

食管癌前细胞 DNA、端粒酶含量及多基因表达产物的定量检测*

左连富** 林培中¹⁾ 齐凤英²⁾ 张林西²⁾ 郭建文 刘江惠

(河北省肿瘤研究所, 石家庄 050011)

摘要 为探讨食管癌高发区人群食管上皮癌变过程中的早期分子改变及早期癌变机理, 应用流式细胞术和免疫荧光技术及碘化丙啶 DNA 荧光染色方法, 对食管上皮癌前细胞的 DNA 含量、端粒酶含量和多个基因 p53、p16、cyclin D1 蛋白质表达进行了定量检测。检测结果发现, DNA 含量在癌变形成时明显增加, 异倍体率为 87.9%; p53 蛋白积聚发生在癌变早期, 在癌细胞组的阳性率为 100% (5/5); 抑癌基因 p16 在癌变早期有明显缺失; 癌基因 cyclin D1 及端粒酶阳性率在癌细胞组都为 100% (分别为 6/6, 7/7)。研究结果表明: 在癌变早期, DNA 含量及异倍体率增加, 癌基因 cyclin D1 表达增高, 抑癌基因 p16 缺失及 p53 蛋白积聚, 端粒酶含量也明显增高, 在癌形成时已有多个分子事件发生。

关键词 p53, p16, cyclin D1, DNA 含量, 端粒酶含量, 食管癌前细胞, 流式细胞术

学科分类号 R735.1

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一, 很多学者已进行了大量研究, 尤其是食管癌前病变及癌变机理是研究的热点。但关于食管癌的早期癌变机制仍不十分清楚。本研究应用食管拉网法, 对河北省磁县食管癌高发区现场采集食管上皮细胞标本, 运用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 对普查标本进行多个基因产物及端粒酶、DNA 含量的检测, 试图探讨食管上皮癌变机制, 为食管癌的早期诊断提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源

自河北省磁县食管癌高发区现场采集食管上皮细胞标本 952 例, 其中正常 101 例, 轻度增生 111 例, 重度增生 I 级 569 例, 重度增生 II 级 138 例, 可疑癌 14 例, 癌 19 例。采用食管拉网法, 将拉网器网球上的脱落上皮细胞部分做细胞涂片, 进行细胞学诊断, 其余洗脱到 20 ml 生理盐水中, 以 260 目筛网过滤, 离心 1 500 r/min, 5 min, 弃去上清后加入 70% 冷乙醇固定, 放入 4℃冰箱中保存, 以备检测。除对每份样品进行 DNA 含量检测外, 从中随机抽取 100 份样品进行 p16 和 cyclin D1 基因蛋白表达的检测。其中正常 7 例, 轻度增生 11 例, 重度增生 76 例, 癌 6 例。再抽取 100 份样品进行 p53 检测, 其中正常 10 例, 轻度增生 24 例, 重度增生 61 例, 癌 5 例。另外抽取 100 份样品进行端粒酶检测, 其中正常 6 例, 轻度增生 10 例, 重度

增生 77 例, 癌 7 例。

1.2 细胞学诊断标准

细胞学涂片经常规巴氏染色, 由二位富有经验的病理医师依据沈琼教授分级诊断标准进行细胞学诊断。

1.3 DNA 含量检测的样品制备

采用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 一步插入性 DNA 定量荧光染色方法。染液中含 PI 50 mg/L, RNA 酶 10 mg/L, Triton X 100 1.0%。上机检测前去除样品中的 70% 乙醇, 调整每份样品的细胞数为 1×10^6 /ml, 以 10% 鸡红细胞作内参标准, 与样品同步染色。以脱落细胞样品中的正常细胞作为二倍体标准。每份样品中加入 DNA 染液 1.0 ml, 在 4℃冰箱中染色 30 min, 以 500 目筛网过滤, 使样品成为合格的单细胞悬液, 即可上机检测。

1.4 免疫荧光定量检测的样品制备

1.4.1 试剂: a. p53: 小鼠抗人单克隆抗体, 克隆号 PAB1801, Oncogene Science, Inc U.S. 工作液浓度 1: 100. b. p16: 小鼠抗人单克隆抗体, 克隆号 F-12, Santa Cruz 公司产品。工作液浓度 1: 100。

