

· 论 著 ·

氢醌诱导下肝细胞 PCNA、RAD6B及 RAD18基因 mRNA表达的时间效应

胡恭华¹, 李锋¹, 庄志雄^{2*}, 庾蕾², 黄海燕²

(1 赣南医学院预防医学系, 江西 赣州 341000 2 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020)

摘要: 目的 研究氢醌 (hydroquinone, HQ) 诱导下 L-02肝细胞 PCNA、RAD6B及 RAD18基因 mRNA表达的时间效应, 探讨 PCNA、RAD6B及 RAD18基因在 HQ所致肝细胞毒性过程中的分子作用机制。方法 体外培养的 L-02肝细胞经 40 μ mol/L的 HQ诱导不同时间 (6、12、24和 48 h) 后, 用 Trizol试剂从 L-02肝细胞中分离总 RNA, 而后反转录为 cDNA, 利用 Primer3软件设计 PCNA、RAD6B及 RAD18基因及内参照 β -ACTN基因的引物, 并进行标准曲线分析和熔解曲线分析, 建立和优化定量检测各目的基因在 mRNA水平上表达的反应体系和反应条件; 最后采用实时荧光定量 PCR法检测不同时间点 PCNA、RAD6B及 RAD18基因 mRNA的表达状况。结果 在各时间处理组 (6、12、24和 48 h) 中, 染毒组 L-02肝细胞内 PCNA、RAD6B及 RAD18基因在 mRNA水平上的表达均高于未染毒组。在 24 h的时间范围内, PCNA基因在 mRNA水平上的表达无论是染毒组 (40 μ mol/L) 还是未染毒组 (0 μ mol/L), 均具有随时间的延长而增加的趋势; 到 24 h时, 相对表达量达到最大值。RAD6B和 RAD18基因在未染毒组中的表达在 48 h范围内均有随时间的增加而升高的趋势, 它们均在 48 h时间点上表达最高, 其相对表达量分别为 2.66和 4.32, 但在染毒组中, RAD6B基因和 RAD18基因在 48 h处的表达则有所下降, 其相对表达量分别由 3.74和 4.83降至 2.78和 4.61。结论 HQ可以诱导 PCNA、RAD6B及 RAD18基因 mRNA的表达上调, 并且呈现一定的时序性。

关键词: 氢醌; PCNA; RAD6B; RAD18; mRNA; L-02肝细胞; 时间效应

中图分类号: R994.6 R114 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)02-0083-05

Study on time effect of PCNA, RAD6B and RAD18 mRNA expression induced by hydroquinone in L-02 hepatic cells

HU Gonghua, LI Feng, ZHUANG Zhixiong*, YU Lei, HUANG Haiyan

(1 Department of Preventive Medicine, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China; 2 Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objective To explore the time effect of PCNA, RAD6B and RAD18 mRNA expressions induced by hydroquinone (HQ) in L-02 hepatic cells and the molecular mechanism of toxic effects of HQ in L-02 hepatic cells. Methods L-02 hepatic cells were exposed to 40 μ mol/L HQ for 6, 12, 24 and 48 h respectively, then the total cellular RNA was isolated from L-02 hepatic cells using Trizol reagent and inversely transcribed to cDNA. Expression of PCNA, RAD6B and RAD18 mRNA in L-02 hepatic cells were measured by RT-qPCR in different time points. Results Levels of expression of PCNA, RAD6B and RAD18 mRNA in L-02 hepatic cells treated with HQ were higher significantly than that of the control (0 μ mol/L). The expression of PCNA mRNA in L-02 hepatic cells were increased along with time within 0—24 h in both treated groups (40 μ mol/L) and control group, which reached the maximum at 24 h. The expressions of RAD6B and RAD18 mRNA in control group were all increased time dependently, which reached 2.66 and 4.32 at 48 h respectively, while the expression of RAD6B and RAD18 mRNA in treated group were decreased at 48 h. Conclusion HQ might induce the up-regulation of expressions of RAD6B, RAD18 and PCNA mRNA and with some time-dependent manner.

