

## 参考文献

- 1 Paradis G, Chiolero A. The cardiovascular and chronic diseases epidemic in low - and middle - income countries: a global health challenge [J]. Am Coll Cardiol, 2011, 57(17): 1775 - 1777
- 2 缪惠宁,王艳飞,王雨水,等.冠心病患者冠状动脉粥样硬化程度与颈动脉粥样硬化的相关性研究[J].中国心血管病研究,2014,12(10):911 - 914
- 3 Taylor SR, Meadowcroft LM, Williamson B. Prevalence, pathophysiology and management of androgen deficiency in men with metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, or both [J]. Pharmacotherapy, 2015, 35:780 - 792
- 4 储岳峰,周鑫.冠心病合并2型糖尿病患者的临床及冠脉造影特点[J].中国心血管病研究,2013,11:957 - 959
- 5 Kannel WB. Framingham study insights on diabetes and cardiovascular disease[J]. Clin Chem, 2011, 57(2):338 - 339
- 6 Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, et al. Sustained elevation of interleukin 33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non - responsive to anti - tumor necrosis factor: possible association with persistent IL. 1e signaling and a poor clinical response [J]. Rheumatology, 2012, 52(5):1397 - 1401
- 7 梁力晖,刘翠中,伍媛.糖耐量异常男性老年患者睾酮水平相关性研究[J].医学临床研究,2013,30(3):557 - 558
- 8 江涛,李艳,王昌富.雄激素与男性冠心病的关系的研究进展[J].
- 9 Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory Diseases, and therapeutic strategies[J]. Am J Pathol, 2012, 181(1):8 - 18
- 10 陈莹,李静,王楚媛,等.男性2型糖尿病患者体内血清性激素水平测定的临床意义[J].中国医科大学学报,2013,42(9):808 - 815
- 11 楼亚梅,徐哲荣,杨云梅,等.十一酸睾酮对雄性家兔髂动脉内膜损伤后的修复作用[J].中国动脉硬化杂志,2007,15(4):272 - 275
- 12 Weiss EP, Villareal DT, Fontana L, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans[J]. Aging: Albany NY, 2011, 3: 533 - 542
- 13 Traish AM, Abdallah B, Yu G. Androgen deficiency and mitochondrial dysfunction: implications for fatigue, muscle dysfunction, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease[J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2011, 8:431 - 444
- 14 Fujioka K, Kajita K, Wu Z, et al. Dehydroepiandrosterone reduces preadipocyte proliferation via androgen receptor[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302:694 - 704

(收稿日期:2015-10-15)

(修回日期:2015-11-05)

## 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈人乳头瘤病毒阳性人群中的分流价值

陈海迎 郑小冬 郑建琼 廖婵婵 吕杰强

**摘要 目的** 探讨高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) E6/E7 mRNA 检测在宫颈人乳头瘤病毒 DNA 阳性人群分流管理中的临床应用价值。**方法** 2014年1月~2015年7月因宫颈疾病在温州医科大学第三临床学院妇科门诊就诊的宫颈 HPV-DNA 阳性患者共970例,随机选取336例,均行 HPV E6/E7 mRNA 及宫颈细胞学(TCT)检测,并追踪其病理学结果。分析 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数与病理分级及宫颈细胞学结果的关系,预测其对 CIN II+ 的诊断价值。**结果** 鳞癌(squamous cell cancer, SCC)组拷贝数最高,无上皮内病变或恶性病变(negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM)组拷贝数最低,宫颈癌组 HPV E6/E7 mRNA 阳性率及拷贝数最高,宫颈炎性改变组阳性率及拷贝数最低。不同细胞学诊断级别间 HPV E6/E7 mRNA 水平比较,细胞学异常组(包括 atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS, low-grade squamous intraepithelial lesion LISL, high-grade squamous intraepithelial lesions HISL, SCC)的表达水平高于 NILM 组,差异有统计学意义( $F = 28.99, P < 0.01$ ),不同宫颈组织病变程度级别间 HPV E6/E7 mRNA 水平比较,CIN II+(histological dysplasia or cancer)的表达水平高于 CIN II-,差异有统计学意义( $F = 40.154, P < 0.01$ )。 Spearman 等级相关提示宫颈细胞学诊断级别及宫颈病理级别同 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数呈正相关,相关系数分别为( $r = 0.408, P < 0.01; r = 0.699, P < 0.01$ )。**结论** 随着宫颈病变程度的加重,HPV E6/E7 mRNA 拷贝数逐渐增加,对宫颈 HPV-DNA 阳性患者的分流有一定的意义,对宫颈癌有一定的筛查价值。

