

肉鸡肠道 *CDX2* mRNA 表达的肠段差异性与发育性变化

詹 勋¹, 冯 幼², 王修启², 束 刚², 江青艳², 冯定远², 舒绪刚³

(1 华南农业大学 增城正大肉鸡中心, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642;
3 广州天科科技有限公司, 广东 广州 510627)

摘要: 选用遗传背景相同的1日龄父母代雄性 Arbor Acre (AA) 肉雏鸡120羽, 随机分为4个重复, 采用相对定量 RT-PCR 方法, 以 AA 肉鸡30 d 肠道样品为模板, 研究肉鸡肠道尾形相关同源盒基因 (cadua-related type homeobox gene) 家族中 *CDX2* mRNA 表达的组织特异性; 以 AA 肉鸡十二指肠和空肠样品为模板, 研究肉鸡肠道 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化. 结果显示: AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA 的表达丰度高于空肠 ($P = 0.09$)、回肠 ($P = 0.06$) 和结直肠 ($P = 0.05$); AA 肉鸡 *CDX2* mRNA 在十二指肠及空肠中的表达具有相同的发育模式, 2~30 d 下降, 44 d 回升, 58 d 略微下降; 在2和44 d 时的表达丰度显著高于30 d ($P < 0.05$). 以上结果表明: AA 肉鸡肠道近端 *CDX2* mRNA 的表达丰度高于远端 ($P > 0.05$). AA 肉鸡十二指肠及空肠 *CDX2* mRNA 的表达具有相同的发育模式, 表明 *CDX2* mRNA 表达受到发育阶段的调控, 且在十二指肠和空肠间具有稳定性.

关键词: 肉鸡; 肠道; *CDX2* mRNA; 组织特异性; 发育性表达

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0073-05

Regional and Ontogenetic Expression of *CDX2* mRNA in Intestine of Chicken

ZHAN Xun¹, FENG You², WANG Xiu-qi², SHU Gang²,
JIANG Qing-yan², FENG Ding-yuan², SHU Xu-gang³

(1 Zengcheng Center of CHIATAI Broiler Chicken, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 Guangzhou Tianke Co. Ltd., Guangzhou 510627, China)

Abstract: One hundred and twenty 1-day-old parental male Arbor Acre (AA) broiler chicks were randomly divided into 4 replicates, respectively. Regional expression of *CDX2* mRNA in different segments of intestinal tract of AA chicken on 30 d and ontogenetic expression of *CDX2* mRNA in duodenum and jejunum of AA broiler chickens were determined by relative quantitative RT-PCR. It was found that: The *CDX2* mRNA expression in duodenum was higher than that in jejunum ($P = 0.09$), ileum ($P = 0.06$) and colorectum ($P = 0.05$), respectively. Ontogenetic patterns of *CDX2* mRNA were consistent between duodenum and jejunum. The abundance of *CDX2* mRNA decreased from day 2 to day 30, increased from day 30 to day 44 and increased slightly on day 58. The abundance of *CDX2* mRNA on day 2 and day 44 were higher than on day 30 ($P < 0.05$), respectively. These results indicate that: Regional expression of *CDX2* mRNA in intestine of AA chickens was declined along the downward intestine from proximal intestine to distal intestine ($P > 0.05$). Ontogeny of *CDX2* mRNA in AA chickens had the same pattern in duodenum and jejunum, indicating that *CDX2* mRNA expression could be regulated by developmental stage.

Key words: chicken; intestine; *CDX2* mRNA; regional expression; ontogenetic expression

收稿日期: 2008-05-14

作者简介: 詹 勋 (1967—), 硕士, 助理研究员; 通讯作者: 王修启, 博士, 研究员, E-mail: xqwang@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30671519); “国家重点基础研究发展计划” (973) 项目 (2004CB117501)

CDX2 是一种新发现的特异性核转录因子,属尾形相关同源盒基因(cadual-related homeobox gene)家族中的一员,在肠道中特异性表达,从早期的胚胎发育开始至个体成熟阶段都有表达,在肠道上皮形态的发生、维持以及分化方面起重要作用^[1].近年来的研究发现,*CDX2* 基因全长 22~23 kb,由 3 个外显子和 2 个内含子构成,与之对应的 *CDX2* 蛋白包含 311 个氨基酸^[2].研究表明,*CDX2* 参与调控肠道碳水化合物消化酶^[3,4] 以及小肽转运载体^[5] 基因表达.另外,*CDX2* 还参与脂类代谢相关酶基因的调控^[6]. Honoi 等^[7] 研究还发现 *CDX2* 通过直接调节 HEPH (hephaestin) 的转录表达,影响肠上皮细胞内铁的代谢.*CDX2* 对导致腹泻的大肠埃希氏杆菌 *Escherichia coli* 热稳定内毒素的受体基因表达也有一定调控作用^[8].目前有关 *CDX2* mRNA 及其蛋白水平研究应用主要集中在医学上^[9],因此,本研究选用遗传背景相同的 1 d 父母代雄性 Arbor Acre (AA) 肉鸡,进行 2 阶段饲养.分别于 2、16、30、44 和 58 d 采集十二指肠、空肠、回肠和结直肠样品,运用相对定量 RT-PCR 方法研究 AA 鸡肠道 *CDX2* mRNA 表达的肠段差异性以及十二指肠和空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育模式,以揭示肉鸡 *CDX2* mRNA 的表达规律,为 *CDX2* 在肉鸡肠道中生理功能的研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

