

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.007

共刺激分子 B7-H4 在宫颈癌中的表达及意义 *

卢文 唐丽萍[△] 胡晓君 刘倩 邵嘉艺 李晓梅 马敬全

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇二科 黑龙江 哈尔滨 150006)

摘要 目的:肿瘤微环境中免疫共刺激分子 B7-H4 与其配体结合后可提供免疫抑制信号,调控肿瘤组织中的免疫应答。本研究探讨 B7-H4、Fas 及 Caspase-3 裂解片段在宫颈鳞状细胞癌中的表达及其与临床病理因素的关系,分析其参与肿瘤免疫逃逸的机制。**方法:**应用免疫组织化学 SP 法检测 23 例正常宫颈上皮、38 例宫颈上皮内瘤变(CIN)和 132 例宫颈鳞状细胞癌组织中 B7-H4、Fas 及 Caspase-3 裂解片段的表达水平,分析其与宫颈癌各临床病理因素的相关性。**结果:**B7-H4 在正常宫颈上皮组织中不表达,在 CIN 组织中微弱表达,在宫颈鳞状细胞癌组织中高表达。B7-H4 表达与肿瘤的临床分期、淋巴结转移、原发肿瘤大小和肿瘤浸润深度有关,B7-H4 与 Fas 蛋白表达呈现负相关,与 Caspase-3 裂解片段存在共表达关系。**结论:**B7-H4 在宫颈鳞状细胞癌中过表达可引起 Fas 蛋白表达下调和 Caspase-3 裂解片段增多,抑制肿瘤细胞发生凋亡,参与肿瘤逃避宿主的免疫监视,从而促发宫颈癌的发生和发展。阻断 B7-H4 通路途径,有望成为宫颈鳞状细胞癌治疗的新靶点。

关键词:B7-H4;Fas;Caspase-3 裂解片段;宫颈癌;免疫逃逸

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)13-2426-05

Expression of Costimulatory Molecule B7-H4 and Its Significance in Cervical Carcinoma*

LU Wen, TANG Li-ping[△], HU Xiao-jun, LIU Qian, SHAO Jia-yi, LI Xiao-mei, MA Jing-quan

(The Second Department of Gynecology, the Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150006, China)

ABSTRACT Objective: Immune costimulatory molecules B7-H4 binds with its ligand in the tumor micro-environment, which provides immune inhibitory signals, and further controls the immune response in tumor tissues. In this paper, we examined the expressions of B7-H4, Fas and Caspase-3 cleavage in cervical squamous cell carcinoma and tried to figure out their connections with its clinical pathological factors to obtain the mechanism of tumor cell immune escape. **Methods:** Immunohistochemical method (SP) was applied to detect the expression levels of B7-H4, Fas and Caspase-3 cleavage in 23 normal cases of normal cervical epithelium, 38 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 132 cases of cervical squamous cancer cells, then analyzed its correlation with the clinicopathological factors in cervical cancer. **Results:** B7-H4 showed no expression in normal cervical epithelial tissues, showed weak expression in CIN tissues and high expression in cervical squamous cell carcinoma; B7-H4 expression was directly related to the clinical stage, lymph node metastasis, primary tumor size and depth of tumor invasion. B7-H4 showed negative correlation with the expression of Fas protein, and shared a co-expression with Caspase-3 cleavage. **Conclusion:** B7-H4 showing excessive expressions in cervical squamous cell carcinoma will lead to down-regulations of Fas protein expression and increases of Caspase-3 cleavage. All these worked together induced tumor evading of host immune surveillance, thus inhibiting the apoptosis of tumor cells, which promotes the occurrence and deterioration of cervical cancer. Blocking the B7-H4 pathway is expected to become a new target in the treatment of cervical squamous cell carcinoma.

Key words: B7-H4; Fas; Caspase-3 cleavage; Cervical cancer; Immune Escape

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2426-05

前言

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病是一个长期而复杂的过程。研究表明,宫颈癌的发生发展是由各种致癌因子(如 HPV 病毒等),并在其他高危因素影响下,经由不同的机制激活原癌基因使其异常表达,抑制抑癌基因的正常表达,使子宫颈细胞的生长增殖与凋亡失调所致^[1]。因此,寻找新的宫

癌分子标志物,提高癌前筛查率及诊断率具有十分重要的意义。

B7 家族新成员 B7-H4 是 T 淋巴细胞免疫应答的负性调节因子,可抑制 T 细胞的增殖活化,促使肿瘤细胞发生逃逸^[2]。Fas 是介导细胞凋亡的重要信号受体,它与 FasL 结合可以启动凋亡信号通路引起细胞凋亡^[3]。Caspase-3 是 Caspase 家族中的重要成员,Caspase-3 裂解片段是细胞凋亡的关键执行因子,在细胞凋亡的终末阶段发挥作用,调节着肿瘤细胞再生^[4]。本研究

