并作统计分析。

1.5 细胞侵袭实验

将 Matrigel 胶(matrigel 与无血清培养基之比为 1:2)铺在小室上面待用。将 RLE-6TN 细胞在无血清 DMEM 高糖培养基中饥饿处理 4 h 后,将其消化、重悬,。上室加入无血清细胞悬液 200 μL(细胞量 4× 10^5/mL),下室加入含 20%FBS 的 DMEM 高糖细胞培养基,每孔 600 μL,培养箱中培养 48h。处理完成后取出小室, 用 PBS 洗涤 3 次, 并用湿棉签轻柔擦除上室面的细胞,随后置于 4%多聚甲醛中固定 20 min。取出室温下风干 3-5 min, 随后置于结晶紫染料中染色 15 min。最后用 PBS 洗涤 3 次,并置于倒置显微镜下观察穿过微孔膜的细胞数量,并进行统计分析。

1.6 统计学方法

本研究所有数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 数据分析采用 SPSS 22.0 软件行单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 百草枯诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞发生形态学改变

未处理组中的 RLE-6TN 细胞呈典型上皮细胞形态, 呈现多边形,各细胞之间排列紧密,相互连接。经过 20 μmol/L 的百草枯处理 24 小时后,RLE-6TN 细胞之间的细胞极性显著消失, 由连接紧密的扁平状上皮形态逐渐变成连接松散的长梭形、纺锤状形态细胞,细胞排列分散,呈现游走状态(图 1)。

2.2 百草枯诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞 EMT 的发生

经过 20 μmol /L 的百草枯分别处理后 24 和 48 小时后,检测 EMT 相关指标。RT-PCR 及 Western Blot 结果显示与对照组相比,随着处理时间的延长,百草枯处理组的 RLE-6TN 细胞的 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低, 伴随着 Vimentin mRNA 和蛋白表达的上调, 同时 HIF-1α 信号通路也显著激活(图 2)。

2.3 百草枯增强大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞的体外侵袭能力

与对照组相比, 百草枯处理组 RLE-6TN 细胞的侵袭能力明显增强(图 3)。

2.4 沉默 HIF-1α 信号通路抑制百草枯介导的 EMT

通过使用 HIF-1α 靶向沉默 siRNA 来抑制其表达,我们进

一步检测 HIF-1α 在百草枯诱导的 EMT 中的作用。RT-PCR 和 Western blot 结果显示，靶向沉默 HIF-1α 表达后，百草枯诱导的 EMT 过程被显著逆转(图 4)。

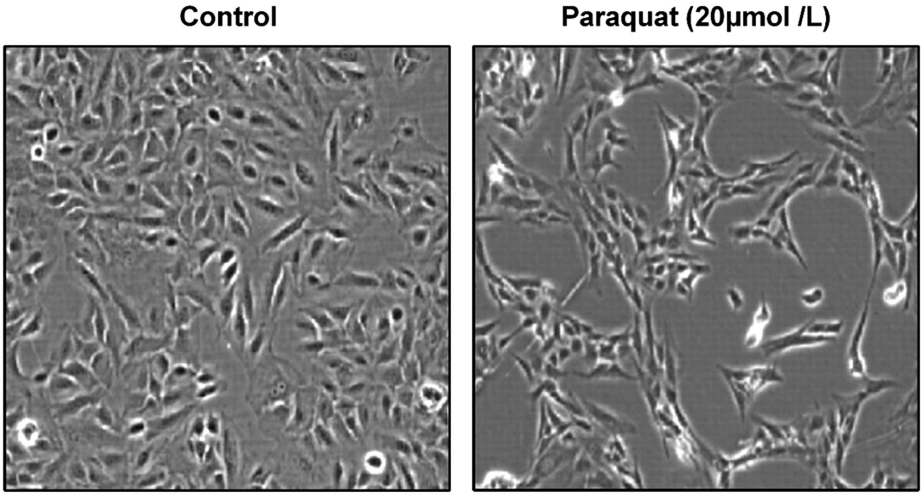

图 1 百草枯诱导大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞发生 EMT

Fig.1 Morphological changes of the RLE-6TN cells under light microscope (× 400)

