

BEX1 和 BEX4 在口腔鳞状细胞癌中的表达与临床意义

吴江恩 后 军 薛浩伟 胡玉坤 孙 明

摘要 目的 分析脑表达的 X 连锁基因 1 (BEX1) 及脑表达的 X 连锁基因 4 (BEX4) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 组织中及癌旁非肿瘤组织中的表达并探讨其与口腔鳞状细胞癌发生发展的关系。方法 使用免疫组化法检测 BEX1 和 BEX4 蛋白在 OSCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达。TCGA 数据库中 Kaplan-Meier 生存分析 BEX1 和 BEX4 的表达与口腔鳞癌患者总生存期的相关性。从 String-DB 数据库中分析 BEX1 和 BEX4 在信号转导中的位置以及相关密切的上下游基因。结果 55 例 OSCC 组织中, BEX1 蛋白阳性 25 例 (45.45%), BEX4 蛋白阳性 19 例 (34.55%); 30 例癌旁非肿瘤组织中, BEX1 阳性 24 例 (80.00%), BEX4 阳性 27 例 (90.00%), OSCC 组织与癌旁非肿瘤组织相比差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), BEX1 和 BEX4 蛋白的表达与口腔鳞癌分期、淋巴结的转移与分化程度存在一定的关联, 同时其中存在的差异有统计学的意义 ($P < 0.001$); 然而 BEX1 与 BEX4 蛋白的表达与患者的年龄、肿瘤发生部位与性别不存在相关性, 差异无统计学意义。关联性分析表明 BEX1 蛋白和 BEX4 蛋白表达关联强度为 0.489 ($P < 0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析显示 BEX1 低表达的 OSCC 患者预后较差。结论 BEX1 和 BEX4 可能成为预测 OSCC 转移的潜在生物学标志物。

关键词 口腔鳞状细胞癌; BEX1; BEX4; 免疫组化
中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1295-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.025

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是一种极为常见的发生于口腔部位的恶性肿瘤, 约 90% 的口腔恶性肿瘤都是口腔鳞癌^[1]。DNA 高度甲基化是口腔癌中抑癌基因失活的常见表观遗传机制, 通过影响转录降低基因表达水平^[2]。脑表达 X 染色体连锁蛋白 (the brain-expressed X-linked protein, BEX) 是一种保守性较高的小分子蛋白家族, 研究^[3]发现了包括 BEX1、BEX2、BEX3、BEX4、

BEX5 在内的 BEX 蛋白家族, 因为 CG 区域在 BEX 家族基因的启动子区中富集, 导致这一家族的蛋白极易受到包括甲基化等在内的表观遗传学调节的影响, 抑癌基因的启动子 CG 区域广泛甲基化是恶性肿瘤发生特性, 亦是调节抑癌基因功能失活的主要方式。作为易受甲基化调节的小分子信号蛋白, 在口腔鳞癌发生、发展过程中存在表达差异。目前研究表明其中 BEX1 在室管膜瘤^[4]、食管鳞癌^[5]、口腔鳞癌^[6]中低表达; BEX4 在肺腺癌^[7]、胃癌^[8]、口腔鳞癌^[9]中低表达。该研究从 BEX1 和 BEX4 蛋白在口腔鳞状细胞癌患者中的表达水平, 探讨其与口腔鳞癌发生、发展的关系, 进而提供与口腔鳞癌的诊疗相关的临床治疗依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本实验收集了 55 例 2015 年 1 月—12 月期间, 安徽医科大学第一附属医院病理科与 OSCC 相关的石蜡包埋样本, 同时选择了 30 例癌旁非肿瘤组织作为本次实验的对照组。患者在手术治疗前均未进行化学治疗或其他的抗肿瘤治疗, 在手术后均未发生围术期死亡的问题。上述病例中, 女性 20 例, 男性 35 例; 年龄 32~85 (64.57 ± 6.54) 岁; 低分化 17 例, 中分化 18 例, 高分化 20 例; 有淋巴结转移 25 例, 无淋巴结转移 30 例; 舌癌 25 例, 牙龈癌 15 例, 颊癌 15 例; 根据口腔癌和口咽癌的国际抗癌联盟 (UICC) 第 8 版 TNM 分类分期标准进行判断, 其中有 24 例处于 I 期, 10 例患者处于 II 期, 11 例患者处于 III 期, 10 例患者处于 IV 期。本次研究所选用的实验样本均经本院伦理委员会审批, 且患者已经签署了知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗人 BEX1 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 工作滴度 1:50; 兔抗人 BEX4 抗体购自北京义翘神州科技股份有限公司, 工作滴度 1:50; 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Olympus 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法 所有免疫组化标本均经 10% 福尔马林溶液固定 24 h, 石蜡包埋机包埋组织, 切成 4

