

云南省遗传性大肠癌组织库的建立及管理

陈明清, 珠珠, 戴莉萍, 魏万里, 杨军, 张洪斌, 董坚

■背景资料

目前遗传性大肠癌在大肠癌发病中占有重要的比例,同时具有肿瘤的遗传性、高发性和肿瘤发生的多器官性的特点。建立遗传性大肠癌的标本库有利于为遗传性大肠癌的基础和临床研究提供基础材料。

陈明清, 昆明医学院第一附属医院肿瘤治疗中心 云南省昆明市 650032

珠珠, 杨军, 张洪斌, 董坚, 昆明医学院第一附属医院生物治疗科 云南省昆明市 650032

戴莉萍, 大理州人民医院病理科 云南省大理市 671000

魏万里, 昆明医学院第三附属医院病理科 云南省昆明市 650106

云南省社会发展科技计划资助项目, No. 2007CA009

作者贡献分布: 陈明清与董坚对此文所作贡献均等; 此课题由陈明清与董坚设计; 病例收集标本采集过程由陈明清, 董坚, 珠珠, 戴莉萍, 魏万里, 杨军及张洪斌操作完成; 家系初步分析由陈明清, 董坚及珠珠完成; 本论文写作由陈明清, 董坚及珠珠完成。

通讯作者: 董坚, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院生物治疗科, dongjian18@yahoo.com
电话: 0871-5361621 传真: 0871-5361621

收稿日期: 2008-06-06 修回日期: 2008-08-25

接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-09-28

Establishment and management of hereditary colorectal cancer tissue bank in Yunnan province

Ming-Qing Chen, Zhu Zhu, Li-Ping Dai, Wan-Li Wei, Jun Yang, Hong-Bin Zhang, Jian Dong

Ming-Qing Chen, Cancer Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Zhu Zhu, Jun Yang, Hong-Bin Zhang, Jian Dong, Biotherapy Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Li-Ping Dai, Department of Pathology, Dali People's Hospital, Dali 671000, Yunnan Province, China

Wan-Li Wei, Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650106, Yunnan Province, China

Supported by: the Society Development Technology Plan Project of Yunnan Province, No. 2007CA009

Correspondence to: Dr. Jian Dong, Biotherapy Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. dongjian18@yahoo.com

Received: 2008-06-06 Revised: 2008-08-25

Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-09-28

Abstract

AIM: To establish a tissue bank of hereditary colorectal cancer to rescue and preserve the national resources of hereditary colorectal cancer family in Yunnan province.

METHODS: Specimens of whole blood, serum, plasma and stool of patients and their lineal con-

sanguinity in hereditary colorectal cancer family were collected and then DNA was extracted from these specimens for preservation. Tissue specimens *in vitro* (including tumor tissues, peritumor tissues and normal tissues) were collected and paraffin-embedded sections were prepared of operative patients. At the same time, DNA specimens of whole blood and tumor tissue of sporadic colorectal cancers were taken as controls. Simultaneously we developed an information management system for tissue bank with the operating system platform for Window XP, database ACCESS2003.

RESULTS: From September 2007 to June 2008, we collected 14 hereditary colorectal families (10 FAP families and 4 HNPCC families) including 9 Han families, 2 Bai families, 2 Yi families and 1 Zang family. There were 356 blood specimens and 157 tissue specimens. DNA of all family members was extracted in reserve. And 354 blood specimens of sporadic colorectal cancer including 127 ones of non-Han nationalities were collected.

CONCLUSION: We established a standard tissue bank of hereditary colorectal cancer in Yunnan province.

