

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.022

乳腺癌中 EGFR 蛋白表达和基因扩增的检测结果比较

王海波¹ 何朝霞¹ 张欣欣¹ 高妮娜² 陈森林²

(1 冷水江市人民医院病理科 湖南 冷水江 417500;

2 湖南省肿瘤医院暨中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院病理科 湖南 长沙 410013)

摘要 目的: 比较免疫组织化学技术检测乳腺癌中 EGFR 蛋白表达和荧光原位杂交检测 EGFR 基因扩增的结果的符合率,为 EGFR 靶向治疗病例的选择提供依据。**方法:** 随机选取 2005 年 1 月到 2011 年 12 月冷水江市人民医院和湖南省肿瘤医院病理科的 147 例乳腺癌档案病例,采用免疫组织化学技术检测乳腺癌组织中 EGFR 蛋白表达,荧光原位杂交检测 EGFR 的基因扩增,比较两种方法阳性结果的符合率。**结果:** 免疫组化染色结果显示 EGFR 在原发性和转移性乳腺癌中的阳性表达率分别为 85% (105/123)和 79% (9/24),两组比较无显著差异($P>0.05$)。FISH 检测结果显示原发性和转移性乳腺癌中分别有 12% (15/123)和 8% (2/24)存在 EGFR 基因扩增,两组比较结果无显著差异($P>0.05$)。所有存在 EGFR 基因扩增的原发性和转移性乳腺癌的 EGFR 免疫组织化学结果均为阳性。在原发性和转移性乳腺癌中,免疫组化阳性和基因扩增程度间呈显著正相关($P<0.05$),但免疫组化结果预测基因扩增的特异性较低。**结论:** 免疫组织化学检测 EGFR 只能作为 EGFR 靶向治疗病例选择的初步筛选,进一步进行荧光原位杂交检测 EGFR 基因扩增是必须的。

关键词: 表皮生长因子受体;免疫组织化学;荧光原位杂交;基因扩增

中图分类号: R737.9;R730.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)14-2697-05

Comparative Study on EGFR Protein Expression and gene Amplification in Breast Carcinoma

WANG Hai-bo¹, HE Chao-xia¹, ZHANG Xin-xin¹, GAO Ni-na², CHEN Sen-lin²

(1 Department of Pathology, Leng shui-jiang Ren min Hospital, Leng shui-jiang, Hunan, 417500, China;

2 Department of Pathology, Hunan Tumor Hospital & Tumor Hospital of Xiangya school of Medicine, central south university, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT Objective: The coincidence rate of detection of EGFR gene expression by immunohistochemical technique and EGFR gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer compared was compared, which provide the basis for selection for EGFR targeted therapy patients. **Methods:** From 2005 January to 2011 December, 147 cases of breast cancer cases in the archives were randomly selected in Department of pathology of Lengshuijiang Municipal People's Hospital and Hunan Tumor Hospital. To detect EGFR protein expression in breast carcinoma by immunohistochemistry technique, and detect EGFR gene amplification by fluorescence in situ hybridization, and the rate of positive results through two methods were compared. **Results:** Immunohistochemical staining showed positive expression rate of EGFR was 85% in primary breast cancer (105/123), the positive expression in metastatic breast cancer rate of 79% (9/24), the expression of EGFR protein in primary and metastatic breast cancer expression was no significant difference ($P>0.05$). FISH results showed that the primary breast cancer 12% (15/123) EGFR gene amplification, metastatic breast cancer 8% (2/24) EGFR gene amplification, EGFR gene amplification in primary and metastatic breast cancer expression was no significant difference ($P>0.05$). All existing EGFR gene amplification in primary and metastatic breast carcinoma EGFR immunohistochemistry showed positive results. In primary breast cancer immunohistochemical staining and gene amplification was significantly positive correlation ($P=0.01$) in metastatic breast cancer, immunohistochemical staining and gene amplification was significantly positive correlation ($P=0.05$), but the results of immunohistochemistry predict specific gene amplification in low. **Conclusion:** Preliminary screening of EGFR can only be detected with immunohistochemistry for EGFR targeting therapy for patient selection, it is necessary to further detect of EGFR gene amplification by fluorescence in situ hybridization.

