

恶性肿瘤干性及其量化分析方法的研究进展

孙学梦^{1,2} 刘芳远^{1,3} 苏丽娅^{1,2*}

(¹内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心, 呼和浩特 010050; ²内蒙古自治区细胞生物学重点实验室, 呼和浩特 010050;

³内蒙古医科大学附属医院外科实验室, 呼和浩特 010050)

摘要 一直以来, 肿瘤干细胞一直是恶性肿瘤研究领域的重要研究靶点之一, 其干性特征影响了癌症的发生、治疗抵抗和复发。传统的肿瘤干性机制研究需要实验流式技术对肿瘤干细胞进行分选和提取。二代测序技术在肿瘤研究领域的普及产生了大量的肿瘤组织测序数据并提供了丰富的恶性肿瘤遗传和分子图谱。随着计算方法的不断革新, 研究人员基于分子特征或机器学习原理, 通过改良算法和组合策略对恶性肿瘤组织中的干性水平进行评估, 并使用干性指数对其描述和定义。对干性的量化计算, 可以为恶性肿瘤中干性调控机制提供帮助, 基于干性指数等指标进行建模预测, 能够指导临床对癌症患者的治疗和预后进行评估。

关键词 肿瘤干细胞; 干性指数; 测序; 算法; 预后

The Research Progress of Malignant Tumor Stemness and Its Quantitative Methods

SUN Xuemeng^{1,2}, LIU Fangyuan^{1,3}, SU Liya^{2*}

(¹Research Center for Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China;

²Inner Mongolia Key Laboratory of Medical Cell Biology, Hohhot 010050, China;

³Surgery Lab, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

Abstract Cancer stem cells are believed to play an important role in the progression, treatment resistance and recurrence of tumors, which make it attractive in the field of malignancy. Next-generation sequencing generated large scale of sequencing data and provided abundant genetic and molecular atlas of malignancy instead of traditional sorting and extracting methods based on flow cytometry. With the innovation of computational methods, researchers utilized stemness score to describe and define stemness by improved algorithms and combinatorial strategies by molecular features or machine learning. The quantitative calculation of stemness has guiding significance for the research on regulated mechanism of stemness in malignant tumor, and modeling and forecasting by stemness score provide guidance to the treatment and prognosis of cancer patients.

Keywords cancer stem cell; stemness score; sequencing; algorithm; prognosis

干细胞是一类能够进行自我更新并具有分化潜能的细胞类型, 在特定的条件下能够持续性地分裂增殖或分化为其他细胞类型^[1]。在恶性肿瘤中,

研究人员证实同样存在一类具有自我更新能力和分化潜能的肿瘤细胞亚群, 并将这种具有干性特征的细胞命名为肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)^[1]。在

收稿日期: 2022-12-27 接受日期: 2023-02-22

国家自然科学基金(批准号: 81860541)、内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY22674)、内蒙古医科大学致远人才计划(批准号: ZY0120025)和内蒙古医科大学青年创新基金(批准号: YKD2020QNCX028)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13644816286, E-mail: suliya2307@hotmail.com

Received: December 27, 2022 Accepted: February 22, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81860541), Scientific Research Project of Colleges and Universities in Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY22674), Zhiyuan Talent Program of Inner Mongolia Medical University (Grant No.ZY0120025), Youth Innovation Fund Project of Inner Mongolia Medical University (Grant No.YKD2020QNCX028)

*Corresponding author. Tel: +86-13644816286, E-mail: suliya2307@hotmail.com

原发性肿瘤中,未分化的CSC比正常的肿瘤细胞更容易发生扩散和侵袭,从而导致癌症的发展和患者的不良预后^[2-3],此外,CSC对肿瘤的抗药性也具有重要的影响^[4-5]。

近年来,随着高通量检测技术的不断发展,越来越多的基因组、转录组、蛋白质组以及表观测序组学特征被证实与肿瘤细胞干性密切相关^[6-7]。这些特征组成的分子调控网络广泛地参与了癌症的信号通路,调控肿瘤细胞的生长和增殖。其中,转录和表观遗传的异常调控被认为可以影响上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、Wnt信号通路、JAK/STAT信号通路和TGF- β 信号通路等干细胞多能性调控网络,从而引起肿瘤细胞的去分化及干性的获得^[8]。不仅如此,CSC中的内部信号调控能够通过反馈调节影响肿瘤微环境的形成和重塑,如血管生成、免疫逃避和肿瘤细胞生长转移^[9-10]。然而,传统的CSC分选方法主要基于流式分选技术,较低的检测通量虽然可以为CSC相关的基础研究提供指导,但无法帮助临床开展基于CSC或肿瘤干性开发有效的诊断和分析工具。

