

鸡与鹌鹑属间杂交早期胚胎 *bcl-2*、*P53* 基因表达的差异及发育性变化

乔爱君, 李大全, 马文霞, 廖和荣, 李岩, 赵宗胜

(新疆石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 【目的】探讨细胞凋亡因子 *bcl-2*、*P53* 对鸡与鹌鹑属间杂交早期胚胎发育的影响。【方法】人工授精获得鸡(♂)与鹌鹑(♀)杂交种蛋, 按照鸡标准孵化条件同批入孵, 随机采集 66、72、78、84、90、96、102、108、114、120 h 活胚。采用 RT-PCR 方法, 用 *Wpkci* 和 β -*actin* 引物进行多重 PCR 鉴定胚胎样本性别, 后选取各时间点雌、雄胚胎各 4 枚, 以 β -*actin* 为内标, 测定 *bcl-2*、*P53* 的 mRNA 相对丰度。【结果】(1) 雄性胚胎 66~114 h *bcl-2* mRNA 表达维持在较低水平, 96 h 有所降低, 随后回升到原水平, 120 h 极显著升高 ($P < 0.01$), 达到峰值; 雌性胚胎 66~114 h *bcl-2* mRNA 表达维持在较低水平, 114 h 极显著升高 ($P < 0.01$), 此后维持在较高水平, 120 h 达到峰值。不同日龄之间的比较, 114 h 雌性表达显著高于雄性 ($P < 0.05$); (2) 雌、雄胚胎 *P53* mRNA 发育性表达模式基本一致。66 h 表达水平较高, 72 h 表达降低, 达到低谷, 雄性达到显著 ($P < 0.05$), 雌性整体差异不显著, 随后上升维持在原水平; 不同日龄之间表达差异不显著。【结论】114 h 雌性胚胎 *bcl-2* mRNA 表达高峰点与其 *P53* *bcl-2* 表达最低水平相吻合; 72 h 雌、雄胚胎 *P53* mRNA 表达与 *P53* *bcl-2* 表达水平一致, 处于低谷点; 72、114 h 早期杂交胚胎 *bcl-2*、*P53* 基因表达出现异常。

关键词: 鸡; 鹌鹑; 杂交早期胚胎; *bcl-2*; *P53*; 表达

The Expressional Differences and Developmental Changes of *bcl-2*, *P53* Gene in Early Embryos of Generic Hybrids of Chicken-Quail

QIAO Ai-jun, LI Da-quan, MA Wen-xia, LIAO He-rong, LI Yan, ZHAO Zong-sheng

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang)

Abstract: 【Objective】To investigate the influences of apoptotic factors *bcl-2*, *P53* on early embryos of generic hybrids of chicken-quail. 【Method】The cross-bred eggs of quail(♀) acquired artificially inseminated by chicken(♂)-semen, hatched the eggs in one batch according to the standard condition of chicken, and collected the early living-embryos of 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 and 120 h at random. The method of RT-PCR was used to multiply PCR to identify and clarify the quail's sex and embryo sex with primers of *Wpkci* and β -*actin*, then selected four embryos of female and male respectively at each period, taken β -*actin* for internal standard to determine the relative quantity of embryo *bcl-2* and *P53* mRNA. 【Result】(1) The *bcl-2* mRNA expression of 66-114 h of male embryos maintained lower level, declined on 96 h, then reached the initial level, rose distinctly on 120 h ($P < 0.01$) and reached the peak; the *bcl-2* mRNA expression of 66-114 h of female embryos maintained lower level, rose distinctly on 114 h ($P < 0.01$), then maintained higher level and reached the peak on 120 h; the female *bcl-2* mRNA expression of 114 h was significantly higher than male of the same days ($P < 0.05$); (2) The patterns of *P53* mRNA expression of male and female embryos were basically consistent. They were higher on 66 h, declined on 72 h ($P < 0.05$) and reached the lowest level, declined distinctly in male, but the whole differences were not significant in female, then reached and maintained the initial level. Compared the expression between different sexes, the differences were not significant. 【Conclusion】At 114 h the expressional peak of *bcl-2* mRNA of female embryos coincide with its *P53*/*bcl-2* lowest expressional level; At 72 h *P53* mRNA expressional quantity of male and female embryos were consistent

