

◇基础医学研究◇

网络出版时间: 2019-3-22 16:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.001.html>

TMEFF2 启动子甲基化对膀胱癌增殖、 迁移、侵袭和凋亡的影响

张文涛^{1,2}, 张子威², 毛士玉², 郭亚东², 张俊峰², 王龙圣², 吴元¹, 姚旭东^{1,2}

摘要 目的 研究含表皮样生长因子和卵泡抑素结构域的跨膜蛋白 2 (TMEFF2) 基因在膀胱癌 (Bca) 的表达情况, 启动子甲基化水平及意义。方法 利用基因甲基化与表达数据库 (MethHC) 分析 TMEFF2 基因启动子区域甲基化水平。通过采用荧光定量 PCR 检测 30 例尿液标本中 TMEFF2 基因甲基化的表达差异, 并分析使用去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-dc) 处理后 Bca 细胞系迁移、侵袭和凋亡的变化情况。同时通过转染质粒使 TMEFF2 基因高表达, 进一步验证其在 Bca 中的生物学作用。结果 5-Aza-dc 药物处理后膀胱癌 T24 细胞凋亡明显增加, 而增殖、迁移和侵袭明显被抑制。同时, 通过转染质粒高表达 TMEFF2 后也得到同样的结果。结论 TMEFF2 基因启动子甲基化可能是 Bca 的潜在的生物标志物, 可能在 Bca 的发生发展中发挥重要作用。

关键词 膀胱癌; TMEFF2; 甲基化

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0337-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.001

膀胱癌 (bladder cancer, Bca) 是男性常见的泌尿系肿瘤之一, 在中国, 2015 年 Bca 新发病例约 8 万^[1-2]。非肌层浸润性 Bca 大约占 Bca 的 75%, 而肌层浸润性 Bca 约占 25%。因此, 发现和筛选新的肿瘤生物标志物对于 Bca 的预防、诊断和治疗具有重要意义。

研究^[3]表明表观遗传学改变可以影响基因的表达, 其与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。含表皮样生长因子和卵泡抑素结构域的跨膜蛋白 2 (trans-membrane protein with EGF and two follistatin motifs 2, TMEFF2) 也称为增生性息肉病 1, 具有表皮生长因子样的跨膜蛋白和两个卵泡抑素样结构域。目前

研究^[4-5]证实, TMEFF2 在前列腺癌、乳腺癌、肺癌中启动子高甲基化。而在 Bca 中, TMEFF2 是否参与 Bca 的发生发展, 其具体机制仍不明确。该文采用荧光定量 PCR 技术检测 Bca 患者尿液中 TMEFF2 基因的甲基化情况, 并研究去甲基化对 Bca 生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 MethHC 数据库 基因甲基化与表达 (DNA methylation and gene expression in Human Cancer, MethHC) 数据库 是基于肿瘤基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 公共数据库, 关注肿瘤基因表达和 DNA 甲基化的综合数据库, 其中包括超过 6 000 个样本的 18 个人类癌症和 6 548 个芯片和 12 567 个 RNA 测序数据。在 MethHC 数据库中, 选择“膀胱癌 (bladder cancer, BLCA)”, 在“gene search”中输入“TMEFF2”, 在“gene region”中选择“promoter” (<https://methhc.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)。

1.2 病例资料 收集 2017 年 1 月~2017 年 8 月间, 在同济大学附属第十人民医院 20 例 Bca 患者尿液及 10 例正常尿液标本。Bca 患者尿液标本在手术前 3 d 收集, 将新鲜组织样本立即在液氮中快速冷冻并储存在 -80 °C 直至进一步使用。30 例标本在年龄、性别等方面差异均无统计学意义。该研究经同济大学附属第十人民医院伦理委员会批准, 并获得患者或其直系亲属的知情同意。该项工作也符合世界医学协会的道德准则 (赫尔辛基宣言)。

