

# 鸡卵清提取液不同组分对293T细胞 多能因子表达的影响

阮光萍 姚翔 刘菊芬 王金祥 庞荣清 潘兴华\*

(解放军成都军区昆明总医院细胞生物治疗中心, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室,  
云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 昆明 650032)

**摘要** 该研究发现, 鸡卵细胞提取液有促进293T细胞多能因子表达增加的作用, 将在细胞生物学有广泛的应用价值。将鸡卵清提取液分离为大于10 kDa和小于10 kDa的组分, 用各提取液50%的终浓度培养293T细胞5 d, 用流式细胞术检测多能因子的表达。结果表明, 鸡卵清提取液及不同组分都有促进293T细胞多能因子表达增加的作用, 而大于10 kDa的组分作用最明显, 差别有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果提示, 鸡卵清提取液有促进293T细胞多能因子表达增加的作用, 鸡卵清提取液中可能存在促进体细胞重编程作用的物质。

**关键词** 鸡卵清提取液; 不同组分; 多能因子; 重编程; 流式细胞仪

## The Effect of Different Fractions of Chicken Egg-White Extract on the Expression of the Pluripotency Factors in 293T Cells

Ruan Guangping, Yao Xiang, Liu Jufen, Wang Jinxiang, Pang Rongqing, Pan Xinghua\*

(The Cell Biological Therapy Center, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command,  
Stem Cells and Immune Cells Biomedical Techniques Integrated Engineering Laboratory of State and Regions  
(Yunnan Province), Cell Therapy Technology Transfer Medical Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

**Abstract** This work was aim to investigate the effect of the chicken egg-white extract on the expression of pluripotent factors of 293T cells. We isolated chicken egg-white extract into 2 fractions, greater or less than 10 kDa fractions. And 2 different fractions were used with a final concentration of 50% to culture 293T cells for 5 days, respectively. And then, the levels of pluripotent factors in the 293T cells were detected by flow cytometry. The results showed that the chicken egg-white extract and its 2 fractions had the roles of increasing pluripotent factors in 293T cells. And the fractions of greater than 10 kDa had the most obvious effects with statistically significant ( $P < 0.01$ ). In conclusion, chicken egg-white extract and its fractions increased the expression of pluripotent factors in somatic cells. The chicken egg-white extract might have some substances to promote to reprogramme somatic cells.

**Keywords** chicken egg-white extract; different fractions; pluripotent factors; reprogramming; flow cytometry

有研究报道, 猪卵和蟾蜍卵提取液具有重编程体细胞的作用<sup>[1-3]</sup>, 但猪卵和蟾蜍卵获取困难, 且卵

细胞提取液获得量少。相反, 鸡卵获取方便, 一个鸡卵可以获得50 mL提取液。我们在研究中发现,

收稿日期: 2015-09-29 接受日期: 2015-11-25

国家科技支撑计划项目(批准号: 2014BAI01B01)和云南省科技计划项目(批准号: 2013CA005)资助的课题

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

Received: September 29, 2015 Accepted: November 25, 2015

This work was supported by National Support Program (Grant No.2014BAI01B01) and Yunnan Provincial Science and Technology Project (Grant No.2013CA005)

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

网络出版时间: 2016-01-11 11:16:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160111.1116.010.html>

鸡卵细胞提取液具有促进体细胞多能基因OCT4和NANOG高表达的作用<sup>[4]</sup>, 深入研究发现, 鸡卵清提取液不仅获取方便, 而且在卵黄和全卵提取液对比中发现, 鸡卵清提取液有促细胞增殖的作用<sup>[5-8]</sup>。在本文中, 我们用鸡卵清提取液培养293T细胞, 随后用流式细胞术检测了三种多能因子表达的变化, 进一步从细胞蛋白质的表达变化证明了鸡卵清提取液含有促体细胞重编程作用的物质。

## 1 材料与方法

### 1.1 鸡卵清提取液制备

取一个鸡蛋, 无菌分离卵清和卵黄。卵清按1:1(v/v)加裂解液, 充分搅匀, 存放于4 °C。冻融3次后, 4 000 r/min离心10 min, 取上清, 4 °C保存。裂解液配方为: 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, dithiothreitol), 0.1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride)和2 μg/mL抑肽酶(aprotinin)。由此得到的提取液为鸡卵清提取液。提取液取50 μL用Bradford方法测蛋白质浓度。标记蛋白质浓度和制备时间, 分装保存于4 °C。

