

田麟博士,中山大学肿瘤防治中心,华南恶性肿瘤防治全国重点实验室独立PI。 田麟博士2011年本科毕业于上海交通大学。2017年博士毕业于美国贝勒医学院。 2017年加入美国纪念斯隆凯特琳癌症研究中心担任博士后研究员,其间获Cancer Research Institute资助,获得Irvington博士后奖学金。田麟博士具有丰富的动物模 型经验,以独立第一/通信作者在Nature和Nat Commun发表研究论文。 https://www.tianlab.info/

利用细胞邻近标记研究早期肿瘤微环境

黄涵英 赵闯 谭志鸿 田麟*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室,广东省恶性肿瘤临床医学研究中心,中山大学肿瘤防治中心,广州 510060)

摘要 肿瘤是一个恶性生态系统,它不仅由癌变的肿瘤细胞组成,还包括成纤维细胞、内皮 细胞、血管周皮细胞、组织驻留细胞和各种免疫细胞等基质细胞。这些基质细胞构成肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME),在肿瘤的发生、进展、转移和治疗耐药中发挥着关键作用,而不仅 仅是作为旁观者。大多数关于TME的临床前研究和临床研究都集中在可见的肿瘤,对活检的恶性 肿瘤组织进行免疫组化染色或单细胞多组学分析。然而,晚期TME变得异常复杂,使得许多治疗策 略无效。因此,研究癌细胞与肿瘤基质之间的相互作用是必要的,最好是从肿瘤起始或小肿瘤集群 开始。荧光标记或生化标记在肿瘤进展过程中接近癌细胞或与癌细胞相互作用的基质细胞,为研究 侵袭性肿瘤生态系统的演变提供了有希望的方法,并具有在TME形成中识别新的治疗靶点的潜力。 在此,该文概述了不同研究早期肿瘤微环境的细胞邻近标记技术,并讨论了如何将这些系统应用于 识别新的肿瘤-基质相互作用,提供了将这些生态位标记系统与原发肿瘤模型相结合的见解。 关键词 肿瘤微环境;邻近标记;脂溶性穿膜红色荧光蛋白;转肽酶A;合成Notch受体

Dissecting Early-Stage Tumor Microenvironment with Niche-Labeling

HUANG Hanying, ZHAO Chuang, TAN Zhihong, TIAN Lin*

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract Tumor represents a malignant ecosystem, composed not only of transformed cancer cells but also of stromal cells, including fibroblasts, endothelial cells, pericytes, tissue-resident cells, and various immune cells. These stromal cells, which constitute the TME (tumor microenvironment), play critical roles in tumor initiation,

收稿日期: 2024-11-28 接受日期: 2025-01-13

国家自然科学基金面上项目(批准号: 82173278)和广州市科技计划(批准号: 202201011364)资助的课题

^{*}通信作者。Tel: 020-87340473, E-mail: tianlin@sysucc.org.cn

Received: November 28, 2024 Accepted: January 13, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82173278), and the Science and Technology Projects in Guangzhou (Grant No.202201011364)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-20-87340473, E-mail: tianlin@sysucc.org.cn

progression, metastasis, and therapeutic resistance, rather than merely acting as bystanders. Most preclinical and clinical studies on the TME focus on overt tumors, where malignant biopsies are dissected for immunostaining or single-cell multi-omics profiling. However, the TME at late stages becomes exceedingly complex, rendering many therapeutic strategies ineffective. Therefore, it is imperative to investigate the interactions between cancer cells and tumor stroma at much earlier stages, ideally from tumor initiation or cancer cell micro-clusters. Fluorescently labeling or biochemically tagging stromal cells that are in proximity to or interact with cancer cells during tumor progression presents promising approaches for studying the evolution of aggressive tumor ecosystems and holds the potential to identify novel therapeutic targets for emerging TME. This review provides an overview of various niche-labeling techniques for studying tumor microenvironment, discusses how these systems have been applied to identify novel tumor-stroma interactions, and offers insights into combining these tools with autochthonous tumor models.

