论著

文章编号:1000-5404(2006)13-1388-05

甲醛对人支气管上皮细胞系转化和染色体不稳定性影响的研究

张桂芝[1],熊 玮[2],刘长庭[1],刘东山[3] ([1]解放军总医院南楼呼吸内科,北京 100853;[2]第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400037;[3]首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069)

提 要:目的 为探讨化学致癌的机制,揭示恶性转化与染色体不稳定性之间的关系,本研究考察甲醛对人支气管上皮细胞系转化和染色体稳定性的影响。**方法** 用甲醛作为诱导剂,以液体染毒后测定BEAS-2B细胞的LC_{50},以低剂量(20% LC_{50})对细胞进行诱导,观察细胞生长特性改变并筛选诱导克隆。然后用细胞遗传学方法(G带染色法)考察诱导细胞染色体畸变的情况。**结果** 甲醛作用后细胞生长速度加快,且呈现无限增殖趋势。在后期(15代)具有很强的锚着独立性生长能力,表明诱导细胞已发生慢性转化。诱导细胞核型由2倍体转化为近2倍体、非整倍体和多倍体等核型同时存在,染色体稳定性降低,呈现丢失、内复制、易位、断裂、双/三着丝粒,并伴有大量非稳定性畸变。**结论** 甲醛可使BEAS-2B细胞发生转化,并影响细胞染色体的稳定性,使其发生畸变并向恶性化方向发展。

关键词: 甲醛;人支气管上皮细胞;转化;染色体不稳定性

中图法分类号: R322.34; R363.13; R730.23 **文献标识码:** A

Transformation and chromosomal instability of human tracheal epithelial cells induced by formaldehyde

ZHANG Gui-zhi[1], XIONG Wei[2], LIU Chang-ting[1], LIU Dong-shan[3] ([1]Department of Respiratory Diseases, General Hospital of PLA, Beijing 100853, [2]Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [3]Faculty of Public Health and Family Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

Abstract: Objective To explore the mechanisms of chemical carcinogenesis and the relationship between malignant transformation and genomic/chromosomal instability of human bronchial epithelial cell line by formaldehyde. **Methods** BEAS-2B cell line was toxicated by formaldehyde and the LC_{50} of formaldehyde was tested by MTT assay. BEAS-2B cells were induced by formaldehyde at 20% LC_{50}, and the transformation of BEAS-2B cells was identified and induced clones were selected. By G-banding technique, the metaphase modal chromosome number, karyotypes and nonrandom structural change of induced cell strains were analyzed. **Results** The growth rate of BEAS-2B cells induced by formaldehyde was significantly increased. The induced cells showed a trend of infinite proliferation and the anchorage independent growth was seen in 15^{th} generation cells. As compared with the relatively stable pseudodiploid karyotype of BEAS-2B cells, most of induced cells were triploid and/or tetraploid karyotypes and their chromosome 14 had lost two copies of chromosome replaced by the other two. They also had high frequency of unstable aberration (39%), including chromosome loss, endoduplication, translocation, breakage, two and/or three centromeres *etc.*. **Conclusion** The formaldehyde could lead to progression of malignant transformation and result in genomic instability of human bronchial epithelial cells *in vitro*.

Key words: formaldehyde; human bronchial epithelial cell; transformation; chromosomal instability

基金项目: 国家社会公益研究专项(2001DIA10001-6);北京市教委科技面上基金资助项目(KM2006100025007)

Supported by the National Foundation for Public Welfare Research (2001DIA10001-6) and the General Program of Sci & Tech Research Project Foundation of Beijing Municipal Education Committee (KM2006100025007)

