

DOI: 10.13376/j.cblls/2018043

文章编号: 1004-0374(2018)04-0345-09

· 专刊: 生物大分子动态修饰 ·



陈大华, 研究员、博士生导师, 中国科学院大学岗位教授, 中国科学院“百人计划”引进的学术带头人, 国家杰出青年基金获得者, 教育部“长江学者奖励计划”特聘教授, 科技部国家重大科学研究计划首席科学家, 中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室副主任。2016年度中国科学院杰出科技成就奖(个人)及谈家桢生命科学创新奖获得者。实验室以果蝇、斑马鱼等为模型, 系统研究生殖细胞发育和成体干细胞命运的调控机制, 以及核酸修饰的表观调控机制等。近年来, 陈大华研究员在 *Cell*、*Dev Cell*、*PNAS*、*PLoS Biol*、*JCB*、*Curr Biol*、*PLoS Genet*、*Development* 等主流杂志上发表一系列研究性论文, 在国内外产生重要影响。

干细胞中的DNA甲基化

程 郢, 张国强, 陈大华*

(中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: DNA 甲基化是表观遗传机制中一种重要的调控方式, 它通过调控基因的表达影响一系列的生物学过程。干细胞作为具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体, 其分化和再生过程必然受到精确的表观调控。DNA 甲基化在干细胞的维持、分化调控等方面都发挥着重要作用。现对胚胎干细胞、多能干细胞以及成体干细胞中 DNA 甲基化及羟甲基化的最新研究进展进行简要综述, 回顾并展望 DNA 甲基化在干细胞中的潜在生物学功能及调控机制, 同时为未来在临床诊断治疗及药物研发等方面提供一定的参考。

关键词: 甲基化; 去甲基化; 羟甲基化; 干细胞; TET

中图分类号: Q71; Q754; Q813 **文献标志码:** A

DNA methylation in stem cells

CHENG Ying, ZHANG Guo-Qiang, CHEN Da-Hua*

(State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: DNA methylation, an epigenetic mechanism, does not change DNA sequence but instead suppresses the transcription factor-DNA association, thereby regulating gene expression and a variety of cellular processes. Stem cells are undifferentiated cells that can differentiate into specialized cells and self-renew through mitosis, and are highly involved in epigenetic regulation. DNA methylation plays an important role in stem cell regulation and function. Here, we review the current knowledge and highlight the most recent advances about DNA methylation and hydroxymethylation in stem cells. Our current understanding of stem cell epigenetics and new advances in the field will stimulate further clinical applications of regenerative medicine in the future.

Key words: methylation; demethylation; hydroxymethylation; stem cells; TET

收稿日期: 2018-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(3159830021, 31671498)

*通信作者: E-mail: chendh@ioz.ac.cn

“表观遗传学”(epigenetics)是Conrad Waddington在大约80年前提出的一个专业术语,用于联结遗传学和发育生物学这两个重要的领域^[1]。目前对表观遗传学的定义是研究不改变DNA序列的基因表达和功能的遗传变化^[2]。表观遗传调控主要包括DNA甲基化修饰(如胞嘧啶甲基化、羟甲基化和最近重新发现的腺嘌呤甲基化)、组蛋白翻译后修饰(如甲基化、泛素化、乙酰化和磷酸化等)和非编码RNA介导的途径^[2-4]。

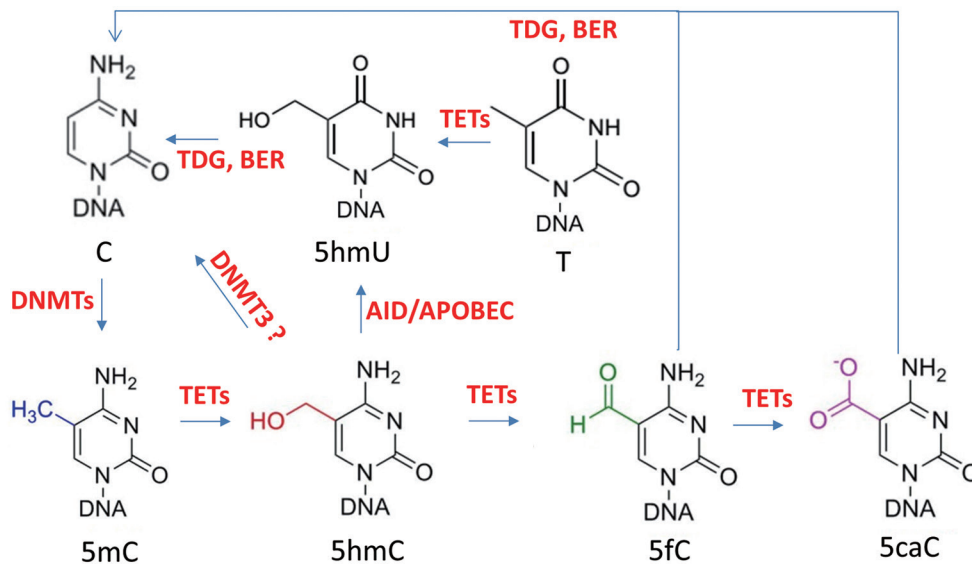
胞嘧啶第5位的甲基化(5-methylcytosine, 5mC)是脊椎动物中最主要的DNA甲基化修饰,在调节基因表达、染色质结构、基因印迹、X染色体失活和基因组稳定性等过程中起非常关键的作用^[5]。DNA甲基化通常与基因抑制相关联,维持适当的DNA甲基化状态对于机体正常发育至关重要,因此,异常的DNA甲基化模式与许多疾病的发病机理相关,包括神经疾病和癌症^[6-7]。

