

## 曲古抑菌素 A 对外培养牛成纤维细胞组蛋白乙酰化和甲基化的影响

吴 侠<sup>1</sup>, 牛 栋<sup>1</sup>, 李 燕<sup>1</sup>, 岳永莉<sup>1</sup>, 旭日干<sup>1</sup>, 于海泉<sup>1,\*</sup>

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

**摘要:** Trichostatin A(TSA)是一种特异的组蛋白去乙酰化酶抑制剂。研究显示, TSA 可以特异地抑制组蛋白去乙酰化酶活性, 提高细胞的组蛋白乙酰化水平, 激活基因的表达。但是, 目前还不是很清楚 TSA 处理是否对组蛋白甲基化产生影响。本研究以成纤维细胞为研究对象, 利用免疫细胞化学技术及激光共聚焦显微镜, 探讨了 TSA 处理体细胞对其组蛋白乙酰化及甲基化修饰的影响。结果显示, 随 TSA 浓度增加, 体细胞形态发生明显的改变, 细胞变得扁平且核区较大, 处理后组蛋白 H4K8 位点的乙酰化水平随着 TSA 浓度的增加明显提高。检测组蛋白 H3 上两个甲基化位点发现, 随组蛋白乙酰化水平的提高, H3K4 位点的三甲基化 (H3K4me3) 水平也显著提高。但是, 对于 H3K9 的二甲基化水平 (H3K9me2) 则没有明显变化。以上结果显示, TSA 的处理不仅可以提高体细胞的组蛋白乙酰化水平, 同时也增加了与基因表达激活相关组蛋白修饰位点的甲基化水平, 但是对于与沉默基因相关的组蛋白修饰位点则没有明显的影响。

**关键词:** 曲古抑菌素 A; 组蛋白乙酰化; 组蛋白甲基化; 成纤维细胞

**中图分类号:** Q344; Q939.92; Q959.842.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2009)04-0361-08

## Effect of Trichostatin A (TSA) on Histone Acetylation and Methylation in Bovine Fibroblast Cells

WU Xia<sup>1</sup>, NIU Dong<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, YUE Yong-li<sup>1</sup>, BOU Shorgan<sup>1</sup>, YU Hai-quan<sup>1,\*</sup>

(The Key Laboratory of Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology of the Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

**Abstract:** Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, could increase histone acetylation, and active gene expression in somatic cells. However, effect of TSA on histone methylation is unclear. In present study, the bovine fibroblast cells were treated with TSA, and histone acetylation and methylation were examined by using indirect immunofluorescence and scanning confocal microscopy. We found that the morphology of cells was changed from being slightly concave to more flat and elongated even at the 10ng/mL group. Intensive H4K8ac signals in fibroblast cells were observed after TSA treatment. A similar increasing with H4K8ac in H3K4me3 was found, but no change was observed at H3K9me2 when somatic cells were treated with TSA. These result indicated that TSA was not only increasing histone acetylation, but also increasing histone methylation that was correlated with gene expression. However, TSA could not change the level of histone methylation that regulated gene silence.

**Key words:** TSA; Histone acetylation; Histone methylation; Fibroblast cells

整个生命过程中, 在不改变 DNA 序列的情况下, 通过碱基序列外的各种修饰和与之相关的各种蛋白质或 RNA 的协同作用下, 调控基因的表达, 以完成生命周期或适应环境变化, 而且还能在代与代之间传递的现象称之为表观遗传。表观遗传主要

包括 DNA 甲基化、RNA 干扰、基因组印迹、组蛋白修饰、X 染色体失活和激活以及端粒的变化等多个方面。在这些基因的修饰中, 组蛋白的修饰对于基因表达和沉默具有重要作用。相比 DNA 甲基化, 核小体核心组蛋白的修饰则更为复杂。肽链 N 末端

收稿日期: 2009-03-12; 接受日期: 2009-05-12

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20050126005); 内蒙古自然科学基金重点项目 (200508010403)

