

DOI: 10.13376/j.cbls/2020039

文章编号: 1004-0374(2020)03-0299-09



江小霞, 博士, 副研究员, 军事科学院军事医学研究院神经工程与生物交叉研究室主任。中国生理学会血液学专业委员会青年委员, 中国生物医学工程学会组织工程与再生医学分会青年委员, 中国空间科学学会空间生命专业委员会委员。主要研究工作包括: (1) 间充质干细胞的免疫调控功能及其机制; (2) 干细胞自我更新及分化的表观遗传学机制; (3) 材料对干细胞分化和功能的调控机制; (4) 组蛋白泛素化修饰对星形胶质细胞亚群及功能的影响机制。研究结果发表在 *Biomaterials*、*Immunity*、*Blood* 等。2014 年获国家科学技术进步奖一等奖 1 项。获得授权专利 11 项。

## 表观遗传学与组织工程

江小霞\*, 王常勇

(军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

**摘要:** 表观遗传学是环境和遗传相互作用的一门学科, 其调控方式包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 调控等。这些调控方式的协调作用决定了细胞的发育、功能、状态和命运, 因此表观遗传调控机制已经成为外界环境影响因素和基因转录调控之间的重要联系。组织工程的目标是研究和开发用于修复、维护、促进人体各种组织或器官损伤后的功能和形态的生物替代物, 该领域的主要挑战之一在于寻找最佳的能够控制细胞命运和促进细胞成熟的微环境。该文综述了表观遗传的调控方式及相应研究方法、表观遗传对细胞分化和功能的影响、生物材料对表观遗传的调控, 以期为组织工程研究及转化提供参考。

**关键词:** 表观遗传调控; 组织工程; DNA 甲基化; 组蛋白修饰; 染色质重塑; 非编码 RNA 调控; 细胞; 生物材料

中图分类号: Q343.1; Q754; Q813

文献标志码: A

## Epigenetics and tissue engineering

JIANG Xiao-Xia\*, WANG Chang-Yong

(Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** Epigenetics is a subject of interaction between environment and genetics. Epigenetic regulation includes DNA methylation, histone modification, chromatin remodeling, and non-coding RNA regulation. The coordination of these regulation determines the development, function, state and fate of cells. Therefore, epigenetic regulation has become an important link between external environmental factors and gene transcription regulation. The objective of tissue engineering is to study and develop biological substitutes for the repair, maintenance, and promotion of the function and morphology of various tissues or organs after injury. One of the main challenges in this area is to find the best cellular microenvironment that can control the fate of cells. This paper reviews the

收稿日期: 2019-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81771998); 国家重点研发计划(2016YFC1101300)

\*通信作者: E-mail: smilovjiang@163.com; Tel: 010-66931592

regulation of epigenetics and the corresponding research methods, the effects of epigenetics on cell differentiation and function, and the epigenetic regulation with biological materials. It is expected to provide a theoretical reference for the application of tissue engineering in the study of epigenetics and the use of epigenetics for the transformation of tissue engineering research.

**Key words:** epigenetic regulation; tissue engineering; DNA methylation; histone modification; chromatin remodeling; non-coding RNA regulation; cell; biomaterials

## 1 表观遗传学

表观遗传是指在不改变核苷酸序列的前提下, 基因功能发生可逆的、可遗传的改变。表观遗传调控是机体生长、发育、衰老与疾病发生过程中重要的基因表达调控方式。生命个体对环境因素发生有序应答在很大程度上依赖于表观遗传调控网络的有效运行<sup>[1]</sup>。

表观遗传调控方式包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 调控等。这些不同的调控方式并非独立作用, 而是相互影响、相互调控。DNA 的甲基化、组蛋白部分位点的甲基化、组蛋白的单泛素化以及染色质紧密的折叠状态往往会抑制基因的转录; 而 DNA 的去甲基化、组蛋白的去泛素化、组蛋白的乙酰化和染色质疏松的折叠状态则促进基因的转录。通过对发育或环境刺激响应, 各种表观遗传调控之间合作赋予“表观遗传记忆”, 使细胞能够传递遗传信息和相关表型。

### 1.1 DNA甲基化及其研究方法

#### 1.1.1 DNA甲基化

DNA 甲基化是表观遗传修饰中最主要的作用机制<sup>[2]</sup>。在 DNA 甲基化过程中, 甲基(CH<sub>3</sub>)基团被酶催化添加到具有时间和空间精度的胞嘧啶环上<sup>[3]</sup>。CpG 二核苷酸是主要的甲基化位点, CpG 岛的胞嘧啶甲基化会影响转录因子与特定 DNA 序列的结合, 从而抑制基因转录<sup>[4]</sup>。启动子区域包括转录起始位点(transcription start site, TSS)的 DNA 甲基化, 通常通过招募 DNA 结合蛋白和抑制转录的组蛋白修饰酶而抑制下游基因表达<sup>[5]</sup>。DNA 甲基化也可能发生在基因体中, 但与启动子甲基化不同, 它与转录活化相关<sup>[6]</sup>。已有研究表明, 其他基因组区域(如增强子和绝缘子)也存在甲基化, 但其功能重要性有待进一步研究<sup>[7]</sup>。

DNA 甲基化是一个动态过程, 包括甲基化的合成、维持或移除。这些过程是由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)和 DNA 去甲基化酶来协调平衡的。人类基因组编码三个 DNMT

(DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B)来催化 DNA 甲基化。DNMT1 对半甲基化 DNA (即两条链中的一条已经甲基化)具较大活性, 调控 DNA 复制和损伤修复后的甲基化<sup>[8-9]</sup>。DNMT3A 和 DNMT3B 在从头 DNA 甲基化中起主要作用, 不区分非甲基化以及半甲基化 DNA 底物<sup>[10-11]</sup>。胞嘧啶核苷类似物 5-aza-2'-脱氧胞苷对 DNMT 的抑制作用已被广泛用于研究 DNA 甲基化在各种细胞功能中的作用<sup>[12]</sup>。介导 DNA 去甲基化的主要是 10-11 易位甲基胞嘧啶双加氧酶(ten-eleven translocation, TET)家族蛋白。5-甲基胞嘧啶的甲基氧化产生 5-羟甲基胞嘧啶, 并可进一步被氧化为 5-甲酰胞嘧啶和 5-羧基胞嘧啶<sup>[13]</sup>。这些 5-羟甲基胞嘧啶的衍生物是新的表观遗传标记, 可能具有新的生物学功能。

#### 1.1.2 DNA甲基化的研究方法

DNA 甲基化的研究方法主要是基于未甲基化的胞嘧啶在重亚硫酸盐的处理下变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不发生变化, 该原理也被称为 DNA 甲基化分析的金标准。根据不同的研究目标和范围<sup>[14]</sup>, DNA 甲基化的分析方法主要分为两类: 一是基因组整体水平的甲基化分析, 主要包括高效液相色谱、甲基化敏感扩增多态性(MSAP)检测、DNA 甲基化免疫共沉淀(MeDIP)及甲基化芯片检测; 二是特异位点的 DNA 甲基化分析, 主要包括结合亚硫酸氢钠处理和酶解分析(COBRA)、重亚硫酸氢盐处理并测序(WGBS)以及甲基化敏感性单核苷酸扩增(Ms-SnuPE)等。

### 1.2 组蛋白修饰及其研究方法

#### 1.2.1 组蛋白修饰

组蛋白是核小体的核心成分, 可发生多种修饰, 包括甲基化、泛素化、乙酰化、磷酸化和 SUMO 化等<sup>[15]</sup>。组蛋白修饰在整个基因组广泛分布并形成组蛋白密码, 调控 DNA 的可及性, 并募集转录因子和共激活因子或共抑制因子, 导致活跃、稳定或沉默的基因转录。与 DNA 甲基化修饰相结合, 组蛋白修饰可影响基因组区域的转录状态。乙酰-组蛋白 H3(Lys-27)(H3K27ac)、三甲基-组蛋白 H3(Lys-4)

(H3K4me3)、甲基-组蛋白 H3(Lys-4)(H3K4me1) 和三甲基-组蛋白 H3(Lys-36)(H3K36me3) 等均与转录活化相关。三甲基-组蛋白 H3(Lys-27)(H3K27me3) 和三甲基-组蛋白 H3(Lys-9)(H3K9me3) 等主要与转录抑制相关。组蛋白修饰可以通过两种主要机制影响转录活性。首先, 组蛋白修饰能改变染色质的结构和构象, 例如 H3K27ac 可以减少组蛋白的正电荷, 从而抑制组蛋白与 DNA 的结合, 增加 DNA 的可及性<sup>[16]</sup>。其次, 组蛋白修饰可以为组蛋白识别酶提供信号, 进一步招募转录激活因子/抑制因子, 例如 H3K27me3 可以被介导组蛋白 H2A 泛素化的多梳抑制复合物 1 (PRC1) 识别从而抑制转录<sup>[17]</sup>。

不同类型的组蛋白修饰对应不同的酶, 包括建立修饰的酶, 如甲基转移酶、乙酰转移酶、泛素化酶等, 以及去除修饰的酶, 如去甲基化酶、去泛素化酶、去乙酰化酶等。组蛋白修饰能够募集调控分子, 这些调控分子能识别不同的组蛋白修饰, 进而调控转录, 改变下游分子事件。

### 1.2.2 组蛋白修饰的研究方法

传统的研究组蛋白修饰的方法主要有免疫测序法和 Edman 降解法。但这两种方法都有局限性, 如免疫测序法中的抗体制备困难, 不易单独用于鉴定未知的修饰位点; Edman 降解法需要提供大量的高纯度样品, 而且不能检测 N 端封闭的序列。随着技术发展, 目前已开发出几种方法来鉴定组蛋白亚型及其修饰, 并确定它们如何影响转录。Tian 等<sup>[18]</sup>使用二维液相色谱法-串联质谱法在完整的蛋白质水平上测定了 708 个组蛋白亚型。利用以质谱为基础的蛋白质组学方法, Tan 和 Davey<sup>[19]</sup>在组蛋白上识别出 67 个新的修饰位点, 揭示了人类细胞组蛋白修饰的广谱性。

