

## Bmi-1 在口腔鳞癌组织中的表达及意义\*

刘庭庭, 马洪\*\*, 段晓峰

(贵州医科大学 口腔医学系, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨 Bmi-1 基因在口腔鳞癌组织中的表达及意义。方法: 收集口腔鳞癌(OSCC)患者手术切除新鲜标本 30 例作为 OSCC 组, 癌旁 0.5 cm 外正常组织及正常体检者的口腔黏膜组织共 30 例作为正常对照组, 免疫组织化学染色 SP 法检测两组组织中 Bmi-1 蛋白的表达, 实时定量基因扩增荧光检测系统(QPCR)检测 Bmi-1 mRNA 的表达, 比较不同临床特征 OSCC 患者 Bmi-1 的表达差异。结果: OSCC 组织中, Bmi-1 蛋白和 mRNA 的表达明显高于正常对照组; 在 OSCC 组织中, 中低分化的 OSCC 组织的 Bmi-1 蛋白和 mRNA 表达高于高分化 OSCC 组织, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), Bmi-1 表达与患者年龄、性别无关( $P > 0.05$ )。结论: Bmi-1 基因检测可作为 OSCC 的辅助诊断指标之一。

**[关键词]** Bmi-1; 基因; 口腔肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)08-0942-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.08.019

### Bmi-1 Expression and its Clinical Significance in Oral Squamous Carcinoma Tissues

LIU Tingting, MA Hong, DUAN Xiaofeng

(Department of Oral Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the Bmi-1 gene expression and clinical significance in oral squamous carcinoma(OSCC) tissues. **Methods:** Fresh tissue samples of 30 patients with oral squamous cell carcinomas were collected as OSCC group, while 30 cases of 0.5 cm normal tissue adjacent to carcinoma and normal physical examination were taken as the normal control group. The expression of Bmi-1 protein in the two groups was detected by immunohistochemistry SP method, and the expression of mRNA Bmi-1 was detected by real-time quantitative PCR. **Results:** The expression of Bmi-1 protein and mRNA in OSCC tissue were significantly higher than those in normal control group. In OSCC tissues, the expression of Bmi-1 protein and mRNA in the low and middle differentiated OSCC tissues were higher than those in the highly differentiated OSCC tissues, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). BMI-1 expression was not related to patient's age and sex. **Conclusion:** Bmi-1 gene detection can be used as one of the auxiliary diagnostic indicators of oral squamous cell carcinomas.

**[Key words]** Bmi-1; gene; mouth neoplasms; carcinoma; squamous cell, immunohistochemistry

PcG 蛋白-多梳家族蛋白(polycomb group protein)是一类在染色质水平抑制靶基因转录的蛋白,在胚胎发育、细胞记忆、细胞周期、细胞增殖和

肿瘤形成等过程中起到非常重要的作用。B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点(B-cell-specific moloney murine leukemia virus integration site

\*[基金项目]贵阳市科技局社会发展项目科研基金一项[筑科合同(2013103)]

\*\*通信作者 E-mail:mahong1966@126.com

网络出版时间:2016-08-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160823.1343.058.html>

1, Bmi-1) 是目前研究中最深入的哺乳动物 PcG 家族成员。近年来,越来越多的证据表明, Bmi-1 在恶性肿瘤的发生发展中具有重要作用。Bmi-1 在很多肿瘤中处于高表达的状态,如髓母细胞瘤<sup>[1]</sup>、非霍奇金淋巴瘤<sup>[2]</sup>、肝癌<sup>[3]</sup>、结直肠癌<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>等,本研究通过检测口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)组织中 Bmi-1 的表达,并比较 OSCC 不同临床病理特征患者 Bmi-1 表达的差异,为 OSCC 的临床早期诊断、生物蛋白靶向治疗及预后监测判断提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 2012 年 9 月~2015 年 3 月手术切除 OSCC 患者 30 例作为 OSCC 组,男 22 例,女 8 例,高分化 22 例、中低分化 8 例;无淋巴结转移 25 例、有淋巴结转移 5 例。术前未采用任何针对肿瘤的治疗(放疗、化疗等),术中用尖刀切取标本后,盐水冲洗,置 -80 °C 冰箱保存;术后常规病理检查确诊为 OSCC。选择口腔黏膜正常组织及癌旁 0.5 cm 正常组织(经病理证实无癌累及)共 30 例作为正常对照组。

