

王艳,赵楠楠,何艳舫,等. p21 在滋养细胞迁移和侵袭中的作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 645-650.

Wang Y, Zhao NN, He YF, et al. Role of p21 in trophoblast migration and invasion [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 645-650.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.009

p21 在滋养细胞迁移和侵袭中的作用研究

王艳,赵楠楠,何艳舫,董建新,陈燕*

(华北理工大学附属医院,唐山 063000)

【摘要】 目的 探究 p21 基因在正常滋养细胞迁移和侵袭中的作用以及可能的机制。**方法** 通过 siRNA 敲低滋养细胞 HTR-8/SVneo 中的 p21 基因。通过细胞增殖实验、划痕实验以及 Transwell 小室侵袭实验,来观察 p21 敲低的滋养细胞迁移和侵袭能力的变化。通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 和免疫印记分析 (Western Blot),在 mRNA 和蛋白质水平上检测 p21 敲低对 ERK3 和 MMP2 表达的影响。**结果** p21 敲低的滋养细胞迁移和侵袭能力显著减弱,但对细胞增殖无影响。ERK3 及 MMP2 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达都显著降低。**结论** 以上结果说明 p21 基因能促进正常滋养细胞的运动能力,这种作用与调节 ERK3 和 MMP2 的表达有关。

【关键词】 p21;滋养细胞;迁移;侵袭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0645-06

Role of p21 in trophoblast migration and invasion

WANG Yan, ZHAO Nannan, HE Yanfang, DONG Jianxin, CHEN Yan*

(Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: CHEN Yan. E-mail: yan_doctor@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role of the p21 gene in the migration and invasion of normal trophoblasts and the possible associated mechanisms. **Methods** The p21 gene in trophoblast HTR-8/SVneo was knocked down by siRNA. Cell proliferation, wound assays, and Transwell invasion assays were used to observe changes in the migration and invasion of trophoblasts with p21 knockdown. The effects of p21 knockdown on ERK3 and MMP2 expression were also examined at both mRNA and protein levels by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) and western blotting. **Results** The migration and invasion of trophoblasts with p21 knockdown were significantly reduced, whereas there was no effect on cell proliferation. The expression of ERK3 and MMP2 was significantly decreased at both mRNA and protein levels. **Conclusions** These result indicate that the p21 gene can promote the motility of normal trophoblasts, and this effect is related to regulation of the expression of ERK3 and MMP2.

【Keywords】 p21; trophoblast; migration; invasion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

绒毛外滋养细胞 (extravillous trophoblast, EVT) 侵入母体蜕膜对于胎盘植入和胎儿发育至关重要,该过程的失败与多种妊娠疾病有关,比如子痫前期 (preeclampsia, PE)。PE 的病理生理学与细胞功能障碍密切相关,包括细胞增殖失调、凋亡增加、分化缺陷、滋养层细胞侵入减弱以及氧化

[基金项目] 河北省卫生健康委科研基金项目 (20180776)。
Funded by Research Fund Project of Hebei Health Commission (20180776)。
[作者简介] 王艳 (1983—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 妇产科。Email: 1252834262@qq.com
[通信作者] 陈燕 (1971—), 女, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 妇产科。Email: yan_doctor@163.com

应激^[1-2]。PE 的全球患病率约为 8%,是孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一。尽管已对 PE 进行了数十年的研究,对其详细的病理生理和分子机制仍知之甚少。

细胞周期进程的平衡和控制需要通过不同的调控因子来确保。p21 是周期素依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDK) 抑制剂,由 CDKN1A 基因编码。作为细胞周期调节因子的重要成员,p21 在很多生理过程中都发挥了重要的作用,例如:参与细胞周期调控、包括有丝分裂、DNA 修复、细胞凋亡、分化、细胞骨架动力学、细胞迁移、基因转录、诱导性多能干细胞的重新变成、衰老及衰老起始等^[3]。在与癌症有关的多项研究中,p21 被证实不仅能抑制癌症,还能作为原癌基因发挥致癌能力。然而,目前关于 p21 在胎盘学中的调节功能还研究的较少。有证据表明,在整个正常妊娠期内,p21 基因都能在包括 EVT 在内的多种滋养细胞类型中表达,调控其增殖、分化和侵袭。因此,p21 被认为是细胞周期停滞,衰老和凋亡的潜在标志物之一^[4-5]。

本研究希望通过敲低滋养细胞 HTR-8/SVneo 中的 p21,来探究 p21 对正常滋养细胞运动能力的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

