

# 核糖体基因转录与体细胞重编程的研究进展

庞楠 廖辰 黄星卫 姜琦 王楠 高萌 雷蕾\*

(哈尔滨医科大学组织学与胚胎学教研室, 哈尔滨 150081)

**摘要** 核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)是指编码核糖体RNA的DNA序列,通常以串联重复的形式存在于细胞核的核仁位置。由RNA聚合酶I(RNA polymerase I, Pol I)介导的rDNA转录是核糖体生物合成的关键步骤,直接影响细胞的生长和增殖。在哺乳动物细胞中存在多种信号途径通过调控Pol I影响rRNA的转录,如mTOR、MAPK及PI3K途径。研究表明,体细胞核移植胚胎中的rDNA重编程效率是由它们的供体细胞中rDNA转录活性决定的。体细胞重编程是指分化的体细胞在特定的条件下被逆转恢复到全能性状态或多能性状态。目前体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是2种研究较多的重编程方式。成功地将体细胞基因组重新编程到全能性,既要持续沉默体细胞特异性基因,又必须激活必要的多潜能基因。与正常受精胚胎相比,核移植胚胎存在发育率低下的问题。SCNT胚胎的功能核仁发育延迟, rDNA去甲基化, 这些可能是其发育率低的重要原因。该文总结了Pol I途径调控rDNA转录的研究进展,分析了rDNA转录活性在早期胚胎发育和体细胞重编程中的作用,展望了通过调控rDNA转录促进体细胞重编程的可能方式。

**关键词** rDNA; 核仁; rDNA转录; 体细胞重编程

## Research Advances on Ribosomal Gene Transcription and Somatic Cell Reprogramming

PANG Nan, LIAO Chen, HUANG Xingwei, JIANG Qi, WANG Nan, GAO Meng, LEI Lei\*

(Department of Histology and Embryology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract** The rDNA (ribosomal DNA) is a tandem repeat involved in cellular ribosome biosynthesis and located in the nucleolus of the nucleus. The transcription of rDNA mediated by RNA Pol I (polymerase I) is a key step in ribosome biosynthesis, directly affecting cell growth and proliferation. Multiple signaling pathways in mammalian cells affect the transcription of rRNA by regulating Pol I, such as the mTOR, MAPK and PI3K pathways. Somatic cell reprogramming refers to the reversion of differentiated somatic cells to a totipotent state or a pluripotent state under specific conditions. At present, SCNT (somatic cell nuclear transfer) and iPSCs (induced pluripotent stem cells) are two widely studied reprogramming methods. Successfully reprogramming the somatic genome to pluripotency requires both the continuous silencing of somatic-specific genes and the activation of the necessary pluripotency genes. Compared with normal fertilized embryos, SCNT embryos have a problem of low development rate. In SCNT embryos, functional nucleoli development delay and rDNA methylation erasure are incomplete, which may be an important reason for its low development rate. This review summarizes the research progress that

收稿日期: 2018-12-13 接受日期: 2019-05-13

国家自然科学基金(批准号: 31671545)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0451-86674518, E-mail: leiys2002@yahoo.com

Received: December 13, 2018

Accepted: May 13, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31671545)

\*Corresponding author. Tel: +86-451-86674518, E-mail: leiys2002@yahoo.com

网络出版时间: 2020-01-07 13:33:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200107.1333.010.html>

affects the regulation of rDNA transcription by the Pol I pathway, analyzes the role of rDNA transcriptional activity in early embryonic development and somatic cell reprogramming, and prospects for possible ways to promote somatic cell reprogramming by regulating rDNA transcription.

**Keywords** rDNA; nucleoli; rDNA transcription; somatic cell reprogramming

体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)是将体细胞移入去核的卵母细胞中, 开启胚胎发育。尽管已经获得了多种哺乳动物的SCNT后代, 但SCNT的效率仍然很低, 这阻碍了重编程技术的广泛应用。而且小鼠SCNT胚胎中的rRNA未被完全激活, 功能性核仁的建立比正常受精胚胎晚一个细胞周期, 从而影响克隆胚胎的发育。哺乳动物Pol I(polymerase I)转录和加工47S pre-rRNA是调节核糖体核糖体生物发生的重要机制。本文介绍了3种与Pol I相关的rRNA转录调控机制, 并且推测Pol I抑制剂CX-5461通过抑制供体细胞rDNA的转录活性, 可以使供体细胞更好地重编程, 从而提高SCNT胚胎的效率。

