

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00342

# TSA 和 VPA 处理对食蟹猴-猪异种体细胞核移植胚胎早期发育的影响

秦祖兴<sup>1</sup>, 黄高波<sup>2</sup>, 罗军<sup>2</sup>, 宁淑芳<sup>1</sup>, 卢晟盛<sup>1</sup>, 卢克焕<sup>1</sup>

1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530004;
2. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004

**摘要:** 食蟹猴-猪异种体细胞核移植(Interspecies somatic cell nuclear transfer, iSCNT)研究旨在由 iSCNT 胚胎建立具有与人类相似遗传背景的胚胎干细胞 (ESCs), 作为医学和基础科学研究的实验材料。文章探讨了两种组蛋白脱乙酰化酶抑制剂(HDACi)—Trichostatin A(TSA)和 Valproic acid(VPA)处理浓度、时间与培养液(PZM-3 和 HECM-10)组合对食蟹猴-猪 iSCNT 胚胎早期发育的影响。结果表明, 在 PZM-3 中添加 10 nmol/L TSA 处理 48 h 组的囊胚率显著高于对照组(22.78% vs 9.86%,  $P<0.05$ )。但是, 不管在 PZM-3 或是 HECM-10 中, 添加 2~10 mmol/L VPA 处理均不能提高 iSCNT 胚胎早期发育能力。文章证明了 TSA 处理可以提高食蟹猴-猪 iSCNT 胚胎早期发育能力。

**关键词:** 组蛋白脱乙酰化酶抑制剂(HDACi); 食蟹猴; 猪; 异种核移植; 胚胎发育

## Effect of TSA and VPA treatment on long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*)-pig interspecies somatic cell nuclear transfer

QIN Zu-Xing<sup>1</sup>, HUANG Gao-Bo<sup>2</sup>, LUO Jun<sup>2</sup>, NING Shu-Fang<sup>1</sup>, LU Sheng-Sheng<sup>1</sup>, LU Ke-Huan<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources/Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

**Abstract:** Long-tailed macaque-pig interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) is beneficial to yield embryonic stem cells from iSCNT embryos with similar genetic background as human, which can be used as materials for medical and basic research. The primary objective of this study was to investigate the effects of concentrations and treatment duration of two histone deacetylase inhibitors—Trichostatin A (TSA) and Valproic acid (VPA) and two different embryo culture media (PZM-3 and HECM-10) on the *in vitro* development of iSCNT embryos. The results suggested that when PZM-3 was used

收稿日期: 2011-07-04; 修回日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(批准号: 30860039)和广西自然科学基金重点项目(编号: 2010GXNSFD013021)资助

作者简介: 秦祖兴, 硕士, 专业方向: 动物胚胎工程方面研究。E-mail: qinzux@163.com

通讯作者: 卢晟盛, 研究员, 博士, 研究方向: 动物胚胎工程。Tel: 0771-3270036, E-mail: sslu@gxu.edu.cn;

卢克焕, 教授, 博士, 研究方向: 动物胚胎工程。Tel: 0771-3238064, E-mail: khlu@gxu.edu.cn

网络出版时间: 2012-2-15 10:52:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120215.1052.001.html>

as the embryo culture medium, the blastocyst rate of 10 nmol/L TSA treatment for 48 h was significantly higher than the control group (22.78% vs 9.86%,  $P < 0.05$ ). However, neither in PZM-3 nor in HECM-10, 2–10 mmol/L VPA treatment did not increase the *in vitro* developmental potential of iSCNT embryos. It was concluded that TSA treatment could enhance the *in vitro* developmental potential of long-tailed macaque-pig iSCNT embryos.

