

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0293-03

A23187 诱导恶性黑色素瘤患者的外周血单核细胞向树突状细胞分化

吴 军, 杨太成, 王 捷, 王晓怀 (广州军区广州总医院肿瘤分子生物学研究所, 广州 510010)

* A23187 为一种钙离子载体(calcium ionophore, CI), 可提高胞浆内游离钙水平, 模拟某些细胞内信号转导事件, 导致多基因活化^[1,2]。我们先前曾探讨了 A23187 对正常人外周血单核细胞(peripheral monocytes, PBMC)来源的 DC 的影响^[3], 最近, 我们进行了有关 A23187 诱导 MMe 患者的 PBMC 向 DC 分化的实验研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

人重组粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)购自第一军医大学中心实验室; 淋巴细胞分离液 Ficoll 为上海生化试剂二厂产品; 荧光标记的抗人 CD83, CD80, CD86, CD54, HLA-DR 抗体及流式细胞仪均为 BD 公司产品; RPMI-1640 培养液及钙离子载体(A23187)为 Sigma 公司产品; 无血清培养基(serum-free medium, SFM)为 Life Technologies 公司产品; 胎牛血清 FCS 为 Hyclone 公司产品; ELISA 试剂盒为 Immunotech 公司产品; 酶标仪(BIOCELL HT)为奥地利 Anthos Labtec Instruments Ges. m. b. H 公司产品。

1.2 病例选择

MMe 患者共 5 例均为我院肿瘤科住院患者, 其中男 3 例, 女 2 例, 平均年龄 47 岁(27 ~ 63 岁); 均经过手术后病理证实, 其中 4 例为手术 + 化疗 + 白介素-2(IL-2)生物治疗后又复发的晚期患者, 1 例为术后尚未进行辅助化疗及生物治疗的早期患者, 5 例患者外周血象均正常。健康献血员的全血由我院输血科提供。

1.3 树突状细胞及混合 T 淋巴细胞的制备

采集 MMe 患者外周血经 Ficoll 梯度离心分离单个核细胞(PBMC), 以 RPMI-1640 调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 于 5% CO_2 , 37℃ 条件下培养 4 h, 用力晃动培养瓶后洗出非黏附细胞, 在剩下的贴壁细胞(即 PBMC)中加入 SFM 及终浓度为 50 ng/ml 的 rhGM-CSF 和/或 100 ng/ml 的 A23187, 置于 5% CO_2 , 37℃ 条件下培养 40 h。采集健康献血员全血, 经上述方法获得非黏附细胞, 经尼龙毛法分离获得 T 淋巴细胞, 用作同种异体 T 淋巴细胞的刺激增殖实验。

1.4 形态学观察

用相差倒置显微镜每 6 ~ 8 h 观察细胞的生长状态及形态变化。40 h 后, 用电镜观察由贴壁变悬浮的细胞形态。

1.5 细胞表型分析

采用直接免疫荧光法, 以荧光标记的鼠抗人 CD80, CD86, CD83, CD54, HLA-DR 抗体标记培养前及不同方法培养 40 h 后的细胞, 用流式细胞仪检测细胞表面分子的表达。

1.6 T 淋巴细胞的刺激增殖实验

分别将不同方法处理的上述细胞洗涤 3 遍, 用 γ -射线照射灭活(30 Gy)后作抗原呈递细胞(APC), 用含 10 % FCS 的 RPMI-1640 制成浓度为 $1 \times 10^9/\text{L}$, 加入 96 孔培养板中(100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 然后每孔加入同种异体 T 淋巴细胞($5 \times 10^9/\text{L}$, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 即 APC: T = 1: 5, 同时设无 APC 组为对照, 在 5% CO_2 , 37℃ 条件下培养 72 h, 收集上清(用于测定 IFN- γ 水平)。加入 MTT 20 μl (5 g/L), 于 5 % CO_2 , 37℃ 条件下继续培养 4 h。离心、弃上清, 加入 DMSO 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 溶解结晶, 用酶标仪双波长检测(检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm), 测 OD 值。

