DOI:10.16016/j.2097-0927.202309147

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

陈 旭[1],储召乐[2],秦苾珺[2],刘碧颖[2],李先锋[2],王 涛[2],刘文康[2],王 斌[1,2] 400044 重庆,重庆大学医学院[1];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[2]

[摘要] **目的** 研究组蛋白 H3K27ac 修饰在肠型胃癌的全基因组分布情况,探讨其增强子及相关调控组重塑特征,建立临床预后评估模型。**方法** 收集于 2022 年 1-12 月在我院消化内科就诊患者的 15 例肠型胃癌组织与 18 例正常胃黏膜组织进行靶向 H3K27ac 修饰的染色质靶向捕获(cleavage under targets and tagmentation,CUT&Tag)测序,采用生物信息学分析,比较两种组织 H3K27ac 修饰在基因组的分布差异;基于 H3K27ac 修饰分布特征,鉴定增强子元件,探讨增强子及相关调控组的重塑特征;采用单因素 Cox 和多因素 Cox 等回归分析方法,构建增强子相关靶基因的预后预测模型。**结果** 两种组织的 H3K27ac 修饰的基因组分布特征无明显差异,主要位于增强子区域;与正常胃黏膜相比,肠型胃癌增强子 H3K27ac 修饰的整体水平更高;共鉴定出 8 847 个在肠型胃癌中活性增加的增强子(获得性增强子),占所有增强子的 8.3%,其可能促进胃癌细胞增殖、黏附等恶性行为;联合 6 个获得性增强子相关靶基因(*BHLHE41*、*CEP97*、*CHI3L2*、*NR6A1*、*SUPT3H* 和 *TOMM20*)构建的预测模型,能够较好地推测患者总体生存期。**结论** 增强子重塑是肠型胃癌显著的表观遗传学特征之一,增强子可能通过上调 *MYC*、*E2F3* 等基因表达促进癌细胞恶性增殖与黏附行为,并基于增强子靶基因构建预后模型。

[关键词] 肠型胃癌;表观基因组学;H3K27ac;增强子;预后

[中图法分类号] R318.04; R394.3; R735.2 [文献标志码] A

Remodeling characteristics and construction of a survival prediction model based on enhancers and regulome in intestinal type gastric cancer

CHEN Xu[1], CHU Zhaole[2], QIN Bijun[2], LIU Biying[2], LI Xianfeng[2], WANG Tao[2], LIU Wenkang[2], WANG Bin[1,2]

[1]Medical College of Chongqing University, Chongqing, 400044; [2]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 explore the genome-wide distribution of histone H3K27ac in intestinal type gastric cancer, analyze remodeling features of enhancers and regulome and construct a prediction model for prognosis. **Methods** H3K27ac CUT&Tag sequencing and RNA sequencing were performed in intestinal type gastric cancer tissues from 15 patients and normal gastric mucosa tissues from 18 healthy volunteers. Bioinformatics analysis was performed to identify the differences in genome distribution of H3K27ac modifications. Based on the distribution characteristics of H3K27ac, the enhancer elements were identified and the remodeling characteristics of enhancer and related regulome were explored. The prediction model for prognosis based on enhancer related target genes was constructed by univariate Cox and multivariate Cox regression analyses. **Results** The histone H3K27ac modification was mainly distributed in the enhancer region and displayed no significant differences in the genomic distribution patterns between normal and cancer

[基金项目] 国家自然科学基金优秀青年科学基金(81822032);重庆市杰出青年基金(cstc2019jcyjjqx0027)

[通信作者] 王 斌,E-mail: wb_tmmu@126.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/)

tissues. Compared with normal gastric mucosa, the level of enhancer H3K27ac modification was higher in intestinal type gastric cancer. A total of 8 847 enhancers with increased activity in intestinal type gastric cancer were identified, accounting for 8.3% of all enhancers, which might promote malignant behaviors such as proliferation and adhesion of gastric cancer cells. A prognosis-predicting model established based on a panel of 6 genes that upregulated by the acquired enhancer in cancers, which was able to predict the overall survival of patients. **Conclusion** Enhancer remodeling is one of the significant epigenetic features of intestinal type gastric cancer. These enhancers may drive malignant growth and adhesion of cancer cells by upregulating the expression of *MYC*, *E2F3* and other genes. A prognosis model based on enhancer target genes is constructed.

[**Key words**] intestinal type gastric cancer; epigenomics; H3K27ac; enhancer; prognosis

Supported by the Excellent Young Scientists Fund of National Natural Science Foundation of China (81822032) and the Fund for Distinguished Young Scholars of Chongqing (cstc2019jcyjjqx0027). Corresponding author: WANG Bin, E-mail: wb_tmmu@126.com

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,每年确诊约42万例,其发病率和病死率居恶性肿瘤的第3位[1]。按照组织病理学特征,胃癌主要分为肠型(53%)、弥漫型(33%)和混合型(14%)[2-3],其中肠型胃癌较为常见。大量研究表明,肠型胃癌遵循Correa多步骤发生模式[3],即浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌,而肠型胃癌发生的分子机制仍未完全阐明。

肿瘤发生发展伴随异常的基因表达谱征,其中表观调控组紊乱发挥重要作用[4]。表观调控组是由顺式作用元件以及各种表观遗传学机制共同决定,包括DNA修饰、组蛋白修饰、核小体位置以及染色质空间结构。表观调控组整合DNA及组蛋白修饰(如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化等),改变顺式调节元件(cis-regulatory elements,CREs)与转录起始复合物的亲和力,决定CREs的层次结构、可及性和活性[5],调控基因表达水平,从而决定细胞异质性表型[6-7]。DNA甲基化改变是胃癌重要特征[8],但对其他表观遗传紊乱在胃癌发生中功能和机制的认识仍有限。

组蛋白H3第27位赖氨酸乙酰化修饰(H3K27ac)标记的增强子(enhancer)[9-10]是表观调控组的重要顺式作用元件,其通过招募转录因子及染色质重塑复合物等驱动细胞分化基因的转录程序,从而决定细胞功能与组织形态。近期有研究描绘了间充质型胃癌(主要为弥漫型胃癌)的特异性增强子图谱特征[11],但肠型胃癌的增强子状态及功能尚不清楚。

鉴于此,本研究利用染色质靶向捕获(cleavage under targets and tagmentation,CUT&Tag)测序技术,系统性描绘肠型胃癌组蛋白H3K27ac修饰的全基因组图谱,发现肠型胃癌存在增强子重塑现象,初步解析增强子调控胃癌发生发展相关基因表达的表观遗传机制,探究了增强子相关靶基因表达水平对评估肠型胃癌临床预后的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 临床生物样本

