

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.007

· 基础研究 ·

## 肺腺癌穿膜蛋白 125 通过高甲基化介导 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活降低对地西他滨的敏感性

郑亚妹, 符诒慧, 朱轶轲, 陈永倬(海南省人民医院 呼吸与危重症医学科, 海南 海口 570100)

**[摘要]** **目的:** 探讨穿膜蛋白 125(transmembrane protein125, TMEM125)在肺腺癌组织与 A549 细胞中的表达, 以及影响细胞的增殖和侵袭能力的分子机制。**方法:** 从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库收集肺腺癌数据包, 下载临床信息及基因表达谱数据。分析 TMEM125 在肺腺癌组织中的表达及其与患者总生存期的相关性。构建 TMEM125 过表达 A549 细胞株, 以 CCK-8 法、细胞划痕实验检测 TMEM125 过表达对肿瘤细胞的增殖和迁移能力的影响; 流式细胞术检测 TMEM125 过表达对 A549 细胞的细胞周期和凋亡的影响。WB 检测 TMEM125 过表达对下游 NF- $\kappa$ B 信号通路、凋亡蛋白的影响; 免疫共沉淀法(co-immunoprecipitation, Co-IP)检测 TMEM125 与 NF- $\kappa$ B 抑制因子结合 Ras 样 2(NF- $\kappa$ B inhibitor interacting Ras-like 2, NKIRAS2)的相互作用。利用 TNF $\alpha$ (10 ng/ml)处理 TMEM125 过表达 A549 细胞, CCK-8、流式细胞术及 WB 检测其对细胞增殖、凋亡以及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响。去甲基化试剂地西他滨处理 A549 细胞, qPCR 和 WB 检测 TMEM125 基因和蛋白的表达。**结果:** TMEM125 mRNA 在肺腺癌组织中表达水平显著低于正常组织( $P < 0.001$ ), 启动子甲基化水平显著高于正常组织( $P < 0.001$ ), 并且低、中表达患者总生存期显著低于高表达患者( $P < 0.001$ )。过表达 TMEM125 抑制了 A549 细胞的增殖和迁移( $P < 0.01$ ), 增加细胞 G2/M 期, 促进细胞凋亡( $P < 0.01$ ); 过表达 TMEM125 与 NKIRAS2 相互作用, 显著抑制 NF- $\kappa$ B 的活性( $P < 0.01$ ); 地西他滨处理 A549 细胞可促进 TMEM125 表达并且抑制细胞增殖( $P < 0.01$ )。**结论:** 启动子高甲基化水平降低了 TMEM125 基因表达, 导致其抑制 NF- $\kappa$ B 活性功能和抑制细胞增殖的作用下降, 并且降低了细胞对地西他滨的敏感性。

**[关键词]** 穿膜蛋白; TMEM125; 肺腺癌; A549 细胞; 甲基化; NF- $\kappa$ B**[中图分类号]** R730.54; R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2021)10-0998-07

## Hypermethylation of the transmembrane protein125 in lung adenocarcinoma mediates the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway and reduces the sensitivity to decitabine

ZHENG Yamei, FU Yihui, ZHU Yike, CHEN Yongxing (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Hainan General Hospital, Haikou 570100, Hainan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expression of transmembrane protein 125(TMEM125) in lung adenocarcinoma (LUAD) tissues and A549 cells, and the molecular mechanism that affects the proliferation and invasion of A549 cells. **Methods:** Collected and downloaded the lung adenocarcinoma clinical information and gene expression profile data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and analyzed the correlation between the expression of TMEM125 in lung adenocarcinoma and the overall survival of patients. Constructed TMEM125 overexpressing A549 cell line, detected the effect of TMEM125 overexpression on the proliferation and migration of A549 cells by CCK-8 assay and Wound healing assay, and detected the effect of TMEM125 overexpression on the cell cycle and apoptosis of A549 cells by using flow cytometry. WB was used to detect the effect of TMEM125 overexpression on downstream NF- $\kappa$ B signaling pathways and apoptotic proteins. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to detect the interaction between TMEM125 and NF- $\kappa$ B inhibitor interacting Ras-like 2 (NKIRAS2). TMEM125 overexpressing cells was treated with TNF $\alpha$  (10 ng/ml) and then CCK-8 assay, flow cytometry and WB were used to detect its effects on cell proliferation, apoptosis and NF- $\kappa$ B signaling pathway proteins. A549 cells were treated with demethylation reagent decitabine, and the expression of TMEM125 gene and protein was detected by qPCR and WB. **Results:** The expression level of TMEM125 mRNA in LUAD tissue was significantly lower than that in normal tissues ( $P < 0.001$ ), the promoter methylation level was significantly higher than that in normal tissues ( $P < 0.001$ ), and the overall

**[基金项目]** 海南省卫生健康行业科研资助项目(No.19A200014)。Project supported by the Health Industry Scientific Research Project of Hainan Province (No.19A200014)**[作者简介]** 郑亚妹(1987—),女,本科,主治医师,主要从事肺癌发病机制研究,E-mail: wztg2020@126.com**[通信作者]** 陈永倬(CHEN Yongxing, corresponding author),本科,主任医师,主要从事肺癌发病机制研究,E-mail: chen Yongxing1969@163.com

survival of patients with low and medium expression was significantly lower than that of patients with high expression ( $P < 0.001$ ). Overexpression of TMEM125 inhibited the proliferation and migration of A549 cells ( $P < 0.01$ ), increased cell G2/M phase and promoted cell apoptosis ( $P < 0.01$ ). Overexpression of TMEM125 could interact with NKIRAS2 and inhibit the activity of NF- $\kappa$ B ( $P < 0.01$ ). Treatment of A549 cells with decitabine could promote the expression of TMEM125 and inhibit cell proliferation ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Promoter hypermethylation inhibits TMEM125 gene expression, leading to a decline in its function of inhibiting NF- $\kappa$ B activity and inhibiting cell proliferation and therefore reduce the sensitivity to decitabine, and resulting in the decreased sensitivity to decitabine.

