

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201906003

# 联合应用 RNA-seq 和 ATAC-seq 寻找 FOXQ1 转录因子的下游靶基因

伊梦杰<sup>1,2</sup>, 张锦锦<sup>3</sup>, 郭强<sup>2</sup>, 唐慧<sup>2\*</sup>

(1.昆明理工大学医学院, 昆明 650504; 2.云南省第一人民医院, 昆明理工大学附属医院, 云南省消化内镜临床医学中心, 云南省临床病毒学重点实验室, 昆明市肿瘤分子与免疫防治重点实验室, 昆明 650032;  
3.中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

**摘要:** 结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是一种全球高发的恶性肿瘤, 发病原因复杂且预后较差。近年来发现叉头框 Q1 (Forkhead box Q1, FOXQ1) 基因作为一类核转录因子在结直肠癌中高表达, 可控制下游基因转录活性。本实验拟探究 CRC 细胞中 FOXQ1 的转录调控功能并寻找其下游基因。方法: (1) 构建低表达 FOXQ1 基因的稳态转染 CRC 细胞株; (2) 应用 RNA-seq 检测 FOXQ1 敲低前后表达量显著差异的基因; (3) 应用转座酶可接近性核染色质区域测序分析 (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing, ATAC-seq) 检测 FOXQ1 敲低前后细胞染色质易接近性的变化; (4) 进一步对 FOXQ1 敲低前后的 RNA-seq 和 ATAC-seq 数据进行一系列生物信息学分析, 寻找 CRC 中 FOXQ1 转录调控的潜在下游基因。结果: 应用 RNA-seq 筛选出了敲低 FOXQ1 后表达显著差异的基因 *EI24*、*TLR2*、*SMAD3*, 通过联合分析两细胞系的测序结果, 发现 FOXQ1 基因敲低后, 在 DLD1 和 SW480 两个细胞系中染色质易接近性均增强且表达量均上调的基因有 61 个, 染色质易接近性均减弱且表达量均下调的基因有 70 个, 且 *EI24*、*TLR2*、*SMAD3* 基因均位于重叠分析结果中, 其中 *TLR2*、*SMAD3* 基因的染色质区域有明显变化, 而 *EI24* 基因的染色质区域变化不明显。通过代谢通路分析找到了 *EI24*、*TLR2*、*SMAD3* 基因所富集的代谢通路。其中 *SMAD3*、*TLR2* 基因在炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 通路中显著富集。*EI24* 基因在 p53 信号通路 (p53 signaling pathway) 通路中显著富集。结论: 基于染色质易接近性的变化和转录水平的研究发现: 敲低 FOXQ1 基因对 CRC 细胞系中染色质的开放情况有较大的影响, 且影响 FOXQ1 转录调控的下游基因的表达。找到了 FOXQ1 敲低后在 SW480、DLD1 中均发生变化的基因, 为丰富 FOXQ1 转录因子的下游调控网络提供了研究基础。

**关键词:** ATAC-seq; RNA-seq; 结直肠癌; 靶基因

**中图分类号:** R735.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2019)04-227-10

## Combining ATAC-seq and RNA-seq to find downstream target genes of FOXQ1 transcription factor

YI Mengjie<sup>1, 2</sup>, ZHANG Jinjin<sup>3</sup>, GUO Qiang<sup>2</sup>, TANG Hui<sup>2\*</sup>

(1. Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, China; 2. Kunming Key Laboratory of Cancer Molecular and Immunological Control, Yunnan Provincial Key Laboratory of Virology, Institute of Basic Medical Sciences, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China; 3. Kunming Institute of Zoology. CAS, Kunming 650223, China)

**Abstract:** Colorectal cancer (CRC) is a kind of malignant tumor with high incidence in the world, which has complicated causes and poor prognosis. In recent years, Forkhead box Q1 (FOXQ1) gene has been found to be highly expressed in CRC as a nuclear transcription factor, which can control the transcriptional activity of downstream genes. This study aims to explore the transcriptional regulation function of FOXQ1 in CRC cells and search for its downstream genes. Methods of the study include 1) constructing constructing stable transfected

收稿日期: 2019-06-12; 修回日期: 2019-07-02.

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.81502556, 81860522); 云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人培养基金 (No.D-201642); 云南省临床病毒学重点实验室基金 (No.2018DG010), 昆明市肿瘤分子与免疫防治重点实验室基金 (No.2018-1-A-17334).

**作者简介:** 伊梦杰, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫. E-mail: 15762182860@163.com.

\* **通信作者:** 唐慧, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤免疫. E-mail: htang1122@aliyun.com.

CRC cell lines with knockdown *FOXQ1* gene, 2) applying RNA-seq to detect genes with significant differences in expression level before and after *FOXQ1*, 3) assaying for the Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq) for the determination of Chromatin accessibility in cells before and after *FOXQ1* knockdown; and 4) conducting a series of bioinformatics analysis on the RNA-seq and ATAC-seq data before and after *FOXQ1* knockdown to search for potential downstream genes of *FOXQ1* in CRC. *EI24*, *TLR2*, and *SMAD3* genes were picked out using RNA-seq, which expressed significant difference. Through joint analysis of two cell lines sequencing results, we found that after knocking down *FOXQ1*, there were 61 genes with enhanced chromatin accessibility and up-regulation in both cell lines of DLD1 and SW480, and 70 genes with reduced chromatin accessibility and down-regulated expression. *EI24*, *TLR2*, and *SMAD3* genes were located in the overlapping analysis. The chromatin region of *TLR2* and *SMAD3* genes showed significant changes, while that of *EI24* gene did not change significantly. Metabolic pathways enriched by *EI24*, *TLR2*, and *SMAD3* genes were found by metabolic pathway analysis. *SMAD3* and *TLR2* genes were significantly enriched in the Inflammatory Bowel Disease (IBD) pathway, and *EI24* gene was significantly enriched in the p53 signaling pathway. Based on the changes in chromatin accessibility and transcriptional levels, it was found that knocking down the *FOXQ1* gene had a great effect on the chromatin opening in CRC cell lines and it influenced the expression of downstream genes for *FOXQ1* transcriptional regulation. Genes that changed in SW480 and DLD1 after *FOXQ1* knockdown were found, which provides a research basis for enriching the downstream regulatory network of *FOXQ1* transcription factors.

