

Dukes A、B 期大肠癌淋巴结微转移的检测及其对预后的影响

汤睿¹, 王兵¹, 唐思聪¹, 刘炳亚², 朱正纲²

(1. 上海第二医科大学附属第九人民医院普外科, 上海 200011;

2. 上海第二医科大学附属瑞金医院普外科, 上海消化外科研究所, 上海 200025)

[摘要] 目的:探讨 Dukes A、B 期大肠癌淋巴结微转移的检测和淋巴结微转移对预后的影响。方法:于前瞻性研究 31 例行根治性手术的 Dukes A、B 期大肠癌病人,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测所清除的 398 枚淋巴结中细胞角蛋白(cytokeratin,CK)20 mRNA 的表达以检出微转移;经 5 年以上的随访,探讨淋巴结微转移对预后的影响和术后复发的可能原因。结果:在 31 例 Dukes A、B 期大肠癌病人的 398 枚淋巴结中,有 15 例(48.39%)共 46 枚(11.56%)淋巴结检出微转移。单因素分析提示微转移的淋巴结数量、位置及肿瘤生长方式与术后复发有关;Logistic 多元回归模型提示,3 枚以上淋巴结发生微转移与复发紧密联系。结论:CK20 RT-PCR 是检测 Dukes A、B 期大肠癌淋巴结微转移灵敏而特异的方法。3 枚以上淋巴结发现微转移是预示复发的独立因素。

关键词:结肠直肠肿瘤; 肿瘤转移; 预后; 病理学,临床

中图分类号:R735.3*4 文献标识码:A 文章编号:1007-9610(2005)05-0445-06

Detection of lymph node micrometastasis in Dukes A and B colorectal cancer patients and its prognostic significance TANG Rui¹, WANG Bing¹, TANG Si-cong¹, LIU Bing-ya², ZHU Zheng-gang². 1. Department of General Surgery, Shanghai Ninth Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China; 2. Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

[Abstract] Objective To study the detection of lymph node micrometastasis in Dukes A and B colorectal cancer patients and its prognostic significance in these patients. **Methods** In a prospective study, 398 lymph nodes obtained from 31 cases of Dukes A and B colorectal cancer going curative operation were examined, using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to detect cytokeratin 20 (CK20) mRNA expression for identifying micrometastasis. After more than 5 years of follow-up, the prognostic value of lymph nodes micrometastasis and the possible cause of postoperative recurrence were explored. **Results** Micrometastasis was detected in 46 lymph nodes (11.56%, 46/398) of 15 cases (48.39%, 15/31). Univariate analysis showed the number and location of the lymph nodes with micrometastasis and the growth pattern of the tumor were closely related with post-operative recurrence. Logistic regression model indicated that findings of more than 3 lymph nodes with micrometastasis predicted recurrence. **Conclusions** CK20 RT-PCR assay is a sensitive and specific method to detect lymph node micrometastasis in the patients with Dukes A and B colorectal cancer. Findings of more than 3 lymph nodes with micrometastasis is an independent predictor for post-operative recurrence in the patients.

Key words: Colorectal neoplasms; Neoplasms metastases, Lymphatic; Micrometastasis; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR); Prognosis

淋巴结转移状况是判断大肠癌病人预后和指导术后化疗的重要指标^[1,2]。常规的病理组织学检查在敏感性等许多方面存在不足,近年通过连续切片、免疫组化和逆转录聚合酶链反应(PT-RCR)等方法均可在部分苏木精-伊红(HE)染色阴性的淋巴结中检出微小转移^[1]。笔者既往也曾应用 RT-PCR 法进行大肠癌淋巴结转移的检测,结果发现 RT-

PCR 法检出淋巴结转移的敏感性高于 HE 染色,并能检出 HE 阴性淋巴结中的微转移灶^[3]。Dukes A、B 期是指 HE 检查未发现淋巴结转移者,预后相对较好,但其中仍有 10%~25%的病人在术后 5 年内出现复发^[2]。因此本研究针对 Dukes A、B 期病人,仍采用 RT-PCR 法检测淋巴结微转移,并探讨淋巴结微转移的发生对预后的影响。