1.3 主要材料 人正常膀胱上皮细胞 (SV-HUC-1)、人膀胱移行癌细胞株 (T24, UMUC3, EJ, 5637) 均购自上海细胞库; RPMI-1640 培养基、胎牛血清均自美国 Gibco 公司; 甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dc), CCK-8 试剂盒购自美国 Sigma 公司; 转染试剂 LipofectamineTM3000 购自美国 Invitrogen 公司; 甲基化特异荧光 PCR 试剂盒购自上海纽思格生物医学科技有限公司; 兔抗

2019-01-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472389)

作者单位: ¹ 安徽医科大学上海临床学院泌尿外科, 上海 200072

² 上海市第十人民医院泌尿外科, 上海 200072

作者简介: 张文涛, 男, 硕士研究生;

姚旭东, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

yaoxudong1967@163.com

人 TMEFF2 抗体、Bcl2 抗体和 Bax 抗体、羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司; 预涂有 Matrigel 的 Transwell 小室购自美国 Costar 公司。

1.4 主要方法

1.4.1 患者尿液甲基化特异性荧光 PCR 取 5 ~ 50 ml 尿液 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 留沉淀用于 DNA 提取。采用磁珠法自动核酸提取仪进行核酸提取, 经裂解与亚硫酸氢盐的转化反应并纯化。采用甲基化特异的实时荧光 PCR 进行扩增。反应条件: 50 °C、2 min 95 °C、5 min 95 °C、10 s 60 °C、40 s, 循环 40 ~ 45 次。TMEFF2 基因引物序列为 F: 5'-TTTGCCAGTTTGGTGCAGAA-3'; R: 5'-GATTGAAGTTGGTTTGAGAACAGTCA-3'; P: 5'-FAM-ACGAAGATGCCGAGGATGTCTGGTGT-MGB-3'。内参 ACTB 引物序列为 F: 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAACT-3'; R: 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3'; P: 5'-FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-MGB-3'。获得 TMEFF2 和 ACTB 的扩增曲线和荧光域循环次数 (cycle threshold, CT 值)。见图 1B。利用 ΔCt 法进行相对定量的计算。

1.4.2 膀胱癌 T24 细胞培养及 5-Aza-dc 处理 在含 10% 胎牛血清、含有双抗的 RPMI-1640 培养基中培养、传代并在 6 孔板上铺板。当 6 孔板上细胞生长至 70 ~ 80% 时在实验组细胞中分别加入含 5-Aza-dc 的培养基, 使其药物终浓度分别为 5、10 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入同体积的 DMSO, 细胞经 5-Aza-dc 连续处理 3 d, 每天更换新鲜配置的药物。

1.4.3 膀胱癌 T24 细胞转染 常规培养 T24 细胞, 传代并在 6 孔板上铺板。当 6 孔板上细胞生长至 80% ~ 90% 时, 按照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书进行操作, 转染 TMEFF2 质粒 (Ubi-MCS-3FLAG-CBh-geGFP-IRES-puromycin, 购自上海吉凯基因公司), 对照组转染空载质粒。

1.4.4 Western blot 检测 每孔加入 40 μg 蛋白样品, 用 10% SDS-PAGE 湿转法电转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 同时用 5% 脱脂奶粉稀释一抗 (兔抗人 TMEFF2、Bcl2 和 Bax 抗体) 4 °C 过夜; 加入羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h, 显影。

1.4.5 CCK-8 实验 使用 CCK-8 检测细胞增殖速率。将细胞以 1×10^3 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中, 并用 5-Aza-dc 加药 5 d。向每个孔中加入 10 μl CCK-8 试剂, 将细胞在 37 °C 下保持 2 h。使用微孔板分光光度计测量 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值。

1.4.6 细胞划痕迁移试验 在 6 孔板上每孔的左、中、右用 20 μl 枪头在水平垂直方向各划一条线。用 PBS 洗细胞去除划下的细胞。将培养基更换为无血清培养基以观察其迁移能力。拍照记录 0、24、48 h 细胞的迁移能力。