## 1 核糖体基因的特性及转录过程

哺乳动物细胞中存在数百个拷贝的单个rDNA重复序列。每个rDNA重复序列(人体中约43 Kb, 小鼠中约45.3 Kb)分为2个主要部分: 编码区和基因间隔区(intergenic region, IGS)。编码区长度为13~14 Kb, 包含该序列18S、5.8S和28S rRNA以及几种非编码转录间隔区序列<sup>[1]</sup>。IGS含有大量简单的重复序列、SINE(short interspersed nuclear elements)元件、增强子、间隔子、启动子和相邻rDNA重复序列的核心启动子(core promoter, CP)<sup>[2]</sup>。rDNA启动子包括核心启动子和上游控制元件(upstream control element, UCE)。这2个序列元件的特异性对于有效的转录起始是至关重要的。在哺乳动物体细胞内, 只有一部分rDNA重复序列具有转录活性, 表现为与转录活性相关的组蛋白修饰(即H3K4me、H3K9ac)和低水平的CpG甲基化。其他重复序列表现为异染色质的结构特征, 含有与转录抑制相关的组蛋白修饰(即H3K9me、H4K20me)和高甲基化的CpG二核苷酸<sup>[3]</sup>。

在哺乳动物中, Pol I将每个活化的rDNA重复序列的编码区转录成47S前体rRNA(pre-rRNA)。pre-rRNA经由一系列切割和化学修饰产生成熟的18S、5.8S和28S rRNA, 然后在核仁中被组装成核糖体。哺乳动物rDNA转录的启动需要Pol I和至少4种转录起始因子在rDNA启动子组装形成Pol I转录起始复

合物(Pol I transcription initiation complex, PIC)<sup>[4]</sup>(图1)。PIC的形成需要上游结合因子(upstream binding factor, UBF)、选择性因子1(selectivity factor 1, SL-1, 在小鼠中被称为TIF-1B)2种转录因子的协同作用。UBF包含HMG(high mobility group)盒子, HMG盒子具有已知的DNA基序, 这种结构促进UBF和TIF-1B/SL1之间相互作用以及与2个启动子元件UCE和CP的结合。UBF也与Pol I亚基PAF53(酵母Pol I亚基A49的哺乳动物同源物)相互作用, 促进了PIC形成<sup>[5]</sup>。PIC的形成最重要的步骤是将Pol I募集到rDNA启动子处, 一旦UBF/SL-1复合物在rDNA启动子装配, SL-1/TIF-1B与辅助转录起始因子(transcriptional initiation factor, TIF-1A, 酵母中Rrn3的同源物)相互作用将Pol I募集到rDNA启动子启动rDNA转录<sup>[6]</sup>。rDNA转录受到细胞环境的调控, 包括生长因子和营养物质, 这与细胞对蛋白质合成的需求密切相关<sup>[7]</sup>。

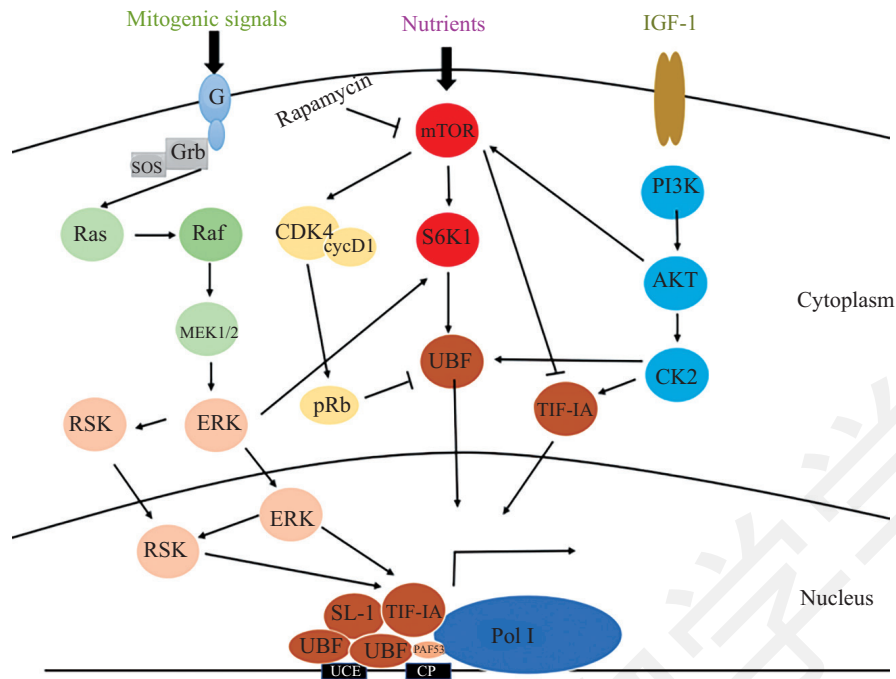
## 2 与Pol I相关的rRNA转录调控机制

营养/生长因子激活的3种主要的通路——mTOR、MAPK和PI3K, 通过调控Pol I的活性, 从而调控rDNA转录。

### 2.1 mTOR通路

mTOR通路参与细胞生长和代谢的调控, 是PI3K-AKT-mTOR信号通路的核心组成部分<sup>[8]</sup>。mTOR通路通过营养物质、生长因子和细胞应激来调节细胞生长和代谢<sup>[9]</sup>。早期研究已经确定, 哺乳动物细胞中的rRNA合成受mTOR通路的调节。mTOR信号通路通过以下3种机制调控Pol I的转录<sup>[10]</sup>(图1)。

