

• 临床研究 •

EGFR 敏感突变肺腺癌获得性耐药特征的
单细胞转录组分析

陈宇, 邵卓伟, 陈伟庄, 焦文睿, 吴仕波

【摘要】目的 应用单细胞转录组探索表皮生长因子受体 (EGFR) 敏感突变的肺腺癌靶向治疗获得性耐药后的分子特征及其肿瘤微环境。**方法** 6 例 EGFR 敏感突变的晚期肺腺癌患者纳入了本研究, 包括 3 例初治患者 (初治组) 和 3 例一线酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 治疗耐药患者 (耐药组), 分别对其肿瘤活检样本进行单细胞转录组测序, 比较两组患者肿瘤微环境组成、细胞簇功能表型及细胞相互作用等方面的差异。**结果** 整合数据后共获得 63 184 个细胞, 耐药组募集了更高比例的肿瘤相关成纤维细胞和髓系细胞。上皮细胞层面, 相关性分析显示转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白 β (CEBPB)、Fos 家族成员 B (FOSB)、FOS 和 JUNB 可能通过激活上皮-间质转化, 促进肿瘤的进展; T 细胞层面, 弱杀伤、高耗竭 KLRD1⁺CD8⁺T 细胞和高耗竭 MKI67⁺CD8⁺T 细胞占比在耐药组更高, 而强杀伤 GZMK⁺CD8⁺T 细胞在初治组占比更高; 髓系细胞层面, 本研究鉴定了一个新的脂质相关肿瘤相关巨噬细胞 (LA_TAM) 亚群, 并且其在耐药组中的占比更高; 细胞互作分析显示, 相比于初治组, 耐药组 CD8⁺T 细胞与 LA_TAM 存在更强的细胞交互。**结论** 上调的促肿瘤转录因子、CD8⁺T 细胞免疫功能受损以及具有免疫抑制特性 LA_TAM 亚群的浸润可能参与了获得性耐药, 为耐药后的治疗策略提供了潜在的研究方向。

【关键词】 EGFR; 肺腺癌; 获得性耐药; 肿瘤微环境; 单细胞转录组

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.10.010

【中图分类号】 R734.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)10-1300-05

携带表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 敏感突变的肺腺癌患者, 绝大部分都能从酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 治疗中受益^[1]。但是获得性耐药不可避免, 其耐药机制主要包括 EGFR 依赖及非依赖性信号通路^[2-3]。近年来, 肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 与 TKIs 耐药相关性日益被重视, 微环境中调节 T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞及成纤维细胞等各种免疫细胞介导的免疫反应可能参与 TKIs 的耐药机制^[4]。当前, 已有部分研究通过细胞模型及临床样本, 在单细胞层面展示 TKI 耐药的潜在机制, 并为克服耐药提供可能的方案^[5]。本研究通过对 EGFR 敏感突变的初治和 TKI 耐药的肿瘤活检样本行单细胞转录组测序, 比较两组间肿瘤微环境组成、细胞簇功能表型以及细胞相互作用等方面差异, 探讨肿瘤 TKI 治疗后耐药相关的分子特征和特异性 TME, 为耐药后的治疗策略提供相关参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照人口学特征相似的原则进行配对入组, 2021 年 3 月至 2023 年 11 月在宁波市医疗中心李惠利医院治疗的 6 例具有 EGFR 敏感突变的晚期肺腺癌患者纳入了本研究, 包括 3 例初治患者 (初治组) 和 3 例一线 TKIs 治疗耐药患者 (耐药组)。本研究获得宁波市医疗中心李惠利医院医学伦理委员会批准 (批件号: KY2020PJ142), 所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 单细胞测序数据 从样本中获得单细胞悬浮液, 进行 cDNA 合成以及单细胞测序分析。使用 Cell Ranger 软件对数据进行预处理。利用 Seurat 软件包建立单细胞测序数据分析对象, 去除低质量细胞。进行全局缩放归一化后, 采用同质化处理进行批次效应校正。然后进行主成分分析, 以获得细胞聚类前 30 的基因。并根据标记的特征, 进行细胞亚群的注释。

