

聚羟基丙烯酸和 Van-clear 替代传统试剂在 FISH 法检测宫颈 *hTERC* 基因中的应用比较

陈志强[△], 王莹, 米贤军, 陈昂, 黄华勇, 钟守军, 邓文同, 刘超凡, 徐秀梅, 代新珍

(南方医科大学附属中山博爱医院病理科, 广东中山 528400)

[摘要] **目的:** 观察环保固定液(聚羟基丙烯酸、环保透明脱蜡液 Van-clear 单独或联合)替代传统固定液[4% (体积分数)中性缓冲甲醛、传统透明脱蜡液二甲苯]应用于荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)法检测宫颈组织中人端粒酶核糖核酸组分(human telomerase RNA component, *hTERC*)基因扩增的差异。**方法:** 收集 2013 年 3 月到 2015 年 4 月于中山市博爱医院妇科住院部送检的 255 例宫颈组织标本, 同一病变部位切取 4 个样本, 分为 4 组, 命名为 A、B、C、D 组; A 组采用 4% 中性缓冲甲醛固定、二甲苯透明脱蜡制作切片; B 组采用聚羟基丙烯酸固定、二甲苯透明脱蜡制作切片; C 组采用 4% 中性缓冲甲醛固定、Van-clear 透明脱蜡制作切片; D 组采用聚羟基丙烯酸固定、Van-clear 透明脱蜡制作切片。采用 FISH 技术检测 4 组宫颈标本中 *hTERC* 基因。**结果:** 在 FISH 法检测宫颈各级病变组织 *hTERC* 基因时, 荧光显微镜下, A、B、C、D 四组的组织轮廓和背景均清晰, 探针定位准确, 可见耀眼的红/绿荧光信号。B、C、D 组与 A 组阳性率相比差异均无统计学意义($P > 0.05$), 且 FISH 结果符合率高。**结论:** 环保试剂聚羟基丙烯酸、Van-clear 有潜在的可能单独或联合替代 4% 中性缓冲甲醛、二甲苯应用于 FISH 法检测宫颈 *hTERC* 基因。

[关键词] 病理学, 临床; 组织固定; 石蜡包埋; 原位杂交, 荧光; 末端转移酶端粒 RNA

[中图分类号] R365 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)02-0356-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2016.02.033

Comparison between poly hydroxy acrylic acid and Van-clear replacing the traditional reagents to detect the cervical *hTERC* genes by adopting FISH technique

CHEN Zhi-qiang[△], WANG Ying, MI Xian-jun, CHEN Ang, HUANG Hua-yong, ZHONG Shou-jun, DENG Wen-tong, LIU Chao-fan, XU Xiu-mei, DAI Xin-zhen

(Department of Pathology, Zhongshan BOAI Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528400, Guangdong, China)

ABSTRACT Objective: To observe the difference of the human telomeres RNA component (*hTERC*) genes' amplification in the cervical tissue by applying the environment-friendly fixative poly hydroxy acrylic acid and the transparent dewaxing solution Van-clear separately or jointly to replace the traditional fixative 4% (volume fraction) neutral buffered formalin and the conventional transparent dewaxing solution xylene in the use of fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection. **Methods:** In the study, 255 cases of cervical tissue specimens submitted by the Department of Gynecology in Zhongshan Boai Hospital were collected from Mar. 2013 to Apr. 2015. Four samples were taken from the same lesion site. All the cases were divided into 4 groups and named group A, B, C, and D. Group A used 4% neutral buffered formalin fixed and xylene dewaxing to make slices. Group B used poly hydroxy acrylic fixed and xylene dewaxing to make slices. Group C used 4% neutral buffered formalin fixed and Van-clear transparent to make slices. Group D used poly hydroxy acrylic fixed and Van-clear transparent dewaxing to make slices. The amplification of *hTERC* genes in the four groups of cervical specimens was also detected by FISH technique. **Results:** When the *hTERC* genes were detected by FISH method under the fluorescence microscope, it was obvious that the tissue profile and the background of group A, B, C and D were all clear. The probe was fixed in the accurate position so that the bright red or green fluorescence signals were easily found in these four groups. Compared with the positive rate of group A, there was no statistical significance in that of group B, C and D ($P > 0.05$). At the same time, the coincidence rate of the FISH results was high, which showed that the new environment-friendly reagent had no significant difference in the detection of cervical *hTERC* genes by FISH technique. **Conclusion:** It is possible for the environment-friendly reagent poly hydroxy acrylic acid and Van-clear to replace 4% neutral buffered for-

