DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210068

胃黏膜肠化的 H3K27me3 沉默子重塑特征及转录调控机制

吴林育,刘文康,喻 博,储召乐,刘碧颖,李先锋,陈东风,王 涛,王 斌 400042 重庆,陆军特色医学中心消化内科,消化系统肿瘤精准防治重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 绘制胃黏膜肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)(简称肠化)组织中沉默子(组蛋白 H3K27me3 修饰为标记)的全基因组分布图谱,揭示肠化发生的表观调控新机制。**方法** 在陆军特色医学中心消化内科收集 22 例人正常胃窦黏膜及 39 例人胃窦肠化黏膜,采用低起始量细胞的染色质靶向捕获(Cleavage Under Targets and Tagmentation, CUT&Tag)测序技术检测基因组 H3K27me3 修饰情况,RNA 测序检测转录组特征。利用 Ngsplot、ChIPseeker、MAnorm2、ggbiplot、edgeR、Homer 等工具分析沉默子信号及其对肠化组织基因表达调控作用。**结果** H3K27me3 的 CUT&Tag 测序数据质量较好,正常胃黏膜和肠化组织 H3K27me3 修饰的全基因组分布特征无明显差异。肠化组织沉默子信号强度显著降低($P<0.05$)。主成分分析发现,肠化组织的全局性沉默子特征与正常组织差异明显,表现为沉默子重塑。整合分析转录组数据发现,沉默子重塑可能是 CDX1 等肠化标志性基因表达增加、肠化相关信号通路激活的重要原因之一。沉默子信号丢失可能招募 ATOH1($P<0.01$)和 ONECUT2($P<0.01$)等转录因子形成网络,它们在肠化组织高表达,调控 CDX1 等肠化关键基因表达,影响营养物质代谢等细胞生物学过程。**结论** 表观组、转录组学测序数据整合分析表明沉默子重塑是胃黏膜肠化的一种显著表观遗传特征,沉默子丢失区域可能招募 ATOH1 及 ONECUT2 等转录因子形成网络,调控肠化关键基因表达与肠化细胞的多种物质代谢过程。

[关键词] 肠上皮化生;表观遗传;组蛋白 H3K27me3 修饰;沉默子;转录因子

[中图法分类号] R394-33; R394.3; R735.2 [文献标志码] A

Remodeling characteristics of H3K27me3-marked silencer in gastric intestinal metaplasia and its transcriptional regulatory mechanism

WU Linyu, LIU Wenkang, YU Bo, CHU Zhaole, LIU Biying, LI Xianfeng, CHEN Dongfeng, WANG Tao, WANG Bin Department of Gastroenterology, Chongqing Key Laboratory of Precise Prevention and Treatment of Digestive Malignancies, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To systemically characterize the genome-wide distribution of H3K27me3-marked silencers in gastric intestinal metaplasia (IM) tissues and to elucidate a novel epigenetic regulatory mechanism of IM. **Methods** Gastric antrum mucosa samples were collected from 22 healthy individuals and 39 patients with IM. The modification of H3K27me3 and the transcriptome characteristics were detected by Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag) sequencing and RNA sequencing, respectively. Various bioinformatics tools, such as Ngsplot, ChIPseeker, MAnorm2, GGBiPlot, edgeR, Homer and others were applied for analyzing the silencer signal and its regulation on gene expression of IM tissues.

[基金项目] 国家自然科学基金优青项目(81822032);重庆市杰出青年基金项目(CSTC2019JCYJJQX0027)

[通信作者] 王 斌,E-mail: wb_tmmu@126.com

王 涛,E-mail: 269839470@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

Results CUT&Tag sequencing and RNA sequencing data were of great quality, and there was no significance in the whole-genome distribution of H3K27me3 modification between normal gastric mucosa and IM tissues. Genome-scale distribution of H3K27me3-marked silencers was also portrayed, which revealed weakened silencer signal intensity in IM tissues ($P<0.05$). Principal component analysis (PCA) showed that the silencer characteristics in IM were greatly different from those in normal tissues, indicating extensive silencer remodeling in the IM tissues. Combined with RNA sequencing analysis, silencer remodeling was closely associated with the increased expression of CDX1 and other IM-related genes, as well as with the possible activation of IM-related metabolic pathways. In addition, loss of silencer signal recruited various transcription factors such as ATOH1 ($P<0.01$) and ONECUT2 ($P<0.01$) to form a regulatory network, which were highly expressed in IM tissues, regulating the expression of CDX1 and other key genes of IM, and affecting cell biological processes like coll fate commitment. **Conclusion** Integration analysis of epigenetic and transcriptomic sequencing data discovers silencer remodeling as a hallmark epigenetic feature in gastric IM tissues. Loss-of-function in silencer loci may recruit IM-regulatory transcription factors such as ATOH1 and ONECUT2, which may generate a network to impact on the expression of key genes and the metabolism of IM cells.

