



张瑞霖, 武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系副主任, 教授, 博士生导师。本科毕业于复旦大学, 博士毕业于美国梅奥医学院, 美国加州大学圣地亚哥分校博士后, 曾任复旦大学研究员。兼任中国动物学会斑马鱼分会常务理事, 中国细胞生物学学会发育生物学分会理事, 湖北省生物化学与分子生物学学会常务理事。主要研究方向为利用斑马鱼模式动物并综合运用分子生物学、遗传学、发育生物学的方法研究信号转导、细胞分化和代谢稳态, 建立人类疾病模型, 重点关注心血管系统的发育和代谢、损伤和再生。近年来在*Nature*、*eLife*、*Protein Cell*等SCI期刊上发表论文30余篇, 文章总被引用次数达600余次。

## 再生调控的开关: 组织再生增强子的研究进展

李奇<sup>1</sup> 耿芳<sup>2</sup> 张瑞霖<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>武汉大学基础医学院, 武汉 430071; <sup>2</sup>上海中学, 上海 200237)

**摘要** 再生是组织发生损伤后恢复原有形态和功能的过程。不同脊椎动物的再生能力差异很大, 硬骨鱼和两栖动物再生能力很强, 而哺乳动物的再生能力极其有限。不同物种再生能力的差异很可能不是由于再生特异基因在进化过程中丢失造成的, 相反, 调控元件在组织损伤时的激活与否可能是决定再生成功与否的开关。增强子是一种顺式作用调控元件, 对于精确调控基因表达必不可少。目前已经在多种模式生物中鉴定出了多个组织再生增强子, 并报道了这些元件在组织再生中的关键作用。这篇综述将重点介绍增强子在组织再生中的重要调控作用, 组织再生增强子的预测和鉴定, 以及组织再生增强子在损伤时被激活的具体机制。

**关键词** 再生; 组织再生增强子; 斑马鱼; 转录因子; 组蛋白修饰

## Switching on Regeneration: Research Progress of Tissue Regeneration Enhancers

LI Qi<sup>1</sup>, GENG Fang<sup>2</sup>, ZHANG Ruilin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China; <sup>2</sup>Shanghai High School, Shanghai 200237, China)

**Abstract** Regeneration is the process by which tissue restores its original shape and function after injury. The regenerative capacity varies widely among different vertebrates. Teleost fish and amphibians have strong regenerative capacity, while mammals have limited capacity to regenerate in most tissues. The reasons behind varied regenerative capacity among species may not be attributed to loss of regeneration-specific genes during evolution. However, activation of regulatory elements in response to tissue damages may account for the key switch of regeneration. Enhancers are *cis*-acting regulatory elements that are essential for the precise regulation of gene expression. Several tissue regeneration enhancers have been identified in a variety of model organisms and prove to play impor-

收稿日期: 2022-05-02 接受日期: 2022-06-15

国家自然科学基金(批准号: 32170852)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13916763446, E-mail: zhangruilin@whu.edu.cn

Received: May 2, 2022 Accepted: June 15, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32170852)

\*Corresponding author. Tel: +86-13916763446, E-mail: zhangruilin@whu.edu.cn

tant roles in regeneration. This review will focus on the important regulatory role of enhancers in tissue regeneration, the prediction and identification of tissue regeneration enhancers, and the specific mechanisms by which tissue regeneration enhancers are activated in response to injury.

**Keywords** regeneration; tissue regeneration enhancer; zebrafish; transcription factor; histone modification

再生是组织发生损伤后恢复原有形态和功能的过程。当发生组织损伤后,一些组织和器官会通过细胞的增殖、分化和迁移等活动来修复损伤区域。不同脊椎动物之间的再生能力有着显著的区别。在修复过程中再生能力强的生物不会产生或者产生暂时性的纤维化瘢痕<sup>[1]</sup>,再生组织具有与受损组织相同的形态和生理特性,可以行使正常的功能<sup>[2]</sup>;再生能力有限的生物则会用永久性的瘢痕取代受损区域,可能导致组织功能障碍<sup>[3]</sup>。心肌梗死是由冠状动脉疾病造成的心肌细胞不可逆转的死亡,受损的心肌会被纤维化的瘢痕所取代,纤维化瘢痕虽然可维持心室壁的完整性,但是会影响心脏泵血功能。心梗发生后的临床治疗,例如使用 $\beta$ 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、心房利钠肽等药物治疗<sup>[4]</sup>,只能减缓心脏的恶性重构,导致患者最终发生心力衰竭。同样,神经损伤后修复治疗的恢复效果往往不尽人意,这大大影响了患者的生活质量<sup>[5]</sup>;发生严重脊柱损伤后可能导致永久性的瘫痪,缺少行之有效的临床干预手段<sup>[6]</sup>;因为哺乳动物肢体的不可再生,不可逆转的截肢手术会给患者生理和心理上带来双重的沉重压力<sup>[7]</sup>。

许多非哺乳动物如硬骨鱼和两栖类具有较强的再生能力。斑马鱼是再生研究中使用广泛的一种模式动物,能再生许多组织和器官,包括大脑<sup>[8]</sup>、视网膜<sup>[9]</sup>、尾鳍<sup>[10]</sup>、脊髓<sup>[11]</sup>、心脏<sup>[12]</sup>等。反复切除蝾螈的组织和器官如尾巴、晶状体、心脏等不会改变它的再生能力,而且蝾螈组织的再生效率也不受年龄的影响<sup>[13]</sup>。在变态发育前的蝌蚪阶段非洲爪蟾的组织和器官具有很强的再生能力,然而在变态发育后大部分组织的再生能力都消失了<sup>[14]</sup>。成年哺乳动物的再生能力极其有限<sup>[5-7,15-18]</sup>,而新生哺乳动物如人类婴幼儿和小鼠的心脏具有较强的再生能力<sup>[19-23]</sup>。令人感兴趣的是,最近研究发现非洲刺毛鼠在成年后也具有强的器官再生能力,能实现损伤皮肤<sup>[24]</sup>、耳朵<sup>[25]</sup>、肾脏<sup>[26]</sup>和心脏<sup>[27-28]</sup>的再生,它是第一个被发现具有这种再生能力的哺乳动物。

脊椎动物的基因组在进化过程中发生了什么样的变化导致了再生能力的多样性?研究发现,在不同的自然选择压力下脊椎动物的再生能力可能会发生不同程度的丢失<sup>[29]</sup>,表现为在进化过程中某些再生相关基因只在具有高度再生能力的物种中得以保留,造成了不同物种再生能力的差异。比如Agrs超家族(Ag1、Agr2和Agr3)在不同物种的再生中具有功能上的保守性。在蝾螈中,nAG(Agr2)与Prod1相互作用<sup>[30]</sup>,激活ERK1/2丝裂原活化蛋白激酶信号通路,促进芽基生成<sup>[31]</sup>。在非洲爪蟾中,Agr2和Ag1同样对肢体再生是必要的,它们通过与Prod1结构和功能类似的Tfp4结合促进芽基细胞增殖。但在哺乳动物等再生能力有限的高等脊椎动物中,却没有发现Ag1的同源基因<sup>[32-33]</sup>。然而除了Agrs之外,并没有发现更多的物种特异性的再生关键基因。

