

## 小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体的构建及其功能的初步研究

沈震<sup>1,3</sup>, 陈欢欢<sup>2</sup>, 张浩<sup>1\*</sup>, 盛燕辉<sup>1</sup>, 杨荣<sup>1</sup>, 孔祥清<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院心内科, <sup>2</sup>内分泌科, 江苏 南京 210029, <sup>3</sup>泰州市人民医院心内科, 江苏 泰州 225300)

**[摘要]** **目的:**构建小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体,比较其对 P19 细胞 NOMO1 基因的抑制效率,以研究 NOMO1 基因与 P19 细胞向心肌细胞方向分化的关系。**方法:**利用 Designer3.0 软件设计小鼠 NOMO1 基因干扰片段,合成 shRNA 序列,再行寡核苷酸双链的合成,退火后形成的寡核苷酸双链克隆到 pGPU6/Hygro 载体的黏性末端,连接产物转化到感受态细胞,增菌,质粒扩增,质粒 DNA 抽提,使用 *Pst* I、*Bam*H I 进行双酶切和 DNA 测序鉴定重组克隆。将小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体转染 P19 细胞,以 RT-PCR 技术验证 NOMO1 基因在 P19 细胞中的 mRNA 表达。以 DMSO 诱导分化方案诱导 P19 细胞向心肌细胞分化,采用定量 RT-PCR 技术检测 P19 细胞中  $\alpha$ -MHC 等基因 mRNA 的表达,评估 NOMO1 与 P19 干细胞向心肌细胞方向分化的关系。**结果:**双酶切证实 shRNA 正确插入质粒,测序结果表明插入的序列正确。载体转染的 P19 细胞筛选稳定表达株,经 RT-PCR 和 Western blot 验证 4 个位点设计的干扰质粒对 NOMO1 在 P19 细胞中的 mRNA 表达均具有较高的抑制效率。转染后 P19 细胞的  $\alpha$ -MHC 基因 mRNA 表达则显著下调( $P < 0.05$ )。**结论:**成功构建小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体,为研究 NOMO1 基因与 P19 细胞向心肌细胞方向分化的关系提供了稳定的转染细胞工具,NOMO1 可能通过诱导  $\alpha$ -MHC 等基因表达,促进 P19 干细胞向中胚层的分化。

**[关键词]** 先天性心脏病; NOMO1 基因; RNA 干扰; RNA 干扰载体; P19 细胞

**[中图分类号]** Q753

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)12-1661-05

### Construction and function of mouse NOMO1 RNA interference vector

SHEN Zhen<sup>1,3</sup>, CHEN Huan-huan<sup>2</sup>, ZHANG Hao<sup>1\*</sup>, SHENG Yan-hui<sup>1</sup>, YANG Rong<sup>1</sup>, KONG Xiang-qing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Cardiology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China)

**[Abstract]** **Objective:**To construct the RNAi vectors targeting mouse NOMO1 gene and compare the silence effects of these small interference RNAs, and to study the effects of NOMO1 gene on the differentiation of P19 cells to cardiac myocytes. **Methods:**Short hairpin RNAs of mouse NOMO1 gene were designed by Designer3.0 software, synthesized and cloned into the pGPU6/Hygro plasmid. Connection products were transfected into competent cells and identified by *Pst* I + *Bam*H I double digestion and DNA sequencing. Then the vectors were transfected into P19 cell. The level of NOMO1 mRNA was evaluated by RT-PCR. The expression of  $\alpha$ -MHC mRNA in P19 cell, which was induced by DMSO, was evaluated by RT-PCR. **Results:**shRNA was inserted into the pGPU6/Hygro plasmid correctly, confirmed by double digestion and DNA sequencing. The strains of P19 cell stably expressing shRNA were selected. RT-PCR and Western blot showed that 4 shRNAs silenced the expression of NOMO1 gene markedly.  $\alpha$ -MHC was down-regulated in transfected P19 cell. **Conclusion:**pGPU6/Hygro vectors carried mouse NOMO1 shRNA are constructed successfully. It provides us a useful tool for the study of NOMO1 gene function in the differentiation of P19 cell into cardiac myocyte. NOMO1 may be involved in  $\alpha$ -MHC gene expression, and the differentiation of P19 stem cell into mesodermal cell.

