DOI:10.3724/cbls.2026005 **CSTR**:32203.14.cbls.2026005
文章编号:1004-0374(2026)05-0932-11

分析前变量对生物样本库组织样本RNA质量影响的研究进展

郑仰思[1],林旋豪[1],王媛媛[1,2*]
(1 汕头市中心医院生物样本库,汕头 515031;2 汕头市中心医院病理科,汕头 515031)

摘 要:生物样本库作为转化医学研究的重要资源,其保藏的组织样本质量对下游分子分析结果的可靠性起着决定性作用。组织样本中RNA完整性是样本质量的重要指标,受多种分析前变量的综合影响。本文系统综述了影响RNA质量的关键分析前变量,探讨采集前阶段(如供体特征、组织类型和手术相关变量)和采集后阶段(如冷缺血时间、保藏温度、冻存时间、冻融次数和保护剂选择)多种影响因素,旨在为生物样本库标准化操作流程的建立提供理论依据,为医学研究提供更可靠的样本资源。

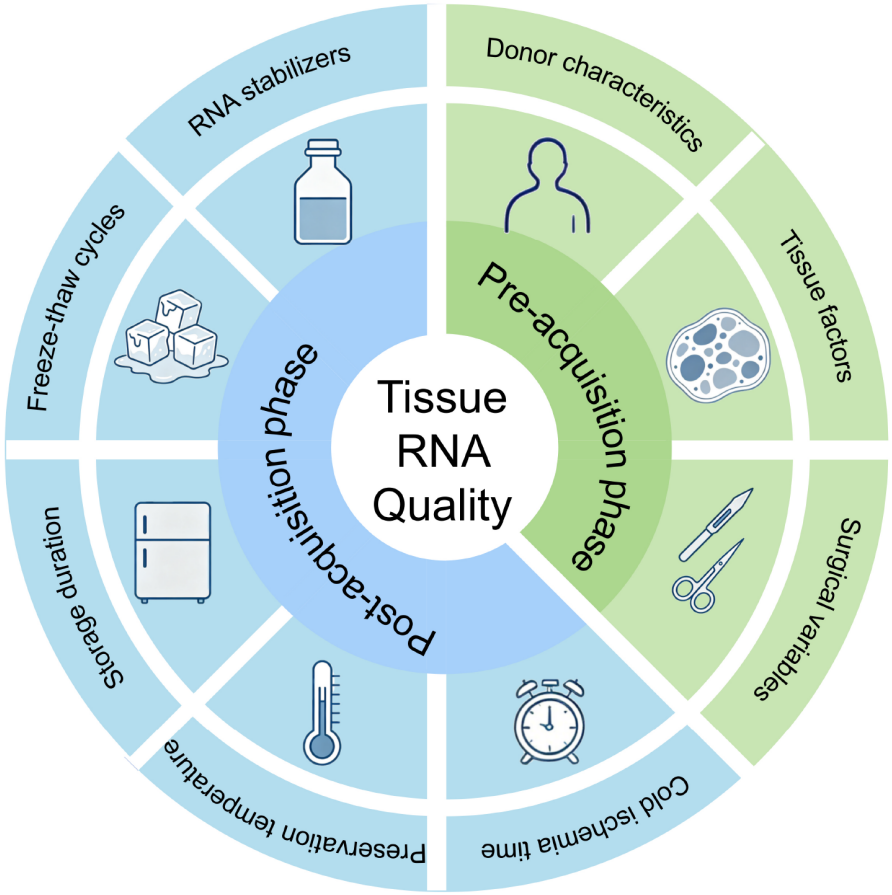
关键词:分析前变量;RNA质量;生物样本库;组织样本
中图分类号:Q522;R-331 **文献标识码**:A

Research progress on the impact of pre-analytical variables on RNA quality in biobank tissue samples

ZHENG Yang-Si[1], LIN Xuan-Hao[1], WANG Yuan-Yuan[1, 2*]
(1 Biobank, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China; 2 Department of Pathology, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China)

Abstract: Biobanks represent irreplaceable core resources for translational medicine and precision medicine research. The quality of preserved tissue samples directly determines the reliability and reproducibility of downstream molecular analyses, among which RNA integrity is widely acknowledged as a pivotal quality indicator of tissue specimens. However, RNA quality is significantly influenced by numerous pre-analytical variables throughout the entire lifecycle from sample collection to analysis. Elucidating the mechanisms underlying these variables provides essential theoretical basis and practical guidance for the development of standardized biobank protocols. This paper systematically reviews key pre-analytical variables that influence RNA quality in tissue samples. These variables are categorized into two phases: pre-acquisition and post-acquisition phases. The pre-acquisition phase mainly encompasses donor characteristics (age, BMI, disease status, and medication history), tissue factors (organ origin, histological features, tumor grade, tumor location, and clinical stage), and surgical variables (surgical approach and warm ischemia time). The post-acquisition phase focuses on cold ischemia time, preservation temperature, storage duration, freeze-thaw cycles and the selection of RNA stabilizers. The review elaborates on the effects of these factors on RNA integrity across different tissue types, and summarizes the controversial findings and underlying molecular mechanisms in current studies. Based on comprehensive analyses, this review proposes that biobanks should implement dynamically optimized and full-lifecycle quality control strategies tailored to specific tissue types and research objectives. It is recommended to strictly regulate the pre-analytical window periods, establish a full-chain temperature monitoring system, adopt aliquot storage to minimize freeze-thaw damage, and apply the Standard PREanalytical Code (SPREC) for standardized recording and traceability of key pre-analytical variables. Furthermore, the combined application of multiple RNA quality evaluation systems (such as RIN, RNA IQ, and RQI) and regular sampling quality control is recommended to enhance the accuracy of RNA quality assessment. This review provides a robust theoretical foundation for the development of standardized, high-quality biobanks and facilitates the efficient utilization of biospecimens in clinical translation and scientific research.

