DOI:10.16016/j.2097-0927.202310001

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

秦苾珺[1],谭玉婷[2,3],储召乐[2],刘碧颖[2],李先锋[2],王 涛[2],陈东风[2],崔红娟[1],吴林育[2],王 斌[2] 400715 重庆,西南大学医学研究院[1];400042 重庆,陆军军医大学陆军特色医学中心(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室[2];400044 重庆,重庆大学医学院[3]

[摘要] **目的** 绘制胃黏膜高级别上皮内瘤变(High-Grade Intraepithelial Neoplasia, HGIN)组织的组蛋白 H3K27me3 沉默子图谱,寻找沉默子调控的重要靶基因。**方法** 从本院内镜中心收集 HGIN 与正常胃黏膜组织各 24 例,采用 H3K27me3 染色体靶向切割和标签化(Cleavage Under Target & Tagmentation, CUT&Tag)测序技术捕获基因组修饰区域。通过生物信息学分析比较两类组织的沉默子信号特征以及差异;整合 RNA 测序数据及高通量染色体构象捕获技术(Hi-C)公共数据,分析沉默子重塑调控的靶基因及调控的潜在生物学过程。**结果** 与正常胃黏膜相比,HGIN 组织 H3K27me3 修饰数量减少,信号强度全局性降低,呈现 H3K27me3 信号峰重塑现象;转录组差异分析结果显示,与正常胃黏膜组织相比,HGIN 共有 8 887 个差异表达基因,其中表达上调基因 4 335 个,表达下调基因 4 552 个,其中 CTNNB1 等肿瘤发生相关基因显著上调;整合分析表观组学和转录组学数据,发现沉默子丢失可能在转录水平上调氨基酸生物合成、精氨酸与脯氨酸代谢和糖酵解等关键代谢基因,如糖酵解关键酶磷酸甘油醛激酶 1(phosphoglycerate kinase1, PGK1)表达,进而促进胃黏膜上皮内瘤变。**结论** 组蛋白 H3K27me3 沉默子信号丢失是 HGIN 表观重塑特征之一,沉默子丢失可能与 PGK1 等糖酵解和氨基酸代谢基因表达紊乱相关。

[关键词] 胃高级别上皮内瘤变;胃癌;组蛋白修饰 H3K27me3;沉默子;磷酸甘油醛激酶 1
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

Remodeling of histone H3K27me3-associated silencers upregulates PGK1 expression in gastric high-grade intraepithelial neoplasia

QIN Bijun[1], TAN Yuting[2,3], CHU Zhaole[2], LIU Biying[2], LI Xianfeng[2], WANG Tao[2], CHEN Dongfeng[2], CUI Hongjuan[1], WU Linyu[2], WANG Bin[2] [1]Southwest University Medical Research Institute, Chongqing, 400715; [2]Department of Gastroenterology, Chongqing Key Laboratory of Precision Diagnosis and Treatment for Digestive Malignancies, Army Medical Center of PLA (Daping Hospital), Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042; [3]School of Medicine, Chongqing University, Chongqing, 400044, China

[**Abstract**] **Objective** To characterize the silencers in genomic loci that were labeled by H3K37me3 modification in gastric high-grade intraepithelial neoplasia (HGIN) tissues, and identify their key downstream genes. **Methods** Gastric mucosa were collected from 48 donors, including 24 patients with HGIN and 24 healthy controls who underwent dndoscopic biopsy or endoscopic gastric mucosal dissection in our hospital. Genomic distribution of histone H3K27me3 modification was retrieved by targeted chromosome Cleavage Under Target &Tagmentation (CUT&Tag) sequencing. Bioinformatics analysis tools were used to compare the characteristics and differences of the silencer signals between the 2 types of tissues. The RNA sequencing data and the public high-through chromosome conformation capture (Hi-C) data were integrated to analyze the

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81822032, 91959111, 81872027);重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyjjqX0027, cstc2021jcyj-msxmX0340)

[通信作者] 王 斌,E-mail:wb_tmmu@126.com
吴林育,E-mail:wly17750176828@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

target genes regulated by silencer remodeling and their potential biological processes. **Results** Compared with normal gastric mucosal tissue, the number of H3K27me3 modifications and signal intensity in HGIN tissues were significantly reduced, which was manifested by global remodeling of H3K27me3 signals. High-throughput RNA sequencing and bioinformatics analysis showed that there were a total of 8 887 differentially expressed genes for HGIN tissues, including 4 335 up-regulated genes and 4 552 down-regulated ones, and among them, CTNNB1 and other oncogenes were significantly up-regulated. Integrated analysis of epigenomics and transcriptomics data reveled that extensive remodeling of silencers in HGIN. Loss of silencer may regulate the expression of metabolic genes related to amino acid biosynthesis, arginine and proline metabolism and glycolysis at the transcriptional level, such as phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), which may promote development of gastric precancerous lesions. **Conclusion** Global remodeling of silencers, namely loss of H3K27me3 modification, is an epigenomic characteristics of HGIN tissue, which may lead to expression dysregulation of glycolysis and amino acid metabolism regulators, such as PGK1.

[**Key words**] high-grade intraepithelial neoplasia; gastric cancer; histone modification H3K27me3; silencer; phosphoglycerate kinase1

Supported bythe National Natural Science Foundation of China (81822032, 91959111, 81872027) and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyjjqX0027, cstc2021jcyj-msxmX0340). Corresponding authors: WANG Bin, E-mail: wb_tmmu@126.com; WU Linyu, E-mail: wly17750176828@163.com

胃癌是我国发病和死亡人数最多的恶性肿瘤之一[1],其中肠型胃癌发生是一个炎-癌转化过程,包括正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生、胃癌等级联步骤。异型增生是最重要的胃癌前病变之一,与上皮内瘤变含义相似,即胃黏膜产生肿瘤上皮细胞但没有侵袭性生长,根据细胞和结构的异型程度分为低级别上皮内瘤变(LGIN)和高级别上皮内瘤变(High-Grade Intraepithelial Neoplasia, HGIN)两个类型[2-3]。LGIN 相当于胃黏膜轻、中度异型增生,而 HGIN 为重度异型增生[4-5]。研究表明 HGIN 在 4~48 个月内进展为胃癌的概率高达 60%~85%且突变负荷较低、发病机制尚不清楚[6]。因此,解析 HGIN 的表观调控机制,对研发胃癌诊疗策略具有重要意义。

HGIN 病理特征表现为胃黏膜上皮细胞出现胞核增大、深染、核浆比失调、极性丧失等细胞异型性;上皮细胞排列拥挤、腺体结构扭曲折叠等结构异型性[7,8],提示 HGIN 发生过程中胃黏膜细胞发生异常分化。

表观调控的方式主要包括组蛋白修饰、DNA 甲基化、染色质重塑等,其中组蛋白修饰与癌症发生密切相关[9]。组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化修饰(trimethylated histone H3 at lysine27, H3K27me3)是一种抑制性修饰,其标记的远端基因组为沉默子(Silencer),下调靶基因转录活性[10]。研究表明细胞分化、胚胎发育、炎症损伤以及肿瘤发生发展等过程均发生沉默子数量与基因组分布的重塑现象[11-12],提示 HGIN 病理改变可能与沉默子重塑有关。由于沉默子对 HGIN 的调控作用尚不清楚,本文采用 ATAC 测序技术识别全基因组内染色质开放区域,利用 CUT&Tag 测序技术捕获、检测 H3K27me3 修饰标记的沉默子,结合 RNA-seq 转录组数据,探讨 HGIN 的沉默子特征及下游基因调控网络,有望为解析 HGIN 发生机制、开发胃癌预防新策略提供思路。

