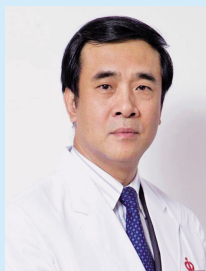


胃肠肿瘤组织标本库的取材与质量控制规范

肖韵¹, 杨东杰¹, 王维佳², 侯洵¹, 陈连周³, 王嘉林³, 何裕隆¹(1.中山大学附属第一医院胃肠外科中心; 2.中山大学图书馆; 3.中山大学附属第一医院普通外科实验室, 广东广州 510080)



作者简介:何裕隆, 中山大学附属第七医院院长、附属第一医院院长助理、外科主任, 博士研究生导师, 兼任中山大学胃癌诊治中心主任、中山大学附属第一医院胃肠外科中心主任、中山大学人类遗传资源平台主任等职务。

作为临床业务专家, 何裕隆教授擅长胃肠胰腺疾病的外科治疗和临床营养, 特别是胃肠道肿瘤的诊治。此外, 何裕隆教授现任亚洲外科学会会员, 中华医学会外科学分会委员, 中华医学会外科学分会胃肠外科学组副组长, 中国医师协会外科医师分会上消化道外科医师委员会副主任委员兼秘书长, 中国抗癌协会胃癌专业委员会副主任委员, 中国临床肿瘤学会(CSCO)胃肠间质瘤专家委员会副组长, 中国医师协会第二届医学教育委员会委员, 在国内外相关领域都具有较高的学术影响力, 连续3年入选“中国高被引用学者”医学榜单(ELSEVIER SCI)。

【摘要】 随着转化医学发展和精准医疗概念的提出, 生物样本库作为临床与科研转化的桥梁作用日益凸现。生物样本库中蕴含着大量可开发与挖掘的科学信息, 临床研究样本资源的重要性已经得到了广泛的重视。本文综述了国内外胃肠肿瘤组织标本的标准化采集流程, 对组织标本库的采集操作流程中影响标本质量的因素如取材方法、标本离体时间和组织来源差异等做分面总结, 以期为胃肠肿瘤组织标本的规范化收集提供参考。

【关键词】 胃肠道肿瘤; 组织标本库; 标本收集操作流程

Biobanking of gastrointestinal tumor tissue: standardized sample retrieval and quality control XIAO Yun¹, YANG Dong-jie¹, WANG Wei-jia², HOU Xun¹, CHEN Lian-zhou³, WANG Jia-lin³, HE Yu-long¹. 1. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University; 2. Sun Yat-sen University Libraries; 3. General Surgery Laboratory, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Province Guangzhou 510080, China
Corresponding author: HE Yu-long, Email: heyulong@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 With the development of translational medicine and the introduction of the concept of precision medicine, the biological specimen bank has become increasingly prominent as a bridge between clinical and scientific research. The biological specimen bank contains a large amount of scientific information that can be exploited and excavated. The importance of resources for clinical specimens has been given extensive attention. This article summarizes the standard operating procedure of collecting gastrointestinal tumor tissue specimens both at home and abroad, and summarizes the factors influencing the specimen quality in the collection and operation process of tissue specimen bank, such as the method of resection specimens of gastrointestinal tumor, the ex vivo ischemia time and the differences between organizations of different origins, in order to provide a reference for the standardized collection of gastrointestinal tumor tissue specimens.

【Key words】 Gastrointestinal tumor; Tissue bank; Specimen collection process

前言

中国是人口大国, 疾病生物样本资源极其丰

基金项目: 广东省科技计划(2013B021800120), 国家自然科学基金面上项目(项目编号: 81672333)。

通信作者: 何裕隆, E-mail: heyulong@mail.sysu.edu.cn

富。国内对于遗传资源的保护起源于人类基因组计划(HGP), 肿瘤生物样本库的建设在我国起步虽晚, 但发展迅速。目前科研管理部门、部分学者已经充分认识到了组织库建设的重要性, 并相继在自己的研究所(室)建立与他们从事研究相适应的单病种或多病种肿瘤组织库。

1996年,季加孚教授等在北京大学临床肿瘤学院率先成立了胃肠肿瘤生物样本库^[1]。此后,国内相关单位陆续创建肿瘤标本库进行肿瘤组织收集、储存和管理,以期应用基因组学、转录组学、蛋白质组学和其他高新生物技术发现更多肿瘤的潜在标志物。然而,上述分子或基因研究的成功及其转化应用依赖于新鲜人体组织样品的收集、处理、储存和质量控制。人体组织的生物分子分析需要完整的生物材料,包括保存良好的核酸和蛋白质。建立组织生物资源库需要规范化管理,需要从标本的采集、保存及后续使用都要有章可循,更需要外科医生、护士、技术人员、病理学家和分子生物学家共同努力以提供高质量的肿瘤组织和瘤旁组织及病人临床信息。只有规范上述各环节,才能确保样本库可用于大样本基因表达的转化医学研究。