收稿日期:2025-10-09; **修回日期**:2025-11-16
基金项目:汕头市医疗卫生科技计划项目(230509116495638)
***通信作者**:E-mail: 315075516@qq.com



Key words: pre-analytical variables; RNA quality; biobank; tissue samples

生物样本库（又称生物银行，biobank）是指标准化收集、处理、储存和应用生物样本及其相关数据的系统。其样本来源于健康或患病的生物体，涵盖生物大分子、细胞、组织和器官等（例如人体器官组织、全血、血浆、血清、生物体液，以及经处理获得的DNA、RNA和蛋白质等）；同时，还包括与这些样本相关的知情同意、临床、治疗、随访和病理等资料，以及相应的质量控制、信息管理与应用系统[1]。作为精准医学转化的核心支撑平台，生物样本库通过整合高质量生物样本及多维信息数据，推动转化医学研究进程，为疾病的预防、诊疗、预后提供宝贵的生物样本资源[2]。

高质量的组织样本是临床研究不可缺少的材料，其中组织样本中的RNA质量对下游实验研究的成功至关重要。RNA的质量不仅决定了基因表达分析的准确性，更关系到生物标志物的筛选及其临床应用的有效性。RNA作为生物大分子在组织中的稳态表征，已成为评估组织样本质量的重要指标。传统的RNA质量检测方法包括分光光度法和琼脂糖凝胶电泳，存在灵敏度低、难以准确检测RNA的降解程度和完整性等缺点。当前受到广泛认可的检测方法是通过Agilent Bioanalyzer生物分析仪测定RNA完整性指数（RNA integrity number，RIN）进行检测。RIN值范围从1到10，数值越高表示RNA的完整性越好[3]，通常RIN≥7被认为是高质量RNA阈值[4]。此外，还有其他生物分析仪的RQI值（RNA quality indicator）和RNA IQ值（RNA integrity and quality number）也被用于评估RNA的完整性[4]。

组织样本RNA易降解，而且RNA酶普遍存在，容易受到多种分析前变量的影响。根据ISBER（国际生物和环境样本库协会）颁布的《2023生物样本库最佳实践规范（第五版）》和GB/T 37864-2019《生物样本库质量和能力通用要求》，在样本的采集、处理、运输、储存、分发及检测过程中存在很多质控点，这些分析前变量会影响样本RNA质量，影响实验结果的可靠性[5,6]。分析前变量复杂多样，涵盖采集前和采集后两个阶段。深入探讨分析前变量对RNA质量的影响，可为生物样本库标准化流程的优化提供

理论依据,提高医学研究的准确性和可靠性。

1 采集前变量对组织样本RNA质量的影响

采集前变量可能会对组织样本RNA质量产生影响,包括供体相关因素、手术相关因素和组织相关因素等。采集前变量受限于临床治疗的个体差异性,难以实现标准化控制。但是,这些因素的潜在干扰不仅可能使基因表达评估复杂化,还会导致实验结果的偏差。生物样本库需提取并记录采集前变量的相关信息,以便下游实验在研究设计和结果分析中将这些变量纳入考虑,从而最大程度降低采集前变量对研究结果的影响。

1.1 供体相关因素

个体之间的生物学差异,包括年龄、体重、药物干预和基础健康状况等都可能影响RNA的提取质量和稳定性。研究发现,年龄增长可导致脑组织样本RNA质量显著降低[7]。其原因可能与衰老过程中细胞内各种代谢活动和酶活性变化有关,进而影响RNA的稳定性。在骨骼肌组织研究中发现,BMI>25的个体其RNA完整性明显降低[8];其具体机制尚不清楚,可能与肥胖个体全身性的代谢紊乱,如胰岛素抵抗、慢性炎症和氧化应激水平升高等相关,并且其骨骼肌组织可能伴有脂肪浸润,高脂肪细胞占比可能导致RNA提取质量下降[9-11]。此外,供体健康状况和药物使用也会加速RNA降解。研究表明,阿尔茨海默病和孤独症供体的脑组织中RIN值普遍较低,推测与疾病特有的分子病理变化,尤其是氧化应激损伤相关[7,12]。在乳腺癌患者中,新辅助化疗药物的使用与肿瘤组织的 RNA 质量下降相关[13]。化疗药物通过干扰细胞RNA和蛋白质合成,从而导致RNA质量下降,肿瘤组织RNA完整性可作为乳腺癌患者重要的预后标志物。

1.2 组织相关因素

在分析前变量中,组织相关因素是影响RNA质量的重要因素之一。不同器官来源的组织在RNA完整性方面表现出显著的异质性。研究表明,在12种不同器官来源的肿瘤组织中,肝脏肿瘤组织的RNA完整性最佳,而脑肿瘤组织的RNA完整性最差[14]。在食管癌和乳腺癌中的比较研究显示,食管组织RIN值显著高于乳腺组织,该差异在两者的正常组织中尤为明显[15]。此外,多项研究证实,来自胃肠道的肿瘤组织样本(特别是胰腺、胃和结直肠)普遍RNA质量较低[14,16]。这种器官间RNA质量的差异性可能与组织样本中结缔组织、脂肪组织、消化酶、厌氧菌和RNase酶活性等导致RNA降解程度不同有关[10,14,16]。

在肿瘤组织样本中,RNA质量还可能与临床分期、肿瘤分级和肿瘤位置等相关。有研究报道,肺癌组织中高pTNM分期与低RIN值相关,其机制可能是晚期肿瘤常伴随更广泛的坏死区域,并且需要更大范围、更长时间的手术操作,从而使更多RNase从破损细胞中释放,加速RNA降解[17]。然而,Zheng等[10]在肝癌组织中的研究发现,RNA完整性与患者临床分期、肿瘤部位、肿瘤直径和手术方式无关联,但受肿瘤分级的影响:肿瘤分级越高,分化越差的肿瘤组织,其RIN值越低;推测其原因可能是低分化肿瘤细胞形态不规则,mRNA或rRNA结构稳定性差,更容易受到各种体内外条件的影响[10,18]。在食管癌、肺癌、胃癌和结直肠癌等研究中也有与此一致的发现[19]。在结肠癌研究中发现,左侧结肠癌的 RQI 值显著高于右侧结肠癌,这可能与左/右侧结肠的酶环境和菌群差异相关;此外,这一现象为左/右侧结肠肿瘤组织所特有,在正常组织中未观察到[20]。然而,在左/右侧肝癌组织中未发现RNA质量差异,推测可能是因为左/右侧肝组织与左/右侧结肠在胚胎起源和生理上有较大差异[10]。

