



· 综述 ·

单细胞测序技术在实体瘤研究中的应用进展

郑小翠 综述, 汪希鹏 审核

上海交通大学医学院附属新华医院妇产科, 上海 200092

[摘要] 肿瘤异质性是实体瘤组织的重要特征之一, 其多样性和复杂性给实体瘤的基础研究和临床诊治带来了极大的困难。因此, 鉴别实体瘤内及其微环境中不同的细胞亚群及与之相关的基因表达水平就显得十分重要。单细胞测序技术是利用DNA二代测序技术对单个细胞的DNA、RNA或DNA甲基化水平进行分析, 分别揭示其基因组、转录组和表观遗传学特征, 了解单个细胞功能和所处的状态。单细胞测序分析不仅能进一步鉴定实体瘤内细胞的异质性, 还有助于阐明肿瘤发生、发展、转移、耐药和免疫逃逸等分子作用机制, 从而使实体瘤的临床诊治和转归预测变得更加准确。简要总结目前单细胞测序技术的发展, 对单细胞测序在实体瘤研究中的应用与进展进行综述。

[关键词] 单细胞测序; 实体瘤异质性; 转移; 耐药; 免疫

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.07.009

中图分类号: R730.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)07-0535-05

Progress of single-cell sequencing in solid tumors ZHENG Xiaocui, WANG Xipeng (Department of Obstetrics and Gynecology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Correspondence to: WANG Xipeng E-mail: wangxipeng@xinhumed.com.cn

[Abstract] Heterogeneity is one of the most important characteristics of solid tumors. Therefore, it is essential to identify different cell subsets and related gene expression levels in solid tumor and its microenvironment. Single-cell sequencing uses DNA second-generation sequencing technology to analyze the DNA, RNA or DNA methylation level of a single cell, reveal its genome, transcriptome and epigenetic characteristics, and understand the state and function of a single cell. Single-cell sequencing can not only further identify the heterogeneity of cells in solid tumors, but also help clarify the molecular mechanisms of tumor development, metastasis, drug resistance and immune escape, making clinical diagnosis, treatment and prognosis of solid tumors more accurate. This article briefly summarized the advances of single-cell sequencing, and reviewed the application and progress of single-cell sequencing in solid tumor research.

[Key words] Single-cell sequencing; Heterogeneity of solid tumors; Metastasis; Drug resistance; Immunity

肿瘤是由遗传物质异常引起的体细胞恶性克隆。为适应宿主各种复杂的微环境, 肿瘤细胞在对原有突变基因进行优势选择的同时, 还不断产生新的基因突变^[1], 而这些携带不同“新基因”的肿瘤细胞将表现出不同的特性, 在侵袭转移能力和耐药性等多方面有所差异, 从而形成了瘤内细胞异质性。近年来, 单细胞测序技术的出现为进一步鉴别肿瘤的异质性提供了新的手段。对实体瘤及其微环境中单个细胞的基因组、转录组及表观遗传学进行测序分析, 不仅能揭示瘤内细胞

异质性, 还能有效区分肿瘤微环境中的各细胞亚群, 从而有利于研究肿瘤发生、发展、转移、耐药和免疫逃逸的相关机制。

1 单细胞测序技术概述

单细胞测序技术主要包括单细胞基因组测序、转录组测序和表观遗传学测序(图1), 它们各有优势和特点, 能够从不同角度揭示细胞的功能状态。与以往样本测序不同, 我们需要先将实体组织或体液中的细胞群分离成单个细胞, 再通过对提取的核酸(DNA或RNA)进行一定倍