**Keywords:** histone deacetylase inhibitors (HDACi); long-tailed macaque(*Macaca fascicularis*); pig; iSCNT; embryo development

组蛋白乙酰化是常见的表观遗传学修饰,与染色质的结构、基因的表达有着密切的联系。组蛋白乙酰化是乙酰基转移酶 (Histon acetylase, HAT)将乙酰辅酶A上的乙酰基结合到组蛋白N端的赖氨酸残基结合位点上。组蛋白氨基酸残基上增加的乙酰化水平导致核苷酸与DNA和/或交联组蛋白的松散结合,使得染色质结构松弛,允许转录状态的形成<sup>[1-5]</sup>。此外,增加的组蛋白乙酰化伴随更有效的DNA复制复合体的形成,有利于细胞增殖<sup>[6]</sup>。特异位点上组蛋白乙酰化水平常与相应的DNA 甲基化水平呈负相关。这两种表观遗传修饰间很可能有多种或某种独立的关联<sup>[7,8]</sup>。将体细胞移植到卵母细胞胞质中后,一系列表观遗传学事件随之发生<sup>[9]</sup>。

组蛋白脱乙酰化酶抑制剂(Histone deacetylase inhibitor, HDACi)可以维持细胞组蛋白高度乙酰化。研究表明,HDACi处理可以提高动物体细胞核移植效率。本研究旨在探讨两种HDACi-Trichostatin A(TSA)和Valproic acid(VPA)处理浓度、时间与培养液组合(PZM-3<sup>[10]</sup>和HECM-10<sup>[11]</sup>)对食蟹猴-猪异种体细胞核移植(Interspecies somatic cell nuclear transfer, iSCNT)胚胎发育的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 猪卵母细胞收集和体外成熟培养

从屠宰场收集猪卵巢,置于含双抗的生理盐水中(30~37℃),2 h内运回实验室。采用10 mL注射器(12号针头)从直径2~6 mm卵泡中吸取卵泡液,在体视显微镜下用捡卵针挑选具有3层以上紧密卵丘颗粒细胞包裹的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs),在洗卵液(Hepes-buffered TL-PVA)中洗3次,再转入成熟液[TCM-199(Gibco),其中添加0.57 mmol/L Cysteine 和 10 µg/L EGF]洗2~3次。

然后,将COCs转入过夜平衡的成熟液滴,矿物油覆盖,置于39℃培养箱中培养。培养24 h后,将COCs转入不含激素的成熟液继续培养20~22 h。

### 1.2 食蟹猴供体细胞的准备

从一只3岁雄性食蟹猴活检获取耳部组织,用双抗消毒处理并去除毛发和角质层后将组织块切成1 mm小块,转入60 mm Nunc培养皿中,添加含10%胎牛血清的DMEM(Invitrogen)培养液,转入37℃培养箱中培养。待组织块贴壁以后,向培养皿中添加2~3 mL DMEM,覆盖组织块。每隔2~3 d更换新鲜培养液。待细胞单层覆盖皿底75%~85%后,进行传代培养或冷冻保存。核移植操作时,采用第5~7代细胞作为核供体。细胞同期化( $G_0/G_1$ 期)处理采用接触抑制2~4 d。

### 1.3 异种体细胞核移植(iSCNT)

猪卵母细胞体外成熟培养44~46 h后,将COCs转入0.2% (w/v)透明质酸酶中处理,去除卵丘颗粒细胞。洗涤2~3次后,挑选第一极体明显、胞质均匀的MII期卵母细胞用于核移植。在显微操作液[Hepes-buffered TL Medium, 10% (v/v) FCS, 7.5 µg/mL Cytochalasin B(CB)]中洗涤5~6次后,将裸卵转入含供体细胞的显微操作液滴中。核移植时,采用内径为20 µm去核针吸取第一极体和附近少量胞质完成卵母细胞去核。去核后,用去核针吸取一个表面圆滑、直径20 µm左右的供体细胞。将供体细胞注入去核卵母细胞卵周隙,轻轻按压,使供体细胞和受体胞质紧密接触。

### 1.4 重构胚融合和激活

融合和激活同时进行,采用细胞融合仪(BTX 2001)完成。经融合/激活液(300 mmol/L Mannitol solution, 1.0 mmol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mmol/L

