

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.002

## PITX1 基因在肺腺癌中的表达及临床预后意义

张卫东

(湖南省人民医院呼吸内科, 长沙 410005)

**[摘要]** 目的: 探讨同源域转录因子1(paired like homeodomain 1, *PITX1*)基因在肺腺癌组织和正常组织中的表达水平及其与临床病理特征和预后之间的相关性。方法: 综合利用肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库和基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中的GSE130779和GSE85841数据集, 分析*PITX1*基因在肺腺癌患者癌组织及癌旁组织中的表达水平, 并利用实时荧光定量PCR法在40例肺腺癌患者组织中验证*PITX1*基因的表达水平。同时利用COX回归分析*PITX1*基因与肺腺癌患者的总生存期(overall survival, OS)和无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)之间的相关性, 进而分析其表达水平与肺腺癌患者临床病理特征之间的相关性。结果: 基于TCGA和GEO数据库分析结果显示*PITX1*基因在肺腺癌组织中显著高表达( $P < 0.01$ ), 实时荧光定量PCR结果显示*PITX1*基因在肺腺癌组织的表达量显著高于癌旁正常组织( $P < 0.001$ ), 其相对表达量分别为 $1.064 \pm 0.077$ 和 $0.641 \pm 0.044$ 。COX回归分析显示*PITX1*基因的表达水平与肺腺癌患者的TNM分期、淋巴结转移状态和肿瘤大小显著相关(均 $P < 0.05$ )。同时, 上调*PITX1*的表达水平与肺腺癌患者的OS和RFS呈负相关。结论: *PITX1*基因在肺腺癌组织中显著高表达, 且与肺腺癌患者的预后显著相关。

**[关键词]** 同源域转录因子1; 肺腺癌; 预后; 表达

## Expression of *PITX1* gene in lung adenocarcinoma and its clinical prognostic significance

ZHANG Weidong

(Department of Respiratory Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression of paired like homeodomain 1 (*PITX1*) gene in lung adenocarcinoma and normal tissues and its correlation with clinicopathological features and prognosis. **Methods:** The GTX130779 and GSE85841 data sets in the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and the Gene Expression Omnibus (GEO) were used to analyze the *PITX1* gene in cancer tissues and adjacent tissues of lung adenocarcinoma patients. The expression level of *PITX1* gene was verified in 40 patients with lung adenocarcinoma by real-time fluorescent quantitative PCR. COX regression was used to analyze the correlation between *PITX1* gene and overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) in patients with lung adenocarcinoma, and to analyze the correlation between the expression level and clinicopathological features of patients with lung adenocarcinoma.

收稿日期 (Date of reception): 2019-11-06

通信作者 (Corresponding author): 张卫东, Email: yanxingxi0360@163.com

**Results:** Based on TCGA and GEO database analysis, *PITX1* gene was highly expressed in lung adenocarcinoma tissues ( $P < 0.01$ ). The results of real-time quantitative PCR showed that the expression of *PITX1* gene in lung adenocarcinoma tissues was significantly higher than that in normal adjacent tissues ( $P < 0.001$ ). The relative expression amounts of these two tissues were  $1.064 \pm 0.077$  and  $0.641 \pm 0.044$ , respectively. Moreover, COX regression further analysis showed that the expression level of *PITX1* gene was significantly correlated with TNM stage, lymph node metastasis status and tumor size in patients with lung adenocarcinoma (all  $P < 0.05$ ). At the same time, the up-regulation of *PITX1* expression was significantly negatively correlated with OS and PFS in patients with lung adenocarcinoma. **Conclusion:** *PITX1* gene is highly expressed in lung adenocarcinoma and is significantly associated with the prognosis of patients with lung adenocarcinoma.

