

# 增强子的鉴定及其在肿瘤研究中的应用

刘倩<sup>1</sup>, 李春燕<sup>1,2</sup>

1. 北京航空航天大学, 大数据精准医疗高精尖创新中心和医学科学与工程学院, 北京 100191

2. 工业和信息化部大数据精准医疗重点实验室(北京航空航天大学), 北京 100191

**摘要:** 增强子是一类增强靶基因转录活性的 DNA 顺式作用元件。但是增强子与靶基因的方向和距离不确定, 大大增加了研究增强子调控的靶基因及其作用机制的困难。已有大量研究显示, 增强子的突变或功能异常与疾病发生发展相关; 仅有少量研究报道增强子通过促进靶基因的表达, 引发癌症或产生抗药性。目前与癌症发生发展和在癌症治疗过程中抗药性产生相关的增强子尚未得到充分鉴定, 这些增强子的调控机制也未得到充分解析。本文对目前可在全基因组水平上预测和鉴定增强子以及解析增强子调控机制的方法进行总结和对比, 并对近几年增强子在肿瘤诊断、治疗和发生发展机制中的研究进展进行综述。期望本文为筛选与癌症发生发展相关的增强子和解析这些增强子的调控机制提供参考, 为提高癌症的诊断和制定癌症的治疗策略提供新的视角。

**关键词:** 增强子; 超级增强子; 鉴定; 肿瘤

## The identification of enhancers and its application in cancer studies

Qian Liu<sup>1</sup>, Chunyan Li<sup>1,2</sup>

1. Beijing Advanced Innovation Center for Big Data-Based Precision Medicine & School of Medical Sciences and Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

2. Key Laboratory of Big Data-Based Precision Medicine (Beihang University), Ministry of Industry and Information Technology, Beijing 100191, China

**Abstract:** Enhancers are a type of *cis*-acting DNA elements that enhance transcriptional activity of target genes. However, the uncertainty in the orientation and distance between enhancers and target genes could post significant difficulties in identifying the target genes and the regulatory mechanisms of the enhancers. Numerous studies have shown that the mutations and/or abnormalities in the functions of enhancers are associated with development of diseases. A few studies have reported that enhancers could activate cancer development or drug resistance by promoting the expression of target genes. At present, enhancers involved in carcinogenesis and drug resistance have not been fully identified, and the underlying mechanism are still largely unknown. This paper summarizes the main methods used in identifying and

收稿日期: 2020-04-09; 修回日期: 2020-07-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 31801094)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31801094)]

作者简介: 刘倩, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物医学工程。E-mail: ZY1910219@buaa.edu.cn

通讯作者: 李春燕, 博士, 特聘副研究员, 研究方向: 肿瘤基因组学。E-mail: lichunyan@buaa.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-097

网络出版时间: 2020/8/6 11:48:29

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200804.1614.002.html>

characterizing enhancers and analyzing the regulatory mechanism at the genome-wide level. It further reviews the recent research progress of enhancers in cancer diagnosis, treatment, and the underlying mechanism during carcinogenesis, thereby providing a reference for the screening of these enhancers involved in carcinogenesis and drug resistance and exploring their regulatory mechanisms of target genes. It also provides a new perspective for improving the diagnosis of cancer and insights for formulating cancer therapeutic strategies.

**Keywords:** enhancer; super enhancer; identification; cancer

增强子是一种通过与靶基因启动子相互作用来增强靶基因转录的 DNA 调控元件。增强子与调控的靶基因的位置不确定,有些位于靶基因的 5' 端,有些位于靶基因的 3' 端,甚至位于基因的内含子中。增强子与靶基因的距离也不确定,甚至远离靶基因达几 Mb 仍可增强靶基因的转录。猿猴空泡病毒 40 (simian virus 40, SV40) 的增强子与其早期启动子相距 3000 bp 以上,并且该增强子无论是在启动子上游还是下游均能对转录起增强作用。在小鼠(*Mus musculus*)肢芽组织中, *sonic hedgehog* (*shh*) 基因与增强子相距 1 Mb 以上,但是此增强子仍然可以通过促进 *shh* 的表达,参与器官的模式形成<sup>[1]</sup>。尽管在 DNA 序列上,增强子距离靶基因有很远的距离,但在染色质三维空间结构上,增强子区域和靶基因启动子区域形成三维环状结构(3D-loop)直接相互作用,促进靶基因的转录表达<sup>[1,2]</sup>。

2006 年,Chapel-Fernandes 等<sup>[3]</sup>发现人 *PSA* (prostate specific antigen) 增强子可以增强 *PSA* 启动子驱动的绿色荧光蛋白在前列腺癌中的表达。近年来,越来越多研究表明增强子通过增强启动子的转录活性,促进癌基因的转录表达<sup>[4]</sup>。癌基因的表达水平上调是肿瘤形成的重要机制,经过基因重组或基因突变的增强子,通常可促进癌基因的表达<sup>[5,6]</sup>。近年来,汤柳笛等<sup>[5]</sup>发现,在基因重组过程中增强子位置变化与肿瘤发生相关,基因重组使原本距癌基因较远的增强子出现在癌基因附近,进而增强子可以调控附近癌基因的表达<sup>[5]</sup>。2017 年,Abraham 等<sup>[6]</sup>发现插入突变的增强子在肿瘤发生中起着重要作用,并在致癌基因附近的增强子序列中发现了多种插入突变,如插

入突变造成调控原癌基因 *LMO2* (LIM only protein 2) 的活性增强子形成,使正常体细胞癌变为原发性白血病肿瘤细胞。因此,对增强子位置、活性及功能的鉴定对研究癌症的发生机制具有重要意义,可提供全新的癌症治疗策略。本文主要总结了增强子和超级增强子的特点、鉴定和预测调控机制的方法及其在肿瘤研究中的应用。

## 1 增强子及其特性

增强子最早被发现于 20 世纪 80 年代初期。1980 年, Grosschedl 等<sup>[7]</sup>发现位于组蛋白 *H2A* 基因转录起始位点上游大于 100 bp 处的一段 DNA 序列能促进 *H2A* 基因有效转录。1981 年, Benoist 等<sup>[8]</sup>在 *SV40* 早期基因的上游发现了首个增强子序列,该序列的缺失会使 *SV40* 基因的转录效率降低,将增强子序列反转后放置在 *SV40* 基因的下游依然可以增强转录,由此将这种不依赖位置和方向增强基因转录的顺式元件命名为增强子<sup>[9]</sup>。

随着增强子研究的深入,其作用特点以及生物学功能进一步被发现。近 40 年的研究证明增强子具有以下特征:(1)增强子是增强靶基因转录的顺式作用元件。但不能根据方向和距离预测增强子调控的靶基因,因为增强子可以位于靶基因的上游,也可位于下游,甚至可以位于基因内;而且两者的距离可远可近<sup>[10]</sup>。(2)增强子位于染色质开放区域。(3)增强子的活性与转录因子的结合、DNA 序列的甲基化修饰及核小体中组蛋白的修饰有关,如增强子与转录因子结合可促进基因的转录<sup>[10]</sup>;增强子 DNA 序列高甲基化会导致 eRNA 表达下降,相反,低甲基化可促进 eRNA 的表达<sup>[11]</sup>;

H3K4me1 (H3 lysine 4 monomethylation)修饰常常促进增强子序列转录表达, 而 H3K27me3 (H3 lysine 27 trimethylation)修饰会使增强子沉默无法转录表达; H3K27ac (H3 lysine 27 acetylation)修饰使增强子序列转录活跃<sup>[12,13]</sup>。(4)增强子区域需要和启动子区域形成三维环状结构直接相互作用才能发挥功能, 增强子和启动子的相互作用由多种蛋白介导, 如 Mediator 复合体和 cohesin 等<sup>[14,15]</sup>。

## 2 超级增强子及其特性

2013 年首个超级增强子(super enhancers, SEs)由美国怀特黑德生物医学研究所 Richard A. Young 实验室在胚胎干细胞中发现, 该实验室定义超级增强子是多个具有转录活性增强子串联而成的长约 8~20 kb 的片段, 可以强力驱动相关基因的表达<sup>[16]</sup>。与增强子相比, 超级增强子与重要转录因子的结合密度更高, 调控转录的强度和敏感度更高<sup>[17]</sup>。

随着对超级增强子研究的深入, 研究人员提出了一些更为明确、普遍的超级增强子特性。目前, 超级增强子区别于增强子的功能特性有: (1)超级增强子结合更多的转录因子以及转录辅助因子<sup>[14,15]</sup>; (2)超级增强子具有更多的转录活性相关组蛋白修饰, 如: H3K27ac 和 H3K4me1 修饰; (3)超级增强子的 DNA 序列具有较低的甲基化修饰<sup>[11]</sup>; (4)组成超级增强子的单个增强子同样具有增强子激活靶基因转录的功能<sup>[9]</sup>; (5)超级增强子活性对转录因子表达水平的变化更敏感<sup>[18]</sup>; (6)超级增强子驱动基因表达量更高<sup>[9]</sup>。增强子与超级增强子结构特征和功能对比如图 1 所示。