材料与方法

一、病例资料和标本采集

前瞻性研究。所有病例均为 1999 年 1~12 月入我院普外科,实验终止于 2004 年 12 月。入组条件:①行根治性手术的大肠癌病人,经术后常规病理检查分期为 Dukes A、B 期;②术前无放、化疗史。术后定期检查随访,随访期均超过 5 年,排除失访者和因其他病因导致死亡的病例。至实验终止共收集 31 例病人。术后总随访期为 60~70 个月,期间记录病人的复发情况,死亡病人的生存期为手术至肿瘤转移复发死亡的时间,存活病人的生存期为手术至研究终止的实际时间。31 例大肠癌病人中男 17 例,女 14 例;年龄 32~80 岁,平均(60.2±13.7)岁。结肠癌 18 例,直肠癌 13 例;Dukes A 期 5 例,Dukes B 期 26 例;肿瘤超过肠腔周径 1/2 者 11 例,未超过者 20 例;肿瘤呈膨胀型生长 14 例,浸润型生长 17 例;病理检查分化好 5 例,中等分化 18 例,分化差 8 例。

手术切除的标本立即分离淋巴结并取一小块肿瘤组织,每枚淋巴结纵行切开,一半做常规病理切片 HE 染色,另一半与肿瘤组织液氮冻存直至 RNA 抽提。淋巴结总数为 398 枚,平均每例病人(14.7±6.3)枚。此外,取 2 例良性胃肠道病变的 15 枚淋巴结(1 例胃溃疡病人 10 枚,1 例直肠腺瘤病人 5 枚)作为阴性对照;取 2 例 Dukes C 期大肠癌病人的 8 枚 HE 染色阳性淋巴结作为阳性对照。

二、RT-PCR 检测方法

本实验采用 RT-PCR 法定性检测淋巴结中细胞角蛋白(CK)20 mRNA 的表达,同时选择管家基因 GAPDH 作为内参证明抽提 RNA 的完整性。

Trizol 试剂(华舜公司产品)抽提组织总 RNA(具体步骤详见操作手册),取部分 RNA 样品稀释后测光密度(OD)值,OD260/OD280 为 1.8~2.0,并换算浓度。采用 Access RT-PCR 试剂盒(Promega),逆转录和 PCR 在同一试管、单一缓冲液中完成。每个 RNA 样品分别用 CK20 和 GAPDH 引物进行 RT-PCR 反应。反应体系 25 μl,含 5×缓冲液 5 μl(终浓度为 1×),dNTP 0.5 μl(终浓度 0.2 mM),上游和下游引物各 0.5 μl(终浓度 1 μM),25 mM MgSO₄ 1 μl(终浓度 1 mM),AMV 逆转录酶、Tfl DNA 合成酶各 0.5 μl(终浓度 0.1 M/μl)和 1 μg 总 RNA。加样完成后,轻微振荡混匀,放入 PTC-100™ 热循环仪(MJ Research)。首先 48℃、45 min 进行逆

转录(cDNA 第 1 链合成),然后 94℃、2 min 使 AMV 酶失活并使 RNA/cDNA/引物变性,以后按以下条件合成 cDNA 第 2 链和进行 PCR 扩增。CK20 引物存在时反应条件为 94℃ 1 min、62℃ 2 min、68℃ 2 min 共 40 次循环;GAPDH 引物存在时为 94℃ 1 min、63℃ 1 min、68℃ 2 min 共 30 次循环,最后 68℃ 7 min。引物序列如下:CK20,正义:5'-CAG ACA CAC GGT GAA CTA TGG-3',反义:5'-GAT CAG CTT CCA CTG TTA GAC G-3';GAPDH,正义:5'-ATG GCA CCG TCA AGG CTG AG-3',反义:5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT-3'。扩增终产物长度分别为 370 bp 和 626 bp。同时用不加 RNA 的反应体系进行 PCR 扩增作为空白对照;不加 AMV 逆转录酶进行 PCR 扩增排除基因组 DNA 的污染。

取 10 μl RT-PCR 产物在含 0.5 μl/ml 溴乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳后的凝胶由 Fluoro-S MultiImage 全自动图像分析仪(BIO RAD)扫描并打印成像。PCR 产物应用 ABI PTISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS (Perkin Elmer),采用 ABI PTISM™ 377XL DNA 测序仪检测序列。

