

蚯蚓 *Sox2* 基因的克隆及其在再生进程中的表达

郑鹏飞^① 刁晓平^{①②*} 李赞东^③ 杜俊俏^④

① 海南大学农学院 海口 570228; ② 海南大学海口市环境毒理学重点实验室 海口 570228; ③ 中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室 北京 100193; ④ 海南大学环境与植物保护学院 海口 570228

摘要: 为了解 *Sox2* 基因在赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 再生进程中的作用, 本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法成功克隆并得到了完整的赤子爱胜蚓 *Sox2* 基因序列(GenBank 登录号: KP637161), 其 cDNA 序列全长 2 354 bp, 其中包括 367 bp 的 5'端非翻译区, 844 bp 的 3'端非翻译区和编码 380 个氨基酸残基的 1 143 bp 开放阅读框。通过实时荧光定量 PCR 检测了 *Sox2* 基因在发育成熟的赤子爱胜蚓不同体段(头部、环带和尾部)以及在尾部体段再生进程中的表达特征。结果显示: *Sox2* 在不同体段中(头部、环带、尾部)的表达差异不显著。在尾部断肢后再生进程中, 随着时间推移, *Sox2* 的表达量明显上调, 其中, 截断后 12 h, *Sox2* 基因表达量达到峰值, 是截断初期(0 h)的 22 倍。研究结果表明, *Sox2* 基因可能与蚯蚓的再生进程有关。

关键词: 赤子爱胜蚓; *Sox2*; 克隆; 再生; cDNA 末端快速扩增方法

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 01-95-08

Gene Cloning and Expression of *Sox2* during Tail Regeneration of Earthworm *Eisenia foetida*

ZHENG Peng-Fei^① DIAO Xiao-Ping^{①②*} LI Zan-Dong^③ DU Jun-Jiao^④

① Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228; ② Haikou Key Laboratory of Environment Toxicology, Haikou 570228; ③ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193; ④ College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: In order to elucidate the role of *Sox2* during regeneration in the earthworm *Eisenia foetida*, the full length cDNA of *Sox2* was firstly cloned by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. The expression level of *Sox2* in different body segments (head, clitellum and tail) of mature earthworm and during tail regeneration at different time points was detected by quantitative real-time PCR. The data were analyzed by the method of delta-delta Ct. RACE results showed that the full-length of cDNA sequence was 2 354 bp

基金项目 海南省普通高等学校研究生创新科研课题 (No. S201305);

* 通讯作者, E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn;

第一作者介绍 郑鹏飞, 男, 硕士研究生; 研究方向: 生态毒理学; E-mail: zhengpengfei122@126.com.

收稿日期: 2015-02-11, 修回日期: 2015-07-06 DOI: 10.13859/j.cjz.201601011

(GenBank Accession number: KP637161), including 367 bp of 5'-UTR, 844 bp of 3'-UTR and 1 143 bp ORF (Fig. 1 and 2). Phylogenetic analysis showed that *Sox2* in *Eisenia foetida* was conservative in phylogeny compared with other species (Fig. 3). The q-PCR results showed that *Sox2* expression transcripts were not significantly different in head, clitellum and tail body segments (Fig. 4a). The expression level of *Sox2* in the tail was obviously up-regulated during regeneration, and reached the highest level at 12 h after amputation, 22 times higher compared with that in the beginning of amputation (Fig. 4b). These results indicated that the *Sox2* gene may be associated with the regeneration in earthworm. Our research has provided new evidence for further understanding of the molecular mechanisms of the regeneration.

Key words: *Eisenia foetida*; *Sox2*; Clone; Regeneration; Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

再生是一种动物界普遍存在的现象。目前研究较多的再生动物模型有蝾螈、斑马鱼、涡虫等(白桂芬等 2012)。其中涡虫再生能力来源于其体内存在的具有分化成其他组织或器官的全能性干细胞(郭晓强等 2010, 刘殿辰等 2013)。蚯蚓同样具有再生能力,目前的研究认为环节动物是以去分化的方式实现再生(Myohara et al. 1999, Pearson 2001),即蚯蚓新形成的细胞来源于发生了细胞重编程的已分化细胞(刘殿辰等 2013),这与齐丽萍等(2004)的显微电镜观察结果一致,但目前关注于蚯蚓再生机制分子水平的研究较少。

