

# 表观遗传学及其研究方法的进展

李苑<sup>1</sup>, 陆超<sup>2</sup>, 曹浩<sup>2</sup>

(1. 同济大学附属东方医院心力衰竭研究所 上海;

2. 同济大学附属东方医院心胸外科 上海)

**摘要:** 表观遗传学调控在过去十几年间得到深入的研究, 组蛋白修饰、DNA 甲基化、染色质重塑和非编码 RNA 介导的基因调控对人类多种重大疾病的发生和发展中起重要的调控作用。在这里, 我们介绍表观遗传学调控途径的原理和研究进展, 综述了目前常用的组蛋白修饰、DNA 甲基化的研究方法及其全基因组定位技术, 并对它们在表观遗传修饰检测中的应用做了简要说明。

**关键词:** 表观遗传学; 组蛋白修饰; DNA 甲基化; 染色质免疫共沉淀; 甲基化限制性内切酶法, 全基因组定位技术

**中图分类号:** Q1

## Research and Method Progress of Epigenetics

Li Yuan<sup>1</sup>, Lu Chao<sup>2</sup>, Cao Hao<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Heart Failure, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, China;

2. Department of Cardiovascular Surgery, East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai, China)

**Abstract:** The epigenetic regulation has been intensely studied over the last decades. Histone modification, DNA methylation, chromosome remodeling and RNA-mediated targeting regulate many biological processes that are fundamental to the genesis and development in many disease. Here, we present the basic principles and progress behind these epigenetic research. The most commonly used and newly developed techniques of histone modification, DNA methylation and genome-wide mapping technique are reviewed and their applications in the detection are made a brief comment.

**Keywords:** Epigenetic, Histone modification, DNA methylation, Chromatin immunoprecipitation(ChIP), Restriction endonuclease enzyme digestion, genome-wide mapping technique(GMAT)

## 0 引言

“表观遗传学”(epigenetics)一词最初由康拉德·瓦德丁顿在《现代遗传学导论》一书中提出, 描述了与 DNA 序列改变无关的细胞表型的遗传变化这一现象。经过几十年的辩论和研究, 关于表观遗传学的准确定义仍然存在争议。它区别于传统遗传学在于, 传统遗传学认为遗传信息储存在 DNA 序列信息中, 研究基因序列改变导致的基因表达水平的变化, 而表观遗传学是研究在 DNA 序列不发生改变的情况下, 由于组蛋白修饰、DNA 的甲基化、染色质重塑和非编码 RNA 调控等发生改变, 引起基因功能发生可遗传的变化并最终导致表型变异的遗传学机制, 是以基因表达水平为主的量变遗传学。在整个生命过程中, 表观遗传学机制使机体对外界环境如生长因子等调节分子传递的信息在不改变 DNA 序列的情况下作出反应。两

**基金项目:** 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20130072120063, 20130072120062); 国家自然科学基金 (81400070)

**作者简介:** 李苑 (1979 年), 女, 助理研究员, 干细胞治疗心衰

**通信联系人:** 曹浩 (1973 年), 男, 讲师, 主治医师, 硕导, 干细胞治疗心衰. E-mail: caohaotj@163.com

套遗传学系统互相影响，相辅相成，共同保障着细胞正常功能发挥。

45 组蛋白和 DNA 的修饰过程都是通过染色质修饰酶以一种高度调控的方式动态地构建和清除进而调控着真核基因表达，目前已经知道的有 4 种 DNA 修饰和 16 种组蛋白修饰 [2, 3]，参与人类生长发育过程且与重大疾病如肿瘤、心血管疾病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病等密切相关 [4-8]。

## 1 表观遗传学研究进展

50 小体是染色质的基本结构单位，由核心组蛋白八聚体及缠绕其外周的 DNA 组成。核心组蛋白是一类富含带正电荷的碱性氨基酸小分子的蛋白质，氨基酸小分子同 DNA 中带负电的磷酸基团相互作用，形成 DNA-组蛋白复合物。每个组蛋白都有两个结构域：组蛋白的球形折叠区和氨基末端结构域。球形折叠区负责组蛋白分子间相互作用和 DNA 缠绕，而氨基末端结构域富含赖氨酸，像一条“尾巴”伸出核小体外，与其他调节蛋白和 DNA 作用。氨基末端的“尾巴”具有极度精细的变化，发挥“信号位点”的作用，常被组蛋白乙酰转移酶、组蛋白甲基转移酶和组蛋白磷酸转移酶等作用，发生甲基化、乙酰化、磷酸化等共价修饰，然后被一系列特定的蛋白质识别，并将其转译成一种特定的染色质状态从而实现特定基因的调节。