Key words: Hydroquinone; PCNA; RAD6B; RAD18; mRNA; L-02 hepatic cells; Time effect

氢醌 (hydroquinone, HQ) 是一种广泛存在的环境化学物, 主要用于黑白显影剂、偶氮染料、橡胶防老剂、

抗氧化剂、皮肤化妆品及治疗色素沉着症的外用制剂等, 同时还是许多致癌物在体内关键的中间代谢产物。人群流行病学调查显示, HQ可引起肝脏组织结构和功能的异常。动物实验表明, HQ对肝、肾和造血系统等均可造成损害, 并具有一定的神经毒性^[1]和免疫毒性^[2]。体外研究发现, HQ具有一定的诱变性^[3], 可导致动物及人体细胞内 DNA 的损伤等^[4,5]。而 DNA 损伤如果未被修复则会阻碍细胞内

收稿日期: 2008-11-12 修回日期: 2009-01-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2002CB512903, 2002CB512904)

作者简介: 胡恭华 (1972-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事生化与分子毒理学研究。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

正常的 DNA复制,最终导致细胞的明显死亡。最近的研究表明,增殖细胞核抗原(PCNA)、泛素结合酶 RAD6B及泛素连接酶 RAD18基因与DNA的复制后修复有关,从而可在一定程度上提高细胞对环境有害因素刺激的适应能力。本研究以不同时间同一浓度 HQ作用条件下的 L02肝细胞为模型,采用实时荧光定量 PCR技术观察 PCNA、RAD6B和 RAD18基因 mRNA表达的时间变化规律,并探讨 PCNA、RAD6B和 RAD18基因在 HQ所致肝细胞毒性过程中分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI1640培养基(美国 Gibco公司),胰蛋白酶(美国 Amresco公司),胎牛血清(杭州四季青公司),青霉素、链霉素、焦炭酸二乙酯(DEPC)和二羟乙基呱嗪乙烷磺酸钠(Sigma公司),细胞总 RNA提取试剂盒(美国 MRC公司),反转录试剂盒(立陶宛 Fermentas公司),Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix试剂盒(美国 Stratagene公司),超净工作台和 CO₂培养箱(上海力申科学仪器公司),倒置显微镜(重庆光学仪器厂),纯水仪(法国 MILDRE公司),高压灭菌器(日本 HIRAYAMA公司),541 SR型台式高速冷冻离心机和 BioPhotometer型生物分光光度计(德国 Eppendorf公司),Gene Genius型凝胶成像系统(英国 Syngene公司),SM-H24型颗粒制冰机(日本三洋公司),E-Centrifuge型离心机(美国 Wealtec公司),Mx4000荧光定量 PCR仪(美国 Stratagene公司)。

1.2 细胞培养及处理

L02肝细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。培养基采用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 将 L02肝细胞用 37℃、体积分数为 5%的 CO₂细胞培养箱培养,每 3 d传代 1次。将处于对数生长期的 L02肝细胞用 40 μmol/L 的 HQ依次作用 6、12、24 和 48 h 每一时间组各设一个未染毒的正常对照组(染毒剂量为 0 μmol/L),以检测 HQ染毒组和未染毒组细胞内 PCNA、RAD6B及 RAD18基因 mRNA在时间上的表达趋势,细胞处理之后收集细胞以备提取总 RNA之用。

1.3 荧光定量 PCR检测 PCNA、RAD6B及 RAD18 基因 mRNA的表达

1.3.1 L02肝细胞内总 RNA提取及纯度和完整性鉴定 用 TRI REAGENT总 RNA提取试剂盒,在各处理组培养瓶内加入 Trizol Reagent 1 ml 匀浆后将裂解物移至 1.5 ml 离心管中,室温下孵育 5 min 之后加入 0.2 ml 氯仿,剧烈振摇 15 s 室温下静置 10

min 接着于 4℃条件下离心 (12 000×g) 15 min 吸取上层水相约 600 μl 至新的 1.5 ml 离心管中,加入 0.5 ml 异丙醇,混匀并将该混合液于室温下放置 10 min 接着于 4℃条件下离心 (12 000×g) 8 min 弃上清,加入 1 ml 70%乙醇,水平摇动离心管以清洗 RNA沉淀;随后于 4℃条件下离心 (7 500×g) 5 min 弃去乙醇洗涤液,空气干燥 3~5 min 加入 20 μl DEPC处理水,用吸头轻轻吹打数次使 RNA完全溶解,于 55~60℃下孵育 10 min 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测纯度和完整性。

