DOI:10.16016/j.2097-0927.202502039

弥漫型胃癌的增强子重塑特征及其上调GDF15表达促进恶病质的作用研究

谭玉婷[1],吴林育[2],潘雨薇[1],彭仕银[1],薛 锐[1],李先锋[2],储召乐[3],刘碧颖[2],李 科[4],张 璇[5],王 斌[2] [1]重庆大学医学院,重庆;[2]陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院)消化内科,消化系统肿瘤精准防治重庆市重点实验,重庆;[3]西南大学药学院,重庆;[4]金凤实验室,重庆;[5]重庆市中医院肿瘤科,重庆

[**摘要**] **目的** 绘制弥漫型胃癌(diffuse-type gastric cancer, DGC)组织的H3K27ac标记的活性增强子图谱,揭示增强子调控DGC相关恶病质的表观遗传机制。**方法** 收集2022年1月至2023年3月来自陆军特色医学中心消化内科的10例正常胃黏膜组织(Normal组)、10例来自并发恶病质的弥漫型胃癌组织(DGC组)以及10例弥漫型胃癌类器官(Organoid组),并进行H3K27ac染色质靶向捕获(cleavage under targets and tagmentation,CUT&Tag)技术捕获基因组H3K27ac修饰区域,筛选DGC组织特异性增强子以及潜在调控的恶病质相关靶基因。通过CRISPR-dCas9基因编辑技术干预增强子,Western blot检验以及定量反转录PCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证靶基因表达。采用16只6~8周龄雌性SPF级BALB/c Nude野生型小鼠(体质量18~21 g),并构建人源弥漫型胃癌MKN45细胞系裸鼠原位移植瘤模型,检测正常组(n=4)、沉默组(n=6)和对照组(n=6)小鼠的恶病质相关表型。**结果** DGC组与Normal组的H3K27ac信号在全基因组水平存在明显差异,前者的增强子数量(P<0.05)和信号强度均显著升高。整合分析转录组数据发现,特定活性增强子区域可能促进恶病质相关靶基因*GDF15*表达。利用CRISPR/dCas9-KRAB载体质粒技术沉默*GDF15*基因的活性增强子,显著下调GDF15 mRNA(P<0.05)和蛋白水平;以此细胞进行弥漫型胃癌原位移植瘤实验的结果表明,沉默*GDF15*基因相关活性增强子延缓荷瘤小鼠的恶病质表型(P<0.05)。**结论** 弥漫型胃癌发生了组蛋白H3K27ac增强子重塑,特别是调控下游关键基因*GDF15*表达,从而促进恶病质发生发展。

[**关键词**] 弥漫型胃癌;肿瘤恶病质;组蛋白H3K27ac修饰;增强子

[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R735.2 [**文献标志码**] A

Enhancer remodeling characteristics in diffuse-type gastric cancer and role in upregulating GDF15 expression and promoting cancer cachexia

TAN Yuting[1], WU Linyu[2], PAN Yuwei[1], PENG Shiyin[1], XUE Rui[1], LI Xianfeng[2], CHU Zhaole[3], LIU Biying[2], LI Ke[4], ZHANG Xuan[5], WANG Bin[2] [1]School of Medicine, Chongqing University, Chongqing; [2]Department of Gastroenterology, Chongqing Key Laboratory of Precise Prevention and Treatment of Digestive Malignancies, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing; [3]College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing; [4]Jinfeng Laboratory, Chongqing; [5]Department of Oncology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To identify the enhancer landscape marked by histone H3K27ac modifications in diffuse-type gastric cancer (DGC) tissues, and to elucidate the epigenetic remodeling

[**基金项目**] 国家重点研发计划项目(2023YFC3402100);中国博士后科学基金面上项目(2024M763883)

[**通信作者**] 王 斌,E-mail:danielwang@tmmu.edu.cn

张 璇,E-mail:zhangxuan52210@126.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:谭玉婷,吴林育,潘雨薇,等. 弥漫型胃癌的增强子重塑特征及其上调GDF15表达促进恶病质的作用研究[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(11):1165-1176. DOI:10.16016/j.2097-0927.202502039.

Citation:TAN Y T, WU L Y, PAN Y W, *et al*. Enhancer remodeling characteristics in diffuse-type gastric cancer and the role in upregulating GDF15 expression and promoting cancer cachexia[J]. J Army Med Univ,2025,47(11):1165-1176. DOI:10.16016/j.2097-0927.202502039.

mechanisms by which active enhancers regulate cachexia-related genes. **Methods** Gastric mucosal tissue samples were collected from Department of Gastroenterology of Army Medical Center of PLA during January 2022 to March 2023, including 10 normal gastric mucosa tissues (Normal group), 10 DGC tissues diagnosed with cachexia (DGC group), and 10 organoids derived from DGC tissues (Organoid group). Using H3K27ac chromatin targeting cleavage and tagmentation (CUT&Tag) technology, genomic modification regions were captured to screen specific active enhancers and their potential target genes in DGC tissues. CRISPR-dCas9 gene editing technology was used to intervene with the enhancers, and the expression of target genes was detected with Western blotting and qRT-PCR. Sixteen female SPF-grade BALB/c Nude mice (6~8 weeks old, weighing 18~21 g) were utilized to establish an orthotopic xenograft tumor model using the human diffuse-type gastric cancer cell line MKN45. Cachexia-related phenotypes were evaluated in 3 groups: normal group (n=4), silencing group (n=6), and control group (n=6). **Results** Significant differential enhancer regions were identified between DGC and normal gastric mucosa tissues. DGC tissues exhibited a marked increase in enhancer abundance (P<0.05) and signal intensity when compared with the normal counterparts. Integrated analysis of transcriptome data revealed that some of these active enhancers up-regulated the expression of *GDF15*, a cachexia-associated target gene in DGC. Targeted silencing of the active enhancer of *GDF15* using CRISPR/dCas9-KRAB plasmid technology resulted in a significant reduction in GDF15 expression at both mRNA levels (P<0.05) and protein. Results from orthotopic transplantation experiments of DGC demonstrated that silencing of active enhancers alleviated the cachexia phenotype in nude mice (P<0.05). **Conclusion** DGC exhibits enhancer remodeling, which regulates the expression of the cachexia-associated gene *GDF15*, and thereby contributes to the pathogenesis and progression of cancer cachexia.

