

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.001

· 专家论坛 ·

单细胞转录组测序和肿瘤精准医疗

杨梅¹, 唐乐怡^{1△}, 訾晓渊² (1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 新格元生物科技有限公司, 江苏 南京 210044)



訾晓渊 博士, 新格元生物科技有限公司高级副总裁。曾任原第二军医大学细胞生物学教研室副教授、硕士生导师, 长海医院泌尿外科实验室执行主任; 耶鲁大学博士后, 耶鲁大学生物医学工程系副研究员。先后入选上海市“浦江人才计划”和江苏省“双创人才计划”。在单细胞的功能基因组学、肝干细胞及肝癌干细胞的基础研究与临床转化、前列腺癌的精准治疗、转基因小鼠和肝纤维化的发生机制等领域进行了长期的研究, 作为项目负责人先后承担了国家自然科学基金等6项科研项目, 参与了国家973计划、863计划项目等多项研究工作。先后在 *Cell*、*Nature*、*Cancer Discov*、*Cell Stem Cell*、*Oxid Med Cell Longev*、*Sci Rep* 和 *Eur J Immunol* 等国际知名学术期刊上发表研究论文30余篇, 主编或参编学术专著和教材16部。

[摘要] 单细胞测序技术是指以单个细胞为单位, 通过高通量测序技术全方位分析单个细胞内的遗传信息, 其已成为现代生物学深度研究的一种强有力工具, 使生物医药领域研究和临床应用转化研究达到了传统测序方法难以实现的极高精确度和灵敏度。目前, 单细胞转录组测序(又称“单细胞RNA测序”, scRNA-seq)已成为最广泛应用的单细胞测序技术。简要介绍scRNA-seq技术的发展历程、技术原理和方法, 系统阐述其应用在肿瘤异质性、肿瘤转移、肿瘤免疫、肿瘤耐药等基础领域的研究成果及其在肿瘤精准医疗的临床转化与应用中的研究进展, 单细胞测序技术的发展和應用必将推动肿瘤精准医疗迈向更高水平。

[关键词] 单细胞转录组测序; 精准医疗; 肿瘤异质性; 肿瘤微环境; 肿瘤免疫; 肿瘤耐药

[中图分类号] R730.51; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)11-1053-08

Single-cell transcriptome sequencing and precision medicine in cancer

YANG Mei¹, TANG Leyi^{1△}, ZI Xiaoyuan² (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 2. Singleron Biotech Co., Ltd, Nanjing 210044, Jiangsu, China)

[Abstract] Single-cell sequencing is a new technology for comprehensive analysis of genetic information at single cell level through high-throughput sequencing technology. Single-cell sequencing has become a powerful tool for in-depth research in modern biology. Single-cell sequencing technologies have enabled the research in biomedical field and clinical translation to achieve a high level of accuracy and sensitivity that traditional sequencing technology couldn't achieve. At present, single-cell transcriptome sequencing (often referred to as “single-cell RNA sequencing”, scRNA-seq) has become the most widely used single-cell sequencing technology. In this paper, the development history, technical principles and methods of scRNA-seq are briefly introduced. In addition, the research achievements of scRNA-seq in the basic research fields of tumor heterogeneity, tumor metastasis, tumor immunity and tumor drug resistance, as well as its research progress on translational medicine and application in tumor precision medicine are systematically described, in hope to promote tumor precision medicine to a higher level through the development and application of single-cell sequencing technology.

[Key words] single cell transcriptome sequencing technology; precision medicine; tumor heterogeneity; tumor microenvironment; tumor immune; tumor drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(11): 1053-1060. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.11.001]

单细胞测序(single-cell sequencing)技术是指以单个细胞为单位, 通过对单细胞遗传物质扩增、标记、建库和测序, 最后对单个细胞基因组或转录组展开数据分析。目前, 已经开发了多种单细胞测序方法, 包括单细胞转录组测序(又称“单细胞RNA测序”, single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)^[1]、单细胞全基因组测序(single-cell whole-genome sequencing, scWG-seq)^[2]、单细胞全基因组甲基化测

[基金项目] 江苏省“双创人才计划”资助项目(No.JSP-ORB2019-12-04)。Project supported by the Program for High Level Entrepreneurial and Innovative Talents Introduction (No.JSP-ORB2019-12-04)

[作者简介] 杨梅(1999—), 女, 硕士生(教育部卓越工程师培养计划), 主要从事生物制药的研究。E-mail: Ymee_47cpu@163.com; 唐乐怡(2000—), 女, 硕士生(教育部卓越工程师培养计划), 主要从事生物制药的研究, E-mail: tangleyi2000@163.com。△为共同第一作者。

[通信作者] 訾晓渊(ZI Xiaoyuan, corresponding author), E-mail: zixiaoyuan@singleronbio.com

序 (single-cell whole-genome methylation sequencing, scWGMs)^[3]、单细胞染色质可及性测序 (single-cell assay for transposase accessible chromatin using sequencing, scATAC-seq)^[4] 及单细胞多组学测序 (single-cell multi-omics sequencing technology, scCOOL-seq)^[5] 等, 基于这些方法进行生物信息学分析, 可以对单个细胞的基因组、转录组或表观基因组等单独或同时进行全面而精确的分析, 使人们能够在单细胞水平上检测基因表达谱、追踪细胞发育谱系等^[1]。

