

DOI: 10.13376/j.cbls/2021038

文章编号: 1004-0374(2021)03-0346-09

维生素C与体细胞核移植介导的重编程

王蓉蓉¹, 季一杰¹, 徐燕宁^{2*}, 沈星辉^{1*}, 雷 蕾¹

(1 哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150000; 2 天津市中心妇产科医院/南开大学附属妇产医院病理科, 天津市人类发育与生殖调控重点实验室, 天津 300110)

摘要: 维生素C (vitamin C, VC)是一种常见的天然小分子, 可作为抗氧化剂在各种生化反应中发挥重要作用。近年来有研究发现, 体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)胚胎的发育率在VC的存在下可以显著提高, 其中一个重要的原因可能是VC参与了DNA和组蛋白的去甲基化, 使供体细胞的甲基化水平在核移植前后能够降至与体外受精的胚胎相似。该文综述了VC在提高SCNT介导的重编程效率方面的可能的分子机制, 为进一步探索VC提高SCNT胚胎发育效率的机制提供了一定的理论依据。

关键词: 维生素C; 重编程; 体细胞核移植; 组蛋白修饰; DNA甲基化

中图分类号: Q813; R394.2 **文献标志码:** A

Vitamin C and somatic cell nuclear transfer-mediated reprogramming

WANG Rong-Rong¹, JI Yi-Jie¹, XU Yan-Ning^{2*}, SHEN Xing-Hui^{1*}, LEI Lei¹

(1 Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150000, China;
2 Tianjin Key Laboratory of Human Development and Reproductive Regulation, Department of Pathology, Tianjin Central Hospital of Gynecology Obstetrics/Nankai University Affiliated Maternity Hospital, Tianjin 300100, China)

Abstract: Vitamin C (VC) is a common natural small molecule that can play an important role in various biochemical reactions as an antioxidant. In recent years, it has been discovered that in the presence of VC, the development rate of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos has increased significantly. One of the important reasons may be that VC is involved in the demethylation of DNA and histones, so that donor cells can reduce the methylation level as much as possible to the *in vitro* fertilization group before and after nuclear transfer. This article reviewed the possible molecular mechanism of VC in improving the efficiency of SCNT-mediated reprogramming, and provided a basis for further exploring the mechanism of VC improving the efficiency of SCNT embryo development.

Key words: vitamin C; reprogramming; somatic cell nuclear transfer; histone modification; DNA methylation

重编程是指将体细胞现有的分化记忆抹去, 使之回到类似胚胎细胞的状态并重新获得全能性或者多能性的过程。到目前为止, 研究人员已经建立了3种核重新编程的方法: 细胞融合、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)和体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)。在细胞融合的过程中通常运用3种方法: 生物诱导法, 如灭活的仙台病毒(Sendai virus)诱导; 化学诱导法, 如聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)以及物理诱导法, 如电融合、离心法融合等。iPSC则是导入特定的转

录因子, 从而使终末分化的细胞诱导成为具有多潜能的干细胞; 而SCNT则是将体细胞注入去核的卵母细胞中, 通过激活培养和移植, 从而可以获得一个个体的技术。这3种核重编程的方法各有优缺点, 其中, iPSC和SCNT因有着更多的应用前景而

收稿日期: 2020-09-27; 修回日期: 2020-11-04

基金项目: 天津市中心妇产科医院/天津市人类发育与生殖调控重点实验室开放基金资助(2019XHY05)

*通信作者: E-mail: xhshen@ems.hrbmu.edu.cn (沈星辉); xuyanning0616@163.com (徐燕宁)

被广泛研究。两者相比, iPSC因不涉及卵细胞而不受伦理问题的束缚, 通过这种技术能获得不与人体排斥的器官, 未来可以解决很多再生医学上的问题; 但在研究中发现, 使用这种技术可能会产生一些无法预料的突变^[1], 还有可能存在诱癌或促癌等安全性问题。因此, 目前SCNT成为了研究再生医学的一个重要途径。

首先, 直接利用SCNT技术可以研究细胞发育过程中不同基因的表达规律和调控机理; 利用该技术建立起稳定的动物模型, 利于研究人类疾病的发病机理, 揭示基因结构和功能间的关系; 利用动物克隆技术可以获得足够数量的动物器官用于人体器官移植, 缓解目前移植器官供体严重缺乏的问题, 从而挽救更多人的生命; 当然, 动物克隆技术还可用于延缓珍稀濒危动物的灭绝。此外, 在人SCNT胚胎的内细胞团中可以提取到人胚胎干细胞, 这种干细胞可以更新和替换损坏的细胞和组织, 减缓甚至治愈组织和器官功能失调或受损的患者的病情。

2013年, 美国俄勒冈健康与科学大学的Shoukhrat Mitalipov团队将人类皮肤细胞核移植到卵母细胞中, 从形成囊胚的内细胞团中获得了人类胚胎干细胞, 这种胚胎干细胞与从受精胚胎中获得的干细胞很相似, 没有出现任何染色体异常, 表明这种细胞具有正常的基因活性, 能分化发育为更多特定的细胞类型, 替换受损组织^[2]。但由于卵母细胞对体细胞核的重编程不完全, 以及培养环境等各种因素的影响, 获取人核移植胚胎干细胞的建系效率比较低, 样品也很不容易获取, 因此先在动物实验中探寻实验条件, 进而提高体细胞核移植的发育率和发育潜能显得尤为重要。