## 3 增强子的研究方法

由于增强子多位于基因的非编码区, 不同增强子相对于靶基因的位置不固定, 而且增强子可能只在特定组织细胞或特殊生理情况下才具有活性<sup>[19]</sup>。因此, 增强子的发现和功能注释变得更为复杂和具有挑战性。比较基因组方法(comparative

genomics)和转录因子基序法(transcription factor motif matches)可以进行增强子的预测。在已知各物种基因组序列的前提下, 比较基因组法是通过不同物种基因组的比较, 进而发现在不同物种间高度保守的 DNA 序列。但与编码基因序列比较, 增强子的保守性较差, 因此基于保守性预测增强子的效率较低。转录因子基序法鉴定增强子的原理基于增强子中包含充当转录因子结合位点的 DNA 基序(一般只有 6~10 bp), 利用结合位点的保守性, 在全基因组范围搜索与已知转录因子基序匹配的序列。较短的 DNA 序列在整个基因组中出现的频率较高, 影响增强子鉴定的准确率<sup>[17]</sup>。此外, 通过保守的基因组和基序, 无法预测增强子的活性状态。因此需要新的方法进行增强子的预测和鉴定。随着高通量测序技术的快速发展, 在全基因组水平上研究增强子方法和工具呈现多样化, 如 ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation followed by sequencing)、DNase-Seq (DNase I hypersensitive sites sequencing)、ATAC-Seq (assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing)、RNA-Seq (RNA sequencing)、基因编辑(gene editing)技术、亚硫酸氢盐测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP)和染色质构象捕获(chromosome conformation capture, 3C)技术及其衍生技术, 如环形染色质构象捕获(circular chromosome conformation capture, 4C)、染色质构象捕获碳拷贝(chromosome conformation capture carbon copy, 5C)和高通量染色体构象捕获(high-through chromosome conformation capture, Hi-C)等。

### 3.1 基于 ChIP-Seq 技术鉴定增强子

1997 年, Orlando 等<sup>[20]</sup>创立了染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术, 该技术也称结合位点分析法, 其原理是在活细胞状态下用甲醛固定蛋白质-DNA 复合物, 然后利用抗原抗体免疫结合将含目的蛋白的复合物沉淀下来, 然后从中提取 DNA 进行 PCR 分析和序列测定, 从而获得与目的蛋白互作的 DNA 信息。ChIP 是在全基因组范围内检测 DNA 与蛋白质体

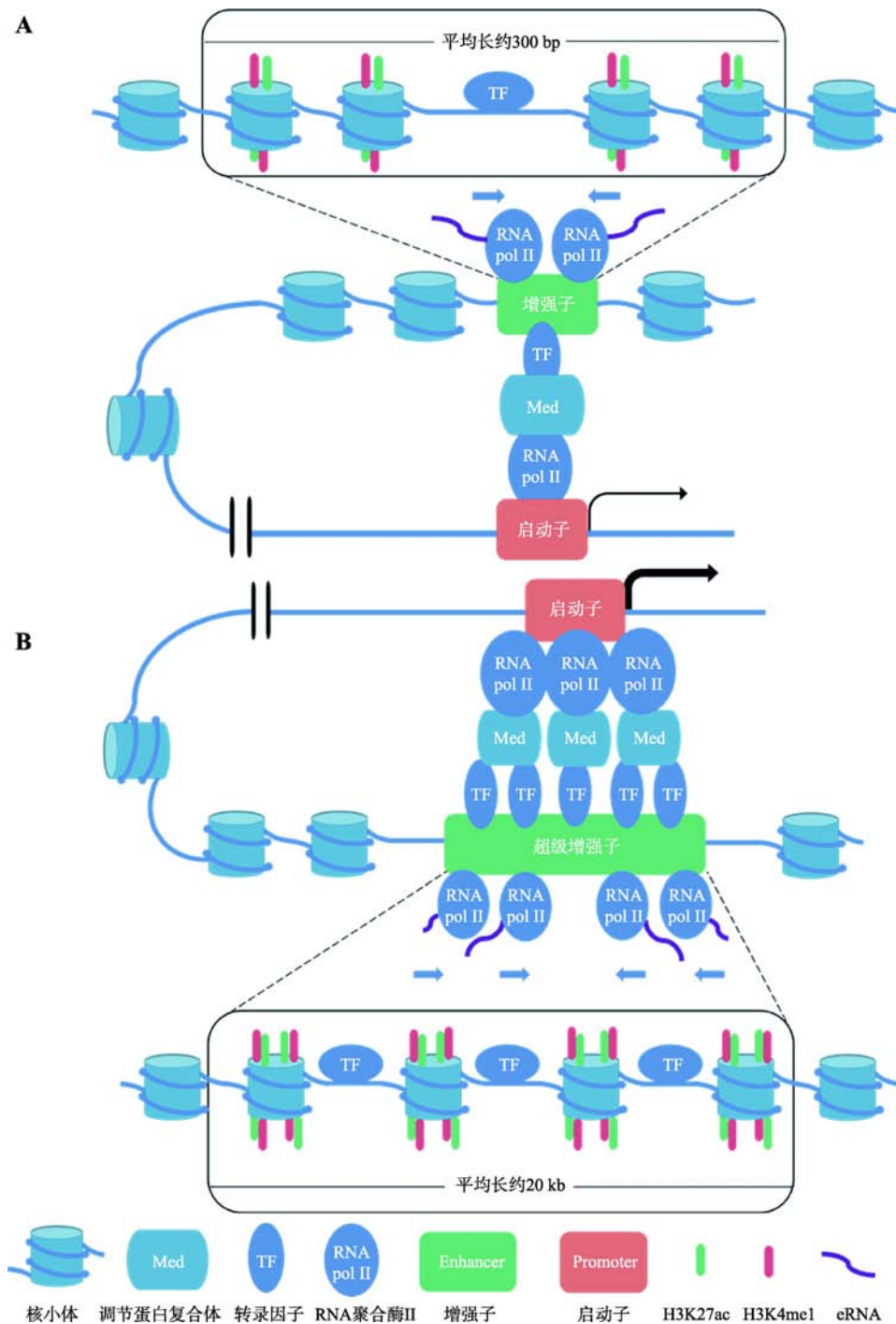


图 1 增强子与超级增强子的结构特征和功能

**Fig. 1 Structural features and functions of enhancers and super enhancers**

**A:** 增强子的结构特征和功能。增强子位于染色质疏松的区域, 平均长约 300 bp。增强子区域的组蛋白富集 H3K4me1 和 H3K27ac 修饰, 暴露的 DNA 序列招募并结合转录因子, 转录因子招募 Mediator 复合体介导增强子与 RNA 聚合酶 II 的相互作用。增强子在 RNA 聚合酶 II 的介导下双向转录 eRNA。增强子区域和启动子区域形成三维环状结构相互作用, 增强靶基因的转录水平。**B:** 超级增强子的结构特征与功能。超级增强子是由多个具有转录活性的增强子串联而成, 平均长约 20 kb。与增强子相比, 超级增强子区域组蛋白的 H3K4me1 和 H3K27ac 修饰更加富集, 暴露的 DNA 序列结合更多的转录因子, 转录因子招募更多的 Mediator 复合体介导增强子与 RNA 聚合酶 II 的相互作用。暴露的超级增强子序列通过结合 RNA 聚合酶 II 双向转录出超级增强子 RNA。超级增强子区域与启动子区域同样形成三维环状结构相互作用, 但促进靶基因转录的效果更为显著(与 A 图比较, 启动子下游的线更粗)。



内相互作用的方法<sup>[21]</sup>。ChIP-Seq 技术是将 ChIP 技术与二代测序技术相结合在全基因组范围内分析蛋白质与 DNA 互作信息的方法。首先利用 ChIP 技术富集与目的蛋白特异性结合的 DNA 片段, 然后利用二代测序技术对 DNA 片段进行高通量测序, 从而在全基因组范围内获得与转录因子、辅助转录因子、或不同修饰的组蛋白结合的 DNA 信息。根据已知增强子的特征(特异性结合的转录因子和辅助转录因子或组蛋白修饰特征等), 可利用 ChIP-Seq 技术在全基因组范围内寻找转录因子和辅助转录因子结合位点、组蛋白修饰区段, 进而进行增强子的预测和鉴定<sup>[22]</sup>。

