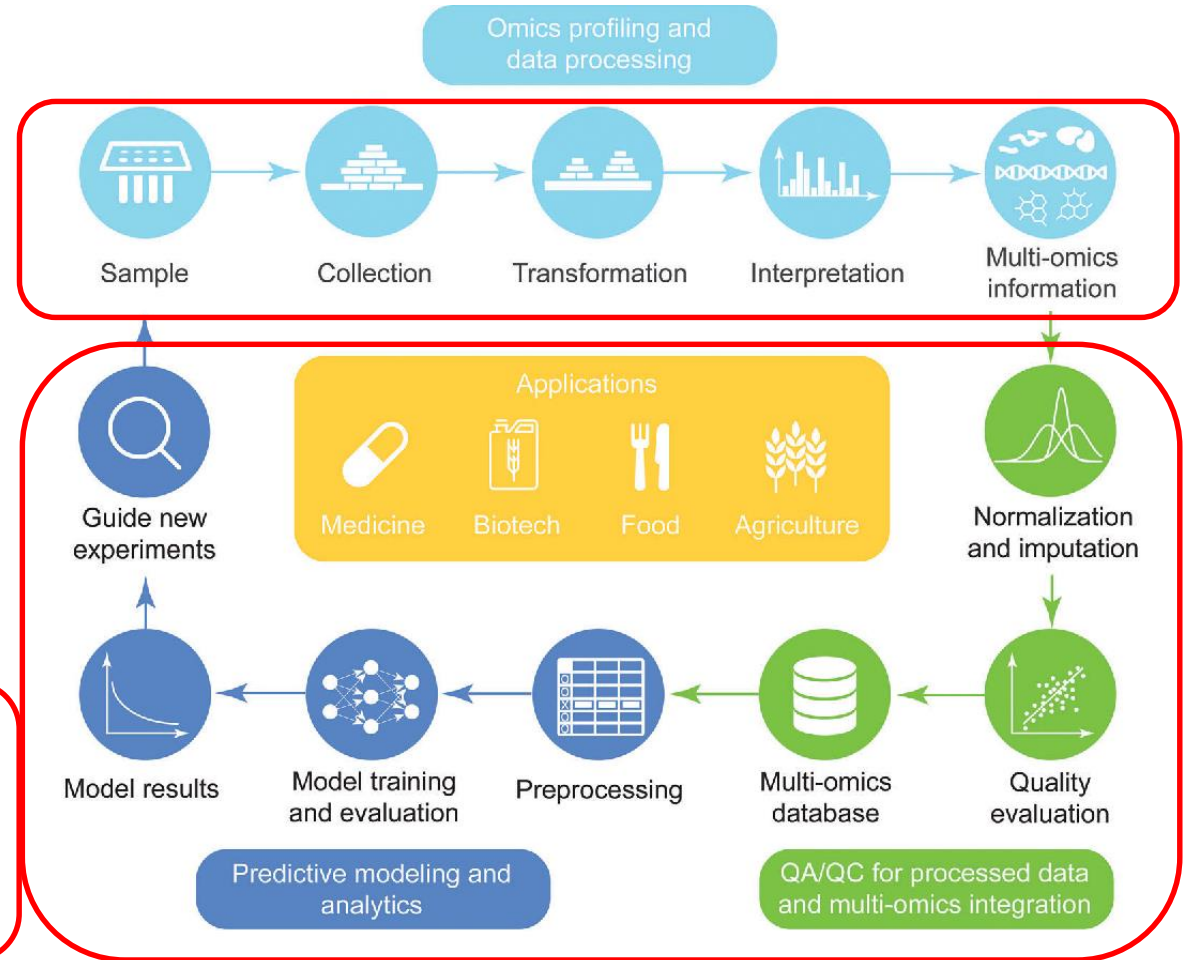
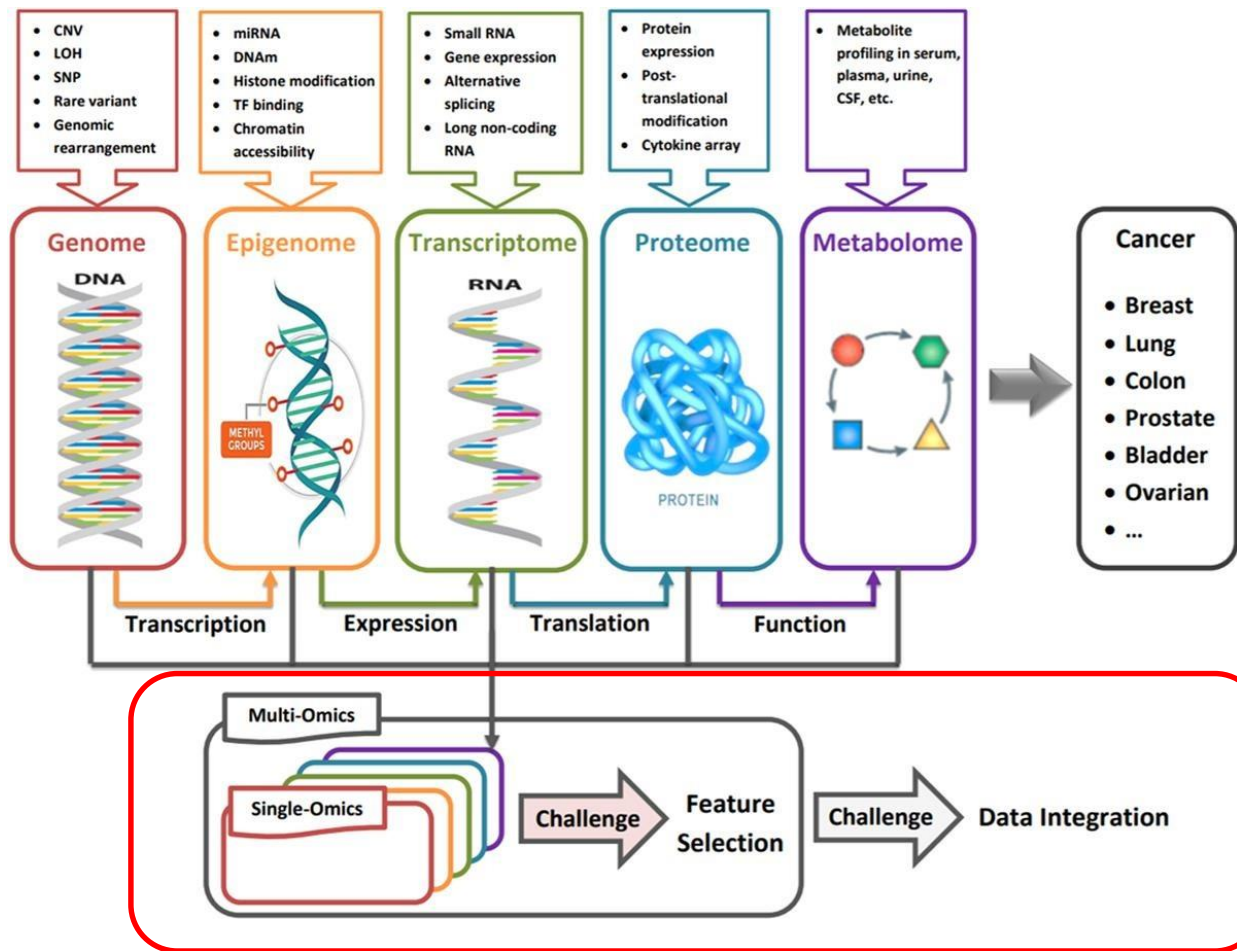


RNA-seq与空间组学的交互分析

设计思路与数据分析策略

多组学交互研究的趋势



经典的多组学研究策略

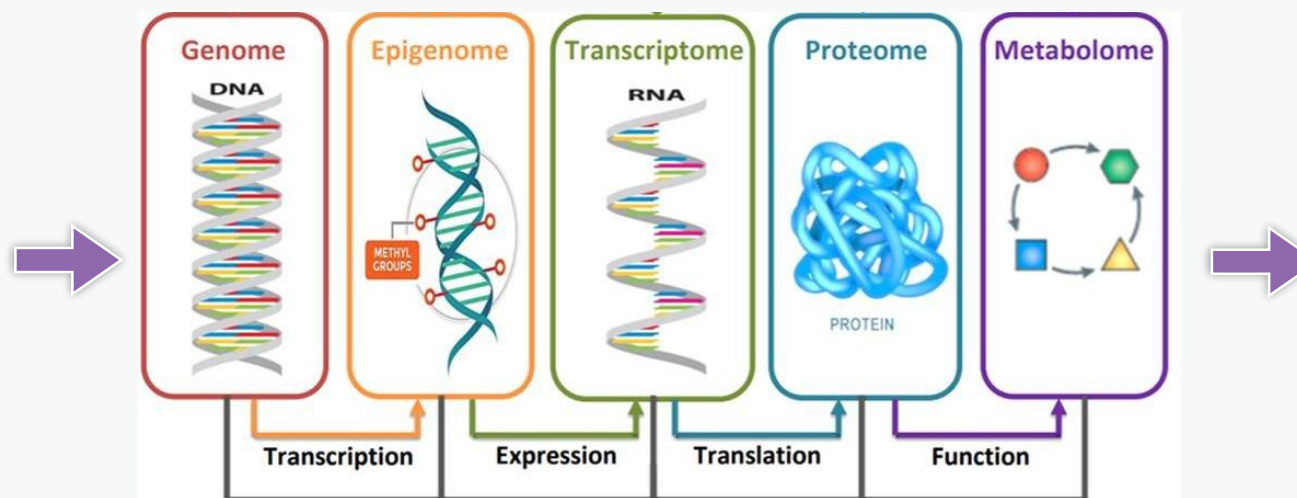
病人组织样本

外周血

外泌体

细胞模型

动物模型



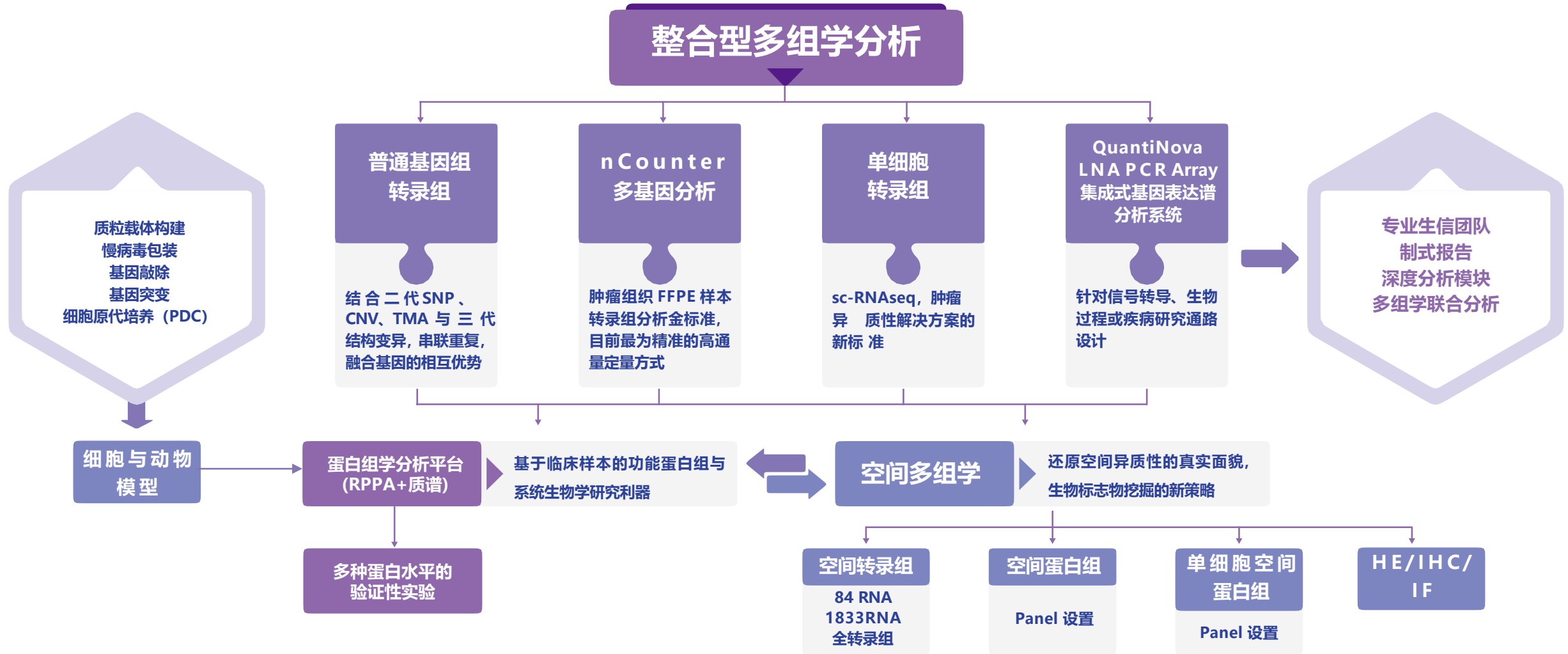
整合型多组学分析



蛋白组和空间组为核心的多组学研究策略



非因生物多组学研究策略



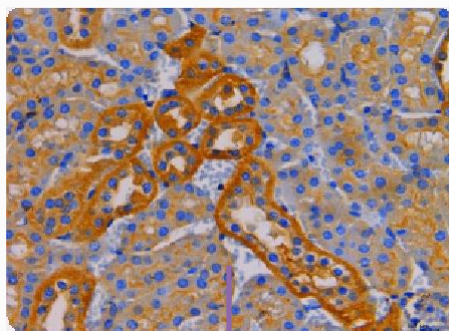
OUTLINE 目录

非因生物 专注癌症精准医疗 / 全球领先的蛋白组学 · 空间多组学技术平台

- 如何合理设计研究方案并最大化利用样本，开展空间多组学研究？
- 如何对多组学技术平台获得的数据进行集成分析，并有效进行验证？

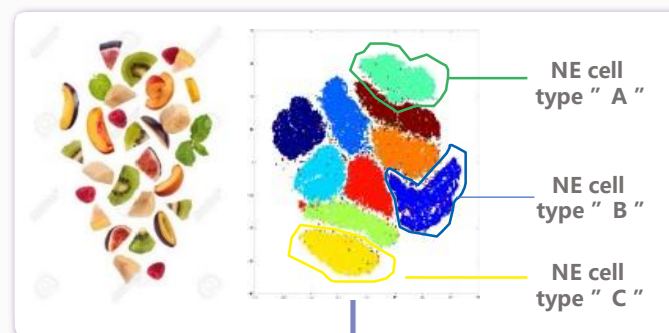
空间生物学的革命正在发生

探究微环境中组织结构、细胞亚型分布、特殊基因表达的重要性



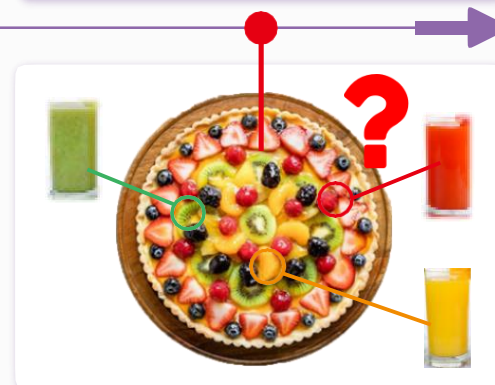
TCGA 和bulk组织
NGS 分析
2006 年至今

组织形态及功能
传统方式



单细胞测序，细胞分群
2012 年至今

组学结果如何与组织原位空间
信息对应起来进行验证？



数字化空间分析(DSP)技术的出现

nature biotechnology

Explore content ▾ About the journal ▾ Publish with us ▾ Subscribe

[nature](#) > [nature biotechnology](#) > [letters](#) > article

Letter | [Published: 11 May 2020](#)

Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue

[Christopher R. Merritt](#) , [Giang T. Ong](#), [Sarah E. Church](#), [Kristi Barker](#), [Patrick Danaher](#), [Gary Geiss](#), [Margaret Hoang](#), [Jaemyeong Jung](#), [Yan Liang](#), [Jill McKay-Fleisch](#), [Karen Nguyen](#), [Zach Norgaard](#), [Kristina Sorg](#), [Isaac Sprague](#), [Charles Warren](#), [Sarah Warren](#), [Philippa J. Webster](#), [Zoey Zhou](#), [Daniel R. Zollinger](#), [Dwayne L. Dunaway](#), [Gordon B. Mills](#) & [Joseph M. Beechem](#) 

[Nature Biotechnology](#) **38**, 586–599 (2020) | [Cite this article](#)

20k Accesses | 119 Citations | 133 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

Digital Spatial Profiling (DSP) is a method for highly multiplex spatial profiling of proteins or RNAs suitable for use on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples. The approach relies on (1) multiplexed readout of proteins or RNAs using oligonucleotide tags; (2) oligonucleotide tags attached to affinity reagents (antibodies or RNA probes) through a photocleavable (PC) linker; and (3) photocleaving light projected onto the tissue sample to release PC oligonucleotides in any spatial pattern across a region of interest (ROI) covering 1 to ~5,000 cells. DSP is capable of single-cell sensitivity within an ROI using the antibody readout, with RNA detection feasible down to ~600 individual mRNA transcripts. We show spatial profiling of up to 44 proteins and 96 genes (928 RNA probes) in lymphoid, colorectal tumor and autoimmune tissues by using the nCounter system and 1,412 genes (4,998 RNA probes) by using next-generation sequencing (NGS). DSP may be used to profile not only proteins and RNAs in biobanked samples but also immune markers in patient samples, with potential prognostic and predictive potential for clinical decision-making.



