

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.016

· 临床研究 ·

## 负性协同刺激分子 B7-H4 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义

张彩娣<sup>1</sup>, 史建平<sup>1</sup>, 王凤鸣<sup>2</sup>, 徐秋岚<sup>3</sup>, 陈宝华<sup>1\*</sup> (1. 南通大学附属第三医院呼吸科, 江苏无锡 214041; 2. 苏州大学医学生物技术研究所, 江苏苏州 215007; 3. 南通大学附属第三医院病理科 江苏无锡 214041)

[摘要] 目的: 探讨负性协同刺激分子 B7-H4 在原发性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达及其与 NSCLC 临床病理特征间的关系。方法: 选取南通大学第三附属医院胸外科 2008 年 1 月至 2009 年 4 月手术切除并经病理证实的 NSCLC 标本 52 例。免疫组织化学法检测 NSCLC 组织中 B7-H4 分子的表达及 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润程度, 分析 B7-H4 表达水平与 NSCLC 组织中 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润、临床病理特征间的关系。结果: 52 例 NSCLC 组织中 B7-H4 表达阳性率为 48.08% (25/52), 正常肺组织不表达或较少表达 B7-H4, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。B7-H4 表达水平与 NSCLC 临床分期和淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ ), 与 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润程度呈负相关( $P < 0.05$ ), 与其他临床病理参数无关( $P > 0.05$ )。结论: 负性协同刺激分子 B7-H4 在 NSCLC 发病过程中可能起重要的作用, 其阳性表达与 NSCLC 临床分期及淋巴结转移密切相关, B7-H4 为 NSCLC 的诊断及治疗提供参考依据。

[关键词] 非小细胞肺癌; B7-H4; T 细胞; 负性协同刺激分子

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0633-04

## Expression of negative costimulatory molecule B7-H4 in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance

ZHANG Cai-di<sup>1</sup>, SHI Jian-ping<sup>1</sup>, WANG Feng-ming<sup>2</sup>, XU Qiu-lan<sup>3</sup>, CHEN Bao-hua<sup>1\*</sup> (1. Department of Respiratory Diseases, Third Affiliated Hospital of Nantong University, Wuxi 214041, Jiangsu, China; 2. Medical Bio-tech Institute, Suzhou University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 3. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Nantong University, Wuxi 214041, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of negative costimulatory molecule B7-H4 in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and its relationship with the clinical features of NSCLC. **Methods:** Fifty-two NSCLC specimens from patients who were pathologically diagnosed in our hospital during January 2008 to April 2009 were included in the present study. B7-H4 expression and infiltration of CD3<sup>+</sup>T cells in NSCLC tissues were detected by immunohistochemistry. The correlation between B7-H4 expression, CD3<sup>+</sup>T infiltration, and the clinical features of NSCLC was studied. **Results:** The positive rate of B7-H4 in 52 NSCLC tissues was 48.08% (25/52), and B7-H4 expression in normal lung tissues was negative or low ( $P < 0.05$ ). B7-H4 expression was positively correlated with the clinical tumor stages and lymph node metastasis of NSCLC ( $P < 0.05$ ), and negatively correlated with tumor infiltration of CD3<sup>+</sup>T cells ( $P < 0.05$ ), but had no relationship with clinicopathologic parameters of NSCLC ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Negative costimulatory molecule B7-H4 may play important roles in the development of NSCLC. Positive expression of B7-H4 is correlated with the clinical tumor stages and lymph node metastasis of NSCLC, which provides a foundation for diagnosis and therapy of NSCLC.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); B7-H4; T cell; negative costimulatory molecule

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 633-636]

肿瘤在其发生、发展过程中可表达一些肿瘤相关抗原, 这些抗原可被正常机体的免疫系统所识别, 通过天然和获得性免疫抵抗肿瘤。然而事实并非如此简单, 大部分肿瘤发生在免疫系统正常的患者, 且确诊时已属晚期。在机体免疫功能正常的情况下, 肿瘤为何得以形成和发展, 这引起了免疫学界及医