Key Words: Tissue bank; Hereditary colorectal cancer; Hereditary non-polyposis colorectal cancer; Familial adenomatous polyposis; Families

Chen MQ, Zhu Z, Dai LP, Wei WL, Yang J, Zhang HB, Dong J. Establishment and management of hereditary colorectal cancer tissue bank in Yunnan province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(27): 3122-3125

摘要

目的: 为抢救和保存云南省民族性遗传性大肠癌家系标本资源, 建立云南省遗传性大肠癌标本库。

方法: 采集遗传性大肠癌家系中患者及其直系亲属的全血、血清、血浆和粪便标本等, 从中提取DNA保存。手术患者采集离体后组织标本(包括肿瘤、瘤旁和远端正常组织)、石

■同行评议者

杜祥, 教授, 复旦大学附属肿瘤医院病理科; 李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

蜡包埋切片. 同时采集散发性大肠癌全血和组织标本提取DNA作为对照. 并开发一套信息管理系统应用于标本库的管理, 系统运行平台为WindowXP, 数据库为ACCESS2003.

结果: 2007-09/2008-06共采集14个遗传性大肠癌家系(10个FAP家系, 4个HNPCC家系), 其中包括9个汉族家系, 2个白族家系, 2个彝族家系, 1个藏族家系的标本. 其中血液标本达356份, 组织标本157份, 提取所有家系成员的DNA备用. 并同时采集散发性大肠癌血液样本354份其中非汉民族127份.

结论: 建立了规范的, 具有一定规模的云南省民族性遗传性大肠癌标本库.

关键词: 组织库; 遗传性大肠癌; 遗传性非息肉性大肠癌; 家族性腺瘤样息肉病; 家系

陈明清, 珠珠, 戴莉萍, 魏万里, 杨军, 张洪斌, 董坚. 云南省遗传性大肠癌组织库的建立及管理. 世界华人消化杂志 2008; 16(27): 3122-3125
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3122.asp>

0 引言

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 我国结直肠癌的年发病率正以4.2%的年增长率迅速升高, 正在逐渐接近欧美发达国家(位居第二位)的水平^[1-4]. 遗传性大肠癌在大肠癌体系中占有重要的比例, 同时具有肿瘤的遗传性、高发性、多发性和肿瘤发生的多器官性的特点, 是威胁人类生命健康的主要疾病之一^[4-5]. 遗传性大肠癌包括两大类, 即家族性腺瘤样息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)和遗传性非息肉病性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC). FAP和HNPCC分别占大肠癌发病的1%和10%-15%^[5-6]. 我国遗传资源丰富, 有明显的家族聚居分布, 遗传背景相对单纯^[7]. 而云南省民族众多, 具有不同民族遗传结构的多样性和民族背景的单一性, 因此云南是中国遗传资源最为丰富的地区, 是遗传学研究优质的样本群. 而随着经济的发展、交通条件的改善、生活方式的变迁、婚姻观念的更新, 这些资源却正面临着流失、混杂和消失的危险. 为了抢救和保存我省宝贵的遗传性大肠癌家系, 我院建立了云南省遗传性大肠癌标本库, 通过对我省遗传性大肠癌家系的血液、新鲜组织、病理蜡块、粪便等标本的收集、保存和研究, 对其进行科学的管理和质量控制, 充分利用组

织库资源为人类遗传性大肠癌的基础和临床研究提供宝贵材料, 有望在民族侧重性上发现与遗传性大肠癌相关的新基因. 由于遗传性大肠癌的基因筛查目前在我国尚未广泛开展, 组织库的建立将为促进我国遗传性大肠癌的研究提供服务, 并为今后我国乃至亚洲人群建立标准化遗传性大肠癌的基因筛查、临床诊治标准提供理论依据. 随着对肿瘤的深入研究, 已经从使用动物和细胞株为研究对象转移为以人体肿瘤标本为研究对象. 国外先后建立了单病种肿瘤库和多病种肿瘤库^[8-15]. 2003年英国建立了国家肿瘤库. 最为成功的便是1987年美国NIH建立的人类组织协作网(cooperation human tissue network, CHTN), 自建立以来, 已经收集数千名患者不同组织器官的标本共20万份以上^[8-9]. 近年来国内部分单位也建立了标本库. 1996年北京大学成立了临床肿瘤学院标本库^[12], 2000年解放军总医院建立了胆道肿瘤标本库^[15], 2002年无锡市肿瘤库建立^[13], 2003年广州医学院第一附属医院儿童肿瘤标本库建立^[14]. 而关于少数民族遗传性大肠癌的标本库尚未见报道.

