DOI:10.16016/j.2097-0927.202406068

组蛋白H3K27me3修饰缺失上调弥漫型胃癌细胞中*SLC7A11*的表达

任原锋,刘文康,储召乐,刘碧颖,侯永英,吴林育,李先锋,陈东风,王 涛,王 斌,杨 敏 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室,重庆

[**摘要**] **目的** 描绘弥漫型胃癌组织中组蛋白H3第27位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)修饰的全基因组分布图谱,通过鉴定H3K27me3所调控的关键靶基因,初步探究H3K27me3修饰重编程可能调控弥漫型胃癌细胞发生发展的作用机制。**方法** 样本来源于2021-2023年在陆军特色医学中心消化内科内镜中心及手术室胃肠外科组接受检查或治疗的患者。共收集到正常组患者14例,其中男性6例,女性8例,平均年龄46岁;胃癌组患者14例,其中男性8例,女性6例,平均年龄63岁。采用染色质靶向剪切及转座酶技术(cleavage under target and tagmentation, CUT&Tag)捕获基因组H3K27me3修饰区域,分析H3K27me3修饰重编程特征。整合转录组(RNA-Seq)测序数据、高通量染色体构象捕获技术(high-throughput chromosome conformation capture,Hi-C)及已发表的公共单细胞数据,分析H3K27me3修饰重编程在弥漫型胃癌细胞中所调控靶基因。**结果** CUT&Tag和RNA测序数据质量符合下游分析标准,正常胃黏膜组织和弥漫型胃癌组织的组蛋白H3K27me3修饰均主要分布于远端基因间区和内含子区。相较于正常组织,胃癌组织的H3K27me3修饰存在显著的重编程特征,表现为H3K27me3总体信号强度明显降低。其中缺失的2 912个H3K27me3信号峰可能导致822个肿瘤相关基因的表达上调,这些基因中上调最显著(信号值强度的差异倍数≥2, $P<0.05$)的56个基因主要富集于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1(mammalian target of rapamycin complex 1,mTORC1)信号通路,其中甲硫氨酸转运体*SLC7A5*和胱氨酸转运体*SLC7A11*在胃癌组织中的表达最高。单细胞数据提示,弥漫型胃癌组织中*SLC7A11*的异常高表达主要存在于肿瘤上皮细胞。利用公共数据和免疫组织化学实验进一步验证*SLC7A11*在弥漫型胃癌中高表达,且与胃癌患者的不良预后相关。**结论** 组蛋白H3K27me3修饰重编程是弥漫型胃癌的重要表观遗传学特征;组蛋白H3K27me3修饰缺失可能上调肿瘤细胞*SLC7A11*表达,进而促进肿瘤进展。

[**关键词**] H3K27me3;组蛋白修饰;表观遗传;弥漫型胃癌;溶质载体家族*7A11*

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

Loss of histone H3K27me3 up-regulates *SLC7A11* in diffuse gastric cancer cells

REN Yuanfeng, LIU Wenkang, CHU Zhaole, LIU Biying, HOU Yongying, WU Linyu, LI Xianfeng, CHEN Dongfeng, WANG Tao, WANG Bin, YANG Min Department of Gastroenterology, Chongqing Key Laboratory of Precision Diagnosis and Treatment for Digestive Malignancies, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To map the genome-wide distribution profile of histone H3K27me3 modification in diffuse gastric cancer tissues, identify target genes regulated by H3K27me3, and primarily explore the potential mechanism of its modification reprogramming in the occurrence and development of the

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2022YFA1105302, 2023YFC3402102)

[**通信作者**] 杨 敏,E-mail: yangmindoctor@126.com

王 斌,E-mail: wb_tmmu@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: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(01):71-81. DOI:10.16016/j.2097-0927.202406068.

Citation: 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(01): 71-81. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202406068.

tumor. **Methods** Normal gastric mucosal tissues and diffuse gastric cancer tissues were harvested from the patients who underwent examinations or treatments in the departments of gastroenterology and gastrointestinal surgery of our medical center between 2021 and 2023. There were 14 patients in the normal group (6 males and 8 females, average age of 46 years) and 14 patients in the gastric cancer group (8 males and 6 females, average age of 63 years). Cleavage under target and tagmentation (CUT&Tag) technology was employed to capture genomic regions modified by H3K27me3, and analyze the reprogramming characteristics of these modifications. RNA sequencing data, data from high-throughput chromosome conformation capture (Hi-C) technology, and publicly available single-cell data were integrated to investigate the target genes regulated by the reprogramming of H3K27me3 modifications in diffuse gastric cancer cells. **Results** The quality of the CUT&Tag and RNA sequencing data met the standards required for subsequent analysis. Histone H3K27me3 modifications in normal gastric mucosa and diffuse gastric cancer tissues were primarily distributed in distal intergenic regions and intronic regions. In gastric cancer tissues, compared to normal tissues, there was significant reprogramming of H3K27me3 modifications, characterized by a marked reduction in overall H3K27me3 signal intensity. The loss of 2 912 H3K27me3 signal peaks might lead to the up-regulation of 822 tumor-associated genes. Among them, 56 genes displayed the most significant up-regulation (fold change in signal intensity $\geqslant 2$, $P<0.05$), with notable enrichment in the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway. Specifically, the methionine transporter *SLC7A5* and the cystine transporter *SLC7A11* were found to have the highest expression levels in gastric cancer tissues. Single-cell data revealed that the abnormal overexpression of *SLC7A11* in diffuse gastric cancer was primarily observed in tumor epithelial cells. Further validation using public data and immunohistochemical experiments confirmed the elevated expression of *SLC7A11* in diffuse gastric cancer, which is associated with poor prognosis in gastric cancer patients. **Conclusion** The reprogramming of histone H3K27me3 modification is an important epigenetic characteristic in diffuse gastric cancer. Loss of H3K27me3 signal peaks may up-regulate the expression of *SLC7A11* in diffuse gastric cancer cells, and thereby promote tumor progression.