**Keywords:** ATAC-seq; RNA-seq; Colorectal cancer; Target genes

结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)是一种由多致病因素导致且预后很差的恶性消化道肿瘤,是世界第三大常见肿瘤,其死亡率在所有癌症中居于第四位(位于肺癌、肝癌、胃癌之后)<sup>[1]</sup>。叉头框 Q1 (Forkhead box Q1, *FOXQ1*)是叉头框(Forkhead box, *FOX*)基因家族的成员之一,基因定位于 6p23-25, 编码含 403 个氨基酸的 *FOXQ1* 蛋白,作为一类核转录因子,可以稳定结合到靶基因启动子区域的 GC 盒等核心元件,控制下游基因转录活性从而发挥生物效应<sup>[2]</sup>。2010 年 Kaneda 等<sup>[3]</sup>研究发现 *FOXQ1* 在 CRC 中异常高表达,近年来大量研究亦证实 *FOXQ1* 在卵巢癌、乳腺癌、膀胱移行细胞癌、胃癌、肝癌、非小细胞肺癌和神经胶质瘤等多种肿瘤中异常表达<sup>[4-6]</sup>,与多种肿瘤的发生、发展密切相关,在许多肿瘤中具有明确的促肿瘤生长转移的功能。因此,鉴定新的 *FOXQ1* 下游靶基因,丰富由 *FOXQ1* 参与并介导的信号通路信息,有望为肿瘤的靶向治疗提供新的靶点。

ATAC-seq 是一种检测染色质易接近性的测序方法,可以检测样本间染色质易接近性的变化情况。ATAC-seq 只需要很少的细胞(50 000 个)就能检测基因组中所有活跃的调控序列<sup>[7]</sup>,DNA 探针(作为转座子发挥作用)通过酶促反应(转座酶 Tn5)被整合到基因组的开放区域,然后通过测序来鉴定这些区域<sup>[8]</sup>。本实验联合应用 RNA-seq 与 ATAC-seq 寻找由 *FOXQ1* 敲低引起的染色质易接近性改变所导致的表达改变基因,即 *FOXQ1* 转录因子调控的潜在

下游基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、仪器和试剂

本实验所用细胞系均购于中科院上海细胞库,DMEM 高糖培养液、RPMI 1640 培养液购于美国 Corning 公司,胎牛血清购于美国 Gibco 公司。Puromycin 购于北京索莱宝科技有限公司,*FOXQ1* 一抗购于 abcam 公司,HRP-Rb-anti-goat 二抗购于 Cell Signaling Technology 公司, $\beta$ -actin 一抗、HRP-goat-anti-mouse 二抗均购于 Proteintech 公司。RNazol RT RNA Isolation Reagent 购于美国 MRC 公司,引物由宝生物工程(上海)有限公司合成。核酸定量仪为 Thermo 公司产品,LightCycler 480 实时荧光定量仪为 Roche 公司产品,WB 垂直基础电泳仪为伯乐公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组

根据课题组前期工作并结合文献报道,选取在 CRC 细胞系中 *FOXQ1* 表达量较高的 SW480 和 DLD1 细胞系进行 *FOXQ1* 基因的敲低实验,实验分为两组共 4 株细胞。*FOXQ1* 基因敲低组:SW480-sh*FOXQ1* 和 DLD1-sh*FOXQ1*; 对照组:SW480-shControl 和 DLD1-shControl。

#### 1.2.2 *FOXQ1* 基因低表达稳定细胞系的构建

##### 1.2.2.1 慢病毒表达质粒的构建、筛选与扩增

根据 *FOXQ1* 序列,得到 siRNA 靶序列,设计合

成3对 shRNA 干扰序列(见表1),命名为 shRNA-A、shRNA-B、shRNA-C,并设计一条对照序列 shRNA-control;应用 Addgene 的 pSPAX2 慢病毒包装系统,PLKO.1-puro-shFOXQ1 质粒包装构建获得

lenti-shFOXQ1 慢病毒,每组重组质粒经测序鉴定无误后,用去内毒素大提试剂盒提取质粒,测浓度;酶切鉴定无误后,在 HEK293T 细胞中扩增,之后用 LB 培养基筛选、扩增<sup>[9]</sup>。

表1 shRNA 引物序列  
Table 1 shRNA primer sequences

The name of the primer	Base sequence (5' to 3')
shRNA-A F	CCGGCTCCATCAAACGTGCCTTACTCGAGTAAGGCACGTTTGATGGAGTTTTTG
shRNA-A R	AATTCAAAACTCCATCAAACGTGCCTTACTCGAGTAAGGCACGTTTGATGGAG
shRNA-B F	CCGGCTATTGACCGATGCTTCACTCGAGTGAAGCATCGGTCAATAGCTTTTTG
shRNA-B R	AATTCAAAAAGCTATTGACCGATGCTTCACTCGAGTGAAGCATCGGTCAATAGC
shRNA-C F	CCGGCTTGAAGCAAGTGTGATTCTCGAGAATCACACTTGCTTCAAGTTTTTG
shRNA-C R	AATTCAAAACTGAAAGCAAGTGTGATTCTCGAGAATCACACTTGCTTCAAGAA

### 1.2.2.2 慢病毒的感染及阳性细胞的筛选

将待感染的 SW480 和 DLD1 细胞铺在 24 孔板中培养,生长密度达 70%~80%时将病毒浓缩液加至细胞中,培养 12~15 h 后更换为完全培养基。待细胞长满时,将 24 孔板中的细胞传代至六孔板中进行初步扩大培养,并加入含有 1 μg/ml 嘌呤霉素的培养基筛选阳性细胞。筛选获得的阳性细胞分别应用 qRT-PCR 和 WB 在 mRNA 和蛋白水平验证 FOXQ1 基因的敲低效率<sup>[10]</sup>。

### 1.2.3 RNA-seq

#### 1.2.3.1 收集细胞

将稳定转染的细胞传代培养稳定生长后,分别收集生长状态良好的 DLD1、SW480 基因敲低组与对照组细胞进行后续 RNA-seq 实验。

#### 1.2.3.2 RNA 的提取和检测

提取基因敲低组与对照组细胞总 RNA,用 Nanodrop 2000 检测所提总 RNA 的浓度和纯度后用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,最后利用 Agilent 2100 测定 RIN 值。

#### 1.2.3.3 RNA 的富集和测序

使用结合有 poly-T 寡核苷酸的磁珠从总 RNA 中分离出含有 poly-A 的 mRNA,加入片段化缓冲剂将其打成片段,将片段化的 mRNA 逆转录成 cDNA 并纯化;经末端修复、poly-A 添加、测序接头连接及 AMPure XP beads 筛选后得出大小合适的片段,进行 PCR 扩增,建立测序文库并进行文库质检<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.3.4 上机测试。

