

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00150

• 论 著 •

低剂量烟草悬凝物诱导正常永生化人支气管上皮细胞慢性恶性转化

张 诚¹, 吴庆琛^{1*}, 李 强¹, 朱茂祥², 杨陟华², 潘秀颀², 谢俊豪¹

1. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

[摘要] **目的:**用低剂量烟草悬凝物模拟吸烟环境诱导正常永生化人支气管上皮细胞慢性恶性转化,构建恶性转化的细胞模型。**方法:**通过 MTT 法及细胞亚急性毒性存活能力检测实验确定慢性诱导物的剂量,以不同剂量的烟草悬凝物对细胞进行单次或多次染毒,以不染毒细胞为对照。用血清抗性实验和锚着独立生长实验鉴定细胞恶性转化的倾向和恶性特征,比较各组抗血清促分化的能力和集落形成率。**结果:**以体积分数为 0.5、1、2 $\mu\text{l/ml}$ 的烟草悬凝物对细胞进行单次和多次染毒,各相应剂量组多次染毒和单次染毒与对照组相比,传至第 25 代细胞,其抗血清促分化的能力均差异明显($P < 0.05$);传至第 38 代,成功建立细胞恶性转化模型,细胞复层生长,无接触性抑制,染色体异常,转化细胞的锚着独立生长实验克隆形成率均明显高于对照组($P < 0.05$)。多次染毒组的恶性转化趋势比单次染毒组强,而且剂量反应关系呈现良好的直线相关($r = 0.969, y = 42x$)。**结论:**用 0.5~2 $\mu\text{l/ml}$ 烟草悬凝物诱导的正常永生化人支气管上皮细胞恶性转化,可作为模拟吸烟环境下细胞慢性恶性转化的理想模型。

[关键词] 烟草悬凝物;致瘤性试验;人支气管上皮细胞;慢性恶性转化

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0150-06

Low dose of cigarette smoke condensate induces chronic malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells

ZHANG Cheng¹, WU Qing-chen^{1*}, LI Qiang¹, ZHU Mao-xiang², YANG Zhi-hua², PAN Xiu-jie², XIE Jun-hao¹

1. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a chronic malignant transformation model of immortalized human bronchial epithelial cell line BEP-2D by low dose cigarette smoke condensate (simulating smoking environment). **Methods:** The chronic dose of cigarette smoke condensate was determined by MTT assay and the colony formation test of BEP-2D cells. BEP-2D cells were exposed to cigarette smoke condensate once or for multiple times; unexposed cells were taken as control. The malignant tendency of BEP-2D cells was identified by anti-serum experiment and the malignant features of transformed BEP-2D cells were identified by semisolid agar culture. The differentiation ability of BEP-2D cells in anti-serum experiment and the colony forming rates of BEP-2D cells were compared between different groups. **Results:** The BEP-2D cells were exposed to 0.5, 1 and 2 $\mu\text{l/ml}$ of cigarette smoke condensate once or for multiple times and were cultured for 25 generations; the differentiation abilities of BEP-2D cells (the 25th generation) was significantly different between the cigarette smoke condensate exposed groups (at 0.5, 1 and 2 $\mu\text{l/ml}$) and the normal control group ($P < 0.05$). The cell malignant transformation model was successfully established in the cells of the 38th generation; the cells had multi-layer growth and had no contacting inhibition, with chromosome abnormality. The colony forming rates in the semisolid agar culture test was significantly higher in all smoke condensate exposed groups than in control group ($P < 0.05$). The dose-response relationship showed a good linear correlation ($r = 0.969, y = 42x, P < 0.05$). **Conclusion:** The malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells can be successfully induced by cigarette smoke condensate at 0.5-2 $\mu\text{l/ml}$, which offers an ideal model for simulating smoking environment induced chronic malignant transformation.