高维度分析与空间表达信息的解决方案

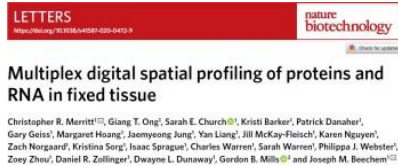
Gordon B. Mills



Dr. Joseph Beechem



Digital Spatial Profiler (DSP) 是一个全新的技术平台，Dr. Mills 是该项技术的共同发明人之一。它将传统的免疫荧光技术与数字可视化编码技术相结合，因此不仅能获得清晰的空间信息，而且可以做到多重蛋白/RNA靶标的检测。目前在单个样本中的检测上限能够达到 150 种蛋白 / 18000 种 RNA，很好的将空间信息及其他多组学数据结合起来，极大的帮助科研工作者来解读 肿瘤异质性及其复杂的微环境。

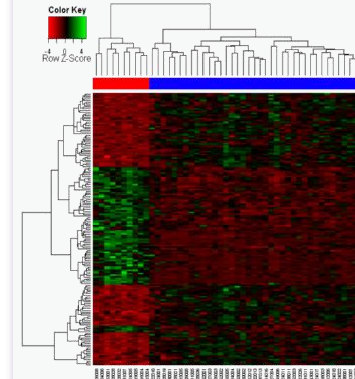


解决现有技术存在问题，可进行RNA - 蛋白共分析

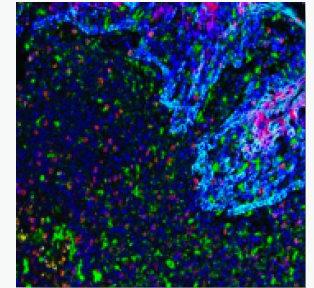
高维度表达谱分析

OR

低维度图像分析



- + 高维度 -
- 空间性 +
- + 定量性 -
- + 准确性 -



GEP:
Multi-plex PCR (bulk),
RNAseq (bulk),
Single-cell RNAseq,
PEP:
Flow Cytometry,
Mass cytometry,
DSP

IHC,
Immunofluorescence,
FISH

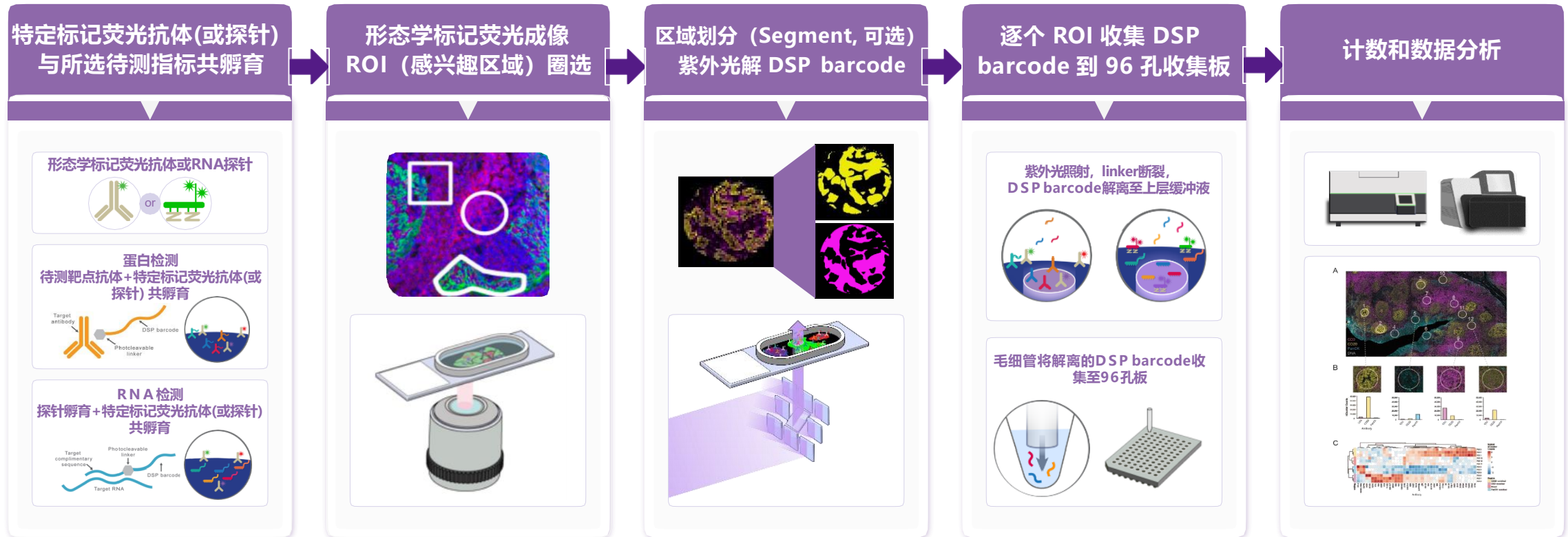
- 相对荧光强度定义的表达量，各个荧光基团的激发强弱差异
- 定量存在偏倚
- 自荧光

- 荧光信号交叠
- 多重靶标检测能力限制在30-40重(实操)



DSP技术原理及流程

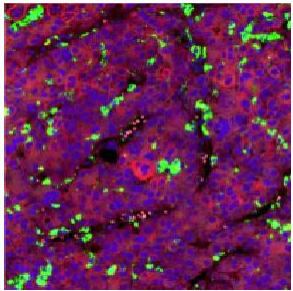
- 石蜡样本/冰冻切片/穿刺样本等多样本、珍贵样本策略
- 靶向检测, 对中低表达靶点友好
- 前处理简单, 无需优化, 视野区域广阔, 无需盲选
- 自动化程度高, 结果可重复性强



特殊光学技术助力灵活的ROI 选择和Masking 覆盖

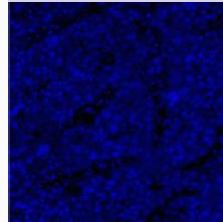
细胞亚群纯化策略

Full Channel Overlay

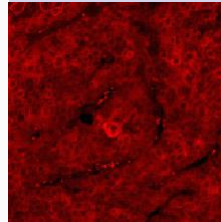


Single Channel (Mask)

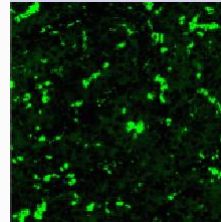
SYTO 13



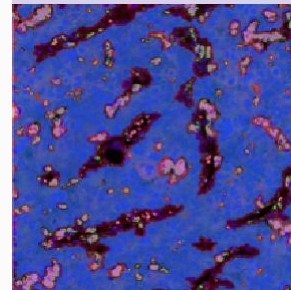
PanCK



CD68

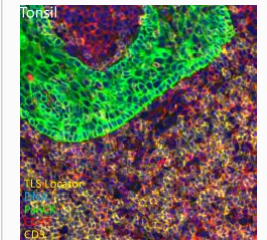
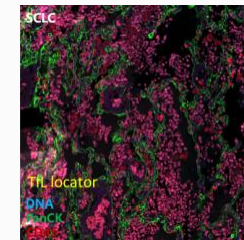
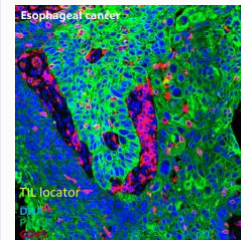
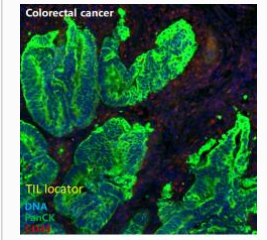
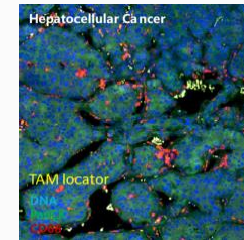
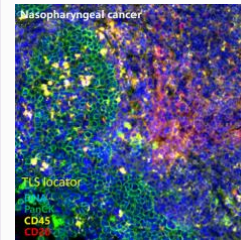
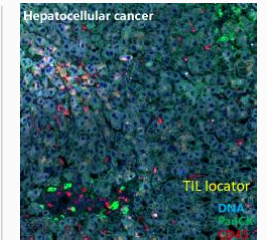
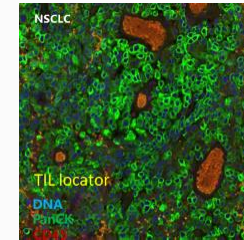
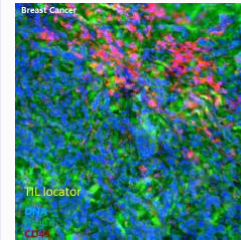


Segmentation



细胞亚群及特殊组织结构定位

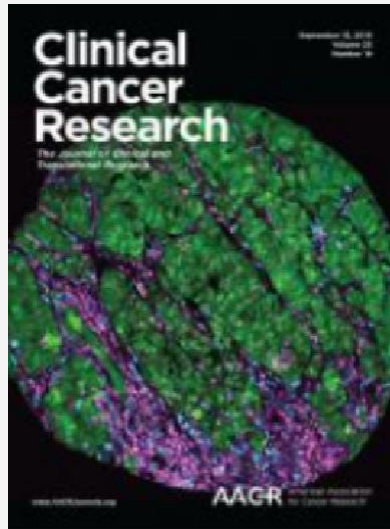
(TLS/TIL/TAM)



DSP技术的应用场景

01

免疫治疗分子标志物探索
(TMA)



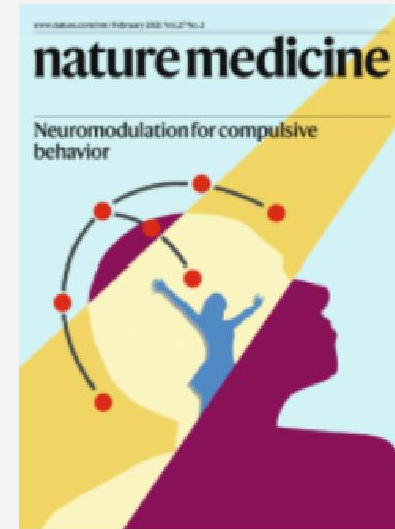
02

临床亚型肿瘤微环境表达
谱分析 (DSP+nCounter
)



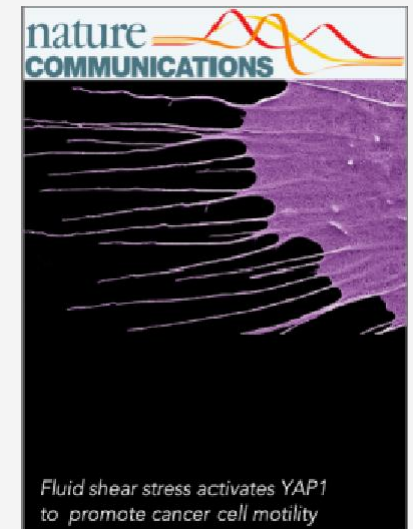
03

基于肿瘤微环境的机制探索
(DSP+scRNA-seq)



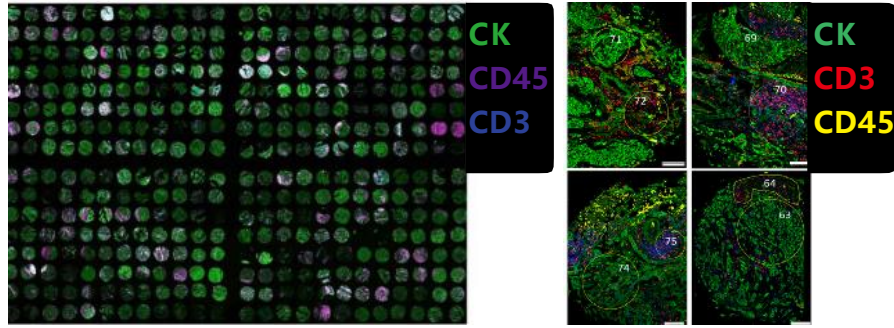
04

在肿瘤异质性评估及表型准
确分类的应用
(DSP+bulk RNA-seq)

