

• 医学与免疫生物技术 •

Tet2 调节骨髓间充质干细胞功能

顾洁, 王玉霞, 高娟, 袁胜男, 初雅婧, 李妍涵, 袁卫平, 汪晓敏

中国医学科学院 北京协和医学院 血液学研究所 血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

顾洁, 王玉霞, 高娟, 等. Tet2 调节骨髓间充质干细胞功能. 生物工程学报, 2019, 35(1): 142–149.

Gu J, Wang YX, Gao J, et al. Tet2 regulates the function of mesenchymal stem cells. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 142–149.

摘要: Tet2 (Tet 家族成员 2) 在 DNA 去甲基化修饰、表观遗传调控及骨髓造血中起着重要作用。笔者课题组前期研究发现, 随着年龄增长, *Tet2* 敲除小鼠逐步发展为淋系白血病和髓系白血病。但 *Tet2* 在骨髓微环境中的作用仍不清楚。进一步研究发现, *Tet2* 敲除的骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) 更多处于 G2/M 分裂期, 其细胞分裂时间缩短, 生长速度加快。长周期培养-起始细胞实验表明, *Tet2* 敲除的 MSC 支持造血干细胞扩增和髓系分化的能力增强。通过点杂交实验发现, *Tet2* 敲除后, 骨髓细胞 DNA 总甲基化水平升高。对 *Tet2* 缺失的骨髓细胞进行甲基化测序, 结果表明: 基因组转录调控区域等多个功能性结构域的甲基化水平明显升高。同时, 敲除 *Tet2* 的 MSC 分泌 IL-8、IL-18 等炎性细胞因子的能力下降; 敲除 *Tet2* 的 MSC 更多分泌促进造血干细胞髓系分化的 GM-CSF 和 CCL-3 等细胞因子。*Tet2* 可以影响间充质干细胞造血支持作用, 进而调节造血。

关键词: *Tet* 基因家族成员 2, 表观遗传调控, DNA 甲基化, 间充质干细胞

Tet2 regulates the function of mesenchymal stem cells

Jie Gu, Yuxia Wang, Juan Gao, Shengnan Yuan, Yajing Chu, Yanhan Li, Weiping Yuan, and Xiaomin Wang

State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Abstract: Tet2 (member 2 of the Tet family) plays an important role in DNA demethylation modification, epigenetic regulation, and hematopoiesis. In our previous study, we found that *Tet2* knockout mice progressively developed lymphocytic leukemia and myeloid leukemia with aging. However, the role of Tet2 in bone marrow microenvironment is unclear. Here in this study, we found that more *Tet2*^{-/-} mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow were in the G2/M cell cycle stages. The division time of *Tet2*^{-/-} MSCs was shorter than that of the control cells. The growth rate of *Tet2*^{-/-} MSCs was accelerated. The cobblestone area-forming cells assay (CAFC) showed that *Tet2* knockout MSCs supported the expansion of hematopoietic

Received: March 27, 2018; **Accepted:** June 14, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81629001, 81470280), Tianjin Science and Technology Commission (Nos. 15JCQNJC12100, 17JCQNJC09800), Peking Union Medical College Youth Grant (Nos. 3332016141, 3332016092).

Corresponding author: Xiaomin Wang. Tel: +86-22-23909166; Fax: +86-22-23909418; E-mail: wangxiaomin@ihcams.ac.cn

国家自然科学基金(Nos. 81629001, 81470280), 天津科学技术委员会青年基金(Nos. 15JCQNJC12100, 17JCQNJC09800), 北京协和医学院“协和青年基金”(Nos. 3332016141, 3332016092)资助。

stem cells (HSCs) and the differentiation of HSCs was skewed towards myeloid cells. Through the dot blotting experiment, we found that the total methylation level was increased in *Tet2*^{-/-} bone marrow cells (BM). We used the methylation-chip to analyze the methylation level of *Tet2*^{-/-} bone marrow cells and found that the level of methylation was increased in the transcriptional starting area (TSS), exons (EXONS) and 3' untranslated region (3' UTR). Moreover, we found that the cytokines secreted by *Tet2*^{-/-} MSCs, such as IL-8 and IL-18, were decreased. While the expressions of GM-CSF and CCL-3, which supported hematopoietic stem cells to differentiate to myeloid cells, were increased in *Tet2*^{-/-} MSCs. Our results demonstrated that Tet2 regulates MSCs to support hematopoiesis.

