

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.037

单细胞测序技术在肿瘤基础研究中的应用*

陈 诚¹, 杨 军²综述, 董 坚^{2△}审校

(1. 昆明医科大学第一临床学院, 昆明 650031; 2. 昆明医科大学第一附属医院肿瘤内科, 昆明 650032)

关键词: 肿瘤; 基础研究; 临床研究; 单细胞测序

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)32-4374-03

随着人类基因组计划(human genome project, HGP)和国际人类基因组单体型图计划(the international HapMap project)的完成以及高通量生物芯片技术的成功研发, 以全基因组测序为目标的基因组结构初步分析已经完成。研究发现, 肿瘤是在细胞水平的恶性克隆, 同时, 恶性肿瘤细胞通过对自身的不断的“改良”以适应宿主各种环境。从进化上来说, 能够引发恶性肿瘤的细胞即所谓“成功”的肿瘤细胞, 其具备将遗传模板传递给下一代肿瘤细胞的能力, 而能够引致远处转移的恶性肿瘤细胞其自身必定带有其他肿瘤细胞亚群所不具备的信息。因此, 在单克隆水平去分析这些肿瘤克隆的发生、发展、转移等, 有可能揭示恶性肿瘤产生的具体机制。由于恶性肿瘤本身的异质性, 在原发灶的肿瘤细胞群可能是由具备血管生成、侵袭能力、转移特性等不同方面的能力或是具备多功能的细胞亚群所组成。目前普遍认为, 倾向于发生远处转移的一些细胞亚群在亲代肿瘤中已然存在, 不同的转移灶可从不同的单个细胞增生而来, 并且这些发生转移的细胞亚群受多重机制的调控。如果能够以单个细胞进行整个全基因组范围的分析, 不仅取材更经济, 更重要的是细胞可能达到真正的纯化, 实验所得结果更精确也更可靠。因此, 探索单个肿瘤细胞的遗传信息并对其进行分析成为肿瘤基础研究人员梦想。

2011年, 由纽约冷泉港实验室、德州大学安德森癌症研究中心开发并报道单细胞测序技术(single cell sequencing, SNS), 该技术能够突破传统癌症基因组研究的如混合样品测序无法判断具体突变来源及频率, 无法解释癌症的发生、发展以及演化过程中的细节, 难以区分主动与被动突变; 细胞系测序无法除去体外培养时产生的新突变等问题^[1]。目前, 对于恶性肿瘤单细胞测序已应用于神经胶质瘤、肾癌、血液肿瘤等恶性肿瘤的发病机制等的研究, 同时, 也有研究者将该技术应用用于乳腺癌转移机制方面的研究^[2-4]。将单细胞的纯化技术联合单细胞测序技术应用于肿瘤的相关机制研究必将能够取得突破性进展。

1 单细胞测序技术的原理

单细胞测序主要包括单细胞基因组测序和转录组测序, 通过对单个细胞内的 DNA 和 RNA 进行序列分析, 分别揭示单个细胞的基因组和转录组的变化情况。单细胞全基因组测序是对选定的目的细胞的全部基因组序列进行非选择性、均匀扩增, 随后利用外显子捕获技术进而高通量测序。单细胞转录组测序是利用高通量测序技术进行 cDNA 测序, 从而获取特定器官或组织在某一状态下的几乎所有转录本, 主要用于在全基因组范围内挖掘基因调节网络, 尤其适用于存在高度异质性的

干细胞及胚胎发育早期的细胞群体。与活细胞成像系统相结合, 单细胞转录组分析更有助于深入理解细胞分化、细胞重编程及转分化等过程及相关的基因调节网络。

2 单细胞分离技术

2.1 单细胞分离的重要性 既往关于肿瘤的相关机制的研究中, 研究样本主要来源于在体外培养的肿瘤细胞系以及患者的肿瘤标本。由于样本采集及单细胞分离技术受限的原因, 几乎所有的癌症基因组研究结果都来自包含多种不同细胞群(包括肿瘤细胞及其他正常细胞亚群等)的肿瘤样本, 混杂的细胞中掺杂许多干扰信号, 导致目标肿瘤细胞亚群内那些包含有与肿瘤发生、浸润或转移相关的信号可能被平均化甚至被无限稀释。为了尽可能的获得单个细胞用于肿瘤基因组学研究, 研究人员开展了一系列的细胞纯化技术并进行优化。目前, 对于单细胞的分离技术主要两大类: (1) 基于细胞培养以达到单个细胞分离的目的; (2) 分离技术是基于仪器的单个细胞的分选。