收稿日期: 2006-11-29; 接受日期: 2007-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30360071;30660125)

作者简介: 乔爱君 (1981-), 男, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传与动物育种。E-mail: qiaojun1981@163.com。通讯作者李大全 (1937-), 男, 北京人, 教授, 研究方向为动物遗传育种。Tel: 0993-20587227; E-mail: lidaquan37@sohu.com

with their *P53/bcl-2* expressional level, both were at low level. At 72, 114 h the *bcl-2*, *P53* mRNA expression of early embryos of hybrids were abnormal.

Key words: Chicken; Quail; Early embryo of hybrids; *bcl-2*; *P53*; Expression

0 引言

【研究意义】鸡与鹌鹑的属间杂交是禽类中典型的远缘杂交，其杂交种在生长势、体型、肉质等生产性能方面结合了父母双方的优点^[1]，是动物遗传的良好研究材料。然而其杂交仍然面临异种生殖细胞的不亲和及杂种不育的问题，从分子水平上揭示胚胎早期死亡、杂交不亲和的机理一直是本课题研究的核心之一，这将为其在畜牧业生产中的应用奠定理论基础，并将为人们带来新的高品质禽产品；同时也为其它远缘杂交提供理论参考。【前人研究进展】鸡与鹌鹑的正交组合先后于美国、日本、马来西亚杂交成功，中国于1992年取得成功^[2]。Yoshihiro 研究鸡与鹌鹑杂交种性比率时发现，入孵72~120 h的子一代雏胚有公有母，而在以后各阶段以及出壳后通过细胞学检验全部为雄性，观察了孵化72 h受精蛋，发现母雏胚胎发育不正常，大多数雄性胚胎发育正常，雌性胚胎发育早期，细胞分化活动终止，杂种雌性胚胎早期死亡^[3]。近年来国内学者的研究结果与前人一致，李岩等发现孵化出的杂交种睾丸未发育，杂交种单性不育的程度较大^[4]。*bcl-2*、*P53* 基因都是细胞凋亡的关键基因，鸡的 *bcl-2*、*P53* 基因相继得到克隆。学者们研究了它们在鸡的各器官、组织及胚胎中的分布、表达和功能，发现它们的表达受各种因素的调控^[5]。张书霞等研究报告 *bcl-2* 直接调控鸡免疫器官中的细胞凋亡，在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达与细胞凋亡率之间呈反向关系^[6]。Valerie 等发现 *P53* 在鸡胚外胚层细胞有丝分裂过程中纺锤丝的形成中发挥了重要作用^[7]；李金龙等发现低浓度镉引起的鸡脾脏淋巴细胞凋亡与 *P53* mRNA 表达密切相关^[8]。【本研究切入点】鸡和鹌鹑胚胎发育早期各个时间段 *bcl-2*、*P53* 基因表达模式的研究尚未见报道，本试验以杂交种早期胚胎的性别鉴定结果为前提，检测 *bcl-2*、*P53* 在发育早期表达的时序性和在雌雄体表达的差异。【拟解决的关键问题】通过对胚胎期细胞凋亡关键因子的研究来进一步寻找导致胚胎死亡的原因。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验设计

2006年3月于石河子大学实验站选取产蛋高峰期朝鲜雌性鹌鹑(*Coturnix coturnix*)、成年种公鸡(*Gallus gallus*)，采用人工授精获得鸡与鹌鹑杂交种蛋，同批孵化获取发育早期(66~120 h)胚胎，并采集成年雄性、雌性鹌鹑的肝脏、肾脏、睾丸(卵巢)，于液氮速冻，后转入-80℃冷冻备用。采用RT-PCR方法，以已知性别的成体鹌鹑做外参照，鉴定杂交胚的性别，然后分别测定发育早期 *bcl-2* 和 *P53* mRNA 的相对丰度。

