

技术与方法

鼻咽癌组织的显微切割及其 RNA 线性扩增*

周艳宏^{1)**} 曾朝阳^{1)**} 熊 炜^{1)***} 罗晓敏¹⁾ 李小玲¹⁾ 范松青^{1,2)} 张文玲¹⁾ 刘华英¹⁾
李 征¹⁾ 杨一新¹⁾ 武明花¹⁾ 唐 珂¹⁾ 曹 利¹⁾ 沈守荣³⁾ 李桂源^{1)***}

¹⁾中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011;

³⁾中南大学湘雅三医院消化内科, 长沙 410083)

摘要 从微小体积鼻咽癌活检标本中获取纯净癌细胞一直是鼻咽癌分子生物学研究中的难题. 为了寻找一种能从鼻咽癌活检组织中获得高纯度、高质量 RNA 来完成 cDNA 微阵列 (cDNA Microarray) 实验的简便实用方法, 采用 RNAlater 技术保存鼻咽癌活检组织, 显微切割技术来获得高纯度鼻咽癌细胞, 利用 RNA 线性扩增技术得到 cDNA 微阵列实验所需 RNA. 结果表明: 利用 RNAlater 技术可以很好地保持组织 RNA 的稳定, 通过优化显微切割和 RNA 线性扩增的条件获得了 cDNA 微阵列实验所需的高纯度、高质量 RNA.

关键词 RNAlater 技术, 手工显微切割, RNA 线性扩增技术, cDNA 微阵列

学科分类号 Q734.2

cDNA 微阵列 (cDNA Microarray) 技术近年来得到迅猛发展, 该技术可以同时监测大量基因在机体不同健康状况、生理与病理状况下的活性, 杂交结果可以通过有关软件分析进行定量, 因此已广泛应用于快速筛选大量致病相关基因、发育相关基因, 疾病诊断、药物筛选等领域^[1-5].

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 由于发病部位隐蔽、体积小, 因而取材非常困难, 我们所得到的 NPC 标本常小于 3 mm×3 mm. 从微小鼻咽癌活检标本中获取纯净癌细胞一直是鼻咽癌分子生物学研究中的难题. 传统上对临床取材的鼻咽癌组织进行分子水平的研究, 主要凭肉眼粗略分离正常组织和癌组织, 随后提取 RNA 从而开始工作. 然而, 鼻咽癌活检组织成分复杂, 癌组织细胞中夹杂着淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞等多种非肿瘤细胞成分, 如直接抽提, 所得的 RNA 是它们的混合物, 因而结果不足以令人信服. 液氮保存活检组织标本虽然能在一定程度上防止 RNA 降解, 但是活检组织标本一旦离开液氮, 其 RNA 很快降解, 影响实验结果. 激光捕获显微切割仪能够对组织切片中特定癌巢甚至单个癌细胞进行切割而纯化实验标本, 但是这种仪器价格昂贵, 使用费用高^[6,7]. 另外还有由于鼻咽癌癌组织小, 通过显微切割得到的癌细胞数目较少, 如果不经 RNA 线性扩增, 其 RNA 量很难满足 cDNA 微阵列杂交实验需求. 本文

介绍一种简便、实用的方法, 即利用 RNAlater 技术保存鼻咽癌活检组织, 倒置显微镜下手工将癌巢从正常组织及周边介质中准确地分离纯化, 并抽提其 RNA, 同时通过 RNA 线性扩增技术来获得实验所需的 RNA (扩增后的 RNA 我们称之为 aRNA).

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 新鲜标本. 鼻咽部活检组织从中南大学湘雅二医院和中南大学湘雅三医院门诊采集. 鼻咽癌活检组织标本分为二份, 一份送医院病理科取得病理诊断, 另一份 RNAlater 中-20℃冻存备用.

