

# 膀胱癌中 GDF15 基因启动子区甲基化检测及逆转 其甲基化状态对 5637 膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响

潘大庆, 牛三强, 徐从云, 肖峻

**摘要** 目的 检测生长分化因子 15(GDF15)在膀胱癌中的甲基化状态,探讨其启动子区异常甲基化对于膀胱癌发生发展的作用。方法 应用重亚硫酸盐测序 PCR(BSP)联合 T-载体 PCR 产物(TA)克隆检测人膀胱移行细胞癌细胞系 5637、HT1376、KU19-19、膀胱癌组织、癌旁组织、正常组织样品中 GDF15 启动子区甲基化状态,并用甲基化酶抑制剂 5-Aza-2-deoxycytidine(5-Aza-dc)处理 5637,观察处理前后平均甲基化率的变化情况,Western blot 法检测 5637 处理前后蛋白表达情况,MTT 法检测细胞增殖情况,划痕实验检测迁移情况,Transwell 法检测侵袭能力。结果 5637、HT1376、KU19-19 细胞中 GDF15 启动子区平均甲基化率为 89.29%、10.71%、8.33%,肿瘤组织、癌旁组织及正常组织分别为 86.91%、9.52%、5.95%。膀胱癌组织中 GDF15 启动子区甲基化率较癌旁组织和正常组织中高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );5-Aza-dc 可以逆转 5637 中 GDF15 的甲基化状态:与处理前相比,处理组 5637 细胞系 GDF15 蛋白表达增加,增殖、迁移、侵袭能力下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 膀胱癌中 GDF15 基因表达与甲基化状态有关,启动子区高甲基化导致基因沉默,逆转甲基化状态可以使基因蛋白表达增加,细胞增殖、迁移、侵袭能力均降低。GDF15 基因甲基化异常状态有可能成为膀胱癌诊断的潜在靶点。

**关键词** 膀胱癌;甲基化;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0952-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.003

膀胱癌是一个重大的全球挑战性疾病,2012 年膀胱癌的新发病例和死亡病例分别是 430 000 和 165 000 例<sup>[1]</sup>。目前诊断膀胱癌主要靠无创的尿脱落细胞学检查和膀胱镜检查。然而,这两种方法对于低级别肿瘤灵敏度较低。由于早期膀胱癌症状不明显,不易发现,因而早诊断、早治疗对于膀胱癌患者的预后意义较大。肿瘤的发生发展涉及基因和表观遗传的改变,而基因启动子区异常甲基化是最常

见的表观遗传改变。近年来研究<sup>[2-3]</sup>显示,生长分化因子 15(growth differentiation factor 15, GDF15)基因与多种疾病的发生发展相关。该研究采用重亚硫酸盐测序 PCR(BSP)联合 T-载体 PCR 产物(TA)克隆方式检测膀胱移行细胞系 5637、HT1376、KU19-19 和膀胱癌组织、癌旁组织及正常组织中 GDF15 基因启动子区的甲基化状态,研究 5-Aza-dc 逆转 GDF15 在 5637 甲基化状态后的蛋白表达、增殖、迁移、侵袭能力的变化,该研究对于揭示膀胱癌发生发展的分子机制,治疗方案的选择具有重要意义。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 人膀胱移行癌细胞株 5637、HT1376、KU19-19(上海细胞库);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);甲基化酶抑制剂 5-Aza-dc、MTT(美国 Sigma 公司);DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司);DNA 甲基化试剂盒(美国 ZYMO Research 公司);Gel Image System 凝胶图像分析仪(上海天能公司);引物合成(安徽通用生物有限公司);TA 克隆试剂盒(上海 Sangon Biotech 公司);兔抗人 GDF15 多克隆抗体、HRP 标记羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司);Transwell 小室(美国 Costar 公司)。膀胱癌组织标本来源于安徽省立医院泌尿外科,并经过病理学明确诊断为膀胱移行细胞癌,其中膀胱癌肿瘤组织及对应癌旁组织标本 43 例,正常组织 10 例。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与处理** 膀胱癌细胞系 5637 用含 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基,实验组用 5  $\mu\text{mol/L}$  甲基化酶抑制剂 5-Aza-2-deoxycytidine(5-Aza-dc)药液处理,对照组不做处理;HT1376、KU19-19 细胞用含 10%胎牛血清 DMEM 培养基;3 种细胞均在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。

