

· 论 著 ·

VVC 与 RVVC 患者治疗前后阴道菌群的对比研究

叶桂娥¹, 刘木彪¹, 黄宜娥², 周宏伟²

[摘要] **目的** 从菌群总体角度分析和比较单纯性外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)患者与复发性外阴阴道假丝酵母菌病(recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC)患者临床治疗前后阴道菌群的差异,了解临床治疗与阴道微生物多样性的相关性。**方法** 采集 VVC 患者(VVC 组,3 例)及 RVVC 患者(RVVC 组,3 例)女性阴道后穹窿分泌物,提取细菌总基因组 DNA,扩增 16s rRNA V4 区基因,以得到样品的物种信息用于对比研究。**结果** VVC 组和 RVVC 组两组阴道菌群未见显著差异,而以个体为特点区分聚类。用药后,VVC 组菌群的 α -多样性未见明显改变,但菌群结构改变显著,体现在乳酸菌比例增加,加德纳菌和变异菌属比例降低。用药后 RVVC 组菌群的 α -多样性和菌群构成均未见显著改变($P>0.05$)。**结论** VVC 组和 RVVC 组阴道菌群无显著差异。用药后,VVC 组菌群结构改变较 RVVC 组显著。

[关键词] 外阴阴道假丝酵母菌病;复发性外阴阴道假丝酵母菌病;阴道菌群;16s rRNA

[中图分类号] R711.31 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.06.012

Comparative study of vaginal microflora of VVC and RVVC patients before and after treatment

YE Gui-e¹, LIU Mu-biao¹, HUANG Yi-e², ZHOU Hong-wei². 1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Environmental Health, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

[Abstract] **Objective** To analyze and compare differences of vaginal microflora of patients with VVC and RVVC and explore the correlation of clinical treatment and vaginal microflora diversity after clinical treatments. **Methods** Twelve vaginal swabs of the vaginal fornix were collected from 3 VVC patients and 3 RVVC patients. Genomic DNA of the samples was extracted for amplifying the 16s rRNA V4 hypervariable region were employed to analyze the information of the species from the samples. **Results** The vaginal microflora were clustered by individual rather than VVC and RVVC. The VVC group existed no difference in alpha-diversity but significant structural change that characterized by increasing in the proportion of Lactobacillus and decreasing in Gardnerella and Atopobium after treatment. However, no significant differences in alpha-diversity and microbial structure exhibited in RVVC group($P>0.05$). **Conclusion** The vaginal microflora existed no different structure between VVC group and RVVC group. Compared with RVVC group, the VVC group demonstrated significantly microbial structure.

[Key words] VVC; RVVC; vaginal microflora; 16s rRNA

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是一种常见外阴阴道炎症。研究显示, VVC 大约占有症状感染者的 17% ~ 39%, 约占微生物所致阴道炎的 25% ~ 30%; 其中 5% ~ 8% 的 VVC 患者发展为复发性外阴阴道假丝酵母菌病(recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC), 即一年内 VVC 发作 4 次或以上^[1]。既往报道 VVC 患者的阴道菌群大部分为乳杆菌, 与健康女性阴道菌群相似^[2]。随着分子生物学技术的推广, 已有相关研究发现 VVC 的发生与阴道菌群微生态失衡有一定的相关性, 但对 VVC 患者药物治疗后其阴道微生物群落菌

群的整体结构及组成变化, 迄今为止没有深入的研究, 对 RVVC 患者的研究更是少之又少。本研究利用基于荧光测序平台的双末端测序(barcode paired-end illumina sequencing, BIPES)法^[3]分析比较 VVC 和 RVVC 患者治疗前后的阴道菌群结构, 以了解临床治疗与阴道微生物多样性的相关性。

1 材料与研究对象

1.1 主要试剂 阴道拭子基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克, 中国)、蛋白酶 K(广州学友生物, 中国)、Ex-taq PCR 试剂盒(TaKaRa, 日本)。Microfuge 18 台式高速离心机(Beckman, 德国)、MS2 振荡器(IKA, 德国)、BIE-168 紫外线凝胶成像分析仪(广东方统生物, 中国)、041BR 电泳仪(Bio-RAD, 美国)。盐酸特比萘芬阴道泡腾片(齐鲁天和惠世