### 3.1.1 基于转录因子和转录辅助因子结合位点鉴定增强子

转录因子是可以直接结合在增强子的 DNA 序列上调控基因表达的蛋白质, 可利用 ChIP-Seq 技术在全基因组内寻找增强子 DNA 序列与转录因子(蛋白质)的结合位点进行增强子的预测。转录辅助因子由转录因子募集到结合位点行使生物学功能, 协助 RNA 聚合酶与靶基因启动子的结合, 促进增强子 RNA 的转录。因此, 也可利用 ChIP-Seq 技术检测辅助转录因子与 DNA 的结合位点, 从而对增强子进行预测。如广泛表达的通用辅助转录激活因子组蛋白乙酰转移酶 P300, 参与多种转录因子的转录调控<sup>[10]</sup>。Visel 等<sup>[23]</sup>曾在小鼠模型中进行转录辅助因子 P300 的 ChIP-Seq 实验, 发现数千个 P300 结合位点, 然后通过转基因技术在小鼠体内进行验证, 结果表明绝大部分预测的结合位点都显示了增强子的调控活性。基因组上增强子与转录因子和转录辅助因子的结合机制为增强子的鉴定提供了可行方法。

### 3.1.2 基于组蛋白修饰鉴定增强子

缠绕在组蛋白上的 DNA 处于高度压缩状态, 基因很难表达, 为了提高基因的表达, 需要改变 DNA 与组蛋白的紧密结合程度。组蛋白修饰是表观遗传学的重要部分, 组蛋白修饰的改变可导致组蛋白与 DNA 结合程度的改变, 从而实现表观修

饰对基因表达的调控作用。组蛋白修饰主要包括甲基化、磷酸化、乙酰化和泛素化。目前, 关于增强子研究较多的组蛋白修饰是组蛋白甲基化和乙酰化。不同的组蛋白甲基化修饰可能会激活也可能抑制增强子的转录表达, 如 H3K4me1 修饰会促进增强子转录, 而 H3K27me3 修饰会抑制增强子转录。组蛋白乙酰化修饰可以减弱增强子 DNA 序列与组蛋白的结合程度, 让部分 DNA 序列暴露, 进而可以与转录因子结合促进增强子转录表达, 如 H3K27ac 修饰使增强子序列转录活跃; 相反, 组蛋白去乙酰化会使增强子 DNA 序列与组蛋白的结合更加紧密, 抑制增强子的转录表达<sup>[24]</sup>。目前 H3K4me1 和 H3K27ac 常用来作为鉴定增强子的组蛋白修饰特征。

Nathaniel 等<sup>[25]</sup>利用 ChIP-Seq 技术在人类基因组中发现高密度的 H3K4me1 修饰存在于活性增强子区域<sup>[25]</sup>。研究者发现 H3K27ac 修饰是区分活性增强子和非活性增强子的重要标记, 非活性增强子只存在 H3K4me1 的修饰; 而活性增强子存在 H3K4me1、H3K27ac 等的修饰, 位于转录基因的近端; 存在 H3K27me3 和 H3K4me1 修饰却不存在 H3K27ac 修饰, 不参与基因的转录的增强子为平衡增强子<sup>[26,27]</sup>。此外, 有活性的增强子可以有多种组蛋白修饰方式, 如 H3K79me3 (H3 lysine 79 trimethylation)、H4K16ac (H3 lysine 16 acetylation) 和 H3K122ac (H3 lysine 122 acetylation) 修饰等<sup>[27-29]</sup>。因此, 利用 ChIP-Seq 技术在全基因组水平寻找富集多种不同的组蛋白修饰的位点进行增强子预测和活性鉴定。

## 3.2 基于 DNA 甲基化检测技术鉴定有活性的增强子

DNA 甲基化(DNA methylation)是指在 DNA 甲基转移酶的催化下 DNA 序列特定碱基共价结合一个甲基基团, DNA 甲基化通常发生在 CpG (胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤)位点, 胞嘧啶在 DNA 甲基转移酶的催化下结合一个甲基基团转化为 5-甲基胞嘧啶。通过增强子 DNA 甲基化修饰, 可以在不改变增强子 DNA 序列的情况下影响增强子的活

性。增强子 DNA 序列高甲基化会导致 eRNA 表达下降,相反,低甲基化可促进 eRNA 的表达,因此,增强子序列 CpG 位点的甲基化成为增强子活性预测的标志物<sup>[30,31]</sup>。

常用的 DNA 甲基化检测方法为 BSP 直接测序法,首先用重亚硫酸氢盐处理 DNA,然后设计引物进行 PCR 扩增,直接对 PCR 产物测序进而判断 CpG 位点是否甲基化<sup>[32]</sup>。增强子序列的甲基化水平与增强子的转录活性成反比,通过 BSP 直接测序法检测已知增强子序列 CpG 位点是否甲基化,进而预测增强子的活性。

### 3.3 基于 DNase-Seq、ATAC-Seq、RNA-Seq 技术鉴定有活性的增强子

核小体是由 DNA 和组蛋白形成的染色质基本结构单位,一连串的核小体呈螺旋状排列构成染色质。常染色质状态下的 DNA 压缩包装比约为 1000,在细胞有丝分裂前期染色质高度螺旋化成为染色体,此染色体状态下的 DNA 压缩包装比最高可达 8400,染色体长度约为伸展状态的万分之一,核小体的高度压缩使 DNA 序列不被暴露。非活性增强子通常由未修饰的核小体紧密包裹,因此它不能与转录因子或聚合酶结合。当增强子被激活时,它的局部染色质首先被修饰(如 H3K4me1)变得松散,可以与转录因子和 RNA 聚合酶结合<sup>[10,33]</sup>。

当增强子与一些转录因子如 CBP(CREB-binding protein)结合,被充分激活,增强子将去除核小体结构,局部染色质完全开放,使其具有可接近性(亦称为染色质可及性,chromatin accessibility)。可以利用脱氧核糖核酸酶 I 超敏位点测序(DNase-Seq)技术或 ATAC-Seq 技术检测染色质开放区域。DNase-Seq 技术利用脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)识别并切割染色质开放区域的 DNA 片段,然后对切出的 DNA 片段测序,与已知基因组序列进行比对,在全基因组范围内确定染色质开放的区域<sup>[33]</sup>。ATAC-Seq 技术利用 Tn5 转座酶将已知序列标签插入到染色质开放区域,利用已知序列标签进行测序,捕获全基因组范围内完整的染色质开放区域。与 DNase-Seq 相比,ATAC-Seq

不仅操作简单、可重复性强,并且可以在全基因组范围内捕获完整的染色质开放区域<sup>[33]</sup>。由于增强子位于染色质开放区域,利用 DNase-Seq 或 ATAC-Seq 在全基因组范围内检测染色质开放区域,可进行增强子的预测。

当增强子区域与 RNA 聚合酶结合启动转录,转录出增强子 RNA。通过检测增强子表达出的 eRNAs (如通过分析 RNA-Seq 数据),鉴定增强子的活性。Kim 等<sup>[34]</sup>通过 RNA-Seq 数据分析,在神经元细胞中发现了活跃增强子的广泛转录模式。2018 年,Chen 等<sup>[35]</sup>利用 TCGA 的 RNA-Seq 数据对 33 种癌症类型近 9000 例癌症患者样本中的增强子表达进行系统分析,发现癌症中广泛存在已激活的增强子。2019 年,美国德州大学健康科学中心韩冷实验室利用 RNA-Seq 技术在全基因组范围内鉴定了 9108 种人类癌症中可检测到的 eRNAs,构建了目前最完整的癌症 eRNA 图谱,充分展现了癌症中活性增强子的分布<sup>[36]</sup>。利用 RNA-Seq 在全基因组范围内检测 eRNA 的表达,判断已知增强子的转录活性。

### 3.4 基于基因编辑技术研究增强子

基因编辑技术可以在活细胞内对增强子进行靶向插入、敲除或修饰,进而探究增强子的功能和作用机制。基因编辑技术主要通过基因工程改造的核酸酶在基因组特定位点进行切割,使 DNA 双链断裂,通过同源重组(homologous recombination, HR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)进行修复,从而导致基因的插入、删除或替换。基因编辑技术包括 ZFN (zinc finger nucleases)技术、TALEN (transcription activator-like effector nucleases)技术以及 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术。与 CRISPR 相比,ZFN 操作繁琐、价格昂贵,而 TALEN 的基因切割效率较低,因此 CRISPR 的应用更为广泛<sup>[37]</sup>。利用 CRISPR 靶向识别切割基因的特性对增强子的活性进行靶向调控,进而研究增强子的功能。研究者基于 CRISPR 开发出 CRISPR-Cas (CRISPR-associated)系统,融合了向

导 RNA (guide RNA, gRNA), 提高了基因编辑的靶向性和精确度, 含有 Cas9 蛋白的 CRISPR-Cas9 在基因编辑中使用较为广泛。在 CRISPR-Cas9 系统的基础上开发出 CRISPR-dCas9 (nuclease-deficient cas9, dCas9) 系统, dCas9 蛋白与效应器融合可以特定位点进行基因调控且不损伤 DNA<sup>[4,38]</sup>。下面将分别列举 CRISPR-Cas9 和 CRISPR-dCas9 这两个工具在增强子功能研究中的应用。

