

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.016

非小细胞肺癌外周血抗 Hu 抗体水平与远处转移的相关性

马增霞¹, 关雅萍^{1▲}, 张先欣¹, 王俊², 王宝成², 荣学东¹, 胡华¹(1. 山东省胸科医院呼吸科, 山东 济南 250000; 2. 中国人民解放军济南军区总医院 肿瘤科, 山东 济南 250031)

[摘要] **目的:** 检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者外周血抗 Hu 抗体水平与健康志愿者抗 Hu 抗体水平进行比较, 并分析其与肿瘤转移部位和多种临床病理变量间的关系。**方法:** 收集济南军区总医院肿瘤科 2013 年 6 月至 2013 年 12 月 NSCLC 患者外周血清标本 75 例, 同时收集成年健康志愿者外周血清标本 100 例(除外肿瘤及神经系统疾病史)作为阴性对照, 按照酶联免疫吸附试验原理, 检测 175 例血清抗 Hu 抗体表达。纳入研究的变量主要包括: 75 例 NSCLC 患者的性别、年龄、组织类型、核分化级别、EGFR 突变状态、肿瘤标志物(CEA、CY21-1 和 NSE)水平及远处转移部位(脑转移、骨转移及其他部位转移)。**结果:** 肺癌患者外周血抗 Hu 抗体水平[(40.00 ± 35.76) ng/ml]显著高于健康人群[(16.40 ± 8.19) ng/ml, $P=0.000$]。75 例患者中有 62.67%(47/75)抗 Hu 抗体高水平表达, 37.33%(28/75)呈低表达。外周血抗 Hu 抗体水平与患者脑转移($P=0.015$)显著相关; 81.81%(9/11)的脑转移患者检测到高水平的抗 Hu 抗体, 但仅仅 50.00%(32/64)的非脑转移患者检测到高水平的抗 Hu 抗体; 抗 Hu 抗体水平与患者性别、年龄、组织类型、分期、EGFR 突变、CEA 水平、CY21-1、NSE、骨转移及其他部位转移无关($P>0.05$)。多变量回归分析显示, 外周血中抗 Hu 抗体水平是预测脑转移的独立变量($P=0.015$)。**结论:** 非小细胞肺癌患者外周血中抗 Hu 抗体呈高水平, 与脑转移显著相关。抗 Hu 抗体在非小细胞肺癌脑转移中的作用机制尚需进一步明确。

[关键词] 非小细胞肺癌; 抗 Hu 抗体; 远处转移

[中图分类号] R734.2; R730.3; R73-37

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)04-0500-04

Association of distant tumor metastasis with the presence of anti-Hu antibody in peripheral blood of NSCLC patients

Ma Zengxia¹, Guan Yaping^{1▲}, Zhang Xianxin¹, Wang Jun², Wang Baocheng², Rong Xuedong¹, Hu Hua¹(1. Department of Respiratory Disease, Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan 250000, Shandong, China; 2. Department of Oncology, General Hospital, Jinan Command of the People's Liberation Army, Jinan 250031, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical pathological features of patients with non-small cell lung cancer who had anti-Hu antibody and whether the presence of the antibody is associated with distant metastasis of the tumor. **Methods:** Peripheral blood samples were collected from 75 NSCLC patients enrolled into the Department of Oncology between June and December of 2013, and from 100 healthy volunteers who did not have tumor or neurologic history and underwent blood test between November and December of 2013 in the Clinical laboratory, General Hospital, Jinan Command of the People's Liberation Army. Anti-Hu antibody was measured by ELISA. Clinical pathological features investigated include sex, age, pathological type, differentiation stage, EGFR mutation, tumor markers (CEA, CY21-1, and NSE), and distant metastasis. **Results:** Compared with healthy volunteers, NSCLC patients had significantly elevated anti-Hu antibody titration (40.00 ± 35.76 ng/ml vs 16.40 ± 8.19 ng/ml, $P<0.01$). The increase of the anti-Hu antibody was significantly associated with brain metastasis (81.81% vs 50.00%, $P=0.015$), but not distant metastasis to other tissues. It was also independent of sex, age, gender, pathological stage, EGFR mutation, and the levels of CEA and NSE (all $P>$

