

基于基因芯片整合分析筛选及验证 BeWo 细胞 合体化相关调控因子

顾珺巍, 丁裕斌, 付利娟, 王永恒, 王应雄, 刘太行

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学实验室教育部生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast, STB)是一类多核化上皮细胞位于人类胎盘最外层,由单核滋养细胞(cytotrophoblast, CTB)分化、融合而来,肩负妊娠维持关键激素的分泌和母胎间营养交换的重要职责,也是母胎屏障重要组成部分之一。然而,目前关于胎盘滋养细胞的合体化过程的调控机制仍不明确。本研究即利用生物信息学的方法筛选并初步验证潜在调控绒毛膜癌 BeWo 细胞合体化调控的关键基因。**方法:**从 GEO 数据库检索并下载 BeWo 细胞合体化前后的基因芯片数据集,并利用生物信息学分析方法对所有相关数据集进行综合分析,筛选出差表达基因并进行 GO 及 KEGG 聚类分析,进一步通过 PPI 蛋白互作网络寻找节点基因,最后利用 qRT-PCR 验证候选基因在合体化前后的差异表达。**结果:**从 2 组数据中共筛选出 137 个差异表达基因,其中 25 个差异基因为 2 组数据集共有,参与细胞迁移、细胞黏附、激素代谢、MAPK 信号通路等。进一步借助蛋白质互作网络分析,得到 3 个候选基因并通过 qRT-PCR 验证,结果与信息分析结果一致。**结论:**本研究为滋养细胞合体化研究提供了潜在靶基因,也为解析其分子调控机制提供了线索。

【关键词】BeWo; 合体化; 基因芯片; 生物信息

【中图分类号】R714.56

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-10-17

Screening and validation of the regulatory factors for BeWo cell fusion based on gene microarray integration

Gu Junwei, Ding Yubin, Fu Lijuan, Wang Yongheng, Wang Yingxiong, Liu Taihang

(Laboratory of the Reproductive Biology, Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the screening and preliminary validation of potential key genes for the regulation of BeWo cell fusion based on bioinformatics, since syncytiotrophoblasts (STBs) are a type of multinucleated epithelial cells located at the outermost layer of the placenta and are generated by the differentiation and fusion of cytotrophoblasts (CTBs). STBs play an important role in the secretion of key hormones for pregnancy maintenance and nutrition exchange between mother and fetus during pregnancy. However, the regulatory mechanism of placenta trophoblast cell fusion remains unclear. **Methods:** The microarray datasets of BeWo cells before and after cell fusion were searched and downloaded from GEO database. A bioinformatics analysis was performed for a comprehensive analysis of all datasets to screen out the differentially expressed genes (DEGs), and then a cluster analysis was performed based on GO and KEGG. The PPI network was used to screen out node genes, and qRT-PCR was used to verify the differential expression of candidate genes before and after cell fusion. **Results:** A total of 137 differentially expressed genes were screened out from two datasets, among which 25 were shared by the two datasets and were involved in cell migration, cell adhesion, hormone metabolism, and the MAPK signaling pathway. Three candidate genes were screened out by the PPI network and validated by qRT-PCR, and the results were consistent with the information analysis. **Conclusion:** This study provides some potential target genes for the research on

trophoblast fusion and gives a clue to molecular regulation mechanism.

【Key words】BeWo; cell fusion; gene microarray; bioinformatics

作者介绍: 顾珺巍, Email: 530920428@qq.com,

研究方向: 胎盘早期发育与疾病。

通信作者: 刘太行, Email: sitoyy@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81801458); 中国博士后科学基金资助项目(编号: 2018M633328)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190222.0901.014.html>
(2019-02-22)

细胞融合是一类特殊的细胞事件,不论在健康或疾病的多细胞生物中都有广泛发生。在正常组织和器官发育过程中,细胞融合是一个关键且高度可控的稳态事件;然而,细胞融合在癌症的发生发展过程中同样具有关键作用^[1]。在胎盘发育过程中,细胞滋养细胞(cytotrophoblast,CTB)分化、融合为合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast,STB)的合体化过程是一类典型的细胞融合事件,最终融合成 12~14 m² 表面积连续合体滋养层母胎界面,是母胎屏障的重要组成部分^[2]。STB 细胞不仅在调节母胎循环营养物质、水、废物和气体的交换过程中起重要作用,同时还能分泌对妊娠维持和发展至关重要的激素,如促绒毛性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG)、人胎盘催乳素、黄体酮等。STB 细胞作为终末分化的非增殖性上皮型细胞,只能由 CTB 祖细胞池进行分化补充。因此,CTB 细胞的合体化不足或受损,会导致胎盘发育不良及母胎循环障碍,引发子痫前期(preeclampsia,PE)、宫内生长受限(intrauterine growth restriction,IUGR)、早产等,严重危险孕、产妇和围产儿的健康安全。

相对于其他细胞融合事件,胎盘滋养细胞的合体化、肌肉中肌细胞融合成肌管以及骨中巨噬细胞形成破骨细胞这 3 类目前研究仍然甚少^[1]。已有研究表明,滋养细胞合体化是一个复杂的生理过程,受环境因素(缺氧等)、表观调节因素(基因甲基化、蛋白磷酸化等)、信号通路(cAMP、Wnt/ β -catenin等)及多种蛋白的联合调控^[3-4]。Aguilar 等^[5]描述细胞融合可分为 3 个主要阶段:感受态阶段包括细胞退出增殖状态,诱导和分化成为融合感受态细胞;呈递阶段包括细胞迁移、细胞粘附、融合搭档的相互识别,以及细胞间的通信连接,即融合信号的同步与交换;融合阶段包括细胞膜融合及细胞质融合。