Keywords: member 2 of the Tet family, epigenetic regulation, DNA methylation, mesenchymal stem cells

DNA 的甲基化修饰是基因表达调控的重要环节, 肿瘤细胞往往表现为典型的 DNA 高甲基化, 尤其是胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤 (CpG) 启动子区域肿瘤抑制基因的高甲基化^[1-2]。肿瘤抑制基因的高甲基化通过改变染色质状态, 招募辅助活化因子或抑制因子, 使基因转录活化受到抑制, 导致肿瘤抑制基因表达沉默。TET 蛋白属于依赖酮戊二酸和亚铁离子的双加氧酶, 其催化 5-甲基胞嘧啶(5-mC) 转化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hmC), 并进一步转化为 5-甲酰胞嘧啶 (5-fC) 和 5-羧基胞嘧啶(5-caC), 在胚胎发育和基因重新编码等过程中都起着重要作用^[3-5]。对染色体 4q24 最小区域杂合性缺失和微缺失的筛查显示, 骨髓增殖性肿瘤(Myeloproliferative neoplasms, MPN) 和 MDS (Myelodysplastic syndrome, MDS) 患者中往往存在 *TET2* 缺失和失活性突变^[6-7]。*TET2* 突变在 MPN 和 MDS 中的发生率为 10%–20%, 在急性髓细胞白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 中为 7%–23%^[8]。5-hmC 可阻止甲基化 DNA 与相关蛋白的结合, 进而抑制其转录, 产生沉默作用。对胚胎干细胞的研究表明, 5-hmC 富集在靠近转录起始点和基因内的 CpG 二核苷酸区, 且 5-hmC 在这些调控区域的富集均与基因表达增强有关^[9]。研究发现, 在 MDS 和慢性粒单核细胞白血病(Chronic myelomonocytic leukaemia, CMML) 中, *TET2* 突变可发生在包括造血干细胞的 CD34⁺ 细胞, 且有些患者同时存在多个 *TET2* 突变点, 提示 *TET2* 突变可导致早期干细胞获得克隆性生长优势^[10-11]。

既往研究大多局限于造血细胞 TET2 异常导

致的造血改变及其临床意义, 而 TET2 是否具有调控 MSC 生物学特性及其造血支持能力的作用, 目前仍不清楚。在本研究中, 我们获取 Tet2 敲除小鼠 (*Tet2*^{-/-}) 和正常小鼠 (WT) 骨髓 MSC, 通过比较研究, 阐述 Tet2 基因调控 MSC 的生物学能力的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清 (Gibco 公司), CCK-8 (DojinDo Laboratories 公司), Spectra Max M5 Microplate Reader (Molecular Devices 公司), 细胞培养箱 (Thermo 公司)。

Tet2 基因全身敲除小鼠购于 The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/023359>), 货号为 023359。

1.2 方法

1.2.1 骨髓间充质干细胞分离和培养

取 *Tet2*^{-/-} 小鼠双下肢股骨和胫骨, 冲出骨髓细胞, 将骨髓细胞用 2 mL HBSS 缓冲液洗涤 2 遍 (枪尖吹匀), 1 500 r/min 离心 6 min, 将骨髓细胞均匀平铺于 10 cm 培养皿中, 10% 胎牛血清 IMDM 培养 1 周。1 周后可见间充质干细胞呈现克隆样生长。去除培养基, 换新鲜培养基继续培养。每隔 3–4 d 待细胞长满后分瓶传代。

1.2.2 细胞增殖实验

收集对数生长期细胞, 计数, 用完全培养基重新悬浮细胞, 调整细胞浓度至合适浓度, 接种 96 孔板, 每孔加 100 μ L 细胞悬液。细胞在 37 $^{\circ}$ C、100% 相对湿度, 5% CO₂ 培养箱中培养 1–7 d。每

天取一个培养板,加入含 10% CCK-8 的完全培养基置于 37 °C 培养箱中孵育 3 h。轻轻振荡后在 Spectra Max M5 Microplate Reader 上测定 450 nm 波长处的吸光度。绘制生长曲线。

