

人 *NPTX1* 相关 H3K27ac 富集的非保守性增强子鉴定

陈旭东^{1,2,3,4} 张琦^{1,2,3,4} 张颖蓝^{1,2,3,4} 林佳^{1,2,3,4} 王凤^{1,2,3,4}
桂怡婷^{1,2,3,4} 刘婷^{1,2,3,4} 李强^{1,2,3,4△}

(¹国家儿童医学中心/复旦大学附属儿科医院儿科研究所 上海 201102; ²复旦大学儿童发育与疾病转化医学研究中心 上海 201102;
³上海市出生缺陷防治重点实验室 上海 201102; ⁴国家卫生健康委员会新生儿疾病重点实验室(复旦大学) 上海 201102)

【摘要】 目的 探索和鉴定人 *NPTX1* 相关 H3K27ac 富集的非保守性的增强子,完善 *NPTX1* 相关调控区的注释,为 *NPTX1* 相关疾病及非编码区突变的研究提供相应的理论基础。**方法** 从 CistromeDB 数据库下载和分析涉及 7 种组织的 39 个 H3K27ac ChIP-seq 数据,选择 *NPTX1* 两侧 100 kb 范围内的峰。通过 ECR 浏览器分析各片段在人、小鼠和斑马鱼之间的序列保守性。将相应 DNA 片段插入双荧光素酶验证载体中,在人神经源细胞系 SH-SY5Y 和人肾源细胞系 293T 行双荧光素酶实验,以检测增强子活性。**结果** 分析获得 5 个 H3K27ac 富集片段,各片段在人、小鼠和斑马鱼之间 DNA 序列不保守。*NPTX1*-E1-P 在 SH-SY5Y 中双荧光素酶活性比值明显高于阴性对照组,但在 293T 细胞中其增强子活性下降约 40%。**结论** *NPTX1* 附近的 H3K27ac 富集片段中,*NPTX1*-E1-P 在人神经细胞系 SH-SY5Y 中具有增强子活性,且在物种间序列保守性低。相对于人神经源细胞系 SH-SY5Y,其在人肾源细胞系 293T 中增强子活性下降。

【关键词】 *NPTX1*; 增强子; 染色质免疫共沉淀测序(ChIP-seq); H3K27ac

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2023.04.002

Identification of human *NPTX1* associated non-conserved enhancers from H3K27ac-enrichments

CHEN Xu-dong^{1,2,3,4}, ZHANG Qi^{1,2,3,4}, ZHANG Ying-lan^{1,2,3,4}, LIN Jia^{1,2,3,4}, WANG Feng^{1,2,3,4},
GUI Yi-ting^{1,2,3,4}, LIU Ting^{1,2,3,4}, LI Qiang^{1,2,3,4△}

(¹Institute of Pediatrics, National Children's Medical Center/Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China; ²Translational Medical Center for Child Development and Disease, Shanghai 201102, China; ³Shanghai Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Control, Shanghai 201102, China; ⁴National Health Commission Key Laboratory of Neonatal Diseases (Fudan University), Shanghai 201101, China)

【Abstract】 Objective To explore and identify H3K27ac enriched non-conserved enhancers near human *NPTX1*, improve the annotation of *NPTX1*-related regulatory regions, and provide a corresponding theoretical basis for the study of *NPTX1*-related diseases and mutations in non-coding regions. **Methods** A total of 39 H3K27ac ChIP-seq data involving 7 tissues were downloaded from the CistromeDB database and analyzed. Peaks in the range of 100 kb on both sides of *NPTX1* were selected. Fragments' sequence conservation among human, mouse and zebrafish was analyzed by ECR browser. The fragments were inserted into a dual luciferase validation vector, and dual luciferase assays were performed in human neural-derived cell line SH-SY5Y and human kidney-derived cell line 293T to detect enhancers' activity. **Results** We obtained 5 H3K27ac-enriched fragments. The DNA sequences of each fragment were not conserved among human, mouse and zebrafish. The ratio of dual luciferase activity of

国家自然科学基金(81771632, 81271509);上海市自然科学基金(21ZR1410100)

[△]Corresponding author E-mail: liq@fudan.edu.cn

网络首发时间:2023-03-17 16:10:49 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20230316.1427.014

NPTX1-E1-P was significantly higher than that of the negative control in SH-SY5Y, but it was about 40% lower in 293T cells. **Conclusion** Among the H3K27ac-enriched fragments near *NPTX1*, *NPTX1*-E1-P has enhancer activity in human neurogenic cell line SH-SY5Y, and low sequence conservation among species. Compared with the human neurogenic cell line SH-SY5Y, its enhancer activity is decreased in human kidney-derived cell line 293T.

【Key words】 *NPTX1*; enhancer; chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq); H3K27ac

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81771632, 81271509) and Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1410100).

