

# 抑制 KDM2A 基因对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

何济南<sup>1</sup>, 孔红言<sup>1</sup>, 向丹丹<sup>1</sup>, 黄帅文<sup>1</sup>, 宋启琴<sup>2</sup>, 苗蕊<sup>1</sup>, 黄加权<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科, 湖北武汉 430030; <sup>2</sup>江汉大学附属第三人民医院中西医结合肝病科, 湖北武汉 430077

[中图分类号] R73-37 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0421.2023.0811

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 何济南, 孔红言, 向丹丹, 等. 抑制 KDM2A 基因对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(7): 814-822.

[收稿日期] 2023-03-21

[录用日期] 2023-04-25

[上线日期] 2023-08-11

**[摘要]** **目的** 探讨抑制 KDM2A 基因对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其可能的调控机制。**方法** 收集2014—2017年华东科技大学同济医学院附属同济医院收治的40例肝细胞癌(HCC)患者的肝癌组织及其癌旁组织, 体外培养人肝癌细胞株 HepG2、Huh7、HCCLM3、MHCC-97H 及正常肝细胞 LO2, 采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测肝癌组织及细胞中 KDM2A mRNA 及蛋白的表达情况。取 Huh7 细胞, 设置: (1) si-NC 组(转染 si-NC)与 si-KDM2A 组(转染 si-KDM2A); (2) mimic-NC 组(转染 mimic-NC)、miRNA-29a-3p mimic 组(转染 miRNA-29a-3p mimic)、inhibitor-NC 组(转染 inhibitor-NC)与 miRNA-29a-3p inhibitor 组(转染 miRNA-29a-3p inhibitor)。采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 KDM2A mRNA 及蛋白的表达情况, CCK-8 法检测细胞增殖能力, Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力。采用在线数据库 TargetScan、miRDIP、miRWalk、Starbase 及 miRDB 预测 KDM2A 与 miR-29a-3p 的结合位点。将 KDM2A 3'-UTR(WT)或 KDM2A 3'-UTR(MUT)报告质粒分别与 NC-miRNA 或 miR-29a-3p mimic 共转染 293T 细胞 48 h 后, 采用荧光素酶报告实验检测荧光素酶活性。**结果** 与癌旁组织相比, 肝癌组织中 KDM2A mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高( $P<0.05$ ); 与正常肝细胞 LO2 相比, 肝癌细胞 HepG2、Huh7、HCCLM3、MHCC-97H 中 KDM2A mRNA 和蛋白相对表达水平明显升高( $P<0.05$ )。与 si-NC 组比较, si-KDM2A 组 Huh7 细胞增殖、侵袭和迁移能力明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。在线数据库 TargetScan、miRDIP、miRWalk、Starbase 及 miRDB 分析结果显示, miR-29a-3p 与 KDM2A 存在结合位点。双荧光素酶报告实验结果显示, miR-29a-3p mimic 可明显降低 KDM2A-MUT 荧光素酶活性( $P<0.01$ )。过表达 miRNA-29a-3p 后, Huh7 细胞中 KDM2A mRNA 和蛋白相对表达水平降低( $P<0.01$ ), 细胞增殖、侵袭和迁移能力下降( $P<0.05$ ); 抑制 miRNA-29a-3p 的表达后, Huh7 细胞中 KDM2A mRNA 和蛋白相对表达水平升高( $P<0.05$ ), 细胞增殖、侵袭和迁移能力增强( $P<0.05$ )。**结论** 抑制 KDM2A 的表达可减弱人肝癌细胞 Huh7 的增殖和转移能力, 而 miR-29a-3p 可能是 KDM2A 的上游调节因子, 可参与肝癌的发生发展。

**[关键词]** KDM2A; miR-29a-3p; 肝细胞癌; 增殖; 侵袭和转移

## Effects of inhibiting KDM2A gene on the proliferation, invasion, and migration of liver cancer cells

He Ji-Nan<sup>1</sup>, Kong Hong-Yan<sup>1</sup>, Xiang Dan-Dan<sup>1</sup>, Huang Shuai-Wen<sup>1</sup>, Song Qi-Qin<sup>2</sup>, Miao Rui<sup>1</sup>, Huang Jia-Quan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department and Institute of Infection Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science Technology, Wuhan, Hubei 430030, China

<sup>2</sup>Department of Hepatology, Integrated Chinese and Western Medicine, No. 3 People's Hospital Affiliated to Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430077, China

\*Corresponding author, E-mail: huangjiaquan21@aliyun.com

This work was supported by the Scientific Research Project of Health Commission of Hubei Province (WJ2021M201), and the Wu Jieping Foundation (320.6750.2021-02-130)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of inhibiting KDM2A gene on the proliferation, invasion and migration of