[**Key words**] intestinal metaplasia; epigenetics; histone modification H3K27me3; silencer; transcription factor

Supported by the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (81822032) and the Fund for Distinguished Young Scholars of Chongqing (CSTC2019JCYJJQX0027). Corresponding authors: WANG Bin, E-mail: wb_tmmu@126.com; WANG Tao, E-mail: 269839470@163.com

肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)(以下简称肠化)是正常胃黏膜细胞被类似肠上皮形态的细胞所取代的病理阶段[1-3],是一种重要的肠型胃癌癌前状态。流行病学研究显示,肠化的诱因包括慢性幽门螺杆菌感染、胆汁反流、烟酒摄入以及饮食结构不均衡等。新近研究发现,肠化上皮具有与正常胃黏膜上皮截然不同的转录组特征[4],但肠化发生的分子调控机制尚不甚清楚,目前也缺乏逆转肠化的有效治疗方法。由于肠化组织的基因组序列改变较少(染色体拷贝数变化和突变负荷极低),提示表观遗传状态紊乱可能是肠化发生的重要原因之一,但这个领域尚缺乏深入研究[5]。

表观遗传调控指在基因组碱基序列不变的情况下,决定基因在何时何处(时空特异性)表达的调控机制,组蛋白修饰是其中一种重要形式。以沉默子(silencer)为代表的远距调控元件是一种重要的抑制性表观调控方式[6],由多梳抑制复合体 2 (polycomb repressive complex 2,PRC2)催化的组蛋白 H3 上第 27 位赖氨酸三甲基化修饰(H3K27me3)所标记[7]。沉默子区域的 H3K27me3 修饰可招募抑制性调节因子,改变染色质凝聚状态或阻碍激活因子结合,进而关闭临近基因转录程序,调控细胞分化/细胞命运决定、器官发育和肿瘤发生发展等生理和病理过程[6,8-9]。

与正常胃黏膜细胞相比,肠化细胞的形态和功能发生明显转换,提示沉默子等表观修饰状态可能发生显著变化。因此,本研究利用针对 H3K27me3 修饰的染色质靶向捕获(CUT&Tag)测序技术,系统描绘胃黏膜肠化这一病理过程中的全基因组沉默子分布特征;整合转录组数据,探讨沉默子对肠化相关基因的调控机理。为深入认识肠化发生机制,开发阻断肠化进展的肠型胃癌预防策略提供新思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象

课题收集 22 例人正常胃窦样本和 39 例人胃窦肠化样本,均由陆军特色医学中心消化内科提供。纳入标准:① 年龄、性别不限;②白光内镜下观察到红白相间(以白为主)的胃窦黏膜(肠化黏膜),ME-NBI 观察可见特征性亮蓝嵴[10];③ HE 染色显示肠化的经典病理改变,包括胃黏膜内散在分布的杯状细胞、刷状缘的形成等。排除标准:孕妇、凝血功能障碍者。样本由内镜下活检获取后液氮保存。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]。

1.2 方法

1.2.1 冻存组织细胞核的提取 取冰冻样本(胃窦正常黏膜或肠化黏膜),采用 Omni-ATAC 实验流程提取组织细胞核[11],台盼蓝染色检查细胞核完整性并

计数,稀释至 10^5 个,用于后续 CUT&Tag 文库构建。

1.2.2 CUT&Tag 文库构建和测序 按诺唯赞 TD903 试剂盒说明书进行。将提取的细胞核用 H3K27me3 抗体及二抗识别目标 DNA 序列,并用 pA-Tn5 捕获目标 DNA 序列,同时片段化。随后,将纯化产物进行 PCR 扩增,并将纯化 PCR 产物进行浓度测定,完成 CUT&Tag 文库构建,采用 Illumina HiSeq-X 测序仪进行测序。

1.2.3 RNA 文库构建和测序 将正常胃窦样本和肠化样本进行总 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 oligo dT 磁珠与 mRNA 的 poly(A)尾特异性结合从而去除其他 RNA,获得 mRNA 样品,同时对提取的 mRNA 进行片段化。随后,合成并纯化双链 cDNA,连接接头并纯化产物进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行纯化后得到文库。文库质检合格后,上机测序。

1.2.4 CUT&Tag 测序数据处理 利用 Fastp 联合 cutadpat 去除接头(adaptor);通过使用 Hisat2 工具将去除接头的测序数据比对到基因组上,该步骤可查看比对率,并得到比对后的 SAM 文件;利用 sambamba 将 SAM 文件转换为 BAM 文件,进一步用 Picard 去除重复的 reads,得到应用于后续分析的 unique reads。因 H3K27me3 CUT&Tag 数据有部分存在于启动子,在对沉默子进行研究前,采用 bedtools 工具将 H3K27me3 CUT&Tag 数据进行启动子区(距离基因转录起始位点 2 kb 范围内的 DNA 区域)去除后,再进行后续操作[12]。

1.2.5 利用 Ngsplot 对沉默子信号进行可视化 利用 MACS2 对过滤后的数据进行 Peak calling,根据功能元件的基因组坐标处理 BAM 文件,计算 TSS、peak 和 genebody 区域的富集信号丰度,绘制峰线图。

1.2.6 利用 ChIPseeker 注释基因组上的沉默子分布情况 利用 Macs peak calling 分析后得到的 BED 文件,同时准备好基因组注释库,加载 ChIPseeker 包,对 H3K27me3 信号峰所在位置进行注释,执行 plotAnnoBar 和 plotAnnoPie 两条命令对信号峰所在的位置信息进行可视化。

1.2.7 整合分析 CUT&Tag 和 RNA-seq 数据 利用 edgeR 对 RNA 和 H3K27me3 CUT&Tag 数据进行差异分析,得到差异基因表达以及差异染色质区域的矩阵,再整合差异染色质状态所调控的靶基因,进行可视化分析。统计沉默子信号强度减弱且表达上调的靶基因,以及沉默子信号强度增强且表达下调的靶基因,分别进行 GO 以及 KEGG 分析。

1.2.8 转录因子结合基序富集分析以及转录因子调控网络的绘制 利用 edgeR 工具分析肠化及正常组织的转录组差异,整合沉默子信号减弱区域,确定用于预测的基因组区间范围。利用 Homer 预测沉默子信号丢失区域的转录因子基序,除限定区间范围,其他均使用默认参数。根据 Q-value 富集程度对转录因子进行排名,展示前 10 个富集程度最高的转录因子基序;选取在肠化组织高表达的转录因子,绘制调控网络图。

