

文章编号 :1004-0374(2011)01-0135-04

· 技术与应用 ·

单个肿瘤细胞测序研究进展

吴 松^{1,2}, 蔡志明^{1*}

(1 北京大学深圳医院泌尿外科, 男性生殖与遗传实验室, 深圳 518000; 2 安徽医科大学, 合肥 230000)

摘 要: 肿瘤是机体在各种致癌因素作用下, 遗传物质受损导致特定细胞失去对正常生长调控, 引起其克隆性异常增生而形成的恶性赘生物。随着单细胞分离技术及单细胞测序技术日益成熟, 单个肿瘤细胞全基因组测序已成为肿瘤研究的一个崭新的领域。该文就对单个肿瘤细胞的获取及单个肿瘤细胞测序研究进展进行综述。

关键词: 肿瘤; 单个肿瘤细胞分离; 单个肿瘤细胞测序

中图分类号: R73-3 文献标识码: A

Progress in sequencing single cancer cell

WU Song^{1,2}, CAI Zhi-Ming^{1*}

(1 Institute of Urology, Guangdong and Shenzhen Key Laboratory of Male Reproductive Medicine and Genetics, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518000, China; 2 Anhui Medical University, Hefei 230000, China)

Abstract: Malignant neoplasm is a class of diseases, in which a cell, or a group of cells display uncontrolled growth. With the development of the technology of single-cell separation and sequence, sequencing single tumor cell has become a new area of cancer research. We review the proceedings on sequencing and obtaining for single tumor cell.

Key words: tumor; separating single tumor cell; sequencing single cancer cell

1986 年, 诺贝尔奖获得者 Renato Dulbecco^[1]在“肿瘤研究的转折点: 人类基因组测序”一文中指出: 如果人类想更多地了解肿瘤, 从现在起必须关注细胞的基因组。2005 年, 美国首次宣布实施“肿瘤基因组计划”, 并规划在未来 13 年里找出肺癌、脑癌、卵巢癌等所有困扰人类的癌症基因。5 年过去了, 研究人员湮没在人类基因组的繁杂序列中。国际癌症基因组研究团队(International Cancer Genome Consortium, ICGC)的研究者们希望对 25 000 个肿瘤样本进行全面测序, 从而获得大量不同肿瘤基因组全序列。虽然测序技术已经更新换代, 但是测序仍是项繁杂的工作。然而, 外显子测序技术的成熟^[2]使研究人员能够在测序进程中精简工作, 提高效率, 并删除对癌症研究没有意义的基因序列。2009 年, Tang 等^[3]应用转录组分析单个细胞, 精确分析了取自四细胞胚胎和卵母细胞的单个小鼠细胞的转

录组, 从而使单细胞测序成为可能。技术的突破成为肿瘤研究的转折点^[4,5], 单个肿瘤细胞测序成为肿瘤研究的新领域。

1 单个肿瘤细胞的提取

为了获得尽可能纯的肿瘤组织、细胞用于肿瘤基因组学研究, 人们开展了一系列肿瘤组织纯化技术: 从各种手工显微切割纯化技术到借助各种机械手段并经显微切割纯化肿瘤组织, 再发展到激光切割分离单细胞, 到现在的高级流式细胞仪分离单个肿瘤细胞。

收稿日期: 2010-06-20; 修回日期: 2010-09-05
基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)
(2006AA02A302)

* 通讯作者: E-mail: Caizhiming2000@yahoo.com

起初,研究者是用手术刀片或注射用针头分离单个细胞^[6,7]。实际应用中,用手术刀片大体纯化肿瘤组织(区分肿瘤与非肿瘤);而注射针头(借助显微镜)对瘤组织的纯化技术虽然可以使纯化达到细胞水平,但是对显微操作技巧要求非常高,而且并不能准确地筛选出单个肿瘤细胞,因而限制了该操作技术的广泛应用。

