

# 鸡胚 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因不同发育阶段表达谱分析

邢晋祎 张宁波

(临沂大学 生命科学学院, 山东 临沂 276005)

**摘要** 为了解析鸡胚发育过程中 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因的调控作用,利用荧光定量 RT-PCR 方法,研究 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因在孵化 1~6 d(E1~E6)的整体胚胎和孵化 15 和 18 d(E15、E18)鸡胚的大脑、心脏、肝脏和左侧大腿肌肉组织中的表达谱。结果表明,1) *NANOG* 基因的表达水平在 E2~E6 整胚和 E15、E18 胚期的大脑、心脏、肝脏和腿肌中的表达水平均极显著低于 E1 时期 ( $P < 0.01$ )。2) 在鸡胚发育的整胚 E1~E6 和 E15、E18 时期的大脑、肝脏、心脏和腿肌中, *POUV* 基因的表达水平基本呈现逐渐降低趋势,且从 E3 时期后均显著低于 E1 时期 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。3) *TWIST2* 基因在 E1~E6 整胚中的表达水平呈现逐渐增高趋势,到 E6 达到最高水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );在 E15 和 E18 时期的上述 4 种组织中又呈现降低趋势,但均高于 E1 时期。*NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因在鸡胚发育过程的调控水平存在差异,研究结果可望为鸡的育种和临床研究提供资料。

**关键词** 鸡胚; *NANOG* 基因; *POUV* 基因; *TWIST2* 基因; 基因表达谱

中图分类号 S 814.6

文章编号 1007-4333(2014)06-0155-06

文献标志码 A

## Analysis of *NANOG*, *POUV* and *TWIST2* gene expression patterns during chicken embryonic development

XING Jin-yi, ZHANG Ning-bo

(College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China)

**Abstract** In order to analyze the regulation effect of *NANOG*, *POUV* and *TWIST2* genes, their expression patterns in chicken whole embryo (E1-E6) and in brain, heart, liver and muscle during chicken embryonic development (E15 and E18) were studied by real time RT-PCR. The results showed that, firstly, the *NANOG* expression levels for whole E2-E6 and in brain, heart, liver and muscle of E15 and E18 were significantly lower than those of E1 ( $P < 0.01$ ). Secondly, overall, the *POUV* gene expression patterns gradually reduced from whole E1 to E6 and in brain, liver, heart and muscle of E15 and E18, and their expression levels except E2 were lower than those of E1 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Finally, for whole E1-E6, the *TWIST2* expression levels gradually increased, and peaked at E6 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and then reduced in brain, liver, heart and muscle of E15 and E18, but they all exceeded those of E1. *NANOG*, *POUV* and *TWIST2* expression levels showed differences during chicken embryonic development. These results may provide data for chicken breeding and clinical research.

**Key words** chicken embryo; *NANOG* gene; *POUV* gene; *TWIST2* gene; gene expression patterns

鸡是动物学实验和医学临床研究中常用的模式动物,尤其是鸡的胚胎在体外发育时,易于控制发育时间和观察发育阶段的变化,是发育生物学的理想材料,在发育生物学研究中发挥了重要作用。

鸡胚胎发育过程受多种基因严格调控,这样才能保证胚胎有序地进行组织分化和个体发育。*NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因在鸡胚胎发育过程中起着非常重要的作用。

收稿日期: 2014-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31372333); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2013CL012); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2012NY001); 临沂大学博士启动基金(BS08019)

