

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.014

· 临床研究 ·

## 负性协同刺激分子 B7-H1 和 B7-H3 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

陈陆俊<sup>1</sup>, 孙 静<sup>1</sup>, 张 磊<sup>2</sup>, 谈 炎<sup>3</sup>, 张光波<sup>1</sup>, 张学光<sup>1\*</sup> (1. 苏州大学 医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007;  
2. 苏州大学 附属第三医院 乳腺外科, 江苏 常州 213003; 3. 苏州大学 附属第三医院 病理科, 江苏 常州 213003)

[摘要] 目的: 探讨负性协同刺激分子 B7-H1、B7-H3 在乳腺癌组织中的表达及其与患者临床病理参数、预后及 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度的相关性。方法: 选取 2003 年 3 月至 2004 年 1 月在苏州大学附属第三医院乳腺外科接受手术治疗的女性乳腺癌患者 49 例(均经病理诊断确认为浸润性导管癌)的乳腺癌组织标本, 免疫组织化学方法检测乳腺癌组织中协同刺激分子 B7-H1、B7-H3 的表达以及 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度。结果:(1)乳腺癌组织中 B7-H1 阳性表达率为 53.06%(26/49), 其表达水平与肿瘤大小呈正相关( $P < 0.05$ )、与 Her2/neu 表达水平呈正相关( $P < 0.05$ )、与 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度呈负相关( $P < 0.05$ );(2)乳腺癌组织中 B7-H3 阳性表达率为 59.18%(29/49), 其表达水平与病理分期呈正相关( $P < 0.05$ )、与患者预后呈负相关( $P < 0.05$ );(3)乳腺癌组织中 B7-H1 和 B7-H3 的表达水平呈正相关( $r = 0.3316, P < 0.05$ )。结论: 负性协同刺激分子 B7-H1 和 B7-H3 在乳腺癌中的表达水平与临床病理因素及预后密切相关, 对该两分子的检测在乳腺癌诊断和预后判断中具有潜在的临床应用价值。

[关键词] B7-H1; B7-H3; CD3<sup>+</sup>T 细胞; 乳腺癌

[中图分类号] R737.9; R730.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)03-0277-05

## Expression of negative costimulatory molecules B7-H1 and B7-H3 in breast cancer and their clinical significance

CHEN Lu-jun<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>, TAN Yan<sup>3</sup>, ZHANG Guang-bo<sup>1</sup>, ZHANG Xue-guang<sup>1\*</sup> (1. Medical Biotechnology Institute, Suzhou University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Department of Breast Surgery, Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu, China; 3. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of negative costimulatory molecules B7-H1 and B7-H3 in breast cancer and its relationship with patient's clinical parameters, prognosis and infiltration of CD3<sup>+</sup>T lymphocytes. **Methods:** Forty-nine breast cancer patients, who were diagnosed as having infiltrating ductal breast cancer histopathological were selected from Third Affiliated Hospital of Suzhou University from March 2003 to January 2004. B7-H1 and B7-H3 expression and CD3<sup>+</sup>T lymphocytes infiltration in breast cancer tissues were detected by immunohistochemistry. **Results:** (1) B7-H1 positive expression rate was 53.06%(26/49) in breast cancer tissues; the expression was positively correlated with the tumor size ( $P < 0.05$ ) and Her2/neu expression ( $P < 0.05$ ), and negatively with the intensity of CD3<sup>+</sup>T infiltration ( $P < 0.05$ ). (2) B7-H3 positive expression rate was 59.18%(29/49) in breast cancer tissues; the expression was positively correlated with patient's pathological stage ( $P < 0.05$ ) and negatively with postoperative prognosis ( $P < 0.05$ ). (3) B7-H1 expression in breast cancers was positively correlated with B7-H3 expression ( $r = 0.3316, P < 0.05$ ). **Conclusion:** Expression of negative costimulatory molecules B7-H1 and B7-H3 in breast cancer is significantly correlated with the clinicopathological parameters and postoperative prognosis of patients. B7-H1 and B7-H3 might have a potential role in clinical diagnosis and prognostic evaluation of breast cancers.