Keywords tumor microenvironment; niche-labeling; sLP-mCherry; sortase A; syn-Notch

恶性癌细胞是癌症研究的"主角"。通过对驱动 癌症发展的癌基因和肿瘤抑制基因的研究,我们已 掌握了促进或者抑制癌症发展的重要信号通路,但 截至今日,针对大多数形式的人类癌症的疗法仍然 不完全有效,且效果短暂^[1]。事实上,这些恶化的癌 细胞无法独立存在。肿瘤应被视为一个恶化的生 态系统,其中除了癌细胞外,还有许多表面上看似正 常的基质细胞构成肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)^[2]。这些被癌细胞征召的基质细胞既可 以是组织驻留细胞,也可以是来源于骨髓的细胞。 在这一恶化的生态系统中,基质细胞帮助癌细胞形 成我们熟知的癌症重要特征(hallmarks),包括维持增 殖信号转导、逃避生长抑制因子、抵抗细胞死亡、 实现复制永生、诱导血管生成、激活侵袭和转移、 重编程能量代谢,或逃避免疫破坏等^[3-4]。

随着多色兔疫荧光和空间转录组等技术的应用,我们已经可以利用少量样本在单细胞水平上同时分析几十乃至成百上千个基因表达水平^[5-6]。这些技术极大地帮助了我们理解TME中的基质细胞是如何协同促进癌症进展、耐药和转移。然而,靶向TME的策略效果仍然有限。原因之一是大多数关于

TME的临床前研究和临床研究都集中在可见的肿瘤 (overt tumor),此时肿瘤已经具有很高的异质性和复 杂性,对药物干预的效果存在很大的不确定性^[7]。因 此,研究癌症起始或转移早期的TME演化不仅在理 解肿瘤进展的机理上具有重大意义,也有助于开发 更有效的干预治疗手段。

在这一综述中,我们介绍了四种研究癌细胞与 TME中基质细胞互作的技术原理及其应用实例。这 些技术已被部分应用于研究肿瘤的早期转移(incipient metastasis)。此外,我们还对这些技术进行了展望, 讨论了它们如何与肿瘤原发模型结合,以研究肿瘤 起始过程中的微环境变化,以及探讨肿瘤之外的其 他疾病进展的基本机制。

1 微环境标记技术原理

我们首先介绍四种无偏倚邻近细胞标记的原 理以及优缺点(表1)。

1.1 分选带有多种标志的细胞团

为了分选与肿瘤细胞互作的微环境细胞,最直接和简便的策略是在相对温和的组织解离后,富集由两个或几个细胞组成的微小细胞团(图1A)^[8-9]。这

Table 1 Comparison of four approaches for detecting interactions between neighboring cells				
方法	细胞间物理接触	标记持续时间	信噪比	参考文献
Method	Physical interaction	Duration of labeling	Signal-to-noise	References
PIC-seq	Required	Not applicable	Unstable	[8-9]
sLP-mCherry	Not required	1-2 days	Low	[10-11]
SrtA-based	Required	Cell-dependent	Medium	[12-13]
syn-Notch	Required	1 day to lifetime	High	[14-15]

表1 比较四种检测邻近细胞之间相互作用的方法

些细胞团中的细胞被认为具有物理位置上的相互作用(physical interaction)。进一步对这些细胞团进行高通量测序(sequencing physically interacting cells, PIC-seq)可以推测细胞直接相互作用导致的基因调 控程序。

在肿瘤的定植模型中,可以将标记某种荧光蛋白的肿瘤细胞定植到全身性表达另一种荧光蛋白的小鼠中。在成瘤后,利用流式分选纯化带有两种荧光的细胞团。如果细胞团本身不带有荧光^[16],则需对肿瘤细胞和微环境细胞进行抗体标记。例如,肿瘤细胞可以用 anti-EpCAM抗体标记,微环境细胞则可以用标记不同基质细胞组分的 cocktail标记(如用 anti-CD31抗体标记血管, anti-CD45抗体标记免疫细胞, anti-PDGFRα抗体标记成纤维细胞等)。利用这一策略,MERAD实验室^[17]发现高表达免疫检查点PD1及 CXCL13的 CD4⁺ T细胞可以在肿瘤的引流淋巴结中与树突状细胞相互作用,接受树突状细胞提呈的抗原,这对抗 PD1的免疫检查点疗法及抗肿瘤作用具有关键意义。