染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析已被广泛用于鉴定修饰组蛋白的 DNA 结合位点及其结合程度。简言之, 由 DNA、组蛋白和其他参与转录的蛋白质组成的染色质被交联后用超声波破碎, 抗组蛋白或其他蛋白质成分的抗体可以被免疫共沉淀, 最后对相互作用的 DNA 进行定量 PCR (ChIP-PCR)、微阵列 (ChIP-chip) 或深度测序 (ChIP-seq) 分析。ChIP-seq 是一种强大的 NGS 方法, 用于组蛋白修饰的全基因组分析, 可以显示活跃、稳定或抑制性转录状态。同样, 使用抗转录因子或辅因子抗体的 ChIP-seq 是研究 DNA 和蛋白质之间关系的常用方法。这种分析可以与组蛋白 ChIP-seq 结合起来研究组蛋白和转录因子/辅因子

之间的相互作用<sup>[20]</sup>, 或者级联的两个 ChIPs (序列 ChIP 或 re-ChIP) 可以显示相同的 DNA 片段上一个以上的组蛋白修饰<sup>[21]</sup>。现已开发出的基于 ChIP-seq 的新方法可以提供更高分辨率和更深入的测序数据, 例如, ChIP-exo 引入了核酸外切割步骤降解未结合的双链 DNA, 使分辨率降至单碱基水平<sup>[22]</sup>。另外, ChIP 可以与亚硫酸氢盐测序结合为 BisChIP-seq<sup>[23-24]</sup>, 这种结合方法有利于识别同时或协变的 DNA 甲基化和组蛋白修饰。

## 1.3 染色质重塑及其研究方法

### 1.3.1 染色质重塑

染色体是遗传物质的载体, DNA 盘绕在组蛋白周围形成染色体的基本结构单元核小体。细胞核中的 DNA 以两种形式的染色质存在, 紧密包装、非转录的异染色质, 和包装松散、可以被转录的常染色质。通常, 异染色质在无转录活性或活性较低的细胞中很丰富, 常染色质在转录活跃的细胞中普遍存在。异染色质的紧密包装限制了核小体中转录因子和共激活因子接近 DNA, 因此需要通过某种方式打开紧密压缩的染色质, 暴露启动子区的顺式作用元件, 使其利于与反式作用因子相结合, 从而促进基因的转录。

核小体定位的关键决定因素包括 DNA 序列组成<sup>[25]</sup>和 ATP 依赖性核小体重塑物<sup>[26-28]</sup>。ATP 依赖的染色质重塑复合物 SWI/SNF 超家族成员包括 SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable)、ISWI (imitation switch)、CHD (chromodomain helicase DNA-binding) 以及 INO80 (inositol-requiring 80)。染色质重塑复合物参与 DNA 复制、基因表达调控以及染色质重塑等多种分子事件, 但目前对其催化核小体重塑的分子机制还不完全清楚。

### 1.3.2 染色质重塑的研究方法

染色质的可及性可通过旨在评估其开放性与闭合状态的方法来确定, 如微球菌核酸酶测序 (MNase-seq)<sup>[29]</sup>、DNase I 过敏位点测序 (DNase-seq)<sup>[30]</sup>、测定转座酶可接触的染色质高通量测序 (ATAC-seq)<sup>[31]</sup>和甲醛辅助的分离调节元件测序 (FAIRE-seq)<sup>[32]</sup>。MNase-seq 利用 MNase 逐步消化 DNA 直到达到核小体, 而被包装的 DNA 不被消化。同样, DNase-seq 是基于 DNase I 对染色质高度敏感, 具有消化松散堆积的染色质的能力。ATAC-seq 是一种在染色质加工过程中使用序列适配器加载的转座酶切割基因组 DNA 的替代方法。FAIRE-seq 使用甲醛交联染色质, 然后超声处理提取 DNA 并测序。

染色体构象捕获(3C)技术可用于识别两个已知位点的远程相互作用<sup>[33]</sup>。DNA-蛋白质复合物交联,被DNA限制酶消化,可能相互作用的两段DNA通过DNA连接酶连接,然后定量PCR扩增连接产物,需要能够针对两个相互作用的DNA片段的两个反向引物。通过使用3C并与PCR结合,可以很容易地确认公认的远端区域能否直接与特定靶启动子相互作用。3C只能检测一对一的相互作用(一个DNA区域与另一个DNA相互作用区域),而目前已有一系列染色质构象捕获方法来检测多个远距离染色质相互作用(一对全部和全-全)。这些方法包括圆形染色体构象捕获(4C)<sup>[34]</sup>、染色体构象捕获碳拷贝(5C)<sup>[35]</sup>、通过末端配对标签测序进行染色质相互作用分析(ChIA-PET)<sup>[36]</sup>和全基因组染色体构象捕获(Hi-C)<sup>[37]</sup>。高分辨率4C是一种经济有效的方法,结合两轮酶消化,然后进行反向PCR,扩增全基因组未知序列。ChIA-PET结合了ChIP和3C,可捕获所有的由目标蛋白介导的染色质相互作用。利用ChIA-PET,Fullwood等<sup>[36]</sup>绘制了雌激素受体 $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )全面染色质相互作用组,包括许多基因启动子。他们的发现不仅突出了ChIA-PET在揭示转录相互作用网络方面的强大功能,同时也提出了一个关键机制,即转录因子通过广泛的染色质环协调转录。在Hi-C中,连接处掺入生物素标记的核苷酸,使嵌合DNA可以有选择地纯化,然后对所有连接产物进行深度测序<sup>[37]</sup>。因此,Hi-C不限于特定的目标位点,可以表征广泛的全基因组范围染色质DNA相互作用,并帮助构建基因组的3D结构<sup>[38]</sup>。

