维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0526-05

化疗前后肺癌患者外周循环癌细胞数的动态观察

王 梅[1],葛明建[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院胸外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:本实验观察 32 例肺癌患者化疗前后外周循环癌细胞数(CTCs)的动态变化,以寻找新化疗的疗效评判标准。方法:分别于化疗前及化疗 1 周期后、第 3 周收集 32 例肺癌患者外周血标本。同时行胸片或胸部 CT 扫描,并计算肿瘤的大小。运用实时荧光定量逆录 - 聚合酶链反应(fqRT-PCR)法定量检测外周血中 CK19 基因的表达。结果:化疗后 CTCs 水平显著降低(P=0.000 1)。化疗前小细胞肺癌(Small cell lung cancer,SCLC)患者外周血 CK19 mRNA 水平明显高于非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)患者(P=0.041)。治疗前后 CK19 mRNA 测值变化与瘤负荷间存在正相关(P=0.000)。结论:在治疗过程中,运用 fqRT-PCR 法对肺癌患者 CTCs 进行定量监测是可行的。通过动态检测可及时评价化疗反应,有助于在早期阶段即对患者设计更合理、更有针对性的治疗方案。

【关键词】肺肿瘤;聚合酶链反应;细胞角蛋白;信使 RNA;化学治疗

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-18

Observation of circulating tumor cells in patients with lung carcinoma by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after chemotherapy

Wang Mei, et al

(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: In order to develop a new standard of curative effect, this study was designed to track the number of CTCs in patients with lung cancer during chemotherapy. *Methods*: Samples of peripheral blood was taken from each lung cancer patients(n=32) on the day before chemotherapy as well as the third week after the chemotherapy cycle. The samples were subjected to real-time fqRT-PCR. Meanwhile the tumour size was determined by chest X-ray or computed tomograghy. *Results*: Compared to that of pre-chemotherapy, the expression level of CK19 in the patients significantly declined after chemotherapy(t=4.659, P=0.000 1). The level of CK19 mRNA in patients with SCLC was higher than that of patients with NSCLC(t=1.944, P=0.041). The change of CK19 mRNA correlated well with the type during the treatment. Relatively the shift of SCLC is more obvious(t=6.073, P=0.000 1). *Conclusions*: The real-time fluorescent quantitative-PCR approach is useful for measuring the relative number of CTCs in a patients' peripheral blood to monitor the effectiveness of treatment, and for designing more comprehensive and reasonable therapeutic regimes at earlier dates for patients.

【Key words】 Lung neoplasm; Polymerase chain reaction; Cytokeratin; Messenger RNA; Chemotherapy

由于 CK19 在肺癌细胞中呈高度表达,同时又不存在于造血组织中,因此,可以通过检测非上皮组织中有否角蛋白存在来判断这些组织中是否存在肺癌细胞[1]。本实验以 CK19 作为检测标志物,以观察化疗期间肺癌患者 CTCs 数量的动态变化,以寻找新的化疗疗效评判标准,并分析其临床相关性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

经病人同意后,分别于化疗开始前及化疗周期结束后第 3 周收集外周血标本各 5ml。采集标本的同时对病人行胸片或胸部 CT 扫描,并根据检查结果计算肿瘤最大径及垂直径的乘积(cm^2)。对照组(n=20)外周血标本来自健康体检者。

所有患者均为初诊并接受第 1 周期化疗。其中 SCLC 病人的化疗方案为:鬼臼乙甙 100mg/(m^2·d),第 1~3d;顺铂 50 mg/(m^2·d),第 1d。NSCLC 病人的化疗方案为:丝裂霉素 10

作者介绍:王 梅(1970-),女,主管技师,
研究方向:分子生物学和临床生物化学。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助(合同号:00-2004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

mg/(m^2·d),第 1d 和第 8d;长春酰胺 3mg/(m^2·d),第 1d;顺铂 80mg/(m^2·d),第 1d。

32 例患者均经病理检查证实诊断。其中 SCLC 8 例,NSCLC 24 例,分期方法包括胸片、支气管镜、胸部 CT、超声检查、骨扫描及活检术(如转移淋巴结活检)等。Ⅲ期 6 例,Ⅳ期 16 例各病例的临床病理特征见表 1。