HTR-8/SVneo 细胞与 BeWo 细胞由本院研究室提供。

1.1.2 试剂

靶向 p21 的 siRNA (F: ACACCUCCUCAUGU ACAUA, R: UAUGUACAUGAGGAGGUGU; 命名为 sip21)、对照 siRNA 以及丝裂霉素 C 均购自 Sigma-Aldrich 公司;GAPDH (GTX627408,1:1000)的抗体购自 Genetex;p53(sc-126,1:1000)的抗体购自 Santa Cruz Biotechnology;p21 (#2947,1:1500)、ERK3 (#4067,1:1000)以及 PARP (#9542,1:1000)的抗体均购自 Cell Signaling;CellTiter 细胞活力检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒以及反转录试剂盒购自 Promega 公司;GAPDH、p21、ERK3、MMP2 的反转录引物由生工生物工程股份有限公司合成;RPMI 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素均购自生工生物工程股份有限公司。所用引物见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence	
基因 Gene	引物序列 Primer sequence
GAPDH	F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'
	R: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCC-3'
p21	F: 5'-GAGGGCAAGTACGAGTGGCAA-3'
	R: 5'-CTGCGCATTGCTCCGCTAACC-3'
p53	F: 5'-TCCTCCCCAACATCTTATCC-3'
	R: 5'-GCACAAACACGAACCTCAAA-3'
ERK3	F: 5'-TGGCAAATCTGGCTCAATTAGA-3'
	R: 5'-ACAGTCCTCCCCACCACTCA-3'
MMP2	F: 5'-TGGCACCACCGAGGATTATG-3'
	R: 5'-CCACTTCGCGTCATCATCGT-3'

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 siRNA 转染

正常人绒毛膜滋养细胞 HTR8/Svneo 与人绒毛膜癌细胞 BeWo 分别接种于含 5%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μmol/L 链霉素的 RPMI-1640(标准生长培养基)中进行培养。融合前经胰蛋白酶消化,然后在 5% CO₂、37℃ 环境下连续传代培养。

用转染试剂 Oligofectamine 对 10 ~ 20 nmol/L siRNA 进行瞬时转染,转染采用电穿孔法(250 V, 250 μF, 500 Ω)。

1.2.2 细胞增殖、迁移和侵袭实验

细胞增殖实验:按照细胞活力检测试剂盒制造商的说明进行细胞增殖测定。细胞划痕实验:将 HTR8/SVneo 细胞以 2.0 × 10⁵ 个/孔的浓度接种在 24 孔板中并培养过夜。融合成单层状态时,用丝裂霉素 C 处理细胞,抑制增殖。划动移液枪尖端制造划痕,24 h 后观察并用 Image J 分析划痕愈合情况。

Transwell 小室侵袭实验:按照细胞侵袭检测试剂盒制造商的说明,进行细胞侵袭测定。简单说来,先将 500 μL 无血清培养基添加到 Transwell 的上室中,再将 HTR8/SVneo 细胞以 7.5 × 10⁴ 个/孔的浓度接种到培养基中,并在下室中加入 750 μL 无血清培养基。16 h 后,去除下室中的培养基,添加含有 10%胎牛血清的培养基,开始侵袭测定。24 h 后,用甲醇固定侵袭的细胞,并用结晶紫染色。用显微镜对侵袭的细胞进行成像分析,并进行细胞计数。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (qPCR)

按照总 RNA 提取试剂盒制造商的说明提取总 RNA,并按照反转录试剂盒制造商的说明对 RNA 进行反转录,使用 ABI StepOnePlus Real-time PCR System 进行实时荧光定量 PCR。反应条件如下:

94℃	5 min	} 共 40 个循环
94℃	20 s	
54℃	20 s	
72℃	20 s	
72℃	1 min	

使用 StepOne Software v2.2.2 分析数据,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.4 蛋白印记分析 (Western Blot)

先使用 RIPA 缓冲液和蛋白酶抑制剂制备细胞裂解物,然后采用 Bio-Rad 法测量蛋白质浓度。用 SDS-PAGE 分离总蛋白并转移到聚偏二氟乙烯膜上,将膜用 5% BSA 在 4℃ 下过夜封闭,与各一抗在室温下孵育 1.5 h,用 PBS 将膜冲洗 3 次,然后与二抗在室温下孵育 1 h,再用 PBS 冲洗 3 次。以 GAPDH 作为内参,使用化学发光检测试剂盒检测各蛋白表达。使用 Image J 对蛋白质印迹分析进行定量分析。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 Student's *t* 检验进行组间差异比较。当 $P < 0.05$ 时,被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 p21 和 p53 在滋养细胞中的表达