再生的一个特征是通过重新激活早期发育程序来重建损伤组织。激活FGF信号通路可以促进斑马鱼尾鳍和蝾螈肢体损伤区域的芽基生成<sup>[34]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路同样是一个在进化上保守的肢体再生相关的关键信号通路<sup>[35]</sup>。研究发现,许多调控脊椎动物发育过程的信号通路如Hh、BMP、RA、IGF、Activin、Notch、mTOR、Calcineurin等对于斑马鱼尾鳍再生也是必要的<sup>[36]</sup>。一些在脊椎动物中保守的转录因子AP-1、Sox、Hand2、Tbx5、YAP和TEAD在发育中起着重要作用,它们的缺陷也会导致斑马鱼等再生能力强的物种再生的失败<sup>[37]</sup>。这些研究表明,哺乳动物有限的再生能力可能不是由于再生基因的缺陷造成的,而是因为它们缺少对再生作出反应的机制。

组织损伤后的修复需要多个基因在损伤区域精确表达,基因表达水平的差异决定了脊椎动物之间不平衡的再生能力。基因在不同生理活动中的精确时空表达依赖于调控元件的调节,基因有着复杂的调控元件,反式作用因子和染色质调节因子通过共同作用于调控元件来调控基因的表达,所以调控元件可能是造成再生能力差异的关键因素。增强子

是顺式作用的DNA元件,广泛分布于各个物种的基因组中,能增强基因的转录且不受距离和方向的限制。它分布在靶基因的5'端、3'端和内含子区,在长达几Mb的远距离也可以发挥作用<sup>[38]</sup>。在染色质三维结构上增强子通过和靶基因的启动子区形成“环”发生相互作用,进而激活基因的转录。增强子功能的实现是通过转录激活因子和抑制因子在特定位点的结合来介导的,转录因子结合位点的数量和结合的偏好性决定了增强子结构和功能上的差异<sup>[39]</sup>。增强子的调控作用为修复的“精确性”提供了保障,挖掘增强子在再生能力强的物种中的功能和激活机制或许可以解释哺乳动物再生能力变弱的原因,为人类组织器官的修复提供新的治疗思路。

## 1 再生受到组织再生增强子的调控

1981年,首次在SV40病毒DNA上发现了增强子元件,表现为不依赖于距离和方向地增强基因表达<sup>[40]</sup>。此后在各类模式生物中也发现了多个增强子,比如小鼠淋巴细胞特异的免疫球蛋白重链基因上的增强子<sup>[41]</sup>,上调果蝇卵黄蛋白基因表达的增强子<sup>[42]</sup>,以及酵母半乳糖调节的上游启动子元件中的类增强子序列<sup>[43]</sup>等。目前已经发现了许多在发育中起作用的增强子。研究表明有些发育相关的增强子,同样也能够被损伤信号诱导激活。推测在进化的早期,生物可能在发育和再生中共用同一个增强子,随后逐渐分化为单独被发育信号激活的增强子和损伤信号激活的组织再生增强子。而再生增强子在进化过程中可能也发生了分化,表现为再生能力强的物种保持着能同时激活损伤和再生的增强子活性,在再生能力有限

的物种中增强子只保留了损伤响应,而再生响应缺失(图1)。通过ChIP-seq和转基因分析等技术手段已经鉴定出了多个再生相关的增强子(表1),如在斑马鱼中发现的*LEM*<sup>[44]</sup>和*careg*调节元件<sup>[45]</sup>,在非洲鲷鱼中发现的*IEM*<sup>[46]</sup>等,它们都能被损伤信号诱导激活。

### 1.1 再生中发育相关增强子的重激活

有些发育相关增强子参与调节机体的早期发育,这些增强子的活性随着机体的成熟逐渐被抑制。当发生组织损伤时,它们重新被激活调控组织的再生。如*Raldh2*和*Wt1*心外膜增强子的活性在小鼠心脏发育过程中和成年小鼠心脏损伤时都能被转录因子C/EBP激活,通过活化心外膜调节心脏发育和再生<sup>[47]</sup>。*ZPA*调节序列(*ZRS*)在脊椎动物中高度保守,可调控四足动物的肢体发育基因*Shh*的时空特异性表达,在鱼鳍发育中也发现了*ZRS*的同源序列<sup>[48]</sup>。但是没有附肢的蛇在进化过程中发生了*ZRS*的突变,造成*Shh*基因的表达能力微弱,研究表明,*ZRS*增强子在蛇进化过程的肢体退化中发挥了一定的作用<sup>[49]</sup>。*ZRS*序列的突变会引起人和小鼠的前轴型多指畸形,然而在突变蝾螈*ZRS*后*shh*基因的表达水平显著降低,影响了它的肢体再生<sup>[50-51]</sup>,此研究表明组织发育和再生可能共用一套分子机制。*careg*元件是*ctgfa*基因上游的一个调控元件,在斑马鱼成鱼损伤心脏的心肌细胞和损伤尾鳍的间充质细胞中被激活。它被鉴定为再生特异的增强子,*careg*的激活依赖于TGF- $\beta$ 和Activin信号通路。转基因报告品系表明,*careg*元件指导的荧光蛋白在原始心肌层中有表达,表明*careg*同样也参与了胚胎的心脏发育过程,谱系追踪发现,*careg*阳性的心肌细胞参与了发育过程中肌小