* 国家“九五”攻关项目 (96-906-01-02) 和河北省自然科学基金 (301351) 资助项目。

¹⁾ 中国医学科学院肿瘤医院实验病理室, 北京 100021。

²⁾ 河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017。

** 通讯联系人。 Tel: 0311-6033511

收稿日期: 2001-06-15, 接受日期: 2001-07-30

c. Cyclin D1: 小鼠抗人单克隆抗体, 克隆号 H-231, Santa Cruz 公司产品. 工作液浓度 1: 100.
d. Telomerase 抗体: 兔抗人多克隆抗体, 克隆号 H-231, Santa Cruz 公司产品. 工作液浓度 1: 50.
e. 第二抗体为羊抗鼠 FITC-IgG, Code Number 115-095-003, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. 工作液浓度 1: 100. 羊抗兔 FITC-IgG, Code Number 115-095-003, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. 工作液浓度 1: 100.

1.4.2 免疫荧光标记方法: 采用间接免疫荧光标记方法, 去除样品中的 70% 乙醇, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 2 次, 将细胞数调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 每份样品加入第一抗体 (p53, p16, cyclin D1 及端粒酶) 工作液 100 μL . 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温浴 30 min. 然后用 0.01 mol/L PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 每份样品加入第二抗体工作液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水中温浴 30 min, 再用 0.01 mol/L PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 以除去未结合的多余荧光抗体. 上机检测前加入 1.0 ml PBS 溶液经 400 目筛网过滤, 即可上机分析. 在对蛋白免疫荧光标记物测定时, 设有 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照, 以及只加一抗或二抗的阳性对照.

$$FI = \frac{\text{样品蛋白表达的平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}}{\text{正常对照样品平均荧光强度}}$$

如果 $FI > 1.0$ 为阳性表达, $FI \leq 1.0$ 为阴性表达.

1.6.4 统计学处理: 采用 STATA 统计软件进行统计分析.

2 结果

2.1 食管上皮 DNA 倍体及细胞周期分析

根据 DNA 倍体的判定标准, 正常组中有 89 例 (88.1%) 为二倍体, 而随着细胞学分级的升高, DI 值增大, 二倍体所占百分比明显降低, 异

1.5 流式细胞术检测方法

采用美国 B-D 公司生产的 FACS420 型流式细胞仪, 激发光源为 2 W 氩离子激光器, 输出功率 300 mW, 激发波长为 488 nm, 分别进行单参数检测. DNA 检测以线性方式采集数据, 免疫荧光检测以对数方式采集数据. 输入 HP-300Consort 30 计算机进行处理. 测定前以鸡血红细胞作为标准样品调整仪器的 CV 值在 5% 以内.

1.6 测量资料分析方法

1.6.1 DNA 倍体分析方法: 依据 DNA 指数 (DNA Index, DI) 判定 DNA 倍体, $DI = 1.0 \pm 2CV$ 为二倍体; $DI \neq 1.0 \pm 2CV$ 为异倍体.

1.6.2 细胞周期分析方法: 应用 DNA 细胞周期分析软件, 计算出 DNA 组方图各时相分布的百分比, 以增殖指数 (proliferation index, PI) 表示细胞的增殖活性, 其计算公式为:

$$PI(\%) = \frac{S + G_2M}{G0/G1 + S + G_2M} \times 100\%$$

1.6.3 p53, p16, cyclin D1 蛋白及端粒酶表达的定量分析: 以荧光指数 (fluorescence Index, FI) 表示它们的相对含量, 公式为:

倍体百分比明显升高. 重度增生 II 组均值 $DI = 1.09 \pm 0.13$, 有 37 例 (26.8%) 为异倍体. 而可疑癌组及癌组 DI 均值分别为 1.24 ± 0.14 和 1.26 ± 0.16 , 其异倍体率分别达到 92.9% 和 84.2% (表 1), 与前几组相比, 差异非常显著 ($P < 0.01$). 通过对细胞周期的分析发现: G0/G1 期细胞随细胞学分级增高而减少, S+G2M 期细胞明显增多. 正常组 PI 值为 13.8 ± 4.5 , 而可疑癌及癌组 PI 值分别为 27.4 ± 11.2 和 28.5 ± 11.2 , 差异有显著性 ($P < 0.05$).

