

*c-Myc*基因在人滋养细胞合体化中的作用

徐增伟 王永恒 刘太行 王应雄 丁裕斌*

(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 *c-Myc*属于bHLH家族转录因子, 在人多能干细胞维持细胞自我更新中发挥着重要作用, 但在人胎盘滋养细胞分化中的功能尚不明确。该研究采用免疫组化、免疫荧光、Western blot及qRT-PCR技术, 初步证实人早孕绒毛、原代滋养细胞及福斯科林诱导BeWo细胞合体化前后*c-Myc*均高表达于细胞滋养细胞, 并在滋养细胞合体化过程中表达下调。qRT-PCR检测*c-Myc*网络相关因子在滋养细胞合体化过程中的作用, 发现细胞周期相关因子*CCNA2*及*CDK2*表达下调, *CDKN2A*表达上调; *c-Myc*调控网络中滋养细胞干细胞相关因子*OCT4*、*SOX2*及*hTERT*在滋养细胞合体化过程中表达下调。研究初步发现, *c-Myc*可能通过其调控网络及细胞周期, 影响滋养细胞增殖及分化平衡, 从而参与滋养细胞合体化。

关键词 滋养细胞; *c-Myc*; BeWo; 合体化

The Role of *c-Myc* in the Syncytialization of Human Trophoblast

XU Zengwei, WANG Yongheng, LIU Taihang, WANG Yingxiong, DING Yubin*

(Joint International Research Laboratory of Reproductive and Development, Department of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The proto-oncogene *c-Myc* is known to regulate the self-renewal of human pluripotent stem cells but its function in human trophoblast progenitor cells is unclear. This study aimed to determine the role of *c-Myc* in the syncytialization of cytotrophoblast cells. In this study, immunohistochemistry, immunofluorescence, Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of *c-Myc* in human early pregnancy villous trophoblasts and in BeWo cells. Verification of the expression of the transcription factors involved in *c-Myc*-mediated regulation of syncytialization was done with qRT-PCR. The expression of *c-Myc* was observed in both the primary villous tissues and Bewo cells. And within the villous tissues, the expression was higher in the inner layer but weaker in the outer layer of the cytotrophoblast. Both forskolin-induced fusion of Bewo cells and spontaneous fusion of the primary cytotrophoblast led to a significant downregulation of *c-Myc* and the trophoblast stem cell-related transcription factors: *OCT4*, *SOX2* and *hTERT*. The cell cycle-related factors, *CCNA2* and *CDK2*, were downregulated while *CDKN2A* was upregulated. The expression of *c-Myc* was downregulated during syncytialization, and might be involved in the process by regulating the cell cycle and the self-renewal of the trophoblast cells.

Keywords trophoblast; *c-Myc*; BeWo; cell fusion

单核细胞融合为一个多核的合胞体(syncytium)的过程, 是一种重要的细胞学行为, 广泛发生于不同

的生理过程, 如精子与卵细胞融合、肌肉细胞发育、骨骼细胞形成等, 对于组织形态发生、细胞成熟和

收稿日期: 2019-10-17 接受日期: 2019-12-20

国家自然科学基金(批准号: 81671493、81801458)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15023169558, E-mail: dingyb@cqmu.edu.cn

Received: October 17, 2019 Accepted: December 20, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671493, 81801458)

*Corresponding author. Tel: +86-15023169558, E-mail: dingyb@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5196>

维持特定功能等都不可或缺^[1-2]。细胞融合受到严格且复杂的调节, 异常的细胞融合参与多种疾病的发生, 例如多发性骨髓瘤、结肠癌、乳腺癌和妊娠滋养细胞疾病^[3-4]。

在人类妊娠期间, 胎盘的单核绒毛滋养细胞(cytotrophoblast, CTB)不断分化、融合为外层多核合体滋养细胞(syncytiotrophoblast, STB)是确保正常成功妊娠的关键^[5]。STB细胞作为母胎屏障的重要组成部分, 负责调节母体-胎儿之间的营养物质运输, 并分泌雌激素、黄体酮、人绒毛膜促性腺激素(β -human chorionic gonadotropin, β -hCG)、人胎盘催乳素(human placental lactogen, hPL)等重要激素以维持妊娠^[6-7]。CTB细胞是一种具有自我更新、高增殖潜力的中间型滋养细胞, 由胚泡的滋养外胚层干细胞分化形成, 是分化绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblast, EVT)和STB细胞的“祖细胞池”^[7-9]。此外, 滋养细胞合体化不足会导致妊娠期间胎盘发育不良、再灌注不足, 进而引发子痫前期、宫内生长受限等妊娠并发症, 严重威胁母体及胎儿健康生长发育^[10-11]。然而, 目前对于胎盘滋养细胞合体化的研究较少, 滋养细胞合体化异常引发的妊娠相关疾病发病机制尚不明确。

*c-Myc*基因属于碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链(basic helix-loop-helix protein, bHLH)家族转录因子成员, 能够调节包括细胞增殖、生长、分化和凋亡在内的多种细胞生物过程, 其转录表达受到一系列严格的调控, 包括Wnt/ β -catenin、Notch等信号通路^[12-13]。*c-Myc*与其配偶体Myc相关蛋白X(Myc-associated factor X, MAX)形成*c-Myc*-MAX特异性异二聚体结构, 并通过与E-box(CANNTG) DNA序列结合, 从而调节参与细胞生物过程的多种下游靶基因的转录表达^[14-15]。过表达*c-Myc*导致其他基因的上调, 促进细胞增殖和细胞生长, 可增强妊娠早期胎盘绒毛滋养细胞的增殖能力^[16-17]。在子痫患者胎盘中, 胎盘发育具有STB细胞合体化不足和胎盘功能障碍等特征, 其中*c-Myc*的转录水平未见明显升高, 但其蛋白水平呈现高量表达^[8, 18]。上述研究均提示, *c-Myc*的表达失调可能参与滋养细胞分化(融合)异常。