[**Key words**] H3K27me3; histone modification; epigenetics; diffuse gastric cancer; *SLC7A11*

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFA1105302, 2023YFC3402102). Corresponding authors: YANG Min, E-mail: yangmindoctor@126.com; WANG Bin, E-mail: wb_tmmu@126.com

胃癌是全球癌症发病率第5、病死率第4的恶性肿瘤[1]。1965年,LAUREN[2]按照组织病理学特征将胃癌分为2种主要类型:肠型胃癌和弥漫型胃癌。根据新的流行病学调查显示,由于群众幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染率的不断下降导致肠型胃癌的发病率不断降低,而弥漫型胃癌的发病率则相对升高[3]。弥漫型胃癌主要包括印戒细胞癌以及未分化和低分化癌,在组织学上通常无腺管样结构,缺乏细胞连接,呈现更强的浸润性和侵袭性,其5年生存率显著低于肠型胃癌[4]。然而,对弥漫型胃癌发生发展的分子调控机制尚未完全阐明。

表观重塑是胃癌发生发展过程中的重要特征[5]。表观调控组通过整合DNA甲基化、组蛋白修饰以及染色质重塑因子介导的核小体定位等特征,从而决定转录复合物与调控元件的亲和力,驱动特异性转录程序,影响细胞的异质性[6]。组蛋白修饰是影响表观调控组功能紊乱的重要方式之一,其主要分为激活性修饰和抑制性修饰。研究显示,以激活性修饰组蛋白H3第27位赖氨酸的乙酰化修饰(H3K27ac)为标志的增强子在肠型胃癌和间充质型胃癌的发生发展中发挥了重要作用[7-9]。与激活性组蛋白修饰相比,抑制性修饰通常与基因沉默和转录抑制相关,其通过招募抑制性转录因子、重塑染色质状态,降低目的基因的转录水平,调控关键细胞生物学功能[10-12]。组蛋白H3第27位赖氨酸的三甲基化修饰(H3K27me3),通常表征一类重要的抑制性顺式作用元件,在多种生理及病理过程起着重要作用[11-14],但其在胃癌的发生发展中发挥什么样的作用目前仍知之甚少,有待进一步研究。

基于表观调控机制发挥功能的方式,本研究利用染色质靶向剪切及转座酶技术(cleavage under targets and tagmentation, CUT & Tag)并整合转录组(RNA-Seq)、高通量染色体构象捕获技术(high-throughput chromosome conformation capture, Hi-C),系统性鉴定了弥漫型胃癌中组蛋白H3K27me3修饰的重编程特征及其调控的靶基因与生物学过程。

1 材料与方法

1.1 临床样本来源

本研究已通过陆军特色医学中心伦理委员会审批

通过[医研伦审(2021)第260号],样本来源于2021-2023年在陆军特色医学中心消化内科内镜中心及手术室胃肠外科组接受检查或治疗的患者。收集前获得患者知情同意,并由2名病理医师确认组织的病理类型。共获得正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织各14例。正常组男性患者6例,女性患者8例,平均年龄46岁;胃癌组男性患者8例,女性患者6例,平均年龄63岁。

1.2 CUT&Tag文库构建及测序

取冻存的正常胃黏膜组织和弥漫型胃癌组织,解冻后将其研磨,利用Omni-ATAC的方法提取细胞核[15]。用台盼蓝染色计数,收集10万个细胞核,加入靶向H3K27me3的一抗,二抗识别目标DNA序列后,继续参照诺唯赞TD903试剂盒的标准流程,构建高通量测序文库,并使用Illumina HiSeq-X测序仪进行测序[16]。

1.3 RNA文库构建及测序

取冻存的正常胃黏膜组织和弥漫型胃癌组织,抽提总RNA,检测RNA降解程度、总RNA含量,达到质控标准(RIN值≥7,含量1~4 μg)后,利用oligo dT磁珠与poly(A)尾特异性结合对mRNA进行分离,并对纯化的mRNA进行片段化。随后,通过反转录合成双链cDNA,连接接头并进行PCR扩增,产物进行纯化后得到文库。文库质检合格后上机测序。

1.4 CUT&Tag数据质控及初步分析

利用fastp进行数据质控,并通过cutadapt完成去接头。使用bowtie2进行基因组比对得到sam文件。利用sambamba将sam文件转换为bam文件,并使用Piacard进行去重。调用Macs寻找各个样本组蛋白H3K27me3修饰的信号峰,通过MAnorm2得到共识的信号峰区域[17],共识区域在基因组上所处的位置通过ChIPseeker注释,上下游500 kb基因在GREAT数据库里进行注释,区域内H3K27me3的信号强度则采用Ngsplot进行可视化。

1.5 差异H3K27me3信号峰的鉴定

MAnorm2对H3K27me3信号峰的信号值进行定量,通过DiffChIPL工具鉴定差异的H3K27me3信号峰(差异倍数≥2.0,P<0.05)。

1.6 靶基因的鉴定

在评估注释基因是否受到组蛋白H3K27me3修饰的调控时,采取斯皮尔曼相关检验,计算信号峰H3K27me3信号强度(Log_2CPM, Counts per million)和注释基因表达(Log_2FPKM, Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)的相关性[18]。斯皮尔曼相关系数(r)<-0.2,鉴定该注释基因为受H3K27me3调控的靶基因。

1.7 RNA-seq数据质控及分析

Fastp进行初步质控,去除接头序列后,通过Sortmerna过滤rRNA序列。使用Hisat2将序列与人参考基因组hg38比对,采取Samtools去除低质量和重复reads。通过RSeQC评估测序饱和度、DNA片段的分布情况。使用featureCounts工具统计基因表达量,得到表达矩阵后,通过DESeq2分析鉴定差异表达的基因(差异倍数≥2.0,P<0.05)。

1.8 Hi-C数据分析

对弥漫型胃癌的公共数据集GSE135941,利用HiC-Pro进行处理,通过pyGenomeTracks将靶基因位点的H3K27me3信号峰、RNA信号峰以及与信号峰之间的调控关系进行IGV可视化。

1.9 单细胞数据分析

单细胞数据集来自于人类遗传资源组学原始数据归档库(the genome sequence archive for human, GSAHuman),编号为HRA003647[19]。通过Seurat进行数据质控。在进行初步质控后,使用harmony工具对数据进行整合并校正批次效应。分别通过UMAP、SingleR工具对数据进行降维分析和细胞亚群注释。通过Nebulosa工具包对单细胞数据进行可视化。

1.10 免疫组织化学染色

利用免疫组织化学染色技术检测SLC7A11在正常胃黏膜(n=14)和弥漫型胃癌(n=14)的组织样本中的表达情况。将石蜡切片放在65 ℃烘箱中烘烤3 h;烘片后依次置于二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇中脱蜡水化;切片取出用PBS洗涤3次后进行抗原修复,将切片置于加入柠檬酸钠缓冲液的抗原修复盒,放入盛有水的高压锅中煮沸,保持沸腾8 min,关火,待蒸汽完全放出后取出切片,自然冷却至室温;取出洗涤后,修复盒中加入3%过氧化氢溶液,室温浸泡15 min去除过氧化物酶;再次洗涤,用免疫组化笔圈出组织,在组织上滴加封闭液,使其覆盖整个组织,在37 ℃孵箱中孵育1 h;封闭后将血清甩去,滴加稀释后的一抗(来自于武汉三鹰生物技术有限公司,Cat No:26864-1-AP),放入4 ℃冰箱中,孵育过夜;次日,复温10 min后洗涤,滴加二抗(来自于福州迈新生物技术开发有限公司,Cat No:Kit-5020),37 ℃孵育1 h;洗涤,随后DAB显色,苏木精染液染细胞核;将显色后的切片先后置于75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯中脱水;切片干燥后滴加中性树脂封片。