对构建合格的测序文库进行双末端(Paired-end)测序,本测序实验组和对照组均设置了三次生物学重复,测序工作由上海嘉因生物科技有限公司完成。

#### 1.2.3.5 RNA-seq 的数据分析

RNA-seq 数据下机后首先进行空载去除、接头去除等数据预处理后产出原始数据,紧接着利用

FastQC 软件进行数据质量控制,利用生物信息学软件 STAR、HTSeq 和 DESeq2 对测序结果进行参考序列比对、表达量统计、差异基因筛选等分析<sup>[12-14]</sup>,并通过 R 软件绘制基因聚类分析图、火山图等。分别建立 DLD1 和 SW480 细胞 FOXQ1 敲低前后的转录谱。

### 1.2.4 ATAC-seq

#### 1.2.4.1 收集细胞

分别收集 DLD1、SW480 基因敲低组和对照组细胞,计数 50 000 个细胞,离心去上清后依次用预冷的 PBS、lysis buffer 悬浮细胞 500g,4 °C 离心去除上清液,立即进行转座反应<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.4.2 转座反应与纯化

确保细胞始终置于冰上,配置转座反应体系悬浮细胞,37 °C 孵育 30 min,立即用 Qiagen MinElute PCR Purification Kit 纯化 DNA,之后用 10 μl elution buffer 洗脱。

#### 1.2.4.3 PCR 扩增

配置 PCR 反应体系循环扩增,之后用 Qiagen MinElute PCR Purification Kit 纯化 DNA<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.4.4 上机测试

库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求合并后进行 Illumina HiSeq 测序。测序基于边合成边测序(Sequencing by Synthesis)的原理进行,在序的流动池中加入四种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增,在每一个测序簇延伸互补链时,每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光,测序仪通过捕获荧光信号,并通过计算机软件将光信号转化为测序峰,从而获得待测片段的序列信息。本测序实验由上海嘉因生物科技有限公司完成。

#### 1.2.4.5 ATAC-seq 的数据分析

首先对 ATAC-seq 下机数据进行预处理,如



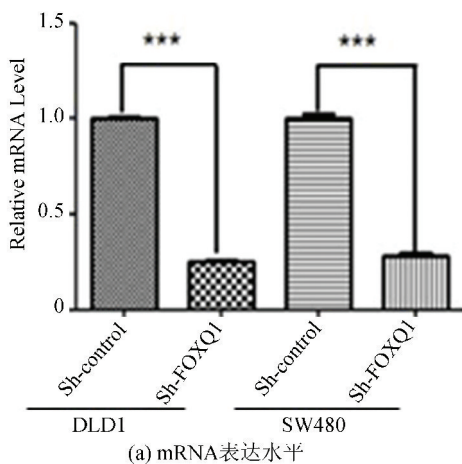
FastQC 质量控制, 去除 duplicate sequences, 去除 blacklist reads<sup>[16]</sup>, 原始序列比对, 比对后去除重复序列和细胞器序列等, 再利用生物信息学软件 BWA、Macs2、Homer、Deep tools 等对 ATAC-seq 测序结果进行参考序列比对分析、差异结合位点检测、特征峰在全基因组上的分布注释等, 建立 DLD1 和 SW480 细胞 FOXQ1 敲低前后的染色质易接近性变化图谱。

### 1.2.5 RNA-seq 和 ATAC-seq 数据的关联分析

分别将 DLD1 和 SW480 两个细胞系中 RNA-seq 的差异基因和 ATAC-seq 的差异表达峰进行关联分析, 得到两组关联分析结果, 以明确两组细胞中染色质易接近性变化区域对下游基因的调控功能, 并找出每种细胞实验组与对照组相比差异染色质易接近性区域可能调控的下游基因。

### 1.2.6 两个细胞系关联分析数据的重叠分析

从 DLD1 和 SW480 的关联分析结果中找出两细胞共有的重叠部分, 即获得 FOXQ1 敲低后引起的染色质易接近性改变所导致的表达改变基因。



### 1.2.7 代谢通路分析

将重叠分析结果中所获基因基于代谢通路数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行代谢通路注释, 得到注释基因参与的所有代谢通路名称, 采用 Fisher 检验计算代谢通路的显著性水平 ( $P < 0.05$ ), 从而筛选出注释基因富集的显著性代谢通路<sup>[17]</sup>。

## 2 结果分析

### 2.1 在 mRNA 和蛋白水平验证 DLD1 和 SW480 细胞中 FOXQ1 的敲低效率

qRT-PCR 和 WB 实验结果 (见图 1) 表明成功构建了 FOXQ1 基因敲低组 DLD1-sh-FOXQ1、SW480-sh-FOXQ1 以及对照组 DLD1-sh-Control 和 SW480-sh-Control。FOXQ1 基因敲低组在 mRNA 和蛋白水平与对照组相比 FOXQ1 基因的表达量均显著降低 ( $*** P < 0.001$ )。

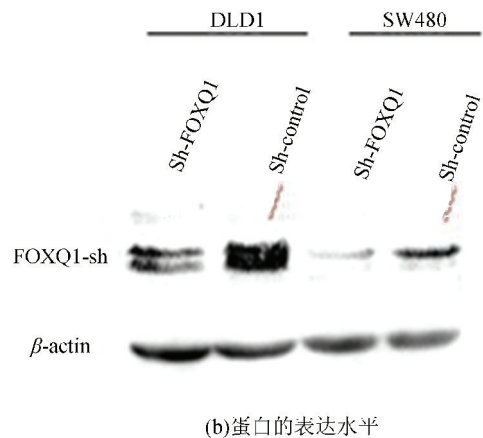


图 1 稳定低表达 FOXQ1 的 DLD1 和 SW480 细胞验证 ( $*** P < 0.001$ )

Fig.1 Verification of the FOXQ1 expression quantity in DLD1 and SW480 cells which knock down FOXQ1 gene steadily ( $*** P < 0.001$ )

### 2.2 RNA-seq

RNA-seq 结果表明, DLD1 细胞 FOXQ1 基因敲低组与对照组相比表达显著上调的基因有 215 个, 表达显著下调的基因有 131 个; SW480 细胞 FOXQ1 敲低组与对照组相比表达显著上调的基因有 171 个, 表达显著下调的基因有 358 个 (表达差异基因的筛选阈值为  $FDR < 0.05$ ,  $\log_2 FC > 1$ )。对这些表达显著差异基因进行分析, 发现在 FOXQ1 基因敲低后, 与侵袭、自噬相关的 *EI24* 基因在表达下调基因中位居前列, 与先天免疫应答和炎症反应相关的 *TLR2* 基因以及与迁移相关的 *SMAD3* 基因在表达上调的基因中位居前列。推测这些基因的表达改变与 CRC 的发生、侵袭、发展等密切相关, 将进一步结合

