

文章编号: 1004-0374(2009)04-0542-07

DNA 甲基化修饰与体细胞核移植的关系

颜 昊^{1,2}

(1 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040; 2 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室,
上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040)

摘 要 成功的体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)有赖于供体细胞的基因组通过重编程恢复到支持胚胎发育的全能性状态。但是, 相比起自然受精后发生的重编程来说, 要诱导一个已经分化的供体细胞重编程为全能性状态, 往往在时间上和程度上都是迟滞的和不完全的。同时, DNA 甲基化状况又是影响克隆胚胎发育和基因表达的关键因素之一。因此, 深入研究主导 DNA 甲基化修饰的分子机理, 探讨 DNA 去甲基化在供体细胞重编程过程中扮演的角色, 从而进一步提高供体细胞重编程效率, 提高克隆胚的发育潜能, 这对于体细胞核移植效率的提高具有重要的意义。

关键词: DNA 甲基化; 体细胞核移植; 重构胚; 表观重编程

中图分类号: Q789; Q813; Q251 **文献标识码:** A

DNA-methylation modification in somatic cell nuclear transfer

YAN Hao^{1,2}

(1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China; 2 Key Laboratory of Medical Embryo Molecular Biology, Ministry of Health; Shanghai Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China)

Abstract: Reprogramming of a somatic nucleus to a totipotential state of supporting embryonic development is thought to be essential for successful cloning by SCNT (somatic cell nuclear transfer). Due to the evolved capacity of oocyte in normal fertilization, SCNT-induced reprogramming of a differentiated nucleus to a totipotential state is suboptimal in comparison with adequate and appropriately timed maternal and paternal genome reprogramming ensuing normal fertilization. Meanwhile, DNA-methylation pattern is one of the key factors which affect the development of SCNT-reconstructed embryos and gene expression profile. Hence, thorough understanding of the molecular mechanism underlying DNA-methylation modification and grasp of the knowledge about the role of DNA-demethylation in reprogramming of a donor nucleus, further enhancing the efficacy of this process and the developing potential of SCNT-reconstructed embryos are likely to have a significant impact on elevating the SCNT efficiency.

Key words: DNA methylation; SCNT; reconstructed embryo; epigenetic reprogramming

目前, 有相当数量的体细胞克隆动物面临着发育异常、出生前和围产期的高死亡率等问题, 诸如怀孕期延长、巨大儿、胎盘发育异常、心血管和呼吸系统异常、免疫缺陷、肥胖、肝肾功能异常、行为改变、新生儿疾病的易感性等等, 都可以归结为“巨大儿综合征”(large offspring syndrome, LOS)^[1]。但是, 表型异常的克隆动物其后代往往又具有正常的表型。这就告诉我们这种异常源自于克隆动物表

观遗传修饰的改变, 而非基因突变所致^[2]。目前认为, 这种现象与供体细胞重编程缺陷, 不能支持胚胎正常发育有关^[3]。然而, 对于能够驱动精子染色

收稿日期: 2009-05-11; 修回日期: 2009-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871379)

通讯作者: E-mail: yanhaojustin@yahoo.com.cn; Tel: 021-62472308

体进行重编程的卵母细胞来说, 将供体细胞重编程则是另外一回事。这也就不难理解为什么体细胞核移植中供体细胞的重编程并不那么理想了。因此, 找到一种能促进卵母细胞重编程供体细胞为全能性状态的方法, 对提高核移植的效率具有重要的意义。

1 表观遗传修饰机制

生物体能否正常发育取决于能否随着不同发育阶段对其基因表达进行精确的调控。在这里需要引出一个概念——细胞记忆 (cellular memory)。一个生物体中的所有细胞虽然拥有着相同的遗传物质, 但是却有着各自不同的表型和功能, 更重要的是这些特征是从发育早期就已经具备了, 即使经历了一生中无数次的细胞分裂, 却依然保存了下来。Feng 等^[4]提出细胞中存在外在 (apparent) 和内在 (intrinsic) 两种表观记忆 (epigenetic memory): 前者需要外界信号刺激来维持其持续性, 而后者则不需要。细胞分化或者细胞对外界环境刺激应答使特定基因暂时性沉默, 由外在记忆效应负责; 而内在记忆效应则负责对反转录病毒、转座子和能引起细胞转化的癌基因的沉默。两者扮演的角色各不相同。这种记忆效应之所以能够存在, 表观遗传修饰机制功不可没。这样就可以在不改变 DNA 序列的情况下, 保证细胞代与代之间遗传特征的稳定传递。其中, DNA 的甲基化和组蛋白修饰又是两个主要的机制^[5]。然而, 不同于组蛋白修饰, DNA 的甲基化是独一无二的, 因为它能独立、持久地引起表观记忆效应^[4]。简而言之, 把握住分化细胞的记忆效应, 从表观遗传修饰机制入手, 就可以重塑细胞的基因表达模式, 将分化细胞转变为支持胚胎发育的全能性状态。本文也将重点关注 DNA 的甲基化与体细胞核移植之间的关系。