虽然*c-Myc*在滋养细胞合体化过程中的作用仍未明确, 但是已有研究证实, *c-Myc*下游靶标基因组成的调控网络可能在维持人胎盘滋养细胞增殖、自我更新及分化中扮演重要角色, 如人端粒酶逆转录

酶(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)作为*c-Myc*的下游靶标基因, 参与端粒酶活化和细胞增殖, 在维持细胞增殖过程中起着重要作用^[19]。在人妊娠早期胎盘绒毛中*hTERT*高表达, 但随着妊娠发展进程, 其水平急剧下降^[20]。此外, 核受体亚家族2, F组, 第2号成员(nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2, NR2F2)与*c-Myc*通过竞争结合*hTERT*启动子区域的E-box序列位点, 抑制*hTERT*的转录表达^[21]。NR2F2的突变小鼠的胎盘海绵滋养层细胞减少、迷路层区域降低, 严重威胁正常妊娠^[22-23]。*c-Myc*的反式激活可以受到转录因子TFAP2A(transcription factor AP-2 alpha)抑制^[24], 且TFAP2A能诱导hPL、 β -hCG和促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)等妊娠相关激素的表达^[25]。这都从侧面提示, *c-Myc*可能在调控人胎盘滋养细胞增殖及分化中起重要作用。

因此, 本研究通过对人胎盘绒毛、原代滋养细胞自发合体化细胞模型及 forskolin (FSK) 诱导BeWo细胞合体化模型, 检测*c-Myc*及相关调控因子, 初步探究*c-Myc*及相关调控因子在人滋养细胞合体化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样本材料 早孕绒毛的采集(孕8~10周, $n=4$), 选择2018年1月至2018年4月自愿在重庆医科大学附属第一医院门诊进行人工流产的早期妊娠女性为研究对象。研究对象的年龄为20~35岁, 既往无不良孕产史, 无不良生活习惯和长期服用药物史。足月(孕38~40周)胎盘标本取自选择性剖宫产单胎妊娠女性, 排除合并各种内外科妊娠并发症。本研究得到重庆医科大学生物医学研究伦理委员会批准, 标本收集经患者知情同意。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清购自德国PAN-Biotech公司; 青霉素、链霉素、两性霉素B、RIPA裂解缓冲液、5 \times SDS-PAGE上样缓冲液、DAPI、抗荧光淬灭剂均购自中国碧云天生物技术有限公司; HEPES、FSK、胶质细胞缺少转录因子1(glial cells missing transcription factor 1, GCM1)抗体均购自美国Sigma-Aldrich公司; *c-Myc*抑制剂10058-F4购自美国MedChemExpress公司; Percoll购自美国GE Healthcare公司; DMEM培养基购自以色列Biologi-

cal Industries公司; F12K培养基、脱脂奶粉、BSA、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联的二抗、山羊抗小鼠FITC或山羊抗兔TRITC二抗、EDTA抗原修复液、免疫组化染色试剂盒(SA1021-鼠IgG, SA1022-兔IgG)、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)、 β -Actin抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司; c-Myc抗体、E-Cadherin抗体购自美国CST公司; 合胞素1(syncytin-1, Syn1)购自北京博奥森生物技术有限公司; Tween-20购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 化学发光底物购自苏州新赛美生物科技有限公司; CK7抗体购自美国Abcam公司; Trizol购自美国Invitrogen Life Technologies公司; PrimeScript™ RT Master Mix、SYBR Green Supermix均购自日本TaKaRa公司; 定量引物购自深圳华大基因股份有限公司。

二氧化碳恒温细胞培养箱购自美国Thermo Scientific公司; 光学显微镜购自日本Olympus公司; 石蜡组织切片机购自德国Leica公司; 化学发光检测仪、实时荧光定量PCR仪、PCR仪均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 BeWo细胞使用含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素和20 mmol/L HEPES的F12K完全培养基培养于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中。使用含100 μ mol/L的10058-F4培养基培养BeWo细胞24 h, 抑制c-Myc与MAX发生二聚化。使用含25 μ mol/L的FSK培养基培养BeWo细胞72 h, 诱导细胞合体化。通过Western blot、免疫荧光、qRT-PCR等验证BeWo细胞合体化水平。Percoll连续密度梯度法分离人原代胎盘滋养细胞(primary human trophoblast, PHT), 使用含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素、2.5 μ g/mL两性霉素B的DMEM完全培养基培养于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中。培养48 h, 诱导其自发合体化。qRT-PCR检测相关基因表达验证PHT细胞合体化水平。

1.2.2 Western blot 细胞蛋白提取使用RIPA裂解缓冲液于冰上裂解细胞10 min, 加入5 \times SDS-PAGE上样缓冲液, 100 °C加热10 min。细胞蛋白冻存于-80 °C。将提取的蛋白质进行SDS-PAGE凝胶电泳, 并电转至聚偏二氟乙烯膜。5%脱脂奶粉37 °C封闭20 min后, 将膜与c-Myc(1:1 000)、GCM1(1:500)、Syn1(1:500)和 β -Actin(1:1 000)一抗于4 °C孵育过夜, 用含有0.2%