然而, 在所有的实验动物中, 体细胞克隆效率仍然很低。影响克隆动物生产效率的因素有很多, 如克隆胚胎体外生产过程中各个环节处理、体外培养条件以及克隆胚胎自身质量等, 而卵母细胞对供体细胞核重编程的不完全也是其中的一个重要影响因素。

当含有少量细胞质的体细胞注入到去核的M II期的卵母细胞后, 可能由于卵母细胞内高水平的促成熟因子(maturation-promoting factors, MPFs)的激活, 体细胞以类似有丝分裂中期的杆状形态折叠, 过早进入染色质凝聚(premature chromatin condensation, PCC)状态, 而这一状态可以通过化学信号或者电信号激活而退出。这种从类似有丝分裂中期到减数第二次分裂中期的转变有可能是已分化的体细胞获得

全能性的一个关键步骤, 因为在iPSC重编程期间没有这样的转变^[3]。在SCNT胚胎的发育过程中, 染色质虽然经历了解密化, 并逐步重组, 但与体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)胚胎相比, 在SCNT胚胎中还是能观察到许多异常, 如2-细胞迟滞、H3K9me3富集, 以及染色质松弛的效率低或者相对延迟^[4]等, 且两者的甲基化程度也不尽相同。

合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)是哺乳动物胚胎发育的关键, 通常发生在胚胎2-细胞阶段。筛选发现, Dux、Dppa2和Dppa4是增强SCNT中ZGA的关键因子, 直接注射ZGA的诱导剂, 瞬时过表达Dux能够改善SCNT胚胎的发育^[5]。

在SCNT过程中发生的重编程事件有以下几个: 染色体重塑、组蛋白替代、转录组激活、组蛋白修饰改变、DNA去甲基化(图1)^[6]。人们把更多的目光聚焦在组蛋白修饰以及DNA去甲基化上, 将这两个事件的进程在SCNT和IVF胚胎中进行对比研究。与体细胞相比, 多能干细胞和胚胎干细胞处于DNA低甲基化状态, 并且哺乳动物的生殖细胞也经历了广泛的DNA去甲基化, 这在很大程度上是通过在连续的细胞分裂过程中被动的甲基化稀释实现的, 并伴随着TET酶的DNA主动去甲基化^[7]。同时, 组蛋白的甲基化也被认为是供体细胞核重编程的主要障碍之一^[8]。

针对重编程障碍这一大问题, 人们尝试了多种方法, 如使用组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂短暂处理SCNT胚胎, 使多种哺乳动物的SCNT重编程效率得到改善, 但其改善程度却不足以使SCNT产生出用于治疗的人胚胎干细胞^[9-10]。

近年来, 陆续有研究人员发现, 维生素C(vitamin C, VC)能从多个方面提高重编程及诱导多能干细胞的效率, 而VC在SCNT介导的重编程中能否起到同样的作用也引起了人们的猜想。VC, 又称抗坏血酸(ascorbic acid), 是一种灵长类必需的营养物质。大多数哺乳动物可通过代谢途径从葡萄糖中合成抗坏血酸盐, 然而由于长期突变的累积, 灵长类、蝙蝠和土拨鼠等物种已经丧失了VC合成能力, 因此, 人类必须通过饮食来获取VC。VC因在体内传递电子而广泛地参与生物体中的各种生化反应, 它不仅能够抗氧化^[11]、参与儿茶酚胺和肉碱的合成^[12], VC还介导DNA去甲基化酶TET蛋白^[13]和组蛋白去甲基化酶KDM蛋白降低甲基化水平^[14]。此外, VC还存在可能松散染色质的作用^[15]。而本文就VC在诱导体细胞重编程这一过程中的作用机制

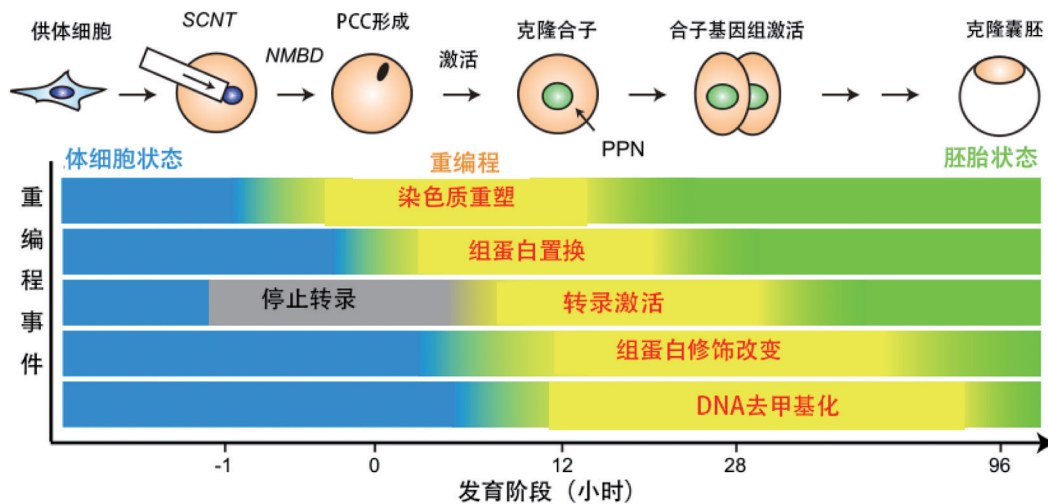


图1 SCNT重编程过程中发生的细胞和分子事件^[6]

