

· 综述 ·

染色质可接近性在前列腺癌研究中的作用

尚芝群, 陈宣蓉, 田昊, 李常颖, 牛远杰

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要:研究表明在基因表达的动态平衡调控中染色质的三维空间结构变化和染色质可接近程度处于动态变化中。在前列腺癌的基础研究中, 染色质可接近被用于病因探索和药物研发等方面。利用染色质可接近性和染色质组学, 许多研究人员在染色质层面揭开了前列腺癌的神秘面纱。本文就染色质可接近性这一概念在前列腺癌研究中的相关研究进展加以综述。

关键词:染色质; 前列腺癌; 转录调控

中图分类号:R737.25

文献标志码:R

DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2019.10.020

在对生命奥秘探索的历程中, 人们逐渐认识到真核生物的遗传信息主要储存在细胞核内且以染色质的形式存在。染色质主要由 DNA 与组蛋白组成^[1]。先前的研究普遍认为解码 DNA 携带的遗传信息就可以解释整个基因表达调控规律。随着对组蛋白修饰研究的深入, 人们认识到在基因表达的动态平衡调控中, 组蛋白所处的修饰状态, 染色质的高级结构变化及染色质可接近程度的变化也发挥着重要作用^[2-4]。因此, 对前列腺癌遗传规律的解码, 将从染色质层面揭示其发生变化规律, 从而更深入的认识肿瘤的基因表达调控^[5-7]。

1 染色质可接近性的定义

基因的表达调控瞬息万变, 同时染色质也处于动态变化中, 包含组蛋白、核小体等染色质结构的变化^[8]。真核生物中, 组蛋白被 DNA 紧密地缠绕形成核小体, 一个核小体约含有 147 bp 的双螺旋 DNA。接着核小体再由链接 DNA(linker DNA)连接并进行高度折叠形成染色质, 最终将总长近 2 m 的基因组 DNA 分子包装进细胞核中^[9-10]。当特定的转录因子结合到可接近的染色质区域后, 募集转录相关蛋白和 RNA 聚合酶, 使附近的基因开始转录^[11]。此时, 由于转录因子与染色质可接近区的 DNA 发生结合, 原有的核小体被取代呈现出裸露状态。^[12]

研究发现染色质上不同区域的 DNA 对核酸酶的敏感性差异明显, 其中易受 DNA 酶 I 作用的位点称为 DNA 酶 I 超敏感位点(DNaseI hypersensitive site)^[13-14]。染色质在染色质重塑因子的作用下, 通过改变核小体的装配、拆解和重排等方式来发生重塑^[15]。重塑后的染色质结构或趋于疏松, 或趋于致

密^[16-17]。其中经过重塑后结构趋于疏松的染色质, 表现出对 DNA 酶 I 的高度敏感, 核小体结构消失或排列松散等特性, 称为染色质可接近性^[18]。

2 研究染色质可接近性的生物学意义

基因转录调控过程中, 真核细胞中染色质的可接近性处于动态变化中; 处于疏松状态的染色质增加了转录因子对染色质 DNA 的可接近性, 使得 RNA 聚合酶能募集到特定 DNA 序列上, 从而激活基因的转录; 处于致密状态的染色质使得转录因子和 RNA 聚合酶对染色质 DNA 的可接近性减弱, 从而抑制基因的转录。以往的研究主要关注特定的某一个具有调控功能的顺式作用因子和其反式作用元件在转录调控发挥的作用, 同时需要借助包括 RNA-seq, ChIP-seq 在内的多个组学进行切入。而当我们对染色质可接近性在基因组层面有全局的认识后, 可以了解整个转录的活性和惰性区域, 从而更加精确的了解基因的转录调控机制或规律^[19]。基于此概念, 研究人员启动了人类基因组调控元件百科全书计划(encyclopedia of DNA elements, ENCODE), 从多个角度来解码调控元件与转录因子和染色质之间复杂的相互关系^[20]。

