

# 壳寡糖结合并激活巨噬细胞机制的研究

侯丽娜<sup>1</sup>, 赵鲁杭<sup>1,2</sup>

(1 浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 浙江 杭州 310031; 2 细胞与细胞生物学实验中心)

**[摘要]** 目的: 研究壳寡糖结合并激活巨噬细胞的机制。方法: RT-PCR 和 ELISA 检测壳寡糖对巨噬细胞及经  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 预刺激巨噬细胞的白细胞介素  $\beta$  (IL- $\beta$ ) 基因表达水平的影响; 钙离子脂化探针 Fluo3/AM 检测壳寡糖对巨噬细胞胞浆游离  $Ca^{2+}$  浓度的影响; 用四甲基异硫氰酸罗丹明标记甘露聚糖, 激光共聚焦显微镜和流式细胞仪观察标记糖结合及进入巨噬细胞的情况; 通过竞争性抑制实验探讨巨噬细胞摄取壳寡糖的可能途径。结果: 壳寡糖对巨噬细胞 IL- $\beta$  基因表达的影响呈浓度与时间依赖性, IFN- $\gamma$  预刺激巨噬细胞有增强作用; 高浓度壳寡糖引起巨噬细胞胞浆游离  $Ca^{2+}$  浓度升高; 壳寡糖竞争性抑制巨噬细胞内吞甘露聚糖, 抑制强度达 44%。结论: 壳寡糖可能是经由巨噬细胞表面的甘露糖受体介导结合并激活巨噬细胞, 钙离子相关的信号转导途径可能参与这一过程。

**[关键词]** 壳寡糖; 巨噬细胞; 甘露糖受体; 白细胞介素  $\beta$ ;  $\gamma$  干扰素

**[中图分类号]** R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2006)02-0124-04

## Binding and stimulatory effect of oligochitosan in macrophages

HOU Linda, ZHAO Luhan<sup>2</sup>

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology School of Medicine Zhejiang University Hangzhou 310031, China; 2 Cellular and Molecular Research Center)

**[Abstract]** Objective: To explore the mechanism of the binding and stimulatory effect of oligochitosan in macrophages (MP). Methods: The effect of oligochitosan on interleukin- $\beta$  (IL- $\beta$ ) gene expression in resting macrophages and macrophages prestimulated with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was detected by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Macrophages treated with oligochitosan of different concentrations were dyed with Fluo3/AM to observe the effect of oligochitosan on the level of free  $Ca^{2+}$  in the cytoplasm. Mannan was labeled with tetramethyl rhodamine isothiocyanate. The interactions between macrophages and the labeled sugar were observed under confocal laser microscope and analyzed by using flow cytometry. Competitive inhibition study was performed to determine the mechanism of oligochitosan uptake by macrophages. Results: Oligochitosan stimulated IL- $\beta$  gene expression in the concentration dependent and time dependent manner and this stimulatory effect was augmented by the prestimulation with IFN- $\gamma$ . Oligochitosan of high concentration increased the level of free  $Ca^{2+}$  in the cytoplasm. Oligochitosan competitively inhibited the uptake of mannan in macrophages and the inhibitory intensity was as high as 44%. Conclusion: Oligochitosan may bind and stimulate macrophages via mannose receptor and some  $Ca^{2+}$  dependent signaling pathway may participate in this process.

**[Key words]** oligochitosan; macrophage; mannose receptor; interleukin- $\beta$ ; interferon- $\gamma$

壳寡糖 (oligochitosan) 是壳聚糖的降解产物, 具有多种生理功能<sup>[1-3]</sup>。易经肠道被人体吸收。目前认为壳寡糖发挥生物学效应的机制与其激活免疫系统有关<sup>[4]</sup>。巨噬细胞 (macrophage, MP) 是重要的抗原递呈细胞, 壳寡糖能增强巨噬细胞的杀伤活性, 然而壳寡糖激活巨噬细胞的机制尚不明确。本研究探讨壳寡糖结合并激活巨噬细胞的机制, 为进一步阐明壳寡糖对巨噬细胞的免疫调节机