1.2 实验过程

1.2.1 提取 RNA 首先运用人淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂)分离外周血单个核细胞(PBMNs)。按 Trizol Reagent 的说明提取 PBMNs 中的总 RNA。通过测定 A_{260} 计算 RNA 的浓度,A_{260}/A_{280} 的比值判定 RNA 纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 合成 CDNA 总 RNA 在 70℃中孵育 5min。逆转录反应在 18μl 1×RT 缓冲液[50mmol/L Tris-HCl(pH8.3),75 mmol/L KCl 及 3mmol/L $MgCl_2$]中完成,同时加入 0.5mmol/L dNTP,1μlRNasin 及 200U MMLV 逆转录酶 (Promega),合成条件为 37℃ 30min。

1.2.3 引物与探针 运用 Primer Express 软件来设计合适的

表 1 32 例肺癌患者临床病理特征及化疗前后外周血中 CK19 mRNA 的表达

病人	性别 / 年龄	类别	分期	肿瘤的大小(cm^2)		CK19 mRNA*	
				化疗前	化疗后	化疗前	化疗后
1#	男 /54	腺癌	Ⅱ	8.4	1.6	6.03	4.26
2#	男 /59	小细胞癌	Ⅳ	19.8	9.6	5.19	4.05
3#	女 /48	小细胞癌	Ⅳ	5.2	3.4	5.61	4.09
4#	男 62	鳞癌	Ⅲ	10.1	9.8	4.04	4.40
5#	男 /63	腺癌	Ⅳ	35.3	26.7	4.23	3.81
6#	男 /67	小细胞癌	Ⅲ	34.4	15.8	4.86	2.28
7#	男 /68	鳞癌	Ⅱ	5.2	3.4	4.22	3.40
8#	男 /60	鳞癌	Ⅲ	8.3	6.4	3.51	4.30
9#	男 /53	腺癌	Ⅳ	5.1	5.0	3.62	3.78
10#	男 /58	腺癌	Ⅳ	9.3	8.7	3.55	3.50
11#	男 /45	腺癌	Ⅱ	19.6	12.6	4.60	3.89
12#	男 63	鳞癌	Ⅲ	22.5	10.4	6.15	4.75
13#	男 /62	鳞癌	Ⅳ	14.4	8.7	3.31	3.29
14#	男 /49	鳞癌	Ⅲ	36.1	33.2	3.93	3.73
15#	女 /54	腺癌	Ⅳ	42.6	33.6	5.90	4.74
16#	女 /47	小细胞癌	Ⅳ	10.5	0.0	5.72	3.29
17#	男 /52	鳞癌	Ⅲ	19.3	18.0	6.78	5.71
18#	男 /62	鳞癌	Ⅲ	3.6	3.4	4.12	4.71
19#	男 /39	小细胞癌	Ⅲ	60.8	11.9	5.99	3.98
20#	男 /33	鳞癌	Ⅳ	16.5	17.2	5.06	5.08
21#	女 /50	鳞癌	Ⅳ	10.9	11.8	4.64	4.26
22#	男 /60	小细胞癌	Ⅲ	7.3	0.0	4.94	2.86
23#	男 /56	鳞癌	Ⅲ	10.9	12.5	5.06	5.02
24#	女 /66	鳞癌	Ⅳ	7.8	3.1	5.14	3.99
25#	女 /45	鳞癌	Ⅳ	15.1	13.9	4.25	4.16
26#	男 /62	鳞癌	Ⅳ	2.97	2.32	3.44	3.57
27#	男 /61	鳞癌	Ⅱ	3.6	2.9	3.65	3.85
28#	男 63	小细胞癌	Ⅱ	11.9	2.9	5.41	3.30
29#	男 /47	小细胞癌	Ⅱ	17.5	6.3	4.55	3.29
30#	男 /66	腺癌	Ⅳ	13.2	11.3	4.44	3.70
31#	男 /61	腺癌	Ⅳ	8.4	8.7	6.10	6.05
32#	男 /60	腺癌	Ⅳ	9.6	5.1	3.86	3.73

维普资讯 http://www.cqvip.com

Taqman 引物和探针。CK19 引物的序列为：上游引物(5'→3')GCAGAACCGGAAGGATGCT；下游引物(5'→3')TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC。产物长度为 202bp。Taqman 探针的 5'端被报告基团 FAM(发光波长为 518nm)标记，而 3'端被磷酸化以防止 PCR 过程其自身序列的延伸。探针的序列为 5'-TGGTTCACCAGCCGGACTGAA-3'。选择引物探针时注意引物跨越内含子－外显子交界处，以避免扩增序列高度同源的 CK19 假基因。引物和探针均由上海生物工程有限公司合成。

