

# BST2 在喉鳞状细胞癌中的表达特征及其意义

杨钰玮, 王建星, 贾巧静, 杨志超, 单春光\*

(河北医科大学第二医院耳鼻喉一科, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的** 探讨骨髓基质细胞抗原 2(bone marrow stromal cell antigen 2, BST2)基因在人喉鳞状细胞癌组织中的表达特征及与患者预后及病理特征的关系,明确 BST2 基因沉默对喉癌细胞系细胞增殖、细胞侵袭、细胞迁移的影响。**方法** 通过免疫组织化学实验方法检测 BST2 在喉癌组织和癌旁组织中的差异表达。采用 (cell counting kit 8, CCK-8)法检测 BST2 基因沉默后对细胞增殖状况的影响,细胞划痕实验检测 BST2 基因沉默后对细胞迁移能力的影响,Transwell 实验检测 BST2 基因沉默后对细胞侵袭能力的影响。收集患者的临床资料,分析临床参数与 BST2 蛋白表达水平之间的相关性。Kaplan-Meier 生存曲线比较不同 BST2 蛋白的表达患者的生存时间,采用单因素分析和多因素 Cox 回归分析患者临床特征对生存时间的影响,受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析评价 BST2 的预测价值。**结果** 免疫组织化学结果显示, BST2 蛋白在喉癌组织中的表达高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。在 TU686 细胞系中, CCK-8 结果表明, 48 h 后 siRNA-3 组的 OD 值为  $2.35 \pm 0.18$ , 显著低于正常对照组  $2.87 \pm 0.13$  和阴性对照组  $2.71 \pm 0.12$  ( $F = 16.330, P < 0.001$ )。细胞划痕实验表明, 12 h 后 BST2 基因沉默组细胞愈合率为  $(15.1 \pm 3.71)\%$ , 显著低于正常对照组  $(35.07 \pm 5.25)\%$  和阴性对照组  $(33.03 \pm 5.04)\%$  ( $F = 16.280, P = 0.004$ ); 24 h 后 BST2 基因沉默组细胞愈合率为  $(30.41 \pm 4.01)\%$ , 显著低于正常对照组  $(75.05 \pm 4.44)\%$  和阴性对照组  $(70.6 \pm 4.97)\%$  ( $F = 89.951, P < 0.001$ )。Tanswell 实验表明, BST2 基因沉默组细胞侵袭的细胞数为  $82.67 \pm 2.51$ , 显著低于正常对照组  $134.67 \pm 2.52$  和阴性对照组  $121.67 \pm 4.73$  ( $F = 188.314, P < 0.001$ )。不同临床分期( $P = 0.032$ )及生存时间( $P < 0.001$ )喉癌患者 BST2 表达水平差异有统计学意义; Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, BST2 表达水平较高的患者生存时间较短( $HR = 5.102, P < 0.001$ )。单因素分析结果显示: 不同临床分期( $\chi^2 = 17.383, P < 0.001$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 14.928, P < 0.001$ )及 BST2 表达水平( $\chi^2 = 21.165, P < 0.001$ )喉癌患者的生存时间差异有统计学意义; 多因素 Cox 回归模型结果显示, 临床分期( $HR = 4.228, 95\%CI: 1.881 \sim 9.501, P < 0.001$ )及 BST2 表达水平( $HR = 4.757, 95\%CI: 2.259 \sim 10.019, P < 0.001$ )是喉癌患者生存时间的影响因素。ROC 分析显示, BST2 表达水平对喉癌患者预后较好的预测价值(曲线下面积为 0.730)。**结论** BST2 蛋白在喉癌组织中高表达, BST2 高表达可以促进喉癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 且 BST2 高表达率与喉癌患者生存时间有关。

**[关键词]** 喉肿瘤; 骨髓基质细胞抗原 2; 生存 doi: 10.3969/j.issn.1007-3205.2025.04.015

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)04-0465-09

## Expression characteristics and significance of BST2 in laryngeal squamous cell carcinoma

YANG Yu-wei, WANG Jian-xing, JIA Qiao-jing, YANG Zhi-chao, SHAN Chun-guang\*

(Department of Otolaryngology, the Second Hospital of Hebei Medical University,  
Shijiazhuang 050000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression characteristics of bone marrow stromal

[收稿日期] 2024-04-17

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2020206475); 河北省重点研发计划项目民生科技专项(20372401D); 河北省医学科学研究课题计划(20210408)