[**Key words**] diffuse-type gastric cancer; cancer cachexia; histone H3K27ac modifications; enhancer

Supported by the National Key Research and Develop Program of China (2023YFC3402100) and the General Project of Postdoctoral Science Foundation of China (2024M763883). Corresponding authors: WANG Bin, E-mail: danielwang@tmmu.edu.cn; ZHANG Xuan, E-mail: zhangxuan52210@126.com

胃癌是常见的消化系统肿瘤,全球发病率居第五位,死亡率位居第四[1]。根据全国癌症统计数据,我国每年新发胃癌病例约35.8万例,死亡病例约26万例,是导致癌症患者死亡的主要原因之一。其治疗手段目前仍十分有限,且术后复发率和转移率仍然较高[2]。Lauren分型概括了不同胃癌类型的组织形态特征,分为弥漫型胃癌(diffuse-type gastric cancer, DGC)、肠型胃癌和混合型胃癌。其中,弥漫型胃癌分化程度低,肿瘤细胞黏附力差,易发生侵袭转移,预后较差[3],亟须研究干预新策略。

肿瘤恶病质是恶性肿瘤患者的重要并发症,特征为全身代谢失调、肌肉与脂肪进行性消耗、体质量显著下降及多脏器功能逐渐衰退[4-6],严重降低患者生存质量,并影响患者对治疗方案的耐受性。恶病质诊断标准包括:①6个月内体质量减轻≥5%;②体质指数(body mass index, BMI)<20 kg/m^{2}的患者体质量减轻≥2%;③肌少症患者体质量减轻≥2%[7]。恶病质发病率因肿瘤类型而异,其中胃癌患者发病率可达80%[4,6];与肠型胃癌相比,弥漫型胃癌患者并发恶病质的概率更高[8]。因此,探究弥漫型胃癌患者罹患恶病质的调控机制,有望为逆转恶病质的提供治疗新靶点。

表观遗传是指在基因序列不发生改变的情况下,基因表达发生可遗传变化的现象。它涉及多种机制,主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA调控等[9-10]。其中,组蛋白修饰占据重要地位。已有多项研究报道,组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化修饰(H3K27me3)标记的沉默子[11-13]和组蛋白H3第27位赖氨酸乙酰化修饰(H3K27ac)标记的增强子(enhancer, enh)[14-16]通过调控肠上皮化生、细胞增殖等关键病理过程,在胃癌的发生发展过程中发挥重要调控作用,并显著影响患者预后。H3K27ac标记的增强子是一类远端顺式调控元件,调控区域可结合谱系特异性转录因子、辅因子以及染色质重塑复合物,增强基因的转录活性,从而调控疾病的发生发展[14-17],但其对于肿瘤恶病质的调控作用尚不清楚。

本研究采用染色质靶向捕获技术(cleavage under targets and tagmentation, CUT&Tag),检测DGC组织的全基因组H3K27ac修饰状态,结合转录组测序,系统绘制并发恶病质的DGC增强子图谱,初步探讨增强子对恶病质关键基因*GDF15*的调控作用,揭示恶病质发生的表观遗传新机制,为开发肿瘤恶病质表观治疗策略提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

本研究共纳入30例DGC患者和21例健康人群分

析恶病质特征,所有样本来自陆军特色医学中心消化内科于2022年1月至2023年3月期间收治的临床病例。临床信息收集和样本采集已通过陆军特色医学中心伦理审批[医研伦审(2021)第260号],样本收集前均已获患者书面知情同意。从上述研究队列中,选取10例正常胃黏膜组织(Normal组)、10例伴恶病质特征的DGC组织(DGC组)、10例DGC类器官样本(Organoid组),分别进行H3K27ac组蛋白修饰的CUT&Tag高通量测序和转录组RNA测序,肿瘤组织样本经病理科2名具有副主任医师以上职称的执业医师采用双盲法独立复核,最终确诊为DGC,样本收集后置于组织冻存液和RNA保存液中。

1.2 文库构建及上机测序

1.2.1 RNA文库构建 对样本进行RNA提取,严格检测RNA的完整性(RIN值≥7),同时确保获得足够量(1~4 μg)的合格样品。去除rRNA后,对提取的mRNA进行片段化处理,随后添加cDNA接头,进行纯化和PCR扩增。文库质检合格后上机测序。

1.2.2 CUT&Tag文库构建 对组织样本进行充分研磨,利用碘沙醇梯度溶液提取并收集1×10^5个细胞核。使用TD903试剂盒(中国南京诺唯赞公司)以及H3K27ac抗体(中国武汉爱博泰克公司),严格按照试剂盒说明书完成文库构建,采用Illumina HiSeq X测序仪进行测序。

1.3 数据处理

1.3.1 RNA数据质控及分析 获得RNA测序原始数据后,使用Fastp软件对数据进行初步的质量控制,以去除低质量序列和适配器污染。接着,利用Cutadapt工具进一步精确去除接头序列。随后,采用Sortmerna工具从数据中去除rRNA序列,利用Hisat2工具将经过上述处理的测序数据比对人类参考基因组hg38。为提高数据质量,使用Sambamba工具识别和去除重复的测序读段。进一步使用RSeQC进行测序饱和度、DNA片段分布评估。本研究从MSigDB数据库中收集了恶病质相关基因集合,并结合相关文献[18-20],最终确定了88个关键的恶病质相关基因。利用ssGSEA算法对通过质控样本的RNA数据进行恶病质评分,以量化评估其恶病质特征。运用FeatureCounts工具对基因表达进行定量分析,并通过DESeq2工具进行差异分析,筛选出差异倍数(fold change, FC)>4且校正P值(P. adj)<0.05的差异基因。

1.3.2 CUT&Tag数据质控 使用Fastp工具对CUT&Tag测序原始数据进行初步的质量控制,包括去除低质量碱基、修剪接头污染等。利用Cutadapt软件去除测序数据中的接头序列。采用bowtie2工具将过滤后的数据比对到人类参考基因组hg38上。为了获得高质量、唯一的测序读段,使用Sambamba和Picard工具进行去重和过滤低质量测序读段。测序数据分别从DNA片段数量(>10×10^4个)、与人类参考基因组hg38比对率(>90%)、DNA片段重复率(<30%)和H3K27ac信号峰区域的DNA片段比例(>10%)等多个方面综合评估数据质量。

1.3.3 鉴定增强子区域 利用MACS2工具在全基因组范围内(特别排除已知的黑名单区域)寻找H3K27ac富集信号峰。随后,使用ChIPseeker工具对检测到的H3K27ac信号峰进行位置注释。将基因组转录起始位点(transcription start site, TSS)上下游2.0 kb内的H3K27ac信号峰定义为启动子区域,而TSS上下游2.0 kb以外的H3K27ac信号峰则被视为增强子区域[21]。使用Ngsplot计算信号峰到TSS的距离、信号峰数、全基因区域的信号富集丰度,并绘制峰线图。

1.3.4 增强子信号差异分析 运用MAnorm2工具对检测到的增强子进行合并和归一化处理,并寻找DGC组和Normal组之间的差异增强子(FC>2,P. adj<0.05)。使用ClusterGVis对差异增强子再次进行聚类,筛选在DGC组和Organoid组均获得信号的增强子。

1.3.5 增强子靶基因注释 输入所有样本的基因表达矩阵和增强子丰度矩阵,使用FigR算法基于增强子的H3K27ac信号水平与靶基因的表达水平计算Spearman相关系数,当相关系数>0.3,P<0.05时,认为该基因是增强子的潜在靶基因[22]。

1.3.6 ABC模型构建 根据公共胃癌细胞系OCUM1的Hi-C数据GSE135941,构建活性-接触模型(activity-by-contact, ABC)模型,当ABC得分>0.02时,提示该增强子与靶基因在三维基因组上有较强的作用关系[23]。

1.4 免疫组织化学法检测GDF15表达

将石蜡切片置于65 ℃烘箱中烘烤2~3 h,直至石蜡完全融化。立即将组织切片依次置于二甲苯、梯度乙醇中完成脱蜡。随后将切片转移至EDTA抗原修复液(pH=9.0)中,使用高压锅煮沸3 min后自然冷却至室温。避光条件下置于3%过氧化氢溶液中浸泡15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。随后使用山羊血清封闭液37 ℃下封闭30 min。封闭完成后,滴加按1∶200浓度比例稀释的GDF15抗体(中国武汉三鹰生物公司,27455-1-AP)置于4 ℃孵育过夜。次日滴加二抗MaxVision-HRP鼠/兔(中国福州迈新生物公司,KIT5020)常温孵育15 min,使用DAB显色剂进行显色反应,并使用苏木精对细胞核进行复染。将切片置于梯度乙醇中进行脱水处理,自然风干,使用中性树脂对切片进行封固。染色结果使用Image J软件进行图像处理和分析。

