

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.007

· 基础研究 ·

siRNA 沉默 *B7-H4* 表达对人肺腺癌 A549 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

孟凡珍, 江涛, 汤为学(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] **目的:**探讨靶向 *B7-H4* 基因的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 对人肺腺癌细胞 A549 增殖、侵袭和迁移的影响。**方法:**体外化学合成 *B7-H4* 特异性 siRNA (*B7-H4*-siRNA), 转染 A549 细胞, MTT 法、流式细胞术、Western blotting 分别检测 A549 细胞的增殖、细胞周期, 以及 *B7-H4* 和 Cyclin D1 蛋白的水平; Transwell 实验检测 A549 细胞体外侵袭和迁移能力。**结果:***B7-H4*-siRNA 成功转染入 A549 细胞, Western blotting 结果显示, *B7-H4*-siRNA 转染抑制 A549 细胞中 *B7-H4* 和 Cyclin D1 蛋白的表达。*B7-H4*-siRNA 转染后 A549 细胞增殖活性明显下降, *B7-H4*-siRNA 组 A549 细胞的倍增时间明显长于未转染组、Ctrl-siRNA 组和转染试剂对照组 [(33.78 ± 0.26) h vs (28.69 ± 0.18), (27.32 ± 0.13), (26.93 ± 0.19) h, $P < 0.05$]。 *B7-H4*-siRNA 转染使 A549 细胞阻滞在 G₁ 期。*B7-H4*-siRNA 组 A549 细胞的侵袭细胞数明显少于未转染组 [(89.80 ± 0.99) 个 vs (186.20 ± 1.33) 个, $P < 0.05$]。 *B7-H4*-siRNA 组 A549 细胞的迁移细胞数明显少于未转染组、Ctrl-siRNA 组和转染试剂对照组 [(60.20 ± 0.37) 个 vs (102.57 ± 0.52), (100.72 ± 0.31), (98.65 ± 0.21) 个, $P < 0.05$]。**结论:***B7-H4*-siRNA 能沉默 A549 细胞中 *B7-H4* 的表达, 抑制 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, *B7-H4* 可能成为肺癌基因治疗的候选靶点。

[关键词] 肺癌; *B7-H4* 基因; siRNA; 增殖; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0143-05

Effects of silencing *B7-H4* expression by small interference RNA on proliferation, invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells

MENG Fan-zhen, JIANG Tao, TANG Wei-xue (Chongqing Key Laboratory of Neurology, Department of Respiratory Medicine, First Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of silencing *B7-H4* expression by small interference RNA (siRNA) on proliferation, invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods:** Chemically synthesized siRNA targeting *B7-H4* (*B7-H4*-siRNA) was transfected into A549 cells. The proliferation of A549 cells was determined by MTT assay, the cell cycle was detected by flow cytometry, the levels of *B7-H4* and Cyclin D1 were verified by Western blotting, and the invasion and migration ability was detected by Transwell assay. **Results:** *B7-H4*-siRNA was successfully transfected into A549 cells. Western blotting results showed that *B7-H4*-siRNA transfection inhibited the expressions of *B7-H4* and Cyclin D1 in A549 cells. In the *B7-H4*-siRNA group, the proliferation of A549 cells was significantly down-regulated, the doubling time was longer than that in the untransfected group, the Ctrl-siRNA group and the empty vector group [(33.78 ± 0.26) h vs (28.69 ± 0.18), (27.32 ± 0.13), (26.93 ± 0.19) h, $P < 0.05$], and the cell cycles were arrested in G₁ phase. The invasion of A549 cells in the *B7-H4*-siRNA group was inhibited significantly as compared with the untransfected group [(89.80 ± 0.99) vs (186.20 ± 1.33), $P < 0.05$], and the migration of A549 cells in the *B7-H4*-siRNA group was suppressed significantly as compared with the untransfected group, the Ctrl-siRNA group and the empty vector group [(60.20 ± 0.37) vs (102.57 ± 0.52), (100.72 ± 0.31), (98.65 ± 0.21), $P < 0.05$]. **Conclusion:** *B7-H4*-siRNA can silence *B7-H4* expression in A549 cells, and inhibit the proliferation, invasion and migration of A549 cells effectively. *B7-H4* can be regarded as a candidate gene for lung cancer gene therapy.