基金项目: 国家自然科学基金(81874103)。

通信作者: 汪希鹏 E-mail: wangxipeng@xinhumed.com.cn

数的扩增使其达到现有测序技术的最低检测水平^[2], 用于基因组和转录组测序, 或直接对单

个细胞进行表观遗传学测序。此外, 单细胞多组学测序也正被逐渐应用于各种实体瘤的研究中。

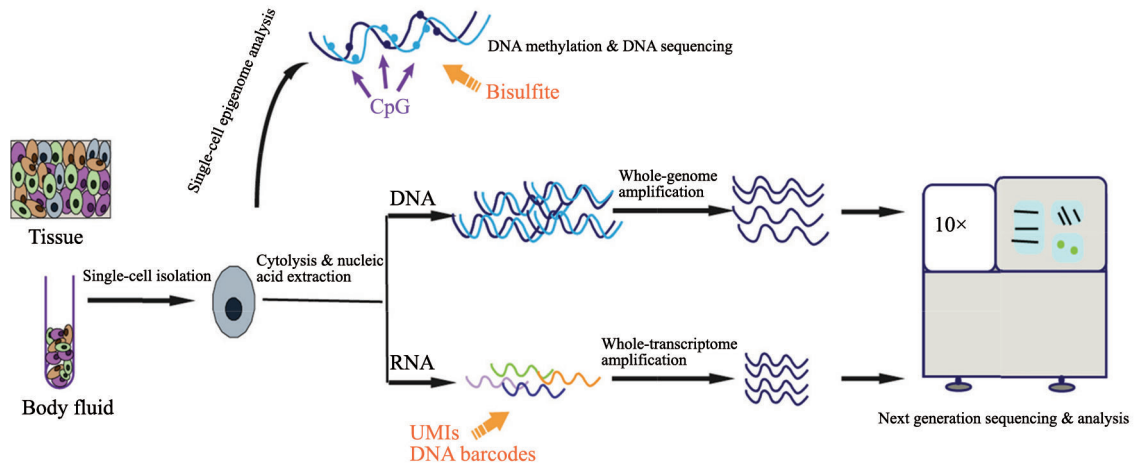


图1 单细胞测序的简要示意图

Fig. 1 A diagram of single-cell sequencing

1.1 单细胞分离

单细胞分离是进行各种单细胞测序的首要步骤, 主要方法有连续稀释法、微量吸液管、流式细胞术、微流控技术、激光捕获显微切割术 (laser-capture microdissection, LCM) 等^[3]。前两者多用于少量目标细胞的分离。流式细胞术可通过各种免疫荧光标记对细胞进行分选, 其中荧光激活细胞分选系统 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 较为常用^[4]。微流控技术主要基于细胞自身特性 (直径、表面抗原、电极等) 进行分离, 试剂的使用少, 但对设备要求高。LCM通过在显微镜下利用激光束对组织切片细胞进行分离, 不需要细胞悬液, 可以显示细胞的空间位置, 但细胞及核酸的完整性可能被破坏^[5]。

1.2 单细胞基因组测序

单细胞基因组测序在对分离得到的单细胞进行DNA提取后, 进一步对单细胞DNA进行全基因组扩增 (whole-genome amplification, WGA), 主要的方法有退行性寡核苷酸聚合酶链反应 (degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction, DOP-PCR)、多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA)、PicoPLEX和多重退火环状循环扩增 (multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC) 等。其中, MDA对全基因组的覆盖率高, 多用于单核苷酸突变的检测, 而DOP-PCR和MALBAC对基因组

扩增的均一性好, 多用于基因拷贝数变异的检测^[4]。扩增后的基因组再通过DNA二代测序技术进行测序分析, 最后准确地检测出多种不同类型的基因改变。

1.3 单细胞转录组测序

基因组测序主要用于检测DNA分子的异常, 而转录组测序可直观反映基因的表达情况, 能更准确地辨别处于不同状态或发展阶段的细胞。单细胞转录组测序在单细胞分离和RNA提取后, 需要先将捕获的mRNA反转录为cDNA, 再用PCR或体外转录 (*in vitro* transcription, IVT) 的方法进行全转录组扩增 (whole-transcriptome amplification, WTA), 最终进行测序分析。为提高测序结果的准确性和实现高通量测序, 许多测序技术在反转录时加入细胞特有的DNA条形码和标记各mRNA的特定分子标识 (UMIs), 如STRT-seq、MARS-seq、CytoSeq和Drop-seq/InDrops^[6]。

1.4 单细胞表观遗传学测序

除了基因组本身, 其表观修饰也对基因的表达起着重要的调控作用, 尤其是DNA甲基化。随着单细胞测序技术的发展, DNA甲基化的检测也可在单细胞水平进行, 目前最常用的技术是单细胞简化代表性亚硫酸氢盐测序 (single-cell reduced-representation bisulfite sequencing, scRRBS), 它主要通过对CpG富集区域 (如CpG岛) 进行限制性消化和亚硫酸氢盐转化, 从而测

序得到单个细胞全面的DNA甲基化水平^[7]，间接地反映大部分基因的表达情况。

1.5 单细胞多组学平行测序

近年来，单细胞测序技术的发展使多组学同步测序分析成为了现实，有助于我们进一步探讨各细胞基因组、转录组和表观遗传学三者之间的关系，研究实体瘤发生、发展过程中的各种分子机制。例如，G&T-seq利用改良二代测序技术和各种WGA方法分别对全长mRNA和基因组DNA进行平行测序，同时获得单个细胞的基因组和转录组信息，从而更好地研究基因与其表达水平之间的关系^[8]；单细胞三重组学测序（single-cell triple omics sequencing, scTrio-seq）技术先将单细胞mRNA释放形成上清液用于转录组测序，再通过scRRBS方法对含有基因组DNA的沉淀物进行DNA甲基化测序和基因拷贝数变异的检测，最终得到单细胞基因组、DNA甲基化和转录组的测序数据，进而探索三者之间的复杂关系^[9]。