学界的重视。研究<sup>[1]</sup>显示, 肿瘤的形成与肿瘤细胞免疫逃逸有关, 肿瘤细胞可通过对自身表面抗原的

[作者简介] 张彩娣(1972-), 女, 汉族, 江苏省无锡市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究

\* 通信作者( Corresponding author )。E-mail: wxsy66566@163.com

修饰或改变肿瘤微环境来逃避机体的免疫识别与攻击。B7-H4 是 B7 家族中新近发现的新成员, 它可以抑制 T 细胞增殖、细胞因子分泌和细胞周期, 负性调节 T 细胞介导的免疫反应; 某些肿瘤细胞高表达 B7-H4 分子, 引起肿瘤免疫逃逸<sup>[24]</sup>。B7-H4 在直肠癌组织中高表达, 可抑制肿瘤浸润淋巴细胞( tumor-infiltrating lymphocytes, TILs ) 的浸润<sup>[5]</sup>。在卵巢癌<sup>[6-7]</sup>及子宫内膜腺癌<sup>[8]</sup>中 B7-H4 分子也高表达。不表达或低表达 B7-H4 的肿瘤细胞株接种小鼠后, 形成的肿瘤组织中 B7-H4 mRNA 和蛋白表达水平上调<sup>[9-10]</sup>。以上实验提示 B7-H4 可能参与肿瘤的形成, 在肿瘤细胞逃逸免疫系统的攻击中发挥一定的作用。本研究采用免疫组织化学方法, 检测非小细胞肺癌( non-small cell lung cancer, NSCLC ) 组织中 B7-H4 的表达和 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润程度, 分析其与患者临床病理参数间的关系, 探讨 B7-H4 在肺癌发生和发展中的作用, 为以 B7-H4 为靶点的肺癌生物治疗提供实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 临床资料

选取南通大学第三附属医院胸外科 2008 年 1 月至 2009 年 4 月外科手术切除并经病理证实的 NSCLC 标本 52 例, 其中男性 30 例, 女性 22 例, 中位年龄 56 岁。根据 NSCLC 的分期标准, 其中 I 期 7 例, II 期 22 例, III 期 20 例( III a 期 15 例, III b 期 5 例 ), VI 期 3 例; 有淋巴结转移者共 33 例; 中央型肺癌 18 例, 周围型肺癌 34 例; 鳞癌 20 例, 腺癌 23 例, 肺泡细胞癌 5 例, 大细胞癌 4 例。所有患者术前均未行放、化疗。8 例癌旁正常肺组织标本作对照。

#### 1.2 试剂和试剂盒

鼠抗人 B7-H4 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 抗 CD3 单抗、辣根过氧化物酶标记二抗购自福州迈新生物科技有限公司。免疫组化 PV 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

#### 1.3 免疫组织化学法检测 NSCLC 组织中 B7-H4 和 CD3 的表达

采用免疫组化 PV-6000 二步法, 按试剂盒说明书操作, 用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。B7-H4 染色结果判断: 以细胞质及细胞膜出现棕黄色颗粒状物为 B7-H4 染色阳性。用半定量分级法判定染色结果: 阳性细胞数所占百分比 < 10% 为阴性; 百分比 > 10% 为阳性; 其中 10% ~ 40% 记为 +、41% ~ 80% 记为 ++、> 80% 记为 +++。

CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润程度的评估: 根据 CD3<sup>+</sup>T 细

胞在肿瘤中心部位及间质部位的分布情况, 划分为四个等级并评分: 0 分为无浸润; 1 分为局部少量浸润; 2 分为适度浸润; 3 分为大量浸润。0 分和 1 分归为低度浸润组, 2 分和 3 分归为高度浸润组<sup>[11]</sup>。

#### 1.4 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPASS13.0 统计软件进行  $\chi$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

#### 2.1 B7-H4 在 NSCLC 组织中的表达

免疫组织化学结果显示, B7-H4 阳性着色产物呈弥漫或散在的棕黄色或棕褐色颗粒, 主要定位于肿瘤细胞胞质和胞膜( 图 1 )。在 52 例 NSCLC 组织中, B7-H4 阳性表达 25 例, 阳性率为 48.08%; 正常肺组织不表达或低表达 B7-H4, 差异具有统计学意义(  $P < 0.05$  )。