细胞重编程,是指分化的细胞在特定条件下逆转细胞命运,恢复至全能性状态,形成干细胞系或进一步形成一个新个体(彭正军等 2014)。日本京都大学 Takahashi 等(2006)将 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 导入小鼠(*Mus musculus*)胚胎成纤维细胞中,诱导细胞发生重编程,成功逆转细胞的发育状态,获得了小鼠的诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)。

Sox 基因家族包含一个 DNA 的结合基序 HMG-box, 该基因家族编码的一类转录调控因子与性腺的功能、软骨的形成和分化及多项促进发育的功能等有关(马莉等 2009)。如 *Sox3*、*Sox5* 和 *Sox9* 与性别决定有关,而 *Sox2* 参与胚胎发育进程和调控细胞命运(常重杰等 2002)。*Sox2* 是 *Sox* 家族的一个重要成员,是分辨神经干细胞和神经祖细胞的生物标志物(郝庆卯等

2014)。小鼠发育早期, *Sox2* 在胚泡的内胚层细胞团和外胚层中短暂表达,随后又在发育中的神经上皮表达。*Sox2* 的这种转录模式与 POU 转录因子的 *Oct-3/4* 一致。*Sox2* 广泛表达于非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、鸡(*Gallus gallus*)、小鼠等物种的早期神经板和神经管,可作为神经系统发育的标志(常重杰等 2000)。*Sox2* 有促进神经细胞分化的功能,而在分化成熟的神经组织中检测不到其表达(常重杰等 2002, 郝庆卯等 2012)。因此,一般认为 *Sox2* 表达量高的细胞,其全能性高(陈艳玫等 2004, 饶家辉等 2012)。

蚯蚓再生被认为存在一个全能性获得的过程(齐莉萍等 2003, 白桂芬等 2012)。*Sox2* 是调控细胞全能性的重要基因,研究其在蚯蚓再生进程中如何表达,对揭示内在分子机制具有重要意义。

本研究旨在克隆蚯蚓的 *Sox2* 基因,并通过实时荧光定量 PCR,分析 *Sox2* 基因在不同体段的表达特征,同时观察 *Sox2* 基因在尾部断肢后不同时间点的表达特性,从分子水平上为研究蚯蚓再生机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),来自海南大学实验农场蚯蚓养殖基地。选取具有明显生殖环带的蚯蚓作为实验材料。用发酵过的牛粪饲喂蚯蚓,饲养条件气温(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,

湿度 60% ~ 70%。将蚯蚓置于有湿润滤纸的聚乙烯培养皿, 每隔 12 h 换一次湿润滤纸, 清肠 2 d。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集 赤子爱胜蚓的第 1 ~ 6 体节为脑神经节所在位置, 生殖环带位于第 26 ~ 33 体节。本实验截断位置如下: 第 1 ~ 25 体节作为头部体段; 第 26 ~ 33 体节为生殖环带(简称环带)体段; 环带后剩余体节作为尾部体段。每个体段组 4 条蚯蚓, 取上述体段用于 RNA 提取。尾部再生实验截断位置为赤子爱胜蚓第 55 ± 2 体节处, 在截断后 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、2 d、4 d 和 6 d 收集包含再生部分的尾部整体, 提取 RNA。取样前确认尾部仍具有活力。

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成 取约 0.1 g 样品于预冷的研钵中, 加入液氮快速研磨, 待研磨成粉末状, 转移至装有 1 ml TRNzol 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技有限公司)的 EP 管中, 振荡, 静置, 离心,

氯仿抽提, 取上清, 异丙醇沉淀, DEPC 水处理过的 75% 酒精洗涤 2 次, 适量 0.01% DEPC 处理过的水溶解总 RNA。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 核酸染色剂为 4S Red Plus (上海生工生物工程股份有限公司), 使用 Thermo Nandrop 2000 测定含量和 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值, -80℃ 保存备用。以总 RNA 为模板, 以 OligodT18 为引物, 按照逆转录 M-MLV Reverse transcriptase (Promega) 说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.3 Sox2 基因片段的获得 根据 GenBank 中大黄鱼 (*Larimichthys crocea* GenBank: KF246679.1)、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*, GenBank: KC758858.1)、山羊 (*Capra hircus* GenBank: JQ290347.1)、人 (*Homo sapiens* GenBank: BC013923.2) 的 *Sox2* 基因保守区域设计 1 对引物 *Sox2*-F 和 *Sox2*-R (表 1), 以上述 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增 *Sox2* 基因中间片段。PCR 反应体系为 20 μl, 含 2 μl PCR Buffer (10 ×, TAKARA)、2 μl MgCl₂