**[基金项目]** 湖北省卫生健康委科研项目(WJ2021M201); 吴阶平医学基金(320.6750.2021-02-130)

**[作者简介]** 何济南, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事肝细胞癌的诊断及治疗研究

**[通信作者]** 黄加权, E-mail: huangjiaquan21@aliyun.com

liver cancer cells and its possible regulatory mechanism. **Methods** Forty pairs of HCC tissues and their adjacent normal counterparts were collected from 2014 to 2017 in Tongji Hospital, Tongji Medical College Affiliated to Huazhong University of Science and Technology. Human liver cancer cell lines HepG2, Huh7, HCCLM3, MHCC-97H and normal liver cells LO2 were cultured *in vitro*. The mRNA and protein expression levels of *KDM2A* in HCC tissues and cells were detected by qRT-PCR and Western blotting. Huh7 cells were taken and set up as follows: (1) si-NC group (transfected with si-NC) and si-*KDM2A* group (transfected with si-*KDM2A*); (2) mimic-NC group (transfected with mimic-NC), miRNA-29a-3p mimic group (transfected with miRNA-29a-3p mimic), inhibitor-NC group (transfected with inhibitor-NC) and miRNA-29a-3p inhibitor group (transfected with miRNA-29a-3p inhibitor). The mRNA and protein expression levels of *KDM2A* were detected by qRT-PCR and Western blotting. The invasion and migration of cells were detected by Transwell, the proliferation of cells was detected by CCK-8 methods. The online databases TargetScan, miRDIP, miRWalk, Starbase and miRDB were used to predict the binding sites of *KDM2A* and miR-29a-3p. The *KDM2A* 3'-UTR (WT) or *KDM2A* 3'-UTR (MUT) report plasmid was co-transfected with NC-miRNA or miR-29a-3p mimics respectively for 48 h in 293T cells, and the luciferase activity was detected by the luciferase reporter gene detection system. **Results** Compared with adjacent normal counterparts, the relative mRNA and protein expression levels of *KDM2A* in HCC tissues increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with LO2, the relative mRNA and protein expression levels of *KDM2A* in HepG2, Huh7, HCCLM3 and MHCC-97H increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with si-NC group, the proliferation, invasion and migration of Huh7 cells in si-*KDM2A* group decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The analysis results of TargetScan, miRDIP, miRWalk, Starbase and miRDB showed that there were binding sites between *KDM2A* and miR-29a-3p. The results of the dual luciferase reporter assay showed that miR-29a-3p mimic significantly reduced *KDM2A*-MUT luciferase activity ( $P < 0.01$ ). After overexpression of miRNA-29a-3p, the relative mRNA and protein expression levels of *KDM2A* were decreased ( $P < 0.01$ ), the proliferation, invasion and migration abilities were decreased ( $P < 0.05$ ) in Huh7 cells. After inhibiting the expression of miRNA-29a-3p, the relative mRNA and protein expression levels of *KDM2A* were increased ( $P < 0.05$ ), the proliferation, invasion and migration abilities were enhanced ( $P < 0.05$ ) in Huh7 cells. **Conclusion** Inhibiting the expression of *KDM2A* can reduce the proliferation and migration ability of Huh7 cells. miR-29a-3p may be the upstream regulator of *KDM2A* and participate in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma.

**[Key words]** *KDM2A*; miR-29a-3p; hepatocellular carcinoma; proliferation; invasion and migration

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球公认的肝脏恶性肿瘤,占原发性肝癌的90%以上,具有侵袭、转移能力强、预后差的特点<sup>[1]</sup>。HCC发病率居所有癌症第6位,死亡数居所有癌症第3位<sup>[2]</sup>。尽管目前的治疗策略在延缓HCC进展方面取得了重要进展,但晚期HCC患者的生存率仍很低<sup>[3]</sup>。因此,进一步了解HCC发生发展的病理生理机制,并开发更有效的治疗策略显得尤为迫切<sup>[4-5]</sup>。表观遗传学是在核苷酸序列不发生改变的情况下,研究基因表达的可遗传变化的一门遗传学分支学科。表观遗传修饰主要包括组蛋白修饰、DNA甲基化及核小体重排,在癌症的发生发展过程中发挥着重要作用<sup>[6-8]</sup>。例如,5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)可被TET(ten-eleven translocation)蛋白家族进一步转化为5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC),该过程是DNA去甲基化的过程。研究发现,5-hmC在结肠癌和HCC的早期诊断中具有潜在应用价值<sup>[9-10]</sup>。另有研究发现,甲基化转移酶3(methyltransferase like 3, METTL3)在胃癌组织中表达上调,可作为胃癌患者预后的独立预测因素<sup>[11]</sup>。Tang等<sup>[12]</sup>发现,结肠癌组织中组蛋白去甲基化酶UTX表达较正常组织上调,沉默UTX可诱导癌细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞,抑制肿瘤增殖。因此,UTX可能成为结肠癌的一个很有前景的治疗靶点。*KDM2A*是一种作用于组蛋白H3K36的赖

氨酸特异性去甲基酶,近年来越来越多的研究发现其与肿瘤的发生发展密切相关。有研究发现,在肺癌、胃癌、胶质母细胞瘤等多种肿瘤中*KDM2A*的表达均明显上调,可能发挥致癌基因的作用<sup>[13-15]</sup>。然而,*KDM2A*在HCC中的作用尚不清楚。

MicroRNAs(miRNAs或miRs)在各种组织中均有表达,并与癌症、糖尿病、感染等多种疾病密切相关<sup>[16-19]</sup>。既往多项研究发现,HCC的发病机制涉及多种miRNAs,这些miRNAs可控制细胞的增殖、侵袭和转移,进而影响HCC的发生发展<sup>[20-21]</sup>。因此,检测肿瘤组织或血液中miRNAs的表达量对疾病的诊断、治疗和预后具有指导意义。近年来,miR-29a-3p作为一种肿瘤抑制基因一直备受关注,本课题组前期研究表明,其可通过降低Robo1的表达来抑制HCC细胞的增殖和转移<sup>[22]</sup>。*KDM2A*作为一种表观遗传调控因子,其表达和生物学功能受到多种外界因素的影响<sup>[23]</sup>。研究表明,在胃癌及胶质母细胞瘤发病过程中,miR-663a、LINC00460、microRNA-3666和microRNA-29b可直接与*KDM2A*的启动子结合,调控*KDM2A*的表达<sup>[14-15,24-25]</sup>。然而,*KDM2A*在HCC发生发展中的作用及其机制研究较少。基于*KDM2A*在核心组蛋白翻译后修饰中的重要作用,本研究探索抑制*KDM2A*对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响,以期对HCC发生发展的分子机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 组织样本收集** 收集2014—2017年华南科技大学同济医学院附属同济医院收治的40例HCC患者的肝癌组织及其癌旁组织。取1.5 cm×1.0 cm×0.5 cm大小的组织置于4%多聚甲醛溶液中固定并行后续石蜡包埋切片,用于病理染色;其余组织于液氮中保存,采用qRT-PCR及Western blotting检测组织中KDM2A的表达情况。(1)纳入标准:初次手术;术前未接受过放疗、新辅助化疗、靶向药物治疗等辅助治疗。(2)排除标准:既往有肿瘤史;合并其他器官肿瘤或转移性肝癌;合并心、肺、肾或其他重要脏器功能不全。本研究获得华中科技大学同济医学院附属同济医院医学伦理委员会批准(201112005),所有研究对象均签署知情同意书。

**1.2 细胞培养及转染** 人肝癌细胞株HepG2、Huh7、HCCLM3、MHCC-97H及正常肝细胞LO2购自武汉大学中国类型培养收藏中心(中国湖北武汉),于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。分别采用qRT-PCR及Western blotting检测细胞中KDM2A mRNA及蛋白的表达情况,选取传代后状态稳定的Huh7细胞进行后续实验。