**Keywords** paired like homeodomain 1; lung adenocarcinoma; prognosis; expression

肺癌是全世界发病率和病死率最高的肿瘤类型, 2018年全球新发肺癌患者有2 093 876例, 死亡患者1 761 007例, 两项数据均居第一<sup>[1-2]</sup>。而绝大多数肺癌是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 其中腺癌占50%, 是最常见的组织学类型<sup>[3-4]</sup>。缺少特异性的生物标志物和诊断不及时, 使得肺腺癌的预后较差。因此, 寻找一种特异性的生物标志物对于肺腺癌的诊断和治疗非常重要。

*PITX1*是包含同源异型盒的小二倍体家族的成员之一, 小二倍体基因在人体组织以及肿瘤的发生发展中起关键作用<sup>[5-7]</sup>。Song等<sup>[8]</sup>研究发现:*PITX1*基因在非小细胞肺癌组织中的表达水平现值高于正常组织中的表达水平, 且较高的*PITX1*的表达水平与较短的总生存期(overall survival, OS)显著相关。有研究<sup>[9]</sup>发现*PITX1*基因在胃癌组织中显著低表达, 且与胃癌患者的不良预后显著相关。同时*PITX1*的去磷酸化会增加肝癌细胞的耐药性<sup>[10]</sup>。此外, *PITX1*在黑色素瘤组织中的异常表达, 可能会对肿瘤的发生发展起重要作用<sup>[11]</sup>。*PITX1*基因在肺腺癌中作用的研究较少, 本研究利用公共数据库的肺腺癌大样本数据和临床样本验证的方式研究*PITX1*基因在肺腺癌组织中的表达水平, 及其与肺癌患者临床预后之间的相关性, 以期为肺腺癌的诊断和治疗提供理论基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源

本研究所用到的数据集是来自基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中的GSE130779和GSE85841两个芯片数据集, 且芯片数据经过均一化的处理; 以及肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome

Atlas, TCGA, <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>)数据库中的肺腺癌队列数据。基因表达谱数据动态分析数据库(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA; <http://gepia.cancer-pku.cn/>)是用于癌症和正常基因表达谱分析的公共数据库, 可在线分析TCGA数据库中的数据, 填补了癌症基因组学大数据信息的缺口。

### 1.2 *PITX1*基因在肺腺癌组织及癌旁正常组织中的表达差异及预后分析

本研究首先分析了GSE130779和GSE85841两个芯片数据集的差异基因, 分析*PITX1*基因在肺腺癌组织和正常组织中的表达水平; 下载TCGA数据库中的数据得到483例肺腺癌组织样本和59例正常组织样本, 验证分析*PITX1*基因在肺腺癌组织和正常组织中的表达水平。利用COX回归和R包Survminer分析*PITX1*基因的表达水平与肺腺癌患者的OS和无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)的相关性。

### 1.3 临床样本信息

本研究所用临床样本均收集于2018至2019湖南省人民医院手术切除的40例肺腺癌患者, 均获得患者知情同意, 并经湖南省人民医院伦理委员会批准。入选标准: 患者手术前均未给与任何放射治疗或化学药物治疗处理, 且无其他重大疾病者。患者基本信息如表1所示。*PITX1*的正向引物为5'-TCCACCAAGAGCTTCACCTT-3', 反向引物为5'-CGGTGAGGTTGTTGATGTTG-3'。 $\beta$ -actin为实时荧光定量PCR验证时的内参, 其正向引物为5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3, 反向引物为5'-GTCATACTCCTGCTTGCTGAT-3'。应用实时定

量荧光PCR法检测PITX1在肺腺癌及其正常组织中的表达水平, 反应条件为95 °C变性5 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共40个循环。以每个荧光信号达到阈值时经历的循环次数作为Ct值,  $\beta$ -actin作为PITX1的内参,  $\Delta Ct = Ct(PITX1) - Ct(\beta\text{-actin})$ , PITX1的相对表达量以 $2^{-\Delta Ct}$ 表示。

#### 1.4 统计学处理

采用R 3.6.1、SPSS 21.0和Graphpad统计软件进行数据分析。PITX1基因在肺腺癌组织和癌旁正常组织中的表达差异分析主要用配对t检验, 其表达水平与肺腺癌患者的预后相关性分析利用Cox回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 PITX1表达水平与40例肺腺癌患者临床病理特征的相关性

Table 1 Correlation between the expression level of PITX1 and clinicopathological characteristics of 40 patients with lung adenocarcinoma

临床特征	PITX1 表达 / 例		$\chi^2$	P
	低表达	高表达		
年龄 / 岁			3.315	0.652
<60	3	7		
$\geq 60$	9	21		
性别			4.797	0.431
男	7	19		
女	5	9		
TNM 分期			7.395	0.043
I+II	6	21		
III+IV	7	6		
淋巴结转移			8.026	0.031
阳性	6	18		
阴性	12	4		
肿瘤大小 /cm			12.908	0.008
<5	9	13		
$\geq 5$	3	15		

