

多能性相关基因 *PouV*、*Nanog* 和 *Sox2* 在鸡胚原始生殖细胞中的表达

武艳群 师 帅 于敏莉 张才乔 *

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要 分离 19 期鸡胚生殖嵴细胞, 采用原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)-体细胞共培养获得 PGCs 集落, 借助 PGCs 特异性标记基因 *Dazl* 和 *Cvh* mRNA 表达检测、过碘酸雪夫氏(periodic acid-Schiff, PAS)染色、阶段特异性胚胎抗原(stage-specific embryonic antigen, SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4)免疫组化检测均表明所形成的细胞团为 PGCs。RT-PCR 检测及基因测序结果表明干细胞多能性相关基因 *PouV* (*Oci4* 同源基因)、*Nanog* 和 *Sox2* 在鸡 PGCs 中均有显著表达。在去除饲养层、添加 15% 血清并采用悬浮培养的条件下, 鸡 PGCs 在体外可分化形成类胚体(embryoid bodies, EBs)。在 PGCs 体外分化形成 EBs 第 0 d、3 d、5 d 和 10 d 分别检测 *Dazl*、*Cvh*、*PouV*、*Nanog* 和 *Sox2* mRNA 的表达。结果表明: *PouV*、*Nanog* 和 *Sox2* 在体外培养的鸡 PGCs 中显著表达, 并且在 PGCs 体外分化过程中, 其表达量伴随 PGCs 标记基因 *Dazl* 和 *Cvh* 一起呈明显下调趋势, 提示 *PouV*、*Nanog* 和 *Sox2* 在维持鸡 PGCs 多能性中起着重要的作用。

关键词 原始生殖细胞; *PouV*; *Nanog*; *Sox2*; 鸡

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是各级生殖细胞的祖细胞, 在体外适宜培养条件下, 其形态、表面标志和分化潜能均类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)^[1,2]。作为生殖干细胞, PGCs 不仅可用于研究生殖细胞的发育和分化, 而且又可以作为转基因动物遗传操作的有效载体^[3,4]。在哺乳动物和人上, *Oct4*、*Nanog* 和 *Sox2* 被认为是调控干细胞多能性及自我更新的 3 个重要的转录因子^[5-7]。Canon 等^[8]的研究指出, 在胚胎发育过程中, 鸡 *Nanog* (*cNanog*) 在 PGCs 上特异表达。2001 年 Soodeen 等^[9]指出鸡体内不存在 *Oct4*, 但 Laval 等^[10]的最新研究发现鸡 ES 细胞表达 *Oct4* 同源基因的鸡 *PouV* (*cPouV*), 并且其对鸡 ES 细胞的多能性有重要作用。本实验利用与体细胞共培养模型获得 PGCs 阳性集落, 通过半定量 RT-PCR 方法检测干细胞多能性基因 *cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2* 在 PGCs 中的表达及其在 PGCs 体外分化形成类胚体(embryoid bodies, EBs)过程中表达量的变化, 以揭示 *cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2* 这三个重要的调控干细胞多能性的转录因子对维持鸡 PGCs 多能性的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高糖 DMEM 培养基和 β -巯基乙醇购自 Invitrogen 公司; L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、明胶购自 Sigma 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 和白白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)购自 StemCell 公司; 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自 Peprotech 公司; UNIQ-10 柱形 RNA 提取试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、引物合成、DNA 序列测定由上海生物工程公司提供。

1.2 PGCs 的分离和培养

艾维茵鸡种蛋(杭州正大肉鸡中心)在 38.5 °C、60% 湿度的旋转孵化箱中孵化至第 19 期(68~72 h)。在体视解剖镜下用玻璃针分离生殖嵴, 经磷酸盐缓冲液(PBS)和培养液清洗, 剪碎成小的组织块后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 在 37 °C 消化 5 min, 经 150 μ m 滤网过滤, 1 000 r/min 离心 8 min 收集细胞。高糖 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)培养液添加 5% FBS、10 ng/ml LIF、10 ng/ml bFGF、0.1 mmol/L MEM 非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙

收稿日期: 2008-07-21 接受日期: 2008-09-18

教育部新世纪人才支持计划(No.NCET-05-0514)和浙江省科技计划项目(No.2008C22040)资助。

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

醇, 2 mmol/L L- 谷氨酰胺, 100 IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素为完全培养液。细胞按 1×10^6 个/孔的密度接种到 6 孔 Corning 细胞培养板, 置 38.5 $^{\circ}$ C、含 5% CO_2 的培养箱中培养。细胞在培养期间, 隔天半量换液。采用胰蛋白酶-EDTA 消化, 按 1:2 的比例进行传代, 本实验分离所得生殖细胞可传至第 5 代。

1.3 PGCs 的鉴定

1.3.1 细胞形态学观察和 PAS 染色 在相差显微镜下观察 PGCs 的生长行为和形态特征, 然后用过碘酸雪夫氏(periodic acid-Schiff, PAS)染色鉴定 PGCs。PGCs 原代培养 5 d 后用 Carnoy 液室温下固定 15 min, 90% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5~30 min, 过碘酸乙醇液中放置 10 min, 入 70% 乙醇洗后 Schiff- 乙醇混合液中避光染色 10 min, 偏重亚硫酸钠液洗 2 min, 水洗终止并拍照。

1.3.2 ES 细胞分子标记物(SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4)的免疫细胞化学染色 PGCs 原代培养 5 d 后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 3% H_2O_2 温育 10 min 灭活内源性过氧化物酶; 室温下用山羊血清封闭 20 min 后加入鼠抗 SSEA-1、SSEA-3 或 SSEA-4 单克隆抗体^[1], 以 PBS 代替一抗作阴性对照; 4 $^{\circ}$ C 过夜后滴加生物素化羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min; 用 3,3'-二氨基联苯胺显色试剂盒室温显色。阳性细胞呈棕红色, 阴性对照组不着色或呈浅褐色。

1.4 PGCs 的体外分化

将 PGCs 原代培养 5 d 后弃培养液, 用新鲜培养液冲洗 3 遍, 用移液器轻轻吹下贴在饲养层上的 PGCs 集落并离心收集, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化成单个细胞, 接种到涂有 0.1% 明胶的培养板中差速贴壁 2 h 除去已分化细胞。调整细胞密度为 10^5 个/孔接种到超低粘附 6 孔培养板中(StemCell 公司), 在添加 15% FBS, 不含 LIF 和 β - 巯基乙醇的 DMEM 高糖培养液中进行悬浮培养, 隔天换液。于悬浮培养第 14 d, 对形成的 EBs 进行吖啶橙 DNA 标记染色, 共聚焦荧光显微镜下观察其内部结构, 同时进行石蜡切片和 HE 染色观察。

1.5 多能性相关基因的 RT-PCR 测定

采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA, 并用 AMV 逆转录酶和 Oligo (dT)₁₈ 引物合成 cDNA。采用 Primer 5.0 软件设计扩增引物, 各种多能性相关基因的引物序列和片段长度见表 1, 以 β - 肌动蛋白为内参比。以合成的 cDNA 为模板按照下列参数进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C

Table 1 Primer sequences for RT-PCR analysis of target genes

Primer	Primer sequence (5' - 3')	PCR product (bp)
<i>Dazl</i>	5'-GCTTGCATGCTTTTCCTGCT-3' 5'-TGCGTCACAAAGTTAGGCA-3'	537
<i>Cvh</i>	5'-GCTCGATATGGGTTTGGAT-3' 5'-TTCTCTTGGGTTCCATTCTGC-3'	751
<i>cPouV</i>	5'-GTTGTCCGGGTCTGGTTCT-3' 5'-GTGGAAAGGTGGCATGTAGAC-3'	189
<i>cNanog</i>	5'-CAGCAGACCTCTCCTTGACC-3' 5'-TTCCTTGTCCCTCTCTCACC-3'	187
<i>Sox2</i>	5'-AGAACCCGAAGATGCACAAC-3' 5'-CGAATGAGACGAGGAGGTGA-3'	599
β -actin	5'-ACGTCGCACTGGATTTCGAG-3' 5'-TGTCAGCAATGCCAGGGTAC-3'	282