(1)取Huh7细胞,设置si-NC组(转染50 nmol/L si-NC)、si-KDM2A组(转染50 nmol/L si-KDM2A),转染48 h后,采用qRT-PCR及Western blotting验证转染效率。采用CCK-8法检测转染24、48、72 h的细胞增殖能力,Transwell实验检测转染48 h后的细胞侵袭和迁移能力。(2)取Huh7细胞,设置mimic-NC组(转染50 nmol/L mimic-NC)、miRNA-29a-3p mimic组(转染50 nmol/L miRNA-29a-3p mimic)、inhibitor-NC组(转染50 nmol/L inhibitor-NC)与miRNA-29a-3p inhibitor组(转染50 nmol/L miRNA-29a-3p inhibitor),转染48 h后,采用qRT-PCR验证转染效率。分别采用qRT-PCR和Western blotting检测转染48 h后各组细胞中KDM2A mRNA及蛋白的表达情况;采用CCK-8法检测转染24、48、72 h的细胞增殖能力,Transwell实验检测转染48 h后的细胞侵袭和迁移能力。si-NC、si-KDM2A、mimic-NC、miRNA-29a-3p mimic、inhibitor-NC、miRNA-29a-3p inhibitor均购自广州锐博生物技术有限公司。

**1.3 生物信息学分析** 利用在线数据库TargetScan、miRDIP、miRWalk、Starbase及miRDB综合预测miR-29a-3p与KDM2A的靶向结合关系。

**1.4 双荧光素酶报告实验测定双荧光素酶活性** 双荧光素酶载体由上海吉凯基因医学科技有限公司构建。将KDM2A 3'-UTR(WT)或KDM2A 3'-UTR(MUT)

报告质粒分别与mimic-NC或miR-29a-3p mimics利用Lip3000共转染至293T细胞中;转染48 h后,采用GloMaxTM96 Microplate Luminometer化学发光检测仪(美国Promega公司)检测荧光素酶活性。

**1.5 qRT-PCR检测miR-29a-3p及KDM2A mRNA相对表达量** 采用Trizol试剂盒提取组织或细胞总RNA,使用cDNA反转录试剂盒反转录成cDNA,采用CFX96 Real-time PCR仪测定miR-29a-3p及KDM2A mRNA相对表达量。以GAPDH及U6为内参照,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算miR-29a-3p及KDM2A mRNA相对表达量。miR-29a-3p及内参照U6引物购自广州锐博生物技术有限公司,KDM2A及内参GAPDH引物购自北京擎科生物公司。引物序列:KDM2A,正义链5'-CAACAGCGATCCCAAGTTAGC-3',反义链5'-TGCCCGAGTGGGGAATTTAAG-3';GAPDH,正义链5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',反义链5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

**1.6 Western blotting检测KDM2A蛋白表达量** 使用RIPA裂解缓冲液收集组织或细胞的总蛋白提取物,然后使用BCA试剂盒测定其浓度。使用10%SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质样品,并转移至PVDF膜,加入特异性一抗兔源KDM2A(1:1000,英国Abcam公司)、兔源GAPDH(1:1000,英国Abcam公司)4℃孵育12 h;加入辣根过氧化物酶用二抗(山羊抗兔,英国Abcam公司)室温孵育40 min;加入SuperPico化学发光底物用于可视化信号。采用ImageJ软件分析KDM2A蛋白相对表达量。

**1.7 免疫组织化学染色检测肝癌组织中KDM2A蛋白表达情况** 将石蜡切片常规脱蜡,高温高压下修复(EDTA修复时间为1.5 min),冷却至室温,TBS缓冲液冲洗5 min×3次;将切片置于3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中室温浸泡20 min,TBS缓冲液冲洗5 min×3次;用10%山羊血清封闭20 min,滴加一抗工作液(1:200,兔源KDM2A)于4℃冰箱过夜;次日取出后复温15 min,PBS冲洗5 min×3次,滴加二抗(1:100)于室温下孵育25 min,PBS缓冲液冲洗5 min×3次;去除PBS,滴加50 μl DAB显色液并于低倍显微镜下观察,DAB显色液新鲜配制;自来水冲洗切片,苏木精复染10 min;使用自来水多次冲洗,避免苏木精残留,将切片置于盐酸乙醇中分化;自来水冲洗切片,返蓝液返蓝;梯度乙醇脱水,将二甲苯脱去,切片晾干后用中性树脂封片镜检。

**1.8 CCK-8法检测细胞增殖能力** 转染48 h后,用胰酶消化Huh7细胞,调整细胞浓度为3×10<sup>4</sup>个/ml;取100 μl细胞悬液接种于96孔板中,边缘孔用无菌PBS填充,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中。分别培养24、48、72 h后,每孔加入10 μl CCK-8试剂,

