

# B7-H1及其受体PD-1分子在原发性肝癌组织中的表达及临床意义

申民强, 孙趁意, 刘占举

## ■背景资料

B7-H1是B7家族中的共刺激信号分子之一,与表达在T细胞表面的受体PD-1分子结合,传递抑制性信号,抑制T、B细胞功能,介导肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤生长,对外周组织中T细胞耐受具有重要调节作用。本文是课题组研究B7-H1和PD-1分子在原发性肝癌组织表达,分析B7-H1分子在肝癌发生过程中免疫病理作用。

申民强, 孙趁意, 刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

申民强, 中国人民解放军152医院消化内科 河南省平顶山市 467000

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NECT-05-0609

2005年河南省卫生厅科技攻关资助项目, No. 2005-45

作者贡献分布: 此课题设计指导由刘占举完成; 实验操作由申民强与孙趁意完成; 研究用试剂由刘占举提供; 本论文写作由申民强, 孙趁意及刘占举完成。

通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科。 zhanjuli@yahoo.com

电话: 0371-63939084

收稿日期: 2008-08-07 修回日期: 2008-09-05

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-09-28

## Expression and clinical significance of B7-H1 and PD-1 in primary hepatocellular carcinoma tissues

Min-Qiang Shen, Chen-Yi Sun, Zhan-Ju Liu

Min-Qiang Shen, Chen-Yi Sun, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Min-Qiang Shen, Department of Gastroenterology, the 152<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Pingdingshan 467000, Henan Province, China

Supported by: the New Century Talent supporting Scheme Projects of the Ministry of Education, No. NECT-05-0609; and the Health Department Scientific and Technological Projects 2005 in Henan Province, No. 2005-45

Correspondence to: Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zhanjuli@yahoo.com

Received: 2008-08-07 Revised: 2008-09-05

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-09-28

## Abstract

**AIM:** To analyze expression of B7-H1 and PD-1 in primary hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and to investigate its role in HCC carcinogenesis.

**METHODS:** B7-H1 protein expression in HCC and normal liver tissues was determined using immunohistochemistry assay and real-time PCR (RT-PCR) in 42 patients. PD-1 expression in intrahepatic lymphocytes was detected using flow

cytometry. The relationship between B7-H1 and the Edmondson grading and tumor metastasis of HCC were analyzed subsequently.

**RESULTS:** The B7-H1 protein and mRNA levels were significantly increased in HCC tissues compared with normal liver tissues (85.71% vs 28.57%, 7.14%;  $0.73 \pm 0.21$  vs  $0.35 \pm 0.12$ ,  $0.23 \pm 0.07$ , all  $P < 0.05$ ). The expression of B7-H1 protein mRNA in HCC was not correlated to the gender of patients, age, tumor size, tissue type groups and  $\alpha$ -fetoprotein expression, but significantly correlated to the Edmondson grading and tumor metastasis ( $\chi^2 = 7.876$ , 8.492, both  $P < 0.05$ ). PD-1 was also highly expressed in T cells from HCC tissues than that in controls ( $20.15\% \pm 3.47\%$  vs  $2.67\% \pm 0.53\%$ ,  $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** B7-H1 is highly expressed in HCC tissues, and the expression of B7-H1 can reflect the HCC infiltration. Therefore, blockade of B7-H1 signaling pathway may have a therapeutic role in HCC treatment.

**Key Words:** B7-H1; Hepatocellular carcinoma; PD-1

Shen MQ, Sun CY, Liu ZJ. Expression and clinical significance of B7-H1 and PD-1 in primary hepatocellular carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(27): 3110-3113

## 摘要

**目的:** 分析B7-H1和PD-1分子在原发性肝癌组织中的表达,并探讨其在肝癌发生过程中的临床意义。

**方法:** 采用免疫组织化学染色和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测42例原发性肝癌组织及对应的癌旁正常肝组织中B7-H1蛋白和mRNA表达,分析B7-H1分子与肝癌分化程度、有无侵袭转移的关系。分离肝组织内淋巴细胞,流式细胞仪分析PD-1分子在T细胞表面表达,以及B7-H1信号对肝癌组织内T细胞功能的影响。