2 单细胞测序与实体瘤研究

2.1 揭示瘤内细胞的异质性

随着单细胞测序在实体瘤研究中的广泛应用，多项研究发现，肿瘤细胞通常由多个克隆亚群组成，它们具有不同的侵袭转移、促血管生成能力，对机体免疫的应答和化疗药的反应也各有不同。2012年，Kreso等^[10]通过对来自10例结肠癌患者的150个肿瘤细胞进行单细胞测序，发现同一患者的各肿瘤细胞表现出不同的生长动力学特征，对奥沙利铂的反应也不一致。2014年，Yu等^[11]对1例结肠癌患者的肿瘤组织进行单细胞外显子测序，检测到两个细胞亚群，大部分肿瘤细胞含有APC和TP53突变基因，小部分则以CDC27和PABPC1突变为主。同年，Patel等^[12]通过对来自5例成胶质细胞瘤患者的430个肿瘤细胞进行单细胞转录组测序，发现同一组织来源的肿瘤细胞在与致瘤信号通路、细胞增殖、免疫应答和缺氧应激相关的基因表达上均有较显著的差异。2016年，Hou等^[9]对来自1例肝细胞癌患者的25个肿瘤细胞进行单细胞多组学（基因组、转录组和表观遗传学）测序，发现了两个细胞亚群，数量少的一个细胞亚群检测到更多的基因拷贝数变异，表达更多侵袭性细胞标志物，更有可能

逃避免疫监视。

2.2 分析肿瘤发生、发展过程

近些年，不少研究利用单细胞测序技术发现了许多与实体瘤发生、发展相关的新异常基因，还鉴别出一些在肿瘤发展中起关键作用的细胞亚群。2016年，Yang等^[13]通过对来自3例膀胱癌患者的肿瘤组织进行单细胞测序，在肿瘤干细胞群中检测到6个与其发生相关的新基因，还发现ARID1A、GPC5A和MLL2的共突变增强了肿瘤上皮非干细胞的自我更新能力并促使肿瘤的发生。同年，Tirosh等^[14]对来自6例少突胶质细胞瘤患者的4 347个肿瘤细胞进行单细胞转录组测序，发现了一群具有很强的增殖潜力并表达干细胞相关生物标志物的肿瘤克隆亚群。这些通过单细胞测序发现的新突变基因和关键肿瘤克隆亚群将可能成为肿瘤治疗的潜在靶标，有利于临床上进一步探索攻克肿瘤的新方法。

此外，单细胞测序还有助于重建更加全面精确的肿瘤细胞系谱树。以往的肿瘤细胞系谱树建立通常是基于多细胞测序的数据，忽略了某些微量的突变基因，并将这些细胞粗略地并入其他克隆亚群中。而单细胞测序则几乎能检测到肿瘤细胞所有的突变基因，得到较完整的数据^[15]。

2.3 阐明肿瘤转移机制

远处转移是肿瘤患者死亡的主要原因之一，而通过对原发灶、转移灶及循环肿瘤细胞（circulating tumor cells, CTC）进行单细胞测序分析，我们对实体瘤的转移分子机制有了更深入的了解。2014年，Ting等^[16]通过对来自胰腺癌小鼠的CTC和原发肿瘤灶进行单细胞转录组测序，发现干细胞相关基因Aldh1a2和多富集于上皮-间质界面的Igfbp5转录本在CTC中表达增加，同时，他们还来源于胰腺癌患者的CTC进行单细胞测序分析，表明细胞外基质基因在小鼠和人的CTC中都高表达，而这个基因被证实与胰腺癌转移密切相关。2015年，Lawson等^[17]利用单细胞测序对不同分期的转移性乳腺癌进行基因表达分析，发现早期病变的转移灶肿瘤细胞的基因表达水平与原发灶有显著差异，而晚期病变则十分相似。同时，他们发现原发肿瘤存在一群微量的干细胞样克隆亚群，也在早期病变的转移肿瘤细

胞中检测到多种干细胞基因的表达, 并证实这些细胞能分化产生体腔样转移细胞, 从而阐明了干细胞样克隆亚群在乳腺癌转移中的作用。2017年, Leung等^[18]分别对2例结直肠癌患者的原发灶和肝转移灶肿瘤细胞进行单细胞基因组测序, 并通过肿瘤细胞系进化分析发现, 结直肠癌的肝转移是由原发肿瘤细胞进化出倾向肝转移的突变基因, 再进行远处转移, 而这个过程可以是单克隆或多克隆。

