

## · 专家论坛 ·

## 从单细胞水平看肿瘤异质性

盛媛 李恒宇

在过去的二十多年里,很少有疾病像乳腺癌一样获得如此多的研究进展,特别是近年来,单细胞研究技术不断进步,掀起了肿瘤异质性研究的热潮。2012 年, Gerlinger 等<sup>[1]</sup>的研究有力证实了肿瘤异质性的存在,随后,肿瘤异质性问题越来越多地被提及。对于临床医师而言,肿瘤异质性对临床工作和转化研究有哪些影响,本文将就此回顾最新进展,分享个人观点。

## 1 肿瘤异质性

## 1.1 异质性的范围

肿瘤异质性是一个宽泛的定义,可粗略地分为时间异质性、空间异质性、结构异质性、细胞异质性、蛋白异质性、基因异质性、功能异质性等<sup>[2]</sup>。临床工作中,病理学异质性多为空间异质性,常表现为下述三种情况:在未扩增的细胞背景中有成簇扩增细胞;少量扩增背景中有未扩增的细胞;孤立的细胞扩增。再如 HER-2 异质性,其发生率在 20% 左右<sup>[3]</sup>,包括了上面所列出的几种情况。空间异质性表现为免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)和荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)结果不一致或者同一组织中 HER-2 扩增结果不一致。时间异质性表现为 HER-2 基因扩增在浸润性乳腺癌及转移癌中提示预后不良,而在早期原位癌中没有预后价值<sup>[4]</sup>。临床上 HER-2 的 FISH 检测多是在选取做免疫组织化学区域的组织上进行检测,对整体肿瘤组织检测不全面。目前还没有足够证据用于指导 HER-2 检测结果不明确的患者进行靶向治疗,并且试验和平台之间的比较相对复杂,所以现行的检测标准可能会导致 HER-2 靶向治疗过度或不足<sup>[5]</sup>。

与 HER-2 同家族的 EGFR 在肿瘤中也有异质性的表现。Xia 等<sup>[6]</sup>发现激活 EGFR 既可促进也可抑制肿瘤生长,在过高表达该基因的人表皮癌 A431 细胞和乳腺癌 MDA-MB-468 细胞中, EGFR 可以抑制其生长。2013 年 Kreso 等<sup>[7]</sup>将来源于 10 例结肠癌患者的 150 个细胞通过慢病毒标记,建立单个肿瘤细胞移植瘤模型进行连续传代培养,发现后代肿瘤细胞虽然具有相同基因组变异,但肿瘤细胞的增殖能力和对化疗药物的敏感性,表现出显著的不一致。由此可见,肿瘤细胞还存在功能异质性。

仅了解瘤内异质性是不全面的,还应当分析扩散及转移的肿瘤细胞,如转移灶与原发灶是否有异质性?患者术后远期复发是来自循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)还是休眠肿瘤细胞(dormant tumor cells, DTC)?它们与原发灶有无异质性?目前多数研究结果支持原发灶与转移灶的肿瘤细胞之间具有相近的克隆关系,但两者之间同样存在遗传多样性,并且转移灶标本采集与原发灶标本留取间隔时间越长,一致性越低。以往的观点认为,CTC 都是单细胞或者单克隆转移到远端器官定植,所以一般认为转移灶应该是单克隆起源,但临床上发现转移灶有多克隆的现象。目前发现 CTC 可以以细胞团方式转移,细胞团内的 CTC 有异质性,从而可能导致转移灶的多克隆起源。

## 1.2 异质性的产生模式

乳腺癌异质性起源于不同的分子分型,目前认为是不同类型的正常细胞恶性转化的结果,例如管腔上皮细胞、基底细胞、肌上皮细胞或者是此类细胞的祖细胞、干细胞发生恶性转化。关于恶性转化后产生异质性的原因目前有两种理论:肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)假说和克隆进化(clonal evolution)模型<sup>[8]</sup>。克隆进化理论指出了肿瘤细胞有不同的基因型,干细胞理论则说明在肿瘤进化过程中会新产生一些具有干细胞样特性