### 3.4.1 CRISPR-Cas9 系统在增强子研究中的应用

目前最常用的基因编辑工具是 CRISPR-Cas9, Cas9 核酸内切酶与 gRNA 融合, gRNA 可将 Cas9 蛋白靶向到目标位点进行切割<sup>[4]</sup>。基于基因编辑技术构建靶向人增强子关键区的 CRISPR-Cas9 重组质粒, 可实现目标增强子序列的定向敲除, 便于增强子功能的预测和深入研究。郭晓龙等<sup>[37]</sup>人利用该技术构建靶向人 *ezrin* 增强子的 CRISPR-Cas9 载体并检测其基因敲除功能。该实验室设计了 2 个 gRNA 靶位点, 分别靶向人 *ezrin* 增强子关

键区的上、下游, 并对食管癌 EC109 细胞进行传代培养, 在 CRISPR-Cas9 重组质粒瞬时转染至食管癌 EC109 细胞群 48h 后, 提取细胞基因组 DNA, 进行 PCR 扩增和亚克隆测序分析。结果表明, CRISPR-Cas9 重组质粒构建正确, 在共转染重组质粒的细胞基因组 DNA 中检测到 *ezrin* 增强子关键区的缺失, *ezrin* 增强子的缺失会抑制癌细胞的增殖和迁移, 进而为食管癌的治疗提供新的靶点 (图 2, 黑色框所示)。莫文慧等<sup>[39]</sup>发现前列腺癌的独立风险因子位于一个增强子内部, 并且该增强子与 *HOXA* 基因存在相互作用。为研究该增强子的功能, 利用 CRISPR-Cas9 技术敲除该增强子, 结果显示癌细胞的增殖和迁移能力降低, 该增强子的缺失可以抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移 (图 2, 黑色框所示)。张晓燕等<sup>[40]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术敲除肺癌细胞中位于 *MYC* 基因 3' 端下游约 450 kb 的增强子, *MYC* 基因表达降低, 癌细胞的增殖和迁移能力降低。各种调控癌基因表达的增强子成为肿瘤治疗的新靶点。

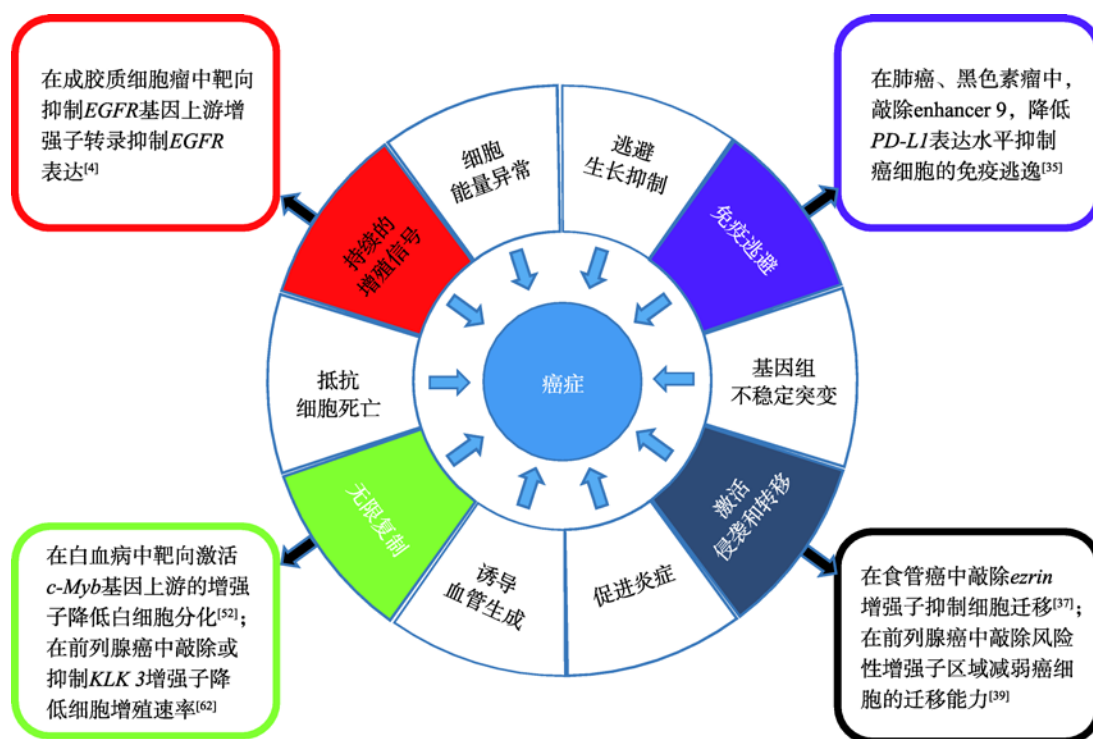


图 2 增强子对不同标志肿瘤的治疗应用

Fig. 2 Application of enhancers in the treatment of tumors with different hallmarks

癌细胞的 10 大标志性特征如饼图所示; 针对癌细胞的某标志性特征, 与增强子相关的治疗方法分别列举在外围的 4 个方框中。



### 3.4.2 CRISPR-dCas9 系统在增强子研究中的应用

CRISPR-dCas9 系统是在 CRISPR-Cas9 的基础上对 Cas9 蛋白进行改造,使其失去内切酶活性,从而成为 dCas9 蛋白。在 gRNA 的引导下,dCas9 蛋白只结合到目标序列上并不进行切割<sup>[41]</sup>。Qi 等<sup>[42]</sup>利用 CRISPR-dCas9 系统,将抑制因子或激活因子与 dCas9 融合,靶向调控特定增强子的活性,调节相关靶基因的表达。抑制因子与 dCas9 融合后可抑制目标基因的转录,目前最常用的抑制因子是 KRAB (kruppel-associated box, KRAB),KRAB 通过组蛋白甲基化和去乙酰化修饰招募抑制转录的辅助因子,抑制基因的转录表达<sup>[41,43]</sup>。

Gilbert 等<sup>[4]</sup>利用 dCas9-KRAB 靶向已知的 *EGFR* 增强子,抑制增强子对 *EGFR* 基因转录的调控作用(图 2, 红色框所示)。dCas9-KRAB 可通过靶向增强子来抑制其表达,而激活因子 VP64 和 P300 融合到 dCas9 中可增加目标基因的表达。Gao 等<sup>[44]</sup>将 VP64 与 dCas9 蛋白融合,靶向激活远端增强子,增强子被激活表现出增强转录的功能<sup>[44]</sup>。徐丽等<sup>[45]</sup>将 P300 与 dCas9 融合,通过组蛋白乙酰化来招募促进转录的转录因子,靶向激活增强子的活性。利用 CRISPR-dCas9 系统靶向增强或抑制增强子进而影响靶基因的表达,该系统常用于已知增强子的功能研究。表 1 为研究增强子的常用方法描述及其优缺点总结。

表 1 增强子预测和功能解析的常用方法

Table 1 Common methods for the prediction and functional analysis of enhancers

方法	描述	优势	局限性
ChIP-Seq	一种将染色质免疫沉淀与高通量测序技术相结合所产生的技术	高分辨率、低噪、高覆盖率、样本需求较少	与 ChIP 芯片技术相比成本较高,数据质量依赖抗体质量
DNase-Seq	一种结合高通量测序技术鉴定全基因组内 DNase I 超敏位点的方法,进行全基因组假定增强子等调控区域的预测	提供的信息比 ChIP-Seq,更广泛	样本需求较大,重复性较差;DNase I 对 DNA 的切割具有序列依赖性,测序误差较大;不能保证切割后的结果,就完全是蛋白质覆盖的区域
ATAC-Seq	利用转座酶研究染色质可进入性的高通量测序技术,利用 DNA 转座酶技术实现染色质可及性分析	样本需求量少,灵敏度高,操作简单,耗时短,实验重复性好,能同时揭示开放染色质的基因组位置,DNA 结合蛋白,转录结合位点的相互作用	有一半 DNA 片段无法利用,无法进行 PCR 富集,DNA 剪切效果仍需优化
RNA-Seq	一种全基因组水平的基因表达差异研究,用于分析基因表达水平以了解细胞在不同状态下的基因表达差异	高通量,高灵敏度,可重复性高,检测范围广	检测细胞内累积的 RNA,包括来自核糖体线粒体的 RNA,影响 RNA 表达水平的准确性
3C	一种结合免疫共沉淀和 PCR 扩增研究两个位点之间的相互作用的技术	—	覆盖范围通常小于 1 Mb;只能研究点对点的互作方式
4C	在全基因组范围研究一个特定基因与所有互作基因之间的相互作用的高通量测序技术	覆盖全基因组范围	只能研究与一个特定基因互作的所有基因
5C	研究多基因与多基因之间的相互作用高通量测序技术	可以研究多个位点与其相互作用的所有位点之间的相互作用	覆盖范围有限,通常小于 1 Mb
Hi-C	在全基因组范围研究所有染色体和染色体外的相互作用的高通量测序技术	覆盖全基因组范围,操作时间短,花费少	分辨率低,噪声高
ChIA-PET	一种整合了免疫共沉淀、染色质交联、双末端标签及高通量测序的技术,可以在全基因组范围研究染色质的相互作用	能够确定蛋白质结合位点间的相互作用;使用超声打断 DNA-蛋白质复合物,避免使用限制性内切酶引入染色质随机连接	无法检测出不依赖蛋白质因子的染色体相互作用;抗体的纯度、质量、特异性要求较高
CRISPR	将 Cas9 核酸酶与向导 RNA(gRNA)结合,可在基因组的特定位点切割,从而实现基因的移除、添加或替换	在内源性环境中研究增强子,对靶向位点进行修饰,操作简单、快速	易脱靶,有效切割效率低