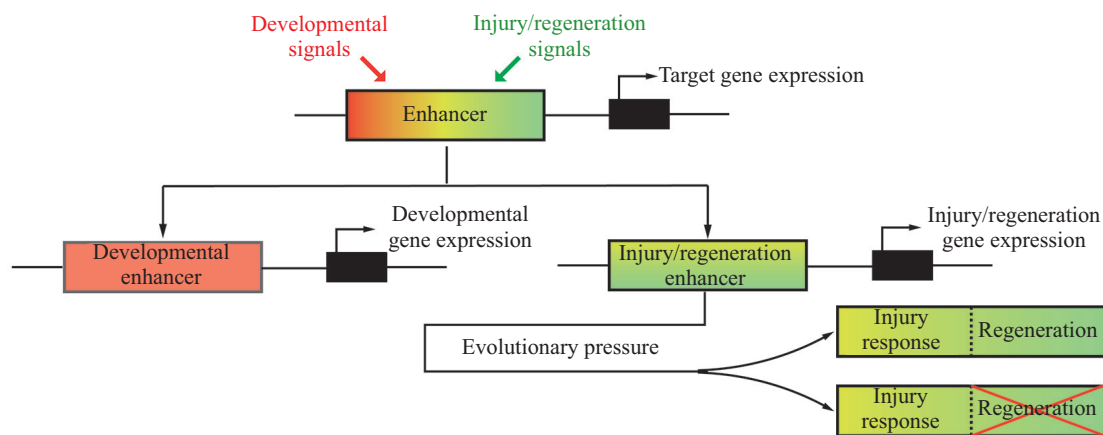


图1 组织再生增强子的分类

Fig.1 Classification of tissue regeneration enhancers

表1 损伤或再生相关增强子  
Table 1 Injury or regeneration-associated enhancers

损伤或再生相关增强子 Injury/regeneration-associated enhancer	组织 Tissue	物种 Species	预测和鉴定 Prediction and validation	功能 Function	参考文献 References
<i>Raldh2</i> and <i>Wt1</i> epicardial enhancers	Epicardium	Mouse	Evolutionarily conserved sequence analysis, transgenic assays	Heart development and regeneration	[47]
<i>ZRS</i> enhancer	Limb	Clawed frog, newt	Methylation analysis, CRISPR-Cas	Limb development and regeneration	[48-51]
<i>careg</i> element	Myocardium	Zebrafish	Evolutionarily conserved sequence analysis, transgenic assays	Primordial cardiac layer development, adult heart and fin regeneration	[45]
<i>Bmp5</i> associated enhancer	Skeletal system	Mouse	Evolutionarily conserved sequence analysis, transgenic assays	Bone, cartilage, skin and lung injury response	[52]
<i>BRV118</i> enhancer	Imaginal disc	Fruit fly	Transgenic assays, CRISPR-Cas	Injury-responsive activity in larvae, epigenetic silencing during maturation	[53-54]
<i>es1</i> enhancer	Tail and limb	Clawed frog	Evolutionarily conserved sequence analysis, transgenic assays	Wound-induced activity in injured region of tadpole tail	[55]
<i>LEN</i>	Heart and fin	Zebrafish	ChIP-seq, transgenic assays	Injury-responsive activity in injured region	[44,56-57]
<i>IEN</i>	Heart and fin	Killifish, zebrafish	ChIP-seq, transgenic assays	Injury/regeneration-responsive activity in injured region	[46]
Schwann cell nerve injury-associated enhancer	Nerve	Rat	ChIP-seq, motif analysis	Nerve injury-responsive activity	[58]
<i>Samd14-Enh</i> (G2A)	Red blood cells	Mouse	FAIRE-seq, CRISPR-Cas	Activated in severe anemia, regulate red blood cell regeneration	[59]
Hematopoiesis-associated <i>GATA2</i> enhancer	Hematopoietic stem cells	Mouse	ChIP-seq, CRISPR-Cas	Bone marrow injury-responsive activity, regulate hematopoiesis	[60-61]
<i>lhx1</i> enhancer	Kidney	Clawed frog, zebrafish	Evolutionarily conserved sequence analysis, transgenic assays	Injury-responsive activity, reactivation of developmental genes	[62]

梁的形成<sup>[45]</sup>。

## 1.2 被损伤信号激活的组织再生增强子

有一类增强子不再对发育信号产生应答,但是具有损伤/再生响应活性,当发生组织损伤时被诱导激活。*Bmp5*是参与骨骼和软骨发育及再生的关键信号分子,研究发现,小鼠体内存在不同的增强子,可以控制*Bmp5*基因在发育过程中的时空特异性表达,精确调控骨骼和软骨在不同部位的发育和生长<sup>[63]</sup>。后续研究发现,小鼠*Bmp5*基因也受一个不同于发育相关增强子的损伤响应增强子的调控,在成年动物的骨骼或软骨损伤中被激活,同时对皮肤和肺部损伤也有应答<sup>[52]</sup>。

*BRV118*是在果蝇中被鉴定出来的能对损伤产

生应答的增强子,位于*wg*和*Wnt6*基因之间,在果蝇成虫盘损伤后*BRV118*增强子被JNK信号通路激活,上调*wg*和*Wnt6*基因的表达。在*BRV118*增强子突变品系中,果蝇翅膀的大小在再生后出现了明显的减小<sup>[53-54]</sup>。非洲爪蟾*es1*增强子在蝌蚪尾部损伤后能在损伤区域表皮边缘激活*es1*基因的表达。当用信号通路抑制剂抑制了ERK、TGF- $\beta$ 和活性氧信号通路后发现增强子的活性显著降低,而且再生也受到了影响,表明增强子的损伤响应活性以及一些经典的信号通路可能参与了增强子对再生的调控过程<sup>[55]</sup>。

在斑马鱼中也发现了心脏和尾鳍特异的再生增强子。瘦素*lepb*基因在成鱼损伤心脏和损伤尾鳍中高水平表达,ChIP-seq分析发现,H3K27ac在*lepb*

基因上游3 Kb和7 Kb的位置有富集。候选增强子元件的转基因分析表明,位于*lepb*上游7 Kb的元件在损伤心脏中具有增强子活性,在再生尾鳍中的活性也上升,因此被称为组织再生增强子*LEN*。随着再生的完成,*LEN*的活性减弱。通过不同长度*LEN*的报告品系分析,发现*LEN*上存在两个分别对心脏和尾鳍具有损伤响应活性的模块<sup>[44]</sup>。

虽然研究发现很多增强子能够被损伤信号诱导激活,但是通常它们对再生而言是非必要的。有研究人员认为这可能是因为组织再生增强子在进化过程中出现了功能上的分化和丢失,再生能力强的物种保留有保守的再生增强子,这种类型的增强子能被损伤诱导激活再生响应程序,而且对再生是必需的。以非洲鲫鱼和斑马鱼为例,二者的生存环境迥异,但是它们的尾鳍在受到损伤后都能再生。通过比较基因组学、单细胞测序和ChIP-seq发现在*inhba*基因上游存在保守的再生响应增强子*IEN*,它对组织再生是必需的,而人类基因组中该增强子因发生功能性调整而丧失激活再生的能力。该工作首次从跨物种进化角度发现了序列进化保守的再生增强子,解释了脊椎动物中器官再生能力不均匀分布的原因<sup>[46]</sup>。

## 2 组织再生增强子的预测和鉴定

增强子的调控作用可能是组织再生的关键开关,但是增强子作用的位置、距离和方向具有不确定性,而且序列变化大,这为增强子的预测和鉴定带来了很大的困难。转录因子和特定组蛋白修饰共同调节增强子的功能,转录因子结合位点在增强子上成簇聚集且相对保守,活性增强子区域通常是开放的,基于这些特性研究人员开发出了ChIP-seq、DNaseI-seq、MNase-seq、FAIRE-seq和ATAC-seq等技术来大规模预测和识别增强子序列<sup>[64]</sup>,并在获得候选增强子序列后,进一步通过各种模式动物的转基因报告品系验证了增强子的功能活性<sup>[65]</sup>。

### 2.1 潜在增强子序列的识别

目前已有多种预测候选增强子的技术,最常见的是染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)。这种方法使用针对特定转录因子和组蛋白修饰的抗体与基因组片段共沉淀,沉淀下来的DNA片段可以进行序列测定和分析,与高

通量测序联合被称为ChIP-seq,从而获得与特定转录因子和组蛋白修饰互作的DNA序列信息<sup>[66]</sup>。组蛋白乙酰转移酶p300是增强子相关的转录结合因子,针对p300的ChIP-seq不仅可以预测增强子在基因组中的位置,还能预测增强子在不同组织中的活性<sup>[67]</sup>。人类表观基因组学联盟描述了五种不同的组蛋白标记,H3K4me1和H3K27ac作为增强子的标记,H3K4me3作为启动子区域的标记,H3K36me3作为基因上游区域的标记,H3K27me3与多梳蛋白的沉默抑制有关,H3K9me3与异染色质化有关<sup>[68-69]</sup>。利用ChIP-seq分析这些特定的组蛋白修饰已经被广泛运用于预测和鉴定相对应的染色质区域<sup>[70]</sup>。ChIP-exo是ChIP-seq的衍生技术,它包括一个额外的核酸外切酶的消化步骤,通过切割DNA来鉴定高分辨率的转录因子结合位点<sup>[71]</sup>。

