

# KDMs在重编程与多能性调控中的生物学功能

高辉<sup>1,2,3</sup> 文兰<sup>1,2,3</sup> 胡蓉<sup>1,2,3</sup> 张昌军<sup>1,3,4</sup> 刁红录<sup>1,2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>十堰市人民医院(湖北医药学院附属人民医院)生殖医学中心, 十堰 442000; <sup>2</sup>湖北医药学院生物医药研究院, 十堰 442000; <sup>3</sup>湖北省生殖医学临床医学研究中心, 十堰 442000; <sup>4</sup>湖北医药学院生物医学工程学院, 十堰 442000)

**摘要** 表观遗传修饰对于干细胞的命运决定和体细胞重编程至关重要, 组蛋白赖氨酸去甲基化酶(lysine demethylases, KDMs)作为组蛋白修饰关键调控因子, 是再生医学研究的热点。目前研究发现, KDMs在干细胞多能性的维持、谱系分化激活以及体细胞核移植胚胎的重编程方面具有重要的生物学作用。该文将对KDMs在干细胞领域的最新研究进展进行综述。

**关键词** KDMs; 胚胎干细胞; 诱导多能干细胞; 专能干细胞; 体细胞核移植

## Biological Functions of KDMs in Reprogramming and Pluripotent Regulation

GAO Hui<sup>1,2,3</sup>, WEN Lan<sup>1,2,3</sup>, HU Rong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Changjun<sup>1,3,4</sup>, DIAO Honglu<sup>1,2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup>Reproductive Medicine Center, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

<sup>2</sup>Biomedical Research Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>3</sup>Hubei Clinical Research Center for Reproductive Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>4</sup>Biomedical Engineering College, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

**Abstract** Epigenetic modification is critical for the fate of stem cells and somatic reprogramming. KDMs (lysine demethylases), as key regulators of histone modification, are hot topics in regenerative medicine. Current studies have found that KDMs play important biological roles in the maintenance of stem cell pluripotency and the activation of lineage differentiation as well as the reprogramming of somatic cell nuclear transfer embryos. This article will review the latest research progress of KDMs in the field of stem cells.

**Keywords** KDMs; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; multipotent stem cells; somatic cell nuclear transfer

干细胞是指具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞, 根据细胞分化的潜能不同可分为全能干细胞、多能干细胞(pluripotent stem cells, PSCs)、专能干细胞(multipotent stem cells)、单能干细胞。多能干细胞又可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、胚胎瘤细胞、胚胎生殖干细胞、诱导多能

干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。ESCs/iPSCs具有向多种细胞类型分化的能力, 并伴有基因表达模式的动态改变<sup>[1]</sup>。ESCs/iPSCs通过表达多潜能相关基因如*Pou5f1*、*Nanog*、*Oct4*和*Sox*等来维持其未分化状态。ESC/iPSC分化包括这些多潜能相关基因的抑制和早期发育基因的激活, 随后是组织谱

收稿日期: 2020-05-05

接受日期: 2020-07-22

国家自然科学基金(批准号: 31671565)、湖北自然科学基金创新群体(批准号: 2020CFA021)、湖北医药学院生物医药研究院PI项目(批准号: HBMUPI201802)和湖北医药学院研究生科技创新项目(批准号: YC2019002)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0719-8637121, E-mail: hldiao1976@hbm.u.edu.cn

Received: May 5, 2020

Accepted: July 22, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31671565), Innovation Group of Natural Science Foundation of Hubei Province (Grant No.2020CFA021), Principal Investigator Grant of Biomedical Research Institute of Hubei University of Medicine (Grant No.HBMUPI201802) and Postgraduate Science and Technology Innovation Project of Hubei University of Medicine (Grant No.YC2019002)

\*Corresponding author. Tel: +86-719-8637121, E-mail: hldiao1976@hbm.u.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5396>

系决定基因的激活<sup>[2-3]</sup>。体细胞可重编程诱导生成iPSCs。体细胞核移植胚胎(somatic cell nuclear transfer, SCNT)在物种克隆、动物生产保护以及为生物医学研究创建疾病模型等领域具有重要的作用,然而SCNT的重编程的效率很低,这是由于移植细胞核的不完全表观遗传重编程<sup>[4]</sup>。在再生医学中,干细胞应用的关键是控制干细胞的命运,将它们扩增并分化成特定的谱系,组蛋白去甲基化对胚胎干细胞的命运决定和体细胞重编程至关重要<sup>[5-6]</sup>。

组蛋白赖氨酸去甲基化酶(lysine demethylases, KDMs)是组蛋白修饰中一个重要的组成部分,根据其结构域的差异,可以分为两大家族,黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)依赖的氨基氧化酶家族KDM1;以Jmj C(Jumonji C)结构域为特征基序的Fe<sup>2+</sup>和二氧戊二酸依赖酶家族的KDM2、KDM3、KDM4、KDM5、KDM6、KDM7。KDMs去甲基化作用覆盖了大部分的赖氨酸甲基化位点,主要在异染色质、基因序列5'端和3'端的H3K4、H3K9、H3K27、H3K36<sup>[7-9]</sup>。表1介绍了KDMs各家

族成员在胚胎干细胞、诱导多能干细胞、专能干细胞的自我更新和多能性维持以及体细胞核移植胚胎的重编程中发挥的生物学功能及其特异性的甲基化位点。但是,KDM1B/5C/5D/7B/7C、JMJD1C和UTY在重编程与多能性调控中的生物学功能尚未见报道,需要进一步研究。

