

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.004

· 基础研究 ·

## miR-3612 靶向 SEMA4C 调控肝细胞癌细胞的恶性生物学行为

马思源<sup>1,2</sup>, 张博超<sup>2</sup>, 李贤锐<sup>3</sup>, 程新悦<sup>1</sup>, 浦春<sup>1</sup> (1. 皖南医学院 检验学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 皖南医学院第一附属医院 检验科, 安徽 芜湖 241001; 3. 皖南医学院 临床医学院, 安徽 芜湖 241000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-3612 靶向信号素 (SEMA)4C 对肝细胞癌细胞增殖与侵袭能力的影响。 **方法:** 收集 2020 年 5 月至 2021 年 9 月间在皖南医学院第一附属医院弋矶山医院手术切除的肝细胞肝癌的 40 对癌组织和相应癌旁组织, 常规培养肝细胞癌 Hep3B 和 Huh7 细胞, 将其分为对照组、miR-3612 mimics-NC 组、miR-3612 mimics 组、miR-3612 inhibitor-NC 组、miR-3612 inhibitor 组、si-NC 组、si-SEMA4C 组、mimics-NC+pcDNA-NC 组、miR-3612 mimics+pcDNA-NC 组和 miR-3612 mimics+pcDNA-SEMA4C 组, 用转染试剂将相应的核酸和质粒转染各组细胞。 qPCR 法检测 miR-3612 和 SEMA4C mRNA 在肝细胞癌组织和 Hep3B 和 Huh7 细胞中的表达, 双荧光素酶报告基因实验和免疫共沉淀 (RIP) 实验验证 miR-3612 与 SEMA4C 的结合及调控关系, qPCR 法和 WB 法检测转染后各组 Hep3B 和 Huh7 细胞中 miR-3612、SEMA4C mRNA 和蛋白的表达, CCK-8 法、细胞划痕实验和 Transwell 小室实验分别检测各组 Hep3B 和 Huh7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。 **结果:** miR-3612 在肝细胞癌组织和 Hep3B 和 Huh7 细胞中呈低表达 ( $P < 0.001$ ), 而 SEMA4C 则呈高表达 ( $P < 0.001$ ), 过表达 miR-3612 可抑制 Hep3B 和 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭和 vimentin、SEMA4C 蛋白的表达, 促进 E-cadherin 蛋白的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ), 敲低 miR-3612 则促进 Hep3B 和 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭和 SEMA4C 蛋白的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。 双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验证实 miR-3612 与 SEMA4C 可直接结合 ( $P < 0.001$ ), miR-3612 与 SEMA4C 的表达呈负相关也间接证明了这一点 ( $P < 0.001$ )。 敲减 SEMA4C 能明显抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移能力 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ), 过表达 SEMA4C 可逆转过表达 miR-3612 对 Hep3B 和 Huh7 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的抑制作用 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。 **结论:** miR-3612 通过调控 SEMA4C 表达影响 Hep3B 和 Huh7 细胞的恶性生物学行为, miR-3612 有望成为临床肝细胞癌治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 肝细胞癌; Hep3B 细胞; Huh7 细胞; miR-3612; 信号素 4C; 增殖; 侵袭; 迁移; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)03-0231-09

## miR-3612 regulates the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma cells via targeting SEMA4C

MA Siyuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Bochao<sup>2</sup>, LI Xianrui<sup>3</sup>, CHENG Xinyue<sup>1</sup>, PU Chun<sup>1</sup> (1. School of Laboratory Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China; 3. School of Clinical Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of miR-3612 targeting semaphorin (SEMA)4C on the proliferation and invasion ability of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** Forty pairs of cancerous tissues and corresponding paracancerous tissues of hepatocellular carcinoma that surgically resected at Yijishan Hospital, the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College between May 2020 and September 2021 were collected for this study. Hepatocellular carcinoma Hep3B and Huh7 cells were routinely cultured and divided into control group, miR-3612 mimics-NC group, miR-3612 mimics group, miR-3612 inhibitor-NC group, miR-3612 inhibitor group, si-NC group, si-SEMA4C group, mimics-NC+pcDNA-NC group, miR-3612 mimics+pcDNA-NC group, and miR-3612 mimics+pcDNA-SEMA4C group. The corresponding nucleic acids and plasmids were transfected into each group of cells with transfection reagents. qPCR assay was used to detect the mRNA expression of miR-3612 and SEMA4C in hepatocellular carcinoma tissues and Hep3B and Huh7 cells. Dual-luciferase reporter gene assay and RNA immunoprecipitation assay (RIP) were used to validate the binding and regulatory relationship between miR-3612 and SEMA4C. qPCR and WB assays were used to detect the mRNA and protein expression of miR-3612 and SEMA4C in Hep3B and Huh7 cells after transfection in each group. The proliferation, migration and invasion abilities of Hep3B and Huh7 cells were detected by CCK-8 assay, cell scratch assay and Transwell assay, respectively. **Results:** miR-3612 was

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (No. 81772180); 安徽省自然科学基金 (No. KJ2016A722)

**[作者简介]** 马思源 (1999—), 男, 硕士生, 检验师, 主要从事肿瘤标志物的研究。 E-mail: 823545914@qq.com

**[通信作者]** 浦春, E-mail: philipcpu@163.com

lowly expressed in hepatocellular carcinoma tissues and Hep3B and Huh7 cells ( $P<0.001$ ), whereas SEMA4C was highly expressed ( $P<0.001$ ). Overexpression of miR-3612 suppressed proliferation, migration, invasion, and expression of vimentin and SEMA4C proteins in Hep3B and Huh7 cells, promoted E-cadherin protein expression ( $P<0.05$  or  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ), and knockdown of miR-3612 promoted proliferation, migration, invasion and SEMA4C protein expression in Hep3B and Huh7 cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). Dual luciferase reporter gene assay and RIP assay confirmed that miR-3612 bound directly to SEMA4C ( $P<0.001$ ), as indirectly evidenced by the negative correlation between miR-3612 and SEMA4C expression ( $P<0.001$ ). Knockdown of SEMA4C significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of Hep3B and Huh7 cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ), and overexpression of SEMA4C reversed the inhibitory effect of miR-3612 overexpression on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of Hep3B and Huh7 cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$  or  $P<0.001$ ). **Conclusion:** miR-3612 affects the malignant biological behaviors of Hep3B and Huh7 cells by regulating SEMA4C expression, and it is expected to be a potential target for clinical hepatocellular carcinoma therapy.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; Hep3B cell; Huh7 cell; miR-3612; SEMA4C; proliferation; invasion; migration; epithelial mesenchymal transition