染色质开放状态的变化为增强子的预测提供了另一种截然不同的途径,这可以对ChIP-seq数据作进一步的补充。DNase I核酸内切酶或微球菌核酸酶MNase能非特异地消化裸露的DNA,将它们与高通量测序结合起来能识别全基因组范围内的调控区<sup>[72]</sup>。甲醛辅助分离调节元件技术FAIRE-seq则是将用甲醛在活体内交联过的染色质经过超声波切割断裂,再对回收的DNA片段进行序列分析<sup>[73]</sup>。2013年研究人员开发了一种新的检测染色质开放状态的技术ATAC-seq,转座酶Tn5在体外负载用于高通量测序的接头序列,之后Tn5可以同时切割并用接头序列标记开放染色质区域<sup>[74]</sup>。通过ATAC-seq可以获得丰富的表观遗传信息,包括开放染色质图谱、核小体定位、转录因子结合位点等<sup>[75]</sup>。

### 2.2 候选增强子的功能验证

在获得候选增强子后,一般通过报告基因在体内的表达来鉴定它们的活性。通常将候选增强子放在最小启动子和报告基因( $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、绿色荧光蛋白等)的上游,构建成质粒,再用质粒转染细胞系或将其整合到发育胚胎的基因组中。每个候选增强子对应一种转基因品系,通过报告基因表达的丰度和定位可以分析增强子时空特异的活性。多种增强子已经在果蝇、小鼠、斑马鱼、秀丽隐杆线虫中得到鉴定<sup>[67,76-78]</sup>。斑马鱼心脏发育的形态发生和信号通路与哺乳动物的类似,而且胚胎透明,容易获得,利用高分辨率实时成像能够揭示其心脏发育和再生的机制<sup>[79]</sup>。转基因品系

*Tg(vmhc:mCherry-NTR)*是一个硝基还原酶NTR介导的遗传消融系统,可以在甲硝唑MTZ的诱导下定向破坏心室心肌细胞,造成心脏损伤。使用该系统鉴定候选增强子更有利于快速鉴别和验证候选增强子的活性<sup>[80]</sup>。有研究人员分别构建了来源于海绵、小鼠、斑马鱼和人的胰岛增强子的斑马鱼转基因报告品系,结果发现报告基因*GFP*的表达模式均相同,说明增强子在一定程度上是保守的。因此,斑马鱼适合于增强子的功能验证<sup>[81]</sup>,目前已经有多个预测的哺乳动物候选增强子在斑马鱼模型中得到了验证<sup>[82]</sup>。

染色体构象捕获技术(chromosome conformation capture, 3C)最开始被用来分析染色质的整体空间结构,在高分辨率下研究染色质拓扑结构域的物理性质<sup>[83]</sup>,后来被用来研究增强子和启动子的相互作用。在3C的基础上研究人员又开发了4C、5C、6C及Hi-C,这些技术提供了更全面的全基因组染色质结构图谱<sup>[84-85]</sup>。另一个方法ChIA-PET将ChIP和3C、邻近标记结合起来,用特异蛋白抗体富集与蛋白结合的DNA片段,不同蛋白结合的DNA片段会带有不同的PET标签,带有同样标签的DNA片段结合在同一个蛋白上,表明它们之间存在相互作用<sup>[86]</sup>。因为转录的关键在于RNA聚合酶和启动子的结合,ChIA-PET的一个应用是使用RNA聚合酶特异性抗体鉴定启动子和增强子的相互作用<sup>[87]</sup>。

比较基因组学通过对不同物种的基因组进行比对分析来解决基因组功能和进化上的关键问题<sup>[88]</sup>。增强子的序列在不同的物种中并不保守,但是它们的功能是保守的,通过比对不同增强子的序列发现增强子上的转录因子结合位点是相对保守的,一个增强子时空特异的活性可能由不同转录因子在特定结合位点的组合调控所决定<sup>[89]</sup>。对斑马鱼和其他9种不同系统发育阶段的鱼类,以及爪蟾、鸡、鼠和人的*careg*元件进行生物信息学分析,结果显示,它由进化保守序列和独特序列组成,有多个转录因子如Smad3、TCFF、MEF3、NKXH和GATA的预测结合位点,推测*careg*的功能可能受到多种转录因子的调控<sup>[45]</sup>。可以用比对不同物种基因组上保守的转录因子结合区域的方法来预测潜在的增强子,也可以比对不同物种的增强子序列找到调控增强子活性的关键转录因子结合位点<sup>[82]</sup>。大规模并行报告方法MPRA可以用来系统地剖析转录调控元件的功能,研究人员通过合成增强子突变体(含单核苷酸突变、多核苷酸突变、不

同位置的插入)和启动子、报告基因、特异的短标签构成质粒文库,并将其转染组织细胞,报告基因表达的RNA丰度代表了增强子的活性<sup>[90]</sup>。MPFD和CRE-seq技术的原理和MPRA相似,它们都被用于验证特定转录因子结合位点的功能<sup>[91-92]</sup>。尽管在DNA水平上的研究有了很大进展,但是仍然缺少行之有效的研究方法对结合在开放染色质上的蛋白质复合物进行功能分析。一种新的策略ctATAC-MS通过sgRNA引导的Tn5-dCas9融合蛋白靶向特定染色质区域如增强子,再通过质谱技术对结合在增强子上的蛋白质复合物进行定性和定量分析,这为蛋白水平上的转录因子研究提供了新的工具<sup>[93]</sup>。

### 3 组织再生增强子的激活机制

组织再生增强子通过调控再生相关基因的表达调节再生。它的活性呈现动态的变化,在未受损伤的组织中沉默,在损伤的组织中被激活,在再生完成后增强子又回到原先沉默的状态。令人感兴趣的问题包括,组织再生增强子的活性是如何精确调控的?它如何维持在未损伤组织中的沉默状态,又是如何在损伤中被激活的?在再生结束后再生增强子活性的终止又是受到了什么因素的调控呢?