[Key words] B7-H1, B7-H3, CD3<sup>+</sup>T lymphocyte, breast cancer

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 277-281]

[基金项目] 江苏省普通高校研究生科研创新计划(No. ZY320710)。Supported by the Innovative Research Project for Postgraduates in Colleges of Jiangsu Province(No. ZY320710)

[作者简介] 陈陆俊(1981-),男,江苏省丹阳市人,硕士研究生,主要从事肿瘤免疫学方面的研究

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: xueguangzh@yahoo.com.cn

乳腺癌是危害妇女健康的常见肿瘤,其发病率有逐年增加的趋势。目前,外科手术治疗、放疗、化疗、内分泌治疗和免疫治疗等综合治疗模式已广泛应用于乳腺癌的临床治疗,使患者生存率得到较大的提高,但仍有部分患者肿瘤复发或预后不理想。为此,进一步研究乳腺癌肿瘤复发因素及肿瘤免疫逃逸机制,具有重要的理论意义和临床应用价值。

T淋巴细胞是介导肿瘤免疫应答的重要效应细胞,而T细胞活化需要双重信号的诱导,分别是MHC-TCR抗原提呈信号和协同刺激信号。B7/CD28家族是重要的协同刺激分子,其超家族陆续发现许多新的成员,如ICOS、ICOSL、PD-1、PD-L1(B7-H1)、PD-L2、B7-H3及B7-H4等。这其中,负性协同刺激分子B7-H1、B7-H3可通过抑制T细胞活化和增殖来负调控免疫应答,并已发现在诸多人类肿瘤组织(如胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌等)中的异常表达<sup>[14]</sup>。目前,已有文献<sup>[5]</sup>报道B7-H1在乳腺癌中的表达水平和患者的肿瘤分级、雌激素受体及孕酮受体表达水平显著相关,但尚无文献报道B7-H3在乳腺癌中的表达及其生物学意义。本课题采用免疫组织化学方法,检测49例乳腺癌组织中B7-H1、B7-H3的表达及CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润程度,分析肿瘤组织中B7-H1、B7-H3的表达水平与患者临床病理参数、预后的相关性及其对CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

病例取自2003年3月至2004年1月在苏州大学附属第三医院乳腺外科收治的女性乳腺癌患者49例。年龄38~84岁,中位年龄53岁。所有患者术前均未接受放疗或化疗,组织标本均经过H-E染色、读片,确认为浸润性导管癌。同时选取5例癌旁正常组织作为正常对照。患者生存时间经信件或电话随访确定。详细临床资料见表1。

### 1.2 主要实验材料

本研究所用一抗为鼠抗人B7-H1(克隆号2H11<sup>[11]</sup>)、鼠抗人B7-H3(克隆号4H7<sup>[6]</sup>)单克隆抗体(由苏州大学医学生物技术研究所制备,使用终质量浓度10 μg/ml),抗CD3单抗(即用型,福州迈新生物科技有限公司);二抗为辣根过氧化物酶标记鼠/兔通用型二抗(即用型,福州迈新生物科技有限公司)。

### 1.3 免疫组化染色及评估

采用EnVision<sup>TM</sup>免疫组化染色法。一抗4℃孵

育过夜,室温下二抗结合30 min,切片经DAB显色,苏木精复染。B7-H1、B7-H3免疫组化染色评分按照切片中着色的肿瘤细胞所占百分比结合免疫组化染色强度判定如下:≤20%肿瘤细胞着色定义为阴性,>20%肿瘤细胞着色定义为阳性。CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润程度的评估:根据CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞在肿瘤中心部位及间质部位的分布情况,划分为四个等级:0,无浸润;1,局部少量浸润;2,适度浸润;3,大量浸润。其中0和1归为低度浸润组,2和3归为高度浸润组<sup>[5]</sup>。