**结果:** 原发性肝癌组织中B7-H1蛋白及mRNA

## ■同行评议者

李旭, 副教授, 广东省广州市南方医院急诊科; 刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院

表达水平均比癌旁组织和正常组织显著升高(85.71% vs 28.57%, 7.14%;  $0.73 \pm 0.21$  vs  $0.35 \pm 0.12$ ,  $0.23 \pm 0.07$ , 均 $P < 0.05$ ), B7-H1阳性细胞与癌组织分化程度、有无侵袭转移相关( $\chi^2 = 7.876$ , 8.492, 均 $P < 0.05$ ), 但与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿块类型及AFP水平无相关关系. 肝癌组织中T细胞表达PD-1水平比癌旁对照显著升高( $20.15\% \pm 3.47\%$  vs  $2.67\% \pm 0.53\%$ ,  $P < 0.001$ ).

**结论:** 肝癌中B7-H1分子表达可能抑制肝癌组织内T细胞功能, 促进肝癌细胞逃避免疫监控, 阻断肝癌细胞表面B7-H1/PD-1信号传导, 可能成为肝癌免疫治疗的新途径.

**关键词:** B7-H1; 原发性肝癌; PD-1

申民强, 孙趁意, 刘占举. B7-H1及其受体PD-1分子在原发性肝癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(27): 3110-3113

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3110.asp>

## 0 引言

抗原特异性T细胞的活化需要两个信号, 即TCR介导的抗原特异性信号和共刺激分子介导的共刺激信号. B7-H1是B7家族中另一个T细胞共刺激分子, 能促进T细胞的增殖和IL-10的产生, 与表达在T细胞表面的受体PD-1分子结合, 传递抑制性信号, 对外周组织中T细胞耐受具有重要调节作用<sup>[1-3]</sup>. 研究发现, B7-H1在一些非淋巴组织、少数造血组织, 以及一些肿瘤组织(如肺癌、卵巢癌、大肠癌、黑色素瘤)中有表达, 并参与局部免疫调节应答. B7-H1与PD-1结合后, 能抑制T细胞、B细胞功能, 从而介导肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤生长<sup>[1-3]</sup>. 本研究分析B7-H1和PD-1分子在原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织和癌旁肝组织中表达, 旨在探讨他们在HCC发生过程中的免疫病理作用和肝癌预后的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2005-08/2008-05在郑州大学二附院普外科住院HCC患者42例, 均接受手术切除治疗, 采集新鲜肝癌组织和癌旁肝组织标本, 各42例, 其中男28例, 女14例, 年龄31-74(平均42.5 ± 13.2)岁, 高、中分化患者30例, 低度分化患者12例, 所有病例均未行化疗及生物免疫治疗, 亦未合并自身免疫性疾病及其他器官的肿瘤(如肺癌、胃癌、结肠癌等). 同时, 收集在消化内科住

院接受肝组织活检的12例正常肝组织(男7例, 女5例, 年龄25-54岁)和14例慢性乙肝患者(男9例, 女5例, 年龄22-49岁)肝脏活检组织标本作为对照研究. 所有标本均有详细临床资料, 并经病理证实. 手术标本取材时, HCC组织均取自癌变原发灶, 避开坏死、炎症区域, 癌旁组织取自相应肿块旁3-5 cm肝组织. 将手术标本和活检组织标本立即置于液氮罐中速冻, 后转移至-80℃超低温冰箱保存备用. 所有实验研究均得到研究对象的同意, 并得到医院医学伦理部门的批准. 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂; 细胞培养用RPMI 1640培养基、胎牛血清购于美国Hyclone公司; 谷氨酰胺、肝组织淋巴细胞分离液Percoll购于美国Sigma公司; 鼠抗人B7-H1 mAb(5H1)由中国科学院生物物理研究所感染与免疫中心王盛典教授馈赠; PE-标记的小鼠抗人PD-1单抗、FITC-标记的抗人CD3单抗购于美国BD Biosciences公司; 免疫组化SP试剂盒购于福州迈新生物技术公司; 其他试剂均为国产分析纯. 根据GenBank检索的Canstatin的基因序列利用Premier 5软件辅助分析设计B7-H1及 $\beta$ -actin的引物, B7-H1引物序列如下: 上游引物为5'-GAC CTA TAT GTG GTA GAG TAT GGT AGC-3', 下游序列为5'-TTC AGC TGT ATG GTT TTC CTC AGG ATC-3', 扩增产物594 bp;  $\beta$ -actin引物上游序列为5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC-3', 下游为5'-GTA GCC GCG CTC GGT GAG GAT CTT CAT-3', 产物409 bp. 以上引物均由北京奥科公司合成.

