

体外抑制 *Piwi* 基因对鸡原始生殖细胞 相关基因表达的影响

李建超, 张颖, 戴爱琴, 王洪志, 翟飞, 华登科, 夏明秀, 常国斌*, 陈国宏*

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 本研究以鸡原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)为材料进行 *Piwi* 基因的干扰, 并探究 *Piwi* 和生殖特异性标记基因 *CVH*、*Dazl* 和 *CDH* 及调控干细胞多能性转录因子基因 *Sox2*、*Nanog* 和 *PouV* 间的关系。由孵化至 19 期的鸡胚分离出 PGCs, 经鉴定后, 利用 RNA 干扰技术抑制 *Piwi* 基因表达, 相对实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达。结果发现, 体外抑制 *Piwi* 后, *CVH*、*Dazl* 和 *Nanog* 表达量显著增加 ($P < 0.05$), *PouV* 和 *Sox2* 表达量显著下降 ($P < 0.05$), *CDH* 表达量变化不显著 ($P > 0.05$)。本研究在家禽 PGCs 中建立 *Piwi* 基因干扰模型, 并发现其干扰后影响生殖特异性标记基因和干性转录因子的表达, 为其在生殖生物学中的功能研究提供了新的依据。

关键词: 鸡; 原始生殖细胞; *Piwi*; RNA 干扰

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)06-0871-08

In Vitro Inhibition of *Piwi* Gene Expression and the Influence on Related Genes in Primordial Germ Cells

LI Jian-chao, ZHANG Ying, DAI Ai-qin, WANG Hong-zhi, ZHAI Fei, HUA Deng-ke,
XIA Ming-xiu, CHANG Guo-bin*, CHEN Guo-hong*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: This study was designed to interfere *Piwi* gene in chicken primordial germ cells (PGCs) and explore its interaction with *CVH*, *Dazl*, *CDH*, *Sox2*, *Nanog* and *PouV* genes. PGCs was isolated from 19 stage chicken embryo, and after identification of PGCs, we analyzed expression of *CVH*, *Dazl*, *CDH*, *Nanog*, *Sox2* and *PouV* under the condition of *Piwi* interference in PGCs by using real time quantitative PCR. The results showed that expression of *CVH*, *Dazl* and *Nanog* genes increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of *PouV* and *Sox2* genes decreased significantly followed with *Piwi* interference in PGCs ($P < 0.05$). Collectively, we constructed a *Piwi* gene interference model *in vitro* and found, and which influenced expression of *CVH*, *Dazl*, *CDH*, *Sox2*, *Nanog* and *PouV*, which provided new basis for studying *Piwi* gene function in reproductive biology.

Key words: chicken; primordial germ cells; *Piwi*; RNA interference

1997年, H. Lin等首次发现了对生殖干细胞(Germline stem cells, GSC)有自我更新作用的PI-

WI蛋白^[1]。D. N. Cox等证实, PIWI蛋白是果蝇雄性种系中活动调控和反转录转座子基因沉默核心蛋

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(31372297; 31301966); 国家科技支撑计划(2011BAD28B03)

作者简介: 李建超(1987-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事家禽小分子RNA及家禽抗病研究, E-mail: 626812759@qq.com

* 通信作者: 常国斌, 教授, E-mail: passioncgb@163.com; 陈国宏, 教授, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

白^[2]。*Piwi* 基因突变体中,生殖细胞的维持和分化异常,导致雄性不育暗示 *Piwi* 基因在精子发生过程中起到重要作用;敲除小鼠的 *Miwi*、*Mili* 或 *Miwi2* 基因,都会造成精子形成受阻,诱导精子凋亡,表现为雄性不育^[3-4]。最新研究表明,在青年以及成年人睾丸生殖肿瘤(TGCT)*Miwi* 表达量上升,而非精原细胞瘤中表达量变化不明显。因此,*Piwi* 基因在睾丸生殖细胞肿瘤中扮演了癌基因的角色^[5]。2006年,有5个小组几乎同时发现能与 PIWI 蛋白质亚家族相互结合的长度在 24~32 核苷酸的非编码 RNA,被称为 Piwi-interacting RNA,简称 PiRNAs。目前, PiRNAs 具体功能尚处于探索阶段^[6-10],通过 PIWI 蛋白的研究来间接探讨 PiRNAs 功能和作用机制将成为小分子 RNA 研究的一条新捷径。