[Key words] lung carcinoma; *B7-H4* gene; siRNA; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 143-147]

[作者简介] 孟凡珍 (1981 -), 女, 河北省衡水市人, 硕士生, 主要从事肺癌基因治疗的基础和临床研究。E-mail: buty_dream@yahoo.cn

[通信作者] 江涛 (JIANG Tao, corresponding author), E-mail: j. tcq@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120328.1514.004.html>

肺癌是一种起源于支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,为世界最常见的恶性肿瘤之一,居男性恶性肿瘤的第1位、女性恶性肿瘤的第2或3位,已成为恶性肿瘤中最常见的死亡原因^[1]。随着对肿瘤发生、转移机制研究的不断深入,人们发现,RNA干扰(RNA interference, RNAi)能特异性抑制靶基因的表达,具有高特异性、高效性、高稳定性、可传播性和可遗传性等特点^[2]。因此,利用RNAi技术进行肿瘤基因治疗已成为肿瘤研究的热点。侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的特征,而*B7-H4*(*B7S1*、*B7X*)基因沉默对人肺腺癌A549细胞增殖和迁移的影响尚未见相关报道,因此本研究以基因*B7-H4*为靶标,化学合成*B7-H4*-siRNA,观察其转染效率,检测其对高表达*B7-H4*的A549细胞增殖及侵袭的影响,为肺癌的基因治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株和材料

人肺腺癌A549细胞株由本实验室保存,常规培养于含10%灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基中,在37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。二甲基亚砜(DMSO)、MTT购于Sigma公司,RPMI 1640培养基购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料研究所,Entranster™-R转染试剂购自北京Engreen公司。兔抗人多克隆抗体*B7-H4*为美国Epitomics公司产品,兔抗人多克隆抗体Cyclin D1购于美国Santa公司,聚合HRP标记抗兔IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。孔径8.0 μm的Transwell小室购自Millipore公司,细胞外基质胶matrigel购自BD公司。

1.2 *B7-H4*-siRNA的设计

根据文献^[3]报道合成针对*B7-H4*基因siRNA靶序列的*B7-H4*-siRNA,其序列为5'-GGUGUUU-AGGCUUGGUCC-3',阴性对照序列(Ctrl-siRNA)为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3',并经过BLAST比对,避免与其他的内源性基因有同源性。*B7-H4*-siRNA、Ctrl-siRNA及Cy3标记的*B7-H4*-siRNA由广州锐博有限生物公司合成。

1.3 *B7-H4*-siRNA转染A549细胞最佳浓度和时间的选择

转染前1 d,以 1.5×10^5 /孔的密度将A549细胞接种于6孔培养板中,加入不含抗生素的完全培养基。实验设未转染组、Ctrl-siRNA组、*B7-H4*-siRNA组和转染试剂对照组,按Entranster™-R转染试剂说明进行转染,将Cy3标记的*B7-H4*-siRNA分别

按20、30、50、100 nmol/L的终浓度转染A549细胞,6 h后换液,分别在转染后6、24、48、72 h用荧光显微镜观察荧光阳性细胞,随机计算5个视野下的细胞数和荧光细胞数目,计算转染效率。

1.4 Western blotting检测*B7-H4*-siRNA转染后A549细胞中*B7-H4*和Cyclin D1蛋白的表达

收集未转染组及转染72 h后的A549细胞,用冰冷PBS洗3次,加入细胞裂解液提取蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取30 μg样品用SDS-PAGE分离,然后将蛋白转移至PVDF膜上,再用5%脱脂奶粉-TBST室温摇床封闭1 h,加入一抗[*B7-H4*(1:1 000)、Cyclin D1(1:100)]于4℃孵育过夜,用TBST洗涤3次,每次5 min,并在摇床上振摇,加入二抗(HRP标记抗兔IgG,1:2 000),于37℃下孵育1 h,用TBST洗涤3次,每次5 min。在化学发光仪上显色,结果用灰度扫描仪分析并计算灰度值。实验重复3次。

