论著

文章编号:1000-5404(2005)18-1848-05

小鼠视神经发育损伤相关基因的凝聚性分层聚类分析

刘运来[1],黄明辉[2],伍亚舟[3],袁碧波[1],姚忠祥[1],孙 榆[1],张彦琦[3],杨梦苏[2],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,[3]高原军事医学系卫生统计学教研室,重庆 400038;[2]香港城市大学生物化学系,香港)

提 要:目的 对前期工作中采用高密度基因芯片技术筛选到的视神经发育、损伤相关基因进行聚类分析,以了解这些基因之间的相互联系,并根据已知功能和CNS轴突生长、导向相关的基因对部分未知功能基因进行功能预测。**方法** 用Gene Cluster软件对筛选到的视神经发育、损伤相关基因进行凝聚性分层聚类,并对已知功能和CNS轴突生长、导向相关的Ptn、Efnb3所在的小组进行进一步的分析。**结果** 1 033个符合聚类条件的基因根据聚类的树型图分成6类,其中B类基因的表达模式和小鼠外侧膝状体的发育过程非常类似,它们可能是视神经发育的关键基因;5个功能完全未知的基因Mm.28443、Mm.9671、Mm.25504、Mm.160640、Mm.182895和Ptn基因聚类在同一个小组中,它们和Ptn基因的相关性非常高,Pearson相关系数为0.979~0.996,这些基因我们暂时作为神经轴突生长、导向相关的候选基因;Lamr1基因和Efnb3基因的相似性很高,结合文献,推测Lamr1及其配体是视神经发育的重要轴突导向分子。**结论** 新的轴突导向因子的发现能为基因工程治疗CNS损伤提供潜在的靶基因。

关键词:中枢神经系统;发育;损伤;轴突导向;聚类分析

中图法分类号:R195.4;R322.85;R329.23 **文献标识码**:A

Hierarchical clustering the genes related to mouse optic nerve development and injury

LIU Yun-lai[1], HUANG Ming-hui[2], WU Ya-zhou[3], YUAN Bi-bo[1], YAO Zhong-xiang[1], SUN Yu[1], ZHANG Yan-qi[3], YANG Meng-su[2], CAI Wen-qin[1] ([1]Department of Histology and Embryology, [3]Department of Statistics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biochemistry, City University, HongKong, China)

Abstract: Objective To find out the correlation among the genes which were screened by high density genechips related to mice optic nerve development and injury in our previous work, then to estimate the functions of some unknown genes according to some genes known related to CNS neurite extention and guidance. **Methods** Hierarchical clustering method was applied for the genes mentioned above and the subgroups respectively containing Ptn, Efnb3 were further analyzed. **Results** A total of 1 033 suitable candidate genes were clustered into 6 groups. The gene expression pattern of group B was identical to the development pattern of lateral geniculate body (LGN), which supposed that the genes of group B might be the key genes to the optic never development. Five functionally unknown genes Mm.28443, Mm.9671, Mm.25504, Mm.160640, Mm.182895 were clustered into a subgroup together with Ptn. The Pearson's coefficient between each of them and Ptn varied from 0.979 to 0.996. These genes were supposed to be candidate genes related to neurite growth and guidance. Lamr1 and its ligand were assumed to be the neurite guiding molecules for optic never, both beacuse of its high Coefficient to Efnb3 gene and related documents. **Conclusion** New neurite guiding molecules might be potential target genes for CNS regeneration by genetic engineering.

