

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.005

· 基础研究 ·

## 干扰 B7-H4 表达通过下调 E2F 家族相关转录因子抑制乳腺癌细胞的增殖

陈昊川, 郜赵伟, 龙敏, 刘冲, 董轲, 张惠中(空军军医大学第二附属医院 检验科, 陕西 西安 710038)

**[摘要]** **目的:** 探讨干扰 B7-H4 表达对乳腺癌细胞增殖、凋亡、周期以及相关下游分子表达的影响。**方法:** 利用脂质体转染技术分别将特异性靶向 B7-H4 的 siRNA (siB7-H4) 及其阴性对照 (siNC) 转染至对数生长期的乳腺癌 T47D 和 MCF-7 细胞, 分别命名为 T47D-siB7-H4、T47D-siNC、MCF-7-siB7-H4 和 MCF-7-siNC 组。用 qPCR 法和 WB 法验证 siRNA 干扰效果及其对细胞周期分子 cyclin D1 表达的影响, CCK-8 法和 FCM 分别检测干扰 B7-H4 表达对 T47D 和 MCF-7 细胞增殖、周期和凋亡的影响, qPCR 法检测 B7-H4 干扰对 E2F 家族相关转录因子表达的影响。**结果:** 成功构建干扰 B7-H4 表达的乳腺癌 T47D 和 MCF-7 细胞。与 T47D-siNC 和 MCF-7-siNC 组相比, T47D-siB7-H4 和 MCF-7-siB7-H4 组细胞中 B7-H4 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低、细胞增殖能力显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 并伴有 G1/S 期细胞周期阻滞以及 cyclin D1 表达下调 (均  $P < 0.01$ ), 但细胞凋亡率差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。与 T47D-siNC 相比, 干扰 B7-H4 后 T47D 细胞中 E2F1、E2F2、E2F7 和 E2F8 mRNA 水平有不同程度的降低 (均  $P < 0.01$ ); 与 MCF-7-siNC 相比, 干扰 B7-H4 后 MCF-7 细胞中 E2F1、E2F2、E2F3、E2F7 和 E2F8 mRNA 水平均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** 干扰乳腺癌细胞 B7-H4 表达可下调 cyclin D1 和 E2F 家族相关转录因子的表达, 导致细胞周期阻滞并抑制细胞增殖。

**[关键词]** 乳腺癌; B7-H4; E2F 家族; T47D 细胞; MCF-7 细胞; 增殖; 细胞周期

**[中图分类号]** R739.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)03-0195-07

## Interfering with B7-H4 expression can inhibit proliferation of breast cancer cells by down-regulating E2F family related transcription factors

CHEN Haochuan, GAO Zhaowei, LONG Min, LIU Chong, DONG Ke, ZHANG Huizhong (Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of interfering with B7-H4 expression on proliferation, apoptosis, cell cycle and expression of downstream molecules in breast cancer cells. **Methods:** Breast cancer T47D and MCF-7 cells at logarithmic phase were transfected with siRNA specifically targeting B7-H4 (siB7-H4) or its negative control (siNC) by using Lipofectamine™ 2000, namely T47D siNC, T47D-siB7-H4, MCF-7-siNC, and MCF-7-siB7-H4 group, respectively. The efficacy of siRNA interference and its effect on the expression of cyclin D1 were verified by quantitative PCR (qPCR) and Western blotting (WB). The effects of interfering with B7-H4 on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of breast cancer cell lines T47D and MCF-7 were detected by CCK-8 assays and flow cytometry, respectively. The effects of interfering with B7-H4 on the expression of E2F family related transcription factors were examined by qPCR. **Results:** The T47D and MCF-7 cell lines with B7-H4 knockdown were successfully constructed. Compared with the cells in T47D-siNC and MCF-7-siNC groups, the mRNA and protein levels of B7-H4 were significantly decreased, and the proliferation was significantly inhibited in the cells of T47D-siB7-H4 or MCF-7-siB7-H4 groups, accompanied with G1/S cell cycle arrest as well as downregulation of cyclin D1 (all  $P < 0.01$ ); however, there were no statistically significant differences in apoptotic rates (all  $P > 0.05$ ). Compared with the cells in T47D-siNC group, the mRNA levels of E2F1, E2F2, E2F7 and E2F8 in T47D cells decreased in varying degrees after interfering with B7-H4 (all  $P < 0.01$ ); compared with cells in MCF-7-siNC group, the mRNA levels of E2F1, E2F2, E2F3, E2F7 and E2F8 in MCF-7 cells also decreased in varying degrees after interfering with B7-H4 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Interfering with B7-H4 in breast cancer cells can down-regulate the expression of cyclin D1 and E2F family related transcription factors, leading to cell cycle arrest and inhibition of cell proliferation.