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.06.002

基金项目:中国博士后科研基金面上项目(2014M552624)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院甲状腺乳腺外科

通信作者:盛媛,Email: sheng528yuan@163.com

的肿瘤细胞,以保持肿瘤更加稳定的状态。两个假说不是独立的,是一个共存、动态的过程。肿瘤细胞所处的时空位置不同,周围微环境使肿瘤细胞向不同方向发展。

乳腺癌的微环境包括细胞外基质、炎性细胞、免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞等,通过与乳腺癌细胞相互作用来影响乳腺癌的发生、发展,可能造成肿瘤间的异质性。另一方面,当突变赋予了肿瘤细胞更强的侵袭和增殖能力时,新的 CSC 就会产生。因此肿瘤在进展过程中,可能包含了多个 CSC 群,只有针对所有 CSC 亚群进行治疗才可能防止肿瘤复发<sup>[9]</sup>。整个肿瘤是一个复杂的生态系统,其中,即使小部分的亚群细胞,也可以驱动整个肿瘤的进展。正是这部分肿瘤细胞在生态系统的生存优势导致了肿瘤的生长和转移,引起患者的病情恶化。

### 1.3 异质性与多驱动基因

乳腺癌不是单驱动基因疾病,ER 阳性患者多是受增殖相关基因调控,而 ER 阴性患者则多受免疫相关基因调控<sup>[10]</sup>。如果能对这些常见的驱动基因进行靶向干预,也许可以治疗大部分的乳腺癌。这种新理念让临床医师和研究者不再将目光局限在原发和转移器官上,而是按照肿瘤的突变型和表达型来对肿瘤进行治疗,这种分类方式会更精确。按此趋势,未来也许可以按照不同的靶基因来划分学科和医师的专长。

乳腺癌也有高发突变型,如 TP53、PIK3CA、BRCA1/2 及 PALB2 等重要基因。Martins 等<sup>[11]</sup>分析了 55 例 BRCA1 相关乳腺癌中的 BRCA1、PTEN 和 TP53 基因,发现在基底型乳腺癌中,PTEN 缺失是较常见的现象,在管腔型乳腺癌患者中 TP53 基因突变多见,PIK3CA 基因突变较少,但上述乳腺癌重要基因所占的比例也仅为 21%。如果加上通过全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)鉴定出的几百个单核苷酸多态性(SNPs),两者加起来也仅占有所有基因变异的一半<sup>[12]</sup>。况且在肿瘤发生发展的不同时期及治疗前后,肿瘤细胞的突变也是呈动态变化的<sup>[4]</sup>。可以说,乳腺癌是一个多驱动基因、多异质性的肿瘤,具体的病因仍不清楚。

在乳腺癌的这些既多又呈动态变化的基因突变中,许多学者试图区分出哪些突变是“驱动性(driver mutation)”,哪些是“乘客性(passenger

mutation)”,但这样的分类有可能造成一种简单化的误导,因为它们只是在特定空间和时间下选择一个适合的表型,随着肿瘤的进展,其选择的价值可能会发生很大的变化,并且大量“乘客突变”的积累也可能影响细胞表型<sup>[8]</sup>。

### 1.4 标本与数据处理对异质性的影响

瘤内及肿瘤间异质性研究要注意标本的处理和研究数据的解读。细致的标本处理和准确的临床标志物的评估至关重要。目前用单一肿瘤活组织检查标本作为肿瘤的诊断依据及个性化医疗决策的基础也许不可靠,不能代表肿瘤遗传多样性的全貌,甚至会在一定程度上误导治疗。转化和临床研究的成功在于选择均质性的患者。此外,治疗全程取样,储存质量高、随访全面和特点明确的组织样本也至关重要。当拿到检测结果后,如何分析细胞间差异,比如在 RNA 测序后,许多表达丰度变化不大的基因也许是真正起作用的基因,再比如一些显著不同的变异体可能不会获得进化机会,因此对单细胞基因组分析的数据解释应该更加谨慎。对于在肿瘤进展过程中所产生的大量“噪音”基因的分析,难免大幅度增加研究成本,需要平衡信噪比来确定研究样本的范围。除单细胞研究之外,如果能将形态学与显微分离技术相结合,分析较小但是有代表性的区域,也会有意义。