2021-03-15 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (编号: 1704f0804023)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科, 合肥 230022

作者简介: 吴江恩, 男, 硕士研究生;

后 军, 男, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 2223409716@qq.com

μm 的连续切片,行免疫组织化学染色。采用免疫组化 SP 法,主要实验步骤如下:石蜡切片脱蜡和水化后,经柠檬酸钠溶液高压加热进行抗原修复 2 min,置室温下自然冷却,每张切片滴入 3% H₂O₂ 作用 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。每张切片滴入非免疫动物血清,以减少非特异性染色。滴加一抗(BEX1、BEX4) 4℃冰箱过夜孵育,每张切片经 PBS 清洗后滴加生物素标记的二抗,放入 37℃温箱孵育 30 min,滴加 DAB 显色,再使用苏木精染色液对切片进行复染,常规脱水中性树脂封片,在镜下观察其染色状态。

1.4 结果判定 将细胞质中出现可见棕黄色颗粒状物质沉淀作为判断阳性 BEX1 与 BEX4 免疫反应的依据,同时计数出现阳性反应的细胞;随机选择 5 个未出现重复视野的组织进行免疫组化切片观察,同时计数所选视野内的细胞。以半定量积分法作为判断依据判断最终的结果,同时由 2 名资历较深的病理科医师对其进行打分,阳性细胞数处于 70%~100% 的计为 3 分;50%~70% 区间的计为 2 分;10%~50% 区间的计为 1 分;<10% 的计为 0 分;而根据染色强度对其进行评分,棕褐色细胞为 3 分,黄褐色计为 2 分,浅黄色计为 1 分,未染色计为 0 分。假如细胞两项指标的乘积总分 < 3 分记为阴性反应,≥3 分为阳性反应^[10]。

1.5 Kaplan-Meier 生存分析 Kaplan-Meier plotter 是一个综合的在线平台,来源于数据库 GEO、EGA 和 TCGA,21 种癌症样类型评估 54 000 多个基因对生存的影响。本研究使用 Kaplan-Meier 绘图分析 BEX1 和 BEX4 在口腔鳞癌患者中的表达情况及预后的相关性。从 TCGA 数据库获得 212 例口腔鳞癌组织和 287 例癌旁非肿瘤组织中 BEX1 mRNA 表达数据以及 132 例口腔鳞癌组织和 367 例癌旁非肿瘤组织中 BEX4 mRNA 表达数据。

1.6 String-DB 数据库 String 数据库(<https://string-db.org/>)常用于对基因与蛋白质间的相互作用进行分析,该数据库中不仅涵盖了蛋白质间的间接功能相关性,同时也涵盖了蛋白质间的直接物理相互作用。该数据库不仅含有从 PubMed 及其他数

据库中所挖掘的数据及相关实验数据,同时还含有通过生物信息学的方法进行预测的结果。在本次实验中,物种选择为“人类”,分别输入 BEX1 与 BEX4,选择 Medium 0.4 的置信度,同时选择 10 的最大相互作用数。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。选用 χ^2 的检验方式对临床病理学参数与 BEX1 和 BEX4 蛋白的表达间的关系进行检验;使用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 检验法分析 BEX1 和 BEX4 表达量差异与患者预后的关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BEX1 和 BEX 蛋白在 OSCC 组织及癌旁非肿瘤组织中的表达 在免疫组化实验中,BEX1 和 BEX4 的表达定位于细胞质(图 1)。BEX1 和 BEX4 在癌旁非肿瘤组织阳性表达率明显高于 OSCC 阳性表达率,BEX1 和 BEX4 在 OSCC 组织与癌旁非肿瘤组织相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。