### 1.2 鸡卵清提取液各组分分离

鸡卵清提取液用超滤管(截留量为10 kDa)分离不同组分, 用超滤管装15 mL鸡卵清提取液, 4 000 r/min离心30 min, 滤膜下面滤过的分别是小于10 kDa的组分, 滤膜上面获得大于10 kDa的组分。

### 1.3 鸡卵清提取液各组分用于培养细胞

用12孔细胞培养板, 每孔加 $1 \times 10^5$  293T细胞, 加300 μL培养基, 培养基为含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基, 再依次分别加300 μL培养基、鸡卵清提取液、大于10 kDa组分和小于10 kDa组分, 使提取液的终浓度为50%, 培养5 d后检测细胞OCT4、NANOG和SSEA-4的表达。对照组为含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基。

### 1.4 流式细胞术标记

细胞收集后分别标记OCT4-PE、NANOG-PE和SSEA-4-PE。SSEA-4-PE存在于细胞表面, 将细胞悬于100 μL PBS中, 加BD公司的SSEA-4-PE 20 μL, 室温避光1 h, 加400 μL PBS, 行流式细胞术检测。OCT4-PE和NANOG-PE存在于细胞内, 细胞先悬于200 μL 4%多聚甲醛的PBS, 室温固定10 min, 加SAP(渗透破膜液) 1 mL, 离心弃上清, 再悬于100 μL SAP中, 加

eBioscience公司的OCT4-PE 2 μL, 或者加BD公司的NANOG-PE 20 μL, 室温避光1 h, 加400 μL SAP, 行流式细胞术检测。

### 1.5 数据分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数±标准差表示。采用two-way ANOVA方差分析比较各组间三种多能因子表达的差异, 两两比较采用LSD方法,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 鸡卵清提取液不同组分对OCT4-PE阳性表达率的影响

用终浓度为50%的鸡卵清提取液各组分培养293T细胞5 d, 结果显示, 培养基对照组OCT4-PE的阳性率为1.45%, 鸡卵清提取液培养的OCT4-PE的阳性率为2.19%。而大于10 kDa组分、小于10 kDa组分培养的OCT4-PE的阳性率分别为7.18%、3.21%。以上结果表明, 鸡卵清提取液及各组分都有升高多能因子OCT4表达的作用, 而大于10 kDa组分作用最明显(图1)。

### 2.2 鸡卵清提取液不同组分对NANOG-PE阳性表达率的影响

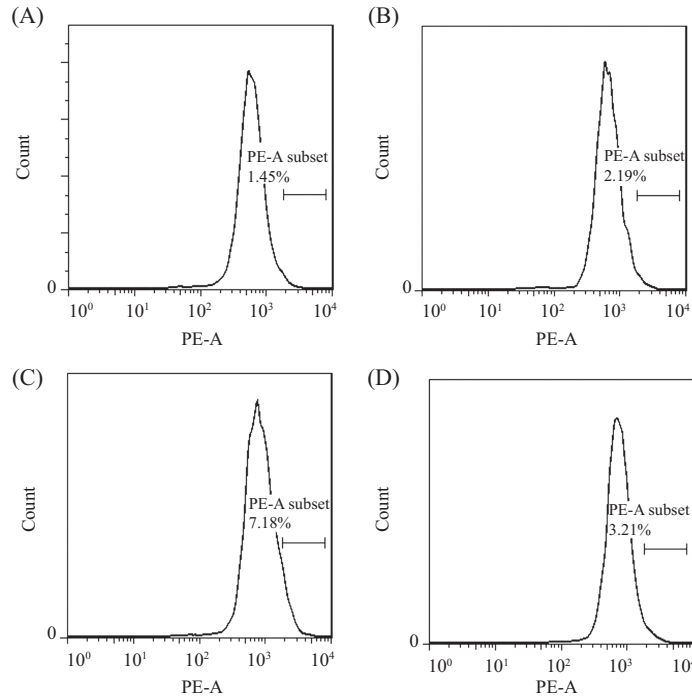
用终浓度为50%的鸡卵清提取液各组分培养293T细胞5 d, 结果显示, 对照组中NANOG-PE的阳性率为1.17%, 鸡卵清提取液培养的NANOG-PE的阳性率为2.29%。而大于10 kDa组分、小于10 kDa组分培养组的NANOG-PE的阳性率分别为3.6%、1.74%, 以上结果表明, 鸡卵清提取液及各组分都有促进多能因子NANOG表达的作用, 而大于10 kDa组分作用最明显(图2)。