## 2 单细胞技术

单细胞技术或稀有细胞检测技术不断发展,迅速应用于干细胞基础研究及肿瘤领域。常见的单细胞技术有以下几种。

### 2.1 单细胞分离技术

单细胞分离技术主要包括有限稀释法、荧光激活细胞流式分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)、激光捕获显微切割(laser capture micro-dissection, LCM)技术、光学镊子、原子力显微镜,以及近年来出现的靶向特异标志物分子修饰的纳米材料结合微流控技术的检测等。

### 2.2 单细胞免疫组织化学技术

单细胞上进行 FISH 检测细胞上的分子表达。在检测 CTC 时,采用阴性富集结合 RNA 原位杂交的 iFISH (immunostaining-fluorescence in situ hybridization)方法<sup>[13]</sup>,对比研究发现较通过用抗体识别肿瘤细胞表面上皮细胞黏附分子



(EpCAM)法检出率更高,但仍需要大样本多中心临床试验验证。

### 2.3 单细胞克隆形成与单细胞移植

克隆形成分析是通过将分离出的 CSC 种植于富含特定成分的培养基来观察细胞自我更新及分化潜能的研究方法。单细胞移植于动物体内,某些恶性程度特别高、具有 CSC 特性的细胞,甚至可以由一个干细胞生长成肿瘤。英国的一项研究将小细胞肺癌患者的 CTC 分离接种于裸鼠,获得 CTC 源性移植瘤模型 (CTC-derived explants, CDXs) 保持着与原发肿瘤相同的形态和基因特征,并且进行常规化疗后获得与患者相似的疗效<sup>[14]</sup>。CDXs 可以稳定传代,为药物试验及耐药研究提供良好的平台。

### 2.4 单细胞实时荧光定量 PCR 技术与微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)

前者是利用 PCR 技术在单细胞水平检测 RNA。后者的方法原理是将含有核酸分子的反应体系分成几万个纳升级的微滴,经 PCR 扩增后,逐个对每个微滴进行检测,因此具有极高的灵敏度,而且不易受背景噪音影响、更精确、重复性好、易于分析解读和比较。

### 2.5 单细胞基因组测序

单细胞基因组测序将分离的单个细胞的微量全基因组 DNA 进行扩增,获得高覆盖率、完整的基因组之后,通过外显子捕获进而高通量测序,用于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。其原理是将分离的单个细胞的微量全基因组 DNA 或 RNA 进行扩增,获得高覆盖率的完整的基因组后进行高通量测序,用于揭示细胞群体差异和细胞进化关系。Smart-seq 单细胞转录组测序技术、微孔取代扩增系统 (micro-well displacement amplification system, MIDAS) 以及多次退火环状循环扩增技术 (multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC) 是目前被普遍认可的三种单细胞测序技术。

### 2.6 单细胞转录组分析

适用于存在高度异质性的细胞群体,有助于深入理解细胞分化、转分化等过程及相关的基因调节网络。Battich 等<sup>[15]</sup>开发了一种结合自动荧光显微镜和超级计算机技术可视化检测单细胞内基因活性的方法,即当基因变得活跃时,RNA 就