[KEY WORDS] cigarette smoke condensate; carcinogenicity tests; chronic malignant transformation; bronchial epithelial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 150-155]

[收稿日期] 2007-10-26 **[接受日期]** 2007-11-14

[作者简介] 张 诚, 硕士. E-mail: zhangcs05223@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: Wuqc6@hotmail.com

烟草烟气是一组成分非常庞大复杂的混合物,主要来源于烟草燃烧过程中发生的一系列热分解与热化合的化学反应。吸烟是肺癌发生的最主要原因。肺癌发生于支气管上皮细胞,烟草烟气进入人体首先作用于呼吸道黏膜,引起机体组织结构和功能发生改变。到目前为止,各国学者对烟草烟气进行了大量的研究工作,有关烟草烟气中代表性成分及烟草烟气作为一种复杂的混合物综合作用于人体的毒性研究作用及致癌致畸突变有了一定认识^[1-3]。但在环境中低浓度作用下,烟草烟气本身各成分间的联合效应对人体的健康影响资料仍然不足。人类上皮细胞培养与转化比较困难,研究中往往难以应用。近年来由于上皮细胞永生生化技术的发展,使得人上皮细胞的广泛应用成为可能。永生化人支气管上皮细胞 BEP-2D 细胞系来源于正常人支气管上皮细胞,是经 HPV-18 病毒转染而永生化的细胞系,具有较好的遗传稳定性,使转化培养研究易于进行。本研究以低剂量的烟草悬凝物 (cigarette smoke condensate, CSC) 模拟自然低剂量的烟草烟气环境,作用于 BEP-2D, 建立转化模型,分析其恶性转化指标的特性,为进一步探讨吸烟环境致癌发生的机制和化学预防烟草毒性提供理想的细胞模型。

1 材料和方法

1.1 试剂与细胞培养 人支气管上皮细胞系 BEP-2D 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所朱茂祥教授从 Harris 实验室引进并馈赠。LHC-8 无血清培养液 Invitrogen 公司产品,小牛血清为杭州四季青公司产品,胰蛋白酶及 EDTA- Na_2 为 Gibco 公司产品,低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品,重庆市某品牌香烟。细胞系以 LHC-8 无血清培养液培养,以 95% 相对湿度、5% (质量分数) CO_2 、37℃ 培养箱内孵育;细胞每 3 d 换液,每周传代 1 次。

1.2 CSC 提取 依据烟草烟气的理化性质和实验室的技术条件,本研究以液体染毒方式进行。考虑本研究所确定的主要 CSC 成分可溶于水,因此以 LHC-8 培养基为溶剂配置储备液进行染毒。具体方法是将经过吸烟机抽吸点燃香烟,每支烟每分钟吸抽 1 次,共抽 4 次,先经过 95% 乙醇吸收,再经过 LHC-8 培养液吸收,最后用 LHC-8 培养液稀释至所需体积分数。乙醇的最终体积分数最大不超过 0.1% (经测定不影响培养细胞的正常生理生化功能)。

1.3 最佳诱导浓度选择实验

1.3.1 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色实验^[4] 采用

MTT 法检测 BEP-2D 细胞对测试毒物的敏感性。用 0.2% 胰蛋白酶消化 BEP-2D 细胞,离心后用 LHC-8 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 9 600 个细胞接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl ,在 37℃、5% CO_2 和 95% 相对湿度条件下培养 24 h;然后以终体积分数为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的 CSC 对细胞染毒,每个剂量设 8 个平行孔,终体积 200 μl ;染毒 24 h 后,终止染毒,继续培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μl ,孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪 570 nm 下测定各孔光密度值,并对细胞存活率进行分析。

1.3.2 细胞亚急性毒性存活能力检测^[4] 指数生长的 BEP-2D 细胞用 2% 胰酶消化,准确计数,采用梯度稀释,吹打均匀,按每皿 3×10^9 个细胞接种至 60 mm 培养皿,以十字方向轻轻晃动,以无测试物的培养皿为对照,每个剂量设 4 个平行皿,在 37℃、5% CO_2 和 95% 相对湿度条件下培养 24 h。分别加入终体积分数为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的 CSC,然后加入 LHC-8 培养液至终体积 5 ml,继续培养 8 d 后终止培养,吸出培养液,用 37℃ 预温的 PBS 小心洗 2 次,甲醇固定 20 min 后,吉姆萨染色 20 min,流水缓慢洗去染色液,空气干燥。用体视显微镜将含有 30 个以上细胞的细胞群作为一个克隆进行计数,按下式计算细胞克隆形成率 (clone forming efficiency, CFE): $\text{CFE}(\%) = (\text{克隆数}/\text{接种细胞数}) \times 100\%$ 。

