维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 813 - 07

人支气管上皮细胞恶性转化过程中染色体畸变的研究

孔令文, 吴庆琛, 朱进国

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究在烟草特异性亚硝胺(NNK)诱发人支气管上皮细胞(BEAS - 2B)恶性转化过程中染色体畸变,探讨其在吸烟高危人群罹患肺癌预警及普查方面的意义。方法 用 NNK 诱发 BEAS - 2B 细胞(BEAS - $2B_{NNK}$)恶性转化,并在此过程中用常规中期染色体分析方法,动态观察染色体畸变的情况。结果:1. NNK 诱发 BEAS - 2B 细胞恶性转化模型的建立 ①BEAS - $2B_{NNK}$(实验组)第 5 代细胞血清抗性显著增强。②第 15 代 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞具有锚着独立性生长特性。③第 20 代 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞超微结构出现明显异型性。④第 25 代 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞在裸鼠体内成瘤,病理为高分化鳞形细胞癌。2. 染色体畸变 ① BEAS - 2B(对照组)二倍体细胞占细胞总数的 91% ~97%,传代后核型稳定;从第 5 代开始 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞即逐渐失去正常核型,随着传代次数增加,二倍体细胞比例从 83% 递减至 54%,异倍体及多倍体细胞呈递增趋势,较对照组明显增高。② 各代 BEAS - 2B 细胞结构畸变发生率为 2% ~4%;除第 5 代 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞结构畸变总频率(11%)明显高于 BEAS - 2B 细胞外,其余各代细胞与 BEAS - 2B 细胞相近。结论:NNK 能成功诱发人支气管上皮细胞(BEAS - 2B)细胞恶性转化,为进一步探讨肺癌发生机制、尤其是吸烟致肺癌发生机制提供了理想模型。染色体的异倍性和多倍性在 NNK 诱发 BEAS - 2B 细胞转化成肺癌过程中可能属早期事件,有望成为吸烟高危人群罹患肺癌的预警及普查指标之一。

【关键词】NNK;永生化人支气管上皮细胞(BEAS - 2B);染色体;畸变

【中图分类号】R734 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 3 - 23

Chromosome Aberration During Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by NNK

KONG Lingwen, et al

(*Department of Cardiac - Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective To investigate chromosome aberration during malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS - 2B) induced by tobacco specific nitrosamine (NNK), and explore those significance of early - warning and mass screening of lung cancer in high - risk smoking population. Methods Immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS - 2B) were induced to malignant transformation cells (BEAS - $2B_{NNK}$) by NNK, and chromosome aberration were detected in the different passage of BEAS - $2B_{NNK}$ and BEAS - 2B cells by analysis of metaphase chromosome. Results 1. Model of malignant transformation of BEAS - 2B cells induced by NNK was created ①The serum resistance was significantly increased in the 5th passage BEAS - $2B_{NNK}$ cells. ② The anchorage independent growth was appeared in the 15th passage. ③ The ultrastructure of the 20th passage BEAS - $2B_{NNK}$ cells shown obvious heteromorphy characterization. ④The 25th passage BEAS - $2B_{NNK}$ cells formed tumors in nude mice, and tumors were overdifferentiation squamous cell carcinoma confirmed by histopathological examination. 2. Chromosome aberration ① BEAS - 2B cells hold relatively stable diploid karyotype which ratio was 91% ~97% up to the 25th passage. Different passage BEAS - $2B_{NNK}$ cells gradually lost the normal diploid karyotype and the ratio of diploid cells decreased from 83% to 54%, the proportion of polyploid and aneuploid cells increased in process of passing generation. ②The ratio of structure aberration neared to 2% ~4% in BEAS - $2B_{NNK}$ and BEAS - 2B cells but the 25th passage of BEAS - $2B_{NNK}$ cells was 11%. Conclusion The model of malignant transformation of BEAS - 2B cells induced by NNK could be created successfully and provided for investigating the molecular biological mechanism of lung cancer, especially smoking - related cases. The polyploid and aneuploid chromosomes could be the early event in the process of malignant

作者介绍:孔令文(1973 -),男,住院医师,
主要研究方向:肺癌病因学研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

transformation of BEAS - 2B cells induced by NNK. In a word, the chromosome aberration might be useful markers for the early warning and mass screening of lung cancer, especially in high - risk smoking population.

