

TBX2 基因在头颈鳞癌中甲基化相关的预后分析



答雨欣¹, 丁妍^{2,3}

1. 湖北医药学院生物医药研究院 (湖北十堰 442000)
2. 湖北医药学院附属太和医院生命科学研究所 (湖北十堰 442000)
3. 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室 (湖北十堰 442000)

【摘要】目的 探究 *TBX2* 基因与头颈鳞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 的关系, 分析甲基化预后的价值。**方法** 综合利用 UCSC Xena 数据库、基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库、人类蛋白质图谱 (Human Protein Atlas, HPA) 数据库、UALCAN 数据库挖掘 *TBX2* 基因的表达、DNA 甲基化和临床相关性, 利用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 法富集 *TBX2* 在 HNSCC 中所参与的信号通路。**结果** *TBX2* 基因在 HNSCC 中高表达, *TBX2* 基因高、低表达组 HNSCC 患者的总生存率 (overall survival, OS) 无明显差异, 但 HNSCC 中 *TBX2* 基因的表达与临床分级分期有关。*TBX2* 基因某些 cg 位点的低甲基化水平与较差的 OS 和无进展生存期 (progression free survival, PFS) 密切相关。GSEA 结果显示, *TBX2* 基因主要参与钙信号通路、黏着斑、蛋白酶体等多条通路。**结论** *TBX2* 基因可作为 HNSCC 特异性诊断和预后的生物标志物。

【关键词】 *TBX2* 基因; 甲基化; 头颈鳞癌; 预后

Methylation-related prognosis of *TBX2* gene in head and neck squamous cell carcinoma

ZAN Yuxin¹, DING Yan^{2,3}

1. Institute of Biological Medicine, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

2. Institute of Life Sciences, Taihe Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

3. Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Corresponding author: DING Yan, Email: dywzx@163.com

【Abstract】Objective To explore the relationship between *TBX2* gene and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and to analyze the value of methylation prognosis. **Methods** The UCSC Xena database, Gene Expression Omnibus (GEO) database, Human Protein Atlas (HPA) database and UALCAN database were comprehensively used to explore the expression, DNA methylation and clinical correlation of *TBX2* gene, and gene set enrichment analysis (GSEA) method was used to enrich the signaling pathways involved in *TBX2* gene in

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202312090

通信作者: 丁妍, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: dywzx@163.com

HNSCC. **Results** *TBX2* gene was highly expressed in patients with HNSCC, and there was no significant difference in overall survival (OS) in patients with HNSCC in *TBX2* gene high expression group and low expression group. However, the expression of *TBX2* in HNSCC was related to clinical grade and stage. Low methylation levels at certain cg sites of the *TBX2* gene were closely associated with poor OS and progression free survival (PFS). The results of GSEA showed that *TBX2* gene was mainly involved in calcium signaling pathway, adhesion plaque, proteasome and other pathways. **Conclusion** *TBX2* gene can be a biomarker for the specific diagnosis and prognosis of HNSCC.

【Keywords】 *TBX2*; Methylation; Head and neck squamous cell carcinoma; Prognosis

头颈鳞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 已在头部和颈部的各个区域检测到, 诊断时存在远处转移, 这与 HNSCC 的高死亡率相关^[1]。已有较多研究表明, 基因甲基化影响 HNSCC 的进展, 如通过 m7G 修饰的 *METTL1*、m6A 修饰的 *RBM15* 及 m5C 调控基因会促进或抑制 HNSCC 细胞的侵袭、迁移和凋亡^[2]。在成熟体细胞组织中, DNA 甲基化一般发生于 CpG 双核苷酸 (cg 位点) 部位, 促甲状腺激素释放激素基因 cg01009664 位点在健康细胞和口腔鳞状癌细胞之间的甲基化水平差异最大, 但关于 HNSCC 其他亚类与 cg 位点的研究较少^[3]。

TBX2 是 T-box 家族成员之一, 在多种癌症中过表达。其甲基化与缺血性脑卒中、非小细胞肺癌、横纹肌肉瘤等有密切联系, 但较少有 *TBX2* 基因甲基化和 HNSCC 相关性和预后的研究^[4]。本文基于数据库研究阐明 HNSCC 中 *TBX2* 基因表达与临床病理参数和预后价值的关联, 进一步探索 *TBX2* 的甲基化 cg 位点与 HNSCC 预后的关系。

1 资料与方法

1.1 数据预处理和差异表达分析

从 UCSC Xena 数据库 (<http://xena.ucsc.edu/>)^[5] 下载 HNSCC 癌症样本和正常样本的 mRNA 表达谱、相关临床数据和甲基化文件 (TCGA-HNSC.methylation450.tsv); 采用 Perl 软件从 HNSCC 的 HTSeq 中提取 *TBX2* 的 mRNA 表达; 从基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[6] 下载 GSE 6631、GSE 2379、GSE 83519 相关数据集, 与健康对照相比; 使用 R 软件 ggpubr 包计算 HNSCC 癌症样本和对照样本的 *TBX2* mRNA 的差异表达。