第一阶段研究发现,多种生长因子及细胞因子能够影响滋养层融合,如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、集落刺激因子(colony stimulating factor 1,CSF-1)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)、转化生长因子(transforming growth factor- α ,TGF- α)等^[6]。融合前细胞需要退出细胞周期,研究发现合胞体周围的卫星细胞是非增殖性的^[7]。Lu 等^[8]发现,HCG 的分泌增多能促进转录因子(glia cell missing-1,GCM-1)的表达,GCM-1 能与上调表达的 p21Cip1 互作引起细胞周期阻滞于 G0 期,同时

促进合体化标志基因之一的 Syncytin-2(人类内源性逆转录病毒 FRD 家族包膜蛋白中一员)的转录,促进细胞融合。单细胞测序结果也同样表明,多种细胞周期相关因子参与滋养细胞合体化过程调控^[9]。第二阶段中,钙粘蛋白 E-cadherin 已被证实负调节滋养细胞合体化,而 Cadherin-11 却具有正向调节作用;紧密连接蛋白(Zona occludens-1,ZO-1)虽然被证实参与合体化调节,但具体机制仍不明确^[10];Cx43 是人类滋养细胞唯一表达的间隙连接蛋白(Connexin-43),能够调节合体化和细胞间通信^[11]。Syncytin-1/-2 作为滋养细胞合体化过程的重要调节因子,能够协同人钠依赖性中性氨基酸转运蛋白(human sodium-dependent neutral amino acid transporter 2,ASCT-2)共同促进第 3 阶段的细胞融合^[12]。然而,关于滋养细胞的合体化调控机制仍然迷雾重重,亟待完善。

目前,通常用滋养细胞样细胞系 BeWo、JAR 和 JEG3 研究人类胎盘功能;然而,只有 BeWo 细胞能够直接在 cAMP 激活剂驱动下融合并形成合胞体,JEG3 细胞在过表达 Cx-43 或 Cadherin-11 同时用 cAMP 刺激情况下才能恢复细胞融合能力^[11,13]。因此,本研究选取 GEO 数据库现有的 BeWo 细胞系诱导合体化前后的基因芯片数据进行综合分析,筛选合体化调控相关因子,期望为滋养细胞合体化研究提供潜在靶基因,也为解析其分子调控机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

芯片数据查找过程中,分别或联合以 placenta,choriocarcinoma cell line,BeWo,trophoblast,cell fusion,syncytialization 及 cAMP 为关键词,在 NCBI 信息中心 GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)子数据库进行检索,共检索到 2 个 BeWo 细胞诱导合体化相关的数据集,即 GSE66840^[14]和 GSE100095(Kusama K,Bai R,Imakawa K,未见相关文章),将其下载到本地并作后续分析。

1.2 实验方法

1.2.1 数据处理与筛选差异表达基因 统计软件 R 和 Bioconductor 包用于不同诱导因子诱导的合体化和正常 BeWo 细胞之间的差异表达基因的显著性分析。首先,使用 RMA(Robert Multichip Average)算法和 affy 包分别对原始 CEL 文件进行背景校正、归一化处理和汇总。然后,使用经验贝叶斯方法和 limma 包用于筛选差异表达基因。使用 BH (Benjamini-Hochberg)算法调整 P 值,在结果中以 $P < 0.05$ 和 $|\log FCI| \geq 1.2$

(FC 即 fold change 的简称)的探针组定义为基因显著差异表达的标准。最后,差异基因由 BioMart 包注释,得到的 2 组差异基因取并集。

1.2.2 聚类分析 将 2 组数据集中筛选到的差异表达基因取并集后,使用 Bioconductor 包(<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>)进行基因的生物学和信号通路聚类分析,ClusterProfiler v3.8.1 用于差异基因的 GO (gene ontology) 和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 聚类分析^[15]。GO 聚类包括生物学进程 (biological processes, BP), 细胞组分 (cell components, CC), 分子功能 (molecular function, MF)。KEGG 聚类是将基因映射到信号通路的富集分析。以 $P < 0.05$ 的聚类结果定义为显著聚类。

1.2.3 蛋白质相互作用网络分析及节点基因筛选 将筛选到的差异表达基因应用 STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 在线数据库用于构建差异表达基因的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络,置信度得分 (confidence score) > 0.4 被定义为相互作用显著。然后将相互作用数据导入 Cytoscape 软件以构建 PPI 网络。使用 Cytoscape 中的 CytoHubba 插件来鉴定节点基因 (Hub gene)。接着,使用 12 个内置中心指数来计算 PPI 的节点得分在 12 个不同中心得分排列的潜在中枢基因列表之间,筛选过程中应用严格的过滤标准,只有在 ≥ 6 个列表的交叉点内的基因被认为是具有潜在生物学意义的信心中心基因。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