NPTX1 是神经元五聚体(neuronal pentraxins, NPs)蛋白家族中的一员,是一种重要的神经系统分泌蛋白。在神经系统发育分化过程中,干细胞表达或胞外来源的 *NPTX1* 可诱导干细胞分化成为神经细胞^[1]。*NPTX1* 主要在海马、小脑和大脑皮层神经元中表达^[2],参与调控神经突触重塑^[3]和神经元凋亡^[4]等生物过程。*NPTX1* 突变或表达水平改变可导致多种疾病,如共济失调^[5-6]、动眼障碍^[7]等,与 *NPTX1* 内突变相关。*NPTX1* 在胶质瘤^[8]、胰腺癌^[9]、肺癌^[10]、结直肠癌^[11]、宫颈癌^[12-13]等肿瘤中表达明显下调,上调 *NPTX1* 表达则可抑制该类肿瘤的转移或降低其侵袭性;而在胃癌^[14]、胸腺瘤^[15]等肿瘤中,*NPTX1* 表达明显上调,并与肿瘤转移或不良预后相关。

增强子是一类可远距离调控基因表达水平的短DNA序列,在调控基因表达的过程中有重要作用^[16-18]。增强子调控基因表达的机制之一是被转录因子识别和结合,使得基因表达随细胞内转录因子谱的变化而改变^[19],继而影响生物体的发育和疾病的发生发展^[20-21]。转录因子通常识别6~12 bp长的DNA序列并结合到DNA上,所以增强子内如有突变,或增强子发生拷贝数变异,该增强子靶向调控的基因的表达模式可能会改变,继而导致发育异常或疾病,如 *PAX6* 远端增强子内的单核苷酸突变与虹膜发育不全高度相关,即增强子活性下降,*PAX6* 表达量降低,导致虹膜发育不全^[22]; *SNCA* 和 *PTF1A* 远端增强子的单碱基对点突变可在不引起相关蛋白序列改变的情况下,引起散发性帕金森病和胰腺发育不全^[23-24];超级增强子的丢失或获得,也与多种癌症的发生相关^[25-26]。*NPTX1* 在多种肿瘤组织中表达下调,其中一种机制是其启动子区域甲基化水平升高^[9-11],而 *NPTX1* 相关增强子的鉴定及其与疾病的关系则缺少探索和研究。

增强子可通过比较基因组学寻找^[27-29]。在

VISTA 数据库^[30]中,搜索 *NPTX1* 上下游 100 kb 范围内的增强子,仅发现 1 个序列保守区 mm2006 (chr17:78,488,791-778,490,654),该保守区经实验验证无增强子活性。活性增强子附近富集有几种组蛋白修饰,尤其是 p300 和 CREB 结合蛋白(CREB-binding protein, CBP)介导的 H3K27 乙酰化修饰^[31-32]。染色质免疫共沉淀测序技术(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)依赖于组蛋白修饰与特定 DNA 元件的交联,与 DNA 序列的保守性无直接关系,有助于探索物种间 DNA 序列不保守的增强子。我们通过分析 CistromeDB 数据库中多种组织 H3K27ac 的 ChIP-seq 数据,在人神经源细胞系 SH-SY5Y 和人肾源细胞系 293T 上进行双荧光素酶实验,初步探索了 *NPTX1* 附近的增强子及其在不同组织细胞内的活性。

材 料 和 方 法

仪器设备 二氧化碳细胞培养箱、超净工作台(美国 Thermo Fisher 公司);PCR 仪、离心机(德国 Eppendorf 公司);Milli-q 超纯水系统(德国 Millipore 公司)。

主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清、opti-MEM 培养基(美国 Gibco 公司);Lipo 3000 试剂(美国 Invitrogen 公司);双荧光素酶检测试剂盒(美国 Promega 公司);2×Taq Mix PCR 试剂、无缝克隆试剂盒、质粒小提试剂盒(南京诺唯赞生物有限公司);去内毒素质粒小提试剂盒(美国 Omega 公司);DH5a 感受态细胞(上海擎科生物有限公司)。

实验细胞系 293T 细胞系由复旦大学附属儿科医院桂永浩课题组馈赠。SH-SY5Y 细胞系由复旦大学附属华山医院董强课题组馈赠。

研究起讫时间 2021 年 12 月 31 日—2022 年 11 月 31 日。

ChIP-seq 数据获取与分析 从 CistromeDB 数据库中,下载人不同组织来源 H3K27ac ChIP-seq 的 peak 数据文件,使用 Wang 等^[33]构建的 ChIP-seq 数据分析方法,以脑组织为实验组,以肺、肝、肾等数据为对照组,筛选评分为 800 以上的脑组织中重要的和特异的 H3K27ac 富集片段。寻找位于 *NPTX1* 上下游 100 kb 内的 H3K27ac 富集片段,将这些片段视为假定的 *NPTX1* 相关增强子。