\*通讯作者(Corresponding author), E-mail: haiquan\_yu@yahoo.com

第一作者简介: 男, 湖南平江人, 助理研究员, 主要从事哺乳动物生殖生物学的研究。E-mail: xia.wu2003@gmail.com

内的赖氨酸 (Lysine, K)、精氨酸 (Arginine, R) 和丝氨酸 (Serine, S) 是组蛋白修饰的主要位点。组蛋白包括磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化、苏素化、ADP 核糖基化和脯氨酸异构化等一系列修饰。通常认为, 组蛋白赖氨酸被乙酰化修饰可增加基因的转录活性, 去乙酰化则使基因沉默, 组蛋白的乙酰化或去乙酰化为转录激活和抑制因子提供了特异的结合位点(Kurdistani et al, 2004)。组蛋白 H3K9、K14、K18 和 K23, 以及组蛋白 H4K5、K8、K12 和 K16 是主要的乙酰化修饰位点(Agalioti et al, 2002; O'Neill & Turner, 1995), 单个或几个赖氨酸位点被乙酰化能够改变染色体构象, 允许调控蛋白与染色体相互作用(Grunstein 1997; Strahl & Allis, 2000)。组蛋白乙酰化转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)所组成的动态平衡维持了组蛋白的乙酰化和去乙酰化修饰。

与组蛋白乙酰化相比, 组蛋白甲基化修饰呈现出更为复杂的调控模式。组蛋白 N 末端的赖氨酸和精氨酸是甲基化的主要修饰位点, 精氨酸主要发生单甲基化和双甲基化修饰, 赖氨酸则要经历单、双、三甲基修饰(Bannister et al, 2002)。组蛋白不同残基, 不同水平的甲基化修饰, 产生了更加复杂的生物学功能。H3K4、H3K36 和 H3K79 甲基化与基因激活相关(Bannister et al, 2005; Bernstein et al, 2005; Pokholok et al, 2005), H3K9、H3K27 和 H4K20 甲基化与基因沉默或异染色质形成有关(Cao et al, 2002; Peters et al, 2001; Rice et al, 2003; Schotta et al, 2004), 组蛋白甲基化也受到甲基化转移酶(HMTs)和去甲基化酶(HDMs)的调节。

曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA) 是一种真菌抗生素(Tsuji et al, 1976)。从前的研究显示, TSA 能够促进血友白血细胞的分化(Yoshida et al, 1987), 也可以将正常的大鼠成纤维细胞抑制于 G1、G2 期(Yoshida et al, 1990b)。后来, Yoshida et al (1990a)证实, TSA 是一种特异的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 其在纳摩尔水平就明显抑制组蛋白去乙酰化酶的活性, 并且明显提高细胞组蛋白的乙酰化水平。由于 TSA 能够增加组蛋白乙酰化水平, 激活基因的表达, 目前被广泛的应用于癌症的治疗(Ailenberg & Silverman, 2002)。

有丝分裂过程中, 凝集的染色体组蛋白 H3K9 和 H4K5 去乙酰化, H4K8 乙酰化水平降低, 远离 N 末端的修饰位点则没有明显变化(H3K14、H4K12

和 H4K16) (Kruhlak et al, 2001)。分析人和小鼠体细胞基因组显示, H3K4me2 和 H3K4me3 在基因组中的定位与 H3 乙酰化存在密切相关, 基因组中 504 个 H3K4me3 位点, 有 495 个位点组蛋白 H3 也被乙酰化修饰(Bernstein et al, 2005)。但是, 目前还不是很清楚, TSA 是否能够在诱导组蛋白乙酰化水平改变的同时, 也改变组蛋白的甲基化修饰状态。

本研究利用免疫细胞化学的方法, 对使用 TSA 处理后的牛成纤维体细胞的组蛋白乙酰化和甲基化水平进行了检测。旨在通过研究 TSA 对组蛋白乙酰化和甲基化的影响, 一方面探讨处理后细胞基因表达水平的改变, 研究组蛋白乙酰化和甲基化对基因激活协同调控的机理; 另一方面将这些细胞用于体细胞核移植的核供体、为进一步研究体细胞核在卵母细胞中的重编程机理奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

成体海福特牛耳皮肤成纤维细胞来源于内蒙古旭日公司牧场。海福特牛耳尖皮肤局部先用手术刀片刮毛, 再用 70%~75% 的酒精消毒, 用组织剪快速剪取耳尖约 1 cm<sup>2</sup> 大小的组织, 立即在 70%~75% 的酒精中浸泡 60s, 在含 250 U/mL 青霉素和 250 μg/mL 链霉素的灭菌 PBS<sup>-</sup> 溶液中清洗三遍, 放入相同溶液中, 4℃ 带回实验室。在超净工作台内, 耳组织于 60 mm 培养皿中用 PBS<sup>-</sup> 溶液漂洗两遍后, 放入青霉素瓶内, 不加任何溶液, 用眼科剪反复剪切组织块约 1 mm<sup>3</sup> 大小。用 PBS<sup>-</sup> 和含 20% FBS 的 DMEM (DMEM+20% FBS) 溶液各清洗三遍后, 挑取组织块, 接种于 2—3 个 60 mm 培养皿中, 每皿约接种 20~30 个组织块, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下, 进行干涸培养 3 小时, 然后加入 5 mL 含 DMEM+20% FBS 进行原代培养。当细胞生长达到 90% 汇合时, 吸出培养液, 用灭菌 PBS<sup>-</sup> 溶液清洗三遍, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 的消化液, 37℃ 消化 2~3 min, 立即加入 2 mL DMEM+10% FBS 终止消化。然后按照 1:4 传代。