染色质的可接近性在整个基因调控过程中也与核小体的动态定位息息相关。核小体对于染色质 DNA 片段选择的特性称为核小体定位。于较疏松的染色质区域来说, 其拥有数量较多的核小体; 对于处于较开放状态的染色质区域来说, 其拥有数量较少的核小体且大部分转录因子的结合位点得以暴露, 使得基因的转录可以顺利进行。当我们对转录失调的肿瘤基因组无从下手时, 可以转变思路去探究失调的基因组中核小体定位、染色质可接近性是否发生改变, 便可以解码基因转录调控中的有效的调控元件, 为深入认识肿瘤的基因调控提供了新的思路。

收稿日期: 2018-11-02

修回日期: 2018-12-09

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81772756); 天津市自然科学基金(No. 17JCZDJC35300; No. 18JCZDJC34800); 天津医科大学第二医院重点实验室科研基金(No. 2017ZDSYS12)

作者简介: 尚芝群(1979-), 男(汉族), 副教授, 博士学位。研究方向: 泌尿系肿瘤。E-mail: zhiqun_shang@tmu.edu.cn

3 研究染色质可接近性的技术

随着第2代高通量测序技术的到来,BOYLE^[21]等利用 DNase I 酶对染色质上已有的超敏感位点切割的特性,将其酶切后的染色质 DNA 片段进行测序文库构建,并进行二代测序,得到了人 CD4⁺ T 细胞中数万个 DNA 酶 I 超敏感位点。基于 DNase-seq 技术可以识别不同类型的具有活性的基因调控元件^[22]。FAIRE 测序(FAIRE-seq)技术则是利用超声打断与高通量测序技术相结合的方式鉴定的开放染色质区,其利用了开放的染色质区易于被超声打断的原理^[23]。由于超声打断的技术要求和甲醛交联的条件不易明确等缺陷而没有被研究人员大量应用。ATAC 测序(ATAC-seq)技术则是利用了 Tn5 转座子在开放的染色质区域的偏好插入的特性进行鉴定染色质的可接近性^[24]。由于其对样本的需求量较低,且整个实验流程简单快速的优点而受到研究人员的青睐,而广泛应用^[25-28]。随着人们对染色质可接近性探索的深入,研究人员发现 ATAC-seq 存在对较大的染色质可接近区的偏好选择的缺点,使得较小的染色质可接近区会被忽略。于是,SOS 等^[29]改进了 ATAC-seq 的实验流程,发明了 THS-seq(transposome hypersensitive sites sequencing)使得对染色质可接近区的鉴定更加完整。表1对现有基于高通量测序手段鉴定染色质可接近区技术进行了归纳和总结。

表1 利用高通量技术检测开放染色质位点的技术比较

技术名称	样品细胞量要求(个)	技术特点
DNase-seq	5×10^6	基于 DNase I 特性
FAIRE-seq	$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$	基于超声打断
ATAC-seq	$5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$	基于转座子
THS-seq	1×10^2	基于 ATAC-seq 基础改进

4 染色质可接近性在前列腺癌研究的应用

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤。根据2018年全球癌症统计报告,前列腺癌的发病率已高居整个男性肿瘤发病率的第二位^[30]。前列腺癌中,雄激素受体(androgen receptor, AR)在维持雄性表型和前列腺癌的发生、进展中起关键作用^[31-32]。人们发现 AR 信号通路所介导的转录调控可以导致前列腺上皮细胞的特异性转化,驱动前列腺癌的发生,与去势抵抗性前列腺癌的进展有关^[33]。CHEN 等^[34]发现在雄激素或特异性配体的作用下,AR 作为转录因子进入细胞核内来调控靶基因的转录,引起靶基因的转录激活或转录抑

