

肝癌 HepG2 细胞中 TEAD1-增强子调控微 RNA 的识别与分析

唐瑜泽, 张 茵, 钟腾伟, 郭志云*

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 中国四川 成都 610031)

摘 要: 转录因子、增强子和微 RNA (microRNA, miRNA) 组成的调控网络对癌症的转录调控和进展至关重要。TEA 结构域转录因子 1 (TEA domain transcription factor 1, TEAD1) 是 TEA/ATTS 结构域家族的成员, 目前尚不清楚 TEAD1 作为一种癌症相关转录因子, 是否参与了增强子-miRNA 网络与肝细胞癌的发生发展。本研究首先通过整合肝细胞癌 HepG2 细胞系的 CAGE-seq 和 GRO-seq 数据, 鉴定出 14 286 个转录稳定与不稳定增强子 RNA (enhancer RNA, eRNA) 的活性增强子, 并证实这些活性增强子具有先前报道的组蛋白修饰特征 (高的 H3K27ac 信号与 H3K4me1/H3K4me3 信号比)。随后, 通过整合从 ChIP-seq 数据获得的 35 883 个 TEAD1-DNA 结合位点, 鉴定出 2 550 个与 TEAD1 结合的增强子 (EnhTEAD1)。进一步分析显示, 与未结合 TEAD1 的增强子 (EnhnoTEAD1) 相比, EnhTEAD1 上活性增强子标记 (H3K27ac、H3K4me1 和 H3K4me3) 和 eRNA 的表达显著升高; TEAD1 与 4 种转录因子 (GATA4、HNF4A、YY1 和 CTCF) 协同作用, 促进 EnhTEAD1 区域介导的染色质可及性和空间环化。最后, 为了研究 EnhTEAD1 与 miRNA 之间的调控网络, 在采用干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰 TEAD1 后, 对 HepG2 肝癌细胞进行了小 RNA (small RNA) 测序, 并通过 RNA-seq 和 Hi-C 共获得 68 个由 EnhTEAD1 调控的差异表达 miRNA (EnhTEAD1-miRNA), 这些 EnhTEAD1-miRNA 显著参与多种癌症相关的生物进程与通路。综上所述, 本研究阐明了 EnhTEAD1-miRNA 网络在肝细胞癌中的调控机制, 为肝细胞癌治疗提供了新的潜在靶点。

关键词: TEA 结构域转录因子 1 (TEAD1); 肝细胞癌; 增强子; 微 RNA (miRNA)

中图分类号: Q523+.1, R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)06-0471-08

Identification and Characteristic Analysis of TEAD1-Enhancers Regulating MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

TANG Yuze, ZHANG Yin, ZHONG Tengwei, GUO Zhiyun*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, Sichuan, China)

Abstract: The regulatory network constituted by transcription factors, enhancers, and microRNAs (miRNAs) is critical to the transcriptional regulation and progression of cancer. TEA domain transcription factor 1 (TEAD1) is a member of the TEA/ATTS domain family. However, it is unclear whether TEAD1, as a cancer-related transcription factor, is involved in the enhancer-miRNA network and the occurrence and development of hepatocellular carcinoma. Herein, 14 286 active enhancers that transcribe stable and unstable enhancer RNAs (eRNAs) were firstly identified by integrating CAGE-seq and GRO-seq data of HepG2 cell line, and confirmed to have previously reported histone modification characteristics (high H3K27ac signal and H3K4me1/H3K4me3 signal ratio). Subsequently, 2 550 TEAD1-binding enhancers (EnhTEAD1) were identified by integrating 35 883 TEAD1-DNA binding sites obtained from ChIP-seq data. Compared with no TEAD1-binding enhancers (EnhnoTEAD1), the expression of active enhancer markers (H3K27ac, H3K4me1 and H3K4me3)

收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-02-24; 网络首发日期: 2023-04-25

基金项目: 四川省科技厅自然科学基金项目(2022NSFSC0779); 中央高校基本科研业务费基础研究培育项目(2682023ZTPY071); 传染病防治科技重大专项(2018ZX10101-003-001-008)

作者简介: 唐瑜泽(1998—), 男, 四川广安人, 硕士研究生; * 通信作者: 郭志云(1978—), 男, 山西大同人, 博士, 西南交通大学副教授, 主要从事肿瘤生物学研究, E-mail: zhiyunguo@swjtu.edu.cn.

and eRNAs on EnhTEAD1 was significantly increased. Furthermore, TEAD1 may act synergistically with four transcription factors (GATA4, HNF4A, YY1, and CTCF) to promote chromatin accessibility and spatial cyclization mediated by the EnhTEAD1 region. To study the regulatory network between EnhTEAD1 and miRNAs, small RNA sequencing was performed in HepG2 cells after *TEAD1* was interfered using small interfering RNAs (siRNAs). A total of 68 differentially expressed miRNAs (EnhTEAD1-miRNAs) regulated by EnhTEAD1 were obtained by RNA-seq and Hi-C, and were found to be significantly involved in a variety of cancer-related biological processes and pathways. In summary, the study elucidates the regulatory mechanism of EnhTEAD1-miRNA network in hepatocellular carcinoma, and also provides a new potential target for treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words: TEA domain transcription factor 1 (TEAD1); hepatocellular carcinoma; enhancer; microRNA (miRNA)