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助项目(No. 30901788; No. 81272619)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30901788; No. 81272619)

[作者简介] 马增霞(1980-), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事呼吸疾病的基础及临床研究, E-mail: 443999470@qq.com; 关雅萍(1989-), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事肺癌转移机制方面研究, E-mail: guanyaping123@163.com。▲为共同第一作者

[通信作者] 王宝成(Wang Baocheng, corresponding author), E-mail: baochengwang@hotmail.com

0.05)。Multivariate regression analysis further indicated that increased anti-Hu antibody level was an independent variable for brain metastasis prediction ($P=0.015$)。 **Conclusion:** Peripheral blood anti-Hu antibody is increased in NSCLC patients and is associated with brain metastasis of the tumor, which deserves further investigation to understand the mechanism.

[**Key words**] non-small cell lung cancer(NSCLC); anti-Hu antibody; distant metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 500-503]

抗 Hu 抗体(anti-Hu antibody)又称抗神经元核抗体 1(the antineuronal nuclear antibody 1, ANNA-1),是一种多克隆的 IgG 抗体,针对的抗原是 Hu 家族的抗原。人们最初在神经系统疾病患者外周血中检测到抗 Hu 抗体,它来源于特异性自身免疫反应。恶性肿瘤可表达 Hu 家族抗原,当抗原被免疫系统识别产生相关抗体,这些抗体不仅可以识别肿瘤细胞,还可以识别任何表达该抗原的神经细胞。研究^[1-3]发现,抗 Hu 抗体水平与肿瘤患者的脑转移或副瘤综合征有导致的神经系统症状有关,如记忆力下降、行为异常、感觉障碍、肌力降低等。既往研究^[4]表明,抗 Hu 抗体的高表达可发生于原发肿瘤诊断前,甚至在肿瘤早期即可出现,而发生脑转移后则表现尤为突出,其中最常见的恶性肿瘤是小细胞肺癌。也有少量报道神经症状可出现于卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌,甲状腺癌、膀胱癌和霍奇金淋巴瘤等^[5-10]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的主要组织类型,约有 30% ~ 50% 会发生脑转移。有关 NSCLC 抗 Hu 抗体的研究较少,陈齐鸣等^[1]报道了 1 例肺腺癌患者具有典型的神经系统症状,且 Hu 抗体呈阳性表达。为研究探索 NSCLC 抗 Hu 抗体表达情况,本研究检测了 63 例 NSCLC 外周血抗 Hu 抗体表达,并分析其表达与肿瘤转移部位及各临床病理特征之前的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集

收集济南军区总医院肿瘤科 2013 年 6 月至 2013 年 12 月经病理或细胞学证实的 NSCLC 患者外周血清标本 75 例。纳入标准:所有患者在抽血前均未进行任何化疗、放疗或其他抗肿瘤治疗,均经病理或细胞学证实为 NSCLC,有完整的临床和病理资料。排除条件:不符合入组条件者,妊娠期、哺乳期患者,同时患有其他肿瘤或者神经系统疾病的患者。其中男性 45 例、女性 30 例,发病年龄 25 ~ 88 岁,中位年龄 61 岁。其中脑转移者 13 例、骨转移者 23 例、其他部位转移 23 例。根据 2012 年美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)和国际抗癌联盟(Union for International Cancer Centre,

UICC)联合修订的 TNM 分期标准进行分期,75 例 NSCLC 组织标本中, I 期 0 例, II 期 3 例(II A 期 2 例、II B 期 1 例), III 期 12 例(III A 期 9 例、III B 期 3 例), IV 期 60 例。收集济南军区总医院检验科 2013 年 11 月至 2013 年 12 月健康志愿者外周血清标本 100 例作为阴性对照。纳入标准:既往体健,志愿参加研究,有完整的病史及病例资料,可追踪随访,无肿瘤及神经系统疾病病史。排除标准:不符合入组条件者,妊娠期、哺乳期女性。所有标本及临床资料的收集均经解放军济南军区总医院医学伦理委员会批准,征得患者及志愿者同意并签署知情同意书。