在哺乳动物中,干细胞是未分化的细胞,可以分化成特化的细胞并通过有丝分裂自我更新。一般来说,有两种类型的干细胞:来源于囊胚内细胞团的胚胎干细胞和存在于补充或修复成体组织的成体干细胞。通常可利用两种特性定义干细胞:长期自我更新的能力和分化成一种或多种特化细胞类型的能力。这些干细胞特性与表观遗传调控密切相关。例如DNA甲基化、组蛋白修饰和核小体重塑这些

被广泛研究的表观遗传修饰是胚胎发育、性染色体沉默、逆转录转座子和基因印记抑制的必要的表观遗传控制机制。本篇综述将主要对DNA甲基化在干细胞领域的最新研究进展进行简要论述。

1 DNA甲基化概述

DNA甲基化修饰是一种常见的表观遗传方式,是生物体在受到不同内源及外源性因子的刺激作用下,以S-腺苷基甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)为甲基供体,通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的生物催化,将甲基基团转移到DNA碱基的特定结构上。5mC通常发生在哺乳动物基因组中含有高频率CG二核苷酸区域的内部。DNMT家族的三个成员(DNMT1、DNMT3a和DNMT3b)负责保持和生成5mC(图1)。DNMT1通过在DNA复制过程中将现有的半甲基化DNA的模式复制到其子链中来维持细胞周期中的DNA甲基化。相比之下, DNMT3a和3b通过与不同相互作用的因子(包括组蛋白修饰体或转录抑制子)协调来创建新的甲基化基因区域,以实现其特异性,从而起到起始性(*de novo*)甲基转移酶的作用^[8]。DNA甲基化可以被一系列阅读器蛋白质所识别,如MeCP2(methyl-CpG-binding protein 2)和MBD1-4(methyl-CpG-binding domain protein 1-4)^[9-10]。这些蛋白质的异常表达往往具有严重的后果,如神经系



DNA甲基转移酶DNMTs将dC催化为5mC, TET家族蛋白将5mC氧化为5hmC, 并进一步氧化成5fC和5caC; 5hmC也可在脱氨酶AID/APOBEC作用下转变为5hmU; 这些催化产物都可以被TDG作用, 并触发后续的BER修复转变为dC。此外, TETs也可以将dT催化为5hmU。

图1 DNA 5mC甲基化及去甲基化调控信号网络

统疾病和癌症, 这些现象反映了 DNA 甲基化的重要性^[11-12]。

在很长的一段时间内, 5mC 都被认为是唯一有功能的 DNA 修饰类型。直到 2009 年, 两个不同的团队报道了 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hydroxymethylcytosine, 5hmC) 可能在发育和神经元活动中起到非常重要的作用^[13-14]。5hmC 最初于 1953 年在噬菌体中被发现^[15], 尽管早在 1972 年就在哺乳动物基因组中发现了 5hmC, 但对于 5hmC 产生的机制在很长的一段时间内都是未知的^[16]。Rao 和他的同事们证明了 TET1 (ten-eleven translocation 1) 是一种 2-酮戊二酸和 Fe²⁺ 依赖性酶, 可以氧化 5mC 转变为 5hmC^[14]。随后的研究表明, TET 家族蛋白 (TET1、TET2 和 TET3) 可以将 5hmC 进一步氧化成 5-甲酰胞嘧啶 (5-formylcytosine, 5fC) 和 5-羧基胞嘧啶 (5-carboxylcytosine, 5caC)^[17-19]。5fC 和 5caC 的都可以被胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (thymine DNA glycosylase, TDG) 剪切, 并触发后续的碱基切除修复 (base excision repair, BER), 这使人们对依赖 5mC 的调控途径有了全新的认识^[18, 20] (图 1)。5hmC 的整体水平在组织之间是不同的, 其在浦肯野神经元等脑组织以及胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 中高度富集, 大约是其他组织的 10 倍^[13-14]。5hmC 一开始被认为仅仅是去甲基化过程中的一个中间环节, 然而随后的研究证明, 5hmC 能够稳定地存在于大脑中, 并随着发育过程和年龄增长而增长^[21]。和 5mC 相似, 5hmC 也可以被特定的蛋白质识别^[22], 并且具有一定的生物学功能^[23]。