1.2.3 长周期培养-起始细胞实验

于 96 孔板接种 MSC, 每组 3 个重复孔, 每孔加 100 μ L 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。待 MSC 融合率达到 80%, 照射 20 Gray, 在 33 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 1 d。加入造血干细胞, 每孔细胞数为 500, 培养基体积为每孔 150 μ L。加入 Stem cell 公司的 5300 长周期培养基 150 μ L。在 33 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养 5 周, 每周半量换液。4 周或 5 周后计数鹅卵石状克隆, 细胞数大于 5 为一个克隆。

1.2.4 点杂交方法检测基因组甲基化水平

提取细胞基因组 DNA, 超声破碎至合适大小。硝酸纤维素膜先用蒸馏水稍微浸湿, 并用 20 \times SSC 使其饱和。将膜放在经 20 \times SSC 预饱和过的滤纸上。以 5 μ L 的 DNA 分装样品在滤膜上点样。将滤膜放在一张干燥的滤纸晾干, 以 5 \times SSC 漂洗 5 min。将硝酸纤维素膜置 80 °C 真空烤炉 2 h。将 DNA 面用紫外线 (280 nm) 照射 3–5 min, 这时的滤膜已可用于杂交。预杂交液过夜封闭醋酸纤维素膜。加入 anti-5-hmC 或者 anti-5-mC 探针 4 °C 过夜孵育。加入 HRP 结合的二抗 1–2 h。化学显色。

1.2.5 全基因组 DNA 甲基化测序和数据分析

利用 hME-Seal 方法从细胞中获得 100–500 bp 大小的 DNA 片段^[12–13]。利用 Illumina 公司的甲基化芯片进行测序, 并建立细胞甲基化数据库 (NEBNext[®] ChIP-Seq Library Prep Reagent Set for Illumina)。数据解读参考 2011 年 Szulwach 和 Yao 等的研究方法^[14–17]。

1.2.6 统计学分析

按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率, 并采用分析软件 Graph Pad Prism 5.0 拟合 IC₅₀ 曲线和计算 IC₅₀ 值。细胞生长抑制率(%) = [(Ac–As)/

(Ac–Ab)] \times 100%。As: 样品的 OA (细胞+CCK-8+待测化合物), Ac: 阴性对照的 OA (细胞+CCK-8+DMSO), Ab: 阳性对照的 OA (培养基+CCK-8+DMSO)。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.005, **** P <0.001。

2 结果与分析

2.1 Tet2 敲除的骨髓 MSC 生长状态良好

取 Tet2^{-/-}小鼠四肢骨, 获得骨髓细胞, 培养骨髓细胞 1 周后, 消化传代 1 次, 继续培养 1 周, 贴壁的细胞为骨髓来源的 Tet2^{-/-}MSC。我们检测了 Tet2 在 Tet2^{-/-}MSC 和 WT-MSC 中的表达, 发现在 Tet2^{-/-}MSC 细胞中 Tet2 几乎不表达 (图 1)。镜下观察 Tet2^{-/-}MSC 形态, 细胞形态均一, 呈长梭形, 扩增速度快, 克隆形成能力强, 体外培养 1 至 2 周可传代。传代后细胞生长速度明显加快, 12 h 内完全贴壁、伸展, 重新变为长梭形, 培养 4–7 d 即达到完全融合。在倒置显微镜下, 细胞为梭形, 胞浆丰富, 核染色质细, 核仁明显, 呈平行排列或旋涡样生长 (图 2)。

2.2 Tet2 敲除的骨髓 MSC 细胞周期加快, 细胞扩增时间缩短

骨髓 MSC 在体外的增殖能力较强, 但随着传代次数增加, 其增殖速率及总体扩增倍数基本保持一致。我们前期研究发现, Tet2 敲除可加速 MSC 生长。我们检测了 Tet2^{-/-}MSC 细胞的生长周期, 发现在血清刺激 24 h 和 48 h 后, Tet2^{-/-}MSC 处于 S 期的细胞比例明显高于 WT-MSC (图 2A)。此外, 根据细胞生长曲线 (图 2B), Tet2^{-/-}MSC 细胞倍增时间 (32.8 h \pm 4.8 h) 明显低于 WT-MSC (49.4 h \pm 5.3 h), 且随着传代次数增加, 细胞倍增时间并不发生改变 (图 2C)。上述结果提示 Tet2^{-/-}MSC 增殖能力明显强于 WT-MSC。

