

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2021.06.004

· 基础研究 ·

Bex1和NF-kBp65在舌鳞状细胞癌组织中的表达及意义

王倩倩¹, 丁丹丹¹, 丁翔², 韩瑞¹, 韩影影¹, 周美云¹, 徐锦程¹

1. 蚌埠医学院第一附属医院口腔科, 安徽 蚌埠(233004); 2. 蚌埠医学院第二附属医院口腔科, 安徽 蚌埠(233000)

【摘要】 目的 探讨Bex1和NF-kBp65在舌鳞状细胞癌组织中的表达及意义。方法 免疫组化法检测60例舌鳞状细胞癌组织及相应癌旁正常组织中Bex1和NF-kBp65的表达情况,分析其与患者临床病理特征及预后的关系。结果 舌鳞状细胞癌组织中Bex1阳性表达率为48.3%(29/60),低于癌旁正常组织的88.3%(53/60),差异有统计学意义($\chi^2 = 22.18, P < 0.01$),其阳性表达率与TNM分期呈负相关($P < 0.05$);舌鳞状细胞癌组织中NF-kBp65阳性表达率63.3%(38/60),高于癌旁正常组织的20%(12/60),差异有统计学意义($\chi^2 = 23.18, P < 0.01$),其阳性表达率与肿瘤TNM分期呈正相关($P < 0.05$)。Pearson相关性分析显示,Bex1和NF-kBp65的表达呈负相关($r = -0.302, P = 0.019$)。Kaplan-Meier生存曲线显示,Bex1阳性表达患者的生存率明显高于阴性表达患者。结论 舌鳞状细胞癌组织中,Bex1阳性表达率低和NF-kBp65阳性表达率高可能对肿瘤的侵袭和转移起促进作用,且Bex1阴性表达可能与患者不良预后有关。

【关键词】 舌肿瘤; 鳞状细胞癌; 侵袭; 转移; TNM分期; Bex1; NF-kBp65; 免疫组化; 预后

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)06-0383-05

【引用著录格式】 王倩倩,丁丹丹,丁翔,等. Bex1和NF-kBp65在舌鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(6): 383-387. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.06.004.

Expression of Bex1 and NF-kBp65 in tongue squamous cell carcinoma and its significance WANG Qian-qian¹, DING Dandan¹, DING Xiang², HAN Rui¹, HAN Yingying¹, ZHOU Meiyun¹, XU Jincheng¹. 1. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 2. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China

Corresponding author: XU Jincheng, Email: xjc9999@163.com, Tel: 86-5522-3086336

【Abstract】 Objective To investigate the expression of brain expressed X-linked gene 1(Bex1) and nuclear factor-kBp65 (NF-kBp65) in tongue squamous cell carcinoma, and its significance. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Bex1 and NF-kBp65 in 60 tongue squamous cell carcinoma (TSCC) tissues and adjacent normal tissues, and the relationships between Bex1, NF-kBp65 and the clinicopathological features and prognosis of patients were analyzed. **Results** The positive expression rate of Bex1 in TSCC was 48.3% (29/60), which was significantly lower than that in adjacent normal tissues 88.3% (53/60) ($\chi^2 = 22.18, P < 0.01$). The positive rate of Bex1 was negatively correlated with TNM stage, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rate of 63.3% (38/60) in TSCC was significantly higher than 20% (12/60) in adjacent normal tissues ($\chi^2 = 23.18, P < 0.01$), the positive rate of NF-kBp65 was positively correlated with TNM stage, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). According to the Pearson correlation analysis results, the expression of Bex1 and NF-kBp65 in TSCC tissues was

【收稿日期】 2020-11-04; **【修回日期】** 2020-12-23

【基金项目】 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A480)

【作者简介】 王倩倩, 医师, 硕士, Email: 1962580034@qq.com

【通信作者】 徐锦程, 主任医师, 硕士, Email: xjch9999@163.com, Tel: 86-5522-3086336



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

negatively correlated ($r = -0.302, P = 0.019$). Kaplan-Meier survival curves showed that the survival rate of Bex1 positive patients was significantly higher than that of Bex1 negative patients. **Conclusion** In TSCC tissues, the low positive expression rate of Bex1 and the high positive expression rate of NF-kBp65 may promote tumor invasion and metastasis, and the negative expression of Bex1 may be related to the poor prognosis of patients.

【Key words】 tongue neoplasms; squamous cell carcinoma; invasion; metastasis; TNM stage; Bex1; NF-kBp65; immunohistochemistry; prognosis

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(6): 383-387.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Key Project of Natural Science Research in Anhui Province (No. KJ2016A480).