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O和 0.5 mmol/L Hepes [12])洗涤 2~3 次后,将重构胚转入 0.5 mm 融合槽中。首先施加一个AC脉冲(2 V, 1 MHz);接着,采用 2 次电场强度为 80 V/mm、作用时间为 30 μs的直流脉冲完成融合/激活。融合/激活后,将重构胚转入含 7.5 μg/mL CB的培养基中,39 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下孵育 0.5 h后,检测融合率。之后,继续孵育 2.5 h。

### 1.5 iSCNT 胚胎培养

按TSA(Sigma公司)和VPA(Wako, American)处理浓度或处理时间,以及TSA和VPA与培养液(PZM-3 和 HECM-10)的组合等设计,将融合的iSCNT胚胎转入培养液中培养 7 d(融合/激活当天记为 0 d)。培养条件为:39 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度。分别于培养第 2 和第 7 d观察检测iSCNT胚胎分裂率和囊胚率。

实验设计如下:

(1)探讨分别在 PZM-3 和 HECM-10 培养液中添加 5 组不同浓度(0、5、10、50、100 nmol/L)TSA 并培养 2 d(48 h)对其后 iSCNT 胚胎早期发育的影响,以寻找获得最高囊胚率的方法。

(2)用上述实验获得的最佳 TSA 浓度在 PZM-3 培养液分别对 iSCNT 胚胎培养 24 h、48 h、72 h、96 h,以获得优化的 TSA 处理时间;采用优化的 TSA 浓度与处理时间相结合的办法处理 iSCNT 胚胎,对其持续观察 48 h,记录并统计 24 h、48 h 胚胎发

育情况。

(3)分别用含有 5 组不同 VPA 浓度(0、2、4、8、10 mmol/L)的 PZM-3 和 HECM-10 处理 iSCNT 胚胎 48 h,统计 iSCNT 胚胎早期发育的相关数据。

### 1.6 统计分析

核移植数据差异显著性采用卡方检验( $\chi^2$ )进行分析。 $P<0.05$  表示差异性显著; $P<0.01$  表示差异性极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 在 PZM-3 中添加不同浓度 TSA 对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

将激活后的 iSCNT 胚胎置于含有不同浓度 TSA 的 PZM-3 中培养 2 d(48 h);然后转入不含 TSA 的 PZM-3 中继续培养(图 1),结果见表 1。50 nmol/L TSA 处理组 iSCNT 胚胎分裂率最高,但与对照组相比差

表 1 在 PZM-3 中添加不同浓度 TSA 处理(48 h)对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

浓度	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	囊胚数(%)
0 nmol/L	71	53(74.65) <sup>ab</sup>	7(9.86) <sup>b</sup>
5 nmol/L	69	54(78.26) <sup>ab</sup>	11(15.94) <sup>ab</sup>
10 nmol/L	79	58(73.42) <sup>b</sup>	18(22.78) <sup>a</sup>
50 nmol/L	85	73(85.88) <sup>a</sup>	14(16.47) <sup>ab</sup>
100 nmol/L	75	55(73.33) <sup>b</sup>	14(18.67) <sup>ab</sup>