#### 3.1 组织再生增强子在损伤前后的表观遗传改变

DNA和组蛋白的表观遗传调控是基因时空特异性表达的重要因素,增强子在未受损伤时的沉默状态与组蛋白的甲基化和乙酰化修饰状态有关<sup>[94]</sup>,在特定时期受到转录因子的协同作用而被激活<sup>[95]</sup>,进而通过上调靶基因的表达来调节再生(图2)。顺式作用元件通常受染色质重塑复合物、转录因子以及不同的组蛋白修饰来影响它所在染色质区域的开放程度<sup>[96]</sup>,只有位于开放染色质区域的顺式作用元件才具有活性。当组织发生损伤时,染色质的组蛋白修饰状态就会发生改变,增强子从沉默状态转变为活性状态,激活再生基因的表达。维持组蛋白的乙酰化水平是非洲爪蟾肢体再生所必需的,研究发现在肢体再生的早期阶段用曲古抑菌素A(TSA)处理可以抑制组蛋白去乙酰化酶HDACs的活性,显著增加组蛋白H4的乙酰化水平,对再生具有抑制作用,并可异常激活*notch1*和*bmp2*基因的表达<sup>[97]</sup>。当小鼠发生急性肌肉损伤时,对增强子区域进行的ChIP实验发现H3K4me3在整个染色质重塑过程中处于稳态,而H3K4me1和H3K27ac是高度动态

的, H3K4me1同时标记沉默增强子和活性增强子, H3K27ac只标记活性增强子。同时也发现了 AP-1、STATs、NF- $\kappa$ B、EGR和 PU.1转录因子在活性增强子区域有富集, 这些转录因子促进了染色质的开放程度<sup>[98]</sup>。同样有研究发现, 新生小鼠和斑马鱼的心脏在损伤后都会表现出活跃的染色质修饰状态的改变, 通过H3K27ac的增多来上调相关基因的表达, 以及H3K27me3的减少来降低结构基因的表达, 进而调节再生<sup>[99]</sup>。

非洲爪蟾在蝌蚪时期具有完全的肢体再生能力, 然而变态发育后的幼蛙再生能力有限。研究发现, *shh*基因与非洲爪蟾再生能力的变化有关, 相比于蝌蚪, 幼蛙再生芽基上*shh*基因及其下游基因的表达水平明显降低<sup>[51]</sup>。*shh*基因的增强子在幼蛙中出现了高度甲基化, 而在蝌蚪以及蝾螈中的甲基化水平较低, 这与*shh*基因的表达情况一致, 表明甲基化抑制了增强子的活性<sup>[51]</sup>。果蝇的成虫盘具有良好的再生能力, 但是在第三个幼虫龄期L3的后期, 随着果蝇逐渐接近变态发育, 它的再生能力逐渐减弱。研究发现, L3期*BRV118*增强子附近区域的H3K27甲基化水平显著增加, 这是典型的由多梳蛋白 PcG介导的表观沉默。这种表观遗传的组蛋白修饰抑制了成熟成虫盘中增强子的活性, 阻止了*wg*基因在损伤成虫盘的高水平表达<sup>[37,53]</sup>, 这也解释了为何果蝇不同年龄阶段再生能力不同。

### 3.2 激活组织再生增强子的转录因子和信号通路

增强子是一个顺式作用元件, 依赖于转录因子的结合调节基因的时空特异性表达。再生增强子被损伤诱导的激活受到转录因子的组合调控, 从而避免基因表达异常引起再生的失败。AP-1复合物由 JUN、FOS等亚基组成, 研究发现, AP-1结合序列在

增强子上的富集对于再生响应增强子的损伤和再生响应活性是必要的。在能完全再生的动物中AP-1结合序列的富集程度高于不能实现完全再生的动物, 当AP-1在增强子(*LEN*、*IEN*)上的结合位点发生突变时, 增强子在损伤心脏和尾鳍中失去了损伤响应活性, 组织不能再生<sup>[46,56]</sup>。JNK通路抑制剂SP600125可以阻断AP-1复合物的激活, 抑制*IEN*的再生响应活性, 阻止损伤尾鳍的再生<sup>[46]</sup>。施万细胞支持神经损伤后的再生, 神经损伤后施万细胞的ChIP-seq实验发现活性增强子区域有H3K27ac的富集, 而H3K27乙酰化的维持与Egr2转录因子在增强子上的结合有关, 活性增强子上有c-Jun(AP-1)和Runx2的富集, 它们对增强子的激活是必需的<sup>[58]</sup>。

*Samd14-Enh*增强子位于*Samd14*基因的内含子内, 与红细胞再生相关, *Samd14-Enh*缺陷会导致小鼠骨髓和脾脏*Samd14*基因表达水平明显降低。虽然稳态造血正常, 但是缺陷小鼠会死于严重贫血。当发生贫血时, 增强子区域的染色质开放程度会增加, 然后在多蛋白复合体GATA-1/2、Scl/TAL1、LDB1和LMO2的介导下*Samd14-Enh*增强造血基因座的转录, 激活促进红细胞再生的干细胞因子c-Kit通路。发生急性的严重贫血时, 血液中红细胞生成素(Epo)水平会上升, Epo常被用来治疗贫血且其可上调*Samd14*基因的表达。但是Epo的作用依赖于*Samd14-Enh*, 表明*Samd14-Enh*的作用受到多个因子的协同调控<sup>[59]</sup>。GATA-2的转录受转录起始位点下游9.5 Kb和上游77 Kb的细胞特异性增强子调控, 当增强子突变时会影响骨髓损伤后的再生<sup>[60-61]</sup>。

肾脏在脊椎动物中进化出了三种不同的类型: 前肾、中肾和后肾。虽然它们的复杂程度不同, 但它们在功能上是保守的。哺乳动物肾脏的再生能

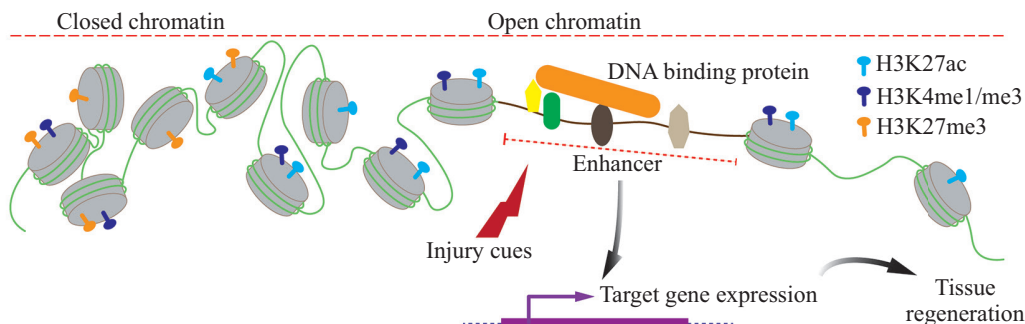


图2 开放染色质区域的活跃增强子

Fig.2 Active enhancer in open chromatin region

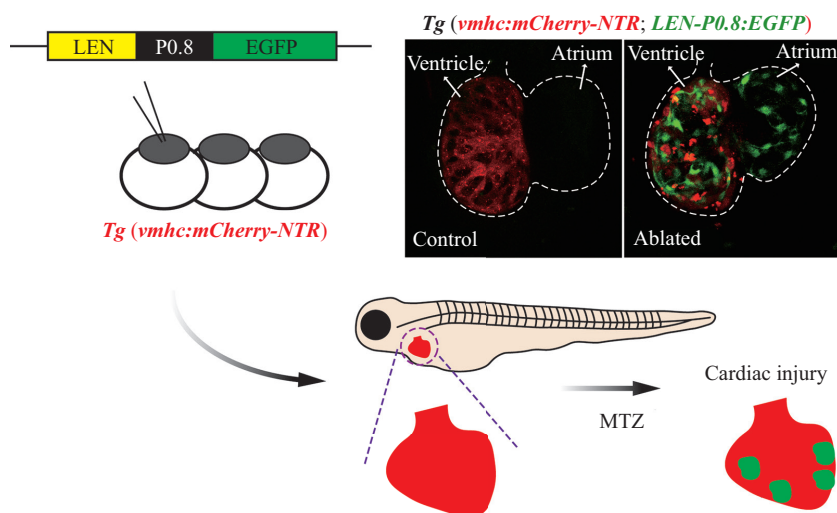


图3 利用斑马鱼心脏遗传消融系统鉴定组织再生增强子

Fig.3 Characterization of tissue regeneration enhancers through zebrafish cardiac genetic ablation system