近年来, 单细胞测序技术发展迅猛, 2017 年被 *Nature* 杂志评论为“遗传学显微镜”^[6], scRNA-seq 技术也于 2018 年被 *Science* 杂志评为十大科技突破之首^[7]。此后, 单细胞多组学研究方法^[8] 和单细胞空间转录组技术^[9] 于 2019 年和 2020 年先后被 *Nat Methods* 杂志评为生命科学领域年度创新方法。由此可见, 单细胞测序技术已成为现代生物学研究的一种有力工具, 为生物医药相关领域研究和临床应用转化提供了传统测序方法所难以实现的突破^[10]。目前, 单细胞测序技术应用最广泛的是 scRNA-seq, 本文重点阐述其在肿瘤研究及精准医疗中应用的研究进展。

1 scRNA-seq 技术的发展历程

scRNA-seq 是在单个细胞水平对细胞基因表达等信息进行检测, 基本技术原理是采用一定的分离技术将组织中的所有细胞分散为单个细胞, 并对单个细胞中的所有 mRNA 进行反转录扩增和高通量测序, 分析单个细胞的转录组特性并探究细胞的异质性。其发展历程大致分为三个阶段。

1.1 单细胞全长转录组测序

scRNA-seq 技术始于 2009 年, TANG 等^[11] 创新性地使用了一种基于 PCR 的单细胞 mRNA 反转录扩增方法, 结合 NGS 技术首次实现了 scRNA-seq, 使人们能够在单个细胞的分辨率下检测基因表达。随后, RAMSKÖLD 等^[11] 于 2012 年利用模板转换原理开发了单细胞全长 RNA 测序 (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript sequencing, SMART-seq) 的方法, 真正实现了单细胞全长转录组测序。后来, 耶鲁大学 SHERMAN 实验室的 PAN 等^[12] 和樊荣教授实验室的 HAN 等^[13] 也共同开发了基于 Phi29 DNA 聚合酶的 mRNA 转录组扩增 (Phi29-mRNA amplification, PMA) 等单细胞全长转录组测序技术。

1.2 基于条码和标签的 scRNA-seq

早期的单细胞全长转录组测序方法虽然实现了单细胞层次的转录组测序, 但其通量较低、成本高, 且很难判断测序后得到的数据是否真实。为此, 科学家们

逐渐将细胞条码 (cell barcode, CB) 和/或唯一分子标签 (unique molecular identifiers, UMI) 引入到单细胞测序技术中。CB 是一小段核酸序列, 在单细胞测序时, 单一细胞将获得唯一 CB; 在混合测序时, 利用 CB 就可区分样品中不同的单细胞。UMI 也是由随机碱基组成的一段核酸序列, 在单细胞测序时, 在反转录过程中同一细胞中每一条转录本上都会添加一个 UMI, 使得测序读长可以对应到单个转录本, 从而去除扩增噪声和偏好性, 做到了对单细胞中转录本的准确定量。基于 CB 和 UMI 的 scRNA-seq, 扩展建立了单细胞标记的逆转录测序 (single-cell tagged reverse transcription sequencing, STRT-seq)^[14]、通过线性扩增和测序进行细胞表达测序 (cell expression by linear amplification and sequencing, CEL-seq)^[15] 和特异分子标识符序列测序 (unique molecular identifiers sequencing, UMI-seq)^[16] 等。

1.3 高通量的 scRNA-seq

CB 和 UMI 概念的引入, 为人们开发高通量 scRNA-seq 奠定了基础。2015 年, 哈佛医学院 MACOSKO 团队^[17] 和 KLEIN 团队^[18] 同时开发了基于微流控液滴法的单细胞高通量液滴测序 (droplet-sequencing, Drop-seq) 和 inDrop (indexing droplet) 高通量 scRNA-seq 方法, 进一步推动了单细胞测序技术的发展, 大大提高了单细胞分析的深度和广度。在上述方法中, 细胞被捕获并封装在凝胶乳胶珠中进行 CB 或 UMI 标记, 从而实现了一次实验可同时数千甚至上万个细胞进行 scRNA-seq, 且定量相对准确。后来, 人们又利用微孔板法也实现了高通量 scRNA-seq。HAN 等^[19] 利用微孔板法进行 scRNA-seq, 确定了所有主要人体器官的细胞组成类型, 并且构建了人体细胞景观 (human cells landscape, HCL), 为人类生物学研究提供了丰富的资源。FAN 等^[20] 开发的微孔捕获测序技术 CytoSeq 是一种结合了 NGS 和 CB 的无须机器人或自动化就能够同时分析几千个微孔单元的单细胞分析技术。新格元生物科技有限公司在此基础上开发了一站式、全方位、高通量 scRNA-seq 技术平台 Singleron GEXSCOPE[®]^[21]。表 1 总结了各种 scRNA-seq 方法的性能特点。

2 高通量 scRNA-seq 技术的原理和方法

scRNA-seq 以单个细胞为研究对象, 通过单细胞分离, 对单个细胞中的 mRNA 进行捕获, 再进行反转录生成 cDNA, 经过均匀扩增、标记建库, 再进行测序, 最后对 scRNA-seq 数据展开生物信息学分析, 从而获得所需的分析结果。目前常见的高通量 scRNA-seq 技

