

肿瘤微环境和肿瘤标志物研究中数字空间多组学技术应用的研究进展

杜毅超, 楼美清

(上海交通大学医学院附属第一人民医院, 上海 200080)

摘要: 肿瘤的发生及进展依赖于肿瘤细胞与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)之间复杂的相互作用, 而 TME 中显著差异表达的蛋白质、细胞因子等物质可能成为预测肿瘤进展的标志物。探索 TME 并寻找肿瘤标志物已成为目前肿瘤免疫治疗领域的研究热点之一。数字空间多组学(Digital Spatial Profiler, DSP)作为一项新型的、基于光学与探针的空间组学技术, 在 TME 和肿瘤标志物等的研究中表现出显著优势。全文论述 DSP 技术在多种肿瘤研究中的应用, 总结其在分析 TME 和肿瘤标志物中的作用。

关键词: 肿瘤微环境; 肿瘤标志物; 数字空间多组学

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2023)05-0430-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2023.05.B014

Application of Digital Spatial Profiler in Studies of Tumor Microenvironment and Tumor Markers

DU Yi-chao, LOU Mei-qing

(Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China)

Abstract: The tumorigenesis and progression depend on the complex interaction between tumor cells and tumor microenvironment (TME). The differentially expressed proteins, cytokines and other substances in TME may be used as tumor markers to predict the progression of tumors. The exploration of tumor markers in TME has become one of the hot spots in the field of tumor immunotherapy. Digital Spatial Profiler (DSP), as a novel spatial omics based on optical and probe, has shown significant advantages in studies of TME and tumor markers. This article reviews the application of DSP in a variety of tumors and summarizes its powerful role in the analysis of TME and tumor markers.

Subject words: tumor microenvironment; tumor markers; Digital Spatial Profiler

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 是一个动态环境, 包括肿瘤细胞、细胞外基质和间质组织等多种复杂成分, 它们之间相互作用和影响, 促进了肿瘤的进展和转移^[1]。在肿瘤免疫治疗研究中, 研究人员不断探寻预测肿瘤进展的标志物, 通过深入研究 TME, 发现 TME 中显著差异表达的蛋白质、细胞因子等物质, 可能成为预测肿瘤进展的标志物^[2]。数字空间多组学(Digital Spatial Profiler, DSP)技术是一项全新的空间多靶标分析技术, 它把细胞的转录组学和蛋白质组学信息重新定位于组织原位, 将表达谱的多重定量信息与组织原位信息进行整合, 克

服了传统分析方法的不足, 在分析 TME 和肿瘤标志物等的研究领域突显出强大的优势^[3]。

1 DSP

DSP 是专项针对肿瘤免疫和 TME 而开发设计的空间多靶标技术, 具有多项特点, 如: 靶标多、组学多、通量高、精度高等。其融合了免疫组织化学、基因转录组学和荧光造影等传统技术, 在综合分析百余种蛋白质和千余种 mRNA 原位表达谱的基础上, 绘出了清晰并全面的生物学图像, 可以同时得到形态学信息和多重靶标表达数据, 这是传统平台无法实现的^[3-4]。

通信作者: 楼美清, E-mail: Loumq68128@sina.com

收稿日期: 2023-02-09

2 DSP 在 TME 和肿瘤标志物研究中的应用

TME 是由肿瘤细胞及其周围的非肿瘤成分所组成的动态结构,包含免疫细胞、间质细胞、神经、血管等多种非肿瘤组织。TME 中这些成分彼此作用,在肿瘤进展过程中发挥以下作用:①为肿瘤细胞的生长、侵袭和转移提供了较好的环境;②抑制免疫反应,帮助肿瘤细胞逃避免疫监视;③增强肿瘤细胞对抗肿瘤药物的抵抗性^[1]。因此,干预 TME 成为肿瘤免疫治疗的一种有效策略。分析 TME 中与免疫相关的物质,包括免疫抑制性分子及免疫效应分子等,对肿瘤的临床分期及预后具有重要的意义^[5],并希望从中筛选出可预测患者生存期和免疫治疗有效性等方面的肿瘤标志物。随着生物信息学技术的飞速发展,越来越多的研究者将目光投入到 TME 与肿瘤标志物的研究中,DSP 的出现再次将该领域的研究推向高潮。

2.1 DSP 在 TME 研究中的应用

TME 成分复杂,加上各种成分之间相互作用,增加了 TME 的研究难度,目前研究者们主要通过免疫组织化学技术、荧光原位杂交技术结合单细胞测序技术来分析研究 TME。但对于不同个体,更为个性化的 TME 的分子生物学特征,以及 TME 复杂的生物分子网络还有待进一步研究。DSP 技术可以整合多重靶标信息与组织形态学信息,提高分析基因表达谱信息的精度,为 TME 的深入研究提供技术支持。