### 1.1 组蛋白修饰

60 组蛋白乙酰化和去乙酰化过程是目前研究最为广泛和深入的组蛋白翻译后修饰之一，呈特异性的高度可逆的动态变化，分别由组蛋白乙酰化转移酶(histone acetyltransferase, HAT) [9-10] 和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)共同调控 [11-12]。目前在人体中共发现了 18 种 HDAC [13]，与动脉粥样硬化、心肌重构、高血压、肺动脉高压、心律失常、糖尿病性心脏病、心力衰竭等心血管疾病的发生、发展有关。HDAC3 和 HDAC7 通过促进白细胞活化、招募、附着，继而迁移至血管内膜，从而引发动脉粥样硬化早期病变 [14]。有研究表明组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲谷抑菌素 (Trichostatin A, TSA) 在离体实验中显示对心肌缺血再灌注引起的损伤具有保护作用，能减少心肌梗死面积，恢复心肌收缩功能 [15]。Ooi 等 [16] 在压力超负荷诱导心肌肥厚的小鼠实验模型中，发现 TSA 能够对基因启动子进行乙酰化与去乙酰化修饰而发挥减弱心肌肥厚的作用。Williams 等 [17] 研究表明，选择性抑制 HDAC 家族可以靶向调控心脏纤维组织母细胞和骨髓源性纤维细胞，有效抑制血管紧张素 II 介导的心肌纤维化。HDACs 抑制剂 CI-994 (Tacedinaline, 泰克地那林) 可以减少小鼠心房的纤维化，在持续性心房颤动犬模型中 CI-994 能缩短总的心房颤动时间，减少心房内脂肪细胞和免疫细胞浸润，而心功能不受显著影响 [18]。

70 催化组蛋白甲基化修饰的酶统称蛋白质精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferases, PRMTs)，甲基化修饰可以发生在精氨酸和赖氨酸的侧链。组蛋白甲基酶 (SET and MYND domain containing, SMYD) 是组蛋白赖氨酸甲基转移酶的一个亚家族，已

75 发现 SMYD1-5 五个成员。SMYD 可以甲基化组蛋白，也可以甲基化非组蛋白如 p53 蛋白、视网  
膜母细胞瘤抑制基因蛋白等。SMYD 与多种肿瘤关系密切[19, 20]。乳腺癌、肝癌和  
结肠直肠癌的恶性细胞中 SMYD3 过度表达，敲除 SMYD3 会阻止宫颈癌细胞的生长和浸润[21]。  
在小鼠胰腺癌和肺癌模型中，SMYD3 通过介导 MAP3K2 发生甲基化激活 RAS 信号进而启动  
80 其致癌作用[22]。此外，SMYD1 特异性表达在骨骼肌和心肌细胞，调节骨骼肌和心肌的发育，  
对于胚胎的存活意义重大。敲除 SMYD1b 基因或 SMYD1b 基因突变会导致斑马鱼胚胎心肌和  
骨骼肌的肌原纤维组织破坏[23, 24]。

## 1.2 DNA 甲基化修饰

DNA 甲基化是由酶介导将甲基选择性地添加到 DNA 或 RNA 上的一种化学修饰过程，虽未  
改变核苷酸顺序及组成，但基因表达受到影响。哺乳动物有两类 DNA 甲基化酶：一类是 DNMT3A  
85 和 DNMT3B，负责对无甲基化 DNA 双链上进行甲基化修饰，同时还参与异常甲基化的形成；  
第二类是 DNMT1，主要参与复制后的半甲基化，对 DNA 分子中未甲基化的一条子链进行甲  
基化修饰，保持子链与亲链有完全相同的甲基化形式，保证表观遗传学信息在细胞和个体间可  
以世代传递。可见，DNA 甲基化不仅影响细胞基因的表达，而且这种影响还可随细胞分裂而  
持续遗传下去，因此，它是一类高于基因水平的基因调控机制。