Key words: Epidermal growth factor receptor; Immunohistochemistry; Fluorescence in situ hybridization; Gene amplification

Chinese Library Classification(CLC): R737.9; R730.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2697-05

作者简介:王海波,男,大学,副主任技师,主要研究方向:新技术在病理诊断中的应用,E-mail:13707387269@163.com
(收稿日期:2013-12-14 接受日期:2014-01-11)

前言

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是酪氨酸激酶生长因子受体家族的成员, 参与影响细胞生长的信号转导通路, 在乳腺癌中高表达, 是抗癌治疗的靶分子。西妥昔单抗是一种人鼠嵌合单克隆抗体, 可特异性阻断 EGFR。目前临床上对免疫组化检测 EGFR 阳性的乳腺癌患者已使用西妥昔单抗, EGFR 免疫组化阳性已作为使用西妥昔单抗病例的选择标准。但西妥昔单抗疗效与 EGFR 染色强度之间不存在明显相关性, 因而 EGFR 免疫组化检测在西妥昔单抗治疗患者选择中的价值受到限制, 需要一种敏感性和特异性更强的方法来评价治疗的反应性。荧光原位分子杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 可用于评价组织水平的基因扩增或缺失、染色体异倍体, 或染色体易位。已有研究显示 FISH 对档案乳腺癌石蜡切片而言是一种实用的、经济和有效的检测基因扩增技术。本研究通过比较 EGFR 基因扩增频率和免疫组化技术检测 EGFR 蛋白表达间的关系, 旨在为西妥昔单抗治疗乳腺癌的筛选提供更为可靠的评价方法和标准^[1-3]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从冷水江市人民医院和湖南省肿瘤医院病理科 2005 年 1 月到 2011 年 12 月的档案病例中随机选取 147 例乳腺癌标本, 其中 123 例为原发性乳腺癌, 24 例为转移性乳腺癌, 转移性癌中 6 例为肺转移, 18 例为肝转移, 均经 HE 染色后行病理学确诊。

1.2 主要试剂和仪器

EGFR(phospho S1026)抗体(ab93128)。柠檬酸盐抗原修复液 (粉剂)(0.01M, pH 6.0, MVS-0066), 0.01M PBS(pH7.2-7.4)。DAB 显色试剂盒(Kit-0015)和 Elivision™ plus Poly HRP (鼠/兔) Kit-9902 免疫组化试剂盒均为福建迈新生物技术公司产品。格兰仕家用微波炉用于抗原微波修复, EGFR 基因检测探针(ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, Green/Orange, 德国 Zytovision GmbH)。奥林巴斯荧光显微镜(BX43)。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学技术 4 μ m 厚石蜡切片用于 EGFR 免疫组化检测, 烤片、脱蜡、水化及抗原修复(EDTA 抗原修复液, 微波修复 15 min), 3%过氧化氢室温孵育 20 min, PBS 液洗, 正常非免疫血清室温孵育 20 min, 滴加 EGFR4℃ 孵育过夜, 按迈新 Elivision™ plus Poly HRP (鼠/兔) Kit-9902 免疫组化试剂盒进行操作, DAB 显色, 复染, 水洗, 脱水及封片, 观察判断结果。应用 Herceptest® 评分系统进行结果判断: 阴性为没有膜染色或染色细胞 <10%; + 为 >10% 细胞有不完整的膜染色; ++ 为 >10% 细胞有弱到中等完整膜染色; +++ 为 >10% 细胞有强而完整膜染色。

1.3.2 荧光原位杂交技术 操作步骤如下, 标本准备及变性, 确保变性液温度在 73 $\pm$ 1℃, 将玻片在变性液中浸泡 5 min, 玻片依次置于预冷的 70%、85% 和 100% 的乙醇溶液中各 3 min 进行梯度脱水。玻片自然干燥后, 可置于 45-50℃ 烤片机上预热 2-5 min 后与探针杂交。若以下探针混合物尚未完成变性, 玻片