三、统计方法

大肠癌病人发生淋巴结微转移与各临床病理因素的相关性分析采用 Fish 确切概率法。生存率的计算采用 Kaplan-Meier 法,Log-rank 检验比较不同组的生存率。各因素与复发的危险度单因素分析采用 Mantel-Haenszel 法,多因素分析采用 Logistic 回归模型。所有统计计算由 SAS 软件(v6.12)完成。

结 果

一、样本检测结果

1. 肿瘤、对照样本:31 例大肠癌病人的肿瘤组织和 2 例良性胃肠道疾病的病变组织(胃溃疡和直肠腺瘤组织)RT-PCR 产物经电泳均可见 370 bp 的条带(图 1),即表示有 CK20 mRNA 的表达;2 例良性胃肠道病变的 15 枚淋巴结 RT-PCR 结果均为阴性(见图 2),而 2 例 Dukes C 期病人的 8 枚 HE 染色阳性淋巴结 RT-PCR 结果均为阳性。以上标本 GAPDH 的 RT-PCR 产物均可见 626 bp 的条带,证实 RNA 完整无降解。不加 RNA 的反应体系作为空白对照进行 PCR 扩增结果为阴性;不加 AMV 逆转

录酶的反应体系进行 PCR 扩增结果为阴性,证实无基因组 DNA 的污染。将存在 CK20 引物的阳性 PCR 产物进行测序,结果与 Gene Bank 检索所获得的序列一致,提示 RT-PCR 结果正确。

2. 大肠癌病人的淋巴结样本:31 例 Dukes A、B 期大肠癌病人的 398 枚淋巴结中,有 15 例共 46 枚淋巴结 RT-PCR 结果为阳性(见图 3),即存在微转移,淋巴结数阳性率为 11.6%,例数阳性率 48.4%。其中 5 例 Dukes A 期大肠癌病人的 50 枚淋巴结中有 2 例 3 枚淋巴结检出微转移;26 例 Dukes B 期大肠癌病人共 348 枚淋巴结中有 13 例 43 枚淋巴结检出微转移。所有病例中发现有 3 枚以上淋巴结微转移者 8 例(25.8%),均为 Dukes B 期;发现

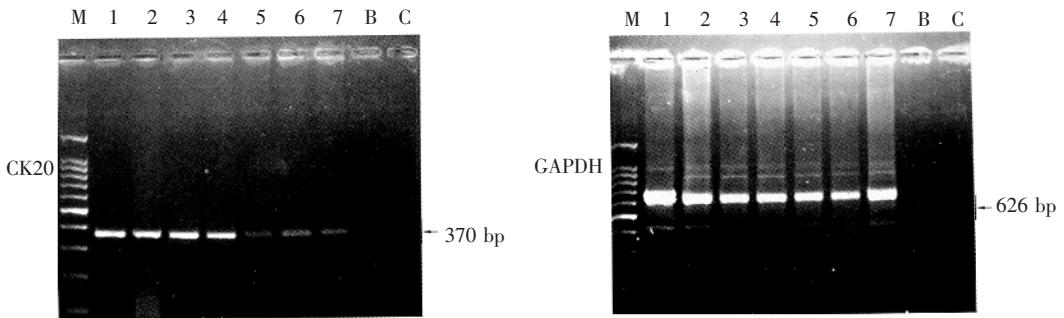
N2 站以上淋巴结微转移者 9 例(29.0%),也均为 Dukes B 期。

二、大肠癌出现淋巴结微转移与各临床病理因素的关系

31 例 Dukes A、B 期大肠癌病人微转移的发生与病人的年龄、性别、肿瘤侵犯肠管周径、生长方式、分化程度和 Dukes 分期等临床病理因素均无显著相关(见表 1)。

