

· 技术与方法 ·

肝癌石蜡包埋组织 miRNA 提取方法的优化*

党裔武¹, 容敏华², 陈 罡^{1△}(1. 广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院
实验研究部, 南宁 530021)

摘要:目的 改进并优化从肝癌(HCC)甲醛固定石蜡包埋组织(FFPE)提取并检测微小 RNA(miRNA)的方法。方法 使用 miRNeasy FFPE 试剂盒探讨提取 HCC 石蜡组织 miRNA 最佳切片厚度及蛋白酶 K 作用时间。实时定量 RT-PCR 检测 miR-221、miR-146a、let7-a、miR-191、miR-103 及 RNU6B 的表达量。将 HCC 细胞制成石蜡组织, 对比同一细胞系新鲜细胞及石蜡包埋细胞的各个 miRNA 表达量差异。结果 切片厚度 30 μm, 蛋白酶 K 作用时间 48 h 时提取 miRNA 效果最佳。各 HCC 细胞系及临床 HCC 石蜡组织均有不同水平的 miRNA-221、miR-146a、let7-a、miR-191、miR-103 及 RNU6B 表达。同一细胞系新鲜细胞与石蜡包埋后的各 miRNA 表达无明显差别。结论 改良后的 miRNeasy FFPE 提取方法能提取石蜡组织中的 miRNA, 可重复性强, 可推广用于临床各种石蜡包埋组织的 miRNA 提取。

关键词:微 RNAs; 甲醛; 石蜡包埋; 肝肿瘤; 逆转录聚合酶链反应

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)34-3623-03

Optimization of MicroRNA extraction method from HCC FFPE tissues*

Dang Yiwu¹, Rong Minhua², Chen Gang^{1△}(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China;
2. Department of Research, Affiliated Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To modify and optimize the microRNA(miRNA) extraction and detection approach from hepatocellular carcinoma(HCC) formalin fixed paraffin embedded(FFPE) tissues. **Methods** miRNeasy FFPE kit was performed to investigate the optimizational thickness of sections from HCC FFPE tissues and time of protease K treatment. Afterwards, expression of miR-221, miR-146a, let7-a, miR-191, miR-103 and RNU6B was detected by real time RT-PCR. The difference of the miRNA expression between fresh cells and FFPE tissues from the same cell line was also compared by real time RT-PCR. **Results** 30 μm thickness and 48 h of proteinase K treatment were the best parameters to isolate miRNA. Different expression levels of all the miRNAs could be detected in both the HCC cells samples and clinic FFPE samples. There was no significant variation of the miRNA expression between fresh cells and FFPE samples from the same cell lines. **Conclusion** The optimizational miRNeasy FFPE method is applicable for miRNA extraction from FFPE tissues. The method is productive and can be popularized for the miRNA isolation for different FFPE tissues.

Key words: microRNAs; formaldehyde; paraffin embedding; liver neoplasms; reverse transcriptase polymerase chain reaction

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一组微小的内源性非编码单链小分子 RNAs(21-25nt),由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后而生成。miRNA 现已被证实不同的生理过程,诸如发育、分化、增殖、凋亡及病毒感染中发挥着重要的作用^[1-5]。最新研究表明,有部分 miRNA 与肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等肿瘤的关系密切。一些 HCC 组织特异性的 miRNA 亦被证实 HCC 的发生过程中起到了非常重要的调节作用^[6-10]。临床甲醛固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)标本是进行医学回顾性研究的最佳资源。虽然新鲜临床标本经过固定、脱水、浸蜡、包埋等步骤后, mRNA 部分已降解或修饰,但从 FFPE 提取总 mRNA 进行医学研究仍得到了长足的进展^[11-12]。miRNA 因为本身体积微小,故在 FFPE 组织中保存相当稳定,与新鲜组织样品中 miRNA 相差无几,因此使用 FFPE 组织进行相关 miRNAs 的研究已成为当前的热点。本实验使用 miRNeasy FFPE 试剂盒探讨提取肝癌石蜡组织 miRNA 最优化的条件,并对使用该方法提取的石蜡标本 miRNA 表达与相应的新鲜细胞

的 miRNA 表达的差异,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人 HCC 细胞系 HepG2, HepB3, SNU449 及 SNU398 均购自美国 ATCC 公司,分别用 DMEM 与 RPMI 1640 培养液(均购自美国 Gibco 公司)培养。取对数生长期细胞(约 1×10^7),以 1 000 r/min 离心 5 min,去上清液;D-Hanks 平衡盐溶液(pH 7.2)清洗 2 遍;最后一次吸出上清液后,沿离血管壁慢慢地加入 1 滴蛋清甘油(蛋清:甘油=1:1),用滴管轻轻地把细胞与蛋清甘油混匀,将细胞用 10% 中性缓冲甲酰胺固定 12 h,低速离心(200 r/min)5 min;离心后的细胞团用擦镜纸包裹,然后进行各级乙醇脱水(各 30 min)、二甲苯透明(2×30 min)、浸蜡(3×30 min)及石蜡包埋^[18]。石蜡组织标本 40 例,为广西医科大学第一附属医院病理科确诊的 HCC 患者,均含有距癌结节 2 cm 以上之癌旁组织。