90 DNA 甲基化在肿瘤的发病、诊断、预后评估及治疗中有重要的临床意义，恶性肿瘤细胞  
普遍存在低甲基化的现象，而且癌变的哺乳动物细胞中，CpG 岛产生甲基化修饰 70%情况都  
发生在启动子区[25]。Hur K 等[26]检测了 77 例结肠直肠癌组织标本及相对应的正常结肠粘  
膜中 LINE-1 序列，发现癌组织序列包含的 MET、RAB3IP 和 CHRM3 的原癌基因均出现低甲基  
化，相应的蛋白表达水平也比正常组升高。此外，DNA 甲基化和多种免疫性皮肤病的发生发展  
95 密切相关。p16 是表观遗传学调节的一个备选基因，可表达成抗凋亡蛋白，研究发现在大  
约 30%的银屑病患者受损处的表皮中，p16 基因启动子发生甲基化，同时伴有其 mRNA 表达  
水平的显著下降，表皮受损和严重程度指数升高[27]，在其造血细胞中，p16 基因启动子序  
列呈现低甲基化和 mRNA 高表达[28]。在系统性红斑狼疮患者的血浆中也检测到低甲基化基  
因组 DNA 片段，且低甲基化与 B、T 淋巴细胞的激活及分化有关[30]。徐国良等[31]结合基  
100 因功能互补分析，解析了 TET 缺失造成胚胎死亡的机制，发现 DNMT 介导的 DNA 甲基化和 DNA  
去甲基化过程相互拮抗，调控着 Lefty-Nodal 信号通路，第一次系统地揭示了胚胎发育过程  
中关键信号通路的表观遗传调控机制。

## 1.3 染色质重塑

染色质的结构改变与基因转录、DNA 复制、修复、重组以及基因表达等基本生物学过程  
105 紧密相关。为保证染色质内的 DNA 与蛋白质的动态结合，细胞内进化产生了一系列特定的染  
色质重塑复合物，称重塑子。染色质重塑子根据所含功能结构域的不同，分为 SWI/SNF、ISWI、  
CHD 和 INO80 四大类[32]。在真核细胞中，染色质重塑子通过改变染色质上核小体的装配、  
拆解和重排等方式来调控染色质结构，使转录相关因子在其染色质 DNA 局部更可接近，影响  
基因转录活性。在哺乳动物细胞中，Swi/Snf 可以与多种转录因子相互作用，包括类固醇受

110 体、肿瘤抑制因子和一些致癌因子 RB、BRCA-1、c-Myc 和 MLL 等[33]，使染色质重塑复合物募集到相应靶基因的启动子区，通过核小体的“滑动”改变相应靶基因启动子区的染色质结构，从而引起相应基因的激活或抑制。而在胚胎干细胞中，大部分 INO80 都是结合在转录起始位点区，发挥激活因子的作用 [34]。

## 1.4 非编码 RNA 调控

115 哺乳动物绝大多数的基因组通过转录产生大量非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA)，这些 ncRNA 多数没有可读框。最早发现在肿瘤中过表达的 miRNA 是 miR-155 和 miR-17-92 基因簇[35]。自从发现 miRNA 与癌症发病机制相关以来，大量研究表明 miRNA 参与调控肿瘤的多个方面,包括转录、细胞周期调节、细胞凋亡、血管生成、肿瘤浸润转移[36]。Calin 等[37]发现 miR-15a 和 miR-16-1 作用靶点是抑制细胞凋亡的癌基因 Bcl-2。Berteaux 等[38]  
120 发现，在乳腺癌细胞增殖中 H19 的过表达起重要作用，这种作用是通过转录因子 E2F1 直接或间接结合在 H19 启动子上，从而促进细胞进入 S 期并加速细胞周期进程。Boutros 等人[39]发现 c-Myc 直接结合 H19 启动子而上调 H19 的表达，通过募集组蛋白乙酰转移酶，上调母源 H19 等位基因转录，对乳腺癌和肺癌细胞的致癌表型具有显著影响[40]。由此可见，miRNA 在许多癌症发生和发展中起着重要作用。

