

· 论 著 ·

# 干扰组蛋白去甲基化酶 KDM3A 表达对肝星状细胞增殖和胶原合成的影响\*

蔡福景<sup>1</sup>, 付荣泉<sup>2</sup>, 周宇<sup>1</sup>, 张盛果<sup>1</sup>, 张东<sup>1</sup>

(1. 温州医科大学附属第三医院感染科, 浙江瑞安 325200; 2. 阳江市人民医院感染科, 广东阳江 529500)

**[摘要]** 目的 探讨干扰组蛋白去甲基化酶 KDM3A 表达对肝星状细胞增殖和胶原合成的影响。

**方法** 首先乙醛处理大鼠肝星状细胞, 用实时荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)检测 KDM3A mRNA 的表达。接着利用慢病毒转染肝星状细胞 72 h, 干扰 KDM3A 的表达, 乙醛刺激后, 收集肝星状细胞, 采用噻唑蓝法检测细胞增殖活性, 酶联免疫吸附试验检测 III 型和 I 型胶原蛋白的含量, RT-PCR 和蛋白质印迹法检测转化生长因子- $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) 的表达水平。**结果** 与对照组比较, 乙醛处理组 KDM3A mRNA 相对表达量升高约 4 倍(1.00±0.10 vs. 4.00±0.20), TGF- $\beta_2$  mRNA 相对表达量升高约 3 倍(1.00±0.40 vs. 3.00±0.50), 差异均有统计学意义( $t=43.201, 44.032, P<0.001$ )。干扰 KDM3A 后, 与对照组比较, 转染组的细胞增殖活性下降约 43.3% [转染组光密度值(0.38±0.06) 低于对照组的(0.67±0.08)], III 型胶原蛋白含量下降约 20.00% (1.00±0.10 vs. 0.80±0.04), I 型胶原蛋白含量下降约 30.00% (1.00±0.10 vs. 0.70±0.04), TGF- $\beta_2$  蛋白及 mRNA 水平也明显下降(1.00±0.10 vs. 0.70±0.10), 差异均有统计学意义( $t=12.272, 12.621, 21.369, P<0.001$ )。**结论** 干扰组蛋白去甲基化酶 KDM3A 可一定程度阻止肝星状细胞的增殖和胶原合成, 机制可能是通过抑制 TGF- $\beta_2$  表达来实现。

**[关键词]** 组蛋白去甲基化酶; KDM3A; 肝星状细胞; 细胞增殖; 胶原合成

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.13.004 中图分类号: R512

文章编号: 1009-5519(2024)13-2178-04

文献标识码: A

## Effects of interfering histone demethylase KDM3A expression on hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis\*

CAI Fujing<sup>1</sup>, FU Rongquan<sup>2</sup>, ZHOU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Shengguo<sup>1</sup>, ZHANG Dong<sup>1</sup>

(1. Department of Infectious Disease, the Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Ruian, Zhejiang 325200, China; 2. Department of Infection Disease, People's Hospital of Yangjiang, Yangjiang, Guangdong 529500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the impact of interfering with the expression of histone demethylase KDM3A on the proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** Primary rat HSCs were treated with acetaldehyde, and the expression of KDM3A mRNA was detected using real-time quantitative PCR (RT-PCR). Subsequently, HSCs were transfected with lentivirus to interfere with KDM3A expression for 72 h. After acetaldehyde stimulation, the HSCs were collected, and cell proliferation activity was assessed using the thiazolyl blue assay. The content of type III and type I collagen proteins was determined using enzyme-linked immunosorbent assay, while the expression levels of transforming growth factor-beta 2 (TGF- $\beta_2$ ) were measured by RT-PCR and Western blotting. **Results** Compared with the control group, the relative expression levels of KDM3A mRNA in the acetaldehyde-treated group increased approximately 4-fold (1.00±0.10 vs. 4.00±0.20), and TGF- $\beta_2$  mRNA expression increased approximately 3-fold (1.00±0.40 vs. 3.00±0.50), with both differences being statistically significant ( $t=43.201, 44.032, P<0.001$ ). Following interference with KDM3A, the proliferation activity of transfected cells decreased by approximately 43.3% compared to the control group [transfected group optical density (0.38±0.06) lower than control group (0.67±0.08)]. Compared to the control group, the content of type III collagen decreased by approximately