1.2.4 Taqman PCR 反应 PCR 反应在以下反应体系中完成：43μl PCR 反应缓冲液[10mMTris-HCl(pH8.4)，50mmol/L KCl 及 1.5mmol/L $MgCl_2$]，0.2mmol/L dNTP，5μlCDNA，2U Taq DNA 聚合酶(Promega)，上、下游引物各 0.4μmol，首先在 95℃水平预变性 5min，然后按以下反应条件完成 35 个循环：95℃ 30s，62℃ 20s，72℃ 20s。最后在 72℃下延伸 10min 结束反应。在每一批 PCR 反应中设立阳性对照(提自 LC-5 细胞的 RNA)及阴性对照(水)。所有反应均在 ABI Prism 7000 序列检测系统上完成。根据所获得的标准曲线，得到各检测标本的起始浓度(基因拷贝数/ml)。实验数据均以每毫升血清中 CK19mRNA 拷贝数的常用对数表示。所有反应均在 ABI Prism 7000 序列检测系统中完成。

1.2.5 LC-5 细胞连续稀释试验 用 Trypsin-EDTA(Sigma)收集单层培养的 LC-5 细胞，用冷 PBS 洗涤并混悬。用计数池测定细胞的密度，以台盼蓝(*Sigma*)染色评价细胞的活力。调整细胞的密度至 2ml DEPC 处理水中含 10^6 个细胞。为了模仿肺癌病人外周循环中癌细胞存在的情况，分别从健康志愿者外周血 10^7 个 PBMNs 和 10^6 个 LC-5 细胞中提取 RNA，将提取自正常人 10^6 个 PBMNs 中的 RNA 分别与提取自 1、10、10^2、10^3、10^4 和 10^5 个 LC-5 细胞的 RNA 相混合。对阴性对照，则只以提自 10^6 个 PBMNs 的 RNA 为检测对象。运用 fqRT-PCR 法分别检测以上 RNA 混合物的起始基因拷贝数，并以此建立标准曲线和 ROC 曲线。每个浓度的标本均重复测定 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件包分析结果。包括配对样本 t 检验、独立样本 t 检验及两变量相关性分析等，以 $P<0.05$ 为差异显著性标准。

2 结 果

2.1 CK19 诊断实验的评估

为了准确评定本方法检测 CTCs 的价值，我们运用 SPSS 10.0 for windows 统计软件建立了受试者工作特征(Receiver operator charicteristic，ROC)曲线。它是以方法的灵敏度(Sensitivity)为横坐标，1-特异性(1-Specificity)为纵坐标建立的曲线。通过测定曲线下的面积(Area under curve)来确定诊断方法的准确性(Accuracy)。本实验方法的曲线下面积为 0.965(95%CI：0.916~1.014)(图 1)。将健康对照组均值的 95%可信区间的上界($\bar{x}+1.96s$)作为本诊断实验的分界值(Cut-off Value)，其值为 4.120。在此分界值条件下，本诊断实验的灵敏度为 90%，特异度为 84%。通过比较批间和批内不同浓度标准品的 Ct 值来评估检测方法的重复性，批间和批内 Ct 值的变异系数(CV)分别为6.5%和 2.2%。图 2 及图 3 分别显示标准曲线及扩增曲线。