注:同列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

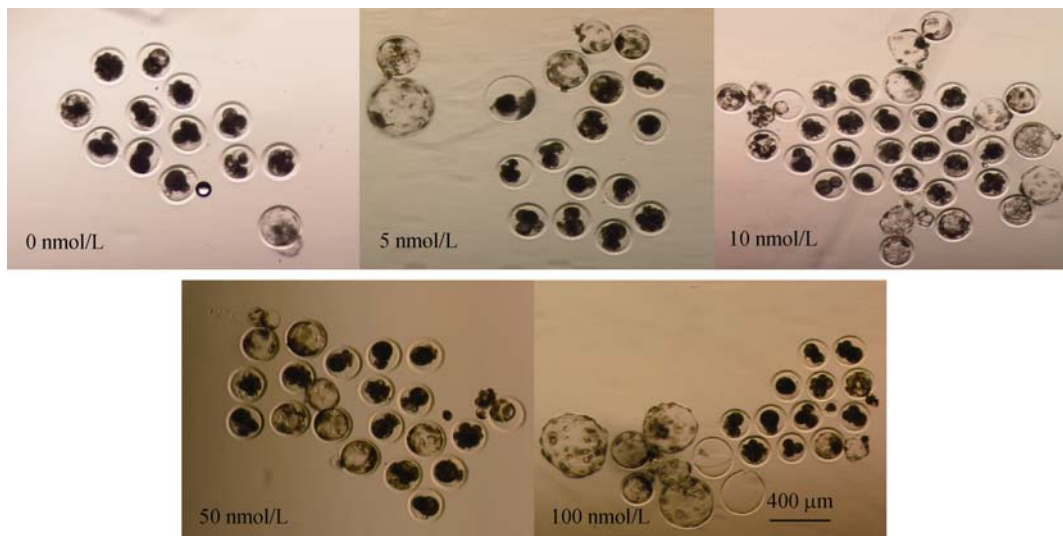


图 1 不同浓度 TSA(PZM-3)处理(48 h)后食蟹猴-猪 iSCNT 胚胎的早期发育情况(10×)

异不显著( $P>0.05$ )。经 TSA 处理, 10 nmol/L 处理组 iSCNT 胚胎囊胚率显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 其他处理组囊胚率与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。但是, 药物各处理组间, iSCNT 囊胚率没有显著差异( $P>0.05$ )。

2.2 在 HECM-10 中添加不同浓度 TSA 对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

将激活后的 iSCNT 胚胎培养于含有不同浓度 TSA 的 HECM-10 中培养 2 d(48 h); 然后转入不含 TSA 的 HECM-10 继续培养, 结果见表 2。TSA 处理组与对照组之间, iSCNT 胚胎分裂率和囊胚率没有显著差异( $P>0.05$ )。各 TSA 处理组间, iSCNT 胚胎分裂率和囊胚率也没有显著差异( $P>0.05$ )。

表 2 在 HECM-10 中添加 TSA 处理对 iSCNT 胚胎早期发育的影响(48 h)

浓 度	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	囊胚数(%)
0 nmol/L	103	92(89.32)	7(6.80)
5 nmol/L	105	86(81.90)	2(1.90)
10 nmol/L	94	87(92.55)	4(4.26)
50 nmol/L	99	88(88.89)	5(5.05)
100 nmol/L	101	91(90.10)	5(4.95)

2.3 TSA 处理时间对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

为检测 TSA 处理对 iSCNT 胚胎早期发育的影响是否与处理时间相关, 本研究选择 10 nmol/L TSA (PZM-3) 的浓度处理, 进行了 TSA 处理时间对 iSCNT 胚胎早期发育影响的初步探讨。结果见表 3, 4 个处理组间, iSCNT 胚胎分裂率没有显著差异( $P>0.05$ ); 但是, 48 h、72 h 和 96 h 三组的囊胚率显著高于 24 h 处理组( $P<0.05$ ); 而 48 h、72 h 和 96 h 三组间, 囊胚率没有显著差异( $P>0.05$ )。

表 3 TSA 处理时间对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

处理时间	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	囊胚数(%)
24 h	91	78(85.71)	5(5.49) <sup>b</sup>
48 h	86	76(88.37)	14(16.28) <sup>a</sup>
72 h	87	78(89.66)	13(14.94) <sup>a</sup>
96 h	88	79(89.77)	16(18.18) <sup>a</sup>

