

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.02.14

· 基础研究 ·

人支气管上皮细胞恶性转化过程中 FHIT 蛋白表达的研究

孔令文 吴庆琛 朱进国

【摘要】 背景与目的 目前大多数研究者分别研究了正常支气管上皮、癌前病变及肺癌组织(吸烟或不吸烟者)标本 FHIT 蛋白表达,而没有在肺癌发生发展过程中研究其表达及意义。本研究的目的是在烟草特异性亚硝胺(NNK)诱发人支气管上皮细胞(BEAS-2B)恶性转化过程中,探讨 FHIT 蛋白表达的变化及其意义。方法 用 500 mg/L NNK 诱发 BEAS-2B 细胞(对照组)恶性转化为 BEAS-2B_{NNK} 细胞(实验组),并在此过程中用免疫细胞化学方法动态观察 FHIT 蛋白表达的情况。结果 (一)NNK 诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化模型的建立:第 5 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞血清抗性显著增强;第 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞具有锚着独立性生长特性(软琼脂克隆形成);第 20 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞超微结构出现明显异型性;第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞在裸鼠体内成瘤,病理类型为高分化鳞癌。(二)FHIT 蛋白表达:BEAS-2B 细胞 FHIT 蛋白表达稳定,在各代之间的差异无统计学意义($P > 0.05$);第 5 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白表达即有所降低,并随传代次数增加而进行性下降,但第 25 代细胞 FHIT 蛋白却呈高表达。结论 500 mg/L NNK 能成功诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化,为进一步探讨肺癌尤其是吸烟致肺癌的发生机制提供了理想模型。FHIT 蛋白表达减弱在肺癌发生过程中可能属早期事件,但 FHIT 蛋白在细胞恶性转化晚期上调表达值得进一步研究。

【关键词】 NNK 永生化人支气管上皮细胞(BEAS-2B) FHIT 蛋白

【中图分类号】 R734.2

FHIT protein expression during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by NNK
KONG Lingwen, WU Qingchen, ZHU Jinguo. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, P. R. China
Corresponding author: KONG Lingwen, E-mail: lingwen9450531@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Background and objective** Most studies about FHIT protein expression were performed in normal tracheal epithelium, precancerous lesions and lung cancer tissues respectively, but not in the course of malignant transformation of lung cancer. The aim of this study is to detect the changes of FHIT protein expression during malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) induced by tobacco-specific nitrosamine (NNK), and to explore its significance. **Methods** BEAS-2B cells were induced to malignantly transform (BEAS-2B_{NNK}) by 500 mg/L NNK, and FHIT protein expression was detected in the different passages of BEAS-2B_{NNK} and BEAS-2B cells by SP immunocytochemistry. **Results** Part 1: Model of malignant transformation of BEAS-2B cells induced by NNK was established. The serum resistance was significantly increased in the 5th passage of BEAS-2B_{NNK} cells. The anchorage independent growth (soft agar colony formation) appeared in the 15th passage of BEAS-2B_{NNK} cells. The ultrastructure of the 20th passage of BEAS-2B_{NNK} cells showed obvious heteromorphy characterization. The 25th passage of BEAS-2B_{NNK} cells developed into tumors in nude mice, which were well differentiated squamous cell carcinoma. Part 2: FHIT protein was steadily expressed in the different passages of BEAS-2B cells ($P > 0.05$). FHIT protein expression was obviously decreased from 5th to 15th passage of BEAS-2B_{NNK} cells, but it was unexpectedly overexpressed in the 25th passage. **Conclusion** The model of malignant transformation of BEAS-2B cells induced by NNK (500 mg/L) can be established successfully and may be used for investigation of molecular biological mechanisms of lung cancer, especially for smoking-related cases. Decrease of FHIT protein expression might be an early event, however, its overexpression in the late passages should be further studied.

