

• 临床检验研究 •

新肿瘤标志物 sB7-H4 初探*

华建江¹, 姜健², 吴雄君¹, 窦宇红¹, 刘镇平¹, 徐军发³

(1. 广州医学院附属深圳沙井人民医院检验科, 广东深圳 518104; 2. 深圳市福田区中医院检验科, 广东深圳 518000; 3. 广东医学院临床免疫学教研室, 广东东莞 523808)

摘要:目的 初步探讨可溶性 B7-H4(sB7-H4)作为肿瘤标志物的可行性。方法 用 ELISA 夹心法检测 61 例胃癌、38 例原发性肝癌、37 例乳腺癌、46 例子宫肌瘤患者与 51 例健康者血清 sB7-H4 水平, 并分析其与临床分期、手术前后及其他血清标志物的相关性。结果 (1)sB7-H4 的分析灵敏度可达 $3.13 \mu\text{g/L}$, 3 种早期恶性肿瘤患者(胃癌、肝癌和乳腺癌)血清 sB7-H4 水平高于健康者, 差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 (2)胃癌、原发性肝癌、乳腺癌患者血清中 sB7-H4 水平均明显高于子宫肌瘤患者和健康者水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 (3)子宫肌瘤患者血清中 sB7-H4 水平与健康者比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (4)III / IV 期原发性肝癌患者血清 sB7-H4 水平高于 I / II 期患者($P < 0.01$), 而胃癌、乳腺癌患者血清 sB7-H4 水平则与临床分期无关($P > 0.05$)。 (5)原发性肝癌、胃癌患者术前血清 sB7-H4 水平高于术后患者, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 sB7-H4 具有较高的灵敏度和较好的特异性, 基本符合肿瘤标志物应具有的条件, 可能是一种新的糖蛋白类肿瘤标志物。

关键词:肿瘤标志物; sB7-H4; 胃癌; 原发性肝癌; 乳腺癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)05-0576-03

The preliminary study of a new tumor marker of sB7-H4

Hua Jianjiang¹, Jiang Jian², Wu Xiongjun¹, Dou Yuhong¹, Liu Zhenping¹, Xu Junfa³

(1. Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Shenzhen Shajing Hospital of Guangzhou Medical College, Shenzhen 518104, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Futian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China; 3. Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To discuss the feasibility of serum soluble B7-H4(sB7-H4) as a tumor marker. **Methods** Using ELISA sandwich method, the serum level of sB7-H4 was detected in 61 cases of gastric cancer patients, 38 cases of primary hepatocarcinoma, 37 cases of breast cancer, 46 cases of hysteromyoma and 51 cases of normal people, then we analyzed the correlation between sB7-H4 and clinical stage, before and after surgical treatment and other serum markers. **Results** 1. The analytic sensitivity of sB7-H4 can be achieved $3.13 \mu\text{g/L}$, the serum level of sB7-H4 in three types of early cancer patients(gastric neoplasms, primary hepatocarcinoma and breast cancer)was significantly higher than that in normal people, the difference between them showed statistically significance. 2. The serum level of sB7-H4 in patients with gastric neoplasms, primary hepatocarcinoma and breast cancer were higher than those in patients with hysteromyoma and normal people, there was significant difference among them; the serum level of sB7-H4 in patients with hysteromyoma was slightly higher than that in normal people, there was no significant difference between them. 3. The serum level of sB7-H4 in III / IV patients with primary hepatocarcinoma was significantly higher than in I / II patients ($P < 0.01$), while the serum level of sB7-H4 in patients with gastric cancer and breast cancer were nothing to do with clinical stage. 4. The serum level of sB7-H4 in patients with gastric neoplasms and primary hepatocarcinoma before surgical treatment were higher than those after surgical treatment, the difference between them showed statistically significance. 5. The serum level of sB7-H4 in patients with primary hepatocarcinoma and gastric cancer were positively correlated with the serum level of AFP, CEA, CA199($P < 0.01$). **Conclusion** Having a high sensitivity and good specificity, sB7-H4 basically meet the conditions with tumor marker, it may be a new glycoproteins of tumor marker.