**[Key words]** breast cancer; B7-H4; E2F family; T47D cell; MCF-7 cell; proliferation; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(3): 195-201. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.005]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No.81772485)

**[作者简介]** 陈昊川 (1991—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗及诊断研究, E-mail: 772104496@qq.com

**[通信作者]** 张惠中, E-mail: huizz328@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,其发病率远高于肺癌和结直肠癌,是女性癌症死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。乳腺癌的发病机制复杂,影响因素多,研究其发生和发展的分子机制对乳腺癌的早期诊断和治疗具有重要意义。共抑制分子B7-H4是B7家族的重要成员,在肿瘤、炎症和自身免疫性疾病中异常表达<sup>[2-3]</sup>,其在肿瘤发生和发展过程中发挥着极其重要的作用。B7-H4通过抑制T细胞增殖和细胞因子分泌,负调控T细胞免疫反应,促进肿瘤细胞免疫逃逸<sup>[4]</sup>。研究结果<sup>[5]</sup>显示,B7-H4在多种类型肿瘤中高表达,可作为肿瘤诊断的生物标志物,与肿瘤的不良预后和高复发率密切相关。然而,目前B7-H4在乳腺癌发生和发展中的作用及其机制尚未完全阐明。本研究以乳腺癌细胞T47D和MCF-7为研究对象,使用siRNA干扰B7-H4的表达,通过体外实验探究B7-H4对两种乳腺癌细胞增殖、凋亡、周期以及相关下游分子表达的影响,明确B7-H4与乳腺癌细胞恶性生物学行为之间的关系,为揭示B7-H4在乳腺癌发生和发展中的作用及其机制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

人乳腺癌细胞系T47D和MCF-7购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自Excell Bio公司,Lipofectamine™ 2000试剂盒购自Invitrogen公司,TRIzol试剂购自TaKaRa公司,逆转录试剂盒购自奥科生物有限公司,qPCR试剂购自Abm生物科技有限公司,引物由西安擎科泽西生物技术有限公司合成,BCA蛋白定量试剂盒购自北京鼎国昌盛公司,SDS-PAGE凝胶试剂、RIPA裂解液购自

碧云天生物技术有限公司,鼠抗人B7-H4单克隆抗体购自Proteintech公司,鼠抗人β-actin单克隆抗体、HRP标记的山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG二抗均购自北京中杉金桥公司,兔抗cyclin D1抗体(ab16663)购自Abcam公司,CCK-8细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物公司。siRNA由上海生工生物工程公司合成。siB7-H4序列:正义链为5'-GCU CUACAAUGUUACGAUCAATT-3',反义链为UUG AUCGUAACAUGUAGAGCTT;siNC序列:正义链为5'-UUCUCCGAACGUG UCACGUTT-3',反义链为5'-ACGUGACACG UUCGGAGAATT-3'。

### 1.2 细胞培养、转染和分组

乳腺癌T47D和MCF-7细胞均在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。转染前一天按照3×10<sup>5</sup>个/孔(MCF-7细胞)或4×10<sup>5</sup>个/孔(T47D细胞)接种于6孔板。根据Lipofectamine™ 2000使用手册将siRNA(siB7-H4)及其阴性对照(siNC)转染至MCF-7和T47D细胞,分别命名为T47D-siNC、T47D-siB7-H4、MCF-7-siNC、MCF-7-siB7-H4组。每孔脂质体5 μL、siRNA 100 pmol/L(opti-MEM稀释),继续培养6 h后更换为DMEM完全培养基。

### 1.3 qPCR法检测乳腺癌细胞中B7-H4、cyclin D1和E2F家族相关转录因子mRNA的表达

收集转染48 h后的各组细胞,用TRIzol提取各组细胞总RNA,并逆转录为cDNA,以β-actin为内参,进行qPCR实验比较目的基因mRNA表达水平差异变化。引物序列见表1。qPCR反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,60℃退火和延伸1 min,共40个循环。以β-actin为参照,采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算各目的基因mRNA的相对表达量。