1.5 MTT法检测*B7-H4*-siRNA对A549细胞增殖的影响

收集未转染组、*B7-H4*-siRNA组(转染48 h)、Ctrl-siRNA组和转染试剂对照组的A549细胞,按 2×10^3 /孔接种于8块96孔培养板,置于5% CO₂培养箱中培养。从0 d开始每隔24 h随机取1块96孔培养板,每孔加入MTT溶液20 μl继续培养4 h,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入DMSO 150 μl,用酶联免疫标记分析仪测其光密度值*D*,连续7 d。细胞抑制率(%)=(对照组*D*值-实验组*D*值)/对照组*D*值×100%。

1.6 细胞计数法计算A549细胞倍增时间

收集未转染组、*B7-H4*-siRNA组(转染48 h)、Ctrl-siRNA组和转染试剂对照组的A549细胞,按 2×10^3 /瓶分别接种于2个细胞培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养7 d,消化细胞计数,根据公式计算A549细胞倍增时间^[4]。倍增时间(*h*)= $t * [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$,*t*为培养时间,*N*₀为首次记下的细胞数,*N*_{*t*}为*t*时间后的细胞数;一般*N*₀在接种细胞24 h后计数获得。

1.7 Transwell法检测*B7-H4*-siRNA对A549细胞侵袭和迁移的影响

将基膜胶matrigel按1:3稀释后均匀地铺在小室膜(40 μl/孔)上,成胶30 min,实验前30 min再次成胶。将未转染组和*B7-H4*-siRNA组(转染48 h)的A549细胞消化后调整细胞密度至 5.0×10^5 个/ml,将400 μl加入至上室,600 μl培养基加入下室,每组3个复孔,培养20 h后,弃去上室液体及细

胞。4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 2 遍, 吉姆萨染液染色、水洗、风干。小心将 matrigel 切取下来, 细胞面朝下, 置于载玻片上, 中性树脂封片, 摄像, 在 400 倍显微镜下随机取 5 个视野计算穿膜细胞数, 求出每个视野平均穿膜细胞数, 并计算其相对侵袭指数。相对侵袭指数(%) = 转染细胞穿膜数/未转染细胞穿膜数 × 100%。

迁移实验与侵袭实验方法相同, 但 transwell 小室底部膜的内表面上不加 matrigel 胶, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 3 h, 通过计数穿膜细胞数, 反映 B7-H4-siRNA 对 A549 细胞迁移能力的影响。

1.8 流式细胞术检测 B7-H4-siRNA 对 A549 细胞周期的影响

收集未转染组和 B7-H4-siRNA 组(转染 48 h)的 A549 细胞各 1.0×10^6 个, PBS 液洗 3 次, 加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇, 流式细胞仪检测 A549 细胞周期的分布。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件行 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4-siRNA 序列成功转染 A549 细胞

B7-H4-siRNA 特异性序列用 Cy3 标记后, 转染到 A549 细胞中, 在倒置荧光显微镜下可观察到细胞膜上有红色荧光出现, 表明转染成功。48 h 时, 100 nmol/L B7-H4-siRNA 转染 A549 细胞的效率高于 20、30、50 nmol/L B7-H4-siRNA ($P < 0.05$), 且高于 24 h 时 100 nmol/L B7-H4-siRNA 的转染效率 ($P < 0.05$), 因此后续研究中用 100 nmol/L B7-H4-siRNA 转染 A549 细胞 48 h, 研究 B7-H4 对 A549 细胞的影响(图 1, 表 1)。

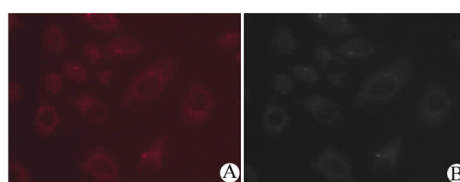


图 1 荧光显微镜下观察 B7-H4-siRNA 转染 A549 细胞的效率(×200)

Fig. 1 Observation of transfection efficiency of B7-H4-siRNA on A549 cells by a fluorescence microscope(×200)

A: Fluorescence microscope; B: Light microscope

表 1 不同浓度和时间点 B7-H4-siRNA 转染 A549 细胞的效率(%)

Tab. 1 Transfection efficiency of B7-H4-siRNA on A549 cells at different concentrations and time points(%)

