

# 焦磷酸测序法检测 *OCT4* 启动子在大鼠骨髓源性肝干细胞分化中的甲基化变化

潘润华, 阿斯楞, 张 茂, 利 民, 张梓朗, 廖彩仙\*

(南方医科大学 南方医院肝胆外科, 中国广东 广州 510515)

**摘 要:** 骨髓间充质干细胞具有分化成为肝细胞的潜能已得到证实, 但其分化的调控机理还不完全清楚。通过检测大鼠骨髓源性肝干细胞 (rat bone marrow-derived liver stem cells, RBMLSCs) 诱导分化为肝细胞过程中 *OCT4* 启动子甲基化的变化, 来探讨启动子甲基化调控细胞分化的机制。RBMLSCs 用 25  $\mu\text{g/L}$  重组人肝细胞生长因子和 0.1 nmol/L 地塞米松进行诱导, 在诱导之后不同时间点(0 d, 7 d, 14 d)提取细胞的 DNA 及 RNA。用荧光定量 PCR 法检测白蛋白(albumin, Alb)和 *OCT4* 的 mRNA 表达水平, 应用焦磷酸测序法定量检测 *OCT4* 基因的启动子中 4 个 CpG 位点的甲基化变化。结果表明: 在 RBMLSCs 分化过程中, Alb mRNA 持续增高( $P<0.05$ ), 但 *OCT4* mRNA 表达在 7 d 及 14 d 明显减少( $P<0.005$ ); 同时 *OCT4* 启动子上游的 CpG 1-2-3 甲基化频率显著上升( $P<0.001$ ), 但 CpG 4 甲基化无明显变化。这些结果说明 *OCT4* 启动子高甲基化可能导致其 mRNA 表达减少, RBMLSCs 多能性消失, 但 CpG 4 并不参与这一分化调控过程。

**关键词:** 大鼠骨髓源性肝干细胞; *OCT4*; 启动子甲基化; 焦磷酸测序

中图分类号: Q344

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)02-0113-06

## Pyrosequencing Detection of *OCT4* Promoter Methylation in Differentiation of Rat Bone Marrow-derived Liver Mesenchymal Stem Cells

PAN Run-hua, A Si-leng, ZHANG Mao, LI Min, ZHANG Zi-lang, LIAO Cai-xian\*

(Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

**Abstract:** It has been confirmed that bone marrow mesenchymal stem cells have the potential to differentiate into hepatocytes, however, the related regulation mechanism has not been elucidated. To explore the specific mechanism, *OCT4* gene promoter methylation variation was detected in differentiation induction of rat bone marrow-derived liver stem cells (RBMLSCs) into hepatocytes *in vitro*. RBMLSCs were induced by 25  $\mu\text{g/L}$  recombinant human hepatocyte growth factor and 0.1 nmol/L dexamethasone. DNA and RNA were extracted from cells at different time points (day 0, 7 and 14) after induction. Fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) was performed to detect *OCT4* and albumin (Alb) mRNA expression. Pyrosequencing was performed to detect methylation variation of 4 CpG sites in *OCT4* promoter. During cell differentiation, Alb mRNA expression was increased significantly ( $P<0.05$ ), but *OCT4* mRNA was decreased significantly ( $P<0.005$ ) at day 7 and day 14. Methylation frequency of the first 3 CpG sites in *OCT4* promoter upstream was increased significantly ( $P<0.001$ ), but the 4th CpG site had no obvious methylation change. The results showed that the hypermethylation of *OCT4* promoter may lead to the decline of its mRNA expression, disappearance of RBMLSCs pluripotency, but that the 4th CpG site might not be involved in the regulating process.

收稿日期: 2015-12-16; 修回日期: 2015-12-29

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B080710169); 国家卫计委重点临床专科资助项目(W0211WAI44)

作者简介: 潘润华(1989-), 男, 广东佛山人, 硕士研究生, 主要从事肝和肝干细胞移植研究; \*通讯作者: 廖彩仙(1960-), 男, 江西赣州人, 南方医科大学教授, 博士, 主要从事肝和肝干细胞移植研究, E-mail: liaocx@fimmu.com.