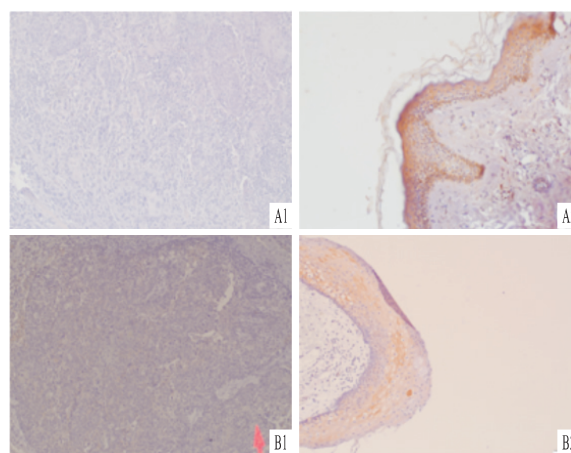


图 1 OSCC 组织和癌旁非肿瘤组织中 BEX1 和 BEX 蛋白免疫组化结果 SP×200
A: BEX1; B: BEX4; 1: OSCC 组织; 2: 癌旁非肿瘤组织

2.2 BEX1 和 BEX4 表达与 OSCC 临床病理参数之间的相关性 BEX1和BEX4蛋白的表达和OSCC

表 1 BEX1 蛋白和 BEX4 蛋白在 OSCC 组织和癌旁非肿瘤组织组织中的表达(n)

组别	n	BEX1 蛋白表达				BEX4 蛋白表达			
		阳性	阴性	χ^2 值	P 值	阳性	阴性	χ^2 值	P 值
OSCC	55	25	30	9.488	0.002	19	36	18.475	<0.001
癌旁	30	24	6			27	3		

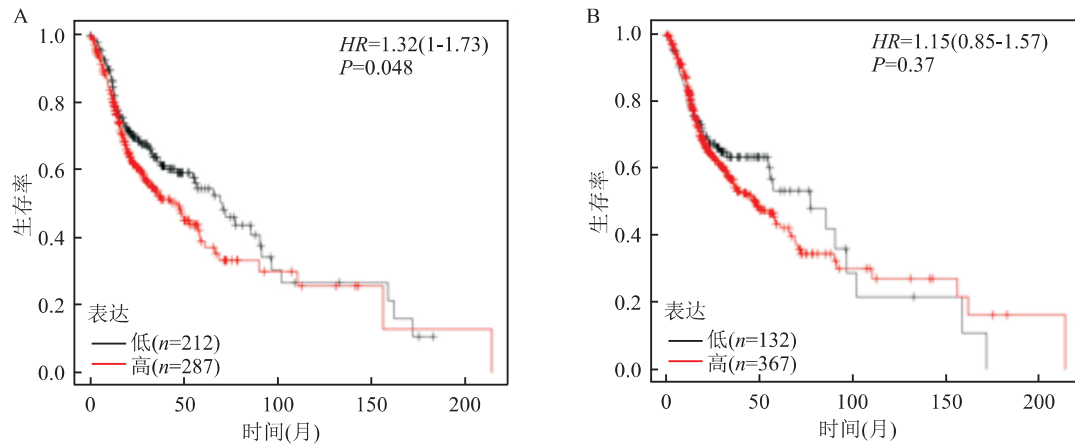


图2 基于 BEX1、BEX4 的总生存期 Kaplan-Meier 生存曲线

A: BEX1; B: BEX4

的分化程度、是否出现淋巴结转移以及临床分期存在着一定的相关性,且其中的差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时 BEX1 与 BEX4 蛋白的表达与患者的年龄、发病部位及性别等无相关性,见表 2。

通过绘制 Kaplan-Meier 生存图来计算基因表达与生存之间的相关性,结果(图 2)表明 BEX1 低表达的患者生存率更差。BEX4 表达与生存率无显著关系。

