

5-Azadc 和 TSA 对鸡 *Nanog* 基因启动活性及 ESC 多能性维持的影响

张亚妮, 王颖洁, 左其生, 李东, 张蕾, 汤贝贝, 连超, 毕瑜林, 张文慧, 李碧春*

(扬州大学动物科学与技术学院 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009)

摘要: 旨在克隆如皋黄鸡 *Nanog* 基因启动子, 并构建含有双荧光素酶报告基因的表达式载体进行启动子活性分析, 找出该基因启动子的核心调控区; 探索甲基化抑制剂 5-Azadc (5-Aza-2'-deoxycytidine) 或曲古抑菌素 (Trichostatin A, TSA) 对 *Nanog* 基因启动活性及其 ESC 体外培养条件下多能性维持的影响, 为初步阐明 *Nanog* 基因的表达调控机制提供理论依据。PCR 扩增 *Nanog* 基因不同长度片段的启动子序列, 定向克隆至 pGL3-basic 载体和 pEGFP-N1 构建重组载体; 将重组载体转染 DF-1 细胞后, 48 h 收集蛋白, 采用双荧光素酶报告基因检测系统测定其转录活性, 确定基本转录调控区; 将重组载体转染 DF-1 细胞后添加 5-Azadc 或 TSA 对 *Nanog* 基因进行诱导表达, 并通过双荧光素酶报告基因检测系统, 分析其对 *Nanog* 基因启动子活性的影响。选取生长至第 3 代的 ESC, 培养基中添加最适浓度的 5-Azadc 和 TSA, 每隔两天观察细胞, 分析其对 ESC 体外多能性维持的影响, 并对诱导至第 10 天的细胞进行间接免疫荧光检测。结果表明, 成功构建 3 个片段的双荧光素酶报告基因表达式载体; 双荧光素酶活性检测结果显示, pGL3/1967 活性最强; 分别添加或者联合添加 5-Azadc 和 TSA 均可使 *Nanog* 基因的转录活性增强; 5-Azadc 和 TSA 诱导对 ESC 体外培养条件下多能性维持的影响结果显示, 诱导 6 d 后, 对照组细胞大量分化, 细胞克隆无法维持, 而 5-Azadc 和 TSA 诱导组克隆明显, 5-Azadc+TSA 联合诱导组细胞克隆数量显著多于对照组; 诱导至第 10 天, 对照组细胞完全分化, 没有细胞克隆, 而诱导组存在大量细胞克隆, 联合诱导组克隆数量显著多于其他两组; SSEA-1 间接免疫荧光结果显示, 对照组没有明显的 ESC 克隆, 而 5-Azadc 组和联合诱导组细胞克隆明显, 综上所述, 5-Azadc 和 TSA 可有效地通过提高 *Nanog* 基因的表达而维持鸡 ESC 在体外培养过程中的多能性。

关键词: *Nanog* 基因; 启动子; 5-Azadc; TSA; 双荧光素酶活性检测系统

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2176-09

Effects of 5-Azadc and TSA Induction on Promoter Activity of *Nanog* and Pluripotency Maintaining in Chicken

ZHANG Ya-ni, WANG Ying-jie, ZUO Qi-sheng, LI Dong, ZHANG Lei, TANG Bei-bei, LIAN Chao, BI Yu-lin, ZHANG Wen-hui, LI Bi-chun*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design for Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The aim of this study was to clone *Nanog* gene promoter of chicken and construct the expression vector containing dual luciferase report gene to analyze the promoter activity, find out its core regulatory region, explore the effect of 5-Azadc (5-Aza-2'-deoxycytidine) and TSA (Trichostatin A) on its promoter activity and ESC pluripotent maintaining *in vitro* condition, so as to elucidate preliminarily the regulating mechanisms of *Nanog* gene and provide the theory basis for

收稿日期: 2015-02-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31301959; 31272429; 31472087); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20123250120009); 中国博士后基金 ((2012M511326)); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 张亚妮 (1977-), 女, 陕西渭南人, 副教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: ynzhang@yzu.edu.cn

* 通信作者: 李碧春, 教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程研究, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

the future research. The different length fragments *Nanog* gene promoter was amplified by PCR technology and cloned into pGL3-basic vector or pEGFP-N1 directly to construct a recombinant vector. After the recombinant vector was transfected into DF-1 cells for 24 h and the protein was collected, the transcriptional activity of *Nanog* gene was measured by dual luciferase assay system to search for the basic transcriptional regulatory region; The recombinant vector was transfected into DF-1 cells, and methylation inhibitor 5-Azadc or histone deacetylase inhibitor TSA was added to detect its effect on the promoter activity. The third generation ESC was selected and grown into the medium supplemented with the optimum concentration of 5-Azadc and TSA, the cells were observed every 2 d to analyze the pluripotent maintaining of ESC *in vitro* culture condition, and indirect immune fluorescence of SSEA-1 was detected on the tenth days induction. The results showed that 3 dual luciferase report gene expression vector was constructed successfully. The strongest dual luciferase activity was shown by pGL3/1967; the transcription activity of *Nanog* gene was enhanced when 5-Azadc and TSA was added single or together. ESC was cultured in the medium with 5-Azadc and TSA *in vitro*, a great number of cells differentiated after 6 d of induction and cell colony was not maintained in control group, while the cell colony in 5-Azadc and TSA induction group was significant higher than the control group; On the tenth days induction, the cells in control group were fully differentiated, there were still a large number of cell clone in the 5-Azadc + TSA group, the number of colony were significantly more than the other 3 groups; the results of indirect immunofluorescence showed there was no cell colony in the control group, but more colonies were observed in the 5-Azadc and TSA induction group. It further showed that 5-Azadc and TSA could effectively maintain ESC pluripotency of chicken *in vitro* culture condition by increasing the expression of *Nanog* gene.