术原理主要有两种:(1)液滴法,其将特制的凝胶微珠与单细胞悬液混合,使单细胞与凝胶微珠结合,利用微流控技术将细胞输入油相孔道形成“油包水”,并且凝胶微珠表面含有CB或UMI,可以将遗传物质片段进行特异标记;(2)微孔法,其使用含有大量孔洞的蜂窝板,将细胞悬液与标记磁珠加入至蜂窝板中,使细胞通过重力沉降进入孔洞,标记磁珠上有类似液滴法中的序列结构,在细胞捕获后可在显微镜下直观地获得捕获数及细胞状态等信息。

表1 各种scRNA-seq方法性能的比较

方 法	检测通量	种 类	敏感性	分辨率	优 势	不 足	文献
SMART-seq	低	基于孔板	+++++	+	全长转录组	成本高	[12]
CEL-seq	低	基于孔板	+++++	+	——	易被其他杂细胞RNA污染	[16]
Drop-seq	高	基于微珠	++	+++	成本低	细胞类型区分欠准确	[18]
CytoSeq	高	基于微珠	++++	+++	分离温和	——	[21]
inDrop-seq	高	基于微珠	+	+++	成本低	——	[19]

高通量 scRNA-seq 的技术流程主要分为图 1 所示几个关键步骤,包括单细胞分离及分离、RNA 捕获和扩增后文库构建、高通量测序以及数据分析。

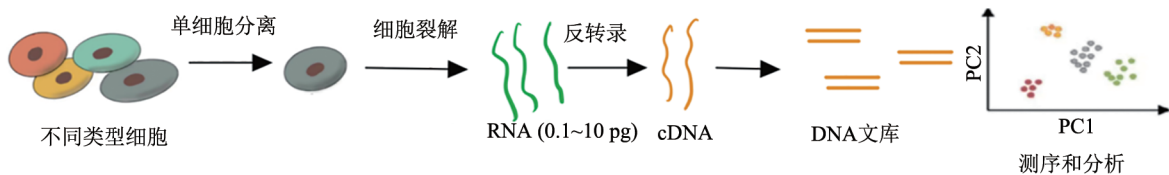


图1 scRNA-seq 技术流程图

3 scRNA-seq 和肿瘤精准医疗的基础研究

3.1 scRNA-seq 推动肿瘤异质性的研究

传统转录组测序技术只能测知混合细胞的平均基因表达信息,因而会掩盖肿瘤细胞之间的异质性与细胞亚群之间的表达差异。scRNA-seq 技术则可解决此技术的缺陷,其能够在单细胞层面对细胞的基因表达进行高分辨率的分析,可发现不同肿瘤细胞亚型之间的转录表达差异,避免了传统基因组技术平均信号所产生的结果误差,进而为肿瘤异质性的应对方法提供了研究基础;也为肿瘤诊疗提供精准的遗传信息,可以真正实现“对症下药”。

scRNA-seq 技术可用于分析肿瘤发展及其演变过程中的机制研究,帮助对肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的表达异质性进行深入研究,并且鉴定出一些在肿瘤发展过程中发挥关键作用的细胞亚群及异常表达的基因。GOJO 等^[22]运用 scRNA-seq 技术分析了室管膜瘤的分子群和解剖位置,探究其肿瘤细胞异质性和发育起源,发现预后良好的室管膜瘤主要含有分化良好的细胞,而侵袭性室管膜瘤则富含未分化的细胞群,揭示了室管膜瘤生物学中与临床行为相关的发育层次。WU 等^[21]采用

新格元 GEXSCOPE®单细胞测序技术全面解析了 42 例晚期 NSCLC 患者的穿刺样本,发现不同患者来源的肿瘤在细胞组成、染色体结构、分化轨迹及细胞间信号网络等方面都存在显著的异质性,该研究还首次发现了肿瘤异质性和肿瘤相关中性粒细胞之间的关联性,为后者在 NSCLC 中的功能研究及其在免疫治疗疗效中的潜在预测作用打开了新的视角。TME 中的基质细胞在多大程度上被结直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞转化一直是个谜。ZHOU 等^[23]对 21 例稳定的 CRC 患者和 6 例无癌的老年人进行了单细胞多组学测序,为深入认识 CRC 中 TME 间质细胞的基因组变化提供了有价值的数据。

乳腺癌的 TME 较为复杂,其中不同细胞的相互作用在肿瘤进展和治疗反应中发挥重要作用。因此,单细胞技术为探究其肿瘤异质性提供了良好帮助。WU 等^[24]利用单细胞与空间分辨转录组学分析技术对乳腺癌进行研究,开发了一种固有亚型分类单细胞方法(single-cell method of intrinsic subtype classification, SCSubtype)来揭示复发性肿瘤细胞的异质性,并利用一种通过测序来进行转录组和表位的细胞索引技术(cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing,