1.11 基因蛋白水平打分

由2名实验员对结果进行双盲打分,比较基因在2组内各样本中蛋白的表达情况。根据细胞染色强度评分为4级,无阳性着色(阴性)计0分,淡黄色(弱阳

性)计1分，棕黄色(阳性)计2分，棕褐色(强阳性)计3分；根据染色面积评为4级，≤25%计1分，26%~50%计2分，51%~75%计3分，>75%计4分，将两项评分相乘得出最终评分结果。

1.12　统计学方法

免疫组化染色评分所得到的半定量数据使用R进行统计分析，结果以$\bar{x}\pm s$表示。两组间比较使用Wilcoxon秩和检验分析，$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

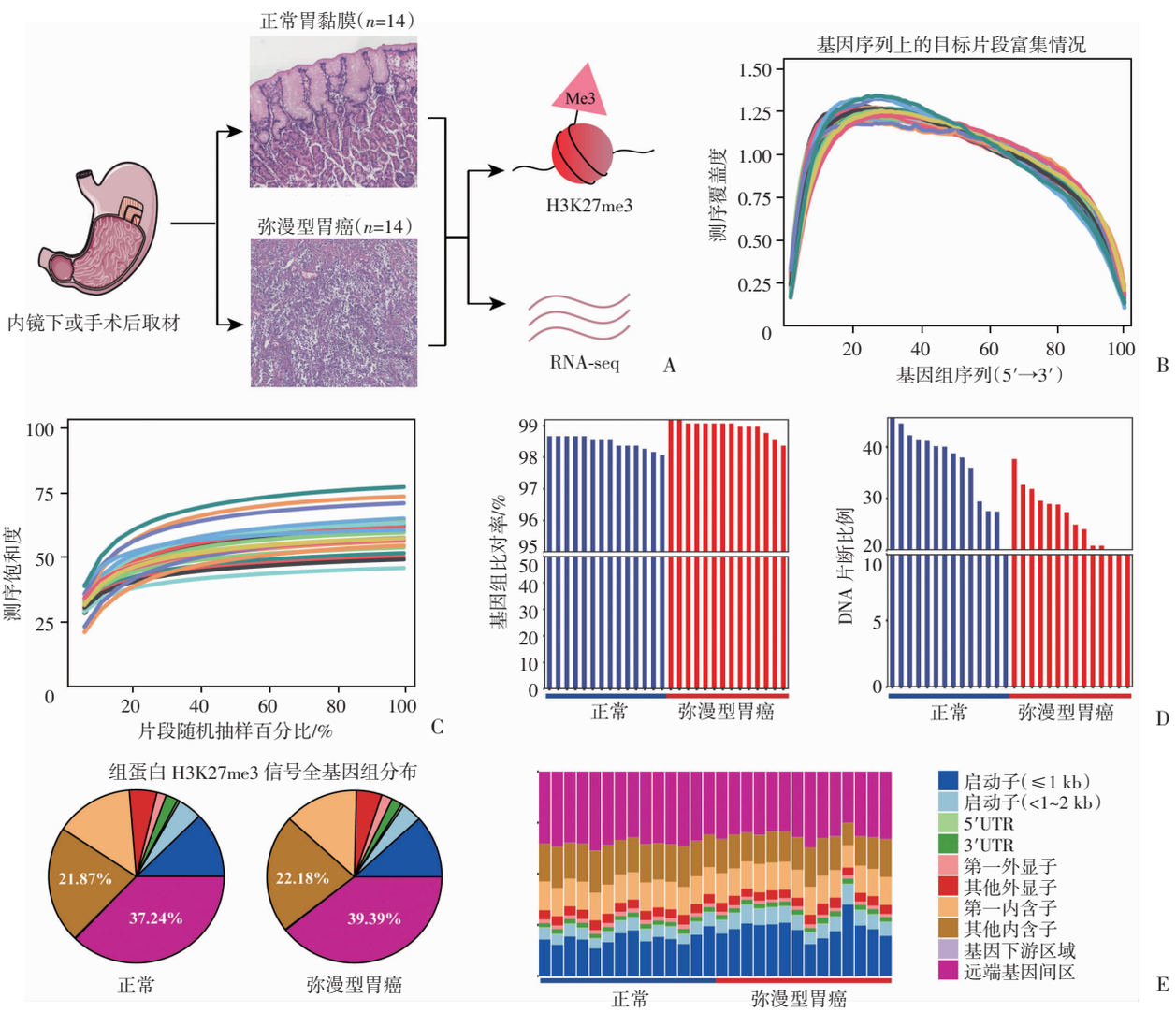
2　结果

2.1　正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织的全基因组组蛋白H3K27me3修饰分布图谱

为描绘弥漫型胃癌组蛋白H3K27me3修饰全基因组图谱，本研究收集正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织样本各14例，用于H3K27me3 CUT&Tag及RNA-seq建库和测序(图1A)。质控分析结果显示：RNA-seq数据的DNA片段在基因编码区高度富集且测序深度饱和(图1B、C)；CUT&Tag测序数据的基因组比对率均>95%，位于信号峰区域的DNA片段比例(fraction of reads in peaks，FRiP)均>10%(图1D)。正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织的表观组及转录组数据均达到质控标准，满足下游分析要求。分析组蛋白修饰在基因组的分布情况，发现正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织的组蛋白H3K27me3修饰均主要分布于远端基因间区和内含子区(图1E)，与既往研究的分布特征相似[11-12, 20]。

2.2　与正常胃黏膜相比，弥漫型胃癌组织发生了显著的H3K27me3重编程

根据H3K27me3信号饱和曲线可知，在纳入11例正常样本和13例弥漫型胃癌样本后H3K27me3信号



A：研究流程图；B、C：转录组数据质控分析　目标片段在基因编码区上的分布以及测序饱和度；D：H3K27me3 CUT&Tag数据的基因组比对率、FRiP值；E：H3K27me3信号峰在各(组)样本的基因组分布情况