尽管 PIC-seq已经被用于阐明免疫细胞与肿瘤 及其他基质细胞的相互作用,但由于测序获得的基 因表达结果是由多个细胞共同贡献的,因此需要进 一步建模,以预测在两种细胞相互作用后,哪一类细胞的哪些基因发生变化。这一过程需要后期的实验验证。此外,该方法在前期需要对组织解离进行优化。如果组织解离过度,则会破坏相互结合的细胞;如果组织解离不足,则会造成过大的细胞团,导致假阳性结果。

1.2 脂溶性穿膜蛋白

邻近细胞间可以通过分泌的局部细胞因子相 互影响,这一过程称为旁分泌(paracrine)。MALAN-CHI实验室借鉴这一生物学过程,对红色荧光蛋白 mCherry进行改造,在mCherry的N-端添加一个人工 合成的分泌肽^[18]和一段有助于穿过细胞膜的TATk 序列^[19]。经过改造的sLP-mCherry(soluble lipidpermeable mCherry)可以被周边50 μm范围的细胞吸 收,吸收后聚集于溶酶体样的多胞体^[20](图1B)。

进一步地,可以对分泌sLP-mCherry的细胞进行 改造,使其表达一个不分泌的绿色荧光蛋白EGFP。 通过流式分选EGFP⁺mCherry⁺和EGFP⁻mCherry⁺细 胞,可以获得分泌和接受sLP-mCherry的细胞。对这 些细胞进行单细胞测序,可以解析在特定生物背景 下微环境相互作用的分子机制。周斌课题组^[11]构 建了基于sLP-mCherry标记的转基因小鼠模型。通



A: 基于细胞与细胞之间的黏附, 通过不完全组织解离, 分选具有两种不同标志物的细胞团。B: 对癌细胞进行工程改造, 使其表达一个带有穿 膜肽的红色荧光蛋白(sLP-mCherry)。该穿膜肽蛋白被周围细胞吸收后, 可实现对邻近细胞的标记。C: 表达转肽酶A的细胞在含有氨基酸基序 LPETG的底物存在下, 可以将该底物连接到邻近细胞表面的寡聚甘氨酸膜蛋白上。如果底物LPETG携带有生物素修饰, 该生物素也会被连接 到邻近细胞的膜蛋白上, 进一步利用荧光标记的链霉亲和素实现对邻近细胞的标记。D: 利用syn-Notch对邻近细胞进行标记并放大信号。当配 体与受体结合后, syn-Notch发生自切割, 使其胞内区域不再锚定于细胞膜。该胞内区域可以作为转录激活因子, 诱导报告基因的表达。

A: carefully calibrated tissue disassociation and fluorescent sorting of cell clusters with two distinct cell-surface markers to enrich putatively interacting cells. B: cancer cells are genetically engineered to express a cell membrane-permeable red fluorescent protein (sLP-mCherry), which is subsequently taken up by neighboring cells for niche-labeling. C: cells expressing SrtA can ligate the substrate containing biotinylated LPETG motif to the membranes of neighboring cells, which can be detected using fluorescently labeled streptavidin. D: the syn-Notch niche-labeling system serves to amplify signal. Upon ligand binding, the syn-Notch receptor undergoes self-cleavage, allowing the intracellular domain to translocate to the nucleus, where it functions as a transcriptional activator to drive the expression of the reporter gene.

图1 检测邻近细胞之间相互作用的四种方法的原理

Fig.1 The principles of four approaches for detecting interactions between neighboring cells

过与表达组织特异性Cre同源重组酶的小鼠配种, 可以使该细胞表达细胞外分泌sLP-mCherry以及不 分泌的EGFP。将该小鼠与肝门静脉血管附件的肝 细胞特异性Cre小鼠(*Mfsd2a^{Cre}*)进行配种,从而标记 Mfsd2a⁺肝细胞周围的基质细胞。通过RNA测序比 较mCherry⁺血管内皮细胞和mCherry⁻血管内皮细胞, 揭示了肝门静脉血管与中央静脉血管之间存在显著 差异。