1.7 IFN- γ 的水平测定

按 Immunotech 公司 ELISA 试剂盒说明书介绍的方法, 测定不同方法培养的 APC, 刺激同种异体 T 淋巴细胞后, 培养液上清中 IFN- γ 的水平变化。

1.8 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计软件包进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 A23187 诱导前后细胞的形态

在相差显微镜下, 未处理的 MMe 患者 PBMC 及单纯经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 处理 40 h 的 PBMC 呈球形, 表面光滑(图略); 经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 和 100 ng/ml 的 A23187 联合刺激 20 ~ 30 h, 就可见胞体变大及不规则, 具有典型树突状及细刺状突起(图 1A); 40

h 后部分细胞树突状突起减少,光镜下由贴壁不规则细胞变成悬浮的圆形细胞(图略),电镜下可见悬浮的圆形细胞仍有树突状突起(1B)。相差显微镜下 DC 周围的小亮点为血小板。

是因为 DC 表面表达高水平的共刺激分子、细胞间黏附分子以及 MHC 分子,可通过交叉呈递作用将 MHC-肿瘤抗原肽段呈递给 CTL 细胞,并表达协同共刺激分子以诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)免疫应答。随着 DC 的免疫治疗进入临床研究,稳定地产生足量有效的 DC 是技术关键。获得 DC 的方法除直接分离纯化外,可用组合细胞因子体外培养,但均存在产量低、培养时间长、易污染以及不能及时给患者回输等缺点。

图 1 rhGM-CSF 和 A23187 处理后 PBMC 在相差显微镜下的形态(A × 400)及在扫描电镜下的形态(B × 5 200)

2.2 免疫表型检测

采用直接免疫荧光法和流式细胞仪对不同方法培养 40 h 所获的细胞进行表型分析。结果表明经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 和 100 ng/ml 的 A23187 联合刺激 40 h,细胞表面 CD83, CD80, CD86, CD54, HLA-DR 等分子的表达明显增高,与未处理组相比, P 值均为 0.000 (<0.001),有明显统计学意义;而单纯经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 刺激的细胞;表面 CD83, CD80, CD86, CD54, HLA-DR 等分子的表达与未处理组相比无明显改变, P 值分别为 0.864, 0.512, 0.422, 0.180, 0.609 (P > 0.05),无统计学意义(结果略)。

2.3 混合 T 淋巴细胞的刺激增殖实验

图 2 结果表明,MMe 患者的 PBMC,在体外经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 和 100 ng/ml 的 A23187 联合刺激 40 h 后具有明显刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖的作用,与其它 3 组相比, P = 0.000 (<0.01),有统计学意义;而对照组、未处理组及单纯 rhGM-CSF 处理组 3 组之间相比, P = 0.198 (>0.05),提示此 3 组之间无明显差别。

2.4 IFN-γ F 的水平

用 ELISA 试剂盒检测不同方法培养获得的 APC 刺激同种异体 T 淋巴细胞后,培养液上清中 IFN-γ 的水平变化。(图 3)提示,5 例 MMe 患者的 PBMC,在体外经 100 ng/ml 的 rhGM-CSF 和 100 ng/ml 的 A23187 联合刺激 40 h 所获得的 APC,刺激 T 淋巴细胞后,培养液上清中 IFN-γ 的水平增高明显;而经单纯 rhGM-CSF 培养所获得的 APC,刺激 T 淋巴细胞后,培养液上清中 IFN-γ 的水平与未处理组相比,无明显区别。提示 rhGM-CSF 联合 A23187 诱导 MMe 患者的 PBMC 所生成的 APC,具有刺激 T 淋巴细胞分泌 IFN-γ 的能力。

DC 之所以在肿瘤细胞免疫治疗领域中备受关注,

图 2 不同方法培养的 APC 对同种异体 T 淋巴细胞的刺激增殖作用(n = 5)

图 3 IFN-γ F 水平变化(P 患者)