Tween-20 PBS洗涤后与HRP偶联的二抗37 °C孵育1 h。洗涤后, 通过化学发光底物显色, 并使用化学发光检测系统检测。

1.2.3 细胞免疫荧光(immunofluorescence, IFC) 将 1×10^5 个BeWo细胞种于24孔板中培养并采用25 μ mol/L的FSK诱导合体化72 h。4%多聚甲醛固定10 min, 用PBS洗涤, 用0.1% Triton X-100通透10 min, 5% BSA于37 °C封闭30 min, 并与c-Myc(1:200)、E-Cadherin(1:200)于4 °C孵育过夜。PBS洗涤后, 使用山羊抗小鼠FITC或山羊抗兔TRITC二抗于37 °C避光孵育1 h。DAPI染色5 min。使用抗荧光淬灭剂封片后通过光学显微镜观察免疫染色并拍照。

1.2.4 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC) 将人早孕绒毛组织包埋于石蜡中, 并进行连续石蜡切片(5 μ m)。将切片用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 3% H₂O₂去除内源性过氧化物干扰。通过EDTA抗原修复液进行抗原热修复。切片自然冷却后使用免疫组化染色试剂盒, 用5% BSA于37 °C封闭30 min, 与c-Myc(1:200)、CK7(1:100)一抗于4 °C孵育过夜, PBS洗涤后使用HRP偶联的二抗于37 °C孵育1 h。经苏木精复染, DAB显色。使用中性和树胶封片后通过光学显微镜观察免疫染色并拍照。

1.2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 使用Trizol 抽提细胞总RNA后冻存于-80 °C。RNA经PrimeScript™ RT Master Mix逆转录为cDNA后, 使用SYBR Green Supermix进行靶基因检测。定量引物采用Primer Premier 5.0进行设计, 由深圳华大基因股份有限公司合成纯化, 引物序列如表1所示。通过使用实时荧光定量PCR仪检测扩增信号, 使用Gapdh作为基因表达内参标记, 基因相对表达水平用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算。

1.2.6 c-Myc蛋白质相互作用网络分析 将c-Myc基因应用于STRING(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)在线数据库中构建c-Myc的蛋白质相互作用(protein protein interaction network, PPI)网络。

1.2.7 统计分析 使用GraphPad Prism 5进行统计分析, *t*检验分析评估组与组之间的差异, *P*<0.05具有统计学差异。每个实验至少包括三组样品重复。

2 结果

2.1 c-Myc在人早孕绒毛中及原代滋养细胞中的表达模式

为了探究c-Myc在人胎盘滋养细胞合体化过程

表1 定量引物序列

Table 1 The sequence of primer

基因 Genes	正向引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>c-Myc</i>	GCC ACG TCT CCA CAC ATC AG	TGG TGC ATT TTC GGT TGT TG
<i>GCM1</i>	GCC AAG CAA GAG CAG CAA A	TCA TCT CAA AGG ACA CAG GTT CA
<i>β-hCG</i>	GTG AAC CCC GTG GTC TCC TA	GGT CAT CAC AGG TCA AGG GG
<i>Syn1</i>	CCT CAA ACC TCA CCT GTG TAA AAT	AGA GCC ATT CAA ACA ACG ATA GG
<i>MAX</i>	TGA CAA ACG GGC TCA TCA TAA T	TGT GTG GTT TTT CCT TCG CAT
<i>CDKN2A</i>	GGC ACC AGA GGC AGT AAC CA	CAG GGT ACA AAT TCT CAG ATC ATC A
<i>CDK2</i>	GCT AGC AGA CTT TGG ACT AGC CAG	AGC TCG GTA CCA CAG GGT CA
<i>CCNA2</i>	AGC CTG CGT TCA CCA TTC AT	GGG CAT CTT CAC GCT CTA TTT T
<i>hTERT</i>	CGT GGT TTC TGT GTG GTG TC	CCT TGT CGC CTG AGG AGT AG
<i>OCT4</i>	GCA AAG CAG AAA CCC TCG TG	ACA CTC GGA CCA CAT CCT TCT C
<i>SOX2</i>	CGG CAA CCA GAA AAA CAG C	GCA TCT TGG GGT TCT CCT G
<i>NR2F2</i>	GCC ATA GTC CTG TTC ACC T	GCA CAC TGA GAC TTT TCC TG
<i>TFAP2A</i>	CTC AAC CGA CAA CAT TCC	CGG TGA ACT CTT TGC ATA TC
<i>hPL</i>	GCT ATG CTC CAA GCC CAT C	TGC AGG AAT GAA TAC TTC TGG TC
<i>CRH</i>	TCC CAT CTC CCT GGA TCT C	AGC TTG CTG TGC TAA CTG CTC
<i>PSG1</i>	CAT CCG CAG TGA CCC AGT	TCT CCT GAA CGG TAA TAG GTG AA
<i>Gapdh</i>	AGA TCA TCA GCA ATG CCT CCT	TGG TCA TGA GTC CTT CCA CG

中的作用,首先利用IHC检测了*c-Myc*在人早孕绒毛中的表达情况,结果显示,*c-Myc*主要表达定位于CK7阳性的单核CTB细胞中,STB细胞中表达相对较低(图1A)。进一步利用Western blot、IFC、qRT-PCR检测了其在人足月胎盘原代滋养细胞自发合体化过程中的表达情况,结果显示,人原代CTB体外成功自发合体成STB细胞(图1B);并在此过程中,*Syn1*、*β-hCG*和*GCM1*合体化标志物的mRNA水平升高,而*c-Myc*的mRNA水平显著降低(图1C)。Western blot检测*c-Myc*、*Syn1*和*GCM1*蛋白表达,结果显示与qRT-PCR结果一致(图1D)。