近年的研究进一步揭示,组织学特征可对RNA质量产生较大影响[21]。在肿瘤组织中,肿瘤细胞比例与RNA质量呈正相关;相反,炎症细胞浸润、间质纤维化、细胞外黏蛋白和正常组织占比升高与RNA质量下降相关。其中,炎症细胞浸润和细胞外黏蛋白为RNA质量的独立负面预测因素[21],其潜在机制涉及炎症或溃烂组织中核酸酶活性增加和RNA动态平衡被破坏[22-24]。值得注意的是,肿瘤组织与其配对正常组织的RNA稳定性也可能存在差异。多项研究发现,在结肠癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和肺癌中,肿瘤组织和配对正常组织的RNA质量存在显著差异[20,25-27]。正常组织中较低的RIN值可能源于其组织构成特点,比如配对的正常样本多取自富含结缔组织的黏膜层,而结缔组织或脂肪组织占比高的组织样本普遍RIN值偏低[9,10,25]。然而,在甲状腺癌[28]和食管癌[15]中观察到了相反的趋势,即正常组织RNA完整性显著优于肿瘤组织。这些研究发现证实,不同器官的组织学特征对RNA质量的影响

存在差异。

为减少采集样本的组织学差异,有研究者提出对乳腺正常组织进行取材时,针对纤维肌肉灰白色条纹区域进行采样,可获得RNA质量高于随机取样的组织样本[29]。这种靶向取样策略具有更高的准确性和可靠性,为获取具有代表性的正常组织提供了实用方法。因此,在分析组织样本RNA完整性时,除考虑其他分析前变量外,应充分重视组织类型及其相关组织学特征的重要影响。

1.3 手术相关因素

手术方式是导致不同样本间RNA质量差异的另一个关键因素。特定外科技术(如热切割)或术中组织的机械牵拉与变形,均可对组织样本基因表达产生影响[30]。此外,手术过程中的热缺血时间是影响样本质量的重要因素。热缺血时间定义为手术期间组织停止供血或减少供血后保持在体温的时间,已有研究证实热缺血会影响RNA质量和表达水平的检测结果[31]。在血供阻断开始的早期阶段即出现缺血诱导的代谢反应,可调控细胞存活或凋亡过程,这些反应进而会影响RNA完整性[30,32,33]。热缺血时间受多种因素影响,包括手术方式、病变部位和组织类型[30]。与开放性手术相比,腹腔镜手术常伴随更长的热缺血时间,可达开放手术的1~3倍。有研究发现,在腹腔镜结肠切除术中,多种基因的RNA转录水平较开放性结肠切除术降低[34],且在腹腔镜结肠切除术或发生吻合口漏时,手术时间的延长会显著降低肿瘤组织样本的RNA完整性[20,34]。然而,在比较耻骨后根治性前列腺切除术和机器人辅助腹腔镜前列腺切除术时,并未观察到前列腺癌生物标志物的RNA质量差异[35,36]。此类不一致的研究结果提示,不同组织类型的样本对热缺血时间的耐受性可能存在差异。Zheng等[14]的研究进一步表明,在4种RNA质量较好的肿瘤组织(肾癌、结直肠癌、食管癌和膀胱癌)中,RNA完整性与热缺血时间呈显著负相关;而在RNA质量较差的组织中,仅胃肿瘤组织呈现类似的负相关趋势。结果表明,初始RNA完整性较好的组织对热缺血时间更为敏感。另一方面,在乳腺癌组织和回肠组织中研究发现,12~118 min的热缺血时间不会对组织RNA质量产生影响[37,38]。手术方式和热缺血时间是难以完全标准化的分析前变量,对不同组织类型的影响存在差异,但对其进行系统、完整的记录仍是生物样本库保障样本质量不可或缺的重要环节。

表1对采集前变量对组织样本RNA质量的影响进行了总结。

2 采集后变量对组织样本RNA质量的影响

除了采集前变量,采集后阶段的冷缺血时间、

表1　采集前变量对组织样本RNA质量的影响

Table 1　The impact of pre-acquisition variables on RNA quality of tissue samples

采集前变量	影响因素	组织类型
供体相关因素	年龄增长	脑[7]
	体重(BMI>25)	骨骼肌[8]
	健康状况(阿尔茨海默病、孤独症)	脑[7,12]
	药物使用(化疗药物)	乳腺癌[13]
组织相关因素	器官来源	肝脏>肾、甲状腺、结直肠、食道、膀胱、宫颈>乳腺、卵巢、肺、胃>脑[14,15]
		前列腺、小肠、乳腺、肾、肝脏>结直肠、胰腺、胃>肺[16]
	pTNM分期高	肺[17]
	肿瘤分级高	肝、食管、肺、胃、结直肠[10,19]
	肿瘤位置	左侧结肠癌>右侧结肠癌[20] 左侧肝癌=右侧肝癌[10]
	组织学特征(低肿瘤细胞、高炎症细胞、高间质纤维化、高细胞外黏蛋白、高正常细胞比例)	结肠腺癌、肝细胞癌、肾癌[21]
	肿瘤组织vs.正常组织	肿瘤组织>正常组织:结肠、乳腺、肝、胃、肺[20,25-27] 正常组织>肿瘤组织:甲状腺、食管[15,28]
手术相关因素	手术方式	开放式手术>腹腔镜手术:结肠癌[34]
		耻骨后根治性切除术=机器人辅助腹腔镜切除术:前列腺癌[35,36]
	热缺血时间长	肝脏、甲状腺、宫颈、乳腺、卵巢、肺、脑>肾、结直肠、食管、膀胱、胃[14]