可置于 45-50℃ 烤片机上较长时间预热。探针混合物准备及变性室温下将如下液体加入到微量离心管中(7 μ L 杂交缓冲液, 1 μ L 去离子水, 21 探针), 将装有 10 μ L 以上 FISH 探针混合物的试管置于 73 $\pm$ 1℃ 水浴箱中变性 5 min 之后, 将该试管置于 45-50℃ 水浴箱中, 杂交前取出。探针准备好之前, 玻片应置于 45-50℃ 烤片机上预热。将 10 μ L 变性后的探针混合物滴于玻片杂交区域, 立即加盖盖玻片, 用橡皮胶封边。将玻片置于预热的湿盒中, 42℃ 保温箱中过夜杂交。室温下将 50% 甲酰胺 / 2 $\times$ SSC 溶液倒入三个分别标记为“1”, “2”, “3”的考普林瓶中。使用前将盛有溶液的考普林瓶置于 46 $\pm$ 1℃ 水浴箱中至少 30 min, 使溶液达到所需温度。分别将 50 mL 2 $\times$ SSC 溶液(B 液) 和 2 $\times$ SSC/0.1% NP-40 洗液倒入考普林瓶中, 使用前将盛有溶液的考普林瓶置于 46 $\pm$ 1℃ 水浴箱中至少 30 min, 使溶液达到所需温度。移去盖玻片, 立即将玻片置于盛有 50% 甲酰胺 / 2 $\times$ SSC 溶液的瓶“1”中, 晃动玻片 3s。按此重复另外几张玻片。10 min 后取出玻片。暗处自然干燥玻片。将 15 μ L DAPI 复染剂滴加于杂交区域位置, 立即盖上盖玻片。暗处放置 10-20 min 后, 在荧光显微镜下选用合适的滤光片组观察玻片。结果判断如下: 无扩增为每个核 <5 基因拷贝, 低度扩增为每个核 5-10 基因拷贝, 高度扩增为每个核 >10 基因拷贝。

1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 11.0 统计软件包分析。EGFR 的免疫组化检测结果和基因扩增检测结果间相关性通过 Jonckheere-Terpstra 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学方法检测 EGFR 在乳腺癌中的表达

免疫组化结果显示: EGFR 阳性信号定位于乳腺癌细胞的细胞浆, 判断强弱分为阴性、+、++、+++ , 见图 1A、B、C、D。EGFR 在原发性乳腺癌中的阳性表达率为 85%(105/123), 在转移性乳腺癌中的阳性表达率为 79%(9/24)。在 105 例原发性乳腺癌 EGFR 阳性病例中, 其中 + 占 38% (40/105), ++ 占 43% (45/105), +++ 占 19%(20/105)。在转移性乳腺癌 19 例 EGFR 阳性病例中, + 占 52.6%(10/19), ++ 占 42.1%(8/19), +++ 占 5.26%(1/19), EGFR 蛋白表达在原发性和转移性乳腺癌中表达率无显著差异($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 荧光原位杂交技术检测 EGFR 在乳腺癌中的扩增

荧光原位杂交结果显示 EGFR 基因扩增情况, 分为无扩增、低度扩增、高度扩增, 见图 2。原发性乳腺癌中 12%(15/123) 存在 EGFR 基因扩增, 转移性乳腺癌中 8%(2/24) 存在 EGFR 基因扩增。其中 2 例原发性乳腺癌和 1 例转移性乳腺癌有 EGFR 高度扩增, EGFR 基因扩增在原发性和转移性乳腺癌中表达率无显著差异($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 乳腺癌中 EGFR 荧光原位杂交检测结果和免疫组化检测结果的相关性分析

在原发性乳腺癌中免疫组化阳性和基因扩增程度呈显著正相关($P = 0.01$), 在转移性乳腺癌中免疫组化阳性和基因扩增程度间呈显著正相关($P = 0.05$)。83%(90/108) 没有 EGFR 扩增的原发性乳腺癌, 77%(17/22) 没有 EGFR 扩增的转移性乳腺癌均显示免疫组化阳性, 这一结果提示免疫组化结果预测基因扩增