**Key words:** rat bone marrow-derived liver stem cells (RBMLSCs); *OCT4*; promoter methylation; pyrosequencing

(*Life Science Research*, 2016, 20(2): 113-118)

干细胞在一定诱导条件下可分化为肝细胞、神经细胞、软骨细胞等多种成体细胞,具有多向分化潜能<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞是一类来源广泛的成体干细胞,分化为肝细胞的比例较高<sup>[2]</sup>,有望成为终末期肝病的一种治疗手段。然而随着对骨髓间充质干细胞的深入研究,一些负面作用被发现,特别是其致瘤性及促进癌症的发生。Rubio等<sup>[3]</sup>报道脂肪组织来源的间充质干细胞经体外多代培养后自发出现恶性变的倾向, Li等<sup>[4]</sup>则发现人间充质干细胞在体内能促进肿瘤的发生和生长。因此,骨髓间充质干细胞的分化调控机制仍需要大量深入的探究。

多能性基因 *OCT4* 对维持干细胞的多潜能性和分化具有重要的作用<sup>[5]</sup>,然而在多种肿瘤中也检测到 *OCT4* 的表达。Atlasi等<sup>[6]</sup>在膀胱癌组织中发现 *OCT4* 的表达与肿瘤的发生明显相关。Ezeh等<sup>[7]</sup>在精原细胞瘤和乳腺癌中检测到多种干细胞基因(如 *OCT4*、*NA NOG*)的表达。根据表观遗传学的研究,发现基因在组织或细胞中的表达水平与启动子甲基化水平有关<sup>[8]</sup>。目前对于基因甲基化的研究大多集中在肿瘤形成方面,在成体干细胞中 *OCT4* 的表达水平与启动子甲基化程度的关系未得到充分阐明。本研究将在大鼠骨髓源性肝干细胞 (rat bone marrow-derived liver stem cells, RBMLSCs)诱导为肝细胞的过程中,应用焦磷酸测序实时定量检测 *OCT4* 启动子每个 CpG 位点的甲基化水平,以期进一步揭示成体干细胞分化的表观遗传机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

高糖 DMEM F12 培养基(美国 Hyclone 公司);澳洲特级胎牛血清(以色列 BioInd 公司);青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司);0.25%胰酶-EDTA(美国 Gibco 公司);重组人肝细胞生长因子(美国 Peprotech 公司);DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司);RNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司);DNA 甲基化修饰试剂盒(德国 Qiagen 公司);焦磷酸测序试剂盒(德国 Qiagen 公司);cDNA 第一链合成试剂盒(瑞士 Roche 公司);FQ-PCR 试剂盒(瑞士 Roche 公司);dNTP(德国 Qiagen 公司)。

### 1.2 细胞培养

#### 1.2.1 细胞培养

将本课题组冻存的 CD90<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> RBMLSCs 复苏后常规培养于基础培养液中(高糖 DMEM F12 培养基+10%胎牛血清+青霉素-链霉素),置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 3 d 换液一次,待细胞长至约 80%时用 0.25%胰酶-EDTA 消化传代。

#### 1.2.2 细胞诱导

参考本实验组已成功建立的诱导方案<sup>[9]</sup>,取培养至第三代生长良好的细胞,培养于诱导培养液中(高糖 DMEM F12 培养基+10%胎牛血清+青霉素-链霉素+25 μg/L 重组人肝细胞生长因子+0.1 nmol/L 地塞米松)进行诱导分化,每 3 d 换液一次,连续诱导 14 d。动态观察细胞在诱导分化过程中的形态,分别在诱导至 0 d、7 d、14 d 时用正置显微镜记录细胞的典型形态,同时留足够样本以备后续实验。取未诱导的 RBMLSCs 为对照组,根据细胞诱导的不同时间点分为 0 d 组、7 d 组、14 d 组。

### 1.3 荧光定量 PCR

#### 1.3.1 RNA 的提取

按照 RNA 提取试剂盒从每瓶约 1×10<sup>6</sup> 个细胞中提取 RNA,经 ND-1000 分光光度计检测吸光度均大于 1.9,保存于-20 °C 备用。

