

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.20.003

胰腺癌及癌旁组织中提取 RNA 样品的方法优化及鉴定*

魏伟¹ 欧政林¹ 窦晓淋¹ 唐翎^{2,3Δ}

(1 中南大学湘雅医院普外科 湖南长沙 410008; 2 中南大学湘雅医院药学部 湖南长沙 410008;

3 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心 湖南长沙 410008)

摘要 目的:优化胰腺癌及癌旁组织总 RNA 的提取方法,为胰腺相关疾病的发病机制研究提供高质量的实验样本。**方法:**采用组织块分离剪碎、RNase 清洗及抑制等方法对胰腺癌及癌旁组织进行预处理,液氮研磨及 trizol-氯仿抽提的方法提取组织 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳及生物分析仪鉴定 RNA 的完整性。使用等量 RNA 作为逆转录模板,以 oligo dT 引物对信使 RNA(messenger RNA, mRNA)进行逆转录;以茎环结构引物对微小 RNA(microRNA, miRNA)进行逆转录。通过定量 PCR 的方法检测 mRNA 及 miRNA 的表达水平。**结果:**相较于常规方法,优化方法提取的 RNA 样品降解程度低,完整性较高。相对于胰腺癌组织,癌旁组织 RNA 更易降解,mRNA 的表达水平出现降低趋势;但 miRNA 的表达在胰腺癌及癌旁组织中无明显差异。**结论:**胰腺癌及癌旁组织的预处理可降低 RNA 降解程度,可为 RNA 的表达检测提供高质量的实验样本,增加实验准确度。

关键词:胰腺癌;信使 RNA;微小 RNA;定量 PCR

中图分类号:R-33;R735.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)20-3813-05

Optimization of the Purification Method of Total RNA from Pancreatic Cancer and Adjacent Tissues*

WEI Wei¹, OU Zheng-li¹, DOU Xiao-lin¹, TANG Ling^{2,3Δ}

(1 Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China;

2 Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China;

3 National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the extraction method of total RNA from pancreatic cancer and adjacent tissues, and provide high-quality experimental samples for the pathogenesis of pancreatic-related diseases. **Methods:** The pretreatment of pancreatic cancer and paracancerous tissues was accomplished through shredding, RNase-free washing and RNase inhibition. RNA was isolated by liquid nitrogen grinding and trizol-chloroform extraction. The integrity of RNA was identified by agarose gel electrophoresis and bioanalyzer. With the same amount of RNA as the reverse transcription template, oligo dT primers were used for reverse transcription of messenger RNA (mRNA); stem-loop structure primers were used to reverse transcription of microRNA (miRNA). The expression levels of mRNA and miRNA were detected by quantitative RT-PCR. **Results:** Compared with conventional methods, RNA samples extracted by the optimized method had a lower degradation degree and higher integrity. Compared with pancreatic cancer tissue, RNA in adjacent tissue is more easily degraded, and the expression level of mRNA tends to decrease. However, there is no significant difference in miRNA expression between pancreatic cancer and adjacent tissue. **Conclusions:** Pretreatment of pancreatic cancer and adjacent tissues could reduce the RNA degradation, and provide high-quality experimental samples for RNA investigation and high experimental accuracy.

Key words: Pancreatic cancer; Message RNA; microRNA; Quantitative RT-PCR

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)20-3813-05

前言

胰腺癌(Pancreatic cancer, PC)是常见的消化系统恶性肿瘤之一,多为胰腺导管腺癌(Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC),约占 PC 的 90%^[1,2]。研究显示 PDAC 的主要危险因素包括年龄、饮酒、慢性胰腺炎、糖尿病、肥胖、家族史和吸烟等。目前除吸烟人数减少外,其他危险因素的比例都在上升,因此

