

## • 论 著 •

## miR-21-5p 过表达对宫颈癌细胞功能的影响研究

沈亲亲, 赵玲军, 吕一帆, 郑晨旻, 张伟峰, 王毅军

**【摘要】目的** 构建过表达 miR-21-5p 宫颈癌 siHa 及 C33A 稳转细胞株, 探讨过表达 miR-21-5p 对宫颈癌细胞增殖及侵袭的影响。**方法** 构建具有嘌呤霉素抗性的 miR-21-5p 慢病毒载体, 体外培养宫颈癌细胞系 siHa 及 C33A, 加入浓度梯度的嘌呤霉素溶液, 筛选出最佳浓度。慢病毒转导 72 h 后, 通过荧光显微成像技术定量分析绿色荧光蛋白的阳性表达细胞比例, 进而评估病毒转导效率; 体外实验使用 PCR 检测 miR-21-5p 在稳转株的表达, MTT 实验检测细胞增殖情况, Transwell 实验检测细胞侵袭能力的变化。**结果** 成功构建重组慢病毒载体, 转入 pCDH-miR-21-5p 的细胞相对于转入 pCDH-control 的细胞, miR-21-5p mRNA 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), miR-21-5p 过表达组细胞增殖和侵袭能力均高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在宫颈癌细胞中 miR-21-5p 的过表达可以促进癌细胞的增殖和侵袭能力。

**【关键词】** 宫颈肿瘤; 癌; 慢病毒载体; miR-21-5p; 细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.06.004

**【中图分类号】** R711.74 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)06-0561-04

### The effect of overexpressing miR-21-5p on the proliferation and invasion of cervical cancer cells

SHEN Qingqing, ZHAO Lingjun, LYU Yifan, ZHENG Chengyang, ZHANG Weifeng, WANG Yijun (Women and Children's Hospital of Ningbo University, 315010 Ningbo, Zhejiang, China)

**【Abstract】Objective** To construct stable cell lines of cervical cancer siHa and C33A, and investigate the effect of overexpressing miR-21-5p on the proliferation and invasion of cervical cancer cells. **Methods** Construct miR-21-5p lentiviral vectors with puromycin resistance, and cultivate cervical cancer cell lines siHa and C33A in vitro, add puromycin solution with concentration gradient to screen for the optimal concentration. The expression of green fluorescent protein (EGFP) was detected by fluorescence microscope after transfection seventy-two hours; the expression of miR-21-5p in stable transgenic strains was detected by PCR; the cell proliferation was detected by MTT assay, while Transwell assay was used to detect changes in cell invasion ability. **Results** A recombinant lentiviral vector was successfully constructed. The relative expression level of miR-21-5p mRNA in the miR-21-5p group was significantly higher than that in the blank control group ( $P < 0.05$ ), and the cell proliferation and invasion ability of miR-21-5p group were higher than those of blank control group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Overexpression of miR-21-5p could promote the proliferation and invasion ability of cervical cancer cells.

**【Key words】** Cervical neoplasm; Carcinoma; Lentiviral vector; miR-21-5p; Cell proliferation

[Modern Practical Medicine, 2025, 37(6): 561-564]

宫颈癌治疗手段包括手术、放疗和化疗。研究显示<sup>[1]</sup>, 新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NACT) 联合同步放化疗 (concurrent chemoradiotherapy, CCRT) 可明显改善局部晚期宫颈癌患者 3 及 5 年总生存期和无病生存期。笔者团队利用芯片筛选出宫颈癌 NACT (紫杉醇联合卡铂) 敏感组及耐药组差异表达的

微核糖核酸 (microRNA, miRNA)<sup>[2-3]</sup>, 显示 miR-21-5p 在耐药组中表达上调。以往研究表明, miR-21-5p 参与了许多癌症的调控, 并参与了许多重要的生物学过程, 包括细胞增殖、迁移和侵袭, 如肝癌、肾透明细胞癌和直肠癌<sup>[4-6]</sup>。本研究拟构建过表达 miR-21-5p 的宫颈癌稳转细胞株, 来观察 miR-21-5p 对体外培养宫颈癌细胞增殖及侵袭能力的影响, 现报道如下。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2020KY877)

