

表观遗传药物对体细胞核移植胚胎发育的促进作用

马盼盼 杨树宝 栾维民* 马 馨*

(吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要 体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)是利用卵母细胞胞质中的重编程物质对高度分化体细胞核进行重编程作用使其恢复全能性并发育为新个体的技术。在SCNT过程中, 表观遗传修饰参与卵母细胞的重编程, 如DNA甲基化修饰和组蛋白的翻译后修饰。这些重编程的异常修饰会对SCNT胚胎的发育产生不良影响。表观遗传药物, 如DNA甲基转移酶抑制剂和组蛋白去乙酰基酶抑制剂, 可改善表观遗传修饰的异常现象, 促进体细胞核移植重编程的重编程。该文对SCNT胚胎重编程过程中的异常表观遗传修饰以及近年来报道的表观遗传相关药物进行综述, 并进一步探讨了这些药物对SCNT胚胎发育的促进作用。

关键词 表观遗传药物; 体细胞核移植; 重编程; 胚胎

Progress on Epigenetic Drugs in Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos

Ma Panpan, Yang Shubao, Luan Weimin*, Ma Xin*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a technology, which makes reprogramming of highly differentiated somatic cell nuclear by making use of cytoplasmic reprogramming material in the oocyte, finally restores the totipotency and develops into a new number. In SCNT, epigenetic modifications participate in reprogramming of oocyte, such as modifications of DNA methylation patterns and histone modification after translation, their abnormal expression has adverse impacts on the development of SCNT embryos. Epigenetic drugs, such as DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylase inhibitors, can improve the abnormal epigenetic modifications and promote the reprogramming of SCNT embryos. This paper summarizes the abnormal epigenetic modifications in the process of SCNT embryonic development as well as the progress of epigenetic drugs. The effects of the drugs on SCNT embryos development were discussed further.

Keywords epigenetic drugs; SCNT; reprogramming; embryos

体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术已成功应用于家畜繁殖、转基因动物生产和濒危物种保护等领域。牛是SCNT技术研究和应用最广泛的物种, 已有良种公牛克隆、高泌乳性能奶牛

培育和濒危物种成功保护等报道, 然而SCNT的牛胚胎发育率以及胚胎移植后的出生率普遍较低^[1]。这主要是由于SCNT后, 基因组进行了重要的表观遗传修饰, 如DNA去甲基化和组蛋白修饰, 这些修饰对

收稿日期: 2017-05-26 接受日期: 2017-07-27

吉林省自然科学基金(批准号: 20170101018JC)和国家自然科学基金青年基金(批准号: 31302047)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-8453480, E-mail: luanweimin1957@163.com; Tel: 0431-8453812, E-mail: maxin3202@163.com

Received: May 26, 2017 Accepted: July 27, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province (Grant No.20170101018JC) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31302047)

*Corresponding authors. Tel: +86-431-8453480, E-mail: luanweimin1957@163.com; Tel: +86-431-8453812, E-mail: maxin3202@163.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:44:38

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1744.022.html>

新形成的受精卵和随后的胚胎发育至关重要^[2],但在SCNT的重编程中出现了错误的表观遗传修饰,影响了胚胎的发育。Thuan等^[3]和Shen等^[4]的研究显示,SCNT胚胎的低发育能力以及许多在克隆动物中的异常情况限制了卵母细胞重新编程体细胞核的能力。为改善这种情况,许多研究者对此进行研究,并从表观遗传修饰方面应用表观遗传药物来提高SCNT胚胎的发育率和囊胚率。本文对SCNT胚胎中的表观遗传异常以及表观遗传药物对SCNT胚胎发育能力的影响进行了综述。

1 SCNT中的表观遗传修饰

1.1 早期发育阶段的表观遗传重编程

正常的发育取决于染色质结构方面精确的序列变化,主要与组蛋白的乙酰化和甲基化状态以及基因组DNA的甲基化相关。这些表观遗传修饰精确地控制组织特异性基因的表达。有研究者推测,哺乳动物约含25 000个基因和30 000~40 000个CpG二核苷酸序列。这些CpG序列主要存在于基因的启动子区,启动子区一般位于基因上游200~2 000 bp非编码区,这个区域C+G的含量大于50%,CpG岛大于0.6^[5]。Li等^[6]的研究表明,在健康哺乳动物的发育中CpG二核苷酸中胞嘧啶的正常甲基化是非常重要的,并且DNA甲基化在抑制寄生性(parasitism)启动子活性中也起到了关键作用,是真核细胞基因沉默系统的一部分。在此之前,甲基化作用被认为主要与基因的沉默相关,但研究者发现,越来越多的基因通过甲基化激活,特别是肿瘤抑制基因和变异相关基因^[6]。因此,表观遗传调控对实现多细胞生物的生物复杂性至关重要,并且表观遗传调控的复杂性随基因组增大而增加^[7]。

