

### 【临床研究】

通信作者:贾 良(1957-),男,河南新乡人,学士,教授,主任医师,研究方向:乳腺肿瘤研究;E-mail:youqing1221@sina.com

correlated with differentiation degree, lymph node metastasis, TNM stage and 5-year survival of lung adenocarcinoma patients ( $P < 0.05$ ), and was not correlated with sex, age, smoking and alcohol consumption of patients ( $P > 0.05$ ). Lymph node metastasis, TNM stage and B7H4 expression were independent risk factors for the prognosis of patients with lung adenocarcinoma ( $P < 0.05$ ). The 5-year survival rate of B7H4 positive group and B7H4 negative group was 2.17% and 27.78%, respectively. The 5-year survival rate of B7H4 positive group was lower than that of the B7H4 negative group ( $\chi^2 = 31.02, P < 0.05$ ). **Conclusion** The high expression of B7H4 may promote the occurrence and development of lung adenocarcinoma, and inhibiting B7H4 may be one of the potential targets for targeted therapy of lung adenocarcinoma.

**Key words:** lung adenocarcinoma; costimulate molecules; B7 homolog 4; prognosis

肺癌是一种严重威胁人体健康和生命的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌是肺癌中常见的类型,患者5 a生存率不超过15%<sup>[1]</sup>。肺腺癌是非小细胞肺癌的一种重要组织学亚型,早期无特异性临床表现,仅有一般呼吸系统疾病所共有的症状,诊断困难,一旦出现胸部疼痛、气促、胸腔积液等,病变已到晚期,预后极差。多年来,研究者一直努力寻找与肿瘤发生、发展、转移及预后相关的因子<sup>[2-7]</sup>。共刺激因子B7同源体4(B7 homolog 4, B7H4)是新近发现的共刺激因子家族成员<sup>[8]</sup>,在多种肿瘤细胞及组织中高表达,与肿瘤免疫逃逸关系密切<sup>[9-13]</sup>。本研究旨在探讨B7H4在肺腺癌及癌旁组织中的表达及其与肺腺癌患者临床病理特征的关系,为肺腺癌的免疫治疗提供新的靶点和思路。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择2012年1月到2012年12月河南科技大学第一附属医院手术切除的肺腺癌患者癌组织及配对的癌旁组织(距肿瘤组织边缘>5 cm)石蜡包埋标本为观察对象,纳入标准:(1)术后病理诊断明确为肺腺癌;(2)患者术前均未接受放射治疗、化学治疗和免疫治疗;(3)治疗性肺腺癌切除术后;(4)病例资料完整;(5)同时具备癌组织及配对癌旁组织。共纳入肺腺癌患者组织标本100例,男53例,女47例;年龄38~76( $61.3 \pm 10.1$ )岁;有吸烟史36例,饮酒史12例;高分化28例,中分化54例,低分化18例;淋巴结转移者37例;TNM分期:I+II期63例,III+IV期37例。本研究经新乡市第一人民医院、河南科技大学第一附属医院肿瘤研究所及医院伦理委员会审核批准,且患者签署书面知情同意书。

**1.2 主要试剂与仪器** 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin peroxidase, SP)试剂盒购自北京

中杉金桥生物技术有限公司,B7H4兔抗人单克隆抗体购自英国Abcam公司,柠檬酸抗原修复液(pH6.0)、苏木精、中性树胶、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)购自北京索莱宝科技有限公司;光学显微镜购自日本尼康公司。