(*Life Science Research*, 2023, 27(6): 471-478)

TEA 结构域转录因子 1 (TEA domain transcription factor 1, TEAD1) 是 TEAD 蛋白家族中的转录因子, 已被证实可通过参与多种信号通路抑制细胞增殖^[1]和促进细胞凋亡^[2]等。增强子作为顺式调控 DNA 元件, 能够以组织特异性的方式正向调控目标基因的转录。增强子的失调往往被认为是导致包括癌症在内的多种疾病发生的关键因素^[3]。先前研究表明, 增强子可以通过招募转录因子促进靶基因的表达, 从而导致肝细胞癌的发生^[4]。另有研究表明, 增强子(包括典型增强子和超级增强子)可以通过调控 *Drosha/DGCR8* 来调控微 RNA (microRNA, miRNA) 的表达并参与 miRNA 生物合成^[5-6]。这些研究暗示, 转录因子、增强子与 miRNA 形成的调控网络可能在肿瘤调控中起重要作用。然而, 目前对于 TEAD1、增强子和 miRNA 是否可以形成这一类型的调控网络, 以及该调控网络是否参与肝细胞癌的调控尚未有相关研究。

本研究首先通过对 CAGE-seq (cap analysis of gene expression and deep sequencing)、GRO-seq (global run-on sequencing) 和染色质免疫沉淀测序 (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) 数据进行分析来识别受到 TEAD1 调控的增强子(EnhTEAD1), 并从组蛋白的角度分析 TEAD1 对增强子上组蛋白富集程度的影响; 然后, 通过干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术、小 RNA 测序 (small RNA-seq) 来识别受 EnhTEAD1 调控的差异表达 miRNA (EnhTEAD1-miRNA), 并对这些 EnhTEAD1-miRNA 进行富集分析、鉴定及功能分析, 最后发现 EnhTEAD1-miRNA 显著参与了肝细胞癌的发生发展进程与通路。研究表明, TEAD1 确实显著参与了增强子-miRNA 网络与肝

细胞癌的发生发展, 这一结果为进一步的肝细胞癌研究提供了新的视角。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝细胞癌细胞系 HepG2 购自中科院上海细胞库。采用 DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国)将细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。该培养基添加了 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) (Biological Industries 公司, 以色列)和抗生素(100 U/mL 青霉素和 100 µg/mL 链霉素; HyClone Laboratories 公司, 美国)。

1.2 RNA 提取和 qRT-PCR

根据制造商说明书, 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国)提取总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和酶标仪(Biotechnology 公司, 美国)测定总 RNA。按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的指示对总 RNA 进行逆转录。采用 SYBR Green I 荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)。定量 PCR 反应流程为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 持续 40 s, 循环 40 次。采用 *GAPDH* 基因作为内参进行相对定量。

1.3 Western-blot 分析

将 HepG2 细胞在 10 cm 培养皿中常规培养至 80% 左右, 以 2.0×10^5 个/孔铺在 6 孔板中, 过夜培养。待细胞长至 70% 左右收集, 冰水浴条件下加入 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司), 充分混匀; 12 000 r/min 低温(4 °C)离心 5 min,

取上清液,采用 BCA 蛋白质定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定总蛋白质浓度。每孔取 20 μg 总蛋白质,加入煮沸的样品缓冲液中,煮沸后进行 10% SDS-PAGE 电泳。将电泳产物采用湿法转至硝酸纤维素膜,并用脱脂奶粉(上海碧云天生物技术有限公司)行封闭处理;加入 TEAD1 与 GAPDH 的小鼠单克隆抗体(稀释比 1:1 000, 华西海圻医药科技有限公司),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 12 h;加入山葵过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(稀释比 1:2 000, 华西海圻医药科技有限公司),室温放置 120 min;采用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)法发光显色。

1.4 细胞转染

靶向 TEAD1 的特异性 siRNA 由上海基因泰克有限公司设计并合成。使用 Lipo6000 转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司)按照制造商的说明将 siRNA 转染到 HepG2 细胞。转染 24 h 后,提取总 RNA,采用 qRT-PCR 法测定 mRNA 水平上 siRNA 的干扰效果(TEAD1-F: 5'-AGATTATCCA-GCTTCTGCCCCA-3', TEAD1-R: 5'-GCAATCAAG-GGATTCTGGGAG-3'; GAPDH-F: 5'-GGAGCGA-GATCCCTCCAAAAT-3', GAPDH-R: 5'-GGCTG-TTGTCATACTTCTCATGG-3'),采用 Western-blot 法测定蛋白质水平上 siRNA 的干扰效果。