1.2 ELISA 方法检测抗 Hu 抗体表达

根据酶免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法原理,采用美国 TSZ 公司合成试剂盒,检测 75 例晚期 NSCLC 患者及 100 例成年健康志愿者血清抗 Hu 抗体水平。步骤如下:先将全血标本离心 15 min($1\ 409 \times g$),保存上层淡黄色血清;抗 Hu 抗体标准品按浓度梯度(1.5、3、6、12、24 ng/ml)稀释,分别设置标准孔(5 个)、空白孔(不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔;在酶标包被板上 5 个标准孔各加入不同浓度标准品 50 μ l,待测样品孔先加入样品稀释液 40 μ l,然后再加待测血清 10 μ l,封板膜封板后 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,随后将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复 5 次,拍干;每孔加入酶标试剂 50 μ l,空白孔除外;再次温育、洗涤;每孔先加入显色剂 A 50 μ l,再加入显色剂 B 50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min;每孔加入终止液 50 μ l,终止反应。实验重复 3 次。

1.3 结果测定

将微孔板置于酶标仪中,空白孔调零,450 nm 波长处测定标准物梯度浓度对应的光密度(D)值,建立标准曲线。然后检测待测血清 D 值,再乘以稀释倍数(标准品浓度梯度进行设置后可知其稀释倍数为 5 倍)最终得出待测血清的实际浓度。

1.4 统计学处理

以 SPSS13.0 统计学软件进行统计学分析。纳入研究的变量主要包括:患者的性别、年龄、组织类

型、EGFR 突变状态、肿瘤标志物(CEA、CY21-1 和 NSE)水平及远处转移部位(脑转移、骨转移及其他部位转移)。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数之间的比较用 Student's *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析。多变量分析采用多元线性回归分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 Hu 抗体在 75 例 NSCLC 患者及 100 例健康志愿者血清中的表达

肺癌患者外周血的抗 Hu 抗体水平(40.00 ± 35.76 ng/ml)显著高于健康人群(16.40 ± 8.19 ng/ml) ($P = 0.000$)。因该抗体采用 ELISA 方法检测尚无明确表达值参考范围, 而健康人群抗 Hu 抗体水平均数的 95% 可信区间为 $14.78 \sim 18.03$ ng/ml, 因此本研究以 18.03 ng/ml 为标准进行统计分析。75 例患者中共有 62.67% (47/75) 抗 Hu 抗体高水平表达, 37.33% (28/75) 例呈低表达。

2.2 抗 Hu 抗体表达与转移部位及各临床病理特征的相关性

单因素 χ^2 检验提示各临床病理特征与抗 Hu 抗体之间无明显相关性。采用多元线性回归分析结果提示, 外周血抗 Hu 抗体水平与患者脑转移($P = 0.015$)显著相关; 84.61% (11/13) 的脑转移患者检测到高水平的抗 Hu 抗体, 但仅 58.06% (36/62) 的非脑转移患者检测到高水平的抗 Hu 抗体。高抗 Hu 抗体水平与骨转移($P = 0.544$)及其他部位转移($P = 0.640$)无关。75 例患者各临床病理特征与抗 Hu 抗体表达情况见表 1。

抗 Hu 抗体水平与患者性别($P = 0.751$)、年龄($P = 0.211$)、组织类型($P = 0.893$)、EGFR 突变($P = 0.808$)、CEA 水平($P = 0.580$)、CY21-1 水平($P = 0.944$)、NSE 水平($P = 0.526$)无关。多变量回归分析显示, 外周血中抗 Hu 抗体水平是预测脑转移的独立变量($P = 0.015$)。

3 讨论

Hu 抗原家族是一组与高度保守的胚胎致死异常视觉(embryonic lethal abnormal vision, ELAV)家族同源的 RNA 结合蛋白, 根据其是否与神经元特异性结合分为两类: 一是特异性神经元 Hu 抗原, 包括 HuB、HuC 和 HuD, 以中枢神经系统和性腺表达为主, 而非神经性正常组织中无明显表现, 它们在神经细胞发育过程中发挥重要作用; 二是可广泛表达于