1.2 试剂

Trizol 试剂、M-MLV、DNase-I、RNasin、Random primer 购自 Promega 公司，MOPS、DEPC 购自上海生物工程公司，pUC19 DNA/*Msp* I 购自 Sigma 公司，Taq 酶购于北京天为时代科技有限公司，引物由上海生物工程公司合成，琼脂糖(西班牙分装)购自华美生物工程公司，普通生化试剂(国产分析纯)。

1.3 RT-PCR

1.3.1 总 RNA 提取 按 Trizol 试剂的说明提取总 RNA，紫外比色法测定样品总 RNA 浓度(260 nm)，用 1.4% 甲醛变性琼脂糖凝胶分析总 RNA 的完整性。28S : 18S 灰度比约为 2.0，无拖尾现象和其它杂带，表明 RNA 样品质量可靠。

1.3.2 反转录(RT) 用随机引物对样品总 RNA 进行反转录，获得各样品的 cDNA。反转录体系：3 μg 总 RNA、5 μmol Random primer、0.5 mmol·L⁻¹ dNTP、20 U RNasin、200 U M-MLV、10 μl 5×RT buffer (含 250 mol·L⁻¹ Tris HCl (pH 8.3)、50 mol·L⁻¹ MgCl₂、250 mol·L⁻¹ KCl、50 mol·L⁻¹ DTT、2.5 mol·L⁻¹ Spermidine)，总反应体积为 50 μl。反转录时，先将 RNA 模板、dNTP 和随机引物在 65℃ 变性 5 min，立即置冰上冷却，然后加其余试剂，37℃ 反应 60 min，95℃ 变性 5 min。

1.3.3 PCR 反应 参考 GenBank 鹌鹑 *Wpkci* (AB033881)、*β-actin* (AF199488) 和鸡 *bcl-2* (Z11961)、*P53*(X13057)的 cDNA 序列，用 DNAMAN 和 Primer 5.0 设计引物。引物序列及扩增条件见表 1，每样品重复 2 次；同时用 ddH₂O 和 RNA 样品代替 RT 产物作对照，以检验是否有外源 DNA 和基因组 DNA 污染，并用混合样品(待测定量样品等比例混合)来建立最佳反应条件和校正不同批次间反转录和 PCR

效率的差异。

PCR 反应体系: 1 μl 反转录产物、2U Taq 酶、2.5 μl 10 \times PCR buffer (含 50 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris HCl (pH 9.0)、100 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、50% Glycerol、10% TritonX100)、0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、1.0~2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 目的基因引物和

适量 β -actin 引物。

1.3.4 电泳及灰度分析 取 10 μl PCR 产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳。图象处理及灰度分析用 Kodak ID Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 软件处理。根据目的基因和 β -actin PCR 产物的灰度比来确定样品中目的基因 mRNA 表达的相对含量。

表 1 基因引物序列及 PCR 条件

Table 1 Conditions of PCR and parameters of oligo-nucleotide primer pairs

基因	GenBank 登录号	引物序列 (5'→3')	PCR 产物 (bp)	PCR 条件
Gene	GenBank No.	Sequence of primer (5'→3')	PCR products	PCR condition
<i>Wpkci</i>	AB033881	F:ATGGCCGGCGGATCGTTAGGT R:GCAAACGTCTTATCCAGGAGGCTGG	402 (7~408)	2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s
β -actin	AF199488	F:TGAACCCCAAAGCCAACAG R:CCACAGGACTCCATACCCAAG	490 (266~755)	2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s
<i>bcl-2</i>	Z11961	F:AGAGGGACTTCGCCAGAT R:AGGCATCCCATCCTCCGT	267 (366~632)	2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s
<i>P53</i>	X13057	F:CCCATCCTCACCATCCTTACA R:CTTCAGCATCTCATAGCGGC	270 (769~1038)	1.8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s

1.4 数据分析

数据用 SPSS 13.0 软件处理, 文中数据均为平均数 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm\text{SE}$), 双因子方差分析、独立样本 *t* 检验、单因子方差分析 (One-Way ANOVA, LSD) 检验试验结果的差异显著性并进行多重比较。

