

DOI: 10.13376/j.cblls/2018009

文章编号: 1004-0374(2018)01-0063-11

# 循环肿瘤细胞单细胞测序——液体活检的新视角

赵丽娜, 赵晓航\*

(国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** 循环肿瘤细胞是实体肿瘤原发灶或转移灶侵袭、脱落进入外周血的, 具有高活力、高转移潜能的肿瘤细胞。由于肿瘤存在异质性, 导致肿瘤组织高通量测序分析难以发现低丰度肿瘤干细胞的基因组特征。循环肿瘤细胞单细胞测序, 通过比较患者外周血循环肿瘤细胞、肿瘤原发灶和转移灶及转移淋巴结中单细胞基因组、转录组和表观遗传组的差异, 避免肿瘤异质性的干扰, 为认识肿瘤的生物学进程提供了全新视角。现综述了运用单细胞测序技术分析实体肿瘤外周血循环肿瘤细胞基因组变异的主要技术和研究进展。

**关键词:** 循环肿瘤细胞; 单细胞测序; 全基因组扩增; 液体活检

**中图分类号:** R730.4; R730.5; R730.7 **文献标志码:** A

## Single cell sequencing analysis of circulating tumor cells: a new horizon of liquid biopsy

ZHAO Li-Na, ZHAO Xiao-Hang\*

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/Cancer Hospital,  
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**Abstract:** Circulating tumor cells (CTCs), shed from primary or metastatic tumors, have high activity and metastatic potential. Due to the tumor heterogeneity, it is challenging to discern the real information of genomic characteristics of low abundant tumor cells, such as tumor stem cells, by traditional high-throughput sequencing of tumor tissues. Conducting aggregate analysis of CTCs, primary and metastatic tumor lesions as well as lymph node through single cell sequencing can compare genomic, transcriptomic and epigenomic differences without the interference of heterogeneity, and these new technologies provide a new perspective to explore the biological process of cancer. We reviewed recent progress on single-cell genomic sequencing technique and its applications in analysis of CTCs in peripheral blood from cancer patients.

**Key words:** circulating tumor cells; single cell sequencing; whole-genome amplification; liquid biopsy

循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 是由上皮来源肿瘤原发灶或转移灶侵袭、脱落进入血液循环系统的具有高活力、高转移潜能的肿瘤细胞。CTC 是肿瘤液体活检 (liquid biopsy) 的重要组成部分之一, 是实时监测肿瘤进展的窗口<sup>[1-3]</sup>。通常, 肿瘤组织的高通量测序分析是基于百万细胞混合样本的分析, 体现了细胞整体的基因组特征, 但忽略了肿瘤细胞的异质性 (heterogeneity), 致使像 CTC 和肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 等低丰度, 但功能重要细胞的基因组特征被稀释。因此, CTC 的单细胞测序分析技术应运而生<sup>[4-5]</sup>。通过 CTC 的单细胞

测序可以比较外周血 CTC、肿瘤原发灶和转移灶, 以及转移淋巴结中单细胞基因组、转录组和表观遗传组的差异, 减少肿瘤异质性的干扰, 为认识肿瘤发生发展的生物学进程提供了全新视角<sup>[6-9]</sup>, 已用于乳腺癌、结直肠癌、恶性黑色素瘤、肺癌和前列腺癌等肿瘤研究。本文综述了运用单细胞测序技术

收稿日期: 2017-06-30; 修回日期: 2017-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(91629105, 81572365, 81372591); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-001)

\*通信作者: E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn

分析实体肿瘤外周血 CTC 基因组变异的研究进展。

## 1 肿瘤异质性与单细胞测序分析

肿瘤异质性是指肿瘤在生长过程中,经过多次分裂增殖,其子细胞呈现出分子生物学或基因表达等差异,使肿瘤出现生长速度、侵袭能力、药物敏感性和预后等不同表型的现象,是恶性肿瘤的特征之一。肿瘤异质性可使肿瘤细胞适应肿瘤微环境的改变,促进肿瘤耐药与进展。

通常,肿瘤异质性包含由不同细胞之间的基因与表型不同构成的肿瘤内异质性 (intra-tumor heterogeneity) 和由不同肿瘤细胞之间的基因与表型不同构成的肿瘤间异质性 (inter-tumor heterogeneity) 两类。肿瘤内异质性指同一肿瘤中存在不同肿瘤细胞亚群,既有致瘤细胞亚群,也有非致瘤细胞亚群。不同肿瘤细胞亚群的基因组学(如基因组、体细胞突变和表观遗传修饰等)和肿瘤生物学(转录组、蛋白质组和代谢组等)存在明显不同<sup>[10]</sup>。不仅针对肿瘤细胞,还包括肿瘤微环境(如淋巴细胞浸润和 MHC 分子类型等)以及肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用均不同<sup>[11]</sup>。肿瘤内异质性使肿瘤细胞既有时间异质性(原发性肿瘤与继发性肿瘤不同),又有空间异质性(相同肿瘤不同区域不同)之分。目前认为,肿瘤内异质性与基因突变的随机性和环境因素及其作用的不均一性有关<sup>[12]</sup>。如推测具有自我更新和扩增能力的肿瘤干细胞具有形成肿瘤异质性的能力,以及认为不同基因型的肿瘤细胞具有相同的肿瘤形成能力的克隆进化 (clonal evolution) 学说<sup>[13-14]</sup>。肿瘤间异质性指不同患者,相同来源肿瘤间的差异,这些肿瘤亚群具有特殊分子标记和不同肿瘤生物学行为,从而造成了对临床预后的不同影响<sup>[15]</sup>。肿瘤间异质性来源于肿瘤细胞对基因组修饰、表观遗传修饰的不同响应产生不同的肿瘤表型,以及起源于不同肿瘤分层的不同肿瘤细胞亚群等因素<sup>[16]</sup>。此外,肿瘤间质异质性还与肿瘤微环境中的细胞和胞外基质的异常调控有关,如肿瘤间质中含有不同的肿瘤相关成纤维细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞等,它们均在肿瘤恶性转化过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。