会产生,机器能够进行染色并记下 RNA 的亮度,并且还能够分辨单个细胞内的不同 RNA 分子的空间分布。这种空间相似性的意义超过了 RNA 数量的相似性。

## 3 单细胞技术与肿瘤异质性的相关研究

### 3.1 肿瘤细胞的应用

2011 年,Navin 等<sup>[16]</sup>利用全基因组扩增及 DNA 测序对单个乳腺癌细胞进行了拷贝数变异的分析,进而推断出细胞群体结构和肿瘤进化过程,但该方法不能检测在肿瘤发展过程中发挥重要作用的单个核苷酸的改变。时隔 3 年,Wang 等<sup>[17]</sup>通过筛选仅对新生的“双”核进行测序,建立了 nuc-seq 技术,错误率比之前大部分测序技术更低。利用该技术对 ER 阳性和阴性的两种乳腺癌中多个单细胞基因组进行测序,发现不同类型的 DNA 突变在不同类型肿瘤中以不同的速度累计,而且在肿瘤细胞内有两种相互独立的“突变时钟”运行。非整倍体重排发生于肿瘤演化早期,并随肿瘤克隆扩增保持高度稳定性。与之相反,点突变则逐渐演变,生成广泛克隆多样性。数学模型表明三阴性乳腺癌细胞突变率增高,而 ER 阳性乳腺癌细胞则没有<sup>[17]</sup>。这项研究的重要性在于,它初步回答了乳腺癌克隆异质性的范围和程度、肿瘤细胞中哪些突变可以作为治疗靶点、突变是长时间演变还是短时间骤变以及乳腺癌突变速率是否增加等问题。大量化疗后出现的抵抗突变可能存在于肿瘤化疗之前,而且是突变率增加驱动了肿瘤进化,表明肿瘤异质性可以被用于指导个体化药物治疗。研究结果也再一次说明目前普遍采用的单个较大肿瘤组织检测并不能全面检测肿瘤的遗传学特点<sup>[17]</sup>。

最近 Zhang 等<sup>[18]</sup>的研究与上述观点不完全一致,他们用肿瘤组织不同区域测序的方法,将研究结果用树形结构来描述肿瘤基因组异质性:树干代表肿瘤中所有区域的突变,树枝代表部分区域的突变,而再小的树枝则代表更小区域中的变异;纳入研究的 11 例患者都是先出现树干的突变,再出现树枝的突变;在 21 个月的随访中,有 3 例复发,其原因都是出现了约 40% 的树枝突变,未复发患者中树枝突变只占 17%。这样的结论与 2012 年 Gerlinger 等<sup>[1]</sup>的研究明显不同,所以作者认为肿瘤异质性在不同癌症类型之间各不相

同。但 Zhang 等<sup>[18]</sup>与 Wang 等<sup>[17]</sup>的结果都表明:突变率的增加或者说树枝突变的增加与患者的病情进展、复发都有密切的关系。

### 3.2 CTC 的应用

CTC 近年来之所以受到高度关注,不仅因为 CTC 的数量可以作为预后指征监测治疗效果,更是因为 CTC 是进行肿瘤细胞基因解读的潜在样本来源。目前已有外周血 CTC 基因表达谱的研究<sup>[19]</sup>。Lohr 等<sup>[20]</sup>通过外显子测序法对 1 例前列腺癌患者原发灶的 9 个不同穿刺点、外周血 CTC 及转移性淋巴结同时进行基因分析,发现 CTC 中检测的 73 种突变类型有 51 种出现在配对组织中,肿瘤组织中的突变类型有 73% 在 CTC 中检出。Ni 等<sup>[21]</sup>报道来自同一个患者的不同 CTC 都展现出高度一致的全基因组拷贝数变化模式,并且与该患者转移部位肿瘤组织的拷贝数变化模式一致;在不同的肺癌患者中,CTC 展现的全基因组拷贝数变化模式也具有高度的相似性。该发现对基于 CTC 拷贝数变异进行肿瘤患者分型提供了理论基础。Yu 等<sup>[22]</sup>通过体外培养 CTC,建立了鉴别新型突变及评估药物敏感性的体系,监测患者疾病的进展,并筛选到有效治疗新突变型的药物。