1 材料与方法

1.1 临床组织标本

本研究纳入的 24 例正常胃黏膜和 24 例 HGIN 样本,均来自陆军特色医学中心消化内科。样本由内镜下活检或内镜下胃黏膜剥离术后获得,并经过两名病理科医师确认病理状态。样本收集后用液氮保存。临床样本采集方案已由陆军特色医学中心伦理委员会通过[医研伦审(2021)第 260 号],所有患者均已书面知情同意。

1.2 实验过程

1.2.1 冻存组织细胞核的提取 利用 Omni-ATAC 的方法对冰冻组织提取细胞核[13],计数取 10^5 个细胞核用于 ATAC 建库和 CUT&Tag 建库。

1.2.2 ATAC 文库构建 试剂盒 TD501 购自诺唯赞公司。将提取的细胞核加入转座酶 Tn5 打断,片段化的 DNA 进行纯化,PCR 扩增目的片段。将 PCR 扩增后的产物进行浓度测定,完成 ATAC 文库构建。采用 Illumina HiSeq-X 测序仪进行测序。

1.2.3 CUT&Tag 文库构建 试剂盒 TD903 购自诺唯赞公司。将细胞核中加入靶向 H3K27me3 的一抗,二抗放大信号,在 Mg^{2+} 的催化下使用 PA/G-Tn5 酶将目的蛋白周围的 DNA 片段化并加上接头,PCR 扩增目的片段形成高通量测序文库。采用 Illumina HiSeq-

X 测序仪进行测序。

1.2.4 RNA 文库构建 将样本总 RNA 的提取并检测 RNA 是否降解（RIN 值≥7），获得足够量（1~4 μg）的合格 RNA 样品，利用 oligodT 引物反转录，捕获带有 poly(A)的 mRNA，再进行 cDNA 的接头添加、打断及后续扩增，纯化 PCR 扩增后产物测浓度检测文库质量，文库质检合格后送样测序。

1.3 数据的分析过程

1.3.1 CUT&Tag 数据和 RNA 数据质量控制 使用 FastQC 软件对单个 CUT&Tag 数据的 fastq 文件进行质量评估筛选质量合格样本。RNA 数据通过 RseQC 工具从 bed 格式的基因组文件中获取注释信息，利用 junction saturation 和 genebody coverage 检测 RNA 数据质量。

1.3.2 数据比对 使用 Fastp 去除原始数据的接头；Bowtie2 工具将去除接头后的数据比对到参考人类基因组 hg38 上，得到 sam 文件用来计算 reads 的 mapping ratio；比对完成后使用 sambamba 工具将 sam 文件转换为 bam 文件，利用 Picard 工具过滤 PCR 扩增引入的重复序列；使用 MAnorm2 工具将 sam 文件转为 bam 文件，将排序好的 bam 文件进行 peak calling，绘制饱和曲线。Chipseeker 工具注释信号峰后的 genomic annotation 可视化，观察信号峰在全基因组的分布位置。

1.3.3 Ngs.plot 可视化基因组功能区域 利用 Macs 软件采用 peak calling 算法识别 reads 中峰富集的区域并获得 summits.bed 文件，计算 TSS、信号峰数和基因体区域的富集信号丰度，绘制峰线图。

1.3.4 捕获染色质开放-H3K27me3 区域 将 ATAC 数据获得的 openchrom.bed 与 CUT&Tag 数据的 bed 文件对信号峰位点取交集，同时去除 promoter（TSS 上下游 2 kb）区域以及 blacklist（测序深度普遍高的基因组区域），获得染色质开放-H3K27me3 信号区域。

1.3.5 鉴定沉默子 使用 MAnorm2_utils 从 sam 和峰值文件生成读取计数矩阵，计算高级别上皮内瘤变样本与正常胃黏膜组织之间的差异峰，通过阈值差异倍数（$\log_2$FC>0.58）以及 P 值（P<0.05）筛选高级别上皮内瘤变样本与正常样本之间的丢失信号（loss peak）与获得信号（gain peak）峰，使用 chipseeker 注释基因后与 RNA 表达差异基因关联，鉴定沉默子区域。使用 R 包 clusterProfiler 软件以 msigdb 数据库为背景基因集，将沉默子重塑调控的靶基因进行 KEGG 富集分析（P<0.05）。

1.3.6 预测沉默子重塑调控的靶基因 统计沉默子信号强度减弱且表达上调的靶基因，结合 mRNA 水平的表达情况以及与沉默子信号丢失信号峰的相互作用关系预测调控的靶基因。利用 pyGenomeTracks 工具将靶基因位点的 ATAC、H3K27me3、RNA 信号以及信号峰与基因的调控关系进行 IGV 可视化。

1.3.7 免疫组织化学法检测 PGK1 和 H3K27me3 的表达情况 采用免疫组织化学染色技术在正常组织（n=16）和 HGIN 组织（n=16）的石蜡样本中检测 PGK1 和 H3K27me3 的表达情况。首先将石蜡切片于 65 ℃烘箱中烘烤 1~2 h；置于二甲苯、梯度乙醇中脱蜡后，浸泡于纯水中进行水化；将切片置于柠檬酸钠（pH=6.0）或 EDTA 抗原修复液（pH=9.0）对组织进行抗原修复，高温高压蒸汽加热 3min 后自然冷却至 37 ℃以下；将切片放入 3%过氧化氢溶液中室温浸泡 15 min 去除过氧化物酶；滴加山羊血清封闭液 37 ℃封闭 1 h；滴加一抗 PGK1（Proteintech 公司，稀释比为 1∶2 000），H3K27me3（Cell Signaling Technology 公司，稀释比为 1∶400）置于暗盒 4 ℃孵育过夜；滴加兔二步法检测试剂盒（中杉金桥，PV-9001）37 ℃孵育 30 min；随后 DAB 显色，苏木素染液染细胞核。将显色后的切片置于梯度乙醇中脱水，待切片干燥后中性树脂封片。根据染色强度（无染色 0 分，弱染色 1 分，中度染色 2 分，强染色 3 分）和阳性细胞百分比（<25%：1 分，26%~50%：2 分，51%-75%：3 分，>75%：4 分）评分相乘作为评分结果。

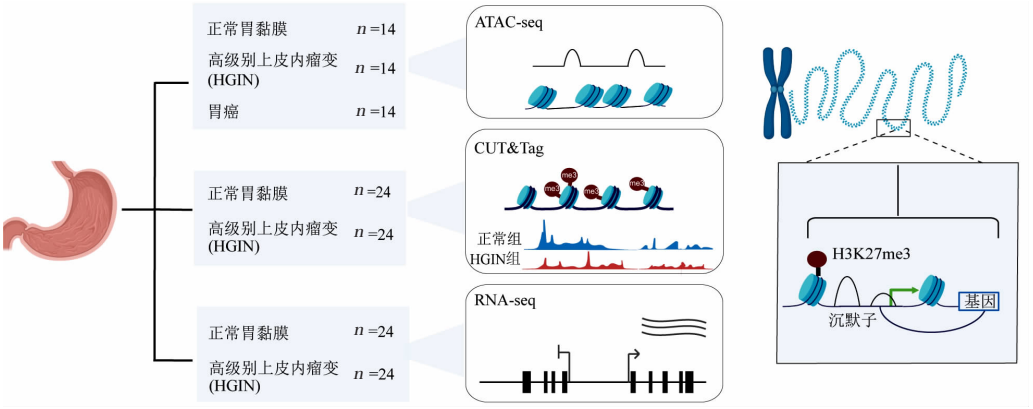
1.3.8 统计分析方法 采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计并分析。所有的统计分析均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 Shapiro Wilk 工具进行正态分布检验，使用 Bartlett 检验方差。采用 t 检验分析组间数据水平的差异，P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

