

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.16.037

FFPE 组织 HPV 检测技术的研究进展

王 诚 综述, 况 薇[△] 审校

四川大学华西第二医院病理科/出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室, 四川成都 610000

关键词: 福尔马林固定石蜡包埋组织; 人乳头瘤病毒; PCR; 核酸

中图分类号: R466.8

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)16-2297-04

宫颈癌是威胁女性生命健康最主要的恶性肿瘤,其主要致癌因素是持续性人乳头瘤病毒(HPV)感染^[1]。我国女性高危型 HPV(HR-HPV)感染率为 19%,与全球其他地区基本一致,感染率位于前 5 的 HPV 型别分别为 16、52、58、53、18 型^[2]。HPV 检测是宫颈癌筛查的重要手段,国内已有一百余种 HPV 核酸检测试剂盒,其均主要适用于宫颈脱落细胞标本^[3]。然而,当新鲜标本无法检测或用于回顾性流行病学研究时,需使用活检组织标本替代。福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织是生物标本最常见的保存形式,可常年存放于病理档案室。FFPE 组织经过一定的物理和化学处理,使细胞形态、组织结构保持稳定的同时,核酸和蛋白质亦不会受到较大的破坏,为分子病理检测、基因分析和流行病学研究等提供了更广泛的标本来源。但甲醛及石蜡等化学试剂可造成组织不同程度的 DNA 片段化及 DNA、蛋白质相互交联,对 DNA 提取产量和 PCR 扩增效率均产生不良影响^[4]。目前,用于 FFPE 组织中的 HPV 检测技术缺乏共识和规范,本文围绕组织标本的获取、固定和保存等方面,归纳了可能影响核酸质量的因素,并对 FFPE 组织的核酸提取制备及 HPV 检测方法进行综述。

1 影响核酸质量的因素

1.1 组织获取 固定前合理的组织获取方式可更好地保证标本中核酸及蛋白质的质量。组织器官的冷缺血时间、标本大小、脱钙方法等均影响后续 FFPE 组织标本的核酸分析。有研究发现,冷缺血时间控制在 24 h 内不影响 PCR 扩增成功率,但冷缺血时间超过 24 h,其荧光原位杂交信号强度会明显减弱^[5]。另外,组织标本体积不宜过大,3~10 mm³ 大小的组织经固定后核酸质量保存较好,PCR 扩增成功率最高。有学者研究发现,脱钙方法的不同会直接影响核酸质量,乙二胺四乙酸(EDTA)和超声脱钙法均优于酸性脱钙液法,前者标本进行 RT-PCR 检测可扩增出更长的片段,同时在荧光检测方面,经甲酸脱钙后荧光信号强度欠佳^[6]。因此,根据研究者检测需求选择相应的组织获取手段,以保证组织内核酸质量少受或不受影响。

1.2 组织固定 固定液的 pH 值、固定时间和温度都是影响 FFPE 组织核酸质量的决定性因素,影响 PCR 扩增能否成功。既往研究发现,中性福尔马林固

定效果较好,对核酸片段化破坏小,且固定时间在 48 h 内获取的 DNA 完整性和产量更高,用于 PCR、原位杂交和单核苷酸多态性检测时的成功率最高;反之,延长固定时间(≥48 h),则影响 RNA 相关的检测^[7]。因此,生物标本分析前组织固定程序标准化至关重要,在某些类型的肿瘤标本中,DNA 和 RNA 的质量可能受到延迟固定或固定时间的影响。通常,福尔马林固定时间的延长(超过 18~24 h)引起 RNA 片段化及核酸修饰会干扰 cDNA 的合成,从而获得低质量的 qPCR 数据。此外,对于标本固定的温度仍有一定争议,有研究表明,福尔马林在 4℃ 下固定可以保留 FFPE 组织标本中 DNA 的完整性,与常温下固定的 FFPE 组织标本相比,前者获得的 DNA 碎片化程度明显降低^[8]。