2 结果与分析

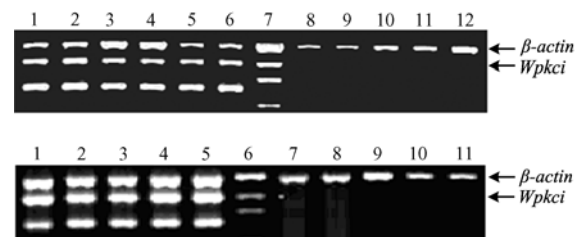
2.1 多重 PCR 鉴定早期胚胎性别

从图 1 可以看出, 用 *Wpkci*^[9] 和内标 β -actin 双基因对未知性别的鸡与鹌鹑杂交胚胎 cDNA 进行扩增时, Marker 左侧样本得到了 490、402、296 bp 共 3 条特异条带, 右边的样本只得到 490 bp 1 条带, 与图 1 下双基因扩增已知性别鹌鹑 cDNA 的鉴定结果一致, 可以确定 Marker 左侧胚胎样本为雌性, 其右边的胚胎样本为雄性。

2.2 早期胚胎 *bcl-2* mRNA 表达的差异及发育性变化

如图 2 所示, 雄性胚胎 66~114 h *bcl-2* mRNA 表达维持在较低水平, 96 h 有所降低, 后回升到原水平, 120 h 极显著的升高 ($P<0.01$), 达到峰值; 雌性胚胎 66~108 h *bcl-2* mRNA 表达维持在较低水平, 102 h 有上升趋势, 但差异不显著, 114 h 极显著升高 ($P<0.01$), 此后维持在较高水平, 120 h 达到峰值。不同日龄间的比较, 114 h 雌性 *bcl-2* mRNA 表达显著高于雄性 ($P<0.05$)。

2.3 杂交早期胚胎 *P53* mRNA 表达的差异及发育性变化

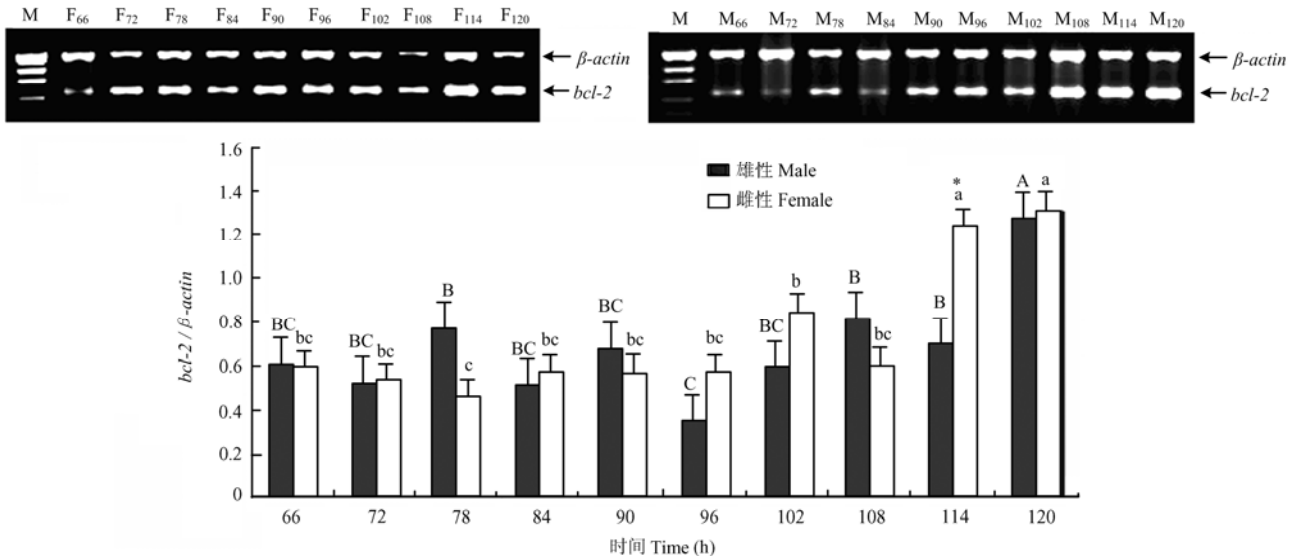


上: 未知性别的鸡与鹌鹑杂交种 cDNA 的扩增结果; 1~6 泳道为雌性杂交种扩增结果; 泳道 7 为 DNA 分子标记 pUC19; 8~12 泳道为雄性杂交种扩增结果。下: 已知性别鹌鹑 cDNA 的扩增结果; 1~5 泳道为雌性鹌鹑扩增结果; 泳道 6 为 DNA 分子标记 pUC19; 7~11 泳道为雄性鹌鹑扩增结果

