

·综述·

胚胎发育过程中的 DNA 甲基化作用

谭颖¹, 王凭青^{1*}, 何腾龙¹, 张宝云¹, 储明星², 樊奇¹, 刘重旭¹

(1. 重庆大学生物工程学院, 中国重庆 400030; 2. 中国农业科学院家养动物遗传资源与种质创新重点开放实验室
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 中国北京 100193)

摘要: 哺乳动物的正常发育取决于表观遗传学调控机制准确无误地运行. 其中尤为重要是发生在原生殖细胞和胚胎中的基因组范围内的 DNA 甲基化模式重排等表观遗传学修饰. 胚胎发育过程中的 DNA 甲基化作用与基因印记的建立、基因表达的调控以及细胞和胚胎的形态建成都密切相关. DNA 甲基化发生机制和功能的阐明将对哺乳动物个体发育与人类疾病研究有重要意义.

关键词: DNA 甲基化; 重编程; 胚胎发育; 原生殖细胞; 胎盘

中图分类号: Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)02-0170-06

DNA Methylation in Embryonic Development

TAN Ying¹, WANG Ping-qing^{1*}, HE Teng-long¹, ZHANG Bao-yun¹,
CHU Ming-xing², FAN Qi¹, LIU Chong-xu¹

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Normal development of mammals depends on accurate function of epigenetic regulation, such as genome-wide DNA methylation reprogramming in the primordial germ cells and in the early embryo. DNA methylation in embryonic development was closely related with genomic imprinting, regulation of gene expression and morphogenesis of cells and embryos. It is of significance to clarify the mechanism and function of DNA methylation for research on mammalian ontogeny and human disease.

Key words: DNA methylation; reprogramming; embryonic development; primordial germ cells; placenta

(*Life Science Research*, 2011, 15(2): 170~175)

DNA 甲基化是最早发现的基因表观修饰方式之一, 在调控基因表达、染色体结构维持、X 染色体失活和基因组印记中起着重要的作用. 近年来关于 DNA 甲基化的研究倍受瞩目. 在 2010 年 11 月, 我国首次绘制完成了中国人高精度的全基因组甲基化图谱, 并在此基础上对各个基因元件及基因组元件的甲基化模式进行了全面的分析. DNA 甲基化发生机制和功能的阐明将对人类个体发育与疾病研究产生深远的影响.

DNA 甲基化是决定染色体结构的标志性表观遗传调控方式之一. 在原生殖细胞和胚胎发

育的整个过程中, 会发生全基因组范围内的 DNA 甲基化模式重排, 而这种改变引起的染色体状态等一系列变化会决定细胞的分化方向^[1]. 首先, 受精卵基因组中的 DNA 甲基化在胚胎发育的卵裂期几乎完全丢失; 在胚泡进入子宫内膜和形成原肠胚的这段时期, 再通过全新甲基化作用重建胚胎中的甲基化模式, 通常情况下这个模式将保持终生^[2]. 这个过程不仅局限于胚胎细胞中, 在胚外细胞谱系里也会以特异的形式发生, 但胚外细胞谱系中甲基化的整体水平显著低于体细胞谱系^[3]. 发育过程中甲基化模式的适时消除和重建对于个体

收稿日期: 2011-01-05; 修回日期: 2011-03-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-39); 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC, 2009BA1066)

作者简介: 谭颖 (1987-), 女, 新疆库尔勒人, 硕士研究生, 主要从事分子遗传学研究, E-mail: tyche.tony@163.com; * 通讯作者: 王凭青 (1962-), 男, 重庆人, 重庆大学生物工程学院教授, 博士, 主要从事分子遗传学方面的研究, Tel: 023-65112753, E-mail: wang_pq@21cn.com.

的生存和健康是至关重要的. 本文将综述DNA甲基化在胚胎发育过程中, 如在胚胎植入前、胚胎早期发育和胎盘中的发生机制及作用.