由于不同细胞对分泌蛋白的吸收能力存在差 异,因此在基于sLP-mCherry标记微环境时可能会 出现一定的偏好性。例如,巨噬细胞具有强大的 吸收微小颗粒的能力,因此更容易被sLP-mCherry 标记,显示出比其他类型细胞更高的比例^[21]。事实 上,在脑转移研究中发现,表达CD206的血管周皮巨 噬细胞即使不位于转移癌细胞周围,也能够检测到 mCherry信号,这进一步说明了sLP-mCherry可能被 巨噬细胞偏好性地捕获^[22]。除了假阳性的问题外, 由于只有一部分sLP-mCherry被邻近细胞吸收,这些 sLP-mCherry会在短时间内被运输至溶酶体进而被 降解,因此信号存在衰减,只能在很小的时间窗口内 标记邻近细胞(表1)。

1.3 膜蛋白标记

基于 sLP-mCherry的标记不需要邻近细胞之间 具有实际的物理互作。与之不同的是一种基于转肽 酶A(sortase A, SrtA)的细胞膜标记技术^[23]。SrtA是一 类在革兰氏阳性菌中保守且广泛存在的膜蛋白和毒 力因子,它能够通过一种称为转肽反应的过程将多 种细菌蛋白定位到细菌表面,从而介导细菌对宿主 细胞的侵袭以及细菌生物膜形成等过程。除了在细 菌中具有重要的生物学功能外, SrtA催化的转肽反 应还能够将一个C-端包含五肽序列(Leu-Pro-任意氨 基酸-Thr-Gly, LPXTG)的蛋白连接到另一个N-端具 有寡聚甘氨酸链的蛋白上(图1C)。具体应用中,除 了需要改造发出信号的细胞使其表达SrtA外,还需 被改造五肽(LPXTG)的"接收"细胞,使其表达带有 寡聚甘氨酸的膜蛋白。如果在这段五肽(LPXTG)上 进行生物素(biotin)修饰,则接收细胞膜的寡聚甘氨 酸链在连接LPXTG五肽时也会携带生物素。利用荧 光标记的链霉亲和素(streptavidin),可以对接收细胞 进行荧光成像和流式分选,并进行下游的测序分析。 VICTORA课题组^[12]构建了基于SrtA细胞标记的转 基因小鼠模型,通过将该模型与组织特异性表达Cre 同源重组酶的小鼠进行配种,可以在特定细胞中表达SrtA(作为信号发出细胞),而不表达Cre的细胞则表达五个甘氨酸的膜定位CD90.1蛋白(作为接收细胞)。利用这一工具,VICTORA课题组^[12]发现小鼠感染淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒后,多个器官中与病毒特异性CD8⁺T细胞互作微环境组分的演变,为测量和了解跨多个生物系统的细胞间相互作用提供了重要见解。

借助"定向进化"技术对SrtA进行改造,可以 获得高活性且能够标记单一甘氨酸的突变体mg-SrtA^[24]。这一技术不仅提高了SrtA的标记效率,还简 化了标记系统——不需要对接收细胞进行改造以使 其表达寡聚甘氨酸的膜蛋白。尽管基于SrtA的标记 具有较高的信噪比和信号不易衰减等优点,但其标 记依赖于生物素化的五肽(LPXTG),这可能限制了 该技术在神经生物学中的应用,因为血脑屏障可能 阻碍该五肽(LPXTG)穿过血管到达大脑皮层。

1.4 接收细胞转录激活放大信号

同sLP-mCherry标记邻近细胞类似,基于SrtA的 邻近细胞标记也存在信号衰减的问题。对于短暂接 触的情况,接收细胞膜蛋白的生物素化程度较低,导 致难以检测。要克服这一问题,需要对接收细胞接 收的信号进行放大。在此,细胞信号转导中两种重 要的信号分子:G蛋白耦联受体和Notch受体经过改 造,实现了信号放大的功能。这两类信号通路在接 收到相应的胞外信号分子后,通过激活下游基因转 录来调控细胞生理功能。如果将胞外区域改造成信 号发出细胞的信号受体,并将下游转录基因变为荧 光蛋白,则可以通过荧光蛋白的表达来可视化邻近 细胞间的互作。值得强调的是,荧光蛋白的表达并 不依赖于信号发出细胞发出的信号"强弱",因此能 够有效解决信号衰减的问题。