1.1.1 试验动物 选用遗传背景和批次相同、发育正常的父母代 1 日龄雄性 Arbor Acre (AA) 肉鸡(购自广东穗屏科宝种鸡场)120 羽,按照平均体质量一致的原则分为 4 个重复,平均体质量为 40.7 g,每个重复 30 只鸡.

1.1.2 日粮组成及营养水平 参照 NRC^[10] 0~8 周龄肉鸡营养需要设计饲料配方,日粮组成和营养水平见表 1.于 31 日龄开始采用逐步换料的方法,至 34 日龄全部更换为后期日粮.

1.1.3 饲养管理与免疫 试验在华南农业大学动物科学学院种鸡场进行,粉料饲喂.红外取暖,自由饮水和采食,人工持续光照,第 1 周育雏温度为 33~35℃,以后每周降低 2℃直至室温,常规免疫.

1.1.4 组织采样 分别于 2、16、30、44 和 58 日龄,每重复取接近平均体质量的 2 只鸡,共 40 只,断颈宰杀,宰前不禁食.分离肠道,沿纵向剖开,用 4℃预冷的 PBS 缓冲液冲洗,吸水纸吸干.分别从十二指肠 U 状弯曲的起始处和结束处向下取 3 cm 肠段,作为十二指肠和空肠样品;从回盲韧带起始处和回盲结

向下取 3 cm 肠段,分别作为回肠和结直肠样品.放入 1.5 mL 离心管中,置液氮速冻,-70℃冷冻保存.

1.2 肠道 CDX2 mRNA 的相对定量 RT-PCR

1.2.1 样品总 RNA 提取和 RNA 电泳 采用 Trizol (北京赛百盛基因技术有限公司)一步抽提法提取组织样的总 RNA,紫外比色法测定总 RNA 的浓度和纯度(Eppendorf BioPhotometer 260 nm).用质量分数为 1.4% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,根据 28S rRNA 和 18S rRNA 的灰度比评价 RNA 的质量.

表 1 2 个生长阶段日粮组成和营养水平
Tab. 1 Diet composition and calculated nutrients level

组分	比例/%		营养水平	0~30 d	31~58 d
	0~30 d	31~58 d			
玉米	65.00	67.65	代谢能/(MJ·kg ⁻¹)	12.12	12.75
玉米蛋白粉	2.70	4.00	w _{粗蛋白} /%	20.00	18.00
豆粕	26.20	22.02	w _{赖氨酸} /%	1.10	1.00
豆油	0	2.00	w _{蛋氨酸} /%	0.52	0.45
鱼粉	2.00	0	w _{蛋+胱} /%	0.85	0.76
石粉	0.80	0.87	w _钙 /%	0.85	0.80
磷酸氢钙	1.57	1.62	w _磷 /%	0.67	0.61
赖氨酸 Lys (78%)	0.16	0.27	w _{有效磷} /%	0.45	0.40
蛋氨酸 Met (98%)	0.18	0.15			
食盐	0.29	0.34			
氯化胆碱(75%)	0.10	0.08			
预混料 ¹⁾	1.00	1.00			
合计	100	100			

1) 提供至每千克全价料:铜 5.00 mg,铁 69.00 mg,锌 84.00 mg,锰 98.60 mg,碘 1.14 mg,硒 0.30 mg,维生素 A 15 000 IU,维生素 D₃ 3 000 IU,维生素 E 25.5 mg,维生素 K₃ 2.1 mg,维生素 B₁ 2.4 mg,维生素 B₂ 9 mg,维生素 B₆ 5.1 mg,维生素 B₁₂ 0.02 mg,泛酸钙 12 mg,烟酸 48 mg,叶酸 1.2 mg,生物素 0.06 mg,洛克沙肿 50 mg,盐霉素 90 mg

1.2.2 反转录 分别准确量取 2 μg 各样品的总 RNA 进行反转录.建立各样品 RNA 的 cDNA (RT product).反转录反应体积为 20 μL,其中含 Oligo dT (18) 5 μmol/L,1 mmol/L dNTP,20 U RNA 酶抑制剂 (RNase inhibitor, TaKaRa, 大连),200 U 反转录酶 (MMLV RT, Promega),4 μL 5 × RT Buffer (含 250 mol/L Tris-HCl pH8.3,50 mol/L MgCl₂,250 mol/L KCl,50 mol/L DTT,2.5 mol/L Spermidine).样品总 RNA、Oligo dT (18) 和 dNTP 在反转录前 70℃变性 5 min,冰上放置 5 min,再加入其余试剂,混匀后于 42℃反应 60 min,95℃变性 5 min.反转录产物 (RT products) -20℃保存备用.

