

· 论 著 ·

可溶性共刺激分子 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 在结直肠癌患者血清中的表达水平及临床意义分析*

周 娟¹, 黄莉莉¹, 芮 棵², 张 慧^{2△}

1. 苏州大学附属儿童医院检验科, 江苏苏州 215002; 2. 江苏大学附属江滨医院检验科, 江苏镇江 212001

摘 要:目的 探讨可溶性共刺激分子[可溶性程序性细胞死亡蛋白配体 1(sPD-L1)、可溶性 B7 同源体 3(sB7-H3)、可溶性 B7 同源体 4(sB7-H4)]在结直肠癌患者血清中的表达情况,及其与患者临床病理参数的关系及预后评估价值。**方法** 酶联免疫吸附试验法检测 68 例结直肠癌组血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平,并与良性病变组及健康对照组进行比较,同时分析其与患者病理参数的关系。**结果** 结直肠癌组 sB7-H3 表达水平为 (9.128 ± 0.509) ng/mL,良性病变组和健康对照组 sB7-H3 表达水平分别为 (7.029 ± 0.293) 、 (6.701 ± 0.373) ng/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$)。受试者工作特征曲线分析显示 sB7-H3 曲线下面积为 0.680 5 (95%CI: 0.584 8~0.776 1), $P = 0.001 0$ 。与肿瘤最大径 < 5 cm、TNM 分期 I + II 期、无淋巴结转移患者比较,肿瘤最大径 ≥ 5 cm、TNM 分期 III + IV 期、有淋巴结转移患者血清 sB7-H3 表达水平显著增高。sB7-H4 水平则与患者 TNM 分期及有无淋巴结转移显著相关($P = 0.037 2$ 、 $0.007 8$);与 TNM 分期 I + II 期、无淋巴结转移患者比较,TNM 分期 III + IV 期、有淋巴结转移的患者血清 sB7-H4 表达水平明显增加。**结论** 结直肠癌患者血清 sB7-H3 表达水平显著升高,在结直肠癌疾病诊断中具有潜在的临床应用价值;患者血清 sB7-H3 与 sB7-H4 水平与患者的 TNM 分期及是否淋巴结转移有显著相关,可作为结直肠癌进展与预后判断的潜在分子标志。

关键词: 结直肠癌; 可溶性程序性细胞死亡蛋白配体 1; 可溶性 B7 同源体 3; 可溶性 B7 同源体 4; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.15.012

中图法分类号:R735.34

文章编号:1673-4130(2023)15-1853-05

文献标志码:A

Expression levels and clinical significance of soluble co-stimulatory molecules sPD-L1, sB7-H3, sB7-H4 in serum of patients with colorectal cancer*

ZHOU Juan¹, HUANG Lili¹, RUI Ke², ZHANG Hui^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Jiangbin Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China

Abstract: Objective To investigate the expression of soluble co-stimulatory molecules [soluble programmed cell death ligand 1 (sPD-L1), soluble B7 homology 3 (sB7-H3), soluble B7 homology 4 (sB7-H4)] in the serum of patients with colorectal cancer, and their relationship with clinicopathological parameters and prognostic value. **Methods** The expression levels of serum sPD-L1, sB7-H3 and sB7-H4 in 68 patients with colorectal cancer were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and compared with those in benign lesion group and healthy control group, and its relationship with pathological parameters was analyzed. **Results** The expression level of sB7-H3 was (9.128 ± 0.509) ng/mL in colorectal cancer group, (7.029 ± 0.293) ng/mL in benign lesion group and (6.701 ± 0.373) ng/mL in healthy control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Receiver operating characteristic curve analysis showed that the area under sB7-H3 curve was 0.680 5 (95%CI: 0.584 8—0.776 1), $P = 0.001 0$. Compared with patients with tumor size < 5 cm, TNM stage I + II, and no lymph node metastasis, the serum sB7-H3 expression level was significantly increased in patients with tumor size ≥ 5 cm, TNM stage III + IV, and lymph node metastasis. The level of sB7-H4 was significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis ($P = 0.037 2$,

* 基金项目:江苏省自然科学基金青年项目(BK20170563)。

作者简介:周娟,女,主管技师,主要从事临床免疫学研究。△ 通信作者,E-mail:huihuizhang0511@163.com。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230725.1748.002.html>(2023-07-26)

0.007 8). Compared with patients with TNM stage I + II and no lymph node metastasis, the serum sB7-H4 expression level in patients with TNM stage III + IV and lymph node metastasis was significantly increased.