富集片段序列保守性分析 使用 ECR 浏览器,设定 DNA 分析长度为 100 bp,以 VISTA 数据库中的 1 个神经系统特异性增强子为参考,对比分析 5 个 H3K27ac 富集片段在人(hg19)、小鼠(mm10)和斑马鱼(danRer7)之间的序列相似性。

增强子活性鉴定质粒构建 设计带有酶切位点两侧同源序列的引物,PCR 获得两侧带有同源序列的目标片段。纯化回收酶切载体和目标片段,将回收产物通过无缝克隆连接,并转化至 DH5a 感受态细胞中;挑选菌落,使用去内毒素试剂盒抽提质粒并测序,以验证质粒序列。

细胞转染与双荧光素酶活性检测 取出冻存细胞系,在 6 cm 细胞培养皿中,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液复苏和培养细胞。待细胞密度达到 80%~90% 时,消化、稀释细胞并接种于 24 孔板中。接种 12 h 后,配制转染混合物:取一 EP 管加入 25 μ L Opti-MEM, 1.5 μ L Lipofectamine 3000;取另一 EP 管加入 25 μ L Opti-MEM、2 μ L P300、500 ng 待检测质粒和 20 ng pRL-TK 质粒。将两个 EP 管内容物混合,静置 10 min,吸取全部混合物加入至 24 孔板的细胞培养基中。转染 24 h 后,吸去细胞培养基,使用 PBS 溶液清洗细胞 2 次。加入 100 μ L 细胞裂解液,置于摇床 30 min 后,每孔取 50 μ L 细胞裂解液,转移至 96 孔酶标板中。使用酶标仪检测,先加入 50 μ L 溶液 I,检测萤光亮度 rum1;再加入 50 μ L 溶液 II,检测萤光亮度 rum2。

使用 rum1/rum2 获得双荧光素酶活性比值 rate1。每种待检测质粒做 3 个复孔。pGL3-E1b 为阴性对照组,pGL3-SV40-Promoter 为阳性对照组。各孔的 rate1 除以同批次 pGL3-E1b 的 rate1 平均值,即为该孔的双荧光素酶相对活性 R。在 SH-SY5Y 细胞系上检测获得的双荧光素酶相对活性计为 RS。每孔的 rate1 除以同一报告质粒的 RS,即为该片段的相对增强子活性。

统计学分析 所有数据使用 GraphPad Prism 9.0 分析处理,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

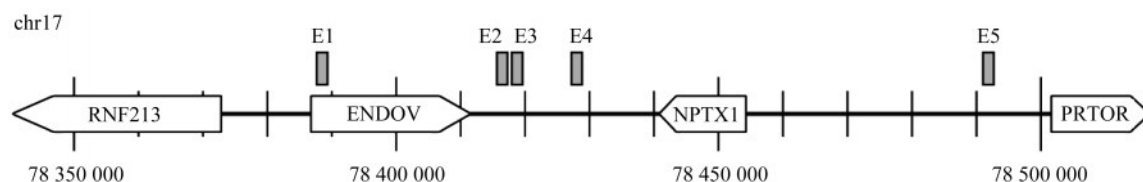
结 果

人 *NPTX1* 两侧 100 kb 内发现 5 个 H3K27ac 富集片段 我们从 CistromeDB 数据库中下载了多个组织的 H3K27ac 数据集,使用 Wang 等^[33]开发的增强子分析和评分方法,在 *NPTX1* 上下游 100 kb 的范围内,共发现 5 个 H3K27ac 的富集片段(表 1),均位于 *NPTX1* 基因两侧(图 1)。将每个富集片段依次命名为 *NPTX1*-E1 至 *NPTX1*-E5,其中 *NPTX1*-E1 仅为脑组织重要片段,*NPTX1*-E2 为脑组织重要且特异性片段,*NPTX1*-E3、*NPTX1*-E4、*NPTX1*-E5 仅为脑组织特异性片段。

表 1 获得的 *NPTX1* 上下游 100 kb 内的 H3K27ac 富集片段

Tab 1 Obtained H3K27ac enriched fragments within 100 kb up- and down-stream of *NPTX1*

Peak	Chromosomal localization (hg19)
<i>NPTX1</i> -E1	chr17:78389074-78389432
<i>NPTX1</i> -E2	chr17:78419185-78419616
<i>NPTX1</i> -E3	chr17:78419703-78419906
<i>NPTX1</i> -E4	chr17:78427074-78427515
<i>NPTX1</i> -E5	chr17:78492954-78494359