非神经组织和肿瘤组织的 Hu 抗原, 即 HuR, 其抗原表达与肿瘤发生、发展密切相关^[11]。本课题组前期研究发现, 胞质表达的 HuR 是肺癌、乳腺癌、食管癌患者不良的预后因子^[12-16], 与其在转录后水平调控肿瘤耐药和转移相关分子的表达有关^[17-18]。但针对 HuR 产生的特异性抗体及抗 Hu 抗体在 NSCLC 中的作用未见系统报告。

表 1 NSCLC 患者抗 Hu 抗体表达与临床病理特征之间的关系(*n*)

Tab.1 Correlation between anti-Hu antibody expression and clinic characteristics in NSCLC (*n*)

Clinic characteristic	Case	Higher anti-Hu case	χ^2	<i>P</i>
Sex			0.851	0.751
Male	45	29		
Female	30	18		
Age(<i>t/a</i>)			0.807	0.211
≥ 61	40	24		
< 61	35	23		
Pathological type			0.848	0.893
SCC	21	13		
AC	40	27		
Others	14	7		
EGFR mutation			0.705	0.808
Yes	5	4		
No	70	43		
CEA			0.633	0.580
High	43	29		
Normal	32	18		
CY21-1			0.075	0.944
High	67	46		
Normal	8	1		
NSE			0.521	0.526
High	17	10		
Normal	58	37		
Brain metastasis			0.412	0.015
Yes	13	11		
No	62	36		
Bone metastasis			0.918	0.544
Yes	23	14		
No	52	33		
Other metastasis			0.697	0.640
Yes	23	16		
No	52	31		

NSCLC 脑转移发生率较高, 容易导致神经系统受压迫或受侵犯, 产生一系列神经系统症状。本研

究也发现,NSCLC 脑转移患者抗 Hu 抗体表达明显升高,而与其他部位转移及临床变量均无明显相关性,提示脑转移过程激发机体发生免疫反应,导致抗神经元抗体产生。推测其主要机制有以下几点:(1)肿瘤脑转移灶的发展压迫周围正常脑神经组织造成局部水肿、变性、炎症反应甚至坏死,刺激神经元细胞的免疫反应,产生特异性抗神经元抗体;(2)与其他部位的定植转移不同,NSCLC 在发生脑转移时肿瘤细胞发生异质性改变,出现某些与神经元细胞核抗原相同的抗原决定簇,激发机体的防御机制,造成抗体的产生;(3)某些脑转移导致的神经系统症状,与 Hu 抗原抗体反应导致的神经系统症状相似,反馈性刺激上游分子,激活体液免疫和细胞免疫进而产生免疫复合物。

本研究对 NSCLC 中抗 Hu 抗体表达进行了首次系统报道,尤其是该抗体与 NSCLC 脑转移之间的相关性具有重要临床意义。采用单因素分析时无明显意义,而多因素分析意义明显,考虑是由于单因素分析未考虑多种因素的相互作用,因此优先应用多因素分析结果。本研究旨在探讨抗 Hu 抗体表达与 NSCLC 患者之间初步的相关性,研究设计过程相对简易,未对 75 例患者的神经系统症状纳入分析,因此,未能将各项神经系统症状与抗 Hu 抗体水平相关性进行研究。但目前结论仍可说明不仅小细胞肺癌患者可检测到高水平的抗 Hu 抗体表达,NSCLC 患者也有高水平的抗 Hu 抗体水平,抗 Hu 抗体水平与 NSCLC 脑转移事件密切相关。抗 Hu 抗体水平与脑转移密切相关提示它可能成为一种特异性标记物,用于 NSCLC 脑转移早期预警。然而,抗 Hu 抗体水平是否与脑转移相关的临床症状相关,各项神经系统症状是否为抗 Hu 抗体表达的相关作用因素目前尚不清楚。将来的研究可将抗 Hu 抗体检测扩展至 NSCLC 诊断,甚至肺癌高危人群的筛查,以及 NSCLC 患者放疗、化疗和靶向治疗的监测。另一方面,在脑转移患者中检测到高水平的抗 Hu 抗体水平,它与原发肿瘤 HuR 水平之间的关系并不清楚,抗 HuR 抗体是一种保护性的抗体还是脑转移后出现对机体产生损伤,目前尚无结论,需要扩大研究的样本量或者通过设计前瞻性试验,以分析抗 Hu 抗体水平对肿瘤复发、进展、生存的影响。这些方面的研究目前正在进行中。

