

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.012

· 临床研究 ·

负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 在结直肠癌中的表达及其临床意义

朱明^{1,4}, 孙静¹, 王辉¹, 茆勇², 吴玉玉³, 张学光¹(1. 苏州大学 医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 苏州大学 附属第四医院 肿瘤科, 江苏 无锡 214062; 3. 苏州大学 附属第四医院 病理科, 江苏 无锡 214062; 4. 苏州大学 附属常州肿瘤医院 临床肿瘤实验室, 江苏 常州 213001)

[摘要] 目的: 检测结直肠癌组织中负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 的表达、T 细胞亚群的浸润情况, 探讨其临床意义。方法: 收集苏州大学附属第四医院 2003 年 1 月至 2003 年 12 月 50 例结直肠癌患者的癌组织标本以及 5 例患者的癌旁组织标本, 免疫组织化学法检测结直肠癌组织中 B7-H1 和 B7-H4 的表达以及 T 细胞亚群的浸润, 分析 B7-H1、B7-H4 的表达与结直肠癌患者临床病理特征及 T 细胞浸润的相关性, 分析 B7-H1、B7-H4 的表达和 CD3⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞浸润程度与患者预后的相关性。结果: 结直肠癌组织高表达 B7-H1(44%) 和 B7-H4(56%), 而癌旁组织不表达($P < 0.01$)。B7-H1 在结肠癌组织中的表达较直肠癌显著升高($P < 0.05$); 随着 Duke's 分期的升高, B7-H4 的表达水平也呈上升趋势($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 B7-H1 的表达与 CD3⁺T 细胞浸润呈负相关($P < 0.05$), 但与 B7-H4 的表达无关。B7-H1 的表达水平与患者预后呈负相关($P < 0.05$), 且 B7-H1 和 B7-H4 同时高表达的患者总体生存率显著降低($P < 0.05$)。结论: 负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 在人结直肠癌组织中高表达, 并与患者总体生存率相关, 两者的共同检测对结直肠癌诊断和预后判断具有一定的临床价值。

[关键词] 结直肠癌; B7-H1; B7-H4; T 细胞; 肿瘤免疫应答

[中图分类号] R735.3; R730.45

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0528-05

Expressions of co-inhibitory molecules B7-H1 and B7-H4 in colorectal carcinoma and their clinical significances

ZHU Ming^{1,4}, SUN Jing¹, WANG Hui¹, MAO Yong², WU Yu-yu³, ZHANG Xue-guang¹(1. Medical Biotechnology Institute, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Department of Oncology, Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214062, Jiangsu, China; 3. Department of Pathology, Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214062, Jiangsu, China; 4. Clinical Oncology Laboratory, Changzhou Tumor Hospital Affiliated to Soochow University, Changzhou 213001, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the expression of co-inhibitory molecules B7-H1, B7-H4 and infiltration of T cell subsets in colorectal carcinoma tissues, and to explore their clinical significances. **Methods:** Fifty tumor tissue specimens and 5 paracancerous tissues of 50 colorectal carcinoma (CRC) patients (from Jan. 2003 to Dec. 2003) in Fourth Affiliated Hospital of Soochow University were collected in the study. Immunohistochemistry staining was used for the detection of B7-H1, B7-H4 expression and T cell subset infiltration in CRC tissues, correlation between B7-H1, B7-H4 expression and clinical parameters of CRC patients was further analyzed. **Results:** B7-H1 and B7-H4 expression was found strong in CRC tissues but negative in paracancerous tissues ($P < 0.05$). B7-H1 expression in colon cancer tissues was significantly higher than that in rectal cancer ($P < 0.05$), B7-H4 expression was positively correlated to the Duke's stage ($P < 0.05$). B7-H1 but not B7-H4 expression in CRC tissues was negatively correlated to the infiltration of CD3⁺T cell ($P < 0.05$). B7-H1 expression was reversely related to the patients' prognosis ($P < 0.05$), and patients with high levels of both B7-H1 and B7-H4 showed a lower overall survival rate than other patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** Co-inhibitory

[基金项目] 苏州大学医学部研究生科研创新基金。Project supported by the Innovative Research Foundation for Postgraduates in Medical College of Soochow University

[作者简介] 朱明(1985-),女,江苏省常州市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: zhuming04sx@163.com

[通信作者] 张学光(ZHANG Xue-guang, corresponding author), E-mail: xueguangzh@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110929.1616.001.html>

molecules B7-H1 and B7-H4 were highly expressed in human CRC tissues, and correlated to patients' overall survival, and the joint detection of these molecules may have clinical value for diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma.