## 125 2 表观遗传学研究方法进展

### 2.1 染色质免疫共沉淀技术及其发展

染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 也称结合位点分析法，由 O' Neill 和 Turner 提出，是研究体内蛋白质与 DNA 相互作用的一种技术，也是目前最常用的组蛋白修饰的研究方法。具体是活细胞状态下对细胞内的 DNA 与蛋白质复合物进行固定，  
130 然后利用超声或酶将染色质处理成一定长度的染色质片段，利用特异性抗体沉淀此目的蛋白复合物，特异性地富集与目的蛋白结合的 DNA 片段，再解除蛋白质与 DNA 偶联，对目的片段进行纯化、检测，从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。将 ChIP 操作与基因芯片技术分析 (chip) 相结合就是 ChIP on chip，是分析目的蛋白与基因组中 DNA 相互作用位点的一种全基因组定位方法。该技术的主要步骤是先通过 ChIP 技术富集组蛋白被修饰的 DNA 片段，加上通用接头进行 PCR 扩增 (在扩增过程中引入荧光基团)，最后将扩增的片段与设计  
135 的芯片进行杂交。染色质免疫沉淀技术主要用于蛋白和 DNA 两者都已经明确的情况下，研究蛋白和目标基因之间的结合关系，而 ChIP-on-chip 则用于已知蛋白质而寻找它可能结合的靶基因，多用于筛选一个蛋白的下游靶基因。

140 将 ChIP 与第二代测序技术相结合就是 ChIP-Seq 技术，能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段，已经越来越广泛的应用到 DNA 与互作蛋白分析中。该技术首先通过 ChIP 特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段，对其进行纯化与文库构建，然后对富集得到的 DNA 片段进行高通量测序，研究人员通过将获得的数百万条序列标签精确定位到基因组上，获得全基因组范围内与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段信息[41]。目

前 ChIP-Seq 技术比较成熟, 通量也在不断提高, 成本随着新一代测序技术出现和发展在逐步降低。该技术的主要困难在于测序完成后对海量数据的分析, 并且各个环节的差别, 如 DNA 质量、获取的片段长短不同导致的扩增效率差异、基因组的重复程度以及测序和序列比对过程中的错误都会引入系统误差造成假阳性。

染色质免疫沉淀和基因表达系列分析相结合的技术, 称为全基因组定位技术 (genome-wide mapping technique, GMAT), 可用于测定全基因组中组蛋白修饰的分布状态 [41]。该方法通过用抗某种修饰的组蛋白尾端的抗体进行 ChIP, 获得细胞中与这种修饰的组蛋白相结合的全部 DNA 片段, 然后利用基因表达系列分析 SAGE 技术构建文库并进行测序和生物信息学分析, 获得这种组蛋白在全基因组中分布状况的信息。GMA 的优点是分辨率高, 结果可信度高, 适用与全基因组水平的组蛋白修饰的定量测定。它与 ChIP-on-chip 相比, 不依赖于预先选择的序列, 可进行全基因组扫描。

155

## 2.2 DNA 甲基化分析技术及其发展及其发展

DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分, 随着对甲基化研究的不断深入, 其检测方法层出不穷, 几乎涵盖了从基因组各个层次水平的研究。根据研究目的, 这些方法分为: 基因组整体水平的甲基化检测, 特异位点甲基化的检测和新甲基化位点的寻找。根据研究方法可以分为: 基于限制性内切酶的甲基化分析方法、基于重亚硫酸盐的甲基化分析方法等 [42-44]。甲基化敏感的限制性内切酶法的原理是一些限制性内切酶的识别位点中含有 CpG 双核苷酸序列, 它们常常只能结合非甲基化的识别序列, 而对发生甲基化的序列没有结合活性, 这样可以帮助我们判断 DNA 序列中是否发生了甲基化。不足之处在于有些限制性内切酶的作用位点具有不唯一性, 可能导致切割位点不准确。在这个基本原理的基础上, 结合不同的通量研究的手段, 已经设计出了多种研究方法, 例如 RLGS (restriction landmark genome scanning, 限制性标志物全基因组扫描)、DMH (differential methylation hybridization for methylation analysis, 差异性甲基化杂交分析)、MCA (methylation CpG island amplification for methylation analysis, 甲基化 CpG 岛扩增子分析) 等 [48-50]。

重亚硫酸盐法是用重亚硫酸氢钠在碱性条件和氢醌的催化下处理单链 DNA 可使非甲基化的胞嘧啶发生脱氨基反应转变成尿嘧啶 (U), 而甲基化的胞嘧啶不能发生脱氨基反应而仍为胞嘧啶, 两轮的聚合酶链式反应扩增后, 该位点变为 T, 而 m5C 则保持不变, 仍然为 C。通过扩增克隆测序比对, 可以鉴别待测位点是否发生了甲基化。该技术很容易确定个体基因组 DNA 分子中各个单链的甲基化状态及甲基化位置, 也适用于特定基因甲基化检测。在此基础上, 结合 DNA 直接测序、限制性内切酶分析、甲基化特异性 PCR 扩增、甲基化敏感的单核苷酸引物延伸法、高效液相色谱法以及锁式探针技术等方法测出相应序列的甲基化情况, 发展出系列高效的检测方法 [51-54]。