1 DNA甲基化

DNA甲基化已经成为表观遗传调控中最着重研究的内容^[4]. 简单来说, DNA甲基化作用是指通过DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, Dnmts)将甲基基团转移到DNA胞嘧啶/鸟嘌呤富集区域(称作CpG岛)中的胞嘧啶残基上的过程. 通常情况下, 当位于基因启动子区域的一个或多个CpG岛中特定的胞嘧啶处于甲基化状态, 这个基因会因为甲基化而被有效地沉默, 这样的CpG岛视为处于“超甲基化”状态. 相反, 当位于基因启动子区域的一个或多个的CpG岛中特定的胞嘧啶处于非甲基化状态, 这个基因将不会由于甲基化而被沉默, 在这种情况下的CpG岛处于“低甲基化”状态. 同时应当注意的是, 并不是DNA甲基化本身造成转录的抑制, 而是各种转录元件(转录阻遏蛋白、阻碍RNA聚合酶移动的蛋白等等)与甲基化的DNA片段结合从而在很大程度上引起基因的转录抑制^[5]. 研究人员一直致力于破译这种染色质密码, 这可能有助于了解何种程度的启动子甲基化及其与翻译后修饰组蛋白的相互作用能使特定的基因沉默^[6].

DNA甲基转移酶分为两类, 一类是维持性甲基转移酶(Dnmt1), 它有两种变体, 即卵母细胞型Dnmt1o和体细胞型Dnmt1s. 第二类是从头型甲基转移酶(*de novo* Dnmts), 如Dnmts3a和Dnmts3b. 近期研究揭示了全新甲基转移酶Dnmt3a和Dnmt3b在特定启动子内CpG二核苷酸的周期性甲基化中起作用^[7]. DNA甲基化途径缺陷可致使人发育失调, 小鼠胚胎Dnmt1o基因的缺失能导致其早期发育迟缓, 这都表明了DNA甲基化作用的对于哺乳动物正常发育的重要性^[8]. 除DNA甲基转移酶之外, 还有一类自身缺乏甲基转移酶活性的甲基化修饰因子, 它们或是与Dnmt联合作用, 或是在甲基转移作用中对于基因组特异位点的靶定起作用. Dnmt3L(DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3-like)与Dnmt3a、3b有同源性, 但是缺少具有活性的甲基转移酶所必需的催化结构域^[9]. Dnmt3L能与Dnmt3a、3b相互作用从而增加甲基化作用的效率并在生殖细胞中起重要作用^[10], 如雌性生殖细胞系中甲基化印记

的获得要依赖Dnmt3a和它的辅助因子Dnmt3L的相互作用^[11]. 此外, AtrX和淋巴特异性解旋酶(Lymphoid specific helicase, Lsh)是染色体重构蛋白SNF2家族的成员, 其中任何一种蛋白的变异都将导致基因组特异位点DNA甲基化状态的改变. AtrX变异会引起核糖体DNA或者Y染色体甲基化位点的改变, 而Lsh变异会引起总体的低甲基化^[12]. 还有研究显示Lsh可与Dnmts相互作用并能帮助Dnmt3b与特异基因组靶点结合, 如Hox基因^[13]. 在小鼠的敲除实验中, 因AtrX、Lsh、Dnmt3L的缺失而引起发育失常进一步证明了DNA甲基化作用对生物个体生长发育的重要意义^[10, 14].

由于DNA甲基化在基因表达调控中的重要作用, DNA甲基化已逐渐成为新的研究热点. 近15年来, 根据不同研究的需要, 已开发出各种不同的方法. 目前通过基于PCR的甲基化分析方法、基于限制性内切酶的甲基化分析方法及基于重亚硫酸盐的甲基化分析方法和柱层法等不同的处理方法可以实现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^[15, 16]. 随着高通量检测技术的发展和运用, 关于DNA甲基化的生物信息学研究已成为日益重要的研究手段^[17].

2 胚胎早期发育中的DNA甲基化

哺乳动物在生殖细胞发育期和胚胎发育早期会发生基因组范围的DNA甲基化重排. 原生殖细胞的分化过程中会发生基因组的去甲基化, 数天后进行重新甲基化, 实现包括父系或母系特定印记相关区域特异性甲基化位点的重排^[18]. 在受精前, 成熟的精子和卵母细胞保持高度的甲基化. 受精后到胚胎植入前的桑葚期, 亲本的基因组发生第2个周期的去甲基化, 之后再行逐步的重新甲基化^[19].