以及近年来其在体细胞核移植中的应用展开讨论。

1 SCNT介导的重编程效率低的原因

1.1 组蛋白修饰中H3K9me3水平高

组蛋白修饰是真核生物中最重要的控制基因转录调节的表观遗传修饰之一，其中组蛋白甲基化和去甲基化又是其最主要的修饰，发生在精氨酸和赖氨酸上的共价修饰作用，被称为组蛋白甲基化作用。赖氨酸和精氨酸残基均含有氨基，具有碱性和疏水性。赖氨酸可以用甲基取代其 $-NH_3^+$ 基团中的每一个氢而进行单甲基化、二甲基化或三甲基化。在游离 $-NH_2$ 和 $=NH_2^+$ 基团下，精氨酸可以被单或二甲基化^[16]。氨基酸残基上每添加一个甲基都需要一组特定的蛋白质酶，并要求其带有底物和辅酶因子。通常，精氨酸残基的甲基化需要含有蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMT)的复合物，而赖氨酸的甲基化则需要特定的含有进化保守的SET结构域的组蛋白甲基转移酶(HMT)^[17]。

赖氨酸有3种不同的甲基化状态，分别与不同的核特征及转录状态相关。为形成上述甲基化状态，细胞利用相应的酶在组蛋白的特定赖氨酸中添加(赖氨酸甲基转移酶, KMT)和去除(赖氨酸去甲基化酶, KDM)不同程度的甲基化。研究表明，在转录激活(H3K4、K36、K79)和沉默(H3K9、K27、H4K20)的过程中均涉及到了赖氨酸甲基化，其甲基化程度与不同的转录效应相关^[18]。组蛋白甲基转移酶KDM家族是属于Fe(II)和2-氧戊二酸依赖性双加氧酶家族，研究发现该家族成员中的KDM3和KDM4可以降低H3K9me3的水平，并且能使诸如

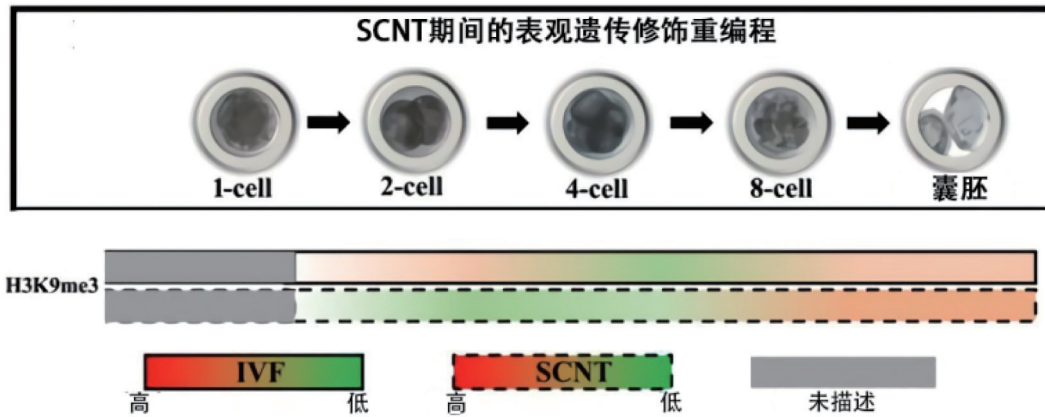
Nanog、Sox2、Dppa5a等多能性相关的基因得以相对正确地表达^[19]。

H3K9甲基化是前体iPSC (pre-iPSC)状态的一个重要的表观遗传决定因素，甲基移除可使得iPSCs发生完全重编程。研究人员构建了一组稳定的pre-iPSC细胞，它们具有多能特性，但不激活其核心多能网络。利用这些pre-iPSC细胞，研究人员证实血清中的骨形态发生蛋白(BMPs)是阻滞重编程的一个关键信号分子，并证实H3K9甲基转移酶是BMPs的下游靶点。H3K9通过甲基转移酶与对应的去甲基酶在核心多能位点调控H3K9甲基化，充当着pre-iPSC细胞命运的开关。H3K9二甲基化或三甲基化招募异染色质蛋白1 (HP1)，并在其占据的位置上建立异染色质状态。因此，H3K9甲基化和去甲基化之间的平衡可以提供常染色质和异染色质之间的动态转换。如果H3K9高甲基化，则会导致异染色质富集，从而不利于重编程，增加细胞发育过程的不确定性^[20]。