BARNEA课题组^[25]改造了G蛋白耦联受体以研 究嗅觉神经元的相互作用。这套系统包含四个组 件:(1)人源的胰高血糖素受体(G蛋白耦联受体家 族)与转录激活蛋白Gal4的融合蛋白,其中胰高血糖 素受体与Gal4通过一段烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶识别序列连接;(2)β-抑制蛋白(β arrestins)与TEV蛋白酶的融合蛋白;(3)Gal4结合序 列UAS及编码红色荧光蛋白的序列;(4)细胞膜锚定 的胰高血糖素。在果蝇神经元中表达以上四个组件 后,如果神经元发生接触,将触发该人工合成的G蛋 白耦联受体信号,进而招募β-抑制蛋白至胰高血糖 素受体。β-抑制蛋白耦联TEV进一步将Gal4转录激 活蛋白从胰高血糖素受体切割出来,使Gal4能够进 入细胞核结合UAS序列,并激活启动子下游红色荧 光蛋白的表达。

相比于G蛋白耦联受体的信号放大系统,Notch 受体的信号放大系统相对简单,因此应用也更广。 Notch本身是一种跨膜蛋白。在结合配体(如Delta 蛋白)后,Notch的胞外区域使跨膜区域发生自切割, 释放出Notch的胞内区域(Notch intracellular domain, NICD)^[26]。NICD进入细胞核后,具有转录激活的功 能,激活Notch相关基因的表达。syn-Notch(synthetic Notch)是对天然Notch的改造^[15](图1D),包括三个组 件:(1)将Notch的胞外区域改造成信号分子的受体; (2)将胞内区域替换为广泛性的转录激活蛋白(如 Gal4-VP64或rtTA);(3)提供与转录激活蛋白对应的 启动子(如UAS或tetO元件)及编码荧光蛋白的序列。 在果蝇的嗅觉神经中表达,用于示踪表达嗅觉受体 的神经元与突触后神经元之间的相互作用^[27]。

2 微环境标记技术在肿瘤研究的应用

在介绍完四种无偏倚邻近细胞标记原理的基础上,我们将通过实例阐明这些邻近标记技术是如何解析TME中癌细胞与基质细胞互作的。

2.1 肿瘤转移

肿瘤转移是癌症患者的主要死因。明确早期转移微环境的特征有助于理解TME中的基质细胞如何协同癌细胞促进其远端定植,也有助于开发更有效地抑制肿瘤转移的策略。sLP-mCherry微环境标记由于其简便性,已被用于乳腺癌和前列腺癌的肺转移^[20]、脑转移^[21-22]和肝转移^[28-29]微环境研究。对于肺转移和肝转移,癌细胞可以分别通过尾静脉和脾脏注射定植于肺和肝脏。对于脑转移,癌细胞首先需要经过多轮的体内筛选^[30-32],以纯化出具有较高脑转移倾向的克隆。在定植前,需要对癌细胞进行标记,除了细胞外分泌的sLP-mCherry以及不分泌的EGFP外,还可以对癌细胞进行改造,使其表达荧光素酶蛋白,这将有助于对小鼠进行无侵袭性成像,评估转移瘤的定植生长情况。

MALANCHI实验室^[20]是最早利用sLP-mCherry 系统研究早期乳腺癌肺转移的。该研究小组以4T1 小鼠乳腺癌细胞系为模型,发现了晚期肺转移中存 在大量中性粒细胞,这验证了他们之前的发现^{[33]。} 然而,在尾静脉注射7天后,转移癌细胞尚未形成显 著的转移瘤(macrometastasis),对转移癌细胞附近的 非免疫细胞进行单细胞测序发现,相较于完全分化 的I型肺泡上皮细胞,具有更强干细胞特性的II型肺 泡上皮细胞的富集更加显著。进一步通过体外类器 官共培养的实验表明,这类II型肺泡上皮细胞能够 促进癌细胞的增殖,揭示了乳腺癌早期肺转移过程 中特定的组织驻留细胞对定植生长的促进作用。