Conclusion The expression level of serum sB7-H3 in patients with colorectal cancer is significantly increased, which has potential clinical application value in the diagnosis of colorectal cancer. Serum sB7-H3 and sB7-H4 levels are significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis of patients, and can be used as potential molecular markers for the progression and prognosis of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; soluble programmed cell death ligand 1; soluble B7 homolog 3; soluble B7 homolog 4; prognosis

近年来,随着经济发展及生活方式和饮食习惯的改变,我国结直肠癌的发病率和病死率均有所上升^[1]。如果结直肠癌患者在转移前得到诊断和治疗,5 年生存率可达 68%,一旦出现浸润,存活率降至 31%,如果发生远处转移,则患者存活率急降至 5%^[2]。目前对于结直肠癌的诊断及进程的判断,主要依赖于组织病理检查。因此,亟需寻找合适的无创血清标志物用以评判患者的病理特征及进展情况。随着肿瘤免疫和肿瘤微环境研究的不断深入,多种共刺激分子成为了目前肿瘤免疫干预的重要靶点,针对程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)、程序性细胞死亡蛋白配体 1(PD-L1)及细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 的多种单抗在临床抗肿瘤应用中显示出卓越的疗效,使得负性 B7 家族免疫检查点分子在肿瘤免疫治疗中的前景受到空前关注。PD-L1、B7 同源体 3(B7-H3)、B7 同源体 4(B7-H4)是目前研究比较多的免疫共刺激分子。近年来越来越多的实验证实,除了膜表达,这些共刺激分子的可溶性形式在多种实体肿瘤患者血清中异常表达,并且与肿瘤的预后密切相关,提示这些可溶性分子在肿瘤的发生发展过程中扮演重要角色^[3]。但多种可溶性共刺激分子的比较分析在肿瘤中的研究较少。本研究对 68 例结直肠癌患者血清可溶性 PD-L1(sPD-L1)、可溶性 B7-H3(sB7-H3)、可溶性 B7-H4(sB7-H4)表达水平及与患者的临床病理参数之间的相关性进行了研究,以期探索 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 在结直肠癌肿瘤诊断及预后评判中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 血清标本收集于 2021 年 1—12 月在江苏大学附属江滨医院确诊的 68 例结直肠癌患者(结直肠癌组),年龄 38~84 岁,男 45 例,女 23 例。结直肠癌组纳入标准:(1)经病理确诊为结直肠癌;(2)术前未进行过任何放、化疗,无其他肿瘤史,且临床病理及随访信息均齐全;(3)排除其他系统的疾病。选取同期 28 例经肠镜检查确诊为良性病变(肠道息肉 5 例、慢性肠炎 23 例)患者的血清标本作为良性病变组,年龄 38~70 岁,男 17 例,女 11 例。选取同期 20 例体检健康者的血清标本作为健康对照组,年龄 30~75 岁,男 13 例,女 7 例。各组人群资料见表 1。本研究经医学伦理委员会批准,受试者均知情同意。

1.2 血清收集 采集入组者空腹静脉血 2 mL,置于含促凝剂和分离胶的真空采集管中,室温下 3 000×g 离心 15 min 后,分离血清,置于一 80 ℃冰箱冻存。禁止样本反复冻融或加热。

表 1 结直肠癌组、良性病变组及健康对照组人群资料			
病理特征	结直肠癌组 (n=68)	良性病变组 (n=28)	健康对照组 (n=20)
年龄中位数(岁)	62	55	56
性别[n(%)]			
男	45(66.2)	17(61.0)	13(65.0)
女	23(33.8)	11(39.0)	7(35.0)
分化程度[n(%)]			
高	2(2.9)	—	—
中	25(36.8)	—	—
低	41(60.3)	—	—
TNM 分期[n(%)]			
I + II 期	28(41.2)	—	—
III + IV 期	40(58.8)	—	—
淋巴结转移[n(%)]			
无	32(47.1)	—	—
有	36(52.9)	—	—