【Key words】 NNK Immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) FHIT protein

肺癌是恶性肿瘤导致人类死亡的主要原因之一,全世界每年死于肺癌的患者超过 100 万^[1]。尽管过去二十年在肺癌治疗方面有很大进展,但肺癌预后进展甚微。主要原因是传统诊断方法只能发现明确的癌变,而不能识别癌前病变中前体细胞的损伤。分子生物学的发展为肺癌的早期诊断提供了理论基础。

肺癌发生是多因素、多步骤的过程,其中包括癌基因的激活和抑癌基因的失活。FHIT 基因是 Ohta 等^[2]于 1996 年用定位克隆技术及外显子捕获法在 3p14.2 上找到的一种新抑癌基因。FHIT 基因异常和吸烟所致肺癌的发生密切相关。Tomizawa^[3]和 Tseng^[4]等认为,在支气管癌前病变中 FHIT 蛋白表达缺失是早期频发事件,并且与吸烟相关。

目前大多数研究者分别研究正常支气管上皮、癌前病变及肺癌组织(吸烟或不吸烟者)标本 FHIT 蛋白表达,推测 FHIT 蛋白表达变化是肺癌发生的早期事件,而没有在肺癌发生、发展过程中研究其表达及意义。本研究的目的是在用烟草特异性亚硝胺 NNK 诱导人支气管上皮细胞恶性转化过程中,利用免疫细胞化学方法,动态观察 FHIT 蛋白表达情况,探讨 FHIT 蛋白表达在肺癌发生、发展过程中的意义,为肺癌高危人群罹患肺癌预警及普查提供理论依据,并为探讨肺癌特别是吸烟所致肺癌的发生、发展及防治开辟一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及实验动物 永生化人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 由美国国立癌症研究所 Harris 教授等建立,美国专利号:U. S. Pat. 4885238。细胞来自于正常人支气管上皮细胞,经腺病毒 12/SV40 杂交病毒(Ad 12/SV40, Adenovirus 12/SV40 hybrid virus preparation)感染,连续传代筛选而永生化。细胞株含 SV40 DNA,表达 T 抗原,但不含腺病毒 DNA,其染色体核型为近二倍体,常用于检测化学物质和生物试剂的致癌性。本实验所用 BEAS-2B 细胞是由军事医学科学院二所四室朱茂祥、杨陟华教授馈赠,细胞代龄 25 代。BALB/C-nu/nu 裸鼠 10 只(雄性,5 周龄,18~22 g/只),购自中国科学院上海实验动物中心。

1.1.2 主要试剂来源 LHC-8 培养基购自美国 Hyclone 公司;NNK 为美国 Chemsyn Science Lab 产品,军事医学科学院二所四室朱茂祥、杨陟华教授馈赠;兔抗人 FHIT 多克隆抗体及 SP 试剂盒购自北京中山生物试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转化处理^[5] BEAS-2B 细胞用 LHC-8 基础无血清培养液于 37℃、5% CO₂、95% 湿度

条件下培养,细胞大致按 $1.0 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种。每 2 天换液 1 次,每 4~6 天传代 1 次。处于指数生长期的 BEAS-2B 细胞在含有 500 mg/L NNK 的完全培养液中连续培养 24 h 作为实验组细胞(BEAS-2B_{NNK}),并以相应的 BEAS-2B 细胞平行传代培养作为对照组细胞(BEAS-2B)。

1.2.2 血清抗性实验 将指数生长的第 5 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞按 300 个细胞/皿接种于 6 cm 培养皿中,每组 6 皿,其中 3 皿加入 10% 胎牛血清。8 天后终止培养。PBS 洗涤 3 次,甲醛固定 30 min, Giemsa 染色后显微镜下计数克隆(大于 16 个细胞为一个克隆)。按下式计算接种效率:接种效率 = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 锚着独立性生长实验^[6] 用 LHC-8 培养液配制 0.7% 琼脂糖,高压灭菌后倒入培养皿中,铺制底层,待凝固后备用。收获第 15 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞与 0.7% 琼脂糖 1:1 混匀,并加到 0.7% 琼脂糖凝胶上(细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{皿}$),待上层琼脂糖凝固后,每皿加入 2 mL LHC-8 培养液。于 37℃、5% CO₂、95% 湿度条件下培养,每 3 天换液 1 次,3 周后镜下计数多于 50 个细胞的克隆数,按下式计算克隆形成率:克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 $\times 1000\%$ 。