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化染色:** 免疫组织化学染色方法见我们既往报道<sup>[4-6]</sup>, 简述如下: 新鲜冰冻标本, 切片厚度5  $\mu$ m, 用30 mL/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用5 min阻断内源性抗原. 加入小鼠抗人B7-H1 mAb(5H1克隆, 1:100稀释), 4℃过夜, 次晨依次加二抗, DAB显色, 苏木素复染细胞核. 用正常PBS或小鼠血清代替一抗作阴性对照, 以已知的胃癌组织染色呈强阳性反应的标本作阳性对照. B7-H1表达分析通过计数在胞膜上或/和胞质内有阳性染色的细胞个数, 在×200倍镜下随机选择的5个肿瘤区域进行细胞计数. B7-H1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%-40%; ++: 40%-80%; +++: >80%. 结果判断: <10%为阴性; 10%-100%为阳性.

**1.2.2 RT-PCR:** 将标本(50-80 mg)放在装有液氮的研钵中充分研磨, 按照TRIzol试剂说明书逐步加入氯仿、异丙醇、乙醇等提取RNA, 并测定RNA浓度、纯度和完整性. 以提取的总RNA为

### ■ 相关报道

国内外有学者曾经发现B7-H1分子在胃癌、结肠癌、肾癌等组织内表达升高, 并诱导肿瘤组织内T细胞免疫耐受, 促使肿瘤生长, 但缺乏在肝癌中的研究.

### ■创新亮点

本文运用免疫组织化学、RT-PCR和流式细胞仪方法探讨B7-H1在肝癌组织中表达,结果表明B7-H1在肝癌组织中表达升高,与癌细胞分化程度、病理分级和有无侵袭转移有密切关系。

模板,按RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit反转录试剂盒说明书进行操作。反转录步骤如下:总RNA 5  $\mu$ L, Oligo-(dT)Primer 1  $\mu$ L, 无RNase水6  $\mu$ L, 混匀,离心。70℃, 5 min;立即置于冰浴, 2 min。加入5 $\times$ Buffer 4  $\mu$ L, RNase抑制剂1  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, 混匀, 37℃ 5 min;加入反转录酶1  $\mu$ L, 42℃ 60 min; 70℃ 10 min;立即置于冰浴,合成cDNA第1链。以cDNA为模板进行PCR扩增,PCR扩增反应步骤如下:反应体积为25  $\mu$ L, 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 61℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 共35循环。PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色)后,紫外透射反射仪下观察结果,并在凝胶成像仪上照相,扫描所得灰度值进行统计学分析<sup>[4-6]</sup>。

1.2.3 肝脏组织内淋巴细胞分离:肝组织内淋巴细胞分离方法见参照我们既往报道<sup>[7]</sup>。简述为,组织标本放于含有抗生素的PBS液冲洗,去除表面的红细胞,然后将标本转至37℃含有胶原酶A(1 g/L)和DNA酶(5  $\mu$ g/L)的消化液中消化3-4 h,然后通过Percoll淋巴细胞分离液离心(600  $g$  20 min),取得肝组织内单个核淋巴细胞,用于流式细胞仪分析。

1.2.4 流式细胞仪检测:将上述分离得到的肝组织内淋巴细胞配制成 $1 \times 10^9$ /L浓度,取样本100  $\mu$ L,用含有2 g/L胎牛血清白蛋白和1 g/L Na<sub>3</sub>的PBS洗2次。然后用含有合适浓度的荧光素抗体(如PE-PD-1、FITC-CD3、同型Ig对照抗体),于4℃染色, 30 min后,用PBS洗2次去除未结合的抗体,用30 g/L多聚甲醛溶液固定,最后用流式细胞仪(FACSsort, 美国BD公司)分析, CellQuest软件分析,计算PD-1阳性T细胞数<sup>[5]</sup>。