Key words: Tumor marker; sB7-H4; Gastric neoplasms; Primary hepatocarcinoma; Breast cancer

肿瘤是严重威胁人类健康的高发病率和高死亡率性疾病, 肿瘤标志物是肿瘤研究中的热点之一。B7-H4 是最新发现的 B7 家族成员, 它在 T 细胞介导的免疫中起负性调节作用^[1]。通过免疫组织化学染色发现, B7-H4 在多种肿瘤组织细胞中均存在高表达。随着 ELISA 夹心法的建立^[2], 已可定量检测出血清中的可溶性 B7-H4(sB7-H4)。本研究检测了 3 种恶性肿瘤(胃癌、原发性肝癌和乳腺癌)、1 种良性肿瘤(子宫肌瘤)和

健康者的血清 sB7-H4 水平, 分析其与临床病理变量之间的相关性, 并按理想肿瘤标志物应具有的特性, 初步探讨 sB7-H4 作为肿瘤标志物的可行性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 肿瘤标本来自 2008 年 6 月至 2009 年 12 月广东医学院附属第一人民医院肿瘤科、普通外科和妇产科的住院和门诊患者, 均经临床诊断和病理诊断确诊; 51 例体检健康

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(200803231); 深圳市宝安区科技计划项目(2008174)。

者作为对照组,标本资料见表 1。

表 1 标本资料

组别	n	男(n)	女(n)	年龄(岁)	I / II 期(n)	III / IV 期(n)	术前(n)	术后(n)
胃癌	61	31	30	17~80	23	38	33	28
原发性肝癌	38	29	9	22~85	25	13	19	19
乳腺癌	37	0	37	29~82	24	13	0	37
子宫肌瘤	46	0	46	29~62	—	—	—	—
健康对照组	51	28	23	18~67	—	—	—	—

—:无数据。

1.2 材料 酶联微量反应板 (coning 公司); 抗人 B7-H4 单克隆抗体 (mAb, eBioscience 公司); HRP 标记羊抗兔 IgG (北京博奥森生物技术有限公司); pETmB7-H4 表达载体 (广东医学院临床免疫教研室构建); TMB 底物及显色剂 (沈阳惠民公司); 甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、糖链抗原 19-9 (CA19-9) 试剂盒 (瑞典 CanAg 公司); BOTEK Elx800 型酶标仪等。

1.3 ELISA 夹心法的建立 将表达重组小鼠 B7-H4 的原核表达载体 pETmB7-H4 转化表达菌诱导表达、纯化目的蛋白, 经鉴定的重组 B7-H4 蛋白用福氏完全佐剂乳化, 再用免疫家兔制备兔抗 B7-H4 多克隆抗体。采用抗人 B7-H4 mAb 包被酶标板, FCS 封闭。在包被好的酶标板中加入待测血清标本, 用重组小鼠 B7-H4 蛋白作为参考标准品, 37 °C 作用 1 h, 加入稀释的兔抗小鼠 B7-H4 多克隆抗体, 用 PBST 洗 3 次, 再加入 HRP 标记羊抗兔 IgG, 加显色底物, 以硫酸终止反应, 在酶标仪上测 A450 值。利用标准曲线法计算未知样品的浓度。

1.4 标本收集和检测 早上采集受试者空腹静脉血后分离血清, -70 °C 保存。用 ELISA 夹心法在同一批内检测所有样本, 每个样本设立 2 个平行孔, 取平均 A 值计算样本中 sB7-H4 的含量 (μg/L)。同时检测患者血清 AFP、CEA、CA19-9 水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 sB7-H4 灵敏度及早期 (I / II 期) 肿瘤患者血清 sB7-H4 水平 (见表 2) 建立的 ELISA 夹心法检测 sB7-H4 的线性范围为 3.13~200 μg/L, 即 sB7-H4 的分析灵敏度为 3.13 μg/L。

表 2 早期 (I / II 期) 肿瘤患者和健康者血清 sB7-H4 水平比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	B7-H4
胃癌	23	44.75 ± 14.40 *
原发性肝癌	25	44.15 ± 13.04 *
乳腺癌	24	42.08 ± 15.51 **
健康对照	51	32.67 ± 12.28

