

同步化处理小鼠成纤维细胞表观遗传水平的相对定量分析

纪少琿¹, 王喜宏¹, 季维智¹, 金立方^{1,2*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 云南省动物生殖生物学重点实验室, 云南 昆明 650223; 2. 绍兴文理学院 生命科学学院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 供体细胞的同步化处理可能改变其表观遗传特性, 进而影响胚胎的克隆效率。研究同步化处理对小鼠胎儿成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 组蛋白 H₃ K₉ 甲基化、乙酰化及组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化、三甲基化表达的影响。分离培养 MEFs, 增殖稳定的第 3 代 MEFs 分别用 5 mL/L 血清饥饿处理 4 d 或 15 mL/L DMSO 处理 2 d 使细胞处于增殖抑制期, 通过免疫组化染色和 Image-J 图像处理软件, 相对定量比较不同处理情况下组蛋白 H₃ K₉ 甲基化、乙酰化和组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化、三甲基化变化情况。Ki-67 染色检测结果表明, 两种同步化处理可使细胞处于 G₀ 期或 G₁ 期。DMSO 处理使 MEFs 组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平升高, 而 5 mL/L 血清饥饿处理则使其表达水平下降; 此外, 两种同步化处理均导致组蛋白 H₃ K₉ 甲基化和 H₃ K₄ 单甲基化表达下降, 但不影响组蛋白 H₃ K₄ 三甲基化的表达水平。研究结论表明: 同步化处理可改变 MEFs 组蛋白乙酰化和甲基化表达水平, 进而有可能影响胚胎克隆效率。

关键词: 小鼠胎儿成纤维细胞; 同步化处理; 组蛋白; 甲基化; 乙酰化

中图分类号: Q954.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0350-06

Relative Quantitative Analysis of Histone Methylation and Acetylation in Synchronized Mouse Embryonic Fibroblasts

Ji Shao-hui¹, Wang Xi-hong¹, Ji Wei-zhi¹, Jin Li-fang^{1,2*}

(1. Kunming Primate Research Center and Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. College of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China)

Abstract: Synchronization of donor cell cycle might affect epigenetic pattern of donor cells, which might have a further impact on the efficiency of embryo cloning. In this study, the effect of serum starvation or DMSO on histone H₃ K₉ methylation, acetylation and H₃ K₄ single-methylation, triple-methylation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) was studied. MEFs at the third passages were synchronized by treating with 5 mL/L serum for 4 days or 15 mL/L DMSO for 2 days. Histone H₃ K₉ methylation, acetylation and H₃ K₄ single-methylation, triple-methylation were detected by fluorescence microscope and analyzed by Image-J image processing software. Ki-67 staining showed that both serum starvation and DMSO were efficient in synchronizing cell into G₀ or G₁ stage of cell cycle. Compared with the control groups, the H₃ K₉ acetylation in the serum starvation groups was significantly reduced, while H₃ K₉ acetylation in the DMSO groups was remarkably increased. In addition, both serum starvation and DMSO treatment reduced the histone H₃ K₄ single-methylation and

收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700159/C100202) 和浙江省“生物医学工程”学科开放基金项目 (SW YX0907)

作者简介: 纪少琿 (1974-), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事干细胞生物学研究; *通讯作者: 金立方, E-mail: lifangj@sohu.com。

H₃ K₉ methylation, but H₃ K₄ triple - methylation was not changed. Thus, the results clearly proved that synchronization treatment obviously changed histone methylation and acetylation in MEFs, which might further affect the cloning efficiency of embryos.

Key words: mouse embryo fibroblasts; synchronization treatment; histone; methylation; acetylation

作为核移植过程的起始生物材料,供体细胞的质量和特性是影响体细胞核重编程和克隆胚发育的重要变量因素^[1]。对于具体的核移植实验而言,对体细胞的同步化处理可以获得更高比例的、性质更均一的体细胞用于核移植实验,研究还发现同步化处理后 G₀期或 G₁期的体细胞核有利于随后的克隆胚重编程和正常发育的进行^[2-6]。在这些同步化处理中,最常用到的方法是血清饥饿和可逆性的周期阻断药物(如 DMSO)。

