

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.025

高通量测序分析 miRNAs 在胃癌新鲜组织与石蜡包埋组织中的表达*

曾文泓¹, 王丽华^{2△}, 唐丹³

(1. 江西中医药大学基础医学院, 江西南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院骨四科, 江西南昌 330006; 3. 南昌大学第一附属医院老干科, 江西南昌 330006)

[摘要] **目的** 利用二代测序技术对 FFPE 标本进行高通量测序及相关的生物信息学分析, 探讨 miRNAs 在来源于石蜡包埋胃癌组织 (FFPE) 中的标本检测的可靠性, 探讨其临床意义。**方法** 选取 2015 年和 2016 年 2 例胃癌患者手术切除同一组织的 FFPE 和新鲜冰冻标本, 从标本中提取 RNA 并分离构建 small RNA 文库, 采用 Illumina 测序平台测序的方法对其进行高通量测序, 统计各已知 miRNAs 家族序列的表达量, 构建已知 miRNAs 表达谱, 对标本 miRNAs 进行 Spearman 相关性分析, 评估 miRNAs 表达量的差异变化情况。**结果** 新鲜冰冻标本中提取的总 RNA 质量较高, RNA 保存度完整, 显示 28S 是 18S 的 1.3~1.4 倍, 从石蜡组中提取的 RNA, 结果显示有不同程度的降解, 28S 和 18S 的波峰不明显, miRNAs 表达谱在冰冻和 FFPE 标本中, Spearman 相关系数分别为 0.90 和 0.86, 两者 miRNAs 表达量较一致, 具有相关性。**结论** FFPE 中的 miRNAs 仍然保持一定的完整性, 且可通过二代测序进行肿瘤标本检测。

[关键词] 胃肿瘤; miRNA; 甲醛固定石蜡包埋; 二代测序

[中图分类号] R35

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)32-4550-03

High throughput sequencing analysis of miRNAs expression in fresh gastric cancer tissues and paraffin embedded tissues*

Zeng Wenhong¹, Wang Lihua^{2△}, Tang Dan³

(1. School of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional

Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department for Geriatric

Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

[Abstract] **Objective** To analyze formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) sample by next generation sequencing (NGS) technology for high throughput DNA sequencing and related bioinformatics analysis, and to explore the reliability and clinic significance of miRNAs in the detection of sample from FFPE gastric cancer tissue. **Methods** FFPE and fresh frozen samples of the same tissue were excised from 2 cases of gastric cancer in 2015 and 2016. RNA was extracted from the samples and the small RNA library was isolated and constructed, and high throughput DNA sequencing was conducted with Illumina sequencing platform. The DNA sequencing results were analyzed by quantifying the expression of known miRNAs families sequence, and the expression profiling of known miRNAs was constructed, Spearman correlation analysis was performed on the miRNAs of the samples to assess the difference in the expression of miRNAs. **Results** The total RNA extracted from the fresh frozen sample had higher quality and complete RNA coverage, and the results showed that the 28S was 1.3—1.4 times of 18S. The RNA extracted from the FFPE sample showed different degrees of degradation, and the peaks of 28S and 18S were not significant. The spearman correlation of miRNAs expression profiling in frozen and FFPE samples was 0.90 and 0.86 respectively, and the expression levels of miRNAs in two samples were consistent and had significant correlation. **Conclusion** miRNAs in FFPE sample can retain certain level of integrity and can be used in tumor test by NGS.

[Key words] gastric neoplasms; miRNAs; formalin-fixed and paraffin-embedded; next generation sequencing

胃癌是消化系统疾病中常见的恶性肿瘤之一^[1], 最近大量的研究表明 miRNAs 在胃癌的发生、发展中起着重要的作用, 参与着胃癌形成的多条信号通路, 同时 miRNAs 被发现在肿瘤分期、分级、预后及药物的靶向治疗分析等方面具有巨大的潜力^[2]。目前, 新一代高通量测序已成为基因表达定量检测强有力的工具, 特别是在定量低丰度的 miRNAs 研究及揭示微小的基因表达变化等领域有很大的优越性。为了研究 miRNAs 在来源于石蜡包埋胃癌组织标本检测的可靠性, 本研究从 FFPE 标本中分离并构建 small RNA 文库, 采用 Illumina 测序平台的边合成边测序的方法对其进行高通量测序, 结合生物信息学, 验证该方法的可行性, 并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取了江西中医药大学附属医院 2015 年和