表1 引物序列

Table 1 Sequence of the primers

引物 Primer	序列 (5' ~ 3') Sequence (5' - 3')	产物长度 Length (bp)	用途 Usage
<i>Sox2</i> -F	GAGAA CCCCA AGATG CACAA C	200	目的基因 Target gene
<i>Sox2</i> -R	GGCAG CGTGT ACTTA TCCTT CTTC		
<i>β-action</i> -F	TCCAT CGTCC ACAGA AAG	149	内参基因 Internal control
<i>β-action</i> -R	AAATG TCCTC CGCAA GCT		
<i>Sox2</i> -GSP3	GCGTG TCGCC AGTGG AAGCT GCTGT		3'RACE
<i>Sox2</i> -NGSP3	TCACC TCAAG GAACA TCCCG ACTAC AA		
<i>Sox2</i> -GSP5	CTTAT CCTTC TTCAT CAGCG TCTTT GTCTT		5'RACE
<i>Sox2</i> -NGSP5	TCGGG ATGTT CCTTG AGGTG AATGG		
3'-CDS Primer A	AAGCA GTGGT ATCAA CGCAG AGTAC (T)30VN (V= A, G, or C; N = A, C, G, or T)		RACE
5'-CDSPrimer A	(T) 25VN (V = A, G, or C; N = A, C, G, or T)		
UPM-long	CTAAT ACGAC TCACT ATAGG GCAAG CAGTG GTATC AACGC AGAGT		RACE
UPN-short	CTAAT ACGAC TCACT ATAGG GC		
N-UPM	AAGCA GTGGT ATCAA CGCAG AGT		
SMARTer II A Oligonucleotide	AAGCA GTGGT ATCAA CGCAG AGTAC XXXXX		RACE

(25 mmol/L)、1 μ l dNTP (2.5 mmol/L)、上游和下游引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L)、0.5 μ l LA Taq 酶(5U/ μ l)和 1 μ l 模板,以 ddH₂O 补充至 20 μ l。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA Marker 为 Marker1 (广东东盛生物科技有限公司)。目标产物经胶纯化回收试剂盒回收(上海生工生物工程股份有限公司)后,与 pGem-T Easy Vector System I 载体 (Promega) 连接构建重组质粒,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经鉴定后将阳性克隆样品质粒送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.4 RACE 扩增 RACE 末端快速扩增按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (Clontech) 的说明书进行。第一轮扩增上游引物用 UPM Mix, 下游引物 3'端为 GSP3-1, 5'端为 GSP5-1。第二轮扩增上游引物为 N-UPM, 下游引物 3'端为 GSP3-2, 5'端为 GSP5-2。

第一轮 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环 95 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 终末延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。将第一轮 PCR 产物进行第二轮巢式 PCR 扩增, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 终末延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。1% 变性琼脂糖凝胶电泳, 4S Red Plus 核酸染色剂染色显示。PCR 产物经 1% 变性琼脂糖凝胶电泳, DNA Marker 为 DS2000 (广东东盛生物科技有限公司), 4S Red Plus 核酸染色剂染色显示。用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化目的基因片段(上海生工生物工程股份有限公司), 并将纯化后的 RACE 产物与 pGem-T Easy Vector System I 载体连接构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经 LB 平板(含 Amp⁺) 培养后, 筛选阳性克隆, 测序。

1.2.5 Sox2 基因同源性分析 RACE 测序结果利用 DNAMAN 软件去除载体序列并将其进行拼接, 得到的全长序列信息利用 ORF Finder

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 程序进行开放阅读框 (ORF) 预测分析, 并推导其相应的氨基酸序列。通过 Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行蛋白质序列相似性检索, 蛋白质的分子质量、等电点及基本性质分析运用 ExPASy (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) 预测; 信号肽分析利用 Signal P 4.1 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>); 氨基酸序列的多序列比较应用 DNAMAN 软件进行分析; 应用 MEGA6.06 软件, 采用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建进化树, bootstrap 值设定为 1 000 (邓治等 2014)。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 荧光定量试剂盒 LightCycler 480 SYBR Green I Master kit 购自 ROCHE 公司; 荧光检测仪器为 ROCHE LightCycler480。引物对 (Sox2-F, Sox2-R) 作为 Sox2 基因的荧光定量引物, 产物长度为 200 bp; 选择 β -actin 作为内参基因, 产物长度为 149 bp (Chen et al. 2011)。荧光定量 PCR 反应体系为 LightCycler480 SYBR Green I (2 \times) 7.5 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ l, 模板 cDNA 5 μ l, ddH₂O 补足至 15 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