Table 1 Analysis of DNA content and ploidy in exfoliated epithelial cell of the esophagus

Cytological group	Number of case	$DI (\bar{x} \pm s)$	Diploid	Heteroploid
Normal	101	$1.03 \pm 0.04 (0.88 \sim 1.15)$	89 (88.1%)	12 (11.9%)
Mild dysplasia	111	$1.04 \pm 0.11 (0.96 \sim 1.33)$	100 (90.1%)	11 (9.9%)
Severe dysplasia I	569	$1.08 \pm 0.43 (0.88 \sim 1.55)$	487 (85.6%)	82 (14.4%)
Severe dysplasia II	138	$1.09 \pm 0.13 (0.93 \sim 1.56)$	101 (73.2%)	37 (26.8%)
Suspicious cancer	14	$1.24 \pm 0.14 (1.11 \sim 1.61)$	1 (7.1%)	13 (92.9%)
Cancer	19	$1.26 \pm 0.16 (1.02 \sim 1.74)$	3 (15.8%)	16 (84.2%)
Total	952		781 (82%)	171 (18.0%)

Note: 12 cases heteroploid are near ploid in normal group ($DI = 1.11 \sim 1.15$).

2.2 p53 蛋白表达与细胞学分级的关系

p53 蛋白在正常细胞组均为阴性表达; 在轻度增生组有 20.8% (5/24) 阳性表达, 在重度增生组阳性率明显增高 (54.8%); 而在癌细胞组则 100% (5/5) 阳性表达 (表 2)。组间差异非常显著 ($P < 0.01$)。

Table 2 Expression of p53 protein in various lesion of esophageal epithelial cell

Cytological group	Number of case	$\overline{FI}$ ($\bar{x} \pm s$)	Case number of positive
Normal	10	$1.00 \pm 0.11 (0.88 \sim 1.18)$	0
Mild dysplasia	24	$1.10 \pm 0.15 (0.88 \sim 1.55)$	5 (20.8%)
Severe dysplasia	61	$1.36 \pm 0.32 (0.93 \sim 2.09)$	34 (54.8%)
Cancer	5	$2.28 \pm 0.20 (2.09 \sim 2.60)$	5 (100%)

2.3 食管上皮 p16 蛋白表达与细胞学分级的关系

p16 蛋白表达均为阴性, 但是随着细胞学分级的增高, FI 值有明显降低的趋势。经统计学分析, 组间差异非常显著 ($P < 0.01$), 主要是第 1、2 组, 1、3 组及 1、4 组间的差异显著 ($P < 0.05$) (表 3)。

Table 3 Expression of p16 protein in various lesion of esophageal epithelial cell

Cytological group	Number of case	$\overline{FI}$ ($\bar{x} \pm s$)	Case number of positive
Normal	7	$1.00 \pm 0.07 (0.90 \sim 1.08)$	0
Mild dysplasia	11	$0.82 \pm 0.11 (0.64 \sim 1.06)$	0
Severe dysplasia	76	$0.77 \pm 0.10 (0.53 \sim 0.93)$	0
Cancer	6	$0.74 \pm 0.05 (0.67 \sim 0.80)$	0

2.4 Cyclin D1 蛋白表达与细胞学分级的关系

Cyclin D1 蛋白表达在正常组 FI 值为 1.00 ± 0.07 , 根据阳性表达判定标准, 正常组均为阴性表达。在轻度增生组仅有 1 例阳性表达 (9.1%)。重度增生组的 FI 值明显增高 (1.21 ± 0.22) (59.2%), 而在癌组 FI 值为 1.84 ± 0.18 , 100% 阳性表达, 组间差异非常显著 ($P < 0.01$) (表 4)。