1.1 组蛋白修饰 在细胞核中, 组蛋白不仅是组成核小体的结构成分之一, 也是调控基因表达的重要组成元件, 如组蛋白的尾部伸出核小体, 在翻译后会经历不同的修饰, 如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化等^[6]。这些修饰及其生物学功能的多样性表明存在一种组蛋白密码。组蛋白密码大大丰富了传统遗传密码的信息含量。这其中, 组蛋白乙酰化是最早被鉴定的修饰机制之一。以乙酰基基团的结合或去除, 来削弱或加强组蛋白与 DNA 之间的结合, 调节染色质的松弛或浓缩状态。它能作为一种信号, 改变相邻核小体上组蛋

白与组蛋白之间或组蛋白与调节因子之间的相互作用, 从而影响到核小体的结构, 形成一个更加开放适合转录的染色质环境, 进而决定基因的表达^[7]。传统观点认为组蛋白乙酰化是基因转录活跃的标记, 而去乙酰化常常代表转录的抑制。

1.2 DNA 甲基化修饰 在哺乳动物中, DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶 (DNA-methyltransferases, Dnmts) 的催化作用下, 在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价结合一个甲基基团而实现的。基因组中富含 CpG 的序列称为 CpG 岛。据估计, 在哺乳动物基因组约 2.5 万个基因中存在着 3 万—4 万个 CpG 岛^[8]。其中的绝大多数存在于管家基因的启动子中, 但也有一些存在于组织特异性基因中。对于哺乳动物而言, CpG 岛的甲基化状态是决定早期胚胎发育过程中, 基因组能否正常重编程、特定基因能否正常表达的关键因素之一^[9]。不同亚型的 DNA 甲基转移酶具有不同的功能。其中, Dnmt1 负责在 DNA 复制过程中, 半保留复制的子代 DNA 能完整的遗传到亲代 DNA 上的甲基化结构^[10]。Dnmt1 对于基因组中甲基化状态的维持具有重要作用。卵母细胞中的亚型 Dnmt1o 则负责维持母系印迹基因的甲基化状态。Dnmt3a 和 Dnmt3b 在 ES 细胞、胚胎和生殖细胞中均有表达, 负责 ES 细胞、早期胚胎、植入后胚胎和生殖细胞中印迹基因的从头甲基化, 对于生物体在发育过程中甲基化状态的建立非常重要^[11,12]。据推测, Dnmt3L 与 Dnmt3a 和 Dnmt3b 相互作用, 共同参与了雌性生殖系特异基因印迹的甲基化过程, 并且调控着雄性精子的发生^[12]。

哺乳动物基因组的甲基化状态决定着基因表达活性, 即基因在它不表达的组织中被甲基化, 而在特异表达的组织中呈去甲基化状态。传统的观点认为, DNA 的甲基化状态与染色质的构象密切相关, 且胞嘧啶的甲基化先于染色质构象变化。甲基化的 DNA 会被甲基化胞嘧啶结合蛋白识别并结合, 两者再与阻抑复合物结合, 后者含有的组蛋白去乙酰化酶可进一步抑制基因表达。未甲基化的 DNA 具有转录活性, 染色质结构松散, 更利于转录; 而甲基化的 DNA 其染色质结构致密, 不利于转录的发生。从这个角度来说, 胞嘧啶的甲基化起到了优先阻抑基因转录的作用。最近, 另外一种相反的说法认为, 染色质构象的变化影响决定着 DNA 的甲基化或去甲基化。