在哺乳动物的早期发育期间,受精卵形成前后存在重组基因组DNA的修饰。受精后,父本的DNA主动并迅速地去甲基化,而母本的DNA进行被动去甲基化,多见于牛、猪、鼠和人类的受精卵^[5]。Ziller等^[8]和Okazaki等^[9]在人类胚胎中对全基因组的DNA甲基化进行分析,发现母本基因组被去甲基,其在囊胚中的去甲基化程度小于小鼠,这在人类基因组中有助于增加印记基因差异甲基化区域(differentially methylated regions, DMRs)的数目。Ziller等^[8]还发现,父本基因组发生全基因组去甲基化,但SINE-VNTR-Alu(short interspersed nuclear elements-variable

number of tandem repeats-Alu)成分和一些其他串联重复序列包含的区域被专一地保护,不受全基因组去甲基化作用的干扰。这些结果表明,基因组DNA的重要部分不发生去甲基化,暗示了表观遗传记忆的存在。

Dean等^[10]的研究发现,胚胎的DNA越来越多地在两细胞和囊胚阶段再被甲基化,这与胚胎基因组转录的物种特异性相关。这些机制确保早期发育阶段的关键步骤,包括第一次细胞分裂的时机、压缩、囊胚的形成、扩张和孵出,受到精密调控基因的表达调控。在生成的胚胎中,辅助生殖技术的应用,如体外受精的培养经常与异常的mRNA表达模式相关,将伴随更大的表观遗传障碍和更高的异常表型风险^[11]。

1.2 异常的表观遗传修饰

各种SCNT动物的相继出生,说明成熟卵母细胞有能力恢复已分化体细胞核的全能性。Gurdon等^[12]的研究表明,在卵母细胞中,重组因子通过表观遗传修饰可参与高度压缩的体细胞染色质的分化,允许额外的修饰,使基因组转录因子参与到染色体中,并建立胚胎发育程序。事实上,在配子基因组中,高度乙酰化和低甲基化的染色质状态是相似的,从而在正常发育中增加了它们的表达^[2]。然而,SCNT后的错误重编程抑制了胚胎的发育,这可能是由于在体细胞基因中基因的性质不同或更高的外基因标记的参与,使受精后发育程序的重组机制遇到重大困难,导致其不完整或不正确的重组^[13]。

SCNT中普遍存在DNA超甲基化和组蛋白低乙酰化等异常的表观遗传修饰,这导致SCNT胚胎的低发育率及胎儿的低出生率和存活率。Chan等^[10]和Bortvin等^[14]的研究发现,SCNT胚胎异常的表观遗传修饰导致异常的基因表达谱,这反过来造成发育障碍或畸形动物的出生,例如胎儿和胎盘的超重、器官的异常大小、成年动物肥胖、呼吸困难或免疫缺陷等。

DNA甲基化由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)介导,并发生在CpG二核苷酸序列胞嘧啶的5位碳原子位点上。目前发现4个DNMT:DNMT1是一种维护酶,负责复制CpG二核苷酸的甲基化模式,复制后新合成半甲基化DNA链^[15],而卵母细胞特异性异构体DNMT1维护母本的印记;DNMT3a和DNMT3b最终不显示DNA的半甲基化,

因此催化重新甲基化,这在发育期间是非常关键的;DNMT2与其他的DNMT同源,但是只表现有限的甲基转移酶活性^[16]。Chen等^[16]的研究表明,DNMT3家族的其他成员,如DNMT3类似的蛋白质(DNMT3L),没有DNMT活性,但是在生殖细胞中参与印迹基因的甲基化,并与DNMT3a和3b相互作用重新刺激他们的甲基转移酶活性。