作者单位: 1. 510282 广东广州, 南方医科大学珠江医院妇产科; 2. 510515 广东广州, 南方医科大学公共卫生与热带医学学院环境卫生学系

通讯作者: 刘木彪, E-mail: liumb1972@126.com; 周宏伟, E-mail: biodegradation@gmail.com

制药有限公司, 50 mg/片, 7 片/盒, 中国)。

1.2 研究对象 2013 年 4—12 月就诊于佛山市顺德区第一人民医院妇科门诊的患者, 年龄 (30 ± 0.2) 岁。患者均签署知情同意书。

VVC 组 (3 例) 纳入标准: ①症状: 外阴瘙痒、灼痛、性交痛及尿痛, 可伴有阴道分泌物增多; ②体征: 外阴红斑、水肿, 多伴抓痕或皮肤皲裂、表皮脱落, 阴道黏膜潮红、小阴唇内侧及阴道黏膜附着白色膜状物, 阴道内可见白色黏稠呈乳胶或豆渣样分泌物; ③实验室检查: 湿涂片 (以生理盐水和 10% KOH 制备) 证实存在假丝酵母菌的芽生孢子或假菌丝; 或真菌培养有白假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌等生长。

RVVC 组 (3 例) 纳入标准: ①符合 VVC 诊断标准, 并在 1 年内有症状并经真菌学证实的 VVC 发作 4 次或以上。②实验室检查: 湿涂片证实存在假丝酵母菌的芽生孢子或假菌丝, 或真菌培养有白假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌等生长。

排除标准: 患者为非妊娠期、哺乳期; 排除全身系统性疾病如糖尿病等; 排除其他阴道炎如滴虫性、细菌性阴道病; 1 个月内无全身应用抗生素、免疫抑制剂、阴道用药史, 3 d 内无性生活史及阴道灌洗。

两组患者确诊后予盐酸特比萘芬阴道泡腾片治疗 (阴道内用药, 50 mg/d, 共 7 d), 治疗结束后, 患者均自觉外阴瘙痒症状缓解、白带减少, 实验室湿涂片检查真菌阴性。

2 方 法

2.1 标本采集 患者于药物治疗前及治疗第 8 天, 用无菌阴道拭子于阴道穹窿处阴道壁取分泌物。将阴道拭子置于无菌干燥试管中, 用于提取细菌总 DNA。标本采集后放于 4 °C 标本箱保存送检。

2.2 细菌总 DNA 的提取与检测 以细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取样本中总 DNA, 具体操作步骤参照说明书。提取的总 DNA 经紫外分光光度计 (波长为 570) 测定纯度和浓度, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后放置 4 °C 冰箱中保存备用^[4]。

2.3 16s rRNA V4 区基因片段的扩增及 Illumina 测序 以样本总 DNA 为模版, 采用引物 (上海生工生物工程股份有限公司) 514F: 5′-GTGCCAGCMGC-CGCGGTAA-3′和 805R: 5′-GGACTACHVGGGTW-TCTAAT-3′, 扩增其中的 16s rRNA V4 区基因。PCR 总反应体系 (25 μL): 10 × buffer (2.5 μL), dNTP (2 μL), Mg^{2+} (1.5 μL), P1 (0.5 μL), P2 (0.5

μL), Ex-taq (0.25 μL) 模板 DNA (1 μL), H_2O (16.75 μL)。PCR 的扩增条件: 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最终 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产量和特性, 经回收纯化后, 通过 Illumina Hiseq2000 平台进行双末端 100 bp 测序 (由深圳华大基因公司进行)。

2.4 生物信息学分析 所测得的序列经过 BIPES 操作进行初步处理, 保留有效测序数据进行修剪; 反向互补组装 V4 序列; 使用两阶段聚类 (twostage-clustering, TSC)^[5] 进行聚类, 提取出每个操作分类单元 (operational taxonomy units, OTU) 的代表序列后利用全局比对序列分类 (global alignment-for sequence taxonomy, GAST) 进行物种的分类, 其中属于乳酸菌属的 OTU 利用 Blast^[6-7] 进一步分到种级别, 基于进化关系分析细菌群落结构距离 (unifrac distance)^[8], 采用微生物生态学定量研究 (quantitative insights into microbial ecology, QIIME)^[9] 进行阴道菌群主成分分析。比较 VVC 组和 RVVC 组两组用药前后菌群结构差异、菌属构成比差异、α-多样性分析、线性判别分析耦合效应测量在线工具 [linear discriminant analysis (LDA) coupled with effect size measurements, LEfSe]^[10] 统计用药前后菌属差异。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计数资料采用率 (%) 或构成比表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内或组间比较采用方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 测序信息 本实验测序样品数 12 个, 共获得 928 028 条序列, 平均每个样品 77 340 条。