黑色素瘤 TME 中的三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS)已被证实与免疫细胞的浸润及功能有关,但具体表型不清楚^[6]。Cabrita 等^[7]利用 DSP 等多项技术对 177 例黑色素瘤样本的免疫微环境进行研究,揭示了 CD8⁺T 细胞和 CD20⁺B 细胞共同组成了黑色素瘤的 TLS,表明 TLS 在黑色素瘤的免疫微环境中发挥关键作用,通过诱导 TLS 的形成有望改善肿瘤的免疫治疗反应。

由于复杂的 TME,人们对胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)的致病机制还不明了^[8]。对此有研究者^[9]提出,借鉴黑色素瘤的免疫研究经验,利用 DSP 技术比较分析了复发 GBM 和高危黑色素瘤样本,两类样本都接受了免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade, ICB)治疗。研究发现复发 GBM

与黑色素瘤的 TME 存在一些共性的同时,也存在着显著差异。在黑色素瘤的 TME 中存在广泛的免疫细胞富集区,相反,复发 GBM 则更多的是免疫缺乏区,并在免疫细胞缺乏区发现高表达的 Ki-67($P=0.03$),表明复发 GBM 存在某些免疫抑制反应,可抑制 CD8⁺T 细胞在内的多种免疫细胞的浸润。进一步分析显示 VISTA、AKT、Bcl-2、IDO-1 和 B7-H3 的表达水平均与 Ki-67 呈正相关(r 均 >0.1),其中相关性最强的是 IDO-1 和 B7-H3。其他研究者也证实了 IDO-1 和 B7-H3 在 GBM 中具有抑制免疫反应的作用^[10-11]。复发 GBM 存在一些与黑色素瘤相同的靶点,这提示我们针对这些靶点的 ICB 治疗可以用于复发 GBM。此外,联合靶向 B7-H3 或 IDO-1,在复发 GBM 新辅助治疗中可能会改善治疗效果。

组织缺氧不仅可以影响正常的细胞代谢,还可以通过刺激肿瘤细胞增殖、侵袭和增加药物耐药性来促进肿瘤的发生及进展。在这个过程中,缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)起到了重要作用,已发现 HIF 参与多种肿瘤的发生及进展^[12]。但缺氧对 GBM 中免疫微环境的影响如何目前尚无定论^[13]。Pettersson 等^[14]选取 10 例 GBM 组织样本,采用 DSP 技术研究了 40 种免疫相关蛋白标志物在缺氧和常氧肿瘤区域的表达情况,结果显示在缺氧条件下 CD44 和 B7-H3 表达上调,而 VISTA 表达下调。这些表达差异导致 CD8⁺T 细胞数量减少,最终导致缺氧区域的肿瘤细胞逃避免疫监视,抑制了免疫反应。其他研究者们也证实了,敲除 CD44 后会抑制 GBM 细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡^[15];一项临床试验则证实了靶向 B7-H3 的免疫治疗可诱导 GBM 细胞的凋亡^[16]。VISTA 在 GBM 中的作用机制尚不清楚,有待后续进一步研究。有望通过下调 CD44 和 B7-H3、上调 VISTA 来抑制 GBM 的进展,改善患者的预后。

免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)应用于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者以来,临床的用药选择更多,单用 ICIs 或结合化疗均使患者的生存期显著延长。然而随之而来的 ICIs 免疫相关不良反应和对 ICIs 的耐药性也不容忽视^[17]。Moutafi 等^[18]利用 DSP 技术对 56 例 ICIs 治疗后的 NSCLC 样本进行分析,结果显示 CD66b 高表达预示着 NSCLC 对 ICIs 治疗

的抵抗性, CD66b 可作为 ICI 治疗耐药性的标志物。后续随着多机构的研究和临床试验的跟进, CD66b 有望造福大量 NSCLC 患者, 改进 ICI 的用药, 改善患者的预后。

对于晚期或者转移性肿瘤患者, 免疫治疗发挥着至关重要的作用, 与患者的预后及生存质量密切相关, 对于 TME 的深入探索则决定着免疫治疗的研究进展。DSP 技术的应用, 不仅为分析 TME 提供了一种新方法, 更加快了 TME 的研究步伐。相信在不久的将来, TME 中复杂的免疫分子网络会取得新的研究突破, 靶向 TME 的免疫治疗也将达到一个全新的高度。