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201136);黑龙江省博士后科学研究基金项目(LBH-Z06252)

作者简介:卢文(1990-),硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤的治疗,E-mail: Berkeley_lu@163.com

[△] 通讯作者:唐丽萍,电话:0451-86298380,E-mail: hanzhigang@medmail.com.cn

(收稿日期:2016-05-23 接受日期:2016-06-18)

通过分析宫颈鳞状细胞癌中 B7-H4、Fas 和 Caspase-3 裂解片段异常表达与宫颈癌临床病理因素的相关性,探讨 B7-H4 通过 Fas 途径抑制肿瘤细胞凋亡,从而实现宫颈癌免疫逃逸的可能性,为宫颈癌的进一步研究提供重要的理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 2010 年至 2013 年的石蜡包埋标本,根据宫颈癌 FIGO 分期(2009)I-IV 宫颈癌组织 132 例,患者年龄 22~73 岁;CIN38 例,患者年龄 33~64 岁;正常宫颈组织 23 例,年龄 36~65 岁,所有标本临床病理资料完整。

1.2 主要试剂

表 1 光镜下细胞阳性表达数评分

Table 1 The grading of positive expression cell number under OM	
Number of positive cells(%)	Score
<10	0
10~25	1
26~50	2
51~75	3
>75	4

根据表 1 和表 2,计算出阳性细胞数与相应染色强度的乘积,从而判定染色结果:0~1 分判定为阴性;2~7 分判定为阳性,其中 2~5 分定为 +~++,>6 分为定 +++。Fas 阳性细胞在胞细膜和 / 或细胞质为棕黄色,无染色为阴性细胞,Caspase-3 阳性细胞均表现为胞浆呈棕黄或棕褐色,而胞核、胞膜无着色者为阴性细胞。染色结果判断标准同上述。

1.5 统计学处理

数据处理采用 SPSS 21.0 软件进行,其中三组数据间的两两比较标准为 χ^2 检验,两组数据间相关性分析采用 Spearman 等级分析,在 $\alpha=0.05$ 检验水准下以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4 在正常宫颈上皮、CIN 和宫颈鳞状细胞癌组织中的表达及其与临床病理因素的关系

B7-H4 正常宫颈上皮组织切片中无明显表达,在 CIN 中少部分表达呈浅黄色,在宫颈鳞状细胞癌细胞中大量表达呈棕黄色(图 A),各组间阳性表达率及表达例数见表 3。B7-H4 在宫颈癌中的表达明显高于正常宫颈组织及 CIN 组,并随正常宫颈上皮组织、CIN、子宫颈癌的发展而升高,差异具有显著性($P<0.05$)。

B7-H4 在宫颈癌不同临床病理分级组织标本中均有表达,如表 4 所示,不同临床分期的宫颈癌组织中 B7-H4 的阳性表达率存在显著统计学差异($P<0.05$),且随临床期别的进展,B7-H4 的表达逐渐增高。在 36 例有淋巴结转移的宫颈癌组织中 B7-H4 蛋白的阳性表达率为 75.0%(27/36),而 96 例无淋巴结转移的宫颈癌组织 B7-H4 蛋白的阳性表达率为 34.84%(33/96),有淋巴结转移的宫颈癌组织中 B7-H4 的阳性表达率

B7-H4 单克隆抗体(稀释度 1:100)、Fas 单克隆抗体、Caspase-3 裂解片段单克隆抗体(稀释度 1:100)及 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物有限公司。

1.3 免疫组化

免疫组织化学染色(SP)法,严格按照试剂盒说明步骤操作,将石蜡包埋蜡块行 4 μm 连续切片,切片常规脱蜡;切片置于柠檬酸盐缓冲液中进行抗原微波热修复,DAB 显色,用已知阳性片(大肠腺癌组织)作阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

常规光学显微镜(Optical microscope, OM)下 B7-H4 的表达在肿瘤细胞膜和 / 或细胞质为棕黄色颗粒。对实验染色结果判断标准拟用半定量分级法^[9],具体标准如表 1 及表 2 所示。

表 2 光镜下细胞染色强度评分

Table 2 The grading of cell staining intensity under OM	
Cell staining intensity	Score
Negative	0
Light yellow	1
Tan	2
Brown	3

显著高于无淋巴结转移的宫颈癌组织,差异具有显著性($P<0.05$)。在不同肿瘤大小及浸润深度的宫颈癌组织中,B7-H4 的表达有显著差异($P<0.05$);在不同分化程度的宫颈癌组织中差异无显著性($P<0.05$)。因此,B7-H4 在宫颈鳞状细胞癌中的表达与临床分期、淋巴结转移、原发肿瘤大小和肿瘤浸润深度相关,与分化程度没有明显相关性。