PDAC 的发生率和死亡率都在不断上升^[3-5]。尽管 PDAC 发病机制的研究已经取得了重要进展,但肿瘤组织的异质性和基质环境的致密性,导致 PDAC 仍是最具化学耐药性的癌症之一^[6-8]。因此,通过高通量测序等方法分析 PDAC 组织的突变基因信息对于患者的个体化治疗尤为重要^[9,10]。研究显示胰腺组织中提取完整 RNA 会受到自溶和内源性核糖核酸酶存在的影响。因此,优化胰腺组织总 RNA 的提取方法并对其进行完整性鉴定,

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(2019JJ40489)

作者简介:魏伟(1978-),男,博士,主治医师,主要研究方向:胰腺肿瘤, E-mail: weiweidoctor@126.com, 电话:0731-89753009

Δ 通讯作者:唐翎, E-mail: tangling82@126.com, 电话:0731-84327455

(收稿日期:2022-05-30 接受日期:2022-06-23)

是 PDAC 个体化检测的必要条件。

1 材料与方法

1.1 组织样本预处理

胰腺癌及癌旁组织为本单位行胰腺癌外科根治手术切除组织。临床标本的采集经患者同意并签署知情同意书,并经医院伦理委员会论证通过。切下的组织经冰预冷的生理盐水 (DEPC 处理水配制,含 RNase 抑制剂)清洗,并区分癌组织及癌旁组织 (距癌组织旁 5 cm)。在生理盐水中将组织剪成小块后,放入冻存管中并在液氮中保存。

1.2 RNA 提取

将冻存的组织分别放在用液氮预冷过的碾钵 (RNase-free)中,用杵子碾磨成粉末状。加入 1 mL 的 Trizol 试剂 (Thermo Fisher 公司),充分裂解后加入 200 μ L 氯仿,振荡器上剧烈振荡 15 s。离心后将 400 μ L 上清液转移至新的离心管中,加入等体积异丙醇。混匀后于 -20 $^{\circ}$ C 冻存 2 h 后。经 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm 离心 15 min,经 70 %乙醇清洗沉淀后,加入适量 DEPC 处理水溶解。

1.3 琼脂糖凝胶电泳

在紫外分光光度计下检测提取 RNA 样品的浓度。适当稀释后去 500 ng 样品,在 1 %琼脂糖凝胶上,以 80 V 电压下进行

30 min 电泳。在凝胶成像仪上观察 RNA 样品的条带拖尾及亮度。以 28 s、18 s 及 5 s 条带的亮度比例作为 RNA 降解情况的初步评价。

1.4 RNA 完整性检测

利用 2100 生物分析仪 (Agilent 公司)检测 RNA 完整性。将 RNA 样品适度稀释后,按 RNA 6000 Nano 试剂盒说明书处理后,通过 Lab on a Chip 微流控技术进行 RNA 完整性分析。设置 RIN 阈值为 6。RIN>7 的 RNA 样品完整性良好,RIN<6 为严重降解。

1.5 mRNA 的逆转录反应

取 200 ng 的 RNA 样品作为逆转录模板,按照 RNA to cDNA EcoDry Premix 逆转录试剂盒 (Takara 公司)说明书进行操作,添加 oligo dT20 引物,反应条件为:98 $^{\circ}$ C, 15 s;42 $^{\circ}$ C, 30 min;4 $^{\circ}$ C 保存。将反应产物适当比例稀释后作为定量 PCR 的反应模板。

1.6 microRNA 的逆转录反应

取 100 ng 的 RNA 样品作为逆转录模板,按照 Prime-ScriptTM RT reagent Kit 逆转录试剂盒 (Takara 公司)说明书进行操作,添加微小 RNA (microRNA, miRNA)特异的茎环结构的引物 (表 1),反应条件为:98 $^{\circ}$ C, 15 s;42 $^{\circ}$ C, 30 min;4 $^{\circ}$ C 保存。将反应产物适当比例稀释后作为定量 PCR 的反应模板。