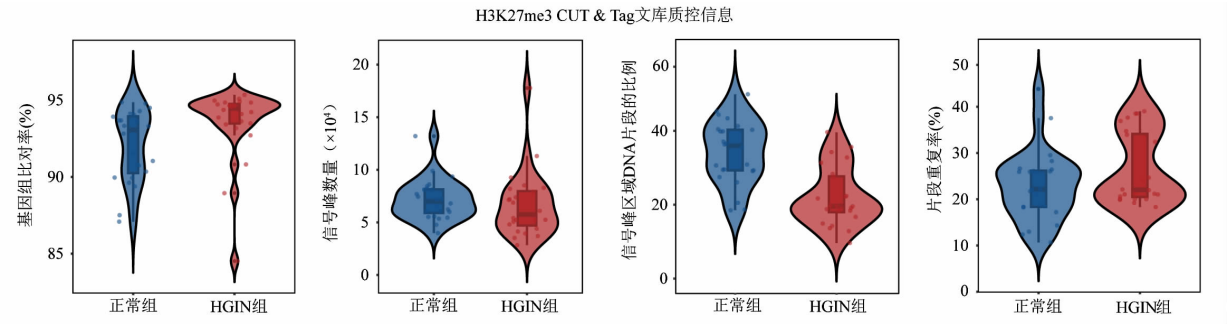
2.1 HGIN 组织与正常胃黏膜 H3K27me3 修饰的全基因组分布图谱

收集正常胃黏膜组织与 HGIN 组织，进行 CUT&Tag、ATAC-seq、RNA-seq 建库、测序及生信分析（图 1A）。质控分析表明，H3K27me3 的信号峰数量均大于 5×10^4；基因组的比对率（mapping ratio）均大于 90%；位于信号峰区域的 DNA 片段比例（FRiP）均大于 20%；片段重复率（duplication ratio）均小于 30%（图 1B）。转录组测序质控分析结果表明，转录本在基因体区域均匀覆盖且有足够的测序深度（图 1C）。

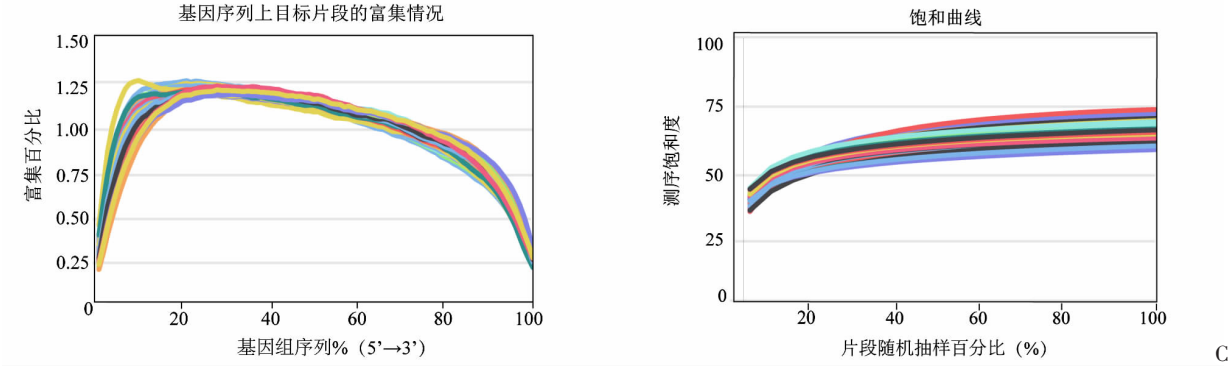
分析 H3K27me3 信号峰的全基因组分布情况，发现 H3K27me3 信号主要分布在远端基因间区和非编码内含子区域（图 1D）；两种样本 H3K27me3 富集峰的分布模式相同，且与其它组织类型相似[14]。综上，本文获得的文库质量良好，满足下游分析要求。



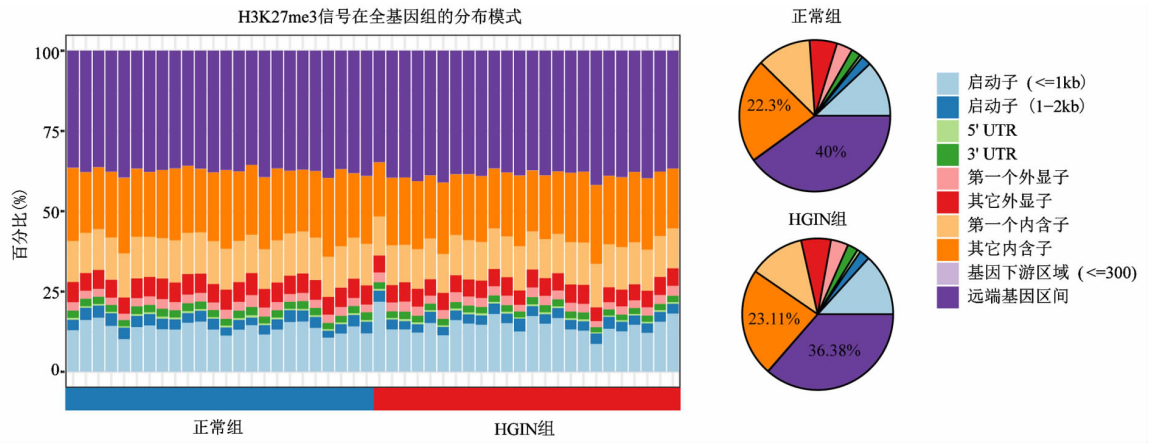
A



B



C



D

A：模式图展示了本研究所用的不同阶段组织数量及组学信息；B：正常胃黏膜组织与 HGIN 组织 H3K27me3 CUT&Tag 数据质控，包括信号峰数量、基因组的比对率、位于信号峰区域的 DNA 片段比例、片段重复率；C：两种组织转录组数据的质控分析，包括测序丰度和测序覆盖均匀度；D：两种组织整体与单个样本 H3K27me3 信号峰的全基因组分布图谱

