

不同取样和提取方法对甲状腺结节细针穿刺标本提取 RNA 检测目的基因的影响

张于芝,吕颖钺,陈欢欢,崔岱,刘晓云,王知笑,段宇,杨涛,武晓泓*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:比较不同取样和提取方法对甲状腺结节细针穿刺(fine needle aspiration, FNA)标本提取 RNA 检测目的基因结果的影响。方法:以单独穿刺与穿刺针冲洗液 2 种方式收取 FNA 标本,以 TRIzol 法和 Qiagen 法 2 种方法提取 RNA,利用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测甲状腺细胞相关基因,比较不同方法对 RNA 质与量及 RT-PCR 结果的影响。结果:102 例 FNA 标本均提取了 RNA,RT-PCR 结果显示,GAPDH 的检出率达 97.06%,TG 为 93.14%,其余依次为 TPO、TSHr、NIS。在单独穿刺样本中,TRIzol 法提取的 RNA 浓度及总量均大于 Qiagen 法,但差异未达统计学意义($P > 0.05$)。2 种方法所提取 RNA 的吸光度值及 PCR 成功率也无统计学差异($P > 0.05$)。在冲洗液标本中亦未发现 Qiagen 法与 TRIzol 法在 RNA 浓度、总量、吸光度值及 PCR 成功率之间有显著差异($P > 0.05$)。在 TRIzol 组中,单独穿刺与穿刺针冲洗液 2 种取样方式对其 RNA 浓度、RNA 总量、吸光度值以及 PCR 成功率的影响均无统计学意义($P > 0.05$)。在 Qiagen 组中,不同取样方式对其 RNA 浓度、RNA 总量、OD 值以及 PCR 成功率的影响亦无统计学意义($P > 0.05$)。结论:FNA 标本可以成功提取 RNA 并进行基因检测。单独穿刺、穿刺针冲洗液 2 种取样方式以及 TRIzol 法、Qiagen 法 2 种 RNA 提取方法均可用于 FNA 标本 RNA 的提取。

[关键词] 甲状腺结节;甲状腺细针穿刺;RNA 提取;RT-PCR;基因检测

[中图分类号] R581.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1667-04

doi:10.7655/NYDXBNS20141209

Effects of different sample collection methods and RNA extraction methods from thyroid fine needle aspiration samples on target gene detection

Zhang Yuzhi, Lü Yingyue, Chen Huanhuan, Cui Dai, Liu Xiaoyun, Wang Zhixiao, Duan Yu, Yang Tao, Wu Xiaohong*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the impacts of different sample collection methods and RNA extraction methods from thyroid fine needle aspiration samples on the results of target gene detection. **Methods:** Trizol and RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) were used to extract RNA from thyroid FNA samples obtained from a separate puncture or leftover material in the needle; the thyrocyte-relevant genes were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction; and the influence of different sample types and RNA extraction methods on RNA quality, quantity and RT-PCR outcome was analyzed. **Results:** RNA was isolated from 102 FNA samples, the RT-PCR results showed that the positive detection rate of GAPDH and TG were 97.06% and 93.14% respectively, followed by TPO, TSHr, and NIS. The concentration and quantity of RNA extracted by Trizol were higher than that by RNeasy Plus Micro Kit in samples from a separate puncture, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The OD ratio of RNA extracted by the two methods had no significant difference, so as the success rate of RT-PCR ($P > 0.05$). In samples obtained from leftover material in the needle, no significant differences were found in RNA concentration, quantity, OD ratio and success rate of RT-PCR between the two RNA extraction methods ($P > 0.05$). In the group that RNA was extracted by Trizol, there were no significant correlation between sample collection methods and RNA concentration, quantity, OD ratio or success rate of RT-PCR ($P > 0.05$). The same results were observed in the group that RNA was extracted by RNeasy Plus Micro Kit, different sample collection methods had no significant

[基金项目] 江苏省“兴卫工程”医学重点人才项目(RC2011068)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: drxhwu@njmu.edu.cn

impact on RNA concentration, quantity, OD ratio and success rate of RT-PCR ($P > 0.05$). **Conclusion:** RNA can be successfully isolated from FNA samples to detect genes. Samples from a separate puncture or leftover material and RNA extraction methods of Trizol or Qiagen can all be used in RNA extraction from thyroid FNA samples.