## 2 结果

### 2.1 PITX1在肺腺癌组织中的表达水平

本研究利用R软件中的limma包对GEO数据库中的GSE130779和GSE85841数据集的芯片数据进行差异表达分析, 进而用Heatmap包绘制热图。结果显示: PITX1基因在肺腺癌肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织中的表达水平(图1A、1B), 利用GEPIA在线数据库分析TCGA中肺腺癌数据集进行验证, 发现PITX1基因在肺腺癌组织中显著高表达(图1C), 与GEO芯片分析结果一致。

### 2.2 PITX1在40例临床样本中的表达水平

采用实时荧光定量PCR法分析验证PITX1基因在肺腺癌患者组织中的表达水平, 结果显示: PITX1基因在肺腺癌组织的表达量显著高于正常组织(图2), 其表达水平分别为 $1.064 \pm 0.077$ 和 $0.641 \pm 0.044$  ( $P < 0.001$ )。进一步分析发现PITX1基因的表达水平与肺腺癌患者的TNM分期、淋巴结转移状态和肿瘤大小显著相关 ( $P < 0.05$ , 表1)。提示PITX1基因可能在肺腺癌患者组织中异常表达, 同时在肺腺癌的发生、发展中发挥重要作用。

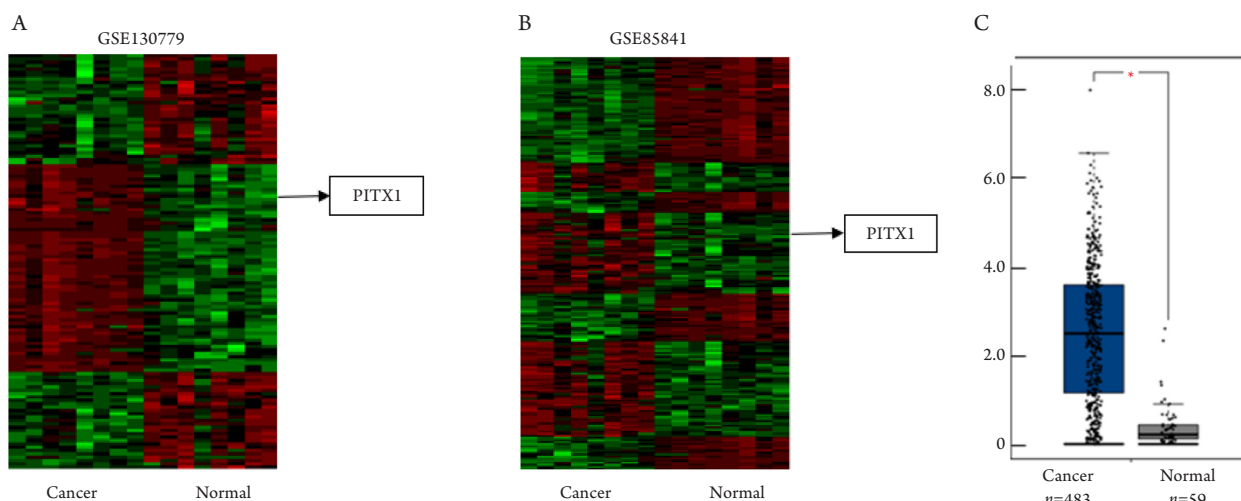


图1 PITX1基因在GSE130779， GSE85841和TCGA数据库中的表达水平

Figure 1 Expression levels of PITX1 gene in the GSE130779, GSE85841, and TCGA databases

(A, B) GSE130779和GSE85841数据集的热图，红色代表高表达，绿色代表低表达。(C)采用GEPIA数据库分析PITX1在TCGA中的表达水平，结果显示PITX1在肿瘤组织中显著高表达。

(A, B) Heatmaps of the GSE130779 and GSE85841 datasets, respectively; red represents high expression; green represents low expression. (C) GEPIA database was used to analyze the expression level of PITX1 in TCGA, and the results showed that PITX1 was significantly highly expressed in tumor tissues.