尽量避免产生气泡，将96孔板置于细胞培养箱中孵育1.5~2.0 h。使用酶标仪测定450 nm处的吸光度(OD)值。

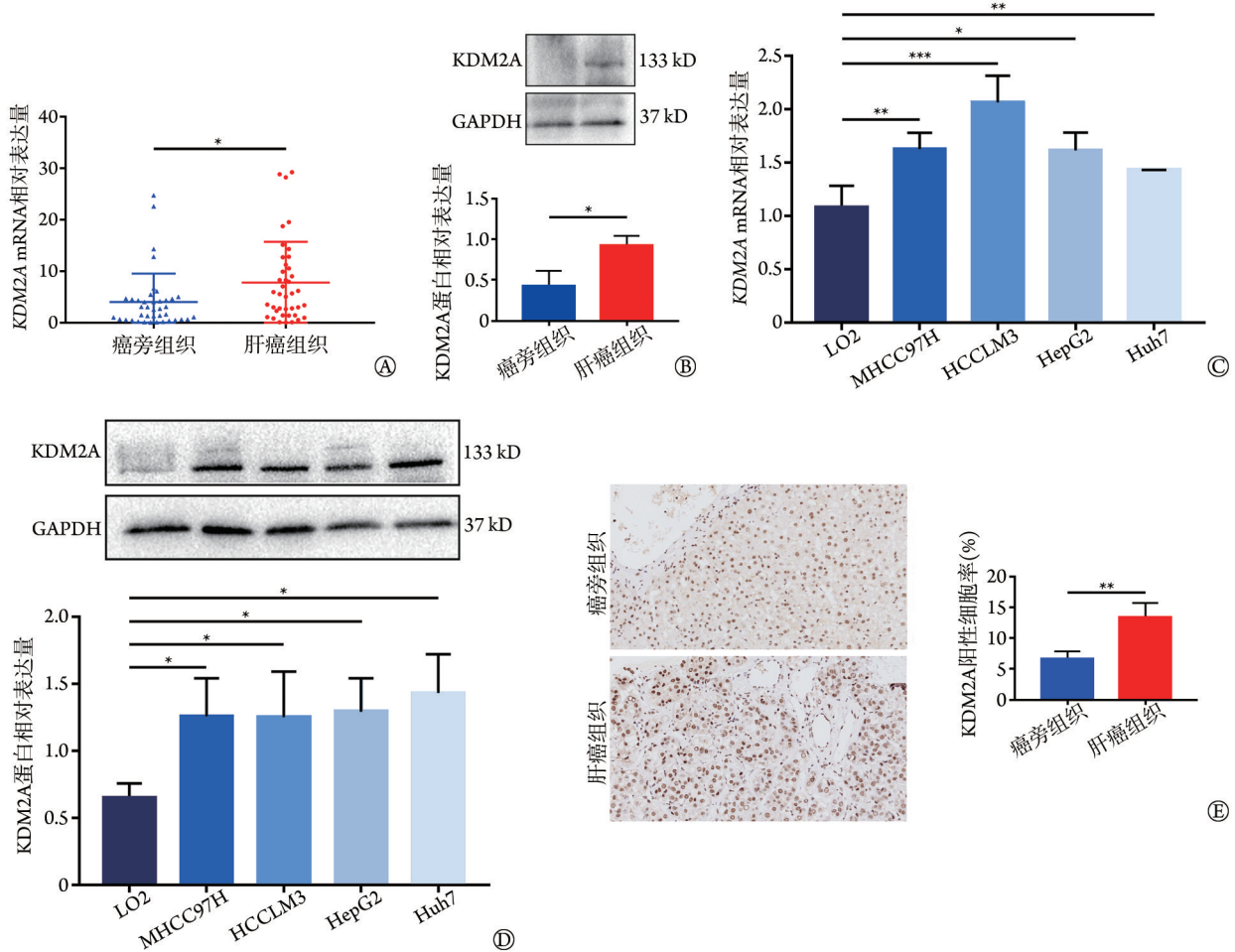
**1.9 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力** 将BD matrigel 基质胶和DMEM无血清培养基以1:3的比例稀释。取100 μl 混合液加入上室中，置于无菌培养箱中孵育4 h，备用。以上步骤均于冰上操作。将转染48 h后的细胞配制成浓度为 $5 \times 10^5$ 个/ml，取1 ml于1000 r/min 离心5 min，去上清，用无血清培养基或PBS洗3次，计数，配制成细胞悬液。于上室中加入200 μl 细胞悬液，吹打混匀；下室中加入600 μl 含10% FBS的DMEM培养基，并于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养48 h。取出Transwell小室，PBS洗2次；4%多聚甲醛溶液固定10 min，PBS洗2次；加入0.1%结晶紫染色20 min后，PBS洗2次，用棉签擦去上室细胞，用中性树脂封片。显微镜下拍片，每个小室随机选取5个视野。细胞迁移实验步骤同侵袭实验，区别是无需基质胶铺板。

**1.10 统计学处理** 采用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。实验独立重复3次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 KDM2A在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达情况** qRT-PCR、Western blotting及免疫组织化学染色检测结果显示，与癌旁组织相比，肝癌组织中KDM2A mRNA和蛋白相对表达水平明显升高( $P < 0.05$ )；与正常肝细胞LO2相比，肝癌细胞HepG2、Huh7、HCCLM3和MHCC97H中KDM2A mRNA和蛋白相对表达水平明显升高，差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图1)。

**2.2 抑制KDM2A表达对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响** 采用qRT-PCR和Western blotting验证转染效率，结果显示，转染si-KDM2A后，Huh7细胞



A. qRT-PCR 检测肝癌组织中 KDM2A mRNA 的表达；B. Western blotting 检测肝癌组织中 KDM2A 蛋白的表达；C. qRT-PCR 检测肝癌细胞中 KDM2A mRNA 的表达；D. Western blotting 检测肝癌细胞中 KDM2A 蛋白的表达；E. 免疫组织化学染色检测肝癌组织中 KDM2A 蛋白的表达( $\times 200$ )；黑色箭头示 KDM2A 阳性区域；\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$

图1 KDM2A在肝癌组织和肝癌细胞系中的表达情况

Fig.1 Expression of KDM2A in HCC tissues and cells

中 *KDM2A* mRNA 和蛋白相对表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 2A、B), 表明转染实验成功。

CCK-8 法检测结果显示, 转染 24 h, si-*KDM2A* 组与 si-NC 组 Huh7 细胞增殖能力差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 转染 48 h 和 72 h, si-*KDM2A* 组 Huh7 细胞增殖能力明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 2C)。

Transwell 实验结果显示, 与 si-NC 组比较, si-*KDM2A* 组侵袭细胞数和迁移细胞数明显减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2D、E)。

**2.3 miR-29a-3p 靶向调控 *KDM2A* 的表达** TargetScan 数据库预测结果显示, *KDM2A* 与 miR-29a-3p 存在相互结合位点 (图 3A)。结合 miRDIP、miRWalk、Starbase、TargetScan 和 miRDB 数据库综合分析 miR-29a-3p 对 *KDM2A* 的调控作用, 对 5 个数据库取交集, 结果显示, 5 个数据库中均显示两个分子间具有相互作用的结合位点 (图 3B)。