肿瘤组织标本库管理首先保证生物安全规范操作,实现相对固定的专人管理,从源头保证入库标本质量。同时,标本库的维护人员需具备有专业技术水平和实验室管理能力,保证标本从收集、保存到利用的整个过程均受到严格质控。目前,国内临床标本库建设与管理主要存在两方面的不足:一方面是标本库建设存在无序、重复建设等现象,缺乏长期规划和相关管理部门的监管;另一方面是临床标本库的相关管理制度不完善,研究及其管理队伍不健全,建设、研究及管理机制有待不断创新^[2]。本文旨在提出一个相对规范的取材方法及流程管理规范,为构建一个以胃肠道恶性肿瘤标本为基础的研究平台提供参考。

1 取材方法

组织样本在离体后,首先评估取材条件,若瘤体较少仅能满足临床病理诊断,则不应强行从离体组织取材。满足取材条件后,应立即剔除网膜、脂肪等无需留存组织,用无菌的生理盐水多次冲洗以去除样本上的黏液、血液。有条件的单位应在取材前进行标本摄影以留存大体外观信息。保存为避免交叉污染,使用消毒灭菌后的器材。按照先瘤旁后瘤灶的顺序取材组织,取材大小应为 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ ^[3]。

瘤旁组织即手术切缘与肿瘤之间的正常组织,通常可用垂直和平行两种方法进行取材^[4]。垂直取材是指沿肿瘤边缘向手术边缘切取标本,其优点是可评价肿瘤边缘与切缘之间的关系,确定

肿瘤是否浸润切缘。平行取材则平行于肿瘤边缘取材,是获得小的管腔样或圆柱体结构完整横切面的理想方法。与垂直取材不同,平行取材不能很好地显示肿瘤边界与切缘之间的关系,故不能评价肿瘤浸润深度。因此,平行取材更适用于离肿瘤较远瘤旁组织,或用于小管腔或圆柱体的切缘^[2]。

肿瘤组织取材应当选择肿瘤边缘及其周边,即交界区。交界区是肿瘤生长较好的区域,而中心区常因缺血坏死失去了很多肿瘤生物学信息。另外,交界区可反映出肿瘤与邻近组织间的界面,常能揭示肿瘤发生的证据(如大肠癌是否来源于先前存在的绒毛状腺瘤),肿瘤生物学行为(如甲状腺滤泡癌是否侵犯包膜)和肿瘤局部浸润深度等(如胃癌对胃壁的浸润深度)^[4]。取材前要根据肿瘤的大小、病变特点和解剖学关系酌量取材,保证瘤体各个区域充分取材。如果怀疑存在癌前病变或良性病变的恶性转化,如胃肠道的腺瘤,还需更广泛取材。值得注意的是,某些基因仅在与肿瘤邻近的组织中被激活而在正常组织黏膜中未活化。这可能导致使用相邻组织作为内部对照时产生偏倚^[4]。

标本切下后,用锡箔纸包好后用液氮快速冷冻防止组织间粘连,后装入冻存管并放入液氮罐运输到组织库。须用石蜡包埋的组织一般先用10%中性福尔马林溶液固定,再用液氮快速冷冻可减少组织形态的扭曲和破坏^[5]。

2 组织离体时间的影响

离体组织在冻存前须经历热缺血和冷缺血状态。热缺血又分为两种情况:①当手术期间血管被束缚或受损时,离体组织即已出现缺血。②组织切除后放置在室温中(37℃)直至取材人员进一步处理前的缺血状态。冷缺血指组织切除后,放置在冰上(0~4℃)的缺血状态。随着离体时间的延长,缺血时间不断增加,组织内很多不稳定的活性生物分子会逐渐降解,基因表达和蛋白质磷酸化模式也可能发生改变,从而影响后续生物实验结果的准确性。

单链RNA相对与其他生物分子不够稳定,容易被环境中广泛存在的RNA酶降解。因此,很多研究皆以RNA降解情况作为评估标本质量的一项重要指标。RNA降解可以在许多条件下发生,如生理学上的RNA衰变,由坏死引起的细胞自溶,

细胞凋亡或在冷冻库储存期间的 RNA 断裂,组织解冻再处理及 RNA 分离过程发生的自然降解等。有文献报道,新鲜结肠癌组织置于冰上或在室温放置 4 h 后再用液氮中快速冷冻,分别提取 RNA 评估其完整性,结果提示两者 RIN(RNA Integrity Number, RIN)并无显著差异^[6]。另外,手术方式也可能影响标本的 RNA 质量。例如,腹腔镜结肠手术的平均手术时间往往比开放结肠手术更长,热缺血时间可能相应延长,这是导致 RIN 较低的可能原因^[5]。另有研究者提出,机器人手术拥有更精细的组织处理能力,可能减少手术对组织细胞产生的应激反应,从而减少组织内 RNase 释放,可能与处理组织 RNA 降解相关。有数据表明机器人手术切除的样本 RNA 质量并不逊色于开放手术^[7]。