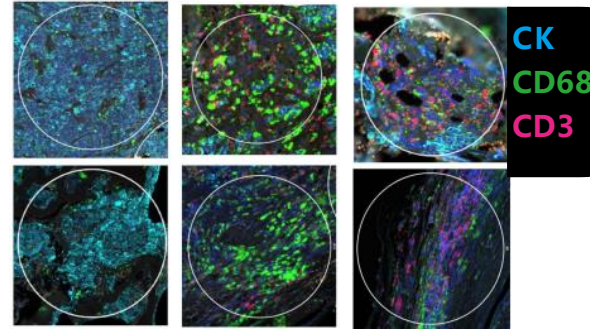


肿瘤微环境相关DSP染色解决方案

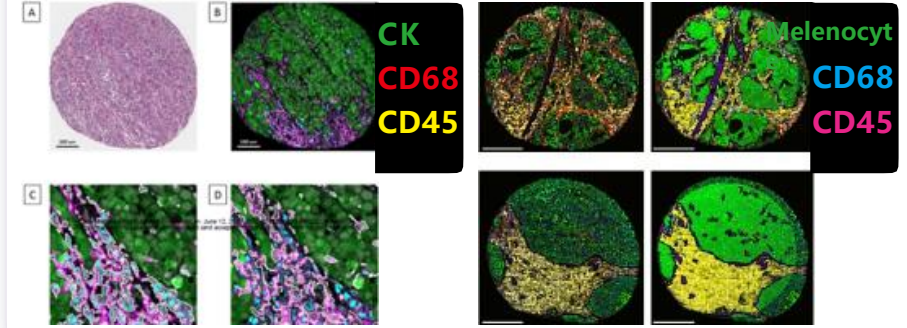
基于微环境的预后风险评估（定位肿瘤基质）



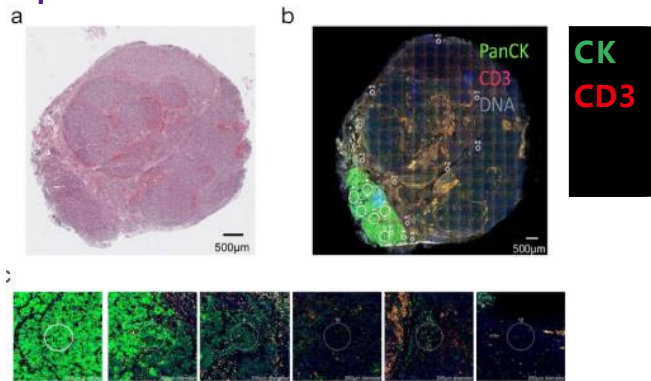
通路机制微环境挖掘



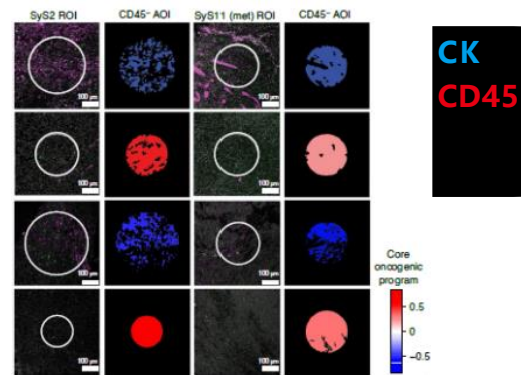
微环境药敏预前标志物探索



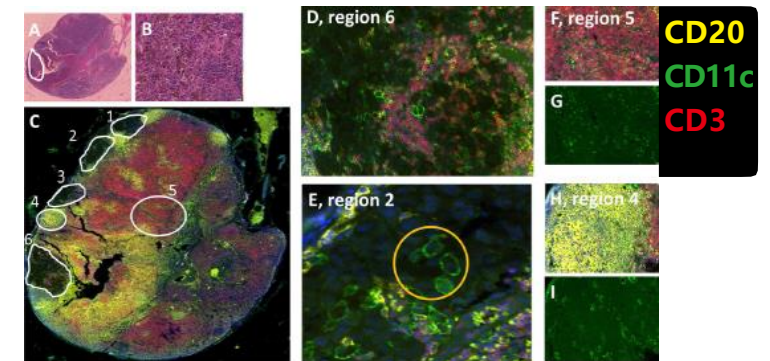
与基因组/bulk 转录组比对（定位肿瘤基质）



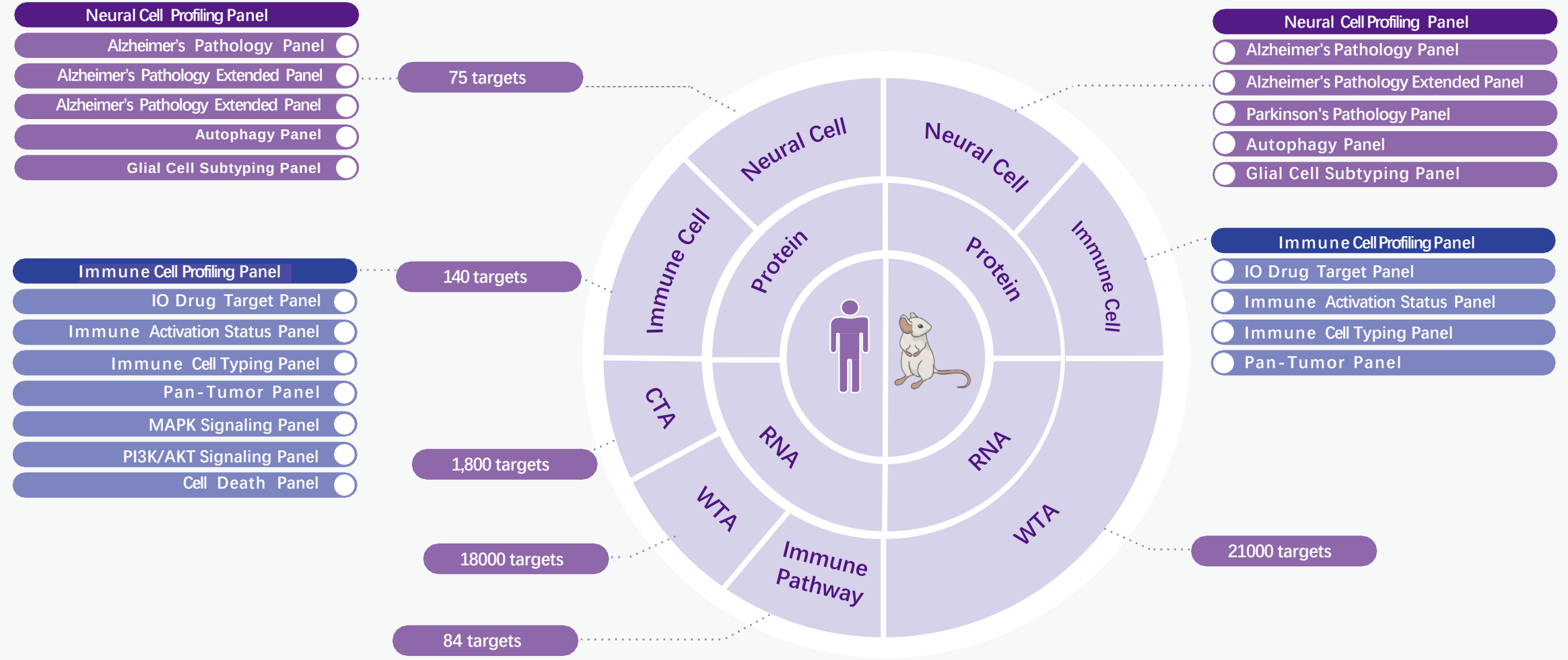
特定基因集微环境表达定位



Immune cell marker 标记表达谱



肿瘤微环境相关DSP检测panel 设置 (蛋白+RNA)



DSP在肿瘤微环境相关研究中的切入点

运用 DSP 作为探索性工具

CLINICAL CANCER RESEARCH

High-Plex Predictive Marker Discovery for Melanoma Immunotherapy-Treated Patients Using Digital Spatial Profiling

Wang, Y., Gou, Y., Li, H., et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* (2019) 7:289

nature cancer

Explore content · About the journal · Publish with us

Articles · Published: 08 April 2021

Spatial proteomic characterization of HER2-positive breast tumors through neoadjuvant therapy predicts response

Katharina J. Michon, et al. *Nature Cancer* (2021) 2:1-11

cancers

High-Plex and High-Throughput Digital Spatial Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)

James Monkman, et al. *Cancers* (2021) 13:1-11

CLINICAL CANCER RESEARCH

Biomarkers Associated with Beneficial PD-1 Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Identified Using High-Plex Digital Spatial Profiling

Wang, Y., Gou, Y., Li, H., et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* (2019) 7:289

ESMO

High multiplex analysis of the immune microenvironment in bone marrow trephine samples using GeoMx™ digital spatial profiling

R. M. Kralj, et al. *ESMO* (2021) 1-11

IOTEC

High multiplex analysis of the immune microenvironment in bone marrow trephine samples using GeoMx™ digital spatial profiling

R. M. Kralj, et al. *IOTEC* (2021) 1-11

运用 DSP 与高通量多组学数据进行整合

Journal for Immunotherapy of Cancer

Short Report · Open Access

Distinct tumor microenvironments of lytic and blastic bone metastases in prostate cancer patients

Qian L. He, et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* (2019) 7:289

JCI Insight

Immunologic alterations in the pancreatic cancer microenvironment of patients treated with neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy

Matthew R. Farnen, et al. *JCI Insight* (2021) 1-11

ARTICLE

Inter- and intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling

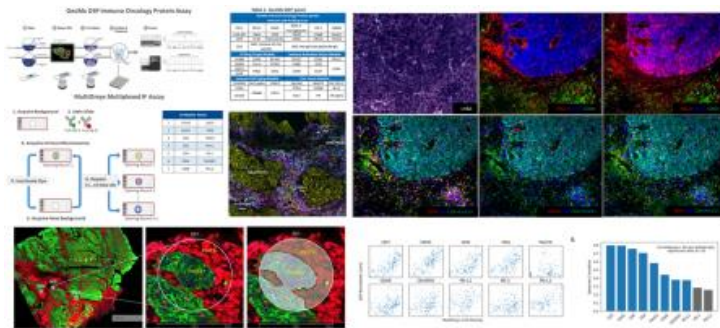
Lauren Brady, et al. *Journal for Immunotherapy of Cancer* (2019) 7:289

Open access

High dose-rate brachytherapy of localized prostate cancer converts tumors from cold to hot

Simon P. Kaam, et al. *Open access* (2021) 1-11

DSP 与单细胞空间组联合分析



运用 DSP 与单细胞测序交叉验证

nature medicine

Opposing immune and genetic mechanisms shape oncogenic programs in synovial sarcoma

Umar Jerby-Aron, et al. *Nature Medicine* (2021) 1-11

Cell

Onco-fetal Reprogramming of Endothelial Cells Drives Immunosuppressive Macrophages in Hepatocellular Carcinoma

Ankur Sharma, et al. *Cell* (2021) 1-11

Cell

Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer

Karin Polka, et al. *Cell* (2021) 1-11

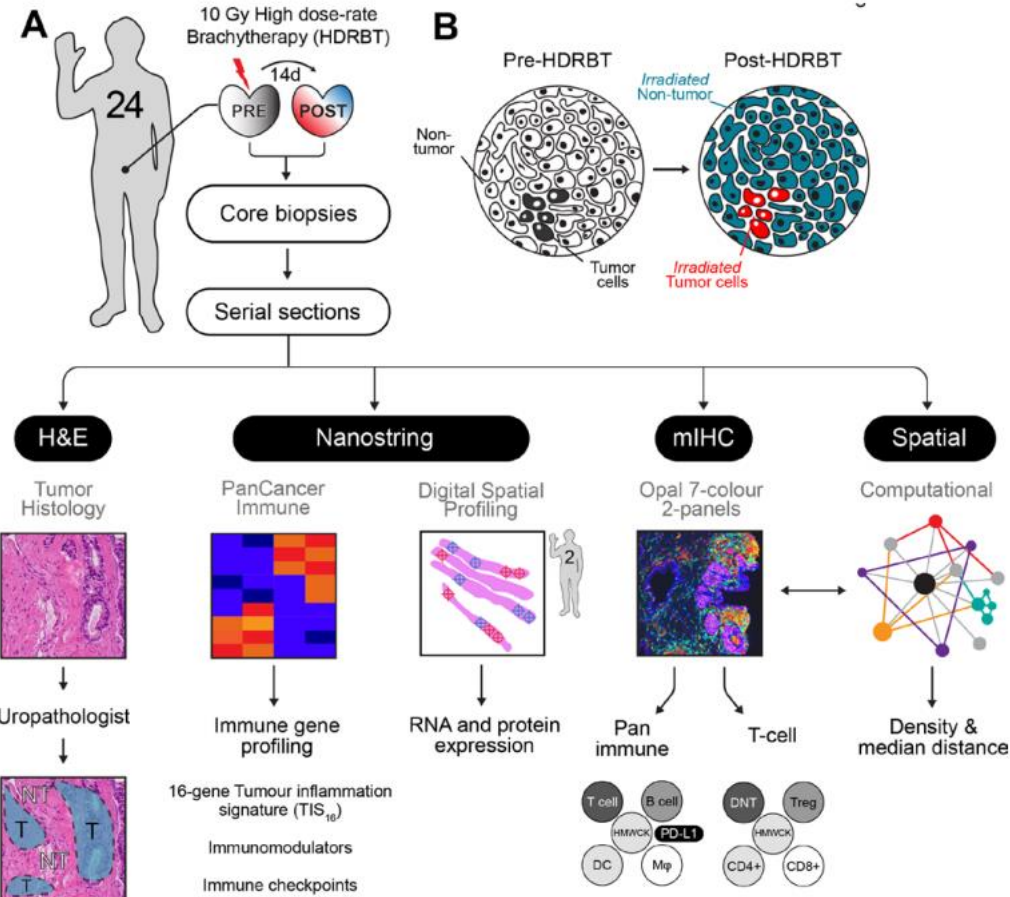
Article

Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma

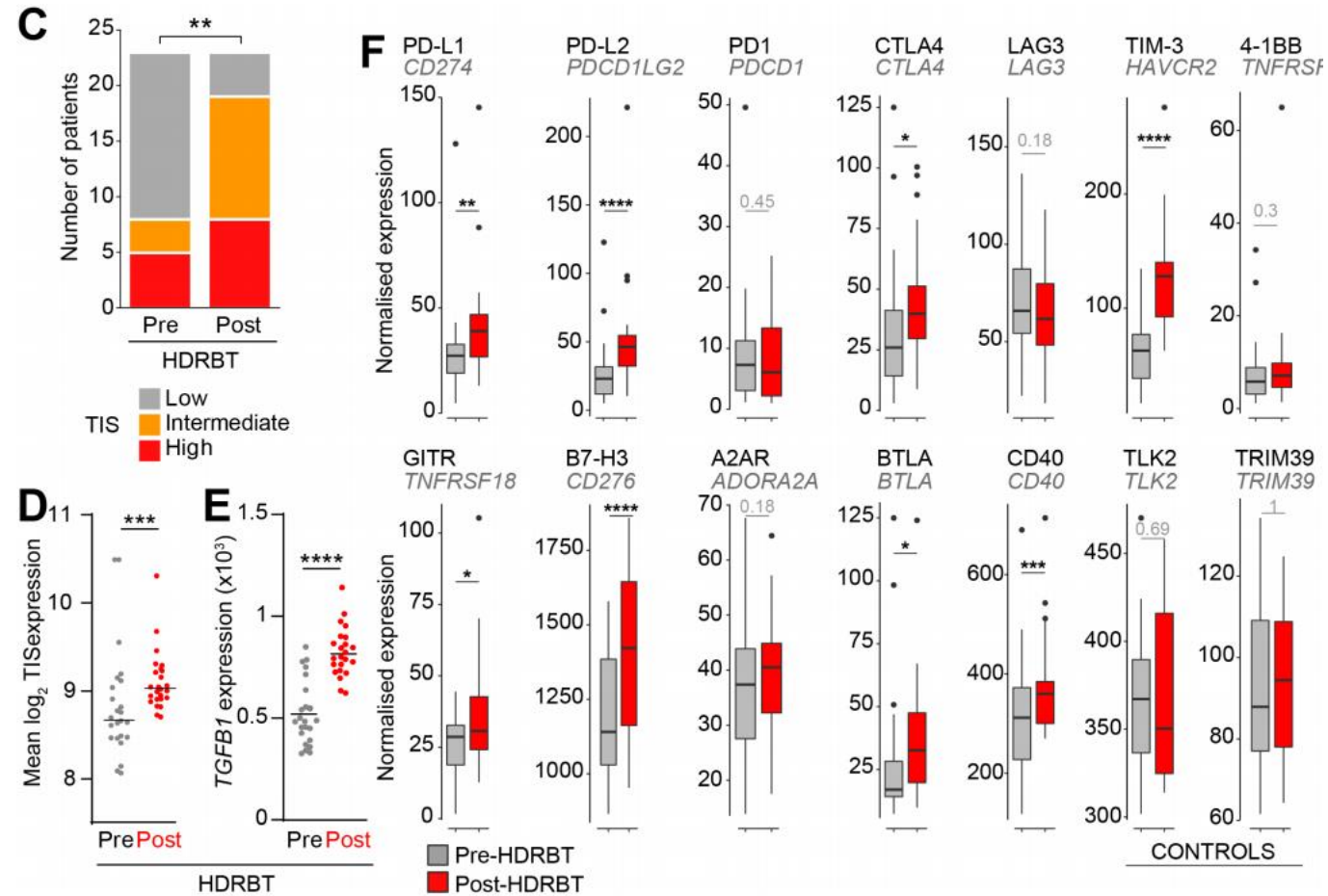
Wito Colotto, et al. *Article* (2021) 1-11