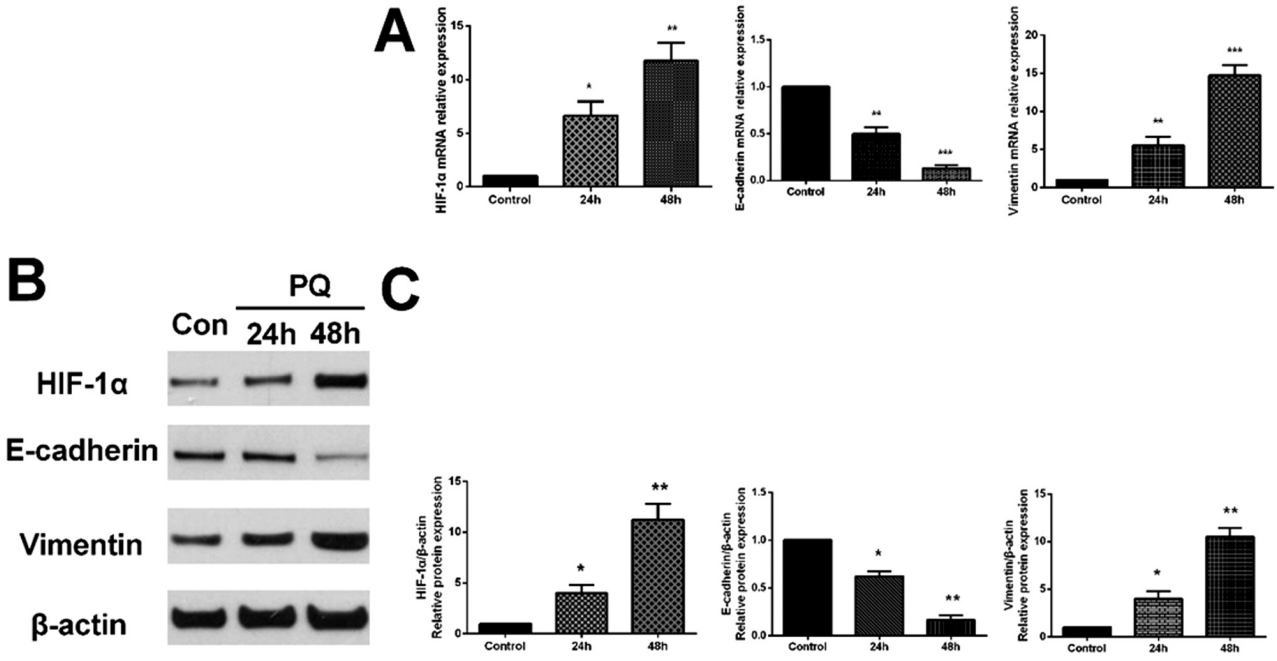

图 2 百草枯诱导 RLE-6TN 细胞 EMT

A：RT-PCR 检测 E-cadherin、Vimentin、HIF-1α mRNA 表达；B：Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、HIF-1α mRNA 蛋白表达；C：Western blot 结果定量分析

Fig.2 EMT of RLE-6TN cell triggered by paraquat

A: RT-PCR analysis of E-cadherin, Vimentin, HIF-1α mRNA; B: Western blot analysis of E-cadherin, Vimentin, HIF-1α protein; C: Quantification of western blot results

2.5 沉默 HIF-1α 削弱百草枯诱导的体外侵袭能力

我们进一步验证 HIF-1α 信号对百草枯诱导的细胞侵袭产生影响。Transwell 小室侵袭实验结果表明靶向沉默 HIF-1α 后，百草枯介导的 RLE-6TN 细胞的侵袭能力被显著削弱(图5)。

