

研究论文

RASSF1A逆转A549-DDP细胞对顺铂耐受的实验研究

侯玉磊 吴艳凤 薛成军 李凤增 罗海霞 郑倩 陈辉*

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要 *RASSF1A*表达下降可能是肺癌对顺铂获得性耐药的主要因素之一。为了寻找预测顺铂对肺腺癌A549细胞化疗敏感性的生物标志, 该研究以对顺铂耐药的同源A549细胞(A549-DDP)为研究对象, 利用转染技术上调*RASSF1A*表达。RT-PCR和Western blot检测转染前后*RASSF1A*在mRNA和蛋白水平的表达情况。在不同浓度顺铂作用下, 通过MTT法、克隆形成实验检测转染前后细胞活力并计算 IC_{50} 和计数克隆形成数。在同一浓度顺铂作用下, 流式细胞仪检测转染前后细胞凋亡分数的改变。结果显示: 顺铂作用24 h后, 转染*RASSF1A*表达质粒的A549-DDP细胞对顺铂 IC_{50} 明显低于A549-DDP细胞[(39.9±6.3) $\mu\text{mol/L}$ vs (53.0±5.8) $\mu\text{mol/L}$, $P=0.036$]; 不同浓度顺铂连续作用5天后, 转染*RASSF1A*表达质粒的A549-DDP细胞形成的克隆数明显少于A549-DDP细胞组; 在同一浓度顺铂作用下, 转染*RASSF1A*表达质粒的A549-DDP凋亡分数明显大于A549-DDP细胞[(7.10±0.01)% vs (3.80±0.18)%, $P=0.002$]。结果提示, *RASSF1A*表达下降可能是肺腺癌A549细胞对顺铂获得性耐药的重要因素之一, *RASSF1A*表达在临床上作为肺癌患者顺铂化疗耐受的生物标志值得进一步研究。

关键词 肺癌A549-DDP细胞株; *RASSF1A*表达质粒; 顺铂

RASSF1A Resensitizes A549-DDP Cell to Cisplatin

Hou Yulei, Wu Yanfeng, Xue Chengjun, Li Fengzeng, Luo Haixia, Zheng Qian, Chen Hui*

(Clinical Laboratories, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Low expression of *RASSF1A* may be a critical cause for acquired chemo resistance of lung cancer. In order to find a biomarker predicting chemo sensitivity of A549 cell to cisplatin, cisplatin-resistant human A549 cells (A549-DDP) were chosen and transfected with a *RASSF1A* plasmid to enhance the expression of *RASSF1A*. Semi-quantitative RT-PCR and Western blot analyses were performed to confirm the expression of *RASSF1A* mRNA or protein before and after cell transfect. Exposing to different concentrations of cisplatin, MTT assays were used to evaluate cell viability and calculated the IC_{50} value to cisplatin before and after transfect respectively; Clone forming tests were used to evaluated the clone forming ability before and after cell transfect. Exposing to the same concentration of cisplatin, flow cytometric analysis was used to assess apoptosis before and after cell transfect. The results indicated: exposing to cisplatin 24 h, IC_{50} value to cisplatin decreased greatly in A549-DDP cell with exogenous expression of *RASSF1A* than that in A549-DDP cell [(39.9±6.3) $\mu\text{mol/L}$ vs (53.0±5.8) $\mu\text{mol/L}$, $P=0.036$]; After exposing to cisplatin for 5 days, the clone number of A549-DDP with exogenous expression of *RASSF1A* was significantly

收稿日期: 2012-11-08 接受日期: 2012-12-26

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2012jjA10105)和重庆市卫生局医学科研计划项目(批准号: 2012-2-016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012033, E-mail: chenhu789@gmail.com

Received: November 8, 2012 Accepted: December 26, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.cstc2012jjA10105) and the Medical Scientific Program of Chongqing Municipal Health Bureau (Grant No.2012-2-016)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012033, E-mail: chenhu789@gmail.com

网络出版时间: 2013-03-12 17:18 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130312.1718.002.html

reduced than that of A549-DDP; with the same concentration of cisplatin, the apoptosis percentage increased greatly in A549-DDP with exogenous expression of *RASSF1A* than that of A549-DDP [(7.10±0.01)% vs (3.80±0.18)%, $P=0.002$]. The results suggest that low expression of *RASSF1A* may be a critical cause for acquired chemo resistance of lung cancer and it needs deeply study about *RASSF1A* acts as biomarker for chemosensitivity of lung cancer patients in clinic.