1.2.7 数据处理 荧光定量 PCR 所获得数据应用 Delta-Delta Ct 方法进行相对定量分析 (Wong et al. 2005), 获得基因的相对表达水平, 应用 SPSS19.0 软件采用单因素方差分析, 进行统计分析。使用 GraphPad Prism 5 软件作图 (彭芳等 2010)。

2 结果

2.1 Sox2 基因的克隆与序列分析

利用引物对 (Sox2-F, Sox2-R) 进行 PCR, 得到了约 200 bp 的 Sox2 基因的部分片段 (图 1a)。3' RACE 得到的条带长度约为 1 600 bp, 而 5' RACE 约为 700 bp (图 1b)。测序结果利用 DNAMAN 软件去除载体序列并将其进行拼

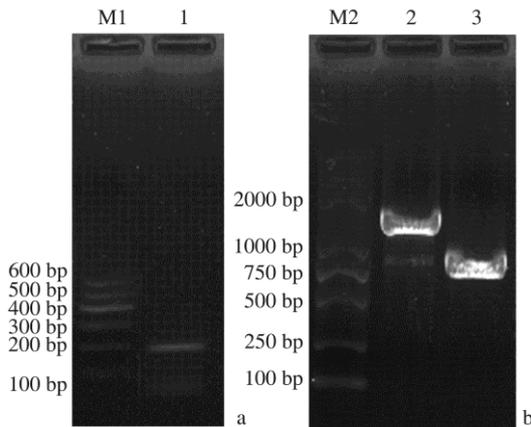


图 1 分离得到的 *Sox2* 部分片段电泳图

Fig. 1 Amplification product of *Sox2*

M1. DNA 分子量标准Marker 1; 1. *Sox2*-F/R 扩增产物; M2. DS2000 DNA 分子量标准; 2. 3' RACE 扩增产物; 3. 5' RACE 扩增产物。
M1. Marker 1; 1. Amplification product of *Sox2*-F/R; M2. DS2000; 2. Amplification product of 3' RACE. 3. Amplification product of 5' RACE.

接, 得到赤子爱胜蚓 *Sox2* 完整的 cDNA 序列。该基因 cDNA 序列全长 2 354 bp, 其中包括 367 bp 的 5'端非翻译区, 844 bp 的 3'端非翻译区和编码 380 个氨基酸残基的 1 143 bp 开放阅读框 (图 2), 在 poly A 尾上游 10 bp 处存在加尾信号序列 AATAA。该序列已提交 GenBank, 登录号为 KP637161。

利用 ExPASy 的 ProtParam 在线预测软件, 根据氨基酸序列预测编码蛋白的理化性质, 推测该蛋白的相对分子质量为 40.45 ku, 等电点为 9.85。利用 Signal P 4.1 程序检索, 本研究得到的氨基酸序列不含信号肽。