1.2.4 BeWo 细胞培养, 合体化诱导及验证 用含 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA)、100 U/mL 青霉素和 100 μ L/mL 链霉素的 Ham's F-12K 培养基培养 BeWo 细胞,置于含 5% CO_2 、95% 空气的 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中。25 μ mol/L Forskolin (FSK; Sigma-Aldrich, USA) 诱导 BeWo 细胞融合 72 h 后,用以下方法验证细胞融合,免疫荧光检测 E-cadherin 表达 (sc-71008; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 观察细胞融合过程中细胞膜消失。荧光定量 PCR 检测细胞融合前后 BeWo 细胞中 β -hCG、Syncytin-1、GCM-1 的表达量,验证合体化效果^[16]。

1.2.5 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及统计分析 将收集到的细胞液氮预冷后存储于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。待样本齐备后,用 Trizol (Invitrogen) 裂解法抽提 RNA; 提取出的 RNA 经无 RNAase 的 DNase I 处理去除样本中潜在的 DNA 污染。经 Takara 公司逆转录转试剂盒得到 cDNA 后,用 SYBR Green Supermix (BioRad) 试剂进行靶基因定量检测, GAPDH 或 Actin 3 作为内参标记。所有定量引物 (表 1) 均用 Primer 5.0 软件进行设计,并由华大基因合成并纯化。基因相对表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算,并使用 SPSS 18.0 进行统计分析^[17]。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

表 1 定量引物序列

基因	序列 (5'~3')	Tm ($^{\circ}\text{C}$)	大小 (bp)
β -hCG	F: GTGAACCCCGTGGTCTCCTA	60	112
	R: GGTCAATCACAGGTCAAGGGG	60	
Syncytin-1	F: CCTCAAACCTCACCTGTGTAATAAT	60	155
	R: AGAGCCATTCAAACAACGATAGG	60	
GCM-1	F: GCCAAGCAAGAGCAGCAAA	60	103
	R: TCATCTCAAAGACACAGGTTCA	60	
LEP	F: GAACCCTGTGCGGATTCTTG	60	149
	R: GGAGGAGACTGACTGCCGTGTG	60	
SERPINE1	F: CACCATCCCCCATCTACG	60	162
	R: CTGGGTTTCTCCTCTGTGTGTC	60	
CYP19A1	F: CACATCTGGACAGGTTGGAGG	60	104
	R: CAAGAAGAGCGTGTAGAGGTGTC	60	
GAPDH	F: AGATCATCAGCAATGCCTCCT	60	96
	R: TGGTCATGAGTCTTCCACG	60	

2 结果

2.1 BeWo 细胞系合体化过程相关芯片收集及筛选

本研究从 NCBI 的 GEO 子库中共收集到了 2 组已公布的 BeWo 细胞合体化前后的基因芯片表达谱数据集,分别为 GSE66840 和 GSE100095 (表 2)。首先对 GSE 矩阵数据进行注释及 RMA 标准化处理等得到高质量数据,并进一步进行主成分 PCA 分析,发现数据集 GSE66840 中 BeWo 细胞合体化前后数据 Hclust 聚类较好;数据集 GSE100095 中, cAMP 通路下游效应因子 PKA (protein kinase A, 也称 cAMP-dependent protein kinase) 诱导 BeWo 合体化后的芯片数据与诱导前数据 Hclust 聚类较好,而另一 cAMP 效应因子 EPAC (exchange factor directly activated by cAMP) 诱导 BeWo 合体化后的芯片数据与诱导前区分度不够 (图 1)。因此,本研究选取 GSE66840 全部数据与 GSE100095 中 PKA 诱导前后的数据,共 12 个样本数据进行下一步分析。

2.2 BeWo 细胞系合体化前后差异基因筛选

GSE66840 和 GSE100095 中分别包括 BeWo 细胞合体前 3 个样本和合体化后 3 个样本,由于 2 组数据集采用的不同平台,因此对 2 组数据分别进行差异基因筛选。结果显示,从 GSE66840 的 21 415 个基因中筛选出 92 个差异表达基因,包括 76 个上调表达基因和 16 个下调表达基因 (图 2A、B);从 GSE100095 的 28 251 个基因中筛选出 70 个差异表达基因,包括 42 个上调表达基因和 28 个下调表达基因。2 组数据取并集共得到 137 个差异表达基因,其中包括 94 个上调

表 2 GEO 数据库中 BeWo 细胞合体化芯片数据集

序号	数据集	平台	芯片型号	参考文献作者
1	GSE66840	GPL570	[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Renaud SJ 等
2	GSE100095	GPL17586	[HTA-2_0] Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 [transcript (gene) version]	Kusama K 等

表达基因和 43 个下调表达基因(图 2C、D)。2 组数据集差异基因取交集共得到 25 个差异表达基因,其中包括 24 个上调表达基因和 1 个下调表达基因(图 2E)。

2.3 差异基因富集分析

将 137 个差异表达基因进行 GO 和 KEGG 功能及通路富集分析。GO 富集分析结果显示,差异表达基因在生物学过

程中聚类于细胞粘附、细胞迁移、干细胞增殖调控、血管生成以及激素代谢等;细胞组件中聚类于细胞紧密连接、细胞粘附、细胞外基质等;分子功能中聚类于激素活动、氨基酸跨膜转运、生长因子活性等(图 3A)。KEGG 通路富集分析结果显示,差异表达基因聚类于 MAPK、FoxO 及细胞因子与其受体交互等信号通路(图 3B)。

