

DOI: 10.13376/j.cblls/2015182

文章编号: 1004-0374(2015)10-1306-06

· 技术与应用 ·

单细胞转录组测序在肿瘤异质性研究及临床中的应用

熊 虎¹, 张 蒙², 杨 立^{1*}, 吴 松^{2,3*}

(1 兰州大学第二医院泌尿外科, 兰州大学泌尿外科研究所, 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心, 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室, 兰州 730030; 2 安徽医科大学深圳市第二人民医院临床医学院, 深圳 518000; 3 深圳市罗湖区人民医院, 深圳 518000)

摘 要: 随着现代生物医学的发展, 基因测序技术已经在肿瘤学研究的多个领域得到广泛应用, 但对肿瘤整体进行测序往往会掩盖细胞之间的异质性。为了探索单个肿瘤细胞的行为特性, 肿瘤细胞异质性已成为从事肿瘤方面研究的科研和临床专家目前共同关注的焦点。单细胞转录组测序能从单个细胞的水平揭示同一肿瘤内不同细胞之间的变异程度与相互联系。随着单细胞分离、二代测序技术的发展, 单细胞转录组测序日趋成熟。未来在临床中, 单细胞转录组测序技术将会在肿瘤的早期诊断、监测、临床预后以及个体化用药等方面得到越来越广泛的应用。

关键词: 肿瘤细胞异质性; 单细胞转录组测序; 单细胞; 转录组测序

中图分类号: Q786; R730.49 **文献标志码:** A

The applications of single-cell RNA-Seq in the studies of intratumor heterogeneity and clinical medicine

XIONG Hu¹, ZHANG Meng², YANG Li^{1*}, WU Song^{2,3*}

(1 Institute of Urology of Lanzhou University, Department of Urology, the Second Hospital of Lanzhou University, Clinical Center of Diseases of Urological System in Gansu Province, Key Laboratory of Diseases of Urological System in Gansu Province, Lanzhou 730030, China; 2 Shenzhen Second People's Hospital, Clinical Medicine College of Anhui Medical University, Shenzhen 518000, China; 3 Luohu District People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518000, China)

Abstract: With the development of modern biomedicine, gene sequencing technology has been widely used in many fields of oncology research. But sequencing the entire tumor perhaps conceals the heterogeneity between cells. In order to explore the behavior of the individual cell, intratumor heterogeneity becomes researchers' and clinical experts' common concern at present. Single-cell RNA-Seq is aimed to reveal the interrelation and variation between cells within the identical tumor at the level of single-cell. With the development of single-cell isolation and the next-generation sequencing (NGS) technology, the single-cell sequencing become more and more mature. In the future, the single-cell transcriptome sequencing technology will become more widely applied in early diagnosis, monitoring, clinical prognosis and individualized therapy of tumors in clinical practice.

Key words: intratumor heterogeneity; single-cell RNA-Seq; single cell; transcriptome sequencing

肿瘤细胞间的异质性是指构成实体肿瘤的不同细胞之间具有不同的基因型和表现型, 这种差异导

致了肿瘤增殖能力、侵袭能力和药物敏感性的不同, 最终会影响到肿瘤患者的诊断、治疗以及病情进展。

收稿日期: 2015-05-19; 修回日期: 2015-08-04

基金项目: 深圳基础研究项目(JCYJ20130401114928183, JCYJ20130401114715714); 深圳市技术开发项目, 未来产业项目(CXZZ20140826163906370)

*通信作者: E-mail: yuze250@163.com(杨立); doctor_wusong@126.com(吴松)

