

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180388

B7-H4 和 B7-H6 在卵巢癌中的表达及意义

章晓洁^{1,2}, 李怀芳^{2*}, 初磊², 程允³, 梅丽艳¹, 周士华¹

1. 上海市宝山区罗店医院妇产科, 上海 201908

2. 同济大学附属同济医院妇产科, 上海 200065

3. 南京医科大学附属南京医院妇科, 南京 210029

[摘要] **目的:**探讨 B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢良性和恶性肿瘤中的表达及其临床病理意义。**方法:**收集同济大学附属同济医院卵巢肿瘤标本 101 例, 其中卵巢恶性肿瘤 58 例、同期卵巢良性肿瘤 43 例。采用免疫组织化学染色检测 B7-H4 和 B7-H6 蛋白在良性及恶性卵巢肿瘤中的表达及分布。采用 χ^2 检验及非参数秩和检验分析卵巢恶性肿瘤中 B7-H4 和 B7-H6 蛋白表达与临床病理参数的相关性。**结果:**B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢恶性肿瘤中表达率分别为 82.76%(48/58)、79.31%(46/58), 在卵巢良性肿瘤中的表达率分别为 13.95%(6/43)、16.28%(7/43); B7-H4 和 B7-H6 的表达在卵巢良恶性肿瘤间差异有统计学意义($P < 0.0001$)。B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢恶性肿瘤细胞浆和细胞膜上均有表达。B7-H4 和 B7-H6 蛋白的表达与卵巢恶性肿瘤患者的年龄、组织分型及 p53 蛋白表达相关($P < 0.05$)。**结论:**B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢恶性肿瘤中呈高表达, 提示两者可能与卵巢恶性肿瘤的发生、发展有关。

[关键词] 卵巢癌; 协同刺激分子; B7-H4; B7-H6**[中图分类号]** R 737.31 **[文献标志码]** A

Expressions of B7-H4 and B7-H6 in ovarian cancers and its clinical implication

ZHANG Xiao-jie^{1,2}, LI Huai-fang^{2*}, CHU Lei², CHENG Yun³, MEI Li-yan¹, ZHOU Shi-hua¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Luodian Hospital of Baoshan District, Shanghai 201908, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

3. Department of Gynecology, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of B7-H4 and B7-H6 in ovarian tumor tissues and related clinicopathological characteristics. **Methods:** A total of 101 ovarian tumor specimens from Tongji Hospital Affiliated to Tongji University were collected, among which 43 cases were benign and 58 cases were malignant. The expressions and distributions of B7-H4 and B7-H6 in ovarian benign and malignant tumors were investigated by immunohistochemical staining. Chi-square test and nonparametric rank sum test were used to analyze the correlation between B7-H4 and B7-H6 protein expressions and clinicopathological parameters. **Results:** Immunohistochemical results showed that 82.76% (48/58) of malignant tumors expressed B7-H4 and 79.31% (46/58) of malignant tumors expressed B7-H6, respectively. While in benign ovarian tumors, there were 13.95% (6/43) and 16.28% (7/43) samples that expressed B7-H4 and B7-H6. The expressions of B7-H4 and B7-H6 proteins in ovarian malignant tumors is significantly higher than that in benign ovarian tumors ($P < 0.05$). B7-H4 and B7-H6 proteins were mostly distributed in the cytoplasm and cell membrane. Moreover, the expression levels of B7-H4 and B7-H6 proteins in ovarian cancers were tightly correlated with the patients' age, histological type of tumors, and p53 expression ($P < 0.05$). **Conclusions:** The high expressions of B7-H4 and B7-H6 proteins in ovarian malignant tumors indicates their potential roles in the occurrence and progress of ovarian malignant tumors.

[Key Words] ovarian cancer; co-stimulatory molecules; B7-H4; B7-H6

卵巢恶性肿瘤是严重威胁女性生命安全的肿瘤。美国 2018 年癌症发病及死亡统计结果^[1]显示, 卵巢恶性肿瘤是致死人数最多的妇科肿瘤。由于卵巢解剖位置较深, 且卵巢癌缺乏特异性症状及体

征, 临床上难以早期发现、及时诊治, 大部分的患者就诊时已发展至晚期, 5 年生存率不足 30%^[2]。因此, 寻找新的生物靶点, 为卵巢癌的早诊早治、预后评价及靶向治疗提供依据, 有重要的临床意义。

[收稿日期] 2018-04-14**[接受日期]** 2018-09-29**[作者简介]** 章晓洁, 硕士, 主治医师。E-mail: zxj07210821@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-66111303; E-mail: huaifangli@gmail.com