CITE-seq)进行免疫分型,为抗肿瘤免疫调节提供了新的见解。

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的TME包含一个异质性的动态基质细胞群,然而大规模RNA测序仍不足以构建NPC浸润性基质细胞的深度景观。因此GONG等^[25]对14名患者的66 627个细胞进行了scRNA-seq,结合T和B细胞的克隆型鉴定,并根据基因图谱鉴定与表征了5个主要的基质簇和36个不同的亚群;又通过与非恶性微环境中的浸润细胞相对比,揭示了NPC的TME极具代表性的异质性特征,包括表型丰度、遗传变异、免疫动力学、克隆扩增、发育轨迹以及深刻影响患者预后和治疗结果的分子间的相互作用,显示了NPC异质性特征和患者PFS之间的相关性。胶质母细胞瘤是一种无法治愈的恶性肿瘤,异质性的存在是治疗失败的主要原因,而遗传、表观遗传以及TME都有可能影响其异质性。NEFTTEL等^[26]采用scRNA-seq结合Bulk转录组数据的方法,对胶质母细胞瘤的异质性、细胞状态和遗传多样性的统一模型进行了推导,发现了其恶性细胞主要以4种状态存在,且他们受TME的影响,该结果为攻克胶质母细胞瘤提供了研究蓝图。

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种高度侵袭性的恶性骨肿瘤,多见于儿童和青少年。ZHOU等^[27]利用GEXSCOPE*平台技术解离了来自7个原发性、2个复发性以及2个肺转移性OS组织,并对得到的瘤细胞进行scRNA-seq,基于基因表达谱和典型标记的无偏聚类方法鉴定出了11个主要细胞簇,描述了OS恶性细胞及其TME的特征;又通过分析推断的拷贝数变异与轨迹揭示了恶性成骨细胞与恶性成软骨细胞间的转化,并发现阻断T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域蛋白(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain, TIGIT)可增强具有高比例TIGIT⁺的原代CD3⁺细胞对OS细胞的毒性作用,这些结果为OS治疗提供了潜在的靶点。

3.2 scRNA-seq推动肿瘤转移的研究

scRNA-seq技术可在恶性肿瘤转移机制研究中发挥重要作用,帮助研究者了解转移过程中细胞亚群所发生的转录组动态变化。恶性肿瘤的转移过程包括原始肿瘤部位发生转移、在血液或淋巴循环的扩散传播、远端的组织侵袭以及成功建立远端转移灶。血液循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是由肿瘤组织脱落进入血液循环的肿瘤细胞^[28-29]。血行扩散是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)转移的主要途径,而CTC为血行扩散的“种子”,促进HCC转移至其他微环境并定植。SUN等^[30]对HCC患者4个血管部位的外周血中的CTC进行

分离筛选和富集后,通过scRNA-seq揭示了CTC的转录动力学与血液运输过程中的应激反应、细胞周期和免疫逃逸信号有关,并发现趋化因子CCL5为CTC免疫逃逸的重要介质,其可通过招募Treg细胞促进免疫逃逸,该结果为解读HCC转移提供了新的视角。BORAL等^[31]对CTC的转录组进行分析,发现一种独特的“CTC基因信号”,进一步研究后确认了与脑基底细胞瘤相关的CTC生物标志物和信号通路,可用作脑微转移检测的筛选工具,或用于辅助脑基底瘤患者的合理治疗决策和治疗监测。YU等^[32]采用微控流装置从内源性胰腺癌小鼠模型中有效捕获CTC,并对CTC进行scRNA-seq,发现Wnt2是CTC中富集的候选基因,其在胰腺癌细胞中的高表达抑制了失巢凋亡(anoikis),增加了体内转移倾向,并且发现胰腺癌细胞形成的非黏附肿瘤球与多种Wnt基因的上调有关,该研究结果确定了CTC可作为预防胰腺癌远端扩散的候选治疗靶点。

乳腺癌淋巴结转移的分子机制尚不清楚。XU等^[33]利用scRNA-seq技术研究了来自15对原发性肿瘤和腋窝淋巴结样本的96 796个瘤细胞的转录组谱,鉴定了9个癌细胞亚群,包括CD44⁺/ALDH2⁺/ALDH6A1⁺乳腺癌干细胞(breast cancer stem cell, BCSC),进一步发现BCSC仅存在于原发性肿瘤中,并进化为浸润淋巴结的转移簇;此外,转录组数据显示,由NECTIN2-TIGIT介导的相互作用促进免疫逃逸和淋巴结转移,该研究结果为乳腺癌转移机制提供了新的见解。ANDERSSON等^[34]为解决肿瘤单细胞测序导致空间信息丢失的问题,使用空间转录组学技术对HER2阳性乳腺癌中的空间基因表达进行研究,研究者构建了一个预测模型来推断三级淋巴样结构的存在,其适用于各种组织类型和技术平台,可结合不同的数据模式来定义肿瘤中细胞相互作用的高分辨率图谱,并提供跨组织和癌种的通用工具。

3.3 scRNA-seq推动肿瘤免疫的研究

scRNA-seq技术可用于分析肿瘤与免疫细胞的关系,帮助寻找肿瘤治疗潜在的新靶点。免疫检查点阻断是目前肿瘤免疫学研究的热点,通过阻断免疫检查点分子的作用可以提高抗肿瘤免疫反应,进而达到消除肿瘤的目的。T细胞免疫球蛋白和黏蛋白分子3(T cell immunoglobulin and mucin-containing protein-3, TIM-3)被鉴定为在产生IFN- γ 的T细胞上表达的分子,作为一种重要的免疫检查点分子被发现。然而,TIM-3在其他几种类型的免疫细胞上也存在表达,因此尚难以确切知道使用抗TIM-3单克隆抗体阻断治疗产生疗效的具体机制。DIXON等^[35]使用条件性敲除TIM-3方法结合scRNA-

seq 技术, 证明了 TIM-3 对 DC 的重要性, 在 DC 上敲除 TIM-3 而非在 CD8⁺ 或 CD4⁺ 细胞上敲除 TIM-3 可以促进强大的抗肿瘤免疫反应。