1.5 HepG2 细胞中活性增强子的识别

增强子 RNA (enhancer RNA, eRNA)通常由活性增强子区域产生^[7]。HepG2 细胞中转录稳定与不稳定 eRNA 的活性增强子的识别分别基于 CAGE-seq 和 GRO-seq 数据。基于 CAGE-seq 识别的增强子下载自 HACER 数据库^[8](<http://bioinfo.vanderbilt.edu/AE/HACER/>; 2022-06-25)。基于 GRO-seq 原始数据识别增强子的步骤如下:从 SRA 数据库上获得 GRO-seq 原始数据(SRR5109940),使用 cutadapt 工具切除多 A 尾[poly(A) tail]和质量低于 10 的测序数据,使用 bowtie2 将长度大于 15 bp 的读数(read)匹配到基因组上;将匹配到核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)位点的读数和匹配质量低于 10 的读数过滤,使用 NRSA 工具(<http://bioinfo.vanderbilt.edu/NRSA/>)识别不稳定 eRNA。

1.6 EnhTEAD1 的鉴定

HepG2 细胞系中 TEAD1 的 ChIP-seq 数据从 ENCODE 项目^[9]下载(ENCSR497JLX)。如果 TEAD1 结合位点与增强子位置有重叠,则认为该增强子受 TEAD1 调控。

1.7 转录因子对 EnhTEAD1 组蛋白修饰的影响分析

从 ENCODE (GRCh38)中获得 HepG2 细胞系的 H3K27ac (ENCSR000AMO)、H3K4me1 (ENCSR000APV)、H3K4me3 (ENCSR575RRX) 3 个组蛋白信号和 GATA4 (ENCSR590CNM)、HNF4A (ENCSR469FBY)、YY1 (ENCSR000BNT)、CTCF (ENCSR607XFI) 4 个转录因子的 ChIP-seq 数据。比较有或没有转录因子结合的增强子上下游 1 kb 的组蛋白修饰信号。

1.8 miRNA 和 mRNA 的差异表达分析

对进行 siRNA 敲降的细胞进行小 RNA 测序,并使用 FastQC 软件对测序数据进行质量检验,去除低质量测序数据,同时使用 cutadapt 工具去掉测序时引入的引物。对于 miRNA,使用 bowtie 匹配到基因组(hg38)上。对于 mRNA,使用 HISAT2 匹配到基因组(hg38)上。然后用 SAMtools 工具过滤未匹配和低质量测序片段^[10]。利用 HTSeq^[11]进行统计,对读数低于 10 的 miRNA 进行过滤,使用 edgeR^[12]进行差异表达分析。差异表达的标准定义为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $Q \leq 0.05$, Q 值为错误发现率(false discovery rate, FDR)。

1.9 EnhTEAD1 调控的差异表达 miRNA 的识别

本研究采用 3 种方法来识别 HepG2 细胞中增强子和 miRNA 之间的调控关系。首先,通过三维基因组信息识别增强子和 miRNA 的相互作用。具体做法是:从 ENCODE 下载 HepG2 细胞的 Hi-C 数据(ENCFF419ZIV 和 ENCFF122SLQ),使用 Hi-Ctool 识别拓扑结构域(topologically associating domain, TAD);若结合 TEAD1 的增强子和差异表达的 miRNA 位于同一个 TAD 内,则认为该增强子调控 miRNA。其次,基于 4DGenome 数据库的 Hi-C 数据,若增强子和 miRNA 分别位于相互作用的两个区域中,则认为有调控关系。再次,参考文献提出的距离公式,将 S 值低于 0.2 的 miRNA 作为增强子相关的 miRNA^[5]。

1.10 已报道的 EnhTEAD1 调控的 miRNA 的靶基因下载及富集分析

从 miRTarBase 数据库^[13]下载已经实验证实的 miRNA 靶基因,使用 R 包的 clusterProfiler 对 EnhTEAD1 调控的 miRNA 的靶基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)的生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)富集分析以及京都基

因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)的通路富集分析。

2 结果与讨论

2.1 HepG2 细胞中活性增强子的识别

研究表明,大多数活性增强子可转录出稳定与不稳定两种 eRNA,它们分别可以通过 CAGE-seq 和 GRO-seq 检测到^[14]。为了研究 TEAD1 与活性增强子之间的调控关系,我们首先基于上述方法检测到的 eRNA 来鉴定活性增强子。结果显示,基于 CAGE-seq 数据共鉴定活性增强子 13 088 个;基于 GRO-seq 数据共鉴定活性增强子 1 322 个。最后,整合两个数据集,一共得到 14 286 个活性增强子。为了验证所获得的活性增强子是否准确,我们使用一系列活性增强子标记,包括 DNA 酶(DNase)位点、H3K27ac、H3K4me1 和 H3K4me3,研究了增强子的特征。结果显示,本文识别的活性增强子具有高水平的 H3K27ac 和 H3K4me1/

H3K4me3 信号比(图 1)。有趣的是,我们发现增强子-启动子环的结构调节因子 YY1 也富集在这些增强子中(图 1)。以上结果表明,我们基于 eRNA 鉴定出了一系列活性增强子,并证实这些活性增强子具有已有研究^[15-16]报道的活性增强子特征。