供体细胞核进入成熟期的卵母细胞后,必然要经过表观遗传修饰的重新编排过程,回到胚胎开始发育的全能状态,若重编程过程不完全,必定会导致克隆效率的降低^[7-8]。但是体细胞核的重编程能力不仅仅是在其移入去核的卵母细胞后所体现,它在不同的供体细胞当中的潜能也不尽相同,并且对供体细胞进行不同的处理,也会导致其重编程的能力和程度不同^[9]。例如用组蛋白去乙酰化酶抑制剂如曲古抑菌素(TSA)处理供体细胞有利于克隆胚胎的重编程,并提高其囊胚发育率^[10-12]。但是,同步化处理是否会改变供体细胞的组蛋白表观遗传特性,从而进一步影响核移植后重编程的发生及克隆胚的正常发育,对此研究的还相对较少。

小鼠胎儿成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)作为核移植供体细胞具有取材方便、生长快和应用广泛等特点,是实验研究常用的工具细胞。本实验通过小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养,相对定量分析了血清饥饿和 DMSO 同步化处理对组蛋白 H₃ K₉ 甲基化、乙酰化和组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化、三单甲基化表达的影响,此研究不仅可为适宜的供体细胞处理方法选择提供参考,也为进一步研究体细胞核在卵母细胞中的重编程机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

清洁级昆明小鼠购自绍兴文理学院试验动物研究中心;细胞培养用的 DMEM 高糖培养基和新生小牛血清(NBS)购自 Gibco 公司;胰蛋白酶、EDTA、DMSO、多聚甲醛、Hoechst 33342、BSA 购自 Sigma 公司;兔抗组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化购自 Upstate Biotechnology 公司;兔抗组蛋白 H₃ K₉ 甲基化、兔抗组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化、兔抗组蛋白 H₃ K₄ 三甲基化均购自 Abcam 公司;兔抗 Ki-67 一抗及羊抗兔 FITC 二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 MEFs 的分离及培养 取孕 13.5 d 雌鼠,断颈处死,破腹取出胎鼠放入平皿中,超净工作台用酒精冲洗二三遍,再用 PBS 冲洗 3 遍,无菌条件下去除头、四肢和内脏,剩余组织清洗后剪碎成 1 mm³ 左右的小块,2.5 mL/L 胰蛋白酶 + 0.4 g/L EDTA 37 消化 3~5 min。加入等体积的有血清培养液终止消化。室温下静置 5 min,弃上清液,留下胚胎组织沉淀物。按上述方法重复消化胚胎组织三四次,将每次消化后所获的上层液合并,最后一次消化后弃组织块。将收集到的细胞悬液 1 200 r/min,离心 5 min。弃上清液,加入适量培养基(DMEM + 10% NBS),轻轻吸吹几次。37、(CO₂) = 5% 饱和湿度培养箱中培养。每天观察。细胞长到 80%~90% 满后,即细胞连成片,即可消化,按 1:3 传代。

1.2.2 细胞的同步化处理 等细胞长到 80%~90% 满后,用 2.5 mL/L 胰蛋白酶 + 0.4 g/L EDTA 消化后,按 1:3 方法传至第 3 代。当细胞汇合程度达到 50%~60% 时,此时的细胞正处于旺盛增殖状态。样品的细胞按照下列方法进行同步化处理。(1)血清饥饿处理:弃去原培养液,用无血清 DMEM 洗 1 遍,加入含有 5 g/L NBS 的 DMEM 培养基继续培养 4 d;(2)DMSO(二甲基亚砷)处理:弃去原培养液,加入含 15 mL/L DMSO 的细胞培养基处理 2 d。

1.2.3 细胞免疫荧光染色、荧光信号的采集和数据分析 对照组和处理组细胞用(多聚甲醛) = 4% 固定 10~15 min 之后,4 mL/L Triton(4 mol/L Triton + PBS)透膜 20 min, PBS 洗涤 3 遍后用 1 mL/L 牛

血清白蛋白封闭 30 min;处理组中任选一孔不加一抗直接加二抗(羊抗兔 FITC)室温孵育 60 min 作为阳性对照,其余加一抗(兔抗组蛋白 H₃ K₉ 甲基化,兔抗组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化,兔抗组蛋白 H₃ K₉ 单甲基化,兔抗组蛋白 H₃ K₉ 三甲甲基化,兔抗 Ki - 67)室温孵育 60 min。加带有 FITC 荧光标记的二抗室温孵育 60 min,之后用 Hoechst 或 PI 染色 5 min。每次更换试剂后用 PBS 清洗 3 遍。使用 LSM 510 META 型激光共聚焦显微镜进行检测,对于每次实验,所有的样品采用同样的参数扫描。图像荧光强度分析使用美国 NH 公司开发的 Image - J 图像处理软件,相对强度的测量参考相关的研究^[13],测定方法为:细胞核荧光强度 = (核区的荧光值 - 背景的荧光值) ÷ 核区的面积,最后对细胞核的荧光强度取平均值。对于不同细胞和实验间的差异用 SPSS 软件的 One - way ANOVA 分析方法进行均值差异显著性分析。