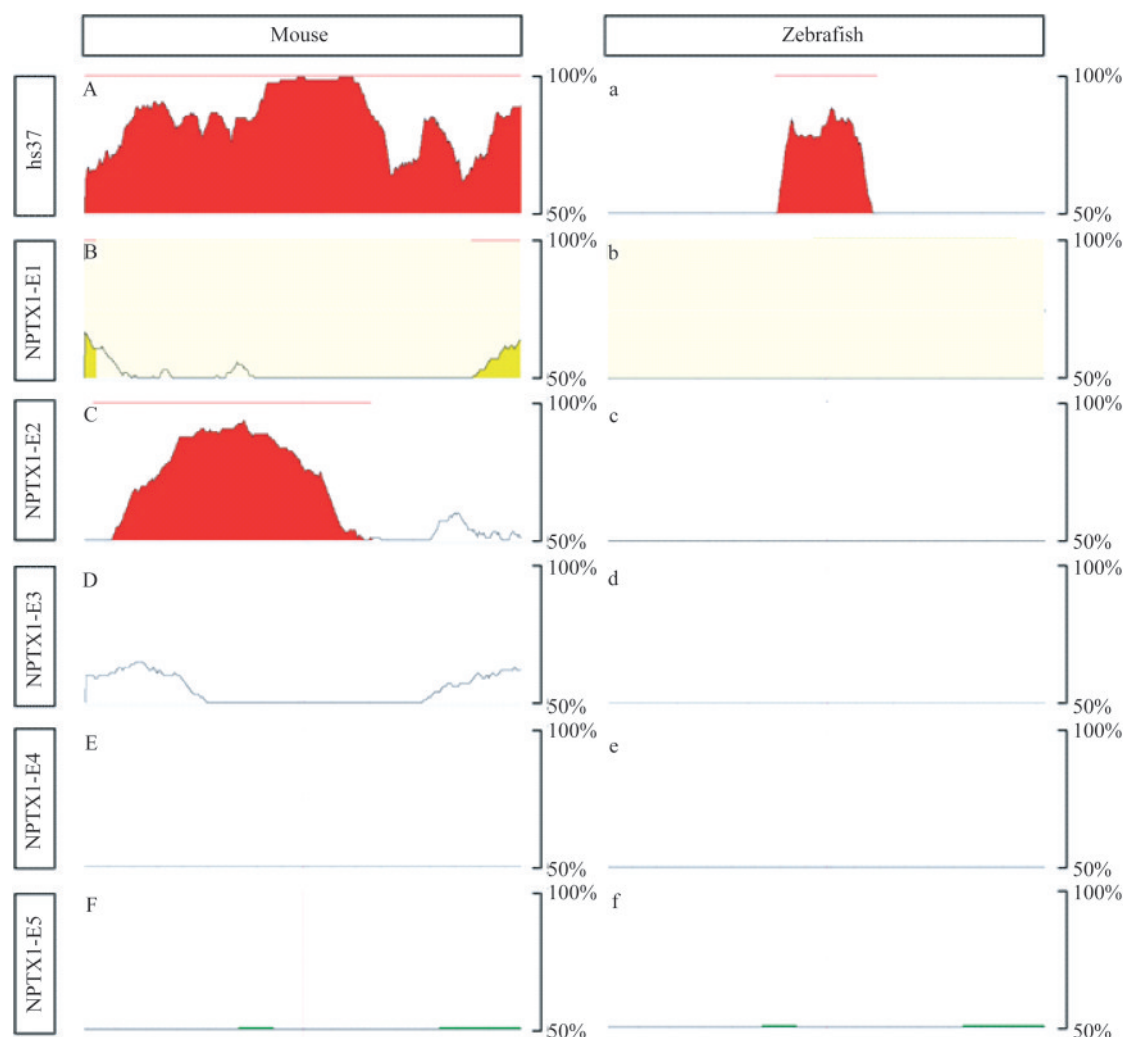
The white arrows in the figure are *NPTX1* and the arrow shows the transcriptional direction. The gray boxes are H3K27ac enriched fragments. E1 to E5 correspond to *NPTX1*-E1 to *NPTX1*-E5, respectively.

图 1 人(hg19) *NPTX1* 及其两侧的 H3K27ac 富集片段和其他基因

Fig 1 Human (hg19) *NPTX1* with its flanking H3K27ac enriched fragments and nearby genes

5个富集片段的序列保守性较低 增强子具有一定的生物功能,其在进化过程中受到一定的约束,尤其是对生物发育有重要作用的增强子^[34]。借助ECR浏览器,我们评估了5个富集片段在人、小鼠和斑马鱼之间的序列保守性。相对于记录在VISTA增强子数据库^[30]中的保守性增强子,

NPTX1-E1、*NPTX1-E3*、*NPTX1-E4*和*NPTX1-E5*的DNA序列在人(hg19)、小鼠(mm10)和斑马鱼(danRer7)之间的序列相似性较低(图2)。*NPTX1-E2*在人和小鼠间序列相似性为77.7%,但在人和斑马鱼之间相似度低。由此可见5个富集片段在3个物种间的保守性较低。



The similarity of DNA sequences between human, mouse and zebrafish was compared by ECR browser. A-F are the results of DNA sequences comparing between human and mouse, and a-f are the results of DNA sequence comparing between human and zebrafish. A and a: A conserved enhancer, hs37, from the VISTA enhancer browser. The red indicates the intervals with more than 70% similarity.