组织原位空间分析常见研究手段

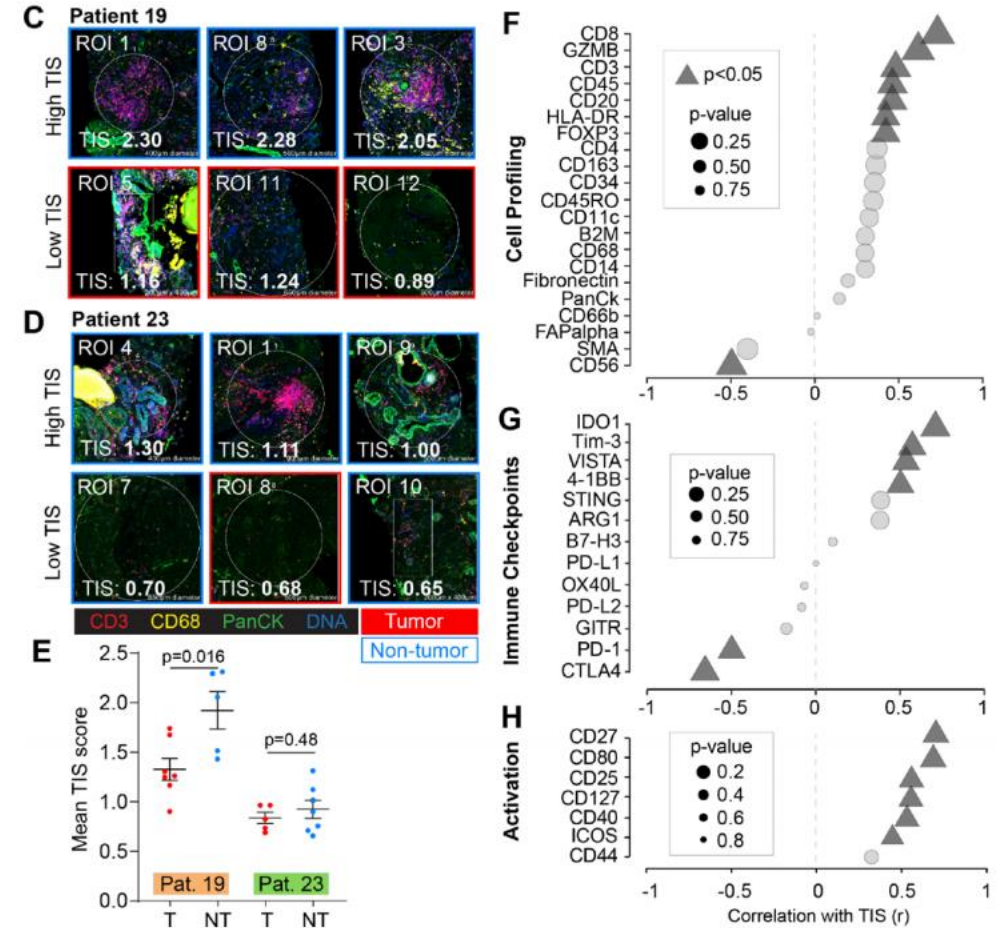
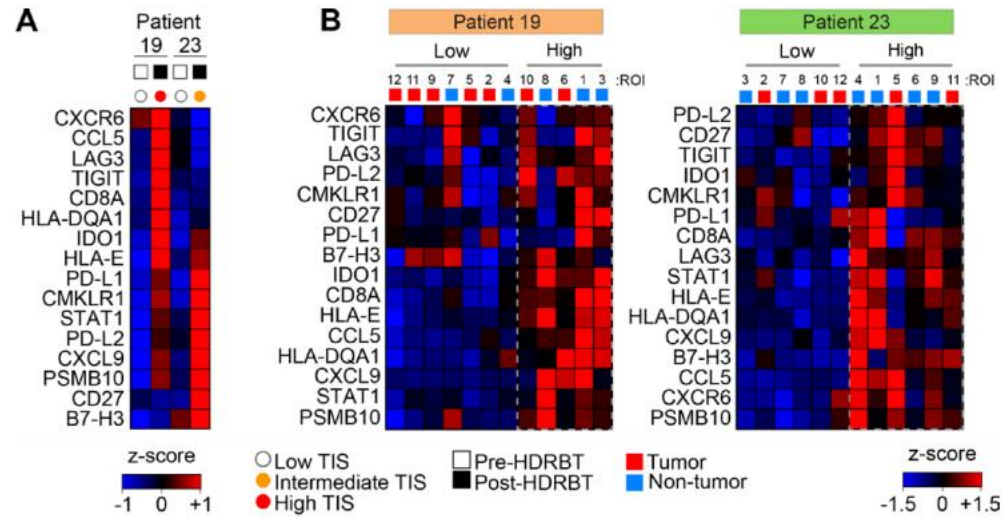


通过DSP技术对自定义的肿瘤免疫特征基因或蛋白集群进行聚类 and 分型



组织原位空间分析常见研究手段

通过DSP技术对不同患者的不同ROI区域的肿瘤免疫特征基因或蛋白集群进行聚类 and 分型



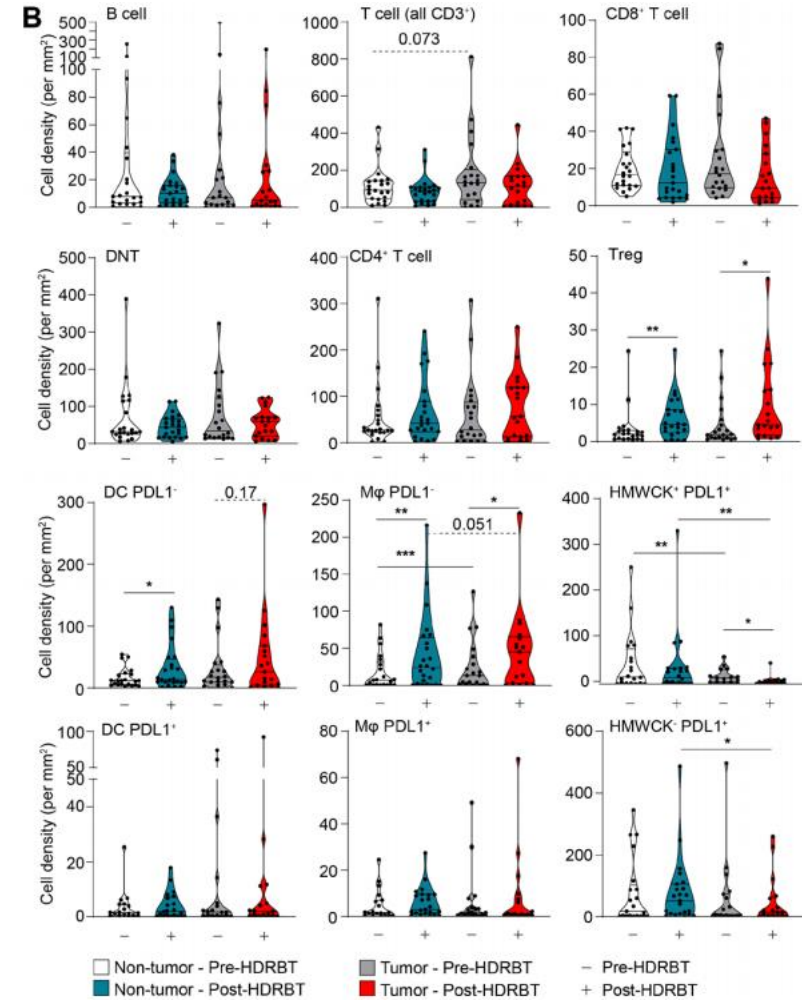
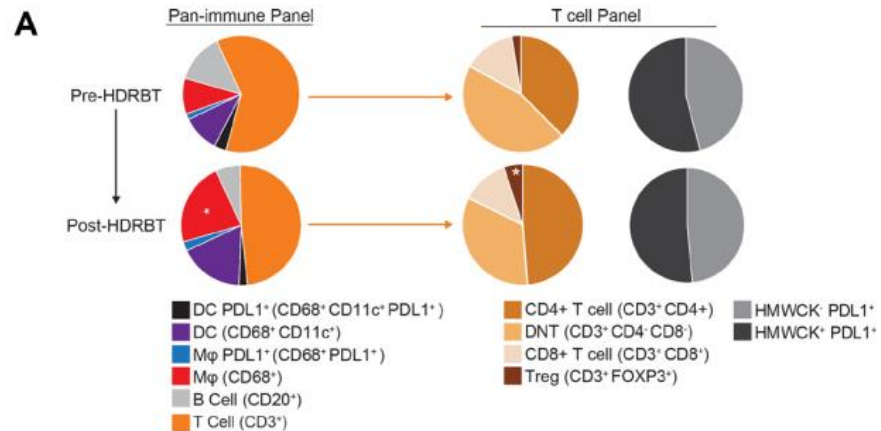
组织原位空间分析常见研究手段

通过mIHC技术对治疗前后的各类免疫细胞类型分布、密度进行分析

Table 2 Immune subsets assessed by multiplex IHC

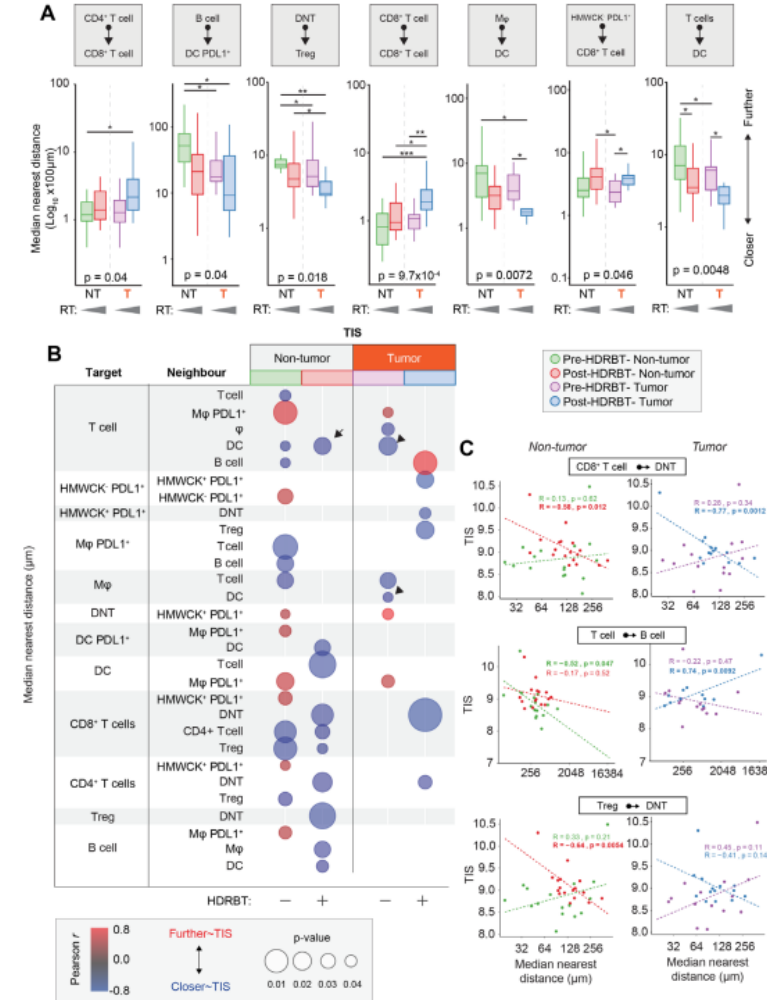
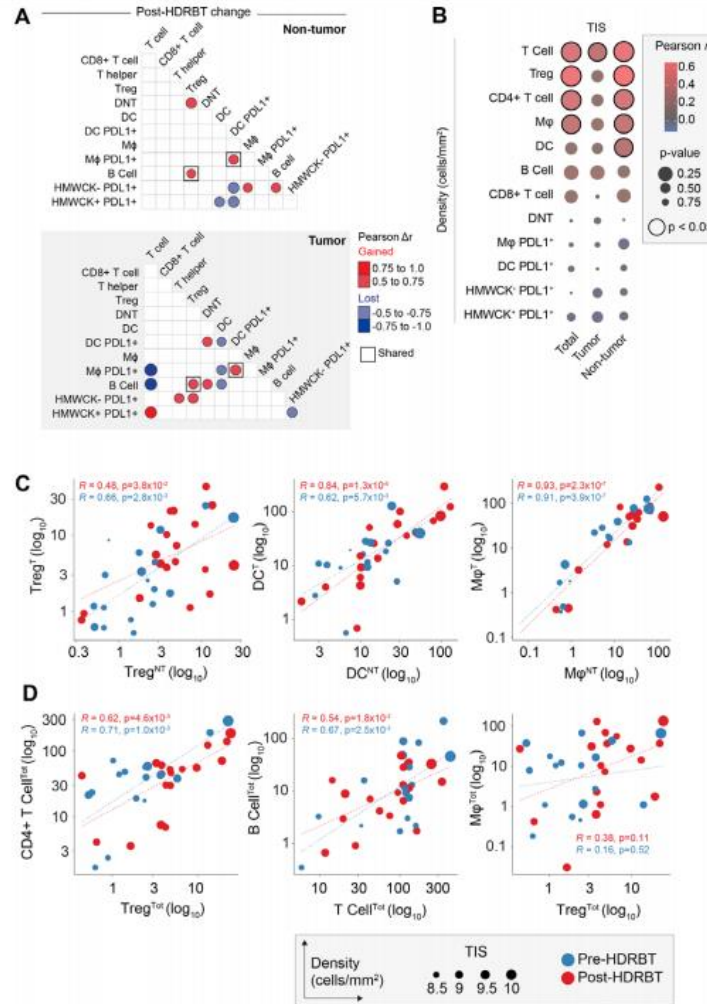
Marker expression	Panel	Cell subset	Abbreviation
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	T cell	T-helper	T-helper
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻	T cell	CD8 ⁺ T cells	CD8 ⁺ T cells
CD3 ⁺ CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	T cell	Regulatory T cell	Treg
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	T cell	Double negative T cell	DNT
CD3 ⁺	Pan immune	Pan T cell	T cell
CD20 ⁺	Pan immune	B cell	B cell
CD68 ⁺	Pan immune	Macrophage	φ
CD68 ⁺ CD11c ⁺	Pan immune	Dendritic cell	DC
CD68 ⁺ PDL1 ⁺	Pan immune	PDL1 ⁺ macrophage	φ ^{PDL1+}
CD68 ⁺ CD11c ⁺ PDL1 ⁺	Pan immune	PDL1 ⁺ dendritic cell	DC ^{PDL1+}
HMWCK ⁺ PDL1 ⁺	Pan immune	PDL1 ⁺ basal cells	HMWCK ⁺ PDL1 ⁺
HMWCK ⁻ PDL1 ⁺	Pan immune	PDL1 ⁺ nonbasal cells	HMWCK ⁻ PDL1 ⁺

IHC, immunohistochemistry.