表 1 miRNA 特异的茎环结构引物序列

Table 1 The sequences of stem-loop primers for miRNA

Genes	Primer sequence (5'-3')
RNU6b	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAAAATAT
miR-16	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGCCAATA

1.7 定量 PCR 反应

按照 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Takara 公司)说明书进行操作,mRNA 检测的反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 5 s;60 $^{\circ}$ C, 30 s;

miRNA 检测的反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 5 s;58 $^{\circ}$ C, 10 s;72 $^{\circ}$ C, 10 s。设置循环数 40。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算样本间相对表达水平。引物序列见表 2。

表 2 定量 PCR 引物序列

Table 2 The sequences of primers for real-time PCR

Genes	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward:AGCCACATCGCTCAGACAC
	Reverse:GCCCAATACGACCAAATCC
β -actin	Forward:CTCCATCCTGGCCTCGCTGT
	Reverse:GCTGTCACCTTCACCGTTCC
GUSB	Forward:GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
	Reverse:CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
RNU6b	Forward:GCAAGGATGACACGCAAATTC
	Reverse:CTCAACTGGTGTCTGGAGT
miR-16	Forward:ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACGTAATA
	Reverse:CTCAACTGGTGTCTGGAGT

1.8 统计学分析

所有数据利用 SPSS 22.0 进行统计分析,以 Shapiro-Wilk 检验分析数据是否符合正态分布,两组间数据分别以 t 检验 (正态分布)和 Mann-Whitney U 检验 (非正态分布)分析统计学差异。 $P<0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 胰腺癌及癌旁组织总 RNA 的凝胶电泳鉴定

优化提取方法后,总 RNA 的提取量比常规方法明显增加。经 1 %琼脂糖凝胶电泳 (图 1),胰腺癌及癌旁组织总 RNA 在

28 s、18 s 和 5 s 条带较常规提取方法明显清晰，亮度梯度变化符合其分子量规律。

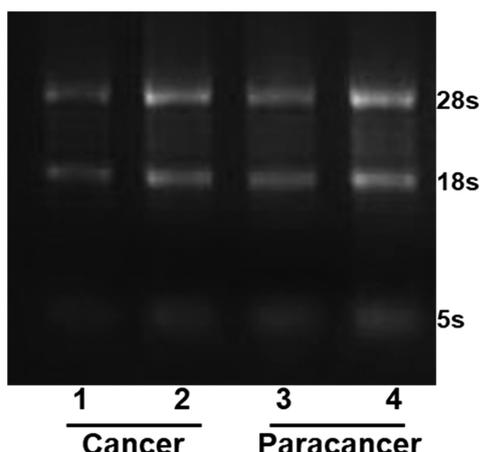


图 1 胰腺癌及癌旁组织 RNA 样品的琼脂糖凝胶电泳
注:1、3 为常规方法,2、4 为优化方法

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA samples from pancreatic cancer and adjacent tissues

Note: Lane 1 and 3 were conventional method, and Lane 2 and 4 were optimized method.

2.2 胰腺癌及癌旁组织总 RNA 的完整性鉴定

经 2100 生物分析仪系统鉴定,优化方法提取的总 RNA 完整性良好,RIN 值均大于 7,而常规方法提取的方法 RIN 值低于 6(图 2)。

2.3 胰腺癌及癌旁组织中的 mRNA 表达的检测

在相同 RNA 逆转录模板(200 ng)的条件下,胰腺癌组织 RNA 样品中 GAPDH、 β -actin 等基因的表达在常规方法和优化方法间无明显差异(图 3A)。但在癌旁组织 RNA 样品中,优化方法提取的 RNA 样品中各基因的表达均显著高于常规方法(图 3B)。在同一方法提取的 RNA 样品中各基因在胰腺癌组织中的表达均明显高于癌旁组织(图 3C-3D)。