\* 基金项目: 浙江省温州市科技局项目(Y2020943)。

作者简介: 蔡福景(1988—), 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事肝炎、肝纤维化、肝癌的临床及基础研究。

20.00% ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.80 \pm 0.04$ ), and type I collagen content decreased by approximately 30.00% ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.70 \pm 0.04$ ), the protein and mRNA levels of TGF- $\beta_2$  also significantly decreased ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.70 \pm 0.10$ ) in the transfected group, with all differences being statistically significant ( $t = 12.272, 12.621, 21.369, P < 0.001$ ). **Conclusion** Interfering with histone demethylase KDM3A can partially inhibit the proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells, possibly by suppressing TGF- $\beta_2$  expression.

**[Key words]** Histone demethylase; KDM3A; Hepatic stellate cells; Cell proliferation; Collagen synthesis

肝纤维化是肝脏遭受长期慢性损伤的结果,尽管肝脏有强大的再生能力,如果不加控制,易进展为肝硬化,引起肝衰竭或肝癌,威胁患者的生命安全。肝纤维化发生机制中主要涉及的是肝星状细胞的激活<sup>[1-2]</sup>。组蛋白去甲基化酶 KDM3A 是调节组蛋白甲基化重要的一个成员,在基因激活中扮演着重要的角色,其表达水平的差异影响着多种疾病的发生、发展<sup>[3-4]</sup>。本研究利用大鼠肝星状细胞系 HSC-T6,探讨干扰 KDM3A 对肝星状细胞增殖、胶原合成的影响,并初步了解潜在机制,以期为肝纤维化发病机制提供新的诊疗思路。

## 1 材料与方法

**1.1 一般材料** 大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 来自中南大学湘雅医学院细胞库; TRIzol Reagent RNA 提取试剂购于 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT) 购自广州赛国公司; 聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒购自 Promega 公司; 40% 乙醛购自北京百灵威公司; 阴性对照病毒和 LV-KDM3A-RNAi 慢病毒购自上海吉凯科技公司; III 型胶原、I 型胶原试剂盒购自 Abcam 公司;  $\beta$ -actin 单抗购自 Abcam 公司; 转化生长因子- $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) 多抗购自 Santa Cruz 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 HSC-T6 细胞培养及转染** 将 HSC-T6 细胞接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶, 在 12 孔培养板中, 每孔加入  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  个细胞, 用含 5% 胎牛血清的 DMEM 混合液培养, 置于 5% 二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ )、37 °C 的恒温培养箱中, 每 2 天换液, 每 3~4 天用胰蛋白酶消化传代。按照转染说明书, 在 96 孔板中, 分别加入阴性对照病毒和 LV-KDM3A-RNAi 慢病毒进行转染, 16 h 后换成常规培养基, 继续培养 72 h, 设转染阴性对照病毒的 HSC-T6 细胞为对照组, 转染 LV-KDM3A-RNAi 慢病毒的细胞为转染组 (KDM3A-shRNA)。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR 技术 (RT-PCR) 检测 KDM3A、TGF- $\beta_2$  表达水平** 慢病毒转染 72 h 后, 应用终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  的乙醛刺激肝星状细胞, 24 h 后提取细胞总 RNA, 取 2  $\mu\text{g}$  RNA 进行逆转录合成 cDNA, 完成 PCR 扩增, 以  $\beta$ -actin 为内参。引物序列如下: KDM3A 上游引物 ATGCTGCAAAGGACACGG, 下游引物 GAACTCCATACTCTTGAT-

GAAGACG; TGF- $\beta_2$  上游引物 CCCACATCTCCTGCTAATGT, 下游引物 GCTGAGTGTCTGAACTCAT;  $\beta$ -actin 上游引物 GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT, 下游引物 GAAGTGGGGTGGCTTTTGA。引物由上海吉玛公司合成。实验重复 3 次, 取均值。目的基因用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算相对表达量。