1.1.2 主要试剂. 鼻咽癌组织标本保存所需的 RNAlater 稳定剂和保存管 (RNAlater RNA Stabilization Reagent, Qiagen 公司), 微量 RNA 抽提试剂盒 (RNeasy Mini Kit, QIAGEN 公司), 以及 RNA 线性扩增试剂盒 (Message AmpTM aRNA Kit, Ambion 公司), 冰冻切片所需的组织冷冻包埋剂 (O.C.T Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA), Mayor's 苏木素、伊红 (博士德公司)、DEPC

* 国家自然科学基金资助项目 (30300201, 30470955, 3030560, 30200312) 和新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-04-0761).

并列第一作者. * 通讯联系人.

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2004-11-29, 接受日期: 2004-12-31

(Invitrogene) 以及二甲苯、乙醇、盐酸(国产分析纯)等。

1.1.3 主要仪器设备. X51 倒置式基础型显微镜(OLYMPUS, Japan)和恒冷切片箱(LEICA CM 1800, LEICA 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 RNAlater 保存鼻咽癌组织. 将新鲜的鼻咽癌组织标本用 0.9% 的生理盐水漂洗后立即放入 RNAlater^[8]中保存, RNAlater 的体积不能少于组织标本体积的 10 倍. 然后于 4℃ 冰箱放置 24 h, 利于 RNAlater 充分渗入组织内部, 最后将标本保存于 -20℃ 或 -80℃.

1.2.2 玻片准备和冰冻切片. 所用玻片经泡酸、干烤(180℃ 8 h, 下同)、0.1% DEPC 水(diethyl pyrocarbonate-treated H₂O)浸泡 2 h, 风干. 切片前, 预冷冰冻切片机至 -25℃, 然后用干烤过的镊子将用 RNAlater 稳定剂保存的鼻咽癌取出、去除多余的 RNAlater, 用 O.C.T. 组织包埋液把整块鼻咽癌组织包埋, 冷冻组织标本约 30 min 开始行连续冰冻切片, 片厚度为 8~15 μm. 切好后的切片置于 -20℃ 冰箱保存。

1.2.3 组织切片染色. 组织切片后, 采用改良方法 Mayor's 苏木素和伊红(HE)染色^[9], 具体步骤见表 1. 染色完成后, 应立即进行显微切割。

Table 1 Hematoxylin and eosin staining procedures

Procedures	Time
(1) sections were fixed in 70% ethanol in DEPC-treated water	5 min
(2) rehydrated in DEPC-treated water	35 s
(3) stained with hematoxylin(Mayor's)	2 min
(4) washed in DEPC-treated water	15 s×2
(5) dehydrated in 70% ethanol	3 min
(6) eosin in DEPC-treated water	25 s
(7) washed in DEPC-treated water	15 s×2
(8) dehydrated in 70% ethanol	3 min
(9) dehydrated in 95% ethanol	3 min
(10) dehydrated in 100% ethanol	3 min
(11) 100% xylene	12 min

1.2.4 显微切割. 倒置显微镜 100 倍的视野下, 用 1 ml 注射器针头进行目标细胞的选择和切割, 分离后的目标细胞用注射器针尖移入事先准备好的小 tube 管中 (tube 管需经过 0.1% DEPC 水处理和高温消毒处理). 为了让操作切割针的手保持稳定, 操

作者应当把该手臂置于一个方便自己操作的物体上^[10] (物体的高度依操作者的操作习惯而定)。

为了增加显微切割的速度和效率、提高切割的精度, 切片时每隔 10 张就切一张厚度为 5 μm 的切片, HE 染色复核和初步判断该标本中癌细胞的比例. 如果癌细胞比例太低, 弃用该标本. 我们只选择那些癌细胞数约 60% 以上的标本. 每个标本可得到癌细胞约 15 000~30 000 个, 切割后癌细胞纯度可达 95% (图 1)。

1.2.5 微量 RNA 的抽提. 采用 QIAGEN 公司生产的 RNeasy Mini Kit 来抽提纯度较高的鼻咽癌细胞 RNA. 具体操作步骤参见 RNeasy Mini Kit 说明书 (<http://www.qiagen.com>).

1.2.6 RNA 线性扩增. 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计鉴定 RNA 质量, 合格的 RNA 样品以 Message AmpTM aRNA Kit 分三步线性扩增(详细步骤参见 Message AmpTM aRNA kit 说明书, Ambion, <http://www.ambion.com>), 最终体外转录合成 aRNA.