2.1 原生殖细胞中的DNA甲基化

从胚胎发育的10.5 d到13.5 d, 原生殖细胞发生整体去甲基化, 雌性小鼠的原生殖细胞只剩下7%的CpG二联核苷酸是甲基化的(而在胚胎干细胞和体细胞中是70%~80%), 大多数启动子和转座子序列在这个阶段处于去甲基化状态^[20]. DNA脱氨基酶和碱基切除修复在这个过程中发挥作用^[20, 21]. 胞嘧啶脱氨酶AID和APOBEC1能使5-甲基胞嘧啶(5mC)和胞嘧啶脱氨^[21, 22]. AID

和 APOBEC1 在原始生殖细胞中有少量表达, 而且原始生殖细胞中 AID 的缺乏会使 20% 的 CpG 岛不发生去甲基化 (假定早期原始生殖细胞和胚胎干细胞或体细胞的甲基化水平相同)^[20]. 原始生殖细胞中还会表达 5mC 羟化酶 TET1 和 TET2^[21], 这意味着原始生殖细胞可以通过两种不同的机制 (脱氨作用和羟化作用) 修饰 5mC 来起始主动的去甲基化. 经最初的修饰后, 5mC 还需要进一步修饰或 DNA 修复来起始去甲基化. DNA 修复途径可能在消除错配和切除 5-羟甲基胞嘧啶中发挥作用, 这些途径包括核苷酸切除修复, 错配修复, 特别是碱基切除修复 (Base excision repair, BER), 在胚胎发育的第 11.5 d, 原始生殖细胞中的 BER 调控元件如聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP1), 脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 (Apurinic/aprimidinic endonuclease, APE1) 和 X 线修复交叉互补基因 1 (X-ray repair cross complementing group 1, XRCC1) 都会上调, 这显示了此时 BER 可能是被激活的^[21].

目前关于原始生殖细胞中非 CG 位点的甲基化的发生和去除还知之甚少^[23].

2.2 早期胚胎中的 DNA 甲基化

在受精的几小时内, 受精卵父源基因组会发生快速、主动去甲基化. 这一过程发生在首次 DNA 复制开始之前, 即非 DNA 复制依赖性的去甲基化. 近期研究表明 Elongator 复合物 (Elongator complex proteins, ELP), 如 Elp1、Elp3、Elp4 对于父本基因组的去甲基化有重要作用, 因为敲除 ELP 家族的成员后去甲基化作用会减弱^[24]. 甲基切除修复和各种 DNA 修复酶也可能在这个过程中发挥作用^[25]. 父本基因组的去甲基化可能发生在两个时期, 第一个时期是 DNA 复制前, 第二个时期是 S 及 G2 期^[26]. 在第一个时期可能发生 5mC 的修饰和部分的去甲基化. 去甲基化会在复制开始之后继续进行. 在这些时期会出现 BER 元件, 而且雄性原核中的染色质与 XRCC1 的结合会增加^[21]. 有现象显示这两个时期都有 DNA 链的断裂, 表明这两个时期都发生了 DNA 修复, 而且抑制 BER 元件会部分影响去甲基化^[21, 26]. 现在还不知道胞嘧啶脱氨酶 AID 和 TET 是否对受精卵去甲基化有作用^[24].