CTC 分子分型的定义和标准不统一,CTC 和组织学 HER-2 状态不一致率波动较大。吴一龙等<sup>[23]</sup>提出大于 30% 的 CTC 强表达 HER-2,定义为 CTC 阳性标准,发现只有 HER-2 在组织学和 CTC 上都是阳性的患者才能够真正从靶向治疗中获益。欧洲肿瘤治疗研究组织(European Organization for Research on Treatment of Cancer, EORTC)正在进行一项基于 CTC 的 II 期临床试验,通过给予肿瘤组织 HER-2 阴性而 CTC 为 HER-2 阳性的乳腺癌患者曲妥珠单抗克隆抗体,对照组不给予靶向药物,来评估 CTC 特有的分子改变可否作为肿瘤治疗靶点(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01548677)。除了 HER-2 以外,乳腺癌患者实体肿瘤与 CTC 的 ER 状态不一致率为 29%~79%<sup>[24]</sup>。而 CTC 上这两个分子的不同状态对乳腺癌患者,特别是手术后靶向治疗具有更重要的指导意义。

### 3.3 CTC 的功能研究

CTC 为研究肿瘤的克隆进化以及肿瘤原发灶、转移灶之间的关系推开了一扇窗<sup>[25]</sup>。虽然目前大多数的临床研究都以强生 CellSearch 系统检

测到 5 个 CTC 作为区别预后的阈值<sup>[26]</sup>,但基础研究表明并不是所有 CTC 都像 CSC 一样可以发生转移,一些特殊分子标志阳性的 CTC 也有转移的能力<sup>[27]</sup>。Baccelli 等<sup>[27]</sup>发现 EpCAM<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD47<sup>+</sup> MET<sup>+</sup> 的 CTC 与患者的高转移及低生存率相关。Zhang 等<sup>[28]</sup>研究发现乳腺癌中 EPCAM<sup>+</sup>/HER-2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup>/HPSE<sup>+</sup>/Notch1<sup>+</sup> 的 CTC 才能够进行脑转移。

2013 年, Dawson 等<sup>[29]</sup>认为循环肿瘤 DNA 具有检测灵敏度高,动态范围大,能够对治疗效果和病程发展较早做出反应,预后生存率、复发风险预测的相关性更强等优点。循环肿瘤 DNA 可以提供基因的扩增、缺失、转位、点突变和染色体异常等方面的信息,但与之相比,CTC 在此基础上还可以提供 RNA 表达、蛋白表达、蛋白磷酸化、融合基因和体内、外培养以及活细胞功能分析等更多、更重要的研究信息。Yu 等<sup>[30]</sup>监测了 11 例乳腺癌患者 CTC 上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的动态变化,明确其与治疗反应和疾病进展密切相关。

最新一项研究发现,肿瘤患者血液中存在 CTC 团与患者不良预后相关<sup>[31]</sup>。该研究小组利用微流体装置——CTC 芯片(CTC-chip)来捕获来自血液样本的 CTC,尽管量少,但其中 CTC 团与单个 CTC 相比,有 23~50 倍的转移潜能。对来自乳腺癌患者的单个及成团的 CTC 进行 RNA 测序,鉴别出几个在 CTC 团中表达水平升高的基因,其中一个基因编码 Plakoglobin 蛋白,它的主要功能与细胞间黏附相关,研究者发现抑制其表达可导致 CTC 团解体,降低转移潜能。在动物模型中抑制 Plakoglobin 可以减少 CTC 团的形成和抑制肺转移。在乳腺癌患者中,CTC 团和 Plakoglobin 蛋白水平升高都提示预后不良<sup>[31]</sup>。

## 4 存在的问题

### 4.1 早期诊断与监测

一些非常早期的肿瘤,因为肿瘤细胞少、临床上较难检测,而容易引起误诊,影响患者预后。乳腺癌中的低级别导管原位癌,只有 5%~10% 的患者最终发展到恶性侵袭阶段。如果能用单细胞技术找到 CSC 或者找到特异的基因特征,以明确其恶性程度,可以避免过度诊疗<sup>[32]</sup>。Allred 等<sup>[33]</sup>支持上述观点,认为在早期的乳腺癌患者中存在一