以 30 d 时 AA 肉鸡肠道各段样品为模板,研究

肉鸡肠道 *CDX2* mRNA 表达的肠段差异性;以 AA 肉鸡十二指肠和空肠样品为模板,研究肉鸡肠道 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化.

1.2.3 目的基因引物设计和 PCR 反应条件

PCR

引物采用 Primer 软件设计,由北京赛百盛基因技术有限公司合成,引物序列及参数见表 2. 以 β -actin 管家基因作为内标,对 *CDX2* mRNA 进行相对定量分析. PCR 反应在 MJR PTC-200 PCR 仪上进行.

表 2 *CDX2* 目的基因和 β -actin 内标基因引物参数
Tab.2 Parameters of primer pairs for *CDX2* and β -actin gene

目的基因	引物位置	引物序列	产物/bp
<i>CDX2</i> (NM_45383525 GenBank)	737 ~ 756	Sense 5'-CTCGGTAGCCAAGTCAAAAC-3'	85
	803 ~ 821	Antisense 5'-ACTCCTTCTCCAGCTCCAA-3'	
β -actin(L 08165 GenBank)	83 ~ 101	Sense 5'-TGCTGCGCTCGTTGTTGAC-3'	291
	355 ~ 373	Antisense 5'-GGGTGCTCCTCAGGGGCTA-3'	

内标基因 β -actin Primers (10 μ mol/L) 和 Competimers(10 μ mol/L) 参照 Dieffenbach^[11] 的方法,将 β -actin Primers 的 3'端进行修饰(北京赛百盛基因技术有限公司),使其在 PCR 过程中只能与模板结合而不能延伸,得到 β -actin Competimers. 将 β -actin Primers 和 Competimers 均稀释至 10 μ mol/L 备用.

采用单管法进行 PCR 扩增,对混合样(待测样品等比例混合)的 PCR 反应条件、循环圈数以及目的基因 *CDX2* 和内标基因 β -actin 引物浓度进行优化. *CDX2* 的 RT-PCR 条件:在 20 μ L 的反应体系中含有 1 μ L 反转录产物,2 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 μ mol/L 目的基因的上、下游引物, β -actin Primers + Competimers 为 0.15 μ L + 0.85 μ L, 0.5 U Tag DNA polymerase (Fermentas, Lietuva). PCR 反应条件:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 65 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 40 s, 循环圈数为 32; 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min.

电泳及灰度分析:取 10 μ L PCR 产物在 0.02 g/mL EtBr 染色的琼脂糖凝胶上电泳. 图像处理及灰度分析用 LabWorks Image Acquisition and Analysis Software 4.0 (Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK) 进行,根据目的基因和 β -actin PCR 产物的灰度比,确定样品中 *CDX2* mRNA 表达的相对含量,RT-PCR 过程至少重复 3 次.

1.3 数据分析

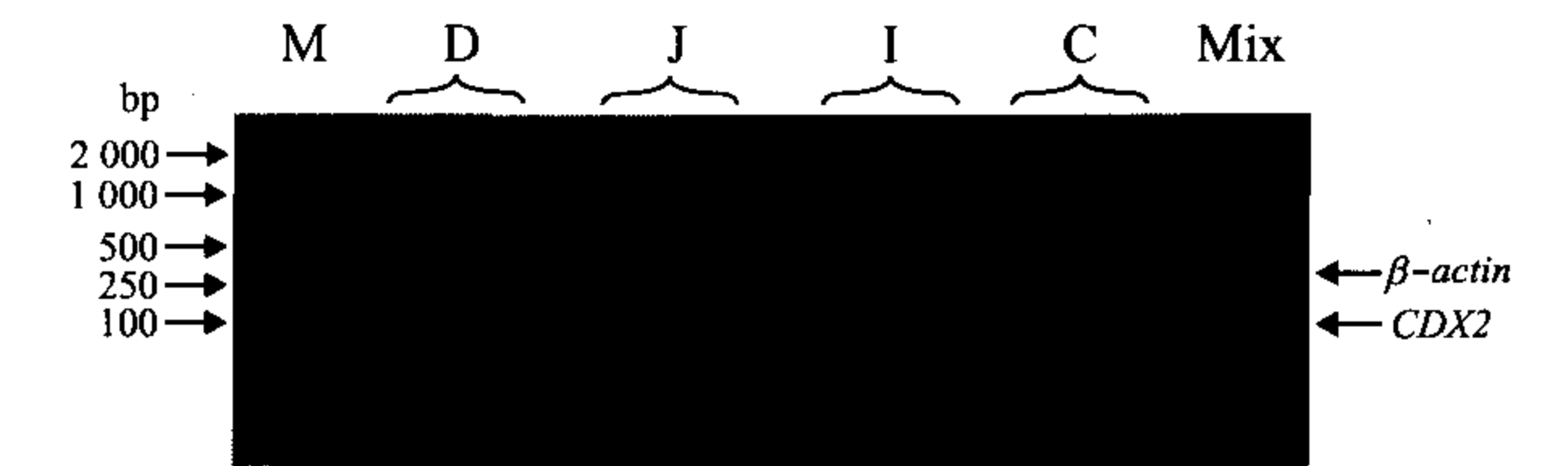
试验数据以平均数 $\pm$ 标准误表示,用 SPSS14.0 统计软件进行单因子方差分析(one-way ANOVA),以 LSD 方法进行多重比较.