基金项目:温州市科技局科研项目(Y20140546)

作者单位:325000 温州医科大学第三临床学院、温州市人民医院妇产科(陈海迎、郑小冬、郑建琼、廖婵婵);325000 温州医科大学附属第二医院妇产科(吕杰强)

通讯作者:吕杰强,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:jieqianglu@126.com

关键词 人乳头瘤病毒 E6/E7mRNA 宫颈上皮内瘤变 HPV - DNA 分流

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.035

**Clinical Performance of Human Papillomavirus (HPV) mRNA after Detection of HPV DNA.** Chen Haiying, Zheng Xiaodong, Zheng Jianqiong, et al. Department of Obstetrics and Genecology, Wenzhou Third Clinical Institute of Wenzhou Medical University, The People's Hospital of Wenzhou, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To detect the role of Human papillomavirus (HPV) mRNA testing in the cervical cancer screening program in the triage of women harboring HPV DNA. **Motheds** A total of 336 patients were admitted to the Department of Obstetrics and Genecology, Wenzhou Third Clinical Institute of Wenzhou Medical University, the People's Hospital of Wenzhou from January 2014 to July 2015. If the samples in case of HPV DNA detection were given cytologic examination, HPV E6/E7mRNA testing and colposcopic biopsy by histopathology. According to different cytologic examination and different histological results, the correlation between the expression of HPV E6/E7 mRNA were analyzed. **Results** The transcripts of the squamous cell cancer group were highest, while the negative for intraepithelial ledion or malignancy group were the lowest. The transcripts and positive rate of cervical cancer group were highest, while the chronic cervical inflammation group were the lowest. The levels of HPV E6/E7 mRNA in abnormal cytologic result groups (ASC, LSIL, HSIL, SCC) were significantly higer than that in NILM group respectively ( $F = 28.99, P < 0.01$ ). The levels of HPV E6/E7 mRNA in CIN II + (histological dysplasia or cancer) were significantly higer than that in CIN II - group respectively ( $F = 40.154, P < 0.01$ ). Spearman rank analysis presented that the correlation between HPV E6/E7 mRNA levels with severity of cervical cytologic lesions ( $r = 0.408, P < 0.05$ ) and histologic lesions ( $r = 0.699, P < 0.01$ ). **Conclusion** With the development of cervical lesion, the expression of HPV E6/E7mRNA were increasing. Testing of HPV E6/E7mRNA may be usefull for the triage of women harboring HPV - DNA.

**Key words** Human papillomavirus; E6/E7mRNA; Cervical intraepithelial neoplasia; HPV - DNA; Triage

据全球统计数字显示,宫颈癌是危害女性健康的第二大恶性肿瘤。现大量研究表明人乳头瘤病毒感染,特别是高危型 HPV 持续感染是绝大多数癌前病变和宫颈癌的主要原因<sup>[1]</sup>。宫颈上皮内瘤变是与宫颈癌密切相关的一组癌前病变,反映了宫颈癌发展过程中的连续过程。从宫颈上皮内瘤变发展为宫颈癌一般需 10~15 年。早发现、早治疗至关重要。那就需要更好的筛查方法将其早期阶段筛选出来。

近年来,积累的大量证据表明把 HPV - DNA 作为主要的筛查工具大大提高了筛查效率。然而,高危型乳头瘤病毒 (high - risk human papillomavirus, HR - HPV) 阳性结果在筛选的人群中十分常见,而且大部分是感染暂时的。事实上,HPV 阳性价值对于 CIN II + 的患者是非常低的。其中只有小部分妇女进展为 CIN II + 或是宫颈癌。这就有必要去选择一种新的可替代的方法去剔除那些临幊上无关紧要的,短暂的 HPV 感染。因此,检测 HPV 病基因 E6/E7mRNA 的表达具有非常重要的意义。本研究旨在探讨高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 检测是否能更好的预测宫颈癌前病变的进展,从而为 HPV 阳性患者提供更好的分流方法。