**1.1.2 主要试剂及设备** 小鼠抗人 Bmi-1 单克隆抗体(Abcam 公司),SP 免疫组化二抗试剂盒-通用型、苏木素及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, mRNA 抽提试剂盒 Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECTTM、逆转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 和 PCR 扩增试剂 Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master 购自 Roche 公司, CFX connect Real Time System PCR 仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 Bmi-1 蛋白表达** 采用免疫组织化学染色 SP 法,组织蜡块切成厚 5 μm 连续切片,脱蜡水化后,3% 去离子过氧化氢液封闭内源性过氧化物酶,高压锅波热处理修复抗原,正常山羊血清封闭特异性抗原,加入 Bmi-1 一抗工作液,4 °C 孵育过夜,加入生物素二抗, DAB 显色,苏木素复染,中性树脂胶封固;PBS 代替一抗,做阴性对照,实验程序严格按照试剂说明书进行。各组切片在光镜下观察、评分及病理图像采集<sup>[6-7]</sup>,每个样本观察 10 个高倍镜视野。根据阳性强度及面积记分,无色记 0 分,淡

黄色记 1 分,棕黄色及以上记 2 分;着色面积 < 1/3、1/3 ~ 2/3 和 > 2/3 分别为 0、1 和 2 分;0 ~ 1 分为阴性,2 ~ 3 分为阳性(+),4 分为强阳性(+++)。

**1.2.2 Bmi-1 mRNA 表达** 采用实时定量基因扩增荧光检测系统(real-time quantitative PCR detecting system, QPCR),利用磁珠法提取组织 mRNA,从存储在 RNALATER 试剂(-80 °C)的组织中切取 1~2 mm<sup>3</sup> 组织,加入蛋白溶解酶 K,55 °C 恒温箱中消化完全后,加入 40 μL Dynabeads dT25,置摇床 10 min,立即放入磁场中,移除上清液并用 BufferA/B 液顺次洗涤。加入 Tris-HCL,溶解磁珠并放入 80 °C 恒温箱 2 min,将收集来的大约 13 μL mRNA(在 Tris-HCL 中的)直接加入事先准备好的 7.5 μL cDNA Synthesis Master Mix 中。将样品放入热循环仪中,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 5 min,-20 °C 储存备用。将上述合成的 cDNA 上样至 10 μL 反应体系:SYBR Green I Master 5.0 μL,上下游引物 4.0 μL,模板 1 μL,用 CFX connect Real Time System PCR 仪进行扩增,反应条件为预变性 95 °C 5 min,变性 95 °C 10 s,退火 65 °C 30 s,共 64 个循环<sup>[8]</sup>。每个样品 3 个复孔,取 CT 平均值,采用相对定量法分析结果。

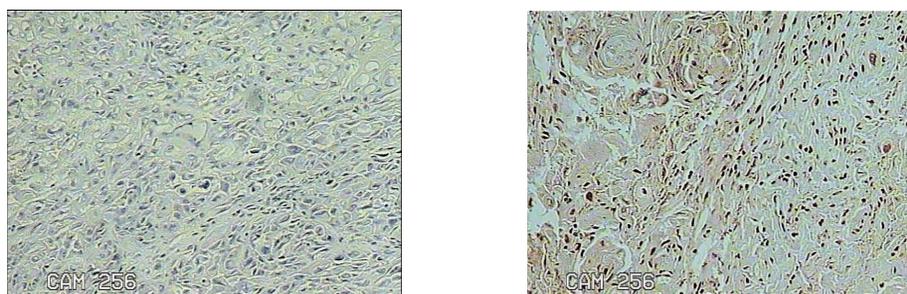
### 1.3 统计学方法

用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验,不符合正态分布资料间的比较采用非参数秩和检验或  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Bmi-1 的蛋白表达