PIWI 蛋白广泛表达于不同物种的配子形成和发育时期,但在体外不容易获取,限制了对其功能及其调控机制的探讨。相对于其他物种,禽类配子、胚胎和组织的获取具有其他生物无可比拟的优越性。目前,禽类 *Piwi* 基因功能的研究国内外尚处于起步阶段,仅 GenBank 中报道了核酸序列(GeneID: 416804)。本研究以鸡的体外 PGCs 为研究对象,构建 *Piwi* 基因的 RNA 干扰载体,沉默 *Piwi* 基因后检测生殖特异性标记基因, *CVH* (Chicken vasa homologue), *Dazl* (Deleted in azoospermia-like) 和 *CDH* (Chicken dead end homologue) 及调控干细胞多能性及自我更新相关的重要转录因子 *PouV* (The class V POU homeodomain family of transcription factors)、*Nanog* (NK-type homeobox gene)、*Sox2* (Sry-related HMG box 2) 基因的表达,初步探究了 PIWI 蛋白基因与上述生殖和多能性相关基因的关系,为进一步研究 *Piwi* 基因的功能和调控机制奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

受精蛋来自中国农业科学院家禽研究所如皋鸡群,于 38.0 °C,相对湿度为 60% 的条件下孵化,孵化分期按 V. Hamburger 等^[11] 标准划分。

1.2 试剂

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、鸡血清、0.05% Trypsin-EDTA、双抗(青链霉素)、PBS 购自 Gibico 公司;鼠白血病抑制因子(mLIF)、人干细胞

因子(hSCF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、DMSO 购自 Sigma 公司;SSEA-1 抗体、IgM-FITC 羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz 公司;丝裂霉素 C、糖原染色试剂盒、碱性磷酸酶染液均购自南京建成科技有限公司;BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo 荧光素标记的阴性对照 siRNA、Lipfectamine™ 2000 转染试剂、Lipfectamine™ RNAiMax 转染试剂、Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 购自 Invitrogen 公司;细胞冻存程序降温盒购自 Nalgene 公司;培养板、培养瓶均购自 Corning 公司。

1.3 鸡 PGCs 分离、培养与鉴定

1.3.1 饲养层细胞制备 参照朱国坡等^[12] 的方法,使用胰酶连续消化法制备鸡胚成纤维细胞。选取生长良好的第 3 代鸡胚胎成纤维细胞(Chicken embryonic fibroblast, CEF),加入含有 10 μg · mL⁻¹ 丝裂霉素 C 的 2% 鸡血清培养基培养液,置 37 °C 培养箱中温育 2 h,以 3 × 10⁴ 个 · cm⁻² 密度接种 12 孔板中,培养 24 h 待细胞完全融合后用作为饲养层细胞备用。

1.3.2 PGCs 分离、培养及鉴定 EDTA-胰蛋白酶法^[13] 分离 PGCs 孵化至 19 期的受精卵,取下生殖腺发生部位,经过 Trypsin-EDTA 室温消化后,调整细胞密度到 10⁵ 个 · mL⁻¹ 接种至饲养层上,2% 鸡血清培养基常规培养 24 h 后换培养液,以后 48 h 换培养液 1 次。PGCs 原代培养 3~5 d 后可形成典型的 EG 样细胞集落。因此,在接种后的 5~7 d 进行 PGCs 传代。糖原染色对 PGCs 集落(培养到第 2 代)进行鉴定,碱性磷酸酶活性检测(培养到第 2 代),胚胎阶段特异性胚胎表面抗原(SSEA-1)检测 PGCs(培养到第 2 代)所处的时期;试剂盒均购自南京建成科技有限公司,严格按照说明书进行操作。

1.4 *Piwi* 基因干扰模型的建立

1.4.1 siRNAs 序列的设计合成 根据 GenBank 公布的鸡 *Piwi1* 基因的 mRNA 序列(NM_001098852)选择了 3 个位点(stealth_1432、stealth_1769、stealth_2070),分别靶向设计得到 3 套 stealth siRNAs; siR-1、siR-2 和 siR-3,由 Invitrogen 公司合成(表 1)。通用无义序列 BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo 为荧光素标记的阴性对照 siRNA,该序列与任何已知基因均不同源。

表 1 StealTh siRNAs 序列

Table 1 Sequences of StealTh siRNAs

名称 Name	正义链/反义链 Sense/ Anti-sense	序列(5'-3') Sequence
siR-1	S	CAAUCCUCAGUUUGCUGAUUGGUCA
	A	UGACCAAUCAGCAAACUGAGGAUUG
siR-2	S	CAGUGCGUGGUUGCUCGUACUUUAA
	A	UUAAAGUACGAGCAACCACGCACUG
siR-3	S	GGGAAUGGUUCAAGUGGAAUAAGUA
	A	UACUUAUCCACUUGAACCAUUC

1.4.2 *Piwi* 干扰条件的优化 转染前 24 h 内将第 2 代生长状态良好的 PGCs 细胞以 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种到含有饲养层的 12 孔细胞培养板中,更换不含抗生素的完全培养基。

分别用 Invitrogen 公司 LipofectamineTM 2000 和 LipofectamineTM RNAiMax 2 种转染试剂介导的脂质体和转染技术进行 siRNA 的转染。对于 siRNA 浓度及 LipofectamineTM 2000/RNAiMax 浓度分别设置如下不同梯度: siRNA, 0、20、50、80 pmol; LipofectamineTM 2000/RNAiMax (μL): 1、2、3 μL 。