些分子特征,但早期患者的精确诊疗仍有很长的路要走。

基于 CTC 是脱落到外周血液的肿瘤细胞, Klein 等<sup>[34]</sup>用 PCR 基因组扩增对单个肿瘤细胞分析,发现在乳腺癌发生的早期阶段患者循环系统中就存在 CTC。2014 年 CSCO 会议上复旦大学中山医院的一项研究证实 CTC 存在空间异质性,因为 CTC 循环路径是由原发灶的血流动力学决定的,同时 CTC 的直径 3~4 倍于毛细血管,所以 CTC 易阻滞在毛细血管中。该研究发现不同的取血部位循环微血栓的大小、数量和 EMT 状态都有不同<sup>[35]</sup>。作者认为 CTC 释放入血后,在血液循环中动态发生了 EMT 事件。

目前国际上有关 CTC 的注册临床试验已达几百例,已发表的结果多数强调使用 CTC 作为连续性监测指标而非单一临界点的重要性,并认为只要 CTC 数量稳定或者减少且没有疾病恶化征兆,就应维持原方案。

关于 CTC 目前还有许多问题不清楚,CTC 的直径比毛细血管大,肿瘤细胞脱落进入静脉系统,通过心脏后,大部分 CTC 可能阻滞毛细血管。而目前检测到的 CTC 很可能是体积较小的、变形能力较强的。那前面提到的 CTC 细胞团是在进入血液循环后形成的吗? CTC 是原发灶还是转移灶在早期还是中晚期脱落的?脱落后有多少细胞又定植在原发灶上?其生物学特性与原发灶不同?它是不是导致肿瘤进展和转移的“罪魁祸首”?

CTC 和微小血栓、休眠的肿瘤细胞等,都存在时空异质性、无法研究群体全貌等缺点,就这点而言,笔者认为循环肿瘤 DNA 应该更有优势。现在用单细胞技术和动态研究等方法,其研究已取得了一定的进步,期待今后有突破性的研究进展。

#### 4.2 个体化治疗

越来越多的研究表明个体化治疗的基础是分清肿瘤的异质性。基因组改变是乳腺癌的特征,如能根据患者的不同基因组异常而制定出个体化的靶向治疗方案,或许能改善患者的治疗获益。André 等<sup>[36]</sup>报道了一项多中心研究,发现在转移性乳腺癌患者中,根据不同基因组改变进行个体化治疗是可行的,包括罕见的基因组改变的患者。Landau 等<sup>[37]</sup>认为,目前需要在基因组范围内检测瘤内异质性和基因不稳定性,并且已有研究报道了瘤内异质性确实可以预测治疗抵抗。在初诊时

通过测序的方法可以明确患者体内是否有靶向治疗抵抗的克隆,也可通过二代测序的方法,用拷贝数变异指导肿瘤个体化分型、诊断、治疗。

Gerlinger 等<sup>[1]</sup>研究发现多基因的重构,即在同一个肿瘤中包含了不同基因背景的细胞,而这样的异质性在病理检查中检测不到,这也可能是某些治疗失败的原因。而这种治疗抵抗可认为是原发的,因为肿瘤内异质性的原因,这些突变在治疗前就已存在。当然除了原发抵抗,还有治疗过程中获得性的抵抗,也要考虑肿瘤自身的损伤修复以及肿瘤微环境在肿瘤诊断治疗中的动态变化。可以把肿瘤理解为一个完整的器官,这个器官中有多种细胞,这些细胞的异质性都会影响疗效,特别是免疫细胞和肿瘤之间的“对话”在治疗抵抗中起到重要作用<sup>[38]</sup>。如果把肿瘤看作一种慢性病,治疗肿瘤不再是你死我活的战斗,也许改善微环境、提高机体防御能力比杀伤更有用,分化诱导是更好的策略,带“瘤”生存是更智慧的选择。