Upper panel: the results of amplified hybridizations'cDNA of unknown sex; lanes 1-6 are the amplified results of female hybrids; lane 7 is DNA molecular marker pUC19; lanes 8-12 are the amplified results of male hybrids. Lower panel: the results of amplified quails'cDNA of known sex; lanes 1-5 are the results of amplified female quails; lane 6 is DNA molecular marker pUC19; lanes 7-11 are amplified results of male quails

图 1 *Wpkci*、 β -actin 基因进行多重 PCR 鉴定性别电泳图
Fig. 1 The results of sex identification by multi-plex PCR with double genes *Wpkci* and β -actin

如图 3 所示, 雌、雄胚胎 *P53* mRNA 发育性表达的模式基本一致。66 h *P53* mRNA 表达水平较高, 72 h 降低, 达到低谷, 雄性达到显著水平 ($P<0.05$), 雌性整体差异不显著, 后上升维持在原水平, 雄性 102 h 有一个表达峰值, 雌性 120 h 达到峰值, 但整体差异都不显著。不同日龄之间无统计学差异。



上: 相对定量 RT-PCR 琼脂糖电泳图; M₆₆~M₁₂₀ 分别代表雄性 66~120 h 胚胎; F₆₆~F₁₂₀ 分别代表雌性 66~120 h 胚胎; M: Marker(pUC19 DNA/MspI)。下: 胚胎 mRNA 表达的发育性变化模式, n=4; 时间之间的比较用字母表示, 两两之间有任何一字母相同者为差异不显著(大写字母: 雄性; 小写字母: 雌性); 同时间不同性别之间的比较用 * 表示 (*: P<0.0)。下同
Upper panel: The results of relative quantity of RT-PCR; M₆₆-M₁₂₀ represents male embryos of 66-120 hours respectively; F₆₆-F₁₂₀ represents female embryos of 66-120 hours respectively; M: Marker (pUC19 DNA/MspI). Lower panel: The developmental pattern of embryo mRNA, n=4; letters represent comparison of different hours, columns with common letters mean no significant differences (capital letters: male; small letters: female); * represent comparison between different sex of the same hour (*: P<0.05). The same as below