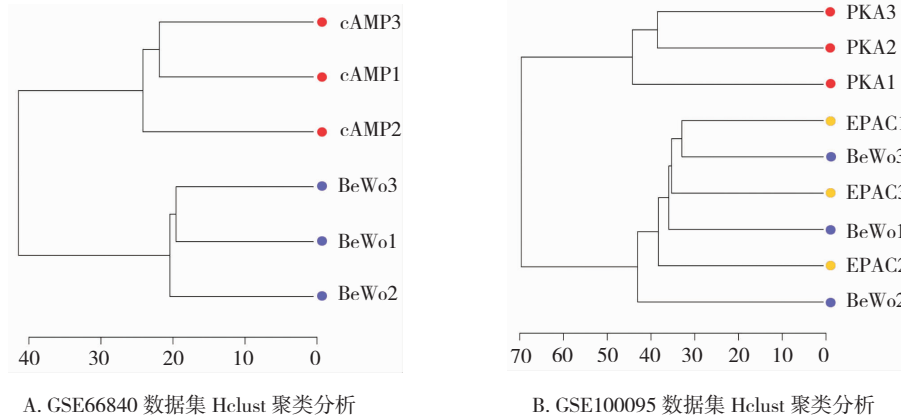


图 1 芯片数据 Hclust 聚类分析

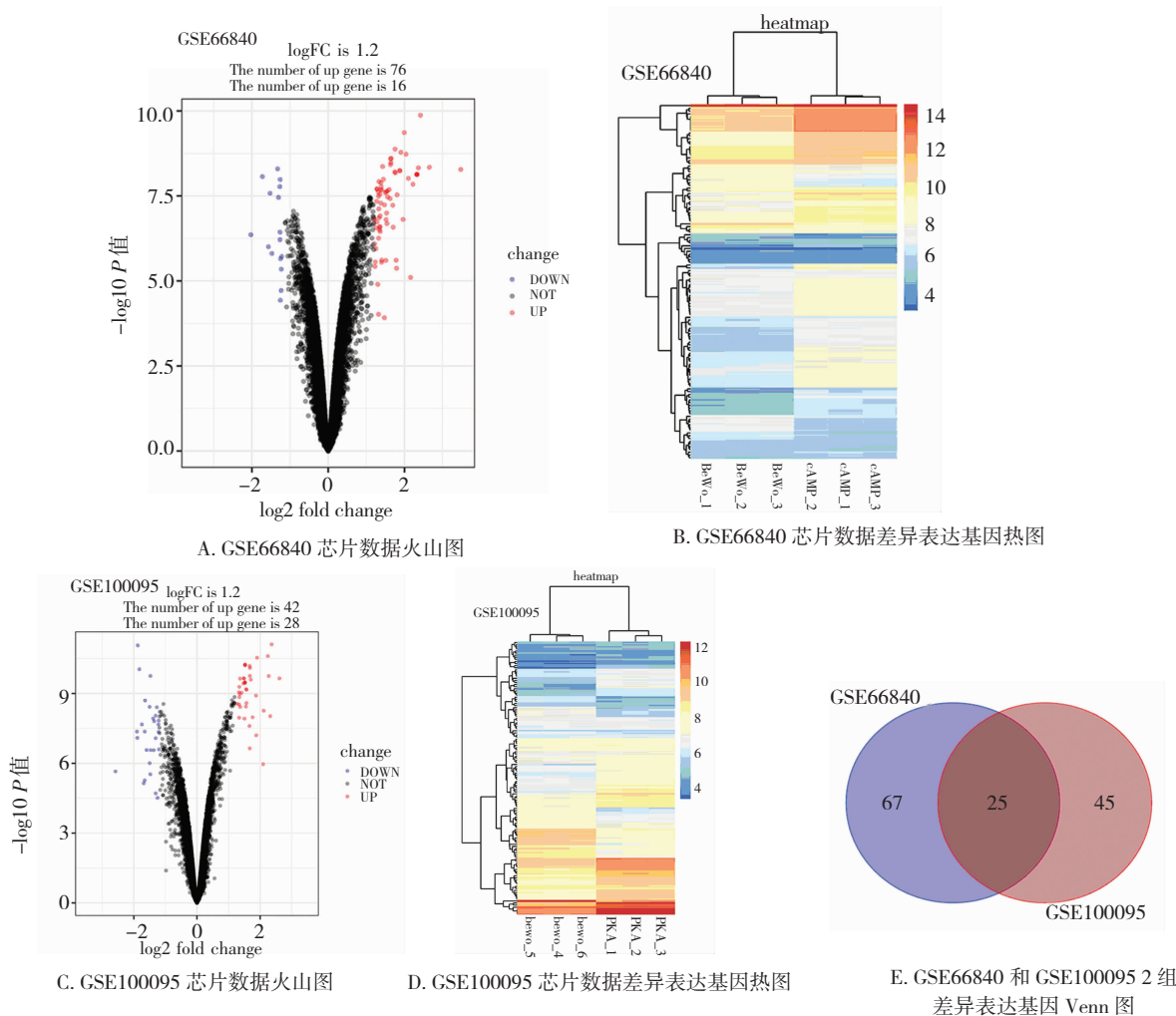
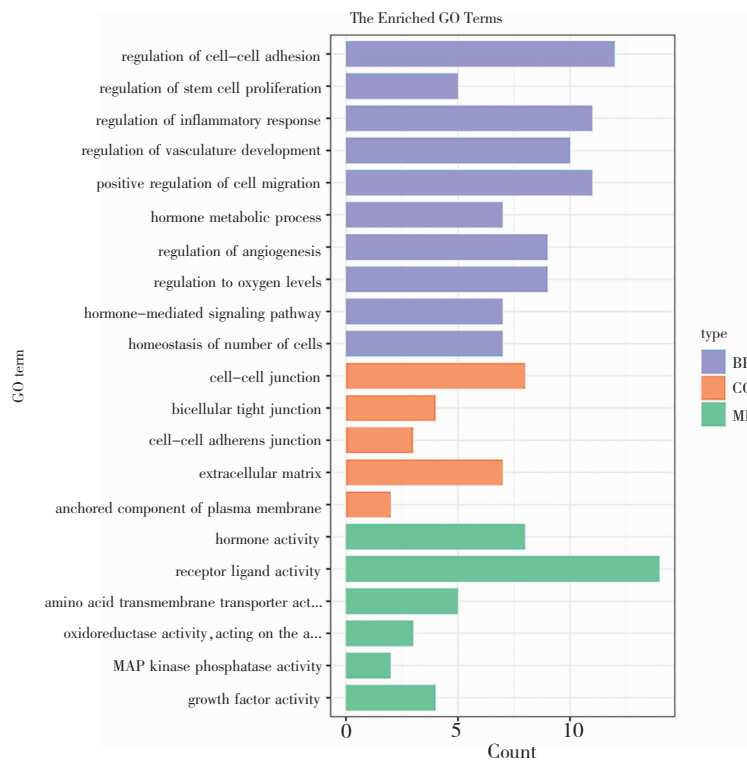
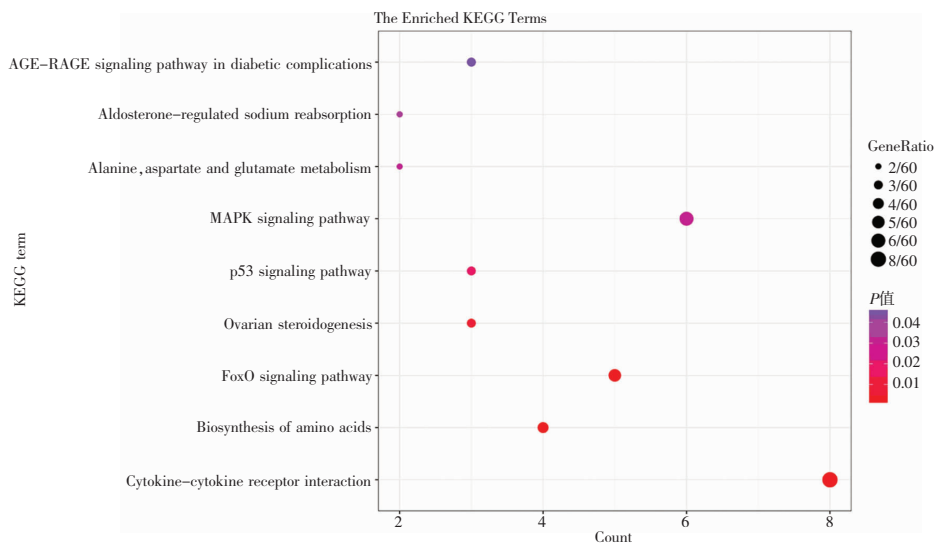