#### 4.3 靶向治疗

乳腺癌的多驱动基因和异质性使得靶向治疗并非是手术之外的不二之选。乳腺癌还是需要多种方法综合治疗,因为靶向攻击只在短期内有效,肿瘤本身在不断进化,消灭掉可治疗的癌细胞,筛选出不易治疗的癌细胞。因此,在靶向治疗时,必须同时确定肿瘤所有可能的变异类型并对其进行治疗,只针对一种类型治疗,或者是对大部分患者用相似的方案治疗往往是徒劳的,应针对性的为患者调制一个混合配方。靶向治疗的另一个问题是如何“修补”,例如靶向 HER-2 都是针对扩增基因的治疗,但其最大的障碍是针对驱动基因的“功能缺失性变异”,使靶向治疗不仅仅是抑制,也可以修补。

Johnson 等<sup>[39]</sup>发现在 BRAF 突变的黑色素瘤中应用 Trametinib 靶向药物,后期出现耐药的原因是细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路的激活,并将这种现象称为“适应性激酶重编程”。这个概念可以理解在细胞或组织中激酶之间形成交互、动态的网络,可以随环境变化而进行适应性调节。当肿瘤中驱动型的激酶突变被抑制后,原先不占主导地位的野生型激酶会代偿性激活,从而产生获得性耐药。与之相对应,原发性耐药多是由激酶下游

分子突变、其余激酶活化、癌基因沉默引起的。了解上述机制对克服特定靶向药物耐药有重要意义。最近还有肝癌患者停用索拉非尼后通过代谢通路促进转移的研究报道,特别当肿瘤进展到后期,基因变异越多,免疫细胞能够检测到的外来蛋白也越多,如能激活自身的免疫系统,就会显现更好的治疗优势<sup>[40-41]</sup>。目前来看,免疫疗法有效率,有效时间长;基因靶向治疗效率高,但有效时间短,二者结合,将会大幅提升治疗效果<sup>[42]</sup>。

在分子靶向治疗日新月异的今天,仍然需要更有效的化疗。化疗在杀死大部分肿瘤细胞的同时能有效减少肿瘤细胞携带突变基因的数量,从而降低残存细胞的遗传多样性,使化疗后机体内残存的肿瘤细胞突变的数量降至最低。要在敏感标志物的指导下,正确判断“敏感”与“不敏感”人群,正确应用靶向药物,才能提高疗效,降低不良反应。针对突变的靶向治疗,要想有效,还需要将“靶”精确到它下游的信号通路。

## 5 结语

单细胞是人体最基本的结构单元,单细胞技术的进步推动了单细胞功能基因组学的研究,而肿瘤基因组的动态变化及高度异质性的特征,很可能使其成为潜在治疗靶点。当肿瘤组织难以获得时,可以通过 CTC 数量、EMT 表型、分子标志以及循环肿瘤 DNA 动态变化来分析肿瘤异质性,监测肿瘤进展、疗效、预后等。特别是随着单细胞技术的进步,如微流控单细胞分析技术、纳米技术等,通过分析 CTC 的物理特征进行甄别,避免了通过抗体识别,从而降低成本,使得动态监测从科研向临床常规检测推广,实现个体化治疗从初级到高级、被动到主动的跨越。

单细胞技术迅速进步,但它还没有取得质的飞跃,仍然处于不成熟的阶段,在技术上和成本上还远没有达到大规模应用的地步。但是,以单细胞测序为代表的单细胞技术的应用前景依然乐观。单细胞研究方法为遗传异质性肿瘤的高精度全面评估提供了一个非常优秀的研究工具和观测视野。笔者相信乳腺癌新的诊断和治疗策略将会因为单细胞技术的发展而改变和优化,乳腺肿瘤学有望成为精准医学发展的标杆。