## 资料与方法

1. 临床资料:选取 2014 年 1 月~2015 年 7 月在温州医科大学第三临床学院(温州市人民医院)妇科

门诊就诊且检查 HPV - DNA 阳性患者 336 例。其年龄为 26~77 岁,多以接触性出血、下腹隐痛、白带异常或体检等就诊,均无 CIN、宫颈癌史,无全子宫切除史。目前无妊娠,取材前 3 天无阴道冲洗及用药史。对研究的患者均行 TCT 及 HPV E6/E7 mRNA 检测,同时行阴道镜下活组织检查。

2. 方法:(1)TCT 检查:采用北京英硕力新柏科技有限公司的新柏氏液基薄层细胞学检测系统,用 TCT 专用毛刷取材,将宫颈管内和鳞状上皮交界处采集的细胞涮洗在 TCT 专用取样瓶中,将 TCT 专用制片机制成薄层涂片,经巴氏染色后镜检,诊断标准按照国际癌症协会推荐的 TBS(2001 年)分类法,具体分为 NILM、ASCUS、不排除高度鳞状上皮病变的非典型鳞状上皮细胞 (atypical squamous cells cannot exclude HSIL, ASC - H)、LSIL、HSIL 及 SCC,由专业的医师进行诊断。(2)HPV - DNA 分型检测:用窥阴器暴露宫颈,拭去宫颈口黏液,将宫颈刷置于宫颈口,轻轻搓动宫颈刷使其顺时针方向旋 5 周。慢慢取出宫颈刷,将其放入取样管内,取样管中已加有专用细胞保存液,拧紧瓶盖。采用上海凯普生物化学有限公司的 PCR 反向点杂交技术。所有操作均严格按照试剂盒进行操作。(3)病理性检查:对 HPV - DNA 阳性人群行阴道镜检查及宫颈活组织检查。病理性检查结果:宫颈炎性改变,宫颈上皮内瘤变 I 级 (cervical in-

traepithelial neoplasia I, CIN I)、CIN II 级、CIN III 级及宫颈癌,诊断标准参照妇产科学。(4) HPV E6/E7 mRNA 检测:HPV E6/E7mRNA 是采用支链 DNA 技术,该技术是西门子授权科蒂亚的核心专利技术,该技术是一项全新的核酸探针信号放大检测技术(裂解→杂交捕获→信号放大→化学发光→结果读取)。操作过程中严格按照试剂盒进行操作。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,方差齐性的多组之间采用 One-way ANOVA 检验,两两比较采用 LSD 法;多组阳性率比较采用 Chi-Square 检验。各指数相关分析采用 Spearman 等级相关法。诊断价值采用受试者工作曲线(ROC)分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 细胞学检查结果与其对应的 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数水平比较:336 例患者细胞学检测结果分为 5 组:NILM 92 例(27.38%),ASC114 例(33.9%),LISL82 例(24.40%),HISL 42(12.5%),SCC 8 例(2.3%),各个组别的 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数相比较,差异有统计学意义( $F = 28.99, P < 0.01$ )。SCC 组拷贝数最高,NILM 组拷贝数最低。与 NILM 相比,ASC、LISL、HISL、SCC4 组的 E6/E7 mRNA 拷贝数高于 NILM 组, $P$  值分别为 0.024、0.012、0.000、0.000,详见表 1。

表 1 不同细胞学水平宫颈组织 HPV mRNA 拷贝数比较

组别(细胞学检查)	n	中位数	四分位间距
NILM	11	231.16	105.57~622.16
ASC	75	677.35	129.45~1923.75
LISL	5	1062.10	175.75~3036.12
HISL	7	4306.84	1190.08~11153.30
SCC	11	8600.21	4983.68~21216.76