以上说明CTC及原发灶中干细胞样克隆亚群是肿瘤转移的关键。临床上可以通过检测这些CTC来判断肿瘤是否发生了转移或有转移和复发的高风险, 从而尽早诊治。Zhang等^[19]在2014年就通过研究表明, CTC生物标记模式分类与计数不仅能较准确地诊断胰腺癌, 还能提示肿瘤的转移并评估患者的预后。或针对原发灶中具有转移倾向的细胞亚群寻找相应的靶向药物, 从而对它们进行早期靶向治疗, 改善早中期肿瘤患者的预后。

2.4 研究肿瘤耐药机制

每年死于肿瘤耐药复发的患者不计其数, 而多年的研究仍未彻底解决这个治疗难题, 通过对耐药复发的实体瘤进行单细胞测序分析, 我们可以更加深入地认识肿瘤的耐药机制。2014年, Lee等^[20]分别对未经化疗、化疗有效和对紫杉醇耐药的转移性乳腺肿瘤进行单细胞转录组测序, 新发现耐药的肿瘤细胞群存在38种与其他两组不同的RNA变异, 并阐述了化疗有效的肿瘤细胞在紫杉醇诱导下的转录谱变化。2015年, Kim等^[21]通过对34个异体种植的肺腺癌细胞进行单细胞转录组测序, 发现表达*KRASG12D*突变基因的肿瘤细胞亚群在体外实验中对化疗药具有耐受性。2018年, Kim等^[22]对多个三阴性乳腺癌患者的未经化疗和化疗后的肿瘤组织进行单细胞基因组和转录组同步测序, 分析表明耐药基因是在化疗后被优势选择的已存在突变基因, 但耐药肿瘤细胞的转录谱是在化疗后经重编码而获得的。

这些通过单细胞测序发现的新耐药基因不仅解释了部分肿瘤患者化疗失败和复发的原因, 还预示着耐药肿瘤进一步治疗的潜在可能。此外, 通过对化疗中的肿瘤组织进行单细胞转录谱分析, 临床

上还可以初步评估患者对化疗药物的反应。

2.5 描绘肿瘤免疫微环境

目前, 许多研究都发现肿瘤微环境中含有大量的肿瘤相关免疫细胞, 也证实了其中一些细胞在肿瘤发展中的作用。而随着单细胞测序的应用, 我们对肿瘤免疫微环境有了更全面的了解。2017年, Chung等^[23]对原位乳腺癌来源的175个肿瘤相关免疫细胞进行单细胞转录组测序, 发现相关的T细胞和巨噬细胞均呈现免疫抑制状态, 且T细胞多为调节性T细胞 (regulatory T cells, Treg) 和耗竭T细胞, 而肿瘤相关巨噬细胞多为M2型。同年, Zheng等^[24]通过对来自6例肝细胞癌患者肿瘤组织、周围正常组织和外周血的5 063个T细胞及T细胞受体进行单细胞转录组测序, 发现耗竭CD8⁺ T细胞和Treg在肿瘤组织中占比最多, 且*lavilin*基因在激活的T细胞和Treg中是上调的。2018年, Azizi等^[25]分别对来源于8例乳腺癌患者原发肿瘤部位、正常乳腺组织、外周血和淋巴结的45 000个免疫细胞进行单细胞转录组测序及对比分析, 不仅发现肿瘤微环境中的T细胞存在多种不同的亚群和激活状态, 重建了肿瘤相关T细胞的进化轨迹, 还发现部分Treg存在*CTLA4*、*TIGIT*和*GITR*基因共突变的现象。

单细胞测序可让我们更全面地了解免疫细胞在肿瘤发生、发展中的作用, 并有助于探索肿瘤相关免疫细胞中较为关键的突变基因和表面标记, 这些基因和分子标记可能成为免疫治疗的新目标。同时, 临床上还能通过对肿瘤免疫微环境的分析来评估患者免疫治疗的效果。

3 结语与展望

单细胞测序技术给实体瘤研究提供了新的角度, 通过对数百个单细胞进行高通量测序, 不仅可揭示实体瘤内及其免疫微环境的细胞异质性, 还有助于我们对实体瘤进行更深入的研究, 从而指导临床上的早期诊断、靶向治疗、疗效监测与预后评估。尽管现阶段发展的单细胞测序技术仍存在一些问题, 如耗时长, 费用高, 各种不可避免的技术误差 (有效细胞的破坏或丢失、覆盖率低、测序结果偏倚、错误率较高、通量有限)^[4, 6, 26], 样本要求高等。随着新技术的发展, 单细胞测序的时间将会加快, 费用也将会降低, 而测序的灵敏度和特异性