## 1.4 非编码RNA调控及其研究方法

### 1.4.1 非编码RNA调控

非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)是真核细胞中大量存在的、不被翻译为蛋白质的RNA分子的总称。但是,ncRNA能调节基因的转录、剪接以及调控mRNA稳定性等,是一种重要的表观遗传调控机制。ncRNA根据长度分为短链ncRNA和长链ncRNA(long ncRNA, lncRNA)。

### 1.4.2 非编码RNA调控的研究方法

用于研究非编码RNA的技术主要有Northern blot、表达文库克隆、荧光定量PCR、表面增强拉曼光谱、芯片技术和高通量测序等。目前比较常用的是芯片技术及高通量测序。芯片技术是把探针分子固定在高密度阵列上,将样品与微阵列探针进行杂交,检测杂交信号的强弱,信号强弱的不同表明

样品中基因表达水平的不同<sup>[39]</sup>。在高通量测序中较为常用的是Solexa测序法,该方法可一次检测上亿个核苷酸片段,精确性好,而且所需样品少,还能减少因二级结构造成的结果缺失,但该方法也会因为miRNA中的特殊修饰而影响结果<sup>[40]</sup>。RNA-seq已广泛用于长链非编码RNA的研究。RNA-seq主要是应用新一代的高通量测序技术,对RNA反转录得到的cDNA文库进行测序。RNA-pulldown、CHIRP(chromatin isolation by RNA purification)及RIP-seq(RNA-immunoprecipitation high-throughput sequencing)等技术被广泛用于研究非编码RNA与蛋白质的相互作用<sup>[41]</sup>,如:利用RNA-pulldown实验发现了hnRNP-K对lincRNA-p21表达的调节<sup>[42]</sup>;利用RIP-seq技术在胚胎干细胞中发现,超过9000种RNA与PRC2相关<sup>[43]</sup>。这些新技术的应用大大加深了人们对不同非编码RNA的功能的认识。

## 2 表观遗传与组织工程

组织工程的目标是建立具有功能的细胞与生物材料的三维活性复合体,从形态、结构和功能方面重建受损组织。组织工程领域的主要挑战之一在于寻找最佳的能够控制细胞命运和促进细胞成熟的细胞微环境。表观遗传调控机制已经成为外界环境影响因素和基因转录调控之间的重要联系,明确表观遗传与种子细胞、表观遗传与生物材料的作用规律,将大大促进组织工程的发展。

### 2.1 表观遗传与种子细胞

表观遗传状态在维持细胞功能的稳定中发挥重要的作用,如干细胞增殖分化、体细胞重编程、免疫细胞极化等重要生物学过程,均以改变表观遗传状态为基础,实现细胞行为的变化。

#### 2.1.1 表观遗传与干细胞增殖、分化

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是组织工程研究和应用中重要的种子细胞。干细胞的增殖伴随多种表观遗传修饰变化。敲除组蛋白去甲基化酶KDM2A能促进MSC中p15INK4B和p27Kip1的表达,使细胞周期停滞于G<sub>1</sub>/S期,从而抑制MSC的增殖<sup>[44]</sup>。人脐带来源的MSC高表达Oct4、Sox2和Nanog等干性相关基因,细胞处于高度的增殖分化状态;这些基因的启动子被甲基化后,MSC的增殖和分化能力显著减弱<sup>[45]</sup>。抑制体外培养的人骨髓MSC的甲基化能增加抗衰老基因的表达,降低衰老基因的表达水平,从而延缓细胞衰老<sup>[46]</sup>。在乙酰化调控方面,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,

HDAC) 抑制剂可通过抑制 PCGs 和促进 JMJD3 的表达来诱导体外培养细胞的衰老<sup>[47]</sup>。在 RNA 调控方面, 研究发现 miR-195 过表达会导致人骨髓 MSC 增殖率下降<sup>[48]</sup>。

干细胞的有序分化不仅需要 DNA 甲基化来控制特定基因表达及其相应的分化表型, 还需要 DNA 去甲基化来促进组织特异性基因的表达, 以形成细胞或组织特异性的甲基化模式。受体酪氨酸激酶样孤儿核受体 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor, ROR) 可结合 Wnt5a、CK1e 等生长因子, 调节经典和非经典 Wnt 信号通路。如 ROR2 启动子区的去甲基化会导致其表达升高, 从而影响 Wnt 信号通路, 进而调控 MSC 成骨分化。

除了 DNA 甲基化, 组蛋白修饰在干细胞分化中发挥或抑制或促进的作用。在正常小鼠 MSC 中过表达组蛋白去甲基化酶 (KDM5A), 能抑制骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 诱导的骨形成; 而骨质疏松症小鼠 KDM5A 高表达, 且 BMP2 对 MSC 的成骨分化诱导作用同样被抑制, 说明 KDM5A 能通过 BMP2 调控 MSC 的成骨分化<sup>[49]</sup>。在 MSC 成骨分化过程中, Runx2、Bsp 和 Dlx5 等基因启动子区的甲基化状态未发生明显改变, 而 Osx 基因启动子区的甲基化模式发生动态变化, 提示 Osx 基因的表现遗传变化可能在该分化过程中发挥主导作用<sup>[50]</sup>。抑制 HDAC1 的表达能够有效促进 MSC 在机械刺激下的成骨分化以及骨形成<sup>[51]</sup>。组蛋白泛素修饰的异常会影响 MSC 的增殖、分化, 从而影响骨的形成和发育<sup>[52]</sup>。组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 与 p300 复合物能作用于 Ocn 和 Dspg 的启动子区, 乙酰化组蛋白 H3K9 可促进 Ocn 和 Dspg 基因的转录, 从而促进细胞的成骨分化及矿化。