ATAC-seq 分析这几种基因在 FOXQ1 敲低后, 染色质开放区域的变化情况 (见图 2)。

### 2.3 ATAC-seq

ATAC-seq 结果表明 DLD1-shFOXQ1 组有 39 146 个特征峰, DLD1-shControl 组有 49 381 个特征峰, 其中, 基因敲低组与对照组相比染色质易接近性增强的差异表达峰有 2 385 个, 染色质易接近性减弱的差异表达峰有 6 205 个。SW480-shFOXQ1 组有 38 962 个特征峰, SW480-shControl 组有 42 244 个特征峰, 其中, 基因敲低组与对照组相比染色质易接近性增强的差异表达峰有 4 563 个, 染色质易接近性减弱的差异表达峰有 3 733 个 (见图 3)。



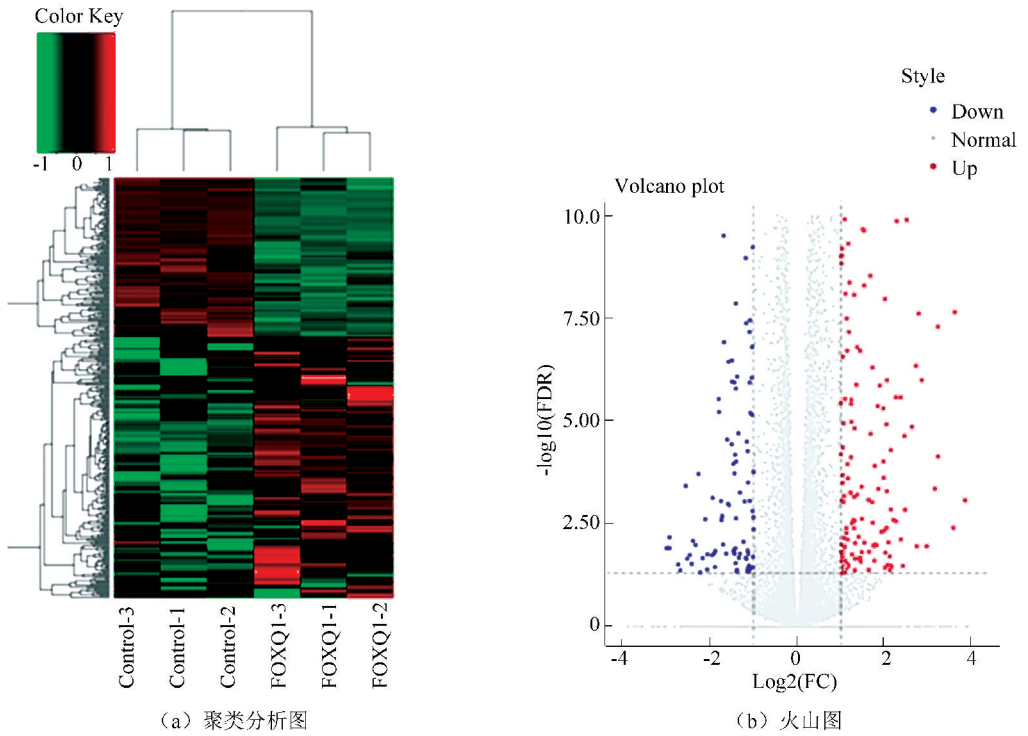


图 2 RNA-seq 基因聚类分析和火山图

Fig.2 RNA-seq cluster analysis and volcano map

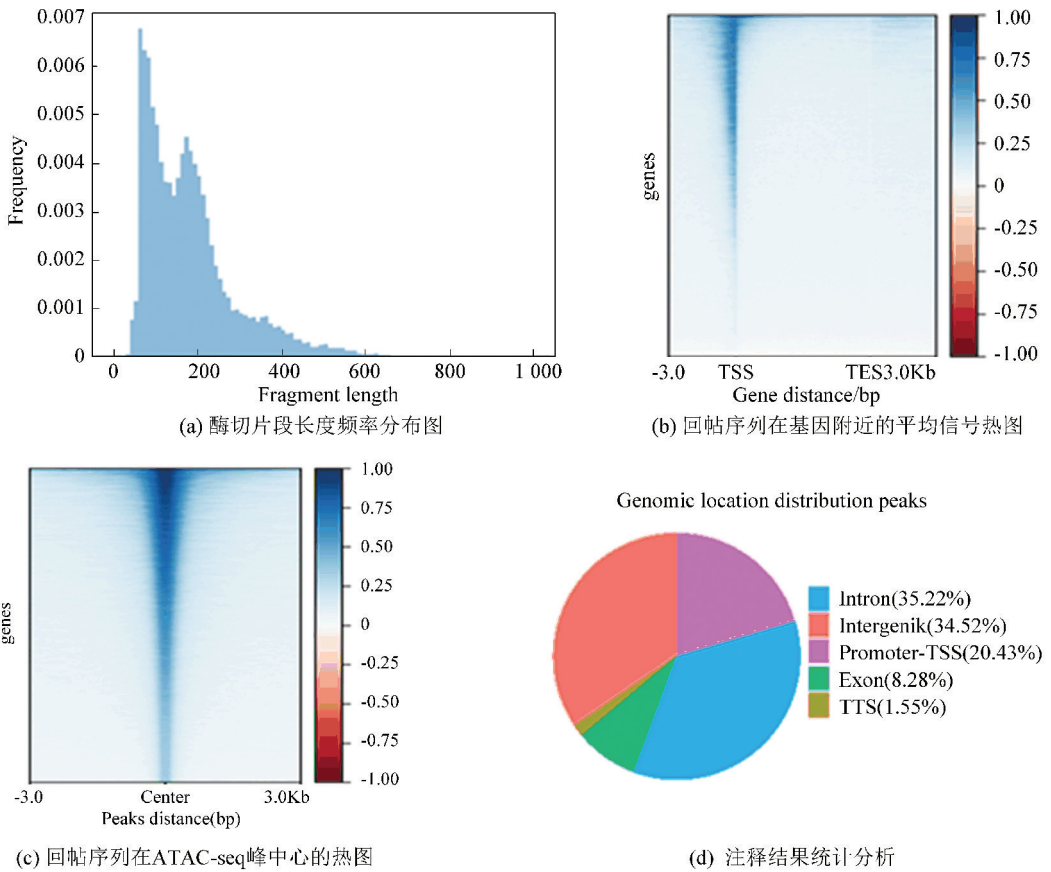


图 3 ATAC-seq 分析图

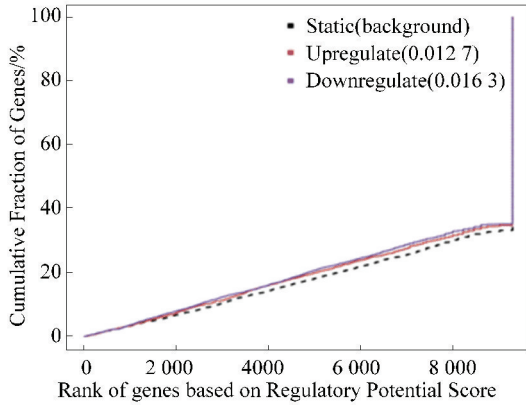
Fig.3 ATAC-seq analysis

注:(a)左侧最高峰代表无核小体片段,对应开放的染色质区域,右侧是单核小体峰,同时具有非核小体片段和单核小体片段说明数据质量好;(b)回帖序列主要富集在转录起始区(TSS);(c)ATAC-seq 序列主要富集在峰中心附近,说明数据良好;(d)将注释结果在全基因组功能性区域上的分布进行统计分析,根据其分布了解结合位点可能具有的功能。

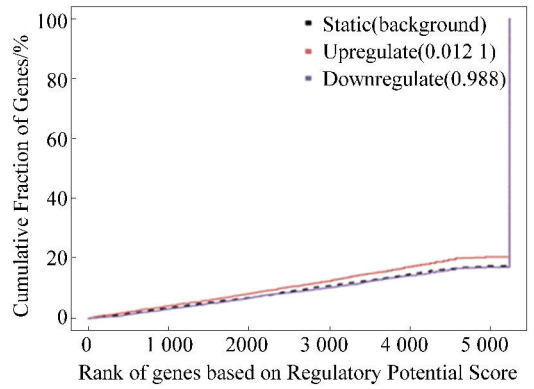