2.2 DSP 在肿瘤标志物研究中的应用

肿瘤标志物是恶性肿瘤在发生及进展、侵袭和转移等过程中, 由肿瘤细胞产生或宿主受肿瘤刺激的影响而异常产生的一类物质, 其可反映肿瘤细胞的多种特征, 如: 肿瘤的存在及恶性程度、肿瘤进展进程, 并可作为肿瘤的前期筛查、病程监测、评估机体对抗瘤治疗有效性的参考^[19]。肿瘤标志物具有检测便捷、患者创伤小、快速且价格低廉等优点, 因而在临床工作中被广泛使用。然而绝大多数肿瘤标志物的特异度和灵敏度均不高, 无法作为强有力的临床诊断依据, 影像学检查、病理活检依然必不可少^[20]。为了提高肿瘤标志物的诊断和判断预后的价值, 研究者利用 DSP 技术筛查出不同肿瘤潜在的肿瘤标志物。

目前临床上最常用的胰腺癌肿瘤标志物是 CA-199, 但胰腺炎等胰腺良性疾病患者 CA-199 水平也会增高, 为提高诊断的灵敏度和特异度, 可联合 CA-199、CEA 和 CA125 等标志物共同筛查胰腺癌^[21]。为了寻找灵敏度和特异度更高的胰腺癌肿瘤标志物, Li 等^[22]利用 DSP 技术对胰腺癌肿瘤及癌旁区域共 1 833 个 RNA 靶点进行基因差异表达分析, 发现 *LAMB3*、*FN1*、*KRT17*、*KRT19* 和 *ANXA1* 在肿瘤区域表达显著上调。通过 Kaplan-Meier 生存分析得到 *LAMB3*、*FN1*、*KRT19* 和 *ANXA1* 可作为预测胰腺癌患者无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 的肿瘤标志物; *LAMB3*、*KRT19* 和 *ANXA1* 可作为预测总生存期 (overall survival, OS) 的肿瘤标志物。最后通过 TIDE (tumor immune dysfunction and exclusion) 数据库评分, 得到 *FN1* 和 *ANXA1* 可作为预测胰腺癌免疫治疗有效性的标志物。其他研究者也证实了

FN1 和 *ANXA1* 在胰腺恶性肿瘤的增殖分化、转移等过程中发挥着重要作用^[23-24]。胰腺癌患者接受免疫治疗后, 为了判断治疗的效果, 临床医生会联合检测 CA-199、CEA 和 CA125 等标志物, 并结合影像学检查来综合判断。联合 *FN1* 和 *ANXA1* 等新兴的肿瘤标志物进行检测, 可能会提高诊断胰腺癌的准确性。

不同于胰腺癌, 胃癌缺乏有效的肿瘤标志物, 临床诊断主要依靠胃镜和 CT 等技术手段^[25]。Grosser 等^[26]通过 DSP 技术研究两组共 480 例胃和胃食管交界处的腺癌, 发现与甘油三酯分解代谢和内源性甾醇相关的通路, 在存在基质活跃侵袭前区 (Stroma AReactive Invasion Front Areas, SARIFA) 的病例中显著上调, 并发现 *COL15A1*、*FABP2* 和 *FABP4* 在存在 SARIFA 的患者中显著差异性表达。*FABP2* 和 *FABP4* 是脂质转运的重要蛋白质, 在脂质代谢中发挥着关键作用, 提示脂肪酸的氧化可为肿瘤的发生发展提供能量^[27]。*COL15A1* 在胃癌中的作用尚不清楚, 需要进一步研究其在胃癌发生及进展中的作用。*SARIFA* 可作为预测胃癌的肿瘤标志物, 但其对早期胃癌的预测效果不佳, 探索早期筛查胃癌的肿瘤标志物是未来研究的一个重要方向。

集便捷、无创、快速等优点于一身的肿瘤标志物, 具有重要的研究价值, 是研究者们关注的重点。利用 DSP 技术, 人们已经在乳腺癌、NSCLC、胰腺癌、黑色素瘤、GBM、肾癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中发现了潜在的肿瘤标志物, 但这些标志物仍需大规模的前瞻性临床研究来进一步验证。虽然将新发现的肿瘤标志物与传统的标志物相结合, 能否有效提升肿瘤标志物灵敏度和特异度还有待进一步研究, 但已明确 DSP 技术在探索肿瘤标志物的道路上有一定价值。

3 总结与展望

在肿瘤免疫治疗领域, 描述分析 TME 可以了解细胞间相互作用、评估预后和预测肿瘤标志物。但在大多数实体肿瘤中, 由于复杂的 TME 和肿瘤异质性之间相互影响和作用, 通过传统的方法难于从实体组织中准确得到基因表达谱信息, 很可能掩盖了某些有重要诊断或预后价值的肿瘤标志物信息。DSP 的开发利用提供了这方面研究有力的技术支持, 通过整合表达谱的多重靶标信息和组织形态学信息,

并弹性选择多处感兴趣区域,原位表达谱分析达到百余种蛋白质及千余种 RNA,从而提高分析基因表达谱信息的精度。在短短的 3 年时间内,DSP 已被有效应用于多种肿瘤的研究中,为肿瘤免疫学研究打开一扇新的大门。尽管 DSP 还处于发展阶段,存在某些局限性,如不能分析单细胞水平上共表达标志物或空间信息,但随着越来越多研究人员的参与及技术层面的不断完善,DSP 在分析 TME 和肿瘤标志物中的作用将进一步推动肿瘤免疫治疗快速发展。