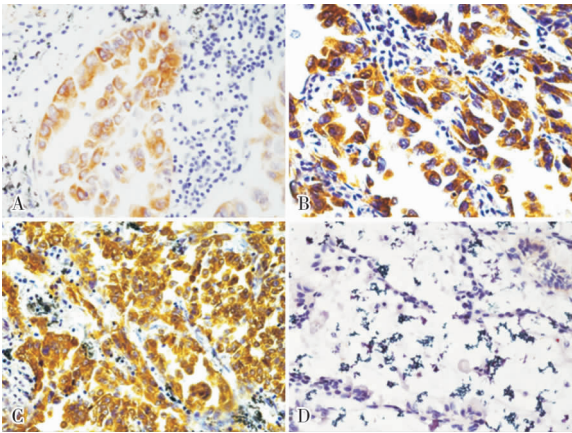
**1.3 免疫组织化学法检测肺腺癌及癌旁组织中B7H4蛋白表达** 取常规石蜡包埋的肺腺癌及癌旁组织标本连续切片,片厚3  $\mu\text{m}$ ;于60  $^{\circ}\text{C}$ 溶蜡1.5 h,二甲苯脱蜡3次,每次10 min,体积分数100%、95%、95%、85%乙醇梯度水化;95  $^{\circ}\text{C}$ 下柠檬酸抗原修复15 min,充分暴露抗原;PBS冲洗3次,每次3 min;过氧化物酶阻断剂封闭10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;PBS冲洗3次,每次3 min;滴加正常山羊血清封闭30 min;每张切片加入一抗(B7H4兔抗人单克隆抗体,PBS稀释比1:200)100  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS冲洗3次,每次3 min;滴加山羊抗鼠/兔聚合物室温下孵育30 min;PBS冲洗3次,每次3 min;滴加SP室温封闭10 min;PBS冲洗3次,每次3 min;DAB显色10 min;蒸馏水冲洗10 min;苏木精复染10 min,常规乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片;使用光学显微镜随机挑选5个高倍镜视野( $\times 400$ )观察肺腺癌及癌旁组织中B7H4蛋白的表达。采用已知阳性切片作为阳性对照,采用PBS缓冲液代替一抗为阴性对照。B7H4蛋白阳性表达判定标准:以肿瘤细胞膜及细胞质出现浅黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达。染色强度计分:无色至浅黄色为0分,棕黄色为1分,棕褐色为2分,深褐色为3分;阳性细胞百分比计分:<5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分, $\geq 75\%$ 为4分;根据染色强度和阳性细胞百分比计分的乘积对每个视野进行综合评分,0分定义为阴性,1~12分定义为阳性,取5个视野评分均值为最终免疫组织化学评分。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用  $t$  检验;计数资料以百分率表示,采用  $\chi^2$  检验;COX 回归分析各因素对预后的影响;应用 Kaplan-Meier 生存曲线及 Log-rank 检验分析 B7H4 蛋白表达与患者生存时间的关系; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌及癌旁组织中 B7H4 蛋白表达比较

肺腺癌组织及癌旁组织中均可见细胞膜及细胞质出现棕黄色颗粒,B7H4 蛋白表达阳性(图 1)。癌组织及癌旁组织中 B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分分别为  $7.78 \pm 0.59$ 、 $2.35 \pm 0.34$ ,高、中、低分化癌组织中 B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分分别为  $5.50 \pm 0.43$ 、 $7.17 \pm 0.48$ 、 $10.67 \pm 0.61$ 。癌组织中 B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分及高、中、低分化癌组织中 B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分均显著高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );随着癌组织分化程度的降低,B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分逐渐升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:高分化癌组织;B:中分化癌组织;C:低分化癌组织;D:癌旁组织。  
图 1 肺腺癌组织及癌旁组织中 B7H4 蛋白表达 (DAB 染色, ×400)

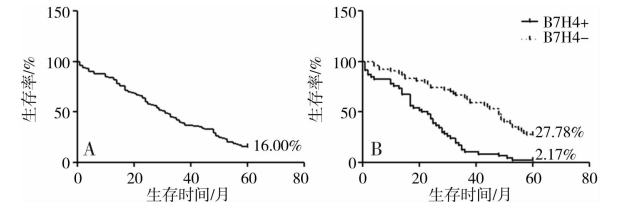
Fig.1 Expression of B7H4 in lung adenocarcinoma and adjacent tissues(DAB staining, ×400)

**2.2 B7H4 蛋白表达与肺腺癌患者临床病理特征的关系** 结果见表 1。B7H4 蛋白表达与肺腺癌患者分化程度、淋巴结转移、TNM 分期和 5 a 生存情况有关( $P < 0.05$ ),与患者的性别、年龄及吸烟、饮酒情况无关( $P > 0.05$ )。