Klose等^[17]的研究显示,DNA甲基化抑制基因表达,主要是通过直接阻断DNA的转录激活因子与目标基因结合,或结合甲基-CpG-结合蛋白(methyl-CpG-binding proteins, MBP),从而结合染色质重塑辅抑制因子复合物使沉默基因表达,以起到抑制作用。DNA甲基化对基因表达的影响最终在染色质结构中通过修饰维持,由MBP和DNMT的活性来介导,并结合组蛋白去乙酰基酶[histone deacetylases, HDACs, 也称为KDACs(lysine deacetylases)]和组蛋白甲基转移酶(histone methyltransferase, HMT)复合物。

SCNT中的低乙酰化,主要是HDAC在基因转录过程中具有重要的抑制作用。组蛋白功能由多个翻译后修饰调控,包括组蛋白赖氨酸 ϵ -氨基的可逆乙酰化作用。组蛋白乙酰化作用通过对抗组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和HDACs的活性之间的平衡严格调控。人类有18个潜在的HDACs,可分为4类。通过去除组蛋白尾部的 ϵ -氨基赖氨酸残基的乙酰基,HDACs可在转录调控中扮演至关重要的作用^[18]。核移植后,核与胞质发生重组,但HDACs去除了存在于已乙酰化的组蛋白及其他蛋白赖氨酸上的 ϵ -氨基上的乙酰基,使体内的乙酰化水平降低,引起全面的核染色体聚集,并导致转录抑制,阻碍了核移植后细胞正常发育的重编程,抑制了细胞的分化和发育,这对SCNT的胚胎发育起到了不良的作用。

2 表观遗传药物

表观遗传学,又称“表遗传学”、“外遗传学”或者“后遗传学”,研究在没有细胞核DNA序列改变的情况下,基因功能可逆的和可遗传的改变。这些改变包括DNA的修饰(如甲基化修饰)、组蛋白的各种修饰等。表观遗传修饰剂被称为表观遗传药物,包括DNA甲基转移酶抑制剂(inhibitors of DNMT, DNMTi)和组蛋白去乙酰基酶抑制剂(inhibitors of

HDAC, HDACi)(表1)。

2.1 DNMT抑制剂

DNMT抑制剂针对异常启动子的超甲基化,可分为核苷和非核苷类似物。最广泛利用的胞嘧啶核苷类似物,是最为有效的DNMT抑制剂,其中,胞嘧啶环被修饰并对其产生DNMT抑制活性,包括5-氮杂胞苷(5-azacytidine)、5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-2-deoxycytidine, 5-AZA-CdR)、5-氟-2-脱氧胞苷(5-fluoro-2-deoxycytidine)、5,6-二氢-5-氮杂胞苷(5,6-dihydro-5-azacytidine)和zebularine^[19]。一旦作用于细胞,这些核苷由核苷酸激酶(nucleoside kinase)修饰,然后合并,直接(脱氧核苷)或伴随核糖还原(核糖核苷),在细胞周期的S期进入DNA^[20]。胞嘧啶类似物合并到DNA中,在S期作为DNMT最佳的底物。然而,修饰过的胞嘧啶环在酶和环之间形成一个稳定的共价键,这以DNMT的不可逆失活结束。由此产生DNMT活性的细胞损耗,最终导致去甲基化DNA的合成^[20]。

近年来,学者们研制出多种新的核苷抑制剂。Fahy等^[21]研究显示,NPEOC-DAC(2'-Deoxy-N4-[2-(4-nitrophenyl) ethoxycarbonyl]-5-azacytidine)是一种5-氮杂胞苷衍生品,可被羧酸酯酶1(carboxylesterase 1)转化成5-AZA-CdR。但还没有被认可为DNMT抑制剂。另外,RX-3117(fluorocyclopentenylcytosine)^[22]是另一个核苷类似物,能够抑制DNMT1的活性。Zebularine是一种更有效的核苷DNMT抑制剂,高剂量有较低的毒性,具有去甲基化作用^[19]。

非核苷DNMT抑制剂具有不结合DNA发挥其活性的特点。(1)它们可通过干扰DNMT和靶位点之间的相互作用来实施,如普鲁卡因^[23]。Amatori等^[24]的研究表明,普鲁卡因对CpG富集区更有亲和力,并对DNMT酶具有部分作用。此外,Villar等^[23]研究显示,普鲁卡因可引起乳房癌细胞系5-甲基胞嘧啶含量的减少,表明这是一种很有前途的DNA去甲基化药剂。(2)直接阻塞DNMT1的催化部位,如绿茶中含有的黄烷-3-醇表儿茶素-3-五倍子酸盐(tea-polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate)^[25]、胍苯吡嗪^[26]和苯二甲酰亚胺基-L-色氨酸的衍生物RG108^[27]。胍苯吡嗪用于高血压的治疗,也曾作为潜在的DNMT抑制剂。Graca等^[26]发现,在前列腺癌细胞中,胍苯吡嗪的处理降低了DNMT1以及DNMT3a和DNMT3b mRNA的产生,表明通过表观