经 NCBI Blast 检索, 赤子爱胜蚓 *Sox2* 基因与其他物种的 *Sox2* 基因或 *Sox* 家族 B 族的其他基因相似性最高。氨基酸序列经过 NCBI 蛋白质保守区序列数据库检索, 具有两个保守结构域, 靠近 5' 端含有 Sox 蛋白家族典型的

```

1 ATGGGCATGATGACCCAGCTCAAGGGGGCACCCATGCCTCCGCCACATTCGCGCCAGCGCCCCGTCTCAGCCTCCGGGGTTCGGCGGC
1 M G M M T Q L K G A P M P P P H S A A S A P S Q P P G V G G
91 TGCAAGAAGTTCGACATGCCCCGCCAGACAGTCGGATCGAACCCGAGCAACAGATCTTGCCGCCGACTCGTCTCATCTCCACTCGGGA
31 C K N S T M P A R Q S A S N P Q Q Q I L P P H S S H L H S G
181 ACTGTAAACACCGGAATCGGAAGTGGCGGCAGCGCGGAACACAGGGCGGACCGCGGAAGTGGCGGTGGTCCGTACTCGTCGGCCACC
61 T V N T G I G S G G S G G T Q G G G H G G S G G G P Y S S A T
271 GGAACCGAAACACGAGAAGCAGAACCGGTGGACGAGGTGAAGCGTCCGATGAATGCCTTCATGGTCTGGTCGAGGGGCCAGAGACGC
91 G N G N T K Q K P V D D R V K R P M N A F M V W S R G Q R R
361 AAGATGGCCAGGAGAACCAGATGCACAACCTCGGAGATCTCGAAGCGGCTTGCGGCCAGTGAAGCTGCTGTCGGAGTCGGAGAAA
121 K M A Q E N P K M H N S E I S K R L G A Q W K L L S E S E K
451 AGGCCGTTTCATCGCAAGCGAAGCAGCTGCGGGCATTACCTCAAGGAACATCCCGACTACAAGTACCGCCCCCGCAAGACAAAG
151 R P F I D E A K R L R A I H L K E H P D Y K Y R P R R K T K
541 ACGCTGATGAAGAAGGACAAGTACACCTGTCCGGGATGCCCTCGCCGCGGGGCCATGCAACACGGTCGCGACATGTACGCCATGAAC
181 T L M K K D K Y T L S G M P L A A G A M Q H G R D M Y A M N
631 GGCTACATGTCGAACGGTTACGTATGACGGGTACCCCTCACGACCAGCAGATGGCAGCCGCTACCACCAGCAGCAGGCCAGCGTCATG
211 G Y M S N G Y V M T G H P H D Q Q M A A A Y H Q Q Q A S V M
721 GGTGGCTTGACAGGTACAGTACGGTACAGCATGGGTGGCCACGGACAGGTAGGCGCTGGTGGAGGGTCTTCATTAATGCAAACACCGGT
241 G G L T G Q Y G Y S M G H G Q V G A G G G S F I N A N T G
811 GGAACACTACATGATCCGATGTCGCGCGTGCCTACCACCAGGCATGACACACCACCACACTCGCAGGTGGCGGCGACATCAAAGAG
271 G N Y M Y P M S A A A Y H H G M T H H H H S Q V A A T I K E
901 GAACACCACAGCCCCCGGGAGCCAGTCCACGGGGTCGTCGAGCGATCGCGGACGTTCCGGGGCCTGTCGCGGCGACCTAAGGGACATG
301 E H H S P A G S Q S T G S S S D R G R S G A C P G D L R D M
991 ATCAGCATGTACCTGCCTGGTGGTGACGGAACGGTGCCTGGCCGTGCCATCAGGCCCGCTCATGCACGGACAGTACAGCCTGTGC
331 I S M Y L P G G D A N G A L A A A H Q A R L M H G Q Y S L V
1081 CAACACCAACTGACTGATTCATTCGTCAGGGATTAGCAACACAGTTCCTTATCACACATGTAG
361 Q H Q L T D H S S G I S N T V P L S H M *
    
```

图 2 *Sox2* 基因的核苷酸序列及对应的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *Sox2*

Sox 基因 T 细胞因子高迁移率组蛋白盒用阴影表示, *Sox* 超家族保守区位点用下划线表示。

Sox-TCF-HMG-box was shadowed, *Sox* super family was underlined.

Sox-TCF-HMG-box 结构域，其相邻的结构域 SOXp 在 Sox 超家族也普遍存在（图 2）。

2.2 Sox2 基因的同源性分析

将得到的赤子爱胜蚓 Sox2 基因的氨基酸序列与 GenBank 中其他物种的氨基酸序列进行同源性序列比对，应用 MEGA6.06 软件绘制进化树（图 3）。参与构建进化树的物种有：人（NP003097.1）、山羊（*Capra hircus*, AEY79522.1）、小鼠（BAC75668.1）、鸡（BAC67545.1）、非洲爪蟾（NP001081691.1）、大黄鱼（AHE80610.1），豆荚草盲蝽（*Lygus hesperus*, JAG18958.1）、栉孔扇贝（*Azumapecten farreri*, AIT51849.1）、合浦珠母贝（*Pinctada fucata*, AGS18764.1）和犬弓蛔虫（*Toxocara canis*, KHN87653.1）。选用最大简约法构建进化树，对赤子爱胜蚓 Sox2 基因的氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列进行邻接聚类分析。在分子系统树中，赤子爱胜蚓（KP637161）与犬弓蛔虫聚为一类，与其他无脊椎动物和较为高等的脊椎动物分开，显示该基因的进化与传统物种的进化趋势基本一致。