**1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活性** 用常规胰酶液消化对数生长期细胞, 制成  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  细胞悬液, 将细胞接种至 96 孔板, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$ , 每组设 6 个复孔, 按照说明书转染 72 h 后, 每孔加入 MTT 液 20  $\mu\text{L}$ , 培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔再加入二甲亚砷 150  $\mu\text{L}$ , 振荡 10 min, 最后用自动酶标仪 (波长 490 nm) 测定各孔光密度。

**1.2.4 细胞上清液 III 型、I 型胶原含量测定** 慢病毒转染 72 h 后, 应用终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  的乙醛刺激肝星状细胞, 采用酶联免疫吸附试验检测细胞上清液中 III 型、I 型胶原的含量, 操作按照试剂说明书进行。

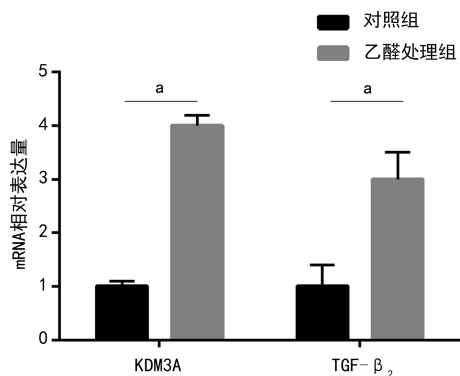
**1.2.5 蛋白质印迹法检测** 慢病毒转染 72 h 后, 接着应用终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  的乙醛刺激肝星状细胞, 利用蛋白质印迹法分析 TGF- $\beta_2$  表达。弃去细胞上清液, 用蛋白裂解液提取总蛋白, 收集上清液用 BCA 试剂测定蛋白浓度, 取 50  $\mu\text{g}$  蛋白进行常规十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转印至 PVDF 膜上, 用 5% 的牛血清白蛋白封闭 2 h, 加入一抗分别为 TGF- $\beta_2$  多抗和  $\beta$ -actin 单抗, 4 °C 孵育过夜, 加入二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体, 37 °C 孵育 1 h, 最后用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪分析结果。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 计量资料符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间比较采用独立样本  $t$  检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。应用 GraphPad Prism4.0 软件辅助作图。

## 2 结果

**2.1 乙醛刺激对肝星状细胞 KDM3A、TGF- $\beta_2$  表达的影响** 与对照组比较, 乙醛处理组 KDM3A mRNA 相对表达量升高约 4 倍 ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $4.00 \pm 0.20$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 43.201, P < 0.001$ ); TGF- $\beta_2$  mRNA 相对表达量升高约 3 倍 ( $1.00 \pm 0.40$

vs.  $3.00 \pm 0.50$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 44.032$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 1。

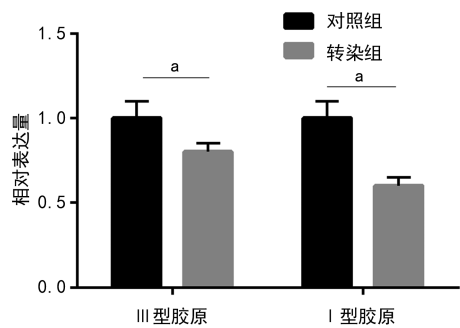


注: 与对照组比较,  $^a P < 0.001$ 。

图 1 对照组与乙醛处理组 KDM3A、TGF-β<sub>2</sub> mRNA 相对表达量比较

**2.2 KDM3A 干扰对肝星状细胞增殖的影响** MTT 实验结果分析得出, 转染组在乙醛刺激肝星状细胞后, 其光密度值为  $0.38 \pm 0.06$ , 低于对照组的  $0.67 \pm 0.08$ , 转染组增殖活性下降约 43.3%, 差异有统计学意义 ( $t = 12.272$ ,  $P < 0.001$ )。

**2.3 KDM3A 干扰对肝星状细胞胶原合成的影响** 转染组 III 型、I 型胶原蛋白含量明显低于对照组, III 型胶原蛋白含量下降约 20.00% ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.80 \pm 0.04$ ), I 型胶原蛋白含量下降约 30.00% ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.70 \pm 0.04$ ), 差异均有统计学意义 ( $t = 12.621$ ,  $P < 0.001$ ;  $t = 21.369$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 2。