最近在高等真核生物, 包括绿藻、线虫、果蝇、蟾蜍、斑马鱼、猪和小鼠的基因组中, 发现了一种在原核生物中普遍存在的 N⁶-甲基腺嘌呤 (N⁶-methyladenine, m⁶A)^[24-30]。尽管这些研究表明 m⁶A 具有潜在在表观遗传作用, 但其确切的生物学功能仍然处在初期探索阶段。

2 DNA甲基化在胚胎干细胞和多能干细胞中的作用

2.1 胚胎干细胞中的甲基化和iPSCs重编程

哺乳动物中的 CpG 甲基化是一种特异的表观遗传机制, 可以促进基因表达的调节。除了 CpG 甲基化之外, 还可以将甲基添加到不在鸟嘌呤上游的胞嘧啶中, 这种形式的 DNA 甲基化被称为非 CpG 甲基化, 并且在植物中广泛存在。在哺乳动物中, 也有非 CpG 甲基化的报道, 如胚胎干细胞^[31-33]。

Dnmt1 对于小鼠胚胎发育必不可少, 而 *Dnmt1* 突变体小鼠的 ESCs 具有正常的自我更新, 但是分化受损^[34-35]。*Dnmt3a* 和 *Dnmt3b* 是小鼠早期发育所必需的, 靶向阻断这两种基因会阻断胚胎干细胞和早期胚胎中的新基因甲基化, 但是通常对甲基化印记模式的维持没有影响^[8]。然而, 对于在 mESCs 中包括 LINE-1 启动子的重复序列, 仅仅 DNMT1 对甲基化的维持是不足的, 而 DNMT3a 和 DNMT3b 可以弥补 DNMT1 的不足^[36]。DNMT1 或 DNMT3a/b 的 DNA 甲基化在发育中起着至关重要的作用, 但是在三重敲除 *Dnmt1*^{-/-} *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-} 的小鼠 ESCs 中, 尽管完全没有 DNA 甲基化, 小鼠 ESCs 仍然完全具有自我更新的功能^[37]。

DNA 甲基化的改变对于诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 重编程是必不可少的, 因为许多多能基因的启动子必须要有甲基化缺失, 即去甲基化^[38]。DNA 甲基化仅发生在 iPSC 重编程的后期^[39], 如果多能基因 DNA 甲基化没有被去除, 细胞只能部分重编程^[40]。低传代数小鼠和人类的 iPSCs 中存在具有表观遗传记忆性的 DNA 甲基化, 这有利于其向供体细胞系分化, 却限制了其向其他细胞类型的分化^[41-42]。在重编程过程中使用的 DNMT 抑制剂 5-氮杂胞苷将重编程效率提高了约 10 倍^[43]。这些发现表明, 去甲基化通常在重编程中起重要作用, DNA 去甲基化是建立多能性的低效步骤。与 DNA 去甲基化相反, DNA 甲基化对 iPSCs 重编程没有显著贡献^[44]。*Dnmt3a* 和 *Dnmt3b* 在胚胎干细胞中高表达, 在多能性建立后被强烈诱导。然而, 起始性 DNA 甲基化并不重要, 对于体细胞核重编程为多能状态是不必要的^[45]。这表明体细胞基因的沉默可能主要通过不同的机制启动, 如 H3K27 甲基化或 H3K9 甲基化, PRC2 (polycomb repressive complex 2) 和 H3K9 甲基转移酶在重编程中的重要作用就是很好的证据^[46-48]。

2.2 TET蛋白和5hmC在多能干细胞重编程中的作用

5hmC 整体水平在 mESCs 和人类 ESCs (hESCs) 中很高。例如, 在 mESCs 中, 5hmC 占有核苷酸的 0.04% 或总 mC 的 5%~10%^[14]。据报道, 5hmC 参与了分化过程^[17, 49], TET1 和 TET2 在 mESCs 中大量表达^[50]。TET1 和 TET2 在 mESCs 中似乎有不同的特征, 如 TET1 缺失会降低基因转录起始位点的 5hmC 水平, 而 TET2 缺失主要与基因中 5hmC 的减少有关^[51]。TET1 和 TET2 双敲除造成的 5hmC 减少会使细胞保持多能性, 但是会导致发育缺陷嵌