**1.2.2 BSP 按照 DNA 提取试剂盒说明书** 提取 5637 细胞、加入 5-Aza-dc 的 5637 细胞、膀胱癌组织、癌旁组织、正常组织 DNA。用 DNA 甲基化试剂盒对 DNA 进行亚硫酸盐修饰,-20  $^{\circ}\text{C}$  存储备用。以

2017-02-05 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085MH166)

作者单位:安徽医科大学附属安徽省立医院泌尿外科,合肥 230001

作者简介:潘大庆,男,硕士研究生;

肖峻,男,硕士生导师,责任作者,E-mail:ahxjdoctor@sina.com

亚硫酸盐修饰后的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系如下:模板 2  $\mu\text{l}$  (5 ng),引物(上游引物:5'-TTTTTAgATGTTTTTGGTGTGTGTTG-3',下游引物:5'-AATCTTCCCAACTCTAATTA-3') 10 pmol/ $\mu\text{l}$  各 2  $\mu\text{l}$ ,10 $\times$ buffer 2  $\mu\text{l}$ ,MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu\text{l}$ ,dNTP 0.4  $\mu\text{l}$ ,King Hot-Start Taq 0.2  $\mu\text{l}$ ,DMSO 0.4  $\mu\text{l}$ ,H<sub>2</sub>O 9.4  $\mu\text{l}$ ,共 20  $\mu\text{l}$  体系,于 PCR 仪上进行扩增,产物长度为 194 bp,反应条件如下:95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min;35 个循环,95  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,51  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;最后进行一次延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。取 PCR 产物 3  $\mu\text{l}$  于 2% 的琼脂糖凝胶上电泳并照相。

**1.2.3 TA 克隆** 将剩下的所有 PCR 产物上样于 2% 的琼脂糖凝胶上并切胶回收,按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行胶回收,纯化。纯化产物按照说明书进行 TA 克隆连接反应,挑取阳性菌落摇菌送测序。

**1.2.4 Western blot 实验** 收集 5-Aza-dc 处理前后 5637 细胞 GDF15 蛋白,经 SDS-PAGE 电泳,随后电转 5% 脱脂奶粉作为封闭液,摇床上封闭 1 h,加入兔抗人多克隆一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,第 2 天 TBS 洗膜,加入羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,显影曝光,以各组 GAPDH 条带灰度值作为参照值观察其 GDF15 的蛋白表达量。

**1.2.5 MTT 实验** 单细胞悬液(用含 10% 胎牛血清培养液配制),每孔 8 000/ml 浓度接种到 96 孔板,每孔体积 100  $\mu\text{l}$ ;37  $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养,分别于 0、12、24 h 时间点,加入 MTT 后在酶标仪上测定各孔吸光值,记录结果,以 6 孔的平均值代表细胞的增殖情况。

**1.2.6 细胞划痕实验** 24 孔板,以划痕实验进行测定。在每孔的左、中、右用黄枪头按照板背后画线的垂直方向各划一条线。用 PBS 洗细胞去除划下的细胞。拍照记录 0 h 每个划痕的宽度。更换培养基为正常含血清培养基。此后,分别于 12/24 h 拍照记录每个划痕宽度。最后进行数据处理:以每个时间点划痕宽度平均值/0 h 划痕宽度平均值计算相对迁移率。

**1.2.7 Transwell 小室实验** 接种  $8\times 10^4$  细胞,加入预先用培养基平衡过的小室上侧,下侧孔中加入 700  $\mu\text{l}$  含血清培养基。细胞贴壁后将小室中的培养基更换为 300  $\mu\text{l}$  无血清培养基,计时为 0 h。细胞进行培养 24 h 后,将小室下侧经甲醇固定 5 min 和结晶紫染色 5 min 后,在显微镜下拍照,并分别取 5 个随机区域计数成功穿过的细胞数,以均值比较侵

染的能力。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,比较各组间差异性采用 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BSP 实验结果** 取 PCR 产物 3  $\mu\text{l}$  于 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,凝胶图像分析仪成像,见图 1A。