本研究共收集18例正常胃黏膜、15例肠型胃癌组织,均来自陆军特色医学中心消化内科2022年1-12月就诊患者。样本用液氮保存,组织病理类型由2名病理医师确认后,用于后续检测。该研究已通过陆军特色医学中心伦理审批[医研伦审(2021)第260号],样本收集前已获患者知情同意。

1.2 CUT&Tag文库构建及测序

组织样本经充分研磨后,采用碘沙醇梯度溶液提取细胞核,随后用台盼蓝染色并计数,收集10^5个细胞核,使用诺唯赞TD903试剂盒以及H3K27ac抗体(中国Abclonal公司),按照试剂盒说明书完成H3K27ac修饰的CUT&Tag文库构建,在Illumina Hiseq-X测序仪进行上机测序。

1.3 RNA-seq转录组文库构建及测序

对样本进行总RNA的提取并进行质控,首先检测RNA降解程度(RIN≥7),并获取足够量(RNA含量≥1 μg)合格RNA样品。利用Ribo-Zero rRNA Removal Reagent(美国Illumina公司)去除rRNA,获取mRNA样本,并对提取的mRNA进行片段化处理。随后采用逆转录方法合成双链cDNA,连接接头,纯化后PCR扩增,再次质检通过后,上机测序。

1.4 CUT&Tag数据质控及初步分析

获得测序仪下机数据,采用Fastp和Cutadapt工具进行初步质控以及去除接头序列。随后使用Bowtie2工具将序列比对到人参考序列hg38上,使用Samtools工具过滤掉低质量和重复reads后,使用

MACS2 工具寻找 H3K27ac 富集的基因组信号峰区域(peak)[12]。进一步使用 R 包 Chipseeker 对 peak 进行初步注释,得到 peak 所处基因组位置。

1.5 RNA-seq 数据质控及差异分析

对于 RNA-seq 测序数据,首先运用 Fastp 工具进行初步质控,过滤掉接头序列,再利用 Sortmerna 工具过滤 rRNA 序列,随后使用 Hisat2 工具将序列比对到人参考基因组 hg38 上,再用 Samtools 工具过滤掉低质量和重复 reads 后,进一步使用 RSeQC 软件进行测序饱和度、DNA 片段分布评估。数据通过质控后,运用 FeatureCounts 工具对基因表达进行定量分析,再通过 DESeq2 工具[13]寻找差异基因[差异基因:差异倍数≥1.5,错误发生率(false discovery rate, FDR)<0.05]。

1.6 增强子及差异增强子鉴定

根据 H3K27ac 修饰富集的信号峰所处的基因组位置,位于基因转录起始位点(transcription start site, TSS)上下游 2 000 个碱基内的 H3K27ac 修饰信号峰被鉴定为启动子元件(promoter),位于基因转录起始位点上下游 2 000 个碱基外区域的 H3K27ac 修饰信号峰被鉴定为增强子元件[14]。再运用 MAnorm2 工具对增强子元件进行合并,得到共识增强子集合,随后用 FeatureCounts 工具对共识增强子集合进行定量,再通过 DESeq2 工具寻找差异增强子(差异增强子:差异倍数≥1.5,FDR<0.05)。

1.7 增强子与靶基因注释

在评估增强子与基因的调控关系时,根据 GREAT 数据库对增强子进行注释,随后基于增强子的 H3K27ac 信号水平与预测靶基因的表达水平计算 Spearman 相关系数,当相关系数>0,并且 $P<0.05$ 时,鉴定该基因是增强子的靶基因[15]。

1.8 功能富集分析

运用 Cytoscape 工具[16]以及其插件 ClueGO 和 CluePedia 程序做京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)基因富集分析。

1.9 预后模型构建和验证

利用 R 软件“survival”包,基于 The Cancer Genome Atlas(TCGA)-stomach adenocarcinoma(STAD)数据集中肠型胃癌患者的基因表达矩阵和临床信息,以患者的总生存期(overall survival, OS)为应变量,以增强子靶基因的基因表达量为自变量,通过单因素 Cox 回归分析、最小绝对收缩和选择操作符(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)回归分析和多因素 Cox 逐步回归分析筛选了基因构建预后模型,建立风险分数方程[17-19]。风险分数(risk score)= *BHLHE41* 表达量×0.013 049 9 + *CEP97* 表达量×(−0.571 894 5)+*CHI3L2* 表达量×0.045 780 8+*NR6A1* 表达量×(−0.567 951 4)+*SUPT3H* 表达量×0.257 408 2+*TOMM20* 表达量×0.013 293 3。以风险分数的中位数为分界值,将患者分为高风险和低风险组,进行生存分析和绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,当 AUC 值>0.7 时,提示预后模型的预测效能较好[20]。