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(3): 231-239. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.03.004]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占肝癌病例的近 85%, 是全球第三大恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>, 在中国其发病率特别高<sup>[3-4]</sup>。因为大多数 HCC 在晚期才被诊断, 只有少数患者能获得根治性治疗的机会, 所以多数 HCC 患者的预后较差<sup>[5-6]</sup>。miRNA 是约 22 bp 的非编码 RNA, 能够调节 mRNA 的切割或抑制其翻译<sup>[7]</sup>, 每个 miRNA 可以靶向调节超过 200 种 mRNA<sup>[8]</sup>。多项研究<sup>[9-11]</sup>表明, miRNA 表达在各种癌症中表达异常, 异常表达的 miRNA 可调控各种相关分子的表达, 进而影响癌细胞的恶性生物学行为。一些肿瘤组织中 miRNA 呈低表达, 表明 miRNA 可能充当肿瘤抑制因子<sup>[12-14]</sup>。研究<sup>[15-17]</sup>发现, miR-3612 在鼻咽癌、乳腺癌、视网膜母细胞瘤等组织中呈低表达, 可抑制肿瘤细胞的发生发展。信号素 (semaphorin, SEMA) 最初作为轴突引导因子被发现, 现已被证明参与多种细胞过程和疾病发生发展, 而且与癌症患者的不良预后有关<sup>[18-19]</sup>。SEMA4C 是 IV 类 SEMA 成员, 近年来, SEMA4C 在癌症中的作用也越来越受到人们的重视<sup>[20]</sup>。研究发现, SEMA4C 能促进乳腺癌<sup>[21]</sup>、胰腺癌<sup>[22]</sup>、结肠癌<sup>[23]</sup>等癌症细胞的生长发展, 却鲜见其在肝癌中的报道。上皮间质转化 (EMT) 是上皮细胞向间质细胞转化的现象, 参与许多种生理、病理过程, 促进肿瘤的发生发展和肿瘤细胞的侵袭与转移<sup>[24-25]</sup>。研究发现, SEMA4C 在结直肠癌<sup>[26]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[27]</sup>、骨肉瘤<sup>[28]</sup>中起到促进 EMT 进程从而调控癌细胞的恶性生物学行为的作用。本研究探讨 miR-3612 是否通过靶向 SEMA4C 调控肝细胞癌细胞的恶性生物学行为, 为肝细胞癌的临床治疗提供潜在的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂与组织标本

人肝细胞癌细胞 Hep3B 和 Huh7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 人正常肝细胞 THLE-2

购自万物生物公司。胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司, DMEM 高糖培养基购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, Matrigel 基质凝胶购自上海 Biozellen 公司, miR-3612 引物、SEMA4C 引物、GAPDH 引物、U6 引物、miR-3612 mimics、miR-3612 inhibitor、si-SEMA4C 均购自通用生物 (滁州) 股份有限公司, pcDNA-SEMA4C、相应的阴性对照及转染试剂 riboFECT™ CP 均购自广州锐博生物技术有限公司, miRNA 逆转录 (miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit)、mRNA 逆转录 (FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix) 和 miRNA 定量 PCR (miRcute Plus miRNA qPCR Kit)、mRNA 定量 PCR (SuperReal PreMix Plus) 试剂盒均购自天北京天根生化科技有限公司, RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒购自美国马萨诸塞州 Magna 公司, RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、TRIzol 试剂、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 均购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗人 SEMA4C 单克隆抗体购自 Proteintech 公司, 兔抗人 E-cadherin、vimentin 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体均购自 Affinity 公司。

收集 2020 年 5 月至 2021 年 9 月间在皖南医学院第一附属医院弋矶山医院确诊为肝细胞性肝癌的组织样本 40 对 (癌组织和癌旁组织), 其中男性 23 例、女性 17 例; 年龄 37~79 岁, 中位年龄 68 岁; 高分化 4 例、中分化 19 例、低分化 17 例; 癌转移 6 例, 未转移 34 例。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他抗癌治疗。所有肝癌样本均经过组织病理检查确诊为肝细胞肝癌。所有患者和家属均充分知情并签署知情同意书, 本研究方案经所在医院医学伦理委员会审查批准 (No. 2020 伦审研第 21 号)。

### 1.2 细胞培养、转染与分组

Hep3B、Huh7 和 THLE-2 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。取生长状态良好的 Hep3B、Huh7 细胞, 以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 24 h 后, 按照 riboFECT™ CP 试剂说

说明书, 将 miR-3612 mimics、miR-3612 inhibitor、si-SEMA4C、pcDNA-SEMA4C 及相应的阴性对照转染 Hep3B、Huh7 细胞, 设置空白对照, 将其分别记为对照组、mimics 组、mimics-NC 组、inhibitor 组、inhibitor-NC 组、si-SEMA4C 组、SEMA4C-NC 组、pcDNA-SEMA4C 组和 pcDNA-NC 组。培养 48 h 后进行后续实验。每组均设 3 个复孔。

### 1.3 细胞中总 RNA 的提取、逆转录和荧光定量 PCR

用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 分光光度法确定提取总 RNA 的纯度。使用逆转录试剂盒逆转录总 RNA 得到 cDNA, 再用 qPCR 试剂盒进行荧光定量检测。miRNA 的 qPCR 反应参数: 95 °C 15 min, 94 °C 20 s、60 °C 34 s, 共 45 个循环。mRNA 的 qPCR 反应参数: 95 °C 15 min, 95 °C 10 s、60 °C 20 s, 共 45 个循环。以 GAPDH 或 U6 为内参基因, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相应目的基因的相对表达水平。每种样品设置 3 个复管。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物扩增序列

基因名称	序列(5'-3')
miR-3612-F	AGGAGGCATCTTGAGAAATGGA
U6-F	CGCTTCGGCACATATAC
SEMA4C-F	ACCTGTGCCGCGTAAGACAG
SEMA4C-R	CGTCAGCGTCAGTGTGAGGAA
GAPDH-F	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
GAPDH-R	GTGTCGCTGTTGAAGTCAGAG