2 结果

2.1 AA 肉鸡 30 d 肠道 *CDX2* mRNA 表达的肠段差异性

AA 肉鸡 30 d 时不同肠段 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳见图 1,不同肠段组织中

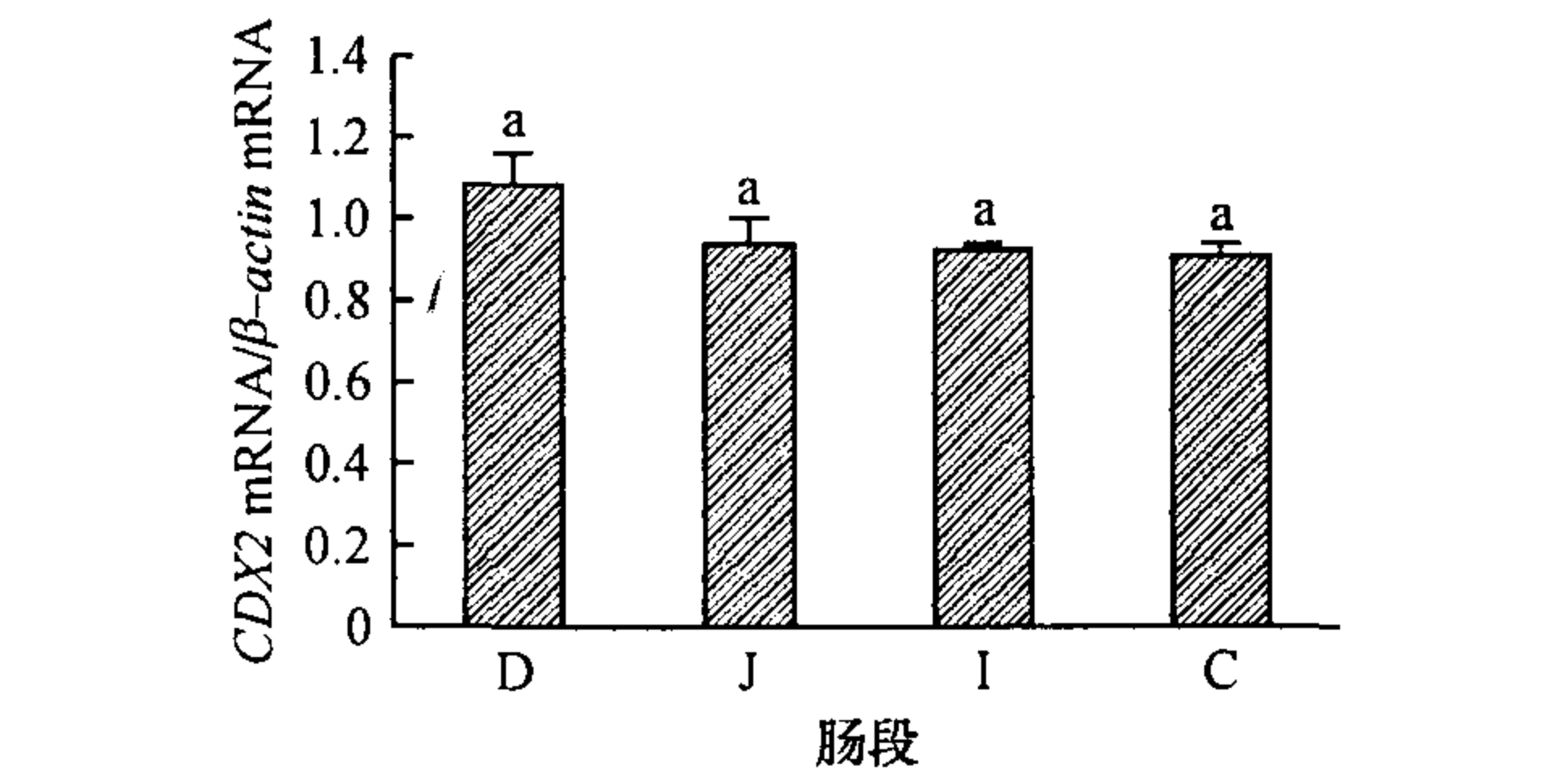
CDX2 mRNA 基因表达的相对丰度见图 2. AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA 的表达丰度高于空肠、回肠和结直肠,但差异不显著(P 值分别为 0.09, 0.06 和 0.05).