* :与健康对照组比较, $P < 0.01$; ** :与健康对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表 2 可知, 3 种早期恶性肿瘤患者 (胃癌、肝癌和乳腺癌) 血清 sB7-H4 水平高于健康对照者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 肿瘤患者、子宫肌瘤患者和健康对照血清 sB7-H4 水平 (见表 3)

表 3 肿瘤患者、子宫肌瘤患者和健康者血清 sB7-H4 水平比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	B7-H4
胃癌	61	49.14 ± 16.16 *
原发性肝癌	38	52.90 ± 23.26 *
乳腺癌	37	42.52 ± 16.63 **
子宫肌瘤	46	34.21 ± 13.32 △
健康对照	51	32.67 ± 12.28

* :与子宫肌瘤患者和健康对照组比较, $P < 0.01$; ** :与子宫肌瘤组和健康对照组比较, $P < 0.05$; △: 与健康对照组比较, $P > 0.05$ 。

结果表明, 胃癌、原发性肝癌、乳腺癌患者血清中 sB7-H4 水平均高于子宫肌瘤患者和健康对照者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 子宫肌瘤患者血清中 sB7-H4 水平与健康对照者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 不同临床分期原发性肝癌、胃癌和乳腺癌患者血清 sB7-H4 水平 (见表 4)

表 4 不同临床分期的 3 种恶性肿瘤患者血清 sB7-H4 水平比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	原发性肝癌	胃癌	乳腺癌
I / II 期	44.15 ± 13.04	44.75 ± 14.40	42.08 ± 15.51
III / IV 期	69.74 ± 29.35 *	45.98 ± 12.60 **	43.32 ± 12.26 **

* :与 I / II 期原发性肝癌组比较, $P < 0.01$; ** :与 I / II 期胃癌、乳腺癌组比较, $P > 0.05$ 。

结果显示, III / IV 期原发性肝癌患者血清 sB7-H4 水平高于 I / II 期患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而胃癌、乳腺癌患者血清 sB7-H4 水平则与临床分期无关 ($P > 0.05$)。

2.4 手术治疗前后原发性肝癌、胃癌患者血清 sB7-H4 水平的变化 (见表 5)

表 5 原发性肝癌和胃癌患者手术前后血清 sB7-H4 水平比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	原发性肝癌	胃癌
手术前	63.29 ± 26.19 *	58.09 ± 15.28 *
手术后	42.51 ± 14.09	38.58 ± 9.49

* :与手术后原发性肝癌、胃癌组比较, $P < 0.01$ 。

结果显示, 原发性肝癌、胃癌患者术前血清 sB7-H4 水平高于术后患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 原发性肝癌、胃癌患者血清 sB7-H4 水平与血清标志物

AFP、CEA、CA19-9 水平的相关性 将原发性肝癌、胃癌患者血清 sB7-H4 水平分别与血清标志物 AFP、CEA、CA19-9 水平进行单因素直线相关分析,结果显示 sB7-H4 水平与 AFP、CEA、CA19-9 水平呈正相关,见表 6。

表 6 原发性肝癌、胃癌患者血清 sB7-H4 水平与 AFP、CEA、CA19-9 水平相关性

血清标志物	t	P
AFP	0.686	<0.01
CEA	0.652	<0.01
CA19-9	0.738	<0.01

3 讨 论

目前国内外尚未明确肿瘤标志物的确切定义,但从其意义考虑,理想肿瘤标志物应具有以下特性:(1)灵敏度高,能早期发现和早期诊断肿瘤;(2)特异性好,仅肿瘤患者阳性,能对良恶性肿瘤进行鉴别诊断;(3)能对肿瘤进行定位,具有器官特异性;(4)与病情严重程度、肿瘤大小或分期有关;(5)能监测肿瘤治疗效果和肿瘤的复发;(6)能预测肿瘤的预后;(7)检测方法简便、经济^[5]。对照上述特性,以下就 sB7-H4 能否具备肿瘤标志物的条件进行初步探讨。