【Key words】 NNK; Immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS - 2B); Chromosome; Aberration

遗传物质的不稳定性是人类恶性肿瘤特征之一,它既可表现在核苷酸水平上微卫星序列的不稳定,也可表现在染色体水平上数目和结构的异常[1],即染色体畸变。Smith 等[2]报道在呼吸道上皮的癌前病变中染色体的异倍性程度和发生频率随着细胞学形态改变的进展而增加。大量的研究显示肺癌发生过程中最常见的染色体结构异常主要表现为 3p、8p、9p、17p 等的缺失[3~5]。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,动态观察染色体畸变,探讨染色体畸变在肺癌发生、发展过程中的意义。

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(对照组)由美国国立癌症研究所 Harris 教授及同事建立,美国专利号:U. S. Pat. 4885238。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,细胞代龄为 25 代。BEAS - $2B_{NNK}$ 为实验组细胞。BALB/C - nu/nu 裸鼠 10 只(雄性,5 周龄,18 ~ 22g/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;秋水仙素购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转化处理[6] BEAS - 2B 细胞用 LHC - 8 基础无血清培养液于 37℃、5% CO_2、95% 湿度条件下培养,细胞大致按 $1.0 \times 10^4/cm^2$ 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 500μg/ml NNK 的完全培养液中连续培养 24h 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 血清抗性试验 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 6cm 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 30min,Giemsa 染色后显微镜下计数克隆(大于 16 个细胞为 1 个克隆)。按下式计算接种效率:接种效率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%。

1.2.3 锚着独立性生长实验 用 LHC - 8 培养液配制 0.7% 琼脂糖,高压灭菌后到入培养皿中,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 1×10^4/皿),待上层琼脂糖凝固后,每皿加入 2ml LHC - 8 培养液。于 37℃、5% CO_2、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) × 1000‰。

1.2.4 电镜 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 ~ 15min, 2000r/min,弃上清,缓慢加入 4℃ 4% 戊二醛固定 2h。4℃ PBS 洗涤离心 1 次,转入 4℃ 四氧化锇固定 2h;依次于 50%、70%、90%、100% 丙酮中脱水,各 15min;环氧树脂 618# 包埋;半薄切片,1% 次甲基蓝 - 天青Ⅱ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 30min,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 裸鼠成瘤试验 收获第 25 代 BEAS - 2B 和 BEAS - $2B_{NNK}$ 细胞,无血清培养液离心洗涤 2 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 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 0.2ml,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 细胞染色体标本的制备

收获细胞前加秋水仙素至终浓度为 0.1μg/ml,摇匀,37℃、5% CO_2 培养箱培养 3 ~ 4h;0.05% 胰蛋白酶(含 0.01% EDTA)消化,1000rpm 离心 8 ~ 10min,弃上清,收获细胞;加入预热 0.75mol/L KCl 6 ~ 8ml 吹打匀,37℃ 低渗处理 15 ~ 18min;加固定液 2ml,混匀,1000r/min 离心 8 ~ 10min,弃上清;加入固定液 6 ~ 8ml,混匀,过夜,1000 r/min 离心 8 ~ 10min,弃上清,重复固定 1 次;加数滴固定液,吹打混匀成细胞悬液,滴 1 ~ 2 滴于冰载波片上,吹散,酒精灯烤干;Giemsa 染色 5 ~ 10min,自来水冲洗,凉干。

1.2.7 镜检分析方法 在低倍镜下(10 × 10 倍)选择染色体分散良好,长短适宜,着色均匀的中期分裂相。油镜下(10 × 100 倍),每代细胞观察 100 个中期分裂细胞,计数染色体及结构畸变数目。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件进行 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差别有显著性意义;$P < 0.01$ 为差别具有极显著性意义。

2 结 果

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 BEAS-2B(对照组)细胞形态

BEAS-2B 细胞贴壁生长,呈梭形。见图 1。

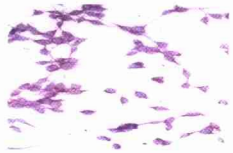


图 1 BEAS-2B 细胞形态(HE 染色 ×40)