### 1.2 TSA 处理体细胞

无水乙醇溶解 TSA, 分别配制成 500 μg/mL、100 μg/mL 和 10 μg/mL 浓储液, -80℃ 储存。处理前再将其稀释至 1000 倍的浓储液。将细胞接种于有盖玻片且事先使用 0.2% 明胶处理的 12 孔板内培

养。目的是使细胞较好的贴于玻璃盖玻片上生长。培养 24 h 后进行药物处理。TSA 处理浓度分别为, 5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL, 处理时间为 24 h。

### 1.3 免疫细胞化学及荧光信号的采集、数据分析

移除培养液后, 使用 PBS 溶液清洗三遍。用 4% 多聚甲醛固定液室温固定 15~20 min, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液室温通透 30 min。通透后的胚胎用含 10% 山羊血清的 PBS 溶液室温封闭 2 h。然后与用 PBS 溶液稀释好的一抗孵育 (1:100), 4℃ 过夜。一抗均购自美国 Upstate 生物试剂公司, 分别为: Anti-acetyl-Histone H4 (Lys8)、Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys 9) 和 Anti-trimethyl-Histone H4 (Lys 4)。次日, 用 PBS 溶液清洗三遍后, 胚胎于 37℃ 条件下用 FITC 标记的二抗 (1:500) 避光染色 2 h。细胞核用 10 μg/mL PI 染色 5 min, PBS 溶液清洗三遍后, 使用 Bio-Rad 1024ES 型激光共聚焦显微镜进行检测。每一次重复试验, 设备都使用相同的参数设置。图像的荧光分析使用美国 NIH 开发的 Image-J 图像处理软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)。相对强度的测量参考相关的研究 (Kim et al, 2002), 测定方法为: 细胞核荧光强度=(核区的荧光值-背景的荧光值)×核区的面积。

### 1.4 统计分析

本研究所有试验至少重复 3 次。试验数据使用 SPSS 软件进行方差分析, 确定差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 TSA 处理对体细胞形态的影响

使用 TSA 及 0.1% 乙醇处理体细胞 24 h 后, 0.1% 乙醇处理组细胞形态与对照组相比没有明显变化, 细胞形态饱满, 呈典型的梭状 (图 1A,B), 而在 TSA 处理组中, 随着 TSA 浓度的增加细胞形态明显改变。当 TSA 浓度达到 10 ng/mL 时, 细胞形态明显改变, 细胞形态不再饱满, 变得扁平, 核区明显可见, 胞质内存在很多黑色斑点 (图 1D, E, F, 箭头所示)。当 TSA 浓度达到 50 ng/mL 时, 部分细胞开始死亡 (图 1F)。

### 2.2 TSA 对体细胞组蛋白 H4K8 乙酰化(H4K8ac)水平的影响

使用免疫细胞化学的方法检测 TSA 处理的体细胞组蛋白 H4K8ac 乙酰化水平显示, 随着 TSA 浓度的增加, H4K8ac 荧光信号明显增强 (图 2A, A'

-F, F')。相对定量分析显示, 乙醇处理组没有影响组蛋白 H4K8ac 的乙酰化水平, 与对照组之间没有显著差异, 但是当加入 TSA 处理 24 h 后, 即使在很低的浓度 (5 ng/mL), H4K8ac 乙酰化信号都与未处理组及乙醇处理组有明显差异, 并且存在明显的剂量依赖性 (图 3,  $P<0.05$ )。

### 2.3 TSA 对体细胞组蛋白 H3K4 三甲基化(H3K4me3)及 H3K9 二甲基化(H3K9me2)的影响

H3K4me3 在基因激活过程中具有重要作用, 被认为是基因激活的标志位点 (Santos-Rosa et al, 2002)。本研究通过免疫细胞化学分析 TSA 处理后体细胞 H3K4me3 甲基化水平。结果显示, 当使用 0.1% 乙醇处理 24 h 后, 没有明显影响 H3K4me3 的荧光强度, 但是当使用不同浓度 TSA 处理 24 h 后, 体细胞的 H3K4me3 荧光水平明显增加 (图 4)。荧光半定量分析显示, TSA 处理组与未处理组及乙醇处理组在 H3K4me3 水平上有明显的差异 (图 6,  $P<0.05$ )。与组蛋白乙酰化不同, TSA 处理后体细胞的 H3K4me3 水平没有呈现明显的剂量依赖性, 不同 TSA 浓度处理组间 H3K4me3 荧光信号没有明显差异。