2016 年 2 例胃癌患者的手术切除标本, 手术标本经病理学检测分别由两位临床医师进行确诊, 并采集相关病理资料。肿瘤位置以病理组织报告为准, 肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移情况分别参照国际抗癌联盟标准 (UICC) 分类、WHO 标准评判^[3]。首先用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗取下的胃癌组织标本, 把标本用组织剪剪切至 0.5 mm 左右大小, 迅速放入液氮罐中进行冷冻待用 (-80 °C), 随后将余下部分用 10% 甲醛固定后石蜡包埋, 归档存放于温室。取病理科石蜡包埋标本, 无菌操作常规切片, 切片厚度约 10 μm, 每 2~3 片放入 1 个 1.5 mL 的灭菌 EP 管中。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 于 -80 °C 保存的新鲜标本在液氮中研磨至粉末状, 加入 Trizol 试剂 (Ambion, # AM12183555) 混匀, 按

* 基金项目: 江西省卫生计生委科技计划项目 (20175539、20155389)。 作者简介: 曾文泓 (1984—), 讲师, 硕士, 主要从事临床基础研究。

△ 通信作者, E-mail: 89463632@qq.com。

照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。使用 RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit(Ambion, # AM1975)处理甲醛固定石蜡包埋的标本,按照说明书进行核酸提取,在纯化柱上消化 DNA 后洗脱得到 RNA。

1.2.2 Small RNA 文库的构建及测序 总 RNA 用 15% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,回收纯化 18~30 nt 的部分,在 T4 RNA 连接酶的作用下连接 RNA Adapter,所得的产物经过 RT-PCR 扩增之后采用 Illumina 高通量测序平台进行测序。

1.2.3 测序数据基本分析 Illumina 测序平台的测序数据经过如下流程进行分析:(1)去除测序质量较低的序列,去除 RNA Adapter 污染的序列,去除没有目的片段的序列,去除包含 polyA 的序列和去除小于 18 nt 的小片段序列,得到高质量序列,对其进行长度分布统计。(2)将小 RNA 序列与基因组进行比对,将其定位到基因组,分析小 RNA 在基因组上的表达和分布情况。(3)将小 RNA 序列与 GenBank 数据库及 Sanger 中心的 Rfam 数据库中的 ncRNA(非编码 RNA)分别进行分析比对,去除 rRNAs, scRNAs, snoRNAs, snRNAs 和 tRNAs。(4)将小 RNA 比对到 mRNA 的外显子和内含子,找出来自 mRNA 降解的片段。(5)将过滤后的序列进行互相比对,找出可以互补、符合 siRNA 结构特征的小 RNA,作为可能的 siRNA 候选者。(6)通过与 miRBase 数据库中的所有 miRNAs 进行比对分析,识别 miRNAs 序列。(7)统计各已知 miRNAs 家族序列的表达量,构建已知的 miRNAs 表达谱。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学分析,将石蜡包埋的标本获得 miRNAs 表达量与新鲜组织获得的 miRNAs 进行 Spearman 相关性分析,评估 miRNAs 表达量的差异变化情况,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 提取结果 临床手术切除组织标本的一般信息:2 例胃癌患者的年龄分别为 56 和 61 岁,男 1 例,女 1 例。从两份标本经过检测提取的总 RNA 结果显示发现,保存在液氮组中提取的总 RNA 质量较高,RNA 保存度完整,显示 28S 是 18S 的 1.3~1.4 倍,符合完整度要求 28S 是 18S 的 1~2 倍范围。从石蜡组中提取的 RNA 结果显示有不同程度的降解,28S 和 18S 的波峰不明显,见图 1。