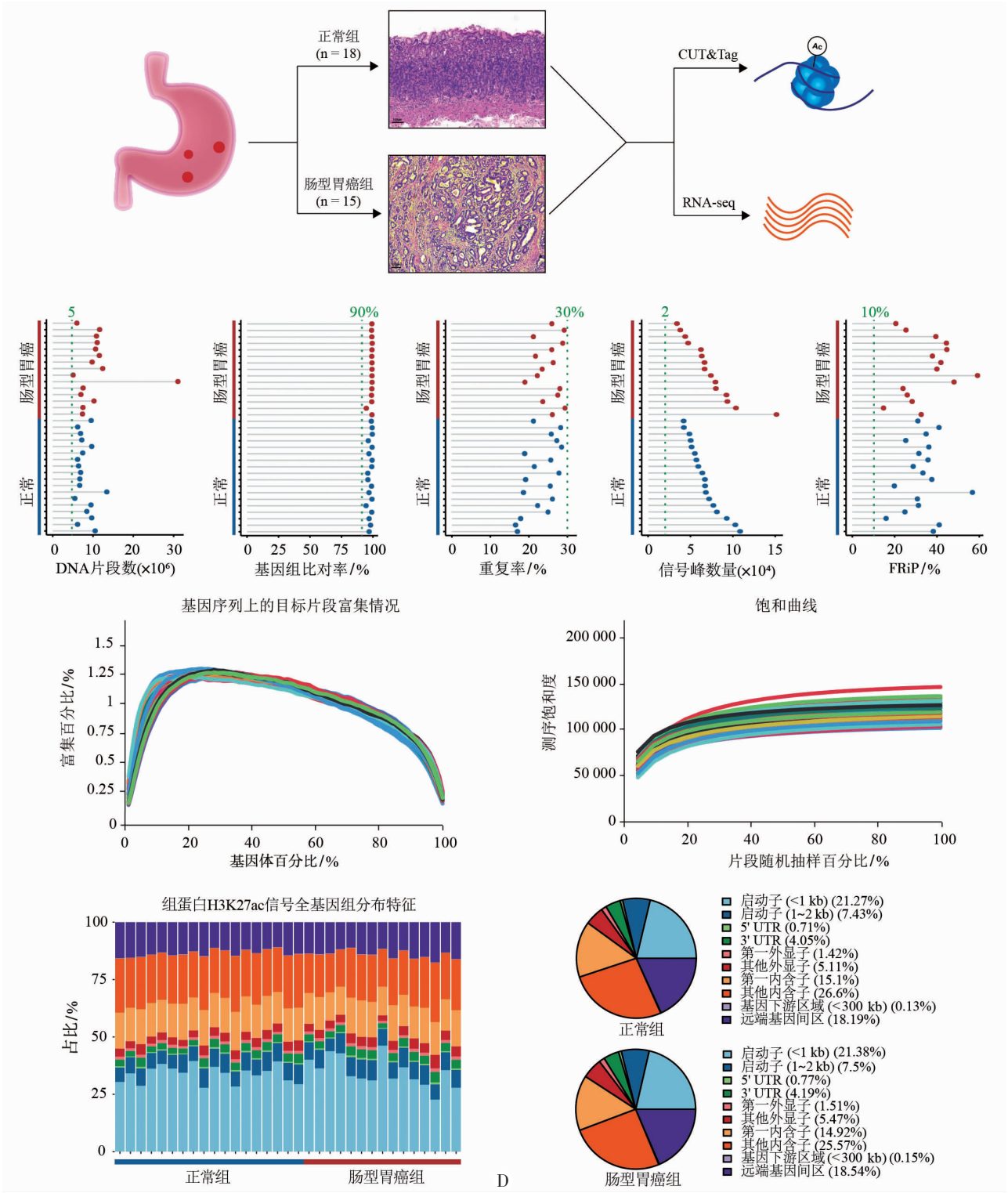
1.10 ABC 模型构建

ABC(activity-by-contact)模型有利于预测增强子在特定细胞类型上调节的靶基因。综合利用 MKN7 和 SNU719 细胞系的 Hic 测序数据、RNA-seq 测序数据、靶向 H3K27ac 的 CUT&Tag 数据和 ATAC-seq 数据,按照流程构建 ABC 模型:定义候选增强子区域、量化增强子活动、计算 ABC 分数。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[21-22],且 ABC 得分越高,增强子与靶基因的潜在调控关系越强。

2 结果

2.1 肠型胃癌 H3K27ac 修饰的全基因组分布特征

为描述肠型胃癌组织的组蛋白 H3K27ac 修饰特征,对正常胃黏膜($n=18$)及肠型胃癌($n=15$)组织进行靶向 H3K27ac 的 CUT&Tag 及 RNA-seq 建库和测序(图 1A)。质控分析提示:CUT&Tag 测序数据的 DNA 片段数(reads number)均>5×10^6 个,提示获得足够 H3K27ac 修饰信号用于下游分析;基因组比对率(mapping rate)均>90%,提示文库无显著的接头污染等情况;片段重复率(duplication rate)均<30%,提示文库复杂性良好;信号峰数量(peak count)均>2×10^4 个,表明捕获的 H3K27ac 信号富集较为集中;位于信号峰区域的 DNA 片段比例(fraction of reads in peaks, FRiP)均>10%,提示捕获到的 H3K27ac 信号较特异富集在染色质上特定信号峰区域(图 1B);RNA-seq 测序数据的 DNA 片段在基因编码区分布无明显偏移,且测序深度饱和(图 1C)。因此,两种组织的 2 个组学数据均达到下游分析的质控标准。H3K27ac 修饰的基因组分布表明,正常及癌变组织 H3K27ac 信号均主要分布在启动子、基因间区及内含子区域(图 1D、E)。



A：研究流程图；B：靶向 H3K27ac 的 CUT&Tag 测序数据的 DNA 片段数、基因组比对率、重复率、信号峰数量和 FRiP 值；C：RNA-seq 数据 DNA 片段的分布情况、饱和度曲线；D：各个样本的组蛋白 H3K27ac 信号分布；E：各组间总体组蛋白 H3K27ac 信号分布

图 1　CUT&Tag 及 RNA-seq 测序绘制肠型胃癌的全基因组 H3K27ac 修饰全景图谱

2.2　肠型胃癌增强子元件 H3K27ac 信号强度显著高于正常胃黏膜组织

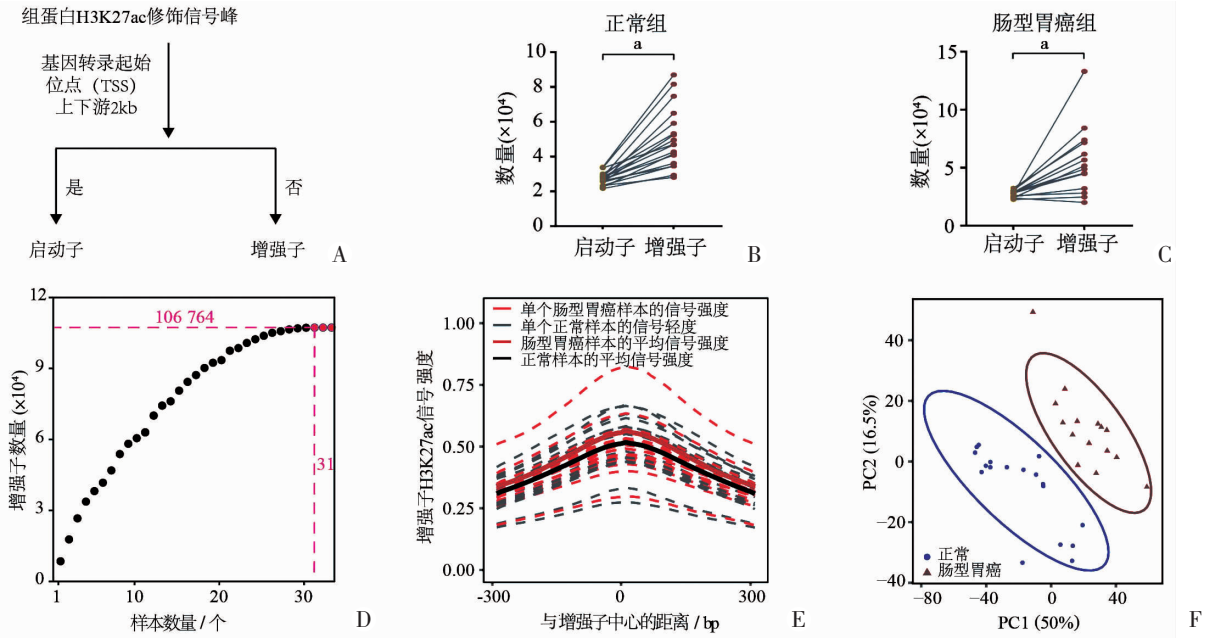
启动子和增强子是调控基因表达的重要功能元件,组蛋白 H3K27ac 修饰信号主要存在于这两类元件,并提示其处于激活状态。按照既往报道,基因转录起始位点上下游 2 000 个碱基内的 H3K27ac 修饰信号峰为启动子元件,其余 H3K27ac 信号峰被鉴定为增强子元件(图 2A)。两种组织中增强子元件数量均显著高于启动子数量(正常组启动子平均数为 27 322 个,增强子平均数为 50 238 个,$P=0.0002$,图 2B;肠型胃癌组启动子平均数为 27 548 个,增强子平均数为 55 894 个,$P=0.0181$,图 2B、C)。