2.4 胰腺癌及癌旁组织中的 miRNA 表达的检测

在相同 RNA 逆转录模板(500 ng)的条件下,胰腺癌及癌旁组织 RNA 样品中 RNU6b 及 miR-16 的表达在常规方法和

优化方法间无明显差异(图 3A-3B);且在同一方法提取的 RNA 样品中,各基因在胰腺癌组织与癌旁组织中的表达均无明显差异(图 3C-3D)。

3 讨论

胰腺作为人体内最富酶活力的组织,从其中分离出完整的 RNA 是进行分子机制研究的前提^[11]。研究证实胰腺的 RNase A 的含量很高,并存在于各种胰腺分泌的多种微粒中,造成组织处理过程中 RNA 不同程度的降解^[12,13]。目前商品化 trizol 试剂是最常用的 RNA 提取试剂,但即使结合使用 RNase 抑制剂和低温均质化,胰腺组织的 RNA 提取也会遇到各种不可控结果。在小鼠等实验动物的胰腺 RNA 提取中,使用原位导管灌注 RNase 抑制剂的方法对组织进行预处理,可提高 RNA 的完整性^[14]。在手术切除胰腺癌组织后,我们用 RNase 抑制剂的生理盐水进行预处理,并在低温下将组织剪成小块,以便于 RNase 抑制剂快速浸润至组织内部,达到防止 RNA 降解的目的。

定量 PCR 是检测基因差异表达的常规方法,一般分为绝对定量和相对定量的分析方式。绝对定量的 PCR 检测是以等量 RNA 模板为标准,相对定量的 PCR 检测在等量 RNA 作为逆转录模板的基础上,还结合管家基因的表达作为标准^[15,16]。因此无论何种方式的分析,RNA 的完整性都会影响分析结果的准确性。我们的结果显示,由于样本 RNA 完整性的差异,管家基因的表达水平就存在一定程度的偏差。常规方法和优化方法提取的胰腺癌组织 RNA 的 RIN 值明显高于癌旁组织,管家基因的表达量明显高于癌旁组织,提示癌变组织的内部结构和功能已改变。

为了处理对定量 PCR 检测性能的不利影响,在数据分析中应用适当的标准化处理也非常重要^[17,18]。利用 PCR 内参的标准化可以降低 RNA 质量对定量 PCR 性能的影响。对于 mRNA,一般使用 GAPDH、 β -actin、 α -tubulin 和 GUSB 等管家基因作为 PCR 检测的内参^[19,20]。常规方法提取的胰腺癌及癌旁组织 RNA 样品间存在降解程度的不一致,造成管家基因的表达水平也不同,使用内参之后可能使检测结果的偏差更大。而在优化 RNA 纯化方法后,样本间的 RNA 降解程度明显降低,管家基因在组织间的表达也相对一致。