[作者简介] 杨钰玮(1997-), 女, 河北衡水人, 河北医科大学第二医院医师, 医学硕士, 从事耳鼻喉科疾病诊治研究。

\* 通信作者。E-mail: shanchunguang@163.com

cell antigen 2 (BST2) gene in human laryngeal squamous cell carcinoma and its relationship with the prognosis and pathological features of patients, and to determine the effects of BST2 gene silencing on the proliferation, invasion and migration of laryngeal cancer cell lines. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the differential expression of BST2 in laryngeal cancer tissues and adjacent tissues. The effects of BST2 gene silencing on cell proliferation, migration ability and invasion ability were detected by cell counting kit 8 (CCK-8) method, cell scratch test, and Transwell test, respectively. Clinical data of patients were collected to analyze the correlation between clinical parameters and the expression level of BST2 protein. Kaplan-Meier survival curve was used to compare the survival time of patients with different expressions of BST2 protein. Univariate and multivariate Cox regression analyses were used to analyze the effects of clinical characteristics on survival time of patients. The predictive value of BST2 was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The immunohistochemical results showed that the expression of BST2 protein in laryngeal cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, showing significant difference ( $P < 0.001$ ). In the TU686 cell line, the results of CCK-8 showed that the OD value of siRNA-3 group was  $2.35 \pm 0.18$  at 48 h, which was significantly lower than that of the normal control group  $2.87 \pm 0.13$  and negative control group  $2.71 \pm 0.12$  ( $F = 16.330$ ,  $P < 0.001$ ). The cell scratch test showed that the healing rate of the BST2 gene silencing group was  $(15.1 \pm 3.71)\%$  at 12 h, which was significantly lower than that of the normal control group  $(35.07 \pm 5.25)\%$  and the negative control group  $(33.03 \pm 5.04)\%$  ( $F = 16.280$ ,  $P = 0.004$ ); the healing rate was  $(30.41 \pm 4.01)\%$  at 24 h, which was significantly lower than that of the normal control group  $(75.05 \pm 4.44)\%$  and the negative control group  $(70.6 \pm 4.97)\%$  ( $F = 89.951$ ,  $P < 0.001$ ). The Transwell experiment showed that the number of invasive cells in the BST2 gene silencing group was  $82.67 \pm 2.51$ , which was significantly lower than that of the normal control group  $134.67 \pm 2.52$  and the negative control group  $121.67 \pm 4.73$  ( $F = 188.314$ ,  $P < 0.001$ ). There were significant differences in the expression of BST2 in patients with different clinical stages ( $P = 0.032$ ) and survival time ( $P < 0.001$ ). Kaplan-Meier survival curve analysis showed that higher BST2 expression level was associated with shorter survival time ( $HR = 5.102$ ,  $P < 0.0001$ ). Univariate analysis results showed that, clinical stage ( $\chi^2 = 17.383$ ,  $P < 0.001$ ), lymph node metastasis ( $\chi^2 = 14.928$ ,  $P < 0.001$ ) and BST2 expression level ( $\chi^2 = 21.165$ ,  $P < 0.001$ ) were significantly correlated with the survival time of laryngeal cancer patients. The results of multivariate COX regression model showed that, clinical stage ( $HR = 4.228$ ,  $95\% CI: 1.881 - 9.501$ ,  $P < 0.001$ ) and BST2 expression level ( $HR = 4.757$ ,  $95\% CI: 2.259 - 10.019$ ,  $P < 0.001$ ) was influencing factors of the survival time of these patients, and ROC analysis showed that the expression level of BST2 had a good predictive value for the prognosis of the patients ( $AUC = 0.730$ ). **Conclusion** BST2 protein is highly expressed in laryngeal cancer tissues, and the high expression of BST2 can promote the proliferation, invasion and migration of laryngeal cancer cells. In addition, the high expression rate of BST2 is related to the survival of laryngeal cancer patients.

**[Key words]** laryngeal neoplasms; bone marrow stromal cell antigen 2; survival

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是发生在头颈部的恶性肿瘤,是世界范围内常见的癌症<sup>[1]</sup>。HNSCC起源于口腔、咽和喉的上皮细胞,占头颈部癌症的90%以上<sup>[2]</sup>。2022年,中国有139 170例新发病例和

75 640例死亡病例与HNSCC相关<sup>[3]</sup>。目前临床上通常采用手术联合放疗、化疗及生物靶向治疗的治疗模式,肿瘤相关基因作为重要生物标志物,逐渐成为喉癌的潜在治疗靶点。骨髓基质细胞抗原2(recombinant bone marrow stromal cell antigen 2,

BST2)在癌症发生发展中起着关键作用,已有实验证明其在结直肠癌<sup>[4]</sup>、卵巢癌<sup>[5]</sup>、胰腺癌<sup>[6]</sup>、宫颈癌<sup>[7]</sup>、胶质母细胞瘤<sup>[8]</sup>等疾病中均呈现高表达。而目前对BST2在头颈鳞癌中的表达与临床意义研究极少。本研究目的在于探讨BST2在喉癌(laryngeal carcinoma, LSCC)中的表达情况及其与喉癌发生发展的关系,希望为喉癌的治疗提供新的思路。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自2018年9月—2022年11月在河北医科大学第二医院的喉癌手术患者。组织样本包括LSCC组织和癌旁组织,LSCC组织样本数为78例,癌旁组织样本数为74例。其中4例喉癌组织样本取自于医院病理科,为2018年9月—2020年8月建档留存的喉癌手术患者石蜡样本,由于患者喉癌累及范围较小,遂行支撑喉镜下CO<sub>2</sub>激光辅助手术治疗,缺少相对应的安全缘组织样本。所有患者术前均未进行过放化疗及靶向治疗,采用病理证实喉鳞状细胞癌患者的癌组织及癌旁组织为研究对象,癌组织为试验组,癌旁组织为对照组。采集患者性别、年龄、烟酒史、肿瘤发生部位、是否发生淋巴结转移、临床分期、生存时间等相关临床资料,分析探讨BST2表达水平与所得临床参数的相关性。

本研究经河北医科大学第二医院伦理委员会批准通过。

1.2 试剂 BST2抗体及 $\beta$ -actin内参抗体购自Proteintech生物科技有限公司,SP法免疫组织化学Kit及DAB Kit(20 $\times$ )购自北京中杉金桥科技公司,人喉癌细胞系TU686购自iCell Bioscience, BST2 siRNA购买于广州锐博生物技术有限公司,苏木精染色液、RPMI-1640培养基、细胞基质胶、1%结晶紫和BCA蛋白浓度测定试剂盒、胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司,蛋白裂解液RIPA购自英文特生物技术有限公司,胎牛血清购买于Gibco生物科技有限公司,Ripro transfectionMax转染试剂、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自河北瑞帕特生物科技有限公司,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、20 $\times$ TBST Buffer购自北京酷来搏科技有限公司,免冰浴快速转膜缓冲液(10 $\times$ )购自上海雅酶生物医药科技有限公司,预染蛋白Marker购自江苏亲科生物研究中心有限公司,Cell counting kit(CCK-8)购自东仁化学科技有限公司。