2.3 Tet2 敲除的骨髓 MSC 在多次传代后仍然有很强的造血支持作用

为了评估 Tet2 基因是否影响 MSC 支持造血

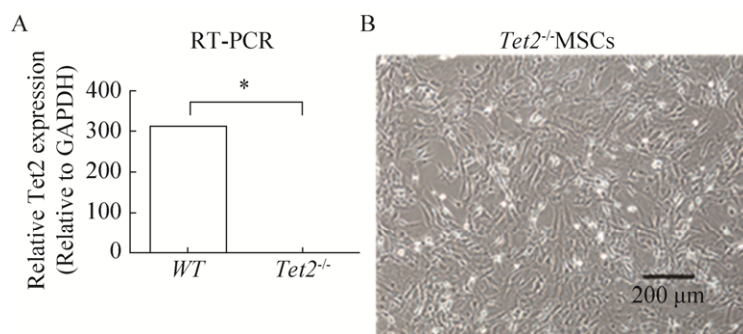


图 1 *Tet2* 缺失的骨髓 MSC

Fig. 1 *Tet2*^{-/-} MSC from BM. (A) Relative expression of *Tet2* in *Tet2*^{-/-} MSC. (B) *Tet2*^{-/-} MSCs are spindle shaped, with rich cytoplasm, fine chromatin and obvious nucleolus.

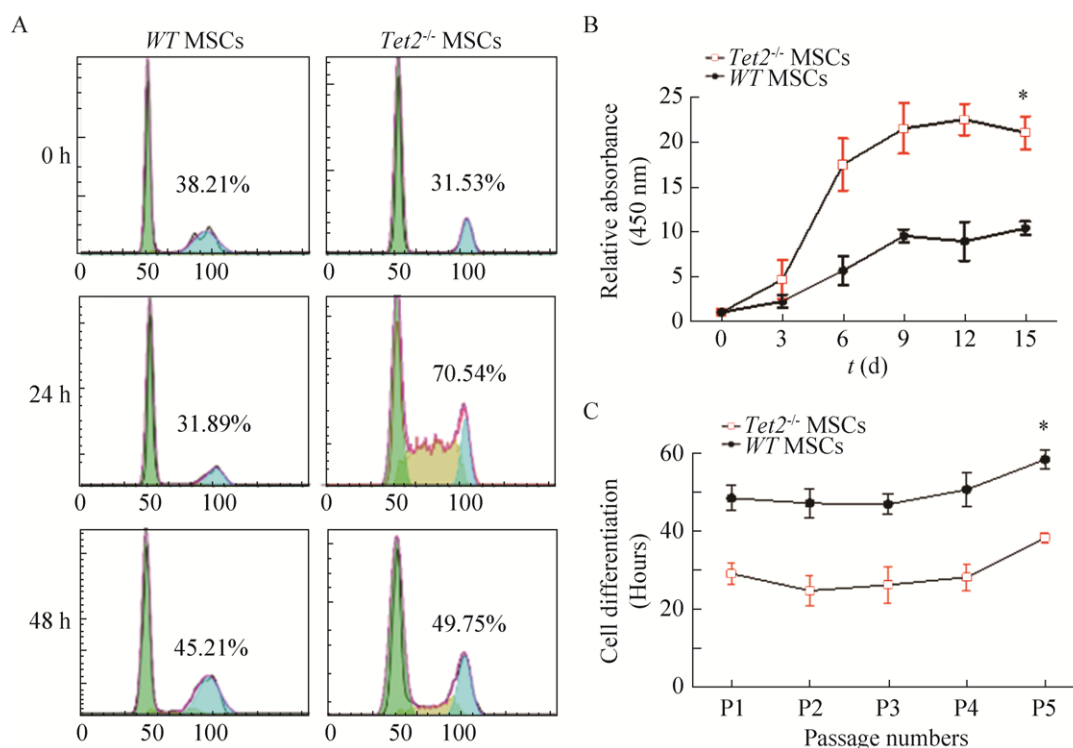


图 2 *Tet2* 缺失导致 MSC 增殖能力的加快

Fig. 2 *Tet2*^{-/-} deletion increased MSCs proliferation. (A) Cell cycle study with PI staining. (B) Cell growth curve. (C) The amplification time of MSCs with different passages. * $P < 0.05$.

