

单细胞测序在血液系统疾病诊断和治疗中的研究进展

杨夏婉 孙恺

郑州大学人民医院血液科, 河南省人民医院血液科 450003

通信作者: 孙恺, Email: sunkai@cellscience.org

基金项目: 国家自然科学基金(81471589、81273259); 河南省科技攻关计划省部共建项目(201201005); 河南省科技厅基础与前沿项目(142300410078)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.020

Research progress of single cell sequencing in the diagnosis and treatment of hematological diseases

Yang Xiawan, Sun Kai

Department of Hematology, Zhengzhou University People's Hospital, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Sun Kai, Email: sunkai@cellscience.org

目前广泛应用的二代测序(NGS)技术,是基于整个细胞群体的分析,不能观察细胞的异质性。单细胞测序(single cell sequencing, SCS)则是在单个细胞水平上,对基因组或转录组进行扩增并测序,以检测单核苷酸位点变异(SNV)、基因拷贝数变异(CNV)、单细胞基因组结构变异、基因表达水平、基因融合、单细胞转录组的选择性剪切、单细胞表观基因组的DNA甲基化状态等^[1]。SCS可实现在单细胞水平对疾病和生物学过程中的遗传学特征进行研究,包括早期胚胎发育、肿瘤发生和发展的分子学机制、肿瘤的异质性和进化过程、循环肿瘤细胞(CTC)和克隆演变等^[2-4]。

利用SCS技术发现既往确定的经典造血细胞类型的血液肿瘤具有高度异质性^[5],在以细胞毒性药物为主的化学药物治疗期间,血液肿瘤细胞可出现新的突变,发生克隆演变,从而导致疾病耐药甚至复发^[6-7]。在临床上,血液系统恶性肿瘤的异质性和克隆演变给疾病的诊断和靶向性治疗带来了挑战。SCS为血液系统恶性肿瘤的异质性及克隆演变提供了有力证据,表明血液肿瘤包含多个细胞亚群,且单个肿瘤细胞可以进一步获得新的突变,从而演变成优势克隆或耐药性克隆^[8-10]。

一、SCS技术的分类

1. 单细胞基因组/DNA测序(DNA SCS / DNA-Seq): 单细胞基因组数据具有重要意义,可用于重建肿瘤演变过程。最常见的全基因组扩增(WGA)方法是简并寡核苷酸引物PCR(DOP-PCR)和多重置换扩增(MDA)^[2]。然而,DOP-PCR的低物理覆盖率使其不易测量碱基对分辨率下的突变。另一种DNA SCS方法是基于多重退火和成环循环的扩增技术(MALBAC)^[11],这种方法可以测定CNV和SNV,但是假阳性率较高。还有一种新的方法是全基因组和外显子组SCS^[11],它是在MDA之前复制单个细胞中的基因组DNA的G₂M核,减少了SCS期间的许多技术性错误。WGA扩增

的DNA用于构建NGS的文库^[12],单细胞文库经常被条形码化并汇集在一起用于多重测序。在许多研究中,条形码文库用于靶向捕获(外显子或基因组),选择性针对感兴趣区域进行测序,并在这些区域获得更高的覆盖深度。

2. 单细胞转录组/RNA测序(RNA SCS / RNA-Seq): RNA SCS方法的发展与进步,有利于实现细胞的异质性和痕量样本转录组的检测。对于看似同源的细胞群,在单个细胞基因表达和蛋白水平上也会有显著差异^[13]。为了对单细胞转录组进行测序,RNA必须首先通过全转录组扩增(WTA)。常用的方法包括:唐氏法(Tang's method)、体外转录扩增法、Smart-seq、Smart-seq2、Quartz-seq、Cel-seq、STRT和定量的单细胞RNA测序,其中Smart-seq、Smart-seq2是目前使用最多的方法^[1]。