1.3 免疫组织化学 制备石蜡切片,将切片置于

65 $^{\circ}$ C恒温烤箱中烘烤1h后置于二甲苯及梯度乙醇中进行脱蜡复水,于柠檬酸盐抗原修复液中加热后冷却进行抗原修复,置于湿化盒中用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育,去除内源性过氧化物酶,切片滴加血清封闭液,孵育。后进行一抗孵育,二抗孵育。滴加卵白素,室温孵育后滴加DAB显色液,苏木素复染,然后依次将切片浸于梯度酒精缸中脱水,中性树胶封片,镜检。在光学显微镜下对切片分别按染色强度(阴性0分;弱1分;中等2分;强阳性3分)及阳性染色范围(<5%,0分;5%~25%,1分;26%~50%,2分;51%~75%,3分;>75%,4分)进行评分,以染色指数(染色强度 $\times$ 染色范围)评价蛋白表达强度,0~7分被认为是低表达,8~12分被认为是高表达。

1.4 细胞培养 人喉癌细胞系TU686购自iCell Bioscience。TU686细胞采用RPMI1640培养基,内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素。细胞的培养条件为37 $^{\circ}$ C,培养箱CO<sub>2</sub>浓度5%、湿度95%。待细胞长满T25培养瓶后,传代至6孔板中,进行下一步实验。

1.5 CCK-8实验 将不同表达BST2基因的细胞用胰蛋白酶消化后,细胞计数板计数并制备细胞悬液,细胞浓度梯度为4 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL,2 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL,1 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL,5 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL,2.5 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL,1.25 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL,细胞悬液混匀后,吸取100 $\mu$ L接种于96孔板中,细胞培养12h后分别在每孔加入10 $\mu$ L CCK-8试剂,培养4h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(optical density, OD)值。

1.6 细胞划痕实验 将不同表达BST2基因的细胞用胰蛋白酶消化后接种于6孔板中(6孔板背面提前每隔0.5~1 cm均匀划线),细胞浓度为2 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL。待细胞铺满整个6孔板,在6孔板中进行划线,经PBS冲洗,然后加入2 mL基础培养基RPMI1640,置于细胞培养箱中继续培养。在划痕后的0 h、12 h、24 h在显微镜下观察拍照。使用Image J软件测量划痕面积或移动距离。

1.7 Transwell实验 稀释的Matrigel胶均匀涂抹于Transwell上室的聚碳酸酯膜表面,置于细胞培养箱中过夜,在Transwell下室加入600 $\mu$ L含20% FBS的完全培养基,将Transwell小室置于24孔板内,向上室中加入200 $\mu$ L细胞悬液,将其放入培养箱中培养48h后进行细胞固定,细胞染色,后在高倍显微镜下选取9个视野观察细胞并计数。

1.8 统计学方法 应用SPSS 21.0统计软件和GraphPad Prism8.0统计软件进行数据分析及作

图。原始数据在分析前采用 Kolmogorov-Smirnov 检验分析其是否符合正态分布。计量资料比较采用单因素方差分析、SNK-*q* 检验和重复测量的方差分析,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。Kaplan-Meier 生存曲线分析评估 BST2 蛋白的表达与患者生存的相关性,采用单变量 Log-rank 检验进行单因素分析,并将差异有统计学意义的变量作为协变量,构建 Cox 回归模型,采用 Cox 回归分析探讨患者临床特征对生存时间的影响;受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析评价 BST2 对喉癌患者预后的预测价值。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 组织水平验证 BST2 在喉鳞状细胞癌中的表达特征 免疫组织化学染色检测喉癌及癌旁组织中 BST2 蛋白表达发现,BST2 主要表达在细胞膜及细胞质表达,且喉癌组织中 BST2 蛋白表达明显高于癌旁正常组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1,表 1。

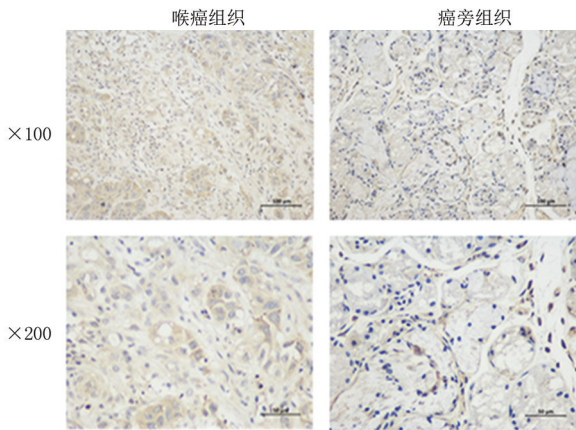


图 1 免疫组织化学法检测 BST2 在喉鳞癌组织及癌旁组织中的表达

Figure 1 The expression of BST2 in laryngeal squamous cell carcinoma and adjacent tissues detected by immunohistochemical method

表 1 BST2 在喉癌组织和癌旁组织中的表达

Table 1 The expression of BST2 in laryngeal cancer and adjacent normal tissues

(例数,%)

部位	例数	BST2 蛋白	
		高表达	低表达
喉癌组织	78	47(60.26)	31(39.74)
癌旁组织	74	25(33.78)	49(66.22)
$\chi^2$ 值		10.674	
<i>P</i> 值		<0.001	