2.2 EnhTEAD1 具有更强的转录活性

为了鉴定 TEAD1 调控的增强子,我们将识别到的 14 286 个增强子与从 ChIP-seq 数据得到的 35 883 个 TEAD1-DNA 结合位点进行匹配,最终得到 2 550 个 EnhTEAD1。为了便于研究 TEAD1 的结合对增强子功能的影响,我们将其他未结合 TEAD1 的增强子定义为 EnhnoTEAD1。EnhTEAD1 和 EnhnoTEAD1 两类增强子的表达量分析结果表明,EnhTEAD1 的表达量显著高于 EnhnoTEAD1 的表达量(图 2A),暗示 TEAD1 的结合促进了增强子的活性,从而正向调控靶基因的表达。

先前的研究表明,活性增强子通常与具有激活基因调控功能的组蛋白耦合,如 H3K27ac、

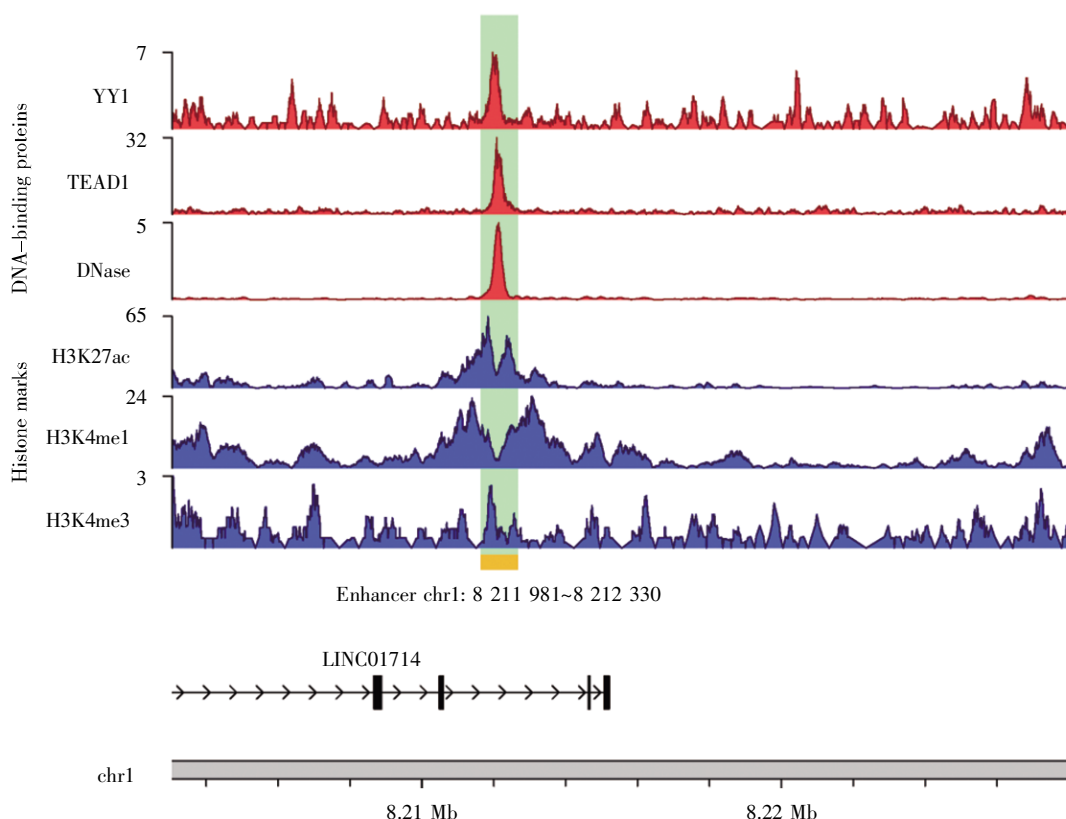


图 1 增强子区域(chr1: 8 211 981~8 212 330) DNA 结合蛋白和组蛋白修饰标记的信号示意图

蓝色代表染色体上的组蛋白信号,红色代表染色体上的转录因子信号,黄色区域代表增强子,绿色区域代表增强子上的信号。

Fig.1 Schematic view of pooled BedGraph tracks at genomic regions representative of DNA-binding proteins and histone marks around enhancers (chr1: 8 211 981~8 212 330)

Blue represents histone signal on chromosomes, and red represents transcription factor signal on chromosomes. Yellow area represents enhancers, and green area represents the signal of enhancer area.