早在 19 世纪人们已经在显微镜下发现, 即使同一组织也是由若干种不同形态特征的细胞构成的^[1]。在 20 世纪 70 年代, 科学家证实了肿瘤组织中存在不同的细胞亚群, 这些细胞之间具有不同的增殖、转移以及抗药物作用能力, 且具有不同的细胞膜表面分子标记, 但这些只是对肿瘤细胞间差异的初步认识^[2-4]。随着单细胞测序技术的发展, 研究者更多地将目光投向肿瘤细胞异质性的研究中。肿瘤细胞的表型随着整个细胞周期的进行会发生动态的变化, 这种变化会深入到细胞的分子结构, 如转录组。单细胞转录组测序是研究肿瘤组织中不同细胞之间基因差异性表达的一项重要方法, 达到从基因层面研究细胞之间变异程度的目的^[5-6]。对肿瘤细胞间异质性的深入研究有助于更好地解决肿瘤的侵袭性、转移性、耐药性等为临床工作者所困扰的问题^[7-9]。单细胞转录组测序包括几个关键步骤, 如分离单细胞、提取 RNA、cDNA 扩增建库、深度测序等。以上各项技术目前均有比较成熟的解决方案, 但仍有一定的缺陷, 正是这些技术的不断更新和发展为肿瘤细胞异质性的研究奠定了坚实的基础。随着这些技术在临床应用, 将会给肿瘤患者的诊断、预后、个体化治疗等方面带来益处^[10]。本文将对目前单细胞转录组测序中常用到的技术进行介绍, 并对单细胞转录组测序在肿瘤基础研究和临床应用两个方面进行综述。

1 单细胞转录组测序技术

由于肿瘤细胞异质性的存在, 以往对由各种细胞混合组成的组织进行测序并分析结果会掩盖不同细胞之间在基因组和功能上的改变和差异, 单细胞技术能很好地解决这一问题。大体上讲, 单细胞技术分为单细胞基因组测序和转录组测序, 两者分别针对不同的研究目的。单细胞基因组测序是为了研究整体的基因突变情况, 包括单核苷酸变异、插入和缺失突变等。单细胞转录组测序通常针对的是细胞的基因调控, 尤其是像肿瘤干细胞和早期胚胎细胞这类具有高度异质性的细胞类型, 有助于分析细胞的基因调控网络、基因重组、细胞分化等过程。另一方面, 单细胞转录组测序通过更精确的检测率来展示和转录相关的分子改变, 如信使 RNA、微小 RNA、内含子保留、选择性剪接、长链非编码 RNA、融合基因等^[11]。表 1 列举了几种单细胞转录组测序技术中 cDNA 文库构建方法的特点。

表1 单细胞转录组测序技术中几种常见cDNA文库构建方法的特点比较

方法	灵敏度	通量	成本
mRNA-Seq	高	低	低
SMART-Seq	较高	低	高
SMART-Seq2	高	低	低
CEL-Seq	较高	高	低

1.1 单细胞的分离

将单个肿瘤细胞从实体肿瘤中分离出来目前常用方法有: 显微操作、激光捕获、荧光激活细胞分选、微流体技术等(图 1)。显微操作主要是针对含有肿瘤细胞的混悬液, 以人工的方式在高倍显微镜的观察下挑出单个的肿瘤细胞(图 1A), 这种方法对操作者的熟练程度要求很高, 且整个过程耗时较长、难度较大。激光捕获是通过激光切割的方式直接从组织中分离细胞(图 1B), 但难免会损伤到染色体, 会对后续的结果产生潜在的影响。荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)技术是流式细胞技术的一种衍生, 预先用带荧光标记的抗体来识别特殊的细胞表面标记分子, 通过流式细胞仪识别荧光信号将目的细胞分选出来(图 1C), 是目前分离单细胞最有效的一种方法^[12]。已有 17 种标记分子在该技术中应用, 可以同时识别出多种具有复杂免疫表型的细胞亚群^[13-14], 还可以发现新的细胞亚群, 如近年来新发现一种 T 细胞亚群具有干细胞样记忆性且具有高度增殖的能力^[15]。FACS 可有效地在 96 或 384 孔板上每个孔获得 1 个单细胞, 纯度接近 100%, 获得上百个目的单细胞只需要短短几分钟的时间^[16]。FACS 的缺点是要要求的细胞数量要多, 需要的样本初始体积较大, 使一些小体积或微量样本(如细针穿刺液)分离单细胞受到了制约^[17]。微流体技术的出现是对 FACS 很好的补充(图 1D), 微流体芯片可用于稀有细胞的筛选、基因测序、单细胞分析等多个方面, 其具有反应体积小、使用样品量少、反应速度快、大量平行处理等优点, 因此, 在单细胞转录组测序中也得到了越来越广泛的应用^[18], 尤其是循环肿瘤细胞的单细胞测序^[19-20]。