Key words: central nervous system; development; injury; axon guidance molecule; hierarchical clustering

脑发育和损伤的关系日益受到人们的重视,一方面,一些发育相关基因参与了脑损伤、再生的病理、生理过程,另一方面在发育期间高表达的许多有利于轴突生长、突触形成以及一些调节神经细胞分化、迁移的基因,可适当的通过基因工程技术应用到再生中去将有助于脑损伤的修复[1]。在前期的工作中,我们采用高密度的发育表达谱基因芯片,检测了在小鼠视神经发育、损伤共8个不同的时相点上视神经的第一级投

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z068)、第三军医大学校管基金资助项目(2004)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01Z068) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2004)

作者简介:刘运来(1971-),男,湖南省涟源市人,博士,讲师,主要从事神经发育、损伤以及无神经支配血管的调控机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752229

通讯作者:蔡文琴,电话:(023)68752232

收稿日期:2005-03-05;**修回日期**:2005-07-28

射站—外侧膝状体的基因表达情况，共找到差异表达基因2 041个：其中至少在 1 个时相点高表达（Ratio≥2，Ratio 值为 Cy5/Cy3 的比值，其意义参见文献[2]）的基因1 095个，低表达（Ratio≤0.5）的基因 946 个。对高表达的1 095个基因进行了功能检索、分组，发现其中 51.19%（561/1 095）的基因的功能完全未知，功能已知或者部分已知的基因大致分为转录调节、信号转导等 17 个功能组。一些和轴突生长、导向、突触形成相关的基因 Efnb3、Ptn、Nrp、Dbn1 只在发育期间高表达，抑制轴突生长的基因 Rtn4 只在损伤后表达，一个和神经元的迁移、轴突的生长相关的基因—Mdk 在发育和损伤过程中均有高表达，这些基因可能是视神经发育以及损伤、修复过程中起关键作用的基因[2]。大量功能不明的基因到底在发育、损伤中起什么作用，以及它们之间有何内在联系，都是值得探讨的问题，聚类分析将能对此提供有益的线索。由于事先并不清楚最后聚类的具体数目，拟采用凝聚性分层聚类的方法来对这些差异表达基因进行自动聚类。

1　材料与方法

1.1　确定参加分层聚类分析的候选基因

我们在前期的工作中，采用高密度的发育表达谱基因芯片，检测了在小鼠胚胎（enbryo，E）15、18 d、出生（postnatal，P）0、7 d 以及视神经损伤（injury，I）1、7、14、21 d 共 8 个不同的时相点上，视神经的第一级投射站—外侧膝状体的基因表达情况。在总计 7 680个待测基因中，有 3 604个基因能获得有效数据，其中同时符合以下 2 个条件的，作为聚类分析的候选基因：①至少 1 个时相点的 Ratio≥2 或者 Ratio≤0.5；如果全部 2 > Ratio > 0.5，则最大 Ratio 与最小 Ratio 的比值大于 3。②在发育、损伤总共 8 个时相点上至少有 5 个以上的时相点能获得有效数据。

1.2　总体聚类分析

上述筛选出来的基因经 Gene Cluster 软件进行凝聚性分层聚类，聚类结果自动生成 1 个 *.cdt 文件。用 Treeview 1.6 软件显示 *.cdt 文件，该软件由 Stanford University 免费提供。

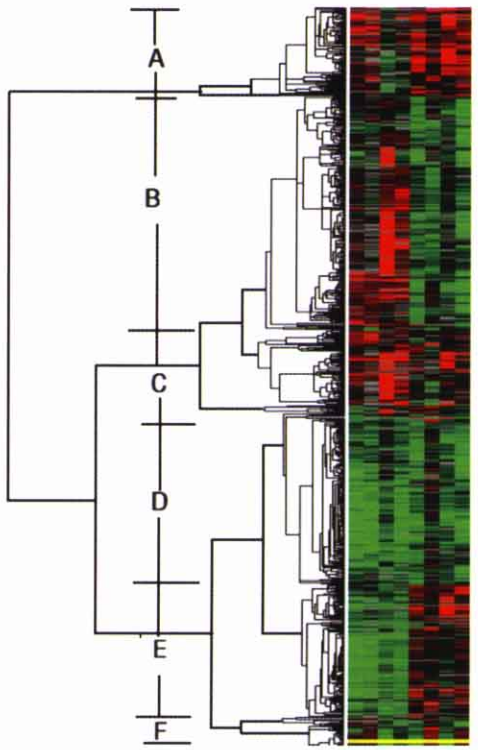
1.3　对已知和轴突生长、导向相关的基因进行进一步的聚类分析

在前期的功能分组研究中我们已经找到 6 个已知和轴突生长相关的基因[2]（Efnb3、Ptn、Nrp、Dbn1、Rtn4、Mdk）在发育和损伤期间有差异表达，对其中符合聚类分析候选条件的基因所在的小组进行进一步的分析。