## 2.4 RNA-seq 与 ATAC-seq 的关联分析

本实验将 RNA-seq 结果中的差异基因和 ATAC-seq 结果中差异染色质开放区域进行关联分析,预测由 *FOXQ1* 基因敲低所导致的染色质开放区域改变引起的转录因子的结合能力的改变,及最终导致下游基因的表达上调或下调。结果显示,DLD1

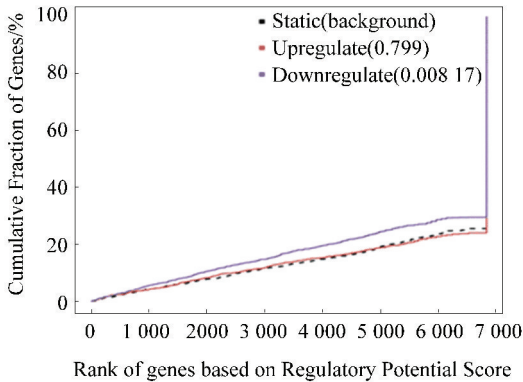
染色质易接近性减弱区域对下游基因表达具有抑制作用(见图 4(a));染色质易接近性增强区域对下游基因表达具有促进作用(见图 4(b))。在 SW480 细胞中也观察到相同的结果(见图 4(c)、图 4(d))<sup>[4]</sup>。



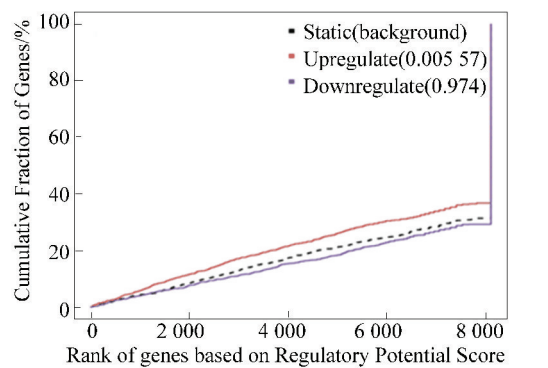
(a) DLD1 染色质易接近性减弱区域对下游基因的表达具有抑制作用



(b) DLD1 染色质易接近性增强区域对下游基因的表达具有促进作用



(c) SW480 染色质易接近性减弱区域对下游基因的表达具有抑制作用



(d) SW480 染色质易接近性增强区域对下游基因的表达具有促进作用

图 4 染色质功能预测

Fig.4 Prediction of chromatin function

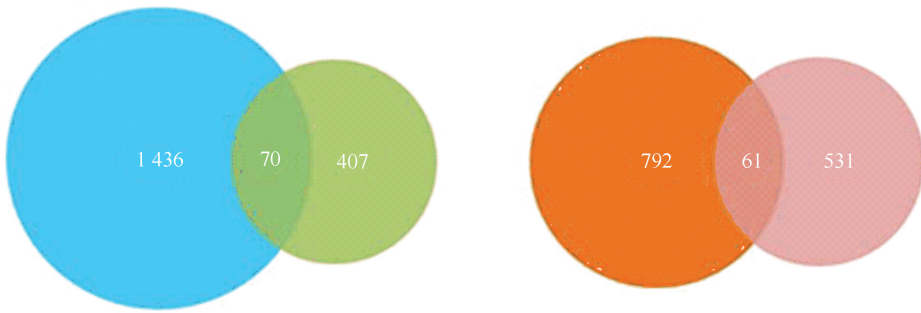
注:红线代表上调基因,紫线代表下调基因,黑色虚线代表没有表达改变的基因作为背景。

## 2.5 SW480 与 DLD1 关联分析结果的重叠分析

将两个细胞系的关联分析结果基因进行重叠分析。重叠部分为在两种细胞中染色质易接近性变化相同且调控的表达量变化趋势相同的基因。其中,DLD1 细胞系中染色质易接近性减弱区域调控的下调基因有 1 436 个,SW480 细胞系中染色质易接近性减弱区域调控的下调基因有 407 个(见图 5),两细胞系染色质易接近性减弱区域共同调控的表达下调基因有 70 个。DLD1 细胞系中染色质易接近性增强区域调控的上调基因有 792 个,SW480 细胞系中染