A23187 为一种钙离子载体(CI),可提高胞浆内游离 Ca²⁺ 水平,导致 Ca²⁺ 结合其调节蛋白-钙调蛋白(calcimodulin, CaM),使 CaM 的构象发生改变暴露疏水区, CaM 籍此区结合各种蛋白受体分子,模拟某些细胞内信号转导事件,导致多基因活化^[4]。本实验中, MMe 患者的 PBMC 在 A23187 联合 rhGM-CSF 的刺激下,在 20 ~ 40 h 就获得了 DC 的典型形态,迅速上调 HLA-DR, CD80, CD86 及 CD54 分子的表达,且出现较高的 CD83 分子的表达,获得的 DC 对同种异体 T 淋巴细胞具有很强的增殖作用,同时能激活 T 淋巴细胞分泌 IFN-γ。在 MMe、肾癌等对生物治疗相对敏感的肿瘤治疗中,我们期望得到一种能快速、稳定地产生足量

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0295-03

支气管上皮癌前病变 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达

张黎歆, 彭 凌, 杜 平 (解放军 305 医院病理科, 北京 100017)

FHIT 基因位于 3p14. 2, 为肿瘤候选抑制基因。FHIT 异常表达广泛存在于肺、食管、胃、乳腺及肾脏等恶性肿瘤组织。实验表明 FHIT 参与细胞凋亡, FHIT 与 p53 的联合基因治疗, 启动两条或更多的凋亡途径, 可抑制肿瘤生长^[1]。近来 FHIT 基因在肺癌前病变发生中的作用引起了特别的关注, 因此我们对支气管上皮癌前病变 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达进行检测, 为 FHIT 基因应用于肺癌前病变的早期诊断及预防治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验标本

临床标本来自山西省肿瘤医院、山西医科大学第一临床医院和第一军医大学南方医院 2000 年 11 月 ~ 2002 年 6 月手术切除的肺大体标本, 包括 230 例鳞状细胞癌(肺癌组) 和 130 例肺炎性病变(主要包括肺炎性假瘤, 肺结核, 支气管扩张症, 以下通称为肺炎性病变组), 将 360 例 2 360 个蜡块进行切片 HE 染色后, 显微镜下寻找各级增生病变。肺癌组筛选出 82 例, 其中正常上皮(BNE)16 例; 基底细胞增生(BCH)12 例; 鳞状上皮化生(SM)13 例; 轻度-中度不典型增生(MMD)10 例, 重度不典型增生-原位癌(S-C)11 例, 浸润性鳞状细胞癌(SSC)20 例。肺炎组筛选出 57 例, 正常上皮 16 例; 基底细胞增生 14 例; 鳞状上皮化生 16 例; 轻度-中度不典型增生 11 例。以上标本同时用于 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达的检测。

1.2 对各级增生病变和癌组织进行微切割

在 Narishige 拉制器上将直径 0.5 mm 空心玻璃管拉制成用于切割和吸取组织细胞的玻璃针, 在 Olympus 显微镜下对不封片 7 μ m 厚的石蜡切片寻找病变组织, 用切割玻璃针将病变组织与周围组织分割开, 再用吸取针吸取组织。采用配制的 DNA 裂解液, 56 $^{\circ}$ C 消化 24 h。采用常规酚/氯仿抽提 DNA; 紫外线分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。

1.3 引物设计及合成

应用 Primer 5 引物设计软件设计引物: D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 扩增微卫星 DNA 片段、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

反应体积为 50 μ l 含模板 DNA 1 μ l, 1.0 \times Taq DAN 聚合酶 buffer 5 μ l, 1.5 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L dNTPS, 20 pmol 上、下游引物及 TaqDAN 聚合酶 1 U。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。配制 12% 的变性聚丙烯酰胺凝胶。

1.5 染色及结果判断

银染参照谷志远主编的《现代医学分子生物学》银染法。结果判断: 与同一个体的正常肺组织或淋巴结比较, 若某一等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上, 则可判断为杂合性缺失(loss of heterozygosity, LHO); 如果肿瘤组织中出现正常对照没有的带型,