1.2.2 识别标记基因 通过 Seurat 的 Find All Markers 功能, 识别各细胞类型的差异表达标记基因。除了 $P < 0.05$ 和 $|\text{avg logFC}| > 0.25$ 的标准外, 还要求

基金项目: 宁波市科技计划项目 (202003N4273)

作者单位: 315211 宁波, 宁波大学医学部 (陈宇); 宁波市医疗中心李惠利医院 (陈宇、邵卓伟、陈伟庄、焦文睿、吴仕波)

通信作者: 吴仕波, Email: woshibo2015@yeah.net

标记基因在每个群组中超过 25% 的细胞表达。使用 cluster Profiler 进行基因本体和 Hallmark 通路富集分析。

1.2.3 细胞相互作用分析 使用 Cell Chat 推断不同细胞簇的相互作用。将配体和受体的表达特征投射到手动选定的路径网络,并评估通讯概率,随后进行子簇间通讯概率的统计测试。利用 R 包 ggplot2 绘制点图和圈图。

1.2.4 转录因子活性分析 在默认参数下,使用单细胞调控网络推断和聚类的单细胞转录因子分析计算转录因子活性。从单细胞测序数据中推断出转录因子、基因调控网络和细胞类型。

1.3 统计方法 采用 R 4.2.2 软件进行统计学分析。去除低质量细胞时,基因数 < 200 或 > 5000 的细胞及线粒体转录本比率超过 25% 的细胞被去除。利用 AddmoduleScore 对细胞的杀伤性和耗竭性进行评分。使用 R 软件包 ggplot2 绘图。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组单细胞转录组分析 汇总样本后,得到一个由 63 184 个细胞和 50 个细胞簇组成的数据集。利用标记基因的表达信息,确定 10 种不同的细胞群,各种细胞群在每个样本中相应的聚类特征被可视化。采用桑基图描述 TME 的组成特征,结果显示耐药组募集更高比例的肿瘤相关成纤维细胞和髓系细胞,而初治组中 B 细胞和浆细胞的占比更高,见图 1。

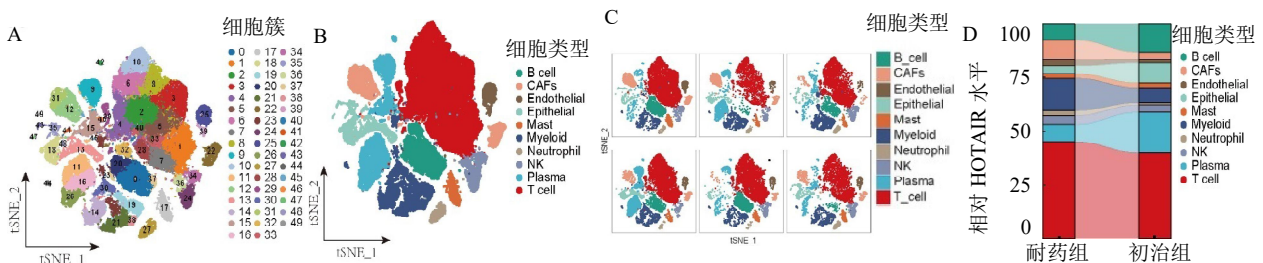
2.2 耐药组上皮细胞的潜在侵袭表型 基于 4 137 个上皮细胞,获取了一个 14 个细胞簇组成的数据集。对 DEGs 进行通路富集分析发现,耐药组富集于上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition,

EMT) 和肿瘤血管生成等关键通路。通过耐药组上调基因与上调转录因子的交集分析,发现 CEBPB、FOSB、FOS 和 JUNB 这 4 个转录因子存在重叠。并且这 4 个转录因子的表达量归一化得分在两组间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。此外,这些转录因子的得分均与 EMT 得分呈正相关 ($r=0.28$ 、 0.25 、 0.34 、 0.37 , 均 $P < 0.05$), 见图 2。

