

# 鸡卵提取物促进293T细胞升高表达多能基因 *OCT4*和*NANOG*

阮光萍 王金祥 姚翔 庞荣清 蔡学敏 何洁 赵晶 潘兴华\*

(解放军昆明总医院干细胞工程实验室, 昆明 650032)

**摘要** 作者找到一种卵细胞提取物有促进293T细胞表达多能基因的作用, 这将在细胞生物学有广泛的应用前景。提取鸡卵清、卵黄和全卵提取物, 用于293T细胞的渗透诱导。在诱导后不同时间提取细胞的RNA, 检测多能基因*OCT4*和*NANOG*的变化。在诱导后10 d提取细胞的DNA, 检测*OCT4*和*NANOG*基因甲基化位点的变化。卵清、卵黄和全卵提取物具有促进293T细胞生长的作用, 三种提取物渗透诱导后的293T细胞*OCT4*和*NANOG*基因表达有不同程度的升高。*OCT4*和*NANOG*基因发生去甲基化, 基因开放表达。鸡卵提取物具有促进293T细胞表达*OCT4*和*NANOG*基因的作用, 有望成为诱导细胞向多能细胞转化的制剂。

**关键词** 鸡卵提取物; 293T细胞; 多能基因; 甲基化

## Chicken Egg Extracts Promote Increased Expression of Pluripotent Gene *OCT4* and *NANOG* in 293T Cells

Ruan Guangping, Wang Jinxiang, Yao Xiang, Pang Rongqing, Cai Xuemin, He Jie, Zhao Jing, Pan Xinghua\*

(Stem Cell Engineering Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032, China)

**Abstract** We find an egg extract that has the role of promoting 293T cells to express pluripotent genes, and it will have broad application prospects in cell biology. Egg-white, egg-yolk and whole-egg extracts were used for the penetration induction of the 293T cells. At different times after induction, *OCT4* and *NANOG* pluripotent gene changes were detected in cell RNA. Ten days after induction, methylation sites changes of *OCT4* and *NANOG* gene were detected in cell DNA. The egg-white, egg-yolk and whole-egg extracts had the role of promoting the growth of 293T cells. After the three extracts permeated the 293T cells, *OCT4* and *NANOG* gene expressions increased to varying degrees. *OCT4* and *NANOG* genes appeared demethylation, and gene expression opened. Chicken egg extracts have the roles to increase *OCT4* and *NANOG* gene expression in 293T cells and may be agents to induce somatic cells into pluripotent cells.

**Key words** chicken-egg extracts; 293T cells; pluripotent gene; methylation

干细胞是一种未充分分化、尚不成熟的细胞, 称之为“万能细胞”。人体干细胞分两种类型, 一种具有再生各种组织器官和人体的潜在功能, 医学界是全功能干细胞, 可直接克隆人体; 另一种是多功

收稿日期: 2013-08-30 接受日期: 2013-11-08

国家自然科学基金(批准号: 31172170)、国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB518106)和中国博士后科学基金特别资助项目(批准号: 201104748)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0871-64774773, E-mail: ynkmy@163.com

Received: August 30, 2013 Accepted: November 8, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172170), the National Key Basic Research and Development Program (973 Program) (Grant No.2012CB518106) and the Special Program of the Postdoctoral Science Foundation of China (Grant No.201104748)

\*Corresponding author. Tel: +86-871-64774773, E-mail: ynkmy@163.com

网络出版时间: 2014-01-26 10:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0275.html>

能干细胞,可直接复制各种脏器和修复组织。但干细胞来源有限,将成熟的体细胞重编程为干细胞提供了新的来源,是目前一个重要的研究热点。许多研究表明,哺乳动物卵细胞提取物<sup>[1]</sup>、非洲爪蟾卵细胞提取物<sup>[2-4]</sup>、黑腹果蝇卵细胞提取物<sup>[5-6]</sup>和其他非哺乳动物卵细胞提取物<sup>[7-8]</sup>能部分诱导体细胞的核重编程,因此,我们推测鸡卵提取物可能也有部分重编程作用。由于鸡卵体积较大容易获取,我们观察了鸡卵清、卵黄和全卵提取物对293T细胞的作用。*OCT4*基因是POU转录因子家族中的一员,对维持胚胎干细胞的多潜能性和自我更新具有极其重要的作用。*NANOG*基因是维持干细胞自我增殖和亚全能性的关键基因。因此,在293T细胞用鸡卵提取液渗透后不同天数,我们用定量PCR检测了多能基因*OCT4*和*NANOG*表达的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 提取液的制备