2 结果

2.1 采用 H3K27me3 CUT&Tag 测序技术,获得全基因组沉默子分布图谱

本研究收集肠化胃窦黏膜和正常胃窦黏膜,进行 H3K27me3 CUT&Tag 及 RNA-seq 测序(图 1A)。全面分析测序数据的质控指标显示(图 1B),样本 DNA 片段数(reads number)均大于 5×10^6,提示获得足够多 H3K27me3 修饰信号,满足下游分析需求;基因组比对率(mapping rate)均大于 90%,提示文库无显著的接头污染等情况;片段重复率(duplication rate)均小于 30%,提示文库复杂性良好;信号峰数量(peak count)均大于 1×10^4,表明捕获 H3K27me3 信号有较集中的富集趋势;位于信号峰区域的 DNA 片段比例(fraction of reads in peaks, FRiP)均大于 25%,提示捕获到的沉默子信号富集在染色质上特定区域,可用于下游分析;正常与肠化组织的质控指标上无显著差异,可排除数据质量不均一导致假阳性结果。RNA 数据质控分析显示,目标片段在基因编码区高度富集,且 RNA-seq 测序深度足够(图 1C)。

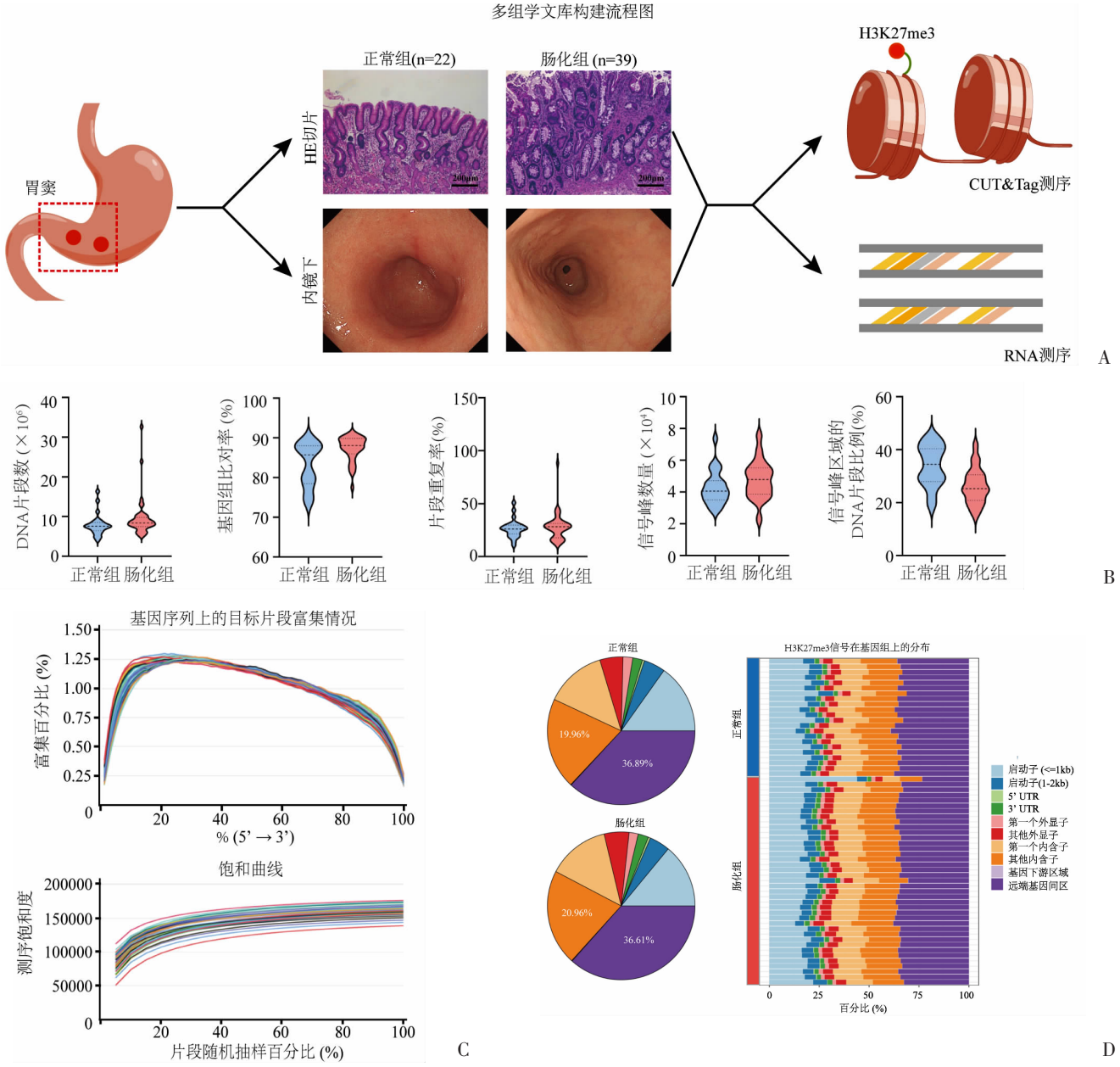
分析 H3K27me3 修饰的基因组分布表明,两种组织的沉默子均主要分布在远端的基因间区以及非编码的内含子区域(图 1D),这与既往报道染色质上的沉默子定位特征一致。因此,两种组学数据质量较好,全面展示了两种组织中沉默子信号的全基因组分布图谱。