#### 1.3.2 cDNA 第一链合成

引物由上海生工公司设计并合成(表 1)。冰上融化各试剂后,按说明书配制 20 μL 反应体系,放入 ABI 7900 PCR 仪(美国 ABI 公司)后按 25 °C 10 min、50 °C 60 min 设置反应参数,之后 85 °C 加热 5 min 灭活逆转录酶,马上冰浴,-20 °C 长期保存备用。

#### 1.3.3 荧光定量 PCR

冰上融化试剂后,按说明书配制反应体系,之后用封板膜封闭 96 孔板,1 500 g 离心 2 min;将板放入 Roche LightCycler 480 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)中,按 95 °C 变性 10 s、60 °C 退火 20 s、72 °C 延伸 20 s,共 45 个循环扩增反应。用相对定量法计算 PCR 结果。

### 1.4 启动子甲基化分析

#### 1.4.1 DNA 的提取

按照 DNA 提取试剂盒从每瓶约 1×10<sup>6</sup> 个细

表 1 *Alb* 及 *OCT4* FQ-PCR 引物序列  
Table 1 *Alb* and *OCT4* FQ-PCR primer sequences

Genes	Primer sequences	Length/bp	Annealing temperature /°C	GC content/(%)
<i>Alb</i>	F TACACCCAGAAAGCACCTCA	20	57.8	50.0
	R TACACCCAGAAAGCACCTCA	20	59.8	55.0
<i>OCT4</i>	F GGACACCTGGCTTCAGACTF	20	59.8	55.0
	R TCCCTCCACAGAACTCGTATG	21	60.0	52.4
<i>GADPH</i>	F ACCACAGTCCATGCCATCAC	20	59.8	55.0
	R TCCACCACCACCCTGTTGCTGTA	23	63.7	56.5

胞中提取 DNA, 经 ND-1000 分光光度计检测吸光度均大于 1.6, 保存于 -20 °C 备用。

#### 1.4.2 DNA 重亚硫酸盐修饰

按甲基化修饰试剂盒说明书, 在 200  $\mu$ L PCR 管中加入各试剂, 彻底混匀后室温放置, 用 PCR 仪来进行 DNA 转化反应, 参数设置为 95 °C 变性 5 min, 60 °C 复性 25 min, 95 °C 变性 5 min, 60 °C 复性 85 min, 95 °C 变性 5 min, 60 °C 复性 175 min, 20 °C 过夜冷却。

#### 1.4.3 甲基化 PCR 反应

选取 *OCT4* 转录起始位点上游 +1 至 -364 bp 间的主要启动子区域, 含 4 个 CpG 位点(图 1)。引物由 PyroMark Assay Design 2.0 设计(表 2)。根据说明书配制 50  $\mu$ L 反应体系, 95 °C 预热 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,

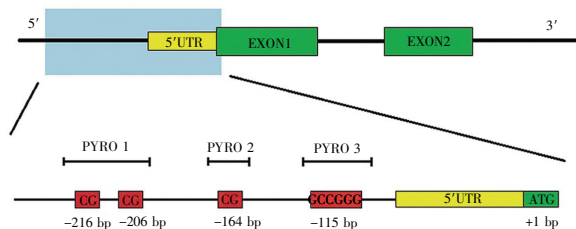


图 1 *OCT4* 启动子区的核苷酸序列

5'UTR 为 5'非翻译区, ATG 为转录起始点, 红色方框表示 CpG 位点, 三段测序序列(PYRO 1-2-3)覆盖启动子里各个 CpG 位点。

Fig.1 The nucleotide sequence of *OCT4* promoter

5'UTR: 5'untranslated region, ATG: Transcription start site. The red boxes represent CpG sites. The three fragments analyzed by sequencing cover all CpG sites in promoter.