保藏温度、冻存时间、冻融次数和RNA保护剂等变量，也是影响组织RNA质量的关键因素。相较于存在较大个体差异的采集前变量，这些采集后变量是生物样本库可以有效控制和实现标准化操作的重要环节。

2.1 冷缺血时间

冷缺血时间是指组织从手术切除到稳定保存之间的时间间隔[39]。该阶段被视为一种复杂的生理扰动过程，综合了组织应激、缺氧、能量代谢障碍、酸中毒、低温应激和电解质紊乱等多重病理生理变化[40]。在一项涉及乳腺癌患者原位活检的研究中发现，冷缺血造成肿瘤细胞中应激反应发生改变，使对基因表达变化的解释复杂化，可能导致关键生物标志物评估出现偏差[41]。在结直肠癌组织中发现，即使冷缺血时间控制在15 min内，也会造成高达15%的基因和蛋白质表达水平发生改变[42]。有研究发现，冷缺血时间达到30 min时，64.3%的样本RNA仍保持完整；而冷缺血时间延长至45 min时，样本RNA合格率降至36%[43]。然而，也有部分研究指出，在一定的冷缺血时间窗口期(1~4 h)内，冷缺血时间对某些组织类型的RIN值未造成显著影响[14,17,44-46]。这些研究结果提示，不同组织对冷缺血时间的敏感性存在明显差异。如甲状腺和结直肠组织对冷缺血时间表现出较高的敏感性，而胃和肺组织则相对耐受[43]。目前的生物样本库实践建议在30 min内快速冷冻组织样本[6]。而对于更脆弱的组织，如肝脏[47,48]或结肠癌组织[49]，需将冷缺血时间控制在10~15 min。此外，多项研究显示，在相同的冷缺血条件下，肿瘤组织中的RNA质量通常高于配对的正常组织[10,45,47]。Zheng等[10]对多种肿瘤组织的研究发现，正常组织在冷缺血2 h后观察到RIN值显著降低，而肿瘤组织在冷缺血6 h后才观察到此现象。这可能是因为肿瘤细胞比正常细胞具有更强的缺氧适应机制，可抵抗更长的缺血时间。以上研究结果表明，冷缺血时间对组织RNA的影响可能依赖于组织类型(器官来源、正常组织或肿瘤组织)，没有单一的对所有组织都是最佳的冷缺血时间。

2.2 保藏温度

生物样本在运输和储存过程中通常采用尽可能低的温度以抑制组织样本中的生化反应，以提高样本的稳定性。但是，快速冷冻前所处的环境温度也会对RNA完整性产生影响。Sun等[45]研究发现，肾癌组织离体后在冰上放置4 h仍可保持RNA完整，而置于室温或盐水中的组织中则出现明显降解。此外，体积较小的活检样本更易受到采集后变量的影响，应在离体后尽快置于冰上转运并迅速冷冻[50]。另有研究指出，卵巢组织在4~8 °C条件下运输24 h或48 h，其RNA质量未受影响[51]。因此，在组织样本采集现场缺乏超低温设备的情况下，将组织样本置于冰上运输，可有效避免RNA质量的显著下降，直至入库保藏。

在条件允许的情况下，样本采集后应立即转移至超低温环境(如液氮或-80 °C冰箱)中保藏。-80 °C存储设备具有操作简便、存储容量大及成本相对较低等优势，成为多数生物样本库用于保存样本的主要设备。-80 °C远低于水的结晶温度，样本内的生化反应显著减弱，有利于维持组织中生物大分子的稳定性，适用于组织样本短期保藏。研究表明，组织RNA可在-80 °C条件下稳定保藏5年，但如果需要更长期地保藏样本，则建议采用更低的保藏温度[19]。在-150~-196 °C的液氮环境中，细胞代谢活动近乎停滞，细胞内的水迅速越过冰晶形成阶段，极大限度地减少了冰晶对细胞的损伤[52]。对乳腺癌组织的研究发现，液氮罐储存的组织样本其RNA完整性更高[53]。尽管有个别研究指出-80 °C保藏的组织样本RIN值与气相液氮罐保藏的样本相当甚至更高[54]，但目前普遍认为将需要长期保藏的组织样本冻存在液氮中更有利于稳定RNA质量。然而，使用大型气相液氮罐进行长期保藏成本较高，多数生物样本库在实际操作中常取折中策略：即先采用液氮对离体组织样本进行快速冷冻，随后转至-80 °C冰箱进行长期保藏，以此作为气相液氮罐保藏的替代方法。

2.3 冻存时间

Wang等[55]对12种不同器官来源的组织样本RNA进行检测发现，随着在-80 °C冰箱中冻存时间的延长，组织样本RNA质量均呈现逐渐下降的趋势；在冻存6年后可观察到RIN值显著降低，其中脑、乳腺和胃组织的RNA降解速率明显高于其他器官。长时间存储，尤其是在不适宜的温度下，可能会导致RNA分子断裂或化学修饰，从而影响其质量[10]。冻存时间对组织样本RNA质量的影响也与保藏温度紧密相关。对比保藏10年的乳腺癌组织样本发现，冻存于气相液氮的样本RIN 值明显高于-80 °C的样

本[53]。另有研究报道,在液氮中冻存6年的16种肿瘤组织样本均保持良好的RNA完整性[27]。加拿大安大略省肿瘤库的研究报告表明,在气相液氮罐冻存2~11年的肿瘤组织,其RNA完整性没有随时间延长而降低[56]。多项研究建议,若需长期保存组织样本(超过5年),液氮环境优于-80 °C冰箱,可有效延缓RNA降解[19,57-59]。然而,也有少数研究发现,-80 °C冻存条件下部分样本仍可实现长期保藏。例如,胃癌组织冻存12年[60]、脑组织冻存23年[7]以及多种内分泌组织冻存28年[61],其RNA质量未见明显下降。近期一项研究还发现,结肠腺癌、肝细胞癌和肾癌组织在-80 °C条件下冻存10年,RNA质量未受显著影响;尽管与肝细胞癌和肾癌相比,结肠腺癌组织RNA质量略有下降,但差异无统计学意义[21]。这些研究结果表明,不同器官组织对冻存时间的耐受性存在差异。为确保实验结果的可靠性,长期冻存的组织样本在用于分析前应进行RNA质量评估,减少分析前变量对下游实验的影响。