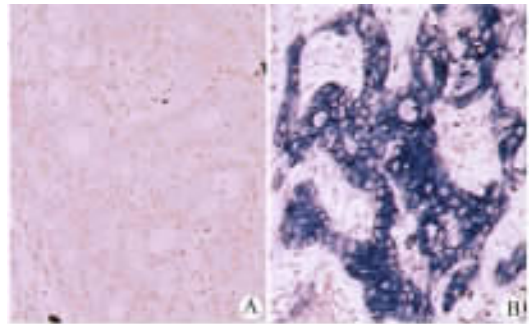


图 1 NSCLC 组织中 B7-H4 的表达

Fig. 1 B7-H4 expression in NSCLC tissues

A: Normal lung tissue ( × 200 ); B: NSCLC tissue ( × 400 )

#### 2.2 NSCLC 组织中 B7-H4 表达与临床病理参数的关系

NSCLC 组织中 B7-H4 表达与患者临床病理参数间的关系见表 1, 结果显示, B7-H4 表达水平与肺癌临床分期和淋巴结转移呈正相关(  $P < 0.05$  ), 与其他临床病理参数无关(  $P > 0.05$  )。

#### 2.3 NSCLC 组织中 B7-H4 表达与 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润程度的关系

非小细胞肺癌组织经 CD3 单抗免疫组化染色, 结果显示, 52 例 NSCLC 组织中, 25 例( 48.9% ) CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞低度浸润, 27 例( 51.9% ) 高度浸润; 阳性表达 B7-H4 的肺癌组织中 17 例( 68.0% ) CD3<sup>+</sup>T 细胞低度浸润, 8 例( 32.0% ) CD3<sup>+</sup>T 细胞高度浸润; 阴性表达 B7-H4 组 NSCLC 组织中 8 例( 29.6% ) 低度浸润, 19 例( 70.4% ) CD3<sup>+</sup>T 细胞高度浸润。肺癌组织中 B7-H4 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 1 NSCLC 组织中 B7-H4 表达水平与临床病理参数间的关系  
Tab. 1 Relationship of B7-H4 expression and their correlation with clinicopathologic parameters of NSCLC

Parameter	Case	B7-H4 positive n( % )	P
Sex			$P > 0.05$
Male	30	14 ( 46.7 )	
Female	22	11 ( 50.0 )	
Age			$P > 0.05$
>60	35	17 ( 48.6 )	
≤60	17	8 ( 47.1 )	
Smoking			$P > 0.05$
Yes	31	15 ( 48.4 )	
No	21	10 ( 47.6 )	
Pathology			$P < 0.05$
T1-T2	29	7 ( 24.1 )	
T3-T4	23	20 ( 69.8 )	
Cancer type			$P > 0.05$
Central	18	9 ( 50.0 )	
Peripheral	34	18 ( 63.2 )	
Lymph node metastasis			$P < 0.05$
Yes	33	23 ( 69.7 )	
No	19	2 ( 10.5 )	
Tumor category			$P > 0.05$
Adenocarcinoma	23	13 ( 56.5 )	
Squamous carcinoma	20	8 ( 40.0 )	
Large cell carcinoma	4	2 ( 50.0 )	
Alveolar cell carcinoma	5	2 ( 40.0 )	

### 3 讨论

肿瘤细胞可通过对自身表面抗原的修饰或改变肿瘤组织周围的微环境来逃避机体的免疫识别与攻击,即肿瘤的免疫逃逸。了解肿瘤免疫逃逸的机制可为肿瘤治疗提供很好的切入点,肿瘤免疫逃逸成为目前基础及临床研究的热点<sup>[1]</sup>。目前认为,肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的攻击是通过一定机制导致机体不能产生有效的抗肿瘤免疫应答。机体的抗肿瘤免疫主要为 T 淋巴细胞所介导,而 T 细胞活化需要双重信号的诱导,分别是 MHC-TCR 抗原信号和

