

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.16.011

FFPE 组织 HPV 检测中 PCR-反向点杂交技术的应用：
两种核酸提取方法的比较王 诚, 童玲玲, 刘千琪, 况 薇[△]

四川大学华西第二医院病理科/出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川成都 610011

摘 要:目的 比较两种不同核酸提取方法在人乳头瘤病毒(HPV)亚型检测中的应用,为实验室选择相应的核酸提取方法来获得有效的 HPV 结果提供依据。方法 收集 25 例浸润性宫颈癌福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织标本,采用粗提法和纯化法两种核酸提取方法提取 DNA 标本,并通过检测 DNA 浓度、纯度及内参 β -Globin 来评估 DNA 质量。将提取的 DNA 经 PCR 扩增后,应用 PCR-反向点杂交法检测 HPV 亚型,分析两种提取方法 HPV 检测结果的有效性及其一致性。结果 两种提取方法均能获得适量的 DNA 用于 HPV 检测,粗提法较纯化法可获得较高的 DNA 浓度($P < 0.05$),但存有一定有机物及蛋白质污染。纯化法较粗提法获得的 DNA 纯度更高($P < 0.05$)。将粗提法和纯化法提取的 DNA 用于检测 HPV 感染,总 HPV 阳性率分别为 92% 和 96%。采用粗提法提取的 DNA 标本高危型 HPV(HR-HPV)阳性率低于纯化法(92% vs. 96%),但单一型 HPV16 阳性率高于纯化法(44% vs. 36%);与纯化法相比,粗提法提取的 DNA 无法检测出更多型别的混合感染,而 FFPE 组织标本经纯化法分离后可检测出 HPV33、HPV53、HPV58 等多型别感染。结论 采用粗提法和纯化法进行 FFPE 组织核酸提取,均可获得足量 DNA 用于 HPV 亚型检测,且 HR-HPV 阳性率达 90% 以上。粗提法具有操作简便、耗时较短、成本较低等优势,能够获得有效的 HPV 结果,但对于 HPV 多型别感染的检测表现欠佳。

关键词:福尔马林固定石蜡包埋组织; 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; PCR-反向点杂交法

中图分类号:R711.74

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)16-2203-05

Application of PCR-reverse dot blot for HPV detection in FFPE tissue:
comparison of two nucleic acid extraction methodsWANG Cheng, TONG Lingling, LIU Qianqi, KUANG Wei[△]

Department of Pathology, West China Second Hospital, Sichuan University/Key Laboratory
of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of
Education, Chengdu, Sichuan 610011, China

Abstract: Objective To compare the application of two different nucleic acid extraction methods in human papillomavirus (HPV) typing detection, to provide a basis for laboratories to select corresponding nucleic acid extraction methods to obtain effective HPV results. **Methods** Collected formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens from 25 cases of invasive cervical cancer. DNA samples were extracted by two nucleic acid extraction methods: crude extraction and purification. DNA quality was assessed by detecting DNA concentration, purity and internal reference β -Globin. After the extracted DNA was amplified by PCR, HPV typing was detected by PCR-reverse dot blot method. The validity and consistency of the HPV detection results of the two extraction methods were analyzed. **Results** The two nucleic acid extraction methods could obtain the right amount of DNA for HPV detection. Compared with the purification method, the crude extraction method could obtain higher DNA concentration ($P < 0.05$), but there were certain organic and protein contamination. The purity of DNA obtained by the purification method was higher than that obtained by the crude extraction method ($P < 0.05$). DNA extraction by crude extraction and purification were used to detected HPV infection, and the total HPV positive rates were 92% and 96% respectively. The positive rate of high-risk HPV (HR-HPV) in DNA samples extracted by crude extraction method was lower than that by purification method (92% vs. 96%), but the positive rate of single type HPV16 was higher than purification method (44% vs. 36%). Compared with the purification method, the DNA extracted by the crude extraction method could not detect more types of mixed infection, and the FFPE tissue specimens separated by the purification method could detect HPV33, HPV53, HPV58 and other multi-type infections. **Conclusion** Nucleic acid ex-

traction from FFPE tissue by crude extraction and purification methods can obtain sufficient DNA for HPV typing detection. And HR-HPV positive rate more than 90%. The crude extraction method has the advantages of simple operation, short time-consuming and low cost, and can obtain effective HPV results, but it is not good for the detection of HPV multi-type infection.