参考文献:

- [1] Arneth B. Tumor Microenvironment [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 56(1):15.
- [2] Zhang W, Wang H, Sun M, et al. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(2-3):69-80.
- [3] Hernandez S, Lazcano R, Serrano A, et al. Challenges and opportunities for immunoprofiling using a spatial high-plex technology: the nanoString GeoMx Digital Spatial Profiler [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:890410.
- [4] Wang N, Li X, Wang R, et al. Spatial transcriptomics and proteomics technologies for deconvoluting the tumor microenvironment[J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(9):e2100041.
- [5] Lan Y, Moustafa M, Knoll M, et al. Simultaneous targeting of TGF- β /PD-L1 synergizes with radiotherapy by reprogramming the tumor microenvironment to overcome immune evasion[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(10):1388-1403.
- [6] Engelhard VH, Rodriguez AB, Mauldin IS, et al. Immune cell infiltration and tertiary lymphoid structures as determinants of antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2018, 200(2):432-442.
- [7] Cabrita R, Lauss M, Sanna A, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma[J]. *Nature*, 2020, 577(7791):561-565.
- [8] Mckinnon C, Nandhabalan M, Murray SA, et al. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management[J]. *BMJ*, 2021, 374:n1560.
- [9] Lu Y, Ng AHC, Chow FE, et al. Resolution of tissue signatures of therapy response in patients with recurrent GBM treated with neoadjuvant anti-PD1[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):4031.
- [10] Zhai L, Ladomersky E, Lenzen A, et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(5):447-457.
- [11] Nehama D, Di Ianni N, Musio S, et al. B7-H3-redirec-ted chimeric antigen receptor T cells target glioblastoma and neurospheres[J]. *EBioMedicine*, 2019, 47:33-43.
- [12] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11):5703.
- [13] Colwell N, Larion M, Giles AJ, et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(7):887-896.
- [14] Petterson SA, Sørensen MD, Burton M, et al. Differential expression of checkpoint markers in the normoxic and hypoxic microenvironment of glioblastomas [J]. *Brain Pathol*, 2023, 33(1):e13111.
- [15] Kolliopoulos C, Ali MM, Castillejo-Lopez C, et al. CD44 depletion in glioblastoma cells suppresses growth and stemness and induces senescence [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(15):3747.
- [16] Tang X, Wang Y, Huang J, et al. Administration of B7-H3 targeted chimeric antigen receptor-T cells induce regression of glioblastoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):125.
- [17] Brueckl WM, Ficker JH, Zeidler G. Clinically relevant prognostic and predictive markers for immune-checkpoint-inhibitor (ICI) therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):1185.
- [18] Moutafi M, Martinez-Morilla S, Divakar P, et al. Discovery of biomarkers of resistance to immune checkpoint blockade in nsclc using high-plex digital spatial profiling [J]. *J Thorac Oncol*, 2022, 17(8):991-1001.
- [19] Raza A, Khan AQ, Inchakalody VP, et al. Dynamic liquid biopsy components as predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1):99.
- [20] Jiang T, Mei L, Yang X, et al. Biomarkers of gastric cancer: current advancement[J]. *Heliyon*, 2022, 8(10):e10899.
- [21] Al-Shaheri FN, Alhamdani MSS, Bauer AS, et al. Blood biomarkers for differential diagnosis and early detection of pancreatic cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 96:102193.
- [22] Li W, Li T, Sun C, et al. Identification and prognostic analysis of biomarkers to predict the progression of pancreatic cancer patients[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1):43.
- [23] Lei X, Chen G, Li J, et al. Comprehensive analysis of abnormal expression, prognostic value and oncogenic role of the hub gene FN1 in pancreatic ductal adenocarcinoma via bioinformatic analysis and in vitro experiments [J]. *PeerJ*, 2021, 9:e12141.
- [24] Novizio N, Belvedere R, Pessolano E, et al. ANXA1 contained in EVs regulates macrophage polarization in tumor microenvironment and promotes pancreatic cancer progression and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20):11018.
- [25] Jelski W, Mroczko B. Molecular and circulating biomarkers of gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14):7588.
- [26] Grosser B, Glückstein MI, Dhillon C, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA) - a new prognostic biomarker in gastric cancer related to tumor-promoting adipocytes[J]. *J Pathol*, 2022, 256(1):71-82.
- [27] Huang X, Zhou Y, Sun Y, et al. Intestinal fatty acid binding protein: a rising therapeutic target in lipid metabolism [J]. *Prog Lipid Res*, 2022, 87:101178.