2.2 胃癌小 RNA 分析 胃癌 FFPE 标本和新鲜标本的 miRNAs,用 Illumina 高通量测序平台对标本进行测序,并构建小 RNA 文库,去除接头并过滤低质量数据。结果小 RNA 序列长度分布在 10~35 nt,其中 22 nt 的序列小 RNA 居多(图 2)随后排除掉小于 18 nt 的序列后,得到了最终目标序列(表 1)。将这些小 RNA 与 Rfam、miRBase、GenBank,进行比对,同时将小 RNA 序列两两比对以寻找 siRNA,最后进行了注释(表 2)。

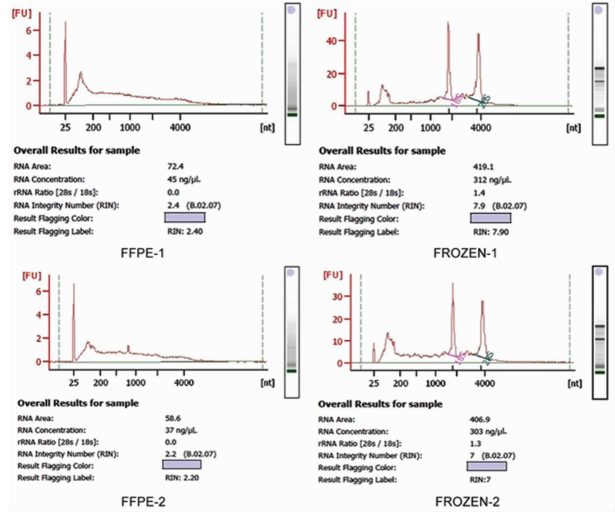
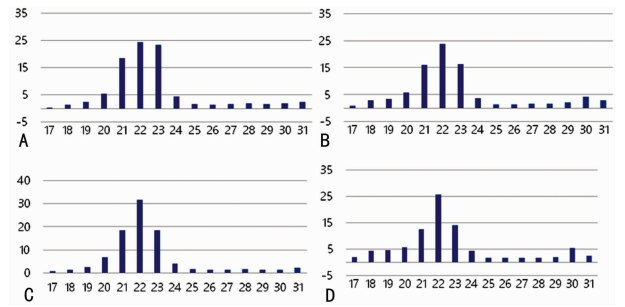


图 1 Agilent 2100 检测 RNA 质量



A: Frozen-1; B: FFPE-1; C: Frozen-2; D: FFPE-2

图 2 小 RNA 长度分布图

表 1 胃癌标本小 RNA 测序数据基本分析统计[n(%)]

片段类型	新鲜标本 1	石蜡包埋标本 1	新鲜标本 2	石蜡包埋标本 2
总片段	13 501 015	14 245 178	14 008 970	14 591 597
高质量片段	13 376 774(100.00)	14 146 375(100.00)	13 861 470(100.00)	14 466 409(100)
3 端接头污染	100 767(0.75)	143 974(1.02)	198 025(1.43)	329 418(2.28)
空载片段	60 975(0.46)	270 796(1.91)	186 678(1.35)	245 872(1.70)
5 端接头污染	11 129(0.08)	30 950(0.22)	13 768(0.10)	23 245(0.16)
小于 18 nt 的片段	74 900(0.56)	272 626(1.93)	88 553(0.64)	672 388(4.65)
poly A	1 201(0.01)	590(0.00)	1 159(0.01)	1 153(0.01)
过滤后的待分析序列	13 127 802(98.14)	13 427 439(94.92)	13 373 287(96.48)	13 194 333(91.21)

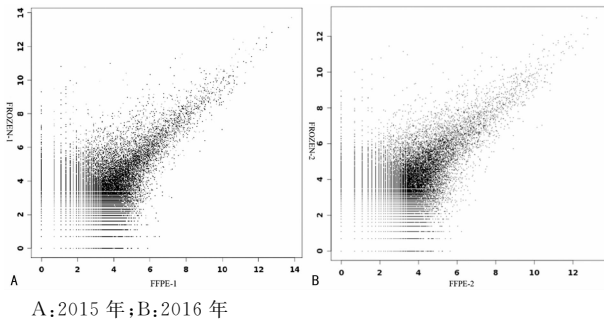
表 2 比较分别在 -20 °C 保存和 FFPE 保存的小 RNA 检测结果[n(%)]