随着肿瘤基因组学研究的逐步深入,纯化技术的重要性日渐显现,各种不同方式的肿瘤组织纯化技术相继涌现:(1)选择性紫外线显微切割,是利用塑料的透明、抗有机溶剂及易切割等特点,以塑料片代替玻璃载玻片,将组织切片直接贴在透明塑料片上,在肿瘤组织切片中适当的区域剪下,使用显微镜区分不同的细胞。实验过程中选用墨水阻挡紫外线,防止紫外线对组织的直接照射,从而保护被筛选的细胞。这种技术的局限性在于只能对小于50个细胞的肿瘤DNA进行保护^[7,8]。(2)1994年,Zhuang等^[9]在高倍镜下,利用纤细的玻璃针头提取遗传性斑痣性错构瘤的肿瘤细胞获得成功,并用该技术对该肿瘤的杂合性丢失进行研究。该技术虽可以在一定程度上获取少量的肿瘤细胞,但是对操作者要求较高,难以应用于大规模实验研究中。(3)1997年, Lee等^[10]使用新型的精确性较高的显微机械操作系统纯化实体肿瘤组织。该系统由光学显微镜、手工三轴机械显微操作系统及一次性皮下注射针组成。实现了纯化肿瘤组织时,可以进行单个目标细胞切割的目标。(4)1998年,美国NIH的Litta实验室开发了激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)技术。该技术核心是利用激光对显微镜下的生物样本(组织、细胞簇、单细胞、染色体、染色体片段等)进行无接触显微切割和分离,并且能保证样品无污染,其切割精度可达1 mm^[11]。LCM实现了目标细胞与周围细胞完全分离的目标,但是仍然对操作者要求较高,不适宜于大规模分离单细胞。

随着各种肿瘤标志物的发现及免疫技术与流式细胞技术的发展,实现了半自动化的单个肿瘤细胞分离。高级流式细胞仪带有细胞分选功能,一种是使用捕获的方法来分选细胞;另一种是通过充电的液滴在电场中偏转来使目标细胞分离,流式分选肿瘤细胞优越性在于能分选复杂分子标记的肿瘤细胞,如要分选出白血病患者骨髓中CD34⁺CD13⁻CD45 dim的幼稚细胞,通过流式细胞仪逻辑程序设计,可以实现4通道分选细胞。当然,流式分选

最大的缺点就是分离后样本的污染。

而新开发的克隆原性肿瘤细胞分离试剂盒(Clonogenic Tumor Cell Isolation Kit, CytoSelect),提供了一种更好的肿瘤细胞分离纯化方案,其分离原理是大多数实体瘤细胞均能在软琼脂上生长并形成克隆,利用该原理,可以将少量的肿瘤细胞从大多数非恶性细胞内分离出来。该克隆的原细胞分离试剂盒,首先对实体瘤进行消化获得单个细胞,然后将细胞置于半干的软琼脂中培养6~8 d,待形成克隆后,使用细胞筛获得肿瘤单细胞,并用于后续的实验。

2 单肿瘤细胞基因组测序研究现状

单个肿瘤细胞测序是指利用现有的免疫及组织分离技术分离出单个肿瘤细胞后,提取其DNA,利用单细胞测序技术,进行单细胞测序,从而获取单细胞全基因组的图谱。

2.1 从血液中分离单个肿瘤细胞,对血液系统肿瘤进行单细胞测序

急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML),是一种骨髓性造血芽细胞(而非淋巴性芽细胞)异常增殖的血液系统恶性肿瘤,其特点是骨髓内异常细胞快速增殖而影响了正常造血细胞的产生。Grimwade^[12]研究表明,急性骨髓性白血病是成年人最常见的急性白血病,其发病率随着人的年龄而增加,年龄越大其预后也越差,目前治疗方案主要依赖综合治疗,这种疾病的治疗已20年没有新进展。

随着肿瘤基因组计划的实施,AML的基因组图谱也逐渐出现。2008年,美国华盛顿医学院的Ley等^[13]完成了对一位50多岁死于AML的患者的基因组测序工作。他们利用高级流式细胞术分离出细胞表面CD13、CD33和CD117阳性,但CD34阴性的肿瘤细胞,并检测它的遗传突变。为了防止DNA受到损伤,所有样本均在患者接受癌症治疗前采集。同时设立对照,对该女性皮肤样本的染色体组进行测序。随后,将患者的肿瘤基因组与其正常皮肤样本基因组进行了比较,在患者肿瘤基因组中接近270万个单核苷酸变异中,接近98%同样也在患者皮肤样本的DNA中检测到。最终在患者的肿瘤DNA中仅发现了10个可能与AML有关的遗传突变,其中8个很罕见,这也是首次发现的与AML有关的基因。通过单细胞分析技术,测得每个肿瘤样本细胞拥有9个突变。