免疫组化结果显示 Bmi-1 主要着色于细胞核内,为棕黄色染色颗粒,在正常组织中几乎无阳性表达,见图 1。OSCC 组中, Bmi-1 蛋白的阳性表达率均高于正常对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。临床病理分析显示, Bmi-1 的表达随着肿瘤体积增大而升高,阳性率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );随着临床分期的进展, Bmi-1 蛋白在 OSCC 组织中的表达也升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );OSCC 组织中, Bmi-1 蛋白表达与患者年龄、性别无关,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。



正常口腔黏膜 OSCC 黏膜  
图 1 正常口腔黏膜及 OSCC 组织中 Bmi-1 蛋白表达 (SP 法, ×100)

Fig. 1 Bmi-1 protein expression in tissue

表 1 OSCC 及正常口腔黏膜组织中 Bmi-1 蛋白表达

Tab. 1 Bmi-1 protein expression in oral squamous carcinoma tissues and normal tissues

分组	Bmi-1 蛋白表达				阳性率 (%)	$\chi^2$	P
	n	-	+	++			
正常对照组	30	21	7	2	30.0	17.38	<0.01
OSCC 组	30	5	15	10	83.3		

### 2.2 Bmi-1 mRNA 表达

30 例 OSCC 组织中 Bmi-1 mRNA 表达 (平均秩和 45.50) 高于正常对照组 (平均秩和 15.50), 差异有统计学意义 ( $Z = -6.666, P < 0.01$ )。在 OSCC 组织中, Bmi-1 mRNA 的表达随着肿瘤体积增大而升高, 中低分化组表达高于高分化组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Bmi-1 mRNA 表达与患者年龄、性别无关, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

### 3 讨论

已知在多种肿瘤中存在一类具有自我更新和多向分化潜能的肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC)。Bmi-1 与 CSC 的自我更新及肿瘤的放化疗敏感性都有关系, 降低 Bmi-1 的表达可以促进肿瘤细胞的凋亡和衰老, 并增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性, Bmi-1 可能为肿瘤治疗的一个重要靶点<sup>[9-10]</sup>。有研究发现, Bmi-1 的特异性表面标志用于头颈部鳞癌干细胞的检测和治疗方案的制定, 能使健康人类口腔角质细胞的寿命延长<sup>[11-12]</sup>, 提示 Bmi-1 在鳞癌组织发生、发展及治疗中起重要作用。本课题通过对 OSCC 组织中 Bmi-1 表达情况进行检测, 发

表 2 不同临床病理参数 OSCC 患者口腔黏膜组织 Bmi-1 蛋白表达

Tab. 2 Bmi-1 expression in oral squamous cell carcinomas and its relationship with clinicopathological parameters

病理参数	n	口腔黏膜 Bmi-1 蛋白表达	
		阴性	阳性
性别			
男	22	4	18 (81.8)
女	8	1	7 (87.5)
年龄			
≥50 岁	18	4	14 (77.8)
<50 岁	12	1	11 (91.7)
分化状态			
高分化	22	5	18 (81.8)
中低化	8	0	8 (100.0)
临床分期 <sup>(1)</sup>			
I - II	19	4	15 (78.9)
III - IV	11	1	10 (90.9)
淋巴结转移 <sup>(1)</sup>			
是	5	0	5 (100.0)
否	25	5	20 (80.0)
肿瘤大小 <sup>(1)</sup>			
≤2 cm	10	3	7 (70.0)
5 cm ≥ ~ >2 cm	15	2	13 (86.7)
>5 cm	5	0	5 (96.5)