项目	冷冻保存标本 1	FFPE 标本 1	冷冻保存标本 2	FFPE 标本 2
外显子	194 252(1.48)	140 526(1.05)	132 126(0.99)	212 219(1.61)
内含子	64 144(0.49)	45 780(0.34)	49 096(0.37)	80 205(0.61)
重复序列	52 914(0.40)	39 645(0.30)	30 919(0.23)	58 245(0.44)
miRNA	8 517 612(0.40)	7 066 710(52.63)	8 309 227(62.13)	6 147 337(46.59)
piRNA	35 271(0.27)	49 644(0.37)	52 800(0.39)	53 064(0.40)
rRNA	949 179(7.23)	1 142 489(8.51)	1 294 557(9.68)	2 008 580(15.22)
scRNA	163 535(1.25)	204 303(1.52)	48 311(0.36)	126 031(0.96)
snRNA	150 971(1.15)	167 465(1.25)	96 262(0.72)	212 952(1.61)

续表 2 比较分别在 -20 °C 保存和 FFPE 保存的小 RNA 检测结果[n(%)]

项目	冷冻保存标本 1	FFPE 标本 1	冷冻保存标本 2	FFPE 标本 2
snoRNA	132 728(1.01)	166 446(1.24)	129 754(0.97)	178 664(1.35)
srpRNA	2 608(0.02)	2 085(0.02)	3 153(0.02)	47 55(0.04)
tRNA	1 522 200(11.60)	2 030 177(15.12)	1 486 850(11.12)	1 745 312(13.23)
未注释小 RNA	1 342 388(10.23)	2 372 169(17.67)	1 740 232(13.01)	2 366 969(17.94)
总数	13 127 802(100)	13 427 439(100)	13 373 287(100)	13 194 333(100)

2.3 高通量测序 miRNAs 表达谱 通过检测两对不同年份的同一胃癌组织冰冻标本和 FFPE 标本进行高通量测序, miRNAs 表达谱在冰冻和 FFPE 标本中, Spearman 相关系数分别为 0.90 和 0.86(图 3)。



A:2015 年;B:2016 年

图 3 同一胃癌组织不同时间冰冻标本与 FFPE 标本中小 RNA 的 Spearman 相关分析

3 讨论

miRNAs 是临床医学研究中新兴的热点分子,参与疾病的信号通路,从而对疾病的发生、发展及治疗有重要作用^[4]。从现阶段研究发现 miRNAs 可作为抑癌基因或者癌基因参与胃癌发展的某个阶段,它可与其他抑癌基因、癌基因及凋亡相关基因产生相互作用影响胃癌的进程。由于其多功能性特点使它在胃癌的标志物诊断和治疗方面有巨大的应用潜力,有利于提高胃癌的早期诊断率^[5-6]。目前鉴定和确证肿瘤分子标志物需要大量的临床标本,而低温冰冻组织和 FFPE 组织标本是生物医学研究中重要和广泛的标本来源,很多医院病理科及医疗研究所都有大量的存档。从相关组织中提取 RNA 或者 DNA 来获得疾病相关的基因表达信息,进行疾病前瞻性、回顾性研究,鉴别不同疾病临床特征和预后转归有关的差异表达基因,筛选出作用的靶基因,分析疾病的调控机制路径等,这是目前研究相关疾病在分子水平的普遍做法,但经过甲醛固定处理过的石蜡包埋块标本经历了长时间的保存,其内部发生了核酸与蛋白质交联反应,单甲基化基团的修饰等,RNA 不可避免地发生降解,对本总 RNA 提取及下游逆转录和基因表达定量分析产生影响。

