

文章编号 1006-8147(2020)01-0039-05

论著

## PITX2 启动子甲基化及其与膀胱癌临床病理的关系

王银蕾<sup>1,2</sup>, 杨瀚<sup>1</sup>, 高杰<sup>1</sup>, 王玉杰<sup>1,2</sup>, 沈冲<sup>1,2</sup>, 吴周亮<sup>1,2</sup>, 田大伟<sup>1</sup>, 胡海龙<sup>1,2</sup>

(1.天津医科大学第二医院泌尿外科,天津 300211;2.天津医科大学第二医院中心实验室,天津 300211)

**摘要 目的:**由于近些年表观遗传学的发展,基因启动子甲基化检测在预测癌症诊断预后方面拥有巨大的潜力。PITX2 启动子的高 CpG 岛增加其甲基化程度,其能够成为新的膀胱癌预测因子。**方法:**QRT-PCR 检测永生生化膀胱上皮细胞系(SV-HUC)和3种膀胱癌细胞系(EJ、5637、T24)以及癌组织和癌旁组织的差异性表达。通过 DNA 甲基化测定实验对33例全膀胱切除术切除癌组织进行甲基化程度测定,分为大于50%甲基化,小于50%甲基化建立甲基化程度与肿瘤分期分级的联系。**结果:**使用实时定量 RT-PCR(Q-PCR)证明 PITX2 在膀胱癌细胞中高表达。癌组织中甲基化程度明显高于癌旁组织。PITX2 启动子甲基化与肿瘤大小( $P=0.0267$ )、高级别( $P=0.0277$ )和 TNM 分期(0.0160)显著相关。在预测肿瘤侵袭(T2-T4 肿瘤)中,PITX2 启动子甲基化的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.867。Kaplan-Meier 生存分析表明,与低 PITX2 甲基化表达的肿瘤相比,高 PITX2 启动子甲基化表达的肿瘤与较短的总体存活相关。**结论:**PITX2 在膀胱癌组织中异常高表达,并且 PITX2 启动子区域在癌组织中存在高甲基化是患者不良预后的独立危险因素,因此,PITX2 启动子甲基化可能成为膀胱癌肿瘤发生进展有效的预测因子。

**关键词** 同源结构域转录因子 2;膀胱癌;DNA 甲基化;预测标记物;预后

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

### Methylation of PITX2 promoter and relationship with clinical pathology of bladder cancer

WANG Yin-lei<sup>1,2</sup>, YANG Han<sup>1</sup>, GAO Jie<sup>1</sup>, WANG Yu-jie<sup>1,2</sup>, SHEN Chong<sup>1,2</sup>, WU Zhou-liang<sup>1,2</sup>, TIAN Da-wei<sup>1</sup>, HU Hai-long<sup>1,2</sup>

(1. Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Central Laboratory, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**Abstract Objective:** Due to the development of epigenetics in recent years, gene promoter methylation detection has great potential in predicting the prognosis of cancer. The high CpG island of the PITX2 promoter increases its rate of methylation, which can be a new predictor of bladder cancer. **Methods:** QRT-PCR was used to detect differential expression of immortalized bladder epithelial cell line (SV-HUC) and three bladder cancer cell lines (EJ, 5637, T24) as well as cancerous and paracancerous tissues. The methylation rates of 33 cases of total cystectomy was determined by DNA methylation assay, which was divided into more than 50% methylation, less than 50% methylation to establish the degree of methylation and tumor staging. **Results:** Real-time quantitative RT-PCR (Q-PCR) was used to demonstrate hypermethylation of the PITX2 promoter in bladder cancer cells. The degree of methylation in bladder cancer tissues is significantly higher than that in adjacent tissues. PITX2 promoter methylation was significantly associated with tumor size ( $P=0.0267$ ), high grade ( $P=0.0277$ ), and TNM stage (0.0160). In the prediction of tumor invasion (T2-T4 tumor), the area under the ROC curve (AUC) of the PITX2 promoter methylation was 0.867. Kaplan-Meier survival analysis indicated that tumors with high PITX2 promoter methylation expression were associated with shorter overall survival compared to tumors with low PITX2 methylation expression. **Conclusion:** Our results suggest that hypermethylation of the PITX2 promoter region is highly expressed in bladder cancer tissues, and high expression is an independent risk factor for poor prognosis in patients. Therefore, PITX2 promoter methylation may be a treatment for high-grade bladder. An effective predictor of cancerous tumors.