在SCNT过程中，染色质的可及性与核小体可定位性使得供体细胞核的染色体有望可以经过全局的重编程。但是与IVF胚胎相比后发现，在供体细胞和二细胞期胚胎中均存在某些富集了异染色质标记H3K9me3的区域(图2)^[21]，组蛋白上的甲基化通常与大多数基因的转录抑制有关，而作为供体细胞染色质上的抑制标记，H3K9me3已经被证实是克隆胚胎中的一个表观遗传障碍，它阻碍了合子基因组激活后各基因的正确转录^[22]。

1.2 移植前DNA高甲基化

DNA甲基化是一种表观遗传修饰，DNA甲基



上: SCNT胚胎; 下: IVF胚胎。SCNT胚胎呈现出去甲基化的延迟以及高水平的H3K9me3。

图2 猪SCNT胚胎和IVF胚胎ZGA之后的H3K9me3的比较

化主要形成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)和少量的N6-甲基嘌呤(N6-methyl purine, N6-mA)及N4-甲基胞嘧啶(N4-methylcytosine, 4-mC)^[23]。在哺乳动物中, 5-mC是DNA修饰的主要形式, 且主要修饰基因组中的CpG位点, 在发育和疾病中起着重要作用, 其主要功能包括介导基因组印记和X染色体失活、抑制转座因子和调节转录。

在DNA甲基化转移酶(DNMT)的作用下, 将甲基从S-腺嘌呤甲硫氨酸(SAM)转移至胞嘧啶残基的第五个碳, 形成5-mC。5-mC是一种甲基化的碱基修饰, 由DNA甲基转移酶催化产生, 以调节基因表达和基因沉默。5-mC由维持性甲基转移酶DNMT1维持, 该酶通过其功能伙伴UHRF1识别半甲基化的CpG二元体, 确保在DNA复制后新合成的链上重新建立5-mC^[7]。5-hmC是一种由TET羟化酶催化产生的DNA修饰, 被认为具有基因调控功能, 参与诸如发育、多能性和RNA剪接的调控等过程^[24]。TET酶是关键的去甲基化酶, 也是属于Fe(II)和2-氧戊二酸依赖性双加氧酶。TET介导的氧化反应需要氧气和 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)作为底物, Fe(II)作为辅助因子来生成二氧化碳和琥珀酸盐。因此, 底物和辅助因子的可用性直接影响反应动力学^[25-26]。

TET酶可将5-mC氧化为5-hmC, 也可以将5-hmC继续氧化为5-甲酰胞嘧啶(5-formylcytosine, 5-fC)和5-羧基胞嘧啶(5-carboxylcytosine, 5-caC)^[27]。5-hmC作为DNA去甲基化的关键, 对于维持机体的正常生理功能具有重要意义。5-fC和5-caC被胸腺嘧啶DNA糖苷酶(TDG)识别和切除, 再通过碱基互补配对主动去甲基化。TET酶和TDG协同作用, 使DNA去甲基化修饰有效地进行。

细胞分裂期间, TET蛋白将5-mC氧化为5-hmC, 5-hmC能够阻滞DNMT1维持甲基化的作用, 稀释/降低随后DNA复制循环中基因组中的甲基化胞嘧啶的密度, 进而实现DNA被去甲基化^[28]。而在克隆胚胎中, 供体细胞基因组DNA高度甲基化, DNA甲基化重编程(特别是DNA去甲基化)是正常发育的必要条件。在SCNT期间, 基因组也经历去甲基化/再甲基化, 但这与正常胚胎相比是延迟和不完全的。在牛成纤维细胞中过表达TET3, 将其注入到去核的MII期的卵母细胞中, 能够使SCNT胚胎中的多能性基因*Nanog*、*Pou5f1* (*Oct4*)的整体甲基化水平降低, 提升SCNT胚胎的胚泡率^[29]。

2 VC与重编程的关系

VC是一种天然的小分子, 是六碳多羟酸性化合物, 因能防治坏血病又叫做抗坏血酸, 其分子中C2、C3位上的烯醇式羟基极易解离出H⁺而具有酸性, 还可以释放H⁺而具有还原性。自19世纪被发现以来, VC的许多作用都为人熟知, 如抗氧化作用、抗自由基、抑制酪氨酸酶的形成, 参与体内多种羟化反应以及人体内的氧化还原反应, 维持还原性谷胱甘肽浓度和保持巯基酶的活性, 发挥其解毒作用等; 并且, VC还可以使难以吸收的三价铁还原成易于吸收的二价铁, 从而提高血红蛋白的运氧能力等。

在重编程的研究中发现, VC可以促进组蛋白去甲基化和DNA去甲基化, 其原因在于它可以作为供电子体, 将铁离子维持在二价状态, 从而维持KDM酶以及TET酶的底物浓度, 提高其酶活性, 使得H3K9me3和DNA甲基化水平下降^[13,20]。同时,