### 1.4 WB 法检测各组细胞中 SEMA4C、E-cadherin 和 vimentin 蛋白的表达

用 RIPA 裂解缓冲液裂解各组细胞提取其总蛋白质, 用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定每个样品总蛋白浓度, 用 SDS-PAGE 分离蛋白样本并电转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶室温下封闭 1 h, 与一抗稀释液 [兔抗人 SEMA4C (1:1 000 稀释)、E-cadherin (1:2 000 稀释)、vimentin (1:2 000 稀释) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:1 000 稀释)] 4 °C 下处理过夜, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 (1:1 000 稀释) 室温处理 2 h, ECL 化学发光液显色, 在成像仪上观察、拍照。以  $\beta$ -actin 为内参, 采用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

### 1.5 CCK-8 法检测各组细胞的增殖能力

取对数生长期的 Hep3B、Huh7 细胞 ( $5 \times 10^3$  个/孔) 接种到 24 孔板中, 每组 3 个重复孔, 培养至第 0、1、2、3 天时, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 37 °C 继续培养 1 h 后, 用酶标仪在 450 nm 波长处测量每孔的光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖活力。

### 1.6 细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力

按方法 1.2 处理的各组细胞的汇合度达到 100% 时, 进行划痕实验, 用 100  $\mu$ L 吸头在每个孔的中间垂直划两条直线, 用 PBS 缓冲液冲洗掉细胞碎片, 每孔加入 2 mL 毫升含 1% 胎牛血清的培养液, 然后将 6 孔板放回培养箱中继续培养, 在 0、24 和 48 h 时在相同部位观察、拍照。划痕愈合率 = (0 h 划痕距离 - 24 或 48 h 划痕距离) / 0 h 划痕距离  $\times$  100%。每组设置 3 个复孔。

### 1.7 细胞侵袭实验检测各组细胞的侵袭能力

在 Transwell 上室铺上 Matrigel 基质凝胶, 用 DMEM 培养基将细胞密度稀释至  $1 \times 10^5$  个/mL, 在上室加入 200  $\mu$ L 的细胞悬液, 在下室加入 800  $\mu$ L 含 10% FBS 培养液后, 按方法 1.2 处理细胞, 在培养箱中培养 24 h, 吸弃培养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 4% 多聚甲醛处理 30 min, 加入紫晶体染色液室温处理 20 min, PBS 冲洗 3 次, 用棉签擦拭掉未侵袭的细胞, 在显微镜下对穿膜细胞进行观察、计数和拍照。

### 1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-3612 与 SEMA4C 的靶向关系

取对数生长期的 Hep3B 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 24 孔板, 确保转染时细胞汇合度达到 70%~80%, 用 lipofectamine 试剂将 SEMA4C-WT 质粒、SEMA4C-MUT 质粒分别与 miR-3612 mimics、mimics-NC 共转染至 Hep3B 细胞中, 记为 SEMA4C-WT+miR-3612 mimics 组、SEMA4C-WT+mimics-NC 组、SEMA4C-MUT+miR-3612 mimics 组、SEMA4C-MUT+mimics-NC 组, 48 h 后检测荧光素酶活性强度。每组检测设置 3 个复孔。

### 1.9 RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 法验证 miR-3612 与 SEMA4C 的结合关系

按照制造商的说明, 使用 RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒进行 RIP 检测。使用 RIP 裂解液在冰上裂解 Hep3B、Huh7 细胞, 在离心管中制备磁珠-抗体混合液, 然后在磁架上除去上清液, 在每个管中加入 900  $\mu$ L RIP 免疫沉淀缓冲液, 将 100  $\mu$ L 细胞裂解上清液移入上一步的磁珠-抗体复合液中, 然后在 4 °C 下处理 3 h。每组样品都在上一步的磁珠-抗体复合液中处理。向每组样品中加入 150  $\mu$ L 蛋白酶 K 缓冲液重悬上述磁珠-抗体复合液, 然后在 55 °C 下处理 30 min, 吸取上清液提取 RNA。纯化后的 RNA 用于 qPCR 检测。

### 1.10 统计学处理

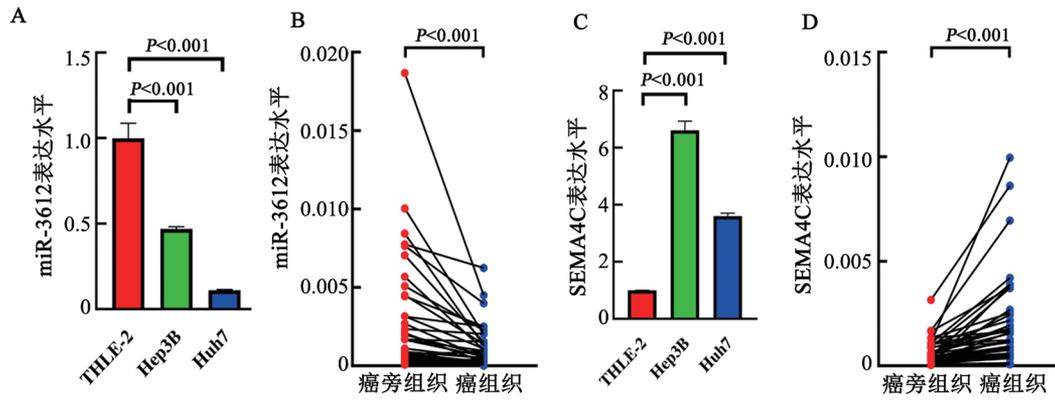
所有实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 24.0、GraphPad Prism 8.02 统计学软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-3612 在肝细胞癌细胞、组织中呈低表达而 SEMA4C mRNA 呈高表达

qPCR 法检测结果显示,与正常肝细胞 THLE-2

或癌旁组织比较,miR-3612 在 Hep3B、Huh7 细胞和肝细胞癌组织中均呈低表达(图 1A、B)(均  $P<0.001$ ),而 SEMA4C 在 Hep3B、Huh7 细胞和肝细胞癌组织中均呈高表达(图 1C、D)(均  $P<0.001$ )。