协同刺激信号。B7/CD28 家族是重要的协同刺激分子,可增强 T 细胞免疫,但是其中某些分子也可抑制 T 细胞免疫应答<sup>[12]</sup>。B7-H4 是最近发现的负性协同刺激分子<sup>[13]</sup>。人 B7-H4 分子于 2003 年由 Sica 等克隆<sup>[3,14-15]</sup>,主要表达在活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、成熟的树突状细胞和某些肿瘤细胞上<sup>[16-18]</sup>。国外研究<sup>[19]</sup>发现,B7-H4 在多种肿瘤组织中高表达,如卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌等。

在抗肿瘤免疫效应中,T 细胞起主要作用,通过对肿瘤抗原的识别,直接杀伤肿瘤细胞,但肿瘤微环境可抑制 T 细胞的免疫功能,导致局部的免疫功能低下。肿瘤微环境包括肿瘤细胞分泌的可溶性抑制因子和肿瘤细胞对 T 细胞的直接接触抑制作用,这些抑制性细胞因子或膜表面抑制性分子可单独或协同作用,抑制 T 细胞的活化和对肿瘤细胞的杀伤<sup>[20-22]</sup>。膜表面负性协同刺激分子 B7-H4 可通过下调 Jun 等转录因子的表达,抑制 T 细胞 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 的分泌,抑制 T 细胞的活化和增殖<sup>[3,23-24]</sup>。因此,肿瘤细胞上 B7-H4 的表达在肿瘤细胞免疫逃避中发挥重要作用。

本研究采用免疫组织化学法对正常肺组织和 NSCLC 中 B7-H4 的表达进行检测,结果显示,B7-H4 在 NSCLC 组织中高表达,而在正常肺组织中不表达或弱表达;B7-H4 表达水平与 NSCLC 临床分期和淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ ),而与 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润程度呈负相关( $P < 0.05$ )。本研究结果提示,B7-H4 有可能成为判断 NSCLC 恶性程度及转移的有价值的指标;阻断 B7-H4 与其受体的相互作用,将有望成为 NSCLC 生物治疗的有效途径。

### [参考文献]

- [1] 张晶. 黏附分子与肿瘤免疫逃逸[J]. 实用肿瘤杂志, 2004, 19(5): 449-452.
- [2] 刘杰,孙玉萍,汪云山,等. B7-H4 在乳腺癌中表达的临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(11): 830-835.
- [3] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a member of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. Immunity, 2003, 18(6): 849-861.
- [4] 付振坤,章婕,李殿俊,等. B7-H4 与肿瘤关系的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2008, 31(1): 32-34.
- [5] 孙玉萍,刘杰,崔霞,等. B7-H4 在直肠癌组织中表达的临床意义[J]. 山东大学学报:医学版, 2006, 44(6): 143-151.
- [6] Tringler B, Liu W, Corral L, et al. B7-H4 overexpression in ovarian tumors [J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(1): 44-52.
- [7] Simon I, Zhou S, Corral L, et al. B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for