**[Key words]** congenital heart disease; NOMO1 gene; RNA interference; RNAi vector; P19 cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1661-1665]

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金(30901473)

\*通讯作者, E-mail: haozhanghh@hotmail.com

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是胚胎期心脏血管发育异常而形成的先天畸形, 发病率为出生活产婴儿的 0.6%~0.9%<sup>[1]</sup>。我国每年有

10~15 万患先天性心脏病的婴儿出生<sup>[2]</sup>。先天性心脏病是心脏发育过程中遗传和(或)环境两方面因素作用而产生的心脏发育异常<sup>[3]</sup>,其发生发展的病因和发病机制还未完全清楚。研究认为,控制人类心脏发育的基因产生突变或相关基因在时间和空间调控表达的失调是先天性心脏病表现的遗传学和分子学基础<sup>[4]</sup>,因此从心脏发育、心肌分化角度研究心脏形成机制将为先天性心脏病的防治提供新的思路。

心脏发育过程受到多种信号通路的调控,Nodal 信号通路是胚胎心脏发育过程中的关键信号通路之一,而 NOMO1(NODAL modulator 1)基因表达与 Nodal 信号通路调控相关<sup>[5]</sup>。本课题组发现 Nodal 信号通路相关的 NOMO1 基因在室间隔缺损患者心肌组织中低表达<sup>[6]</sup>,提示该基因可能为心脏发育相关基因,但其对心肌细胞的生长、发育以及在心脏发育过程的作用尚未有相关研究报道,具体作用机制尚未阐明。同时,P19 细胞是研究心脏发育、基因调控的有用工具<sup>[7-8]</sup>。因此,为深入研究该基因与干细胞向心肌细胞分化之间的关系,本研究通过构建小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体并比较其对 P19 细胞 NOMO1 基因的抑制效率,为进一步研究 NOMO1 基因与 P19 细胞向心肌细胞方向分化的关系和探讨 NOMO1 基因在心脏发育过程中的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒载体为 pGPU6/Hygro、P19 细胞株(ATCC, 美国),大肠杆菌 Top10 由本实验室保存,DNA 内切酶 (*Bpi* I、*Pst* I、*Bam* H I)、DNA 连接酶(MBI Fermentas 公司,加拿大),脂质体 Lipofectamin2 000 (Invitrogen 公司,美国),质粒提取试剂盒(Qiagen 公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 shRNA 序列设计

根据小鼠 NOMO1 基因(NM\_153057.4)的序列,共选择了 4 个位点设计 shRNA。shRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号,shRNA 的转录终止序列采用 T6 结构。正义链模板的 5'端添加了 CACC,与 *Bbs* I 酶切后形成的粘端互补;反义链模板的 5'端添加了 GATC,与 *Bam* H I 酶切后形成的粘端互补;如果 siRNA 的第一个碱基不是 G,则在 CACC 后补加一个 G。本研究构建使用的干扰序列信息见表 1。实验所用 shRNA 的设计使用 Designer3.0(Genepharma)软件(上海吉玛制药技术有限公司),合成引物由上海吉玛制药技术有限公司完成。

表 1 编码小鼠 NOMO1 基因 siRNA 的 DNA 双链体

Table 1 The duplex of DNA coding specific siRNAs

编号	编码 siRNA 的 DNA 序列
Nomo1-mus-2275	5'-CACCGGAGAAGAATGGCAAAGAAGATTCAAGAGATCTTCTTTGCCATTCTTCTCCTTTTTTG-3' 5'-GATCCAAAAAAGGAGAAGAATGGCAAAGAAGATCTTGAATCTTCTTTGCCATTCTTCTCC-3'
Nomo1-mus-2742	5'-CACCGCGTGAGCTTCGAGATTAAGTTCAAGAGACTTTAATCTCGAAGCTCACGCTTTTTTG-3' 5'-GATCCAAAAAAGCGTGAGCTTCGAGATTAAGTCTTGAACCTTAATCTCGAAGCTCACGC-3'
Nomo1-mus-3163	5'-CACCGCTGAAGGCAGAAGGCAATGATTCAAGAGATCATTGCCCTTCTGCCTTCAGCTTTTTTG-3' 5'-GATCCAAAAAAGCTGAAGGCAGAAGGCAATGATCTCTTGAATCATTGCCCTTCTGCCTTCAGC-3'
Nomo1-mus-3562	5'-CACCGCTCCCTGAACAAGACATTGCTTCAAGAGAGCAATGTCTTGTTCAGGGAGCTTTTTTG-3' 5'-GATCCAAAAAAGCTCCCTGAACAAGACATTGCTTCTTGAAGCAATGTCTTGTTCAGGGAGC-3'