作者单位: 315010 宁波, 宁波大学附属妇女儿童医院

通信作者: 王毅军, Email: 395848265@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 宫颈癌细胞株 siHa、C33A 及 293T 细胞

均购自美国 ATCC 生物标准品资源中心;胰酶和胎牛血清均为 GIBCO 公司产品,紫杉醇、卡铂购自上海源叶生物科技有限公司;SYBR Green mix(杭州新景生物试剂开发有限公司)、pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP-T2A-Puro 质粒(武汉淼灵生物科技有限公司)、限制性内切酶 EcoRI 和 Bam HI (NEB 公司)、T4 连接酶(NEB 公司)、质粒小抽试剂盒(QIAGEN 公司)及胶回收试剂盒(TIANGEN 公司)。转染试剂为罗氏公司(Roche)的 Xtreme,MTT 为 Amersco 公司产品。主要设备:PCR 仪(BIORAD 公司)、孵育器(COYOTE 公司)及 Nano drop(Thermo Scientific 公司),倒置荧光显微镜为 Olympus IX 70,酶标仪为 MD 公司产品,荧光定量 PCR 仪为 ABI 7500 Fast。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 siHa 及 C33A 在含 10%热灭活胎牛血清(FBS)的 DMEM 完全培养基中常规培养,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度环境。0.25%胰酶消化细胞,用含 10%二甲基亚砜(DMSO)及 90%血清的冻存液冻存细胞。

1.2.2 引物的设计与合成 根据 miR-21-5p 序列,结合 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP-T2A-Puro 质粒载体的特点,并根据酶切位点设计引物(Sangon Biotech)。F: 5'-G (GAATTC) CTTGCCGTTCTGTAA-GTGTT-3' (括号部分为 EcoR I 酶切位点);R: 5'-CG (GGATCC) AAATCCTCCCTCCATACTGC-3' (括号部分为 BamHI 酶切位点)。

1.2.3 PCR 扩增 以含有 miR-21-5p 序列的 DNA 作为反应模板进行 PCR 扩增。具体反应条件如下:首先在 94℃条件下进行 5 min 的预变性处理;接着进入循环阶段,每个循环包括 95℃变性 15 s、58℃退火 30 s、72℃延伸 40 s,如此循环 30 次;循环结束后,在 72℃条件下再延长 3 min 进行充分延伸;最后将产物置于 4℃环境保存。PCR 扩增结束后,采用 1%琼脂糖凝胶电泳对扩增片段进行分离和纯化,然后回收目的片段。

1.2.4 慢病毒载体的构建和鉴定 (1)片段获取。使用 BamHI 和 EcoRI 两种限制性内切酶对纯化后的 PCR 产物进行双酶切处理,酶切完成后对产物进行纯化,从而得到 miR-21-5p 片段。(2)载体酶切。同样对 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP-T2A-Puro 空

载体进行双酶切,使载体线性化。(3)连接反应。将纯化后的 PCR 产物(miR-21-5p 片段)与酶切后线性化的载体,在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应,反应在 16℃条件下过夜。(4)转化培养。将连接产物转化至 Stbl3 感受态细胞中,然后均匀涂布在含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,于 37℃条件下培养过夜。(5)菌落 PCR 鉴定。从平板上选取少许菌落,将其溶于 LB 培养液中。取 1 μl 菌液作为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:先在 94℃预变性 2 min;然后进入循环,每个循环包括 95℃变性 15 s、58℃复性 30 s、72℃延伸 40 s,共循环 30 次;循环结束后,在 72℃条件下延伸 6 min。扩增结束后,采用琼脂糖凝胶电泳法对 PCR 产物进行初步鉴定。(6)测序验证。对于初步鉴定为阳性的克隆进行培养,培养后提取质粒,并将质粒送至苏州金唯智生物技术有限公司进行测序验证。