随着癌症基因图谱(the cancer genome atlas, TCGA)^[11]和大型肿瘤测序队列项目的不断出现,全面且丰富的肿瘤分子图谱为研究人员提供了广泛的样本和数据。不仅如此,如卷积运算、机器学习算法等计算方法的改进,使人们量化恶性肿瘤干性水平成为了可能,基于干性指数的分子分型一方面可以帮助我们研究肿瘤干性的调控机制,另一方面研究人员还可以通过干性分型筛选出新的分子标志物,为临床肿瘤治疗和预后评估提供指导^[12]。在本文中,我们对恶性肿瘤的CSCs和干性调控机制进行了概述,并重点介绍了基于测序数据对肿瘤干性进行量化的分析方法及其在恶性肿瘤中的应用。

1 肿瘤干细胞及干性概述

恶性肿瘤的发生通常始于细胞由于累积突变而导致增殖失去控制,发生突变的基因包括原癌基因、抑癌基因以及参与DNA修复的基因^[13]。在发生突变的细胞亚群中,CSC被认为是影响恶性肿瘤发生、发展及治疗后复发的重要细胞亚群,研究人员通常使用干性来描述恶性肿瘤中CSC的自我更新能力和分化潜能,高干性的CSC可以分化为构成肿瘤组织主体的异质性肿瘤细胞,即使在低密度下移植

到免疫缺陷小鼠体内,也能够迅速恢复并生长为原始肿瘤^[14-15]。最早的CSC被鉴定来源于急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia, AML),LAPIDOT等^[16]将AML患者体内的naïve干细胞移植到严重免疫缺陷小鼠体内能够诱导小鼠体内AML的发生。其他研究的报道证实了几乎在所有实体型肿瘤如脑胶质瘤、肝细胞癌、黑色素瘤、结直肠癌、胃癌和肺癌中都有CSC的存在^[4,9,12]。因此,研究人员使用与干细胞有关的表面标志物,比如CD133、CD33、CD90和小鼠P物质(substance P, SP),来鉴定肿瘤组织中的CSC细胞亚群^[17]。

恶性肿瘤的干性可以影响肿瘤的生长、血管生成等生物学特性从而促进肿瘤的侵袭。MARFIA等^[18]为了评估鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)对胶质瘤干细胞样细胞(glioma stem-like cells, GSCs)增殖和干性特性的影响,使用了不同增殖指数和干性标志物表达的人胶质母细胞瘤标本的GSCs系,发现GSCs迅速消耗新合成的神经酰胺,并在细胞外环境输出S1P,在这两个过程中细胞的指数出现高增殖并且干性标志物增强,表明了S1P与生长因子之间的合作对GSCs的维持和增殖至关重要,还发现了S1P能够促进GSCs的增殖和干性自分泌,促进其细胞周期进程和干性表型谱。还有研究者也发现了一个能够抑制胶质母细胞瘤干细胞增殖和自我更新的通路^[19]。

除了影响肿瘤的侵袭及转移之外,CSC还可以通过影响肿瘤的某些基因及通路的表达,从而影响肿瘤对治疗的反应。有研究人员通过细胞培养、蛋白质印迹测定和免疫沉淀分析等实验及一系列的检测,发现CSC细胞内、外的己糖磷酸异构酶/自分泌运动因子(hexose phosphate isomerase/autocrine motility factor, HPI/AMF)水平明显高于非干细胞,外部赤藓糖4-磷酸(erythrose 4 phosphate, E4P)不仅能抑制乳腺癌干细胞中干性蛋白的表达和侵袭,而且对HPI/AMF表达及干细胞表型的发育也产生显著和选择性的抑制^[20]。最近的研究发现,长链非编码RNA肌盲样1反义RNA1(muscleblind-like 1 antisense RNA 1, MBNL1-AS1)的敲低显著影响了前列腺癌(prostate cancer, PC)细胞的干性,随后影响了它们的侵袭性和增殖能力,确定了MBNL1-AS1是PCSC的关键调节因子,MBNL1-AS1与干性指数(mRNAsi)呈负相关,甚至与PC患者的预后、肿瘤进展、复发

和耐药性均呈负相关^[21]。应用干性指数, 不仅能够发现与恶性肿瘤侵袭性相关的因子, 还有望找到恶性肿瘤细胞侵袭的原因, 研究者已经证实了这些侵袭因子与CSC的耐药性存在密切的关联^[22]。随着肿瘤干性在恶性肿瘤生长和侵袭的作用不断被揭露, 研究人员希望通过各种药物联合, 进一步确认信号通路对肿瘤干性和CSC耐药性的影响, 提高药物在恶性肿瘤治疗中的疗效, 为患者提供一种更有效的治疗策略。

除了干性特征之外, PLAKS等^[23]指出在肿瘤治疗过程中, CSC能够由非干细胞样向干细胞状态进行重塑, 这一现象是促使CSC能够适应治疗以及来自肿瘤微环境中刺激和变化的重要因素。实际上, CSC在肿瘤发生和复发的过程中, 其干性重塑多来自于肿瘤微环境中的信号或细胞通讯驱动。BOUMAHDHI等^[24]经过研究发现CSC的发生受转录因子性别决定区2(sex determining region Y-box 2, SOX2)的调控, SOX2的表达上调可以促进肿瘤细胞增殖和侵袭; AYOB等^[25]报道则证实了CSC的干性标记物表达与细胞的转移和侵袭能力呈正相关趋势。不仅如此, 研究人员还发现, CSC的干性相关信号通