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。见表 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

Groups	Cells	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

1 与 2 组比较,$P<0.01$;2 与 4 比较,$P<0.01$

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,说明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‰左右,说明具有锚着独立性生长能力。见表 2,图 2。

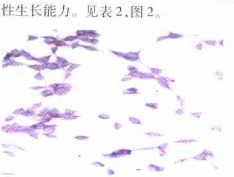


图 2 第 15 代 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞的软琼脂克隆(×40)

表 2 第 15 代 BEAS-2B 和 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞在半固体琼脂中克隆形成率

Groups	Number	Colony forming efficiency(‰)
BEAS-2B	4	0.025±0.050
BEAS-$2B_{NNK}$	4	0.650±0.190

$P<0.01$

2.4 第 20 代 BEAS-2B 和 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞的超微结构

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;胞浆内细胞器较多;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,具有了恶性特征。见图 3~6。



图 3 第 20 代 BEAS-2B 细胞超微结构(×3500)

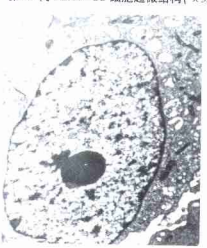


图 4 第 20 代 BEAS-2B 细胞超微结构(×8000)

2.5 裸鼠成瘤性

维普资讯 http://www.cqvip.com

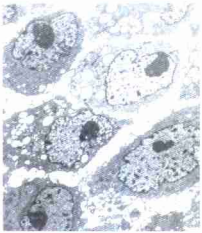


图 5 第 20 代 BEAS－2B$_{NNK}$ 细胞超微结构(×3500)

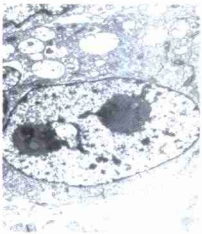


图 6 第 20 代 BEAS－2B$_{NNK}$ 细胞超微结构(×8000)

第 25 代 BEAS－2B 和 BEAS－2B$_{NNK}$ 细胞接种裸鼠后，BEAS－2B 组未见有肿瘤形成(0/4)。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 0.7cm×0.7cm，最小为 0.2cm×0.2cm(图 7)。病理切片均为高分化鳞形细胞癌(Ⅰ～Ⅱ级)，其包膜不清，瘤组织边缘有许多腺腔，具有浸润性(图 8)。

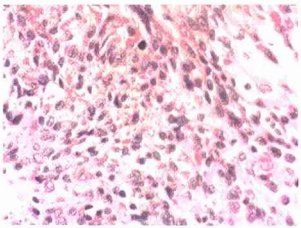


图 7 裸鼠肿瘤组织学图片(HE 染色×40)

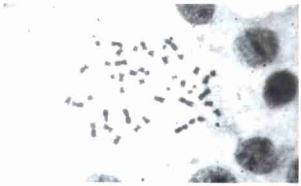


图 8 BEAS－2B 细胞(2n=46)(×100)

2.6 染色体数目变化

BEAS－2B 二倍体细胞占细胞总数 91%～97%，传代后核型及染色体数目稳定。不同代数的 BEAS－2B$_{NNK}$细胞逐渐失去正常核型，随着传代次数增加，二倍体细胞从 83% 递减至 54%，异倍体及多倍体细胞呈递增趋势，较 BEAS－2B 组明显增高。第 25 代 BEAS－2B$_{NNK}$细胞可见内复制现象，占细胞总数的 3%。见表 3。

表 3 各代 BEAS－2B、BEAS－2B$_{NNK}$ 细胞染色体数目分布

P	BEAS－2B						BEAS－2B$_{NNK}$					
	<2n	2n	>2n <4n	4n	6n	内复制	<2n	2n	>2n <4n	4n	6n	内复制
5	7	91	1	1	0	0	5	83	5	7	0	0
10	2	95	0	3	0	0	6	73	8	12	1	0
15	4	94	2	0	0	0	10	71	5	11	3	0
20	0	97	2	1	0	0	12	64	8	13	3	0
25	3	94	1	2	0	0	16	54	10	16	4	3