2.2 细胞水平验证 BST2 基因沉默对 LSCC 细胞生物学功能的影响 通过 CCK-8 实验检测 BST2 基因沉默后,TU686 细胞的增殖活性。结果表明,随时间延长,3 组 OD 值均呈升高趋势,siRNA-3 组 OD 值显著低于正常对照组和阴性对照组,组间、时点间、组间·时点间交互作用差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。说明 BST2 在调节 LSCC 细胞增殖方面发挥重要作用。

通过划痕实验和 Transwell 实验检测沉默 BST2 对 TU686 细胞的迁移和侵袭能力的影响,结果显示:敲低 BST2 的 TU686 细胞 12 h 后划痕愈合率显著低于正常对照组( $P = 0.004$ );24 h 后划痕愈合率低于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 2,表 3;敲低 BST2 基因 24 h 后正常对照组 TU686 细胞穿过小室的细胞为  $(134.67 \pm 2.52)$  个,siRNA-3 组 TU686 细胞穿过小室的细胞为  $(82.67 \pm 2.51)$  个,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 3,表 4。BST2 在 LSCC 细胞迁移、侵袭方面发挥着重要作用。

表 2 TU686 细胞 BST2 敲除后的细胞增殖情况

Table 2 Cell proliferation in TU686 cells after BST2 knockout

( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值			
	0 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	0.40±0.04	0.95±0.11	2.15±0.04	2.87±0.13
阴性对照组	0.43±0.03	0.82±0.04	1.76±0.08	2.71±0.12
siRNA-3 组	0.41±0.04	0.63±0.05	1.49±0.14	2.35±0.18
组间	<i>F</i> 值=87.290		<i>P</i> 值<0.001	
时点间	<i>F</i> 值=1 243.120		<i>P</i> 值<0.001	
组间·时点间	<i>F</i> 值=4.710		<i>P</i> 值<0.001	

2.3 不同临床特征喉癌患者 BST2 表达情况 在采集的 78 例样本中,不同临床分期和生存时间喉癌患者 BST2 蛋白高表达率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 BST2 表达水平不同性别、年龄、烟酒史、有无淋巴结转移、肿瘤部位及分化类型喉癌患者 BST2 蛋白高表达率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 5。

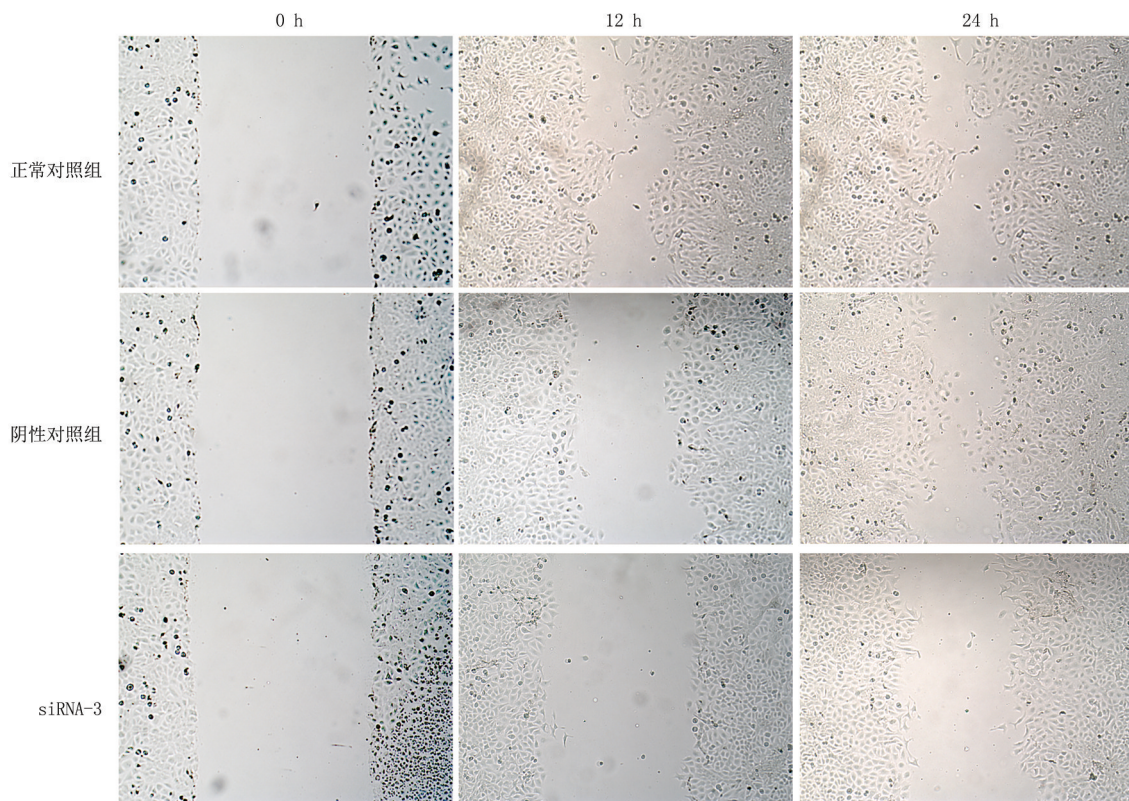


图2 TU686 细胞 BST2 敲除后的细胞划痕情况 (×50)

Figure 2 Cell scratches in TU686 cells after BST2 knockout (×50)