**[Key words]** transmembrane protein; transmembrane protein 125(TMEM125); lung adenocarcinoma; A549 cell; methylation; NF- $\kappa$ B  
[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(10): 998-1004. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.007]

肺癌是一种具有高发病率与高死亡率的恶性肿瘤疾病,其中非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌的85%,且晚期5年生存率不到5%<sup>[1]</sup>。NSCLC中约55%为肺腺癌。近年来,以肺癌驱动基因为靶点、免疫抑制治疗的个体化分子靶向治疗取得了显著临床进展,然而NSCLC的治疗依然是世界性难题。膜蛋白分布于细胞或细胞器表面,多数为整合膜蛋白,又称为穿膜蛋白(transmembrane proteins, TMEM),在细胞和外界环境、细胞与细胞间以及细胞内部的信号转导中起重要作用<sup>[2]</sup>。TMEM家族包括多个成员,如TMEM25、TMEM7、TMEM97、TMEM176等,在肿瘤发生和发展中具有调控作用<sup>[2-3]</sup>。TMEM125为穿膜蛋白家族成员,由219个氨基酸组成,分子量为22 000,具有4个穿膜结构域<sup>[4]</sup>,在肺、甲状腺、胰腺、肠、脊髓和脑中均有表达。TMEM125在乳腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌中存在差异表达<sup>[5]</sup>,但其具体功能尤其是在肺癌中发挥的作用尚不清楚。本研究以NSCLC中常见的肺腺癌为疾病模型,对TMEM125在肺腺癌中的功能和作用机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

总RNA提取试剂(货号为DP405-02)购自天根生化科技(北京)有限公司,逆转录试剂盒(货号为AH411-02)购自北京全式金生物技术有限公司,SYBR染料法荧光定量试剂盒(货号为RR82LR)均购自TaKaRa公司,Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自BioLegend公司(货号640914)。TMEM125一抗抗体购自Thermo公司(货号为PA5-110807),NF- $\kappa$ B p65抗体(货号为ab32536)、Bcl2抗(货号为ab182858)、BAX抗体(货号为ab32503)和NRIRAS2抗体(货号为ab154020)均购自Abcam公司,HRP标记的山羊抗兔IgG(货号为S004F)购自天德悦(北京)生物科技有限责任公司,HA标记的TMEM125过表达慢病毒由苏州吉玛基因股份有限公司制备(病毒滴度 $2 \times 10^8$  TU/ml),TNF $\alpha$ (货号为ab259410)购自美国Abcam公司,去甲基化试剂地西他滨(地西他滨,5-氮杂-2'-脱氧胞苷,货号为A3656)购自Sigma公司,肺腺癌细胞A549购自中国科学院

上海生命科学研究院细胞资源中心,用含有10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素的F12K培养基于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养。

### 1.2 细胞慢病毒感染

A549细胞( $5 \times 10^3$ 个)传代培养于6孔板18 h后,换成新鲜的不含血清的DMEM培养液,依据A549细胞MOI(20~40 pfu/cell),TMEM125过表达组取1  $\mu$ l制备好的TMEM125过表达慢病毒和1  $\mu$ l聚凝胺(Polybrene, 2  $\mu$ g/ml)加入培养皿,然后将细胞置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养24 h后更换新鲜培养液,72 h后荧光显微镜下观察到绿色荧光细胞占比在80%以上,进行后续实验。对照组(control)采用空白质粒包装的慢病毒感染A549细胞,方法同上。

### 1.3 qPCR检测TMEM125在A549细胞中的表达

采用TRIzol一步法提取总RNA,并取2  $\mu$ g总RNA反转录为cDNA。TMEM125的PCR正向引物序列为GGCCAAGGGATGGAGGAATG,反向引物序列为CTAGCTTGGTTTCCGGGGAG;内参GAPDH正向引物序列为AATGGCAGCCGTTA GGAAA,反向引物序列为GCGCCAATACGACC AAATC。按SYBR Green实时PCR试剂盒说明书建立终体积为20  $\mu$ l的PCR反应体系。PCR热循环参数为95  $^{\circ}$ C、5 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,60  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,进行45个循环。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

### 1.4 CCK-8法检测TMEM125对A549细胞增殖的影响

将对数生长期的对照组和TMEM125过表达A549细胞接种于96孔板,1 000个/孔,将细胞置于37  $^{\circ}$ C培养箱中培养0、24、48、72、96 h。于待测前向个培养孔内加入10  $\mu$ l CCK-8溶液,37  $^{\circ}$ C孵育1 h,用酶标仪于450 nm下检测光密度(D)值,每组设置6个重复孔,绘制细胞增殖曲线。

如前所述方法接种细胞,培养24 h后分别加入TNF $\alpha$ (10 ng/ml)或地西他滨(5  $\mu$ mol/L),继续培养0、24、48、72 h,于相应时间点按上述方法测量各孔D值,绘制细胞增殖曲线。