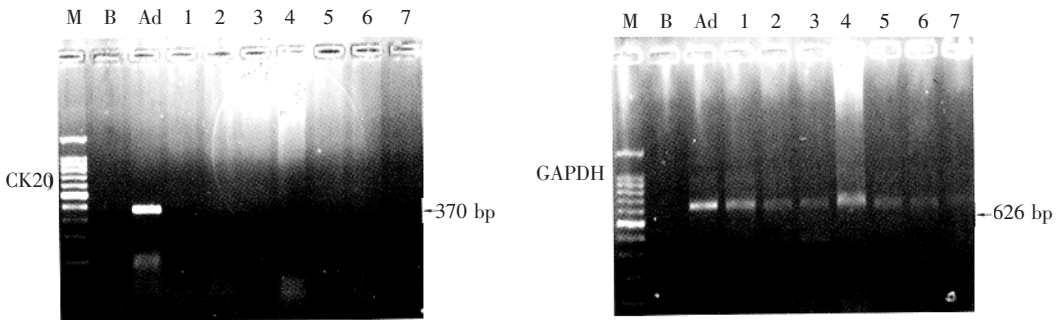
三、随访结果及预后

至研究终止,共有 8 例病人出现转移复发。其中 5 例为肝转移,3 例局部复发,除 2 例术后发现肝左叶单发转移灶再手术切除目前分别存活 63 和 68 个月外,其余均死亡,5 年生存率为 80.6%。



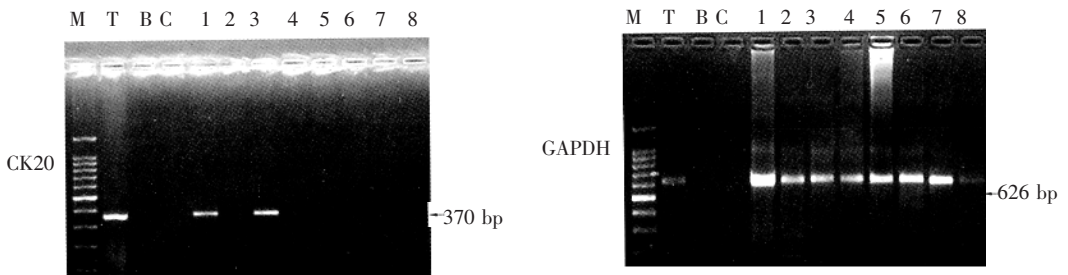
M:分子量参照物(100 bp DNA ladder);1:胃溃疡组织;2:直肠腺瘤组织;3~7:5 例大肠癌病人的肿瘤组织;B:不加 RNA 模板的空白对照;C:不加 AMV 酶的阴性对照

图 1 大肠癌和良性胃肠道疾病病变组织中 CK20 mRNA 的表达



M:分子量参照物;B:空白对照;Ad:直肠腺瘤组织;1~3:直肠腺瘤病人 3 枚肠旁淋巴结;4~7:胃溃疡病人 4 枚胃小弯淋巴结

图 2 RT-PCR 扩增良性胃肠道疾病淋巴结的电泳结果



M:分子量参照物;T:肿瘤组织;B:空白对照;C:不加 AMV 酶的阴性对照;1~4:直肠旁淋巴结,其中 1、3 检出微转移;5~8:直肠上动脉淋巴结均阴性

图 3 1 例 Dukes B 期直肠癌病人 8 枚 HE 染色阴性淋巴结 RT-PCR 产物的电泳结果

表 1 大肠癌淋巴结微转移与临床病理因素的关系

临床病理因素	微转移		P
	阳性(n=15)	阴性(n=16)	
年龄(岁)			
≥62 / <62	8/7	8/8	1.0000
性别			
男 / 女	8/7	9/7	1.0000
侵犯肠管周径			
≤1/2周 / >1/2周	7/8	6/12	0.4928
生长方式			
浸润型/膨胀型	10/5	8/8	0.4725
分化程度			
好、中 / 差	12/3	11/5	0.6853
Dukes分期			
A期/B期	2/13	3/13	1.0000

1. 淋巴结微转移对生存的影响:微转移组 5 年生存率为 66.7%(10/15),无微转移组为 93.8%(15/16),两组无显著差异(图 4a)。3 枚淋巴结微转移组的 5 年生存率为 50.0%(4/8),而少于 3 枚组为 91.3%(21/23),两组差异显著(图 4b)。N2 站及以上淋巴结微转移组的 5 年生存率为 55.6%(5/9),N1 站及无转移组为 90.9%(20/22),两组差异显著(图 4c)。