2.3 耐药组 T 细胞的抗肿瘤免疫功能受损 共获得 24 662 个 T 细胞、32 个集群可供下游分析。通过标记基因表达信息,确定 8 种细胞亚群。通过计算优势比 (OR) 来探索这些亚群的组间分布,结果显示 $CD4^+$ Naive T 细胞倾向于富集在耐药组中,除 $ANKK3^+$ $CD4^+$ T 细胞和 $CD4^+$ Naive T 细胞外,其他 6 种亚型在初诊组中的 OR 较高 (均 $P < 0.05$)。为研究 T 细胞的功能特征,对 $CD8^+$ T 细胞进行杀伤性评分和耗竭评分,结果表明,弱杀伤、高耗竭 $KLRD1^+$ $CD8^+$ T 细胞和高耗竭 $MKI67^+$ $CD8^+$ T 细胞占比在耐药组更高,而强杀伤 $GZMK^+$ $CD8^+$ T 细胞在初治组占比更高 (均 $P < 0.05$), 见图 3。

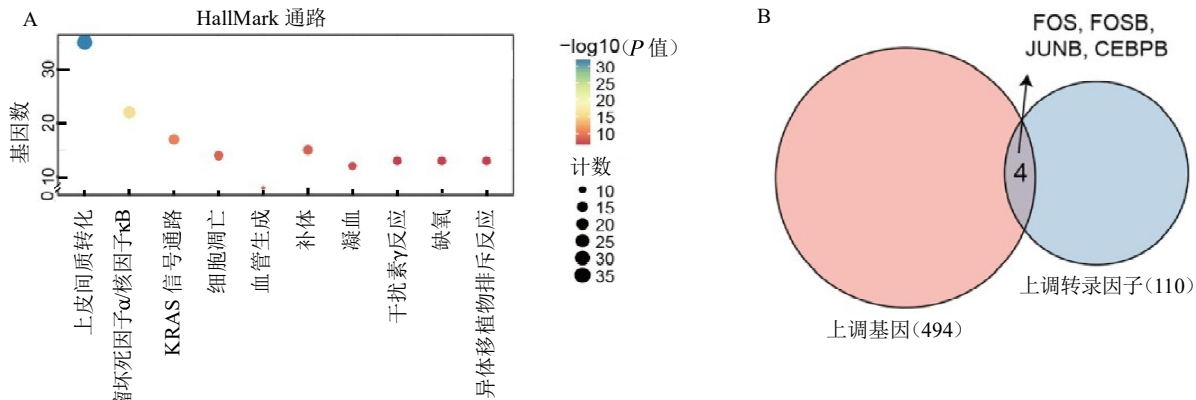
2.4 鉴定新型免疫抑制性 LA_TAM 亚群 共获得 8 005 个髓系细胞,细分成 10 个细胞簇,并通过热图展示其 DEGs 的归一化表达水平。根据标记基因表达信息,确定了 LA_TAMs 和树突状细胞等 8 个亚群。鉴于 LA_TAM 亚群的转录谱与 M2 样 TAMs 相似,并且在两组中比例均最高,推断 LA_TAM 亚群可能具有 M2 样 TAMs 细胞功能。TGFB1、CD163 和 MRC1 这 3 个通常作为肿瘤促进因子和 M2 极化标志的基因,在耐药肿瘤中显著过表达 (均 $P < 0.05$), 见图 4。

2.5 LA_TAM 与耗竭的 $CD8^+$ T 细胞的细胞相互作用分析 对新定义的 LA_TAM 亚群免疫抑制,通过



注: A ~ B 为汇总样本的单细胞的 t-分布随机邻域嵌入图 (tSNE), 按簇 (A)、亚型 (B) 着色; C 为各样本细胞类型的 tSNE 图; D 为两组各类细胞比例的桑基图。B cell 为 B 淋巴细胞; CAFs 为肿瘤相关成纤维细胞; Endothelial 为内皮细胞; Epithelial 为上皮细胞; Mast 为肥大细胞; Myeloid 为髓系细胞; Neutrophil 为中性粒细胞; NK 为自然杀伤细胞; Plasma 为浆细胞; T cell 为 T 淋巴细胞