注:—表示无数据。

1.3 血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 检测 使用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测结直肠癌患者血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平。sPD-L1 表达水平检测按照人 sPD-L1 ELISA 试剂盒(英国 Abcam 公司)说明书进行。简述如下:(1)将所有检测试剂在室温平衡 30 min;(2)取 50 μL 样品、标准品、阴性对照加入酶标板微孔中,标准品浓度为 0.00、7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 pg/mL。室温孵育 1 h;(3)弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次;(4)加 100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液至每个酶标板微孔中,孵育 10 min;(5)加 100 μL 终止液,在 450 nm 读取吸光度(A 值)。sB7-H3 表达水平检测按照人 sB7-H3 检测试剂盒(苏州旭光科星抗体生物科技有限公司)说明书进行。简述如下:(1)将所有检测试剂在室温平衡 30 min;(2)取 100 μL 样品、标准品、阴性对照加入酶标板微孔中,标准品浓度为

2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63 pg/mL。室温孵育 2 h；(3)弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次；洗板；(4)加检测抗体：加入稀释好的 Antibody-Bio 每孔 100 μ L，盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。(5)弃去孔内液体，洗板 3 遍。(6)加入 Avidin-HRP 工作液每孔 100 μ L，盖上封板膜，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。(7)洗板 6 遍，弃去孔内液体。(8)加入 TMB，每孔 100 μ L，室温避光孵育约 15 min。(9)加 100 μ L 终止液，在 450 nm 读取 A 值。sB7-H4 表达水平检测按照人 sB7-H4 ELISA 试剂盒(英国 Abcam 公司)说明书进行。简述如下：(1)将所有检测试剂在室温平衡 30 min；(2)取 50 μ L 样品、标准品、阴性对照加入酶标板微孔中，标准品浓度为 0、23、47、94、188、375、750、1 500 pg/mL。室温孵育 1 h；(3)弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次；(4)加 100 μ L TMB 显色液至每个酶标板微孔中，孵育 10 min；(5)加 100 μ L 终止液，在 450 nm 读取吸光度(A 值)。最后依据标准品浓度和对应的 A 值建立标准曲线，带入样品的 A 值，计算 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 的实际表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析，GraphPad Prism 8.0.1 绘制图片。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，结直肠癌组与健康对照组和良性病

变组血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平差异采用非配对 t 检验。采用非配对 t 检验分析患者 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平与临床病理因素的差异，多样本间进行均值比较采用 ANOVA 方差分析。组间比较采用两独立样本 t 检验。计量资料的相关性研究使用 Spearman 分析。受试者工作特征(ROC)曲线分析 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平对结直肠癌的诊断效能。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平 结直肠癌组 sPD-L1 表达水平为 (0.519 ± 0.082) ng/mL，良性病变组和健康对照组 sPD-L1 表达水平分别为 (0.501 ± 0.057) 、 (0.436 ± 0.048) ng/mL，差异无统计学意义($P > 0.05$)；结直肠癌组 sB7-H3 表达水平为 (9.128 ± 0.509) ng/mL，良性病变组和健康对照组 sB7-H3 表达水平分别为 (7.029 ± 0.293) 、 (6.701 ± 0.373) ng/mL，差异有统计学意义($P < 0.05$)；结直肠癌组 sB7-H4 表达水平为 (45.093 ± 6.891) ng/mL，良性病变组和健康对照组 sB7-H4 表达水平分别为 (30.005 ± 5.271) 、 (24.684 ± 4.149) ng/mL，差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