1.2 *TBX2*在HNSCC中的蛋白表达

人类蛋白质图谱 (Human Protein Atlas, HPA) 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>)^[7] 包含有关人体组织和细胞的蛋白质分布信息, 在该数据库输入目的基因 *TBX2*, 选择 HNSCC 下的“单细胞”和“免疫组织化学”板块。分析 *TBX2* 在 HNSCC 组织和细胞水平上的蛋白差异表达。

1.3 *TBX2*在HNSCC中的临床预后

UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>)^[8] 是一个交互式门户网站, 用于绘制生存曲线和进行临床病理差异分析。在网站输入目的基因 *TBX2*, 链接窗口下选择“生存”和“甲基化”板块, 分析 HNSCC 患者不同临床病理因素中 *TBX2* mRNA 表达与其预后的相关性。

1.4 *TBX2* mRNA的表达和甲基化水平

UALCAN 用于研究 HNSCC 中 *TBX2* 的启动子甲基化水平。采用 Perl 软件分析“TCGA-HNSC.methylation450.tsv”文件中 *TBX2* 的甲基化水平。采用 R 语言 plyr 和 ggpubr 包绘制甲基化箱线图; 采用 R 软件包 dplyr 和 ggpubr 分析 *TBX2* DNA 启动子区域 cg 位点的甲基化水平。

1.5 cg位点甲基化水平和*TBX2* mRNA表达的存活分析

基于 *TBX2* mRNA 表达和甲基化水平将 HNSCC 患者分为高表达组和低表达组。采用 R 软件包 survminer 和 survival 对高表达组和低表达组进行生存分析。

1.6 *TBX2*单基因富集分析

以 MSigDB 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>)^[9] 中的 c2.cp.kegg.v7.5.1.symbols.gmt 和 c5.go.v7.5.1.symbols.gmt 数据集作为功能基因集, 对 *TBX2* 进行单基因功能和通路富集 (错误发现率 < 0.05)。

1.7 统计分析

采用 R 软件 (v4.1.3) 对数据进行分析, 采用 Kaplan-Meier 分析计算 HNSCC 高表达组和低表达组之间的生存差异, Spearman 相关性分析法计算 *TBX2* 基因甲基化水平和基因表达之间的关系。基于组间差异的卡方检验估计分类变量, 采用 Kruskal-Wallis 检验分析连续变量。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *TBX2*在HNSCC和正常组织中的表达

TBX2 在 HNSCC 肿瘤组中 mRNA 表达高于对照组 ($P < 0.001$), 见图 1-A; 通过 GEO 数据库的 RNA-seq 数据进一步分析发现, *TBX2* 在肿瘤组中的表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 1-B; 通过 HPA 数据库分析发现, *TBX2* 的蛋白表达在肿瘤组中升高, 多集中于细胞核 (图 1-C), 在 HNSCC 细胞系中其多表达于 RPMI-2650 细胞系 (图 1-D)。

2.2 *TBX2*表达与临床病理特征的关系

通过 Kaplan-Meier 分析评估 *TBX2* 表达与患

者生存期之间的关系, 未发现显著差异 ($P=0.53$), 见图 2-A; 在 *TBX2* mRNA 表达水平与 HNSCC 患者临床病理特征进展关系方面, 随着年龄增长, 其表达随之上升 (图 2-B); 在临床分级中, 肿瘤组中的 1、2、3、4 级 *TBX2* 表达均高于对照组 ($P < 0.001$), 在临床分期中, 肿瘤组中的 1、2、3、4 级 *TBX2* 表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 2-C、图 2-D。

2.3 *TBX2*在HNSCC中甲基化水平与mRNA表达的相关性

在 UALCAN 数据库中, 甲基化分析板块包含 528 份 HNSCC 样品和 50 份正常样品。结果显示, 与正常样本相比, HNSCC 组织中 *TBX2* 基因的甲基化程度较高 ($P < 0.01$), 见图 3-A。

“TCGA-HNSC.methylation450.tsv”文件共包含 580 份样品, *TBX2* 基因中有 22 个甲基化 CG 位点 (图 3-B)。 *TBX2* 甲基化水平与 mRNA 呈负相关 ($r=-0.19$, $P < 0.001$), 见图 3-C。 *TBX2* 六个不同位点 (cg11031701、cg19021197、cg27027242、cg12163132、cg10930156、cg02577108) 甲基化水平与 mRNA 呈显著负相关