表 1 B7H4 蛋白表达与肺腺癌患者临床病理特征的关系  
Tab.1 Relationship between the expression of B7H4 protein and the clinicopathological features of lung adenocarcinoma prtients

临床病理特征	<i>n</i>	B7H4 阳性/ 例(%)	B7H4 阴性/ 例(%)	$\chi^2$	<i>P</i>
性别					
男	53	24(45.3)	29(54.7)	0.023	0.879
女	47	22(46.8)	25(53.2)		
年龄					
≤60 岁	40	22(55.0)	18(45.0)	2.174	0.140
>60 岁	60	24(40.0)	36(60.0)		
吸烟					
有	36	12(33.3)	24(66.7)	3.633	0.057
无	64	34(53.1)	30(46.9)		
饮酒					
有	12	6(50.0)	6(50.0)	0.088	0.767
无	88	40(45.5)	48(54.5)		
分化程度					
低分化	18	14(77.8)	4(22.2)	10.790	0.005
中分化	54	24(44.4)	30(55.6)		
高分化	28	8(28.6)	20(71.4)		
淋巴结转移					
阳性	37	34(91.9)	3(8.1)	49.800	0.001
阴性	63	12(19.0)	51(81.0)		
TNM 分期					
I + II 期	63	12(19.0)	51(81.0)	49.800	0.001
III + IV 期	37	34(91.9)	3(8.1)		
5 a 生存情况					
生存	16	1(6.3)	15(93.8)	12.160	0.001
死亡	84	45(53.6)	39(46.4)		

**2.3 临床病理特征与肺腺癌患者预后的关系** 结果见图 2、表 2。COX 回归分析显示,淋巴结转移、TNM 分期及 B7H4 蛋白表达为影响肺腺癌患者预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。100 例肺腺癌患者的术后 5 a 总生存率为 16.00% (16/100),其中 B7H4 蛋白表达阳性患者 5 a 生存率为 2.17% (1/46),B7H4 蛋白表达阴性患者 5 a 生存率为 27.78% (15/54),B7H4 蛋白表达阳性患者 5 a 生存率明显低于 B7H4 蛋白表达阴性患者,差异有统计学意义( $\chi^2 = 31.020$ , $P < 0.05$ )。



A:总生存曲线;B:B7H4 蛋白表达阳性及阴性患者生存曲线。  
图 2 肺腺癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线  
Fig.2 Survival curve of Kaplan-Meier in patients with lung adenocarcinoma

表 2 肺腺癌患者预后影响因素的 Cox 回归分析

Tab. 2 Cox regression analysis of prognostic factors in patients with lung adenocarcinoma

影响因素	<i>B</i>	<i>Wald</i>	<i>HR</i>	95% 可信区间		<i>P</i>
				下限	上限	
性别	0.035	0.013	1.035	0.577	1.856	0.908
年龄	0.305	1.619	1.357	0.848	2.172	0.203
吸烟	0.558	3.120	1.748	0.941	3.248	0.077
饮酒	-0.627	2.757	0.534	0.255	1.120	0.097
分化程度	-0.056	0.026	0.946	0.480	1.863	0.871
淋巴结转移	0.890	4.333	2.436	1.053	5.631	0.037
TNM 分期	0.890	4.333	2.436	1.053	5.631	0.037
B7H4 表达	1.091	6.612	2.978	1.296	6.843	0.010

3 讨论

肺腺癌是临床上较为常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率逐年升高。目前,肺腺癌的治疗手段有手术治疗、化学治疗、放射治疗等,但效果仍不理想。因此,寻找与肺腺癌发生、发展、转移相关的因子,以预测肿瘤的发生、发展、转移及预后情况,为免疫治疗提供可能的新靶点,具有极其重要的意义。