注: 同列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

为进一步探讨 TSA 处理时间如何影响 iSCNT 胚胎发育, 我们连续观察了培养 24 h 和 48 h 时, 处理组和对照组 iSCNT 胚胎的发育情况。结果见表 4, 培养 24 h 时, 10 nmol/L TSA 处理组和对照组之间, iSCNT 胚胎分裂率和处于各个时期的胚胎比率均没有显著差异( $P>0.05$ ); 培养 48 h 时, TSA 处理组和对照组 iSCNT 胚胎分裂率也没有显著差异( $P>0.05$ ), 但是 TSA 处理组 4-细胞期胚胎比率显著高于对照组 (31.58% vs 18.56%,  $P<0.05$ ), 而处于其他分裂时期的胚胎比率与对照组没有显著差异( $P>0.05$ )。

2.4 在 PZM-3 和 HECM-10 中添加不同浓度 VPA 处理对 iSCNT 胚胎早期发育的影响

将激活后的 iSCNT 胚胎置于含不同浓度 VPA 的 PZM-3 中培养 2 d(48 h); 然后转入不含 VPA 的 PZM-3 中继续培养, 结果见表 5。4 mmol/L 和 8 mmol/L 处理组 iSCNT 胚胎分裂率显著低于对照组和其他处理组( $P<0.05$ )。随着 VPA 浓度的提高, iSCNT 胚胎囊胚率有下降的趋势, 但与对照组相比, 差异不显著( $P>0.05$ )。

按同样的实验设计, 在 HECM-10 添加不同浓度 VPA 用于培养 iSCNT 胚胎, 结果见表 6。随着 VPA 浓度的提高, iSCNT 胚胎分裂率和囊胚率均有下降的趋势。8 mmol/L 和 10 mmol/L 处理组 iSCNT 胚胎分裂率极显著低于对照组和 2 mmol/L 处理组 ( $P<0.01$ ); 4 mmol/L 处理组 iSCNT 胚胎囊胚率显著

表 4 在 PZM-3 中添加 TSA 处理 iSCNT 胚胎 24 和 48 h 的体外发育情况

时间	浓度	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	2-细胞(%)	4-细胞(%)	8-细胞(%)	16-细胞(%)
24 h	0 nmol/L	97	37(38.14)	17(17.53)	15(15.46)	2(2.06)	1(1.03)
	10 nmol/L	95	41(43.16)	17(17.89)	16(16.84)	3(3.16)	0(0)
48 h	0 nmol/L	97	71(73.20)	18(18.56)	18(18.56) <sup>b</sup>	10(10.31)	3(3.09)
	10 nmol/L	95	72(75.79)	9(9.470)	30(31.58) <sup>a</sup>	13(13.68)	1(1.05)

注: 同列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

表 5 在 PZM-3 中添加 VPA 处理对 iSCNT 胚胎早期发育的影响(48 h)

浓度	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	囊胚数(%)
0 mmol/L	85	67(78.82) <sup>a</sup>	7(8.24)
2 mmol/L	78	64(82.05) <sup>a</sup>	5(6.41)
4 mmol/L	77	50(64.94) <sup>b</sup>	3(3.90)
8 mmol/L	81	52(64.20) <sup>b</sup>	2(2.47)
10 mmol/L	75	54(72.00) <sup>a</sup>	2(2.67)

注：同列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

表 6 在 HECM-10 中添加不同浓度 VPA 处理对 iSCNT 胚胎早期发育的影响(48 h)

浓度	iSCNT 胚胎数	分裂数(%)	囊胚数(%)
0 mmol/L	97	78(80.41) <sup>A</sup>	11(11.34) <sup>a</sup>
2 mmol/L	99	79(79.80) <sup>A</sup>	9(9.09) <sup>ab</sup>
4 mmol/L	99	69(69.70) <sup>AB</sup>	3(3.03) <sup>b</sup>
8 mmol/L	97	58(59.79) <sup>B</sup>	0
10 mmol/L	94	55(58.51) <sup>B</sup>	0

注：同列中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )；不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