2.4 冻融次数

保藏温度的波动和反复冻融会破坏细胞结构的完整性,并激活内源性RNA酶,导致大量RNA降解。研究发现,组织样本在经历不超过3个冻融循环时,其RNA完整性仍可维持,能够满足RT-PCR分析的要求;而经过5次冻融循环后,RNA质量合格率显著下降至约35%,无法继续用于RT-PCR分析[62]。有研究证实,随着冻融次数的增加,胃肠道肿瘤组织RIN值明显下降,而且从癌旁组织中提取的RNA比癌组织更容易发生降解[63]。然而,也有研究提出,不同肺癌组织样本的RIN值差异很大,但其变化与冻融循环次数未见明显相关性[62]。这表明,反复冻融循环对RNA完整性的影响可能因组织类型而异。例如,在RNA酶活性较高的组织(如肝脏和肌肉),反复冻融易导致RNA显著降解[64]。生物样本库在样本采集时可将组织进行分装,避免整体反复冻融,并实时监测存储设备的温度变化,减少冻融对组织样本RNA质量的影响。

2.5 保护剂选择

为更好地保存组织样本中的RNA,多种商品化的RNA保护剂(如RNAlater)已被广泛应用。这类保护剂通常含有高浓度铵盐,能够迅速渗透到组织内部,与RNA酶分子争夺表面的水化层使其失活,从而稳定组织中的RNA。RNA 保护剂在一定程度上降低了组织样本对低温储存设备的依赖,为远程运输提供了便利。在多种组织类型中,RNA保护剂展现出保护优势。例如,在肺组织研究中,与速冻组织相比,采用RNAlater处理的组织样本RNA完整性更高[65];在乳腺癌组织中,采用RNAlater保存可显著提高RNA产量和完整性[37];在肾癌活检组织中,RNAlater有助于获得高质量的组织样本,适用于单细胞RNA测序、蛋白质组学和组织病理学评估等精密分析[66]。另有研究采用PAXgene系统保存结肠组织,其内含的RNA保护剂可使组织中的RNA质量优于速冻保存组织[67]。然而,RNA保护剂的有效性并非绝对,其效果可能因组织类型及具体操作条件而异。在盆腔肿瘤组织研究中发现,RNAlater保存的组织和新鲜冰冻组织间的RNA质量差异非常小[46]。对于回肠黏膜组织,采用速冻和RNA保护液保存,两者RNA质量没有显著差异[38]。研究人员猜测,RNAlater浸润可导致组织韧性增加,使匀浆操作更加困难,并可能导致组织凝结、细胞萎缩以及核深染等现象,这些潜在因素会影响后续组织RNA提取[46]。此外,对于体积较大或致密的组织,RNA保护剂难以迅速渗透到组织中心区域,可能导致内部RNA降解[68]。关于RNA保护剂的实际效益,学术界观点尚未统一。有研究者指出,生物样本库工作人员是否严格执行标准操作程序(SOP),是影响RNA保存效果的关键因素。如果组织样本在均质化和RNA纯化前保持低温与洁净环境,速冻组织也可以获得与RNA保护剂处理相当的质量[46]。同时,RNA保护剂的使用会增加生物样本库的运营成本,且其适用范围存在限制。例如,对于骨骼肌样本,RNAlater保存法可能导致蛋白质含量、氨基酸水平和酶活性发生改变,因此不适合用于广泛的生化分析[69]。RNA保护剂在特定条件下能有效稳定组织RNA,但需结合具体研究目的、组织特性及标准化操作流程进行综合评估,仍需更多研究予以验证。表2对采集后变量对组织样本RNA质量的影响进行了总结。

3 结语

在生物医学研究中,组织样本RNA质量是决定下游分子生物学研究可靠性的基石。在组织样本从采集到分析的全生命周期中,RNA分子的稳定性受到多维度分析前变量的影响。本文系统综述了从采

表2 采集后变量对组织样本RNA质量的影响

Table 2 The impact of post-acquisition variables on RNA quality of tissue samples

采集后变量	影响因素	组织类型
冷缺血时间	<15 min	结直肠癌、肝脏[42,47-49]
	<30 min	肺、胃>乳腺>结直肠、甲状腺[43]
	<1 h	肝脏、甲状腺、宫颈、乳腺、卵巢、肺、脑、肾、结直肠、食管、膀胱、胃[14]
	<3 h	肺、肾、子宫、卵巢[17,45,46]
	<4 h	甲状腺、乳腺、卵巢、胰腺、肺[44]
	耐受性	肿瘤组织>正常组织：肝、肾[10,45,47]
保藏温度、冻存时间	4~8 °C	<4 h：肾癌[45]
		<48 h：卵巢[51]
	-80 °C	<5 yr：食管、肺、肝、胃、结直肠、脑、乳腺、睾丸[19,59]
		<6 yr：结直肠、食管、胆囊、肾、肝脏、肺、卵巢、胰腺、小肠、胆总管、腹膜、睾丸、膀胱>脑、乳腺、胃[10,27,55]
		<12 yr：甲状腺、脑、结肠、肝、胰腺、脾脏、胃等[54,60]
		<23 yr：脑[7]
		<28 yr：内分泌组织[61]
	-150~-196 °C	<10 yr：结肠腺癌、肝癌、肾癌[21]
		2~11 yr：膀胱、乳腺、中枢神经系统、结肠、内分泌、食道、胃、头颈部、肺、卵巢、直肠、肾、软组织肉瘤、子宫[56]
		10~12 yr：乳腺[53]
冻融次数	<1个冻融循环	胰腺、胃、结直肠、肝脏、肌肉[63,64]
	<3个冻融循环	肺[62]
	<6个冻融循环	脑、睾丸[64]
	耐受性	肿瘤组织>正常组织：胃、肝、结直肠、胰腺[63]
保护剂选择	RNAlater	RNAlater>液氮速冻：肺、乳腺、肾[37,65,66]
		RNAlater≈液氮速冻：卵巢、子宫、回肠[38,46]
	PAXgene系统	PAXgene组织保存容器>液氮速冻：结肠[67]