图 2 杂交早期胚胎 *bcl-2* mRNA 表达

Fig. 2 *bcl-2* mRNA expression of early embryos of hybrids

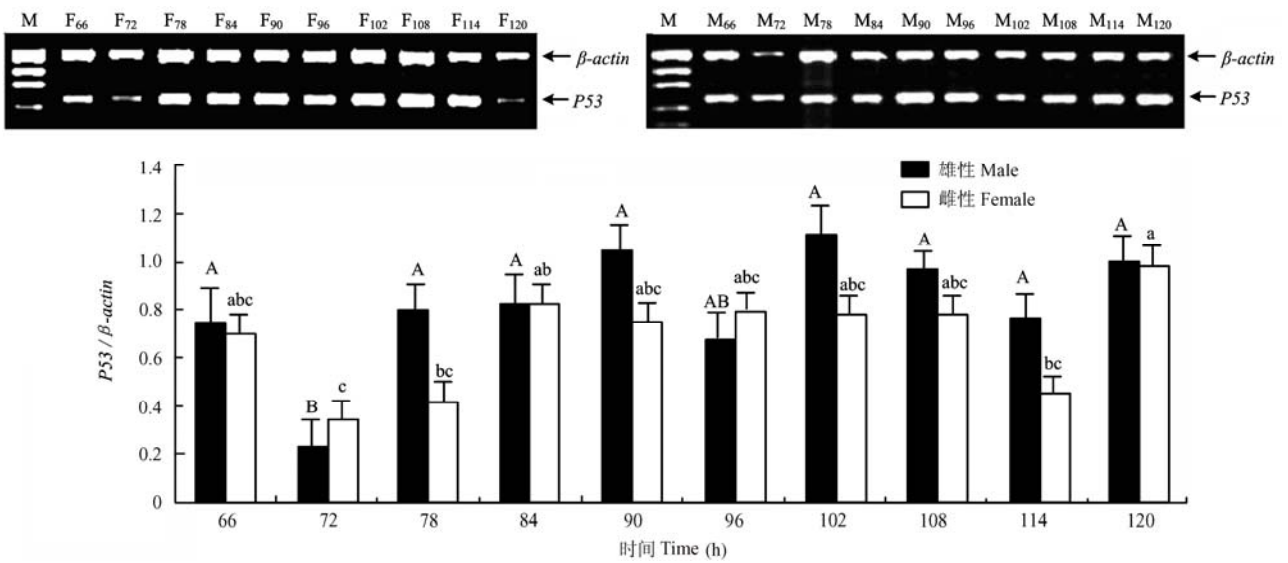


图 3 杂交早期胚胎 *P53* mRNA 表达

Fig. 3 *P53* mRNA expression of earlier embryos of hybrids

3 讨论

3.1 动物胚胎的形态和遗传发生过程中都存在细胞

凋亡现象, 它可以调节细胞平衡, 保证动物正常发育, 但凋亡转导途径一旦紊乱, 细胞增殖和死亡的比率就会发生改变, 继而引发疾病或者病理性症状^[10]。胚胎

期细胞凋亡主要受遗传、激素、凋亡及生长等因子的调控, 细胞程序化死亡 (PCD) 的放大效应及损伤性的细胞凋亡可引起胚胎畸形和发育异常^[11]。

3.2 *bcl-2* 和 *P53* 都是调控细胞凋亡的主要因子, 在凋亡转导途径中起关键作用, *bcl-2* 抑制细胞凋亡, *P53* 则促进细胞凋亡, *bcl-2* 蛋白直接或间接地与 *P53* 蛋白相互作用而调控细胞凋亡。有研究表明, *bcl-2*、*P53* 在胚胎分化和调节细胞生长过程中发挥了重要作用。细胞凋亡过程中 *P53* 表达升高与 *bcl-2* 表达下降存在严格的时序, *P53* 可能作为负调控转录因子而下调 *bcl-2* 的表达^[12]。鸡胚 192~288 h *bcl-2* 表达下降, 但 192 h 在小腿肌高度表达^[13]。外界的声音刺激可以改变鸡胚 *bcl-2*、*bax* 的表达水平, 使细胞增殖和分化^[14]。发育早期的鼠胚所有组织中 *P53* 高度表达, 组织分化末期表达有所下降, 蛋白的下降水平与其 mRNA 表达水平一致^[15,16]。本研究发现, 杂交胚胎发育早期雌、雄样本 *bcl-2*、*P53* 表达存在一定的时序性, 114 h 雌性胚胎 *bcl-2* mRNA 出现表达高峰, 较雄性 (120 h) 提前 (图 4-A), 雌、雄胚胎孵化环境一致, 说明此时雌性胚胎 *bcl-2* 表达异常; 72 h 雌、雄胚胎 *P53* mRNA 表达均处于低谷 (图 4-B), 这与前人研究结果不一致。

3.3 鼠胚中没有或检测不到 *P53* 表达时, 中枢神经发育异常; 人胚胎中枢神经系统 *bcl-2*、*P53* 能同时表

达, *P53/bcl-2* 的表达水平与细胞增殖活性呈反向关系^[17]。本研究发现, 72 h 雌、雄胚胎 *P53/bcl-2* 表达出现低谷, 此时 *P53* 表达也处于低谷; 114 h 雌性胚胎 *P53/bcl-2* 的表达水平降至最低谷, 雄性变化不大 (图 4-C), 说明胚胎大批死亡可能与这两个时间段细胞增殖活性过高有关。

