

负性分子 B7-H4 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

虞培娟¹, 朱 旬², 严茹红¹, 洪 荫², 朱雪明¹, 傅丰庆³, 张学光^{3*}

(¹ 苏州大学附属第二医院检验科, ² 普外科, 江苏 苏州 215004; ³ 苏州大学附属第一医院临床免疫研究所, 江苏 苏州 215001)

[摘要] 目的:探讨负性分子 B7-H4 在乳腺癌组织中的表达情况及其与临床病理参数之间的关系。方法:通过免疫组织化学技术分析 68 例乳腺癌组织和 30 例良性纤维瘤中 B7-H4 的表达情况,并结合临床资料统计分析 B7-H4 表达与乳腺癌患者临床特征之间的关系。结果:免疫组织化学结果显示,乳腺癌组织中 B7-H4 的阳性率为 75%,明显高于纤维瘤组织(17%)($P < 0.05$),并与雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达呈负相关、与人类表皮生长因子 2(human epidermal growth factor receptor2, HER-2)呈正相关,而在年龄、肿瘤大小、病理类型等其他变量之间不存在显著差异。结论:乳腺癌组织中 B7-H4 异常表达,与乳腺组织良性病变存在差异($P < 0.05$),并与 ER、HER-2 的表达相关,提示 B7-H4 分子在乳腺癌的发生发展过程中起了重要作用。

[关键词] B7-H4;乳腺癌;ER;HER-2

[中图分类号] R730.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-520-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160502

Expression and clinical significance of B7-H4 in breast cancer

Yu Peijuan¹, Zhu Xun², Yan Ruhong¹, Hong Yin², Zhu Xueming¹, Fu Fengqing³, Zhang Xueguang^{3*}

(¹Department of Clinical Laboratory, ²Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004; ³Institute of Clinical Immunology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215001, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the expression of B7-H4 protein in breast cancer tissues as well as the relationship among clinical pathological parameters. **Methods:** Immunohistochemical technique was employed to investigate the expression of B7-H4 in 68 cases of breast cancer and 30 cases of benign fibroadenoma. And statistical analysis was carried out to study the relationship between B7-H4 and pathological parameters. **Results:** The B7-H4 positive rate of breast cancer was 75%, significantly higher than fibroadenoma tissues (17%) ($P < 0.05$). And highly expression of B7-H4 was negatively correlated to estrogen receptor (ER) but positively correlated to human epidermal growth factor 2 correlation (HER-2), independent from other factors such as age, size of tumor and clinical stage. **Conclusion:** Aberrant B7-H4 expression in breast cancer but not benign fibroadenoma implied that B7-H4 may play an important role in the development of breast cancer.

[Key words] B7-H4; breast cancer; ER; HER-2

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):520-523]

乳腺癌多发生于成年女性,全世界每年约有 120 万妇女罹患乳腺癌,50 万人死于乳腺癌,并且其发病率与死亡率逐年上升,并呈年轻化趋势,现已成为威胁女性健康的第二大恶性肿瘤^[1]。

有学者通过定量 PCR 分析了 200 多个人类组织标本后发现,DD-O110 编码的膜蛋白分子在乳腺

癌和卵巢癌组织上的表达高于正常组织。根据氨基酸序列分析发现,DD-O110 与 B7 家族新成员 B7-H4 有同源性^[3]。

B7-H4 分子又称 B7S1 和 B7x,是共刺激分子家族中的新成员。B7-H4 mRNA 高表达于各种淋巴组织和非淋巴组织中,但在蛋白水平却鲜有表达。研究发现,B7-H4 通过抑制 T 细胞的增殖、减少白介素(IL)-2、IL-4、IL-10、干扰素(IFN- γ)等细胞因子的产生和控制细胞周期的进程来负性调控 T 细胞免疫应

[基金项目] 国家自然科学基金(81301494)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:xueguangzha@163.com

答^[3]。本研究利用自主研发的鼠抗人 B7-H4 单克隆抗体 2B7^[4],通过免疫组化的方法,检测 B7-H4 在人类乳腺癌标本中的表达,同时分析其与年龄、组织学类型、大小、淋巴结转移以及 ER、PR、HER-2 水平等参数的关系,为乳腺癌临床诊断和免疫治疗寻找新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

