

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.12.1375

• 技术方法 •

胰腺癌石蜡包埋组织中微RNA原位杂交检测技术的优化

倪晨明¹, 倪灿荣², 金钢^{1*}, 焦莉娟², 李连峰², 郑建明^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院胰腺外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 对采用原位杂交检测 10% 中性甲醛溶液固定的石蜡包埋 (FFPE) 胰腺癌组织切片中微 RNA (miR) 的方法进行技术优化, 以提高 miR 的阳性检出率。**方法** 将 20 例胰腺癌组织标本构建成组织芯片, 使用锁核酸 (LNA) 标记的探针和显色原位杂交技术检测 miR-21 和 miR-34a 的表达。杂交温度分别设为 48 °C、53 °C、56 °C, 杂交后采用 3 种不同的洗涤条件 (温度、时间和 3 种不同洗涤缓冲液) 进行杂交条件优化。将 126 例胰腺癌组织标本制成组织芯片, 采用优化的显色原位杂交技术检测 miR-21 和 miR-34a 的表达。**结果** miR-21 探针最佳杂交条件为杂交温度 53 °C 下杂交 6 h, 使用洗涤缓冲液 III 在 65 °C 下洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min; miR-34a 探针最佳杂交条件为杂交温度 53 °C 下杂交 6 h, 使用洗涤缓冲液 III 分别在 4 °C 和 65 °C 下洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min。在 126 例胰腺癌组织中, 84 例 (66.7%) miR-21 表达阳性, 77 例 (61.1%) miR-34a 表达阳性。**结论** 在 FFPE 胰腺癌组织切片中, miR-21 和 miR-34a 的最佳杂交温度均为 53 °C, 选择合适的杂交后洗涤温度和洗涤缓冲液有利于提高 miR 的阳性检出率。

[关键词] 原位杂交; 微 RNA; 组织微阵列; 胰腺肿瘤; 杂交温度

[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)12-1375-06

Optimization of *in situ* hybridization for detecting microRNA in paraffin-embedded pancreatic cancer tissue sections

NI Chen-ming¹, NI Can-rong², JIN Gang^{1*}, JIAO Li-juan², LI Lian-feng², ZHENG Jian-ming^{2*}

1. Department of Pancreatic Surgery, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To optimize *in situ* hybridization (ISH) method for microRNA (miR) detection in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) pancreatic cancer tissue sections, so as to improve the sensitivity of miR detection. **Methods** Tissue microarray (TMA) was constructed from 20 pancreatic cancer tissue specimens. Using locked nucleic acid (LNA) labeled probe, we examined the expression levels of miR-21 and miR-34a by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). The hybridization temperatures were set at 48, 53 and 56 °C, respectively. Three different washing approaches (temperature, time and 3 different washing buffers) were adopted to optimize the hybridization conditions. TMA was prepared using 126 pancreatic cancer tissue specimens, and optimal CISH was used to detect the expression levels of miR-21 and miR-34a. **Results** The optimal hybridization conditions of miR-21 probe were as follows: hybridization at 53 °C for 6 h, washing with washing buffer III at 65 °C for 6 min, and then washing with PBS for 1 min. The optimal hybridization conditions of miR-34a probe were as follows: hybridization at 53 °C for 6 h, washing with washing buffer III at 4 °C and 65 °C for 6 min, respectively, and then washing with PBS for 1 min. Of 126 pancreatic cancer tissue specimens, 84 (66.7%) had positive expression of miR-21, and 77 (61.1%) had positive expression of miR-34a. **Conclusion** The optimal hybridization temperatures of miR-21 and miR-34a are both 53 °C in the FFPE pancreatic cancer tissue sections, and appropriate washing temperature and washing buffer after hybridization are conducive to improve the positive detection rate of miR.

[Key words] *in situ* hybridization; microRNAs; tissue microarray; pancreatic neoplasms; hybridization temperature

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(12): 1375-1380]

[收稿日期] 2018-09-16 [接受日期] 2018-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81172077), 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2015ZB0202). Supported by National Natural Science Foundation of China (81172077) and Important Weak Subject Construction Project of Shanghai Health and Family Planning Commission (2015ZB0202).