3.2 VVC 和 RVVC 组用药前后菌群聚类 应用全链接聚类 (complete linkage) 的方法对 VVC 组和 RVVC 组的阴道菌群进行聚类分析。如图 1 展示 VVC 组和 RVVC 组阴道微生态优势菌群多样性未能以疾病分组显著区分, 而是以个体菌群为特征聚类。VVC 组用药后菌群较用药前差异明显, 而 RVVC 组用药后菌群与用药前菌群结构更相似。说明菌群以个体为单位聚类, 用药前后的样品菌群相似度大于疾病的影响。

3.3 VVC 和 RVVC 组用药前后菌群 β-多样性分析 应用欧式距离 (euclidean distance) 展示 VVC 组和 RVVC 组阴道菌群用药前后的差异。如图 2 所示, VVC 组用蓝点表示, RVVC 组用红点表示, 箭头代表

从用药前到用药后的菌群变化方向,两点之间的距离表示用药后菌群变化幅度。VVC 组用药后的菌群变化幅度均较大,RVVC 组用药后菌群差异较小或不变,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

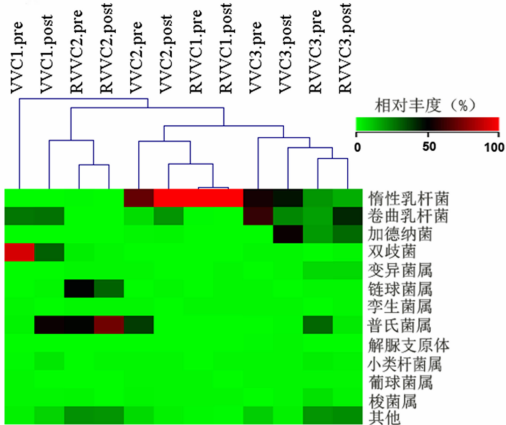


图 1 热点图 (Heatmap) 展示 VVC 组和 RVVC 组个体用药前后菌群聚类

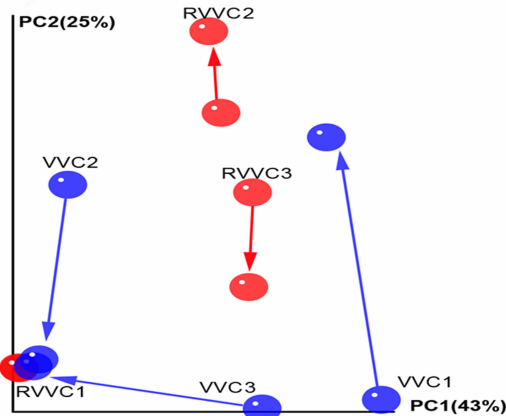


图 2 VVC 组和 RVVC 组用药前后菌群 β -多样性的差异

3.4 VVC 组和 RVVC 组用药前后菌属构成比差异 如图 3 所示,在属水平分析 VVC 组(a)和 RVVC 组(b)用药前后菌属构成比的差异。每例患者分别采集了用药前(第一个图柱)和用药后(第二个图柱)的样品,分析了 VVC 组和 RVVC 组用药前后阴道菌群中主要的 12 个菌属,从属水平对两组用药前后菌属构成比差异进行分析。图 3a 显示 VVC 组用药前双歧杆菌、梭状芽胞杆菌、加德纳菌比例较高,分别占各自标本的 80%、55%、45%,用药后菌群中原优势菌的比例降低约 15% ~ 55%,乳酸菌丰度增加成为优势菌,个体治疗前后的差异存在统计学意义($P < 0.05$)。图 3b 显示药物治疗后 RVVC 组菌属构成比基本一致,个体治疗前后的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