表1 qPCR引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
β-actin	CTTCGCGGGCGACGAT	CCACATAGGAATCCTTCTGACC
B7-H4	CGCTGCTAATTGACTGCCAC	GCCGACTGCTCTGTTTATGC
Cyclin D1	GAAGGAGACCATCCCCCTGA	GAAATCGTGCGGGGTCATTG
E2F1	ACGCTATGAGACCTCACTGAA	TCCTGGGTCAACCCCTCAAG
E2F2	CGTCCCTGAGTTCCCAACC	GCGAAGTGTCAACCCGAGTCTT
E2F3	AGAAAGCGGTCATCAGTACCT	TGGACTTCGTAGTGCAGCTCT
E2F4	ATCGGGCTAATCGAGAAAAAGTC	TGCTGGTCTAGTTCTTGCTCC
E2F5	TGGCAACTCAAAATCTGCCTG	TTGTAGTCATCTGCCGGGGTA
E2F6	TCCATGAACAGATCGTCATTGC	TCCGTTGGTGTCTCCTTATGTG
E2F7	AAAGGGACTATTCCGACCCAT	ACTTGGATAGCGAGCTAGAAACT
E2F8	AAGTACGCCGAGCAGATTATG	ATGTCTGGGTGTCCAATTTGGG

### 1.4 WB法检测乳腺癌细胞中B7-H4和cyclin D1蛋白的表达

收集转染48 h后的各组细胞,PBS清洗后,加入含1% PMSF的RIPA裂解液,提取细胞总蛋白,并用

BCA法测定蛋白浓度。取20 μg蛋白样品进行SDS-PAGE,将蛋白质转移至NC膜上,在5%脱脂奶粉中4℃封闭过夜。次日,加入鼠抗人B7-H4抗体(1:500)、兔抗人cyclin D1抗体(1:200)、鼠抗人β-actin抗体(1:1000),室温中处理2h。TBST洗涤3次(10 min/次),后用HRP标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠IgG二抗(1:5000)室温孵育2h, TBST洗涤后,加入电化学发光液通过自动呈像仪(Bio-Rad公司)显影,采用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

### 1.5 CCK-8法检测乳腺癌细胞的增殖能力

将各组细胞接种于96孔培养板中,其中MCF-7-siNC和MCF-7-siB7-H4为 $5 \times 10^3$ 个细胞/孔, T47D-siNC和T47D-siB7-H4为 $7.5 \times 10^3$ 个细胞/孔,每孔加100 μL培养基,每组设5个复孔,继续培养,分别在24、48、72 h时将10 μL CCK-8溶液加入培养孔中,继续培养2 h后上酶标仪450 nm波长处检测每孔的光密度(D)值,以D值代表细胞增殖水平。

### 1.6 FCM检测乳腺癌细胞的凋亡水平和细胞周期

转染细胞培养48 h后,经胰酶消化并收集细胞, PBS洗涤2次,弃上清液。利用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒处理细胞:用500 μL结合缓冲液悬浮细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,混

匀,室温下避光处理15 min,1 h内上流式细胞仪检测。利用细胞周期检测试剂盒处理细胞:用500 μL 75%乙醇固定细胞2 h, PBS洗涤2次后,加入450 μL PI和50 μL RNase A,混匀后室温避光处理30~60 min,上流式细胞仪分析细胞的周期分布情况。

### 1.7 统计学处理

qPCR法、WB法、CCK-8法、FCM等实验均重复3次。采用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验和近似t检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建干扰B7-H4表达的T47D和MCF-7细胞

qPCR法和WB法检测结果(图1)显示,与T47D-siNC和MCF-7-siNC组相比, T47D-siB7-H4、MCF-7-siB7-H4组细胞中B7-H4 mRNA和蛋白表达水平均显著下降(均 $P < 0.01$ )。结果表明,通过转染特异性siRNA,成功构建干扰B7-H4表达的乳腺癌T47D和MCF-7细胞系,可以进行后续实验。