1.2 FFPE 组织含 miRNA 总 RNA 的提取 miRNeasy FFPE Kit 购自比利时 Qiagen 分公司。按试剂说明书操作并进行相关步骤不同参数的测试,简述如下:(1)蜡块分别切片 5、10、

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2010GXNSFB013059)。

△ 通讯作者, Tel: (0771)5356534; E-mail: chen_gang_triones@163.com。

20、30、40 μm 厚,根据组织大小将 2~16 张切片置于无 RNA 酶的 EP 管中,加二甲苯 1 mL,剧烈振荡 10 s,20 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 r/min 离心 2 min,弃上清液。视石蜡多少重复上述步骤 1~3 次;(2)加 1 mL 无水乙醇,振荡混匀,14 000 r/min 离心 2 min,弃上清液;(3)风干后加 240 μL PKD 缓冲液及 10 μL 蛋白酶 K,振荡混匀,视组织溶解情况 55 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 15 min、1、12、24、36、48 h。如组织不溶解,则在 24 h 时再加 10 μL 蛋白酶 K,继续孵育 12~24 h,然后 80 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;(4)加 500 μL RBC 缓冲液,振荡混匀,将液体全部转移至 gDNA Eliminator 离心管,10 000 r/min 离心 30 s,弃离心管,保留离心后液体;(5)加入无水乙醇 1.2 mL,混匀,将 700 μL 移至 miRNeasy Min Elute 离心管,10 000 r/min 离心 15 s,弃离心液,重复上述过程至全部样本离心完毕;(6)加 500 μL RPE 缓冲液,10 000 r/min 离心 15 s,弃离心液,重复上述步骤,但第 2 次离心 2 min;(7)将 miRNeasy Min Elute 离心管置入新的收集管,14 000 r/min 离心 5 min,弃离心液;(8)将 miRNeasy Min Elute 离心管置入最后的 RNA 收集管,加 30 μL 无 RNase 14 000 r/min 离心 1 min 溶解总 RNA(含 miRNA),使用 ND-1000 Nano Drop 检测 RNA 质量及浓度。

1.3 实时定量 RT-PCR 技术检测 miRNA 表达 miRNA 检测引物、探针(miR-221、miR-146a、let7-a、miR-191、miR-103 和 RNU6B)、逆转录试剂盒及实时定量 RT-PCR 试剂盒购自 Applied Biosystems 公司。细胞总 RNA(含 miRNA)使用 miRNeasy Mini Kit(比利时 Qiagen 分公司)抽提。取各组总 RNA 各 200 ng,加入到含特异引物的 15 μL 的 RT 反应体系中进行 miRNA 逆转录反应。取 2 μL cDNA 样本使用 ABI-Prism 7900HT PCR 仪(Applied Biosystems)行实时定量 PCR 检测。所有实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

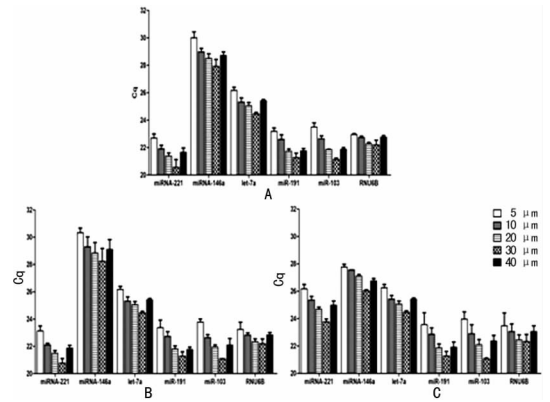
2 结果

2.1 总 RNA 纯度 所有标本不同条件下抽提的总 RNA(含 miRNA) $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值均在 1.80~2.06 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 值均在 1.89~2.08 之间。