Key words: *Nanog*; promoter; 5-Azadc; TSA; dual luciferase activity system

Nanog 蛋白是含有同源盒结构域的转录因子^[1], 由 305 个氨基酸组成, 其中 C 端有强的转录激活结构域而 N 端有弱的转录激活结构域, 在维持 ESC 的多能性过程中起着关键性调控作用^[2]。

过表达 *Nanog* 的 ESC 在没有 LIF 的培养条件下经长时间培养后, 仍具有很强的自我复制能力, 而且体外诱导试验均证明这些 ESC 具有多能性^[3-4]。*Nanog* 过表达时 ESC 可在无饲养层的条件下分裂并保持多能性^[5-6]; I. Chambers 等^[4]将成年小鼠神经细胞与高表达 *Nanog* 的 ESC 混合培养后发现, 成年小鼠神经细胞也表现出 ESC 的特征。J. Zhang 等^[7]用 *Nanog* 基因转染小鼠成纤维细胞后发现, *Nanog* 的表达使高度分化的成纤维细胞重新进入 S 期; J. Yu 等^[8]利用逆转录病毒介导的 *Nanog* 基因转染人成纤维细胞后发现, 人成纤维细胞逆转为多能细胞; J. Silva 等^[9]发现 *Nanog* 基因在成体细胞重获多能性的过程中起着关键的作用; 在骨骼和成纤维细胞等已分化的成体组织中没有检测到 *Nanog* 基因的表达^[10]; T. Nishii 等^[11]研究表明,

CIBZ(a BTB domain zinc finger transcriptional factor)依赖 *Nanog* 基因的表达来维持 ESC 的多能性; A. H. Hart 等^[12]研究表明, *Nanog* 基因在 ESC 中高表达, 而在 ESC 分化过程中其表达水平下调; 由此推测, *Nanog* 基因的表达激活有利于维持 ESC 的多能性, 而其表达抑制则导致 ESC 分化发生。在分化的细胞中 *Nanog* 表达受到限制, 说明在分化细胞中有抑制 *Nanog* 基因表达的信号途径, 因此在维持干细胞多能性的过程中如何解除这种抑制作用是提高维持干细胞多能性的有效措施之一。目前人们对鸡 *Nanog* 基因的结构与功能的关系及其调控基因的作用方式尚属空白, 研究鸡 *Nanog* 基因的表达调节机制, 对于阐明禽类胚胎干细胞多能性维持和分化的分子机理具有重要意义。本研究拟克隆如皋黄鸡 *Nanog* 基因启动子 5' 侧翼区不同长度片段的启动子序列, 插入到 pGL3-Basic 构建重组载体, 瞬时转染 DF-1 细胞, 利用双荧光素酶报告基因系统寻找 *Nanog* 基因核心启动子区, 检测 *Nanog* 基因启动子活性的变化, 寻找 *Nanog* 基因的核心启动子

区,并初步探索 5-Azadc 和 TSA 对 *Nanog* 基因启动活性的影响,以期在体外培养条件下提高 *Nanog* 基因的表达量,维持鸡 ESC 在体外培养过程中的多能性,以帮助人们更好地对鸡 ESC 进行体外遗传修饰和定向诱导分化研究,为生产抗病转基因鸡和具有特殊治疗功能的蛋白质提供技术支持,并为 ESC 在再生医学、细胞工程和药物研制等领域的应用提供相关基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

如皋黄鸡来自中国农业科学院家禽研究所。大肠杆菌 DH5 α 感受态、胶回收试剂盒及小提质粒试剂盒均购自北京天根公司,DL 5000 DNA Marker Prime、STAR[®] Max DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自大连宝生物公司,表达载体 pGL3.0-Basic、pRL-SV40 及双荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 均购自 Promega 公司,Lipofectamine[™] 2000 购自 Invitrogen 公司,5-Azadc 和 TSA 购自 SIGMA 公司,鸡胚胎成纤维细胞系(DF-1)购自 ATCC。其余试剂均为进口或国产分析纯。引物合成及测序由上

海英滩捷基公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 利用在线软件 TFsearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/Tfsearch.html>)和 AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)对 *Nanog* 基因启动子区及其潜在的转录因子结合位点进行预测和分析。利用软件 (http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer_results.cgi)对 *Nanog* 基因的甲基化位点进行预测。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 酚氯仿法(参考《分子克隆试验指南》(第 2 版))提取成年如皋黄鸡基因组 DNA。测定 260 nm/280 nm 的 OD 比值及 DNA 浓度,-20 °C 保存、备用。

1.2.3 如皋黄鸡 *Nanog* 基因启动子区不同片段的扩增 根据 GenBank 上原鸡 *Nanog* 基因序列(GeneID:NC_006088)翻译起始位点(ATG)上游 3 000 bp 区域的序列特征分析结果,在上下游引物的 5'端分别引入 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点和相应的保护碱基,设计不同片段长度的上游引物及共同下游引物。引物序列见表 1。