1.4.7 Transwell 侵袭实验 使用预涂有 Matrigel 的 Transwell 小室测量细胞侵袭能力。将 5×10^4 个加药细胞接种到不含 FBS 的 RPMI-1640 培养基 (200 μl) 中的每个 24 孔板中, 并将 600 μl 含有 10% FBS 的细胞培养基加入到底部室中。将细胞在 37 °C 培养箱中培养 16 h。16 h 后, Transwell 小室用冷 PBS 洗涤 3 次, 上层小室中未迁移的细胞用湿棉签仔细擦拭, 而过滤器另一侧的侵袭穿过的细胞, 用 70% 乙醇处理 30 min, 然后用 0.1% 结晶紫染色 10 min。在显微镜下观察细胞侵袭。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TMEFF2 在 MethHC 数据库中甲基化表达情况 在 MethHC 中, 利用该网站中提供的 TCGA 数据库来源的 432 个膀胱样本, 其中正常膀胱组织 28 例, 膀胱肿瘤 404 例。按上述条件搜索, TMEFF2 有一个转录本 NM_016192, 其在 Bca 组织中甲基化水平明显高于正常组织 ($P < 0.05$)。见图 1A。

2.2 TMEFF2 在人尿液甲基化水平增高 检测的 30 例尿液样本中, 20 例为 Bca 患者, 10 例为正常人, 对于 TMEFF2 甲基化水平, 在 Bca 患者尿液中, 16 例发生高甲基化 (80%), 而在正常人尿液中仅有 2 例发生高甲基化 (20%)。使用 Fisher 确切概率法统计, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.656, P < 0.05$)。见图 1B、1C。

2.3 TMEFF2 蛋白在不同 Bca 细胞株中的表达降低 Western blot 实验结果显示, 与 SV-HUC-1 细胞株相比, TMEFF2 蛋白在 T24、UMUC3、EJ、5637 细胞株中表达均显著降低, 差异有统计学意义 ($F = 712.6, P < 0.05$)。见图 1D。因此本实验选择 T24 细胞系作为实验细胞株。

2.4 5-Aza-dc 处理转染质粒后 TMEFF2 蛋白表达明显增加 5-Aza-dc 处理后 T24 细胞 TMEFF2 蛋白表达量较未处理组表达量明显增加。当 5-Aza-dc 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, TMEFF2 表达量相对较高 (F