多年来, 一直认为由于 DNA 甲基转移酶的存在

在, DNA 的甲基化状态会伴随细胞的一生, 而不会改变。也就是说, 一个终末分化的细胞不可能再转分化成为另一类细胞或再次获得全能性状态。但是, 哺乳动物体细胞核移植技术的成功, 却挑战了这个经典的观念, 呈现出哺乳动物表观基因组的高度可塑性, 人们才发现 DNA 的甲基化其实是个可逆的过程^[13], 可随外界环境信号的变化而发生相应的改变。这种恢复分化的体细胞为全能性状态的过程就称为核的重编程。越来越多的基因被发现其激活与去甲基化状态也有着直接关系, 特别值得一提的是发育分化相关基因的激活^[14]。可以说 DNA 甲基化在基因组修饰和表达调控方面呈多样性变化。

以上的几种说法虽然观点相左, 但都已经注意到染色质的构象和 CpG 岛的甲基化是细胞记忆和维持细胞分化状态的基础。在核移植中, 表观遗传机制, 特别是 DNA 甲基化调节着供体细胞的重编程情况, 对恢复细胞的全能性状态, 提高 SCNT 的效率具有重要的意义。

2 体细胞核移植与 DNA 甲基化

虽然说, 到目前为止, 体细胞核移植是诱导体细胞表观遗传重编程最可靠的方法, 但相比起正常受精获得的胚胎所具有的充分和按时序进行的父源/母源基因组的重编程来说, 核移植来源的重构胚的重编程状态还远未达到要求。从对克隆胚进行的表观遗传情况的检测结果可以看出, 许多物种的重构胚的甲基化状态都不正常, 甚至它们相互之间的甲基化情况也都各不相同。Dean 等^[15]发现, 牛植入前克隆胚在不同发育阶段均表现出 DNA 甲基化情况的异常。对自然受精胚胎和克隆胚的比较研究发现, 两者的 DNA 甲基化情况是不同的。克隆胚的 DNA 甲基化情况更接近于体细胞, 即其供体细胞核的重编程不完全。供体细胞的表观遗传修饰不能被完全去除, 就难以恢复到早期合子细胞的全能性状态。

尽管大多数的重构胚不能发育完全并最终获得克隆后代。但毕竟也得到了一些克隆胚来源的克隆动物。这都是处于终末分化的体细胞做不到的。这就说明, 供体细胞的 DNA 在一定程度上也发生了重编程。针对灵长类动物进行的实验发现, 在卵母细胞的诱导作用下, 供体细胞的确发生了重编程^[16]。只是, 克隆来源的重构胚的表观遗传重编程情况充满了复杂性、偶然性和随机性。

DNA 甲基化可通过直接与反式作用因子互作,

即干扰转录因子与基因调控区 DNA 及其相关蛋白的结合; 或间接性地通过改变染色质构象, 进而控制诸如 X-染色体失活、基因印迹和端粒长度恢复等过程, 来达到调控基因表达的目的。

2.1 X-染色体失活 DNA 的甲基化修饰在 X-染色体失活过程中扮演着重要的角色。X-染色体随机失活主要取决于 X-染色体失活中心的 *XIST* 基因转录的起始。在哺乳动物雌性胚胎发育的早期, 随机任意一条 X-染色体上的 *XIST* 在转录成 RNA 后并不翻译, 而是附着在这条即将失活的 X-染色体 (inactive X chromosome, Xi) 上, 再辅以一系列的染色质修饰, 而使绝大多数基因失去转录活性。需要特别提到的是, 失活 X-染色体上 *XIST* 基因的 5' 端是非甲基化的, 而在活性 X-染色体上是甲基化的; 而且源自内细胞团的细胞其 X-染色体会随机失活, 而来自滋养层中的细胞会优先选择父系 X-染色体失活^[17]。这似乎表明哪条 X-染色体会失活是由基因印迹所决定的。供体细胞中两条 X-染色体, 只有一条具有活性, 重构胚必须首先重新激活另一条失活的 X-染色体, 才能将两者之一再次失活。在鼠的克隆胚中, 原本失活的 X-染色体被重新激活。然而, 在随后的发育中, 特别是妊娠中后期胎盘中出现了 X-染色体连锁基因的异常表达^[18]。这种 X-连锁基因的异常表达, 被认为对胚胎发育产生了不利的影响^[19]。*XIST* RNA 的附着一旦开始, 失活 X-染色体上就会发生一系列的染色质修饰, 诸如 H3-K4 去甲基化、H3-K9 和 H3-K27 上的甲基化, 随后诱发转录沉默和复制的延迟^[20]。已经在牛和其他物种的雌性胚胎中发现, 自 *XIST* 转录开始, 两条 X-染色体复制就变得不同步了。待发育到桑椹胚, 牛雌性胚胎的一些卵裂球中就出现了延迟复制的 X-染色体, 随着胚胎的继续发育, 这种卵裂球会越来越多^[21]。更多的证据表明, 体内胚与包括克隆胚在内的体外胚之间在表观遗传重编程方面存在着差异, 而其中外界培养条件是主要影响因素之一^[22]。早在 1993 年, Yadav 等^[23]就发现, 相比起雌性胚胎, 雄性胚胎会更快的发育到囊胚。由体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 得到的体外胚及其动物的性别更倾向于雄性^[24]。还有的研究发现, 体外培养基的组成成分对胚胎的发育和性别取向也有影响。在体外受精后的第 7 d, 从葡萄糖含量高的培养基中会获得更多的雄性胚胎^[25]; 在培养基中加入血清并与体细胞共培养, 会使许多的雌性胚胎阻滞于发育的桑椹期^[26]。也就