MASSAGUÉ实验室^[21]同样利用 sLP-mCherry系 统研究不同亚型乳腺癌的脑转移微环境。该小组发 现,三阴性乳腺癌模型倾向于形成与星形胶质细胞 和小胶质细胞扩散接触的血管周围鞘,而HER2阳性 乳腺癌模型则倾向于形成由自主产生的Tenascin C 蛋白驱动的紧凑球体,将基质细胞隔离在外围。进 一步利用单细胞转录组比较邻近HER2阳性乳腺癌 脑转移瘤的小胶质细胞与远离转移瘤的小胶质细胞, 研究人员发现,邻近转移瘤的小胶质细胞具有类似 阿尔茨海默病相关小胶质细胞的反应,通过上调酪 氨酸受体激酶AXL相应微环境中GAS6分子的表达, 促进肿瘤的定植。对两种脑定植模式的空间特征进 行精细分析,对利用基质治疗脑转移具有重要意义。

不同于通过sLP-mCherry研究转移瘤微环境, 张翔课题组^[13]利用高活性的转肽酶A(mono-glycine recognition sortase A, mgSrtA)研究乳腺癌细胞在不 同器官定植的TME。除了表达mgSrtA外,肿瘤细 胞还被改造以表达绿色荧光蛋白的纳米抗体(GFP nanobody, GFPn)。用于造模的小鼠全身性表达细 胞膜锚定的GFP小鼠(GPI-GFP)^[34],定植到远端组 织的癌细胞将通过 GFPn 与基质细胞表面的 GFP 发 生相互作用。当两者接触时,对小鼠静脉注射生物 素化的五肽(LPXTG), 癌细胞表面的mgSrtA将该 五肽添加至基质细胞膜蛋白的甘氨酸上,通过荧 光标记的链霉亲和素可鉴定与癌细胞发生接触的 基质细胞。该研究团队发现在骨转移中, 癌细胞 与表达雌激素受体α的巨噬细胞之间存在互作。在 巨噬细胞中敲除雌激素受体α, 可增加CD8⁺ T细胞 浸润骨转移瘤的数量。该研究揭示了早期骨转移 过程中癌细胞与免疫细胞的互作可能营造一个免 疫抑制的TME。然而,在这一改进的转肽酶A系统 中,由于所有基质细胞均表达与癌细胞互作的蛋 白(nGFP:GPI-GFP),这一方面"迫使"所有与癌细

胞接触的基质细胞与其进行实际的接触,另一方 面也限制了癌细胞的迁移,造成非生理情况的假 阳性。

2.2 肿瘤异常血管的生成

血管异常增殖是肿瘤的重要标志之一[3-4]。传 统观点认为,肿瘤分泌血管生长因子,从而诱导正常 组织的血管产生新的萌芽浸润到肿瘤中[35-37]。周斌 课题组^[14]利用 syn-Notch技术,对在小鼠皮下注射的 肺癌细胞TC-1成瘤过程中与癌细胞接触过的血管 细胞进行标记和追踪。在该系统中,小鼠肺癌细胞 TC-1被改造为表达一种细胞膜锚定的绿色荧光蛋白 (mGFP)。此外,研究中使用 anti-GFP抗体作为 syn-Notch的胞外区域, 四环素控制的转录激活因子tTA 作为syn-Notch的胞内区域。该syn-Notch编码序列 被插入到血管内皮细胞特异性基因Cdh5启动子的 下游,确保血管内皮细胞特异性地表达 syn-Notch嵌 合蛋白。将该小鼠与报告基因小鼠 tetO-Cre;CAG-LSL-tdT进行配种。如果癌细胞表面的mGFP与血管 内皮细胞表面的anti-GFP发生接触, syn-Notch嵌合 蛋白的跨膜区域将发生自切割, 使得tTA进入细胞核 并结合至tetO启动子,诱导Cre重组酶的表达。Cre重 组酶进一步切割LSL序列,从而激活CAG启动子驱 动的红色荧光蛋白tdT(tdTomato)表达。值得注意的 是,tdTomato的表达是不可逆的,即使血管内皮细胞 随后不再与肿瘤接触,该tdTomato仍将在内皮细胞 及其后代中表达。

利用该系统,研究小组发现在注射癌细胞后的 7天,相对早期的肿瘤中,癌细胞接触过的血管局限 于肿瘤内,说明血管由正常组织向肿瘤组织生长,这 与之前的认识一致。然而,随着肿瘤进一步增长,在 注射癌细胞后的14天,发现肿瘤外围正常组织的血 管也被红色荧光蛋白tdTomato标记。这说明这些血 管曾与癌细胞接触,即随着肿瘤的进展,瘤内的血管 能够朝正常组织的方向发展。