表1 候选增强子的空间位置和靶向sgRNA序列

增强子	增强子位点	sgRNA(5′→3′)
*GDF15*第二增强子位点	chr19:18374194-18374695	sg1-上游:caccgTTTGGGATGTTAGGTCACCC
		sg1-下游:aaacGGGTGACCTAACATCCCAAAc
		sg2-上游:caccgTCACAGGGCTGTGTATCCGA
		sg2-下游:aaacTCGGATACACAGCCCTGTGAc
		sg3-上游:caccgCCCAGGGTTACTCGGCCAAT
		sg3-下游:aaacATTGGCCGAGTAACCCTGGGc

1.5 增强子信号沉默

针对第二增强子序列设计6条小导向RNA(sgRNA),并克隆到pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro(CRISPR/dCasg-KRAB)载体中(表1)。将重组质粒转染到弥漫型胃癌细胞系MKN45和SNU601中,以实现靶向增强子的目的。针对第二增强子序列设计引物(表2)。采用靶向切割与核酸酶释放实验(cleavage under targets and release using nuclease,CUT&RUN)验证靶序列H3K27ac信号变化;定量反转录PCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测目的基因转录水平变化,Western blot法检测目的基因蛋白水平变化。

表2 增强子位点H3K27ac的qPCR引物序列

增强子	引物序列(5′→3′)
*GDF15*第二增强子位点#1(enh2#1)	上游:GAGCCTCAGTTTACCCCTGT
	下游:ACGCTCGCTCCCATCATAAT
*GDF15*第二增强子位点#2(enh2#2)	上游:TGGCCAGTTTATGCAGGAAC
	下游:TGGCAGCTGAGTATGAGTCA
*GDF15*第二增强子位点#3(enh2#3)	上游:ATTATGATGGGAGCGAGCGT
	下游:GTTCCTGCATAAACTGGCCA
*GDF15*第二增强子位点#4(enh2#4)	上游:CTGAGGATGACGATTTGGGA
	下游:GGGTAAACTGAGGCTCGGAA

1.6 弥漫型胃癌裸鼠原位移植模型构建

本研究所使用的16只6~8周龄雌性SPF级BALB/c Nude野生型小鼠(体质量18~21 g),均购自重庆贝来康生物科技有限公司。经陆军军医大学实验动物福利伦理委员会审核通过(AMUWEC20257001),符合动物伦理和动物福利要求,实验动物生产许可证号为SCXK(渝)2022-0011,使用许可证号为SYXK(渝)2022-0018。

实验动物生理状况健康,饲养环境温度20~25 ℃,日温差≤4 ℃,光照周期为12 h光照/12 h黑暗。使用标准笼具,定期更换垫料,保持清洁干燥。饲料为标准小鼠饲料,自由饮水。实验过程中严格遵守动物福利原则,尽量减少动物的痛苦,实验结束后,对剩余动物进行妥善处理。采用简单随机抽样法将16只小鼠分为3组:正常组(n=4)、沉默组(n=6)以及对照组(n=6)。正常组不进行任何处理,另外2组小鼠建立人源弥漫型胃癌MKN45细胞系裸鼠胃原位移植瘤模型,细胞处理如下:沉默组注射经慢病毒包装的增强子特异性sgRNA稳定转染的增强子沉默MKN45细胞系(已验证增强子序列H3K27ac富集程度下调);对照组注射野生型MKN45细胞系。裸鼠术前禁食禁水8 h,使用异氟烷对小鼠进行麻醉后,取左侧卧位,于腋中线肋骨下方切口进入腹腔,将混匀的弥漫型胃癌MKN45细胞悬液(浓度为2×10^7个/mL)使用注射器吸50 μL,小心注射至胃壁,注射结束后轻柔将胃还纳回腹腔,依次缝合肌肉层和皮肤层。术后严密监测荷瘤裸鼠生命状态和体质量,当小鼠出现明显的衰弱症状(如体质量急剧下降、进食量明显减少、活动能力受限或出现其他明显的病态表现)即视为达到观察终点,立即对小鼠进行安乐死操作。测量体质量后使用无菌手术器械迅速解剖小鼠,收集胃脏、股四头肌、腓肠肌、腹股沟白色脂肪组织(inguinal white adipose tissue,iWAT)和肩胛间区棕色脂肪组织(interscapular brown adipose tissue,iBAT)。对各组织进行称量,并记录数据,以便进行后续的统计学分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.0进行统计分析,当数据符合正态分布时,采用独立样本t检验分析两组样本间差异,当数据不符合正态分布,则使用非参数检验进行分析;3组动物样本间的体质量、组织质量相关实验数据使用方差分析(analysis of variance,ANOVA)进行显著性检验,P<0.05则为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DGC患者呈现出明显的肿瘤恶病质倾向

本研究从临床指标与症状、分子表达水平2个维度,评估弥漫型胃癌患者的恶病质倾向(图1A)。统计来自陆军特色医学中心消化科的30例DGC患者和21例健康人群的临床信息,包括性别、年龄、取样部位、

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染状态、BMI、6个月体质量变化、饮食异常(如食欲减退/早饱/恶心呕吐)以及恶病质等级评分(cachexia staging score, CSS)。基于CSS评分标准,将恶病质严重程度划分为:0~2分定义为无恶病质,3~4分对应恶病质前期,5~8分对应恶病质期,9~12分则界定为恶病质难治期。结果表明:①DGC患者的BMI指数显著低于健康人群(P=0.010);②6个月内体质量下降≥5%的比例显著增加(P=0.010);③DGC患者更容易出现食欲减退、早饱和恶心呕吐等饮食异常症状(P<0.001);④DGC患者的恶病质等级评分显著高于健康人群(P=0.002,表3)。

另收集10例正常胃黏膜组织(Normal组)、10例弥漫型胃癌组织(DGC组)以及10例类器官(Organoid组),评估3组样本所对应的患者临床信息后(表4),进行RNA测序。根据转录组数据对样本进行恶病质评分,结果表明,DGC组和Organoid组的恶病质评分均显著高于Normal组(P<0.001,图1B、C)。通过差异基因分析发现,DGC组、Organoid组与Normal组的基因表达谱存在显著差异。其中,DGC组有1 077个基因表达水平升高,进一步将其与88个恶病质基因取交集,得到图中所标注的16个DGC组上调的恶病质关键基因(图1D)。同样,Organoid组有2 410个基因表达上调,图中所示为14个Organoid组上调的恶病质基因(图1E)。将上述2组样本中异常高表达的恶病质基因经二次交集运算,鉴定出7个上皮特异性弥漫型胃癌恶病质相关基因(图1F)。提示DGC患者肿瘤恶病质倾向显著,肿瘤恶病质相关基因高表达。

表3 健康人群与DGC患者临床信息及统计分析表[例(%)]

