

肿瘤组织库石蜡标本的制备及保存探讨

龚万钢,徐海苗,孙文勇
(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310002)

摘要:近年来,随着对恶性肿瘤发病机制的研究进展加速,新方法增多,对肿瘤标本的需求量也越来越大,建立相应的肿瘤组织库(tumor tissue bank,TTB)势在必行。作为肿瘤标本的重要组成部分,高质量的石蜡标本具有珍贵的生物研究价值。与病理诊断不同,TTB的石蜡标本更注重其核酸和蛋白的质量控制。全文结合实际对TTB的石蜡标本制备和保存过程中存在的问题进行探讨,在传统方法的基础上进行改进,减少其DNA、RNA和蛋白质量的下降。

关键词:肿瘤标本库;石蜡标本

中图分类号:R197 文献标识码:B 文章编号:1004-0242(2015)04-0284-04

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2015.04.A007

Study on the Paraffin Specimen Preparation and Preservation in Tumor Tissue Bank

GONG Wan-gang, XU Hai-miao, SUN Wen-yong
(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China)

Abstract:As the quick development of tumor study, better tumor specimen is in great demand. Scientists decide to establish Tumor tissue bank (TTB) which is believed be helpful improving specimen quality. Paraffin specimens is widely used in biological research, it is also the most important part of TTB. In this paper, the problems in paraffin specimens preparation and preservation were mainly discussed. And go through traditional technology and alterations recently, try to find a good way to keep DNA, RNA and protein stable in TTB.

Key words:tumor tissue bank; paraffin specimens

我国是一个人口大国,也是癌症高发国家。人口多,病种多,具有丰富的肿瘤医学资源。为了避免肿瘤标本的浪费及方便对癌症的研究,肿瘤组织库(tumor tissue bank,TTB)这一技术平台随之产生。肿瘤组织库是系统、规范科学收集、保存手术切除的肿瘤组织、采集肿瘤患者相关体液及汇总相关病理类型临床分期和治疗效果等方面信息的平台^[1-3]。规范化收集,有质量保证的人类组织标本,又恰恰是转化生物医学和临床研究必不可少的资源基础^[4-7]。就单留取组织标本而言,超低温冷冻组织标本和石蜡标本各有优势^[8,9]。超低温冷冻组织标本虽然有质量保证,但却不能像石蜡标本一样进行详尽的微观分析^[10]。

随着越来越多的研究人员转向石蜡标本的分子分析,开发特定的操作步骤,保证其质量就愈发重要。结合本院的TTB建设情况,我们对石蜡标本的制备过程及保存方法所存在的问题进行探讨,并提出相应的解决方法。

1 TTB 石蜡标本的标准化制备流程

1.1 手术室取材

TTB任何标本的留取,都应在患者签署知情同意书的前提下进行。在不影响病理诊断及无菌条件下^[11],在有明显肿块处取2块肿瘤组织,远离肿块处(至少5cm)取2块正常组织作为石蜡标本的留取。在取材过程中对标本质量影响有多个因素,例如缺血时间、转移温度、麻醉方式、术前治疗等,这些变量

收稿日期:2014-12-26;修回日期:2015-01-22

基金项目:卫生事业专项补助资金“浙江省组织生物样本库创新服务平台建设补助”(2100208)

通讯作者:孙文勇,E-mail:sunwengy2222@163.com

因素,对于标本的 mRNA、蛋白表达、磷酸化水平均有明显影响^[12]。可以将标本置于湿冰上进行取材,降低温度以限制细胞的自身变化。在切割过程中,动作应轻及迅速,手术钳及镊子也应小心使用,太重的撕扯可能会对标本造成创伤。留取的组织大小不宜超过 0.5cm³,目前欧洲的人类冰冻组织库(TuBaFrost)及英国的头颈部肿瘤组织库(head and neck cancer,HNSCC)均采用此标准^[13,14],留取组织太大或太厚均影响脱水效果,脱水效果不好则影响标本蛋白质量。在一个比较不同大小样品固定过程的实验中,QIAGEN 的研究人员发现,在固定整个组织(厚度大约 1cm)而不是组织切片(厚度约 4 mm 或以下)时,RNA 显著降解^[15]。为了获得最佳的结果,通常建议固定最多 5 mm 厚的组织标本。取材时间应在 15min 内,通常认为手术标本离体后会有一个缺血时间,Ma 等^[16]通过对不同器官的癌症样本进行研究发现缺血时间对标本影响显著。取材时间过长可能会导致基因表达变化甚至发生组织自溶,所以应对固定前的每一步操作时间都进行一个记录,并进行备案。有些器官的组织(如肝、肺)血液较多,应尽量将血液吸干后再取材,组织内积血的话会影响切片效果^[17]。空腔类脏器如胃应该只取材黏膜而不带有肌层。有些脂肪较多,如乳腺、大网膜结节等,应尽量将脂肪剔除,因为带有脂肪的组织也不利于制片。有些肿块较小,如甲状腺、口咽及喉,应小心取材,不影响其病理诊断。而像大肠标本,特别是右半结肠标本,可能会带有粪便等排泄物,应用生理盐水冲洗后再进行取材。留取肿块组织时,坏死组织应剔除。另外,手术前经过放化疗的患者,留取标本时应特别记录,若患者自身带有传染性强的疾病,如梅毒、艾滋病等,则不建议留取标本。