[作者简介] 倪晨明, 硕士, 住院医师. E-mail: smmuhero@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31161628, E-mail: jingang@sohu.com; Tel: 021-31162257, E-mail: jmzheng1962@163.com

微 RNA (microRNA, miR) 在肿瘤的发生、发展和转移过程中发挥重要作用,有可能成为早期肿瘤的诊断指标和治疗靶点^[1-7]。胰腺癌是一种早期确诊率低、预后差的恶性肿瘤,若能发现胰腺癌的特异性 miR 标志物,对疾病的早期诊断、治疗和预后评估均具有重要意义。检测 miR 的方法有多种,除了实时荧光定量 PCR 外,还有原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 和基因芯片等方法^[1,2,8-13]。由于 ISH 方法结合形态、定位准确,而 10% 中性甲醛溶液固定的石蜡包埋 (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) 组织中 miR 保存较完整^[1,6],因此用 ISH 方法检测 FFPE 胰腺癌组织中 miR 具有一定的优势,但针对 FFPE 胰腺癌组织切片的 ISH 检测未见文献报道。

因 miR 序列长度仅 18~24 核苷酸单位 (nucleotide),标志物少、退火温度高,常导致杂交信号弱、信噪比差,用传统的 ISH 方法检测比较困难。本研究选择与胰腺癌关系密切的 miR-21 和 miR-34a^[10,14],使用锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 标记的探针,以显色原位杂交 (chromogenic *in situ* hybridization, CISH) 技术检测 miR-21 和 miR-34a 的表达,并对杂交温度和杂交后的洗涤条件进行优化设置,以提高 miR 的阳性检出率。

1 材料和方法

1.1 组织标本 选取 2013 至 2015 年在海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院胰腺外科手术切

除的胰腺癌组织标本 126 例。其中男 91 例,女 35 例;年龄为 32~75 岁,平均年龄 60.4 岁。纳入标准:(1)均为 10% FFPE 胰腺癌组织标本;(2)经病理学确诊为胰腺导管腺癌;(3)患者临床病理资料保存完整;(4)术前未行放射和化学治疗。排除标准:(1)合并其他原发性肿瘤;(2)临床病理资料不完整。其中 68 例病例具有配对的癌旁正常胰腺组织 (距癌组织边缘 >1.5 cm) 和癌旁的胰腺炎性增生病变组织。

1.2 胰腺癌组织芯片制作 将 FFPE 胰腺癌组织标本常规制成 H-E 切片,再根据 H-E 切片确定具有代表性的肿瘤部位及癌旁组织,应用商品化 Recipient Block 模块 (1.5 mm, 9×10; Quick-Ray) 和手工 Quick Ray 组织芯片制作枪 (韩国 UINTMA 公司) 制备组织芯片。另外制作 20 例小样本的胰腺癌组织芯片用于杂交条件优化。

1.3 试剂与耗材

1.3.1 探针 LNA 标记的 miR-21、miR-34a 和 scramble-miR (阴性对照) 探针均购自美国 Exiqon 公司 (表 1),浓度为 25 μmol/L,用 DEPC 处理水 1:10 稀释,终浓度为 2.5 μmol/L,取 1 μL 探针稀释到 1 000 μL 杂交缓冲液中。

1.3.2 杂交缓冲液 杂交缓冲液 I:溶解有 10% 硫酸葡聚糖的 4×柠檬酸钠缓冲液,专用于 miR-21 和阴性探针;杂交缓冲液 II:含 50% 去离子甲酰胺、10% 硫酸葡聚糖、80 mmol/L TE、0.6 mol/L NaCl 的 Denhardt 液,专用于 miR-34a 探针。

表 1 LNA 标记的 miR-21、miR-34a 和 scramble-miR 探针基本信息

Tab 1 Information of LNA-miR-21, miR-34a and scramble-miR probes

Probe	Product number	Lot number	LNA labeled probe sequence	Temperature $\theta/^\circ\text{C}$	Dilution
miR-21	38102-01	155426	5DigN/TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A	53	1:1 000
miR-34a	38851-01	155436	5DigN/AGG GCA GTA TAC TTG CTG ATT G	56	1:800
Scramble-miR	99004-01	151998	5DigN/GTG TAA CAC GTC TAT ACG CCC A	57	1:1 000