### 1.5 流式细胞术检测TMEM125对细胞细胞周期和凋亡水平的影响

将control组和TMEM125过表达A549细胞接种

于6孔板,24 h后分别给予TNF $\alpha$ (10 ng/ml)或地西他滨(5  $\mu$ mol/L),培养24 h后,收集细胞并用PBS冲洗2次。将细胞与500  $\mu$ l预冷的1 $\times$ 结合缓冲液和5  $\mu$ l Annexin-V-FITC混合,室温避光孵育15 min,上机前5 min加入2.5  $\mu$ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI),流式细胞仪检测细胞的凋亡率,采用FlowJo软件进行数据分析。

收集细胞后75%乙醇4  $^{\circ}$ C固定过夜,预冷PBS洗涤细胞1次,500  $\mu$ l PBS重悬细胞,加入RNase A溶液20  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C水浴30 min;加入400  $\mu$ l PI染色液,轻轻混匀后4  $^{\circ}$ C避光孵育30 min后,流式细胞仪检测细胞周期,所用最大激发波长为488 nm。

### 1.6 WB检测TMEM125过表达A549细胞中TMEM125、NF- $\kappa$ B、Bcl2、BAX等蛋白的表达

使用RAPI裂解液提取细胞总蛋白,依照蛋白定量BCA试剂盒的操作说明检测蛋白浓度。上样缓冲液中加入提取的蛋白,加热至97  $^{\circ}$ C,维持6 min。12% SDS-PAGE分离蛋白后,转膜、封闭,加入一抗,一抗稀释比例均为1:1 000,4  $^{\circ}$ C下过夜孵育。TBST冲洗膜3次,加入二抗,二抗稀释比例为1:2 000,室温中孵育1 h。洗膜3次后加入化学发光试剂显影蛋白。 $\beta$ -actin用作内参,ChemiScope Mini 3300化学发光成像仪拍照,采用Quantity One软件分析灰度水平。

### 1.7 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)检测TMEM125与NKIRAS2相互作用

细胞样品中加入适量预冷的裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解30 min,细胞裂解液于4  $^{\circ}$ C,12 800 ( $\times$ g)离心10 min取上清。取少量上清以备WB检测分析。剩余裂解液中加入10  $\mu$ g TMEM125抗体,4  $^{\circ}$ C缓慢摇晃孵育过夜。取10  $\mu$ l protein(A+G)琼脂糖珠加入到抗体孵育过后的细胞裂解液中,4  $^{\circ}$ C缓慢摇晃孵育2~4 h,使抗体与其充分偶联。洗抗体-琼脂糖珠混合物5次,离心将琼脂糖珠离心至管底,弃去上清液,沉淀中加入15  $\mu$ l 2 $\times$ SDS上样缓冲液,97  $^{\circ}$ C加热变性6 min。WB检测NKIRAS2与TMEM125的相互作用。

### 1.8 DNA提取及甲基化分析

参照细胞DNA提取试剂盒操作说明书,提取DNA,以亚硫酸氢钠处理基因组DNA后进行DNA纯化、回收。甲基化检测参考了文献[6]方法。从NCBI数据库中选择TMEM125(NM\_001320244.2 GeneID:128218)转录起始点上游-1 000 bp的核苷酸序列输入分析软件。使用在线分析软件Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer>),预测被分析序列内的CpG岛,完成MSP、甲基化非特异性PCR(unmethylation specific PCR, USP)和BSP技术的引物设计。非甲基化正向引物序列为5'-AGGTTTATTTTTGGTTGTTTGT-3',反向引物序列为

5'-TGGGGTTATAAGGGGGCTTA-3';甲基化正向引物序列为5'-AGGTTTATTTTTGGTTGTTTCGT-3',反向引物序列为5'-TGGGGTTATAAGGGGGCTT-3'。PCR热循环参数为:95  $^{\circ}$ C、5 min,然后3步反应:94  $^{\circ}$ C变性30 s,58  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,进行45个循环。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

### 1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism 8软件绘制结果图。SPSS 20.0软件进行统计学数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TMEM125在肺腺癌组织中的表达及临床生存分析

本研究利用TCGA数据库下载、整理、分析了515例肺腺癌患者和59例正常肺部组织TMEM125 mRNA的表达,结果显示,在肺腺癌组织中TMEM125 mRNA表达水平显著低于正常组织( $P < 0.001$ ,图1A),同时在肺腺癌不同分期的组织中TMEM125均显著低于正常组织( $P < 0.001$ ,图1B)。总生存期分析结果显示肺腺癌组织中,TMEM125低、中表达的肺腺癌患者的生存期明显低于TMEM125高表达的肺腺癌患者( $P < 0.01$ ,图1C)。