Key words lung cancer A549-DDP cell line; *RASSF1A* expression plasmid; cisplatin

肺癌是发病率和死亡率极高的恶性肿瘤之一,其发病率在男性群体中处于首位,女性群体中位于第二位^[1]。在所有肺癌中,80%以上的为非小细胞肺癌^[2]。目前,以顺铂为基础的化疗仍然是非小细胞肺癌治疗的重要措施之一^[3]。但肺癌等肿瘤患者对顺铂的耐受日益增多^[2]。耐药的出现对病人来说可谓是雪上加霜,既延误治疗时机,加重病情,还可因药物毒副作用产生新的痛苦,甚至加速死亡。因此,寻找预测顺铂化疗耐受性的指标,是对肺癌实施个体化治疗的重要前提。

RASSF1A(Ras-associated domain family 1, isoform A)是被广泛研究的抑癌基因,其广泛表达于正常组织中,已发现在肺癌、乳腺癌、鼻咽癌、肾癌等肿瘤组织中却表达下降^[4]。*RASSF1A*与肿瘤化疗敏感性的关系已在肝癌、卵巢癌中报道^[5-6],但*RASSF1A*与肺癌对顺铂化疗敏感性关系尚未见报道。本课题组在以前的研究中发现,*RASSF1A*在肺腺癌细胞株A549中高表达,而在对顺铂耐药的肺腺癌细胞株A549-DDP中表达下降。因此,*RASSF1A*在A549细胞对顺铂耐受中的作用引起了我们的关注。本课题拟通过质粒转染上调A549-DDP的*RASSF1A*表达,并观察*RASSF1A*表达与A549-DDP对顺铂敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 顺铂耐药的肺腺癌A549细胞株(A549-DDP)由重庆医科大学附属第一医院邱峰教授惠赠,A549-DDP是在人肺腺癌细胞A549的基础上,以顺铂作为诱导药物,采用逐步递增浓度的方法诱导获得,在常规培养中使用2 μg/mL的顺铂维持其耐药性状。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基与新鲜小牛血清购自美国Gibco公司,顺铂、MTT购自美国Sigma公司, RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和TaqDNA聚合酶购自TaKaRa公司, *RASSF1A*表达质粒购自美国Addgene公司,转染试剂(X-TremeGENE)HP DNA

Transfection Reagent)购自美国Roche公司,质粒小量提取试剂盒购自Omega公司, *RASSF1A*一抗购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 *RASSF1A*表达质粒的提取 添加5 mL LB培养基于无菌的玻璃试管,用接种环挑取含有*RASSF1A*表达质粒的DH5α菌液于准备好的LB培养基中,200 r/min, 37 °C摇菌12~16 h,按质粒提取试剂盒说明书进行提取细菌质粒,分光光度计检测*RASSF1A*表达质粒浓度和纯度。

1.2.2 细胞培养和*RASSF1A*表达质粒转染A549-DDP细胞 用含10%小牛血清的RPMI-1640培养基常规培养A549-DDP细胞(培养基加入2 μg/mL顺铂以维持A549-DDP细胞的耐药性状),37 °C、5% CO₂条件下培养24 h,0.25%胰酶消化贴壁A549-DDP细胞,新鲜RPMI-1640培养基中和胰酶并收集细胞悬液,离心弃上清,RPMI-1640培养液重悬细胞,牛鲍计数板计数,按照每孔2×10⁵细胞铺6孔板,37 °C、5% CO₂培养24 h;选择对数生长期的A549-DDP细胞株,常规细胞换液,严格按照转染试剂说明书将2 μL转染试剂+1 μg DNA分别转染PCMV5-*RASSF1A*表达质粒和PCMV5空载体,37 °C、5% CO₂培养24 h。