表 2 各段待测片段的引物序列及生物素标记位置

Table 2 The primer sequences and biotin-labeled locus of each segment to be sequenced

	Primer sequences	Biotin-labeled locus
PRYO 1-F	5'-TGGAGAAGTCAAAGAGATAGACT-3'	
PRYO 1-R	5'-CCAATCCCACCCTTAACCTTAA-3'	5' Biotin
PRYO 1-S	5'-GAAGGTTTATTTGGTTGT-3'	
PRYO 2-F	5'-GAGGAATGTGGAGAAGTCAAAGAGATAG-3'	5' Biotin
PRYO 2-R	5'-CCCAATCCCACCCTTAACCTTAA-3'	
PRYO 2-S	5'-AGTTTTTTAGATTTTTAGGTAAATT-3'	
PRYO 3-F	5'-TGGAGAAGTCAAAGAGATAGACT-3'	5' Biotin
PRYO 3-R	5'-CCAATCCCACCCTTAACCTTAA-3'	
PRYO 3-S	5'-CTTAACCTTAACCCC-3'	

经 40 个循环扩增反应, 72 °C 冷却 7 min。

#### 1.4.4 焦磷酸测序

在 96 孔 PCR 反应板中按说明加入反应结合珠 2  $\mu$ L, 后将探头上结合珠及 PCR 产物置入 40  $\mu$ L 退火缓冲液 (含测序引物 1.5  $\mu$ L), 85 °C 变性 2 min, 冷却至室温, 使引物与范本退火杂交。在试剂舱中依次加入底物混合物、酶混合物及 4 种 dNTP, 将试剂舱及 96 孔反应板放入 Pyrosequencing 检测仪(PyroMark Q96 ID, 德国 Qiagen 公司)进行反应, Pyro Q-CpG 软件自动分析每个位点甲基化状态。

#### 1.5 统计学分析

应用统计学分析软件 SPSS 19.0 计算实验结果。基因表达量及甲基化频率的计算采用单因素分析, 组间差异方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett T3 检验方法比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RBMLSCs 的培养和诱导分化

复苏后的 CD90<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> RBMLSCs 细胞分布均匀, 形态透明均一, 呈椭圆形。约 48 h 后基本贴壁生长, 呈长梭形, 集落呈漩涡状 (图 2A); 刚加入 25  $\mu$ g/L 重组人肝细胞生长因子及 0.1 nmol/L 地塞米松时细胞无明显变化 (图 2B); 诱导至 7 d 时细胞多呈长梭形、多边形生长, 漩涡状消失 (图 2C); 诱导至 14 d 时细胞进一步变圆, 胞内细胞器增多(图 2D)。

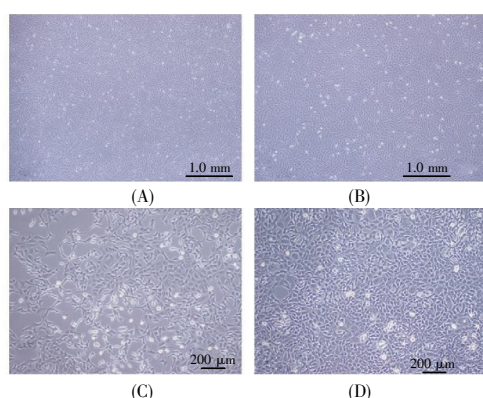


图2 RBMLSCs 诱导分化为肝细胞的形态特征

(A)未诱导,4×10放大;(B)诱导至0 d,4×10放大;(C)诱导至7 d,10×10放大;(D)诱导至14 d,10×10放大。

Fig.2 The morphology of RBMLSCs induced into hepatocytes

(A) Non-differentiation, 4×10 magnification; (B) 0 d after induction, 4×10 magnification; (C) 7 d after induction, 10×10 magnification; (D) 14 d after induction, 10×10 magnification.

## 2.2 RBMLSCs 诱导为成熟肝细胞相关基因的表达

更换诱导培养基后,0 d组的Alb和OCT4 mRNA表达与未分化组相比无明显变化。诱导至7 d时,Alb mRNA与未分化组相比增加了5.22倍( $P=0.025$ ),而OCT4 mRNA表达则下调至0.23倍( $P=0.003$ );诱导至14 d时,Alb mRNA与未分化组相比增加了14.7倍( $P=0.000$ ),而OCT4 mRNA表达则进一步下调至0.055倍( $P=0.000$ )(图3)。

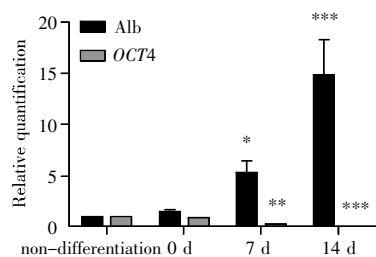


图3 Alb及OCT4的mRNA表达

Fig.3 Alb and OCT4 mRNA expressions

\*  $P<0.05$ , \*\* $P<0.005$ , \*\*\* $P<0.001$ .