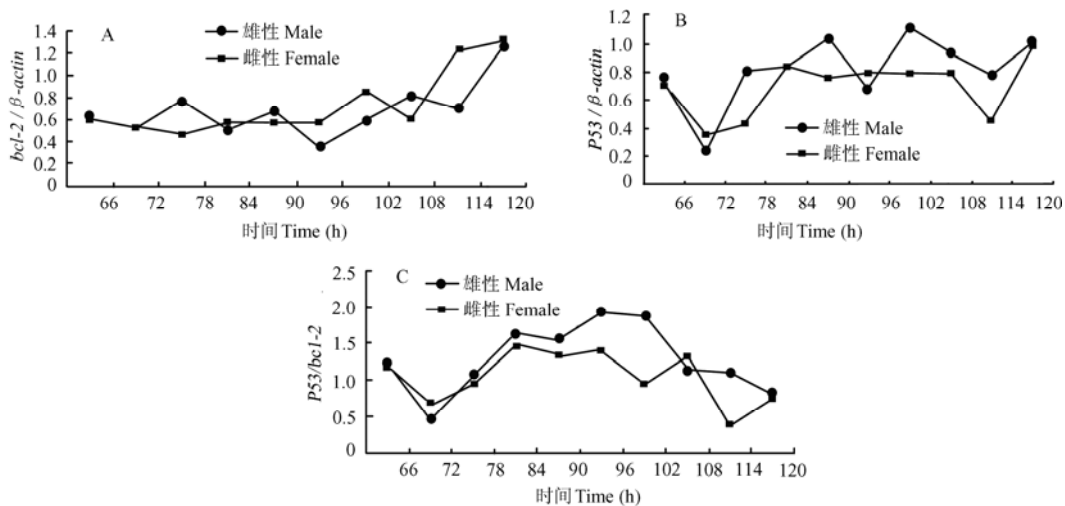
3.4 同正常胚胎发育比较, 本研究发现 72 h 雌、雄胚胎 *P53* 表达均出现异常, 水平降低; 于 114 h 雌性 *bcl-2* 表达出现异常, 水平升高, 推测这些时间点杂交胚胎细胞凋亡转导途径发生紊乱。基因表达异常点与余春梅研究早期杂交胚胎蛋白表达差异点相吻合, 且与观察早期胚胎大批死亡集中时间一致, 但这是否是导致早期胚胎死亡的原因需进一步研究。

4 结论

本试验以杂交胚的性别鉴定结果为前提, 检测了发育早期 *bcl-2*、*P53* 基因表达的相对丰度, 结果表明:

(1) 114 h 雌性胚胎 *bcl-2* mRNA 表达高峰点与其 *P53/bcl-2* 表达最低水平相吻合; (2) 72 h 雌、雄胚胎 *P53* mRNA 表达与 *P53/bcl-2* 表达水平一致, 处于低谷点。

本研究发现早期杂交胚胎 *bcl-2*、*P53* 基因表达出现异常, 与唐森森观察胚胎死亡的高峰期 69~72 h 一



A: 胚胎 *bcl-2* mRNA 表达的发育性变化模式。B: 胚胎 *P53* mRNA 表达的发育性变化模式。C: 胚胎 *P53/bcl-2* mRNA 表达的发育性变化模式

A: The *bcl-2* mRNA developmental patterns of embryos. B: The *P53* mRNA developmental patterns. C: The *P53/bcl-2* mRNA developmental patterns of embryos