图2 不同DNA片段在人、小鼠和斑马鱼之间的序列保守性

Fig 2 Sequence conservation of different DNA fragments among human, mouse and zebrafish

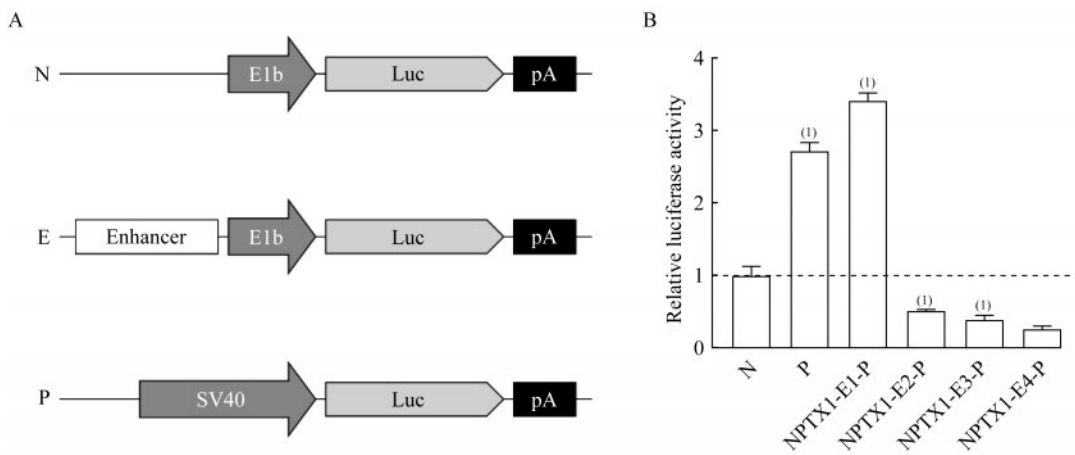
在人神经源细胞系SH-SY5Y中鉴定出1个增强子片段。通过PCR扩增,成功扩增出4个片段,命名为*NPTX1-E1-P*至*NPTX1-E4-P*,这些片段包含完整的H3K27ac富集片段及其两侧各500~600 bp的DNA序列。借助无缝克隆技术,成功将4个片段分别插入双荧光素酶验证载体中,在人神经源

SH-SY5Y细胞系上检测增强子活性。实验结果显示,在SH-SY5Y细胞系中,*NPTX1-E1-P*的双荧光素酶相对活性比值明显高于阴性对照组(3.41 ± 0.09 vs. 1.00 ± 0.12 , $P < 0.0001$),而另外3个片段的双荧光素酶活性比值则低于阴性对照组(图3B),说明*NPTX1-E1-P*在SH-SY5Y细胞系内可明显上调

最小启动子下游的基因表达水平。

***NPTX1* 在不同组织内的增强子活性** 为了探索 *NPTX1*-E1-P 在不同组织内的增强子活性是否会发生改变,我们进行了双荧光素酶实验,将在人肾源 293T 细胞上测得的双荧光素酶活性比值记为 RT,在人神经源 SH-SY5Y 细胞上测得的双荧光素酶活性比值记为 RS,用 RT/RS 表示 293T 细胞系中的相对增强子活性。实验结果显示(图 4),最小启

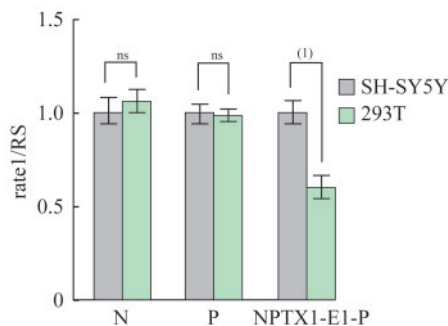
动子载体 pGL3-E1b (1.00 ± 0.07 vs. 1.06 ± 0.05 , $P=0.41$)和泛表达启动子载体 pGL3-SV40(1.00 ± 0.04 vs. 0.99 ± 0.03 , $P=0.98$) 在 SH-SY5Y 和 293T 细胞系中的 rate1/RS 差异无统计学意义,而 *NPTX1*-E1-P 在 293T 细胞中的双荧光素酶活性明显低于 SH-SY5Y(0.60 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.05 , $P<0.0001$),说明 *NPTX1*-E1-P 在 293T 细胞系内的增强子活性明显降低。



A: Schematic diagram of the enhancer reporter plasmid and the control plasmid. N: Negative control plasmid pGL3-E1b, upstream of Luc contains only the minimal promoter E1b; E: Enhancer reporter plasmid pGL3-enhancer, the DNA fragment to be validated is inserted upstream of E1b; P: Positive control plasmid pGL3-SV40, upstream of Luc contains only the pan-expressing promoter SV40 promoter; E1b: Minimal promoter E1b; Luc: Luciferase; pA: Poly A. B: The relative dual luciferase activity of each assay plasmid was obtained by analyzing the enhancer activity of different fragments by the dual luciferase assay system, using the average of the dual luciferase activity ratio of the negative control plasmid as 1. vs. negative control (N), ⁽¹⁾ $P<0.0001$.