1.3 组织的处理及保存 组织标本的脱水、透明和浸蜡过程也影响着核酸质量,高纯度石蜡在 PCR 扩增中具有明显优势。此外,FFPE 组织标本的保存与核酸质量密切相关。有研究将保存了数十年的浸润性宫颈癌 FFPE 组织标本用于 HPV16 L1 基因与人类微管蛋白-β 检测,结果发现,保存时间≤15 年的标本均成功扩增出病毒基因和管家基因,但保存时间>15 年的标本扩增出更长靶基因的能力显著下降^[9]。有研究者将保存时间为 5~21 年的 FFPE 组织标本用于提取 RNA,结果发现保存时间对 mRNA、microRNA 和 rRNA 扩增水平并无太大影响,但其中保存时间≤1 年的 FFPE 组织标本获得的 RNA 完整性最佳^[10]。所以,FFPE 组织标本保存时间的延长会不同程度影响病毒基因和管家基因的 PCR 扩增。影响 FFPE 组织核酸质量的因素见表 1。

2 核酸的提取

2.1 提取步骤 一般而言,FFPE 组织核酸提取需 4 个步骤:切片、脱蜡、蛋白酶消化和纯化。操作前,用 70%~75% 乙醇擦拭切片机以减少污染;切片常采用“三明治”技术,厚度根据试剂及组织大小而定,通常推荐 10 μm 切片;一个刀口对应一个蜡块;若操作中发现疑似污染应及时更换手套,尽可能使用一次性镊子或牙签转移切片^[11]。值得注意的是,由于组织表面暴露于空气中发生的氧化反应,前 2~3 张切片建议丢弃,并推荐切片后 1 h 内进行核酸提取,或存放于 4℃ 待测。脱蜡最常用的试剂为二甲苯,但其具有一定毒性,且有机溶剂的反复处理等可增加组织丢失的

[△] 通信作者, E-mail: jalikehappy@163.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220727.1129.004.html\(2022-07-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220727.1129.004.html(2022-07-27))

风险。另外,由于有机溶剂脱蜡操作比较耗时,有学者通过直接加入自配蛋白酶裂解液(蛋白酶 K、EDTA、0.5%吐温、50 mmol Tris)后,100 ℃热处理 10 min,15 000×g 4 ℃离心,同样能获得足量核酸,并成功扩增 HPV L1 基因片段^[12]。现对于 FFPE 组织标本核酸提取后是否需要纯化尚存有争议,而大多研究集中应用 QIAamp®DNA FFPE Tissue 纯化试剂盒。

2.2 核酸质量的验证 人类管家基因是用于验证 DNA 质量的关键指标,如 β -Globin 或 β -actin。由于福尔马林固定等因素引起 DNA 碎片化会降低 PCR 扩增效率,因此,在 FFPE 组织中容易扩增小片段靶标,一般控制在 65~270 bp 为宜,每 25 μ L 扩增反应体系需标本量 1~10 μ L。有研究发现,粗提试剂所获得的基因组 DNA 与 FFPE 组织纯化提取试剂相比,HPV PCR 扩增结果无明显差异^[13]。因此,FFPE 组织标本核酸提取方法的异同对 HPV L1 基因扩增的影响甚微。也有学者通过对比 QIAamp®DNA FFPE Tissue、EX-WAX™DNA 和 ReliaPrep™FFPE gDNA 3 种提取试剂盒检测 HPV16 感染情况,发现 21 例头颈部癌患者感染率分别为 38.1%、33.3%、

33.3%^[14]。因此,QIAamp®DNA FFPE Tissue 纯化试剂盒可检测出更多 HPV 感染病例。由于 PCR 扩增检测 HPV L1 的靶标长度为 65~700 bp,FFPE 组织标本对于小片段病毒基因扩增更敏感,可能无法检大片病毒基因亚型。FFPE 组织核酸提取的主要试剂盒、方法及 HPV 检测平台见表 2。

