

# 视网膜母细胞瘤中 NY-SAR-35 基因的表达及临床意义

孔 旻, 林 泉, 梁 皓, 蒋林志, 严宇清

基金项目: 广西科技厅青年基金资助项目(编号:桂科青 0542052); 广西卫生厅自筹经费科研课题(编号:桂卫 Z2006049)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科中心

作者简介: 孔 旻(1980-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障及屈光手术。E-mail: min\_kong2005@yahoo.com.cn

通讯作者: 梁 皓(1969-), 女, 医学博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 晶状体病及眼肿瘤免疫。E-mail: lianghao505@yahoo.com.cn

**[摘要]** **目的** 检测癌-睾丸抗原 NY-SAR-35 基因在视网膜母细胞瘤(RB)中的表达, 探讨其作为 RB 特异性免疫治疗靶抗原的可能性。**方法** 利用逆转录-聚合酶链反应方法, 检测 NY-SAR-35 基因在 15 例 RB 组织、12 例非肿瘤病变视网膜和 22 例其他正常眼部组织(眼睑皮肤 12 例、眼肌 5 例、结膜 5 例)中的表达, 随机抽取 RT-PCR 阳性产物直接进行 DNA 测序, 并将其表达结果与临床相关指标(性别、年龄、病理分型、肿瘤大小、临床分期)进行统计学分析, 以探讨这一类肿瘤抗原的临床意义。**结果** 在 15 例 RB 组织中, NY-SAR-35 基因的表达率为 60% (95% CI: 35.2% ~ 84.8%); 在非肿瘤病变视网膜组织和其他正常组织中, 无一例表达 NY-SAR-35 基因; 其表达与临床相关指标(性别、年龄、病理分型、肿瘤大小、临床分期)无关 ( $P > 0.05$ )。**结论** NY-SAR-35 基因可特异性地表达于 RB 中, 可能成为 RB 特异性免疫治疗的靶抗原, 具有进一步研究开发的前景。

**[关键词]** 视网膜母细胞瘤; 癌-睾丸抗原; 肿瘤免疫治疗

**[中图分类号]** R 739.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)09-0813-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.09.01

**Expression of NY-SAR-35 in retinoblastoma and its clinical significance** KONG Min, LIN Quan, LIANG Hao, et al. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To detect the mRNA expression of the cancer testis antigens (NY-SAR-35) in retinoblastoma (RB) and investigate the possibility of applying these antigens as the target antigens for RB specific immunotherapy. **Methods** With reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the mRNA expression of NY-SAR-35 in 15 cases of RB tissues, 12 cases of nontumorous' retina tissues and 22 cases of other ocular region normal tissues (12 cases of blepharo-cutis, 5 cases of muscoli oculi and 5 cases of conjunctiva) was detected. Samples selected randomly from PCR positive products of each CT gene were directly sequenced. The results of expression and related clinical parameters (sex, age, patho-typing, tumorous size, clinical stage) were analyzed with statistic analysis software. **Results** Among 15 RB tissues, NY-SAR-35 mRNA was detected in 60% (95% CI: 35.2% ~ 84.8%), and NY-SAR-35 mRNA can not be detected in both nontumorous' region and other ocular region normal tissues. **Conclusion** NY-SAR-35 is expressed specifically in RB. So NY-SAR-35 may become special target antigen of immunity treatment. This result is worth further study.

**[Key words]** Retinoblastoma; Cancer testis antigen; Cancer immunotherapy

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是儿童最常见的致盲及致命性眼内恶性肿瘤之一, 其恶性度非常高, 传统的手术、放疗及化疗的疗效不佳。基于此, 人们正努力寻求更有效的 RB 治疗方法。免疫治疗是利用特异性抗原对肿瘤进行治疗的一种方

法, 其创伤小、针对性强, 对 RB 无疑是一种较好的治疗选择。RB 免疫治疗的基础是找到具有较强免疫性并与 RB 相关的肿瘤抗原, 在目前已知的众多肿瘤相关抗原中, 癌-睾丸抗原 (cancer testis antigen, CTA) 是一类非常适用于肿瘤免疫治疗的抗原。因