H3K4me1 和 H3K4me3^[15, 17]。为了探索 TEAD1 对增强子上组蛋白富集的影响,我们对 EnhTEAD1 和 EnhnoTEAD1 进行了组蛋白富集程度分析。结果显示,与 EnhnoTEAD1 相比,EnhTEAD1 上的 H3K27ac、H3K4me1 和 H3K4me3 信号显著增强(图 2B~D)。这一结果暗示转录因子 TEAD1 可能通过直接或间接与增强子结合来提高增强子的转录活性。

2.3 EnhTEAD1 的转录因子结合分析

相关报道指出,增强子通过招募转录因子与基因启动子区相互作用,调节增强子的染色质可及性和染色质成环调控基因的表达^[18]。为了探究 EnhTEAD1 对染色质可及性和染色质成环的影响,我们下载并分析了 HepG2 细胞中涉及染色质可及性与染色质环化的 4 个转录因子 GATA4、HNF4A、YY1 和 CTCF 的 ChIP-seq 数据^[19-21]。结果显示,4 种转录因子在 EnhTEAD1 上的结合信号均高于其在 EnhnoTEAD1 上的结合信号(图 3),提示 TEAD1 可能与这些转录因子共同促进染色质

可及性,并在染色质成环调控因子 YY1 和 CTCF 的作用下,调节增强子与启动子的空间成环。

2.4 EnhTEAD1 调控的差异表达 miRNA 的鉴定及功能富集分析

研究表明,增强子可以调节 miRNA 的表达,并参与 Drosha/DGCR8 调控的 miRNA 生物合成^[5]。为了探索 EnhTEAD1 参与的 miRNA 调控网络,我们首先在 HepG2 细胞中对 TEAD1 进行了 siRNA 敲降。结果表明,经 siRNA 干扰后,TEAD1 的表达在 mRNA 和蛋白质水平均显著下降(单因素方差分析, $n=3$) (图 4A)。随后,我们对空白对照组与 siRNA 干扰 24 h 后的 HepG2 细胞进行了小 RNA 测序,以找到受 TEAD1 调控的 miRNA。结果显示,共鉴定出 81 个受 TEAD1 调控的显著差异表达的 miRNA,其中 26 个表达上调,55 个表达下调(图 4B)。最后,我们通过 3 种方法对 EnhTEAD1 与差异表达 miRNA 的调控关系进行了识别,确定了增强子调控的远端和近端 miRNA,并最终获得了 68 个存在空间基因组信息支持的

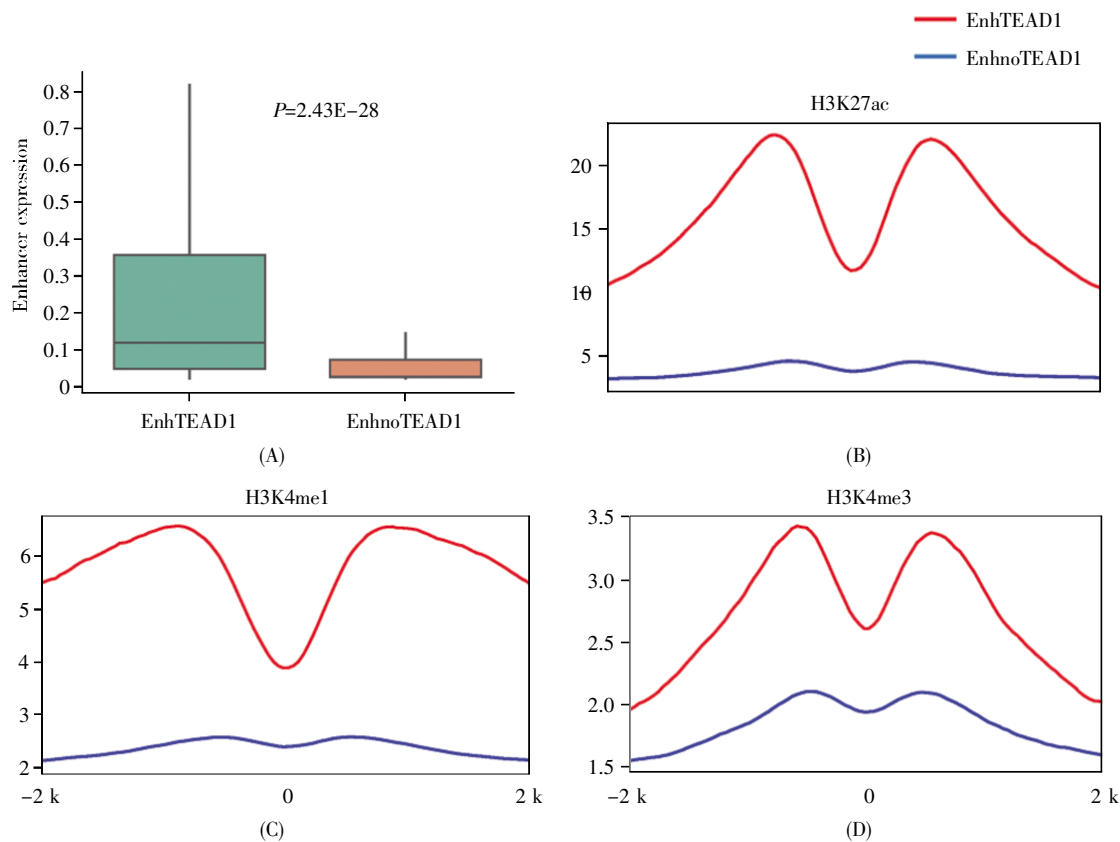


图2 EnhTEAD1 和 EnhnoTEAD1 两类增强子 RNA 表达量以及组蛋白信号的差异

(A) 两类增强子的表达量差异; (B~D) 两类增强子的组蛋白信号差异。

Fig.2 The difference of the expression of eRNAs and histone signals between EnhTEAD1 and EnhnoTEAD1

(A) The difference of expression amount between EnhTEAD1 and EnhnoTEAD1; (B~D) The difference of histone signals between EnhTEAD1 and EnhnoTEAD1.