表 1 影响 FFPE 组织核酸质量的因素

因素	DNA	RNA
冷缺血时间	荧光原位杂交:<1 h; PCR: ≤24 h	<12 h
标本体积	3~10 mm ³	—
脱钙方法	EDTA	EDTA 或超声
组织固定		
缓冲液	中性福尔马林	中性福尔马林
时间	<72 h	8~48 h
温度	4 ℃或常温	4 ℃或常温
包埋试剂	纯石蜡	—
切片厚度	≤10 μ m	≤10 μ m
蜡块储存时间	≤15 年	≤1 年

注:—表示无相关数据。

表 2 核酸提取的主要试剂盒、方法及 HPV 检测平台

厂商	试剂盒	脱蜡方法	蛋白酶 K 孵育温度 (℃)	切片厚度 (μ m)	纯化方法	洗脱液用量 (μ L)	上样量 (μ L)	HPV 检测平台	目的片段 扩增长度 (bp)
Qiagen	DNeasy Blood and Tissue	加热或二甲苯	56	10~20	NG	50	5~10	INNO-LiPA	65
	QIAamp®DNA FFPE Tissue	加热或二甲苯	56	10~30	离心柱、硅膜	50	5	MY09/11 and GP5+/6+ PCR	150
	High pure FFPE DNA Isolation	加热或二甲苯	56	10	离心柱、硅膜	25~50	5	Linear array	450
Roche	High pure FFPE DNA Isolation	加热或二甲苯	56	10	离心柱、硅膜	NG	5	SPF-10 PCR and Li-PA25	65
Invitrogen	MagMAX FFPE DNA Isolation	加热或二甲苯	60	10	磁珠	50	NG	Onclarity	79~137

注:NG 为未获取到信息。

3 HPV 检测技术

3.1 HPV 特点 HPV 是一种小分子双链环状 DNA 病毒,长度约 8 000 bp,呈二十面体对称性,无包膜,直径为 45~55 nm。其核酸按功能主要分为早期编码区、晚期编码区和非编码区,其中晚期编码区分为 L1、L2,早期编码区分为 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7,具有病毒复制、转录调控和细胞转化等功能。E1、E2 均与病毒复制有关,也常作为病毒整合位点。E6、E7 是大多数 HPV 亚型的转录起始点,可分别与抑癌基因 p53、pRb 结合并导致其失活引起宫颈癌的发生。HPV 有多种亚型,根据其致癌能力,分为低危型 HPV(LR-HPV)和 HR-HPV,LR-HPV 一般与皮肤病变有关,HR-HPV 与黏膜病变有关。HPV 具有严格的宿主和组织特异性,主要感染人的皮肤或黏膜上皮细胞,初次感染 HPV 大部分可治愈,与病毒的侵袭能力和感染者免疫状态相关,持续反复的 HR-HPV 感染可能使病毒 DNA 整合至宿主基因组中,破坏自

身基因组和宿主染色体结构,进而导致癌基因激活,引起癌症的发生^[15]。

3.2 PCR 检测技术 PCR 检测技术是 HPV DNA 检测的传统方法。目前,大多数商品化 HPV DNA PCR 检测技术针对宫颈脱落细胞或分泌物,而组织标本的 HPV DNA 检测缺乏合适的检测方法。HPV L1 基因区高度保守,并在不同亚型中的突变频率均较低,其靶向扩增片段为 65~450 bp。FFPE 组织标本制备过程复杂,可能导致广泛的 DNA 损伤,包括交联和断裂,并可能降低检测的准确性。目前,针对 L1 基因区常见的通用引物分为 3 类,包括 MY09/11、GP5+/GP6+ 和 SPF10(INNO-LiPA),其靶标片段大小分别为 450 bp、65 bp 和 150 bp^[16-18]。一项最新的多中心回顾性研究评估了 HPV 相关肿瘤的基因型分布,HPV DNA 和分型检测使用 SPF-10/LiPA25 系统,对来自 50 个国家或地区 18 247 份 FFPE 组织标本进行检测,发现在有效实施 HPV 疫苗接种计划