2 结 果

2.1 MEFs 的分离、培养及传代

将小鼠胚胎制备分离出的单细胞悬液接种后加培养液,吸吹均匀,放置于 37 ℃、(CO₂) = 5% 饱和湿度培养箱中培养。在 24 h 后显微镜下观察到贴壁的细胞多数为成纤维细胞,胞体透光、折射性好,胞核呈卵圆形,位于胞质中央(图 1 A)。培养的细胞增殖旺盛,2 ~ 3 d 后即可长满培养瓶的 90% 以上。

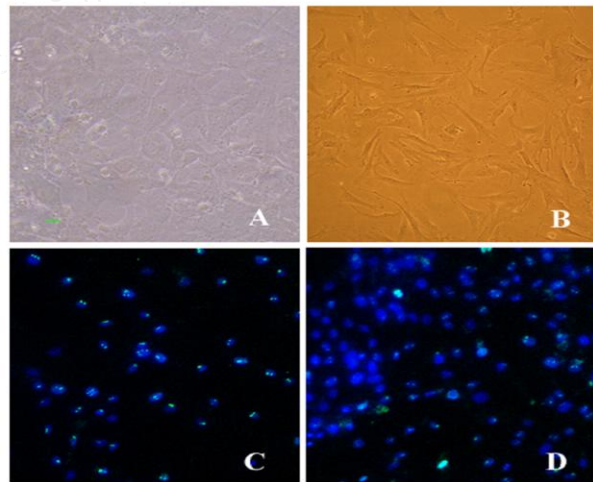
原代培养中细胞混有少量的上皮细胞,鉴于上皮细胞在体外增殖能力弱,一般的培养条件不能满足其长期培养,因此我们采用传代培养的方法去除上皮细胞以获得纯度较高的成纤维样细胞用于实验。细胞经传至第 3 代后,98% 以上的细胞呈现典型的成纤维细胞形态,细胞状态呈纺锤型或星形,细胞和细胞核较大,核仁大而明显,杂质细胞较少,成纤维细胞纯度较高(图 1 B)。MEFs 细胞传至第 5 代后,增殖活力迅速减弱。

2.2 5 g/L NBS 和 15 g/L DMSO 处理使 MEFs 进入增殖抑制期

用含有 5 g/L NBS 的 DMEM 培养基和含 15 g/L DMSO 的培养基分别对 MEFs 进行同步化处理 4 d 和 2 d,处理过的细胞形态逐渐地从由成纤维变成扁平的多边形,细胞质清澈透明。细胞增殖速率明显下降,最后观察不到明显的细胞增长,提示细胞已停止生长,但很少观察到细胞凋亡(结果未显示)。为了更准确地判定细胞已进入增殖抑制期,我们使用细胞周期蛋白 Ki - 67 鉴定同步化细胞。Ki - 67 的表达与细胞周期密切相关,出现于除 G₀、G₁ 期以外的细胞周期中,并且有丝分裂后迅速降解或失去抗原决定簇,是较可靠、全面地反映细胞群体增殖活力的客观指标。结果显示,对照组(100 g/L NBS)有接近 80% 的细胞表达 Ki - 67(图 1 - C),而 15 g/L DMSO 或 5 g/L NBS 处理组仅约有 10% 的细胞表达 Ki - 67(图 1 - D),说明同步化处理可明显抑制细胞的增殖,使大部分细胞处于 G₀ 期或 G₁ 期。

2.3 同步化处理对组蛋白 H₃ K₉ 甲基化和 H₃ K₉ 乙酰化表达的影响

首先比较同步化处理对组蛋白 H₃ K₉ 甲基化和 H₃ K₉ 乙酰化表达的影响。相对定量分析显示 DMSO 处理组组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化荧光强度要高于对照组;血清饥饿处理组 H₃ K₉ 乙酰化荧光强度要低于对照组(图 2 A - C 和图 3);此外,血清饥饿和 DMSO 处理组组蛋白 H₃ K₉ 甲基化表达水平均低于正常组,但 DMSO 处理要高于血清饥饿组(图 2 - D、图 2 - F 和图 3)。