标本来源于苏州大学附属第二医院 2011—2013 年普外科手术切除并经病理确诊的组织,患者术前均未治疗且临床资料完整,均为女性,平均年龄 55 岁(范围 28~75 岁),其中原位癌 3 例,浸润性导管癌 48 例,浸润性小叶癌 10 例,其他浸润性癌 7 例,按 AJCC^[5]和 UICC2002^[6]年的 TNM 临床分期:0 期 3 例、I a 期 5 例、I b 期 3 例、II a 期 6 例、II b 期 15 例、III a 期 25 例、III b 期 6 例、IV 期 5 例。并选取 30 例正常乳腺组织病变(纤维瘤)为对照,其中 ER、PR 和 HER-2 的数据来源于原始病理报告。

1.2 方法

病理标本病灶中央常规取材,置 10%中性福尔马林固定,脱水,石蜡包埋后备用。修整蜡块,4 μm 切片,切片置 70℃温箱烤片 2 h 后放于切片盒中,4℃保存备用。免疫组织化学法检测 B7-H4 的表达。石蜡切片脱蜡、水化后用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,柠檬酸高温高压抗原修复后滴加 200 μL 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 \times 3 min,甩去 PBS,加 3%BSA 封闭,37℃孵育 30 min,甩去 BSA,加 200 μL 抗 B7-H4 单抗 2B7,按 1:100 稀释,4℃冰箱过夜,PBS 冲洗 3 \times 5 min,甩去 PBS,加 HRP 标记的二抗,37℃孵育 40 min,PBS 冲洗 3 \times 3 min,加 DAB 显色,显微镜下观察 3~10 min,自来水冲洗,苏木素复染,60℃水浴返蓝,梯度乙醇脱水干燥,中性树脂封片。阴性对照的一抗为同型 IgG;用已经证实的阳性切片作为阳性对照。

由 2 位病理医师采用盲法分别对染色切片进

行结果判定。光镜下随机观察 4~5 个不重叠的高倍($\times 400$)视野。免疫组织化学染色阳性表达为境界清晰、突出于背景的棕黄色或棕褐色颗粒,将这些标本分为两组:B7-H4 染色肿瘤细胞显色 $<15\%$ 为阴性组; $15\% \sim 100\%$ 为阳性组。阳性细胞的密度也可根据阳性细胞的百分比来进行半定量分级:病灶的表达 $<15\%$ 为(-), $15\% \sim 50\%$ 为(+), $50\% \sim 80\%$ 为(++), $>80\%$ 为(+++)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计数资料差异性采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法,等级资料的相关性分析用秩和检验,分析 B7-H4 在不同肿瘤组织中的表达以及与各临床病理参数之间的关系, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4 在乳腺癌与纤维瘤中表达情况

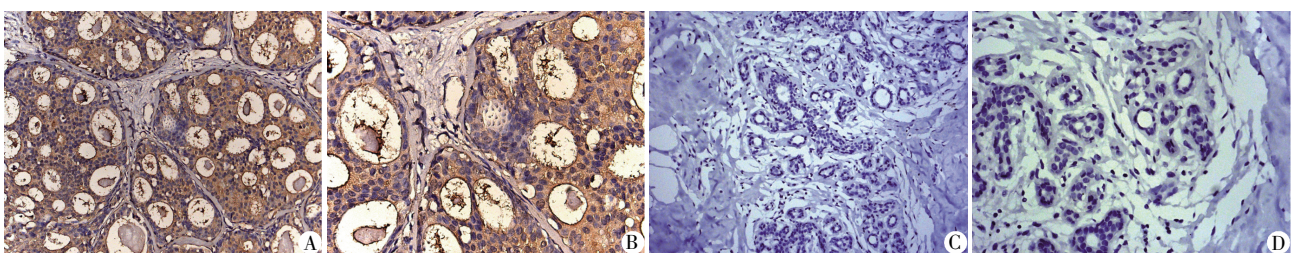
免疫组化结果显示,B7-H4 在乳腺癌组织中有不同程度的表达,阳性染色位于细胞膜及细胞浆,而在纤维瘤组织中几乎不表达(图 1)。在所有 68 例乳腺癌标本中, $75\% (51/68)$ 的标本显示 B7-H4 阳性,而在 30 例纤维瘤中有 $17\% (5/30)$ 的标本显示阳性。B7-H4 蛋白在肿瘤组织中的表达明显高于良性病变组织,有显著差异($P < 0.001$)。