组织原位空间分析常见研究手段

通过DSP技术分析获得**肿瘤免疫特征基因信息**与**mIHC**技术分析获得的**细胞密度与空间分布信息**，可以进行交互分析，获得两者与疾病治疗有关的相关性数据



OUTLINE 目录

非因生物 专注癌症精准医疗 / 全球领先的蛋白组学 · 空间多组学技术平台

研究模式一：从病理学分析入手的肿瘤内异质性与基质微环境研究策略

案例：从病理学分析入手的肿瘤内异质性与基质微环境研究策略

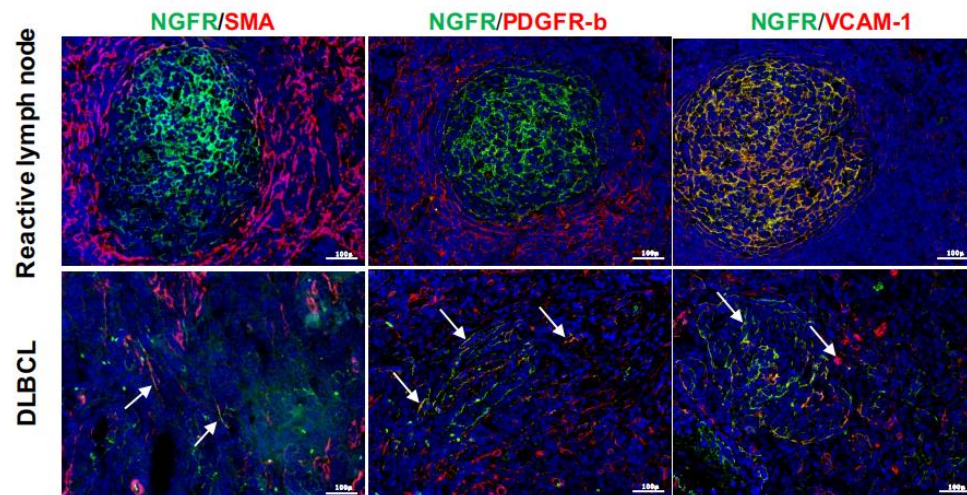
EBioMedicine 61 (2020) 103055



Research paper

Intra-tumour heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma involves the induction of diversified stroma-tumour interfaces

Sabina Sangaletti^{a,1}, Fabio Iannelli^{b,1}, Federica Zanardi^{b,1}, Valeria Cancila^c, Paola Portararo^a, Laura Botti^a, Davide Vacca^c, Claudia Chiodoni^a, Arianna Di Napoli^d, Cesare Valenti^e, Celeste Rizzello^a, Maria Carmela Vegliante^f, Federica Pisati^g, Alessandro Gulino^c, Maurilio Ponzoni^h, Mario Paolo Colombo^{a,1,*}, Claudio Tripodo^{c,g,1,**}



研究背景：

淋巴样恶性肿瘤的肿瘤内异质性包括基因组不稳定性事件(如MYC, BCL2, 和/或BCL6异位)的发生和转录程序的表观遗传调控。侵袭克隆相关的肿瘤细胞群在不同的组织微环境中不稳定地受到免疫编辑和代谢适应的影响。

科学问题：

组织特异性间充质细胞如何影响侵袭性淋巴瘤克隆的多样化？不同组织微环境是否影响肿瘤内异质性的发生？

实验模型：

肿瘤转移小鼠模型、细胞共培养模型

样本类型：

石蜡包埋组织切片，新鲜组织、培养细胞

技术方法：

原位定量免疫表型分析(包括DSP技术、多重免疫荧光)、bulk RNA测序



案例：从病理学分析入手的肿瘤内异质性与基质微环境研究策略

EBioMedicine 61 (2020) 103055



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

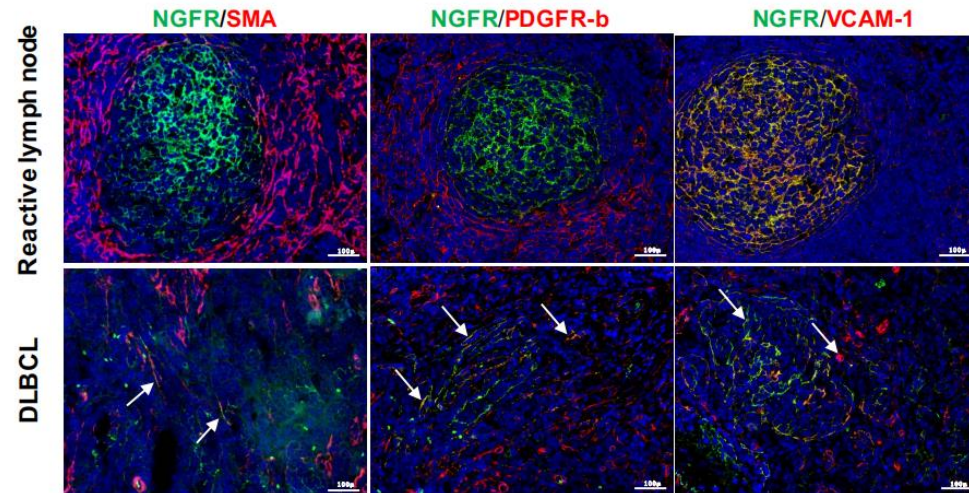
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom



Research paper

Intra-tumour heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma involves the induction of diversified stroma-tumour interfaces

Sabina Sangaletti^{a,1}, Fabio Iannelli^{b,1}, Federica Zanardi^{b,1}, Valeria Cancila^c, Paola Portararo^a, Laura Botti^a, Davide Vacca^c, Claudia Chiodoni^a, Arianna Di Napoli^d, Cesare Valenti^e, Celeste Rizzello^a, Maria Carmela Vegliante^f, Federica Pisati^g, Alessandro Gulino^c, Maurilio Ponzoni^h, Mario Paolo Colombo^{a,1,*}, Claudio Tripodo^{c,g,1,**}



通过构建肿瘤转移动物模型，分别对转移组织进行 HE 染色，分析了 A20 淋巴瘤细胞系在不同组织转移部位的转移灶形态学和表型异质性



运用多重 IHC染色技术对组织不同区域内 A20 浸润的间充质网状异质性进行分析



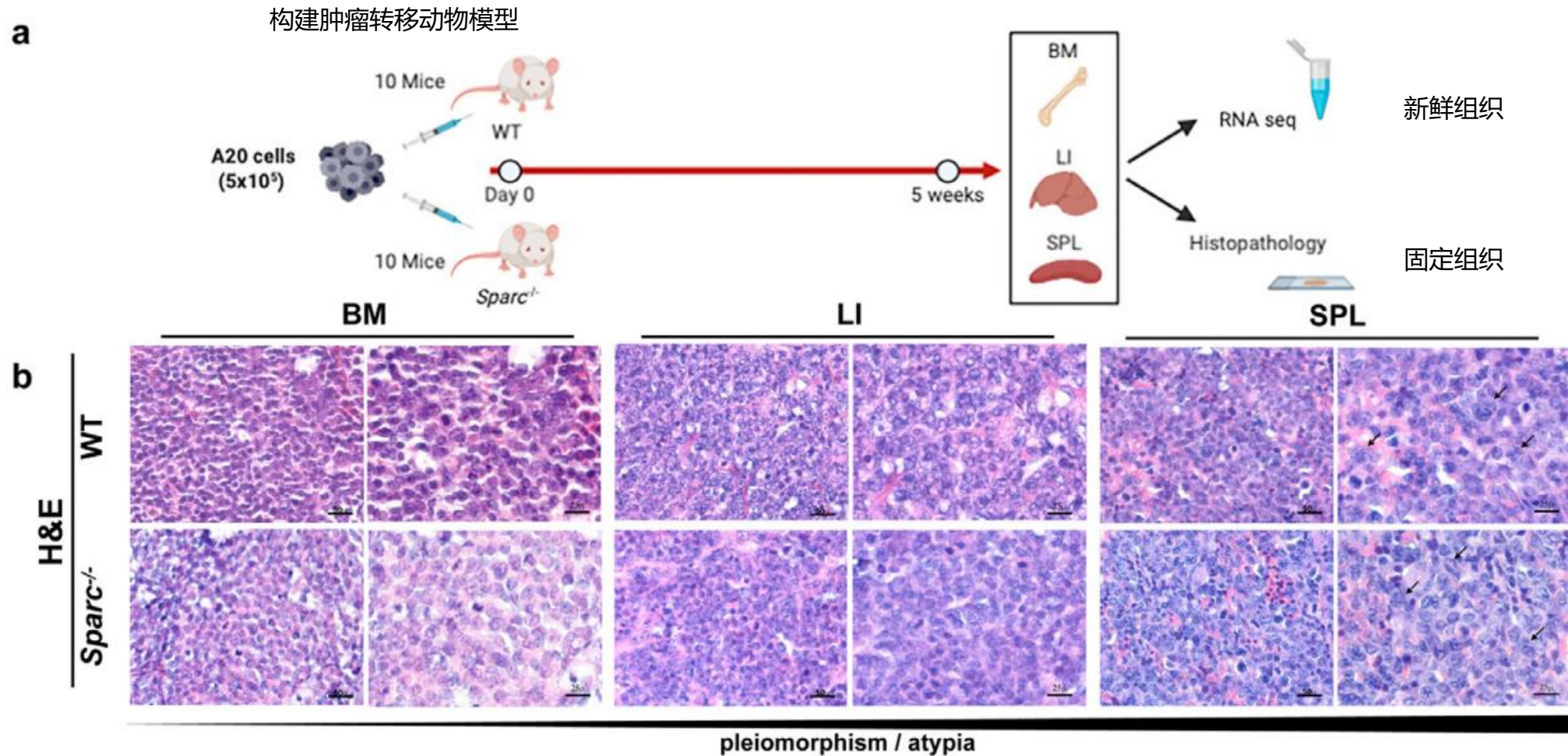
通过 RNA-seq 技术对组织进行转录组信息分析，不同基质的微环境中观察 A20 淋巴瘤转录程序的异质性



运用 DSP 技术针对 8 例患者进行了 87 个基因分析，针对 B 细胞 (CD20、青色)、神经生长因子受体 NGFR (CD271、红色)、平滑肌肌动蛋白 (SMA, 绿色)、Syto83 (蓝色) 荧光标记，分析了富含神经生长因子受体和平滑肌动蛋白的间充质病灶，突出了人淋巴瘤的免疫和基质病灶内异质性



阶段一：构建动物模型及取材，进行RNA-seq及病理学分析



应用 HE 和 原位定量 Ki-67 的 IHC 析了 A20 细胞系表现出形态学和表型异质性，观察到 BM LI 和 SPL 浸润之间具有相当程度的形态变化，其中 SPL 淋巴瘤显示出最高程度的多态性和非典型性。

阶段一：病理相关单指标染色分析

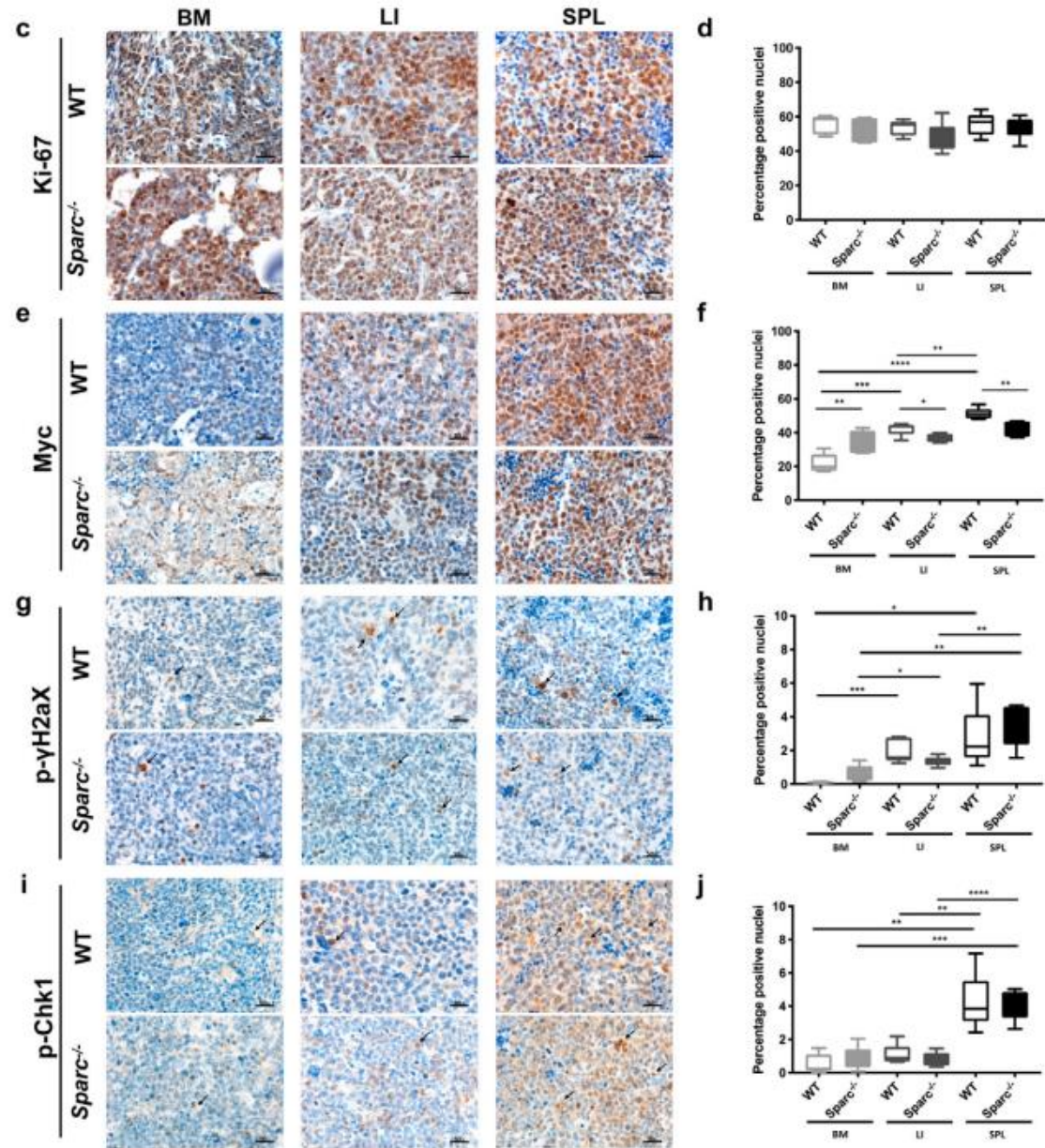
在不同浸润组织当中分析A20细胞的增殖状态标志及DNA损伤标志，发现有不同程度的表达差异。

在所有3个组织当中WT和Sparc^{-/-}组的A20细胞Ki67染色差异不大；

Myc在SPL浸润A20细胞中表达显著升高，高于LI和BM，WT组上升趋势趋势较Sparc^{-/-}组要更明显；

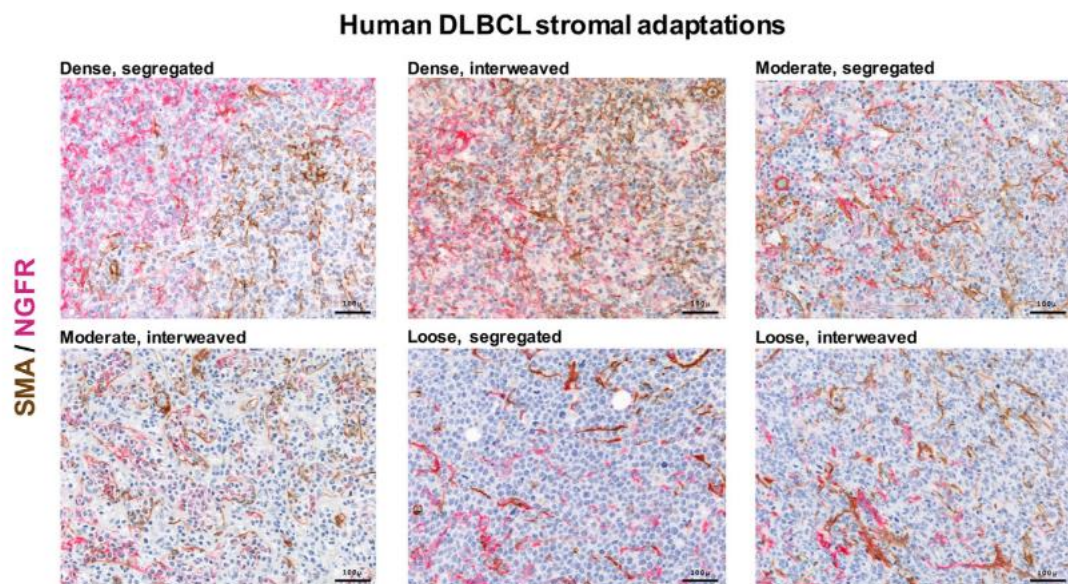
DNA损伤标志p-γH2aX和p-Chk1，在SPL浸润A20细胞中表达相对更高，高于LI和BM浸润A20细胞中的表达强度；