作者简介: 张桂芝(1970-),女,江苏省丰县人,博士,主治医师,主要从事肺部肿瘤诊治方面的研究。电话:(010)66937413

通讯作者: 刘东山,电话:(010)83911505,E-mail:martinliuer@yahoo.com

收稿日期: 2006-01-19;**修回日期:** 2006-04-15

肺癌多起源于内胚层的支气管上皮细胞，在恶性肿瘤发生发展过程中，癌变细胞内众多的分子异常逐渐累积，构成细胞组织病理学改变的基础。其中染色体的异常改变称为染色体不稳定性（chromosome instability，CIN），表现为染色体数目异常，如整条的减少或增加（异倍体），和结构异常如染色体片段的扩增、缺失和易位。CIN 与肿瘤的发生之间的关系是当今肿瘤基础研究的重要课题之一，引起了众多学者的广泛重视。研究证实 CIN 所涉及的染色体部位与癌基因的位点或表达有关[1]，是癌变早期阶段的重要事件[2]，并与肿瘤转移及预后密切相关[3]。本研究初步探讨了单一的化学物甲醛作用于人支气管上皮细胞后其生长特性及染色体稳定性的改变，目的是了解甲醛所致细胞的染色体畸变规律，探索染色体不稳定性与化学致癌之间的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　药品处理及染毒剂量　　诱导剂甲醛为分析纯（含量 37 %），北京化学试剂公司生产。染毒液配置：1.0 ml 甲醛与 100% 乙醇以 1∶1 混合，再以 LHC-8 无血清培养液（LHC-8 SERUM-FREE MEDIUM with GLUTAMINE）稀释 1 000 倍至所需浓度。乙醇的最终浓度不超过 0.1%，经测定该浓度不影响培养细胞的正常生理生化功能。

采用四唑盐 MTT 法确定 BEAS-2B 细胞对测试毒物甲醛的敏感性，并以细胞存活率求出甲醛的 LC_{50} 值，为下步实验剂量的筛选打好基础。

1.1.2　细胞　　永生化人支气管上皮细胞系（BEAS-2B，Adenovirus-12SV40 immortalized human bronchial epithelial cell line）军事医学科学院二所保存细胞株，染色体核型为近二倍体。细胞株含 SV40 DNA，表达 T 抗原，但不含腺病毒 DNA。细胞以 LHC-8 无血清培养液培养，接种于 25 cm^2 或 75 cm^2 的培养瓶内，在 95 % 相对湿度、5 % CO_2、37 ℃培养箱内孵育，每周传代 1 次，传代后 3 d 换液。

1.1.3　溶液　　秋水仙碱（Sigma 公司）；低渗液：0.075 mol KCl；固定液：甲醇∶冰醋酸 = 3∶1；ICN 液：NaCl（8.0 g），KCl（0.2 g），$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（3.0 g），KH_2PO_4（0.2 g）加水至 1 000 ml；GKN 液：葡萄糖（1.0 g），KCl（0.4 g），NaCl（8.0 g），$NaHCO_3$ 加水至 1 000 ml；0.25 % 胰蛋白酶：ICN 液配置。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞染毒剂量的筛选（MTT 法）　　按司徒镇强等[4]方法进行，结果以细胞存活率对剂量作图，求出 LC_{50} 值。

1.2.2　细胞转化和克隆筛选　　甲醛对细胞进行低剂量（20% ~40% LC_{50}）染毒 24 h 后 D-hanks 液洗涤 3 次，加入 4 ml LHC-8 继续培养至存活细胞形成克隆，用胰酶消化收集细胞并转入新的培养瓶，此为染毒转化第 1 代细胞。然后每 2 天换液 1 次，稳定后改为 1 次/3 d，每 6 天传代 1 次，每次接种 1×10^5 个细胞连续传代培养。严密观察细胞生长变化，并验证相关的生物学特性后确定为诱导细胞（induced cell），以未染毒的 BEAS-2B 细胞作为对照细胞。

1.2.3　血清抗性实验和扩增时间测量　　常规消化第 5 代诱导细胞和对照细胞，用 LHC-8 稀释成单细胞悬液，按 300 个/皿接种于含 5 ml、37 ℃培养液的 60 mm 培养皿中，以十字方向轻轻晃动使细胞分散均匀。每组细胞接种 10 皿，其中 5 皿加入 10% 胎牛血清并严格计时。6 d 后终止培养、D-hanks 洗涤 2 遍，甲醇固定 Giemsa 染色，冲洗晾干后解剖显微镜下计数克隆数，按下式计算接种效率（planting efficiency）：