研究发现,肿瘤原发灶、转移淋巴结、转移灶以及不同转移灶之间存在包括基因组变异、RNA 转录和蛋白质表达谱等多层面的异质性。2012年,Vermaat 等<sup>[18]</sup>采用定制的“Cancer Mini-Genome”芯片对结直肠癌原发灶和肝转移灶样本中肿瘤相关信

号通路所包含的 1 264 个基因的外显子组进行了测序分析,发现结直肠癌原发灶及其肝转移灶之间基因组差异十分显著。此外,也有研究发现,结直肠癌原发灶和转移灶中 *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 突变和 *PTEN* 表达,以及 *EGFR* 通路状态明显不同<sup>[19-20]</sup>。Colombino 等<sup>[21]</sup>对比了恶性黑色素瘤的原发灶、转移淋巴结,以及脑和皮肤转移灶中的 *BRAF*、*NRAS* 和 *p16CDKN2A* 的突变状态,发现转移淋巴结与原发灶相似性高于脑和皮肤转移灶。同样,乳腺癌和肺腺癌的研究中也发现了相似的结果。乳腺癌中 *HER2* 的表达和肺腺癌中 *EGFR* 的突变在肿瘤原发灶、转移灶,以及不同转移灶之间差异较大<sup>[22-23]</sup>。

肿瘤的异质性导致肿瘤组织混合样本的高通量测序分析结果主要体现了肿瘤细胞整体的基因组特征,忽略肿瘤细胞的异质性致使像 CTC 和肿瘤干细胞等低丰度,但功能重要的细胞的基因组特征被稀释。因此,采用肿瘤组织和 CTC 的单细胞测序分析对认识肿瘤的生物学进展十分必要。

## 2 循环肿瘤细胞

CTC 是实体肿瘤患者外周血中的一群具有高活力、高转移潜能的肿瘤细胞,是肿瘤液体活检的重要肿瘤标志之一。CTC 数目和表型与其原发肿瘤病灶的进展存在一定的量效关系,观察和分析 CTC 数目和表型改变可以间接了解肿瘤病灶的性质,通过外周血 CTC 可以监测肿瘤进展的观点已得到广泛共识<sup>[1-3]</sup>。

解剖学家和病理学家很早就观察到实体肿瘤患者外周血存在 CTC 的现象。由于相对于血细胞的数量来说,外周血中的 CTC 丰度很低,属于稀有细胞,分离十分困难。随着生物学技术的进步,特别是新型纳米材料和微流控等技术的进步,2004年,美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了用于检测转移性乳腺癌外周血 CTC 的技术<sup>[24]</sup>,已在乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、食管癌、胰腺癌、宫颈癌、结直肠癌、头颈部肿瘤和胃癌等多种肿瘤患者外周血中检测到 CTC。

### 2.1 循环肿瘤细胞的富集与鉴定

分离稀有细胞需要富集捕获。CTC 的富集技术主要有基于细胞表面标志的富集和基于微流控芯片的富集技术。基于细胞表面标志的富集主要有阳性富集 (positive selection) 和阴性富集 (negative selection) 两种策略,即用抗上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、角蛋白 (cytokeratin, CK)

等抗体捕获、富集上皮来源的肿瘤细胞和(或)用抗间叶组织来源的血细胞 CD45 抗体去除白细胞。如 FDA 批准用于乳腺癌和前列腺癌临床诊断的 CTC 方法中使用的 CellSearch 富集法, 通过 EpCAM、CD45 抗体捕捉血液中 EpCAM<sup>+</sup> 细胞, 去除 CD45<sup>+</sup> 的细胞后对分离的 CTC 计数分析<sup>[1-2,25]</sup>。另一种 CTC 捕捉技术采用微流控芯片。根据 CTC 生物学和物理学特性, 分离肿瘤患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)并在稳定缓慢层流控制下使其通过经 EpCAM 抗体包被的微流控芯片, CTC 被 EpCAM 抗体捕获结合于芯片底部, 而其余淋巴细胞随液体流出, 如 CTC-iChip 法<sup>[26-27]</sup>。

CTC 的鉴定主要采用免疫荧光、染色体原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 和 RT-PCR 分析等。那些分离的外周血有核细胞经免疫荧光染色呈现 EpCAM<sup>+</sup>、CK<sup>+</sup> 和 CD45<sup>-</sup> 表型, 具有染色体异倍体改变, 特定肿瘤相关基因突变等为上皮来源的 CTC<sup>[2,28-29]</sup>。

## 2.2 循环肿瘤细胞的主要生物学特性

外周血 CTC 也是一种具有异质性的肿瘤细胞, 不同肿瘤来源的 CTC 表面标志不同、大小不一, 呈现单个或成团簇样 (cluster) 等。研究发现, 外周血出现 CTC 是上皮来源实体肿瘤形成的早期事件<sup>[24]</sup>; 外周血 CTC 可以同时或双向刺激肿瘤原发灶和转移灶中的肿瘤细胞生长<sup>[30]</sup>; CTCs 呈现团簇样是肿瘤干细胞的标志, 肿瘤患者外周血出现 CTC 团簇提示肿瘤进展<sup>[31]</sup>。

检测 CTC 的临床意义主要有以下几种。(1) CTC 作为临床肿瘤 TNM 分期的重要补充。基于解剖学特点的 TNM 分期存在许多不足, 2007 年, CTC 被美国临床肿瘤学会 (American Society of Clinical Oncology, ASCO) 推荐为肿瘤标志物, 作为肿瘤 TNM 分期的重要补充。同时, 2017 年发布的第 8