取一个鸡蛋,无菌分离卵清和卵黄。卵清按1:1加裂解液,卵黄按1:3加裂解液,充分搅匀,存放于4℃。第3 d离心,取上清,4℃保存。裂解液配方:50 mmol/L NaCl,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,100 mmol/L HEPES(pH8.2),1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)和2 μg/mL抑肽酶(aprotinin)。由此得到的提取液为卵清提取液和卵黄提取液。再取一个鸡蛋,按1:2加裂解液混合,充分搅匀,存放于4℃。第3 d离心,取上清,4℃保存,即为全卵提取液。各种提取液留取50 μL用Bradford方法测蛋白浓度。标记蛋白浓度和制备时间,分装保存于-20℃。使用前,提取物的蛋白浓度用HBSS调到10 mg/mL。

### 1.2 293T细胞渗透

步骤按文献[9-10]进行了一些修改。简单地说,5×10<sup>5</sup> 293T细胞用500 μL HBSS洗涤并再悬于475 μL

冰冷的HBSS中,装有实验细胞的离心管在37℃放置2 min,加入25 μL链球菌溶血素O(SLO),使SLO终浓度为500 ng/mL,37℃放置20 min,中间敲打混合细胞一次。注意最佳的SLO浓度和孵育时间需要根据每批SLO进行调整。样品用1 mL预冷的HBSS稀释,细胞在4℃离心120×g 5 min。渗透的细胞一管加HBSS 500 μL做阴性对照,一管加卵清提取液500 μL,一管加卵黄提取液500 μL,一管加全卵提取液500 μL。提取物中预先加入ATP再生系统和20 μL 25 mmol/L NTP混合物,37℃放置20 min,中间敲打混合细胞一次。每管加1 mL预热(37℃)的完全培养基(含2 mmol/L 氯化钙),转入6孔板的4个孔,每孔1 500 μL。培养2~4 h后,移去上清300 μL,用完全培养基500 μL代替。根据细胞生长情况进行常规换液。

### 1.3 定量PCR检测多能基因*OCT4*和*NANOG*

定量PCR检测多能基因和内参基因的引物序列和产物大小见表1。293T细胞用提取物渗透后不同时间,取一定量细胞用百泰克的试剂盒提取RNA,再反转录为cDNA,然后进行定量PCR。