肺癌是一种高度异质性的肿瘤, 癌细胞与 TME 中细胞共同决定疾病进展与患者预后, scRNA-seq 技术则能对 TME 中的免疫细胞类型进行准确分析。GUO 等^[36]对来自 14 名治疗前 NSCLC 患者的 12 346 个 T 细胞进行了深度 scRNA-seq 分析, 结合表达谱和基于 T 细胞抗原受体的谱系追踪, 发现组织间存在很大比例具有高度迁移性的效应 T 细胞, 但除外已经衰竭的肿瘤浸润型 CD8⁺ T 细胞, 另外还观察到高比例的“准衰竭”和衰竭的 T 细胞与肺腺癌的更好预后相关。该研究为患者分层提供了一种新的方法, 并将有助于进一步了解 NSCLC 中 T 细胞的功能状态和动力学。

LI 等^[37]通过对 25 名黑色素瘤患者肿瘤中免疫细胞进行 scRNA-seq 和单细胞 TCR 测序(single-cell TCR sequencing, scTCR-seq)分析, 绘制了详细的黑色素瘤免疫细胞图谱, 发现不同免疫细胞亚型在不同患者中存在显著异质性; 尽管丰度不同, 但所观察到的 CD8⁺ T 细胞的分化途径高度保守, 该研究为癌症中免疫细胞异质性对免疫治疗效果的影响提供了更多的理论支持。2018 年, SAVAS 等^[38]对人乳腺癌组织中 6 311 个 T 细胞进行 scRNA-seq, 发现 CD8⁺ TRM 与患者的较高生存率相关, 患者有更好的预后, 推测 CD8⁺ TRM 参与对乳腺癌的免疫监测, 可能是免疫检查点疗法的关键靶点。

T 细胞介导的适应性细胞免疫在肿瘤免疫反应中具有关键性作用, 而 B 细胞在肿瘤进展与治疗中的作用直到最近才被提出。为了深入了解乳腺癌浸润性免疫细胞, 尤其是 B 细胞亚群的功能和发育动力学, HU 等^[39]结合 scRNA-seq 和抗原受体谱系分析来描述三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)浸润免疫细胞的特征, 得到了 TNBC 浸润 B 细胞的综合图谱。scRNA-seq 分析结果表明, B 细胞特征与乳腺癌患者生存率的提高显著相关; 肿瘤浸润 B 细胞群的功能分析表明, 从机制上讲, B 细胞亚群可能通过各种途径参与免疫监测, 该研究对肿瘤浸润 B 细胞亚群阐明并为肿瘤免疫治疗提供了有价值的线索。

由于膀胱癌是免疫浸润最少的癌症之一, 对于其治疗策略的设计一直较为困难。CHEN 等^[40]通过对 8 个膀胱癌组织和 3 个癌旁组织样本进行 scRNA-seq, 在膀胱癌的 TME 中识别出了 19 种不同的细胞类型, 表明肿瘤内高度异质性; 并且通过对膀胱癌组织 TME 的绘制, 发现了一种癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)亚群, 即炎

症性癌症成纤维细胞(inflammatory cancer-associated fibroblasts, ICAF)及其在膀胱癌中的作用机制, 并探寻到了膀胱癌治疗的可能靶点, 为膀胱癌的个体化治疗提供了基础。

3.4 scRNA-seq 推动肿瘤耐药性的研究

免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)在一些黑色素瘤患者体内产生持久反应, 但仍对许多患者不能产生治疗效果, 导致耐药性的分子基础仍然难以捉摸。JERBY 等^[41]通过对 ICI 治疗前后的黑色素瘤患者样本进行 scRNA-seq, 并将治疗后患者分为耐药人群与不耐药人群, 通过对比分析后发现, 在耐药患者中 T 细胞浸润少、CDK4/6 信号通路异常活跃; 通过在黑色素瘤小鼠模型中使用 CDK4/6 抑制剂联合免疫治疗可使肿瘤得到明显抑制, 目前 CDK4/6 抑制剂已被临床批准用于 HR 阳性乳腺癌治疗。