色质易接近性增强区域调控的上调基因有 531 个(见图 5),两细胞系染色质易接近性增强区域共同调控的表达上调基因有 61 个。

在这两个细胞的交集基因中发现 *EI24*、*TLR2*、*SMAD3* 基因也在其中,所以观察这些基因在染色质易接近性方面发生的变化(见图 6~图 8)。其中,*TLR2*、*SMAD3* 基因在 ATAC-seq 数据中基因敲低组与对照组相比染色质区域有较为明显的变化,而 *EI24* 基因的染色质区域变化很弱。



- Down regulated genes affected by DLD1 chromatin accessibility weakened area
- Down regulated genes affected by SW480 chromatin accessibility weakened area
- Up regulated genes affected by DLD1 chromatin accessibility weakened area
- Up regulated genes affected by SW480 chromatin accessibility weakened area

图 5 SW480 与 DLD1 关联分析结果的重叠分析

Fig.5 Overlapping analysis of correlation analysis results in SW480 and DLD1

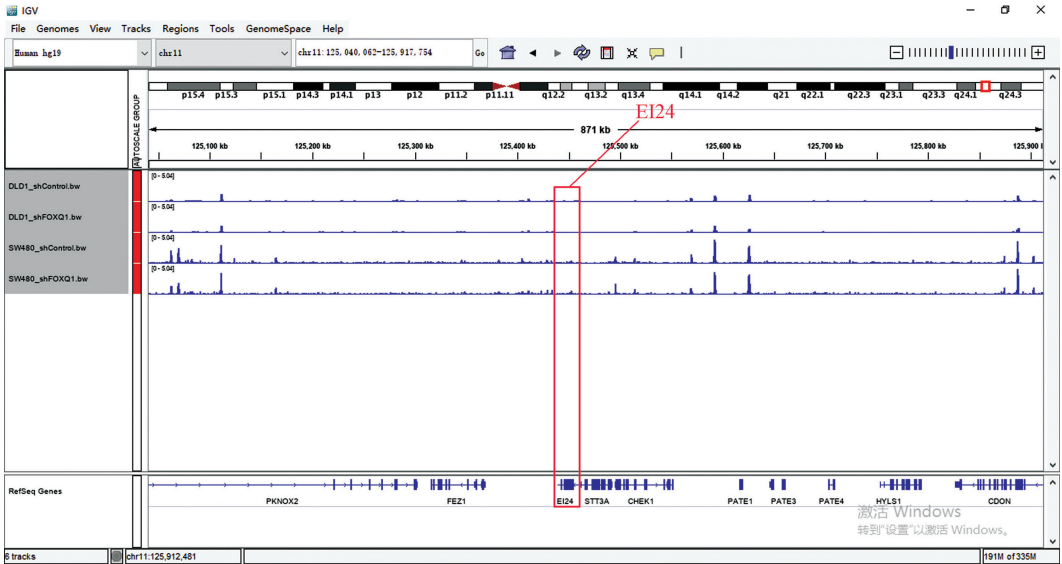


图 6 ATAC-seq E124 基因比对

Fig.6 ATAC-seq E124 genome comparison

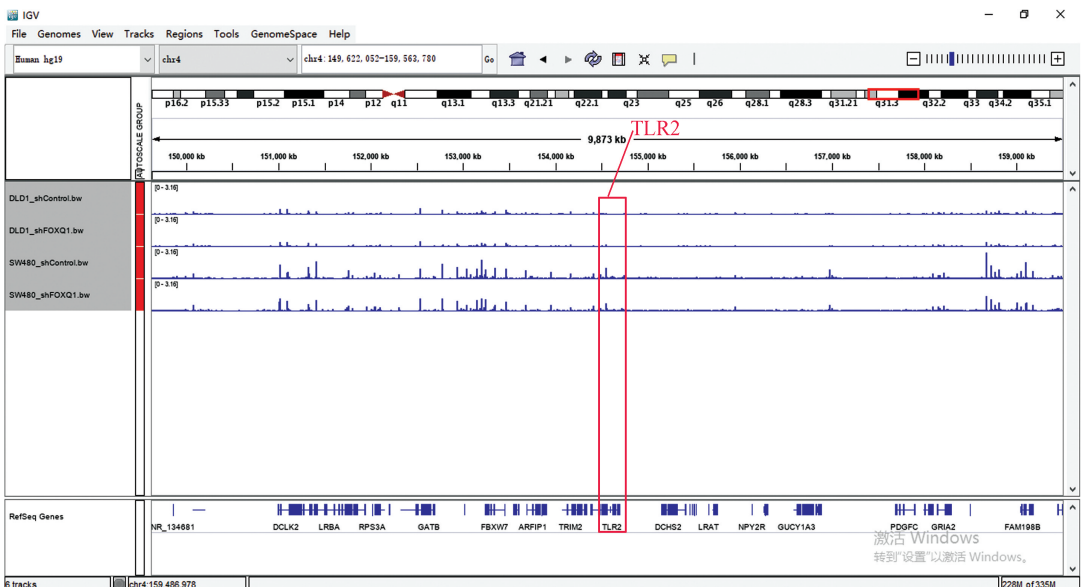