表 1 *Nanog* 基因启动子不同长度片段引物序列

Table 1 The sequence of primers for constructing the vector of *Nanog* gene

引物名称 Name	片段长度/bp Fragment	上游引物序列(5'→3') Forward primer	下游引物序列(5'→3') Reverse primer
pGL3-3049	3 049(-3 049~+1)	CGGGGTACCAAGGGGGCTTAACGTAACACATGGG	
pGL3-1967	1 967(-1 967~+1)	CGGGGTACCCAGCAGTACAAGCTCCGAAGC	CCGCTCGAGGTCCGCA- CCTAACAGAGCCGTA
pGL3-988	988(-988~+1)	CGGGGTACCACAAGTGAGATGAGAAAATCAAAAG	

以鸡基因组 DNA 为模板,通过 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 进行 PCR 扩增不同长度片段,经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收,将纯化、加 A 后的 PCR 产物与 pMD[™]-19T Vector 连接,并转化至感受态细胞 DH5 α 中,经双酶切鉴定及测序正确后,构建正确的 TA 克隆载体。

1.2.4 *Nanog* 基因启动子不同片段重组载体的构建 用 *Kpn* I 和 *Xho* I 分别双酶切克隆载体和 pGL3.0-basic 载体,酶切片段回收纯化后,连接。转化后,经双酶切鉴定及测序正确后,分别命名 pGL3/3049、pGL3/1967、pGL3/988。

1.2.5 *Nanog* 基因启动子定性分析 将细胞接种于 12 孔板,细胞浓度约 5×10^5 孔⁻¹,待细胞完全贴壁生长至 80%左右时,参照 Lipofectamine[™] 2000 使用说明书,将重组质粒 pEGFP-N1/3049 转染至 DF-1 细胞中,同时设置阳性对照组(pEGFP-N1 转染细胞)和阴性对照组(pEGFP-N1-CMV-转染细胞),转染 24 h 后于荧光倒置显微镜下观察荧光表达情况。

1.2.6 细胞瞬时转染及其 5-Azadc 和 TSA 诱导对 *Nanog* 基因启动子活性的影响 转染前,将细胞接种于 24 孔板,细胞数 2.5×10^5 孔⁻¹,待细胞完全

贴壁生长至 80% 左右时,参照 Lipofectamine™2000 使用说明书,分别将重组质粒和内参质粒 pRL-SV40 以 35 : 1 的比例共转染至 DF-1 细胞中,同时设置阴性对照组(pGL3-basic 质粒与 pRL-SV40 质粒共转染),转染 48 h 后收集细胞,进行双荧光素酶活性检测。每组 3 次重复。

转染后 12 h 换液时,添加不同浓度的 5-Azadc 和 TSA 对转染重组质粒的 DF-1 细胞进行诱导,36 h 后进行双荧光素酶活性检测,找到最适宜的诱导浓度。然后以最适浓度设立 5-Azadc 和 TSA 单独诱导组或联合添加诱导组,通过检测双荧光素酶活性检测二者的诱导效果。

1.2.7 双荧光素酶活性检测 将收集后的细胞用 70 μ L 的 PBS 重悬后,加入到 96 孔酶标板中,参照 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒说明书步骤,检测双荧光素酶活性。启动子活性值为荧光素酶相对活性值(Relative luciferase activity)即萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。采用“平均值 \pm 标准差”的形式表示。

1.2.8 5-Azadc 和 TSA 诱导对 ESC 体外培养条件下多能性的影响 为了验证 5-Azadc 和 TSA 对 ESC 体外多能性的影响,选择第 3 代生长良好的 ESC 接种到 24 孔板中,接种密度为 10^5 孔⁻¹,培养基中添加最适浓度的 5-Azadc 和 TSA 进行诱导。接种后每隔 2 d 在荧光倒置显微镜下观察细胞,并对诱导至第 10 天的细胞进行 SSEA-1 间接免疫荧光检测。

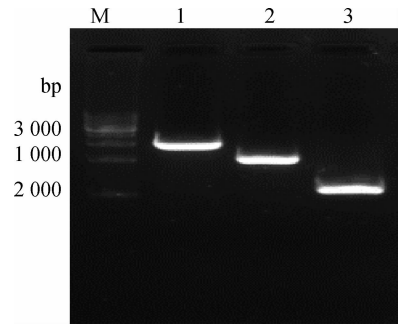
2 结果

2.1 鸡 *Nanog* 基因启动子区生物信息学分析和甲基化水平检测

对 *Nanog* 启动子区域进行转录因子结合区域预测后发现,在 *Nanog* 基因启动子的 -3 049 ~ -1 967 bp 存在 GCNF、Tcf3 和 P53 等转录因子结合位点,而在 -1 967 ~ -988 bp 存在 p300 和 SP1/SP3 等调控元件。甲基化预测结果显示,在 -1 387 ~ -1 285 bp 和 -157 ~ +56 bp 分别存在 101 和 103 bp 的 CpG 岛。

2.2 鸡 *Nanog* 基因启动子区不同长度片段的 PCR 扩增

1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,所获得的不同长度片段的 PCR 产物大小分别与预期设计的长度相一致(图 1),表明成功获得了目的 DNA 片段。