## 4 超级增强子的研究方法

超级增强子是由多个具有转录活性的增强子串联而成, 超级增强子的预测和功能鉴定是在已鉴定出的活性增强子基础上进行的(第3节为增强子的预测和功能鉴定方法)。与增强子相比, 超级增强子序列结合更多的转录因子、辅助转录因子和RNA聚合酶II, 同时也有更高的转录活性, 转录出更多的eRNA(图1所示)<sup>[17]</sup>。结合超级增强子的上述特征, 在增强子基础上进一步鉴定出超级增强子。目前超级增强子的预测和鉴定是借助ChIP-Seq技术和RNA-Seq技术基于转录因子和辅助转录因子的结合特征、组蛋白修饰特征及eRNA的转录水平进行的<sup>[17]</sup>。

与增强子相比, 超级增强子与转录因子和辅助转录因子的结合密度更高、组蛋白修饰也更加富集。因此可以借助ChIP-Seq技术在全基因组范围内鉴定出与转录因子或辅助转录因子结合或具有特定组蛋白修饰的增强子, 再进一步根据转录因子和辅助转录因子的结合密度或组蛋白修饰的富集程度, 筛选和鉴定出超级增强子<sup>[13,17,46]</sup>。Whyte等<sup>[16]</sup>利用ChIP-Seq技术在小鼠胚胎细胞中检测出8000多个增强子, 发现其中231增强子的转录辅助因子结合密度远高于其余增强子, 故将这些增强子命名为超级增强子。

此外, 与增强子相比, 超级增强子序列结合更多的RNA聚合酶II, 因此超级增强子转录出的eRNA的水平更高。在已知的活性增强子基础上, 利用RNA-Seq技术检测活性增强子的eRNA转录水平, 进而判断该活性增强是否为超级增强子<sup>[17]</sup>。

## 5 增强子的应用方向

### 5.1 增强子在肿瘤诊断治疗上的应用潜力

肿瘤诊断是肿瘤治疗的前提, 传统的癌症诊断依赖于影像学检查或活体组织检查(活检)。但是目前影像学检查的分辨率需要进一步提高; 由于肿瘤有很强的异质性, 活检组织的代表性越来越

受质疑<sup>[47]</sup>。为了实现肿瘤的早期诊断, 同时提高诊断的特异性和代表性, 肿瘤的液体活检技术日益兴起, 如血浆中循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)的检测<sup>[31,48]</sup>。通过测序分析cfDNA中的增强子, 根据增强子的肿瘤特异性诊断出癌基因的来源, 肿瘤的早期诊断为肿瘤治疗提供了更大的成功率<sup>[48-50]</sup>。

癌细胞内的增强子通过与启动子相互作用促进癌基因的转录表达, 进而导致肿瘤的发生, 增强子的活性可以影响相关癌基因的表达。研究表明, 免疫逃逸是肿瘤发生发展的重要机制。在肺癌和黑色素瘤中, PD-1/PD-L1通路的激活在肿瘤免疫逃逸过程中起着关键作用, T细胞表面的PD-1(programmed cell death-1, 程序性死亡受体-1)与肿瘤细胞表面的PD-L1(programmed cell death 1 ligand 1, 程序性死亡配体1)结合后传递抑制性信号, T细胞的增殖和活化受到阻碍, 从而促进肿瘤细胞的免疫逃逸。抑制肿瘤细胞PD-L1的表达有利于进一步阻断PD-1/PD-L1信号通路的活化, 使免疫治疗效果得以改善, 因此, PD-L1成为了免疫治疗的主要靶点<sup>[51]</sup>。Chen等<sup>[35]</sup>利用TCGA的RNA-Seq数据对多种肿瘤样本分析发现, PD-L1 mRNA水平与PD-L1下游140 kb的增强子有很强的共表达关系。通过对Hi-C数据的再分析, 进一步证实了增强子直接结合到PD-L1的下游。ChIP-Seq数据显示NF- $\kappa$ B结合在该增强子以及PD-L1启动子的p65结合基序上, 表明NF- $\kappa$ B参与增强子与PD-L1的相互作用。利用CRISPR-Cas9技术敲除此增强子后, PD-L1在mRNA和蛋白水平上的表达均显著降低, 并且很大程度上抑制了NF- $\kappa$ B对PD-L1表达的诱导效应, 癌细胞免疫逃逸得到有效抑制(图2, 紫色框所示)。这是一个增强子-启动子相互作用的模型, 表明增强子还可作为预测癌症治疗反应的标志物。

c-Myb是造血过程中重要的转录因子, 在造血祖细胞中c-Myb表达量很高, 但随着细胞分化, c-Myb表达量会逐渐降低甚至不表达。c-Myb的异常表达会引发各种癌症, 如白血病, 乳腺癌, 结肠癌。为研究c-Myb基因表达的调控机制, 陈

连香等<sup>[52]</sup>使用 4C 技术在人的白血病细胞系 K562 中发现, 在 *c-Myb* 基因的上游有两个远端增强子与启动子互作较强。为进一步验证增强子的功能, 利用 dCas9-P300 靶向激活增强子, 发现 *c-Myb* 基因的表达增强, 在一定程度上降低了 k562 细胞的分化, 通过验证两个上游增强子对 *c-Myb* 的影响从而为白血病的治疗提供了一个新的突破点(图 2, 绿色框所示)<sup>[52]</sup>。此外, 还有一些增强子用于肿瘤特异性治疗研究, 如在结肠癌细胞中敲除位于 *MYC* 基因上游 335 kb 处的肿瘤特异性增强子, 癌细胞的生长和增殖受到抑制, 而对正常肠道细胞没有任何影响<sup>[53]</sup>; 在急性 T 淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)的癌细胞中敲除位于 *TALI* (T-cell acute lymphocytic leukemia 1)基因上游 8 kb 处的癌症特异性增强子的缺失, 导致 *TALI* 基因沉默进而癌细胞存活率降低<sup>[54]</sup>等。增强子的敲除可以使用 CRISPR-Cas9 技术, 对增强子的抑制不仅可以使用 CRISPR-dCas9 技术, 还可以利用化合物干扰转录因子与增强子的结合, 进而达到抑制增强子的目的, 如通过构建 HBV (hepatitis B virus)人工转录因子靶向抑制 HBV 增强子活性<sup>[55]</sup>。

近年来研究发现, 癌基因的高倍数扩增多发生于大规模 DNA 重组, 在重组过程中发生的调控元件位置变化与肿瘤发生发展相关。这类重组包括了一种以染色体外环状 DNA (extrachromosomal circular DNA, eccDNA)形式存在的特殊扩增体<sup>[56,57]</sup>。近年来研究表明, eccDNA 几乎不存在于正常细胞中, 而存在于近一半的人类癌症细胞中, 且其富集处癌基因扩增明显, 表明了这类 DNA 对于肿瘤细胞进化可能存在的重要意义<sup>[58]</sup>。2019 年 Mischel 等<sup>[59]</sup>研究发现, 在人类肿瘤细胞中发现的大量 eccDNA, eccDNA 内癌基因与增强子空间位置的变化, 改变了癌基因的表达方式, 从而促进了癌细胞的侵袭性, 并在肿瘤快速进化和抵御威胁的能力(如化疗、放疗和其他治疗)中发挥了关键作用<sup>[59]</sup>。同年, Morton 等<sup>[60]</sup>发现癌基因及其邻近增强子通过 eccDNA 的形式进行扩增从而增强已有联系或建立新的联系、促进癌症发展