1.2.3 RNA提取和RT-PCR检测转染前后*RASSF1A* mRNA水平 参照文献^[5]设计引物,其中*GAPDH*为内参基因。Trizol法提取各组的总RNA,分光光度法检测RNA浓度。取400 ng总RNA用RT反应液合成第一条cDNA序列,然后按照PCR反应,条件如下:95 °C预变性,5 min;94 °C变性,30 s,60 °C退火,30 s,72 °C延伸30 s,共35个循环。*GAPDH*以相同条件反应35个循环。PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳20 min。

1.2.4 Western blot检测转染前后*RASSF1A*蛋白表达情况 用冷的PBS洗涤细胞两遍,加入40 μL RIPA,4 °C,12 000 r/min,离心10 min。BCA试剂盒检测蛋白浓度,将细胞总蛋白和6×上样缓冲液混匀,100 °C,5 min使蛋白变性,进行SDS-PAGE电泳,条件:先80 V,30 min;后为100 V,100 min。然后将聚丙烯酰胺凝胶

上的蛋白转移至PVDF膜, 转膜条件: 100 V, 90 min。将PVDF膜用含5% BSA的PBST封闭1 h, 一抗(1:500) 4 °C孵育过夜, 0.1%的TPBS洗3次, 用HRP标记的二抗(1:1 000)在4 °C条件下孵育1 h, 0.1%的TPBS洗3次, 用ECL试剂盒显色并在BIO-RAD成像仪上成像。

1.2.5 MTT法检测细胞活力并计算 IC_{50} 选择转染后的A549-DDP细胞, 按照4 000/孔的初始细胞密度铺96孔板, 每个浓度设5个平行孔, 培养24 h, 给予不同浓度顺铂, 顺铂浓度如下: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{mol/L}$ 。当细胞培养至20 h时, 每孔加入5 mg/mL的MTT试剂, 继续培养4 h, 然后弃去细胞培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 摇床摇10 min, 然后在490 nm处比色, 计算 IC_{50} 。

1.2.6 细胞克隆形成实验 选择转染后的A549-DDP细胞, 按照10 000/孔的初始细胞密度铺12孔板, 培养24 h给药, 给药浓度如下: 0, 20, 100 $\mu\text{mol/L}$ 。连续培养5天, 弃去细胞培养液, 用PBS洗涤2次, 然后用甲醇固定15 min, 弃去甲醇并用流水轻轻冲洗两次, 结晶紫染色5 min, 用流水轻轻冲去染液。自然干燥后计数克隆形成数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 选择转染

后的A549-DDP细胞, 按照每孔200 000/孔的初始细胞密度铺6孔板, 培养24 h后, 20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂给药, 继续培养24 h, 收集细胞, 用冷的PBS洗涤细胞3次, 2 000 r/min, 离心5 min, 收集细胞。

加入500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞并加入5 μL Annexin V-EGFP混匀后, 加入5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光、反应15 min后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况(早期凋亡与晚期凋亡之和)。

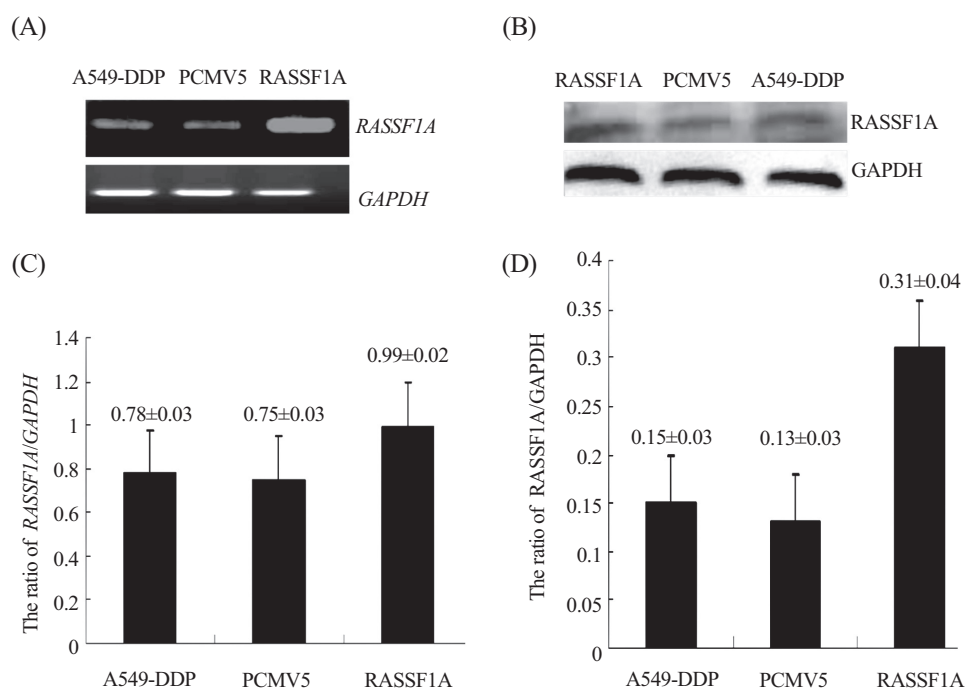
1.2.8 统计学处理 所有的实验至少重复3次, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同实验组之间的比较用 F 检验, 所有的统计学分析均在统计学软件SPSS17.0上进行, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR和Western blot检测转染前后*RASSF1A*在mRNA和蛋白水平的变化