的能力,骨髓造血祖细胞被接种于照射过的 *Tet2*^{-/-} MSC 和 WT-MSC 中,在长期骨髓培养基中培养 4 周后检测鹅卵石区形成细胞 (Cobblestone area forming cell, CAFC) 的生成情况。如图 3 所示, *Tet2*^{-/-} MSC 和 WT-MSC 具有支持造血干细胞克隆形成能力(CAFC),但是 *Tet2*^{-/-} MSC 支持

CAFC 的能力明显优于 WT-MSC ($P \leq 0.01$) (图 3A,C,D)。将 CAFC 进行集落培养,培养一周后发现粒系集落生成单位 (CFU-GM) 在 *Tet2*^{-/-} MSC 组的数量要明显高于 WT MSC ($P \leq 0.01$) (图 3B)。MSC 支持造血能力随着细胞传代并不发生改变。上述结果提示 *Tet2*^{-/-} MSC 支持造血能力增强。

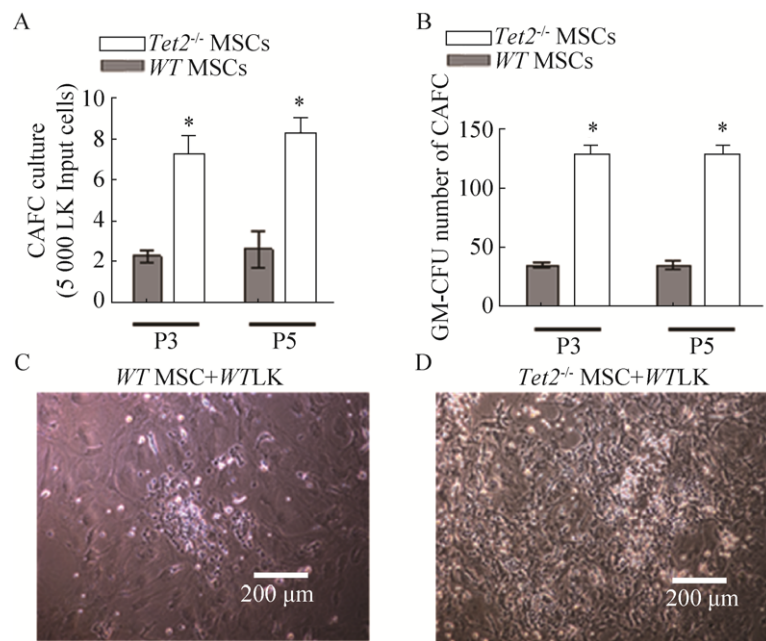


图3 *Tet2* 敲除导致 MSC 支持造血能力的增强

Fig. 3 *Tet2*^{-/-} deletion enhances the ability of MSC to support LK cells proliferation. (A) CAFC assay was used to test the ability of *Tet2*^{-/-} MSC to support LK cells proliferation. (B) CFC assay was used to test the differentiation of LK cells after treatment of *Tet2*^{-/-} MSC. (C, D) Representative graphs of CAFC. * *P*<0.05.

2.4 *Tet2* 敲除导致骨髓 MSC 甲基化水平增加

为了检测 *Tet2* 基因是否影响 MSC 的甲基化状态, 我们应用点杂交和甲基化测序检测 *Tet2*^{-/-}

MSC 和 WT-MSC 的甲基化状态。点杂交结果显示, 同 WT-MSC 相比, *Tet2*^{-/-} MSC 全基因组中 5mc 明显增加, 而 5hmc 明显减低 (图 4A)。甲基化测