A、B:miR-3612 在肝细胞癌细胞、组织和正常肝细胞、组织中的表达水平; C、D:SEMA4C 在肝细胞癌细胞、组织和正常细胞、组织中的表达水平。

图1 miR-3612、SEMA4C 在肝细胞癌组织和细胞中的表达情况

### 2.2 过表达 miR-3612 可显著抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

qPCR 法检测结果显示(图 2A)显示,与 mimics-NC 组相比, mimics 组 Hep3B、Huh7 细胞中 miR-3612 的表达水平均显著升高(均  $P<0.001$ );与 inhibitor-NC 组相比, inhibitor 组 Hep3B、Huh7 细胞中 miR-3612 的表达水平均显著降低(均  $P<0.001$ ),与各自的对照组比较, mimic-NC 和 inhibitor-NC 组 Hep3B、Huh7 细胞中 miR-3612 表达水平相比没有明显变化。实验结果说明,在 Hep3B、Huh7 细胞中成功地过表达或敲减了 miR-3612。CCK-8 法、细胞划痕实验和侵袭实验检测结果(图 2B、C、D)显示,与 mimics-NC 组相比, mimics 组 Hep3B、Huh7 细胞的增殖能力、迁移和侵袭能力均明显降低( $P<0.05$ 、 $P<0.01$  或  $P<0.001$ );与 inhibitor-NC 组相比, inhibitor 组 Hep3B、Huh7 细胞的增殖能力、迁移和侵袭能力均显著升高( $P<0.05$ 、 $P<0.01$  或  $P<0.001$ ),各自的对照组的增殖、迁移和侵袭能力与 mimic-NC 和 inhibitor-NC 组相比没有明显变化。实验结果说明,过表达 miR-3612 可抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,敲减 miR-3612 则可促进其增殖、迁移和侵袭能力。

### 2.3 miR-3612 可与 SEMA4C 结合并调节其在 Hep3B、Huh7 细胞中的表达

为了寻找 miR-3612 的下游靶基因,将 starBase、miRmap 和 miRwalk 三个数据库的预测结果进行交叉,找到了 SEMA4C(图 3A)。ENCORI 数据库分析

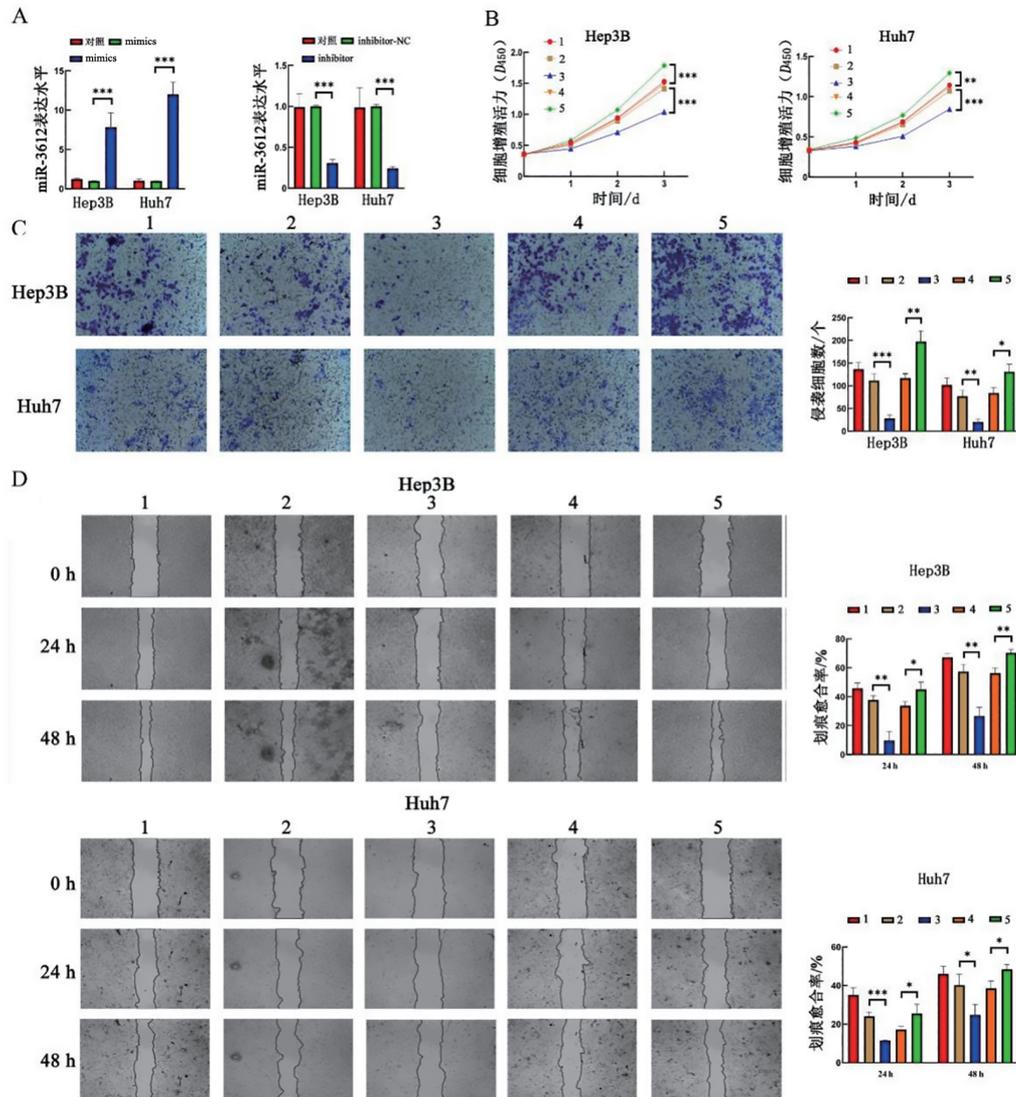
发现,miR-3612 与 SEMA4C mRNA 存在互补结合位点(图 3B)。双荧光素酶报告基因检测结果(图 3C)显示,与 SEMA4C-WT+mimics-NC 组相比, SEMA4C-WT+miR-3612 mimics 组 Hep3B、Huh7 细胞中的荧光素酶活性均明显降低(均  $P<0.001$ );与 SEMA4C-MUT+mimics-NC 组比较, SEMA4C-MUT+miR-3612 mimics 组 Hep3B、Huh7 细胞中的荧光素酶活性无明显变化。RIP 实验检测结果(图 3D)显示,相对于 IgG 对照组,miR-3612 和 SEMA4C 在含有 AGO2 的微核蛋白复合物中明显富集( $P<0.001$ )。利用 miR-3612 和 SEMA4C 的表达构建的相关曲线显示,它们的表达之间呈现负相关关系(图 3E)。qPCR 和 WB 法检测结果(图 3F、G)显示,与 mimics-NC 组相比, mimics 组 SEMA4C 的 mRNA 和蛋白水平下降( $P<0.05$ 、 $P<0.01$  或  $P<0.001$ );与 inhibitor-NC 组相比, inhibitor 组 SEMA4C mRNA 和蛋白水平升高( $P<0.05$ 、 $P<0.01$  或  $P<0.001$ ),上述实验结果表明,miR-3612 可与 SEMA4C 直接结合,且 miR-3612 可调控 Hep3B、Huh7 细胞中 SEMA4C 的表达。