LNA: Locked nucleic acid; miR: MicroRNA

1.3.3 洗涤缓冲液 洗涤缓冲液 I:含 0.1% Tween-20 的柠檬酸钠缓冲液;洗涤缓冲液 II:含 0.1% Tween-20 的 2×柠檬酸钠缓冲液;洗涤缓冲液 III:含 0.1% Tween-20 的 4×柠檬酸钠缓冲液;0.01 mol/L PBS; TN 缓冲液:0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 mol/L NaCl; TNB 阻断缓冲液:

0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 mol/L NaCl、0.5% (质量体积分数) 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA); TNT 缓冲液:0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 mol/L NaCl、0.2% Triton X-100; 3% H₂O₂-磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)。

1.3.4 信号放大试剂 阻断剂(批号: S16-PK1)、鼠抗地高辛抗体(批号: S17-QB1)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多聚物(批号: S18-PL1)和 DAB/H₂O₂ 均购自德国 VytoVision 公司。

1.4 杂交条件优化 分别设置不同杂交温度和不同杂交后洗涤条件进行杂交条件优化。杂交温度: A1 为 48 °C, A2 为 53 °C, A3 为 56 °C。杂交后洗涤条件: B1 为 65 °C 下用洗涤缓冲液Ⅲ洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min; B2 为室温下分别用洗涤缓冲液 I、II、III 各洗涤 5 min, 再用 PBS 洗涤 1 min; B3 为用洗涤缓冲液Ⅲ分别在 4 °C 和 65 °C 下各洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min。

1.5 CISH 方法 将构建的胰腺癌组织芯片以 4 μm 厚度连续切片(50~100 片), 制成 ISH/免疫组织化学专用切片, 经蜡封后贮藏于 -40 °C 冰箱中备用。用时取出, 在 58~60 °C 烤箱烤片 4 h, 常规脱蜡至水, 将杂交 FFPE 切片浸入 0.01 mol/L pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中, 加热煮沸(96 °C) 8 min, 自然冷却 8 min, 加入蛋白酶 K(5 μg/mL, 溶于 0.02 mol/L pH 8.0 TE 缓冲液) 37 °C 孵育 10 min; 用 PBS 洗涤 5 min, 系列乙醇脱水、干燥后进行杂交。(1) 预杂交: 滴加不含探针的杂交缓冲液, 37 °C 预杂交 1 h。(2) 杂交: 不洗涤, 分别滴加含不同探针的杂交缓冲液, 加干净的合适盖玻片并用指甲油封边, 分别于 3 个不同温度(A1、A2、A3)的恒温箱内杂交 6 h。(3) 杂交后洗涤: 分别用 3 种洗涤方法(B1、B2、B3)进行洗涤。(4) IHC 信号放大检测: 用 3% H₂O₂-PBS 孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶, 用 TNB 阻断缓冲液和 PBST 各洗涤 5 min; 滴加鼠抗地高辛抗体, 室温下孵育 1 h, PBST 洗涤 5 min×2 次; 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 多聚物室温孵育 1 h, PBST 洗涤 5 min×2 次; DAB/H₂O₂ 显色 15~30 min, 流水冲洗, 苏木精衬染, 常规脱水透明封片。每组各设同步空白对照和 scramble-miR 阴性对照探针, scramble-miR 阴性对照探针杂交温度以理论计算和公司提供信息为准, 杂交温度设定为 57 °C。