表1 表观遗传药物
Table 1 Epigenetic drugs

名称 Name	类别 Type	性质 Property	参考文献 Reference
5-azacytidine (5-Aza)	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Specific drug of affecting S phase	[19]
5-aza-2-deoxycytidine (5-AZA-CdR)	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[30]
5-fluoro-2-deoxycytidine	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]
5,6-dihydro-5-azacytidine	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]
Zebularine	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inducing gene silencing as well as demethylation and reactivation of hypermethylation p16 gene	[19]
Fluorocyclopentenylcytosine (Rx-3117)	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT1	[22]
MG98	Nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT1	[23]
Procaine	Non-nucleoside class inhibitors of DNMT	Drug of DNA demethylation	[25]
Tea-polyphenol(-)- epigallocatechin-3-gallate	Non-nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[25]
Hydralazine	Non-nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b	[26]
RG108	Non-nucleoside class inhibitors of DNMT	Inhibiting the activity of DNMT and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[27]
Benzamide	Inhibitors of HDAC	Possessing potent inhibitory activity of HDAC	[19]
Valproic acid (VPA)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC, improving the development and performance of SCNT embryos	[33]
Trichostatin A (TSA)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC, inducing cell differentiation and apoptosis, playing to the role of immune regulation	[13]
Sodium butyrate (NaBu)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting deacetylation, phosphorylation of histone and DNA methylation	[34]
Synthetic suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]
Pyroxamide-101 (PDX-101)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]
Panobinostat (LBH589)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]
Dacinostat (NVP-LAQ824)	Inhibitors of HDAC	Inhibiting the activity of HDAC and inducing reprogramming of pluripotent stem cell	[19]

遗传修饰可减少其恶性增长。Savickiene等^[27]的研究表明, RG108在早幼粒细胞白血病细胞中单独或结合HDAC抑制剂诱导钙黏蛋白的表达。此外, 还有研究表明, RG108能通过上调参与生产抗氧化酶沉默基因的甲基化来保护视网膜色素上皮细胞免受氧化干扰^[28], 表明RG108可发展为一个DNMT抑制剂。

反义寡核苷酸(MG98)是一种DNMT抑制剂, 主要抑制DNMT1的活性, 在肿瘤细胞中也已成功用于

诱导低甲基化和基因的重新表达, 其过程中反义寡核苷酸结合到*DNMT1* mRNA的3'端非翻译区, 并且阻碍了它的转录, 引起了mRNA退化^[29]。

近来有研究比较了不同的核苷和非核苷的DNMT抑制剂的活性以揭示它们之间功能的多样性。硫唑嘌呤核苷类似物, 尤其是5-AZA-CdR, 显示最强的去甲基活性, 是唯一能够引起基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)-3-肿瘤抑制基因启动子的去甲基化和重新表

达的物质^[30]。针对这些结果, Siedlecki等^[31]专注于研究DNMT催化剂的三维建模, 以获得新的DNMT特异性抑制剂来证明其在诱导DNA低甲基化方面与5-AZA-CdR一样有效, 并且其毒性更低。

2.2 HDAC抑制剂

HDAC抑制剂可分为短链脂肪酸、异羟肟酸、环状四肽和苯甲酰胺, 其中大部分通过阻断HDAC催化部位来进行表达, 包含一个 Zn^{2+} ^[32]。HDAC抑制剂引起乙酰化的组蛋白积累, 从癌症细胞中观察到, 乙酰化的组蛋白纳入了核小体, 并可导致异常表观遗传模式的逆转。Yoo等^[19]的研究显示, HDACi的活动并不局限于组蛋白, 也会造成非组蛋白细胞蛋白质的高度乙酰化, 至少在某种程度上, 通过不同于直接重塑染色质的机制调节HDACi的效应。