1.3.2 cDNA合成 取 5 μg 总 RNA 加入 1 μl 随机引物 (0.2 μg/μl) 再加入 DEPC处理过的水至 12 μl 离心 3~5 s 轻轻混匀;70℃加热 5 min 立即置于冰上并通过短暂离心收集液滴;接着依次加入 4 μl 的 5× reaction buffer 1 μl 的 RibLock™ Ribonuclease inhibitor (20 U/μl) 和 2 μl 的 10 mmol/L dNTP mix 通过短暂离心来混匀并收集液滴;25℃条件下孵化 5 min 加入 Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μl) 1 μl 总体积达到 20 μl 25℃孵化 10 min 接着 42℃加热 60 min 然后 70℃加热 10 min 终止反应,并且迅速置于冰上。最后将合成的 cDNA保存于 -20℃冰箱内。

1.3.3 PCNA、RAD6B、RAD18及内对照 β-ACTN 基因的引物设计及合成 按照 PCNA、RAD6B、RAD18和 β-ACTN基因的 GenBank 登录号,检索 GenBank 得到各基因的全长 cDNA序列,利用 Primer 软件根据标准荧光定量 PCR引物设计原则[目的基因的扩增片段大小为 200~400 bp 退火温度在 55~60℃范围之内;3'末端避免有 G/C重复序列;(G+C)%<60%等]设计 PCNA、RAD6B、RAD18和 β-ACTN基因的引物;引物序列跨越 2个内含子,以避免基因组 DNA污染定量 PCR产物。接着将设计出的引物输入 BLAST 数据库进行同源性比较,最终得到具有特异性的引物序列。最后将所设计的引物送至上海生工生物工程技术有限公司合成,各引物的稀释浓度为 10 μmol/L。各基因引物的具体序列见表 1。

表 1 PCNA、RAD6B、RAD18和 β-ACTN 基因的引物序列

基因名称	引物类别	引物序列	产物大小 (bp)
PCNA	Forward Primer	5'-AGTAAAGATGCTTCTGGTG-3'	234
	Reverse Primer	5'-AAGTTCAGTACCTCAGTGC-3'	
RAD6B	Forward Primer	5'-GATGTCCATCCAAATGCT-3'	225
	Reverse Primer	5'-CGCCAGCTTTGTTCTACTAT-3'	
RAD18	Forward Primer	5'-TAGAGTCACCAGCCAAATCT-3'	253
	Reverse Primer	5'-TCTGGAGGAGTCTCTCTAC-3'	
β-ACTN	Forward Primer	5'-TGACCAGATCATGTTTGG-3'	324
	Reverse Primer	5'-ATCTCTGCTCGAAGTCCAG-3'	

1.3.4 实时荧光定量 PCR 在对各目的基因进行相对定量之前,先梯度稀释 cDNA模板进行标准曲线和熔解曲线分析,以确定荧光定量 PCR的最佳反应条件及反应体系。然后采用比较阈值法 (threshold cycle) 以看家基因 β -ACTN为内参照,相对定量处理组样品内各目的基因的表达水平。反应体系为: $2 \times$ SYBR Green QPCR master mix $12.5 \mu\text{l}$ Forward Primer ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.5 \mu\text{l}$ Reverse Primer ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.5 \mu\text{l}$ cDNA $1 \mu\text{l}$ ddH₂O $10.5 \mu\text{l}$ 总体积为 $25 \mu\text{l}$ 反应条件: 95°C 预变性 10 min 1个循环;接着 95°C 变性 30 s 55°C 退火 1 min 72°C 延伸 40 s 共 40个循环。每个样品的 PCNA RAD6B RAD18和 β -ACTN基因分管并于相同条件下扩增,每次反应均设无模板对照 (no template control NTC) 以排除 DNA污染的可能。反应结束后,荧光定量 PCR仪所附带的 Mx4000P Software自动计算并分析结果。