指标	健康人群(n=21)	DGC患者(n=30)	χ^2	P
性别				
男性	7(33.3)	24(80.0)	11.286	0.001
女性	14(66.7)	6(20.0)		
年龄/岁				
≤60	20(95.2)	13(43.3)	14.573	<0.001
>60	1(4.8)	17(56.7)		
取样部位				
贲门	0	5(16.7)		
胃窦	16(76.2)	14(46.7)	10.999	0.012
胃体	5(23.8)	4(13.3)		
胃角	0	7(23.3)		
*H. pylori*感染状态				
阳性	0	6(20.0)	4.760	0.029
阴性	21(100.0)	24(80.0)		
BMI/(kg/m^2)				
<18.5	1(4.8)	8(26.7)		
18.5~24	11(52.4)	19(63.3)	9.278	0.010
>24	9(42.9)	3(10.0)		
6个月内体质量降低≥5%				
是	0	8(26.7)	6.642	0.010
否	21(100.0)	22(73.3)		
饮食异常				
是	0	20(66.7)	20.032	<0.001
否	21(100.0)	10(33.3)		
CSS/分				
0~2	21(100.0)	15(50.0)		
3~4	0	5(16.7)		
5~8	0	6(20.0)	14.875	0.002
9~12	0	4(13.3)		

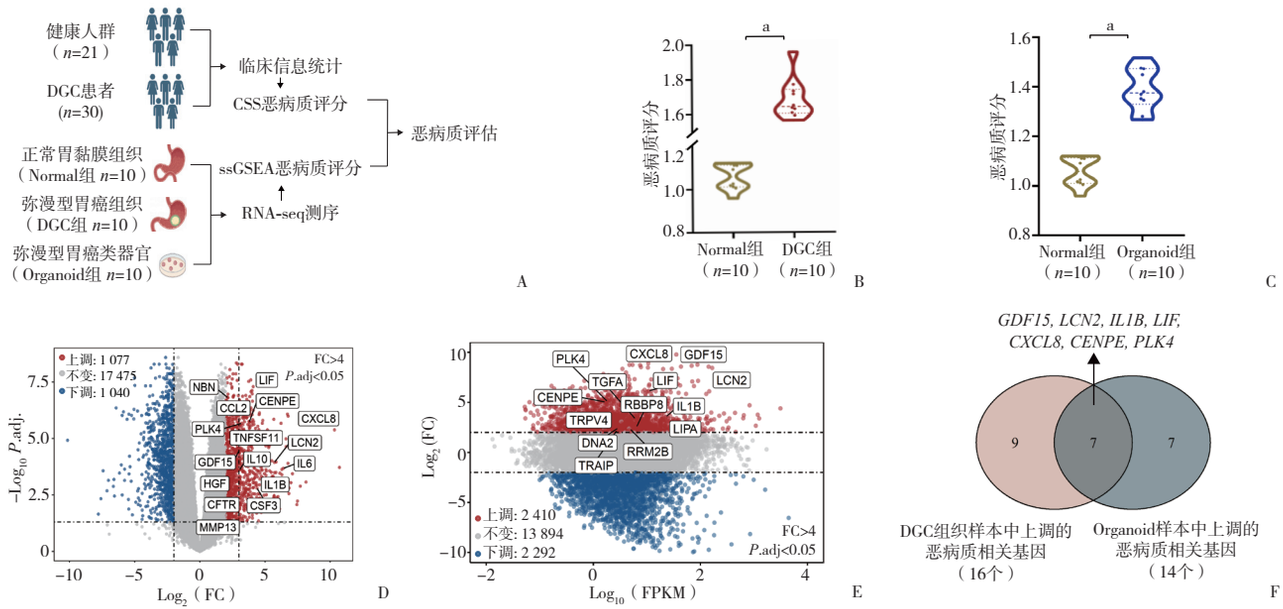
表4 Normal组、DGC组以及Organoid组的患者临床信息[例(%)]

指标	正常胃黏膜组织(*n*=10)	弥漫型胃癌组织(*n*=10)	弥漫型胃癌类器官(*n*=10)
性别			
男性	3(30.0)	7(70.0)	5(50.0)
女性	7(70.0)	3(30.0)	5(50.0)
年龄/岁			
≤60	8(80.0)	5(50.0)	4(40.0)
>60	2(20.0)	5(50.0)	6(60.0)
取样部位			
贲门	0	2(20.0)	2(20.0)
胃窦	5(50.0)	5(50.0)	4(40.0)
胃体	5(50.0)	2(20.0)	2(20.0)
胃角	0	1(10.0)	2(20.0)
*H. pylori*感染状态			
阳性	0	2(20.0)	3(30.0)
阴性	10(100.0)	8(80.0)	7(70.0)
BMI/(kg/m^2)			
<18.5	0	6(60.0)	6(60.0)
18.5~24	8(80.0)	4(40.0)	4(40.0)
>24	2(20.0)	0	0
6个月内体质量降低≥5%			
是	0	4(40.0)	5(50.0)
否	10(100.0)	6(60.0)	5(50.0)
饮食异常			
是	0	10(100.0)	10(100.0)
否	10(100.0)	0	0
CSS评分/分			
0~2	10(100.0)	0	0
3~4	0	2(20.0)	2(20.0)
5~8	0	5(50.0)	4(40.0)
9~12	0	3(30.0)	4(40.0)

2.2 H3K27ac增强子活性与DGC恶病质关键基因*GDF15*的表达水平呈正相关

选取10例正常胃黏膜组织、10例DGC组织以及10例DGC类器官(与RNA测序所使用样本的患者来源相同)进行H3K27ac CUT&Tag测序,以系统绘制DGC组织中的H3K27ac增强子图谱(图2A)。对Normal组和DGC组样本进行H3K27ac增强子信号主成分分析(principal component analysis, PCA),发现DGC组的增强子特征与Normal组明显不同(图2B)。随后对比H3K27ac增强子数量和平均信号强度发现,DGC组的H3K27ac增强子数量(P<0.001)和平均信号强度显著高于Normal组(图2C),提示DGC组织中存在H3K27ac增强子获得的现象。进一步使用MAnorm2对H3K27ac增强子信号进行标准化和差异分析,结果显示DGC组获得的增强子数量为18 195(16.30%)个,丢失的增强子数量为7 404(6.63%)个,未发生显著改变的增强子数量为86 024(77.07%)个(图2D)。这些数据说明,DGC组织中同时存在H3K27ac增强子获得事件和丢失事件,发生广泛的增强子重塑,但总体以H3K27ac增强子信号获得为主。

进一步对Normal组和Organoid组样本的H3K27ac增强子信号进行无监督聚类分析(unsupervised clustering analysis, UCA),提示2组样本间的H3K27ac增强子信号同样存在显著差异(图2E)。将至少在3个DGC类器官中存在的增强子定义为肿瘤上皮特异性增强子,共鉴定得到33 947个,随后与DGC组织中获得的18 195个增强子取交集,最终得到2 931个肿瘤上皮特异性活性增强子(图2F),可能在DGC的发生和发展中起到重要调控作用。运用ClusterGVis工具对上述2 931个肿瘤上皮特异性活性增强子再次聚类,筛选出在DGC组织和类器官中均显著获得信号的位点。对这1 338个增强子进行靶基因注释,得到1 206个调控基因(图2G)。



a: P<0.001

A:样本类型以及测序信息的研究模式图;B:Normal组与DGC组样本转录组数据的恶病质评分;C:Normal组与Organoid组样本转录组数据的恶病质评分;D:DGC组与Normal组样本转录组差异分析火山图;E:Organoid组与Normal组样本转录组差异分析MAplot(M-versus-A plot)图;F:DGC组与Organoid组中相比Normal组上调的7个恶病质相关基因交集的韦恩图