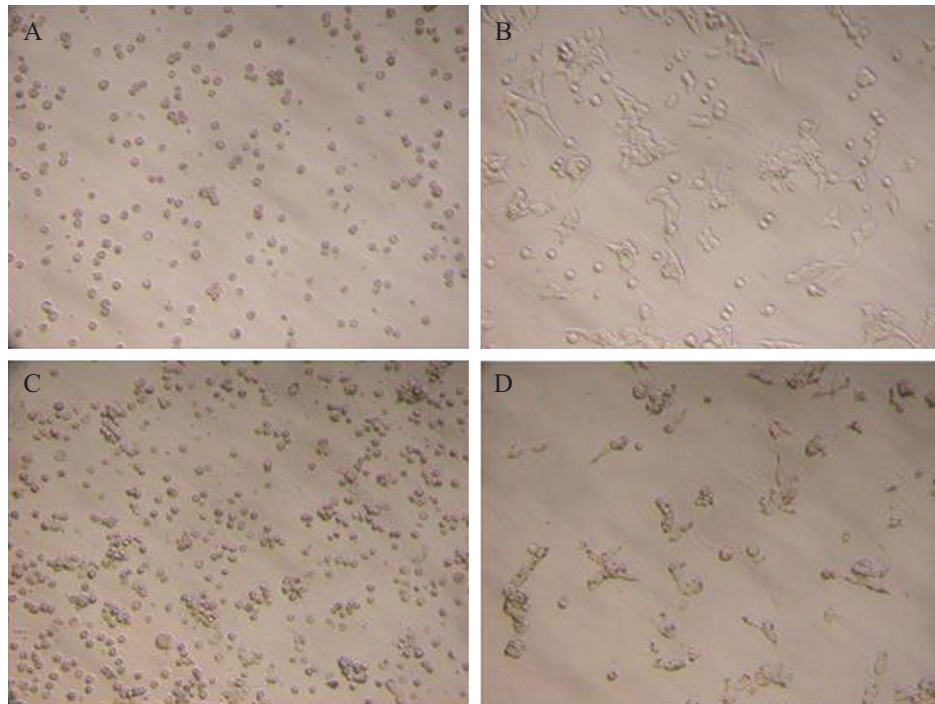
### 1.4 *OCT4*和*NANOG*基因BSP实验

293T细胞用提取物渗透后10 d,提取细胞DNA,交上海奇悟生物技术公司检测*OCT4*和*NANOG*基因的甲基化状态的变化。具体步骤如下:提取的细胞DNA经Nanodrop1000检测,浓度及纯度达到亚硫酸氢盐修饰的要求,调整每个待转化样品量达200~500 ng,作为转化模板。模板处理(采用Zymo Research公司的亚硫酸氢盐修饰Kit),具体步骤按Kit说明书。修饰后DNA作为模板,进行PCR扩增。产物克隆及测序,测序结果进行分析并以黑白圆圈图表示,黑色圆圈表示CpG位点甲基化,白色圆圈表示CpG位点去甲基化。所有位点的甲基化状态以百分比表示。

表1 多能基因和内参基因的引物序列和产物大小

Table 1 Primer sequence and product size of pluripotent gene and internal control gene

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
Genes	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>OCT4</i>	F: AAG CGA TCA AGC AGC GAC TAT R: GGA AAG GGA CCG AGG AGT ACA	163
<i>NANOG</i>	F: CAA AGG CAA ACA ACC CAC TT R: TCT GCT GGA GGC TGA GGT AT	158
<i>GAPDH</i>	F: TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT R: TTG CCA TGG GTG GAA TCA TA	148



A: HBSS渗透的293T细胞; B: 卵清提取液渗透的293T细胞; C: 卵黄提取液渗透的293T细胞; D: 全卵提取液渗透的293T细胞。

A: HBSS penetration of 293T cells; B: egg-white extracts penetration of 293T cells; C: egg-yolk extracts penetration of 293T cells; D: whole-egg extracts penetration of 293T cells.

图1 鸡卵提取物促细胞存活及生长的作用

Fig.1 Chicken-egg extracts promoting cell survival and growth

## 2 结果

### 2.1 三种鸡卵提取物促细胞存活及生长的作用各不同

鸡卵清提取液有促293T细胞存活及生长的作用,全卵提取物作用次之,卵黄提取物促生长作用较小,但仍优于对照(HBSS)(图1)。当我们延长SLO打孔时间,并且不用氯化钙封合细胞上的孔,第2 d发现卵清提取液渗透的细胞全部贴壁存活,全卵提取液渗透的细胞部分存活,卵黄提取液渗透的细胞少数存活,而对照(HBSS)渗透的细胞全死。卵清提取液较好的促细胞生长的作用值得深入研究。

### 2.2 鸡卵提取液渗透293T细胞后6 d多能基因表达的变化

荧光定量PCR检测鸡卵提取液渗透293T细胞后6 d,多能基因*OCT4*和*NANOG*表达明显升高(图2)。6 d时卵清提取液渗透的293T细胞*NANOG*基因表达增加到4.75,对照为0。

### 2.3 鸡卵提取液渗透293T细胞后13 d多能基因表达的变化

荧光定量PCR检测鸡卵提取液渗透293T细胞后13 d,多能基因*OCT4*和*NANOG*表达仍然比对照

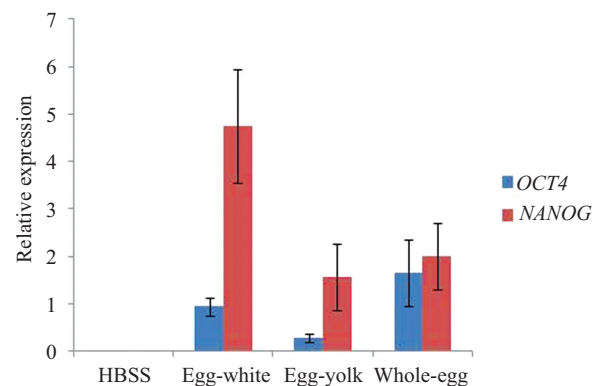


图2 鸡卵提取液渗透293T细胞后6 d多能基因表达的变化 (n=3)

Fig.2 Expression changes of pluripotent gene 6 day after chicken egg extracts penetrating 293T cells (n=3)