由图 1 所示,与人绒毛膜癌细胞株 BeWo 结果相反,在 mRNA 和蛋白质表达水平上,正常滋养细

胞 HTR8/SVneo 细胞 p53 的表达水平较高,而 p21 表达则都较低 ($P < 0.05$)。说明滋养细胞 p21 及其主调控因子 p53 的表达在 mRNA 和蛋白质水平上相互对应,二者在正常滋养细胞与肿瘤细胞中表现出相反的表达水平。

2.2 细胞增殖

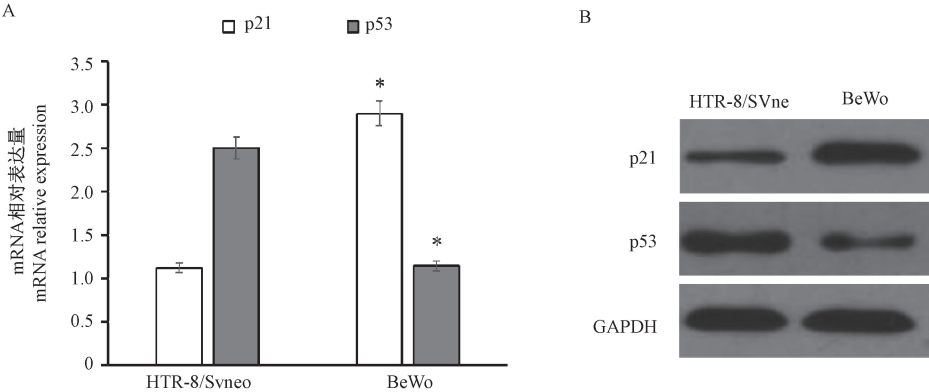
为了探究 p21 在滋养细胞增殖中的作用,用针对 p21 的 siRNA (sip21) 在 HTR 细胞中敲低了 p21 的表达,然后进行 48 h 的细胞活力分析。与对照 siRNA (siCtrl) 相比,用 sip21 处理的细胞在增殖上无显著差异 ($P > 0.05$, 图 2A)。PARP 是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶 (caspase) 的切割底物,可作为凋亡的标志此外。用免疫印迹分析检查了 PARP 及其裂解产物,结果在 p21 敲低的细胞与对照组细胞之间也未观察到显著差异 (图 2B)。这说明 p21 可能对正常滋养细胞的增殖和凋亡没有显著影响。

2.3 细胞迁移

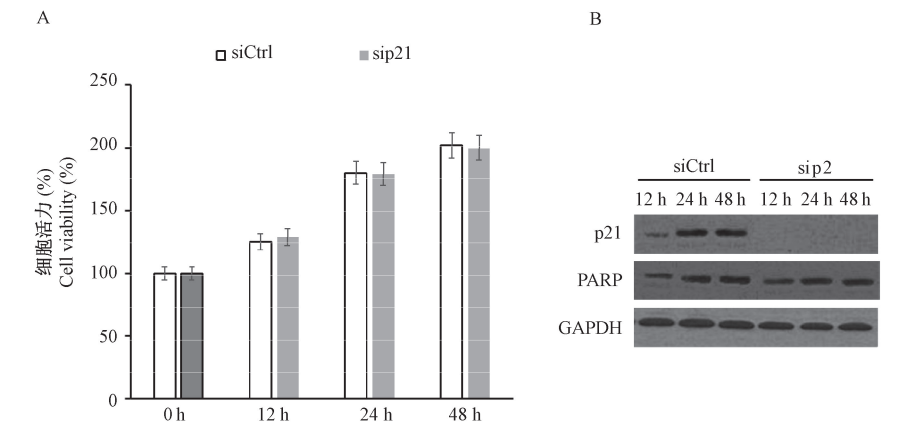
为了探究 p21 对正常滋养细胞运动的影响,进行了细胞划痕实验来观察 p21 敲低后,滋养细胞迁移能力的变化。结果显示,与对照组相比,p21 敲低后的滋养细胞迁移率显著降低 (图 3, $P < 0.05$)。说明 p21 能影响正常滋养细胞的迁移能力。

2.4 细胞侵袭

通过 Transwell 小室侵袭实验,观察 p21 敲低后正常滋养细胞侵袭能力的变化。结果显示,与对照相比,p21 敲低后的滋养细胞侵袭能力显著降低 (图 4, $P < 0.05$),说明 p21 能影响正常滋养细胞的侵袭能力。