比父源基因去甲基化发生的稍晚, 母源基因组在若干次复制中逐渐被动去甲基化, 最后也处于去甲基化状态. 到八细胞期前, 亲本基因组的

甲基化水平几乎一样低^[27]. 造成这种与复制相关的被动去甲基化的部分原因是胚胎植入前缺少维持性甲基转移酶进入细胞核的通道, 而造成维持性甲基转移酶 Dnmt1 在细胞质中的滞留^[28]. 性别特异性剪接会控制早期胚胎中 Dnmt1 的活性^[29]. 雌性能产生卵母细胞类型 Dnmt1 (Dnmt1o), 其分布在细胞质中^[30]. 而在雄性的精母细胞中, Dnmt1 转录物经剪接形成不能翻译的产物^[29]. 除了八细胞期, Dnmt1o 不断从细胞核中排除直到胚胎的植入^[31]. 在八细胞阶段, Dnmt1o 集中在细胞核使印记位点保持甲基化状态, 在桑葚期前再返回细胞质^[30, 32]. 近期研究表明, 基本的 Dnmt1 蛋白普遍存在于原核形成前的植入前发育时期, 以保持早期胚胎的 DNA 甲基化^[33]. 未甲基化的 CpG 岛特异性地和 CXXC 指蛋白 1 (CXXC finger protein 1, CFP1) 结合, 从而招募组蛋白 H3 的第 4 位氨基酸 (Histone 3 at lysine 4, H3K4) 甲基转移酶 SETD1^[11, 34]. 这说明 H3K4 的甲基化和 Dnmt3 从 CpG 岛的排出与启动子保持去甲基化状态有关. 同理, H3K4 的去甲基化对于卵细胞中印记基因的 DNA 甲基化状态也有重要作用^[35].

早期发育中的两波去甲基化一般在桑葚胚前完成, 之后发生全新甲基化, 若不发生 DNA 甲基化会导致胚胎中异位基因激活^[36]. 有种观点认为去甲基化的转座子能产生小 RNA, 会反过来引起该位点的重新甲基化以及转座子的重新沉默^[37]. 胚胎形成过程中, 在许多种基因序列中通过全新甲基化转移酶 Dnmt3a 和 Dnmt3b 催化发生全新甲基化, 但在 CpG 含量高、甲基化程度低的 CpG 岛位点却没有发生^[38]. 关于小鼠的研究表明, 非印记基因启动子的 DNA 甲基化是从亲本的配子中遗传的, 这意味着受精后 DNA 甲基化重排的缺失是普遍存在的^[39]. 外胚层组织特异性表达的基因 (如造血基因) 可以发生定向的甲基化然后在最终分化过程中去甲基化^[39].

2.3 胎盘中的 DNA 甲基化

在妊娠期的整个过程中, 胎盘对于子宫发育和胎儿生长都有重要的作用, 而 DNA 甲基化是影响胎盘发育和功能的重要因素. 早在 20 世纪 80 年代中期, 研究人员已证明了在人类胎盘中特异位点的 DNA 甲基化能够影响胎盘中 DNA 结合蛋白的结合能力, 这对于理解 DNA 甲基化模式在 DNA 结合元件募集及随后的转录中的作用有重要意义.

一些研究进一步分析表明胎盘形成与人类癌

症发展和肿瘤形成具有一定的相似性. 有数据显示, 人类正常胎盘侵袭及功能相关的 DNA 甲基化模式与肿瘤形成和发展中与肿瘤相关的甲基化特定模式具有惊人的相似性^[40]. 与癌细胞类似, 滋养层细胞能够增殖、迁移并且侵入子宫壁和脉管系统而不被免疫系统所排斥^[40]. 正常的人类滋养层细胞也会表达功能性肿瘤相关基因, 其中一些基因对特定恶性肿瘤的发展也有重要作用^[41]. 近期研究发现在人类胎盘中通过 DNA 甲基化和组蛋白修饰可以对一些抑癌基因进行表观遗传调控, 如 *Maspin*、*Ras* 相关结构域家族 1A 基因 (Ras-association domain family 1A gene, RASSF1A) 和腺瘤样结肠息肉易感基因 (Adenomatous polyposis coli, APC)^[42-44]. 另外, Novakovic 等 (2008) 研究了妊娠最初 3 个月的滋养层细胞和足月胎盘中肿瘤相关基因的甲基化程度, 证明甲基化引起的一部分基因表达抑制是保证人类胎盘正常发育的部分原因.