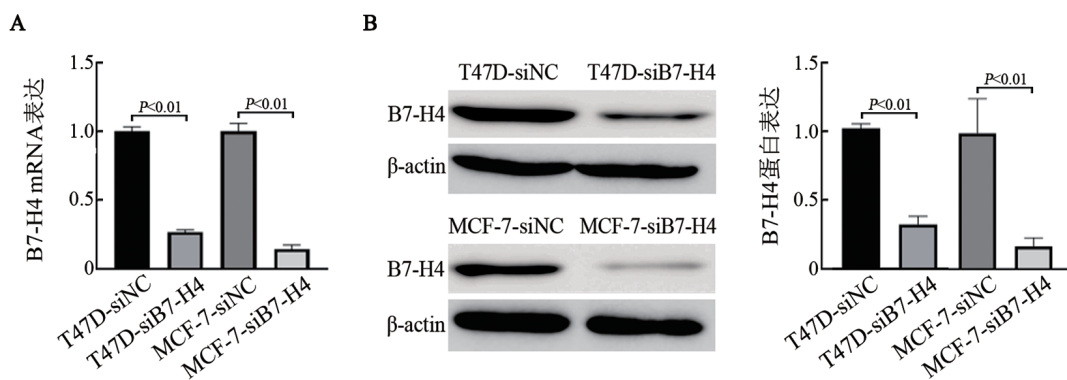


图1 转染siRNA后各组细胞B7-H4 mRNA(A)和蛋白(B)表达水平

### 2.2 干扰B7-H4表达显著抑制T47D和MCF-7细胞的增殖能力

CCK-8法检测结果(图2)显示, T47D-siB7-H4组细胞增殖能力显著低于T47D-siNC组( $P < 0.01$ ); MCF-7-siB7-H4组细胞增殖能力显著低于MCF-7-siNC组( $P < 0.01$ )。结果表明,干扰B7-H4表达显著抑制了乳腺癌T47D和MCF-7细胞的增殖能力。

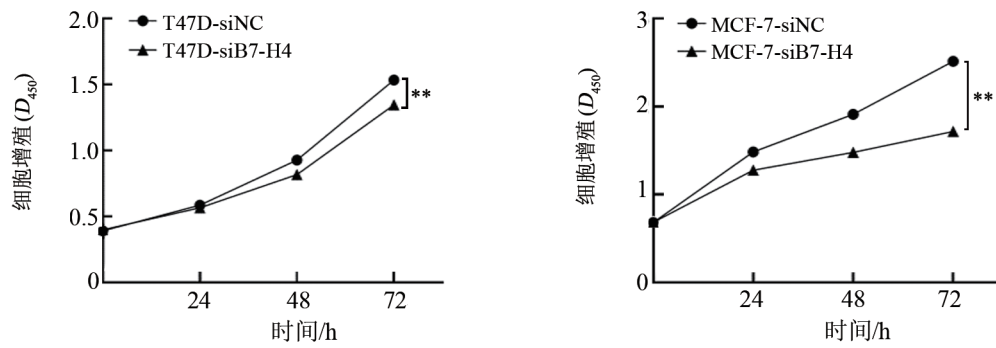
### 2.3 干扰B7-H4表达可使T47D和MCF-7细胞发生G1/S期阻滞

FCM检测结果显示,与T47D-siNC组相比, T47D-siB7-H4组细胞中处于G1期细胞百分比显著

增加[(73.05±3.52)% vs (66.55±1.17)% ,  $P < 0.01$ ; 图3A];与MCF-7-siNC组相比, MCF-7-siB7-H4组细胞中处于G1期细胞百分比显著增加[(67.56±1.85)% vs (56.68±0.31)% ,  $P < 0.01$ ; 图3B]。结果表明,干扰B7-H4表达可使乳腺癌T47D和MCF-7细胞发生G1/S期阻滞。