基金项目: 中山市卫生局医学科研立项课题(2014J128)资助 Supported by the Medical Science and Research Project of Zhongshan Municipal Health Bureau (2014J128)

[△]Corresponding author's e-mail, 765228687@qq.com

网络出版时间:2016-3-23 16:33:37 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160323.1633.010.html>

malin and xylene separately or jointly to detect the cervical *hTERC* genes by adopting FISH technique.

KEY WORDS Pathology, clinical; Tissue fixation; Paraffin embedding; *In situ* hybridization, fluorescence; Telomerase RNA

临床疾病的诊断和相关的实验室病理研究越来越依赖于石蜡包埋的样品,而固定与透明、脱蜡是制作石蜡包埋样品的重要步骤。众所周知,使用甲醛作为固定剂一直是组织病理学检查的传统做法,但甲醛具有致癌性^[1-2],甲醛固定组织可改变核酸与蛋白质,限制了分子诊断技术在石蜡包埋组织中的应用^[3],因此,寻找一个环保的固定液已迫在眉睫。欧洲的大学和生物技术公司将环保固定剂(非交联固定剂 PaxGene)应用于可溶性有机化合物和生物大分子的形态快速保存^[4]已取得了良好效果。在石蜡包埋的样品中,二甲苯传统上被大量用于组织处理和染色,但有研究显示二甲苯可对身体造成多种健康危害^[5-9],所以寻找一个更安全的替代品是十分必要的。Premalatha 等^[10]利用生物环保精制矿物油作为二甲苯替代品脱蜡,在苏木精和伊红染色获得了满意效果。张进华等^[11]应用环保样本处理液制作石蜡切片,提取 DNA 进行荧光定量 PCR 扩增,并与常规方法制作的石蜡切片进行比较,结果证实环保样本处理液能较好地保存组织中的 DNA。

多年来有关环保固定液、透明脱蜡液的国内外相关报告和文献报道已有不少,大部分都是应用于病理常规染色、冰冻切片染色以及免疫组织化学染色,鲜见环保固定液、透明脱蜡液应用于 FISH 法检测宫颈 *hTERC* 基因差异的报道。本研究应用环保试剂聚羟基丙烯酸、Van-clear 单独或联合替代传统试剂 4% (体积分数) 中性缓冲甲醛、二甲苯,比较 FISH 法检测宫颈各级病变的人端粒酶核糖核酸组分(human telomerase RNA component, *hTERC*) 基因扩增阳性率的差异,以获得环保固定、透明脱蜡液未来在临床应用的实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 3 月至 2015 年 4 月中山市博爱医院妇科住院部送检的 255 例宫颈组织标本,患者年龄 23.2 ~ 72.6 岁,平均年龄 (48.5 ± 2.7) 岁;经病理确诊,其中宫颈炎性患者 55 例,宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I 级患者 65 例、CIN II 级患者 54 例、CIN III 级/原位癌患者 51 例,宫颈浸润癌患者 30 例;所有肿瘤患者术前均未接受化疗或放疗,同一病变部位切取 4 个样本,大小

均为 1.0 cm × 0.5 cm × 0.2 cm。根据固定、透明脱蜡液的不同分成 A、B、C、D 组, A 组采用 4% 中性缓冲甲醛固定、二甲苯透明脱蜡制作切片, B 组采用聚羟基丙烯酸固定、二甲苯透明脱蜡制作切片, C 组采用 4% 中性缓冲甲醛固定、Van-clear 透明脱蜡制作切片, D 组采用聚羟基丙烯酸固定、Van-clear 透明脱蜡制作切片。