以上是目目前表观遗传学研究比较广泛的方法, 另外还有比如体外组装核小体技术、体内

DNA 足迹法、染色质 DNA 酶 I 高敏感位点检测法等[55-60]。这些检测方法的发展为探索基因表观遗传信息提供了有效的手段,随着表观遗传研究的不断深入,对各种修饰组蛋白分析,将有助于人们进一步认识组蛋白密码,这些方法作为研究和诊断疾病的重要工具也将得到更加广泛的应用。

### [参考文献] (References)

- [1] Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, et al. An operational definition of epigenetics[J]. *Genes Dev.*2009,23:781-783.
- [2] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2011,11:726-734.
- [3] Tan M, Luo H, Lee S, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification [J]. *Cell*,2011,146:1016-1028.
- [4] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity [J]. *Nature*,2012,483,603-607.
- [5] Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains [J]. *Nat. Genet.*,2012,44:40-46.
- [6] Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, et al. A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer [J]. *Genome Res.*,2012,22,837-849.
- [7] Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells [J]. *Nature*,2012,483:570-575.
- [8] Patel JP, Goñen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*,2012,366:1079-1089.
- [9] Roth S Y, Denu J M, Allis C D. Histone acetyltransferases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 81-120.
- [10] Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*,2001,11(2): 155-161.
- [11] Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family [J]. *Experimental Cell Research*, 2001, 262(2): 75-83.
- [12] De Ruijter AJ, Van Gennip AH, Caron HN, et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family [J]. *Biochemical Journal*,2003, 370(3): 737-749.
- [13] Gregoret I V, Lee Y M, Goodson H V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004,338(1): 17-31.
- [14] Siuda D, Zechner U, El Hajj N, et al. Transcriptional regulation of Nox4 by histone deacetylases in human endothelial cells [J]. *Basic Res Cardiol*,2012,107(5):283-285.
- [15] Zhao TC, Cheng G, Zhang LX, et al. Inhibition of histone deacetylases triggers pharmacologic preconditioning effects against myocardial ischemic injury [J]. *Cardiovasc Res*,2007,76 (3 ):473-481.
- [16] Ooi JY, Tuano NK, Rafehi H, et al. HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes [J]. *Epigenetics*,2015,10(5):418-430.
- [17] Williams SM, Golden ML, Ferguson BS, et al. Class I HDACs regulate angiotensin II-dependent cardiac fibrosis via fibroblasts and circulating fibrocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2014,67:112-125.
- [18] Seki M, LaCanna R, Powers JC, et al. Class I histone deacetylase inhibition for the treatment of sustained atrial fibrillation. [J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2016,358(3):441-449.
- [19] Leinhardt K, Brown M. SET/MYND Lysine methyltransferases regulate gene transcription and protein activity [J]. *Genes (Basel)*,2011, 2(1): 210-218.
- [20] Liu L, Kimball S, Liu H, et al. Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer [J]. *Oncotarget*,2015,6(4): 2466-2482.
- [21] Cockburn J, Yan W, Bhindi R, et al. Spontaneous coronary artery dissection treated with bioresorbable vascular scaffolds guided by optical coherence tomography [J]. *Can J Cardiol*, 2014,30(11):1461.
- [22] Yumoto K, Sasaki H, Aoki H, et al. Successful treatment of spontaneous coronary artery dissection with cutting balloon angioplasty as evaluated with optical coherence tomography [J]. *JACC Cardiovasc Interv*,2014,7(7): 817-819.
- [23] Just S, Meder B, Berger IM, et al. The myosin interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization [J]. *J Cell Sci.*,2011,124(18):3127-3136.
- [24] Gao J, Li J, Li BJ, et al. Expression and functional characterization of Smyd1a in myofibril organization of skeletal muscles [J]. *PLoS One*,2014,9(1):86808-86817.
- [25] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications [J]. *Nat. Rev. Cancer*,2011,11:726-734.
- [26] Hur K, Cejas P, Feliu J, et al. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis [J]. *Gut*, 2014,63(4):635-646.