有效且诱导 Th1 免疫应答的 DC。

[关键词] A23187; 树突状细胞; 恶性黑色素瘤; 外周血单核细胞

[中图分类号] R392.3 [文献标识码] A

[参 考 文 献]

[1] Bedrosian I, Roros JG, Xu S, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-12 synergize with calcium ionophore to enhance dendritic cell function [J]. *J Immunother*, 2000, 23(3): 311-320.
[2] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, *et al.* Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics in-

dependent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents [J]. *Blood*, 1999, 94(4): 1359-1371.

[3] 吴 军, 王晓怀, 王 捷, 等. 钙离子载体对外周血单核细胞来源的树突状细胞的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(1): 52-53, 89.
[4] Koski GK, Schwartz GN, Weng DE, *et al.* Calcium mobilization in human myeloid cells results in acquisition of individual dendritic cell-like characteristics through discrete signaling pathways[J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 82-92.

[收稿日期] 2003 - 12 - 15 [修回日期] 2004 - 03 - 20

称为微卫星不稳定(microsatellite instability, MI)^[2]。

1.6 免疫组织化学分析

主要试剂为浓缩型兔抗人 FHIT 多克隆抗体,抗体稀释度为 1:200。

1.7 统计学分析

用 SPSS10.0 进行 χ^2 检验。

2 结果与讨论

2.1 肺癌组 FHIT 基因 4 个微卫星位点 LOH 和 MI 发生率

微卫星位点 D3S1300 和 D3S1313 的 LOH 发生率均明显大于 MI 发生率,分别为:28.0%(23/82) > 9.8%(8/82);29.3%(24/82) > 4.9%(4/82),*P* 值分别为 0.016 和 0.010,差别有统计学意义。D3S1234 和 D3S1481 的 LOH、MI 发生率分别为:30.5%(25/82)和 9.8%(8/82),28.0%(23/82) 和 9.8%(8/82)。*P* 值分别为 0.177 和 0.200,两者差异没有显示出统计学意义。

2.2 肺癌组和肺炎性病变组 FHIT 基因的 LOH 和 MI 发生率(见表 1)

表 1 肺癌组和肺炎性病变组的 FHIT 基因阳性率(LOH 和 MI 总发生率)比较

分组	n		D3S1234		D3S1300		D3S1481		D3S1313		P1/P2/P3/P4		P
	A	B	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	
BNE	16	16	2(12.5)	0(0.0)	1(6.3)	0(0.0)	1(6.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(18.8)	0(0.0)	0.226
BCH	12	14	4(33.1)	1(7.1)	3(25.0)	1(7.1)	3(25.0)	0(0.0)	2(16.7)	0(0.0)	4(33.3)	1(7.1)	0.148
SM	13	16	4(30.8)	2(12.5)	4(30.8)	2(12.5)	6(46.2)	1(6.3)	4(30.8)	1(6.3)	7(53.8)	2(12.5)	0.041
MMD	10	11	6(60.0)	2(18.2)	3(30.0)	1(9.1)	6(60.0)	1(9.1)	4(40.0)	0(0.0)	7(70.0)	2(18.2)	0.030
S-C	11	-	6(54.5)	-	5(45.5)	-	6(54.5)	-	4(36.4)	-	9(81.8)	-	-
SCC	20	-	11(55.0)	-	7(70.0)	-	9(45.0)	-	14(70.0)	-	17(85.0)	-	-
sum	82	57	33(40.2)	5(8.8)	30(36.6)	4(7.0)	31(37.8)	2(3.5)	28(34.1)*	1(1.8)	47(57.3)	5(8.8)	
χ^2			10.214	3.080	17.415	2.017	11.844	2.458	21.603	2.608	22.235	3.080	
<i>P</i>			0.069	0.379	0.004	0.569	0.037	0.483	0.001	0.456	0.000	0.379	