1.2.5 慢病毒的包装和滴度测定 复苏培养慢病毒包装 293T 细胞,接种于 10 cm 的培养皿中,使用添加 10% FBS 的 DMEM 培养基,每皿接种细胞数为 2×10<sup>6</sup> 个,37℃和 5% CO<sub>2</sub> 条件培养 24 h,使用 Lipofectmaine 2000 共转染表达载体和病毒包装混合物到 293T 细胞,转染后 24 h 使用含 1% FBS 的 DMEM 培养基进行换液,并于转染后 48 h 收集上清,离心后去除细胞沉淀,0.22 μm 除菌滤膜过滤处理后分装保存,并使用梯度稀释法进行病毒滴度测定。

1.2.6 siHa 及 C33A 细胞 miR-21-5p 的表达 用 Real-time PCR 法检测,取稳定过表达 miR-21-5p 宫颈癌细胞系(siHa、C33A),用 Trizol 提取稳转株细胞中总 RNA,测定纯度和浓度并逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qPCR,每个标本做 3 个重复。PCR 反应体系,20 μl 体系包含:2×SYBR Premix Ex Taq™ 10 μl、正反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μl、cDNA 模板 2 μl、ROX Reference Dye II 0.4 μl,ddH<sub>2</sub>O 补至终体积。

扩增程序:94℃预变性 2 min;40 个循环的 95℃变性 30 s、60℃复性 30 s、72℃延伸 40 s;终延伸 72℃6 min。以 U6 为内参(上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'),采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算细胞中 miRNA 的相对表达量。

1.2.7 MTT 细胞增殖情况 (1)将处于对数生长期的 siHa 和 C33A 细胞经 0.25%胰酶-EDTA 消化后接

种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下贴壁培养 12 h。采用倍比稀释法配制嘌呤霉素梯度浓度溶液 (0.25 ~ 10 μg/ml),每孔加入 100 μl 含药培养基,持续处理 48 h。(3)MTT 检测:每孔中加入 20 μl MTT,培养箱中放置 4 h 后,弃去上清,加入 150 μl DMSO,上机检测。

**1.2.8 Transwell 试验** (1)将 Matrigel 基质胶于 4 ℃ 过夜解冻,使用预冷 DMEM 按 1:3 体积比稀释至终浓度 1 mg/ml。(2)取 50 μl 稀释胶体均匀包被 Transwell 小室聚碳酸酯膜表面,37 ℃ 孵育 1 h 完成凝胶聚合。(3)胶层重构。每小室加入 100 μl 无血清 DMEM,37 ℃ 平衡 30 min。(4)下室灌注 600 μl 化学引诱剂(含 20%FBS 的 DMEM)。(5)实验组细胞(C33A/siHa 稳转株)消化后重悬,计数,取 1×10<sup>5</sup> 个细胞于 15 ml 离心管中离心,PBS 洗一遍,然后用 1 ml DMEM 培养基重悬,取 100 μl 细胞悬液,加入到上室小孔中,37 ℃ 培养箱中培养。(6)细胞固定与染色 处理 24 h 后移除上室培养基,PBS 轻柔漂洗 3 次。采用 4%多聚甲醛(PFA)室温固定 30 min,0.1% 结晶紫(含 20%甲醇)染色 30 min。经 PBS 充分洗涤后,于倒置显微镜下随机选取 3 个视野拍摄。

**1.3 统计方法** 数据分析应用 Graphpad Prism 8 软件,计量资料用均数±标准差表示,采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增目的基因** 以人基因组 DNA 为模板成功调取 miR-21-5p 前体序列,大小 514 bp,PCR 产物取 5 μl 进行琼脂样凝胶电泳,通过标准参照物(Marker)比较,条带大小与理论值完全一致,见图 1。