这项研究的意义在于首次确定人类癌症基因组的全DNA序列,并与同一个体的正常组织相比较,这一研究虽未能提供基因治疗AML的新方法,但它为以后AML的基因治疗提供重要的理论基础。当然,它也为大规模癌症基因组测序和单细胞肿瘤测序奠定了基础。

2.2 从细胞系中分离肿瘤细胞进行单细胞测序

细胞系是指原代培养物成功传代后的细胞,主要用于科学研究。2007年,Ehrich等^[14]研究了肿瘤细胞系基因组,包括脑组织(D1234035和D123062)、乳腺癌(D1234086)、肾(D1234142)、白细胞(D1234148)、肺(D1234152)的样本。研究结果表明,大部分肿瘤细胞的部分基因(20%的基因)有改变。虽然大多数基因只在一种肿瘤中(35个基因)的甲基化发生变化,但是在许多不同形式的肿瘤之中也有共同的基因(7个基因)改变。这也为肿瘤细胞系研究提供了一个平台。

U87MG细胞系是一个已应用40年,并被1700多种刊物引用的成胶质瘤细胞系。2010年,Clark等^[15]利用U87的成胶质瘤细胞系进行测序。他们从胶质瘤细胞系中分离出单个肿瘤细胞,提取DNA,将45 μg DNA长链随机地截断,从而变为数十亿个不同的DNA片段,然后利用ABI测序(由Applied Biosystems公司开发)进行读取,结果发现肿瘤细胞发生2384470个单核苷酸变异(SNVs),191743个小的插入和缺失,1314个巨大的结构变化。对512个基因进行突变分析发现,包含154个SNVs、178个插入突变、145个大缺失和高达35个染色体内部易位^[15]。

这项研究的意义在于:(1)提供了癌症全基因组测序图,为寻找癌细胞内独特的基因突变提供了线索;(2)首次完成了脑癌细胞系全基因组测序,是截至目前最为彻底地测序分析的单个癌症细胞系。这项研究成果在单个肿瘤细胞的个性化基因治疗方面迈出了崭新的一步。

2.3 从实质性肿瘤中分离单个肿瘤细胞对肺癌进行单细胞测序

从实质性肿瘤组织到单个肿瘤细胞,再到单细胞测序,从中找到肿瘤发生的机制,这一直是肿瘤基因组学家们的梦想。

2010年,欧洲的Sanger研究所的Plesance等^[16]通过分离单细胞,发现肺癌细胞基因组中包含了22910个突变基因。他们研究发现大多数突变基因已成为基因组的一部分,没有害处,但是有些突变

基因会启动癌症发生。他们确定了小细胞肺癌(SCLC)细胞完整的遗传序列,并且将这一结果与从同一患者身上获得的正常DNA进行比对。利用大规模平行测序技术,在22910个变异之外,同时也发现了一个新的肺癌基因CHD7。遗憾的是这次研究虽然提出了设想,但由于分离技术未成熟,并未完全实现从实质性肿瘤中分离单细胞,而是采取了从NCI-H209细胞系及NCI-BL209(Epstein-Barr-virus-transformed lymphoblastoid line)中分离细胞,利用SOLiD(Sequencing bOligonucleotide Ligation and Detection)平台对分离的单细胞进行分析。

虽然未实现从实际标本中分离单个肿瘤细胞的测序,但是这为人类癌症单细胞水平研究提供了重要的信息。这也是第一次详细地进行人类癌症——肺癌的分析,并对致癌的遗传学突变机制进行了解释,为肿瘤的单细胞研究打下基础。

3 单个肿瘤细胞测序研究的意义

3.1 发现正常细胞与肿瘤细胞差异,从而找出突变基因,用于基因诊断

通过单个肿瘤细胞的测序,我们可以更加直接地了解肿瘤的起源、肿瘤的生长规律,以及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^[14-17]。

3.2 对比原癌巢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肿瘤的浸润遗传学机制

2010年,美国华盛顿医学院的Ding等^[18]研究了一位44岁非洲裔美国人乳腺癌患者的4个DNA样本的完整序列:原发性肿瘤、周围血液、脑转移和癌旁组织等样本。采用突变分析表明,转移肿瘤特定选择来自原发性肿瘤的、含有已存在突变的一个亚类的细胞,并且还会形成少量新突变。如果把这一结果上升到利用单细胞测序技术,分别对这四个样本的基因组测序,通过多个细胞测序结果进行统计分析,这一结果将能更加直接地解释肿瘤转移、浸润的遗传学机制。