以同期培养的 PGCs 设对照组(细胞内不加任何处理, siR-BC), 阴性 siRNA 转染对照组(转染通用的阴性对照 siRNA、siR-NC)和 3 对 siRNA 转染组, 每组重复 3 孔。按照最佳试剂条件进行转染。分别于转染后 24、48 和 72 h 收集细胞以用于 *Piwi* 基因表达检测, 筛选最优的干扰载体及沉默时间。

1.5 细胞 RNA 的提取及反转录

收集对照组及转染的 PGCs 细胞, 均使用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA, 然后用 RNA 纯化试剂盒(Ambion)对提取的总 RNA 进行去 DNA 等处理, 用适量的 RNase-free 水溶解, 用 NanoDrop 1000 分光光度计(Thermo)测定总 RNA 的 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 及浓度, 用 1% 变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。合成 60 μL 的 cDNA, 反应体系为 RNA 根据浓度定加入量(反转录后 cDNA 为 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)用水补至 28.5 μL , 9 μL OligoDt (18), 6 μL Mix-dNTP, 12 μL 5 \times RT Buffer, 1.5 μL 抑制剂, 3.0 μL 反转录酶。样品总 RNA 和 OligoDt(18)在反转录前 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上骤冷, 后加其余试剂, 混合均匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 42 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 1 h, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

1.6 抑制 *Piwi* 基因后目的基因的表达

挑选良好的 PGCs 细胞, 分为试验组和对照组

2 组, 每组 3 个重复。按照 1.4.2 中建立的方法进行转染, 对照组不做任何处理。分别收集细胞, 实时定量 PCR 检测 *Piwi* 基因干扰后目的基因的表达(引物序列见表 2)。

1.7 数据分析

荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行统计, 采用 ANOVA 进行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 显著性水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PGCs 的分离和鉴定

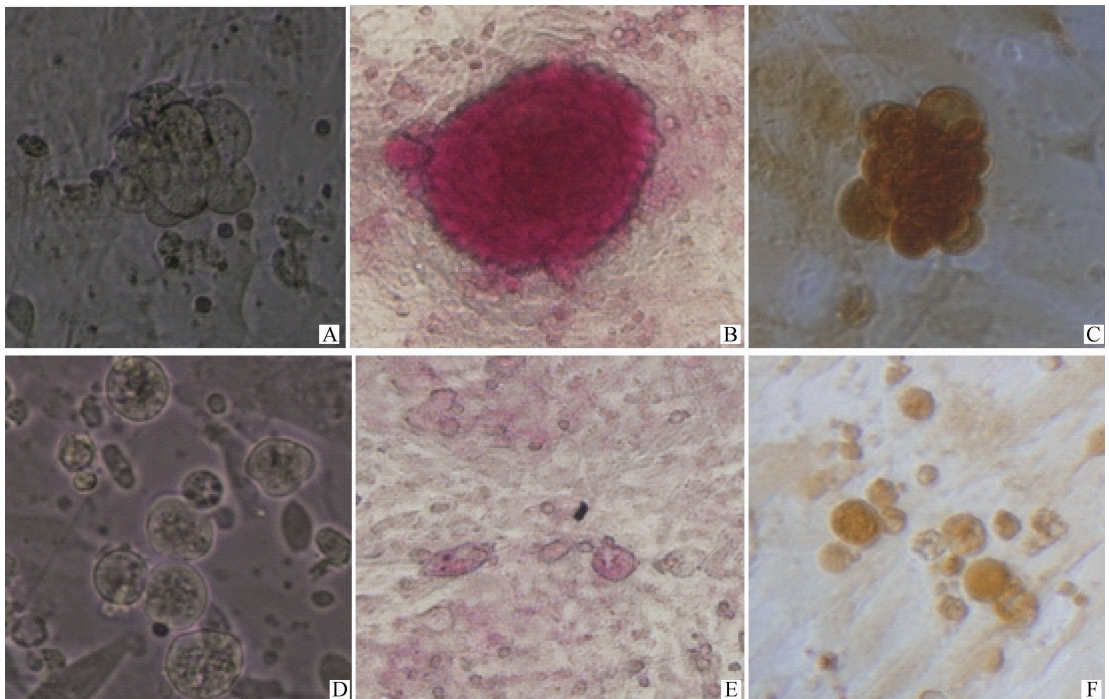
显微镜下观察, 刚分离到的单个 PGCs 较体细胞大, 细胞质中含有球状的卵黄颗粒和脂滴。培养 24 h 后, 可见单个 PGC 已经贴附在饲养层上, 但细胞间结合不紧密, 细胞之间排列疏松、界线较明显, 呈现典型的 PGCs 特征(图 1 B); 培养 2~3 d 左右开始出现 PGCs 集落, 隆起于饲养层上且集落数量和组成的细胞数量不断增加。集落开始形成时, 边缘较光滑, 轮廓清晰, 形成典型的 PGCs 集落特征(图 1 A); 5 d 后可见集落明显增大, 呈鸟巢状, 细胞间排列紧密, 很难辨认出单个细胞(图 1 C)。由于 PGCs 内含有大量的糖原颗粒, 所以 PAS 染色技术是检测 PGCs 细胞的重要手段之一。鸡原代 PGCs 细胞集落和单个 PGC 呈深红色, 显阳性(图 1 C, 1 D); 将传至 2 代的 PGCs 集落经碱性磷酸酶染色后呈棕红色, 而饲养层着浅黄色或者不着色(图 1 E, 1 F)。