力局限于肾小管上皮细胞,而非非洲爪蟾和斑马鱼的肾脏能够实现完全的再生。在早期发育相关基因*lhx1*的上游找到了保守的增强子元件,该元件具有损伤响应活性,可在肾脏损伤时重新激活*lhx1*。Arid3a是H3K9me3去甲基化酶的一个组成部分,能结合在损伤响应增强子上,降低H3K9me3水平,通过促进细胞周期进程来促进肾脏的再生<sup>[62]</sup>,表明转录因子和组蛋白修饰酶在增强子活性调节中的协同作用。

心脏特异的遗传消融模型*Tg(vmhc:mCherry-NTR)*便于建立可以动态观察的心脏损伤模型,使用斑马鱼转基因报告品系鉴定候选增强子有利于快速鉴别和验证候选增强子的活性<sup>[80]</sup>。实验室前期工作中把候选增强子转基因报告品系*Tg(LEN-P0.8:EGFP)*与*Tg(vmhc:mCherry-NTR)*外交,在心脏损伤24 h后发现有强烈的EGFP信号表达于心内膜,随着心脏恢复的完成,荧光信号强度下降。加入麻醉剂和信号通路抑制剂发现血流动力和Notch信号参与调节LEN的损伤响应活性<sup>[57]</sup>(图3)。

### 3.3 组织再生增强子上存在决定活性的主要功能基序

转录因子通常结合长度为6~12 bp的短DNA序列,序列特异性较低。增强子中含有多个转录因子结合位点,除了单个转录因子对增强子活性有调节作用外,多个转录因子的复杂调控作用决定了增强子的功能,而增强子上转录因子结合位点的富集程度和排列顺序直接决定了转录因子在增强子上不同的组合方式<sup>[100]</sup>。

组织再生增强子LEN包含两个组织特异性模块,其分别在心脏和尾鳍再生中独立发挥作用。对LEN心脏模块(*cLEN*)进行基序分析,发现*cLEN*上包含多个与内皮/心内膜相关转录因子的预测结合位点,包括NFAT、GATA、Forkhead、ETS和AP-1。通过对*cLEN*不同截短片段的斑马鱼转基因报告品系分析发现,当同时含有AP-1、GATA和FOX-NFAT-ETS基序时,增强子能对损伤应答,表明增强子受到多个转录因子的调控。基于以上结论人工合成再生增强子AFNEGx3,它由AP-1-FOX-NFAT-ETS-GATA构成,发现只有少部分斑马鱼幼鱼表现出心脏损伤响应活性,说明转录因子对LEN的调控作用可能比想象中更加复杂<sup>[56]</sup>。通过对*cLEN*截短片段和连续11 bp碱基缺失的转基因报告品系分析发现,在*cLEN*上存在一个22 bp的抑制基序,当将其敲除时,*cLEN*在未损伤和损伤心脏中都会表现出增强子活性。在不同鱼类中对这个22 bp的基序进行比对分析发现,其中的GTCA序列是两个抑制因子Gfi1b和Prdm1a的结合位点。将GTCA序列突变成CATT序列,此突变不影响其他转录因子的结合也不会产生新的转录因子结合位点,结果发现未损伤心脏中报告基因EGFP发生了心内膜外的异位表达,表明在心脏未损伤时这个基序对增强子具有抑制作用<sup>[56]</sup>。

## 4 展望

尽管哺乳动物的再生能力有限,但在小鼠中仍鉴定出了对损伤/再生产生应答的增强子,如在骨骼



和软骨被激活的*Bmp5*损伤增强子，它区别于*Bmp5*发育增强子独立存在，表明哺乳动物中可能隐藏着与*LEN*类似的损伤诱导激活损伤/再生响应活性的机制。除此之外，研究证明AP-1复合体对于多个再生增强子发挥作用都是不可或缺的，AP-1的功能表明了它与再生增强子在进化上可能存在某种关联，这有助于进一步阐释增强子发挥再生响应活性的机制。

斑马鱼具有很强的心脏再生能力，通过遗传消融系统可以快速构建心脏损伤模型，同时，候选增强子的转基因报告品系使得增强子活性可视化，研究人员可以观察到再生过程中增强子活性的时间变化。斑马鱼易于操作的基因工程编辑和药物处理有助于鉴定增强子的具体功能，这为快速验证和研究再生响应增强子的功能提供了便利。

增强子活性依赖于转录因子的调节，但是一直缺乏行之有效的工具研究与增强子结合的蛋白质组，而ctATAC-MS提供了一个新的策略，我们利用ctATAC-MS通过对结合在增强子上的转录因子进行分析，进一步探究再生响应增强子的调控机制。不同再生增强子上转录因子结合位点的组合各不相同，在增强子上是否存在一个保守的激活基序或抑制基序来调控增强子的再生响应活性也是值得深入探究的方向，这有助于解释哺乳动物有限的再生能力。