MSC 不仅具有强大的自我更新和多向分化潜能, 还具有免疫调节作用。MSC 通过与靶细胞直接接触或分泌可溶性分子等途径, 调控多种免疫细胞的应答。Wang 等<sup>[53]</sup>发现, 去泛素化酶通过调控 miR-150 启动子区的组蛋白修饰调节 miR-150 的表达, 从而影响脂肪来源 MSC 的免疫调节功能。一些 miRNA 对 MSC 的免疫抑制能力也发挥重要的调节作用。miR-21 可以抑制 TGF- $\beta$ 1 表达, 从而调控 MSC 的免疫调节作用<sup>[54]</sup>。miR-181a 通过下调 TGFBR1 和 TGFBRAP1 的表达, 抑制 TGF- $\beta$  信号通路, 同时活化 P38 和 JNK 通路, 促进 IL-6 和 IDO 等免疫调节分子的分泌, 从而增强 MSC 的免疫调控能力<sup>[55]</sup>。

而 miRNA-155 通过靶向 TAK1 结合蛋白 2, 降低免疫抑制效应分子 iNOS 的表达, 从而减弱 MSC 的免疫抑制能力<sup>[56]</sup>。

### 2.1.2 表观遗传与体细胞重编程

表观遗传调控是细胞产生不同命运的物质基础, 科学家们认为细胞在分化过程中具有各种相对固定的表观调控模式<sup>[57]</sup>。研究人员发现, 通过或直接过表达或抑制表观遗传调控酶, 可以发掘体细胞重编程关键的表观遗传调控机制, 如抑制 HDAC、促进组蛋白 H3K27 甲基化转移酶 EZH2、抑制 H3K9 甲基化转移酶 DOT1L 均能促进重编程<sup>[58-60]</sup>。维生素 C 激活的 KDM3/4 家族蛋白能清除关键的表观遗传障碍 H3K9me3, 从而促进细胞高效地转化为诱导性多能干细胞<sup>[61]</sup>。在体细胞核移植过程中, 体细胞的 H3K9 甲基化是重编程失败的主要原因, 提示 H3K9 甲基化是体细胞的关键标记<sup>[62]</sup>。间质细胞向上皮细胞转变 (mesenchymal to epithelial transition, MET) 是一个非常重要的细胞命运决定事件。表观修饰酶 TET 家族在 MET 过程中发挥重要作用。敲除 Tet 或 TDG 会导致一些关键 miRNAs 启动子区的甲基化不能被清除, 阻碍 MET, 从而抑制重编程<sup>[63]</sup>, 而过表达这些 MET 关键的 miRNAs 能恢复 Tet 或 TDG 敲除的表型。

染色质分为常染色质和异染色质, 常染色质结构疏松, 基因表达活跃, 异染色质结构紧密, 基因表达受到抑制。染色质在体细胞重编程过程中发生了剧烈的变化, 往往伴随常、异染色质的转变, 如许多体细胞特异性的位点被关闭, 而多能性相关的位点则被打开。抑制重编程过程中染色质关闭/打开的动态变化会大大降低体细胞重编程的效率。

### 2.1.3 表观遗传与免疫

表观遗传修饰在免疫细胞的发育和功能发挥中起着重要作用<sup>[64]</sup>。巨噬细胞作为一种异质性固有免疫细胞, 具有极其重要的理论研究和临床应用前景。近年来, 表观遗传调控巨噬细胞极化成为研究人员改造巨噬细胞来促进组织损伤修复的策略之一<sup>[65]</sup>。巨噬细胞在一些关键转录因子及信号分子的作用下分化为不同极化状态的亚型, 该过程伴随着大量表型相关基因的表达或抑制<sup>[66]</sup>, 同时基因组的表观遗传修饰状态也发生动态改变。目前发现, 多种表观修饰酶影响巨噬细胞极化状态<sup>[67]</sup>, 但对于其为何能作用于巨噬细胞及相关机制仍有待深入研究。

## 2.2 表观遗传与生物材料

生物材料是组织工程的核心要素之一。随着生

命科学与材料学的飞速发展，材料研究已由宏观水平向细胞水平、分子水平等介观、微观领域不断突破与创新。表观遗传调控机制已经成为外界环境影响因素和基因转录调控之间的重要联系，通过个性化设计材料特性，实现对植入部位微环境的精准调控，稳定受调控细胞的表观遗传修饰，使细胞生物学行为可控、可遗传是目前材料研究的热点与趋势。

### 2.2.1 生物材料调节细胞表观遗传状态

生物材料提供外部信号，从膜蛋白开始通过细胞骨架进入细胞核，通过多种表观遗传调控机制，包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 等，改变细胞内在的表观遗传状态，从而调控细胞行为或功能，包括核变形、分化、重编程和增殖<sup>[68]</sup>。生物材料的各种特性，如材料的化学性质、硬度/弹性/刚性、机械力/刺激和拓扑结构等，以不同的方式支配细胞行为<sup>[69]</sup>。材料黏附性、微观和纳米形貌以及三维结构都将导致细胞骨架分子重组，使染色质在细胞核内发生重塑<sup>[70]</sup>。染色质重塑包括组蛋白和 DNA 的包装和释放以及组蛋白修饰调节转录活化和抑制，从而影响细胞行为和干细胞分化。