A: 肺癌组; B 肺炎性病变组 * : 肺癌组 82 例中, D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 这 4 个位点之间的 LOH/MI 发生率比较 $\chi^2 = 0.679, P = 0.878, P1/P2/P3/P4$: 4 个位点 D3S1234/D3S1300/D3S1481/D3S1313 LOH/MI 发生率

联合检测微卫星位点 D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 的 FHIT 基因阳性率(LOH 和 MI 发生率之和),肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮的 FHIT 阳性率分别为 18.8% 和 0.0%,两者比较 *P* 值为 0.226,差别无统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组基底细胞增生的 FHIT 阳性率分别为 33.3% 和 7.1%,两者比较 *P* 值为 0.148,差别无统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组鳞状上皮化生的 FHIT 阳性率分别为 53.8% 和 12.5% 两者比较 *P* 值为 0.041,差别有统计学意义。肺癌组轻-中度非典型增生的 FHIT 阳性率 70.0%,与肺炎组轻-中度非典型增生的阳性率 2(18.2%) 比较, *P* 值为 0.030,差别有统计学意义。肺癌组各增生病变比较, *P* 值为 0.000,有显著性差异。肺炎性病变组各增生病变之间比较, *P* 值为 0.379,差异无显著性。

2.3 FHIT 蛋白表达

肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮的 FHIT

蛋白表达缺失率分别为 18.8%(3/16) 和 0.0%(0/16),两者比较 *P* 值为 0.226,差异没有显示出统计学意义。肺癌组与肺炎性病变组基底细胞增生的 FHIT 蛋白表达缺失率分别为 60%(6/10) 和 0.0%(0/11),两者比较 *P* 值为 0.004,差异有显著性。肺癌组与肺炎性病变组鳞状上皮化生 FHIT 缺失率分别为 60%(6/10) 和 16.7%(2/12),两者比较 *P* 值为 0.074,差异没有显示出统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮、基底细胞增生和鳞状上皮化生总缺失率比较差异有显著性。

2.4 FHIT 基因稳定性与 FHIT 蛋白表达的关系

FHIT 蛋白表达缺失为 17 例, FHIT 基因 LOH/MI 为 16 例,其中 15 例同时存在 FHIT 蛋白表达缺失和 FHIT 基因 LOH/MI,两者间的关系系数 Kappa 值为 0.883, Kappa 检验 *P* 值为 0.000,表明 FHIT 基因 LOH/MI 与 FHIT 蛋白表达缺失间的关系具有统计学意义。

最近的研究表明,以腺病毒为载体介导的 FHIT 和

p53 基因联合治疗,可能是非小细胞肺癌或是其它肿瘤有效的治疗方案^[1]。另有报道,通过 E1A 为载体的 FHIT 转基因治疗,抑制了裸鼠体内恶性肿瘤细胞的生长,E1A 构建可望成为有价值的基因治疗工具^[2]。FHIT 基因可否用于肺癌前病变的治疗?首先要弄清 FHIT 基因是否参与肺癌前病变的发生和发展。因此我们收集了临床手术切除的肺大体标本,分为 2 组,一组是肺癌,另一组是肺炎性病变。在此分组的基础上,检测 FHIT 基因在 2 组增生病变中是否存在差异。本实验采用的微卫星位点 D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 位于外显子 4~6 之间,是该基因频发缺失的集中位点^[3,4]。结果显示 4 个微卫星位点中的 1300 和 1313 2 个位点在各级增生病变中以 LOH 现象为主,MI 发生率较低。1234 和 1481 位点的 LOH 和 MI 比较差异无统计学意义。看来肺癌前病变 FHIT 基因异常不仅限于 LOH,MI 也是该基因异常的普遍现象。肺炎性病变组的 4 个微卫星位点的 FHIT 阳性率在正常上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生、轻-中度非典型增生之间无显著性差异,而肺癌组中的 4 个微卫星位点的 FHIT LOH/MI 发生率在各级增生病变比较差异有显著性且逐步递增,提示 FHIT 基因稳定性的改变在预测增生性病变的发展中有重要价值。即 FHIT 越稳定,该增生病变预期的发展结果为炎性或良性的可能性大, FHIT 越不稳定,该增生病变为真正癌前病变的可能性越大。