的全新分子机制。他们发现在非 *EGFR* 扩增的肿瘤细胞中, *EGFR* 启动子仅与其上游的两个染色体增强子具有显著联系; 而在 *EGFR* 扩增的肿瘤细胞中, *EGFR* 启动子尽管仍保持了与其上游两个增强子的联系, 但同时也获得了大量新的互作对象。包括两个上游邻近增强子在内的多个于扩增后新获得的互作增强子都具有对 *EGFR* 扩增肿瘤细胞活性很强的正向效应。该研究表明增强子在由癌基因环化扩增介导的促癌效应中所发挥的重要作用, 展现了超越通常规定的基因边界的基因调控网络。环状染色体外 DNA 上增强子新的互作模式为癌基因的高倍数扩增提供了依据, 也为肿瘤的有效抑制提供新的方向。

Hanahan 等<sup>[61]</sup>总结了目前癌细胞的十大标志性特征, 如持续不断的增殖信号、逃避生长抑制因子、逃避免疫破坏、遗传信息的持续复制、促进新血管生成、基因组的不稳定性、抵抗细胞死亡、激活入侵和转移等。针对部分癌细胞的标志性特征, 已有增强子相关的对应治疗方法(图 2)。

## 5.2 eRNA 在肿瘤诊断治疗上的应用潜力

eRNA 在调控多种肿瘤信号通路中起着重要作用, 介导靶基因的激活, 调节基因表达。*KLK3*-eRNA (kallikrein related peptidase 3, *KLK3*)是人类前列腺癌激肽释放酶 3 (*KLK3*)的增强子区域转录生成的, 抑制 *KLK3*-eRNA 的合成可下调 *KLK3* 基因的表达, 降低前列腺癌细胞增殖速率(图 2, 绿色框所示)<sup>[62]</sup>。因此, 可通过分析肿瘤相关 eRNAs 来评价肿瘤的治疗效果。

2019 年, Zhang 等<sup>[36]</sup>鉴定了 9108 种人类癌症中可检测到的 eRNAs, 并将这些可检测的 eRNAs 分为 3 组: 652 个普遍存在的 eRNAs(在 10 种以上的癌症类型中表达); 3124 个中间特异性 eRNAs(在 2~9 种癌症类型中表达); 5332 个癌症特异性 eRNAs (只在一种癌症类型中表达)。表明大量 eRNAs 可能在特定的特异性癌症类型中具有生物标记作用。研究者通过分析癌细胞系的 eRNAs 表达水平与抗癌药物敏感性之间的相关性, 发现无论是在直接目标通路内还是间接交叉通路, eRNAs

和抗癌药物之间都有很强的相关性<sup>[36]</sup>。

### 5.3 超级增强子在肿瘤研究中的进展

#### 5.3.1 超级增强子与肿瘤的关系

近年研究发现, 超级增强子所驱动的正常基因转录对维持肿瘤细胞特性至关重要。2013年美国怀特黑德生物医学研究所 Richard A. Young 实验室首次在多发性骨髓瘤细胞中发现了超级增强子通过调控 *MYC*、*IRF4*、*PRDM1* 和 *XBPI* 等基因, 促进多发性骨髓瘤的发生和发展<sup>[63]</sup>。研究发现, 超级增强子通过促进 mRNA 的生成、microRNA (miRNA) 的转录以及成熟和 lncRNA (long non-coding RNA) 的转录生成对靶基因实现调控<sup>[9]</sup>。2018年 Jiang 等<sup>[64]</sup>在食道鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞中发现了主要转录因子 TP63 和 SOX2, 通过激活超级增强子和启动子协同调控长链非编码 RNA CCAT1 的表达, CCAT1 促进细胞的增殖, SOX2 或 TP63 基因的过表达可促进细胞增殖和肿瘤发生, CCAT1 与 TP63 和 SOX2 形成复合物, 通过与 *EGFR* 的超级增强子结合调控 *EGFR* 表达, 激活 *EGFR* 下游信号通路, 从而促进食道鳞状细胞癌发生。同年, Peng 等<sup>[65]</sup>在肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞中发现一种超级增强子驱动的长链非编码 RNA HCCL5, 可促进 HCC 细胞的存活、迁移和侵袭, 促进肿瘤发生。

与增强子相比, 大多数致癌基因的表达异常是由超级增强子驱动的, 癌细胞通过构建驱动致癌基因过表达的超级增强子, 显著促进多种癌基因表达, 从而增强肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移的能力; 抑制超级增强子的活性, 则显著抑制肿瘤细胞的生长和存活<sup>[17,66]</sup>。目前已在多种实体肿瘤细胞中鉴定出处于异常激活状态的超级增强子, 如发病率较高的乳腺癌、结肠癌、小细胞肺癌、T 细胞急性淋巴细胞白血病等<sup>[13]</sup>。研究并揭示肿瘤细胞中处于异常激活状态的超级增强子的构建机制和激活路径, 为基因水平上抑制癌基因的过表达提供了新的思路, 进一步改善肿瘤的临床治疗效果。

#### 5.3.2 超级增强子在肿瘤治疗中的应用潜力

在超级增强子驱动致癌基因表达而导致的肿瘤细胞中, 因超级增强子区域过大 (平均在 20 kb 以上) 不易敲除, 为了精确抑制癌基因的表达, 需要抑制超级增强子对癌基因的转录调控作用<sup>[49,67]</sup>。超级增强子调控癌基因转录的关键节点可作为靶点特异性地抑制癌基因表达<sup>[13]</sup>。

超级增强子调控转录的关键节点有: Mediator 复合体、BRD4 (bromodomain containing 4) 和关键的 CDK (cyclin-dependent kinase), 这些关键节点基因表达水平降低均会抑制超级增强子调控的相关基因表达, 因此, 通过靶向关键节点可以影响超级增强子调控的癌基因转录<sup>[13]</sup>。2016年 Jiang 等<sup>[46]</sup>发现了一种治疗食管鳞状细胞癌的特异性 CDK7 抑制剂 THZ1, 可抑制多种致癌基因转录表达。目前通过靶向抑制上述关键节点进而针对超级增强子的治疗药物主要有: (1) BRD 家族蛋白抑制剂或降解剂如: 针对 BRD4 治疗多发性骨髓瘤的抑制剂 JQ1; 针对 BDR4 治疗白血病的抑制剂 iBET151; 针对 BRD2、BRD3、BRD4 治疗成神经细胞瘤的抑制剂 OTX051 等。(2) CDK7 抑制剂如: 针对 CDK7 治疗食管鳞状细胞癌的抑制剂 THZ1; 针对 CDK7 治疗成人晚期实体瘤的抑制剂 SY-1365 等。(3) 其他类型抑制剂如: 针对 RAR $\alpha$  (retinoic acid receptor alpha, RAR $\alpha$ ) 治疗急性髓样细胞样白血病的抑制剂 SY-1425 等<sup>[13]</sup>。

## 6 结语与展望

增强子在人类的生命过程中扮演着十分重要的角色, 了解和研究增强子有助于精细解读人类基因组的功能、转录调控、细胞分化以及个体发育的机制。随着基因组水平鉴定技术的成熟和高通量测序技术的不断完善以及第三代测序技术的应用, 增强子的定位、功能、鉴定会有较大突破, 为肿瘤治疗提供新的有效的靶点。

多个具有转录活性且作用方向相关的增强子构成超级增强子。研究显示, 在多种肿瘤细胞中



超级增强子处于激活状态, 对癌基因的表达有促进作用。目前对超级增强子的组成、超级增强子内部每个增强子的活性以及超级增强子内部多个增强子的协作机制知之甚少。为了更好地治疗肿瘤, 人们需要探索超级增强子内各个组分的作用机制, 探索怎样利用药物同时抑制超级增强子内的多个增强子活性, 从而抑制癌基因的表达。