胚胎阶段特异性胚胎表面抗原(SSEA-1)检测可以检测 PGCs 细胞所处时期。利用荧光标记的 SSEA-1 抗体检测 PGCs 表面特异性抗原, 在荧光显微镜明场(图 2 A, 2 D)、暗场(图 2 B, 2 E)和混合场(图 2 C, 2 F)下均可见细胞形态, 暗场和混合场中 PGCs 克隆表面带绿色荧光呈 SSEA-1 阳性, 呈典型的 PGCs 特征, 而饲养层则呈现阴性。

表 2 Real-time qPCR 检测 PGCs 中目标基因的引物序列

Table 2 Primer sequences for real-time qPCR analysis of target genes

基因 Gene	登录号 Accession No.	正义链/反义链 Sense/ Anti-sense	序列(5'-3') Sequence	大小/bp Size
<i>βactin</i>	NM_205518	S	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA	141
		A	ATGCCAGGGTACATTGTGGT	
<i>Piwil</i>	NM_001098852	S	TCACCTGAGCAAAGACAAC	126
		A	TCCCGTAAAGGACAGTAAG	
<i>CVH</i>	AB004836	S	CCTTGCAGCCTTTCTTTGTC	145
		A	GCCTCTTGATGCTACCGAAG	
<i>CDH</i>	XM_423051	S	CAACCGGACCAATAAGATGG	182
		A	TGAGCGTGTCTCATAACAGG	
<i>Dazl</i>	NM_204218	S	CCCTTTAAGTCCCGGTTCTC	139
		A	CCACTGAGCAGCCAATGTAA	
<i>PouV</i>	DQ867024	S	AAATGTGTGAAGCCCAGTCC	123
		A	GCTCTGGAGCTGAAGCTGTT	
<i>Nanog</i>	DQ867025	S	CAGCAGACCTCTCCTTGACC	187
		A	TTCTTGTCCACTCTCACC	
<i>Sox2</i>	D50603	S	AGGCTATGGGATGATGCAAG	163
		A	GTAGGTAGGCGATCCGTTCA	

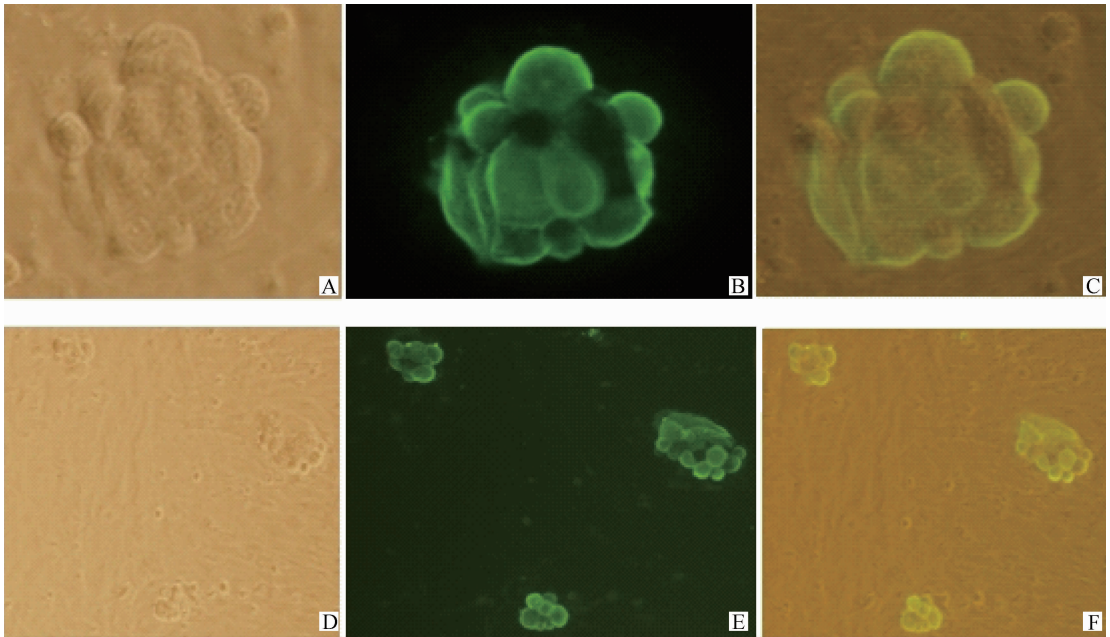


A. 分离 48 h 的 PGCs; B. 分离 24 h 的 PGCs; C. 2 代 PGCs 的 PAS 染色; D. 2 代 PGC 单个细胞 PAS 染色; E. 2 代 PGCs 的 AKP 染色; F. 2 代 PGC 单个细胞 AKP 染色