表3 OCT4 启动子 CpG 位点甲基化频率

Table 3 Methylation frequency of 4 CpG sites in OCT4 promoter

CpG sites	1	2	3	4	/(%)
Non-differentiation	14.33±1.528	13.33±2.517	16.67±0.577	19.33±1.528	
0 d	18.00±3.000	14.00±1.000	15.33±1.528	19.00±1.000	
7 d	47.33±2.082 <sup>a</sup>	46.33±0.577 <sup>a</sup>	41.33±2.082 <sup>a</sup>	19.33±2.517	
14 d	72.67±1.528 <sup>b</sup>	85.67±1.528 <sup>b</sup>	96.67±1.155 <sup>b</sup>	18.33±1.528	

注: CpG 位点甲基化频率以  $\bar{x} \pm s$  表示。a. 7 d 组与未分化组及 0 d 组比较时  $P<0.001$ ; b. 14 d 组与未分化组、0 d 组及 7 d 组比较时  $P<0.001$ 。

Notes: Methylation frequency of all CpG sites was presented as  $\bar{x} \pm s$ . a.  $P<0.001$  versus non-differentiation and 0 d groups; b.  $P<0.001$  versus non-differentiation, 0 d and 7 d groups.

## 2.3 OCT4 启动子甲基化分析

OCT4 在干细胞的分化中起着重要的作用,然而其表达水平与启动子甲基化程度的关系仍未明确。对 RBMLSCs 诱导分化为成熟肝细胞过程中 OCT4 启动子进行了甲基化焦磷酸测序,图 4 为 OCT4 核心启动子区的焦磷酸测序图。图中可见测序峰清晰,干扰背景小,序列结果与 GenBank 收录的一致。而且,预测的 4 个 CpG 位点中,上游 3 个 CpG 位点均显示出不同程度的甲基化(图 5)。设定 20% 为区分高甲基化和低甲基化界限,高于该值为高甲基化,低于该值为低甲基化<sup>[10]</sup>。其中 7 d 组 CpG 1-2-3 甲基化频率高于 0 d 组及未分化组,差异有统计学意义( $P=0.000$ ); 14 d 组 CpG 1-2-3 甲基化频率高于 7 d 组、0 d 组及未分化组,差异有统计学意义( $P=0.000$ ); 而 CpG 4 在各组中差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),即 GC 盒在诱导分化过程中均无明显甲基化(表 3)。

## 3 讨论

OCT4 决定着干细胞增殖和分化的命运,其与多种靶基因共同参与 LIF、Wnt 及 Tgf- $\beta$  等多种重要调节通路。OCT4 通过激活 JMJD1A 和 JMJD2C 基因,使多能性因子持续表达<sup>[11]</sup>,并协同 SOX-2、NANOG 等基因维持干细胞的多潜能性和自我更新<sup>[12]</sup>。Rodda 等<sup>[13]</sup>研究认为, OCT4 属于多能性基因调节的顶级层次,其联合 NANOG 基因并通过下游多种靶基因对细胞的多能性进行调节。如果在胚胎干细胞中缺失 OCT4,即使存在 NANOG 的表达,干细胞也不能维持不分化状态<sup>[14]</sup>。然而也有研究表明,缺失了 OCT4 的鼠成体干细胞仍然能维持其自身的多潜能性<sup>[15]</sup>。因此,对于成体干细胞中 OCT4 在维持多潜性和自我更新的作用方面还有待进一步研究。

