

· 经验交流 ·

乳腺癌生物标本库的建立与管理

陈庆秋 钟玲 齐晓伟 张孔涌 姜军

乳腺癌的基础与临床转化研究是当前医学研究的热点领域。已有研究显示,建立并充分发挥生物样本库是推动转化医学发展的基础^[1]。既往多根据研究课题的需要进行临时的标本收集,大量有使用价值的肿瘤标本和相关资料流失,给相关疾病的深入研究带来了极大的损失^[2]。为解决上述问题,自 20 世纪末期以来,国内外兴起了标准化肿瘤标本库的创建,并逐渐规范化,形成了标准化的标本数据库平台。第三军医大学附属西南医院结合国内外建立肿瘤标本库的经验,自 2004 年起着手建立乳腺癌标本库,历经 10 余年的建设和发展,初步探索出较为完善的建立乳腺癌标本库的方法与管理模式,现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 标本收集

2004 年 9 月至 2014 年 12 月,收集乳腺癌患者的癌组织和血液标本。上述标本的获取均取得患者知情同意,签署相关知情同意书,并通过医院伦理委员会审核。

1.2 主要设备

液氮罐(YDS-30-125 型),-80℃低温冰箱(Thermo),低速离心机(KDC-12),储存管,微量移液枪等。

1.3 主要试剂

人淋巴细胞分离液(LTS1077),无水乙醇,10%甲醛,三氯甲烷。

1.4 乳腺癌组织标本的收集、处理与保存

1.4.1 乳腺癌术前穿刺标本 对高度怀疑乳腺癌的患者,在充分知情同意后,空心针穿刺肿瘤组织获得 6 条组织标本,其中 4 条送检病理,2 条入标本库。穿刺标本在 30 min 内用 10% 福尔马林固定,梯度乙醇 30%、50%、70%、80%、95%、100%脱水,三氯甲烷透明,石蜡包埋后组织蜡块常规保存。若病例最终确诊为良性病变,亦将其纳入标本库,作为良性对照标本。

1.4.2 乳腺癌术后组织标本 术前穿刺或术中冰冻病理确诊乳腺癌后,在保证术后病理诊断的前提下,切除肿瘤组织约 1 cm×1 cm×1 cm,同时在条件允许下留取配对的“癌旁组织”和“正常组织”,组织大小同上。上述标本 1/2 置入 10% 福尔马林固定,具体处理及保存方法同穿刺标本。另外 1/2 在 30 min 内、于无菌条件下放入冻存管,入液氮罐保存,以备提取 RNA 和蛋白等。

1.4.3 乳腺癌全乳腺组织切片 将乳腺癌根治术切除的全乳及肿瘤标本剪除周围脂肪,沿乳头与肿瘤中心连线切开标本,1/2 送病理检查,另 1/2 入标本库。将标本固定于“L”型木板上,放入-20℃冰箱冻存 6~12 h,观察记录肿瘤切面大小及性状,5 mm 厚度连续平行片状切开,依次编号明确部位。制备石蜡包埋蜡块。

1.5 乳腺癌血液标本的收集、处理与保存

收集乳腺癌患者首次入院,每次新辅助化疗前、手术前和手术后第 1 天,每次辅助化疗前,复发转移后入院治疗及定期复查的血液标本,每次采集患者外周静脉血 10 ml 于肝素抗凝管中。将全血缓慢加铺在等体积的淋巴细胞分离液上,低速离心,以 3000 r/min(离心机半径 12 cm)离心 20 min。分别将血浆层和有核细胞层转移至冻存管中,入液氮保存。

1.6 标本的质量控制

取材部位应准确无误,严格掌握好肿瘤标本离体到固定的时间,以及血液标本离体、处理至冻存的时间。组织样本采集在手术标本离体后 30 min 内完成。新鲜的组织冷藏保存不超过 4 h,新鲜血液样本冷藏保存不超过 12 h^[3]。

1.7 标本库信息资料的记录

1.7.1 患者一般资料 患者姓名、性别、年龄、民族、职业、ID 号、住院号、联系方式、外院是否处理及处理方式、绝经状态、临床诊断、手术方式等。

1.7.2 病理资料 肿瘤分期、组织学类型、组织学分级、切缘情况、受体状态等。

1.7.3 标本入库情况 入库编号、入库时间、标本大小/量、标本描述、存放位置、标本数量、存放位置等。

1.7.4 标本使用 使用编号、使用时间、使用量、用途、使用人等。

1.7.5 标本质控信息 入库编号、实验内容、实验结果、实验人、实验日期等。

1.7.6 标本废除信息 废除序号、入库编号、标本原始位置、废除日期、废除原因、经手人等。

2 结果

本标本库共保存 7 446 例乳腺癌患者的各类标本。其中乳腺癌组织标本 1 430 例,术后全乳腺组织标本 989 例,乳腺癌血液标本 5 027 例。完成标本库信息数据管理的合理工作,所收集标本的临床病理资料及标本相关信息均录入计算机归档管理。制定乳腺癌生物标本库标本使用规范,规范标本使用,避免液氮及冷冻标本的反反复冻融,对剩余标本均尽量继续保存。