制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 壳寡糖的制备

采用复合纤维素酶解壳聚糖的方法, 详见参考文献 [5]。

### 1.2 RAW264.7 巨噬细胞的培养

RAW264.7 巨噬细胞 (购于中科院上海生物化学与细胞生物学研究所) 于含 10% 小牛血清、100 U/m 青霉素与链霉素的 RPMI 640 培养液 (N-VIROGEN 公司) 中, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。台盼蓝染色法计算细胞存活率达 95% 以上。

**[基金项目]** 浙江省自然科学基金资助项目 (302031)

**[作者简介]** 侯丽娜 (1978-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 壳寡糖巨噬细胞结合特性。

**[通讯作者]** 赵鲁杭, E-mail: zhaoluhan@263.net

细胞铲 (Orange Scientific 公司) 刮除法传代, 白细胞计数板计数, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 。将  $200 \mu\text{l}$  细胞悬液接种至盖玻片, 贴壁后用无血清 RPMI 1640 培养液冲洗去未悬浮细胞, 每片盖玻片加  $200 \mu\text{l}$  无血清 RPMI 1640 培养液, 备用。

### 1.3 RT-PCR 和 ELISA 检测巨噬细胞分泌的 IL-1 $\beta$ 的量

细胞总 RNA 提取按 RNA 抽提试剂盒 (上海生物工程公司) 说明书操作。逆转录步骤:  $11 \mu\text{l}$  RNA 溶液加入  $1 \mu\text{g}$  随机六聚引物, 混匀,  $70^\circ\text{C}$  温育  $5 \text{ min}$  冰浴中依次加入  $4 \mu\text{l}$   $5 \times$  逆转录缓冲液、 $1 \mu\text{l}$  RNasin (20 U) 和  $2 \mu\text{l}$  dNTP 混匀,  $25^\circ\text{C}$  温育  $5 \text{ min}$  加入  $1 \mu\text{l}$  MolMLV 逆转录酶 (200 U)。总量为  $20 \mu\text{l}$  的反应体系于  $25^\circ\text{C}$  温育  $10 \text{ min}$   $42^\circ\text{C}$  反应  $1 \text{ h}$   $70^\circ\text{C}$   $10 \text{ min}$  停止反应。PCR 步骤: 冰浴下, 取  $2.5 \text{ U}$  Taq DNA 聚合酶、 $2.0 \mu\text{l}$  DNA 模板、 $5.0 \mu\text{l}$   $10 \times$  PCR 缓冲液、 $4.0 \mu\text{l}$   $1 \text{ M}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $1.0 \mu\text{l}$  dNTP  $\beta$ -actin 正反链引物各  $0.2 \mu\text{g}$  IL-1 $\beta$  正反链引物各  $0.4 \mu\text{g}$  及去离子水  $31.5 \mu\text{l}$  混匀, 总量为  $50 \mu\text{l}$  的反应体系于  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$   $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$   $55^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$   $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 30 个循环进行 PCR 扩增, 后延伸  $72^\circ\text{C} \times 10 \text{ min}$ 。小鼠  $\beta$ -actin 正链引物序列: GAGACCTCAACACCCAGC 负链引物序列: GAACCGCTCATIGCCAATAGTG IL-1 $\beta$  正链引物序列: AGCTTCAGGCAGGCAGTATCAC 负链引物序列: CCAGCAGGTTATCATCATCATCC PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳方法定量。

配制 IL-1 $\beta$  标准溶液, 绘制标准曲线。在反应孔中加入待测样品的巨噬细胞培养液上清各  $50 \mu\text{l}$ , 室温下孵育  $2 \text{ h}$  吸去反应孔中上清, 用冲洗液洗涤 3 次, 吸干。各反应孔中加入生物素化抗小鼠 IL-1 $\beta$  抗体  $50 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育  $90 \text{ min}$  吸去反应孔上清, 洗涤 4 次, 吸干, 加入辣根过氧化酶溶液  $100 \mu\text{l}$ , 室温下孵育  $30 \text{ min}$  吸去反应孔上清, 洗涤 4 次, 加入酶反应底物 TMB 溶液  $100 \mu\text{l}$ , 避光, 室温下孵育  $20 \sim 30 \text{ min}$  加入终止液  $100 \mu\text{l}$ 。酶标仪  $450 \text{ nm}$  波长下读取各孔吸光值, 计算各样品 IL-1 $\beta$  含量。