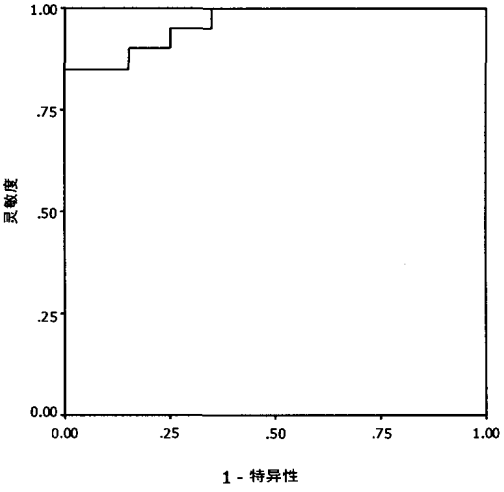


图 1 CK19 诊断实验的 ROC 曲线

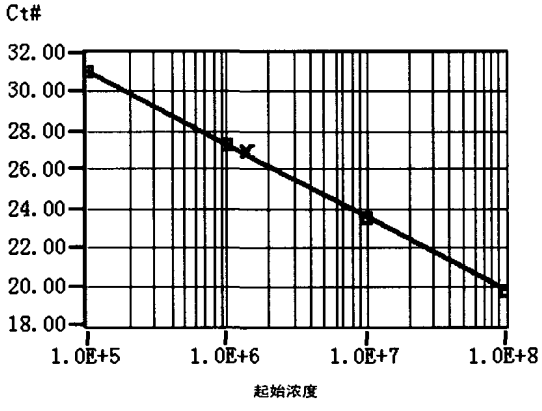


图 2 CK19 诊断实验的标准曲线

2.2 化疗前后外周血 CK19 mRNA 水平变化

与化疗前相比，化疗后 32 例肺癌患者外周血 CK19 mRNA 水平显著降低(4.732±0.969 与 3.986±0.830，t=4.659，P=0.000 1，配对样本 t 检验，见表 1)。

2.3 化疗前后外周血中 CK19 mRNA 水平与临床病理参数间的关系

化疗前，SCLC 患者外周血 CK19 mRNA 水平明显高于 NSCLC 患者(4.548±1.026 与 5.285±0.488，t=-1.944，P=0.041，独立样本 t 检验)(图 4)。然而，