为 CTA 具有独特的表达模式,即在各种肿瘤组织中有不同频率的表达,而在正常组织的表达仅限于睾丸内的生殖细胞,偶然可在胎盘组织中表达<sup>[1]</sup>。利用其作为肿瘤疫苗诱导的免疫应答能特异性地杀伤肿瘤细胞,而不损害全身其它正常细胞。NY-SAR-35 是近年来新发现的广谱特异性肿瘤抗原,这一抗原是运用重组克隆表达抗原的血清学鉴定技术在全身肿瘤中新发现的 CTA。虽然,NY-SAR-35 在多种全身肿瘤中有初步的研究,但是,至今尚未有文献报道其在 RB 中的表达情况。为了解 NY-SAR-35 在 RB 中的表达情况及其与临床指标间的关系,以明确该抗原在 RB 免疫治疗中的应用前景,我们利用 RT-PCR 技术检测了 NY-SAR-35 在 RB 中的表达情况,现报告如下。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 所有标本来源于广西医科大学第一附属医院眼科中心 2004-10~2006-07 的住院病人(标本来源得到广西医科大学第一附属医院眼科中心的同意)共 49 例,其中男性 27 例,女性 22 例。RB 组织 15 例中,男 7 例,女 8 例;年龄 2 个月~5 岁,平均年龄( $2.0 \pm 1.6$ )岁, $\leq 2$  岁者 9 例, $> 2$  岁者 6 例;眼内期 9 例,青光眼期 4 例,眼外期 2 例;低分化型 8 例,未分化型 7 例;肿瘤 $\leq 15$  mm 者 6 例, $> 15$  mm 者 9 例。非肿瘤病变视网膜组织 12 例中,男性 7 例,女性 5 例;年龄 5~65 ( $31.1 \pm 9.5$ )岁。眼部正常组织(眼睑皮肤 12 例、眼肌 5 例、结膜 5 例)22 例中,男性 10 例,女性 12 例;年龄 11~34 ( $18.2 \pm 7.3$ )岁。所有标本取材前均经患者家属同意,RB 病人的标本均经病理检查确诊,组织离体后(20 min)置液氮速冻,然后转置 $-70$  °C 低温冰箱保存备用。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 总 RNA 提取** 分别称取 300 mg  $-70$  °C 保存的肿瘤组织及正常组织,利用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取组织总 RNA。所得 RNA 溶于无 RNA 酶的纯水中,经琼脂糖凝胶电泳和双光束紫外分光光度计测定 A 值,确定所提取的总 RNA 无降解。

**1.2.2 cDNA 合成和质量检测** 取 3  $\mu$ g 总 RNA,用逆转录酶合成 cDNA(MBI 公司逆转录试剂盒),所得 cDNA 通过 PCR 扩增看家基因 GAPDH 以检测 cDNA 的质量。将合格的 cDNA 分装, $-20$  °C 保存备用。

**1.2.3 靶基因的 RT-PCR 检测** 采用 MBI 公司的 TaqDNA 聚合酶进行 PCR 检测。所有引物均由上海

生物工程公司合成(见表 1)。PCR 反应条件及参数(25  $\mu$ l 体系):1.0  $\mu$ l 的逆转录产物,10  $\mu$ mol/L 的特异性上、下游引物各 1  $\mu$ l,5 u/ $\mu$ l 的 Taq DNA 聚合酶 0.125  $\mu$ l,2.5 mmol/L 的 dNTP 2  $\mu$ l,25 mM 的  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ l,10  $\times$  buffer 的 PCR 反应缓冲液 2.5  $\mu$ l。反应体系分别为 GAPDH:94 °C 50 s,67 °C 30 s,72 °C 30 s;OY-TES-1:94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 2 min。所有反应均经预变性 94 °C 5 min,扩增 35 个循环,72 °C 后延伸 8 min。每轮 PCR 反应中均采用睾丸 cDNA 为阳性对照,不加模板为空白对照。反应结束后分别取 5  $\mu$ l 的 PCR 反应产物经 2% 的凝胶电泳、溴化乙锭染色鉴定及照相。