2.2 肠化组织沉默子信号强度显著降低,与正常组织相比发生了显著的沉默子重塑

对比沉默子信号强度发现,肠化组织的平均信号强度显著低于正常组织(肠化组织为 0.69,正常组织为 0.80,$P < 0.05$),说明肠化组织存在沉默子丢失现象(图 2A)。为分析肠化组织中全基因组的沉默子信号丢失区域,我们利用 MAnorm2 工具对 H3K27me3 测序信号进行标准化处理,鉴定了肠化组织与正常组织之间信号强度显著差异的 H3K27me3 修饰位点。统计

结果表明,肠化组织在 15 881 个基因组区域上获得了沉默子信号,在 14 962 个基因组区域上丢失了沉默子信号。这些数据说明,肠化组织不仅存在沉默子获得事件,同时存在大量的沉默子丢失现象(图 2B)。

对两组样本的 H3K27me3 沉默子信号进行主成分分析(PCA analysis)降维展示,发现肠化组织的沉默子特征与正常组织显著不同(图 2C)。上述结果表明,正常组织和肠化组织之间的沉默子信号存在显著差异,肠化组织的沉默子信号强度整体降低,发生沉默子重塑。

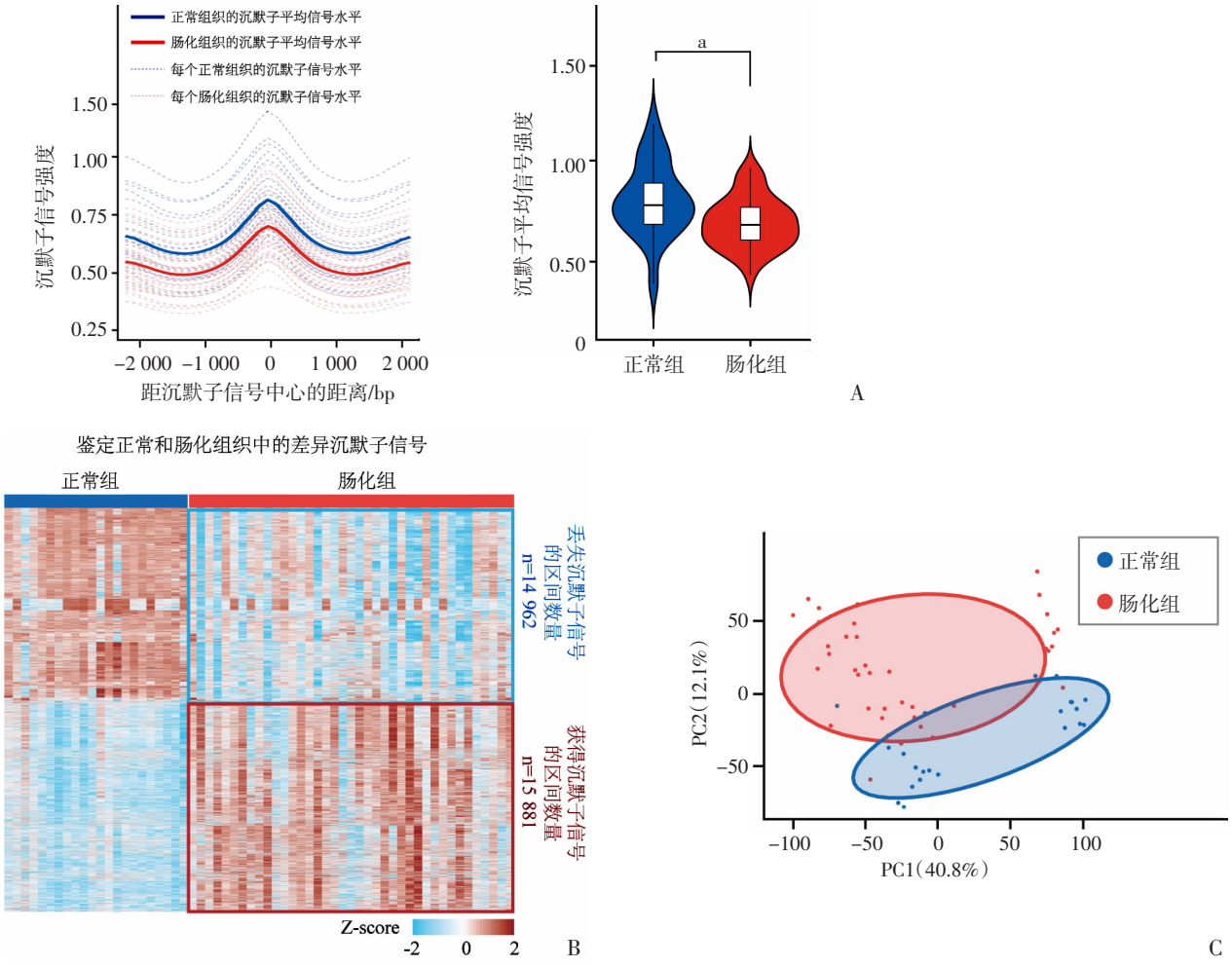


A:胃窦正常组织、肠化组织的 H3K27me3 CUT&Tag、RNA 测序流程图;B:H3K27me3 CUT&Tag 文库质量的质控分析　从左至右:总体 DNA 片段数、比对率、重复序列比例、信号峰数量、信号峰区域的 DNA 片段比例;C:RNA 测序数据的质控分析　上:Reads 片段在基因编码区上的分布;下:转录组测序深度稀释图;D:H3K27me3 沉默子信号在各(组)样本基因组上分布　左:各组整体沉默子信号的分布;右:各样本沉默子信号的分布