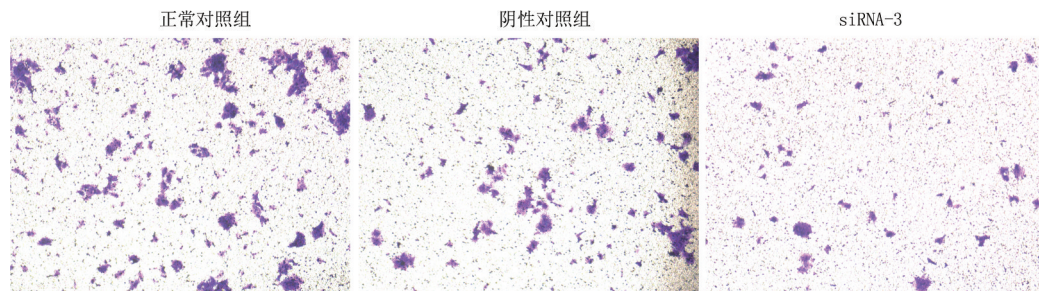


图3 TU686 细胞 BST2 敲除后的细胞侵袭情况 (结晶紫染色 ×50)

Figure 3 Cell invasion of TU686 cells after BST2 knockout (crystal violet staining ×50)

表3 12 h 和 24 h 后细胞划痕结果

Table 3 Cell scratch results at 12 h and 24 h

(n=3,  $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	12 h 愈合率	24 h 愈合率
正常对照组	35.07 ± 5.25	75.05 ± 4.44
阴性对照组	33.03 ± 5.04	70.60 ± 4.97
siRNA-3 组	15.10 ± 3.71 * #	30.41 ± 4.01 * #
F 值	16.280	89.951
P 值	0.004	<0.001

\* P 值 < 0.05 与正常对照组比较 # P 值 < 0.05 与阴性对照组比较 (SNK-q 检验)

表4 细胞侵袭结果

Table 4 Cell invasion results

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	侵袭数(个)
正常对照组	134.67 ± 2.52
阴性对照组	121.67 ± 4.73
siRNA-3 组	82.67 ± 2.51 * #
F 值	188.314
P 值	<0.001

\* P 值 < 0.05 与正常对照组比较 # P 值 < 0.05 与阴性对照组比较 (SNK-q 检验)

表5 BST2 表达与喉癌患者临床特征的关系

Table 5 Relationship between BST2 expression and clinical characteristics of patients with laryngeal cancer

临床特征	例数	BST2		$\chi^2$ 值	P 值
		高表达	低表达		
(例数)					
年龄					
≤60 岁	31	18	13	0.103	0.748
>60 岁	47	29	18		
性别				0.185	0.667
男性	74	45	29		
女性	4	2	2		
烟酒史				1.181	0.277
有	58	37	21		
无	20	10	10		
临床分期				4.608	0.032
I~II 期	20	8	12		
III~IV 期	58	39	19		
淋巴结转移				1.523	0.217
有	54	35	19		
无	24	12	12		
肿瘤部位				3.768	0.152
声门上型	38	26	12		
声门型	30	14	16		
声门下型	10	7	3		
生存时间				25.147	<0.001
<30 个月	49	40	9		
≥30 个月	29	7	22		
分化类型				3.438	0.179
高分化	27	13	14		
中分化	25	15	10		
低分化	26	19	7		

2.4 不同 BST2 表达水平 LSCC 患者 Kaplan-Meier 生存曲线分析 进一步评估 BST2 蛋白的表达与患者生存的相关性,进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析,结果显示:BST2 表达水平较高的患者,生存时间明显较短(HR=5.102, P<0.001),见图 4。

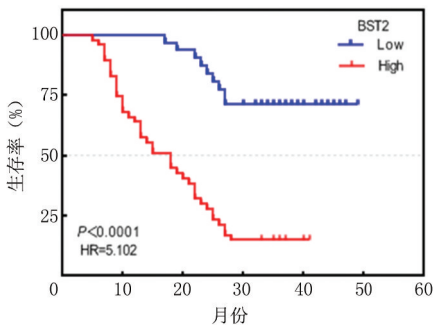


图4 BST2 表达水平与 LSCC 患者生存率比较  
Figure 4 Comparison of BST2 expression level and survival rate of LSCC patients

2.5 单因素分析 为探究喉癌患者临床特征与其生存时间的关系,首先进行单变量 Log-rank 检验,不同临床分期( $\chi^2 = 17.383, P < 0.001$ )、淋巴结转移( $\chi^2 = 14.928, P < 0.001$ )和 BST2 表达水平( $\chi^2 =$

21.165,  $P < 0.001$ )患者生存时间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其余变量间生存时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。具体来看,临床分期为 III~IV 期、发生淋巴结转移和 BST2 高表达的患者,其生存时间均较短。见表 6。

表6 单因素分析患者特征对喉癌患者生存时间的影响

Table 6 Univariate analysis of the impact of patient characteristics on survival time of patients with laryngeal cancer

临床特征	例数	生存时间(月)		$\chi^2$ 值	P 值
		估计值	95%CI		
生存时间(月)					
年龄(岁)					
≤60	31	29.078	22.473~35.683	0.417	0.518
>60	47	25.246	20.536~29.956		
性别				0.348	0.573
男性	74	26.181	22.206~30.157		
女性	4	32.750	16.912~48.588		
烟酒史				0.243	0.622
有	58	27.163	22.799~31.527		
无	20	24.296	16.012~32.581		
临床分期				17.383	<0.001
I~II 期	20	41.906	37.002~46.811		
III~IV 期	58	21.175	17.040~25.311		
淋巴结转移				14.928	<0.001
有	54	21.098	16.910~25.286		
无	24	38.215	32.300~44.129		
肿瘤部位				0.056	0.813
声门上型	38	24.828	19.421~30.235		
声门型	30	30.650	24.176~37.123		
声门下型	10	19.600	11.820~27.380		
BST2				21.165	<0.001
高表达	47	16.000	12.664~19.336		
低表达	31	38.413	34.347~42.479		