版美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 乳腺癌癌症分期手册中肯定了 CTC 的意义, 临床晚期乳腺癌外周血 CTC  $\geq 5$  个 / 7.5 mL, 临床早期乳腺癌外周血 CTC  $\geq 1$  个 / 7.5 mL 提示预后不良, 证据水平为 II 级<sup>[1]</sup>。(2) 疗效监测和预后判断。CTCs 可直接提示肿瘤患者对治疗的反应, CTC 数目持续升高提示肿瘤对治疗反应差, 恶性肿瘤患者外周血出现 CTC 提示预后不良, 治疗后 CTC 出现或数目增多与肿瘤复发相关。(3) 指导肿瘤个体化治疗。转移灶的生物学特点与原发灶细胞存在差异, 通过 CTC 体外分离培养 (*ex vivo* culture) 可以检测药物敏感性, 根据病灶的生物学特性制定个体化治疗方案<sup>[32]</sup>。(4) 转移复发的早期预警。肿瘤转移是肿瘤患者死亡的主要原因。目前检测肿瘤转移的方法主要是影像学方法, 即便采用高分辨率的影像学方法尚难以检测那些在细胞水平的早期肿瘤转移事件。通过高分辨率的影像学检查结合动态监测 CTC 数目与性质改变, 可发现肿瘤病灶潜在的转移线索, 为早期针对性治疗提供可能。

## 3 单细胞分选和测序分析

### 3.1 单细胞分选

由于外周血 CTC 属于稀有细胞, 一些传统的单细胞分选方法, 如荧光激活细胞分选法 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 不适合 CTC 单细胞分选。用于 CTC 单细胞分选的方法主要包括显微操作分选法、微流控技术分选法、DEPArray 和 CellCelector 分选系统等 (表 1)。

显微操作分选法 (micropipette isolation) 是在高倍显微镜下, 借助显微机械操纵仪或可视化镊子完成单细胞分选<sup>[33]</sup>, 优点是可有效控制目的细胞的挑选、转移和释放, 确保所挑选细胞的准确性, 成本较低, 但耗时长、通量低, 易对目的细胞造成机械损伤, 适用于群体中含量较少的目标细胞的分离,

表1 CTC单细胞分选方法比较

分选方法	分选对象	耗时	优点	缺点	参考文献
显微操作分选法	细胞数少的组织和细胞悬液等	长	准确性高、成本低廉	耗时长、通量低, 易对目的细胞造成机械损伤	[33-34]
微流控技术分选法	细胞数多的细胞悬液等	短	通量高、反应体积小、空间密闭污染少	成本高、细胞丢失率高	[36,43]
DEPArray分选系统	CTC悬液	长	可视化、半自动	上样体积小, 不可直接从外周血中分离富集CTC	[7,39-40]
CellCelector分选系统	CTC悬液	短	保留细胞活性、准确性高、耗时少	成本高、仪器依赖性高	[42]

可用于经 CellSearch 或 MagSweeper 技术富集的有核细胞的分选<sup>[6,34-35]</sup>。微流控技术分选法 (microfluidics) 可与下游基因组扩增技术偶联, 一步完成单细胞分选、裂解与扩增, 如 Fluidigm 的 C1 单细胞扩增仪通量高 (每张芯片可完成 96 个单细胞分选)、反应体积小 (可提高扩增效率, 减少试剂消耗)、污染少和对测序的影响小等, 缺点是对黏性、非球形细胞捕获率低, 芯片成本较高<sup>[36-37]</sup>。DEPArray 分选系统 (Di-Electro-Phoretic Array system) 是指从混合细胞群中分离稀有细胞的半自动分选系统<sup>[38]</sup>。通过荧光标记使待分选细胞可视化, 单个细胞被芯片上微电极形成的“电子笼”捕获, 再通过开启或关闭微电极将分选并捕获的目的细胞移动到芯片上合适的位置, 置于合适媒介中以便进入后续测序分析<sup>[39]</sup>。缺点为耗时长、上样体积小 (仅 14  $\mu\text{L}$ ), 外周血样本需事先分离富集 CTC 后才能用该系统分选, 已用于乳腺癌和结直肠癌 CTC 单细胞水平的研究<sup>[7,40-41]</sup>。CellCelector 分选系统是从混合细胞群中分离稀有细胞的自动分选系统, 通过多功能机器人系统自动检索单细胞和细胞克隆以实现单细胞分选, 直接通过机械分离目的细胞或克隆, 不影响细胞活性, 可实时观察细胞影像进行细胞分选, 耗时短、准确率高<sup>[42]</sup>。

### 3.2 单细胞全基因组扩增

单细胞内 DNA 含量仅为 6~7 pg, 不能满足全基因组测序所需的 DNA 含量, 需要对单细胞内全基因组进行高保真、高效和无偏差的基因组扩增。全基因组扩增技术 (whole-genome amplification, WGA) 的发展促进了单细胞基因组测序技术的进步<sup>[44]</sup>。

基于 PCR 扩增法, 即改进传统 PCR 的特异引物或随机引物的 PCR 扩增法, 如引物衔接 PCR (linker-adaptor PCR, LA-PCR)、引物延伸预扩增 PCR (primer extension pre-amplification PCR, PEP-PCR) 和简并寡核苷酸引物 PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR) 等, 解决了随机引物退火动力学不同、酶的保真性不高和指数形式扩增等问题, 但仍有扩增产物覆盖度低且不均匀、扩增偏差和等位基因缺失等不足, 有可能造成单核苷酸变异 (single-nucleotide variation, SNV) 导致假阳性的问题<sup>[45-46]</sup>。