M: DNA Marker DL2000; Mix: 混合样; D: 十二指肠; J: 空肠; I: 回肠; C: 结直肠; $n = 8$

图 1 不同肠段 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Representative agarose gel electrophoresis of *CDX2* mRNA RT-PCR in different intestinal segments



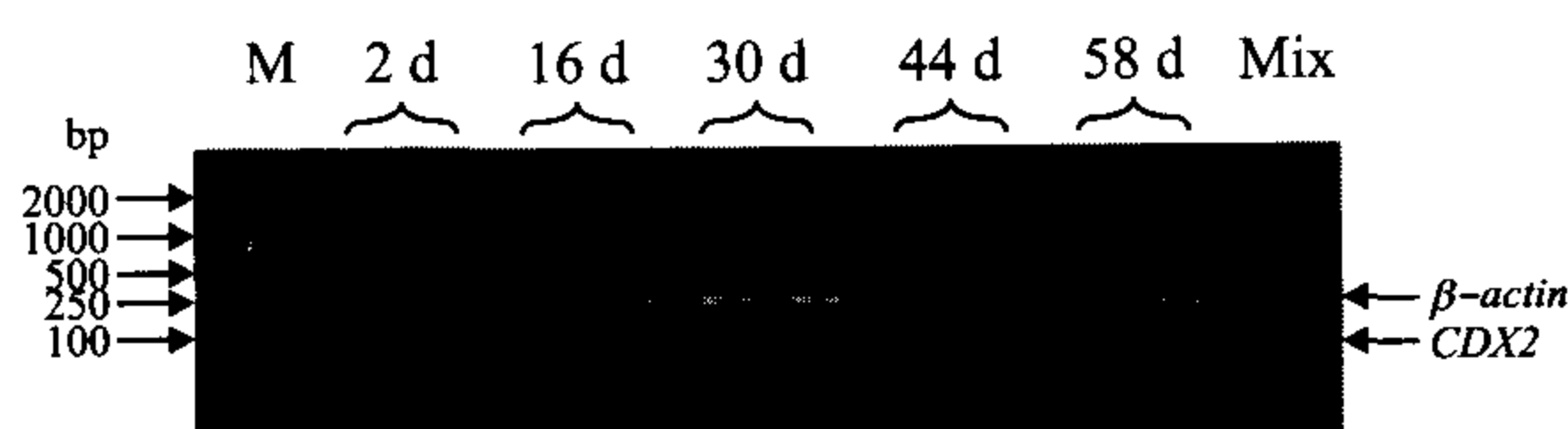
D: 十二指肠; J: 空肠; I: 回肠; C: 结直肠; 图标上方具相同字母者示不同肠段之间差异不显著($P > 0.05$); $n = 8$

图 2 不同肠段 *CDX2* mRNA 表达的组织特异性
Fig.2 Regional expression of *CDX2* mRNA in different intestinal segments

2.2 AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化

AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳见图 3,十二指肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化见图 4. 由图 4 可见,AA 肉鸡十二

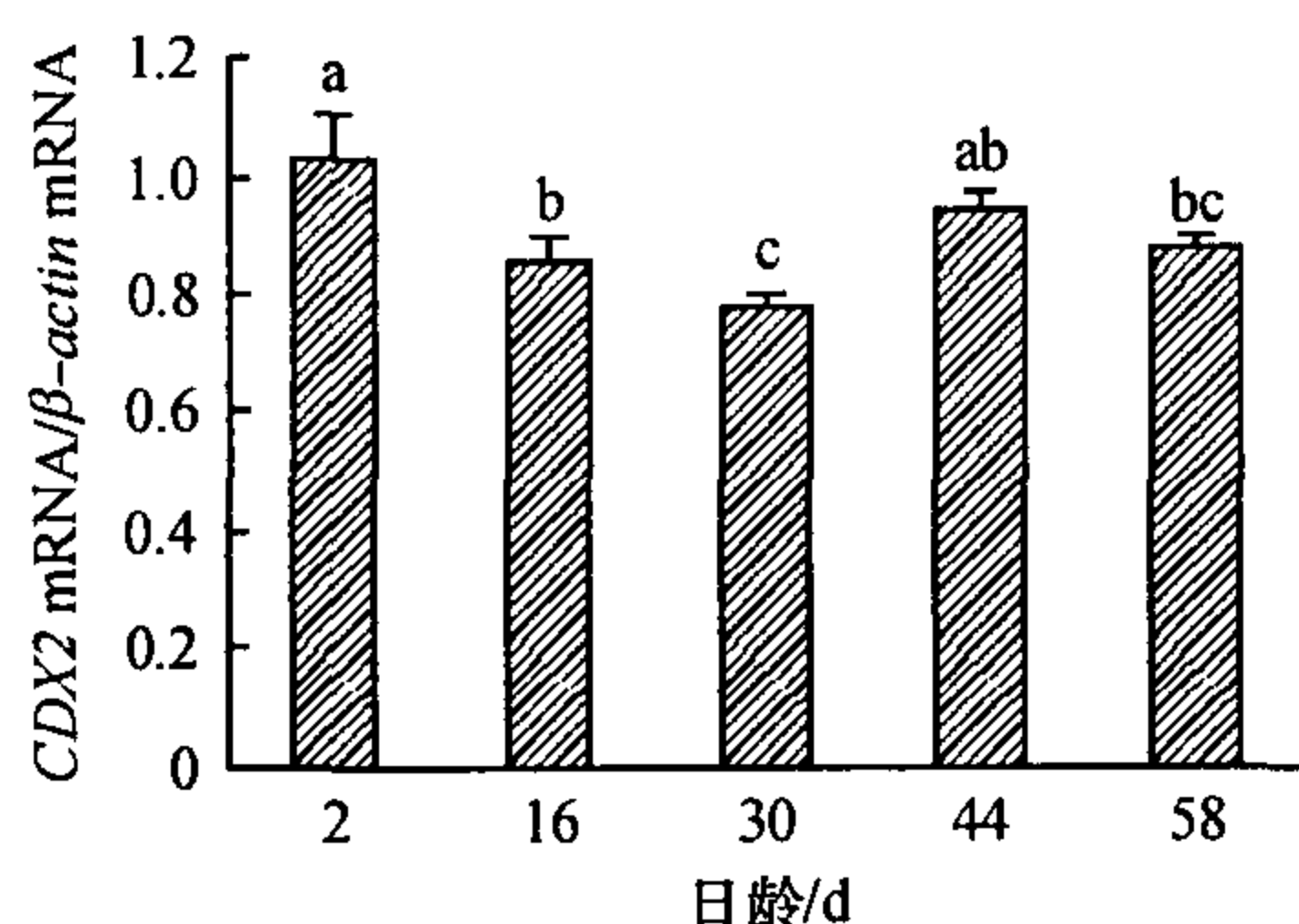
指肠 *CDX2* mRNA 的表达在 2~30 d 时降低,44 d 时回升,58 d 时略微下降;在 2 和 44 d 时的表达丰度显著高于 30 d ($P < 0.05$).