图 7 ATAC-seq TLR2 基因比对

Fig.7 ATAC-seq TLR2 genome comparison



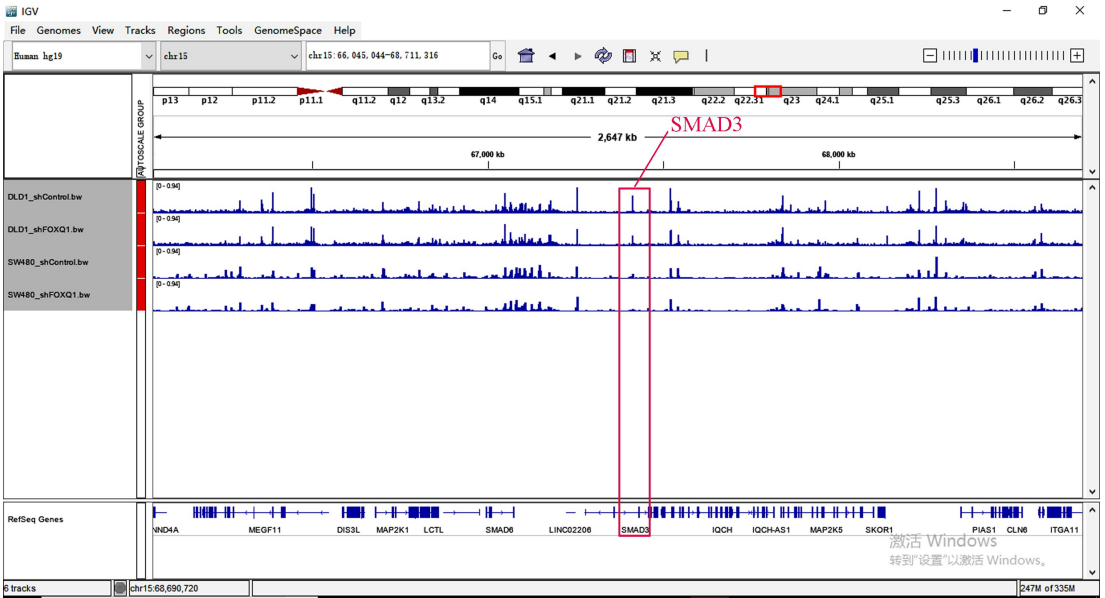
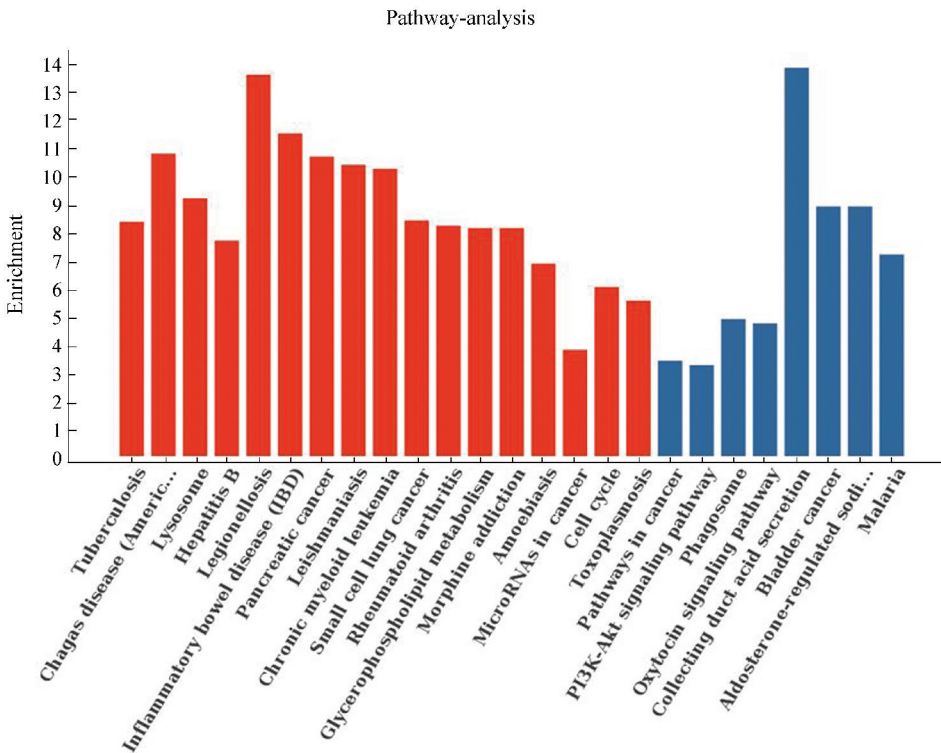


图 8 ATAC-seq *SMAD3* 基因比对  
Fig.8 ATAC-seq *SMAD3* genome comparison

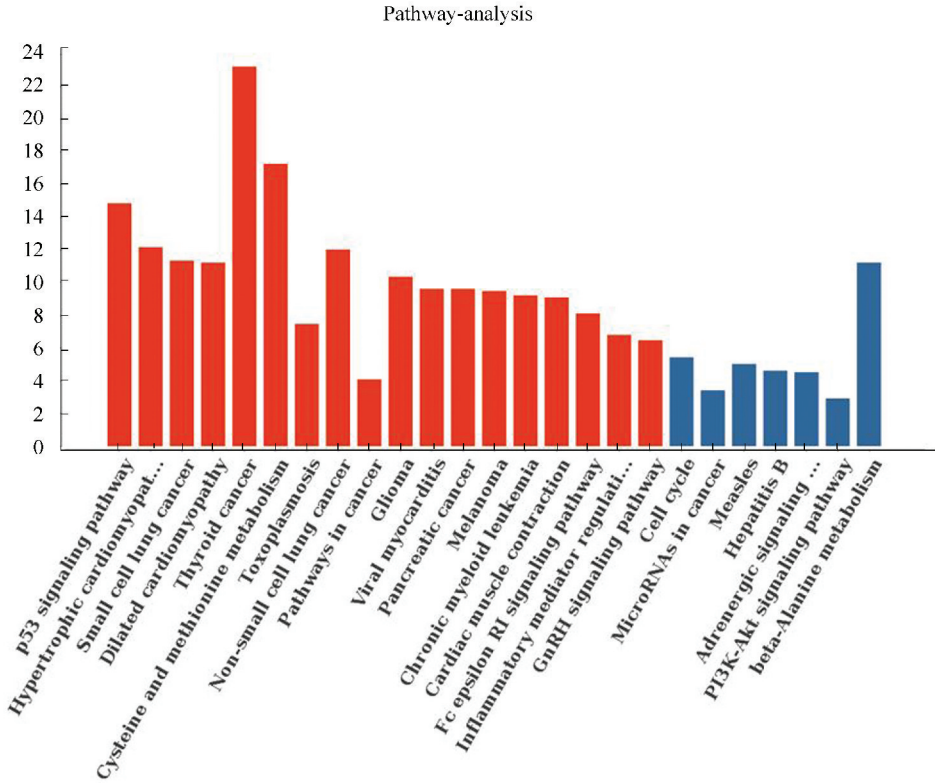
### 2.6 代谢通路分析

将两个细胞系的重叠基因进行代谢通路分析, 结果表明染色质易接近性增强区域调控的表达上调基因显著性富集的代谢通路包括炎症性肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD)、甘油磷脂代谢通路 (Glycerophospholipid metabolism)、细胞周期代谢通路 (Cell cycle) 等。其中 *SMAD3*、*TLR2* 基因显著

性富集在 IBD 代谢通路 (见图 9(a))。染色质易接近性减弱区域调控的表达下调基因显著性富集的代谢通路包括 p53 信号通路 (p53 signaling pathway)、TRP 通道炎症调控通路 (Inflammatory mediator regulation of TRP channels)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路 (Cysteine and methionine metabolism) 等。EI24 基因显著性富集在 p53 信号通路 (图 9(b))。