路可以调控多种与肿瘤进展相关的生物学过程, 包括EMT、血管生成、髓样细胞的外泌体产生和代谢重编程^[17]。除了来自肿瘤微环境中的信号刺激外, 一些表观遗传调节因子包括DNA甲基化相关基因和染色质驱动基因^[26-27]也与CSC的形成有关。在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中, APC突变可以调控DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)的表达和活性, HAMMOUD等^[28]和SUZUKI等^[29]等经过研究发现, 异常的DNMTs表达可以抑制Wnt抑制因子例如WNT抑制因子1(WNT inhibitory factor 1, WIF1)、轴抑制蛋白2抗体(axis inhibition protein 2, AXIN2)、分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled related protein 1, SFRP1)和Dickkopf相关蛋白1(Dickkopf-related protein 1, DKK1)等的表达。在AML中, 同样有研究证实了DNMT的高频突变能够阻碍酶活性, 促进KMT2/MLL基因融合产物白血病干细胞(leukemic stem cells, LSCs)的表达和转移, 从而启动AML的成瘤过程^[30]。

总之, 越来越多的研究报道已经证明了在肿瘤组织中, CSC的存在及其干性调控与肿瘤的发生、复发和转移存在密切的关系(图1)。传统的CSC筛选

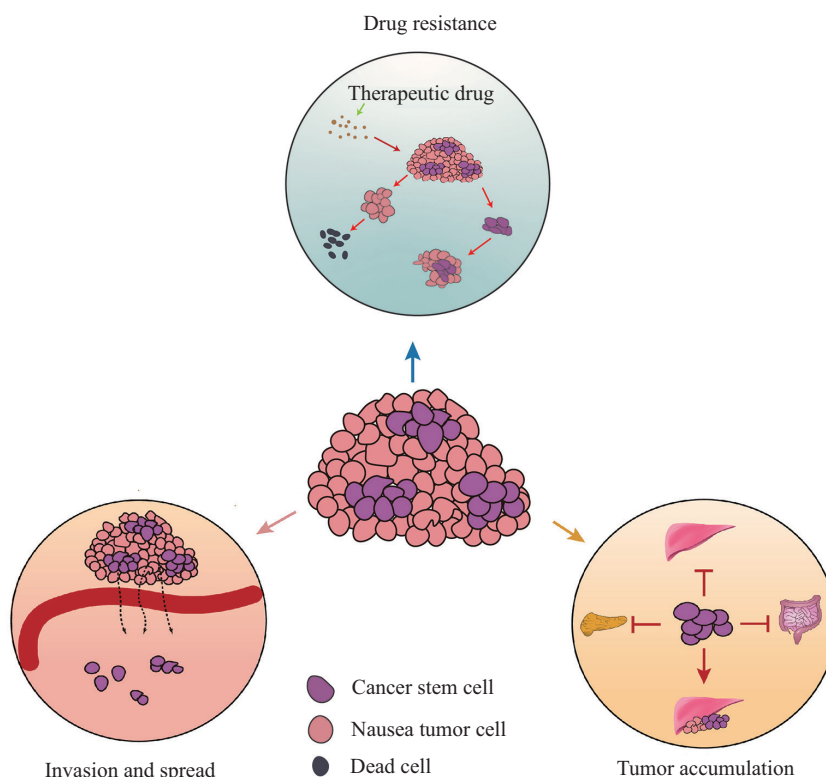


图1 肿瘤干细胞的作用

Fig.1 The role of the cancer stem cells

手段尽管可以支持分子机制研究,但无法为临床诊断和预后评估提供指导。考虑到CSC与恶性肿瘤复发和预后不良的关系,对CSC的干性特征进行量化可以为癌症的临床诊断、治疗效果预测和预后评估提供良好的指导。

2 恶性肿瘤干性指数的量化和分析

由于高通量测序技术的不断发展,大量的癌症基因图谱和队列测序结果为研究人员提供了全面的癌症分子图谱,从测序数据中将干性特征提取并量化后,将有助于开发基于CSC及其干性特征的肿瘤靶向治疗药物和诊断工具。根据计算方法的不同,对恶性肿瘤干性量化的方法主要分为基于多基因的干性评分和基于机器学习的干性评分。接下来,我们将分别对基于两种计算原理的干性量化评分进行介绍。

2.1 基于干性基因集分型的干性评分

当研究人员最初发现CSC与癌症患者的治疗后复发和预后不良存在密切关联后,鉴定和使用干性基因集作为患者治疗效果和预后状态的评估工具便成为一种可能。AML是最早用于开发干性评分的恶性肿瘤,通过分析白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)的基因表达芯片数据,STANLEY等^[31]和GENTLES等^[32]两个研究团队,先后通过回归分析方法,筛选并构建52个基因和17个基因的干性预测模型,用于预测AML患者的复发和预后情况。SHATS等^[33]利用贝叶斯二元回归对100个干性相关的基因进行计算,得到了乳腺癌的干性指数,并将其命名为共识干性排名(consensus stemness ranking, CSR)。通过进一步研究发现,CSR同样可以预测髓母细胞瘤患者和肺癌患者的预后状态,证明了评分模型在其他癌症中同样具有适用性^[33]。SHATS的干性评分模型证实了尽管不同类型的恶性肿瘤存在高度异质性,但肿瘤中的干性调控可能共享了相似的调控网络。