材料微环境通常可以将细胞分为两种形状类型，一种细胞形状由各向异性力引导，另一种细胞形状由同性力引导。前者包括多种细胞形状，如由细长的形状引导平行微凝胶<sup>[71-72]</sup>，排列的纳米纤维<sup>[73]</sup>和单个细胞拓扑结构<sup>[74-76]</sup>；后者通常是圆形<sup>[77-78]</sup>。当扩散均匀时，细胞伸长导致细胞刚度减少<sup>[76]</sup>，核形状延长和核纤层蛋白 A/C 减少<sup>[79]</sup>。同时，染色质解聚，伴随着 HDAC 活性降低，组蛋白乙酰化增加和基因表达增加。生物材料引导的细长细胞形状不仅使组蛋白乙酰化增加，还促进 H3K4 的甲基化，从而引起转录激活。细胞质肌动球蛋白和核纤层蛋白 A/C 是此过程重要的传感器。3D 的富含层黏连蛋白的胞外基质<sup>[77]</sup>以及非黏性材料<sup>[78]</sup>和圆形微模式底物会导致细胞变圆<sup>[80]</sup>。细胞变圆涉及组蛋白去乙酰化，特别是组蛋白 H3 和 H4 的去乙酰化以及染色质凝聚和核尺寸减小，从而抑制基因表达<sup>[77-78,80]</sup>。机械刺激，如压缩、拉伸和流体剪应力，能诱发核变形和组蛋白修饰的变化。细胞可以感知垂直于其扩散轴的力量，类似于拓扑结构引导细胞伸长，其中核的方向和变形由侧向压缩力调节。垂直于基体导向的单轴机械力不仅会导致核形状和方向的变化，也会导致 HDAC 活性降低，伴随组蛋白乙酰化增加<sup>[71]</sup>。同样，关于流体剪切压力，当流

动方向垂直于拓扑结构时，能观察到迁移方向显著改变和迁移曲折性增加<sup>[81]</sup>。因此，与细胞伸长相似，垂直于底物拓扑结构的外力可导致 HDAC 活性降低和组蛋白乙酰化增加。

拓扑结构，包括形状、尺寸、微观结构或纳米结构以及三维材料，是材料-细胞相互作用中研究较多的因素之一。拓扑结构能指导细胞变成长形，导致组蛋白乙酰化和 H3K4 甲基化全面增加，从而促进重编程和分化。拓扑结构能引导细胞变为更扩散的和多边形形状，通常促进成骨分化，导致更高的增殖率<sup>[82-83]</sup>。同时，微观拓扑结构和纳米拓扑结构调控不同信号通路的细胞行为。在 3D 环境中，圆形细胞表现出组蛋白乙酰化水平降低。微观拓扑结构影响 Rho/RhoA 信号通路<sup>[84-85]</sup>。纳米拓扑结构，如纳米管和纳米槽，主要参与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因的差异表达<sup>[85-87]</sup>，而纳米光栅影响 Rho/RhoA 和 Wnt 信号通路中基因的表达<sup>[88]</sup>。生物材料的拓扑结构甚至可以取代小分子表观遗传修饰剂的作用，并显著提高重编程效率，给细胞重编程提供更安全、更方便的替代方法。如微槽或排列的纳米纤维的拓扑结构会引起组蛋白乙酰化和组蛋白甲基化的增加，即通过下调 HDAC 活性和上调 WD 重复域 5 的表达而提高成纤维细胞的重编程效率。因此，与小分子药物相比，利用生物材料增强细胞重编程效率可能更安全。

### 2.2.2 生物材料调节细胞表观遗传状态的应用

在组织工程领域，生物材料旨在提供最有利于种子细胞黏附、扩散、交流并分化成预期谱系的微环境。生物材料如何影响细胞功能的表观遗传组对于定制高度功能化的、个性化的、适于临床应用的生物材料设计和制备至关重要。生物材料的表观遗传调控不仅在再生医学中发挥重要作用，也是生物材料安全评估的潜在工具。在生物材料移植后，炎症反应诱发的表观遗传变化也将成为评估生物材料相容性的重要参数之一。表观遗传改变是解释生物材料为何具有持久性和记忆性的机制之一。

## 3 总结与展望

表观遗传调控机制已经成为外界环境影响因素和基因转录调控之间的重要联系。然而，由于细胞的异质性、材料特征的多样性与表观遗传调控的复杂性，许多科学问题有待解决：如表观遗传变化在什么条件下会影响基因调控的其他机制，特定环境因素改变细胞表型的精确机制是什么，环境触发表

观遗传学靶向的细胞类型或组织的决定因素是什么, 材料的不同生物学特性对表观遗传修饰的调控规律是什么。相信, 随着表观遗传学研究及相关技术手段的迅速发展, 其分子机制的揭示将有助于更好地理解如何将表观遗传学信息纳入组织工程中细胞的调控, 以及研制具有特定表观遗传调控作用的生物材料。