DNA 甲基化不仅能影响胎盘的形态学, 在胎盘的生理学方面也有重要作用. 肾脏 1 α 羟化酶 (Renal 1 α -hydroxylase, CYP27B1) 和 24-羟化酶 (24-hydroxylase, CYP24A1) 的反馈调节能够严格控制具有生物活性的维生素 D 的血浆浓度, 而在妊娠期这种调节是解耦合的, 有研究表明 DNA 甲基化与此现象有关^[45]. 启动子区甲基化能下调 *CYP24A1* 启动子的活性并能阻断维生素 D 介导的反馈激活作用^[45], 这样会显著提高母-胎界面活性维生素 D 的水平, 从而在妊娠过程中产生作用. 具有生物学活性的维生素 D 对于钙平衡调节、免疫调节、细胞分化和编程性细胞死亡具有重要作用^[46]. 另外, 维生素 D 的缺乏会导致胎盘机能不全, 例如先兆子痫^[47]. 而在绒毛膜癌细胞系中, *CYP27B1* 和 *CYP24A1* 都是超甲基化的^[45]. 可见在妊娠过程中 DNA 甲基化对于维生素 D 的调控以及疾病发生具有重要意义.

3 胚胎发育中甲基化状态的相对差异

在胚胎发育过程中 DNA 甲基化状态存在明显的差异. 这种相对差异对于生物体的胚胎发育和正常生长具有重要作用.

早期用 5-甲基胞嘧啶抗体和 Southern 印迹法所进行的研究发现, 精子比卵母细胞拥有更高的 DNA 甲基化水平, 受精后基因组中大多数区域的 DNA 甲基化水平明显降低^[48]. 而在受精作用的数小时内, 与父源基因组相比, 母源基因组

会由低甲基化状态转变成超甲基化状态, 这意味着在受精卵中同时发生了去甲基化和重新甲基化作用^[49, 50], 且单一活动只影响单一亲本基因组的总体甲基化水平. 母源基因组被保护而未发生早期去甲基化, 而父源基因组似乎受到保护而避免了新生 DNA 甲基化. 造成这一现象的原因可能是早期胚胎中亲本基因组在空间上的隔离^[48]. 这种隔离可能造成了酶催化的差别. 另一种可能是父源基因在组装过程中的其他染色质结构差异使父源基因组受到或免受这些不同作用酶的催化^[48]. 另外, 最初的 5mC 修饰对于原生殖细胞和受精卵中 DNA 去甲基化的起始和调节起作用, 这种修饰是通过不同的机制 (比如脱氨作用和羟化作用) 进行的, 进而触发碱基切除修复应答^[20, 50, 51]. 也许正是因为发生在原生殖细胞和胚胎的两次去甲基化作用是基因组水平的, 而且去甲基化发生的时间比较接近甚至是重叠的, 但要保证不同细胞的去甲基化状况不同, 需要对 5mC 采用不同修饰的方式并与不同的机制相配合来完成如此大规模的 DNA 甲基化模式的重排^[22].

除了父、母本基因组中 DNA 甲基化水平的差别外, 在即将发育成胚胎与即将发育成胚外谱系的细胞间也观测到了 DNA 甲基化水平的差别. 发生在胚泡期的全新甲基化只局限于内细胞群 (Inner cell mass, ICM), 而滋养外胚层 (Trophoblast, TE) 实际上是缺乏甲基化的^[49]. 在胚泡期的前 3.5 d, *Dnmt3b* 先在 TE 而不是 ICM 中表达, 但在胚泡期的 4.5 d, *Dnmt3b* 出现在 ICM 谱系而不是 TE 谱系中^[52]. 因此在分化为胚胎和胚外细胞谱系时两种细胞谱系之间形成了甲基化状态的不对等^[47, 53]. 而这种表观遗传调控的不对等将在整个妊娠期都保持着, 即胚胎的整体甲基化水平比胎盘高^[49]. 胚外组织持续获得 DNA 甲基化, 但最终不会达到与胎儿体细胞同等高的水平^[54]. 在克隆胚胎中甲基化状态差别的缺失会导致胚胎衰竭^[55]. 另外, 克隆猫胎盘的超甲基化可能与克隆成功率低下有关^[56]. 因此这种 DNA 甲基化状态的不对称似乎对个体发育也是必不可少的. 但是胎盘相对较低的甲基化是怎样产生的、具体有什么作用目前还不是很清楚. 近期研究发现在早期妊娠的胎盘中发生了 DNA 甲基化引起的 *Dnmt1* 下调及 *Dnmt3L* 基因的去甲基化, 这意味着 *Dnmt* 家族基因的表观遗传调控可能对人类胚外组织中特别的甲基化模式的形成具有重要作用^[57].