从上述模型可以发现,基于基因集的干性评分关键在于干性基因的筛选和确认,如何准确选择干性基因将对评分预测结果产生重要的影响。一款名为StemChecker的工具通过收集了49个已发表的干性特征和转录因子靶基因集合的数据集合,可供研究人员方便快捷检索干性相关基因^[34]。除此之外,随着单细胞测序技术的快速发展和普及,对肿瘤组

织中的CSC进行单细胞水平的鉴定,从而得到反映CSC亚群表达特征的标记基因,也可以提供符合要求的干性基因集合。得到的干性基因更加准确的前提下,研究人员能够通过计算得到更加准确的预测模型。

2.2 基于机器学习计算的干性评分

与基于干性基因的计算方法不同,使用机器学习进行干性评分,首先需要进行数据集训练和特征选取,然后通过进一步计算评估肿瘤样本的干性水平。2016年,SOKOLOV等^[35]首先基于逻辑回归开发出一种单分类逻辑回归算法(one-class logistic regression, OCLR),这种算法能够精准地识别肿瘤组织中的特定细胞亚型,并推导特定的功能特征与肿瘤部分亚型的关联。2018年,MALTA等^[12]使用了OCLR算法对多能干细胞、诱导多能干细胞和不同胚层样细胞的基因和表观遗传表达特征进行学习后,对TCGA数据库中的33种癌症类型的转录组和甲基化组进行了综合分析,最终获得了2个独立的干性指数:基于DNA甲基化的干性特征指数mDNA_{Si};基于基因表达的干性特征指数mRNA_{Si}。随着机器学习算法的不断更新和优化,更多的算法和组合策略被应用于肿瘤干性指数的计算,研究人员使用OCLR同支持向量机(support vector machines, SVM)、随机森林(random forest, RF)、极端梯度提升(extreme gradient boosting, XGBoost)和支持向量机递归特征消除(SVM recursive feature elimination, SVM-RFE)等不同算法进行组合后,重新计算了食管癌^[36]、前列腺癌^[37]、肝细胞癌^[38]、脑胶质瘤^[19,39]和结直肠癌^[40]的干性指数,并利用模型进一步区分了干性亚型。

单细胞测序技术的发展同样能够优化机器学习对干性评分的计算。一方面,研究人员可以通过单细胞技术更准确地鉴定肿瘤组织中的干性细胞亚群及其分子特征,得到更加优质的训练数据集。另一方面,机器学习分析方法无论在单细胞分群鉴定还是干性指数计算,都能够发挥重要的作用。不仅如此,单细胞测序产生了丰富的细胞维度,可以弥补样本数量不足的缺陷,同时降低了数据噪声的干扰,为进一步计算提供了更好的基础。在最近的一项AML研究中,VAN GALEN等^[41]使用了骨髓样细胞单细胞测序数据进行了更精确的细胞亚群定义,重新鉴定了AML中CSC的分子表达特征。ZHANG等^[42]

则利用CytoTRACE对34个单细胞数据的干性评估,联合7种常见的机器算法,并使用5重交叉验证进行优化,最终开发了能够同时反映免疫特征的干性分数——StemSig。这一思路丰富了我们对于干性指数开发的应用,为接下来基于干性机制开发评估肿瘤治疗效果的预测工具提供了新的思路。

3 恶性肿瘤干性指数在不同癌症中的应用

各种各样的干性指数计算方法,为研究人员提供了新的肿瘤干性机制研究思路,无论是早期的多基因干性评分,还是基于OCLR的机器学习计算分数,已经广泛应用于不同恶性肿瘤的干性研究及预测模型的构建(表1)。

3.1 干性指数在急性髓性白血病的应用

早期的研究发现,AML的高发病率与LSCs密切相关^[7],因此计算AML的干性指数可以为患者的临床治疗提供指导和帮助。GENTLES等^[32]使用31个在LSCs中高表达的基因集构建了LSC指数,用来评估AML的干性水平,并收集了4个公共数据集中1 074个患者样本进行验证。证明高LSC指数与AML患者的不良预后和肿瘤复发密切相关。STANLEY等^[31]使用了通过稀疏回归分析构建了另一个AML的干性评分标准——LSC17,通过在5个不同队列中的908名患者进行测试,证明了LSC17能够预测AML患者的预后不良,不仅如此,研究还证实了高LSC17分数与AML患者的治疗抵抗和肿瘤复发相关^[62]。在随后的研究中,BILL等^[63]进一步验证了LSC17对AML患者预后状态预测的准确性,并且证实了LSCs与81个