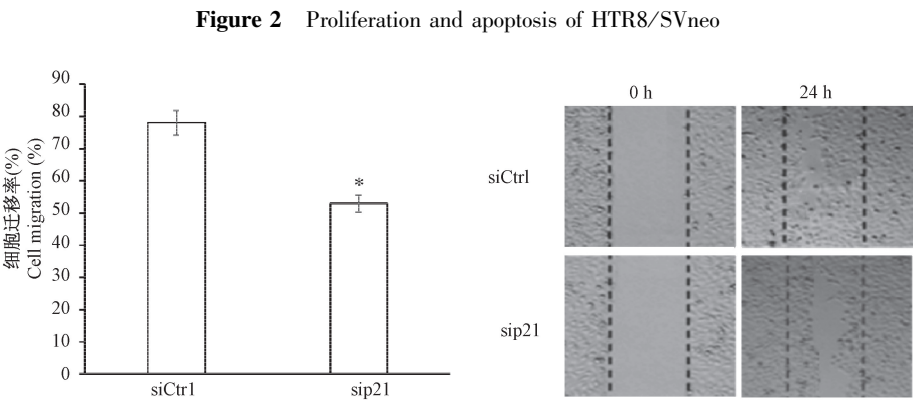
注: A: qPCR 检测结果; B: Western Blot 结果。与 HTR8/SVneo 细胞比较, * $P < 0.05$ 。
图 1 正常滋养细胞 HTR8/SVneo 与人绒毛膜癌细胞 BeWo 中 p21 和 p53 的表达
Note. A, Results of qPCR. B, Results of Western Blot. Compared with HTR8/SVneo, * $P < 0.05$.
Figure 1 Expression of p21 and p53 in HTR8/SVneo and BeWo cells



注:A:细胞活力;B:蛋白印记分析检测 PARP 在 HTR8/SVneo 细胞中的表达。

图 2 HTR8/SVneo 细胞增殖及凋亡

Note. A, Cell viability. B, Expression of PARP in HTR8/SVneo by Western Blot.



注:与 siCtrl 比较, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 3 HTR8/SVneo 细胞迁移能力变化

Note. Compared with siCtrl, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

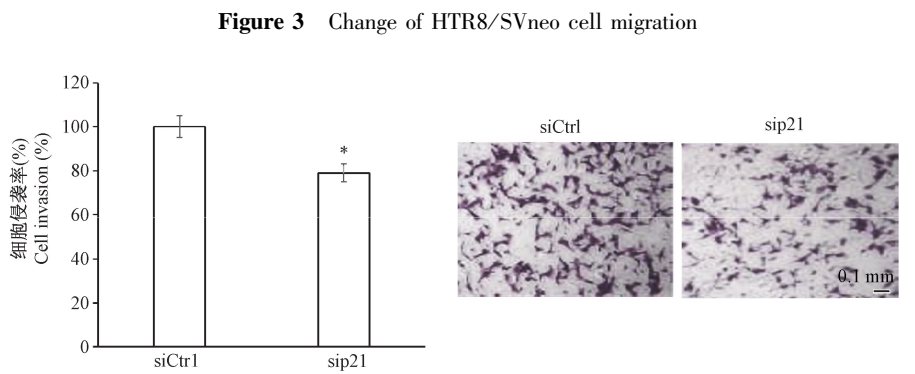


图 4 HTR8/SVneo 细胞侵袭能力变化

Figure 4 Change of HTR8/SVneo cell invasion

2.5 ERK3 的表达水平

ERK3 是有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 超家族的远亲成员,参与细胞的分化和迁移。为了探究 p21 影响滋养细胞运动能力的可能机制,分别检测了 p21 敲低后 ERK3 在 mRNA 和蛋白质水平上的变化。结果表明,与对照组比较,在 p21 敲低的滋

养细胞中,ERK3 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低(图 5, $P < 0.05$)。说明 p21 可能通过调控 ERK3 相关信号途径来影响滋养细胞的运动能力。

2.6 MMP2 mRNA 的表达水平

基质金属蛋白酶能够降解细胞外基质 (ECM),因此滋养细胞的侵袭与基质金属蛋白酶 (MMP) 的

表达密切相关。其中, MMP2 被认为是在滋养层细胞侵袭过程中的关键酶, 且受 ERK3 表达的影响。通过 qPCR 和 Western Blot 检测了 p21 敲低后 MMP2 在 mRNA 和蛋白质水平的变化。结果显示,