### 1.4 统计学处理

运用GraphPad Prism 4.0统计软件对数据进行统计分析,显著水平为双侧α=0.05。两组率的差别的假设检验及B7-H1、B7-H3表达水平与CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润程度的相关性采用χ<sup>2</sup>检验。B7-H1与B7-H3表达水平的相关性采用Spearman相关性分析;采用Kaplan-Meier法进行生存分析。

## 2 结果

### 2.1 B7-H1、B7-H3在乳腺癌组织中的表达

免疫组化结果显示,B7-H1、B7-H3阳性着色主要定位在肿瘤细胞胞质和胞膜(图1A、B)。在49例乳腺癌中,B7-H1阳性表达26例,阳性率为53.06%;B7-H3阳性表达29例,阳性率59.18%;B7-H1和B7-H3双阳性表达17例,占34.69%;B7-H1和B7-H3双阴性表达11例,占22.45%;B7-H1和B7-H3单阳性表达21例,占42.86%。正常乳腺组织中B7-H1、B7-H3均不表达或较少表达。

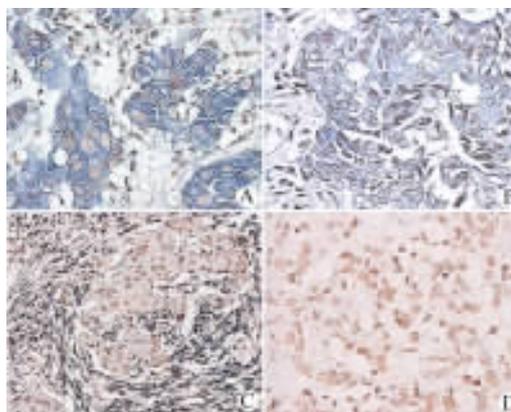


图1 乳腺癌组织中B7-H1、B7-H3的表达及CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞的浸润

Fig. 1 B7-H1 and B7-H3 expressions and CD3<sup>+</sup>T lymphocytes infiltration in breast cancer tissues

A: B7-H1 (×400); B: B7-H3 (×400); C: CD3<sup>+</sup>T (×200); D: Negative control (×400)

## 2.2 乳腺癌组织中 B7-H1、B7-H3 的表达水平患者与临床病理参数的相关性

$\chi^2$  检验分析发现, B7-H1 表达水平和患者的肿瘤大小呈正相关( $P < 0.05$ ), 与 Her2/neu 表达水平呈正相关( $P < 0.05$ ), 与其他临床病理参数无关;

B7-H3 表达水平与患者的病理分期呈正相关( $P < 0.05$ ), 与其他临床病理参数无关(表 1); Spearman 相关性分析显示, 乳腺癌中 B7-H1 和 B7-H3 表达水平呈正相关( $r = 0.3316, P < 0.05$ , 图 2)。

表 1 乳腺癌组织中 B7-H1、B7-H3 的表达水平和患者临床病理参数的关系

Tab. 1 Expressions of B7-H1 and B7-H3 in breast cancer tissues and their relation with patient's clinicopathologic parameters

Index	Case	B7-H1 expression			B7-H3 expression		
		Negative	Positive	<i>P</i>	Negative	Positive	<i>P</i>
Age							
≤50	19	8	11	0.5895	8	11	0.8838
>50	30	15	15		12	18	
Tumor size (d/cm)							
≤2.5	31	18	13	0.0406*	13	18	0.8343
>2.5	18	5	13		7	11	
Lymph node metastasis							
Negative	26	15	11	0.1088	12	14	0.4190
Positive	23	8	15		8	15	
Pathological stage							
I	11	8	8	0.4248	8	3	0.0331*
II a	17	9	8		7	10	
II b	14	4	10		2	12	
III-IV	7	2	5		3	4	
ER							
Negative	18	8	10	0.7898	5	13	0.1571
Positive	31	15	16		15	16	
PR							
Negative	22	12	10	0.3355	7	15	0.2473
Positive	27	11	16		13	14	
Her2/neu							
Negative	23	15	8	0.0159*	11	12	0.3477
Positive	26	8	18		9	17	