图1　弥漫型胃癌患者的恶病质特征

其中,包含图1F鉴定出的DGC组织中上调的恶病质相关基因*GDF15*和*LCN2*,二者分别受6个和4个增强子调控(图2H)。随后,使用GEO公共转录组数据,分析候选靶基因*GDF15*和*LCN2*在正常胃黏膜和DGC组织的表达水平。2组转录组数据分别采取不同的预处理方式:一组使用每百万映射读数标准化后的值(counts per million, CPM),另一组则对原始计数(count)进行Log_2转换。结果表明,在DGC组织中,GDF15呈现出显著上调的态势(GSE113255数据集,P=0.020;GSE122401数据集,P<0.001),而LCN2上调并不显著(GSE113255数据集,P=0.380;GSE122401数据集,P=0.083,图2I)。这些结果提示*GDF15*可能是弥漫型胃癌伴发恶病质的关键基因。

为进一步验证GDF15在DGC中的表达情况,免疫组化染色结果显示,GDF15表达在DGC样本中显著上调,且免疫组化评分差异具有统计学意义(P<0.001,图2J),提示GDF15可能在DGC恶病质中的广泛重要作用。上述结果表明,DGC组织中H3K27ac增强子活性显著增强,可能上调DGC恶病质相关基因*GDF15*表达。

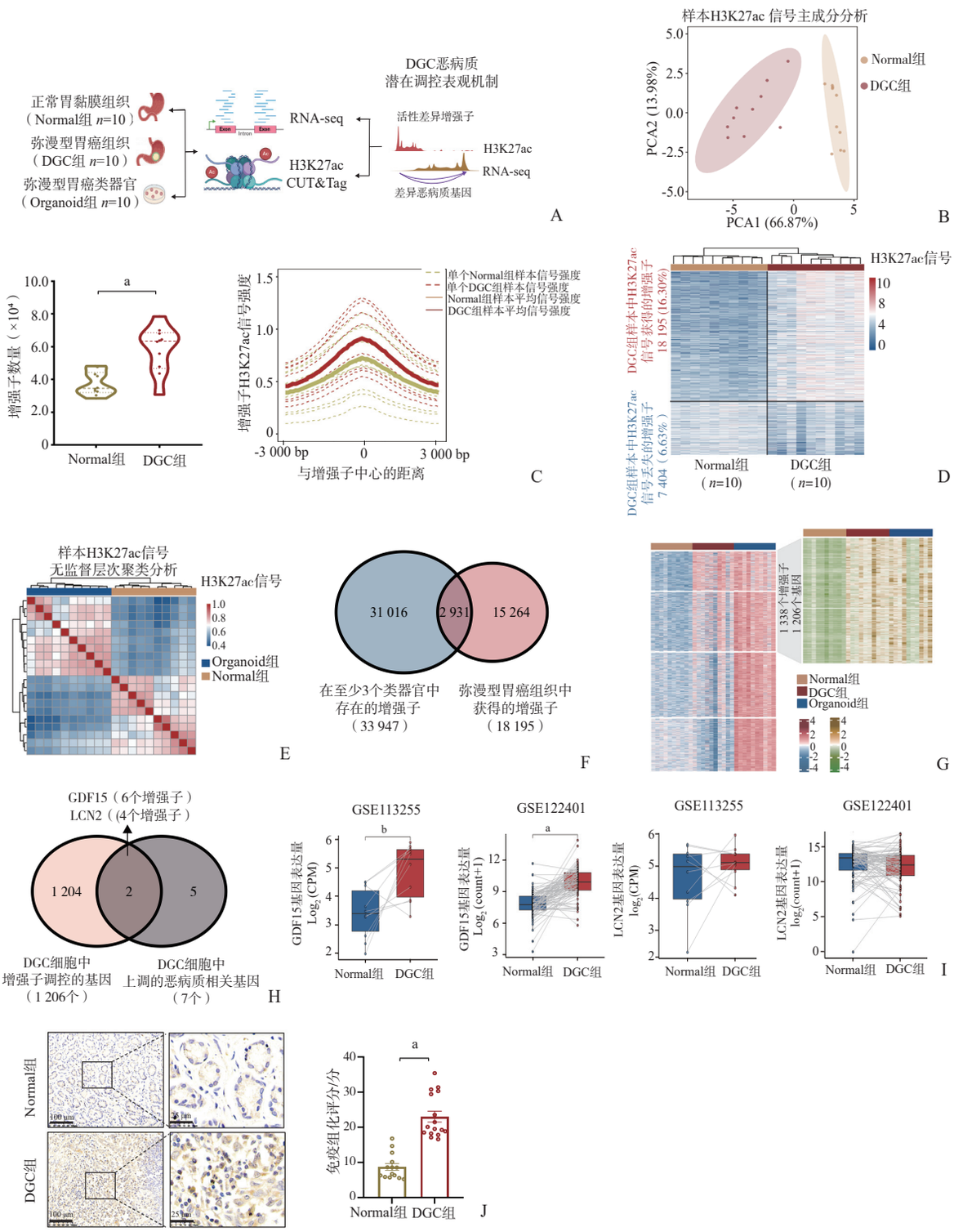
2.3　体外实验证实H3K27ac活性增强子转录激活*GDF15*基因表达

为进一步明确获得性增强子对弥漫型胃癌*GDF15*基因的转录激活作用,利用GSE135941数据集中弥漫胃癌细胞系OCUM1的Hi-C测序数据构建ABC模型。结果表明,其中有4个增强子位点可能在三维空间上与*GDF15*基因有较强相互作用,ABC得分分别为0.39、0.60、0.58、0.57分(图3A)。选择得分最高的第二增强子位点进行后续细胞及动物实验验证。

为验证上述增强子对*GDF15*基因的调控作用,本研究针对Hi-C数据中预测的GDF15相关增强子设计对应的sgRNA,并利用CRISPR/dCas9-KRAB载体系统在MKN45和SNU601细胞株中下调这些顺式作用元件区域的H3K27ac修饰(图3B)。CUT&RUN联合qPCR技术检测增强子沉默后H3K27ac信号的变化,结果显示增强子擦除后,其位点上的H3K27ac修饰水平显著降低(P<0.05,图3C、D)。在沉默GDF15相关增强子后,GDF15的mRNA水平(P<0.001,图3F)和蛋白水平(图3E)均明显降低。这些结果表明*GDF15*基因表达水平受到活性增强子调控。

