

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.019

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190422.1555.008.html(2019-04-23)

B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 在宫颈病变组织中的表达及临床意义*刘畅¹,李坤¹,舒丽莎^{1△},张凡²

(河北北方学院附属第一医院:1.妇产科;2.病理科,河北张家口 075000)

【摘要】 **目的** 探讨负性共刺激分子 B7 同源体 4(B7-H4)和叉状头/翅膀状螺旋转录因子 3 阳性(Foxp3⁺)调节性 T 细胞(Treg)在宫颈病变组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测 50 份宫颈癌、30 份宫颈高级别上皮内瘤变(HISL)、30 份宫颈低级别上皮内瘤变(LSIL)及 20 份正常宫颈组织中 B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 的表达水平,分析 B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 与临床病理参数之间的关系,以及二者有无相关性。**结果** B7-H4 阳性表达于宫颈癌细胞的细胞质及细胞膜,Foxp3⁺Treg 阳性表达于肿瘤浸润淋巴细胞的细胞核。随着宫颈病变加重,B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 的表达逐渐升高。宫颈癌组织中 B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 的表达明显高于 HISL、LSIL 及正常宫颈组织,各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在宫颈癌国际妇产科联盟(FIGO)分期 II 期组织中 B7-H4 的表达高于 FIGO 分期 I 期者。Foxp3⁺Treg 的表达主要与肿瘤的大小及淋巴结转移明显相关。Spearman 相关性分析显示,宫颈癌中 B7-H4 与 Foxp3⁺Treg 表达呈明显正相关($r = 0.34, P < 0.01$)。**结论** 宫颈癌局部微环境中 B7-H4 及 Foxp3⁺Treg 呈高表达,推测 B7-H4 和 Foxp3⁺Treg 可能参与肿瘤免疫逃逸进程。

【关键词】 宫颈肿瘤;B7 同源体 4;叉状头/翅膀状螺旋转录因子 3;调节性 T 细胞;宫颈病变**【中图分类号】** R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8348(2019)17-2960-04Expressions and clinical significances of B7-H4 and Foxp3⁺Treg cells in cervical lesion*LIU Chang¹, LI Kun¹, SHU Lisha^{1△}, ZHANG Fan²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of negative costimulatory molecule B7-H4 and Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) in cervical lesions and their clinical significance. **Methods** The expression of B7-H4 and Foxp3⁺ Treg were detected by immunohistochemistry in 50 cases of cervical cancer, 30 cases of high-grade squamous intraepithelial(HSIL), 30 cases of low-grade squamous intraepithelial(LSIL), and 20 cases of normal cervical tissues. The relationship between B7-H4, Foxp3⁺ Treg and clinicopathological parameters were analyzed, and whether there was a correlation between them. **Results** B7-H4 was positively located in cytoplasm and membrane of cervical cancer cells, Foxp3⁺ Treg was positively located in the nucleus of tumor infiltrating lymphocytes. With the gradual aggravation of cervical lesion, the expressions of B7-H4 and Foxp3⁺ Treg increased gradually. The expressions of B7-H4 and Foxp3⁺ Treg of cervical cancer tissue were higher than those in HISL, LSIL and normal cervical tissue, and the differences between the groups were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of B7-H4 in cervical cancer at International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage II was higher than that at the FIGO stage I. Foxp3⁺ Treg expression was significantly associated with tumor size and lymph node metastasis. Spearman correction analysis showed that there was a positive correlation between B7-H4 and Foxp3⁺ Treg expression in cervical cancer ($r = 0.34, P < 0.01$). **Conclusion** B7-H4 and Foxp3⁺ Treg were highly expressed in the local microenvironment of cervical cancer, suggesting that they may be involved in the process of tumor immune escape.

【Key words】 uterine cervical neoplasms; B7-homolog4; forkhead/winged helix transcription factor3; regulatory T cell; cervical lesion宫颈癌是女性生殖道恶性肿瘤之一,全球宫颈癌 每年死亡病例达 26.57 万^[1],中国占全世界死亡病例

* 基金项目:河北省财政厅临床医学优秀人才项目(361009);河北省卫生和计划生育委员会跟踪项目(GL201651)。 作者简介:刘畅(1993-),在读硕士研究生,主要从事妇科肿瘤的诊治研究。 △ 通信作者, E-mail:lisha.shu@163.com。