### 1.4 巨噬细胞胞浆游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的测定

钙离子脂化探针  $\text{Fluo}_3 / \text{AM}$  溶于二甲亚砜, 配成  $1 \text{ mmol/L}$  储液,  $-20^\circ\text{C}$  保存。用 HEPES 缓冲液冲洗预先接种在盖玻片上的巨噬细胞 3 次, 加入用 HEPES 稀释的终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fluo}_3 / \text{AM}$  溶液  $100 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  避光孵育  $40 \text{ min}$ 。洗涤细胞, 加入  $180 \mu\text{l}$  HEPES 或  $20 \mu\text{l}$   $10 \text{ mg/ml}$  及  $100 \text{ mg/ml}$

的壳寡糖 HEPES 溶液, 激光共聚焦显微镜下 (激发波长  $488 \text{ nm}$ , 发射波长  $525 \text{ nm}$ ) 扫描细胞荧光强度。

### 1.5 荧光物质四甲基异硫氰酸罗丹明 (rhodamine isothiocyanate, TRITC) 标记甘露聚糖

$5 \text{ mg}$  TRITC 溶于  $0.25 \text{ ml}$  甲基甲酰胺, 加入乙二醇  $4.25 \text{ ml}$  制成 TRITC 溶液, 待用。另取甘露聚糖  $20 \text{ mg}$  溶解在由  $1 \text{ ml}$  乙二醇和  $3 \text{ ml}$   $0.1 \text{ mol/L}$  碳酸钠缓冲液 (pH 9.3) 构成的混合溶液中, 待溶解后加入上述 TRITC 溶液。  $4^\circ\text{C}$  避光搅拌  $24 \text{ h}$  后离心取上清, 装入截留相对分子质量为  $10\,000$  的透析袋内, 置  $0.01 \text{ mol/L}$ , pH 7.4 的 PBS 中  $4^\circ\text{C}$  避光透析, 每天更换 PBS 3 次, 直至透析外液置紫外照射下无荧光。冷冻干燥后溶解在  $\text{c-PBS}$  缓冲液中 ( $0.01 \text{ mol/L}$  pH 7.4 的 PBS 加  $1 \text{ mg/ml}$  BSA,  $1 \text{ mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ )。取少量, 测标记物的荧光物质 (F) 与蛋白 (P) 结合比率确定糖的标记效率。适当稀释后使其  $280 \text{ nm}$  的 OD 值接近 1.0 然后分别在  $515 \text{ nm}$  波长下和  $280 \text{ nm}$  波长下读取样品的 OD 值, 参照公式:  $F/P = \text{OD}_{515 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ , 计算得样品的 F/P 为 3.45 (比值在 2.1~9.4 之间均可用)。

### 1.6 标记糖与巨噬细胞作用的观察

实验前用  $\text{c-PBS}$  缓冲液冲洗预先接种在盖玻片上的巨噬细胞 3 遍, 加抑制剂或不同浓度的荧光物或荧光物标记糖,  $37^\circ\text{C}$  避光孵育特定时间, 洗涤细胞, 3% 多聚甲醛固定  $12 \text{ min}$   $\text{c-PBS}$  洗片,  $50 \mu\text{l}$  PBS 甘油混合溶液 (体积比 1:1) 封片。激光共聚焦显微镜下观察 (TRITC 标记甘露聚糖的激发波长为  $550 \text{ nm}$  发射波长  $620 \text{ nm}$ )。

### 1.7 分析标记糖与巨噬细胞结合的观察

用刮除法将贴壁的巨噬细胞制成细胞悬液 (离心后悬浮于  $\text{c-PBS}$  缓冲液), 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 。在抑制剂的存在下与一定浓度的标记糖避光孵育特定时间,  $1\,000 \text{ r/min}$  离心  $5 \text{ min}$  弃上清, 细胞沉淀重新悬浮于  $\text{c-PBS}$  中。结合了标记糖的细胞的荧光强度用 BD-LSR 流式细胞仪的 CellQuest 软件检测。