(1)mTOR可通过转录因子Rrn3/TIF-1A控制Pol I转录从而调控rRNA的转录活性, 在酵母和哺乳动物中, mTOR应答激酶和磷酸酶以不同的方式调节TIF-1A的活性, 而磷酸酶的磷酸化在mTOR依赖调控的Pol I的转录中发挥关键的作用<sup>[11]</sup>。mTOR信号通过增强丝氨酸S44处的磷酸化和降低丝氨酸S199的磷酸化来激活TIF-1A的活性(S44磷酸化对于TIF-1A的激活是必需的, 相反S199的磷酸化可使TIF-1A失活), 更重要的是, 经雷帕霉素处理后, TIF-1A/RRN3与Pol



Pol I转录起始复合物控制因子: PAF53、Pol I亚基。转录起始复合物的形成需要UBF和SL1与rDNA启动子元件UCE和CP的协同结合,而UBF与Pol I亚基PAF53相结合, TIF-1A与Pol I和TIF-1B/SL-1相结合,促进Pol I被招募到启动子处,促进rRNA的转录。

mTOR、MAPK和PI3K通路通过靶向Pol I机制来调节rRNA基因转录。mTOR信号通路: mTOR、S6K1是mTOR通路的核心因子。mTOR信号通路通过3种相互关联的机制调控Pol I转录, mTOR通路调控TIF-1A的活性和定位从而调节Pol I向rDNA启动子处的募集; 激活mTOR下游S6K1激酶和cyclinD1依赖的CDK4蛋白增强UBF的活性从而加速rRNA的合成。这些机制的相互作用解释了mTOR信号受环境变化(营养物质、生长因子等)影响从而调控rRNA合成的原因。MAPK-ERK信号通路: 细胞对生长因子和其他有丝分裂原的反应由蛋白酪氨酸激酶和G蛋白偶联受体(R)特异性受体介导的, Grb的SH3结构域与鸟苷酸交换因子SOS结合, 后者使小分子鸟苷酸结合蛋白Ras的GDP解离而结合GTP, 从而激活Ras; 激活的Ras进一步与Raf的氨基端结合, 激活Raf; Raf磷酸化MEK1/MEK2, 从而激活MAPK级联的核心单元, 其由Raf蛋白, MEK1/2和ERK组成。ERK磷酸化并激活RSK, 转位至细胞核后, RSK磷酸化TIF-1A。随后, ERK磷酸化TIF-1A。ERK也可通过下游S6K1激酶进一步磷酸化UBF从而促进rRNA的转录。PI3K-AKT信号通路: PI3K接受生长因子和细胞因子信号产生3-磷酸肌醇, 3-磷酸肌醇激活AKT激酶并与其结合。AKT通过激酶CK2的磷酸化激活TIF-1A, 促进rRNA转录。此外, CK2也介导UBF磷酸化, 从而增强了与SL-1的相互作用促进转录起始作用。Grb: 生长因子受体; SOS: 鸟苷酸交换因子; Ras: Raf-MEK-ERK通路上游蛋白; Raf: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。

Pol I transcription initiation complex control factors: PAF53, Pol I subunit. The formation of transcription initiation complex requires the synergistic binding of UBF and SL1 to the rDNA promoter elements UCE and CP, while UBF binds to the Pol I subunit PAF53 and TIF-1A binds to both Pol I and TIF-1B/SL-1, which facilitate the recruitment of Pol I to the promoter and promote transcription of rRNA.