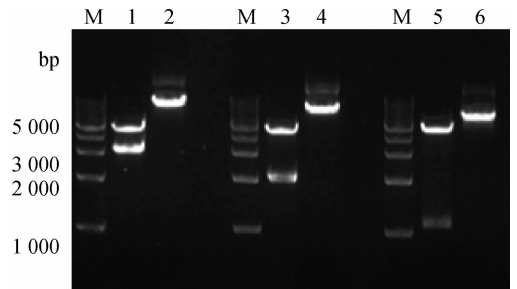


M. DNA 相对分子质量标准;1~3. PCR 扩增产物
M. 1 kb DNA marker;1-3. PCR products

图 1 *Nanog* 基因不同长度片段启动子的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR products of different length promoters

2.3 鸡 *Nanog* 基因启动子不同长度片段载体的构建

用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切 3 个不同长度片段载体,1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 2),分别获得相应启动子片段和载体片段两条清晰的条带,大小与预期结果相符合,且测序结果经对比后也一致,说明载体构建正确,可用于后续试验。



M. DNA 相对分子质量标准;1,3,5. pGL3/3049、pGL3/1967 和 pGL3/988 重组质粒双酶切;2,4,6. pGL3/3049、pGL3/1967 和 pGL3/988 重组质粒单酶切

M. DL5 000 DNA marker;1,3,5. Double restriction enzyme digestion products of pGL3/3049, pGL3/1967 and pGL3/988;2,4,6. Single restriction enzyme digestion products of pGL3/3049, pGL3/1967 and pGL3/988

图 2 pGL3/3049、pGL3/1967 和 pGL3/988 重组载体的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pGL3/3049, pGL3/1967 and pGL3/988 by restriction enzyme digestion

2.4 鸡 *Nanog* 基因启动子活性的定性分析

为检测片段 -3 049 ~ +1 bp 是否具有启动子活性,将 pEGFP-N1/3049、pEGFP-N1、pEGFP-N1-CMV 转染 DF-1 细胞。结果表明, pEGFP-N1/3049 转染的 DF-1 细胞表达 GFP(图 3A),但其荧光强度较强启动子 CMV 驱动的阳性对照质粒 pEGFP-N1 弱(图 3B),而缺失 CMV 的阴性对照质粒 pLinker-EGFP 在细胞中未检测到 GFP 的表达(图 3C)。因此, -3 049 ~ +1 bp 片段具有启动子活性。

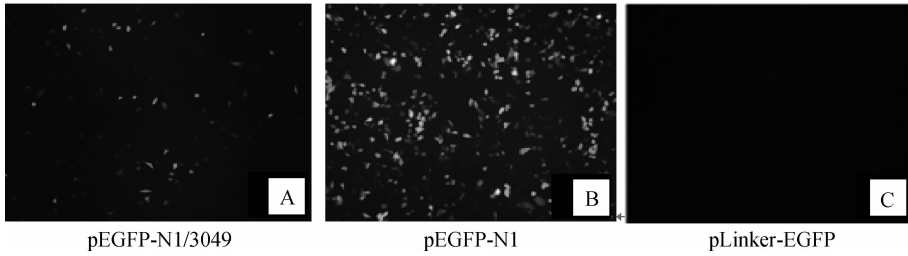


图3 鸡 *Nanog* 基因启动子-3 049~+1 bp 片段的活性检测 40×
Fig. 3 The promoter activity detection of chicken *Nanog* -3 049~+1 bp 40×

2.5 鸡 *Nanog* 基因启动子系列缺失片段活性比较

用构建的 3 个重组载体和 pRL-SV40 载体分别共转染 DF-1 细胞, pGL3-Basic 质粒作为阴性对照, 检测各自启动子活性(图 4)。结果表明: 与 pGL3-Basic 相比较, 鸡 *Nanog* 基因启动子系列缺失片段

都表现出一定的活性, 重组质粒 pGL3/1967 的启动子活性最强, 说明 *Nanog* 基因启动子的-1 967~-998 bp 和-3 049~-1 967 bp 具有重要的调控元件。

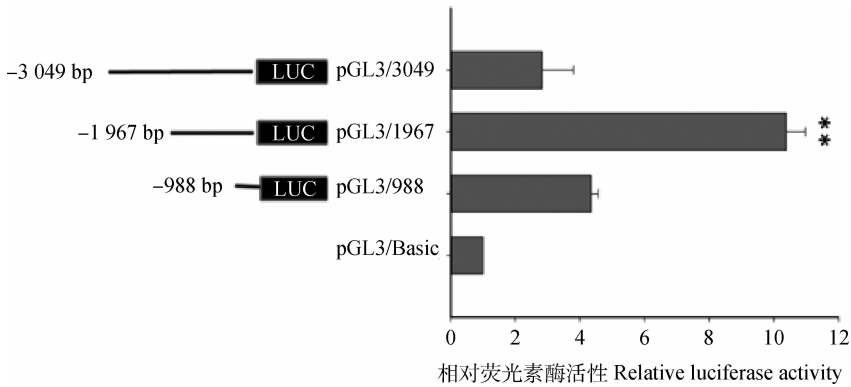


图4 *Nanog* 基因启动子不同长度片段在 DF-1 细胞中的活性
Fig. 4 Activity of different promoters of *Nanog* gene DF-1 cells