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔鳞状细胞癌中最常见的类型,男性多于女性,但近年来有女性发病增多及发病年龄年轻化的趋势^[1]。虽然TSCC的诊断和治疗水平有所提高,但其预后仍较差,且局部浸润和远处转移是TSCC患者预后较差的主要原因^[2]。核因子-kB(nuclear factor kappa B, NF-kB)是真核细胞中一种重要的核转录因子,以p65/p50二聚体为中心的NF-kB异常活化在肿瘤形成、侵袭和转移及抗凋亡机制中发挥重要作用^[3-4]。脑表达的X连锁基因1(brain expressed X-linked gene 1, Bex1)是Bex家族的成员,近年来有研究发现Bex参与细胞周期调控、细胞凋亡等重要的病理生理过程及一些癌症的发生发展过程。Lee等^[5]曾报道Bex1在口腔鳞状细胞癌中表达下调,但Bex1和NF-kB与TSCC临床病理特征和预后关系的研究较少。本文采用免疫组化法检测Bex1和NF-kBp65在TSCC中的表达情况,并进一步探讨其与临床病理特征及预后的关系,以期对TSCC的诊断和治疗提供有价值的参考。

1 资料和方法

1.1 基本资料

收集蚌埠医学院第一附属医院口腔科2012年1月至2014年12月经手术切除且病理证实为TSCC的保持完整的石蜡组织标本60例。所有患者术前均未行放、化疗,术后病理证实有淋巴结转移者转至放疗科放疗等。年龄36~82岁,中位年龄62岁,男性41例,女性19例。高分化者33例,中分化15例,低分化12例。肿瘤直径<2.0 cm者21例,2~4 cm者25例,>4 cm者14例。根据美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)2010年版对临床分期进行划分:I+II期34

例,III+IV期26例。有淋巴结转移者19例,其中淋巴结转移数目为1~3枚者13例,4枚以上者6例,无淋巴结转移者41例。同时选择60例癌旁正常上皮组织作为对照组。所有患者均进行电话随访,术后1年内每3个月随访1次,术后第2年每6个月随访1次,从术后第3年起每1年随访1次,共随访5年。

1.2 主要试剂

兔抗人Bex1和NF-kBp65抗体、羊抗兔二抗均购自南京迈克沃德生物科技有限公司;DAB显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组化

所有石蜡组织标本经4%甲醛固定,常规石蜡包埋,4~5 μm连续切片,脱蜡,高压抗原修复等,采用EliVision法行免疫组织化学染色。一抗Bex1、NF-kBp65稀释比例均为1:300,一抗用PBS缓冲液代替作为阴性对照,TSCC阳性切片作为阳性对照。

1.4 结果评判

免疫组化结果由2位高年资病理科医师在双盲下阅片并记录。每张切片随机选取5个独立高倍视野,计数100个肿瘤细胞。评分标准如下:①细胞着色强度,无着色或弱,0分;淡黄色,1分;棕黄色,2分;棕褐色,3分;②染色阳性细胞百分数,<5%,0分;5%~25%,1分;26%~50%,2分;>50%,3分。总评分将两项得分结果相乘:<3分为阴性,≥3分为阳性。

1.5 统计学分析

应用SPSS20.0软件包对数据进行统计学分析,计数资料用率表示,组间比较用卡方检验,相关性分析采用Pearson检验;单因素生存分析用Kaplan-Meier生存曲线和Log rank检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bex1 和 NF-kBp65 蛋白在 TSCC 和癌旁正常上皮组织中的表达

Bex1 和 NF-kBp65 主要染色于细胞浆,后者部分细胞核中也可见阳性染色,所有蛋白的阳性表

达均呈棕黄色或棕褐色(图1),Bex1 在 TSCC 组织中低表达,NF-kBp65 在 TSCC 组织中高表达。两者在 TSCC 组织和癌旁组织中的阳性率差异具有统计学意义($P < 0.01$)(表1)。