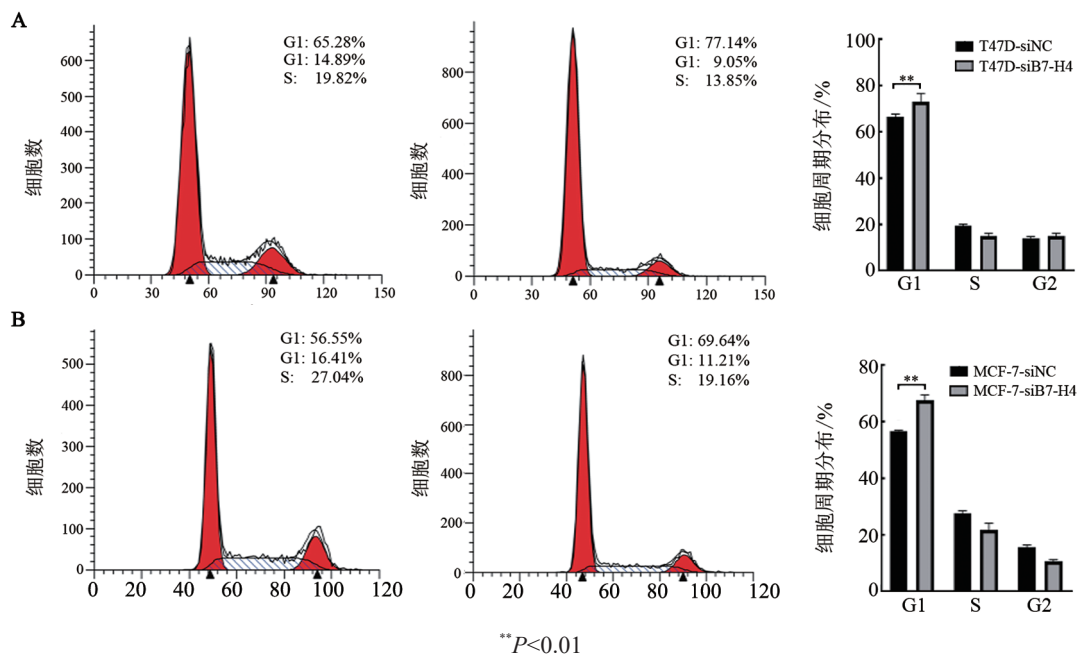
### 2.4 B7-H4表达下调抑制cyclin D1表达

WB实验结果(图4)显示,与T47D-siNC和MCF-7-siNC组相比, T47D-siB7-H4和MCF-7-siB7-H4组细胞中cyclin D1 mRNA和蛋白表达水平均显著下降(均 $P < 0.01$ )。以上结果表明,干扰B7-H4表达能够下调乳腺癌细胞cyclin D1的表达。



与T47D-siNC或MCF-7-siNC组比较, \*\* $P < 0.01$

图2 干扰B7-H4表达对T47D和MCF-7细胞增殖的影响



\*\* $P < 0.01$

图3 干扰B7-H4表达对T47D(A)和MCF-7(B)细胞周期的影响

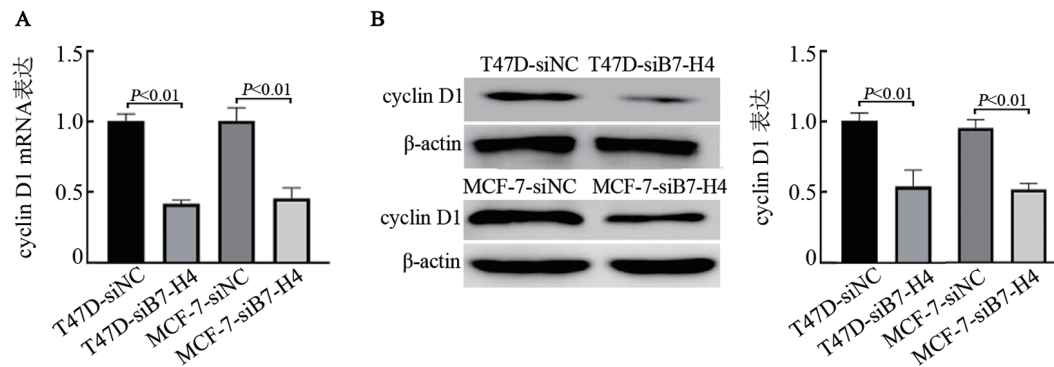


图4 干扰B7-H4表达对T47D和MCF-7细胞cyclin D1 mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响

### 2.5 干扰B7-H4表达对E2F家族相关转录因子表达的影响

qPCR法检测结果(图5)显示,与T47D-siNC组相比, T47D-siB7-H4组细胞中E2F1、E2F2、E2F7和E2F8 mRNA水平有不同程度的降低(均 $P < 0.01$ );与

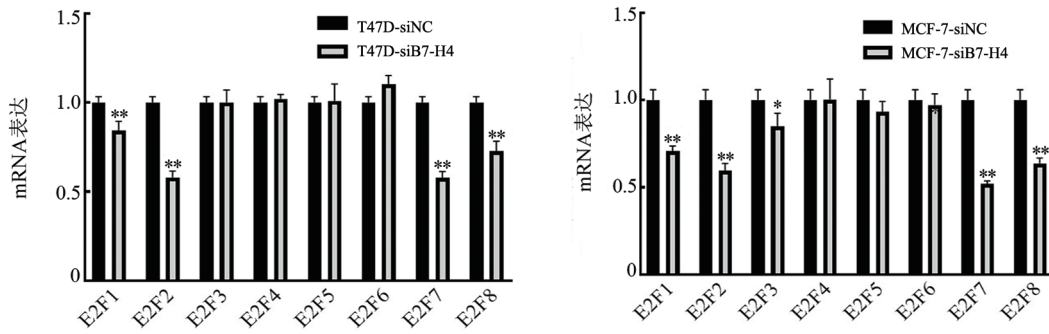
MCF-siNC组相比, MCF-7-B7-H4组细胞中E2F1、E2F2、E2F3、E2F7和E2F8 mRNA水平有不同程度的降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。其中, E2F1、E2F2、E2F7和E2F8为两细胞系干扰B7-H4后共同下调的E2F家族转录因子。