制。TEWARI 等^[35]利用 DNase-seq 技术结合 AR-ChIP-seq 和 RNA-seq 数据,详细分析了前列腺癌细胞 LNCaP 细胞在雄激素处理前后的基因转录的改变。雄激素激活后的 AR 会引起全基因组范围的染色质结构发生改变,这些变化的位点具有明确的 AR 结合位点和与转录应答有关等特点。与其他的 DNA 结合因子所不同的是,AR 的结合位点不仅仅局限在雄激素处理前就已经可以接近的染色质区域,而是主动增加基因组其他位点的染色质的可接近性,从而影响基因的表达^[36]。以上研究指出 AR-转录调控和染色质结构之间有着动态的定量平衡关系,为前列腺癌在去势治疗前后应答的改变建立了理论基础。去势抵抗性前列腺癌患者中大约有 37% 存在视网膜母细胞瘤基因(retinoblastoma, RB)的突变,且这种突变往往和极差的临床预后有关。MCNAIR^[37]等结合多种高通量技术,从转录组、顺反子组、染色质结构组等多个组学出发,阐明了 RB 蛋白的缺失差异性地重编程了 E2F1 在基因组的分布,改变了整个原有的转录调控网络从而趋向于恶性进展。利用 ATAC-seq 技术,作者系统性的分析了在 RB 缺失前后整个染色质的开放和关闭程度的变化情况,得出了 E2F1 的重编程不是由于整个染色质的可接近程度变化引起的结论。CHEN 等^[34]利用 ChIP-exo(chromatin immunoprecipitation-exonuclease)技术对 AR 蛋白不同的配体进行测序分析染色质结构会影响 AR 结合。在这一观念的基础上,其又整合 ATAC-seq 和 ChIP-exo 数据分析发现 AR 剪切变异体 7(AR-V7)和 AR 蛋白在前列腺癌不同阶段有着不同的结合偏好性。在进一步分析的基础上,CHEN 等^[38-39]也发现 HoxB13 作为 AR-V7 驱动的转录组的关键上游调节因子,表明 HoxB13 可以作为 AR-V7 驱动的前列腺肿瘤的治疗靶标。利用染色质可接近性和其他组学的整合分析,越来越受到研究者的重视和应用。

在前列腺癌的新药研发和临床前药物作用机理的研究中,染色质组学也越来越受到人们的关注。XIAO 等^[40]利用 RNA-seq, ChIP-seq 和 ATAC-seq 三个组学整合分析,发现使用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)共同靶向 EZH2(Enhancer of zeste homolog 2)和 AR 后能明显对去势抵抗性前列腺癌产生抑制和杀伤作用。借助 ATAC-seq 作者发现单独 ASO 靶向 EZH2 后,会引起染色质的可接近性大大增强,这提示整个肿瘤细胞在药物处理后转录水平可能会明显升高。在结合 ChIP-seq 数据和 RNA-seq 数据共同分析后,该药物可以重编程 AR 的顺反子组同时上调整个 AR 信号通路,这一

改变也增强了其对 AR 靶向药物的敏感性。这为应用双靶向的 ASO 药物在 CRPC 患者的治疗提供了充足的理论基础和临床前数据支持。

在整个肿瘤的基础研究中,染色质可接近性这一概念也开始得到广泛的认知和应用^[41-43]。无论是在对前列腺癌中特异的转录失调的研究中,还是在 CRPC 患者治疗的药物研发中均得到广泛应用。

5 展 望

利用 ATAC-seq 或 THS-seq 技术,我们可以对整个基因组的染色质开放与否的全貌进行观察和分析。在整个基因转录调节研究中,我们越来越发现仅仅利用一个组学是不能对整个纷繁复杂的转录调控过程进行解读的^[25-27,44]。而将染色质可接近性和染色质组学融入整个转录调控关系的研究中,会使得我们能从染色质层面去解读以前未能解开的转录谜题,使得我们能更进一步地对基因转录调控进行研究和应用。

参考文献:

[1] STRAHL BD, ALLIS CD. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41-45.

[2] GUENTHER MG, FRAMPTON GM, SOLDNER F, et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2): 249-257.

[3] SMALE ST, TARAKHOVSKY A, NATOLI G. Chromatin contributions to the regulation of innate immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 489-511.

[4] BRIEN GL, VALERIO DG, ARMSTRONG SA. Exploiting the epigenome to control cancer-promoting gene-expression programs [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 464-476.

[5] CHEN Z, WANG L, WANG Q, et al. Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer[J]. *Epigenomics*, 2010, 2(4): 551-560.

