

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.18.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220523.1523.006.html\(2022-05-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220523.1523.006.html(2022-05-23))

## 基于单细胞 RNA 测序的胃癌淋巴转移的 细胞学特征及分子机制研究\*

邹媛远, 黄 洋, 周连帮<sup>△</sup>

(安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601)

**[摘要]** **目的** 探讨胃腺癌淋巴转移过程中的细胞学特征及相关分子机制的改变。**方法** 收集 2019 年 9—12 月该院胃肠外科 13 例行胃癌根治术患者的胃癌组织及癌旁组织, 利用单细胞 RNA 测序技术揭示标本中的细胞学特征及相关标记基因。利用实时定量 PCR(RT-qPCR)检测主细胞 3 的标记基因 XIST 和窝状黏液细胞 3 标记基因 CXCL5 的表达水平。分析 XIST、CXCL5 在淋巴结转移阳性和阴性胃癌患者表达水平的差异。**结果** 主细胞 3 和窝状黏液细胞 3 在胃癌淋巴转移阳性的癌组织明显富集。主细胞 3 的标记基因 XIST 在淋巴转移阳性患者胃癌组织表达水平为  $(0.297 \pm 0.261)$ , 高于淋巴转移阴性患者胃癌组织的表达水平  $(0.025 \pm 0.023)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。窝状黏液细胞 3 的标记基因 CXCL5 在淋巴转移阳性患者胃癌组织表达水平为  $(0.036 \pm 0.019)$ , 高于其在淋巴转移阴性患者胃癌组织的表达水平  $(0.008 \pm 0.007)$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。拟时序分析发现主细胞可能是胃癌发生的起源。**结论** XIST、CXCL5 可能是胃腺癌淋巴转移的潜在信号。

**[关键词]** 胃腺癌; 主细胞; 淋巴结转移; 单细胞 RNA 测序; XIST; CXCL5

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2022)18-3083-04

## Cytological characteristics and molecular mechanism of lymphatic metastasis in gastric cancer based on single cell RNA sequencing\*

ZOU Yuanyuan, HUANG Yang, ZHOU Lianbang<sup>△</sup>

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230601, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes in cytological characteristics and related molecular mechanism in the process of the lymphatic metastasis in gastric adenocarcinoma. **Methods** The gastric cancer tissues and paracancerous tissues from 13 patients undergoing radical gastrectomy in the department of gastrointestinal surgery in this hospital from September to December 2019 were collected. The single-cell RNA sequencing technology was used to detect the cytological characteristics and related marker genes in the samples. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of the marker gene XIST in chief cell 3 and the marker gene CXCL5 in pit mucous cell 3. The differences in the expression levels of XIST and CXCL5 in patients with lymph node metastasis and non-metastatic gastric cancer were analyzed. **Results** The chief cell 3 and pit mucous cell 3 were significantly enriched in the gastric cancer tissues with positive lymphatic metastasis. The expression level of chief cell 3 marker gene XIST was  $(0.297 \pm 0.261)$  in positive patients with lymphatic metastasis, which was higher than that in negative patients with lymphatic metastasis  $(0.025 \pm 0.023)$ . The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression level of CXCL5, a marker gene of pit mucous cell 3 was  $(0.036 \pm 0.019)$  in the gastric cancer tissues of patients with positive lymphatic node metastasis, which was higher than that in the gastric cancer tissues of patients with negative lymphatic node metastasis  $(0.008 \pm 0.007)$ . The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81902456)。 作者简介: 邹媛远(1996—), 住院医师, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zhoulianbang@163.com。

The quasi-time sequence analysis showed that the main cell might be the origin of gastric cancer. **Conclusion** XIST and CXCL5 might be the potential signals of lymphatic metastasis in gastric adenocarcinoma.

