

结直肠癌中 B7-H4 的表达及临床意义

祝斌¹, 郑淑华^{2,3}, 胡国艳³, 吕晶³, 徐军发³, 周宇¹

(1. 广东医学院附属医院, 广东 湛江 524001; 2. 广东省妇幼保健院, 广东 广州 510010;

3. 广东医学院临床免疫教研室, 广东 东莞 523808)

摘要: [目的] 探讨结直肠癌中 B7-H4 的表达及临床意义。[方法] 采用免疫组织化学法检测 32 例结直肠癌组织中 B7-H4 的表达, Western blot 法检测 8 例结直肠癌组织中 B7-H4 蛋白表达。双抗体夹心间接 ELISA 法检测 91 例结直肠癌患者血清 B7-H4 水平, 采用 51 例健康体检者血清 B7-H4 水平作为对照。[结果] 免疫组化结果显示结直肠癌组织中 B7-H4 蛋白阳性率为 90.6% (29/32), 正常结直肠组织中 B7-H4 均阴性表达。健康体检者和结直肠癌患者血清 B7-H4 浓度分别为 $32.67 \pm 12.28 \mu\text{g/L}$ 和 $52.14 \pm 24.65 \mu\text{g/L}$, 结直肠癌患者血清 B7-H4 水平显著高于健康体检者 ($P < 0.01$)。[结论] B7-H4 在结直肠癌中高表达, 可能是结直肠癌一种新的肿瘤标志物。

关键词: B7-H4; 结直肠癌; 免疫组织化学; Western blot

中图分类号: R735.3⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)05-0387-04

The Expression of B7-H4 in Colorectal Cancer and its Clinical Significance

ZHU Bin¹, ZHENG Shu-Hua^{2,3}, HU Guo-yan³, et al.

(1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Guangdong Women and Children Hospital and Health Institute, Guangzhou 510010, China;

3. Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of B7-H4 in colorectal cancer and its clinical significance. [Method] The expression of tissue sample B7-H4 in 32 cases with colorectal cancer was detected by immunohistochemical method; and expression of B7-H4 in 8 cases colorectal cancer tissues was detected by Western blot method. Serum B7-H4 in 91 cases with colorectal cancer was detected by double-antibody sandwich indirect ELISA method, serum B7-H4 in 51 healthy as control. [Result] As immunohistochemical result, the positive rate of B7-H4 in colorectal cancer was 90.6% (29/32), and B7-H4 was negative expression in normal colorectal tissues. The level of serum B7-H4 in colorectal cancer and healthy was $32.67 \pm 12.28 \mu\text{g/L}$ and $52.14 \pm 24.65 \mu\text{g/L}$ respectively, with significantly difference ($P < 0.01$). [Conclusion] B7-H4 is overexpression in colorectal cancer, it might be a new tumor marker for colorectal cancer.

Key words: B7-H4; colorectal cancer; immunohistochemistry; Western blot

B7-H4 是 2003 年发现的一种负性共刺激分子, 对活化的 T 细胞起负调节作用^[1], 研究发现其在多种肿瘤组织中都有高表达^[2], 在肿瘤的发生发展中起重要作用, 被认为是某些肿瘤的新型标志物^[3]。我们探讨 B7-H4 在结直肠癌中的表达情况, 以研究其是否可作为结直肠癌的新型肿瘤标志物。

收稿日期: 2011-04-01; 修回日期: 2011-11-21

基金项目: 广东省社会发展计划项目 (2008B060600015, 2009B030801333); 东莞市科技计划项目 (2008108101054); 国家自然科学基金项目 (30972779)

通讯作者: 徐军发, E-mail: fxu75@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择 2007 年 1 月至 2009 年 12 月经手术切除和病理证实的结直肠癌标本 32 例, 来自广东医学院附属医院消化内科和胃肠外科, 由病理科提供。病理类型: 高分化腺癌 8 例, 中分化腺癌 12 例, 低分化腺癌 4 例, 高中分化腺癌 5 例, 中低分化腺癌 3 例。男性 24 例, 女性 8 例; 年龄 28~83 岁, 平均 48.3 岁。经