研究显示 H3K9me2 主要定位于常染色体的转录沉默区, H3K9me3 则特异的存在于异染色质区域 (Fuks et al, 2003)。免疫细胞化学分析显示, 0.1% 乙醇处理组没有影响细胞的 H3K9me2 水平。细胞经 TSA 处理 24 h 后, 没有发现 H3K9me2 荧光强度有明显的变化 (图 5)。统计分析显示, 不同浓度 TSA 处理的体细胞 H3K9me2 水平与对照组没有明显差异 (图 6,  $P>0.05$ )。

## 3 讨论

本研究使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (TSA) 对牛成体成纤维细胞进行处理, 研究了 TSA 对体细胞形态和细胞组蛋白乙酰化、甲基化水平的影响。研究发现, 随着 TSA 浓度的增加, 细胞形态发生明显改变。当 TSA 浓度大于 10 ng/mL 时, 细胞形态即与对照组有明显差异。Enright et al (2003) 研究显示, 当 TSA 浓度为 0.08 μmol/L ( $\approx 24.2$  ng/mL) 细胞形态发生改变。但是本研究证实, TSA 在更低的浓度即引起了细胞形态的变化。体细胞形态改变与 Enright et al (2003) 及 Hoshikawa et al (1994) 的描

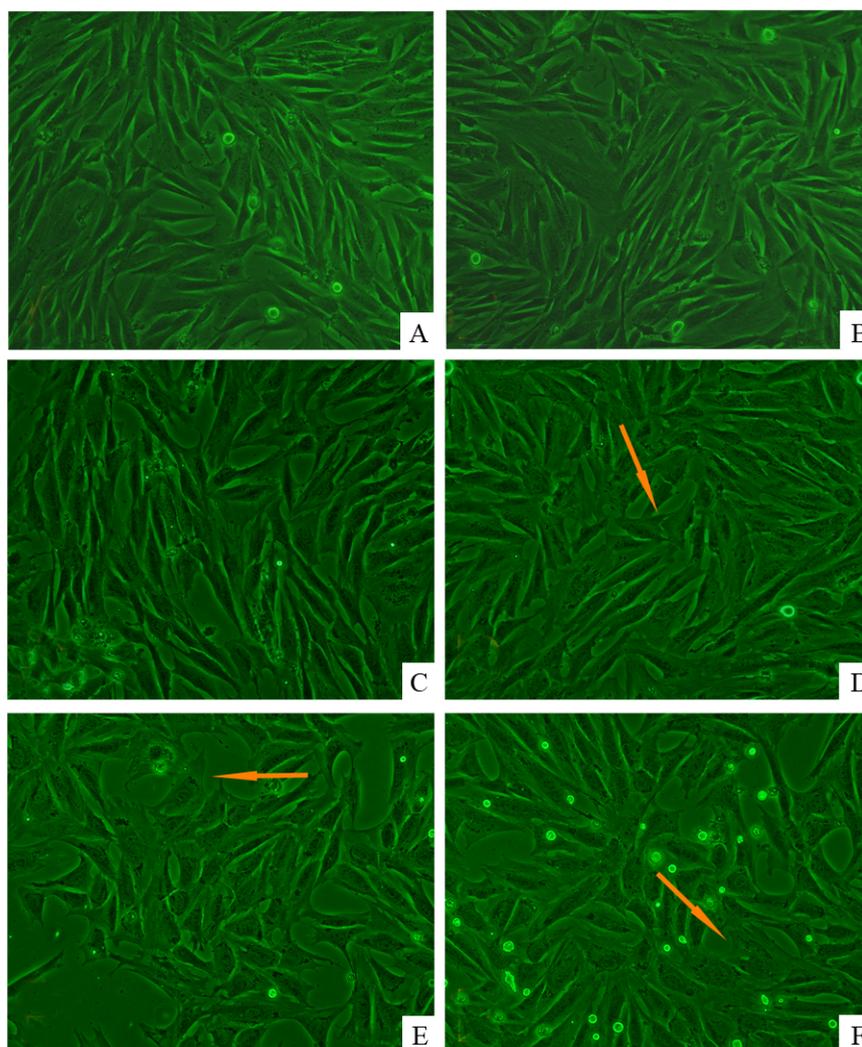


图 1 不同浓度 TSA 处理体细胞对细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of TSA on morphology of fibroblast cells