转染PCMV5-*RASSF1A*的A549-DDP细胞*RASSF1A* mRNA和蛋白水平明显升高, 转染PCMV5空质粒的A549-DDP细胞和A549-DDP细胞中, *RASSF1A* mRNA和蛋白变化不大(图1A和图1B)。

通过计算*RASSF1A*与GAPDH灰度值比发



A: 转染前后*RASSF1A*在mRNA水平的变化; B: 转染前后*RASSF1A*在蛋白水平的变化; C: 在mRNA水平, *RASSF1A*与*GAPDH*的比值; D: 在蛋白水平, *RASSF1A*与*GAPDH*的比值。

A: RT-PCR analysis for *RASSF1A* mRNA; B: Western blot analysis for *RASSF1A* protein expression; C: quantification of *RASSF1A* mRNA levels relative to *GAPDH*; D: quantification of *RASSF1A* protein expression relative to *GAPDH*.

图1 在质粒转染前后*RASSF1A*在mRNA和蛋白水平的变化

Fig.1 Changes of *RASSF1A* mRNA and protein levels in A549-DDP before and after *RASSF1A* plasmid transfection

现,发现转染PCMV5-*RASSF1A*的A549-DDP细胞 *RASSF1A*/GAPDH在mRNA和蛋白水平均大于对照组($P=0.002$; $P=0.021$,图1C和图1D)。

2.2 *RASSF1A*质粒转染前后A549-DDP细胞活力及 IC_{50} 的改变

转染PCMV5-*RASSF1A*表达质粒24 h后,A549-DDP细胞株在不同浓度的顺铂培养液中,其活力明显均低于对照组(转染PCMV5空质粒和未转染的A549-DDP细胞株),但转染PCMV5空质粒的A549-DDP细胞和A549-DDP细胞的活力无显著差异(图2)。

不同浓度顺铂作用24 h后,PCMV5-*RASSF1A*转染组、PCMV5组和A549-DDP组的 IC_{50} 分别为(39.9 ± 6.3) $\mu\text{mol/L}$ 、(51.9 ± 6.3) $\mu\text{mol/L}$ 、(53.0 ± 5.8) $\mu\text{mol/L}$,其中,PCMV5-*RASSF1A*转染后的A549-DDP细胞对顺铂的 IC_{50} 明显低于转染PCMV5空质粒和A549-DDP组($P=0.036$,图3)。

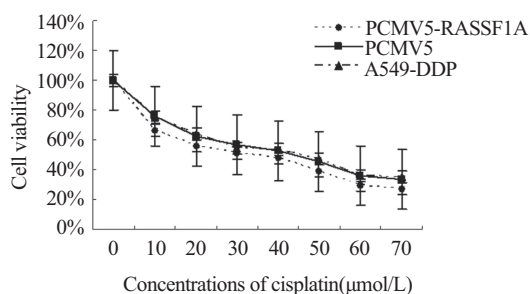


图2 不同浓度顺铂作用后各组细胞活力变化情况
Fig.2 Changes of cell viability among different groups

2.3 *RASSF1A*质粒转染前后,A549-DDP细胞克隆形成能力的改变

不同浓度顺铂作用下,转染PCMV5-*RASSF1A*质粒的A549-DDP细胞形成的克隆数明显少于对照组(转染PCMV5空质粒和未转染的A549-DDP细胞株,表1和图4)。