增强子饱和曲线提示,总体样本量累计至 31 例时,增强子数量达到饱和(图 2D),说明本研究使用 33 个样本量足以发现胃黏膜与肠型胃癌的增强子,样本数量充分。分析增强子信号强度发现,肠型胃癌的增强子信号明显高于正常胃黏膜(图 2E)。2 组样本的增强子信号的主成分分析(principal component analysis,PCA)表明,增强子信号可以明显区分正常胃黏膜和肠型胃癌组织(图 2F),提示二者具有明显异常的增强子特征。上述结果提示,肠型胃癌发生明显的增强子重塑。

2.3　肠型胃癌的增强子重编程可能调控肠型胃癌相关基因表达

利用差异分析工具 DESeq2 分析正常胃黏膜和肠型胃癌的增强子 H3K27ac 信号差异,共识别出 19 305 个差异增强子位点,占全部增强子的 18.1%。相较于正常胃黏膜,肠型胃癌 H3K27ac 信号增加的获得性增强子 8 847 个,占全部增强子 8.3%;肠型胃癌丢失性增强子 10 458 个,占全部增强子 9.8%(图 3A)。差异分析显示肠型胃癌获得性增强子信号明显升高,而丢失性增强子信号明显降低(图 3B)。参照 GREAT 数据库分析发现,获得性增强子富集于胃癌、炎症、肿瘤形成等疾病过程(图 3C),提示可能调控胃癌发生。

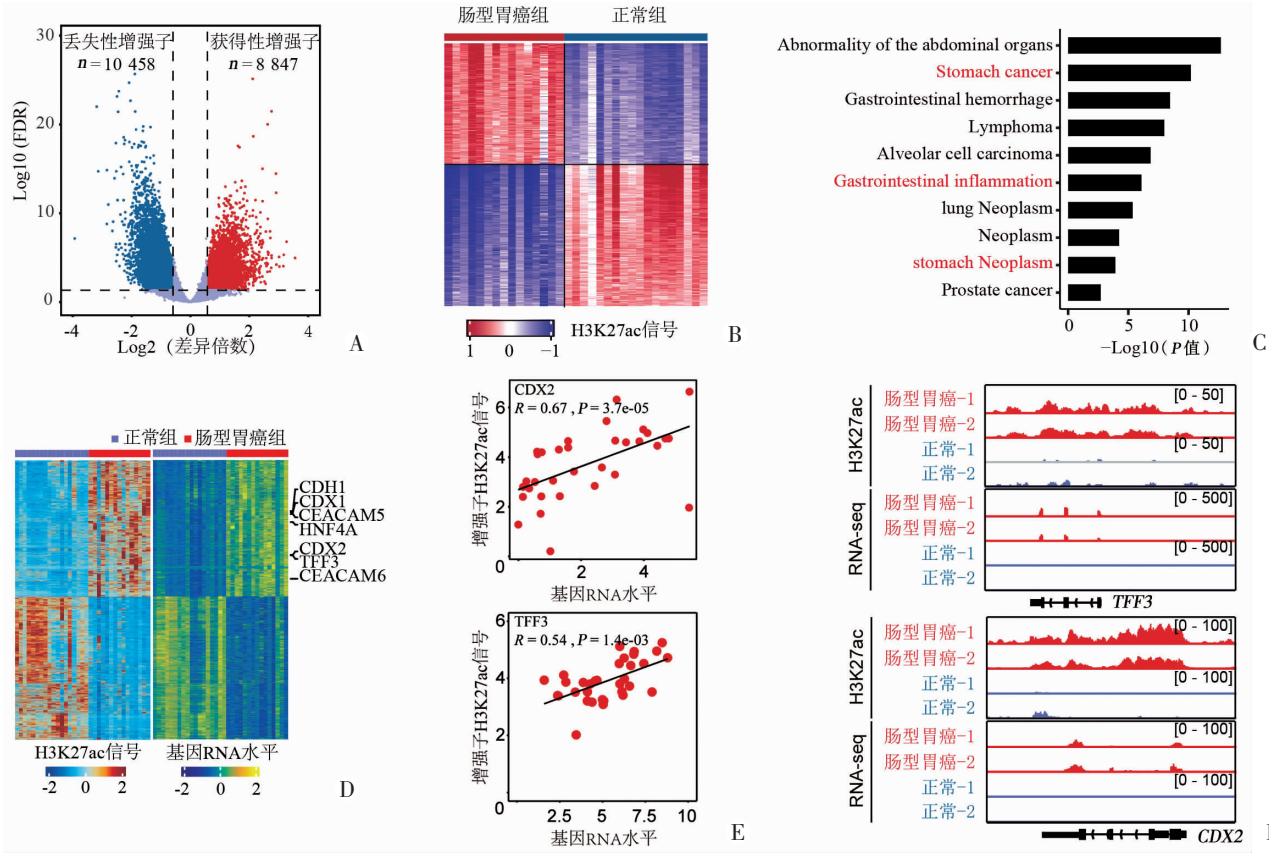
增强子 H3K27ac 信号与其靶基因的表达水平密切相关。分析发现 23 280 个增强子-靶基因的对应关系正相关(Spearman 相关系数范围为 0.344~0.876,$P<0.05$),其中 3 404 个获得性增强子可能调控 1 540 个基因,其中包括 *CDH1*、*CDX1*、*CDX2*、*HNF4A*、*TFF3* 等胃癌发生相关基因(图 3D)。有 3 567 个丢失性增强子可能调控 1 144 个靶基因,提示靶基因可能受多个增强子调控。以 *CDX2* 和 *TFF3* 为例,*CDX2*、*TFF3* 的 RNA 水平与其增强子 H3K27ac 信号正相关(图 3E),IGV 可视化显示增强子 H3K27ac 信号强度与靶基因表达水平正相关(图 3F),表明获得性增强子可能上调胃癌相关基因表达。