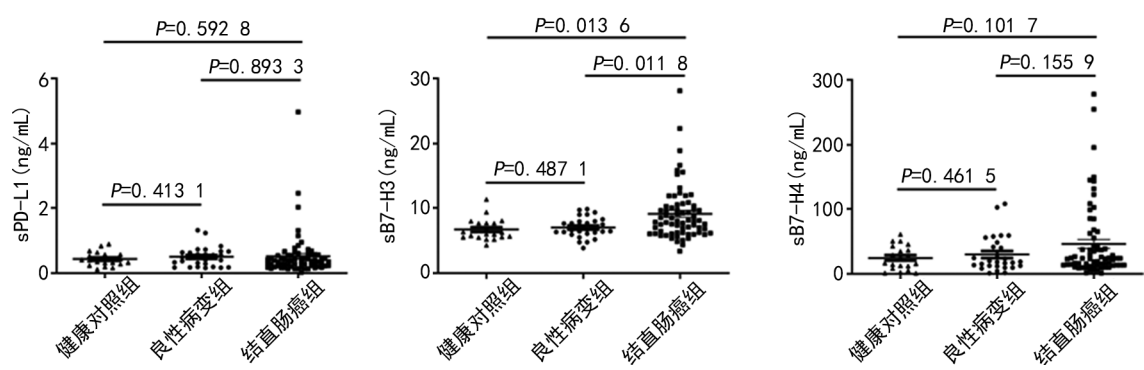


图 1 3 组血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平比较

2.2 结直肠癌患者中血清可溶性共刺激分子的诊断价值 通过 ROC 曲线分析，当 sPD-L1 作为区分结直肠癌组和良性病变组、健康对照组的诊断指标时，截断值(Cut-off 值)为 0.466 ng/mL，灵敏度为 70.59% (95%CI: 58.89% ~ 80.08%)，特异度为 45.83% (95%CI: 32.58% ~ 59.71%)。曲线下面积(AUC)为 0.5691 (95%CI: 0.4635 ~ 0.6747)， $P = 0.2062$ ；当 sB7-H3 作为区分结直肠癌组和良性病变组、健康对照组的诊断指标时，Cut-off 值为 6.940 ng/mL，灵敏度为 69.12% (95%CI: 57.36% ~ 78.83%)，特异度为 58.33% (95%CI: 44.28% ~ 71.15%)，AUC 为 0.6805 (95%CI: 0.5848 ~ 0.7761)， $P = 0.0010$ ；而当 sB7-H4 作为区分结直肠癌组和良性病变组、健康对照组的诊断指标时，Cut-off 值为 18.61 ng/mL，灵敏度为 58.82% (95%CI: 46.96% ~ 69.74%)，特异

度为 50.00% (95%CI: 36.39% ~ 63.61%)。AUC 为 0.5695 (95%CI: 0.4638 ~ 0.6753)， $P = 0.2032$ 。

2.3 结直肠癌患者血清 sPD-L1、sB7-H4、sB7-H3 表达水平与临床病理参数的关系 将 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平分别与患者的性别、年龄、肿瘤最大径、TNM 分期、分化程度及是否淋巴结转移等临床病理参数通过非配对 t 检验进行统计学分析。结果显示，sPD-L1 表达水平与患者的各种病理参数比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。sB7-H3 表达水平与患者肿瘤最大径，TNM 分期及淋巴结转移显著相关 ($P = 0.0424, 0.0063, 0.0372$)；与肿瘤最大径 < 5 cm、TNM 分期 I + II 期、无淋巴结转移患者比较，肿瘤最大径 ≥ 5 cm、TNM 分期 III + IV 期、有淋巴结转移患者血清 sB7-H3 表达水平显著增高。sB7-H4 水平则与患者 TNM 分期及有无淋巴结转移显著相关

($P=0.037\ 2, 0.007\ 8$);与 TNM 分期Ⅰ+Ⅱ期、无淋巴结转移患者比较, TNM 分期Ⅲ+Ⅳ期、有淋巴结转移的患者血清 sB7-H4 表达水平明显增加。见表 2。

表 2 血清 sPD-L1、sB7-H3、sB7-H4 表达水平与患者临床病理参数的关系

病理特征	<i>n</i>	sPD-L1 (ng/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	sB7-H3 (ng/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	sB7-H4 (ng/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄										
<60 岁	32	0.472 9	0.522 5	0.603 1	8.876	0.464 9	0.643 5	44.83	0.190 2	0.849 7
≥60 岁	36	0.559 3			9.352			47.49		
性别										
男	45	0.545 0	0.445 1	0.657 7	9.398	0.739 2	0.462 4	49.52	0.659 9	0.511 6
女	23	0.467 3			8.600			39.81		
肿瘤最大径										
<5 cm	30	0.448 0	0.763 0	0.448 2	7.971	2.070 0	0.042 4	35.29	1.413 0	0.162 3
≥5 cm	38	0.574 5			10.040			54.88		
TNM 分期										
Ⅰ+Ⅱ期	28	0.483 0	0.360 9	0.719 3	7.494	2.824 0	0.006 3	29.06	2.126 0	0.037 2
Ⅲ+Ⅳ期	40	0.543 6			10.270			58.26		
分化程度										
中、高	27	0.387 6	1.303 0	0.197 1	8.068	1.715 0	0.091 1	37.89	0.976 2	0.332 5
低	41	0.605 0			9.826			51.73		
淋巴结转移										
无	32	0.431 4	1.003 0	0.319 7	7.970	2.208 0	0.030 7	26.97	2.744 0	0.007 8
有	36	0.596 3			10.160			63.36		