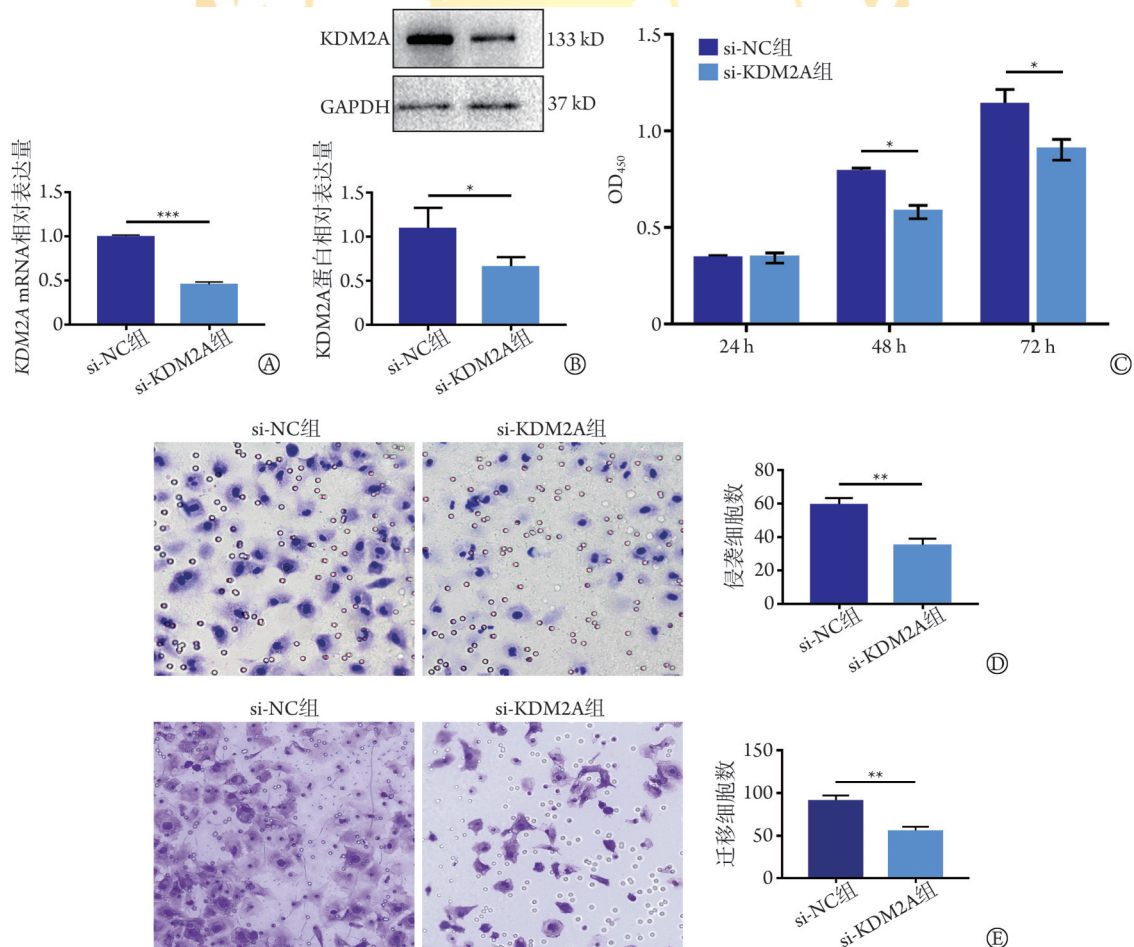
双荧光素酶报告实验结果显示, WT-miR-29a-3p mimic 组双荧光素酶活性明显低于 WT-mimic-NC 组

( $P < 0.01$ ), 而 MUT-miR-29a-3p mimic 组与 MUT-mimic-NC 组双荧光素酶活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3C)。

qRT-PCR 检测结果显示, 转染 miR-29a-3p mimic 后, Huh7 细胞中 miR-29a-3p 表达水平升高 ( $P < 0.001$ ); 转染 miR-29a-3p inhibitor 后, Huh7 细胞中 miR-29a-3p 表达水平降低 ( $P < 0.05$ , 图 4A), 表明转染实验成功。

qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示, 过表达 miR-29a-3p 后, Huh7 细胞中 *KDM2A* mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 抑制 miR-29a-3p 的表达后, Huh7 细胞中 *KDM2A* mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 4B、C)。

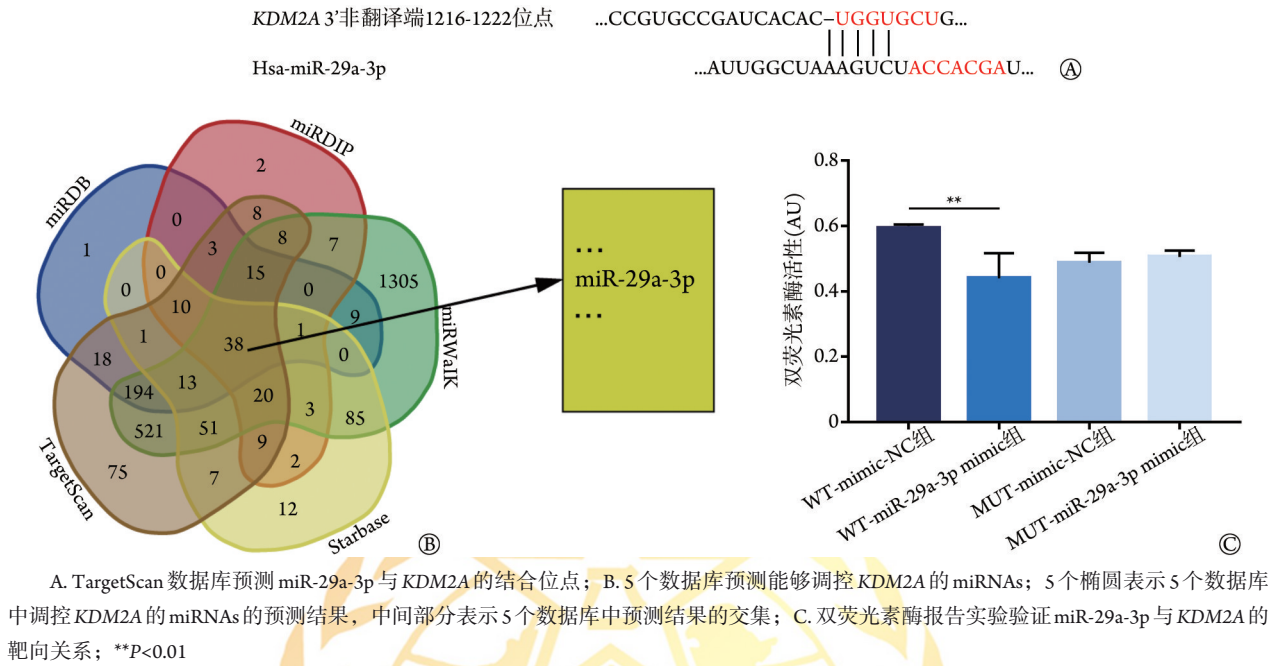
**2.4 miR-29a-3p 对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响** CCK-8 法检测结果显示, 转染 miR-29a-3p mimic 及 mimic-NC 24 h 后, 两组 Huh7 细胞增殖能力差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 转染 48 h 和 72 h 后, 与 mimic-NC 组比较, miR-29a-3p mimic 组 Huh7 细胞增殖能力明显下降 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。相反, 与 inhibitor-NC