1.4 转化细胞鉴定实验

1.4.1 细胞转化实验 将对数生长的 BEP-2D 细胞接种于 4 个 50 ml 培养瓶,每瓶接种 3×10^5 个,加入 4 ml 的 LHC-8 培养液培养,至细胞 80% 处于融合状态后进行染毒处理。根据 MTT 实验、细胞亚急性毒性存活能力检测实验确定转化实验所用 CSC 量 (0.5、1、2 $\mu\text{l}/\text{ml}$),染毒 24 h 后弃除含 CSC 培养液,用 D-Hank 液洗 3 次,换以新鲜的 LHC-8 培养液继续培养至第 10 天,各处理组的细胞分为两部分,一部分不再染毒继续培养;另一部分再次染毒,每次染毒 24 h,每 3 d 换 1 次液,6~7 d 传代 1 次,直至细胞染毒 3 个月。观察细胞恶性转化的形态和生长特性^[5]。

1.4.2 血清抗性实验 将指数生长期的各处理组转化细胞第 25 代和平行传代正常对照细胞常规消化,用 LHC-8 培养液梯度稀释成单个细胞悬液后按每皿约 400 个细胞均匀接种于 60 mm 培养皿中。每组细胞接种 8 皿,其中 4 皿加入 10% 胎牛血清,严

格计时,将培养皿移入 CO₂ 孵箱,在 37℃、5% CO₂ 和 95% 湿度环境下,静止培养 6 d 后终止培养,用预温的 D-Hank 液洗涤 2 次后,甲醇固定 20 min,吉姆萨染色 15 min,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, PE):
 接种效率(PE)=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.4.3 锚着独立生长实验 用 LHC-8 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,稍冷却后放入 39℃ 水浴中保温,然后加入已预温的 LHC-8 培养液稀释为 0.7% 琼脂糖。以每皿 3 ml 倒入 60 mm 带格培养皿(Corning)中,铺制底层,待凝固后备用。常规消化,离心收集第 38 代转化细胞及相应的对照细胞与 0.7% 琼脂糖 1:1 混匀,稀释成为 0.35% 细胞琼脂混合液,加到培养皿中 0.7% 琼脂糖凝胶上(细胞密度为 1×10⁴/皿),待上层琼脂凝固后,每皿加入 2 ml LHC-8 培养液,每组 5 皿,在 37℃、5% CO₂ 和 95% 湿度环境下静止培养。每 3 d 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,按下公式计算克隆形成率:克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.5 统计学处理 应用统计学软件包 SPSS 11.0 进行 t 检验或 Fisher's 精确检验。

2 结果

2.1 最佳诱导浓度 MTT 实验显示细胞存活率,当 CSC 体积分数在 2 μl/ml 以下时,随着体积分数

增加,细胞存活率降低,具有较好的剂量-反应关系;细胞亚急性毒性存活能力检测试验显示,当 CSC 体积分数增高时,相对克隆形成率明显降低,表现极强的毒性效应。结合以上两种实验结果,确定细胞慢性转化实验的 CSC 体积分数为 0.5、1、2 μl/ml (表 1)。

表 1 CSC 对 BEP-2D 细胞的毒性试验
 Tab 1 Cytotoxicity tests of cigarette smoke condensate on BEP-2D cells by MTT assay

CSC φ/μl·ml ⁻¹	Cell survival rate	Colony forming rate (%)
0	100	100
0.5	90.4	91.4
1	75.5	76.5
1.5	65.5	68.6
2	50.2	51.9
2.5	45.5	41.2
3	35.3	34.5
3.5	28.8	30.1
4	26.4	21.2
4.5	12.3	13.2
5	5.5	6.2