2.2 正常宫颈上皮、CIN 和宫颈鳞状细胞癌组织中 Fas 和 Caspase-3 裂解片段的表达

Fas 阳性颗粒主要位于细胞膜及细胞质(图 B),Fas 在正常宫颈上皮组织、CIN 和宫颈鳞状细胞癌中均有表达(如表 3),三组间比较差异具有统计学意义($\chi^2=7.22, P<0.05$),宫颈癌与 CIN 组之间比较差异无统计学意义($\chi^2=1.016, P>0.05$)。在正常宫颈上皮组织、CIN 和宫颈鳞状细胞癌组织标本中 Caspase-3 裂解片段均有阳性表达,上皮细胞和间质中均有表达,主要以上皮细胞胞质表达为主(图 C),23 例正常宫颈组织中,Caspase-3 表达阳性 7 例,阳性率 30.4%;38 例 CIN 组织中,Caspase-3 表达阳性 15 例,阳性率 39.5%;132 例宫颈鳞癌组织中,Caspase-3 裂解片段表达阳性 103 例,阳性率 78.0%。宫颈癌组 Caspase-3 的表达低于正常宫颈上皮组织、CIN 组,三组间表达差异有统计学意义($\chi^2=21.54, P<0.01$)。正常宫颈上皮组织中 Caspase-3 裂解片段的表达与 CIN 组和宫颈癌组比较差异具有统计学意义($\chi^2=5.96; \chi^2=6.33, P<0.05$),如表 3 所示。

2.3 宫颈鳞状细胞癌组织中 B7-H4 与 Fas、Caspase-3 裂解片段表达的相关性

132 例宫颈鳞状细胞癌组织中,B7-H4 阳性 62 例,其中 B7-H4 表达阳性、Fas 表达阴性 48 例,Fas 表达阳性、B7-H4 表达阴性 49 例,B7-H4 与 Caspase-3 裂解片段共同阳性 54 例,共同阴性 24 例,共阳性率 40.9%,共阴性率 18.2%,结果显示,

B7-H4 表达与 Fas 表达呈负相关,B7-H4 与 Caspase-3 裂解片段存在共表达(P<0.05,表 5)。

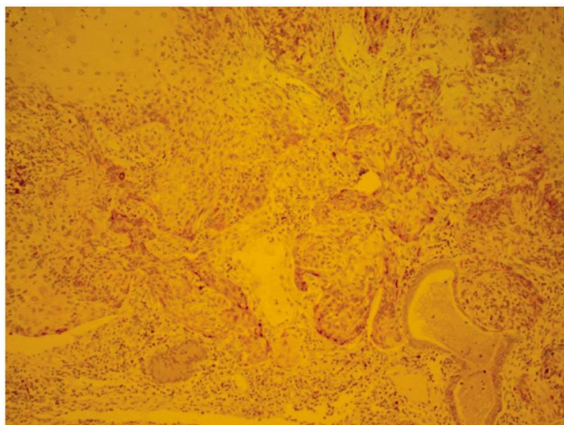


图 A1 宫颈鳞状细胞癌中 B7-H4 的表达(× 100)
Fig.A1Positive expression of B7-H4 in SCC(× 100)

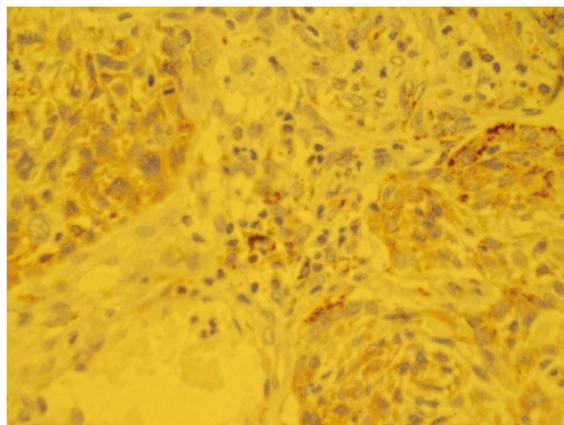


图 A2 宫颈鳞状细胞癌中 B7-H4 的表达(× 400)
Fig.A2Positive expression of B7-H4 in SCC(× 400)

表 3 正常宫颈上皮、CIN 及宫颈鳞状细胞癌中 B7-H4、Fas 及 Caspase-3 裂解片段的表达

Table 3 The expressions of B7-H4, Fas and Caspase-3 cleavage(CC3) in Normal Cervical Epithelium(NCE), CIN and Squamous Carcinoma of Cervix (SCC)

Groups	NCE	CIN	SCC	x ²	P
B7-H4	0(0.0)	8(21.1)	62(47.0)	8.18	P<0.05
Fas	20(87.0)	17(44.7)*	53(40.2)*	7.22	P<0.05
CC3	7(30.4)	15(39.5)	103(78.0)	21.54	P<0.01

注:*Fas 在 CIN 和 SCC 中的表达差异无显著性。

Note: *The expression of Fas in CIN and SCC had no significant difference.