A: 未处理对照组 (200×); B: 0.1%乙醇处理 24 h (200×); C、D、E、F: 体细胞分别用 5、10、25 和 50ng/mL TSA 处理 24 h (200×)。箭头所指, 扁平化的细胞和胞质内的黑色斑点。

A: Non-treated fibroblast cells (200×); B: Fibroblast cells were treated with 0.1% vehicle for 24 h (200×); C, D, E, F: Fibroblast cells were treated with 5, 10, 25, 50ng/mL TSA for 24 h, respectively (200×). Arrow showed TSA treatment changed cell morphology from being slightly concave to more flat, and black spots in cytoplasm.

述一致。

核心组蛋白 H4N 末端第 8 号赖氨酸残基 (H4K8) 的乙酰化可以诱导 SWI/SNF 转录复合物在染色体上的聚集, 启动基因的转录, 其在基因表达过程中具有重要作用 (Peterson & Workman, 2000)。本研究利用免疫细胞化学的方法检测了 TSA 处理后体细胞组蛋白 H4K8 乙酰化水平。结果显示, 随着 TSA 浓度的增加, 组蛋白 H4K8 的乙酰化水平明显增加, 荧光半定量分析显示, 当 25 和 50ng/mL TSA 处理 24 h, H4K8 乙酰化达到最高水平。组蛋白乙酰化转移酶和去乙酰化酶的平衡调控着组蛋

白的乙酰化修饰, 当酶活性被抑制, 平衡被打破, 从而组蛋白乙酰化水平发生改变 (Hake et al, 2004)。TSA 是典型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 通过抑制去乙酰化酶的活性, 破坏组蛋白乙酰化与去乙酰化修饰的平衡, 从而提高细胞染色体的组蛋白乙酰化水平, 激活基因的表达, 抑制肿瘤的发生 (Ailenberg & Silverman, 2002)。

与组蛋白乙酰化激活基因表达不同, 组蛋白 N 末端不同位点氨基酸残基的甲基化则具有不同的作用。H3K4 的甲基化与基因的激活相关, 而 H3K9 的甲基化则与基因的沉默和异染色质的形成有关

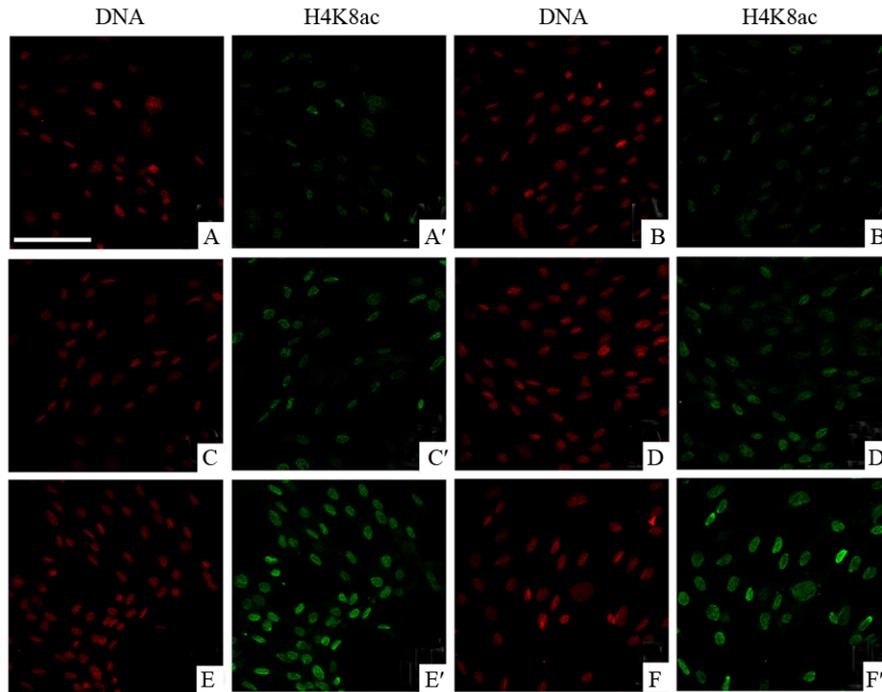


图 2 TSA 处理体细胞对 H4K8 乙酰化的影响

Fig. 2 Effect of TSA on histone 4 lysine 8 acetylation in bovine fibroblast cells

A, A': 未处理组; B, B': 0.1% 乙醇处理组; C, C' -F, F': 5、10、25、25ng/mL 处理组; A、B、C、D: PI 染色, 显示体细胞 DNA; A'、B'、C'、D': H4K8ac 染色。标尺为 100 $\mu$ m。

A, A': Non-treated transfected cells; B, B': Fibroblast cells were treated with 0.1% vehicle; C, C' -F, F': Fibroblast cells were treated with 5, 10, 25, 50ng/mL TSA, respectively. H4K8ac: Green; DNA: Red. Bar, 100 $\mu$ m.