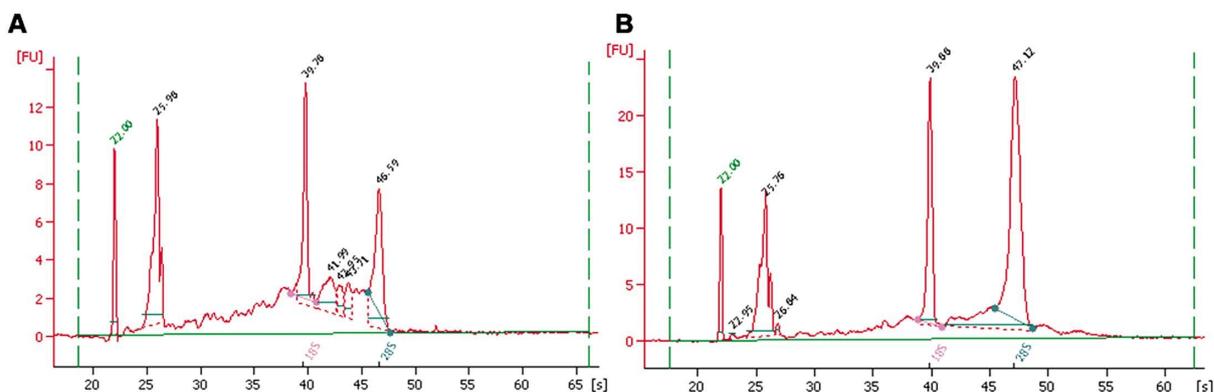


图 2 胰腺癌及癌旁组织总 RNA 的完整性分析
注:A 常规方法,B 优化方法

Fig. 2 RNA integrity analysis of samples from pancreatic cancer and adjacent tissues

Note: A conventional method, B optimized method.

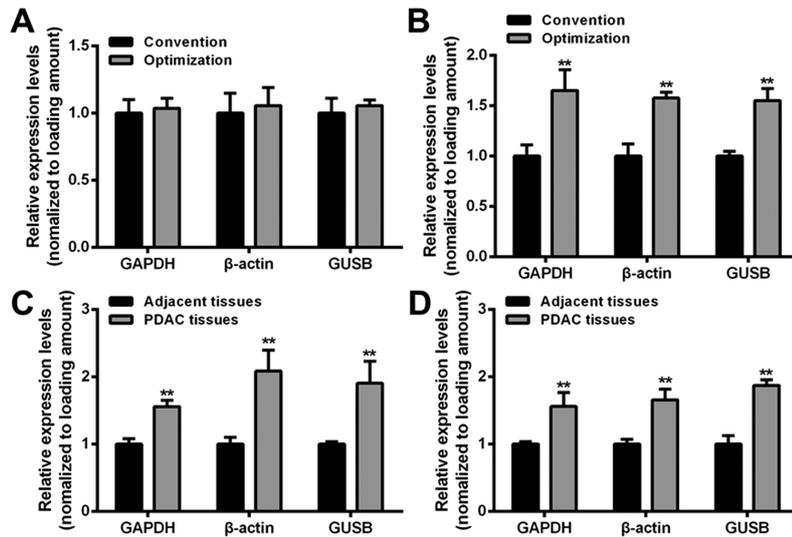


图3 胰腺癌及癌旁组织中 mRNA 相关内参基因的检测

注:A 胰腺癌组织, B 癌旁组织, C 常规方法, D 优化方法

Fig. 3 Detection of mRNA expression in pancreatic cancer and adjacent tissues

Note: A pancreatic cancer tissues, B adjacent tissues, C conventional method, D optimized method.

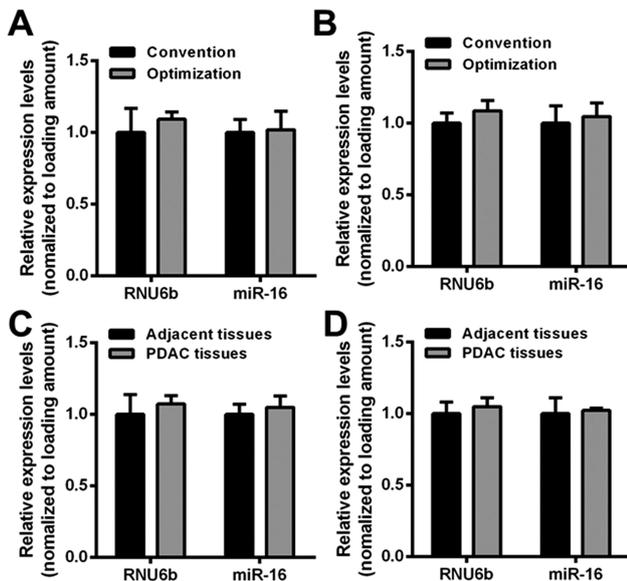


图4 胰腺癌及癌旁组织中 miRNA 相的检测

注:A 胰腺癌组织, B 癌旁组织, C 常规方法, D 优化方法

Fig. 4 Detection of miRNA expression in pancreatic cancer and adjacent tissues

Note: A pancreatic cancer tissues, B adjacent tissues, C conventional method, D optimized method.