接种效率（PE）=（克隆数/接种细胞数）×100%

同时，未加血清的各组细胞随机计数 10 ~20 个克隆的细胞数，按下式计算细胞扩增时间（multiplication time，MT）：

扩增时间 MT（h）= 接种时间 t（h）/log2（克隆细胞平均数）

1.2.4　细胞生长曲线测定　　常规消化第 10 代诱导细胞及其对照，按司徒镇强等[4]方法绘制生长曲线。

1.2.5　锚着独立性生长实验　　用 LHC 基础培养基（LHC basal medium）配制 1.4% 的备用琼脂糖，高温高压灭菌后放入 39 ℃水浴中保温，用预温的 LHC-8 稀释为 0.7% 琼脂糖。以 3 ml/皿倒入 60 mm 带格培养皿（Corning）中，铺制底层、凝固后备用。常规消化收集第 15 代诱导细胞及对照细胞，与 0.7% 琼脂糖 1∶1 混匀稀释为 0.35% 细胞琼脂混合液，加到培养皿中 0.7% 琼脂糖凝胶上（细胞浓度为 1×10^4/皿），凝固后每皿加入 2 ml LHC-8 培养液，每组 5 皿，静置培养。每 3 天换液 1 次，4 周后镜下计数直径大于 75 μm 或细胞多于 50 个的克隆数，按下公式计算集落形成率：

克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 ×100%

同时，挑取阳性细胞克隆继续培养后进行染色体分析。

1.2.6　细胞染色体核型分析　　培养细胞 50 % ~60 % 融合时，加入秋水仙碱（终浓度 0.03 μg/ml），继续培养 3 h，Gibco trypsin-EDTA 消化液消化部分细胞脱壁，加 1/20 体积的 Gibco 胎牛血清终止消化后收获细胞，常规方法制备染色体片[5]。低倍镜下（10 ×10）选择染色体分散良好，长短适宜，着色均匀的中期分裂象。油镜下每株细胞观察 50 ~100 个中期分裂细胞，计数染色体数目。染色体结构分析：观察 25 个中期分裂细胞，选取至少 10 个具有畸变共性的细胞，进行显微摄影，照片冲洗放大后，参照人标准核型进行核型分析。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 11.5 分析软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间比较用方差分析；甲醛 LC_{50} 分别以作图法进行计算，同时采用概率单位法（PROBIT，Probability unit）进行验证；其他数据依据其性质分别采用计数资料的 χ^2 检验或非参数检验的秩和检验进行分析。

2　结果

2.1　甲醛细胞染毒剂量的筛选 MTT 法结果

图 1 是甲醛 MTT 细胞存活曲线，可得甲醛的半数致死量 LC_{50} 为 13.0 mg/L，概率单位法计算所得 LC_{50} 为 12.33 mg/L，经拟和优度的 χ^2 检验（Pearson Goodness-of fit Chi Square）得 χ^2 = 53.662，$P < 0.01$，接受“对称 S 型曲线”的假设，认为可信区间

计算中没有使用非齐同因素(no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits),95%的可信区间为7.53~19.99 mg/L。因此本研究以20% LC_{50}(2.62 mg/L)作为细胞的诱导剂量,即12.5 μl/ml培养液体系对BEAS-2B细胞进行诱导,待长期培养后筛选阳性克隆用于染色体分析。

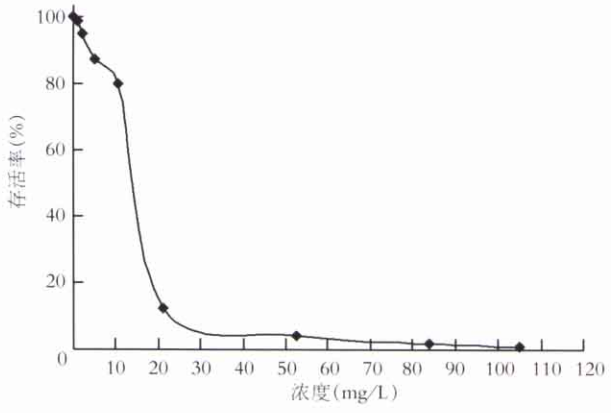


图1 甲醛MTT细胞存活曲线

2.2 诱导细胞的形态变化

正常BEAS-2B细胞大小均匀,多为梭形,偶见多角形,细胞质较少,相邻细胞间连接较为紧密;细胞核呈椭圆或长椭圆形,常为1个核仁;细胞单层生长,细胞克隆呈现有序或放射状排列,有明显的接触抑制和密度抑制。而诱导细胞呈圆形或类圆形,常伴有多角形不规则形,细胞体积变大、细胞质丰富;细胞核嗜碱深染,体积大,有1至数个核仁;细胞复层生长,排列紊乱,呈现无序的条索状或团块状生长,无明显的接触抑制和密度抑制(图2)。