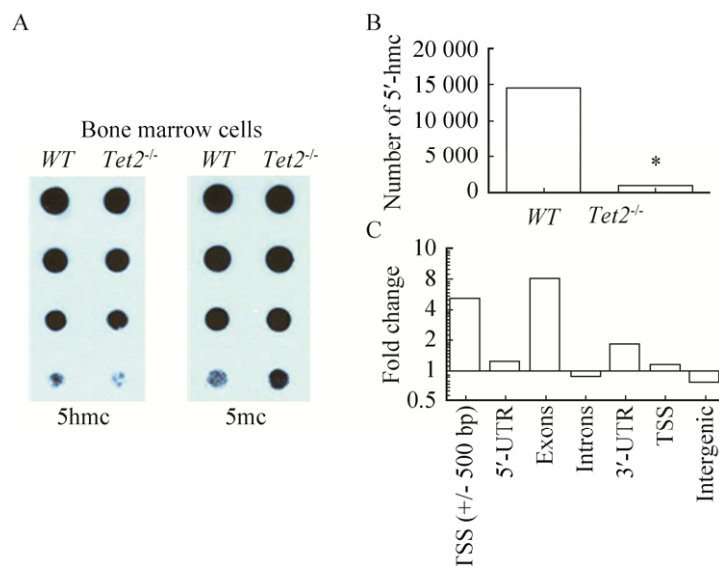


图4 *Tet2* 敲除导致骨髓细胞甲基化水平升高

Fig. 4 *Tet2*^{-/-} deletion increases the methylation level of bone marrow (BM). (A) Genomic DNA was extracted from BM cells of WT or *Tet2*^{-/-} mice and blotted onto nitrocellulose membrane after 2-fold serial dilution. 5hmc and 5mc levels were detected with an anti-5hmc (ActiveMotif, #39791) or 5mc (Calbiochem; NA#81) antibody. (B) Methylation-chip demonstrated that the methylation level was increased in *Tet2*^{-/-} BM cells. (C) Methylation level was increased in the transcriptional starting area (TSS), exons (EXONS) and 3' untranslated region (3' UTR) of *Tet2*^{-/-} BM cells. **P*<0.05.

序的结果进一步证实, *Tet2*^{-/-} MSC 全基因组中的 5hmc 数量明显低于 WT-MSC (图 4B)。随后的分析发现异常改变的 5hmc 主要分布于转录起始区 (TSS)、外显子区 (EXONS) 和 3'非翻译区 (3' UTR) (图 4C)。上述结果说明 *Tet2* 基因可以显著影响 MSC 全基因组的甲基化状态。

2.5 *Tet2* 异常的骨髓 MSC 分泌造血调控因子功能的改变

为了进一步明确 *Tet2*^{-/-} MSC 支持造血能力改变的原因, 我们通过细胞因子芯片方法发现, 许多常见的由 MSC 分泌的细胞因子(包括黏附分子和造血调控因子)在 *Tet2*^{-/-} MSC 的培养上清液中表达异常。其中, IL-16、IL-6、TREM1、TNF- α 、sICAM1、CXCL2、G-CSF 明显减低, 而 CCL5、GM-CSF、SDF1 和 CCL3 明显增加 (图 5)。上述结果提示 *Tet2* 基因影响 MSC 的关键细胞因子表达, 进而改变其造血支持功能。

3 讨论

正常造血依赖于复杂而完整的骨髓造血微环境, 骨髓微环境主要通过骨髓内细胞与细胞间的相互作用、基质细胞产生的生长或抑制因子以及细胞基质与造血细胞间的相互作用来调节造血功能^[18-19]。MSC 是一类具有自我更新和多向分化能力的多能干细胞。存在于骨髓中的 MSC 是骨髓基质细胞的前体细胞, 可形成骨髓和外膜间质细胞, 构成造血的微环境, MSC 分化形成的结缔组织骨架及该骨架产生的细胞因子、化学因子和 ECM 可调节造血细胞的归巢和增殖; MSC 还能够分泌多种造血因子, 表达多种表面粘附因子, 在造血调控的过程中发挥着重要作用^[19]。

DNA 甲基化是最常见的一种表观遗传学修饰, 广泛参与干细胞增殖、分化和转化相关的关键基因群的表达调控。既往研究证实 DNA 甲基化在造血干细胞(Hematopoietic stem cell, HSC)增殖和分化中发挥重要调控作用^[20-21]。但是,