a:$P<0.05$

A:鉴定增强子与启动子流程图;B:正常胃黏膜样本的启动子与增强子数量;C:肠型胃癌样本的启动子与增强子数量;D:增强子元件数量的饱和度分布;E:正常胃黏膜和肠型胃癌胃黏膜组织中增强子 H3K27ac 信号强度比较;F:增强子 H3K27ac 信号的主成分分析

图 2　肠型胃癌增强子元件的 H3K27ac 信号重塑特征



A:肠型胃癌及正常胃黏膜组织的差异增强子图谱;B:肠型胃癌组相比于正常组获得与丢失的增强子 H3K27ac 信号强度;C:肠型胃癌获得性增强子可能影响的疾病表型;D:差异增强子 H3K27ac 信号强度与其靶标基因 RNA 表达水平;E:*CDX2*、*TFF3* 两个基因分别与其增强子的 Spearman 相关系数;F:正常组和肠型胃癌组中 *CDX2*、*TFF3* 两基因表达水平以及其增强子 H3K27ac 信号强度

图 3 肠型胃癌差异增强子图谱与其可能的靶基因

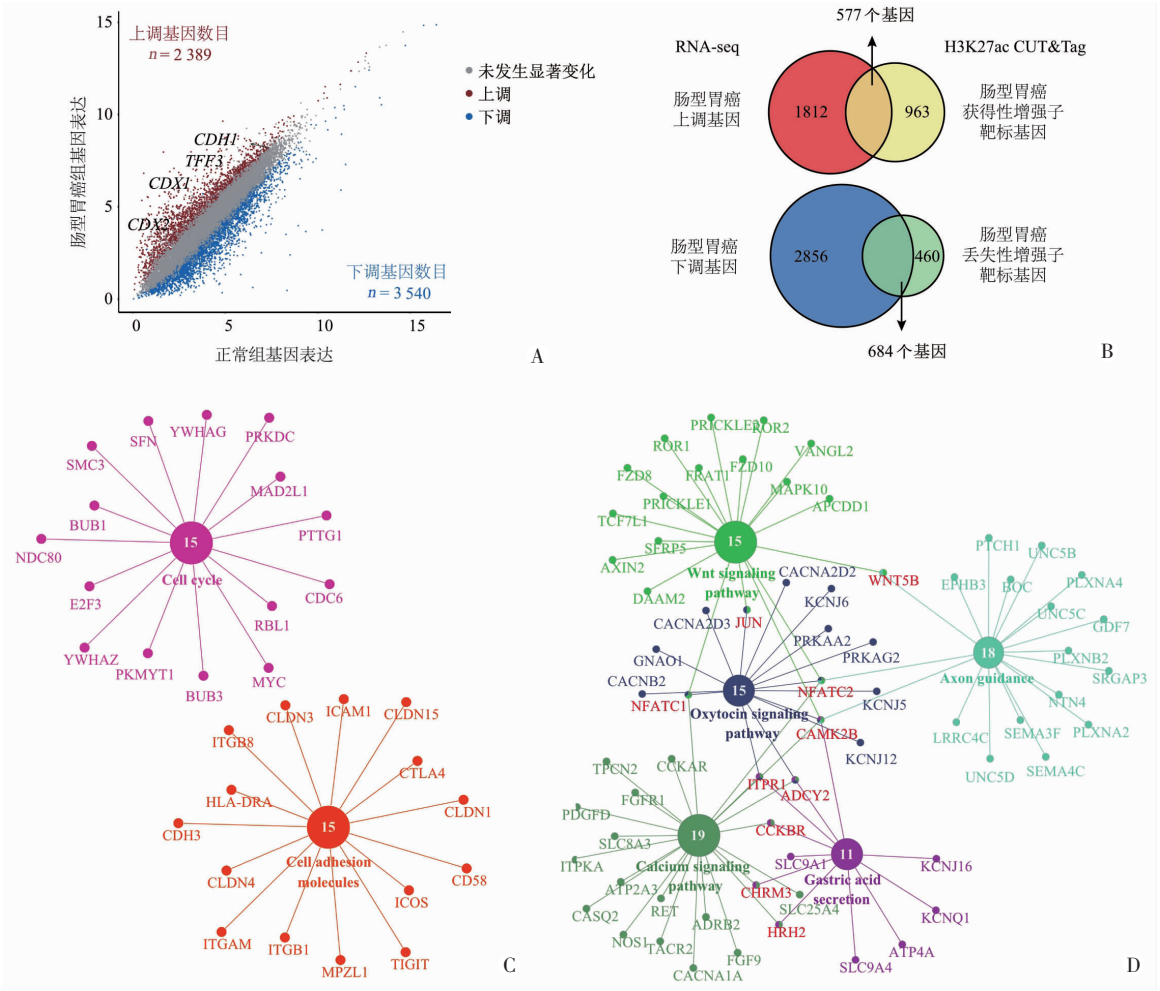
2.4 肠型胃癌增强子重编程可能调控的细胞功能与生物学行为

转录组数据分析发现,肠型胃癌中有 2 389 个基因的表达相较于正常胃黏膜显著上调,包括了 *CDX1*、*CDX2*、*CDH1*、*TFF3* 等肠型胃癌相关基因;有 3 540 个基因的表达显著下调(图 4A)。整合差异增强子和差异表达基因分析,发现在肠型胃癌中有 577 个基因的增强子 H3K27ac 信号和 RNA 表达水平同步上调,占肠型胃癌上调基因数量的 24.2%;同时有 684 个基因的增强子 H3K27ac 信号和 RNA 表达水平同步下调,占肠型胃癌下调基因数量的 19.3%(图 4B)。