3 讨 论

结直肠癌是发病率第三高的肿瘤,也是全球第二大癌症死亡原因。2020 年,全球约有 190 万新发结直肠癌患者,935 000 例结直肠癌患者死亡^[4]。多项研究表明在肿瘤细胞异常表达的 PD-L1、B7-H3、B7-H4 等共刺激分子与多种实体肿瘤的进展,及预后相关,可作为肿瘤治疗的靶点及预测肿瘤进展的分子标志^[5-9]。目前,检测这些负性共刺激分子在肿瘤细胞表达水平,主要通过对肿瘤组织进行免疫组化分析,而病理组织的取样对患者创伤较大。血清中出现的这些 B7 家族可溶性蛋白的来源被认为是肿瘤组织中高表达的细胞分泌并释放入血的。因此,血清中可溶性 B7 分子蛋白的表达水平一定程度上反映病变组织的 B7 分子表达水平,这是本课题的理论基础。

本研究结果显示,与健康对照组相比,结直肠癌组血清 sPD-L1 水平并没有显著增加,同时 sPD-L1 水平也与患者的病理参数无明显相关,这与 WU 等^[10]在胰腺癌患者中研究结果相类似。但是肿瘤患者血清 sPD-L1 水平是否与患者的临床病理参数具有相关性,不同的研究得出了不同的结论^[5,11]。这提示不同细胞表达的 PD-L1 在肿瘤进展中的作用不尽相同。很重要的一个原因是不同肿瘤组织中 PD-L1 的表达

差异很大,且很多肿瘤的 PD-L1 表达率整体较低^[12]。在非小细胞肺癌治疗中患者 PD-L1 的表达率>1%时,帕博利珠单抗(抗 PD1 单抗)就可以使一线化疗失败的肺癌患者获益^[13]。相对于 B7-H3 和 B7-H4 在多种肿瘤组织中广泛的表达,PD-L1 在肿瘤组织中的表达水平并不高^[14],这也许是 sPD-L1 在肿瘤患者血清中表达不高的原因。同样,较少的 sPD-L1 进入血液循环也使 sPD-L1 表达水平很难作为结直肠癌患者的疾病进展及预后标志物。

本研究结果显示,与肿瘤最大径<5 cm、TNM 分期Ⅰ+Ⅱ期、无淋巴结转移患者比较,肿瘤最大径≥5 cm、TNM 分期Ⅲ+Ⅳ期、有淋巴结转移患者血清 sB7-H3 表达水平显著增高,这与在卵巢癌、膀胱癌及骨癌中研究结果相一致^[3]。与 sPD-L1 不同,结直肠癌组 sB7-H3 表达水平显著高于健康对照组($P=0.013\ 6$)。同样与肠癌组织的 PD-L1 表达水平不同,有研究显示,B7-H3 在肠癌组织中有超过 50%的表达率,而在正常组织中则低表达^[6],提示 B7-H3 是一种肿瘤特异性标志物。这种肿瘤组织的表达差异很可能是血清 sB7-H3 表达具有结直肠癌诊断潜能的原因。HUANG 等^[15]研究也发现,血清 sB7-H3 与胃癌组织中肿瘤细胞来源的 B7-H3 表达具有很强的相关

性,提示 sB7-H3 主要来源于肿瘤细胞表达的膜型 B7-H3,而非肿瘤微环境中表达的膜型 B7-H3。这些研究结果提示,结直肠癌患者血清 sB7-H3 可能参与了疾病进程,其表达水平的异常增加可作为结直肠癌诊断及预后判断的潜在的分子标志。