表 2 BEX1 和 BEX4 的表达与 OSCC 临床病理参数的关系 [n(%)]

病理参数	n	BEX1 阳性	χ^2 值	P 值	BEX4 阳性	χ^2 值	P 值
性别			0.262	0.609		1.266	0.26
男	35	15(42.9)			14(40.0)		
女	20	10(50.0)			5(25.0)		
年龄(岁)			0.026	0.871		2.383	0.123
≤65	39	18(46.2)			11(28.2)		
>65	16	7(43.8)			8(50.0)		
部位			1.689	0.43		2.402	0.301
舌	25	13(52.0)			11(44.0)		
颊	15	7(46.7)			5(33.3)		
牙龈	15	5(33.3)			3(20.0)		
淋巴转移			25.933	<0.001		18.912	<0.001
无	30	23(76.7)			18(60.0)		
有	25	2(8.0)			1(4.0)		
分化程度			7.691	0.021		9.997	0.007
低	17	5(29.4)			2(11.8)		
中	18	6(33.3)			5(27.8)		
高	20	14(70.0)			12(60.0)		
分期			9.544	0.002		9.406	0.002
I + II	34	21(61.8)			17(50.0)		
III + IV	21	4(19.0)			2(9.5)		

表 3 BEX1 蛋白和 BEX4 蛋白在口腔鳞癌组织表达关联性(n)

BEX1 蛋白表达	BEX4 蛋白表达			
	阳性	阴性	关联强度	P 值
阳性	15	10	0.489	<0.001
阴性	4	26		

2.3 BEX1 和 BEX4 在 OSCC 中表达的关联性
关联性分析显示, BEX1 和 BEX4 的表达关联强度为 0.489($P < 0.001$), 差异有统计学意义(表 3)。

2.4 BEX1 和 BEX4 Kaplan-Meier 生存分析
使用生物信息学在线工具, 利用 Cox 比例风险回归和

2.5 BEX1 和 BEX4 相互作用蛋白网络
根据方法部分的输入, 得到如下结果: BEX1: PPI 富集 $P = 0.00155$ (图 3)。其中在 PPI 网络中与 BEX1 相互作用的蛋白有 OMP、TCEAL5、LDB2、LDB1、NHLH2、TRAF6、RIPK2、NGF 等, 在细胞周期和神经元分化中起作用。抑制对神经生长因子(nerve growth factor, NGF) 的神经元分化。BEX4: PPI 富集 $P = 0.000258$ 。其中在 PPI 网络中与 BEX4 相互作用的蛋白有 TEX19、TCEAL7、MAP7D3、ATXN3L、FAM47B、SATL1、ITIH6 等, 主要参与了参与控制细胞周期进程和基因组稳定性。

3 讨论

发生于口腔位置的恶性肿瘤均可被称为口腔癌, 其中最为常见的便是 OSCC, OSCC 常见于牙龈、颊等位置, 患者的发病部位会出现硬结、溃疡等症状, 晚期患者甚至可出现颈部淋巴结转移或肿瘤细胞的远处转移^[11]。BEX 家族因子高度同源, 多项研究^[3]发现 BEX 因子多位于细胞质、细胞核内, 可在不同细胞器间动态穿插, 参与多种信号通路, 推测