### 2.3 鸡卵清提取液不同组分对SSEA-4-PE阳性表达率的影响

用终浓度为50%的鸡卵清提取液各组分培养293T细胞5 d, 结果显示, 对照组中SSEA-4-PE的阳性率为0.529%, 鸡卵清提取液培养的SSEA-4-PE的阳性率为1.87%。而大于10 kDa组分、小于10 kDa组分培养的SSEA-4-PE的阳性率为3.36%、1.11%。以上结果表明, 鸡卵清提取液及各组分都有促进多能因子SSEA-4表达的作用, 而大于10 kDa的组分作用最明显(图3)。

### 2.4 鸡卵清提取液不同组分对多能因子表达影响的统计分析

不同组分鸡卵清提取液培养293T细胞5 d, 流

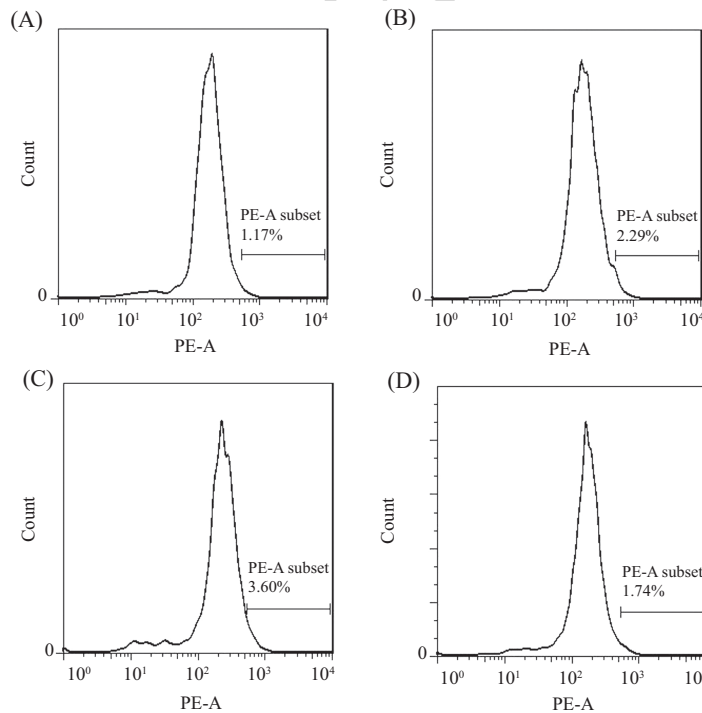


A: 对照组; B: 终浓度为50%鸡卵清提取液培养组; C: 终浓度为50%鸡卵清提取液中大于10 kDa组分培养组; D: 终浓度为50%鸡卵清提取液中小于10 kDa组分培养组。

A: control group; B: 50% chicken egg-white extract cultured group; C: 50% greater than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group; D: 50% less than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group.

图1 不同组分鸡卵清提取液对293T细胞中OCT4-PE的阳性表达率的影响

Fig.1 The effect of different fractions of chicken egg-white extract on the expression of OCT4-PE in 293T cells