第一作者: 邢晋祎, 副教授, 博士, 主要从事动物分子遗传学和发育生物学研究, E-mail: xingjinyi@lyu.edu.cn

NANOG 是一种涉及未分化胚胎干细胞自我更新的关键转录因子,它能调控外胚层的多能性并阻止向原始内胚层的分化<sup>[1-2]</sup>,有促进细胞增殖的作用。鸡 NANOG 基因最初从鸡胚胎干细胞文库中克隆出来<sup>[3]</sup>。POUV(POU5F1 或 Oct4),常作为未分化细胞的标志物,其表达水平与未分化的表型和肿瘤有关<sup>[4]</sup>。NANOG 和 POUV 基因的表达水平对于维持干细胞的多潜能性和自我更新以及早期细胞分化具有非常重要的作用<sup>[3]</sup>。TWIST 基因是在进化过程中的一个保守转录因子,它属于螺旋-环-螺旋(BASIC HELIX-LOOP-HELIX, BHLH) 转录因子家族,可调节胚胎发育过程中的细胞重建,并赋予细胞迁移的能力。研究发现 TWIST 基因在果蝇中胚层分化、体壁肌肉的构型中发挥关键作用<sup>[5]</sup>。脊椎动物中转录因子 TWIST 家族包括 TWIST1 和 TWIST2。鸡 TWIST2(以前称为 *Dermol*)基因由 Scaal 等<sup>[6]</sup>于 2001 年克隆出来,并研究了其功能。

心脏、肝脏、大脑是鸡胚发育过程中较早发育的几个重要器官。目前,尚未见有 NANOG、POUV 和 TWIST2 基因在鸡胚中定量表达研究的报道。本研究以鸡胚为试验材料,研究鸡胚发育过程中 NANOG、POUV 和 TWIST2 基因的表达水平变

化,旨在为鸡的育种和临床研究提供素材。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物及样品采集

#### 1.1.1 种蛋孵化

新鲜质量相近的 AA 肉鸡种蛋购自临沂六和种鸡场,用 37 °C 温水洗净,75% 酒精棉球消毒。孵化条件:温度 37.5 °C,相对湿度 55%~65%,2 h 翻蛋一次。

#### 1.1.2 样品采集

分别取孵化 1~6 d(E1~E6)的整胚及孵化 15 和 18 d(E15 和 E18)鸡胚的大脑、心脏、肝脏和左侧大腿肌肉组织液氨速冻后-80 °C 冰箱保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 RNA 准备、cDNA 合成及引物设计

总 RNA 的提取采用 TRizol(Invitrogen) 方法,按照操作说明书进行;cDNA 合成按 M-MLV RT(Invitrogen)试剂盒说明书进行。以 cDNA 第一链作为表达谱分析的模板。参考 Laval 等方法<sup>[3]</sup>和 GenBank 上鸡 NANOG、POUV、TWIST2 和 GAPDH 基因序列设计引物(表 1),以 GAPDH 作为内参。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增片段大小/bp Amplicon size	退火温度/°C Annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession number
NANOG	CAGCAGACCTCTCCTTGACC TTCCTTGTCCTACTCTCACC	187	55	NM_001146142
POUV	GTTGTCCGGGTCTGGTTCT GTGGAAAGGTGGCATGTAGAC	189	55	NM_001110178
TWIST2	ACGAGAGGCTGAGTTATG CCAGTTTACTTGAGGTCG	192	56	NM_204679
GAPDH	CTACACACGGACACTTCAAG ACAACATGGGGGCATCAG	244	59	NM_204305

#### 1.2.2 荧光定量 RT-PCR 分析

使用 SYBR Green I (TaKaKa)在 Light Cycler 480 定量 PCR 仪(Roche)上,对 NANOG、POUV 和 TWIST2 基因的表达水平进行相对定量表达分析。

PCR 反应体系:SYBR® Premix Ex Taq™ (2×) 10 μL,上下游引物各 0.4 μL(10 μm),cDNA(稀释 8 倍)1 μL,灭菌超纯水加到 20 μL。

PCR 反应程序:95 °C 8 min;95 °C 20 s,各不同退火温度 20 s(表 1),72 °C 1 s,40 个循环;每个循环后采集荧光生成扩增曲线。为了分析实时荧光定量 PCR 扩增的特异性,从 55 °C 缓慢升至 95 °C,连续测定样品的荧光强度以获取溶解曲线。对所有样本进行 3 个重复测定,并在每次试验时设阴性对照。根据荧光曲线的 Ct 值及标准曲线,以鸡 GAPDH

基因作为内参,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分别计算 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因 mRNA 相对表达水平<sup>[7]</sup>。