Table 4 Expression of cyclin D1 protein in various lesion of esophageal epithelial cell

Cytological group	Number of case	$\overline{FI}$ ($\bar{x} \pm s$)	Case number of positive
Normal	7	$1.00 \pm 0.07 (0.89 \sim 1.10)$	0
Mild dysplasia	11	$0.97 \pm 0.12 (0.86 \sim 1.33)$	1 (9.1%)
Severe dysplasia	76	$1.21 \pm 0.22 (0.86 \sim 1.99)$	45 (59.2%)
Cancer	6	$1.84 \pm 0.18 (1.56 \sim 2.16)$	6 (100%)

2.5 端粒酶的定量表达与细胞学分级的关系

对 100 例随机抽取的样品进行端粒酶含量的定量检测发现, 正常组 FI 值为 0.99 ± 0.07 , 根据阳性判定标准均为阴性表达。但是随着细胞学分级的增高, FI 值明显增高, 阳性率也明显上升。重度增生组 FI 值为 1.33 ± 0.27 , 阳性率为 83.1%; 而癌组 FI 值为 1.70 ± 0.15 , 100% 阳性表达 (表 5)。组间差异非常显著 ($P < 0.01$)。

Table 5 Expression of telomerase content in various lesion of esophageal epithelial cell

Cytological group	Number of case	$\overline{FI}$ ($\bar{x} \pm s$)	Case number of positive
Normal	6	$0.99 \pm 0.07 (0.83 \sim 1.04)$	0
Mild dysplasia	10	$1.22 \pm 0.15 (0.96 \sim 1.44)$	7 (70.0%)
Severe dysplasia	77	$1.33 \pm 0.27 (0.80 \sim 1.90)$	64 (83.1%)
Cancer	7	$1.70 \pm 0.15 (1.42 \sim 1.84)$	7 (100%)

3 讨 论

食管癌发生过程中, 可有多个分子事件发生异常改变。目前细胞癌基因的研究已由单一基因发展到对多基因协同作用和相互调节机制的研究阶段^[1]。对食管癌高发区人群食管上皮癌变过程中多种分子标志物的研究, 将有助于揭示食管癌的早期癌变机理, 提高食管癌的早期诊断水平。

食管癌中 DNA 含量及倍体的检测常见报道, 而食管上皮癌变过程中 DNA 含量的变化检测则少见报道。从本研究结果可见, 随着癌前病变的进展, DI 值明显增高, 即 DNA 含量明显增加, 异

倍体数目不断增高, 在癌细胞组有 87.9% 是异倍体. 这说明食管上皮细胞在由正常形成癌过程中, 染色体已发生了显著的异常改变, 可能已发生了多个基因异常, 最终表现为形态学及生物学特性的改变. 本研究基于这种推测, 对食管癌高发区食管上皮癌变过程中多个抑癌基因及癌基因、端粒酶的表达进行了定量检测, 以发现它们在早期癌变中的作用.

对食管癌高发区人群食管上皮癌变过程中 p53 蛋白的定量检测发现, 在正常细胞组没有突变型 p53 蛋白积聚, 而随着异型增生程度的增高, p53 积聚含量及频率也逐渐增加. 在重度增生组, p53 阳性率为 54.8% (34/61), 与董琰滨等^[2]的结果较一致, 而在癌细胞组为 100% 阳性表达 (5/5), 提示 p53 过度表达与食管癌早期癌变有关^[3]. Simada 等^[4]研究也提示 p53 改变在食管癌形成中是一个关键事件. 由此可见, 对高发区人群食管上皮 p53 蛋白检测的重要性. 以前对 p53 基因的研究大多集中在食管实体癌组织^[5,6], 且多数注重与临床病理关系及预后的探讨, 我们认为注重 p53 在食管上皮早期癌变过程中的研究更为重要. 本结果是对食管癌高发区易感人群的食管上皮癌变早期的 p53 蛋白检测, 高度提示 p53 基因改变是食管癌发生过程中的早期事件, 有可能作为食管癌前人群筛选高危个体的生物标志.