预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环 40 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 5 μ l 扩增产物, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳 (120 V, 50 min)。Tanon 凝胶成像系统观察并拍照。采用 Tanon Gis 凝胶图象分析系统, 对 RT-PCR 结果进行光密度分析, 电泳条带光密度值作为 PCR 产物的相对含量。以每个基因与 β - 肌动蛋白光密度的比值表示该基因的相对表达量。

1.6 统计学处理

数据采用 SAS 6.12 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 鸡胚 PGCs 的鉴定

2.1.1 细胞形态学变化 刚分离的鸡胚生殖嵴含体细胞(主要是成纤维细胞)和少量 PGCs, PGCs 呈圆形比体细胞大, 细胞核大, 胞浆少。在完全培养液中培养 5 d 后, 体细胞成单层平滑梭状紧贴在培养板底部, PGCs 则呈集落生长紧贴在体细胞上, PGCs 细胞之间边界不清晰, 集落与体细胞界限明显, 用移液枪头可以轻轻吹掉使其与体细胞分开(图 1A)。

2.1.2 PAS 染色及免疫细胞化学鉴定 PGCs 集落经 PAS 染色后呈深红色, 体细胞不着色(图 1B)。将细胞团消化成单个细胞后进行 PAS 染色, 结果显示集落中 98% 以上的细胞呈 PAS 阳性(图 1C)。干细胞标记物 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 的免疫细胞化学鉴定结果表明, PGCs 集落呈阳性, 而阴性对照和体细胞均不着色(图 1D~G)。

2.1.3 PGCs 标志基因 *Dazl* 和 *Cvh* 的表达 PGCs 原代培养 5 d 后, 将集落从体细胞层吹下, 0.25% 胰

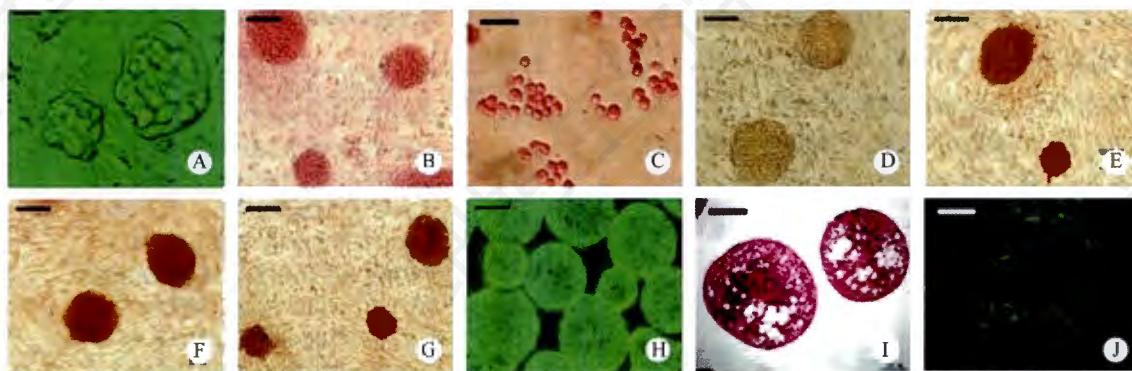


Fig.1 Morphology and characterization of chicken PGCs and EBs

A: primary PGCs colonies, scale bar: 20 μ m; B: PGCs colonies stained positive for PAS, scale bar: 50 μ m; C: dispersed cells from colonies showed PAS positive, scale bar: 20 μ m; D – G: immunocytochemical staining of negative, SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4, respectively, scale bar: 50 μ m; H: formed EBs on day 5, scale bar: 100 μ m; I: HE-stained sections of EBs cultured in suspension for 14 days, scale bar: 100 μ m; J: inner structure of EBs observed under confocal fluorescence microscope following acridine orange staining on day 14, scale bar: 20 μ m.