合胚胎^[52]。此外，TET1、TET2和TET3三重敲除的hESCs中，未分化状态下的基因表达总体上没有相应减少，但二价启动子发生显著超甲基化，表明TET蛋白保护二价启动子免受过度甲基化，同时也限制了胚胎干细胞的正常分化^[53]。5hmC可被进一步氧化为5fC和5caC，两者均可通过TDG修复产生未修饰的胞嘧啶^[18, 20, 54]。已经有调控因子被报道参与了这一过程，将这一机制与各种细胞功能联系起来。例如，在mESCs中，TET蛋白是直接的钙蛋白酶(calpains)的底物。calpain1在转录后介导TET1和TET2的稳定性，calpain2在分化过程中调节TET3的水平^[55]。除胞嘧啶的修饰之外，细胞还含有5-羟甲基尿嘧啶(5-hydroxymethyluracil, 5hmU)，它是活性氧的产物。最近的报道显示，TET诱导的氧化不限于5mC，而胸腺嘧啶也是一种底物，可被催化为5hmU。因此，除了触发DNA修复途径之外，5hmU可能在细胞中具有另外的功能^[56]。

考虑到DNA去甲基化可能通过TET-BER过程进行修饰的模型，许多研究小组已经研究了TET介导的5hmC是否参与重编程，以及它是如何促成这一过程的^[57-60]。TET1与NANOG协同增强重编程的效率。其中NANOG和TET1的共表达可提高目标基因位点*Esrrb*和*Oct4*上的5hmC的水平^[57]。在另一项研究中，TET1过表达促进成纤维细胞形成重编程的克隆细胞，并且作者认为TET1通过对其启动子的去甲基化作用来加速*Oct4*转录激活发挥功能^[59]。这个模型提供了TET1能够取代*Oct4*以产生完全多能iPSCs的重要实验证据。TDG缺陷型成纤维细胞的重编程也受到影响，重编程的障碍至少部分是由于一些miRNA的缺陷激活引起的，这依赖于由TET和TDG促进的去甲基化^[61]。类似于许多其他系统，重编程期间的TET调控过程具有复杂的调节网络，如miR-22既是TET蛋白的阻遏蛋白，也是乳腺上皮和造血系统中一个强有力的致癌基因^[62-63]；miR-29a/b也参与TET的调控^[63]。由于miR-22和miR-29a/b在成纤维细胞和iPSCs中的表达是有差异性的^[64]，因此这些miRNAs可能在转录后水平调节TET的表达，从而抑制体细胞重编程。

有趣的是抗坏血酸(维生素C)能够调节TET活性。一些报道表明，维生素C使5hmC水平在细胞DNA中增加3~7倍^[65-68]，指出它是TET活性的直接调节因子和促进DNA去甲基化的因子。从机制上讲，维生素C可能通过增强5hmC的形成促进

复制依赖性和被动的DNA去甲基化，并通过增强5fC和5caC的形成来加速活性DNA去甲基化。在iPSCs重编程中，维生素C被认为可以克服衰老阻滞，促进pre-iPSCs转换^[69]，提高H3K36脱甲基酶的活性^[70]，这些都是提高重编程效率的重要因素，也意味着TET1对重编程有积极的影响。然而，一项研究表明，从标准的iPSCs培养基转换为富含维生素C的改良培养基时，*TET1*^{-/-}MEF细胞的效率得到提高。这一矛盾的发现揭示了维生素C和TET1重编程之间的关系。根据这份报告，一些人认为根据维生素C的存在与否，TET1可以正向或负向调节体细胞重编程^[68]。

3 DNA甲基化在神经干细胞中的作用

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是自我更新和多能细胞产生中枢神经系统的主要部分^[71-72]。成体NSCs的发现是了解成年大脑可塑性的一个里程碑，因为它颠覆了成年哺乳动物中枢神经系统不产生新神经元的传统观念^[73-74]。神经系统中的干细胞生态位在位于侧脑室下区基部的内皮细胞以及海马齿状回颗粒下区^[75-77]。成体NSCs主要产生神经元和神经胶质细胞，包括星形胶质细胞和少突胶质细胞^[78]。从成体NSCs产生各种功能性神经细胞的过程被定义为成体神经发生^[79-81]。成体神经发生可以被认为是干细胞分化过程的经典案例，遗传调节剂在时间和空间上微妙地操纵神经干细胞中关键基因的表达，并决定神经干细胞的增殖和分化。