1.2 固定

固定是留取石蜡标本的关键步骤,是决定其质量的关键。取材后的组织,要置于做好标记的包埋盒并放入固定液中进行固定。传统固定液中,使用最广泛的为 10%中性福尔马林溶液,具有渗透能力强,固定均匀,对组织收缩小等优点。为了获得最佳的结果,应当使用中性福尔马林缓冲溶液,以取代无缓冲或酸性的溶液,因为无缓冲溶液会导致核酸的水解^[18]。中性缓冲液减缓福尔马林的降解,而通常认为其降解产物会损害核酸的质量。福尔马林固定液

的优点很多,沿用多年,一般病理科就使用此固定液进行组织固定,以保持组织的良好形态。但不可否认的是,甲醛会导致生物分子间的交联,包括核酸之间,蛋白之间,以及核酸和蛋白之间的交联,明显影响标本质量,并且这种交联是不可避免的。所以 10%中性福尔马林溶液不是 TTB 固定液的首选。在发达国家已经推广应用环保型的固定液替代 10%中性福尔马林溶液^[19]。潘黎明^[20]通过自己配制的无甲醛固定液对标本进行固定,发现与 10%中性福尔马林溶液固定结果差异不明显,并且无甲醛固定液对环境污染小,无毒,无色,无刺激性。但这种固定液其中成分不明确,尚不明确是否会对标本质量有影响。TTB 所要求的固定液要求很高,一方面要求其有很好的固定效果,另一方面,要求其基本不影响标本 DNA、RNA 及蛋白质量。基于此,我们选用了 QIAGEN 公司开发的 PAXgene 系列产品 PAXgene Tissue Containers,PAXgene Tissue Containers 是一种双腔容器,预装 2 种试剂,分别用于组织的固定和稳定。第一个腔装有特定固定液,可快速渗入并固定组织,时间为 2~4h(最多 12h)。固定效果好,而且基本不影响标本的 DNA、RNA 及蛋白质量。固定的样品可包埋到石蜡中,可以后续进行染色,或者免疫组化反应,用于组织形态学研究,效果良好,完全可以替代 10%中性福尔马林溶液。

1.3 脱水

固定所选用的固定液基本上都是水溶液,所以,应先脱去组织内的水分,为脱蜡创造条件。脱水剂通常使用无水乙醇,步骤是从低浓度到高浓度,直至水分完全置换为乙醇。切不可颠倒顺序,并以新配试剂在可密封容器内进行完全脱水。并根据组织的大小,厚薄调整脱水时间,脱水须完全,否则会影响下一步骤的组织透明。刘海萍等^[21]经过 6 年多的调整实验和研究发现:组织的透明与否,不在于使用透明试剂进行透明,关键在于脱水干净与否。而且脱水不完全,可能会导致标本降解。

1.4 透明

组织脱水后,应使用一种既能与乙醇混合,又能溶解于石蜡的溶剂的替代过程,称为透明。由于二甲苯价格便宜,透明效果好,作用时间短而被广泛采用^[22]。但是,二甲苯在组织处理过程中,易使组织收缩、硬化变脆。并且二甲苯有轻微毒性,对人体神经系统和

黏膜都有影响。近年来,各医院病理科正逐步使用一种新型环保生物组织透明剂——TO 试剂,其主要以醇类为稀释剂,不含芳香烃类化合物,不产生对人体有害物质,对环境也不造成污染,而且透明效果好,处理得当可以代替二甲苯^[23]。王青霞等^[24]通过反复实验,使用硬脂酸石蜡混合液可代替二甲苯进行透明,效果良好。