1.4 数据统计分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS14.0 for Windows软件对 PCNA RAD6B和 RAD18基因 mRNA表达的相对定量值进行单因素方差分析,组间比较选择 Dunnett 法。

2 结果

2.1 RNA纯度及完整性分析

总 RNA经紫外分光光度计测定其 OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值在 $1.80 \sim 2.00$ 之间,说明所制备的 RNA较纯,无蛋白质污染。琼脂糖凝胶电泳显示,28S和 18S条带清晰可见,并且 28S条带亮度约为 18S的 2倍,说明所提取的总 RNA无明显降解,完整性较好。

2.2 标准曲线及熔解曲线分析

通过标准曲线分析可知,PCNA RAD6B RAD18及 β -ACTN基因的扩增效率分别为 93.4%、103.5%、110.4%和 108.6%,接近 100%,说明这些基因的扩增效率接近,可以进行相对定量。根据熔解曲线分析结果 (图 1~图 4)可知,PCNA RAD6B RAD18及 β -ACTN基因扩增产物的熔解曲线峰均为单一峰形,未见其他峰值,并且峰的形状也较锐利,提示各基因的熔解温度均一,扩增产物特异性好,以此为基础进行定量是可靠的。因而可以确定前面所述的 QPCR反应条件和反应体系是合理的。

2.3 HQ作用下 PCNA RAD6B和 RAD18基因在 mRNA水平上表达的时间效应

实时荧光定量 PCR结果显示 (表 2),在 24 h的时间范围内,PCNA基因在 mRNA水平上的表达无论

是染毒组 ($40 \mu\text{mol/L}$) 还是未染毒组 ($0 \mu\text{mol/L}$) 均具有随时间的延长而增加的趋势;到 24 h时,其在染毒组和未染毒组中的相对表达量达到最大值,分别为 2.63和 4.53 明显高于 6 h组 ($P < 0.01$);当培养时间达到 48 h时,该基因的表达则有所下降,但仍高于 6 h对照组。RAD6B和 RAD18基因在未染毒组中的表达在 48 h范围内均有随时间的增加而升高的趋势,它们均在 48 h时间点上表达最高,其相对表达量分别为 2.66和 4.32 其中 24 h及 48 h组与 6 h组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);但在染毒组中,RAD6B和 RAD18基因在 48 h处的表达则有所下降,其相对表达量分别由 24 h的 3.74和 4.83降至 2.78和 4.61,但仍明显高于 6 h组 ($P < 0.01$)。此外,实时荧光定量 PCR结果还显示,在各时间处理组 (6、12、24和 48 h)中,染毒组 L02肝细胞内 PCNA RAD6B及 RAD18基因在 mRNA水平上的表达均高于未染毒组。

表 2 不同时间点 PCNA RAD6B和 RAD18基因 mRNA表达的相对定量值 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

HQ浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	作用时间 (h)	相对定量值		
		PCNA	RAD6B	RAD18
0 (未染毒组)	6	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
	12	1.33 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.09
	24	2.63 $\pm$ 0.21**	2.21 $\pm$ 0.21**	3.12 $\pm$ 0.23**
	48	1.82 $\pm$ 0.17**	2.66 $\pm$ 0.13**	4.32 $\pm$ 0.11**
40 (染毒组)	6	2.08 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	1.55 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	1.35 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$
	12	2.67 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$	1.76 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	2.05 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$
	24	4.53 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta$	3.74 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	4.83 $\pm$ 0.37 $\Delta\Delta$
	48	2.72 $\pm$ 0.11 $\Delta\Delta$	2.78 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	4.61 $\pm$ 0.46 $\Delta\Delta$

与 6 h未染毒组比较, * $P < 0.01$; 与 6 h染毒组比较, # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 相同作用时间条件下与未染毒组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