VC还有一定的松散异染色质的作用,可以使得诱导重编程的山中因子中的KLF4更容易的结合到位点上,从而促进重编程的过程^[15](图3)。

2.1 VC促进组蛋白去甲基化酶的功能

已有研究表示, H3K9甲基化是体细胞重编程为iPSCs的一个屏障。H3K9me3被认为是抑制基因表达的标记组蛋白,组蛋白去甲基化酶KDM3a/b和KDM4是H3K9me3/me2去甲基化所必需的。KDM3a/b和KDM4是 α -KG和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶,VC作为辅酶因子不影响KDM酶的表达,但会增强KDM3a/b和KDM4酶的催化活性,导致H3K9me2的可逆性丢失和H3K9me3的水平下降^[14]。

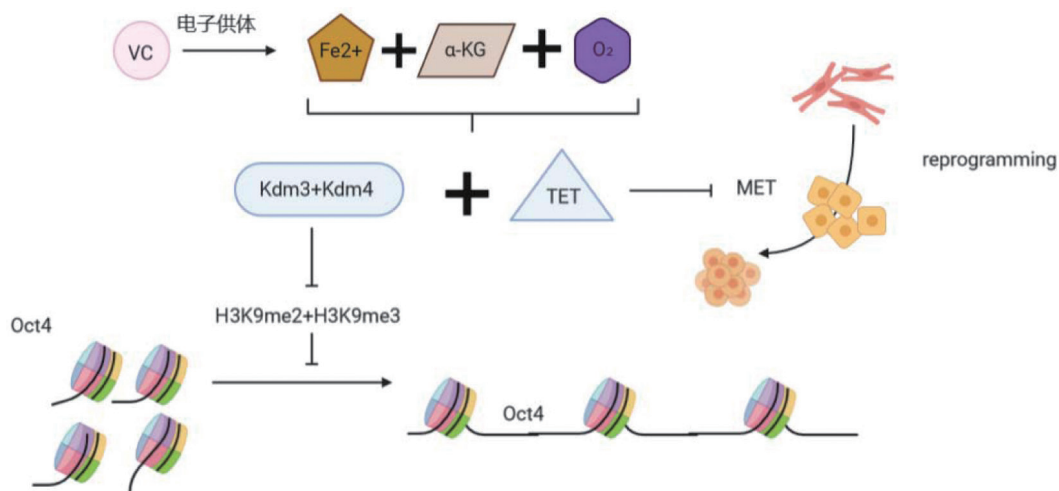
VC还参与H3K36me2/me3的去甲基化,使其表达显著降低,促进iPSC的生成。进一步研究发现,两个 $\text{Fe}(\text{II})$ 和2-氧戊二酸(2OG)依赖性组蛋白去甲基化酶JHDM1a和JHDM1b,对于调节H3K36的去甲基化起着重要作用。VC作为辅酶因子增强JHDM1a和JHDM1b的活性,JHDM1b通过其组蛋白脱甲基酶活性去除H3K36me2/3标记,抑制Ink4/Arf位点,进而减少诱导细胞衰老,增强OCT4重编程^[30]。此外,在VC存在的情况下,JHDM1b去除H3K36me2/3标记,OCT4才能结合和激活microRNA-302-367簇,而microRNA-302-367簇的启动是JHDM1b增强重编程的相关机制。MicroRNA-302-367簇在维持ESC细胞周期中起着至关重要的作用,这种microRNA簇通过靶向降低TGF- β 受体2、

促进E-cadherin表达以及加速MET来促进重编程^[31]。

2.2 VC介导重编程中TET蛋白作用,降低DNA甲基化水平

研究发现,VC可以在胚胎干细胞中诱导TET介导的DNA去甲基化^[32]。TET蛋白在靠近C端区域拥有一个催化结构域,该结构域具有3个金属离子(Fe^{2+})和1个 α -KG的结合位点,是生物体内的一种 α -KG和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶。TET以VC依赖的方式调节MET关键位点的5-hmC形成,而VC作为辅酶因子,发挥着类似TET蛋白的激动剂的作用,能够刺激TET蛋白的表达^[24,33]。TET蛋白能够催化5-mC的氧化和5-hmC的形成,VC可显著提升胚胎干细胞以及小鼠和人成纤维细胞重编程为iPSC的过程中5-hmC的产量。

TET家族的基因在不同细胞类型中表达差异较大,TET蛋白表达的组织特异性提示,DNA去甲基化调控具有很大的动态性,如TET3在受精卵中的雄性原核特异性富集,而卵母细胞中缺乏TET3,导致其对供体细胞核的重编程能力不足^[34];在ESC中,VC与TET1、TET2以相互依赖的方式保持TET活性,并且是DNA精确甲基化的直接调节器^[35]。最近也有证据表明,在小鼠母体妊娠期间,5-hmC所参与的重编程确实需要较高水平VC的参与^[36]。在小鼠胚胎成纤维细胞中,TET1虽然低表达,却也能够以VC依赖的方式调节体细胞重编程,但是在缺乏VC的情况下,TET1可能依靠与5-hmC形成无



VC作为电子供体维持铁离子的二价状态,使 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶KDM3/KDM4/TET的底物增多,从而使其去甲基化作用得到更好的发挥。KDM3/KDM4可以降低H3K9的甲基化水平,亦可能通过调节H3K9me3辅助松散异染色质。TET可促进间充质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)进程,从而促进重编程。