研究表明胚外细胞谱系的所有衍生物都保持着低甲基化水平. 例如胎盘中位于 *IGF2-H19* 区域的两个调节域是低甲基化的, 而在新生婴儿血液中, 两个等位基因之一的相同区域是甲基化的^[2]. 虽然滋养层细胞谱系整体是低甲基化的, 但 DNA 甲基化对于胚外组织的正常发育是必不可少的, 尤其对于滋养层细胞的侵袭行为. 给不同发育阶段的妊娠期小鼠摄入 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷 (一种 DNA 甲基化抑制剂) 能中断滋养层细胞的增殖^[58]. 在人类绒毛膜癌细胞系中 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷能中断滋养层细胞的迁移^[59]. 此外, DNA 甲基转移酶 *Dnmt1* 和 *Dnmt3L* 基因敲除小鼠的研究表明, 这些纯和型小鼠的胎盘会产生多种形态学上的缺陷, 比如绒毛膜尿囊融合缺陷和迷路形成的缺失^[11, 60], 这些可能是由于印记缺失引起的. *Dnmt1* 的突变会导致胰岛素样生长因子 II (Insulin-like growth factor, IGF2)、小核核糖核蛋白多肽 N 基因 (Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N, Snrpn) 和父系表达基因 3 (Paternally expressed gene 3, Peg3) 调节域特定基因的双等位基因表达, 而在 *Kcnq1* 域的基因对 *Dnmt1* 的缺失较不敏感^[61].

4 展望

DNA 甲基化是调节细胞分化过程中基因状态的主要机制, 在胚胎早期发育中具有重要意义. 但是关于 DNA 甲基化的启动机制和作用机理还需进一步地研究. 我们对于多能基因, 发育基因和具有组织特异性的差别甲基化基因中 DNA 甲基化的发生位点还知之甚少; DNA 甲基化对特异的基因组位点的靶定情况; 除了引起基因沉默, DNA 甲基化对于染色质和细胞核结构是否还有别的作用和作用方式, 以及 DNA 甲基化通路缺陷怎样引起人类疾病等等都不甚明了. 对甲基化的深入研究将有助于进一步阐明发育、分化以及肿瘤等疾病发生的机制, 从而开拓其在克隆技术及人类医疗等领域的应用前景.

参考文献 (References):