- [27] Chandra A,Ray R, Senapatic S,et al. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis [J]. Mol Immunol,2015,64:313-323.
- 240 [28] Park GT, Han J, Park SG, et al. DNA methylation analysis of CD4+ T cells in patients with psoriasis [J]. Arch Dermatol Res.,2014,306:259-268.
- [29] Luo Y, Li Y, Su Y, et al. Abnormal DNA methylation in T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus [J].Br J Dermatol,2008,159:827-833.
- [30] Wu H, Zhao M, Yoshimura A, et al. Clinial link between epigenetics and transcription factors in the induction of auto-immunity: a comprehensive review [J]. Clin Rev Allerg Immu. ,2016,50: 333-344.
- 245 [31] Dai HQ, Wang BA, Yang L, et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling [J]. Nature,2016, 538(7626):528-532.
- [32] Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes [J]. Annual Review of Biochemistry,2009,78:273-304.
- [33] Hargreaves D C, Crabtree G R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms [J]. Cell Research,2011,21(3): 396-420.
- 250 [34] Wang L,Du Y, Ward JM, et al.INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming and blastocyst development [J]. Cell Stem Cell,2014,14(5): 575-591.
- [35] Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma [J]. Cancer Res., 2004,64: 3087-3095.
- 255 [36] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research [J]. Nat Rev Cancer,2010,10:389-402.
- [37] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99:15524-15529.
- [38] Berteaux N, Lottin S. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1 [J]. J Biol.Chem.,2005,280:29625-29636.
- 260 [39] Barsyte LD, Lau SK, Boutros PC. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis [J]. Cancer Res.,2006,66: 5330-5337.
- [40] Toillon RA, Descamps S, Adriaenssens E.Hepatocyte growth factor enhances CXCR4 expression favoring breast cancer cell invasiveness [J]. Exp Cell Res.,2005,310:176-185.
- 265 [41] 蔡禄.表观遗传学前沿[M].北京:清华大学出版社,2012.
- [42] Oakeley EJ, Podesta A, Jost JP. Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation [J]. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1997,94:11721-11725.
- [43] Wu J, Issa J, Hermen J, et al. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyl transferase gene induces transformation of NiH3T3 cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1993,90(19):8891-8895.
- 270 [44] Oakeley EJ, Podesta A, Jost JP. Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction [J]. Biotechniques,1999,27:744-752.
- [45] 沈玥.染色质与表观遗传调控[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [46] Li E, Bestor TH,Jaenisch R.Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality[J]. Cell,1992,69:915-926.
- 275 [47] Frommer M, Mcdonald LE, Millar DS,et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J]. Proc. Natl.Acad.Sci.USA,1992,89:1827-1831.
- [48] Cervera MT,Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater JM. Analysis of DNA methylation in Arabidopsis thaliana based on methylation-sensitive AFLP markers [J]. Mol Genet genomics,2002,268(4):543-52.
- 280 [49] McClelland M,Nelson M,Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J].Nucleic Acids Res,1994, 22(17):3640-59.
- [50] Sutherland E, Coe L,Raleigh EA.McrBC:a multisubunit GTP-de-pendent restriction endonuclease [J]. J Mol Biol.,1992,225(2):327-48.
- [51] Xiong Z,Laird PW. COBRA:a sensitive and quantitative DNA methylation assay [J]. Nucleic Acids Res.,1997,25(12):2532-2534.
- 285 [52] Boyko A,Kovalchuk I. Analysis of locus-specific changes in methylation patterns using a COBRA(combined bisulfite restriction analysis)assay [J]. Methods Mol Biol, 2010,631:23-31.
- [53] Eads CA, Laird PW. Combined bisulfite restriction analysis(COBRA)[J]. Methods Mol Biol,2002,200:71-85.
- [54] Herman JG,Graff JR,Myohanen S,et al. Methylation-specific PCR:a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(18):9821-9826.
- 290 [55] Lowary PT, Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning [J].J Mol Biol,1998,276(1):19-42.
- [56] Ito T, Bulger M, Pazin MJ,et al. ACF, an iSWi-Containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor[J].Cell, 1997,90(1):145-155.
- [57] Travers A, Drew H. DNA recognition and nucleosome organization [J].Biopolymers,1997,44(4):423-433.
- 295 [58] Wu J, Issa J, Hermen J,et al. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyl transferase gene induces transformation of NiH3T3 cells[J].Proc Natl Acad Sci USA,1993, 90(19):8891-8895.
- [59] 徐冬冬,刘德培,吕湘等. 固相 DNase I 足迹法研究 DNA-蛋白质相互作用[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(4):587-590.
- [60] He HH, Meyer CA, Shin H, et al. Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers[J]. Nature Genetics,2010,42(4): 343-348.
- 300