2.2 基于培养的方法 (1) 有限稀释法: 主要是针对肿瘤细胞系进行单个肿瘤细胞的分选, 将细胞配制成系列浓度梯度的细胞悬液, 接种于 96 孔板等培养器皿中, 从而使某些孔中只有 1 个细胞。由于操作费时, 且无法保证对单个肿瘤细胞的分离和纯化, 因此, 不能大规模开展。(2) 软琼脂培养法: 其主要应用于新鲜采集的肿瘤标本内单个肿瘤细胞的筛选, 利用实体瘤细胞能在软琼脂上生长并形成克隆的原理, 可将少量的肿瘤细胞从大多数非恶性细胞内分离出来。目前, 由 Cell Biolabs 公司的开发的克隆原性肿瘤细胞分离试剂盒(clonogenic tumor cell isolation kit, CytoSelect)能够将单个肿瘤细胞进行分离纯化, 达到单细胞分离的需求。

2.3 基于仪器分选的方法 (1) 单细胞显微操作法: 利用玻璃针头等高倍镜下进行细胞分选, 该方法获取细胞数量少, 且操作难度大、易损伤目的细胞, 因此难以应用于大规模实验研究中。(2) 流式细胞仪分选细胞: 通过超声波使样本细胞团分散成单个细胞, 使带不同电荷的细胞经过电场偏向不同方向, 或是通过荧光标记目的细胞进行分选, 从而达到分选以及获取单个细胞的目的, 该技术分离迅速, 纯度高。(3) 激光捕获显微切割: 在组织切片上覆盖一层透明的膜, 显微镜下选择目的细胞后, 利用脉冲式红外激光束使膜熔化, 冷却后该位置的细胞牢固地黏附在膜上面, 从而实现细胞分离, 利用该方法可方便、确定分离靶细胞。(4) 免疫磁珠分离: 其原理是基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合, 在外加磁场中, 与磁珠相连的带有表面抗原的细胞被吸附而滞留在磁场中, 不能与磁珠连接着的细胞不在磁场中停留, 从而使目的细胞得以分

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160245); 云南省科学技术联合专项(2010FB)。 作者简介: 陈诚(1986—), 在读硕士, 主要从事消化道肿瘤的研究。 △ 通讯作者, Tel: (0871)65361621; E-mail: dongjian18@yahoo.com。

离。这是目前最为常用的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)富集方法,现已有 FDA 批准上市的专业产品 Cell Search™ System (Veridex)。

3 单细胞测序技术在肿瘤相关基础研究中的应用

3.1 肿瘤发生发展机制的研究 2008 年,Ley 等^[5]利用流式细胞分选技术分选出 AML 患者的肿瘤细胞,随后对这些肿瘤细胞进行了遗传突变检测,发现了可能与 AML 有关的基因;2009 年,Tang 等^[6]分析了单个小鼠细胞的四细胞胚胎和卵母细胞的转录组,同年,Mayer 等^[7]通过激光显微切割技术分离单个的外周血淋巴细胞,然后对一类罕见的遗传性大肠癌—家族性腺瘤性息肉综合征的致病基因 APC 基因进行了测序分析,获得了完整的 APC 基因突变数据。2010 年,Clark 等^[2]及 Pleasance 等^[8]分别对胶质瘤细胞系 U87 及小细胞肺癌细胞系 NCI-H209 进行了的单个肿瘤细胞测序分析,研究所得结果为肿瘤的基因诊断提供了新的线索;2011 年 Hannemann 等^[9]采用高分辨率微阵列比较基因组杂交(comparative genomic hybridization,CGH)技术,通过显微切割技术分离出单个的结肠癌细胞系 HCT116 的细胞,随后对这些细胞进行了拷贝数变异(copy number variations,CNV)的检测。最新的研究结果显示,通过利用单细胞测序技术所进行的深度测序可发现许多非常罕见的与人大肠癌发生的密切相关的突变。2011 年,Bass 等^[10]通过对 9 名的大肠癌患者进行了全基因组的测序,得出了如 VTI1A 和 TCF7L2 的融合等 11 个读码框内的基因融合事件。2012 年,Hou 等^[4]采用以 MDA 为基础的单细胞测序技术对原发性血小板增多症(essential thrombocythemia,ET)患者的单个骨髓细胞进行了测序并分析,筛查出在 ET 发病和进展中的驱动基因。随后,该研究团队用同样的方法分析了单个肾癌细胞的单核苷酸突变特征^[3]。