2　结果

2.1　总体聚类结果

经筛选，3 604个候选基因中有1 033个基因符合确定的筛选条件。1 033个符合筛选条件的基因经 Gene Cluster 软件聚类后，用 Treeview 显示的聚类结果如图 1 所示。从图 1 中聚类的树型图来看，1 033个基因根据各自的表达模式，最合理的分类可以分成 A、B、C、D、E、F 共 6 组。



From left to right in the clustering area, there were eight time pionts: respectively E15, E18, P0, P7, I1, I7, I14, I21; From top to bottom, there were 1033 candidote genes, which were clusted into 6 groups (A to F) according to the clustering treeshape.

图 1　Treeview 显示的聚类结果图

Fig 1　Clustering result displayed by Treeview

每个组的全部基因在发育、损伤中每个时相点的 Ratio 值取该时相点全组基因的平均值，以了解该组基因表达水平的时间变化趋势。A 组的基因有 127 个，占总数的 12.3%，其大体变化趋势是在发育阶段 E15、E18 表达升高，在 P0、P7 表达水平和正常对照水平接近，而在损伤各阶段均高表达。B 组基因一共328 个，占总数的31.8%，是 6 个组中数量最多的一个组，该基因群的表达模式如图 2 所示，在发育各期均表达增高，P0 时达到高峰，而在损伤各个时相点均表达降低。从该类基因的表达模式来看，和 LGN 的发育模式非常类似，即在胚胎后期开始发育，P0 达到高峰，P7 仍然处于继续发育当中；当形态学的发育完成后则这些基因也低表达或者不再表达。C 组基因 108 个，占总数的 10.5%，其变化趋势在发育各阶段均有较高表达，在损伤后的各个时期也有一定程度的高表达，这些基因参与了 LGN 各个时期的发育，也参与了损伤后的病理或者自发性的再生过程。D 组基因 234 个，其表达模式在发育以及损伤的各个时期均有一定程度的低表达。这个基因群占总数的 22.7%，它们在各个时期低表达的意义尚不清楚。E 组基因 191 个，占总数的 18.5%，其表达规律在各个发育时期均为低表达，而在各个损伤时期在均有一定程度的升高。F 组基因 44

个，占总数的4.26% 。其表达模式为发育期间的E15、E18以及损伤后I7、I21表达增高，其它时相点表达降低，其表达模式图和A组的表达模式图有些类似，该基因群也是参与LGN的早期发育和损伤后某些时期的病理、生理过程。

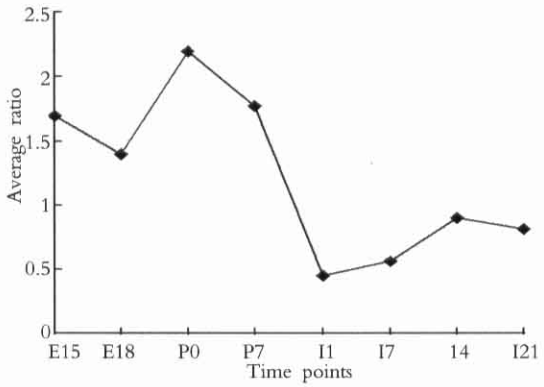


图2 B组基因平均Ratio值变化趋势图

Fig 2 The average ratio of genes in group B

2.2 和神经轴突生长、导向相关基因的进一步聚类分析结果

6个已知和轴突生长相关的基因中，Ptn、Efnb3基因符合聚类分析的候选条件参加了本次聚类分析，对这些基因的进一步的聚类分析的结果如下。

2.2.1 Ptn基因(Blot2520)的聚类分析 在聚类的树型图上，和Ptn聚类在同一个小组的基因共有6个，它们的基因名称、功能简述以及与Ptn的Pearson相关系数与见表1。

表1 与Ptn聚类同组的基因

Tab 1 Genes clustered together with Ptn

Blot	NCBI Unigene ID	Function	Pearson's coefficient correlation with Ptn
3637	Mm. 28443	Unknown	0.984 3
5748	Mm. 9671	Unknown	0.987 28
2375	Mm. 25504	Unknown	0.995 66
2520	Mm. 3063	Neurite extention, Grwoth factor	1
7211	—	Unknown	0.979 08
6566	Mm. 160640	Unknown	0.983 7
6953	Mm. 182895	Unknown	0.991 2