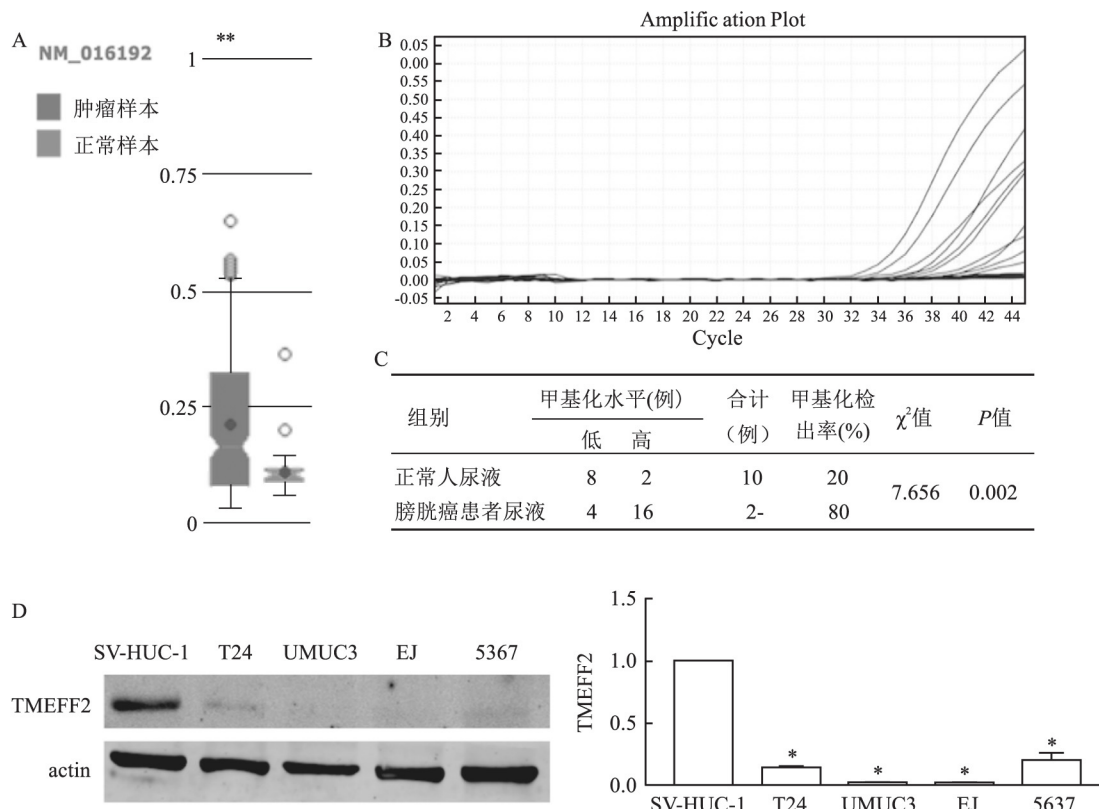


图1 TMEFF2 基因和甲基化表达情况

A: TMEFF2 基因启动子转录本 NM_016192 在 Bca 和正常膀胱黏膜组织中甲基化情况; B: Bca、正常对照样本的扩增曲线; C: Bca 与正常对照样本 TMEFF2 基因启动子甲基化检出率比较; D: TMEFF2 在 Bca 细胞系的表达情况; 与正常组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

= 286.6 $P < 0.05$) ,见图 2A; 因此, 选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 为后续实验组的浓度。Western blot 结果显示, 与对照组比较, TMEFF2⁺ 组细胞中蛋白表达明显上调 ($t = 90.9$, $P < 0.05$)。见图 2B。

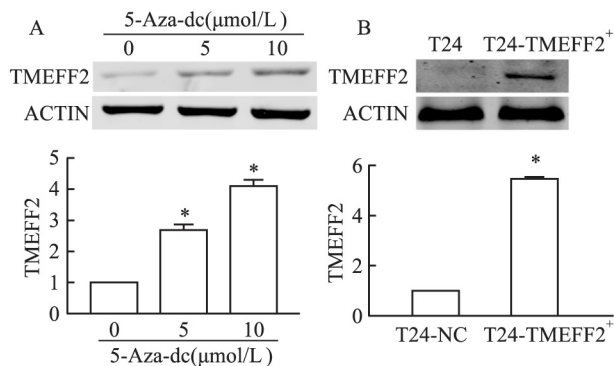


图2 5-Aza-dc 处理和转染质粒后 TMEFF2 蛋白表达情况

A: 5-Aza-dc 处理后 TMEFF2 蛋白表达量; B: 转染过表达质粒后 TMEFF2 蛋白表达量; 与未处理组比较: * $P < 0.05$

2.5 5-Aza-dc 降低 T24 细胞增殖能力情况 CCK-8 检测 5-Aza-dc 处理前后 T24 细胞增殖能力情况, 分别检测 6、12、24、36、48 h 的 OD 值, 结果显示 5-Aza-dc 处理组 T24 细胞在 48 h 的 OD 值较对照组显

著降低, 两组 OD 值差异有统计学意义 ($t = 2.88$, $P < 0.05$)。见图 3A。同时, 质粒转染 TMEFF2⁺ 组 T24 细胞在 48 h 的 OD 值较对照组也显著降低, 两组 OD 值差异有统计学意义 ($t = 2.815$, $P < 0.05$) , 见图 3B。

2.6 5-Aza-dc 降低 T24 细胞迁移和侵袭 为评估 5-Aza-dc 对 Bca 细胞迁移和侵袭能力的影响, 首先, 对 T24 细胞系进行细胞划痕试验。与对照组相比, 处理组 Bca 细胞的迁移的能力显著降低。此外, 通过预先涂有 Matrigel 的 transwell 小室也证明 5-Aza-dc 显著降低了 T24 细胞的侵袭性。见图 4A、4B。同时通过高表达 TMEFF2 基因也证明其干扰了 Bca 细胞的迁移和侵袭。