集前到采集后的分析前变量，由于分析前变量的复杂性和交叉性，不同研究之间的结论存在争议，且许多分析前变量对组织样本RNA质量的具体作用机制仍未被充分揭示，这也是生物样本库亟需突破的关键问题之一。生物样本库在追求标准化建设时，需根据组织类型和研究目的，动态优化并严格把控从采集、运输、制备到冻存的每一个环节，具体措施包括：对采集窗口期进行管控，建立覆盖全流程的温度监控链条，设定冻存时效预警机制，并对中长期保藏的组织样本实施定期抽样质控。此外，生物样本库可应用标准化预分析编码(standard preanalytical code，SPREC)，对生物样本采集、处理及储存过程中的关键分析前变量进行统一编码和记录[70]。SPREC可通过标准化的记录方式，将分析前变量(如热缺血时间、冷缺血时间等)转化为可追溯、可分析的结构化数据，为每一份样本赋予丰富的质量背景信息。对分析前变量的有效控制和信息化管理，不仅有助于生物样本库追溯和操作流程优化，而且可提高样本在医学研究中的利用价值，促进多中心研究数据的有效整合。

值得注意的是，当前主流的RNA质控一般采用RIN值等指标评估RNA的完整性，但其仍存在一定局限性。一方面，其灵敏度有限，难以准确评估低丰度转录本和小RNA的质量；另一方面，即使是RNA完整性合格的样本，其表达谱仍可能受分析前变量的影响而偏离原始生理状态。例如，肾癌组织研究显示，尽管术后4 h内组织样本RNA保持完整，但不同采集条件仍会导致基因表达谱出现显著差异[71]。鉴于RNA降解过程的复杂性，单一指标难以全面评估RNA质量。因此，建议生物样本库采取多种策略对组织样本RNA进行质控，以提升评估的全面性和准确性。首先，结合使用不同的RNA质量评分系统非常关键。RIN值和RNA IQ值在评估不同降解类型的RNA样本时表现出互补特性：热降解时RIN值显示出良好线性，而酶降解时RNA IQ值线性更优[4]。因此，采用多种生物分析仪组合检测可提高RNA完整性指标的准确性。其次，对于特定研究项目，可采用更明确的实验方法对目标基因进行验证，

如RT-PCR或RNA测序,甚至可应用激光捕获显微切割分离特定细胞群的RNA。因此,应当构建样本质量分级体系,明确不同等级样本的适用场景。未来还可进一步开发新型RNA完整性评估方法,例如探索能够灵敏指示RNA降解的生物标志物。当前阶段,生物样本库能做到的是将样本的分析前变量进行系统的信息化记录,推动不同生物样本库间质控数据的标准化。未来可借助机器学习模型,整合多维度质控数据,从而更精准地预测样本适用于特定项目的可行性,为精准医学研究提供高质量和高信息保真度的样本资源。

参考文献

[1] 郜恒骏, 杜莉利. 中国生物样本库迈进NSBAAA的崭新时代. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 971–5.
Gao HJ, Du LL. China Biobank enters a new era of NSBAAA. Sci Sin Vitae, 2024, 54: 971–5.

[2] Borkhataria CH, Sharma S, Vaja P, et al. Quality management, ethical considerations, and emerging challenges in genomics and biobanking: a comprehensive review. Clin Chim Acta, 2025, 569: 120161.

[3] Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol, 2006, 7: 3.

[4] Li S, Liu J, Zhao M, et al. RNA quality score evaluation: A preliminary study of RNA integrity number (RIN) and RNA integrity and quality number (RNA IQ). Forensic Sci Int, 2024, 357: 111976.

[5] 全国生物样本标准化技术委员会(SAC/TC 559). 生物样本库质量和能力通用要求: GB/T 37864-2019[S]. 中国标准出版社, 2019.
National Technical Committee 559 on Bio-specimen of Standardization Administration of China. General requirements of quality and competece for biobank: GB/T 37864-2019[S]. Standards Press of China, 2019.

[6] Wilde AD. The fifth edition of the ISBER best practices: user feedback supports broad applicability. Biopreserv Biobank, 2023, 21: 635–6.

[7] White K, Yang P, Li L, et al. Effect of postmortem interval and years in storage on RNA quality of tissue at a repository of the NIH neurobiobank. Biopreserv Biobank, 2018, 16: 148–57.

[8] Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, et al. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. Int J Legal Med, 2011, 125: 573–80.

[9] Roy D, Tomo S, Modi A, et al. Optimising total RNA quality and quantity by phenol-chloroform extraction method from human visceral adipose tissue: a standardisation study. MethodsX, 2020, 7: 101113.

[10] Zheng XH, Zhou T, Li XZ, et al. Banking of tumor tissues: effect of preanalytical variables in the phase of pre- and postacquisition on RNA integrity. Biopreserv Biobank, 2023, 21: 56–64.

[11] Dabrowski P, Rasmus M, Jundzill A, et al. A comparison of five methods to maximize RNA and DNA isolation yield from adipose tissue. PeerJ, 2024, 12: e17071.

[12] Highet B, Parker R, Faull RLM, et al. RNA quality in post-mortem human brain tissue is affected by Alzheimer's disease. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 780352.

[13] Cazzaniga ME, Ademuyiwa F, Petit T, et al. Low RNA disruption during neoadjuvant chemotherapy predicts pathologic complete response absence in patients with breast cancer. JNCI Cancer Spectr, 2024, 8: pkad107.

[14] Zheng XH, Zhang SD, Zhang PF, et al. Tumor cell content and RNA integrity of surgical tissues from different types of tumors and its correlation with *ex vivo* and *in vivo* ischemia. Ann Surg Oncol, 2018, 25: 3764–70.