肺癌组的鳞状上皮化生和轻度-中度非典型增生病变的 FHIT 阳性率(LOH/MI),均明显高于肺炎性病变组相对应的增生病变,具有显著性差异。但是肺癌组的正常支气管上皮和基底细胞增生病变的 FHIT 阳性率,与肺炎性病变组的支气管上皮和基底细胞增生比较差异没有显示出统计学意义,这或许与样本量有一定关系。总体来看肺癌组的支气管上皮增生病变和肺炎性病变组的支气管上皮增生病变确实存在差异。

在肺癌组的各级增生性病变中,从正常支气管上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生到轻度-中度非典型增生病变 LOH/MI 阳性率逐渐增高。重度非典型增生-原位癌和鳞状细胞癌两组间的 FHIT 阳性率接近,分别为 81.8% 和 85.0%。鳞状细胞癌 FHIT 基因阳性检出率与有关文献报道的发生率相近^[5,6]。在肺炎性病变组的各级癌前增生病变的 FHIT 阳性率很少,明显低于肺癌组。表明 FHIT 基因的改变与肺癌发生的早期阶段密切相关。我们在癌旁的 16 例正常支气管上皮检测到 3 例 LOH/MI,癌旁基底细胞增生病变

FHIT 基因阳性率为 33%。而肺炎性病变组正常支气管上皮没有任何位点的丢失现象,基底细胞增生有一例发生 LOH。我们认为形态结构貌似正常的支气管上皮和基底细胞增生却发生了 FHIT 基因的丢失现象,并不能排除癌前病变的可能。因此对形态正常的 FHIT 基因阳性病理随访显得尤为重要。

随后我们应用免疫组织化学方法对两组支气管上皮、基底细胞增生和鳞状上皮化生病变进行了 FHIT 蛋白表达的检测。数据表明肺癌组中基底细胞增生和鳞状上皮化生病变的 FHIT 蛋白表达阴性率明显大于肺炎性病变组中的相应支气管上皮病变。肺癌组 FHIT 蛋白表达总缺失率比肺炎性病变组高 8 倍。在综合分析肺炎性病变和肺癌患者肺组织中的支气管上皮增生性病变的基础上,得出 FHIT 蛋白缺失同 FHIT 基因 LOH/MI 的一致性为 88.3%。通过对 FHIT 蛋白的分组检测比较进一步证实了 FHIT 是参与肺癌发生的早期抑癌基因。肺癌组的增生性病变与肺炎性病变组的增生性病变确实存在差异。传统“肺癌前病变”这一概念已不能完全满足肺癌早期诊断的实际要求。我们的结果提示 FHIT 可作为诊断支气管上皮和各级癌前病变及分析其预后的检测指标,为肺癌前病变的早期基因治疗和设计新药提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Nishizaki M, Sasaki J, Fang B, *et al.* Synergistic tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5745-5752.
- [2] Opalka B, Dickopp A, Kirch HC. Apoptotic genes in cancer therapy[J]. *Cells Tissues Organs*, 2002, 172(2): 126-32.
- [3] Chyczewski L, Niklinski J, Chyczewska E, *et al.* Morphological aspects of carcinogenesis in the lung[J]. *Lung Cancer*, 2001, 34 (Suppl 2): S 17-25.
- [4] Sozzi G, Ugo P, Moiraghi L, *et al.* Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions[J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 5032-5037.
- [5] Venmans BJ, van Boxem TJ, Smit EF, *et al.* Outcome of bronchial carcinoma *in situ*[J]. *Chest*, 2000, 117(6): 1572-1576.
- [6] Pylkkanen L, Wolff H, Stjernvall T, *et al.* Reduced Fhit protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients[J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(2): 285-290.

[收稿日期] 2004-05-10

[修回日期] 2004-08-20