多重置换扩增法 (multiple displacement amplification, MDA) 采用随机六聚体为引物, 持续合成能力强、保真性高和链置换活性强的  $\phi\text{29}$  DNA 聚合酶, 在 30  $^{\circ}\text{C}$  时完成扩增<sup>[47-48]</sup>。等温条件下, 具有核酸外切酶活性的随机引物与模板结合, 扩增时  $\phi\text{29}$  DNA 聚

合酶可以取代模板的互补链, 被取代的单链 DNA 作为新的模板进一步扩增, 呈现分枝状结构, 完成指数形式扩增, 最终形成 5~10 kb 的扩增子片段。MDA 是常用的单细胞全基因组扩增方法, 覆盖度高且均匀、准确性好、扩增子长, 但存在等位基因缺失率高、指数扩增造成依赖于序列的偏差, 以及忽略细胞间异质性等不足, 不适合检测拷贝数变异 (copy-number variation, CNV)<sup>[5,49]</sup>。许多扩增方法在 MDA 的基础上进一步改进, 如微孔置换扩增系统 (microwell displacement amplification system, MIDAS) 通过微流控技术减少反应体积, 从而减少扩增造成的偏差, 可对纳升体积的微孔中上千个单细胞基因组同时扩增, 从而提高扩增反应均一性<sup>[50]</sup>。乳化全基因组扩增 (emulsion whole-genome amplification, eWGA) 将基因组 DNA 片段分散入皮升级乳化液滴中, 在足够长的时间中, 每个反应体系均可达到饱和, 减少了扩增时依赖于序列的差异。与经典 MDA 相比, 该方法保证了高覆盖度, 提高了准确性和分辨率<sup>[51]</sup>。Picher 等<sup>[52]</sup> 在 MDA 系统中引入 DNA 引物酶 *Thermus thermophilus* PrimPol (*Tth*PrimPol) 形成复制起始聚合物, 可同时执行 DNA 链的起始和延伸功能, 该 WGA 方法被命名为 TruePrime。与原始 MDA 相比, 该方法扩增产物量增加, 所得产物片段更长, 对少量初始 DNA 模板的敏感度更高。该方法覆盖度和均一性更好, 重现性提高, 可进行 CNV 分析。此外, 由于等位基因缺失 (allelic dropout, ADO) 造成的 SNV 数目下降, SNV 检测假阳性率降低。MDA 反应中链置换过程会形成嵌合体 (chimera), 但是该方法仍依赖于  $\phi\text{29}$  的链置换活性, 所以, 对嵌合体的形成并无改善<sup>[52]</sup>。

多重退火 - 环化循环扩增法 (multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC) 是一种类线性的扩增法。在延伸形成半扩增子后升温使产物从模板脱落, 降温形成发夹结构以防止进一步扩增, 从而保证只基于原始模板上的扩增, 整个反应循环 8~12 次, 产生微克级基因组样本<sup>[53]</sup>。由于该方法为类线性扩增, 避免了扩增偏差, 均一度高, 更适用于 CNV 的检测, 但由于其使用的 Taq DNA 聚合酶保真性低, 造成 SNV 检测中假阳性率较高 (约比 MDA 高 40 倍)<sup>[49]</sup>。

转座子插入线性扩增法 (linear amplification via transposon insertion, LIANTI) 系统中引入特殊设计的 Tn5 转座子, 其中包含的 T7 启动子可随机与基因组结合, 进而通过体外反转线性扩增为数千个

RNA 拷贝, 随后通过反转和第二链合成形成 LIANTI 扩增子, 用于文库构建。与其他扩增方法相比, 该方法覆盖度和均一性均有提升, 降低了等位基因缺失率和假阳性率<sup>[54]</sup>。

单细胞内 DNA 含量在 pg 级别, 所以在扩增中应特别注意防止来自环境和操作者的污染以减少非特异性扩增, 应在无菌、可控气压的条件下操作并控制污染。

### 3.3 单细胞全基因组测序

单细胞测序分析技术由美国安德森癌症研究中心和冷泉港实验室于 2011 年研发<sup>[4]</sup>。常用的下一代测序 (next generation sequencing, NGS) 平台包括 454 Life Sciences/Roche、Illumina 和 Applied Biosystems 的 SOLiD 系统<sup>[55-56]</sup>。单细胞基因组测序首先检测扩增产物的总量和片段分布, 对合格的样本构建文库。文库制备包括: 将扩增产物随机打断为 DNA 小片段、末端修复、加 A、加接头和 PCR 扩增等过程获得所需文库, 文库浓度和扩增片段分布质检合格后进行测序。

单细胞基因组测序数据分析基本流程与 NGS 相似。首先, 对原始下机数据进行过滤并评估测序质量, 然后, 将过滤后的数据比对到参考基因组上并对相应指标质控。由于 WGA 带来的覆盖度不均一和高嵌合体率, 数据需要预处理, 如对核酸文库进行标准化处理进而可采用传统拼接方法对其拼接<sup>[57]</sup>。目前, 针对单细胞顺序开发的数据分析方法包括 SmashCell、Velvet-SC 和 SPAdes 等, 这些高性能计算平台和生物信息学方法一定程度上克服了扩增带来的覆盖度不均一的问题, 获得单细胞内生物遗传信息<sup>[58-60]</sup>。单细胞基因组测序能提供包括基因组重排、插入、重复、倒置和转位等大规模基因组结构变异以及 CNV 和 SNV 等基因组结构变异信息。其中, SNV 包括单碱基插入、缺失和突变。通过这些基因组结构变异可发现肿瘤驱动基因和生物标志物, 还可以了解肿瘤发生发展进程<sup>[61]</sup>。