(HBSS)高(图3)。13 d时卵清提取液渗透的293T细胞*NANOG*基因表达增加到5.95,对照为0。

### 2.4 鸡卵提取液渗透293T细胞后18 d多能基因表达的变化

渗透293T细胞后18 d多能基因*OCT4*和*NANOG*表达比之前有所降低,说明培养18 d后细胞表达多能基因开始下降(图4)。18 d时卵清提取液渗透的

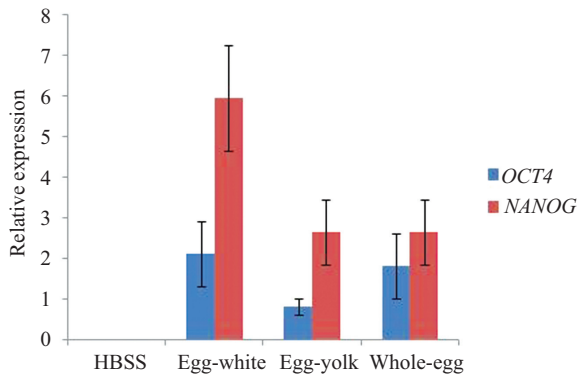


图3 鸡卵提取物渗透293T细胞后13 d多能基因表达的变化(n=3)

Fig.3 Expression changes of pluripotent gene 13 d after chicken egg extracts penetrating 293T cells (n=3)

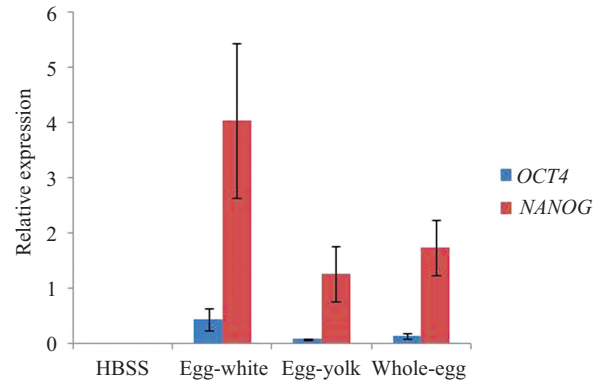
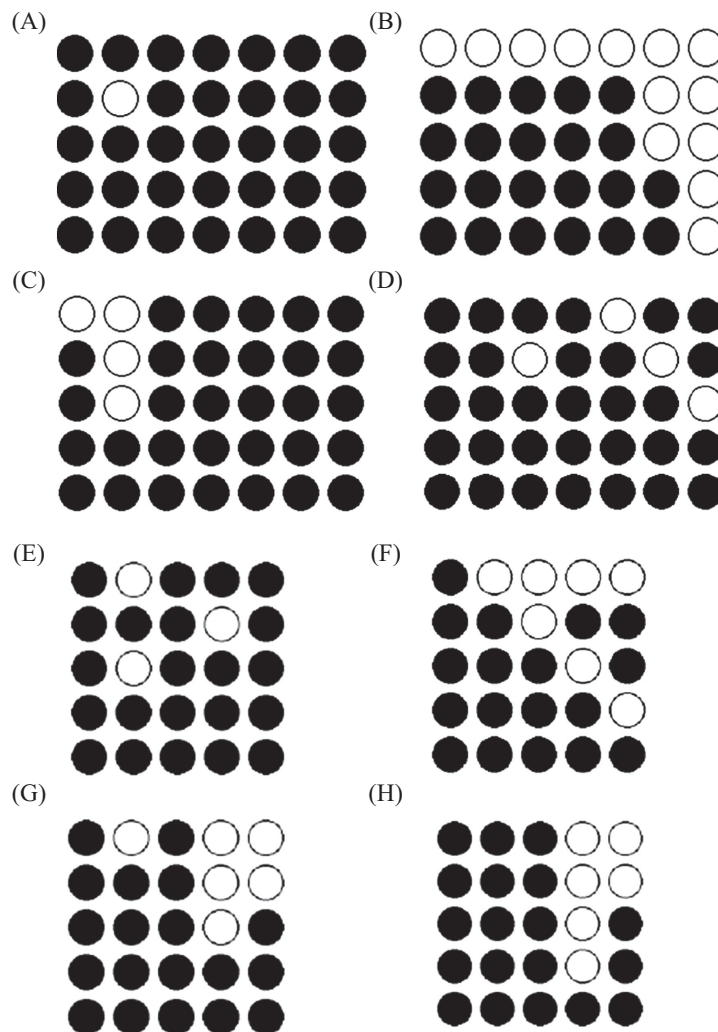


图4 鸡卵提取物渗透293T细胞后18 d多能基因表达的变化(n=3)

Fig.4 Expression changes of pluripotent gene 18 d after chicken egg extracts penetrating 293T cells (n=3)



A: *OCT4*用HBSS处理; B: *OCT4*用卵清处理; C: *OCT4*用卵黄处理; D: *OCT4*用全卵处理; E: *NANOG*用HBSS处理; F: *NANOG*用卵清处理; G: *NANOG*用卵黄处理; H: *NANOG*用全卵处理。

A: *OCT4* treated with HBSS; B: *OCT4* treated with egg-white extracts; C: *OCT4* treated with egg-yolk extracts; D: *OCT4* treated with whole-egg extracts; E: *NANOG* treated with HBSS; F: *NANOG* treated with egg-white extracts; G: *NANOG* treated with egg-yolk extracts; H: *NANOG* treated with whole-egg extracts.