### 2.4 敲减 SEMA4C 能明显抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移能力

qPCR、WB 法检测结果(4A、B)显示,与 si-NC 组相比, si-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 细胞中 SEMA4C mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ),实验结果说明,在 si-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 细胞中成功地敲减了 SEMA4C mRNA、蛋白的

表达。CCK-8 法检测结果(图4C)显示,与 si-NC 组相比, si-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 的细胞增殖能力均明显降低(均  $P < 0.001$ )。划痕实验和侵袭实验检测结果(4D、4E)显示,与 si-NC 组相比, si-SEMA4C

组 Hep3B、Huh7 细胞的侵袭、迁移能力均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。实验结果说明,敲减 SEMA4C 能明显抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。



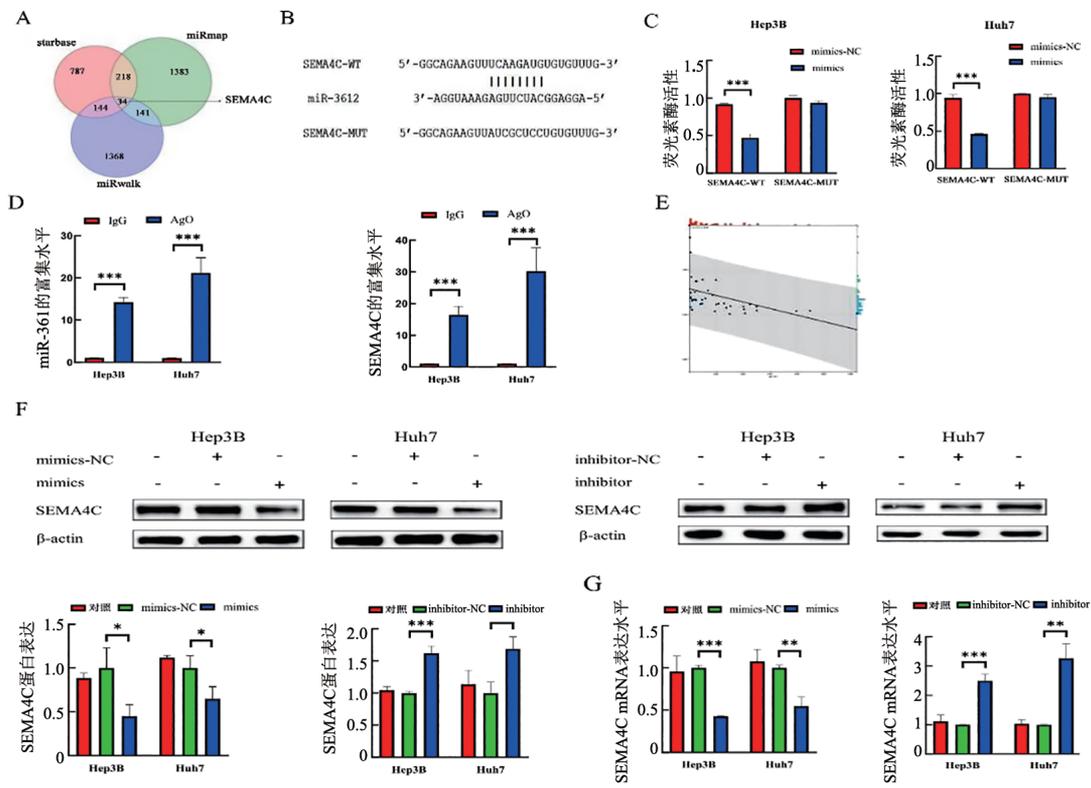
A~D: qPCR 法(A)、CCK-8 法(B)、Transwell 小室实验(C)和细胞划痕实验(D)检查各组 Hep3B、Huh7 细胞中 miR-3612 mRNA 的表达、增殖能力、侵袭能力。1: 对照组; 2: mimics-NC 组; 3: mimics 组; 4: inhibitor-NC 组; 5: inhibitor 组。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图2 过表达和敲减 miR-3612 对 Hep3B、Huh7 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