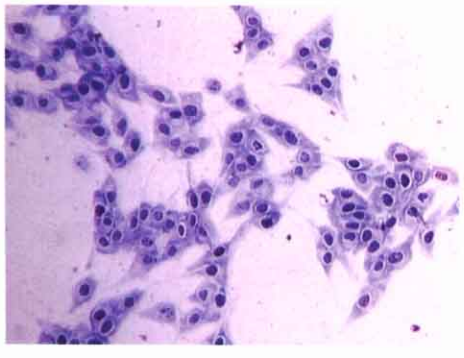


图2 甲醛诱导细胞的形态变化 (HE×100)

2.3 血清抗性实验和扩增时间测定结果

血清抗性实验和扩增时间测定结果见表1。结果显示:在无血清条件下,甲醛作用后诱导细胞接种效率低于正常细胞($P<0.01$),而扩增时间明显缩短[(25.57±1.26) h]($P<0.01$)。在有血清时,正常BEAS-2B细胞生长明显受到抑制,接种效率显著降低($P<0.01$),而诱导细胞接种效率明显提高($P<0.01$)。

2.4 细胞生长曲线测定

甲醛作用后的诱导细胞生长特性见表2、图3。初期对照细胞和诱导细胞的生长速度相差不大,诱导细胞自第4天开始生长速度加快,12 d时对照细胞已明显饱和,而诱导细胞继续增殖,此时其饱和密度,最大增殖倍数高于对照细胞($P<0.01$);诱导细胞的细胞数是最初接种的102.45倍,其倍增时间1.80 d(43 h)明显短于对照细胞2.08 d(50 h),差异有显著性($P<0.01$)。

表1 甲醛诱导细胞的血清抗性实验和扩增时间测定结果

细胞	血清	浓度(mg/L)	接种效率(%,$x\pm s$)	扩增时间(h)
BEAS-2B	-	0	21.90±2.76[a]	35.78±3.15
BEAS-2B	+	0	8.13±1.52	
诱导细胞	-	2.62	12.38±1.68[b]	25.57±1.26[b]
诱导细胞	+	2.62	27.45±2.44[a]	

a:$P<0.01$,与无血清组比较;b:$P<0.01$,与BEAS-2B比较

表2 BEAS-2B、诱导生长曲线的特性($x\pm s$)

细胞	扩增时间(d)	饱和度(1×10^4/ml)	最大增殖倍数(倍)
BEAS-2B	2.082±0.032	321.17±13.13	54.62±5.45
诱导细胞	1.797±0.027[a]	512.25±34.44[a]	102.45±6.89[a]

a:$P<0.01$,与BEAS-2B比较

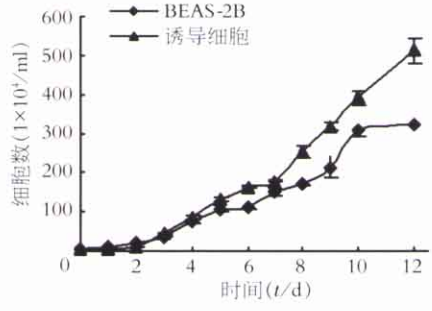


图3 BEAS-2B和诱导细胞的生长曲线

2.5 锚着独立生长实验

甲醛诱导细胞的半固体克隆形成率实验结果见表3,图4。

表3 甲醛诱导细胞的半固体克隆形成率实验结果

组别	细胞数(个/皿)	克隆数	克隆形成率(%)
BEAS-2B	1×10^4	13.2±5.4	0.13±0.05
诱导细胞	1×10^4	1171.6±149.5[a]	11.71±1.49[a]

a:$P<0.001$,与BEAS-2B比较

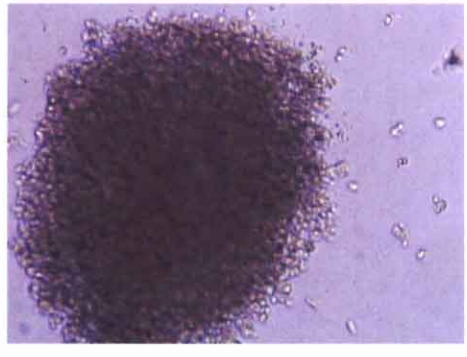


图4 甲醛诱导细胞形成的半固体克隆 (×200)