DNA 甲基化是一种重要表观遗传修饰,在干细胞分化调控、维持细胞正常功能、细胞发育、X

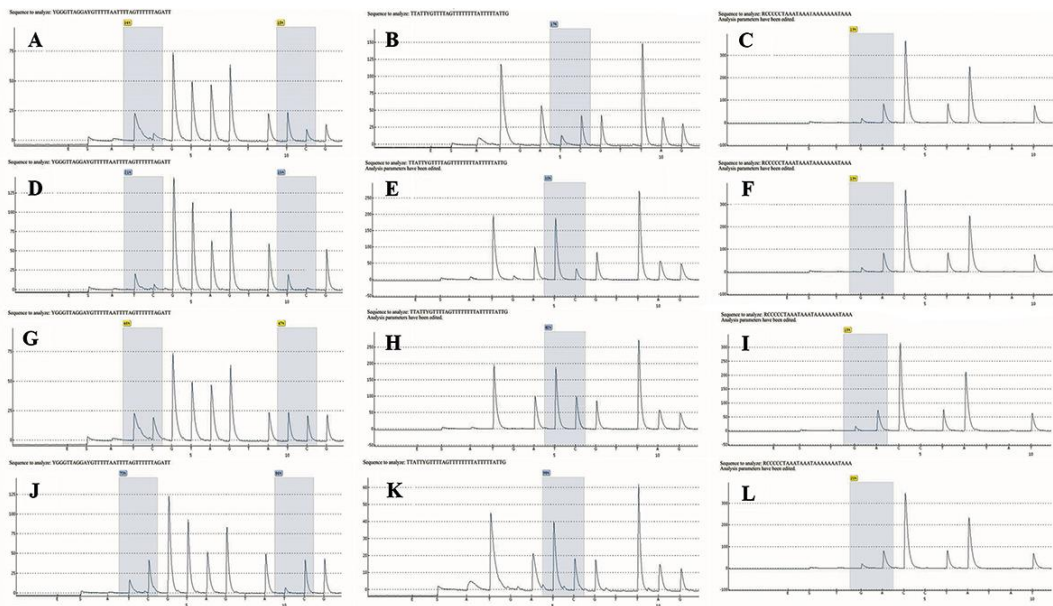


图 4 *OCT4* 启动子甲基化焦磷酸测序图

A~C: 未分化组的 4 个 CpG 位点; D~F: 0 d 组的 4 个 CpG 位点; G~I: 7 d 组的 4 个 CpG 位点; J~L: 14 d 组的 4 个 CpG 位点。

Fig.4 Pyrosequencing maps of *OCT4* promoter methylation

A~C: Four CpG sites of non-differentiation group; D~F: Four CpG sites of 0 d group; G~I: Four CpG sites of 7 d group; J~L: Four CpG sites of 14 d group.

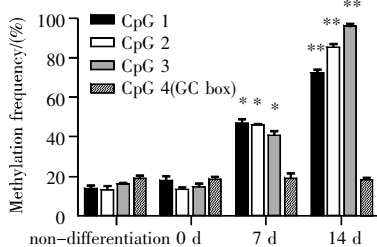


图 5 *OCT4* 启动子甲基化频率

\* $P < 0.001$ , 与未分化组及 0 d 组相比较; \*\* $P < 0.001$ , 与未分化组、0 d 组及 7 d 组相比较。

Fig.5 *OCT4* promoter methylation frequency

\* $P < 0.001$  versus non-differentiation and 0 d groups,

\*\* $P < 0.001$  versus non-differentiation, 0 d and 7 d groups.

染色体失活以及基因印记过程中起至关重要的作用<sup>[16, 17]</sup>。DNA 甲基化对细胞的调控主要表现在启动子上胞嘧啶第 5 位碳原子和甲基间的共价结合, 绝大多数存在于 CpG 二联核苷酸中, 因此在结构基因 5' 端附近富含 CpG 二联核苷酸的区域称为 CpG 岛。最近有研究表明, 基因中甲基化修饰可能调控基因转录本的选择性, 进而影响基因的表达<sup>[18]</sup>。目前, 甲基化分型的检测手段主要有甲基化特异性 PCR、DNA 直接测序法(Sanger 法)、甲基化敏感性解链曲线分析等, 这些方法都已广泛应用于科研和临床检验, 如甲基化特异性 PCR 能简便地对癌基因进行筛查<sup>[19]</sup>。但上述这些方法只