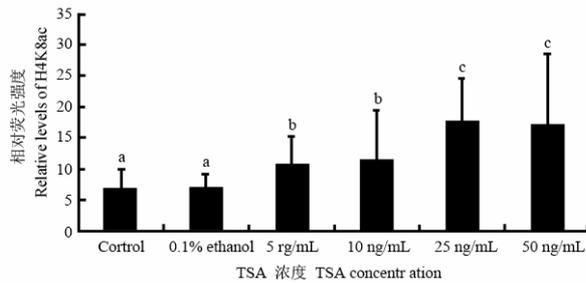


图 3 不同浓度 TSA 处理体细胞组蛋白 H4K8 乙酰化荧光相对定量分析

Fig. 3 Quantity analysis of fibroblasts acetyl-H4K8 fluorescent intensity after TSA treatment

浓度分别为 0、5、10、25、50ng/mL TSA 处理组和 0.1% 乙醇处理组组蛋白 H4K8ac 乙酰化荧光信号的相对强度。字母不同表示组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Bovine fibroblast cells were treated by 0, 5, 10, 25, 50ng/mL TSA and 0.1% ethanol. The histogram was showed the relative levels of acetylation fluorescent intensity at H4K8ac. Values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ), mean  $\pm$  SEM.

(Noma et al, 2001; Santos-Rosa et al, 2002)。但是, 目前还不清楚, 是否组蛋白乙酰化水平的转变会影响组蛋白甲基化修饰。本研究使用 TSA 处理体细胞, 检测体细胞组蛋白乙酰化修饰改变的同时研究

了其甲基化的修饰状况。结果显示, TSA 不但增加了组蛋白乙酰化水平, 与基因激活相关的 H3K4 三甲基化水平也随之增加。这一结果与 Yan & Boyd(2006)报道的结果一致, 该研究通过对转基因细胞内外源基因的表达证实, 在基因表达的活跃区, 组蛋白 H3 乙酰化与 H3K4 的甲基化同时富集, 而在基因表达的沉默区, 则很少检测到这两种修饰的组蛋白。分析人和小鼠基因组显示, H3K4me2、H3K4me3 在基因组中的定位与组蛋白乙酰化修饰明显相关, 基因组 504 个 H3K4me3 修饰位点, 其中有 495 个位点同时也被 H3 乙酰化修饰(Bernstein et al, 2005)。因此, TSA 在提高组蛋白乙酰化的同时, 增加了 H3K4me3 在基因组中的富集, 也增加了基因的转录活性。

但是, 检测与基因沉默相关的 H3K9 二甲基化显示, TSA 没有影响该位点的修饰。组蛋白 H3K9me1 和 H3K9me2 定位于常染色体基因沉默区域及一些特殊的异染色质区(Tachibana et al, 2005), H3K9me3 则与高度凝集的异染色质结构的形成有关(Arney & Fisher, 2004)。Kondo et al (2003)用 TSA 处理三个结肠癌细胞系发现, TSA 增加了细胞的组