## 参考文献(References):

- [1] Zhang Y, Xu XF, Guo CY. The regulation of sonic hedgehog gene in the development process. *Prog Mod Biomed*, 2014, 14(2): 358–360.  
张艳, 徐选福, 郭传勇. Sonic Hedgehog 基因及其在发育过程中的调控作用. *现代生物医学进展*, 2014, 14(2): 358–360. [DOI]
- [2] Bunney PE, Zink AN, Holm AA, Billington CJ, Kotz CM. Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. *Physiol Behav*, 2017, 176(1): 139–148. [DOI]
- [3] Chapel-Fernandes S, Jordier F, Lauro F, Maitland N, Chiaroni J, De Micco P, Mannoni P, Bagnis C. Use of the PSA enhancer core element to modulate the expression of prostate- and non-prostate-specific basal promoters in a lentiviral vector context. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(10): 919–929. [DOI]
- [4] Gilbert L A, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen YW, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159(3): 647–661. [DOI]
- [5] Tang LD, Wu N, Jin Y. Enhancer hijacking: a new direction in the study of tumorigenesis. *Int J Genet*, 2018, 41(6): 478–482.  
汤柳笛, 吴楠, 金焰. 增强子劫持: 研究肿瘤发生机制的新方向. *国际遗传学杂志*, 2018, 41(6): 478–482. [DOI]
- [6] Abraham BJ, Hnisz D, Weintraub AS, Kwiakowski N, Li CH, Li Z, Weichert-Leahey N, Rahman S, Liu Y, Etchin J, Li B, Shen S, Lee TI, Zhang J, Look AT, Mansour MR, Young RA. Small genomic insertions form enhancers that misregulate oncogenes. *Nat Commun*, 2017, 8(15797): 1–12. [DOI]
- [7] Grosschedl R, Birnstiel ML. Spacer DNA sequences upstream of the T-A-T-A-A-A-T-A sequence are essential for promotion of H2A histone gene transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(12): 7102–7106. [DOI]
- [8] Benoist C, Chambon P. *In vivo* sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature*, 1981, 290(5804): 304–310. [DOI]
- [9] Zhou Y, Shi XM, Han S, Guo M, Wu YX, Wang JX, Jin ZJ. Research progress of super enhancer. *J Int Repord Heal/Fam Plan*, 2017, 36(2): 137–141, 159.  
周洋, 施晓敏, 韩澍, 郭猛, 吴玉仙, 王金兴, 金志军. 超级增强子的发现与研究进展. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2017, 36(2): 137–141, 159. [DOI]
- [10] Xie JH, Sun Y, Wang S, Tian XH, Cao JH. Functional identification of enhancer and its research progress in agricultural animals. *Chin J Cell Biol*, 2019, 41(7): 1395–1400.  
谢骏辉, 孙艳, 王昇, 田小欢, 曹建华. 增强子功能鉴定及其在农业动物中的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(7): 1395–1400. [DOI]
- [11] Yan Q, Zhou XQ, Xue W, Dai Y. Advances in the relationship between epigenetic DNA methylation and histone modification with diseases. *Med Recap*, 2017, 23(16): 3160–3163, 3169.  
晏强, 周献青, 薛雯, 戴勇. 表观遗传 DNA 甲基化和组蛋白修饰与疾病关系的研究进展. *医学综述*, 2017, 23(16): 3160–3163, 3169. [DOI]
- [12] Bulger M, Groudine M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 2011, 144(3): 327–339. [DOI]
- [13] Wu ZQ, Mi ZY. Research progress of super enhancer in cancer. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(1): 41–51.  
吴志强, 米泽云. 超级增强子在肿瘤研究中的进展. *遗传*, 2019, 41(1): 41–51. [DOI]
- [14] DI Micco R, Fontanals-Cirera B, Low V, Ntziachristos P, Yuen SK, Lovell CD, Dolgalev I, Yonekubo Y, Zhang GT, Rusinova E, Gerona-Navarro G, Cañamero M, Ohlmeyer M, Aifantis I, Zhou MM, Tsirogas A, Hernando E. Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell*, 2014, 9(1): 234–247. [DOI]
- [15] Ing-Simmons E, Seitan VC, Faure AJ, Flicek P, Carroll T, Dekker J, Fisher AG, Lenhard B, Merkenschlager M. Spatial enhancer clustering and regulation of enhancer-proximal genes by cohesin. *Genome Res*, 2015, 25(4): 504–513. [DOI]
- [16] Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013, 153(2): 307–319. [DOI]



- [17] Sun CB, Zhang X. Advance in the research on super-enhancer. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(12): 1056–1068.  
孙长斌, 张曦. 超级增强子研究进展. *遗传*, 2016, 38(12): 1056–1068. [DOI]
- [18] Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, Hoke H, Young RA. Transcriptional super-enhancers connected to cell identity and disease. *Cell*, 2013, 155(4): 1–24. [DOI]
- [19] Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao XB, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, Valen E, Li K, Schwarzfischer L, Glatz D, Raithel J, Lilje B, Rapin N, Bagger FO, Jørgensen M, Andersen PR, Bertin N, Rackham O, Burroughs AM, Baillie JK, Ishizu Y, Shimizu Y, Furuhata E, Maeda S, Negishi Y, Mungall CJ, Meehan TF, Lassmann T, Itoh M, Kawaji H, Kondo N, Kawai J, Lennartsson A, Daub CO, Heutink P, Hume DA, Heick Jensen TH, Suzuki H, Hayashizaki Y, Muller F, R. R. Forrest A, Carninci P, Rehli M, Sandelin A. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 2014, 507(7493): 455–461. [DOI]
- [20] Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods*, 1997, 11(2): 205–214. [DOI]
- [21] Pillai S, Dasgupta P, Chellappan SP. Chromatin immunoprecipitation assays: analyzing transcription factor binding and histone modifications *in vivo*. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1288: 429–446. [DOI]
- [22] Yang W, Liu RS. Introduction of ChIP-Seq technology and data analysis. *Henan Sci*, 2014, 32(8): 1440–1444.  
杨薇, 刘若水. 染色质免疫共沉淀-测序(ChIP-Seq)技术及数据分析方法介绍. *河南科学*, 2014, 32(8): 1440–1444. [DOI]
- [23] Visel A, Blow MJ, Li ZR, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM, Pennacchio LA. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*, 2009, 457(7231): 854–858. [DOI]
- [24] Xiao T, Zhou J, Fu JJ F. Research progress in histone modifications as epigenetic tumor markers. *J Southwest Med Univ*, 2019, 42(3): 284–288.  
肖婷, 周菊, 傅俊江. 组蛋白修饰作为表观遗传肿瘤标志物的研究进展. *西南医科大学学报*, 2019, 42(3): 284–288. [DOI]
- [25] Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu YT, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu CX, Ching KA, Wang W, Weng ZP, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 311–318. [DOI]
- [26] Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA, Jaenisch R. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(50): 21931–21936. [DOI]
- [27] Bonn S, Zinzen RP, Girardot C, Gustafson EH, Perez-Gonzalez A, Delhomme N, Ghavi-Helm Y, Wilczynski B, Riddell A, Furlong EEM. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat Genet*, 2012, 44(2): 148–156. [DOI]
- [28] Taylor GCA, Eskeland R, Hekimoglu-Balkan B, Pradeepa MM, Bickmore WA. H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2053–2065. [DOI]
- [29] Pradeepa MM, Grimes GR, Kumar Y, Olley G, Taylor GCA, Schneider R, Bickmore WA. Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. *Nat Genet*, 2016, 48(6): 681–686. [DOI]
- [30] Yang LL, Jiang T, Sui YX, Shi WJ, Song YB, Tian YP, Zhang PJ. DNA methylation detection technology. *Labeled Immunoassays & Clin Med*, 2020, 27(5): 898–904.  
杨林林, 蒋涛, 隋亚鑫, 史文杰, 宋永波, 田亚军, 张朋军. DNA 甲基化检测技术. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(5): 898–904. [DOI]
- [31] Cao L, Guo LJ, Guo XJ, Gong Y, Li F. New path of cancer liquid biopsy: DNA methylation detection by digital PCR. *Prog Biochem Biophys*, 2019, 46(11): 1085–1100.  
曹雷, 郭丽娟, 郭晓锦, 巩燕, 李菲. 癌症液体活检新思路: 数字 PCR 检测 DNA 甲基化. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(11): 1085–1100. [DOI]
- [32] Yan JG, Fu HY, Shen JZ, Zhou HR, Zhang YY, Huang JL, Chen CJ, Huang SH. Application of bisulfite sequencing pcr in detecting the abnormal methylation of suppressor gene of Wnt signaling pathway in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Hematol*, 2016, 24(5): 1299–1304.  
晏建国, 付海英, 沈建箴, 周华蓉, 张媛媛, 黄劲龙, 陈聪杰, 黄思晗. 重亚硫酸氢盐测序法检测 Wnt 信号通路抑制基因在急性早幼粒细胞白血病细胞中甲基化变化. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(5): 1299–1304. [DOI]
- [33] Ghisletti S, Barozzi I, Mietton F, Polletti S, De Santa F, Venturini E, Gregory L, Lonie L, Chew A, Wei CL,