DNA损伤标志p-γH2aX和p-Chk1，在LI和SPL浸润WT组A20细胞中的表达强度要高于Sparc^{-/-}组，但在BM浸润WT组A20细胞中的表达强度要略低于Sparc^{-/-}组。



阶段二：肿瘤微环境相关细胞空间分布及构成分析

a



基于观察到的A20淋巴瘤的形态学和表型异质性，作者研究了宿主组织相关的特征是否与上述三种微环境的异质性有关。利用SMA和NGFR双标的 IHC 测试了宿主组织对 A20 淋巴瘤接种的适应性，结果表明，对DLBCL 浸润的不同基质适应性为恶性克隆表型的多样化提供了微环境基础。

SMA+：肌成纤维细胞/网状细胞标志物

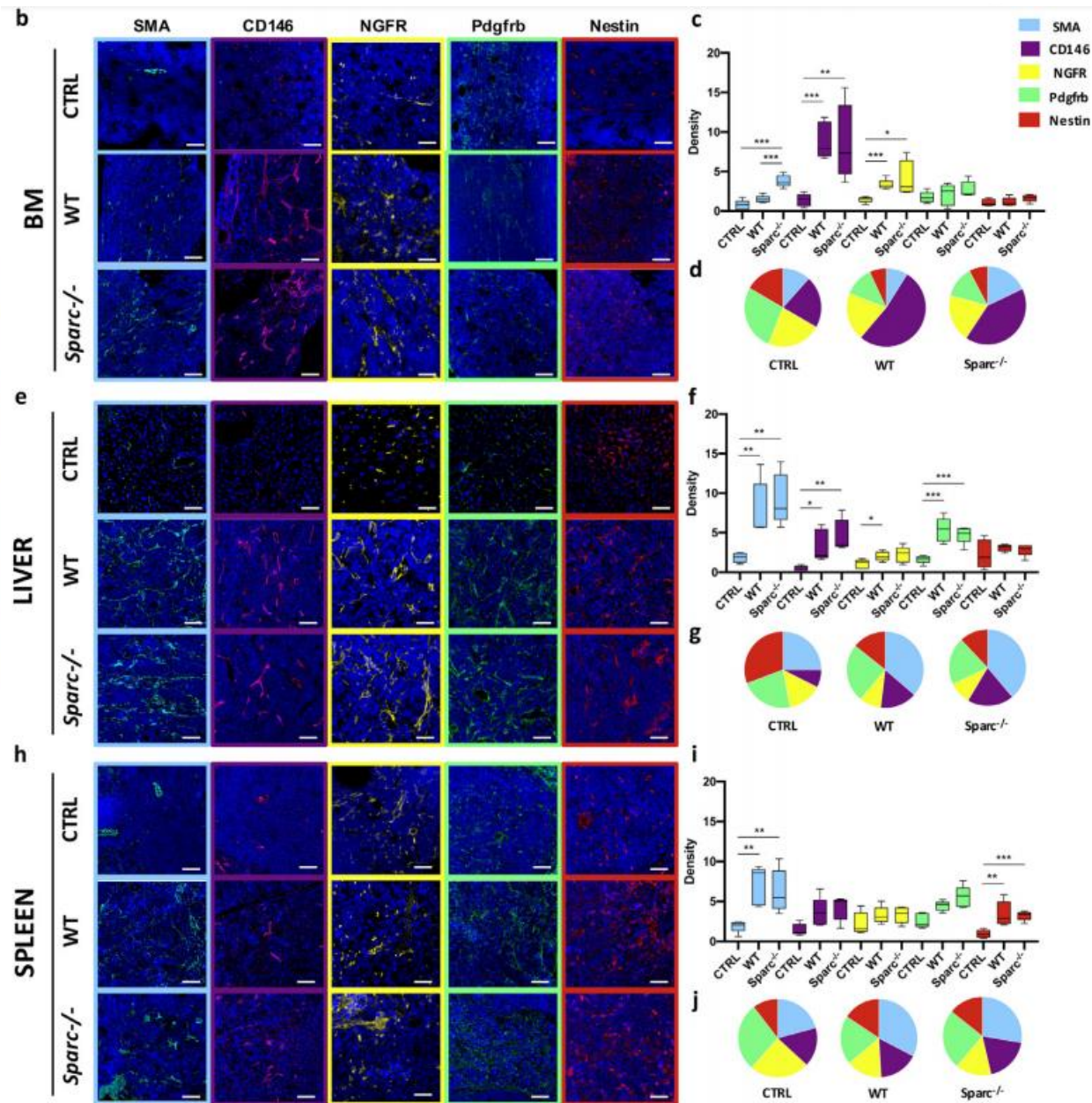
NGFR+：滤泡树突细胞(Follicular dendritic cells, FDC)细胞标志物

CD146+：周细胞/间充质间质细胞标志物

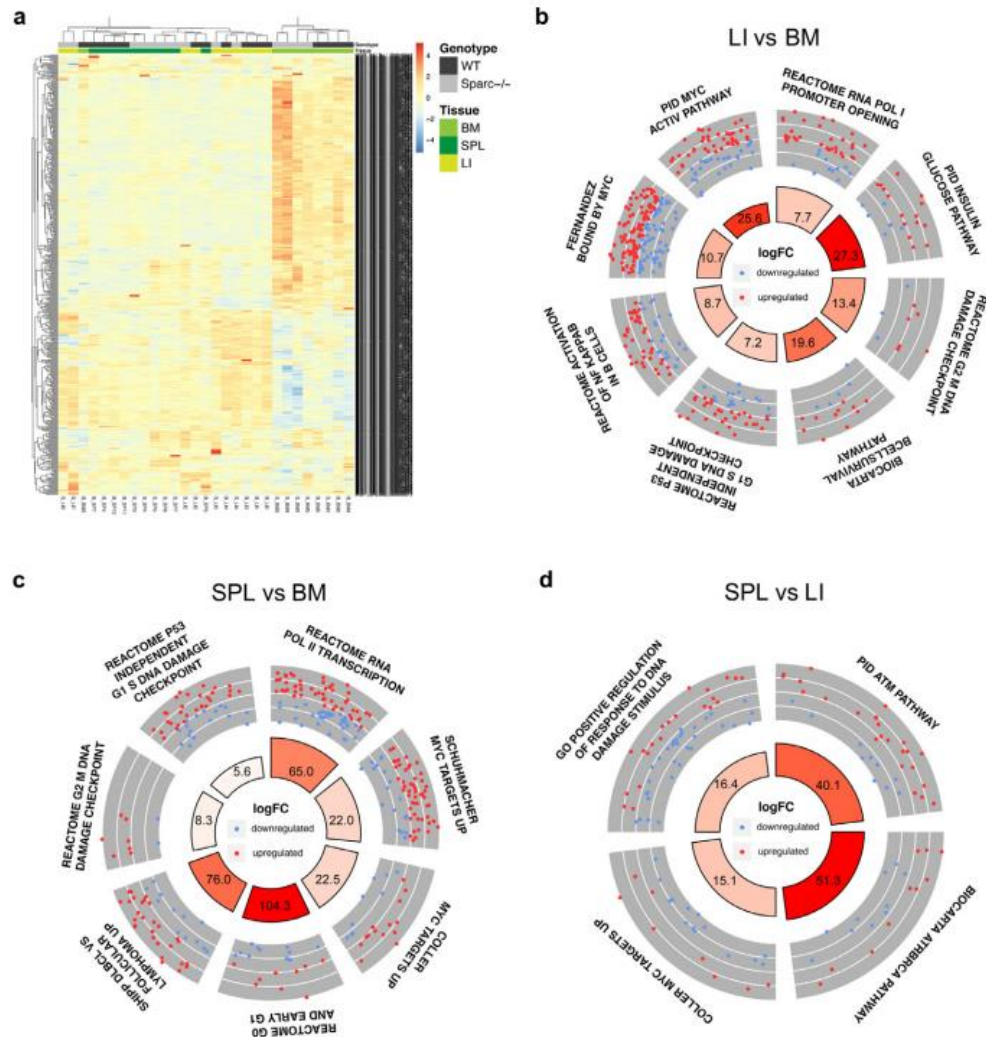
PDGFR β +：血管周围间质细胞标志物

Nestin：骨髓来源的间充质干细胞标志物

b



阶段三：转移灶肿瘤细胞表达谱聚类分析

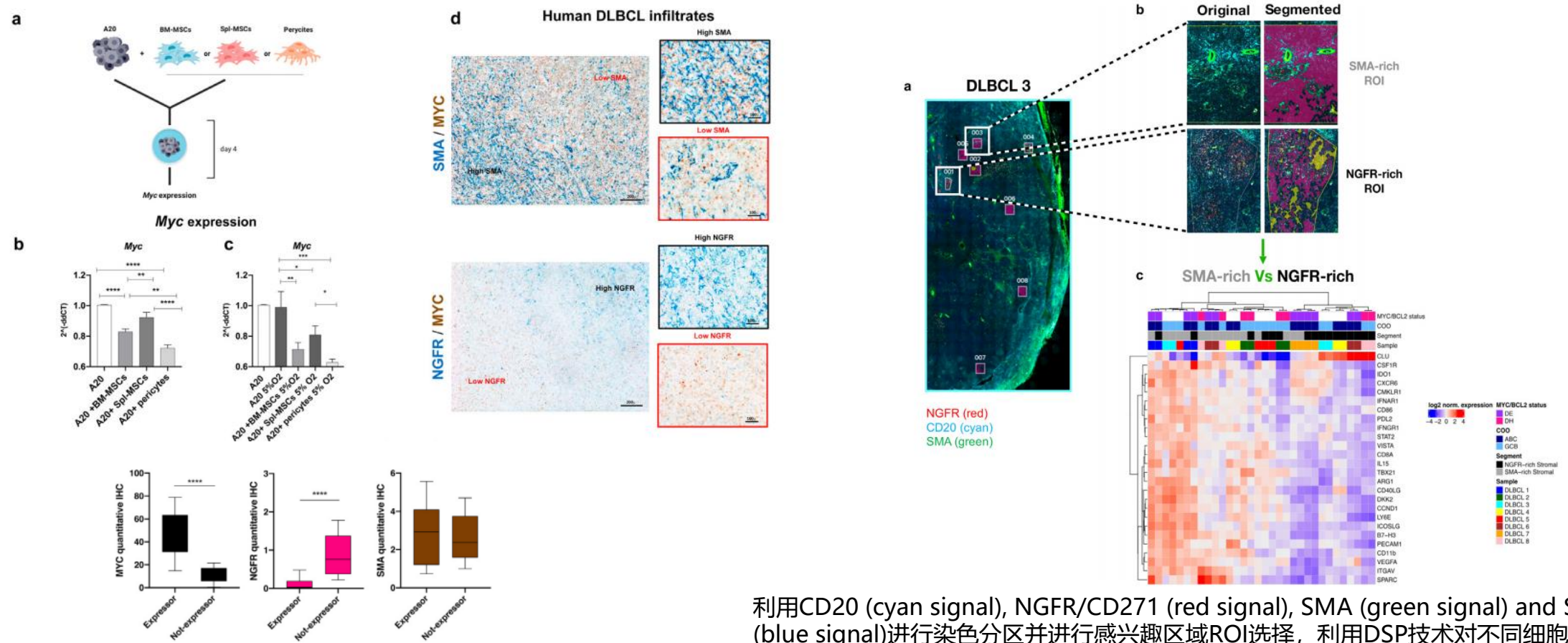


通过 RNA-seq 技术对组织进行转录组信息分析，结果表明 比较LI和BM浸润的A20淋巴瘤细胞的转录谱在与代谢和转录相关的程序的表达中显示出差异，特别是与B细胞存活、Nf-KB在B细胞中的激活以及与DNA损伤检查点相关的基因在LI组富集明显。

同样，比较在SPL和BM或SPL和LI浸润的A20细胞转录组之间，发现了在涉及转录和DNA损伤的通路中存在显著的有效富集；

上述结果表明，多样化的组织微环境印记影响了A20淋巴瘤细胞的转录活性。

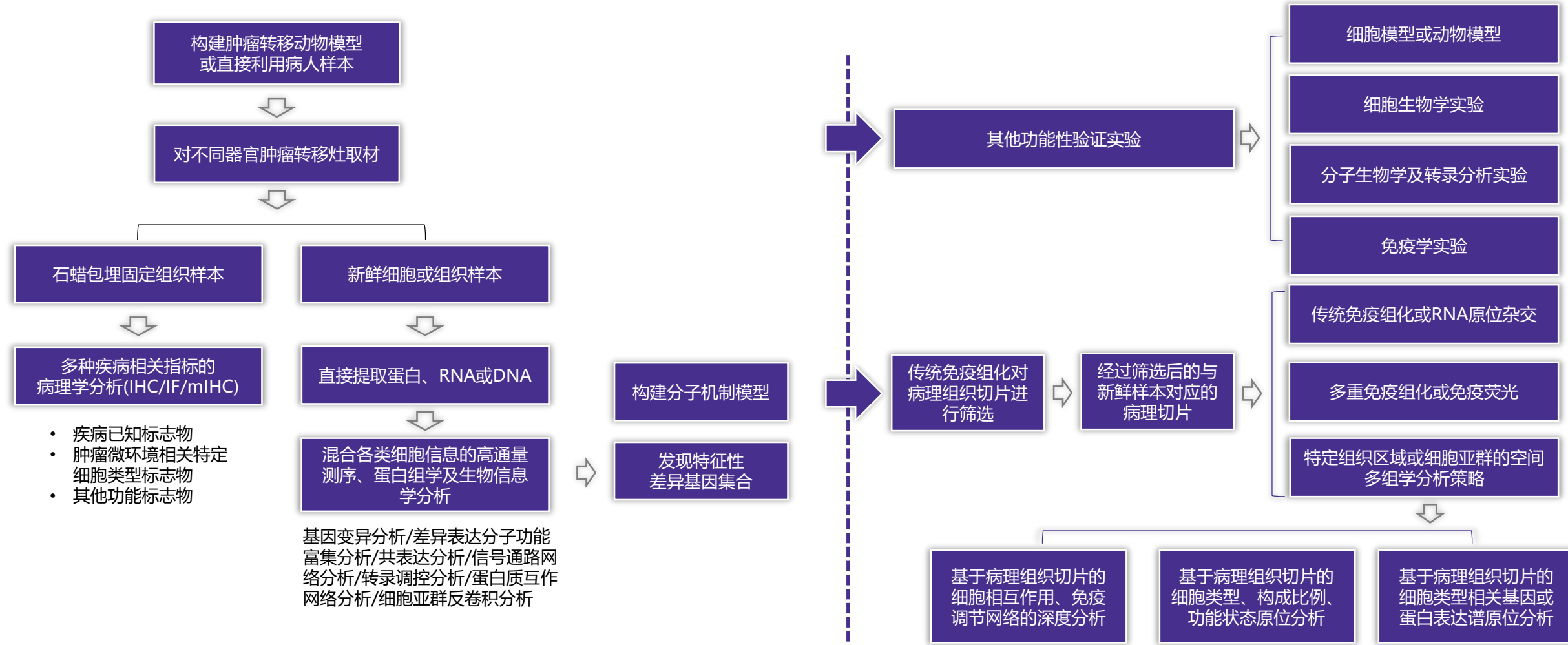
阶段四：利用细胞共培养模型及DSP技术进行肿瘤微环境空间异质性验证分析



利用A20同不同间质细胞类型进行共培养模型以及利用人DLBCL浸润的淋巴结组织切片，对MYC与间质标志物SMA或NGFR分别进行共染色，发现不同的间充质环境与Myc调节和空间异质性相关。

