

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.022.html>

◇临床医学研究◇

膀胱癌中 *eya4* 基因启动子区甲基化状态及其临床意义

牛三强, 徐从云, 潘大庆, 林 壤, 沈 洲, 许 言, 刘 治, 肖 峻

摘要 目的 探讨膀胱癌细胞系和膀胱移行细胞癌组织中 EYA 转录共激活磷酸酶 4(*eya4*) 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态及在临床病理特征中的意义。方法 应用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP) 检测 *eya4* 基因在 5 株膀胱癌细胞系、1 株膀胱永生化上皮细胞系和 75 例膀胱移行细胞癌组织及癌旁组织, 并结合临床病理特征行统计学分析。结果 *eya4* 基因启动子区在 5 株膀胱癌细胞系中, 有 4 株出现甲基化, 其甲基化率为 80%; 在人正常膀胱细胞系中甲基化阴性。*eya4* 在膀胱癌组织中的甲基化率为 70.7% (53/75), 显著高于癌旁组织(24%, 18/75), 差异有统计学意义($\chi^2 = 32.760, P < 0.01$)。*eya4* 基因启动子区 CpG 岛甲基化在临床病理特征中如单发膀胱肿瘤与多发膀胱肿瘤相比, 直径≤3 cm 的膀胱肿瘤与>3 cm 的膀胱肿瘤相比, 低级别膀胱肿瘤与高级别膀胱肿瘤相比, 浅表性膀胱肿瘤与浸润性膀胱肿瘤相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但与年龄和性别无关。结论 基因 *eya4* 启动子区甲基化与膀胱癌的发生发展有关, 可能作为膀胱移行细胞癌诊断的一个新的标志物。

关键词 膀胱癌; *eya4*; 启动子甲基化

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0724-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.022

膀胱癌是我国泌尿外科临幊上最常见的肿瘤之一, 近年来其发病率仍呈上升趋势。对于早期诊断的膀胱癌, 其 5 年生存率高达 94%, 因此准确的早期诊断是十分必要的^[1]。膀胱癌与其他人类肿瘤的发生发展相似, 主要由于基因和表观遗传的改变, 异常的 DNA 甲基化是最常见的表观遗传改变, 最新研究^[2-5]显示 EYA 转录共激活磷酸酶 4(eyes absent 4 *eya4*) 基因启动子的异常甲基化发生在口腔癌、肝癌、结肠癌和肺癌。至于其在膀胱癌中的甲基化状态尚不明确, 该研究旨在通过甲基化特异性聚

2017-01-11 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(编号: 1608085MH166)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院泌尿外科, 合肥 230001

作者简介: 牛三强, 男, 硕士研究生;

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

合酶链反应(methylationspecific PCR, MSP) 法检测 *eya4* 启动子甲基化状态, 探讨与膀胱癌发生发展及其临床病理资料之间的关系, 为膀胱移行细胞癌的早期诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集 2014 年 12 月~2016 年 6 月安徽医科大学附属省立医院泌尿外科和安徽省肿瘤医院泌尿肿瘤外科进行手术的膀胱癌患者 75 例, 并有完整的临床及病理资料, 取膀胱癌组织及对应距肿瘤边缘>3 cm 的新鲜癌旁组织, 迅速放入液氮后转到-80℃冰箱, 所有患者为初诊, 且术前均未进行放化疗及免疫治疗, 术后病理均证实为膀胱移行细胞癌, 其中男 49 例, 女 26 例, 年龄 31~79 (55.4±8.6) 岁。根据 2004 年世界卫生组织(WHO) 病理分级标准, 高级别尿路上皮癌 28 例, 低级别尿路上皮癌 47 例; 根据国际抗癌联盟(UICC) 2009 年第七版 TNM 分期法标准, 非肌层浸润性膀胱癌(Tis、Ta、T1) 45 例, 肌层浸润性膀胱癌 30 例(T2 以上);