**[Key words]** gastric adenocarcinoma; chief cell; lymphatic node metastasis; single cell RNA sequencing; XIST; CXCL5

胃腺癌是一种起源于胃黏膜的恶性肿瘤,其最常见的转移方式是淋巴结转移,淋巴结转移与胃腺癌患者的治疗反应、局部复发和长期生存直接相关,不仅能够评价患者的预后,而且对于治疗模式的选择也是至关重要的<sup>[1]</sup>。单细胞 RNA 测序是一种在单细胞水平上对整个转录组进行扩增和测序的新技术。一些基于单细胞测序对胃癌的研究已经发表,但较少涉及与淋巴转移相关细胞学的研究<sup>[2-4]</sup>。本研究收集淋巴结转移阳性及阴性的胃腺癌组织及癌旁组织标本,采用单细胞测序技术进行分析,利用实时定量 PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR)技术对相关分子表达水平进行验证,旨在发现与胃癌淋巴转移有关的细胞学特征及分子改变,为胃癌的临床诊断和治疗提供了新的见解,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取 2019 年 9—12 月本院接受胃切除手术的 13 例胃腺癌患者术中切除的肿瘤组织及癌旁组织,标本经病理检查确诊。患者术前未进行过放化疗,且对本研究均知情同意。单细胞 RNA 文库试剂盒均由南京新格元生物有限公司提供;SYBR<sup>®</sup> Green PCR(PowerTrack<sup>™</sup> SYBR Green Master Mix)试剂盒、Trizol 试剂购自美国 Thermo Scientific 有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组

单细胞 RNA 测序:胃癌组织及癌旁组织根据淋巴结转移情况,分为 4 种类型,即 N1、T1(无淋巴结转移的癌旁及肿瘤组织),N2、T2(有淋巴结转移的癌旁及肿瘤组织)。RT-qPCR:胃癌标本 13 例依据术后病理结果分为淋巴结转移阳性组及淋巴结转移阴性组。

#### 1.2.2 单细胞 RNA 测序

按照试剂盒说明进行单细胞分离。利用 Seurat 程序进行细胞类型鉴定和聚类分析,将 FindClusters 函数的参数分辨率设置为 0.6 用于集群分析。使用功能 FindMarkers 对不同标本或连续聚类之间的差异表达基因进行鉴定。

#### 1.2.3 RT-qPCR 检测 XIST 和 CXCL5 表达水平

提取胃癌组织按照试剂盒说明进行 PCR,相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。以 GAPDH 为内参,XIST 上游引物 5'-TGGATA GAG GAC CCA AGC GA-

3',下游引物 5'-CAA GAC TGG CCC AGG CAT AA-3';CXCL5 上游引物 5'-CAA GTT CCC TCC CCA CTC AC-3',下游引物 5'-TGC TAA AAA CCC GAC AGG CA-3';内参 GAPDH 上游引物 5'-CAA CGA ATT TGG CTA CAG CA-3',下游引物 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃腺癌中单细胞转录组图谱和不同细胞类型

分别从淋巴结转移阴性和阳性组的胃腺癌组织中获得 1 461 和 2 951 个单细胞转录本进行分析,共鉴定出 10 种主要细胞类型。与淋巴转移阴性组比较,淋巴转移阳性组的主细胞占比明显升高,见图 1。