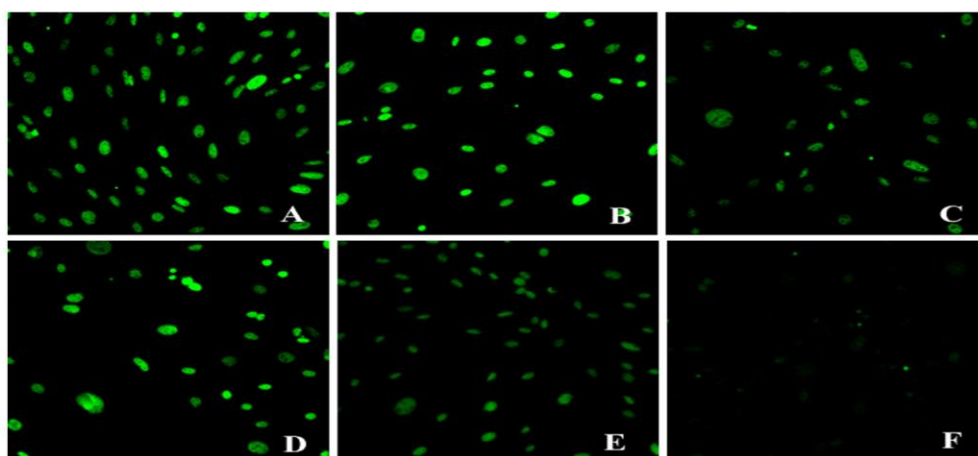


A: 原代培养的 MEFs; B: 第 3 代纯度较高的 MEFs; C: 对照组 Ki - 67 染色(小亮点); D: 5 g/L NBS 和 15 g/L DMSO 处理组 Ki - 67 染色(小亮点); Hoechst 33342 染核(灰色)。

A: MEFs in primary culture; B: purified MEFs at third passages; C: Ki - 67 staining of control group; D: Ki - 67 staining of 5 g/L NBS or 15 g/L DMSO treated cells. Nucleus were stained by Hoechst 33342

图 1 小鼠胎儿成纤维细胞形态及同步化对细胞增殖的影响 (×200)

Fig 1 The morphology of MEFs and effect of synchronization treatment on proliferation of MEFs (×200)



A - C: H₃ K₉ 乙酰化染色:对照组 (A,亮点); 15 g/L DMSO处理组 (B,亮点); 5 g/L NBS处理组 (C,亮点); D - F: H₃ K₉ 甲基化染色:对照组 (D,亮点); 15 g/L DMSO处理组 (E,亮点); 5 g/L NBS处理组 (F,亮点)。

A - C: H₃ K₉ acetylation staining in control(A), 15 g/L DMSO treatment (B), and 5 g/L NBS treatment group (C); D - F: H₃ K₉ methylation staining in control(D), 15 g/L DMSO treatment(E), and 5 g/L NBS treatment group (F).

图 2 同步化处理对 MEFs组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化和甲基化的影响 (×200)

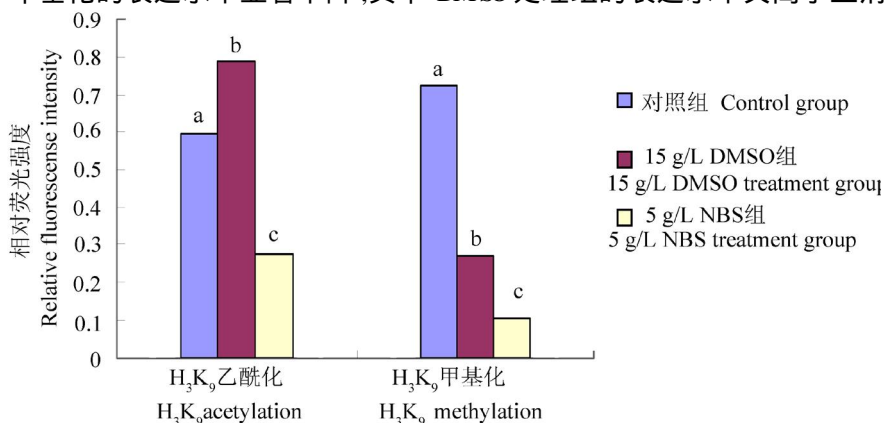
Fig 2 Effect of synchronization treatment on acetylation and methylation of H₃ K₉ (×200)