2.4　靶向沉默*GDF15*基因活性增强子有效缓解荷瘤鼠的恶病质表型

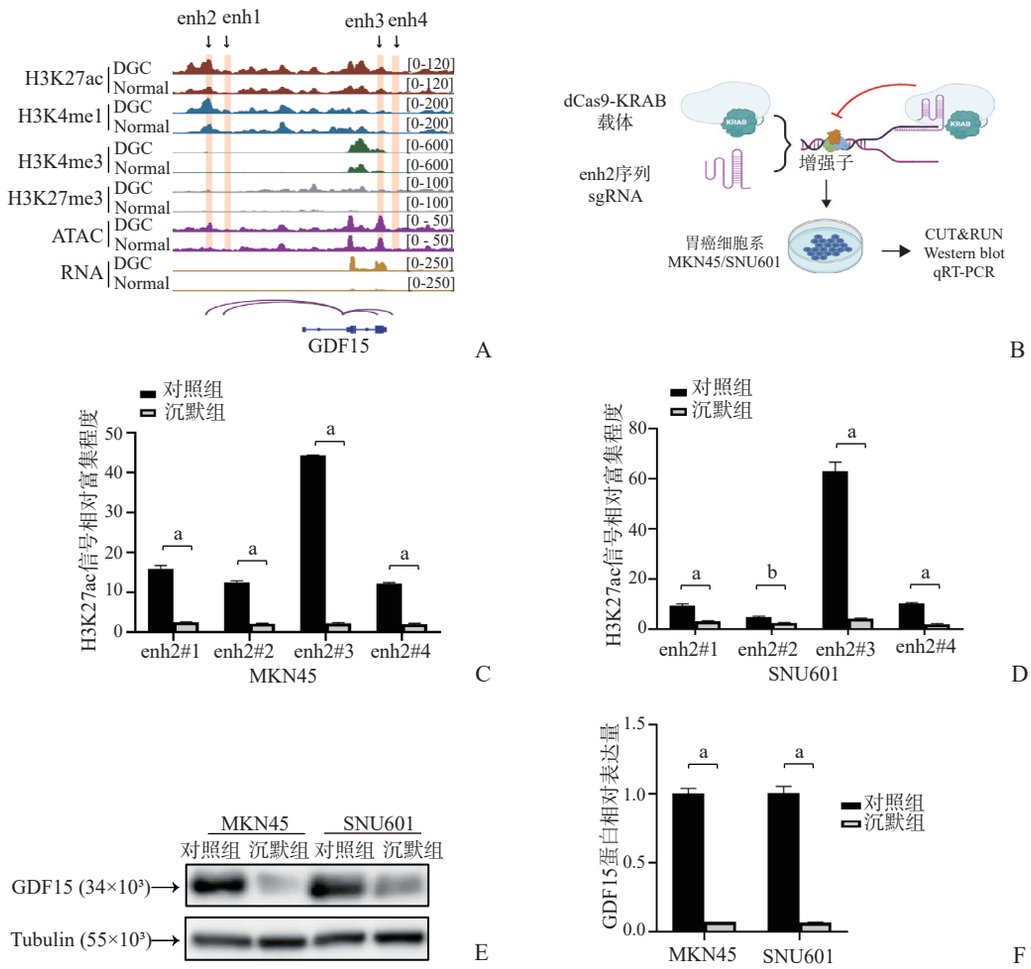
为了探讨*GDF15*基因增强子活性是否诱导恶病质表型,本研究构建了裸鼠人弥漫型胃癌细胞系原位移植模型,对比观察正常组、对照组、沉默组小鼠的恶病质程度(图4A)。检测小鼠体质量,结果显示,对照



a：P<0.001；b：P<0.05

A：组织建库及生信分析模式图；B：Normal组和DGC组样本H3K27ac信号的PCA；C：Normal组和DGC组样本增强子的数量（左）和信号强度可视化、量化比较（右）；D：Normal组和DGC组样本间差异H3K27ac增强子信号热图；E：Normal组和Organoid组样本的H3K27ac增强子信号无监督聚类图；F：上皮特异性弥漫型胃癌中的活性增强子数量韦恩图；G：1 338个活性增强子潜在调控1 206个表达水平上调的基因热图；H：弥漫型胃癌组织中的活性增强子所调控的恶病质相关基因韦恩图；I：GEO公共转录组数据*GDF15*和*LCN2*在弥漫型胃癌中的表达水平；J：Normal组和DGC组样本的GDF15免疫组化病理染色图及量化柱状图

图2 H3K27ac增强子重塑可能调控恶病质相关基因表达



a: P<0.001; b: P<0.05

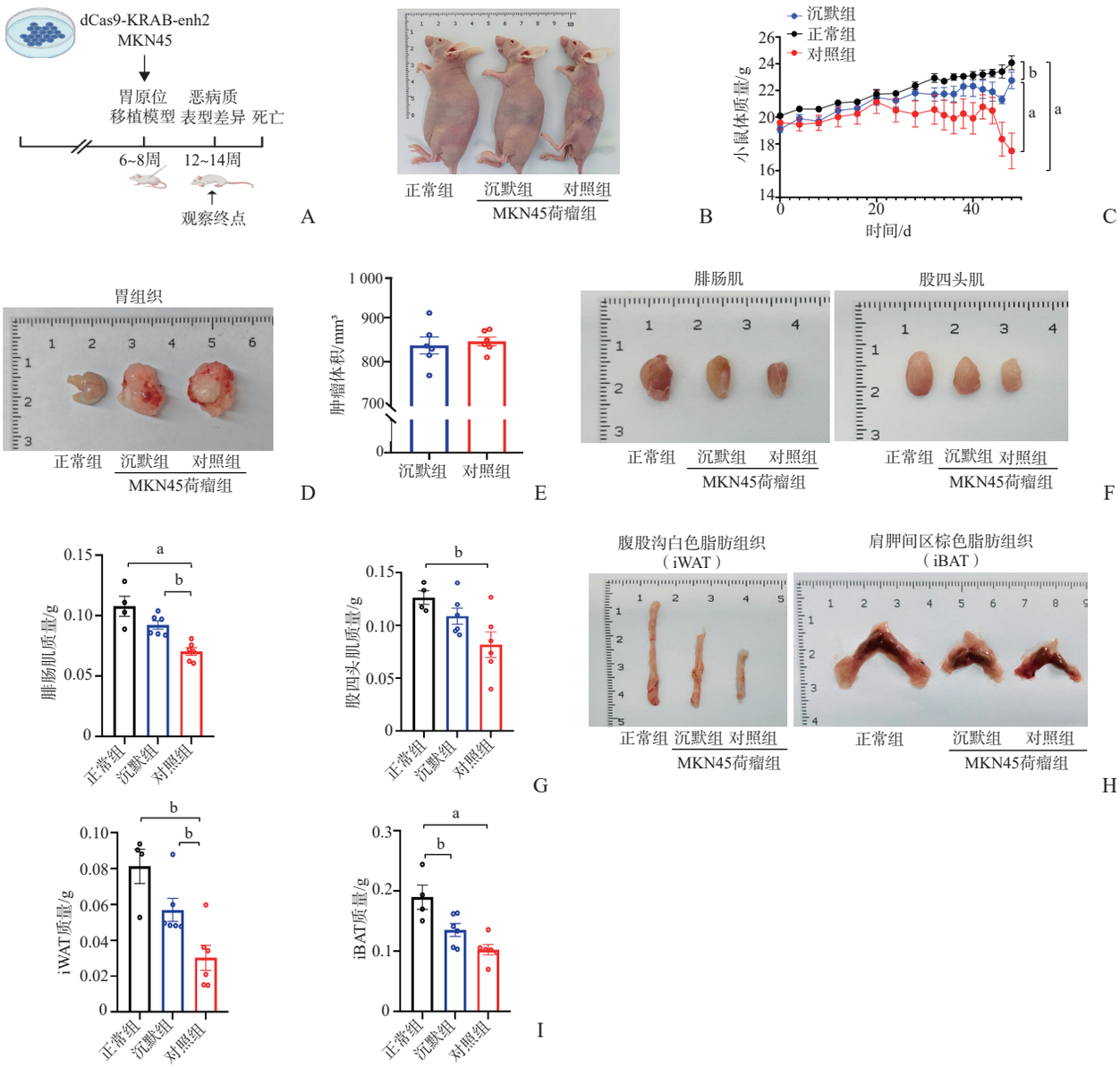
A:增强子调控*GDF15*基因的IGV可视化图　上方箭头所指橙色区域:4个增强子位点,下方紫色弧线:染色质位点之间的交互作用;B:靶向沉默增强子的质粒构建以及基于该质粒的胃癌细胞系构建模式图;C:MKN45细胞*GDF15*增强子沉默后H3K27ac信号变化图;D:SNU601细胞*GDF15*增强子沉默后H3K27ac信号变化图;E:Western blot检测沉默后GDF15蛋白水平;F:qRT-PCR检测增强子沉默后*GDF15*转录水平

