

KDM5A 通过 TAF3 转录激活促进肝细胞癌增殖的分子机制探究

陈娜^{1, 2} 马婷婷^{1, 2} 毕森盛¹ 冯湛¹ 王政禄^{1, 2}

1 天津市第一中心医院 生物样本资源共享中心, 天津, 300192;

2 南开大学移植医学研究院, 天津, 300192;

摘要: 目的: 肝细胞癌是一种在临幊上常见且致死率极高的恶性肿瘤。本研究旨在探讨 KDM5A-TAF3 调控通路, 分析其在肝细胞癌细胞增殖中的作用机制, 为肝癌的治疗提供新的理论支持和潜在的靶向治疗方向。

方法: 利用 TCGA 数据库将患者分为 TAF3 高表达和低表达两组, 进行基因表达差异的分析; 结合生物信息学技术预测 TAF3 的上游转录调控网络; 通过 ChIP-seq 数据库研究 HepG2 细胞; 使用 qPCR 技术检测基因及蛋白的表达水平; 并通过 CCK-8 实验评估 KDM5A 抑制剂对细胞增殖的影响。

结果: 研究结果表明, TAF3 的表达与肝细胞癌的增殖能力有着密切的联系。KDM5A 作为 TAF3 的上游调节因子, 主要集中在其启动子区域。使用 KDM5A 抑制剂可以显著降低 HepG2 细胞中 TAF3 基因的表达水平。此外, TAF3 的过表达能够有效抵消 KDM5A 抑制剂对细胞增殖的抑制效果。该结果充分表明, KDM5A 可通过激活 TAF3 的转录来调控 HepG2 细胞的增殖过程。

结论: 本研究深入探讨了 KDM5A 如何通过 TAF3 的转录激活作用来调控肝细胞癌的增殖机制, 证实了 KDM5A 能够通过激活 TAF3 促进肝细胞癌的恶性增殖。因此, KDM5A 和 TAF3 可能成为肝细胞癌治疗的新靶点。

关键词: KDM5A; TAF3; 转录激活; 细胞增殖

DOI: 10. 69979/3029-2808. 25. 09. 013

1 实验方法

1.1 TCGA 数据分析

从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 获取肝细胞癌患者的转录组数据及临床信息。基于 TAF3 的表达水平, 使用 R 语言 (版本 4.2.1) 将患者分为 TAF3 高表达组与低表达组 (以中位数为界)。随后, 对差异基因进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析等。此外, 通过生物信息学方法, 利用 Cistrome 数据库 (<http://dc2.cistrome.org/#/>) 预测以及 Cytoscape 可视化分析 TAF3 上游转录调控网络。

1.2 CCK8 检测细胞增殖

选用人肝癌细胞系 HepG2 进行实验。细胞以每孔 3×10^3 的密度接种于 96 孔板, 并在 37°C 、5% CO_2 的培养环境中培养 24 小时。实验分为几个组别: 空白对照组 (仅含培养基)、溶剂对照组 (添加与抑制剂等量的 DMSO 溶剂)、KDM5A 抑制剂处理组 ($5 \mu\text{M}$ KDOAM-25 citrate)、KDM5A 抑制剂与 TAF3 过表达组, 以及 KDM5A

抑制剂与 TAF3 敲低组。在 72 小时后, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 继续孵育 2 小时, 随后使用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度, 绘制细胞增殖曲线并计算细胞增殖抑制率。

1.3 qPCR 检测

按照 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 说明书提取各组细胞的总 RNA, 通过 NanoDrop 2000 测定 RNA 浓度和纯度 (A260/A280 比值在 1.8-2.0 之间视为合格)。使用逆转录试剂盒 (Vazyme) 将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green Master Mix (Roche) 在实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96) 上进行扩增。反应条件为: 95°C 预变性 30 秒, 95°C 变性 5 秒, 60°C 退火 30 秒, 共进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 TAF3 基因的相对表达量, 以 β -actin 作为内参基因。

1.4 ChIP-seq 数据库分析

基于 ChIP-altas 数据库获取 HepG2 细胞中 KDM5A 的 ChIP-seq 数据。可视化分析 KDM5A 在 TAF3 启动子区域的富集情况, 计算富集倍数。同时, 分析 TAF3 启动

子区域组蛋白 H3K4me3 修饰水平, 判断 KDM5A 对该区域表观遗传修饰的影响。

2 实验结果

2.1 TAF3 表达水平与肝细胞癌增殖功能密切相关

基于 TCGA 数据库将肝细胞癌患者分为 TAF3 高表达组与低表达组。火山图可视化结果表明, TAF3 高低表达组间存在大量差异基因 ($P < 0.05$) (图 1A)。KEGG 生物过程富集分析表明, 差异基因显著参与 DNA 复制、染色体分离、核分裂等与染色质重塑、细胞增殖高度关联的生物学过程, 揭示 TAF3 对肿瘤进展的影响 (图 1B)。KEGG 通路富集分析发现差异基因富集于细胞周期、DNA 复制等通路, 证实 TAF3 可通过干预核心通路驱动癌细胞恶性增殖 (图 1C)。基因集富集分析 (GSEA) 显示细胞氮化合物生物合成过程相关基因集在 TAF3 高表达组有富集趋势, 从代谢维度进一步解析了 TAF3 促癌机制 (图 1D)。综上, TAF3 高低表达组差异基因显著富集于 DNA 复制、染色体分离、细胞周期调控等细胞增殖关键过程与通路。