1.2 试剂与设备

聚羟基丙烯酸固定液购自广州市艾发生物医学技术工程有限公司, Van-clear 环保透明脱蜡剂购自华烁科技股份有限公司葛店分公司。探针: *hTERC* 基因探针由中国北京金菩嘉医疗科技有限公司提供, 为 *TERC/CSP3* DNA 探针。SAKURA Tissue Tek Vip-5 全自动密闭式组织脱水机为日本樱花检验仪器株式会社生产; HistoStar™ Embedding Workstation 包埋机、Shandon™ Finesse™ 325 手动石蜡切片机为德国 Thermo 生产, 切片厚度 2 ~ 3 μm; S500-24 荧光原位杂交仪为美国 Thermobrit 公司生产; 蔡司荧光显微镜 (Zeiss, 德国荧光显微镜公司) 配备相应的波长滤波器、CCD 摄像机、图像采集和分析系统。研究中所用的聚羟基丙烯酸是单纯固定液, 固定速度是 1 mm/h, 于 10 ~ 30 °C 温度下保存。

1.3 组织学分组

根据世界卫生组织 2014 年发布的宫颈上皮内病变新的分类体系, 宫颈上皮肿瘤包括低级别/高级别鳞状上皮内病变 (low- and high-grade intraepithelial lesions, LSIL/HSIL), 新分类的 LSIL 包括原来的 CIN I, HSIL 包括原来的 CIN II 及 CIN III/原位癌^[12]。CIN I 级 (轻度非典型增生): 异型细胞局限于上皮层的下 1/3 区; CIN II 级 (中度非典型增生): 异型细胞占上皮层的 1/3 ~ 2/3; CIN III 级 (重度非典型增生及原位癌): 异型细胞超过上皮层的 2/3 但还未累及上皮全层。一般重度非典型增生具有恶变危险, 故可将重度非典型增生视为癌前病变; 原位癌指癌细胞局限于上皮全层内, 尚未突破基底膜、间质无浸润; 浸润癌指癌细胞突破基底膜, 间质有浸润。

1.4 组织标本采集及制片

阴道镜下采集宫颈活体组织标本, 分别经聚羟基丙烯酸或 4% 中性缓冲甲醛固定 12 h 以上, 用 Van-clear 或二甲苯透明, 梯度酒精脱水、石蜡浸蜡流程和时间按中华医学会病理学会病理技术相关规

程在全自动组织脱水机中进行^[13],常规石蜡包埋,2~3 μm 厚切片,裱片于防脱片载玻片上。

1.5 FISH 相关操作及结果判读

玻片预处理后放入 56 °C 恒温箱烤片过夜。Van-clear 或二甲苯脱蜡后,胃蛋白酶 K 消化 8 min,室温下氯化钠柠檬酸钠缓冲液 (sodium chloride-citric sodi, SSC) 洗脱,体积分数为 70%、85% 和 100% 的乙醇梯度脱水固定,自然干燥。于暗室滴加杂交液,盖上盖玻片,橡皮胶封边,73 °C 变性 5 min,42 °C 杂交过夜;移去盖玻片,温度 46 °C,玻片置于 50% (体积分数) 甲酰胺/(2 × SSC) 溶液 10 min × 3,再置于 2 × SSC 溶液中 10 min,最后于 2 × SSC/0.1% (体积分数) NP40 溶液中 5 min,室温 70% 乙醇中漂洗 3 min,干燥后滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 封固,于荧光显微镜下观察。

FISH 结果判定参考探针试剂盒说明和相关文献^[14]。信号判定:TERC 探针为橘红色信号,CSP3 探针为亮绿色信号。CSP3 探针所标荧光颜色与 TERC 位点不同,作为对照探针参与对 TERC 位点的检测。阈值判定:正常细胞绿、红信号均 ≤ 2 个,

