

肝脏组织样本库的建立及管理

陆晓芳, 马欣, 周骏群, 陈凤秋, 杨清平, 魏明月, 刘逸敏, 杨远, 周伟平

陆晓芳, 马欣, 周骏群, 陈凤秋, 杨清平, 魏明月, 刘逸敏, 杨远, 周伟平, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院 上海市 200438

国家科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-018
作者贡献分布: 陆晓芳、马欣及周骏群对此文所作贡献均等; 此课题由周伟平、刘逸敏与杨远设计; 标本采集由陆晓芳与杨清平等完成; 样本库管理由马欣与陈凤秋等完成; 数据管理由周骏群与魏明月等完成; 本论文写作由陆晓芳与杨远完成; 周伟平指导。

通讯作者: 杨远, 主治医师, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院。

yy@smmu.edu.cn

电话: 021-81875529 传真: 021-81875529

收稿日期: 2011-02-09 修回日期: 2011-03-20

接受日期: 2011-03-23 在线出版日期: 2011-04-18

Establishment and management of a liver tissue bank in China

Xiao-Fang Lu, Xin Ma, Jun-Qun Zhou, Feng-Qiu Chen, Qing-Ping Yang, Ming-Yue Wei, Yi-Min Liu, Yuan Yang, Wei-Ping Zhou

Xiao-Fang Lu, Xin Ma, Jun-Qun Zhou, Feng-Qiu Chen, Qing-Ping Yang, Ming-Yue Wei, Yi-Min Liu, Yuan Yang, Wei-Ping Zhou, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Supported by: the National Science and Technology Major Project of China, No. 2008ZX10002-018

Correspondence to: Yuan Yang, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. yy@smmu.edu.cn

Received: 2011-02-09 Revised: 2011-03-20

Accepted: 2011-03-23 Published online: 2011-04-18

Abstract

AIM: To develop a standardized and well-rounded liver tissue bank available for hepatology research using well-characterized and optimally preserved liver tumor tissue samples.

METHODS: Standardized operational procedures were developed, and samples such as fresh-frozen surgical tissue samples, pre- and postoperative whole blood, urine and paraffin section samples were collected. Using the National Liver Tissue Bank (NLTB) data management platform, the database can be accessed and renewed automatically or manually with the Hospital Information System (HIS).

RESULTS: From Mar 2009 to Dec 2010, over 4000 individuals had been enrolled as liver tumor donors to the NLTB, including 2 500 cases of newly diagnosed hepatocellular carcinoma (HCC), and 1 500 cases of diagnosed benign or malignant liver tumors. Database access and sample preservation can be managed easily and correctly with the data management platform.

CONCLUSION: We established a standard liver tissue bank using high-quality well-characterized samples, which will become the cornerstone for hepatology research, especially the diagnosis and treatment of HCC and other liver diseases.

Key Words: Liver neoplasms; Tissue bank; Information system; Standardization

Lu XF, Ma X, Zhou JQ, Chen FQ, Yang QP, Wei MY, Liu YM, Yang Y, Zhou WP. Establishment and management of a liver tissue bank in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(11): 1187-1190

摘要

目的: 建立按照统一标准收集的, 具备完整临床资料的肝脏组织及相关体液的肝脏组织样本库。

方法: 制定标准化操作流程, 采集患者的血液、尿样和新鲜和石蜡手术样本, 血样本包括术前术后样本以及患者随访的血样本, 按不同要求处理分装, 应用数据库管理系统, 建设临床资料完整的组织样本库。

结果: 收集2009-03/2010-12 4 000余例完整肝脏肿瘤新鲜组织、石蜡切片、血样、尿样, 及完整的临床资料及随访资料, 包括了超过2 500例原发性肝细胞癌, 及约1 500例其他肝脏肿瘤, 广泛应用于肝脏病学研究的各个领域。