1.6 结果判读标准^[11-12] 阳性定位以细胞核、细胞质为主, 大多数表达在细胞核内。判读采用染色强度和阳性细胞百分比二级计分法。染色强

度: 无着色计 0 分, 浅黄色计 1 分, 黄或深黄色计 2 分, 黄褐色或棕褐色计 3 分。阳性细胞占比: 无阳性细胞记 0 分, 阳性细胞占 1%~20% 记 1 分, 占 21%~45% 记 2 分, 占 46%~70% 记 3 分, >70% 记 4 分。最终评分为染色强度和阳性细胞占比得分乘积, 得分 ≤3 分判读为(-), >3 分判读为(+)。连续切片评分以实验片得分除以对照片得分得到的相对数值表示, 定义该相对数值 ≥0.75 的组织为高表达, <0.75 的组织为低表达。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数和百分数表示, 阳性强度的比较采用秩和检验(两两比较采用 Nemenyi 法)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 最佳杂交条件 由图 1 可见, miR-21 以细胞核中染色为主, 仅有少量在细胞质中表达; miR-21 在所有癌组织中大部分肿瘤细胞中表达, 而在周围基质中可见少量阳性表达; 同步实验中, 阴性对照和不含探针的空白对照均呈阴性表达。miR-34a 的 CISH 结果与 miR-21 相似。由图 1 和表 2 可见, miR-21 探针最佳杂交条件为 A2B1, 即杂交温度为 53 °C, 杂交后洗涤条件为 65 °C 下用洗涤缓冲液Ⅲ洗涤 6 min、再用 PBS 洗涤 1 min; miR-34a 探针最佳杂交条件为 A2B3, 即杂交温度为 53 °C, 杂交后洗涤条件为用洗涤缓冲液Ⅲ在 4 °C 和 65 °C 下各洗涤 6 min、再用 PBS 洗涤 1 min。

2.2 miR-21 和 miR-34a 在胰腺癌组织标本中的原位表达 在 126 例胰腺癌组织中, 84 例(66.7%) miR-21 呈阳性表达, 其中 70 例为低表达, 14 例为高表达; miR-21 在癌旁正常胰腺组织(8.8%, 6/68)和癌旁的胰腺炎性增生病变组织(26.5%, 18/68)中表达较少且均未见高表达, 与胰腺癌组织相比差异均有统计学意义(*P* 均 <0.01)。在 126 例胰腺癌组织中, 77 例(61.1%) miR-34a 呈阳性表达, 其中 65 例为低表达, 12 例为高表达; miR-34a 在癌旁正常胰腺组织(7.4%, 5/68)和癌旁的胰腺炎性增生病变组织(26.5%, 18/68)中表达较少且均未见高表达, 与胰腺癌组织相比差异均有统计学意义(*P* 均 <0.01)。