和Ptn基因同组的6个基因均是功能未知的基因，其中5个是在NCBI的GenBank中已经登陆的EST，而且这6个基因和Ptn的Pearson相关系数高达0.979～0.991(最高为1)。

表1中的7个基因在各时相点的Ratio值取平均值，作图显示其在发育、损伤中的变化趋势，该基因群在P0有峰值表达，而在损伤后的各个时期均为低表达。见图3。

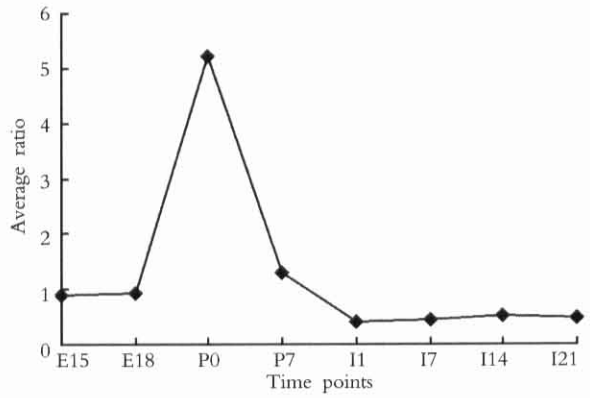


图3 Blot2520聚类同组基因平均Ratio值变化趋势模式图

Fig 3 The average ratio of genes subgrouped together with Blot2520

2.2.2 Efnb3基因(Blot3981)的基因聚类分析 在聚类的树型图上，和Efnb3聚类在同一个组的基因名称、功能简述以及与Efnb3的Pearson相关系数与见表2。

表2 与Blot3981聚类同组的基因

Tab 2 Genes subgrouped together with Efnb3

Blot	NCBI Unigene ID	Function	Pearson's coefficient correlation with Efnb3
5533	Mm. 43931	Unknown	0.390 2
4881	Mm. 27927	RNA processing	0.734 72
5343	Mm. 173892	Unknown	0.367 99
3520	Mm. 43213	RNA processing	0.634 13
6801	Mm. 27927	RNA processing	0.733 35
4967	Mm. 2115	RNA processing	0.788 61
2081	Mm. 182959	Specially expressed in CNS, related to mitosis	0.548 13
6202	Mm. 16421	Transcription regulation	0.582 05
702	Mm. 347798	Adhesion molecule	0.960 79
5194	—	Immune reaction	0.856 39
1300	Mm. 19187	Immune reaction	0.823 22
3981	Mm. 19016	Neurite extention, cell migration	1
1144	Mm. 171394	RNA binding, protein synthesis	0.491 01
5137	Mm. 5286	RNA binding, protein synthesis	0.924 54
3954	—	Immune reaction	0.64262

和Efbb3聚类在同一组的基因总共有14个，这些基因只有BLOT702和Efbb3的相关系数较高(Pearson相关系数0.96)。BLOT5194、BLOT1300、BLOT3954聚类在这同一个小组中，经检索它们是同一个基因Ptma的3个片段，它们和Efbb3基因的相关性均教低(0.64～0.85)，但相互之间的相关性非常高，达0.95～0.98；另外Blot4881、Blot6801实际上是同一基因Hnrpa1的两个不同片段，它们彼此之间的相关系数为0.99。