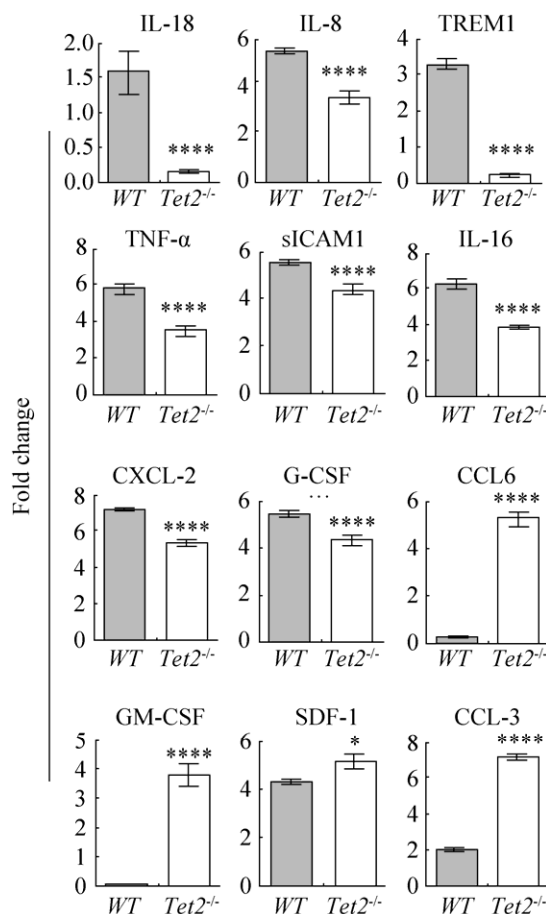


图 5 *Tet2* 敲除骨髓 MSC 分泌细胞因子能力改变

Fig. 5 The cytokine secreted by *Tet2*^{-/-} MSC is changed. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005, *****P*<0.001.

DNA 甲基化是否具有调控 MSC 生物学性状的能力, 目前尚不清楚。TET2 是目前发现最关键的 DNA 甲基化调控基因之一, 不仅具有调控 HSC 的功能, 还是关键的抑癌基因, 在血液系统肿瘤的发生中发挥作用^[22-23]。TET2 是调控 DNA 羟甲基化最重要的胞嘧啶甲基化双氧酶, TET2 能够将 5mc 转化成 5hmc。Li 等证实 *Tet2* 敲除的造血干祖细胞中 5mc 明显增加, 而 5hmc 相应降低^[21]。我们的研究发现: 同 WT-MSC 比较, *Tet2*^{-/-} MSC 全基因组中 5mc 明显增加, 而 5hmc 明显减低, 提示 *Tet2* 基因可以显著影响 MSC 全基因组的甲基化状态。骨髓 MSC 具有很强的增殖能力, 可以

有效在体外扩增获得细胞治疗需求的细胞量。既往研究发现关键基因的变化可以影响 MSC 的自我更新和增殖能力。Zhang 等的研究发现 *Asx1l* 敲除 MSC 的自我更新和体外增殖能力都明显下降^[24]。本研究中,我们发现,同 WT-MSC 比较, *Tet2*^{-/-} MSC 增殖能力明显增加,这种改变的增殖能力随着细胞传代并不发生改变。上述结果提示 *Tet2* 基因的异常可以显著改变 MSC 的生物学性状。

作为骨髓微环境中最重要的细胞群, MSC 通过和 HSC 的直接接触,激活和关闭调控 HSC 的诸多信号通路,发挥调控 HSC 的作用。此外, MSC 还能合成多种造血调节因子,发挥维持长期培养起始细胞的增殖、支持造血和促进造血恢复的作用,由此可见骨髓 MSC 可以通过模拟骨髓微环境发挥调控造血的功能。诸多外在因素(包括 HSC 和药物)可以影响骨髓 MSC 造血支持作用,重塑骨髓造血微环境,实现生理或者病理性造血调控。但是,表观遗传学相关基因是否具有调控 MSC 造血支持能力,目前尚不清楚。我们的研究通过骨髓长期培养和克隆生成实验,阐明 *Tet2*^{-/-} MSC 维持 HSC 能力明显强于 WT-MSC。进一步分析上述培养体系中 CFU-GM 的生成情况,结果表明 *Tet2*^{-/-} MSC 对定向祖细胞的增殖能力明显优于 WT-MSC。我们的结果说明, TET2 可以影响 MSC 对不同阶段造血干祖细胞增殖和分化能力的调节作用。