2.6 5-Azadc 和 TSA 诱导对 *Nanog* 基因启动子活性的影响

由图 4 可知, pGL3/1967 的活性最高, 因此选-1 967~+1 bp 进行诱导活性检测。DF-1 细胞经 pGL3/1967 转染后, 采用不同浓度梯度(终浓度分别为 1、5、10 和 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 5-Azadc 对其进行诱导, 通过检测双荧光素酶活性确定最佳诱导浓度。不同浓度的诱导结果显示: 与对照组相比, 终浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-Azadc 的诱导效率最高(图 5A)。*Nanog* 基因启动子区的甲基化检测结果显示, 用 5-Azadc 处理后明显降低了 *Nanog* 基因的甲基化水平。分别设置 4 个不同浓度梯度(0.1、0.5、1.0 和 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 TSA 进行诱导, 终浓度为 1.0 和 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可极显著提高其启动活性(图 5B)。因此, 选择 TSA 的最佳诱导浓度为 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

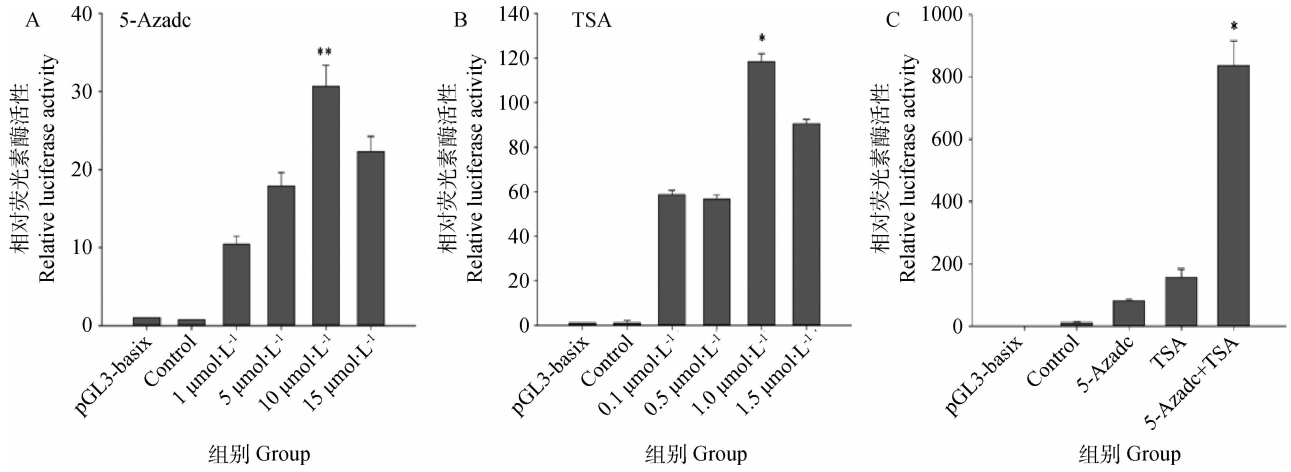
用 pGL3/1967 转染 DF-1 细胞后, 培养基中分

别单独添加或者联合添加终浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-Azadc、1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA 对其进行诱导。结果显示, 联合添加 5-Azadc 和 TSA 后使-1 967~+1 bp 片段的转录活性显著高于单独添加组(图 5C)。

2.7 5-Azadc 和 TSA 诱导激活 *Nanog* 基因维持 ESC 体外培养多能性的影响

取培养第 3 代纯化后的 ESC 细胞进行 5-Azadc 和 TSA 的诱导试验, 结果显示, 诱导 6 d 后, 对照组细胞大量分化, 细胞克隆无法维持, 而 5-Azadc 和 TSA 诱导组克隆明显, 5-Azadc+TSA 联合诱导组细胞克隆数量显著多于对照组; 诱导至第 10 天, 对照组细胞完全分化, 没有细胞克隆, 而诱导组存在大量细胞克隆, 联合诱导组克隆数量显著多于其他 3 组(图 6A 和 B)。

取诱导至 10 d 的细胞进行 SSEA-1 间接免疫荧光试验, 结果显示, 对照组没有明显的 ESC 克隆, 而 5-Azadc 组和联合组细胞克隆明显(图 7)。实时