### 1.3 统计分析

用 SAS(version 8.2)软件统计分析基因表达量数据,用单因子方差分析(One-way ANOVA)分析平均数间的差异显著性。试验数据以平均值±标准误差表示。

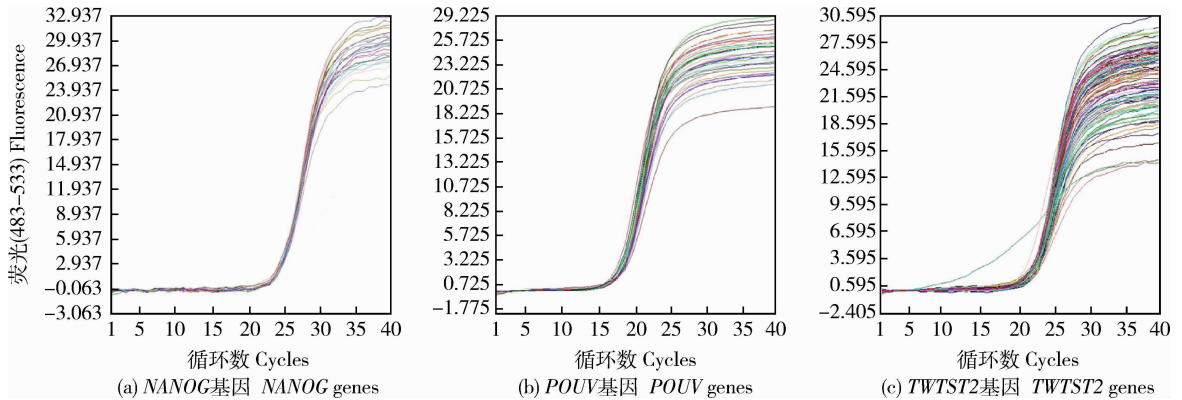


图 1 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因的扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of *NANOG*, *POUV* and *TWIST2* genes

## 2 结果与分析

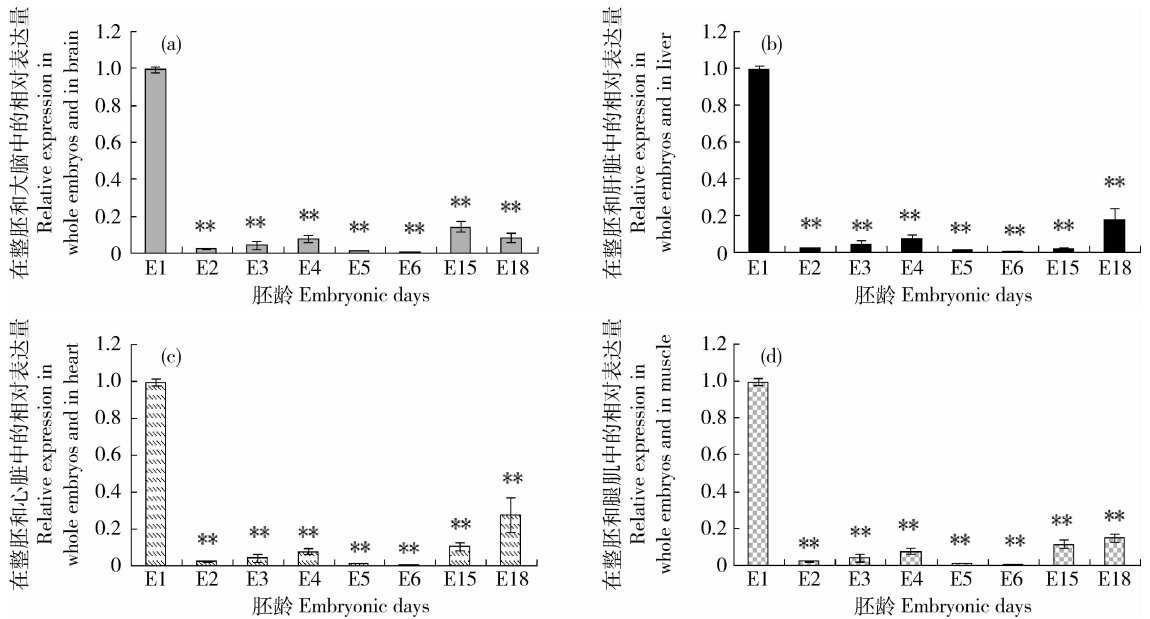
### 2.1 *NANOG*、*POUV* 及 *TWIST2* 基因的扩增曲线