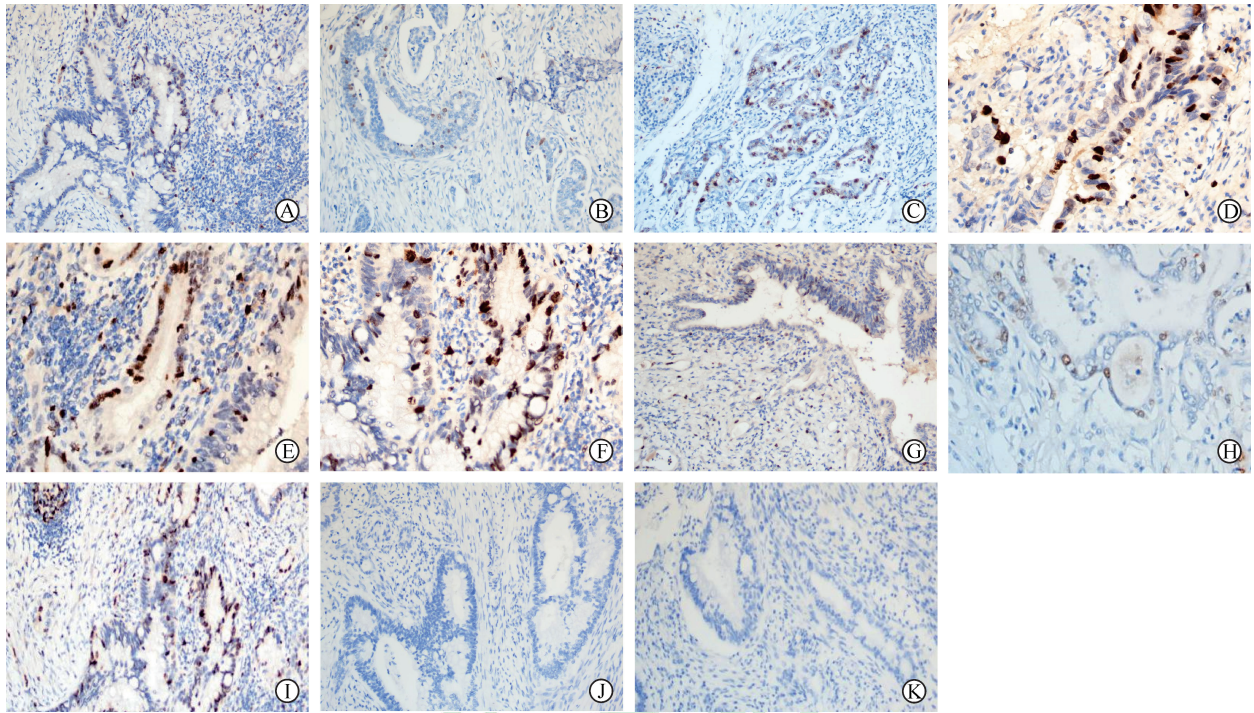


图 1 不同杂交条件下胰腺癌组织 FFPE 切片 miR-21 原位杂交结果

Fig 1 *In situ* hybridization results of miR-21 in FFPE pancreatic cancer tissue sections in different hybridization conditions

A-I: *In situ* hybridization showing miR-21 positive expression using LNA-miR-21 probe under conditions of A1B1, A1B2, A1B3, A2B1, A2B2, A2B3, A3B1, A3B2 and A3B3, respectively; J, K: MiR-21 negative expression in synchronous experiment using scramble-miR probe (J) and without miR probe (K). A1-A3: Hybridization temperature (A1: 48 °C; A2: 53 °C; A3: 56 °C); B1-B3: Hybridization washing conditions (B1: Washing using washing buffer III at 65 °C for 6 min, and PBS for 1 min; B2: Washing using washing buffer I, II and III at room temperature for 5 min, respectively, and PBS for 1 min; B3: Washing using washing buffer III at 4 °C and 65 °C for 6 min, respectively, and PBS for 1 min). FFPE: Formalin-fixed and paraffin-embedded; miR: MicroRNA; LNA: Locked nucleic acid. Original magnification: ×200

表 2 胰腺癌小样本组织芯片 miR-21、miR-34a 探针杂交条件的优化

Tab 2 Optimization of hybridization conditions of miR-21 and miR-34a probes in small sample pancreatic cancer tissue microarray

Pathologic diagnosis	A1B1	A1B2	A1B3	A2B1	A2B2	A2B3	A3B1	A3B2	A3B3
N=20									
hsa-miR-21									
Low expression <i>n</i>	3	3	6	4	12	11	4	3	7
High expression <i>n</i>	0	0	0	10	1	2	0	0	0
Positive expression rate <i>n</i> (%)	3 (15)	3 (15)	6 (30)	14 (70)	13 (65)	13 (65)	4 (20)	3 (15)	7 (35)
hsa-miR-34a									
Low expression <i>n</i>	4	4	6	6	6	3	3	3	7
High expression <i>n</i>	0	0	0	5	4	10	0	0	0
Positive expression rate <i>n</i> (%)	4 (20)	4 (20)	6 (30)	11 (55)	10 (50)	13 (65)	3 (15)	3 (15)	7 (35)

A1-A3: Hybridization temperature (A1: 48 °C; A2: 53 °C; A3: 56 °C); B1-B3: Hybridization washing conditions (B1: Washing using washing buffer III at 65 °C for 6 min, and PBS for 1 min; B2: Washing using washing buffer I, II and III at room temperature for 5 min, respectively, and PBS for 1 min; B3: Washing using washing buffer III at 4 °C and 65 °C for 6 min, respectively, and PBS for 1 min). miR: MicroRNA

3 讨论

ISH 是基因表达和基因功能分析的一个重要工

具, 而 FFPE 切片是回顾性研究的主要切片形式。影响 FFPE 切片 ISH 结果的技术因素很多, 例如固定、核酸与蛋白的分离 (酶消化与高温修复)、

探针上的标记量等, 但针对 miR 检测最重要的因素之一是选择最适的杂交温度和杂交后的洗涤条件^[2,7,15]。此外, 用传统的探针标记方法检测 miR 比较困难, 因标志物少、退火温度高等因素, 导致杂交信号弱、信噪比差。利用 LNA 标记 miR 可以很好地解决这些缺陷。这是因为 LNA 是一种经过修饰的 RNA, LNA 中一部分核糖上的 2' 氧原子可与核糖支架上的 4' 碳原子结合以锁住杂交体的两部分, 这样可以增加解链温度; 但是由于 LNA 探针产生复合体的稳定性与 miR 的互补性, 导致杂交信号下降、杂交背景增加, 因此在杂交过程中应设计严格的杂交温度和洗涤条件^[14-15]。