图 1　HGIN 组织与正常胃黏膜组蛋白 H3K27me3 修饰的全基因组分析

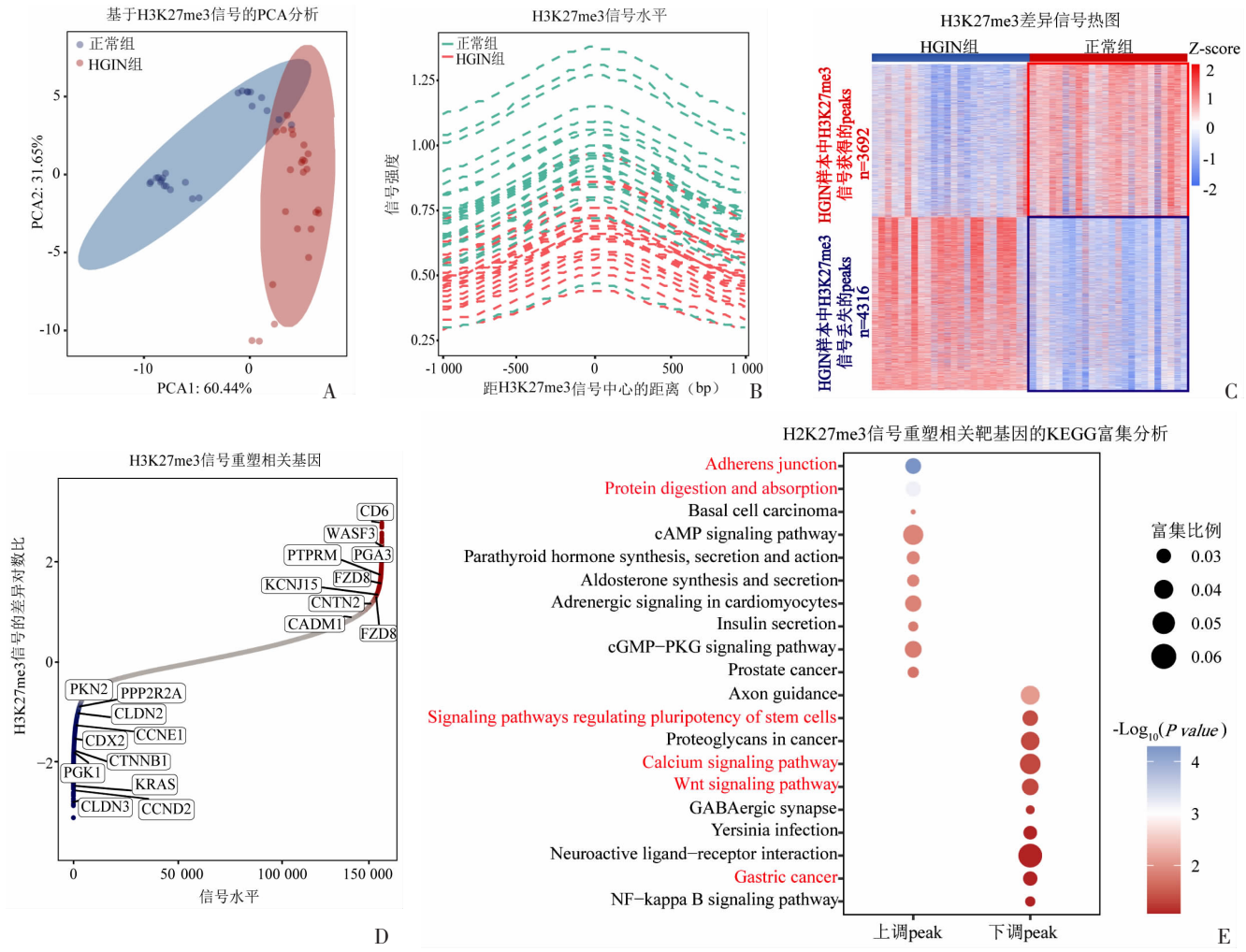
2.2 HGIN 基因组染色质开放区域内大量 H3K37me3 信号丢失

为了探究 HGIN 组织中 H3K27me3 修饰信号的改变,首先分析正常胃黏膜组织和 HGIN 组织的信号差异。主成分分析(PCA)表明两种组织的 H3K27me3 修饰信号差异显著(图 2A),HGIN 组织中 H3K27me3 信号强度整体低于正常胃黏膜组织(图 2B)。这些结果提示 HGIN 组织中存在 H3K27me3 信号重塑现象。

定量识别 HGIN 组织 H3K27me3 信号变化区域,我们首先分析正常胃黏膜组织、HGIN 组织、进展期胃癌组织的染色质开放区域,并与正常胃黏膜组织和 HGIN 组织的差异 H3K27me3 信号峰取交集,获得两种组织的染色质开放区域中差异 H3K27me3 信号数量。热图结果表明,HGIN 组织在 3692 个基因组区域获得 H3K27me3 信号,在 4316 个基因组区域丢失 H3K27me3 信号(图 2C)。

由于 H3K27me3 信号重塑与基因的转录激活或抑制有关,我们进一步探讨 H3K27me3 信号重塑潜在调控的靶基因,发现 CDX2、CCND2、CLDN3[15-16] 等与胃癌发生发展相关的基因(图 2D)。

KEGG 富集分析提示 HGIN 组织中丢失 H3K27me3 信号影响的基因,多富集在钙信号通路、Wnt 信号通路、干细胞多能性信号通路、PI3K-Akt 信号通路等胃癌发生相关重要通路[17]。然而,获得 H3K27me3 信号潜在调控的基因,多富集在细胞黏附、蛋白质消化与吸收等通路[18]。这些结果提示 HGIN 组织中 H3K27me3 信号重塑可能调控胃癌相关基因,是 HGIN 的表观紊乱特征。



A: HGIN 组织与正常胃黏膜组织的 H3K27me3 信号的主成分分析(PCA); B: HGIN 组织与正常胃黏膜组织的 H3K27me3 信号强度的峰图;绿色为正常胃黏膜组织,红色为 HGIN 组织;C:两种组织染色质开放区域内的差异 H3K27me3 信号热图;D: 按照差异倍数排列差异 H3K27me3 peak 注释的基因,红色代表 H3K27me3 信号上调,蓝色代表 H3K27me3 信号下调;E: HGIN 组织上调信号峰与下调信号峰分别注释基因后的 KEGG 富集分析

图 2 HGIN 组织发生显著的 H3K27me3 信号重塑现象

2.3 HGIN 组织与正常胃黏膜的基因表达谱存在明显差异

分析转录组发现,HGIN 组织与正常胃黏膜的基因表达谱差异存在显著差异(图 3A),HGIN 组织中上调和下调的基因分别为 4 335 个和 4 552 个,其中表达上调基因 CDX2、CCNE1 等与胃癌发生相关,表达下调基因 CDH5 等为抑癌基因(图 3B)。