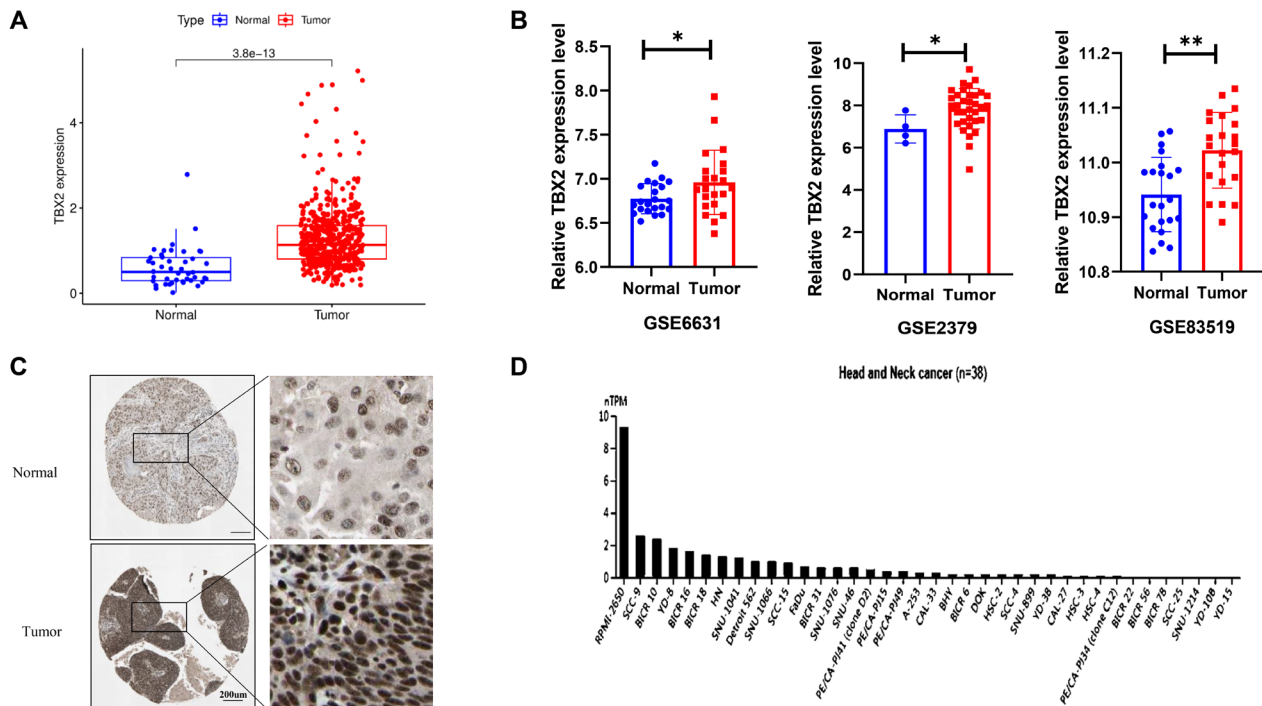


图1 *TBX2*在HNSCC和正常组织中的表达

Figure 1. Expression of *TBX2* in HNSCC and normal tissues

注: A. *TBX2*在人类正常组别和HNSCC肿瘤组中的mRNA表达; B. GSE6631数据集中*TBX2*的表达水平; C. HPA数据库中人类正常组织和HNSCC组织表达; D. *TBX2*在HNSCC细胞系中表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