**2.2 重组慢病毒表达载体的克隆和鉴定** 克隆测序结果与 Genebank 上 miR-21-5p 基因编码 mRNA (NR\_029493.1)编码区比对,序列完全一致,见图 2~3。

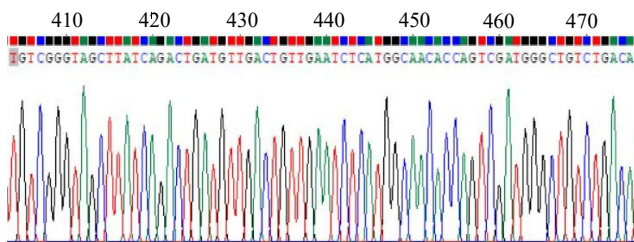
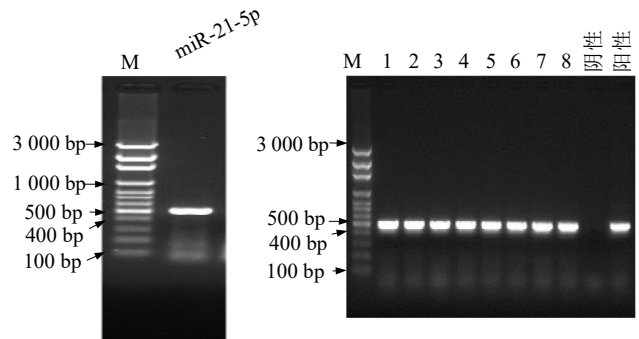


图 3 重组 pCDH-miRNA21-5p 测序片段

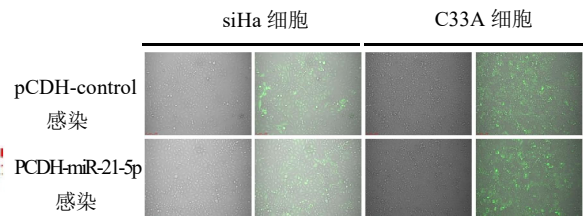
**2.3 稳定过表达 miR-21-5p 的 siHa、C33A 细胞系的建立** 将 pCDH-miR-21-5p 和 pCDH-control 分别感染 siHa、C33A 细胞,24 h 后荧光显微镜观察,有绿色荧光的细胞表明感染成功。计算得到转染效率在 90%以上,且感染后的细胞活力良好(图 4)。转染 48 h 后提取细胞总 RNA,发现转入 pCDH-miR-21-5p 的细胞相对于转入 pCDH-control 的细胞,miR-21-5p mRNA 表达明显增高,差异统计学意义(*P* < 0.05),见封三图 1。

**2.4 过表达 miR-21-5p 对细胞增殖能力的影响** siHa 细胞中,miR-21-5p 过表达组与空白对照组 120 h OD 值为(1.52±0.14)及(1.06±0.04),差异有统计学意义(*t*=5.35, *P* < 0.05)。C33A 细胞中,miR-21-5p 过表达组与空白对照组 120 h OD 值为(1.61±0.15)及(1.06±0.03),差异有统计学意义(*t*=6.08, *P* < 0.05)。

**2.5 过表达 miR-21-5p 对细胞侵袭能力的影响** 24 h 后显微镜下 siHa 细胞数,过表达 miR-21-5p 组为(114.2±11.64)个,空白对照组(78.8±9.7)个,差异有统计学意义(*t*=7.02, *P* < 0.05)。24 h 后显微镜下



注:M 为标准参照物 注:M 为标准参照物:阴性为空载对照,阳性为 GAPDH  
图 1 miR-21-5p PCR 扩增 图 2 重组慢病毒表达载体 PCR 鉴定



注:pCDH-miR-21-5p 感染 siHa、C33A 细胞 24 h 后,经转染的细胞发出明亮的绿色荧光,与同一视野下的白光图对比  
图 4 siHa 及 C33A 细胞 pCDH-miR-21-5p 和 pCDH-control 感染后荧光图(×200)

C33A 细胞数, 过表达 miR-21-5p 组为  $(213.8 \pm 18.5)$  个, 空白对照组为  $(89.8 \pm 10.7)$  个, 差异有统计学意义 ( $t=21.85, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