1.2.7 微阵列杂交. 成对 aRNA 样品分别用 cy3、cy5 标记, 依常规方法与玻璃片基微阵列杂交^[11,12].

2 结 果

2.1 显微切割

鼻咽癌活检组织标本经显微切割可以很好地分离鼻咽癌细胞, 切割前和切割后见图 1。

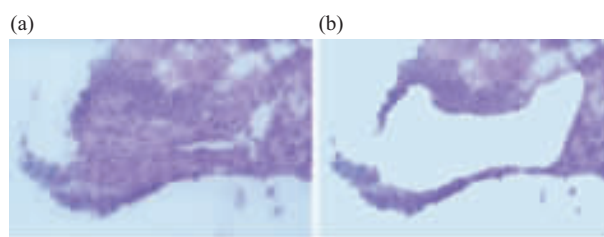


Fig.1 Microdissection of nasopharyngeal carcinoma tissue (×200)

(a) before the microdissection; (b) after the microdissection.

2.2 微量 RNA 的抽提效果

切割得到的鼻咽癌细胞抽提 RNA, 抽提柱上进行 DNase- I 消化, 洗脱收集. 琼脂糖凝胶电泳, 28 S 和 18 S 条带清晰, 且 28 S 条带亮度约为 18 S 的 2 倍 (5 S 条带太弱, 图中不可见), 表明 RNA 未降解, 见图 2a. 我们成功地显微切割、抽提 RNA 样品 30 份, 其 A_{260}/A_{280} 值在 1.820~2.106 之间, 说

明 RNA 纯度符合要求. RNA 总量在 0.735~2.609 μg 之间, 而普通玻璃芯片一次杂交所需的总 RNA (Total RNA) 量为 50~100 μg ^[11,12], 若不经线性扩增, RNA 总量无法满足微阵列实验要求.

经液氮保存的鼻咽癌活检组织通过冰冻切片、HE 染色和显微切割等诸多步骤之后, RNA 降解较严重, 见图 2b.

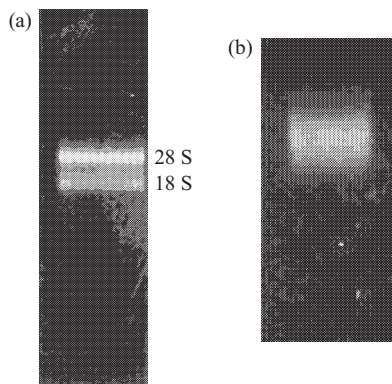


Fig.2 RNA of nasopharyngeal carcinoma cell through microdissection

(a) RNA later technology; (b) liquid nitrogen technology.

2.3 RNA 线性扩增条件优化

RNA 线性扩增的基本原理是: 第一步, 利用 5'端含有 T7 启动子的 Oligo(dT)为引物, 逆转录合成 cDNA 第一链; 第二步, 合成 cDNA 第二条链; 第三步, 以双链 cDNA 为模板, 大量转录 aRNA. RNA 扩增效率关键取决于第三步的温育时间. 为此我们对第三步温育时间进行了摸索.

取 0.5 μg 总 RNA, 依试剂盒提供的方法合成 cDNA 第一、二链后, 分别于 37°C 温育 7 h、9 h、11 h、13 h (试剂盒推荐温育时间为 6~14 h), 从 60 μl 总转录产物中取 5 μl , 变性琼脂糖凝胶电泳结果见图 3. aRNA 的产量随合成时间的延长而增加, 9 h 和 11 h aRNA 产量和质量均比较合适, aRNA 平均长度约为 1.0 kb, 而合成时间太长 (13 h), aRNA 产物片段有偏小的趋势, 主要分布于 500 bp 以下.

因此, 后续实验中 aRNA 温育合成时间我们采用 10 h. 0.5 μg 左右的总 RNA 扩增出 aRNA 在 6~15 μg 之间, 足够进行 2~3 次微阵列杂交^[11]. 以 mRNA 占总 RNA 的 0.5%~1.0%计^[11], 扩增效率为 2 000 倍左右.