利用CD20 (cyan signal), NGFR/CD271 (red signal), SMA (green signal) and Syto83 (blue signal)进行染色分区并进行感兴趣区域ROI选择，利用DSP技术对不同细胞来源(COO)和不同MYC/BCL2状态的8个DLBCL病人组织切片当中SMA和NGFR富集区域的87个自定义免疫和间质相关基因Panel进行表达谱差异分析，分析后进行无监督的层次结构聚类，显示了26个差异表达基因的分布。与富含NGFR的ROI区域相比，富含SMA的基质ROI区域当中，免疫调节分子和血管间质相关转录本更加富集。

从病理学分析入手的研究策略总结



OUTLINE 目录

非因生物 专注癌症精准医疗 / 全球领先的蛋白组学 · 空间多组学技术平台

研究模式二：从肿瘤微环境结构主要细胞亚群分析入手的研究策略

案例2：从肿瘤微环境结构主要细胞亚群分析入手的研究策略

研究背景：

弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)是一种高度异质性的肿瘤，包括GC（表达生发中心(GC)B细胞标记物）亚型和非GC亚型(缺乏GC转运的迹象)。前期研究已经表明，GC和非GC-DLBCL的区别在于遗传、表观遗传以及转录和表型差异，这些差异共同影响临床病程、过程诊断和治疗反应。

早期的组织学观察，基于形态学标准将生发中心(GC)B细胞分为两种细胞类型：成中心细胞(centroblasts)和中心细胞(centrocytes)两种类型。一个富含中心细胞(centrocytes)的亮区(LZ)，近端至淋巴结包膜或脾脏红髓；和富含成中心细胞(centroblasts)的暗区(DZ)。

其中，利用流式细胞术，CD83或CD86与CXCR4共同染色，定义了2个GC细胞亚群对应于解剖学定义的LZ和DZ细胞类群。

科学问题：

生发中心DZ和LZ这两种截然不同的微环境中B细胞/基质界面转录特征有何差异？

实验模型：

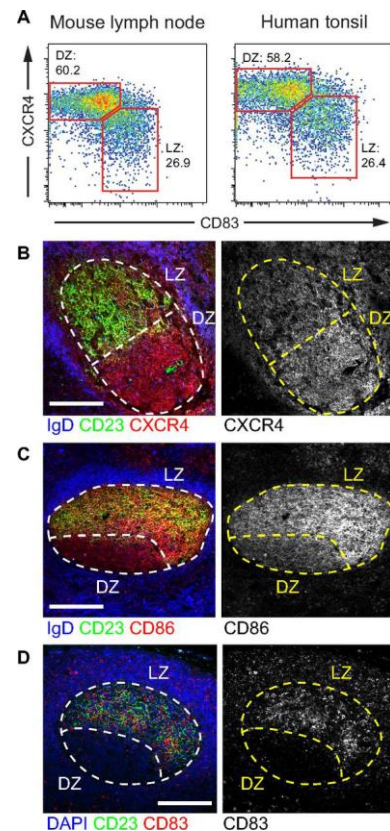
无

样本类型：石蜡包埋正常淋巴结固定组织

调用数据：临床病人肿瘤组织样本转录组数据集

技术方法：

流式细胞术、原位定量免疫表型分析(包括DSP技术、多重免疫荧光)



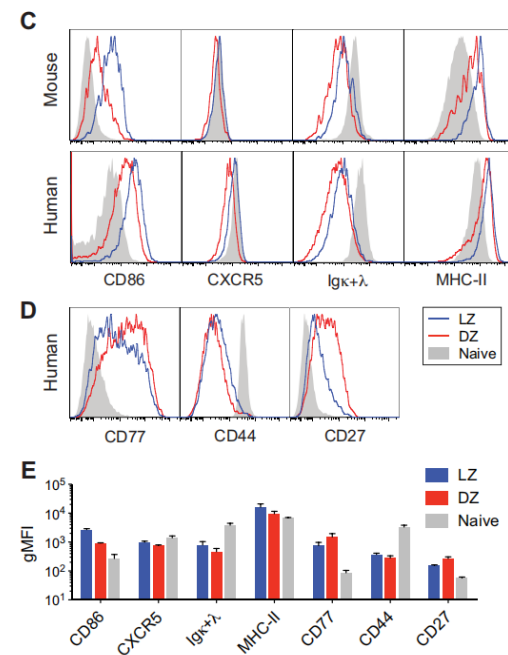
Dark zone: CXCR4^{high}CD83^{low}
Light Zone: CXCR4^{low}CD83^{high}



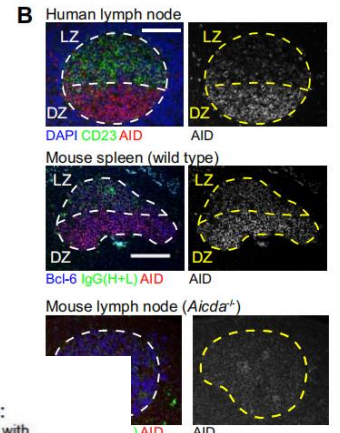
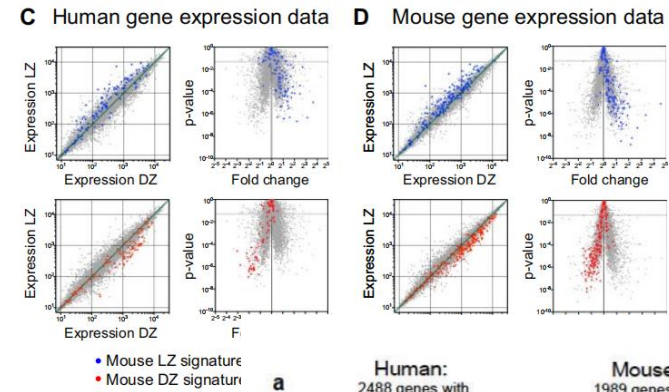
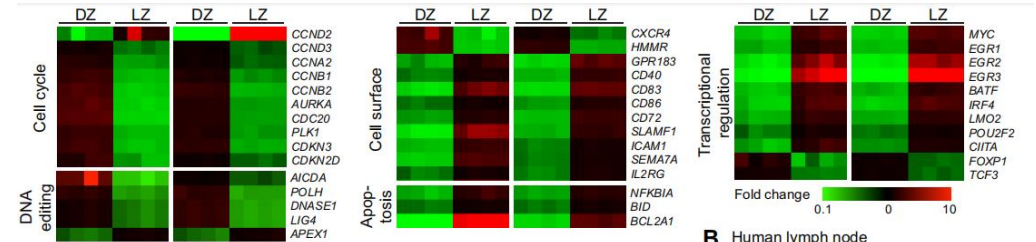
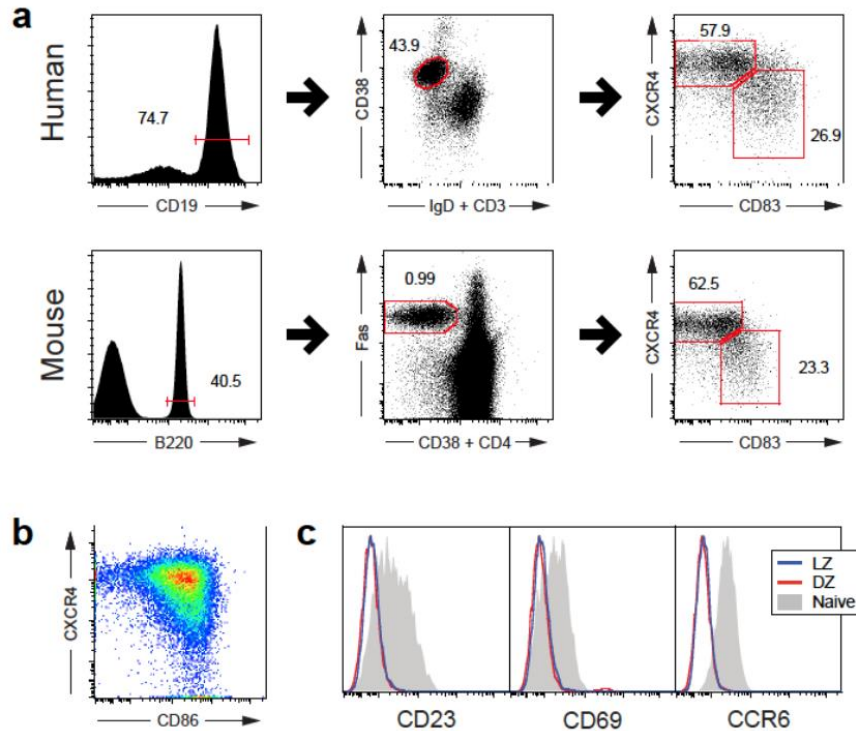
LYMPHOID NEOPLASIA

Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas

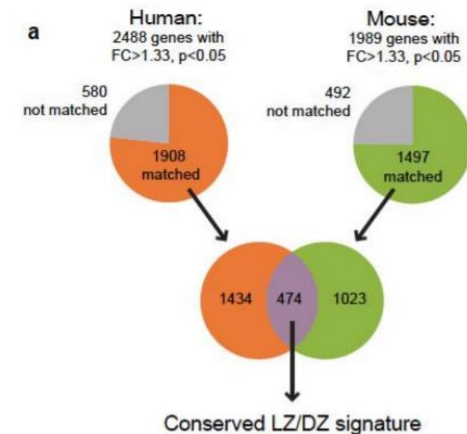
Gabriel D. Victora^{1,*,} David Dominguez-Sola^{2,*}, Antony B. Holmes², Stephanie Deroubais¹, Riccardo Dalla-Favera^{2,†}, Michel C. Nussenzweig^{1,3,†}



利用传统RNA-seq方法对不同肿瘤微环境结构的基因表达特征进行分析



作者首先对人和小鼠LZ和DZ区域B细胞进行分选，然后对两个区域来源的B细胞亚群的基因表达进行了差异分析，发现LZ和DZ区域B细胞之间表达变化的基因在物种之间是保守的，或者可能与GC分区化有关。基于此假设，作者构造了一个人和小鼠共有的LZ/DZ差异基因特征集合(表达差异基因选取cut-off值为1.33倍和P.05)。这个特征基因集合包含473个基因，其中290个基因在LZ表达上调，183个基因在DZ表达上调。



利用传统RNA-seq方法对不同肿瘤微环境结构的基因表达特征进行分析

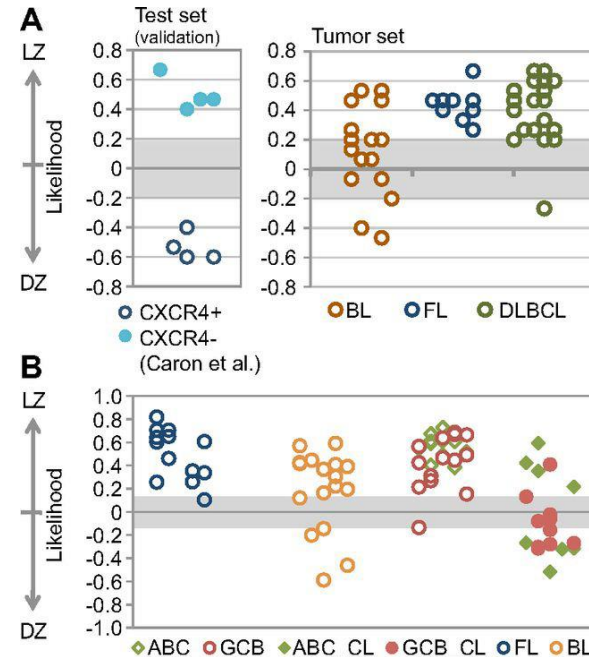
研究背景



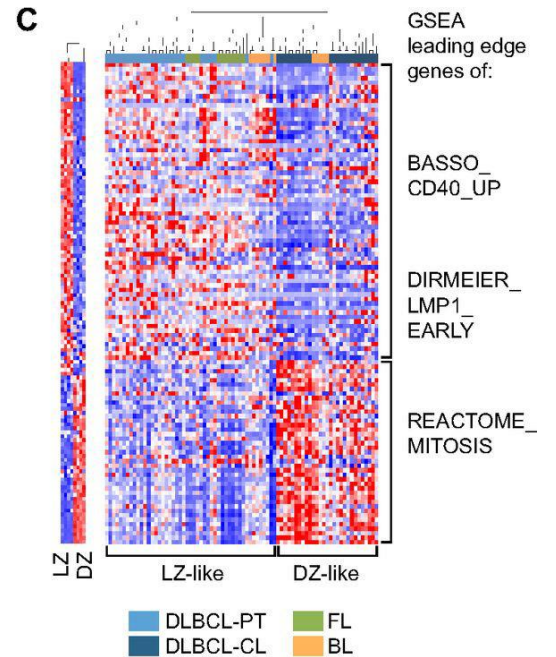
LYMPHOID NEOPLASIA

Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas

Gabriel D. Victora^{1,*}, David Dominguez-Sola^{2,*}, Antony B. Holmes², Stephanie Deroubaix¹, Riccardo Dalla-Favera^{2,†}, Michel C. Nussenzweig^{1,3,†}



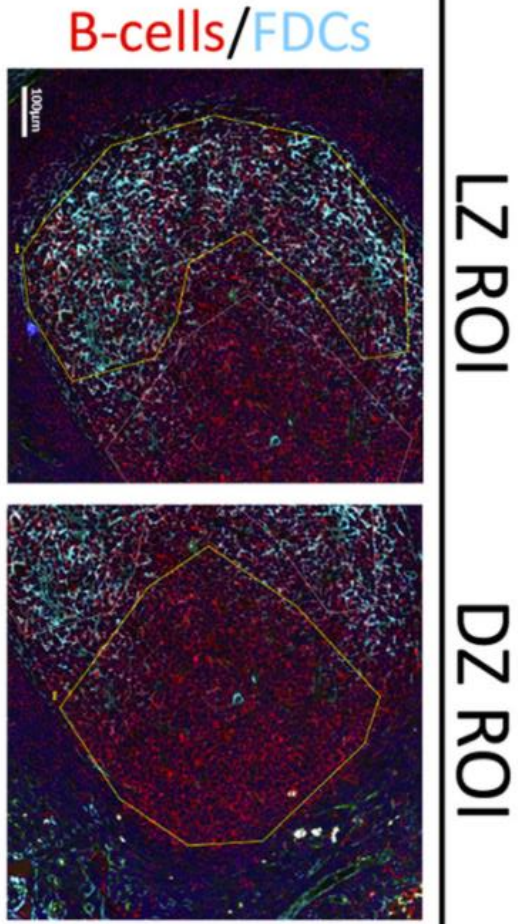
LZ表达上调特征基因与CD40/LMP1激活、NF- κ B和c-Myc招募以及抗细胞凋亡有关；相比之下，参与细胞周期调控的基因，特别是细胞有丝分裂，主导了DZ特征。



作者采用不同的基于差异基因表达进行分型预测的方法，所分析的大多数肿瘤都被分为LZ类，与正常的CXCR4⁺GC细胞分型相似(如上图A, B所示)。所有FLs和除1个DLBCL外的所有DLBCL都被归类为Lz相关，尽管很少有DLBCL病例出现在每个算法的低置信度 (<95%) 区间内。原发性BL病例两极化较少，约75%的病例仍被划分为LZ表型。对于DLBCL病例无论其分类为活化B细胞样(ABC)或GCB细胞样(GCB)，大部分被划分为LZ表型。