结论: 建立了规范化、规模化的肝脏组织样本库, 为肝癌及其他肝脏病学的研究提供高质量的样本。

关键词: 肝肿瘤; 组织库; 信息系统; 标准化

陆晓芳, 马欣, 周骏群, 陈凤秋, 杨清平, 魏明月, 刘逸敏, 杨远,

■背景资料

建立一定规模的临床组织样本库是进一步提高疾病诊断和治疗效果、改善肿瘤患者长期疗效的必然途径。

■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市立医院肝病内科

■应用要点

建立以专科医院及肿瘤医院为核心力量的规范化、单病种的重大疾病临床标本库和资料库, 统一样本采集标准, 完善标准化管理体系, 为生命科学研究提供更优质的服务。

周伟平. 肝脏组织样本库的建立及管理. 世界华人消化杂志 2011; 19(11): 1187-1190

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1187.asp>

0 引言

临床疾病的流行病发病因素、早期发现和治疗、抗肿瘤转移和复发的分子机制研究、个体化治疗方案的制定以及抗肿瘤新药的研发等领域均离不开临床生物样本, 因此建立一定规模的临床组织样本库是进一步提高疾病诊断和治疗效果、改善肿瘤患者长期疗效的必然途径^[1,2]。自2009年起, 为配合国家科技重大专项-“病毒性肝炎相关肝癌样本库及其相关信息共享数据库的建设及维护”课题的开展, 以中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院为首牵头承担了国家肝脏组织样本库, 为全国各研究中心提供标准化的肝脏组织样本^[3]。并以此形成肝脏组织样本及相关信息的采集保存规范, 现整理如下。

1 材料和方法

1.1 材料 样本贮藏室根据不同温区分隔放置液氮罐、-20℃冰箱、-80℃低温冰箱及蜡块保存柜等用于存放各种不同类型样本; 设分子生物室、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; 设临床数据采集、随访办公室及数据中心, 进行临床及随访的数据采集管理, 以及数据库的维护。

1.2 方法

1.2.1 样本采集: 肝脏组织样本库的建立已经过中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院伦理委员会对生物样本收集方案以及生物样本采集知情同意书进行伦理审核, 并讨论通过。由患者的主治医师向生物样本捐赠者或其法定监护人进行生物样本采集知情说明, 以便获取生物样本组织捐赠者或其法定监护人认可与支持, 并签署知情同意书。(1)肝脏切除样本采集: 肝肿瘤切除术由专业肝脏外科医师完成, 肝切除术尽可能以肝段为本(尤其是恶性肿瘤), 保证肿瘤完整性, 并于肿瘤离体后迅速交给样本采集工作人员。取材必须在样本离体30 min内, 且必须保证在无菌条件下完成; 将标本放在预处理的辅料巾上, 本着避免交叉污染的原则按肿瘤远端(正常组织)、肿瘤旁组织、肿瘤组织依次切下, 必要时用抗RNA酶预处理的无菌生理盐水洗去样本上血污。正常组织指距离肿瘤2 cm

以外最远端的组织样本, 肿瘤旁组织指距离肿瘤2 cm以内的组织样本; 肿瘤组织指肿瘤内活性组织, 取肿瘤组织时避开坏死出血区域; 取完正常组织后, 以肿瘤长径为轴心, 将肿瘤切开, 充分暴露病灶切面, 放置标记直尺, 600万以上像素数码相机拍摄肿瘤大体及病灶照片, 肿物体积较小时必须首先确保不影响常规病理诊断, 留取样本原则上不得超过原样本1/4。根据样本大小, 切分成数等份, 每份不少于0.5 cm³, 分别装入冻存管, 旋紧盖子。核对样本标签编号后及时将冻存管以患者为单位包装后置于便携液氮罐中冻存。推荐使用RNA later防止RNA降解。同时留取一份石蜡包埋样本;(2)体液样本的采集与保存: 血液取材必须在手术切除前进行, 必要时术后定期随访留取血样(如留取术后6、12、24 h及3、5、7 d血样); 血液需留取不少于10 mL全血, 其中5 mL为EDTA K₂抗凝全血, 5 mL为非抗凝血, 均以真空采血管留取。抗凝血分离血浆及混合血细胞, 非抗凝血分离血清, 抗凝不全者重新采样; 出现溶血者, 重新采集, 在6 h内以eppendorf管每管300-500 μL分装冻存。推荐使用Ficoll-Hypaque法分离单核细胞冻存。核对样本标签编号后及时冻存, 在-20℃贮存2 mo; -80℃贮存6 mo; 可在液氮中长期保存。尿液取材建议与血液同步留取, 方便对照; 采集后离心留取上清, 分装冻存, 在4 h内处理完毕; 核对样本标签编号后及时冻存, 推荐在-40℃贮存^[4,5]。

1.2.2 核酸纯化: 样本分装好后, 取血细胞200 μL和冰冻组织一份, 分别提取基因组DNA和总RNA, 为保证纯度, 我们推荐使用QIAGEN公司的QIAGEN Blood DNA Kit和QIAGEN Tissue RNA Kit。基因组DNA和总RNA纯化后经分光光度计定量质检后, 登记, 存放于-80℃备用。