### [参 考 文 献]

- [1] Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 774-90
- [2] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 204-20
- [3] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [4] Lin JC, Jeong SW, Liang GN, et al. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell*, 2007, 12: 432-44
- [5] Wade PA, Wolffe AP. ReCoGnizing methylated DNA. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 575-7
- [6] Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, et al. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 2806-10
- [7] Holmgren C, Kanduri C, Dell G, et al. CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr Biol*, 2001, 11: 1128-30
- [8] Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, et al. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol*, 2001, 309: 1189-99
- [9] Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48350-9
- [10] 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
- [11] Fatemi M, Hermann A, Gowher H, et al. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *Eur J Biochem*, 2002, 269:4981-4
- [12] Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2002, 21: 5483-95
- [13] Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxy-lycytosine. *Science*, 2011, 333: 1300-3
- [14] Chen Z, Li S, Subramaniam S, et al. Epigenetic regulation: a new frontier for biomedical engineers. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 195-219
- [15] Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell*, 2013, 155: 39-55
- [16] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histonemodifications. *Cell Res*, 2011, 21: 381-95
- [17] Pasini D, Hansen KH, Christensen J, et al. Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and polycomb-repressive complex 2. *Genes Dev*, 2008, 22: 1345-55
- [18] Tian Z, Tolic N, Zhao R, et al. Enhanced top-down characterization of histone post-translational modifications. *Genome Biol*, 2012, 13: R86
- [19] Tan S, Davey CA. Nucleosome structural studies. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21: 128-36
- [20] Brown JD, Lin CY, Duan Q, et al. NF- $\kappa$ B directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol Cell*, 2014, 56: 219-31
- [21] Geisberg JV, Struhl K. Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation, a method for analyzing co-occupancy of proteins at genomic regions *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e151
- [22] Rhee HS, Pugh BF. Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell*, 2011, 147: 1408-19
- [23] Brinkman AB, Gu H, Bartel SJ, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation crosstalk. *Genome Res*, 2012, 22: 1128-38
- [24] Statham AL, Robinson MD, Song JZ, et al. Bisulfite sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res*, 2012, 22:1120-7
- [25] Trifonov EN. Cracking the chromatin code: precise rule of nucleosome positioning. *Phys Life Rev*, 2011, 8: 39-50
- [26] Pugh BF. A preoccupied position on nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 923
- [27] Struhl K, Segal E. Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 267-73
- [28] Zhang Z, Wippo CJ, Wal M, et al. A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science*, 2011, 332: 977-80
- [29] Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 2007, 129: 823-37
- [30] Hesselberth JR, Chen X, Zhang Z, et al. Global mapping of protein-DNA interactions *in vivo* by digital genomic footprinting. *Nat Methods*, 2009, 6: 283-9
- [31] Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, et al. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*, 2013, 10: 1213-8
- [32] Giresi PG, Kim J, McDaniell RM, et al. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res*,

- 2007, 17: 877-85
- [33] Dekker J, Rippe K, Dekker M, et al. Capturing chromosome conformation. *Science*, 2002, 295: 1306-11
- [34] van de Werken HJ, Landan G, Holwerda SJ, et al. Robust 4C-seq data analysis to screen for regulatory DNA interactions. *Nat Methods*, 2012, 9: 969-72
- [35] Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, et al. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res*, 2006, 16: 1299-309
- [36] Fullwood MJ, Liu MH, Pan YF, et al. An oestrogen-receptor- $\alpha$ -bound human chromatin interactome. *Nature*, 2009, 462: 58
- [37] Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, 326: 289-93
- [38] Jager R, Migliorini G, Henrion M, et al. Capture Hi-C identifies the chromatin interactome of colorectal cancer risk loci. *Nat Commun*, 2015, 6: 6178
- [39] Liu CG, Spizzo R, Calin GA, et al. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays. *Methods*, 2008, 44: 22-30
- [40] Li Y, Ding X, Mao J. Detection technologies of non-coding RNA. *J Anhui Agricult Sci*, 2010, 11: 5546-8
- [41] Zhu J, Fu H, Wu Y, et al. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 876-85
- [42] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 2010, 142: 409-19
- [43] Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, et al. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*, 2010, 40: 939-53
- [44] Gao R, Dong R, Du J, et al. Depletion of histone demethylase KDM2A inhibited cell proliferation of stem cells from apical papilla by de-repression of p15INK4B and p27Kip1. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379: 115-22
- [45] Yannarelli G, Pacienza N, Cuniberti L, et al. Brief report: the potential role of epigenetics on multipotent cell differentiation capacity of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 2013, 31: 215-20
- [46] Oh YS, Jeong SG, Cho GW. Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62: 583-90
- [47] Jung JW, Lee S, Seo MS, et al. Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 1165-76
- [48] Almeida MI, Silva AM, Vasconcelos DM, et al. miR-195 in human primary mesenchymal stromal/stem cells regulates proliferation, osteogenesis and paracrine effect on angiogenesis. *Oncotarget*, 2015, 7: 7-22
- [49] Wang C, Wang J, Li J, et al. KDM5A controls bone morphogenic protein 2-induced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells during osteoporosis. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2335
- [50] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, et al. Different methylation patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J*, 2015, 17: 71-82
- [51] Wang J, Wang CD, Zhang N, et al. Mechanical stimulation orchestrates the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells by regulating HDAC1. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2221
- [52] Li P, Yang YM, Sanchez S, et al. Deubiquitinase MYSM1 is essential for normal bone formation and mesenchymal stem cell differentiation. *Sci Rep*, 2016, 6: 22211
- [53] Wang YH, Huang XH, Yang YM, et al. Mysm1 epigenetically regulates the immunomodulatory function of adipose-derived stem cells in part by targeting miR-150. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 3737-46
- [54] Wu T, Liu Y, Fan Z, et al. miR-21 modulates the immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells through the PTEN/Akt/TGF- $\beta$ 1 pathway. *Stem Cells*, 2015, 33: 3281-90
- [55] Liu L, Wang Y, Fan H, et al. MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2012, 30: 1756-70
- [56] Xu C, Ren G, Cao G, et al. miR-155 regulates immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by targeting TAK1-binding protein 2. *J Biol Chem*, 2013, 288: 11074-9
- [57] Dixon JR, Jung I, Selvaraj S, et al. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature*, 2015, 518: 331-6
- [58] Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 427-39
- [59] Ang YS, Tsai SY, Lee DF, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 2011, 145: 183-97
- [60] Onder TT, Kara N, Cherry A, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*, 2012, 483: 598-602
- [61] Chen J, Liu H, Liu J, et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet*, 2013, 45: 34-42
- [62] Matoba S, Liu Y, Lu F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159: 884-95
- [63] 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
- [64] Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C. Therapeutic epigenetic reprogramming of trained immunity in myeloid cells. *Trends Immunol*, 2019, 40: 66-80
- [65] Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol*, 2013, 120: 163-84
- [66] Kapellos TS, Iqbal AJ. Epigenetic control of macrophage