AML关键基因突变存在密切关联。单细胞技术的发展为AML的干性评分带来新的突破,VAN GALEN等^[41]基于单细胞测序数据开发的干性特征,不仅更精确地定义了AML中的干性细胞亚型,同时将干性调控机制与肿瘤免疫微环境结合起来,为开发新的干性指数计算工具提供了可能。作为恶性肿瘤干性指数的早期研究之一,LSC17取得了良好的预测效果,证实了干性指数在恶性肿瘤诊断和预后评估方面具有良好的应用前景,为开发其他恶性肿瘤的干性指数模型提供了指导。

3.2 干性指数在结直肠癌中的应用

肠道是由成体干细胞支持的组织之一,在CRC中,研究人员证实了再生CSC亚群的存在,并参与了CRC的肿瘤治疗抵抗和复发^[64]。多项基于mRNAsi的干性评分建模,证实了干性指数可以作为预测CRC预后状态和治疗效果的强有力指标^[46,65]。在mRNAsi的基础上,YE等^[47]发现了一种新的干性亚型,能够体现肿瘤的突变负荷水平。WENG等^[49]基于mRNAsi开发的干性风险评分模型,不仅能够预测预后状态,在CRC免疫治疗和化疗敏感性方面也展现出良好的预测效果。除了上述基于mRNAsi的干性评分模型之外,LIU等^[48]通过非因式矩阵分解分析了肿瘤异质性后,通过组合多种机器学习算法,开发出一个由9个基因组成的干性评分机制,成功得到了两种不同的干性亚型,并基于新的分型筛选出了潜在的治疗药物。在最近的一项报道中,VASQUEZ等^[44]基于小肠隐窝基柱状细胞表达特征和再生干细胞表达特征开发了一种新的干性评分机制,可用于检测CRC

表1 常见癌症干性指数计算及其应用

Table 1 Calculation and application of common cancer stemness index

癌症类型 Cancer type	指数计算原理 Principle of index calculation	应用 Application	参考文献 References
Acute leukemia	LSC17, OCLR	Screening targets, predicting prognosis, evaluation of treatment effect	[31,41,43]
Colorectal cancer	OCLR, SVM, GSV	Screening targets, predicting prognosis, immunotherapy evaluation	[44-49]
Liver cancer	OCLR	Screening targets, predicting prognosis	[38,50-53]
Pancreatic cancer	OCLR	Screening targets, evaluation of treatment effect	[54-56]
Breast cancer	OCLR	Screening targets, predicting prognosis	[57-58]
Lung cancer	OCLR	Screening targets, predicting prognosis	[59-60]
Esophageal cancer	OCLR	Predicting prognosis, immunotherapy evaluation	[36]
Gastric cancer	OCLR	Screening targets, predicting prognosis	[61]
Glioma brain	OCLR	Subtype typing, predicting prognosis, evaluation of treatment effect	[19,39]
Prostatic cancer	OCLR	Screening targets, predicting prognosis, evaluation of treatment effect	[37]

中CSC的丰度, 通过这个评分模型研究人员可以进行生物引导的新辅助疗法, 以辅导临床对当前的治疗策略进行指导。Vasquez的评分模型还能够解释CRC治疗过程中肿瘤耐药性的演变变化, 为研究人员开发既能靶向CSC干细胞群, 又可以阻断适应性信号, 从而降低肿瘤抗药性的治疗方法提供了新的策略^[44]。

3.3 干性指数在肝细胞癌中的应用

肝细胞癌(hepatocellular cancer, HCC)是一种高度异质性的恶性肿瘤, 具有独特的遗传背景, 能够对癌症治疗产生不同的反应。研究结果表明, CSC参与了HCC的发展和复发^[66], 为了分析干性调节因素在HCC中的作用机制, 先后有不同的课题组在HCC的mRNAsi基础上, 分析了干性指数在预后、免疫治疗和耐药性等方面的预测作用, 结果表明无论是使用共表达网络分析、相关性分析还是其他计算方法, 基于干性指数都能够筛选出良好的干性靶点并构建出准确性较高的预测模型^[50-52]。XU等^[53]和CHEN等^[67]的研究均发现, 干性指数对HCC的免疫治疗具有指导意义, 高干性指数与肿瘤免疫细胞浸润水平、免疫突变负荷和肿瘤分级均存在显著相关性, 基于共表达网络分析或差异分析筛选出的干性相关基因进行建模后, 在肿瘤免疫细胞的浸润水平、免疫检查点PD-1和CTLA-4的表达丰度、索拉非尼治疗反应等方面均存在显著差异。ZHANG等^[52]还通过干性指数鉴定出了HCC中与干性相关的长非编码RNA, 并基于这些干性相关长非编码RNA成功构建了预后风险模型。除此之外, 利用机器学习对干性指数及其测模型进行优化, 能够对HCC中的干性进行亚型分类, 为改善HCC临床治疗及诊断提供帮助^[38]。尽管干性指数在HCC中应用的实验证据并不如AML和CRC中的研究结果充分, 但是通过上述报道, 证实了干性指数在HCC的基础和临床研究领域具有宝贵的指导意义和研究价值。