3 讨论

目前有关百草枯中毒的临床治疗缺乏特效药，使得中毒死亡率高，即使存活也严重影响患者身心健康[13,14]。百草枯毒素可通过多种途径被人体组织吸收，其中肺组织具有高度特异性，毒素容易在肺内堆积，导致不可逆性肺间质纤维化的发生，最终导致患者窒息死亡[15,16]。因此，阻止或延缓肺纤维化的发展，是治疗百草枯中毒患者的新的研究方向。

关于百草枯导致肺纤维化的具体发生机制尚未明确，提出的理论主要包括 DNA 损伤、细胞因子网络、酶失衡等[3,17]。新近研究表明 EMT 在多种因素诱导的肺纤维化中都扮演重要角色。EMT 是在某些生理、病理等条件下细胞失去上皮细胞特性

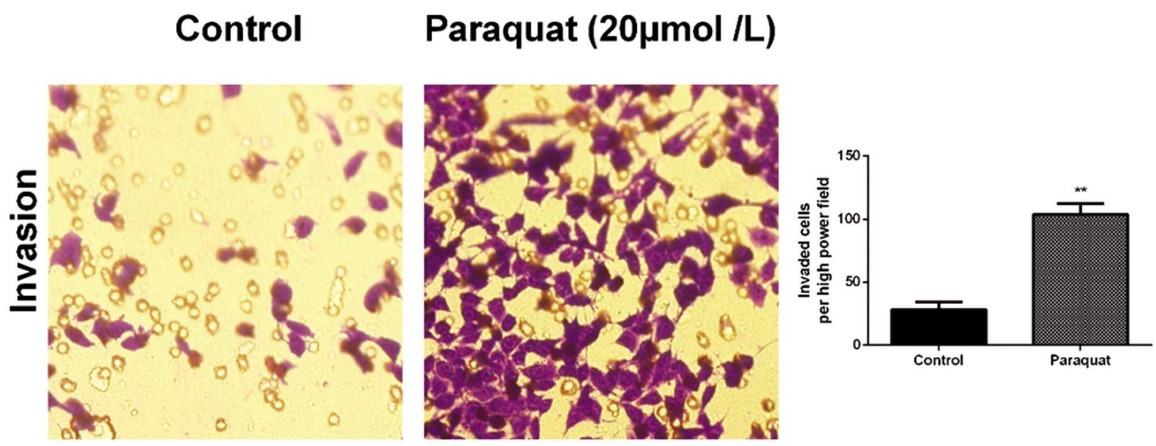

图 3 百草枯增强肝癌大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞侵袭能力(结晶紫染色× 200)

Fig.3 The invasion potentiality of RLE-6TN enhanced by paraquat (crystal violet staining× 200)