mTOR, MAPK and PI3K pathways regulate rRNA gene transcription by targeting the Pol I mechanism. mTOR signaling pathway: mTOR and S6K1 are the core factors of mTOR pathway. The mTOR signaling pathway regulates Pol I transcription through three interrelated mechanisms that regulate the activity and localization of TIF-1A, thereby regulating the recruitment of Pol I to the rDNA promoter; the mTOR pathway accelerates the synthesis of rRNA by activating the downstream S6K1 kinase and cyclinD1-dependent CDK4 protein of mTOR to enhance UBF activity. The interaction of these mechanisms can provide a mechanism to explain that mTOR signaling is affected by environmental changes (nutrient, growth factors, etc.) to regulate rRNA synthesis. MAPK-ERK signaling pathway: cellular responses to growth factors and other mitogens are mediated by protein tyrosine kinases and G protein-coupled receptor(R)-specific receptors. The SH3 domain of Grb binds to the guanine exchange factor SOS, which dissociates the GDP of small molecule guanine binding protein Ras and binds GTP, thus activating Ras. Activated Ras further binds to the amino end of Raf to activate Raf. Raf phosphorylates MEK1/MEK2, thus activating the core unit of MAPK cascade, which is composed of Raf protein, mek1/2 and ERK. ERK phosphorylates and activates ribosomal S6 kinase (RSK), which phosphorylates TIF-1A after translocating to the nucleus. Subsequently, ERK phosphorylates TIF-1A. ERK can also further phosphorylate UBF by downstream S6K1 kinase to promote transcription of rRNA. PI3K-AKT signaling pathway: PI3K receives growth factor and cytokine signaling to produce 3-phosphoinositide, which activates and binds AKT kinase. AKT activates TIF-1A through phosphorylation of kinase CK2 to promote rRNA transcription. In addition, CK2 also mediates UBF phosphorylation, thereby enhancing interaction with SL-1 to promote transcription initiation. Grb: growth factor receptor; RAS: upstream protein of Raf-MEK-ERK pathway; Raf: serine/threonine protein kinase.

图1 Pol I转录起始装置及与Pol I相关的3种主要调控rDNA转录的通路(根据参考文献[6, 12, 17]修改)

Fig.1 Pol I transcription initiation mechanism and three major regulatory pathways for transcription of rDNA associated with Pol I (modified from references [6, 12, 17])



I和TIF-IB/SL1的结合解离,所以mTOR通路通过调节Pol I向rDNA启动子处的TIF-IB/SL1的募集,从而调节PIC的形成。此外mTOR信号不仅可以控制TIF-IA的活性,还可以控制TIF-IA在细胞内的定位。mTOR通路经雷帕霉素处理后被抑制,导致TIF-IA从细胞核转移到细胞质,从而抑制rRNA的转录<sup>[12]</sup>。

(2)UBF也以核糖体磷酸S6激酶(ribosomal phosphate S6 kinase, S6K1)依赖的方式被mTOR调控<sup>[13]</sup>。丝裂原诱导S6K1激活磷酸化UBF,而UBF磷酸化是UBF与TIF-IB/SL1相互作用所必需的。mTOR通路通过激活S6K1,促进了Pol I转录作用,增强了rRNA的转录活性<sup>[14]</sup>。

(3)在肥厚性骨骼肌中,mTOR通路激活细胞周期相关蛋白CDK4/cyclinD<sup>[15]</sup>,随后视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)磷酸化失活并与UBF分离,同时UBF有效性增加,从而增强rRNA合成,促进细胞分裂。mTOR信号可结合多种Pol I特异性转录因子,根据细胞需求调控rRNA的合成<sup>[16]</sup>。这些结果强调了mTOR在细胞增殖和分化中的核心作用。

## 2.2 MAPK-ERK通路

细胞外信号调节激酶(extracellular regulatory protein kinase, ERK)属于MAPK级联的分支,通过蛋白酪氨酸激酶和G蛋白偶联受体将生长因子和其他有丝分裂原信号传递至多种靶蛋白<sup>[17-18]</sup>。rDNA转录对生长因子的快速应答被MAPK级联信号通路的核心组分MEK1/2抑制剂PD98059阻断,表明生长因子通过Raf-ERK途径激活Pol I转录。ERK和核糖体S6激酶(ribosomal S6 kinase, RSK)在TIF-IA 2个特定丝氨酸残基(S633和S649)处磷酸化TIF-IA,这些丝氨酸残基的磷酸化激活TIF-IA并促进pre-rRNA合成。除此之外,氨酸取代Ser 649抑制TIF-IA活性,从而抑制体内和体外Pol I转录及细胞生长。因此,生长因子通过ERK/RSK介导的TIF-IA磷酸化来调节rRNA合成和核仁活性。这些结果证明,TIF-IA是核糖体生物发生的生长因子依赖性激活的共同最终靶标<sup>[6]</sup>。ERK介导的UBF苏氨酸残基T117和T201的磷酸化可激活UBF并且促进UBF和rDNA之间的相互作用,从而促进转录延伸。同时,ERK和RSK磷酸化TIF-IA对于促进PIC的形成是至关重要的,也表明ERK协调Pol I转录起始和延伸。