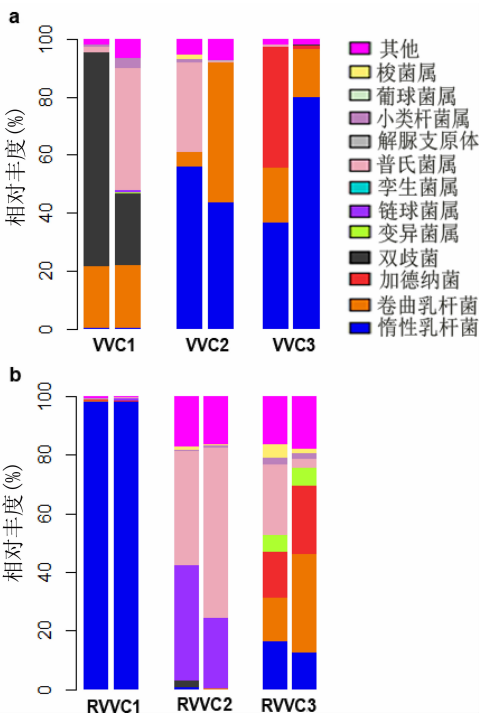
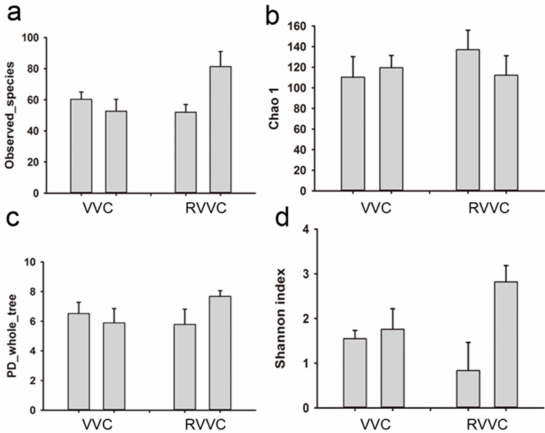


图 3 VVC 组(a)和 RVVC 组(b)用药前后菌属构成比差异

3.5 VVC 组和 RVVC 组用药前后 α -多样性比较分析 以 OTU 的个数测定 (Observed-species) (a)、赵氏菌种丰富度指数 (Chao1) (b)、谱系多样性 (PD-whole-tree) (c) 和香农指数 (Shannon Index) (d) 四个指标分析,展示 VVC 组和 RVVC 组用药后阴道菌群的 α -多样性未发生显著变化(图 4, P 均 > 0.05)。



a: Observed-species; b: Chao1; c: PD-whole-tree; d: Shannon
图 4 四个指标展示 VVC 组和 RVVC 组用药前后菌群的 α -多样性变化

3.6 菌群差异性统计学分析 LEfSe 是新开发的统计方法,可用于寻找、统计分析微生物群落标志

物。通过 LEfSe 统计两组菌属差异表明,未发现 VVC 组和 RVVC 两组用药前后存在差异性菌属。

4 讨论

女性阴道内的正常微生态环境中存在多种微生物菌群,菌群之间的关系既有共生也有拮抗,共同形成一个动态的平衡。多个研究发现阴道正常菌群中的优势菌是以乳酸杆菌为主,其具有抵抗病原菌生长繁殖的作用,在维持阴道微生物平衡中起着重要作用^[11]。有研究发现,假丝酵母菌属细菌可以产生曲霉毒素,结合其他的细菌生长抑制物质,可以拮抗其他细菌的生长繁殖^[12]。由此推测,当阴道内乳酸杆菌的生长受到抑制,寄生在阴道内的假丝酵母菌就可能大量繁殖,形成 VVC。阴道内菌群平衡状态的改变可能是 VVC 发生的重要原因之一。

本研究显示 VVC 组用药后优势菌群较用药前差异明显,而 RVVC 组则改变不明显。从各菌属丰度的表达分析,如图 1 所示,VVC1 治疗前阴道微生态内以双歧杆菌、卷曲乳杆菌为主,而治疗后则以普氏菌为主,同样明显的差异出现在 VVC2、VVC3 菌群结构内。RVVC1 阴道微生态内则以嗜性乳杆菌为主,治疗后仍以嗜性乳杆菌为主,同样的表现出现在 RVVC2、RVVC3 菌群结构内,只是 RVVC2 阴道微生态内以链球菌属、普氏菌属为主,RVVC3 阴道微生态内则以嗜性乳杆菌、卷曲乳杆菌、加德纳菌为主,RVVC 组治疗前后阴道内优势菌群基本一致,对 RVVC 患者的治疗并未引起阴道微生态的明显变化,但不同样本间仍然存在着显著的个体间差异。由此可见,患者阴道样本菌群中的优势菌群存在显著个体差异^[13]。菌群以个体为单位聚类,用药前后的样品菌群相似度大于疾病的影响。而从属水平对两组用药前后菌属构成比差异进行分析,如图 3a 显示 VVC 组用药前双歧杆菌、嗜性乳杆菌、加德纳菌比例较高,分别占各自标本的 80%、55%、45%,用药后菌群中原优势菌的比例降低约 15%~55%,乳酸菌丰度增加成为优势菌,个体治疗前后的差异存在统计学意义($P < 0.05$)。由此推测,VVC 组患者出现临床不适症状,与其原有阴道微生态内正常优势菌群逐渐被其他细菌所取代并趋向于微生态失衡状态有关^[13]。图 3b 显示药物治疗后 RVVC 组菌属构成比基本一致,个体治疗前后的差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果说明药物杀灭假丝酵母菌属菌同时,降低了其对乳杆菌的拮抗作用,从而调整了阴道菌群的结构,使菌群结构逐渐趋向于正常,表现为 VVC 组对药物治疗较敏感,而对 RVVC 患者的