总数的 20.1%^[2]。其中,局部晚期宫颈癌是导致肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤的发生、发展与免疫逃逸密切相关。B7 同源体 4(B7 homolog4, B7-H4)是 B7 家族的负性共刺激分子,其表达上调能抑制机体免疫应答。在胰腺癌^[3]、结直肠癌^[4]的研究中发现过表达 B7-H4 能抑制 T 细胞活化、增殖,在肿瘤进展中起重要作用。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是以发挥免疫抑制功能为主的 T 细胞亚群,广泛分布于多种恶性肿瘤的间质中,Treg 的聚集与肿瘤的不良预后密切相关^[5-7]。本文通过检测 B7-H4、叉状头/翅膀状螺旋转录因子 3 阳性(forkhead/winged helix transcription factor3, Foxp3⁺)Treg 在宫颈病变组织中的表达,并探讨二者的临床意义,旨在为宫颈癌的免疫治疗提供新靶点及思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院妇产科 2016 年 10 月至 2018 年 5 月行宫颈活检或宫颈手术的石蜡包埋标本。按第四版世界卫生组织(WHO)女性生殖器官肿瘤分类标准^[8],以组织病理学诊断为金标准。对照组患者年龄 40~55 岁,平均(46.2±3.00)岁。宫颈病变患者年龄 40~59 岁,平均(48.6±5.90)岁,组间年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有患者既往未接受过药物及放化疗治疗,排除自身免疫性疾病及其他恶性肿瘤。其中,宫颈癌组织标本 50 份(宫颈癌组)、宫颈高级别上皮内瘤变(high grade squamous intraepithelial, H1SL)组织标本 30 份(H1SL 组)、宫颈低级别上皮内瘤变(low grade squamous intraepithelial, LSIL)组织标本 30 份(LSIL 组)。对照组为因子宫良性病变行全子宫切除的病灶旁正常宫颈组织 20 份。在 50 份宫颈癌标本中,病理类型均为宫颈磷状细胞癌。其中,国际妇产科联盟(FIGO)分期 I 期 19 例,II 期 31 例;高分化 22 例,中低分化 28 例;肿瘤大于或等于 4 cm 的 18 例,小于 4 cm 的 32 例;有淋巴结转移 19 例,无淋巴结转移 31 例。本研究征得患者知情同意,并经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 小鼠抗人 Foxp3 单克隆抗体(Ab20034),兔抗人 B7-H4 抗体(ab5069)抗体均购自英国 Abcam 公司,抗体稀释浓度分别为 1:100、1:150,免疫组织化学 SP 试剂盒购自北京博奥森公司,二氨基联苯胺(DAB)显色剂购自丹麦 Dako 公司。CX21 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2.2 检测方法 将石蜡包埋组织 4 μ m 连续切片,切片固定于经多聚赖氨酸处理的载玻片上。经二甲苯、梯度乙醇常规脱蜡、脱水,高压抗原修复[B7-H4 使用 pH 值 6.0 柠檬酸缓冲液, Foxp3 使用 pH 值 9.0 乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲液]。按照博奥森 SP 免疫组织化学试剂盒操作说明进行操作,3%过氧化氢(H₂O₂)室温孵育 15 min 灭活内源性过氧化物酶的

活性,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。山羊血清室温封闭 20 min。切片分别滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜孵育 14 h。滴加相应二抗室温孵育 30 min,辣根酶标链霉卵白素室温孵育 20 min, DAB 室温显色,苏木素复染,分化反蓝、脱水、透明、中性树胶封固。以 PBS 缓冲液替代一抗作为阴性对照组。

1.2.3 结果判定标准 B7-H4 阳性表达在肿瘤细胞的细胞质及细胞膜中,显微镜下选取 5 个高倍视野,以细胞的细胞质有黄至棕褐色为 B7-H4 阳性细胞。按染色强度分级:无染色(0 分)、浅黄色(1 分)、棕褐色(2 分)、褐色(3 分)。按阳性细胞所占比例计分:无阳性细胞为 0 分, <10% 为 1 分, 10%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。两项指标乘积, <4 分为低表达, ≥ 4 分为高表达。Foxp3⁺主要表达在淋巴细胞的细胞核中。每个切片显微镜下选取 5 个高倍视野($\times 200$),以细胞核黄色或棕褐色为 Foxp3⁺ Treg, 计算 5 个高倍视野 Foxp3⁺ Treg 平均值。