2.2 细胞转化形态学改变 CSC 诱导的 BEP-2D 细胞传至 38 代时呈复层生长,排列紊乱,细胞群体呈现无序的条索状或团块状生长,无明显的接触性抑制和密度抑制,细胞有无限增殖趋势,生长速度加快,有异倍体或非二倍体,甚至多倍体出现(图 1)。

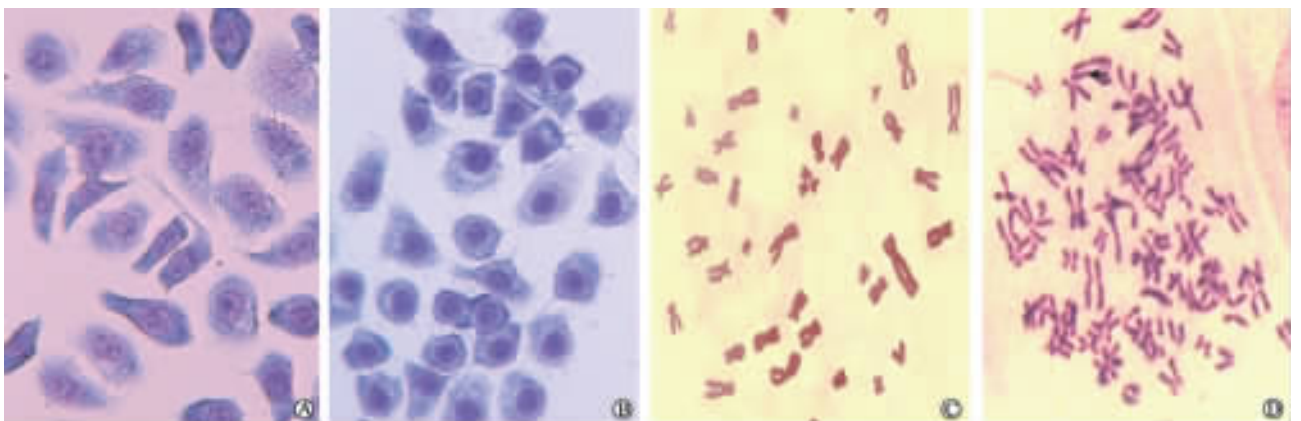


图 1 BEP-2D 细胞转化形态学改变

Fig 1 Morphology changes of malignant transformation of BEP-2D cells

A: Normal cells(Original magnification: ×200); B: Transformed cells(Original magnification: ×200); C: Chromosome of normal cells(Original magnification: ×1 000); D: Chromosome abnormality in transformed cells(Original magnification: ×1 000)

2.3 血清抗性测定结果 各剂量组单次与多次染毒25代细胞血清抗性结果为:在有血清的条件下,正常细胞生长明显受抑制,与无血清组相比显著降低;而CSC诱导的转化细胞接种效率明显升高,与无血清组相比有显著差异,说明CSC作用于细胞后,其促增殖能力显著增强,并且CSC作用后的细胞在有血清的情况下接种效率高于无血清,表明CSC转化的细胞对环境的选择性和依赖性降低,细胞自主生存能力增强,提示有恶性转化趋势。染毒

组与对照组相比:单次染毒的第25代细胞中,低剂量组差异性不明显,中、高剂量组的细胞接种效率与对照组比较具有显著性差异($P < 0.001$);而多次染毒的第25代细胞中,低剂量组的细胞接种效率与对照组比较具有统计学差异($P < 0.05$),中、高剂量组的细胞接种效率与对照组比较具有统计学差异($P < 0.001$)。单次染毒与多次染毒的第25代细胞比较,各相应剂量组的细胞接种效率均统计学差异($P < 0.001$)。详见表2。

表2 CSC单次和多次染毒对培养25代细胞的血清抗性
Tab 2 Inoculative efficiency of cells inoculated for 25 generations induced by CSC

($n=8, \bar{x} \pm s, \%$)

CSC $\varphi/\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	Induced once		Induced for multiple times	
	Without serum	With serum	Without serum	With serum
0(Control)	11.75±0.96	4.25±0.96△△		
0.5	11.00±0.82	13.50±1.29**△△	15.50±1.29***▲▲	17.75±1.29*△△▲▲
1	10.25±0.96*	16.00±1.41**△△	13.25±0.96***▲▲	19.00±1.83*△△▲▲
2	9.00±0.82*	17.00±1.41**△△	11.00±1.83***▲▲	21.00±1.83*△△▲▲