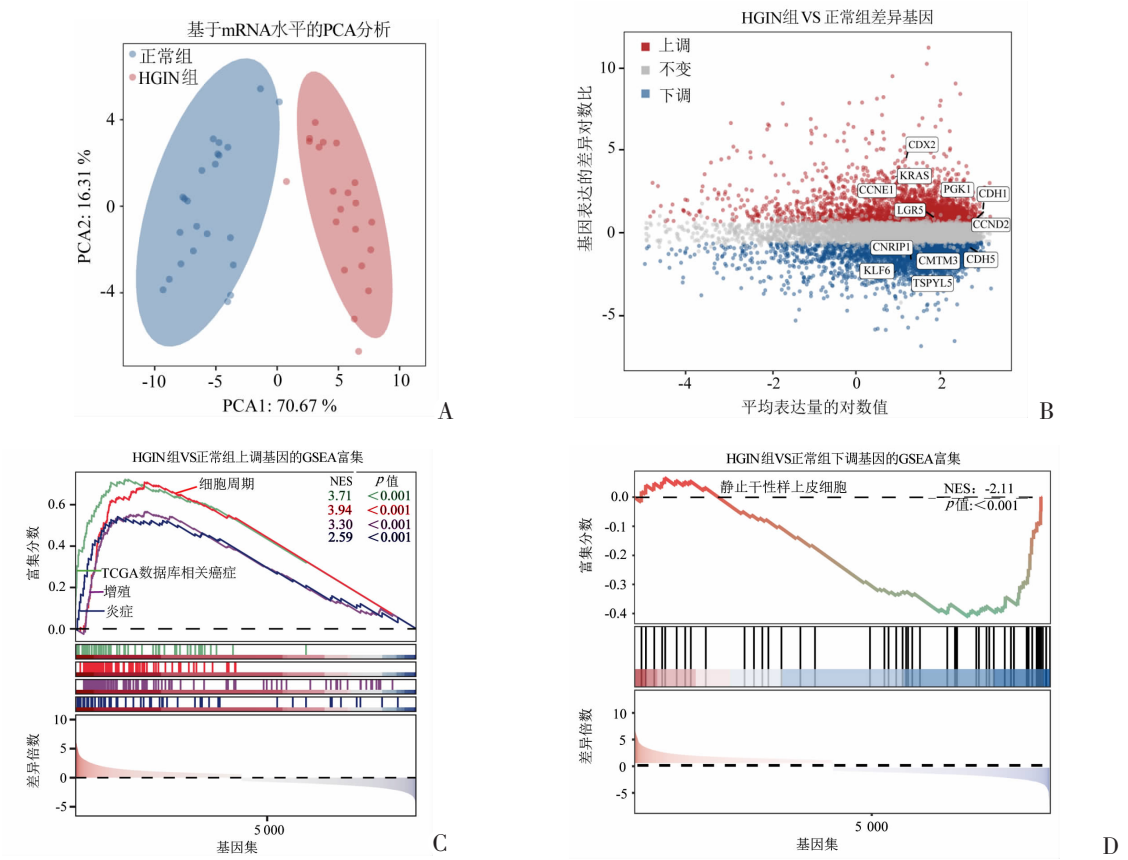
基因集合富集分析(GSEA)发现,HGIN 组织中表达上调的基因主要富集在细胞周期、癌症以及炎症、增殖相关等通路,下调的基因主要富集在静止干性样上皮细胞通路[19]。这些结果说明,HGIN 组织中肿瘤发生相关基因的表达水平已发生显著改变。

2.4 沉默子重塑可能调控多种胃癌相关靶基因表达

为探讨 H3K27me3 信号改变是否调控胃癌相关靶基因表达,我们整合分析两种组织的差异 H3K27me3 信号峰数据与转录组数据。HGIN 的染色质开放区域内,一部分基因组区域获得性 H3K27me3 信号峰伴随靶基因表达水平下调(Ⅰ型,Type 1),另一部分 H3K27me3 信号峰丢失伴随靶基因转录水平上调(Ⅱ型,Type 2),这两类顺式元件都符合沉默子特征(图 4A)。

与正常组织相比,Ⅰ型沉默子获得可能下调 637 个靶基因,包括 KLF2、LRIG1[20] 等抑癌基因,Ⅱ型沉默子丢失可能上调 337 个靶基因(图 4B),包括 CDX1、MUC17、PGK1 等致癌基因(图 4B 和 4C)。

KEGG 富集分析提示Ⅱ型沉默子相关上调基因与氨基酸生物合成、精氨酸与脯氨酸代谢、糖酵解等代谢过程有关,可能导致代谢紊乱并促进胃癌发生[21],而Ⅰ型沉默子相关下调基因可能调控蛋白质消化与吸收、胃酸分泌等过程,提示正常胃黏膜功能的丧失(图 4D)。

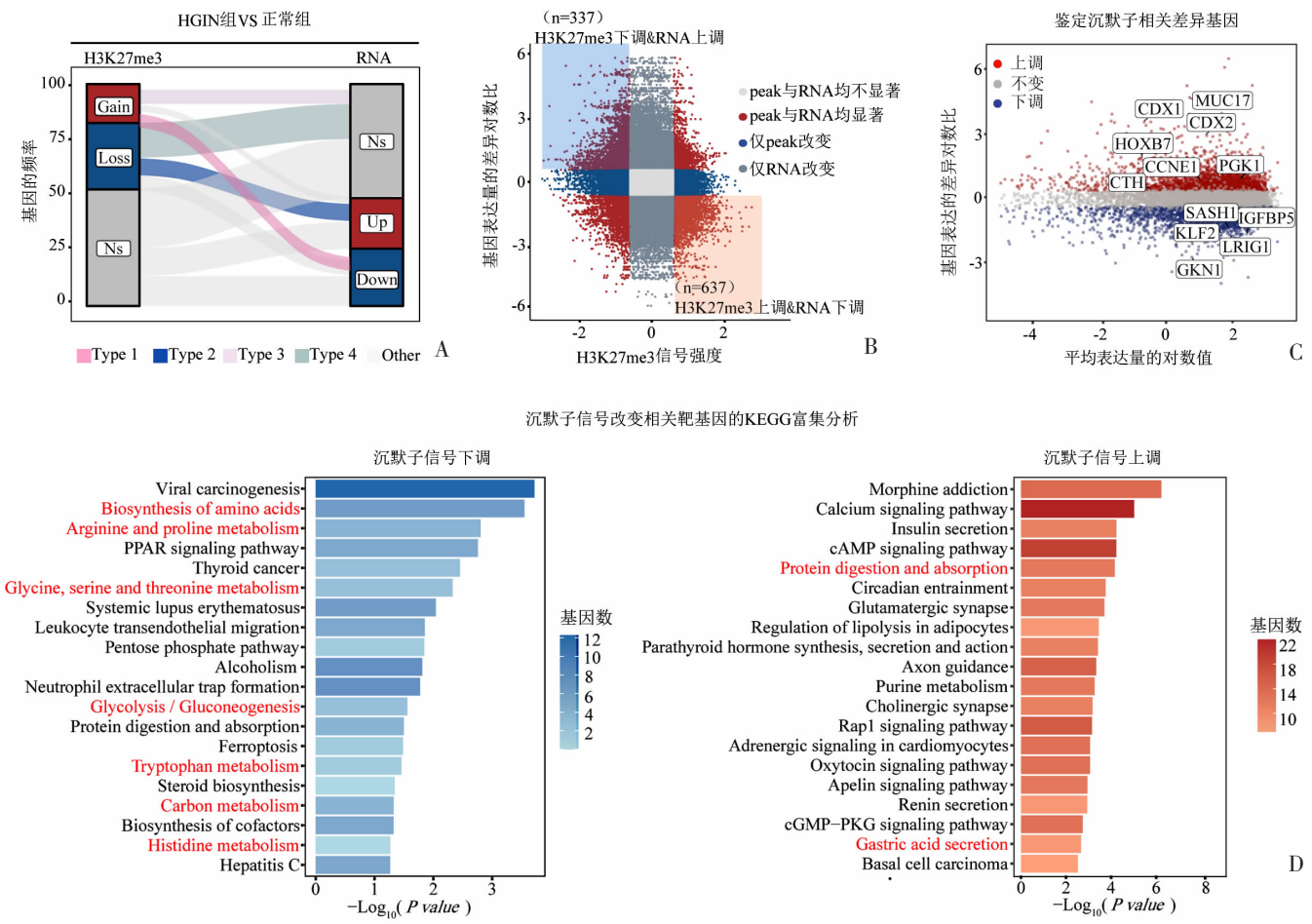


A: HGIN 组织与正常胃黏膜组织转录组数据的主成分分析(PCA); B: MA 散点图 (M-versus-A plot)展示 HGIN 组织与正常胃黏膜的差异基因表达,横坐标为差异基因的 FPKM 值,纵坐标用 $\log_2$(fold change)表示,红色的为表达上调的基因,蓝色为表达下调的基因,灰色为没有表达改变的基因;C: 两种组织差异基因的 GSEA 富集分析通路,其中 *NES*>1,*P*<0.05;D: 两种组织差异基因的 GSEA 富集分析通路,其中 *NES*<1,*P*<0.05