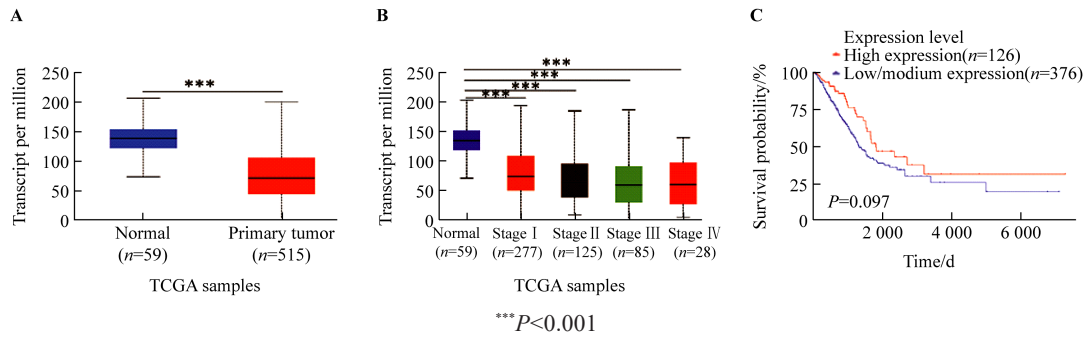
### 2.2 过表达TMEM125对A549细胞增殖、迁移及细胞周期和凋亡的影响

A549细胞感染TMEM125慢病毒后,Realtime PCR和WB检测TMEM125 mRNA和蛋白,结果显示成功制备TMEM125过表达A549细胞(图2A、2B)。CKK-8检测细胞增殖,结果显示,过表达TMEM125后细胞增殖能力下降( $P < 0.01$ ,图2C)。细胞划痕实验结果也显示,过表达组的A549细胞迁移能力低于对照组( $P < 0.01$ ,图2D)。流式细胞术检测细胞周期结果显示,过表达组A549细胞中S期细胞比例降低,细胞周期停滞在G2/M期( $P < 0.01$ ,图2E)。细胞凋亡检测结果显示,过表达TMEM125组凋亡率高于对照组( $P < 0.01$ ,图2F)。

### 2.3 过表达TMEM125对NF- $\kappa$ B信号通路的影响

WB检测结果显示,与对照细胞相比,TNF $\alpha$ 处理细胞p-P65(phospho-NF- $\kappa$ B P65)表达水平上调,而过表达组A549细胞中p-P65表达水平下调,并且过表达TMEM125能够下调经TNF $\alpha$ 处理的细胞中p-P65表达水平;同时无论是否过表达TMEM125或加入TNF- $\alpha$ ,细胞中的P65均没有明显变化。对照细胞TNF- $\alpha$ 处理与未处理组相比上调了Bcl2蛋白表达和下调了BAX蛋白表达。当细胞过表达TMEM125