3.1 成体神经干细胞中DNA甲基化

DNA甲基化通过调节特定的基因表达，在与学习记忆相关的突触可塑性中发挥重要作用。为了探索DNA甲基化在CNS中的作用，已经产生了许多条件性敲除小鼠模型。DNMT1在小鼠脑中普遍表达，而DNMT1在神经元祖细胞中的消除会导致DNA低甲基化，同时激活JAK-STAT星形胶质细胞生成途径并加速神经胶质分化过程^[82-83]。DNMT3a在小鼠神经元前体的E10.5附近激活细胞，并在成年后的有丝分裂神经元中保持活性^[84]。整个中枢神经系统缺失DNMT3a的小鼠看起来健康，但过早死于发育缺陷^[85]。随着DNMT3a的缺失，在侧脑室下区和海马齿状回颗粒下区区域都出现了神经发育障碍，从DNMT3a缺失的NSCs中分化出来的神经元数量减少了90%^[86]。此外，DNMT3a还通过非近端启动子甲基化与polycomb竞争，并促进包括神经原性基因在内的靶标的转录^[86]。

MBD1 是一种与高甲基化基因启动子结合的蛋白, 是 DNA 甲基化依赖性的成体 NSCs 不可缺少的特异性调节因子。Fgf2 (fibroblast growth factor 2) 是成体神经祖细胞的促分裂原, Fgf2 高甲基化的启动子可以被 MBD1 结合。因此, MBD1 的缺失诱导 Fgf2 启动子的低甲基化, 并增强其在成体 NSCs 中的表达, 导致 NSCs 分化被抑制。据报道, 主动 DNA 甲基化 / 去甲基化在神经发生中起关键作用, 其中 Gadd45b (growth arrest and DNA damage-inducible protein 45b) 被认为是促进成体神经发生的关键调控因子, 而成熟神经元中 MeCP2 可以在 DNMTs 和 Gadd45b 蛋白的调控下诠释可逆的 DNA 甲基化^[84, 87]。另外, 一些 miRNA, 如 miR-184 和 miR-137 可分别作为 MBD1 和 MeCP2 的直接靶标, 抑制来自成体 NSCs 的神经元分化^[88-90]。MeCP2 介导的 miR-137 表观遗传调控还涉及通过干细胞的核心转录因子 Sox2 的共调节来调节成体 NSCs 的命运^[90]。

3.2 DNA羟甲基化和TET在成体神经干细胞中的作用

5hmC 在哺乳动物大脑中的特定分布和其在基因调控中的作用表明, 5hmC 在神经元发育中起重要作用, 并可能在神经疾病中发挥功能^[91]。研究表明, 神经元细胞中的 5hmC 总量从小鼠出生后的神经发育阶段到成年期阶段明显增加^[21]。鉴于 5hmC 在脑中如此高的水平且其结合蛋白已确定, 5hmC 被认为不仅仅是 DNA 去甲基化的中间体。

TET1 介导的 5mC/5hmC 转换表明, 5hmC 更容易被 AID (activation-induced deaminase)/APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme complex) 完成去甲基化循环^[92]。在海马齿状回中过表达 TET1 或 AID 导致两个神经元活性相关基因 *Bdnf* 和 *Fgflb* 的启动子 CpG 甲基化水平显著降低^[92]。在条件性突变体小鼠中, TET1 的缺失导致侧脑室下区中的 NSCs 减少 45%, 并且从 *TET1*^{-/-} 小鼠分离的神经元体外生长功能受损^[93]。研究人员发现, *TET1*^{-/-} 小鼠中参与 NSCs 增殖的许多基因都是高甲基化和表达下调的^[93]。此外, TET2 敲除后会促进成体 NSCs 的增殖, 同时抑制分化。TET2 与 Foxo3a (transcription factor forkhead box O3) 相互作用, 共同调控 NSCs 重要基因的表达, 在神经发生过程的转录调控中发挥重要作用^[94]。

4 DNA甲基化在生殖干细胞中的作用

在植入后的哺乳动物胚胎发育期间, E6.25 的一小群后近端上胚层与体细胞分离并呈现生殖细胞

分化命运。此后不久, 这些细胞被胚胎外胚层的信号诱导, 在 E7.25 上成为原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs)^[95-96]。从 PGCs 迁移到性腺早期 (E7.75-E12.5), 全基因组的表观遗传发生变化, 在此过程中 PGCs 逃脱了体细胞命运, 获得了发育成为生殖干细胞 (germ stem cells, GSCs) 的单能性发育潜能^[97-99]。鉴于其产生遗传信息世代的配子性质, GSCs 也被认为是真正的“不朽的干细胞”^[100]。在模式无脊椎动物, 如果蝇和秀丽隐杆线虫中, 长期自我更新的 GSCs 存在于雄性和雌性中^[101]。在哺乳动物中, 雄性在睾丸中维持 GSCs 的精子发生^[102], 而出身后雌性是否拥有 GSCs 仍然存在争议^[103-105]。小鼠 GSCs 已经成功地在体外培养, 可以使生殖细胞耗尽的睾丸恢复生育能力^[106-107]。体外培养的小鼠 GSCs 还可以产生能够分化成不同细胞类型的 ESCs 类似细胞^[106, 108]。