## 2.3 PI3K通路

PI3K是一种级联信号通路,参与控制细胞生长、

增殖和生存,并常在各种癌症中被上调。PI3K可以单独或者与mTOR、Ras-ERK通路一起调控Pol I的转录<sup>[19]</sup>。生长因子和细胞因子信号被传递到PI3K产生3-磷酸肌醇,3-磷酸肌醇激活丝氨酸/苏氨酸激酶并与其结合<sup>[20]</sup>。AKT(protein kinase B)通过酪氨酸激酶II(casein kinase II, CK2)的磷酸化将信号转导至TIF-IA<sup>[21]</sup>。CK2靶向TIF-IA中的丝氨酸残基S170和S172,并在转录起始后与Pol I解离<sup>[22]</sup>,表明AKT具有促进转录延伸的作用。此外,CK2介导的UBF磷酸化增强了与SL-1的相互作用,从而促进转录起始作用<sup>[23]</sup>。胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)通过PI3K途径直接磷酸化UBF实现UBF的进一步活化,这与ERK信号传导相似的PI3K/AKT靶UBF和TIF-IA促进Pol I转录起始和延伸的观点是一致的。

## 3 早期胚胎中核仁的变化过程与rDNA转录

### 3.1 早期胚胎中核仁的变化过程

在哺乳动物中,成熟的卵母细胞和早期卵裂期胚胎中的核仁主要由致密纤维状组分构成,被称为核仁前体(nucleolus precursor body, NPB)。NPB无活性且在早期胚胎发育阶段便开始转化为完全成熟功能性核仁。功能性核仁由rRNA合成产物以及核糖体蛋白(r-proteins)组装而成,是生产核糖体亚基的中心<sup>[24]</sup>。经Pol I转录形成的pre-rRNA可在核仁中进一步加工成熟,核糖体的组装发生于rRNA的合成、加工的过程中。在成熟的胚胎中,干细胞和分化细胞中核仁为圆形结构,在超微结构水平上分为3个不完全分隔的区室:纤维状中心(fibrillar center, FC)是rRNA基因转录发生的位置;致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)含有新生的rRNA和加工所需的酶;颗粒组分(granular component, GC)是早期核糖体组装的位置<sup>[25]</sup>,核仁结构密切反映了Pol I的活性,核仁的大小反映了细胞代谢活跃的程度。

核仁是一种高度动态性的结构,随着细胞周期进程的推进,核仁可在有丝分裂和减数分裂期间发生周期性的重建和消失。生发泡(germinal vesicle, GV)期卵母细胞中的核仁与活性体细胞核仁在形态上没有差异。随着卵母细胞的生长,rRNA合成逐渐停止<sup>[26]</sup>,功能性核仁转变为NPB,松散的三维网状结构转变为致密的纤维球形结构。这种转化伴随着Pol I转录的减少而发生。随着卵母细胞恢复减数

表1 与Pol I相关的rRNA转录调控机制

Table 1 rRNA transcription regulation mechanism related to Pol I

信号通路 Signal path	关键基因 Key gene	转录因子 Transcription factor	rRNA转录 rRNA transcription	参考文献 Reference
mTOR	<i>Rrn3/TIF-1A</i> ↑	Rrn3/TIF-1A ↑	↑	[12]
	<i>S6K1</i> ↑	UBF ↑	↑	[13]
	<i>Rpb</i> ↓	UBF ↑	↑	[16]
	<i>RSK</i> ↑	TIF-1A ↑	↑	[6]
MAPK-ERK	<i>ERK</i> ↑	UBF ↑ TIF-1A ↑	↑	[18]
	<i>AKT</i> ↑	TIF-1A ↑	↑	[21]
	<i>CK2</i> ↑	UBF ↑ TIF-1A ↑	↑	[22-23]

分裂, 细胞核分解, NPB分散在细胞质中。在成熟卵母细胞中的NPB表面发现了活性rRNA产生的位点。在减数分裂和受精后, NPB再次出现在受精卵中, 并持续到Pol I转录重新激活(人类胚胎的4-细胞、小鼠胚胎中的2-细胞)阶段。伴随着Pol I转录的激活, NPB超微结构转化为活性纤维颗粒。在NPB的超微结构转化过程中, 参与rRNA合成的核仁蛋白来源于卵母细胞的mRNA和蛋白质。随着胚胎的发育, NPB逐渐改变其形态, 在胚胎4-细胞阶段重新形成典型的功能型核仁。几种典型的核仁蛋白(如B23、UBF等)定位于NPB, 因此NPB长期以来被认为是核仁蛋白的储存库<sup>[27]</sup>。功能型核仁的组装依赖于从头合成的胚胎转录物, 其在合子基因组激活(zygote genome activation, ZGA)的初始阶段产生<sup>[28]</sup>, 并且核仁形态和数量的变化作为一些疾病的标志, 核仁异常和rDNA转录增加被认为是许多癌症的常见病理特征。