图 1 为 *NANOG*、*POUV* 和 *TWIST2* 基因的扩增曲线,从中可见 *Ct* 值比较集中,呈 S 型,说明各扩增样本中基因的表达强度比较一致,起始模板的浓度差别不大。

### 2.2 *NANOG* 基因的表达变化

*NANOG* 基因 mRNA 表达水平的分析结果如

图 2 所示。从图 2 中可以看出,对于整胚来说,在 E2~E6 阶段,*NANOG* 基因的表达水平均极显著



(a)~(d) 分别代表 *NANOG* 基因在 1~6 胚龄(E1~E6)整胚和 15、18 胚龄(E15、E18)的大脑、肝脏、心脏以及腿肌中的表达水平 (Mean±Std Error, n=4)。\*\* 为 *NANOG* 基因在其他胚龄中的表达与 E1 中的表达水平差异极显著 ( $P<0.01$ )

(a)-(d) represent *NANOG* gene expression levels in whole embryos on each of embryonic days (E) 1-6 and in brain, heart, liver and muscle at E15 and E18 (Mean±Std Error, n=4). \*\* indicates significant difference between E1 and other embryonic days ( $P<0.01$ )

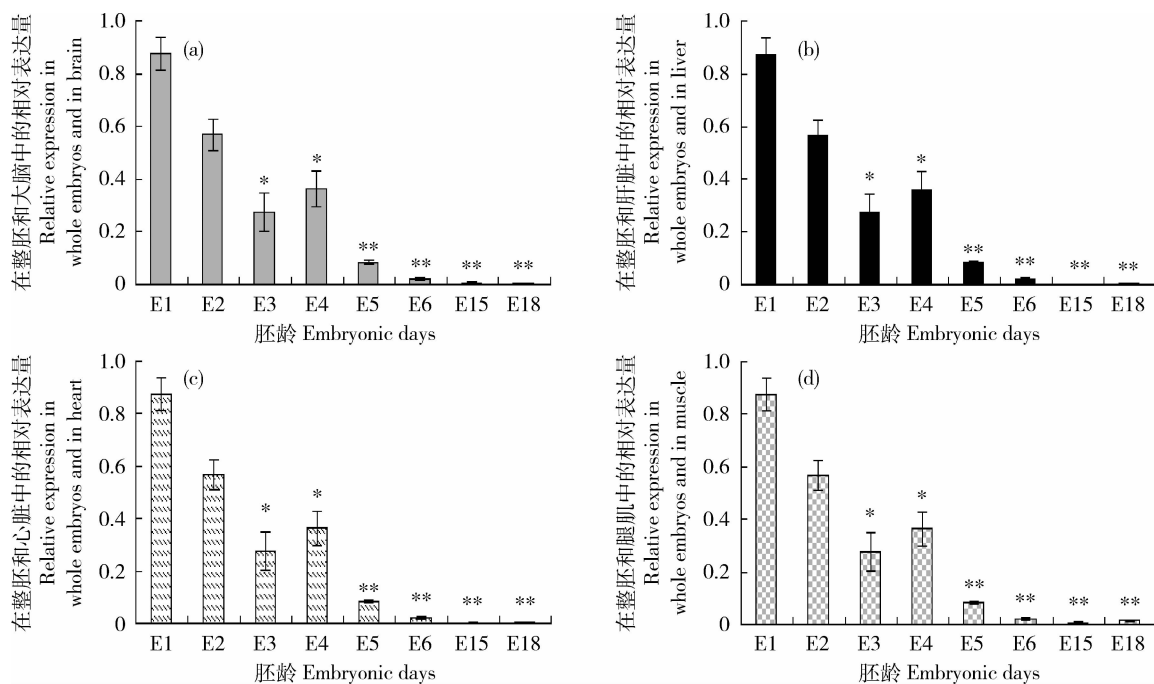
图 2 *NANOG* 基因在鸡胚中的表达水平

Fig. 2 *NANOG* gene expression levels in chicken embryonic tissues

低于 E1 时期 ( $P < 0.01$ )。当胚胎发育到 E15 和 E18 时期, 尽管 *NANOG* 基因 mRNA 在大脑、肝脏、心脏和腿肌中的表达水平有所回升, 但与 E1 相比还是徘徊在较低的水平 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 2.3 *POUV* 基因的表达变化