3.2 肿瘤转移机制的研究 通过单细胞测序技术分析来自同一患者成对的肿瘤原发灶及转移灶的样品中的单个肿瘤细胞的基因组信息,对比原发灶肿瘤细胞与转移肿瘤细胞之间突变位点,从而阐明肿瘤的转移及浸润遗传学机制,可以认识各种肿瘤细胞之间及个体之间存在差异的起因和解释肿瘤产生的机制^[11-12]。2010 年,Ding 等^[13]完成了来源于同一患者的 4 种组织样本的 DNA 样本的完整序列分析,结果证实转移肿瘤来源于原发性肿瘤中 1 个亚类的细胞,与原发灶内的细胞相比,转移灶内的细胞已发生突变。2011 年,Navin 等^[1]利用全基因组扩增及 DNA 测序对 100 个乳腺癌细胞分别进行了 CNV 的分析,准确地量化出单个核基因组中的拷贝数,推断出乳腺癌细胞的群体结构和肿瘤的进化过程^[2]。通过对 100 个源于多染色体组肿瘤的单细胞进行分析,发现了 3 个不同的与肿瘤细胞连续克隆扩增有关的细胞亚群。接着又对 100 个源于单染色体组肿瘤的原发灶和转移灶的单细胞进行分析后,得出肿瘤的播散和转移与单个克隆扩增有关。他们还发现了一种不会发生转移的含有丰富亚群的假二倍体细胞。

3.3 肿瘤干细胞的研究 Liu 等^[14]通过运用单细胞分离技术所取得的单个肿瘤干细胞接种于特定的培养基培养,进行单细胞克隆形成分析,观察肿瘤干细胞的自我更新及分化潜能。对来源于同一乳腺癌细胞系的肿瘤干细胞进行分析发现,单克隆形成细胞比部分克隆及多克隆形成细胞具有更高的增殖潜能,提示单克隆形成细胞中可能含有肿瘤干细胞的亚群体。他们通过对单个肿瘤干细胞的测序研究发现 CD133(+)的高表达和肿瘤血管生成的密切关系可能与三阴乳腺癌的进展复发有关。Felthaus 等^[15]利用单细胞测序技术对口腔鳞状细胞癌的

干细胞研究发现口腔鳞状细胞癌对常规放化疗的抵抗可能由肿瘤干细胞引起。

4 单细胞测序技术在肿瘤临床治疗方面的应用

4.1 指导肿瘤的治疗 由于单染色体组肿瘤的患者要比多染色体组肿瘤患者有更好的化疗敏感性和更高的生存率,这提高了发现研究耐药克隆的可能性,单细胞测序可以提高原发肿瘤中比较罕见的耐药性克隆的检测灵敏度^[16]。这一方法可能会解释耐药性克隆是在原发性肿瘤中先天存在还是在治疗后出现这一问题^[17-18]。此外,通过对 1 个患者数以百万计的单个肿瘤细胞进行分析,可以绘制出肿瘤在接受辅助治疗前后的全基因组多样性图谱。这样的研究在顺铂治疗宫颈癌和卵巢癌化疗中已经开始进行,这些研究通过分析肿瘤基因组化疗前和化疗后的基因拷贝数,检测到一些肿瘤的异质性及预先存在于原发性肿瘤的亚群在化疗后进一步扩大^[19-20]。利用单细胞测序技术来进行单个细胞的基因组拷贝数分析可以提供更全面的基因组信息,一些潜在的癌基因可能会被发现,从而为肿瘤的治疗提供更好的决策指导。

4.2 评估肿瘤的预后 单细胞测序技术的一个主要应用是它可以检测那些在组织样本中比较罕见的,少于 100 个细胞数的肿瘤细胞。例如只有 5%~10%的早期乳腺癌会进展为浸润性癌,所以用传统的检测手段无法检测。免疫组织化学发现,许多早期乳腺癌就可以表现出很明显的肿瘤异质性,利用单细胞测序技术来监测这些肿瘤的异质性,相应的检测结果可提示患者的预后,从而可能会对这些肿瘤是否会发展为浸润性癌提供预测并更好地对肿瘤的治疗进行指导^[21]。

4.3 监测肿瘤的复发 单细胞测序的另一临床应用是在监测和分析转移性肿瘤治疗过程中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)。Bidard 等^[21]对 115 例确诊为转移性乳腺癌的患者化疗前及化疗后随访 36 个月都进行了血液中 CTCs 的检测,23%的患者可以检测到循环肿瘤细胞,有 10%的患者在 7.5 mL 血液中可以检测到 1 个以上的循环肿瘤细胞。其结果提示化疗前 CTCs 的检测可以作为转移性乳腺癌远转移无进展生存期和总生存期的一个独立预后因素。Rao 等^[22]对转移性黑色素瘤的循环肿瘤细胞的检测也提示了 CTCs 与黑色素瘤的预后及生存率有关。临床医生在患者接受辅助治疗或化疗后通过监测循环肿瘤细胞来确定肿瘤是否有复发的可能。