**Key words** homology domain transcription factor 2; bladder cancer; DNA methylation; predictive marker; prognosis

膀胱癌近些年发病率逐渐增高,排在全球癌症发病率的第9位<sup>[1]</sup>。它的发生率和死亡率在我国泌尿系统癌症致死率中长期居于首位,癌症的根本挑战之一是检测癌症进展过程中基因的变化和导致这些变化的调节因子。目前已知异常表观遗传

修饰在基因表达的改变中起关键作用,可诱导肿瘤的形成。特异性基因中启动子区域的异常甲基化作为表观遗传学中重要一项,是癌症形成和发展的关键。

PITX2 属于 Paired-Bicoied 同型盒蛋白家族,并与 PITX1 和 PITX3 构成 PITX 亚家族。所属基因位于人4号染色体。这种蛋白作为一个转录因子<sup>[2-3]</sup>,调节胶原赖氨酰羟化酶基因的表达。其蛋白质包含两个结构域:2型同型盒结构域(homeobox\_2)和

基金项目 天津市卫生行业重点项目(16KG119);天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC26200)

作者简介 王银蕾(1991-),女,硕士在读,研究方向:外科学,泌尿外科;通信作者:胡海龙,E-mail:huhailong@tmu.edu.cn。

OAR 结构域。同型盒是一种包含 60 个氨基酸残基的蛋白质结构域,这种结构域在包括脊椎动物在内的各物种中都极为保守,可通过其“螺旋-旋转-螺旋”(helix-turn-helix, HTH) 结构与特异性的 DNA 位点结合,包含这种结构域的蛋白质大部分是转录因子,并在个体发育过程中发挥着重要作用。在正常组织中 PITX2 通过调节 cyclin D2<sup>[4]</sup>, cyclin D1<sup>[5]</sup> 和 c-myc<sup>[6]</sup> 表达参与了眼睛, 牙齿和腹部器官的发育, 所属基因突变会导致 Axenfeld-Rieger 综合征 (ARS)、Peters 综合征、法洛四联症以及心室间隔缺损等先天性心脏病<sup>[6-8]</sup>。PITX2 启动子基因序列, 可见聚集的回文型 CpG (也称为 CpG 岛)<sup>[9-10]</sup>。CpG 岛的大小范围为 0.5 至 5 kb, G:C 含量至少为 55%, CpG 至 GpC 频率至少为 0.65:10, CpG 岛与约 50% 的哺乳动物基因相关, 大部分位于基因的启动子和第一外显子区域, 尽管偶尔也发现它们在 3' 末端<sup>[11]</sup>。正常的成年健康组织中, CpG 岛几乎不是甲基化的, 但在癌症中呈现不同程度的甲基化<sup>[12]</sup>。PITX2 启动子区域的高 CpG 岛增加其高甲基化的概率 `cgccactaa gggcggctgg aggctgggga gtcccggcga cggcggcggg ggcac- cgtg gattaggatg tggattgcag gacagacctt tgittgtca cattcgc- gac agggattggg ggaagggtcg tectcctcg agatcacgct ggatttt- tat agactcgcct taaaagggtc cactcttcac agggtaatt tatacg- gctt tcgaggaata ttaggacttt taagacgctg...aatcggtatt agcg- gaatga agacttggg gccttggaaa ttttaaaaga ggtttacttt tttttttt ttttaataaa acaaaacccg aggatagggc aaagataccg agagaa- gaaa aggtgcctgc tagtaacagg tgagggatgg aagggggtgg cggggagaaa gccccagac ggcggatcgt ctgcccgggg ttctgcc- cc aggcctggcg aacctctgag cgctcaagga gcacggcggc agt- gcgctga ggccagttag gcctgggcgc ctccgggccc aacctcgagc tcgccatttt tgaaccecaag cggggaaggt...`