2.3 不同体段中 Sox2 基因的表达差异

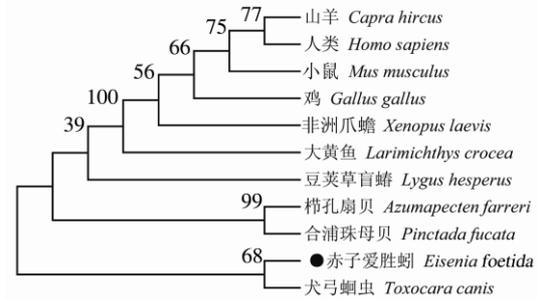
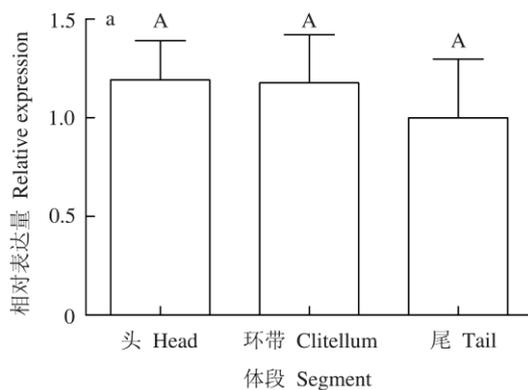


图 3 不同物种 Sox2 氨基酸序列进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of Sox2 from different species

图中枝上的数据代表置信度，黑圆点是本研究得到的赤子爱胜蚓的 Sox2 序列。

Numbers on nodes indicate bootstrap values, *Eisenia foetida* Sox2 is marked with a black dot.

采用 qRT-PCR 检测 Sox2 基因在成熟的赤子爱胜蚓不同体段，即头部、环带和尾部的相对表达量，不同体段 Sox2 基因的表达差异不显著 ($P > 0.05$ ，图 4a)。

2.4 赤子爱胜蚓再生进程中尾部芽基 Sox2 的表达特征

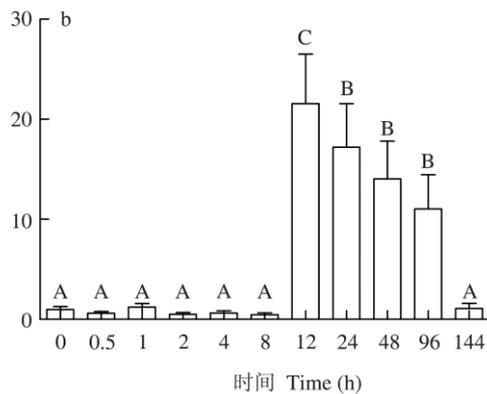


图 4 Sox2 基因在不同体段和再生进程中的表达

Fig. 4 Expression of Sox2 in different segments and during regeneration

a. Sox2 在蚯蚓不同体段中的相对表达量；b. Sox2 在蚯蚓尾部截断后不同时间点的相对表达量。标注相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

a. Relative Expression of Sox2 in different Body segments; b. Relative Expression of Sox2 in different time points after amputation of tail segments. Same letters in table differentiated no significantly, different letters differentiated significantly, $P < 0.05$.