1.1.2 细胞系 5 株人膀胱癌细胞株分别为 5637、T24、J82、Biu87、UM-UC-3 细胞系(均为膀胱移行癌细胞系)和 1 株人永生化正常膀胱上皮细胞株 SV-HUC-1 均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂及仪器 RPMI-1640 培养基、MEM 培养基、F12K 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(美国 Winsent 公司); 磁珠(美国 aline biosciences 公司); DNA 胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司); 10×PCR buffer、dNTP、Mg²⁺、Hs-Taq 酶(上海睿安生物科技有限公司); EZ DNA Methylation-Gold Kit(美国 Zymo Research 公司); M. SssI(CpG 甲基转移酶, 美国 NEB 公司); MSP 引物合成(安徽通用生物科技有限公司); G-Storm GS1 热循环 PCR 仪(美国 labtech 公司); Tanon 1600 凝胶成像仪(上海天能公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 膀胱癌细胞系 5637、T24、Biu87、J82 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, UM-UC-3 用含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基。人永生化正常膀胱上皮细胞株 SV-HUC-1 用含有 10% 胎牛血清的 F12K 培养基。以上细胞系均培养在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。

1.2.2 DNA 提取 应用磁珠纯化法分别获取膀胱癌组织、癌旁组织和各细胞系的基因组 DNA, 跑胶电泳后使用 Tanon 1600 凝胶成像仪进行 DNA 定量。

1.2.3 DNA 亚硫酸盐修饰 使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 进行膀胱癌组织、癌旁组织和各细胞系的基因组 DNA 重亚硫酸盐修饰, 最终溶于 10 μl Elution Buffer。

1.2.4 eya4 基因启动子区 MSP 引物的设计 通过 UCSC Genome Browser 数据库 获得 eya4 基因启动子区序列 (chr6: 133239586-133241585), 使用 Li et al^[6] 的 Methprimer 预测软件设计 eya4 基因启动子区 MSP 引物, 引物序列位于 CpG 岛内 (-427 ~ -280), 涵盖 17 个 CpG 位点。eya4 甲基化特异性引物序列: 上游引物 (MF): 5'-GTTATTGAGGTTAAATAAAATGG-3', 下游引物 (MR): 5'-ACTTACG-CAAAAAATAAACGAA-3' 扩增产物 149 bp, 退火温度 58 °C; eya4 非甲基化特异性引物序列: 上游引物 (UF): 5'-GTTATTGAGGTTAAATAAAATGG-3', 下游引物 (UR): 5'-CACTTACACAAAAAAATAAAA-CAAA-3' 扩增产物 150 bp, 退火温度 55 °C。

1.2.5 PCR 反应过程 PCR 反应体系为 20 μl, 模板为经过 EZ DNA Methylation-Gold Kit 处理的 DNA (2 μl), 10 × PCR buffer 2 μl, Mg²⁺ 1.6 μl, dNTP mix 0.4 μl, DMSO 0.4 μl, 上下游引物 10 pmol/μl 各 2 μl, HS-Taq 酶 0.2 μl, 灭菌水 11.4 μl。用经过 M. SssI 处理和未处理的正常人外周血细胞 DNA 作

为甲基化和非甲基化的阳性对照, 灭菌水作为甲基化和非甲基化阴性对照, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 热循环 95 °C 变性 20 s, 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 40 次, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.2.6 PCR 产物分析 取 5 μl PCR 扩增产物, 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳 25 min, 使用 Tanon 1600 凝胶成像仪观察拍照, 比对分析: ① 甲基化阳性: M 引物扩增出目的条带, 而 U 引物扩增出或未扩增出目的条带, 则判断甲基化阳性; ② 甲基化阴性: M 引物未扩增出目的条带, 而 U 引物扩增出目的条带, 则判断甲基化阴性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 甲基化率用百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌细胞系和膀胱永生化上皮细胞中 eya4 基因甲基化检测结果 eya4 基因启动子区在 5 株膀胱癌细胞系中, 其中 UMUC-3、T24、5637、Biu87、细胞系中 eya4 基因启动子区均为甲基化, 仅 J82 细胞系未检测到甲基化, 甲基化率为 80%, 在人正常膀胱永生化上皮细胞系 (SV-HUC-1) 中未检测到甲基化, 见图 1。

2.2 膀胱癌组织和癌旁组织中 eya4 基因甲基化检测结果 eya4 在膀胱癌组织中有 53 例发生甲基化, 其甲基化率为 70.7% (53/75), 癌旁组织中仅有 18 例发生甲基化, 其甲基化率为 24% (18/75), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 32.760$, $P < 0.01$) 部分结果见图 2。