**2.2 TA 克隆结果** TA 克隆测序分析后显示,肿瘤组织和 5637 细胞中 GDF15 基因平均甲基化率分别为 86.91%、89.29%,癌旁组织、正常组织和 HT1376、KU19-19、5-Aza-dc 处理的 5637 细胞 GDF15 平均甲基化率分别为 9.52%、5.95%、10.71%、8.33% 和 4.76%。肿瘤组织中 GDF15 甲基化率明显高于正常膀胱组织和癌旁组织,差异有统计学意义( $t=267.64,259.70 P<0.05$ );经去甲基化处理,5637 中 GDF15 基因甲基化率下降明显( $t=354.81 P<0.05$ );见图 1B、C、D。

**2.3 GDF15 蛋白表达情况** 5-Aza-dc 处理后 5637 细胞 GDF15 蛋白表达量较未处理组表达量明显增加,处理后 GDF15 蛋白与内参蛋白相对灰度值的比值为  $(0.128\pm 0.015)$ ,而未处理组比值为  $(0.836\pm 0.028)$ ,差异有统计学意义( $t=651.65 P<0.05$ ),见图 2。

**2.4 5637 细胞增殖能力情况** MTT 检测 5-Aza-dc 处理前后 5637 细胞增殖能力情况,结果显示,5-Aza-dc 处理组 5637 细胞在 0、12、24 h 的吸光度值分别为  $(0.454\pm 0.016)$ 、 $(0.552\pm 0.014)$ 、 $(0.724\pm 0.017)$ ;而对照组在 0、12、24 h 的吸光度值分别为  $(0.458\pm 0.015)$ 、 $(0.683\pm 0.0150)$ 、 $(0.902\pm 0.012)$ ;12、24 h 时间点两组差异有统计学意义( $t=507.36,125.87 P<0.05$ )。

**2.5 5637 细胞迁移能力情况** 细胞划痕实验检测 5-Aza-dc 处理前后 5637 细胞迁移能力情况,结果表明,5-Aza-dc 处理后 5637 细胞 0、12、24 h 的吸光度值分别为  $(1.000\pm 0.000)$ 、 $(0.872\pm 0.014)$ 、 $(0.593\pm 0.013)$ ,而对照组在 0、12、24 h 的吸光度值分别为  $(1.000\pm 0.000)$ 、 $(0.791\pm 0.012)$ 、 $(0.443\pm 0.016)$ ;12、24 h 时间点两组差异有统计学意义( $t=-4.18,-9.82 P<0.05$ ),见图 3。

**2.6 5637 细胞侵袭能力情况** Transwell 侵袭实验,对照组和实验组穿过滤膜细胞数分别为  $(344.000\pm 6.258)$ 、 $(76.800\pm 5.325)$ ,结果显示 5-Aza-dc 处理后 5637 细胞侵袭能力下降,差异有统计学意义( $t=$