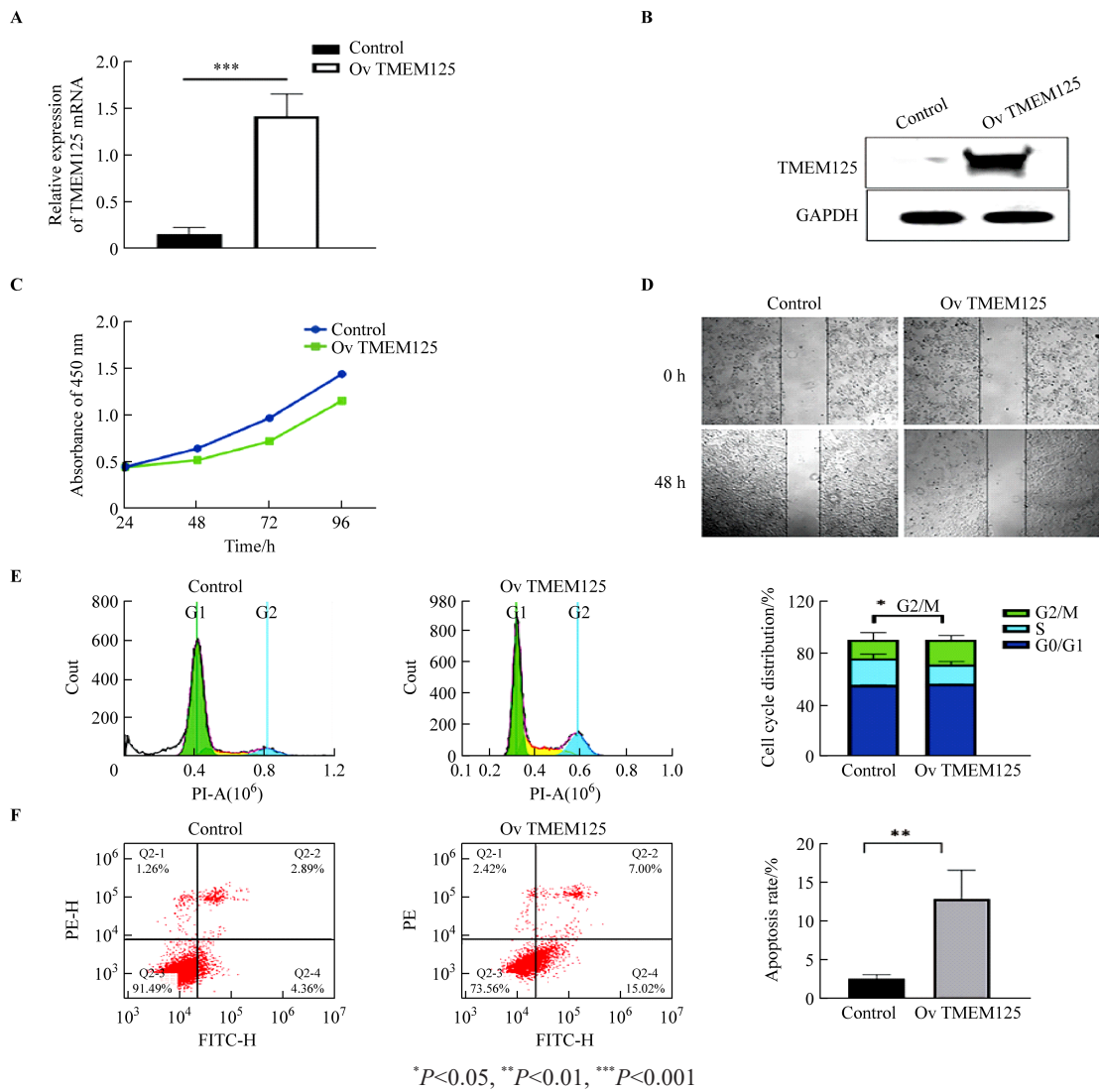




A: Expression of TMEM125 mRNA in LUAD and normal tissues; B: Expression of TMEM125 mRNA in LUAD base on individual cancer stages; C: Effect of TMEM125 expression level on LUAD patient survival

图 1 TMEM125 在肺腺癌组织中的表达及临床生存分析

Fig.1 Expression of TMEM125 in LUAD tissues and clinical survival analysis



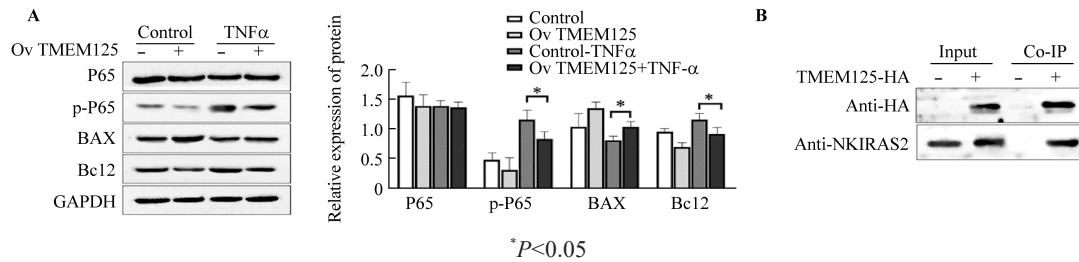
A: TMEM125 mRNA relative expression in A549 cells,  $n=6$ ; B: TMEM125 protein relative expression in A549 cells; C: Effect of overexpression of TMEM125 on proliferation of A549 cells; D: Effect of overexpression of TMEM125 on migration of A549 cells; E: Effect of overexpression of TMEM125 on cell cycle of A549 cells,  $n=6$ ; F: Effect of overexpression of TMEM125 on apoptosis of A549 cells,  $n=6$

图 2 过表达 TMEM125 对 A549 细胞增殖、迁移及细胞周期和凋亡的影响

Fig.2 Effect of overexpression of TMEM125 on proliferation, migration, cell cycle and apoptosis of A549 cells

后,则表现出与 TNF $\alpha$  相反的趋势,即下调 Bcl2 蛋白表达,上调 BAX 蛋白表达(均  $P<0.05$ ,图 3A)。免疫共沉淀检测结果显示 TMEM125 能够与 NKIRAS2 相

互作用(图 3B),以上结果提示 TMEM125 或许能通过 NKIRAS2(NF- $\kappa$ B 抑制因子)抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路活性。



A: Overexpression of TMEM125 inhibits TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B pathway,  $n=3$ ;  
B: Interaction of TMEM125 and NKIRAS2 detected by Co-IP

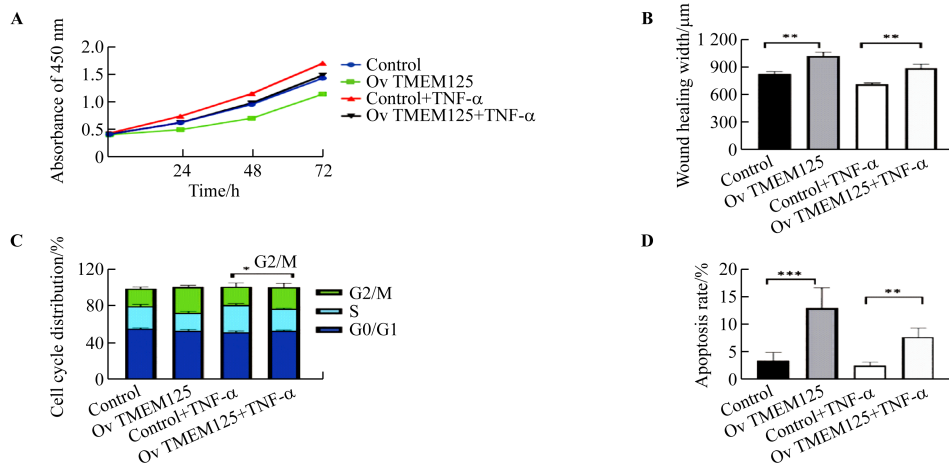
图3 过表达 TMEM125 对 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

Fig.3 Effect of overexpression of TMEM125 on NF- $\kappa$ B pathway

2.4 TMEM125 对 TNF- $\alpha$  刺激下细胞增殖、迁移、及细胞周期和凋亡的影响

CKK-8 检测细胞增殖, 结果显示 TNF- $\alpha$  处理 A549 细胞后, 促进细胞的增殖 ( $P < 0.05$ , 图 4A), 而过表达 TMEM125 下调 TNF $\alpha$  对细胞的增殖作用 ( $P < 0.01$ , 图 4A)。细胞划痕实验结果也显示, TNF- $\alpha$  处理 A549 细胞后促进细胞的迁移, 而过表达组 A549 细胞迁移能