A. PGCs after 48 h culture; B. PGCs after 24 h culture; C. PAS staining of second generation chicken PGCs; D. PAS staining of second generation of single chicken PGC; E. AKP staining of second generation of chicken PGCs; F. AKP staining of second generation of single chicken PGC

图 1 PGCs 的形态学鉴定及生化鉴定 200×

Fig. 1 PGCs morphology and biochemical identification 200×



A~C. 分别为明场、暗场和混合场中的单细胞克隆 SSEA-1 免疫荧光染色 (200 \times); D~F. 分别为明场、暗场和混合场中的多个克隆 SSEA-1 免疫荧光染色 (100 \times)

A-C. Expression of SSEA-1 (stage-specific embryonic antigens-1) in PGCs under different images (200 \times); D-F. Expression of SSEA-1 (stage-specific embryonic antigens-1) in PGCs under different images(100 \times)

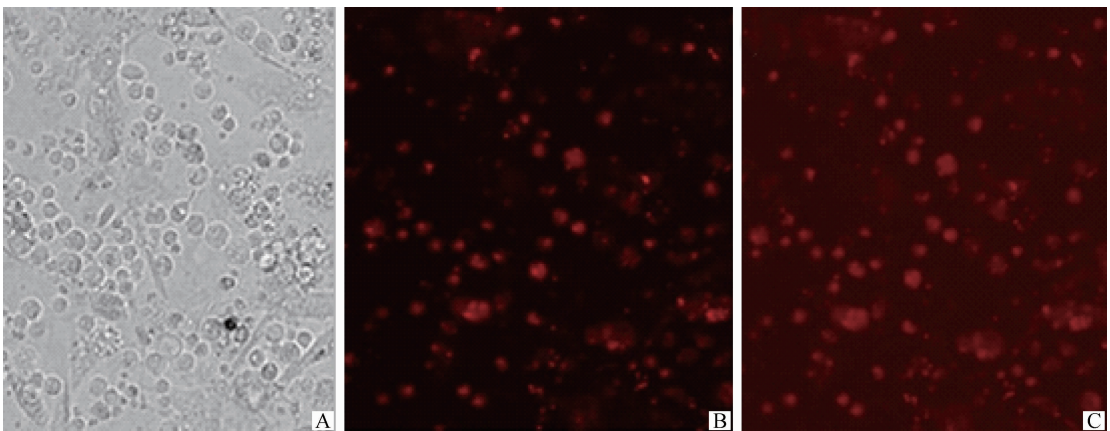
图 2 PGCs 的 SSEA-1 鉴定

Fig. 2 Expression of SSEA-1 (stage-specific embryonic antigens-1) in chicken PGCs

2.2 siRNA 转染条件优化结果

2.2.1 试剂的优化结果 每孔寻找 3 个具有代表性的视野,各观察 100 个细胞,计数红色荧光显色细胞,计算转染阳性细胞率,即转染效率。转染效率=转染 siRNA 的细胞计数/全部细胞计数。荧光显微镜下观察红色荧光信号的细胞数,发现用 Li-

pofectamineTM 2000 的转染试剂优于 LipofectamineTM RNAiMax 试剂,且相对于转染 12 孔板而言,siRNA 为 50 pmol 和 +LipofectamineTM 2000 为 2 μ L 时的转染效率相对较高(图 3B,3C),大于 80%。在随后 *Piwi* 基因 RNA 干扰试验中采用了 LipofectamineTM 2000 的转染试剂。



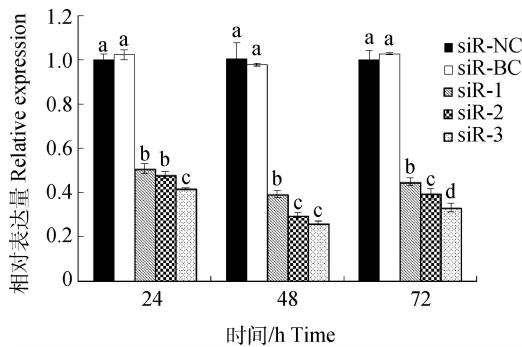
A. 对照组 PGCs; B. 暗场中转染的 PGCs; C. 混合场中转染的 PGCs