- Ragoussis J, Natoli G. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. *Immunity*, 2010, 32(3): 317–328. [DOI]
- [34] Kim T, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-haley K, Kuersten S, Markenscoff-papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 2010, 465(7295): 182–187. [DOI]
- [35] Chen H, Li CY, Peng XX, Zhou ZC, Weinstein JN, Liang H. A Pan-Cancer analysis of enhancer expression in nearly 9000 patient samples. *Cell*, 2018, 173(3): 386–399. [DOI]
- [36] Zhang Z, Lee J, Ruan H, Ye YQ, Krakowiak J, Hu QS, Xiang Y, Gong J, Zhou BY, Wang L, Lin CR, Diao LX, Mills GB, Li WB, Han L. Transcriptional landscape and clinical utility of enhancer RNAs for eRNA-targeted therapy in cancer. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4562. [DOI]
- [37] Guo XL, Zhang QF, Ye QS, Mo ZT, Li WN, Gao SY. Construction of CRISPR/Cas9 vectors targeting to ezrin enhancer key region. *J Biol*, 2017, 34(6): 19–22.  
郭晓龙, 张青峰, 野庆松, 莫镇涛, 李文娜, 高书颖. 靶向 ezrin 增强子关键区的 CRISPR/Cas9 载体的构建. 生物学杂志, 2017, 34(6): 19–22. [DOI]
- [38] Korkmaz G, Lopes R, Ugalde AP, Nevedomskaya E, Han RQ, Myacheva K, Zwart W, Elkon R, Agami R. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 192–198. [DOI]
- [39] Mo WH, Zhang HQ, Zhao ZF, Shi JD, Lu WG. The role and mechanism of enhancer containing risk SNP rs10486567 in prostate cancer. *Acta Sci Natl Univ Nankai (Nat Sci Ed)*, 2018, 51(2): 9–13.  
莫文慧, 张浩琪, 赵忠芳, 石建党, 吕万革. 含有前列腺癌风险性 SNPs10486567 位点潜在增强子座位在前列腺癌细胞中功能的研究. 南开大学学报(自然科学版), 2018, 51(2): 9–13. [DOI]
- [40] Zhang XY, Choi PS, Francis JM, Imielinski M, Watanabe H, Cherniack AD, Meyerson M. Identification of focally amplified lineage-specific super-enhancers in human epithelial cancers. *Nat Genet*, 2016, 48(2): 176–182. [DOI]
- [41] Wang J, Zhao ZW, Ma LN, Ma Q. Research progress on enhancer forecast and targeted sequencing technology. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2019, 46(5): 1308–1315.  
王锦, 赵正伟, 马丽娜, 马青. 增强子预测及靶向测序技术研究进展. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1308–1315. [DOI]
- [42] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183. [DOI]
- [43] Thakore PI, D'Ippolito AM, Song YL, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, Reddy TE, Crawford GE, Gersbach CA. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*, 2015, 12(12): 1143–1149. [DOI]
- [44] Gao XF, Tsang JCH, Gaba F, Wu DH, Lu LM, Liu PT. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(20): e155. [DOI]
- [45] Xu L, Zhao LX, Gao YD, Xu J, Han RZ. Empower multiplex cell and tissue-specific CRISPR-mediated gene manipulation with self-cleaving ribozymes and tRNA. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(5): e28. [DOI]
- [46] Jiang YY, Lin DC, Mayakonda A, Hazawa M, Ding L W, Chien WW, Xu L, Chen Y, Xiao JF, Senapedis W, Baloglu E, Kanojia D, Shang L, Xu X, Yang H, Tyner JW, Wang MR, Koeffler HP. Targeting super-enhancer-associated oncogenes in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut*, 2017, 66(8): 1358–1368. [DOI]
- [47] Shioga T, Kondo R, Ogasawara S, Akiba J, Mizuochi S, Kusano H, Mihara Y, Tanigawa M, Kinjo Y, Naito Y, Kuromatsu R, Nakashima O, Yano H. Usefulness of tumor tissue biopsy for predicting the biological behavior of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Research*, 2020, 40(7): 4105–4113. [DOI]
- [48] Dong Y, Wang Z, Shi QH. Liquid biopsy based single-cell transcriptome profiling characterizes heterogeneity of disseminated tumor cells from lung adenocarcinoma. *Proteomics*, 2020, 20(13): 1–7. [DOI]
- [49] Sur I, Taipale J. The role of enhancers in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 483–493. [DOI]
- [50] Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*, 2016, 164(1–2): 57–68. [DOI]
- [51] Bastaki S, Irandoust M, Ahmadi A, Hojjat-Farsangi M, Ambrose P, Hallaj S, Edalati M, Ghalamfarsa G, Azizi G, Yousefi M, Chalahour H, Jadidi-Niaragh F. PD-L1/PD-1 axis as a potent therapeutic target in breast cancer. *Life Sci*, 2020, 247: 117437. [DOI]
- [52] Chen LX, Cao LX. MiR-150 inhibits cell proliferation through regulating c-Myb in human chronic myeloid

- leukemia cell line K562. *Basic Clin Med*, 2019, 39(9): 1259–1264.
- 陈连香, 曹丽霞. miR-150 通过调节 c-Myb 抑制人慢性髓系白血病细胞系 K562 增殖. *基础医学与临床*, 2019, 39(9): 1259–1264. [DOI]
- [53] Tak YG, Hung Y, Yao LJ, Grimmer MR, Do A, Bhakta MS, O'Geen H, Segal DJ, Farnham PJ. Effects on the transcriptome upon deletion of a distal element cannot be predicted by the size of the H3K27Ac peak in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): 4123–4133. [DOI]
- [54] Mansour MR, Abraham BJ, Anders L, Berezovskaya A, Gutierrez A, Durbin AD, Etchin J, Lee L, Sallan SE, Silverman LB, Loh ML, Hunger SP, Sanda T, Young RA, Look AT. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science*, 2014, 346(6215): 1373–1377. [DOI]
- [55] Luo W, Jiang QH, Liu JM, Hu HW, Wen L, Wei XF, Liu R, Wu ZJ. Preparation of artificial transcription factors to HBV and its targeted inhibitory effect on activity of HBV enhancer. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2014, 36(5): 450–455.
- 罗伟, 蒋清虎, 刘济铭, 胡慧雯, 温路, 魏续福, 刘锐, 吴忠均. HBV 人工转录因子的制备及其靶向抑制 HBV 增强子活性研究. *第三军医大学学报*, 2014, 36(5): 450–455. [DOI]
- [56] Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell*, 2013, 152(6): 1226–1236. [DOI]
- [57] Paulsen T, Kumar P, Koseoglu MM, Dutta A. Discoveries of extrachromosomal circles of DNA in normal and tumor cells. *Trends Genet*, 2018, 34(4): 270–278. [DOI]
- [58] Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C, Li B, Arden K, Ren B, Nathanson DA, Kornblum HI, Taylor MD, Kaushal S, Cavenee WK, Wechsler-Reya R, Furnari FB, Vandenberg SR, Rao PN, Wahl GM, Bafna V, Mischel PS. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature*, 2017, 543(7643): 122–125. [DOI]
- [59] Wu SH, Turner KM, Nguyen N, Raviram R, Erb M, Santini J, Luebeck J, Rajkumar U, Diao YR, Li B, Zhang WJ, Jameson N, Corces MR, Granja JM, Chen XQ, Coruh C, Abnoui A, Houston J, Ye Z, Hu R, Yu M, Kim H, Law JA, Verhaak RGW, Hu M, Furnari FB, Chang HY, Ren B, Bafna V, Mischel PS. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression. *Nature*, 2019, 575(7784): 699–703. [DOI]
- [60] Morton AR, Dogan-artun N, Faber ZJ, Macleod G, Bartels CF, Piazza MS, Allan KC, Mack SC, Wang XX, Gimple RC, Wu QL, Rubin BP, Shetty S, Angers S, Dirks PB, Sallari RC, Lupien M, Rich JN, Scacheri PC. Functional enhancers shape extrachromosomal oncogene amplifications. *Cell*, 2019, 179(6): 1330–1341.e13. [DOI]
- [61] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674. [DOI]
- [62] Hsieh CL, Fei T, Chen YW, Li TT, Gao YF, Wang XD, Sun T, Sweeney CJ, Lee GSM, Chen SY, Balk SP, Liu XS, Brown M, Kantoff PW. Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): 7319–7324. [DOI]
- [63] Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 2013, 153(2): 320–334. [DOI]
- [64] Jiang Y, Jiang YY, Xie JJ, Mayakonda A, Hazawa M, Chen L, Xiao JF, Li CQ, Huang ML, Ding LW, Sun QY, Xu L, Kanojia D, Jeitany M, Deng JW, Liao LD, Soukiasian HJ, Berman BP, Hao JJ, Xu LY, Li EM, Wang MR, Bi XG, Lin DC, Koeffler HP. Co-activation of super-enhancer-driven CCAT1 by TP63 and SOX2 promotes squamous cancer progression. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3619. [DOI]
- [65] Peng L, Jiang BY, Yuan XQ, Qiu YT, Peng JY, Huang YS, Zhang CY, Zhang Y, Lin ZY, Li JS, Yao WC, Deng WX, Zhang YQ, Meng M, Pan X, Li CQ, Yin D, Bi XY, Li GC, Lin DC. Super-enhancer-associated long noncoding RNA HCCL5 is activated by ZEB1 and promotes the malignancy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2019, 79(3): 572–584. [DOI]
- [66] Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 2013, 155(4): 934–947. [DOI]
- [67] Wang GR. The research of tumor specific activated super enhancer PLAU\_SE [Dissertation]. *Harbin Inst Technol*, 2018.
- 王冠儒. 肿瘤特异超级增强子 PLAU\_SE 及其组分的鉴定和功能研究[学位论文]. 哈尔滨工业大学, 2018. [DOI]