116.12,  $P < 0.05$ ) ,见图4。

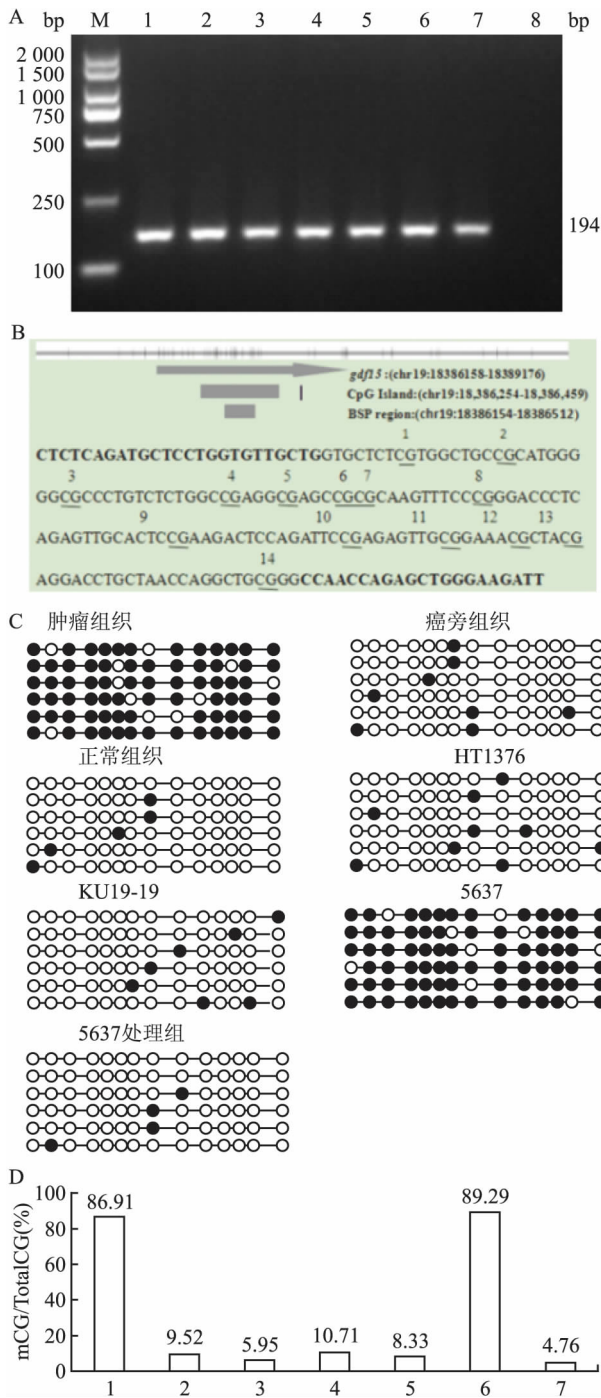


图1 TA克隆测序结果及BSP反应电泳图

A: BSP电泳图; B: 显示GDF15基因启动子全长, 启动子区CG岛区域以及本研究的BSP扩增区域(序列中标记出CG位点和引物); C: T克隆测序结果, 黑圈表示发生甲基化, 白圈表示未发生甲基化; D: GDF15在肿瘤组织、癌旁组织、正常组织、5-Aza-dc处理前后的5637细胞中平均甲基化率柱形图; M: Marker; 1: 肿瘤组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常组织; 4: HT1376; 5: KU19-19; 6: 5637; 7: 5637处理组; 8: 水对照

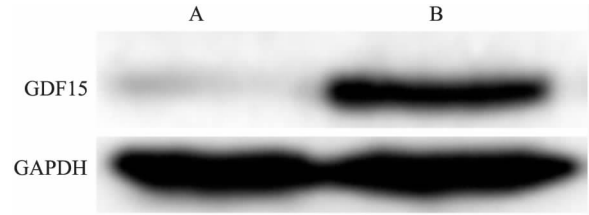


图2 5-Aza-dc处理前后GDF15蛋白表达情况  
A: 未处理5637细胞; B: 5-Aza-dc处理5637细胞

### 3 讨论

GDF15是转化生长因子-β超家族中的一员,其影响多种肿瘤生物进程,而在膀胱癌中的研究较少。研究<sup>[4]</sup>表明,GDF15广泛参与多种肿瘤细胞系致瘤作用,包括抑制细胞生长、促进凋亡、增加侵袭能力。这些作用与组织和细胞特异性均有关<sup>[5-6]</sup>。Tsui et al<sup>[7]</sup>发现,过表达GDF15抑制膀胱癌细胞系增殖、侵袭和肿瘤形成能力,而敲低GDF15结果刚好相反。研究<sup>[8-9]</sup>显示,GDF15基因在膀胱癌患者尿液和组织样本中高甲基化,提示GDF15可能是膀胱癌一种重要的生物标志物。

基因启动子区甲基化作为一种肿瘤标志,已表现出对前列腺和膀胱肿瘤检测的准确性和临床实用性。表观遗传学改变,特别是DNA甲基化,作为泌尿系统肿瘤分子标志物,具有很好的敏感性和特异性。有报道<sup>[10]</sup>关于通过肿瘤组织甲基化分析诊断膀胱癌的可行性。然而,这些研究<sup>[11-12]</sup>大多局限性而非定量的方法,并且甲基化基因的启动子在数种泌尿系统肿瘤中也被显示,从而限制了膀胱癌诊断的特异性。这种方法运用在膀胱癌患者尿沉渣中时,低敏感性同样出现<sup>[13-14]</sup>。