### 2.5 miR-3612 抑制 Hep3B、Huh7 小细胞中 SEMA4C 表达进而抑制肝细胞增殖、迁移、侵袭

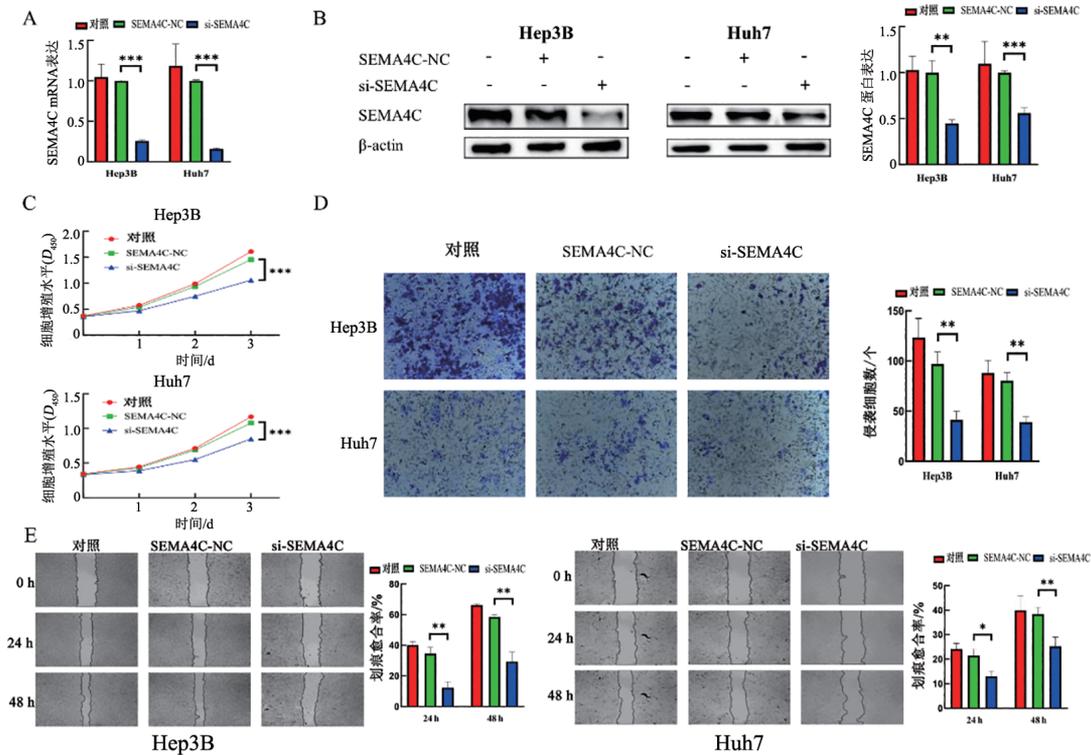
qPCR、WB 法检测结果(图 5A、B)显示,与对照组或 mimics-NC+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-NC 组 Hep3B、Huh7 细胞中 SEMA4C mRNA、蛋白水平均明显降低(均  $P < 0.001$ ); 与 mimics+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 细胞中 SEMA4C mRNA、蛋白水平均明显升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。实验结果说明,单独过表达 miR-3612 可抑制 Hep3B 和 Huh7 细胞中 SEMA4C mRNA 和蛋白的表达,而同时过表达 miR-3612 和 SEMA4C 则可使

SEMA4C mRNA 和蛋白的表达有所恢复。CCK-8 法、Transwell 小室实验和细胞划痕实验检测结果(图 5C~E)显示,与对照组或 mimics-NC+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-NC 组 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均明显降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ); 与 mimics+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、侵袭和迁移能力均明显升高( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。WB 法检测结果(图 5F)显示,与对照组或 mimics-NC+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-NC 组 Hep3B、Huh7 细胞中 E-cadherin 表达显著增高, vimentin 表达显著降低( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或



A: 用 starBase、miRmap 和 miRwalk 共同预测 miR-3162 的下游靶基因; B: miR-3162 与 SEMA4C 的结合位点; C: 荧光素酶报告基因实验验证 miR-3162 与 SEMA4C 的靶向结合关系; D: RIP 实验进一步显示 miR-3162 与 SEMA4C 的靶向结合关系; E: miR-3162 与 SEMA4C 表达的相关曲线; F、G 各组 Hep3B、Huh 细胞中 SEMA4C 蛋白(F)和 mRNA(G)表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图3 双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验验证 miR-3162 与 SEMA4C 的结合关系

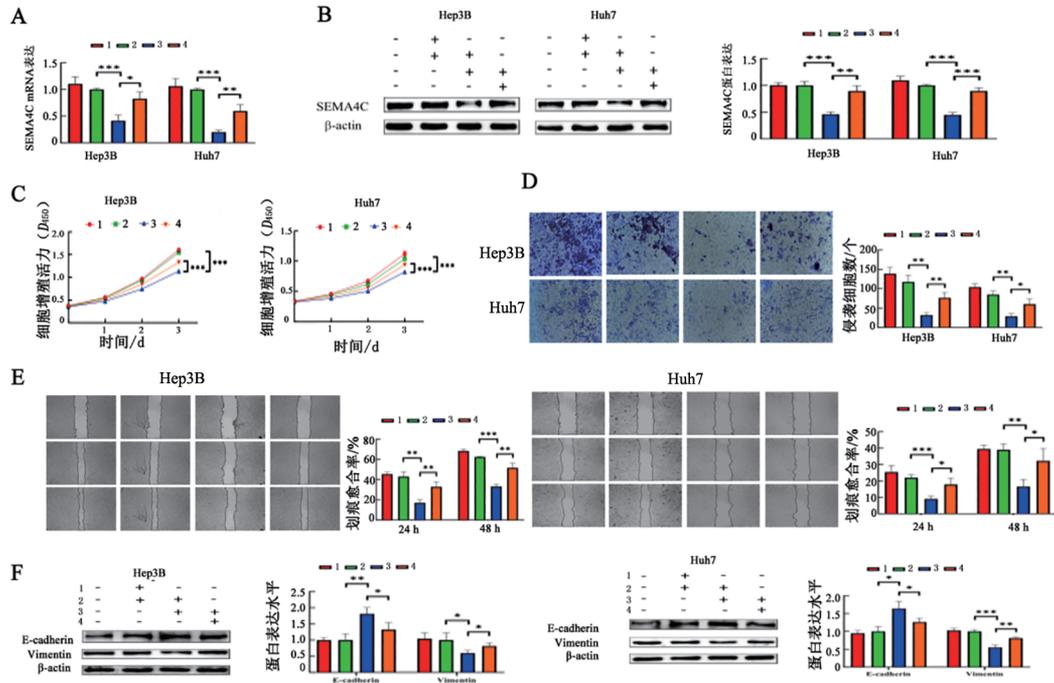


A: 各组细胞的 SEMA4C 的 mRNA 表达水平; B: 各组细胞的 SEMA4C 的蛋白表达水平; C: 各组细胞的增殖能力; D: 各组细胞的迁移能力; E: 各组细胞的侵袭能力。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图4 细胞转染 si-NC、si-SEMA4C 后各组细胞的增殖、迁移和侵袭能力

$P < 0.001$ ); 而与 mimics+pcDNA-NC 组相比, mimics+pcDNA-SEMA4C 组 Hep3B、Huh7 细胞中 E-cadherin 表达显著降低, vimentin 表达显著增高 ( $P < 0.05$  或