\*  $P < 0.05$  vs other items in same index

## 2.3 乳腺癌组织中 B7-H1、B7-H3 的表达水平与 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润程度的相关性

经抗 CD3 单抗免疫组化标记, 49 例乳腺癌组织中, CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞低度浸润 24 例, 高度浸润 25 例。  $\chi^2$  检验发现, 乳腺癌组织中 B7-H1 的表达水平和 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度呈负相关( $P < 0.05$ , 表 2), B7-H3 表达水平和 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度无显著相关性( $P > 0.05$ , 表 2)。

## 2.4 B7-H1、B7-H3 在乳腺癌中的表达和患者预后

的关系

Kaplan-Meier 生存分析结果由图 3 显示, B7-H1 表达水平和患者预后无关( $P > 0.05$ , 图 3B); 而 B7-H3 阳性表达的患者, 其预后与 B7-H3 阴性表达的患者有显著差异( $P < 0.05$ , 图 3C); 将 B7-H1 和 B7-H3 的表达水平进行组合, B7-H1 和 B7-H3 表达同时阳性的患者其预后差于不同时阳性的患者( $P = 0.1325$ )以及同时阴性的患者( $P = 0.0546$ , 图 3D), 但未发现有显著统计学差异。

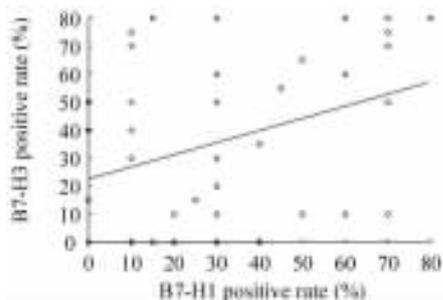


图2 乳腺癌组织中 B7-H1 和 B7-H3 表达水平的相关性

Fig.2 Correlation between B7-H1 and B7-H3 expression in breast cancer tissues

3 讨论

人 B7-H1 基因定位于 9 号染色体, 其开放阅读框编码一个含有 290 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白。B7-H1 mRNA 主要表达于胎盘、心脏、肝脏、肺、肾和

少数造血组织等非淋巴组织。B7-H1 蛋白广泛表达于抗原提呈细胞, 活化 T、B 细胞、巨噬细胞和胸腺皮质上皮细胞。B7-H1 通过与其受体 PD-1 结合, 抑制 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖和活化, 同时降低 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 的分泌, 负性调控机体免疫应答过程<sup>[7]</sup>。人 B7-H3 基因位于 15 号染色体, 属 Ig 家族的 I 型跨膜蛋白。成熟的 B7-H3 蛋白编码 316 个氨基酸, 由胞外区、跨膜区和胞内区组成。B7-H3 广泛表达于非淋巴样组织中, 在一些肿瘤细胞株和肿瘤组织中亦有表达。最初研究显示, B7-H3 可协同抗 CD3 单抗刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖, 并上调 T 细胞 IFN- $\gamma$ 、IL-10 和 TNF- $\alpha$  的表达和分泌, 同时经由 IFN- $\gamma$  促进 CTL 的活化, 从而发挥抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。但随后的研究发现, B7-H3 亦可抑制 T 细胞增殖, 同时下调 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 GM-CSF 等细胞因子的分泌<sup>[9]</sup>。

表2 乳腺癌组织中 B7-H1、B7-H3 表达水平和 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞浸润程度的关系

Tab.2 Expressions of B7-H1 and B7-H3 in breast cancer tissues and their relation with infiltration of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes

Intensity of CD3 <sup>+</sup> T infiltration	Case	B7-H1 expression			B7-H3 expression		
		Negative	Positive	P	Negative	Positive	P
Slight infiltration	24	7	17	0.0146*	10	14	0.9055
Severe infiltration	25	16	9		10	15	