本研究应用BSP联合TA克隆的方法检测膀胱癌组织、癌旁组织、正常组织、5637细胞及5-Aza-dc处理后5637细胞中GDF15基因启动子区甲基化状态,此方法更能准确地检测基因序列中每个CG位点的甲基化情况,相较于COBRA<sup>[15]</sup>法和甲基化特异性PCR具有更高的准确性和实用性。能够定量计算出片段中基因的平均甲基化率,对于确定组织或细胞中基因的甲基化状态意义更大。随后本研究又用去甲基化试剂5-Aza-dc处理GDF15处于高甲基化状态的膀胱癌细胞系5637,并使其甲基化状态得到逆转,利用Western blot实验、MTT实验、细胞划痕实验、Transwell细胞小室实验检测5-Aza-dc处理前后5637细胞蛋白表达、增殖、迁移、侵袭能力变

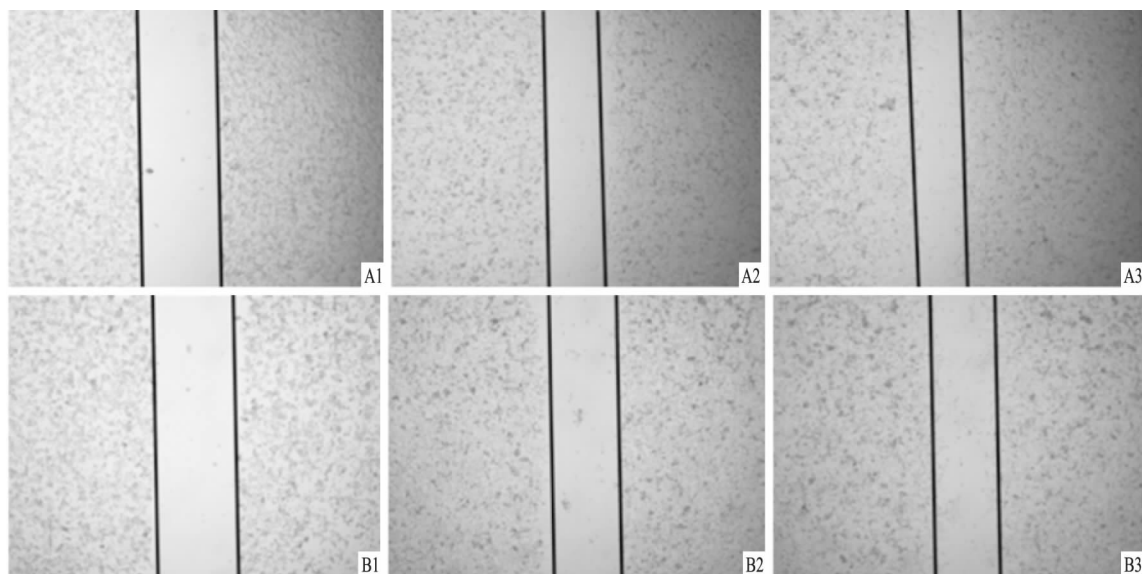


图3 划痕实验检测 5637 细胞 5-Aza-dc 处理前后细胞迁移能力情况  $\times 100$   
A: 对照组; B: 实验组; 1: 0 h; 2: 12 h; 3: 24 h

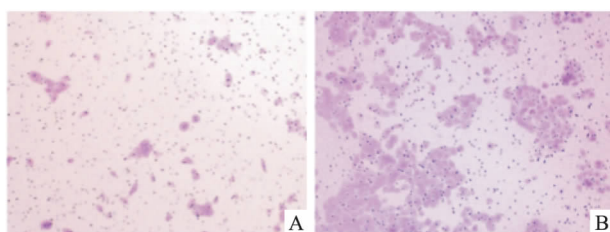


图4 Transwell 实验检测 5637 细胞 5-Aza-dc 处理前后细胞侵袭能力情况 0.1% 结晶紫染色  $\times 100$   
A: 对照组; B: 实验组

化。实验显示,膀胱癌组织和 5637 中 GDF15 呈现高甲基化,癌旁组织、正常组织以及 5-Aza-dc 处理后的 5637 中 GDF15 呈现低甲基化;甲基化程度逆转后的 5637 细胞,GDF15 蛋白表达增加,细胞增殖、迁移、侵袭能力减弱。这些结果表明,GDF15 基因在膀胱癌发生发展中可能扮演抑癌基因的角色,膀胱癌中 GDF15 高甲基化状态与细胞增殖、迁移、侵袭能力密切相关,GDF15 基因启动子区甲基化有望成为膀胱癌诊断的一个潜在靶点。