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs control; △△ $P < 0.001$ vs without serum; ▲▲ $P < 0.001$ vs induced once

2.4 锚着独立生长实验 CSC作用BEP-2D细胞后,传代培养至第38代时,可见正常细胞形成的克隆较小,数量少;转化细胞形成的克隆较大,数量较多(图2)。克隆形成率测定结果见表3,单次染毒的第38代细胞染毒组与对照组相比,各染毒组克隆形成率明显高于对照组($\chi^2 = 61.83, P < 0.001$);多次染毒的第38代细胞染毒组与对照组相比,不同剂量染毒组克隆形成率明显高于对照组($\chi^2 = 67.35, P < 0.001$);染毒方式相比:单次染毒与多次染毒的第38代细胞中,各剂量之间的克隆形成率有显著差异性($P < 0.05$)。

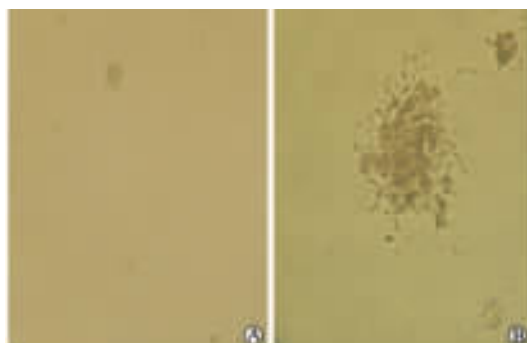


图2 正常细胞(A)和转化细胞(B)形成的克隆
Fig 2 Colony forming of normal cells(A) and transformed cells(B) (Original magnification: ×200)

表3 第38代细胞的克隆形成率
Tab 3 Colony forming rates of the 38th generation cells

($n=4, \bar{x} \pm s$)

CSC $\varphi/\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	Induced once		Induced for multiple times	
	Colony number	Colony forming rate(%)	Colony number	Colony forming rate(%)
0	1±0.05	0.1		
0.5	15±1.21**	1.5**	27±1.82**△	2.7**△
1	37±1.55**	3.7**	57±2.19**△	5.7**△
2	53±2.10**	5.3**	75±2.32**△	7.5**△

** $P < 0.001$ vs control; △ $P < 0.05$ vs induced once

2.5 剂量-反应关系分析 对多次染毒的细胞作剂量-反应关系分析,以细胞接种效率为纵坐标,CSC浓度为横坐标,第25代细胞可呈较好的直线相关,回归方程 $y = 15.25 + 3.14x$ ($r = 0.867, P = 0.031$);

以集落形成率为纵坐标,CSC浓度为横坐标,第38代细胞呈很好的直线相关, $y = 42x$ ($r = 0.969, P = 0.0037$)。

3 讨论

国际癌症研究中心(IARC)曾公布的一份研究报告中指出:根据目前癌症的发病趋势,到2020年全世界癌症发病率将比现在增加50%,全球每年新增癌症患者人数将达到1500万人,其中,发病最高的肺癌将达120万人^[6-8]。肺癌的发生起源支气管上皮,而呼吸道上皮细胞是烟草烟气的主要侵袭目标,在呼吸性疾病的发生过程中起重要的作用。选用永生化的人支气管上皮细胞作为靶细胞具有较好的代表性,16HBE、SV40和HPV-18永生化的人支气管上皮细胞曾在辐射和化学物诱导恶性转化研究中得到应用^[9-11]。BEP-2D细胞系来源于正常人支气管上皮细胞,是经HPV-18病毒转染而永生化的细胞系,保留着正常人支气管上皮细胞的特性和功能;在体外连续传代100次以上未发生衰老和死亡,且不具有锚着独立生长能力,接种裸鼠饲养12个月以上未观察到成瘤^[12],表明该永生化的细胞株具有较好的遗传稳定性;同时由于永生化的细胞具备了多阶段(启动—促进—发展)的启动阶段的某些特点,而且体外培养的细胞本身有自己的优势:可以避免体内外各种混杂因素的干扰,可按实验目的人为控制有害因子与细胞作用时间、方式等,还可以在体外直接观察细胞的形态改变。因此用该细胞研究吸入性化合物的急性毒性、遗传毒性和致癌性、致突变性,在一定程度上模拟了人类接触吸入性致癌物的条件,比用动物细胞或人成纤维细胞更为合理,不仅避免了种属间差异,同时也避免了组织间差异。本实验以烟草悬凝物诱导BEP-2D细胞构建恶性转化模型,为化学预防烟草的毒性提供科学的依据。