1.2 转录组测序

单细胞转录组测序在技术上面临众多困难, 主要包括: 起始 RNA 量少, 通常只有 10 pg; 无法保证大部分 mRNA 都被逆转录成 cDNA; 无法高效地得到全长 cDNA, 而不是靠近 poly(A) 尾的断裂的 cDNA^[21]。Ramskold 等^[22] 和 Picelli 等^[23] 提出了一

种命名为 Smart-Seq 的单细胞转录组测序方案, 该方案较以往的方法具有更高的敏感性和精确性, 大大地提高了转录本的读序覆盖度和对单核苷酸多态性的识别能力。

从单细胞中提取 RNA 到建立 cDNA 文库进行测序的过程中, 最大的难点在于如何将微量的由 RNA 反转录的 cDNA 扩增到测序仪所要求的最低量, 且在经过多个循环后仍具有高度保真性, 以往的全基因组扩增方法显然不能满足要求。近年来涌现出了多种针对单细胞转录组测序的 cDNA 扩增方法, 根据合成第二条 cDNA 链时使用的酶可分为 PCR 法 (如 mRNA-Seq^[6]、Smart-Seq^[22]、Smart-Seq2^[23]、STRT-Seq^[24] 和 SMA^[25])、体外转录法 (如 CEL-Seq^[26]) 和 Phi29 聚合酶法 (如 PMA^[25])。Tang 等^[6] 采用的 mRNA-Seq 方法, 通过末端 DNA 转移酶在新合成的 cDNA 的 3' 末端加上一串 A 或 G, 然后用多聚寡核苷酸 T 或 C 做引物合成其互补链。Smart-Seq、Smart-Seq2 和 STRT-Seq 等方法采用模板转换的方式合成互补 cDNA 链, CEL-Seq 法在合成第一链之后, 通过引入 RNA 聚合酶合成互补 cDNA 链, 而 SMA 法用随机的寡核苷酸引物合成互补 cDNA 链。通过上述方法扩增建立的 cDNA 文

库经过实验室准备后便可进行二代测序 (next-generation sequencing, NGS), 分析数据最终得出结果。

Fluidigm 公司最新研发的 C1 平台可以将单细胞转录组测序过程中的单细胞分离、反转录、cDNA 扩增等步骤自动化地在微流控芯片中进行, 之后用转座酶技术构建 cDNA 文库, 由于微流控芯片和转座酶技术的应用显著地提高了测序通量^[27-28]。C1 平台在单细胞 RNA-Seq 中的应用将会为研究者提供强有力的技术支持和保障, 极大程度地节省了时间和人力。

2015 年, Macosko 等^[29] 新开发的一种名为 Drop-Seq 的技术, 该技术利用微流体装置将大量带有 DNA 条形码 (barcoded) 的微珠送入液滴中, 微珠上的条形码会与每个单细胞的一部分基因相结合, 研究者可以通过批量测序所有的基因来追踪每个基因的来源细胞。Klein 等^[30] 也同时开发了一种类似的技术——inDrops, 两者除了生成微珠方式和一些技术细节外, 得到的结果是一致的。Drop-Seq 或 inDrops 技术极大地降低了单细胞测序的成本并提高了测序效率, 期待这项技术在未来单细胞 RNA-Seq 领域能得到广泛应用并为研究者带来便利。