图3 VC作用示意图

关的途径和功能促进体细胞的重编程, 而这种方式的重编程效率非常低^[37]。

DNA甲基化和组蛋白甲基化之间存在广泛的串扰, DNA去甲基化也可能会影响组蛋白去甲基化, 但VC诱导的5-hmC/5-mC变化与VC诱导的H3K9me2减少之间相互独立^[38], 其中的机制还需要进一步研究。

除此之外, 裴端卿的团队曾发现, 在早期重编程中OCT4可作为先驱因子松散异染色质, 促进KLF4与重编程关键位点的结合及上皮基因的表达, 从而促进iPSC重编程。然而, 异染色质能否被OCT4打开, 很大程度取决于它的连接结构域的L80残基。L80残基的点突变会使异染色质松动不活跃, 阻断KLF4的结合, 阻碍重编程进程。而VC可以在重编程的早期阶段减少L80残基点突变带来的异染色质松动缺陷, 增强KLF4的结合, 以提高重编程效率^[15]。

3 VC在体细胞核移植中的使用

3.1 作用于核移植前的供体细胞

VC在细胞和胚胎培养中的作用得到广泛的探索, 研究发现它还可以用于促进细胞重编程(表1)。2015年, Chen等^[39]发现, 用VC处理成年牛成纤维细胞可以改善供体细胞的生理功能, 并提高克隆胚胎的发育潜力。

一定浓度的VC处理可以促进细胞增殖, 使供体细胞5-hmC水平增加, 降低供体细胞DNA甲基化水平, 提高体细胞核移植胚胎的发育能力。此外, VC处理可使牛供体细胞的染色质松散。通过RNA-Seq研究早期胚胎转录谱的变化, 发现VC处理增加了细胞-底物黏附连接相关基因的表达。VC处理供体细胞后进行SCNT, 实验组第一天的卵裂率显著高于对照组, 但第二天差异不再显著; 不过, 实验组的囊胚率高于对照组, 达到了39.6%, 与IVF组胚胎比率相似^[39]。

GO分析表明, 用VC处理供体细胞促进了细胞自噬的激活, 而自噬在克隆的2-细胞胚胎中是缺乏的, 自噬激活剂雷帕霉素能增加克隆囊胚的形成率。另外, 用VC处理供体细胞还恢复了一些编码基因和长非编码RNA在克隆胚胎中的异常表达, 其中包括锌指蛋白641 (ZNF641)。虽然不能确定ZNF641的过表达是否促进胚胎发育, 但其衍生的囊胚质量却得到提升, VC处理挽救了ZNF641的表达, 提高了克隆胚胎的发育潜力^[40]。

3.2 作用于植入前胚胎

RNA-Seq分析表明, 体细胞核移植胚胎2-细胞发育能力低下的主要原因是H3K9甲基化水平的维持而导致的基因表达异常^[8]。根据这一结果, 在小鼠、牛、羊和猪的模型中均证明, 通过人为降低H3K9的甲基化水平可以改善体细胞核移植胚胎的发育。VC作为辅酶因子增加促进胚胎基因组激活(ZGA)的赖氨酸去甲基化酶KDM家族的催化活性, 显然这为冲破2-细胞发育壁垒提供了一个可能性。

有证据显示, 小鼠体细胞核移植胚胎激活后, 在去离子化牛血清白蛋白(d-BSA)的存在下, 使用组蛋白去乙酰化抑制剂Trichostatin A (TSA)和VC持续处理能够显著降低H3K9me3的水平并显著提高小鼠的克隆效率, 并且经过2-细胞胚胎移植后, 有15%的克隆胚胎发育到足月。TSA和VC的处理可能导致重编程抗性基因表达上调, 并且提高了早期胚胎特异性逆转录元件的表达, 也包括上调了KDM3的表达^[41-42]。另外, 也有研究报道联合使用VC与组蛋白去乙酰化酶抑制剂Psammaplin A (PsA)或者微丝解聚剂Latrunculin A (LatA)能促进克隆胚胎发育, 但与单独使用这三者的效果没有区别。同时, 未检测到VC和LatA联合使用对多能性基因(Oct4和Nanog)或核重编程标记(H3K14乙酰化、H3K9甲基化以及DNA甲基化和羟甲基化)的显著影响^[43]。

然而, 在猪SCNT胚胎中, VC处理有助于猪体细胞核移植胚胎的体内和体外发育, 其体外发育率的提高与H4K5乙酰化水平的提高以及囊胚中OCT4、SOX2和KLF4表达水平的提高有关^[44]。在另一项试验中, 浓度为100 mmol/L的VC提高了猪SCNT胚胎的发育能力。100 mmol/L的VC处理组的囊胚形成率(27.3%)显著高于对照组和其他处理组(16.4%~19.6%)。100 mmol/L的VC培养的囊胚的内细胞团、滋养层细胞和总细胞数(分别为14.6、43.2和57.8)明显高于对照组和其他实验组(分别为8.8~11.0、24.7~32.9和33.5~43.8)^[45]。