2.6 多因素 Cox 回归分析 将单因素分析中有统计学意义的变量作为协变量,构建 Cox 回归模型。采用逐步向前法(Forward:LR)筛选变量,变量进入模型的标准为 0.05,变量从模型中剔除的标准为 0.10,变量赋值情况见表 7。

表7 Cox 回归分析变量赋值表

Table 7 Variable assignment table for Cox regression analysis

变量	赋值情况
临床分期	I~II 期=0, III~IV 期=1
淋巴结转移	有=0, 无=1
BST2	低表达=0, 高表达=1
生存时间	连续变量
生存结局	≥30 个月=0, <30 个月=1

Cox 回归分析结果显示,临床分期为 III~IV 期的患者,其生存时间缩短的风险是临床分期为 I~II 期的 4.228 倍(HR = 4.228, 95%CI: 1.881~9.501,  $P < 0.001$ );BST2 高表达的患者,其生存时间缩短的风险是 BST2 低表达者的 4.757 倍(HR =

4.757, 95%CI: 2.259~10.019,  $P < 0.001$ )。临床分期和 BST2 高表达可能是威胁患者生存的独立危险因素。见表 8。

表 8 Cox 回归分析结果

Table 8 Results of Cox regression analysis

变量	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	P 值	HR 值	95%CI
临床分期	1.442	0.413	12.173	$< 0.001$	4.228	1.881~9.501
BST2	1.560	0.380	16.844	$< 0.001$	4.757	2.259~10.019

2.7 BST2 表达对 LSCC 患者预后的预测意义 采用 ROC 曲线分析评价 BST2 对 LSCC 患者预后的预测价值。ROC 曲线下面积为 0.730 (95%CI: 0.651~0.808), 说明 BST2 对喉癌患者的预后有良好的预测价值, 见图 5。

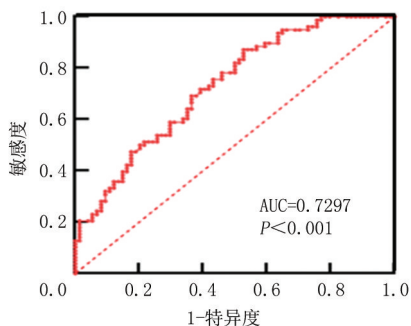


图 5 BST2 表达的 ROC 曲线

Figure 5 ROC curve of BST2 expression

### 3 讨 论

头颈部鳞状细胞癌包括口腔、口咽、下咽和喉的恶性肿瘤, 头颈部鳞状细胞癌的发生主要与吸烟、酗酒及 HPV 感染有关。目前临床上通常采用传统的手术联合放疗、化疗及生物靶向治疗的综合治疗模式, 与此同时, 肿瘤相关基因作为临床上新的重要生物标志物, 并逐渐成为潜在治疗靶点, 被越来越多的研究者所关注。通过严谨设计的临床试验确定肿瘤相关基因的具体功能, 可以指导其今后在恶性肿瘤靶向治疗中的应用。

BST2 也称为 CD317、HM1.24 或 tetherin, 是一种 II 型跨膜糖蛋白, 含有 180 个氨基酸, 它的相对分子质量为 35 000, 它的基因分布在染色体 19p13.2 上。BST2 包括 4 个主要部分: N 端和 C 端、跨膜区和胞外螺旋区<sup>[9]</sup>。它的表达是由干扰素 I (interferon- I, IFN- I) 诱导的, 它作为一种免疫应答因子, 通过直接将包膜的人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type-1, HIV-1) 颗粒捕获到细胞表面来启动宿主免疫反应<sup>[10]</sup>。它也可以通过抑制逆转录病毒的复制, 起到逆转录病毒因子的作用<sup>[11]</sup>。BST2 参与细胞膜完整性和脂质筏形成, 可激活表皮生长因子受体信号通路, 提供

BST2 与肿瘤发生的潜在机制联系<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示, BST2 在 LSCC 中高表达, 并且 BST2 具有促进喉癌细胞增殖、侵袭、迁移等生物学过程的作用。说明在喉鳞状细胞癌中, BST2 蛋白的表达可能与肿瘤的进展相关, 通过收集喉癌患者的临床资料并进行分析, 发现 BST2 的表达量与喉鳞状细胞癌患者的临床分期及生存分类相关, 通过进一步分析发现 BST2 的高表达与较差的生存及预后相关, 提示 BST2 可以作为 LSCC 诊断及治疗的生物标志物。

针对 BST2 的研究中, 研究者最先发现其在多发性骨髓瘤细胞中存在高表达的现象, 推测 BST2 也与肿瘤的发生有关<sup>[13]</sup>。Fang 等<sup>[14]</sup>发现, BST2 在淋巴结转移的口腔鳞状细胞癌组织和原发肿瘤细胞中的表达明显高于邻近正常上皮, BST2 高表达与 N 分期、肿瘤分期、神经周围浸润和肿瘤深度相关。随后, 越来越多的学者发现 BST2 在结直肠癌<sup>[4]</sup>、卵巢癌<sup>[5]</sup>、胰腺癌<sup>[6]</sup>、宫颈癌<sup>[7]</sup>、胶质母细胞瘤<sup>[8]</sup>等疾病中均呈现高表达特征, 且 BST2 蛋白的高表达可能与口腔癌、食管癌、胃癌以及结直肠癌患者的不良预后相关<sup>[15]</sup>。本研究结果与之基本一致。有研究者探究了 BST2 蛋白在癌细胞中表达量较高的可能机制, 研究表明, STAT3 是信号传导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 中的一种与癌症联系非常紧密的分子, 在癌症中很容易出现 STAT3 的过度激活<sup>[16]</sup>, 而 BST2 的启动子区含有多个持续重复的 STAT3 的结合位点<sup>[17]</sup>, 因此认为这可能会引起 BST2 的高表达。但是, BST2 不仅能够增强某些癌细胞的增殖、转移能力, 在一些癌症, 比如前列腺癌、甲状腺癌中, BST2 还表现为低表达或无明显的表达<sup>[18]</sup>。因此, 目前尚不能简单地将 BST2 定义为促癌基因。肿瘤的主要特点是细胞的正常调控机制被破坏从而导致癌细胞可以无限快速地增殖, 细胞周期的起始、进行及终止过程出现异常, 引起肿瘤的发生和发展, 所以肿瘤是细胞周期性疾病的一种<sup>[19]</sup>。肿瘤细胞的主要生物学行为包括细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡, 局部淋巴结的转移和癌的远处转移也