[6] CUCCHIARA V, YANG JC, MIRONE V, et al. Epigenomic regulation of androgen receptor signaling: potential role in prostate cancer therapy[J]. *Cancers*, 2017, 9(1): Pii; E9.

[7] JERONIMO C, BASTIAN PJ, BJARTELL A, et al. Epigenetics in prostate cancer: biological and clinical relevance[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(4): 753-766.

[8] HSIEH TF, FISCHER RL. Biology of chromatin dynamics[J]. *Annu Rev Plant Bio*, 2005, 56: 327-351.

[9] JIANG C, PUGH BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 161-172.

[10] LAI WKM, PUGH BF. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(9): 548-562.

[11] ZLATANOVA J, SEEBART C, TOMSCHIK M. The linker-protein network: control of nucleosomal DNA accessibility [J].

Trends Biochem Sci, 2008, 33(6): 247-253.

[12] ARYA G, MAITRA A, GRIGORYEV SA. A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2010, 27(6): 803-820.

[13] COCKERILL PN. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites[J]. *FEBS J*, 2011, 278(13): 2182-2210.

[14] CHEN A, CHEN D, CHEN Y. Advances of DNase-seq for mapping active gene regulatory elements across the genome in animals[J]. *Gene*, 2018, 667: 83-94.

[15] DAUGHERTY AC, YEO RW, BUENROSTRO JD, et al. Chromatin accessibility dynamics reveal novel functional enhancers in *C. elegans*[J]. *Genome Res*, 2017, 27(12): 2096-2107.

[16] VERGARA Z, GUTIERREZ C. Emerging roles of chromatin in the maintenance of genome organization and function in plants [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 96.

[17] CORPET A, ALMOUZNI G. Making copies of chromatin; the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(1): 29-41.

[18] TSOMPANA M, BUCK MJ. Chromatin accessibility: a window into the genome[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2014, 7(1): 33.

[19] HARMSTON N, LENHARD B. Chromatin and epigenetic features of long-range gene regulation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7185-799.

[20] DAVIS CA, HITZ BC, SLOAN CA, et al. The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D794-D801.

[21] BOYLE AP, DAVIS S, SHULHA HP, et al. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome[J]. *Cell*, 2008, 132(2): 311-322.

[22] ZHANG W, ZHANG T, WU Y, et al. Open chromatin in plant genomes[J]. *Cytogenetic Genome Res*, 2014, 143(1-3): 18-27.

[23] GIRESI PG, KIM J, MCDANIELL RM, et al. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin[J]. *Genome Res*, 2007, 17(6): 877-885.

[24] BUENROSTRO JD, WU B, CHANG HY, et al. ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 109(21): 91-99.

[25] LI D, LIU J, YANG X, et al. Chromatin accessibility dynamics during ipsc reprogramming[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(6): 819-833. e6.

[26] QU K, ZABA LC, SATPATHY AT, et al. Chromatin accessibility landscape of cutaneous t cell lymphoma and dynamic response to hdac inhibitors[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(1): 27-41. e4.

[27] CAO S, YU S, LI D, et al. Chromatin accessibility dynamics during chemical induction of pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(4): 529-542. e5.

[28] WU J, HUANG B, CHEN H, et al. The landscape of accessible chromatin in mammalian preimplantation embryos[J]. *Nature*, 2016, 534(7609): 652-657.

[29] SOS BC, FUNG HL, GAO DR, et al. Characterization of chromatin accessibility with a transposome hypersensitive sites sequen-