**统计学处理** B7-H1表达水平以mean $\pm$ SD表示,采用SPSS13.0统计分析软件分析,根据资料类型采用ANOVA、 $t$ 检验、 $\chi^2$ 检验,取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肝组织中B7-H1分子原位表达 B7-H1染色在肝癌组织中均表达增强(++以上),主要在癌细胞膜和胞质内,呈棕黄至棕褐色颗粒或团块,多区域分布, B7-H1表达阳性率为85.71%(36/42);而癌旁组织阳性表达率为28.57%(12/42),肝炎组织或正常组织仅微弱表达,阳性率为7.14%(3/42)仅有少量表达。统计学分析发现, HCC组织中B7-H1阳性表达率明显高于癌旁组织和正常组织( $P < 0.05$ )。进一步分析发现(表1),

表1 B7-H1与HCC转移和病理分级的关系

分组	<i>n</i>	B7-H1阳性 <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>P</i>
癌灶转移				
有	27	20(74.07)	7.876	<0.05
无	15	15(100.00)		
病理分级				
I-II	19	14(73.68)	8.492	<0.05
III-IV	23	21(91.30)		

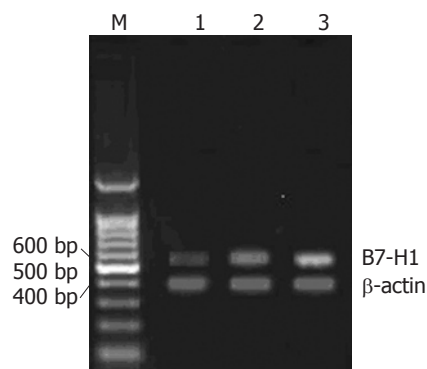


图1 RT-PCR分析B7-H1表达。M: 100 bp的DNA标准参照; 1: 健康组织; 2: 癌旁组织; 3: HCC组织。

B7-H1染色强弱与细胞分化程度相关,癌细胞分化程度相对较高,侵袭能力较低, B7-H1染色较弱;癌细胞异型性明显,分化程度较低, B7-H1染色强,并与肿瘤的侵袭性生长相一致。

2.2 肝组织中B7-H1 mRNA表达 HCC组织中B7-H1 mRNA条带明显增亮,应用灰度扫描半定量分析, B7-H1 mRNA在HCC组织、癌旁组织和正常组织中阳性表达灰度值分别为 $0.73 \pm 0.21$ 、 $0.35 \pm 0.12$ 和 $0.23 \pm 0.07$ ,统计学分析发现, B7-H1 mRNA在HCC组织的表达水平明显高于癌旁组织( $P = 0.041$ )和正常组织( $P = 0.015$ );而癌旁组织和正常组织间B7-H1 mRNA表达,差异无显著性( $P = 0.9231$ , 图1)。

2.3 B7-H1表达与临床资料的相关性分析 B7-H1阳性表达与HCC的病理分级和有无侵袭转移相关( $\chi^2 = 7.876, 8.492$ , 均 $P < 0.05$ , 表1);但与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿块类型、AFP水平无关。

2.4 PD-1分子在HCC组织内T细胞表面表达 使用肝组织标本,分离肝组织内淋巴细胞,通过流式细胞仪分析发现, PD-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T细胞数在HCC组织内明显高于癌旁组织( $20.15\% \pm 3.47\%$  vs  $2.67\% \pm 0.53\%$ ,  $P < 0.001$ ),提示在癌变组织内T细胞表达B7-H1的配体明显升高,可能参与癌变组织的免疫调节作用。