2. 336 例患者病理检查结果:根据结果分为 5 组:宫颈炎性改变 118 例(35.11%),CIN I 114 例(33.93%),CIN II 82 例(24.40%),CIN III(16.67%),宫颈癌 12 例(3.5%),各个组别的 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数相比较,差异有统计学意义( $F = 40.154, P < 0.01$ )。宫颈癌组拷贝数最高,宫颈炎性改变组拷贝数最低。与宫颈炎性改变组相比,CIN II、CIN III、宫颈癌 3 组的 E6/E7 mRNA 拷贝数高于宫颈炎性组及 CIN I 组, $P$  值分别为 0.000、0.000、0.000,但 CIN I 与宫颈炎性改变组拷贝数差异无统计学意义( $P = 0.320$ )。另由表 3 可见各组阳性率比较差异有统

计学意义( $\chi^2 = 145.00, P < 0.05$ )。宫颈炎组阳性率最低(15.25%),宫颈癌组阳性率最高(100%)。

表 2 不同病理级别宫颈组织 HPV mRNA 拷贝数比较

病理结果	n	中位数	四分位间距
宫颈炎性改变	118	141.87	0~354.64
CIN I	75	477.30	121.00~1329.00
CIN II	75	1062.10	924.20~4233.00
CIN III	56	4306.84	1521.90~10563.57
宫颈癌	12	8600.21	4087.98~18476.05

表 3 不同病理级别宫颈组织 HPV mRNA 的阳性率比较

病理级别	n	HPV E6/E7mRNA 阳性例数
宫颈炎性改变	118	18
CIN I	75	35
CIN II	75	62
CIN III	56	53
宫颈癌	12	12

拷贝数≥500 拷贝/毫升为阳性,<500 拷贝/毫升为阴性

3. HPV E6/E7 mRNA 图 1 和图 2 可以说明 5 组不同级别的宫颈细胞学及病理学结果所对应的 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数随着级别的升高而呈递增状态。将宫颈细胞学检查结果及病理学检查结果与 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数进行 Spearman 等级相关分析,相关系数分别为  $r_{\text{细胞学}} = 0.408 (P = 0.000), r_{\text{病理学}} = 0.699 (P = 0.000)$ ,可以看出 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数与宫颈组织病变程度之间呈正相关(图 3)。

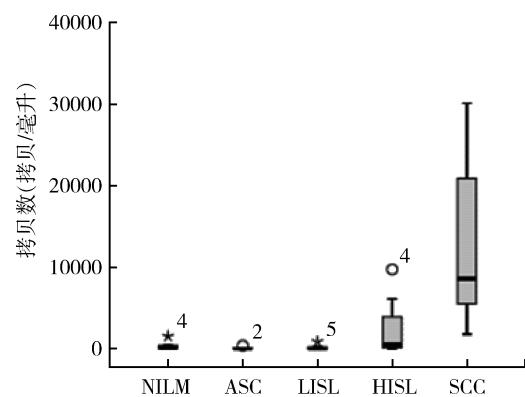


图 1 宫颈细胞学不同级别病变 HPV E6/E7 mRNA 水平箱线图

4. 336 例 HPV 阳性患者行 HPV E6/E7 检测:HPV mRNA 对诊断为 CIN II + 的曲线下面积为 0.887,95% CI:0.851~0.923,截断值为 419.85 拷贝/毫升,遂前假定拷贝数≥500 拷贝/毫升为阳性,