图3　H3K27ac活性增强子对弥漫型胃癌细胞GDF15表达水平的调控作用

组小鼠体质量显著低于正常组(P<0.001),而沉默组虽然与正常组差异存在统计学意义(P=0.0292),但其体质量显著高于对照组(P<0.001,图4B、C),这一结果提示,沉默增强子能在一定程度上减轻荷瘤小鼠体质量的降低程度。沉默增强子后,对照组和沉默组的肿瘤体积无显著差异(P=0.637,图4D、E)。上述实验结果证实,沉默*GDF15*基因的活性增强子可缓解荷瘤小鼠的体质量减轻症状,且不影响肿瘤生长情况,提示小鼠体质量维持并非由肿瘤生长抑制所致,而是由于沉默增强子后可能延缓恶病质进展。

骨骼肌萎缩和脂肪降解是肿瘤恶病质患者的主要特征,收集小鼠的骨骼肌(图4F、G)和脂肪组织样本(图4H、I)进行量化分析。与正常组比较,对照组的腓肠肌(P<0.001)、股四头肌质量显著降低(P=0.023),而沉默组与正常组相比未见明显差异(图4G)。上述结果表明,通过沉默*GDF15*基因增强子有效缓解荷瘤鼠的骨骼肌萎缩。

进一步分析脂肪组织显示,对照组的iWAT和iBAT质量较正常组均显著降低(P=0.045,P=0.001)。沉默组的iWAT质量与正常组无显著差异(P=0.109),提示沉默增强子能有效缓解小鼠iWAT丢失。然而,对于棕色脂肪组织而言,沉默组的iBAT质量较正常组仍呈下降趋势(P=0.027),同时沉默组与对照组差异不显著(P=0.151,图4I)。综上,沉默*GDF15*基因增强子显著延缓荷瘤鼠体质量下降、骨骼肌萎缩以及iWAT降解,表明有效缓解了荷瘤鼠的恶病质表型。



a：P<0.001；b：P<0.05

A：构建裸鼠人弥漫型胃癌细胞系原位移植模型模式图；B：正常组和胃原位异种移植荷瘤裸鼠的对比图像；C：实验裸鼠体质量变化曲线；D：实验裸鼠胃部及原位异种移植肿瘤的对比图像；E：沉默组和对照组荷瘤裸鼠胃原位异种移植肿瘤体积；F：正常组和荷瘤裸鼠腓肠肌、股四头肌解剖图像；G：正常组、沉默组及对照组裸鼠骨骼肌质量统计分析；H：正常组和荷瘤裸鼠iWAT和iBAT解剖图像；I：正常组、沉默组及对照组裸鼠脂肪组织质量统计分析

图4　GDF15增强子沉默对荷瘤裸鼠恶病质表型的缓解作用

3　讨论

肿瘤-靶器官远程调控作用是驱动恶病质进展的核心机制，涉及多种分解代谢信号及炎症因子，导致患者体质量减轻、食欲减退等不良预后[24-25]。既往研究表明，肌肉及脂肪组织DNA甲基化和组蛋白修饰等表观调控紊乱与恶病质进程密切相关[26]，但肿瘤特异性活性增强子是否在恶病质进程中发挥作用还尚不清楚。组蛋白修饰检测技术包括ChIP-seq、CUT&Tag和CUT&RUN等[27-29]。鉴于类器官及部分活检组织的细胞量较少，本研究采用了靶向组蛋白H3K27ac修饰的CUT&Tag技术鉴定潜在增强子位点，通过Normal组、DGC组和Organoid组的测序数据揭示了活性增强子重塑在GDF15表达调控及恶病质表型驱动中的关键作用。

本研究以弥漫型胃癌为模型，结合多组学生物信息学分析（H3K27ac CUT&Tag、RNA-seq、scRNA-seq、Hi-C）和功能实验（CRISPR编辑、小鼠模型），系统性构建弥漫型胃癌恶病质相关增强子图谱，发现恶病质

进程中存在肿瘤增强子重塑事件,活性增强子上调恶病质关键基因*GDF15*表达,促进恶病质表型。作为转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族的分支成员[30-32],GDF15的表达受炎症因子和应激相关蛋白的正向调控,如白介素(IL-1β、IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF-α)和巨噬细胞集落刺激因子(MCSF-1)等[30]。当机体处于应激状态,如伴随组织损伤、炎症和恶性肿瘤等疾病时,GDF15水平升高。目前已证实,血清GDF15水平与厌食症/恶病质直接相关[30-32],它通过作用于下丘脑的GFRAL受体,调节迷走神经-交感神经系统活动,延迟胃排空,诱导条件性味觉厌恶,并通过增加脂解、氧化代谢和产热来调节体质量和能量消耗[33-34]。本研究结果表明,干预GDF15增强子可能是恶病质治疗的候选新靶点。

然而,当前研究仍存在局限性。首先,本研究所使用的动物模型样本量较小,且裸鼠存在免疫缺陷,可能影响结果的可靠性。因此,未来研究需扩大样本量,建立人源化患者来源异种移植模型,深入量化恶病质相关指标,并构建多组学动态监测体系,以全面理解恶病质机制。此外,为进一步验证增强子干预策略在抑制肿瘤恶病质方面的潜力,未来亟需开发靶向GDF15增强子的治疗药物,推动其临床转化进程。值得一提的是,肿瘤恶病质常与炎症进程并行[4,5,18],因此,深入探究增强子重塑机制,明确微环境因子(包括细胞因子、代谢产物等)在诱导重塑中的关键作用,并解析相关信号通路及上游转录因子调控机制,成为未来研究的关键方向。

综上所述,弥漫型胃癌存在以全基因组增强子重塑为特征的表观遗传调控紊乱,其通过上调*GDF15*基因表达驱动恶病质表型。通过靶向沉默*GDF15*基因活性增强子元件,可特异性下调GDF15水平,为阻断恶病质进程提供了潜在干预靶点与治疗新策略。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] 王磊, 万凌红, 王涛, 等. 新辅助免疫化疗对比新辅助化疗用于局部进展期胃癌的临床疗效分析[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(20): 2313-2321. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202405076.
WANG L, WAN L H, WANG T, *et al*. Clinical efficacy of neoadjuvant immunochemotherapy versus neoadjuvant chemotherapy for local advanced gastric adenocarcinoma[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(20): 2313-2321. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202405076.

[3] LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification[J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965, 64: 31-49. DOI: 10.1111/apm.1965.64.1.31.

[4] ARGILÉS J M, BUSQUETS S, STEMMLER B, *et al*. Cancer cachexia: understanding the molecular basis[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(11): 754-762. DOI: 10.1038/nrc3829.

[5] ARGILÉS J M, LÓPEZ-SORIANO F J, STEMMLER B, *et al*. Cancer-associated cachexia: understanding the tumour macroenvironment and microenvironment to improve management[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(4): 250-264. DOI: 10.1038/s41571-023-00734-5.