### 3.2 早期胚胎中的rDNA表达与转录

早期胚胎发育中Pol I特异性转录rDNA, 参与胚胎基因组激活(embryo genome activation, EGA)<sup>[29]</sup>。Pol I的活化对于在胚胎发育阶段基因组活化是尤其重要的。在小鼠受精卵中, rRNA合成在1-细胞和早期2-细胞胚胎中下降, 且仅在核质中显示出rDNA转录活性, 但在第二个细胞周期中恢复。此时NPB周围观察到新合成的rDNA与rDNA转录的激活, NPB超微结构转化为活性纤维颗粒核仁。在NPB的超微结构转化过程中, 与rDNA合成相关核仁蛋白定位到发育的核仁中<sup>[30]</sup>。

在早期SCNT胚胎中rRNA的表达被完全抑制。在核移植胚胎与正常胚胎中早期2-细胞阶段中检测到rDNA转录起始, 但是在SCNT胚胎中, rDNA转录的激活和功能性核仁的建立延迟了一个细胞周期,

并且核仁蛋白的分布也延迟了一个细胞周期。所以在大多数SCNT胚胎中, 核仁的蛋白质分布与4-细胞期rDNA转录的激活同时发生, 这与单精子胞质内注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)胚胎相比延迟一个细胞周期。因此, 小鼠SCNT胚胎中核仁蛋白分布的延迟与活性基因的抑制有关。总之, 尽管克隆胚胎中ZGA被正常激活, 但核移植(nuclear transfer, NT)胚胎功能性核仁的活化相较正常胚胎延迟的一个细胞周期<sup>[31]</sup>。ICSI和SCNT胚胎之间胚胎基因组激活的明显差异表明, 细胞周期调节是改善SCNT胚胎的重要因素。

### 4 体细胞重编程中rDNA的作用

在体细胞核移植过程中, 其目的是将分化的基因重编程为全能模式, 而抑制体细胞特异性基因的表达是将体细胞重编成全能状态的一个关键步骤<sup>[32]</sup>。在核移植过程中, 供体细胞进入卵母细胞后, 在卵质作用下, 供体细胞的核仁会迅速失去rRNA的合成和加工活性, 随后进入解离的过程, 供体细胞中功能性核仁转变为NPB。然而供体细胞核则表现出对卵胞质较强的抵抗力, 这是阻碍体细胞的重编程的一个原因。将供体细胞引入去核卵母细胞的卵质中后, 基因表达活性降低并且沉默。在原核和第一次有丝分裂期间也未检测到rRNA转录活性。然而小鼠卵母细胞在成熟过程中会破坏大量的rRNA、核糖体蛋白和mRNA, 母体核糖体的储存显然不足以支持胚胎发育。因此, 在2-细胞晚期, 合子基因组被激活, 参与核糖体生物发生和组装的基因是首批被激活转录的。NT胚胎在ZGA期间表现出RNA加工和翻译起始缺陷, 所以具有完整rRNA合成、加工和核糖体亚基组装功能的纤维状颗粒核仁在小鼠的4-细胞阶段建立<sup>[33]</sup>, 提供大量核糖体用于核移植胚胎的

早期发育。所以与正常体外受精胚胎相比,在SCNT小鼠胚胎中,rDNA的转录激活的启动是延迟的,功能性核仁的激活也是延迟了一个细胞周期<sup>[34]</sup>,影响了SCNT胚胎核糖体的发育及蛋白质的合成,这是SCNT胚胎发育率低下的一个重要原因。

在iPSCs重编程过程中在体细胞中通过外源表达多潜能基因iPSCs的产生,如*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*(即OSKM),可将体细胞重编程为多能状态<sup>[35]</sup>。然而,目前重编程效率低下并且对与重编程过程机制尚不清楚,阻碍了iPSCs的临床应用。在iPSCs重编程过程中,rDNA表观遗传变化的主要差异存在于重编程的初级阶段,有文献报道,在iPSCs重编程早期(第6天)时成纤维细胞具有最低水平rDNA转录活性<sup>[36]</sup>。在重编程结束时,iPSCs具有最高表达的rDNA转录相关基因(*45S*、*18S*、*UBF*、*TIF-IA*和*RPI*)和高度去甲基化的rDNA启动子区域。用血清饥饿刺激成纤维细胞在重编程早期则不经历瞬时rDNA转录抑制。相反,rDNA转录水平直接重新激活,因此血清饥饿在重编程的早期阶段促进rDNA转录活性。血清饥饿预处理增加rDNA转录活性,可能有助于部分重编程细胞克服表观遗传障碍<sup>[37]</sup>。此外,血清饥饿相当于营养物质缺乏,可能通过激活细胞的自噬从而激活mTOR途径促进rDNA的转录。