2.7 5-Aza-dc 促进 T24 细胞凋亡 5-Aza-dc 处理 48 h 后, 提取 T24 细胞系蛋白, 通过 Western blot 检测凋亡相关的蛋白, 可以发现相较于对照组, B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 明显下降, 而 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax) 显著上升, Bcl-2 和 Bax 与对照组相比差异均有统计学意义 ($t = 6.21$, $P < 0.05$; $t = 20.45$, $P < 0.05$) , 由此可以证明 5-Aza-dc 可以促进 Bca 细胞的凋亡。在高

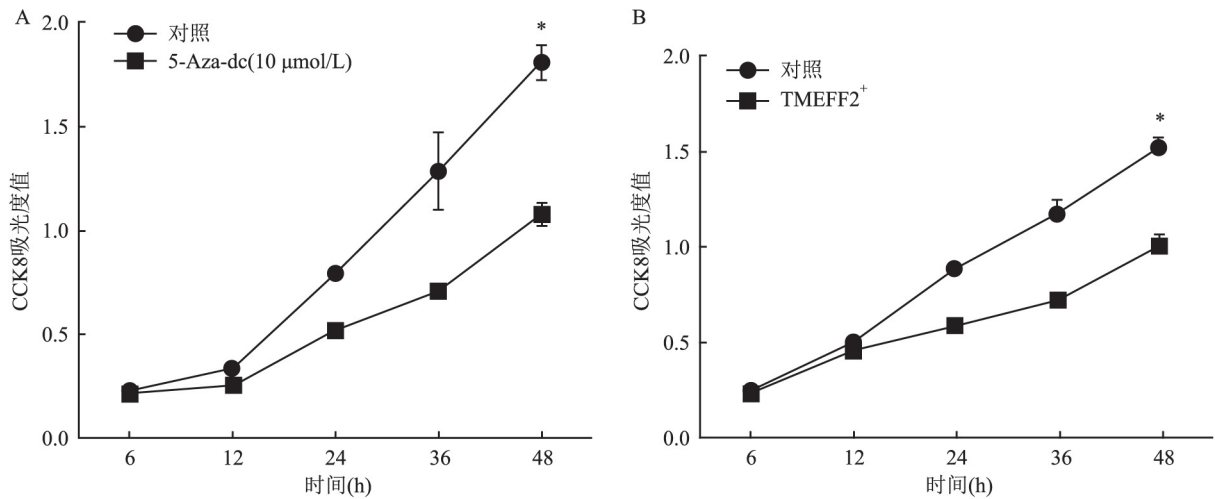


图3 5-Aza-dc 处理和转染质粒后 TMEFF2 后细胞增殖能力降低

A: 5-Aza-dc 处理后与对照组 T24 的增殖情况; B: TMEFF2+ 转染与对照组 T24 的增殖情况; 与对照组比较: * P < 0.05

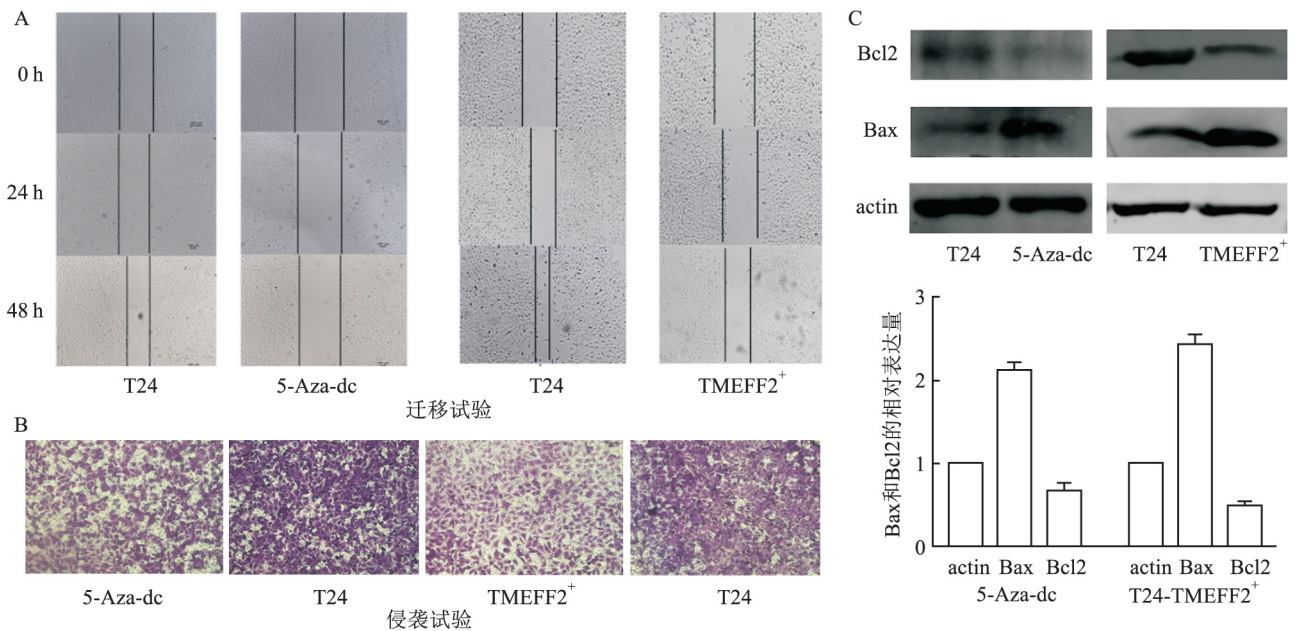


图4 5-Aza-dc 处理和转染质粒后 TMEFF2 后对膀胱癌迁移侵袭和凋亡的影响

A: 5-Aza-dc 处理和 TMEFF2+ 转染后 T24 的迁移能力降低; B: 5-Aza-dc 处理和 TMEFF2+ 转染后 T24 的增殖侵袭能力显著下降 (0.1% 结晶紫染色 ×200); C: 5-Aza-dc 处理和 TMEFF2+ 转染后促进了 T24 的凋亡; 与对照组比较: * P < 0.05

表达质粒中, Western blot 同样证明了 TMEFF2 促进了细胞凋亡, Bcl-2 和 Bax 与对照组相比差异有统计学意义 (t = 15.87, P < 0.05; t = 20.66, P < 0.05)。见图 4C。