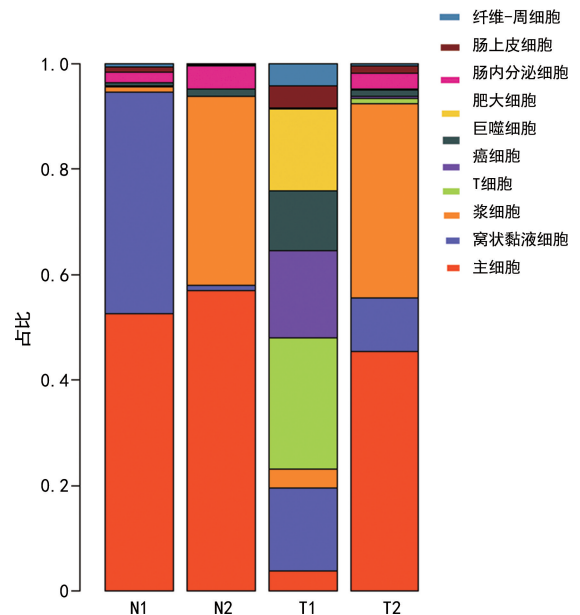
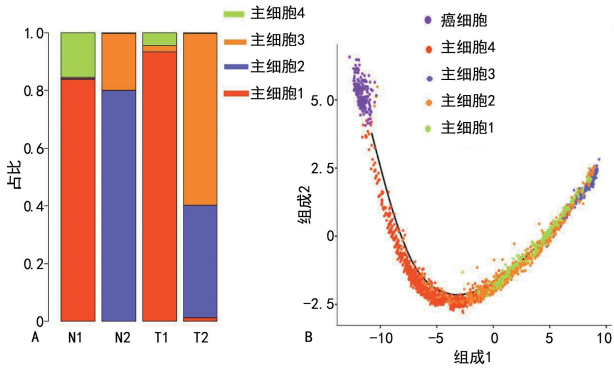


图 1 胃腺癌中不同细胞类型占比

### 2.2 与胃癌转移相关的一种主细胞亚型

根据主细胞的转录谱自动聚类,主细胞亚聚类显示 4 簇,分别为主细胞 1、主细胞 2、主细胞 3 和主细胞 4。采用拟时序分析法进行了转录轨迹分析,发现存在主细胞 2、主细胞 3、主细胞 1 向癌细胞的转录过渡状态。主细胞 3 在淋巴转移阳性患者的胃癌组织标本中明显富集,见图 2。