- [1] THERESA M G, EIMAN K M. DNA methylation in early development[J]. *Molecular Reproduction Development*, 2010, 77(11): 105-113.
- [2] CORRY G N, TANASIJEVIC B, BARRY E R, *et al.* Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development[J]. *Birth Defects Research, Part C, Embryo Today*, 2009, 87(4): 297-313.
- [3] GUO L, CHOUFANI S, FERREIRA J, *et al.* Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age(SGA)placentae[J]. *Developmental Biology*, 2008, 320(1): 79-91.
- [4] BIRD A. Perceptions of epigenetics[J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 396-398.
- [5] KLOSE R J, BIRD A P. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators[J]. *Trends in Biochemical Science*, 2006, 31(2): 89-97.
- [6] PROKHORTCHOUK E, DEFOSSEZ P. The cell biology of DNA methylation in mammals[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1783(11): 2167-2173.
- [7] METIVIER R, GALLAIS R, TIFFOCHE C, *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter[J]. *Nature*, 2008, 452(7183): 45-50.
- [8] ZHANG X, HO S M. Epigenetics meets endocrinology[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2011, 46(1): 11-32.
- [9] BOURC'HIS D, XU G L, LIN C S, *et al.* Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints[J]. *Science*, 2001, 294(5551): 2536-2539.
- [10] GOWHER H, LIEBERT K, HERMANN A, *et al.* Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(14): 13341-13348.
- [11] CHOTALIA M, SMALLWOOD S A, RUF N, *et al.* Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(1): 105-117.
- [12] SUN L Q, LEE D W, ZHANG Q, *et al.* Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the *SNF2*-like gene, *PASG*[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(9): 1035-1046.
- [13] XI S, ZHU H, XU H, *et al.* Lsh controls *Hox* gene silencing during development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(36): 14366-14371.
- [14] GEIMAN T M, TESSAROLLO L, ANVER M R, *et al.* Lsh, a SNF2 family member, is required for normal murine development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1526(2): 211-220.
- [15] JORDÀ M, PEINADO M A. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer [J]. *Mutation Research*, 2010, 693(1-2): 84-93.
- [16] 刘梅冬, 龚环宇, 谭斯品, 等. 巢式甲基化特异性 PCR 检测肺癌病人 *WIF-1* 基因启动子区异常甲基化 [J]. *生命科学研究* (LIU Mei-dong, GONG Huan-yu, TAN Si-pin, *et al.* Detection of promoter hypermethylation of *WIF-1* gene by nested methylation specific polymerase chain reaction in lung cancer patients[J]. *Life Science Research*), 2010, 13(5): 443-447.
- [17] DATTA S, DATTA S, KIM S, *et al.* Statistical analyses of next generation sequence data: a partial overview[J]. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 2010, 3(6): 183-190.
- [18] LEES-MURDOCK D J, WALSH C P. DNA methylation reprogramming in the germ line[J]. *Epigenetics*, 2008, 3(1): 5-13.
- [19] HEMBERGER M, DEAN W, REIK W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal[J]. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 526-537.
- [20] POPP C, DEAN W, FENG S, *et al.* Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1101-1105.
- [21] HAJKOVA P, JEFFRIES S J, LEE C, *et al.* Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway[J]. *Science*, 2010, 329(5987): 78-82.
- [22] MORGAN H D, DEAN W, COKER H A, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52353-52360.