$P < 0.01$ )。这部分实验结果说明, miR-3612 可能通过抑制 SEMA4C 的表达, 进而抑制 Hep3B、Huh7 细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程。



A、B: qPCR法(A)和WB(B)法检测单独过表达miR-3612或同时过表达miR-3612和SEMA4C各组Hep3B、Huh7细胞中SEMA4C mRNA和蛋白表达水平; C、D、E、F: CCK-8法、Transwell小室实验( $\times 200$ )、细胞划痕实验( $\times 100$ )和WB法检测各组Hep3B、Huh7细胞的增殖活力、侵袭、迁移能力以及EMT相关蛋白的表达。1: 对照组; 2: mimics-NC+pcDNA-NC; 3: mimics+pcDNA-NC; 4: mimics+pcDNA-SEMA4C。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图5 miR-3612通过调控SEMA4C的表达进而抑制Hep3B、Huh7细胞的恶性生物学行为  
增殖、迁移、侵袭能力以及EMT相关蛋白的表达

### 3 讨论

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 病死率很高, 对人类健康造成了巨大的威胁<sup>[29]</sup>。肝细胞癌中miRNA失调增加了对其理解的难度, 但也为诊断、治疗肝细胞癌提供了有前途的新方法<sup>[30]</sup>。miR-3612在多种肿瘤中呈低表达, 且对肿瘤细胞的发生发展起抑制作用, 比如CHANG等<sup>[31]</sup>发现, miR-3612通过靶向调节DTL对鼻咽癌产生抑制作用, WANG等<sup>[32]</sup>和TANG等<sup>[33]</sup>的研究也发现, miR-3612通过结合mRNA对黑色素瘤和食管鳞状细胞癌产生抑制作用。本研究通过qPCR检测发现, miR-3612在肝细胞癌细胞和肝细胞癌组织中都呈低表达, 实验也证实了miR-3612可以抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

本研究通过多数据库联合筛选出miR-3612的下游靶基因SEMA4C, SEMA4C在多种癌症中表达显著上调并且可以促进癌细胞的发生发展。YANG等<sup>[34]</sup>发现, SEMA4C促进了紫杉醇耐药乳腺癌细胞的

运动性和侵袭性, 并且调节了细胞EMT; ZHANG等<sup>[35]</sup>也发现, SEMA4C可以促进结直肠癌和非小细胞肺癌的增殖、迁徙和侵袭, 且其受miR-25-3p的调控。本研究通过双荧光素酶报告实验和RIP实验发现, miR-3612与SEMA4C之间可能存在直接调控位点, 在肝细胞癌细胞中过表达miR-3612可抑制SEMA4C的表达, 且在肝癌组织中miR-3612与SEMA4C的表达呈现负相关趋势, 这也间接说明了二者之间的靶向调控关系。本研究还发现, 敲减SEMA4C可以抑制肝细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 通过回复实验发现过表达SEMA4C可以逆转过表达miR-3612对肝细胞癌细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用, 这也充分说明了miR-3612与SEMA4C在肝细胞癌细胞中的确存在相互作用。由于SEMA4C在多种肿瘤中通过影响EMT来调节癌细胞的发生发展, 例如YANG等<sup>[36]</sup>发现, SEMA4C下调可通过抑制转化生长因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ )诱导的HeLa细胞p38丝裂原活化, 从而抑制EMT以及宫颈癌细胞的侵袭和

转移; LIU 等<sup>[37]</sup>也发现, miR-138 靶向 SEMA4C 对乳腺癌细胞 EMT 和侵袭的影响。本研究发现, 过表达 miR-3612 可抑制 SEMA4C 的表达和肝细胞癌细胞的恶性生物学行为 EMT 进程, 而同时过表达 miR-3612 和 SEMA4C 可以逆转上述作用。

总之, miR-3612 在肝细胞癌细胞中可以通过靶向调节 SEMA4C 的表达达到影响肝细胞癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程, miR-3612 有望成为临床治疗肝细胞癌的诊断标志物和潜在靶点。