## 1 材料与方法

1.1 人群选择 2010-2018 年在我院行全膀胱切除术 33 例患者, 取膀胱癌组织和癌旁组织(距离肿瘤边缘 >5 cm)。根据 WHO 2016 膀胱尿路上皮癌恶性程度分级系统将肿瘤的组织学亚型分类<sup>[13]</sup>。上述参加者已采取书面知情同意书, 并且使用这些临床样本已获天津医科大学第二医院机构审查委员会的审批(伦理编号 KY2018K083)。

1.2 细胞系选择 永生化膀胱上皮细胞系 (SV-HUC-1) 和 3 种膀胱癌细胞系 (EJ, HTB-9、低度恶性)、(T24、高度恶性), 均由天津医科大学第二医院中心实验室提供。所有细胞系均在含有 10% 胎牛血清 (Gibico) 青霉素-链霉素双抗 (Gibico)、RPMI1640 培养基 (Gibico)/F12K (Gibico) (SV-HUC-1 基础培

养基) 的 25 cm<sup>2</sup> 或 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中培养, 并在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育。

1.3 RNA 提取、逆转录和 PITX2 差异表达检测 使用 TRIzol (CW BIO, CW0580S) 法提取组织、细胞 RNA, 然后使用逆转录试剂盒 (HiFiScript cDNA Synthesis Kit CW BIO) 合成 cDNA。用于 QRT-PCR 测定的引物如下: 正向: 5'-GATCGTTAGTCGCGTAGT CG-3' 和反向: 5'-TCCAAC TTTCTCGCTCGAT-3'。(引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成) RT-PCR 参数为 94 °C, 5 min; 35 个循环的 95 °C, 30 s, 58 °C, 30 s; 并在 72 °C 延伸 10 min。qPCRmix (2× lightcycler 480 SYBR Green I Master, Roche) 荧光定量 PCR 仪 (Life Technologies, ABI7900)。

1.4 免疫组化检测 PITX2 蛋白差异表达 细胞蛋白提取: 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶细胞铺满 80%, 按说明书加入 RIPA 和 PMSF (CW BIO, CW2334S), 冰上孵育间断摇匀 30 min, 4 °C 离心机离心 15 min。取上清; 组织蛋白提取: 液氮研磨黄豆大小组织, 加入 RIPA 和 PMSF, 相同方法。提取的蛋白 95 °C 变性保存。

1.5 甲基化 DNA 检测 应用甲基化 DNA 检测试剂盒 (CW BIO, CW2140M) 纯化在 2.3 中提取的 cDNA, 再进行甲基化的 PCR 检测。引物和方法同上。用于检测 33 例膀胱癌组织的 PITX2 甲基化程度。

1.6 统计学分析 所有数据分析均使用 SPSS 22.0 软件。GraphPad Prism 5.0 用于绘制所有图形。配对学生 *t* 检验应用于永生化膀胱上皮细胞系 (SV-HUC) 和 3 种膀胱癌细胞系的甲基化程度的比较, 而单因素方差分析用于多个病理亚组之间的比较。通过  $\chi^2$  检验检查 PITX2 表达与患者临床特征的关系。构建受试者工作特征 (ROC) 曲线以评估 PITX2 启动子甲基化对肿瘤侵袭的诊断准确性。使用 Kaplan-Meier 方法分析术后存活率, 并使用对数秩检验评估存活曲线之间差异的显著性水平。P < 0.05 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

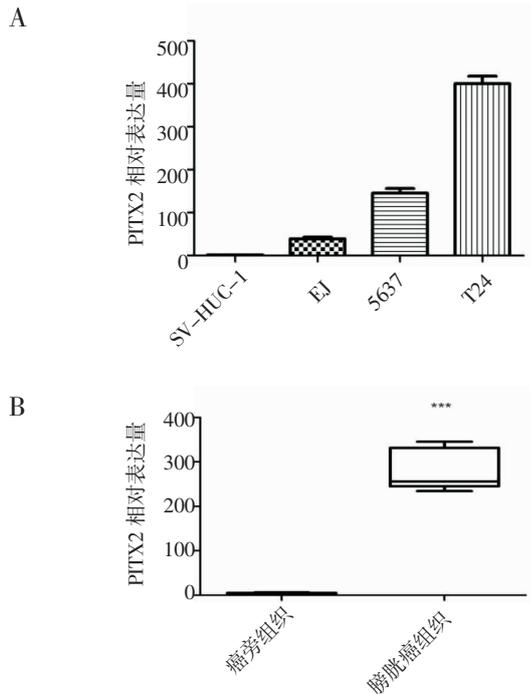
2.1 PITX2 差异表达 检测 PITX2 在 SV-HUC-1 和 3 种膀胱癌细胞系的差异表达情况 (图 1A), PITX2 在 33 例膀胱癌组织与癌旁组织的差异表达 (图 1B)。