图3 鉴定 *NPTX1* 基因附近的增强子

Fig 3 Identification of enhancers near the *NPTX1* gene



N: Negative control plasmid pGL3-E1b; P: Positive control plasmid pGL3-SV40. RS: Relative dual luciferase activity of the corresponding plasmids obtained by assay on SH-SY5Y; rate1: Relative activity of dual luciferase in each well. ns: Not significant; ⁽¹⁾ $P<0.0001$.

图4 不同细胞系双荧光素酶活性检测

Fig 4 Different cell lines were assayed by dual luciferase activity

讨 论

我们在人 *NPTX1* 基因两侧识别并鉴定了1个序列保守程度较低的增强子 *NPTX1*-E1-P,该增强子可在人神经来源的 SH-SY5Y 中上调报告基因的表达水平,且其增强子活性在人肾来源的 293T 细胞中降低。

NPTX1 主要在中枢神经系统细胞中表达^[2],在神经系统发育分化^[1]、神经突触重塑^[3]和神经元凋亡^[4]等过程中有重要作用。然而,关于 *NPTX1* 的表达调控机制尚不明确。*NPTX1* 的组织特异性表达部分受到增强子的调控,因而有必要鉴定可能调控 *NPTX1* 的增强子。在本研究中,增强子 *NPTX1*-E1-P 在人神经母细胞来源的细胞系中表现出明显

的增强子活性,在人肾上皮细胞来源的细胞系中增强子活性下降,与 *NPTX1* 的表达模式有一定的相似之处,说明 *NPTX1*-E1-P 在 *NPTX1* 的表达调控中可能有一定的作用。

H3K27ac 组蛋白标记是增强子活性的特征之一,常用于识别基因组中的增强子^[16]。此种方式可以一次获得大量序列,且基本覆盖基因组中的增强子序列,但也囊括大量非增强子序列。在人类胚胎干细胞的研究中,仅有 12% 的 H3K27ac 富集片段具有增强子活性^[35]。另一项研究显示,即使结合 H3K27ac、p300、和 RNA 聚合酶 II 的 ChIP-seq 数据,也只有不到 10% 的假定增强子片段具有增强子活性^[36]。因此,尽管我们使用 H3K27ac 组蛋白标记在 *NPTX1* 附近寻找到 5 个富集片段,在人神经源 SH-SY5Y 细胞中验证出有增强子活性的却只有 1 个片段。

增强子具有一定的生物功能,其在进化过程中受到一定的约束,尤其是对生物发育有重要作用的增强子^[34]。因此,寻找增强子待定序列的方式之一是寻找目标基因上下游的序列保守区域。Vista 数据库记录了大量经过实验验证的保守性增强子^[30],在其中搜索到 *NPTX1* 上下游 100 kb 范围内存在 1 个序列保守区 mm2006(chr17:78,488,791-778,490,654,mm10),与我们鉴定的 5 个 H3K27ac 富集片段没有交集,且该区域在小鼠体内未检测到增强子活性。因此,我们的工作与 Vista 浏览器的工作互补,进一步完善了 *NPTX1* 附近的调控元件功能注释。

NPTX1 的表达水平改变与多种肿瘤及其预后相关^[8-10,14-15],研究显示表达量改变与 *NPTX1* 启动子区甲基化水平改变相关^[9-11],而其他疾病中 *NPTX1* 表达水平改变的机制尚不明确。大量全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)的研究显示,与疾病或特征相关联的变异富集在调控区,尤其是细胞特异性强的增强子区域^[25,37-38]。我们通过鉴定 *NPTX1* 附近的增强子,进一步完善了 *NPTX1* 附近的调控区功能注释,并探索了与该增强子结合的转录因子,为该区域突变的致病性评估和致病机制探索提供了一定的理论依据。

在本研究中,我们通过增强子与靶基因的距离,初步判断 *NPTX1*-E1-P 可能调控人 *NPTX1* 的表达。然而,*NPTX1*-E1-P 两侧也有其他基因,距离