图 3 HGIN 组织与正常胃黏膜的差异基因表达谱

为了鉴定沉默子相关促癌靶基因,我们按照如下条件确定候选基因:(1)多条代谢通路中富集次数最多的靶基因;(2)靶基因 mRNA 表达水平在正常组织与 HGIN 组织中具有显著差异;(3)靶基因沉默子区域的 H3K27me3 信号在 HGIN 组织中显著降低;(4)根据公共胃癌 Hi-C 数据分析沉默子重塑区域是否调控靶基因。根据以上筛选策略确定磷酸甘油酸激酶 1(PGK1)可能是关键的沉默子相关促癌代谢基因,其 mRNA 水平在 HGIN 组织中显著上调(图 4E)。

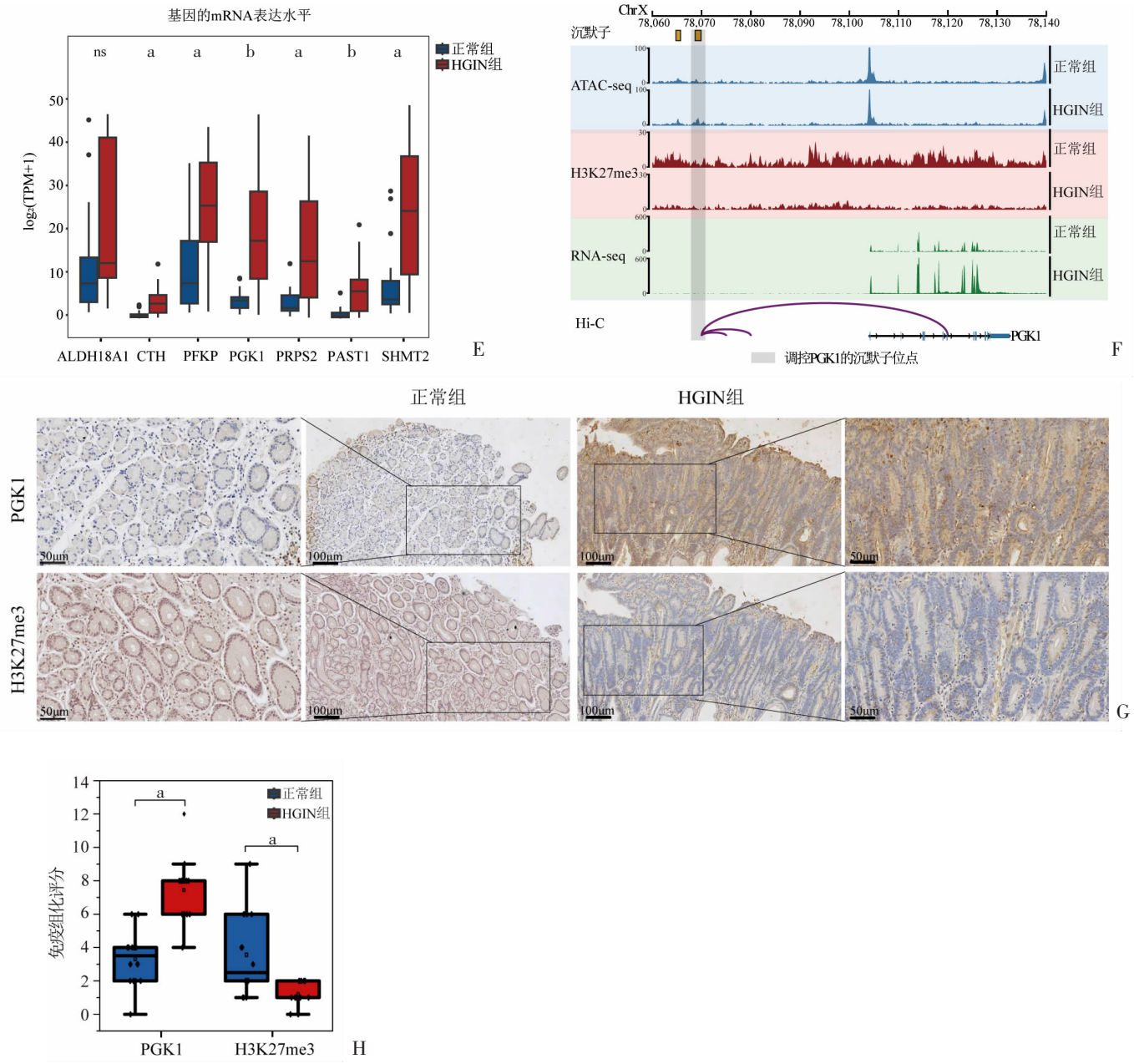
利用 IGV 可视化以及公共胃癌 Hi-C 数据验证,PGK1 相关沉默子区域的 H3K27me3 信号显著下调,且可能与 PGK1 基因发生远距离互作,促进 PGK1 转录激活(图 4F)。为检测在临床样本中沉默子信号 H3K27me3 与 PGK1 的表达相关性,采用免疫组织化学染色检测 H3K27me3 与 PGK1 的蛋白表达水平。结果表明,在 HGIN 组织中 H3K27me3 修饰蛋白表达水平显著下调,PGK1 表达水平显著上调(图 4G-H),提示沉默子相关 H3K27me3 信号丢失可能上调 PGK1 表达水平,促进胃癌发生。



A:桑基图显示两种组织 H3K27me3 信息峰与靶基因表达的相关性,利用 R 语言以差异 peak 注释的基因、靶转录水平为单位作图,纵坐标为出现的频率。Ⅰ型(Type 1):HGIN 组织 H3K27me3 信号峰上调,且靶基因表达下调;Ⅱ型(Type 2):HGIN 组织 H3K27me3 信号峰下调,且靶基因表达上调;Ⅲ型(Type 3):HGIN 组织 H3K27me3 信号峰上调,但靶基因表达无显著变化;Ⅳ型(Type 3):HGIN 组织 H3K27me3 信号峰下调,但靶基因表达没有变化;Other:除此以外的所有情况;B:两种组织差异 H3K27me3 信号与基因表达的相关性;C:沉默子信号丢失与获得相关靶基因的转录水平,横坐标为平均表达量,纵坐标为 FC(差异倍数);D:沉默子信号变化相关靶基因的 KEGG 富集情况;

图 4　HGIN 组织的沉默子重塑可能调控多种胃癌相关靶基因的转录水平

(图 4E、F、G、H 续下页)