是说,这两种培养条件更适合于雄性胚胎的发育,而对雌性胚胎的发育是不利的。而且,体外培养温度过高,也不利于雌性胚胎的发育^[27]。也许,其中的原因之一就是体外操作及培养条件影响了X-染色体的正常失活和X-连锁基因的表达。

这就提示可以通过诸如基因芯片等高通量手段,分别在表观遗传水平、转录水平和蛋白质水平找出在体内胚和克隆胚、雌性胚和雄性胚之间差异表达的基因,分析其中机制,并最终应用到实践中,改进实验操作规程和体外培养条件等影响因素,有目的地提高克隆效率。

2.2 基因印迹 基因印迹是指来自父母双方的等位基因在通过精子和卵子传递给子代时发生了修饰,使带有亲代印迹的等位基因具有不同的表达特征。也就是说,其表达依赖于亲本等位基因的遗传。即使双亲遗传给后代的基因完全相同,若印迹不同必定出现不同的效应。一般而言,基因印迹在配子发生过程中就开始了,只是不同的印迹基因开始形成印迹的时间各不相同。但目前已知的印迹基因都有一个共同特征,即发生了DNA甲基化。通常,印迹基因的标志往往就在印迹控制区(imprinting control regions, ICRs)上通过DNA的甲基化体现出来。经Dnmt 3a的催化,在CpG二核苷酸上结合上甲基基团,致使相应的等位基因沉默。来自父母双方的等位基因,在以各自独立的配子,到最终结合成受精卵发育的过程中,经历了一系列的甲基化修饰。配子阶段,精子和卵子均保持高甲基化状态。在受精后的几个小时内,雄原核迅速发生去甲基化,这似乎是一种由酶催化的主动过程;而雌原核的去甲基化是随着有丝分裂时染色体的复制而进行的,更加的被动和滞后^[28]。在哺乳动物胚胎发育早期,基因组DNA的甲基化状态又发生了改变,囊胚期基因组DNA发生了从头甲基化,内细胞团DNA和组蛋白呈高甲基化,明显区别于滋养外胚层细胞的相对低甲基化状态^[29]。父源和母源等位基因的不同修饰方式导致了不同的胚胎发育情况。母源印迹基因对胚胎正常发育尤为重要,而父源印迹基因则是滋养外胚层来源组织正常发育的关键。可见,对胚胎发育而言,亲本等位基因能否正常表达至关重要^[30]。有一种假说^[31]认为,基因印迹作为一种遗传机制参与到了哺乳动物胎儿的发育中,在胎儿期对胎儿营养物质的供应及储存进行调节。通常,胎盘中表达的遗传自父系的等位基因趋向于将母亲体内的营养成