Key words: formalin-fixed paraffin-embedded tissue; human papillomavirus; cervical cancer; PCR-reverse dot blot method

在全球范围内,宫颈癌是女性癌症死亡的第 3 大原因,每年新发病例约 52.8 万,死亡病例约 26.6 万^[1]。约 95% 的宫颈癌是由人乳头瘤病毒(HPV)持续感染引起的,尤其是高危型 HPV(HR-HPV)16 和 18 两种亚型,是肿瘤转化发生的主要激活因素^[2-3]。目前,宫颈脱落细胞 HPV 检测是宫颈癌筛查及后续疫苗接种研究的主要手段^[4]。然而,行宫颈脱落细胞 HPV 检测的大部分感染人群是一过性感染^[5]。采用组织标本进行检测对明确 HPV 感染亚型与肿瘤病变的关系尤为重要。福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织是使用最广泛的可用于临床回顾性研究的标本资料,近年来,FFPE 组织用于 HPV 检测引起研究者的广泛关注^[6]。福尔马林固定及石蜡处理会引起 DNA 片段化、DNA 与蛋白质相互交联,从而影响标本 DNA 的提取产量和扩增效率,因此对于 FFPE 组织的 DNA 提取及 HPV 检测方法尚存在争议。本研究通过对比粗提法和纯化法两种核酸提取方法获得的 DNA 质量,分析 PCR-反向点杂交法(PCR-RDB)用于 HPV 检测所得结果的有效性,根据经济效益及实验室条件选择不同的核酸提取方法,为临床提供有效的 HPV 检测结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2019 年 9 月至 2020 年 10 月四川大学华西第二医院病理科存档的宫颈癌标本(FFPE 组织)25 例。所有标本病理诊断均为浸润性宫颈癌,标本来源患者的中位年龄为 48.7 岁。其中宫颈鳞癌 12 例,腺癌/黏液腺癌 6 例,腺鳞癌 6 例,小细胞神经内分泌癌 1 例。宫颈癌国际妇产科联盟(FIGO)分期:ⅠB 期 14 例,ⅡA 期 5 例,Ⅲ期 5 例,Ⅳ期 1 例。

1.2 仪器与试剂 FFPE 组织核酸提取试剂盒(QIAamp® DNA FFPE Tissue kit,德国凯杰公司)、NanoDrop 2000 分光光度计(赛默飞世尔科技公司)、PCR-RDB 检测试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司)、内参 β -Globin 试剂(上海透景生命科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 FFPE 组织切片的制备 切片均由有经验的病理技师完成。从蜡块中切取 6 张 5 μ m 切片(面积 2~4 cm²),第 1 张及最后 1 张用于 HE 染色及癌灶面积评估,第 2、3 张用于粗提法,第 4、5 张用于纯化法。操作前、后均用 75% 乙醇擦拭切片机、蜡块和刀架表面,每切一个蜡块更换一个刀口,用一次性塑料镊子

转移切片至 EP 管。

1.3.2 DNA 提取 粗提法:加入 200 μ L 裂解液,振荡混匀 1 min,置入金属浴 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min,放入离心机中 12 000 r/min 离心 5 min,离心后由上至下分为 3 层,分别为石蜡层、DNA 溶液层、组织碎片层,取中间 DNA 溶液层进行检测。

纯化法:二甲苯加入 EP 管脱腊,无水乙醇洗涤去除残留二甲苯,后续操作按照 FFPE 组织核酸提取试剂盒说明书操作。最后,加入 100 μ L 洗脱液获得 DNA 溶液。

1.3.3 DNA 质量评估 用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。通常认为 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 表明 DNA 纯度较好,低于 1.6 表明标本中蛋白质含量超标或酚等污染,高于 2.0 表明标本中含有 RNA。采用实时荧光定量 PCR 法检测标本中 β -Globin(Cy5 通道)Ct 值,Ct 值 ≤ 32 判定结果为有效,Ct 值 > 32 判定结果为无效。