1.2.4 电镜观察 取指数生长的第 20 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞(约 6×10^6 个细胞),常规消化离心后,转入 EP 管,PBS 洗涤离心 10~15 min, 2000 r/min,弃上清,缓慢加入 4% 戊二醛固定 2 h。4% PBS 洗涤离心一次,转入 4% 四氧化锇固定 2 h;依次于 50%、70%、90%、100% 丙酮中脱水,各 15 min;环氧树脂 618[#] 包埋;半薄切片,1% 次甲基蓝一天青染色,光学显微镜定位,再制备超薄切片;醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,各 30 min,去二氧化碳蒸馏水浸洗,滤纸吸干;透射电子显微镜下观察、照相。

1.2.5 裸鼠成瘤实验 收获第 25 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞,无血清培养液离心洗涤两次,计数活细胞,调整细胞数,将细胞悬浮于 PBS 中,备用。10 只健康雄性裸鼠,随机分为 2 组。用带 6 号针头的注射器抽取适量瘤细胞悬液接种于裸鼠的腋下或背部皮肤,每个接种部位注射 0.2 mL,含活细胞数约 1×10^7 个。观察 4 个月内裸鼠成瘤情况,并对生长的肿块进行常规病理组织学检查。

1.2.6 免疫细胞化学 采用免疫细胞化学 SP 法。分别收获第 5、10、15、20、25 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞爬片,PBS 浸洗 2 min $\times 3$ 次;4% 纯丙酮固定 5 min,PBS(pH 7.2~7.6)浸洗 2 min $\times 3$ 次,干燥后冰冻保存备用;30% H₂O₂ 1 份 + 纯甲醇 50 份混合,室温浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗,PBS(pH 7.2~7.6)浸泡 5 min;滴加正常山羊血

清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加一抗(兔抗人 FHIT 多克隆抗体),4 过夜,PBS(pH7.2~7.6)浸洗 3 min ×3 次;滴加二抗(生物素标记羊抗兔 IgG),37 水浴 20 min。PBS(pH7.2~7.6)浸洗 3 min ×3 次;滴加 S-A/HRP(辣根酶标记链霉卵白素),37 水浴 20 min,PBS(pH7.2~7.6)浸洗 3 min ×4 次;DAB 显色 5~30 min,自来水终止显色;苏木素复染 2 min,1%盐酸酒精分色;70%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水,二甲苯透明;封片。

1.2.7 图像分析系统定量分析 用北航 CM-2000B 型生物学图像分析系统定量分析各代 BEAS-2B 及 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白表达。每代细胞随机取 5 个样本。FHIT 蛋白表达阳性产物呈棕黄色。正常乳腺组织为阳性对照。免疫反应产物的标记强度用平均光密度(OD)值($\bar{x} \pm s$)表示。

1.3 统计学分析 全部数据均经 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。两样本率的比较采用 χ^2 检验,多个样本均数两两之间的比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BEAS-2B(对照组)细胞形态 BEAS-2B 细胞贴壁生长,呈梭形。

2.2 第 5 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞对血清促分化作用的抗性反应 在有血清条件下,第 5 代 BEAS-2B 细胞生长明显受到抑制($P < 0.01$)。BEAS-2B_{NNK} 细胞接种效率及抗血清促分化能力显著提高($P < 0.01$),表明细胞增殖能力增强,对环境条件的选择

性和依赖性降低(表 1)。

表 1 第 5 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞对血清促分化作用的抗性反应

Tab 1 Results of serum fastness of the 5th passage of BEAS-2B and BEAS-2B_{NNK} cells

Group	Cell	Serum	Planting efficiency
1	BEAS-2B	-	9.4 ± 2.0
2	BEAS-2B	+	2.7 ± 1.4
3	BEAS-2B _{NNK}	-	10.2 ± 1.5
4	BEAS-2B _{NNK}	+	15.0 ± 1.3