1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS20.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表达,组间比较采用 t 检验;计数资料采用非参数检验,组间比较采用 χ^2 检验; Spearman 秩相关分析表示两变量值之间关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4 和 Foxp3⁺ Treg 在不同宫颈组织中阳性表达水平比较 B7-H4 在宫颈癌组、H1SL 组、LSIL 组、对照组宫颈组织的阳性表达率分别为 78.00% (39/50)、46.67% (14/30)、26.67% (8/30)、10.00% (2/20)。与对照组比较,宫颈癌组、H1SL 组中 B7-H4 阳性率明显升高,组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 27.22, 7.41, P<0.01$)。B7-H4 阳性率在 LSIL 组与对照组之间比较差异无统计学意义($\chi^2 = 2.08, P>0.05$)。宫颈癌组 B7-H4 表达阳性率明显高于 H1SL、LSIL 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。Foxp3⁺ Treg 在正常宫颈组织几乎不表达,阳性表达主要定位于肿瘤间质的淋巴细胞的细胞核。与对照组比较,宫颈癌组、H1SL 及 LSIL 组中 Foxp3⁺ Treg 阳性数明显升高,各组间比较差异有统计学意义($t = -20.30, -15.93, -2.25, P<0.05$)。宫颈癌组 Foxp3⁺ Treg 阳性数明显高于 H1SL 及 LSIL 组,随着宫颈病变的加重, Foxp3⁺ Treg 阳性数明显增多,差异有统计学意义($t = -8.81, -23.02, P<0.01$)。B7-H4 和 Foxp3⁺ Treg 在不同宫颈组织中阳性表达水平比较,见表 1。

2.2 B7-H4 和 Foxp3⁺ Treg 的表达与宫颈癌临床病理特征间的关系 在宫颈癌组织中, FIGO 分期 II 期 B7-H4 的表达水平明显高于 FIGO 分期 I 期,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.202, P<0.05$)。B7-H4 的表达与肿瘤大小、分化程度及淋巴结转移无明显相关性($\chi^2 = 3.760, 0.005, 1.746, P>0.05$)。Foxp3⁺ Treg

细胞数与肿瘤大小及淋巴转移密切相关,肿瘤直径大于或等于 4 cm 者肿瘤浸润的 Foxp3⁺ Treg 数量高于肿瘤直径小于 4 cm 者($t=2.084, P<0.05$),淋巴结转移阳性者肿瘤浸润的 Foxp3⁺ Treg 数量高于淋巴结转移阴性者($t=2.277, P<0.05$)。Foxp3⁺ Treg 数与组织分化程度及 FIGO 分期无明显相关性($t=0.348, 1.754, P>0.05$),见表 2。

2.3 宫颈癌组织中 B7-H4、Foxp3⁺ Treg 表达的相关性 Spearman 秩相关分析显示,在宫颈癌组织中 B7-H4 与 Foxp3⁺ Treg 表达呈正相关($r=0.34, P<$

0.01)。

表 1 不同宫颈组织中 B7-H4 及 Foxp3⁺ Treg 表达水平比较

组别	n	B7-H4[n(%)]	Foxp3 ⁺ Treg($\bar{x}\pm s$,个)
对照组	20	2(10.00) ^a	2.70±5.85 ^a
LSIL 组	30	8(26.67) ^a	13.13±13.34 ^{ab}
HSIL 组	30	14(46.67) ^{ab}	53.57±13.40 ^{ab}
宫颈癌组	50	39(78.00) ^b	87.08±18.06 ^b

^a: $P<0.01$,与宫颈癌组比较;^b: $P<0.05$,与对照组比较

表 2 宫颈癌组织中 B7-H4 及 Foxp3⁺ Treg 表达与临床病理特征的关系($n=50$)

病理特征	n	B7-H4[n(%)]		χ^2	P	Foxp3 ⁺ Treg($\bar{x}\pm s$,个)	t	P
		低表达	高表达					
肿瘤大小								
<4 cm	32	14(43.75)	18(56.25)	3.760	0.053	83.2±15.7	2.084	0.043
≥4 cm	18	13(72.22)	5(27.78)			93.9±20.4		
FIGO 分期								
I 期	19	6(31.58)	13(68.42)	6.203	0.013	92.7±15.3	2.277	0.086
II 期	31	21(67.74)	10(32.26)			83.7±19.0		
分化程度								
高分化	22	12(54.55)	10(45.45)	0.005	0.945	88.1±19.1	0.348	0.730
中低分化	28	15(53.57)	13(46.43)			86.3±17.5		
淋巴结转移								
阳性	19	8(42.11)	11(57.89)	1.746	0.186	94.2±15.7	1.754	0.027
阴性	31	19(61.29)	12(38.71)			82.7±18.3		