维普资讯 http://www.cqvip.com

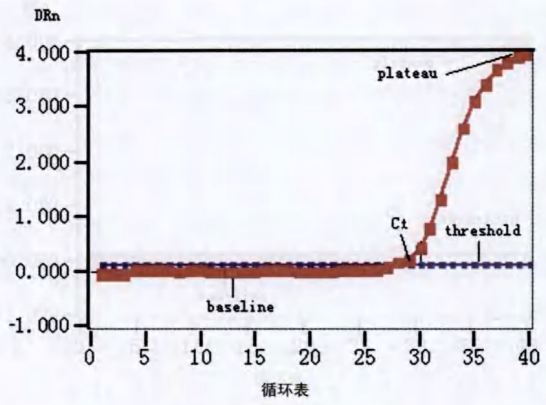


图 3 CK19 诊断实验的扩增曲线

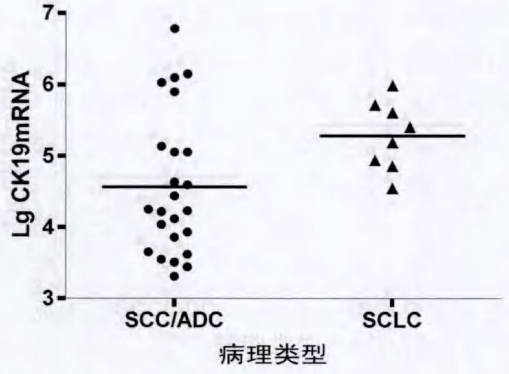


图 4 SCLC 与 NSCLC 治疗前外周血 CK19 mRNA 水平比较

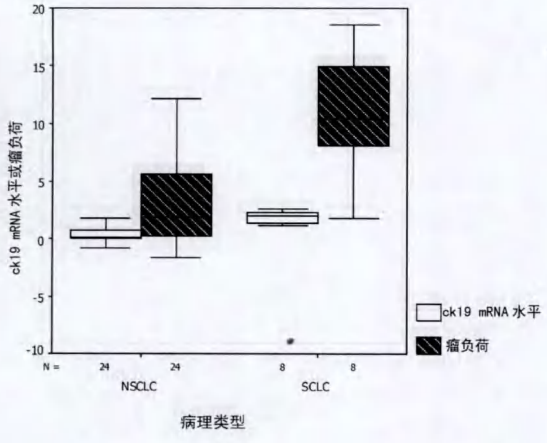


图 5 SCLC 与 NSCLC 治疗前后外周血 CK19 mRNA 水平及瘤负荷改变的情况

治疗前 CK19 mRNA 水平与肿瘤分期、患者性别及年龄等无关（$P>0.05$）。

化疗前后 CK19 mRNA 测值改变与病变的组织类型密切关系，SCLC 治疗前后的改变较 NSCLC 更为明显（1.892 与 0.363，$t=6.073$，$P=0.000\ 1$，独立样本 t 检验）。治疗前后 CK19 mRNA 测值变化与肿瘤分期、患者性别及年龄等无关（$P>0.05$），但与瘤负荷间存在正相关（$r=0.593$，$P=0.000\ 1$，两变量相关性分析）。此外，化疗后肿瘤大小的改变也与组织类型（NSCLC 与 SCLC）有显著关系（3.052 5 与 14.687 5，$t=3.686$，$P=0.001$，独立样本 t 检验）。图 5 显示不同组织类型肺癌化疗前后 CK19 mRNA 水平及瘤负荷改变情况。

2.4 化疗前后 CK19 mRNA 阳性率比较

以健康对照组外周血 CK19mRNA 均值（3.664 7）的 95%可信区间的上限值（4.120）为分界值，测值＞4.120 为阳性，本组病例化疗前 CK19 mRNA 阳性率为 71.9%（23/32），化疗后为 37.5%（12/32），有 11 例患者经首次化疗后外周血中 CK19 mRNA 表达转阴。在 TNM 分期为Ⅳ期的 16 例患者中有 11 例为 CK19mRNA 阳性（68.8%），16 例Ⅱ/Ⅲ期患者中有 12 例为阳性（75%）。

3 讨 论

微小转移（Micrometastasis）是指恶性肿瘤在发展过程中，播散并存活于血循环、淋巴道、骨髓及各组织器官中的肿瘤细胞，此时它们尚未形成转移结节，无任何临床表现，常规检查方法如影像、常规病理检查等难以发现。在血循环、骨髓以及淋巴结中存在癌细胞，提示肿瘤已经不再局限于原发灶，有发展为远处转移瘤的可能，预后不良[1-3]。研究表明，不少患者在首次治疗前就已经存在微转移，这些微小病灶的结局如何，取决于癌细胞的生物学特性、机体的免疫状况及宿主器官的微环境[4,5]。因此，检测是否存在肿瘤微小转移对肿瘤患者预后的判断及指导治疗方案的选择都具有重要意义[6,7]。

进入血循环的绝大多数癌细胞都将被机械的、免疫的或是一些不明机制所消灭。然而，在整个病程中不发生转移的肿瘤却很少，转移是恶性肿瘤患者的主要死因。由于外科手术技术的完善以及肿瘤局部治疗措施（如放疗）疗效的不断提高，如今癌症治疗的主要失败原因为远处转移。这就要求我们努力寻找有效的全身性辅助治疗手段。而在此之前，我们需要确定哪些病人能从这些辅助治疗中获益[8]。

能定量检测 CTCs 的数量或标志物基因表达水平的精细变化代表了一个里程碑。与现有的其它定量 PCR 方法相比，实时 PCR 法有一些明显的优点。

维普资讯 http://www.cqvip.com

由于传统的 RT-PCR 法最多只能达到半定量的程度,因此它很难区分正常组织中靶基因的基础表达水平与癌相关组织中增高的表达水平,从而导致假阳性的产生。本实验运用 fqRT-PCR 法来检测外周血中 CTCs,以便为动态监测疾病、观察化疗疗效等创造条件。

本研究结果发现,与化疗前相比,化疗后肺癌患者外周血 CK19 mRNA 水平显著降低(P=0.000 1),这可能是化疗减少原发灶癌细胞入血或直接杀灭 CTCs 的结果。化疗前 SCLC 患者外周血CK19 mRNA 水平高于 NSCLC 患者(P=0.041),经一个周期的化疗后,SCLC 患者 CK19 mRNA 水平改变更明显,减少幅度更显著(P=0.000 1)。这提示,与 NSCLC 相比,SCLC 对化疗更敏感。传统的实体瘤疗效评定标准是比较治疗前后瘤体大小的变化情况,属宏观标准。但在疗效评价上除了临床及 X 线标准以外,最好能得到微观标准(如细胞学)的证实。本实验结果表明,化疗前后外周血 CK19 mRNA 水平变化与肿瘤大小改变间存在正相关,提示化疗过程中动态监测 CTCs 可作为一种新的疗效评定标准。与传统标准相比,新的标准显示出更大的优越性。如在传统标准无法评定治疗措施的疗效时(如接受术后化疗的患者),新的标准就具有独到的优越性。