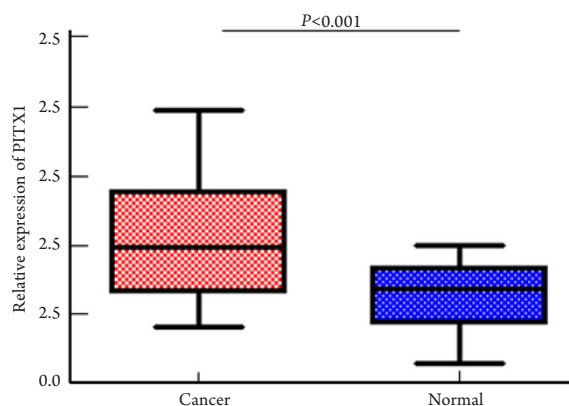


图2 PITX1基因在40例肺腺癌组织中的表达水平

Figure 2 Expression levels of PITX1 gene in 40 cases of lung adenocarcinoma

### 2.3 PITX1与肺腺癌患者临床预后之间的相关性

为进一步分析评估PITX1基因在肺腺癌的诊断及与预后生存方面的能力，本研究下载得到TCGA数据库中483例肺腺癌患者的完整临床数据，绘制ROC曲线，分析其生存预后，结果显示：PITX1

基因对于肺腺癌患者具有较好的诊断能力(图3A)；PITX1基因的表达水平与肺腺癌患者OS和RFS具有显著相关性(图3B、3C)，PITX1基因高表达组患者的OS和RFS显著少于PITX1基因低表达组患者。

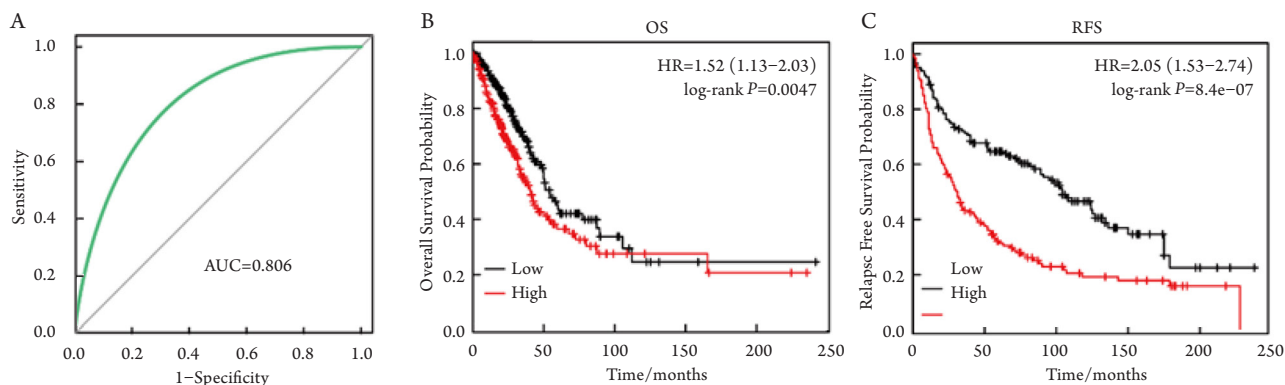


图3 *PITX1* 基因的诊断及生存意义

**Figure 3 Diagnosis and survival significance of *PITX1* gene**

(A) *PITX1* 诊断肺腺癌患者的ROC曲线; (B) *PITX1* 表达水平与肺腺癌患者的OS; (C) *PITX1* 表达水平与肺腺癌患者RFS的相关性。

(A) ROC curve for patients with lung adenocarcinoma diagnosed by *PITX1*; (B) *PITX1* expression level and OS of patients with lung adenocarcinoma; (C) *PITX1* expression level and RFS of patients with lung adenocarcinoma correlation.

### 3 讨论

肺癌是全球范围内发病率和致死率最高的肿瘤<sup>[4,12]</sup>, 且肺腺癌是主要的病理亚型之一。缺乏特异性的生物标志物和易转移复发使得肺腺癌的预后较差<sup>[13]</sup>。

*PITX1* 是同源异型盒的小二倍体家族的成员之一, 在多种肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。Takenobu等<sup>[14]</sup>研究发现: *PITX1* 基因在人头颈部鳞状细胞癌组织中异常表达, 且可以作为头颈鳞癌患者化学药物治疗敏感性的生物标志物。Zhan等<sup>[15]</sup>发现*PITX1* 在胶质瘤组织中显著高表达, 且与患者的肿瘤大小以及组织学分级显著相关。Shen等<sup>[16]</sup>和Liu等<sup>[17]</sup>研究发现*PITX1* 在胃癌细胞系以及子宫内膜癌中异常表达, 可作为新型的生物标志物。