图1　高质量测序数据描绘组蛋白H3K27me3修饰的基因组分布特征

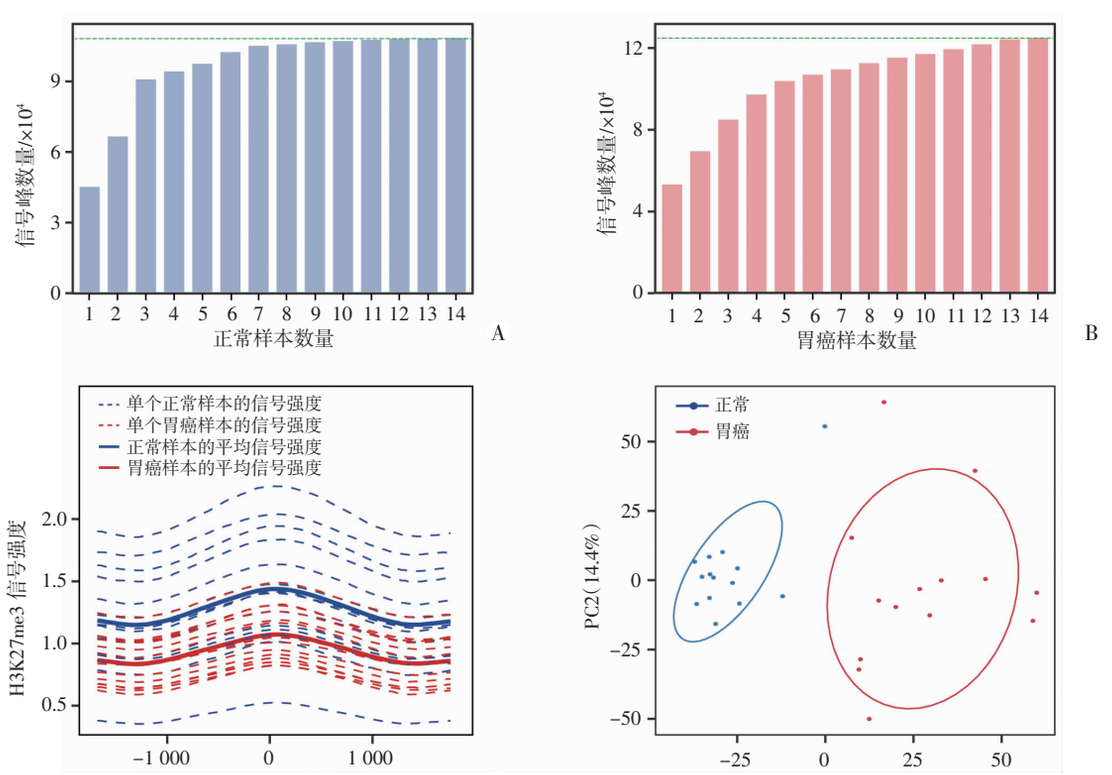
峰数量达到饱和,表明本研究所纳入的28例样本可以分别获得正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织的大部分H3K27me3信号峰(图2A、B),分析结果不会受到样本选择偏倚的影响。分析组蛋白H3K27me3修饰信号峰的信号强度发现,对比正常胃黏膜,弥漫型胃癌组织整体信号强度明显降低(图2C)。这些结果提示在弥漫型胃癌的发生发展过程中,发生了H3K27me3修饰的全基因组重新分布。将所有样本H3K27me3修饰的标准化信号用于主成分分析(principal component analysis,PCA),降维结果发现,2组样本的组蛋白H3K27me3修饰的全局性特征明显不同(图2D)。以上结果提示,在弥漫型胃癌的发生发展过程中,伴随着显著的H3K27me3修饰重编程,这种表观遗传改变可能在调控弥漫型胃癌的进展中发挥重要作用。

2.3　H3K27me3修饰重编程可能调控肿瘤相关基因的表达

正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织中,存在显著差异的组蛋白H3K27me3修饰信号峰共有6 070个,占信号峰总数量的16.7%。其中,相较于正常胃黏膜,弥漫型胃癌H3K27me3信号峰获得区域有3 158个,缺失区域有2 912个(图3A)。组蛋白H3K27me3修饰是一类重要的抑制性顺式作用元件,其整体信号强度降低(图2D)以及部分信号峰的缺失可能导致重要癌基因的负性调控作用减弱。通过GREAT数据库,对2 912个信号明显降低的H3K27me3信号峰缺失区域进行注释,其中831个区域注释到1个基因,占比28.5%,2 024个区域注释到2个及以上的基因,占比69.5%,而57个区域未注释到任何基因,占比2.0%(图3B)。

信号峰缺失区域的H3K27me3信号强度和注释基因的表达水平呈高度负相关,以斯皮尔曼相关系数<−0.2为标准,鉴定出了822个负调控靶基因的缺失信号峰(图3C),250个受H3K27me3负性调控的靶基因(其中相关系数绝对值排名靠前的包括*THBS1*、*MUC4*、*PMAIP1*、*MYC*、*RASA2*、*CLDN4*等与肿瘤发生发展密切相关的基因),表明基因可能会受到多个H3K27me3区域的调控。

结合Hi-C公共数据发现,与*THBS1*和*RASA2*具备潜在调控关系的多个H3K27me3区域分别位于远端基因间区和内含子区,这些区域与其所调控的基因位于一个拓扑结构域内,并与基因多个位点之间具有较强



A:正常样本数量递增中H3K27me3信号峰的数量;B:弥漫型胃癌样本递增中H3K27me3信号峰的数量　绿色虚线表示信号峰达饱和时的数量;C:样本H3K27me3信号峰整体信号强度;D:基于组蛋白H3K27me3修饰的信号强度对各样本进行的主成分分析(PC1:30.9%;PC2:14.0%)