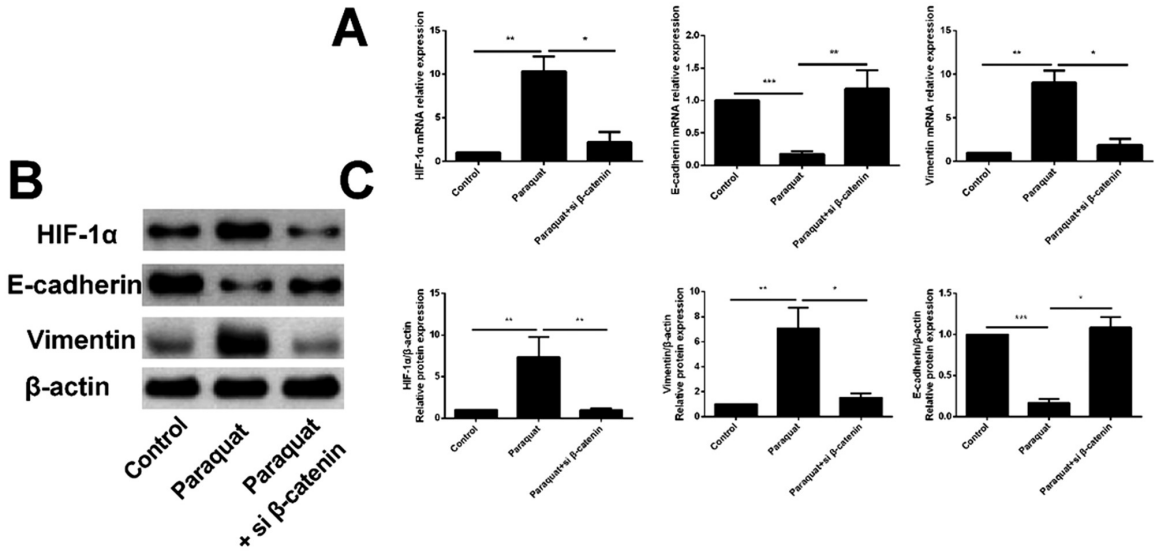

图 4 沉默 HIF-1α 抑制百草枯诱导的 EMT

A：RT-PCR 检测 E-cadherin、Vimentin、HIF-1α mRNA 表达；B：Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、HIF-1α 蛋白表达；C：Western blot 结果定量分析

Fig.4 Knockdown of HIF-1α inhibits paraquat triggered EMT

A: RT-PCR analysis of E-cadherin, Vimentin, HIF-1α mRNA; B: Western blot analysis of E-cadherin, Vimentin, HIF-1α protein; C: Quantification analysis of western blot results

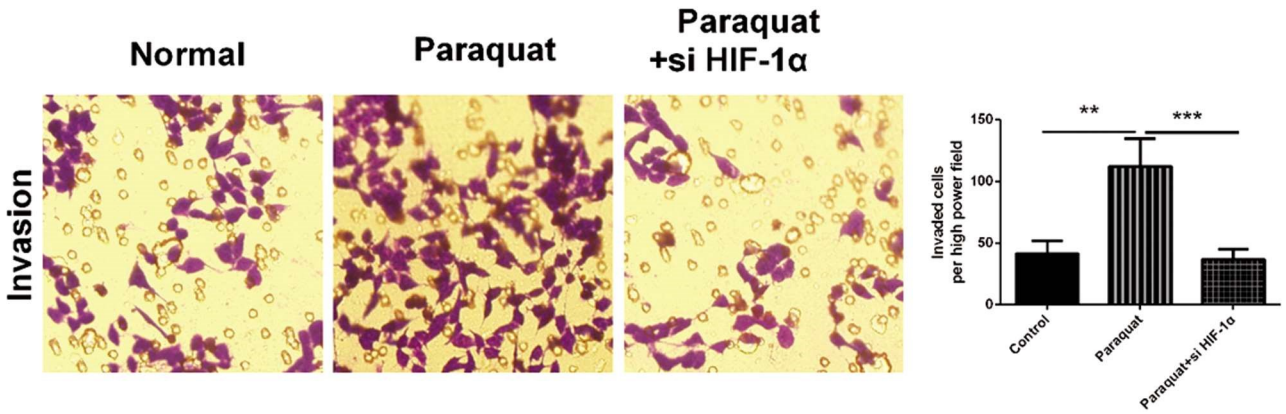

图5 靶向沉默 HIF-1α 减弱百草枯诱导的 RLE-6TN 细胞侵袭 (结晶紫染色× 200)

Fig.5 HIF-1α specific siRNA attenuates paraquat triggered RLE-6TN cell invasion (crystal violet staining× 200)

并获得间质细胞特性的一种复杂生物过程[18]。细胞发生EMT 会发生以下变化，如细胞间连接丧失，细胞极性消失，细胞骨架改变，上皮标记分子 E-cadherin 的缺失而间质标记分子 Vimentin 的表达上调，从而获得迁移和侵袭能力[19]。EMT 过程不仅参与