- polarisation and soluble mediator gene expression during inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6591703
- [67] Novakovic B, Habibi E, Wang SY, et al.  $\beta$ -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*, 2016, 167: 1354-68
- [68] Larsson L, Pilipchuk SP, Giannobile WV, et al. When epigenetics meets bioengineering- material characteristics and surface topography perspective. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106: 2065-71
- [69] Lv L, Tang Y, Zhang P, et al. Biomaterial cues regulate epigenetic state and cell functions-a systematic review. *Tissue Eng Part B Rev*, 2018, 24: 112-32
- [70] Chen Z, Li S, Subramaniam S, et al. Epigenetic regulation: a new frontier for biomedical engineers. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 195-219
- [71] Li Y, Chun JS, Kurpinski K, et al. Biophysical regulation of histone acetylation in mesenchymal stem cells. *Biophys J*, 2011, 100: 1902-9
- [72] Thakar RG, Cheng Q, Patel S, et al. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J*, 2009, 96: 3423-32
- [73] Downing TL, Soto J, Morez C, et al. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat Mater*, 2013, 12: 1154-62
- [74] Jain N, Iyer KV, Kumar A, et al. Cell geometric constraints induce modular gene-expression patterns via redistribution of HDAC3 regulated by actomyosin contractility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 11349-54
- [75] Versaevel M, Grevesse T, Gabriele S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun*, 2012, 3: 671
- [76] Roca-Cusachs P, Alcaraz J, Sunyer R, et al. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation. *Biophys J*, 2008, 94: 4984-95
- [77] Le Beyec J, Xu R, Lee SY, et al. Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, 2007, 313: 3066-75
- [78] Vergani L, Grattarola M, Nicolini C. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 1447-61
- [79] Kulangara K, Yang J, Chellappan M, et al. Nanotopography alters nuclear protein expression, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One*, 2014, 9: e114698
- [80] Talwar S, Jain N, Shivashankar GV. The regulation of gene expression during onset of differentiation by nuclear mechanical heterogeneity. *Biomaterials*, 2014, 35: 2411-9
- [81] Morgan JT, Wood JA, Shah NM, et al. Integration of basal topographic cues and apical shear stress in vascular endothelial cells. *Biomaterials*, 2012, 33: 4126-35
- [82] Lv L, Liu Y, Zhang P, et al. The nanoscale geometry of TiO<sub>2</sub> nanotubes influences the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by modulating H3K4 trimethylation. *Biomaterials*, 2015, 39: 193-205
- [83] Liu W, Wei Y, Zhang X, et al. Lower extent but similar rhythm of osteogenic behavior in hBMSCs cultured on nanofibrous scaffolds versus induced with osteogenic supplement. *ACS Nano*, 2013, 7: 6928-38
- [84] Seo CH, Jeong H, Feng Y, et al. Micropit surfaces designed for accelerating osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells via enhancing focal adhesion and actin polymerization. *Biomaterials*, 2014, 35: 2245-52
- [85] Ogino Y, Liang R, Mendongca DB, et al. RhoA-mediated functions in C3H10T1/2 osteoprogenitors are substrate topography dependent. *J Cell Physiol*, 2016, 231: 568-75
- [86] Wang W, Zhao L, Ma Q, et al. The role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation. *Biomaterials*, 2012, 33: 7993-8002
- [87] Yu W, Zhang Y, Xu L, et al. Microarray-based bioinformatics analysis of osteoblasts on TiO<sub>2</sub> nanotube layers. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 93: 135-42
- [88] McMurray RJ, Gadegaard N, Tsimbouri PM, et al. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat Mater*, 2011, 10: 637-44