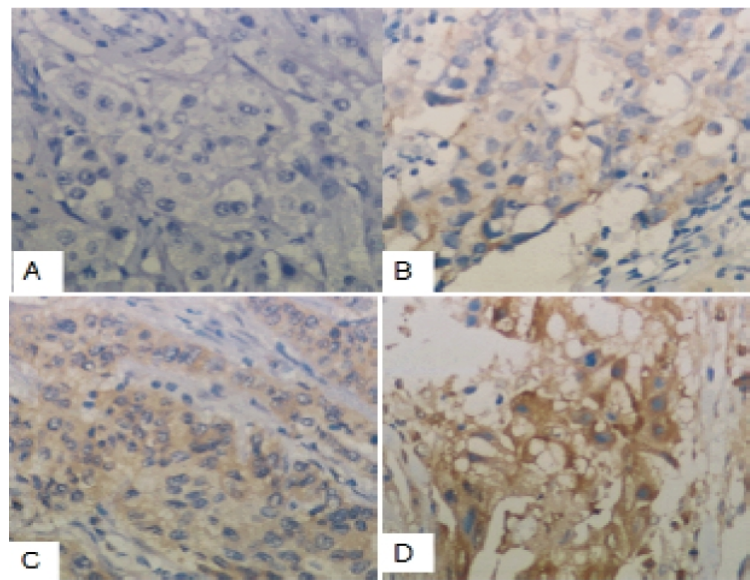


图 1 免疫组织化学技术检测乳腺癌中 EGFR 的表达

Fig.1 Assay of EGFR protein expression in breast carcinoma by Immunohistochemical method A:-, B: +, C: ++, D:+++

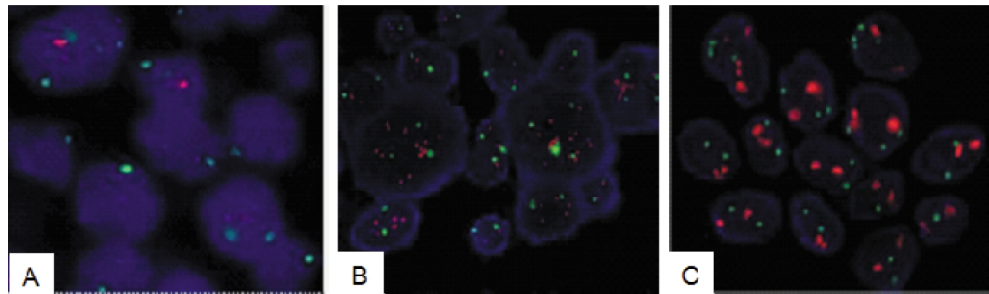


图 2 FISH 检测乳腺癌中 EGFR 的基因扩增

Fig.2 Assay of EGFR amplification in breast carcinoma by FISH

A: 无扩增 no amplification, B: 低度扩增 low amplification, C: 高度扩增 high amplification

表 1 原发性和转移性乳腺癌中 EGFR 免疫组织化学和荧光原位杂交检测结果的相关性

Table 1 Correlation between IHC and FISH detection of EGFR in primary and metastatic breast carcinomas.

免疫组织化学		荧光原位杂交			合计
IHC		FISH			Total
		No amplification	Low amplification	High amplification	
原发性乳腺癌 Primary breast carcinoma					
0	18	0	0		18
+	36	4	0		40
++	40	5	0		45
+++	14	4	2		20
合计 Total	108	13	2		123
转移性乳腺癌 Metastatic breast carcinoma					
0	5	0	0		5
+	10	0	0		10
++	7	1	0		8
+++	0	0	1		1
合计 Total	22	1	1		24