酪氨酸激酶抑制剂(TKI)对携带受体酪氨酸激酶体细胞突变的某些癌症亚型的患者具有临床疗效, 其作为一线治疗药物在 EGFR 突变的 NSCLC 患者中进行应用。然而该药的临床反应持续时间有限, 大部分患者最终会产生耐药性。为了优化 TKI 的临床应用, 需要对其内在和获得性耐药机制进行探索。AISSA 等^[42]使用 NGS、液滴数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)和 CB 标记技术追踪 NSCLC 细胞系 PC9 的变化, 结果表明它们与预先存在的耐药克隆有关; 又利用 scRNA-seq 技术分析对 TKI 存在反应的 NSCLC 临床前模型, 揭示了治疗过程中 NSCLC 细胞系模型产生药物耐受的机制。对携带间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)基因重排的晚期 NSCLC 患者使用 ALK-TKI 会产生良好的治疗效果, 但患者仍然产生了获得性耐药, 因此识别并认识这些耐药机制对于设计新的治疗策略十分必要。OULHEN 等^[43]选择了 6 例对 ALK-TKI 耐药的 ALK 重排患者, 根据上皮和/或 ALK 表达特征提供的 CTC 拷贝数变异(copy number alteration, CNA)图谱的综合描述, 并通过评估染色体不稳定性(chromosomal instability, CIN)和等级聚集性分析表征 CTC 中 CNA 的异质性, 最终确定了 AKL 非依赖性通路中的多种 CNA 驱动因素, 该研究描绘了 AKL-TKI 异质性耐药细胞景观图并为针对性地确定治疗策略提供了基础。

TNBC 为一种侵袭性的乳腺癌亚型, 患者发生化疗耐药。为了研究 TNBC 的耐药性是由已存在的罕见克隆选择引起还是通过获得新的基因突变引起, KIM 等^[44]应用单细胞 DNA 和转录组测序及外显子测序技术对 20 例 TNBC 患者在新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy, NAC)期间的样本进行了纵向分析, 数

据表明耐药基因型预先存在,而转录谱是通过TNBC患者化疗反应的重新编程获得的,该研究为消除TNBC的耐药性提供了依据。

去势疗法(androgen-deprivation therapy, ADT)是前列腺癌常见的治疗方法,但癌症复发后雄激素受体(androgen receptor, AR)抑制剂的疗效因人而异。来自哈佛医学院的研究者^[45]通过液体活检获得CTC后进行scRNA-seq分析,揭示了前列腺癌的耐药机制并发现其与非经典Wnt通路相关。该研究中使用了目前较为热门的微流控scRNA-seq技术。

4 scRNA-seq和肿瘤精准医疗研究的临床转化

自从2015年起,美国“精准医疗计划”启动,掀起了全球精准医疗的热潮,肿瘤等疾病的治疗逐步进入“精准医疗时代”。精准医疗,即以患者的临床病史信息、病理、影像和基因组信息等为基础,为患者量身定制个体化的治疗方案。精准医疗需要快速精准的基因数据分析,而scRNA-seq可以提供患者的多种病变基因信息,同时结合大数据,锁定更多的疾病特征,从而指导制定预防和治疗方案。精准医疗要惠及每一位患者,必须解决三个问题,即检测的精准化、检测的自动化和数据分析的无人化,从而可以在第一时间在任何地点实现患者个体的精准诊疗。通过建立自动化和智能化的精准检测单位,结合其他临床数据信息,检测中心能够提供更快、更精准的服务,帮助医生进行治疗决策。

目前scRNA-seq技术已经能够实现对多达数十万个的细胞进行同时分析,特别适合从基因信息角度剖析乳腺癌复杂的TME,并评估乳腺肿瘤内及周围细胞群体的异质性,进而为乳腺癌的精准治疗提供强有力的信息和技术支持。例如,CHUNG等^[46]通过分析11例乳腺癌患者(包括luminal A型、B型及HER2阳性和TNBC)的515个乳腺肿瘤细胞的转录本后发现,从HER2阳性肿瘤中分离出的细胞高度多样化,主要表现为HER2和TNBC表型。此外,从ER/HER2双阳性肿瘤中分离出的细胞通常是ER亚型,这是因为HER2模块基因低表达和ER信号通路的激活。因此,单细胞信息分子图谱可以帮助识别ER途径显著激活的ER/HER2双阳性肿瘤,并且该肿瘤类型可能受益于强化内分泌治疗。另外,WAGNER等^[47]研究发现,所有临床亚型的肿瘤都由多个不同表型的细胞组成,但其中一种特定表型通常占主导优势,并且表型优势对肿瘤进展和治疗耐药至关重要。例如,占主导地位的ERa⁺HER2⁺Survivin^{high}表型与新辅助化疗耐药有关; luminal B亚型肿瘤中ER⁺细胞的比例与乳腺癌TME中的PD-L1⁺肿瘤相关巨噬细胞以及衰竭T细胞表型

相关,并且影响ICI的疗效。因此,通过scRNA-seq技术了解患者的肿瘤异质性,有助于选择合适的治疗方案并改善患者预后。

在精准医疗时代,精准的检测技术推动了癌症等疾病的个体化诊疗的发展。同时,临床精准诊疗的需求可以进一步推动精准检测技术的改进和应用。新技术能够帮助专业人员绘制肿瘤图谱、识别关键的致癌因素,并制定专门的治疗方案,以推动临床精准诊疗发展。近年来,精准医学检测技术推动了精准医学新技术、新靶点、新药物的研发进程。目前,在精准检测技术和平台方面还存在许多挑战:首先,不同的NGS技术得到的结果不完全一致,这可能与样品预处理、NGS平台和算法的差异有关;其次,活检的敏感性和准确性还需要完善和统一,尚不能用于肿瘤的早期精准筛查和诊断^[48];还有,scRNA-seq技术的成本、对新鲜分离细胞的需求和高水平的实验室要求限制了其广泛的临床应用。此外,有研究^[49]表明针对同一基因突变的治疗在不同的肿瘤类型中有不同的效果,这可能与信号转导和肿瘤间异质性的差异有关。未来在表观遗传学、罕见基因检测、个体化靶向治疗、多基因靶向药物联合治疗等方面,应广泛探索精准检测技术的应用^[50]。总体而言,精确检测技术可以完成对每个肿瘤患者的分子特征和突变信息的数据整理分析,从而制定个性化的诊断和治疗方案。