通常正常 BEAS-2B 细胞不能在半固体琼脂中生长，而诱导细胞失去接触抑制，具有锚着独立生长能力，能够在半固体琼脂中形成集落。因此细胞获得锚着独立性，能在软琼脂介质中形成克隆是细胞发生恶性转化的重要标志。

2.6　甲醛诱导细胞染色体的变化

2.6.1　染色体数目的变化　　表 4 是对照 BEAS-2B 细胞和诱导细胞染色体数目分布结果。

表 4　BEAS-2B 细胞和诱导细胞染色体数目分布

细胞	细胞数	具有不同染色体数的细胞			
		<2n	2n	2n～4n	≥4n
BEAS-2B	100	10	78	10	2
诱导细胞[a]	100	14	50	14	22

a：$P<0.005$，与 BEAS-2B 比较

由表 4 可见正常 BEAS-2B 细胞的染色体数目以二倍体核型（2n=46）为主，亚二倍体、多倍体很少，且传代过程中保持稳定；而诱导细胞二倍体核型（2n=46）比例下降，出现了大量亚二倍体（<2n）、超二倍体（>2n & <4n）和多倍体（≥4n）细胞，多倍体核型约占 22/100。采用多个构成比比较的 χ^2 检验显示，两组构成具有显著性差异（$P<0.005$）。

2.6.2　染色体结构的改变　　表 5 是对照 BEAS-2B 细胞和诱导细胞染色体核型特点。

表 5　对照 BEAS-2B 细胞和诱导细胞染色体核型特点

细胞	代表核型	染色体异常
BEAS-2B	46，xy，M_1、M_2、M_3	5p+，15p+，16p+
诱导细胞	46，xy，-14，-14，M_1、M_2、M_3、$2M_4$	5p+，15p+，16p+，14p+

BEAS-2B 细胞代表核型为二倍体（2n=46），但其 5、15、16 号染色体各丢失 1 条染色体，呈单体型状态，而相同位置各有 1 条未知染色体分别与各染色单体配对，且这 3 条染色体在传代过程中稳定表达，因此将其作为 BEAS-2B 细胞的标记染色体（marker chromosome），分别表示为：M_1、M_2、M_3，可见 BEAS-2B 细胞是单体型混合配对的假二倍体细胞。

诱导细胞除 5、16 号 M_1、M_3 标记染色体外，可见 2 条 14 号染色体丢失，出现 1 条或 2 条不明染色体，以 M_4 表示。其超二倍体（2n=48）细胞可见 5 号或 16 号染色体呈 3 体混合，并增加 1 条不明染色体，诱导细胞多倍体核型可见非整倍体细胞和大量无着丝粒的染色体片断。

2.6.3　多倍体核型非稳定性畸变　　对照细胞与诱导细胞非稳定性畸变结果见表 6。

表 6　对照 BEAS-2B 细胞和诱导细胞染色体非稳定性畸变

细胞	具有非稳定性畸变的细胞					
	dic	tri	ace	r	t	+
BEAS-2B	-	-	-	-	2	2
诱导细胞[α]	6	2	10	1	20	-

dic：双着丝粒；tri：三着丝粒；ace：无着丝粒；r：环状染色体；t：染色体易位；+：染色体增长；a：$P<0.01$，与 BEAS-2B 比较；总细胞数为 100

由表 6 可见对照细胞有 2% 的染色体易位和 2% 的染色体增长，总的非稳定性畸变为 4%；而诱导细胞出现 6% 的双着丝粒染色体，2% 的三着丝粒染色体，10% 的无着丝粒片段，1% 的环状染色体，20% 的染色体易位，总的非稳定性畸变为 39%，高于对照 BEAS-2B 细胞，采用等级资料秩和检验显示二者之间具有统计学意义（$P<0.01$）。