### 参考文献 (References)

- [1] MARQUES I J, LUPI E, MERCADER N. Model systems for regeneration: zebrafish [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.167692.
- [2] HARDY M A. The biology of scar formation [J]. *Phys Ther*, 1989, 69(12): 1014-24.
- [3] GURTNER G C, WERNER S, BARRANDON Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314-21.
- [4] REDDY K, KHALIQ A, HENNING R J. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(5): 243-76.
- [5] FARONI A, MOBASSERI S A, KINGHAM P J, et al. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010.
- [6] VERMA P, FAWCETT J. Spinal cord regeneration [J]. *Adv Biochem Eng Biot*, 2005, 94: 43-66.
- [7] PENN-BARWELL J G, GRP S S. Outcomes in lower limb amputation following trauma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Injury*, 2011, 42(12): 1474-9.
- [8] KROEHNE V, FREUDENREICH D, HANS S, et al. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors [J]. *Development*, 2011, 138(22): 4831-41.
- [9] VIHTELIC T S, HYDE D R. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina [J]. *J Neurobiol*, 2000, 44(3): 289-307.
- [10] JOHNSON S L, WESTON J A. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration [J]. *Genetics*, 1995, 141(4): 1583-95.
- [11] BECKER T, WULLIMANN M F, BECKER C G, et al. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. *J Comp Neurol*, 1997, 377(4): 577-95.
- [12] POSS K D, WILSON L G, KEATING M T. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-90.
- [13] EGUCHI G, EGUCHI Y, NAKAMURA K, et al. Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 384.
- [14] PHIPPS L S, MARSHALL L, DOREY K, et al. Model systems for regeneration: xenopus [J]. *Development*, 2020, doi: 10.1242/dev.180844.
- [15] LAFLAMME M A, MURRY C E. Heart regeneration [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 326-35.
- [16] MELO-NARVAEZ M C, STEGMAYR J, WAGNER D E, et al. Lung regeneration: implications of the diseased niche and ageing [J]. *Eur Respir Rev*, 2020, doi: 10.1183/16000617.0222-2020.
- [17] MARTIN P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration [J]. *Science*, 1997, 276(5309): 75-81.
- [18] LAHA B, STAFFORD B K, HUBERMAN A D. Regenerating optic pathways from the eye to the brain [J]. *Science*, 2017, 356(6342): 1031-4.
- [19] FRATZ S, HAGER A, SCHREIBER C, et al. Long-term myocardial scarring after operation for anomalous left coronary artery from the pulmonary artery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2011, 92(5): 1761-5.
- [20] HAUBNER B J, SCHNEIDER J, SCHWEIGMANN U, et al. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 216-21.
- [21] HAUBNER B J, ADAMOWICZ-BRICE M, KHADAYATE S, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction [J]. *Aging*, 2012, 4(12): 966-77.
- [22] STRUNGS E G, ONGSTAD E L, O'QUINN M P, et al. Cryoinjury models of the adult and neonatal mouse heart for studies of scarring and regeneration [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1037: 343-53.
- [23] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-80.
- [24] SEIFERT A W, KIAMA S G, SEIFERT M G, et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*) [J]. *Nature*, 2012, 489(7417): 561-5.
- [25] MATIAS SANTOS D, RITA A M, CASANELLAS I, et al. Ear wound regeneration in the African spiny mouse *Acomys cahirinus* [J]. *Regeneration*, 2016, 3(1): 52-61.
- [26] OKAMURA D M, BREWER C M, WAKENIGHT P, et al. Spiny mice activate unique transcriptional programs after severe kidney injury regenerating organ function without fibrosis [J]. *iScience*, 2021, 24(11): 103269.
- [27] KOOPMANS T, VAN BEIJNUM H, ROOVERS E F, et al. Isch-

- emic tolerance and cardiac repair in the spiny mouse (*Acomys*) [J]. *NPJ Regen Med*, 2021, 6(1): 78.
- [28] PENG H, SHINDO K, DONAHUE R R, et al. Adult spiny mice (*Acomys*) exhibit endogenous cardiac recovery in response to myocardial infarction [J]. *NPJ Regen Med*, 2021, 6(1): 74.
- [29] POSS K D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(10): 710-22.
- [30] KUMAR A, GODWIN J W, GATES P B, et al. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate [J]. *Science*, 2007, 318(5851): 772-7.
- [31] BLASSBERG R A, GARZA-GARCIA A, JANMOHAMED A, et al. Functional convergence of signalling by GPI-anchored and anchorless forms of a salamander protein implicated in limb regeneration [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 1): 47-56.
- [32] IVANOVA A S, TERESHINA M B, ERMAKOVA G V, et al. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1279.
- [33] IVANOVA A S, TERESHINA M B, ARASLANOVA K R, et al. The secreted protein disulfide isomerase Ag1 lost by ancestors of poorly regenerating vertebrates is required for tail regeneration [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 738940.
- [34] WHITEHEAD G G, MAKINO S, LIEN C L, et al. *fgf20* is essential for initiating zebrafish fin regeneration [J]. *Science*, 2005, 310(5756): 1957-60.
- [35] YOKOYAMA H. Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity [J]. *Dev Growth Differ*, 2008, 50(1): 13-22.
- [36] WEHNER D, WEIDINGER G. Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin [J]. *Trends Genet*, 2015, 31(6): 336-43.
- [37] SUZUKI N, OCHI H. Regeneration enhancers: a clue to reactivation of developmental genes [J]. *Dev Growth Differ*, 2020, 62(5): 343-54.
- [38] BLACKWOOD E M, KADONAGA J T. Going the distance: a current view of enhancer action [J]. *Science*, 1998, 281(5373): 60-3.
- [39] LI L, WUNDERLICH Z. An enhancer's length and composition are shaped by its regulatory task [J]. *Front Genet*, 2017, 8: 63.
- [40] BANERJI J, RUSCONI S, SCHAFFNER W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote Sv40 DNA-sequences [J]. *Cell*, 1981, 27(2): 299-308.
- [41] BANERJI J, OLSON L, SCHAFFNER W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 729-40.
- [42] SHEPHERD B, GARABEDIAN M J, HUNG M C, et al. Developmental control of *Drosophila* yolk protein 1 gene by cis-acting DNA elements [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1985, 50: 521-6.
- [43] STRUHL K. Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24): 7865-9.
- [44] KANG J, HU J, KARRA R, et al. Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements [J]. *Nature*, 2016, 532(7598): 201-6.
- [45] PFEFFERLI C, JAZWINSKA A. The careg element reveals a common regulation of regeneration in the zebrafish myocardium and fin [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15151.
- [46] WANG W, HU C K, ZENG A, et al. Changes in regeneration-responsive enhancers shape regenerative capacities in vertebrates [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.aaz3090.
- [47] HUANG G N, THATCHER J E, MCANALLY J, et al. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1599-603.
- [48] LETTICE L A, HEANEY S J H, PURDIE L A, et al. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(14): 1725-35.
- [49] LEAL F, COHN M J. Loss and re-emergence of legs in snakes by modular evolution of sonic hedgehog and HOXD enhancers [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(21): 2966-73.
- [50] RODRIGUEZ A M, KANG J. Regeneration enhancers: starting a journey to unravel regulatory events in tissue regeneration [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 97: 47-54.
- [51] YAKUSHIJI N, SUZUKI M, SATOH A, et al. Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians [J]. *Dev Biol*, 2007, 312(1): 171-82.
- [52] GUENTHER C A, WANG Z, LI E, et al. A distinct regulatory region of the *Bmp5* locus activates gene expression following adult bone fracture or soft tissue injury [J]. *Bone*, 2015, 77: 31-41.
- [53] HARRIS R E, SETIAWAN L, SAUL J, et al. Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature *Drosophila* imaginal discs [J]. *eLife*, 2016, doi: 10.7554/eLife.11588.
- [54] SCHUBIGER M, SUSTAR A, SCHUBIGER G. Regeneration and transdetermination: the role of wingless and its regulation [J]. *Dev Biol*, 2010, 347(2): 315-24.
- [55] SATO K, UMESONO Y, MOCHII M. A transgenic reporter under control of an *es1* promoter/enhancer marks wound epidermis and apical epithelial cap during tail regeneration in *Xenopus laevis* tadpole [J]. *Dev Biol*, 2018, 433(2): 404-15.
- [56] BEGEMAN I J, SHIN K, OSORIO-MÉNDEZ D, et al. Decoding an organ regeneration switch by dissecting cardiac regeneration enhancers [J]. *Development*, 2020, doi: 10.1242/dev.194019.
- [57] GENG F, MA J, LI X, et al. Hemodynamic forces regulate cardiac regeneration-responsive enhancer activity during ventricle regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3945.
- [58] HUNG H A, SUN G, KELES S, et al. Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(11): 6937-50.
- [59] HEWITT K J, KATSUMURA K R, MATSON D R, et al. GATA factor-regulated *Samd14* enhancer confers red blood cell regeneration and survival in severe anemia [J]. *Dev Cell*, 2017, 42(3): 213-25.
- [60] JOHNSON K D, HSU A P, RYU M J, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(10): 3692-704.
- [61] SOUKUP A A, ZHENG Y, MEHTA C, et al. Single-nucleotide human disease mutation inactivates a blood-regenerative GATA2 enhancer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1180-92.