3 讨论

DNA修复过程中,损伤旁路 (复制后修复的一种类型) 对于基因组内未修复的损伤而言是一种重要的细胞反应。而增殖细胞核抗原 PCNA 泛素结合酶 RAD6B和泛素连接酶 RAD18是人体细胞内 DNA损伤旁路机制所必需的成分。PCNA基因定位于人 20号染色体上,是一个含有 6个外显子和 5个内含子的基因,其编码蛋白是 DNA合成和细胞周期进展所必需的成分。PCNA表达的强弱可以反映出细胞增殖的程度。近年来的研究发现,PCNA在 DNA复制后修复过程中的聚合酶转换^[6]环节上发挥着重要的作用。人类 RAD6B基因和 RAD18基因分别定位于染色体 5q23-q31和 3p24-25之上。在人体细胞内,RAD6B与 RAD18之间存在着相互作用^[7]。RAD6B与 RAD18组成的蛋白复合体首先是通过与长单链 DNA结构之间

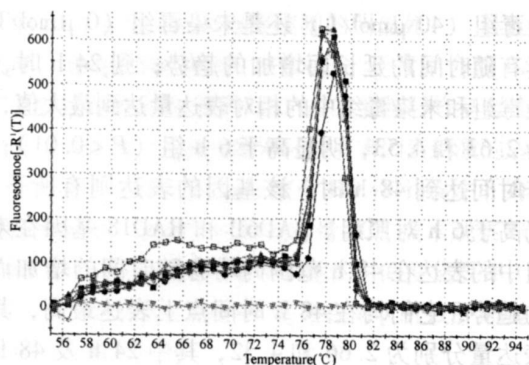


图1 PCNA 基因的熔解曲线分析

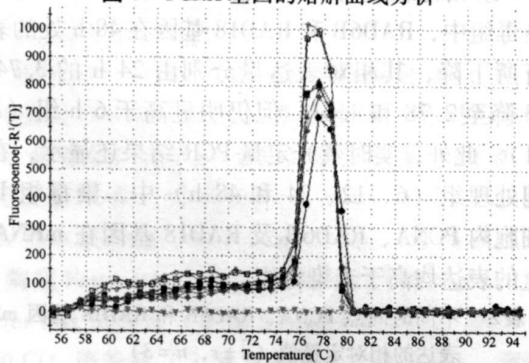


图2 RAD6B 基因的熔解曲线分析

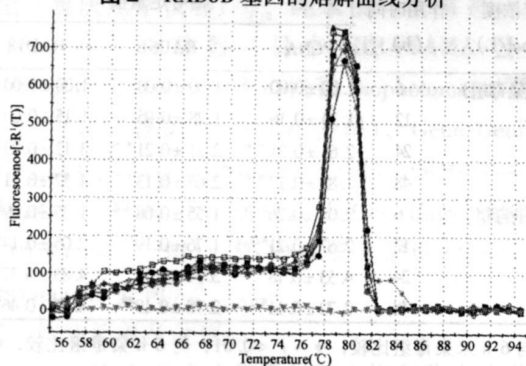


图3 RAD18 基因的熔解曲线分析

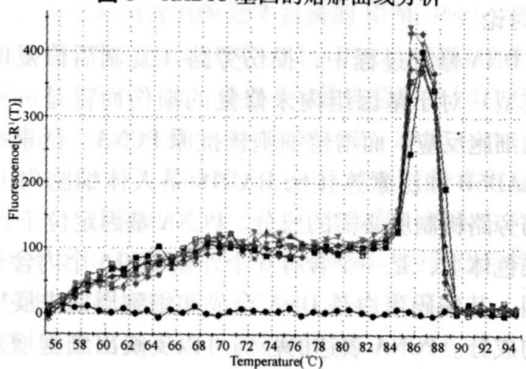


图4 β-ACTIN 基因的熔解曲线分析

的作用而被招募到受阻复制叉上^[8],接着通过RAD18的单链DNA结合活性而结合于受损的DNA位点之上。在受DNA损伤剂处理过的细胞内,RAD6B和RAD18在体外能够引起PCNA的单泛素