[15] 郑仰思, 林旋豪, 李帆等. 离体时间和冻存时间对生物样本库乳腺癌和食管癌冰冻组织样本RNA质量的影响. 复旦学报(医学版), 2025, 52: 437–45.
Zheng YS, Lin XH, Li F, et al. Impact of ischemia time and storage periods on RNA quality of fresh frozen breast cancer and esophageal cancer tissue samples in biobank. Fudan Univ J Med Sci, 2025, 52: 437–45.

[16] Zeugner S, Mayr T, Zietz C, et al. RNA quality in fresh-frozen gastrointestinal tumor specimens-experiences from the tumor and healthy tissue bank TU Dresden. Recent Results Cancer Res, 2015, 199: 85–93.

[17] Guerrera F, Tabbò F, Bessone L, et al. The influence of tissue ischemia time on RNA integrity and patient-derived xenografts (PDX) engraftment rate in a non-small cell lung cancer (NSCLC) biobank. PLoS One, 2016, 11: e0145100.

[18] Olsen J, Kirkeby LT, Eiholm S, et al. Impact of *in vivo* ischemic time on RNA quality–Experiences from a colon cancer biobank. Biopreserv Biobank, 2015, 13: 255–62.

[19] Chen YY, Han QY, Chen QY, et al. Impact of sample processing and storage conditions on RNA quality of fresh-frozen cancer tissues. Biopreserv Biobank, 2023, 21: 510–7.

[20] Galissier T, Schneider C, Nasri S, et al. Biobanking of

fresh-frozen human adenocarcinomatous and normal colon tissues: which parameters influence RNA quality? PLoS One, 2016, 11: e0154326

[21] Kim S, Kang J, Kim B, et al. Frozen section histopathology and preanalytical factors affecting nucleic acid integrity in biobanked fresh-frozen human cancer tissues. J Pathol Transl Med, 2025, 59: 398–407.

[22] Bedenbender K, Scheller N, Fischer S, et al. Inflammation-mediated deacetylation of the ribonuclease 1 promoter via histone deacetylase 2 in endothelial cells. FASEB J, 2019, 33: 9017–29.

[23] Miyahara K, Hino M, Yu Z, et al. The influence of tissue pH and RNA integrity number on gene expression of human postmortem brain. Front Psychiatry, 2023, 14: 1156524.

[24] Lasch M, Kumaraswami K, Nasiscionyte S, et al. RNase a treatment interferes with leukocyte recruitment, neutrophil extracellular trap formation, and angiogenesis in ischemic muscle tissue. Front Physiol, 2020, 11: 576736.

[25] Bao WG, Zhang X, Zhang JG, et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. Ann Surg Oncol, 2013, 20: 1737–44.

[26] Musella V, Verderio P, Reid JF, et al. Effects of warm ischemic time on gene expression profiling in colorectal cancer tissues and normal mucosa. PLoS One, 2013, 8: e53406.

[27] Song SY, Jun J, Park M, et al. Biobanking of fresh-frozen cancer tissue: RNA is stable independent of tissue type with less than 1 hour of cold ischemia. Biopreserv Biobank, 2018, 16: 28–35.

[28] Mathieson W, Betsou F, Myshunina T, et al. The effect of long-term -80°C storage of thyroid biospecimens on RNA quality and ensuring fitness for purpose. J Clin Pathol, 2016, 69: 1105–8.

[29] Mehta K, Sharma A, Mehta A, et al. Enhancing negative control selection: a comparative analysis of random and targeted sampling techniques for obtaining high-quality RNA from normal breast tissue. Biol Methods Protoc, 2024, 9: bpae083.

[30] Bonin S, Stanta G. Pre-analytics and tumor heterogeneity. N Biotechnol, 2020, 55: 30–5.

[31] 金力. 中国人类遗传资源的共享设计与解决方案[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2024.
Jin L. Design and solutions: Human genetic resources sharing of China. Shanghai: Fudan University Press, 2024.

[32] Liu N, Luo Y, Zhu Y, et al. Effects of warm ischemia time, cryopreservation, and grinding methods on RNA quality of mouse kidney tissues. Biopreserv Biobank, 2021, 19: 306–11.

[33] Jacquemin V, Antoine M, Dom G, et al. Dynamic cancer cell heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications. Cancers, 2022, 14: 280.

[34] Bono A, Bianchi P, Locatelli A, et al. Angiogenic cells, macroparticles and RNA transcripts in laparoscopic vs open surgery for colorectal cancer. Cancer Biol Ther, 2010, 10: 682–5.

[35] Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Jindal S, et al. Comparative biomarker expression and RNA integrity in biospecimens derived from radical retropubic and robot-assisted laparoscopic prostatectomies. Cancer Epidemiol, 2010, 19: 1755–65.

[36] Best S, Sawers Y, Fu VX, et al. Integrity of prostatic tissue for molecular analysis after robotic-assisted laparoscopic and open prostatectomy. Urology, 2007, 70: 328–32.

[37] Hatzis C, Sun H, Yao H, et al. Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. J Natl Cancer Inst Monogr, 2011, 103: 1871–83.

[38] Lee SML, Schelcher C, Thasler R, et al. Pre-analytical determination of the effect of extended warm or cold ischaemia on RNA stability in the human ileum mucosa. PLoS One, 2015, 10: e0138214.

[39] Betsou F, Chuaqui R, De-Wilde A, et al. Standard PREanalytical code version 4.0. Biopreserv Biobank, 2025, 23: 328–32.

[40] Mertins P, Yang F, Liu T, et al. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. Mol Cell Proteomics, 2014, 13: 1690–704.

[41] Pedersen IS, Thomassen M, Tan Q, et al. Differential effect of surgical manipulation on gene expression in normal breast tissue and breast tumor tissue. Mol Med, 2018, 24: 57.