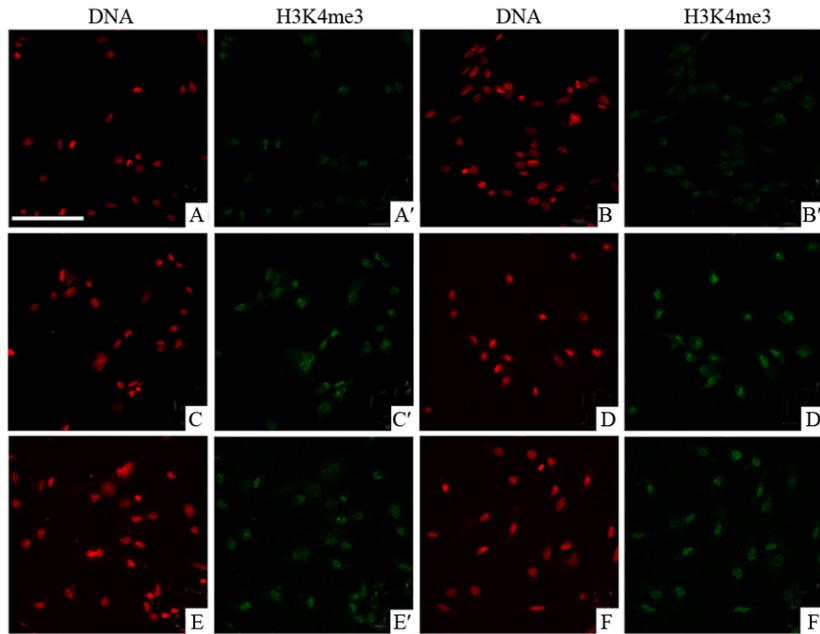


图 4 TSA 处理体细胞对 H3K4 三甲基化的影响

Fig. 4 Effect of TSA on tri-methyl-histone 3 lysine 4 in bovine fibroblast cells

A, A': 未处理组; B, B': 0.1%乙醇处理组; C, C' -F, F': 5、10、25、50ng/mL 处理组; A、B、C、D: PI 染色, 显示体细胞 DNA; A'、B'、C'、D': H3K4me3 染色。标尺为 100 $\mu$ m。

A, A' : Non-treated transfected cells; B, B' : Fibroblast cells were treated with 0.1% vehicle; C, C' -F, F' : Fibroblast cells were treated with 5, 10, 25, 50ng/mL TSA, respectively. H3K4me3: Green; DNA: Red. Bar, 100 $\mu$ m.

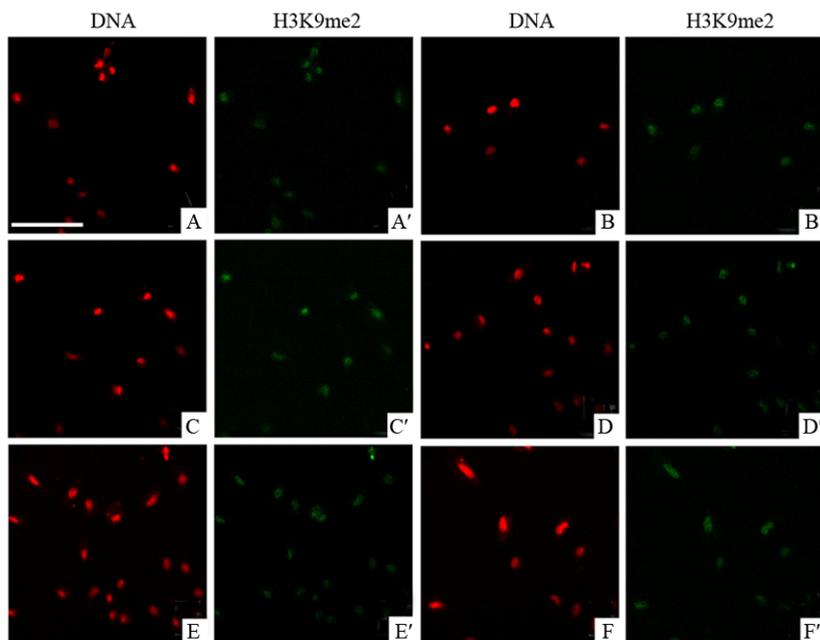


图 5 TSA 处理体细胞对 H3K9 二甲基化的影响

Fig. 5 Effect of TSA on di-methyl-histone 3 lysine 9 in bovine fibroblast cells

A, A': 未处理组; B, B': 0.1%乙醇处理组; C, C' -F, F': 5、10、25、50ng/mL 处理组; A、B、C、D: PI 染色, 显示体细胞 DNA; A'、B'、C'、D': H3K9me2 染色。标尺为 100 $\mu$ m。

A, A' : Non-treated transfected cells; B, B' : Fibroblast cells were treated with 0.1% vehicle; C, C' -F, F' : Fibroblast cells were treated with 5, 10, 25, 50ng/mL TSA, respectively. H3K9me2: Green; DNA: Red. Bar, 100 $\mu$ m.