本研究首次利用GEO和TCGA数据库中的大样本病例样本研究分析了*PITX1* 基因在肺腺癌中的表达水平以及在临床预后中的意义。此外, 本研究在40例临床样本进行验证, 结果显示: *PITX1* 在肺腺癌组织中的表达水平显著高于正常非肿瘤组织, 其表达水平与肺腺癌患者的TNM分期、肿瘤大小和淋巴结转移状态显著相关, 说明*PITX1* 在肺腺癌的发生发展中可能发挥着癌基因的作用。同时利用ROC曲线分析发现*PITX1* 基因在肺腺癌的诊断方面具有较好的效能。进一步进行生存分析发现*PITX1* 基因的表达水平与腺癌患者的OS和RFS显著相关, *PITX1* 基因高表达组患者的OS和RFS显著

少于*PITX1* 基因低表达组患者, 这与Song等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。

综上, *PITX1* 在肺腺癌组织中异常表达, 可作为肺腺癌诊断、治疗和预测预后的特异性生物标志物。本研究首次利用公共数据库中的大样本数据分析了*PITX1* 基因在肺腺癌中的表达水平及其与预后生存之间的相关性, 但未进行分子机制的分析, 将会在后续的实验进行分子机制的研究, 以期对肺腺癌的预测预后和治疗提供理论依据。

### 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
2. Ellis L, Woods LM, Esteve J, et al. Cancer incidence, survival and mortality: explaining the concepts[J]. Int J Cancer, 2014, 135(8): 1774-1782.
3. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
5. Mantovani R, Pellicelli M, Picard C, et al. E2F1 and TFDP1 regulate *PITX1* expression in normal and osteoarthritic articular chondrocytes[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165951.
6. Nemeč S, Luxey M, Jain D, et al. *Pitx1* directly modulates the core

- limb development program to implement hindlimb identity[J]. *Development*, 2017, 144(18): 3325-3335.
7. Wang JS, Infante CR, Park S, et al. PITX1 promotes chondrogenesis and myogenesis in mouse hindlimbs through conserved regulatory targets[J]. *Dev Biol*, 2018, 434(1): 186-195.
  8. Song X, Zhao C, Jiang L, et al. High PITX1 expression in lung adenocarcinoma patients is associated with DNA methylation and poor prognosis[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(12): 2046-2053.
  9. Qiao F, Gong P, Song Y, et al. Downregulated PITX1 modulated by miR-19a-3p promotes cell malignancy and predicts a poor prognosis of gastric cancer by affecting transcriptionally activated PDCD5[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2215-2231.
  10. Tai WT, Chen YL, Chu PY, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B dephosphorylates PITX1 and regulates p120RasGAP in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2016, 63(5): 1528-1543.
  11. Ohira T, Naohiro S, Nakayama Y, et al. miR-19b regulates hTERT mRNA expression through targeting PITX1 mRNA in melanoma cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8201.
  12. Wu GX, Raz DJ. Lung cancer screening[J]. *Cancer Treat Res*, 2016, 170: 1-23.
  13. Zou J, Li Z, Deng H, et al. TMEM213 as a novel prognostic and predictive biomarker for patients with lung adenocarcinoma after curative resection: a study based on bioinformatics analysis[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(8): 3399-3410.
  14. Takenobu M, Osaki M, Fujiwara K, et al. PITX1 is a novel predictor of the response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(1): 89-94.
  15. Zhan L, Mu Z, Yang M, et al. Elevation of circ-PITX1 upregulates interleukin 17 receptor D expression via sponging miR-518a-5p and facilitates cell progression in glioma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 16495-16502.
  16. Shen X, Gu Y, Yu S, et al. Silenced PITX1 promotes chemotherapeutic resistance to 5-fluorocytosine and cisplatin in gastric cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 4046-4054.
  17. Liu Y, Nan F, Lu K, et al. Identification of key genes in endometrioid endometrial adenocarcinoma via TCGA database[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 21(1): 11-21.

**本文引用：**张卫东. *PITX1* 基因在肺腺癌中的表达及临床预后意义[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(4): 742-747. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.002

**Cite this article as:** ZHANG Weidong. Expression of *PITX1* gene in lung adenocarcinoma and its clinical prognostic significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(4): 742-747. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.04.002