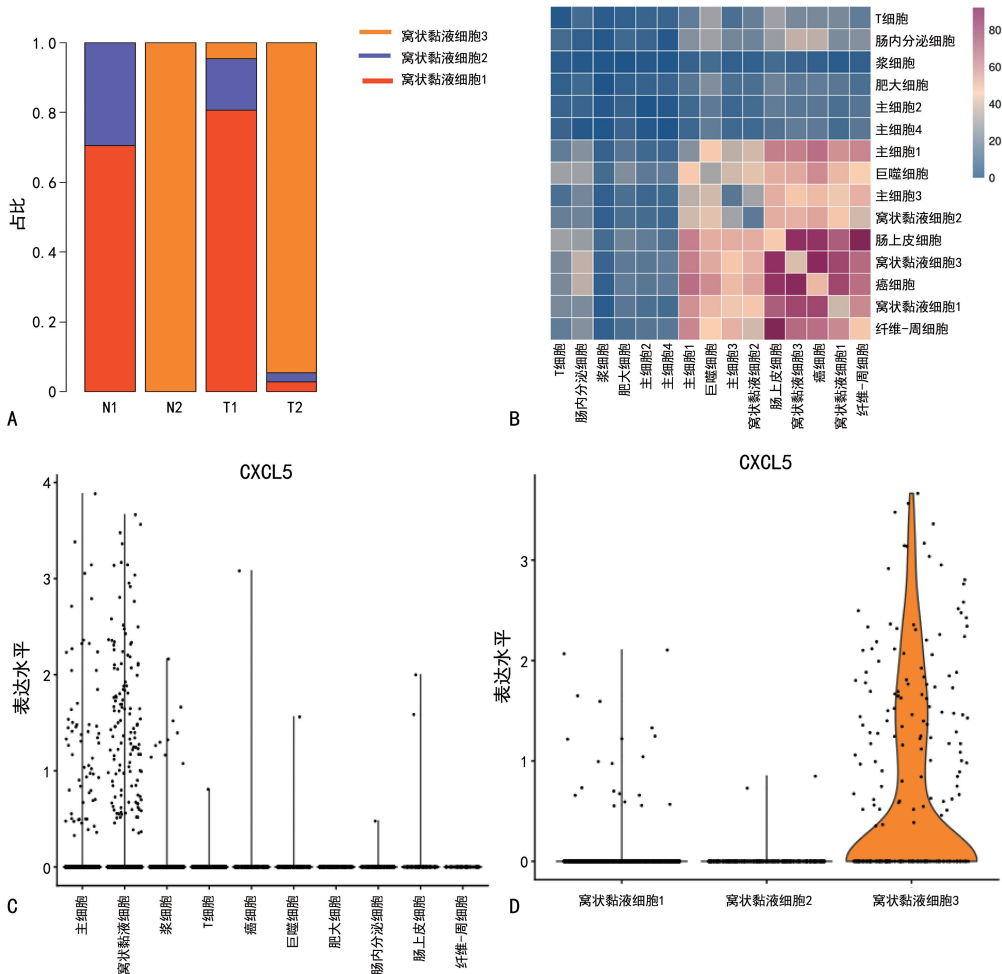


A: 主细胞亚聚类的比例; B: 从主细胞到癌细胞的转化过程。

图2 与胃癌转移相关的一种主细胞亚型

### 2.3 与胃癌转移相关的一种窝状黏液细胞亚型

窝状黏液细胞亚聚类为3簇,窝状黏液细胞1和窝状黏液细胞2主要存在于淋巴结转移阴性组的标本中,与肿瘤组织(T1)比较,在正常组织(N1)中含量略有增加。窝状黏液细胞3主要富集于淋巴结转移



A: 不同亚簇的窝状黏液细胞在标本中的比例; B: 细胞通信网络; C: CXCL5 在不同细胞类型中的表达情况; D: CXCL5 在3个窝状黏液细胞亚簇中的表达情况。

图3 与胃癌转移相关的一种窝状黏液细胞亚型

## 3 讨论

淋巴结转移是胃癌根治术后复发的最重要危险

阳性组的标本中。使用受体-配体相互作用实现了细胞通信网络。在这个网络中,窝状黏液细胞3与癌细胞之间的相互作用最为明显。窝状黏液细胞3标记基因CXCL5在窝状黏液细胞3中特异性表达,见图3。

### 2.4 淋巴结转移阳/阴性组胃癌组织 XIST、CXCL5 表达水平比较

RT-qPCR 检测结果显示,淋巴结转移阳性组的胃癌组织中 XIST、CXCL5 表达水平均高于淋巴结转移阴性组( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 淋巴结转移阳/阴性组胃癌组织 XIST、CXCL5 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	淋巴结转移 阳性组(n=6)	淋巴结转移 阴性组(n=7)	t	P
XIST	0.297±0.261	0.025±0.023	2.766	0.018
CXCL5	0.036±0.019	0.008±0.007	3.402	0.006

因素之一,淋巴结清扫已被证明可以提高胃癌的生存率<sup>[5]</sup>。单细胞 RNA 测序可以更好地揭示细胞之间的

异质性,识别不同的细胞亚群,剖析细胞分化过程和细胞作用关系,目前,单细胞 RNA 测序在胃癌淋巴结转移中的研究鲜有报道。因此,将单细胞 RNA 测序技术应用于胃癌淋巴结转移探寻有关的细胞学特征和相关分子标志物等十分有必要。