Time (t/h)	B7-H4-siRNA concentration (c_b /mmol · L ⁻¹)			
	20	30	50	100
24	15.1 ± 0.11	19.9 ± 0.11	30.8 ± 0.20	34.6 ± 0.29
48	36.5 ± 0.28	40.3 ± 0.02	57.2 ± 0.30	79.7 ± 0.49*
72	41.4 ± 0.09	47.1 ± 0.11	59.6 ± 0.12	72.3 ± 0.21

* $P < 0.05$ vs 20, 30, 50 nmol/L; * $P < 0.05$ vs 24, 72 h

2.2 B7-H4-siRNA 降低 A549 细胞中 B7-H4 和 Cyclin D1 蛋白的表达

Western blotting 结果(图 2)显示, 与未转染组、Ctrl-siRNA 组、转染试剂对照组相比, B7-H4-siRNA 转染 72 h 后 A549 细胞中 B7-H4 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达水平均明显下降[B7-H4: (0.03 ± 0.001) vs (0.16 ± 0.016)、(0.14 ± 0.026)、(0.13 ± 0.033); CyclinD1: (0.36 ± 0.023) vs (0.61 ± 0.015)、(0.60 ± 0.014)、(0.61 ± 0.018), $P < 0.05$]。由此说明, B7-H4-siRNA 能降低 A549 细胞中 B7-H4 和 Cyclin D1 蛋白的表达。

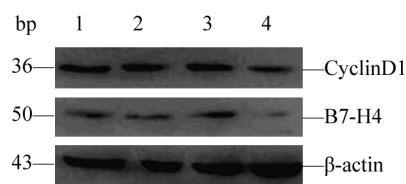


图 2 Western blotting 检测转染后 A549 细胞中 B7-H4 和 Cyclin D1 蛋白的表达

Fig. 2 Expressions of B7-H4 and CyclinD1 proteins in A549 cells after B7-H4-siRNA transfection

1: Control; 2: Ctrl-siRNA; 3: Empty vector; 4: B7-H4-siRNA

2.3 B7-H4-siRNA 抑制 A549 细胞的增殖

实验结果(图 3)可见,与未转染组、Ctrl-siRNA 组、转染试剂对照组相比,B7-H4-siRNA 组 A549 细胞(转染 48 h)的增殖明显缓慢($P < 0.05$)。B7-H4-siRNA 转染 48 h 后 A549 细胞的倍增时间为(33.78 ± 0.26)h,与未转染组倍增时间的(28.69 ± 0.18)h、Ctrl-siRNA 组的(27.32 ± 0.13)h 和转染试剂对照组的(26.93 ± 0.19)h 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,B7-H4-siRNA 能明显抑制 A549 细胞的增殖。

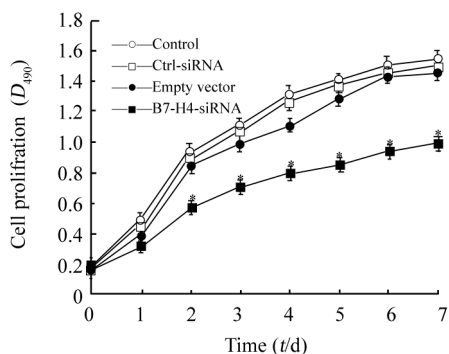


图 3 B7-H4-siRNA 抑制 A549 细胞的增殖

Fig. 3 B7-H4-siRNA inhibited proliferation of A549 cells

* $P < 0.05$ vs Ctrl-siRNA group

2.4 B7-H4-siRNA 下调 A549 细胞的侵袭力

Transwell 小室上室中,A549 细胞穿过膜上 matrigel 胶到膜的下室面,其数量反映了 A549 细胞侵袭能力的大小。侵袭实验结果(图 4)显示,B7-H4-siRNA 组(转染 48 h)穿膜细胞数为(89.80 ± 0.99)个,侵袭指数为(46.94 ± 0.27)%,明显少于未转染组的(186.20 ± 1.33)个和侵袭指数的 100%($P < 0.05$)。由此表明,B7-H4-siRNA 能抑制 A549 细胞的侵袭能力。

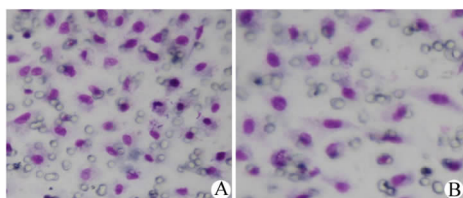


图 4 Transwell 实验检测 B7-H4-siRNA 对 A549 细胞侵袭的影响($\times 200$)