KEGG 富集分析提示,同步显著上调的基因主要富集在细胞周期和细胞黏附分子通路上(图 4C),其中包括 *MYC*、*E2F3*、*ITGAM*、*ITGB1* 等基因,提示肠型胃癌获得性增强子可能通过上调这些基因表达,促进癌细胞的增殖、黏附行为;另一方面,同步下调的基因主要富集在胃酸分泌、钙离子传递等信号通路(图 4D)。这些结果表明,增强子重编程既可能正向调控癌细胞增殖、黏附等恶性生物学行为,也可能导致胃黏膜上皮泌酸等正常生理功能的异常。

2.5 肠型胃癌获得性增强子靶基因的预后模型构建及其临床意义

为进一步探究肠型胃癌获得性增强子及靶基因的临床意义,对 TCGA-STAD 数据中的 150 例具有预后信息的肠型胃癌数据(其中 49 例患者预后不良,101 例患者预后良好)进行单因素 Cox 分析,结果显示,共有 23 个获得性增强子调控的靶基因对肠型胃癌患者的总生存期具有预测潜力($P < 0.05$),其中 13 个基因是肠型胃癌预后的保护因素,10 个基因是肠型胃癌预后的危险因素(图 5A)。随后进行 LASSO 回归分析,进一步筛选得到 15 个最优预后相关基因(图 5B、C)。基于多因素 Cox 回归分析,构建由 6 个基因(*BHLHE41*、*CEP97*、*CHI3L2*、*NR6A1*、*SUPT3H* 和 *TOMM20*)组成的预后模型(图 5D)。

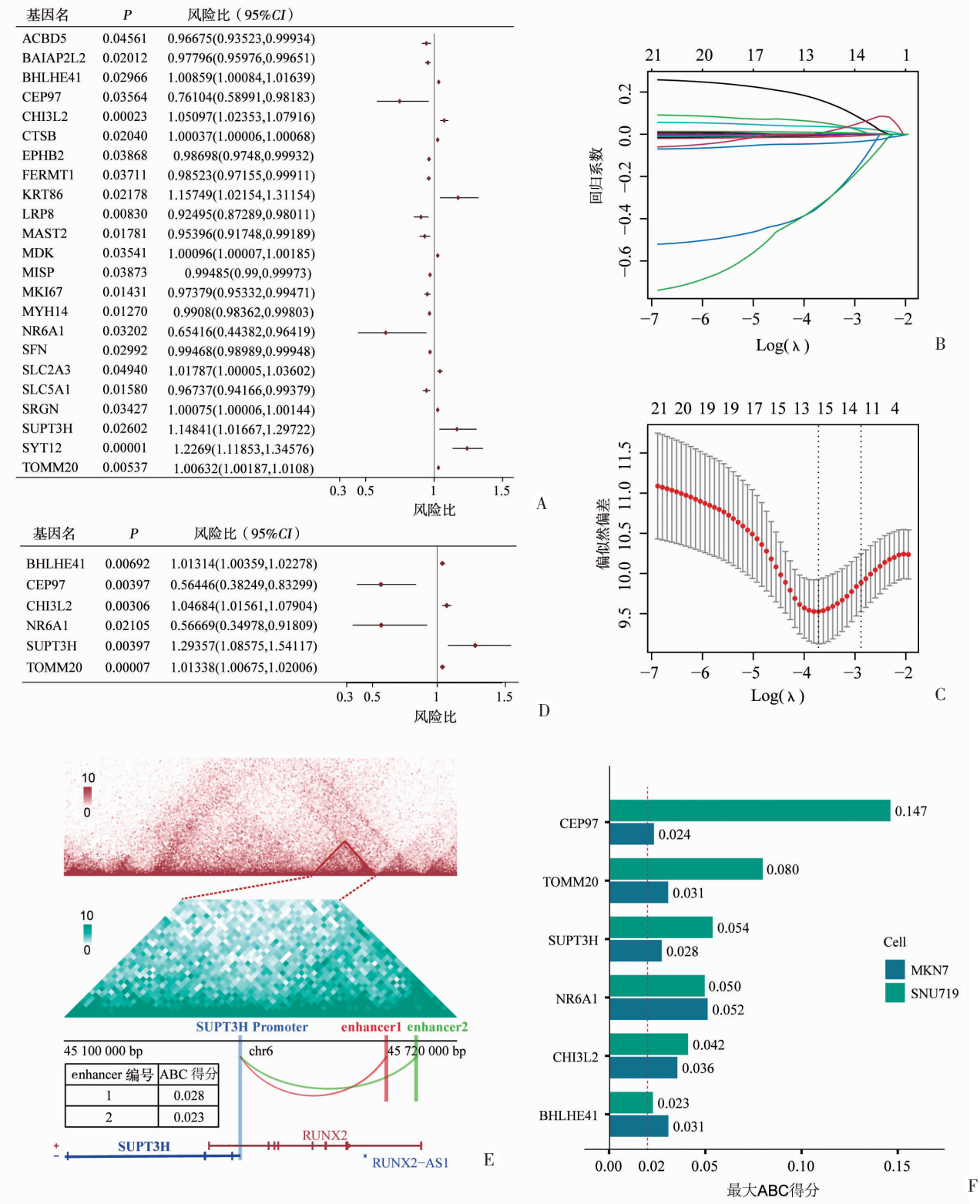


A:肠型胃癌的差异基因图谱;B:肠型胃癌中增强子 H3K27ac 信号和靶基因表达水平同步上调、同步下调的基因数目;C:肠型胃癌中增强子 H3K27ac 信号和靶基因表达水平同步上调基因的 KEGG 功能富集分析以及富集的相关基因;D:肠型胃癌中增强子 H3K27ac 信号和靶基因表达水平同步下调基因的 KEGG 功能富集分析以及富集的相关基因