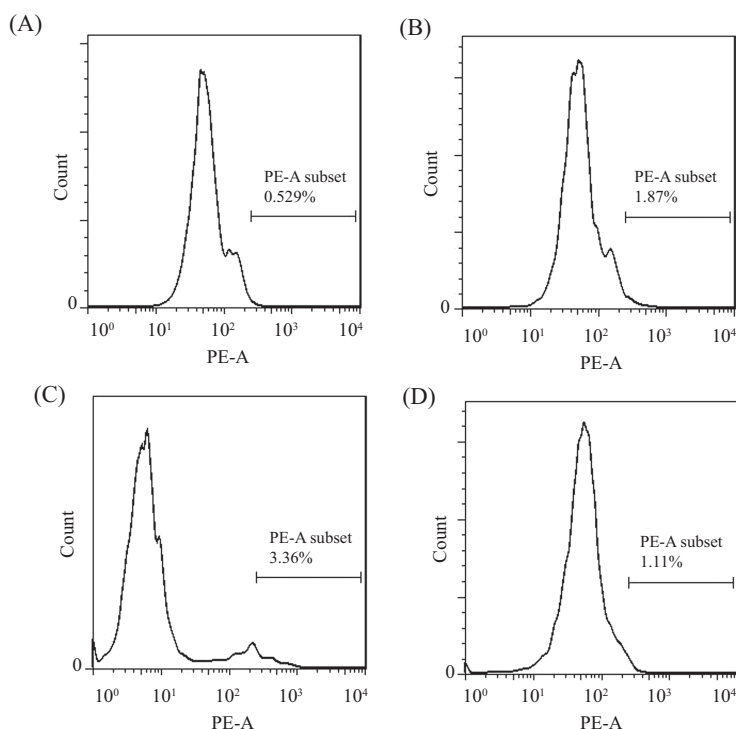


A: 对照组; B: 终浓度为50%鸡卵清提取液培养组; C: 终浓度为50%鸡卵清提取液中大于10 kDa组分培养组; D: 终浓度为50%鸡卵清提取液中小于10 kDa组分培养组。

A: control group; B: 50% chicken egg-white extract cultured group; C: 50% greater than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group; D: 50% less than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group.

图2 不同组分鸡卵清提取液对293T细胞中NANOG-PE的阳性表达率的影响

Fig.2 The effect of different fractions of chicken egg-white extract on the expression of NANOG-PE in 293T cells

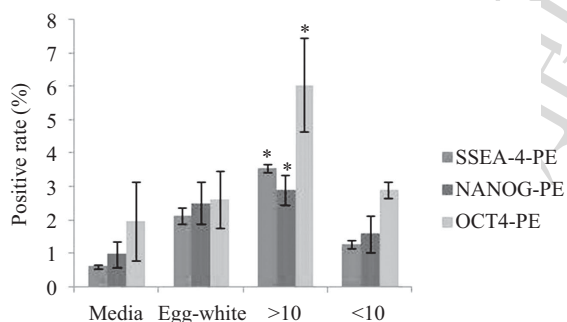


A: 对照组; B: 终浓度为50%鸡卵清提取液培养组; C: 终浓度为50%鸡卵清提取液中大于10 kDa组分培养组; D: 终浓度为50%鸡卵清提取液中小于10 kDa组分培养组。

A: control group; B: 50% chicken egg-white extract cultured group; C: 50% greater than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group; D: 50% less than 10 kDa fraction of chicken egg-white extract cultured group.

图3 不同组分鸡卵清提取液对293T细胞中SSEA-4-PE的阳性表达率的影响

Fig.3 The effect of different fractions of chicken egg-white extract on the expression of SSEA-4-PE in 293T cells



\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.01$  vs control group.

图4 不同组分鸡卵清提取液对293T细胞中三种多能因子表达的分析

Fig.4 The effect of different fractions of chicken egg-white extract on the expression of three kinds of pluripotent factor in 293T cells

式细胞术检测多能因子表达, 实验共重复4次, 对结果进行统计分析(图4)。从图中可见, 终浓度为50%鸡卵清提取液培养293T细胞, 能促进多能因子SSEA-4、NANOG和OCT4的表达, 表达量高于对照(培养基), 而大于10 kDa组分升高多能因子表

达更为明显( $P < 0.05$ ), 说明促进体细胞重编程作用的物质在鸡卵清提取液中大于10 kDa组分中。

### 3 讨论

以往研究报道, 猪卵和蟾蜍卵细胞提取液含有使体细胞重编程作用的物质<sup>[1-3]</sup>, 但猪卵和蟾蜍卵获取困难, 需要杀掉动物获得卵, 而且卵细胞提取液获得量少。我们在研究中发现, 鸡卵细胞提取液也含有使体细胞多能因子基因升高表达的作用<sup>[4]</sup>, 而且鸡卵获取方便, 一只母鸡可以产下多个鸡卵, 一个鸡卵可获得50 mL鸡卵清提取液。但多能因子基因升高表达, 多能因子蛋白质是否也会升高表达需要深入研究。在本研究中, 我们用流式细胞术证明了鸡卵清提取液不同组分也有使细胞升高表达多能因子蛋白质的作用, 用3种抗体经流式细胞术检测到人的体细胞293T细胞经鸡卵清提取液诱导后, 人的多能因子SSEA-4、NANOG、OCT4表达明显升高, 而鸡卵清提取液中大于10 kDa的组分促进多能蛋白表达升高最为明显, 证明了鸡卵清提取液有升高293T细胞表达多能因子的作用。经过超滤后, 获得浓缩的