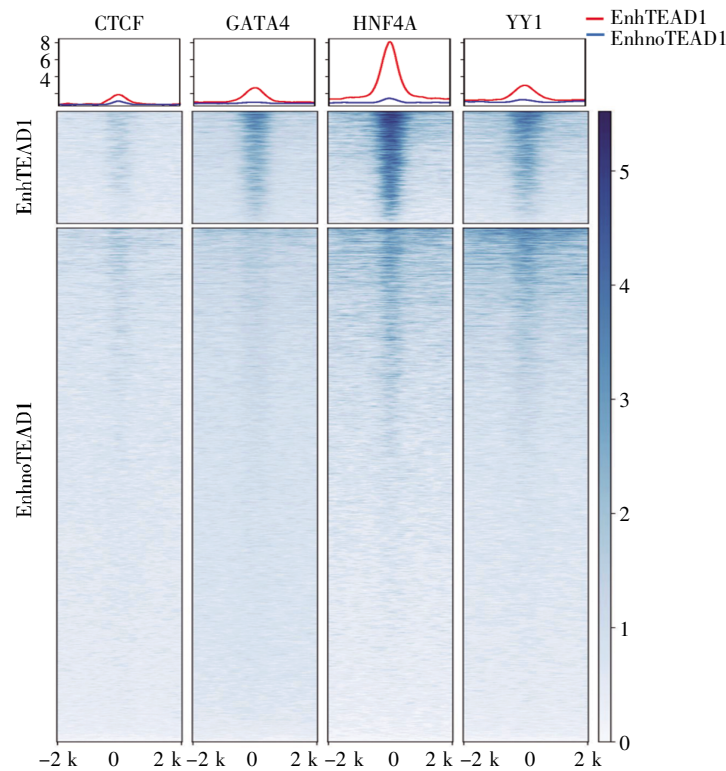


图 3 四种转录因子在 EnhTEAD1 和 EnhnoTEAD1 上的结合信号

Fig.3 The binding signals of four transcription factors at EnhTEAD1 and EnhnoTEAD1

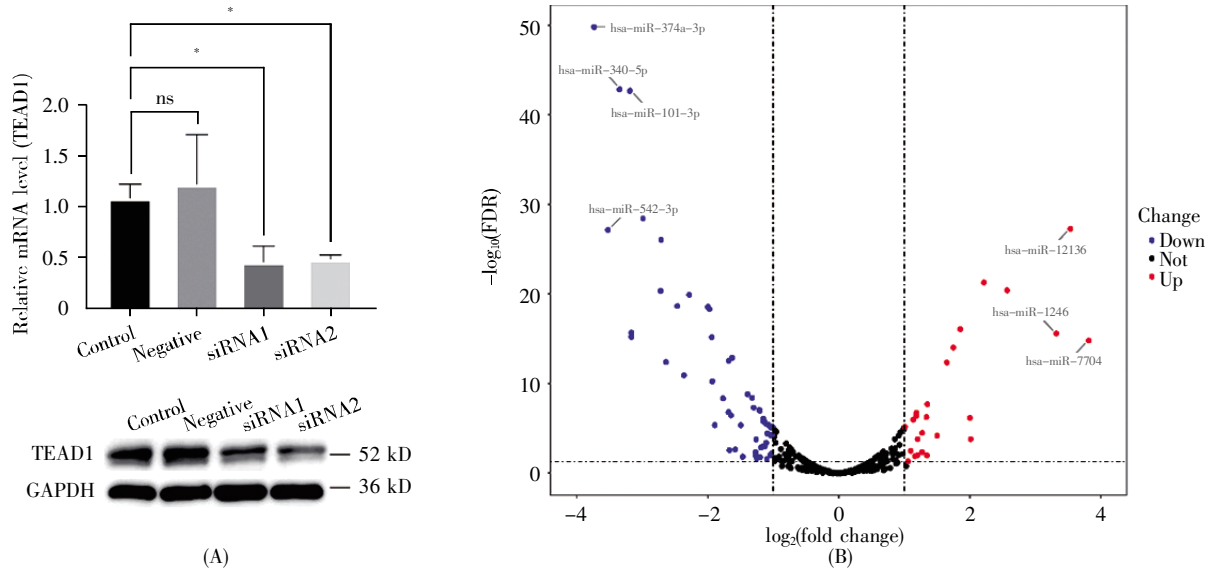


图 4 TEAD1 的 siRNA 干扰效果及其调控的差异表达 miRNA

(A) 采用 qRT-PCR 和 Western-blot 检测各组 HepG2 细胞中 TEAD1 的表达, 重复 3 次, ns 表示无显著差异, * 表示 $P < 0.05$ (control 为空白对照组, 不做处理; negative 为阴性对照组, 插入没有任何靶向基因的随机片段; siRNA1 和 siRNA2 为对 TEAD1 进行了 siRNA 敲降的实验组 1 和 2); (B) 受 TEAD1 调控的差异表达 miRNA。红点代表显著上调的 miRNA, 蓝点代表显著下调的 miRNA [$|\log_2(\text{fold change})| \geq 1, Q \leq 0.05$].