图 4 早期杂交胚胎基因表达模式

Fig. 4 Gene expression patterns of early embryos of hybrids

致^[18], 结合前人研究推测这与细胞凋亡信号转导途径发生紊乱有关, 这是否导致早期胚胎死亡需进一步研究。

References

- [1] 焦丽萍. 鸡与鹌鹑属间杂交试验及其效果分析. 石河子大学硕士学位论文, 2001.
Jiao L P. The generic cross experiment and its' effective analysis in chicken and quail. The Master Dissertation of Shihezi University, 2001. (in Chinese)
- [2] 余春梅. 鸡与鹌鹑属间杂交不亲和性机理的研究. 石河子大学硕士学位论文, 2003.
Yu C M. The research of incompatible mechanism of the generic cross in chicken and quail. The Master Dissertation of Shihezi University, 2003. (in Chinese)
- [3] Yoshihiro T. The sex ratio of chicken-quail hybrids. *Japanese Poultry Science*, 1982, 19(1): 53-54.
- [4] 李岩, 赵宗胜, 孙杰, 李大全, 余春梅. 鸡、鹌鹑及其属间杂种解剖观察试验. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (3): 40-41.
Li Y, Zhao Z S, Sun J, Li D Q, Yu C C. The anatomical observation experiment of chicken, quail and their hybrids. *Helongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2003, (3): 40-41. (in Chinese)
- [5] 乔爱君, 郭庆河, 李大全, 廖和荣, 赵宗胜. 凋亡因子 *bcl-2*、*P53* 及其在鸡上的研究进展. 上海畜牧兽医通讯, 2006, (4): 9-11.
Qiao A J, Guo Q H, Li D Q, Liao H R, Zhao Z S. Apoptosis factor *bcl-2*、*P53* and their development of research on chicken. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006, (4): 9-11. (in Chinese)
- [6] 张书霞, 陈万芳. *Bcl-2* 在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达及其与细胞凋亡的关系. 南京农业大学学报, 1999, 22(4): 65-68.
Zhang S X, Chen W F. Relationship between *bcl-2* expression and apoptosis in chicken immune organs including adult and embryo. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(4): 65-68. (in Chinese)
- [7] Valerie B, Jennifer B, Jane N, Roger R. p53 Localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: An immunofluorescence study. *Experimental Cell Research*, 2000, 256: 122-130.
- [8] 李金龙, 徐世文, 熊永忠, 李术, 王秀荣. 镉致鸡脾淋巴细胞凋亡及对 p53mRNA 表达的影响. 中国环境科学, 2004, 24: 456-459.
Li J L, Xu S W, Xiong Y Z, Li S, Wang X R. Cadmium-induced apoptosis of chicken splenic lymphocytes and effects on expression of p53 mRNA. *China Environmental Science*, 2004, 24: 456-459. (in Chinese)
- [9] Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Mizuno S. *Wpkci*, encoding an altered form of *PKCI*, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11: 3645-3660.
- [10] 胡野, 凌志强, 单小云. 细胞凋亡的分子医学. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 60-76.
Hu Y, Ling Z Q, Shan X Y. *The Apoptosis of Molecular Medicine*. Beijing: Military Iatrology Press, 2002: 60-76. (in Chinese)
- [11] 孙超, 刘景生译. 信号转导与调控的生物化学(第三版). 北京: 化学工业出版社, 2005: 381-383.
Sun C, Liu J S. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* (3rd ed). Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 381-383. (in Chinese)
- [12] 王文恭, 童坦君. 小鼠成纤维细胞凋亡过程中 *P53* 与 *bcl-2* 表达的时序性. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14: 318-321.
Wang W G, Tong T J. The time order of *P53* and *bcl-2* gene expression in the apoptotic process of mouse fibroblast cell lines. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 14: 318-321. (in Chinese)
- [13] Equchi Y, Ewert D, Tsujimoto Y. Isolation and characterization of the chicken *bcl-2* gene: expression in a variety of tissue including lymphoid and neuronalorgans in adult and embryo. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 4187-4192.
- [14] Phalguni A, Tarashankar R, Neeta S, Shashi W. Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of *Bcl-2* and *Bax* to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. *Developmental Neuroscience*, 2005, 23: 363-373.
- [15] Haanen C, Vermes I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology*, 1996, 64: 129-133.
- [16] Peter S, Andreas L, Horst H, Mathias M. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development*, 1991, 113: 857-865.
- [17] Lichnovsky V, Kolár Z, Murray P, Hlobilková A, Cernochová D, Pospíšilová E, Vojtesek B, Nenutil R. Differences in p53 and *bcl-2* expression in relation to cell proliferation during the development of human embryos. *The Journal of Clinical Pathology*, 1998, 51: 131-137.
- [18] 唐森森. 鸡与鹌鹑杂交雌性胚胎早期死亡机理的研究. 石河子大学硕士学位论文, 2006.
Tang S S. The death mechanism of female embryos in chicken and quail hybridization. The Master Dissertation of Shihezi University, 2006. (in Chinese)

(责任编辑 高雨)