的特异性较低。

3 讨论

免疫组化方法检测 EGFR 表达不能较好地反映肿瘤对西妥昔单抗的反应性主要是因为 EGFR 信号通路复杂,如配体表达水平、受体酪氨酸磷酸化水平和其它下游分子的表达影响西妥昔单抗的作用。从技术角度而言,组织处理、组织样本的储存时间可能使细胞表面受体的降解加快而导致蛋白表达改变,此外使用的抗体因为不同来源克隆对不同的抗原决定簇有特异性。鉴于免疫组化检测 EGFR 表达在指导 EGFR 靶向治疗中的局限性,需要其它方法更好地反映 EGFR 基因状态,EGFR 过度表达的原因有基因扩增、转录上调或基因改变如突变和多态性)引起受体结构异常,对这些基因改变的检测也能预测对 EGFR 靶向治疗的反应性。基因检测可避免与免疫组化有关的一些问题如标本储存时间,EGFR 阳性强弱随着标本储存时间的延长而减弱。基因保存的问题相对更小,如果基因不能保存,在肿瘤细胞和非肿瘤细胞中都不能显示基因信号使假阴性结果可能性降到最低。

本研究免疫组化结果结果显示 EGFR 在原发性乳腺癌中阳性表达率为 85%,在转移性乳腺癌中的阳性表达率为 79%,而 FISH 检测结果显示原发性乳腺癌中 12%存在 EGFR 基因扩增,转移性乳腺癌中 8%存在 EGFR 基因扩增。不同实验室检测 EGFR 表达的阳性率差别较大,有报道 EGFR 在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率为 51.2%^[6],Buchholz TA 对 82 例乳腺癌研究结果显示 EGFR 阳性率为 17%^[7]。Aziz SA 报道 EGFR 在乳腺癌中的扩增或过表达率为 22%^[8]。有研究发现 EGFR 阳性表达在乳腺癌三阴患者(ER、PR、Her2 均为阴性)中更常见^[9]。影响免疫组化检测 EGFR 表达结果的因素较多,如乳腺标本的检测前处理方式、乳腺癌的组织学类型、EGFR 抗体类型和检测方法、结果判断标准等,对待不同实验室所得出的 EGFR 阳性表达率的差异应根据具体情况分析。

本研究更为关注的是对 FISH 检测 EGFR 基因扩增结果和免疫组化检测 EGFR 表达结果进行比较,结果显示在原发性和转移性乳腺癌中免疫组化阳性和基因扩增间均呈显著正相关,但免疫组化结果预测基因扩增的特异性较低,没有 EGFR 扩增的原发性乳腺癌和转移性乳腺癌均有较高比例显示免疫组化阳性。这一问题的一直都受到关注,其主要原因涉及 EGFR 靶向治疗的适应征。这一方面有较多的研究报道,如在 EGFR 基因扩增病例中 EGFR 免疫组化阳性显著高于没有基因扩增病例,EGFR 免疫组化强阳性与该基因扩增有关并提示存在基因扩增^[10]。Kersting C 报道 13%蛋白过表达通过 FISH 检测有基因扩增,仅仅 1.6%EGFR 表达阴性病例有基因扩增。在侵袭性乳腺癌中 EGFR 全基因扩增较少见,这可以解释 EGFR 蛋白过表达仅出现在 12.5% 浸润性乳腺癌患者,而约 75%EGFR 过表达病例没有基因扩增,可能涉及其它机制^[11]。Lv N 报道 FISH 检测 46/139(33.1%)EGFR 基因扩增,2/139(1.4%)有 EGFR 基因突变,仅 1 例同时存在基因突变和基因扩增,92(66.2%)病例两者均为阴性。EGFR 基因高拷贝数与 EGFR 蛋白表达显著相关。EGFR 基因突变可能在乳腺癌 EGFR 靶向治疗中意义不大而 EGFR 全基因扩增较常见,可能更适用于乳腺癌 EGFR 靶向治