图 2 BeWo 细胞系合体化前后差异基因筛选



A. 差异基因 GO 聚类分析



B. 差异表达基因 KEGG 聚类分析

图 3 差异基因聚类分析

2.4 PPI 网络构建及模块化分析

通过应用 STRING 数据库构建出 137 个差异表达基因的 PPI 互作网络图,使用 Cytoscape 分析发现,共包含 106 个点和 330 条边(图 4A)。进一步分析发现,前 10 个节点基因为 TGFB1、LEP、SERPINE1、SGK1、CYP19A1、TXNIP、SLC7A11、GDF15、SLC6A4 和 PSAT1。为了进一步分析差异基因间的相互作用,使用 Cytoscape 检测到 4 个模块(MCODE):模块 1 主要参与细胞黏附及对氧压水平应答(图 4B);模块 2 主要参与氨基酸的转运(图 4C);模块 3 参与对激素、生物刺激的

应答调控(图 4D);模块 4 参与炎症反应及细胞粘附调节(图 4E)。

2.5 差异表达基因验证

一方面为了进一步验证基因芯片分析结果,另一方面为了筛选潜在的调控 BeWo 细胞合体化的关键基因,利用 qRT-PCR 的方法检测 2 组数据集共有同时又属于前 10 个节点基因的 3 个差异表达基因:LEP(leptin)、SERPINE1(serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1)和 CYP19A1(cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1)在 BeWo 细胞诱导合体

化前后的表达水平。成功构建 BeWo 细胞诱导合体化模型, 免疫荧光检测结果显示, FSK 诱导 BeWo 细胞合体化 72 h 后 E-cadherin 出现明显下调表达, 细胞核聚集成簇现象明显 (图 5A); qRT-PCR 检测合体化标志基因的表达水平发现, β -hCG、Syncytin-1、GCM-1 在诱导合体化的 BeWo 细胞