3　讨论

正常细胞如何演变为肿瘤（癌）细胞是肿瘤研究中的一个根本性问题。作为一种个体体细胞容易自发或诱发断裂的遗传缺陷，染色体不稳定性可能引起细胞对环境中潜在致癌物敏感性增高，并最终导致肿瘤的发生。本研究以甲醛作为诱导剂，考察人支气管上皮细胞系（BEAS-2B）转化过程中细胞生长特性和染色体不稳定性变化情况，探讨细胞在恶性转化过程中细胞生长状态和染色体畸变之间的关系。

本研究表明，BEAS-2B 细胞在甲醛作用后细胞逐渐变大、变圆，细胞质丰富，并伴有多角形或不规则形；细胞核嗜碱深染，体积变大，核仁增多；细胞呈复层生长，排列紊乱，细胞克隆呈现无序的条索状或团块状排列；诱导细胞生长速度加快，倍增时间明显缩短，细胞生长呈现无限增殖趋势，无明显的接触抑制和密度抑制。

同时细胞转化过程中也获得明显的血清抗性，这说明甲醛作用后，诱导细胞抗血清促分化的能力显著升高，细胞自主生存能力增强，对环境的选择性和依赖性降低。而对照 BEAS-2B 细胞为无血清培养的细胞株，对血清的分化诱导无明显抗性，有血清存在时细胞总体生长状况就会明显受到抑制。而且，诱导细胞转化后期（15 代）已具有很强的锚着独立性生长能力，可在软琼脂培养基内形成典型的甚至肉眼可见的阳性细胞克隆，软琼脂克隆形成率为 11.72%，明显高于对照细胞 0.13%（$P<0.01$），说明诱导细胞的遗传性状已经发生改变，具备了慢性转化特性，完成了癌前转化并极有可能转化为肿瘤细胞。

染色体分析显示，诱导细胞中二倍体（2n=46）比例降低（50 % 左右），而近二倍体（亚二倍体 + 超二倍体）却占 30 % ～40 % 左右，多倍体比例也升高至 22%，并可见大量非稳定性畸变（dic、tri、ace）。同时甲醛可特异性引起转化细胞 2 条 14 号染色体缺失和 2 条不明染色体（M_4）出现，5 号或 16 号出现三体型。上述变化是甲醛诱导细胞恶性转化过程中重要的染色体变异，这与细胞转化启动，增殖分化失控和多倍体克隆的急剧扩增有直接关系。

同时，经甲醛诱导转化的多倍体细胞中可见大量非稳定性畸变（dic、tri）和无着丝粒片段。通常非稳定性畸变作为非平衡的互换畸变，其直接后果是引起细胞死亡，而诱导细胞所呈现的高频率非稳定性畸变，说明携带有非稳定性畸变的细胞在传代选择过程中非但没有失去分裂增殖能力，反而获得了明显的生长优势，并逐步形成恶性细胞。这一切都表明在细胞的转化过

程中，其染色体的不稳定性逐渐增高。

研究表明，发生于体外细胞的癌变过程中的细胞遗传学改变与体内细胞癌变历程中发生的染色体异常非常接近。因此，使用哺乳动物细胞体外培养系统研究染色体不稳定性与恶性转化的关系，分析诱导细胞的染色体核型将有助于了解机体细胞癌变过程中所发生的细胞遗传学改变。据报道，肿瘤细胞染色体数目变化复杂，最常见的染色体数目异常是非整倍体和多倍体。而肺癌患者癌细胞染色体数目变异主要为超二倍体和亚四倍体，染色体数目以48，75，单体(45)，三体(47)，38-200等最为典型[6]。因此，超二倍体、多倍体比例增加是细胞恶性转化的标志之一。这种染色体众数(model number)由二倍体向近二倍体、非整倍体、多倍体转化的趋势，代表着细胞增殖失控、核分裂加速，染色体复制过程错误率升高，核浆分裂失衡等增生细胞的特性。

上述结果表明诱导细胞染色体畸变率显著增加，提示细胞对各种DNA损伤修复能力逐渐降低或产生了不可逆缺陷。这一结果显示，在致癌物质长期存在时，支气管上皮细胞系染色体不稳定逐渐增加，更容易发生各类畸变并向恶性化方向转化，最终导致肿瘤发生。有研究表明[7]细胞染色体畸变率与肺癌临床分期密切相关，染色体畸变分析可望作为临床肺癌诊断及分期判断的一项有意义的辅助检查手段。

参考文献：

[1] 蒋幼凡，薛亚梅. rasP21和PCNA在非小细胞肺癌中的表达[J]. 重庆医学，2001，30(5)：438.