2.6 干扰B7-H4表达对T47D和MCF-7细胞的凋亡无影响

FCM检测结果(图6)显示,与T47D-siNC和MCF-7-siNC组相比,T47D-siB7-H4和MCF-7-siB7-H4

组细胞的凋亡率差异无统计学意义(均 $P>0.05$ )。结果表明,干扰B7-H4表达对乳腺癌T47D和MCF-7细胞的凋亡无显著影响。



与T47D-siNC或MCF-7-siNC组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$   
图5 干扰B7-H4表达对E2F转录因子家族表达的影响

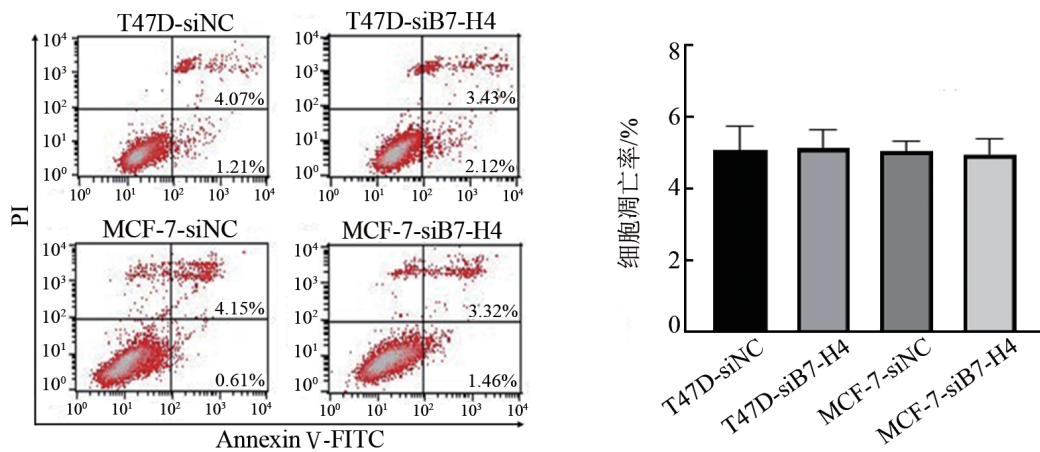


图6 干扰B7-H4表达对T47D和MCF-7细胞凋亡无显著影响

3 讨论

B7-H4与B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、B7-H1/PD-L1(CD274)、ICOS-L/B7-H2(CD275)、B7-H3(CD276)等同属B7家族成员,在多种肿瘤的发生与发展中起重要作用。B7-H4在宫颈癌、食管癌、黑色素瘤、尿路上皮细胞癌、肾细胞癌、非小细胞肺癌和肝癌等多种肿瘤中均有异常表达<sup>[6]</sup>,且在几乎所有乳腺浸润性导管癌和小叶乳腺癌中高表达<sup>[7]</sup>。B7-H4与宫颈癌患者总生存期和无病生存期呈负相关,在卵巢癌患者血清中水平升高,是一种有应用前景的卵巢癌标志物<sup>[8-10]</sup>。HAO等<sup>[11]</sup>的研究结果显示,抑制B7-H4通过激活PI3K信号通路促进肝细胞癌细胞凋亡和自噬。作为B7家族的成员,研究者常聚焦于其在肿瘤微环境中所扮演的免疫抑制角色。B7-H4的过表达通过上调CXCL8募集肿瘤相关嗜中性粒细胞促进肾细胞癌进展<sup>[12]</sup>,并且与转移性结直肠癌中

免疫细胞浸润和不良预后相关<sup>[13]</sup>。DANGAJ等<sup>[14]</sup>认为,阻断B7-H4和受体相互作用是一种可行的肿瘤治疗策略,然而B7-H4的受体分子仍不明确<sup>[3]</sup>。在肿瘤治疗中,针对B7-H4已经开发了几种策略,包括抗体、CAR-T细胞和药物偶联物等。由于在三阴性乳腺癌组织中存在较高水平的PD-L1<sup>[15]</sup>,因此抑制B7-H4糖基化可与化疗和PD-L1阻断相结合,从而控制肿瘤细胞增殖<sup>[16]</sup>;抗B7-H4协同曲妥珠单抗治疗可促进巨噬细胞吞噬作用并根除乳腺癌<sup>[17]</sup>。据报道<sup>[18]</sup>,B7-H4是一种不稳定的细胞表面抗原,可能不适合作为抗体依赖的细胞毒性或单克隆抗体药物的靶点。因此,对B7-H4在肿瘤发生与发展中的作用及机制研究可以为免疫治疗药物的研发提供新的思路和途径。