表 1 引物序列及扩增片段长度

| 基 因       | 引物序列                                                                       | 产物片段<br>(bp) |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|--------------|
| GAPDH*    | S:5'ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'<br>AS:5'TCC CAC CAC CCT GTT GCT GTA 3'   | 450          |
| NY-SAR-35 | S:5'CTT GGT GCG ATC AGC CTT AT 3'<br>AS:5'TTG ATG CAT GAA AAC AGA ACT C 3' | 377          |

注:\* 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)S:上游引物;AS:下游引物

**1.2.4 DNA 测序** 随机选取阳性的 PCR 产物,经纯化后进行双向 DNA 测序(ABI3100 自动测序仪,美国生产)。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS13.0 软件包进行数据的统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

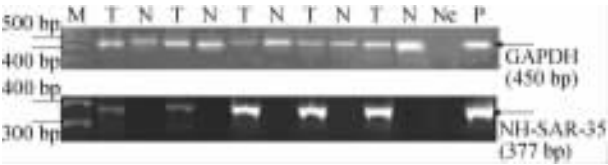
## 2 结果

**2.1 GAPDH 和 NY-SAR-35 基因在组织中表达的情况** 在 15 例 RB 组织中,NY-SAR-35 肿瘤基因有较高的表达率,为 60.0% (95% CI:35.2%~84.8%),明显高于非肿瘤病变视网膜组织和其他眼部正常组织(0.0%) ( $P < 0.05$ ),表明它在 RB 组织中的表达率高于在非肿瘤病变视网膜组织及其他正常眼部组织中的表达率。见表 2,图 1。

表 2 GAPDH 和 NY-SAR-35 基因在组织中表达的情况[n(%)]

| 组 别       | 例数 | GAPDH     | NY-SAR-35 |
|-----------|----|-----------|-----------|
| RB①       | 15 | 15(100.0) | 9(60.0)   |
| 非肿瘤病变视网膜② | 12 | 12(100.0) | 0(0.0)*   |
| 其他正常眼部组织③ | 22 | 22(100.0) | 0(0.0)▲   |

注:与①比较,\*  $P = 0.0040$ ;▲  $P = 0.0002$



M: 分子量标准(100 bp); P: 阳性对照(睾丸组织); Ne: 空白对照; T: RB 组织; N: 正常组织(非肿瘤病变视网膜、其他眼部组织)

图 1 NY-SAR-35 的 PCR 扩增产物电泳图

**2.2 NY-SAR-35 基因表达与 RB 临床相关指标的关系** 经分析发现,在 RB 组织中,NY-SAR-35 基因的表达与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度和临床分期等无显著相关性( $P>0.05$ )。见表 3。

表 3 NY-SAR-35 基因表达与 RB 临床相关指标的关系[ $(n=15),n(\%)$ ]

| 分 类      |      | NY-SAR-35 | $\chi^2$ | P     |
|----------|------|-----------|----------|-------|
| 性别       | 男    | 4/7(57.1) | 0.321    | 0.751 |
|          | 女    | 5/8(62.5) |          |       |
| 年龄(岁)    | ≤2   | 7/9(77.8) | 1.400    | 0.237 |
|          | >2   | 2/6(33.3) |          |       |
| 临床分期     | 眼内期  | 5/9(55.6) | 0.532    | 0.714 |
|          | 青光眼期 | 3/4(75.0) |          |       |
|          | 眼外期  | 1/2(50.0) |          |       |
| 肿瘤大小(mm) | ≤15  | 5/6(83.3) | 0.938    | 0.333 |
|          | >15  | 4/9(44.4) |          |       |
| 病理分型     | 低分化  | 5/7(71.4) | 0.411    | 0.577 |
|          | 未分化  | 4/7(57.1) |          |       |