表2中的16个基因在个时相点的Ratio值取平均值，作图显示其在发育、损伤中的变化趋势，该基因群在发育各个时相点高表达，而在损伤各个时相点低表达，见图4。

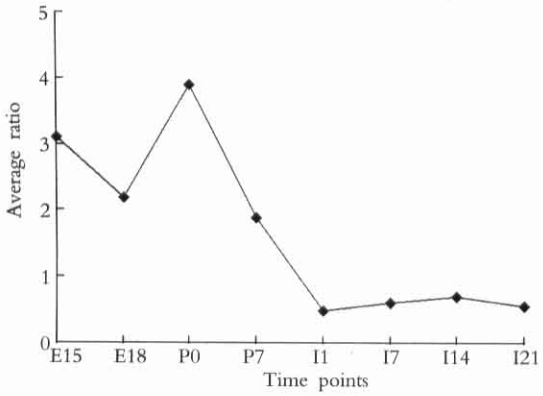


图 4　Blot3981 聚类同组基因平均 Ratio 值变化趋势模式图

Fig 4　The average ratio of genes subgrouped together with Blot3981

3　讨论

分层聚类是基因芯片实验数据最常用的聚类方法，操作简单而结果直观，其聚类的依据是每个基因之间的“相似性”或者“距离”，如果一个基因缺失的时相点数据越多，则这种软件自动计算出来的相似性的误差就会越大[3]。均衡考虑一方面到尽量减少误差另一方面又能同时观察尽可能多的基因的聚类情况，本研究中我们选择在总共 8 个时相点中多于 5 个有效数据的基因作为聚类分析的候选基因。

全部 1 033 个基因的聚类结果，从树型聚类图上可以分成 A、B、C、D、E、F 6 个组。从各组基因的表达模式来看：A 组基因的大体变化趋势是在发育阶段 E15、E18 表达升高，在 P0、P7 表达水平和正常对照水平接近，而在损伤各阶段均高表达。从该表达模式来看，该基因群参与 LGN 早期的发育以及视神经损伤后各期的一些生物学过程。

B 组基因一共 328 个，是 6 个组中数量最多的一个组，该基因群的表达模式和小鼠视神经的第一级投射站—外侧膝状体的发育模式非常类似，即在胚胎后期开始发育，P0 达到高峰，P7 仍然处于继续发育当中，当形态学的发育完成后则这些基因也低表达或者不再表达，由此推测 B 组基因应该是外侧膝状发育最重要的基因群。而且我们在前期工作中已经证实的和轴突生长相关的 6 个基因中，2 个参加聚类的基因（Ptn、Efnb3）全部聚类于这个组中，也从一个侧面证实我们的推测。B 组基因在损伤后均低表达，对该类基因进行进一步的深入研究，可望从中发现一些适合于基因工程治疗脑损伤的靶基因。

C 组基因的变化趋势在发育各阶段均有较高表达，在损伤后的各个时期也有一定程度的高表达，这些基因参与了 LGN 各个时期的发育，也参与了损伤后的病理或者自发性的再生过程。C 组表达模式和 A 组有些类似，但是不同的是，C 组的表达高峰在 P0 – P7，从形态学研究来看，这个时期的形态学变化包括有髓神经纤维出现、GFAP 阳性星形胶质细胞出现、无髓神经纤维增多并且排列更加规则等等，该时期应该是视神经发育最关键的时期，而 A 组的表达高峰在 E15、E18，这个时候的 LGN 的主要变化是神经细胞的增殖、分化以及少量无髓神经纤维的出现，两组基因表达模式不同说明它们在 LGN 的发育和再生中有不同的作用。

D 组基因的表达模式是在发育以及损伤的各个时期均有一定程度的低表达，它们在各个时期低表达的意义尚不清楚。考虑到我们在发育、损伤阶段取材的时间间隔为 3 ~ 7 d，而事实上很多基因的表达只有一个很短时间的峰值，我们所选的时相点也许并不能完全真实的反应这些基因的详尽表达规律。

E 组基因的表达规律是在各个发育时期均为低表达，而在各个损伤时期在均有一定程度的升高。这个基因群是被损伤激活的一个基因群，在损伤的病理以及自发性再生中起重要的作用。