本文利用特异性靶向B7-H4的siRNA成功干扰了乳腺癌MCF-7和T47D细胞中B7-H4的表达,研究结果显示,干扰B7-H4的表达后,MCF-7和T47D细

胞的增殖受到显著抑制,发生G1/S期阻滞并伴有cyclin D1表达的降低,这与在肝癌<sup>[19]</sup>、结直肠癌<sup>[20]</sup>、胃癌<sup>[21]</sup>中的研究报道一致。此外,本实验中干扰B7-H4表达后对2种乳腺癌细胞的凋亡无显著影响,这与之之前其他研究报道不符,如干扰B7-H4表达可以促进胃癌MGC-803细胞<sup>[21]</sup>和结直肠癌HT-29细胞凋亡<sup>[20]</sup>。B7-H4作为肿瘤微环境中的免疫抑制因子,可通过抑制肿瘤微环境中的CD8<sup>+</sup>T细胞的抗肿瘤作用来帮助肿瘤细胞发生免疫逃逸,从而促进肿瘤的发生发展。本研究中,干扰的是乳腺癌细胞自身B7-H4的表达,在体外培养环境中无法体现干扰B7-H4表达对乳腺癌细胞肿瘤微环境中浸润的免疫细胞的影响,如CD8<sup>+</sup>T细胞诱导的肿瘤细胞凋亡,这可能是本实验中干扰B7-H4对乳腺癌细胞凋亡无直接影响的原因,也表明B7-H4的作用存在肿瘤特异性,即在不同类型肿瘤中的作用不一致,因此针对B7-H4在乳腺癌中的作用及其机制需要更广泛的研究。

细胞异常增殖是恶性肿瘤的重要特征之一,若无有效控制,肿瘤细胞会逐渐侵犯和破坏其周围的组织和器官,并向远处组织器官转移<sup>[22]</sup>。乳腺癌是由乳腺上皮细胞发生增殖失控、进而恶变形成,是世界女性最常见的恶性肿瘤。细胞增殖涉及受到高度调控的一系列事件,在此过程中细胞中的遗传信息被复制并最终分裂成两个子细胞。标志着细胞从G1期向S期过渡的最关键事件是E2F家族相关转录因子调控的转录程序的激活<sup>[23]</sup>,在G1末期,E2F家族的成员会刺激数百个基因的表达,促进DNA复制,并促进细胞周期的不可逆进程<sup>[24]</sup>。E2F家族由8个成员(E2F1~8)组成,成员可分为转录激活因子和转录抑制因子。E2F1和E2F2是转录激活因子,他们驱动基因表达促进细胞从G1期有序过渡到S期,从而促进细胞增殖;E2F7和E2F8虽被归类为“抑制型”E2F成员,但与经典的E2F家族抑制因子不同,他们的表达与细胞的高增殖率相关<sup>[25]</sup>。本实验中干扰乳腺癌细胞B7-H4的表达后,MCF-7和T47D细胞中E2F1、E2F2、E2F7、E2F8 mRNA表达水平都有不同程度的下调。不论是E2F家族的转录激活因子成员E2F1和E2F2还是E2F家族非典型抑制成员E2F7和E2F8,他们表达水平的下降与干扰B7-H4表达导致的细胞周期阻滞及细胞增殖抑制的现象相一致。该结果为进一步探索B7-H4在乳腺癌发生与发展的具体机制提供了研究方向,为下一步研发针对B7-H4的新治疗方式奠定了初步实验基础。

综上所述,B7-H4无论是通过间接参与免疫调控亦或是直接促进肿瘤细胞进展,都表明它是肿瘤发生与发展中的重要分子,干扰B7-H4表达可下调

cyclin D1和E2F家族相关转录因子的表达,导致乳腺癌细胞的细胞周期阻滞,并抑制细胞增殖,对其凋亡无显著影响。此研究为后续B7-H4在乳腺癌的诊断和治疗中的应用提供了实验依据。当然,本实验的研究结果仍需进一步进行体内实验验证。