\* P < 0.05 vs the severe infiltration

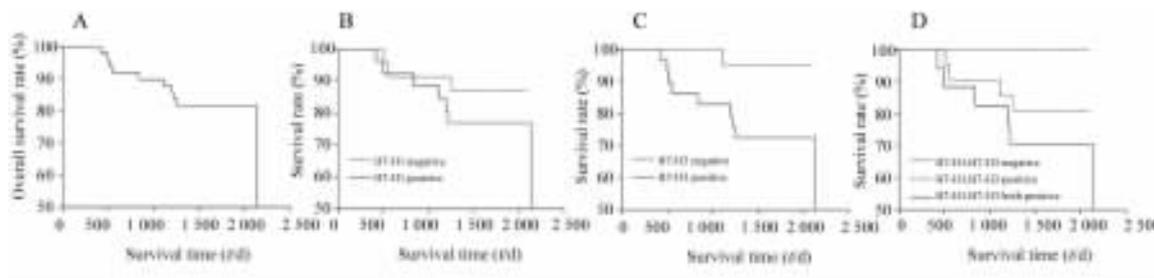


图3 乳腺癌组织中 B7-H1、B7-H3 的表达水平和患者预后的关系

Fig.3 Expressions of B7-H1 and B7-H3 in breast cancer tissues and their relation with postoperative prognosis

A: Total survival curve; B: Survival curves of patients with different B7-H1 expressions; C: Survival curves of patients with different B7-H3 expressions; D: Survival curves of patients with of B7-H1 and B7-H3 combination expression in breast cancers

截至目前, 通过免疫组织化学方法, 已先后对 B7-H1 及 B7-H3 在许多人类肿瘤组织中的表达及其生物学意义进行了研究。Ghebeh 等<sup>[5]</sup>发现, B7-H1 在乳腺癌组织中的表达水平和肿瘤的肿瘤分级、ER 及 PR 表达水平显著相关。本课题组孙静等<sup>[1]</sup>报道, PD-L1 在胃癌中的表达和肿瘤大小、浸润深度及淋巴结转移相关, 同时 PD-L1 的表达水平是评价患者预后的重要指标, < 2 年存活期的患者其 PD-

L1 表达的阳性率显著高于 > 5 年存活期的患者。Roth 和 Zang 等<sup>[3,4]</sup>先后报道, B7-H3 在前列腺癌中高表达, 其表达水平与肿瘤分级及转移显著相关, 并且 B7-H3 表达水平在诸多临床参数中, 是一个独立的预后判断风险因素。B7-H3 在肾癌肿瘤细胞及瘤内血管中均有表达, 且 B7-H3 的表达水平和肿瘤分期、淋巴结转移、远处转移、肉瘤样分化等临床参数及预后显著相关<sup>[10]</sup>。

本研究发现, B7-H1 在乳腺癌中的表达水平与患者的肿瘤大小、Her2/neu 呈正相关; B7-H3 在乳腺癌中的表达与患者的病理分期呈正相关, 这些结果提示负性协同刺激分子 B7-H1、B7-H3 均参与乳腺癌发生与发展的病理生理学过程。结合患者生存资料, 虽然本研究仅发现 B7-H3 在乳腺癌中的表达水平和患者预后呈负相关, 但是, 将 B7-H1 和 B7-H3 的表达水平进行组合, 可见 B7-H1、B7-H3 同时高表达的患者, 其预后较好于不同时表达阳性或者同时表达阴性的患者。在将来, 通过进一步收集组织标本及患者预后资料, 深入探讨 B7-H1、B7-H3 表达水平的检测在乳腺癌预后评估中的作用, 具有重要的临床应用价值。