病理证实的结直肠癌血清标本 91 例,健康体检者血清标本 51 例,均由广东医学院附属医院检验科提供。

1.2 材料

免疫组化所用抗体稀释液、SP-9000 通用型试剂盒、DAB 显色试剂盒、APES 均来自于北京中杉金桥生物技术有限公司。酶联微量反应板来源于 Coning 公司。抗人 B7-H4 单克隆抗体(mAb)购自 E-Bioscience 公司。重组小鼠 B7-H4 蛋白及兔抗小鼠 B7-H4 多克隆抗体由本室制备^[4]。HRP 标记羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司。总蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物。TMB 底物及显色剂购自沈阳惠民公司产品。BIOTEK Elx800 酶标仪。

1.3 免疫组化检测 B7-H4 表达

采用 SP 法进行染色,石蜡切片 4 μ m 厚,用防脱片剂 APES 处理过的载玻片捞片,置烤箱 58℃~60℃,60min。切片脱蜡至水,PBS 洗 3 次 $\times$ 3min。高温高压抗原修复后,滴加 3%甲醇-过氧化氢阻断过氧化物酶,室温孵育 15min,PBS 洗 3 次 $\times$ 5min。滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20min,甩去多余血清,滴加按 1:500 浓度稀释的抗人 B7-H4 单抗,以 PBS 代替一抗作空白对照,小鼠 IgG 作为同型对照,4℃冰箱孵育过夜。PBS 洗 3 次 $\times$ 5min,滴加生物素标记的二抗,室温孵育 10min。PBS 洗 3 次 $\times$ 5min,滴加链霉素亲生物素蛋白-过氧化物酶溶液(三抗),室温孵育 10min。PBS 洗 3 次 $\times$ 5min,DAB 显色:蒸馏水 1ml,加显色试剂盒内 A、B、C 试剂各一滴,充分混匀,室温下显色 3~10min(显微镜下控制显色时间),蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染,自来水返蓝 30min,逐级脱水,透明,封片。通过计数在胞膜上或/和胞浆内有阳性染色的细胞个数进行组织学分析 B7-H4 的表达,在 400 倍镜下随机选择 5 个肿瘤区域进行细胞计数,B7-H4 的染色强度根据阳性细胞的百分比进行半定量分级:0:<10%;+:10%~50%;++:50%~80%;+++:>80%。<10%为阴性,其他为阳性。

1.4 Western blot 检测 B7-H4 表达

按照试剂盒说明书提取结直肠癌组织中总蛋白,先进行 SDS-PAGE 电泳,在电泳结束后,将凝胶浸泡于转移电泳缓冲液中 20min,将大小与凝胶一致的滤纸和硝酸纤维素滤膜于转移电泳缓冲液中浸泡 5min,从阴极到阳极依次放置滤纸-凝胶-滤膜-滤纸,在转移电泳缓冲液中以恒压 100V 转印 1h;取下滤膜,观察彩色蛋白 Marker 证实已转印至硝酸纤

维素滤膜上,切去右上角作为标记。将滤膜以 5%脱脂奶粉室温封闭 120min,将滤膜浸入 1:500 稀释的兔抗人 B7-H4 血清溶液,室温温育 60min,用 TBST 洗滤膜 3 次,每次 5min,将滤膜浸入 1:5000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 二抗溶液中,室温温育 60min。用 TBST 洗滤膜 3 次,每次 5min,再用 TBS 洗滤膜 10min。按照 1ml H₂O 加显色剂 A、B、C 各 1 滴的比例配 20ml 显色液,并加于滤膜的正面,室温放置观察,可出现明显的棕褐色蛋白显色带;用水漂洗杂交膜终止反应。