2.2 切片厚度与 miRNA 表达的关系 HepG2、HepB3、SNU449 及 SNU398 细胞均制成蜡块,并选取 3 例 HCC 病例及其对应癌旁正常肝组织进行不同厚度与 miRNA 表达量关系的测试。10 个蜡块不同切片厚度均能检测出相关 miRNA 的表达。但 5 μm 厚的切片 Cq 值明显高于其他厚度切片,miRNA 表达量下降。同一 miRNA 表达量最高者均为厚 30 μm 的切片,Cq 值低于 5 μm 者 1~2 循环不等。30 μm 组与其他组别相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。从 5、10 μm 至 20、30 μm ,各个 miRNA 的表达量呈现上升趋势,但 40 μm 厚之切片 miRNA 表达略低于 30 μm 者。HepG2 及其中 1 例 HCC 和癌旁肝组织各 miRNA 表达,见图 1。

2.3 蛋白酶 K 作用时间与 miRNA 表达的关系 试剂盒说明书建议蛋白酶 K 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,但孵育 15 min 后肉眼仍可见明显的组织块,将孵育时间增加至 1 h,组织块仍未消失。故将孵育时间延长至 12~24 h,直至液体呈现清亮。如一次抽提的组织较多,在 24 h 时补加一次蛋白酶 K,继续孵育 12~24 h。为观察蛋白酶 K 作用时间对 miRNA 表达的影响,选取 1 例 HCC 蜡块(表面积 200 mm^2),每次切片 2 张,厚 30 μm ,该

例首次加蛋白酶 K 24 h 后,液体仍浑浊,则在 24 h 时再加第 2 次蛋白酶 K,36 h 时液体清亮。不同蛋白酶 K 作用时间下总 RNA(含 miRNA)质量分别为,1 h:1 365.87 ng/ μL ;12 h:1 855.56 ng/ μL ;24 h:2 045.65 ng/ μL ;36 h:2 746.87 ng/ μL ;48 h:2 718.56 ng/ μL 。以上 5 组总 RNA 均能检测出相关 miRNA 的表达。但 1、12 及 24 h 之 Cq 值明显高于 36 h 及 48 h,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



A: HepG2; B: HCC; C: 正常肝组织。

图 1 FFPE 组织不同厚度切片与 miRNA 表达的关系

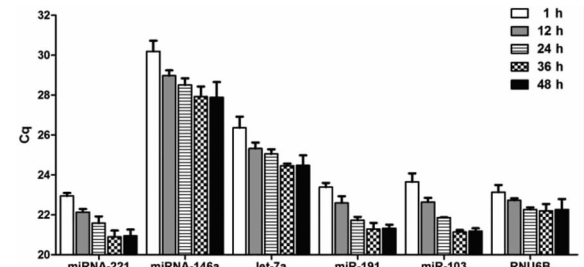


图 2 HCC 蛋白酶 K 作用时间与 miRNA 表达的关系

2.4 组织量与 miRNA 表达的关系 如一次提取的组织量过多,有可能导致各个步骤的离心管阻塞,从而影响提取质量和数量。本实验也选取 3 例 HCC 组织,进行不同组织量(3.0、6.0、12.0、24.0 mm^3)的对比(图 3),结果显示组织总体积为 24.0 mm^3 时,RNA 量最高,并未发生离心管阻塞现象。其中病例 1 不同组织体积提取总 RNA 数量分别为 900.24、1 800.45、2 799.34、4 935.45 ng/ μL ,病例 2 为 687.45、1 356.45、2 436.34、4 535.45 ng/ μL ,病例 3 为 865.42、1 564.72、2 987.12、5 432.56 ng/ μL 。各组 RNA 也经实时荧光定量 RT-PCR 检测,各 miRNA 表达量未见明显差别。

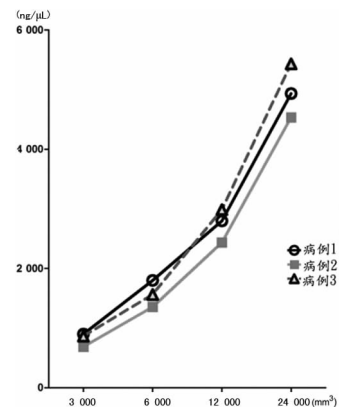


图 3 蛋白酶 K 作用时间与 miRNA 表达的关系

2.5 新鲜细胞及石蜡组织 miRNA 表达的对比 抽提 HepG2、HepB3、SNU449 及 SNU398 4 种肝癌细胞系新鲜细胞及石蜡组织的总 RNA, 实时荧光定量 RT-PCR 检测各 miRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), HepB3、SNU449 及 SNU398 结果未示, 见图 4。