治疗并未引起阴道微生态的明显变化。两组治疗前后的菌群差异的比较如图 2 所示,VVC 组用药后的菌群变化幅度均较大,RVVC 组用药后菌群差异较小或不变。分析原因:RVVC 组用药后菌群变化不明显,可能与其致病菌较顽固等因素有关,药物对该组患者阴道内假丝酵母菌属杀灭效果较 VVC 组差,所致的拮抗作用相对减少,故表现出治疗后菌群结构的变化不大。而 Liu 等^[14]研究发现 VVC 患者阴道局部甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)的表达显著高于正常人群,当假丝酵母菌和 MBL 结合后可启动吞噬过程,发挥免疫清除作用;在 RVVC 患者,阴道局部的 MBL 表达显著低于正常人群。因此,推测在患者天然免疫作用下,VVC 组用药后致病菌得以控制,其拮抗作用下降,菌群逐渐被正常菌群代替,故较用药前差异明显,而 RVVC 组用药后致病菌的清除较 VVC 组的低,菌群变化更小,用药前后的菌群结构较 VVC 组更相似。说明抗真菌药物治疗并非促使患者出现新的菌属,而是调节阴道菌群自身内部的构成,恢复菌群平衡状态达到治疗效果。如图 4 所示,VVC 组和 RVVC 组用药后阴道菌群的 α -多样性未发生显著变化,此观点通过 LEfSe 统计两组菌属差异,未发现用药前后存在差异性菌属进一步得以印证。由此推测,RVVC 患者复发率高、治疗顽固与其药物治疗后菌群结构调节不明显有关,提示临床治疗 VVC 患者需规范足程的有效治疗,一旦发展成 RVVC 则治愈难度增加,而对 RVVC 患者的治疗若以辅助乳酸菌治疗促进正常菌群比例恢复,可能有较好的疗效。因此,欲从病因上达到治愈的目的,可能需要采用一种既能抑制或杀灭假丝酵母菌,又能调整阴道菌群正常结构的药物,这仍需全面了解疾病状态下女性生殖道菌群结构及多样性变化,对临床治疗与阴道微生态变化的相关性进一步深入研究,以利于患者的诊断和治疗^[15]。

【参考文献】

- [1] Anderson MR, Klink K, Cohrsen A. Evaluation of vaginal Complaints[J]. JAMA 2004, 291(11):1368-1379.
- [2] Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(3):250-261.
- [3] Zhou Hw, Li DF, Tam NF, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity[J]. ISME J, 2011, 5(4):741-749.
- [4] 许苏容,宗利丽,刘木彪,等. Illumina 测序 16S rRNA 标签法分析细菌性阴道病患者阴道菌群多样性[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(5):672-677.

- [5] Ling Z, Kong J, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 488.
 - [6] Gloor GB, Hummelen R, Macklaim JM, et al. Microbiome profiling by illumina sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products [J]. PLoS One, 2010, 5(10): 15406.
 - [7] Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV [J]. PLoS One, 2010, 5(8): 12078.
 - [8] Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast unfrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and phylochip data [J]. ISME J, 2010, 4(1): 17-27.
 - [9] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QiimeE allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336.
 - [10] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biol, 2011, 12(6): 60.
 - [11] McFarland LV. Normal flora: diversity and functions [J]. Microb Ecol Health Dis, 2000, 12: 193-207.
 - [12] Williams AB, Yu C, Tashima K, et al. Evaluation of two self-care treatments for vaginal candidiasis in women with HIV [J]. J Assoc Nuress AIDS Care, 2001, 12(6): 51-57.
 - [13] 凌宗欣. 女性生殖道微生物群落菌群多样性变化与生殖道感染的相关性研究 [D]. 浙江大学, 2012, 25.
 - [14] Liu F, Liao Q, Liu Z. Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2006, 92(1): 43-47.
 - [15] 张迪, 初晓玲, 楼小伟, 等. 203 株血培养病原菌的分布和耐药情况分析 [J]. 东南国防医药, 2014, 16(4): 416-417.
- (收稿日期: 2014-09-22; 修回日期: 2014-10-24)
(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