图 1　高质量 H3K27me3 CUT&Tag 及 RNA-seq 测序数据和 H3K27me3 修饰的基因组分布特征

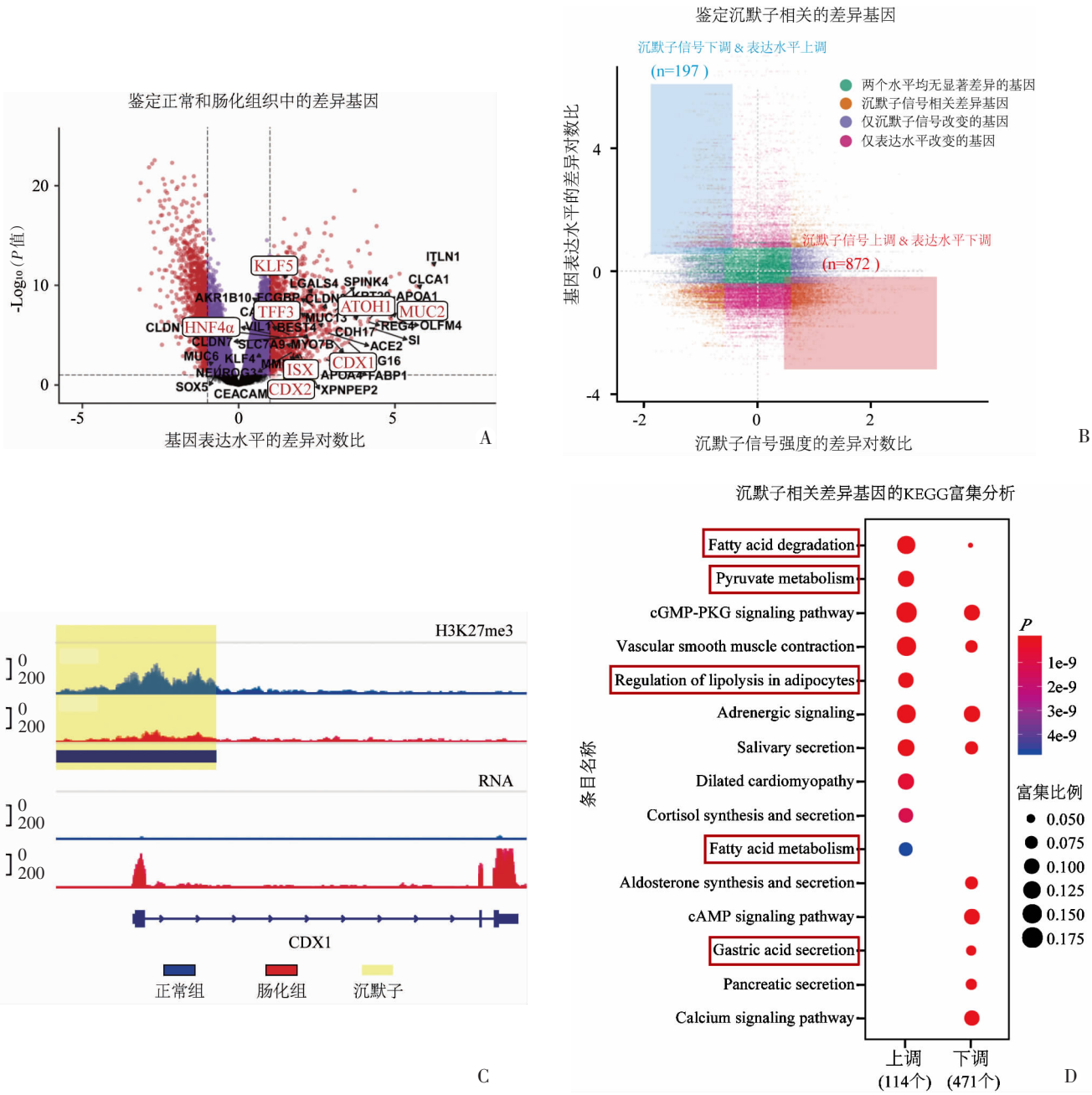
2.3 沉默子重塑可能调控肠化相关基因表达及肠化细胞的多种代谢通路

由于沉默子是下调基因转录活性的重要表观调控机制,我们进一步筛选肠化组织中沉默子调控的下游靶基因。两种组织转录组存在显著差异:肠化组织中有 1 449 个基因表达上调,包括 CDX1、CDX2、TFF3、MUC2、HNF4α、ATOH1[13] 和 ISX[14] 等肠上皮黏膜表达的基因;肠化组织下调的基因有 1 312 个(图 3A)。整合分析沉默子数据与差异表达基因,发现 872 个基因沉默子信号上升且表达水平降低,占肠化低表达基因的 66.5%;197 个基因沉默子信号下调且表达水平升高,占肠化高表达基因的 13.6%(图 3B),提示沉默子重塑可能在调控肠化组织基因表达中发挥重要作用。使用 IGV 工具可视化展示已知肠化标志物 CDX1 基因[15] 的沉默子信号和 RNA 测序数据,发现肠化组织 CDX1 基因 H3K27me3 信号下调,伴随 RNA 表达水平上调,提示 CDX1 表达可能受沉默子调控(图 3C)。统计肠化组织可能受沉默子调控的所有基因,KEGG 分析显示,沉默子重塑可能调控多条代谢通路和细胞生物学功能,比如上调脂肪酸降解和丙酮酸代谢通路;同时也可能下调胃酸分泌相关通路(图 3D)。这些代谢通路与肠化表型密切相关[16-20],提示沉默子重塑可能通过调控肠化相关基因表达,影响肠化细胞的物质代谢和生物学过程。