近年来,研究^[3]表明,协同刺激途径参与多种实体肿瘤的发生发展,其中包括卵巢恶性肿瘤。协同刺激分子的异常表达可以抑制 T 细胞的增殖和细胞周期进程,进而负性调控 T 细胞的免疫应答,导致肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤的发生、发展^[4]。B7-H4 和 B7-H6 均属于 B7 家族,是重要的协同刺激分子。近年来的研究^[5-11]表明,这两种蛋白在多种人类肿瘤组织中异常表达,包括宫颈癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、星形细胞瘤等,并直接影响肿瘤细胞的生物学行为,辅助肿瘤免疫逃逸,从而影响患者预后。然而,B7-H4 及 B7-H6 在卵巢癌中的研究很少。

因此,本研究通过分析 B7-H4 和 B7-H6 在卵巢肿瘤中的表达,及其与患者临床病理特征的关系,探讨这两种蛋白在卵巢癌中的作用及作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择同济大学附属同济医院 2015 年 4 月至 2018 年 6 月收治的卵巢恶性肿瘤 58 例及卵巢良性肿瘤 43 例。所有患者术前均未进行手术、放化疗、激素及免疫治疗,按照国际妇产科联盟 (FIGO)2014 卵巢恶性肿瘤分期标准进行临床分期。58 例卵巢恶性肿瘤包括 23 例浆液性癌、12 例透明细胞癌、9 例苗氏管癌、7 例子官内膜样癌及 7 例印戒细胞癌。43 例卵巢良性肿瘤包括 10 例畸胎瘤、10 例黏液性囊肿、10 例子官内膜异位囊肿、5 例黄体囊肿、4 例浆液性囊肿及 4 例纤维瘤。恶性组患者年龄 28~86 岁,平均 53.62 岁;良性组患者年龄 25~76 岁,平均 51.14 岁。两组间年龄差异无统计学意义。

1.2 免疫组织化学 将同济大学附属同济医院病理科采集的组织蜡块制作成组织切片,进行 DAB 免疫组织染色。60℃ 恒温箱烘烤,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,0.01 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液抗原修复,含 3% 过氧化氢的甲醇溶液处理后,孵一抗 (北京博奥森生物技术有限公司)。将 B7-H4 和 B7-H6 抗体按 1:1 000 稀释于抗原稀释液中,200 μL 覆盖在组织切片,4℃ 孵育过夜;PBS 清洗后,二抗 (美国 Vector 公司)按 1:1 000 稀释于抗原稀释液中,覆盖切片,4℃ 孵育过夜。DAB 显色,脱水,脱脂,中性树胶封片。

1.3 免疫组化结果判定标准 在 200 倍镜下,每张切片随机选取 5 个视野,计数细胞,每个视野计数 100 个细胞;共计 500 个细胞。按照染色阳性细胞所占比例进行 A 评级:0 级 (0%)、1 级 (<10%)、2

级 (10%~50%)、3 级 (>50%);按阳性细胞显色强度进行 B 评级:0 级 (无着色)、1 级 (淡黄色,+),2 (黄色,++)、3 级 (棕褐色,+++)。免疫组化评分 (IHS)=A×B;IHS<2 为染色阴性,IHS≥2 为染色阳性。B7-H4 和 B7-H6 蛋白共同表达为双阳,两者之一表达为单阳,均未表达为双阴。

1.4 统计学处理 采用 SAS 9.4 软件进行统计分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验,组间进一步两两比较采用 Bonferroni 校正法;对于不满足 χ^2 检验条件的计数资料,进行 Fisher 确切概率法分析;组间等级计数资料比较采用非参数秩和检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 B7-H4 和 B7-H6 在卵巢良、恶性肿瘤细胞中的表达 免疫组织化学染色 (图 1、图 2) 显示:B7-H4 和 B7-H6 蛋白阳性着色为棕黄色颗粒,在卵巢良性肿瘤中不表达或低表达。B7-H4 在卵巢良性肿瘤中的 A 评级为 1、B 评级 1,IHS 为 1;B7-H6 在卵巢良性肿瘤中的 A 评级为 1、B 评级 1,IHS 为 1。

B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢癌细胞胞质和胞膜表达,呈现强或中等强度染色,呈灶状或片状分布,间质细胞中无或弱染色。B7-H4 在卵巢恶性肿瘤中的 A 评级为 3、B 评级 3,IHS 为 9;B7-H6 在卵巢恶性肿瘤中的 A 评级为 3、B 评级 3,IHS 为 9。