2.2 蛋白水平上检测 PITX2 差异表达 免疫组化实验检测蛋白水平上 PITX2 的差异表达, 膀胱癌细胞系 PITX2 表达明显高于永生化膀胱上皮细胞系 (图 2A), 癌组织的表达明显高于癌旁正常组织

(图2B)。

2.3 PITX2 启动子甲基化差异检测 在永生化细胞系和 3 种膀胱癌细胞系中检测 PITX2 启动子甲基化的差异表达(图 3A),同时在 33 例膀胱癌组织和癌旁组织中验证 PITX2 启动子甲基化的差异表达( $P<0.0001$ ,图 3B)。及癌组织中 PITX2 甲基化程度与患者临床参数的相关性(表 1)。

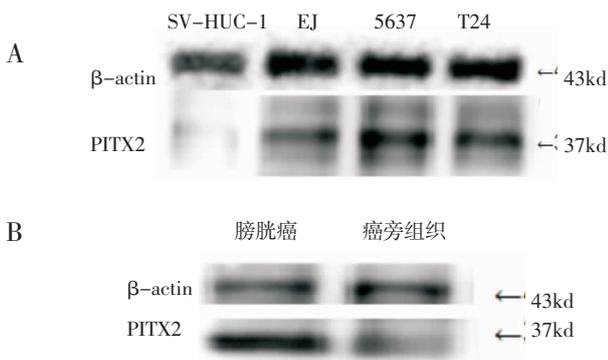
2.4 PITX2 启动子甲基化与膀胱癌临床病理因素的相关性 33 例癌组织中 PITX2 甲基化程度与患者临床参数的相关性(表 1)。



A.QPCR 检测永生化膀胱上皮细胞与 3 种膀胱癌细胞系差异表达; B.例膀胱癌组织和癌旁组织中 PITX2 的差异表达

图 1 PITX2 差异表达

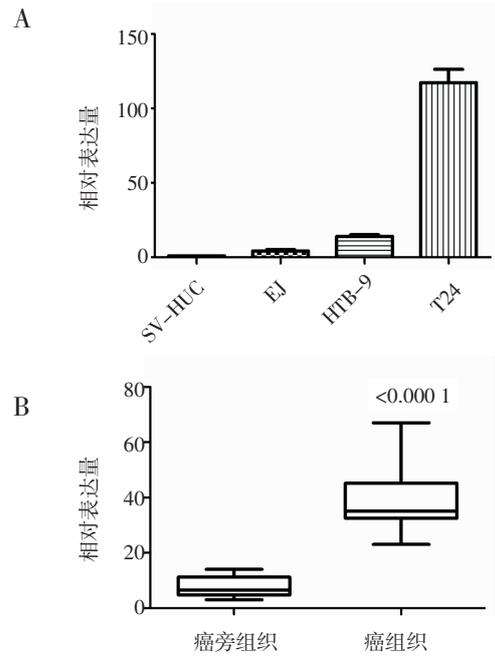
Fig 1 PITX2 differential expression



A.免疫组化实验检测 SV-HUC-1 和 EJ、5637、T24 的中 PITX2 的差异表达;B.免疫组化实验检测膀胱癌和癌旁组织的中 PITX2 的差异表达

图 2 蛋白水平上检测 PITX2 差异表达

Fig 2 Detection of differential expression of PITX2 at protein level



A.QRT-PCR 结果显示 PITX2 启动子甲基化在永生化膀胱上皮细胞 SV-HUC 细胞系和 EJ、5637、T24 3 种膀胱癌细胞系差异表达;B. PITX2 启动子甲基化在 33 例全膀胱切除术膀胱癌和癌旁组织之间差异表达( $n=33$ )