F 组基因的表达表达模式为发育期间的 E15、E18 以及损伤后 I7、I21 表达增高，其它时相点表达降低，其表达模式图和 A 组的表达模式图有些类似，该基因群也是参与 LGN 的早期发育和损伤后某些时期的病理、生理过程。从功能分类来看，在该组 11 个功能已知的基因中，其中 7 个基因（Blot1803、Blot1809、Blot1854、Blot3738、Blot4209、Blot4210、Blot5644）属于物质转运组，2 个（Blot473、Blot2523）属于代谢组，1 个（Blot6883）属于细胞骨架蛋白，1 个（Blot6840）和蛋白质降解相关。可见这个基因群中物质转运、代谢组的基因占有较高的比例，对同组的其它未知功能的基因有一定的提示作用。

和 Blot2520 基因聚在同一个小类的基因有 6 个，该群基因的表达模式都是在 P0 峰值表达。Blot2520 基因的表达产物是一个和肝素高亲和力的肽—Ptn（Pleiotrophin，Ptn），在发育早期广泛表达，有促进血管生成、细胞分化，在中枢神经系统中有促进轴突生长和轴突导向等作用[4,5]。值得重点关注的是，和 Blot2520 聚在同一个组的其它 6 个基因 Mm. 28443、Mm. 9671、Mm. 25504、Mm. 160640、Mm. 182895、Blot7211 均是功能未知的基因，而它们和 Blot2520 的相关性非常高，Pearson 相关系数高达 0. 979 ~ 0. 996（最高为 1）。其中 5 个是已经在 NCBI 的 GenBank 中正式登陆的 EST，这 5 个基因我们暂时作为神经轴突生长相关的候选基因，对这些基因的进一步的研究以阐述它们各自的功能，是否能找到新的能促进轴突生长的新基因，是我们在以后工作中将继续探索的课题。

和 Blot3981 基因（Efnb3）基因聚在同一个小类的基因有 14 个。Efnb3 基因的表达产物是 Eph 家族受体的配体之一，通过一个信号转导途径，可以诱导轴突

生长的方向[6]，其在发育时期的高表达也说明 Eph 途径在视神经的轴突导向方面起重要的作用。同组的14个基因中，和 RNA 加工或者蛋白质合成相关的基因6个、和免疫反应相关的基因3个、和转录调节相关的基因1个、细胞粘附分子1个、有丝分裂相关且 CNS 特异性表达的基因1个、功能不明的基因2个。对这些基因进行进一步的分析时发现：和免疫反应相关的 Blot5194、Blot1300、Blot3954 实际上是同一基因 Ptma 的3个不同的片段，虽然它们和 Blot3981 的 Pearson 相关系数仅为 0.62～0.86，但相互之间的 Pearson 相关系数高达 0.95～0.98；和 RNA 加工相关的 Blot4881、Blot6801 实际上是同一基因 Hnrpa1 的两个不同片段，它们和 Blot3981 的 Pearson 相关系数仅为 0.73，但彼此之间的相关系数高达 0.99，这些数据一方面说明本研究的芯片实验结果具有较高的重复性，同一基因的不同片段的实验结果非常的接近，另外一方面也从侧面说明我们的聚类分析确实能把部分表达相关的基因聚到一起。Efnb3 基因和本组其它基因的相似系数大多数不高，但和 Blot702（laminin receptor 1，lamr1）的 Pearson 相关系数达到 0.96。Lamr1 是层粘连蛋白-1的受体，和细胞粘附相关，能负调控肿瘤细胞的浸润[7,8]。Stuermer 等[9]在研究视网膜节细胞的生长锥的方向诱导时发现，在视盘处的层粘连蛋白-1 和 netrin、beta-integrin 一起，是生长锥停止生长并转变为视神经的重要诱导信号，结合我们的研究，推测 LGN 处的 Lamr1 是正确引导向视神经纤维向 LGN 生长的一个轴突导向因子，这个推论还有待于在体、离体实验的证实。

参考文献：

[1] Murray M. Cellular transplants: steps toward restoration of function in spinal injured animals[J]. Prog Brain Res, 2004, 143: 133－146.