A. PGCs of control group; B. PGCs after tansfected in dark field; C. PGCs after tansfected in mix field

图 3 +LipofectamineTM 2000 试剂转染 PGCs 100 \times

Fig. 3 +LipofectamineTM transfecting PGCs 100 \times

2.2.2 干扰时间的优化结果 Real-time qPCR 检测 *Piwi* 基因表达量结果如图 4 所示,阴性 siRNA 组和对照组 (siR-NC) 相比,在 24、48 和 72 h 均差异不显著 ($P > 0.05$)。3 个特异性 siRNAs 组和阴性 siRNA 组、对照组 (siR-NC) 相比,*Piwi* 基因表达量显著降低 ($P < 0.05$),表明 3 个特异性 siRNAs 干扰序列均有明显的干扰作用。而干扰作用于干扰时间不同效果也有差别,在 48 h 干扰作用最强。转染 24 h,对 *Piwi* 基因的干扰作用,siR-1 与 siR-2 差异不显著 ($P > 0.05$)。转染 48 h,siR-2 与 siR-3 干扰作用差异不显著 ($P > 0.05$)。转染 72 h,3 个序列间相比均呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。综合以上结果,转染 48 h 后的 siR-3 干扰效果最好,用于后续试验。



字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$),字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同

Different letters means significant difference between the treatments ($P < 0.05$), same letter means not significant difference between treatments ($P > 0.05$). The same as below

图 4 荧光定量检测干扰后 *Piwi* 基因的表达

Fig. 4 Expression of *Piwi* gene after interference by qPCR

2.3 应用 *Piwi* 基因干扰后检测目的基因的表达

用 siR-3 序列抑制 PGCs 中的 *Piwi* 基因后,转染 48 h,同时采用 Real-time qPCR 技术检测 *CVH*、*Dazl*、*CDH* 及 *PouV*、*Nanog*、*Sox2* 在 mRNA 水平上的表达量,如图 5 所示。结果表明,与阴性对照组 (siR-NC) 相比,抑制 *Piwi* 基因表达后,*CVH*、*Dazl* 和 *Nanog* 基因表达量上升,而 *PouV* 和 *Sox2* 基因表达量下降且差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),仅 *CDH* 基因表达量变化差异不显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

鸡 PGCs 细胞作为精原细胞和卵原细胞的祖细胞具有全能性,可作为体外胚胎发育研究的良好模

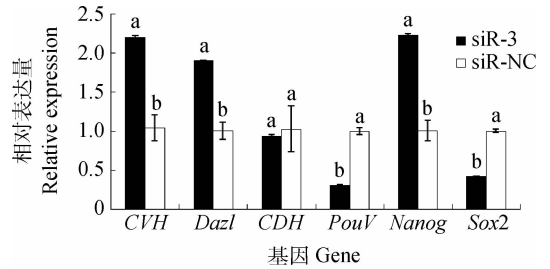


图 5 *Piwi* 基因干扰后目的基因的表达

Fig. 5 Expression of target genes by qPCR after *Piwi* gene interference

型,而禽类独特的生理和发育特点使得其原始生殖细胞 (PGCs) 在 *Piwi* 基因研究中有着巨大价值。鸡 PGCs 的鉴别主要有形态学和生化 2 种方法。鸡 PGCs 直径约 15~25 μm ,呈圆形或椭圆形,因其较大的体积能与其他细胞明显的区分。细胞核较大直径约为 8~12 μm ,且偏于细胞的一端,有 1~2 个核仁,细胞核内缘存在少量异染色质,其余常染色质则均匀分布^[14-15]。在已经分化的细胞中,糖原含量减少,碱性磷酸酶活性降低。而 PGCs 细胞中糖原含量和 APK 活性都保持较高的水平^[16]。胚胎阶段特异性胚胎表面抗原 (SSEAs) 的表达在胚胎发育早期受到严密的调节,当细胞分化时这些抗原的表达会出现明显变化^[17]。本研究用 EDTA-胰蛋白酶法分离鸡 PGCs,并通过形态鉴定和糖原染色法、碱性磷酸酶生化鉴定等方法鉴别所分离出的 PGCs,胚胎阶段特异性胚胎表面抗原 (SSEA-1) 检测 PGCs 所处的时期。保证了干扰试验所需的 PGCs 数量和质量。本研究设计了 3 组干扰序列 siR-1、siR-2 和 siR-3,并选择了 Invitrogen 公司 LipofectamineTM 2000 和 LipofectamineTM RNAiMax 2 种转染试剂介导的脂质体和转染技术进行 siRNA 的转染。同时设置了 3 个转染时间 24、48 和 72 h,检测干扰的效果。对干扰序列干扰时间以及转染试剂进行选择保证了转染的效果。

CVH、*Dazl* 和 *CDH* 三者均编码 RNA 结合蛋白,被认为是鸡 PGCs 中表达的 3 个生殖特异性标记基因,这 3 个基因均在生殖细胞系中特异表达,参与生殖细胞的维持和形成及配子发生。*CVH* 是 *Vasa* 基因的同源物,*Vasa* 基因由 S. Trudi 等于 1986 年在果蝇中首次发现,*Vasa* 属于 DEAD-box 家族,该家族基因编码一类 ATP 依赖的 RNA 解旋酶,因 *CVH* 在 PGCs 发展过程持续表达,被认为是鸡 PGCs 起源和分化的重要分子标志^[18]。2009 年,