## 1 KDMs与多能干细胞

### 1.1 KDMs与胚胎干细胞

ESCs是胚胎期的内细胞团、桑葚胚、卵裂期的胚胎甚至活检的卵裂球在体外特定的条件下培养形成的永生化细胞,可无限传代,并保持增殖和分化的潜能。在分化过程中,ESCs分化基因的表达调控包括谱系特异性基因的激活和多能性基因的抑制<sup>[10]</sup>。

KDM1A通过调节二价结构域的功能来参与多能性维持,二价结构域是发育基因的调节区中存在的一种染色质环境,包含H3K4me2/3和H3K27me3标记。KDM1A在未分化的人类胚胎干细胞(hESCs)中高表达,在分化过程中其表达水平逐

表1 KDMs家族分类(根据参考文献[7,9]修改)

Table 1 KDMs family classification (modified from reference [7,9])

名称 Name	同义词 Synonyms	特异性作用位点 Specificity site	生物学功能 Biological function
KDM1	KDM1A	AOF2/BHC110/LSD1	H3K4me1/me2, H3K9me1/me2
	KDM1B	AOF1/LSD2	H3K4me1/me2
KDM2	KDM2A	JHDM1A/FBXL11	H3K36me1/me2
	KDM2B	JHDM1B/FBXL10	H3K36me1/me2, H3K4me3
KDM3	KDM3A	JHDM2A/JMJD1A/TSGA	H3K9me1/me2
	KDM3B	JHDM2B/JMJD1B	H3K9me1/me2/me3
	JMJD1C	JHDM2C/TRIP8	H3K9me1/me2
KDM4	KDM4A	JHDM3A/JMJD2A	H3K9me2/me3, H3K36me2/me3, H4K26me2/me3
	KDM4B	JHDM3B/JMJD2B	
	KDM4C	JHDM3C/JMJD2C/GASC1	
	KDM4D	JHDM3D/JMJD2D	
KDM5	KDM5A	JARID1A/RBP2	H3K4me2/me3
	KDM5B	JARID1B/PLU1	
	KDM5C	JARID1C/SMCX	
	KDM5D	JARID1D/SMCY	
KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me2/me3
	UTY	/	/
	KDM6B	JMJD3	H3K27me2/me3
KDM7	KDM7A	KIAA1718	H3K4me3
	KDM7B	PHF8	H3K9me2
	KDM7C	/	H3K4me3

/: 未提及。

/: not mentioned.

渐降低。hESCs中的*KDM1A*敲除导致多能性基因*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*的基因水平表达降低,而控制内胚层和中胚层分化基因如*Foxa2*(forkhead box A2)、*EOMES*(eomesodermin)、*BMP2*(bone morphogenetic protein 2)和*Sox17*表达上调<sup>[11]</sup>。在未分化的ESCs中, DNMT3A与KDM1A-MI2/NuRD(nucleosome remodeling and deacetylase)复合体相结合,处于自我抑制状态。在ESCs分化过程中, KDM1A与MI2/NuRD去乙酰酶复合物特异性地结合在多能性基因(pluripotency gene, PpG)增强子上。这种抑制复合物的激活是由OSN(*Oct4/Sox2/Nanog/HATp300*)共激活复合物的解离引起的,通过组蛋白去乙酰化和去甲基化来抑制PpG增强子<sup>[10,12]</sup>。KDM1A与激活的增强子相结合去甲基化H3K4me1,在相关的辅抑制子的作用下直接抑制KMT2D(histone lysine N-methyltransferase 2D)激活基因靶点。若KMT2D缺失, KDM1A及其相关的辅抑制子失代偿,导致转录抑制和多能性转化失败。抑制KDM1A的表达可以逆转KMT2D缺失造成的ESCs的分化异常<sup>[13]</sup>。KDM1A抑制剂CBB1007可促进ESCs向脂肪细胞分化<sup>[14]</sup>。但有研究表明, KDM1A与MyoD(myogenic differentiation)和MEF2(myocyte enhancer factor 2)的靶启动子相互作用激活肌原性基因, KDM1A的缺失会导致成肌细胞失去分化能力, KDM1A也参与控制造血、神经、垂体和成骨等各种类型的细胞分化过程<sup>[16-17]</sup>。KDM1A可以通过调节二价结构域、与PpG增强子结合等途径参与ESCs多能性的维持,在不同组织中, KDM1A发挥不同的作用,如抑制脂肪组织的细胞分化,却促进肌肉、造血、神经等组织的细胞分化,其具体的生物学功能的差异性机制需进一步研究。

在ESCs中, KDM2A通过其CXXC结构域被招募到CpG岛(CpG islands, CGIs)中去甲基化H3K36me2<sup>[18]</sup>。KDM2A通过去甲基化H3K36me2和影响H3K4me3的沉积来调节ESCs中内源性逆转录病毒(endogenous retroviruses, ERVs)表达。ERVs参与调节ESCs的命运决定, ERVs的异常激活将导致基因组不稳定并影响ESCs分化。KDM2A的缺失导致ERVs的*LAPey*基因表达减少,并导致H3K36me2的增加和H3K4me3在*LAPey*上的缺失<sup>[5]</sup>。KDM2B对于hESCs招募关键的分化因子BCOR-PRC1.1(BCL6 corepressor-polycomb repressive complex 1.1)至关重要, *KDM2B*敲除的hESCs不能沿着神经外胚层谱系进行分化<sup>[19]</sup>。KDM3A/