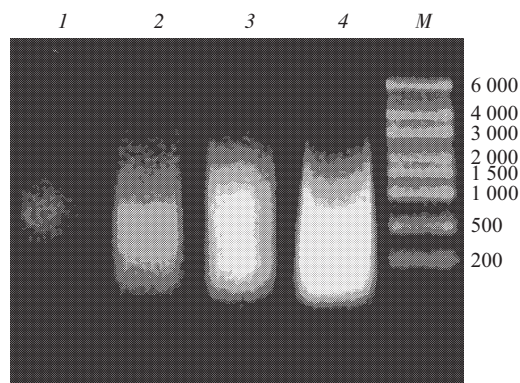


Fig.3 RNA of nasopharyngeal carcinoma cell through microdissection after line-amplification on a denatured agarose gel with ethidium bromide staining

1: 9 h; 2: 10 h; 3: 11 h; 4: 12 h; M: RNA ladder (Fermentas, #SM0421).

2.4 微阵列杂交

利用上述方法得到的 aRNA, 经 cy3、cy5 标记, 与微阵列杂交, 得到了令人满意的结果 (图 4).

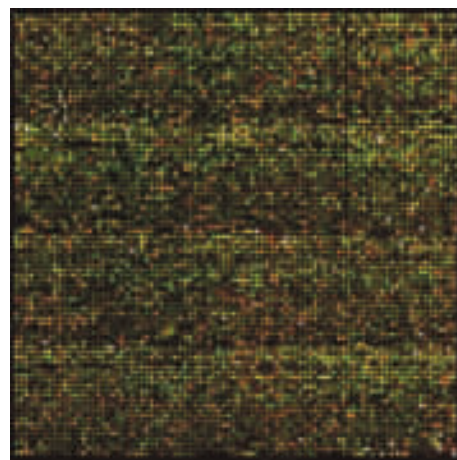


Fig.4 Overlay images of the microarray hybridization

3 讨 论

RNA 特异或非特异降解可能会使基因表达模式发生改变^[13], 因此 RNA 稳定 (未发生降解) 是可靠基因表达分析的前提^[11,12]. 对于微阵列分析、定量 RT-PCR 以及其他与核酸相关的技术, 这种 RNA 的降解是应该避免的. 液氮虽可以长期保存组织标本, 但运输不便, 保存时需不断补充液氮, 以防挥发, 且在我们的实践中发现, 液氮保存标本经显微切割等诸多步骤后降解明显. RNA later 技术是一种

保存动物组织、且能保持其 RNA 不被降解的新技术, RNAlater 稳定剂可以快速渗透组织细胞, 稳定和原位保护其 RNA 不发生降解, 这为研究基因表达谱等提供了很好的前提条件. RNAlater 技术可以保护组织标本中 RNA 在 37℃ 至少 1 天、18~25℃ 至少 7 天、2~8℃ 至少 4 周不发生降解, 在 -20℃ 时即可永久保存^[8], 大大方便了组织标本的保存和运输, 且 RNAlater 稳定剂不影响组织 RNA 的抽提. 但是在利用 RNAlater 技术时 also 需要注意以下一些方面: a. 新鲜活检组织标本用 RNAlater 稳定剂保存后, 首先应置于 4℃ 冰箱过夜, 然后转移到 -20℃ 冰箱或 -80℃ 冰箱永久保存. 因为只有这样才能让 RNAlater 稳定剂渗透整个组织标本, 从而达到其最佳效果. b. 获取组织标本后立即浸没在 RNAlater 稳定剂中 (活检组织从取出到储存于 RNAlater 中的时间越短越好), RNAlater 稳定剂的量应当大于活检组织体积的 10 倍 (如一块 5 mm×5 mm×5 mm 大小的组织, RNAlater 稳定剂的量不能少于 1.25 ml), 为防止活检组织标本内部 RNA 在 RNAlater 稳定剂渗入起作用前降解, 活检组织标本厚不要超过 5 mm.