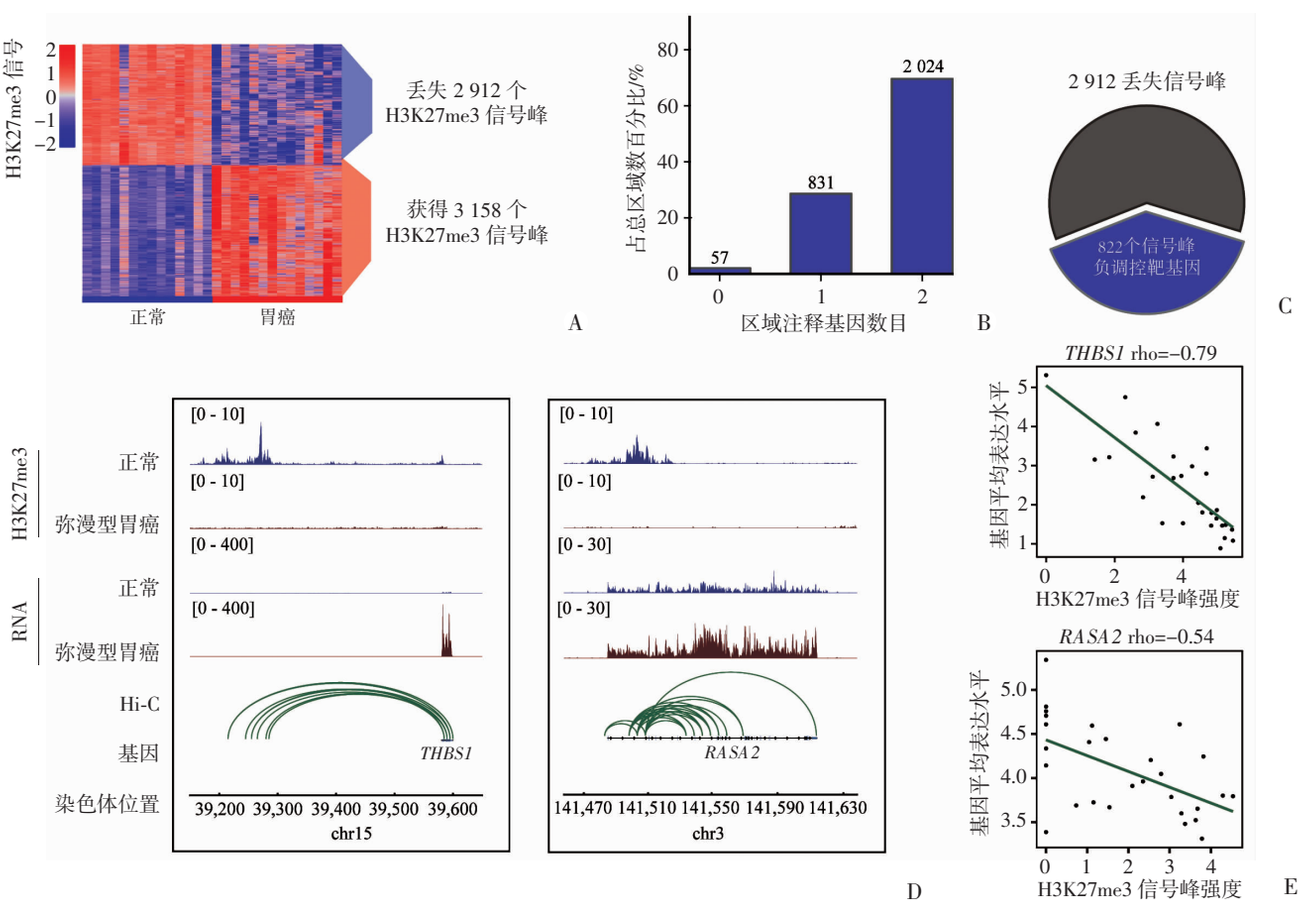
图2　弥漫型胃癌组织发生H3K27me3重编程,信号峰数量和强度改变

的互作关系，而其基因表达水平与调控的H3K27me3区域信号强度呈显著负相关，伴随弥漫型胃癌H3K27me3信号强度的降低，*THBS1*和*RASA2*基因的表达水平显著升高（图3D、E）。这些结果提示弥漫型胃癌发生发展过程中，部分H3K27me3区域的信号下调可能是重要的肿瘤相关基因表达水平升高的必要条件。

2.4　H3K27me3修饰缺失可能上调肿瘤细胞*SLC7A11*表达，进而促进肿瘤进展

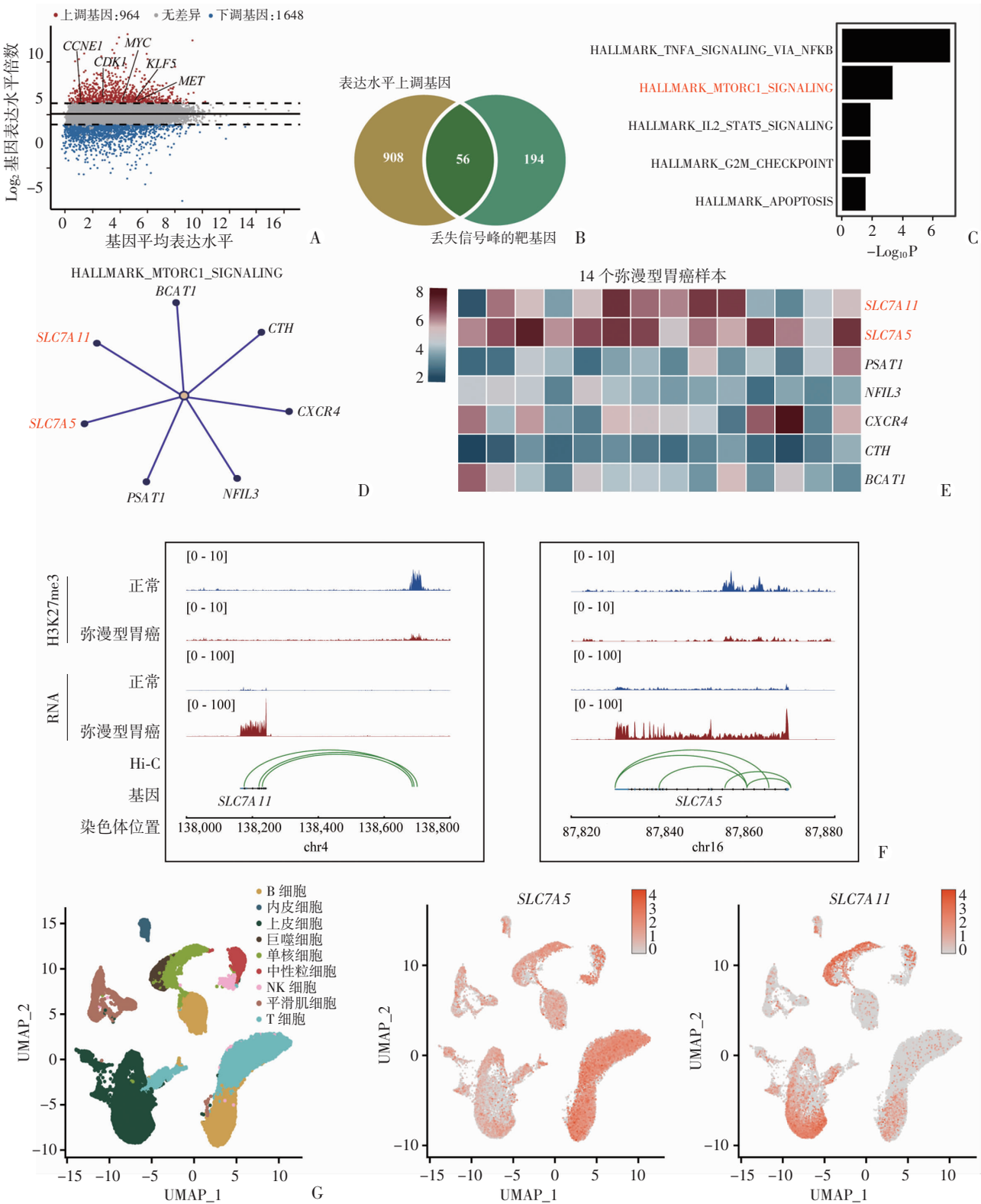
转录组分析发现，弥漫型胃癌组织有964个基因表达上调，包括*CCNE1*、*CDK1*、*MYC*、*KLF5*、*MET*等肿瘤相关基因和转录因子；以及1 648个基因表达下调（图4A）。整合组蛋白H3K27me3修饰谱征和差异表达基因，发现有56个基因的表达水平升高而潜在调控区域的H3K27me3信号下调（图4B），占弥漫型胃癌高表达基因的5.8%。引入MSigDB数据库（the human molecular signatures database）的hallmark基因集，富集分析提示这些基因主要与核因子κB（nuclear factor kappa-B）NF-κB通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体1（mammalian target of rapamycin complex 1，mTORC1）信号通路相关（图4C）。mTORC1通路中包含*SLC7A5*、*SLC7A11*、*PSAT1*、*NFIL3*、*CXCR4*、*CTH*、*BCAT1*，其中和肿瘤发生发展密切相关的*SLC7A5*和*SLC7A11*分别是甲硫氨酸和胱氨酸的转运体，其在胃癌组织中基因表达水平最高（图4D、E），它们对氨基酸的摄取与mTORC1的激活密切相关[21-22]。