异常细胞绿、红信号 > 2 个。选取正常宫颈组织 20 例,每例随机观察 100 个细胞,统计异常 TERC 信号细胞数的百分比。异常阈值 = 平均数 + 3 × 标准差^[15-16],本实验阈值为 7.29%,取整数 7%。每例样本随机计数 100 个细胞核,若异常信号细胞数的检测值大于异常阈值,判定为阳性结果;小于异常阈值,判定为阴性结果;等于异常阈值,则加大观测样本细胞数目,以判断最后结果。

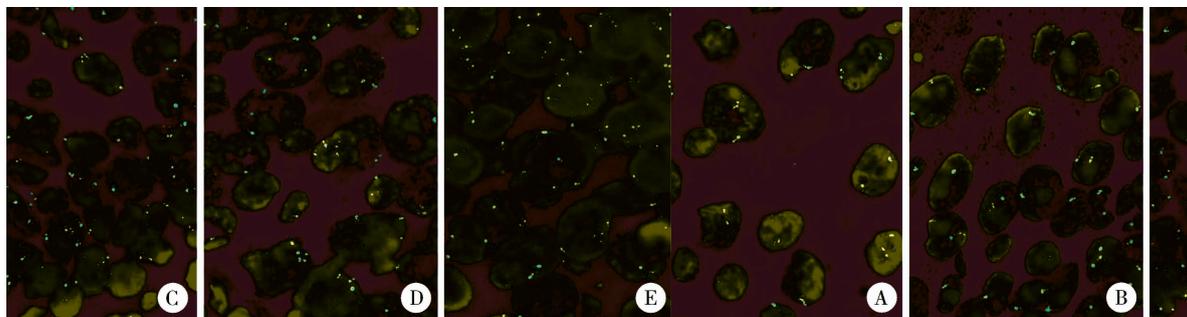
1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 完成统计分析,FISH 结果阳性率的差异用配对 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。FISH 结果的符合率定义为以 A 组实验诊断结果为参照,B、C、D 组实验诊断结果与其符合情况。

2 结果

2.1 荧光显微镜下的大体情况

在荧光显微镜下,A、B、C、D 四组的组织轮廓和背景均清晰,探针定位准确,可见深蓝色细胞核及耀眼的红/绿荧光信号(图 1),随病变程度加重,异常杂交信号数量明显增加,出现多种不同的异常杂交表现,说明异常扩增及多体细胞比例显著增加。



A, The cervicitis cells are thediploid ones, in which the numbers of both the red and green signals are less than or equal to 2; B, The amplified or polysomic cells are seldom seen in the tissue at CIN I level; C, The number of the amplified and polysomic cells have obviously increased in the tissue at CIN II level; D, The proportion of the abnormally amplified and polysomic cells has obviously increased in the tissue at CIN III level. E, It is proved to be the cervical invasive carcinoma.

图 1 hTERC 基因 DNA 双色 FISH 图像:亮绿色为 CSP3 信号数,橘红色为 hTERC 信号数,蓝色为细胞核 (×1 000)

Figure 1 Bicolor FISH image of hTERC genes in DNA, in which the green ones are the CSP3 signals, the red ones are hTERC signals, and the blue ones are the cell nucleus (×1 000)

2.2 hTERC 基因阳性率

A、B、C、D 组试剂制片,FISH 法检测宫颈各级病变组织 hTERC 基因阳性率结果见表 1,可见 B、C、D 组与 A 组 hTERC 基因阳性率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),且 FISH 结果符合率高,最小值为 96.36% (表 2),说明新型环保试剂与传统试剂一致性好。

3 讨论

宫颈癌是女性癌症死亡的第二大原因,一般经 10 年左右会从癌前病变发展为浸润性宫颈癌,因

此,有效筛选癌前病变是非常重要的。近年来有研究发现,在宫颈非典型异常增生到宫颈癌转化的过程中,几乎所有的宫颈上皮细胞都会出现 hTERC 基因的异常扩增^[17-19]。应用 FISH 技术检测宫颈细胞内的遗传信息有望应用于宫颈癌的诊断^[20-21],因此,利用 FISH 技术进行 hTERC 基因扩增不仅可作为宫颈癌的重要筛查手段,而且还可能是预测恶性 CIN 的重要指标。