表 4 不同临床病理参数的宫颈鳞状细胞癌组织中 B7-H4 表达情况

Table 4 Relationship between clinical pathologic characteristics and expression of B7-H4 in cervical Squamous cancer (n, %)

		Case	Positive	Negative	Positive expression rate(%)	x ²	P
Clinical stage	I	44	7	37	15.9	7.68	P<0.05
	Ila	63	27	36	42.9		
	Ilb~IV	25	19	6	76.0		
Lymph node metastasis	Yes	36	27	9	75.0	7.17	P<0.05
	No	96	33	63	34.4		
Differentiation status	High	42	18	24	42.9	1.52	P>0.05
	Moderate+Low	90	43	47	47.8		
Tumorsize	< 4 cm	68	26	42	38.2	10.08	P<0.05
	≥ 4 cm	64	37	27	57.8		
Deep stromal invasion	Yes	57	36	21	63.2	13.23	P<0.05
	No	75	28	47	37.3		

3 讨论

机体抗肿瘤效应中最主要的机制之一就是细胞免疫,其中以肿瘤微环境中 Th1 细胞及其辅助增强的特异性 CD8⁺CTL 因子对肿瘤细胞的杀伤最为重要^[6]。B7 家族中的 B7-H4 分子在细胞膜中以跨膜蛋白的形式存在,作为一种免疫弱化因子抑制 T 细胞免疫应答,增强肿瘤细胞的免疫侵袭力,进而促进肿瘤的发生发展^[7]。Salceda 等^[8]研究表明,除抑制 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞增殖和产生免疫因子外,肿瘤上皮细胞内高表达的 B7-H4 蛋白还可促进上皮细胞恶性转化并形成肿瘤。现已发现 B7-H4

蛋白在多中肿瘤细胞中表达增多,如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和卵巢癌等^[9-12],但在宫颈鳞状细胞癌中的研究甚少。本组研究结果显示,B7-H4 在正常宫颈上皮无明显表达,在 CIN 中呈少量的阳性表达,而在宫颈鳞状细胞癌组织中呈现明确阳性表达,表明 B7-H4 蛋白可能在宫颈鳞状细胞癌的发生和发展过程发挥了重要的作用。在 132 例宫颈鳞状细胞癌患者中根据 FIGO 分期 B7-H4 阳性表达率为:I 期为 15.9 %(7/44);Ila 期为 42.9 %(27/63);Ilb~IV 期为 76.0 %(19/25);B7-H4 蛋白的阳性表达率呈现逐渐升高的趋势,各组中 B7-H4 蛋白的阳性表达率存在差异(P<0.05),且随着临床分期的级别增加表达阳性率也