Sox2 基因在蚯蚓尾部再生进程中的表达特征见图 4b。截断后 8 h 之前 *Sox2* 基因相对表达量与刚截断时 (0 h) 相比均无显著差异 ($P > 0.05$), 截断后 12 h, *Sox* 基因的表达量骤升, 达到峰值, 其峰值是截断初期 (0 h) 的 22 倍 ($P < 0.01$)。随着时间的推移, 表达量逐渐降低, 截断 6 d 时, *Sox2* 基因的表达量降低至接近于截断前的水平。

3 讨论

再生组织细胞的来源有两种途径: 一种是机体内存在干细胞或具有干细胞功能的细胞或细胞群, 已被证实通过该方式再生的物种有涡虫、水螅 (宇文延青等 2012, 刘殿辰等 2013); 另一种机制是机体已分化的细胞通过去分化形成具有一定全能性的细胞, 再分化形成新的组织, 如斑马鱼、蝾螈 (Kragl et al. 2009, Xiao et al. 2011, 白桂芬等 2012, 胡雨等 2012, Goessling et al. 2014)。

关于蚯蚓的再生机制研究较少, 追溯到 20 世纪中叶, Liebmanm (1942) 认为蚯蚓再生与体内油细胞 (eleocytic) 的数量有关, 当性成熟的个体油细胞数量不能同时满足生殖和再生时, 生殖停止, 而再生进行。Moment (1949, 1972, 1974) 认为蚯蚓再生的长度和再生体节数由体内的电压控制, 当蚯蚓尾部再生出更多体节时, 蚯蚓头部和尾部的电势差依次增加, 电势差作为抑制再生的因素, 达到阈值后, 再生停止, 体节不再增加。Chark 等 (1959) 认为寡毛纲动物的再生需要食道上神经节分泌的激素, 若食道上神经被切除, 则再生受抑制。Pearson (2001) 和 Myohara 等 (1999) 认为蚯蚓再生进程存在去分化过程, 即蚯蚓新形成的细胞来源于发生了细胞重编程的已分化细胞 (齐莉萍等 2003, 白桂芬等 2012)。*Sox2* 表达量下降, 细胞的分化程度升高、全能性降低 (陈艳玫等 2004, 饶家辉等 2012)。蚯蚓尾部截断后 8 ~ 12 h, *Sox2* 表达上调, 表明再生的蚯蚓尾部细胞分化程度降低, 即在该段时间细

胞发生了去分化, 逆转了细胞的分化状态, 导致分化程度降低, 获得了全能性; 而在 12 h 到 6 d 期间, *Sox2* 表达量逐渐下降, 细胞分化程度升高, 全能性降低, 说明细胞发生了分化。

Sox2 基因作为神经干细胞和神经祖细胞的生物标志物, 蚯蚓再生进程中明显上调, 这说明蚯蚓再生经历了神经干细胞或神经祖细胞的阶段, 而这些细胞在成熟蚯蚓体内极少存在, 据此推测具有干细胞特性的细胞极是由其他细胞发生重编程去分化形成的。

Sox2 在其他物种如再生机理相似的蝾螈中的表达模式与本研究类似。Maki 等 (2009) 发现 *Sox2* 在蝾螈晶状体再生进程中, 其表达先上升后下降, 在蝾螈肢端再生进程也发生上调, 同时再生进程中伴随其他多能性因子如 *Klf-4* 和 *c-Myc* 的表达上调 (Knapp et al. 2012)。Christen 等 (2010) 发现 *Sox2* 基因的表达在蟾蜍指端、尾端再生的芽基中也会随伤愈时间延长发生上调, 随后表达下调; 斑马鱼鱼鳍再生进程中 *Sox2* 基因的表达也发生了上调 (Christen et al., 2010)。Kragl 等 (2009) 认为蝾螈肢端再生的细胞来源是相关的祖细胞, 如上皮组织可再生形成新的上皮和软骨组织, 但不能形成肌肉和神经系统的雪旺氏细胞; 软骨组织可再生出新的软骨组织, 但不能形成肌肉组织; 肌肉组织能再生形成新的肌肉组织, 但不能形成软骨组织和表皮组织。这些研究结果都说明蝾螈再生进程中, 伴随着 *Sox2* 的上调, 细胞发生了一定程度的去分化, 获得部分全能性。基于 *Sox2* 的表达模式的相似性, 可以推测, 赤子爱胜蚓在再生进程也发生了一定程度的去分化。

参 考 文 献

- Chen C, Zhou Q X, Liu S, et al. 2011. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere*, 83(8): 1147-1154.
- Christen B, Robles V, Raya M, et al. 2010. Regeneration and reprogramming compared. *BMC Biology*, 8(1): 5.