(上接第 586 页)

放疗 + 辅助性化疗组, 结果显示, 单纯放疗组和放疗 + 辅助性化疗组 5 年总生存率分别为 60.5% 和 54.5% ($P = 0.50$), 无复发生存率分别为 49.5% 和 54.4% ($P = 0.38$), 辅助性化疗无论在总生存率还是在无复发生存率上均未显示出明显的优势, 而且还增加了毒性反应。Kwong 等^[15]的研究表明辅助性化疗并不能提高鼻咽癌患者的生存率。本研究将放疗配合化疗的患者归为综合治疗组, 包括诱导化疗、同步放化疗、辅助性化疗及它们的组合, 与单纯放疗相比, 单因素分析预后的差异并无统计学意义, 但是多因素分析预后的差异有统计学意义。由于多因素分析是校正后的分析结果, 因此认为综合治疗的鼻咽癌患者生存率高于单纯放疗。

鼻咽癌在我国南方地区发病率高, 研究影响鼻咽癌预后相关因素, 有利于进一步提高鼻咽癌生存率。

【参考文献】

- [1] Xu T, Zhu G, He X, et al. A phase III randomized study comparing neoadjuvant chemotherapy with concurrent chemotherapy combined with radiotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Updated long-term survival outcomes [J]. Oral Oncol, 2014, 50(2): 71-76.
 - [2] Teo P, Yu P, Lee WY, et al. Significant prognosticators after primary radiotherapy in 903 nondisseminated nasopharyngeal carcinoma evaluated by computer tomography [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996, 36(2): 291-304.
 - [3] Yeh SA, Tang Y, Lui CC, et al. Treatment outcomes and late complications of 849 patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy alone [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 62(3): 672-679.
 - [4] 覃慕萍, 胡晓桦, 岑洪, 等. 鼻咽癌的临床特点及预后因素分析 [J]. 广西医学, 2012, 34(6): 721-724.
 - [5] 蔡永林, 李军, 陆爱英, 等. 血清 EB 病毒抗体水平与鼻咽癌患者预后的关系 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(2): 119-122.
 - [6] Twu CW, Wang WY, Liang WM, et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 67(1): 130-137.
 - [7] Ho HC, Lee MS, Hsiao SH, et al. Prognostic influence of parapharyngeal extension in nasopharyngeal carcinoma [J]. Acta Otolaryngol, 2008, 128(7): 790-798.
 - [8] Guigay J, Temam S, Bourhis J, et al. Nasopharyngeal carcinoma and therapeutic management: the place of chemotherapy [J]. Ann Oncol, 2006, 17(suppl 10): 304-307.
 - [9] 韩露, 林少俊, 潘建基, 等. 305 例鼻咽癌调强放疗预后因素分析 [J]. 癌症, 2010, 29(2): 153-158.
 - [10] Xu L, Pan J, Wu J, et al. Factors associated with overall survival in 1706 patients with nasopharyngeal carcinoma: significance of intensive neoadjuvant chemotherapy and radiation break [J]. Radiother Oncol, 2010, 96(1): 94-99.
 - [11] Chua DT, Ma J, Sham JS, et al. Improvement of survival after addition of induction chemotherapy to radiotherapy in patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma: Subgroup analysis of two Phase III trials [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65(5): 1300-1306.
 - [12] Lin JC, Jan JS, Hsu CY, et al. Phase III study of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for advanced nasopharyngeal carcinoma: positive effect on overall and progression-free survival [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(4): 631-637.
 - [13] Zhang L, Zhao C, Ghimire B, et al. The role of concurrent chemoradiotherapy in the treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma among endemic population: a meta-analysis of the phase III randomized trials [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 558.
 - [14] Chi KH, Chang YC, Guo WY, et al. A phase III study of adjuvant chemotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 52(5): 1238-1244.
 - [15] Kwong D, Sham J, Au G. 27: Five-year update on a randomized factorial study on concurrent and adjuvant chemotherapy for advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 66(3): S15-S16.
- (收稿日期: 2014-07-16; 修回日期: 2014-08-04)
(本文编辑: 齐名; 英文编辑: 王建东)