2.3 eya4 基因启动子区甲基化与膀胱癌临床病理特征之间的关系 在 75 例膀胱移行细胞癌组织中, eya4 基因与患者肿瘤数目、大小、分期和分级差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与患者的年龄、性别差异无统计学意义, 见表 1。

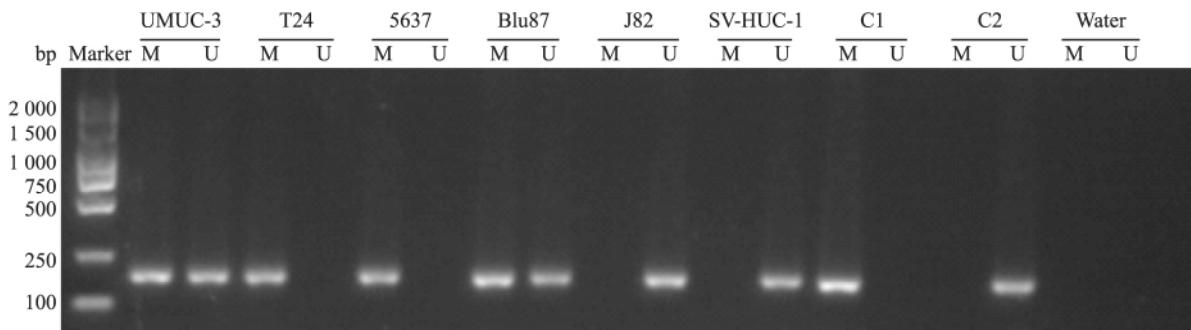
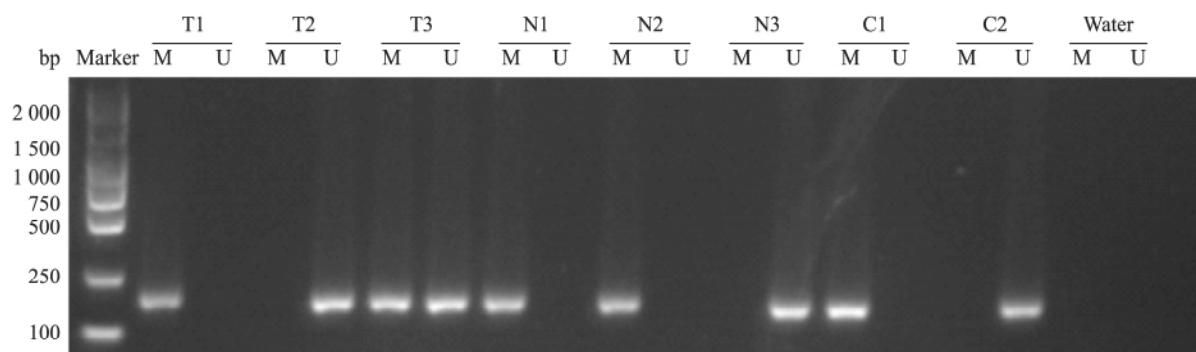


图 1 膀胱癌细胞系中 eya4 基因甲基化状态

M: 甲基化; U: 非甲基化; C1: 甲基化阳性对照; C2: 非甲基化阳性对照

图2 部分膀胱癌组织和癌旁组织中 *eya4* 基因甲基化状态

M: 甲基化; U: 非甲基化; T1 ~ T3: 膀胱癌组织; N1 ~ N3: 癌旁组织; C1: 甲基化阳性对照; C2: 非甲基化阳性对照

表1 *eya4* 基因启动子区甲基化与

膀胱癌临床病理特征之间的关系 [n=75, n(%)]