#### 1.2.2 载体的构建和鉴定

利用分子克隆技术方法将目的序列退火接入 pGPU6/Hygro 载体,获得 siRNA 重组质粒。将重组质粒转化感受态细胞获得重组菌,挑选阳性克隆培养并制备质粒,使用 *Pst* I、*Bam* H I 双酶切鉴定。酶切鉴定正确的克隆送公司测序证实。重组菌大规模扩增后,用去内毒素质粒 DNA 制备试剂盒(UltraMobius™ 1000 Plasmid Kit,Qiagen 公司,德国)按说明书步骤提取质粒,于-80℃保存。

#### 1.2.3 RNA 干扰质粒转染 P19 细胞

分组:空白组(B组,不转染 RNA 干扰载体);M 组(不转染 RNA 干扰载体,使用脂质体试剂 Lipofectamine2 000);空白载体转染对照组(NC 组,转染 pGPU6/Hygro 载体);Nomo1-mus-2275 转染组(转染 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体,shRNA 编码序列为 Nomo1-mus-2275);Nomo1-mus-2742 转染组(转染 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体,shRNA 编码序列为 Nomo1-mus-2742);Nomo1-mus-3163 转染组(转染 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体,shRNA 编码序列为 Nomo1-mus-3163);

Nomol-mus-3562 转染组 (转染 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体, shRNA 编码序列为 Nomol-mus-3562)。除 B 组、M 组,其余转染组采用脂质体试剂 Lipofectamine 2000 进行 P19 细胞转染。转染细胞 6 h 后,吸出无血清培养液,换成含 10%胎牛血清 DMEM 培养液过夜,48 h 后,在倒置显微镜下观察细胞形态学变化,同时提取总 RNA 和蛋白。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测 NOMO1 表达

按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 P19 细胞总 RNA,反转录为 cDNA。反应条件:42°C 45 min;85°C 10 min;冰浴 5 min,-20°C 保存。以合成的 cDNA 作为 PCR 模板。PCR 反应条件:95°C,3 min;95°C,12 s,40 个循环;62°C,40 s。NOMO1 引物正义链:5'-AGATGGCGAGA ACTATGTG GTGC-3';反义链:5'-CTTGGCGCAGGACGTAGTCG-3'。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分析后进行灰度扫描,以所得灰度值与  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示产物的相对表达量, $\beta$ -actin 作为内参照。

#### 1.2.5 免疫印迹鉴定表达

SDS-PAGE 蛋白电泳后,用半干转移法将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭。一抗为 1:500 的 NOMO1 的多克隆抗体,二抗为 1:2 000 的过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG。用化学发光蛋白免疫印迹法 (ECL) 进行 Western blot 显色分析。

#### 1.2.6 P19 细胞的培养和向心肌细胞的诱导分化

采用 2.5%胎牛血清加 7.5%的小牛血清 (诱导分化时采用 10%胎牛血清)、100  $\mu$ g/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基,在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养有 RNAi 载体的 P19 细胞株。取第 4~5 代贴壁生长的 P19 细胞,消化后以  $1 \times 10^6$  个/ml 的密度接种于 10 cm 的细菌培养皿中,悬浮培养于 15 ml 分化培养液 (含 1%DMSO 的完全培养液)中,进行诱导分化。

#### 1.2.7 定量 RT-PCR 检测 $\alpha$ -MHC 表达

按照 TRIzol 试剂盒说明书提取诱导分化 d5 (开始诱导分化为 d5,以此类推)P19 细胞总 RNA,反转录为 cDNA。反应条件:70°C 孵育 5 min,置于冰上,梯度 PCR 仪中 42°C 孵育 1 h,95°C 孵育 10 min。以合成的 cDNA 作为 PCR 模板。PCR 反应条件:50°C 2 min,95°C 10 min,95°C 15 s,60°C 1 min,循环 40 次。 $\alpha$ -MHC 引物正义链:5'-ACCGTGGACTACAACAT-3';反义链:5'-AGGGTTGCTCGCTTTC-3'。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分析后进行灰度扫描,以所得灰