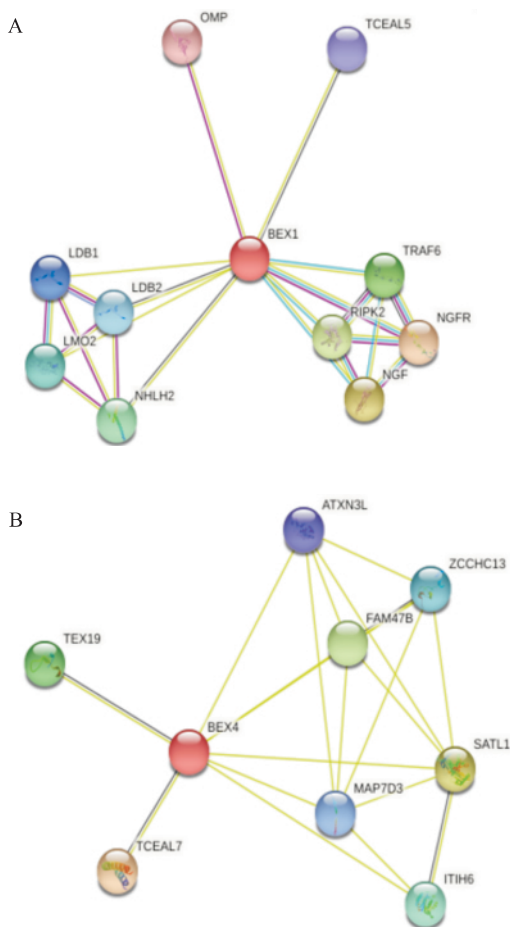


图3 BEX1 和 BEX4 相关蛋白网络图
A: BEX1; B: BEX4

其起到信号中介体作用。由于 BEX 家族基因启动子区富含 CG 区域,易受到甲基化等表观遗传学调节。现阶段关于抑癌基因的研究报道较少,近些年国内有学者研究^[12]发现 E-cadherin 在 OSCC 中的表达较癌旁组织显著降低,推测可能起到抑制癌基因的作用。本文研究 BEX1 和 BEX4 在口腔鳞癌中的表达情况,为口腔鳞癌的临床诊断提供帮助。

目前,Geng et al^[5]研究结果表明在食管鳞癌组织中 BEX1 蛋白的表达程度较低,且该蛋白的表达情况与 T 分期等情况呈负相关的关系。生存分析研究结果表明,BEX1 蛋白表达水平较低,可提示食管鳞癌患者的术后预后效果较差。Zhang et al^[7]研究表明 BEX 家族在肺腺癌组织中的表达水平明显低于正常组织,BEX1、BEX4 和 BEX5 的低表达水平与某些病理特征有关,尤其是在晚期肺腺癌中。生存分析表明,BEX 家族成员,特别是 BEX4,在临床早期和晚期都参与了肺腺癌患者的预后。这种表达模式可能作为肺腺癌患者诊断和预后的潜在标志

物。Zhu et al^[8]研究表明 BEX4 在胃癌中低水平表达,BEX4 低表达预测胃癌的生存率较差,它是诊断和预后胃癌的有价值的分子预测因子。

本研究分析了 55 例 OSCC 组织及 30 例癌旁非肿瘤组织中 BEX1 蛋白表达水平。结果显示 45.45% 的 OSCC 组织中 BEX1 蛋白阳性表达,BEX1 蛋白表达水平在 OSCC 中的表达较癌旁组织降低。Lee et al^[6]研究结果表明,在与咀嚼槟榔、抽烟及饮酒相关的 OSCC 标本中,BEX1 蛋白的表达程度较低,且有着较为显著的甲基化程度,启动子甲基化使 BEX1 和 LDOC1 失活可能代表了 OSCC 分子发病机制中的关键,这与其研究结果基本相符合。其 BEX4 蛋白在 OSCC 组织中阳性表达为 34.55%,且在中低分化、有淋巴结转移组明显低表达,表明随着 OSCC 恶性程度的提高,BEX4 表达水平越低,可能预示 OSCC 分期越晚。Gao et al^[9]研究显示,BEX4 通过抑制口腔癌细胞增殖和生长而起到抑癌作用,BEX4 的减少导致 OSCC 增殖倾向增加。本研究表明 BEX1 和 BEX4 蛋白的表达与 OSCC 分期、淋巴结的转移以及肿瘤分化程度相关,差异有统计学意义($P < 0.001$)。对 BEX1 和 BEX4 之间的相关性分析结果显示,OSCC 组织中 BEX1 蛋白表达水平与 BEX4 蛋白表达水平差异有统计学意义,关联强度为 0.489 ($P < 0.001$),说明分析 BEX1 和 BEX4 有助于 OSCC 患者的诊断及预后评价。通过 GEPIA 分析 BEX1 和 BEX4 表达水平对 OSCC 总体生存率的影响,显示 BEX1 低表达的患者其预后较差的趋势,意味着更短的总生存期 ($P < 0.05$),BEX4 表达与总体生存率无显著关系。