综上所述,本研究证实膀胱癌中 GDF15 基因启动子区高甲基化,5-Aza-dc 可以逆转甲基化状态。目前,5-Aza-dc 药物已经进入临床试验阶段,在其他肿瘤治疗中目前也已取得不错疗效。需要注意的是,DNA 甲基化具有组织和细胞特异性,因此 GDF15 在膀胱癌组织中甲基化状态以及对于肿瘤的发生发展,需要更多临床样本量进一步证实。

## 参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-86.
- [2] Lee E S, Kim S H, Kim H J, et al. Growth differentiation factor-15 predicts chronic liver disease severity [J]. *Gut Liver*, 2017, 11(2):276-82.
- [3] Barma M, Khan F, Price R J, et al. Association between GDF-15 levels and changes in vascular and physical function in older patients with hypertension [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2016: [Epub ahead of print].
- [4] Khaled Y S, Elkord E, Ammori B J. Macrophage inhibitory cytokine-1: a review of its pleiotropic actions in cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2012, 11(5):183-90.
- [5] Corre J, Hebraud B, Bourin P. Concise review: growth differentiation factor 15 in pathology: a clinical role? [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(12):946-52.
- [6] Mimeault M, Batra S K. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(3):626-35.
- [7] Tsui K H, Hsu S Y, Chung L C, et al. Growth differentiation factor-15: a p53- and demethylation-upregulating gene represses cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in bladder carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12870.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Yu J , Zhu T , Wang Z , et al. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res* , 2007 ,13(24) :7296-304.
- [12] Hoque M O , Begum S , Topaloglu O , et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection [J]. *J Natl Cancer Inst* 2006 ,98(14) :996-1004.
- [13] Ellinger J , El Kassem N , Heukamp L C , et al. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer [J]. *J Urol* 2008 ,179(1) :346-52.
- [14] Negraes P D , Favaro F P , Camargo J L , et al. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection [J]. *BMC Cancer* 2008 ,8:238.
- [15] Xiong Z , Laird P W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay [J]. *Nucleic Acids Res* , 1997 ,25(12) :2532-4.

## Detection of GDF15 gene promoter methylation in bladder cancer and its reverse status effect on the proliferation , migration and invasion of 5637 cell

Pan Daqing , Niu Sanqiang , Xu Congyun , et al

(Dept of Urology , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

**Abstract Objective** To detect the growth differentiation 15 factor (GDF15) methylation status and explore the role of promoter region aberrant methylation in the development of bladder cancer. **Methods** We detected the methylation status of GDF15 promoter CpG island (CGI) in bladder cancer cell line 5637 , HT1376 , KU19-19 , normal bladder tissue and 1 pairs of bladder tissues (cancer and para-cancerous tissue) by using bisulfite genomic sequencing PCR (BSP) combined with TA clone for sequencing. The methylation rate of GDF15 in 5637 was compared before and after treatment of the inhibitor of DNA methyltransferase (5-Aza-2-deoxycytidine 5-Aza-dc). Western blot was used to detect the protein expression of GDF15; MTT was used to detect cell proliferation; scratch assay was used to detect cell migration and transwell assay was used to detect cell invasion capability. **Results** The average methylation rate of GDF15 promoter CGI was 86.91% in 5637 , 10.71% in HT1376 , 8.33% in KU19-19 , and 86.91% in cancer tissues 9.52% in para-cancerous tissues , 5.95% in normal tissues. The methylation rate of cancer tissue was higher than that of normal bladder and para-cancerous tissues ( $P < 0.05$ ). 5-Aza-dc could reverse the methylation status of GDF15 promoter in 5637 and compared with before treatment all of the index including of protein increasing , cell proliferation , migration and invasion ability decreasing had statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This promoter hypemethylation is correlated with GDF15 gene expression in bladder cancer cell line 5637 and bladder tissues , and plays a key role in GDF15 silencing. Reverse methylation status can result in protein increasing , cell proliferation , migration and invasion ability decreasing. Aberrant hypermethylation of GDF15 might become early diagnosis index and treatment target of bladder cancer.

**Key words** bladder cancer ; methylation ; proliferation ; migration ; invasion