3. 单细胞表观遗传组测序: 单细胞的表观遗传学分析是一项重大的技术挑战。有证据表明,基因组和转录组测序只提供细胞的部分信息,表观遗传状态也影响着细胞的功能,包括DNA甲基化、羟甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA调节、染色质构型及结合在染色质上的结构和调节蛋白等^[1]。对于同源的细胞群,表观遗传状态同样存在着巨大的差异。因此,在单细胞水平,发展高通量方法检测表观基因组具有重要的意义。当前,单细胞DNA甲基化测序方法主要为单细胞简化代表性重亚硫酸氢盐测序法(scRRBS)和单细胞重亚硫酸氢盐测序法(scBS-seq)^[1,14]。

二、SCS的应用优势

目前,在血液系统恶性肿瘤的诊断和治疗中,通过对大样本多细胞的检测,分析混合细胞群体的表达,忽略了肿瘤细胞间的异质性和克隆演变的特征。因此,在多个时间节点分析患者的肿瘤分子学特点,从而制定出针对特定患者的特异性个体化治疗方案有着重要的临床意义和应用价值。克隆复杂性意味着诊断中存在的克隆亚群受治疗和微环境改

变的影响,从而获得不同的遗传、生物学或表型特征,可成为改变治疗决策的靶点^[15]。

三、SCS在血液肿瘤诊断和治疗中的意义

1. SCS研究血液肿瘤的异质性和克隆演变:肿瘤从单一正常细胞演变而来。在此过程中,癌细胞累积突变产生多样性,形成不同的谱系和亚群。肿瘤异质性干扰了患者的临床诊断,是影响治疗反应和逃逸复发的重要因素。在个体癌症中,尤其是血液肿瘤,存在有多种克隆亚群,而大多数遗传/基因组学检测将肿瘤看作整体,而不是单个细胞成分。常规大样本检测仅仅分析了主要克隆,而微小克隆和肿瘤干细胞常不易检测到,进而忽略了一些与耐药、疾病进展及复发相关的克隆。

肿瘤细胞群的异质性程度和构成随时间变化,被称为克隆演变。血液系统恶性肿瘤,尤其是淋巴样和浆细胞样肿瘤具有高度异质性,并随时间发生演变^[16-17]。因此,只能用单细胞分析来检测肿瘤异质性及克隆演变引起的后续耐药性及复发相关的克隆。克隆间和克隆内异质性发生频繁,SCS可以鉴别出最终介导疾病进展和复发的恶性克隆,可以在临床上疾病进展之前检测到克隆间和克隆内异质性,并提供有用的临床信息。总之,由于个体患者的克隆异质性,特别是对于不断演变的克隆,有必要进行个体化治疗。

2. SCS研究白血病:造血干细胞(HSC)获得多次打击转化为意义未明的单克隆造血细胞甚至是白血病干细胞(LSC)。LSC是白血病的起始和维持细胞^[18],与预后不良、治疗失败及白血病复发有关^[19]。然而,LSC的确切分子学特征仍未完全明确。Saadatpour等^[20]应用单细胞基因表达测序技术,分析MLL-AF9驱动小鼠模型中AML的细胞异质性,发现只有一个白血病亚型(白血病1)更具有侵袭性;白血病细胞的基因表达谱与HSC不同,支持LSC的“干性”与正常干细胞的“干性”不同的观点。通过SCS分析LSC的基因组学、转录组学等特征,有效地从HSC和白血病细胞亚群中鉴别出LSC,从而针对LSC独特的表面标志和信号传导通路进行靶向治疗,进而清除LSC,具有重要的临床意义。

近年来,SCS研究白血病细胞的异质性和克隆演变为理解血液病的发生发展提供了新见解^[21-22]。Niemöller等^[23]应用外显子组测序分析了CBL突变的克隆造血中inv(16)急性髓系白血病(AML)的克隆组成和进化,证实PTPRT、CAND1和DOCK6突变在相同AML克隆中共同发生,但存在不同的克隆层次,即PTPRT突变在CAND1和DOCK6突变后发生。急性淋巴瘤细胞白血病(ALL)和AML均具有克隆异质性特征,在复发时存在克隆演变,可能增加了与复发有关的新突变。在骨髓增生异常综合征(MDS)向AML进展期间也已经检测到类似的克隆演变模式。Hughes等^[8]对3例MDS发展而来的AML患者的单个白血病细胞进行测序,靶向测序了每例患者的十几个单细胞的近1900个基因分型位点,分析了突变时间和克隆层次,有助于了解MDS向AML转变过程中的遗传学改变和制定针对起始克隆及优势克隆的靶向治疗。因此,应用SCS技术来评估靶向变体之间