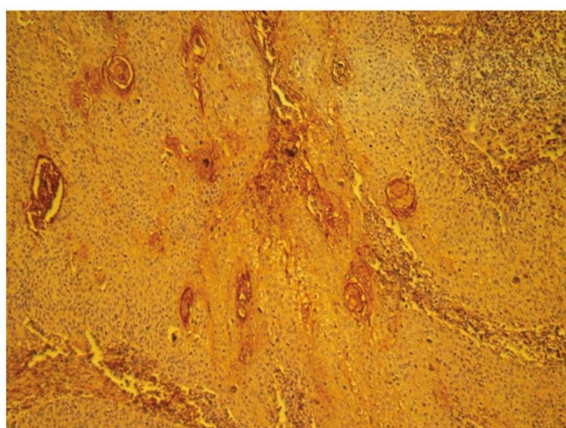
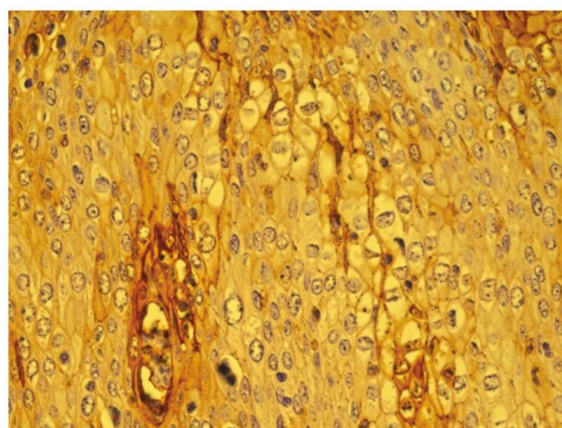
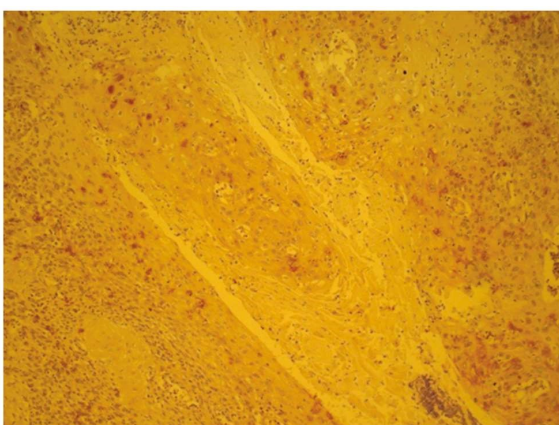
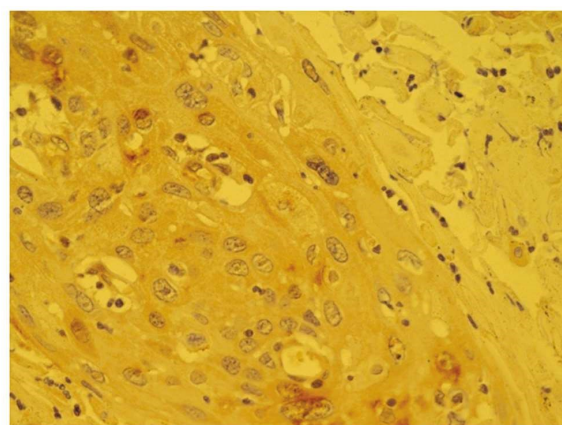
图 B1 宫颈鳞状细胞癌中 Fas 的表达($\times 100$)Fig.B1 Positive expression of Fas in SCC($\times 100$)图 B2 宫颈鳞状细胞癌中 Fas 的表达($\times 400$)Fig.B2 Positive expression of Fas in SCC($\times 400$)图 C1 宫颈鳞状细胞癌中 CC3 的表达($\times 100$)Fig.C1 Positive expression of CC3 in SCC($\times 100$)图 C2 宫颈鳞状细胞癌中 CC3 的表达($\times 400$)Fig.C2 Positive expression of CC3 in SCC($\times 400$)

表 5 宫颈鳞状细胞癌组织中 B7-H4 与 Fas 蛋白、B7-H4 与 Caspase-3 裂解片段表达的关系

Table 5 Relationship between the expression of B7-H4 with Fas protein and CC3 in SCC

B7-H4	Fas		R	P	CC3		R	P
	+	-			+	-		
	14	48	10.34	P<0.05	54	8	6.95	P<0.05
	49	21			46	24		

不断增加,表明 B7-H4 蛋白的阳性表达可能参与宫颈鳞状细胞癌的进展。Kim 等^[13]的研究表明,B7-H4 表达下调伴随着细胞内 B7-H4 分子核异位,导致线粒体功能失调,进而增强了肿瘤细胞凋亡,本实验验证了这一结果。在有淋巴结转移的宫颈鳞状细胞癌组织中 B7-H4 蛋白的阳性表达率 74.6%显著高于无淋巴结转移的宫颈鳞状细胞癌组织 34.8%,表明 B7-H4 蛋白高表达可能参与促进宫颈鳞状细胞癌发生淋巴结转移。此外,原发肿瘤较大和深肌层浸润组 B7-H4 蛋白表达显著高于原发肿瘤较小和浅肌层浸润组,但不同分化程度的宫颈癌组织中 B7-H4 的表达无显著差异。宫颈鳞状细胞癌患者的预后通常与临床分期、淋巴结转移情况、肿瘤体积大小及肌层浸润深度等因素密切相关,以上结果提示 B7-H4 蛋白可能有助于宫颈鳞状细胞癌的临床防治和预后监测。

Fas(CD95)是一种跨膜受体蛋白,普遍表达于多种细胞表面,Fas 与其配体(FasL)间的互动在 T 细胞受体(TCR)介导的肿瘤细胞凋亡中起着至关重要的作用^[14]。研究发现,良性肿瘤