1.3.4 HPV-DNA 亚型检测 HPV-DNA 亚型检测采用 PCR-RDB。标本 DNA 提取后,按操作说明书进行 PCR 扩增、杂交和显色。设置阴性和阳性对照品作为质控,以尼龙膜条上 IC 点作为内参质控点,膜条各检测点有蓝色信号表明 HPV 有对应基因亚型阳性;若 HPV 阳性,IC 点无信号,则可能为 PCR 扩增竞争抑制,结果应判读为 HPV 阳性;若 HPV 为阴性,且 IC 点无信号,则表明该标本检测操作失败。PCR-RDB 检测试剂盒可检出 23 种亚型,包括 18 种 HR-HPV 亚型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83)和 5 种低危型 HPV(LR-HPV)亚型(6、11、42、43、81)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种提取方法提取的 DNA 质量比较 粗提法提取的 DNA 浓度为 (60.70 ± 28.50) ng/ μ L,纯化法提取的 DNA 浓度为 (21.65 ± 10.46) ng/ μ L,粗提法较纯化法可获得较高的 DNA 浓度($P < 0.05$);粗提法和纯化法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 分别为 1.44 ± 0.20 、 1.92 ± 0.16 ,纯化法获得的 DNA 纯度更高($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 法检测两组标本 β -

Globin 的 Ct 值,发现粗提法 Ct 值高于纯化法 (18.99 ± 1.88 vs. 17.44 ± 2.79 , $P < 0.05$),但有 1 例标本 Ct 值 > 32 。粗提法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 虽明显低于纯化法,但 DNA 提取成功率可达 96%,除 1 例标本未获得足量 DNA 外,其余标本均完成检测,且 Ct 值均 < 32 。见图 1。

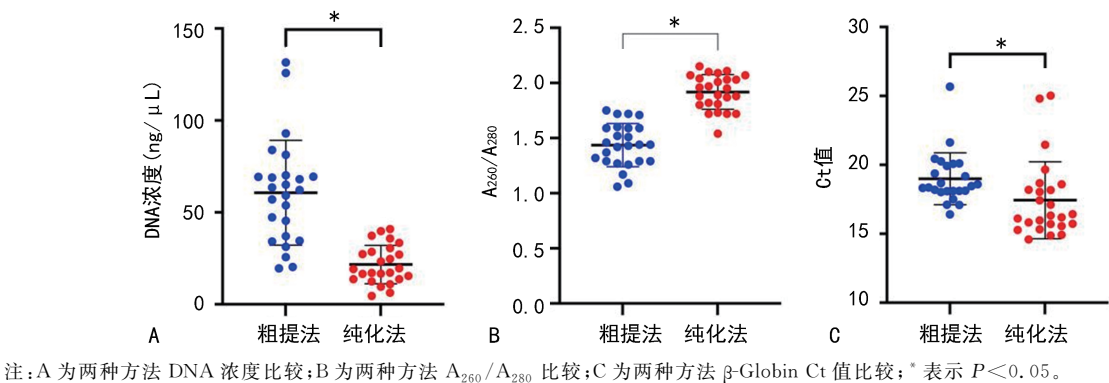


图 1 两种提取方法提取的 DNA 质量比较

2.2 宫颈癌标本 HPV 感染结果分析 采用粗提法和纯化法提取 DNA 后检测 HPV 感染情况,结果发现总 HPV 阳性率分别为 92%和 96%;在鳞癌标本中,粗提法提取时有 1 例失败,且 PCR-RDB 检测未获得有效结果,但通过纯化法检测出 HPV58 感染。在腺癌/黏液腺癌和腺鳞癌中,两种提取方法均发现 HPV 阳性病例,二者检测结果比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 25 例不同病理类型宫颈癌标本 HPV 感染情况

编号	病理类型	HPV 亚型	
		粗提法	纯化法
1	鳞癌	16	16、58
2	腺癌	16	11、16
3	鳞癌	16	16
4	腺鳞癌	16、18	16、18
5	鳞癌	52	52
6	鳞癌	16	16
7	鳞癌	16	16
8	黏液腺癌	阴性	阴性
9	腺鳞癌	16	16
10	鳞癌	无效	58
11	鳞癌	18	18
12	腺鳞癌	16	16
13	黏液腺癌	18	18
14	腺癌	16、18	16、18
15	腺癌	33	16、33
16	鳞癌	16	16
17	鳞癌	16	16
18	腺鳞癌	16	16
19	黏液腺癌	18	18
20	腺鳞癌	16、18	16
21	鳞癌	16	16、18、53

续表 1 25 例不同病理类型宫颈癌标本 HPV 感染情况

编号	病理类型	HPV 亚型	
		粗提法	纯化法
22	腺鳞癌	18	18
23	鳞癌	16、18	16、18、58
24	小细胞神经内分泌癌	52	52
25	鳞癌	18	18