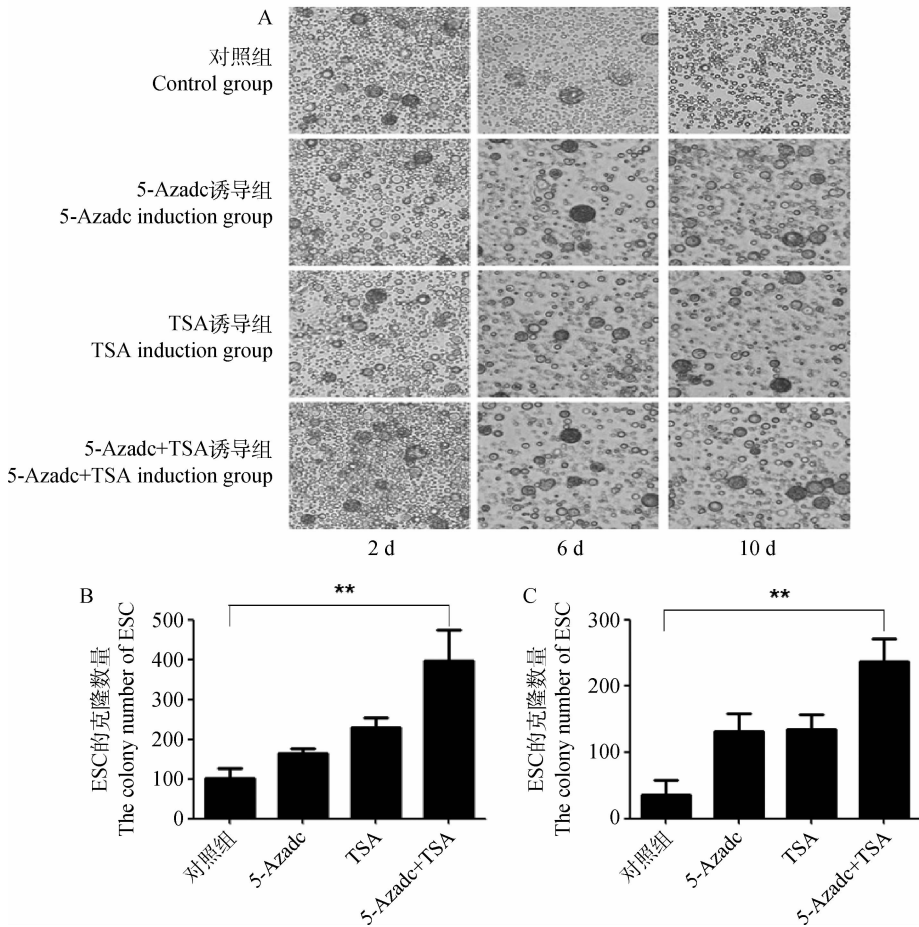


A. 5-Azadc 最佳诱导浓度的筛选;B. TSA 最佳诱导浓度的筛选;C. 5-Azadc 和 TSA 联合诱导效果检测

A. The optimal induction concentration screening of 5-Azadc; B. The optimal induction concentration screening of 5-Azadc; C. The combination induction effect of 5-Azadc and TSA on *Nanog* gene promoter

图 5 5-Azadc 和 TSA 诱导对 *Nanog* 基因启动活性的影响

Fig. 5 Effects of 5-Azadc and TSA induction on *Nanog* promoter activity



A. 不同诱导组 ESC 细胞克隆 40×;B 和 C. 第 6 和第 10 天不同诱导组 ESC 的克隆数量

A. ESC cell clone of different induction group 40×;B and C. The number comparison of different group at the 6th and 10th induction

图 6 5-Azadc 和 TSA 诱导对 ESC 体外分化的影响

Fig. 6 The effect of 5-Azadc and TSA induction on the differentiation of ESC *in vitro*

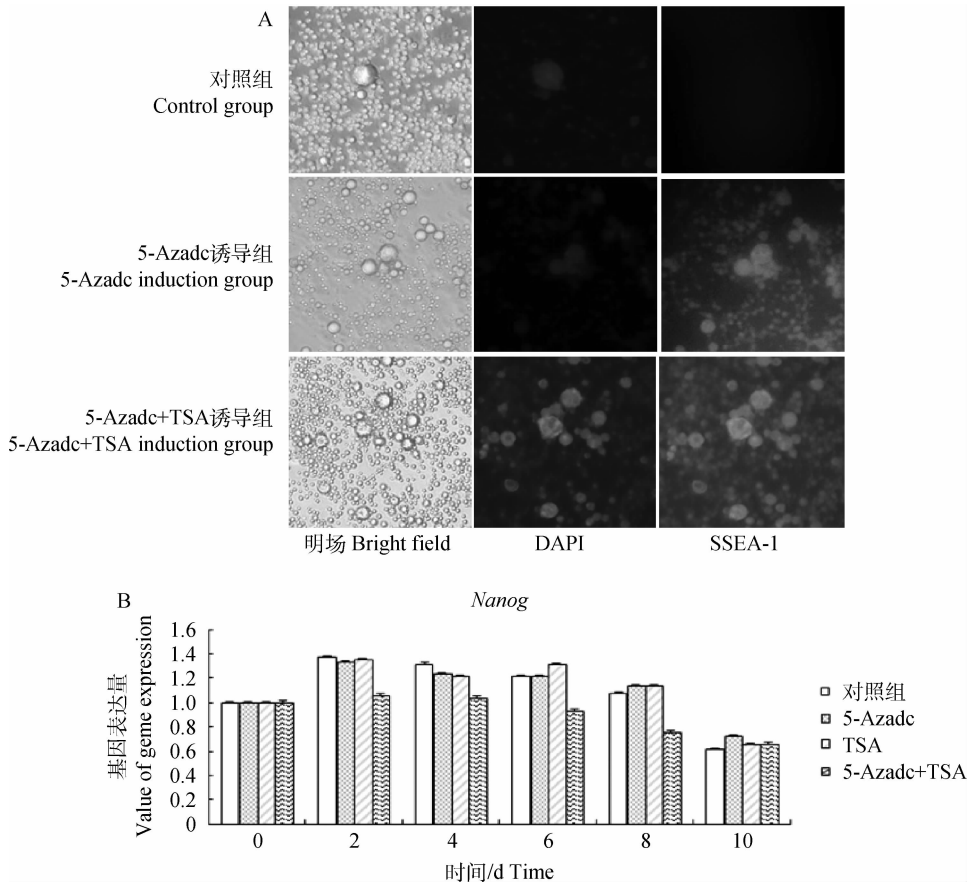


图7 SSEA-1 间接免疫荧光(A 40×)和 *Nanog* 定量检测(B)