### 1.8 统计方法 采用统计软件 SPSS 10.0 数据采用 检验。

## 2 结果

### 2.1 壳寡糖对巨噬细胞 IL-1 $\beta$ 基因表达的影响 (表 1)

寡糖对巨噬细胞 IL-1 $\beta$  基因转录可随浓度增

加和时间增长而起增强作用。浓度和时间依赖在 40 μg/ml 18 h 时接近饱和。

表 1 壳寡糖作用浓度对巨噬细胞 IL-1β 基因转录水平的影响 (x±s)

Tab 1 Effect of oligochitosan with different concentration and duration on the expression of IL-1β in RAW 264 7 cell (x±s)

作用浓度 (μg/ml)	IL-1β (μg/L)	作用时间 (h)	IL-1β (μg/L)
10	0.4516 ± 0.0619 <sup>1)</sup>	6	0.3436 ± 0.0465 <sup>1)</sup>
20	0.5679 ± 0.1097 <sup>1)</sup>	12	0.4103 ± 0.0664 <sup>1)</sup>
30	0.6552 ± 0.1159 <sup>1)</sup>	18	0.4823 ± 0.0543 <sup>1)</sup>
40	0.7606 ± 0.0501 <sup>1)</sup>	24	0.4794 ± 0.0460 <sup>1)</sup>
60	0.7511 ± 0.0216 <sup>1)</sup>		
对照组	0.4040 ± 0.0430	对照组	0.3158 ± 0.0386

注: 1)与对照组比较, P < 0.01

### 2.2 壳寡糖对经 IFN-γ 预刺激的巨噬细胞 IL-1β 基因表达的影响 (表 2)

巨噬细胞经 IFN-γ 预刺激后, 壳寡糖促进 IL-1β 基因表达效应在转录和翻译水平上均比壳寡糖单独作用时显著增强; IFN-γ 单独作用巨噬细胞 22 h 后, IL-1β 基因表达与对照组无显著差异, 表明 IFN-γ 的加入在该实验中仅起到预刺激的作用。

表 2 壳寡糖对 IFN-γ 预刺激巨噬细胞 IL-1β 基因转录和翻译水平的影响 (x±s)

Tab 2 Effect of oligochitosan on IL-1β gene expression in macrophages prestimulated with IFN-γ (x±s)

分 组	IL-1β 转录 (μg/L)	IL-1β 转录 (μg/L)
40 μg/ml 光密度作用 18 h	0.6512 ± 0.1263 <sup>1)</sup>	93.8 ± 14.3 <sup>1)</sup>
100 U/ml IFN-γ 预刺激 4 h 后	1.1762 ± 0.3140 <sup>1)</sup>	165.4 ± 27.0 <sup>1)</sup>
40 μg/ml 壳寡糖作用 18 h		
IFN-γ 单独作用 22 h	0.3049 ± 0.0436	38.9 ± 5.7
对照组	0.3137 ± 0.0530	39.6 ± 7.6

注: 1)与对照组比较 P < 0.01

### 2.3 壳寡糖对巨噬细胞胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度影响

1 mg/ml 壳寡糖加入前后单个巨噬细胞的荧光强度 (43.526 ± 4.440, 44.444 ± 4.096) 无显著差异; 10 mg/ml 壳寡糖加入后荧光强度显著增强 (43.056 ± 3.577, 74.423 ± 4.116), 提示巨噬细胞胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度明显增高 (升高 69% 左右)。本实验还观察到巨噬细胞胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度在 120~140 s 之间达到高峰, 并维持在高峰水平很长时间。

### 2.4 壳寡糖对巨噬细胞内吞甘露聚糖-TRITC 的影响

以 TRITC 标记的甘露聚糖单独作用巨噬细胞为阳性对照, 用壳寡糖及其他经典的甘露糖受体的

配体 (甘露糖、甘露聚糖、岩藻糖、甘露糖-BSA、N-乙酰氨基葡萄糖胺-BSA) 分别竞争甘露聚糖-TRITC 与巨噬细胞的结合, 激光共聚焦显微镜和流式细胞仪观察和分析细胞荧光强度。结果显示壳寡糖加入后, 巨噬细胞表面的红色荧光变暗, 荧光强度比阳性对照组明显降低 (抑制强度 44%), 表明壳寡糖可与 TRITC 壳寡糖竞争结合巨噬细胞。