化,而这一过程对于DNA损伤旁路中的聚合酶转换来说是至关重要的^[9]。并且,RAD18通过蛋白-蛋白交互作用及PCNA的单泛素化而对跨DNA损伤合成酶Pol η 在受损位点上的招募起着关键性的作用^[10]。此外,有研究发现RAD18参与了一些化学因子如甲基磺酸甲酯(MMS)等所引起的损伤旁路过程^[11]。虽然PCNA、RAD6B和RAD18对于复制后修复很重要,但是这些因子被招募于受阻复制叉的分子机制仍不太清楚。我们在以往的研究中发现,HQ可以导致L-02肝细胞DNA的明显损伤^[12],因此研究PCNA、RAD6B和RAD18基因在HQ所致肝细胞遗传毒性中的作用及其可能机制,将有助于筛选出HQ中毒的特异性生物学效应指标,以便尽早发现和防治HQ中毒,从而降低HQ对人群健康的危害。

本研究利用实时荧光定量PCR技术对HQ作用下L-02肝细胞内PCNA、RAD6B和RAD18基因mRNA的时间表达规律及其相互关系进行了动态观察。在PCNA基因mRNA水平表达的时间-反应关系研究中发现,在一定的时间范围(24 h)内,PCNA基因的表达具有随着时间的延长而升高的趋势,呈现一定的时间依赖性;到24 h时其相对表达量在染毒组和未染毒组内均达到最高值,说明该时间点是检测PCNA基因表达的最佳时机。同时该结果也揭示,当DNA受损时,PCNA与其他DNA修复酶可能是在DNA的受损位点上同步起作用的。对于RAD6B和RAD18基因而言,它们在mRNA水平上的表达变化规律相似;在24 h范围内均具有随着时间的延长而增加的趋势;但是当染毒时间为48 h时,染毒组RAD6B和RAD18基因的表达与未染毒组相比较却有明显的不同,如在未染毒组细胞内表达继续升高,而在染毒组细胞内的表达则有所下调,这就提示RAD6B和RAD18基因在正常L-02肝细胞内的最佳表达时间与PCNA基因相比可能要迟一些,同时也提示HQ可诱导该基因最佳表达时间的前移,以满足DNA损伤修复的需要。总之,上述结果说明了PCNA基因的表达与RAD6B和RAD18基因的表达存在着时相上的差异。可以推测,在DNA损伤所引起的DNA复制后修复过程中,可能先是PCNA在受损的DNA位点上积聚,接着才是RAD18和RAD6B基因所编码的蛋白在受阻的复制器周围相互作用,继而引起PCNA蛋白的泛素化,然后才是有效的DNA复制,从而使得L-02肝细胞耐受HQ所致的细胞毒性和遗传毒性作用。至于其确切机制,还有待于进一步的研究来加以阐明。

(下转第90页)

癌物的代谢能力及对 DNA损伤修复能力有所不同,可能会影响活性代谢产物及 DNA加合物的含量。本研究未发现性别对 ϵ dA水平产生明显影响,可能说明导致机体产生 1氮-6乙烯(脱氧)腺嘌呤的氯乙烯接触作用更加明显。

综上所述,1氮-6乙烯(脱氧)腺嘌呤与氯乙烯累积接触剂量存在相关关系,并随着累积接触剂量的升高,接触工人 DNA加合物含量和异常率均增加。本次研究初步探讨 1氮-6乙烯(脱氧)腺嘌呤与氯乙烯暴露之间的关系,并初步表明 1氮-6乙烯(脱氧)腺嘌呤可作为氯乙烯的接触生物标志物,但未对其他 3种加合物与氯乙烯暴露之间的关系做进一步研究。因此,应首先完善其余 DNA加合物的检测方法,同时进一步开展大规模的氯乙烯接触人群分子流行病学研究,筛选和确认可靠的接触生物标志物,更好地保护氯乙烯接触工人的健康。

参考文献:

- [1] Ghissassi F, Baubín A, Bartsch H. Metabolic activation of vinyl chloride by rat liver microsomes: low-dose kinetics and involvement of cytochrome P450 2E1 [J]. *Biochem Pharmacol* 1998; 55 (9): 1445-1452.
- [2] Dosanjh M K, Chenna A, Kim E, et al. All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (3): 1024-1028.