VC促进胚胎发育的作用是目前其他抗氧化剂无法替代的, 故而猜想其发挥作用的机制可能并不只是最熟知的抗氧化作用, 但目前其中的详细机制还不甚了解。另外, SCNT介导的重编程机制没有得到更具体的探讨, 尚不明确iPS中的重编程与SCNT介导的重编程有哪些异同点。VC是目前重编程中研究较多的天然小分子, 在母体妊娠期间不可或缺, 那么VC在SCNT介导的重编程中的影响机制究竟是怎样的, 目前还没能得到完整的解释。也有多个实

表1 不同动物的胚胎经过不同浓度VC处理后的发育情况表

分组	重编程数	激活数 (%)	激活后卵母细胞发育到不同阶段的数量 (%)				平均细胞数		
			2细胞	桑葚胚	囊胚	内细胞团	滋养层	总计	
小鼠	NT	176 (94.6)a	143 (81.3) ^{ab}	111 (63.1) ^{ab}	47 (26.7) ^a	(10.7 ± 0.7) ^a	(24.9 ± 1.5) ^a	(35.6 ± 2.1) ^a	
	VitC 8~9 h	200 (97.1) ^a	159 (79.5) ^a	112 (56.0) ^a	71 (35.5) ^{ab}	(12.8 ± 0.9) ^{ab}	(26.2 ± 1.7) ^{ab}	(39.0 ± 2.4) ^{ab}	
	VitC 16 h	209 (95.4) ^a	188 (90.0) ^c	152 (72.7) ^{bc}	89 (42.6) ^{bc}	(15.0 ± 0.7) ^b	(31.5 ± 1.3) ^{ab}	(46.4 ± 1.8) ^b	
	VitC 24 h	208 (95.4) ^a	184 (88.5) ^{bc}	149 (71.6) ^{bc}	92 (44.2) ^{bc}	(14.3 ± 0.7) ^b	(31.4 ± 1.5) ^{ab}	(45.7 ± 2.1) ^{ab}	
	VitC 120 h	207 (96.7) ^a	186 (89.9) ^c	159 (76.8) ^c	95 (45.9) ^c	(15.3 ± 0.8) ^b	(32.8 ± 1.5) ^b	(43.1 ± 2.1) ^b	
	ICSI	248 (98.0) ^a	237 (95.6) ^a	170 (68.5) ^{ab}	144 (58.1) ^a				
牛	IVF	not applicable			107 (45.3 ± 2.3) ^a	(29.7 ± 3.2) ^a	(75.0 ± 5.2) ^a	(105.3 ± 4.3) ^a	
	SCNT	237 (73.60 ± 1.9) ^a			62 (26.0 ± 1.1) ^b	(20.0 ± 2.5) ^a	(64.8 ± 4.4) ^a	(84.5 ± 4.3) ^b	
	VC-NT	271 (75.60 ± 2.6) ^a			107 (39.6 ± 1.8) ^a	(28.5 ± 4.0) ^a	(74.3 ± 4.2) ^a	(102.8 ± 5.0) ^a	
猪	Control	168 (77.7)	97 (57.8)	19 (19.6) ^a		(8.8 ± 1.5) ^a	(24.7 ± 4.8) ^a	(33.5 ± 5.7) ^a	
	50 μmol/L	176 (79.2)	122 (69.3)	20 (16.4) ^a		(11.0 ± 2.7) ^a	(32.9 ± 9.5) ^b	(43.8 ± 11.9) ^b	
	100 μmol/L	172 (77.8)	110 (64.0)	30 (27.3) ^b		(14.6 ± 3.4) ^b	(43.2 ± 9.9) ^c	(57.8 ± 12.7) ^c	
	200 μmol/L	148 (74.0)	99 (66.9)	16 (16.2) ^a		(10.4 ± 1.4) ^a	(28.7 ± 4.9) ^{ac}	(39.1 ± 5.9) ^{ab}	
	IVF	not applicable	180 (67.7)	27 (15.0) ^a		(10.8 ± 1.1) ^a	(29.6 ± 6.6) ^a	(40.4 ± 6.8) ^a	

注: VC处理小鼠、牛、猪的SCNT胚胎, 均能显著提升SCNT胚胎囊胚率^[39,43,45]。NT: 未做处理的SCNT组; ICSI: 单精注射组; IVF: 体外受精组; VC-NT: 用VC处理的SCNT组; 各动物种类之间不作比较, 仅在同种动物间比较; 同一列中无共同上标的数值差异有统计学意义($P < 0.05$)。

验通过VC处理改变供体细胞的整个甲基化水平, 从而提高整个基因组在卵母细胞中被完全重编程的可能性, 结果发现不论是在只处理供体细胞后再移植的胚胎还是直接处理重构的胚胎中, 都能看到胚胎的二细胞率和囊胚率均得到了显著的提升, 猜测可能与VC促进了组蛋白与DNA的去甲基化有关。