Hi-C数据提示，调控*SLC7A11*表达的H3K27me3信号峰位于远端基因间区，调控*SLC7A5*的信号峰位于内含子区域，两个信号峰分别与两个基因的多个位点之间存在互作，位于一个拓扑结构域内，*SLC7A11*和*SLC7A5*的表达水平随H3K27me3信号强度的降低而升高（图4F）。以上结果提示，H3K27me3重编程可能通过上调氨基酸转运体*SLC7A5*和*SLC7A11*的表达，促进胱氨酸和甲硫氨酸的转运，并导致弥漫型胃癌发生发展。



A：差异热图　信号值强度的差异倍数≥2，$P<0.05$；B：信号峰注释基因数目的统计图；C：斯皮尔曼相关性分析得到822个负调控基因表达的缺失信号峰；D：IGV展示正常组织和胃癌组织*THBS1*和*RASA2*的H3K27me3信号强度和基因表达水平，以及信号峰与基因之间潜在的空间相互作用；E：*THBS1*和*RASA2*的基因表达水平与H3K27me3信号强度的斯皮尔曼相关性分析

图3　H3K27me3重编程调控肿瘤相关基因表达



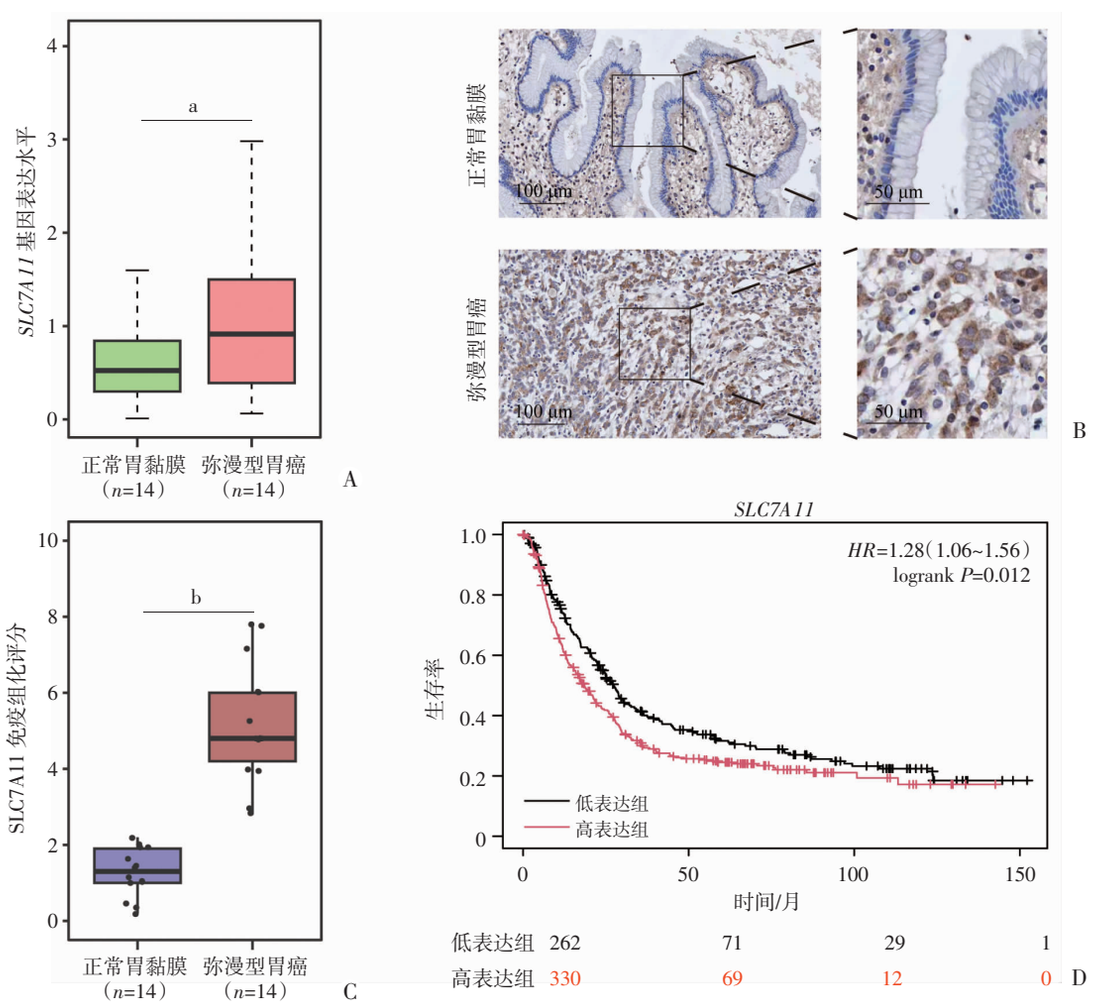
A:正常、弥漫型胃癌胃黏膜组织转录组差异分析的 MA 图 基因表达水平的差异倍数≥ 2.0, P< 0.05;B:弥漫型胃癌 H3K27me3 信号峰缺失和基因表达水平 Venn 图 56 个基因上调;C:MSigDB 数据框 hallmark 富集分析结果;D:富集于 HALLMARK_MTORC1_SIGNALING 通路的重要基因;E: HALLMARK_MTORC1_SIGNALING 通路富集基因表达水平热图;F:正常、胃癌组织 *SLC7A11* 和 *SLC7A5* 的 H3K27me3 表达 IGV 图;G、H:弥漫型胃癌患者单细胞的 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)图