图 1 单细胞转录组图谱



注:A为耐药组富集通路的点阵图;B为耐药组上调基因和上调转录因子的维恩图

图2 上皮细胞的不同特征

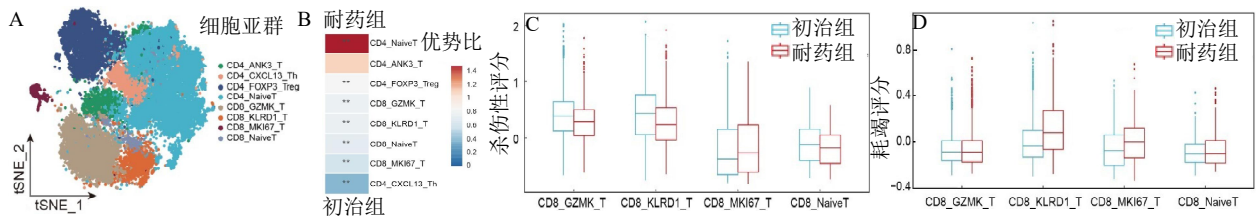
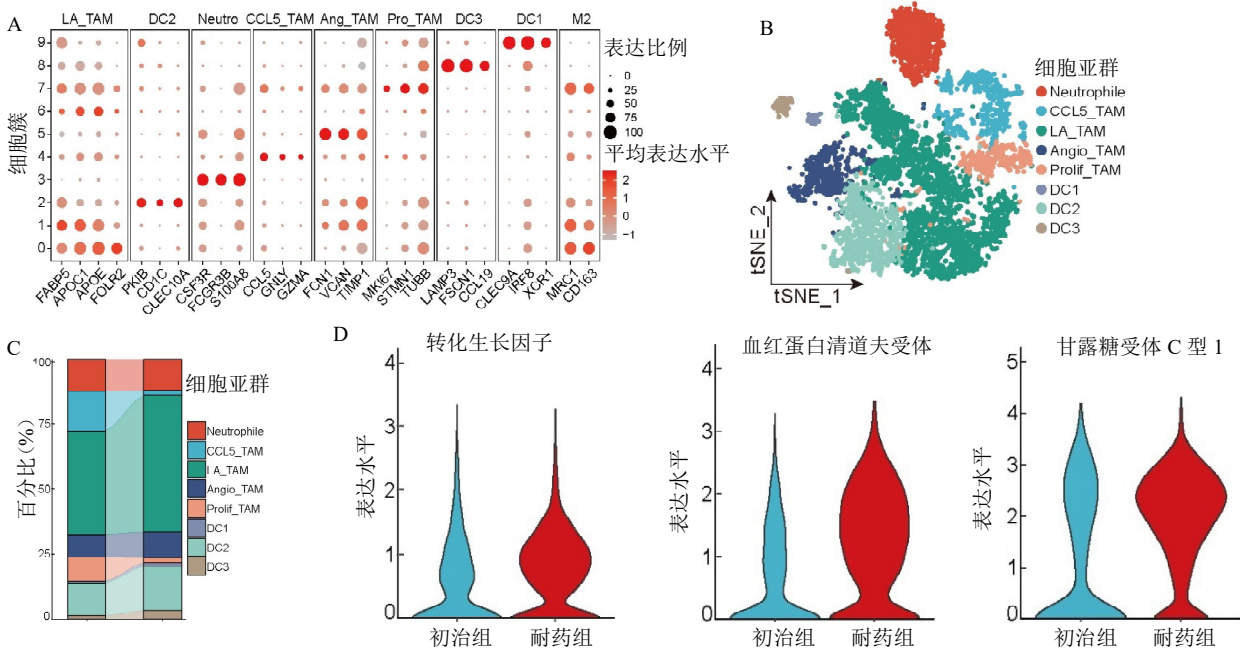
注:A为T细胞按亚型着色的tSNE图;B为T细胞各亚群优势比的热图;C为CD8⁺T亚群杀伤性评分的方框图;D为CD8⁺T亚群耗竭得分的方框图