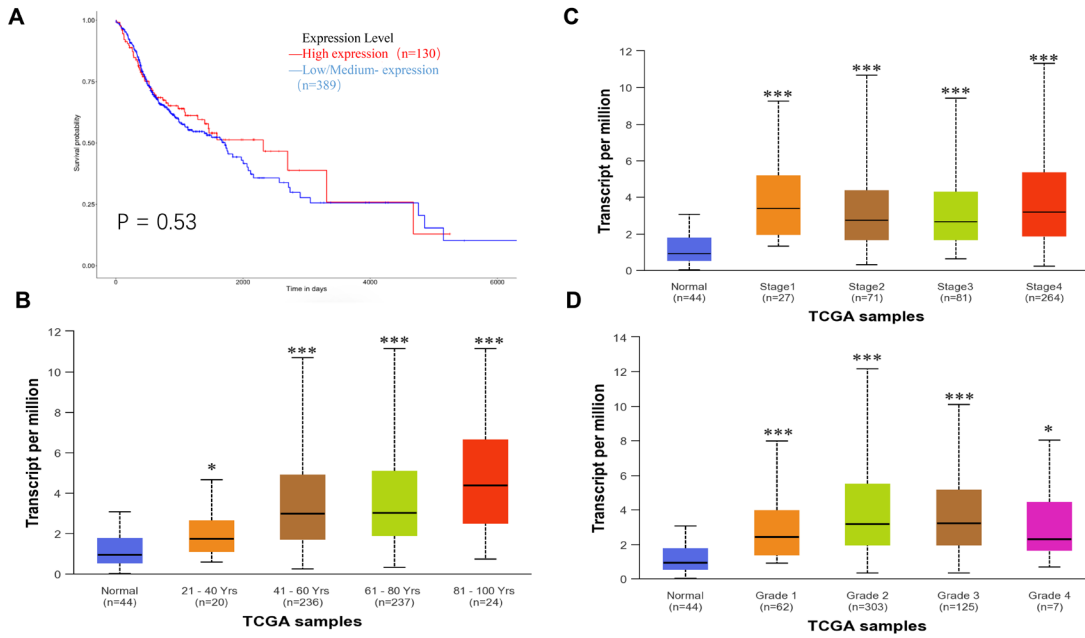


图2 *TBX2*的预后和临床病理特征

Figure 2. Prognostic and clinicopathologic characteristics of *TBX2*

注：A. *TBX2*在人类正常组别和HNSCC肿瘤组中的mRNA表达；B. GSE6631数据集中*TBX2*的表达水平；C. HPA数据库中人类正常组织和HNSCC组织表达；D. *TBX2*在HNSCC细胞系中表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

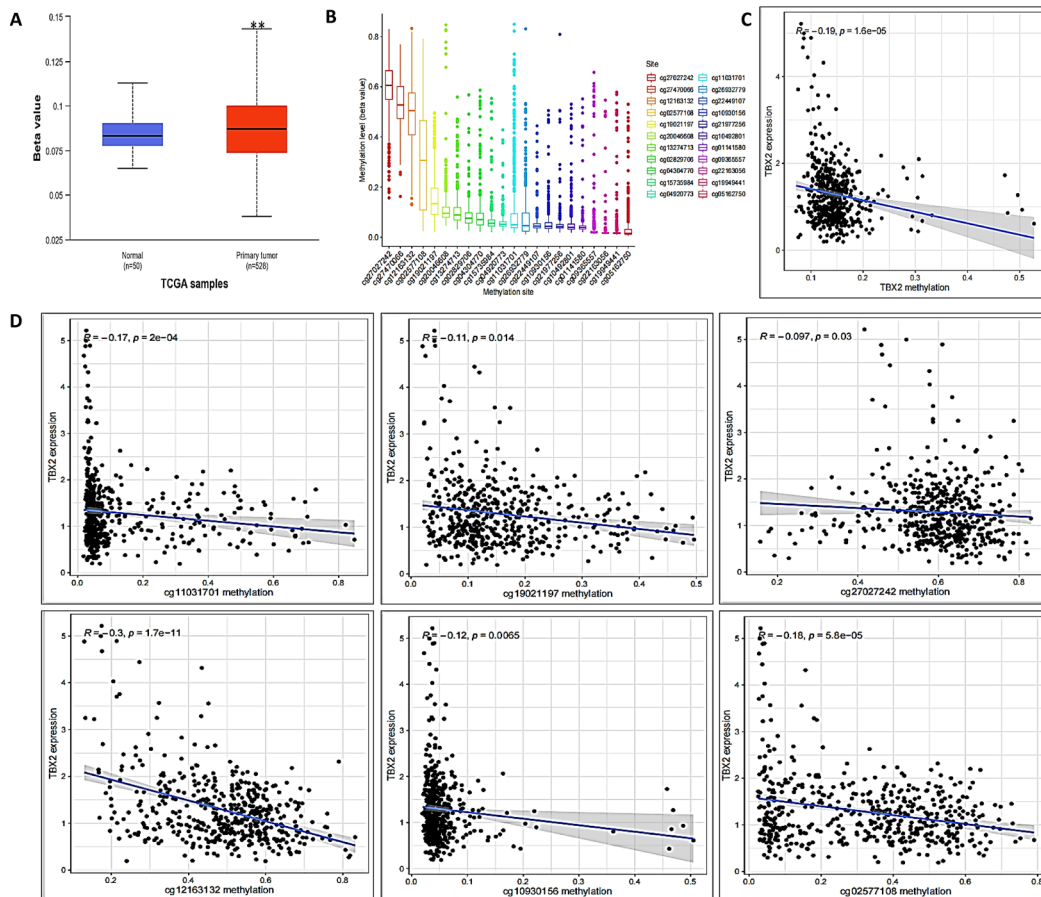


图3 *TBX2*基因甲基化水平与mRNA表达的相关性

Figure 3. Correlation between methylation level of *TBX2* gene and mRNA expression

注：A. *TBX2*基因甲基化在HNSCC组织中的表达水平；B. *TBX2* DNA启动子CpG位点的分布；C. *TBX2*甲基化水平与mRNA相关性比较；D. *TBX2*不同位点甲基化水平与mRNA相关性比较。** $P < 0.01$ 。