蛋白酶-EDTA 消化为单细胞。RT-PCR 检测 *Dazl* 和 *Cvh* mRNA 表达的结果显示, PGCs- 体细胞共培养形成的集落显著表达 PGCs 特异性标记基因 *Dazl* 和 *Cvh* (图 2)。

2.2 类胚体的形成

在无饲养层、无 LIF 和 β - 巯基乙醇条件下, 将消化原代 PGCs 集落形成的单细胞进行悬浮培养, 相差显微镜观察结果显示, 在悬浮培养 4 d 后, PGCs 聚集在一起形成团状聚集集体(图 1H)。经共聚焦荧光显微镜和石蜡切片 /HE 染色观察结果表明, PGCs 在体外悬浮培养条件下可形成简单 EBs, 长时间悬浮培养则形成含有空腔的囊状 EBs (图 1I、图 1J)。表明与 ES 细胞一样, 鸡胚 PGCs 也具有体外分化形成典型 EBs 的能力。

2.3 PGCs 体外分化形成类胚体过程中基因表达的变化

应用半定量 RT-PCR 检测及测序结果表明, 干细胞多能性相关基因 *Oct4* 在鸡上的同源基因 *cPouV*、*cNanog* 及 *Sox2* 在鸡 PGCs 形成的克隆中有显著表达。在 PGCs 体外悬浮培养分化形成 EBs 过程的第 0 d、3 d、5 d 和 10 d 各检测点, 取等量的细胞分别进行 *Dazl*、*Cvh*、*cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2* 表达量的检测(图 2), 结合凝胶定量分析, 以 β - 肌动蛋白的表达量作为内参比, 通过计算 *Dazl*、*Cvh*、*cPouV*、*cNanog*、*Sox2* 与 β - 肌动蛋白光密度的比值, 对各基因的表达结果进行半定量分析(图 3)。结果表明随着分化时间延长, *Dazl*、*Cvh* 及 *cNanog* 表达量呈明显的下调趋势, 变化较大, 特别是 *Cvh*, 在 10 d 的 EBs

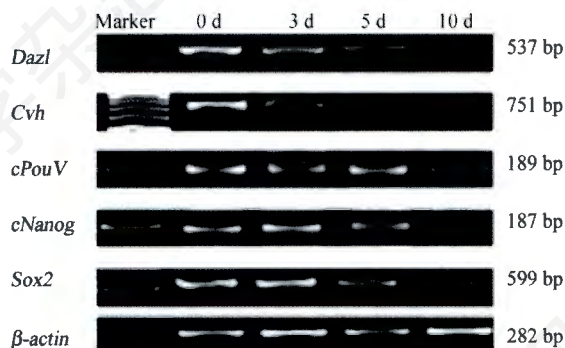


Fig.2 Expression profiles of *Dazl*, *Cvh*, *cPouV*, *cNanog* and *Sox2* genes during PGCs differentiation in vitro

中其表达量已经很低; *cPouV* 及 *Sox2* 的表达在 PGCs 分化过程中也呈明显的下调趋势, 其表达量的下降相对较为缓慢。

3 讨论

PGCs 起源于胚盘上胚层, 随着血液循环迁移到左右两侧生殖嵴中定居, 在迁移过程中 PGCs 持续分裂、增殖, 到达生殖嵴则停止增殖并在体细胞和多种生长因子及激素共同调控下分化形成卵细胞或精子^[1]。研究表明, 在体外长期传代培养过程中 PGCs 可以转化为胚胎生殖细胞, 但也有研究表明 PGCs 本身的形态、标志、自我更新及分化潜能等方面都类似于 ES 细胞, 具有多能性^[1]。本实验分离 19 期鸡胚生殖嵴, 采用 PGCs- 体细胞共培养体系, 成功得到大量的 PGCs 集落。经 PAS 染色、干细胞特异性分子标记物 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 免疫细胞化学鉴