综上所述,BEX1 和 BEX4 在 OSCC 组织中低表达,且 BEX1 低表达提示 OSCC 患者预后较差,可能作为 OSCC 临床诊断及预后的关键因素。

参考文献

- [1] Valdez J A ,Brennan M T. Impact of oral cancer on quality of life [J]. Dent Clin North Am ,2018 ,62(1) : 143 - 54.
- [2] 原振英 管翠强 南欣荣. DNA 甲基化与口腔疾病的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志 ,2019 ,46(4) : 437 - 41.
- [3] Kazi J U ,Kabir N N ,Rönstrand L. Brain-Expressed X-linked (BEX) proteins in human cancers [J]. Biochim Biophys Acta ,2015 ,1856(2) : 226 - 33.
- [4] Karakoula K ,Jacques T S ,Phipps K P , 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.
- [5] Geng H T ,Cheng Z W ,Cao R J , et al. Low expression of BEX1

- predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell cancer[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2778–87.
- [6] Lee C H, Wong T S, Chan J Y, 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.
- [7] Zhang Z H, Luan Z Y, Han F, et al. Diagnostic and prognostic value of the BEX family in lung adenocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5523–33.
- [8] Zhu C, Xiao D. Aberrant brain-expressed X-linked 4 (BEX4) expression is a novel prognostic biomarker in gastric cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(47): e23133
- [9] Gao W, Li J Z, Chen S Q, et al. Decreased brain-expressed X-linked 4 (BEX4) expression promotes growth of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 92.
- [10] 刘 妹, 王 峰. CAV2、p53 在口腔鳞癌中的表达及意义[J]. *实验与检验医学*, 2020, 38(2): 397–400.
- [11] Arunkumar G, Deva Magendhra Rao A K, Manikandan M, et al. Dysregulation of miR-200 family microRNAs and epithelial-mesenchymal transition markers in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 649–57.
- [12] 程如玉, 韩 瑞, 王尚华, 等. YAP、E-cadherin 和 Vimentin 在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12): 1964–7.

Expression and clinical significance of BEX1 and BEX4 in oral squamous cell carcinoma

Wu Jiagen, Hou Jun, Xue Haowei, et al

(Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the expression of brain-expressed X-linked protein 1 (BEX1) and brain-expressed X-linked protein 4 (BEX4) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and adjacent tissues, and to explore its relationship with the occurrence and development of OSCC. **Methods** The expression of BEX1 and BEX4 proteins in OSCC tissues and non-tumor tissues was analyzed by immunohistochemistry method. Kaplan-Meier survival analysis in TCGA was performed to analyze the correlation between BEX1 and BEX4 expression in OSCC and the overall survival. The location of BEX1 and BEX4 in signal transduction and its upstream and downstream genes related to it were analyzed by the String-DB database. **Results** Among 55 cases of OSCC, 25 cases were positive for BEX1 protein (45.45%), 19 cases were positive for BEX4 protein (34.55%), 24 cases were positive for BEX1 in non-tumor tissues adjacent to cancer (80.00%), 27 cases were positive for BEX4 in non-tumor tissues adjacent to cancer (90.00%). The differences were statistically significant compared with adjacent tissues ($P < 0.01$). The expression of BEX1 protein and BEX4 protein was related with the stage of oral squamous cell carcinoma, lymph node metastasis and differentiation degree, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$); but neither of them was related to gender, age and tumor site. The correlation analysis showed that the correlation intensity of BEX1 protein and BEX4 protein expression was 0.489 ($P < 0.001$). Kaplan-Meier survival analysis showed that OSCC patients with low expression of BEX1 had a poor prognosis. **Conclusion** BEX1 and BEX4 may serve as biomarkers for predicting metastasis of OSCC.

Key words oral squamous cell carcinoma; BEX1; BEX4; immunohistochemistry