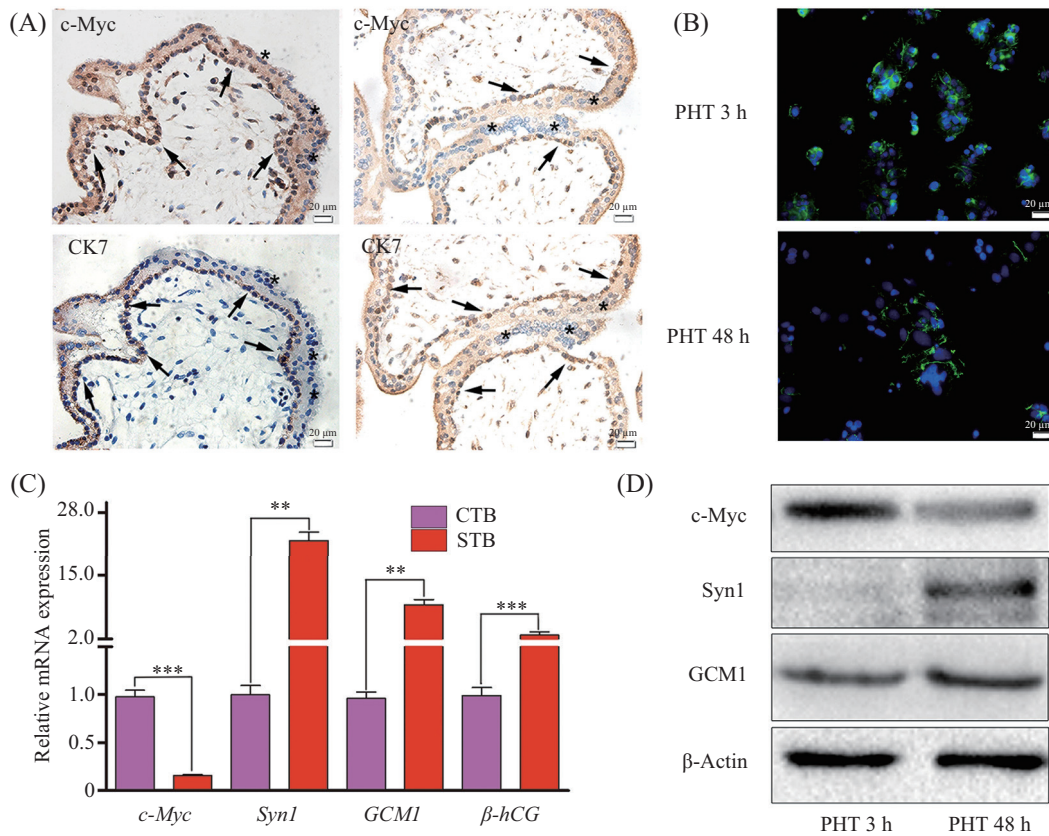
2.2 *c-Myc*对BeWo细胞合体化的影响

上述已明确,*c-Myc*在合体化过程中呈现下调表达,因此进一步利用BeWo细胞诱导合体化模型明确其在合体化过程中作用。首先,通过IFC、Western blot、qRT-PCR检测*c-Myc*在BeWo细胞合体化过程中的表达模式,结果发现,*c-Myc*的蛋白及mRNA水平均在BeWo细胞合体化过程中呈下调表达(图2A~图2D)。因此,*c-Myc*在BeWo细胞合体化中的表达模式与人原代滋养细胞中的结果相似。进而,我们利用*c-Myc*抑制剂10058-F4抑制*c-Myc*对下游因子的调控作用,并诱导BeWo细胞合体化。通过IFC、Western blot、qRT-PCR检测*c-Myc*对BeWo细胞合体

化的影响。结果显示,在10058-F4成功抑制*c-Myc*的作用之后,BeWo细胞合体化能力提高(图2E~图2G),进一步表明,*c-Myc*在合体化中表达下调,抑制*c-Myc*后成功促进BeWo细胞合体化。

2.3 *c-Myc* PPI网络调控BeWo细胞合体化

上述结果已明确,*c-Myc*对BeWo细胞合体化过程的影响,因此,为进一步探究*c-Myc*相关调控作用网络在BeWo细胞合体化中的表达模式,我们通过STRING在线数据库构建*c-Myc*的PPI网络(图3A),结果显示,*c-Myc*与多种细胞周期调控相关因子相互作用,我们选取其中细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶2(cyclin dependent kinase 2, *CDK2*)、细胞周期依赖性激酶抑制剂2A(cyclin dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*)、细胞周期蛋白A2(cyclin A2, *CCNA2*)及*MAX*进行实时荧光定量PCR检测验证,结果显示,在FSK诱导BeWo细胞合体化后,随着*c-Myc*的表达降低,与其相关的*CDK2*表达降低,*CDKN2A*上调,*CCNA2*降低(图3B),揭示*c-Myc*可能通过调节周期相关因子,改变细胞周期进程,诱导细胞周期阻滞,影响CTB细胞的增殖能力,从而降低滋养细胞干性,影响细胞分化(融合)。此外,*MAX*作为与*c-Myc*结合蛋白,共同调控下游靶标基因转录,其mRNA水平在BeWo细胞合体化后同样发生下调。



A: IHC检测人早孕绒毛连续切片中c-Myc及CK7的表达, “→”指示CK7标记绒毛中单核CTB细胞, “*”指示STB细胞。B: IFC检测人原代滋养细胞体外自发合体化。C: qRT-PCR检测人原代滋养细胞体外培养3 h和48 h后c-Myc、Syn1、GCM1、β-hCG的mRNA水平, 使用Gapdh作为内参基因, GraphPad Prism 5进行t检验统计分析。**P<0.01, ***P<0.001; D: Western blot检测人原代滋养细胞体外培养3 h和48 h后c-Myc、Syn1、GCM1的蛋白水平。

A: IHC was used to detect the expression of c-Myc and CK7 in serial sections of human early pregnancy villous, and CK7-labeled monocyte CTB cells in the villous(indicated by arrows). B: IFC was used to detect the fusion of PHT cells. C: qRT-PCR was used to detect the mRNA level of c-Myc, Syn1, GCM1, and β-hCG in human primary trophoblast cells for 3 h and 48 h in vitro. Gapdh was used as the internal reference gene, and GraphPad Prism 5 was used for t-test statistical analysis. **P<0.01, ***P<0.001; D: Western blot was used to detect the expression of c-Myc and related syncytium marker protein during the fusion of PHT cells.