[Key words] thyroid nodule; fine needle aspiration; RNA extraction; RT-PCR; gene detection

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12):1667-1670, 1676]

甲状腺结节是一种常见的内分泌疾病, 一般人群中触诊发现率为3%~7%, 而超声筛查的发现率高达20%~76%^[1]。其良恶性病变的鉴别诊断是确定个体化治疗方案的核心。近年来, 随着高分辨率超声、超声弹性成像技术及超声造影的出现, 显著提高了甲状腺结节良恶性鉴别诊断的水平^[2]。然而甲状腺细针穿刺细胞学 (fine needle aspiration cytology, FNAC) 检查仍是目前敏感性最高的一种诊断方法。最近, 一项基于甲状腺细胞病理学 Bethesda 报告系统的荟萃分析显示, FNAC 诊断的敏感性、特异性及诊断准确率分别为97.0%、50.7%和68.8%^[3]。但其尚存在结果不确定以及无法区分滤泡性癌和滤泡性腺瘤的缺陷。近年来分子生物学技术的提高使得微量标本的分子诊断取得突破。FNAC 联合分子诊断正逐步走向临床^[4]。本研究旨在建立从甲状腺细针穿刺标本中提取 RNA 的方法, 比较不同取样方式及 RNA 提取方法对结果的影响, 并采用 RT-PCR 的方法检测甲状腺细胞相关基因, 为分子诊断奠定基础。

1 对象和方法

1.1 对象

利用随机数表法, 随机选取本院内分泌科行超声引导下甲状腺细针穿刺(FNA)检查的甲状腺结节病例102例。单独穿刺标本共50例, 其中采用 TRIzol、Qiagen 法提取 RNA 的各25例; 冲洗液标本(即在完成常规细胞学涂片后, 将穿刺针在相应的细胞裂解液中冲洗所得样本)共52例, 其中采用 TRIzol、Qiagen 法提取 RNA 的分别为27、25例。穿刺由专人完成, 使用25G的细针, 每个结节穿刺1~2针, 每针在结节内朝多个方向穿刺3~5次。穿刺完成后将穿刺针在相应的细胞裂解液中冲洗, 所得标本置于-80℃冰箱中保存, 以备 RNA 提取。

GeneAmp® PCR System 9700 与 ABI StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国), Nanodrop® ND-2000 分光光度计 (NanoDrop 公司, 美国), Gel Doc™ EZ Imager 凝胶成像系统 (Bio-Rad

公司, 美国)。TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen 公司, 美国), 5xPrime Script RT Master Mix (TaKaRa 公司, 日本), FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂提取 52 例标本的 RNA (简称 TRIzol 法), 步骤参照说明书, 最终得到 RNA 20 μl/例。采用 RNeasy Plus Micro Kit 提取 50 例标本的 RNA (简称 Qiagen 法), 步骤参照说明书, 最终得到 RNA 12 μl/例。所提取的 RNA 浓度和纯度用 Nanodrop® ND-2000 分光光度计来检测。

1.2.2 cDNA 合成

合成 cDNA 所需逆转录酶和引物使用了 5x Prime Script RT Master Mix, 采用 GeneAmp® PCR System 9700 进行逆转录, 37℃反应 15 min, 85℃放置 5 s 后终止反应, 4℃冷却。cDNA 产物存放在-20℃冰箱中。

1.2.3 实时定量 PCR

采用实时定量 PCR (real-time PCR) 方法对每个样本甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、甲状腺球蛋白 (TG)、甲状腺过氧化物酶 (TPO)、钠碘转运体 (NIS)、促甲状腺素受体 (TSHr) 5 个基因进行扩增。基因引物由上海生工公司设计并合成, 引物序列见表 1。采用 ABI StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪。反应体系 10 μl, 反应条件 95℃ 10 min 预变性, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。所有试验均重复 3 次以上。

1.2.4 凝胶电泳

将经过扩增后的基因产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴乙锭染色, 在 Gel Doc™ EZ Imager 凝胶成像系统中观察并记录图像结果。

1.3 统计学方法

利用 SPSS13.0 整理分析数据。连续变量用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 分类变量用率或比描述。两样本均数采用 *t* 检验, 两组间成功率采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 反应所需引物

Table 1 The primers for PCR

目的基因	引物序列
GAPDH	Forward 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'
	Reverse 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'
TG	Forward 5'-AGACACCTCCTACCTCCCTCA-3'
	Reverse 5'-TCCTTGGACATCGCTTTGGC-3'
TPO	Forward 5'-AAACACTTGCCTGGCGAACA-3'
	Reverse 5'-GCTGACTGAAGCCGTCCTCATA-3'
NIS	Forward 5'-TGTCACCGGAATTATCTGCAC-3'
	Reverse 5'-CAGAAGCCACTTAGCATCACCA-3'
TSHr	Forward 5'-CTGCAGCAGCTGGAATCACAC-3'
	Reverse 5'-TGGAAATAAAGTTGGTCAGGTCAGG-3'