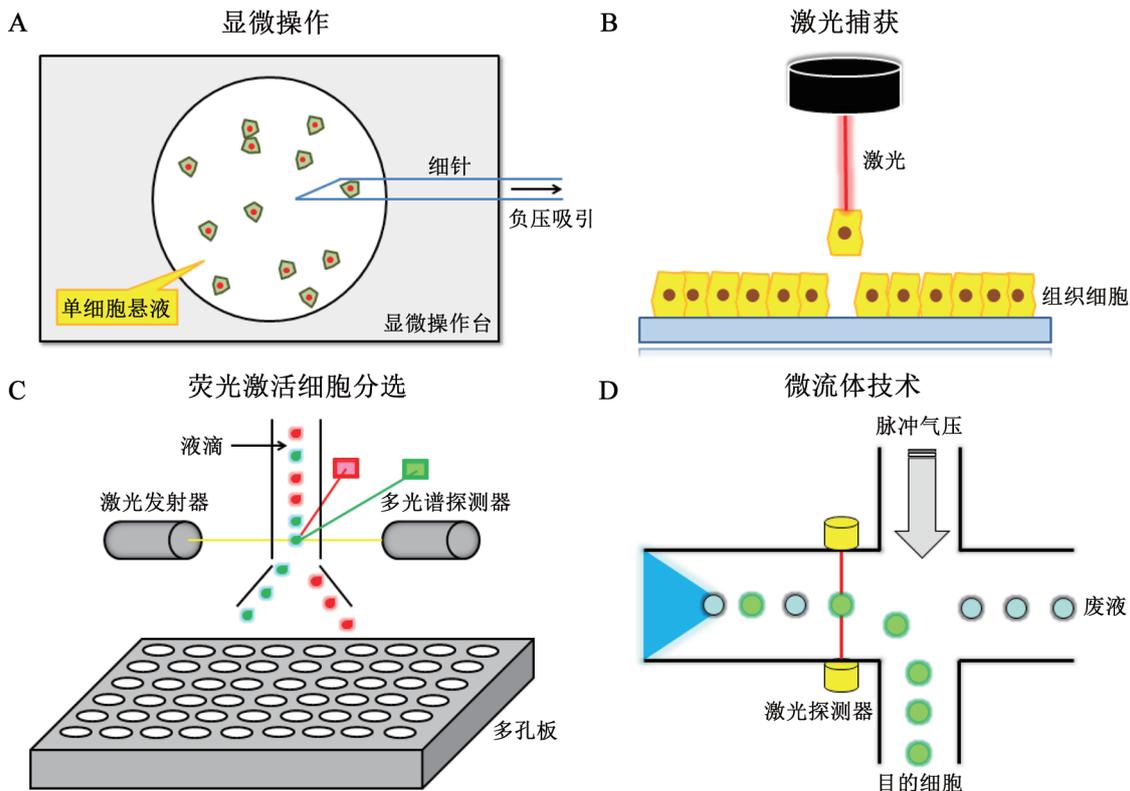


图1 几种常见单细胞分离方法示意图

2 单细胞RNA-Seq在肿瘤异质性研究中的应用

近些年来, 随着单细胞转录组测序技术不断发展, 越来越多的研究者借助这项技术投入到肿瘤异质性的研究中。Welty 等^[31]对前列腺癌细胞采用微阵列的方法进行转录组检测, 结果显示单细胞组与5细胞、10细胞组相比有较低的假阳性率。Dalerba 等^[16]通过单细胞PCR分析结肠癌基因表达, 得出肿瘤组织内包含多个细胞分化亚群, 充分地展示了肿瘤细胞间具有很大的异质性。Patel 等^[32]对5例神经胶质母细胞瘤的430个细胞进行单细胞RNA-Seq, 结果表明神经胶质母细胞瘤肿瘤细胞间具有不同的细胞亚群, 异质性大的肿瘤类型预后更差。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的检测可应用于肿瘤早期诊断, 以及化疗药物的疗效评估、耐药性的检测、肿瘤复发的监测等, CTC与肿瘤的转移和复发有着密切关系。循环肿瘤细胞在血液中的数量虽然稀少, 但对其的研究有助于寻找一些与肿瘤转移相关的基因和通路。Yu 等^[33]通过对胰腺癌大鼠模型的循环肿瘤细胞进行单细胞RNA-Seq, 发现*Wnt2*基因可能与胰腺癌循环肿瘤细胞的富集有关, WNT可能是参与调控这一过程的主要信号通路。Powell 等^[34]用MagSweeper方法对转移性乳腺癌患者的循环肿瘤细胞首次进行高维度基因表达分析, 筛选了一些与乳腺癌转移(*NPTN*、*SI00A4*、*SI00A9*)和上皮-间叶组织转化(*VIM*、*TGFβ1*、*ZEB2*、*FOXCl*、*CXCR4*)相关的基因。Cann 等^[35]同样用MagSweeper方法对前列腺癌患者的单个CTC进行了mRNA-Seq分析, 发现了181个在前列腺癌CTCs里高表达的基因, 其中有34个基因分别与肿瘤细胞代谢和细胞周期及有丝分裂等过程相关, 并通过信号通路分析(ingenuity pathway analysis, IPA)发现了细胞周期G₂/M DNA损伤检查点调控通路的异常。