图1 c-Myc在人正常早孕绒毛中的表达及在人正常原代滋养细胞自发合体化过程中的改变

Fig.1 The expression of c-Myc in human normal early pregnancy villous and the changes during spontaneous fusion of human primary trophoblast cells

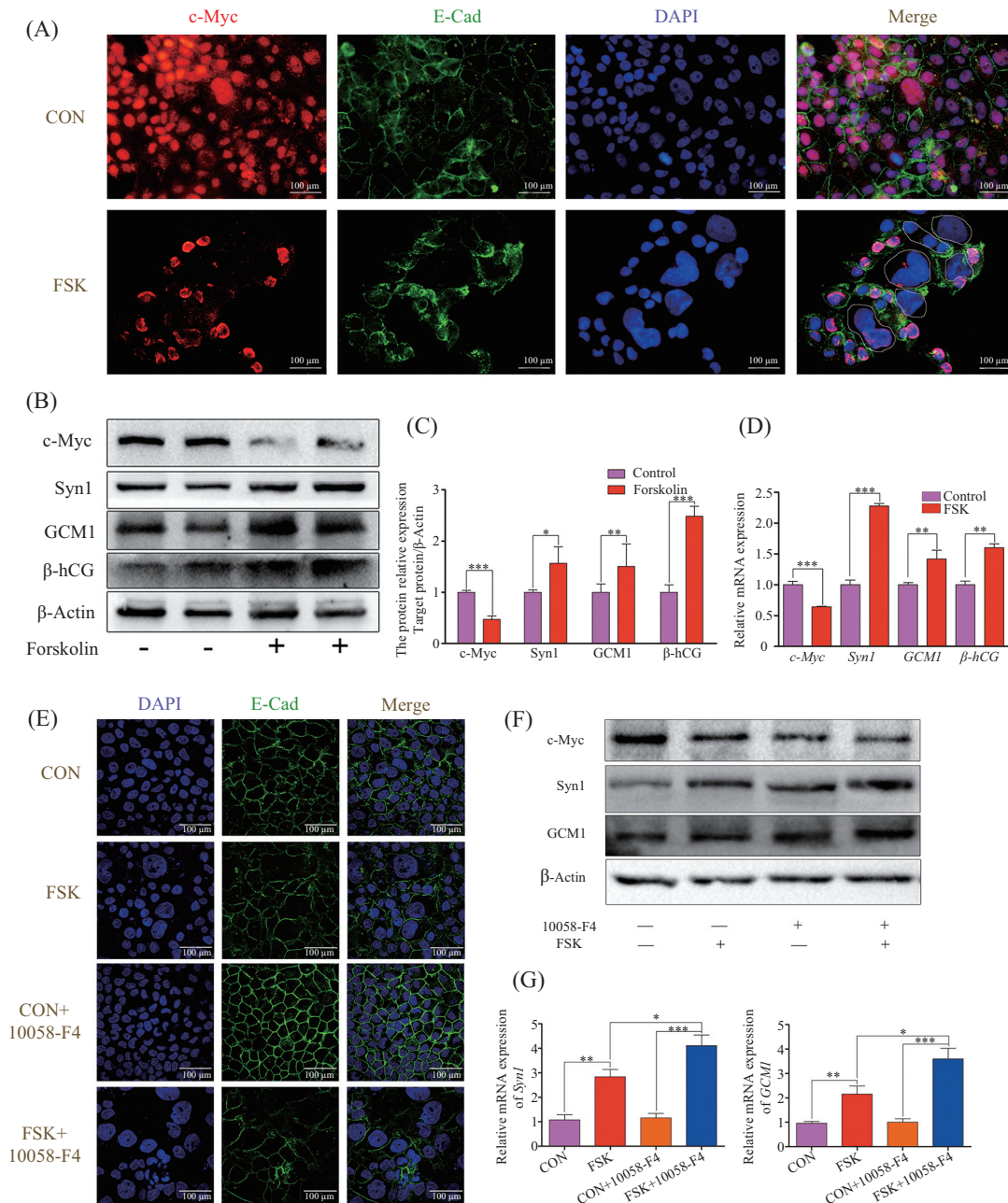
2.4 c-Myc相关因子在BeWo细胞合体化过程中的表达模式

为进一步验证c-Myc在BeWo细胞合体化过程中的作用, 本研究通过qRT-PCR分析了负责维持滋养细胞增殖的OCT4、SOX2、hTERT及合体化的hPL、CRH、PSG1的基因mRNA水平。结果显示, 在FSK诱导BeWo细胞合体化后, NR2F2、TFAP2A、hPL、CRH、PSG1等基因mRNA水平上调, 而OCT4、SOX2、hTERT等基因mRNA水平下调(图4)。