4 结语

SCNT技术具有广阔的应用前景, 但其介导的重编程效率低下仍然是主要问题。在导致重编程效率低下的关键因素中, 组蛋白修饰和DNA去甲基化的障碍尤为突出。VC能作为辅酶因子提高组蛋白甲基转移酶KDM和DNA去甲基化酶TET蛋白的酶活性, 在体细胞重编程中起到促进作用, 且这种促进作用在SCNT中亦得到验证。有证据表明在一定条件下, VC可以提升SCNT胚胎的发育率, 然而VC参与SCNT介导的重编程过程的分子机制尚未完全阐明, 需要进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Duan L, Wang Z, Shen J, et al. Comparison of reprogramming genes in induced pluripotent stem cells and nuclear transfer cloned embryos. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10: 548-60
- [2] Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153: 1228-38
- [3] Chen M, Zhu Q. Chromatin architecture reorganization in murine somatic cell nuclear transfer embryos. *Nat Commun*, 2020, 11: 1813
- [4] Zhang K, Wu DY, Zheng H, et al. Analysis of genome architecture during SCNT reveals a role of cohesin in impeding minor ZGA. *Mol Cell*, 2020, 79: 234-50.e9
- [5] Yang L, Liu X, Song L, et al. Transient Dux expression facilitates nuclear transfer and induced pluripotent stem cell reprogramming. *EMBO Rep*, 2020, 21: e50054
- [6] Matoba S, Zhang Y. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 471-85
- [7] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*, 2017, 18: 517-34
- [8] Liu W, Liu X, Wang C, et al. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010
- [9] Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, et al. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 2009, 138: 309-17
- [10] Yamada M, Johannesson B, Sagi I, et al. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, 2014, 510: 533-6
- [11] Pohanka M, Pejchal J, Snopkova S, et al. Ascorbic acid: an old player with a broad impact on body physiology including oxidative stress suppression and immunomodulation: a review. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12: 35-43
- [12] Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 2000, 23: 209-16
- [13] 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
- [14] Ebata KT, Mesh K, Liu S, et al. Vitamin C induces specific demethylation of H3K9me2 in mouse embryonic stem cells via Kdm3a/b. *Epigenet Chromatin*, 2017, 10: 36
- [15] Chen K, Long Q, Xing G, et al. Heterochromatin loosening by the Oct4 linker region facilitates Klf4 binding and iPSC reprogramming. *EMBO J*, 2020, 39: e99165
- [16] Blanc RS, Richard S. Arginine methylation: the coming of age. *Mol Cell*, 2017, 65: 8-24
- [17] Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 2001, 15: 2343-60
- [18] Black JC, Van Rechem C, Whetstine JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell*, 2012, 48: 491-507
- [19] Loh YH, Zhang W, Chen X, et al. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2007, 21: 2545-57
- [20] 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
- [21] Wang X, Qu J, Li J, et al. Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. *Front Genet*, 2020, 11: 205
- [22] 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
- [23] Zhang G, Huang H, Liu D, et al. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 2015, 161: 893-906
- [24] 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
- [25] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 2013, 502: 472-9
- [26] Lu X, Zhao BS, He C. TET family proteins: oxidation activity, interacting molecules, and functions in diseases. *Chem Rev*, 2015, 115: 2225-39
- [27] 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
- [28] Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of

- the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 4100-8
- [29] Zhang J, Hao L, Wei Q, et al. TET3 overexpression facilitates DNA reprogramming and early development of bovine SCNT embryos. *Reproduction*, 2020, 160: 379-91
- [30] 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
- [31] Liao B, Bao X, Liu L, et al. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem*, 2011, 286: 17359-64
- [32] Chung TL, Brena RM, Kolle G, et al. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2010, 28: 1848-55
- [33] Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ, et al. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*, 2017, 549: 476-81
- [34] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 2011, 477: 606-10
- [35] 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
- [36] DiTroia SP, Percharde M, Guerquin MJ, et al. Maternal vitamin C regulates reprogramming of DNA methylation and germline development. *Nature*, 2019, 573: 271-75
- [37] Chen J, Guo L, Zhang L, et al. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45: 1504-9
- [38] Kang J, Kalantry S, Rao A. PGC7, H3K9me2 and Tet3: regulators of DNA methylation in zygotes. *Cell Res*, 2013, 23: 6-9
- [39] Chen H, Zhang L, Guo Z, et al. Improving the development of early bovine somatic-cell nuclear transfer embryos by treating adult donor cells with vitamin C. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82: 867-79
- [40] Zhang L, Zhang Y, Han Z, et al. Transcriptome analyses reveal effects of vitamin C-treated donor cells on cloned bovine embryo development. *Int J Nul Sci*, 2019, 20: 2628
- [41] Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, et al. Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open*, 2017, 6: 415-24
- [42] Azuma R, Miyamoto K, Oikawa M, et al. Combinational treatment of trichostatin A and vitamin C improves the efficiency of cloning mice by somatic cell nuclear transfer. *J Vis Exp*, 2018, 26: 57036
- [43] Tian X, Mallol A, Santaló J, et al. Improved development of somatic cell cloned mouse embryos by vitamin C and latrunculin A. *PLoS One*, 2015, 10: e0120033
- [44] Huang Y, Tang X, Xie W, et al. Vitamin C enhances *in vitro* and *in vivo* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411: 397-401
- [45] Jeong YW, Park SW, Hossein MS, et al. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 2006, 66: 2104-12