2.2 B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢良、恶性肿瘤中的表达率 58 例卵巢恶性肿瘤标本中,48 例 (82.76%) 表达 B7-H4,46 例 (79.31%) 表达 B7-H6。43 例卵巢良性肿瘤标本中,6 例 (13.95%) 表达 B7-H4,7 例 (16.28%) 表达 B7-H6。卵巢恶性肿瘤中,B7-H4 和 B7-H6 蛋白至少其中之一阳性的比例为 91.38% (53/58);卵巢良性肿瘤中,B7-H4 和 B7-H6 蛋白至少其中之一阳性的比例为 27.91% (12/43)。B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢恶性肿瘤中的表达率高于卵巢良性肿瘤 ($P<0.000 1$)。

2.3 B7-H4 和 B7-H6 蛋白的表达与卵巢恶性肿瘤临床病理参数的相关性 结果 (表 1) 表明:B7-H4 和 B7-H6 在 <55 岁组的表达率高于 55 岁及以上年龄组 ($P<0.05$)。两者在不同组织类型间的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)。两者在 p53 蛋白阳性标本中的表达率高于 p53 蛋白阴性标本 ($P<0.05$)。两者在不同组织分化程度、FIGO 临床分期及 CA125 表达情况间差异无统计学意义。

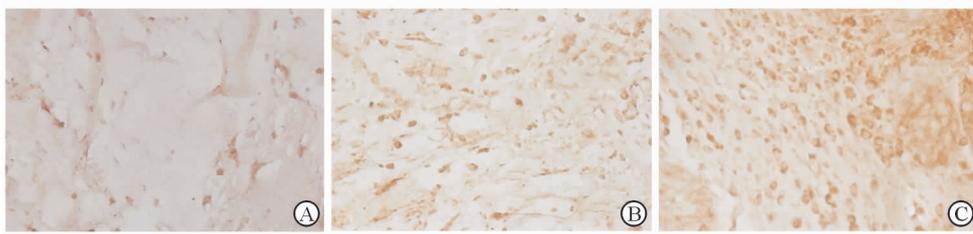


图1 B7-H4在卵巢良、恶性肿瘤中的表达

A: 卵巢良性肿瘤; B, C: 卵巢恶性肿瘤. Original magnification: ×400

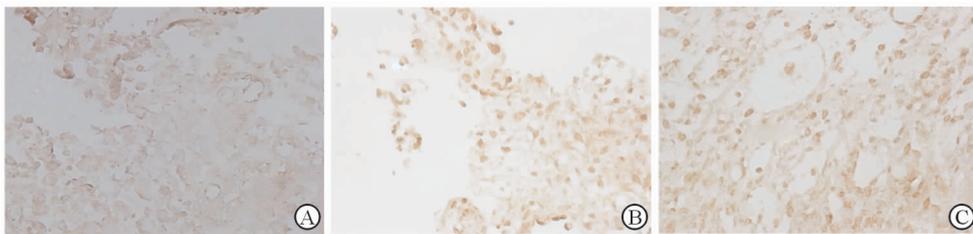


图2 B7-H6在卵巢良、恶性肿瘤中的表达

A: 卵巢良性肿瘤; B, C: 卵巢恶性肿瘤. Original magnification: ×400

表1 B7-H4和B7-H6表达与卵巢恶性肿瘤临床病理参数之间的关系

变 量	N	B7-H4 表达			B7-H6 表达			n(%)
		表达	统计量	P 值	表达	统计量	P 值	
年龄			3.930	0.047		8.227	0.004	
<55岁	31	29(93.55)			29(93.55)			
≥55岁	27	19(70.37)			17(62.96)			
组织类型			-	0.013		-	0.044	
浆液性癌	23	20(86.96)			19(82.61)			
子宫内膜样癌	7	7(100.00)			4(57.14)			
透明细胞癌	12	12(100.00)			12(100.00)			
苗氏管癌	9	5(55.56)			5(55.56)			
印戒细胞癌	7	4(57.14)			6(85.71)			
细胞分级			-1.318	0.188		1.328	0.184	
低分化	35	27(77.14)			30(85.71)			
中分化	12	11(91.67)			8(66.67)			
高分化	11	10(90.91)			8(72.73)			
FIGO分期			1.203	0.229		0.461	0.645	
I期	14	13(92.86)			13(92.86)			
II期	7	6(85.71)			6(85.71)			
III期	20	16(80.00)			12(60.00)			
IV期	17	13(76.47)			15(88.24)			
CA125			0.094	0.760		0.028	0.867	
表达	39	33(84.62)			29(74.36)			
未表达	7	5(71.43)			6(85.71)			
p53			-	0.017		-	0.047	
表达	37	37(100.00)			36(97.30)			
未表达	6	4(66.67)			4(66.67)			