分供应给胎儿;而源自母系的等位基因更趋向于限制这种转移,以保证母体的健康^[32]。如果这种假说成立,那么胎盘中印迹基因的表达情况在胎儿发育过程中扮演的角色就非常重要了。对胎盘的重要性,有一种说法认为它对体细胞表观遗传重编程存在的异常更加敏感。也可以认为,胎盘更需要正常的重编程修饰。Kim等^[33]在克隆牛和人工受精牛的胎盘中发现了60种差异表达的蛋白质。可以说,克隆动物中出现的许多表型缺陷都与胎盘发育功能异常相关^[34]。事实上,一些印迹基因只在胎盘中特异性地表达^[35]。在囊胚的滋养外胚层细胞中表达的基因也存在着异常。Wrenzycki等^[36]观察到,在滋养层细胞中特异表达的*IF-tau*基因在一些牛的克隆囊胚中异常表达。Jouneau等^[37]发现,向表型缺陷的小鼠克隆胚中导入胚胎干细胞或内细胞团细胞并不能完全修复异常表型;如果导入四倍体细胞,就可以达到修复的目的。而在那些没有明显的过度生长的克隆胎儿中,也依然会表现出胎盘形态的异常^[38]。

总体说来,许多表型异常的克隆动物都存在着不同程度印迹基因甲基化调节的异常^[18]。

2.3 端粒长度 端粒在维持真核动物线性染色体末端的完整性和防止染色体之间发生末端融合方面发挥着重要的作用。其由末端重复序列和特异性端粒酶共同组成的核蛋白复合体构成。从已有的报道可以看出,用于克隆的不同物种和组织来源的供核细胞其端粒长度存在着差别^[39]。在牛的克隆实验中,如果以肌肉细胞用作供体细胞,则重构胚端粒长度与相同年龄段的对照组相当;如果选用来自上皮组织的供核细胞,其端粒就会明显缩短^[39]。Enright等^[40]利用5-氮胞苷,一种DNA甲基转移酶的抑制物处理供体细胞,发现实验组的细胞多处于细胞周期的G₀/G₁期,呈长梭形,与基质连接松散;而对照组则大多位于S期,且胞质致密,更紧密地连接在培养基质上。Belloch等^[41]提到,相比起处于高甲基化状态的细胞来说,低甲基化的供体细胞对卵母细胞的重编程作用更加敏感,也具有更高的克隆效率。Beyhan等^[42]在基因转录水平上的研究表明,不同供核细胞对卵母细胞重编程的敏感度不同,会导致不同供核细胞来源的重构胚的重编程效果不同,而导致胚胎发育潜能的差异;而且即使不同供体细胞来源的囊胚基因表达情况类似,但转录后修饰的差异也会造成移植后发育水平的不同。基于以上研究结果,我们可以认为由于不同组织类型或不同时

相的细胞其甲基化情况或者说表观遗传修饰各不相同,才导致了这种现象的发生。Schaetzlein等^[43]在牛和鼠的克隆实验中发现,在桑椹胚向囊胚过渡时,存在一种端粒延长程序(telomere elongation program),用来重置端粒至特定的调定点。众所周知,从桑椹胚到囊胚的转换是植入前胚胎发育的重要环节,由此开始了胚胎的首次分化,形成了内细胞团和滋养层,同时也伴随着胚胎形态和基因表达方面的诸多改变。可以认为,如果此时重构胚没能完成重编程,或重编程进度滞后,就会影响到端粒长度的重置,胚胎就会停滞在桑椹胚期而不会继续发育下去,而影响到克隆效率。

既然在克隆实验中要求供体细胞从分化状态转变成具有支持胚胎发育能力的全能性细胞,这就需要重新思考怎样在体外降低细胞基因组DNA(如CpG岛)的甲基化程度,提高供体细胞、重构胚的重编程效率,恢复细胞的全能性状态。这对提高核移植获得的重构胚的发育潜能,提高克隆效率,具有着重要的意义。

3 体外诱导DNA去甲基化及卵母细胞重编程

到目前为止,对如何去掉DNA上的甲基基团还不是很清楚。Simonsson和Gurdon^[44]发现,蟾蜍卵母细胞的确拥有去甲基化的能力,只是具有一定的局限性,只对基因组中特定的甲基化位点有效。如此看来,卵母细胞的这种去甲基化能力并不适用于全基因组,而是有一定的选择性。

Byrne等^[45]发现,将鼠胸腺细胞转入蟾蜍卵母细胞后的第4d,*Oct4*基因才得以转录,出现了明显的延迟现象,如果在核移植前就将供体细胞中的抑制性蛋白脱去,这种延迟现象就会缓解到2d,如果将未甲基化的DNA(如导入细菌质粒中)转入卵母细胞,就不会出现这种延迟现象。这似乎说明,就算将供体细胞中全部的抑制性蛋白都去除掉,还是会出现基因延迟表达的情况。只有当DNA完成去甲基化,基因的表达才会得以进行。