1 材料和方法

1.1 材料 设有80 m²标本库库房, 放置液氮罐、-20℃冰箱、-80℃低温冰箱, 病理切片及蜡块保存柜等用于存放各种不同类型标本; 另设有分子生物室、血清室、PCR实验室等用于提取核酸, 分离淋巴细胞, 进行PCR扩增和从事相关研究. 121 L液氮罐2个, 每个容纳4000份样本(美国CBS); -80℃超低温冰箱1台(美国Thermo); 4~-20℃冰箱2台(瑞典Electrolux); 离心机1台(德国Herolab); 电泳系统(美国Bio-Rad); 凝胶成像系统(中国Tannon); 联想电脑; 高压蒸汽灭菌锅; 分光光度计. EDTA抗凝血采血管(紫头), 无抗凝采血管(红头); 手术刀片, 剪刀, 镊子, 搪瓷盘、研钵、研磨棒; 标本采集运输保温桶; 2 mL冻存管(美国Corning); 标本保存盒(德国Eppendorf); 微量移液器(美国Thermo); DNA提取试剂盒(德国Qiagen).

1.2 方法 自2007-09/2008-06在云南省科技厅立项支持下, 我院联合云南省肿瘤医院、大理州第一人民医院等多中心合作收集FAP和HNPCC家系标本, 同时收集散发性大肠癌血液标本, 标本采集严格按照规范由专人操作. 云南省遗传性大肠癌标本库的建立经本单位伦理委员会批准, 在标本采集前均需获得患者或家属的知情同意; 对无民事行为能力的人需获得其监护人

■ 研发前沿

规范化的组织库的建立已成为众多科研机构、医院的重点项目, 通过规范化的组织库的建立提供大量的标本资源, 以便今后深入的研究大肠癌的发病机制及遗传性大肠癌相关肠外肿瘤.

■应用要点

通过建立规范的云南省遗传性大肠癌标本库,为遗传性大肠癌的基础研究提供有效资源;为建立标准化遗传性大肠癌的基因筛查、临床诊治标准提供理论依据,减低大肠癌的发病率及死亡率;同时也能作为遗传性大肠癌相关肠外肿瘤的研究提供基础材料。

的知情同意,并签署知情同意书。

1.2.1 血液样本的采集及保存:所有符合临床诊断标准的FAP和HNPCC家系,采集首发患者及家系成员和少数民族、部分汉族散发性大肠癌的血液标本。每个患者均采集含20 g/L EDTA抗凝剂(紫帽采血管)(BD公司,美国)2管,不含抗凝剂(红帽采血管)(BD公司,美国)1管,共计3管(10 mL)血液样本。其中1管紫帽采血管分别用两个不同公司的DNA提取试剂盒提取4份DNA样本后琼脂糖凝胶电泳,观察DNA纯度并测定其浓度。编号后放入-80℃超低温冰箱保存,另1管紫帽采血管尽快离心分离血浆编号按100 μ L标志分装成数管后存入液氮中。红帽采血管室温放置30 min后离心分离血清,将血清按100 μ L标志分装成数管存入-80℃超低温冰箱保存。

1.2.2 组织样本的采集及保存:(1)新鲜组织的采集及保存:进行手术治疗的患者都采集组织标本,手术结束后在不影响病理诊断取材需要的前提下采集组织样本。将取下的肿瘤组织用生理盐水冲洗2次,取肿瘤组织(避免取到坏死组织并尽量冲洗尽血液)、癌旁组织(癌组织旁1 cm)、正常组织(癌组织旁5 cm以外或最远处)。用相机拍摄标本外观取材部位,将标本切成小块(0.5 cm \times 0.5 cm,厚度<0.5 cm),每份组织重量在原则上不低于2 g。标记后放入液氮保存。(2)石蜡固定标本的采集:经过手术治疗的患者均需要采集石蜡固定标本。每一患者均保存2张HE染色切片,明确大肠癌的病理诊断。疑似HNPCC的患者除HE染色切片外还需20张免疫组化切片,以便后续进行免疫组化检测。对于已经过世的患者,用QIAamp DNA FFPE Tissue试剂盒从蜡块组织中提取DNA备用。