Fig. 7 Immunofluorescence staining of SSEA-1(A 40×) and real time quantitative detection of *Nanog*(B)

荧光定量检测结果发现对照组 *Nanog* 基因表达量随着诱导天数延长持续下降,而试验组 *Nanog* 基因维持相对稳定的水平,进一步表明,5-Azadc 和 TSA 可有效地维持鸡 ESC 在体外培养过程中的多能性。

3 讨论

本实验室一直致力于鸡 ESC 向雄性生殖细胞分化的研究,由于 ESC 是原代细胞,在长时间的体外培养过程中会发生老化和自发分化,致使其丧失多能性,严重影响体外遗传修饰和定向诱导分化的效率。因此,如何在体外培养条件下使鸡 ESC 较长时期处于未分化状态和维持多能性就显得尤为重要。尽管许多研究表明添加 LIF 或 BMP4 等细胞因子能够维持 ESC 细胞的多能性^[13-14],但需将 ESC 生长于饲养层细胞上或在培养基中添加细胞因子、生长因子、激素、胎牛血清或血清抽提物等。最新的研究结果表明,利用一些特定的小分子化合物和无任何生长因子的基础培养基就能很好地维持 ESC 的不分化状态和多能性,尤其是目前已从化学分子

库中筛选出一些小分子化合物,并且成功地应用于 ESC 多能性维持的研究中,这些小分子化合物的应用简化了试验步骤、无需制备饲养层细胞,且避免了动物源性污染,使得培养体系的组分具体化,对延长 ESC 在体外培养条件下多能性的维持具有重要的意义。

DNA 甲基化(DNA methylation)是发现较早的一种重要的 DNA 表观遗传修饰方式。具体指的是在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DMT)的催化作用下,生物体内甲基被选择性地添加到 DNA 序列的 CG 两个核苷酸的胞嘧啶上,形成 5-甲基胞嘧啶的过程。甲基化发生会导致核小体之间发生紧密结合从而使基因的表达受到抑制。但是,通过添加小分子化合物使基因发生去甲基化可使基因再次表达。5-Azadc 就是一种临床普遍应用且效果极佳甲基化抑制剂,大量研究表明,对于因发生甲基化而造成表达沉默的基因,采用 5-Azadc 进行处理后,基因能够重新得到表达^[15-16]。为了研究 DNA 甲基化对鸡 *Nanog* 基因启动子活性及表达的

影响,本研究对 *Nanog* 基因启动子区的甲基化进行预测,发现在 $-1\ 662 \sim -1\ 764$ bp 和 $-2\ 892 \sim -2\ 993$ bp 分别存在 103 和 102 bp 的 CpG 岛,因此采用 5-Azadc 处理转染 pGL3/1967 双荧光素酶报告基因载体的 DF-1 细胞,检测 *Nanog* 启动子的活性变化以分析 DNA 甲基化程度对启动子活性及表达的影响;与对照组相比较,经 5-Azadc 处理后 pGL3/1967 的转录活性提高 8 倍,进一步推测采用 5-Azadc 处理后抑制了 *Nanog* 基因启动子区的甲基化,从而促使其启动活性增强。由于 *Nanog* 基因的表达活性增强,有利于维持 ESC 的多能性,促使大量的 ESC 克隆出现。

组蛋白乙酰化是一个可逆的反应,包含组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC),二者相互进行反应。组蛋白的乙酰化有利于 DNA 与组蛋白八聚体的解离,核小体结构松弛,从而使各种转录因子和协同转录因子能与 DNA 结合位点特异性结合,激活基因的转录。组蛋白的去乙酰化,使得其与带负电荷的 DNA 紧密结合,染色质致密卷曲,基因的转录受到抑制。曲古抑菌素(Trichostin A, TSA)能够与 HDAC 结合,抑制组蛋白去乙酰化,促进基因表达^[17-18]。R. Cotterman 等^[19]研究证实,可以通过改变基因富集区域和已知基因远距离区域的组蛋白乙酰化来调节整个基因组的染色质结构。本试验中,为进一步验证 *Nanog* 基因的表达是否存在组蛋白修饰,采用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 来诱导 *Nanog* 启动活性。分别探索了 4 个不同浓度梯度的 TSA 对 *Nanog* 基因启动活性的影响,发现终浓度为 1.0 和 $1.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均可极显著提高 *Nanog* 启动活性,表明 *Nanog* 基因存在组蛋白修饰作用。即通过 TSA 处理后,抑制了组蛋白的去乙酰化,促进 *Nanog* 基因的转录,使其在 ESC 的表达量增多,促使较多数目的 ESC 克隆出现,延长 ESC 体外培养的多能性。