将提高,对测序目标的覆盖率和准确率也会趋近100%,且测序样本不再局限于新鲜组织。2017年,Guillaumet-Adkins等^[27]对超过1 000例新鲜和冷藏保存的单细胞进行转录组学测序,表明保存过程并不改变转录组学特征,Martelotto等^[28]还实现了对原位和侵袭性乳腺癌的石蜡包埋组织进行单细胞全基因组测序,描述了肿瘤细胞的异质性及进化过程。完善后的单细胞测序技术不仅会成为实体瘤研究的主要手段,还将可能直接应用于临床,通过对肿瘤患者的组织标本进行单细胞基因组、转录组或表观遗传学测序分析,进而实现个体化的诊治、监测与评估。

【参 考 文 献】

- [1] STRATTON M R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise [J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1553–1538.
- [2] VAN LOO P, VOET T. Single cell analysis of cancer genomes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 24: 82–91.
- [3] NAVIN N E. Cancer genomics: one cell at a time [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(8): 452.
- [4] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3): 175–188.
- [5] WANG Y, NAVIN N E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 598–609.
- [6] PICELLI S. Single-cell RNA-sequencing: the future of genome biology is now [J]. *RNA Biol*, 2017, 14(5): 637–650.
- [7] CLARK S J, LEE H J, SMALLWOOD S A, et al. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 72.
- [8] MACAULAY I C, HAERTY W, KUMAR P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 519–522.
- [9] HOU Y, GUO H, CAO C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas [J]. *Cell Res*, 2016, 26(3): 304–319.
- [10] KRESO A, O'BRIEN C A, VAN GALEN P, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 543–548.
- [11] YU C, YU J, YAO X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene *SLC12A5* in colon cancer by single-cell sequencing [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 701–712.
- [12] PATEL A P, TIROSH I, TROMBETTA J J, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [J]. *Science*, 2014, 344(6190): 1396–1401.
- [13] YANG Z, LI C, FAN Z, et al. Single-cell sequencing reveals variants in *ARID1A*, *GPRC5A* and *MLL2* driving self-renewal of human bladder cancer stem cells [J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 8–12.
- [14] TIROSH I, VENTEICHER A S, HEBERT C, et al. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 309–313.
- [15] KUIPERS J, JAHN K, BEERENWINKEL N. Advances in understanding tumour evolution through single-cell sequencing [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1867(2): 127–138.
- [16] TING D T, WITTNER B S, LIGORIO M, et al. Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 8(6): 1905–1918.
- [17] LAWSON D A, BHAKTA N R, KESSENBRÖCK K, et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells [J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 131–135.
- [18] LEUNG M L, DAVIS A, GAO R, et al. Single-cell DNA sequencing reveals a late-dissemination model in metastatic colorectal cancer [J]. *Genome Res*, 2017, 27(8): 1287–1299.
- [19] ZHANG Y, WANG F, NING N, et al. Patterns of circulating tumor cells identified by CEP8, CK and CD45 in pancreatic cancer [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): 1228–1233.
- [20] LEE M C, LOPEZ-DIAZ F J, KHAN S Y, et al. Single-cell analyses of transcriptional heterogeneity during drug tolerance transition in cancer cells by RNA sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(44): E4726–E4735.
- [21] KIM K T, LEE H W, LEE H O, et al. Single-cell mRNA sequencing identifies subclonal heterogeneity in anti-cancer drug responses of lung adenocarcinoma cells [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 127.
- [22] KIM C, GAO R, SEI E, et al. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 879–893. e13.
- [23] CHUNG W, EUM H H, LEE H O, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15081.
- [24] ZHENG C, ZHENG L, YOO J K, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1342–1356. e16.
- [25] AZIZI E, CARR A J, PLITAS G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1293–1308. e36.
- [26] WEN L, TANG F. Single cell epigenome sequencing technologies [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 59: 62–69.
- [27] GUILLAUMET-ADKINS A, RODRIGUEZ-ESTEBAN G, MEREU E, et al. Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 45.
- [28] MARTELOTTO L G, BASLAN T, KENDALL J, et al. Whole-genome single-cell copy number profiling from formalin-fixed paraffin-embedded samples [J]. *Nat Med*, 2017, 23(3): 376–385.

(收稿日期: 2019-04-01 修回日期: 2019-05-15)