MiRNA 是近年来研究较为广泛的 22 nt 左右的非编码 RNA, 在胰腺癌的发病机制研究中具有重要的地位^[21,22]。作为具有调控作用的一类 RNA 分子, miRNA 表达水平的检测是筛选并探索其功能的首要工作。miRNA 的降解不依赖于常规的 RNA 降解酶, 而是以泛素连接酶介导的靶向衰变的方式进行降解的^[23,24]。因此 miRNA 相对降解程度都较低。我们的检测结果也显示常规方法以及优化方法提取的 RNA 样品中 miRNA 的表达水平均无明显差异, 提示其未出现降解。

对于 miRNA 表达检测的标准化还没有普遍的指南, 不同类型组织中的检测标准存在一定的差异。目前, 内源性的核小

RNA(U6 等)、某些 "参考 miRNA"(具备组织特异性高表达特点) 是 miRNA 检测最常用的内参基因, 但有的研究也使用 GAPDH 等管家基因作为 miRNA 检测的内参基因^[25-27]。从我们的结果分析, 管家基因与 miRNA 的降解效率程度不同, 在胰腺等富含降解酶的组织 RNA 检测中, 不能作为 PCR 的内参基因使用。在芯片或定量 PCR- 微阵列等高通量实验, 使用平均表达值或稳定的内源性 miRNA 进行归一化, 可以减少定量 PCR 检测中的技术差异^[28,29]。相较于 mRNA 的检测, miRNA 的标准化对样本 RNA 的质量要求更敏感。尽管可以进行检测数据标准化, 但对于几乎全部 miRNA 和组织样本来说, RNA 的 RIN 值与相对表达量的相关性仍然存在^[30]。

总之, 我们从胰腺及癌组织中提取了相对高质量的 RNA 样品。针对富含 RNase 的组织 RNA 的纯化, 在组织分离阶段应重视 RNase 的去除及抑制, 使用 DEPC 处理的生理盐水可清洗掉组织间隙的 RNase; RNase 抑制剂的使用可进一步抑制 RNase 的活性; 组织块前期剪碎有益于预处理试剂的浸润。这种研究方法的使用将为胰腺相关疾病的分子机制探索提供重要的条件。

参考文献 (References)

- [1] Bianchini M, Giambelluca M, Scavuzzo MC, et al. In Pancreatic Adenocarcinoma Alpha-Synuclein Increases and Marks Peri-Neural Infiltration[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3775
- [2] Makinen L, Vaha-Koskela M, Juusola M, et al. Pancreatic Cancer Organoids in the Field of Precision Medicine: A Review of Literature and Experience on Drug Sensitivity Testing with Multiple Readouts and Synergy Scoring[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(3): 525
- [3] Shichi Y, Gomi F, Sasaki N, et al. Epithelial and Mesenchymal Features of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines in Two- and Three-Dimensional Cultures[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(5): 746
- [4] Sally A, McGowan R, Finn K, et al. Current and Future Therapies for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(10): 2417