### 3 讨论

IL-1β 是一种在体内、外都能发挥抑制细胞生长和细胞毒作用的重要的细胞因子。本实验结果显示与静息细胞相比, IL-1β 的产生在壳寡糖作用后明显增加。而且用 IFN-γ 预刺激巨噬细胞可明显提高这种效应。SHIBATA<sup>[6]</sup> 报道, 几丁质通过诱导 IFN-γ 的生成进而激活巨噬细胞, 使其分泌多种细胞因子, 二者在免疫调节方面互相反馈、影响。壳寡糖作为几丁质部分脱乙酰化产物壳聚糖的降解物, 二者激活巨噬细胞的机理相似, 本实验结果进一步证实了体内壳寡糖对巨噬细胞的刺激作用与壳寡糖诱导 IFN-γ 的生成密切相关。

本实验结果高浓度的壳寡糖 (10 mg/ml) 可以引起巨噬细胞胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高, 与上述壳寡糖通过甘露糖介导的内吞过程激活巨噬细胞的结论一致, 提示提高胞浆 Ca<sup>2+</sup> 浓度可能是壳寡糖进入巨噬细胞的重要信号转导途径。

CARNA<sup>[7]</sup> 认为, 壳聚糖与特异性受体的结合是激活巨噬细胞的先决条件。因此, 我们推测在巨噬细胞表面应该存在特异性结合壳寡糖的受体。因为甘露聚糖本身没有发光集团, 将荧光素 TRITC 与甘露聚糖偶联, 方便了观察其与巨噬细胞之间的相互作用。实验结果巨噬细胞与 TRITC 甘露聚糖结合后显示荧光, 而 TRITC 本身与巨噬细胞结合能力很弱, 排除了 TRITC 对实验的干扰, 证明了方法的可行性。

研究发现, 以 N-乙酰氨基葡萄糖胺为末端的糖蛋白是通过甘露糖受体被巨噬细胞吞噬的<sup>[8]</sup>。我们用壳寡糖及一系列经典的甘露糖受体的配体, 分别去竞争甘露聚糖与巨噬细胞的结合。结果显示, 甘露糖受体的配体均能抑制 TRITC-甘露聚糖与巨噬细胞的结合, 同时, 壳寡糖不仅能够竞争甘露聚糖与巨噬细胞的结合, 且竞争性抑制作用非常强, 达到 44%。由此我们得出结论, 壳寡糖是通过巨噬细胞表面甘露糖受体被巨噬细胞识别结合的, 并且这一过程可能在激活巨噬细胞发挥生物学效应中发挥关键性作用。

综上所述,壳寡糖作为一种几丁质的衍生物,能够被人体的重要抗原递呈细胞——巨噬细胞内吞,并且凭借其生物安全性及水溶性吸收的优势,极有可能成为一种非常有潜力的新型海洋药物投入到免疫增强和免疫调节的临床应用中。

#### 参考文献:

- [ 1 ] FUJWARA M, HAYASHI Y, OHARA N. Inhibitory effect of water-soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans* [ J ]. *New Microbiol* 2004, 27(1): 83—86.
- [ 2 ] PAE HQ, SEO WG, KIM NY, et al. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer [ J ]. *Leuk Res* 2001, 25(4): 339—46.
- [ 3 ] KWON DK, SONG SB, PARK YY. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerators [ J ]. *Biomaterials* 2003, 24(9): 1595—1601.
- [ 4 ] 竺国芳, 赵鲁杭. 几丁寡糖和壳寡糖的研究进展 [ J ]. *中国海*

洋药物, 2000, 19(1): 43—46.