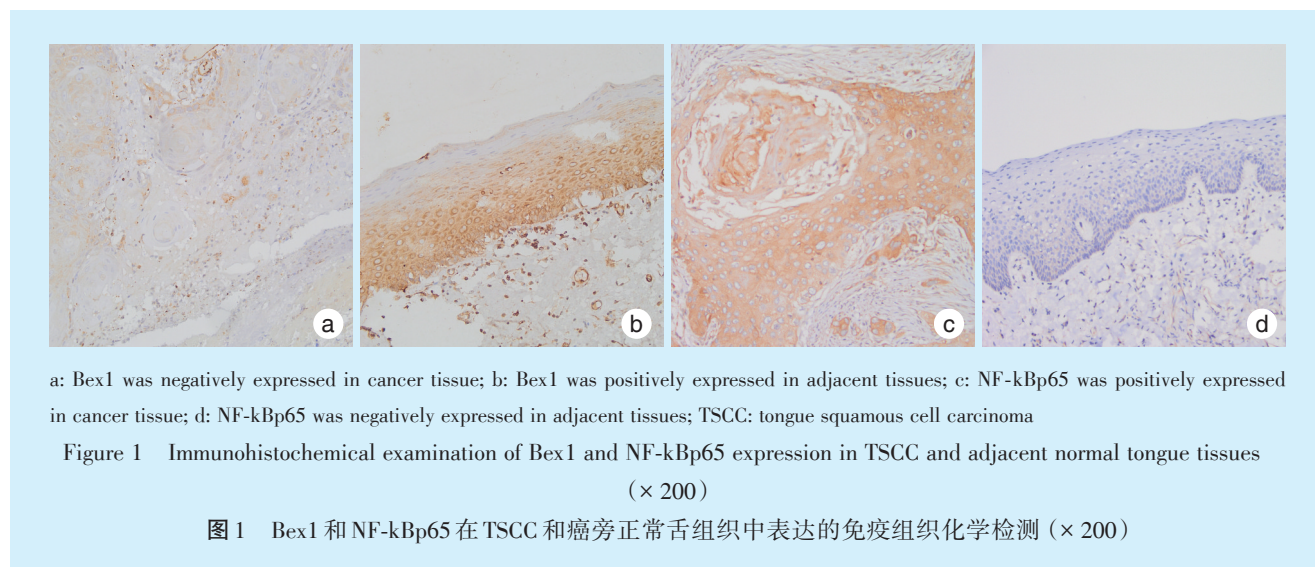


表1 TSCC 和癌旁正常组织中 Bex1、NF-kBp65 的表达

Groups	n	Bex1	χ^2	P	NF-kBp65	χ^2	P
TSCC tissues	60	29(48.3)	22.18	$P < 0.001$	38(63.3)	23.18	< 0.001
Adjacent normal tissues	60	53(88.3)			12(20.0)		

TSCC: tongue squamous cell carcinoma

2.2 Bex1 和 NF-kBp65 与 TSCC 临床病理特征的关系

结果显示,Bex1 的阳性表达率与肿瘤直径、TNM 分期及淋巴结转移有关,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与性别、年龄、组织学分级均无关($P > 0.05$)。NF-kBp65 的阳性表达率与 TNM 分期、组织学分级和淋巴结转移有关,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与性别、年龄、肿瘤直径均无关($P > 0.05$),见表2。

2.3 Bex1 和 NF-kBp65 在 TSCC 中表达的相关性

根据相关性分析显示,Bex1 和 NF-kBp65 在 TSCC 中的表达呈负相关性($r = -0.302, P = 0.019$),见表3。

2.4 生存分析

Kaplan-Meier 生存分析显示 NF-kBp65 阳性表达与 TSCC 患者的生存率无关($P = 0.674$);Bex1 阳性表达的 TSCC 患者平均生存时间为 56 个月,而

Bex1 阴性表达的 TSCC 患者平均生存时间为 42 个月,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,Bex1 阳性表达的 TSCC 患者生存率明显高于阴性表达者(图2)。

3 讨论

人脑表达 X 连锁 Bex 家族由 Bex1、Bex2、Bex3、Bex4、Bex5 五个成员组成,位于染色体 Xq22 区域,Bex1 和 Bex2 在 C 末端附近包含一个保守的基序 Ser-Leu-Arg,该基序被蛋白激酶 C 磷酸化,蛋白激酶 C 由 10 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成,与许多癌症相关^[6-8]。Bex 蛋白参与神经变性、癌症、细胞周期和肿瘤生长所涉及的转录调控和信号通路,并在一些恶性肿瘤中表达失调。Bex1 在肺腺癌中参与肿瘤的侵袭和转移并且与患者不良预后有关^[9];Bex1 在食管鳞状细胞癌中的低表达与食管鳞状细胞癌的临床预后不良相关,是影响总生存

表2 TSCC中Bex1、NF-kBp65的表达与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between the expression of Bex1 and NF-kBp65 in TSCC and clinicopathologic features of patients with TSCC n(%)