4 单个肿瘤细胞研究的挑战

4.1 肿瘤细胞分离技术的挑战

虽然目前出现了一系列的细胞分离技术(如上所列),例如高级流式细胞术,利用肿瘤标志物分离肿瘤细胞,但是对于含有肿瘤细胞较少的组织进行单个肿瘤细胞的分离仍是新时期的一大难题。

4.2 单细胞测序技术的挑战

一个细胞含有1~6 pg的mRNA。2006年, Jensen和Watt^[19]利用单细胞测序方法成功完成了人类表皮干细胞的转录组测序;2008年,成熟的单细胞测序技术SOLiD由美国应用生物系统公司推出,这项新一代的测序技术可对单个细胞和癌症样品中存在的痕量RNA进行整体的全基因组表达图谱分析;2009年,Tang等^[3]在Nature上发表了关于单细胞全转录组分析方法,使单细胞测序逐渐走向完善。但是由于该过程要求仪器的高度敏感性,使得单细胞测序的特异性下降,因为微弱的污染都会影响结果,这也是未来单细胞测序技术遇到的最大挑战。

5 展望

我们研究各类肿瘤细胞的基因组图谱,希望找出恶性细胞在基因组水平是否存在统一结构,但是面对肿瘤异质性的这些问题仍然束手无策。同时肿瘤的异质性是导致肿瘤耐药性问题的原因^[20]。如果能从单个肿瘤细胞水平对肿瘤单细胞进行测序,并找出一个肿瘤在单个细胞上的共同结构,揭露出每个肿瘤细胞的突变规律,这将为药物研究、肿瘤的靶向治疗提供基础。当然,必须首先对大量的肿瘤细胞基因组完成测序工作,只有在发现了功能突变位点之后,单个肿瘤基因组测序才能为肿瘤治疗提供帮助^[21]。

[参 考 文 献]

- [1] Renato D. A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science*, 1986, 231(4742): 1055-6
- [2] Mather B. Exome sequencing takes centre stage in cancer profiling. *Nature*, 2009, 459(7244): 146-7
- [3] Tang FC, Barbacioru C, Wang YZ, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-82
- [4] Porreca GJ, Zhang K, Li JB, et al. Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nat Methods*, 2007, 4(11): 931-6
- [5] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, et al. Dissecting biological ‘‘dark matter’’ with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (29): 11889-94
- [6] Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, et al. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*, 1993, 12(13): 4955-67
- [7] Shibata D, Hawes D, Li ZH, et al. Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1992, 141(3): 539-43
- [8] Shibata D, Hawers D, Li ZH, et al. Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1993, 141(3): 539-43
- [9] Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, et al. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions < 1 mm in size. *Am J Pathol*, 1995, 146 (3): 620-5
- [10] Lee JY, Dong SM, Kim SY, et al. A simple, precise and economical microdissection technique for analysis of genomic DNA from archival tissue sections. *Virchows Arch*, 1998, 433(4): 305-9
- [11] Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, et al. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet*, 1998, 14(7): 272-6
- [12] Grimwade D. Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML[M]// Karp JE. *Acute Myelogenous Leukemia*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007: 177-92
- [13] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 2008, 456(7218): 66-72
- [14] Ehrlich M, Turner J, Gibbs P, et al. Cytosine methylation profiling of cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 12(105): 4844-9
- [15] Clark MJ, Homer N, Connor BD, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet*, 2010, 6(1): e1000832
- [16] Pleasance ED, Futreal PA, Campbell PJ, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, 2010, 463(7278): 184-274
- [17] Pittet MJ, Grimm J, Berger CR, et al. *In vivo* imaging of T cell delivery to tumors after adoptive transfer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 30 (104): 12457-61
- [18] Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*, 2010, 464(7291): 989-90
- [19] Jensen KB, Watt FM. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: *Lrig1* is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 11958-63
- [20] Zhang W, Dolan EM. Use of cell lines in the investigation of pharmacogenetic loci. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(32): 3782-95
- [21] Marcel P, Brug VD, Claes W, et al. Navigating genomic maps of cancer cells. *Nat Biotechnol*, 2009, 28(3): 241-2