图3 T细胞的特征差异



注:A为DEGs归一化表达水平的热图;B为髓系细胞的tSNE图,按细胞亚型着色;C为髓系细胞亚群比例的桑基图;D为转化生长因子、血红蛋白清道夫受体和甘露糖受体C型1表达水平的小提琴图。LA_TAMs为脂质相关肿瘤相关巨噬细胞;DC2为淋巴样树突状细胞;Neutro为中性粒细胞;CCL5_TAM为趋化因子配体5/肿瘤相关巨噬细胞;Ang_TAM为血管生成肿瘤相关巨噬细胞;Pro_TAM为增殖性肿瘤相关巨噬细胞;DC1为髓样树突状细胞;DC3为3型树突状细胞;M2为M2样肿瘤相关巨噬细胞。FABP5为脂肪酸结合蛋白5;APOC1为载脂蛋白C1;APOE为载脂蛋白E;FOLR2为叶酸受体2;PKIB cAMP为依赖型蛋白激酶抑制剂β;CD11c为1型树突状细胞亚型;CLEC10A为C型凝集素家族10成员A;CSF3R为粒细胞集落刺激因子3受体;FCGR3B为低亲和力Fcγ受体IIIb;S100A8为钙结合蛋白A8;CCL5为C-C趋化因子5;GNLY为颗粒溶素;GZMA为颗粒酶A;FCN1为岩藻多糖酶;VCAN为多功能蛋白聚糖;TIMP1为组织金属蛋白酶抑制因子1;MKI67为增殖标记物Ki-67;STMN1为微管解聚蛋白1;TUBB为β-微管蛋白;LAMP3为溶酶体相关膜蛋白3;FSCN1为肌成束蛋白-1;CCL19为趋化因子配体19;CLEC9A为DC-NK凝集素家族受体;IRF8为干扰素调节因子8;XCR1为C趋化因子受体1

图4 髓系细胞的不同特征

细胞互作分析进一步证明。结果表明,在耐药组中, MK167⁺CD8⁺T 细胞与 LA_TAM 之间互作更强, 而 KLRD1⁺CD8⁺T 细胞与 LA_TAM 之间互作在两组中强度相当。根据这两种 T 细胞的高耗竭评分, 结合互作关系提示 LA_TAM 诱导了耗竭性 CD8⁺T 细胞的积累。进一步研究发现, 特异性配体-受体介导的活化, 促进了从 LA-TAM 到 T 细胞亚群的信号转导, 见图 5。