我们还发现 CTCs 的存在与传统 TNM 分期无关。为何 16 例Ⅳ期病人中不是所有而是 11 例为阳性? 这种现象可能是由于癌细胞被间断释放入血所导致。它可以通过多点采样即在不同的时间点收集多个标本的方法来解决。假阴性结果也可以出现于其它情况如治疗后靶基因的表达下调或进入血循环的细胞或细胞群由于分化低而不能表达待测的组织特异性标志物。运用检测多种标志物的方法可以克服这种假阴性。另一方面,本研究还发现 16 例Ⅱ/Ⅲ期患者中竟有 12 例存在 CTCs! 我们认为不少实体瘤患者在病程的早期阶段即可出现癌细胞的全身播散,在临床决策的时候应将它作为一个重要的相关因素来考虑。UICC 已经在其新的分期系统中将游离癌细胞(Isolated tumour cells)纳入 M 分期中,若有游离癌细胞存在,则归为 Mi。机体内存在有活力的播散癌细胞的患者是不能单靠手术来获得"根治"的,需要接受全身性辅助治疗[9]。

动态监测 CTCs 可用于肿瘤治疗的长期观察。近年来,由于定量检测方法(如 FQ-PCR)的出现,使得定量监测外周血中癌细胞的数量变化更加准确,从而使这方面的研究发展很快[10]。与肉眼可见的临床转移病灶不同,由于药物大分子和免疫效应细胞可以作用于这些播散的游离癌细胞,因此它们是静脉给药的治疗靶点。但因为大多数微转移细胞处于非增殖态(G_0 期),常规的针对增殖细胞的化疗药物对它们效果很差,这也可以部分解释为何临床上化疗效果不满意。因此一些可以作用于休眠态细胞的辅助治疗措施如免疫治疗就显得很重要了[11]。

本研究提示,在肿瘤治疗过程中对 CTCs 进行定量监测是可行的。虽然,癌细胞间 CK19 基因的表达水平不同,高水平表达的病人外周血中并不一定有比低水平表达病人更多的癌细胞,但是,实时荧光定量 PCR 方法在检测外周血中 CTCs 的相对数量以监测治疗疗效方面是有价值的。虽然本实验的样本数有限,但我们仍然发现治疗过程中 CTCs 的相对数量与肿瘤负荷及治疗反应间存在相关性。通过动态检测化疗过程中患者 CTCs 的数量改变可及时评价化疗反应,它有助于在早期阶段即对患者设计合理、更有针对性的治疗方案[12]。今后,需要开展大规模的前瞻性研究来确定是否外周血中存在 CTCs 具有预后价值,以及这个病人群体是否能从全身性辅助治疗中受益。

参 考 文 献

[1] Osaki T,Oyama T,Gu CD,et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage Ⅰ non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol,2002;20(13):2930-2936.

[2] Osaki T,Oyama T,Inoue M,et al. Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lug cancer. Prognostic implications [J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg,2001;49(9):545-551.

[3] Gu CD,Osaki T,Oyama T,et al. Detection of micrometastatic tumor in PNo lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer:impact on recurrence and survival[J]. Ann Surg,2002;235(1):133-139.

[4] Ge MJ,Wu QC,Wang M,et al. Detection of disseminated lung cancer cells in regional lymph nodes by assay of CK(19) reverse transcriptase polymerase chain reaction and its clinical significance[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2005;131:662-668.

[5] Aerts J,Wynendaele W,Paridaens R,et al. A real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood[J]. Ann Oncol,2001;12(1):39-46.

[6] Godfrey TE,Raja S,Finkelstein SD,et al. Prognostic value of

(下转第 535 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

尽量避免选用花粉量大、抗原性强、致敏率高和播散范围广的植物，制定出符合当地需要的最佳绿化方案，减少花粉症的发生率。

虽然引起变应性鼻炎的变应原以吸入性为主，但本研究发现食入性变应原皮试阳性率也较高，以海鱼(62.47%)、海虾(60.43%)为多见，说明食物变应原也是不容忽视的变应原，患者在检测出此类变应原后，应改变饮食习惯，尽量避免食用此类食物。