KDM3B的缺失损害ESCs的自我更新并促进其分化,多能性相关基因*Oct3/4*、*Nanog*、*Klf4*(Kruppel-like factor 4)和*Tcl1*(T-cell leukemia/lymphoma 1)表达下调,而谱系相关的原始内胚层标记基因*Fgf5*(fibroblast growth factor 5)表达上调,其细胞功能缺失及其死亡是由于G9a引起的H3K9过度甲基化<sup>[20]</sup>。维生素C可诱导KDM3A和KDM3B表达导致H3K9me2在小鼠ESCs(mESCs)中减少,增强ESCs中Tet酶的活性,从而导致DNA去甲基化和谱系基因的激活<sup>[21]</sup>。KDM2A/KDM2B均可促进分化的发生, KDM2A作用于H3K36me2和H3K4me3,调节ERVs的表达,从而影响ESCs的分化过程, KDM2B作用于BCOR-PRC1.1,促进神经外胚层分化。KDM3A/KDM3B与G9a作用于H3K9,在ESCs的自我更新、抑制分化过程中具有协同作用。

KDM4A和KDM4C都定位于H3K4me3的启动子上,防止H3K9me3和H3K36me3的积累。KDM4B/KDM4C可调节mESCs中*Nanog*的表达, KDM4B或KDM4C的缺失导致ESCs向大多数谱系的普遍分化。KDM4A和KDM4C的联合缺乏会导致ESCs自我更新受损,并自发分化为原始内胚层<sup>[22-23]</sup>。KDM4A的一个新亚型DN-JMJD2A促进H3K9me2在*MyoG*(myogenin)启动子处的去甲基化, DN-JMJD2A缺失会导致肌肉特异性基因*MyoG*和*CKM*(creatine kinase, muscle)表达强烈下调。KDM4C通过抑制G9a依赖性的MyoD降解,增加MyoD的转录活性; UTX(KDM6A)被招募到*MyoG*和*CKM*基因的转录调控区域去除H3K27me3抑制标记,以上均可促进骨骼肌的分化<sup>[24]</sup>。mESCs中, KDM4C通过稳定谱系特异性增强子上的介质黏附素复合物(mediator-cohesin complexes)的组装促进细胞分化。KDM4C和G9a结合在同一增强子上, KDM4C的缺失可抑制G9a的募集,并进一步破坏增强子上的介质黏附素复合物Med1和Smc1a稳定性,因此, KDM4C是一个用于组装重要的增强子-蛋白复合物的分子支架,可以影响基因的及时激活<sup>[25]</sup>。KDM4家族在调节ESCs的多能性维持和细胞分化方面具有时空的平衡性,以维持生物体的正常功能。KDM4家族成员主要作用于ESCs多能性维持,但KDM4A去甲基化*MyoG*启动子处H3K9me2促进肌肉组织的分化, KDM4C与G9a相互作用稳定谱系特异性增强子上的介质黏附素复合物组装促进分化。

UTX与人和小鼠*Hoxb1*(homeobox1)基因启动



子结合,降低H3K27me<sub>3</sub>及增加H3K4me<sub>3</sub>,这个过程可以被视黄酸所增强<sup>[26]</sup>,而H3K27me<sub>3</sub>是干细胞自我更新所必需的,调控ESCs分化过程中的三个关键多能基因*Oct4*、*Nanog*和*Sox2*的表达<sup>[27]</sup>。*UTX*敲除的ESCs可以正常自我更新,但在分化后不能正确激活发育调节因子,向中胚层谱系分化的能力受到严重限制<sup>[28]</sup>。在mESCs向脂肪细胞分化的过程中, $\beta$ -catenin/c-Myc信号通路在*UTX*敲除的细胞中存在差异调节,*UTX*通过调节c-Myc的表达来促进向脂肪细胞的分化<sup>[29]</sup>。KDM6B与PcG蛋白具有协同作用,促进hESCs分化后中胚层分化相关基因的表达。PcG的组分EZH2(zeste homolog 2)、EED(embryonic ectoderm development)和SUZ12(suppressor of zeste 12)都存在于多能性关键发育基因的启动子上,SUZ12缺失的mESCs表现出基因组H3K27me<sub>3</sub>的缺失以及发育相关基因的转录抑制,与KDM6B缺失的hESCs具有相同的表型<sup>[2]</sup>。在ESCs中,KDM6B的缺失会导致中胚层的形成受损,并抑制内皮细胞和心肌细胞的分化。在心脏祖细胞分化过程中,KDM6B被募集到分化相关靶基因位点,其去甲基化活性受到ISL1(insulin gene enhancer binding protein 1)的调节<sup>[30]</sup>。在山羊雄性生殖干细胞(male germline stem cells, mGSCs)中,Tet1和KDM6B促进MEK-ERK(MAPK kinase/extracellular signal-regulated protein kinase)途径的激活,从而促进山羊mGSCs的自我更新<sup>[31]</sup>。*UTX*去甲基化H3K-27me<sub>3</sub>调节细胞分化,与c-Myc相互作用来促进脂肪细胞的分化。KDM6B对hESCs、mESCs以及mGSCs维持细胞的自我更新非常重要,但目前更多的研究集中于起在循环系统分化方面,在其他组织中的相关功能需进一步发掘。