的主要克隆关系,更全面地了解恶性肿瘤的演变过程,可以促进新型抗癌治疗方案和预防策略的合理开发。

儿童ALL发病率高,严重威胁儿童的生命健康。单细胞基因组学为确定肿瘤克隆异质性、克隆起源及克隆演变提供了最严格的方法。既往有关儿童ALL发病机制的研究仅提供了白血病发生过程中遗传事件的有限顺序,然而,对遗传事件的突变顺序与儿童ALL诊断时的实际克隆结构是未知的。Gawad等^[9]对6例正常核型儿童ALL患者的1479个单一肿瘤细胞中的单核苷酸变异、缺失和IgH序列进行靶向测序,初步确定了发展成为ALL过程中突变事件的时间顺序。ETV6-RUNX1移位发生在子宫中,其次是基因组结构变异引起的白血病前演变,随后胞嘧啶突变驱动分支演变(显示IgH重排),产生多个优势克隆,最后产生最优势的克隆,导致ALL发生。因此,利用SCS技术更深入研究患者特异性肿瘤的克隆异质性和克隆演变史,能够为理解儿童ALL的发病机制、开发新的治疗和预防策略提供依据。

慢性髓性白血病(CML)作为分子靶向性治疗的范例,也是探索靶向治疗耐药性细胞基础研究的理想疾病。Giustacchini等^[21]融合荧光激活细胞分选(FACS)、高灵敏度单细胞突变检测和单细胞RNA测序方法,选取CML从诊断到缓解和疾病进展整个过程中的超过2000个CML-干细胞(CML-SC),通过Smart-seq2或BCR-ABL tSS2处理单个K562细胞,qPCR检测BCR-ABL和GAPDH,揭示了CML-SC的异质性,识别了具有不同分子特征(BCR-ABL+SC/BCR-ABL-SC)的CML-SC亚组。这种方法,可广泛应用于多种恶性肿瘤,在疾病缓解阶段即可识别出大样本细胞群体分析中所不能检测到的耐药性SC亚群。

3. SCS研究骨髓增殖性疾病:骨髓增殖性肿瘤属于造血性肿瘤,HSC或造血祖细胞发生遗传学变异,导致异常分化和骨髓细胞产生增多。原发性血小板增多症(ET)是典型的骨髓增殖性肿瘤,特征是骨髓巨核细胞持续增殖,导致循环血小板数量的增多。约55%ET患者存在JAK2基因突变,然而,该突变也可以在其他类型的骨髓增殖性肿瘤中发现,不能成为推断ET进化史的独特标志。

Hou等^[24]首次利用MDA为基础的单细胞测序技术,对来自典型JAK2阴性ET患者的90个单细胞进行全外显子测序,筛查出在ET发生和进展中的驱动基因,从而证实ET为单克隆来源的疾病。该方法与经典方法相比,具有高敏感性、高特异性、低假阳性率等特点,为分析疾病的遗传学结构及克隆进化提供了新思路。

4. SCS研究多发性骨髓瘤(MM):MM是一种不可治愈性肿瘤,其特征存在于血液中存在单克隆免疫球蛋白、溶骨性病变及骨髓中存在单克隆浆细胞^[25]。随着有效靶向治疗的出现,患者存活率显著提高,但是几乎所有患者都会复发,且随着复发次数的增加,疾病逐渐发展到难治状态。MM的不断克隆进化和遗传异质性可能解释其耐药性的出现^[10,26-27]。