度值与  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示产物的相对表达量, $\beta$ -actin 作为内参照。

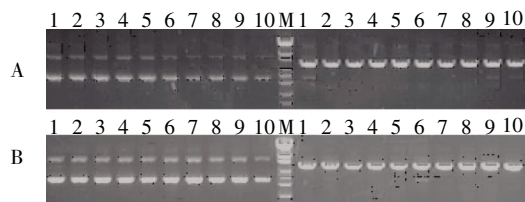
#### 1.3 统计学方法

计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,并采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。两组间样本均数的比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用 ANOVA 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组 pGPU6/Hygro 载体酶切鉴定和测序结果

从 4 个干扰序列中挑取一个阳性克隆进行扩增抽提质粒,使用 *Pst* I、*Bam* H I 双酶切过夜,进行电泳。阳性重组载体可以被 *Bam* H I 切开,而不能被 *Pst* I 切开,酶切结果显示序列插入质粒 (图 1)。测序结果表明 NOMO1 基因序列正确克隆到载体上。



M: Marker; A: 左侧 1~5 为 Nomol-mus-2275 *Pst* I 酶切结果,6~10 为 Nomol-mus-2742 *Pst* I 酶切结果;右侧 1~5 为 Nomol-mus-2275 *Bam* H I 酶切结果,6~10 为 Nomol-mus-2742 *Bam* H I 酶切结果;B: 左侧 1~5 为 Nomol-mus-3163 *Pst* I 酶切结果,6~10 为 Nomol-mus-3562 *Pst* I 酶切结果;右侧 1~5 为 Nomol-mus-3163 *Bam* H I 酶切结果,6~10 为 Nomol-mus-3562 *Bam* H I 酶切结果。

图 1 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体的 *Pst* I、*Bam* H I 双酶切鉴定

Figure 1 Identification of pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA recombinant plasmid digested by *Pst* I and *Bam* H I

### 2.2 RT-PCR 方法比较不同序列的抑制效率

P19 细胞培养 48 h 后,Nomol-mus-2275 组、Nomol-mus-2742 组、Nomol-mus-3163 组、Nomol-mus-3562 组与 NC 组相比,细胞 NOMO1 基因的 mRNA 表达均显著下调 ( $P < 0.05$ ),构建的质粒抑制效果明显 (图 2)。

### 2.3 Western blot 比较

转染不同干扰序列的 P19 细胞培养 48 h 后,提取蛋白,经 Western blot 鉴定发现 Nomol-mus-2275 组、Nomol-mus-2742 组、Nomol-mus-3163 组、Nomol-mus-3562 组与 NC 组相比,NOMO1 基因的蛋白表达水平明显下调 (图 3)。

### 2.4 $\alpha$ -MHC mRNA 的表达

转染 2275 干扰序列的 P19 细胞培养 48 h 后,

提取 mRNA, 经 RT-PCR 鉴定发现 P19 细胞的  $\alpha$ -MHC mRNA 的表达明显下调(图 4)。

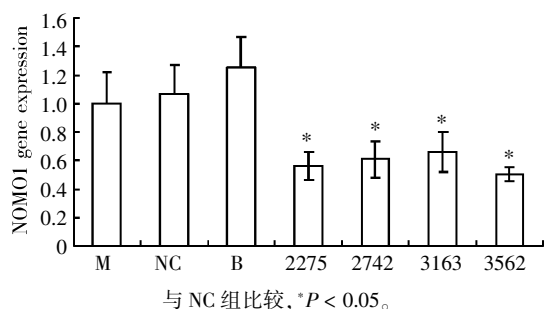


图 2 不同 RNAi 序列对 P19 细胞 NOMO1 转录水平的抑制效率比较

Figure 2 Restraint effect of siRNA on the transcriptional level of NOMO1 in P19 cell