冷缺血时长也是影响标本 RNA 的完整性重要因素。有研究指出,在冷缺血状态下放置 30 min,79%胃组织标本和 55%结肠组织标本的 RNA 尚能保持完整;放置 45 min 后,60%胃组织标本和 20%结肠组织标本的 RNA 仅能保持完整^[8]。因此,我们建议用于 RNA 研究的组织标本应在离体后 30 min 内取材并转移到液氮容器中。

DNA 双链结构相对于单链 RNA 稳定,而目前关于缺血对 DNA 稳定性影响的研究较少。有研究对切除后的结肠癌组织在冷缺血状态下放置 10、30、60、90 min 后分别提取 DNA,发现各组 DNA 都可显示高分子条带,且组间差异无统计学意义^[9]。这间接提示组织缺血状态对样本的 DNA 信息影响较小,研究 DNA 基因信息可能产生的偏倚也较轻。

在离体组织标本中,一些翻译后修饰蛋白,如磷蛋白,也是不稳定的生物分子类型。有研究报道,在 13 个切除后快速冻存的食管腺癌组织中有 9 个可表达 pAkt,然而组织在经历了热缺血后没有 1 个样本能检测到 pAkt^[10]。此外,有研究者发现,很多的组织在冷缺血期间磷酸化 MAPK 和 Akt 含量也会发生显著变化^[9]。因此,研究人员应充分评估组织中特定分子的稳定性,应意识到缺血状态可能对某些蛋白稳定性产生负面影响而提前采取援救措施。目前尚缺乏胃肠肿瘤组织在离体后磷酸蛋白稳定性评价的研究,只能暂时参照 RNA 的处理时间,希望在未来的研究中能得以完善。

综上所述,胃肠道组织标本应在离体 30 min 内取材,这需要具备标本解剖经验的专职人员提前与主刀医生沟通,尽量在离体后尽快处理标本

并完成取材。减少缺血时间对于保存更多的生物信息至关重要。

3 其他影响因素

与正常组织相比,结肠癌组织 RNA 浓度高, RNA 降解半衰期相对延长。肿瘤组织同时存在高水平的 RNA 结合蛋白,如 Hu R 等,已被证明能稳定 RNA 结构。此外,肿瘤组织多表现出高细胞活性,许多基因处于高转录状态,因而新生 RNA 较正常组织丰富,RIN 也明显高于正常值^[12]。结直肠组织的标本 RNA 却有相对较低的 RIN,可能因为厌氧细菌的离体增殖加速了 RNA 降解,但上述现象需进一步研究确定具体原因^[12,13]。有文献证明,肿瘤分化级别也与样本 RNA 质量相关。与中分化或高分化的组织相比,低分化癌组织的 RNA 较中、高分化组织有更低的 RIN。这可能与低分化细胞的 mRNA 或 rRNA 更易于在缺血时被降解有关^[14]。此外,术前新辅助放化疗可引起肿瘤组织大范围坏死和纤维化,造成取材样品有更低的 RIN 值^[15]。

4 质量控制

当建立生物标本库用于长期储存组织标本时,需要制定一套严格的管理细则对纳入样本进行质量控制。肿瘤样本的异质性必然会出现部分纳入标本的肿瘤细胞过少,长期存储不可避免地会造成部分生物信息的降解、丢失。

肿瘤组织的病理学复检与定期抽样也是样本质控的重要内容。参考国内建立的消化肿瘤标本库,目前主要采用随机原则,即每月随机抽取 2% 的样本,每年年初抽取 0.1% 的样本进行质量检测^[3]。检测内容包括 DNA 纯度、RNA 完整度、蛋白质磷酸水平和肿瘤特性等几个方面(表 1)。

表 1 肿瘤组织标本库复检指标与方法

指标	方法
DNA	紫外分光光度计,吸光度 A260/A280 比值即为特定 DNA 纯度
RNA	Agilent 2100 Bioanalyzer 完整性值(RIN) ^[16]
蛋白质	磷酸化水平,修饰后蛋白绝对水平 ^[17]
肿瘤特性	苏木素和伊红染色确定肿瘤细胞的百分比,肿瘤部分大于 80%质量良好、小于 65%为不合格样本 ^[3]