[2] 刘运来，黄明辉，姚忠祥，等. 应用高密度基因芯片筛选中枢神经系统发育和损伤相关基因的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(24)：2218－2222.

[3] Bushel P R, Hamadeh H K, Bennett L, *et al*. Computational selection of distinct class- and subclass-specific gene expression signatures[J]. J Biomed Inform, 2002, 35(3): 160－170.

[4] Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, *et al*. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis[J]. J Neurosci, 2003, 23(16): 6586－6595.

[5] Jin M H, Tanaka S, Sekino Y, *et al*. A novel, brain-specific mouse drebrin: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization[J]. Genomics, 2002, 79(5): 686－692.

[6] Tang X X, Zhao H, Robinson M E, *et al*. Implications of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in human neuroblastoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 10936－10941.

[7] Alper O, Bergmann Leitner E S, Bennett T A, *et al*. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(18): 1375－1384.

[8] Sinha R, Unni E, Ganther H E, *et al*. Methylseleninic acid, a potent growth inhibitor of synchronized mouse mammary epithelial tumor cells *in vitro*[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(3): 311－317.

[9] Stuermer C A, Bastmeyer M. The retinal axon's pathfinding to the optic disk[J]. Prog Neurobiol, 2000, 62(2): 197－214.

（编辑 周 芳）

（上接1847页）

无统计意义（$P>0.05$，秩和检验）。顺铂组消化道反应、肌肉（关节痛）较卡铂组高，有统计意义（$P<0.05$，秩和检验）。其余不良反应如转氨酶异常、口腔炎/恶心呕吐、腹泻、尿素氮异常、蛋白尿、脱发、心电图异常及周围神经毒性均相近（$P>0.05$，秩和检验）。

3 讨论

临床研究结果显示，紫杉醇作为治疗 NSCLC 最有效的药物之一，其作用机制通过干扰微管系统，阻止肿瘤细胞的有丝分裂[1]。临床使用多与铂剂联合以取得协同作用[2,4]。卡铂作为第2代铂类抗癌药，与顺铂相比它具有肝、肾、神经毒性低，胃肠道反应轻等优点。含卡铂的联合化疗方案与含顺铂者相比，前者虽然有效率稍低，但生存期较长，毒性较低[5]。本组资料表明2组化疗有效率顺铂组（35.3%）高于卡铂组（32.3%），2组化疗有效率稍低于文献[6]报道。1年生存率卡铂组（35.5%）好于顺铂组（35.3%），两者无统计学意义；卡铂组中位生存期（11.4个月）优于顺铂组（9.5个月），有显著差异。对于晚期 NSCLC 而言，TAX＋CBP 方案、TAX＋DDP 方案均可作为一线方案使用；卡铂组患者耐受性好，消化道反应轻，更适于老年人及消化道反应重的病人。

关键词：NSCLN；化疗；紫杉醇；卡铂；顺铂

中图法分类号：R979.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Bunn P A Jr, Soriano A F. Chemotherapeutic options in lung cancer[J]. Cancer, 1998, 83(Suppl 8): 1740－1750.

[2] Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials[J]. BMJ, 1995, 311(7010): 899－909.

[3] 孙 燕. 内科肿瘤学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 430－431.

[4] Klastersky J, Scalier J P. Dose-finding study of paclitaxel (Taxol) plus cisplatin in patients with non-small cell lung cancer. European Lung Cancer Working Party[J]. Lung Cancer, 1995, 12(Suppl 2): S117－S125.

[5] Schiller J H, Harrington D, Belani C P, *et al*. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer[J]. New Engl J Med, 2002, 346(2): 92－98.

[6] Chen Y M, Peng R P, Lee Y C, *et al*. Paclitaxel plus carboplatin, compared with paclitaxel plus gemcitabine, shows similar efficacy while more cost-effective: a randomized phase II study of combination chemotherapy against inoperable non-small-cell lung cancer previously untreated[J]. Ann Oncol, 2002, 13(1): 108－115.

（编辑 龙 亮）