(上接第 86页)

参考文献:

- [1] TOPPING D C, Bernard L G, O'Donoghue J L, et al. Hydroquinone: acute and subchronic toxicity studies with emphasis on neurobehavioral and nephrotoxic effects [J]. *Food Chem Toxicol* 2007; 45 (1): 70-78.
- [2] Macedo S M, Vaz S C, Lourenco E L, et al. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats [J]. *Toxicology* 2007; 41 (1-2): 47-57.
- [3] McGregor D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties [J]. *Crit Rev Toxicol* 2007; 37 (10): 887-914.
- [4] Gaskell M, McLuckie K, J, Farmer P B. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites hydroquinone and parabenzoquinone in the supF forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity [J]. *Mutat Res* 2004; 554 (1-2): 387-398.
- [5] Gaskell M, McLuckie K, J, Farmer P B. Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and parabenzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity [J]. *Carcinogenesis* 2005; 26 (3): 673-680.
- [6] Kannouché P L, Wang J, Lehmann A R. Interaction of human DNA polymerase ϵ with monoubiquitinated PCNA: A possible mechanism

- [3] Mustonen R, Schoket B, Hemminki K. Smoking-related DNA adducts: 32P-postlabeling analysis of 7-methylguanine in human bronchial and lymphocyte DNA [J]. *Carcinogenesis* 1993; 14 (1): 151-154.
- [4] Li Y, Marion M J, Zippert H J, et al. The role of XRCC1 polymorphisms in base excision repair of ethenoDNA adducts in French vinyl chloride workers [J]. *Int J Occup Med Environ Health* 2006; 19 (1): 45-52.
- [5] 谭祥林, 徐顺清, 陈剑, 等. 利用生物发光法测定人群外周淋巴细胞 DNA加合物水平 [J]. *中华预防医学杂志* 2002; 36 (6): 363-365.
- [6] Chaudhary A K, Nookubom R, Reddy G R, et al. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver [J]. *Science* 1994; 265 (5178): 1580-1582.
- [7] Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk [J]. *Mutat Res* 2006; 600 (1-2): 23-36.
- [8] Cheng Y W, Chen C Y, Lin P, et al. DNA adduct level in lung tissue may act as a risk biomarker of lung cancer [J]. *Eur J Cancer* 2000; 36 (11): 1381-1388.
- [9] Györfi E, Anna L, Kovacs K, et al. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts [J]. *Mutagenesis* 2008; 23 (1): 1-18.
- [10] Bond J A, Mauderly J L, Wolff R K. Concentration-dependent and time-dependent formation of DNA adducts in lungs of rats exposed to diesel exhaust [J]. *Toxicology* 1990; 60 (1-2): 127-135.
- [11] Ogawa M, Oyama T, Ise T, et al. A comparison of covalent binding of ethanol metabolites to DNA according to A1h2 genotype [J]. *Toxicol Lett* 2007; 168 (2): 148-154.
- [12] Hecht S S. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis [J]. *Chem Res Toxicol* 2008; 21 (1): 160.

for the polymerase switch in response to DNA damage [J]. *Mol Cell* 2004; 14 (4): 491-500.

- [7] Xin H, Lin W, Sumanasakera W, et al. The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B [J]. *Nucleic Acids Res* 2000; 28 (14): 2847-2854.
- [8] Tsuji Y, Watanabe K, Araki K, et al. Recognition of forked and single stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks [J]. *Genes Cells* 2008; 13 (4): 343-354.
- [9] Miyase S, Tateishi S, Watanabe K, et al. Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent Mono and Polyubiquitination [J]. *J Biol Chem* 2005; 280 (1): 515-524.
- [10] Watanabe K, Tateishi S, Kavasujim M, et al. Rad18 guides Pol θ to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination [J]. *EMBO J* 2004; 23 (19): 3886-3896.
- [11] Nikiforov A, Svetlova M, Solovjeva L, et al. DNA damage-induced accumulation of Rad18 protein at stalled replication forks in mammalian cells involves upstream protein phosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323 (3): 831-837.
- [12] 胡恭华, 庄志雄, 夏芳莲, 等. 氢醌对 L02肝细胞 DNA损伤及细胞周期的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2007; 24 (4): 201-203.