($P < 0.05$), 见图 3-D, 与其他位点相关性差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 *TBX2*在HNSCC中各甲基化cg位点的预后

TBX2 甲基化水平低的 cg 位点 (cg13274713、cg02577108、cg10492801、cg04304770、

cg05162750、cg10930156) 与不良OS相关 (图 4-A), *TBX2*的cg位点 (cg13274713、cg04304770、cg02577108、cg21977256、cg26932779、cg27027242、cg10492801、cg22449107) 的低甲基化水平与不良 PFS 相关 (图 4-B), 而其他甲基化 cg 位点与 HNSCC 患者的

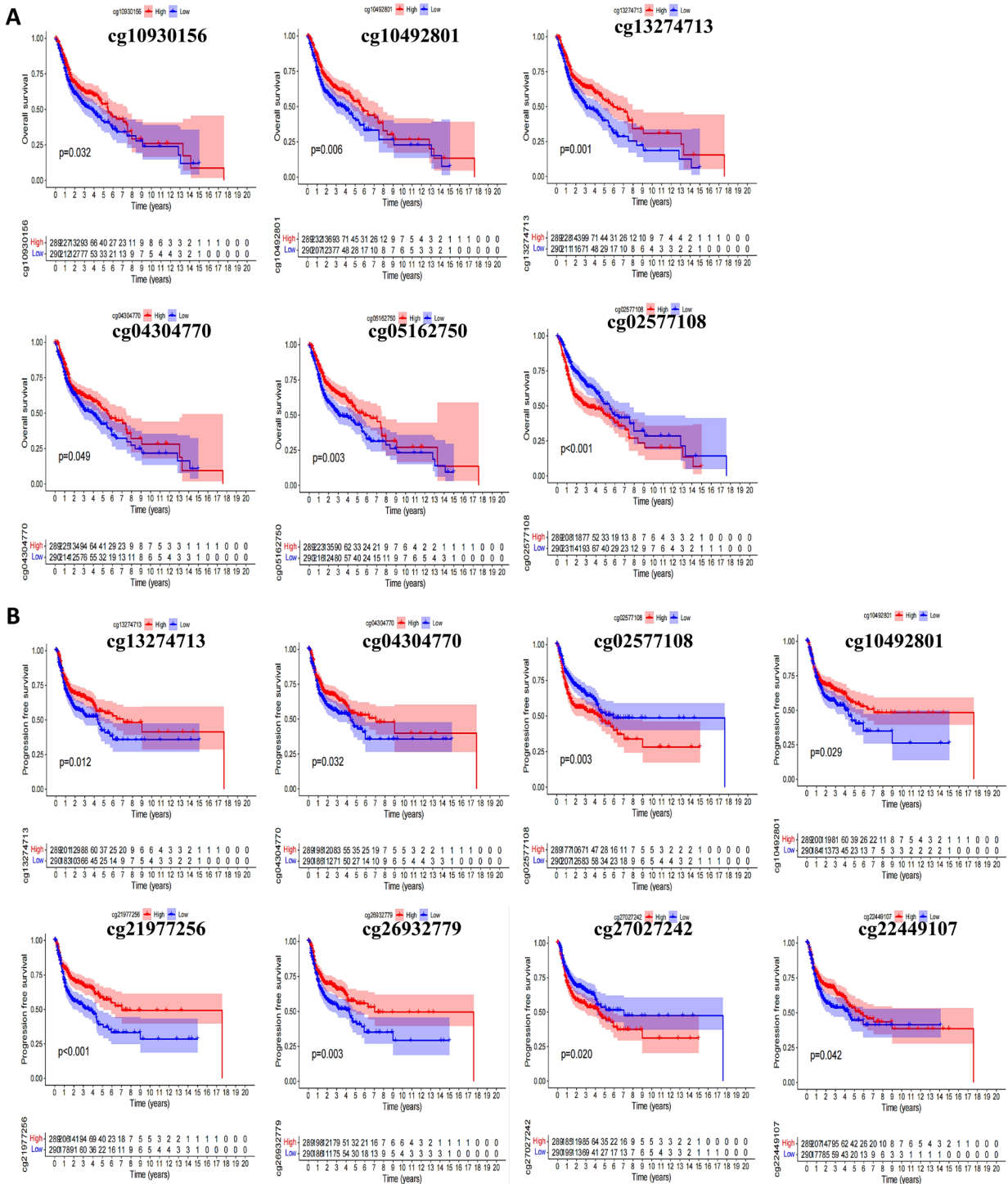


图4 *TBX2*基因甲基化与临床病理参数的关联

Figure 4. Association of *TBX2* gene methylation with clinicopathological parameters