Group 1 vs group 2, $P < 0.01$; Group 2 vs group 4, $P < 0.01$

2.3 第 15 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞锚着独立性生长能力 第 15 代 BEAS-2B 细胞几乎不能在半固体琼脂中生长,克隆形成率极低(0.025% ± 0.050%),锚着独立性生长能力极弱;而第 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞在半固体琼脂中生长,克隆形成率达 0.650% ± 0.190%,具有锚着独立性生长能力($P < 0.01$)。

2.4 第 20 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞的超微结构(图 1) 第 20 代 BEAS-2B 细胞的细胞核较大,位于中央,呈卵圆形;核周聚集少量异染色质,核内有大量细而分散的常染色质;核仁较小或无核仁;胞质内细胞器较多,线粒体轻度肿胀。未见明显的转化特性。而第 20 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞的细胞核大,核形态不规则;核内可见局部空化,常染色质丰富;核仁明显肥大、边集,可见两个核仁;胞质内细胞器较少;可见线粒体肿胀,表明细胞已经恶性转化。

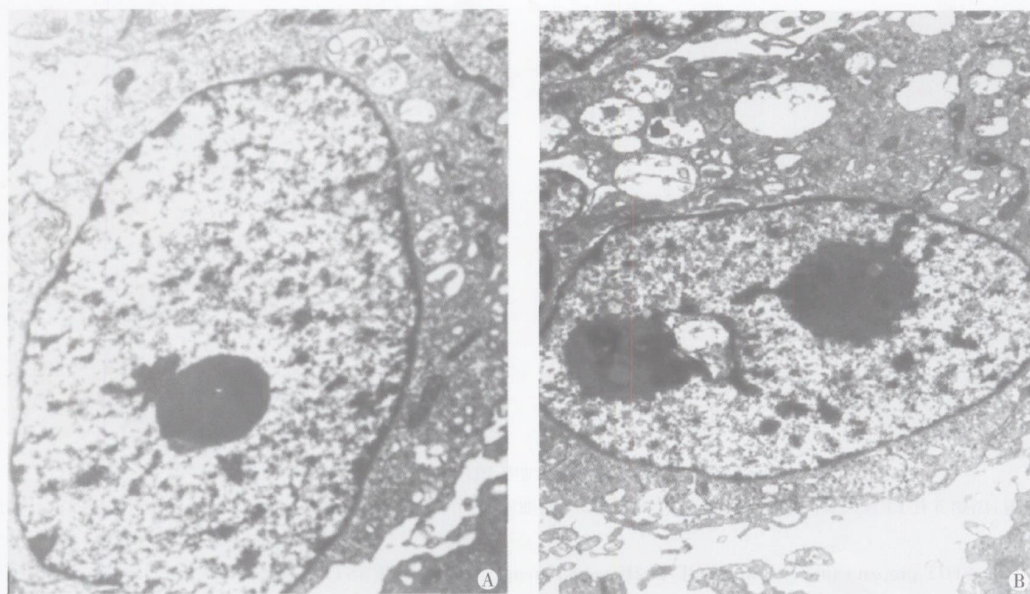


图 1 A: 第 20 代 BEAS-2B 细胞超微结构(×8000); B: 第 20 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞超微结构(×8000)

Fig 1 A: Ultrastructure of BEAS-2B cells in the 20th passage (×8000); B: Ultrastructure of BEAS-2B_{NNK} cells in the 20th passage (×8000)

2.5 裸鼠成瘤性 第 25 代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞接种裸鼠后, BEAS-2B 组未见肿瘤形成 (0/4), 该组裸鼠在喂养过程中不明原因死掉一只; BEAS-2B_{NNK} 组第 3 个月未观察到有 2 只裸鼠肿瘤形成 (2/5), 第 4 个月未观察到有 4 只裸鼠肿瘤形成 (4/5), 肿瘤最大为 0.7 cm × 0.7 cm, 最小为 0.2 cm × 0.2 cm (图 2A)。病理切片均为高分化鳞癌(~ 级), 包膜不清, 瘤组织边缘有许多腺腔, 具有浸润性(图 2B)。