2.4 同步化处理对组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化和三甲基化表达的影响

然后比较同步化处理对组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化和 H₃ K₄ 三甲基化表达的影响。相对定量分析显示同步化处理使组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化的表达水平显著下降,其中 DMSO处理组的表达水平又高于血清饥饿组(图 4 - A、图 4 - C和图 5);同步化处理不影响组蛋白 H₃ K₄ 三甲基化表达水平,但与 H₃ K₄ 单甲基化相比较,组蛋白 H₃ K₄ 三甲基化荧光强度总体偏弱(图 4D、图 4 - E和图 5)。

3 讨论

本实验探究了同步化处理对 MEFs组蛋白甲基化和乙酰化修饰的影响。MEFs用血清饥饿和 DMSO同步化处理,使 MEFs群体中处于不同细胞周期时相的细胞均处于 G₀期或 G₁期,增殖明显停止。自从多利羊诞生以来,血清饥饿诱导的 G₀期细胞核的特定状态一直被认为是有利于重编程事件的发生,从而有利于克隆胚的发育^[2-6]。但是这个假说遭到其他研究者的质疑。最近越来越多的研究结果显示,供体细胞组蛋白的高乙酰化水平有利于核的重编程,且发现用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理后的供体细胞克隆胚发育率高于未处理组^[10-12]。在我们的研究中发现,血清饥饿可降低组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平,结合前人的研究结果,在一定程度上说明了血清饥饿可能并不是理想的供体细胞处理方法。与此相反,DMSO处理 MEFs使细胞增殖静止期后,可提高细胞的组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平,目前已清楚,DMSO是从



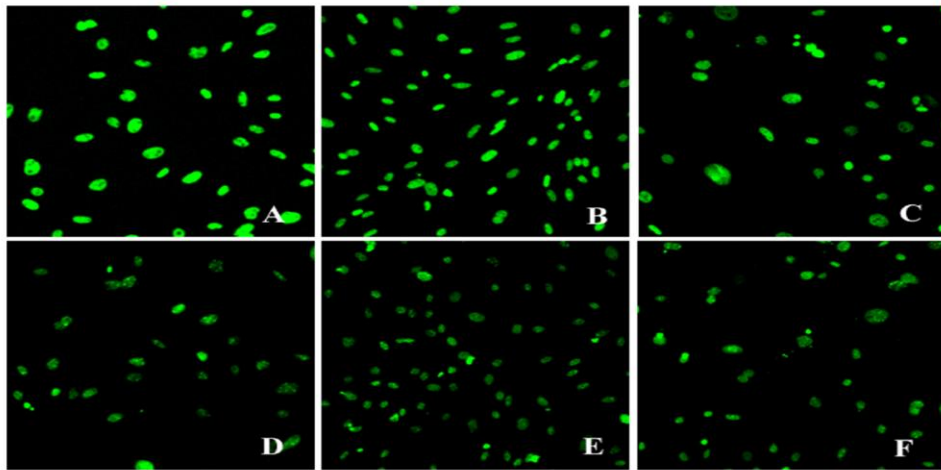
图柱高低代表相应染色强度的相对强弱 (±SD),字母不同表示 H₃ K₉ 乙酰化或 H₃ K₉ 甲基化组内不同处理组间存在显著差异 (P < 0.05),但不比较 H₃ K₉ 乙酰化和 H₃ K₉ 甲基化的荧光强弱。

The relative acetylation and methylation fluorescent intensity of H₃ K₉ (±SD). a, b, c Denote significant differences within H₃ K₉ acetylation group or methylation group (P < 0.05), but not comparison fluorescence intensity of H₃ K₉ between acetylation and methylation

图 3 同步化处理对 MEFs组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化和甲基化表达荧光强度相对定量分析

Fig 3 Quantitative analysis of histone H₃ K₉ acetylation and methylation of MEFs fluorescent intensity after synchronization