Ramskold 等^[22]用Smart-Seq方案对黑素瘤循环肿瘤细胞进行全转录组单细胞测序, 识别了该肿瘤CTCs不同的基因表达类型, 还发现了一些候选的肿瘤分子标记物。

以上研究成果表明, 肿瘤细胞间具有很大的异质性, 癌基因(oncogene)在同一肿瘤的不同细胞之间表达差异很大, 根据不同的基因表达类型可以将癌细胞分为多个亚群, 反映了从肿瘤干细胞到分化成熟的肿瘤细胞之间存在一个动态变化的过程, 可能与每个细胞生存的微环境有关, 肿瘤细胞异质性越高则预后越差, 不同的基因表达类型是导致肿瘤

恶性程度或者耐药性等差异的主要原因。随着单细胞RNA-Seq技术的广泛应用, 对单个肿瘤细胞的转录组进行分析, 有望研究清楚肿瘤细胞的来源及其分化演变的过程, 找到导致肿瘤侵袭、转移、耐药的机制以及相关基因和通路, 对肿瘤的临床治疗提供靶向及指导。

3 单细胞RNA-Seq在临床中的应用

随着单细胞测序在肿瘤研究领域取得了骄人的成果, 人们开始探索如何能把这项技术与临床相结合, 解决一些实际问题, 给肿瘤患者带来益处。在肿瘤的诊断、转移早期监测、个体化治疗等方面已有初步的尝试。

3.1 肿瘤的早期诊断

在临床上, 癌症早期患者病灶处往往只有少量的肿瘤细胞, 因而难以诊断, 常常会因为误诊、漏诊而错过最佳的治疗时机, 加快病情发展。在低级别的乳腺原位癌患者中, 仅有5%~10%会突破基底层而更具有侵袭性^[36]。Allred 等^[37]的研究表明, 在乳腺癌的早期, 个别肿瘤细胞确实会具有特殊的基因特征。因此, 如果能利用从原位癌患者体内少量肿瘤细胞提取的DNA或RNA的信息, 通过单细胞测序技术而检测出是否含有那些具有高度侵袭性的肿瘤干细胞, 就可以此对肿瘤的恶性程度做出判断, 及时地调整治疗策略。通过对抽血或细针穿刺等微创方式获得的样本进行转录组分析, 可以使患者得到快速的即时诊断(point-of-care diagnostic)。