将scRNA-seq检测融合到临床检验中可以更加高效地挖掘潜在治疗靶点及发现更多的个体生物标志物,有效地指导治疗决策和预测治疗效果,从而实现个体化的肿瘤诊疗。

5 结 语

scRNA-seq是基于NGS技术进一步发展起来的新技术,它将改变人们对于很多生命现象和疾病的认识。虽然scRNA-seq技术起步较晚,但是从2009年最早开始的低通量测序到2015年与微流控技术的结合,使得scRNA-seq迅速发展成高通量检测平台。高通量scRNA-seq迅速已经在全球呈现出蓬勃发展的态势,从美国的“HCA计划”到欧洲的“Lifetime计划”,以及我国以浙江大学为首的研究团队完成的“HCL计划”,都将标志着生物医药学研究从基因组时代迈向了单细胞时代。随着精准医疗时代的到来,scRNA-seq技术将不断地结合临床实践促进人类健康保障的进一步发展。

[参考文献]

- [1] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whol

- etranscriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382. DOI:10.1038/nmeth.1315.
- [2] WANG Y, NAVIN N E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 598-609. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.005.
- [3] SMALLWOOD S A, LEE H J, ANGERMUELLER C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 817-820. DOI:10.1038/nmeth.3035.
- [4] BUENROSTRO J D, WU B, LITZENBURGER U M, et al. Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation [J]. *Nature*, 2015, 523(7561): 486-490. DOI:10.1038/nature14590.
- [5] PICELLI S, FARIDANI O R, BJÖRKLUND A K, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9 (1): 171-181. DOI:10.1038/nprot.2014.006.
- [6] GILADI A, AMIT I. Immunology, one cell at a time[J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 27-29. DOI:10.1038/547027a.
- [7] PENNISI E. Development cell by cell[J]. *Science*, 2018, 362(6421): 1344-1345. DOI:10.1126/science.362.6421.1344.
- [8] ZHU C X, PREISSE S, REN B. Single-cell multimodal omics: the power of many[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 11-14. DOI: 10.1038/s41592-019-0691-5.
- [9] MARX V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 9-14. DOI:10.1038/s41592-020-01033-y.
- [10] ZHANG X, MARJANI S L, HU Z, et al. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1305-1312. DOI:10.1158/0008-5472.can-15-1907.
- [11] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG Y C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-782. DOI: 10.1038/nbt.2282.
- [12] PAN X, DURRETT R E, ZHU H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells[J]. *PNAS*, 2013, 110(2): 594-599. DOI:10.1073/pnas.1217322109.
- [13] HAN L, ZI X, GARMIRE L X, et al. Co-detection and sequencing of genes and transcripts from the same single cells facilitated by a microfluidics platform[J/OL]. *Sci Rep*, 2014, 6485-6485[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/srep06485>. DOI: 10.1038/srep06485.
- [14] ISLAM S, KJÄLLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq[J]. *Genome Res*, 2011, 21(7): 1160-1167. DOI: 10.1101/gr.110882.110.
- [15] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-673. DOI:10.1016/j.celrep.2012.08.003.
- [16] ISLAM S, ZEISEL A, JOOST S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(2): 163-166. DOI:10.1038/nmeth.2772.
- [17] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets[J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1202-1214. DOI:10.1016/j.cell.2015.05.002.
- [18] KLEIN A M, MAZUTIS L, AKARTUNA I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1187-1201. DOI:10.1016/j.cell.2015.04.044.
- [19] HAN X, ZHOU Z, FEI L, et al. Construction of a human cell landscape at single-cell level[J]. *Nature*, 2020, 581(7808): 303-309. DOI:10.1038/s41586-020-2157-4.
- [20] FAN H C, FU G K, FODOR S P A. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry[J]. *Science*, 2015, 347(6222): 1258367-1258375. DOI:10.1126/science.1258367.
- [21] WU F, FAN J, HE Y, et al. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2540-2540. DOI: 10.1038/s41467-021-22801-0.
- [22] GOJO J, ENGLINGER B, JIANG L, et al. Single-cell RNA-seq reveals cellular hierarchies and impaired developmental trajectories in pediatric ependymoma[J/OL]. *Cancer Cell*, 2020, 38(1): 44-59 [2021-09-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32663469/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.004.
- [23] ZHOU Y, BIAN S, ZHOU X, et al. Single-cell multiomics sequencing reveals prevalent genomic alterations in tumor stromal cells of human colorectal cancer[J/OL]. *Cancer Cell*, 2020, 38(6): 818-828, e5[2021-09-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33096021/>. DOI:10.1016/j.ccell.2020.09.015.
- [24] WU S Z, AL-ERYANI G, RODEN D L, et al. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1334-1347. DOI:10.1038/s41588-021-00911-1.
- [25] GONG L, KWONG D L, DAI W, et al. Comprehensive single-cell sequencing reveals the stromal dynamics and tumor-specific characteristics in the microenvironment of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1540-1558. DOI:10.1038/s41467-021-21795-z.
- [26] NEFTEL C, LAFFY J, FILBIN M G, et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma[J/OL]. *Cell*, 2019, 178(4): 835-849[2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31327527/>. DOI:10.1016/j.cell.2019.06.024.
- [27] ZHOU Y, YANG D, YANG Q, et al. Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6322 [2021-09-10] <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20059-6>. DOI:10.1038/s41467-020-20059-6.
- [28] TURAJLIC S, SWANTON C. Metastasis as an evolutionary process [J]. *Science*, 2016, 352(6282): 169-175. DOI: 10.1126/science.aaf2784.
- [29] HUNTER K W, AMIN R, DEASY S, et al. Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(4): 211-223. DOI:10.1038/nrc.2017.126.
- [30] SUN Y F, WU L, LIU S P, et al. Dissecting spatial heterogeneity and the immune-evasion mechanism of CTCs by single-cell RNA-seq in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):4091-4105. DOI:10.1038/s41467-021-24386-0.
- [31] BORAL D, VISHNOI M, LIU H N, et al. Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 196-206. DOI: 10.1038/s41467-017-00196-1.
- [32] YU M, TING D T, STOTT S L, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis[J]. *Nature*, 2012, 487(7408): 510-513. DOI:10.1038/nature11217.
- [33] XU K, WANG R, XIE H, et al. Single-cell RNA sequencing reveals