- [62] SUZUKI N, HIRANO K, OGINO H, et al. Arid3a regulates nephric tubule regeneration via evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancers [J]. *eLife*, 2019, doi: 10.7554/eLife.43186.
- [63] GUENTHER C, PANTALENA-FILHO L, KINGSLEY D M. Shaping skeletal growth by modular regulatory elements in the *Bmp5* gene [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(12): e1000308.
- [64] 刘倩, 李春燕. 增强子的鉴定及其在肿瘤研究中的应用[J]. 遗传(LIU Q, LI C Y. The identification of enhancers and its application in cancer studies [J]. *Hereditas*, 2020, 42(9): 817-31.
- [65] 谢骏辉, 孙艳, 王昇, 等. 增强子功能鉴定及其在农业动物中的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报(XIE J H, SUN Y, WANG S, et al. Functional identification of enhancer and its research progress in agricultural animals [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(7): 1395-400.
- [66] COLLAS P. The current state of chromatin immunoprecipitation [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 45(1): 87-100.
- [67] VISEL A, BLOW M J, LI Z, et al. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 854-8.
- [68] KUNDAJE A, MEULEMAN W, ERNST J, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes [J]. *Nature*, 2015, 518(7539): 317-30.
- [69] NAKATO R, SAKATA T. Methods for ChIP-seq analysis: a practical workflow and advanced applications [J]. *Methods*, 2021, 187: 44-53.
- [70] SHLYUEVA D, STAMPFEL G, STARK A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(4): 272-86.
- [71] RHEE H S, PUGH B F. Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution [J]. *Cell*, 2011, 147(6): 1408-19.
- [72] SONG L, CRAWFORD G E. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, doi: 10.1101/pdb.prot5384.
- [73] GIRESI P G, KIM J, MCDANIELL R M, et al. FAIRE (Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements) isolates active regulatory elements from human chromatin [J]. *Genome Res*, 2007, 17(6): 877-85.
- [74] 吴杰, 全建平, 叶勇, 等. 染色质转座酶可及性测序研究进展[J]. 遗传(WU J, QUAN J P, YE Y, et al. Advances in assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing [J]. *Hereditas*, 2020, 42(4): 333-46.
- [75] LI L, WUNDERLICH Z. An enhancer's length and composition are shaped by its regulatory task [J]. *Front Genet*, 2017, 8: 63.
- [76] PFEIFFER B D, JENETT A, HAMMONDS A S, et al. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(28): 9715-20.
- [77] NAVRATILOVA P, FREDMAN D, HAWKINS T A, et al. Systematic human/zebrafish comparative identification of cis-regulatory activity around vertebrate developmental transcription factor genes [J]. *Dev Biol*, 2009, 327(2): 526-40.
- [78] DUPUY D, LI Q R, DEPLANCKE B, et al. A first version of the *Caenorhabditis elegans* promoterome [J]. *Genome Res*, 2004, 14(10B): 2169-75.
- [79] ZHANG R, HAN P, YANG H, et al. *In vivo* cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration [J]. *Nature*, 2013, 498(7455): 497-501.
- [80] POON K L, LIEBLING M, KONDRYCHYN I, et al. Zebrafish cardiac enhancer trap lines: new tools for *in vivo* studies of cardiovascular development and disease [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(3): 914-26.
- [81] WONG E S, ZHENG D, TAN S Z, et al. Deep conservation of the enhancer regulatory code in animals [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.aax8137.
- [82] PARISI C, VASHISHT S, WINATA C L. Fish-Ing for enhancers in the heart [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3914.
- [83] DEKKER J, RIPPE K, DEKKER M, et al. Capturing chromosome conformation [J]. *Science*, 2002, 295(5558): 1306-11.
- [84] VAN ARENSBERGEN J, VAN STEENSEL B, BUSSEMAKER H J. In search of the determinants of enhancer-promoter interaction specificity [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(11): 695-702.
- [85] 宁椿游, 何梦楠, 唐茜子, 等. 基于Hi-C技术哺乳动物三维基因组研究进展[J]. 遗传(NING C Y, HE M N, TANG Q Z, et al. Advances in mammalian three-dimensional genome by using Hi-C technology approach [J]. *Hereditas*, 2019, 41(3): 215-33.
- [86] FULLWOOD M J, LIU M H, PAN Y F, et al. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome [J]. *Nature*, 2009, 462(7269): 58-64.
- [87] LI G, RUAN X, AUERBACH R K, et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation [J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 84-98.
- [88] 章天骄, 王亚东. 生物信息学方法预测增强子及其作用位点综述[J]. 智能计算机与应用(ZHANG T J, WANG Y D. Review of bioinformatics methods for predicting enhancers and their targets [J]. *Intelligent Computer and Applications*, 2020, 10(3): 1-6,13.
- [89] YANG S, OKSENBERG N, TAKAYAMA S, et al. Functionally conserved enhancers with divergent sequences in distant vertebrates [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 882.
- [90] MELNIKOV A, MURUGAN A, ZHANG X, et al. Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(3): 271-7.
- [91] PATWARDHAN R P, HIATT J B, WITTEN D M, et al. Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(3): 265-70.
- [92] KWASNIESKI J C, MOGNO I, MYERS C A, et al. Complex effects of nucleotide variants in a mammalian cis-regulatory element [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(47): 19498-503.
- [93] ZHANG H, QIN Z, YUE X, et al. Proteome-wide profiling of transcriptional machinery on accessible chromatin with biotinylated transposons [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(43): eabh1022.
- [94] WU X, ZHANG H, ZHANG B, et al. Methylome inheritance and enhancer dememorization reset an epigenetic gate safeguarding embryonic programs [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(52): eabl3858.
- [95] HASHIMOTO H, WANG Z, GARRY G A, et al. Cardiac reprogramming factors synergistically activate genome-wide cardiogenic stage-specific enhancers [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(1): 69-86.
- [96] 李重辉, 曹丹, 王纲. 转录中介体复合物与转录及表观遗传调控[J]. 中国细胞生物学学报(LI C H, CAO D, WANG G. Mediator in transcriptional and epigenetic regulation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(5): 788-94.

- [97] TSENG A S, CARNEIRO K, LEMIRE J M, et al. HDAC activity is required during *Xenopus* tail regeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26382.
- [98] AGUILAR C A, POP R, SHCHERBINA A, et al. Transcriptional and chromatin dynamics of muscle regeneration after severe trauma [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(5): 983-97.
- [99] BEN-YAIR R, BUTTY V L, BUSBY M, et al. H3K27me3-mediated silencing of structural genes is required for zebrafish heart regeneration [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.178632.
- [100] SPITZ F, FURLONG E E M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(9): 613-26.