[**Key words**] colorectal carcinoma; B7-H1; B7-H4; T cell; tumor immune response

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 528-532]

结直肠癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤之一^[1-2]。目前虽然手术治疗、放疗和化疗等常规治疗模式使患者的生存率得到一定程度的提高,但仍不甚理想。因此,有必要进一步探讨结直肠癌免疫逃逸机制,为肿瘤生物治疗开拓新的途径。肿瘤的发生和发展是一个非常复杂的过程,肿瘤微环境中不仅存在众多的肿瘤细胞,还包含有大量免疫细胞。B7 家族负性共刺激分子是介导宿主免疫调节的重要参与者^[3],其中的 B7-H1 分子是由 Dong 等^[4]从卵巢癌组织 EST 中克隆得到,广泛表达于人类乳腺癌、肺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中,并与肿瘤患者的临床病理特征及预后紧密相关^[5-7];B7-H4 分子是 Chen 等^[8]在 2003 年利用生物信息学方法发现的 B7 家族最新成员,在卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌和肺癌细胞等肿瘤细胞中呈组成性表达^[5],而在正常组织中几乎检测不到。众多研究均提示,负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 在肿瘤微环境中发挥重要作用,然而其确切机制还有待进一步探讨。本课题选择 50 例结直肠癌患者的癌组织为研究对象,检测 B7-H1、B7-H4、CD3 和 CD8 的表达,结合患者临床病理指标,探讨 B7-H1 和 B7-H4 两者共表达在结直肠癌中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2003 年 1 月至 2003 年 12 月在苏州大学附属第四医院接受结直肠癌手术的 50 名患者的病理资料以及石蜡切片,经 H-E 染色读片确认为结肠癌或直肠癌。患者年龄 29~83 岁,中位年龄 63.5 岁,其中男 29 例、女 21 例,所有患者术前均未接受放疗或化疗。同时选取 5 例癌旁切端良性组织作为正常对照。对生存时间的随访截止至 2008 年 12 月。该研究所有提供样本的患者均签署知情同意书,并报院伦理委员会批准同意。

1.2 主要材料与试剂

免疫组化用鼠抗人 B7-H1、B7-H4 单抗由苏州大学生物技术研究所制备,CD3 和 CD8 单抗(即用型)、辣根过氧化物酶标记鼠/兔通用性二抗(即用型)、PBS 缓冲液、柠檬酸缓冲液及 DAB 显色剂购自福州迈新生物科技有限公司。

1.3 免疫组化染色检测结直肠癌组织中 B7-H1 和 B7-H4 的表达

石蜡切片经 56℃ 烘片 2 h 后,用柠檬酸缓冲液修复,采用 Envision™ 免疫组化染色法进行染色。B7-H1、B7-H4 染色结果评估法:光镜下每张切片中选取肿瘤细胞较多的 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,以细胞质或细胞膜出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色。结合染色强度和阳性细胞百分比评分如下:- 为无肿瘤细胞着色;+ 为 1%~30% 肿瘤细胞着色;++ 为 31%~60% 肿瘤细胞着色;+++ 为 60% 以上肿瘤细胞着色。为便于分析,将评分 - 和 + 的病例归为低表达组,++ 和 +++ 的病例归为高表达组。

1.4 免疫组化染色检测结直肠癌组织中 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞的浸润

石蜡切片经 56℃ 烘片 2 h 后,用柠檬酸缓冲液修复,采用 Envision™ 免疫组化染色法进行染色。CD3⁺T、CD8⁺T 淋巴细胞浸润程度的评估参照 Ghebeh 等^[9]的方法:根据 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞在肿瘤中心及间质部位的阳性细胞百分比及染色强度进行分级:0 为无浸润;1 为局部少量浸润;2 为中度浸润;3 为大量浸润。为便于分析,将 0 和 1 归为低度浸润,2 和 3 归为高度浸润。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析。B7-H1、B7-H4 的表达水平与临床病理参数及 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞浸润程度之间的相关性采用 χ^2 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法进行 Long rank 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H1、B7-H4 在结直肠癌组织中的表达

利用免疫组化方法检测了 50 例结直肠癌组织中 B7-H1 和 B7-H4 的表达,结果(图 1)显示,阳性着色均主要定位于肿瘤细胞胞质和胞膜,B7-H1 低表达 28 例、高表达 22 例,高表达率为 44%(22/50);B7-H4 低表达 22 例、高表达 28 例,高表达率为 56%(28/50)。5 例癌旁良性组织均不表达 B7-H1、B7-H4 分子。结直肠癌中 B7-H1 和 B7-H4 的表达水平均显著高于癌旁组织(均 $P < 0.01$)。