胚胎形态的形成和多种组织器官的发育,也在多种纤维化性疾病中发挥重要作用[20]。此外,II 型肺泡上皮细胞能够通过启动 EMT 程序来促进肺纤维化的发生和发展[21]。但是目前尚未有研究表明 EMT 是否参与了百草枯中毒导致的肺纤维化，以及其具体调控机制。

HIF-1α 是细胞适应低氧微环境的关键因子。在低氧条件下,细胞会发生特异性反映,来调节氧供给与利用之间的不平衡,使细胞适应低氧代谢压力[22]。而这些应激反应绝大多数是通过的 HIF-1α 来介导的。低氧条件下,HIF-1α 与 HIF-1β 形成二聚体进入细胞核内与靶基因启动子上的低氧反应元件(hypoxia response elements, HRE) 结合来发挥转录调控作用,从而参与一系列的细胞低氧应激反应;而在常氧条件下,HIF-1α 在脯氨酸羟化酶 (proline hydroxylase, PHD) 的作用下被羟基化,进而被 VHL E3 泛素连接酶辨识并泛素化,之后透过蛋白酶体使其被快速降解,所以,在常氧条件下很难检测到 HIF-1α 的表达[23]。既往研究表明,肺纤维化与肺部肿瘤等呼吸系统疾病中均存在 HIF-1α 基因的异常高表达[22,23]。另有研究表明,百草枯中毒能够通过 HIF-1α 信号通路调控早期肺纤维化的发生[11,12]。但是 EMT 过程是否参与百草枯导致的肺纤维化形成,HIF-1α 信号通路在其中的作用及其调控机制目前鲜有报道。

在本实验中,我们首先使用 20 μmol/L 浓度的百草枯溶液对大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞 RLE-6TN 进行 24 h 的刺激,随后在倒置显微镜下观察细胞形态改变并采用 RT-PCR 和 Western blot 技术验证了体外百草枯是否能够诱导 RLE-6TN 细胞 EMT 的发生。结果表明,与空白对照组相比,使用百草枯处理 24 小时后,RLE-6TN 细胞的形态由最初的多边形向成纤维样细胞形态改变，呈长梭形、纺锤状。同时随着处理时间的延长，RLE-6TN 细胞 E-cadherin mRNA 和蛋白表达的下降，而 Vimentin mRNA 和蛋白表达的升高。Transwell 侵袭实验结果也显示经过百草枯处理 24 小时后,RLE-6TN 细胞的侵袭能力显著增强,符合 EMT 的生物学特征。为了进一步探究百草枯诱导 EMT 程序激活的分子机制，我们检测 EMT 关键调控通路 HIF-1α 信号通路。结果表明,RLE-6TN 细胞经百草枯处理 24h 后 HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平显著升高,提示 HIF-1α 信号通路的激活在 EMT 的发生中发挥重要作用。为了明确 HIF-1α 信号在其中的具体调控机制。我们采用特异性 HIF-1α si-RNA 来靶向沉默阻断其表达，并进一步检测其对细胞 EMT 启动和侵袭能力影响。研究发现,在靶向沉默 HIF-1α 基因之后,百草枯了介导的 RLE-6TN 细胞 EMT 过程和侵袭现象被逆转,表明 HIF-1α 基因在这一过程中起着关键作用。基于以上研究,我们推测百草枯通过激活 HIF-1α 信号通路来启动上皮间质转化，最终诱导肺纤维化的产生。

综上所述，本研究初步证实在大鼠Ⅱ型肺泡上皮 RLE-6TN 细胞中百草枯能够通过激活 HIF-1α 信号通路来启动上皮间质转化程序,进而诱导肺纤维化的产生,这有助于我们对肺纤维化发病机制的了解。因此,深入研究 HIF-1α 信号通路在肺纤维化 EMT 过程中的作用及其具体调控机制，通过靶向阻断 HIF-1α 基因,从而阻断 EMT 过程以达到抑制肺纤维化的目的,这将为百草枯中毒所致肺纤维化的预防和治疗提供新的思路和理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] Bang Y J, Kim J, Lee W J. Paraquat use among farmers in Korea after the ban [J]. Archives of environmental & occupational health, 2017, 72(4): 231-234