综上所述,KDMs对ESCs自我更新和多能性维持至关重要,参与细胞谱系决定和各种组织器官的分化过程。KDMs在ESCs中的功能研究,对于再生医学的进一步发展和临床应用,具有十分重要的生物学意义。

## 1.2 KDMs与诱导多能干细胞

外源导入或者以化学小分子诱导的方式激活体细胞中多能性因子(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、c-Myc)的表达,使终末分化的体细胞重新回到多能性的状态,由此产生的人类诱导多能干细胞(hiPSCs)具有无限自我更新的能力,几乎可以分化生成体内所有的细胞<sup>[1]</sup>。利用KDM1A抑制剂或RNAi技术可以建立具

有不同KDM1A活性的hiPSCs。KDM1A活性越低,分化标志基因的表达越高,KDM1A活性为71.36%时,控制内胚层和中胚层分化基因*BMP2*表达上调,细胞生长和多能性相关基因(*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*)表达无明显变化;KDM1A活性为53.28%时,控制内胚层分化基因*Sox17*上调,多能性相关基因表达下调,同时细胞生长明显受到抑制;KDM1A活性为31.33%时,控制内胚层分化基因*Sox17*表达增加,控制外胚层分化基因 *$\beta$ -III-tubulin*下调,但细胞分裂多阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,细胞凋亡水平并未改变<sup>[11]</sup>。c-Myc是iPSCs中的核心转录因子,KDM1A去甲基化H3K4可促进c-Myc诱导的转录启动复合物的组装,同时c-Myc可以直接结合在*KDM1A*基因近端启动子的E-boxes上,c-Myc敲除时,KDM1A的表达降低。c-Myc可以诱导KDM1A的表达,同时,KDM1A在c-Myc的转录体系形成正反馈作用<sup>[32]</sup>。KDM1A是维持hiPSCs自我更新和分化之间平衡的一个重要因素,KDM1A活性在50%可能是hiPSCs转向分化的一个“分水岭”,这主要是通过调节多能基因和发育基因启动子区的组蛋白甲基化和去甲基化水平来实现的。因此,准确调节KDM1A活性获得所需目标细胞,对于个体化干细胞治疗具有十分重要的临床意义。

KDM2A/KDM2B是诱导体细胞重编程的增强剂,可以促进H3K36去甲基化的发生。KDM2A/2B-Oct4能增强体细胞重编程,并能诱导成纤维细胞重编程获得多能性。KDM2B通过募集PRC1.1到CGIs来促进Oct4诱导的体细胞重编程。但BMP可以选择性抑制KDM2B/Oct4诱导的体细胞重编程。BMP-SMAD(decapentaplegic homolog 3)途径减弱了与发育相关的基因中的PRC1.1结合和H2AK119(lysine 119 of histone H2A)泛素化,导致中胚层标志性分子如*Sox17*的表达,从而抑制体细胞的重编程<sup>[6,33]</sup>。KDM3A诱导的细胞表达更高水平的*ZFP42*(zinc finger protein 42)和其他代表原始状态的基因,并表现出更开放的染色质状态,增强重编程作用<sup>[34]</sup>。维生素C可以增加iPSCs中*KDM5A*的表达,促进H3K4me<sub>2</sub>/me<sub>3</sub>的去甲基化,从而增加iPSCs多能性,减少不必要的自发分化,降低了内胚层标志*FOXA2*、 $\alpha$ 胎儿蛋白,中胚层标志*MSX1*(msh homeobox 1),外胚层标志*MAP2*(microtubule-associated protein 2)、*PAX6*(paired box protein 6)的表达<sup>[35]</sup>。KDM2A/KDM2B、KDM3A、KDM5A均可促进体细胞重编程。KDM2B通过募集

PRC1.1到CGIs促进Oct4的表达促进重编程,但是此过程会被BMP所抑制。KDM3A诱导*Rex1*等基因的表达增强重编程。维生素C促进KDM5A表达,促进H3K4me2/me3去甲基化从而增加iPSCs多能性。

用KDM6B处理iPSCs可以降低其基因组中H3K27me3的水平,激活特定的分化基因,这是由于H3K27me3抑制iPSCs中分化基因表达,H3K27me3短暂的强制去甲基化也会触发中胚层基因的上调。KDM6B去甲基化H3K27me3使得Wnt和BMP信号通路相关的关键基因被激活,从而激活中胚层/内胚层诱导的转录网络,抑制外胚层分化。KDM6B的去甲基化酶活性间接参与肌源性基因的激活,如KDM6B过表达后,*MyoD1*表达上调,显著提高了hiPSCs的成肌分化效率,但H3K27me3没有在hiESCs中肌源性基因(*MyoG*和*MEF2C*)的启动子上富集。KDM6B还可以单独诱导早期肌源性调控因子PAX3和PAX7的表达,从而促进肌源性细胞的终末分化<sup>[2]</sup>。*KDM6B*敲除的小鼠胚胎成纤维细胞可以产生更多的iPSCs,而KDM6B的异位表达明显抑制了细胞的重编程。KDM6B去甲基化H3K27me3激活Wnt和BMP信号通路的关键基因抑制分化,因此,抑制KDM6B的表达可以提高体细胞重编程生成iPSCs的能力。但是KDM6B作用于*MyoD1*、PAX3和PAX7可促进肌肉组织的分化。