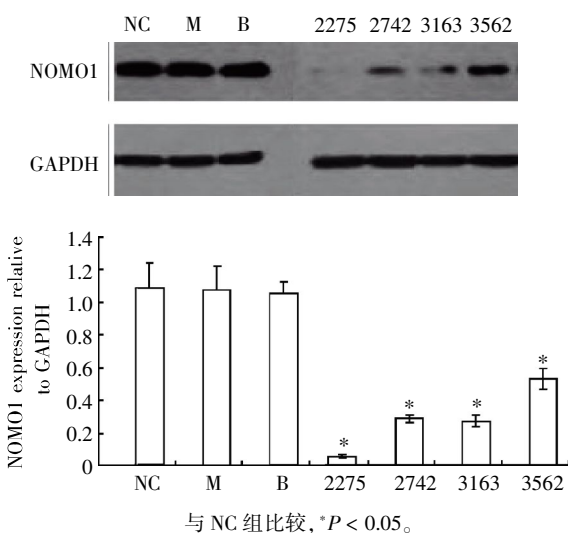


图 3 不同 RNAi 序列转染 P19 细胞后 NOMO1 蛋白表达水平

Figure 3 NOMO1 protein level in P19 cells transfected with different RNAi sequences

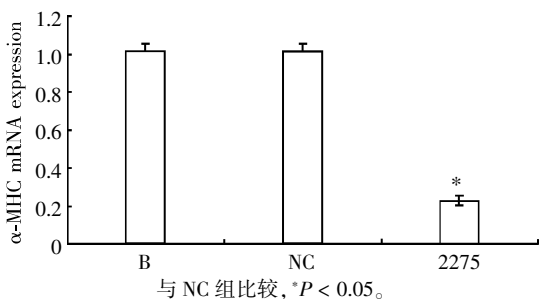


图 4 NOMO1-shRNA 抑制对 P19 细胞  $\alpha$ -MHC mRNA 表达的影响

Figure 4  $\alpha$ -MHC mRNA expression in P19 cells transfected with different RNAi sequences

### 3 讨论

本研究成功构建小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰

载体,为研究 NOMO1 基因与 P19 细胞向心肌细胞方向分化的关系提供了稳定转染细胞的工具。心脏发育过程受到多种信号通路的调控,如 BMP、FGF、Crescent、Shh/Ihh 等信号通路通过激活心脏转录因子 Nkx2.5、GATA4、myocardin 和 TBX5 表达而促进心脏中胚层的形成,而 Wnt/ $\beta$ -Catenin、Notch 和 Chordin 等信号通路则产生抑制信号<sup>[9]</sup>。Nodal 信号通路也是胚胎心脏发育过程中的关键信号通路之一<sup>[5]</sup>,Nodal 信号通路在脊椎动物胚胎发育的中胚层和内胚层诱导形成,左右不对称性的建立,神经外胚层沿前后轴线的分化等方面起着重要的作用<sup>[10]</sup>。该通路中的 Nodal 基因是转化生长因子- $\beta$ (TGF $\beta$ )家族成员之一,在脊椎动物早期发育多个过程中起关键作用<sup>[11]</sup>。Nodal 与 ALK4 和 ActR II、ActR II B 受体结合后,激活 Smad2,作用于 Smad4 后信号传递至核内产生生物学效应<sup>[12]</sup>。同时,Nodal 信号通路还受调节因子的调控,Lefty 负反馈抑制调节 Nodal 信号通路<sup>[13-14]</sup>,Dpr2 在胚胎发育过程中可下调 Nodal 活性<sup>[15-16]</sup>。本课题组对 CHD 致病基因及心脏发育相关基因开展了一系列研究。运用抑制性差减杂交 (suppressive subtractive hybridization,SSH) 技术成功构建了差减文库,并获得大量室间隔缺损患者心肌组织差异表达基因,发现 Nodal 信号通路相关的 NOMO1 基因在室间隔缺损患者心肌组织中低表达<sup>[6]</sup>。研究表明,NOMO1 基因编码的蛋白是新发现参与调控 Nodal 信号通路蛋白复合体的组成部分,具有调控 Nodal 信号通路的作用。NOMO1 在中胚层和内胚层发育过程中抑制 Nodal 信号通路<sup>[17-18]</sup>。NOMO1 基因表达与 Nodal 信号通路调控相关,但其对心肌细胞的生长和发育以及在心脏发育过程中的作用仍不清楚。

P19 细胞是一种小鼠胚胎畸瘤细胞,在体外培养条件下能保持未分化状态,通过条件培养可被诱导为包括心肌细胞、骨骼肌细胞、神经元在内的多种类型细胞<sup>[10]</sup>。研究显示,P19 细胞向心肌细胞分化过程中,其细胞发育相关基因的表达及电生理学特征基本模拟了正常小鼠心肌发育过程,目前已被认为是研究心肌细胞发育的良好体外模型系统<sup>[9]</sup>,本课题组也有相关的研究报道<sup>[19]</sup>。