2.6 FHIT 蛋白表达(图 3、4) 各代 BEAS-2B 和 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白均有不同程度的阳性表

达。BEAS-2B 细胞 FHIT 蛋白表达在各代之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 5、10、15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞随着传代次数增加, 其 FHIT 蛋白表达呈现减弱趋势; 第 25 代细胞 FHIT 蛋白却呈高表达。除第 5 与 10 代、第 10 与 20 代、第 15 与 20 代之间差异无显著性 ($P > 0.05$) 外, 其余各代之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。BEAS-2B_{NNK} 组与 BEAS-2B 组之间比较: 第 5 代间差异无显著性 ($P > 0.05$), 其余 4 代间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中第 15 代间差异非常显著 ($P = 0.001$)。

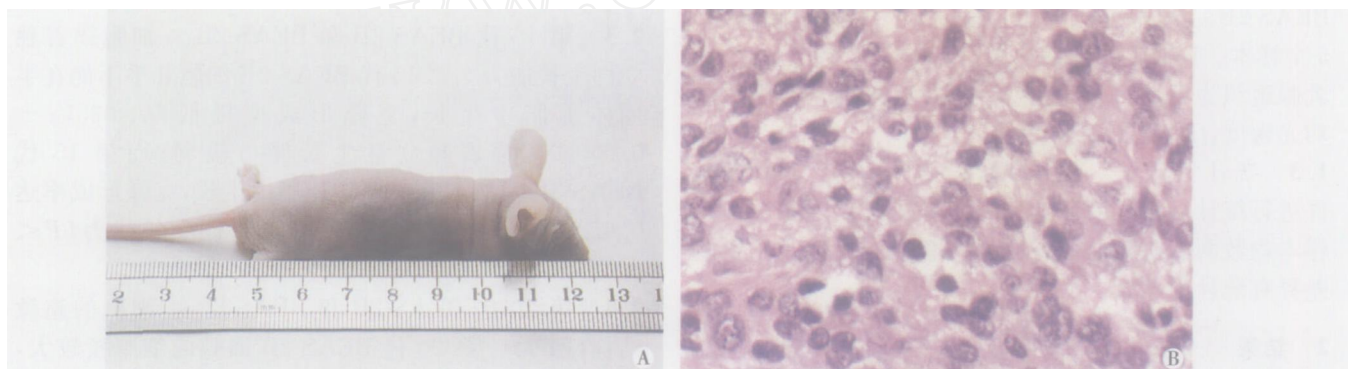


图 2 第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞裸鼠成瘤性观察

A: 裸鼠成瘤图片; B: 裸鼠肿瘤组织学图片 (HE 染色, ×40)

Fig 2 Tumorigenicity of the 25th passage of BEAS-2B_{NNK} cells in nude mice

A: Tumor formation in nude mouse; B: Histological picture of tumor in nude mice (HE staining, ×40)