注: A. *TBX2*的cg位点甲基化水平与OS生存曲线; B. *TBX2*的cg位点甲基化水平与PFS生存曲线。

预后无关。

2.5 *TBX2*通过基因集富集分析进行通路富集

采用基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 探究 *TBX2* 对 HNSCC 主要生物学过程的影响。基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析结果显示, *TBX2* 主要富集于生物过程 (biological process, BP) 中非编码 RNA 3' 端

加工、小核 RNA 代谢过程、翻译起始等; 细胞组成 (cellular component, CC) 有免疫球蛋白复合物; 分子功能 (molecular function, MF) 有翻译调节剂活性核酸结合等 (图 5-A)。从京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 基因集中富集到通路包括钙信号通路、黏着斑、黑色素瘤、神经活性配体与受体相互作用、蛋白酶体等 (图 5-B)。

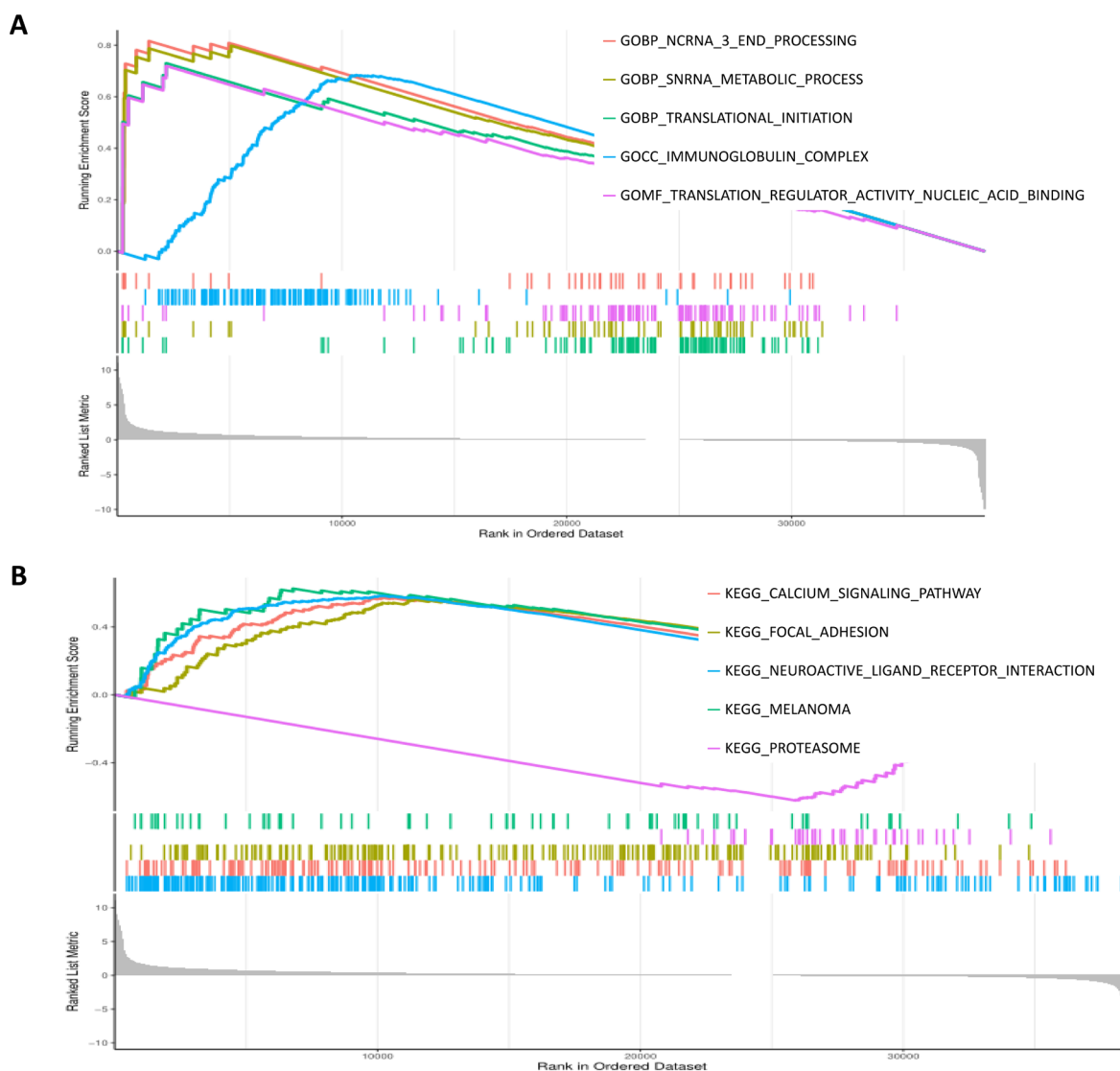


图5 GSEA通路富集

Figure 5. Enrichment of GSEA pathways

注: A. GO富集; B. KEGG富集。

3 讨论

TBX2 编码参与发育过程调控的转录因子可作为诊断和预后生物标志物, 甚至是新的治疗靶点。目前仅有少量研究探索 HNSCC 中 *TBX2* 表

达与临床病理参数和预后的关系。在喉癌、甲状腺乳头状癌和鼻咽癌中, *TBX2* 的 mRNA 表达水平上调, 且与淋巴结转移、分化程度相关, 但在 HNSCC 中鲜有报道^[10]。本研究探讨了 *TBX2* 在 HNSCC 中的表达和甲基化及其临床病理参数和

预后的关系,发现 *TBX2* mRNA 和蛋白表达显著高于邻近正常组织,不同 *TBX2* 表达水平 HNSCC 患者的 OS 无明显差异,*TBX2* 基因部分 cg 位点甲基化水平与 OS 和 PFS 显著相关,*TBX2* 是 HNSCC 中重要的诊断和预后生物标志物。

异常的 DNA 甲基化已被证实会改变肿瘤微环境,可用于疾病诊断和预后预测。甲基化谱对于鉴定基因的功能状态至关重要,因其表达依赖于 DNA CpG 岛的甲基化状态。根据文献,某些基因的异常 DNA 甲基化可能在 HNSCC 病理生理和发展中起着关键作用^[11]。DNA 甲基化异常可使与细胞增殖相关的基因表达异常,从而导致细胞增殖异常。早期研究表明,同源重组 DNA 修复途径中 XRCC3 c.722、Lig4 c.26 和 Rad51 c.3429 单核苷酸多态性与 HNSCC 风险之间显著相关,而单核苷酸多态性在 CG 序列上出现最为频繁^[12]。