结语

目前,国内大部分医院病理科和生物标本库

是两个相对独立的部门,这并不利于肿瘤组织的规范取材和质量控制。根据医院流程,离体肿瘤标本通常在手术结束后才送到病理科进行取材,这就严重影响了标本的保存质量。因此,标本库取材会在病理送检之前进行,如果取材人员不够专业就可能影响后续病理判断的准确性,从而导致临床治疗的失当。国外一些国家已建立相对完善的取材流程,病理科与生物标本库通力合作以满足临床检测和标本储存两方面的需要^[18]。有些国家甚至还建立了大型多中心合作的生物标本库,方便组织标本的统一管理和相互调配,为研究提供更多样的生物学信息^[19,20]。

高质量的肿瘤组织标本库是进行各类型胃肠肿瘤研究的前提条件。采用规范统一的取材方法及定期的质量控制可以保证储存标本的有效性和稳定性,从而节省工作时间,加快研究进程。建立规范化、标准化胃肠肿瘤标本的取材方法不仅可以充分保护、合理利用胃肠肿瘤标本资源,更能为胃肠肿瘤的临床及分子生物学研究提供保障,具有十分重要的转化医学意义。

参考文献

- [1] 徐斐. 肿瘤生物样本库与转化医学[J]. 中国实用口腔科杂志, 2012, 5(12): 720-723.
- [2] 孙荣国, 贾晓蓉. 对我国临床标本库建设的建议[J]. 卫生软科学, 2012, 26(09): 772-773.
- [3] 窦建华, 唐光波, 李曾等. 具有学科特色的消化系疾病生物样本库[J]. 转化医学杂志, 2015, (04): 199-201+207.
- [4] 帅智峰, 吴淑琴. 外科病理肿瘤标本的取材方法体会[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, (16): 2216-2217.
- [5] Olsen J, Kirkeby L T, Eiholm S, et al. Impact of in vivo ischemic time on RNA quality—Experiences from a colon cancer biobank[J]. *Biopreserv Biobank*, 2015, 13(4): 255-262.
- [6] Bao W G, Zhang X, Zhang J G, et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality [J]. *Annals of surgical oncology*, 2013, 20(5): 1737-1744.
- [7] Dev H, Rickman D, Sooriakumaran P, et al. Biobanking after robotic-assisted radical prostatectomy: a quality assessment of providing prostate tissue for RNA studies[J]. *Journal of translational medicine*, 2011, 9(1): 121.
- [8] Viana C R, Neto C S, Kerr L M, et al. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples[J]. *Cell and tissue banking*, 2013, 14(2): 167-173.
- [9] Wolf C, Jarutat T, Vega Harring S, et al. Determination of phosphorylated proteins in tissue specimens requires high-quality samples collected under stringent conditions [J]. *Histopathology*, 2014, 64(3): 431-444.
- [10] Grizzle W E, Bell W C, Sexton K C. Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research [J]. *Cancer Biomarkers*, 2011, 9(1-6): 531-549.
- [11] Shabihkhani M, Lucey G M, Wei B, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings [J]. *Clinical biochemistry*, 2014, 47(4): 258-266.
- [12] Wang TH, Chen CC, Liang KH, et al. A Multivariate Evaluation of Factors Affecting the Quality of Freshly Frozen Tissue Specimens[J]. *Biopreserv Biobank*, 2017, 15(4): 344-349.
- [13] Zeugner S, Mayr T, Zietz C, et al. RNA quality in fresh-frozen gastrointestinal tumor specimens—experiences from the tumor and healthy tissue bank TU Dresden [M]//Pre-Analytics of Pathological Specimens in Oncology. Springer International Publishing, 2015: 85-93.
- [14] Olsen J, Kirkeby L T, Eiholm S, et al. Impact of in vivo ischemic time on RNA quality—Experiences from a colon cancer biobank[J]. *Biopreserv Biobank*, 2015, 13(4): 255-262.
- [15] Andreasson A, Kiss N B, Juhlin C C, et al. Long-term storage of endocrine tissues at 80 °C does not adversely affect RNA quality or overall histomorphology [J]. *Biopreserv Biobank*, 2013, 11(6): 366-370.
- [16] Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA integrity number (RIN) - standardization of RNA quality control [J]. *Agilent application note, publication*, 2004: 1-8.
- [17] 孙孟红. 肿瘤生物样本库的运营与应用[J]. 中华临床实验管理电子杂志, 2017, 5(01): 12-18.
- [18] Corso G, Garosi L, Marrelli D, et al. Assessment of a tumor bank: a thirty years experience of the University of Siena (Italy) [J]. *Cell Tissue Bank*, 2015, 16(2): 283-286.
- [19] Abrams JA, Appelman HD, Beer DG, et al. Barrett's Esophagus Translational Research Network (BETRNet): the pivotal role of multi-institutional collaboration in esophageal adenocarcinoma research [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): 1586-1590.
- [20] Grizzle W E, Otali D, Sexton K C, et al. Effects of cold ischemia on gene expression: a review and commentary [J]. *Biopreserv Biobank*, 2016, 14(6): 548-558.

(收稿日期: 2018-02-11)