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.7 染色体结构畸变

BEAS－2B 细胞各代结构畸变发生率为 2% ～4%，除 BEAS－$2B_{NNK}$ 第 5 代细胞结构畸变总频率(11%)明显高于 BEAS－2B 细胞外，其余各代细胞与 BEAS－2B 细胞相近。见表 4 及图 9～16。



图 9 BEAS－$2B_{NNK}$ 超二倍体细胞(×100)

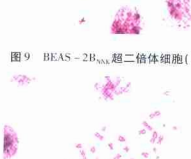


图 10 BEAS－$2B_{NNK}$ 亚二倍体细胞(×100)



图 11 BEAS－$2B_{NNK}$ 细胞染色体易位畸变(×100)

表 4 各代 BEAS－2B、BEAS－$2B_{NNK}$ 细胞染色体结构畸变

P	BEAS－2B					BEAS－$2B_{NNK}$				
	dic	tri	ace	r	t	dic	tri	ace	r	t
5	1	0	1	0	2	3	0	4	0	4
10	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
15	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1
20	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
25	1	0	0	0	2	1	0	2	0	1

注：dic：双着丝粒；tri：三着丝粒；ace：无着丝粒断片；r：环状染色体；t：染色体相互易位。

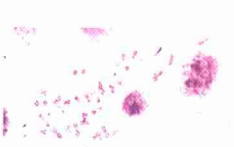


图 12 BEAS－$2B_{NNK}$ 细胞染色体断裂(×100)



图 13 BEAS－$2B_{NNK}$ 细胞双着丝粒(dic)染色体(×100)

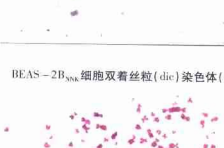


图 14 BEAS－$2B_{NNK}$ 多倍体细胞及无着丝粒断片(×100)



图 15 第 25 代 BEAS－$2B_{NNK}$ 细胞染色体内复制(×100)

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

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[7,8]。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 致肺癌机理的重要靶细胞。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化。细胞株含 SV40 DNA，表达 T 抗原，但不含腺病毒 DNA。建株时裸鼠体内成瘤实验未见致瘤性[9,10]。

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 BEAS-$2B_{NNK}$ 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，说明该细胞已经具有细胞恶性转化早期生物学行为；随着传代次数的增加，第 15 代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[11] 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。

BEAS-2B 细胞具有较为稳定的细胞遗传特性，在传代过程中保持了稳定的染色体众数。二倍体细胞保持在 91% ~97%，亚二倍体和超二倍体细胞比例低于 8%，四倍体细胞比例稳定于 1% ~3% 之间。与袁素波等[12] 的研究结果基本一致。肿瘤细胞的染色体数目变化非常复杂，最常见的染色体数目异常是非整倍性和多倍体。楼铁柱等[13] 在运用 α 离子诱发人支气管上皮细胞(BEP2D)恶性转化过程中发现，随着传代次数增加，转化细胞具有向非整倍体和多倍体发展的趋势。本研究中第 5 代 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞染色体数目为近二倍体，同时存在一定比例的亚二倍体、超二倍体及多倍体，并且随着传代次数增加其所占比例也逐渐增高，转化细胞非整倍体从 10% 升至 26%，多倍体高达 20%，而二倍体所占比例则从 84% 降至 54%。NNK 作用后 BEAS-2B 细胞染色体数目在长时间内仍然不断变化，表明在细胞转化过程中存在染色体和基因组的不稳定，原因可能是由于 NNK 导致了非致死性的不稳定染色体区域的形成，这些区域发生变化有一定的潜伏期时间，并可以通过传代传递给后代细胞，从而在后代细胞中表现出染色体的不稳定性，其机理可能是致癌物质的致癌作用使机体细胞产生癌前异倍体，异倍体的不平衡分裂导致了核型的不断变化[14]。BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞非整倍体和多倍体比例在细胞恶性转化早期较 BEAS-2B 细胞稍有增高，并随着细胞恶性转化而呈进行性发展，提示染色体异倍性和多倍性在 NNK 诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化过程中可能属早期事件。研究还发现第 25 代 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞可见占细胞总数 3% 的内复制现象。内复制是细胞两次分裂之间染色体两次或多次复制所致，被认为可能是大多数肿瘤细胞核异常增大和染色体多倍化的原因。