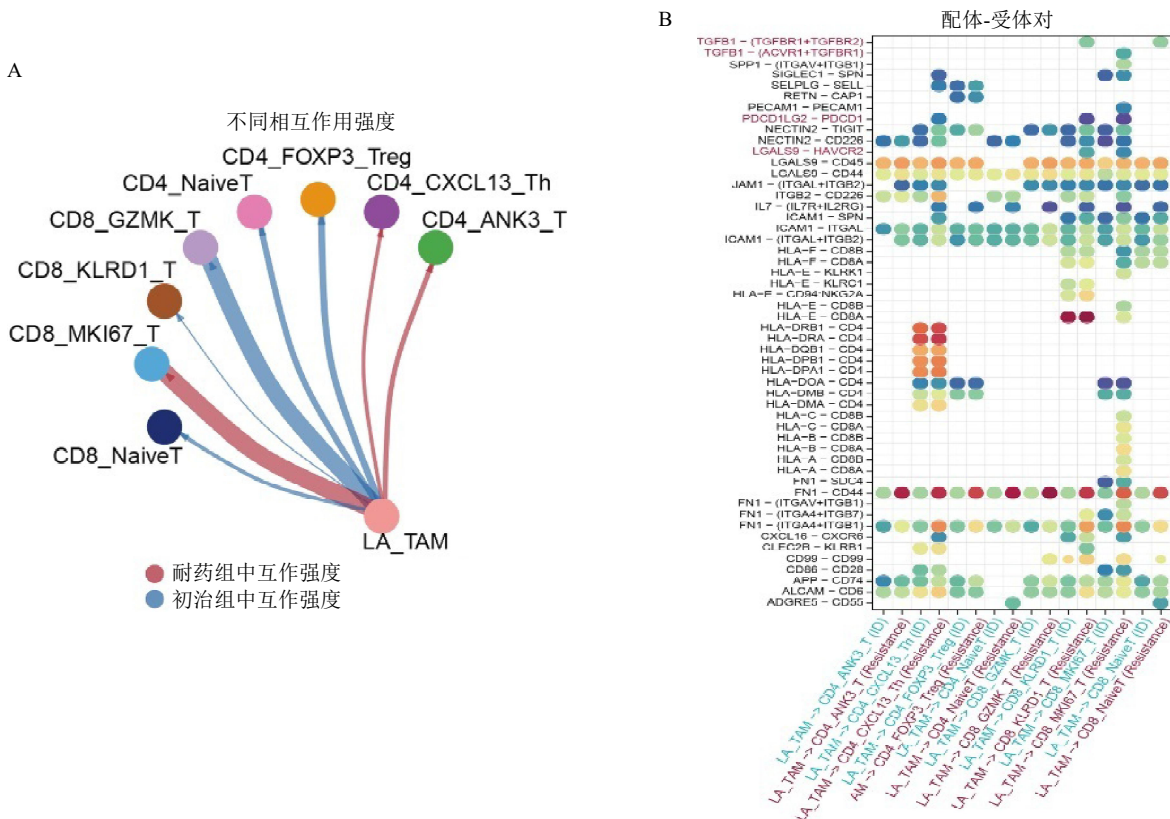
3 讨论

本研究对 EGFR 敏感突变初治和 TKI 耐药患者的肿瘤组织进行单细胞转录组比较分析, 结果展示了肿瘤异质性和 TME 的表达特征, 揭示了耐药相关的信号通路及其特定的免疫抑制特征。

研究显示, EMT 参与 EGFR-TKI 治疗诱导的耐药机制^[5]。本文基于两组间的差异表达基因, 发现耐药组存在 EMT 等通路富集。EMT 的过程通常由 NFkB2、RELB、FOSL1 和 JUNB 等调控因子组成的基因调控回路控制^[6]。部分调控因子与肺癌耐药的

相关性已有报道^[7], 包括 DUSP1 和 FOS 等一些关键蛋白可能导致肺癌 TKIs 治疗耐药出现和持续。而 CEBPB 对 NRF2 通路激活的肺癌细胞产生 NRF2 介导的耐药至关重要^[8]。在本研究中, 耐药组显著上调 FOS、FOSB、JUNB 和 CEBPB 表达, 并与 EMT 得分呈正相关, 表明这 4 种转录因子可能通过上调 EMT 参与耐药性的发生, 与既往的研究结果一致。

T 细胞耗竭通过抑制受体的过表达和效应性细胞因子的减少, 导致癌细胞免疫逃避^[9]。在 Tex 的多个发展阶段中, KLRD1 已被验证作为 Texprog3 的关键指标^[10]。同样, MKI67 与也 T 细胞耗竭密切相关, 在肝癌的 T 细胞耗竭中起着重要作用^[11]。本研究观察到 KLRD1⁺CD8⁺T 细胞和 MKI67⁺CD8⁺T 细胞更多分布于耐药组中, 其耗竭评分明显高于初治组。结合以往的研究, 推测耗竭的 KLRD1⁺CD8⁺T 细胞和 MKI67⁺CD8⁺T 细胞可能促进肿瘤进展和 TKI 耐药。GZMK 是实体肿瘤中预后良好的生物标志物, GZMK⁺细胞可能是 TME 中的重要效应细胞^[12]。初治组具有更高的优势比和细胞毒性评分 GZMK⁺



注: A 为 LA-TAM 与 T 细胞亚群互作关系, 红色表示在耐药组中互作强度高, 蓝色代表初治组互作强度高; B 为耐药组和初治组之间显著激活的配体-受体对

图 5 细胞相互作用分析

CD8⁺T 细胞,提示其在抗肿瘤免疫中的作用。

在 TKIs 治疗复发患者中, TAMs 具有激活旁路、抑制抗肿瘤免疫活动和促进 M2 样极化等作用。TAMs 向 M2 表型的极化促进肿瘤的生长^[13]。而脂质代谢与 TAMs 极化密切相关^[14]。而基于 M2 样 TAM 与 CD8⁺T 细胞细胞互作,导致 CD8⁺T 细胞转化为不可逆转的耗竭状态,并降低肿瘤患者总体生存率^[15]。本研究发现了一个新的具有 M2 样转录特征、并在耐药肿瘤中过表达免疫抑制标记基因的 LA_TAM 亚群,还与 MK167⁺CD8⁺T 细胞有着强大的细胞互作,这提示 LA_TAM 在耐药性 TME 发挥着重要作用。本研究还提示,促进 LA-TAM 到 T 细胞亚群的信号转导的特异性配体-受体涵盖 PDCD1、TIM3 等重要的免疫检查点。