3.2 利用循环肿瘤细胞监测恶性肿瘤的转移

单细胞测序的另一个主要的应用方向就是通过对循环肿瘤细胞进行基因分析来达到监测肿瘤转移的目的, 使医生能尽早地做出临床干预来控制肿瘤转移的发生。循环肿瘤细胞是指少量侵袭力强能够突破原发灶释放到循环系统中的肿瘤细胞, 这类细胞非常稀少, 估计与血细胞的比例为1:10 000万^[38]。尽管比例很低, 但是还是可以通过一些特殊的表型分子标记来识别, 这类标记分子往往与上皮-间叶组织化生这一肿瘤转移的特征性病理过程有关^[39]。早年间通过对化疗后转移到骨髓的肿瘤单细胞进行转录组微阵列分析就已经发现, 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase, EMMPRIN/CD147)与肿瘤的侵袭性和化疗抵抗性相关^[40]。对黑素瘤患者的CTC进行RNA-Seq发现, 多种膜蛋白基因的异常表达与CTC的侵袭性和逃避机体免疫监视的能力有关, 研究者采用SMART-

Seq 方案获得了近乎全长的转录组, 由此来寻找黑色素瘤患者的 CTC 存在哪些转录组单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可以有助于对肿瘤的监测^[22]。Cristofanilli 等^[41] 已证明了检测 CTCs 能提示转移性乳腺癌患者的预后和对治疗的反应。在趋势抵抗性前列腺癌患者中, 通过免疫磁珠富集测试 CTC 水平比前列腺特异抗原 PSA 对整体生存率有更好的预测作用^[42]。

对 CTCs 进行单细胞测序主要具有两大应用价值。首先, 比肿物活检能得到纯度更高的肿瘤细胞, 且相比腹膜后淋巴结活检大大简化了操作过程; 其次, 对样本质量的要求更低, 无论是体积仅 7.5 mL 的血液还是穿刺液, 都能够对所含有的微量 DNA 或 RNA 信息做出精确分析^[43]。

3.3 肿瘤异质性指导个体化治疗

忽略肿瘤异质性是导致肿瘤治疗效果不佳的潜在因素, 会影响到患者的预后。如何将单细胞测序得到的肿瘤异质性信息运用到肿瘤的个体化药物治疗上成为目前研究的一个趋势。Navin 等^[44] 通过单细胞测序分析了 2 例原发性乳腺癌患者基因拷贝数变异, 其中一例是单基因性, 另一例是多基因性的, 分为 3 个不同的克隆亚群。Gerlinger 等^[45] 发现了肿瘤存在多基因重建, 63%~69% 的体细胞突变往往不能被检测到。Powell 等^[34] 的研究表明, 根据不同的基因表达类型可以将乳腺癌患者的 CTCs 分为 5 个亚群, 以往组织活检并不能反应单个癌细胞的基因表达情况, 根据 CTCs 不同的基因类型来制定治疗策略显得尤为重要。这些研究结果都提示: 组成肿瘤的不同细胞都有不同的基因学改变, 这些改变无法通过对肿瘤整体的检测来发现, 而且这些基因异质性有可能是导致治疗失败的原因。因此, 对肿瘤患者进行单细胞测序有助于发现一些稀有的和耐药性相关的基因, 以加强用药的针对性。Dalerba 等^[16] 建立了一套基于检测几种关键基因进行多变量分析计算危害比来预测结肠癌临床预后的系统, 预测效果要优于以往的病理分级制度, 临床医生可以根据这套系统来判断患者预后, 以便及时制定或调整治疗方案。

4 结语与展望

肿瘤细胞异质性是目前肿瘤基因学研究的热点, 肿瘤细胞是组成肿瘤的基本单位, 即使同一肿瘤内也存在着各种不同功能和表型的细胞, 研究这些基本的肿瘤细胞之间的差异会对肿瘤的发生、发