图 4 H3K27me3 信号峰的缺失上调 *SLC7A5* 和 *SLC7A11* 的表达

肿瘤微环境，包含肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞和内皮细胞等多种细胞成分[23]，为了探究2个转运体的高表达以及甲硫氨酸和胱氨酸的代谢紊乱发生于肿瘤微环境的何种细胞，本研究纳入了GSA-Human数据库的7例弥漫型胃癌单细胞数据[19]。通过质控、去批次和降维分析后，将所有细胞分为9个亚群，分别为B细胞、内皮细胞、上皮细胞 、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、NK细胞、平滑肌细胞以及T细胞（图4G）。对*SLC7A5*和*SLC7A11*的表达水平进行展示，结果表明，弥漫型胃癌组织中*SLC7A11*的异常高表达主要存在于上皮细胞和单核巨噬细胞，而*SLC7A5*的异常高表达并非主要存在于上皮细胞，而是由肿瘤微环境中的淋巴细胞所致（图4H）。因此，后续选择集中研究*SLC7A11*，进行组织学层面表达差异的验证以及生存预后的分析。

2.5　*SLC7A11*在弥漫型胃癌中高表达，且与胃癌患者的不良预后相关

纳入TCGA数据库转录组数据，发现相较于正常胃黏膜组织，*SLC7A11*在弥漫型胃癌组织中mRNA水平明显升高（图5A）。为进一步探讨正常胃黏膜和弥漫型胃癌组织中SLC7A11蛋白表达水平是否存在差异，采用免疫组织化学检测SLC7A11的蛋白表达水平，结果发现*SLC7A11*在细胞质和细胞膜均有着色（图5B）。对2组内的各样本进行染色强度和面积的打分，半定量统计分析发现在胃癌样本中SLC7A11的蛋白表达水平较正常样本高（图5C）。结合公共数据库以及临床样本检测，进一步验证*SLC7A11*在弥漫型胃癌中表达水平高于正常胃黏膜组织。基于Kaplan-Meier Plotter数据库分析，发现*SLC7A11*的高表达和胃癌患者的不良预后密切相关（图5D）。



A：TCGA数据库分析*SLC7A11*在正常、弥漫型胃癌胃黏膜组织中的mRNA水平　a：$P<0.01$；B：免疫组化检测在正常、弥漫型胃癌胃黏膜组织中SLC7A11蛋白表达水平；C：正常、弥漫型胃癌胃黏膜组织中SLC7A11的免疫组化染色评分　b：$P<0.001$；D：不同*SLC7A11*表达水平的弥漫型胃癌患者的生存分析

图5　SLC7A11在弥漫型胃癌中的表达与胃癌患者不良预后的关系

3 讨论

3.1 弥漫型胃癌的治疗现状

弥漫型胃癌是胃癌的一种主要亚型,侵袭性强,诊断时常处于晚期,预后较差,缺乏有效的治疗手段。亚洲癌症研究小组(ACRG)将胃癌分为4种分子亚型:MSI、MSS/EMT、MSS/TP53+和 MSS/TP53-,其中MSS/EMT亚型多以弥漫型胃癌为主,预后最差,手术后复发率很高[24]。有研究显示,相比EBV、MSI亚型胃癌表现出的明显的免疫细胞浸润特征,弥漫型胃癌通常具有较少的免疫细胞浸润,呈现出典型的免疫荒漠特征,这也是其免疫检查点阻断(ICB)治疗效果不佳的主要原因之一[25]。然而,这一治疗效果不佳、临床预后极差的胃癌亚型发生发展的分子调控机制仍不清楚,因此寻找弥漫型胃癌治疗的全新靶点和干预策略成为了亟待解决的问题。

3.2 H3K27me3重编程调控弥漫型胃癌肿瘤特性的分子机制

表观重塑如DNA甲基化在弥漫型胃癌发生发展过程中起关键作用[26],而组蛋白修饰尤其是抑制性组蛋白修饰如何调控弥漫型胃癌的侵袭特性鲜有报道。本研究首次系统性表征了弥漫型胃癌中组蛋白H3K27me3修饰的重编程特征,并发现H3K27me3信号峰的缺失可能引起肿瘤代谢紊乱和mTORC1信号通路的激活,这很有可能与部分溶质载体(Solute Carriers, SLCs)家族的表达上调相关。

3.3 溶质载体在肿瘤代谢与免疫逃逸中的作用及其作为治疗靶点的潜力

SLCs即溶质转运蛋白超家族是人类细胞膜(含胞内膜)上最重要的膜转运蛋白家族之一[27],可介导各种营养物质和代谢产物的跨膜生物膜转运,包括金属离子、无机离子、有机离子、氨基酸、脂质、糖类、神经递质、核酸和药物等[28-29]。研究表明,在肿瘤中,肿瘤细胞对于氨基酸的大量摄取主要是通过各种过表达的氨基酸转运体实现的[28-29],*SLCs*蛋白表达异常或功能缺陷与肿瘤的发生发展密切相关。肿瘤细胞高表达*SLC6A6*,介导牛磺酸摄取,并可反式激活免疫检查点基因,诱导$CD8^+$ T细胞衰竭[30];*SLC38A2*的高表达,使肿瘤细胞在与cDC1s争夺营养物质谷氨酰胺时处于优势地位,从而实现免疫逃逸[31]。因此,通过靶向肿瘤细胞的氨基酸转运体,实现对肿瘤生长的抑制成为一个有效的策略。本研究发现的*SLC7A5*和*SLC7A11*分别转运甲硫氨酸和胱氨酸,其中*SLC7A11*的异常高表达存在于肿瘤细胞,因此本研究重点讨论*SLC7A11*,*SLC7A11*作为轻链亚基和重链亚基*SLC3A2*组成胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白(*System* Xc^-),负责细胞摄取胱氨酸[21]。*xCT/SLC7A11*在调节铁死亡中发挥着重要的作用,铁死亡是由于脂质氢过氧化物(-OOH)以铁依赖性方式过度积累而导致的。*xCT/SLC7A11*摄入的胱氨酸在细胞内还原为半胱氨酸,用于合成谷胱甘肽(GSH)。GSH作为*GPX4*的辅助因子将细胞中积累的脂质氢过氧化物转化为脂质醇,减少过氧化物相关产物,从而保护细胞免受ROS引起的损伤,抑制铁死亡[14, 32-35]。

因此,本研究发现组蛋白H3K27me3修饰对肿瘤上皮细胞SLC7A11具备潜在调控作用,并与氨基酸代谢紊乱相关。这为高侵袭性的弥漫型胃癌临床治疗药物的开发提供新思路,有望改善这一冷肿瘤免疫检查点阻断(ICB)疗效不佳的现状[36-38]。

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] 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] HENSON D E, DITTUS C, YOUNES M, *et al*. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(7): 765-770. DOI: 10.5858/2004-128-765-DTITIA.