4.1 成体生殖干细胞的DNA甲基化和去甲基化

有研究绘制了成体生殖干细胞 (adult GSCs, AGSCs) 和精子发生过程中 5mC、5hmC、组蛋白修饰和 RNA-seq 的特异性高分辨率图谱^[109]。研究表明, 在生殖发育过程中, AGSCs 和 ESCs 的 DNA 在甲基化位点上有差异, 通过对 AGSCs 与 ESCs 的 DNA 甲基化位点进行比对, 发现了大约 330 个差异性甲基化的区域。这些区域集中在 ESCs 沉默基因的启动子上。在 E16.5 的 PGCs 和 AGSCs 之间, 与减数分裂相关的许多关键基因失去 DNA 甲基化, 许多负责细胞迁移的关键基因被沉默。值得注意的是, 配子发生过程并未发生显著的 DNA 甲基化变化, 而携带有 5hmC、低含量 CG 以及高含量 H3K9ac 和 H3K4me3 的启动子的转录却发生显著变化。此外, *Nanog*、*Sox2* 和 *Prdm14* 等多能性基因的增强子在成熟精子中通常是低甲基化和二价的, 这表明合子可能有主动的 DNA 去甲基化^[109]。

4.2 TET和DNA羟甲基化在原始生殖细胞中的作用

原则上, PGC 重编程必须同时抑制正在进行的体细胞程序和激活生殖细胞转录网络, 以确保 GSCs 单一性的成功获得, 从而导致配子发生^[97, 110]。研究表明, 在野生型 PGCs 生殖细胞重编程的过程中, 5mC 和 5hmC 显著分布于不同区域, 说明 DNA 甲基化在适当的生殖细胞维持中的动态变化是非常重要的^[111-113]。PGCs 的去甲基化过程和印记的建立始终伴随着从 5mC 转换为 5hmC, 这主要是由 TET1 和 TET2 介导的^[113]。此外, TET3 在配子发生后 (E16.5) 以及在精子发生和卵母细胞中表达,

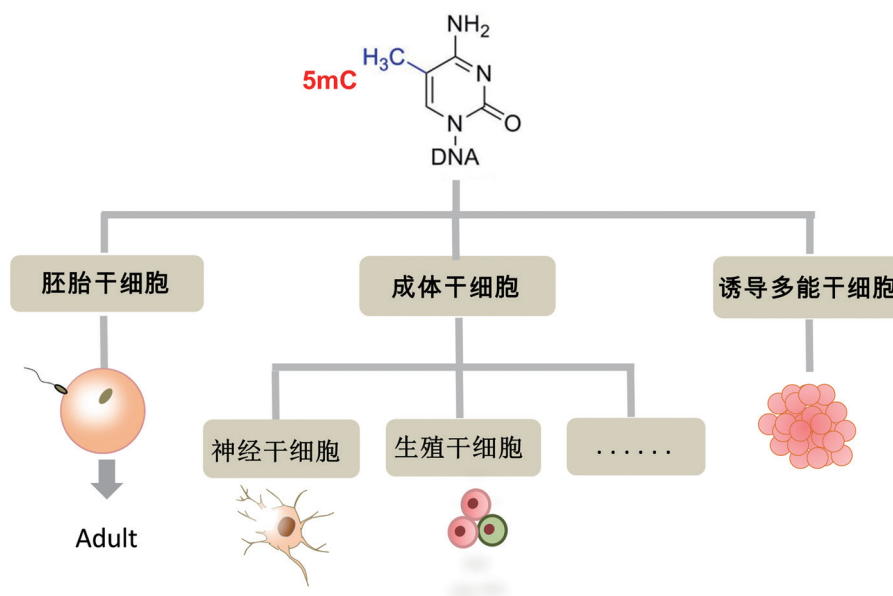
而在早期胚芽小鼠卵母细胞中 TET3 的消除导致了父系基因组中的表观遗传异常^[114]。

5 结论与展望

尽管 DNA 甲基化及去甲基化在胚胎干细胞、体细胞重编程及成体干细胞等过程中的作用机制已被广泛研究(图2), 但其在干细胞中的详细调控机制及涉及到的信号转导方面的认识还很有限。进一步探索 DNA 甲基化与去甲基化确切的分子机制、DNA 甲基化与其他表观修饰之间的复杂关系是理解其在干细胞维持与分化过程调控功能的基础, 而这也是未来相关领域研究的热点问题, 这方面的理