## [参考文献]

- [1] 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. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] CEERAZ S, NOWAK E C, NOELLE R J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(11): 556-563. DOI:10.1016/j.it.2013.07.003.
- [3] GREENWALD R J, FREEMAN G J, SHARPE A H. The B7 family revisited[J/OL]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 515-548[2021-08-23]. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611>. DOI:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.
- [4] WANG S D, CHEN L P. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(8): 759-766. DOI:10.1016/j.micinf.2004.03.007.
- [5] WANG J Y, WANG W P. B7-H4, a promising target for immunotherapy [J/OL]. *Cell Immunol*, 2020, 347: 104008[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733822/>. DOI:10.1016/j.cellimm.2019.104008.
- [6] ZHANG L, WU H, LU D, *et al.* The costimulatory molecule B7-H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus[J/OL]. *Oncogene*, 2013, 32(46): 5347-5358[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898118/>. DOI: 10.1038/onc.2012.600.
- [7] TRINGLER B, ZHUO S Q, PILKINGTON G, *et al.* B7-H4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1842-1848. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-04-1658.
- [8] SIMON I, ZHUO S Q, 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. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-3550.
- [9] 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. DOI:10.1016/j.yexcr.2005.01.018.
- [10] FUKUDA T, KAMAI, MASUDA A, *et al.* Higher preoperative serum levels of PD-L1 and B7-H4 are associated with invasive and metastatic potential and predictable for poor response to VEGF-targeted therapy and unfavorable prognosis of renal cell carcinoma [J/OL]. *Cancer Med*, 2016, 5(8): 1810-1820[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971909/>. DOI: 10.1002/cam4.754.
- [11] HAO T T, LIAO R, LEI D L, *et al.* Inhibition of B7-H4 promotes hepatocellular carcinoma cell apoptosis and autophagy through the PI3K signaling pathway[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106889[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32805693/>. DOI:10.1016/j.intimp.2020.106889.

- [12] LI A Q, ZHANG N Y, ZHAO Z M, *et al.* Overexpression of B7-H4 promotes renal cell carcinoma progression by recruiting tumor-associated neutrophils *via* upregulation of CXCL8[J/OL]. *Oncol Lett*, 2020, 20(2): 1535-1544[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7377185/>. DOI:10.3892/ol.2020.11701.
- [13] DING S S, LV X L, LIU Z J, *et al.* Overexpression of B7-H4 is associated with infiltrating immune cells and poor prognosis in metastatic colorectal cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107144. DOI:10.1016/j.intimp.2020.107144.
- [14] DANGAJ D, LANITIS E, ZHAO A Z, *et al.* Novel recombinant human B7-H4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses[J/OL]. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4820-4829[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732560/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3457.
- [15] 戴毅君, 邱燕如, 江振健, 等. 三阴性乳腺癌组织中PD-L1和CD8<sup>+</sup>TIL的水平及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(9): 920-925. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.009.
- [16] SONG X X, ZHOU Z, LI H C, *et al.* Pharmacologic suppression of B7-H4 glycosylation restores antitumor immunity in immune-cold breast cancers[J/OL]. *Cancer Discov*, 2020, 10(12): 1872-1893[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7710601/>. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-0402.
- [17] HU X C, LIU Y W, ZHANG X S, *et al.* The anti-B7-H4 checkpoint synergizes trastuzumab treatment to promote phagocytosis and eradicate breast cancer[J/OL]. *Neoplasia*, 2020, 22(11): 539-553[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7509589/>. DOI:10.1016/j.neo.2020.08.007.
- [18] KAUR G, JANAKIRAM M. B7x-from bench to bedside[J/OL]. *ESMO Open*, 2019, 4(5): e000554[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6735664/>. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000554.
- [19] DONG L J, XIE L L, LI M J, *et al.* Downregulation of B7-H4 suppresses tumor progression of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14854[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6795893/>. DOI:10.1038/s41598-019-51253-2.
- [20] LI C, ZHAN Y D, MA X Z, *et al.* B7-H4 facilitates proliferation and metastasis of colorectal carcinoma cell through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Clin Exp Med*, 2020, 20(1): 79-86. DOI:10.1007/s10238-019-00590-7.
- [21] ZHOU D H, ZHOU Y, LI C, *et al.* Silencing of B7-H4 suppresses the tumorigenicity of the MGC-803 human gastric cancer cell line and promotes cell apoptosis *via* the mitochondrial signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(4): 1267-1276. DOI:10.3892/ijo.2018.4274.
- [22] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [23] KENT L N, LEONE G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(6): 326-338. DOI: 10.1038/s41568-019-0143-7.
- [24] BERTOLI C, SKOTHEIM J M, DE BRUIN R A M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(8): 518-528. DOI:10.1038/nrm3629.
- [25] EMANUELE M J, ENRICO T P, MOUERY R D, *et al.* Complex cartography: regulation of E2F transcription factors by cyclin F and ubiquitin[J/OL]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(8): 640-652[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7859860/>. DOI:10.1016/j.tcb.2020.05.002.

[收稿日期] 2021-08-24

[修回日期] 2022-01-18

[本文编辑] 党瑞山