2. 复发危险度分析:单因素分析提示,肿瘤呈浸润型生长、>3 枚淋巴结和 N2 站以上淋巴结有微转移与复发关系显著(表 2)。Logistic 回归分析提示,>3 枚淋巴结有微转移是复发的独立因素(表 3)。

表 3 Dukes A、B 期大肠癌复发原因多元 Logistic 回归分析

临床病理因素	P
年龄	0.7098
性别(男/女)	0.7495
侵犯肠管周径(≤1/2周/>1/2周)	0.7679
生长方式(浸润型/膨胀型)	0.0184*
分化程度(好、中/差)	0.2554
微转移淋巴结数(≥3 / 0~3)	0.0059* ^Δ
发生微转移淋巴结的位置(N2 以上/ N1 或无)	0.0155*

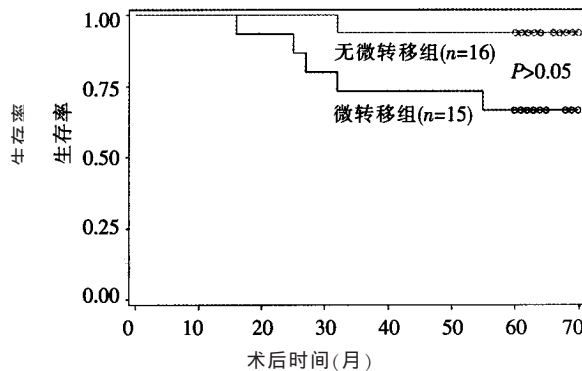
*: P<0.05; ^Δ: 经逐步回归 P=0.0119, RR=0.090, 95% CI 0.014-0.588; 回归方程: P(1-P) = EXP(2.9186-2.4078X6)

表 2 Dukes A、B 期大肠癌复发原因的单因素分析

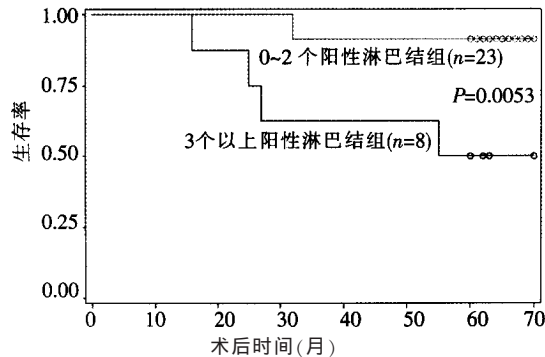
临床病理因素	复发		P	RR	95%CI
	阳性(n=8)	阴性(n=23)			
年龄(岁)					
≥62 / <62	4/4	12/11	1.0000	0.9375	0.2842~3.0926
性别					
男/女	4/4	13/10	1.0000	0.8235	0.2501~2.7119
侵犯肠管周径					
≤1/2周 / >1/2周	3/5	8/15	1.0000	1.0909	0.3196~3.7240
生长方式					
浸润型/膨胀型	7/1	10/13	0.0454*	5.7647	0.8021~41.4311
分化程度					
好、中/差	7/1	16/7	0.6417	2.4348	0.3517~16.8534
微转移淋巴结数(n)					
≥3/0~3	5/3	3/20	0.0135*	4.7917	1.4667~15.6545
发生微转移淋巴结的位置					
N2 以上/N1 或无	5/3	4/19	0.0272*	4.0741	1.2233~13.6678