论研究和实际应用都具有重要意义。

再生医学的目标是通过干细胞治疗的方法创造并取代功能发生损害的组织和器官, 特别是多能干细胞的定向诱导一直以来是干细胞及再生医学研究的难点。一方面, 为设计更好的治疗方案, 利用 DNA 甲基化对细胞分化倾向性的影响可能有助于实现 iPSCs 的定向诱导; 另一方面, 在临床应用中使用的干细胞及其衍生物进行治疗时也需注意基因组的表观修饰的稳定性。相信这方面的理论研究及新技术的广泛开发及应用势必会推动该领域的发展, 也为未来人类移植及相关退行性疾病提供了替代治疗策略。



5mC在胚胎干细胞、诱导多能干细胞及成体干细胞(神经干细胞、生殖干细胞等)的维持、分化调控等方面发挥重要作用。

图2 DNA 5mC甲基化调控干细胞的维持与分化

[参 考 文 献]

- [1] Waddington CH. An introduction to modern genetics [M]. London: George Allen & Unwin Ltd., 1939
- [2] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet, 2003, 33: 245-54
- [3] Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications - miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. Nat Rev Cancer, 2010, 10: 457-69
- [4] Reid MA, Dai Z, Locasale JW. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. Nat Cell Biol, 2017, 19: 1298-306
- [5] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. Cell, 2014, 156: 45-68
- [6] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. Nat Rev Cancer, 2011, 11: 726-34
- [7] Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, et al. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. Nat Neurosci, 2010, 13: 1338-44
- [8] 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: 247-57
- [9] Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol Cell Biol, 1998, 18: 6538-47
- [10] Bogdanovic O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. Chromosoma, 2009, 118: 549-65
- [11] Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. Adv Genet, 2010, 70: 27-56

- [12] Guy J, Cheval H, Selfridge J, et al. The role of MeCP2 in the brain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 631-52
- [13] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-30
- [14] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [15] Wyatt GR, Cohen SS. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem J*, 1953, 55: 774-82
- [16] Penn NW, Suwalski R, O'Riley C, et al. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 1972, 126: 781-90
- [17] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466: 1129-33
- [18] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-7
- [19] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-3
- [20] Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*, 2011, 286: 35334-8
- [21] Szulwach KE, Li X, Li Y, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1607-16
- [22] Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, 2013, 152: 1146-59
- [23] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 517-34
- [24] Fu Y, Luo GZ, Chen K, et al. N⁶-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell*, 2015, 161: 879-92
- [25] Greer EL, Blanco MA, Gu L, et al. DNA methylation on N⁶-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 2015, 161: 868-78
- [26] Zhang G, Huang H, Liu D, et al. N⁶-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 2015, 161: 893-906
- [27] Koziol MJ, Bradshaw CR, Allen GE, et al. Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 24-30
- [28] Liu J, Zhu Y, Luo GZ, et al. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nat Commun*, 2016, 7: 13052
- [29] Wu TP, Wang T, Seetin MG, et al. DNA methylation on N⁶-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 329-33
- [30] Yao B, Cheng Y, Wang ZQ, et al. DNA N⁶-methyladenine is dynamically regulated in the mouse brain following environmental stress. *Nat Commun*, 2017, 8:1122
- [31] Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, et al. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*, 1981, 124: 67-71
- [32] Tasheva ES, Roufa DJ. Densely methylated DNA islands in mammalian chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 5636-44
- [33] Woodcock DM, Crowther PJ, Diver WP. The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 145: 888-94
- [34] Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992, 69: 915-26
- [35] Canovas S, Ross PJ, Kelsey G, et al. DNA methylation in embryo development: epigenetic impact of ART. *Bioessays*, 2017, 39: 1700106
- [36] Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 480-91
- [37] Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*, 2006, 11: 805-14
- [38] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [39] Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*, 2012, 151: 1617-32
- [40] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454: 49-55
- [41] Kim K, Zhao R, Doi A, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 1117-9
- [42] Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 467: 285-90
- [43] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 795-7
- [44] Onder TT, Kara N, Cherry A, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, 2012, 483: 598-602
- [45] Pawlak M, Jaenisch R. *De novo* DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes Dev*, 2011, 25: 1035-40
- [46] Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 2012, 151: 994-1004
- [47] Ding X, Wang X, Sontag S, et al. The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 931-40