图 4 肠型胃癌增强子重编程与其可能调控的细胞生物学功能

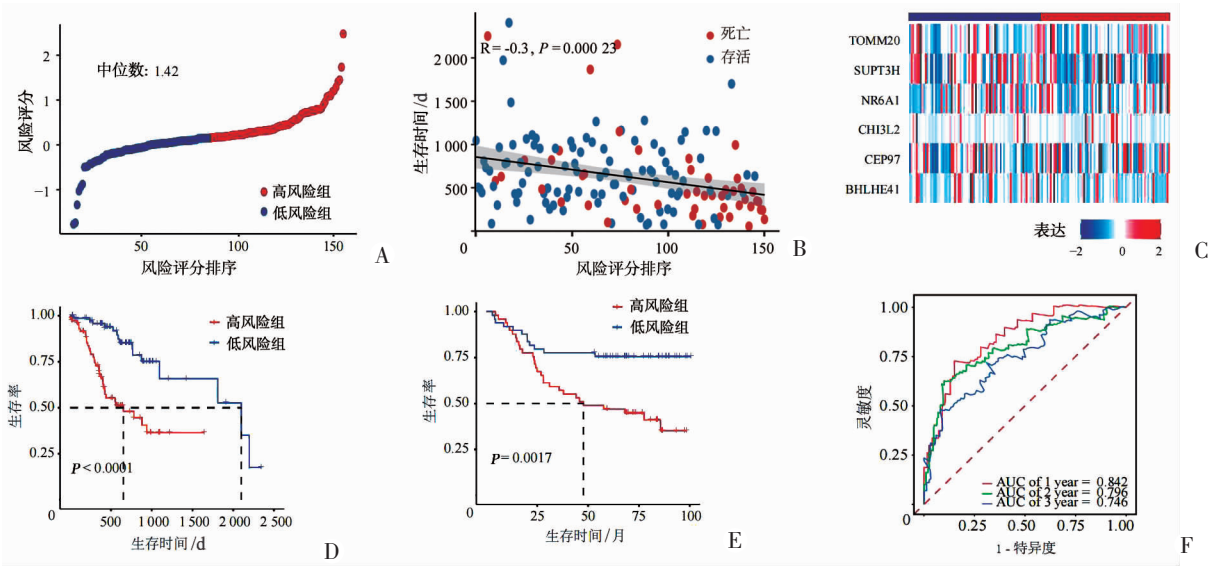
为进一步阐明肠型胃癌获得性增强子对预后模型基因的潜在调控关系,分别整合 GSE135176 数据集中肠型胃癌细胞系 MKN7、SUN719 的 HiC 测序数据,基于增强子图谱,构建 ABC 模型,以 *SUPT3H* 基因为例,展示其附近的 HiC 图谱、增强子与靶基因的关系(图 5E),最终的结果表明 6 个预后相关基因与其增强子在同一个拓扑结构域内,并在三维基因组上可能有较强的作用关系(ABC 得分 > 0.02,图 5F)。

根据预后模型计算每个肠型胃癌患者的风险分数,以风险分数中位数作为分界点(cut-off = 1.424 934),将患者分为高低风险 2 组(图 6A),发现高风险组患者的生存时间更短、死亡人数更多(图 6B)。*BHLHE41*、*CHI3L2*、*SUPT3H* 和 *TOMM20* 在高风险组中表达水平更高,*CEP97* 和 *NR6A1* 在低风险组中表达水平更高(图 6C)。为了进一步评估临床价值,采用 Kaplan-Meier 法对 TCGA-STAD 训练集进行生存分析,结果提示低风险组患者的生存概率显著高于高风险组($P<0.05$,图 6D),在 GSE62254 验证集中得到了一致的结果($P=0.001\ 7$,图 6E),表明基于肠型胃癌获得性增强子靶基因的预后模型划分的高低风险组患者在总生存时间上存在明显的差异。为评估该模型的预测效能,计算该预后模型时间依赖性的 ROC 曲线,TCGA-STAD 数据集中肠型胃癌患者的 1 年、2 年、3 年的 OS 的 AUC 值分别是 0.842、0.796、0.746(图 6F)。在对 TCGA-STAD 数据集中肠型胃癌患者的预后预测中,患者 1 年内的预后预测灵敏度和特异度分别为 87.5%和 56.34%,患者 2 年内的预后预测灵敏度和特异度分别为 79.49%和 59.46%,患者 3 年内的预后预测灵敏度和特异度分别为 75.56%和 60%。因此,基于 6 个获得性增强子靶基因可构建肠型胃癌预后模型,该模型稳定性和预测效能较好。



A:23 个与预后显著相关的获得性增强子靶基因的森林图;B:23 个基因在 LASSO 回归模型中的系数变化轨迹;C:LASSO 回归模型中的最优参数和最优预后相关基因(虚线处);D:6 个预后模型基因的森林图;E:MKN7 胃癌细胞系中 *SUPT3H* 基因附近的 HiC 图谱、增强子与靶基因的关系;F:6 个预后相关基因在 MKN7、SUN719 细胞系中的最大 ABC 得分

图 5 肠型胃癌获得性增强子靶基因的预后模型与 ABC 模型



A:肠型胃癌获得性增强子靶基因预后模型 TCGA-STAD 训练集风险分数分布图;B:肠型胃癌获得性增强子靶基因预后模型 TCGA-STAD 训练集生存状态分布图;C:TCGA-STAD 训练集中 6 个关键预后基因的表达热图;D:TCGA-STAD 训练集肠型胃癌高、低风险组患者 Kaplan-Meier 法生存分析;E:GSE62254 验证集肠型胃癌高、低风险组患者 K-M 生存分析;F:肠型胃癌获得性增强子靶基因预后模型的时间依耐性 ROC 曲线

图 6　肠型胃癌获得性增强子靶基因预后模型的临床意义

3　讨论

肠型胃癌作为临床最常见的胃癌亚型,发病呈现年轻化趋势,其发生发展的表观遗传学机制尚不清楚。既往研究显示,胃癌与 DNA 异常甲基化的关系密切,例如抑癌基因 *P*16 的高 DNA 甲基化水平促进细胞发生恶性增殖,导致胃癌的发生[23];*CDH*1 负责编码 E-钙黏蛋白,是维持上皮细胞间黏附的主要蛋白,有研究表明,*CDH*1 高甲基化在胃癌早期已经存在,可能和早期胃癌的侵袭转移相关[24]。增强子作为表观遗传调控的另一重要方式,却少有报道其在胃癌发生发展中的作用。

本研究运用靶向 H3K27ac 修饰的 CUT&Tag 测序技术,全面揭示了肠型胃癌中存在的显著增强子重塑特征。*CDX*2 和 *HNF*4*A* 是维持胃癌特异性超级增强子的关键转录因子,在胃癌中发挥着重要作用[25],本研究进一步发现这些基因自身可能受获得性增强子调控。因此,由于这些关键基因可通过维持增强子活性,形成增强子-靶基因-转录因子的表达调控环路,进而促进胃黏膜癌变。