2.2 B7-H4 在 68 例乳腺癌中表达强度的分布比例

根据半定量分级,有 17 例(25%)阴性,13 例(19%)表达强度为+,11 例(16%)表达强度为++,27 例(40%)表达强度为+++。

2.3 B7-H4 分子表达与乳腺癌组织临床病理参数之间的关系

B7-H4 的表达在年龄、肿瘤大小、病理类型、是否淋巴结转移、肿瘤分期等各组中表达没有显著差异($P > 0.05$),但在 ER、Her-2 阳性组和阴性组中存在差异($P < 0.05$),而在 PR 阳性组和阴性组中也没有显著差异($P > 0.05$,表 1)。



A:乳腺癌阳性表达($\times 200$);B:乳腺癌阳性表达($\times 400$);C:纤维瘤阴性表达($\times 200$);D:纤维瘤阴性表达($\times 400$)。

图 1 B7-H4 在乳腺癌和纤维瘤中的表达

Figure1 The expression of B7 - H4 in breast cancer and benign fibro adenoma

表 1 乳腺癌中 B7-H4 的表达与临床病理参数之间的关系
Table 1 Correlation analyses between B7-H4 and clinical pathological parameters in breast cancer patients (n)

临床病理参数	n	B7-H4 表达		P 值
		阳性	阴性	
年龄(岁)				0.781
≤50	24	19	5	
>50	42	32	10	
肿瘤大小(cm)				0.369
≤2	22	15	7	
>2	46	36	10	
病理类型				0.190
原位癌	3	1	2	
浸润性导管癌	48	38	10	
浸润性小叶癌	10	8	2	
其他	7	4	3	
淋巴结转移				0.119
0	29	19	10	
≥1	39	32	7	
分期				0.572
0	3	1	2	
I a+ I b	8	6	2	
II a+ II b	21	16	5	
III a+ III b	31	24	7	
IV	5	4	1	
ER				0.035
+	37	24	13	
-	31	27	4	
PR				0.484
+	35	25	10	
-	33	26	7	
HER-2				0.014
+	20	19	1	
-	48	32	16	

2.4 差异组中 ER、HER-2 与 B7-H4 表达的相关性
统计学结果显示 B7-H4 与 ER 的表达呈负相关 ($r = -0.56, P < 0.05$), 而与 HER-2 呈正相关 ($r = 0.68, P < 0.05$)。

3 讨论

尽管现在针对乳腺癌的治疗手段多种多样, 包括传统的放化疗、联合内分泌治疗和针对 HER-2 的靶向治疗, 但这些治疗方式存在不良反应或疗效欠佳的缺陷。因此寻找安全高效的生物免疫治疗方案是目前亟需解决的难题, 而找到乳腺癌特异高表达的靶向分子是第一步。

B7-H4 是共刺激家族的新成员, 属于免疫球蛋白超家族, 其 mRNA 形式广泛表达在肺、肾、肝、胰

腺和睾丸等各种组织中, 然而在蛋白水平上却很少表达, 这说明 B7-H4 在转录后受到严格的调控。体外实验发现, B7-H4 通过抑制 T 细胞活化、阻滞细胞周期、影响细胞因子的分泌来负相调节 T 细胞免疫应答^[7]。

本研究利用自主研发的鼠抗人 B7-H4 的单抗 2B7 检测了 68 例乳腺癌上 B7-H4 的表达, 75% 乳腺癌组织上 B7-H4 蛋白在细胞膜和细胞浆中弥漫性表达, 并且与 HER-2 呈正相关, 而与 ER 呈负相关, 与 PR 无关。这与 Tringler 等^[8]的报道不一致, 他认为 B7-H4 的表达与 HER-2、PR 呈负相关, 与国内学者刘杰等^[9]报道稍有出入, 他们的研究结果显示, B7-H4 的表达与 HER-2 的水平呈正相关而与 PR、ER 无关, 造成这种差异的原因尚不清楚, 需要扩大样本量及采用多种抗人 B7-H4 单抗来寻找造成差异的因素。