中明显上调表达 ($t=-31.385, t=-12.751, t=-11.914$, 均 $P=0.000$) (图 5B)。利用该模型进行后续研究发现, LEP、SERPINE1 和 CYP19A1 在合体化细胞中均呈明显上调表达 ($t=-21.307, t=-17.161, t=-11.13$, 均 $P=0.000$) (图 5C); 所有验证结果均符合本研究的生信分析指标。

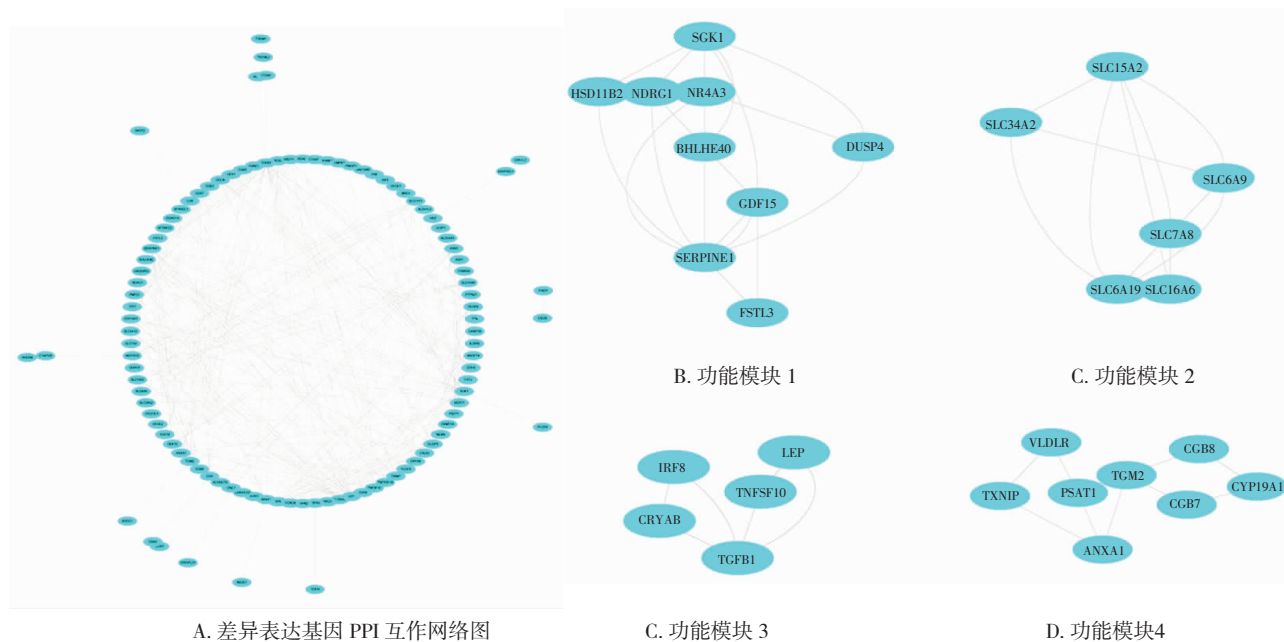
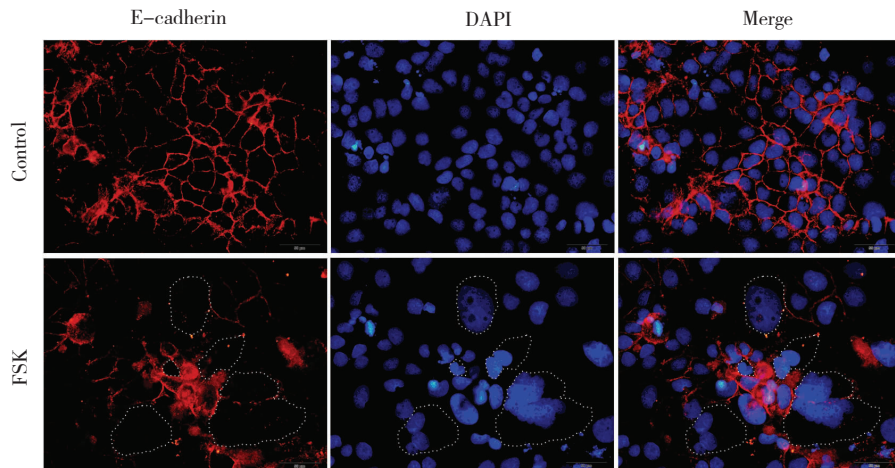
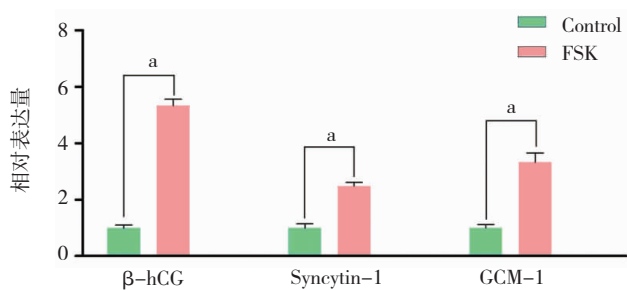