3.4 干性指数在胰腺癌中的应用

胰腺癌(pancreatic cancer, PCA)是最致命的恶性肿瘤之一, 其诊断、治疗及发病机制均是目前难以攻克的问题, 探讨干性机制在PCA中的作用可以为临床和基础研究提供新的见解。在MALTA等^[12]提出的mRNAsi基础上, TANG等^[55]通过研究发现PCA中的干性调控参与了肿瘤的代谢重编程, 由于代谢重编程是PCA的标志性事件, 这一研究成果提示针

对CSC开发PCA靶向治疗药物具有潜在的研究和应用价值。HUANG等^[54]和LI等^[56]同样使用了mRNAsi构建了PCA的预后评估模型, 通过加权共表达网络分析联合lasso回归进行组合建模后, 分别构建了4个基因和7个基因的预测模型, 用于预测PCA患者的预后状态。干性指数同样用于PCA的基础研究当中, 在LUO等^[68]的报道中, 研究人员对干性指数进行分析, 证实了PCA的易感基因NR5A2在肿瘤发生发展过程中, 参与了干性调控和EMT的过程, 提示干性指数在恶性肿瘤调控机制方面具有应用前景。

3.5 干性指数在其他癌症中的应用

除了上述提到的癌症类型外, 在乳腺癌^[58,69]、肺癌^[59]、胃癌^[61]、食管癌^[36]、脑胶质瘤^[19,39]、前列腺癌^[37]中, 均有报道证实了基于干性指数能够开发出良好的预测模型, 以用来预测肿瘤患者的预后状态和治疗效果。在这些报道中, 针对食管癌和前列腺癌的干性评分, YI等^[36]和ZHANG等^[37]采用了机器学习方法进行建模和评估, 并将预测模型结合免疫细胞浸润水平及药物敏感性进行了联合分析, 从而深层次地评估干性指数在肿瘤免疫治疗中的作用。相比于使用mRNAsi的干性指数建模, 这种分析模式能够帮助研究人员更全面地了解恶性肿瘤中的作用。

与MALTA等^[12]的研究相似, 研究人员通过开发和改良机器学习算法, 开发和计算新的干性评分, 从而为CSC研究和临床诊疗提供更精确的指导^[37,39,44]。无论是构建预测模型, 还是新型干性指数计算, 都证明了干性指数在恶性肿瘤研究领域具有极高的研究价值和意义。

4 讨论

CSC在恶性肿瘤的发生、发展、治疗抵抗和复发中发挥了关键的作用, 了解肿瘤组织中的干性调控及其特征, 能为肿瘤治疗提供十分重要的参考和帮助^[12,31-32]。多种研究都显示, 较高的干性指数与不同癌症的进展程度直接相关, 并且指数能够有效地鉴别抗癌药物的新型靶点, 从而帮助研究人员开发新型疗法来抑制肿瘤的进展。计算测序数据量化肿瘤组织的干性水平可以为我们进一步了解肿瘤中的干性调控机制提供帮助。本文介绍近年来肿瘤干性研究及其量化计算方法的研究进展, 以及干性量化指标在癌症研究领域的应用, 从而为CSC的肿瘤靶向治疗提供新的思路。与流式分选等传统的CSC研

究方法相比, 下一代测序技术的普及和测序数据分析方法的革新为肿瘤干性研究提供了更加便捷的分析工具。

近年来已经有不少研究证实能够通过靶向CSC来治疗恶性肿瘤, 多种CSC相关的调控因子和信号通路均有望成为抑制或杀死CSC的作用靶点, 这些研究成果为探索和筛选针对CSC的特异性临床化疗药物提供了理论支持。此外, 测序技术的高通量优势, 可以为我们提供更全面更丰富的见解和认识。然而, 基于干性指数的研究也存在不足和缺陷, 无论是量化计算方法以及后续的建模应用, 对数据和计算方法的依赖程度均较高, 因此在功能和机制研究方面会略有不足, 必须将细胞和分子实验进行联合分析才能准确地阐述CSC影响肿瘤发生和侵袭的具体机制。但笔者也相信, 随着单细胞技术的不断发展, 机器学习及其他计算方法的优化和改良, 干性量化方法在今后将得到进一步的提升, 更精准、更强大的分析工具会帮助研究人员更详细地了解恶性肿瘤中的干性调控机制。

参考文献 (References)