血清饥饿诱导的 G₀期细胞核的特定状态一直被认为是有利于重编程事件的发生,从而有利于克隆胚的发育^[2-6]。但是这个假说遭到其他研究者的质疑。最近越来越多的研究结果显示,供体细胞组蛋白的高乙酰化水平有利于核的重编程,且发现用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理后的供体细胞克隆胚发育率高于未处理组^[10-12]。在我们的研究中发现,血清饥饿可降低组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平,结合前人的研究结果,在一定程度上说明了血清饥饿可能并不是理想的供体细胞处理方法。与此相反,DMSO处理 MEFs使细胞增殖静止期后,可提高细胞的组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平,目前已清楚,DMSO是从



A - C: H₃ K₄ 单甲基化染色:对照组 (A,亮点); 15 g/L DMSO处理组 (B,亮点); 5 g/L NBS处理组 (C,亮点); D - F: H₃ K₉ 三甲甲基化染色:对照组 (D,亮点); 15 g/L DMSO处理组 (E,亮点); 5 g/L NBS处理组 (F,亮点)。

A - C: H₃ K₄ single methylation in control(A), 15 g/L DMSO treatment (B), and 5 g/L NBS treatment group (C); D - F: H₃ K₉ triple methylation in control(D), 15 g/L DMSO treatment(E), and 5 g/L NBS treatment group (F)。

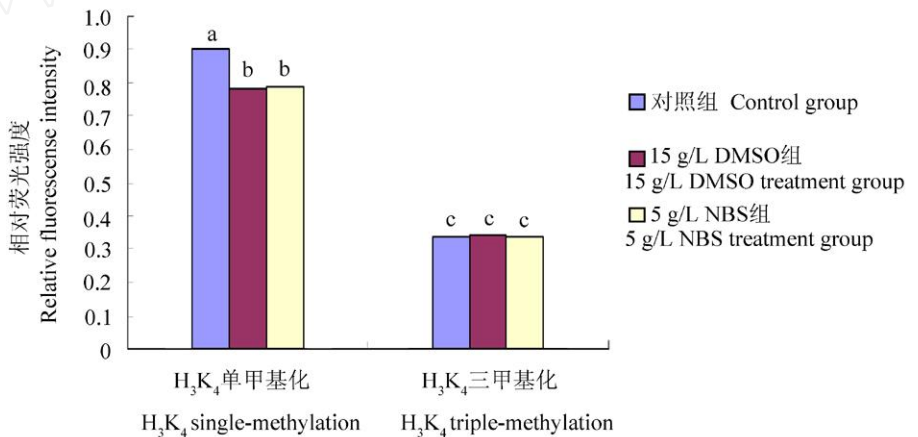
图 4 同步化处理对 MEFs组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化和三甲甲基化的影响 (×200)

Fig 4 Effect of synchronization treatment on single and triple methylation of H₃ K₄ (×200)

多组蛋白去乙酰化酶抑制剂中的一种。在小鼠克隆实验中,在克隆胚激活液中加入 10 g/L DMSO,可明显地提高了囊胚发育率和个体出生率^[14]。以上结果提示: DMSO 处理可能是供体细胞同步化处理的理想方法。

组蛋白 H₃ K₉ 既可被乙酰化又可被甲基化,研究认为组蛋白 H₃ K₉ 的乙酰化和甲基化间存在负相关,当乙酰化几乎没有表达时,甲基化水平则呈高水平表达^[15]。我们的研究结果显示,当 MEFs 组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化水平高的时候,其 H₃ K₉ 甲基化表达水平则相对较低,这与已有的研究结果相一致^[15]。

我们还首次研究了同步化处理对组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化、三甲甲基化表达的影响。H₃ K₄ 甲基化与基因的激活相关联,通过分析 H₃ K₄ 不同的甲基化情况和它们在不同生物体内的分布情况显示, H₃ K₄ 二甲基化和三甲甲基化多富集于活性转录基因^[16]。本研究结果显示同步化处理使 MEFs 组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化表达水平下降但不影响组蛋白 H₃ K₄ 三甲甲基化表达水平。H₃ K₄ 甲基化状态的改变是在组蛋白甲基化酶的介导下完成的,而 DMSO 作为一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂并不能直接改变组蛋白 H₃ K₄ 的甲基化状态。但组蛋白去乙酰化抑制剂似乎在细胞中对组蛋白 H₃ K₄ 的甲基化有不同作用;在 TSA 处理的胃肿瘤细胞中,其组蛋白 H₃ K₄ 甲基化表达水平未发生改变^[17];而 TSA 处理可使牛成纤维细胞的