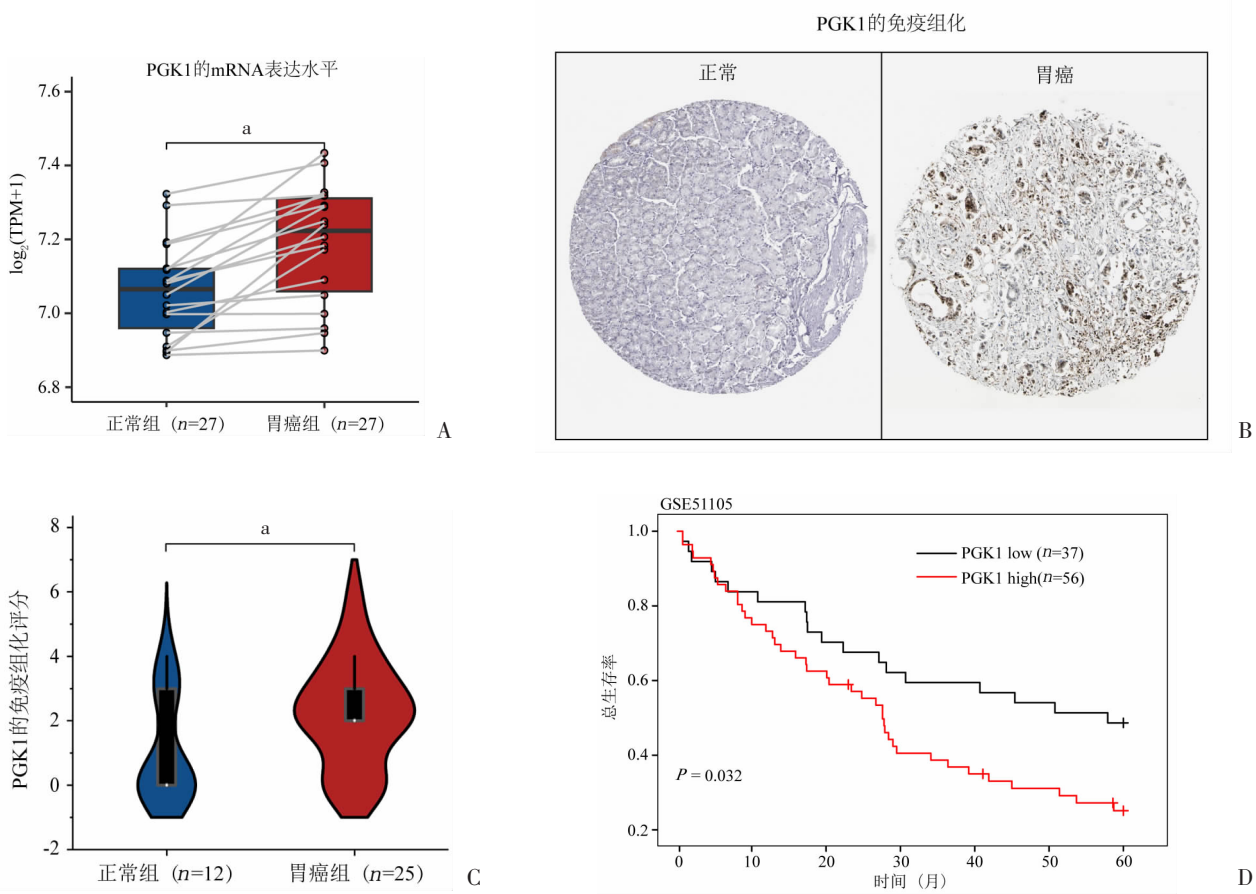


E：靶基因按照多条代谢通路中富集次数排序,柱状图展示部分靶基因在正常胃黏膜组与 HGIN 组的转录水平差异。ns 没有统计学意义,a：$P<0.001$,b：$P<0.0001$；F：IGV 展示 HGIN 组织 PGK1 基因的 ATAC 信号、H3K27me3 信号和 RNA 表达水平,以及沉默子区域与 PGK1 基因调控区域的空间相互作用;G：正常和 HGIN 组织中 PGK1 和 H3K27me3 代表性免疫组化图片;H：正常和 HGIN 组织中 PGK1 和 H3K27me3 免疫组化染色评分 a：$P<0.01$

续图 4 HGIN 组织的沉默子重塑可能调控多种胃癌相关靶基因的转录水平

2.5 沉默子重塑相关基因 PGK1 高表达与胃癌患者的不良预后密切相关

为明确沉默子信号丢失相关靶基因 PGK1 的潜在临床意义,我们分析配对样本的转录组数据,发现胃癌组织 PGK1 的 mRNA 水平显著升高(图 5A)。来自人类蛋白组图谱(The Human Protein Atlas, HPA)免疫组织化学染色结果也表明,胃癌组织 PGK1 蛋白染色强度显著高于正常胃黏膜(图 5B 和 C)。Kaplan-Meier plot 生存分析发现,胃癌组织 PGK1 高表达与患者较短生存时间相关(图 5D)。这些结果提示 HGIN 沉默子丢失相关靶基因 PGK1 可能参与胃癌发生发展。



A：基于 TCGA 数据库，PGK1 基因在正常组织和胃癌组织中的表达　a：$P<0.0001$；B. 基于 HPA 公共数据库的组织免疫组织化学结果展示 PGK1 在正常组织与胃癌组织中表达的差异；C：基于 HPA 数据库中正常组织和胃癌组织中 PGK1 的免疫组化评分　a：$P<0.01$；D：PGK1 高表达和低表达组胃癌患者的生存分析，红线代表高表达，黑线代表低表达

图 5　PGK1 基因在胃癌和正常组织中的表达

3　讨论

胃黏膜上皮内瘤变是胃癌前病变的关键阶段，以往研究表明胃黏膜 LGIN 进展缓慢、一部分可逆转，而 HGIN 癌变风险高[22-23]，因此研究 HGIN 的调控机制，为制定胃癌预防措施具有重要意义。由于表观遗传调控机制如组蛋白修饰如何调控 HGIN 进程尚未完全阐明，本研究系统描绘 HGIN 组织的沉默子表观图谱，首次报道沉默子重塑可能与 HGIN 代谢相关基因表达异常相关。

本研究采用新近报道的低起始量细胞数的 CUT&Tag 技术进行系统研究，与染色质免疫共沉淀技术（Chromatin immunoprecipitation Sequencing，Chip-seq）相比，CUT&Tag 技术所需样本量少，文库低背景、质量高[24]，可以更好地识别 H3K27me3 标记的沉默子元件。基于这个最新技术，本研究发现 HGIN 组织发生显著的沉默子重塑现象，沉默子信号丢失可能调控氨基酸生物合成、精氨酸与脯氨酸代谢、糖酵解等大量胃癌发生相关的代谢生物学过程，初步描绘了 HGIN 发生的表观遗传学特征。

启动子低甲基化是 PGK1 转录激活的潜在机制[25]，提示抑制性表观修饰紊乱与 PGK1 的异常表达有关。本研究通过筛选 HGIN 组织中沉默子重塑可能调控的靶基因，发现沉默子信号丢失与糖酵解关键酶 PGK1 表达上调显著相关，是 PGK1 转录激活的另一潜在新机制。既往研究显示 PGK1 与肿瘤发生发展密切相关，PGK1 含量在早期胃癌患者血清中升高，可能是早期胃癌候选诊断标志物[26]。过表达 PGK1 促进胃癌细胞侵袭和转移，提示其促癌作用[27]。食管炎-癌转化过程 PGK1 等糖酵解通路也异常激活，导致癌细胞恶性增殖[28]。综上所述，HGIN 组织普遍存在沉默子重塑现象，这种变化可能导致 PGK1 等代谢酶异

常表达,提示表观重塑可能驱动代谢重编程,参与胃癌前病变的发生发展,这种变化可能是预防胃癌发生干预新靶标。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 秦苾珺:生物样本建库、论文撰写;谭玉婷:数据分析;储召乐、刘碧颖:生物样本建库;王涛、李先锋:课题指导、论文修改;陈东风、崔红娟:课题指导;吴林育:课题指导、论文修改;王斌:课题指导、经费支持、论文修改与审核

参考文献:

[1] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, *et al*. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0008.