图5 *OCT4*和*NANOG*基因BSP实验结果

Fig.5 BSP results of *OCT4* and *NANOG* genes



293T细胞*NANOG*基因表达增加到4.04, 对照为0。

## 2.5 *OCT4*和*NANOG*基因BSP实验结果

293T细胞用HBSS、卵清、卵黄、全卵提取物渗透培养10 d后, *OCT4*的甲基化位点的百分比分别为97%、63%、88%和88%。*NANOG*的甲基化位点的百分比分别为88%、72%、76%和76%。从甲基化位点的百分比可以看出, 卵清、卵黄、全卵提取物渗透培养10 d后, *OCT4*和*NANOG*的甲基化位点的百分比都减少了, 说明卵清、卵黄、全卵提取物渗透培养10 d后, *OCT4*和*NANOG*基因发生了去甲基化, 多能基因*OCT4*和*NANOG*开放表达(图5)。

## 3 讨论

如果发现一种卵细胞提取物能维持和增强细胞的存活, 将广泛地应用于细胞生物学研究。我们的研究表明, 卵清提取物促进293T细胞存活和增殖的能力最强, 其次为全卵提取物, 而卵黄提取物低于卵清和全卵, 但比平衡盐(HBSS)强。

许多研究报道, 动物的卵细胞提取物能诱导体细胞重编程<sup>[1,11]</sup>。一个鸡蛋中的卵黄就是一个卵细胞, 其中卵黄物质就是细胞质的主要成分, 它是胚胎发育时的营养物质。卵黄膜是细胞膜, 卵清、卵带和蛋壳则是由输卵管分泌物形成的, 有营养和保护作用。因此, 我们制备鸡卵清、卵黄、全卵提取液来渗透293T细胞, 观察对细胞存活和分化的作用。结果表明, 鸡卵提取物含有促进293T细胞存活和增殖的物质, 我们假设这些物质是鸡卵中的蛋白或小分子物质。我们发现, 鸡卵清对促进细胞存活起重要作用。鸡卵清含胚胎发育必需的营养, 可能也含关键成分维持胚胎多能性, 我们假设维持胚胎多能性的关键成分是鸡卵中的蛋白或小分子物质。目前, 还不知道卵细胞提取物促进重编程过程的分子机制。到目前为止, 使用鸡卵清、卵黄、全卵提取物渗透293T细胞后, 定量PCR检测多能因子表达的变

化还没有报道<sup>[1,9-10,12]</sup>。我们的研究将对卵细胞提取物重编程体细胞提出新的研究方法和手段, 有望找到新的有效成分来重编程体细胞。

## 参考文献 (References)

- 1 Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M, *et al.* Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. *Biol Reprod* 2009; 80(5): 935-43.
- 2 Danilchick M, Peng HB, Kay BK. *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Pictorial collage of embryonic stages. *Methods Cell Biol* 1991; 36: 679-81.
- 3 Lohka MJ, Masui Y. Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* 1983; 220(4598): 719-21.
- 4 Alberio R, Johnson AD, Stick R, Campbell KH. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Exp Cell Res* 2005; 307(1): 131-41.
- 5 Leno GH. Cell-free systems to study chromatin remodeling. *Methods Cell Biol* 1998; 53: 497-515.
- 6 Ulitzur N, Gruenbaum Y. Nuclear envelope assembly around sperm chromatin in cell-free preparations from *Drosophila* embryos. *FEBS Lett* 1989; 259(1): 113-6.
- 7 Cameron LA, Poccia DL. *In vitro* development of the sea urchin male pronucleus. *Dev Biol* 1994; 162(2): 568-78.
- 8 Iwao Y, Katagiri C. *In vitro* induction of sperm nucleus decondensation by cytosol from mature toad eggs. *J Exp Zool* 1984; 230(1): 115-24.
- 9 Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of *OCT4* and *NANOG* regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* 2007; 18(5): 1543-53.
- 10 Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.
- 11 Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by *Xenopus* egg extract requires BRG1. *Curr Biol* 2004; 14(16): 1475-80.
- 12 Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 2010; 116(3): 386-95.