M: DNA Marker DL2000; Mix: 混合样; 2 d、16 d、30 d、44 d、58 d: 分别代表 2、16、30、44 和 58 日龄肠道样品

图 3 AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Representative agarose gel electrophoresis of *CDX2* mRNA RT-PCR in duodenum of AA broilers



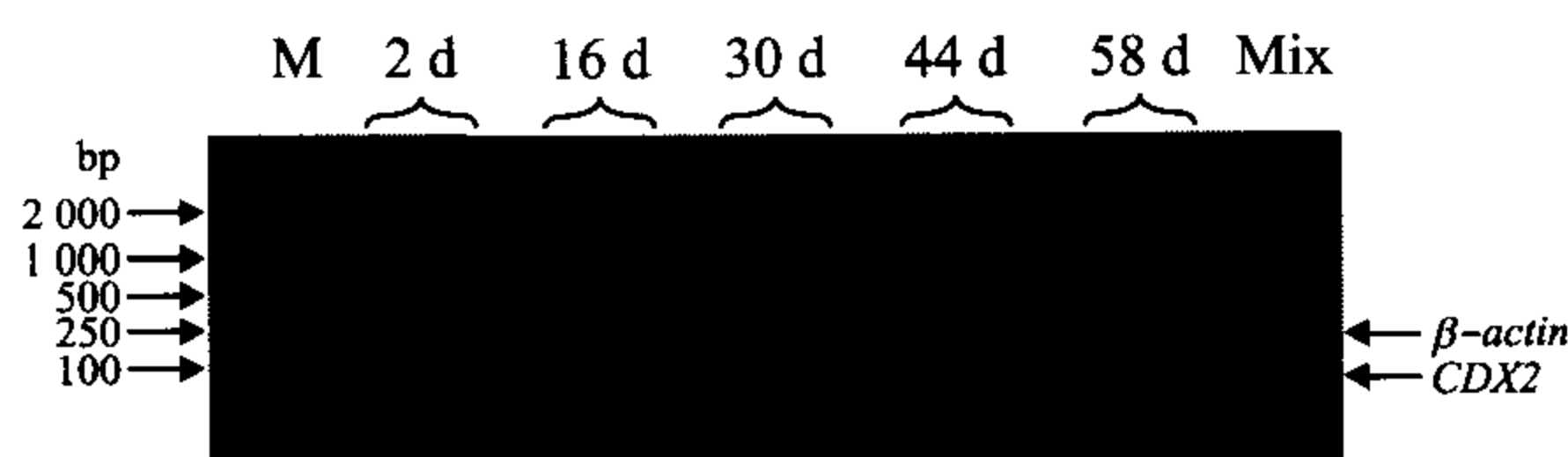
图标上方无相同字母者, 示不同日龄之间差异显著 ($P < 0.05$), $n = 8$