本研究中发现了一种新的主细胞亚聚类——主细胞 3,可能是胃腺癌转移的潜在标志。上皮化生是胃癌发生、发展的一个重要过程,主细胞的异常分化被认为是导致上皮化生的主要原因<sup>[6-7]</sup>。解痉多肽表达化生(spasmolytic polypeptide expressing metaplasia, SPEM)作为胃癌癌前病变,有报道称,发生化生时,主细胞会直接转化为 SPEM 细胞,而当化生消退时,SPEM 细胞则会重新分化为主细胞<sup>[8]</sup>。本研究通过拟时序分析发现了在假的时间轴上,存在主细胞 2、主细胞 3、主细胞 1 向癌细胞的转化。本研究发现,主细胞 2 与正常主细胞标记基因类似,均高表达 LIPF,而主细胞 1 和 SPEM 细胞相似,均高表达 MUC6、SOX9<sup>[3]</sup>。作为正常的主细胞和 SPEM 细胞之间的中间状态,主细胞 3 仅在淋巴转移阳性患者的标本中明显富集,提示主细胞 3 可能是主细胞的一种新亚型,可以作为转移的标志。有了这个实验基础,继续对主细胞 3 的差异富集基因 XIST 进行 RT-qPCR 实验。XIST 基因是哺乳动物中 X 基因失活的主调控因子,据报道,XIST 在多种恶性肿瘤中过表达,并与更具有侵袭性的表型相关<sup>[9]</sup>。越来越多的研究表明,XIST 异常上调与多种实体肿瘤的晚期肿瘤分期、分化差和生存期缩短直接相关<sup>[10]</sup>。整理文献发现,对 XIST 在胃癌淋巴结转移的研究鲜有报道。本课题组对 XIST 进行 RT-qPCR,发现 XIST 在淋巴结转移阳性组的胃癌组织中表达水平更高,提示 XIST 过表达能够促进胃癌肿瘤细胞的淋巴结转移,从而提高肿瘤的恶性程度。

本研究发现窝状黏液细胞 3 主要存在于淋巴结转移阳性组的标本中,且在胃癌组织中明显富集,通过细胞互作分析发现其与癌细胞相互作用强烈。同时 GO 分析显示窝状黏液细胞 3 差异基因富集的信号通路很多与细胞分离、细胞迁移相关,如细胞骨架蛋白绑定、有丝分裂细胞周期、细胞分裂等<sup>[11-12]</sup>。对其差异基因进行分析,发现 CXCL5 为其标记基因。CXCL5 是实体瘤中肿瘤微环境中重要的趋化因子之一,研究发现其来源可能与肿瘤微环境中的肿瘤自分泌和旁分泌有关<sup>[13]</sup>。根据以往的研究,与相应癌旁组织及正常组织比较,CXCL5 在鼻咽癌、胃癌、结直肠癌等癌组织中表达水平明显升高<sup>[14-16]</sup>。本课题组对 CXCL5 进行 RT-qPCR 实验,发现 CXCL5 在淋巴结

转移阳性组的胃癌组织中表达水平更高,提示 CXCL5 过表达能对胃癌肿瘤细胞的淋巴结转移有促进作用。

综上所述,本研究将单细胞 RNA 测序应用于胃癌淋巴转移,确定了两种可能对淋巴转移有促进作用的细胞类型——主细胞 3 和窝状黏液细胞 3,并对这两种细胞类型进行差异基因鉴定,发现其标记基因 XIST、CXCL5 在淋巴结转移阳性患者的胃癌组织中明显高表达,提示主细胞 3、窝状黏液细胞 3 及其标记基因 XIST、CXCL5 有望成为预测胃癌淋巴转移和治疗的分子生物标志物。

## 参考文献

- [1] 武颖超,谢森,蔡云龙,等.早期胃癌淋巴结转移规律及其预后分析[J].中华普通外科杂志,2019,34(7):561-564.
- [2] ZHANG P, YANG M, ZHANG Y, et al. Dissecting the single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer [J]. Cell reports, 2019, 27(6): 1934-1947.
- [3] ZHANG M, HU S, MIN M, et al. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing [J]. Gut, 2021, 70(3): 464-475.
- [4] 李承果,沈倩,尹玉平,等.单细胞测序技术在胃癌研究中的应用[J].中华实验外科杂志,2021,38(6):1183-1186.
- [5] HUANG K H, LAN Y T, FANG W L, et al. The correlation between miRNA and lymph node metastasis in gastric cancer [J]. Biomed Res Int, 2016, 2015(2): 543163.
- [6] MILLS J C, GOLDENRING J R. Metaplasia in the stomach arises from gastric chief cells [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 4(1): 85-88.
- [7] KINOSHITA H, HAYAKAWA Y, KOIKE K. Metaplasia in the stomach-precursor of gastric cancer? [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2063.
- [8] BURCLAFF J, WILLET S G, SÁENZ J B, et al. Proliferation and differentiation of gastric mucous neck and chief cells during homeostasis and injury-induced metaplasia [J]. Gastroenterology, 2020, 158(3): 598-609.
- [9] LIU H, DENG H, ZHAO Y, (下转第 3094 页)