- [1] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-11.
- [2] BEACHY P A, KARHADKAR S S, BERMAN D M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 324-31.
- [3] LOBO N A, SHIMONO Y, QIAN D, et al. The biology of cancer stem cells [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 675-99.
- [4] SAYGIN C, MATEI D, MAJETI R, et al. Targeting cancer stemness in the Clinic: from hype to hope [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 25-40.
- [5] SHIBUE T, WEINBERG R A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10): 611-29.
- [6] BEN-PORATH I, THOMSON M W, CAREY V J, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5): 499-507.
- [7] EPPERT K, TAKENAKA K, LECHMAN E R, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia [J]. *Nat Med*, 2011, 17(9): 1086-93.
- [8] BRADNER J E, HNISZ D, YOUNG R A. Transcriptional addiction in cancer [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 629-43.
- [9] LI F, XU J, LIU S. Cancer stem cells and neovascularization [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1070.
- [10] LOPEZ DE ANDRES J, GRINAN-LISON C, JIMENEZ G, et al. Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 136.
- [11] TOMCZAK K, CZERWINSKA P, WIZNEROWICZ M. The cancer genome atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge [J]. *Contemp Oncol*, 2015, 19(1A): A68-77.
- [12] MALTA T M, SOKOLOV A, GENTLES A J, et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 338-54, e15.
- [13] GREAVES M, MALEY C C. Clonal evolution in cancer [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 306-13.
- [14] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-8.
- [15] 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): 539-44.
- [16] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645-8.
- [17] TURDO A, VESCHI V, GAGGIANESI M, et al. Meeting the challenge of targeting cancer stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 16.
- [18] MARFIA G, CAMPANELLA R, NAVONE S E, et al. Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells [J]. *Glia*, 2014, 62(12): 1968-81.
- [19] TERRIE E, DELIOT N, BENZIDANE Y, et al. Store-operated calcium channels control proliferation and self-renewal of cancer stem cells from glioblastoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(14): 3428.
- [20] GALLARDO-PEREZ J C, ADAN-LADRON DE GUEVARA A, MARIN-HERNANDEZ A, et al. HPI/AMF inhibition halts the development of the aggressive phenotype of breast cancer stem cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(10): 1679-90.
- [21] LIU J, NIRAJ M, WANG H, et al. Down-regulation of lncRNA MBNL1-AS1 promotes tumor stem cell-like characteristics and prostate cancer progression through miR-221-3p/CDKN1B/C-myc axis [J]. *Cancers*, 2022, 14(23): 5783.
- [22] CHEN M Y, HSU C H, SETIAWAN S A, et al. Ovatodiolide and antrocin synergistically inhibit the stemness and metastatic potential of hepatocellular carcinoma via impairing ribosome biogenesis and modulating ERK/Akt-mTOR signaling axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154478.
- [23] PLAKS V, KONG N, WERB Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells [J]? *Cell Stem Cell*, 2015, 16(3): 225-38.
- [24] BOUMAHDHI S, DRIESSENS G, LAPOUGE G, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma [J]. *Nature*, 2014, 511(7508): 246-50.
- [25] AYOB A Z, RAMASAMY T S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 20.
- [26] VEDEL D H M, SKOTHEIM R I, LOTHE R A, et al. The recently suggested intestinal cancer stem cell marker DCLK1 is an epigenetic biomarker for colorectal cancer [J]. *Epigenetics*, 2014, 9(3): 346-50.
- [27] AVGUSTINOVA A, BENITAH S A. The epigenetics of tumour initiation: cancer stem cells and their chromatin [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 36: 8-15.