综上所述,本研究初步探索了潜在的 TKI 耐药机制,上调的促肿瘤转录因子、CD8⁺T 细胞免疫功能受损以及具有免疫抑制特性 LA_TAM 亚群的浸润可能参与了靶向治疗获得性耐药,为耐药后的治疗策略提供了潜在的研究方向。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈宇、邵卓伟:实验操作、论文撰写;陈宇、焦文睿、陈伟庄:数据整理、统计学分析;吴仕波:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] WU L L, KE L P, ZHANG Z S, et al. Development of egfr tkis and options to manage resistance of third-generation egfr tki osimertinib: Conventional ways and immune checkpoint inhibitors[J]. Front Oncol, 2020, 10: 602762.
- [2] LEMMON M A, SCHLESSINGER J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases[J]. Cell, 2010, 141(7): 1117-1134.
- [3] SEQUIST L V, WALTMAN B A, DIAS-SANTAGATA D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(75): 75ra26.
- [4] YUAN S Y, XU H, XIE J P. New progress in the relationship between

- immune cells, PD-1 in tumor microenvironment and the efficacy of EGFR-TKIs[J]. Chin J Lung Cancer, 2017, 20(11): 775-780.
- [5] KASHIMA Y, SHIBAHARA D, SUZUKI A, et al. Single-cell analyses reveal diverse mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer[J]. Cancer Res, 2021, 81(18): 4835-4848.
 - [6] RAMIREZ D, KOHAR V, LU M Y. Toward modeling context-specific EMT regulatory networks using temporal single cell RNA-seq data[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7: 54.
 - [7] HOWELL M C, GREEN R, CIANNE J, et al. EGFR TKI resistance in lung cancer cells using RNA sequencing and analytical bioinformatics tools[J]. J Biomol Struct Dyn, 2023, 41(19): 9808-9827.
 - [8] OKAZAKI K, ANZAWA H, KATSUOKA F, et al. CEBPB is required for NRF2-mediated drug resistance in NRF2-activated non-small cell lung cancer cells[J]. J Biochem, 2022, 171(5): 567-578.
 - [9] HU P P, MA J H, CHEN J J. A systematic and comprehensive analysis of T cell exhaustion related to therapy in lung adenocarcinoma tumor microenvironment[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1126916.
 - [10] BELTRA J C, MANNE S, ABDEL-HAKEEM M S, et al. Developmental relationships of four exhausted CD8⁺T cell subsets reveals underlying transcriptional and epigenetic landscape control mechanisms[J]. Immunity, 2020, 52(5): 825-841.e8.
 - [11] WU S Y, LIAO P, YAN L Y, et al. Correlation of MK167 with prognosis, immune infiltration, and T cell exhaustion in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Gastroenterol, 2021, 21(1): 416.
 - [12] DUQUETTE D, HARMON C, ZABOROWSKI A, et al. Human granzyme K is a feature of innate T cells in blood, tissues, and tumors, responding to cytokines rather than TCR stimulation[J]. J Immunol, 2023, 211(4): 633-647.
 - [13] VAN DALEN F J, VAN STEVENDAAL M H M E, FENNEMANN F L, et al. Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages[J]. Molecules, 2018, 24(1): 9.
 - [14] BATISTA-GONZALEZ A, VIDAL R, CRIOLLO A, et al. New insights on the role of lipid metabolism in the metabolic reprogramming of macrophages[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2993.
 - [15] KRISHNA C, DINATALE R G, KUO F S, et al. Single-cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy[J]. Cancer Cell, 2021, 39(5): 662-677.e6.

收稿日期:2024-08-09

(本文编辑:吴迪汉)