p16 蛋白是调节细胞周期 CDK4 激酶的特异抑制因子. CDK4 能与 cyclin D1 特异结合形成 cyclin D1/CDK4 复合物, 后者可使 Rb 抑癌基因产物磷酸化而失活, 从而使细胞进入周期. 所以正常细胞周期的控制需要 CDK4 激酶和抑制蛋白之间的平衡^[7]. 大多数研究认为^[8,9], p16 基因突变或/和等位基因缺失在食管癌中较为常见, 对食管早期癌变过程中 p16 基因的改变及表达的研究, 尤其是对 p16 蛋白表达的定量检测尚未见报道. 本研究发现随着细胞学分级的增高, 其在上皮细胞中的表达含量显著减少, 组间差异非常显著 ($P < 0.01$). 结果提示 p16 抑癌基因在正常细胞中呈低水平表达, 调节 CDK4 的生物学活性, 从而很好地调控细胞周期及细胞的增殖. 而在逐步向恶性细胞转化过程中, 其表达含量显著减少, 从而逐渐丧失了对 cyclin D/CDK4 复合体的抑制作用, 导致食管过多的上皮细胞进入细胞周期, 以致过度增生甚至癌变.

Cyclin D1 是另一种细胞周期相关癌基因. 它

所表达的蛋白质在细胞周期中是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白. 它可与 CDK4 构成 cyclin D1/CDK4 复合体, 在功能上与抑癌基因 Rb 及 p16INK4 有竞争作用. 从本研究结果可以明显看出, 随食管上皮细胞癌变的进展, p16 表达明显减少, 从而降低了对 cyclin D1/CDK4 的抑制作用, 而 cyclin D1 表达却明显增加, 这样 cyclin D1/CDK4 促细胞增殖活性大大增强, 过多的细胞进入细胞周期, 造成食管上皮的过度增殖以致癌变. Shamma 等^[10]研究发现, cyclin D1 和 p16^{INK4a} 表达呈负相关, 并且在 cyclin D1、p16INK4、Rb 和 p27^{KIP1} 四种基因中, 有 92% (62/66) 病例至少有一种或一种以上的这些基因异常. 这进一步说明对食管癌高发区人群食管上皮细胞进行 p16 和 cyclin D1 定量检测的重要意义.

最近, 端粒酶活性与癌关系的研究成为新的研究热点. 自从 Kim 等^[11]于 1994 年报道了用 TRAP 法 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 能检测到数十个肿瘤细胞的端粒酶活性以来, 对人体各种肿瘤中端粒酶活性检测的报道不断出现. 目前对食管癌中端粒酶的检测主要集中在癌组织中端粒酶活性或端粒酶 RNA (hTR) 的检测. 关于它在食管癌前上皮细胞中的定量表达在国内外尚未见报道. 本研究应用 FCM 方法对高发区人群食管上皮中端粒酶含量进行了定量检测, 发现正常上皮中无阳性表达, 在重增组及癌细胞组, 端粒酶含量剧增, 表达阳性率为 83.1% ~ 100%. 提示端粒酶过量表达在食管上皮癌变过程中可能起着重要作用, 且是一较早发生的分子事件. 这与 Hiyama 等^[12,13]的观点相一致. 另外 Koyanagi 等^[14]研究也发现 57 例食管癌组织中都显示端粒酶活性, 而癌旁正常上皮只有 10% (5/50) 有端粒酶活性, 与本研究结果相一致. 因此, 可能通过对食管拉网脱落细胞进行端粒酶定量检测及早诊断食管癌, 并可能为将来的抗端粒酶活性治疗筛选患者提供了敏感指标.