成为影响喉癌患者生存期长短的主要原因。研究者发现,在结直肠癌中沉默 BST2 可明显抑制结直肠癌的进展,肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的浸润与 BST2 的高表达呈正相关, TAMs 的缺失减轻了 BST2 在结直肠癌中的原瘤作用<sup>[20]</sup>。BST2 在胃癌组织中也显著上调,能促进胃癌上皮-间质转化和转移<sup>[10]</sup>。BST2 可以诱导血管平滑肌细胞转换为巨噬细胞样细胞相关的表型,体外血管平滑肌细胞实验表明,暴露于 BST2 时,巨噬细胞转录程序上调,增殖、迁移和吞噬能力增强。肿瘤中 BST2 的敲低显著降低了向巨噬细胞样表型的转变,并且这种转变的细胞具有相对较高的炎症信号,通常与抗肿瘤作用相关<sup>[21]</sup>。根据目前的研究,可以推断出 BST2 具有促进喉癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用,但具体的分子机制及参与的信号通路有待进一步研究。前期研究已发现, BST2 基因中有 STAT3 的一个结合位点。在 STAT3 与 BST2 相结合的时候, BST2 的表达被活化,从而可以对癌细胞的生长、迁移产生推动的效果,同时还可以增加癌症的临床分级和恶性程度<sup>[22]</sup>。同时, BST2 的过表达可以对核转录分子信号途径进行压制,并提高了磷酸化核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitor of  $\kappa$ B Alpha,  $\text{i}\kappa\text{B}\alpha$ ) 和高尔基体外周膜蛋白 P65 蛋白( GRASP65 protein, p65) 的水平,进而加速了肿瘤细胞的增殖,此外, BST2 还可以提高抗凋亡基因的水平,进而对肿瘤的发生、侵袭和转移产生影响<sup>[14]</sup>。BST2 也可以通过活化基质金属蛋白酶 2,促使癌细胞的增殖、移动,并进一步增强其迁移、侵袭能力,这在骨肉瘤细胞 HT1080 中已经得到了证实<sup>[23]</sup>。

BST2 在肿瘤的发生发展中起到重要作用,但其中的分子机制还不是很清楚,目前已知的受 BST2 调控的信号通路主要有核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)。BST2 具有激活 NF- $\kappa$ B 的功能。该功能的实现依赖于 BST2 胞质尾区的 YxY 基序与转化生长因子  $\beta$  活化激酶 1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1, TAK1)、转化生长因子  $\beta$  活化激酶结合蛋白 1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1-binding protein 1, TAB1)等信号转导蛋白结合<sup>[24]</sup>。BST2 的胞质尾区可能含有一个半免疫受体酪氨酸激活基序(Hemi-Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs, hemITAMs),通 hemITAMs 招募脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)从而可以激活

NF- $\kappa$ B<sup>[25]</sup>。EGFR 信号轴也是一条作用机制较为明确的 BST2 调控通路。在癌细胞中, BST2 可能促进 EGFR 从脂筏到非脂筏细胞膜的转位,从而激活 EGFR 及下游细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、STAT3 等信号通路,加速细胞周期进程,促进癌细胞增殖及肿瘤发展<sup>[26]</sup>。此外, BST2 还可以直接激活 ERK 或通过抑制线粒体损伤及细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)释放、核转位等过程帮助癌细胞抵抗恶劣环境<sup>[27]</sup>。此前,有研究者在针对口腔鳞状细胞癌的研究中,评估了 STAT1/BST2 调控口腔鳞状细胞癌生物学行为的信号通路,发现 STAT1/BST2 通过 AKT/ERK1/2 信号通路起作用<sup>[28]</sup>, AKT/ERK1/2 信号通路对细胞存活和凋亡至关重要。AKT(蛋白激酶 B)在细胞代谢、细胞凋亡、细胞增殖和细胞迁移中起关键作用<sup>[29]</sup>, ERK 被磷酸化激活,从细胞质转运到细胞核,介导上游因子的转录激活,参与细胞功能,包括增殖、细胞骨架构建和凋亡<sup>[30]</sup>。BST2 也通过调节 EGFR 通路促进口腔鳞状细胞癌的生长<sup>[31]</sup>, EGFR 的激活进一步启动下游信号通路,包括 Janus 激酶/STAT3 和 Ras/Raf/MEK/ERK 通路。这种 EGFR 激活模式可能是针对 EGFR 驱动的恶性肿瘤的一个有趣和潜在的治疗方向<sup>[12]</sup>。

综上所述, LSCC 中 BST2 蛋白的表达水平上调, BST2 可以促进喉癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,此外,喉癌患者高表达的 BST2 与较差的生存率相关, BST2 在喉癌发生发展中的作用机制有待进一步研究,但是随着研究不断深入, BST2 可能作为一个潜在的肿瘤生物标志物,参与到相关疾病,特别是恶性肿瘤的靶向治疗中。

#### [参考文献]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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: 209-249.
- [2] Sun Z, Sun X, Chen Z, et al. Head and neck squamous cell carcinoma: risk factors, molecular alterations, immunology and peptide vaccines[J]. Int J Pept Res Ther, 2022, 28: 19.
- [3] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022, 135: 584-590.
- [4] Rodriguez A, Corchete LA, Alcazar JA, et al. Dysregulated expression of three genes in colorectal cancer stratifies patients into three risk groups[J]. Cancers (Basel), 2022, 14: 4076.