ER 是一种核内激素受体, 具有转录激活或阻遏、核定位、DNA 结合、激素结合等多种功能, 在乳腺癌的发生和发展中扮演了重要角色^[10]。作为 ER 与 E2 结合诱导的产物, PR 的合成必须有雌激素作为启动, 因此 PR 的表达受 ER 的调控, 两者具有一定程度的依赖性 or 一致性^[11]。HER-2 蛋白是具有跨膜酪氨酸激酶活性的生长因子受体, 通过 PI3K/Akt、Erk 等信号通路促进细胞的增殖, 缩短细胞周期导致肿瘤形成^[13]。HER-2 在 20%~40% 乳腺癌中过度表达, 是乳腺癌的独立危险因子^[14]。本研究发现, B7-H4 的表达与 ER 呈负相关, 与 HER-2 呈正相关, 在一定程度上说明 B7-H4 阳性的患者预后不良, 但具体数据还应根据患者随访结果得出。另本研究发现不同 PR 状态下 B7-H4 表达差异无统计学意义, 考虑可能与其敏感性低于 ER 有关, 有待增大样本继续研究。

尽管 B7-H4 在肿瘤发生发展和转移过程中确切作用机制尚未明确, 但已有研究表明, B7 家族成员及其受体通过抑制 T 细胞增殖, 减少细胞因子的分泌和阻滞细胞周期来调节免疫应答。B7-H4 分子作为 B7 家族中的一员, 过表达产生免疫抑制, 有助于肿瘤逃避免疫监视。由于该分子在正常组织中表达微弱, 但在大多数肿瘤组织和肿瘤患者血清中高表达而成为研究的热点。本研究显示 B7-H4 广泛异常表达在原位和转移性的乳腺癌组织上, 并且与 ER 受体和 HER-2 相关, 但与肿瘤分级、分期或其他临床病理资料无关, 表明 B7-H4 可能与乳腺癌的进展和预后相关, Abadi 等^[15]也证实了 B7-H4 高表达能促进乳腺癌的肺转移。因此, B7-H4 有望成为乳

腺癌免疫治疗的新靶点^[16-18]。

[参考文献]

- [1] DeSantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):52-62
- [2] Smith IE. New drugs for breast cancer[J]. Lancet, 2002, 360(9335):790-792
- [3] 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
- [4] 虞培娟,赵 娟,吴鸿雅,等. 鼠抗人 B7-H4 单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定[J]. 现代免疫学, 2014, 34(5):413-417
- [5] Fleming ID, Phillips JL, Menck HR, et al. The national cancer data base report on recent hospital cancer program progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging[J]. Cancer, 1997, 80(12):2305-2310
- [6] Wittekind C, Compton CC, Greene FL, et al. TNM residual tumor classification revisited[J]. Cancer, 2002, 94(9):2511-2516
- [7] 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
- [8] Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, et al. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5):1842-1848
- [9] 刘 杰,孙玉萍,汪运山,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):830-832, 835
- [10] Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, et al. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SS-CP in breast cancer; association with lymph node metastasis[J]. Breast J, 2002, 8(4):226-229
- [11] Osborne CK, Schiff R, Arpino G, et al. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy[J]. Breast, 2005, 14(6):458-465
- [12] Davidson JD, Ma L, Flagella M, et al. An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2004, 64(11):3761-3766
- [13] Yuan P, Xu BH, Chu DT. Correlation between serum HER-2 oncoprotein and patients with breast cancer[J]. Chin Med Sci J, 2004, 19(3):212-215
- [14] Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer; Cancer and Leukemia Group B Study 8662[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9):2703-2711
- [15] Abdai YM, Jeon H, Ohaeqbulam KC, et al. Host b7X promotes pulmonary metastasis of breast cancer[J]. J Immunol, 2013, 90(7):3806-3814
- [16] Simon I, Zhuo 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
- [17] Simon I, Liu Y, Krall KL, et al. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2007, 106(1):112-118
- [18] Simon I, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, et al. B7-H4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression[J]. Gynecol Oncol, 2007, 106(2):334-341

[收稿日期] 2016-01-03

欢迎投稿 欢迎订阅