越来越多的研究证实 MSC 通过分泌多种细胞因子调控造血,促进骨髓来源的 CFU-GM、CFU-E 和 CFU-GEMM 的增殖。Zhang 等发现 *Tet2* 可以结合在 IL-6 启动子区, *Tet2* 缺失可以促进炎症反应中树突细胞和巨噬细胞 IL-6 的分泌^[25]。Greenbaum 等发现在 MSC 中敲除 *CXCL12* 可以导致骨髓 HSC 数量明显减低,并影响其造血重建和分化功能,提示 MSC 分泌的 *CXCL12* 在维持

正常 HSC 造血功能方面发挥重要作用^[26]。本研究通过细胞因子芯片方法证实多种细胞因子(包括黏附分子和造血调控因子)在 *Tet2*^{-/-} MSC 中异常表达。其中, IL16、IL6、TREM1、TNF- α 、sICAM1、CXCL2、G-CSF 明显减低;而 CCL5、GM-CSF、SDF1 和 CCL3 明显增加。提示 *Tet2* 通过影响 MSC 分泌异常的细胞因子,进而发挥调控造血的功能。

综上所述,我们的研究显示 *Tet2* 可以影响骨髓 MSC 基因组的甲基化状态,增加 MSC 体外增殖能力。此外, *Tet2* 影响 MSC 对不同阶段造血干祖细胞增殖和分化能力的调节作用,这种造血调控能力可能与细胞因子途径相关。

REFERENCES

- [1] Ziller MJ, Gu HC, Müller F, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 2013, 500(7463): 477–481.
- [2] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(8): 597–610.
- [3] Tahiliani M, Koh KP, Shen YH, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324(5929): 930–935.
- [4] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129–1133.
- [5] Guo JU, Su YJ, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 2011, 145(3): 423–434.
- [6] Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and *TET2* mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2009, 113(25): 6403–6410.
- [7] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant *TET2*. *Nature*, 2010, 468(7325): 839–843.
- [8] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al.

- Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 2009, 360(22): 2289–2301.
- [9] Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, et al. Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 160–169.
- [10] Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*, 2013, 121(12): 2186–2198.
- [11] Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*, 2010, 116(19): 3923–3932.
- [12] Song ZQ, Zhang QS. Design, synthesis, and incorporation of fluorous 5-methylcytosines into oligonucleotides. *J Org Chem*, 2011, 76(24): 10263–10268.
- [13] Song ZJ, Zhou RB, Li D, et al. Detection of *p16INK4a* promoter methylation status in non-small cell lung cancer by a fluorescence polarization assay. *Diagn Mol Pathol*, 2011, 20(3): 138–142.
- [14] Szulwach KE, Li XK, Li YJ, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 2011, 14(12): 1607–1616.
- [15] Szulwach KE, Li XK, Li YJ, et al. Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet*, 2011, 7(6): e1002154.
- [16] Yao LS, Li YY, Du FX, et al. Histone H4 Lys 20 methyltransferase SET8 promotes androgen receptor-mediated transcription activation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 692–696.
- [17] Yao B, Lin L, Street RC, et al. Genome-wide alteration of 5-hydroxymethylcytosine in a mouse model of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(4): 1095–1107.
- [18] Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med*, 2014, 20(8): 833–846.
- [19] Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche—home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(1): 7–20.
- [20] Pan F, Wingo TS, Zhao ZG, et al. *Tet2* loss leads to hypermutagenicity in haematopoietic stem/progenitor cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 15102.
- [21] Li Z, Cai XQ, Cai CL, et al. Deletion of *Tet2* in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*, 2011, 118(17): 4509–4518.
- [22] Zhao ZQ, Chen L, Dawlaty MM, et al. Combined loss of *Tet1* and *Tet2* promotes B cell, but not myeloid malignancies, in mice. *Cell Rep*, 2015, 13(8): 1692–1704.
- [23] Zhao Z, Chen S, Zhu X, et al. The catalytic activity of TET2 is essential for its myeloid malignancy-suppressive function in hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia*, 2016, 30(8): 1784–1788.
- [24] Zhang P, Xing CH, Rhodes SD, et al. Loss of *Asx1* alters self-renewal and cell fate of bone marrow stromal cells, leading to bohring-opitz-like syndrome in mice. *Stem Cell Rep*, 2016, 6(6): 914–925.
- [25] Zhang Q, Zhao K, Shen QC, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*, 2015, 525(7569): 389–393.
- [26] Greenbaum A, Hsu YMS, Day RB, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*, 2013, 495(7440): 227–230.

(本文责编 陈宏宇)