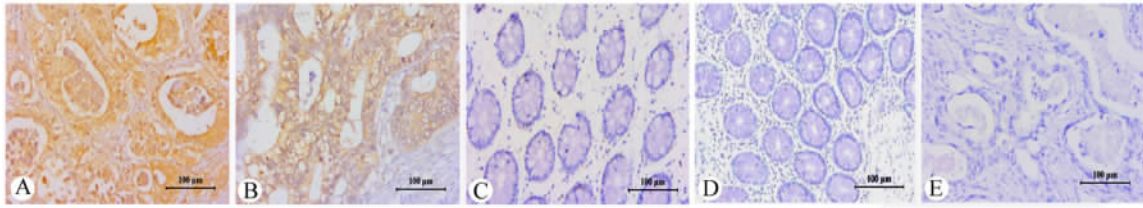


图 1 结直肠癌组织中 B7-H1、B7-H4 的表达

Fig. 1 B7-H1 and B7-H4 expression in CRC tissues

A: B7-H1 expression in CRC tissues; B: B7-H4 expression in CRC tissues; C: B7-H1 expression in paracancerous tissues; D: B7-H4 expression in paracancerous tissues; E: Negative control

2.2 B7-H1、B7-H4 与结直肠癌患者临床病理特征的关系

分析显示,结直肠癌中 B7-H1 的表达水平与肿瘤部位密切相关,其在结肠癌中的表达水平较直肠癌显著升高 ($P < 0.05$); B7-H4 的表达水平随着 Duke's 分期的升高也呈现出增高趋势 ($P < 0.05$),但两者与其他病理特征(如性别、年龄、分化程度、转移状态等)无关(表 1)。

2.3 B7-H1、B7-H4 在结直肠癌的表达与 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞浸润程度的关系

免疫组化法分析表明,在 50 例结直肠癌患者组织中,CD3⁺T 细胞低度浸润 21 例、高度浸润 29 例,其浸润程度与 B7-H1 的表达呈负相关 ($P < 0.05$,表 2),但与 B7-H4 的表达水平无关。CD8⁺T 细胞低度浸润 22 例、高度浸润 28 例,其浸润程度与 B7-H1 和 B7-H4 的表达水平均无显著相关性。

2.4 B7-H1、B7-H4 在结直肠癌组织中的表达与患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析显示,B7-H1 的表达水平与患者预后显著相关 ($P < 0.05$),且 B7-H1 低表达患者的生存率明显高于高表达的患者(图 3A)。虽然 B7-H4 的表达水平与患者生存率无显著差异,但是 20 个月以后 B7-H4 高表达的患者生存率有下降的趋势(图 3B)。而且,通过对两者的联合分析发现,B7-H1 和 B7-H4 同时高表达患者的生存率显著低于其他表达组的患者 ($P < 0.05$,图 3C)。

2.5 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞在结直肠癌组织中的浸润与患者预后的关系

对肠癌浸润 T 淋巴细胞与患者预后的相关性分析发现,CD3⁺T 细胞的浸润程度与患者预后呈正相关 ($P < 0.05$,图 4A),而 CD8⁺T 细胞的浸润程度对患者预后的影响无统计学意义(图 4B)。

表 1 B7-H1、B7-H4 表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系 (n)

Tab. 1 Correlation between B7-H1 and B7-H4 expressions and clinical parameters of CRC patients (n)

Index	Case	B7-H1			B7-H4		
		Low	High	P^{\ddagger}	Low	High	P^{\ddagger}
Sex							
Men	29	17	12	0.661	11	18	0.301
Women	21	11	10		11	10	
Age							
≤60	21	12	9	0.890	9	12	0.890
>60	29	16	13		13	16	
Tumor position							
Colon	28	12	16	0.035	13	15	0.696
Rectum	22	16	6		9	13	
Differentiation degree							
Low	12	5	7	0.251	3	9	0.128
Moderate	38	23	15		19	19	
High	0	0	0		0	0	
Tumor stage							
T1	4	3	1	0.117	3	1	0.193
T2	2	0	2		2	0	
T3	42	25	17		16	26	
T4	2	0	2		1	1	
Lymph node metastasis							
Negative	29	17	12	0.661	15	14	0.196
Positive	21	11	10		7	14	
Distant metastasis							
Negative	45	26	19	0.447	18	27	0.087
Positive	5	2	3		4	1	
Duke's stage							
A	3	3	0	0.406	3	0	0.038
B	24	13	11		10	14	
C	18	10	8		5	13	
D	5	2	3		4	1	