图柱高低代表相应染色强度的相对强弱 (±SD),字母不同表示 H₃ K₄ 单甲基化或 H₃ K₄ 三甲甲基化组内不同处理组间存在显著差异 (P < 0.05), 但不比较 H₃ K₄ 单甲基化和 H₃ K₄ 三甲甲基化组的荧光强弱。

The relative single and triple methylation fluorescent intensity of H₃ K₄ (±SD). a, b, c Denote significant differences within H₃ K₄ single or triple methylation group (P < 0.05), but not comparison fluorescence intensity of H₃ K₄ between single and triple methylation

图 5 同步化处理对 MEFs组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化和三甲甲基化表达荧光强度相对定量分析

Fig 5 Quantitative analysis of histone H₃ K₄ single and triple methylation of MEFs fluorescent intensity after synchronization treatment

H₃ K₄ 三甲基化水平升高^[18],对此还需作进一步的研究分析。

实验中还发现组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化总体表达强于三甲基化,且单甲基化整体处于高表达状态而三甲基化处于相对低表达状态。组蛋白 H₃ K₄ 甲基化在正常受精卵中母本基因组是一直表达的,父本基因组是受精后才逐渐激活表达的^[19],因此似乎很难判断供体细胞的组蛋白 H₃ K₄ 甲基化水平是否会影响克隆胚的发育率。

在两种同步化处理的方法中,DMSO可提高MEFs的组蛋白 H₃ K₉ 乙酰化表达水平,而血清饥饿则使其表达水平下降,与此同时,组蛋白 H₃ K₉ 甲基化水平则与乙酰化水平的高低呈负相关,提示在克隆胚胎过程中,与血清饥饿相比较,用DMSO作为同步化处理剂可能更为合适。同时我们的研究还首次证实DMSO和血清饥饿处理可降低MEFs组蛋白 H₃ K₄ 单甲基化表达水平,但不影响组蛋白 H₃ K₄ 三甲基化的表达水平。

参考文献:

- [1] Miyoshi K, Ruzicko S J, Pratt S L, et al. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(4): 1079 - 1086.
- [2] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810 - 813.
- [3] Zakhartchenko V, Durcova Hills G, Stojkovic M, et al. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. *J Reprod Fertil*, 1999, 115(2): 325 - 331.
- [4] Wells D N, Laible G, Tucker F C, et al. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 45 - 59.
- [5] Kasinathan P, Knott J G, Wang Z, et al. Production of calves from GI fibroblasts[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12): 1176 - 1178.
- [6] Gibbons J, Arat S, Ruzicko J, et al. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(4): 895 - 900.
- [7] Campbell K H, McWhir J, Ritchie, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380(6569): 64 - 66.
- [8] Oback B, Well D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen[J]. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(2): 147 - 168.
- [9] Yamanaka K I, Sugimura S, Wakai T, et al. Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos[J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(6): 683 - 644.
- [10] Shi L H, Miao Y L, Ouyang Y, et al. Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(3): 640 - 648.
- [11] Ding X, Wang Y, Zhang D, et al. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-azacytosine and trichostatin A[J]. *Theriogenology*, 2008, 70(4): 622 - 630.
- [12] 张东, 杨鹭, 王勇胜, 等. TSA处理供体细胞对组蛋白乙酰化和核重编程效果的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(7): 1007 - 1012.
- [13] Kim J M, Ogura A, Nagata M, et al. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(3): 760 - 766.
- [14] Wakayama T, Yanagimachi R. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei[J]. *Reproduction*, 2001, 122(1): 49 - 60.
- [15] Richards E J, Elgin S C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects[J]. *Cell*, 2002, 108(4): 489 - 500.
- [16] Shi X, Hong T, Walter K L, et al. NG2 PDH domain links histone H3 - lysine - 4 - methylation to active gene repression[J]. *Nature*, 2006, 442(7098): 96 - 99.
- [17] Meng C F, Zhu X J, Peng G, et al. Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with the state of histone modification in gastric cancer cell lines[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(46): 6166 - 6171.
- [18] 吴侠, 牛栋, 李燕, 等. 曲古抑菌素 A 对体外培养牛成纤维细胞组蛋白乙酰化和甲基化的影响[J]. *动物学研究*, 2009, 30(4): 361 - 368.
- [19] Lepikhov K, Walter J. Differential dynamics of histone H₃ methylation at positions K₄ and K₉ in the mouse zygote[J]. *BMC Dev Biol*, 2004, 4(12): 1 - 5.