* P<0.05

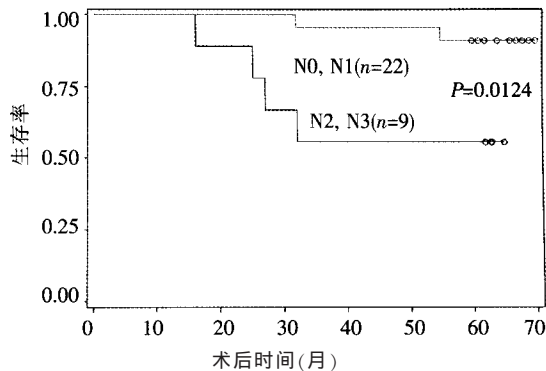
万方数据



a. 根据有无微转移分组



b. 根据微转移淋巴结数量分组



c. 根据微转移淋巴结位置分组

图 4 不同微转移大肠癌病人的术后生存率

讨 论

一、大肠癌淋巴结微转移的检测方法

淋巴结转移与否是判断大肠癌预后和指导术后化疗的重要指标。长期以来,临床上采用病理切片 HE 染色判断淋巴结的转移情况,并将无远处转移、HE 染色未发现淋巴结转移者定义为 Dukes A、B 期。但仍有 10%~25% 组织学证实淋巴结阴性的病人在术后 5 年内出现复发^[2],近年用连续切片、免疫组化和 PT-RCR 等多种方法对 HE 染色阴性淋巴结进行检测,均发现其中的部分淋巴结存在微转移^[1]。因此,用 HE 染色法检测淋巴结转移的敏感性是不够的。

其他方法中,连续切片法工作量过大,临床难以推广。免疫组化法尽管有助于检出淋巴结微转移,但目前可供选择的抗体其特异性和敏感性还不能满足诊断的要求,作为一种形态学方法,还存在阳性判断标准不一致的缺点,且切片的数量有限,不足以反映整个淋巴结的情况,能否作为预后指标也存在争议^[1,4-6]。RT-PCR 法通过逆转录并扩增正常被检组织不表达而肿瘤或肿瘤来源组织表达的 mRNA 以证实微转移的存在,由于 PCR 强大的扩增效应,具有很高的敏感性,可以在 $10^5\sim 10^7$ 个正常细胞中检出 1 个肿瘤细胞^[1,3]。本实验选择的靶 RNA 是 CK20 mRNA,CK20 是一种细胞骨架蛋白,在正常人体内的表达主要局限于胃肠道上皮,而在正常淋巴结的淋巴细胞和上皮细胞中不表达^[7],同时 CK20 在几乎所有大肠癌组织中均表达^[8],因此具有较高的特异性,是目前用于大肠癌微转移检测的最常用指标之一。

本实验中所有大肠癌病人的肿瘤组织和 2 例良性胃肠道疾病的病变组织均表达 CK20 mRNA,而 2 例良性胃肠道疾病的 15 枚阴性淋巴结均不表达,证实 CK20 RT-PCR 具有较高的特异性。31 例病人的 398 枚淋巴结中,有 15 例 46 枚淋巴结发现微转移,说明该法能发现 Dukes A、B 期大肠癌淋巴结的微转移,淋巴结微转移在 Dukes A、B 期大肠癌病人中并不少见。

二、淋巴结微转移检测的临床意义及其对预后的影响

在较早开展研究的乳腺癌^[9]和黑色素瘤^[10]研究报告中,认为淋巴结微转移检测对预后有影响,并已用于前哨淋巴结的检测。而对于大肠癌,其意义

仍存在争议,有认为淋巴结即使存在微转移也已被切除;也有认为由于敏感性过高,检出的肿瘤细胞并不具有活性。对预后的影响有不同的报道结果,免疫组化方面报道多认为对预后无影响^[1],RT-PCR 的一些报道则认为其是影响术后复发和生存的重要因素^[11,12]。其实这些结果都可从以下方面来理解和解释:①淋巴道是大肠癌早期转移的重要途径,淋巴结存在转移也间接提示其他部位存在微小转移,只不过常规检查未能发现而已,这也就是为什么大部分 Dukes C 期病人虽进行了包括淋巴结清扫的根治术,但仍有不少病人术后复发,且多数为肝转移和局部复发而非淋巴结;此外,近年提出的“淋巴血管生成”理论也是重要佐证^[13];②仅一部分微小转移的肿瘤细胞最终能发展形成显性转移,其发生与转移肿瘤细胞本身的基因型、表型、局部微环境以及是否能诱导肿瘤血管生成等诸多因素有关^[13];③各实验室采用的方法、操作步骤不统一,研究样本较小。