疗病例的筛选^[12]。Gumuskaya B 报道 16.1%(10/62)FISH 阳性病例,1.6%(1/62)有扩增,其余的为多倍体。所有 FISH 阳性病例免疫组化均阳性。扩增病例免疫组化 EGFR 膜强阳性,EGFR 膜表达与基因拷贝数增加有关^[13]。Bhargava R 报道 6%(11/175)乳腺癌有 EGFR 基因扩增而 7%(13/175) 乳腺癌有 EGFR 蛋白过度表达。91%基因扩增有 EGFR 过度表达^[14]。FISH 检测有确切的 EGFR 基因扩增病例仅一例有膜强阳性^[15]。在 EGFR 表达的免疫组化结果和 EGFR 基因拷贝数间没有相关性^[16]。而研究发现 FISH 和 IHC 检测结果比较显示出高度一致性,约 90%^[17]。

本研究结果显示部分免疫组化 EGFR 阳性乳腺癌病例,即使是强阳性(+++),其基因扩增也呈阴性,高度基因扩增的并不一定显示强的免疫组化阳性,而低度扩增病例的免疫组化结果从弱到强(+ 到 +++),这些结果提示 EGFR 表达的免疫组化结果并不能很好地反映基因扩增状态。仅仅在一小部分 EGFR 免疫组化阳性病例中可检测到 EGFR 基因扩增。而免疫组化检测 EGFR 阴性的病例均不能检测到基因扩增,但研究发现 EGFR 基因扩增阴性的病例也对西妥昔单抗治疗有效,这提示基因扩增在预测西妥昔单抗效果尚需进一步证实。

对肿瘤中 EGFR 扩增的 FISH 结果解释和判断需要慎重,这是因为大肠癌细胞的细胞核往往重叠,当细胞核拥挤时容易判断为高度扩增。每个核小于 1 个 0 信号的低度扩增则需要仔细计数和辨认。应该对没有核重叠的区域进行计数而避免错误判断,但有时对核重叠区进行计数难以避免,这可能使产生假阳性的一个潜在原因。解决这个问题是对一个视野的所有细胞核和核中所有信号进行计数。除了以上所述技术上的局限性,FISH 是一种较简单而实用的基因扩增检测技术^[18-20]。乳腺癌中 EGFR 基因扩增较免疫组化检测 EGFR 蛋白表达少出现,免疫组化在预测基因扩增方面特异性低,而 FISH 技术可能更适于 EGFR 靶向治疗病例的选择。

参考文献(References)

- [1] Lebeau A, Unholzer A, Amann G, et al. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 79(2):187-198
- [2] Matkovic B, Juretic A, Separovic V, et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, HER-2, CK 5/6, p63 and EGFR antigen expression in medullary breast cancer[J]. Tumori, 2008, 94(6): 838-844
- [3] Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10 (3):R49
- [4] Leibl S, Moinfar F. Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(7):700-704
- [5] Aguiar FN, Mendes HN, Bacchi CE, et al. immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2013, 35(3):97-102
- [6] Aguiar FN, Mendes HN, Bacchi CE, et al. Comparison of nuclear grade and Pala EE, Bayol, Cumurcu S, et al. Immunohistochemical characteristics of triple negative/basal-like breast cancer [J]. Turk