的国家或地区约 90% 的宫颈癌和 50% 的 HPV 相关癌症的发生被有效预防^[19]。SPF-10 的扩增效率高于其他通用引物,可能是由于扩增靶区较小,扩增效率较高。同样,有研究通过对比宫颈脱落细胞与 FFPE 组织标本的 HPV 感染情况,发现 Onclarity 荧光 PCR 与 SPF-10 检测 HPV 感染的总体一致性较好 ($Kappa=0.82$),但对某些基因型的检测结果存在一定差异^[20]。此外,FFPE 组织 DNA 提取过程中容易造成标本交叉污染,应按组织核酸提取标准操作规程进行操作,以减小污染的风险;同时,也可以设置内参以减少 HPV DNA 假阳性的发生。

3.3 原位杂交(ISH) ISH 是一种将特定标记的已知序列核酸作为探针与组织细胞中的核酸进行杂交,并对其进行检测的方法,能显示病毒整合到染色体上的分布情况及具体位置。荧光信号标记的核酸探针特异性识别肿瘤病灶 HPV DNA/RNA,其优势在于成本较低,但灵敏度与特异度取决于探针的类型。当杂交信号在细胞核内为点状密集分布时为整合状态,点状信号和弥散信号共存时为游离状态与整合状态的混合。然而,有研究发现,ISH 产生的高强度背景信号会干扰目标 DNA 信号,造成假阴性结果,并且 DNA ISH 检测技术的灵敏度明显低于 RNA ISH 检测技术^[21]。HPV E6 和 E7 癌蛋白检测是判断病毒活化情况的“金标准”。近年来,采用 RNAscope 方法检测 FFPE 组织标本中 18 种 HR-HPV 和 6 种 LR-HPV E6/E7 被证实具有较高的特异度、灵敏度及稳定性。RNAscope 使用特有探针和单分子水平检测技术来检测靶 mRNA 分子,并区分基因亚型,其独特的“双 Z”寡核苷酸探针设计可高度特异性地在 FFPE 组织中检测到每个 HPV 亚型转录的 E6/E7 mRNA^[22]。有学者研究发现,HR-HPV E6/E7 mRNA ISH 检测技术在宫颈病变组织中呈不同的染色模式,可能呈现弥散染色核信号(CIN I)到整个上皮多点状细胞质及核信号(CIN III),此现象与 HPV 感染机制基本相符,可用于辅助宫颈病变的诊断^[23]。因此,RNA ISH 检测技术能检测出活化的 HPV,并将活性病毒在肿瘤组织中的转录动态可视化,但缺点在于其成本较高且无法确定具体型别。

3.4 其他方法 免疫组织化学 p16 染色是最简单、经济的 HPV 感染检测替代标记物,应用广泛,易于操作,高度敏感。另外,p16 染色的优势在于标本 DNA 的降解对结果不会产生明显影响,对 HPV 相关口咽鳞状细胞癌的诊断特异度高达 80%^[24]。随着现代分子诊断学方法的不断发展,新技术逐渐被广泛应用于 FFPE 组织的 HPV 检测,如多重实时荧光 PCR 技术、多重连接依赖式探针扩增技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法、杂交捕获法和测序技术等^[25-27]。

4 小 结

随着对检测技术研究的不断深入,HPV 疫苗已成为当前研究热点,其主要分为两种:预防性疫苗和治疗性疫苗,前者以晚期编码区 L1/L2 作为靶抗原,

在细胞表面完成自我组装形成病毒样颗粒,通过诱导机体产生特异性中和抗体及免疫反应,防止机体受到 HPV 感染。早期编码区 E6/E7 靶抗原是 HPV 感染相关疾病理想的治疗性疫苗,但其免疫机制复杂,仍在探索中。持续性 HR-HPV 感染是宫颈癌发生的先决条件,及时、准确的 HPV 检测是早期诊治与预防宫颈癌的关键。FFPE 组织的 HPV 检测受到多种因素的影响,包括组织的获取、核酸的提取及检测方法的选择等方面。PCR 技术是目前检测病毒的有效手段之一,其限制因素较少,适合新鲜组织标本及 FFPE 组织标本。SPF-10 PCR 体系扩增效率最佳,被广泛应用于各类 FFPE 组织的检测。RNA ISH 检测技术不仅可以定位单个细胞病毒的整合位点,还能检测到低病毒载量的细胞,是目前 FFPE 组织 HPV 检测的“金标准”。随着分子诊断技术的不断发展,HPV 检测方法逐渐呈现多元化,病理实验室可根据诊断需要选择合适的检测方法,为临床诊疗工作提供最有效的帮助。