Clinicopathological variable		n	Bex1 positive	P	NF-kBp65 positive	P
Gender	Male	41	19(46.3)	0.650	27(70.7)	0.081
	Female	19	10(52.6)		11(47.4)	
Age (years)	> 60	32	15(46.9)	0.809	17(53.1)	0.079
	≤ 60	28	14(50.0)		21(75.0)	
Tumor diameter(cm)	< 2	21	16(76.2)	0.001	10(47.6)	0.179
	≥ 2, ≤ 4	25	11(44.0)		18(72.0)	
	> 4	14	2(14.3)		10(71.4)	
TNM stage	I + II	34	24(70.6)	< 0.001	16(47.1)	0.003
	III+IV	26	5(19.2)		22(84.6)	
Histological grade	I	33	17(51.5)	0.168	16(48.5)	0.030
	II	15	9(60.0)		12(80.0)	
	III	12	3(25.0)		10(83.3)	
Lymph node metastasis	No	41	26(63.4)	0.001	19(46.3)	< 0.001
	Yes	19	3(15.8)		19(100)	

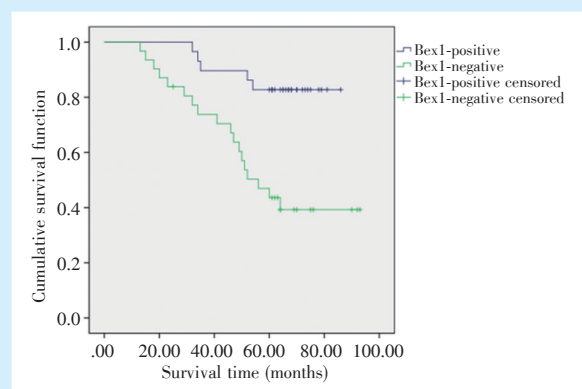
TSCC: tongue squamous cell carcinoma

表3 TSCC中Bex1和NF-kBp65表达的相关性

Table 3 Correlation of Bex1 and NF-kBp65 expression in TSCC

Bex1	NF-kBp65		Total	r	P
	+	-			
+	14	15	29	-0.302	0.019
-	24	7	31		
Total	38	22	60		

TSCC: tongue squamous cell carcinoma



The blue line represents the survival curve of Bex1 positive patients, and the green line represents the survival curve of Bex1 negative patients; TSCC: tongue squamous cell carcinoma

Figure 2 Kaplan-Meier survival curves of Bex1-positive and Bex1-negative TSCC patients

图2 Bex1阳性表达和阴性表达TSCC患者Kaplan Meier生存曲线

率的独立预后因素,体外实验结果显示 Bex1 可能通过 NF-kB 信号通路抑制食管癌的增殖和生长而发挥抑癌作用^[10];在颅内室管膜瘤中存在启动子高甲基化使 Bex1 表达下调,而 Bex1 过表达可抑制细胞的增殖^[11];Bex1 在伴有混合系白血病突变的急性髓系白血病中高表达,推测其可能起癌基因的作用^[12];Bex1 在一组 FMS 样络氨酸激酶-3 驱动的急性白血病等疾病中表达下调等^[13]。本研究结果显示,Bex1 主要染色于细胞浆,在 TSCC 中的阳性表达率明显低于癌旁正常组织,且与肿瘤直径、TNM 分期、有无淋巴结转移有关,而与患者性别、年龄、组织学分级无关,Kaplan-Meier 生存分析显示 Bex1 阳性表达患者的预后明显优于阴性表达患者,表明 Bex1 可能参与了 TSCC 的侵袭和转移,与 TSCC 患者的不良预后有关。

NF-kB 包括 5 个多肽链亚基,其中 p65 是 NF-kB 的主要功能蛋白,能发挥转录激活功能。以 p65 亚基磷酸化为特征的 NF-kB 活化在恶性肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭和转移中发挥重要作用^[3]。p65 异常活化是 NF-kB 通路激活的关键调控点,仍然是目前的研究热点。本研究结果显示,NF-kBp65 在 TSCC 的表达明显高于癌旁组织,主要染色于细胞浆,部分细胞核中出现阳性染色,且随着 TNM 分期增加,组织学分级越高、有淋巴结转移者 NF-kBp65 的表达越强,与蒋丽兰等^[14]的研究结果一致。提示 NF-kBp65 的异常活化在 TSCC 的增殖、侵袭和转移过程中可能起重要的促进作用。根据文献报

道, Bex 家族成员与 NF- κ B 通路之间有紧密联系, Bex1 的过表达对 NF- κ B 的活性有显著抑制作用^[15]。本研究结果也表明 Bex1、NF- κ Bp65 在 TSCC 组织中的表达呈负相关关系, 提示 NF- κ B 信号通路可能参与了 Bex1 促进 TSCC 的增殖。