本研究探讨了 cg 位点的甲基化水平与预后之间的关联,结果显示,与健康对照组相比,HNSCC 中的 *TBX2* 表达较高,但甲基化同样较高。此外,*TBX2* 甲基化水平低的 cg 位点 (cg13274713、cg02577108、cg10492801、cg04304770、cg05162750、cg10930156) 与不良 OS 相关,*TBX2* cg 位点 (cg13274713、cg04304770、cg02577108、cg21977256、cg26932779、cg27027242、cg10492801、cg22449107) 的低甲基化水平与不良 PFS 有关,提示 cg13274713、cg02577108、cg10492801、cg04304770 这 4 个位点是未来研究的重点,可能被用作 HNSCC 的预后和治疗靶点。由于有关 *TBX2* 基因的 cg 位点研究有限,现仅发现其在高血压中具有易感性^[13]。

为进一步探讨 *TBX2* 导致肿瘤发生的具体机制,本研究采用 GSEA 探究了 *TBX2* 对 HNSCC 主要生物学过程的影响。GO 富集分析到分子功能翻译调节剂活性核酸结合。不论是非编码 RNA 相关 n6- 甲基腺苷对免疫球蛋白的识别和 3' 端加工,还是小核仁 RNA 都已被证明通过 28'-O- 甲基化修饰在癌症发展中起着关键的调节作用,证实基因甲基化及其潜在的 cg 位点在肿瘤预后中发挥着潜在作用^[14-15]。从 KEGG 基因集分析中富集到通路包括钙信号通路、神经活性配体与受体相互作用、蛋白酶体和细胞外基质。有研究指出蛋白酶体抑制剂硼替佐米治疗头颈癌,*TBX2* 可诱导 *HAS2* 基因表达并增加透明质酸沉积,从而重

塑肿瘤微环境^[16]。早期有研究显示,原发癌细胞向远处器官的转移被认为是由上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 诱导控制的,*TBX2* 可能通过调节 EMT 和转移前生态位的建立,在许多恶性肿瘤的转移中起着至关重要的作用,*TBX2* 过表达通过 EMT 和 ERK 信号通路促进胃癌增殖和侵袭,E-钙黏蛋白增加可抑制细胞入侵^[17]。研究表明 *TBX2* 抑制明显增加了 E-钙黏蛋白的表达,并且抑制了体外鼻咽癌细胞的侵入与迁移^[10]。生信结果与已有基础研究结果相互验证,但 *TBX2* 对 HNSCC 的生物学过程还需要基础实验进一步验证。

本研究存在一定的局限性,尽管采用了生物信息分析,但缺乏了实际临床研究,降低了研究的可行性。综上所述,*TBX2* 表达与 HNSCC 患者的肿瘤分级分期有关,但与 OS 无关。此外,与正常样本相比,HNSCC 组织中 *TBX2* 基因的甲基化程度较高,*TBX2* 基因中某些 cg 位点的低甲基化水平与不良的 OS 和 PFS 密切相关。整合甲基化和基因表达分析支持 *TBX2* 作为 HNSCC 中的特异性诊断和预后生物标志物。