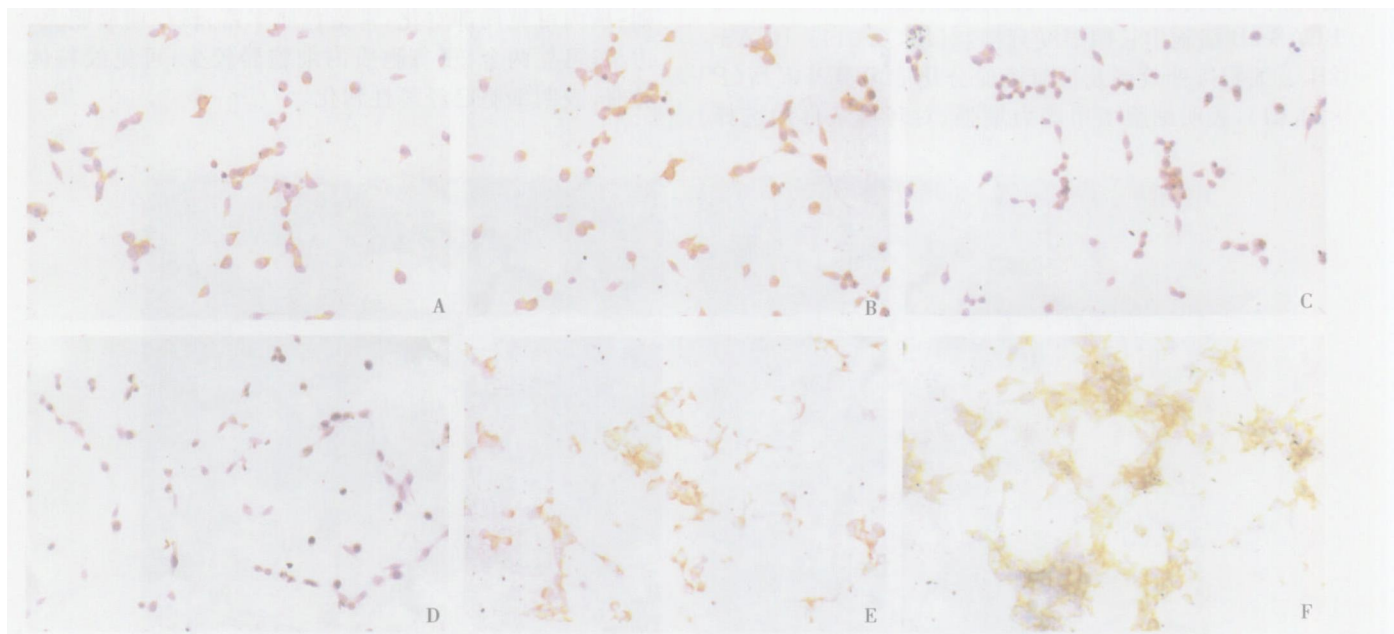


图 3 BEAS-2B 及各代 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白表达 (原始放大倍数 ×20)

A: BEAS-2B 细胞; B: 第 5 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞; C: 第 10 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞; D: 第 15 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞; E: 第 20 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞; F: 第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞

Fig 3 FHIT protein expression in the BEAS-2B and different passages of BEAS-2B_{NNK} cells (original magnification ×20)

A: Control BEAS-2B cells; B: The 5th passage of BEAS-2B_{NNK} cells; C: The 10th passage of BEAS-2B_{NNK} cells; D: The 15th passage of BEAS-2B_{NNK} cells; E: The 20th passage of BEAS-2B_{NNK} cells; F: The 25th passage of BEAS-2B_{NNK} cells

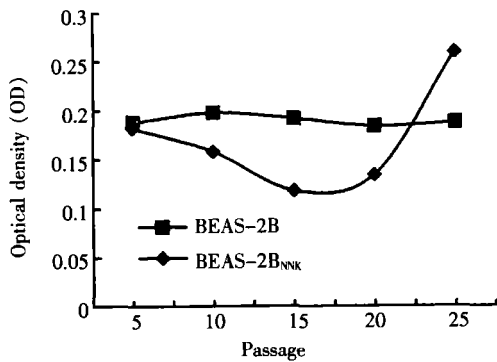


图 4 各代 BEAS-2B 及 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白表达

Fig 4 FHIT protein expression in the different passages of BEAS-2B and BEAS-2B_{NNK} cells

3 讨论

原发性支气管肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一。报道约有 90% 的肺癌发生与吸烟有关^[7]。NNK 是已知化学结构的七种烟草特异性亚硝胺类化合物中的一种,它在烟草中含量最高,致癌性强,可诱发大鼠、小鼠和地鼠等动物的多种肿瘤发生,尤其以肺癌更为显著^[8,9]。支气管上皮细胞是 NNK 代谢活化的主要场所,也是肺癌发生的主要来源。因此,支气管上皮细胞是体外研究 NNK 致肺癌机制的重要靶细胞。近年来,国内外先后建立了 SV-40、HPV-16、HPV-18 永生化的多种人类支气管上皮细胞系。本研究所用 BEAS-2B 细胞来自于正常人支气管上皮细胞,经腺病毒 12/SV40 杂交病毒感染,连续传代筛选而永生。细胞株含 SV40 DNA,表达 T 抗原,但不含腺病毒 DNA。染色体核型为近二倍体。细胞建株时在裸鼠体内做成瘤实验,未见致瘤性^[10,11]。