- [ 5 ] 纪莹, 赵轶, 周翔, 等. 壳寡糖的制备及组分分析 [ J ]. *中国现代应用药学*, 2003, 20(3): 195—196.
- [ 6 ] SHIBATA Y, FOSTER LA, KURNOIOM, et al. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of TNF-gamma inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma [ J ]. *J Immunol* 1998, 161(8): 4283—4288.
- [ 7 ] PORFORATIO C, BIANCO ID, RIERA CM, et al. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and in inflammatory macrophages [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 304(2): 266—272.
- [ 8 ] LNEHAN SA, MARTINEZ-ROMARES L, STAHL HD, et al. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and non-lymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia and mesangial cells, but not dendritic cells [ J ]. *J Exp Med* 1999, 189(12): 1961—1972.

[ 收稿日期 ] 2005—06—30

(上接第 123 页)

致 MS 及 LOH 造成 FHIT 基因复杂的多样性。

本研究结果显示,胃癌组织中 FHIT 基因 LOH 平均频率 32.4%, MS 平均频率 26.4%。D3S1300 和 D3DS4103 两个位点位于 FHIT 基因第 1 编码外显子 (E5 附近),在这两个位点出现高频率的 LOH 和 MS 与 FHIT 基因异常转录本中 E5 的缺失相吻合,也证实 FHIT 基因的缺失在胃癌中常见。并且发现多例出现 2 个或 2 个以上位点检出 LOH 和 MS 提示 FHIT 基因的变异范围较大。HUIPING<sup>[2]</sup> 报道在胃癌中 FHIT 蛋白的缺失与其淋巴结转移有关, CAPPUZZI<sup>[3]</sup> 报道 FHIT 蛋白丢失与胃癌的分期及组织学分级呈正相关,并与不良预后呈负相关。但也有相反的报道,NOGUCHI<sup>[7]</sup> 报道 FHIT 基因的 LOH 与胃癌的进展及预后无关。以上研究提示 FHIT 基因在胃癌的发生发展中起着重要作用,但相关的分子机制还需要进一步研究。

FHIT 基因的 LOH 和 MS 与胃癌临床病理特征的关系研究结果显示, FHIT 基因的缺失可能与胃癌组织分化无关。FHIT 基因的穿透浆膜组的胃癌较未穿透浆膜组的 LOH 阳性率高,提示 FHIT 基因的 LOH 与胃癌细胞的浸润扩散有关。而无淋巴结转移的胃癌 MS 阳性率高于有淋巴结转移的胃癌,提示 FHIT 基因 MS 主要参与胃癌发生早期事件,其在转移后表达下调还有待于进一步深入研究。

由此可见, FHIT 基因的 LOH 和 MS 均在不同

程度上反映了胃癌细胞基因组的不稳定性,推测其在胃癌的发生发展过程中起着重要作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] OHTA M, NOUE H, COTTICELLI M, et al. The FHIT gene spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated (38) breakpoint is abnormal in digestive tract cancer [ J ]. *Cell* 1996, 84(4): 587—597.
- [ 2 ] HUIPING C, KRISTJANSDOTTIR S, BERGTHORSSON JJ, et al. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer [ J ]. *Eur J Cancer* 2002, 38(5): 728—735.
- [ 3 ] CAPPUZZI ID, SANTORO E, HAUCK WW, et al. Fhit expression in gastric adenocarcinoma: correlation with disease stage and survival [ J ]. *Cancer* 2000, 88(1): 24—34.
- [ 4 ] HAN CB, ZHAO YJ, LI E, et al. Quantitation and detection of deletion in tumor mitochondrial DNA by microarray technique [ J ]. *Chin J Oncol* 2004, 26(1): 10—13.
- [ 5 ] MMORIKI NOUE H, SHIRASHI T, et al. Microsatellite instability is often observed in esophageal carcinoma patients with allelic loss in the FHIT/FRA3B locus [ J ]. *Oncology* 2003, 64(3): 275—279.
- [ 6 ] QUDDUS MR, SUNG CJ, COOK SW, et al. Loss of Fhit protein in carcinoma of primary and secondary müllerian system [ J ]. *Histopathology* 2004, 44(1): 87—88.
- [ 7 ] NOGUCHI T, MILLER W, WRTZ HC, et al. FHIT gene in gastric cancer: association with tumor progression and prognosis [ J ]. *Pathol* 1999, 88(4): 378—392.

[ 收稿日期 ] 2005—10—17