Fig.4 The siRNA interference effect of TEAD1 and the significantly differentially expressed miRNA regulated by TEAD1

(A) The expression of TEAD1 in HepG2 cells of each group was detected by qRT-PCR and Western-blot, which was repeated three times. ns indicates no significant difference, and * indicates $P < 0.05$. The control group was untreated. In the negative control group, a random fragment without any targeted genes was inserted. The groups of siRNA1 and siRNA2 were experimental groups 1 and 2 that performed siRNA knockdown on TEAD1; (B) Differentially expressed miRNA regulated by TEAD1. Red dots represent significantly up-regulated miRNAs, and blue dots represent down-regulated miRNAs [$|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ and $Q \leq 0.05$].

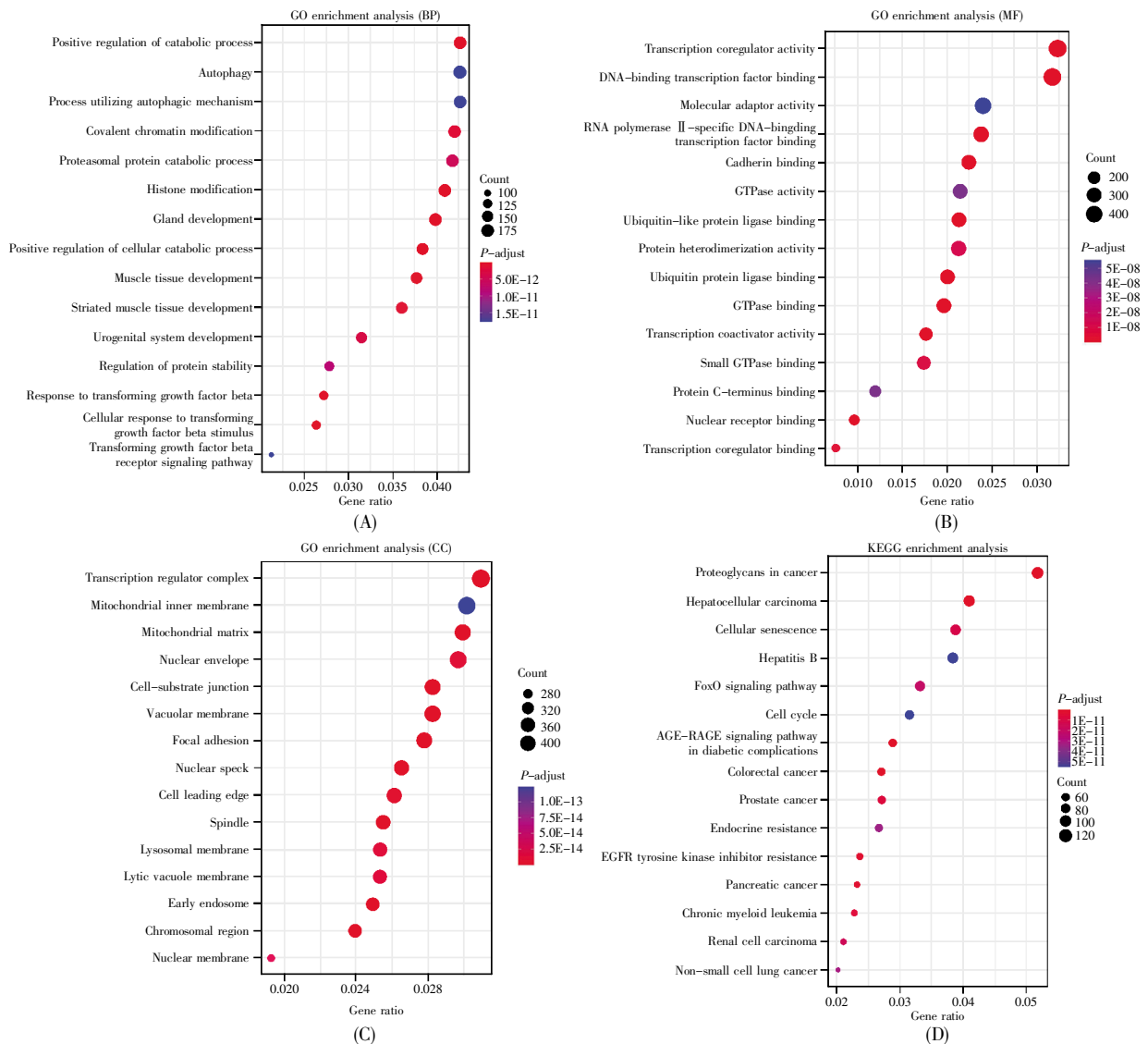


图 5 EnhTEAD1 调控的 miRNA 靶基因的功能富集分析(前 15 条)

(A~C) GO 富集分析; (D) KEGG 信号通路富集分析。

Fig.5 Functional enrichment analysis of target genes of miRNAs regulated by EnhTEAD1 (top 15)

(A~C) GO enrichment analysis; (D) KEGG signaling pathway enrichment analysis.