## [参考文献]

- [1] ALSHUWAYKH O, DAUGHERTY T, CHEUNG A, *et al.* Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection in those not meeting criteria for antiviral therapy[J]. *Hepatol Commun*, 2022, 6(11): 3052-3061. DOI: 10.1002/hep4.2064.
- [2] LLOVET J M, ZUCMAN-ROSSI J, PIKARSKY E, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16018[2023-12-01]. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18.
- [3] LI D D, ZHANG J W, LI J M. Role of miRNA sponges in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 500: 10-19. DOI: 10.1016/j.cca.2019.09.013.
- [4] HUANG Q, TAN Y X, YIN P Y, *et al.* Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 4992-5002. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0308.
- [5] DER STROTH L I, THAREHALLI U, GÜNES C, *et al.* Telomeres and telomerase in the development of liver cancer[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2048[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32722302/>. DOI: 10.3390/cancers12082048.
- [6] DELIRE B, STÄRKEL P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications[J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45(6): 609-623. DOI: 10.1111/eci.12441.
- [7] CAI Y M, YU X M, HU S N, *et al.* A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2009, 7(4): 147-154. DOI: 10.1016/S1672-0229(08)60044-3.
- [8] HAN T S, BAN H S, HUR K, *et al.* The epigenetic regulation of HCC metastasis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3978[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30544763/>. DOI: 10.3390/ijms19123978.
- [9] WEN L Q, LI Y R, JIANG Z P, *et al.* MiR-944 inhibits cell migration and invasion by targeting MACC1 in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3415-3422. DOI: 10.3892/or.2017.5611.
- [10] LIANG H W, FU Z, JIANG X Y, *et al.* MiR-16 promotes the apoptosis of human cancer cells by targeting FEAT[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 448[2023-12-01]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1458-8>. DOI: 10.1186/s12885-015-1458-8.
- [11] MCCANN J V, XIAO L, KIM D J, *et al.* Endothelial miR-30c suppresses tumor growth via inhibition of TGF- $\beta$ -induced serpine1[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(4): 1654-1670. DOI: 10.1172/jci123106.
- [12] MANVATI M K S, KHAN J, VERMA N, *et al.* Association of miR-760 with cancer: an overview[J/OL]. *Gene*, 2020, 747: 144648 [2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32251703/>. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144648.
- [13] CHAUHAN N, DHASMANA A, JAGGI M, *et al.* miR-205: a potential biomarker for cancer therapy[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(9): 1957[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32854238/>. DOI: 10.3390/cells9091957.
- [14] ZHANG L, LIAO Y, TANG L L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 53[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30717802/>. DOI: 10.1186/s13046-019-1059-5.
- [15] ZHANG W, ZHANG Q, CUI Q B, *et al.* miR-3612 targeting THBS1 suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by PI3K/AKT signaling pathway[J/OL]. *Hum Exp Toxicol*, 2023, 42: 9603271221150248[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36607163/>. DOI: 10.1177/09603271221150248.
- [16] GAO Z X, ZHENG G, GONG X J, *et al.* lncRNA MAFG-AS1 deregulated in breast cancer affects autophagy and progression of breast cancer by interacting with miR-3612 and FKBP4 invitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 616: 95-103. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.05.020.
- [17] AI K, NI W C, LI Z. lncRNA ZFPM2-AS1 enhances retinoblastoma development by targeting the miR-3612/NT5E signaling axis[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2022, 32(6): 69-82. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2022042697.
- [18] HUNG Y H, LAI M D, HUNG W C, *et al.* Semaphorin 4C promotes motility and immunosuppressive activity of cancer cells via CRMP3 and PD-L1[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(2): 713-728.
- [19] SMEESTER B A, SLIPEK N J, POMEROY E J, *et al.* SEMA4C is a novel target to limit osteosarcoma growth, progression, and metastasis[J]. *Oncogene*, 2020, 39(5): 1049-1062. DOI: 10.1038/s41388-019-1041-x.
- [20] SHENG J J, JIANG B X, SHI R J, *et al.* Sema4C is required for vascular and primary motor neuronal patterning in zebrafish[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(16): 2527[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36010604/>. DOI: 10.3390/cells11162527.
- [21] GURRAPU S, PUPO E, FRANZOLIN G, *et al.* Sema4C/PlexinB2 signaling controls breast cancer cell growth, hormonal dependence and tumorigenic potential[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(7): 1259-1275. DOI: 10.1038/s41418-018-0097-4.
- [22] FEI X, JIN H Y, GAO Y, *et al.* hsa-miR-10a-5p promotes pancreatic cancer growth by BDNF/SEMA4C pathway[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3): 927-934. DOI: 10.23812/20-61-A-47.
- [23] HUANG Y D, BAI Q Y, YU H B, *et al.* circ-POLA2-mediated miR-138-5p/SEMA4C axis affects colon cancer cell activities[J]. *Acta Biochim Pol*, 2023, 70(3): 517-523. DOI: 10.18388/abp.2020\_6457.
- [24] LU J R, SHENOY A K. Epithelial-to-pericyte transition in cancer[J/OL]. *Cancers*, 2017, 9(7): 77[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28677655/>. DOI: 10.3390/cancers9070077.
- [25] BANYARD J, BIELENBERG D R. The role of EMT and MET in cancer dissemination[J]. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(5): 403-413. DOI: 10.3109/03008207.2015.1060970.
- [26] HOU Y F, WANG W Q, ZENG Z F, *et al.* High SEMA4C expression promotes the epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in colorectal carcinoma[J]. *Aging*, 2020, 12(21): 21992-22018. DOI: 10.18632/aging.104038.

- [27] LI J F, WANG Q R, WEN R L, *et al.* miR-138 inhibits cell proliferation and reverses epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by targeting GIT1 and SEMA4C[J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2015, 19(12): 2793-2805. DOI: 10.1111/jcmm.12666.
- [28] FENG T Y, ZHU Z K, JIN Y Q, *et al.* The microRNA-708-5p/ZEB1/EMT axis mediates the metastatic potential of osteosarcoma[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 491-502. DOI: 10.3892/or.2019.7452.
- [29] HUANG J Q, WU Q L, GELLER D A, *et al.* Macrophage metabolism, phenotype, function, and therapy in hepatocellular carcinoma (HCC) [J/OL]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 815[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37968714/>. DOI: 10.1186/s12967-023-04716-0.
- [30] WANG Y, LEE C G L. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention?[J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 235-243. DOI: 10.2217/epi.11.5.
- [31] CHANG X J, JIAN L. lncRNA ZFPM2-AS1 drives the progression of nasopharyngeal carcinoma *via* modulating the downstream miR-3612/DTL signaling[J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(6): 523-533. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001282.
- [32] WANG K, LI M, ZHANG T, *et al.* LINC01116 facilitates melanoma progression *via* sequestering miR-3612 and up-regulating GDF11 and SDC3[J]. *Arch Med Res*, 2022, 53(1): 44-50. DOI: 10.1016/j.arcmed.2021.06.008.
- [33] TANG R Z, ZHOU Q, XU Q H, *et al.* Circular RNA circ\_0006948 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating microRNA-3612/LASP1 axis[J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(6): 2158-2172. DOI: 10.1007/s10620-021-07057-4.
- [34] YANG Q L, WANG Y Y, LU X H, *et al.* miR-125b regulates epithelial-mesenchymal transition *via* targeting Sema4C in paclitaxel-resistant breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3268-3279. DOI: 10.18632/oncotarget.3065.
- [35] ZHANG M Y, JIANG X, JIANG S M, *et al.* LncRNA FOXD2-AS1 regulates miR-25-3p/Sema4c axis to promote the invasion and migration of colorectal cancer cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10633-10639. DOI: 10.2147/CMAR.S228628.
- [36] YANG L L, YU Y Y, XIONG Z F, *et al.* Downregulation of SEMA4C inhibit epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the invasion and metastasis of cervical cancer cells *via* inhibiting transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced HeLa cells p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e918123[2023-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31951596/>. DOI: 10.12659/MSM.918123.
- [37] LIU H J, YE H, LI X Z. Effect of microRNA-138 on epithelial-Mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells by targeting semaphorin 4C[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10117-10125. DOI: 10.1080/21655979.2021.2000733.

[收稿日期] 2023-12-05

[修回日期] 2024-02-15

[本文编辑] 向正华