### ■应用要点

通过检测B7-H1,可早期诊断肝癌,判断肝癌的侵袭转移能力和预后。



### 3 讨论

目前研究认为<sup>[1-3]</sup>, B7-H1通过与PD-1结合后抑制T、B细胞的功能, 抑制机体的特异性细胞免疫和体液免疫能力, 诱导特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)凋亡, 而使肿瘤细胞发生免疫逃逸, 促进肿瘤生长。既往报道发现<sup>[2-3]</sup>, 造血系统和非造血系统肿瘤细胞表面均有B7-H1表达, 在乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠腺癌等组织也检测到B7-H1表达。将B7-H1转染小鼠肥大细胞瘤P815细胞株, 注射入免疫缺陷型小鼠内, 建立腹腔肿瘤模型<sup>[8]</sup>, 研究发现相应小鼠的肿瘤呈进行性生长, 病理分析发现在肿瘤早期便出现腹腔广泛播散和血运转移, 若将荷瘤小鼠PD-1基因敲除, 肿瘤生长即受到了明显的抑制。此研究证实了B7-H1在肿瘤细胞上表达削弱其免疫原性, 影响CTL效应应答, 抑制肿瘤免疫应答产生<sup>[9]</sup>。此外, 研究报道发现<sup>[10]</sup>, 肿瘤细胞表达B7-H1还使其对CTL的细胞毒杀伤效应敏感性下降, 提示B7-H1信号能通过诱导特异性CTL凋亡, 促使肿瘤细胞发生免疫逃逸。

本研究发现, 肝癌细胞B7-H1表达明显高于癌旁组织及正常组织, HCC恶性程度越高, B7-H1表达越强, B7-H1表达水平在伴有侵袭转移的肝癌中明显高于无侵袭转移的肝癌。HCC组织内PD-1阳性的T细胞浸润也明显增强, 提示在HCC癌变过程中, B7-H1分子可能直接与其受体PD-1相互作用, 参与了肝脏内T细胞免疫耐受, 并抑制HCC组织内CTL效应功能, 促使HCC的侵袭转移, 并诱导肝癌细胞免疫逃避出现。

目前有研究发现, 抗B7-H1单抗能明显抑制B7-H1转染的P815荷瘤小鼠局部肿瘤的生长, 并出现良好的完全缓解率<sup>[11]</sup>。通过建立B7-H1-SCCV的荷瘤小鼠模型的基础上, 使用B7-H1单抗和特异性T细胞过继免疫治疗, 有效率为60%, 明显提高荷瘤小鼠远期存活率<sup>[12]</sup>。另有报道<sup>[13]</sup>, 小鼠体内使用可溶性的PD-1蛋白治疗, 抑制B7-H1信号作用, 可以显著阻断接种有肝癌细胞株H22的皮下生长。在健康状态下, 肝组织内血管内皮细胞表达低水平的B7-H1分子, 进而维持肝组织内T细胞免疫耐受状态<sup>[14]</sup>。肝癌的发生可能是多因素诱发, 乙、丙型肝炎病毒感染, 黄曲霉毒素污染, 饮酒和电离辐射等共同参与了疾病发展过程<sup>[15]</sup>。本研究结果表明, B7-H1分子有可能成为判断HCC侵袭转移能力及肝癌患者预后的一个新指标, 通过阻断B7-H1/PD-1信号通

路, 可能用于治疗HCC, 为靶向生物治疗HCC奠定了重要理论基础。

### 4 参考文献

- 1 Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548
- 2 Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677-704
- 3 Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; 27: 195-201
- 4 孙趁意, 唐芙爱, 刘占举. B7-H1在慢性乙型肝炎肝组织中的表达及临床意义. 河南科技大学学报(医学版) 2008; 26: 94-96
- 5 刘书漫, 孟青, 王盛典, 刘占举, 张钦宪. 不同胃癌细胞系中B7-H1分子的表达水平及定位. 解剖学报 2008; 39: 70-73
- 6 刘书漫, 李倩如, 张妮, 王一菱, 孟青, 张钦宪, 刘占举. 共刺激分子B7-H1在胃癌中表达上调. 基础医学与临床 2008; 28: 450-454
- 7 Liu Z, Jiu J, Liu S, Fa X, Li F, Du Y. Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun* 2007; 29: 187-194
- 8 Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burrow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003; 9: 562-567
- 9 Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol* 2002; 169: 3581-3588
- 10 Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800
- 11 Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12293-12297
- 12 Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, Salomao D, Cheville J, Hirano F, Lin W, Kasperbauer JL, Ballman KV, Chen L. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 6501-6505
- 13 He L, Zhang G, He Y, Zhu H, Zhang H, Feng Z. Blockade of B7-H1 with sPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 3309-3313
- 14 Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology* 2008; 47: 296-305
- 15 朱德强, 黄志勇. DNA损伤与肝癌发生. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1775-1780

### ■同行评价

本文探讨了B7-H1及其受体PD-1分子在原发性肝癌组织中的表达及临床意义, 有一定的创新性, 分析讨论逻辑性尚可, 具有一定的学术价值。