Lohr等^[10]在单细胞分辨率下,应用DNA及RNA SCS技术识别出24例随机选择的患者体内的CTC,证明了SCS技

术与FACS监测骨髓微小残留病(MRD)有相似的灵敏度。他们还发现单一MM CTC能够再现MM骨髓中的体细胞突变模式,并通过CTC识别到致癌基因,包括BRAF激活突变和KRAS G12C突变,目前BRAF抑制剂已被证明有效^[28],而KRAS G12C变构抑制剂正在开发中^[29]。值得注意的是,与骨髓穿刺检查相比,应用SCS技术测定CTC,可确定多个MM细胞中更丰富的驱动突变^[10]。

这种方法为血液系统恶性肿瘤的无创诊断及高敏感性监测MRD提供了新思路,较骨髓穿刺有明显优势,能够在单细胞水平上早期发现骨髓瘤细胞的突变模式和克隆层次,从而实现早期针对耐药克隆的治疗^[30-31]。

四、小结

SCS技术是精准医学的重要代表,其通过在单个细胞水平上,对基因组、转录组、表观遗传组进行扩增和测序,证明了在肿瘤的发生、发展、治疗等过程中存在的肿瘤细胞间的高度异质性和克隆演变的特征,为实现疾病的精准诊断、精准治疗带来了希望。通过SCS研究单个细胞基因组、转录组及表观遗传组学的特征,可用以监测血液肿瘤的进展、疗效、预后等,很可能发现潜在的治疗靶点。当前,SCS技术已经在多种血液肿瘤研究中得到应用,进一步验证了血液肿瘤细胞间的异质性和克隆演变,并从单细胞水平上研究了多种血液肿瘤的克隆起源,为血液肿瘤精准诊断、动态监测及个体化治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Liang J, Cai W, Sun Z. Single-cell sequencing technologies: current and future [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41 (10):513-528. DOI: 10.1016/j.jgg.2014.09.005.
- [2] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing [J]. *Nature*, 2011, 472 (7341):90-94. DOI: 10.1038/nature09807.
- [3] Xue Z, Huang K, Cai C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Nature*, 2013, 500 (7464):593-597. DOI: 10.1038/nature12364.
- [4] Ni X, Zhuo M, Su Z, et al. Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(52):21083-21088. DOI: 10.1073/pnas.1320659110.
- [5] Garg M, Nagata Y, Kanojia D, et al. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse [J]. *Blood*, 2015, 126 (22):2491-2501. DOI: 10.1182/blood-2015-05-646240.
- [6] Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing [J]. *Nature*, 2012, 481 (7382):506-510. DOI: 10.1038/nature10738.
- [7] Sant M, Minicozzi P, Mounier M, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15 (9):931-942. DOI: 10.1016/S1470-2045 (14)70282-7.
- [8] Hughes AE, Magrini V, Demeter R, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia defined by single-cell sequencing [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10 (7):e1004462. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004462.
- [9] Gawad C, Koh W, Quake SR. Dissecting the clonal origins of childhood acute lymphoblastic leukemia by single-cell genomics [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (50):17947-17952. DOI: 10.1073/pnas.1420822111.
- [10] Lohr JG, Kim S, Gould J, et al. Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8 (363):363ra147. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7037.
- [11] Wang Y, Waters J, Leung ML, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing [J]. *Nature*, 2014, 512(7513):155-160. DOI: 10.1038/nature13600.
- [12] Shinozuka H, Forster JW. Use of the melting curve assay as a means for high-throughput quantification of Illumina sequencing libraries [J]. *PeerJ*, 2016, 4:e2281. DOI: 10.7717/peerj.2281.
- [13] Yuan GC, Cai L, Elowitz M, et al. Challenges and emerging directions in single-cell analysis [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1):84. DOI: 10.1186/s13059-017-1218-y.
- [14] Farlik M, Sheffield NC, Nuzzo A, et al. Single-cell DNA methylation sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics [J]. *Cell Rep*, 2015, 10 (8):1386-1397. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.001.
- [15] Wang W, Zhu B, Wang X. Dynamic phenotypes: illustrating a single-cell odyssey [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2017, 33(5):423-427. DOI: 10.1007/s10565-017-9400-2.
- [16] Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(2):100-113. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.122.
- [17] Kriangkum J, Motz SN, Mack T, et al. Single-Cell Analysis and Next-Generation Immuno-Sequencing Show That Multiple Clones Persist in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9):e0137232. DOI: 10.1371/journal.pone.0137232.
- [18] Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(2):187-198. DOI: 10.1038/cdd.2014.89.
- [19] Zhou J, Chng WJ. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(4):473-484. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i4.473.
- [20] Saadatpour A, Guo G, Orkin SH, et al. Characterizing heterogeneity in leukemic cells using single-cell gene expression analysis [J]. *Genome Biol*, 2014, 15 (12):525. DOI: 10.1186/s13059-014-0525-9.
- [21] Giustacchini A, Thongjuea S, Barkas N, et al. Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia [J]. *Nat Med*, 2017, 23 (6):