[2] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 胃癌诊疗指南(2022年版)[J]. 中华消化外科杂志, 2022, 21(9): 1137-1164. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220726-00432.
National Health Commission of the People's Republic of China Medical Administration. Standardization for diagnosis and treatment of gastric cancer (2022 edition)[J]. Chin J Dig Surg, 2022, 21(9): 1137-1164. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220726-00432.

[4] ZHAO B C, HUANG R, LU H W, *et al*. Risk of lymph node metastasis and prognostic outcome in early gastric cancer patients with mixed histologic type[J]. Curr Probl Cancer, 2020, 44(6): 100579. DOI: 10.1016/j.currproblcancer.2020.100579.

[5] SUNG J K. Diagnosis and management of gastric dysplasia[J]. Korean J Intern Med, 2016, 31(2): 201-209. DOI: 10.3904/kjim.2016.021.

[6] MIN B H, HWANG J, KIM N K, *et al*. Dysregulated Wnt signalling and recurrent mutations of the tumour suppressor RNF43 in early gastric carcinogenesis[J]. J Pathol, 2016, 240(3): 304-314. DOI: 10.1002/path.4777.

[7] 于颖彦, 朱正纲. 第5版WHO消化道肿瘤分类与分期解读: 胃肿瘤[J]. 外科理论与实践, 2020, 25(3): 207-210. DOI: 10.16139/j.1007-9610.2020.03.007.
YU Y Y, ZHU Z G. Interpretation of the 5th edition WHO classificaion and staging of tumors of digestive system: gastric tumors[J]. J Surg Concepts Pract, 2020, 25(3): 207-210. DOI: 10.16139/j.1007-9610.2020.03.007.

[8] JEON J W, KIM S J, JANG J Y, *et al*. Clinical outcomes of endoscopic resection for low-grade dysplasia and high-grade dysplasia on gastric pretreatment biopsy: Korea ESD study group[J]. Gut Liver, 2021, 15(2): 225-231. DOI: 10.5009/gnl19275.

[9] YEOH K G, TAN P. Mapping the genomic diaspora of gastric cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(2): 71-84. DOI: 10.1038/s41568-021-00412-7.

[10] LI N N, MENG G, YANG C J, *et al*. Changes in epigenetic information during the occurrence and development of gastric cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 153: 106315. DOI: 10.1016/j.biocel.2022.106315.

[11] PANG B X, VAN WEERD J H, HAMOEN F L, *et al*. Identification of non-coding silencer elements and their regulation of gene expression[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(6): 383-395. DOI: 10.1038/s41580-022-00549-9.

[12] ZHANG Y, SEE, TERGAONKAR V, *et al*. Long-distance repression by human silencers: chromatin interactions and phase separation in silencers[J]. Cells, 2022, 11(9): 1560. DOI: 10.3390/cells11091560.

[13] CORCES M R, TREVINO A E, HAMILTON E G, *et al*. An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues[J]. Nat Methods, 2017, 14(10): 959-962. DOI: 10.1038/nmeth.4396.

[14] ZHAO Y, HU J T, WU J J, *et al*. ChIP-seq profiling of H3K4me3 and H3K27me3 in an invasive insect, *Bactroceradorsalis*[J]. Front Genet, 2023, 14: 1108104. DOI: 10.3389/fgene.2023.1108104.

[15] ZHUO S S, SUN M M, BAI R M, *et al*. Long intergenic non-coding RNA 00473 promotes proliferation and migration of gastric cancer via the miR-16-5p/CCND2 axis and by regulating AQP3[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 496. DOI: 10.1038/s41419-021-03775-9.

[16] LIU Y, SETHI N S, HINOUE T, *et al*. Comparative molecular analysis of gastrointestinal adenocarcinomas[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 721-735.e8. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.010.

[17] PATRAD E, KHALIGHFARD S, AMIRIANI T, *et al*. Molecular mechanisms underlying the action of carcinogens in gastric cancer with a glimpse into targeted therapy[J]. Cell Oncol, 2022, 45(6): 1073-1117. DOI: 10.1007/s13402-022-00715-3.

[18] BURE I V, NEMTSOVA M V, ZALETAEV D V. Roles of E-cadherin and noncoding RNAs in the epithelial-mesenchymal transition and progression in gastric cancer

[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2870. DOI: 10.3390/ijms20122870.

[19] VAN DER HEIJDEN M, VERMEULEN L. Stem cells in homeostasis and cancer of the gut[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 66. DOI: 10.1186/s12943-019-0962-x.

[20] JI Y, GAO L, ZHANG C, *et al*. Identification of the hub genes and prognostic indicators of gastric cancer and correlation of indicators with tumor-infiltrating immune cell levels[J]. J Cancer, 2021, 12(13): 4025-4038. DOI: 10.7150/jca.52105.

[21] HE R P, MA R Y, JIN Z, *et al*. Proteomics and metabolomics unveil *Codonopsis pilosula* (franch.) nannf. ameliorates gastric precancerous lesions *via* regulating energy metabolism[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 933096. DOI: 10.3389/fphar.2022.933096.

[22] LIU D R, LIU Y Y, ZHU W S, *et al*. *Helicobacter pylori*-induced aberrant demethylation and expression of GNB4 promotes gastric carcinogenesis via the Hippo-YAP1 pathway [J]. BMC Med, 2023, 21(1): 134. DOI: 10.1186/s12916-023-02842-6.

[23] SUNG J K. Diagnosis and management of gastric dysplasia [J]. Korean J Intern Med, 2016, 31(2): 201-209. DOI: 10.3904/kjim.2016.021.

[24] 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.

[25] SHAO F, YANG X Y, WANG W, *et al*. Associations of PGK1 promoter hypomethylation and PGK1-mediated PDHK1 phosphorylation with cancer stage and prognosis: a TCGA pan-cancer analysis[J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 54. DOI: 10.1186/s40880-019-0401-9.

[26] ZHU Q Y, HE P P, ZHENG C L, *et al*. Identification and evaluation of novel serum autoantibody biomarkers for early diagnosis of gastric cancer and precancerous lesion[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(11): 8369-8378. DOI: 10.1007/s00432-023-04732-z.

[27] ARCHID R, ZIEKER D, WEINREICH F J, *et al*. shRNA-mediated inhibition of PhosphoGlycerate Kinase 1 (PGK1) enhances cytotoxicity of intraperitoneal chemotherapy in peritoneal metastasis of gastric origin[J]. Eur J Surg Oncol, 2020, 46(4 pt a): 613-619. DOI: 10.1016/j.ejso.2020.01.018.

[28] LI L L, JIANG D X, ZHANG Q, *et al*. Integrative proteogenomic characterization of early esophageal cancer [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1666. DOI: 10.1038/s41467-023-37440-w.

(收稿:2023-10-01;修回:2024-01-15)

(编辑 邓强庭)