NNK 诱发肺癌是一多步骤的发展过程,在烟草致癌物等各种环境致癌因素作用下,支气管上皮细胞增殖/鳞状化生过程的控制异常被认为是肺鳞癌多阶段发生过程中的重要步骤。本研究通过观察 NNK 诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化过程中生物学特征的动态变化,发现其对血清促分化作用的抗性反应增强,说明 BEAS-2B_{NNK} 细胞已经具有细胞恶性转化早期的生物学行为;随着传代次数的增加,第 15 代细胞软琼脂克隆形成率显著提高,说明转化细胞已初步表现出其恶性表型,与 Langenfeld 等^[12]的研究结果一致;第 20 代细胞超微结构出现明显异型性,第 25 代细胞在接种裸鼠后可导致鳞癌的发生(4/5),表明细胞已经恶变。至此本研究已成功建立 BEAS-2B 细胞恶性转化模型,为进一步探讨肺癌发生的机制、尤其是吸烟致肺癌发生的机制提供了理想的生物模型。

肺癌的病因学研究显示,与肺癌发生有关的因素主要包括吸烟、职业因素、环境因素、病毒感染、遗传背景以及肺癌易感基因多态性等,其中约 90% 的肺癌与吸烟相关^[13]。研究表明,烟草烟雾中的致癌物多达 55 种,其中近 20 种已在实验动物体内证明有致肺癌作用。卷烟中的致癌物多环芳香烃、NNK 等被吸入体内,经 P450 活化酶等活化后,与 DNA 形成加合物,如果持续存在于细胞内,部分细胞因 DNA 编码错误而凋亡,部分细胞因关键基因如 Ras、p53、FHIT 基因突变而最终形成肺癌^[14]。其中, FHIT 基因是在 3p14.2 上发现的一种新的抑癌基因。FHIT 基因在染色体上占据约 2 Mb 大小的位置,包括 t(3;8) 断裂点、FRA3B 及 HPV16 整合位点。FHIT 基因共有 10 个外显子,其中第 5~9 外显子(约 1.1 kb 大小)编码 146 个氨基酸,组成 16.8 ku 大小的蛋白质。此蛋白质具有 Ap3A 水解酶活性。其功能的丧失将导致 Ap3A 水平升高,从而抑制基因激酶的活性,增强生长信号传导途径,阻断抑制途径或凋亡通道导致肿瘤的发生^[2]。FHIT 蛋白质脱帽功能的丧失也可能引起肿瘤的发生^[15]。

肿瘤的发生是一个多因素、多步骤的过程,其中包括癌基因的激活和抑癌基因的失活。目前认为 FHIT 基因缺失与肺癌、食管癌、乳腺癌等多种肿瘤的发生有关,并属于早期事件^[16]。FHIT 基因常因易碎片 FRA3B 易被烟草等致癌物诱导断裂,而在肺癌中频繁发生异常。FRA3B 异常高表达可能增加 FHIT 基因缺失的危险性,并与吸烟成正相关^[17]。

本研究利用烟草特异性亚硝胺 NNK 诱发人支气管上皮细胞(BEAS-2B)恶性转化模型,模拟吸烟致肺癌发生。在此过程中应用免疫细胞化学方法,动态检测 FHIT 蛋白表达情况。结果 BEAS-2B(对照组)细胞 FHIT 蛋白表达均为阳性,各代之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示在 BEAS-2B 细胞连续传代过程中 FHIT 蛋白表达基本稳定,适合建立体外肺癌发生模型来检测 FHIT 蛋白表达情况。BEAS-2B_{NNK}(实验组)第 5、10、15 代细胞随着恶性程度增加,其 FHIT 蛋白表达呈现减弱趋势,提示 FHIT 蛋白表达减少在肺癌发生过程中属早期事件。

本研究还观察到第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞 FHIT 蛋白却呈现高表达。范保星等^[18]在研究永生化的支气管上皮细胞(BEP2D)和粒子辐射诱发 BEP2D 细胞后形成的恶性转化细胞中 60 个肺癌相关基因的表达谱时,亦发现第 35 代恶性转化细胞 FHIT 基因呈高表达现象。鉴于 FHIT 基因的突变在永生化的但不成