组织中 Fas 蛋白的表达类似于其正常的来源组织,而恶性肿瘤中 Fas 蛋白的表达呈现出下调或缺失的现象^[15],原因可能在于免疫反应过程中 T 细胞对 Fas 介导肿瘤细胞凋亡的敏感性受机体免疫系统严密调控,这种调控是以抗原特异性 T 细胞凋亡为基础的^[16]。本组研究显示,正常宫颈组织的 Fas 蛋白阳性表达率为 87.0%,而在宫颈鳞状细胞癌和 CIN 组织中 Fas 的表达率明显下降,分别为 40.2%和 44.7%,提示宫颈癌细胞由于某种原因 Fas 表达出现下调,减少了 Fas 与其相应的 T 细胞表面配体的互动,最终抑制了 TCR 介导的肿瘤细胞凋亡。

Caspase-3 是外源性细胞凋亡途径中的关键效应酶,是凋亡执行过程中最重要的蛋白水解酶,外源性途径中 Caspase-3 裂解激活是细胞凋亡发生关键的步骤^[17]。Sunyoung Ham 等的研究表明 Fas/FasL 可交叉激活 Caspase 家族级联反应,激活 Caspase-3,Caspase-3 的激活可增强 Caspase-8 的活性,反之亦然,进而形成瀑布式强化反应^[18]。本实验发现 Caspase-3 裂解片段在宫颈鳞状细胞癌的各临床分期组织中均有一定表达,在正

常宫颈上皮、CIN、宫颈鳞状细胞癌组织中的阳性表达率呈逐渐增高趋势($P < 0.05$)。这表明在宫颈癌的进展过程中,Caspase-3 裂解失活减缓了外源性凋亡途径中 Caspase 蛋白间级联反应的进程,使肿瘤细胞凋亡受到抑制,从而促进了子宫颈癌的发生发展。邸丽双等也证实了晚期子宫颈癌中存在 Caspase-3 表达失调,其在宫颈癌的进展中发挥重要作用^[9]。

外源性细胞凋亡途径与死亡受体的激活密切相关,这个过程中 Fas 与肿瘤坏死因子受体的功能类似,Fas 与其配体结合后即可启动外源性细胞凋亡途径。Fas 蛋白上的死亡结构域以寡聚体的形式存在,Fas 相关死亡结构域(FADD)募集并与 Caspase-8 前体结合形成可死亡诱导信号复合物(DISC)^[20]。Caspase-8 前体被裂解和活化后从 DISC 中释放至细胞质中进而激活凋亡效应因子 Caspase-3,启动外源性细胞凋亡途径引发细胞凋亡^[21]。本实验发现 B7-H4 和 Fas 蛋白在子宫颈癌中的表达呈负相关,所以我们推测 B7-H4 可能通过某种途径抑制肿瘤细胞表面 Fas 蛋白的表达而抑制细胞内 Caspase 蛋白级联反应,最终抑制了宫颈癌细胞的凋亡。B7-H4 还可直接与 Caspase-3 结合并抑制其活化,阻断它们在细胞凋亡过程中的信号转导作用,从而抑制细胞凋亡的进程;B7-H4 通过抑制 Caspase-9 酶原的活化可抑制 Caspase-3,7 酶原活化,并进一步阻止 Caspase-3 反馈激活 Caspase-9^[22]。Krystyna 等^[23]研究表明,被转染 B7-H4 的宫颈癌 HeLa 细胞 FasL 基因表达上调,同时伴有 Caspase-3 活性下降,提示 FasL 可能是 B7-H4 与 Caspase-3 联系的纽带。本研究证实 B7-H4 和 Caspase-3 裂解片段在子宫颈癌中的表达呈正相关,因此我们认为,在宫颈鳞状细胞癌的发生过程中,B7-H4 基因高表达可能导致肿瘤细胞中 Fas 表达缺失,进而使 Caspase-3 裂解增多下降,Caspase-3 失活增多使正常的细胞凋亡机制受阻,从而导致宫颈癌的发生发展。在宫颈癌细胞增殖和侵袭过程中,Fas 干扰了免疫细胞诱导肿瘤细胞凋亡,使肿瘤细胞逃避免疫系统监视。此外,宫颈癌细胞中 Caspase-3 裂解片段水平升高也说明宫颈癌存在 Fas 相关性凋亡抵抗。因此,B7-H4 基因在宫颈癌中表达上调可能是宫颈癌发生的重要事件,B7-H4、Fas 和 Caspase-3 裂解片段联合检测对子宫颈癌的早期诊断、临床疗效及预后判断具有重要意义。