参考文献

- [1] BRIANTI P, DE FLAMMINEIS E, MERCURI S R. Review of HPV-related diseases and cancers[J]. New Microbiol, 2017, 40(2): 80-85.
- [2] LI K, LI Q, SONG L, et al. The distribution and prevalence of human papillomavirus in women in mainland China [J]. Cancer, 2019, 125(7): 1030-1037.
- [3] POLJAK M, OŠTRBENK V A, GIMPELJ D G, et al. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(9): 1144-1150.
- [4] TAW E L, GROVER S, NARASIMHAMURTHY M, et al. Molecular detection of human papillomavirus (HPV) in highly fragmented DNA from cervical cancer biopsies using double-nested PCR[J]. MethodsX, 2018, 5: 569-578.
- [5] GUNN S R, GOVENDER S, SIMS C L, et al. Reference size matching, whole-genome amplification, and fluorescent labeling as a method for chromosomal microarray analysis of clinically actionable copy number alterations in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(3): 279-288.
- [6] REINEKE T, JENNI B, ABDOU M T, et al. Ultrasonic decalcification offers new perspectives for rapid FISH, DNA, and RT-PCR analysis in bone marrow trephines [J]. Am J Surg Pathol, 2006, 30(7): 892-896.
- [7] CARITHERS L J, AGARWAL R, GUAN P, et al. The biospecimen preanalytical variables program: a multi-assay comparison of effects of delay to fixation and fixation duration on nucleic acid quality[J]. Arch Pathol Lab Med, 2019, 143(9): 1106-1118.
- [8] BERRINO E, ANNARATONE L, MIGLIO U, et al. Cold formalin fixation guarantees DNA integrity in formalin fixed paraffin embedded tissues: premises for a better quality of diagnostic and experimental pathology with a specific impact on breast cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 173.
- [9] NICOLÁS-PÁRRAGA S, TORRES M, ALEMANY L, et al. Human DNA decays faster with time than viral dsD-