- [5] Yang LQ, Hu HY, Han Y, et al. CpG-binding protein CFP1 promotes ovarian cancer cell proliferation by regulating BST2 transcription[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29:1895-1907.
- [6] Lei C, Hou Y, Chen J. Specificity protein 1-activated bone marrow stromal cell antigen 2 accelerates pancreatic cancer cell proliferation and migration[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22:1459.
- [7] Liu G, Du X, Xiao L, et al. Activation of FGD5-AS1 promotes progression of cervical cancer through regulating BST2 to inhibit macrophage M1 Polarization [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021:5857214.
- [8] Kong Y, Xue Z, Wang H, et al. Identification of BST2 contributing to the development of glioblastoma based on bioinformatics analysis[J]. *Front Genet*, 2022, 13:890174.
- [9] Mamet-Bratley MD, Karska-Wysocki B. Role of 3-methyladenine-DNA glycosylase in host cell reactivation of methylated T7 bacteriophage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 698:29-34.
- [10] Zhao Y, Zhao K, Wang S, et al. Multi-functional BST2/tetherin against HIV-1, other viruses and LINE-1[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:979091.
- [11] Singh H, Jadhav S, Arif Khan A, et al. APOBEC3, TRIM5 $\alpha$ , and BST2 polymorphisms in healthy individuals of various populations with special references to its impact on HIV transmission[J]. *Microb Pathog*, 2022, 162:105326.
- [12] Yu H, Bian Q, Wang X, et al. Bone marrow stromal cell antigen 2: tumor biology, signaling pathway and therapeutic targeting (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2024, 51(3):45.
- [13] Wainwright DA, Balyasnikova IV, Han Y, et al. The expression of BST2 in human and experimental mouse brain tumors[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(1):440-446.
- [14] Fang KH, Kao HK, Chi LM, et al. Overexpression of BST2 is associated with nodal metastasis and poorer prognosis in oral cavity cancer[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124(9):E354-E360.
- [15] Ozaki S, Kosaka M, Wakahara Y, et al. Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells[J]. *Blood*, 1999, 93(11):3922-3930.
- [16] Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(11):736-746.
- [17] Kawai S, Azuma Y, Fujii E, et al. Interferon-alpha enhances BST-2 expression and the antitumor activity of anti-BST-2 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models [J]. *Cancer Science*, 2008, 99(12):2461-2466.
- [18] Mahauad-Fernandez WD, Okeoma CM. The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation [J]. *Immunity Inflamm Dis*, 2016, 4:4-23.
- [19] Zhang F, Landford WN, Ng M, et al. SIV Nef proteins recruit the AP-2 complex to antagonize tetherin and facilitate virion release[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(5):e1002039.
- [20] He X, Chen H, Zhong X, et al. BST2 induced macrophage M2 polarization to promote the progression of colorectal cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(1):331-345.
- [21] Bell CF, Baylis RA, Lopez NG, et al. BST2 induces vascular smooth muscle cell plasticity and phenotype switching during cancer progression[J]. *BioRxiv Preprint*, 2024, 2024:612298.
- [22] Yan C, Zhang W, Shi X, et al. MiR-760 suppresses non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting ROS1[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(19):18385-18391.
- [23] Gu G, Zhao D, Yin Z, et al. BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(3):1013-1021.
- [24] Tokarev A, Suarez M, Kwan W, et al. Stimulation of NF- $\kappa$ B activity by the HIV restriction factor BST2[J]. *J Virol*, 2013, 87(4):2046-2057.
- [25] Galão RP, Pickering S, Curnock R, et al. Retroviral retention activates a syk-dependent hemITAM in human tetherin[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(3):291-303.
- [26] Zhang GZ, Li X, Chen Q, et al. CD317 activates EGFR by regulating its association with lipid rafts [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(9):2220-2231.
- [27] Li X, Zhang GZ, Chen Q, et al. CD317 promotes the survival of cancer cells through apoptosis inducing factor [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1):117.
- [28] Shan F, Shen S, Wang X, et al. BST2 regulated by the transcription factor STAT1 can promote metastasis, invasion and proliferation of oral squamous cell carcinoma via the AKT/ERK1/2 signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2023, 62(4):54.
- [29] Gu Y, Wang R, Chen P, et al. In situ synthesis and unidirectional insertion of membrane proteins in liposome-immobilized silica stationary phase for rapid preparation of microaffinity chromatography [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12:3682-3693.
- [30] Mao X, Wang X, Jin M, et al. Critical involvement of lysyl oxidase in seizure-induced neuronal damage through ERK-Alox5-dependent ferroptosis and its therapeutic implications [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12:3513-3528.
- [31] Jin H, Zhang L, Wang S, et al. BST2 promotes growth and induces gefitinib resistance in oral squamous cell carcinoma via regulating the EGFR pathway [J]. *Arch Med Sci*, 2019, 17(6):1772-1782.

(本文编辑:赵丽洁)