1.5 浸蜡和包埋

透明完成之后,需要用一种包埋剂代替透明剂,浸入组织而起支撑作用。石蜡是常用的包埋剂,通常先把组织材料块放在熔化的石蜡和二甲苯的等量混合液浸渍 1~2h,再先后移入 2 个熔化的石蜡液中浸渍 3h 左右,浸蜡应在高于石蜡熔点 3℃左右的温箱中进行,以利于石蜡浸入组织内。在使用溶解温度高的石蜡时,包埋过程需要较高的温度,这可能导致样品中大分子降解,所以不宜使用。通常石蜡采用熔点为 56℃~58℃或 60℃~62℃两种,可根据季节及操作环境温度来选用。此外应当避免包含添加剂如蜂蜡的石蜡,因为它们可能干扰生物分子的回收。

2 石蜡标本的保存

2.1 石蜡块的保存

经过一系列步骤而得的石蜡标本保存也至关重要。为了最大程度地减少石蜡标本中核酸和蛋白质量的下降,建议采用-30℃冰箱进行石蜡块的保存。在一个比较不同保存温度的实验中,QIAGEN 的科学家发现,如果福尔马林固定石蜡包埋的样品(formalin-fixed,paraffin-embedded FFPE)保存在 4℃,而不是室温或更高,则 RNA 在 1 年后仍基本完整^[15]。Sfakianos 等^[25]通过选取存储在 4℃不干燥条件下,并且存储天数为 179~3399d 的 FFPE 进行研究,发现在该条件下储存的 RNA 并没有被影响。理论上,温度越低,对核酸和蛋白的保存越好;不过考虑到成本问题,我们建议使用-30℃冰箱。一方面冰冻的环境解决潮湿所引起的 FFPE 发霉问题,另一方面,可以使石蜡切片更好更容易进行。TTB 与病理科不同,一天所制备的 FFPE 量不多,也不存在病理诊断问题,通过订做与 FFPE 相配套的架子和盒子,节省冰箱的空间,也方便入库和出库。不过存放于冰箱也存

在问题,比如可能会对石蜡标本进行反复冻融。

2.2 制成石蜡切片

尽管 TTB 不进行临床病理诊断,但是我们认为制作石蜡切片还是必要的,通过相应的石蜡切片,可以让我们更直观的观察肿瘤细胞形态,并且大概估计肿瘤细胞的比例。TTB 工作人员应该观察石蜡切片,以确认在切除的组织样本中是否有足够的癌细胞。合格样品是有超过 75%癌细胞的癌组织,而少于 65%则认为是不合格的^[26]。现在国外的肿瘤数据库中加入了该组织的病理学图像信息,其中既包括收集的组织标本的大体照片,也包括该组织已做成常规 H&E 切片的镜下采集图片^[27]。

染色通常采用 HE 染色,对于石蜡切片的保存,与病理科相同,室温,通风干燥处进行。

3 小 结

近年来,随着分子病理学和分子生物学的发展,肿瘤研究进入了崭新阶段,同时也对 TTB 的建设提出了更高的标准和要求。目前,大部分国内外 TTB 都以留取新鲜冰冻组织为主,对于高质量的石蜡组织留取和保存是一个空白。本文为 TTB 石蜡标本的一系列流程和保存提出建议,并对出现的问题进行探讨,提出一些可靠及可行性的方法和操作,为高质量的石蜡标本制作提供参考,希望在日后的实践中不断改进,完善质量控制系统,为本院及院外科研单位提供高质量石蜡标本,并为转化医学的发展贡献力量。

参考文献:

- [1] Knox K,Kerr DJ. Establishing a national tissue bank for surgically harvested cancer tissue [J]. Br J Surg,2004,91(2):134-136.
- [2] Asslaber M,Zatloukal K. Biobanks;transnational,Euro-pean and global networks [J]. Brief Funct Genomic Proteomic,2007,6(3):193-201.
- [3] Barnes RO,Parisien M,Murphy LC,et al. Influence of evolution in tumor biobanking on the interpretation of translational research [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2008,17(12):3344-3350.
- [4] Riegman PH,Morente MM,Betsou F,et al. Biobanking for better healthcare[J]. Mol Oncol,2008,2(3):213-222.