- NA: an analysis on HPV16 using pathology archive samples spanning 85 years[J]. *Virol J*, 2021, 18(1): 65.
- [10] XIE R, CHUNG J Y, YLAYA K, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections [J]. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(4): 356-365.
- [11] VEYER D, WACK M, GRARD O, et al. HPV detection and genotyping of head and neck cancer biopsies by molecular testing with regard to the new oropharyngeal squamous cell carcinoma classification based on HPV status[J]. *Pathology*, 2019, 51(4): 421-425.
- [12] CANNAVO I, LOUBATIER C, CHEVALLIER A, et al. Improvement of DNA extraction for human papillomavirus genotyping from formalin-fixed paraffin-embedded tissues [J]. *Biores Open Access*, 2012, 1(6): 333-337.
- [13] KOCJAN B J, HOŠNJAK L, POLJAK M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens[J]. *J Clin Virol*, 2016, 76(Suppl 1): S88-S97.
- [14] BIESAGA B, JANECKA A, MUCHA-MAŁECKA A, et al. HPV16 detection by qPCR method in relation to quantity and quality of DNA extracted from archival formalin fixed and paraffin embedded head and neck cancer tissues by three commercially available kits[J]. *J Virol Methods*, 2016, 236: 157-163.
- [15] YUAN Y, CAI X, SHEN F, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 243-254.
- [16] 田亚宾, 张春涛. 人乳头状瘤病毒核酸分型检测试剂的研究进展[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(10): 729-735.
- [17] JENKINS D, MOLIJN A, KAZEM S, et al. Molecular and pathological basis of HPV-negative cervical adenocarcinoma seen in a global study[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(9): 2526-2536.
- [18] BUSSANI C, MALENTACCHI F, ANDERSSON K L, et al. High grade cervical intraepithelial neoplasia positive biopsy: the importance of accurate pre-operative workup [J]. *Minerva Ginecol*, 2020, 72(6): 413-419.
- [19] DE SANJOSÉ S, SERRANO B, TOUS S, et al. Burden of human papillomavirus (HPV)-related cancers attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58[J]. *JNCI* *Cancer Spectr*, 2019, 2(4): 045.
- [20] CASTRO F A, KOSHIOL J, QUINT W, et al. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods[J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 544.
- [21] KEUNG E S, SOUERS R J, BRIDGE J A, et al. Comparative performance of high-risk human papillomavirus RNA and DNA in situ hybridization on College of American Pathologists Proficiency Tests [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(3): 344-349.
- [22] AUGUSTIN J, OUTH-GAUER S, MANDAVIT M, et al. Evaluation of the efficacy of the 4 tests (p16 immunohistochemistry, polymerase chain reaction, DNA, and RNA in situ hybridization) to evaluate a human papillomavirus infection in head and neck cancers: a cohort of 348 French squamous cell carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2018, 78: 63-71.
- [23] JENKINS T M, SHOJAEI H, SONG S J, et al. Role of ancillary techniques in cervical biopsy and endocervical curettage specimens as follow-up to papanicolaou test results indicating a diagnosis of atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion, or high-grade squamous intraepithelial lesion [J]. *Acta Cytol*, 2020, 64(1/2): 155-165.
- [24] 赵艺哗, 白玉萍, 毛美玲, 等. 口咽部人乳头状瘤病毒阳性鳞状细胞癌临床病理学观察[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(2): 127-131.
- [25] KRIEGSMANN M, WANDERNOTH P, LISENKO K, et al. Detection of HPV subtypes by mass spectrometry in FFPE tissue specimens: a reliable tool for routine diagnostics [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70(5): 417-423.
- [26] TIAN R, CUI Z, HE D, et al. Risk stratification of cervical lesions using capture sequencing and machine learning method based on HPV and human integrated genomic profiles [J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(10): 1220-1228.
- [27] MOREL A, NEUZILLET C, WACK M, et al. Mechanistic signatures of human papillomavirus insertions in anal squamous cell carcinomas[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1846.

(收稿日期: 2021-12-26 修回日期: 2022-03-28)

(上接第 2292 页)

参考文献

- [1] 纪汉杰. 广东珠江中江地区 1 500 例泌尿系结石患者的结石成分分析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(32): 4065-4067.
- [2] 杨泽松, 王芳, 林忠应, 等. 降钙素原在输尿管结石继发尿脓毒血症中的应用价值[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2015, 36(4): 265-269.
- [3] YILMAZ S, PEKDEMIR M, AKSU N M, et al. A multicenter case control study of diagnostic tests for urinary tract infection in the presence of urolithiasis [J]. *Urol Res*, 2012, 40(1): 61-65.
- [4] PAPAGIANNOPOULOS D, WHELAN P, AHMAD W, et al. Procalcitonin is a strong predictor of urine culture results in patients with obstructing ureteral stones: a prospective, pilot study[J]. *Urol Ann*, 2016, 8(3): 277-280.
- [5] 周健, 刘剑新. 性激素与尿路结石形成的关系[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(5): 838-840.
- [6] AURITI C, FISCARELLI E, RONCHETTI M P, et al. Procalcitonin in detecting neonatal nosocomial sepsis[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2012, 97: 368-370.
- [7] 周强, 黄海樱, 陈波. 尿沉渣检验图谱[M]. 北京: 人民军医出版社, 2014: 9-11.

(收稿日期: 2021-11-20 修回日期: 2022-03-21)