## 5 总结与展望

体细胞重编程逆转了通常高度稳定的细胞分化状态。此外,iPSCs技术可以将特定成体细胞(比如患者的皮肤细胞)重编程为多潜能干细胞,这在疾病模拟、药物筛选和临床细胞治疗中有着巨大的应用前景,被人们视为细胞疗法的新希望。但是,重编程中的某些缺陷严重限制了该技术的应用,在SCNT胚胎发育过程中,供体细胞基因组的表观遗传修饰的异常阻碍了克隆胚胎的发育。供体细胞核具有特定的表观遗传信息,其表现为特定的DNA甲基化和组蛋白修饰,而目前认为,H3K9me3是NT胚胎发育的主要屏障,早期SCNT胚胎的H3K9me3的擦除和重建产生异常,也是重编程过程的主要障碍,改变SCNT胚胎的甲基化状态有利于成功完成SCNT胚胎的表观重编程并促进胚胎的发育<sup>[38]</sup>。由于卵母细胞对体细胞核的重编程能力有限,胚胎发育效率仍然很低。因此,提高SCNT胚胎发育率的重点已转向选择适当的供体细胞类型,甚至是供体细胞核的预处理从

而沉默体细胞特异性基因的表达,接着开启胚胎基因的表达,最终促进胚胎发育。在重编程早期体细胞仍然保持体细胞特异rDNA的转录和表观遗传特征<sup>[39]</sup>,因此我们提出假设:在重编程早期阶段关闭体细胞rDNA的转录,有利于重编程过程中重新开启胚胎rDNA的转录,提高重编程的效率。最近发现了几种Pol I的小分子抑制剂(CX-5461、BMH-21等)抑制rDNA的转录。CX-5461直接靶向SL-1,使其与Pol I解离,抑制Pol I转录起始复合物的形成<sup>[40]</sup>。BMH-21是一种rDNA的小分子嵌入剂<sup>[41]</sup>,BMH-21快速深入地诱导Pol I大亚基RPA194的解离<sup>[42]</sup>。这2种小分子抑制剂以不同的作用机理通过抑制Pol I活性从而抑制rDNA的转录。用BMH-21、CX-5461处理供体细胞抑制供体细胞rRNA转录,使供体细胞与受体细胞处于同一细胞周期水平,以增强基因组重编程的表观遗传可塑性,可能有助于解决重编程效率低下难题,对未来的细胞替换治疗、组织器官移植等再生医学和肿瘤治疗的应用提供积极的推动作用。

## 参考文献 (References)

- Devika S, DBW, Amy F, Gillian C, Jianmin W, C. PS, *et al.* DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. *PLoS Genet* 2017; 13(9): e1007006.
- Grozdanov P, Georgiev O, Karagyozov L. Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* 2003; 82(6): 637-43.
- Mcstay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; 24(1): 131-57.
- Jackobel AJ, Han Y, He Y, Knutson BA. Breaking the mold: structures of the RNA polymerase I transcription complex reveal a new path for initiation. *Transcription* 2018; 9(4): 255-61.
- Han Y, Yan C, Nguyen THD, Jackobel AJ, He Y. Structural mechanism of ATP-independent transcription initiation by RNA polymerase I. *Elife* 2017; 6: e27414.
- Grummt I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 2003; 17(14): 1691-702.
- Kusnadi EP, Hannan KM, Hicks RJ, Hannan RD, Pearson RB, Kang J. Regulation of rDNA transcription in response to growth factors, nutrients and energy. *Gene* 2015; 556(1): 27-34.
- Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013; 126(8): 1713-9.
- Chi KT, Qi H, Liu LF, Zheng XFS. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007; 12(3/4): 112-24.
- Sharifi S, Bierhoff H. Regulation of RNA polymerase I transcription in development, disease, and aging. *Annu Rev Biochem* 2018; 87(1): 51-73.
- Sabatini, MD. Twenty-five years of mTOR: uncovering the link