1.2.3 样本信息化管理: 取样人员根据预先知道的手术安排, 确定需采集的患者样本并打印样本标签。样本标签用患者住院号标示, 类型标识肿瘤组织为T, 肿瘤旁组织为L, 正常组织为N, 淋巴结为LN, 癌栓为CE, 号码前打印医院(课题组标识), 类型标识后接拷贝数。样本操作员可以通过样本编号了解到一定的样本信息, 以此保证样本在脱机管理过程中的有序性和操作的正确性。系统将利用架子(抽屉)将冰箱空间进行合理分割, 抽屉可以放进若干个试管盒, 盒子里面存放最终的样本管。在样本分装完毕之后, 贴上空间条码, 先在样本库系统中入库, 然后对照样本定位编号进行实体入库。这样样本的存储位置

将在样本库系统中一览无余^[6-8]。

1.2.4 临床信息录入及随访: 在样本入库后, 临床的信息的补填是一个重要的工作, 临床信息可以同时通过两种渠道输入。Web端手工填写手术情况, 并发症, 诊断治疗信息以及通过医院信息系统(hospital information system, HIS)获取一般情况、检验信息、影像及病理信息。建议由HIS系统开放接口, 利用HIS系统的接口调用HIS系统的信息。另外系统对样本的信息提供上传附件的功能, 完善对样本的描述^[9,10]。完成患者的在院信息后, 还需对患者进行随访, 定期根据需要补充更新随访信息。对于原发性肝癌或其他恶性肿瘤, 应在术后前两年每3 mo随访1次, 两年后每半年随访1次。随访内容包括实验室检查(肝功能, 肿瘤标记物等)和影像学检查(如B超等), 同时记录术后用药情况, 抗病毒治疗情况, 术后第1次复发时间, 复发后治疗, 以及患者的死亡时间和死亡原因等。

1.2.5 样本使用管理: 样本出入库实行专人双人管理, 严格按照样本库制定的各项规章制度进行标准化管理, 每次使用样本时均要经过严格的审批程序, 申请人需要填写样本使用申请单, 由本人、部门负责人签字、主管部门盖章后提交样本库管理领导, 使用时填写样本编号、出库日期、样本原始位置、使用人, 使用原因等; 同时, 需返回该批次样本的基本检测数据, 便于对样本的采集、保存质量做到双重监管。每份样本的使用都需有详尽的记录, 在提供样本信息的同时, 不提供有关患者的姓名, 住址, 电话等身份相关信息, 确保患者医疗信息的私密性。

2 结果

2009-03/2010-12, 肝脏组织样本库已建立了肝脏肿瘤样本采集管理的标准化流程, 基本完成位于中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院的肝脏组织样本库的实体建设, 收集4 000余例完整肝脏肿瘤新鲜组织、石蜡切片、血样、尿样, 以及外周血单核粒细胞提取(DNA、RNA等)。同时, 仍以每月近200例病例的速度不断增长。肝脏组织样本库中包括了超过2 500例原发性肝细胞癌, 及1 500例左右其他肝脏肿瘤, 如胆管细胞型肝癌、转移性肝癌、肝母细胞瘤等恶性肿瘤; 肝腺瘤、局灶结节性增生、血管瘤、血管平滑肌脂肪瘤等良性肿瘤。

结合HIS的开发应用, 肝脏组织样本库同时建立了完整的样本临床信息登记及随访系

统, 至2010-12, 共录入40余万条患者基本信息, 2 500多万条的检验记录及60余万条随访数据。各种临床信息除应用于生物样本的研究外, 还广泛地应用于临床科研统计。

3 讨论

生命科学研究的进一步深入伴随着相关技术平台的搭建, 必然要求生物样本库的建设朝着专科化, 专业化, 规模化、产业化的方向发展, 同时也是实现转化医学的最宝贵资源和最重要环节之一。具备完整临床资料及随访资料的肝脏组织样本库的建立, 为各类生命科学研究, 商业新药开发, 新的靶向治疗研究, 筛选特异性基因治疗手段等提供大量的实验素材^[11,12]。同时, 具备自主知识产权临床资料采集和跟踪随访系统软件也为肝癌的临床科研提供了完整而详尽的资料, 将进一步提高肝癌的规范化治疗水平。