本实验根据MTT试验和细胞亚急性毒性存活能力检测实验,表明烟草悬凝物对BEP-2D的毒性抑制作用。随着剂量增加,毒性抑制加强,呈现剂量效应关系。最终确定以0.5、1、2 $\mu\text{l/ml}$ 作为染毒剂量,一方面对细胞有毒性作用,另一方面保证实验有充足的细胞数目。

BEP-2D细胞为无血清培养的细胞系,通常在有血清条件下,由于受到血清的诱导分化作用,细胞在含有血清的培养基中总体生长状态明显受到抑制,细胞接种效率低;而转化细胞由于诱导物对细胞遗传性状的改变,对血清的分化诱导呈现明显抗性,因而在有血清培养基中生长^[13]。本实验中CSC处理的BEP-2D细胞经数次传代后血清抗性测定结果

示其促增殖能力显著增强,对环境的选择性和依赖性降低,细胞自主生存能力增强,具有了初步转化特性。CSC组的细胞接种效率与对照组比较具有显著差异,且有剂量-反应关系;单次染毒与多次染毒的第25代细胞比较,各相应剂量组的细胞接种效率均有显著的差异($P < 0.001$),表明接触烟草悬凝物越多而细胞发生恶性转化趋势越强。

正常细胞在半固体琼脂培养基中不能形成克隆,而肿瘤细胞失去接触抑制,具有锚着独立生长能力,能够在半固体琼脂中形成克隆,因此细胞获得锚着独立性,能在软琼脂中形成克隆是细胞发生恶性转化的重要标志,也是检测转化细胞和肿瘤生物学特性最常用的方法^[14]。本实验中不同剂量组的CSC处理的BEP-2D细胞的软琼脂克隆形成率与对照组比较具有明显的差异,并有很好的剂量-反应关系,说明随着剂量的增加,细胞发生的恶性转化的可能性增加,也符合随着剂量的增加恶性细胞增多的理论。但从软琼脂实验的结果来看,多次染毒第38代细胞的2.1%~7.5%的克隆形成率也非常高,且各剂量组多次染毒的克隆形成率显著高于单次染毒,表明长期接触致癌物有利癌症的发生^[15]。同时细胞呈复层生长,排列紊乱,细胞群体呈现无序的条索状或团块状生长,无明显的接触性抑制和密度抑制,细胞有无限增殖趋势,生长速度加快,有异倍体或非二倍体,甚至多倍体出现。通过以上分析,0.5~2 $\mu\text{l/ml}$ 的浓度范围内,是CSC诱导BEP-2D细胞发生恶性转化的理想方案,既满足恶性转化的实验要求,又符合人们长期频繁接触烟草致癌物污染的环境。

本实验将血清抗性实验和锚着独立生长实验联合应用于恶性转化细胞模型的建立,便于观察和判断细胞转化过程的各种生理特性变化,因为血清抗性实验在细胞恶性转化早期过程就可以出现。避免单独应用锚着独立生长实验观察和判断细胞恶性转化的单一性,同时也避免过多的传代、长时间培养所带来的繁重工作量及易污染的弊端。

总之,本实验探索出CSC慢性诱导BEP-2D细胞恶性转化的理想条件,为探索烟草及类似对环境造成污染的物质致癌机制提供了良好的细胞恶性转化模型。

[参考文献]