1.5 双抗体夹心间接 ELISA 法检测血清 B7-H4 水平

用 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液按 1:2000 稀释抗人 B7-H4mAb,包被可拆酶标板,置 4℃过夜,用 PBST 洗涤 3 次。采用 100ml/L FCS 封闭,200 μ l/孔,37℃作用 2h 后用 PBST 洗涤 3 次。用 PBST-BSA 将 200mg/L 重组小鼠 B7-H4 从 1:1000 做倍比稀释至 1:64000 作为标准品。在包被好的酶标板中加入标准品或待测血清标本 100 μ l/孔。37℃作用 1h,用 PBST 洗 3 次。加入 1:1000 稀释兔抗小鼠 B7-H4 多克隆抗体,100 μ l/孔,37℃作用 1h 后用 PBST 洗 3 次,再加入 1:5000 稀释 HRP 标记羊抗兔 IgG,37℃作用 1h 后用 PBST 洗 3 次,按 100 μ l/孔加显色底物,作用 15min,以 2mol/L 硫酸终止,在酶标仪上测 A450 值。所有样本均在同一批次检测,每个样本设立两个平行检测,取平均 A 值计算样本中 B7-H4 的含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4 蛋白表达

免疫组化检测结果显示,32 例结直肠癌组织中 29 例(90.6%)B7-H4 阳性(图 1),胞浆和胞膜上均有表达,其中+5 例,++8 例,+++16 例。正常结直肠组织未见 B7-H4 表达,与结肠癌组织比较,差异有显著性(*P*<0.05)。

Western blot 方法检测 8 例结直肠癌组织中的 B7-H4 蛋白,结果发现 8 例均有 B7-H4 蛋白表达,能与抗 B7-H4 抗体特异性结合。见图 2。

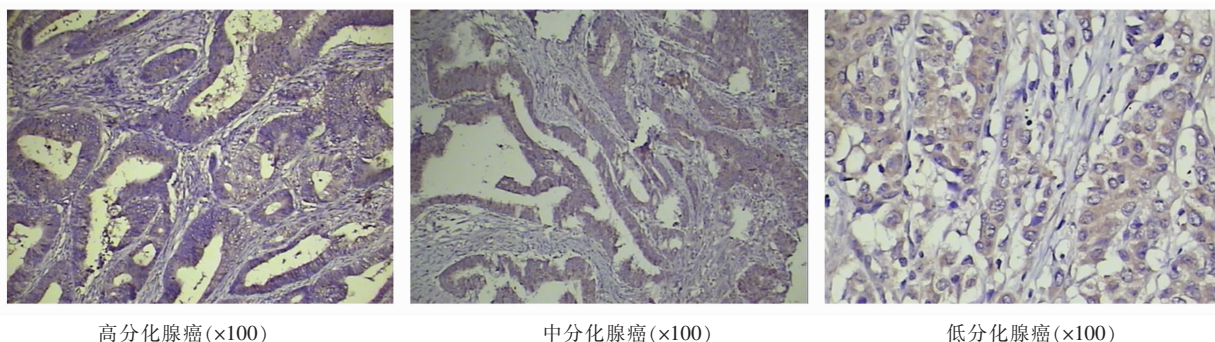


图1 结直肠癌组织中 B7-H4 阳性表达

2.2 结直肠癌患者血清 B7-H4 水平

结直肠癌患者血清 B7-H4 含量为 $52.14 \pm 24.65 \mu\text{g/L}$, 明显高于健康体检者的 $32.67 \pm 12.28 \mu\text{g/L}$, 差异有显著性 ($t = -5.280, P < 0.01$)。91 例结直肠癌标本和 51 例健康体检者标本血清 B7-H4 检测值的散点图见图 3, 显示结直肠癌血清 B7-H4 水平明显高于正常体检者。