短链脂肪酸由丁酸和丙戊酸(valproic acid, VPA)组成, 是第一个为了建立HDAC抑制活性的化合物。然而, 对需要提高药物浓度来实现HDAC抑制的具体情况还不明确^[19]。Isaji等^[33]的研究证明, VPA可提高鼠、牛、猪SCNT胚胎的发育和性能, 与曲古抑菌素(trichostatin A, TSA)有相似或更高的程度。Liu等^[34]的研究表明, 丁酸钠(sodium butyrate, NaBu)是一种无毒的4-碳脂肪酸, 可作为一种有效的HDAC抑制剂, 它是一个HDAC非竞争性抑制剂, 与底物结合部位不相关, 在体外的一系列细胞系中, 它可以诱导有效的蜂窝效应, 包括生长停滞和分化。在不同的蜂窝系统, NaBu不仅能抑制组蛋白去乙酰化, 还可抑制组蛋白磷酸化和DNA甲基化, 但适量的浓度下可促进猪体外受精胚胎的发育^[34]。然而, NaBu对牛卵母细胞体外诱导的影响目前还不清楚。

以异羟肟酸为基础的HDACi, 如链霉菌衍生物曲古抑菌素(TSA)、辛二酰苯胺异羟肟酸(synthetic suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)、PXD-101(pyroxamide-101)、LBH589(panobinostat)和NVP-LAQ824(dacinostat), 都是非常有效的HDACi, 纳摩尔浓度即可很好地抑制HDAC活性^[19]。TSA是一种有效的HDACi, 是第一个表观遗传修饰剂, 成功地用于SCNT的药物。在体外, 供体牛体细胞或重建的鼠卵母细胞用TSA处理后, 改善了胚胎发育, 后一种情况, 显著增加了鼠克隆和来自克隆胚胎的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)导出的成功率^[13]。

Yoo等^[19]的研究显示, 环状四肽的效应相当于异羟肟酸化合物(如缩酚酞), 这代表了一个快速扩

展类HDACi, 它们是通过额外的一系列速度增长的新四肽类似物, 在HDAC的催化部位, 针对 Zn^{2+} 运送官能团。

苯甲酰胺, 如MS-275和CI-994, 是具有高效的HDAC抑制活性的合成化合物, 至少对于MS-275, 在酶的催化部位, 通过针对 Zn^{2+} 被调节。这类HDACi具有广泛的潜力, 是因为当口服药物时, 它们保留了HDACi活性^[19]。

尽管每个特定HDACi对菌株和物种之间的影响不同, 一些被测试的HDACis, 如芳酰吡咯异羟肟, 曾显示没有任何有益的效果^[35]。但许多研究表明, 大部分HDACis提高核的重编程和克隆效率。然而, 是否同样适用于其他的表观遗传修饰剂仍然是不确定的, 例如DNMTis或组蛋白甲基转移酶抑制剂(inhibitors of HMT, HMTi)。

3 表观遗传异常的修复

目前, 提高SCNT效率的策略主要在于促进卵母细胞的重编程方面, 通过供者细胞的化学处理或重建使其具有表观遗传修饰。在SCNT胚胎中观察到异常的表观遗传修饰, 如异常的DNA甲基化和组蛋白修饰^[10,36]。HDACi和DNMTi可分别引起组蛋白乙酰化水平提高和DNA甲基化水平降低, 有助于打开转移的细胞核的染色质, 并修饰异常的表观遗传修饰, 使它更易于使重组因子出现在卵母细胞的细胞质中, 提高胚胎发育。Wang等^[30]的研究表明, 供体细胞和SCNT胚胎用5-杂氮-2'-脱氧胞嘧啶(5-Aza-2'-deoxyazacytidine, 5-aza-dC)和TSA联合处理减少了NT囊胚放射性I序列的甲基化水平, 与体外受精胚胎的水平相似, 并使克隆效率从2.6%增加到了13.4%。然而, 从供体细胞和克隆胚胎经5-aza-dC和TSA联合处理后的克隆牛和未经处理的克隆牛中观察到各种异常, 包括胎儿过大综合征等现象来看, 仅仅通过表观遗传修饰剂的处理很难完全地修正表观遗传异常^[30]。

4 结论

SCNT是一个复杂的过程, 在生产和理论研究中具有重要的价值, 可应用于濒危物种的克隆、动物品种的改良、动物的繁殖和疾病模型的研究等。但有许多生物和技术性因素影响SCNT胚胎的发育。研究表明, 表观遗传药物在SCNT中可提高胚胎发育率, 但健康克隆牛的克隆效率仍然很低, 未能重新