- [28] HAMMOUD S S, CAIRNS B R, JONES D A. Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 177-83.
- [29] SUZUKI H, WATKINS D N, JAIR K W, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(4): 417-22.
- [30] SOMERVAILLE T C, MATHENY C J, SPENCER G J, et al. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(2): 129-40.
- [31] STANLEY W K Ng, MITCHELL A, KENNEDY J A, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia [J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 433-7.
- [32] GENTLES A J, PLEVRITIS S K, MAJETI R, et al. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *JAMA*, 2010, 304(24): 2706-15.
- [33] SHATS I, GATZA M L, CHANG J T, et al. Using a stem cell-based signature to guide therapeutic selection in cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1772-80.
- [34] PINTO J P, KALATHUR R K, OLIVEIRA D V, et al. Stem-Checker: a web-based tool to discover and explore stemness signatures in gene sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W72-7.
- [35] SOKOLOV A, PAULL E O, STUART J M. One-class detection of cell states in tumor subtypes [J]. *Pac Symp Biocomput*, 2016, 21: 405-16.
- [36] YI L, HUANG P, ZOU X, et al. Integrative stemness characteristics associated with prognosis and the immune microenvironment in esophageal cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105144.
- [37] ZHANG C, CHEN T, LI Z, et al. Depiction of tumor stemlike features and underlying relationships with hazard immune infiltrations based on large prostate cancer cohorts [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(3): bbaa211.
- [38] CHEN D, LIU J, ZANG L, et al. Integrated machine learning and bioinformatic analyses constructed a novel stemness-related classifier to predict prognosis and immunotherapy responses for hepatocellular carcinoma patients [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 360-73.
- [39] WANG Z, WANG Y, YANG T, et al. Machine learning revealed stemness features and a novel stemness-based classification with appealing implications in discriminating the prognosis, immunotherapy and temozolomide responses of 906 glioblastoma patients [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(5): bbab032.
- [40] WANG W, XU C, REN Y, et al. A novel cancer stemness-related signature for predicting prognosis in patients with colon adenocarcinoma [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 7036059.
- [41] VAN GALEN P, HOVESTADT V, WADSWORTH II M H, et al. Single-cell RNA-Seq reveals AML hierarchies relevant to disease progression and immunity [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1265-81.e24.
- [42] ZHANG Z, WANG Z X, CHEN Y X, et al. Integrated analysis of single-cell and bulk RNA sequencing data reveals a pan-cancer stemness signature predicting immunotherapy response [J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 45.
- [43] ZHANG Y, LIU D, LI F, et al. Identification of biomarkers for acute leukemia via machine learning-based stemness index [J]. *Gene*, 2021, 804: 145903.
- [44] VASQUEZ E G, NASREDDIN N, VALBUENA G N, et al. Dynamic and adaptive cancer stem cell population admixture in colorectal neoplasia [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1213-28.e8.
- [45] ZHENG H, LIU H, LI H, et al. Characterization of stem cell landscape and identification of stemness-relevant prognostic gene signature to aid immunotherapy in colorectal cancer [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 244.
- [46] WEI R, QUAN J, LI S, et al. Integrative analysis of biomarkers through machine learning identifies stemness features in colorectal cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 724860.
- [47] YE M L, LI S Q, YIN Y X, et al. Integrative analysis revealed stemness features and a novel stemness-related classification in colorectal cancer patients [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 817509.
- [48] LIU Z, XU H, WENG S, et al. Stemness refines the classification of colorectal cancer with stratified prognosis, multi-omics landscape, potential mechanisms, and treatment options [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828330.
- [49] WENG M, LI T, ZHAO J, et al. mRNAsi-related metabolic risk score model identifies poor prognosis, immunoevasive contexture, and low chemotherapy response in colorectal cancer patients through machine learning [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 950782.
- [50] ZHANG Y, ZHANG R, ZENG L, et al. Identification and validation of a potential stemness-associated biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 1534593.
- [51] LI J, ZHANG C, YUAN X, et al. Correlations between stemness indices for hepatocellular carcinoma, clinical characteristics, and prognosis [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5496-510.
- [52] ZHANG Q, CHENG M, FAN Z, et al. Identification of cancer cell stemness-associated long noncoding rnas for predicting prognosis of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(8): 1087-100.
- [53] XU Q, XU H, CHEN S, et al. Immunological value of prognostic signature based on cancer stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 710207.
- [54] HUANG X Y, QIN W T, SU Q S, et al. A new stemness-related prognostic model for predicting the prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6669570.
- [55] TANG R, LIU X, WANG W, et al. Identification of the roles of a stemness index based on mrna expression in the prognosis and metabolic reprogramming of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 643465.
- [56] LI S, CHEN R, LUO W, et al. Identification of a four cancer stem cell-related gene signature and establishment of a prognostic nomogram predicting overall survival of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2022, 25(12): 2070-81.
- [57] SUO H D, TAO Z, ZHANG L, et al. Coexpression network analysis of genes related to the characteristics of tumor stemness in triple-negative breast cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7575862.
- [58] PEI J, WANG Y, LI Y. Identification of key genes controlling breast cancer stem cell characteristics via stemness indices analysis [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 74.
- [59] ZHANG Y, TSENG J T, LIEN I C, et al. mRNAsi index: machine learning in mining lung adenocarcinoma stem cell biomarkers [J]. *Genes*, 2020, 11(3): 257.

- [60] LIU Q, LEI J, ZHANG X, et al. Classification of lung adenocarcinoma based on stemness scores in bulk and single cell transcriptomes [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 1691-701.
- [61] CHEN X, ZHANG D, JIANG F, et al. Prognostic prediction using a stemness index-related signature in a cohort of gastric cancer [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 570702.
- [62] NG S W K, MURPHY T, KING I, et al. A clinical laboratory-developed LSC17 stemness score assay for rapid risk assessment of patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood Adv*, 2022, 6(3): 1064-73.
- [63] BILL M, NICOLET D, KOHLSCHMIDT J, et al. Mutations associated with a 17-gene leukemia stem cell score and the score's prognostic relevance in the context of the European LeukemiaNet classification of acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2020, 105(3): 721-9.
- [64] FUMAGALLI A, OOST K C, KESTER L, et al. Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 569-78, e7.
- [65] WANG X C, LIU Y, LONG F W, et al. Identification of a lncRNA prognostic signature-related to stem cell index and its significance in colorectal cancer [J]. *Future Oncol*, 2021, 17(23): 3087-100.
- [66] LEE T K, GUAN X Y, MA S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(1): 26-44.
- [67] CHEN L, ZHANG D, ZHENG S, et al. Stemness analysis in hepatocellular carcinoma identifies an extracellular matrix gene-related signature associated with prognosis and therapy response [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 959834.
- [68] LUO Z, LI Y, ZUO M, et al. Effect of NR5A2 inhibition on pancreatic cancer stem cell (CSC) properties and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(5): 1438-48.
- [69] HUANG K, WU Y, XIE Y, et al. Analyzing mRNAi-related genes identifies novel prognostic markers and potential drug combination for patients with basal breast cancer [J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 4731349.