2.4 *RASSF1A*质粒转染前后A549-DDP细胞在顺铂作用下的凋亡的比较

20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂作用24 h后,转染PCMV5-*RASSF1A*转染组、PCMV5转染组和A549-DDP细胞组凋亡分数分别为: (7.10 ± 0.01)%、(3.50 ± 0.22)%、(3.80 ± 0.18)%,如图5所示,PCMV5-*RASSF1A*转染组的细胞凋亡分数显著大于PCMV5转染组和A549-DDP组($P=0.002$),而转染PCMV5空质粒的A549-DDP细胞和A549-DDP细胞凋亡分数无显著差异($P>0.05$)。

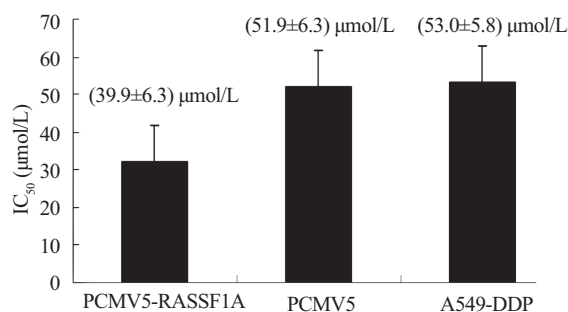


图3 不同浓度顺铂作用24 h后各组 IC_{50} 的变化
Fig.3 Changes of IC_{50} among different groups with different concentrations of cisplatin for 24 h

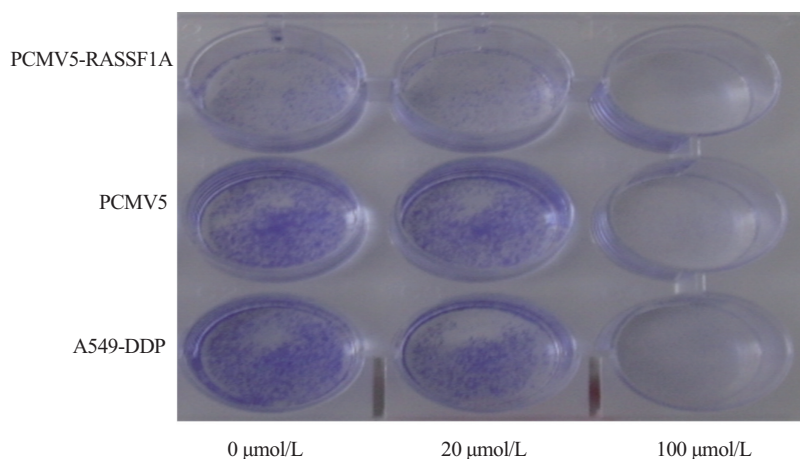


图4 *RASSF1A*质粒转染前后A549-DDP细胞克隆形成能力的比较
Fig.4 Clone forming abilities among different groups before and after *RASSF1A* transfection

表1 不同浓度顺铂作用下, 各组细胞克隆形成数

Table 1 Clone numbers among different groups with different concentrations of cisplatin				
顺铂浓度(μmol/L) Concentrations of cisplatin(μmol/L)	PCMV5- <i>RASSF1A</i> 组细胞克隆数 Cell clones of PGMV5- <i>RASSF1A</i> group	PCMV5组细胞克隆数 Cell clones of PGMV5 group	A549-DDP组细胞克隆数 Cell clones of A549-DDP group	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
0	748.7±67.2	1 848.0±83.3	1 735.2±78.4	0.000*
20	153.5±14.6	746.7±70.2	685.3±63.4	0.000*
100	5.8±2.1	5.3±3.5	6.5±2.4	0.854