综上所述,B7-H4 基因异常表达可能通过外源性途径阻止了细胞凋亡正常进行,从而实现了免疫逃逸。Fas/FasL 系统和 Caspase-3 在抑制子宫颈癌的发生发展方面可能起协同作用。负性免疫共刺激分子 B7-H4 和 Fas/FasL 凋亡蛋白在宫颈癌的发生、进展中起到了重要作用,其共同作用可能为宫颈癌细胞逃逸机体免疫的机制之一。检测或联合检测 B7-H4、Fas 和 Caspase-3 裂解片段可能成为预测宫颈癌生物学行为、评价宫颈癌预后的有效参考指标。干预 B7-H4、Fas 或 Caspase-3 裂解片段的表达将可能成为宫颈癌免疫治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Lyng H, Beigi M, Svendsrud D H, et al. Intratumor chromosomal heterogeneity in advanced carcinomas of the uterine cervix[J]. Int J Cancer, 2004, 111(3): 358-366
- [2] Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, et al. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate t-cell anti-tumor responses[J]. Cancer Res, 2013, 73(15): 4820-4829
- [3] Bishayee K, Mondal J, Sikdar S, et al. Condurango (gonolobus condurango) extract activates fas receptor and depolarizes mitochondrial membrane potential to induce ros-dependent apoptosis in cancer cells in vitro: Ce-treatment on hela: A ros-dependent mechanism [J]. J Pharmacopuncture, 2015, 18(3): 32-41
- [4] Cunha K S, Caruso A C, Faria P A, et al. Evaluation of bcl-2, bcl-x and cleaved caspase-3 in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas[J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4): 1497-1511
- [5] Cahall C F, Lilly J L, Hirschowitz E A, et al. A quantitative perspective on surface marker selection for the isolation of functional tumor cells[J]. Breast Cancer, 2015, 9(1): 1-11
- [6] Guo Y, Wang A Y. Novel immune check-point regulators in tolerance maintenance[J]. Front Immunol, 2015, 6: 421
- [7] Dong Q, Ma X. B7-H4 expression is associated with tumor progression and prognosis in patients with osteosarcoma [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 156432
- [8] 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
- [9] Sadun R E, Sachsman S M, Chen X, et al. Immune signatures of murine and human cancers reveal unique mechanisms of tumor escape and new targets for cancer immunotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(13): 4016-4025
- [10] Peng H X, Wu W Q, Yang D M, et al. Role of b7-h4 sirna in proliferation, migration, and invasion of lovo colorectal carcinoma cell line [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 326981
- [11] Kreymborg K, Haak S, Murali R, et al. Ablation of b7-h3 but not b7-h4 results in highly increased tumor burden in a murine model of spontaneous prostate cancer [J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3 (8): 849-854
- [12] Cheng L, Jiang J, Gao R, et al. B7-h4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19 (9): 1481-1486
- [13] Kim H K, Song I S, Lee S Y, et al. B7-h4 downregulation induces mitochondrial dysfunction and enhances doxorubicin sensitivity via the camp/creb/pgc1-alpha signaling pathway in hela cells [J]. Pflugers Arch, 2014, 466(12): 2323-2338
- [14] Nallapalle S R, Daripally S, Prasad V T. Promoter polymorphism of fasl confers protection against female-specific cancers and those of fas impact the cancers divergently [J]. Tumour Biol, 2015, 36 (4): 2709-2724
- [15] Eun Y G, Lee Y C, Kim S K, et al. Single nucleotide polymorphisms of the fas gene are associated with papillary thyroid cancer [J]. Auris Nasus Larynx, 2015, 42(4): 326-331
- [16] Carter L L, Zhang X, Dubey C, et al. Regulation of t cell subsets from naive to memory[J]. J Immunother, 1998, 21(3): 181-187
- [17] Karki P, Lee J, Shin S Y, et al. Kinetic comparison of procaspase-3 and caspase-3[J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 442(1): 125-132
- [18] Sunyoung H, Ki H K, Tae H K, et al. Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7 oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18-associated cells[J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2683-2691