1.2.3 粪便的采集及DNA的提取:云南是一个多民族的地区,部分民族由于对血液的崇拜,给采集血液样本带来了困难,对这一部分患者,收集粪便标本用试剂盒进行粪便中DNA提取。

1.2.4 标本的标志和存储:存储于液氮或-80℃低温冰箱的标本分装入带有橡皮垫圈的冻存管,在冻存管上做好标记,包括冻存管编号、患者姓名、疾病种类、标本类型(血清、血浆、DNA或组织),将冻存管存于标本盒中。记录在液氮罐或冰箱中的位置坐标、在标本盒中的位置坐标。在每一标本盒侧面标志标本盒编号和标本存放的日期。病理切片或蜡块上标明患者姓名、疾病种类、病理类型、切片编号。切片或蜡块按编号存于切片蜡块柜中。记录在柜中

的位置坐标。

1.2.5 标本库的信息化管理:云南省遗传性大肠癌标本库来源与血液、组织、DNA、粪便、病理蜡块等。随着标本数量的不断增加,计算机的信息化的管理显得至关重要。标本库实行动态化的数据管理模式,对标本库涉及的实体资源和信息资源进行系统和规范化的管理。因此要求信息管理系统兼具有信息录入、存储、浏览、检索、管理等功能。我们自行设计并开发出一套信息管理系统应用于肿瘤库的管理,系统运行平台为Window XP,数据库为ACCESS2003。遗传性大肠癌标本数据库由病例资料数据库、标本储存数据库和提取标本数据库、动态背景资料数据库组成。

1.2.6 信息录入功能:(1)患者基本信息录入:患者及家系成员姓名、性别、年龄、职业、血型、住院号、病理号、肠镜号、症状体征、临床诊断、病理类型、肿瘤部位、手术方式、治疗方案、家庭地址联系方式。(2)标本基本信息录入:标本入库编号、家系编号、患者姓名、标本类型、病变类型、组织部位、保存的方式、样本量、预处理、收集人姓名、收集方式、入库时间等。(3)标本存放位置信息录入:入库的编号、家系编号、患者姓名、存放设备、标本盒规格、标本数量、计量单位、存放位置坐标等。

1.2.7 标本使用管理:(1)标本使用登记:每次使用标本使用时均要经过严格的审批程序。申请人需要填写标本使用申请单,由本人、有关部门负责人签字、主管部门盖章后提交标本库管理委员会。使用时填写标本出库编号、出库日期、标本原始位置、使用人等。(2)标本实验信息录入:填写入库编号、实验号、实验内容、实验结果、实验人、实验日期等。(3)废除标本信息登记:进行实验后的废除标本需登记废除编号、入库编号、标本原始位置、废除日期、废除原因、经手人等。

1.2.8 标本库的系统管理:标本的采集、保存、使用实行专人管理。管理人员经过专业的培训严格按照标本库制定的各项规章制度进行标准化管理。定期核对,随机取库存标本进行光镜检查、核酸抽提,了解保存质量。病例资料严格按照规范化录入,定期进行统计学的分析。

组织标本库的标本和资料都是宝贵的资源,对遗传性大肠癌及大肠癌疾病的研究起着重大的意义。标本的使用有严格原则:要做到资源共享、物尽其用,不能盲目浪费资料和标本。每份

标本的使用都有详细的记录. 在提供标本的同时, 不提供有关患者身份及其相关信息, 确保患者医疗信息的私密性.