**P*<0.05.

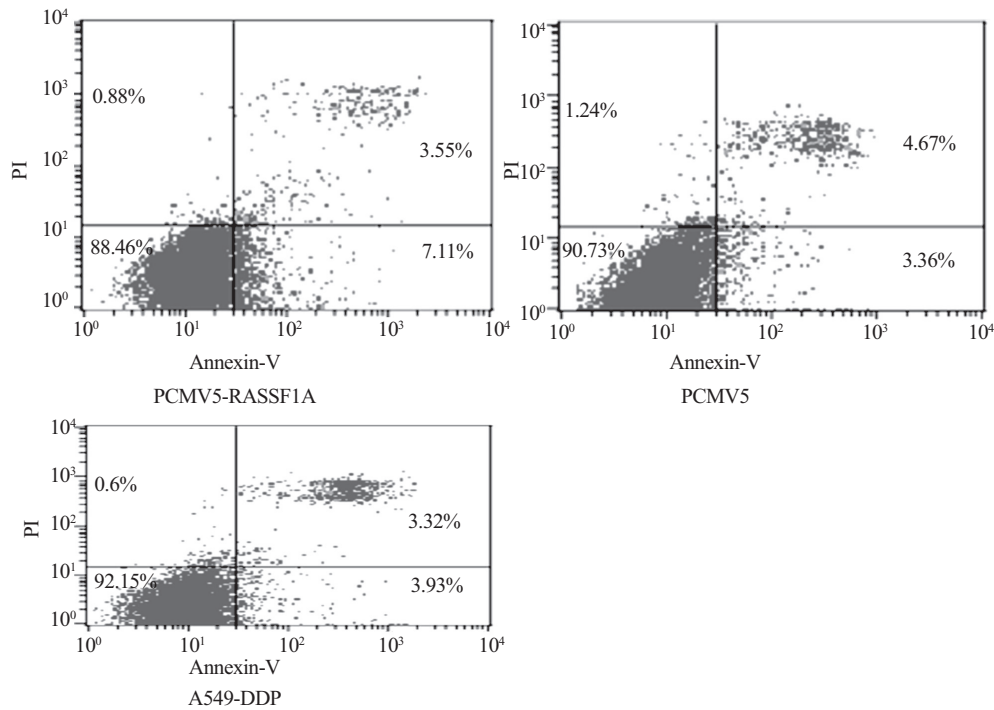


图5 流式细胞仪检测顺铂作用24 h后, 各组的凋亡变化情况

Fig.5 Changes of apoptosis among different groups after exposing A549-DDP cell to cisplatin for 24 h

3 讨论

化疗是治疗恶性肿瘤的主要方法之一, 但是近年来肿瘤化疗耐药日益突出, 严重地影响了化疗效果。因此对肿瘤化疗耐药的机制研究成为一个新的热点。一种化疗药物的有效性主要在于引起肿瘤细胞凋亡的能力^[7]。抑癌基因表达的降低能够引起肿瘤细胞促凋亡途径的改变, 降低化疗药物对肿瘤细胞促凋亡的能力, 引起肿瘤细胞对化疗药物的耐受^[8-9]。

*RASSF1A*位于染色体3p21.3区域, 因在肺癌和乳腺癌中表达下降而被发现。随后的多个研究证实, *RASSF1A*参与了肿瘤发生、发展的全过程, 通过激活效应物和相关的信号通路, 调控细胞周期进展、凋亡、微管形成和迁徙等多个过程, 是介导细胞外促有丝分裂和凋亡信号的关键枢纽^[10-11]。Dammann

等^[12]报道*RASSF1A*在正常肺组织100%表达, 但在17种小细胞肺癌细胞株中表达下降。他们将肺腺癌细胞株A549用*RASSF1A*转染后, 发现其克隆增生比对照组降低了2/3。进而将*RASSF1A*转染的A549细胞株接种至裸鼠后, 发现其体内成瘤能力也明显低于对照组。Shivakumar等^[13]利用转染技术将*RASSF1A*转染NCI-H1299肺癌细胞株发现细胞周期被成功阻断在G₁/S期。Burbec等^[14]通过对多种肺癌细胞株及动物实验也发现了类似的结果。可见, *RASSF1A*的表达下降在肺癌的发生中起着非常重要的作用。

*RASSF1A*表达与肿瘤化疗敏感性的关系新近成为研究的热点。本研究成功利用转染技术将*RASSF1A*表达质粒转入A549-DDP细胞(在mRNA和蛋白水平得到证实), 转染后A549-DDP对顺铂的