(a) 染色质易接近性增强区域调控的上调基因的代谢通路分析



(b) 染色质易接近性减弱区域调控的下调基因的代谢通路分析

图 9 代谢通路分析

Fig.9 Metabolic pathway analysis

注:红色代表具有显著性(P<0.05)蓝色代表不具有显著性(P>0.05),横坐标代表代谢通路名称,纵坐标代表富集程度。

有研究表明,患有 IBD 的患者与健康人群相比患结直肠癌的风险更高<sup>[18-19]</sup>,当肠道系统与其微生物群之间的关系(包括屏障功能、免疫信号和代谢物)受到干扰后引起的慢性炎症是其发病的主要潜在原因<sup>[20]</sup>。其次,在 CRC 中 P53 信号通路也是一种重要的信号通路,p53 抑癌基因突变是导致 CRC 发生的最主要原因之一,同时也是结直肠癌侵袭和转移的原因之一,还有研究认为 p53 突变在腺瘤-癌转移过程中也发挥重要作用<sup>[21]</sup>。进一步研究 IBD、P53 信号通路在 CRC 发生发展中的作用将具有重要意义。

### 3 讨论

一般来说,染色质有“关闭”“开放”两种状态,处于“关闭”状态的染色质,在异染色质蛋白以及修饰酶的作用下,被包装成致密、紧凑的结构,阻遏转录因子等蛋白的结合,此时染色质处于沉默失去生物功能的阶段;而处于“开放”状态的染色质,具有不

太紧密的结构,可招募转录因子等蛋白的结合,进而调控基因的表达水平。ATAC-seq 作为一种绘制全基因组染色质可及性图谱的方法<sup>[8]</sup>,利用超活性 Tn5 转座酶检测染色质的可接近性,是本实验的重要研究手段之一<sup>[7]</sup>。通过对 ATAC-seq 和 RNA-seq 数据的分析,初步确定了 FOXQ1 基因敲低后发生差异表达的基因,丰富了 FOXQ1 转录因子的下游调控网络。

### 参考文献(References)

[1]INÉS M, CRISTINA S D D, PRADILLA D A, et al. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(1): 197-236. DOI:10.3390/ijms18010197.

[2]BIELLER A, PASCHE B, FRANK S, et al. Isolation and characterization of the human forkhead gene FOXQ1 [J]. DNA & Cell Biology, 2001, 20(9): 555-561. DOI:10.1089/104454901317094963.

[3]HIROYASU K, TOKUZU A, KAORU T, et al. FOXQ1 is

- overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(5): 2053–2063. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2161.
- [4] WANG S, SUN H, MA J, et al. Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(12): 2502–2515. DOI: 10.1038/nprot.2013.150.
- [5] GAO M, SHIH I M, WANG T L. The role of forkhead box Q1 transcription factor in ovarian epithelial carcinomas [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(11): 13881–13893. DOI:10.3390/ijms131113881.
- [6] ZHANG H, MENG F, LIU G, et al. Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis [J]. *Cancer Research*, 2011, 71(4): 1292–1301. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2825.
- [7] POTT S, LIEB J D. Single-cell ATAC-seq: Strength in numbers [J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 172. DOI:10.1186/s13059-015-0737-7.
- [8] BUENROSTRO J D, WU B, CHANG H Y, et al. ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide [J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2015, 109(1): 21.9.1–21.9.9. DOI: 10.1002/0471142727.mb2129s109.
- [9] 白璇, 唐慧, 郎丰超, 等. 慢病毒表达载体的构建及沉默 FOXQ1 基因在大肠癌细胞系 DLD-1 种的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(19): 2752–2757. DOI: 10.11569/wjcd.v22.i19.2752.
- BAI Xuan, TANG Hui, LANG Fengchao, et al. Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of FOXQ1 gene in colorectal cancer cell line DLD-1 [J]. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2014, 22(19): 2752–2757. DOI:10.11569/wjcd.v22.i19.2752.
- [10] 刘捷, 施露露, 刘春燕, 等. 慢病毒载体沉默 ADAMTS6 人非小细胞肺癌稳转株的构建 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(8): 1401–1406. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.001.
- LIU Jie, SHI Lulu, LIU Chunyan, et al. Construction of ADAMTS6 stable knockdown non-small cell lung cancer cell line using lentiviral vector [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 19(8): 1401–1406. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.001.
- [11] 李露双, 董文慧, 丁兴萃, 等. 麻竹笋转录组测序及苦涩味物质合成基因差异表达分析 [J]. *林业科学研究*, 2018, 31(4): 38–46. DOI: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.04.006.
- LI Lushuang, DONG Wenhui, DING Xingcui, et al. Transcriptome sequencing and differential expression analysis of bitter and astringent substances biosynthesis related gene in dendrocalamus latiflorus [J]. *Forest Research*, 2018, 31(4): 38–46. DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.04.006.
- [12] CHEN G, SHI T, SHI L. Characterizing and annotating the genome using RNA-seq data [J]. *Science China-life Sciences*, 2017, 60(2): 116–125. DOI:10.1007/s11427-015-0349-4.
- [13] DOBIN A, DAVIS C A, SCHLESINGER F, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- [14] ANDERS S, PYL P T, HUBER W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(2): 166–169. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- [15] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550. DOI:10.1186/s13059-014-0550-8.
- [16] 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]. *Nature Methods*, 2017, 14(10): 959. DOI:10.1038/nmeth.4396.
- [17] GUO Y, YE F, SHENG Q, et al. Three-stage quality control strategies for DNA re-sequencing data [J]. *Briefings in bioinformatics*, 2014, 15(6): 879–889. DOI: 10.1093/bib/bbt069.
- [18] DRAGHICI S, KHATRI P, TARCA A L, et al. A systems biology approach for pathway level analysis [J]. *Genome Research*, 2007, 17(10): 1537. DOI:10.1101/gr.6202607.
- [19] PULUSU S S R, LAWRENCE I C. Dysplasia and colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease [J]. *Expert Review Gastroenterology Hepatology*, 2017, 11(8): 711–722. DOI:10.1080/17474124.2017.1327347.
- [20] YANG Y, JOBIN C. Novel insights into microbiome in colitis and colorectal cancer [J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2017, 33(6): 422–427. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000399.
- [21] LI X L, ZHOU J, CHEN Z R, et al. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(1): 84–93. DOI:10.3748/wjg.v21.i1.84.