目前 siRNA 的制备方法分别是:化学合成法、体外转录法、酶切长链 dsRNA 法、载体表达法和表达框架法。前 3 种方法是在体外制备 siRNA,然后通过转染或电转的方法导入细胞内;后 2 种方法则依赖能够表达 siRNA 的 DNA 载体或基于 PCR 的表

达框架转染到细胞中,通过转染细胞的 DNA 模板在体内的转录得到 siRNA。与其他方法相比,载体表达法具有成本低、抑制时间长且稳定的优势。其载体分为病毒载体和质粒载体。质粒载体可在胞内持续产生 siRNA 来抑制靶基因的表达,适于长期实验研究。本研究利用 Designer3.0 软件设计小鼠 NOMO1 基因干扰片段,合成 4 个 shRNA 序列,构建 pGPU6/Hygro-NOMO1-shRNA 重组载体,经 RT-PCR 技术,证实根据 4 个位点设计的干扰质粒均对 NOMO1 在 P19 细胞中的 mRNA 表达有较高的抑制效率,成功构建了小鼠 NOMO1 基因 RNA 干扰载体,为研究 NOMO1 基因与 P19 细胞向心肌细胞方向分化的关系提供了稳定的转染细胞工具,同时转染后的 P19 细胞中  $\alpha$ -MHC 基因表达下调, $\alpha$ -MHC 是反映向中胚层(心肌分化早期)分化的标志基因<sup>[20]</sup>,NOMO1 基因 shRNA 抑制后显著下调  $\alpha$ -MHC 的表达,提示 NOMO1 可能通过诱导  $\alpha$ -MHC 等基因表达,促进 P19 干细胞向中胚层的分化。

[参考文献]

- [1] Hoffman JI. Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence[J]. *Pediatr Cardiol*, 1995, 16(3): 103-113
- [2] Wenxiang D. Status of paediatric cardiac surgery in China [J]. *Heart Lung Circ*, 2001, 10(2): A16-19
- [3] Weismann CG, Gelb BD. The genetics of congenital heart disease: a review of recent developments [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2007, 22(3): 200-206
- [4] Montano MM, Doughman YQ, Deng H, et al. Mutation of the HEXIM1 gene results in defects during heart and vascular development partly through downregulation of vascular endothelial growth factor [J]. *Circ Res*, 2008, 102(4): 415-422
- [5] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart [J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1922-1927
- [6] Zhang H, Zhou L, Yang R, et al. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 135-144
- [7] van der Heyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2): 292-302
- [8] van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y. P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2): 410-422
- [9] Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis [J]. *Dev Biol*, 2003, 258(1): 1-19
- [10] Aoki TO, David NB, Minchiotti G, et al. Molecular integration of casanova in the Nodal signalling pathway controlling endoderm formation [J]. *Development*, 2002, 129(2): 275-286
- [11] Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation [J]. *Development*, 2007, 134(6): 1023-1034
- [12] Schier AF. Nodal signaling in vertebrate development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 589-621
- [13] Branford WW, Yost HJ. Nodal signaling: Cryptic Lefty mechanism of antagonism decoded [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(9): R341-343
- [14] Smith JR, Vallier L, Lupo G, et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm [J]. *Dev Biol*, 2008, 313(1): 107-117
- [15] Iratni R, Yan YT, Chen C, et al. Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1 [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1996-1999
- [16] Zhang L, Zhou H, Su Y, et al. Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors [J]. *Science*, 2004, 306(5693): 114-117
- [17] Haffner C, Frauli M, Topp S, et al. Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists [J]. *EMBO J*, 2004, 23(15): 3041-3050
- [18] Haffner C, Dettmer U, Weiler T, et al. The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-nodal modulator (NOMO) membrane protein complex [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10632-10638
- [19] 卓莉莉, 龚杰, 周蕾, 等. P19 细胞向心肌细胞分化过程中 ZNF207 基因的表达变化 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(8): 781-784
- [20] Koike M, Sakaki S, Amano Y, et al. Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104(4): 294-299

[收稿日期] 2012-05-27