2.3 两种提取方法提取的 DNA 标本 HPV 亚型检测结果对比 采用粗提法提取的 DNA 标本 HR-HPV 阳性率低于纯化法 (92% vs. 96%),但单一型 HPV16 阳性率高于纯化法 (44% vs. 36%);与纯化法相比,粗提法提取的 DNA 无法检测出更多型别的混合感染,但经纯化法提取后可检测出 HPV33、HPV53、HPV58 等多型别感染。二者阴性率相当,均为 4%。见表 2。

表 2 两种提取方法提取的 DNA 标本 HPV 亚型检测结果对比[n(%)]

HPV 亚型	粗提法	纯化法
HR-HPV 阳性	23(92)	24(96)
单一型 HPV16 阳性	11(44)	9(36)
单一型 HPV18 阳性	5(20)	5(20)
单一型 HPV52 阳性	2(8)	2(8)
其他单一亚型阳性	1(4)	1(4)
HPV16 和 HPV18 阳性	4(16)	2(8)
HPV16 和 1 种非 HPV18 亚型阳性	0(0)	3(12)
3 种及以上亚型阳性	0(0)	2(8)
阴性	1(4)	1(4)
无效	1(4)	0(0)

3 讨 论

HPV 是一种小型双链环状 DNA 病毒,其基因组长度为 8 000 bp。现已知超过上百种 HPV 亚型,其中 12 种被世界卫生组织认定与癌症密切相关,尤其

是 HPV16 和 HPV18 与癌症病变最相关^[7]。HPV 感染主要发生在上皮组织,包括宫颈、肛门和咽喉部的上皮组织等,这可能与上述部位特殊的解剖结构有关,其黏膜表面可提供微生物感染的最佳环境,更容易造成 HPV 持续感染,导致肿瘤的发生^[8]。目前,HPV 检测方法主要适用于宫颈脱落细胞。从 FFPE 组织中获得高质量的 DNA 是一项难题,因为福尔马林引起的核酸-蛋白质之间的交联会影响 DNA 下游分析。通常,从福尔马林固定的组织标本中提取的核酸处于高度降解状态,且平均片段大小在 300 bp 左右。PCR-RDB 主要用于宫颈脱落细胞 HPV 检测,因其操作简便及价格低廉,在国内较多医院被广泛使用,但其针对 FFPE 组织的 HPV 检测研究甚少。SUN 等^[9]通过大样本单中心临床研究发现,PCR-RDB 是一种可靠、灵敏、准确的方法,其检测结果具有良好的临床参考价值,可以准确检测宫颈 HPV 感染^[9-10]。

与宫颈脱落细胞相比,FFPE 组织 HPV 亚型的准确鉴定对监测疾病进展和预防宫颈癌的发生具有重要意义。另外,FFPE 组织可长期存放于病理档案室,为回顾性流行病学研究提供了丰富的生物样本。目前,德国凯杰公司 FFPE 组织核酸提取试剂已被广泛运用于分子病理基因下游检测,其主要通过二甲苯和无水乙醇预处理来去除石蜡,但存在操作复杂和二甲苯对人体危害大等缺点,尤其是反复洗涤的过程可能造成组织碎片的丢失^[11]。同时,由于福尔马林的固定及石蜡的存在会引起 DNA 的片段化及 DNA 与蛋白质相互交联。一般情况下,DNA 与蛋白质交联可通过加热在某种程度上逆转,但对处理的时间和温度却存有争议^[12-13]。本研究采用粗提法,即标本与裂解液混合加热 100 ℃ 10 min 解除 DNA 与蛋白质交联,由于粗提法加入裂解液后直接加热提取可能存在大量有机物或蛋白质污染的风险,影响核酸的分离及病毒基因扩增,而结果显示纯化法获得的 DNA 纯度确实较粗提法更高,提示粗提法获得的 DNA 标本中残存一定量有机溶剂和蛋白质污染,可能影响后续 HPV 检测结果。但本研究结果发现,纯化法获得的 DNA 浓度明显低于粗提法,粗提法获得的 DNA 标本中除了 1 例未获得足量 DNA 外,其他标本均完成 HPV 检测,且粗提法获得的 DNA 标本 HPV 阳性率为 92%,与纯化法结果相当(96%),粗提法单一型 HPV16 阳性率也明显高于纯化法(44% vs. 36%)。粗提法中存在的有机物及蛋白质污染可能影响 PCR 反应扩增效率,本研究结果显示,粗提法获得的 DNA 标本 HPV 多型别感染阳性率较低,而纯化法获得的 DNA 标本 HPV 多型别感染阳性率明显较高。然而,快速、简单的粗提法获得的 DNA 标本 HR-HPV 阳性率虽然低于纯化法,但两种提取方法获得的 DNA 标本 HR-HPV 阳性率均超过 90%。本研究发现粗提法获得的 DNA 标本足以满足 HPV 亚型检测,且能获