变量	患者	未甲基化	甲基化	χ^2 值	P 值
性别					
男	49	14(28.6)	35(71.4)	0.040	0.842
女	26	8(30.8)	18(69.2)		
年龄(岁)					
≤65	21	6(28.6)	15(71.4)	0.008	0.928
>65	54	16(29.6)	38(70.4)		
肿瘤					
单发	23	12(52.2)	11(47.8)	8.349	0.004
多发	52	10(19.2)	42(80.8)		
肿瘤直径(cm)					
≤3	50	20(40.0)	30(60.0)	8.233	0.004
>3	25	2(8.0)	23(92.0)		
分级					
低级别(G1-G2)	47	18(38.3)	29(61.7)	4.881	0.027
高级别(G3)	28	4(14.3)	24(85.7)		
分期					
浅表性(Tis-T1)	45	19(42.4)	26(57.8)	9.016	0.003
浸润性(T2-T4)	30	3(10.0)	27(90.0)		

3 讨论

膀胱癌的发生发展是复杂、多因素、多步骤的病理变化过程。主要由于基因和表观遗传的改变,导致肿瘤抑癌基因的失活,促癌基因的活化。其中特别是肿瘤抑癌基因的表观沉默发挥了较为显著的作用^[7]。目前已知的表观遗传学机制包括DNA甲基化和多种组蛋白共价修饰、核小体的结构、非编码RNA、染色质和核内三维高级结构等^[8]。其中DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶的作用下,特定胞嘧啶的第5位碳上连接甲基基团,这是近乎惟一的发生在哺乳动物基因组的共价修饰。DNA甲基化水平有着明确的表观效应:DNA高甲基化状态,尤其是在基因的启动子区上的高甲基化是转录静息基因的重要标志。DNA的甲基化修饰具有细胞世代间可

遗传性,是目前研究的最为深入的表观遗传学机制。肿瘤细胞中DNA甲基化异常通常是较之基因突变更为频繁的事件^[9]。已被广泛证实参与了从肿瘤发生到发展、增殖、侵润、转移的全部过程^[10]。一些基因的甲基化频繁地出现在不同种类的人类的癌症中,包括膀胱癌。因此在膀胱癌中检测异常基因DNA甲基化可能对预测膀胱癌患者的结果起到重要作用^[11]。

eya4 基因是 EYA(eyal-4)家族的成员,是一种转录催化剂。在哺乳动物器官形成和发育中起到转录催化作用,并在细胞凋亡调控、DNA损伤修复、增殖和分化发挥重要的作用^[12]。Towle et al^[2]研究发现在口腔鳞状细胞癌组织中 *eya4* 启动子是高甲基化状态,同时启动子区的高甲基化水平也降低了 *eya4* 的表达,并且与口腔鳞状细胞癌增殖、凋亡和DNA损伤修复相关。另有研究^[3]显示 *eya4* 基因在肝癌中作为一个分子诊断标志物,其异常高甲基化导致其表达水平的下调进一步促进了肿瘤的进展,其表达升高抑制肝癌细胞的增殖和入侵,从而推测其可能在肝癌的发生发展中起到抑癌基因的作用。Liu et al^[4]研究表明在结直肠癌中 *eya4* 基因启动子甲基化具有一定的肿瘤组织特异性,并参与结直肠癌的发生和发展。本研究结果表明在膀胱癌细胞系中 *eya4* 基因启动子甲基化率较高且对照组未检测到甲基化,但膀胱癌细胞系 J82 同样未检测出 *eya4* 基因甲基化,可能由于膀胱癌细胞系之间存在一定的差异或所检测的启动子区所包含的甲基化位点存在一定的差异,另本研究显示在膀胱癌组织中的甲基化率显著高于癌旁组织,差异有统计学意义。根据本研究中 *eya4* 基因甲基化在膀胱癌细胞系、膀胱癌组织和癌旁组织中的差异,与上述所提到的在其它肿瘤中 *eya4* 基因启动子区的高甲基化与肿瘤的发