- ovarian cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 3 ): 1570-1575.
- [ 8 ] Miyatake T, Tringler B, Liu W, *et al.* B7-H4 is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106( 1 ): 119-127.
- [ 9 ] 李文桦, 刘瑞梓, 杨秀利, 等. 肿瘤模型中 B7-H4 和 BTLA 的异常表达 [ J ]. *中国癌症杂志*, 2005, 25( 04 ): 313-316.
- [ 10 ] Sun Y, Wang Y, Zhao G, *et al.* B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer [ J ]. *Lung Cancer*, 2006, 53( 2 ): 243-151.
- [ 11 ] Ghebeh H, Mohammed S, AL-Omair A, *et al.* The B7-H1 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.
- [ 12 ] 段文元, 白云, 张华欣, 等. 人 PD-1-Fc 融合分子的构建及其在 CHO 细胞中的表达及意义 [ J ]. *免疫学杂志*, 2005, 21( 6 ): 460-462.
- [ 13 ] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T cell immunity [ J ]. *Nature Rev Immunol*, 2004, 4( 5 ): 336-347.
- [ 14 ] Prasad DV, Richard S, Mai XM, *et al.* B7SI, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation [ J ]. *Immunity*, 2003, 18( 6 ): 863-873.
- [ 15 ] Zang X, Loke P, Kim J, *et al.* B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 18 ): 10388-10392.
- [ 16 ] Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited [ J ]. *Trends Immunol*, 2001, 22( 4 ): 217-223.
- [ 17 ] Choi IH, Zhu G, Sica GL, *et al.* Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family [ J ]. *J Immunol*, 2003, 171( 9 ): 4650-4654.
- [ 18 ] Awadallah NS, Shroyer KR, Lange RD, *et al.* Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a etymological diagnostic adjunct [ J ]. *Pancreas*, 2008, 36( 2 ): 200-213.
- [ 19 ] Mugler KC, Singh M, Tringler B, *et al.* B7-H4 expression in a range of breast pathology: correlation with tumor T-cell infiltration [ J ]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007, 15( 4 ): 363-370.
- [ 20 ] Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses [ J ]. *Microbes Infect*, 2004, 6( 8 ): 759-766.
- [ 21 ] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4( 12 ): 941-952.
- [ 22 ] Carreno BM, Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand [ J ]. *Trends Immunol*, 2003, 24( 10 ): 524-527.
- [ 23 ] 毛一香, 王勤, 陈洁, 等. 人 B7-H4 基因转染细胞的构建及其对 T 细胞的共刺激效应的初步研究 [ J ]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2005, 25( 8 ): 609-613.
- [ 24 ] 毛一香, 张学光. B7-H4——B7 家族的又一新成员 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21( 5 ): 395-397.
- [ 收稿日期 ] 2009-09-24 [ 修回日期 ] 2009-11-08
- [ 本文编辑 ] 王莹

## · 简 讯 ·

## 《免疫学前沿进展》已出版

由中国免疫学会理事长曹雪涛院士牵头、全国免疫学各领域知名专家联合编著的《免疫学前沿进展》，于 2009 年 12 月初由人民卫生出版社正式出版。免疫学是一门重要的基础学科，与临床医学紧密相关，是生物医学乃至整个生命科学中发展最快的学科之一。《免疫学前沿进展》是国内第一本及时反映国、内外免疫学研究现状与进展的专著。本书的编者都是免疫学相关领域学术造诣精深、研究成果卓著的专家，其工作受到国、内外同行的高度关注和认可，有着很高的国内、国际影响力。在本书中他们结合自己的工作，特别是近年来的研究成果，介绍该领域的研究现状、热点、进展、存在的问题，并展望未来的发展趋势。

本书在概要介绍免疫学基本理论的基础上，分专题阐述免疫学当前重要研究领域和热点问题，内容涉及 NK 细胞、T 细胞、抗原提呈细胞、MHC 分子、天然免疫识别、调节性 T 细胞、Th1/Th2/Th17 细胞、记忆性 T 细胞、免疫受体编辑、CD 分子、协同刺激分子、趋化因子及其受体、炎症性细胞因子与炎症反应等基础研究，此外还介绍了肿瘤免疫、抗病毒免疫、艾滋病免疫学、原发性免疫缺陷病、自身免疫性病、移植免疫、过敏性疾病、生殖免疫、骨免疫等临床免疫学科的现状与进展，最后还介绍了兽医免疫学、结构免疫学、免疫药理学、免疫疫苗设计、抗体工程、抗体药物、重组蛋白质药物等近年来的研究进展。

本书面向免疫学专业的研究生和青年教师，是第二届免疫学新进展研讨班的培训教材，可作为免疫学及相关专业研究生的教材，对从事免疫学工作的研究人员和临床各科医务工作者也有非常好的参考作用。

出版社地址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼( 100078 )

购书热线：010-67605754, 010-65264830; E-mail: pmph@pmph.com;

经销：新华书店；标准书号：ISBN978-7-117-12311-2/R·12312；定价：180 元