- [19] FU H, ZHAO J, XU L, et al. Reduced beta2-GPI is associated with increased platelet aggregation and activation in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(7):921-929.
- [20] 高延民, 刘红云, 张驰, 等. 感染相关性血小板减少症 273 例临床分析[J]. *血栓与止血学*, 2014, 20(4):159-163.
- [21] WU Z, ZHOU J, WEI X, et al. The role of Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) in immune thrombocytopenia [J]. *Hematology*, 2013, 18(5):295-299.
- [22] AMER A, KAIDER M, TASHER D, et al. Epstein-Barr virus infection was associated with nephrotic syndrome, severe thrombocytopenia and coombs-positive haemolytic anaemia [J]. *Acta Paediatr*, 2018, 107(11):2030-2031.
- [23] LIN Y, HU X, CHENG H, et al. Graft-versus-host disease causes broad suppression of hematopoietic primitive cells and blocks megakaryocyte differentiation in a murine model [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20(9):1290-1300.
- [24] ROSHANDEL E, KAVIANI S, HAJIFATHALI A, et al. Pre-transplant thrombocytopenia predicts engraftment time and blood products requirement in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients [J]. *Transfus Apher Sci*, 2020, 59(4):102810.
- [25] BLUMBERG N, HEAL J M, PHILLIPS G L, et al. Platelets: to transfuse or not to transfuse [J]. *Lancet*, 2012, 380(9850):1287-1289.
- [26] YUAN C, BOYD A M, NELSON J, et al. Eltrombopag for treating thrombocytopenia after allogeneic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(7):1320-1324.
- [27] GILL H, WONG R S M, KWONG Y L. From chronic immune thrombocytopenia to severe aplastic anemia: recent insights into the evolution of eltrombopag [J]. *Ther Adv Hematol*, 2017, 8(5):159-174.
- (收稿日期:2022-02-12 修回日期:2022-03-20)
- 
- (上接第 3086 页)
- et al. LncRNA XIST/miR-34a axis modulates the cell proliferation and tumor growth of thyroid cancer through MET-PI3K-AKT signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):279.
- [10] ZHU, J W, FAN Y K, LING X, et al. Prognostic and clinicopathological value of long non-coding RNA XIST in cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 479:43-47.
- [11] HASAN R, ZHOU G L. The cytoskeletal protein cyclase-associated protein 1 (CAP1) in breast cancer: context-dependent roles in both the invasiveness and proliferation of cancer cells and underlying cell signals [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11):2653.
- [12] HOU P F, JIANG T, CHEN F, et al. KIF4A facilitates cell proliferation via induction of p21-mediated cell cycle progression and promotes metastasis in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):477.
- [13] ZHANG W, WANG H, SUN M, et al. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(2):69-80.
- [14] 刘诗光, 赵敬坤, 陆爱国, 等. 趋化因子 CXCL5 和程序性死亡配体 1 在结肠直肠癌组织的表达与患者预后的关系 [J]. *外科理论与实践*, 2021, 26(6):543-549.
- [15] 阮鹏, 谭爱丽. 趋化因子 CXCL5 通过调控 ERK/MAPK 信号通路抑制肿瘤免疫促进鼻咽癌恶化的机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(21):2613-2618.
- [16] 徐勇超, 任莹坤, 唐礼恭, 等. 趋化因子 CXCL5 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5):1159-1161.
- (收稿日期:2021-11-23 修回日期:2022-03-05)