生有关相似,推测膀胱癌的发生发展也可能与 *eya4* 基因启动子甲基化状态相关,但由于本研究标本量较少,今后还需要大规模多角度、多层面的研究去证实。

该研究也进一步对 *eya4* 基因甲基化水平与患者的临床病理特征进行分析,单发膀胱肿瘤组织中 *eya4* 基因启动子区甲基化程度 47.8%,多发膀胱肿瘤组织中其甲基化程度 80.8%;直径≤3 cm 的膀胱癌肿瘤组织中 *eya4* 基因启动子区甲基化程度为 60%,>3 cm 的膀胱肿瘤组织中其甲基化程度为 92%;低级别膀胱肿瘤组织中 *eya4* 基因启动子区甲基化程度 61.7%,高级别膀胱肿瘤组织中其甲基化程度 85.7%;浅表性(Tis-T1)膀胱肿瘤组织中 *eya4* 基因启动子区甲基化程度 57.8%;浸润性(T2-T4)膀胱肿瘤组织中其甲基化程度 90%;差异均有统计学意义,但其与膀胱癌患者的年龄和性别差异无统计学意义。以上结果提示 *eya4* 甲基化率与膀胱癌患者的临床病理资料如肿瘤的数目、大小、分级和分期密切相关,与其年龄和性别无相关性。

综上所述 *eya4* 基因启动子甲基化在膀胱移行细胞癌的发生发展中起到一定的作用,并与膀胱移行细胞癌的相关临床病理特征密切相关,有望作为膀胱移行细胞癌早期诊断的一个新的标志物,但本研究尚缺乏 *eya4* 基因启动子甲基化状态是否与基因表达相关,其具体的作用机制有待后续实验进一步探讨。

参考文献

- [1] Goodison S, Rosser C J, Urquidi V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine-and blood-based marker tests[J].
- [2] Towle R, Truong D, Garnis C. Epigenetic mediated silencing of EYA4 contributes to tumorigenesis in oral dysplastic cells[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2016, 55(7): 568–76.
- [3] Hou X, Peng J X, Hao X Y, et al. DNA methylation profiling identifies EYA4 gene as a prognostic molecular marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(12): 3891–9.
- [4] Liu Y, Tham C K, Ong S Y, et al. Serum methylation levels of TAC1, SEPT9 and EYA4 as diagnostic markers for early colorectal cancers: a pilot study[J]. *Biomarkers*, 2013, 18(5): 399–405.
- [5] Wilson I M, Vucic E A, Enfield K S, et al. EYA4 is inactivated biallelically at a high frequency in sporadic lung cancer and is associated with familial lung cancer risk[J]. *Oncogene*, 2014, 33(36): 4464–73.
- [6] Li L C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427–31.
- [7] Lin Y L, Gui S L, Ma J G. Aberrant methylation of CDH11 predicts a poor outcome for patients with bladder cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 647–52.
- [8] Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 635–8.
- [9] Baylin S B, Jones P A. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 726–34.
- [10] Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology[J]. *Nat Med*, 2011, 17(3): 330–9.
- [11] Kim Y K, Kim W J. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer[J]. *Int J Urol*, 2009, 16(1): 17–22.
- [12] Huang S, Jiang M M, Chen G F, et al. Epigenetic silencing of eyes absent 4 gene by acute myeloid leukemia 1-eight-twenty-one oncoprotein contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2016, 129(11): 1355–62.

The methylation status and clinical significance of the promoter of *eya4* gene in bladder cancer

Niu Sanqiang, Xu Congyun, Pan Daqing, et al

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

Abstract Objective To explore the methylation status of the CpG island of eyes absent 4(*eya4*) promoter and its significance of clinical pathological characteristics in bladder cancer. **Methods** The promoter methylation status of *eya4* gene was examined by methylation specific PCR(MSP) in 5 bladder cancer cell lines and 75 cases of primary bladder transitional cell carcinoma. 1 bladder immortalized epithelial cell line and 75 cases of corresponding adjacent tissues were selected as controls. Meanwhile, clinical pathological data of patients were investigated by statistical analysis. **Results** The promoter of *eya4* were detected in 4 cases of 5 bladder cancer cell lines where methylation rate was 80%. While the methylation status was negative in normal bladder epithelial cell line. The methylation