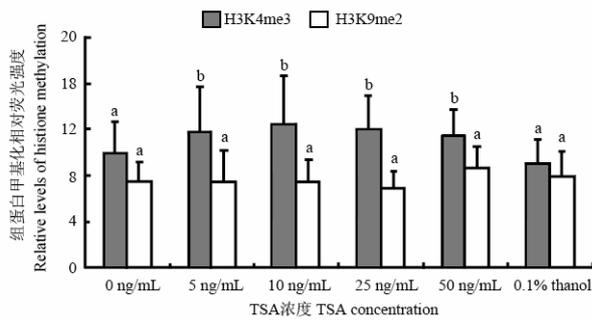


图 6 不同浓度 TSA 处理体细胞组蛋白 H3K4 三甲甲基化和 H3K9 二甲甲基化荧光相对定量分析

Fig 6 Quantity analysis of fibroblasts tri-methyl-H3K4 and di-methyl-H3K9 fluorescent intensity after TSA treatment

浓度分别为 0、5、10、25、50 ng/mL TSA 处理组, 0.1% 乙醇处理组组蛋白 H3K4me3 和 H3K9me2 荧光信号的相对强度。字母不同表示组间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Bovine fibroblast cells were treated by 0, 5, 10, 25, 50 ng/mL TSA and 0.1% ethanol. The histogram was showed the relative levels of methylation fluorescent intensity at H3K4me3 and H3K9me2. Values with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ), mean  $\pm$  SEM.

## 参考文献:

- Agaloti T, Chen GY, Thanos D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene[J]. *Cell*, **111**(3): 381-392.
- Ailenberg M, Silverman M. 2002. Trichostatin A-histone deacetylase inhibitor with clinical therapeutic potential-is also a selective and potent inhibitor of gelatinase A expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **298**(1): 110-115.
- Arney KL, Bao S, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA. 2002. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote[J]. *Int J Dev Biol*, **46**(3): 317-320.
- Arney KL, Fisher AG. 2004. Epigenetic aspects of differentiation[J]. *J Cell Sci*, **117**(Pt 19): 4355-4363.
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. 2002. Histone methylation: dynamic or static? [J]. *Cell*, **109**(7): 801-806.
- Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes[J]. *J Biol Chem*, **280**(18): 17732-17736.
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas III EJ, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse[J]. *Cell*, **120**(2): 169-181.
- Cao R, Wang LJ, Wang HB, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing[J]. *Science*, **298**(5595): 1039-1043.
- Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Biol Reprod*, **69**(3): 896-901.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation[J]. *J Biol Chem*, **278**(6): 4035-4040.
- Grunstein M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription[J]. *Nature*, **389**(6649): 349-352.
- Hake SB, Xiao A, Allis CD. 2004. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer[J]. *Br J Cancer*, **90**(4): 761-769.
- Hoshikawa Y, Kwon HJ, Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. 1994. Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines[J]. *Exp Cell Res*, **214**(1): 189-197.
- Kim JM, Ogura A, Nagata M, Aoki F. 2002. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer[J]. *Biol Reprod*, **67**(3): 760-766.
- Kondo Y, Shen L, Issa JP. 2003. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer[J]. *Mol Cell Biol*, **23**(1): 206-215.
- Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang XJ, Verdin E, Bazett-Jones DP. 2001. Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin[J]. *J Biol Chem*, **276**(41): 38307-38319.
- Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. 2004. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression[J]. *Cell*, **117**(6): 721-733.
- Noma K, Allis CD, Grewal SI. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries[J]. *Science*, **293**(5532): 1150-1155.
- O'Neill LP, Turner BM. 1995. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner[J]. *Embo J*, **14**(16): 3946-3957.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. 2001. Loss of the *Suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability[J]. *Cell*, **107**(3): 323-337.
- Peterson CL, Workman JL. 2000. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex[J]. *Curr Opin Genet Dev*, **10**(2): 187-192.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell

- GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast[J]. *Cell*, **122**(4): 517-527.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains[J]. *Mol Cell*, **12**(6): 1591-1598.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3[J]. *Nature*, **419**(6905): 407-411.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin[J]. *Genes Dev*, **18**(11): 1251-1262.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, **403**(6765): 41-45.
- Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9[J]. *Genes Dev*, **19**(7): 815-826.
- Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. 1976. A new antifungal antibiotic, trichostatin[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, **29**(1): 1-6.
- Yan CH, Boyd DD. 2006. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression[J]. *Mol Cell Biol*, **26**(17): 6357-6371.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. 1990a. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A[J]. *J Biol Chem*, **265**(28): 17174-17179.
- Yoshida M, Nishikawa M, Nishi K, Abe K, Horinouchi S, Beppu T. 1990b. Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells[J]. *Exp Cell Res*, **187**(1): 150-156.
- Yoshida M, Nomura S, Beppu T. 1987. Effects of trichostatin on differentiation of murine erythroleukemia cells[J]. *Cancer Res*, **47**(14): 3688-3691.