3 讨论

通过检测 30 例尿液样本, Bca 细胞系以及数据库验证了 TMEFF2 在 Bca 中低表达, 并证明其甲基化水平高表达。利用去甲基化药物 5-Aza-dc 诱导

TMEFF2 高甲基化状态的 Bca 细胞去甲基化, 当 5-Aza-dc 浓度为 10 μmol/L, 通过 Western blot 实验、CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 细胞小室实验检测 5-Aza-dc 处理前后 T24 细胞相关生物学行为的变化, 表明 5-Aza-dc 处理后 TMEFF2 表达水平升高, 甲基化水平得到逆转, 并抑制了 Bca 的增殖、迁移、侵袭并促进凋亡。同时, 通过高表达 TMEFF2 也证明该基因能干扰 Bca 的相关生物学行为, 进一步证明该基因在 Bca 发挥重要作用, 并且高甲基化水平可

能是其发挥作用的重要原因。

自2001年首次发现TMEFF2存在差异甲基化序列之后,目前已经在许多癌症中揭示TMEFF2的启动子处于高甲基化水平^[6]。Sun et al^[7]通过基因集富集分析和基因本体富集分析证实在胃癌中TMEFF2改变、细胞增殖、凋亡和DNA修复途径显著富集。Herbst et al^[8]在转移性结直肠癌患者中发现TMEFF2的甲基化与预后不良相关,也有研究^[9]证实,通过其CpG岛(CpG island)的甲基化,导致基因的表观遗传沉默,从而抑制癌细胞的凋亡。而在Bca中,Monteiro-Reis et al^[10]研究了TMEFF2甲基化水平的表达情况,然而对其具体机制在Bca中仍无深入研究。因此在本文中,当应用去甲基化药物后,干扰了Bca细胞系的增殖、迁移、侵袭和凋亡。这些研究也为探讨Bca发生机制提供新的方向。