*POUV* 基因 mRNA 表达水平的分析结果如图



(a)~(d) 分别代表 *POUV* 基因在 1~6 胚龄 (E1~E6) 整胚和 15、18 胚龄 (E15、E18) 的大脑、肝脏、心脏以及腿肌中的表达水平 (Mean±Std Error,  $n=4$ )。\* 或 \*\* 为 *POUV* 基因在其他胚龄中的表达与 E1 中的表达水平差异显著或极显著 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

(a)-(d) represent *POUV* gene expression levels in whole embryos on each of embryonic days (E) 1-6 and in brain, heart, liver and muscle at E15 and E18 (Mean±Std Error,  $n=4$ ). \* or \*\* indicates significant difference between E1 and other embryonic days ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

图 3 *POUV* 基因在鸡胚中的表达水平

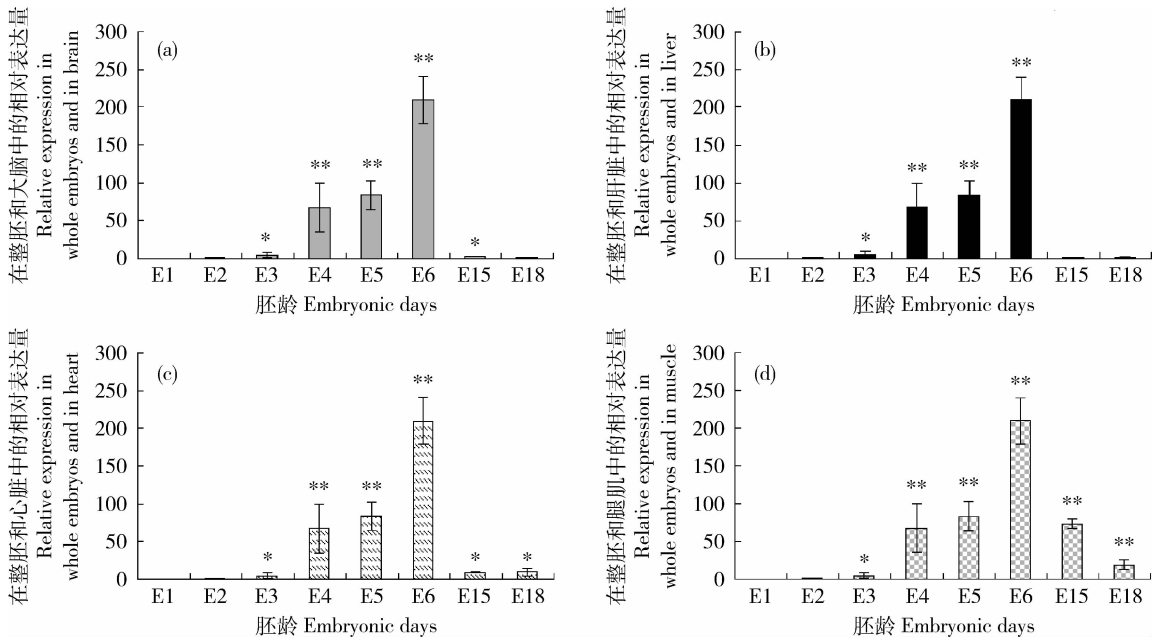
Fig. 3 *POUV* gene expression levels in chicken embryonic tissues