- from nutrients to growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(45): 11818-25.
- 12 Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cTell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 2006; 25(48): 6384-91.
- 13 Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, *et al.* mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF? *Mol Cell Biol* 2003; 23(23): 8862-77.
- 14 Xie X, Hu H, Tong X, Li L, Gao D. The mTOR-S6K pathway links growth signalling to DNA damage response by targeting RNF168. *Nat Cell Biol* 2018; 20(3): 320-31.
- 15 Nader GA, McLoughlin TJ, Esser KA. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289(6): C1457-65.
- 16 Lee D, An J, Park YU, Liaw H, Woodgate R, Park JH, *et al.* SHPRH regulates rRNA transcription by recognizing the histone code in an mTOR-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(17): E3424-33.
- 17 Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(11): pii: a011254.
- 18 Hutton SR, Otis JM, Kim EM, Lamsal Y, Snider WD. ERK/MAPK signaling is required for pathway-specific striatal motor functions. *J Neurosci* 2017; 37(34): 8102-15.
- 19 Aggarwal S, John S, Sapra L, Sharma SC, Das SN. Targeted disruption of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, via PI3K inhibitors, promotes growth inhibitory effects in oral cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019; 83(3): 451-61.
- 20 Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 2011; 23(10): 1515-27.
- 21 Nguyen LXT, Mitchell BS. Akt activation enhances ribosomal RNA synthesis through casein kinase II and TIF-IA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(51): 20681-6.
- 22 Bierhoff H, Dunder M, Michels AA, Grummt I. Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates rRNA gene transcription by promoting dissociation of TIF-IA from elongating RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* 2008; 28(16): 4988-98.
- 23 Lin CY, Sonia N, Sita R, Lucio C. CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res* 2006; (17): 4752-66.
- 24 Fulka H, Aoki F. Nucleolus Precursor bodies and ribosome biogenesis in early mammalian embryos: old theories and new discoveries. *Biol Reprod* 2016; 94(6): 143.
- 25 Boisvert FOM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(7): 574-85.
- 26 Tosti E, Boni R. Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. Dubai: Bentham Science Publisher, 2011.
- 27 Fulka H, Kyogoku H, Zatssepina O, Langerova A, Fulka J. Can nucleoli be markers of developmental potential in human zygotes? *Trends Mol Med* 2015;21(11): 663-72.
- 28 Svoboda, P. Mammalian zygotic genome activation. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 84: 118-26.
- 29 Hug CB, Grimaldi AG, Kruse K, Vaquerizas JM. Chromatin architecture emerges during zygotic genome activation independent of transcription. *Cell* 2017; 169(2): 216-28, e19.
- 30 Hamdane N, Tremblay MG, Dillinger S, Stefanovsky VY, Németh A, Moss T. Disruption of the UBF gene induces aberrant somatic nucleolar bodies and disrupts embryo nucleolar precursor bodies. *Gene* 2017; 612: 5-11.
- 31 Svarcova O, Dinnyes A, Polgar Z, Bodo S, Maddox-Hyttel P. Nucleolar re-activation is delayed in mouse embryos cloned from two different cell lines. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(2): 132-41.
- 32 Muguruma K. Self-organized cerebellar tissue from human pluripotent stem cells and disease modeling with patient-derived iPSCs. *Cerebellum* 2017; 17(3): 37-41.
- 33 Wang M, Ling W, Xiong C, Xie D, Chu X, Li Y, *et al.* Potential strategies for cardiac diseases: lineage reprogramming of somatic cells into induced cardiomyocytes. *Cell Reprogram* 2019; 21(2): 63-77.
- 34 Zheng Z, Jia JL, Bou G, Hu LL, Wang ZD, Shen XH, *et al.* rRNA genes are not fully activated in mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *J Biol Chem* 2012; 287(24): 19949-60.
- 35 Skalova S, Svadlakova T, Qureshi W, Dev K, Mokry J. Induced pluripotent stem cells and their use in cardiac and neural regenerative medicine. *Int J Mol Sci* 2019; 16(2): 4043-67.
- 36 Tokuno O, Hayakawa A, Yanai T, Mori T, Ohnuma K, Tani A, *et al.* Sterility testing of stem cell products by broad-range bacterial 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction. *Lab Med* 2015; 46(1): 34-41.
- 37 Reynolds N, Latos P, Hynes-Allen A, Loos R, Leaford D, O'Shaughnessy A, *et al.* NuRD suppresses pluripotency gene expression to promote transcriptional heterogeneity and lineage commitment. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5): 583-94.
- 38 Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, *et al.* Reprogramming of H3K9me3-depeheterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol* 2018; 20(5): 620-31.
- 39 Han F, Li X, Song D, Jiang S, Xu Q, Zhang Y. SCNT versus iPSCs: proteins and small molecules in reprogramming. *Int J Dev Biol* 2015; 59(4/5/6): 179-86.
- 40 Drygin D, Lin A, Bliesath J, Ho CB, O'Brien SE, Proffitt C, *et al.* Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res* 2011; 71(4): 1418-30.
- 41 Peltonen K, Colis L, Liu H, Jaamaa S, Zhang Z, af Hallstrom T, *et al.* Small molecule BMH-compounds that inhibit RNA polymerase I and cause nucleolar stress. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(11): 2537-46.
- 42 Wei T, Najmi SM, Liu H, Peltonen K, Kucerova A, Schneider DA, *et al.* Small-molecule targeting of RNA polymerase I activates a conserved transcription elongation checkpoint. *Cell Rep* 2018; 23(2): 404-14.