DNA的表观遗传改变可以调节正常细胞和肿瘤细胞中的基因表达。DNA甲基化是DNA的表观遗传改变调节基因表达的常见机制。在许多基因的启动子区周围,存在许多以CpG二核苷酸成簇形成CpG岛。在许多人类恶性肿瘤中,CpG岛的高甲基化抑制肿瘤抑制基因的表达,即表观遗传沉默^[11]。近年来研究^[12]表明,在肿瘤发生的早期DNA的异常甲基化比基因突变更为频繁,因此与正常人相比,肿瘤患者中甲基化的基因可能是潜在的生物标志物。膀胱是作为尿液的暂时储存的器官,其尿液中基因甲基化水平可能更能反映膀胱的状态。Jarmalaite et al^[13]报道了通过检测一组基因的甲基化水平来预测浅表Bca是否会进展为肌层浸润性Bca。并证实启动子甲基化作为Bca疾病进展期预后的有价值生物标志物的分析。在Bca中,Costa et al^[14]报道了通过检测尿液中一组包括TMEFF2基因的甲基化水平来诊断Bca,其敏感性达到94%、特异性达到90%,然而该项研究样本量并不大,并且未对其机制进行深入研究。因此,TMEFF2在Bca中甲基化是否可以作为一个潜在的诊断性标志物,还需要更多的临床样本进一步证实。

综上所述,本研究从大数据库水平、尿液水平、细胞系水平验证了Bca中TMEFF2基因甲基化的变化,并影响了其生物学行为,表明Bca的发生发展可能受表观遗传影响。当然本研究的不足之处有:①未能在更大尿液样本中验证。②未能在Bca组织中验证其表达情况。③未能对收集标本进行随访

研究。因此在接下来的研究中希望开展大样本多中心的研究,并希望将该基因尿液的甲基化检测应用在Bca的早期筛查中。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016, 66(2): 115–32.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7–30.
- [3] Akhavan-Niaki H, Samadani A A. DNA methylation and cancer development: molecular mechanism [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 501–13.
- [4] Lee S M, Park J Y, Kim D S. Methylation of TMEFF2 gene in tissue and serum DNA from patients with non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(2): 171–6.
- [5] Afar D E, Bhaskar V, Ibsen E, et al. Preclinical validation of anti-TMEFF2-auristatin E-conjugated antibodies in the treatment of prostate cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(8): 921–32.
- [6] Horie M, Mitsumoto Y, Kyushiki H, et al. Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons [J]. *Genomics*, 2000, 67(2): 146–52.
- [7] Sun T, Du W, Xiong H, et al. TMEFF2 deregulation contributes to gastric carcinogenesis and indicates poor survival outcome [J]. *Clin Cancer Res* 2014, 20(17): 4689–704.
- [8] Herbst A, Vdovin N, Gacesa S, et al. Methylated free-circulating HPPI DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Int J Cancer* 2017, 140(9): 2134–44.
- [9] Bird A. Molecular biology: Methylation talk between histones and DNA [J]. *Science*, 2001, 294(5549): 2113–5.
- [10] Monteiro-Reis S, Leça L, Almeida M, et al. Accurate detection of upper tract urothelial carcinoma in tissue and urine by means of quantitative GDF15, TMEFF2 and VIM promoter methylation [J]. *Eur J Cancer* 2014, 50(1): 226–33.
- [11] Van S L. From epigenesis to epigenetics: The case of C. H. Waddington [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 981(1): 61–81.
- [12] Andresen K, Boberg K M, Vedeld H M, et al. Four DNA methylation biomarkers in biliary brush samples accurately identify the presence of cholangiocarcinoma [J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1651–9.
- [13] Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaitė K, et al. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer [J]. *Oncology*, 2008, 75(3–4): 145–51.
- [14] Costa V L, Henrique R, Danielsen S A, et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(23): 5842–51.