本研究建立的定量检测 sB7-H4 的 ELISA 夹心法,是一种灵敏度高、稳定性好的免疫学方法,3 种早期肿瘤患者(胃癌、肝癌和乳腺癌)的血清 sB7-H4 水平均高于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示 sB7-H4 可早期发现和早期诊断肿瘤。与子宫肌瘤患者和健康对照组相比,胃癌、原发性肝癌、乳腺癌患者血清中 sB7-H4 水平已有升高($P < 0.01$),而子宫肌瘤患者与健康对照组血清中 sB7-H4 水平的差异无统计学意义($P > 0.05$)。Simon 等^[6]的研究发现,sB7-H4 含量仅在卵巢癌患者中升高而在良性病变中不升高。以上研究结果提示,sB7-H4 能对良、恶性肿瘤进行鉴别诊断,具有较好的特异性。由于本研究尚属初步研究,因而尚未对 sB7-H4 在器官的定位价值进行探讨,据目前研究推测,sB7-H4 应属于非器官特异性、广谱的肿瘤相关抗原。在 sB7-H4 浓度与肿瘤大小或分期关系方面,仅发现原发性肝癌患者血清 sB7-H4 水平与分期有关,而胃癌、乳腺癌患者血清 sB7-H4 水平与其临床分期或大小无关,这可能是由于 B7-H4 在不同肿瘤中表达形式的差异决定的:在原发性肝癌患者中,存在血清的 sB7-H4 远多于表达于肿瘤细胞表面和胞浆中的 B7-H4,故肝癌患者血清 sB7-H4 与其病情严重程度、肿瘤分期有关;在胃癌、乳腺癌患者中,表达于肿瘤细胞表面和胞浆中的 B7-H4 远多于血清中的 sB7-H4,故胃癌、乳腺癌患者血清 sB7-H4 水平与临床分期无关。Simon 等^[6]对术后卵巢癌患者进行了 150 个月观察,结果 sB7-H4 表达高的患者复发率也高;在肾细胞癌中^[7],B7-H4 阳性的肿瘤患者比 B7-H4 阴性的患者复发可能性更大;本研究发现原发性肝癌、胃癌患者术后血清 sB7-H4 水平远低于术前患者,提示 sB7-H4 可用于监测肿瘤治疗效果和肿瘤的复发。据报道^[8],高表达 B9-H4 的前列腺癌更容易扩散,患者病死率也高;非小细胞肺癌^[9]中 B7-H4 的表达与肿瘤的转移相关;在肾细胞癌中,B7-H4 阳性和 B7-H4 阴性患

者的 3 年存活率分别是 71.2% 和 90.5%^[7];在卵巢癌中,预后不良的患者 B7-H4 表达更高^[10];Kryczek^[11]等发现 B7-H4 与疾病的结局呈负相关。从以上研究结果推测,sB7-H4 应与肿瘤患者的预后相关。定量检测 sB7-H4 的 ELISA 夹心法是一种免疫学方法,采用静脉血标本,与采用肿瘤组织切片为标本的定性免疫组织化学染色方法相比,具有操作简便、经济实用等特点。另外发现,原发性肝癌、胃癌血清 sB7-H4 水平与其相应的血清标志物 AFP、CEA、CA19-9 水平呈正相关,蒋敏等^[12]报道,sB7-H4 在食管癌诊断中的灵敏度和准确性均高于 CEA。

综上所述,sB7-H4 具有较高的灵敏度和较好的特异性,基本符合肿瘤标志物应具有的条件,可能是一种新的糖蛋白类肿瘤标志物,但还需进一步研究证实。

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] 孔凡荣,王黎明,戴淑真,等. B7-H4 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 山东医药, 2008, 48(46): 32-33.
- [3] Awadallah NS, Shroyer KR, Langer DA, et al. Detection of B7-H4 and p53 in pancreatic cancer: potential role as a cytological diagnostic adjunct[J]. Pancreas, 2008, 36(2): 200-206.
- [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] 吴健民. 免疫检验理论与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 335-347.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [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] Simon I, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, et al. B7-H4 is overexpressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression[J]. Gynecol Oncol, 2007, 106(2): 334-341.
- [11] Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T Cells, and patient outcome in human ovarian[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8900-8905.
- [12] 蒋敏,顾国浩,张光波,等. 可溶性 B7-H4 在食管癌患者血清中的表达分析[J]. 广东医学, 2009, 30(6): 925-926.

(收稿日期:2010-08-08)