低于对照组( $P<0.05$ )；8 mmol/L 和 10 mmol/L 处理组中，iSCNT 胚胎未能发育到囊胚期。

### 3 讨论

TSA 是一种 HDACi，其通过抑制组蛋白脱乙酰化酶的活性来提高组蛋白的乙酰化水平。研究表明，TSA 处理的 SCNT 胚胎可以有效地发育到囊胚阶段，并且可以发育到足月的胎儿<sup>[9,13]</sup>。此外，由 TSA 处理的克隆囊胚获得的胚胎干细胞效率比未处理囊胚高 3 倍<sup>[13]</sup>。另有研究表明，TSA 处理胚胎发育到囊胚阶段的能力由于供体细胞类型的不同而存在差异<sup>[13,14]</sup>。本研究中，10 nmol/L 处理组囊胚率显著高于对照组(22.78% vs 9.86%， $P<0.05$ )，表明 TSA 处理提高了 iSCNT 胚胎发育能力。有研究者采用 TSA 处理 10 h<sup>[15]</sup>，而另外的研究者则采用 TSA 处理 24 h<sup>[16]</sup>，所报道的 TSA 处理时间不尽相同，但都提高了猪 SCNT 胚胎发育能力。通过检测 TSA 处理时间对 iSCNT 胚胎发育的影响，我们发现 TSA 处理时间对 iSCNT 胚胎分裂率均没有影响，但是 48 h、72 h 和 96 h 组囊胚率显著高于处理 24 h 组( $P<0.05$ )，并且，48 h、72 h 和 96 h 三组间，囊胚率没有显著差异。这表明，10 nmol/L TSA 处理 48 h 最有利于提高 iSCNT 胚胎发育能力。

通过比较 10 nmol/L TSA 处理组和对照组 iSCNT 胚胎在培养 24 h 和 48 h 的发育情况，我们发

现，激活后 48 h 时，TSA 处理组和对照组分裂率没有显著差异，但是 TSA 处理组 4-细胞期胚胎比率显著高于对照组的(31.58% vs 18.56%， $P<0.05$ )。我们推测，TSA 处理可以加速 iSCNT 胚胎由 2-细胞期到 4-细胞期的过渡。

将 TSA 添加到灵长类胚胎培养基(HECM-10)中并未提高 iSCNT 胚胎发育能力，反而一定程度抑制了胚胎的发育，尽管差异不显著。TSA 通过直接结合到 HDAC 活性位点来发挥作用<sup>[17]</sup>，可能是 HECM-10 中的某种成分抑制了 TSA 作为 HDACi 发挥作用的能力。

VPA 是一种细胞渗透性的短链状脂肪酸，可以抑制 HDAC。Huangfu 等<sup>[18,19]</sup>报道，VPA 处理提高 3 种重编程因子诱导小鼠胚胎成纤维细胞重编程和两因子诱导人原代成纤维细胞重编程的效率。这些结果使研究者们相信 VPA 有助于提高克隆效率。Miyoshi 等<sup>[20]</sup>的研究表明，VPA 可以提高猪转基因 SCNT 胚胎囊胚率，并维持表达转基因的能力。Kim 等<sup>[14]</sup>报道，VPA 处理提高猪 SCNT 囊胚率和内细胞团细胞数。

有研究者推测，VPA 抑制 HDAC 的机制很可能是通过结合到 HDAC 催化中心从而封闭底物的结合路径来实现<sup>[21]</sup>。本研究将 VPA 分别添加到 PZM-3 和 HECM-10 中，但并未提高 iSCNT 胚胎发育能力。Göttlicher 等<sup>[21]</sup>报道，不同的细胞可能对 VPA 的敏感性不同，例如，HEK293T 和 F9 细胞对 VPA 的敏感性存在显著差异。因此，我们推测，可能是 iSCNT 胚胎对 VPA 更敏感，本研究中使用浓度超出了 VPA 作为 HDACi 的浓度范围。在 HECM-10 中，随着 VPA 浓度的增加 iSCNT 胚胎分裂率降低，并且 8 mmol/L 和 10 mmol/L 处理组分裂率显著低于对照组和 2 mmol/L 组( $P<0.01$ )。同样，随着 VPA 浓度的增加，囊胚率也降低，并且在 8 mmol/L 和 10 mmol/L 组中的 iSCNT 胚胎未能发育到囊胚期。这进一步支持了我们的推测，即 HECM-10 的某种成分抑制了 HDACi 的作用，同时，基于实验结果我们推测，在本研究条件下，浓度大于 4 mmol/L 时，VPA 超出了作为 HDACi 的浓度范围，VPA 对 iSCNT 胚胎产生了负面作用，而且这种负面作用会随着 VPA 浓度的增加而愈发严重。