在克隆实验前后,分别对供体细胞和重构胚施以药物处理,辅助重编程达到提高克隆效率的目的。Enright等^[46]分别以5-氮胞苷的脱氧衍生物5-氮-2'-脱氧胞苷和TSA处理供体细胞结果显示,以TSA处理供体细胞组得到了较高的囊胚率;在5-氮-2'-脱氧胞苷处理组中,重构胚向2-细胞期发育明显加快,但囊胚率并无显著提高。Blelloch等^[41]认为,这并非表明5-氮-2'-脱氧胞苷不能提高克隆

效率,而与药物具有的细胞毒性有关。Kishigami等^[47]在小鼠核移植实验中以一种组蛋白去乙酰化酶的抑制剂曲古抑菌素A(TSA)处理重构胚发现,与对照组比较,实验组囊胚率提高了2-4倍,并且产仔率达到了6.0%。虽然对不同来源的供体细胞效果不尽相同,但却不失为一种好的方法。对小鼠早期重构胚施以TSA处理不仅能够促进1-细胞期和2-细胞期重构胚中核的重塑,活产率也有了显著提高^[48]。Betthausen等^[49]的研究表明,利用核浆素(nucleoplasmin, NPL),一种促进染色质重塑的药物,能够提高囊胚率,提高克隆效率。在融合前后,分别施以药物,经超声探查胎儿心跳发现,供体细胞移入前注入100 ng/ μ L核浆素,实验组怀孕率达到了42.9%;移入细胞后注入500 ng/ μ L核浆素,实验组怀孕率达到48%;而同比对照组只有28.4%。虽然其中的机制还不是很清楚,但似乎和卵母细胞重编程能力的增强有关。

虽然特定的药物处理能够在一定程度上起到促进供体细胞去甲基化,提高卵母细胞重编程效率的作用,但由于细胞毒性的存在,致使胚胎发育情况并不乐观。因此,Eilertsen等^[50]利用siRNA技术敲减供体细胞中的Dnmt1,发现2-细胞期重构胚中*Dnmt1*的表达明显减少,囊胚率达到了50%,而对照组只有21%。Blelloch等^[41]发现,表达*Dnmt1*的亚效型等位基因(丧失部分功能)的成纤维细胞呈低甲基化,从其克隆胚中得到了更多的干细胞(65%);而使用野生型成纤维细胞的对照组只有25%。也有实验证明,敲除*Dnmt3a*和*Dnmt3b*能诱导ES细胞呈低甲基化状态^[51]。最近,Lluis和Cosma^[13]研究发现,调节Wnt/ β -catenin、MAPK/ERK和PI3K/Akt信号通路及一些转录因子的过表达,两者可协同作用促进体细胞的重编程。Bui等^[52]发现,生发泡期卵母细胞的胞浆裂解液具有促进体细胞重编程,辅助胚胎发育的功效,其中存在的重编程因子或许有助于提高克隆效率。

4 结语

综上所述,人们已经逐渐认识到DNA甲基化修饰在调节生物体基因时空表达方面的重要性。越来越多的研究表明,以不完全去甲基化为代表的胚胎基因组重编程的缺陷是导致克隆胚胎及克隆动物出现异常表型的关键影响因素之一,也是制约体细胞核移植技术在医药农业等领域更广泛、更深入应用的瓶颈所在。更加深入地了解调节细胞去分化、

再分化的分子机理, 修复细胞重编程中存在的缺陷, 将会有助于提高体细胞核移植技术的效率。

[参 考 文 献]