[2] Spangenberg T, Grahn H, Van Der Schalk H, et al. Paraquat poisoning. Case report and overview [J]. Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2012, 107(4): 270-274

[3] Zhou Q, Jian X, Zhang Z, et al. The research progress of paraquat poisoning lung molecular mechanism [J]. Journal of industrial hygiene and occupational diseases, 2015, 33(1): 72-75

[4] Su Y, Liu Y. Research advance in molecular mechanism of pulmonary fibrosis induced by paraquat poisoning [J]. Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases, 2015, 33(9): 718-720

[5] Xiao Z W, Zhang W, Ma L, et al. Therapeutic effect of magnesium isoglycyrrhizinate in rats on lung injury induced by paraquat poisoning [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2014, 18(3): 311-320

[6] Delirrad M, Majidi M, Boushehri B. Clinical features and prognosis of paraquat poisoning: a review of 41 cases [J]. International journal of clinical and experimental medicine, 2015, 8(5): 8122-8128

[7] Ge W, Wang H L, Sun R P. Clinical characteristics of paraquat poisoning in 22 Chinese children [J]. Indian journal of pediatrics, 2014, 81 (7): 670-674

[8] Chen T, Nie H, Gao X, et al. Epithelial-mesenchymal transition involved in pulmonary fibrosis induced by multi-walled carbon nanotubes via TGF-beta/Smad signaling pathway [J]. Toxicology letters, 2014, 226(2): 150-162

[9] Ohbayashi M, Kubota S, Kawase A, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis [J]. The Journal of toxicological sciences, 2014, 39(2): 319-330

[10] Cui Y, Li S. Hypoxia, epithelia-mesenchymal transition and cancer [J]. Chinese journal of pathology, 2014, 43(3): 203-206

[11] Guo L, Xu J M, Liu L, et al. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Is Involved in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis [J]. BioMed research international, 2015: 232791

[12] Ueno M, Maeno T, Nomura M, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates TGF-beta-induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis [J]. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology, 2011, 300(5): L740-752

[13] Fang W Y, Xie X S, Feng S G. Recent advance of cytokines in the pathogenesis of lung injury induced by paraquat poisoning [J]. Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases, 2016, 34 (9): 719-721

[14] Wang Y, Jin B, Liu M, et al. Advance of study on pathological mechanism of paraquat poisoning[J]. Journal of hygiene research, 2006, 35 (3): 366-369

[15] Liu J Y, Liu Q M, Guo Y J, et al. Risk factors for pulmonary fibrosis in patients with paraquat poisoning [J]. Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases, 2016, 34(7): 520-522

[16] Li L R, Sydenham E, Chaudhary B, et al. Glucocorticoid with cyclophosphamide for paraquat-induced lung fibrosis [J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2014, (8): Cd008084

(下转第 2430 页)

antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013,8(11): e72411

[18] Teodori L, Albertini M C, Uguccioni F, et al. Static magnetic fields affect cell size, shape, orientation, and membrane surface of human glioblastoma cells, as demonstrated by electron, optic, and atomic force microscopy[J]. Cytometry A, 2006, 69(2): 75-85

[19] Martino C F, Belchenko D, Ferguson V, et al. The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells [J]. Bioelectromagnetics, 2008, 29(2): 125-132

[20] Rosen A D, Chastney E E. Effect of long term exposure to 0.5 T static magnetic fields on growth and size of GH3 cells [J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(2): 114-119

[21] He J, Zhang Y, Chen J, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on the expression of NFATc1 and CAII in mouse osteoclast-like cells[J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27(1): 13-19

[22] Keck C M, Kovacevic A, Muller R H, et al. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): the value of different alkyl polyglucoside surfactants[J]. Int J Pharm, 2014, 474(1-2): 33-41