2 结果

共采集14个遗传性大肠癌家系(10个FAP家系, 4个HNPCC家系), 其中包括9个汉族家系, 2个白族家系, 2个彝族家系, 1个藏族家系的标本. 其中血液标本达356份, 组织标本157份提取所有家系成员的DNA备用. 并同时采集散发性大肠癌血液样本354份其中汉族227份, 其他民族127份. 部分家系标本已用于遗传性大肠癌的基因研究, 取得了良好的效果.

3 讨论

云南省遗传性大肠癌标本库的建立是开展遗传性大肠癌疾病相关基因研究的重要基础性工作, 并为云南省大肠癌的基础研究展开了新的领域. 同时为抢救和保存我国宝贵的民族性大肠癌标本资源, 以便研究不同民族基因的差异性, 为我国大肠癌高危人群的结直肠癌变早期基因筛查提供理论依据. 建立组织库, 一方面满足自身研究的需要, 同时可向其他医院、科研机构 and 高等院校的研究者们提供遗传性大肠癌、民族性散发性大肠癌标本, 深入开展遗传性大肠癌的基础研究. 随着对遗传性大肠癌的深入研究, 有望发现更加有效的在基因水平上阻断遗传性大肠癌发展的新的方法.

4 参考文献

1 董志伟, 乔友林, 李连弟, 陈育德, 王润田, 雷通海, 饶

- 克勤, 王汝宽, 赵平, 游伟程, 鲁凤珠, 戴旭东, 王国清, 罗贤懋, 周海城. 中国癌症控制策略研究报告. 中国肿瘤 2002; 11: 250-260
- 2 Winawer SJ. Screening of colorectal cancer: progress and problems. *Recent Results Cancer Res* 2005; 166: 231-244
- 3 Zheng S, Cai SR. Colorectal Cancer Epidemiology and Prevention Study in China. *Chin Ger J Clin Oncol* 2003; 2: 72-75
- 4 郑树, 蔡善荣, 张苏展. 重视结直肠癌高危人群的筛查. *中华消化杂志* 2006; 6: 361-363
- 5 Gonciarz M, Pierzchalski P, Lorens K, Pawlik W, Petelenz M. [Genetic aspects of colorectal carcinogenesis] *Wiad Lek* 2004; 57: 74-79
- 6 Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline MLH1 and MSH2 mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2727-2732
- 7 贺林. 解码生命—人类基因组计划和后基因组计划. 第1版. 北京: 科学出版社, 2000: 17-25
- 8 Whyte B. National tumor bank set up in United kingdom. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 706
- 9 Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM, Williams N, Grizzle WH, LiVolsi V, MacLennan G, Sedmak DD. Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 733-741
- 10 Watson PH, Snell L, Parisien M. The NCIC-Manitoba Breast Tumor Bank: a resource for applied cancer research. *CMAJ* 1996; 155: 281-283
- 11 Thomas GA, Williams ED. Chernobyl thyroid tumor tissue and nucleic acid bank. *Radiat Res* 2001; 156: 333
- 12 季加孚. 北京大学临床肿瘤学院标本库的建设. *北京大学学报(医学版)* 2005; 37: 329-330
- 13 李莉华, 魏福祥, 王丰, 徐渊洪, 龚佩娟. 肿瘤库(用于分子生物学研究)的建立及管理. *肿瘤* 2004; 24: 578-580
- 14 叶铁真, 郑锦涛, 张晓红, 陈福雄. 儿童肿瘤标本库标本信息管理系统的建立和应用. *中国小儿血液* 2003; 8: 183-185
- 15 万涛, 周宁新, 黄志强. 胆管癌新鲜组织标本库建立与鉴定. *中国普外基础与临床杂志* 2005; 12: 329-332

■同行评价

本研究为抢救和保存云南省民族性遗传性大肠癌家系标本资源建立了一种可操作的模式, 整体设计较为合理, 但总体样本量还有待进一步增加.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com>/在线提交未成功, 请通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-28)