[4] CHEN Y C, FANG W L, WANG R F, *et al*. Clinicopathological variation of lauren classification in gastric cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2016, 22(1): 197-202. DOI: 10.1007/s12253-015-9996-6.

[5] CHIA N Y, TAN P. Molecular classification of gastric cancer[J]. Ann Oncol, 2016, 27(5): 763-769. DOI: 10.1093/annonc/mdw040.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] ZHANG Y Z, YUAN J L, ZHANG L R, *et al*. Coupling of H3K27me3 recognition with transcriptional repression through the BAH-PHD-CPL2 complex in *Arabidopsis* [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6212. DOI: 10.1038/s41467-020-20089-0.

[11] 吴林育.胃黏膜肠化的H3K27me3沉默子重塑特征及肠化调控因子ATOH1的初步功能鉴定[D].陆军军医大学,2023.
WU L Y. Remodeling characteristics of H3K27me3 silencing in intestinal metaplasia of gastric mucosa and preliminary functional identification of ATOH1, a regulator of intestinal metaplasia[D]. Army Medical University, 2023.

[12] 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(6):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.

[13] FLAVAHAN W A, GASKELL E, BERNSTEIN B E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer [J]. Science, 2017, 357(6348): eaal2380. DOI: 10.1126/science.aal2380.

[14] CHEN S J, ZHANG J, ZHOU T, *et al*. Epigenetically upregulated NSUN2 confers ferroptosis resistance in endometrial cancer *via* m^5C modification of SLC7A11 mRNA [J]. Redox Biol, 2024, 69: 102975. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102975.

[15] 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.

[16] 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.

[17] TU S Q, LI M S, CHEN H J, *et al*. MAnorm2 for quantitatively comparing groups of ChIP-seq samples [J]. Genome Res, 2021, 31(1): 131-145. DOI: 10.1101/gr.262675.120.

[18] 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: 6041. DOI: 10.1038/s41467-022-33377-8.

[19] ZHAO W Z, JIA Y F, SUN G Y, *et al*. Single-cell analysis of gastric signet ring cell carcinoma reveals cytological and immune microenvironment features [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2985. DOI: 10.1038/s41467-023-38426-4.

[20] LIU X Y, WANG C F, LIU W Q, *et al*. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos[J]. Nature, 2016, 537(7621): 558-562. DOI: 10.1038/nature19362.

[21] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620. DOI: 10.1007/s13238-020-00789-5.

[22] KANAI Y. Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2022, 230: 107964. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107964.

[23] DE VISSER K E, JOYCE J A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 374-403. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.016.

[24] CRISTESCU R, LEE J, NEBOZHYN M, *et al*. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 449-456. DOI: 10.1038/nm.3850.

[25] KIM T S, DA SILVA E, COIT D G, *et al*. Intratumoral immune response to gastric cancer varies by molecular and histologic subtype[J]. Am J Surg Pathol, 2019, 43(6): 851-860. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001253.

[26] YAMAMOTO E, SUZUKI H, TAKAMARU H, *et al*. Role

of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer[J]. Digestion, 2011, 83(4): 241-249. DOI: 10.1159/000320453.

[27] LIU X D. SLC family transporters[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1141: 101-202. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_3.

[28] ZHOU S W, SHU Y. Transcriptional regulation of solute carrier (SLC) drug transporters[J]. Drug Metab Dispos, 2022, 50(9): 1238-1250. DOI: 10.1124/dmd.121.000704.

[29] CÉSAR-RAZQUIN A,SNIJDER B,FRAPPIER-BRINTON T, *et al*. A call for systematic research on solute carriers[J]. Cell, 2015, 162(3): 478-487. DOI: 10.1016/j. cell. 2015.07.022.

[30] CAO T Y, ZHANG W Y, WANG Q, *et al*. Cancer *SLC6A6*-mediated taurine uptake transactivates immune checkpoint genes and induces exhaustion in $CD8^+$ T cells[J]. Cell, 2024, 187(9): 2288-2304. e27. DOI: 10.1016/j. cell. 2024.03.011.

[31] GUO C S, YOU Z Y, SHI H, *et al*. SLC38A2 and glutamine signalling in cDC1s dictate anti-tumour immunity[J]. Nature, 2023, 620(7972): 200-208. DOI: 10.1038/s41586-023-06299-8.

[32] HE F, ZHANG P, LIU J L, *et al*. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis[J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 362-377. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.016.

[33] ZHOU Q Y, YU H F, CHEN Y X, *et al*. The $CRL3^{KCTD10}$ ubiquitin ligase-USP18 axis coordinately regulates cystine uptake and ferroptosis by modulating SLC7A11[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(28): e2320655121. DOI: 10.1073/pnas.2320655121.

[34] CHEN Q P, ZHENG W, GUAN J, *et al*. $SOCS_2$-enhanced ubiquitination of SLC7A11 promotes ferroptosis and radiosensitization in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death Differ, 2023, 30(1): 137-151. DOI: 10.1038/s41418-022-01051-7.

[35] WANG Z J, SHEN N, WANG Z A, *et al*. TRIM3 facilitates ferroptosis in non-small cell lung cancer through promoting SLC7A11/xCT K11-linked ubiquitination and degradation[J]. Cell Death Differ, 2024, 31(1): 53-64. DOI: 10.1038/s41418-023-01239-5.

[36] 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 Amry Med Univ, 2024, 46(20): 2313-2321. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202405076.

[37] WANG L, WAN L H, CHEN X, *et al*. Reduced intestinal-to-diffuse conversion and immunosuppressive responses underlie superiority of neoadjuvant immunochemotherapy in gastric adenocarcinoma[J]. MedComm, 2024, 5(11): e762. DOI: 10.1002/mco2.762.

[38] WANG L, SUN M T, LI J Y, *et al*. Intestinal subtype as a biomarker of response to neoadjuvant immunochemotherapy in locally advanced gastric adenocarcinoma: insights from a prospective phase II trial[J]. Clin Cancer Res, 2025, 31(1): 74-86. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-2436.

(**收稿**:2024-06-20;**修回**:2024-10-18)

(编辑 邓强庭)