$^{\ddagger}P$ values were calculated using Pearson Chi-square test or Chi-square test for trend

表 2 结直肠癌组织中 B7-H1、B7-H4 的表达与 CD3⁺T、CD8⁺T 细胞浸润的关系(n)

Tab. 2 Correlation between expressions of B7-H1, B7-H4 and CD3⁺T, CD8⁺T cells infiltration in CRC tissues(n)

Type	Case	B7-H1			B7-H4		
		Low	High	P	Low	High	P
CD3 ⁺ T cell							
Slight infiltration	21	8	13	0.030	8	13	0.474
Severe infiltration	29	20	9		14	15	
CD8 ⁺ T cell							
Slight infiltration	22	10	12	0.183	12	10	0.183
Severe infiltration	28	18	10		10	18	
Total	50	28	22		22	28	

3 讨论

特异性肿瘤免疫应答能有效识别肿瘤细胞并将其清除,有效控制肿瘤的发生、发展。然而,大部分肿瘤却能逃避宿主杀伤性效应细胞的攻击,并降低肿瘤微环境中效应细胞的浸润,形成肿瘤免疫逃逸。在这过程中,可能的机制主要有两种:肿瘤细胞通过表达负性共刺激分子(如 B7-H1、B7-H4)诱导 T 细胞凋亡或失能^[10-11];肿瘤诱导产生抑制性免疫细胞,如 Foxp3⁺调节性 T 细胞^[12-13]。近年来,B7 家族负性共刺激分子在肿瘤组织中的异常表达受到越来越多的关注。

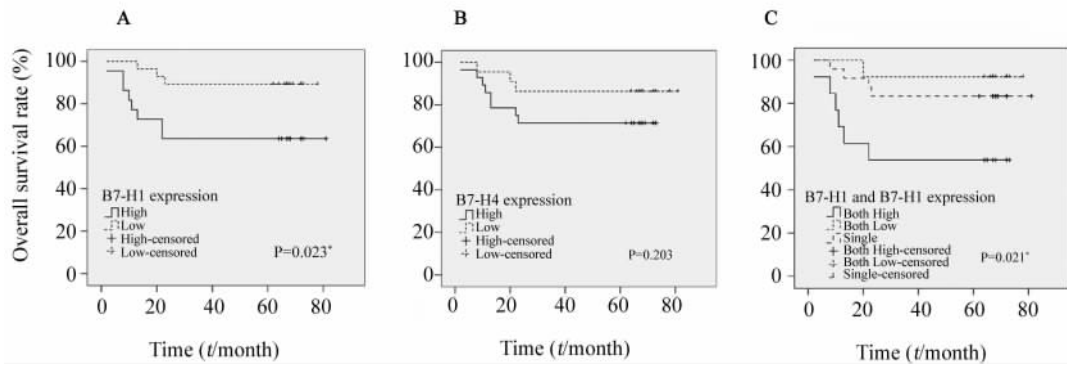


图 3 结直肠癌组织中 B7-H1、B7-H4 的表达与患者预后的关系

Fig. 3 Correlation between expression of B7-H1, B7-H4 and prognosis of CRC patients

A: CRC patients with different B7-H1 expression; B: CRC patients with different B7-H4 expression; C: CRC patients with different B7-H1 and B7-H4 expression

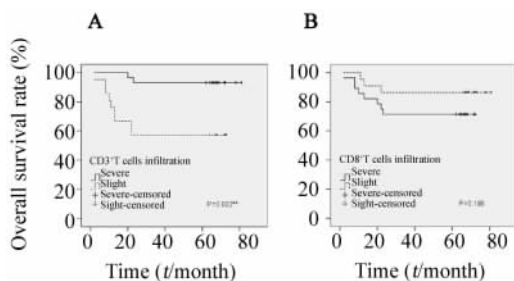


图 4 结直肠癌组织中浸润性 T 细胞与患者预后的关系

Fig. 4 Correlation between number of tumor infiltrating T cells and prognosis of CRC patients

A: CRC patients with different degree of CD3⁺T cell infiltration; B: CRC patients with different degree of CD8⁺T cells infiltration

本研究发现,负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 在结直肠癌组织中都存在异常高表达,并且 B7-H1 在结直肠癌中的表达水平与患者肿瘤部位密切相

关,其在结肠癌中的表达水平较直肠癌显著升高;B7-H4 的表达水平随着 Duke's 分期的升高也呈现出增高趋势。但两者与其他病理因素(如性别、年龄、分化程度、转移状态等)无关。提示 B7-H1 和 B7-H4 参与了结直肠癌的发生和发展,然而两者是如何影响结直肠癌的进程还有待进一步探讨。