3 讨论

本研究在人早孕绒毛、原代滋养细胞自发合体

化及BeWo细胞诱导合体化模型中证实了c-Myc主要表达于CTB细胞, 在STB细胞中呈现低表达; STB属于终末分化细胞, 退出了正常细胞周期而无法增殖, 这提示了, c-Myc可能参与调控滋养细胞的细胞周期进而参与滋养细胞合体化过程。我们通过构建PPI网络发现, c-Myc互作蛋白主要涉及周期相关因子, 并在BeWo诱导合体化过程中发现, CDKN2A表达上调、CDK2和CCNA2表达下调。现已知CCNA2作为调控细胞周期G₁/S和G₂/M过渡阶段的蛋白, 需与CDK2形成特定的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物而发挥作用^[26]; 抑制CCNA2/CDK2复合物活性, 可诱导细胞周期发生阻滞^[27]; CDKN2A能够在抑制CDK4

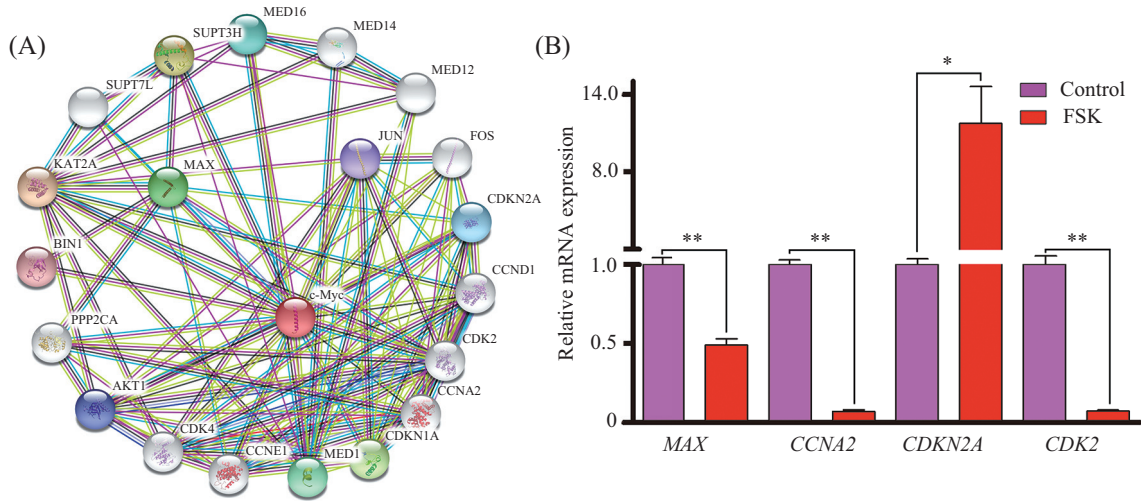


A: IFC检测c-Myc及E-Cadherin在BeWo细胞合体化前后共定位。B: Western blot检测c-Myc及相关合体化标志因子蛋白在BeWo细胞合体化前后表达水平; C: 灰度分析c-Myc及相关合体化标志因子蛋白表达水平, GraphPad Prism 5进行 t 检验统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; D: qRT-PCR检测BeWo细胞合体化前后c-Myc、*Syn1*、*GCM1*及β-hCG的mRNA水平, *Gapdh*作为内参基因, GraphPad Prism 5进行 t 检验统计分析, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; E: 免疫荧光检测10058-F4抑制c-Myc后, BeWo细胞合体化水平。F: Western blot检测10058-F4抑制c-Myc后, c-Myc及相关合体化标志因子蛋白在BeWo细胞合体化前后表达水平; G: qRT-PCR检测10058-F4抑制c-Myc后, BeWo细胞合体化前后合体化标志因子mRNA水平, *Gapdh*作为内参基因, GraphPad Prism 5进行 t 检验统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: IFC was used to detect c-Myc and E-Cadherin co-localization during the fusion of BeWo cells. B: Western blot was used to detect the expression of c-Myc and related syncytium marker protein during the fusion of BeWo cells; C: Gray-scale analysis of c-Myc and related syncytium marker protein, GraphPad Prism 5 was used for t -test statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; D: qRT-PCR was used to detect the mRNA level of c-Myc, *Syn1*, *GCM1*, and β-hCG in BeWo cells. *Gapdh* was used as the internal reference gene, and GraphPad Prism 5 was used for t -test statistical analysis. , ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; E: IFC was used to detect the fusion of BeWo cells treated with 10058-F4. F: Western blot was used to detect the expression of c-Myc and related syncytium marker protein during the fusion of BeWo cells treated with 10058-F4; G: qRT-PCR was used to detect the mRNA level of *Syn1* and *GCM1* in BeWo cells treated with 10058-F4. *Gapdh* was used as the internal reference gene, and GraphPad Prism 5 was used for t -test statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 c-Myc对BeWo细胞合体化的影响