能对基因甲基化进行定性检测, 不能对某个 CpG 位点的甲基化频率进行精确的定量检测。焦磷酸测序法是新一代检测 DNA 甲基化的方法, 能精确敏感地分析每一个 CpG 位点的甲基化水平上的细微改变。其原理是变性的 DNA 中未被甲基化的胞嘧啶能被重亚硫酸钠转变为尿嘧啶, 在测序的过程中, 根据甲基化的胞嘧啶的数目与其和胸腺嘧啶之和的比值即可求出甲基化频率<sup>[20]</sup>。

本研究成功建立了 RBMLSCs 体外培养和成熟肝细胞分化体系, 并观察到 RBMLSCs 诱导至 7 d 已有 Alb 的表达, 具有肝细胞特征, 至 14 d 进一步成熟(图 2, 图 3)。王菊等<sup>[21]</sup>虽然证明了在小鼠骨髓间充质干细胞分化过程中 *OCT4* 甲基化与其表达的关系, 但由于采用的是定性方法, 不能表现出具体每个 CpG 位点甲基化对分化的可能影响。在应用焦磷酸测序法对目的序列进行测序时, 由于相邻 CpG 位点相隔较远, 为了保证测序的准确性, 我们将目的序列分成三段来测序。在 RBMLSCs 分化中, *OCT4* 启动子 CpG 前 3 个位点甲基化程度增高, 而 *OCT4* mRNA 表达下调, 干细胞多能性消失, 但第 4 个点位, 即 GC 盒无明显变化, 表明 GC 盒可能不参与分化调控(图 5)。

本研究中, 焦磷酸测序法在对甲基化的检测中表现出定量、准确等优势, 可精确检测出具体

的 CpG 位点的甲基化程度, 不仅补充和丰富了 RBMLSCs 定向分化的表观遗传机制, 且对 OCT4 甲基化参与调控 RBMLSCs 诱导分化提供了更多的实验数据。

### 参考文献 (References):

- [1] YAMADA T, YOSHIKAWA M, KANDA S, *et al.* *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(2): 146–154.
- [2] LI Z, GU T X, ZHANG Y H. Hepatocyte growth factor combined with insulin like growth factor-1 improves expression of GATA-4 in mesenchymal stem cells cocultured with cardiomyocytes[J]. *Chinese Medical Journal (English)*, 2008, 121(4): 336–340.
- [3] RUBIO D, GARCIA-CASTRO J, MARTIN C, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(8): 3035–3039.
- [4] TIAN L L H, YUE W M, ZHU F, *et al.* Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(7): 1860–1867.
- [5] NICHOLS J, ZEVIK B, ANASTASSIADIS K, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct4*[J]. *Cell*, 1998, 95(3): 379–391.
- [6] ATLASI Y, MOWLA S J, ZIAEE S A, *et al.* *OCT-4*, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 120(7): 1598–1602.
- [7] EZEH U I, TUREK P J, REUO R A, *et al.* Human embryonic stem cell genes *OCT4*, *NANOG*, *STELLAR* and *GDF3* are expressed in both seminoma and breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2255–2265.
- [8] KOBER P, BUJKO M, OLEDZKI J, *et al.* Methyl-CpG binding column-based identification of nine genes hypermethylated in colorectal cancer[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2011, 50(11): 846–856.
- [9] 黎冠宏, 王薇, 李继业, 等. H3K27me2 在大鼠骨髓源性肝干细胞分化过程中的变化[J]. *山东大学学报(医学版)* (LI Guan-hong, WANG Wei, LI Ji-ye, *et al.* H3K27 dimethylation changes during BMDLSCs differentiation into hepatocytes from rats *in vitro*[J]. *Journal of Shandong University (Health Science)*, 2014, 52(6): 28–32.
- [10] TAKAHASHI Y, IWAI M, KAWAI T, *et al.* Aberrant expression of tumor suppressors *CADMI* and *4.1B* in invasive lesions of primary breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2012, 19(3): 242–252.
- [11] LOH Y H, ZHANG W W, CHEN X, *et al.* *Jmjd1a* and *Jmjd2c* histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(20): 2545–2557.
- [12] MATIN M M, WALSH J R, GOKHALE P J, *et al.* Specific knockdown of *Oct4* and  $\beta 2$ -microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 659–668.
- [13] RODDA D J, CHEW J L, LIM L H, *et al.* Transcriptional regulation of *Nanog* by *OCT4* and *SOX2*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(26): 24731–24737.
- [14] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, *et al.* The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631–642.
- [15] LENGGER C J, CAMARGO F D, HOCHEDLINGER K, *et al.* *Oct4* expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(4): 403–415.
- [16] HELLMAN A, CHESS A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome[J]. *Science*, 2007, 315(5815): 1141–1143.
- [17] CHANG G, LIU S, WANG F C, *et al.* Differential methylation status of imprinted genes in nuclear transfer derived ES (NT-ES) cells[J]. *Genomics*, 2009, 93(2): 112–119.
- [18] NAUNAKEA A K, NAGARAJAN R P, BILENLY M, *et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulation alternative promoters[J]. *Nature*, 2010, 466(7303): 253–257.
- [19] 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 Dong-mei, 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*, 2009, 13(5): 443–447.
- [20] HAJKKOVA P, EL-MARRI O, ENGEMANN S, *et al.* DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2002, 200: 143–154.
- [21] 王菊, 符毓豪, 王维山, 等. *Oct-4* 在小鼠骨髓间充质干细胞定向诱导分化中的甲基化状态[J]. *中国医学科学院学报* (WANG Ju, FU Yu-hao, WANG Wei-shan, *et al.* *Oct-4* methylation in induced differentiation of bone mesenchymal stem cells[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2013, 35(3): 275–280.