HECM-10 中除了含有常用的无机盐，还含有乳酸、11 种氨基酸、1 种维生素(泛酸)和 PVA。因此，还



需要更多实验来确定 HECM-10 中何种成分可能抑制 HDACi 的作用。同时, 何种浓度范围的 VPA 可以促进 iSCNT 胚胎的发育能力亦需进一步研究来确定。

本研究表明, TSA 可以提高食蟹猴-猪 iSCNT 胚胎体外发育能力。这将有助于构建食蟹猴-猪异种克隆胚胎干细胞的研究。但是, TSA 处理促进 iSCNT 胚胎发育的能力受到培养基成分的影响, 因此, 今后还需要更深入研究其中的机理。

### 参考文献(References):

- [1] Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*, 1988, 7(5): 1395–1402. [DOI](#)
- [2] Vidal M, Gaber RF. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(12): 6317–6327. [DOI](#)
- [3] Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus: thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J Biol Chem*, 1993, 268(1): 305–314. [DOI](#)
- [4] Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 1993, 72(1): 73–84. [DOI](#)
- [5] Zlatanova J, Caiafa P, Van Holde K. Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *FASEB J*, 2000, 14(12): 1697–1704. [DOI](#)
- [6] Vogelauer M, Rubbi L, Lucas I, Brewer BJ, Grunstein M. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell*, 2002, 10(5): 1223–1233. [DOI](#)
- [7] Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem*, 2001, 276(4): 40778–40787. [DOI](#)
- [8] Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation—how does it all fit together? *J Cell Biochem*, 2002, 87(2): 117–125. [DOI](#)
- [9] Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Bio Reprod*, 2006, 74(6): 1083–1089. [DOI](#)
- [10] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod*, 2002, 66(1): 112–119. [DOI](#)
- [11] Zhang P, Wang H, Bavister BD, Ji W. Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined culture media and their functional assessment by IVF and embryo development. *Human Reprod*, 2001, 16(2): 300–305. [DOI](#)
- [12] Lai LX, Prather RS. Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(4): 233–241. [DOI](#)
- [13] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, van Thuan N, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189. [DOI](#)
- [14] Sugimura S, Narita K, Yamashiro H, Sugawara A, Shoji T, Terashita Y, Nishimori K, Konno T, Yoshida M, Sato E. Interspecies somatic cell nucleus transfer with porcine oocytes as recipients: A novel bioassay system for assessing the competence of canine somatic cells to develop into embryos. *Theriogenology*, 2009, 72(4): 549–559. [DOI](#)
- [15] Zhao JG, Hao YH, Ross JW, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS. Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram*, 2010, 12(1): 75–83. [DOI](#)
- [16] Kim YJ, Ahn KS, Kim M, Shim H. Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell, Dev Biol Anim*, 2011, 47(4): 283–289. [DOI](#)
- [17] Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 1999, 401(6749): 188–193. [DOI](#)
- [18] Huangfu DW, Maehr R, Guo WJ, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795–797. [DOI](#)
- [19] Huangfu DW, Osafune K, Maehr R, Guo WJ, Eijkelenboom A, Chen SB, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nat. Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269–1275. [DOI](#)
- [20] Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M. Development of a noninvasive monitoring system for evaluation of *oct-3/4* promoter status in miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev*, 2009, 55( 6): 661–669. [DOI](#)
- [21] Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 2001, 20(24): 6969–6978. [DOI](#)