展和演化产生更加深入地了解和认识。

正是单细胞测序技术的不断发展和改进, 为肿瘤异质性的研究奠定了坚实的基础, 使研究者对肿瘤单细胞这一全新领域的探索变得更为容易。今后一定会有越来越多的肿瘤异质性的研究成果, 从而揭示肿瘤这一人类健康杀手生存的奥秘, 使生物学家和医学家在攻克肿瘤发病机制和治疗肿瘤的道路上不断向前迈进。

不久的将来, 用单细胞测序检测肿瘤异质性一定会从实验室走向临床, 一批全新的单细胞测序产品将会应用到肿瘤的早期诊断、病程进展和治疗的方方面面, 为肿瘤患者的健康带来福音。

[参 考 文 献]

- [1] Brown TM, Fee E. Rudolf Carl Virchow: medical scientist, social reformer, role model. *Am J Public Health*, 2006, 96(12): 2104-5
- [2] Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*, 1978, 38(9): 2651-60
- [3] Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metast Rev*, 1983, 2(1): 5-23
- [4] Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 1978, 38(10): 3174-81
- [5] Tang F, Barbacioru C, Nordman E, et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 516-35
- [6] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-82
- [7] Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 2010, 141(1): 69-80
- [8] Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, et al. Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*, 2014, 343(6167): 204-8
- [9] Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 539-44
- [10] Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(9): 618-30
- [11] Shalek AK, Satija R, Adiconis X, et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature*, 2013, 498(7453): 236-40
- [12] Navin N, Hicks J. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med*, 2011, 3(5): 31
- [13] Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TF, et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping

- by polychromatic flow cytometry. *Nat Med*, 2006, 12(8): 972-7
- [14] Chattopadhyay PK, Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, 2012, 57(3): 251-8
- [15] Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1290-7
- [16] Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12): 1120-7
- [17] Saliba AE, Saias L, Psychari E, et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33): 14524-9
- [18] Streets AM, Zhang X, Cao C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(19): 7048-53
- [19] Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc*, 2014, 9(3): 694-710
- [20] Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med*, 2013, 5(179): 179ra47
- [21] Tang F, Lao K, Surani MA. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. *Nat Methods*, 2011, 8(4 Suppl): S6-11
- [22] Ramskold D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-82
- [23] Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc*, 2014, 9(1): 171-81
- [24] Islam S, Kjallquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res*, 2011, 21(7): 1160-7
- [25] Pan X, Durrett RE, Zhu H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(2): 594-9
- [26] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-73
- [27] Wu AR, Neff NF, Kalisky T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 41-6
- [28] Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, et al. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(10): 1053-8
- [29] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161(5): 1202-14
- [30] Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 2015, 161(5): 1187-201
- [31] Welty CJ, Coleman I, Coleman R, et al. Single cell transcriptomic analysis of prostate cancer cells. *BMC Mol Biol*, 2013, 14: 6
- [32] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 2014, 344(6190): 1396-401
- [33] Yu M, Ting DT, Stott SL, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature*, 2012, 487(7408): 510-3
- [34] Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One*, 2012, 7(5): e33788
- [35] Cann GM, Gulzar ZG, Cooper S, et al. mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49144
- [36] Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(9): 627-37
- [37] Allred DC, Wu Y, Mao S, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 370-8
- [38] Yu M, Stott S, Toner M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, 2011, 192(3): 373-82
- [39] Joosse SA, Hannemann J, Spotter J, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4): 993-1003
- [40] Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 387-92
- [41] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2004, 351(8): 781-91
- [42] Scher HI, Morris MJ, Larson S, et al. Validation and clinical utility of prostate cancer biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(4): 225-34
- [43] Naoe M, Ogawa Y, Morita J, et al. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the CellSearch System. *Cancer*, 2007, 109(7): 1439-45
- [44] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-4
- [45] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-92