得有效结果,操作过程简便易行,耗时较短,可同时进行多个 FFPE 组织标本的提取;虽然纯化法获得的 DNA 质量较好,但操作复杂,耗时较长,组织经蛋白酶 K 消化不佳常发生堵管现象,且成本较高。

综上所述,本研究证明了宫颈癌 FFPE 组织两张 5 μm 切片(面积 2~4 cm^2)即可用于 HPV 亚型检测。无论采用何种核酸提取方法都能获得足量 DNA 用于 HPV 检测,且在浸润性宫颈癌组织中发现 HR-HPV 感染超过 90%。此外,FFPE 组织 HPV 检测可以采用简便易行的粗提法提取 DNA,该提取方法可供基层医院使用,操作中应避免交叉污染。若需要获得更多 HPV 亚型或多型别 HPV 感染情况,仍推荐采用纯化法提取 DNA,但粗提法足以满足常规临床病理检测工作,并能够为临床提供有效的 HPV 检测结果。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Intern J Cancer, 2015, 136(5): 359-386.
- [2] KUGUYO O, TSIKAI N, THOMFORD N E, et al. Genetic susceptibility for cervical cancer in African populations: what are the host genetic drivers? [J]. OMICS, 2018, 22(7): 468-483.
- [3] SUBA E J, MICHELOW P M, RAAB S S. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(19): 1482-1484.
- [4] LUHN P, WENTZENSEN N. HPV-based tests for cervical cancer screening and management of cervical disease [J]. Curr Obstetr Gynecol Rep, 2013, 2(2): 76-85.
- [5] QUINT W, JENKINS D, MOLIJN A, et al. One virus, one lesion-individual components of CIN lesions contain a specific HPV type[J]. J Pathol, 2012, 227(1): 62-71.
- [6] HARLÉ A, GUILLET J, THOMAS J, et al. Evaluation and validation of HPV real-time PCR assay for the detection of HPV DNA in oral cytobrush and FFPE samples [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11313.
- [7] DE SANJOSE S D, QUINT W G P, ALEMANY L M, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(11): 1048-1056.
- [8] MILLER D L, PURICELLI M D, STACK M S. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus) associated oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. Biochem J, 2012, 443(2): 339-353.
- [9] SUN P, SONG Y, RUAN G, et al. Clinical validation of the PCR-reverse dot blot human papillomavirus genotyping test in cervical lesions from Chinese women in the Fujian province: a hospital-based population study[J]. J Gynecol Oncol, 2017, 28(5): e50.
- [10] KANG Y, SUN P, MAO X, et al. PCR-reverse dot blot human papillomavirus genotyping as a primary screening test for cervical cancer in a hospital-based cohort[J]. J Gynecol Oncol, 2019, 30(3): e29. (下转第 2210 页)

胞和入侵物的主要免疫细胞,其亚群水平可用于评估机体细胞免疫功能。T 淋巴细胞亚群主要包括反映机体总体免疫水平的 $CD3^+$,辅助免疫应答的 $CD4^+$,以及对免疫起到调节作用的 $CD8^+$,而 $CD4^+/CD8^+$ 是反映机体免疫功能平衡的重要指标,其水平降低常提示机体免疫功能降低,预后较差^[18]。本研究结果显示,T1、T2、T3 时间点,对照组 HR、MAP、Cor、ATCH、NE、E 水平明显高于观察组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示术前使用右美托咪定的患者术中应激反应较轻。观察组 T4、T5、T6 时间点的血清 IL-6 水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示术前使用右美托咪定的患者术后体内炎症反应水平较低,发生感染的风险低于对照组。观察组 T4、T5、T6 时间点的 $CD8^+$ 水平明显低于对照组, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示术前使用右美托咪定的患者免疫抑制情况更轻,术后免疫功能恢复得更好。