研究发现, miR-21 在多种恶性肿瘤中呈高表达, 包括肝癌、肺癌及食管癌等<sup>[7-8]</sup>。miR-21-5p 是由 miR-21 前体的 5' 端臂加工而来的, 作为 miR-21 家族中的成员, 其表达与部分肿瘤细胞的浸润、转移具有明确的相关性, 并参与肿瘤化疗的调控。有研究表明, miR-21-5p 靶向结合 FGF18 基因, 激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路, 从而促进人鼻咽癌组织及 CNE1 细胞的增殖<sup>[9]</sup>。白洁等<sup>[10]</sup>研究表明, 下调 miR-21-5p 表达, 上调程序性细胞死亡因子 4 (PDCD4) 表达可以改善乳腺癌细胞的多西他赛耐药性。另有研究认为<sup>[11]</sup>, 上调或下调 miR-21-5p, 能促进子宫内膜癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。由于 miR-21-5p 具有多个靶基因, 因此 miR-21-5p 对子宫内膜癌细胞生物学功能的影响并不完全是通过抑制靶基因 PITX2 或 VCL 的表达所完成的。miR-21-5p 在多种肿瘤中高度表达, 并参与了许多重要的生物学过程, 包括细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[12]</sup>。miR-21-5p 在宫颈癌发生、发展中的具体作用及其调控机制尚不清楚。

本实验构建了 miR-21-5p 慢病毒表达载体, 感染宫颈癌 siHa、C33A 细胞, 从而获得了稳定过表达 miR-21-5p 的稳转细胞株。实验结果显示, miR-21-5p 在 miR-21-5p 过表达组的相对表达量明显高于空白对照组, 说明 miR-21-5p 在两种宫颈癌细胞中稳定过表达。在此基础上, 进一步行细胞功能学实验, 结果表明 miR-21-5p 促进了宫颈癌细胞的增殖能力, 且 Transwell 迁移实验表明它能够促进宫颈癌细胞的迁移能力。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 沈亲亲、王毅军: 科研设计、实验操作、撰写论文、论文修改; 郑晨旸: 实验操作、数据收集、统计学分析; 吕一帆: 数据收集、统计学分析; 赵玲军、张伟峰: 研究指导、经费支持

### 参 考 文 献

- [1] HARSH K K, KAPOOR A, PARAMANANDHAN M, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation in the management of different stages of cervical carcinoma: 5-year retrospective study[J]. J Obstet Gynaecol India, 2016, 66(5): 372-378.
- [2] 王毅军, 陈安儿, 史慧薇, 等. 宫颈鳞状细胞癌新辅助化疗耐药相关的 miRNA 分析[J]. 现代实用医学, 2021, 33(9): 1134-1136, 1261.
- [3] HUSSEN B M, HIDAYAT H J, SALIHI A, et al. microRNA: A signature for cancer progression[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111528.
- [4] RODRIGUES P M, AFONSO M B, SIMO A L, et al. miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis[J]. Liver Int, 2023, 43(10): 2256-2274.
- [5] XIE M Y, CHENG B, YU S, et al. Cuproptosis-related miR-21-5p/FDX1 axis in clear cell renal cell carcinoma and its potential impact on tumor microenvironment[J]. Cells, 2022, 12(1): 173.
- [6] JIANG R, CHEN X, GE S, et al. miR-21-5p induces pyroptosis in colorectal cancer via TGFBI[J]. Front Oncol, 2020, 10: 610545.
- [7] HE B X, ZHAO Z Y, CAI Q D, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [8] ARISAN E D, RENCUZOGULLARI O, CIEZA-BORRELLA C, et al. miR-21 is required for the epithelial-mesenchymal transition in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1557.
- [9] 卡衣赛尔·卡哈尔, 谭元元, 哈斯叶提·外里, 等. miR-21-5p 通过靶向 FGF18 促进人鼻咽癌 CNE1 细胞增殖的机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(14): 2435-2441.
- [10] 白洁, 英子伟, 赵林, 等. miR-21-5p 对乳腺癌多西他赛耐药细胞株存活的影响及其机制研究[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(5): 476-480.
- [11] 马艳妮. miR-21-5p 影响子宫内膜癌细胞增殖、迁移及侵袭机制的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- [12] DU J T, QIAN J K, ZHENG B, et al. miR-21-5p is a biomarker for predicting prognosis of lung adenocarcinoma by regulating PIK3R1 expression[J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 8873-8880.

收稿日期: 2025-03-08

(本文编辑: 钟美春)