虽然hiPSCs的分化潜力有很大的治疗应用前景,但hiPSC的分化效率低于hESCs,这可能是由于这些细胞类型之间的表观遗传差异,包括DNA甲基化和组蛋白修饰<sup>[35]</sup>。目前,KDMs诱导iPSCs产生以及促进后续iPSCs向特定细胞分化的研究前景十分可观,进一步研究KDMs诱导iPSCs的分子机制为解决再生医学中hiPSC分化效率低、ESCs来源有限和移植后免疫排斥的难题提供更多的理论依据。

## 2 KDMs与专能干细胞

专能干细胞的发育潜能有限,只能分化成特定器官或者组织的细胞,如常见的神经干细胞、骨髓间充质干细胞、造血干细胞等。KDM1A的辅因子Rcor2(CoREST2)主要表达于中枢神经系统,直接靶向*Dlx2*(distal-less homeobox 2)和*Shh*(Sonic hedgehog),在神经干细胞增殖和神经发生过程中抑制其表达。此外,抑制*Shh*表达可以挽救体内Rcor2缺失引起的神经再生缺陷<sup>[36]</sup>。KDM1A是上皮-间质转

化过程中主要调节因子SNAI1的分子伴侣,并协同抑制上皮分化相关基因的表达,同时还调节上皮-间质转化过程中的上游信号分子(TNF $\beta$ 、Wnt、NF- $\kappa$ B、Notch)的表达<sup>[37]</sup>。Max与KDM2B相互作用,抑制ESCs中的生殖细胞特异性基因的表达,骨髓间充质干细胞也有相似的KDM2B和Max表达水平<sup>[6]</sup>。KDM4B通过去甲基化H3K9me3激活*Dlx*,参与骨髓间充质干细胞的软骨和脂肪分化。在软骨形成过程中,KDM4B的表达依赖TNF $\beta$ 的调节,去除*Sox9*启动子上的H3K9me3的抑制性标记,诱导软骨形成。KDM4B结合C/EBP $\beta$ ,去甲基H3K9me3来调节细胞周期基因*CDC45*(cell division cycle 45 homolog I)、*CDC25C*和*MCM3*(minichromosome maintenance 3)的表达,并驱动有丝分裂克隆扩增<sup>[38-39]</sup>。Rcor2可抑制神经干细胞分化,SNAI1与KDM1A相互作用抑制上皮-间质转化。Max与KDM2B相互作用抑制生殖干细胞分化。TNF $\beta$ 调节KDM4B的表达,去甲基化*Sox9*启动子上的H3K9me3,从而促进骨髓间充质干细胞的软骨的形成。

miR-199a-3p通过靶向UTX/Wnt信号通路调控骨髓间充质干细胞的脂肪生成,在这个过程中,miR-199a-3p表达逐渐增加,UTX表达逐渐降低。UTX为miR-199a-3p的直接靶点,Wnt信号位于miR-199a-3p/UTX的下游<sup>[40]</sup>。前文中,UTX通过抑制c-Myc表达促进mESCs向脂肪细胞分化,但是在骨髓间充质干细胞中UTX通过激活c-Myc抑制其向脂肪细胞的分化<sup>[29]</sup>。UTX通过去甲基化H3K27me3诱导人牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)向软骨分化,UTX敲除的PDLSCs中,*Sox9*、*Col2a1*、*Acan*的表达受到抑制,H3K27me3水平升高,H3K4me3水平降低,软骨分化潜能丧失。EZH2抑制剂通过调节H3K27me3,可以恢复UTX基因敲除后PDLSCs的软骨分化潜能丧失<sup>[41-42]</sup>。UTX在造血干细胞中高表达,UTX敲除的成年雌性小鼠表现出骨髓发育不良,脾脏的红巨核细胞生成和髓外代偿受到抑制,造血干细胞的规律性迁移是造血的基础,UTX是造血干细胞迁移的关键调节因子,但UTX介导的细胞迁移调节是否需要H3K27去甲基酶活性及其信号通路仍有待确定<sup>[43]</sup>。UTX基因突变抑制造血干细胞的分化,造成了人骨髓增生异常综合征和急性髓性白血病。KDM1A抑制剂SP2509恢复了UTX突变细胞中靶基因H3K4甲基化的平衡,促进UTX突变的造血干细胞的分化,延

长白血病小鼠的存活时间<sup>[44]</sup>。UTX对于小鼠骨髓间充质干细胞、人牙周膜干细胞、造血干细胞的细胞分化至关重要,靶向作用UTX信号通路可能有利于更好地理解肥胖、糖尿病、骨质疏松症、骨髓增生异常综合征以及先天性UTX缺乏症等疾病的分子机制和为干细胞治疗提供新的视角。

专能干细胞存在于成年动物的许多组织和器官,在特定条件下可再生或者按一定的程序进行分化形成新的功能细胞,保持组织器官生长和衰退的动态平衡。目前研究发现,KDMs参与神经干细胞、间充质干细胞以及造血干细胞的再生和分化过程,但是关于KDMs在更多的专能干细胞分子机制的研究需要进一步被揭示。