## 4 循环肿瘤细胞单细胞测序

CTC 作为肿瘤进展的重要标志, 实体肿瘤患者外周血 CTC 单细胞全基因组测序分析有助于对肿瘤的发生发展, 尤其是肿瘤异质性和耐药性等问题认识, 可发现肿瘤发生发展关键基因的变异, 发现新的驱动基因, 了解肿瘤的克隆起源及其进化机制, 认识肿瘤各亚型之间的基因序列差异, 发现新的生物标志物<sup>[44]</sup>。通过单细胞测序获得的信息更

为全面, 弥补了根据单一活检进行肿瘤分层治疗的不足, 广泛用于辅助肿瘤早期诊断、治疗药物选择、预后预测和复发监测等, 促进肿瘤的精准治疗, 为肿瘤的诊断和预后提供一种非侵入性的检测方法 (表 2)。

### 4.1 促进肿瘤精准分型

前期许多研究在单细胞水平采用 Sanger 测序或 NGS 方法检测 CTC 中特定基因突变, 发现肿瘤患者间以及同一肿瘤患者中的异质性, 如通过 Sanger 测序揭示乳腺癌 CTC 之间, 以及 CTC 与肿瘤组织中 *PIK3CA* 基因突变的异质性很大。此外, 还可根据 CTC 中 *TP53* 基因突变, 发现 CTC 异质性亚群<sup>[7,62]</sup>。在结直肠癌研究中, 发现不同的 CTC 中 *BRAF*、*PIK3CA* 和 *KRAS* 等位点突变, 提示存在个体间和同一个体内较大的肿瘤异质性。同样, 针对恶性黑色素瘤中 *BRAF* 和 *KIT* 突变测序发现 CTC 和肿瘤组织之间具有高度异质性<sup>[6,63]</sup>。

此外, 通过全基因组测序和比较基因组杂交 (array comparative genomic hybridization, aCGH) 技术, 在全基因组水平研究 CTC 中 CNV 变异模式。通过对乳腺癌 CTC 进行 aCGH 分析发现, 相同病理类型的不同患者 CTC 中 CNV 变异具有高度异质性, 提示可根据 CNV 变异模式进一步对乳腺癌精准分型<sup>[40]</sup>。一项关于胃癌、结直肠癌、乳腺癌和肺癌等多种肿瘤的 CTC 单细胞全基因组测序研究发现, 同一患者的不同 CTC 具有高度一致的全基因组 CNV 变化模式, 而不同肿瘤以及不同病理类型 (如乳腺癌和肺鳞癌) 相同肿瘤, CTC 的 CNV 变异模式差异较大。与上述研究相似, 乳腺癌患者 CTC 中 CNV 变化模式较复杂, 提示 CNV 可作为进一步精准分型的依据<sup>[64]</sup>。

### 4.2 揭示肿瘤转移机制

肿瘤复发转移是肿瘤致死的主要原因, 通过 CTC 单细胞测序分析 CNV 等变异模式有助于了解肿瘤转移的机制。Heitzer 等<sup>[35]</sup>用 aCGH 在单细胞基因组水平分析了结直肠癌原发灶、转移灶和 CTC 中的 CNV 变异模式, 发现 CTC 中含有与肿瘤原发灶和转移灶相同的 CNV 变异, 也含有新 CNV 变异。Lohr 等<sup>[8]</sup>选择 10 例外周血未检测到 CTC 的转移性前列腺癌病例, 分别对其肿瘤原发灶和转移灶组织样本作了外显子组测序分析。在原发灶中发现了 10 个称为“早期突变”的变异, 在转移灶中发现了 56 个称为“转移突变”的变异。继而, 选择另外两例外周血含有 20 个以上 CTC 的转移性前列腺癌病

表2 CTC单细胞测序研究进展

肿瘤类型	病例数	采血法	CTC富集法	CTC单细胞分选法	CTC单细胞分析数	分析样本			目的基因/序列	突变类型	Ref	
						WGA方法	测序方法	原发灶				
乳腺癌	15+	CellSave	CellSearch	DEPArray	37+	Amplifi™ WGA	qPCR/aCG	√	×	ERBB2/PIK3CA/全基因组 aCGH 分析	拷贝数变异/点突变	[40]
乳腺癌	43	CellSave	CellSearch	DEPArray	202	Kit	H/Sanger	√	×	TP53	点突变	[7]
乳腺癌	18	CellSave	CellSearch	DEPArray	115	Amplifi™ WGA Kit	Sanger	√	×	PIK3CA	点突变	[62]
结直肠癌	6	CellSave	CellSearch	显微操作	37	GenomePlex Single Cell WGA kit/ GenomiPhi DNA Amplification kit	aCGH/NGS	√	√	全基因组 aCGH 分析/68 结直肠癌相关基因	拷贝数变异/点突变	[35]
结直肠癌	5	CellSave	CellSearch	显微操作	69	GenomePlex Single Cell WGA kit	Sanger	√	×	BRAF/KRAS/PIK3CA	点突变	[6]
乳腺癌/肺癌	3+2	EDTA	CTC-Chip + 双膜纳米材料包被凝胶基质	频率控制显微吸取	NA	NO WGA	Sanger	√	×	PIK3CA/EGFR	点突变	[66]
恶性黑色素瘤	11	Heparinized blood	Dynabeads	激光捕获显微切割	14	NO WGA	Nested PCR + Sanger	√	×	BRAF/KIT	点突变	[63]
乳腺癌	17	EDTA	MagSweeper	显微镜下微量吸取	185	NO WGA	Nested PCR + Sanger	√	√	PIK3CA	点突变	[67]
乳腺癌	5	CellSave	CellSearch	DEPArray	≥100	Amplifi™ WGA Kit	NGS	√	×	ESR1、PIK3CA、TP53 和 ERBB2 热点突变; Custom Cancer Hotspot Panel v2 for Amplifi WGA DNA	点突变	[68]