[42] David KA, Unger FT, Uhlig P, et al. Surgical procedures and postsurgical tissue processing significantly affect expression of genes and EGFR-pathway proteins in colorectal cancer tissue. Oncotarget, 2014, 5: 11017–28.

[43] Viana CR, Neto CS, Kerr LM, et al. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. Cell Tissue Bank, 2013, 14: 167–73.

[44] Guo D, Wang A, Xie T, et al. Effects of ex vivo ischemia time and delayed processing on quality of specimens in tissue biobank. Mol Med Rep, 2020, 22: 4278–88.

[45] Sun H, Sun R, Hao M, et al. Effect of duration of ex

vivo ischemia time and storage period on RNA quality in biobanked human renal cell carcinoma tissue. Ann Surg Oncol, 2016, 23: 297–304.

[46] Hentze JL, Kringelbach TM, Novotny GW, et al. Optimized biobanking procedures for preservation of RNA in tissue: comparison of snap-freezing and RNAlater-fixation methods. Biopreserv Biobank, 2019, 17: 562–9.

[47] Zheng H, Tao YP, Chen FQ, et al. Temporary ischemia time before snap freezing is important for maintaining high-integrity RNA in hepatocellular carcinoma tissues. Biopreserv Biobank, 2019, 17: 425–32.

[48] Servais MD, Galtier F, Nouvel A, et al. Addressing the quality challenge of a human biospecimen biobank through the creation of a quality management system. PLoS One, 2022, 17: e0278780.

[49] Hong SH, Baek HA, Jang KY, et al. Effects of delay in the snap freezing of colorectal cancer tissues on the quality of DNA and RNA. J Korean Soc Coloproctol, 2010, 26: 316–23.

[50] Kap M, Sieuwerts AM, Kubista M, et al. The influence of tissue procurement procedures on RNA integrity, gene expression, and morphology in porcine and human liver tissue. Biopreserv Biobank, 2015, 13: 200–6.

[51] Cheng J, Ruan X, Zhou Q, et al. Long-time low-temperature transportation of human ovarian tissue before cryopreservation. Reprod Biomed Online, 2021, 43: 172–83.

[52] Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res, 2017, 6: 12–8.

[53] Babel M, Mamilos A, Seitz S, et al. Compared DNA and RNA quality of breast cancer biobanking samples after long-term storage protocols in -80 °C and liquid nitrogen. Sci Rep, 2020, 10: 14404.

[54] Auer H, Mobley JA, Ayers LW, et al. The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. Biotech Histochem, 2014, 89: 518–28.

[55] Wang TH, Chen CC, Liang KH, et al. A multivariate evaluation of factors affecting the quality of freshly frozen tissue specimens. Biopreserv Biobank, 2017, 15: 344–9.

[56] Kelly R, Albert M, Ladurantaye Md, et al. RNA and DNA integrity remain stable in frozen tissue after long-term storage at cryogenic temperatures: a report from the ontario tumour bank. Biopreserv Biobank, 2019, 17: 282–7.

[57] Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. Clin Biochem, 2014, 47: 258–66.

[58] Neuber AC, Komoto TT, Silva ECAd, et al. Quality assessment of cryopreserved human biological samples from the biobank of Barretos Cancer Hospital. Biopreserv Biobank, 2023, 21: 74–80.

[59] Shah SG, Rashid M, Verma T, et al. Establishing a correlation between RIN and A260/280 along with the multivariate evaluation of factors affecting the quality of RNA in cryopreserved cancer bio-specimen. Cell Tissue Bank, 2019, 20: 489–99.

[60] Zhang X, Han QY, Zhao ZS, et al. Biobanking of fresh-frozen gastric cancer tissues: impact of long-term storage and clinicopathological variables on RNA quality. Biopreserv Biobank, 2019, 17: 58–63.

[61] Andreasson A, Kiss NB, Juhlin CC, et al. Long-term storage of endocrine tissues at - 80°C does not adversely affect RNA quality or overall histomorphology. Biopreserv Biobank, 2013, 11: 366–70.

[62] Yu K, Xing J, Zhang J, et al. Effect of multiple cycles of freeze-thawing on the RNA quality of lung cancer tissues. Cell Tissue Bank, 2017, 18: 433–40.

[63] Hu Y, Han H, Wang Y, et al. Influence of freeze-thaw cycles on RNA integrity of gastrointestinal cancer and matched adjacent tissues. Biopreserv Biobank, 2017, 15: 241–7.

[64] Ji X, Wang M, Li L, et al. The Impact of repeated freeze-thaw cycles on the quality of biomolecules in four different tissues. Biopreserv Biobank, 2017, 15: 475–83.

[65] Esteva-Socias M, Gómez-Romano F, Carrillo-Ávila JA, et al. Impact of different stabilization methods on RT-qPCR results using human lung tissue samples. Sci Rep, 2020, 10: 3579.

[66] Gies SE, Hänzelmann S, Kylies D, et al. Optimized protocol for the multiomics processing of cryopreserved human kidney tissue. Am J Physiol Renal Physiol, 2024, 327: F822–44.

[67] Korenkova V, Slyskova J, Novosadova V, et al. The focus on sample quality: influence of colon tissue collection on reliability of qPCR data. Sci Rep, 2016, 6: 29023.

[68] Jiang L, Li L, Kang P, et al. Inappropriateness of RNAlater to preserve *Caenorhabditis elegans* for RNA extraction. MethodsX, 2019, 6: 2460–7.

[69] Edman S, Engvall A, Viklund TE, et al. Assessment of different preservation techniques for human skeletal

muscle biopsy samples: a comparative method study on freeze-drying, RNAlater, and RNAlater-ICE. Physiol Rep, 2025, 13: e70562.

[70] Skoworonska M, Blank A, Centeno I, et al. Real-life data from standardized preanalytical coding (SPREC) in tissue biobanking and its dual use for sample characterization and process optimization. J Pathol Clin Res, 2023, 9: 137–48.

[71] Liu NW, Sanford T, Srinivasan R, et al. Impact of ischemia and procurement conditions on gene expression in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res, 2013, 19: 42–9.