- cell heterogeneity and transcriptome profile of breast cancer lymph node metastasis[J/OL]. *Oncogenesis*, 2021, 10(10): 66[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41389-021-00355-6>. DOI: 10.1038/s41389-021-00355-6.
- [34] ANDERSSON A, LARSSON L, STENBECK L, et al. Spatial deconvolution of HER2-positive breast cancer delineates tumor-associated cell type interactions[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6012[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26271-2>. DOI:10.1038/s41467-021-26271-2.
- [35] DIXON K O, TABAKA M, SCHRAMM M A, et al. TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation[J]. *Nature*, 2021, 595(7865): 101-106. DOI: 10.1038/s41586-021-03626-9.
- [36] GUO X, ZHANG Y, ZHENG L, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 978-985. DOI:10.1038/s41591-018-0045-3.
- [37] LI H, VAN DER LEUN A M, YOFE I, et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma[J/OL]. *Cell*, 2019, 176(4): 775-789[2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30595452/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.043.
- [38] SAVAS P, VIRASSAMY B, YE C, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 986-993. DOI:10.1038/s41591-018-0078-7.
- [39] HU Q T, HONG Y, QI P, et al. Atlas of breast cancer infiltrated B lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2186[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22300-2>. DOI:10.1038/s41467-021-22300-2.
- [40] CHEN Z, ZHOU L, LIU L, et al. Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5077[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18916-5>. DOI:10.1038/s41467-020-18916-5.
- [41] JERBY A L, SHAH P, CUOCO M S, et al. A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade[J/OL]. *Cell*, 2018, 175(4): 984-997[2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30388455/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.09.006.
- [42] AISSA A F, ISLAM A B, ARISS M M, et al. Single-cell transcriptional changes associated with drug tolerance and response to combination therapies in cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1628[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21884-z>. DOI:10.1038/s41467-021-21884-z.
- [43] OULHEN M, PAWLIKOWSKA P, TAYOUN T, et al. Circulating tumor cell copy-number heterogeneity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors[J]. *NPJ Precis Oncol*, 2021, 5(1): 67[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/s41698-021-00203-1>. DOI:10.1038/s41698-021-00203-1.
- [44] KIM C, GAO R, SEI E, et al. Chemoresistance evolution in triplenegative breast cancer delineated by single-cell sequencing[J/OL]. *Cell*, 2018, 173(4): 879-893[2021-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29681456/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.03.041.
- [45] MIYAMOTO D T, ZHENG Y, WITTNER B S, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance[J]. *Science*, 2015, 349(6254): 1351-1356. DOI:10.1126/science.aab0917.
- [46] 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/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(2017): 15081[2021-09-10]. <https://www.nature.com/articles/ncomms15081>. DOI: 10.1038/ncomms15081.
- [47] WAGNER J, RAPSOMANIKI M A, CHEVRIER S, et al. A single-cell atlas of the tumor and immune ecosystem of human breast cancer[J/OL]. *Cell*, 2019, 177(5): 1330-1345. DOI:10.1016/j.cell.2019.03.005.
- [48] MERKER J D, OXNARD G R, COMPTON C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: american society of clinical oncology and college of american pathologists joint review[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(16): 1631-1641. DOI: 10.1200/jco.2017.76.8671.
- [49] STEWART A, COKER E A, PÖLSTERL S, et al. Differences in signaling patterns on PI3K inhibition reveal context specificity in KRAS-mutant cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(8): 1396-1404. DOI:10.1158/1535-7163.mct-18-0727.
- [50] SICKLICK J K, KATO S, OKAMURA R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I¹-PREDICT study[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 744-750. DOI: 10.1038/s41591-019-0407-5.

[收稿日期] 2021-10-22

[修回日期] 2021-11-02

[本文编辑] 沈志超, 黄静怡