- [5] Tarannum M, Vivero-Escoto JL. Nanoparticle-based therapeutic strategies targeting major clinical challenges in pancreatic cancer treatment[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 114:357
- [6] Yoneda A, Minomi K, Tamura Y. Heat shock protein 47 confers chemoresistance on pancreatic cancer cells by interacting with calreticulin and IRE1 α [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(7): 2803-2820
- [7] Lumibao JC, Tremblay JR, Hsu J, et al. Altered glycosylation in pancreatic cancer and beyond [J]. *J Exp Med*, 2022, 219 (6): e20211505
- [8] Carmona-Carmona CA, Dalla Pozza E, Ambrosini G, et al. Divergent Roles of Mitochondria Dynamics in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(9): 2155
- [9] McCubrey JA, Meher AK, Akula SM, et al. Wild type and gain of function mutant TP53 can regulate the sensitivity of pancreatic cancer cells to chemotherapeutic drugs, EGFR/Ras/Raf/MEK, and PI3K/mTORC1/GSK-3 pathway inhibitors, nutraceuticals and alter metabolic properties[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(8): 3365-3386
- [10] Malvi D, Vasuri F, Maloberti T, et al. Molecular Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using a Next-Generation Sequencing Custom-Designed Multigene Panel [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(5): 1058
- [11] Borrello MT, Martin MB, Pin CL. The unfolded protein response: An emerging therapeutic target for pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Pancreatology*, 2022, 22(1): 148-159
- [12] Tang X, Ren H, Guo M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 910-928
- [13] Shankar S, Tien JC, Siebenaler RF, et al. An essential role for Argonaute 2 in EGFR-KRAS signaling in pancreatic cancer development[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2817
- [14] Thompson KL, Pine PS, Rosenzweig BA, et al. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA[J]. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 57
- [15] Zheng D, Huang X, Peng J, et al. CircMYOF triggers progression and facilitates glycolysis via the VEGFA/PI3K/AKT axis by absorbing miR-4739 in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 362
- [16] Yin J, Yan J, Hou L, et al. Identification and functional deciphering suggested the regulatory roles of long intergenic ncRNAs (lincRNAs) in increasing grafting pepper resistance to *Phytophthora capsici* [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 868
- [17] Fleige S, Walf V, Huch S, et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR[J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(19): 1601-1613
- [18] Lv Y, Li S, Li Z, et al. Quantitative analysis of noncoding RNA from paired fresh and formalin-fixed paraffin-embedded brain tissues [J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134(3): 873-884
- [19] Rochow H, Franz A, Jung M, et al. Instability of circular RNAs in clinical tissue samples impairs their reliable expression analysis using RT-qPCR: from the myth of their advantage as biomarkers to reality [J]. *Theranostics*, 2020, 10(20): 9268-9279
- [20] Heumuller-Klug S, Sticht C, Kaiser K, et al. Degradation of intestinal mRNA: a matter of treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(12): 3499-3508
- [21] Gaal Z. Implication of microRNAs in Carcinogenesis with Emphasis on Hematological Malignancies and Clinical Translation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5838
- [22] Kt RD, Karthick D, Saravananaraj KS, et al. The Roles of MicroRNA in Pancreatic Cancer Progression[J]. *Cancer Invest*, 2022: 1-10
- [23] Shi CY, Kingston ER, Kleaveland B, et al. The ZSWIM8 ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA degradation [J]. *Science*, 2020, 370(6523): eabc9359
- [24] Han J, LaVigne CA, Jones BT, et al T. A ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA decay independently of tailing and trimming[J]. *Science*, 2020, 370(6523): eabc9546
- [25] Kroupova A, Ackle F, Asanovic I, et al. Molecular architecture of the human tRNA ligase complex[J]. *Elife*, 2021, 10: e71656
- [26] Liang K, Yao L, Wang S, et al. miR-125a-5p increases cellular DNA damage of aging males and perturbs stage-specific embryo development via Rbm38-p53 signaling [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(12): e13508
- [27] Peskoe SB, Barber JR, Zheng Q, et al. Differential long-term stability of microRNAs and RNU6B snRNA in 12-20 year old archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 32
- [28] Kumar V, Gupta S, Varma K, et al. Diagnostic performance of microRNA-34a, let-7f and microRNA-31 in epithelial ovarian cancer prediction[J]. *J Gynecol Oncol*, 2022 [Online ahead of print]
- [29] Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(6): R64
- [30] Parrella P, Barbano R, Pasculli B, et al. Evaluation of microRNA-10b prognostic significance in a prospective cohort of breast cancer patients[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 142