- [1] Smith SL, Everts RE, Sung LY, et al. Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of *in vitro* maturation, fertilization and culture. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(1): 38-47
- [2] Suzuki T, Kondo S, Wakayama T, et al. Genome-wide analysis of abnormal H3K9 acetylation in cloned mice. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1905
- [3] Suzuki J Jr, Therrien J, Filion F, et al. *In vitro* culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. *BMC Dev Biol*, 2009, 9: 9
- [4] Feng YQ, Desprat R, Fu H, et al. DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *PLoS Genet*, 2006, 2(4): e65
- [5] Dressler GR. Epigenetics, development, and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(11): 2060-7
- [6] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403(6765): 41-5
- [7] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 81-120
- [8] Niemann H, Tian XC, King WA, et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*, 2008, 135(2): 151-63
- [9] Farthing CR, Ficiz G, Ng RK, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet*, 2008, 4(6): e1000116
- [10] Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J*, 1992, 11(7): 2611-7
- [11] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99(3): 247-57
- [12] Hata K, Okano M, Lei H, et al. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002, 129(8): 1983-93
- [13] Lluís F, Cosma MP. Somatic cell reprogramming control: signaling pathway modulation versus transcription factor activities. *Cell Cycle*, 2009, 8(8): 1138-44
- [14] Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, 1999, 15(1): 34-7
- [15] Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13734-8
- [16] Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, Mar 27 [Epub ahead of print]
- [17] Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, et al. Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci*, 2006, 11: 852-66
- [18] Kang YK, Park JS, Koo DB, et al. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J*, 2002, 21(5): 1092-100
- [19] Dinnyes A, Tian XC, Yang X. Epigenetic regulation of foetal development in nuclear transfer animal models. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43, Suppl 2: 302-9
- [20] Chadwick BP, Willard HF. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(50): 17450-5
- [21] De La Fuente R, Hahnel A, Basrur PK, et al. X-inactive-specific transcript (XIST) expression and X-inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod*, 1999, 60(3): 769-75
- [22] Purpera MN, Giraldo AM, Ballard CB, et al. Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(8): 783-93
- [23] Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 1993, 36(4): 434-9
- [24] Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, et al. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 1999, 51(1): 59-70
- [25] Bredbacka K, Bredbacka P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1996, 106(2): 169-72
- [26] Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, et al. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 2001, 55(5): 1117-26
- [27] Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, et al. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, 2001, 55(1): 209-23
- [28] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403(6769): 501-2
- [29] Reik W, Santos F, Mitsuya K, et al. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, 358(1436): 1403-9
- [30] Cui XS, Zhang DX, Ko YG, et al. Aberrant epigenetic reprogramming of imprinted microRNA-127 and Rtl1 in cloned mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(2): 390-4
- [31] Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(5): 359-68
- [32] Constância M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature*, 2004, 432(7013): 53-7
- [33] Kim HR, Kang JK, Yoon JT, et al. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer. *Proteomics*, 2005, 5(16): 4264-73
- [34] Constant F, Guillomot M, Heyman Y, et al. Large offspring

- or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod*, 2006, 75(1): 122-30
- [35] Tveden-Nyborg PY, Alexopoulos NI, Cooney MA, et al. Analysis of the expression of putatively imprinted genes in bovine peri-implantation embryos. *Theriogenology*, 2008, 70(7): 1119-28
- [36] Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, 65(1): 309-17
- [37] Jouneau A, Zhou Q, Camus A, et al. Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation. *Development*, 2006, 133(8): 1597-607
- [38] Lee RS, Peterson AJ, Donnison MJ, et al. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod*, 2004, 70(1): 1-11
- [39] Miyashita N, Shiga K, Yonai M, et al. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod*, 2002, 66(6): 1649-55
- [40] Enright BP, Sung LY, Chang CC, et al. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2005, 72(4): 944-8
- [41] Bleiloch R, Wang Z, Meissner A, et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2007-13
- [42] Beyhan Z, Ross PJ, Iager AE, et al. Transcriptional reprogramming of somatic cell nuclei during preimplantation development of cloned bovine embryos. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 637-49
- [43] Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 8034-8
- [44] Simonsson S, Gurdon J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 984-90
- [45] Byrne JA, Simonsson S, Western PS, et al. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr Biol*, 2003, 13(14): 1206-13
- [46] Enright BP, Kubota C, Yang X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 896-901
- [47] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183-9
- [48] Maalouf WE, Liu Z, Brochard V, et al. Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev Biol*, 2009, 9: 11
- [49] Betthausen JM, Pfister-Genskow M, Xu H, et al. Nucleoplasmin facilitates reprogramming and in vivo development of bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(8): 977-86
- [50] Eilertsen KJ, Power RA, Harkins LL, et al. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(1-2): 129-46
- [51] Chen T, Ueda Y, Dodge JE, et al. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(16): 5594-605
- [52] Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, et al. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development*, 2008, 135(23): 3935-45