利用 RNAlater 技术解决了新鲜活检组织标本的保存问题, 但组织是由不同细胞群组成的三维立体结构, 若用整块组织提取 RNA 进行研究, 由于混杂有多种细胞, 可能出现偏差的结果. 因此组织标本纯化是实验研究中的重要部分. 组织显微切割技术就是在显微视野下从具有异质性的组织样品中获取单一类型的细胞群或单个细胞的组织标本纯化技术^[14,15]. 目前这种方法主要分手工和机械操作, 国外用得较多的是激光捕获显微切割技术 (laser captured microdissection, LCM)^[6,7], 但仪器及其消耗品的价格还比较昂贵, 操作技术比较复杂, 在普通实验室难以开展. 而手工组织显微切割技术不需要任何特殊仪器, 且操作简便, 普通分子生物学工作者稍经组织病理学培训和练习即可胜任, 适用于一般实验室. 我们采用冰冻切片、HE 染色和显微切割方法得到高纯度的鼻咽癌细胞. 多次重复实验我们有以下经验: a. 鼻咽癌组织标本切片厚度以 10 μm 左右为佳; b. 在实际操作中我们发现每张玻片上放置组织块的数目不宜太多, 因为在显微切割时可能会因为一张玻片上组织块过多而使后面切割的组织块的 RNA 发生降解, 影响最终的实验结果; c. 在收集目标细胞的 tube 管中加入少量 RNAlater 稳定剂可以避免其 RNA 在显微切割后、

RNA 抽提前发生降解, 保证 RNA 的质量; d. 组织标本显微切割后最好及时进行 RNA 抽提, -80℃ 保存时间最好不要超过 10 天, 切忌把显微切割收集好的鼻咽癌细胞反复冻存.

通过显微切割得到了纯度较高的鼻咽癌细胞, 但由于其数目太少, 用传统的 RNA 抽提方法很难得到其 RNA. 我们采用 QIAGEN 公司生产的 RNeasy Mini Kit 来抽提 RNA, 可以弥补细胞数不够这一困难. 但此方法抽提得到的 RNA 量仍然较少, 如果不通过扩增, RNA 的量很难满足接下来的实验要求. 为此, 用 Message AmpTM aRNA Kit 分三步线性扩增, 最终体外转录合成 aRNA. 该方法可使每一条 mRNA 均成倍数扩增, 不会改变其相对丰度, 因而可用于 cDNA 文库构建、RT-PCR^[16,17]和基因芯片研究^[1]. 线性扩增过程中, aRNA 的产量和质量随最后一步转录合成时间的改变而有不同, 我们发现, 10 h 左右, aRNA 产量和质量都达到了最佳, 扩增效率可达到 2 000 倍左右. 根据我们的芯片杂交及其他同行的结果^[1], 该方法扩增的 aRNA 能忠实反应各基因 mRNA 的丰度, 完全可用于疾病基因表达谱的研究, 特别在取材非常困难的疾病基因表达谱研究中更具有应用价值.

通过利用 RNAlater 技术、优化显微切割技术和 RNA 线性扩增技术, 我们从较小的鼻咽癌活检组织中得到了高纯度、高质量实验所需的 RNA, 在 cDNA 微阵列实验中, 得到了令人满意的结果.

参 考 文 献

- 1 张必成, 周 鸣, 周后德, 等. 鼻咽癌差异表达基因 PRL4 特性分析. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (2): 262~265
Zhang B C, Zhou M, Zhou H D, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (2): 262~265
- 2 谭 琛, 李 江, 彭 聪, 等. cDNA 微阵列技术分析 NAG7 基因对鼻咽癌细胞基因表达谱的影响. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (1): 99~106
Tan C, Li J, Peng C, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (1): 99~106
- 3 袁开宇, 赵震宇, 刘 瑛, 等. 用 cDNA 微阵列研究内毒素休克小鼠肺组织基因表达谱的改变. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (3): 402~406
Yuan K Y, Zhao Z Y, Liu Y, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (3): 402~406
- 4 马淑华, 王敦成, 邹宗亮, 等. 应用 cDNA 芯片分析 79 个新基因的人胚组织表达谱. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (4): 532~536
Ma S H, Wan D C, Zou Z L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (4): 532~536