Fig. 4 Influence of B7-H4-siRNA on invasion of A549 cells detected by Transwell assay($\times 200$)

A: Control; B: B7-H4-siRNA

2.5 B7-H4-siRNA 抑制 A549 细胞的迁移能力

Transwell 实验结果显示,B7-H4-siRNA 组穿膜

细胞数为(60.20 ± 0.37)个,明显少于未转染组的(102.57 ± 0.52)个、Ctrl-siRNA 组的(100.72 ± 0.31)个和转染试剂对照组的(98.65 ± 0.21)个($P < 0.01$)。由此说明,B7-H4 特异性的 siRNA 能有效抑制 A549 细胞的体外迁移能力。

2.6 B7-H4-siRNA 抑制 A549 的细胞周期

流式细胞术分析结果(表 2)表明,B7-H4-siRNA 组(转 48 h)的 A549 细胞被阻滞在 G₁ 期,与未转染组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,B7-H4-siRNA 可诱导 A549 细胞发生 G₁ 期阻滞。

表 2 流式细胞术检测 B7-H4-siRNA 对 A549 细胞周期的影响
Tab. 2 Influence of B7-H4-siRNA on cell cycle distribution of A549 cells detected by flow cytometry

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	32.06 ± 0.58	47.21 ± 0.98	20.72 ± 1.08
B7-H4-siRNA	44.19 ± 0.41 *	45.39 ± 0.88	10.42 ± 0.75 *

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

RNA 干扰是近年来新兴的一种具有高度特异性的基因沉默技术^[5],作为后基因组时代的一种下调基因表达的工具已被广泛应用于基因功能的研究^[6]。目前,此项技术已广泛应用于肿瘤的研究,可特异地抑制癌相关基因、癌基因、突变基因的过度表达,为肿瘤的基因研究提供新的途径。siRNA 转染技术的关键在于转染效率的高低,而化学合成的 siRNA 方法简便、操作性强、转染效率高、对细胞的毒性作用小,可直接应用于肺癌的靶向基因治疗。

最近,B7 家族的几个同源分子已经确定,包括 B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4 和 B7-H6^[7]。而 B7-H4 是最近发现的 T 淋巴细胞共刺激分子 B7 家族成员,为细胞表面糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族。最新研究^[8]表明,肿瘤细胞株中 B7-H4 在细胞质中表达,而在新鲜分离的肿瘤细胞中 B7-H4 呈膜表达,膜结合的 B7-H4 在肿瘤细胞中表达的增加可促进肿瘤的转化。B7-H4 mRNA 广泛分布于外周组织,包括肾、肝、肺、脾、胸腺和胎盘,但在脑和心脏中则没有表达^[9-10]。国外学者研究^[11]发现,B7-H4 在黏液性和低度恶性卵巢癌中呈阴性表达^[3,12],而在多种恶性肿瘤组织中高表达,如卵巢癌^[13]、小细胞肺癌^[14]、导管和小叶乳腺癌^[3,15]、肾细胞癌^[13],在增生和恶性的子宫内膜上皮组织中过度表达^[16]。

此外,B7-H4 还能通过抑制 T 细胞的增殖、分化,负性调控 T 细胞的免疫应答^[9,17-18]。有研究^[19]报道,B7-H4 可能与 PI3K/AKT 信号转导通路有关,AKT 的激活抑制了 GSK-3 β 活性,使胞浆中 β -catenin 增加,进入细胞核与 LEF/TCF 结合增加,促进 c-myc、Cyclin D1、MMP-7、CD44 等的表达,从而促进肿瘤细胞的增殖和转移。

本实验 Western blotting 结果显示:B7-H4-siRNA 组相对于未转染组、Ctrl-siRNA 组和转染试剂对照组的 B7-H4 蛋白表达下降,说明 B7-H4-siRNA 能有效地下调 B7-H4 蛋白的表达。MTT 比色法检测结果显示,A549 细胞在转染 B7-H4-siRNA 后,与未转染组、Ctrl-siRNA 组及转染试剂对照组相比生长明显减缓,B7-H4-siRNA 能有效抑制 A549 细胞的增殖。B7-H4-siRNA 组 A549 细胞中 Cyclin D1 表达降低。流式细胞仪结果显示,B7-H4-siRNA 组 A549 细胞被阻滞在 G₁ 期,因细胞周期不能正常运行,所以倍增时间延长,这与细胞倍增实验的结果相吻合。研究报道^[20-21],原发性胃癌肿瘤细胞中也表达 B7-H4,其表达与肿瘤侵袭性有关。本实验 Transwell 小室结果显示:B7-H4-siRNA 转染的 A549 细胞侵袭、迁移能力明显减弱,提示,B7-H4 基因沉默能明显抑制 A549 细胞的侵袭和转移。