综上所述, 本研究发现相较于癌旁组织, TSCC 中 Bex1 阳性表达率低, NF- κ Bp65 阳性表达率高, 其表达水平与 TSCC 的发展有关, 提示两者可能与 TSCC 的侵袭和转移有关。Kaplan-Meier 生存分析结果显示 Bex1 阳性表达的平均生存时间长于阴性表达者, Bex1 的表达与患者的生存率有关, 提示 Bex1 对 TSCC 的预后有一定的影响。本研究仅在组织学水平验证了 Bex1 和 NF- κ Bp65 在 TSCC 中的表达和相关性分析, 而 Bex1 是如何通过 NF- κ B 信号通路促进 TSCC 的增殖的机理仍有待进一步研究。

【Author contributions】 Wang QQ, Ding DD, Ding X, Han R, Han YY, Zhou MY, Xu JC performed the experiments, analyzed the data, and wrote the article. Xu JC designed the study. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Mukdad L, Heineman TE, Alonso J, et al. Oral tongue squamous cell carcinoma survival as stratified by age and sex: a surveillance, epidemiology, and end results analysis[J]. *Laryngoscope*, 2019, 129(9): 2076-2081. doi: 10.1002/lary.27720.
- [2] Zhou G, Huang Z, Meng Y, et al. Upregulation of long non-coding RNA FOXD2-AS1 promotes progression and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49(10): 1011-1018. doi: 10.1111/jop.13074.
- [3] Hartley AV, Wang B, Mundade R, et al. PRMT5-mediated methylation of YBX1 regulates NF- κ B activity in colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15934. doi: 10.1038/s41598-020-72942-3.
- [4] 王骞, 谭林, 陈维顺. Rspo1、LGR5、NF- κ B/p65 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(5): 436-442, 435. doi: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2019.05.007.
Wang Q, Tan L, Chen WS. Expression of Rspo1, LGR5, NF- κ B/p65 in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2019, 28(5): 436-442, 435. doi: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2019.05.007.
- [5] Lee CH, Wong TS, Chan JY, et al. Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Pathol*, 2013, 230(3): 298-309. doi: 10.1002/path.4173.
- [6] He M, Wang Y, Shen J, et al. Bex1 attenuates neuronal apoptosis in rat intracerebral hemorrhage model[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(4): 527-535. doi: 10.1016/j.prp.2018.02.012.
- [7] Yang QS, Xia F, Gu SH, et al. Cloning and expression pattern of a spermatogenesis-related gene, BEX1, mapped to chromosome Xq22[J]. *Biochem Gene*, 2002, 40(1/2): 1-12. doi: 10.1023/a:1014565320998.
- [8] Kazi JU, Kabir NN, Rönstrand L. Protein kinase C (PKC) as a drug target in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 757. doi: 10.1007/s12032-013-0757-7.
- [9] Zhang ZH, Luan ZY, Han F, et al. Diagnostic and prognostic value of the BEX family in lung adenocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5523-5533. doi: 10.3892/ol.2019.10905.
- [10] Geng HT, Cheng ZW, Cao RJ, et al. Low expression of BEX1 predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2778-2787. doi: 10.3892/or.2018.6647.
- [11] Karakoula K, Jacques TS, Phipps KP, et al. Epigenetic genome-wide analysis identifies BEX1 as a candidate tumour suppressor gene in paediatric intracranial ependymoma[J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(1): 34-44. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.005.
- [12] Quentmeier H, Tonelli R, Geffers R, et al. Expression of BEX1 in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements[J]. *Leukemia*, 2005, 19(8): 1488-1489. doi: 10.1038/sj.leu.2403820.
- [13] Lindblad O, Li T, Su X, et al. BEX1 acts as a tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21395-21405. doi: 10.18632/oncotarget.4095.
- [14] 蒋丽兰, 赵娅军, 李勇. TGF- β R II 和 NF- κ B 在口腔鳞状细胞癌的表达及临床意义[J]. *上海口腔医学*, 2016, 25(6): 729-733.
Jiang LL, Zhao YJ, Li Y. Expressions and clinical significance of TGF- β R II and NF- κ B in oral squamous cell carcinoma[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2016, 25(6): 729-733.
- [15] Hu Y, Xiao Q, Chen H, et al. BEX2 promotes tumor proliferation in colorectal cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(3): 286-294. doi: 10.7150/ijbs.15171.

(编辑 张琳, 曾曙光)



官网



公众号