3 讨论

肿瘤组织标本是肿瘤研究的重要材料,是不可再生的资源^[4]。随着当今科学技术的飞速发展,实验水平的不断完善,创建肿瘤标本库已经受到越来越多发达国家的政府和研究机构的重视,并于 20 世纪 90 年代后期,开始建立多种肿瘤标本库^[5]。2004 年起第三军医大学附属西南医院借鉴国内外建立生物标本库的经验,结合自身实际开始建立乳腺癌生物标本库。经过近年来的不断学习、总结和改进,目前在乳腺癌生物标本库建立方面已经形成了自己的规范和特色。

生物标本库的质量是实验研究的关键。为确保标本的质量,本标本库所采集标本均由临床手术医师及标本库专职人员一起在手术中采集,以确保标本采集的及时和准确。由于大部分肿瘤样本都是从手术中获得的,麻醉时间与手术方式、组织缺血时间、切取组织的尺寸和污染情况都是影响组织样本中 DNA、RNA 和蛋白质质量的关键。因此,应在无菌条件下 30~60 min 内固定组织标本^[6-7],并定期随机抽取库存标本进行总 RNA 含量测定^[5],以保证标本质量,避免 DNA、RNA 和蛋白质降解。并且后期对标本的处理仍有专职人员统一标准、统一方法、信息化管理,从根本上保证了标本质量。同时本院建立了病例数据库,拥有大量完整的临床资料和随访资料,可以与生物标本库的信息进行整合。既往研究采用的肿瘤标本往往是单次标本^[8],笔者将同一患者完整治疗过程中和复查时的标本与患者本人的病情相联系对乳腺疾病的研究更有意义^[9],有助于推动基础研究成果的转化,最大程度发挥肿瘤标本的临床价值^[10]。

在实际应用方面,标本库的建立为乳腺疾病的基础和临床研究提供了大量的标本,一方面满足本科室研究人员的需要和临床实验的研究,同时也为其他科研机构的研究者们提供了科学的符合科研设计要求的乳腺肿瘤标本,有效地为乳腺肿瘤的基础和临床研究工作提供了平台。从 2004 年 9 月至 2014 年 12 月为本科室研究生提供相关标本 7 000 余份,由此获得的研究结果共发表论文 50 余篇,其中 SCI 论文 30 余篇^[11-13];为 8 项在研课题提供相关标本 5 000 余份;为相关科研机构提供组织标本 1 000 余份。从以上数据可以看出,在实际临床工作以及科研工作中数据库均有着非常重要的作用。但目前在实际的操作和应用中笔者还发现很多的不足,在将来的工作中笔者将在以下几个方面不断完善:(1)标本库采用更标准化、规范化的采集流程,以减少人力物力消耗;(2)建立完整、规范、准确的样本信息和随访资料,建立信息共享平台;(3)标本库的建立和维护需要耗费许多人力和经费,因此建立具有适当经济效益的标本库是保证标本库持续性和高质量的关键;(4)样本出库后对标本的使用情况及产生的问题应及时的反馈,找到原因,及时解决。

乳腺疾病的研究和诊断治疗都离不开标本库的支持,相信在不久的将来乳腺疾病组织标本库一定会有更广泛

的应用和发展空间。

【关键词】 乳腺肿瘤; 生物标本库

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 B

参 考 文 献

- [1] Mishra A, Pandey A, Shaw R. Initiating tumor banking for translational research: MD Anderson and Liverpool experience[J]. Indian J Cancer, 2007, 44 (1): 17-24.
- [2] Hwang RF, Wang H, Lara A, et al. Development of an integrated biospecimen bank and multidisciplinary clinical database for pancreatic cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15 (5): 1356-1366.
- [3] 中国医药生物技术协会. 中国医药生物技术协会生物样本库标准(试行) [J]. 中国医药生物技术, 2011, 6 (1): 71-79.
- [4] 张颖, 叶永照, 孙韵, 等. 肿瘤资源库的建立和管理[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(S3): 1-2.
- [5] 季加孚. 北京大学临床肿瘤医院标本库的建设[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37 (3): 329-330.
- [6] 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.
- [7] Johnsen IK, Hahner S, Brière JJ, et al. Evaluation of a standardized protocol for processing adrenal tumor samples: preparation for a European adrenal tumor bank [J]. Horm Metab Res, 2010, 42 (2): 93-101.
- [8] Kang B, Park J, Cho S, et al. Current status, challenges, policies, and bioethics of biobanks [J]. Genomics Inform, 2013, 11 (4): 211-217.
- [9] Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Measuring the contribution of tumor biobanks to research in oncology: surrogate indicators and bibliographic output [J]. Biopreserv Biobank, 2013, 11 (4): 235-244.
- [10] Braicu C, Berindan-Neagoe I, Pileczki V, et al. Breast tumor bank: an important resource for developing translational cancer research in Romania [J]. Cancer Biomark, 2014, 14 (2-3): 119-127.
- [11] Chai F, Liang Y, Bi J, et al. High expression of REG-γ is associated with metastasis and poor prognosis of patients with breast cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7 (11): 7834-7843.
- [12] Xu Y, Hu B, Qin L, et al. SRC-1 and Twist1 expression positively correlates with a poor prognosis in human breast cancer [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10 (4): 396-403.
- [13] Wang S, Zhang Y, Yang X, et al. Shrink pattern of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy and its correlation with clinical pathological factors [J]. World J Surg Oncol, 2013, 11 (1): 166.

(收稿日期: 2015-02-06)

(本文编辑: 宗贝歌)