EnhTEAD1-miRNA 相互作用。

为了研究这些 EnhTEAD1-miRNA 的功能, 对 EnhTEAD1 调控的 miRNA 的靶基因进行 GO 和 KEGG 通路分析。结果表明, EnhTEAD1-miRNA 的靶基因主要参与正调控分解代谢、自噬、组蛋白修饰等肿瘤相关生物通路(图 5A~C), 并显著富集在多种癌症通路中, 如癌症中的蛋白聚糖、肝癌、细胞衰老、FoxO 信号通路和细胞周期等(图 5D)。

3 结论

本研究通过整合 HepG2 细胞的 CAGE-seq 和 GRO-seq 数据, 鉴定出 14 286 个活性增强子, 将其与 ChIP-seq 数据中的 35 883 个 TEAD1-DNA

结合位点进行匹配, 获得 2 550 个 EnhTEAD1。与 EnhTEAD1 相比, EnhTEAD1 上的活性增强子标记信号(H3K27ac、H3K4me1/H3K4me3)和 eRNA 表达量显著升高, 而且 TEAD1 与 GATA4、HNF4A、YY1 和 CTCF 协同促进 EnhTEAD1 的染色质可及性和空间环化。此外, 经 siRNA 干扰和小 RNA 测序, 鉴定得到 81 个受到 TEAD1 调控的显著差异表达的 miRNA, 其中 68 个存在空间基因组信息支持。进一步的功能富集分析显示, 受 EnhTEAD1 调控的 miRNA 显著参与肝细胞癌生物进程与通路。综上所述, 本研究表明在肝细胞癌中存在 EnhTEAD1-miRNA 这一新的调控模式, 这为进一步的肝癌研究提供了新的视角。

参考文献(References):

- [1] YU M H, ZHANG W. TEAD1 enhances proliferation via activating SP1 in colorectal cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83: 496–501.
- [2] ZHOU Y, HUANG T, ZHANG J, *et al.* TEAD1/4 exerts oncogenic role and is negatively regulated by miR-4269 in gastric tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(47): 6518–6530.
- [3] THANDAPANI P. Super-enhancers in cancer[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019, 199: 129–138.
- [4] NIA A, DHANASEKARAN R. Genomic landscape of HCC[J]. *Current Hepatology Reports*, 2020, 19(4): 448–461.
- [5] SUZUKI H I, YOUNG R A, SHARP P A. Super-enhancer-mediated RNA processing revealed by integrative microRNA network analysis[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1000–1014.e15.
- [6] WOOD C D, CARVELL T, GUNNELL A, *et al.* Enhancer control of microRNA miR-155 expression in Epstein-Barr virus-infected B cells[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(19): e00716–18.
- [7] SHEN Y X, HUANG Z Y, YANG R Q, *et al.* Insights into enhancer RNAs: biogenesis and emerging role in brain diseases[J]. *Neuroscientist*, 2023, 29(2): 166–176.
- [8] WANG J, DAI X Z, BERRY L D, *et al.* HACER: an atlas of human active enhancers to interpret regulatory variants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D106–D112.
- [9] ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project[J]. *Science*, 2004, 306(5696): 636–640.
- [10] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078–2079.
- [11] ANDERS S, PYL P T, HUBER W. HTSeq: a Python framework to work with high-throughput sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(2): 166–169.
- [12] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140.
- [13] HSU S D, LIN F M, WU W Y, *et al.* miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA–target interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Database issue): D163–D169.
- [14] WANG J, ZHAO Y, ZHOU X F, *et al.* Nascent RNA sequencing analysis provides insights into enhancer-mediated gene regulation[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19: 633.
- [15] CREYGHTON M P, CHENG A W, WELSTEAD G G, *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2010, 107(50): 21931–21936.
- [16] KANG Y J, KIM Y W, KANG J, *et al.* Histone H3K4me1 and H3K27ac play roles in nucleosome eviction and eRNA transcription, respectively, at enhancers[J]. *FASEB Journal*, 2021, 35(8): e21781.
- [17] HEINTZMAN N D, STUART R K, HON G, *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(3): 311–318.
- [18] KLEMM S L, SHIPONY Z, GREENLEAF W J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(4): 207–220.
- [19] HE A B, GU F, HU Y, *et al.* Dynamic GATA4 enhancers shape the chromatin landscape central to heart development and disease[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4907.
- [20] BEAGAN J A, DUONG M T, TITUS K R, *et al.* YY1 and CTCF orchestrate a 3D chromatin looping switch during early neural lineage commitment[J]. *Genome Research*, 2017, 27(7): 1139–1152.
- [21] ROGERSON C, BRITTON E, WITHEY S, *et al.* Identification of a primitive intestinal transcription factor network shared between esophageal adenocarcinoma and its precancerous precursor state[J]. *Genome Research*, 2019, 29(5): 723–736.