Fig.2 The effect of c-Myc on FSK-induced fusion of BeWo cells

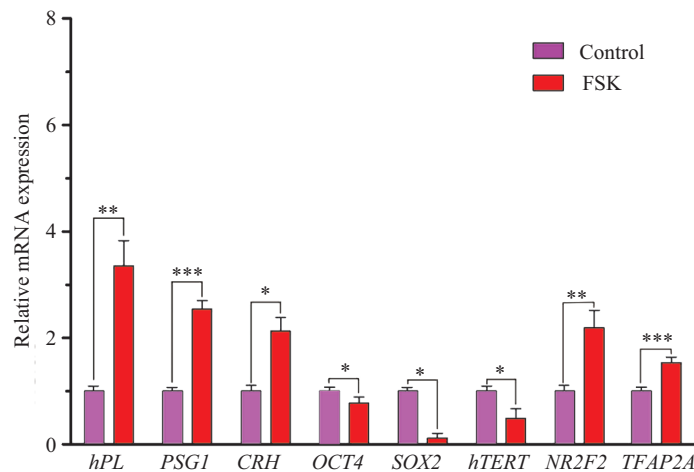


A: c-Myc蛋白相互作用的PPI网络。B: qRT-PCR检测BeWo细胞合体化前后c-Myc PPI相关周期调控因子的mRNA水平, 使用*Gapdh*作为内参基因, GraphPad Prism 5进行t检验统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: c-Myc PPI-associated regulation network. B: qRT-PCR was used to detect the mRNA level of c-Myc PPI-associated regulation factors in FSK-induced fusion of BeWo cells. *Gapdh* was used as the internal reference gene, and GraphPad Prism 5 was used for t-test statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 c-Myc蛋白质相互作用网络模式图及qRT-PCR验证

Fig.3 c-Myc protein-protein interaction network pattern and qRT-PCR verification



qRT-PCR检测BeWo细胞合体化前后c-Myc相关调控网络因子的mRNA水平, 使用*Gapdh*作为内参基因, GraphPad Prism 5进行t检验统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

qRT-PCR was used to detect the mRNA level of c-Myc-mediated regulation network in FSK-induced fusion of BeWo cells. *Gapdh* was used as the internal reference gene, and GraphPad Prism 5 was used for t-test statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

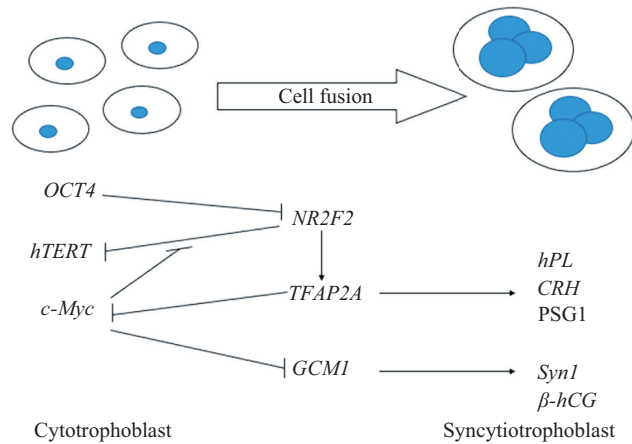
图4 qRT-PCR验证滋养细胞干性基因及相关融合基因在BeWo细胞合体化中的水平

Fig.4 qRT-PCR verification of trophoblast stem gene and related fusion gene in FSK-induced fusion of BeWo cells

和CDK6的磷酸化水平诱导细胞周期G₁期阻滞^[28]。我们的结果提示, c-Myc作为转录因子在STB中表达下调可能介导细胞周期相关因子表达改变, 促进CTB退出细胞周期参与调控滋养细胞的合体化。

c-Myc、OCT4、SOX2及hTERT在多能干细胞的快速增殖、维持干细胞特性及体细胞重编程中必不可少^[29-30]。本研究利用生物信息学预测并经qRT-

PCR证实c-Myc、OCT4及hTERT与TFAP2A、NR2F2在人滋养细胞中形成调控网络调控下游因子, 我们推测, 这些基因参与了CTB细胞的增殖及分化(融合)(图5)。c-Myc与NR2F2竞争结合hTERT启动子序列从而调控hTERT表达, 其中NR2F2抑制hTERT的表达, 而c-Myc可以逆转由NR2F2引起的hTERT表达抑制^[21,25]。转录因子TFAP2A受到NR2F2的正向调控, 同



*c-Myc*在滋养细胞合体化过程中的调控网络模式。“→”表示促进基因表达，“—|”表示抑制基因表达。

Schematic diagram of *c-Myc*-mediated regulation network pattern of during the syncytialization of trophoblast. “→” means promoting genes expression; “—|” means inhibiting genes expression.

图5 在滋养细胞合体化过程中*c-Myc*调控网络模式

Fig.5 *c-Myc*-mediated regulation pattern during the syncytialization of trophoblast

时在*c-Myc*的反式激活中发挥着抑制作用^[25,31]。OCT4通过调控microRNA靶向抑制NR2F2表达^[32],这提示了,在胎盘滋养细胞中细胞干性的维持抑制滋养细胞分化(融合)的进程。*c-Myc*、OCT4及hTERT形成维持细胞干性调控网络,并通过转录因子NR2F2、TFAP2A调控CRH、PSG1、hPL等因子表达参与滋养细胞增殖和分化(融合)平衡,从而维持胎盘正常发育过程。

在滋养细胞中CRH、PSG1、hPL等因子亦可维持STB细胞的终末分化细胞状态^[33-35],转录因子TFAP2A可促进CRH、PSG1、hPL的表达,促使CTB细胞分化(融合)为STB细胞,维持妊娠正常进行^[25]。本研究证实,OCT4、SOX2及hTERT在FSK诱导BeWo细胞合体化前后下调,进一步反映了滋养细胞在分化前细胞干性降低;TFAP2A、NR2F2、CRH、PSG1及hPL的上调也进一步表明,滋养细胞分化(融合)为STB细胞后,形成终末分化细胞,执行维持正常妊娠功能。

综上,我们初步发现,*c-Myc*的表达下调在人滋养细胞合体化过程中可协同细胞周期相关因子降低CTB细胞的干性,并诱导GCM1、Syn1、β-hCG、hPL、CRH及PSG1等从而促进STB细胞的形成^[1]。

参考文献 (References)