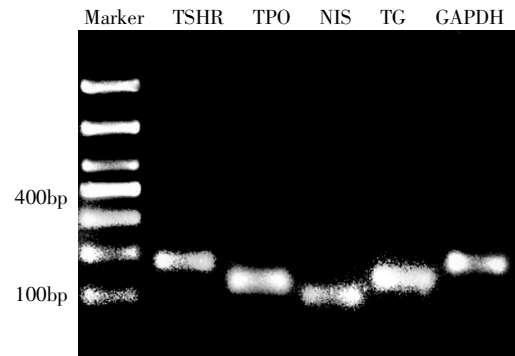


图 1 甲状腺基因的凝胶电泳图

Figure 1 The electrophoresis result of thyroid genes

2 结果

2.1 RT-PCR 结果及其与细胞病理学关系

102 例 FNA 标本均提取了 RNA, 经过 RT-PCR 后 5 个目的基因的 PCR 熔解曲线均为单峰曲线。其 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳可得到清晰的单一条带(图 1)。在所有标本中, GAPDH 的检出率最高, 为 97.06%, 而甲状腺特异性基因的检出率各异, 其中最高的为 TG(93.14%), 其余依次为 TPO(84.31%)、TSHr(82.35%)、NIS(59.80%), 其检出率与标本的病理类型有关。

102 例甲状腺结节的细胞涂片均由本院病理科基于甲状腺细胞病理学 Bethesda 报告系统给出诊断。其中无诊断价值 18 例, 良性 45 例, 意义不明确病变 9 例, 滤泡性肿瘤 7 例, 可疑恶性 18 例, 恶性 5 例。不同病理学类型标本其 RT-PCR 的成功率亦不同, 在无诊断价值及良性标本中, 其成功率分别为 77.78%、95.56%, 而在诊断为意义不明确、滤泡性肿瘤、可疑恶性及恶性标本中其成功率均为 100.00%, 差异无统计学意义($P = 0.117$, 表 2)。

2.2 TRIzol 与 Qiagen 两种 RNA 提取方法对 RT-PCR 结果的影响

按 FNA 标本的不同取样方式进行分层分析, 在单独穿刺样本中, TRIzol 法提取的 RNA 浓度及总量均大于 Qiagen 法, 但差异未达统计学意义, P 值分别为 0.145、0.074。两种方法所提取 RNA 的吸光度值亦无明显差别($P = 0.934$)。其 PCR 成功率也无统计学差异($P = 1.000$)。在冲洗液标本中亦未发现 Qiagen 法与 TRIzol 法在 RNA 浓度、总量、吸光度值及 PCR 成功率之间有显著差异, P 值分别为 0.424、0.256、0.790、1.000(表 3)。

2.3 单独穿刺与冲洗液两种取标本方式对 RT-PCR 结果的影响

按不同 RNA 提取方法进行分层分析, 在 TRIzol 组中, 不同取样方式对其 RNA 浓度、RNA 总量、吸光度值以及 PCR 成功率的影响均无统计学意义, P 值分别为 0.097、0.096、0.535、0.945; 在 Qiagen 组中, 不同取样方式对其 RNA 浓度、RNA 总量、吸光度值以及 PCR 成功率的影响亦无统计学意义, P 值分别为 0.074、0.179、0.643、1.000(表 3)。

表 2 不同病变组织 RT-PCR 成功率的差异

Table 2 The differences of the success rate of RT-PCR in different lesions

细胞病理学诊断	无诊断价值	良性	意义不明确病变	滤泡性肿瘤	可疑恶性	恶性
例数	18	45	9	7	18	5
RT-PCR 成功率(%)	77.78	95.56	100.00	100.00	100.00	100.00

表 3 不同取样方式和 RNA 提取方法对 RT-PCR 的影响

Table 3 The impact of different methods of sample collection and RNA extraction on RT-PCR results

取样方式	RNA 提取方法	RNA 浓度(ng/ μ l)	吸光度比值(260 nm/280 nm)	RNA 总量(ng)	RT-PCR 成功率(%)
单独穿刺	TRIzol	28.10 \pm 44.05	1.87 \pm 0.26	562.00 \pm 880.96	95.24(24/25)
	Qiagen	13.10 \pm 11.59	1.88 \pm 0.26	194.11 \pm 173.34	95.24(24/25)
冲洗液	TRIzol	9.86 \pm 15.89	1.80 \pm 0.23	196.54 \pm 306.31	90.00(25/27)
	Qiagen	7.83 \pm 5.83	1.84 \pm 0.24	130.78 \pm 115.93	90.00(23/25)

3 讨论

2010年美国修订版的《ATA 甲状腺结节与分化型甲状腺癌治疗指南》建议对于 FNAC 检测无法确定的患者采用分子标志物诊断^[5]。为此,开始摸索建立从甲状腺细针穿刺标本中提取 RNA 的方法。本研究发现单独穿刺、穿刺针冲洗液 2 种标本以及 TRIzol 法、Qiagen 法 2 种 RNA 提取方法均适用于 RNA 的提取,且不同的方法对 RT-PCR 的结果均无明显影响。