价格低廉的甲醛与二甲苯依然是迄今为止保存组织标本、透明脱蜡最常用的试剂,但其刺激性、毒

性、致癌性已经引起人们的重视。本研究中所用的环保型固定液聚羟基丙烯酸是由多羟基丙烯酸聚合而成,性质稳定,对人体无害;Van-clear 是一种从桔皮或其他植物中提取的生物透明剂,不含芳香族化合物,性质稳定,是对人体无危害的有机溶剂。

甲醛固定组织的机制为醛基与氨基基团形成可逆的羟甲基衍生物和稳定的亚甲基桥,从而使甲醛和蛋白质发生广泛的交联,但甲醛固定过程中可以改变许多生物分子,包括核酸和蛋白质。聚羟基丙烯酸固定组织的机制可能是羟基和羧基基团发生可逆的酯化反应,与此同时羧基和氨基基团发生中和反应;前者生成稳定的酯化物、硬化组织,后者维系稳定的反应环境,从而使蛋白质凝固、生物大分子快速保存^[22]。图 1 背景清晰、探针定位准确,说明聚羟基丙烯酸固定组织效果良好,但较甲醛而言,因聚羟基丙烯酸固定过程中没有改变核酸和蛋白质,对核酸蛋白质的检出率可能更高。

透明脱蜡的主要作用机制是遵循相似相溶规律,通常的说法是“极性相似的两组互溶度大”,即分子间作用力的类型和大小相近的物质往往可以互溶。石蜡主要组分为直链烷烃,还有少量带个别支链的烷烃和带长侧链的单环环烷烃。二甲苯是苯环上两个氢被甲基取代的芳香烃。Van-clear 是由

C8 ~ C12 的饱和直链烷烃组合的混合物构成。从图 1 可知,两种透明脱蜡液的实际效果均良好,但与二甲苯相比, Van-clear 的直链烷烃与石蜡组织结构更为相似,因此,其与石蜡的分子间结合得更紧密,更易互溶,为 FISH 法检测宫颈 *hTERT* 基因中探针的进入提供了更为有利的条件。

本研究选用环保试剂聚羟基丙烯酸、Van-clear 环保透明脱蜡剂单独或联合替代传统试剂 4% 中性缓冲甲醛、二甲苯制作切片。从表 1 实验数据来看,4 组 *hTERT* 基因扩增阳性率均与宫颈疾病的严重程度显著相关,且炎症、CIN I、CIN II、CIN III/原位癌、宫颈浸润癌的阳性率与梅平等^[23]报道基本上一致。时姗姗等^[24]利用 Van-clear 透明脱蜡液代替二甲苯用于分子病理检测,结果证实环保透明脱蜡液能较好地保存组织中的 DNA,且对 FISH 法检测 DNA 结果无明显影响,与本文检测出的 A 组和 C 组 *hTERT* 基因阳性率无统计学差异这一结论相符。时姗姗等^[24]研究的是 5 例乳腺癌 *HER2* 基因及 5 例肺癌 *EGFR* 基因,而本研究针对宫颈 *hTERT* 基因,且囊括了不同程度的宫颈病变,实验样本量更大。此外,本研究还对不同试剂制作切片后 FISH 检测 *hTERT* 基因的阳性率差异做了统计学分析,从多角度保证了研究的严谨性与可信度。

表 1 4 组 FISH 法检测宫颈各级病变组织 *hTERT* 基因的阳性率

Table 1 Reagent production of four groups, targeting at the positive rate of the *hTERT* genes in the cervical lesions at all levels by FISH detection