[1] WILLKOMM L, BLOCH W. State of the art in cell-cell fusion [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1313: 1-19.
[2] HERNANDEZ J M, PODBILEWICZ B. The hallmarks of cell-

cell fusion [J]. *Development*, 2017, 144(24): 4481-95.
[3] PLATT J L, ZHOU X, LEFFERTS A R, et al. Cell fusion in the war on cancer: a perspective on the inception of malignancy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7). pii: E1118.
[4] LATOS P A, HEMBERGER M. From the stem of the placental tree: trophoblast stem cells and their progeny [J]. *Development*, 2016, 143(20): 3650-60.
[5] GAMAGE T K, CHAMLEY L W, JAMES J L. Stem cell insights into human trophoblast lineage differentiation [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 23(1): 77-103.
[6] KUSAMA K, BAI R, IMAKAWA K. Regulation of human trophoblast cell syncytialization by transcription factors STAT5B and NR4A3 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4918-27.
[7] RED-HORSE K, ZHOU Y, GENBACEV O, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(6): 744-54.
[8] WU F, TIAN F J, LIN Y. Oxidative stress in placenta: health and diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 293271.
[9] APLIN J D. Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2/3): 323-9.
[10] YONEKURA COLLIER A R, ZSENGELLER Z, PERNICONE E, et al. Placental sFLT1 is associated with complement activation and syncytiotrophoblast damage in preeclampsia [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2019, 38(3): 193-9.
[11] LAI W S, DING Y L. GNG7 silencing promotes the proliferation and differentiation of placental cytotrophoblasts in preeclampsia rats through activation of the mTOR signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(5): 1939-50.
[12] WANG X, ZHANG Z, ZENG X, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway in severe preeclampsia [J]. *J Mol Histol*, 2018, 49(3): 317-27.
[13] HE Y, ZOU L. Notch-1 inhibition reduces proliferation and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3): 1884-90.
[14] SI J, YU X, ZHANG Y, et al. Myc interacts with Max and Miz1

- to repress C/EBPdelta promoter activity and gene expression [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 92.
- [15] SAMMAK S, HAMDANI N, GORREC F, et al. Crystal structures and nuclear magnetic resonance studies of the apo form of the c-MYC:MAX bHLHZip complex reveal a helical basic region in the absence of DNA [J]. *Biochemistry*, 2019, 58(29): 3144-54.
- [16] HORIUCHI D, ANDERTON B, GOGA A. Taking on challenging targets: making MYC druggable [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2014: e497-502.
- [17] PU H H, DUAN J, WANG Y, et al. Thymic stromal lymphopoietin promotes the proliferation of human trophoblasts via phosphorylated STAT3-mediated c-Myc upregulation [J]. *Placenta*, 2012, 33(5): 387-91.
- [18] ZHANG M, MURALIMANO HARAN S, WORTMAN A C, et al. Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(45): E7069-76.
- [19] WANG X, ZHOU P, SUN X, et al. Acidified bile acids increase hTERT expression via c-myc activation in human gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3038-44.
- [20] RAHAT B, HAMID A, AHMAD NAJAR R, et al. Epigenetic mechanisms regulate placental c-myc and hTERT in normal and pathological pregnancies; c-myc as a novel fetal DNA epigenetic marker for pre-eclampsia [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(10): 1026-40.
- [21] WANG Q, BAI Z, LI X, et al. The evidences of human orphan receptor COUP-TFII inhibiting telomerase activity through decreasing hTERT transcription [J]. *Cancer Lett*, 2004, 214(1): 81-90.
- [22] LEE K, JEONG J, TSAI M J, et al. Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 102(1/5): 41-50.
- [23] SUZUKI T, MORIYA T, DARNEL A D, et al. Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 164(1/2): 69-75.
- [24] GAUBATZ S, IMHOF A, DOSCH R, et al. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2 [J]. *EMBO J*, 1995, 14(7): 1508-19.
- [25] HUBERT M A, SHERRITT S L, BACHURSKI C J, et al. Involvement of transcription factor NR2F2 in human trophoblast differentiation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9417.
- [26] PAGANO M, PEPPERKOK R, VERDE F, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle [J]. *EMBO J*, 1992, 11(3): 961-71.
- [27] ALI G M E, IBRAHIM D A, ELMETWALI A M, et al. Design, synthesis and biological evaluation of certain CDK2 inhibitors based on pyrazole and pyrazolo[1,5-a] pyrimidine scaffold with apoptotic activity [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 86: 1-14.
- [28] STOTT F J, BATES S, JAMES M C, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2 [J]. *EMBO J*, 1998, 17(17): 5001-14.
- [29] LIU X, HUANG J, CHEN T, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells [J]. *Cell Res*, 2008, 18(12): 1177-89.
- [30] CHENG, ZHAO Y, ZHANG F, et al. Engineering a humanized telomerase reverse transcriptase gene in mouse embryonic stem cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9683.
- [31] LI Q, LUO C, LOHR C V, et al. Activator protein-2alpha functions as a master regulator of multiple transcription factors in the mouse liver [J]. *Hepato Res*, 2011, 41(8): 776-83.
- [32] HU S, WILSON K D, GHOSH Z, et al. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2 [J]. *Stem cells*, 2013, 31(2): 259-68.
- [33] WANG W S, LIU C, LI W J, et al. Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts [J]. *Placenta*, 2014, 35(1): 30-6.
- [34] ZHOU G Q, BARANOV V, ZIMMERMANN W, et al. Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta [J]. *Placenta*, 1997, 18(7): 491-501.
- [35] KUMPEL B, KING M J, SOORANNA S, et al. Phenotype and mRNA expression of syncytiotrophoblast microparticles isolated from human placenta [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1137: 144-7.