### 3 KDMs与体细胞核移植

SCNT是指将体细胞核移入去核卵母细胞中,使其重编程并发育为新的胚胎,但SCNT移植的细胞核只有经历充分的重组,获得一个全能性的状态和主要的基因表达模式,才能发育成一个正常的胚胎。由于SCNT允许用受体卵母细胞替代体细胞线粒体,它为治疗mtDNA突变引起的代谢综合征提供了新的临床思路。SCNT对体细胞进行了重编程,并成功地获得了核移植胚胎干细胞(NT-ESCs),从患者供体细胞中获得人NT-ESCs为克隆性细胞治疗的未来临床应用带来了新的希望。研究发现,只有5%的SCNT的胚胎能发育至足月。与正常的体外受精的胚胎相比,小鼠、牛和猪的SCNT胚胎在胚胎基因组激活(embryo genome activation, EGA)中H3K4、H3K9、H3K27的去甲基化状态发生了改变,KDMs表达异常<sup>[4,45]</sup>。

KDM1A主要在干细胞多能性维持方面起重要作用,因此,用KDM1A抑制剂2-苯基环丙胺处理山羊SCNT胚胎可以纠正其H3K4me2异常甲基化状态,促进关键发育基因*Oct4*和*Sox2*的表达,而不影响印迹基因*IGF2R*和*H19*的表达水平,从而促进SCNT胚胎发育<sup>[46]</sup>。当联合使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂Scriptaid和5,6-甲基苯并咪唑1- $\beta$ -D-呋喃糖苷处理SCNT胚胎时,使得EGA相关的KDMs(*KDM1A*、*KDM3A*、*KDM4A*、*KDM4B*、*KDM4C*、*KDM5A*、*KDM5B*、*KDM5C*、*KDM6A*、*KDM7A*)提前表达,提高了SCNT胚胎质量<sup>[4]</sup>。

KDM4家族在EGA期间将染色质从沉默转变为活跃状态。不同的KDM4去甲基化酶在不同的

哺乳动物中表现出EGA阶段特异性表达,过表达*KDM4A/4B/4D/4E*可以降低胚胎中H3K9me3水平,显著提高SCNT胚胎的囊胚形成率<sup>[47-50]</sup>。用重组人KDM4D蛋白(rhKDM4D)处理绵羊胎儿成纤维细胞可以同时提高囊胚形成率,上调囊胚质量多能性基因(*Sox2*、*Nanog*和*CDX2*)的表达<sup>[51]</sup>。KDM5B在具有较高发育潜能的SCNT胚胎中的EGA时具有一个表达高峰,KDM5B的失活导致了SCNT胚胎发育阻滞在4-细胞阶段;KDM4B失活导致SCNT胚胎发育阻滞在2-细胞阶段<sup>[4]</sup>。共注射KDM4B和KDM5B可以部分挽救SCNT胚胎的平均甲基化水平,虽然仍高于同期WT胚胎的甲基化水平,但是最终极大地提高了SCNT囊胚形成率、胚胎植入率以及发育到足月的胚胎数<sup>[52]</sup>。KDM4家族成员与KDM5B在EGA阶段都特异性表达,KDM4家族作用于H3K9me3在SCNT建立过程中具有十分重要的生物学作用,KDM5B在EGA高表达的SCNT胚胎会具有更高的发育潜能。

SCNT胚胎在合子基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)阶段存在缺陷,这是小鼠、牛和猪SCNT重编程的一个重要障碍。而另一个障碍是SCNT之后的*Xist*(X-inactive-specific transcript)基因异常激活。X连锁基因的下调主要是由*Xist*的异位表达引起的,通过siRNA沉默*Xist*或抑制*Xist*表达可使小鼠SCNT胚胎的正常出生率提高约10倍,H3K27me3是*XIST*的印记标记,而H3K27me3的丢失诱导了*Xist*的异位表达。抑制SCNT胚胎中H3K27me3去甲基化酶KDM6B的表达,不仅促进克隆胚胎ZGA的发生,增加H3K27me3依赖的印迹基因包括*Gab1*(growth factor receptor binding 2-associated binding protein 1)、*Sfmbt2*(Scm-like with four MBT domains protein 2)和*Slc38a4*(sodium-coupled neutral amino acid transport protein 4)的表达,而且在SCNT重编程过程中也可以抑制*Xist*的异位表达,最终提高了囊胚形成率、出生率和NT-ESCs的获取率。同时,*KDM6B*敲除的胚胎中UTX的表达增加,这与前期研究中,过表达UTX可以提高SCNT胚胎植入前的发育潜能的结果一致<sup>[53-54]</sup>。KDM7A去甲基化H3K9me1/me2和H3K27me1/me2参与SCNT胚胎发育,*KDM7A*敲除后,*KDM3C*、*Nanog*、*Oct4*下调、*CDX2*、*KDM4B*和*KDM6B*上调,SCNT胚胎的囊胚形成率降低<sup>[55]</sup>。抑制KDM6B或者过表达UTX通过促进ZGA和抑制*Xist*的异位表达,均可提高SCNT的成功率。

研究发现,抑制KDM1A、KDM6B或者过表达



KDM4A/4B/4D/4E、KDM5B、KDM6A、KDM7A都可以促进SCNT胚胎构建以及提高后续的囊胚发育能力。综上所述, KDMs对于SCNT胚胎构建具有举足轻重的作用, 但SCNT构建仍然是困难重重。因此, 进一步研究KDMs在SCNT胚胎构建过程中的分子机制, 对于克服器官移植的免疫排斥、干细胞治疗、线粒体遗传病的治疗提供更多的理论依据。