图 4 差异表达基因 PPI 蛋白质交互网络分析

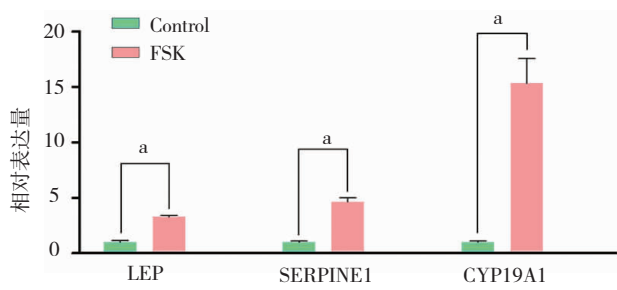


A. FSK 体外诱导 BeWo 细胞合体化模型构建



B. qRT-PCR 检测合体化标志基因

a: $P < 0.001$



C. qRT-PCR 检测靶标基因表达差异

图 5 BeWo 细胞合体化前后差异表达基因 qRT-PCR 分析

3 讨论

胎盘作为维系母体和胎儿间物质交换的重要器官,同时还具有免疫防御、合成及代谢调节等功能,一个健康发育的胎盘是正常妊娠的重要保证。合体滋养层细胞作为胎盘外层最重要的功能细胞,对于维系胎盘上述重要功能具有不可替代的位置。合体滋养层细胞合体化不足或受损都将引起胎盘结构或功能障碍,严重威胁母胎健康安全。虽然目前用作研究人类胎盘功能,特别是滋养细胞融合机制及功能的最佳选择是胎盘分离而来的原代滋养细胞 PHT,但是滋养细胞样 BeWo 细胞系仍然具有许多优势。它属于一类肿瘤细胞,能在体外稳定传代和生长,而 PHT 在体外基本丧失增殖能力^[18]。更重要的是,BeWo 细胞系能够被诱导进行细胞融合并能保持激素分泌能力,且合体化标志基因的表达模式与 PHT 合体化前后表达趋势一致^[9]。本研究对目前 NCBI 的 GEO 子库中现有的 BeWo 细胞被诱导合体化前后的基因芯片数据进行了综合分析,共得到 137 个差异表达基因。进一步进行 GO 及 KEGG 富集分析发现,137 个差异表达基因主要参与细胞迁移、细胞粘附、干细胞增殖、激素代谢调节、细胞因子及氧压应答调节、MAPK 信号通路等,这与上述 Aguilar 等关于细胞融合的“三阶段论”相吻合,也与目前研究已知的滋养细胞合体化相关调控基因的功能相一致。其中,氧压应激对于滋养细胞的融合已有一些研究,子宫内适当的缺氧环境有利于滋养细胞的分化和融合,而严重缺氧会导致 GCM-1 和 Syncytin-1 转录水平呈时间依赖性降低,严重影响滋养细胞合体化,但具体机制仍不明确^[19-20]。MAPK 信号通路激活已被证实能促进 hCG 等的表达,进而正向调控合体化进程^[4];FoxO 信号通路在滋养细胞合体化中的作用目前仍然不明确。

对 2 组数据集的差异表达基因取交集共得到 25 个共有基因,其中 ERVFRD-1 编码的 Syncytin-2 已是公认的合体化标志基因之一,进一步证实了 2 组数据集中样本已被成功诱导合体化;转录因子 OVOL-1 已被上传 GSE66840 数据集的作者 Stephen 研究发现,其上调表达能诱导滋养细胞分化主导滋养主细胞命运,促进细胞融合和激素合成相关基因的广泛转录^[14]。合体滋养层分泌的绒毛膜促性腺激

素 CGB-1、-2、-3、-5、-7、-8 也在 2 组数据集中都检测到上调表达,有利于维持卵巢黄体功能,进一步暗示了 BeWo 细胞仍然维持滋养细胞的激素分泌功能。HSD11B2(皮质类固醇 11- β -脱氢酶同工酶 2)的高量表达可以保护胎儿免受皮质醇的不良影响^[21]。

为了寻找潜在调控 BeWo 细胞合体化的关键基因,通过 PPI 蛋白质互作网络分析提取前 10 个节点基因,并将这 10 个节点基因与 2 组数据集共有的 25 个差异表达基因取交集得到 LEP、SERPINE1 和 CYP19A1 基因,进一步利用荧光定量 PCR 分析发现这 3 个基因在合体化过程中明显上调表达。瘦素(leptin, LEP)是一种由脂肪细胞分泌的激素,有助于通过抑制饥饿调节能量平衡,有趣的是,LEP 也能由胎盘滋养细胞合成并对生殖和妊娠起多重调控作用,包括调节胚胎着床、促进滋养细胞的增殖和存活、抑制细胞凋亡、刺激激素和细胞因子分泌、调节免疫等^[22]。Barrientos 等^[23]发现,在胎盘滋养细胞中,LEP 能够激活 MEK/Erk 和 PI3K 信号通路促进 HLA-G 的表达,暗示在母胎界面免疫逃避调节中起重要作用。同时,LEP 在胎盘中的表达受到高度调控,能够被 cAMP 及雌二醇 1 等信号所调控^[22]。SERPINE1(纤溶酶原激活物抑制剂-1)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制蛋白),其功能主要是抑制组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA)和尿激酶(urinary plasminogen activator, uPA),目前研究发现其在人和小鼠的胚胎植入过程中有表达,暗示其可能参与胎盘植入调节,但是其在合体化过程中的功能仍未见明确报道^[24-25]。CYP19A1 又称为雌激素合成酶,能够催化雄激素转化为雌激素,而妊娠期雌激素主要来源之一是由胎盘合体滋养层中 CYP19A1 催化合成并分泌的。研究表明 PKA 能诱导 JEG3 中雌激素前体 DHEAS 的摄取和 CYP19A1 的上调表达,因此 CYP19A1 在 BeWo 合体化过程中上调表达可能只是维持细胞分泌功能需要^[26]。