注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ 。

图 2 不同组别 III 型胶原和 I 型胶原蛋白含量比较

**2.4 KDM3A 干扰对肝星状细胞中 TGF-β<sub>2</sub> 表达的影响** 与对照组比较, 转染组 TGF-β<sub>2</sub> 蛋白及 mRNA 表达水平明显下降 ( $1.00 \pm 0.10$  vs.  $0.70 \pm 0.10$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 37.674$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 3、4。

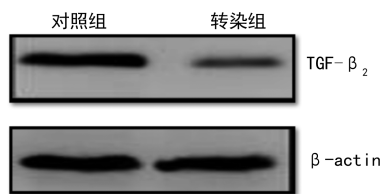
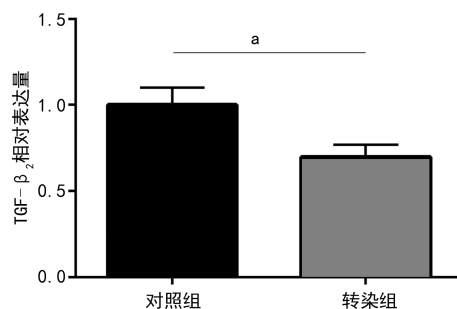


图 3 不同组别 TGF-β<sub>2</sub> 蛋白表达水平比较



注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ 。

图 4 不同组别 TGF-β<sub>2</sub> mRNA 表达水平比较

### 3 讨论

肝纤维化形成的主要原因是细胞外基质蛋白的沉积, 包括 I 型和 III 胶原蛋白, 随后形成纤维瘢痕, 使正常肝功能受损。肝纤维化发病的具体机制非常复杂, 包括肝细胞死亡、慢性炎症因子的释放等, 其中肝星状细胞的激活环节非常重要<sup>[5-6]</sup>。当肝脏受到持续损伤时, 原本静止的肝星状细胞激活成肌成纤维细胞, 开始表达成纤维基因, 例如 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA) 和 I 型胶原。有研究认为, 如能去除病因或抑制肝星状细胞的活化, 肝纤维化有逆转可能<sup>[7-8]</sup>。

组蛋白修饰是一种重要的调节基因表达的机制, 组蛋白去甲基化酶是其中关键性组成部分, 参与了机体胚胎形成、分化和新陈代谢等过程。KDM3A 是组蛋白去甲基化酶家族中被研究最广泛的成员之一, 特别是在促进肿瘤细胞增殖、生存、迁移和转移上被深入报道, 与肝纤维化不良预后也有密切关系<sup>[9]</sup>。KDM3A 涉及多种不同类型肿瘤的发生、发展, 包括前列腺癌、乳腺癌、结肠癌和肝癌等, 被认为是相关疾病, 特别是肿瘤治疗的潜在药物靶点<sup>[10-12]</sup>。近期, 关于 KDM3A 调节脏器纤维化的研究逐渐增加。有报道发现, 在慢性肾脏纤维化组织中, KDM3A 被检测出呈现较高水平, 抑制 KDM3A 表达可减少 I 型胶原基因的产生, 减轻肾脏纤维化程度, 机制可能涉及 miR-101a 的调控<sup>[13]</sup>。

本研究利用乙醛刺激肝星状细胞活化, 发现 KDM3A 的表达水平升高, 说明 KDM3A 可能涉及肝星状细胞的激活。在此基础上, 向肝星状细胞转染慢病毒, 干扰 KDM3A 表达后, 用 MTT 法分析细胞增殖活性, 发现转染组的细胞增殖活性显著下降, 提示 KDM3A 干扰可抑制肝星状细胞增殖。接着, 本研究检测 III 型和 I 型胶原蛋白的表达, 发现转染组中两者分泌均下降, 提示 KDM3A 干扰抑制了肝星状细胞的胶原合成。为了进一步确定 KDM3A 的具体作用机制, 本研究在蛋白和基因水平上检测了 TGF-β<sub>2</sub> 的表达, 发现干扰 KDM3A 后 TGF-β<sub>2</sub> 的水平明显下降, 提示 TGF-β<sub>2</sub> 可能是 KDM3A 在肝星状细胞中作用的靶点之一。TGF-β<sub>2</sub> 可抑制胶原的降解, 促进纤维化进