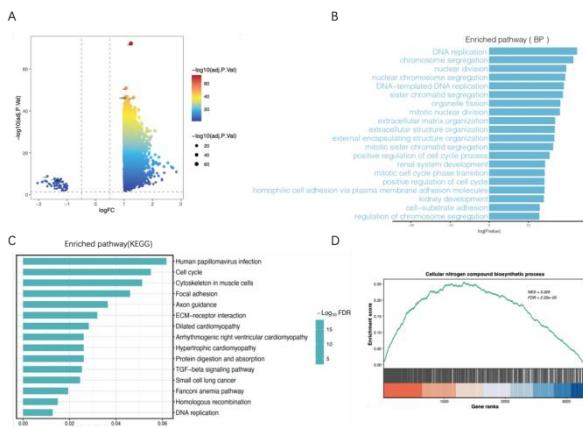


图 1. 基于 TCGA 数据库分析显示 TAF3 表达水平与肝细胞癌增殖功能密切相关

2.2 KDM5A 在 TAF3 启动子区域富集显著

接下来, 探究了 TAF3 上游调控因子及关联。首先借助 Cistrome 数据库以及 Cytoscape 网络调节分析, 结果显示 KDM5A 等为 TAF3 潜在上游调控因子, 呈现分子间调控关联 (图 2A)。TCGA 肝细胞癌表达谱数据显示, KDM5A 与 TAF3 表达显著正相关 ($R=0.62$, $P = 0$) (图 2B)。进一步结合数据库 CHIP-seq 数据分析发现, 在 HepG2 细胞中 KDM5A 显著富集于 TAF3 启动子区域 (富集倍数=3.8, $P < 0.001$), 同时该区域的组蛋白 H3K4me3 修饰水平显著上升 (见图 2C)。该结果表明, KDM5A 可

能通过转录层面调控 TAF3, 为解析 KDM5A-TAF3 调控轴在肝细胞癌中的作用提供关键分子证据。

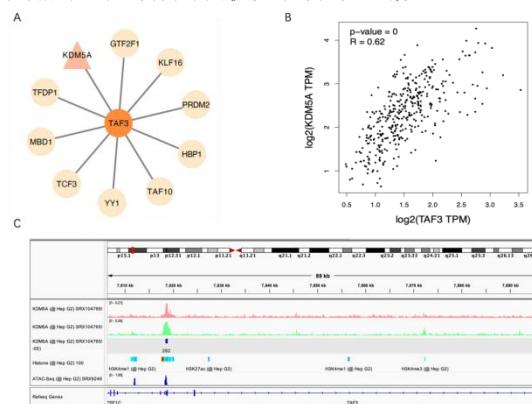


图 2. Chip-seq 数据分析显示 KDM5A 在 TAF3 启动子区域富集显著

2.3 KDM5A 抑制剂显著抑制 TAF3 基因的表达, 并抑制 HepG2 细胞的增殖

本研究进一步探究了 KDM5A 是否通过调控 TAF3 发挥功能。首先, 使用 KDM5A 特异性抑制剂处理 HepG2 细胞, qPCR 分析结果显示 TAF3 基因的表达水平显著降低 ($P < 0.01$) (图 3A)。CCK-8 增殖实验的结果表明, 与对照组和溶剂组相比, KDM5A 抑制剂在 72 小时后显著降低了细胞的增殖活力, 结果表明抑制 KDM5A 能够有效抑制 HepG2 细胞的增殖, 而 KDM5A 抑制剂与 TAF3 敲低组的细胞增殖活力进一步下降 (图 3B)。在 KDM5A 抑制剂与 TAF3 过表达处理组中, 细胞增殖率相比于 KDM5A 抑制剂低浓度组有所回升, 表明 TAF3 的过表达能够显著逆转 KDM5A 抑制所导致的细胞增殖抑制 (图 3C)。该部分结果表明 KDM5A 通过转录激活 TAF3, 促进肝细胞癌的恶性增殖。