#### 4 展望

表观遗传修饰对调控干细胞使之有效适当地分化成所需的细胞类型至关重要, 直接操纵相关基因可以使得干细胞分化产生所需的细胞类型, 用于细胞移植治疗和药物筛选平台等临床应用。然而, 在大多数情况下, 低分化效率和复杂的培养体系仍然是干细胞研究的主要阻碍, 这是由于多能干细胞倾向于通过维持多能性转录网络和表观基因组结构来抵抗分化。高效精准调控干细胞分化的途径需要主动清除多能性基因组的表观遗传屏障。虽然已经认识到表观遗传机制在分化过程中观察到的转录组改变中发挥重要作用, 但是主要负责建立分化状态的表观遗传因素目前尚不清楚。因此, 进一步研究组蛋白赖氨酸去甲基化在干细胞多能性维持和分化过程中的作用, 对于再生医学未来的发展具有十分重要的临床意义。

#### 参考文献 (References)

- [1] 杨曾明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学[M], 第2版. 北京: 科学出版社, 2019, 318-24.
- [2] AKIYAMA T, WAKABAYASHI S, SOMA A, et al. Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2016, 143(20): 3674-85.
- [3] BRINKHOF B, VAN TOL H, GROOT K M, et al. Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172920.
- [4] RISSI V B, GLANZNER W G, DE MACEDO M P, et al. Inhibition of RNA synthesis during scriptaid exposure enhances gene reprogramming in SCNT embryos [J]. *Reproduction*, 2019, 157(2): 123-33.
- [5] FU E, SHEN J, DONG Z, et al. Histone demethylase Kdm2a regulates germ cell genes and endogenous retroviruses in embryonic stem cells [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(7): 751-66.
- [6] ZHOU Z, YANG X, HE J, et al. Kdm2b regulates somatic reprogramming through variant PRC1 complex-dependent function [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(8): 2160-70.
- [7] PEDERSEN M T, HELIN K. Histone demethylases in development and disease [J]. *Trend Cell Biol*, 2010, 20(11): 662-71.
- [8] MOSAMMAPARAST N, SHI Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 155-79.
- [9] CHATURVEDI S, RAMANAN R, WAHEED S, et al. Structure-function relationships in KDM7 histone demethylases [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 117: 113-25.
- [10] PETELL C J, ALABDI L, HE M, et al. An epigenetic switch regulates *de novo* DNA methylation at a subset of pluripotency gene enhancers during embryonic stem cell differentiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(16): 7605-17.
- [11] YAN H J, ZHOU S Y, LI Y, et al. The effects of LSD1 inhibition on self-renewal and differentiation of human induced pluripotent stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 340(2): 227-37.
- [12] ALABDI L, SAHA D, HE M, et al. Oct4-mediated inhibition of Lsd1 activity promotes the active and primed state of pluripotency enhancers [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(5): 1478-90, e6.
- [13] CAO K, COLLINGS C K, MORGAN M A, et al. An Mll4/COMPASS-Lsd1 epigenetic axis governs enhancer function and pluripotency transition in embryonic stem cells [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(1): eaap8747.
- [14] XIONG Y, WANG E, HUANG Y, et al. Inhibition of lysine-specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) promotes the adipogenic differentiation of hESCs through H3K4 methylation [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2016, 12(3): 298-304.
- [15] CHOI J, JANG H, KIM H, et al. Histone demethylase LSD1 is required to induce skeletal muscle differentiation by regulating myogenic factors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401(3): 327-32.
- [16] MILANO-FOSTER J, RAY S, HOME P, et al. Regulation of human trophoblast syncytialization by histone demethylase LSD1 [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(46): 17301-13.
- [17] MAJELLO B, GORINI F, SACCA C D, et al. Expanding the role of the histone lysine-specific demethylase LSD1 in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 324.
- [18] STEWART K R, VESELOVSKA L, KIM J, et al. Dynamic changes in histone modifications precede *de novo* DNA methylation in oocytes [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(23): 2449-62.
- [19] WANG Z, GEARHART M D, LEE Y W, et al. A non-canonical BCOR-PRC1.1 complex represses differentiation programs in human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 235-51, e9.
- [20] KUROKI S, NAKAI Y, MAEDA R, et al. Combined loss of JMJD1A and JMJD1B reveals critical roles for H3K9 demethylation in the maintenance of embryonic stem cells and early embryogenesis [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(4): 1340-54.
- [21] EBATA K T, MESH K, LIU S, et al. Vitamin C induces specific demethylation of H3K9me2 in mouse embryonic stem cells via Kdm3a/b [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2017, 10: 36.
- [22] PEDERSEN M T, KOOISTRA S M, RADZISHEUSKAYA A, et al. Continual removal of H3K9 promoter methylation by Jmjd2 demethylases is vital for ESC self-renewal and early development [J]. *EMBO J*, 2016, 35(14): 1550-64.
- [23] SANKAR A, KOOISTRA S M, GONZALEZ J M, et al. Maternal expression of the histone demethylase Kdm4a is crucial for pre-implantation development [J]. *Development*, 2017, 144(18): 3264-77.
- [24] JIN W, PENG J, JIANG S. The epigenetic regulation of embryonic myogenesis and adult muscle regeneration by histone methylation