与对照组比较, MMP2 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低(图 6, $P < 0.05$)。该结果进一步证实了 p21 可能通过调控 ERK3/MMP2 信号路径来影响滋养细胞的运动能力。

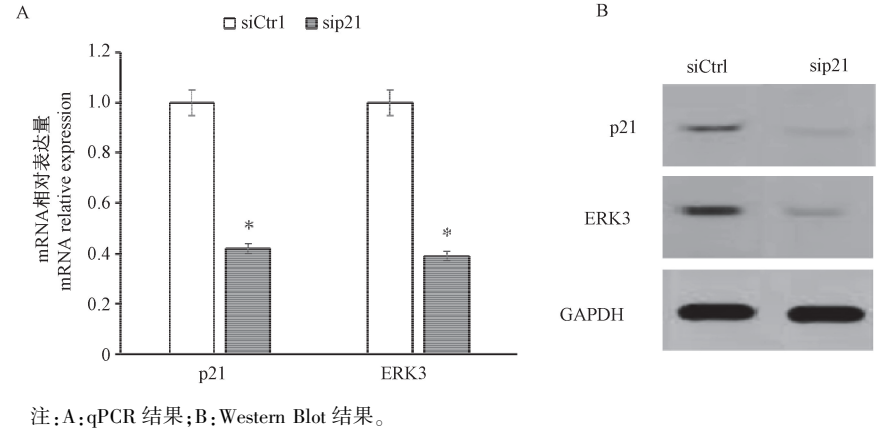


图 5 p21 和 ERK3 在 mRNA 和蛋白质上平上的的表达

Figure 5 Expression of p21 and ERK3 at mRNA and protein levels

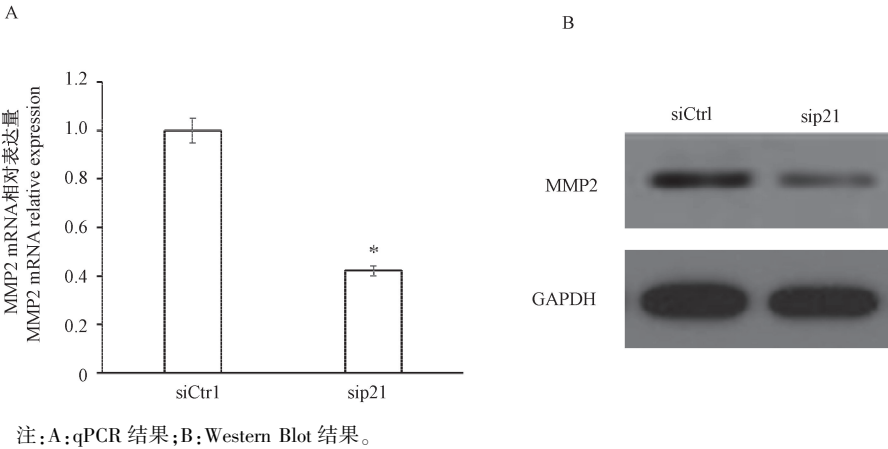


图 6 MMP2 在 mRNA 和蛋白质上平上的的表达

Figure 6 Expression of MMP2 at mRNA and protein levels

3 讨论

p21 在细胞运动中的作用是多方面的, 取决于不同的细胞环境。核 p21 能作为转录因子/辅因子, 在转化生长因子 β (TGF- β) 介导的乳腺癌细胞的迁移和侵袭有必不可少的作用, 当其基因被沉默后, 虽然对细胞生长和增殖没有显著影响, 但能抑制乳腺脂肪垫异种移植小鼠和其他多种乳腺癌细胞的侵袭。Dai 等^[6]指出 p21 的高表达与促进癌细胞的迁移/侵袭进而降低乳腺癌患者的存活率有关。Qian 等^[7]关于肿瘤小鼠模型的研究则发现, 肿瘤的侵袭伴随着 p21 的上调, 而 p21 基因敲除的小鼠, 其

肿瘤转移受到明显的抑制, 当 p21 重新表达后, 该抑制现象被逆转。细胞质 p21 被发现能通过抑制 Rho/ROCK/LIM 途径来促进小鼠胚胎成纤维细胞的运动能力^[8]。也有报道指出, 细胞质 p21 和 p53 的复合物能通过诱导细胞凋亡来抑制侵袭^[9]。同时, 滋养细胞必须在侵袭过程发生之前就结束细胞周期, 包括 p21 的激活^[10]。