基于 RNA-seq 分析人肝癌耐药细胞 BEL-7402/FU 的差异表达基因

周谢海¹, 张婷¹, 谢刚¹, 崔志华¹, 许杜娟^{1,2,3}, 夏泉²

摘要 目的 分析调控人肝癌耐药细胞 BEL-7402/FU 耐药的关键基因和信号通路,进而探讨引起肝癌多药耐药的可能机制,寻找逆转肝癌多药耐药的潜在靶点。方法 TRIzol 法提取人肝癌细胞 BEL-7402 与耐药细胞 BEL-7402/FU 的总 RNA,采用 RNA-seq 测序技术检测两组细胞的数字基因表达谱并筛选差异表达基因(DEGs),运用生物信息学分析方法对 DEGs 进行生物通路等富集分析。结果 检测到上调的 DEGs 数为 2 899 个,下调的 DEGs 数为 3 313 个;GO 富集及 KEGG 分析发现涉及的主要生物进程为单生物体过程类别、细胞类别、结合分子功能类别,主要的信号通路为代谢通路等;PPI 分析显示,在蛋白互作网络中具有重要作用的基因为 TP53、EGFR、MAPK8、BCL2L1、STAT5A、STAT5B、

ABALON、FYN、CDKN1A、BCL2 等。结论 肝癌耐药过程涉及到多个基因和通路,这些具有差异的基因和通路或将成为逆转肝癌耐药的靶点。

关键词 肝癌耐药; RNA-seq 技术; 差异表达基因

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0342-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.002

原发性肝癌主要是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),简称肝癌,是常见的恶性肿瘤之一,临床发病率和死亡率均较高。化疗是中晚期肝癌重要的治疗手段,然而患者往往因为多药耐药的产生而导致化疗失败。肝癌耐药是一个多进程多种因素相互作用的结果,其中包括多药耐药蛋白的高表达^[1],凋亡抑制途径异常^[2],以及细胞内在信号通路的调节^[3]等。但迄今为止仍尚未完全阐明肝癌耐药的机制。RNA-seq,即对经 RNA 反转录以及 PCR 扩增得到的 cDNA 进行高通量测序分析,具有数据量大、定量准确、可重复性高、分析可靠等特

2018-09-30 接收

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045014)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230022

³国家中医药管理局三级药物化学实验室,合肥 230001

作者简介:周谢海,女,硕士研究生;

许杜娟,女,主任药师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

xudujuan6365@163.com

Effects of TMEFF2 promoter methylation on proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer

Zhang Wentao^{1,2}, Zhang Ziwei², Mao Shiyu², et al

(¹Dept of Urology, Shanghai Clinical College of Anhui Medical University, Shanghai 200072;

²Dept of Urology, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072)

Absrtact Objective To study the expression of transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2 (TMEFF2) and promoter methylation level in bladder cancer. **Methods** The methylation level of the promoter region of TMEFF2 gene was analyzed by DNA methylation and gene expression in human cancer (MethHC) database. The methylation-specific quantitative PCR was used to detect the difference in methylation expression of TMEFF2 gene in 30 urine samples and the proliferation, migration, invasion and apoptosis of bladder cancer cell lines were analyzed after treated with 5-Aza-dc. At the same time, the TMEFF2 gene was highly expressed by transfecting the plasmid, further verifying its biological role in bladder cancer. **Results** Apoptosis of bladder cancer T24 cells was significantly increased after 5-Aza-dc treatment, while migration and invasion were significantly inhibited. The same result was obtained by highly expressing TMEFF2 by transfection of the plasmid. **Conclusion** TMEFF2 gene promoter methylation may be a potential biomarker of bladder cancer, which may play an important role in the development of bladder cancer.

Key words bladder cancer; TMEFF2; methylation