图 3 PITX2 启动子甲基化差异检测

Fig 3 PITX2 promoter methylation difference detection

表 1 PITX2 启动子甲基化与膀胱癌临床病理因素的相关性

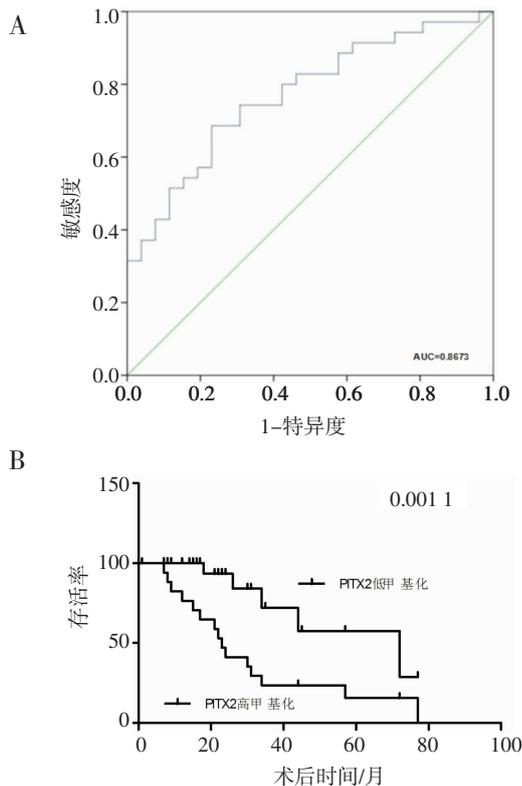
Tab 1 Correlation between PITX2 promoter methylation and clinicopathological factors of bladder cancer

分类	病人数量	PITX2 甲基化程度		P
		低表达 n(%)	高表达 n(%)	
性别				0.938 8
女性	8	3(0.375)	5(0.625)	
男性	25	9(0.360)	16(0.640)	
年龄/岁				0.338 4
<60	8	2(0.25)	6(0.75)	
>60	25	11(0.44)	14(0.56)	
是否抽烟				0.200 6
是	17	3(0.176)	14(0.824)	
否	16	6(0.375)	10(0.625)	
肿瘤大小				0.026 7
<3 cm	9	6(0.667)	3(0.333)	
>3 cm	24	6(0.25)	18(0.75)	
肿瘤数量				0.111 9
单发	17	10(0.588)	7(0.411)	
多发	16	5(0.313)	11(0.687)	
分级				0.027 7
低级别	5	4(0.800)	1(0.200)	
高级别	28	8(0.286)	20(0.714)	
T 分期				0.016 0
Ta-T1	7	5(0.714)	2(0.286)	
T2-T4	26	6(0.231)	20(0.769)	

\* $P<0.05$  统计学有意义

为了评估 PITX2 启动子甲基化对肿瘤侵袭 (T2-T4 膀胱癌) 的诊断价值, 绘制了 ROC 曲线。ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.867, 敏感性和特异性分别为 0.653 和 0.726 (图 4A), 表明 PITX2 启动子甲基化在肿瘤侵袭诊断中的适度准确性。

PITX2 启动子甲基化表达与患者存活率的相关性探讨了 PITX2 启动子甲基化表达水平 (高与低) 与膀胱癌患者总体存活率的相关性。Kaplan-Meier 曲线显示, 与低 PITX2 甲基化表达的肿瘤相比, 高 PITX2 甲基化表达的肿瘤与较短的总体存活相关。在这项研究中, 中位随访时间为 24 个月。高表达组的中位总生存时间为 22.5 个月, 而低表达组为 34 个月 (图 4B,  $P=0.0011$ )。



A. PITX2 启动子甲基化在膀胱癌 TNM (Ta-T1, T2-T4) 诊断中的 ROC 曲线。曲线下面积 (AUC) 为 0.867; 敏感性和特异性分别为 0.653 和 0.726。ROC = 受试者工作特征曲线, AUC = 曲线下面积。B. Kaplan-Meier 曲线显示按肿瘤组织中 PITX2 甲基化表达水平分类的患者组的总体存活率。具有高 PITX2 启动子甲基化表达的患者显示出比具有低 PITX2 启动子甲基化表达的患者显著更短的总存活率 ( $P=0.0011$ , 对数秩检验)