肿瘤浸润淋巴细胞( tumor infiltrating lymphocytes, TILs )是指位于肿瘤组织中肿瘤细胞周围的淋巴细胞, 具有杀伤肿瘤细胞、降低转移潜能的作用, 是肿瘤微环境中的重要组成部分。肿瘤浸润淋巴细胞与肿瘤细胞密切接触, 是宿主免疫系统对肿瘤识别的直接而特异的表现。肿瘤组织中浸润免疫细胞数量和功能的变化是评价机体抗肿瘤反应总体水平和患者术后预后判断的一个有效指标<sup>[11-12]</sup>。协同刺激分子也是肿瘤微环境的重要组成部分, 许多肿瘤细胞通过高表达一些负性协同刺激分子, 以弱化其免疫原性, 逃避机体免疫系统的监控和杀伤<sup>[13]</sup>。研究证实, B7-H1 在卵巢癌中的表达水平和 CD8<sup>+</sup>T 的浸润程度呈负相关, 而在肝癌中的表达水平和浸润的 Foxp3<sup>+</sup> Tregs 呈正相关<sup>[2,14]</sup>。Sun 等<sup>[15]</sup>证实 B7-H3 在肺癌组织中的表达水平和 TILs 的浸润程度呈负相关。本研究也发现, B7-H1 在乳腺癌中的表达水平与浸润 T 淋巴细胞的分布呈负相关。这些结果提示, 负性协同刺激分子在肿瘤细胞中表达的主要生物学功能作用之一, 即是通过参与负调控 T 细胞介导的肿瘤免疫应答, 最终导致肿瘤免疫逃逸的发生。

综上所述, B7-H1、B7-H3 作为乳腺癌发生发展过程中的两个重要分子, 在调控 T 细胞介导的肿瘤免疫应答中具有重要意义。在将来, 通过干预这些负性调控分子介导的信号通路, 分别或者联合利用 B7-H1、B7-H3 分子作为乳腺癌临床诊治的分子靶标, 有望成为肿瘤免疫治疗的新策略。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Sun J, Xu K, Wu C, *et al.* PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling

by two functional monoclonal antibodies[ J ]. *Tissue Antigens*, 2007, 69( 1 ): 19-27.

- [ 2 ] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 9 ): 3360-3365.
- [ 3 ] Roth T J, Sheinin Y, Lohse CM, *et al.* B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy[ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 16 ): 7893-7900.
- [ 4 ] Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, *et al.* B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 49 ): 19458-19463.
- [ 5 ] Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omar A, *et al.* The B7-H1 ( PD-L1 ) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors[ J ]. *Neoplasia*, 2006, 8( 3 ): 190-198.
- [ 6 ] Zhang G, Hou J, Shi J, *et al.* Soluble CD276 ( B7-H3 ) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum[ J ]. *Immunology*, 2008, 123( 4 ): 538-546.
- [ 7 ] Carter L, Fouser LA, Jussif J, *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and is overcome by IL-2 [ J ]. *Eur J Immunol*, 2002, 32( 3 ): 634-643.
- [ 8 ] Chapoval AI, Ni J, Lau JS, *et al.* B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production[ J ]. *Nat Immunol*, 2001, 2( 3 ): 269-274.
- [ 9 ] Suh WK, Gajewska BU, Okada H, *et al.* The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses[ J ]. *Nat Immunol*, 2003, 4( 9 ): 899-906.
- [ 10 ] Crispin PL, Sheinin Y, Roth TJ, *et al.* Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14( 16 ): 5150-5157.
- [ 11 ] Pages F, Berger A, Camus M, *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer[ J ]. *N Engl J Med*, 2005, 353( 25 ): 2654-2666.
- [ 12 ] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer[ J ]. *N Engl J Med* 2003, 348( 3 ): 203-213.
- [ 13 ] Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment[ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8( 6 ): 467-477.
- [ 14 ] Gao Q, Wang X, Qiu S, *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[ J ]. *Clin Cancer Res* 2009, 15( 3 ): 971-979.
- [ 15 ] Sun Y, Wang Y, Zhao J, *et al.* B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer[ J ]. *Lung Cancer*, 2006, 53( 2 ): 143-151.

[ 收稿日期 ] 2009 - 03 - 29

[ 修回日期 ] 2009 - 05 - 07

[ 本文编辑 ] 韩 丹