- [5] Herpel E, Koleganova N, Schirmacher P. Tissue bank of the National Centre for Tumour Disease. An innovative platform for translational tumour [J]. *Pathologe*, 2008, 29 (Suppl 2): 204–209.
- [6] Riegman PH, Dinjens WN, Oosterhuis JW. Biobanking for interdisciplinary clinical research[J]. *Pathobiology*, 2007, 74 (4): 239–244.
- [7] Bates S. Progress towards personalized medicine [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(3–4): 115–120.
- [8] Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens; molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(12): 1475–1487.
- [9] Shi SR, Liu C, Pootrakul L, et al. Evaluation of the value of frozen tissue section used as “gold standard” for immunohistochemistry [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(3): 358–366.
- [10] Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings[J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(4–5): 258–266.
- [11] Signoretti S, Bratslavsky G, Waldman FM, et al. Tissue based research in kidney cancer; current challenges and future directions [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (12): 3699–3705.
- [12] Wang C, Zhang DQ, Zhao YY, et al. Colorectal cancer tissue is built and experience in quality control [J]. *Practical Oncology*, 2012, 27(4): 406–410. [王聪, 张大庆, 赵盈盈, 等. 大肠癌组织库建立及质量控制的经验[J]. *实用肿瘤杂志*, 2012, 27(4): 406–410.]
- [13] Mager SR, Oomen MH, Morente MM, et al. Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(5): 828–834.
- [14] Hall G L, Kademani D, Risk JM, et al. Tissue banking in head and neck cancer[J]. *Oral Oncol*, 2008, 44(2): 109–115.
- [15] von Ahlfen, Missel A, Bendrat K, et al. Determinants of RNA quality from FFPE samples [J]. *PloS One*, 2007, 2 (12): e1261.
- [16] Ma Y, Dai H, Kong X. Impact of warm ischemia on gene expression analysis in surgically removed biosamples[J]. *Anal Biochem*, 2012, 423(2): 229–235.
- [17] Bo ML, Song Y, Lin QF, et al. Experimental animals prone to problems in the liver tissue paraffin section [J]. *China Mod Drug Appl*, 2012, 6(20): 121–122. [柏美玲, 宋昱, 林群凡, 等. 实验动物肝组织石蜡切片制作中易发问题探讨[J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(20): 121–122.]
- [18] Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues; which methods are useful when?[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e537.
- [19] Moelans CB, ter Hoeve N, van Ginkel JW, et al. Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(4): 548–556.
- [20] Pan LM. Environmental protection has no fixed liquid aldehyde and formaldehyde fixed effects of immunohistochemical staining were compared [J]. *Modern Practical Medicine*, 2013, 25 (5): 583–584. [潘黎明. 环保型无醛固定液与甲醛固定液对免疫组化染色的效果比较[J]. *现代实用医学*, 2013, 25(5): 583–584.]
- [21] Liu HP, Wang XD. Conventional paraffin section dewatering plan adjustment and experiment [J]. *Practical Medical Techniques*, 2014, 21(4): 427. [刘海萍, 王星斗. 常规石蜡切片脱水方案的调整与实验[J]. *实用医技杂志*, 2014, 21(4): 427.]
- [22] Wang YJ, Wang XX, Lv F, et al. Green transparent agent in the application of conventional organization production [J]. *Clin Exp Pathol*, 2014, 30(3): 336. [王永军, 王肖肖, 吕菲, 等. 环保透明剂在常规组织制片中的应用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(3): 336.]
- [23] Xia Q, Liu L, Yang N, et al. New environmental protection biological tissue transparent agent in the application of pathologic technology[J]. *Proceeding of Clinical Medicine*, 2014, 1(23): 35–36. [夏勤, 刘禄, 杨娜, 等. 新型环保生物组织透明剂在病理技术中的应用 [J]. *临床医药实践*, 2014, 1(23): 35–36]
- [24] Wang QX, An HB, Liu ZY, et al. Stearic acid and organizational dewaxing transparent liquid instead of xylene in the application of pathological production [J]. *Clin Exp Pathol*, 2009, 25(4): 442. [王青霞, 安会波, 刘征艳, 等. 硬脂酸和组织脱蜡透明液替代二甲苯在病理制片中的应用[J]. *临床与病理学杂志*, 2009, 25(4): 442.]
- [25] Sfakianos AP, Iversen ES, Whitaker R, et al. Validation of ovarian cancer gene expression signatures for survival and subtype in formalin fixed paraffin embedded tissues [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 129(1): 159–164.
- [26] Yu YY, Zhu ZG. Significance of biological resource collection and tumor tissue bank creation [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2010, 2(1): 5–8.
- [27] Viti F, Merrelli I, Caprera A, et al. Ontology based, Tissue Micro Array oriented, image centered tissue bank [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(Suppl 4): S4.