表2 CTC单细胞测序研究进展(续)

肿瘤类型	病例数	CTC富集法	CTC单细胞分选法	CTC单细胞析数	WGA方法	测序方法	分析样本		目的基因/序列	突变类型	Ref
							原发灶	CTC			
胰腺癌	12	ACD Solution A tubes	NanoVelcro /LCM CTC	222	REPLI-g Single Cell Kit	Sanger	√	×	KRAS	点突变	[69]
结肠癌	21	EDTA	Oncoquick	NA	Ampli <sup>TM</sup> WGA Kit	Sanger/pyro sequencing	√	×	KRAS	点突变	[41]
前列腺癌	1	EDTA	PN-NanoVelcro chip	25	GenomePlex Single Cell WGA kit	NGS	√	×	全基因组外显子测序	点突变	[70]
前列腺癌	1	Anticoagulated blood tubes	红细胞裂解+自制玻片黏附	41	GenomePlex Single Cell WGA kit	NGS	√	×	全基因组测序	拷贝数变异	[65]
前列腺癌	2	EDTA	MagSweeper/CellSearch	25	MDA	NGS	√	√(淋巴结)	全基因组外显子测序	点突变	[8]
肺癌	4	CellSave	CellSearch	24	MALBAC	NGS	√	√(转移灶)	全基因组外显子测序	拷贝数变异/异点突变/插入	[9]
结肠癌	2	CellSave	CellSearch	5	MALBAC	NGS	√	√(淋巴结)	全基因组测序	拷贝数变异/异点突变/结构变异	[64]
乳腺癌/胃癌/前列腺癌	9+7+5			97			√	×		拷贝数变异/异点突变	

例, 对其肿瘤原发灶、转移灶和 CTC 单细胞进行外显子组测序分析, 发现 CTC 中含有 9 个与原发灶相同的“早期突变”和 41 个与转移灶相同的“转移突变”, 提示 CTC 既含有肿瘤原发灶又含有转移灶的基因变异信息, 有可能从 CTC 的变异了解肿瘤转移的机制<sup>[8]</sup>。2017 年, Gao 等<sup>[64]</sup>对取自一位结肠癌患者的 28 个原发灶肿瘤细胞、5 个 CTC 以及 3 处转移淋巴结进行了全基因组测序分析。他们发现原发灶的 28 个肿瘤细胞中 CNV 变异具有较大异质性, 即任意两个原发灶细胞的 CNV 变异相关系数在 0.09 到 0.96 之间; 而 5 个 CTC 间 CNV 变化模式相似, 与 3 处转移淋巴结的 CNV 变异接近, 而且与肿瘤原发灶中的某一亚群细胞相似, 表明肿瘤转移过程中 CNV 的变化模式呈现逐渐收敛的趋势, 提示可能仅有恶性程度较高的一群肿瘤细胞可从原发灶进入循环系统并随后形成转移灶。通过综合分析 SNV、CNV 以及结构变异提出一个形成多区间 CNV 的两步模型, 即首先在 DNA 复制过程中由于一系列的复制叉停顿和模板转位形成多区间拷贝数增加, 随后通过同源重组进一步将该区域扩增到较高的拷贝数, 从更深的层次揭示了肿瘤 CNV 形成的原因<sup>[64]</sup>。

### 4.3 动态监测肿瘤进展

作为液体活检的重要组成, 越来越多的研究尝试将 CTC 携带的肿瘤变异信息用于肿瘤临床治疗。2014 年, Dago 等<sup>[65]</sup>通过分析取自去势抵抗性前列腺癌患者 4 个治疗时间点, 即化疗前、阿比特龙治疗前、症状明显缓解和症状加重时的外周血 CTC 全基因组 CNVs 变异, 并结合 CTC 形态和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 表达水平等综合分析, 发现不同时期 CTC 中 CNVs 变化模式显著不同, 尤其是在阿比特龙无效和症状加重时出现一种 AR 强阳性、CNVs 变化较大并存在 MYC 基因扩增的 CTC 细胞亚群, 这一恶性 CTC 细胞亚群的出现与患者对阿比特龙耐药性之间具有显著相关性。他们的研究表明, CTC 单细胞测序可以动态监测肿瘤患者对治疗的响应, 及时发现肿瘤细胞的进化和疾病进展, 建立了一种多参数综合分析的液体活检新方案<sup>[65]</sup>。

Ni 等<sup>[9]</sup>对经 CellSearch 分离的非小细胞肺癌 CTC 基因组采用 MALBAC 扩增, 通过单细胞外显子组测序分析 CTC 中肿瘤相关 SNV 和插入/缺失 (insertions/deletions, INDEL) 变异, 发现不同患者药物靶点相关的点突变 (*EGFR*、*PIK3CA* 和 *RBI*) 不同,

可作为个体化治疗选择的依据。动态监测一例肺腺癌患者的治疗过程, 发现从 3 个治疗时间点 (化疗前、一线化疗和肿瘤进展后行二线化疗前) 分选的 CTC 中随着疾病进展呈现不同的 SNV 变异, GO 分析提示 *ALPK2*、*KIF16B*、*TP53*、*MYH7*、*TLL2* 和 *PAK2* 的变异可能参与疾病进展, 反映对治疗的响应情况。此外, 小细胞肺癌和肺腺癌具有不同的 CNV 变异模式, 可辅助肿瘤诊断<sup>[9]</sup>。