综上所述,在需单侧肺通气的肺癌患者进行肺癌根治术前使用右美托咪定能高选择性激动 α_2 受体,有助于减轻术中应激反应,降低术后炎症反应水平,调节患者免疫功能,从而改善患者预后。

参考文献

- [1] 高艳波,贺晓宁.无创正压通气治疗 56 例老年重症肺炎并发呼吸衰竭的临床疗效与护理分析[J/CD].实用临床护理学电子杂志,2019,4(4):57.
- [2] 于晓然,王勇,孙菲,等. BiPAP 呼吸机不同使用时间对 II 型呼吸衰竭患者血气指标和呼吸功能的影响[J]. 检验医学与临床,2017,14(5):663-665.
- [3] 陈相猛,张嘉瑜,段晓蓓,等.原发性肺淋巴上皮瘤样癌的 MDCT 影像学特征及临床表现[J].放射学实践,2020,35(6):725-730.
- [4] 崔永奇,郑宇,张丽妍,等.肺癌合并肺栓塞的胸部 CT 血管造影特点分析[J/CD].中华肺部疾病杂志(电子版),2020,13(2):134-138.
- [5] 赵龙.肺癌术后呼吸衰竭患者使用呼吸机辅助通气治疗的临床效果分析[J].中国继续医学教育,2017,9(29):80-81.
- [6] 阮国虎,李欢.白细胞介素-8 对无创正压通气治疗急性呼吸衰竭患者早期病死率的预测价值[J].山西医药杂志,2019,48(1):60-63.
- [7] 陈泊宁.损伤控制外科手术治疗严重腹部创伤的效果及对炎症反应、应激反应的影响[J].现代诊断与治疗,2020,31(6):926-928.
- [8] 肖建婷.分析应用手术室护理干预对胃癌手术患者应激反应的影响情况[J/CD].中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(11):104.
- [9] 袁季,许辉,疏树华.右美托咪定对老年患者腹部手术围术期认知功能、血流动力学和免疫功能的影响[J].中国医刊,2019,54(10):1099-1102.
- [10] 支修益,吴一龙,马胜林,等.原发性肺癌诊疗规范(2011 年版)[J].中国肺癌杂志,2012,15(12):677-688.
- [11] 中华医学会呼吸病学分会呼吸生理与重症监护学组.《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会.无创正压通气临床应用专家共识[J].中华结核和呼吸杂志,2009,32(2):86-98.
- [12] 杨雪.右美托咪定对中度慢性阻塞性肺疾病合并肺癌患者术中肺氧合作用、肺呼吸力学参数的影响[J].临床医学,2018,38(11):93-95.
- [13] 姚健春.右美托咪定对老年和青少年脑外伤患者 S100 蛋白及 NSE 水平影响的研究[J].泰山医学院学报,2016,37(8):851-853.
- [14] 何峰.右美托咪定对开胸肺叶切除术患者麻醉效果的影响[J].中国民康医学,2017,29(5):7-10.
- [15] 廉海云,刘国利.右美托咪定联合布托啡诺在老年患者经尿道前列腺电切术中的应用[J].广东医学,2020,41(6):634-637.
- [16] 孙光梅,刘姚珍,王欢.右美托咪定联合布托啡诺超前镇痛对老年结直肠癌手术围术期疼痛介质的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(19):4136-4138.
- [17] WEERINK M A S, STRUYS M M R F, HANNIVOORT L N, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexmedetomidine[J]. Clin Pharmacokine, 2017, 56(8): 893-913.
- [18] 袁静,孙静雪,黄代强,等.小剂量右美托咪定联合乌司他丁对肺癌患者免疫功能和应激反应的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2019,24(1):83-88.

(收稿日期:2021-12-29 修回日期:2022-04-13)

(上接第 2206 页)

- [11] MAN Y, MOINFAR F, BRATTHAUER G L, et al. An improved method for DNA extraction from paraffin sections[J]. Pathol Res Pract, 2001, 197(9): 635-642.
- [12] DEDHIA P, TARALE S, DHONGDE G, et al. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2007, 8(1): 55-59.

- [13] SHI S, COTE R J, WU L, et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle; heating under the influence of pH[J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(8): 1005-1011.

(收稿日期:2021-11-13 修回日期:2022-04-03)