5 展 望

2011 年《自然方法》杂志将单细胞测序列为年度值得期待的技术之一,2013 年《科学》杂志将单细胞测序列为年度最值得关注的六大领域榜首。虽然大部分的肿瘤组织样本基因组学研究可以提供 1 个患者身上的总体突变趋势,但不能确定是否所有的肿瘤细胞都包含全套的突变,或者不同的亚群是否包含这些突变的子集,并且联合推动了肿瘤的进化和发展。而单细胞测序法向人们提供了探索肿瘤基因组多样性和检测分析罕见癌症细胞基因组或肿瘤细胞亚群所包含的遗传信息的手段和方法。同时,在基础研究方面,它还揭示了部分肿瘤发生、发展及转移的部分机制,并在肿瘤的早期诊断,指导临床治疗,提示预后复发等方面发挥了积极的作用。笔者相信,随着单细胞分离技术以及单细胞基因组扩增技术的逐渐成熟,测序成本的大幅度下降,破译来自单细胞的 30 亿碱基的基因组并逐个细胞比较序列正在变为现实。

参考文献:

[1] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumor evolution in-

- ferred by single-cell sequencing [J]. *Nature*, 2011, 472 (7341):90-94.
- [2] Clark MJ, Homer N, Connor BD, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(1):e1000832
- [3] Xu X, Hou Y, Yin X, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor[J]. *Cell*, 2012, 148(5):886-895.
- [4] Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm[J]. *Cell*, 2012, 148(5):873-885.
- [5] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome [J]. *Nature*, 2008, 456(7218):66-72.
- [6] Tang F, Barbacioru C, Wang Z, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5):377-382.
- [7] Mayer V, Schoen U, Holinski-Feder E, et al. Single cell analysis of mutations in the APC gene[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2009, 26(3):148-156.
- [8] Pleasance ED, Futreal PA, Campbell PJ, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure[J]. *Nature*, 2010, 463(7278):184-274.
- [9] Hannemann J, Meyer-Staeckling S, Kemming D, et al. Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e26362.
- [10] Bass AJ, Lawrence MS, Brace LE, et al. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion [J]. *Nat Genet*, 2011, 43 (10): 964-968.
- [11] Ehrlich M, Turner J, Gibbs P, et al. Cytosine methylation profiling of cancer cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(12):4844-4849.
- [12] Pittet MJ, Grimm J, Berger CR, et al. In vivo imaging of T cell delivery to tumors after adoptive transfer therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(30):12457-12461.
- [13] Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft [J]. *Nature*, 2010, 464(7291):989-990.
- [14] Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, et al. CD133(+1) cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer[J]. *Onco-gene*, 2013, 32(5):544-553.
- [15] Felthaus O, Ettl T, Gosau M, et al. Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 28-33.
- [16] Navin N, Hicks J. Future medical applications of single cell sequencing in cancer[J]. *Genome Med*, 2011, 3(5): 31.
- [17] Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine [J]. *Br J Cancer* 2010, 103(8): 1139-1143.
- [18] Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, et al. Cancer as an evolutionary and ecological process[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(12):924-935.
- [19] Cooke SL, Temple J, Macarthur S, et al. Intra-tumour genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(2):361-368.
- [20] Cooke SL, Ng CK, Melnyk N, et al. Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (35): 4905-4913.
- [21] Bidard FC, Mathiot C, Delalogue S, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(4):729-733.
- [22] Rao C, Bui T, Connelly M, et al. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(3):755-760.

(收稿日期:2014-08-01 修回日期:2014-09-15)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.038

肺癌和卵巢癌细胞分子表达的差异及其与远处转移的关系

何松原^{1,2}综述,雷开键^{2△}审校

(1. 川北医学院,四川南充 637000;2. 四川省宜宾市第二人民医院肿瘤科 644000)

关键词:肺肿瘤;卵巢肿瘤;细胞分子表达

中图分类号:R73-37

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)32-4376-04

远处转移是恶性肿瘤患者病情进展的重要步骤,然而各种起源的恶性肿瘤发生远处转移的概率有明显的差异,脑转移严重影响肿瘤病人预后及生活质量。肺癌发生远处转移非常常见,特别是脑转移,占 10%~80%^[1-2]。而卵巢癌腹腔盆腔转移常见,肺、骨转移相对较少,脑转移极少见。有报道称,卵巢上皮细胞癌(epithelial ovarian cancer, EOC)脑转移发生率为

0.49%~2.50%^[3-5]。肺癌与卵巢癌脑转移率不同可能是由于两种癌细胞表面结构存在差异所致。近年来,癌细胞表面不同结构及功能的分子被广泛研究,如 nm-23、E-钙黏素(E-cadherin)抑制转移,CD44v6、表皮生长因子受体(EGFR)、整合素 $\alpha v \beta 3$ 促进转移。本文对以上 5 种细胞分子在肺癌、卵巢癌中的表达情况及与远处转移的关系作一综述。