本研究的结果显示, p21 的敲低造成了正常滋养细胞迁移能力和侵袭能力的减弱, 但对细胞增殖或凋亡诱导则无影响。与对照相比, p21 敲低的滋养细胞迁移率显著降低, 仅为 53% ($P < 0.05$), 而侵袭细胞的数量则比对照减少了 21% ($P < 0.05$)。

此外,在 p21 敲低的滋养细胞中,ERK3 不论在 mRNA 水平还是蛋白质水平上的表达都显著降低,这提示了滋养细胞运动能力和侵袭能力的减弱可能在一定程度上是由减少 ERK3 的表达来介导的。ERK3 在细胞增殖,细胞周期进程和分化中都发挥了作用。ERK3 可以激活其第一个被鉴定的底物 PRAK,从而影响肌动蛋白的重塑和细胞迁移^[11]。与 p21 一样,ERK3 也是细胞有丝分裂过程中 Cdk1 的底物,其磷酸化受到 Cdk1 的调节^[12]。ERK3 促进癌细胞的迁移/侵袭和肿瘤的转移,其表达在乳腺癌、肺癌、头颈癌等多种癌症中受到上调^[13]。除 ERK3 外,p21 的敲低还与 MMP2 表达减少有关。ERK3 通过激活癌蛋白 SRC3 的磷酸化,引起包括 MMP2 在内的不同 MMP 基因的上调,从而在体外和体内刺激肺癌细胞的侵袭。敲低 ERK3 则能够抑制肺癌细胞的侵袭^[14]。本研究的结果证实,敲低 p21 后 MMP2 在 mRNA 和蛋白质水平上也表现出显著的降低,进一步证实了 p21 可能通过调控 ERK3/MMP2 信号路径来影响滋养细胞的运动能力。但到目前为止,关于 ERK3 与 p21 间的直接相关性的研究还十分缺乏。

综上所述,本研究的结果表明 p21 与正常滋养细胞的运动有关,p21 缺乏会减弱滋养细胞的迁移能力和侵袭能力。此外,p21 缺乏还会降低 ERK3 和 MMP2 的表达。但与二者间的联系到底是直接的还是间接的,目前还尚未可知,有待进一步的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Heazell AE, Crocker IP. Live and let die-regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies [J]. Placenta, 2008, 29(9): 772-783.
 [2] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Pre-eclampsia [J]. Lancet, 2010, 376(9741): 631-644.
 [3] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: Intricate networks and

multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6): 400-414.
 [4] Cobellis L, Mastrogiacomo A, Federico E, et al. Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia-complicated placentas [J]. Cell Tissue Res, 2007, 330(3): 527-534.
 [5] Sharp AN, Heazell AE, Dora B, et al. Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87621.
 [6] Dai M, Al-Odaini AA, Arakelian A, et al. A novel function for p21Cip1 and acetyltransferase p/CAF as critical transcriptional regulators of TGFbeta-mediated breast cancer cell migration and invasion [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(5): R127.
 [7] Qian X, Hulit J, Suyama K, et al. p21CIP1 mediates reciprocal switching between proliferation and invasion during metastasis [J]. Oncogene, 2013, 32(18): 2292-2303.
 [8] Lee S, Helfman DM. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway [J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1885-1891.
 [9] Kim EM, Jung CH, Kim J, et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins [J]. Cancer Res, 2017, 77(11): 3092-3100.
 [10] Kipkeew F, Kirsch M, Klein D, et al. CCN1 (CYR61) and CCN3 (NOV) signaling drives human trophoblast cells into senescence and stimulates migration properties [J]. Cell Adh Migr, 2016, 10(1): 163-178.
 [11] Kostenko S, Dumitriu G, Moens U. Tumour promoting and suppressing roles of the atypical MAP kinase signalling pathway ERK3/4-MK5 [J]. J Mol Signal, 2012, 7(1): 9.
 [12] Tanguay PL, Rodier G, Meloche S. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis [J]. Biochem J, 2010, 428(1): 103-111.
 [13] Elkhadragy L, Chen M, Miller K, et al. A regulatory BMI1/let-7i/ERK3 pathway controls the motility of head and neck cancer cells [J]. Mol Oncol, 2017, 11(2): 194-207.
 [14] Long W, Foulds CE, Qin J, et al. ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion [J]. J Clin Invest, 2012, 122(5): 1869-1880.

[收稿日期] 2020-04-24