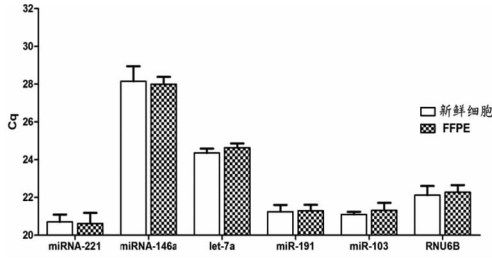


图 4 HepG2 同一细胞系新鲜细胞及石蜡组织 miRNA 表达的对比

3 讨论

石蜡组织中 RNA 降解或修饰严重, 但是 miRNA 因为本身体积较小, 大部分石蜡组织中的 miRNA 未被修饰, 保存完整, 为利用石蜡组织资源研究 miRNA 的在各种疾病中的作用机制提供了基础^[12]。miRNeasy FFPE 试剂盒能提取纯化长度 18 个核苷酸以上的总 RNA, 独特的裂解和孵育条件逆转甲醛对 RNA 造成的修饰。并且裂解缓冲液可将 RNA 从组织切片中有效释放出来, 同时避免进一步的 RNA 降解。该试剂盒使用 gDNA 去除柱有效去除基因组 DNA 污染。但在组织脱蜡的过程中, 如果缺少完整细胞膜的保护, 二甲苯或无水乙醇可溶解部分 miRNA, 造成 miRNA 的丢失。成人肝细胞直径为 20~30 μm , 故过薄的切片细胞膜的完整性受到破坏, 直接影响 miRNA 提取的数量与质量。本实验将试剂盒推荐的 5~10 μm 切片厚度增加至 20、30、40 μm , 结果发现 30 μm 厚度保持完整的 miRNA 效果最佳。

蛋白酶 K 是一种切割活性较广的丝氨酸蛋白酶。它切割脂族氨基酸和芳香族氨基酸的羧基端肽键, 用于生物样品中蛋白质的一般降解。在 RNA 提取中, 蛋白酶 K 的作用还有降解 RNA 酶, 防止 RNA 的降解。本研究发现, 蛋白酶 K 作用时间对 miRNA 数量及质量有着重要的影响, 最佳作用时间应为肉眼观标本液体呈现清亮后再延长 12 h。在蛋白酶 K 作用期间, 可多次剧烈振荡, 协助样品中蛋白质的降解。

综上所述, 经改良后的 miRNA 抽提方法稳定, 可重复性强, 提取的含 miRNA 的总 RNA 纯度高, 产量高, 多个 miRNA 表达量与从新鲜细胞提取的 miRNA 对比差异无统计学意义

($P > 0.05$)。同时保存 15 年以上的 FFPE 组织也可以提取出高质量的含 miRNA 的总 RNA。故经过条件优化的从 FFPE 组织提取 miRNA 的方法值得推广使用。

参考文献:

- [1] 刘强, 郑秀峰, 辛永红. miRNA 研究进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(15): 1970-1972.
- [2] Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants [J]. Mol Cell, 2011; 43(6): 892-903.
- [3] van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(9): 644-656.
- [4] Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis[J]. J Biochem, 2010, 148(4): 381-392.
- [5] Agami R. microRNAs, RNA binding proteins and cancer [J]. Eur J Clin Invest, 2010, 40(4): 370-374.
- [6] Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression[J]. Br J Cancer, 2011, 104(2): 235-240.
- [7] Frenette C, Gish RG. Hepatocellular carcinoma: molecular and genomic guideline for the clinician[J]. Clin Liver Dis, 2011, 15(2): 307-321.
- [8] Negrini M, Gramantieri L, Sabbioni S, et al. microRNA involvement in hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(6): 500-521.
- [9] Kerr TA, Korenblat KM, Davidson NO. MicroRNAs and liver disease[J]. Transl Res, 2011, 157(4): 241-252.
- [10] Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(3): 437-449.
- [11] Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization[J]. Lab Invest, 2005, 85(8): 1040-1050.
- [12] Arzt L, Kothmaier H, Quehenberger F, et al. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 91(2): 490-495.

(收稿日期: 2012-06-13 修回日期: 2012-09-12)

(上接第 3618 页)

al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I; treatment of new onset epilepsy. report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society[J]. Neurology, 2004, 62(8): 1252-1260.

- [7] 解学孔. 癫痫病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 382-383.
- [8] Faught E. Topiramate in the treatment of partial and generalized epilepsy[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2007, 3(6): 811-821.

- [9] Krakow K, Lengler U, Rettig K, et al. Topiramate in addition therapy: results from an open-label, observational study[J]. Seizure, 2007, 16(7): 593-600.
- [10] Coppola G, Verrotti A, Resicato G, et al. Topiramate in children and adolescents with epilepsy and mental retardation: a prospective study on behavior and cognitive effects[J]. Epilepsy Behav, 2008, 12(2): 253-256.
- [11] 朱曼, 孙艳, 郭代红, 等. 卡马西平不良反应国内文献分析[J]. 药物流行病学杂志, 2007, 16(2): 85-87.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)