- [5] Dou Jing-yun, Yu Jun-sheng. *Prunella vulgaris* L. Pharmacological Action and Clinical Application Research Progress [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2013, 07: 1039-1041
- [6] Liu Jing-ru. Impact of Selfheal Capsule on autoantibodies and T helper 17 cells in patients with Hashimoto's thyroditis [D]. Jilin University, 2012
- [7] Wang Zhen-qian, Shen Wen-wen, Jiang Xiao, et al. Application of Xiakucao Oral Liquid in the Treatment of Cystic Thyroid Disease[J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2016, 14 (20): 58-59
- [8] Jiang De-you, Qu Xiao-xue. Treatment of Goiter with Chinese Medicine [J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2016, 36 (7): 1237-1239
- [9] Zhang Jing, Wang Ying, Zhan Hua-dong, et al. Effects of Traditional Chinese Medicine *Prunella Vulgaris* on Proliferation Cycle and Apoptosis of Human Thyroid Cancer Cell Line SW579 [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(23): 4434-4436
- [10] Du Hong-dao, Fu Qiang, Wang Qiang-wei, et al. Traditional chinese medicine *Prunella vulgaris* can accelerate the apoptosis of human thyroid cancer cell line SW 579 in vitro [J]. Modern Oncology, 2009, 17 (2): 212-214
- [11] Liu ZZ, Chen SY, Cai J, et al. Traditional Chinese Medicine syndrome-related herbal prescriptions in treatment of malignant tumors [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 01:19-26
- [12] Yan Dong, Xie Wen-jian, Li Chun, et al. Chemical Components from *Prunellae Spica* and Their Anti-tumor Activities in Vitro [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 11: 49-54
- [13] Wu Yuan-zhao, Zeng Yong, Zheng Ke-si, et al. Apoptotic Effect of the Extract of *Xiakucao* Oral Solution on Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer Cells [J]. Acta Universitatis Traditionis Medicinalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2016, 30(2): 78-81
- [14] Jiang Qiong, Xia song-bo, Mei Tong-he, et al. Inhibitory effects and mechanism of *Ajuga Decumbens* Thunb extracts on proliferation of liver carcinoma cells[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2016, 36(20): 1770-1773
- [15] Ma Yao-zhen, Sun Zhen-chang, Fu Xiao-rui, et al. Effects of Selfheal Extract on Jurkat Cell Apoptosis[J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2016, 29(2): 106-109
- [16] Zheng Xue-zhi, Zheng Xue-hai, Li Jia, et al. Effects of *Prunella vulgaris* on Proliferation and Apoptosis in Esophageal Cancer Eca-109 Cells[J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(11): 74-76
- [17] Zhang Ke-jie, Zhang Ming-zhi, Wang Qing-duan. Inductive effect of *Prunella vulgaris* Injection on K562 cells apoptosis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(7): 1031-1035
- [18] Tan JA, Qi HZ, Ni JD. Extracts of endophytic fungus xkc-s03 from *Prunella vulgaris* L. spica inhibit gastric cancer in vitro and in vivo[J]. Oncology Letters, 2015, 9(2): 945-949
- [19] Fang Yi, Zhang Ling, Lin Wei, et al. *Prunella vulgaris* L. induced apoptosis of colon cancer cells HCT-8[J]. Journal of Fujian University of TCM, 2014, 3(03): 46-48
- [20] Song Wei. Apoptotic influence and Mechanism Research of Injection of *Prunella Vulgaris* on Pancreatic Cancer Cells PANC-1 [D]. Shanxi medical university, 2012
- [21] Weng Jin-yue, Zheng Liang-pu, Zhang Chun-chun. Experimental observation of *Prunella vulgaris* L. on human colon cancer cell apoptosis [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 10: 772-774
- [22] Bai Yu-Bing, Li Chun, Zhou Ya-min, et al. Chemical constituents of triterpenoids from *Prunella vulgaris* and their antitumor activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(24): 3623-3629
- [23] Fan Peng-ying. Apoptotic effect of extract from *Prunella vulgaris* on human papilloma virus positive cervical cancer cells[J]. Drug Evaluation Research, 2016, 39(3): 388-393
- [24] Brenner C, Kroemer G. Mitochondria-the Death Signal Integrators[J]. Science, 2000, 289(5482): 1150-1151
- [25] Zou Xun-feng, Yan Ye-hong. Study Progress of Mitochondria or Cytochrome C-mediated Apoptosis Pathway [J]. Medical Recapitulate, 2007, 01: 16-19

(上接第 2430 页)

- [19] 邸丽双,王德华,高阳. Maspin 和 Caspase-3 在宫颈癌中的表达及相关性[J]. 天津医科大学学报, 2009, 15(1): 77-80
Di Li-shuang, Wang De-hua, Gao Yang. The expression and correlation of Maspin and Caspase-3 in cervical carcinoma [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2009, 15(1): 77-80
- [20] Wong B, Arron J, Choi Y. T cell receptor signals enhance susceptibility to fas-mediated apoptosis [J]. J Exp Med, 1997. 186 (11): 1939-1944
- [21] Cheng C H, Cheng Y P, Chang I L, et al. Dodecyl gallate induces apoptosis by upregulating the caspase-dependent apoptotic pathway and inhibiting the expression of anti-apoptotic bcl-2 family proteins in human osteosarcoma cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1495-1500
- [22] Cunha K S, Caruso A C, Faria P A, et al. Evaluation of bcl-2, bcl-x and cleaved caspase-3 in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas[J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4): 1497-1511
- [23] Krystyna G, Marcin O, Wiesława W, et al. The immunohistochemical analysis of antigens such as RCAS1 and B7-H4 in the cervical cancer nest and within the fibroblasts and macrophages infiltrating the cancer microenvironment[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68(1): 85-93