综上所述,本研究成功构建了 pEGFP-N1/3049,对 *Nanog* 启动子活性进行定性验证,证明其具有启动活性;通过构建包含 3 个不同长度 *Nanog* 基因启动子片段的荧光素酶报告载体,分别转染了 DF-1 细胞,说明 *Nanog* 基因启动子的 $-1\ 967 \sim -998$ bp 具有正调控元件,而在 $-3\ 049 \sim -1\ 967$ bp 具有负调控元件。根据对 *Nanog* 基因启动子区的甲基化分析结果,发现添加 5-Azadc 后能明显促

进 *Nanog* 基因的启动活性,进一步表明该基因的启动受到甲基化水平的调控,这与 CEF 细胞和 ESC 细胞 *Nanog* 基因的甲基化检测水平相一致,提示分化的细胞中 *Nanog* 低表达可能是由于甲基化修饰造成的。TSA 的联合添加进一步提高了 *Nanog* 基因的启动活性,说明 *Nanog* 基因的表达亦受到乙酰化水平的调控,提示在后续的研究中,如果要在体外通过提高 *Nanog* 基因的表达量而延长 ESC 细胞的多能性维持时间可通过添加诱导剂 5-Azadc 和 TSA 来实现。此外,本研究通过启动子预测软件 Promoter Scan 和 TFSEARCH database 预测分析后发现:在 *Nanog* 基因启动子的 $-3\ 049 \sim -1\ 967$ bp 存在 GCNF、Tcf3 和 P53 等转录因子结合位点,双荧光素酶活性检测结果显示,缺失该段导致 *Nanog* 的转录活性提高,因此,下一步将定点缺失该结合位点,进一步验证 *Nanog* 的启动子活性,进而阐明鸡 *Nanog* 基因转录调控机制,为有效地提高 *Nanog* 的表达水平提供参考依据。

参考文献 (References):

- [1] SUMER H, LIU J, MALAVER-ORTEGA L F, et al. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts[J]. *J Anim Sci*, 2011, 89 (9):2708-2716.
- [2] THEUNISSEN T W, SILVA J C. Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011, 366(1575):2222-2229.
- [3] 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.
- [4] CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development[J]. *Nature*, 2007, 450(7173):1230-1234.
- [5] DARR H, MAYSHAR Y, BENVENISTY N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features[J]. *Development*, 2006, 133(6):1193-1201.
- [6] KUIJK E W, VAN MIL A, BRINKHOF B, et al. PTEN and TRP53 independently suppress Nanog expression in spermatogonial stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(7):979-988.
- [7] ZHANG J, WANG X, CHEN B, et al. Expression of Nanog gene promotes NIH3T3 cell proliferation[J].

- Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2): 1098-1102.
- [8] YU J, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [9] SILVA J, NICHOLS J, THEUNISSEN T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state [J]. *Cell*, 2009, 138(4): 722-737.
- [10] MOON J H, KWON S, JUN E K, et al. Nanog-induced dedifferentiation of p53-deficient mouse astrocytes into brain cancer stem-like cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(1): 175-181.
- [11] NISHII T, OIKAWA Y, ISHIDA Y, et al. CtBP-interacting BTB zinc finger protein(CIBZ) promotes proliferation and G1/S transition in embryonic stem cells via Nanog[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 12417-12424.
- [12] 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 Dyn*, 2004, 230(1): 187-198.
- [13] YING Q L, NICHOLS J, CHAMBERS I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3[J]. *Cell*, 2003, 115(3): 281-292.
- [14] KUNATH T, SABA-EL-LEIL M K, ALMOU-SAILLEAKH M, et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment[J]. *Development*, 2007, 134(16): 2895-2902.
- [15] 王 海. 5-氮杂 2'-脱氧胞苷联合曲古抑菌素 A 对 人 胃 癌 SGC-7901 细 胞 生 长、Reprimo 基 因 甲 基 化 水 平 及 表 达 的 影 响[D]. 合 肥: 安 徽 医 科 大 学, 2012.
- WANG H. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on expression, methylation of reprimo gene and the growth of human gastric cancer cell line SGC-7901 [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2012. (in Chinese)
- [16] 刘 林 青. 5-氮 杂 2'-脱 氧 胞 苷 及 曲 古 抑 菌 素 A 对 胃 癌 细 胞 株 SGC-7901 及 其 CHFR 基 因 表 达 的 影 响[D]. 合 肥: 安 徽 医 科 大 学, 2013.
- LIU L Q. The effects of 5-Aza-2'-deoxyctidine combined with Trichostatin A on the proliferation and CHFR expression of gastric cancer cell line SGC-7901 [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013. (in Chinese)
- [17] 丁 辉. 组 蛋 白 去 乙 酰 化 酶 抑 制 剂 曲 古 菌 素 A 治 疗 膀 胱 癌 的 相 关 作 用 机 制 研 究[D]. 兰 州: 兰 州 大 学, 2013.
- DING H. The mechanism study of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on bladder cancer [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2013. (in Chinese)
- [18] 王 雅 新. 曲 古 抑 菌 素 A(TSA) 在 IFN- γ 调 控 TRIM22 表 达 中 的 作 用 及 其 机 制 研 究[D]. 上 海: 复 旦 大 学, 2011.
- WANG Y X. Modulation of IFN- γ -induced TRIM22 expression by histone deacetylase inhibitor TSA and the underlying mechanism[D]. Shanghai: Fudan University, 2011. (in Chinese)
- [19] COTTERMAN R, JIN V X, KRIG S R, et al. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9654-9662.

(编辑 程金华)