A:胃窦正常与肠化组织中沉默子信号强度的可视化(左)以及量化比较(右) a:$P<0.05$;B:热图展示两组样本间差异的沉默子信号 $FC>1.5$,$FDR<0.05$;C.依据沉默子特征对各样本进行的主成分分析

图 2 肠化组织中重塑的 H3K27me3 沉默子信号



A:胃窦正常与肠化组织中的差异表达基因 $FC>2, FDR<0.05$;B:各基因的沉默子信号与表达水平;C:肠化特异性基因CDX1在正常和肠化组织中的沉默子信号及转录水平;D:受沉默子调控的基因的KEGG富集分析

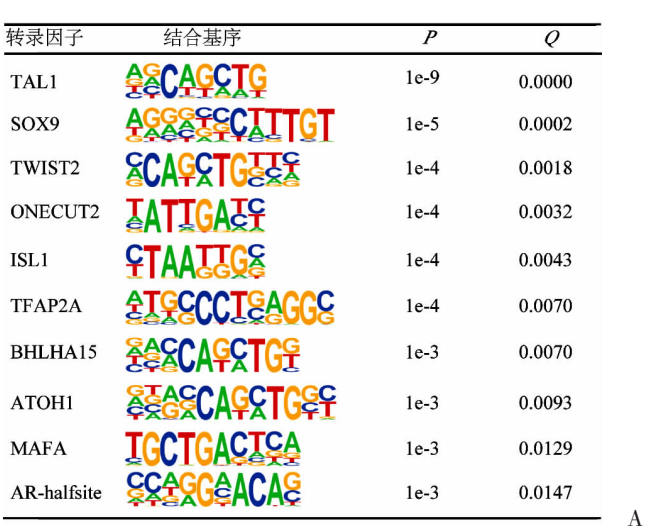
图3 沉默子相关靶基因及生物学功能

2.4 转录因子ATOH1和ONECUT2可能被招募到沉默子丢失区域,形成转录因子网络,进而调控肠化相关基因表达

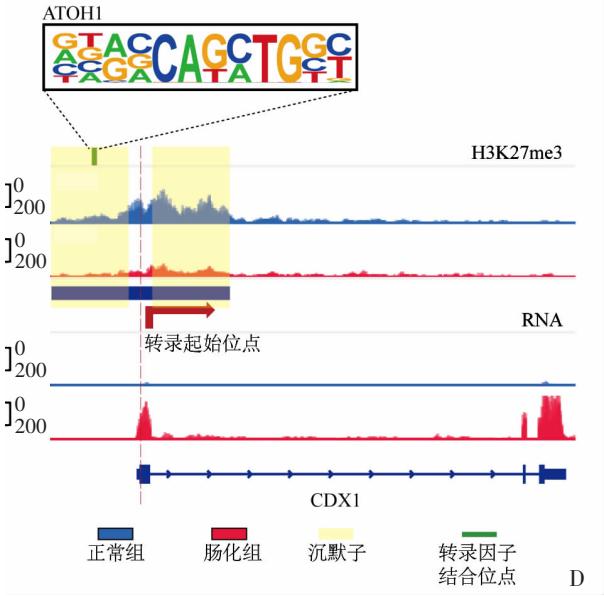
组蛋白H3K27me3修饰丢失后,沉默子区域染色质开放性增加,有利于招募转录因子,激活基因表达。分析肠化组织沉默子丢失区域的转录因子结合基序(TF motif),发现一系列转录因子可能被招募,图4A中列举了排名前10位的预测转录因子。由于ATOH1和ONECUT2在肠化组织中表达水平显著上调(图4B),提示它们可能调控肠化相关基因表达。我们聚焦这两个转录因子,比对全基因组沉默子信号减弱区域(图4C),发现:①ATOH1和ONECUT2均可能调控自身表达,形成正反馈环路;②ATOH1和ONECUT2均可能调控其余8个转录因子;③ONECUT2可能调控ATOH1表达;④ATOH1和ONECUT2各自可能调控一系列重要的肠化相关基因。比如,沉默子丢失可能招

募 ATOH1 至 CDX1 基因调控区域,直接上调肠化关键转录因子 CDX1 表达(图 4D)。

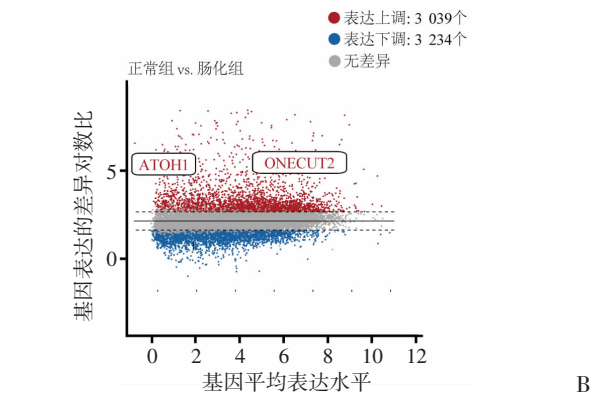
对 ATOH1 和 ONECUT2 可能调控的靶基因进行 GO-BP 分析,发现这些基因主要参与细胞命运决定、分化发育等重要生物学过程(图 4E)。以上数据提示,肠化过程中沉默子重编程,可能异常激活多个转录因子,导致胃黏膜细胞分化谱系异常,而其中 ATOH1 和 ONECUT2 这两个转录因子可能发挥关键调控作用。