杂交温度的选择是 ISH 杂交成败的关键因素之一。教科书上推荐的 RNA 检测的杂交温度是 48 °C; 各 miR 探针因 GC 含量不同, 其理论推荐的杂交温度差异较大。从理论上分析, 若反应温度低于杂交温度 10~15 °C, 碱基顺序高度同源的互补链可形成稳定的双链, 错配碱基对减少; 若反应温度再低 (低于杂交温度 30 °C), 虽然互补链之间也可形成稳定的双链, 但互补碱基对减少, 错配碱基对增多, 氢链之间的结合更弱; 调整杂交温度可使它们之间的杂交率变化 10 倍, 因此在实验前必须首先确定杂交温度。

LNA 标记的 miR 探针因标记技术的改进, 其最佳的杂交温度是根据出厂时理论计算与杂交缓冲液中盐浓度推荐的杂交温度减去 30 °C, 本研究使用的 miR-21 和 miR-34a 理论杂交温度分别 53 °C 和 56 °C。但是在具体实验时, 使用的杂交缓冲液成分不一定与推荐的成分一致, 而且杂交温度过高会对组织形态产生不利影响, 因此需要结合具体情况调整。Nuovo 等^[16]推荐了几种 miR 原位检测流程及其调整方法, 认为可以通过增加某些成分浓度来调整杂交温度, 例如 50% 甲酰胺可以降低杂交温度 2~3 °C。本研究使用的 miR-34a 探针理论推荐杂交温度为 56 °C (86 °C - 30 °C), 预实验中我们使用两种含有不同离子浓度的杂交缓冲液及相对应的杂交温度, 结果发现使用杂交缓冲液 I 在 56 °C 下杂交 6 h 和使用杂交缓冲液 II 在 53 °C 下杂交 6 h, 其阳性信号与强度基本一致。本研究中选择了 48、53 和 56 °C 3 个杂交温度进行条件优化。

洗涤条件也是影响 ISH 结果的重要因素。Nuovo 等^[16]推荐了几种常见的杂交后洗涤缓冲液和

洗涤温度, 但未论述其原理, 具体实验时仍然需要根据具体情况进行摸索。本研究根据购买探针厂家推荐的、本实验室经常使用的或其他 CISH 试剂盒中经常使用的洗涤条件, 设置了 3 种洗涤条件进行杂交条件优化。

本研究制作了 20 例胰腺癌组织的小样本组织芯片, 对杂交条件进行优化。结果显示 miR-21 探针的最佳杂交条件为 A2B1, 即在杂交温度 53 °C (使用杂交缓冲液 I) 下杂交 6 h, 使用洗涤缓冲液 III 在 65 °C 下洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min; miR-34a 探针最佳杂交条件为 A2B3, 即在杂交温度 53 °C (使用杂交缓冲液 II) 下杂交 6 h, 用洗涤缓冲液 III 分别在 4 °C 和 65 °C 下各洗涤 6 min, 再用 PBS 洗涤 1 min。采用上述优化条件, 用 miR-21 和 miR-34a 探针检测 126 例胰腺癌组织标本构建的组织芯片, 发现 84 例 (66.7%) miR-21 呈阳性表达, 其中 70 例为低表达、14 例为高表达; 77 例 (61.1%) miR-34a 呈阳性表达, 其中 65 例为低表达、12 例为高表达。miR-21 和 miR-34a 在癌旁正常胰腺组织和癌旁的胰腺炎性增生病变组织中表达较少且均未见高表达。

既往研究多通过血清学 PCR 法及新鲜组织 miR 微阵列结合 PCR 法等检测 miR 的表达, Fu 等^[17]对既往文献进行了 meta 分析, 结果表明 miR-21 几乎在所有实体肿瘤包括胰腺癌组织中呈高表达, 而且高表达的 miR-21 可能发挥类似原癌基因的作用且与胰腺导管癌的总生存期有关。本研究采用 CISH 技术检测发现 miR-21 在胰腺癌组织中的阳性率达 66.7%, 且高于癌旁正常组织和癌旁的胰腺炎性增生病变组织, 与上述文献报道结果一致。胰腺导管腺癌组织 miR-34a 的原位检测方法未见文献报道, Pramanik 等^[18]采用 PCR 法检测 miR-34a, 结果发现其在大多数胰腺癌样本中的表达缺失。我们前期研究也采用 PCR 法检测了胰腺癌组织中 miR-34a 的表达, 结果发现其在胰腺癌组织中表达水平低, 且与胰腺癌分化程度高度相关^[10]。本实验方法的结果表明 miR-34a 表达阳性率为 61.1%, 但低表达组占比较高 (84.41%, 65/77), 与既往文献报道有一定差异, 其原因有待进一步分析。