3 展望与总结

邻近细胞标记是解析 TME的重要手段。本文 介绍了四种邻近标记技术的原理及其在解析 TME中 基质细胞与癌细胞互作的具体应用。这些技术随着 生物标记手段的发展而不断进步。其他化学标记策 略,例如标记大分子的正交化学技术^[38]、高活性的 生物素连接酶技术等被改造^[39],是否有希望被改造 以用于细胞邻近标记仍需进一步研究。

目前这些邻近细胞标记技术主要应用于移植 瘤模型,即对癌细胞进行改造,并将其注射到肿瘤原 发位置或远端器官进行造模。如何将这些邻近标记 技术与肿瘤原发模型结合,剖析正常上皮细胞癌变 过程中微环境的动态变化,将是一个有趣的研究方 向(图2)。进一步结合单细胞测序,可以明确不同时 期癌细胞周围的微环境细胞组分类型差异,以及与 癌旁正常组织中相同细胞类型之间的差异。这不仅 有助于深入了解这些既往被认为是旁观者的"正常" 细胞如何在机制上协助癌细胞的进展,还能帮助识 别新的靶向微环境的靶点。

综上所述, 癌细胞与TME基质细胞的互作研究 正处于快速发展之中。而邻近标记的应用不仅有助 于我们理解肿瘤早期微环境的动态变化, 也将为肿 瘤治疗的新靶点发现提供新的启发和指引。



该系统由三部分构成:组织特异性启动子驱动的Cre重组酶,以实现特定组织或细胞中的表达;Cre诱导的原癌基因表达(如KRas突变)以及抑癌基因的沉默(如TP53);不同的邻近标记元件。

The system consists of three components: the Cre recombinase, which is driven by a tissue or cell-specific promoter; the Cre-inducible activation of an oncogene (e.g., *KRas* mutation) or repression of a tumor suppressor gene (e.g., *TP53* deletion); and distinct niche-labeling elements.

图2 邻近细胞标记与原发肿瘤模型结合研究肿瘤起始的微习环境演化

Fig.2 Dissecting the evolution of TME through the integration of niche-labeling and autochthonous tumor models

参考文献 (References)

- HANAHAN D, COUSSENS L M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment [J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 309-22.
- [2] CHEN X, SONG E. The theory of tumor ecosystem [J]. Cancer Commun, 2022, 42(7): 587-608.
- [3] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions [J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31-46.
- [4] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-74.
- [5] MOFFITT J R, LUNDBERG E, HEYN H. The emerging landscape of spatial profiling technologies [J]. Nat Rev Genet, 2022, 23(12): 741-59.
- [6] VANDEREYKEN K, SIFRIM A, THIENPONT B, et al. Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics [J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(8): 494-515.
- [7] STANGIS M M, CHEN Z, MIN J, et al. The hallmarks of precancer [J]. Cancer Discov, 2024, 14(4): 683-9.
- [8] GILADI A, COHEN M, MEDAGLIA C, et al. Dissecting cellular crosstalk by sequencing physically interacting cells [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(5): 629-37.
- [9] BOISSET J C, VIVIÉ J, GRÜN D, et al. Mapping the physical network of cellular interactions [J]. Nat Methods, 2018, 15(7): 547-53.
- [10] OMBRATO L, NOLAN E, PASSARO D, et al. Generation of neighbor-labeling cells to study intercellular interactions *in vivo* [J]. Nat Protoc, 2021, 16(2): 872-92.
- [11] ZHANG S, ZHANG Q, LIU Z, et al. Genetic dissection of intercellular interactions *in vivo* by membrane-permeable protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(1): e2120582120.
- [12] NAKANDAKARI-HIGA S, WALKER S, CANESSO M C C, et al. Universal recording of immune cell interactions *in vivo* [J]. Nature, 2024, 627(8003): 399-406.
- [13] XU Z, LIU F, DING Y, et al. Unbiased metastatic niche-labeling identifies estrogen receptor-positive macrophages as a barrier of T cell infiltration during bone colonization [J]. bioRxiv, 2024, doi: 10.1101/2024.05.07.593016.
- [14] ZHANG S, ZHAO H, LIU Z, et al. Monitoring of cell-cell communication and contact history in mammals [J]. Science, 2022, 378(6623): eabo5503.
- [15] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors [J]. Cell, 2016, 164(4): 780-91.
- [16] HALPERN K B, SHENHAV R, MASSALHA H, et al. Pairedcell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(10): 962-70.
- [17] COHEN M, GILADI A, BARBOY O, et al. The interaction of CD4⁺ helper T cells with dendritic cells shapes the tumor microenvironment and immune checkpoint blockade response [J]. Nat Cancer, 2022, 3(3): 303-17.
- [18] BARASH S, WANG W, SHI Y. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(4): 835-42.
- [19] FLINTERMAN M, FARZANEH F, HABIB N, et al. Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products [J]. Mol Ther, 2009, 17(2): 334-42.
- [20] OMBRATO L, NOLAN E, KURELAC I, et al. Metastatic-niche