程,并且可作用于肝星状细胞使之转变为肌纤维母细胞并大量合成胶原,在肝脏纤维化中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。但本研究仅为细胞实验,有待进一步进行体内动物实验以验证本研究机制。

综上所述,干扰 KDM3A 可在一定程度上阻止肝星状细胞增殖和胶原合成,减少细胞外基质的成分,机制可能是通过抑制 TGF- $\beta_2$  的表达实现。干扰 KDM3A 的方式可能成为肝纤维化的潜在治疗手段。

## 参考文献

- [1] BERUMEN J, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications[J]. *Wires Mech Dis*, 2021, 13(1): e1499.
- [2] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(10): 633-646.
- [3] YOO J, JEON Y H, CHO H Y, et al. Advances in histone demethylase KDM3A as a cancer therapeutic target[J]. *Cancers(Basel)*, 2020, 12(5): 1098.
- [4] FAN L L, SUDEEP K, QI J F. Histone demethylase KDM3(JMJD1) in transcriptional regulation and cancer progression[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1433: 69-86.
- [5] POULSEN K L, CAJIGAS-DU ROSS C K, CHANEY J K, et al. Role of the chemokine system in liver fibrosis: A narrative review[J]. *Dig Med Res*, 2022, 5: 30.
- [6] TANG R, LUO J, ZHU A A, et al. Recent progress in the effect of ferroptosis of HSCs on the development of liver fibrosis [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1258870.
- [7] HUANG Y, DENG X, LIANG J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2): 420-426.
- [8] SIAPOUSH S, REZAEI R, ALAVIFARD H, et al. Therapeutic implications of targeting autophagy and TGF- $\beta$  crosstalk for the treatment of liver fibrosis[J]. *Life Sci*, 2023, 329: 121894.
- [9] SUI Y, GU R C, JANKNECHT R. Crucial functions of the JMJD1/KDM3 epigenetic regulators in cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(1): 3-13.
- [10] POLAT D, ONUR E, YILMAZ N, et al. KDM3A, a novel blood-based biomarker in colorectal carcinogenesis[J]. *Balkan J Med Genet*, 2023, 25(2): 23-27.
- [11] JIN R R, ZENG C, CHEN Y. MiR-22-3p regulates the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells by directly targeting KDM3A through the hippo pathway[J]. *Histol Histopathol*, 37(12): 1241-1252.
- [12] YANG L, ZHANG Q N, YANG Q Y. KDM3A promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation and invasion via H3K9me2 demethylation-activated DCLK1[J]. *Genes Genomics*, 2022, 44(11): 1333-1342.
- [13] DING H, XU Y Y, JIANG N. Upregulation of miR-101a suppresses chronic renal fibrosis by regulating KDM3A via blockade of the YAP-TGF- $\beta$ -smad signaling pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 1276-1289.
- [14] (收稿日期: 2023-11-22 修回日期: 2024-03-18)
- [15] 陈豪诚, 柳娜, 宋莎莎, 等. 强迫症住院患者抑郁水平及诊治状况的回顾性分析[J]. *临床精神医学杂志*, 2022, 32(3): 198-201.
- [16] 王苹, 王儒芳, 罗聪, 等. 敌意对戒毒者生命质量的影响: 抑郁的中介作用[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2021, 30(6): 460-463.
- [17] ZHENG S W, NGO A L, FORMAN M R, et al. Associations of household food insufficiency with childhood depression and anxiety: A nationwide cross-sectional study in the USA[J]. *BMJ Open*, 2021, 11(9): e054263.
- [18] WANG Y H, LU Q D, SHI J, et al. Comment on: Sleep in the anxiety-related disorders: A meta-analysis of subjective and objective research[J]. *Sleep Med Rev*, 2020, 52: 101316.
- [19] LIU X, PENG L X, WANG Z, et al. Effects of interpersonal sensitivity on depressive symptoms in postgraduate students during the COVID-19 pandemic: Psychological capital and sleep quality as mediators[J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14: 1100355.
- [20] (收稿日期: 2023-11-13 修回日期: 2024-02-28)

(上接第 2177 页)