我国的疾病样本资源极其丰富, 是任何其他国家无法比拟的, 我们有条件利用样本库建设的先机, 开拓我国生命科学研究和医药产业的新的方向。近年来, 随着“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项”的开展, 针对重点疾病的易感人群筛选、临床前期发现、早期患者诊断及指导个体化治疗相关的特异性分子标志物, 建立各种疾病的分子分型标准等研究均需要大量临床组织样本的支持。我国各大学、医院及研究院所都非常重视生物样本库的建设与转化医学的研究^[13-16], 以此为契机, 应建立以专科医院及肿瘤医院为核心力量的规范化, 单病种的重大疾病临床标本库和资料库, 统一样本采集标准, 完善标准化管理体系, 为生命科学研究提供更优质的服务。

4 参考文献

- 1 于颖彦, 刘炳亚, 朱正纲. 肿瘤组织库建立的进展及意义. 诊断学理论与实践 2009; 8: 9-11
- 2 邵恒骏, 朱明华. 重视肿瘤组织库的标准化建设和应用. 中华病理学杂志 2008; 37: 797-798
- 3 Yang Y, Liu YM, Wei MY, Wu YF, Gao JH, Liu L, Zhou WP, Wang HY, Wu MC. The liver tissue bank and clinical database in China. *Front Med China* 2010; 4: 443-447
- 4 Mager SR, Oomen MH, Morente MM, Ratcliffe C, Knox K, Kerr DJ, Pezzella F, Riegman PH. Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer* 2007; 43: 828-834
- 5 Morente MM, Mager R, Alonso S, Pezzella F, Spatz A, Knox K, Kerr D, Dinjens WN, Oosterhuis JW, Lam KH, Oomen MH, van Damme B, van de Vijver M, van Boven H, Kerjaschki D, Pammer J, Lopez-Guerrero JA, Llombart Bosch A, Carbone A, Gloghini A, Teodorovic I, Isabelle M, Passiukov A, Lejeune S, Therasse P, van Veen EB, Ratcliffe C, Riegman PH. TuBaFrost 2: Standardising tis-

■同行评价

本文思路清晰, 具有较高的临床和科研价值, 值得进一步推广。

- sue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2684-2691
- 6 杨远, 刘逸敏, 吴益飞, 马欣, 魏明月, 高军晖, 刘雷, 周伟平. 双重条形码结合信息管理平台在临床组织样本库的应用. *中国数字医学* 2010; 5: 29-31
 - 7 张俊星, 杨远, 吴益飞, 马欣, 刘晟, 魏明月, 叶飞, 陆晓芳, 高军晖, 周伟平. 双重条形码技术在临床组织样本库标准化管理中的应用. *中国医院管理* 2011; 3: 64-65
 - 8 Poon EG, Keohane CA, Yoon CS, Ditmore M, Bane A, Levitzion-Korach O, Moniz T, Rothschild JM, Kachalia AB, Hayes J, Churchill WW, Lipsitz S, Whittemore AD, Bates DW, Gandhi TK. Effect of bar-code technology on the safety of medication administration. *N Engl J Med* 2010; 362: 1698-1707
 - 9 刘逸敏, 魏明月, 周伟平, 杨远, 高军晖, 吴益飞. SOA架构搭建肝癌样本库信息服务平台. *中国医疗设备* 2009; 24: 57-60
 - 10 周骏群, 刘逸敏, 魏明月, 杨远, 周伟平, 吴益飞, 高军晖, 刘雷. 肝癌样本库元数据设计. *中国数字医学* 2010; 5: 15-19
 - 11 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: 3122-3125
 - 12 Møller S, Jensen MB, Ejlersten B, Bjerre KD, Larsen M, Hansen HB, Christiansen P, Mouridsen HT. The clinical database and the treatment guidelines of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG); its 30-years experience and future promise. *Acta Oncol* 2008; 47: 506-524
 - 13 王青, 林爱芬, 周文君, 章霞, 包卫光, 张坚刚, 颜卫华, 陈海啸. 我院人体组织生物样本库的建立和应用. *中华医院管理杂志* 2010; 26: 150-153
 - 14 黄东海, 章华, 范松青, 李翔, 邱元正, 张欣, 赵素萍, 田勇泉. 鼻咽癌组织库及其信息管理系统的建立. *中华病理学杂志* 2010; 39: 574-575
 - 15 王沛涛, 李强, 邵翠华. 移植用组织库建立及管理. *中国医药生物技术* 2009; 4: 307-309
 - 16 韩洪秀, 杨敏, 李向红. 肿瘤组织库的建立与规范化管理. *中华病理学杂志* 2008; 37: 849-850

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *Vd*, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.