Group	The positive rate of <i>hTERT</i> gene amplification in cervical lesions at all levels/%				
	Cervicitis (n = 55)	CIN I (n = 65)	CIN II (n = 54)	CIN III/Carcinoma <i>in situ</i> (n = 51)	Cervical invasive carcinoma (n = 30)
A	5.45 (3/55)	13.85 (9/65)	64.81 (35/54)	82.35 (42/51)	100 (30/30)
B	7.27 (4/55)	13.85 (9/65)	66.67 (36/54)	84.31 (43/51)	100 (30/30)
C	7.27 (4/55)	15.38 (10/65)	64.81 (35/54)	82.35 (42/51)	100 (30/30)
D	9.09 (5/55)	15.38 (10/65)	66.67 (36/54)	84.31 (43/51)	100 (30/30)

Group A used 4% neutral buffered formalin fixed and xylene dewaxing; Group B used poly hydroxy acrylic fixed and xylene dewaxing; Group C used 4% neutral buffered formalin fixed and Van-clear transparent dewaxing to make slices; Group D used poly hydroxy acrylic fixed and Van-clear transparent dewaxing. CIN, cervical intraepithelial neoplasia.

表 2 B、C、D 组与 A 组 FISH 结果符合率

Table 2 The coincidence rate of the FISH results among group B, C, D and group A

Items	Coincidence rate/% (95% CI)				
	Cervicitis (n = 55)	CIN I (n = 65)	CIN II (n = 54)	CIN III/Carcinoma <i>in situ</i> (n = 51)	Cervical invasive carcinoma (n = 30)
A-B	98.18% (95% - 100%)	100% (100% - 100%)	98.15% (95% - 100%)	98.04% (94% - 100%)	100% (100% - 100%)
A-C	98.18% (95% - 100%)	98.46% (95% - 100%)	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)	100% (100% - 100%)
A-D	96.36% (91% - 100%)	98.46% (95% - 100%)	98.15% (95% - 100%)	98.04% (94% - 100%)	100% (100% - 100%)

The abbreviations and groupings are shown in Table 1.

本研究以当前病理学界广泛使用的传统试剂 (4% 中性缓冲甲醛固定、二甲苯透明脱蜡) 制作切

片作为参考,应用于 FISH 法检测不同宫颈病变组织 *hTERT* 基因,结果表明,不论哪种宫颈病变, B、

C、D 组与传统试剂间 *hTERC* 基因阳性率差异均无统计学意义(表 1),且 FISH 检测结果符合率高(表 2),说明环保固定液、透明脱蜡液可以单独与传统透明脱蜡液、固定液搭配使用,也可联合使用,均不影响应用 FISH 技术进行 *hTERC* 基因扩增的检测。

环保固定液、透明脱蜡液单独或联合用于检测宫颈各级病变组织 *hTERC* 基因,其阳性率均不低于传统试剂组,从环保角度考虑,我们提倡联合使用环保固定液和环保透明脱蜡液。当然,本研究并未考虑假阳性问题,进一步的实验可以考虑对同一标本采用不同试剂进行 *hTERC* 基因阳性率检测,或者通过多次重复性实验排除手工操作存在差异的可能,以还原实验的真实结果,效果会更好。

总之,对于日益发展的临床病理诊断和病理实验研究来说,在相关技术中用多病种、大样本来优化环保试剂的相关检测流程,将会是大势所趋。

参 考 文 献

[1] Bolt HM, Degen GH, Hengstler JG. The carcinogenicity debate on formaldehyde: How to derive safe exposure limits? [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(2): 421-422.

[2] Bosetti C, McLaughlin JK, Tarone RE, et al. Formaldehyde and cancer risk: a quantitative review of cohort studies through 2006 [J]. Ann Oncol, 2008, 19(1): 29-43.

[3] Wang YN, Lee K, Pai S, et al. Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal [J]. Biotech Histochem, 2011, 86(5): 359-365.

[4] Belloni B, Lambertini C, Nuciforo P, et al. Will PAX gene substitute formal in? A morphological and molecular comparative study using a new fixative system [J]. J Clin Pathol, 2013, 66(2): 124-135.

[5] Edokpolo B, Yu QJ, Connell D. Health risk assessment of ambient air concentrations of benzene, toluene and xylene (BTX) in-service station environments [J]. Int J Environ Res Public Health, 2014, 11(6): 6354-6374.