- 5 Li Y, Li Y, Tang R, *et al.* Discovery and analysis of hepatocellular carcinoma genes using cDNA microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, **128** (7): 369~379
- 6 Emmert B M R, Bonner R F, Smith P D, *et al.* Laser capture microdissection. *Science*, 1996, **274** (8): 998~1001
- 7 Cortesi R, Gui V, Osti F, *et al.* Human leukemic K562 cells treated with cytosine arabinoside: enhancement of erythroid differentiation by retinoic acid and retinal. *Eur J Haematol*, 1998, **61** (5): 295~301
- 8 Bonham M J, Danielpour D. Improved purification and yields of RNA by RNeasy. *Biotechniques*, 1996, **21** (1): 57~60
- 9 Goldsworthy S M, Stockton P S, Trempus C S, *et al.* Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog*, 1999, **25** (2): 86~91
- 10 Walch A, Specht K, Smida J, *et al.* Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses. *Histochem Cell Biol*, 2001, **115** (4): 269~276
- 11 Li Y, Li T, Liu S Z, *et al.* Systematic comparing the fidelity of aRNA, mRNA and T-RNA on gene expression profiling using cDNA microarray. *Journal of Biotechnology*, 2004, **107** (1): 19~28
- 12 李 瑶, 吴超群, 裘敏燕, 等. 用基因表达谱芯片研究人正常肝和肝细胞癌中差异表达的基因. *遗传学报*, 2000, **27** (12): 1042~1048
- 13 Li Y, Wu C Q, Qiu M Y, *et al.* . *Acta Genetica Sinica*, 2000, **27** (12): 1042~1048
- 14 Auer H, Liyanarachchi S, Newsom D, *et al.* Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nature Genetics*, 2003, **35** (4): 292~293
- 15 Moskaluk C A, Kern S E. Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. *Am J Pathol*, 1997, **150** (5): 1547~1552
- 16 Upson J J, Stoyanova R, Cooper H S, *et al.* Optimized procedures for microarray analysis of histological specimens processed by laser capture microdissection. *J Cell Physiol*, 2004, **201** (3): 366~373
- 17 Ying S Y, Lin S L. Gene expression in precursor cells of prostate cancer associated with activin by combination of subtractive hybridization and microarray technologies. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313** (1): 104~109
- 18 Shibutani M, Uneyama C, Miyazaki K, *et al.* Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab Invest*, 2000, **80** (2): 199~208

Microdissection and RNA Line-amplification of Nasopharyngeal Carcinoma Tissue*

ZHOU Yan-Hong^{1)**}, ZENG Zhao-Yang^{1)**}, XIONG Wei^{1)***}, LUO Xiao-Min¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾,
FAN Song-Qing^{1,2)}, ZHANG Wen-Ling¹⁾, LIU Hua-Ying¹⁾, LI Zheng¹⁾, YANG Yi-Xin¹⁾, WU Ming-Hua¹⁾,
TANG Ke¹⁾, CAO Li¹⁾, SHEN Shou-Rong³⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

¹⁾Cancer Research Institute, Xiangya School of Medical, Changsha 410078, China; ²⁾The Second Xiangya Hospital, Changsha 410011, China;

³⁾The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract It is a difficult problem in molecular biology study of nasopharyngeal carcinoma (NPC) to obtain pureness tumor cells from tiny NPC tissue. To seek a convenient and applied way to obtain pureness and high quality RNA from NPC tissue for cDNA Microarray, the study was designed to use RNAlater technology to keep the NPC dissected tissue and obtain pureness NPC cells by microdissection and gain RNA through RNA line amplification technology. The results hinted that RNAlater technology could keep the stability of NPC tissue and obtain the pureness and high quality RNA for cDNA Microarray combined with microdissection and RNA line amplification through optimum conditions.

Key words RNAlater technology, manual microdissection, RNA line-amplification technology, cDNA microarray

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300201, 30470955, 3030560, 30200312) and Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0761).

These authors contributed equally to the article. *Corresponding author.

Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: November 29, 2004 Accepted: December 31, 2004