瘤和早期肿瘤细胞(特别是来源于上皮细胞的肿瘤)中经常被发现,而转染了野生型 FHIT 基因的肺癌细胞失去了裸鼠致瘤性^[19~21],因此,FHIT 蛋白在第 25 代 BEAS-2B_{NNK} 细胞上调表达是正常型还是突变型值得进一步研究。

综上所述,本研究的结果显示,500 mg/L NNK 能成功诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化,为进一步探讨肺癌发生的机制、尤其是吸烟致肺癌发生的机制提供了理想的模型。在 NNK 诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化早期,FHIT 蛋白表达随着 BEAS-2B 细胞恶性程度的增加而减少,推测 FHIT 蛋白表达减少在肺癌发生过程中属于早期事件,有望成为吸烟高危人群罹患肺癌及普查的预警指标之一。另外,FHIT 蛋白在细胞恶性转化晚期上调表达值得进一步研究。

参 考 文 献

- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 2001, 37(Suppl 8) S4-S66.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 1996, 84(4) 587-597.
- Tomizawa Y, Nakajima T, Kohno T, et al. Clinicopathological significance of Fhit protein expression in stage non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 1998, 58(23) 5478-5483.
- Tseng JE, Kemp BL, Khuri FR, et al. Loss of Fhit is frequent in stage non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Res*, 1999, 59(19) 4798-4803.
- Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI, et al. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation*, 1988, 38(1) 60-66.
- Dodson MG, Slota J, Lange C, et al. Distinction of the phenotypes of *in vitro* anchorage-independent soft-agar growth and *in vivo* tumorigenicity in the nude mouse. *Cancer Res*, 1981, 41(4) 1441-1446.
- Ozlu T, Bulbul Y. Smoking and lung cancer. *Tuberk Toraks*, 2005, 53(2) 200-209.
- Djordjevic MV, Brunnemann KD, Hoffmann D. Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco. *Carcinogenesis*, 1989, 10(9) 1725-1731.
- Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 1988, 9(6) 875-884.
- Wiley JC, Broussoud A, Sleemi A, et al. immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. *Cancer Res*, 1991, 51(19) 5370-5377.
- Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*, 1988, 48(7) 1904-1909.
- Langenfeld J, Lonardo F, Kiyokawa H, et al. Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene*, 1996, 13(9) 1983-1990. Erratum in: *Oncogene*, 1996, 13(12) 2743.
- Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol*, 2003, 4(1) 45-55. Erratum in: *Lancet Oncol*, 2003, 4(7) 396.
- Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(14) 1194-1210.
- Barnes LD, Garrison PN, Siperashvili Z, et al. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5''-P₁, P₃-triphosphate hydrolase. *Biochemistry*, 1996, 35(36) 11529-11535.
- Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, et al. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol*, 2002, 3(12) 748-754.
- Stein CK, Glover TW, Palmer JL, et al. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 34(3) 333-340.
- Fan BX, Sun JF, Zhang KT, et al. Expression profile of 60 lung cancer related genes in BEP2D cell and R15Hp35T-2 cell. *Chin J Lung Cancer*, 2002, 5(5) 321-325. [范保星,孙敬芬,张开泰,等. BEP2D 细胞和 R15Hp35T-2 细胞中 60 个肺癌相关基因的表达研究. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(5) 321-325.]
- Werner NS, Siperashvili Z, Fong LY, et al. Differential susceptibility of renal carcinoma cell lines to tumor suppression by exogenous Fhit expression. *Cancer Res*, 2000, 60(11) 2780-2785.
- McIver B, Grebe SK, Wang L, et al. FHIT and TSG101 in thyroid tumours: aberrant transcripts reflect rare abnormal RNA processing events of uncertain pathogenetic or clinical significance. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2000, 52(6) 749-757.
- Menin C, Santacatterina M, Zamboni A, et al. Anomalous transcripts and allelic deletions of the FHIT gene in human esophageal cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 2000, 119(1) 56-61.

(收稿:2005-03-31 修回:2005-06-23)

(本文编辑 李蓓兰)