[6] BROWN L R, LAIRD B J A, WIGMORE S J, *et al*. Understanding cancer cachexia and its implications in upper gastrointestinal cancers[J]. Curr Treat Options Oncol, 2022, 23(12): 1732-1747. DOI: 10.1007/s11864-022-01028-1.

[7] FEARON K, STRASSER F, ANKER S D, *et al*. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70218-7.

[8] HAUGSTVEDT T K, VISTE A, EIDE G E, *et al*. Factors related to and consequences of weight loss in patients with stomach cancer. The Norwegian multicenter experience[J]. Cancer, 1991, 67(3): 722-729. DOI: 10.1002/1097-0142(19910201)67:3722::aid-cncr2820670332>3.0.co;2-r.

[9] PORTELA A, ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(10): 1057-1068. DOI: 10.1038/nbt.1685.

[10] YANG J, XU J, WANG W, *et al*. Epigenetic regulation in the tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 210. DOI: 10.1038/s41392-023-01480-x.

[11] 秦苾珺, 谭玉婷, 储召乐, 等. 组蛋白H3K27me3沉默子重塑上调胃黏膜高级别上皮内瘤变磷酸甘油醛激酶1表达[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(06): 597-607. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202310001.
QIN B J, TAN Y T, CHU Z L, *et al*. Remodeling of histone H3K27me3-associated silencers upregulates PGK1 expression in gastric high-grade intraepithelial neoplasia[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(6): 597-607. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202310001.

[12] 吴林育, 刘文康, 喻博, 等. 胃黏膜肠化的H3K27me3沉默子重塑特征及转录调控机制[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(6): 510-518. DOI: 10.16016/j. 2097-0927.202210068.
WU L Y, LIU W K, YU B, *et al*. Remodeling characteristics of H3K27me3-marked silencer in gastric intestinal *Metaplasia* and its transcriptional regulatory mechanism[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(6): 510-518. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210068.

[13] 任原锋, 刘文康, 储召乐, 等. 组蛋白H3K27me3修饰缺

失上调弥漫型胃癌细胞中SLC7A11的表达[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(1): 71-81. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202406068.
REN Y F, LIU W K, CHU Z L, *et al*. Loss of histone H3K27me3 up-regulates SLC7A11 in diffuse gastric cancer cells [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(1): 71-81. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202406068.

[14] 刘文康, 吴林育, 喻博, 等. 胃黏膜肠上皮化生的H3K27ac增强子重编程特征及转录调控机制[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(6): 500-509. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210071.
LIU W K, WU L Y, YU B, *et al*. Reprogramming characteristics of H3K27ac-marked enhancer in gastric intestinal metaplasia and its transcriptional regulatory mechanism[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(6): 500-509. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210071.

[15] 陈旭, 储召乐, 秦苾珺, 等. 增强子及相关调控组在肠型胃癌中的重塑特征及其预后预测模型[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(7): 695-704. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202309147.
CHEN X, CHU Z L, QIN B J, *et al*. Remodeling characteristics and construction of a survival prediction model based on enhancers and regulome in intestinal type gastric cancer [J]. J Army Med Univ, 2024, 46(7): 695-704. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202309147.

[16] 薛锐, 潘雨薇, 谭玉婷, 等. 胃黏膜高级别上皮内瘤变组织的增强子重塑及其对增殖相关基因CD24表达的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(5): 426-434. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202408113.
XUE R, PAN Y W, TAN Y T, *et al*. Remodeling of enhancers in high-grade epithelial dysplasia of gastric mucosa and its effect on expression of proliferation-related gene CD24 [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(5): 426-434. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202408113.

[17] AUDIA J E, CAMPBELL R M. Histone modifications and cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(4): a019521. DOI: 10.1101/cshperspect.a019521.

[18] FEARON K C H, GLASS D J, GUTTRIDGE D C. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways [J]. Cell Metab, 2012, 16(2): 153-166. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.06.011.

[19] OLSON B, DIBA P, KORZUN T, *et al*. Neural mechanisms of cancer cachexia[J]. Cancers(Basel), 2021, 13(16): 3990. DOI: 10.3390/cancers13163990.

[20] FREIRE P P, FERNANDEZ G J, DE MORAES D, *et al*. The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2020, 11(4): 947-961. DOI: 10.1002/jcsm.12565.

[21] BRIEND M, RUFIANGE A, MONCLA L M, *et al*. Connectome and regulatory hubs of CAGE highly active enhancers[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5594. DOI: 10.1038/s41598-023-32669-3.

[22] KARTHA V K, DUARTE F M, HU Y, *et al*. Functional inference of gene regulation using single-cell multi-omics[J]. Cell Genom, 2022, 2(9): 100166. DOI: 10.1016/j.xgen.2022.100166.

[23] FULCO C P, NASSER J, JONES T R, *et al*. Activity-by-contact model of enhancer-promoter regulation from thousands of CRISPR perturbations[J]. Nat Genet, 2019, 51(12): 1664-1669. DOI: 10.1038/s41588-019-0538-0.

[24] PRYCE B R, WANG D J, ZIMMERS T A, *et al*. Cancer cachexia: involvement of an expanding macroenvironment [J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 581-584. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.007.

[25] SCHMIDT S F, ROHM M, HERZIG S, *et al*. Cancer cachexia: more than skeletal muscle wasting [J]. Trends Cancer, 2018, 4(12): 849-860. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.10.001.

[26] CARR R M, ENRIQUEZ-HESLES E, OLSON R L, *et al*. Epigenetics of cancer-associated muscle catabolism [J]. Epigenomics, 2017, 9(10): 1259-1265. DOI: 10.2217/epi-2017-0058.

[27] JOHNSON D S, MORTAZAVI A, MYERS R M, *et al*. Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions[J]. Science, 2007, 316(5830): 1497-1502. DOI: 10.1126/science.1141319.

[28] KAYA-OKUR H S, WU S J, CODOMO C A, *et al*. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1930. DOI: 10.1038/s41467-019-09982-5.

[29] SKENE P J, HENIKOFF S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites[J]. eLife, 2017, 6: e21856. DOI: 10.7554/eLife.21856.

[30] WISCHHUSEN J, MELERO I, FRIDMAN W H. Growth/differentiation factor-15(GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint [J]. Front Immunol, 2020, 11: 951. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00951.

[31] ASSADI A, ZAHABI A, HART R A. GDF15, an update of the physiological and pathological roles it plays: a review[J]. Pflugers Arch, 2020, 472(11): 1535-1546. DOI: 10.1007/s00424-020-02459-1.

[32] WANG D D, DAY E A, TOWNSEND L K, *et al*. GDF15: emerging biology and therapeutic applications for obesity and cardiometabolic disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(10): 592-607. DOI: 10.1038/s41574-021-00529-7.

[33] HSU J Y, CRAWLEY S, CHEN M, *et al*. Erratum: non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15 [J]. Nature, 2017, 551(7680): 398. DOI: 10.1038/nature24481.

[34] SURIBEN R, CHEN M, HIGBEE J, *et al*. Antibody-mediated inhibition of GDF15-GFRAL activity reverses cancer cachexia in mice[J]. Nat Med, 2020, 26(8): 1264-1270. DOI: 10.1038/s41591-020-0945-x.

(收稿:2025-02-14;修回:2025-03-31)
(编辑 邓强庭)