- Clark R B, Clark M E. 1959. Role of the supra-oesophageal ganglion during the early stages of caudal regeneration in some errant polychaetes. *Nature*, 183(4678): 1834–1835.
- Goessling W, North T E. 2014. Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7): 769–776.
- Knapp D, Tanaka E M. 2012. Regeneration and reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22(5): 485–493.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, et al. 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251): 60–65.
- Liebmann E. 1942. The coelomocytes of Lumbricidae. *Journal of Morphology*, 71(2): 221–249.
- Maki N, Suetsugu-Maki R, Tarui H, et al. 2009. Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in newts. *Developmental Dynamics*, 238(6): 1613–1616.
- Moment G B. 1949. Segment frequencies in anterior regeneration in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Journal of Experimental Zoology*, 111(3): 449–456.
- Moment G B. 1972. Recovery and abscopal effects after inhibitory x-irradiation in earthworm regeneration. *Journal of Experimental Zoology*, 181(1): 33–39.
- Moment G B. 1974. Variation and its causation in earthworm regeneration. *Journal of Experimental Zoology*, 190(3): 297–303.
- Myohara M, Yoshida-Noro C, Kobari F, et al. 1999. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. *Development, Growth & Differentiation*, 41(5): 549–555.
- Pearson H. 2001. The regeneration gap. *Nature*, 414(6862): 388–390.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663–676.
- Wong M L, Medrano J F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 75–85.
- Xiao N W, Ge F, Edwards C A. 2011. The regeneration capacity of an earthworm, *Eisenia fetida*, in relation to the site of amputation along the body. *Acta Ecologica Sinica*, 31(4): 197–204.
- 白桂芬, 李冰, 刘沛. 2012. 蚯蚓再生及影响因素的研究进展. 赤峰学院学报: 自然科学版, (9): 34–36.
- 常重杰, 杜启艳, 邵红伟. 2002. *Sox*基因家族研究的新进展. *遗传*, 24(4): 470–476.
- 常重杰, 周荣家, 余其兴. 2000. *Sox*基因家族的研究现状. *遗传*, 22(1): 51–53.
- 陈艳玫, 姚鑫. 2004. 转录因子 *Sox2*的研究进展. *生命科学*, 16(3): 129–134.
- 邓治, 刘辉, 王岳坤, 等. 2014. 橡胶树胞质型谷胱甘肽还原酶基因的克隆与表达分析. *植物生理与分子生物学学报*, 50(11): 1699–1706.
- 郭晓强, 冯志霞. 2010. 动物细胞全能性研究的先驱——格登. *生物学通报*, 45(6): 59–61.
- 郝庆卯, 李力, 李岳, 等. 2012. *Sox2*在成年小鼠室周器官细胞的表达及其意义. *解剖学杂志*, 35(6): 758–760.
- 郝庆卯, 秦永, 李力, 等. 2014. *Nestin/Sox2*及*Sox2/BrdU*在成年小鼠室周器官细胞的表达. *解剖学杂志*, 37(3): 315–317.
- 胡雨, 姚纪花. 2012. 斑马鱼多能性因子的研究进展. *遗传*, 34(9): 1097–1107.
- 刘殿辰, 王玲燕, 赵博生. 2013. EdU标记涡虫体内多能干细胞 neoblast的方法. *山东理工大学学报: 自然科学版*, 27(2): 11–13.
- 马莉, 孔清华, 赵树华, 等. 2009. *Sox2*基因3'非翻译区保守元件对基因表达的调控作用. *动物学研究*, 30(6): 633–638.
- 彭芳, 金建华, 余方. 2010. Graphpad prism 5.01在科技期刊统计图表中的应用. *中国科技纵横*, (1): 104–105.
- 彭正军, 刘路, 凌均荣. 2014. 细胞重编程及其影响因素. *国际口腔医学杂志*, 41(3): 300–303.
- 齐莉萍, 戈峰. 2003. 再生研究与再生医学. *生命的化学*, 23(3): 201–203.
- 齐莉萍, 戈峰, 甘雅玲, 等. 2004. 赤子爱胜蚓再生过程中肌细胞超微结构变化的研究. *动物分类学报*, 28(4): 563–567.
- 饶家辉, 周虚. 2012. 干细胞中两个关键细胞因子*Ocr4*和*Sox2*. *动物医学进展*, 33(3): 114–119.
- 宇文延青, 司晓慧, 陈广文. 2012. 涡虫成体干细胞研究进展. *安徽大学学报: 自然科学版*, 36(2): 103–108.