参考文献

- 1 Ghafouri-Fard S, Gholipour M, Taheri M, et al. MicroRNA profile in the squamous cell carcinoma: prognostic and diagnostic roles[J]. Heliyon, 2020, 6(11): e05436. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05436.
- 2 Xue M, Shi Q, Zheng L, et al. Gene signatures of m5C regulators may predict prognoses of patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(10): 6841-6852. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7653571/>.
- 3 Puttipanyalears C, Arayataweegool A, Chalertpet K, et al. TRH site-specific methylation in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 786. DOI: 10.1186/s12885-018-4706-x.
- 4 Kazim N, Adhikari A, Oh TJ, et al. The transcription elongation factor TCEA3 induces apoptosis in rhabdomyosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 67. DOI: 10.1038/s41419-020-2258-x.
- 5 Navarro Gonzalez J, Zweig AS, Speir ML, et al. The UCSC Genome Browser database: 2021 update[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1046-D1057. DOI: 10.1093/nar/

- gkaa1070.
- 6 Chicco D. geneExpressionFromGEO: an R package to facilitate data reading from Gene Expression Omnibus (GEO)[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2401: 187–194. DOI: [10.1007/978-1-0716-1839-4_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1839-4_12).
 - 7 Digre A, Lindskog C. The Human Protein Atlas—spatial localization of the human proteome in health and disease[J]. *Protein Sci*, 2021, 30(1): 218–233. DOI: [10.1002/pro.3987](https://doi.org/10.1002/pro.3987).
 - 8 Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022, 25: 18–27. DOI: [10.1016/j.neo.2022.01.001](https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001).
 - 9 Castanza AS, Recla JM, Eby D, et al. Extending support for mouse data in the Molecular Signatures Database (MSigDB)[J]. *Nat Methods*, 2023, 20(11): 1619–1620. DOI: [10.1038/s41592-023-02014-7](https://doi.org/10.1038/s41592-023-02014-7).
 - 10 Huang Y, Li Z, Zhong Q, et al. Association of *TBX2* and P21 expression with clinicopathological features and survival of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 5394–5402. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4307495/>.
 - 11 Qin T, Li S, Henry LE, et al. Whole-genome CpG-resolution DNA methylation profiling of HNSCC reveals distinct mechanisms of carcinogenesis for fine-scale HPV+ cancer subtypes[J]. *Cancer Res Commun*, 2023, 3(8): 1701–1715. DOI: [10.1158/2767-9764.Crc-23-0009](https://doi.org/10.1158/2767-9764.Crc-23-0009).
 - 12 Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F, et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption[J]. *Mutat Res*, 2008, 656(1–2): 74–81. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2008.07.013](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.07.013).
 - 13 Ivanova T, Churnosova M, Abramova M, et al. Sex-specific features of the correlation between GWAS-noticeable polymorphisms and hypertension in Europeans of Russia[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7799. DOI: [10.3390/ijms24097799](https://doi.org/10.3390/ijms24097799).
 - 14 Nair L, Zhang W, Laffleur B, et al. Mechanism of noncoding RNA-associated N⁶-methyladenosine recognition by an RNA processing complex during IgH DNA recombination[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(19): 3949–3964. DOI: [10.1016/j.molcel.2021.07.037](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.037).
 - 15 Wang K, Wang S, Zhang Y, et al. SNORD88C guided 2'-O-methylation of 28S rRNA regulates SCD1 translation to inhibit autophagy and promote growth and metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(2): 341–355. DOI: [10.1038/s41418-022-01087-9](https://doi.org/10.1038/s41418-022-01087-9).
 - 16 Min KD, Asakura M, Shirai M, et al. ASB2 is a novel E3 ligase of SMAD9 required for cardiogenesis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23056. DOI: [10.1038/s41598-021-02390-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-02390-0).
 - 17 Liu X, Miao Z, Wang Z, et al. *TBX2* overexpression promotes proliferation and invasion through epithelial-mesenchymal transition and ERK signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1): 723–729. DOI: [10.3892/etm.2018.7028](https://doi.org/10.3892/etm.2018.7028).

收稿日期: 2023 年 12 月 14 日 修回日期: 2024 年 01 月 05 日
本文编辑: 王雅馨 黄笛

引用本文: 昝雨欣, 丁妍. *TBX2*基因在头颈鳞癌中甲基化相关的预后分析[J]. 数理医药学杂志, 2024, 37(2): 100–107. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202312090](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202312090).
Zan YX, Ding Y. Methylation-related prognosis of *TBX2* gene in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2024, 37(2): 100–107. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202312090](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202312090).