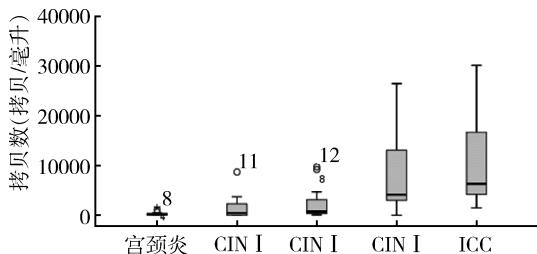


图 2 宫颈病理学不同级别病变 HPV E6/E7 mRNA 水平箱线图

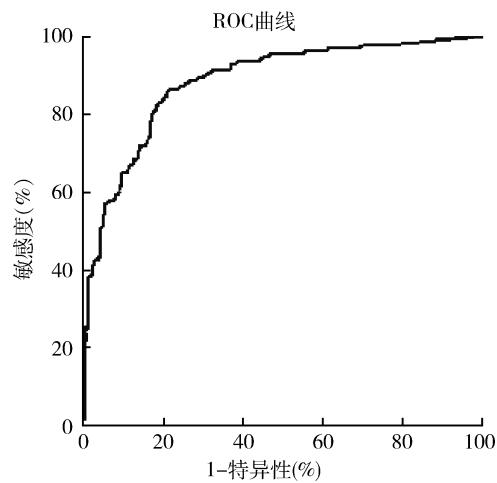


图 3 HPV - mRNA 对诊断 CIN II + 的曲线下面积

<500 拷贝/毫升为阴性。

### 讨 论

1974 年首次提出 HPV 感染与宫颈癌有密切关系,现在已基本明确 HPV 感染是宫颈癌前病变和浸润性宫颈癌发生的必要条件<sup>[2~5]</sup>。HPV 是自然界广泛存在的无包膜的闭环、双链 DNA 病毒。病毒基因组全长约 7904bp。HPV 早期蛋白包括 E1、E2、E3、E4、E5、E6 和 E7。随着医学技术的不断发展,但 HPV 仍不能在体外培养,又无合适的实验动物,只能通过形态学方法和分子生物学技术进行检查。现检测 HPV 感染的方法层出不穷,目前常用的检测 HPV 感染常用 HPV 斑点杂交、荧光定量聚合酶 PCR、HPV HC2 这 3 种 DNA 方法,这些方法都是以病毒基因组 DNA 为检测目标,以此判定待测标本细胞载有的病毒类型及负荷量,均有敏感度高,特异性偏低,这大大增加了患者的心理负担及不必要的阴道镜检查率。E6/E7 是病毒的致癌基因,编码病毒癌蛋白,在细胞转化和维持转化组织恶性表型的过程中起着至关重要的作用。

现有研究已经证实,E6/E7 癌蛋白表达过程中反

映其转录癌基因 E6/E7 mRNA 的表达产物更能体现 HPV 致癌基因活动程度及预测病情进展。

Molden 等<sup>[6]</sup>对宫颈病变患者进行几年随访发现 HPV mRNA 较 HPV - DNA 具有更高特异性及阳性预测值,特别是对于 CIN II + 以上的患者具有更高的特异性及阳性预测值<sup>[7~10]</sup>。目前 HPV - DNA 分型检测在宫颈癌筛查过程中发挥着重要作用。但是其局限性亦众所周知,很多研究发现其敏感度高,但特异性较低,且 HPV - DNA 检测不能区分宫颈 HPV 感染的阶段,且其在凋亡细胞中也可表达,这说明 HPV - DNA 阳性不能体现其致癌风险,而大部分 HPV - DNA 阳性患者只能在 3~6 个月的复查等待过程中承受着严重的焦虑和精神压力<sup>[11]</sup>。

本研究旨在探讨高危型人乳头瘤病毒 HPV E6/E7 mRNA 检测在 HPV 阳性患者人群中分流管理应用。本研究对笔者医院妇科门诊就诊的宫颈 HPV 阳性患者 336 例,均行 HPV E6/E7 mRNA 及宫颈细胞学(TCT)检测,并追踪其阴道镜后病理检查结果。结果显示,不同细胞学诊断级别间 HPV E6/E7 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 28.99, P < 0.01$ ),宫颈组织不同病理级别间 HPV E6/E7 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 40.154, P < 0.01$ ),说明 HPV E6/E7 mRNA 与宫颈细胞学及宫颈组织病理级别间存在密切关系。

据 Spearman 等级相关亦提示宫颈细胞学诊断级别及宫颈病理级别同 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数呈正相关,相关系数分别为( $r = 0.408, P < 0.01; r = 0.699, P < 0.01$ ),即 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数越高,其发生宫颈癌前病变甚至宫颈癌的风险越大。且根据箱图同样可看出 HPV E6/E7 mRNA 拷贝数随着宫颈细胞学级别及病理级别的升高而升高,亦证明二者关系密切,且呈正相关,对预测宫颈癌前病变的发生有一定的意义。另外根据 ROC 曲线算得截断值为 419.85 拷贝/毫升,但是由于本次研究样本量有限,HPV mRNA 对 CIN II + 的截断值有待于开展大样本研究进一步证实。