IC₅₀显著下降,并促进了A549-DDP细胞在含顺铂培养液中的死亡和凋亡,表明*RASSF1A*的表达下降在A549对顺铂的耐受中发挥了比较重要的作用。Zhao等^[6]利用基因转染技术将*RASSF1A*真核表达载体转入*RASSF1A*表达缺失的肝癌细胞株SMMC-7721,发现SMMC-7721对丝裂霉素的IC₅₀下降了4倍。Balch等^[15]利用5-AZA使甲基化的*RASSF1A*去甲基化而恢复*RASSF1A*的表达,发现卵巢癌细胞对顺铂的IC₅₀浓度明显降低。Guan等^[5]发现,野生型*RASSF1A*质粒能够增加BEL-7402对丝裂霉素的化疗敏感性。Whang等^[16]的研究证实,*RASSF1A*通过诱导肺癌细胞停滞在G₂/M期,从而提高其对紫杉醇和长春新碱的药物敏感性。他们的研究结果与我们在肺癌A549细胞中的结果基本一致。Agathangelou等^[17]用*RASSF1A*质粒转染A549细胞,成功地诱导了A549细胞周期停止,并筛选出66个表达发生明显改变(2倍以上)的下游基因,这些基因涉及到转录、信号转导、细胞周期、凋亡等多个环节,其中多个信号和分子与顺铂的作用及耐受机制相关。可见,*RASSF1A*的表达在增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性方面同样起着至关重要的作用。

本研究在细胞水平首次证实了*RASSF1A*与A549-DDP细胞对顺铂敏感性之间的关系,这既为临床预测肺癌对顺铂化疗敏感性提供了可供参考的实验室标志,也为抗肺癌化学新药设计提供了关键的靶点。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Breathnach OS, Freidin B, Conley B, Green MR, Johnson DH, Gandara DR, *et al.* Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: Sobering results. *J Clin Oncol* 2001; 19(6): 1734-42.
- Azzoli GC, Baker S, Temin S, Pao W, Aiff T, Brahmer J, *et al.* American society of clinical oncology clinical practice guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(36): 6251-66.
- Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, *et al.* Methylation associated inactivation of *RASSF1A* from region3p21.3 in lung, breast and ovarian tumors. *Oncogene* 2001; 20(12): 1509-18.
- Guan HG, Xue WJ, Qian HX, Zhou XJ, Qin L, Lan J. *RASSF1A* expression inhibits cell growth and enhances cell chemosensitivity to mitomycin in BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells. *Clin Med J* 2009; 122(11): 1328-32.
- Zhao ZQ, Dou KF. Methylation of Ras association domain family protein 1, isoform A correlated with proliferation and drug resistance in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(5): 683-9.
- Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50(5): 343-52.
- Bassett EA, Wang W, Rastinejad F, El-Deiry WS. Structural and functional basis for therapeutic modulation of P53 signaling. *Clin Cancer Res* 2008; 14(20): 6376-86.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108(2): 153-64.
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The *RASSF1A* tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 18): 3163-72.
- Thaler S, Hähnel PS, Schad A, Dammann R, Schuler M. *RASSF1A* mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res* 2009; 69(5): 1748-57.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3q21.3. *Nat Genet* 2000; 25(3): 315-9.
- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The *RASSF1A* tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclinD1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(12): 4303-18.
- Burbee DG, Forgacs E, Zöschbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, *et al.* Epigenetic inactivation of *RASSF1A* in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(9): 691-9.
- Balch C, Yan P, Craft T, Yong S, Skalnik DG, Huang TH, *et al.* Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitors zebularine in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(10): 1505-14.
- Whang YM, Park KH, Jung HY, Jo UH, Kim YH. Microtubule-damaging agents enhance *RASSF1A*-induced cell death in lung cancer cell lines. *Cancer* 2009; 115(6): 1253-66.
- Agathangelou A, Bièche I, Ahmed-Choudhury J, Niche B, Dammann R, Baksh S, *et al.* Identification of novel gene expression targets for the ras association domain family 1(*RASSF1A*) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5344-51.