[23] Villeneuve P J, Agnew D A, Johnson K C, et al. Brain cancer and occupational exposure to magnetic fields among men: results from a Canadian population-based case-control study [J]. Int J Epidemiol, 2002, 31(1): 210-217

[24] Bunch K J, Swanson J, Vincent T J, et al. Magnetic fields and childhood cancer: an epidemiological investigation of the effects of high-voltage underground cables [J]. J Radiol Prot, 2015, 35 (3): 695-705

[25] Gellrich D, Becker S, Strieth S. Static magnetic fields increase tumor microvessel leakiness and improve antitumoral efficacy in combination with paclitaxel[J]. Cancer Lett, 2014, 343(1): 107-114

[26] El-Bialy N S, Rageh M M. Extremely low-frequency magnetic field enhances the therapeutic efficacy of low-dose cisplatin in the treatment of Ehrlich carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 189352

[27] Li K, Ma S, Li Y, et al. Effects of PEMF exposure at different pulses on osteogenesis of MC3T3-E1 cells [J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(9): 921-927

[28] Rosen A D, Chastney E E. Effect of long term exposure to 0.5 T static magnetic fields on growth and size of GH3 cells [J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(2): 114-119

[29] Dini L, Abbro L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures[J]. Micron, 2005, 36(3): 195-217

[30] Tenuzzo B, Chionna A, Panzarini E, et al. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: a comparative study in different cell types[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(7): 560-577

[31] Cespedes O, Ueno S. Effects of radio frequency magnetic fields on iron release from cage proteins[J]. Bioelectromagnetics, 2009, 30(5): 336-342

[32] Koh E K, Ryu B K, Jeong D Y, et al. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species[J]. Int J Radiat Biol, 2008, 84(11): 945-955

[33] Zheng M, Xing L, Guo H, et al. Study of the Effects of 50Hz Homogeneous Magnetic Field on Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 of SNU Cells In Vitro [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2005, 5: 4870-4873

[34] Luukkonen J, Liimatainen A, Juutilainen J, et al. Induction of genomic instability, oxidative processes, and mitochondrial activity by 50Hz magnetic fields in human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Mutat Res, 2014, 760: 33-41

[35] Salvador J M, Brown-Clay J D, Fornace A J. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis [J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 793: 1-19

[36] Gavrielov-Yusim N, Friger M. Use of administrative medical databases in population-based research [J]. J Epidemiol Community Health, 2014, 68(3): 283-287

[37] Nepal P R, Han H K, Choi H K. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of Witepsol H35 based self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of coenzyme Q(10)[J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 39(4): 224-232

[38] Huang C Y, Chang C W, Chen C R, et al. Extremely low-frequency electromagnetic fields cause G1 phase arrest through the activation of the ATM-Chk2-p21 pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104732

[39] Yamaguchi S, Ogiue-Ikeda M, Sekino M, et al. Effects of pulsed magnetic stimulation on tumor development and immune functions in mice[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(1): 64-72

（上接第 2423 页）

[17] Yao D, Yu X, Tian Y, et al. Progress in the mechanism of cytokine on lung injury caused by acute paraquat poisoning [J]. Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases, 2014, 32(11): 865-868

[18] Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation [J]. Pharmacology & therapeutics, 2015, 150(33-46)

[19] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2014, 15(3): 178-196

[20] Nowrin K, Sohal S S, Peterson G, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer[J]. Expert review of respiratory medicine, 2014, 8(5): 547-559

[21] Balli D, Ustiyan V, Zhang Y, et al. Foxm1 transcription factor is required for lung fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. The EMBO journal, 2013, 32(2): 231-244

[22] Lee J W, Bae S H, Jeong J W, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions [J]. Experimental & molecular medicine, 2004, 36(1): 1-12

[23] Balamurugan K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. International journal of cancer, 2016, 138(5): 1058-1066