[2] TEIXEIRA-DA-COSTA L，LENGAUER C. Exploring and exploiting instability[J]. Cancer Biol Ther，2002，1(3)：212－225.

[3] MASUDA A，TAKAHASHI T. Chromosome instability in human lung cancers：possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis[J]. Oncogene，2002，21(45)：6884－6897.

[4] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]//西安：世界图书出版社西安分公司，1996：138，186－187，127.

[5] 刘权章. 人类染色体方法学[M]//北京：人民卫生出版社，1992：272.

[6] 张世良，王立东. 肿瘤分子细胞遗传学[M]//郑州：郑州大学出版社，2002：184.

[7] 熊 玮，黄桂君，钱桂生，等. 肺癌染色体畸变分析[J]. 重庆医学，2002，31(9)：776－777.

(编辑 陈聪连)

(上接1387页)

表1 FHIT与下咽癌临床病理特征的关系

临床特征	例数	FHIT +	FHIT −	χ^2	P
分化程度					
中-高分化	20	11	9	5.156	0.022
低分化	19	7	12		
淋巴结转移					
有	27	11	16	4.728	0.037
无	12	7	5		
临床病理分期					
Ⅰ+Ⅱ期	14	8	6	5.640	0.019
Ⅲ+Ⅳ期	25	10	15		

3 讨论

研究表明，在许多肿瘤组织中，FHIT基因呈现多发性、广泛性的纯合性或杂合性缺失，提示此基因的异常可能和肿瘤的发生有关，即为多种肿瘤的候选抑制基因。本研究显示，下咽癌组中FHIT阳性表达率显著低于正常咽上皮组，差异有显著性。Pavelic等[4]研究发现，在大部分头颈部鳞癌中，FHIT基因的表达均发生异常，并伴有$p21^{waf1}$表达的下调或缺失。FHIT蛋白表达下调或缺失可能是下咽癌发生的早期事件，FHIT蛋白在下咽癌组织中表达的降低，使得抑制正常咽上皮细胞恶性转化的能力降低，细胞发生癌变，增殖能力增强，导致肿瘤的发生。采用咽上皮活检结合免疫组化技术检测FHIT蛋白表达可作为监测下咽癌发生的辅助手段之一。

本实验证实，FHIT蛋白表达与下咽癌组织分化程度密切相关，组织分化程度高，恶性程度低，其蛋白高表达，提示FHIT在诱导肿瘤分化过程中起重要作用。本研究表明FHIT蛋白表达与下咽癌的临床分期及淋巴结转移相关，随临床分期增加，淋巴结的转移，FHIT蛋白阳性表达率逐渐降低，提示FHIT在肿瘤的发展浸润转移过程中起重要作用。Roz等[5]发现，外源性FHIT基因表达对肿瘤细胞株的恶性表型具有一定的逆转作用。随着对FHIT基因的进一步研究，必将为肿瘤的基因治疗提供一个广阔的前景。

总之，我们的研究发现，FHIT表达与下咽癌的发生、发展有关，其为下咽癌的早期诊断、判断预后提供新的参考。

关键词：下咽肿瘤；免疫组织化学；脆性组氨酸三联体基因

中图法分类号：R739.63 文献标识码：B

参考文献：

[1] OHTA M，INOUE，COTTICELLI M G，*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[J]. Cell，1996，84(4)：587－597.

[2] XIAO Y P，HAN C B，MAO X Y，*et al*. Relationship between abnormality of FHIT gene and EBV infection in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol，2005，11(21)：3212－3216.

[3] HAO X P，WILLIS J E，PRETLOW T G，*et al*. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions[J]. Cancer Res，2000，60(1)：18－21.

[4] PAVELIC K，KRIZANAC S，CACEV T，*et al*. Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis-clinical evidence in lung and head and neck carcinomas[J]. Mol Med，2001，7(7)：442－453.

[5] ROZ L，GRAMEGNA M，ISHII H，*et al*. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(6)：3615－3620.

(编辑 陈聪连)