[6] Heck JE, Park AS, Qiu J, et al. Risk of leukemia in relation to exposure to ambient air toxics in pregnancy and early childhood [J]. Int J Hyg Environ Health, 2014, 217(6): 662-668.

[7] Lemke LD, Lamerato LE, Xu X, et al. Geospatial relationships of air pollution and acute asthma events across the Detroit-Windsor international border: study design and preliminary results [J]. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2014, 24(4): 346-357.

[8] Oiamo TH, Luginaah IN. Extricating sex and gender in air pollution research: a community-based study on cardinal symptoms of exposure [J]. Int J Environ Res Public Health, 2013, 10(9): 3801-3817.

[9] 许宇翔, 顾江. 病理工作者职业污染危害与防护 [J]. 汕头大学医学院学报, 2012, 25(4): 227-229.

[10] Premalatha BR, Patil S, Rao RS, et al. Mineral oil: a biofriendly substitute for xylene in deparaffinization: a novel method [J]. J Contemp Dent Pract, 2013, 14(2): 281-286.

[11] 张进华, 肖莎, 李显箏, 等. 比较 GS 环保试剂与常规试剂制备的组织样本在荧光定量 PCR 中的效果 [J]. 诊断病理学杂志, 2011, 18(4): 33.

[12] 卢朝辉, 陈杰. WHO 女性生殖器官肿瘤学分类(第 4 版)解读 [J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(10): 649-650.

[13] 王泊云, 李玉松, 黄高昇, 等. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 80-81.

[14] 袁艳龙, 何春年, 徐明堂, 等. 应用荧光原位杂交技术在组织标本中检测宫颈上皮病变的端粒酶 RNA 基因扩增 [J]. 中华病理学杂志, 2011, 40(3): 182-186.

[15] Jiang J, Wei LH, Li YL, et al. Detection of TERC amplification in cervical epithelial cells for the diagnosis of high-grade cervical lesions and invasive cancer [J]. J Mol Diagn, 2010, 12(6): 808-817.

[16] 米贤军, 吴秋良, 钟守军. FISH 检测宫颈细胞 *hTERC* 基因在宫颈癌筛查中的价值 [J]. 中华全科医学, 2013, 11(4): 504-505.

[17] Andersson S, Sowjanya P, Wangsa D, et al. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene TERC, a potential marker for triage of women with HPV-positive, abnormal pap smears [J]. Am J Pathol, 2009, 175(2): 1831-1847.

[18] Li Y, Zeng WJ, Ye F, et al. Application of *hTERC* in thinprep samples with mild cytologic abnormality and HR-HPV positive [J]. Gynecol Oncol, 2011, 12(7): 73-78.

[19] Li Y, Ye F, Lü WG, et al. Detection of human telomerase RNA gene in cervical cancer and precancerous lesions: comparison with cytological and human papillomavirus DNA test findings [J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(2): 631-637.

[20] Sokolova I, Algeciras-Schimnich A, Song M, et al. Chromosomal biomarkers for detection of human papillomavirus associated genomic instability in epithelial cells of cervical cytology specimens [J]. J Mol Diagn, 2007, 9(2): 604-611.

[21] Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, et al. Genomic amplification of the human telomerase gene (*TERC*) in pap smears predicts the development of cervical cancer [J]. Am J Pathol, 2005, 16(2): 1229-1238.

[22] 吴传保, 孙平, 刘祥瑞, 等. 聚合度可控的双端羟基聚乳酸的缩聚合成研究 [J]. 实验技术与管理, 2013, 30(6): 24-27.

[23] 梅平, 刘艳辉, 骆新兰, 等. FISH 检测宫颈脱落细胞中 *hTERC* 基因的意义 [J]. 诊断病理学杂志, 2010, 17(6): 453-455.

[24] 时姗姗, 余波, 马恒辉, 等. 在分子病理检测中环保透明脱蜡液与二甲苯应用的比较 [J]. 诊断病理学杂志, 2013, 20(12): 794-795.

(2015-08-09 收稿)
(本文编辑:赵 波)