图 4 AA 肉鸡十二指肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化

Fig. 4 Ontogenetic expression of *CDX2* mRNA in duodenum of AA broilers

2.3 AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化

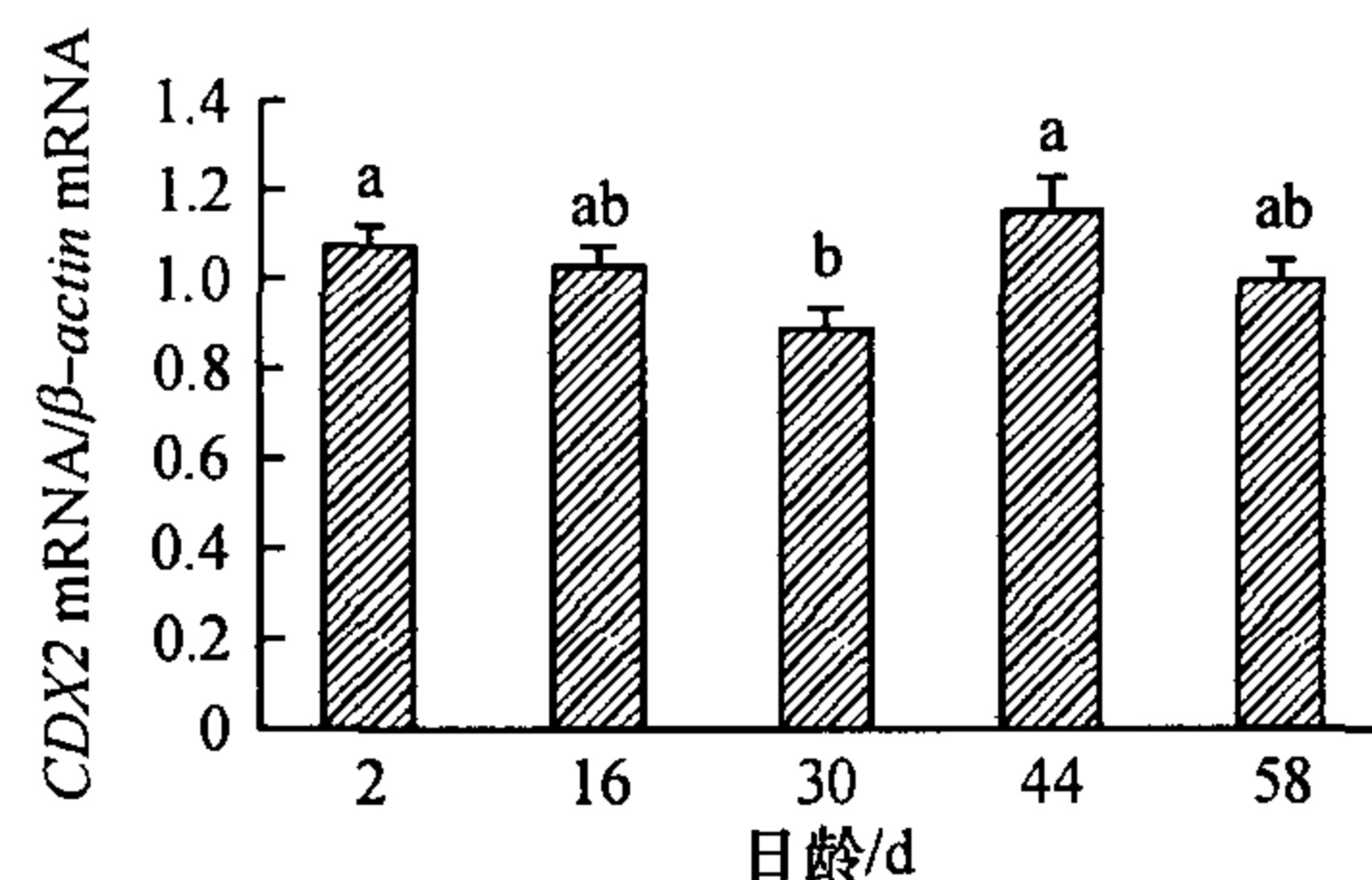
AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳见图 5, 空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化见图 6. 由图 6 可见, AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育模式与十二指肠相同, 2~30 d 时下降, 44 d 时回升, 58 d 时略微下降; 在 2 和 44 d 时的表达丰度显著高于 30 d ($P < 0.05$).



M: DNA Marker DL2000; Mix: 混合样; 2 d、16 d、30 d、44 d 和 58 d: 分别代表 2、16、30、44 和 58 日龄肠道样品

图 5 AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5 Representative agarose gel electrophoresis of *CDX2* mRNA RT-PCR in jejunum of AA broilers



图标上方无相同字母者, 示不同日龄之间差异显著 ($P < 0.05$), $n = 8$

图 6 AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育性变化

Fig. 6 Ontogenetic expression of *CDX2* mRNA in jejunum of AA broilers

3 讨论

CDX2 是一种肠道特异性核转录因子^[6], 在肠道上皮细胞增殖、分化以及表型的维持方面起到重要作用^[1,12], 还参与了调控肠道中一些酶的基因表达^[3-6]. 对人消化道器官进行免疫组织化学染色研究发现, 在消化器官中, *CDX2* 的表达率和表达强度在胃肠道各部位存在差别, 在十二指肠, 结肠和直肠粘膜中, *CDX2* 表达率较高, 呈高强度表达, 在食管、胃粘膜中表达率低且较弱, 食管、胃与十二指肠、结肠及直肠之间存在明显差别, 而十二指肠、结肠及直肠之间、胃及食管之间无明显差别^[13]. 对小鼠的研究表明 *CDX2* mRNA 的表达丰度从小肠到结肠依次增加^[14]. 本研究结果显示, AA 肉鸡 *CDX2* mRNA 表达丰度从十二指肠、空肠、回肠到结直肠依次降低, 空肠、回肠和结直肠之间表达丰度相近 ($P > 0.05$). 肉鸡 *CDX2* mRNA 表达在肠道不同区间表现出的与哺乳动物完全不同的模式, 具体的原因有待于进一步的研究.