力低于 TNF- $\alpha$  处理组 ( $P < 0.01$ , 图 4B)。流式细胞术检测细胞周期结果显示, TNF- $\alpha$  处理 A549 细胞后细胞周期 S 期增加, 过表达 TMEM125 后, 与单纯 TNF- $\alpha$  处理 A549 细胞相比, S 期细胞比例降低, 细胞周期停滞在 G2/M 期 ( $P < 0.01$ , 图 4C)。细胞凋亡检测结果显示, TNF- $\alpha$  处理下, 过表达 TMEM125 组细胞凋亡率高于对照组细胞 ( $P < 0.01$ , 图 4D)。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

A: Overexpression of TMEM125 inhibits the proliferation of A549 cells treated by TNF- $\alpha$ ,  $n=6$ ; B.: Overexpression of TMEM125 inhibits the invasion of A549 cells treated by TNF $\alpha$ ; C: Overexpression of TMEM125 delays the cell cycle of A549 cells treated by TNF- $\alpha$ ,  $n=6$ ; D: Overexpression of TMEM125 increases the apoptosis rate of A549 cells treated by TNF- $\alpha$ ,  $n=6$

图4 过表达 TMEM125 抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 A549 细胞增殖、迁移、细胞周期和促进凋亡

Fig.4 Overexpression of TMEM125 inhibits the proliferation, migration, cell cycle and increases apoptosis of A549 cells treated by TNF- $\alpha$

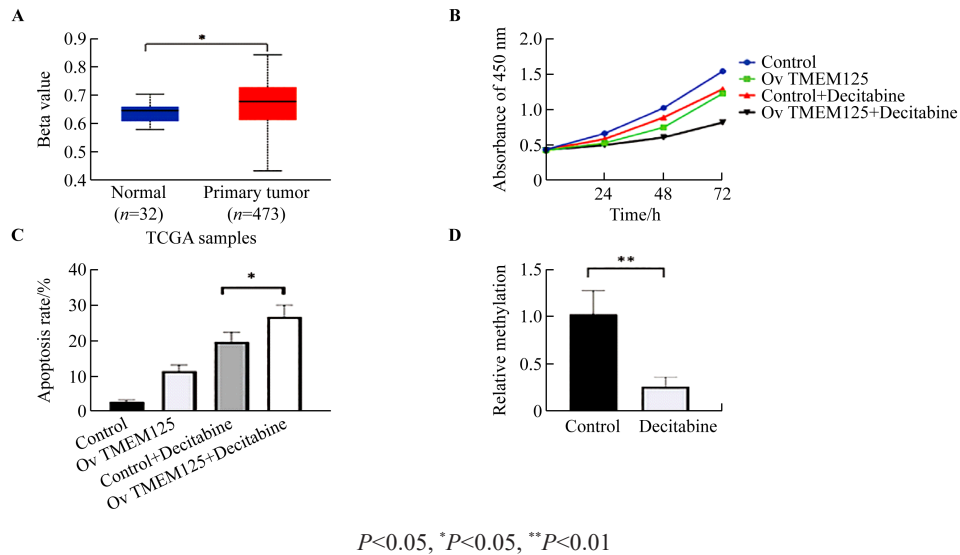
2.5 过表达 TMEM125 促进了 A549 细胞对去甲基化药物的敏感性

TCGA 数据库中肺癌组织 TMEM125 启动子甲基化结果 (图 5A) 显示, 473 例肺腺癌组织中 TMEM125 启动子甲基化显著高于正常组织 ( $P < 0.05$ , 32 例)。CCK-8 检测细胞增殖, 结果显示地西他滨处理 A549 细胞后, 抑制了细胞的增殖, 而过表达 TMEM125 则加重了地西他滨对细胞的增殖抑制作用 ( $P < 0.05$ , 图 5B)。细胞的凋亡结果显示地西他滨处理 A549 细胞, 促进了细胞的凋亡, 过表达 TMEM125 加重了地西他滨对细胞的促凋亡作用 ( $P < 0.05$ , 图 5C)。甲基化检

测结果显示地西他滨处理细胞后 TMEM125 启动子甲基化水平降低 ( $P < 0.01$ , 图 5D)。

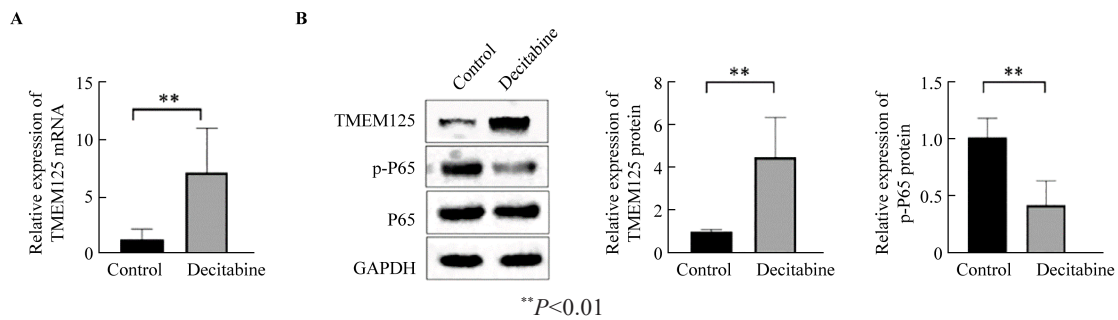
2.6 去甲基化药物地西他滨促进 TMEM125 表达、抑制 NF- $\kappa$ B 活性

qPCR 结果显示, 地西他滨处理 A549 细胞后, TMEM125 mRNA 表达水平增加 ( $P < 0.01$ , 图 6A)。WB 检测结果显示, 地西他滨处理的 A549 细胞, TMEM125 蛋白表达升高, p-p65 表达水平降低 ( $P < 0.01$ , 图 6B)。以上结果提示去甲基化药物处理细胞后, TMEM125 基因和蛋白表达水平升高, 抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活。