因此, 通过单细胞测序动态监测肿瘤原发灶细胞、CTC 和肿瘤转移灶细胞, 可以非侵入性地实时了解肿瘤进展, 了解肿瘤患者关键癌基因与抑癌基因, 以及基因组 CNV 的变异情况, 为肿瘤早诊、动态治疗监测以及发现耐药变异等重要个体化治疗信息提供依据, 具有潜在临床应用前景。对比外周血 CTC 和肿瘤原发灶、转移淋巴结以及转移灶中单细胞基因组、转录组和表观遗传组差异, 减少了肿瘤异质性的干扰, 为认识肿瘤发生发展的生物学进化过程提供了全新视角<sup>[6-9,63]</sup>。

### 4.4 辅助治疗疗效判断

通过 CTC 单细胞转录组测序分析了解肿瘤治疗疗效也是单细胞测序分析的重要应用方向。2014 年, Ting 等<sup>[71]</sup>采用 CTC-iChip 富集了小鼠胰腺癌外周血 CTC, 并在单细胞水平分析了 75 个 CTC 的转录组。他们综合分析了上皮细胞、造血细胞和内皮细胞标志基因的表达水平, 发现 CTC 中存在 7 个不同细胞亚群, 还发现小鼠胰腺癌 CTC 细胞外基质 *Dcn*、*Sparc*、*Ccdc80*、*Colla2*、*Col3a1* 和 *Timp2* 等基因高表达, 并与肿瘤远端器官播散相关。2015 年, 该团队采用相同方法分析了分选自 13 位前列腺癌患者外周血的 77 个 CTC, 发现 CTC 中的基因表达异质性较大, 还包含雄激素受体 (AR) 突变体以及剪接异构体等的差异表达。在此基础上, 回顾性分析患者使用 AR 抑制剂及其对抑制剂的响应率, 发现使用 AR 抑制剂后仍表现为前列腺特异性抗原阳性或仍需要放射治疗患者的 CTC 中, 伴随非经典 Wnt 信号通路及其下游 *RAC1*、*RHOA* 和 *CDC42* 信号被激活, 表明 CTC 中细胞信号通路的改变可能与患者治疗疗效相关<sup>[72]</sup>。与 CTC 单细胞基因组测序分析相比, CTC 单细胞转录组测序分析相对技术难度较大。

## 5 问题与展望

单细胞测序是一项正在蓬勃发展的新兴技术, 2013 年, *Science* 杂志将其列为最值得期待的六大



领域榜首。但目前该技术尚未完全成熟, 如全基因组扩增人为引入的偏差、覆盖度低、重现性差、等位基因缺失、假阳性和假阴性等问题以及测序中出现的错误和拼接软件尚不完善等, 使肿瘤异质性、克隆进化和发现驱动基因等分析还具有挑战。随着全基因组扩增方法的不断优化和生物信息学的快速发展, 这些问题将会逐步解决。一些覆盖度更高、均一性更好的扩增方法将会推进单细胞基因组测序技术的发展。关于单细胞测序的数据分析, 目前通常采用大样本测序分析方法, 如 MuTect、VarScan 和 Monovar 等。研究人员也在发展基于单细胞测序数据分析的方法, 如 Scaller 分析旨在排除扩增造成的 CG-TA 假阳性突变, 提高分析准确度<sup>[73]</sup>。

同时, 单细胞转录组测序和表观遗传组测序也在不断发展, 结合单细胞基因组测序可进行单细胞多组学整合分析。汤富酬实验室建立了单细胞三组学测序方法, 对从肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者分离的 26 个单细胞同时进行甲基化、基因组 CNV 和转录组分析, 发现可根据 CNV 变异对 HCC 进行亚群分类, 不同亚群甲基化变化规律差异很大<sup>[74]</sup>。此外, CNV 增加的区域相应基因的转录组水平上调, 如急性炎症反应、自身免疫响应和类固醇类代谢等通路<sup>[74]</sup>。

鉴于 CTC 在肿瘤发生发展中的关键作用, 随着单细胞测序技术的不断成熟以及 CTC 富集鉴定技术的标准化, CTC 单细胞测序分析将有助于肿瘤细胞遗传异质性、进化和耐药等研究。单细胞测序联合其他组学的整合分析提供大量有价值的信息, 也会促进肿瘤精准医学的发展。

### [参 考 文 献]

- [1] Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67: 93-9
- [2] Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 623-31
- [3] Tjensvoll K, Nordgard O, Smaaland R. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. *Int J Cancer*, 2014, 134: 1-8
- [4] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, 472: 90-4
- [5] Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16: 79-102
- [6] Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*, 2013, 59: 252-60
- [7] Fernandez SV, Bingham C, Fittipaldi P, et al. TP53 mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 445
- [8] Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 479-84
- [9] Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 21083-8
- [10] Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol*, 2012, 65: 335-59
- [11] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 2011, 147: 992-1009
- [12] Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*, 2013, 108: 479-85
- [13] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 755-68
- [14] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, 194: 23-8
- [15] Chekhun VF, Demash DV, Nalieskina LA. Evaluation of biological effects and possible mechanisms of action of static magnetic field. *Fiziol Zh*, 2012, 58: 85-94
- [16] Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, et al. Tumour heterogeneity: the advantages of single-cell analysis. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1-19
- [17] Cassidy JW, Caldas C, Bruna A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. *Cancer Res*, 2015, 75: 2963-8
- [18] Vermaat JS, Nijman IJ, Koudijs MJ, et al. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 688-99
- [19] Mao C, Wu XY, Yang ZY, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep*, 2015, 5: 8065
- [20] Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, et al. Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12: 124-31
- [21] Colombino M, Capone M, Lissia A, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*, 2012, 30:

- 2522-9
- [22] Chen ZY, Zhong WZ, Zhang XC, et al. *EGFR* mutation heterogeneity and the mixed response to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist*, 2012, 17: 978-85
- [23] Hayes DF, Paoletti C. Circulating tumour cells: insights into tumour heterogeneity. *J Int Med*, 2013, 274: 137-43
- [24] 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: 781-91
- [25] Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 61-6
- [26] Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450: 1235-9
- [27] Gascoyne PR, Noshari J, Anderson TJ, et al. Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2009, 30: 1388-98
- [28] Yu M, Stott S, Toner M, et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, 2011, 192: 373-82
- [29] Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem*, 2014, 60: 214-21
- [30] Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*, 2009, 139: 1315-26
- [31] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 2014, 158: 1110-22
- [32] Yu C, Yu J, Yao X, et al. Discovery of biclonal origin and a novel oncogene *SLC12A5* in colon cancer by single-cell sequencing. *Cell Res*, 2014, 24: 701-12
- [33] Ramser K, Hanstorp D. Optical manipulation for single-cell studies. *J Biophotonics*, 2010, 3: 187-206
- [34] Kirkness EF, Grindberg RV, Yee-Greenbaum J, et al. Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome. *Genome Res*, 2013, 23: 826-32
- [35] Heitzer E, Auer M, Gasch C, et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res*, 2013, 73: 2965-75
- [36] Shalek AK, Satija R, Shuga J, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature*, 2014, 510: 363-9
- [37] Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*, 2015, 58: 610-20
- [38] Fuchs AB, Romani A, Freida D, et al. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab Chip*, 2006, 6: 121-6
- [39] Peeters DJ, De Laere B, Van den Eynden GG, et al. Semi-automated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer*, 2013, 108: 1358-67
- [40] Polzer B, Medoro G, Pasch S, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*, 2014, 6: 1371-86
- [41] Fabbri F, Carloni S, Zoli W, et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett*, 2013, 335: 225-31
- [42] Choi JH, Ogunniyi AO, Du M, et al. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving. *Biotechnol Prog*, 2010, 26: 888-95
- [43] Nagano T, Lubling Y, Stevens TJ, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*, 2013, 502: 59-64
- [44] Zhang X, Marjani SL, Hu Z, et al. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects. *Cancer Res*, 2016, 76: 1305-12
- [45] Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5261-6
- [46] Ling LL, Keohavong P, Dias C, et al. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods Appl*, 1991, 1: 63-9
- [47] Blanco L, Salas M. Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 5325-9
- [48] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*, 2001, 11: 1095-9
- [49] Lasken RS. Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37: 450-3
- [50] Gole J, Gore A, Richards A, et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1126-32
- [51] Fu Y, Li C, Lu S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11923-8
- [52] Picher AJ, Budeus B, Wafzig O, et al. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol. *Nat Commun*, 2016, 7: 13296
- [53] Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338: 1622-6
- [54] Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*, 2017, 356: 189-94
- [55] Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 387-402
- [56] Jessri M, Farah CS. Harnessing massively parallel sequencing in personalized head and neck oncology. *J Dent Res*, 2014, 93: 437-44

- [57] Direito SO, Zaura E, Little M, et al. Systematic evaluation of bias in microbial community profiles induced by whole genome amplification. *Environ Microbiol*, 2014, 16: 643-57
- [58] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 2012, 19: 455-77
- [59] Harrington ED, Arumugam M, Raes J, et al. SmashCell: a software framework for the analysis of single-cell amplified genome sequences. *Bioinformatics*, 2010, 26: 2979-80
- [60] Chitsaz H, Yee-Greenbaum JL, Tesler G, et al. Efficient *de novo* assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 915-21
- [61] Van Loo P, Voet T. Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 24: 82-91
- [62] Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol*, 2015, 9: 749-57
- [63] Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, et al. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *Br J Cancer*, 2012, 106: 939-46
- [64] Gao Y, Ni X, Guo H, et al. Single-cell sequencing deciphers a convergent evolution of copy number alterations from primary to circulating tumour cells. *Genome Res*, 2017, 27: 1312-22
- [65] Dago AE, Stepansky A, Carlsson A, et al. Rapid phenotypic and genomic change in response to therapeutic pressure in prostate cancer inferred by high content analysis of single circulating tumor cells. *PLoS One*, 2014, 9: e101777
- [66] Reategui E, Aceto N, Lim EJ, et al. Tunable nanostructured coating for the capture and selective release of viable circulating tumor cells. *Adv Mater*, 2015, 27: 1593-9
- [67] Deng G, Krishnakumar S, Powell AA, et al. Single cell mutational analysis of *PIK3CA* in circulating tumor cells and metastases in breast cancer reveals heterogeneity, discordance, and mutation persistence in cultured disseminated tumor cells from bone marrow. *BMC Cancer*, 2014, 14: 456
- [68] Shaw JA, Guttery DS, Hills A, et al. Mutation analysis of cell-free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 88-96
- [69] Court CM, Ankeny JS, Sho S, et al. Reality of single circulating tumor cell sequencing for molecular diagnostics in pancreatic cancer. *J Mol Diagn*, 2016, 18: 688-96
- [70] Zhao L, Lu YT, Li F, et al. High-purity prostate circulating tumor cell isolation by a polymer nanofiber-embedded microchip for whole exome sequencing. *Adv Mater*, 2013, 25: 2897-902
- [71] Ting DT, Wittner BS, Ligorio M, et al. Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells. *Cell Rep*, 2014, 8: 1905-18
- [72] Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science*, 2015, 349: 1351-6
- [73] Dong X, Zhang L, Milholland B, et al. Accurate identification of single-nucleotide variants in whole-genome-amplified single cells. *Nat Methods*, 2017, 14: 491-3
- [74] Hou Y, Guo H, Cao C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res*, 2016, 26: 304-19