目前国内有关 B7-H4 在肺腺癌中的表达研究相对较少,在人肺腺癌 A549 细胞株中的表达及其侵袭、转移的关系也未见报道。本实验通过体外化学合成 B7-H4-siRNA 序列,在 EntransterTM-R 的介导下转染 A549 细胞,B7-H4-siRNA 组与未转染组、Ctrl-siRNA 组及转染试剂对照组相比,B7-H4 蛋白的表达下降,然而 B7-H4 蛋白的表达下降是否通过 PI3K/AKT 通路,其与 c-myc、Cyclin D1、MMP-7、CD44 等表达的关系,还有待进一步深入研究。总之,利用 siRNA 技术下调人肺腺癌 A549 细胞中 B7-H4 的表达,可以阻滞肿瘤细胞的生长,抑制细胞的侵袭,特异性干预 B7-H4 基因的表达有可能成为治疗肺癌的一种新手段。

[参 考 文 献]

- [1] 辛建保,汪金峰,马万里,等. 呼吸科疑难问题解析 [M]. 南京:江苏科学技术出版社,2009: 156.
- [2] 王海伦. RNAi 及其在肿瘤生物学研究中的应用 [J]. 湖南省环境生物职业技术学院学报,2011, 17(3): 20-23.
- [3] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation [J]. Exp Cell Res, 2005, 306(1): 128-141.

- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京:北京出版社,1995: 155.
- [5] 方雷,吴海滨,陈晓岗. Survivin 基因沉默抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖并增强其对塞来昔布的敏感性 [J]. 南方医科大学学报,2011, 31(11): 1944-1948.
- [6] 史毅,金由辛. RNA 干扰与 siRNA(小干扰 RNA)研究进展 [J]. 生命科学,2008, 20(2): 196-201.
- [7] He C, Qiao H, Jiang H, et al. The inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: Association with cancer progression and survival [J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011: 695834.
- [8] Chen C, Qu QX, Shen Y, et al. Induced expression of B7-H4 on the surface of lung cancer cell by the tumor-associated macrophages: A potential mechanism of immune escape [J]. Cancer Lett, 2012, 317(1): 99-105.
- [9] Flies DB, Chen L. The new B7s: Playing a pivotal role in tumor immunity [J]. J Immunother, 2007, 30(3): 251-260.
- [10] Tringler B, Liu W, Corral L, et al. B7-H4 overexpression in ovarian tumors [J]. Gynecol Oncol, 2006, 100(1): 44-52.
- [11] Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, et al. B7-4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: Associations with cancer progression and survival [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10391-10396.
- [12] Choi H, 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.
- [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] 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.
- [15] Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, et al. B7-4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1842-1848.
- [16] Miyatake T, Tringler B, Liu W, et al. B7-H4 (DD-O110) is overexpressed in high risk uterine endometrioid adenocarcinomas and inversely correlated with tumor T-cell infiltration [J]. Gynecol Oncol, 2007, 106(1): 119-127.
- [17] 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.
- [18] Prasad DV, Richards S, Mai XM, et al. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation [J]. Immunity, 2003, 18(6): 863-873.
- [19] Park GB, Song H, Kim YS, et al. Cell cycle arrest induced by engagement of B7-H4 on Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma cell lines [J]. Immunology, 2009, 128(3): 360-368.
- [20] Arigami T, Uenosono Y, Ishigami S, et al. Clinical significance of the B7-H4 coregulatory molecule as a novel prognostic marker in gastric cancer [J]. World J Surg, 2011, 35(9): 2051-2057.
- [21] 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.

[收稿日期] 2011 - 12 - 03 [修回日期] 2012 - 02 - 24
[本文编辑] 王莹