3 讨论

宫颈癌是发生在子宫颈鳞-柱交界处的恶性肿瘤。随着生活方式的改变,使宫颈癌的发病呈年轻化。虽然手术及放射、化学药物等治疗,使宫颈癌患者的病死率明显降低。但对于晚期及复发的宫颈癌仍是临床治疗中的难点。近年,许多免疫疗法在某些晚期恶性肿瘤治疗中取得重大突破,由此为宫颈癌免疫治疗开拓了新的治疗方法。

HANAHAN 等^[9]指出免疫逃逸是肿瘤发展过程中新的表型,是肿瘤发生、转移的重要原因。从人乳头瘤病毒(HPV)感染发展到宫颈癌,患者宫颈局部微环境中的免疫功能受到抑制,能够让肿瘤细胞避开免疫的生理破坏,尤其是 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞的破坏作用,从而促进宫颈癌发生、发展及转移。B7-H4 是 B7 家族的新成员,被认为是免疫应答的负调节因子。B7-H4 存在于抗原提呈细胞表面,与 T 细胞表面受体结合的配体相互作用,通过抑制 T 细胞增殖及细胞因子产生发挥抗肿瘤免疫作用^[10]。LIU 等^[11]发现宫颈癌组织中 B7-H4 表达明显上调,并且高表达的 B7-H4 与患者不良预后相关,推测 B7-H4 能作为评估宫颈癌患者临床预后的潜在生物标记物。

CHEN 等^[12]发现喉癌组织中高表达 B7-H4 可能与肿瘤复发密切相关,通过阻断 B7-H4 信号通路可能成为肿瘤治疗靶点。B7-H4 能活化相关信号通路促进细胞的侵袭、转移。HAN 等^[13]研究发现过表达 B7-H4 的宫颈癌细胞可通过调控磷酸化-酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导和转录激活因子 3(JAK2/STAT3)信号通路,促进白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子-β1(TGF-β1)的产生,诱导癌细胞恶性进展。随着免疫检查点程序性死亡配体 1(PD-L1)的阻断剂在晚期癌症治疗中取得明显疗效,B7 家族逐渐引起关注。深入了解 B7-H4 在宫颈癌中的表达及功能可能为肿瘤免疫治疗提供新的靶点。本研究发现 B7-H4 在正常宫颈上皮几乎不表达,在宫颈癌组织中的表达明显上调。主要阳性定位在癌细胞的细胞膜及细胞质中,阳性率为 78.00%(39/50),明显高于其他 3 组。随着宫颈病变的发展,B7-H4 的表达水平逐渐增高,当发展至宫颈癌时,B7-H4 表达明显增强并广泛分布于癌变细胞中,表明 B7-H4 在宫颈癌中能抵抗机体抗肿瘤免疫。因此,推断 B7-H4 对判断病变持续或进展有一定参考价值。FIGO 分期对于评估患者预后具有重要价值。本研究发现 B7-H4 的高表达与肿瘤的 FIGO 分