大于10 kDa的组分, 这种组分进一步升高多能因子水平, 进一步证明了鸡卵清提取液中升高多能因子表达的物质在大于10 kDa的组分中。而小于10 kDa的组分和鸡卵清提取液也能促进多能因子表达升高, 但统计学意义不明显。与对照组相比, 进一步证明鸡卵清提取液中大于10 kDa的组分有促进体细胞多能因子表达增加的作用。

与培养基培养的293T细胞对照组相比, 50%鸡卵清提取液培养293T细胞5 d后, 多能因子表达升高, 但没有统计学意义( $P=0.066$ ); 但与对照组相比, 大于10 kDa的组分明显升高了三种多能因子蛋白质的表达( $P<0.01$ ), 说明经过超滤后, 有效成分得到了浓缩, 与293T细胞培养后诱导体细胞进一步升高了多能因子蛋白质的表达。

本研究结果表明, 鸡卵清提取液含有促进体细胞重编程作用的物质, 而最有效的组分在大于10 kDa的组分中。与对照组相比, 当50%终浓度的大于10 kDa的组分培养体细胞后, 对比普通培养基培养, 三种多能因子蛋白质表达明显升高( $P<0.01$ )。本研究结果为体细胞重编程诱导剂的制备打下了一定的基础, 为鸡卵清提取液的应用提供了实验基础。

在研究中, 我们还用到了截留量为100、50、30、3 kDa的超滤管, 但发现10 kDa的截留量获得的结果最佳、最稳定, 所以我们集中报道了10 kDa的截留量超滤管获得的2种不同组分和鸡卵清全液用于培养体细胞后的流式细胞术检测结果, 表明大于10 kDa的组分诱导细胞后, 293T细胞三种多能因子表达明显升高。今后我们可以继续研究这几种组分的异同, 最终获得在重编程过程中起作用的关键蛋

白质或关键分子, 为体细胞重编程的机制研究提供新的理论基础。

### 参考文献 (References)

- 1 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.
- 2 Miyamoto K, Furusawa T, Ohnuki M, Goel S, Tokunaga T, Minami N, *et al.* Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol Reprod Dev* 2007; 74(10): 1268-77.
- 3 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.
- 4 阮光萍, 王金祥, 姚翔, 庞荣清, 蔡学敏, 何洁, 等. 鸡卵提取物促进293T细胞升高表达多能基因OCT4和NANOG. *中国细胞生物学学报*(Ruan Guangping, Wang Jinxiang, Yao Xiang, Pang Rongqing, Cai Xuemin, He Jie, *et al.* Chicken egg extracts promote increased expression of pluripotent gene OCT4 and NANOG in 293T cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(2): 190-4.
- 5 阮光萍, 王金祥, 刘菊芬, 舒帆, 杨建勇, 庞荣清, 等. 鸡卵清提取液中小于3 kDa的成分有促细胞增殖的作用. *中国细胞生物学学报*(Ruan Guangping, Wang Jinxiang, Liu Jufen, Shu Fan, Yang Jianyong, Pang Rongqing, *et al.* Components of chicken ovalbumin extract less than 3 kDa in size promote cell proliferation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(10): 1350-4.
- 6 Besler and Mine The major allergen from hen's egg white: Ovomuroid (Gal d 1). *Internet Symposium on Food Allergens* 1999; 1: 137-46.
- 7 Lee A, Molloy MP, Baker MS, Kapur A. Tandem ion exchange fractionation of chicken egg white reveals the presence of proliferative bioactivity. *J Agric Food Chem* 2013; 61(17): 4079-88.
- 8 Mizunoya W, Tashima A, Sato Y, Tatsumi R, Ikeuchi Y. The growth-promoting activity of egg white proteins in the C2C12 myoblast cell line. *Anim Sci J* 2015; 86(2): 194-9.