3 讨论

B7 家族成员是重要的协同刺激分子,对 T 细胞活化、B 细胞活化、细胞因子产生、某些分子和抗体的产生发挥重要调节作用。B7-H4 是 T 细胞免疫应答负性调控基因,通过阻止 T 细胞的活化来抑制细胞因子的分泌,负调节 T 细胞介导的免疫应答^[12]。B7-H6 能促进自然杀伤细胞(NK 细胞)释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ),从而杀伤靶细胞^[13]。近年的研究发现,B7-H4 在宫颈癌^[5]、胃癌^[6]、非小细胞肺癌^[7]和胰腺癌^[8]等恶性肿瘤中过度表达,为潜在的治疗靶点^[14];B7-H6 在胃癌^[9]、非小细胞肺癌^[10]和星形细胞瘤^[11]等恶性肿瘤中均有表达,并在荷瘤小鼠中取得显著的靶向治疗效果^[15]。B7-H4 和 B7-H6 在肿瘤发生发展中的作用正日益受到关注,通过深入研究,有望成为新的靶向治疗方向。

本研究发现,在卵巢恶性肿瘤中,B7-H4 和(或)B7-H6 蛋白的表达率为 91.38%,高于其在卵巢良性肿瘤中的表达率(27.91%, $P < 0.05$),提示其与卵巢恶性肿瘤的发病密切相关。本研究结果还显示,B7-H4 和(或)B7-H6 蛋白的表达率与患者年龄、组织类型、p53 蛋白表达情况有关($P < 0.05$),但未显示其与组织分化程度、FIGO 临床分期及 CA125 表达情况的相关性,可能与样本量较小有关。此外,本研究中的标本均为石蜡标本,由于包埋固定剂与抗原交联作用,会封闭一部分抗原,且固定时间越久,抗原封闭的越多,使弱表达的抗原呈现假阴性,也可能导致结果偏倚。

综上所述,B7-H4 和 B7-H6 蛋白在卵巢良、恶性肿瘤中的表达存在差异,并与恶性肿瘤患者年龄、组织类型、p53 蛋白表达相关,提示这两种蛋白参与卵巢恶性肿瘤的发病。此外,近年来已有研究获得 B7 家族靶向治疗肿瘤的证据^[14-15],但确切作用机制尚不清楚,须加大样本量进行深入的体内及体外研究。研发针对 B7-H4 和 B7-H6 的卵巢恶性肿瘤靶向药物,联合经典的治疗方法,有望为卵巢癌提供新的治疗方案,进而提高患者的生存率。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30.

- [2] 王丹,代晶,潘长清,等.血清 CA125、HE4 以及 ROMA 指数在卵巢癌早期诊断中的应用价值[J].实用妇产科杂志, 2018,34(4):314-316.
- [3] 王丽,吴昌平,蒋敬庭.协同刺激分子 PD-L1、B7-H3 与 B7-H4 在卵巢癌中的表达及其意义[J].临床肿瘤学杂志, 2013,18(7):663-667.
- [4] 岳翠华,杨敏,蒋敬庭,等.协同刺激分子 B7-H4 在肿瘤免疫治疗中的机制及应用进展[J].临床检验杂志, 2016,34(11):850-853.
- [5] HUANG C, ZHOU L, CHANG X, et al. B7-H3, B7-H4, Foxp3 and IL-2 expression in cervical cancer: associations with patient outcome and clinical significance[J]. Oncol Rep, 2016, 35(4): 2183-2190.
- [6] ZHOU D, ZHOU Y, LI C, et al. Silencing of B7-H4 suppresses the tumorigenicity of the MGC-803 human gastric cancer cell line and promotes cell apoptosis via the mitochondrial signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2018, 52(4):1267-1276.
- [7] 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.
- [8] SHEN L, QIAN Y, WU W, et al. B7-H4 is a prognostic biomarker for poor survival in patients with pancreatic cancer [J]. Hum Pathol, 2017, 66:79-85.
- [9] CHEN X J, SHEN J, ZHANG G B, et al. B7-H6 protein expression has no prognostic significance in human gastric carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2014, 20(1):203-207.
- [10] ZHANG X, ZHANG G, QIN Y, et al. B7-H6 expression in non-small-cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10):6936-6942.
- [11] GUO J G, GUO C C, HE Z Q, et al. Clinical significance of B7-H6 protein expression in astrocytoma[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3291-3297.
- [12] SICA G L, CHOI I H, ZHU G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity [J]. Immunity, 2003, 18(6):849-861.
- [13] BRANDT C S, BARATIN M, YI E C, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans[J]. J Exp Med, 2009, 206(7):1495-1503.
- [14] PODOJIL J R, MILLER S D. Potential targeting of B7-H4 for the treatment of cancer[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1):40-51.
- [15] WU M R, ZHANG T, GACEREZ A T, et al. B7H6-specific bispecific T cell engagers lead to tumor elimination and host antitumor immunity [J]. J Immunol, 2015, 194(11): 5305-5311.

[本文编辑] 姬静芳