期密切相关,说明随着肿瘤的进展,B7-H4 的局部免疫抑制作用增强,有利于癌细胞增殖及转移。

肿瘤微环境的 Treg 是一类发挥负性调节作用的免疫细胞,能通过分泌抑制性细胞因子、干扰细胞代谢、介导靶细胞凋亡等途径抑制效应性细胞的功能,帮助肿瘤细胞逃避免疫攻击,促进肿瘤的发生、发展^[14]。以往研究表明,Foxp3⁺ Treg 能在胰腺癌^[5]、结直肠癌^[6]、乳腺癌^[7]患者外周血及肿瘤间质高表达,并与肿瘤预后不良相关。HUANG 等^[15]研究发现宫颈癌患者 Foxp3⁺ Treg 阳性表达率为 91.67%,阳性表达于 T 细胞的细胞核。此外,Foxp3⁺ Treg 的表达与肿瘤的大小及 FIGO 分期相关。本研究发现正常宫颈上皮及 LISL 组织中 Foxp3⁺ Treg 微量表达,HSIL 及宫颈癌组织中的 Foxp3⁺ Treg 数明显增多。Foxp3⁺ Treg 主要浸润在肿瘤的间质部,聚集的 Foxp3⁺ Treg 能直接抑制 T 细胞增殖及功能,促进肿瘤免疫逃逸。Treg 在 LISL 局部微环境中抑制作用不明显,机体内利用强大的免疫系统使病变清除。当发展至 HSIL 及宫颈癌时,增多的 Treg 发挥明显免疫抑制作用,使病变不断进展。此外,本研究还发现 Foxp3⁺ Treg 表达与肿瘤大小及淋巴转移密切相关,推测这可能与 CC 趋化因子 22(CCL22)/CC 趋化因子受体 4(CCR4)介导的信号通路有关。肿瘤细胞能分泌 CCL22,能通过 CCR4 受体招募 Treg 到肿瘤微环境,使 Treg 聚集在肿瘤周围,抑制效应细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[16]。本研究与韩丽萍等^[17]研究结果相近,该研究显示 Foxp3⁺ Treg 表达随着宫颈病变的加重而增多,并与宫颈癌的淋巴结转移密切相关,提示 Foxp3⁺ Treg 的高表达对宫颈癌患者的预后有一定影响。

此外,本研究还发现宫颈癌组织 B7-H4 与 Foxp3⁺ Treg 表达呈正相关($r=0.34, P<0.01$),推测二者在宫颈癌的发展过程中具有协同作用。一方面,B7-H4 可能通过增加 Foxp3⁺ Treg 的数量介导免疫逃逸。同时,浸润的 Foxp3⁺ Treg 使局部免疫抑制有利于 B7-H4 的表达。

综上所述,宫颈癌组织中 B7-H4、Foxp3⁺ Treg 表达上调,共同形成免疫抑制的微环境,参与肿瘤生长和转移。深入探讨二者在免疫逃逸中的作用及机制,是今后宫颈癌免疫治疗的研究方向。

参考文献

[1] TSU V, JERONIMO J. Saving the World's women from cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2016, 374(26): 2509-2511.
[2] 刘萍. 中国大陆 13 年宫颈癌临床流行病学大数据评价

[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(1): 41-45.
[3] QIAN Y, SANG Y, WANG F X, et al. Prognostic significance of B7-H4 expression in matched primary pancreatic cancer and liver metastases[J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 72242-72249.
[4] 王丹, 李怡飞, 历春, 等. 结直肠癌组织中 B7-H1 和 B7-H4 表达与 FOXP3 调节性 T 细胞浸润的关联性[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(3): 543-547.
[5] WANG X, LANG M, ZHAO T, et al. Cancer-Foxp3 directly activated CCL5 to recruit Foxp3⁺ Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncogene, 2017, 36(21): 3048-3058.
[6] SUN X, FENG Z, WANG Y, et al. Expression of Foxp3 and its prognostic significance in colorectal cancer[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2017, 30(2): 201-206.
[7] MERLO A, CASALINI P, CARCANGIU M L, et al. Foxp3 expression and overall survival in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(11): 1746-1752.
[8] 魏丽惠, 沈丹华, 赵方辉, 等. 中国子宫颈癌筛查及异常管理相关问题专家共识(二)[J]. 中国妇产科临床杂志, 2017, 18(3): 286-288.
[9] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
[10] 胡明, 魏雷, 谢楠. B7-H4 与肿瘤发生、发展关系的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(14): 245-249.
[11] LIU W, SHIBATA K, KOYA Y, et al. B7-H4 overexpression correlates with a poor prognosis for cervical cancer patients [J]. Mol Clin Oncol, 2014, 11(2): 219-225.
[12] CHEN L, JIN M, SHANG Y, et al. The tissue distribution and significance of B7-H4 in laryngeal carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(54): 92227-92239.
[13] HAN S, WANG Y, SHI X, et al. Negative roles of B7-H3 and B7-H4 in the microenvironment of cervical cancer [J]. Exp Cell Res, 2018, 371(1): 222-230.
[14] FACCIABENE A, MOTZ G T, COUKOS G. T-regulatory cells; key players in tumor immune escape and angiogenesis[J]. Cancer Res, 2012, 72(9): 2162-2171.
[15] HUANG C L, 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.
[16] LI Y Q, LIU F F, ZHANG X M, et al. Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76379.
[17] 韩丽萍, 刘丽雅, 孙晓慧, 等. 宫颈癌组织中 FOXP3、PD-1 及 PD-L1 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(1): 83-88.