- cing (THS-seq) assay[J]. *Genome Biol*, 2016, 17:20.
- [30] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 9:1-31.
- [31] HEINLEIN CA, CHANG C. Androgen receptor in prostate cancer[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(2):276-308.
- [32] SHAFI AA, YEN AE, WEIGEL NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(3):223-238.
- [33] KARANTANOS T, EVANS CP, TOMBAL B, et al. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(3):470-479.
- [34] CHEN Z, LAN X, THOMAS-AHNER JM, et al. Agonist and antagonist switch DNA motifs recognized by human androgen receptor in prostate cancer[J]. *EMBO J*, 2015, 34(4):502-516.
- [35] TEWARI AK, YARDIMCI GG, SHIBATA Y, et al. Chromatin accessibility reveals insights into androgen receptor activation and transcriptional specificity[J]. *Genome Biol*, 2012, 13(10):R88.
- [36] ITKONEN H, MILLS IG. Chromatin binding by the androgen receptor in prostate cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 360(1-2):44-51.
- [37] MCNAIR C, XU K, MANDIGO AC, et al. Differential impact of RB status on E2F1 reprogramming in human cancer[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(1):341-358.
- [38] CHEN Z, WU D, THOMAS-AHNER JM, et al. Diverse AR-V7 cistromes in castration-resistant prostate cancer are governed by HoxB13[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26):6810-6815.
- [39] NAVARRO HI, GOLDSTEIN AS. HoxB13 mediates AR-V7 activity in prostate cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26):6528-6529.
- [40] XIAO L, TIEN JC, VO J, et al. Epigenetic reprogramming with antisense oligonucleotides enhances the effectiveness of androgen receptor inhibition in castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(20):5731-5740.
- [41] BUCK MJ, RAAIJMAKERS LM, RAMAKRISHNAN S, et al. Alterations in chromatin accessibility and DNA methylation in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2014, 33(41):4961-4965.
- [42] NAIR SS, KUMAR R. Chromatin remodeling in cancer: a gateway to regulate gene transcription[J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(6):611-619.
- [43] WINGELHOFER B, NEUBAUER HA, VALENT P, et al. Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer [J]. *Leukemia*, 2018, 32(8):1713-1726.
- [44] WILLIAMS KA, LEE M, WINTER JM, et al. Prostate cancer susceptibility gene HIST1H1A is a modulator of androgen receptor signaling and epithelial to mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(47):28532-28536.

(编辑 何宏灵)

(上接第 866 页)

(包括人口学资料、结石负荷、结石位置、肾脏积水情况等),术中相关指标(包括手术时间、穿刺成功率、穿刺时间、平均血红蛋白下降等),结石清除率以及术后并发症发生情况。可视穿刺超微通道 PCNL 组患者在全麻后,首先采用截石位,逆行置入 F6 输尿管导管,随后改为俯卧位,超声观察结石位置并确定穿刺点及穿刺入路。超声引导下实施可视化穿刺,当确定进入目标盏后,退出针芯,将 3 通套件与针鞘相连,并连接灌注泵,灌注液采用生理盐水,置入 200 μm 钬激光光纤,粉末化碎石。术后不留置双 J 管及肾造瘘管。术后 3 月通过 CT 扫描评价结石清除率。

结果显示,两组间并发症发生率没有明显差异,可视穿刺超微通道 PCNL 组一期结石清除率及最终结石清除率均略高于输尿管软镜组,但差异并未达到统计学意义。尽管增加了体位改变及穿刺时间,但可视穿刺超微通道 PCNL 组手术时间显著短于输尿管

软镜组。文章得出结论:处理小于 2 cm 的肾下盏结石,相较于输尿管软镜,可视穿刺不会增加出血及并发症的发生,两组间结石清除率无明显差异,而可视穿刺效率更高,手术时间明显占优势。

点评:可视穿刺超微 PCNL 实现了穿刺的可视化操作,在直视下进行穿刺,可以有效避免穿刺的盲目性,提高准确率,降低对肾脏血管及邻近器官损伤的几率。此外这项技术支持目前最细的工作通道碎石,仅 F4.85 的工作通道明显小于目前临床上使用的超微经皮肾镜碎石术(super mini PCNL, SMP 或 ultra mini-PCNL, UMP),对于特定类型的小结石而言,提供了更加微创化的治疗选择。目前关于可视穿刺的研究还不多,本研究是一个很好的尝试,正如作者所言,任何新技术的出现都必然需要长时间的临床验证,我们期待后续更有效、设计更科学的大样本随机对照研究。

(编辑 何婷)