### 2.4 *TWIST2* 基因的表达变化

*TWIST2* 基因 mRNA 表达水平的分析结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出 *TWIST2* 基因在 E1-E6 阶段呈逐渐上调趋势。在整胚中, E3 阶段 *TWIST2* 基因 mRNA 表达水平显著高于 E1 阶段; 与 E1 时期相比, 在 E4-E6 阶段 *TWIST2* 基因的表达均达到了差异极显著的水平 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。与 E1 相比, 在大脑中 *TWIST2* 基因的表达水平在

3 所示。在鸡胚发育的整胚 E1~E6 和 E15、E18 时期的大脑、肝脏、心脏和腿肌中, *POUV* 基因的表达水平基本呈现逐渐降低的趋势, 且从 E3 时期后均显著低于 E1 时期 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 尽管在 E4 时期出现稍高趋势 (图 3)。

E15 时期显著高于 E1 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (图 4(a)); 在肝脏中, *TWIST2* 基因的表达水平在 E15 和 E18 时期与 E1 时期相比未表现出差异 ( $P > 0.05$ ) (图 4(b)); 在心脏中, *TWIST2* 基因的表达水平在 E15 和 E18 时期均显著高于 E1 时期 ( $P < 0.05$ ) (图 4(c))。在腿肌中, E15 和 E18 阶段的表达水平均极显著高于 E1 阶段 ( $P < 0.01$ ) (图 4(d))。



(a)~(d) 分别代表 *TWIST2* 基因在 1~6 胚龄(E1~E6)整胚和 15、18 胚龄(E15、E18)的大脑、肝脏、心脏以及腿肌中的表达水平(Mean±Std Error,  $n=4$ )。\*、\*\* 为 *TWIST2* 基因在其他胚龄中的表达与 E1 中的表达水平差异显著或极显著( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )

(a)~(d) represent *TWIST2* gene expression levels in whole embryos on each of embryonic days (E) 1-6 and in brain, heart, liver and muscle at E15 and E18 (Mean±Std Error,  $n=4$ ). \*, \*\* indicates significant difference between E1 and other embryonic days ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )

图 4 *TWIST2* 基因在鸡胚中的表达水平

Fig. 4 *TWIST2* gene expression levels in chicken embryonic tissues

### 3 讨论

1) *NANOG* 基因是一种与多潜能性相关的特异表达因子。国外有报道<sup>[8]</sup>, *NANOG* 基因在鸡胚胎原始生殖细胞上特异表达; 国内研究也发现 *NANOG* 在体外培养的鸡胚胎生殖细胞和胚胎干细胞中显著表达, 并且在类胚体体外分化过程中, 其表达量呈明显下降趋势<sup>[9-10]</sup>。高玉花等<sup>[11]</sup>也检测到 *NANOG* 基因在北京油鸡羊膜上皮细胞中表达。在硬骨鱼上的研究表明 *NANOG* 基因能调控正在发育的胚胎 S 期细胞转移和增值<sup>[12]</sup>。在成年小鼠的研究中发现, *NANOG* 基因在脾脏、卵巢中表达较高, 在睾丸、肾脏和肝脏中中等表达, 在心脏、大脑等组织中表达较低<sup>[13]</sup>。最近的研究表明<sup>[14]</sup>, 删除 *NANOG* 基因导致早期胚胎死亡, *NANOG* 基因通过抵制或者倒转可选择基因的表达状态来稳固胚胎干细胞。另外, 也发现 *NANOG* 基因的表达与癌症的发生有关<sup>[14]</sup>, 因此研究 *NANOG* 基因的功能和调控机制对于癌症的诊疗也许能提供一些帮助和思路。本研究中, *NANOG* 基因在 E1 时期表达量最