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.023.html>

腰椎多裂肌 MRI 参数改变 应用于诊断分析峡部断裂型腰椎滑脱

欧阳石林^{1,2} 程大为¹ 方 瑛¹ 申才良¹

摘要 目的 探讨峡部断裂型腰椎滑脱的患者多裂肌 MRI 影像学改变,并与退变型腰椎滑脱及正常体检健康者比较,发现其中规律,探讨临床价值。方法 研究对象分为 3 组:峡部裂型组患者 60 例,其中 L3 滑脱 3 例、L4 滑脱 35 例(Ⅰ度 15 例,Ⅱ度 20 例)、L5 滑脱 22 例;退变型组患者 60 例,其中 L3 滑脱 4 例、L4 滑脱 32 例(Ⅰ度 20 例,Ⅱ度 12 例)、L5 滑脱 24 例;体检资料健康者 60 例为对照组。所测对象的年龄及体重指数(BMI)进行比较,并对所有患者行功能障碍指数评分(ODI)。应用 Image J 软件测量所纳入对象的 L3/4、L4/5、L5/S1 椎间隙水平层面多裂肌净横截面面积占多裂肌区域横截面面积(LCSA/GCSA)的比值。数据间的显著性差异利用单因素方差分析(one-way ANOVA)或 Student's *t* 检验。结果 峡部裂型组患者 3 个不同层面数据与退变型组相应节段滑脱患者及对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),峡部裂型组 L4 不同程度滑脱患者 3 个不同层面数据与退变型组 L4 相应程度滑脱患者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 峡部裂型组与退变型组及对照组相比,其多裂肌退变明显,可考虑其作为腰椎滑脱的诊断参考指标。

关键词 峡部断裂型腰椎滑脱; 多裂肌; 核磁共振; 横截面积

中图分类号 R 681.53

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0728-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.023

脊柱滑脱是因先天性因素、退行性病变或外伤

2017-01-20 接收

基金项目: 安徽省科技厅面上攻关项目(编号: 08010302194)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院脊柱外科, 合肥 230022

²滁州第一人民医院骨科, 滁州 239000

作者简介: 欧阳石林, 男, 硕士研究生;

申才良, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

等使得上位椎体及椎弓根、横突和上关节突一起在下位椎节上方向前(或向后)移位, 其中腰椎滑脱最为常见。腰椎滑脱常见类型有峡部裂型和退变型。腰椎峡部裂是指腰椎椎弓上下关节突之间的峡部骨质失去连续性, 是引起下腰痛的主要原因。峡部缺损使腰椎后部骨性结构的稳定性降低^[1]。多裂肌在腰骶段位于椎骨背侧椎板棘突槽沟内, 背面浅层被腰背筋膜覆盖, 是构成椎旁肌及维持腰椎稳定最重要部分, 其功能是参与脊柱背伸运动, 维持脊柱腰段前凸, 稳定脊柱动力。多裂肌对腰椎滑脱的诊断、治疗及预后有重要作用。符楚迪等^[2]指出多裂肌萎缩与下腰痛、腿痛、椎间盘突出存在显著相关性。目前多裂肌退变与峡部裂型腰椎滑脱相关性研究较少。该研究应用 MRI 对峡部裂型腰椎滑脱的多裂肌进行测量, 并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2013 年 9 月~2015 年 9 月在安徽医科大学第一附属医院治疗滑脱症患者为研究对象(峡部裂型组), 其中 L3 滑脱 3 例、L4 滑脱 35 例(Ⅰ度 15 例, Ⅱ度 20 例)、L5 滑脱 22 例, 所有病例且未进行影响椎旁肌的治疗如: 理疗、针灸、按摩、及药物治疗等, 临床资料完善; 选取同时期确诊的退变性腰椎滑脱患者为退变型组, 其中 L3 滑脱 4 例、L4 滑脱 32 例(Ⅰ度 20 例, Ⅱ度 12 例)、L5 滑脱 24 例, 临床资料齐全, 行腰椎 X 线片及腰椎 MRI 明确诊断。

选取同期在本院健康体检的资料齐全的 60 例

tion rate of *eya4* gene was 70.7% in bladder cancer tissues(53/75) which was significantly more frequent than adjacent tissues(24%, 18/75), and the difference was significant($\chi^2 = 32.760, P < 0.01$). The methylation status of the CpG island of *eya4* promoter was correlated with the clinicopathological features such as tumor diameter, tumor single and multiple, tumor grade and stage($P < 0.05$). However, no association was detected between *eya4* methylation and age and gender. **Conclusion** *eya4* methylation status which is closely correlated with the occurrence and development of primary bladder transitional cell carcinoma may be used as an independent diagnostic biomarker for patients with different kind of bladder cancer.

Key words bladder cancer; *eya4*; methylation of promoter