A: Promoter methylation level of TMEM125 in LUAD; B: Overexpression of TMEM125 enhances the decitabine inhibitory effects on cell proliferation,  $n=6$ ; C: Overexpression of TMEM125 enhances the decitabine-induced apoptosis in A549 cells,  $n=6$ ; D: Decitabine decreases the promoter methylation level of TMEM125,  $n=6$

图5 TMEM125促进了A549细胞对地西他滨的药物敏感性  
Fig.5 TMEM125 enhances the decitabine sensitivity on A549 cells



A: Decitabine increases the expression level of TMEM125 mRNA,  $n=6$ ; B: Decitabine increases the expression level of TMEM125 protein and inhibits P65 phosphorylation,  $n=6$

图6 地西他滨处理细胞增加TMEM125蛋白表达、抑制NF- $\kappa$ B活性  
Fig.6 Expression of TMEM125 increased and NF- $\kappa$ B activity decreased after treatment with decitabine

### 3 讨论

TMEM蛋白家族是一种贯穿生物膜两侧的蛋白,通常具有控制生物物质进出细胞的通道控制的功能。另外,部分穿膜蛋白还具有其他的一些功能,如TMEM45A与表皮细胞角质化相关,TMEM16与自噬相关、TMEM97与肝脏的分化和发育相关、TMEM9B与免疫应答等<sup>[7-8]</sup>。最近,部分穿膜蛋白在肿瘤发生、发展过程中的功能也逐渐被人们所认识,例如TMEM7、TMEM25、TMEM176A等具有抑癌功能<sup>[2]</sup>。TMEM7在80%的肝癌组织中表现为下调,体外实验中也发现TMEM7可抑制肿瘤的发生、增殖和转移,在应用干扰素 $\alpha$ 处理细胞后TMEM7表达增强,抗肿瘤反应增强<sup>[9]</sup>。TMEM25在68%的结直肠癌组织中表达水平明显低于正常组织<sup>[10]</sup>。在乳腺癌中有50%是低表达,尤其在三阴性乳腺癌中是不表

达<sup>[11]</sup>。本研究利用TCGA数据库,下载收集了515例肺腺癌的mRNA测序数据和59例正常肺组织mRNA测序数据。通过统计分析TMEM125的mRNA表达水平,发现肺腺癌组织中TMEM125显著低于正常肺部组织,而OS结果也显示出低表达的TMEM125患者生存期显著少于非低表达的患者。由此本课题假设TMEM125在肺部组织或许具有抑制肿瘤的功能。

为了探索TMEM125的肿瘤抑制功能,本研究开展了一系列体外实验,结果发现,过表达TMEM125能够有效抑制肺腺癌A549细胞的增殖、迁移能力,促进细胞的凋亡,使细胞周期停滞在G2/M期。过表达TMEM125降低了NF- $\kappa$ B信号通路中P65磷酸化,抑制其对下游信号的激活。NF- $\kappa$ B信号通路在肿瘤细胞中的激活能够促进细胞周期进展和增殖<sup>[12-13]</sup>。在NF- $\kappa$ B上游的调控信号中,TNF- $\alpha$ 与TNFRI的结合致使IKK复合物的活化,靶向IKB- $\alpha$ 使之进行降解,并使NF- $\kappa$ B

保留在细胞核中,维系对靶基因的转录<sup>[14]</sup>。本研究对肿瘤细胞进行过表达 TMEM125 后,降低了 TNF- $\alpha$  对 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活作用。NKIRAS 是一种核质小 GTP 酶,包括两个家族蛋白 NKIRAS1 和 NKIRAS2,负调节 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 活化和内源性 NF- $\kappa$ B 靶基因的表达<sup>[15]</sup>。免疫共沉淀结果显示 NKIRAS2 与 TMEM125 相互作用。DNA 甲基化是 DNA 的一种表观遗传学修饰方式,也是肿瘤最常见的驱动性分子事件。在人类肿瘤中常存在 DNA 甲基化水平降低或升高的现象,DNA 甲基化在基因的转录和转录后调控中发挥着关键作用,与肿瘤发生密切相关<sup>[16]</sup>。临床中,DNA 甲基化检测在肺癌早筛中具有一定的应用价值<sup>[6,17]</sup>,例如半胱氨酸双加氧酶 1,死亡相关蛋白激酶 (DA PK)、6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT)、APC 基因启动子 1A (APC1A) 及上皮黏性蛋白基因 (ECAD) 等肺癌相关基因的甲基化检测<sup>[18]</sup>以及对 SHOX2、RASSF1A 基因甲基化<sup>[19-20]</sup>。本研究发现 515 例肺腺癌患者肿瘤组织中 TMEM125 基因启动子甲基化水平显著高于正常肺部组织。当对 A549 细胞进行去甲基化处理后, TMEM125 启动子甲基化水平下降, mRNA 和蛋白表达水平上升,抑制了 NF- $\kappa$ B 的激活,进而抑制细胞的周期进展和增殖。而细胞过表达 TMEM125 后,促进了细胞对去甲基化药物的敏感性。