labelling reveals parenchymal cells with stem features [J]. Nature, 2019, 572(7771): 603-8.

- [21] GAN S, MACALINAO D G, SHAHOEI S H, et al. Distinct tumor architectures and microenvironments for the initiation of breast cancer metastasis in the brain [J]. Cancer Cell, 2024, 42(10): 1693-712,e24.
- [22] MASSARA M, DOLFI B, WISCHNEWSKI V, et al. Investigation of a fluorescent reporter microenvironment niche labeling strategy in experimental brain metastasis [J]. iScience, 2024, 27(7): 110284.
- [23] KUMARI P, BOWMIK S, PAUL S K, et al. Sortase A: a chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces [J]. Biotechnol Bioeng, 2021, 118(12): 4577-89.
- [24] GE Y, CHEN L, LIU S, et al. Enzyme-mediated intercellular proximity labeling for detecting cell-cell interactions [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(5): 1833-7.
- [25] TALAY M, RICHMAN E B, SNELL N J, et al. Transsynaptic mapping of second-order taste neurons in flies by trans-Tango [J]. Neuron, 2017, 96(4): 783-95,e4.
- [26] GORDON W R, ZIMMERMAN B, HE L, et al. Mechanical allostery: evidence for a force requirement in the proteolytic activation of Notch [J]. Dev Cell, 2015, 33(6): 729-36.
- [27] HUANG T H, NIESMAN P, ARASU D, et al. Tracing neuronal circuits in transgenic animals by transneuronal control of transcription (TRACT) [J]. eLife, 2017, doi: 10.7554/eLife.32027.
- [28] LIU K, JING N, WANG D, et al. A novel mouse model for liver metastasis of prostate cancer reveals dynamic tumour-immune cell communication [J]. Cell Prolif, 2021, 54(7): e13056.
- [29] SZNURKOWSKA M K, CASTRO-GINER F, ZHANG Y, et al. Mapping the niche of breast cancer metastases in lung and liver [J]. bioRxiv, 2024, doi: 10.1126/sciadv.abf4408.
- [30] KANG Y, SIEGEL P M, SHU W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone [J]. Cancer Cell, 2003, 3(6): 537-49.
- [31] MINN A J, GUPTA G P, SIEGEL P M, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung [J]. Nature, 2005, 436(7050): 518-24.
- [32] BOS P D, ZHANG X H, NADAL C, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain [J]. Nature, 2009, 459(7249): 1005-9.
- [33] WCULEK S K, MALANCHI I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells [J]. Nature, 2015, 528(7582): 413-7.
- [34] RHEE J M, PIRITY M K, LACKAN C S, et al. *In vivo* imaging and differential localization of lipid-modified GFP-variant fusions in embryonic stem cells and mice [J]. Genesis, 2006, 44(4): 202-18.
- [35] DE PALMA M, BIZIATO D, PETROVA T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(8): 457-74.
- [36] BERGERS G, BENJAMIN L E. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 401-10.
- [37] ZHANG R, YAO Y, GAO H, et al. Mechanisms of angiogenesis in tumour [J]. Front Oncol, 2024, 14: 1359069.
- [38] PRESCHER J A, BERTOZZI C R. Chemistry in living systems [J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(1): 13-21.
- [39] GINGRAS A C, ABE K T, RAUGHT B. Getting to know the neighborhood: using proximity-dependent biotinylation to characterize protein complexes and map organelles [J]. Curr Opin Chem Biol, 2019, 48: 44-54.