- Patoloji Derg, 2012, 28(3):238-244
- [7] Buchholz TA, Tu X, Ang KK, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in patients who have breast carcinoma treated with doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy [J]. Cancer, 2005, 104(4):676-681
- [8] Aziz SA, Pervez S, Khan S, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a prognostic marker: an immunohistochemical study on 315 consecutive breast carcinoma patients[J]. J Pak Med Assoc, 2002, 52(3): 104-110
- [9] Nozoe T, Mori E, Iguchi T, et al. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer [J]. Breast Cancer, 2011, 18(1):37-41
- [10] Shao MM, Zhang F, Meng G, et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein overexpression in basal-like carcinoma of the breast[J]. Histopathology, 2011, 59(2):264-273
- [11] Kersting C, Tidow N, Schmidt H, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma [J]. Lab Invest, 2004, 84(5):582-587
- [12] Lv N, Xie X, Ge Q, et al. Epidermal growth factor receptor in breast carcinoma: association between gene copy number and mutations[J]. Diagn Pathol, 2011, 6:118
- [13] Gumuskaya B, Alper M, Hucumenoglu S, et al. EGFR expression and gene copy number in triple-negative breast carcinoma [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 203(2):222-229
- [14] Bhargava R, Gerald WL, Li AR, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations[J]. Mod Pathol, 2005, 18(8):1027-1033
- [15] Grob TJ, Heilenk tter U, Geist S, et al. Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted therapy in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(2):561-567
- [16] Sauer T, Beraki K, Noren T, et al. EGFR gene copy number heterogeneity in fine-needle aspiration cytology from breast carcinomas determined by chromogenic in situ hybridization[J]. Diagn Cytopathol, 2005, 33(4):228-232
- [17] Orvieto E, Dei Tos AP. Measurement of HER-2/neu in breast cancer: which methodologic approach [J]. Pathologica, 2001, 93(3):183-188
- [18] Sekaran A, Kandagaddala RS, Darisetty S, et al. HER2 expression in gastric cancer in Indian population--an immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study [J]. Indian J Gastroenterol, 2012, 31(3):106-110
- [19] Wulf MA, Bode B, Zimmermann D, et al. Silver-enhanced in situ hybridization for determination of EGFR copy number alterations in non-small cell lung cancer [J]. Am J Surg Pathol, 2012, 36(12): 1801-1808
- [20] Huang WT, Li LY, Pang J, et al. Fluorescence in situ hybridization assay detects upper urinary tract transitional cell carcinoma in patients with asymptomatic hematuria and negative urine cytology[J]. Neoplasma, 2012, 59(4): 355-360

(上接第 2729 页)

- [13] Agrawal VS, Kapoor S. An in vitro scanning electron microscopic study comparing the efficacy of passive ultrasonic and syringe irrigation methods using sodium hypochlorite in removal of debris from the root canal system[J]. J Ir Dent Assoc, 2012, 58(3):156-161
- [14] 张志慧, 袁杰, 孙丽华, 等. 不同冲洗液对根管超声冲洗效果的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(1): 102-104
- Zhang Zhi-hui, Yuan Jie, Sun Li-hua, et al. Cleaning Effects of Different Irrigation Solutions on the Root Canal with Ultrasonic Instrumentation[J]. Journal of Oral Science Research, 2010, 26(1): 102-104
- [15] Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rocas IN, et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study [J]. J Endod, 2012, 38(9):1202-1206
- [16] 侯晓雷, 郑瑜, 李翠莉, 等. 根管治疗失败的原因及预防[J]. 现代生物医学进展, 2010, 4: 780-783
- Hou Xiao-lei, Zheng Yu, Li Cui-li, et al. Causes and Prevention of Treatment Failure of Root Canal[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 4: 780-783
- [17] 杨志峰, 孟令秋, 李海霞, 等. 两种根管冲洗方法对前牙侧支根管充填的影响[J]. 中国美容医学, 2009, 18(10): 1504-1505
- Yang Zhi-feng, Meng Ling-qiu, Li Hai-xia, et al. Effect of obturated lateral canals of anterior teeth treated with two kinds of Root canals irrigation[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2009, 18(10): 1504-1505
- [18] Kocani F, Kamberi B, Dragusha E. Manual sonic-air and ultrasonic instrumentation of root canal and irrigation with 5.25% sodium hypochlorite and 17% Ethylenediaminetetraacetic acid: A scanning electron microscope study[J]. J Conserv Dent, 2012, 15(2):118-122
- [19] Castelo-Baz P, Martí n-Biedma B, Cantatore G, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth[J]. J Endod, 2012, 38(5):688-691
- [20] 谭青松, 彭彬, 边专, 等. 不同浓度次氯酸钠根管超声冲洗的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2007, 23(4): 388-390
- Tan Qing-song, Peng Bin, Bian Zhuan, et al. Efficacy of Sodium Hypochlorite for Root Canal Irrigation with Ultrasonic Agitation[J]. Journal of Oral Science Research, 2007, 23(4): 388-390