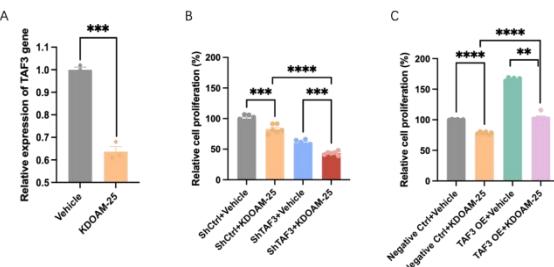


图 3. KDM5A 抑制剂显著抑制 TAF3 的表达并抑制 HepG2 细胞的增殖

3 讨论

肝细胞癌作为临床常见的高致死性恶性肿瘤^[1]。前期研究显示, TAF3 基因的表达与肝细胞癌预后密切相关。

本研究聚焦 KDM5A-TAF3 调控轴, 系统解析其对肝细胞癌增殖的作用机制, 为肝癌治疗提供了新的理论依据与潜在靶点方向。

基于 TCGA 数据库的分析发现, TAF3 与肝细胞癌增殖过程紧密关联。差异基因分析中, TAF3 高低表达组间差异基因显著 ($P < 0.05$), 表明 TAF3 的表达改变对肝细胞癌基因调控网络的显著影响。KEGG 与 GO 富集分析进一步证实, TAF3 通过参与 DNA 复制、染色体分离、细胞周期调控等关键生物学过程, 促进肝细胞癌的恶性进展。与既往研究中“转录辅助因子参与肿瘤增殖调控”的理论相契合^[2], 如 TAF 家族成员在非小细胞肺癌、乳腺癌、白血病等通过调控细胞周期驱动肿瘤发展^[3-6], 本研究则明确了 TAF3 在肝细胞癌中的促增殖作用, 再次强调了 TAF3 作为肿瘤增殖关键调控分子的地位。

生物信息学预测与 ChIP-seq 数据结合分析, 首次揭示 KDM5A 对 TAF3 的上游调控模式。组蛋白去甲基化酶家族与 TAF3 的显著正相关 ($r=0.62$, $P < 0.001$), 为后续机制挖掘锚定方向。同时, HepG2 细胞中 KDM5A 在 TAF3 启动子区域的显著富集 (富集倍数=3.8, $P < 0.001$), 及该区域 H3K4me3 修饰水平的上调, 从表观遗传层面阐释了 KDM5A 调控 TAF3 转录的可能路径。拓展了组蛋白去甲基化酶在肿瘤中的作用认知, KDM5A 不再局限于传统的“染色质重塑-泛癌调控”角色, 而是通过精准靶向 TAF3 启动子, 实现对肝细胞癌增殖关键分子的转录激活, 为表观遗传调控网络干预肿瘤进程提供了新的分子交互范例。

细胞功能实验从表型层面验证了 KDM5A-TAF3 轴的关键作用, KDM5A 抑制剂可显著下调 TAF3 表达 ($P < 0.01$), 并抑制 HepG2 细胞增殖。相反, TAF3 过表达/敲低对细胞增殖的“逆转/强化抑制”效应, 直接证明 TAF3 是 KDM5A 调控肝细胞癌增殖的核心下游分子。这一结果为临床治疗提供了双重潜在靶点: 一方面, KDM5A 抑制剂有望通过阻断 TAF3 转录激活, 遏制肝癌细胞增殖, 为小分子药物研发提供方向; 另一方面, TAF3 的表达水平或可作为肝癌增殖活性的生物标志物, 辅助临床预后评估与治疗方案选择。尽管本研究在分子机制解析上取得突破, 但仍存在局限, 未来需深入探究 KDM5A-TAF3 轴与肝癌其它驱动通路 (如 PI3K-AKT、Wnt/β-catenin) 的交互作用, 拓展研究网络调控, 完善肝癌分子机

制图谱。

综上, 本研究系统阐明 KDM5A 通过转录激活 TAF3 驱动肝细胞癌增殖的分子机制, 为肝癌发病机理增添新的调控维度。KDM5A 与 TAF3 作为潜在治疗靶点, 有望推动肝细胞癌精准治疗的发展, 后续需围绕临床转化深入探索, 加速从基础研究到临床应用的跨越。

参考文献

- [1] Sung, H. , et al. , Global Cancer Statistics 200: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 2021. 71(3): p. 209–249.
- [2] Thompson, M. R. , D. Xu, and B. R. Williams, ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. J Mol Med (Berl), 2009. 87(11): p. 1053–60.
- [3] Pijnappel, W. P. , et al. , Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle. Proteome Sci, 2009. 7: p. 46.
- [4] Xu, Y. , et al. , TAF1 plays a critical role in AML1-ETO driven leukemogenesis. Nat Commun, 2019. 10(1): p. 4925.
- [5] Zhang, J. , et al. , TAF1 promotes NSCLC cell epithelial-mesenchymal transition by transcriptionally activating TGFβ 1. Biochem Biophys Res Commun, 2022. 636(Pt 2): p. 113–118.
- [6] Zhang, S. , et al. , Targeting TAF1 with BAY-299 induces antitumor immunity in triple-negative breast cancer. Biochem Biophys Res Commun, 2023. 665: p. 55–63.

基金项目: 天津市自然科学基金 (No: 23JCQNJC01540)

作者简介: 擅长疾病治疗新靶点及靶向干预探究

作者简介: (陈娜, 1989.11 出生年-), 性别, 女; 民族, 汉; 籍贯, 河南驻马店, 学位, 博士; 职位: 无; 职称, 助理研究员; 研究方向, 疾病治疗新靶点及靶向干预策略探究, 单位: 天津市第一中心医院

通信作者: 王政禄