高, 基本与小鼠的结果一致, 说明 *NANOG* 基因在胚胎发育的早期发挥着一定调控作用。

2) 关于鸡基因组中是否有 *POUV* 基因, 以前一直存在争论, 因为 Soodeen-Karamath 等<sup>[15]</sup>利用 PCR 和 Southern 杂交试验发现在鸡基因组中不存在 *POUV* 序列, 后来采用 RT-PCR 和 cDNA 文库技术也没发现在鸡早期胚胎中有 *POUV* 基因的表达, 但 Laval 等<sup>[3]</sup>研究发现鸡胚胎干细胞中有 *POUV* 基因的表达, 并且在维持鸡胚胎干细胞多潜能性和自我更新方面发挥着重要作用。武艳群<sup>[9]</sup>的研究也发现 *POUV* 基因在体外培养的鸡胚胎生殖细胞显著表达。 *POUV* 基因在脊椎动物早期发育中维持细胞的多能性方面发挥着一定作用<sup>[16]</sup>。本研究中, *POUV* 基因在 E1 阶段表达水平最高, 不论是整胚还是在脑、肝脏、心脏和腿肌中表达呈现下降趋势。这也许说明 *POUV* 基因主要在未分化的胚胎干细胞中表达的事实, 因为鸡的受精卵已经到了胚胎发育的第 X 期, 相当于哺乳类的囊胚期, 尤其是鸡胚的 E15 和 E18 期各器官已经基本形成。

3) 本研究对鸡胚不同发育阶段 *TWIST2* 基因

的表达水平进行了检测。目前用荧光定量 PCR 方法对鸡胚 *TWIST2* 基因的表达谱未见报道, 仅见 Scaal 等<sup>[6]</sup>用原位杂交方法对鸡胚羽毛和中胚层组织中 *TWIST2* 基因的表达进行研究, 发现 *TWIST2* 基因在鸡的体节、头部间质、四肢、鳃弓和羽毛芽体间质中有表达, 与本研究结果基本一致。试验证明, *TWIST1* 缺失的小鼠在胚胎第 10 天死亡, 而无 *TWIST2* 等位基因的纯合小鼠将高表达炎症前细胞因子, 导致围产期的死亡<sup>[17]</sup>。最近的研究表明 *TWIST2* 基因在分化细胞中的分布与肿瘤进程有关<sup>[18]</sup>。因此, 研究鸡胚 *TWIST* 基因的表达谱也许能为人类肿瘤的早期诊断提供理论参考。

### 参 考 文 献

- [1] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655
- [2] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-642
- [3] Laval F, Acloque H, Bertocchini F, et al. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells[J]. *Development*, 2007, 134(19): 3549-63
- [4] Looijenga L H, Stoop H, de Leeuw H P, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2244-250
- [5] Castanon I, Baylies M K. A Twist in fate: Evolutionary comparison of twist structure and function [J]. *Gene*, 2002, 287: 11-22
- [6] Scaal M, Fuchtbauer E M, Brand-Saber B. cDermo-1 expression indicates a role in avian skin development[J]. *Anat Embryol (Berl)*, 2001, 203: 1-7
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [8] Canon S, Herranz C, Manzanares M. Germ cell restricted expression of chick Nanog[J]. *Dev Dynamic*, 2006, 235: 2889-2894
- [9] 武艳群. 鸡胚胎生殖细胞多向分化调控的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009
- [10] 孙敏, 施青青, 傅德智, 等. 鸡胚 ESC 和 SSCs 特定基因表达差异的研究[J]. *生物技术*, 2011, 21(3): 16-19
- [11] 高玉花, 张文秀, 吴芳春, 等. 北京油鸡羊膜上皮细胞的分离、培养及分化潜能的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(2): 211-219
- [12] Camp E, Sánchez-Sánchez A V, García-España A, et al. Nanog regulates proliferation during early fish development [J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 2081-2091
- [13] Hart A H, Hartley L, Ibrahim M, et al. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human[J]. *Dev Dynamic*, 2004, 230: 187-198
- [14] Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development[J]. *Nature*, 2007, 450(7173): 1230-1234
- [15] Soodeen-Karamath S, Gibbins A M. Apparent absence of oct 3/4 from the chicken genome[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(2): 137-48
- [16] Morrison G M, Brickman J M. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development [J]. *Development*, 2006, 133(15): 2011-2022
- [17] Šošić D, Richardson J A, Yu K, et al. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity[J]. *Cell*, 2003, 24: 112(2): 169-180
- [18] Mao Y B, Zhang N N, Xu J F, et al. Significance of heterogeneous *TWIST2* expression in human breast cancers[J]. *Plos One*, 2012, 7(10): e48178

责任编辑: 苏燕