(上接第 112 页)

- [9] 李晓慧, 王卫东, 胡远亮, 等. 稀土 (La, Ce, Er)-L-亮氨酸-邻菲啉三元配合物的合成及其抑菌活性[J]. *中国稀土学报* (LI Xiao-hui, WANG Wei-dong, HU Yuan-liang, *et al.* Synthesis and bacteriostasis activity of rare earth(La,Ce,Er)with L-leucine acid and 1, 10-phenanthroline ternary complexes[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2012, 30(1): 1–6.
- [10] 张建新, 刘起丽, 张秀英, 等. 水杨酸类稀土配合物抑菌作用研究[J]. *稀土* (ZHANG Jian-xin, LIU Qi-li, ZHANG Xiu-ying, *et al.* Study on the inhibition of the complexes of rare earth with salicylic acids on three bacteria[J]. *Chinese Rare Earths*, 2010, 31(5): 63–66.
- [11] 张丽红, 张冬艳, 卢庆华, 等. 小檗碱与稀土硝酸盐二元配合物的合成、表征及抑菌作用[J]. *中国稀土学报* (ZHANG Li-hong, ZHANG Dong-yan, LU Qing-hua, *et al.* Preparation and antibacterial of berberine complexes with rare earth[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2010, 28(6): 751–754.
- [12] 何笃贵, 李强国, 杨德俊, 等.  $RE(C_2H_3O_2)_3(C_6H_5NO)$  配合物抗真菌作用的热动力学研究[J]. *中国稀土学报* (HE Du-gui, LI Qiang-guo, YANG De-jun, *et al.* Thermokinetics study of antifungal functions of complexes of rare earths with salicylic acid and 8-hydroxyquinoline[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2007, 25(1): 107–110.
- [13] 肖圣雄, 李强国, 李旭, 等. 镧配合物的热化学及其对酵母菌作用的热动力学研究[J]. *中国科学: 化学* (XIAO Sheng-xiong, LI Qiang-guo, LI Xu, *et al.* Thermochemical and thermokinetic studies on complex of praseodymium[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2010, 40(9): 1422–1429.
- [14] 张辉, 喻莉萍, 李旭, 等.  $La(Sal)_3 \cdot (Qu)$  对重组 Fas 基因酵母促凋亡作用[J]. *中国公共卫生* (ZHANG Hui, YU Li-ping, LI Xu, *et al.* Apoptosis induced by  $La(Sal)_3 \cdot (Qu)$  in *S. pombe* with recombinant Fas gene[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2010, 26(11): 1357–1359.
- [15] CHAUDHARY A, BANSAL N, GAJRAJ A, *et al.* Antifertility, antibacterial, antifungal and percent disease incidence aspects of macrocyclic complexes of manganese (II)[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 96(2–3): 393–400.