本研究发现提取冰冻组织和 FFPE 组织标本获得一定质量的 RNA,可以达到进一步分子生物学检测的要求^[7-9]。通过高通量测序 2 对不同年份的同一胃癌组织冰冻标本和 FFPE 标本,miRNAs 表达谱在冰冻和 FFPE 标本中,Spearman 相关系数分别为 0.90 和 0.86,两者 miRNAs 表达量较一致,具有相关性,研究还显示组织标本的 RNA 降解、片段化程度基于标本类型、保存期长短,以及固定、包埋和储存的条件而发生变化,同一胃癌组织不同保存年份中的冰冻组织标本和 FFPE 组织标本的 RNA,冰冻组织中提取的总 RNA 质量比 FFPE 组织的要高,FFPE 保存方法其 RNA 的降解程度比冰冻的要多,不同保存时间的冰冻标本 RNA 的降解会逐渐增加。FFPE 标本中分离到的核酸比新鲜标本或冰冻标本的相对分子质量更低,石蜡组织标本提取的 RNA 通常会有一定的降解或甲醛修饰,而 miRNAs 分子的大小通常只有 20~22 nt,自身片段短优势

可以避免被修饰和酶的破坏降解^[10]。由于活体细胞中 miRNAs 只有极少数处于游离状态,且可能 miRNAs 通过 RNA 诱导沉默复合体(RISC)靶向结合 mRNA,发挥阻遏转录后翻译功能或降解 RNA 的作用,miRNAs 受到 RISC 复合体的保护,所以石蜡组织中的大部分 miRNAs 未被修饰^[11],而在研究检测不同的临床标本中,具有高度的稳定性和重复性是作为有价值的肿瘤候选标志物的一个重要特点,因此选择 miRNAs 作为肿瘤候选标志物具有一定的临床意义^[12]。本研究显示通过二代测序技术可以利用石蜡组织标本研究 miRNAs 在疾病中的作用,这为后期大样本肿瘤标志物研究筛选提供了很好的基础,可能为解决样本量不足及检测方案的选择提供帮助。

参考文献

- Jemal A,Center MM,DeSantis C,et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,2010,19(8):1893-1907.
- 安艳新,王菁,刘家良,等. 进展期胃癌靶向治疗的研究进展[J]. *现代生物医学进展*,2013,13(21):4197-4200.
- Solcia E,Capella C,Klöppl G,et al. *Endocrinotumours of the gastrointestinal tract*[M]//Solcia E,Klöppl G,Sobin LH. *Histological typing of endocrine tumours*. 2nd ed. Berlin:Springer Verlag,2000:61-68.
- Farazi TA,Hoell JI,Morozov P,et al. MicroRNAs in human cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*,2013,774:1-20.
- 陈兆峰,刘晓光,刘敏,等. miR-551b-3p 在胃癌细胞和组织中的表达及其临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*,2014,36(12):903-904.
- 谢黎明,贺荣芳,张志伟,等. miR-124 抑制胃癌细胞增殖和侵袭的机制研究[J]. *中华肿瘤杂志*,2013,35(7):497-500.
- 薛洋,曾富春,舒骏,等. 福尔马林固定石蜡包埋样本提取的 RNA 质量分析及其临床应用[J]. *实验与检验医学*,2015,33(1):23-27.
- Lee TS,Jeon HW,Kim YB,et al. Aberrant microRNA expression in endometrial carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded(FFPE) Tissues[J]. *PLoS One*,2013,8(12):e81421.
- Wang F,Wang L,Briggs C,et al. DNA degradation test predicts success in whole-genome amplification from diverse clinical samples[J]. *J Mol Diagn*,2007,9(4):441-451.
- Arzt L,Kothmaier H,Quehenberger F,et al. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies[J]. *ExpMol Pathol*,2011,91(2):490-495.
- Tang F,Hajkova P,O'Carroll D,et al. MicroRNAs are tightly associated with RNA-induced gene silencing complexes in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,372(1):24-29.
- Cortez MA,Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum; a new tool to diagnose and monitor diseases[J]. *Expert Opin Biol Ther*,2009,9(6):703-711.