综上所述,通过生物信息学方法分析了 cAMP/PKA 诱导 BeWo 细胞合体化前后的 2 组转录组芯片数据集,得到 137 个差异表达基因,其中 25 个差异表达基因为 2 组共有。进一步验证了 LEP、SERPINE1 和 CYP19A1 在 BeWo 合体化过程中明显上调表达,下一步本课题组一方面要对这些差异表达

基因进行更加深入挖掘,另一方面将通过体内外等实验深入研究其在合体化过程中的调控作用。期望本研究能为滋养细胞合体化研究提供了潜在靶基因。

参 考 文 献

- [1] Dittmar T,Zanker KS. Cell fusion in health and disease. Volume II :cell fusion in disease. Introduction[J]. Adv Exp Med Biol,2011,714: 1-3.
- [2] Burton GJ,Jauniaux E. Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1995,102(10):818-825.
- [3] Wu PH,Chen XM,Liu XQ,et al. Activation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) receptor gene expression following DNA demethylation in placental choriocarcinoma and transformed cell lines[J]. Reprod Fertil Dev,2015[Epub ahead of print]. DOI:10.1071/RD14408.
- [4] Delidakis M,Gu M,Hein M,et al. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line[J]. Mol Cell Endocrinol,2011,332(1-2):213-220.
- [5] Aguilar PS,Baylies MK,Fleissner A,et al. Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms[J]. Trends Genet,2013,29(7):427-437.
- [6] Gerbaud P,Pidoux G. Review;an overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion[J]. Placenta,2015,36(S1):35-42.
- [7] Huang Q,Li J,Wang F,et al. Syncytin-1 modulates placental trophoblast cell proliferation by promoting G1/S transition[J]. Cell Signal, 2013,25(4):1027-1035.
- [8] Lu X,Wang R,Zhu C,et al. Fine-tuned and cell-cycle-restricted expression of fusogenic protein syncytin-2 maintains functional placental syncytia[J]. Cell Rep,2017,21(5):1150-1159.
- [9] Liu Y,Fan X,Wang R,et al. Single-cell RNA-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta[J]. Cell Res,2018,28(8):819-832.
- [10] Pidoux G,Gerbaud P,Gnidehou S,et al. ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2010,298(6):C1517-1526.
- [11] Dunk CE,Gellhaus A,Drewlo S,et al. The molecular role of connexin 43 in human trophoblast cell fusion[J]. Biol Reprod,2012,86(4): 115.
- [12] Lavillette D,Marin M,Ruggieri A,et al. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors[J]. J Virol,2002,76(13): 6442-6452.
- [13] Getsios S,MacCalman CD. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro[J]. Dev Biol,2003,257(1):41-54.
- [14] Renaud SJ,Chakraborty D,Mason CW,et al. OVO-like 1 regulates progenitor cell fate in human trophoblast development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2015,112(45):E6175-6184.
- [15] Yu G,Wang LG,Han Y,et al. clusterProfiler:an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS,2012,16 (5):284-287.
- [16] Fu LJ,Ding YB,Wu LX,et al. The effects of lycopene on the methylation of the GSTP1 promoter and global methylation in prostatic cancer cell lines PC3 and LNCaP[J]. Int J Endocrinol,2014,2014: 620165.
- [17] Liu TH,Wu YE,Dong XL,et al. Identification and characterization of the BmCyclin L1-BmCDK11A/B complex in relation to cell cycle regulation[J]. Cell Cycle,2017,16(9):861-868.
- [18] Kliman HJ,Nestler JE,Sermasi E,et al. Purification,characterization,and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta[J]. Endocrinology,1986,118(4):1567-1582.
- [19] Caniggia I,Mostachfi H,Winter J,et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3)[J]. J Clin Invest,2000,105(5):577-587.
- [20] Wich C,Kauster S,Dotsch J,et al. Syncytin-1 and glial cells missing a:hypoxia-induced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts[J]. Gynecol Obstet Invest,2009,68(1):9-18.
- [21] Albrecht ED,Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy[J]. Endocr Rev,1990,11(1):124-150.
- [22] Maymó JL,Pérez Pérez A,Gambino Y,et al. Review;leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival[J]. Placenta,2011,32(S2):146-153.
- [23] Barrientos G,Toro A,Moschansky P,et al. Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways[J]. Placenta,2015,36(4):419-426.
- [24] Hofmann GE,Glatstein I,Schatz F,et al. Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites[J]. Am J Obst Gynecol,1994,170(2):671-676.
- [25] Chern SR,Li SH,Lu CH,et al. Spatiotemporal expression of the serine protease inhibitor,SERPINE2,in the mouse placenta and uterus during the estrous cycle,pregnancy,and lactation[J]. Reprod Biol Endocrinol,2010,8:127.
- [26] Tomi M,Miyata Y,Noguchi S,et al. Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells[J]. Placenta,2014,35(8):658-660.

(责任编辑:张辉洁)