【关键词】 肿瘤; 乳腺肿瘤; 单细胞分析; 异质性

【中图法分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

## 参 考 文 献

- [1] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-892.
- [2] Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 277-302.
- [3] 杨壹玲, 范宇, 郎荣刚, 等. 乳腺癌 HER2 基因遗传异质性与其临床病理特征的相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27(5): 540-545.
- [4] Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(10): 4009-4014.
- [5] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(2): 241-256.
- [6] Xia L, Wang L, Chung AS, et al. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 30716-30723.
- [7] Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer[J]. *Science*, 2013, 339(6119): 543-548.
- [8] Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, et al. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution[J]. *Cell*, 2009, 138(5): 822-829.
- [9] 杨壹玲, 褚嘉祐, 王明荣. 肿瘤遗传异质性[J]. *遗传*, 2013, 35(1): 1-9.
- [10] Weigelt B, Reis-Filho JS. Back to the basis: breast cancer heterogeneity from an etiological perspective[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014 Aug 12, 106(8).
- [11] Martins FC, De S, Almendro V, et al. Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(6): 503-511.
- [12] Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention[J]. *Science*, 2014, 343(6178): 1466-1470.
- [13] Yang MJ, Chiu HH, Wang HM, et al. Enhancing detection of circulating tumor cells with activating KRAS oncogene in patients with colorectal cancer by weighted chemiluminescent membrane array method[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(2): 624-633.
- [14] Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer[J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 897-903.

- [15] Battich N, Stoeger T, Pelkmans L. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1127-1133.
- [16] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-94.
- [17] 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.
- [18] Zhang J, Fujimoto J, Wedge DC, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing [J]. *Science*, 2014, 346 ( 6206 ): 256-259.
- [19] Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 4993-4997.
- [20] Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(5): 479-484.
- [21] 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.
- [22] Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility[J]. *Science*, 2014, 345(6193): 216-220.
- [23] 吴一龙, 秦叔逵, 马军. 中国临床肿瘤学进展 2014 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 193.
- [24] Onstenk W, Gratama JW, Foekens JA, et al. Towards a personalized breast cancer treatment approach guided by circulating tumor cell (CTC) characteristics[J]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(7): 691-700.
- [25] Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 573-581.
- [26] Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5701-5710.
- [27] 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[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(6): 539-544.
- [28] Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(180): 180ra148.
- [29] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13): 1199-1209.
- [30] Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition[J]. *Science*, 2013, 339(6119): 580-584.
- [31] Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis [J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1110-1122.
- [32] Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, et al. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(9): 627-637.
- [33] Allred DC, Wu Y, Mao S, et al. Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 370-378.
- [34] Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(8): 4494-4499.
- [35] Sun YF. Circulating tumor cells en route: their distinct molecular characteristics and clinical significance at different vascular sites in patients with localized hepatocellular carcinoma [EB/OL]. [2014-09-20]. <http://reg.csc.org.cn/reg2014/hm/201409201p.pdf>.
- [36] André F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER) [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(3): 267-274.
- [37] Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cell*, 2013, 152(4): 714-726.
- [38] Junttila MR, De Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 346-354.
- [39] Johnson GL, Stuhlmiller TJ, Angus SP, et al. Molecular pathways: adaptive kinome reprogramming in response to targeted inhibition of the BRAF-MEK-ERK pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10): 2516-2522.
- [40] Sounni NE, Cimino J, Blacher S, et al. Blocking lipid synthesis overcomes tumor regrowth and metastasis after antiangiogenic therapy withdrawal[J]. *Cell Metab*, 2014, 20(2): 280-294.
- [41] Zhang W, Sun HC, Wang WQ, et al. Sorafenib down-regulates expression of HTATIP2 to promote invasiveness and metastasis of orthotopic hepatocellular carcinoma tumors in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(6): 1641-1649.
- [42] Gravitz L. Therapy: This time it's personal [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): S52-54.

(收稿日期:2014-10-23)

(本文编辑:刘军兰)

盛媛,李恒宇. 从单细胞水平看肿瘤异质性[J/CD]. 中华乳腺病杂志;电子版,2014,8(6):384-390.