- [48] Fragola G, Germain PL, Laise P, et al. Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003292
- [49] Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 2011, 473: 398-402
- [50] Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 200-13
- [51] Huang Y, Chavez L, Chang X, et al. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 1361-6
- [52] Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell*, 2013, 24: 310-23
- [53] Verma N, Pan H, Doré LC, et al. TET proteins safeguard bivalent promoters from *de novo* methylation in human embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2018, 50: 83-95
- [54] Shen L, Wu H, Diep D, et al. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*, 2013, 153: 692-706
- [55] Wang Y, Zhang Y. Regulation of TET protein stability by calpains. *Cell Rep*, 2014, 6: 278-84
- [56] Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 574-81
- [57] Costa Y, Ding J, Theunissen TW, et al. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*, 2013, 495: 370-4
- [58] Doege CA, Inoue K, Yamashita T, et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature*, 2012, 488: 652-5
- [59] Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 453-69
- [60] Wang T, Wu H, Li YJ, et al. Subtelomeric hotspots of aberrant 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic modifications during reprogramming to pluripotency. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 700-11
- [61] Hu X, Zhang L, Mao SQ, et al. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 512-22
- [62] Song SJ, Poliseno L, Song MS, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*, 2013, 154: 311-24
- [63] Zhang P, Huang B, Xu X, et al. Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437: 368-73
- [64] Henzler CM, Li Z, Dang J, et al. Staged miRNA re-regulation patterns during reprogramming. *Genome Biol*, 2013, 14: R149
- [65] Minor EA, Court BL, Young JI, et al. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem*, 2013, 288: 13669-74
- [66] Yin R, Mao SQ, Zhao B, et al. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 10396-403
- [67] Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 2013, 500: 222-6
- [68] Chen J, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45: 1504-9
- [69] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 71-9
- [70] Wang T, Chen K, Zeng X, et al. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 575-87
- [71] Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10: 153-63
- [72] Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, 414: 112-7
- [73] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287: 1433-8
- [74] Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res*, 2009, 19: 672-82
- [75] Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999, 97: 703-16
- [76] Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 1997, 8: 389-404
- [77] Shen Q, Goderie SK, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 2004, 304: 1338-40
- [78] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, 2000, 288: 1660-3
- [79] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 2011, 70: 687-702
- [80] Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 2005, 28: 223-50
- [81] Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, et al. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1338-44
- [82] Feng J, Chang H, Li E, et al. Dynamic expression of *de novo* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the

- central nervous system. *J Neurosci Res*, 2005, 79: 734-46
- [83] Goto K, Numata M, Komura JI, et al. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation*, 1994, 56: 39-44
- [84] Feng J, Zhou Y, Campbell SL, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 423-30
- [85] Nguyen S, Meletis K, Fu D, et al. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. *Dev Dyn*, 2007, 236: 1663-76
- [86] Wu H, Coskun V, Tao J, et al. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*, 2010, 329: 444-8
- [87] Ma DK, Jang MH, Guo JU, et al. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*, 2009, 323: 1074-7
- [88] Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, et al. Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 433-44
- [89] Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, et al. MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells*, 2010, 28: 1060-70
- [90] Szulwach KE, Li X, Smrt RD, et al. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*, 2010, 189: 127-41
- [91] Lian H, Li WB, Jin WL. The emerging insights into catalytic or non-catalytic roles of TET proteins in tumors and neural development. *Oncotarget*, 2016, 7: 64512-25
- [92] Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011, 145: 423-34
- [93] Zhang RR, Cui QY, Murai K, et al. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 237-45
- [94] Li X, Yao B, Chen L, et al. Ten-eleven translocation 2 interacts with forkhead box O3 and regulates adult neurogenesis. *Nat Commun*, 2017, 8:15903
- [95] Sabour D, Schöler HR. Reprogramming and the mammalian germline: the Weismann barrier revisited. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24: 716-23
- [96] Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, 2008, 2008: 129-40
- [97] Hackett JA, Zyllicz JJ, Surani MA. Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet*, 2012, 28: 164-74
- [98] Guibert S, Forne T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*, 2012, 22: 633-41
- [99] Bagci H, Fisher AG. DNA demethylation in pluripotency and reprogramming: The role of tet proteins and cell division. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 265-9
- [100] Lehmann R. Germline stem cells: origin and destiny. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 729-39
- [101] Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21: 605-31
- [102] Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science*, 2007, 316: 404-5
- [103] Eggan K, Jurga S, Gosden R, et al. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 2006, 441: 1109-14
- [104] Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 2004, 36: 647-52
- [105] Kaas GA, Zhong C, Eason DE, et al. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*, 2013, 79: 1086-93
- [106] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod*, 2005, 72: 985-91
- [107] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16489-94
- [108] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440: 1199-203
- [109] Hammoud SS, Low DH, Yi C, et al. Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 239-53
- [110] Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, et al. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod*, 2006, 75: 705-16
- [111] Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, et al. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell*, 2012, 48: 849-62
- [112] Yamaguchi S, Hong K, Liu R, et al. Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature*, 2012, 492: 443-7
- [113] Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, 2013, 339: 448-52
- [114] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10