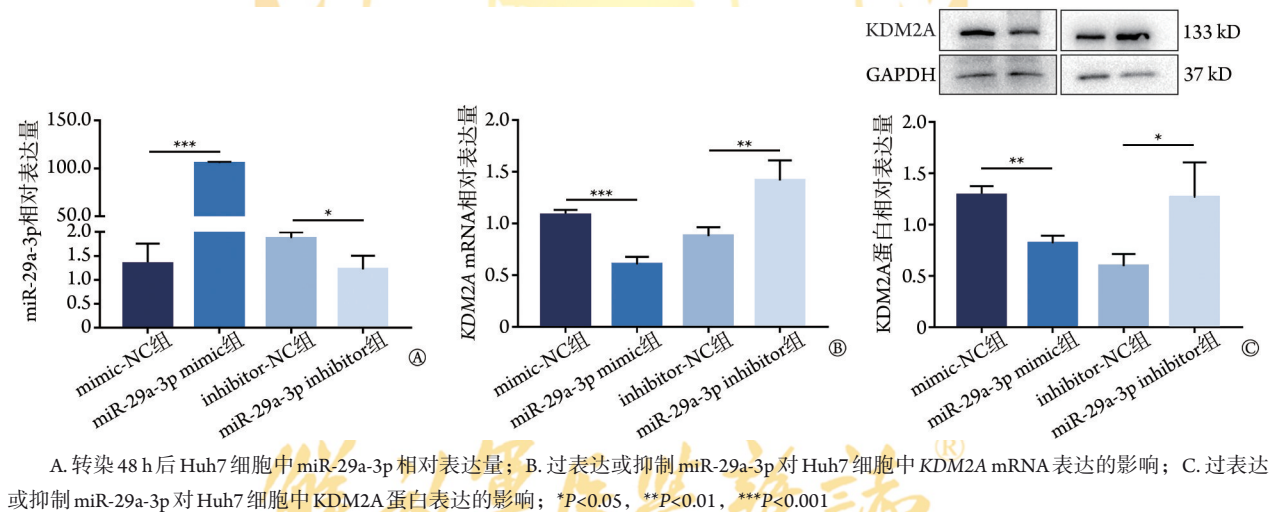
A. qRT-PCR 验证转染效率; B. Western blotting 验证转染效率; C. CCK-8 法检测转染 24 h、48 h 和 72 h 后 Huh7 细胞增殖能力; D. 转染 si-*KDM2A* 后, Transwell 法检测 Huh7 细胞侵袭能力; E. 转染 si-*KDM2A* 后, Transwell 法检测 Huh7 细胞迁移能力; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图 2 抑制 *KDM2A* 表达后肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭减弱

Fig.2 Down-regulation of *KDM2A* inhibited HCC cell proliferation, migration and invasion



**图3** miR-29a-3p与KDM2A的靶向结合位点  
**Fig.3** The target binding site of miR-29a-3p and KDM2A



**图4** miR-29a-3p负向调控KDM2A的表达  
**Fig.4** miR-29a-3p negatively regulates the expression of KDM2A

组比较，转染24 h、48 h和72 h后，miR-29a-3p inhibitor组Huh7细胞增殖能力明显增强(P<0.05，图5A)。

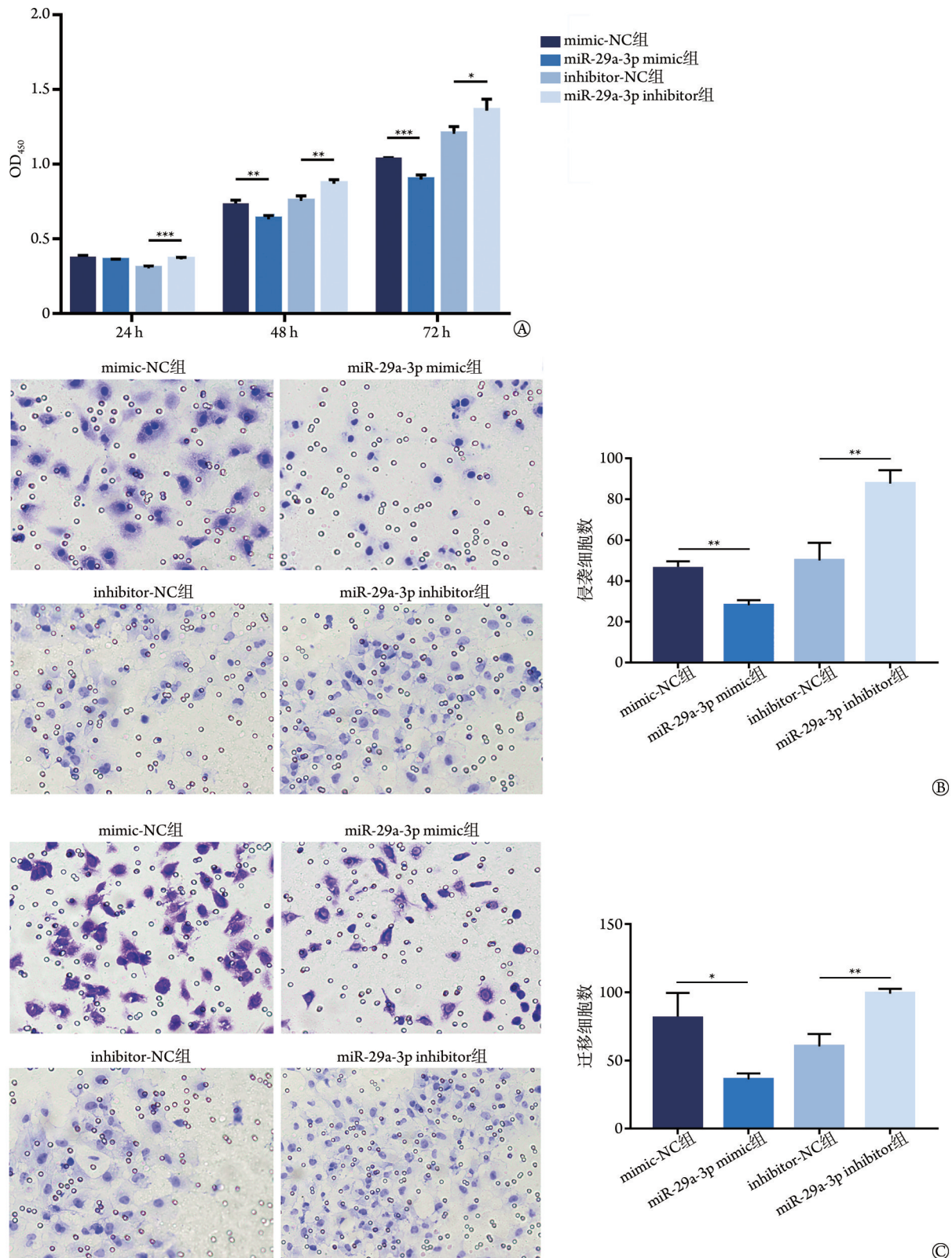
Transwell实验结果显示，与mimic-NC组比较，miR-29a-3p mimic组Huh7细胞侵袭和迁移能力明显降低(P<0.05)；抑制miR-29a-3p的表达后，Huh7细胞侵袭和迁移能力明显增强(P<0.01，图5B、C)。