- modification [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2016, 6: 209-19.
- [25] TOMAZ R A, HARMAN J L, KARIMLOU D, et al. Jmjd2c facilitates the assembly of essential enhancer-protein complexes at the onset of embryonic stem cell differentiation [J]. *Development*, 2017, 144(4): 567-79.
- [26] MIZUKAMI H, KIM J D, TABARA S, et al. KDM5D-mediated H3K4 demethylation is required for sexually dimorphic gene expression in mouse embryonic fibroblasts [J]. *J Biochem*, 2019, 165(4): 335-42.
- [27] YANG L, SONG L, LIU X, et al. The maternal effect genes UTX and JMJD3 play contrasting roles in mus musculus preimplantation embryo development [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26711.
- [28] CHUNG N, BOGLIOTTI Y S, DING W, et al. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos [J]. *Epigenetics*, 2017, 12(12): 1048-56.
- [29] WANG F S, LIAN W S, LEE M S, et al. Histone demethylase UTX counteracts glucocorticoid deregulation of osteogenesis by modulating histone-dependent and -independent pathways [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(5): 499-512.
- [30] WANG Y, LI Y, GUO C, et al. ISL1 and JMJD3 synergistically control cardiac differentiation of embryonic stem cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(14): 6741-55.
- [31] ZHENG L, ZHAI Y, LI N, et al. The modification of Tet1 in male germline stem cells and interact with PCNA, HDAC1 to promote their self-renewal and proliferation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37414.
- [32] NAGASAKA M, TSUZUKI K, OZEKI Y, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A) is a novel target gene of c-Myc [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(3): 481-8.
- [33] VACIK T, LADINOVIC D, RASKA I. KDM2A/B lysine demethylases and their alternative isoforms in development and disease [J]. *Nucleus*, 2018, 9(1): 431-41.
- [34] MAO J, ZHANG Q, DENG W, et al. Epigenetic modifiers facilitate induction and pluripotency of porcine iPSCs [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(1): 11-20.
- [35] EID W, ABDEL-REHIM W. Vitamin C promotes pluripotency of human induced pluripotent stem cells via the histone demethylase JARID1A [J]. *Biol Chem*, 2016, 397(11): 1205-13.
- [36] WANG Y, WU Q, YANG P, et al. LSD1 co-repressor Rcor2 orchestrates neurogenesis in the developing mouse brain [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10481.
- [37] BURG J M, LINK J E, MORGAN B S, et al. KDM1 class flavin-dependent protein lysine demethylases [J]. *Biopolymers*, 2015, 104(4): 213-46.
- [38] WILSON C, KRIEG A J. KDM4B: a nail for every hammer [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(2): 134.
- [39] LEE H L, YU B, DENG P, et al. Transforming growth factor-beta-induced KDM4B promotes chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3): 711-9.
- [40] SHUAI Y, YANG R, MU R, et al. MiR-199a-3p mediates the adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating KDM6A/WNT signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 220: 84-91.
- [41] WANG P, LI Y, MENG T, et al. KDM6A promotes chondrogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by demethylation of SOX9 [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(3): e12413.
- [42] GAZOVA I, LENGELING A, SUMMERS K M. Lysine demethylases KDM6A and UTY: the X and Y of histone demethylation [J]. *Mol Genet Metab*, 2019, 127(1): 31-44.
- [43] SEBASTIAN T, TOBIAS G R, CORNELIA R, et al. The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis [J]. *Blood*, 2013, 121(13): 2462-73.
- [44] WU B, PAN X, CHEN X, et al. Epigenetic drug library screening identified an LSD1 inhibitor to target UTX-deficient cells for differentiation therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 11.
- [45] CHUNG YG, MATOBA S, LIU Y, et al. Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 758-66.
- [46] MAO T, HAN C, DENG R, et al. Treating donor cells with 2-PCPA corrects aberrant histone H3K4 dimethylation and improves cloned goat embryo development [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2018, 64(3): 174-82.
- [47] LI C H, GAO Y, WANG S, et al. Expression pattern of JMJD1C in oocytes and its impact on early embryonic development [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18249-58.
- [48] WENG X G, CAI M M, ZHANG Y T, et al. Improvement in the *in vitro* development of cloned pig embryos after kdm4a overexpression and an H3K9me3 methyltransferase inhibitor treatment [J]. *Theriogenology*, 2020, 146: 162-70.
- [49] KRIEG A J, MULLINAX S R, GRIMSTAD F, et al. Histone demethylase KDM4A and KDM4B expression in granulosa cells from women undergoing *in vitro* fertilization [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(6): 993-1003.
- [50] LIU X, WANG Y, GAO Y, et al. H3K9 demethylase KDM4E is an epigenetic regulator for bovine embryonic development and a defective factor for nuclear reprogramming [J]. *Development*, 2018, 145(4): dev158261.
- [51] ZHANG Y, WANG Q, LIU K, et al. Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(5): 1469-77.
- [52] 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 [J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010.
- [53] YANG L, SONG L, LIU X, et al. KDM6A and KDM6B play contrasting roles in nuclear transfer embryos revealed by MERVL reporter system [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(12): e46240.
- [54] XU K, CHEN X, YANG H, et al. Maternal sall4 is indispensable for epigenetic maturation of mouse oocytes [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(5): 1798-807.
- [55] RISSI V B, GLANZNER W G, DE MACEDO M P, et al. The histone lysine demethylase KDM7A is required for normal development and first cell lineage specification in porcine embryos [J]. *Epigenetics*, 2019, 14(11): 1088-101.