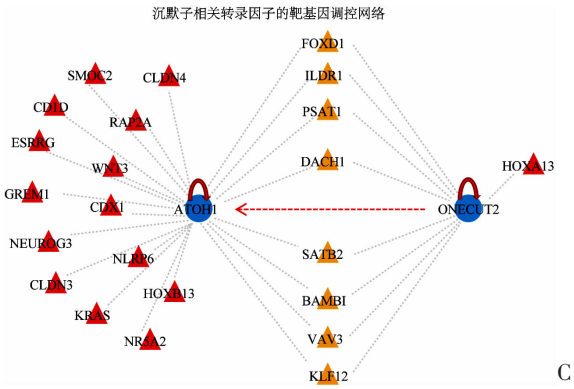
A



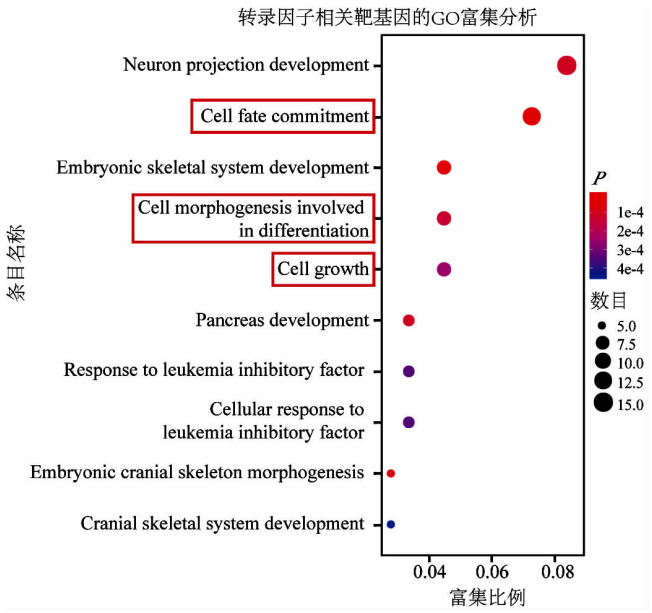
D



B



C



E

A:沉默子信号丢失的基因组区域上的转录因子富集情况 B:沉默子相关转录因子 ATOH1 和 ONECUT2 在胃窦肠化样本中表达水平显著上调 *FC*>1.5, *FDR*<0.05;C:转录因子 ATOH1 与 ONECUT2 可能调控的沉默子丢失基因,其中黄色标记同时受到二者调控的靶基因;D:ATOH1 促进 CDX1 表达的沉默子调控机制;E:ATOH1 与 ONECUT2 潜在调控的沉默子丢失基因的 GO 富集分析

图 4 沉默子相关转录因子 ATOH1 和 ONECUT2 调控肠化相关基因的机制

3 讨论

胃黏膜肠化是一种重要的肠型胃癌癌前状态,较难逆转,显著增加癌变风险,是胃癌发生的关键病理阶段[3]。表观修饰如 DNA 甲基化水平在肠化组织出现全局性改变,与肠化进展密切相关[5],但其它表观遗传学机制如组蛋白修饰如何调控肠化进程尚未全面探索。本研究系统描绘了肠化组织的全基因组沉默子分布图谱,首次报道沉默子重编程是肠化的重要表观调控特征。

组蛋白修饰可通过染色质免疫共沉淀技术(ChIP-seq)、CUT&Tag-seq 以及 CUT&RUN-seq 等测序技术检测,其中 ChIP-seq 应用最为广泛,但所需样本量大。近年来新兴测序技术如 CUT&Tag-seq 和 CUT&RUN-seq 具有多重优势,比如步骤简便、实验周期短、建库样本的细胞量要求低、信号峰特异性好、成本低廉[21-22]。这两项新兴技术原理相似,CUT&Tag-seq 是 CUT&RUN-seq 的升级版,采用 Tn5 转座酶复合物,切割染色质同时增加建库引物接头,简化建库步骤,可快速获得高质量信号峰[22-23]。由于内镜活检组织的细胞量较少,本研究采用 CUT&Tag-seq 技术鉴定沉默子。

本研究发现肠化组织的沉默子信号显著降低,发生广泛的重编程,可能调控大量肠化相关基因,影响胃黏膜上皮的营养物质代谢和胃酸分泌过程。沉默子与 DNA 甲基化,均为抑制性表观调控方式,两者在胚胎发育、肿瘤发生等过程中协同发挥作用[24-25]。既往研究发现肠化组织的启动子 DNA 高甲基化与肠化程度呈正相关[5],而本研究发现肠化组织远端调控元件的沉默子重塑特征,提示两者可能协同作用,在肠化过程中联合发挥抑制性表观调控效应。

肠化过程中多个转录因子可能被招募至组蛋白 H3K27me3 修饰信号丢失区域,其中 ATOH1 与 ONECUT2 可能形成互作网络,调控肠化相关基因表达。ATOH1 表达于胚胎发育期的肠道黏膜上皮细胞,受 NOTCH 信号激活,进而诱导肠上皮干细胞分化,维持潘氏细胞、杯状细胞和内分泌细胞数量[26]。此外,Barrett 食管组织中 ATOH1 被肠上皮转录因子 CDX2 诱导,参与肠化过程[27]。这些结果提示,除已知的 CDX1/2 等转录因子外,ATOH1 与 ONECUT2 也可能参与调控胃黏膜肠化细胞的表型和功能转换。

综上,胃黏膜肠化组织存在全基因组沉默子重塑为特征的表观修饰紊乱。沉默子重塑可能招募 ATOH1 与 ONECUT2 等转录因子,形成调控网络,影响肠化相关基因表达。这些发现有助于深入理解胃黏膜肠化的发生规律,为开发表观靶向药物,逆转肠化和预防胃癌提供了新思路。

参考文献:

[1] CORREA P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process: first American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention[J]. Cancer Res, 1992, 52(24): 6735-6740.