[参 考 文 献]

[1] 陈齐鸣,宋文英,温伟,等. 特异性神经元抗核抗体--Hu 抗体的研究 [J]. 中华神经外科杂志, 1996, 29(13): 156-159.

- [2] 白鹤,胡霞,周晓辉. 神经系统副肿瘤综合征的临床特征 [J]. 新疆医学, 2015, 44(4): 526-527.
- [3] McKeon A. Paraneoplastic and other autoimmune disorders of the central nervous system [J]. Neurohospitalist, 2012, 3(2): 53-64.
- [4] 王刚,陈齐鸣,祝延,等. 特异性神经元抗 Hu 抗体对小细胞肺癌早期诊断价值的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(12): 732-735.
- [5] Okagbue UE, Wang LY, Cymet T, et al. A rare case of anti-Hu paraneoplastic neurologic syndrome in association with cervical cancer [J]. Compr Ther, 2008, 34(1): 48-50.
- [6] Vernino S, Eggenberger ER, Rogers LR, et al. Paraneoplastic neurological autoimmunity associated with ANNA-1 autoantibody and thymoma [J]. Neurology, 2002, 59(6): 929-932.
- [7] Hee KY, Se JW, Woong YP, et al. Paraneoplastic neuromyelitis optica associated with ANNA-1 antibodies in invasive thymoma [J]. BMC Ophthalmol, 2014, 14: 106.
- [8] Lukacs S, Szabo N, Woodhams S. Rare association of anti-Hu antibody positive paraneoplastic neurological syndrome and transitional cell bladder carcinoma [J]. Urology, 2012, 2012: 724940.
- [9] Hammack J, Kotanides H, Rosenblum MK, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration. II. Clinical and immunologic findings in 21 patients with Hodgkin's disease [J]. Neurology, 1992, 42(10): 1938-1943.
- [10] Lucchinetti CF, Kimmel DW, Lennon VA. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear autoantibodies [J]. Neurology, 1998, 50(3): 652-657.
- [11] Wang J, Guo Y, Chu H, et al. Multiple functions of RNA binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5): 10015-10041.
- [12] Wang J, Wang B, Bi J, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer [J]. Med Oncol, 2011, 28(Suppl 1): 577-585.
- [13] Wang J, Li D, Wang BC, et al. Predictive and prognostic significance of Cytoplasmic expression of ELAV-like protein HuR in invasive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 141(2): 213-224.
- [14] 关雅萍. RNA 结合蛋白 HuR、TTP 与 miR-133b 在非小细胞肺癌中的表达和预后作用的研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2014.
- [15] Zhu Z, Wang B, Bi J, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with P-gp, HER-2 positivity and poor outcome in breast cancer [J]. Tumor Biol, 2013, 34(4): 2299-2308.
- [16] Zhang C, Wang B, Zhu Z, et al. Cytoplasmic HuR expression as a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Tumor Biol, 2014, 35(1): 73-80.
- [17] Wang J, Zhao W, Guo Y, et al. The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis [J]. Oncology, 2009, 76(6): 420-429.
- [18] 楚慧丽,王俊,朱忠鹏,等. 沉默 HuR 表达增加人乳腺癌耐药 MCF-7/Adr 细胞对多柔比星的敏感性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(2): 153-157.

[收稿日期] 2015 - 02 - 01

[修回日期] 2015 - 06 - 22

[本文编辑] 黄静怡