图 4 PITX2 启动子甲基化在预测肿瘤侵袭性和预后上的作用

Fig 4 The role of PITX2 promoter methylation in predicting tumor invasion and prognosis

### 3 讨论

基因启动子甲基化在预测癌症发生和预后中发挥作用。如非小细胞肺癌<sup>[14]</sup>, 乳腺癌<sup>[15]</sup>和前列腺癌<sup>[16]</sup>的研究所示, 与肺腺癌相比, SHOX2 和 PITX2 的

DNA 甲基化在肺鳞状细胞癌中显著更高, 并且与吸烟史有很大相关性, 能够将 SHOX2 和 PITX2 的 DNA 甲基化描述为用于检测肺癌的生物标志物。乳腺癌中, RASSF1A 和 PITX2 的 CpG 岛启动子的高甲基化可能在乳腺癌发病机制的早期阶段起重要作用, 并且与年龄增加 ( $P<0.05$ ), 肿瘤分级 ( $P<0.0001$ ) 和分期 ( $P<0.0001$ ) 显著相关。在前列腺癌中, PITX2 甲基化是生化复发的最强预测因子, 为根治性前列腺切除术治疗患者, 尤其是中度风险患者 (Gleason 7) 提供预后信息。肿瘤中 PITX2 甲基化程度大于中位数的患者在术后 8 年内发生生化复发的可能性是甲基化程度低于平均水平的患者的 4 倍。这些研究都说明 PITX2 启动子甲基化能够成为肿瘤诊断以及预后预测的可靠指标。本研究主要方向是其在膀胱癌中 PITX2 启动子甲基化的诊断和预测价值。

启动子区域高 CpG 岛是甲基化的基础, PITX2 启动子区域 CpG 岛分布明显高于其他基因, Salem 等<sup>[17]</sup>分子机制研究显示, 位于转录单位不同区域的 CpG 岛的定量扫描提示可能解释在癌症进展期间如何实现启动子甲基化的变化等级。每一个 CpG 岛是独立运作, 但是表明 CpG 岛甲基化, 其转录起始位点下游的 DNA 区域中发生 CpG 岛甲基化会更加频繁, 程度也随着肿瘤恶性度增高而不断加深, 并且肿瘤增长速度也会越快, 如果检测非浸润性乳头状瘤的基因甲基化改变更频繁, 这种肿瘤更可能发展为侵袭性疾病, 这也在分子水平解释为什么癌症分子突变存在级联现象。

使用 QRT-PCR 检测了永久化膀胱上皮细胞系 (SV-HUC) 和 3 种膀胱癌细胞系 PITX2 启动子甲基化程度, 高恶性度的 T24 细胞系显示其甲基化程度比低恶性度膀胱癌细胞系 (EJ, 5637) 要高。虽然检测 PITX2 启动子甲基化中, 膀胱癌细胞系比永生膀胱上皮细胞系高几十到一百多倍, 但是在检测 PITX2 表达时发现, 这一差异又增高了将近 4 倍, 癌组织与癌旁正常组织中 PITX2 表达差异更加明显。这说明 PITX2 甲基化可能促进 PITX2 的表达。免疫组化同时显示 PITX2 蛋白水平上表达, 无论在细胞中还是组织中, 癌中表达均高于正常膀胱细胞或组织。在成釉细胞癌中, PITX2 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径下游调节信号, 其高表达诱导肿瘤增长, 作为肌动蛋白-肌球蛋白重组反应上游调节信号促进肿瘤侵袭<sup>[18]</sup>。在宫颈癌中, PITX2 与 HPV E6 蛋白结合并抑制细胞中 p53 的降解, 从而导致 p53 积聚和细胞周期阻滞于 G1/G0 期, 通过抑制肿瘤细胞凋亡促进肿瘤增长<sup>[19]</sup>。在淋巴结阳性结直肠癌中,  $\beta$ -catenin/

LEF1 / PITX2 复合物能够激活 LEF1 表达, 进而激活上皮基因 FN1 促进纤维蛋白合成, 这一蛋白主要促进肿瘤细胞的迁移<sup>[20]</sup>。在膀胱癌中, Wnt/ $\beta$ -catenin 途径在促进肿瘤增殖、侵袭和迁移中早已占有一席之地, 其调节 PITX2 的高表达, 并调节下游 Cyclin-D1 和 C-myc 发挥作用, 但 PITX2 高表达是否与其甲基化有关, 还需要更深一步研究。