本研究还发现,结直肠癌组织中 B7-H1 分子的表达水平与 CD3⁺T 淋巴细胞的浸润数量呈负相关,提示 B7-H1 在肿瘤中可能通过下调 T 细胞的浸润,进而抑制 T 细胞介导的肿瘤免疫应答。结果进一步显示,B7-H1 分子的表达水平与肠癌患者预后显著相关,B7-H1 高表达患者的生存率较低表达的患者显著降低。提示,B7-H1 在结直肠癌的预后过程中起着至关重要的作用。此外发现,虽然结直肠癌组织中 B7-H4 分子的表达对 T 细胞的浸润及患者生存率无显著影响,但在 20 个月后的生存统计中,B7-H4 高表达患者的生存率表现出下降的趋势。且

B7-H4 和 B7-H1 同时高表达的患者生存率显著低于其他表达组的患者,这也在一定程度上提示,在结直肠癌的发生和发展过程中,B7-H4 同样发挥了不可忽视的作用。此外,亦有研究^[14-15]证实,胃癌患者肿瘤组织中 B7-H4 在患者预后过程中起着至关重要的作用。

早期研究^[10]认为,B7 家族负性分子主要通过介导 T 细胞凋亡促进肿瘤逃避免疫监视。近年的研究^[5]却发现,结直肠癌中不仅存在着大量的肿瘤细胞,还普遍浸润着相当数量的淋巴细胞。这提示,在结直肠癌中 B7-H1 和 B7-H4 是否还存在有别于诱导 T 细胞凋亡的其他机制。传统意义上 CD8⁺T 细胞是杀伤肿瘤细胞的主要效应细胞,然而本研究发现,结直肠癌组织中浸润着相当数量的 CD8⁺T 细胞,但却并未有效地发挥抗肿瘤效应,虽然其浸润程度与患者预后无显著相关性,但是在 20 个月后的生存统计中,CD8⁺T 细胞浸润程度高的患者生存率反而呈现出下降的趋势。结合这一异常现象及近年的一些研究^[11-16],可以推测,结直肠癌中可能浸润着一群异质性的 CD8⁺T 细胞,这些 T 细胞失去了原有的杀伤功能,而成为一群失能的 CD8⁺CTL,而结直肠癌中异常表达的 B7 家族负性分子(如 B7-H1 和 B7-H4)很有可能是产生这群失能 T 细胞的主要诱因。亦有研究^[17-19]证实,B7-H1 能诱导 CD4⁺Tregs 的产生,从而抑制 T 细胞介导的肿瘤免疫应答,参与肿瘤免疫逃逸。

综上所述,B7-H1 和 B7-H4 作为结直肠癌中的两个重要的负性协同刺激分子,在 T 细胞介导的抗肿瘤免疫应答过程中起着关键的作用。因此,对这两个负性协同刺激分子的共同检测,对结直肠癌的临床诊断和预后判断具有一定的临床价值。

[参 考 文 献]

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(2): 277-300.

[2] 李明,顾晋. 中国结直肠癌 20 年来发病模式的变化趋势 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(3): 214-217.

[3] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses [J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(1): 29-53.

[4] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365-1369.

[5] Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(6): 467-477.

[6] Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(2 Pt 2): 709s-715s.

[7] 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.

[8] Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. Immunity, 2003, 18(6): 849-861.

[9] 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.

[10] Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion [J]. Nat Med, 2002, 8(8): 793-800.

[11] Wu K, Kryczek I, Chen L, et al. Kupffer cell suppression of CD8⁺T Cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions [J]. Cancer Res, 2009, 69(20): 8067-8075.

[12] Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders [J]. Blood, 2009, 114(10): 2149-2158.

[13] Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma [J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8900-8905.

[14] Arigami T, Uenosono Y, Hirata M, et al. Expression of B7-H4 in blood of patients with gastric cancer predicts tumor progression and prognosis [J]. J Surg Oncol, 2010, 102(7): 748-752.

[15] Jiang J, Zhu Y, Wu C, et al. Tumor expression of B7-H4 predicts poor survival of patients suffering from gastric cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(11): 1707-1714.

[16] Wong RM, Scotland RR, Lau RL, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs [J]. Int Immunol, 2007, 19(10): 1223-1234.

[17] Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells [J]. J Exp Med, 2009, 206(13): 3015-3029.

[18] Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance [J]. Blood, 2010, 116(8): 1291-1298.

[收稿日期] 2011-06-20

[修回日期] 2011-07-30

[本文编辑] 韩丹