最近的是 *ENDOV*,其亦可能调控 *ENDOV* 的表达。此外,增强子与其靶基因的相互作用并非单纯的一对一的关系,*NPTX1*-E1-P 也可能同时调控多个基因。其他增强子也可能跨越更远的距离(>100 kb)调控 *NPTX1* 的表达。HiC、3C 等技术可以初步评估该增强子可能的靶基因,但是该技术分辨率较低,神经系统相关的公开数据库较少,未来相关数据公开后将进一步分析研究。亦可通过增强子敲除等技术,进一步确定 *NPTX1*-E1-P 的靶基因。

作者贡献声明 陈旭东 数据采集、统计和分析,论文构思、撰写和修订。张琦 数据审核,论文修订。张颖蓝,林佳 实验技术支持。王凤 生物信息学分析技术支持。桂怡婷,刘婷 图片绘制,数据统计和分析,论文修订。李强 项目管理,资金支持,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] BOLES NC, HIRSCH SE, LE S, *et al.* *NPTX1* regulates neural lineage specification from human pluripotent stem cells[J]. *Cell Rep*, 2014, 6(4):724-736.
- [2] GUZELOGLU-KAYISLI O, BASAR M, SHAPIRO JP, *et al.* Long-acting progestin-only contraceptives enhance human endometrial stromal cell expressed neuronal pentraxin-1 and reactive oxygen species to promote endothelial cell apoptosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(10):E1957-E1966.
- [3] FIGUEIRO-SILVA J, GRUART A, CLAYTON KB, *et al.* Neuronal pentraxin 1 negatively regulates excitatory synapse density and synaptic plasticity [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(14):5504-5521.
- [4] ENGUITA M, DEGREGORIO-ROCASOLANO N, ABAD A, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(4):1237-1246.
- [5] COUTELIER M, JACOUPLY M, JANER A, *et al.* *NPTX1* mutations trigger endoplasmic reticulum stress and cause autosomal dominant cerebellar ataxia [J]. *Brain*, 2021, 145(4):1519-1534.
- [6] DEPPE J, DEININGER N, LINGOR P, *et al.* A Novel *NPTX1* de novo variant in a late-onset ataxia patient [J]. *Mov Dis*, 2022, 37(6):1319-1321.

- [7] HELMCHEN C, KOCH PJ, GIRARD G, *et al.* NPTX1-related oculomotor apraxia: an intra-hemispheric disconnection disorder[J]. *J Neurol*, 2022, 269(7): 3931-3936.
- [8] LI H, YAN R, CHEN W, *et al.* Long non coding RNA SLC26A4-AS1 exerts antiangiogenic effects in human glioma by upregulating NPTX1 via NFkB1 transcriptional factor[J]. *FEBS J*, 2021, 288(1): 212-228.
- [9] HAGIHARA A, MIYAMOTO K, FURUTA J, *et al.* Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers[J]. *Oncogene*, 2004, 23(53): 8705-8710.
- [10] ZHOU C, QIN Y, XIE Z, *et al.* NPTX1 is a novel epigenetic regulation gene and associated with prognosis in lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(2): 381-386.
- [11] MORI Y, OLARU AV, CHENG Y, *et al.* Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2011, 18(4): 465-478.
- [12] YANG N, EIJSSINK JJ, LENDVAI A, *et al.* Methylation markers for CCNA1 and C13ORF18 are strongly associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in cervical scrapings[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(11): 3000-3007.
- [13] ONGENAERT M, WISMAN GB, VOLDERS HH, *et al.* Discovery of DNA methylation markers in cervical cancer using relaxation ranking [J]. *BMC Med Genomics*, 2008, 1: 57.
- [14] YAN H, ZHENG C, LI Z, *et al.* NPTX1 promotes metastasis via integrin/FAK signaling in gastric cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 3237-51.
- [15] 杜鑫, 于磊, 杨凌, 等. NPTX1在胸腺瘤患者中的表达及诊断价值[J]. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(1): 1-6.
- [16] BULGER M, GROUDINE M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers[J]. *Cell*, 2011, 144(3): 327-339.
- [17] BUECKER C, WYSOCKA J. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics[J]. *Trends Genet*, 2012, 28(6): 276-284.
- [18] ONG CT, CORCES VG. Enhancers: emerging roles in cell fate specification[J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(5): 423-430.
- [19] NATOLI G. Maintaining cell identity through global control of genomic organization [J]. *Immunity*, 2010, 33(1): 12-24.
- [20] SAGAI T, HOSOYA M, MIZUSHINAY, *et al.* Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb [J]. *Development (Cambridge, England)*, 2005, 132(4): 797-803.
- [21] LEVINE M, TJIAN R. Transcription regulation and animal diversity[J]. *Nature*, 2003, 424(6945): 147-151.
- [22] BHATIA S, BENGANI H, FISH M, *et al.* Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(6): 1126-1134.
- [23] SOLDNER F, STELZER Y, SHIVALILA CS, *et al.* Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of α -synuclein modulates target gene expression [J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 95-99.
- [24] WEEDON MN, CEBOLA I, PATCH AM, *et al.* Recessive mutations in a distal PTF1A enhancer cause isolated pancreatic agenesis [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(1): 61-64.
- [25] HNISZ D, ABRAHAM BJ, LEE TI, *et al.* Super-enhancers in the control of cell identity and disease [J]. *Cell*, 2013, 155(4): 934-947.
- [26] OOI WF, XING M, XU C, *et al.* Epigenomic profiling of primary gastric adenocarcinoma reveals super-enhancer heterogeneity[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12983.
- [27] PENNACCHIO LA, AHITUV N, MOSES AM, *et al.* In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences[J]. *Nature*, 2006, 444(7118): 499-502.
- [28] NOBREGA MA, OVCHARENKO I, AFZAL V, *et al.* Scanning human gene deserts for long-range enhancers[J]. *Science (New York, NY)*, 2003, 302(5644): 413.
- [29] VISEL A, PRABHAKAR S, AKIYAMA JA, *et al.* Ultraconservation identifies a small subset of extremely constrained developmental enhancers[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 158-160.
- [30] VISEL A, MINOVITSKY S, DUBCHAK I, *et al.* VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35 (Database issue): D88-D92.
- [31] HEINTZMAN ND, STUART RK, HON G, *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 311-318.
- [32] RADA-IGLESIAS A, BAJPAI R, SWIGUT T, *et al.* A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans [J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 279-283.
- [33] WANG F, ZHANG Y, WU F, *et al.* Functional assessment of heart-specific enhancers by integrating ChIP-seq data[J]. *Pediatr Res*, 2022, 92(5): 1332-1340.