洪苏玲等[11]在 1991 年、1993 年、1996 年对重庆市鼻变态反应患者进行吸入性变应原皮肤试验，结果显示阳性程度最高的依次为室尘、螨、早春花粉、蟑螂、多价霉菌及旧棉絮。而本次调查的皮试阳性率依次为室尘、螨、早春花粉、晚春花粉、夏秋花粉、烟草、蟑螂、多价羽毛、多价兽毛、多价霉菌、旧棉絮。可见，重庆地区变应性鼻炎患者变应原谱近年有一些改变，变应原皮试阳性率也有逐年增加的趋势。室尘、螨、花粉始终是重庆地区最重要的变应原，这与本地区气候和空气污染严重有关。烟草、多价羽毛、多价兽毛阳性率增高与吸烟人群增加及家庭养宠物增加有关，吸烟可损害气道上皮致白三烯释放引起气道非特异性炎症，而且妇女在怀孕期或哺乳期接触烟草可显著增加小孩患变应性疾病的危险性。许多动物的分泌物中都存在着具有强变应原特性的蛋白质，在空气中漂浮时间很长，可导致严重的过敏反应，以猫、狗多见，故对宠物过敏患者，建议放弃宠物，并彻底清洗室内物品。调查结果显示，蟑螂(55.28%)和霉菌(51.63%)仍是重庆地区常见的变应原，这是由于重庆独特的地理状况所形成的气温及湿度等气候条件，有利于蟑螂和霉菌的生长繁殖。

重庆地区变应性鼻炎患者吸入性变应原皮肤点刺阳性率以室尘和螨最高，其次为春季花粉和夏秋花粉，且在不同年龄组及不同性别均表现一致。本研究在一定程度上反映了近年重庆地区人群的变应原分布特征，为本地区变应性疾病的防治提供了流行病学资料和临床依据。

参 考 文 献

[1] Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001; 108(5S): 147-334.

[2] Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998; 102(4 Pt 1): 558-562.

[3] 叶世泰，张庆松. 实用变态反应学[M]. 北京：人民卫生出版社，1987. 63.

[4] 王德云. 应重视对变应性鼻炎的研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2005; 40(3): 163-165.

[5] 洪苏玲，黄江菊，白 燕. 重庆地区气传致敏花粉调查[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2001; 15(12): 558-560.

[6] 王成硕，张 罗，韩德民，等. 北京地区变应性鼻炎患者吸入变应原谱分析[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2006; 20(5): 204-207.

[7] 阮 岩，李 笋，杨占军，等. 广州地区变应性鼻炎患者常见变应原调查分析[J]. 实用中西医结合临床，2006; 6(3): 46-47.

[8] 孙臻峰，孟睛虹，董 频. 上海地区过敏性鼻炎和支气管哮喘患者致敏原比较[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报，2006; 20(3): 223-224.

[9] 开月梅，石兰萍，张 杨. 深圳地区变应性鼻炎变应原分析[J]. 中国基层医药，2006; 13(2): 272-273.

[10] 邓景宏，蒋 萍，陶家驹. 天津地区过敏性疾病常见吸入过敏原调查分析[J]. 中国现代实用医学杂志，2005; 4(5): 92-93.

[11] 洪苏玲，王丽洪，黄江菊. 鼻变态反应专科门诊病人情况调查[J]. 重庆医学，1998; 27(5): 332-334.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 530 页)

quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in lymph node-negative esophageal cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2001; 7(12): 4041-4048.

[7] Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, et al. Real-time rapid reverse transcriptase-polymerase chain reaction for intraoperation diagnosis of lymph node micrometastasis: clinical appilication for cervical lymph node dissection in esophageal cancer[J]. Surgery, 2002; 132(1): 34-40.

[8] Curry BJ, Myers K, Hersey P. Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma[J]. J Clin Oncol, 1998; 16(5): 1760-1769.

[9] Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, et al. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer[J]. Cancer Res, 2000; 60(24): 6836-6840.

[10] Wong IH, Lau WY, Leung T, et al. Hematogenous dissemination of hepatocytes and tumor cells after surgical resection of hepatocellular carcinoma: a quantitative analysis[J]. Clin Cancer Res, 1999; 5(12): 4021-4027.

[11] Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease[J]. J Natl Cancer Inst, 1999; 91(13): 1113-1124.

[12] Peck K, Sher YP, Shih JY, et al .PC.Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1998; 58(13): 2761-2765.

(责任编辑：谭乐勤)