<sup>(1)</sup> 同病理参数下的各指标比较,  $P < 0.05$

现在 OSCC 患者口腔黏膜中 Bmi-1 蛋白的表达主要在基底细胞层, 阳性表达率为 83.3%, 高于文献报道的 79.0%<sup>[13]</sup>, 这可能与样本的数量有关; 同时本实验还发现, 在 OSCC 组织中 Bmi-1 基因的表达高于正常对照组, 且 Bmi-1 的高表达与临床分期及

表 3 不同临床特征 OSCC 患者口腔黏膜 Bmi-1 mRNA 表达比较

Tab. 3 The correlation between Bmi-1 expression and clinical feature of OSCC

OSCC 患者	<i>n</i>	平均秩次	<i>Z</i>	<i>P</i>
性别				
男	22	15.32		
女	8	16.00	-0.188	0.851
年龄				
≥50 岁	18	12.71		
<50 岁	12	17.36	-1.419	0.156
分化状态				
高分化	22	12.09		
中低分化	8	24.88	-3.520	<0.01
临床分期				
I - II	22	13.59		
III - IV	8	20.75	-1.971	0.049
淋巴结转移				
是	5	24.60		
否	25	13.68	-2.534	0.011

淋巴结转移成正相关,提示 Bmi-1 在口腔鳞癌发生浸润转移过程中也起重要作用,其发生机制需进一步研究。综上所述,Bmi-1 基因检测可作为 OSCC 的辅助诊断指标之一,研究 Bmi-1 在 OSCC 中的表达与 OSCC 的相关性及协同作用,可为 OSCC 的临床诊断、预防、生物蛋白靶向治疗及预后监测判断等提供理论基础。

#### 4 参考文献

- [1] Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medullo blastomas [J]. *Nature*, 2004 (6980): 337 - 341.
- [2] Van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, et al. Co-expression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodg? kin lymphoma [J]. *Blood*, 2011 (12): 3896 - 3901.
- [3] Neo SY, Leow CK, Vega VB, et al. Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach [J]. *Hepatology*, 2014(4): 944 - 953.
- [4] Kim JH, Yoon SY, Kim CN, et al. The BMI-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins [J]. *Cancer Lett*, 2004(2): 217 - 224.
- [5] Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, et al. Overexpression of BMI-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer [J]. *Breast*, 2004 (5): 383 - 388.
- [6] Omoto Y. Clinical value of the wild-type estrogen receptor  $\beta$  expression in breast cancer [J]. *Cancer letters*, 2001 (2): 207 - 212.
- [7] Elledge RM, Allred DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer [J]. *Breast cancer research and treatment*, 1994(1): 39 - 47.
- [8] Muy-Teck T, Iain LH, Daniela EC, et al. Exploiting FOXM1-Orchestrated Molecular Network for Early Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Prognosis [J]. *International Journal of Cancer*, 2012(132): 2095 - 2106.
- [9] López-Arribillaga E, Rodilla V, Pellegrinet L, et al. Bmi1 regulates murine intestinal stem cell proliferation and self-renewal downstream of Notch [J]. *Development*, 2015(1): 41 - 50.
- [10] Liu YI, Liu F, Yu H, et al. Akt phosphorylates the transcriptional repressor bmi-1 to block its effects on the tumor-suppressing ink4a-arf locus [J]. *Sci Signal*, 2012 (247): 77.
- [11] Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, et al. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer [J]. *Oral Oncol*, 2011(4): 237 - 243.
- [12] 姚小宝, 王晓侠, 张少强, 等. BMI-1 基因过度表达与喉癌的分化、转移及预后的关系 [J]. *西安交通大学学报*, 2011(2): 246 - 249.
- [13] Kim RH, Kang MK, Shin KH, et al. BMI-1 cooperates with human papillomavirus type 16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2007(3): 462 - 472.

(2016-02-05 收稿, 2016-05-15 修回)  
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘 华