编程供体基因组被认为是低克隆效率的主要原因之一。因此, 为提高SCNT胚胎的发育率和牛的克隆效率, 应进一步研究优化SCNT的各个步骤并进一步理解其重组机制, 以便SCNT技术更好地应用于基础研究和生产。

参考文献 (References)

- Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *J Reprod Dev* 2014; 60(5): 329-35.
- Cantone I, Fisher AG. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(3): 282-9.
- Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J Reprod Dev* 2010; 56(1): 20-30.
- Shen K, Li X, Dai X, Wang P, Li S, Xiong Z, *et al.* Effects of MG132 on the *in vitro* development and epigenetic modification of Debao porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 2017; 94: 48-58.
- Niemann H. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology* 2016; 86(1): 80-90.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002; 3(9): 662-73.
- Mager J, Bartolomei MS. Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nat Genet* 2005; 37(11): 1194-200.
- Ziller MJ, Gu H, Muller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, *et al.* Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 2013; 500(7463): 477-81.
- Okabe H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet* 2014; 10(12): e1004868.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(24): 13734-8.
- Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 2014; 9(6): 803-15.
- Gurdon JB, Wilmot I. Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; doi: 10.1101/cshperspect.a002659.
- Miyamoto K, Tajima Y, Yoshida K, Oikawa M, Azuma R, Allen GE, *et al.* Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open* 2017; 6(4): 415-24.
- Chan MM, Smith ZD, Egli D, Regev A, Meissner A. Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nat Genet* 2012; 44(9): 978-80.
- Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J* 1992; 11(7): 2611-7.
- Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the *de novo* methyltransferase family. *J Cell Biochem* 2005; 95(5): 902-17.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(2): 89-97.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(4): a18713.
- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(1): 37-50.
- Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005; 32(5): 443-51.
- Fahy J, Jeltsch A, Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opin Ther Pat* 2012; 22(12): 1427-42.
- Choi WJ, Chung HJ, Chandra G, Alexander V, Zhao LX, Lee HW, *et al.* Fluorocyclopentenyl-cytosine with broad spectrum and potent antitumor activity. *J Med Chem* 2012; 55(9): 4521-5.
- Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(16): 4984-9.
- Amatori S, Bagaloni I, Donati B, Fanelli M. DNA demethylating antineoplastic strategies: a comparative point of view. *Genes Cancer* 2010; 1(3): 197-209.
- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Sun Y, Lu H, Welsh W, *et al.* Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7563-70.
- Graca I, Sousa EJ, Costa-Pinheiro P, Vieira FQ, Torresferreira J, Martins MG, *et al.* Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer. *Oncotarget* 2014; 5(15): 5950-64.
- Savickiene J, Treigyte G, Jazdauskaite A, Borutinskaite VV, Navakauskiene R. DNA methyltransferase inhibitor RG108 and histone deacetylase inhibitors cooperate to enhance NB4 cell differentiation and E-cadherin re-expression by chromatin remodelling. *Cell Biol Int* 2012; 36(11): 1067-78.
- Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Inhibition of DNA methyltransferase or histone deacetylase protects retinal pigment epithelial cells from DNA damage induced by oxidative stress by the stimulation of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol* 2016; 776: 167-75.
- Goffin J, Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* 2002; 13(11): 1699-716.
- Wang YS, Xiong XR, An ZX, Wang LJ, Liu J, Quan FS, *et al.* Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2/-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 2011; 75(5): 819-25.
- Siedlecki P, Garcia BR, Musch T, Brueckner B, Suhai S, Lyko F, *et al.* Discovery of two novel, small-molecule inhibitors of DNA methylation. *J Med Chem* 2006; 49(2): 678-83.
- Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, *et al.* Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(42): 15064-9.
- Isaji Y, Yoshida K, Imai H, Yamada M. An intracytoplasmic injection of deionized bovine serum albumin immediately after somatic cell nuclear transfer enhances full-term development of

- cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 2015; 61(6): 503-10.
- 34 Liu L, Song G, Gao F, Guan J, Tang B, Li Z. Transient exposure to sodium butyrate after germinal vesicle breakdown improves meiosis but not developmental competence in pig oocytes. *Cell Biol Int* 2012; 36(5): 483-90.
- 35 Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, *et al.* The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 2009; 138(2): 309-17.
- 36 Senda S, Wakayama T, Arai Y, Yamazaki Y, Ohgane J, Tanaka S, *et al.* DNA methylation errors in cloned mice disappear with advancement of aging. *Cloning Stem Cells* 2007; 9(3): 293-302.