- [23] FENG S, JACOBSEN S E, REIK W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development[J]. *Science*, 2010, 330(6004): 622-627.
- [24] OKADA Y, YAMAGATA K, HONG K, *et al.* A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 554-558.
- [25] GEHRING M, REIK W, HENIKOFF S. DNA demethylation by DNA repair[J]. *Trends in Genetics*, 2009, 25(2): 82-90.
- [26] WOSSIDLO M, ARAND J, SEBASTIANO V, *et al.* Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(11): 1877-1888.
- [27] MAYER W, FUNDELE R, HAAF T. Spatial separation of parental genomes during mouse interspecific (*Mus musculus* x *M. spretus*) spermiogenesis[J]. *Chromosome Research*, 2000, 8(6): 555-558.
- [28] KURIHARA Y, KAWAMURA Y, UCHIJIMA Y, *et al.* Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1[J]. *Developmental Biology*, 2007, 313(1): 335-346.
- [29] KO Y G, NISHINO K, HATTORI N, *et al.* Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10): 9627-9634.
- [30] WEAVER J R, SUSIARJO M, BARTOLOMEI M S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo[J]. *Mammalian Genome*, 2009, 20(9-10): 532-543.
- [31] HOWELL C Y, BESTOR T H, DING F, *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene[J]. *Cell*, 2001, 104(6): 829-838.
- [32] JEONG Y S, OH K B, PARK J S, *et al.* Cytoplasmic localization of oocyte-specific variant of porcine DNA methyltransferase-1 during early development[J]. *Developmental Dynamics*, 2009, 238(7): 1666-1673.
- [33] LODDE V, MODINA S C, FRANCIOSI F, *et al.* Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, *in vitro* maturation and early embryonic development in cow[J]. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 2009, 53(4): 199-207.
- [34] THOMSON J P, SKENE P J, SELFRIDGE J, *et al.* CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1[J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1082-1096.
- [35] CICCONE D N, SU H, HEVI S, *et al.* KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints[J]. *Nature*, 2009, 461(7262): 415-428.
- [36] LEES-MURDOCKURDOCK D J, SHOVLIN T C, GARDINER T, *et al.* DNA methyltransferase expression in the mouse germ line during periods of *de novo* methylation[J]. *Developmental Dynamics*, 2005, 232(4): 992-1002.
- [37] SLOTKIN R K, VAUGHN M, BORGES F, *et al.* Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen[J]. *Cell*, 2009, 136(3): 461-472.
- [38] LANE N, DEAN W, ERHARDT S, *et al.* Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse[J]. *Genesis*, 2003, 35(2): 88-93.
- [39] BORGEL J, GUIBERT S, LI Y, *et al.* Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1093-1100.
- [40] NOVAKOVIC B, RAKYAN V, NG H K, *et al.* Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first-trimester cytotrophoblasts[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2008, 14(9): 547-554.
- [41] FERRETTI C, BRUNI L, DANGLES-MARIE V, *et al.* Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts[J]. *Human Reproduction Update*, 2007, 13(2): 121-141.
- [42] DOKRAS A, COFFIN J, FIELD L, *et al.* Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2006, 12(10): 611-617.
- [43] CHIU R W, CHIM S S, WONG I H, *et al.* Hypermethylation of *RASSF1A* in human and rhesus placentas[J]. *The American Journal of Pathology*, 2007, 170(3): 941-950.
- [44] WONG N C, NOVAKOVIC B, WEINRICH B, *et al.* Methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human placenta and hypermethylation in choriocarcinoma cells [J]. *Cancer Letters*, 2008, 268(22): 56-62.
- [45] NOVAKOVIC B, SIBSON M, NG H K, *et al.* Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(22): 14838-14848.
- [46] DUSSO A S, BROWN A J, SLATOPOLSKY E, *et al.* Vitamin D[J]. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 2005, 289(1): 8-28.
- [47] BODNAR L M, CATOV J M, SIMHAN H N, *et al.* Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2007, 92(9): 3517-3522.
- [48] MAYER W, NIVELEAU A, WALTER J, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome[J]. *Nature*, 2000, 403(6769): 501-502.
- [49] NAKAMURA T, ARAI Y, UMEHARA H, *et al.* *PGC7/Stella* protects against DNA demethylation in early embryogenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(1): 64-71.
- [50] MAATOUK D M, KELLAM L D, MANN M R, *et al.* DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages[J]. *Development*, 2006, 133(17): 3411-3418.
- [51] SEKI Y, YAMAJI M, YABUTA Y, *et al.* Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice[J]. *Development*, 2007, 134(14): 2627-2638.
- [52] HIRASAWA R, SASAKI H. Dynamic transition of *Dnmt3b* expression in mouse pre- and early post-implantation embryos[J]. *Gene Expression Patterns*, 2009, 9(1): 27-30.
- [53] REIK W, SANTOS F, MITSUYA K, *et al.* Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 2003, 358(1436): 1403-1409.
- [54] MACCANI M A, MARSIT C J. Epigenetics in the placenta[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2009, 62(2): 78-89.
- [55] DEAN W, SANTOS F, STOJKOVIC M, *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(24): 13734-13738.
- [56] CHO S J, YIN X J, CHOI E, *et al.* DNA methylation status in somatic and placenta cells of cloned cats[J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(4): 477-484.
- [57] NOVAKOVIC B, WONG N C, SIBSON M, *et al.* DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(13): 9583-9593.
- [58] SERMAN L, VLAHOVIC M, SIJAN M, *et al.* The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta[J]. *Placenta*, 2007, 28(8-9): 803-811.
- [59] RAHNAMA F, SHAFIEI F, GLUCKMAN P D, *et al.* Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(11): 5275-5283.
- [60] ARIMA T, HATA K, TANAKA S, *et al.* Loss of the maternal imprint in *Dnmt3Lmat^{-/-}* mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue[J]. *Developmental Biology*, 2006, 297(2): 361-373.
- [61] WEAVER J R, SARKISIAN G, KRAPP C, *et al.* Domain-specific response of imprinted genes to reduced DNMT1[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(16): 3916-3928.