总之,HPV 癌基因 E6/E7 表达与宫颈病变关系密切,其高表达很可能促进宫颈癌前病变的发生、发展。HPV E6/E7 mRNA 检测在一定程度上可反映病毒的致癌能力,对 HPV 阳性患者有一定的分流价值,应有较好的临床应用前景。

### 参考文献

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus

- is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 18(9):12-19
- 2 Kr AJ, Skaland I, Janssen EA, et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability [J]. Int J Gynecol Pathol, 2004, 23(2):100-109
- 3 Baussano I, Elfstrom KM, lazzarato F, et al. Type-specific human papillomavirus biological features: Validated model-based estimates [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e81171-e81175
- 4 Adersson S, Rylander E, larsson B, et al. The role of human pspiloma virus in cervical carcinoma carcinogenesis [J]. Eur Cancer, 2001, 37(37):326-331
- 5 Cheah PL, Lool LM. P53 immunohistochemical expression messages in cervical carcinogenesis [J]. Pathology, 2002, 34(4):100-109
- 6 Molden T, Nygard JF, Krausl. Predicting CIN2+ when detecting HPV Mrna and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR; A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL [J]. Int J Cancer, 2005, 114(6):97-100
- 7 Kliopoulos G, Chrelias C, Pappas A, et al. The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2012, 9(1):794-801
- 8 Sørbye SW, Arbyn M, Fismen S, et al. HPV E6E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy [J]. PLoS One, 2011, 6(e):26022-26025
- 9 Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence—implications for cervical disease progression and monitoring [J]. Med Virol, 2004, 7(3):65-70
- 10 Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Human papillomavirus E6E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age [J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(2):95-100
- 11 Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears [J]. Cancer Epidemiol Biomar, 2008, 17(3):3033-3042

(收稿日期:2015-10-12)

(修回日期:2015-11-06)

## 贲门癌与非贲门癌根治术后患者的临床病理特点及预后分析

苏虎艳 徐晓燕 方乐平 黄普文

**摘要 目的** 探讨贲门癌与非贲门癌根治术后患者的临床病理特点及预后。**方法** 回顾性分析笔者医院2007年8月至2010年3月717例行胃癌根治术患者的临床资料及随访资料,按肿瘤部位分为贲门癌组和非贲门癌组,对两组患者的临床病理特点及预后进行分析。**结果** 与非贲门癌组相比,贲门癌组男性患者、≥60岁者、瘤体最大直径≥4cm者、有神经侵犯者、有脉管内癌栓者、术前白蛋白<40g/L者、Ⅲ期患者、有淋巴结转移者、浸润深度达T<sub>3</sub>~T<sub>4</sub>者所占比例更高,且差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而两组在术后病理分级差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。贲门癌根治术后患者的5年生存率为42.0%,明显低于非贲门癌根治术后患者的5年生存率63.2%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 贲门癌与非贲门癌在临床病理方面差异有统计学意义,且根治术后预后比非贲门癌差。

**关键词** 胃肿瘤 贲门肿瘤 根治性切除术 预后**中图分类号** R73      **文献标识码** A      **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.036

**Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis of Radical Resection for Cardia Cancer and Non-cardia Cancer.** Su Huyan, Xu Xiaoyan, Fang Leping, et al. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu 210000, China

**Abstract Objective** To explore the clinicopathological features and prognosis in cardia cancer and non-cardia cancer that underwent gastric radical resection. **Methods** A retrospective clinical analysis was made in 717 cases gastric cancer. All the patients were treated by radical resection in Jiangsu province people's hospital from Aug 2007 to Mar 2010. According to different tumor position the patients were divided into cardia cancer group and non-cardia cancer group. **Results** Patients with males, more than 60 years old, tumor max diameter more than 4cm, nerve invasion, vascular tumor embolus, preoperative albumin lower 40g/L, stage III (TNM), lymph node