- Gastroenterol*, 2015, 49(7):599-606.
- [26] DENG H, QI X, GUO X. Diagnostic accuracy of APRI, AAR, FIB-4, FI, King, Lok, Forns, and fibroindex scores in predicting the presence of esophageal varices in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(42):e1795.
- [27] ELALFY H, ELSHERBINY W, ABDEL RAHMAN A, *et al*. Diagnostic non-invasive model of large risky esophageal varices in cirrhotic hepatitis C virus patients [J]. *World J Hepatol*, 2016, 8(24):1028-1037.
- [28] 单成祥, 杨宁, 杭建飞, 等. 肝硬化食管静脉曲张破裂出血危险因素的Meta分析[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(8):888-893.
- [29] 贺庆红, 黄蔚. 肝硬化食管静脉曲张破裂出血患者门静脉血流参数的变化[J]. 临床荟萃, 2014, 29(3):295-297.
- [30] 石喻, 刘莹, 李秋菊, 等. SE-EPI磁共振弹性成像评价肝硬化食管胃底静脉曲张[J]. 中国医学影像技术, 2016, 32(2):266-269.
- [31] WANG X K, WANG P, ZHANG Y, *et al*. A study on two kinds of scoring models in predicting the degree of esophageal varices and bleeding [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7):3876-3881.
- [32] YAN Y, XING X, WANG X, *et al*. Development and validation of an easy-to-use risk scoring system for screening high-risk varices in patients with HBV-related compensated advanced chronic liver disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(12):4518-4524.
- [33] RENZULLI M, DAJTI E, IERARDI AM, *et al*. Validation of a standardized CT protocol for the evaluation of varices and porto-systemic shunts in cirrhotic patients [J]. *Eur J Radiol*, 2022, 147:110010.
- [34] ELKASSEM AA, ALLEN BC, LIRETTE ST, *et al*. Multiinstitutional evaluation of the liver surface nodularity score on CT for staging liver fibrosis and predicting liver-related events in patients with hepatitis C [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2022, 218(5):833-845.

(收稿日期:2022-07-11; 编辑:王蔚)

(上接第 493 页)

- [34] WONG ES, ZHENG D, TAN SZ, *et al*. Deep conservation of the enhancer regulatory code in animals [J]. *Science (New York, NY)*, 2020, 370(6517):eaax8137.
- [35] BARAKAT T S, HALBRITTER F, ZHANG M, *et al*. Functional dissection of the enhancer repertoire in human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2):276-288.e8.
- [36] GASPERINI M, HILL AJ, MCFALINE-FIGUEROA JL, *et al*. A genome-wide framework for mapping gene regulation via cellular genetic screens [J]. *Cell*, 2019, 176(1-2):377-390.e19.
- [37] KARCZEWSKI KJ, DUDLEY JT, KUKURBA KR, *et al*. Systematic functional regulatory assessment of disease-associated variants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(23):9607-9612.
- [38] CORRADIN O, SAIKHOVA A, AKHTAR-ZAIDI B, *et al*. Combinatorial effects of multiple enhancer variants in linkage disequilibrium dictate levels of gene expression to confer susceptibility to common traits [J]. *Genome Res*, 2014, 24(1):1-13.

(收稿日期:2022-05-26; 编辑:张秀峰)