染色体结构畸变包括稳定性畸变和非稳定性畸变。稳定性畸变包括染色体的易位、缺失、重复等能传给子细胞的结构异常；非稳定性畸变指细胞分裂后不能传给子细胞的畸变，包括：双着丝粒、三着丝粒、无着丝粒断片、环状染色体等。有学者在环磷酰胺、噻替哌诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化过程中发现其存在偶见的非稳定性畸变，各代非稳定性畸变发生率为 3% ~5%，其原因是 SV40 病毒永生化的细胞存在随机性的染色体单体断裂及双着丝粒和染色体数目的增加。认为 BEAS-2B 细胞的非稳定性畸变与 SV40 病毒 DNA 与细胞基因组的整合，SV40 T 抗原的表达以及细胞永生化的维持有关[12]。研究显示 BEAS-2B 细胞各代结构畸变发生率为 2% ~4%，略低于相关报道。除第 5 代 BEAS-$2B_{NNK}$ 细胞结构畸变总频率(11%)明显高于 BEAS-2B 细胞外，其余各代细胞的结构畸变与 BEAS-2B 细胞相近，考虑这些染色体结构畸变是 BEAS-2B 细胞在 SV40 病毒永生化过程中所携带的本底标志。极早期细胞结构畸变明显增高，可能是 NNK 等致癌物引起部分染色体断裂，导致染色体缺失、重排，易位等畸变。非稳定性畸变作为非平衡的互换畸变，对细胞具有较强的致死效应，因此其发生频率随细胞的传代次数的增加而逐渐减少。

综上所述，染色体的异倍性和多倍性在 NNK 诱发 BEAS-2B 细胞恶性转化过程中可能属早期事件，有望成为吸烟高危人群罹患肺癌及普查的预警

维普资讯 http://www.cqvip.com

指标之一。

参 考 文 献

[1] Lengauer C, Kingler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers [J]. Nature, 1997; 386(6625): 623.

[2] Smith AL, Hung J, Walker L, et al. Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients [J]. Br J Cancer, 1996; 73: 203 - 209.

[3] Nishisaka T, Takeshima Y, Inai K, et al. Evaluation of p53 gene mutation and loss of heterozygosity of 3p, 9p and 17p in precancerous lesions of 29 lung cancer patients [J]. Hiroshima J Med Sci, 2000; 49(2): 109 - 116.

[4] Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. Allelic losses at chromosome 8p21 - 23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer [J]. Cancer Res, 1999; 59(8): 1973 - 1979.

[5] Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints [J]. Cancer Res, 2000; 60(7): 1949 - 1960.

[6] 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 [J]. Differentiation, 1988; 38(1): 60 - 66.

[7] Djordjevic MV, Brunnemann KD, Hoffmann D. Identification and analysis of a nicotine - derived N - nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco [J]. Carcinogenesis, 1989; 10(9): 1725 - 1731.

[8] Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco - specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke [J]. Carcinogenesis, 1988; 9(6): 875 - 884.

[9] Willey JC, Broussoud A, Sleemi A, et al. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18[J]. Cancer Res; 1991; 51(19): 5370 - 5377.

[10] 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 [J]. Cancer Res, 1988; 48(7): 1904 - 1909.

[11] 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 [J]. Oncogene, 1996; 13(9): 1983 - 1990.

[12] 袁素波, 王治乔, 叶常青等. 环磷酰胺、噻替哌诱发人支气管上皮细胞的染色体畸变,[J]. 癌变·畸变·突变, 2000; 12(4): 205 - 211.

[13] 楼铁柱,项晓琼,吴德昌. α 离子诱发 BEP2D 细胞转化过程中染色体数目的变化[J]. 癌变·畸变·突变, 2000; 12(3): 172 - 173.

[14] Duesberg P, Li R, Rasnick D, et al. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2000; 119(2): 83 - 93.