T. Thomson 等应用荧光共定位和免疫共沉淀分析等方法,发现在果蝇卵母细胞中,PIWI 蛋白同 CVH 基因的同源基因 *Vasa* 之间存在相互作用^[19]。*DazL* 属于 DAZ 基因家族,是一个进化上高度保守的基因。人类精子发生障碍时,睾丸中 *DazL* 转录本的数量水平显著降低,*DazL* 的 RRM 基序的多态性会导致严重的精子生成障碍^[20]。生殖细胞发育早期 *Dazl* 便开始表达,被认为是减数分裂启动的内因,并持续在减数分裂过程中表达,在精子形成过程中起到重要作用。*Dazl* 的基因突变体或者缺失个体中,减数分裂障碍,导致雄性不育^[21]。*Dnd* 基因由 G. Weidinger 等在斑马鱼 PGCs 中获得,沉默该基因后,斑马鱼的 PGCs 失去迁移能力并大量死亡^[22]。同源基因 *Dnd1* 突变小鼠中 PGCs 丧失,并导致小鼠睾丸生殖细胞瘤 (Testicular germ cell tumour, TGCT),同时部分胚胎死亡^[23]。S. Aramaki 等于 2007 年发现了鸡的 *Dnd* 同源基因 *CDH*,并利用原位杂交技术 (ISH) 追踪,发现 *CDH* 在胚盘、生殖新月区、性腺期的 PGCs 中均有表达,因此可以作为 PGCs 起源、迁移、分化的分子标记^[24]。在本研究中,沉默 *Piwi* 基因后,PGCs 中 *CVH*、*Dazl* 和 *CDH* 的表达均产生了变化。其中,相对于对照组,*CVH* 和 *Dazl* 基因的表达显著升高了,表明 *Piwi* 基因表达可能和 *CVH* 和 *Dazl* 呈正相关。而 *Dazl* 表达的上调意味着 *Piwi* 基因和 *Dazl* 之间可能存在着调控关系。生殖细胞的形成和配子发生过程中,*Piwi* 通过直接作用也可能通过生殖细胞形成和配子发生中某个信号通路中两者的抑制因子间接调控两者的表达。然而,三者之间相互关系及其相互作用机制有待于通过高通量测序和荧光定位等方法进一步研究。本研究中,在 PGCs 中沉默 *Piwi* 基因,*CDH* 基因的表达并未产生显著变化,表明 *Piwi* 和 *CDH* 基因可能处于不同的调控通路。

研究表明,*Oct4*、*Nanog* 和 *Sox2* 能协同调控 ES 的多能性和自我更新能力,并参与多能细胞的重新编码过程。而在鸡上不存在 *Oct4* 基因,*PouV* 是其同源基因,可以作为细胞全能性的标志基因。*Nanog* 基因有助于维持细胞的未分化状态,表达于人类原始干细胞中,在胚胎生殖细胞和胚胎纤维瘤细胞中也有表达,并参与核重编程启动,是调控多能干细胞的重要转录因子。*Sox2* 也是调控干细胞多能性及自我更新的重要转录因子,且有研究表明,其

能协同 *PouV* 基因调控胚胎发育中一些重要基因的表达^[25-26]。本研究发现,体外抑制 *Piwi* 基因后,PGCs 中 *PouV*、*Sox2* 和 *Nanog* 基因均产生显著变化,其中 *PouV* 与 *Sox2* 基因相对于对照组表达量显著下降,而 *Nanog* 基因表达量显著上升。以上结果表明,*Piwi* 基因通过某种途径影响了 PGCs 的干性维持。*Nanog*、*Oct4* 和 *Sox2* 3 个转录因子位于细胞全能性调控网络的顶端,联合形成调节通路(自动调节通路和反馈通路),自动调节主要应对外界各种刺激因素,稳定相关基因表达,而反馈调节包括正反馈和负反馈,在保持细胞全能性,对抗分化信号能力中发挥作用^[27-28]。本研究发现,*Nanog* 基因表达量显著上升,与 *PouV* 和 *Sox2* 基因表达趋势相反,可能的原因:一是在干细胞中,*Nanog* 基因的表达稍晚于 *PouV/Oct4* 和 *Sox2*,它主要在第 2 阶段内胚层形成中起作用,而 *PouV/Oct4* 主要是在桑椹胚和滋养外胚层及内细胞团的形成中发挥作用;二是 *Nanog* 与 *PouV/Oct4* 和 *Sox2* 基因位于不同的信号通路中,调节方式虽然联系但并不相同,但 *Piwi* 基因是如何影响 *Nanog* 和 *PouV*、*Sox2* 基因以及他们间相互作用机制还有待于进一步研究。