**2.3 DNA 测序** 随机抽取 PCR 阳性产物进行 DNA 测序,所得序列与美国 NCBI BLAST 基因库检索的 NY-SAR-35(Genbank Access 号为 gi:29164876)进行比对,其符合率为 99.0%,证明扩增的产物为 NY-SAR-35 的片段。

3 讨论

**3.1 李永平等**<sup>[2]</sup>提出制备肿瘤疫苗是肿瘤免疫治疗的新方法之一,其目的与传统意义上的疫苗不同,主要不是用于肿瘤的预防,而是通过疫苗刺激机体产生对肿瘤的免疫应答来治疗肿瘤。同时提出采用机体内功能最强的抗原提呈细胞即树突细胞(dendritic cells,DC)作为疫苗载体,以肿瘤抗原体外冲击使其致敏,保证肿瘤抗原能有效摄取并可提供所需要的共刺激信号,显示了优于常规疫苗的前景。1995 年德国的免疫学家创立了 SEREX,并运用该技术发现了大量肿瘤抗原,同时,他们将所发现的肿瘤抗原分为五类:(1)CTA;(2)分化抗原;(3)突变基因产物抗原;(4)病毒抗原;(5)自身抗原;其中最

应用前景的肿瘤抗原为 CTA。随着技术不断发展,CTA 在各种全身肿瘤中已有很多相关研究,其中一些 CTA 已应用于全身各种肿瘤的免疫治疗<sup>[3]</sup>,主要是黑色素瘤的免疫治疗,并收到了可喜的疗效。目前国外肿瘤免疫学家除了继续不断地努力寻找和发现更多新的 CTA 外,同时也致力于对各种类型肿瘤中的 CTA 基因的表达研究<sup>[4-6]</sup>,目的是筛选出更多高表达的特异性 CTA,为建立应用于治疗各种肿瘤的肿瘤疫苗打开新的路子。

**3.2 Lee 等**<sup>[7]</sup>于 2003 年应用恶性纤维组织细胞瘤和纤维肉瘤患者的血清筛选滑膜肉瘤 cDNA 表达文库,发现一种新的 CTA,命名为 NY-SAR-35,运用 RT-PCR 技术在全身多种肿瘤组织中检测,发现它在黑色素瘤、肉瘤、肺癌、乳腺癌等有不同程度的表达(6.3%~23.1%)。此后,范蓉等<sup>[8]</sup>在脑膜瘤组织中发现其表达率为 36.6%,许涛等<sup>[9]</sup>检测出其在肝癌表达率为 38.1%(24/63)。国内外目前尚未见有关 NY-SAR-35 在 RB 中的研究报道。因此,我们研究了 15 例 RB 组织,发现 NY-SAR-35 在 RB 中的表达率高达 60%,而在非肿瘤病变视网膜和其他正常组织中均无表达,说明该基因仅仅特异性地表达于肿瘤组织中,而在正常组织中没有表达。尽管其表达与患者年龄、性别以及病理分型等相关临床资料没有明显的相关性,但其却显示了在肿瘤组织中存在高表达率。我们还发现其在 RB 中的表达率(60%)明显高于其它肿瘤(0%~36.6%)<sup>[7,8]</sup>,提示它可能是 RB 的特异性肿瘤抗原,值得进一步研究。

**3.3 由于 RB 样本例数较少,NY-SAR-35 在 RB 中表达率的 95% CI 跨度较大,今后需加大样本例数以获得较好的 CI。此外,目前对 NY-SAR-35 表达情况的了解均是局限于 mRNA 水平,而从分子生物学的角度来看,mRNA 水平与蛋白质表达并非严格相关。因此,在目前定性研究的基础上,今后还需做定量 PCR 和免疫组织化学定位研究,为 RB 的免疫诊断及治疗提供更可靠的实验依据。**

参考文献

1 Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy[J]. Immunol Rev, 2002, 188: 22-32.  
2 李永平, 冯官光, 易玉珍. 国内视网膜母细胞瘤的研究现状及展望[J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(4): 217-219.  
3 Marchand M, van Barn N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-AL[J]. Int J Cancer, 1999, 80(2): 219-230.