综上所述,肺腺癌组织中 TMEM125 启动子高甲基化, mRNA 低表达与肿瘤发生发展相关,预示着 TMEM125 或许可以作为肺腺癌治疗的靶点和早筛生物标志物。

## [参 考 文 献]

- [1] 韩宝惠,沈胤晨.我国肺癌筛查现状与展望[J].诊断学理论与实践,2018,17(5):487-489. DOI:10.16150/j.1671-2870.2018.05.001.
- [2] SCHMIT K, MICHELIS C. TMEM proteins in cancer: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1345-1358. DOI: org/10.3389/fphar.2018.01345.
- [3] 缪秋菊,徐秀莲.跨膜蛋白在恶性肿瘤中的作用[J].国际肿瘤学杂志, 2020, 47(6): 355-359. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20191227-00035.
- [4] GERHARD D S, WAGNER L, FEINGOLD E A, et al. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC) [J]. *Genom Res*, 2004, 14(10B): 2121-2127. DOI:org/10.1101/gr.2596504.
- [5] SEHOVIC E, HADROVIC A, DOGAN S. Detection and analysis of stable and flexible genes towards a genome signature framework in cancer [J]. *Bioinformatics*, 2019, 15(10): 772-779. DOI:10.6026/97320630015772.
- [6] 王攀,赵洪林,施睿峰,等.血浆中 CDO1 甲基化在肺癌早期诊断中的作用研究[J].中国肺癌杂志,2020,23(5):314-320. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.20.
- [7] HAYEZ A, ROEGIERS E, MALAISSE J, et al. TMEM45A is dispensable for epidermal morphogenesis, keratinization and barrier formation [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147069. [2021-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26785122/>. DOI: org/10.1371/journal.pone.0147069.
- [8] LV X F, ZHANG Y J, LIU X, et al. TMEM16A ameliorates vascular remodeling by suppressing autophagy via inhibiting Bcl-2-p62 complex formation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(9): 3980-3993. DOI:10.7150/thno.41028.
- [9] ZHOU X, POPESCU N C, KLEIN G, et al. The interferon- $\alpha$  responsive gene TMEM7 suppresses cell proliferation and is downregulated in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 177(1): 6-15. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2007.04.007.
- [10] HRAŠOVEC S, HAUPTMAN N, GLAVAC D, et al. TMEM25 is a candidate biomarker methylated and down-regulated in colorectal cancer [J]. *Dis Markers*, 2013, 34(2): 93-104. DOI: 10.3233/DMA-120948.
- [11] DOOLAN P, CLYNES M, KENNEDY S, et al. TMEM25, REPS2 and Meis 1: favourable prognostic and predictive biomarkers for breast cancer [J]. *Tumor Biol*, 2009, 30(4): 200-209. DOI:org/10.1159/000239795.
- [12] SERASANAMBATI M, CHILAKAPATI S R. Function of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in human diseases-a review [J]. *South Indian J Biologic Sci*, 2016, 2(4): 368-387. DOI:10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443.
- [13] RASMI R R, SAKTHIVEL K M, GURUVAYOORAPPAN C. NF- $\kappa$ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer [J]. *Biom Pharmacother*, 2020, 130: 110569. DOI: org/10.1016/j.biopha.2020.110569.
- [14] WU YD, ZHOU B. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion [J]. *Brit J Cancer*, 2010, 102(4): 639-644. DOI:org/10.1038/sj.bjc.6605530.
- [15] TAGO K, FUNAKOSHI-TAGO M, SAKINAWA M, et al.  $\kappa$ B-Ras is a nuclear-cytoplasmic small GTPase that inhibits NF- $\kappa$ B activation through the suppression of transcriptional activation of p65/RelA [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40): 30622-30633. DOI: 10.1074/jbc.M110.117028.
- [16] 王雪玮,史卫红,王熙才. DNA 甲基化在肿瘤中的调控机制及其在肺癌中的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(5): 558-566. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.018.
- [17] 朱宇敏,李坚,俞立超,等.血浆 APC 和 DCC 基因启动子甲基化测定在肺癌早期诊断中的应用[J].江苏大学学报(医学版), 2015,32(1):62-67. DOI:10.13312/j.issn.1671-7783.y140290.
- [18] 李杨,樊青霞.肺癌相关基因甲基化在肺癌早期诊断中的作用[J].中华肿瘤杂志,2020,42(8):644-647. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20190311-00144.
- [19] 亢春彦,王丹丹,汤少鹏,等.痰标本 FHIT, P16, MGMT, RASSF1A, APC 基因甲基化在肺癌诊断中的作用[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(8):869-873. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7399.2011.08.017.
- [20] 孙永强,孔天东,段方方,等.外周血及痰液 SHOX2, RASSF1A 基因甲基化检测对肺癌早期诊断的意义[J].中国实用医刊,2020,8(1):9-12. DOI:10.3760/cma.j.cn115689-20191211-08925.

[收稿日期] 2021-04-24

[修回日期] 2021-08-19

[本文编辑] 韩丹