### 3 讨论

HCC是全球范围内主要的癌症相关死亡原因之一。80%~90%的HCC患者合并慢性肝炎和肝硬化疾病，HCC的危险因素十分复杂，其中最主要的是乙

型、丙型肝炎病毒感染<sup>[26-28]</sup>。HCC病死率高的主要原因为缺少可靠的早期检测手段，大多数HCC患者在晚期阶段才被诊断，此时患者的预后往往较差。此外，尽管针对HCC的治疗已经取得了很大进展，如手术和化疗，但部分患者仍表现为预后不良和高转移倾向<sup>[29]</sup>。因此目前仍需要寻找特异性的生物标志物来提高早期HCC的检测，评估预后和预测治疗反应。

KDM2A是一种可作用于H3K36的赖氨酸脱甲基酶，与基因表达的激活或抑制有关<sup>[30]</sup>。近年来研究发现，KDM2A在肿瘤发生发展中的作用复杂且呈现出组织特异性。Frescas等<sup>[31]</sup>使用OncoPrint在线数据



A. 过表达或抑制 miR-29a-3p 对 Huh7 细胞增殖能力的影响; B. Huh7 转染 miR-29a-3p mimic 后, Transwell 法检测各组细胞的侵袭能力; C. Huh7 转染 miR-29a-3p inhibitor 后, Transwell 法检测各组细胞的迁移能力; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

图5 miR-29a-3p 抑制 Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移

Fig.5 miR-29a-3p inhibits proliferation, invasion and migration of Huh7 cells

库比较分析了 KDM2A 在前列腺癌组织和匹配的非肿瘤组织中的差异表达, 发现与正常前列腺组织相比,

KDM2A 在前列腺癌组织中的表达降低。Lu 等<sup>[32]</sup>发现, KDM2A 在膀胱癌中表达水平升高, 且可通过沉

默下游基因 *RARRES3* 促进膀胱癌的发生发展。Chen 等<sup>[33]</sup>研究发现, *KDM2A* 在乳腺癌中呈高表达, 且可通过抑制 DNA 去甲基化酶 *TET2* 的表达而增加 DNA 甲基化。Huang 等<sup>[34]</sup>发现, *KDM2A* 可增强胃癌细胞的生长和转移能力。另外, Wang 等<sup>[35]</sup>发现, *KDM2A* 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中发挥致癌作用, 并在 ESCC 细胞中高表达, 然而, 利用 RNA 测序分析 *KDM2A* 控制的基因表达网络时发现, *KDM2A* 不仅可诱导某些致癌基因的表达, 如 *IL6* 和 *LAT2*, 同时又可抑制某些致癌基因的表达, 如 *MAT2A* 和 *HMGCS1*。目前, 有关 *KDM2A* 在 HCC 中的研究仍较少。本研究发现, *KDM2A* 在肝癌细胞及组织中高表达, 抑制 *KDM2A* 的表达可抑制肝癌细胞的增殖、转移及侵袭, 进而抑制 HCC 的发生发展。

非编码 RNA 是缺乏编码蛋白质或多肽的序列, 包括小型非编码 RNA(20~30 个碱基)和长链非编码 RNA(大于 200 个碱基)。MicroRNAs 是一种小型非编码 RNA, 在干细胞维持、增殖、凋亡、代谢、生长及发育等生命过程中发挥着重要作用, 其表达异常与多种疾病密切相关, 包括病毒感染、心血管疾病和癌症等<sup>[36-37]</sup>。研究表明, miRNAs 是癌症诊断和预后的潜在生物标志物, 也是肿瘤治疗的有效靶点<sup>[38]</sup>。目前, 已有多项研究报道 HCC 中存在多种差异表达的 microRNAs, 可能参与 HCC 的发生发展<sup>[39-41]</sup>。既往研究表明, miR-29a-3p 可通过上调 *Robo1* 的表达, 激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 从而影响 HCC 的发生发展<sup>[22]</sup>。本研究通过双荧光素酶实验验证了在肝癌细胞中 *KDM2A* 受到 miR-29a-3p 的调控。

综上所述, 本研究结果表明, *KDM2A* 在 HCC 中高表达, 抑制 *KDM2A* 的表达后, Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移能力减弱, 并且可被 miR-29a-3p 靶向调控。这为 HCC 靶向药物研发提供了理论依据, 但由于缺乏相关动物实验支持, 所以, 抑制 *KDM2A* 表达在 HCC 荷瘤小鼠中的作用尚不明确。*KDM2A* 是否可作为 HCC 的诊断标志物及治疗靶点仍需进一步研究。此外, *KDM2A* 基因有两个可替换的剪接变体长亚型(21 个外显子)和短亚型(10 个外显子)。有研究表明, *KDM2A*(长亚型)过表达可抑制 HT-29 结肠癌细胞的增殖和克隆形成, 相反, 在肺癌和胃癌细胞中, 过表达 *KDM2A* 可促进肿瘤的发生发展<sup>[42]</sup>。*KDM2A* 的不同亚型可能是其在不同细胞模型中发挥作用的关键。在 HCC 中发挥作用的 *KDM2A* 亚型及调控机制仍需进一步探究。

#### 【参考文献】

[1] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ. A global view of hepatocellular

carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.

- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [3] Sun LY, Zhang KJ, Xie YM, et al. Immunotherapies for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1138493.
- [4] 雷艳文, 丁广成, 秦德华, 等. SBRT 联合卡瑞利珠单抗和阿帕替尼治疗晚期肝细胞癌的疗效及安全性[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(12): 1420-1426.
- [5] Yi Lu, Yue Gao, Huan Yang, et al. Nanomedicine-boosting icaritin-based immunotherapy of advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Military Med. Res.*, 2023, 10(3): 403-414.
- [6] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(10): 1057-1068.
- [7] Liu L, Liu J, Lin Q. Histone demethylase *KDM2A*: biological functions and clinical values (review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 723.
- [8] 阳雪兰, 曾雷. 基因融合与癌症发生发展关系及其致病机制的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(2): 527-532.
- [9] Xiao Z, Wu W. 5-Hydroxymethylcytosine signature in circulating cell-free DNA as a potential diagnostic factor for early-stage colorectal cancer and precancerous adenoma[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(1): 138-150.
- [10] Cai Z, Zhang J, He Y, et al. Liquid biopsy by combining 5-hydroxymethylcytosine signatures of plasma cell-free DNA and protein biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *ESMO Open*, 2021, 6(1): 100021.
- [11] Ge Y, Zhang Y, Yang S, et al. The comprehensive analysis of N6-methyladenosine writer *METTL3* and *METTL14* in gastric cancer [J]. *J Oncol*, 2023, 2023: 9822995.
- [12] Tang X, Cai W, Cheng J, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase *UTX* plays a critical role in colorectal cancer cell proliferation[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 144.
- [13] Wagner KW, Alam H, Dhar SS, et al. *KDM2A* promotes lung tumorigenesis by epigenetically enhancing *ERK1/2* signaling[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5231-5246.
- [14] Wang F, Liang S, Liu X, et al. *LINC00460* modulates *KDM2A* to promote cell proliferation and migration by targeting miR-342-3p in gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6383-6394.
- [15] Shou T, Yang H, Lv J, et al. MicroRNA-3666 suppresses the growth and migration of glioblastoma cells by targeting *KDM2A*[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 1049-1055.
- [16] Wonnacott A, Denby L, Coward RJM, et al. MicroRNAs and their delivery in diabetic fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 182: 114045.
- [17] Yuechen Z, Shaosong X, Zhouxing Z, et al. A summary of the current diagnostic methods for, and exploration of the value of microRNAs as biomarkers in, sepsis-associated encephalopathy[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1125888.
- [18] Lu X, Yao C, Sun L, et al. Plasmon-enhanced biosensors for microRNA analysis and cancer diagnosis[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114041.
- [19] 刘建兵, 林晓雨, 李文龙, 等. miR-205 在宫颈鳞癌中的表达及其对癌细胞迁移、侵袭能力的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(7): 694-700.
- [20] Khare S, Khare T, Ramanathan R. Hepatocellular carcinoma: the role of microRNAs[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(5): 645.

- [21] Khan S, Zhang DY, Zhang JY, *et al.* The key role of microRNAs in initiation and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 950374.
- [22] Song Q, Zhang H, He J, *et al.* Long non-coding RNA LINC00473 acts as a microRNA-29a-3p sponge to promote hepatocellular carcinoma development by activating Robo1-dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920937890.
- [23] Tanaka Y, Tsuneoka M. Gallic acid derivatives propyl gallate and epigallocatechin gallate reduce rRNA transcription *via* induction of KDM2A activation[J]. *Biomolecules*, 2021, 12(1): 30.
- [24] Kong Y, Zou S, Yang F, *et al.* RUNX3-mediated up-regulation of miR-29b suppresses the proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting KDM2A[J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(1): 138-148.
- [25] Wang L, Lang B, Zhou Y, *et al.* Up-regulation of miR-663a inhibits the cancer stem cell-like properties of glioma *via* repressing the KDM2A-mediated TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(19): 1935-1952.
- [26] Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4): 273-277.
- [27] 李乐, 廖昊, 思兰兰, 等. 新型血清学标志物在不同类型乙型肝炎病毒感染中的检出特征分析[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(2): 163-167.
- [28] 文正燕, 孙传俊, 杨献光. 混合谱系激酶结构域样蛋白、caspase-8及受体相互作用蛋白激酶3 mRNA在不同阶段乙型肝炎病毒感染患者中的表达及诊断价值[J]. *新乡医学院学报*, 2023, 40(7): 628-633.
- [29] 乔浩东, 刘一璠, 梁泽, 等. TLS和PD-1/PD-L1信号通路在肝细胞癌免疫治疗方面的研究进展[J]. *医学新知*, 2023, 33(5): 373-380.
- [30] Zuo Y, Zhan L, Wen H, *et al.* Stabilization of nuclear  $\beta$ -catenin by inhibiting KDM2A mediates cerebral ischemic tolerance[J]. *FASEB J*, 2023, 37(3): e22796.
- [31] Frescas D, Guardavaccaro D, Kuchay SM, *et al.* KDM2A represses transcription of centromeric satellite repeats and maintains the heterochromatic state[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(22): 3539-3547.
- [32] Lu B, Wei J, Zhou H, *et al.* Histone H3K36me2 demethylase KDM2A promotes bladder cancer progression through epigenetically silencing RARRES3[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(6): 547.
- [33] Chen JY, Luo CW, Lai YS, *et al.* Lysine demethylase KDM2A inhibits TET2 to promote DNA methylation and silencing of tumor suppressor genes in breast cancer[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(8): e369.
- [34] Huang Y, Liu Y, Yu L, *et al.* Histone demethylase KDM2A promotes tumor cell growth and migration in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(1): 271-278.
- [35] Wang J, Zhang ZY, Jiang J, *et al.* KDM2A plays a dual role in regulating the expression of malignancy-related genes in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 624: 53-58.
- [36] Li Y, Wang Z, Li Y, *et al.* MicroRNA-29a functions as a potential tumor suppressor through directly targeting CDC42 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3896-3904.
- [37] 董勇, 徐菱遥, 华静, 等. 巨噬细胞外泌体 lncRNA HULC 对肝癌细胞迁移、侵袭和转移的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(5): 1217-1226.
- [38] Sell MC, Ramlogan-Steel CA, Steel JC, *et al.* MicroRNAs in cancer metastasis: biological and therapeutic implications[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2023, 25: e14.
- [39] Zhao X, Dou J, Cao J, *et al.* Uncovering the potential differentially expressed miRNAs as diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma based on machine learning in The Cancer Genome Atlas database[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(6): 1771-1784.
- [40] Pascut D, Pratama MY, Vo NVT. The crosstalk between tumor cells and the microenvironment in hepatocellular carcinoma: the role of exosomal microRNAs and their clinical implications[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 823.
- [41] Wang X, He Y, Mackowiak B, *et al.* MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases[J]. *Gut*, 2021, 70(4): 784-795.
- [42] Adélaïde J, Finetti P, Bekhouche I, *et al.* Integrated profiling of basal and luminal breast cancers[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11565-11575.

(责任编辑: 纪方方)