[2] GOLDENRING J R, MILLS J C. Cellular plasticity, reprogramming, and regeneration: metaplasia in the stomach and beyond[J]. Gastroenterology, 2022, 162(2): 415-430. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.10.036.

[3] GIROUX V, RUSTGI A K. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(10): 594-604. DOI: 10.1038/nrc.2017.68.

[4] LARIO S, RAMÍREZ-LÁZARO M J, BRUNET-VEGA A, *et al*. Coding and non-coding co-expression network analysis identifies key modules and driver genes associated with precursor lesions of gastric cancer[J]. Genomics, 2022, 114(3): 110370. DOI: 10.1016/j.ygeno.2022.110370.

[5] HUANG KK, RAMNARAYANAN K, ZHU F, *et al*. Genomic and epigenomic profiling of high-risk intestinal metaplasia reveals molecular determinants of progression to gastric cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(1): 137-150.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.11.018.

[6] SEGERT J A, GISSELBRECHT SS, BULYK M L. Transcriptional silencers: driving gene expression with the brakes on[J]. Trends Genet, 2021, 37(6): 514-527. DOI: 10.1016/j.tig.2021.02.002.

[7] HUANG D, PETRYKOWSKA H M, MILLER B F, *et al*. Identification of human silencers by correlating cross-tissue epigenetic profiles and gene expression[J]. Genome Res, 2019, 29(4): 657-667. DOI: 10.1101/gr.247007.118.

[8] PANG B X, SNYDER M P. Systematic identification of silencers in human cells[J]. Nat Genet, 2020, 52(3): 254-263. DOI: 10.1038/s41588-020-0578-5.

[9] NGAN C Y, WONG C H, TJONG H, *et al*. Chromatin interaction analyses elucidate the roles of PRC2-bound silencers in mouse development[J]. Nat Genet, 2020, 52(3): 264-272. DOI: 10.1038/s41588-020-0581-x.

[10] WEI N, MULMI SHRESTHA S, SHI R H. Markers of gastric intestinal metaplasia under digital chromoendoscopy: systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Gastroenterol

Hepatol, 2021, 33(4): 470-478. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001834.

[11] 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.

[12] NAKKA K, HACHMER S, MOKHTARI Z, *et al*. JMJD3 activated hyaluronan synthesis drives muscle regeneration in an inflammatory environment[J]. Science, 2022, 377(6606): 666-669. DOI: 10.1126/science.abm9735.

[13] SINGH H, HA K, HORNICK J L, *et al*. Hybrid stomach-intestinal chromatin states underlie human Barrett's metaplasia[J]. Gastroenterology, 2021, 161(3): 924-939.e11. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.05.057.

[14] SUE S, SHIBATA W, KAMETA E, *et al*. Intestine-specific homeobox (ISX) induces intestinal metaplasia and cell proliferation to contribute to gastric carcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2016, 51(10): 949-960. DOI: 10.1007/s00535-016-1176-2.

[15] SILBERG D, FURTH E, TAYLOR J, *et al*. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium[J]. Gastroenterology, 1997, 113(2): 478-486. DOI: 10.1053/gast.1997.v113.pm9247467.

[16] KANEMITSU T, YAO K S, NAGAHAMA T, *et al*. Extending magnifying NBI diagnosis of intestinal metaplasia in the stomach: the white opaque substance marker[J]. Endoscopy, 2017, 49(6): 529-535. DOI: 10.1055/s-0043-103409.

[17] HANDA O, NAITO Y, YOSHIKAWA T. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *helicobacter pylori*[J]. Redox Rep, 2011, 16(1): 1-7. DOI: 10.1179/174329211X12968219310756.

[18] KATSURAHARA M, KOBAYASHI Y, IWASA M, *et al*. Reactive nitrogen species mediate DNA damage in *helicobacter pylori*-infected gastric mucosa[J]. Helicobacter, 2009, 14(6): 552-558. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.00719.x.

[19] HATA M, KINOSHITA H, HAYAKAWA Y, *et al*. GPR30-expressing gastric chief cells do not dedifferentiate but are eliminated *via* PDK-dependent cell competition during development of metaplasia[J]. Gastroenterology, 2020, 158(6): 1650-1666.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.01.046.

[20] KON S, ISHIBASHI K, KATOH H, *et al*. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(5): 530-541. DOI: 10.1038/ncb3509.

[21] PARK P J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(10): 669-680. DOI: 10.1038/nrg2641.

[22] 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.

[23] 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.

[24] BLACKLEDGE N P, KLOSE R J. The molecular principles of gene regulation by polycomb repressive complexes[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(12): 815-833. DOI: 10.1038/s41580-021-00398-y.

[25] PIUNTI A, SHILATIFARD A. The roles of polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(5): 326-345. DOI: 10.1038/s41580-021-00341-1.

[26] LIN X, GAUDINO S J, JANG KK, *et al*. IL-17RA-signaling in $Lgr5^{+}$ intestinal stem cells induces expression of transcription factor ATOH1 to promote secretory cell lineage commitment[J]. Immunity, 2022, 55(2): 237-253.e8. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.12.016.

[27] TAMAGAWA Y, ISHIMURA N, UNO G, *et al*. Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of barrett's esophagus[J]. Lab Investig, 2012, 92(6): 896-909. DOI: 10.1038/labinvest.2012.56.

(收稿:2022-10-11;修回:2023-01-12)

(编辑 邓强庭)