综上所述,目前鸡 PGCs 的研究处于起步阶段,沉默 *Piwi* 基因后影响了生殖特异性标记基因 *CVH*、*Dazl*、*CDH* 和调控干细胞多能性转录因子基因 *Sox2*、*Nanog* 和 *PouV* 表达情况,但仅仅体外抑制 *Piwi* 基因,虽然能证实 *Piwi* 基因通过和其他基因相互作用,在干细胞多能性维持和配子发生中起到一定作用,但如何发挥作用,可通过高通量测序等手段结合生物信息学构建调控网络进一步研究。

4 结 论

本试验中,首次利用 *Piwi* 靶向 siRNAs 在体外特异性且有效抑制鸡 PGCs 中 *Piwi* 基因的表达,通过检测生殖特异性标记基因 *CVH*、*Dazl*、*CDH* 和调控干细胞多能性转录因子基因 *Nanog*、*PouV* 和 *Sox2* 表达情况发现 *Piwi* 基因影响生殖特异性标记基因和调控干细胞多能性转录因子基因表达,证实 *Piwi* 和生殖特异性标记基因和调控干细胞多能性转录因子基因可能存在某种作用。

参考文献:

- [1] LIN H, SPRADLING A C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline

- stem cells in the Drosophila ovary [J]. *Development*, 1997, 124:2463-2476.
- [2] COX D N, CHAO A, LIN H. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells [J]. *Development*, 2000, 127:503-514.
- [3] KURAMOCHI-MIYAGAWA S, KIMURA T, LJIRI T W, et al. Mili, a mammalian member of Piwi family gene, is essential for spermatogenesis [J]. *Development*, 2004, 131:839-849.
- [4] DENG W, LIN H. miwi, a murine homolog of Piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(6):819-830.
- [5] QIAO D, ZEEMAN A M, DENG W, et al. Molecular characterization of hiwi, a human member of the Piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas [J]. *Oncogene*, 2002, 21(25):3988-3999.
- [6] ARAVIN A, GAIDATZIS D, PFEFFER S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes [J]. *Nature*, 2006, 442(7099):203-207.
- [7] GORARD A, SACHIDANANDAM R, HANNO G J, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. *Nature*, 2006, 442(7099):199-202.
- [8] GRIVNA S T, BEYRET E, WANG Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(13):1709-1714.
- [9] LAU N C, STEO A G, KIM J, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes [J]. *Science*, 2006, 313(5785):363-367.
- [10] WZTANABE T, TAKEDA A, TSUKIYAMA T, et al. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(13):1732-1743.
- [11] HAMBURGER V, HAMILTON H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo [J]. *J Morphol*, 1951, 88(1):49-92.
- [12] 朱国坡, 周晓丽, 郭延锋, 等. 鸡胚成纤维细胞原代培养及应用 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31(3):112-114.
- [13] TANG X Y, ZHANG C Q, ZENG W D, et al. Proliferating effects of the flavonoids daidzein and quercetin on cultured chicken primordial germ cells through antioxidant action [J]. *Cell Biol Int*, 2006, 30:445-451.
- [14] PARK T S, HAN J Y. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56:475-482.
- [15] NAITO M, TAJIMA A, TAJIMA T, et al. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring [J]. *J Reprod Fert*, 1994, 102(2):321-325.
- [16] TSUNEKAWA N, NAITO M, SAKAI Y, et al. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells [J]. *Development*, 2000, 127(12):2741-2750.
- [17] MURAMATSU T, MURAMATSU H. Carbohydrate antigens expressed on stem cell and early embryonic cells [J]. *Glycoconj J*, 2004, 21(1-2):41-45.
- [18] TRUDI S, ERIC W. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the Drosophila embryo [J]. *Roux's Arch Dev Biol*, 1986, 195:302-317.
- [19] THOMSON T, LIN H. The biogenesis and function PIWI proteins and piRNAs; progress and prospect [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25:355-376.
- [20] LIN Y M, CHEN C W, SUN H S, et al. Expression patterns and transcript concentrations of the autosomal DAZL gene in testes of azoospermic men [J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(11):1015-1022.
- [21] YEN P H, CHAI N N, SALIDO E C, et al. The human autosomal gene DAZLA; testis specificity and a candidate for male infertility [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(12):2013-2017.
- [22] WEIDINGER G, STEBLER J, SLANCHEV K, et al. Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(16):1429-1434.
- [23] YOUNGREN K K, COVENEY D, PENG X, et al. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours [J]. *Nature*, 2005, 435(7040):360-364.
- [24] ARAMAKI S, SATO F, KATO T, et al. Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 330(1):45-52.
- [25] RODDA D J, CHEW J L, LIM L H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26):24731-24737.
- [26] LAVIAL 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):3549-3563.
- [27] MASUI S, NAKATAKE Y, TOUOOKA Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):625-635.
- [28] WANG Z, ORON E, NELSON B, et al. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4):440-454.