- 4 Sahin U, Türeci O, Chen YT, et al. Expression of multiple cancer/teatis(CT) antigens in breast cancer and melanoma; basis for polyvalent CT vaccine strategies[J]. Int J Cancer, 1998, 78(3): 387 - 389.
  - 5 Sahin U, Koslowski M, Türeci O, et al. Expression of cancer testis genes in human brain tumors[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(10): 3916 - 3922.
  - 6 Xie X, Wacker HH, Huang S, et al. Differential expression of cancer testis genes in Non-Hodokin's lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 167 - 173.
  - 7 Lee SY, Obata Y, Yoshida M, et al. Immunomic analysis of human sarcoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(5): 2651 - 2656.
  - 8 范 蓉, 肖绍文, 罗 昱, 等. 癌-睾丸抗原基因 NY-SAR-35 在人类脑膜瘤中的表达[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(2): 109.
  - 9 许 涛, 张小静, 王 峰, 等. 肝细胞癌中 NY-SAR-35、NY-TLU-57 和 NY-ESO-1 基因的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(10): 545 - 548.
- [收稿日期 2011-03-16][本文编辑 谭 毅 黄晓红]

## 课题研究 · 论著

# 抗甲状腺药物治疗彩超不同声像特征原发性甲亢的疗效观察

许春梅, 朱尚勇, 刘红燕, 陈彦红, 万里凯, 王小燕, 康利克

基金项目: 广西科技厅青年基金资助项目(编号: 桂科青 0339019)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院超声科(许春梅, 陈彦红, 王小燕, 康利克), 内分泌科(刘红燕), 生殖医学与遗传中心(万里凯); 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院超声科(朱尚勇)

作者简介: 许春梅(1966-), 女, 大学本科, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 腹部超声诊断。E-mail: ld9696@yahoo.com.cn

**[摘要]** 目的 探讨抗甲状腺药物治疗两种彩超不同声像特征原发性甲亢的疗效。方法 随机选择均匀回声型(均匀组)及不均匀回声型(不均匀组)原发性甲亢患者各 31 例, 两组均用抗甲状腺药物治疗, 于治疗前后检测甲状腺功能、甲状腺抗体, 同时对甲状腺进行彩超检查, 观察甲状腺声像、彩色血流分布, 检测甲状腺大小及上动脉血流频谱参数。结果 两组治疗前各检测指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 经抗甲状腺药物治疗后两组疗效比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。均匀回声型治疗效果明显优于不均匀回声型( $P < 0.01$ ), 不均匀回声型组其危险度高于均匀回声型组( $\hat{OR} = 12.923, P = 0.000, 95\% CI: 3.225 \sim 51.781$ )。结论 抗甲状腺药物对原发性甲亢均匀回声型疗效较好, 对不均匀回声型疗效较差, 这对临床治疗方法的选择有重要的参考意义。

**[关键词]** 原发性甲亢; 抗甲状腺药物; 疗效

**[中图分类号]** R 581.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)09-0816-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.09.02

**Observation of curative effects of antithyroid drug on the patients with primary hyperthyroidism of different imaging** XU Chun-mei, ZHU Shang-yong, LIU Hong-yan, et al. Department of Ultrasonography, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the curative effects of antithyroid drug (ATD) on the patients with primary hyperthyroidism (PHT) of different imaging. **Methods** Sixty-two patients with PHT of different imaging [homogeneous echo ( $n = 31$ ) and inhomogeneous echo ( $n = 31$ )] were randomly chosen and were treated with ATD. The volume of thyroid gland (V) was examined by using B-ultrasound and systolic and diastolic blood flow velocity ( $V_{max}$ ,  $V_{min}$ ) and resistance index (RI) were examined by using CDFI in these two groups. Serum levels of  $TT_3$ ,  $TT_4$ ,  $FT_3$ ,  $FT_4$ , TSH, TRH, TRAb, TGAb and TMAb were also assayed before and after treatment. **Results** There