从本研究的结果来看,如将病例分为淋巴结微转移组和无微转移组,尽管前者的 5 年生存率低于后者,但统计学无差异。如按照淋巴结个数或分站进行比较,有 3 枚淋巴结微转移组病人的生存率显著低于 3 枚以下组,N2 及以上淋巴结微转移组的生存率显著低于 N1 及无转移组,提示微转移负荷量和到达位置可能较单纯显示微转移存在对于推断预后更有价值。对复发因素进行危险度分析,单因素分析发现浸润型生长、3 枚以上淋巴结和 N2 以上淋巴结发生微转移与复发关系显著;多元回归分析,3 枚以上淋巴结发生微转移是复发的独立预后因素。提示 Dukes A、B 期病人如发现这些情况,则是复发的高危病例,应该进行更积极的随访观察和治疗,比如对这些 Dukes A 期病人也应进行化疗,Dukes B 期病人应调整放、化疗方案,随访检查应更加细致等。

三、技术更新和前景

前文曾提到 RT-PCR 法的一些不足和局限^[3],近年来技术方法的改进使情况有所改善,如采用定量 RT-PCR 法^[14]使实验更加快捷、简便,也有助于减少假阳性率;通过显微切割技术^[15]已能够抽提蜡块组织的 mRNA,使大规模的回顾性研究成为可能。

虽然本研究是国内首例报道 RT-PCR 检测 Dukes A、B 期大肠癌淋巴结微转移对预后影响的前瞻性研究,但仍然只是一个小样本研究。对于是否可以将有淋巴结微转移的 Dukes A、B 期病人提

升为 C 期,是否可将此作为指导放、化疗的指征等问题,仍然需要统一规范操作的大样本、多中心研究才能得出结论。

总之,CK20 RT-PCR 法是检测 Dukes A、B 期大肠癌淋巴结微转移较为敏感而特异的方法,发现微转移的淋巴结数量、位置和肿瘤生长方式与术后复发有关,3 枚以上淋巴结发生微转移是复发的独立预后因素。

[参考文献]

[1] Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer[J]. Br J Surg, 2001,88(10):1307-1320.

[2] Bresalier RS. Malignant neoplasms of the large intestine [A]. In: M. Feldman, L. S. Friedman, and M. H. Sleisenger, eds. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease [M]. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002.2215-2261.

[3] 汤睿,唐思聪,郭善禹,等. 大肠癌淋巴结微转移基因检测的意义[J]. 癌症, 2000,19(10): 893-898.

[4] Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes'B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49: correlation with long-term survival[J]. Cancer, 1994,73(3):563-569.

[5] Adell G, Boeryd B, Franlund B, et al. Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes'B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study [J]. Eur J Surg, 1996,162(8): 637-642.

[6] Oberg A, Stenling R, Tavelin B, et al. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colotectal cancer[J]? Dis Colon Rectum, 1998,41(10):1244-1249.

[7] Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression

during fetal development and in gastrointestinal carcinomas[J]. Differentiation, 1993,53(2):75-93.

[8] Moll R, Lowe A, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinoma. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies[J]. Am J Pathol, 1992,140(2):427-447.

[9] Masuda N, Tamaki Y, Sakita I, et al. Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(11): 4176-4185.

[10] Bostick PJ, Morton DK, Turner RR, et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early stage melanoma patients[J]. J Clin Oncol, 1999,17(10):3238-3244.

[11] Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 1998,339(4):223-228.

[12] Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, et al. Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase-polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2002,20(4):1049-1055.

[13] Van Trappen PO, Pepper MS. Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases [J]. Lancet Oncol, 2002,3(1):44-52.

[14] Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, et al. Identification of occult tumor cells in node negative lymph nodes of colorectal cancer patients by cytokeratin 20 gene and protein expression[J]. Int J Colorectal Dis, 2004,19(2):87-94.

[15] Ho SB, Hyslop A, Albrecht R, et al. Quantification of colorectal cancer micrometastases in lymph nodes by nested and real-time reverse transcriptase-PCR analysis for carcinoembryonic antigen[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17):5777-5784.

(收稿日期:2005-02-28)

(本文编辑:林有裔)

《外科理论与实践》杂志 2006 年度函授继续医学教育报名工作已开始,欲参加者请速报名

欲订阅本刊者,可向当地邮局或直接向本刊编辑部订阅。本刊邮发代号:4-607。

本刊欢迎来稿,欢迎订阅,欢迎批评指正。