参 考 文 献

- 1 朱明华. 肿瘤抑制基因 p53 的生物学功能研究进展和意义. 中华病理学杂志, 2000, 29 (1): 60~62
Zhu M H. Chin J Pathol, 2000, 29 (1): 60~62
- 2 董琰滨, 刘树范. 食管癌及癌前病变组织 p53 蛋白表达的研究. 中华肿瘤杂志, 1996, 18 (1): 58~60
Dong Y B, Liu S F. Chin J Oncol, 1996, 18 (1): 58~60
- 3 Suzuki H, Moriya J, Nakahata A, et al. Cyclin D1 gene amplification in esophageal carcinosarcoma shown by differential polymerase chain reaction. Hum Pathol, 1998, 29 (7): 662~667

- 4 Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, *et al.* Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer*, 1999, **80** (8): 1281~ 1288
- 5 程继东, 李 淳, 沈忠英. 食管鳞癌自发细胞凋亡和核增殖抗原 p53 关系的研究. *中华肿瘤杂志*, 1998, **20** (6): 415~ 417
Cheng J D, Li C, Shen Z Y. *Chin J Oncol*, 1998, **20** (6): 415 ~ 417
- 6 Kuwahara M, Hirai T, Yoshida K, *et al.* p53, p21 (Waf1/Cip1) and cyclin D1 protein expression and prognosis in esophageal cancer. *Dis Esophagus*, 1999, **12** (2): 116~ 119
- 7 Serrano M, Hannon G J, Beach D A. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, **366** (6456): 704
- 8 Hayasgi K, Metzger R, Salonga D, *et al.* High frequency of simultaneous loss of p16 and p16 beta gene expression in squamous cell carcinoma of the esophagus but not in adenocarcinoma of the esophagus or stomach. *Oncogene*, 1997, **15** (12): 1481~ 1488
- 9 Kato H, Yoshikawa M, Fukai Y, *et al.* An immunohistochemical study of p16, pRb, p21 and p53 proteins in human esophageal cancers. *Anticancer Res*, 2000, **20** (1A): 345~ 349
- 10 Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, *et al.* Effect of cyclin D1 and associated proteins on proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 1998, **13** (3): 455~ 460
- 11 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266** (5194): 2011~ 2015
- 12 Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, *et al.* Overexpression of human telomerase RNA is an early event in esophageal carcinogenesis. *Virchows Arch*, 1999, **434** (6): 483~ 487
- 13 Lord R V, Salonga D, Danenberg K D, *et al.* Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg*, 2000, **4** (2): 135~ 142
- 14 Koyanagi K, Ozawa S, Ando N, *et al.* Clinical significance of telomerase activity in the non-cancerous epithelial region of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Surg*, 1999, **86** (5): 674~ 679

A Quantitative Detection of DNA, Telomerase Content and Multi-gene Expression in Esophageal Precancerous Cell*

ZUO Lian-Fu^{**}, LIN Pei-Zhong¹⁾, QI Feng-Ying²⁾, ZHANG Lin-Xi²⁾, GUO Jian-Wen, LIU Jiang-Hui
(Hebei Provincial Tumor Institute, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract In order to investigate its alteration in the molecular events and early carcinogenesis mechanism of esophageal epithelium cell in the high incidence area of esophageal cancer, content of DNA, telomerase and multi-gene p53, p16, cyclin D1 expression in esophageal precancerous cell were quantitative detected by flow cytometry with indirect immunofluorescence technique and DNA propidium iodide fluorescence staining methods. The detected results showed the DNA content increased significantly and the heteroploid rate was 87.9% in occurred carcinogenesis. The p53 protein accumulated and p16 was deleted in the early carcinogenesis of esophagus. The positive rate of p53 was 100% (5/5) in the cancea group. The telomerase and oncogene cyclin D1 were overexpression in the cancer group and their positive rates were 100% (respectively 6/6, 7/7), the results indicate that DNA content and heteroploid rate increased, tumor suppressor gene p16 deleted and p53 protein accumulated while telomerase and cyclin D1 protein overexpressed in the early carcinogenesis of esophageal epithelium. There were multiple molecular events occurred when the esophageal carcinoma happened.

Key words p53, p16, cyclin D1, DNA content, telomerase content, esophageal precancerous cell, flow cytometry

* This work was supported by the grants from the National 9th Five Years Plan Special Research Programs of China (96-906-01-02) and Hebei Province Natural Science Foundation (301351).

¹⁾ Department of Pathology, Tumor Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China.

²⁾ Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-311-6033511

Received: June 15, 2001 Accepted: July 30, 2001