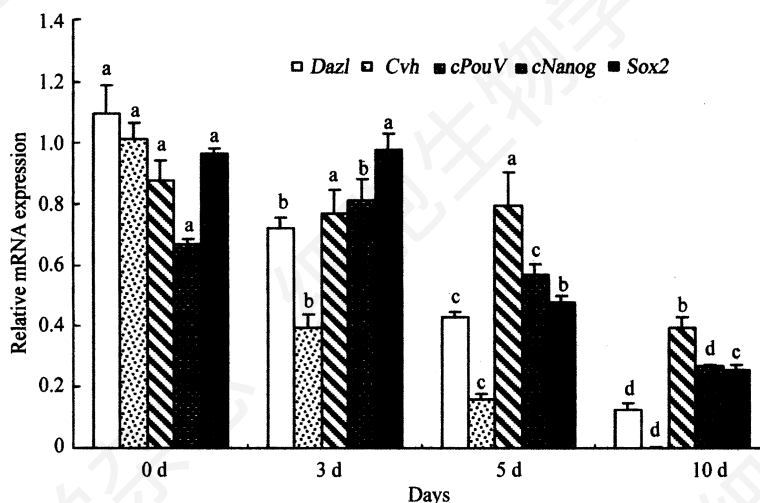


Fig.3 Changes on expression of *Dazl*, *Cvh*, *cPouV*, *cNanog* and *Sox2* genes during PGCs differentiation *in vitro*

Values (mRNA expression / β -actin) represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). Bars with different superscripts are statistically different ($P<0.05$).

定及 PGCs 特异性基因表达的检测^[12,13], 均证实所得细胞团为 PGCs 阳性集落, 且团中 PGCs 数量比例为 98% 以上。

在体外悬浮培养时, 如果去除饲养层和 LIF 等维持干细胞分化的培养条件, ES 细胞可自发分化形成具有内、中 and 外三胚层结构的 EBs^[14]。由于 EBs 可以基本再现胚胎早期发育过程, 所以在由 ES 细胞向特定组织细胞诱导分化过程中往往需要经过 EBs 阶段的培养, 以完成 ES 细胞分化的启动。此外, 体外分化形成类胚体也普遍被认为是干细胞的一种特性。为了进一步证明鸡 PGCs 的干细胞特性, 本实验对体外培养获得的 PGCs 克隆进行了 EBs 形成试验, 结果表明 PGCs 可以体外形成典型的 EBs, 组织切片及染色结果表明其内部含有多种类型的细胞(结果待发表)。

研究表明, Oct4、Nanog 和 Sox2 作为一类协同作用的调控因子, 可通过组成互联的前馈系统和自身调节网络来共同调控其自身的编码基因和编码关键信号转导通路组成部件基因的转录, 并阻遏某些在发育过程中起关键作用的基因, 从而调控 ES 细胞的多潜能性和自我更新能力^[15]。Soodeen-Karamath 等^[9]报道 Oct4 基因在鸡上不存在, 而 Lavial 等^[10]最近从鸡 ES 细胞中分离得到 Oct4 同源基因 *cPouV*, 并且进一步证实了其对维持鸡 ES 细胞多能性及自我更新的重要作用。PGCs 作为类似 ES 细胞的另一种多能性细胞对其体内外的分化潜能已有较多相关报道^[2], 但对其与 Oct4、Nanog 和 Sox2 这 3 个重要转录因子的相关性还未见报道。本试验设计引物并利用半定量

RT-PCR 技术, 从体外培养获得的 PGCs 克隆中检测出 *cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2* 基因的显著表达。此外, 在 PGCs 体外分化形成 EBs 的过程中, PGCs 标记基因 *Dazl* 和 *Cvh* 表达量呈明显的下调趋势, 尤其 *Cvh* 在 10 d EBs 中的表达量已经很低, 表明在 EBs 形成过程中, PGCs 向其他细胞系的转变。多能性基因 *cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2* 的表达量在 PGCs 分化过程中也呈较明显的下调趋势, 但相对 *Dazl* 和 *Cvh* 较缓慢, 推测可能在 EBs 培养过程, PGCs 先分化形成其他细胞系单能干细胞或前体细胞, 不再表达 PGCs 标志基因, 但仍具有多能性, 随着时间分化再向成熟的细胞分化失去多能性。