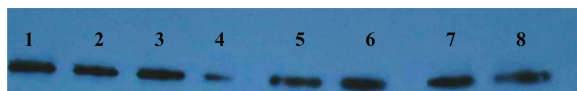


图2 Western blot 检测 8 例结直肠癌组织中 B7-H4 表达

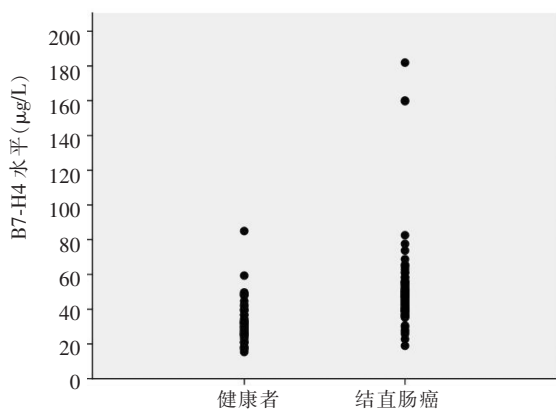


图3 健康体检者与结直肠癌患者血清 B7-H4 水平散点图

3 讨论

结直肠癌是人类主要的恶性肿瘤之一, 在欧美

发病率较高, 但近几年来随着人民生活水平的提高, 饮食习惯的西化, 结直肠癌的发病率和死亡率在我国有升高趋势。研究表明, 结直肠癌的发生是一个多因素、多步骤的过程, 是遗传易感性和环境因素长时间相互作用的结果。对结直肠癌的早期诊断和早期治疗可望改善预后, 提高生存率。

B7-H4 是最近发现的 T 细胞活化的共抑制分子, 其 mRNA 广泛表达于淋巴样和非淋巴样组织, 但其蛋白质在各种组织中不表达或低表达, 而在树突状细胞、单核/巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞表面诱导性表达^[1,5]。正常人类组织不表达或极低表达 B7-H4, 但在多种肿瘤组织中发现 B7-H4 高表达, 目前已经发现的有卵巢癌^[6,7]、乳腺癌^[7,8]、非小细胞肺癌^[9]、肾癌^[10]、前列腺癌^[11,12]等, 在肿瘤组织中 B7-H4 主要表达在肿瘤细胞和肿瘤浸润性巨噬细胞。研究发现, 高表达 B7-H4 的前列腺癌更容易转移、复发, 患者死亡率也高^[11], 高表达 B7-H4 的卵巢癌病情进展速度更快^[13], 而高表达 B7-H4 的胃癌预后更差^[14]。此外, B7-H4 还可溶性形式存在于肿瘤患者的血液和体液中, 研究发现卵巢癌患者血清和腹水中 B7-H4 的含量显著高于正常人和生殖系统良性病变的妇女^[15], 近来研究也发现胃癌患者血液中 B7-H4 mRNA 明显高于正常人^[16]。研究认为 B7-H4 与肿瘤的免疫逃逸有关, 并可能为一个较敏感的新型肿瘤标志物。

本研究结果显示, 32 例结直肠癌组织 B7-H4 的阳性率为 90.6%, 表达于肿瘤细胞的胞质中和细胞膜上。8 例结直肠癌组织 Western blot 检测均有 B7-H4 蛋白表达, 进一步证明结直肠癌组织中高表达 B7-H4。血清检测结果发现结直肠癌患者血清 B7-H4 蛋白水平明显高于健康体检者。这可能是肿瘤组

织中高表达的 B7-H4 蛋白释放到血液中的结果。

综上, 肿瘤组织和血清检测结果都提示 B7-H4 在结直肠癌中高表达, 其可能是结直肠癌一种较好的肿瘤标志物。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Qian Y, Shen L, Cheng L, et al. B7-H4 expression in various tumors determined using a novel developed monoclonal antibody[J]. *Clin Exp Med*, 2010, 11(3): 163-170.
- [3] Flies DB, Chen L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity[J]. *J Immunother*, 2007, 30(3): 251-260.
- [4] 胡国艳, 郑淑华, 刘伟, 等. 检测可溶性 B7-H4 ELISA 夹心法的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(8): 831-833.
- [5] Choi IH, 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.
- [6] Tringler B, Liu W, Corral L, et al. B7-H4 overexpression in ovarian tumors[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(1): 44-52.
- [7] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(1): 128-141.
- [8] Mugler KC, Singh M, Tringler B, et al. B7-H4 expression in a range of breast pathology: correlation with tumor T-cell infiltration [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007, 15(4): 363-370.
- [9] 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.
- [10] Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, et al. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27): 10391-10396.
- [11] Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19458-19463.
- [12] Qian Y, Yao HP, Shen L, et al. Expression of B7-H4 in prostate cancer and its clinical significance [J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 39(4): 345-349.
- [13] Cheng L, Jiang J, Gao R, et al. B7-H4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, 19(9): 1481-1486.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.