近年来,有学者采用 RT-PCR 技术对 FNA 标本进行基因分析,用于辅助诊断^[6]。这些研究在取 FNA 标本时,采用了穿刺针冲洗液标本和单独穿刺两种方式。研究显示,在不影响常规涂片细胞学检查的前提下,可以利用穿刺针冲洗液标本进行基因分析^[7]。但 Samija 等^[8]发现,利用冲洗液标本进行 RT-PCR 检测甲状腺特异性基因的失败概率明显大于单独穿刺标本。本研究发现,单独穿刺样本的 RNA 浓度与总量均高于冲洗液样本,但由于其离散程度较大,差异尚未达到统计学差异。这种现象可能与穿刺技术、甲状腺结节的性质以及标本中掺杂的红细胞的影响有关。利用所提取的 RNA 进行 RT-PCR 检测甲状腺特异性基因的成功率两组无明显差异。因此,单独穿刺与穿刺针冲洗液这 2 种标本均可以用于 FNA 的分子检测。

目前提取 RNA 的方法诸多,不同组织细胞各有不同。Winzer 等^[9]发现,对于甲状腺 FNA 样本,不同的 RNA 提取方法对 RT-PCR 的结果有很大影响。本研究比较了 TRIzol 法与 Qiagen 法 2 种最为常用的 RNA 提取方法。TRIzol 法为酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿 RNA 提取方法,在提取过程中 RNA 以沉淀的形式析出,对 RNA 的片段大小和浓度要求比较高,而 Qiagen 法属于柱式离心分离技术,适用于浓度较低及成分单一样本的 RNA 提取^[10]。本研究发现,无论是单独穿刺样本还是冲洗液样本,不同的 RNA 提取方式对 RNA 浓度、纯度、RNA 总量以及 RT-PCR 成功率的影响均无统计学意义。但是, Qiagen 法提取的 RNA 总量的离散度明显低于 TRIzol 法,提取 RNA 的量相对稳定。

为了验证所提 FNA 标本 RNA 的质量,本研究通过 RT-PCR 检测甲状腺特异性基因的表达。结果显示,所取样本的 RT-PCR 成功率为 94.12%,与文献报道接近^[7-8]。在所有 102 个样本中,有 99 个样本可以检测出 GAPDH。3 个 GAPDH 未检出的样本,

甲状腺特异性基因亦未检测出,且其均为冲洗液标本,与提取 RNA 方法无明显相关性。甲状腺特异性基因在 96 个样本中检测到,有 3 个样本仅检测到 GAPDH 而无甲状腺特异性基因。在 6 例 RT-PCR 失败的标本中,4 例病理诊断为无诊断价值标本,镜下仅可见嗜酸细胞、血细胞、巨噬细胞或胶质等。另有 2 例为良性病变,标本均来自冲洗液,其失败的原因可能与标本中所含甲状腺滤泡上皮细胞数较少有关。值得注意的是,在无诊断价值标本中仍有 77.78% 的标本成功进行了 RT-PCR,且在意义不明确的不典型病变中所有 6 例标本 RT-PCR 均成功,提示这些标本虽然不能提供细胞学诊断,但仍能进行分子学检测以辅助诊断。

此外,本研究发现每个甲状腺特异性基因的检出率各不相同, TG 检出率最高,为 93.14%,其次为 TPO、TSHr、NIS。此结果与国外报道相符^[9]。这与 TG、TPO、TSHr、NIS 4 种基因的表达丰度以及甲状腺结节病变组织的病理类型、分化程度均有重要关系^[11]。TG 在甲状腺组织中表达最丰富,故在甲状腺的分子研究中,多以 TG 为阳性对照。然而本研究在 RT-PCR 成功的样本中,有 1 例病理诊断为无诊断价值的标本,其 TG 检测为阴性,而 TSHr 阳性。这说明在某些病理类型的甲状腺结节中, TG 的表达量很少,甚至无表达,这时需要紧密结合细胞学检测明确诊断^[12]。

[参考文献]

- [1] Gharib H, Papini E, Paschke R, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules [J]. *Endocr Pract*, 2010, 16(Suppl 1):1-43
- [2] 巩海燕, 林红军, 叶新华, 等. 实时组织弹性成像鉴别诊断甲状腺实性结节的价值[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(8):1131-1135
- [3] Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: A meta-analysis[J]. *Acta Cytologica*, 2012, 56(4):333-339
- [4] Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer [J]. *The Lancet*, 2013, 381(9871):1058-1069
- [5] Cooper D, Doherty G, Haugen B, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2009, 19(11):1167-1214