综上所述, 体外培养的鸡 PGCs 中, 存在调控干细胞多能性基因 *cPouV*、*cNanog* 和 *Sox2*, 且随着 PGCs 的分化其表达量均逐渐降低, 提示这三种调控多能性的基因在维持鸡胚 PGCs 多能性中起着重要的调控作用, 这为进一步深入研究鸡 PGCs 分化过程中基因调控的内源性机制打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Jung JG, Kim DK, Park TS, *et al.* Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells, *Stem Cells*, 2005, 23(5): 689-698
- [2] 唐新燕, 张才乔. 鸡胚原始生殖细胞体外的分化, *农业生物技术学报*, 2007, 159(1): 20-23
- [3] Chen B, Shi J, Zheng J, *et al.* Differentiation of liver cells from human primordial germ cell-derived progenitors, *Differentiation*, 2007, 75(5): 350-359
- [4] Mozdziaik PE, Wysocki R, Angerman-Stewart J, *et al.* Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated

- cell-sorted gonocytes, *Poult Sci*, 2006, 85(10):1764-1768
- [5] Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, *et al*. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2, *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 24731-24737
- [6] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al*. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells, *Cell*, 2003, 113(5): 631-642
- [7] Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency, *Cell Res*, 2007, 17(1): 42-49
- [8] Cañón S, Herranz C, Manzanares M. Germ cell restricted expression of chick Nanog, *Dev Dyn*, 2006, 235(10): 2889-2894
- [9] Soodeen-Karamath S, Gibbins AM. Apparent absence of *oct3/4* from the chicken genome, *Mol Reprod Dev*, 2001, 58: 137-148
- [10] Laval F, Acloque H, Bertocchini F, *et al*. The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells, *Development*, 2007, 134(19): 3549-3563
- [11] Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, *et al*. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo, *Poult Sci*, 2007, 86(10): 2182-2193
- [12] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, *et al*. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells, *Development*, 2000, 127(12): 2741-2750
- [13] van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, *et al*. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells, *Nature*, 2006, 441(7094): 766-769
- [14] zur Nieden NI, Cormier JT, Rancourt DE, *et al*. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors, *J Biotechnol*, 2007, 129(3): 421-432
- [15] Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency, *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(5): 455-462

Expression of Pluripotency-associated Genes of *PouV*, *Nanog* and *Sox2* in Cultured Chicken Primordial Germ Cells

Yan-Qun Wu, Shuai Shi, Min-Li Yu, Cai-Qiao Zhang *

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Primordial germ cells (PGCs) were isolated from the genital ridges of chicken embryos at the 19th stage and co-cultured with somatic cells to obtain multicellular PGCs colonies. These cells were identified by stem cell-specific markers SSEA-1, SSEA-3 and SSEA-4, expression of PGCs-specific marker genes such as *Dazl* and *Cvh* together with the pluripotency-associated genes such as chicken *Oct4* homologue *PouV* (*cPouV*), chicken *Nanog* (*cNanog*) and *Sox2* genes. The expression profiles of *Dazl*, *Cvh*, *cPouV*, *cNanog* and *Sox2* genes during the EBs development *in vitro* were also examined. Results showed that all of these genes were expressed in chicken PGCs, and were down-regulated during the formation of EBs, suggesting their presumable effects in their regulatory effects in maintaining the pluripotency during differentiation of chicken PGCs. Further research is required to study the mechanisms of these genes in regulating the pluripotency and self-renewal of chicken PGCs.

Key words primordial germ cells; *PouV*; *Nanog*; *Sox2*; chicken

Received: July 21, 2008 Accepted: September 18, 2008

This work was supported by the Ministry of Education of China (No.NCET-05-0514) and Zhejiang Bureau of Science & Technology (No.2008C22040)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971976 E-mail: cqzhang@zju.edu.cn