QRT-PCR 检测 33 例膀胱癌患者的肿瘤组织中 PITX2 启动子甲基化的表达。基于检测的数据, PITX2 启动子甲基化的表达水平在个体之间变化还是有的, 并且观察到与匹配的邻近正常粘膜相比, 膀胱肿瘤组织中甲基化表达显著增高。重要的是, 研究表明 PITX2 启动子甲基化的表达与肿瘤分级、大小和 TNM 分类显著相关, 并且更具侵袭性的肿瘤倾向于更高的甲基化表达, 暗示 PITX2 启动子区域甲基化在膀胱癌中的诊断作用。因此, 采用 ROC 曲线来评估其在肿瘤侵袭预测中的表现。尽管特异性和敏感性结果仅支持 PITX2 用于肿瘤侵袭诊断的适度功效。

研究中有人群样本量过少, 随访时间不足等问题, 因此, 在进一步的研究中使用高甲基化或者沉默甲基化细胞系模型探索 PITX2 启动子甲基化在膀胱癌功能, 提高样本量和病人随访时间。探索 PITX2 启动子区域甲基化是否为队列中膀胱癌患者 5 年总生存的独立预后因素。明确膀胱癌中 PITX2 启动子甲基化在 Wnt 信号通路中角色。总之, 笔者的研究首次表明 PITX2 启动子甲基化与膀胱肿瘤侵袭、TNM 分类等相关, 可能预测膀胱癌的发生和总体存活率。

#### 参考文献:

- [1] Rebecca L, Kimberly D, Ahmedin J, et al. Cancer statistics, 2018 [J]. *Cancer J Clinical*, 2018, 68: 7
- [2] Logan M, Pagán-Westphal S M, Smith D M, et al. The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals[J]. *Cell*, 94 (3): 307
- [3] Héon E, Sheth B P, Kalenak J W, et al. Linkage of autosomal dominant iris hypoplasia to the region of the Rieger syndrome locus (4q25) [J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, 4(8): 1435
- [4] Kioussi C, Briata P, Baek S H, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development[J]. *Cell*, 2002, 111 (5): 673
- [5] Baek S H, Kioussi C, Briata P, et al. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6):3245
- [6] Sun Y M, Wang J, Qiu X B, et al. PITX2 loss of function mutation contributes to tetralogy of Fallot[J]. *Gene*, 2016, 577(2):258
- [7] Zhao C M, Peng L Y, Li L, et al. PITX2 Loss-of-Function mutation contributes to congenital endocardial cushion defect and Axenfeld-Rieger syndrome[Z]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124409
- [8] Wei D, Gong X H, Qiu G, et al. Novel Pitx2c loss-of-function mutations associated with complex congenital heart disease[Z]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(5):1201
- [9] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(4):286
- [10] Baylin S B. DNA methylation and gene silencing in cancer[Z]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005(2 Suppl 1):S4
- [11] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. *The New England Journal of Medical*, 2008, 358:1148
- [12] Widschwendter M, Jones P A. DNA methylation and breast carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35):5462
- [13] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664
- [14] Dietrich D, Hasinger O, Liebenberg V, et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2012, 21(2):93
- [15] Eva J, Karol K, Pavol Z, et al. Methylation in promoter regions of PITX2 and RASSF1A genes in association with clinicopathological features in breast cancer patients[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37:15707
- [16] Vinarskaja A1, Schulz W A, Ingenwerth M, et al. Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis[Z]. *Urol Oncol*, 2013, 31(5):622
- [17] Salem C, Liang G, Yc T, et al. Progressive increases in de Novo methylation of CpG islands in bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(9):2473
- [18] Basu M, Roy S S. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(6):4355
- [19] Wei Q. Pitx2a binds to human papillomavirus type 18 E6 protein and inhibits E6-mediated P53 degradation in HeLa cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(45):37790
- [20] Hirose H, Ishii H, Mimori K, et al. The significance of PITX2 overexpression in human colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(10): 3005

(2019-02-25 收稿)