共刺激因子 B7H4 是 B7H 共刺激因子家族成员,作为负性调节因子,在多种肿瘤及免疫逃逸机制中的作用日益受到重视<sup>[8-13]</sup>。研究表明,B7H4 在乳腺癌、肾癌、结直肠癌、食管癌、肝癌等肿瘤中的表达与患者的预后相关<sup>[9-13]</sup>。B7H4 在结直肠癌组织中异常高表达,并与结直肠癌的临床病理因素相关,其表达水平则与结直肠癌患者的生存期呈负相关<sup>[11]</sup>。B7H4 蛋白的表达促进了肝癌的发生、发展,癌旁肝组织中 B7H4 蛋白表达的高低与肝癌患者的总体生存率及肿瘤的复发密切相关,是肝癌患者独立的预后因素,且癌旁组织 B7H4 高表达组更易发生早期复发或转移<sup>[13]</sup>。B7H4 在鳞状细胞食管癌组织中高表达,其表达水平与患者远处转移、TNM 分期显著相关,且与患者生存期呈负相关<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示,肺腺癌组织中 B7H4 蛋白表达免疫组织化学评分显著高于配对癌旁组织,提示 B7H4 蛋白表达上调可能在肺腺癌发生、发展中扮演着重要的角色。B7H4 蛋白在 TNM 分期 I、II 期肺腺癌患者的阳性表达率显著低于 III、IV 期患者,在发生淋巴结转移的肺腺癌患者的阳性表达率显著高于无淋巴结转移患者;表明随着病情的恶化,B7H4 表达不断提高。另外,B7H4 蛋白在低分化癌组织

中的阳性表达率高于中、高分化组织,提示 B7H4 表达与肿瘤进展程度有关。本研究结果还显示,B7H4 为肺腺癌患者预后的独立危险因素,其高表达与肺腺癌患者的预后相关,提示 B7H4 在肺腺癌瘤中可以作为预后判断的一个标准。B7H4 蛋白表达阳性患者 5 a 生存率明显低于 B7H4 蛋白表达阴性患者,提示抑制 B7H4 的表达可能是肺腺癌免疫治疗的潜在靶点。

综上所述,B7H4 与肺腺癌分化程度、淋巴结转移、TNM 分期有关,B7H4 可能促进了肺腺癌的发生、发展,可以作为肺腺癌早期诊断和预后评估的参考依据,同时,抑制 B7H4 表达可能是肺腺癌免疫治疗的潜在靶点之一。

参考文献:

[1] 何芳华. 共刺激分子 B7H1、PD-1 在 NSCLC 中的表达及临床意义[D]. 苏州:苏州大学,2018.

[2] 宋燕秋,吕坤聚,王丽,等. 肺腺癌中 PD-L1、B7H3 的表达与 EGFR 基因突变的关系[J]. 临床肺科杂志,2016,21(5):866-869.

[3] 谢雨芹,石芳,曹邦荣,等. B7 家族负性共刺激分子在肺区域免疫构建过程中的表达变化[J]. 四川大学学报(医学版),2018,49(6):886-890.

[4] 顾成,徐振宇. B7 家族在胃癌中的研究现状[J]. 牡丹江医学院学报,2018,39(3):89-91.

[5] 吴敏. B7H3 在胃癌组织不同细胞的表达及其与临床特征的相关性分析[D]. 苏州:苏州大学,2018.

[6] 潘阳,王定森,邱世明,等. 急性胰腺炎患者血清降钙素原和协同刺激分子 B7 家族及可溶性细胞间黏附分子-1 水平变化及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2018,32(7):654-656.

[7] 李建,游焜,王迎,等. 胆囊癌组织中共刺激因子 B7-H1 和 B7-H3 蛋白表达与患者预后的关系[J]. 新乡医学院学报,2017,34(7):599-602.

[8] 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.

[9] 林雨虹. 人 B7H4 启动子荧光素酶报告基因载体的构建及 p53 转录因子的调控作用[D]. 福州:福建医科大学,2017.

[10] 王利飞,崔激,刘翠莲,等. 协同共刺激分子 B7- H4 参与肿瘤免疫逃逸的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(1):139-141.

[11] 李艳玲,庄兢,冯伟宇,等. 血清 TPS、B7H4 水平与结直肠癌患者肿瘤发生发展的关系[J]. 实验与检验医学,2019,37(1):9-11.

[12] PIAO L,YANG Z,JIN J,et al. B7H4 is associated with stemness and cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Hum Patho*,2018,80:152-162.

[13] 孙太伟. B7 家族分子 B7-H3 和 B7-H4 在肝细胞癌中的表达及临床意义[D]. 上海:复旦大学,2011.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)