- [1] Luppi F, Aarbiou J, van Wetering S, Rahman I, de Boer W I,

- Rabe K F, et al. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells *in vitro*: role of glutathione[J]. *Respir Res*, 2005, 25: 140.
- [2] Fukano Y, Oishi M, Chibana F, Numazawa S, Yoshida T. Analysis of the expression of heme oxygenase-1 gene in human alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke condensate[J]. *J Toxicol Sci*, 2006, 31: 99-109.
- [3] Nagaraj N S, Zacharias W. Cigarette smoke condensate increases cathepsin-mediated invasiveness of oral carcinoma cells[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 170: 134-145.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养(修订版)[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2006: 199, 248-249.
- [5] Ke Y, Reddel R R, Gerwin B I, Miyashita M, McMenamin M, Lechner J F, et al. Human bronchial epithelial cells with Integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation[J]. *Differentiation*, 1998, 38: 60-66.
- [6] Lung cancer and smoking-UK. *Cancer Stats. Cancer Research UK*, April 2004. <http://info.cancerresearchchuk.org/cancer-stats>
- [7] 王 伦, 刘 晨. 30%的癌症与吸烟有关[J]. *中国医药指南*, 2007, 4: 78-79.
- [8] Kurahashi N, Inoue M, Liu Y, Iwasaki M, Sasazuki S, Sobue T, et al. Passive smoking and lung cancer in Japanese non-smoking women: A prospective study[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122: 653-657.
- [9] Hei T K. Radio-induced neoplastic transformation of human bronchial epithelial cells[J]. *Radio Oncol Inv*, 1996, 3: 398-404.
- [10] Yang Z H, Fan B X, Lu Y, Cao Z S, Yu S, Fan F Y, et al. Malignant transformation of human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) induced by depleted uranium[J]. *Ai Zheng*, 2002, 21: 944-948.
- [11] Chen H J, Yu R A, He L F, An S J, Wu Z G, Yang K D, et al. Inhibitory effects of selenium on telomerase activity and hTERT expression in cadmium-transformed 16HBE cells[J]. *Biomed Environ Sci*, 2007, 20: 307-312.
- [12] Kern J A, Torney L, Weiner D, Gazdar A, Shepard H M, Fendly B. Inhibition of human lung cancer cell line growth by an anti-p18HER2 antibody[J]. *Ant J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 9: 448-454.
- [13] 杨陟华, 朱茂祥, 龚诒芬, 徐 勇, 孙红琰. NNK 诱发人支气管上皮细胞恶性转化及氧化损伤机理研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 1999, 11: 184-187.
- [14] Li H, Gu Y, Miki J, Hukku B, McLeod D G, Hei T K, et al. Malignant transformation of human benign prostate epithelial cells by high linear energy transfer alpha-particles[J]. 2007, 31: 537-544.
- [15] 吕兰海, 杨陟华, 尤汉虎, 曹珍山, 刘兴荣, 朱茂祥. 卷烟烟气及其主要有害成分诱发细胞基因突变的研究[J]. *环境与健康杂志*, 2004, 21: 286-288.

[本文编辑] 孙 岩

• 书 讯 •

《重症监护学》已出版

本书由毕清泉、李惠萍主编, 第二军医大学出版社出版, ISBN 978-7-8106-0668-4, 16开, 定价 24.00 元。

本书探讨了重症监护学的范畴、工作方法和护理特点; 描述了重症患者的监测项目以及临床常见危重患者护理评估和护理措施, 包括常用重症监护操作技术; 详细介绍了重症监护操作技术的目的、适应证、操作方法与步骤以及注意事项等。在临床常见疾病监护一章, 加入了疾病的病理生理内容, 以便读者更好地理解掌握。本书为医学护理专业的本科生、研究生使用教材, 也可作为护理专业的成人继续教育, 大专、中专和高职高专的医学生在进一步深入学习时阅读使用, 同时也可供临床工作的护士和住院医师临床实践时参考。

本书由第二军医大学出版社发行科发行, 全国各大书店均有销售。

通讯地址: 上海市翔殷路 800 号, 邮编: 200433

邮购电话: 021-65344595, 65493093

<http://www.smmup.com>