动物发育过程影响 *CDX2* mRNA 的表达, 小鼠空肠 *CDX2* mRNA 表达丰度在出生后 13 日龄时达到最大值, 在 13~20 日龄阶段随着日龄的增加而降低^[15]. 本研究的结果发现: AA 肉鸡空肠 *CDX2* mRNA 表达的发育模式与十二指肠基本相同, 2~30 d 时下降, 44 d 时回升, 58 d 时略微下降; 在 2 和 44 d 时的表达丰度显著高于 30 d ($P < 0.05$). 这与小鼠肠道 *CDX2* mRNA 表达的模式有所不同. 此外, 也与我们以前的研究中肉鸡生长发育过程中肠道前段主要营养物质转运载体——葡萄糖转运载体 SGLT1 和 GLUT2^[16]、碱性氨基酸转运载体 rBAT 和 y^+ LAT-2^[17] 和寡肽转运载体 PEPT1^[18] mRNA 的表达模式存在反向关系, 这是否提示可以通过调控肠道上皮特

异性基因 *CDX2* 的表达,或者利用 *CDX2* 蛋白处理来调控肠道营养物质转载体基因表达?从而调控家禽生产性能?对这一问题的回答有待于进一步的深入研究.

参考文献:

- [1] YUASA Y, NAGASAKI H, AKIYAMA Y, et al. Relationship between *CDX2* gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(1):193-200.
- [2] JAMES R, ERLER T, KAZENWADEL J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2* expression in embryonic and adult intestinal epithelium[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(21):15229-15237.
- [3] BOUDREAU F, RINGS E H H M, VAN WERING H M, et al. Hepatocyte-nuclear-factor-1alpha (HNF-1alpha), GATA-4 and caudal-related homeodomain protein Cdx2 functionally interact to modulate intestinal gene transcription: Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 31909-31917.
- [4] CATHY M, JESPER T, SPODSBERG T N. Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1a mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene [J]. *J Biol Chem*, 2000, 346:529-535.
- [5] SHIMAKURA J, TERADA T, SHIMADA Y, et al. The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71(11):1581-1588.
- [6] SONG Bao-liang, QI Wei, WANG Can-hua, et al. Preparation of an anti-cdx-2 antibody for analysis of different species *cdx-2* binding to *acat2* promoter[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(1):6-12.
- [7] HINOI T, GESINA G, AKYOL A, et al. *CDX2*-regulated expression of iron transport protein hephaestin in intestinal and colonic epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4):946-961.
- [8] DI GUGLIELMO M D, PARK J, SCHULZ S, et al. Nucleotide requirements for *CDX2* binding to the cis promoter element mediating intestine-specific expression of guanylyl cyclase C[J]. *FEBS Letters*, 2001, 507(2):128-132.
- [9] ESCAFFIT F, PARE F, GAUTHIER R, et al. Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(1):66.
- [10] NRC. Nutrient requirements of poultry[S]. 10th ed. New York:National Academy Press,1994.
- [11] DIEFFENBACH C W. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [12] DANG L H, CHEN F, YING C, et al. *CDX2* has tumorigenic potential in the human colon cancer cell lines LOVO and SW48[J]. *Oncogene*, 2005, 25(15):2264-2272.
- [13] 宋艳, 李凌, 孙耘田. *CDX2* 在人体组织中的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(11):1310-1313.
- [14] DULUC I, LORENTZ O, FRITSCH C, et al. Changing intestinal connective tissue interactions alters homeobox gene expression in epithelial cells[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(11):1317-1324.
- [15] KURANUKI S, MOCHIZUKI K, TANAKA T, et al. The possible roles of homeobox protein, Cdx-2 for the expression of LPH gene during postnatal development[J]. *Life Sciences*, 2007, 80(8):795-799.
- [16] 王修启, 谭会泽, 束刚, 等. 不同基因型肉鸡十二指肠 SGLT1 和 GLUT2 mRNA 的发育性变化[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(3):334-340.
- [17] 谭会泽. 肉鸡肠道碱性氨基酸转载体 mRNA 表达的发育性变化及营养调控[D]. 广州:华南农业大学动物科学学院, 2006.
- [18] 王修启, 邹仕庚, 左建军, 等. 肉鸡肠道 PepT1 mRNA 表达的组织特异性与发育性变化[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(8):814-821.

【责任编辑 柴 焰】