目前有研究指出,对于 sB7-H4 在肿瘤中的诊断价值研究结论不一致,MACH 等^[7]研究发现,仅有 14% 的卵巢上皮癌患者血清中可以检测到 sB7-H4,且血清 sB7-H4 表达水平与患者的 FIGO 分级、淋巴结转移、顺铂的耐药性等病理参数无相关性。而在肝癌、肾癌的研究中,sB7-H4 与肿瘤最大径、淋巴结转移、肿瘤浸润深度、TNM 分期显著相关^[3]。本研究结直肠癌患者的 sB7-H4 表达水平高于健康对照组,但由于肿瘤患者之间差异很大(变异系数高),因此结果并无统计学意义($P=0.1017$)。有研究报道 B7-H4 与患者的肿瘤转移密切相关,包括肠癌、胰腺癌的远处转移等^[3,16]。尽管 B7-H4 介导转移的具体机制尚未明确,但 B7-H4 与肿瘤转移的发生具有很强的相关性,本研究结果也说明了除了肿瘤细胞膜表面的 B7-H4 以外、可溶性 B7-H4 也与肿瘤转移有密切关系,考虑到 sB7-H4 与肿瘤淋巴结转移显著相关($P=0.0078$),尽管血清 sB7-H4 表达水平不是诊断结直肠癌的良好分子指标,但却是预测肿瘤不良进展,特别是预测淋巴结转移的优良指标。

目前,市面上有多种可溶性共刺激分子的 ELISA 检测试剂盒,由于包被/检测抗体的不同,以及不同试剂制作过程中的差异导致同一种可溶性共刺激分子的不同检测试剂盒之间存在较大的浓度量值差异,量值溯源很难统一。因此,相对于可溶性共刺激分子的绝对表达水平,同一试剂盒检测的相对表达水平差异更具有参考价值。但随着可溶性共刺激分子应用范围的不断拓展,量值溯源,统一蛋白标准品,建立标准参考系统,更有利于可溶性共刺激分子的临床应用。

综上所述,结直肠癌患者血清 sB7-H3 表达水平显著升高,是诊断结直肠癌疾病的良好标志物。血清 sB7-H3 表达水平与患者的多项病理参数相关,可作为结直肠癌进展与预后判断的潜在分子标志,而血清 sB7-H4 表达水平则是判断结直肠癌患者是否发生淋巴结转移的优良分子标志物。

参考文献

[1] LI N, LU B, LUO C Y, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522(1): 255-268.

[2] GBD 2017 stomach cancer collaborators. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990—2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. *Lancet Gastroen-*

terol Hepatol, 2020, 5(1): 42-54.

[3] KHAN M, AROOJ S, WANG H. Soluble B7-CD28 family inhibitory immune checkpoint proteins and anti-cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 (1): 651634.

[4] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[5] ZHANG Y, LI Z J, CHEN Y X, et al. Higher serum sPD-L1 levels after radiotherapy indicate poor outcome in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Transl Oncol*, 2022, 26 (1): 101537.

[6] FLEM-KARLSEN K, FODSTAD Ø, NUNES-XAVIER CE. B7-H3 Immune checkpoint protein in Human cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(24): 4062-4086.

[7] MACH P, KIMMIG R, KASIMIR-BAUER S, et al. Association of soluble B7-H4 and circulating tumor cells in blood of advanced epithelial ovarian cancer patients[J]. *Front Oncol*, 2021, 11(1): 721067.

[8] ZHANG Y P, ZHENG J K. Functions of immune checkpoint molecules beyond immune evasion[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1248(1): 201-226.

[9] GAO Z R, LING X Y, SHI C Y, et al. Tumor immune checkpoints and their associated inhibitors[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2022, 23(10): 823-843.

[10] WU W, XIA X, CHENG C, et al. Serum soluble PD-L1, PD-L2, and B7-H5 as potential diagnostic biomarkers of human pancreatic cancer [J]. *Clin Lab*, 2021, 67 (6): 210103.

[11] NIU M K, LIU Y M, YI M, et al. Biological characteristics and clinical significance of soluble PD-1/PD-L1 and exosomal PD-L1 in cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13 (1): 827921.

[12] AI L Y, XU A T, XU J. Roles of PD-1/PD-L1 pathway: signaling, cancer, and beyond [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1248(1): 33-59.

[13] RECK M, RODRIGUEZ-ABREU D, ROBINSON A G, et al. Five-year outcomes with pembrolizumab versus chemotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score ≥ 50 [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(21): 2339-2349.

[14] SCHONIGER S, JASANI B. The PD-1/PD-L1 pathway: a perspective on comparative immuno-oncology[J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(19): 2661.

[15] HUANG L, ZHOU Y, SUN Q, et al. Evaluation of the role of soluble B7-H3 in association with membrane B7-H3 expression in gastric adenocarcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2022, 33(1): 123-129.

[16] WANG J Y, Wang W P. B7-H4, a promising target for immunotherapy[J]. *Cell Immunol*, 2020, 347(1): 104008.