692-702. DOI: 10.1038/nm.4336.

[22] Klcó JM, Spencer DH, Miller CA, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 (3):379- 392. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.031.

[23] Niemöller C, Renz N, Bleul S, et al. Single cell genotyping of exome sequencing- identified mutations to characterize the clonal composition and evolution of inv (16) AML in a CBL mutated clonal hematopoiesis [J]. *Leuk Res*, 2016, 47:41- 46. DOI: 10.1016/j.leukres.2016.05.008.

[24] Hou Y, Song L, Zhu P, et al. Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2- negative myeloproliferative neoplasm [J]. *Cell*, 2012, 148 (5):873- 885. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.028.

[25] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91 (7):719-734. DOI: 10.1002/ajh.24402.

[26] Mitra AK, Mukherjee UK, Harding T, et al. Single-cell analysis of targeted transcriptome predicts drug sensitivity of single cells within human myeloma tumors [J]. *Leukemia*, 2016, 30 (5): 1094-1102. DOI: 10.1038/leu.2015.361.

[27] Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2012, 120(5):1067-1076. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405985.

[28] Andrulelis M, Lehnert N, Capper D, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(8):862-869. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0014.

[29] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503(7477):548-551. DOI: 10.1038/nature12796.

[30] Ebinger S, Özdemir EZ, Ziegenhain C, et al. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30 (6):849-862. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.11.002.

[31] Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 (1):91-101. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.12.015.

(收稿日期:2018-09-27)
(本文编辑:刘爽)

中华医学会血液学分会第十届委员会委员名单

- 主任委员** 王建祥
前任主任委员 黄晓军
候任主任委员 吴德沛
副主任委员 胡 豫 邵宗鸿 周道斌 刘启发
常务委员(按姓氏笔画为序) 马 军 方美云 王建祥 王景文 任汉云 刘启发 吴德沛
 宋永平 张 曦 张连生 李军民 杨林花 邵宗鸿 陈协群 周剑峰 周道斌
 侯 明 侯 健 胡 豫 胡建达 黄 河 黄晓军
委员兼秘书长 肖志坚
委 员(按姓氏笔画为序) 马 军 方美云 牛 挺 王 欣 王建祥 王健民 王景文
 付 蓉 白 海 卢英豪 任汉云 江 明 纪春岩 刘 竞 刘 利 刘 林
 刘 霆 刘开彦 刘启发 刘卓刚 孙自敏 孙爱宁 朱尊民 吴广胜 吴德沛
 宋永平 张 梅 张 曦 张连生 张晓辉 李 娟 李 艳 李 薇 李 骥
 李文倩 李军民 苏雁华 杨仁池 杨同华 杨林花 沈建平 肖志坚 邵宗鸿
 陈 虎 陈协群 周剑峰 周道斌 金 洁 罗建民 姚红霞 郑 波 侯 明
 侯 健 胡 豫 胡建达 赵永强 赵维莅 赵谢兰 徐开林 梁爱斌 黄 河
 黄晓军 黄瑞滨 韩艳秋 彭志刚 曾庆曙 谭 荻