本研究构建了由 6 个获得性增强子相关靶基因(*BHLHE*41、*CEP*97、*CHI3L*2、*NR*6*A*1、*SUPT*3*H* 和 *TOMM*20)形成的预后模型,具有较好的稳定性和预测效能。*CHI3L*2 编码几丁质类蛋白的 1 个成员,可以诱导抗炎信号因子产生,从而产生抑制性免疫微环境[26];*CHI3L*2 还可以作为 M2 型巨噬细胞的标志基因,与胶质瘤、肾细胞癌等癌种的不良预后呈正相关[27]。*NR*6*A*1 是核受体家族 6 中的唯一成员,参与胚胎发育等生物学过程,在本模型中是作为一种保护性因素。有研究显示,*NR*6*A*1 可以通过调控脂质代谢影响肝癌的发生发展,在肝癌细胞中敲低 *NR*6*A*1 会导致脂质的积累,促进肿瘤细胞的增殖和迁移。但在另外一项肝癌预后相关模型中,*NR*6*A*1 显示与肝细胞癌患者的不良预后相关[28]。

综上所述,本研究系统性绘制肠型胃癌的组蛋白 H3K27ac 修饰全基因组图谱,发现增强子可能通过上调癌基因表达,进而促进癌细胞增殖、黏附行为的恶性表型,初步提示胃癌发生发展可能的表观调控机制。基于获得性增强子的靶基因构建预后模型,为临床判断患者预后提供了参考工具,有助于提供个性化的诊疗和随访方案。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] ZHENG R S, ZHANG S W, ZENG H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jncc.2022.02.002.

[2] 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.

[3] BUSINELLO G, ANGERILLI V, PARENTE P, *et al*. Molecular landscapes of gastric pre-neoplastic and pre-

invasive lesions[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9950. DOI: 10.3390/ijms22189950.
[4] DAWSON M A, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. Cell, 2012, 150(1): 12-27. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
[5] ZHANG Q, CAO X T. Epigenetic remodeling in innate immunity and inflammation[J]. Annu Rev Immunol, 2021, 39: 279-311. DOI: 10.1146/annurev-immunol-093019-123619.
[6] STILLMAN B. Histone modifications: insights into their influence on gene expression[J]. Cell, 2018, 175(1): 6-9. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.032.
[7] LAWRENCE M, DAUJAT S, SCHNEIDER R. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression[J]. Trends Genet, 2016, 32(1): 42-56. DOI: 10.1016/j.tig.2015.10.007.
[8] CRAVO M, PINTO R, FIDALGO P, *et al*. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma[J]. Gut, 1996, 39(3): 434-438. DOI: 10.1136/gut.39.3.434.
[9] ONG C T, CORCES V G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(4): 283-293. DOI: 10.1038/nrg2957.
[10] HÖRNBLAD A, REMESEIRO S. Epigenetics, enhancer function and 3D chromatin organization in reprogramming to pluripotency[J]. Cells, 2022, 11(9): 1404. DOI: 10.3390/cells11091404.
[11] HO S W T, SHENG T T, XING M J, *et al*. Regulatory enhancer profiling of mesenchymal-type gastric cancer reveals subtype-specific epigenomic landscapes and targetable vulnerabilities[J]. Gut, 2023, 72(2): 226-241. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-326483.
[12] KAYA-OKUR H S, JANSSENS D H, HENIKOFF J G, *et al*. Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag[J]. Nat Protoc, 2020, 15(10): 3264-3283. DOI: 10.1038/s41596-020-0373-x.
[13] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
[14] BRIEND M, RUFIANGE A, MONCLA L H 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.
[15] ZHOU R W, XU J, MARTIN T C, *et al*. A local tumor microenvironment acquired super-enhancer induces an oncogenic driver in colorectal carcinoma[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6041. DOI: 10.1038/s41467-022-33377-8.
[16] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, *et al*. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis[J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 185. DOI: 10.1186/s13059-019-1758-4.
[17] XU F, HUANG X L, LI Y Y, *et al*. m^6A-related lncRNAs are potential biomarkers for predicting prognoses and immune responses in patients with LUAD[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24: 780-791. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.04.003.
[18] AU E H, FRANCIS A, BERNIER-JEAN A, *et al*. Prediction modeling-part 1: regression modeling[J]. Kidney Int, 2020, 97(5): 877-884. DOI: 10.1016/j.kint.2020.02.007.
[19] CHEN F, GONG X, XIA M, *et al*. The aging-related prognostic signature reveals the landscape of the tumor immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12: 857994. DOI: 10.3389/fonc.2022.857994.
[20] DE HOND A A H, STEYERBERG E W, VAN CALSTER B. Interpreting area under the receiver operating characteristic curve[J]. Lancet Digit Health, 2022, 4(12): e853-e855. DOI: 10.1016/S2589-7500(22)00188-1.
[21] 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.
[22] NASSER J, BERGMAN D T, FULCO C P, *et al*. Genome-wide enhancer maps link risk variants to disease genes[J]. Nature, 2021, 593(7858): 238-243. DOI: 10.1038/s41586-021-03446-x.
[23] WU Y C, LV P, HAN J, *et al*. Enhanced serum methylated p16 DNAs is associated with the progression of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(4): 1553-1562.
[24] KIM D Y, KYOON JOO J, KYU PARK Y, *et al*. E-cadherin expression in early gastric carcinoma and correlation with lymph node metastasis[J]. J Surg Oncol, 2007, 96(5): 429-435. DOI: 10.1002/jso.20732.
[25] OOI W F, XING M J, XU C, *et al*. Epigenomic profiling of primary gastric adenocarcinoma reveals super-enhancer heterogeneity[J]. Nat Commun, 2016, 7: 12983. DOI: 10.1038/ncomms12983.
[26] LIU L L, YANG Y Z, DUAN H, *et al*. CHI3L2 is a novel prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gliomas[J]. Front Oncol, 2021, 11: 611038. DOI: 10.3389/fonc.2021.611038.
[27] PUSZTAI C, YUSENKO M V, BANYAI D, *et al*. M2 macrophage marker chitinase 3-like 2 (CHI3L2) associates with progression of conventional renal cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2019, 39(12): 6939-6943. DOI: 10.21873/anticanres.13915.
[28] LIN Z H, ZHANG J, ZHUANG L K, *et al*. Establishment of a prognostic model for hepatocellular carcinoma based on bioinformatics and the role of NR6A1 in the progression of HCC[J]. J Clin Transl Hepatol, 2022, 10(5): 901-912. DOI: 10.14218/JCTH.2022.00191.

(收稿:2023-12-19;修回:2024-02-05)
(编辑 邓强庭)