综上所述, 本研究发现在 FFPE 胰腺癌组织切片 miR 的检测中, miR-21 和 miR-34a 的最佳杂交

温度均为 53 °C, 选择合适的杂交后洗涤温度和洗涤缓冲液有利于提高 miR 的阳性检出率。本研究为后续在组织水平研究 miR-21 和 miR-34a 在胰腺癌发生和发展中的作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] HUANG Y, YANG Y B, ZHANG X H, YU X L, WANG Z B, CHENG X C. MicroRNA-21 gene and cancer[J/OL]. *Med Oncol*, 2013, 30: 376. doi: 10.1007/s12032-012-0376-8.
- [2] KASAI A, KAKIHARA S, MIURA H, OKADA R, HAYATA-TAKANO A, HAZAMA K, et al. Double *in situ* hybridization for micrnas and mrnas in brain tissues[J/OL]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 126. doi: 10.3389/fnmol.2016.00126.
- [3] 陈栋,赵萍,陆连芳,苏彤,任清霞,贾巍,等. 抑制 miR-29 对胰腺癌 PANC1 细胞生长、侵袭和转移的影响[J]. *中华胰腺病杂志*,2017,17:386-392.
- [4] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, FERNANDEZ A F, GAMMON S T, KAYE J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523: 177-182.
- [5] 王冬燕,汤茂春,赵严. miRNA-155 与胰腺疾病[J]. *中华胰腺病杂志*,2017,17:349-352.
- [6] ZHANG J, ZHAO C Y, ZHANG S H, YU D H, CHEN Y, LIU Q H, et al. Upregulation of miR-194 contributes to tumor growth and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31: 1157-1164.
- [7] ZIMMERMAN S G, PETERS N C, ALTARAS A E, BERG C A. Optimized RNA ISH, RNA FISH and protein-RNA double labeling (IF/FISH) in *Drosophila* ovaries[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2158-2179.
- [8] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [9] JØRGENSEN S, BAKER A, MØLLER S, NIELSEN B S. Robust one-day *in situ* hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes[J]. *Methods*, 2010, 52: 375-381.
- [10] 倪晨明,邵卓,倪灿荣,熊杰,王欢,金钢,等. miR-34a 靶向调控 c-MET 促进胰腺癌发展的分子机制及临床意义[J]. *中华胰腺病杂志*,2018,18:233-237.
- [11] NIELSEN B S. MicroRNA *in situ* hybridization[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 822: 67-84.
- [12] DONÉ S C, BELTCHEVA O. *In situ* hybridization detection of miRNA using LNATM oligonucleotides[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1182: 57-71.
- [13] DE PLANELL-SAGUER M, RODICIO M C. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 699: 134-152.
- [14] SARAGGI D, GALUPPINI F, FANELLI G N, REMO A, URSO E D L, BAO R Q, et al. MiR-21 up-regulation in ampullary adenocarcinoma and its pre-invasive lesions[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214: 835-839.
- [15] NIELSEN B S, MØLLER T, HOLMSTRØM K. Chromogen detection of microRNA in frozen clinical tissue samples using LNATM probe technology[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1211: 77-84.
- [16] NUOVO G J, ELTON T S, NANA-SINKAM P, VOLINIA S, CROCE C M, SCHMITTGEN T D. A methodology for the combined *in situ* analyses of the precursor and mature forms of microRNAs and correlation with their putative targets[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4: 107-115.
- [17] FU X, HAN Y, WU Y, ZHU X, LU X, MAO F, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41: 1245-1253.
- [18] PRAMANIK D, CAMPBELL N R, KARIKARI C, CHIVUKULA R, KENT O A, MENDELL J T, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10: 1470-1480.

[本文编辑] 孙 岩