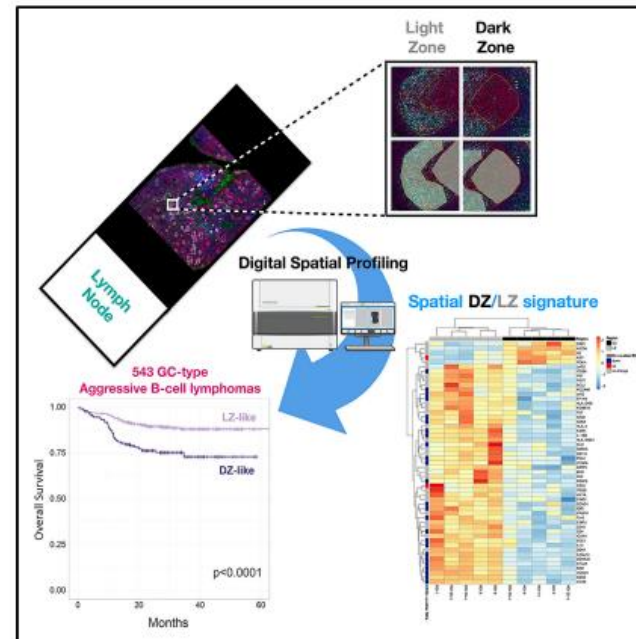
利用DSP技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关基因表达特征进行分析



iScience

Article

A Spatially Resolved Dark- versus Light-Zone Microenvironment Signature Subdivides Germinal Center-Related Aggressive B Cell Lymphomas



CellPress
OPEN ACCESS

Claudio Tripodo,
Federica Zanardi,
Fabio Iannelli, ...,
Mario P. Colombo,
Maurilio Ponzoni,
Stefano A. Pileri

claudio.tripodo@unipa.it

HIGHLIGHTS
Digital Spatial Profiling
identifies an immunof
stromal GC dark-zone/
light-zone signature

The DZ/LZ signature
highlights prognostic
clusters in aggressive GC
B cell lymphomas

Digital Spatial Profiling
reveals GC DZ
microenvironment
programs in double-hit
lymphomas

通过 DSP 技术针对 87 个免疫和基质相关的RNA (定制 Panel) 进行分析, 来观察转录谱在 **DZ (暗区)** 和 **LZ (亮区)** 区域间的差异。



实验染色策略为B细胞 (CD20、红色)、神经生长因子受体NGFR (CD271[NGFR]、青色)、平滑肌肌动蛋白 (SMA, 绿色)、细胞核 (Syto83、蓝色, 染色完成不同病理区域的划分并进行 ROI 的选择。



通过免疫组化和免疫荧光双标、三标来联合检测生发中心内 DZ 和 LZ 蛋白水平上的表达差异。



选定通过bulk & 区域分割得到的共有25 signature gene set, 将543例患者根据其RNA-seq数据分为DZ样和LZ样, 并与生存期进行关联。



利用DSP技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关基因表达特征进行分析

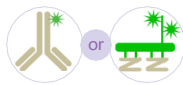
研究背景和临床问题创新

虽然一般GC-相关B细胞淋巴瘤有更好的预后，但GC-相关B细胞淋巴瘤遗传亚型（由突变模式定义，如MYC、BCL2 and/or BCL6 Double-hit，对标准免疫化疗方案存在显著反应，其中DH-HGBL免疫化疗方案病程主要归因于克隆生物学DH-HGBL的。

作者试图从D（特别是非致析入手，找到接触界面生物学特征。

特定标记荧光抗体(或探针)与所选待测指标共孵育

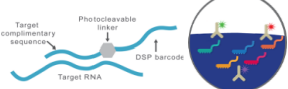
形态学标记荧光抗体或RNA探针



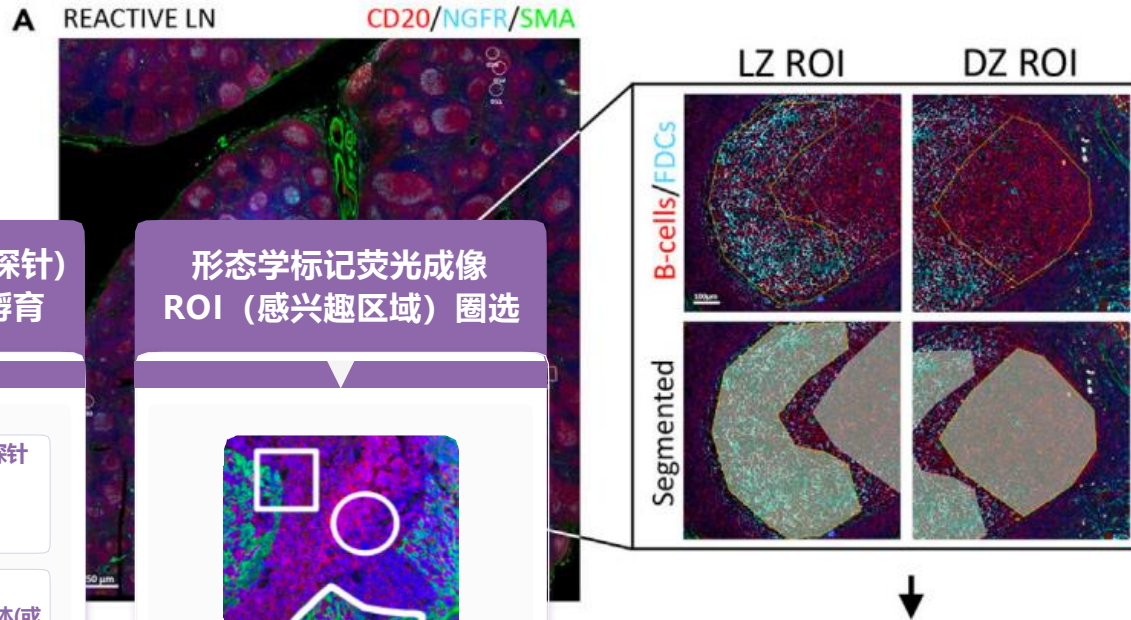
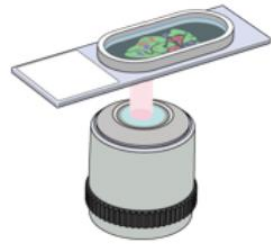
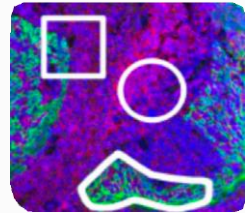
蛋白检测 待测靶点抗体+特定标记荧光抗体(或探针)共孵育



RNA 检测 探针孵育+特定标记荧光抗体(或探针)共孵育



形态学标记荧光成像 ROI (感兴趣区域) 圈选



第一步:

多重免疫荧光检测CD20 (红色信号)、神经生长因子受体(NGFR)/CD271 (青色信号)、平滑肌肌动蛋白(SMA, 绿色信号)和Syto83 (蓝色信号)进行染色，便于LZ和DZ对应的ROI的选择，用于分割和基因表达分析。比例尺，250微米。

CD20: B细胞亚群标志物

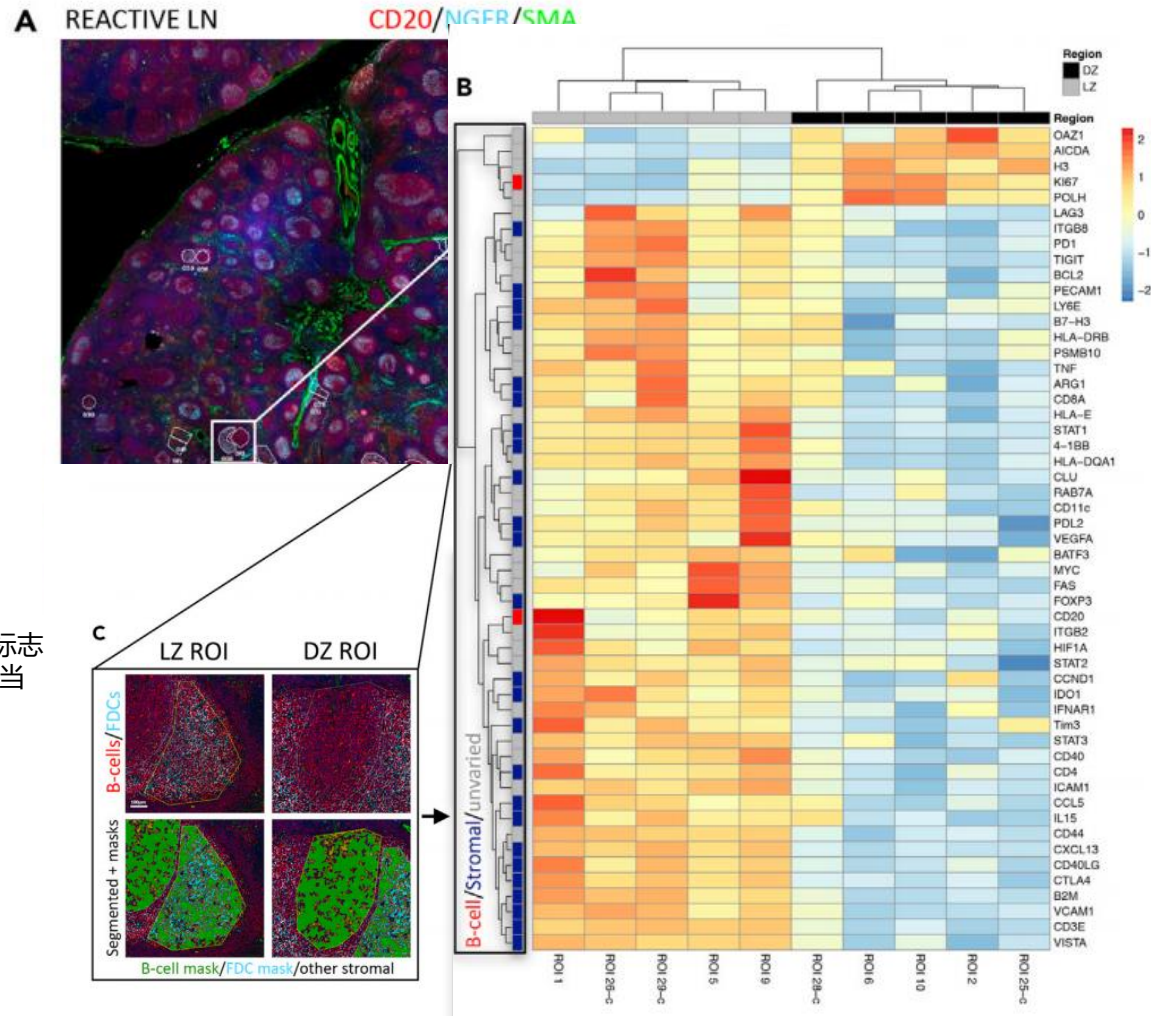
NGFR/CD271: 滤泡树突细胞(Follicular dendritic cells, FDC)细胞标志物

SMA: 肌成纤维细胞/网状成纤维细胞标志物

作者根据自己的研究目的和前期积累，自选了免疫调节和基质相关基因mRNA panel，进行ROI选定区域的原位RNA检测



利用DSP技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关基因表达特征进行分析



第二步:

基于作者自选的免疫调节和基质相关基因mRNA panel, 对DZ和LZ分段ROI生成的基因表达谱进行无监督聚类, 显示有53个基因的表达在DZ和LZ ROI当中存在明显差别。

那些参与细胞增殖、体细胞高突变和染色质重塑的基因, 如AICDA、MKI67、H3F3B和OAZ1在DZ ROI中表达上调, 与DZ承载胞苷脱氨酶(AID)活性诱导的GCB细胞增殖和免疫球蛋白基因高突变事件的微环境特征是一致的。

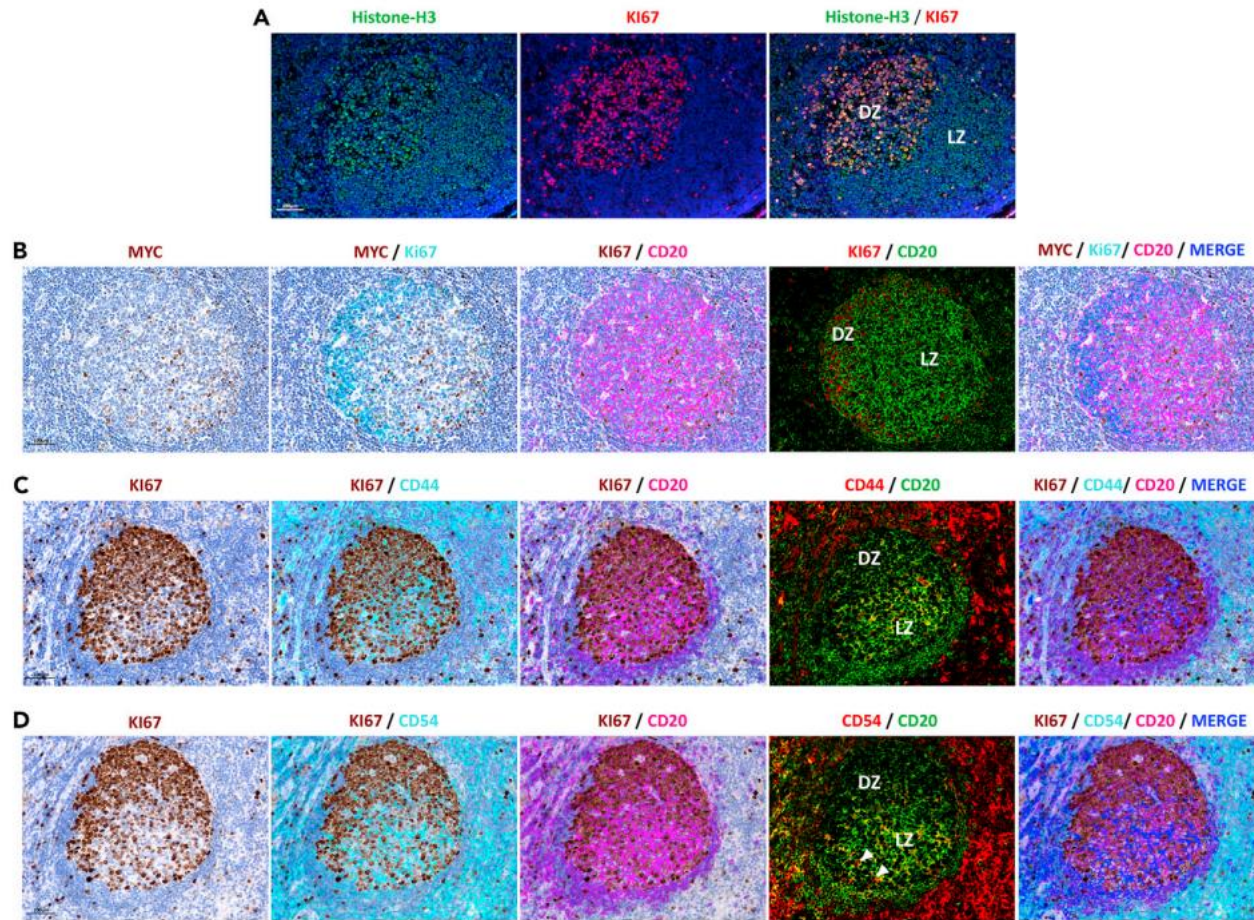
如果在DSP分析当中, 还可以利用不同细胞类型标志物作为特异性蒙板(mask), 可以对DZ和LZ ROIs当中的差异基因进行细胞类型还原解析。

B细胞(CD20+NGFR-)
FDCs(CD20-NGFR+)
其他基质和免疫成分(CD20-NGFR-)

B细胞当中存在显著差异的基因 (红色)
B细胞和基质共有的显著差异基因 (灰色)
基质细胞当中存在显著差异的基因 (蓝色)



利用多重免疫染色技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关蛋白进行分析



第三步:

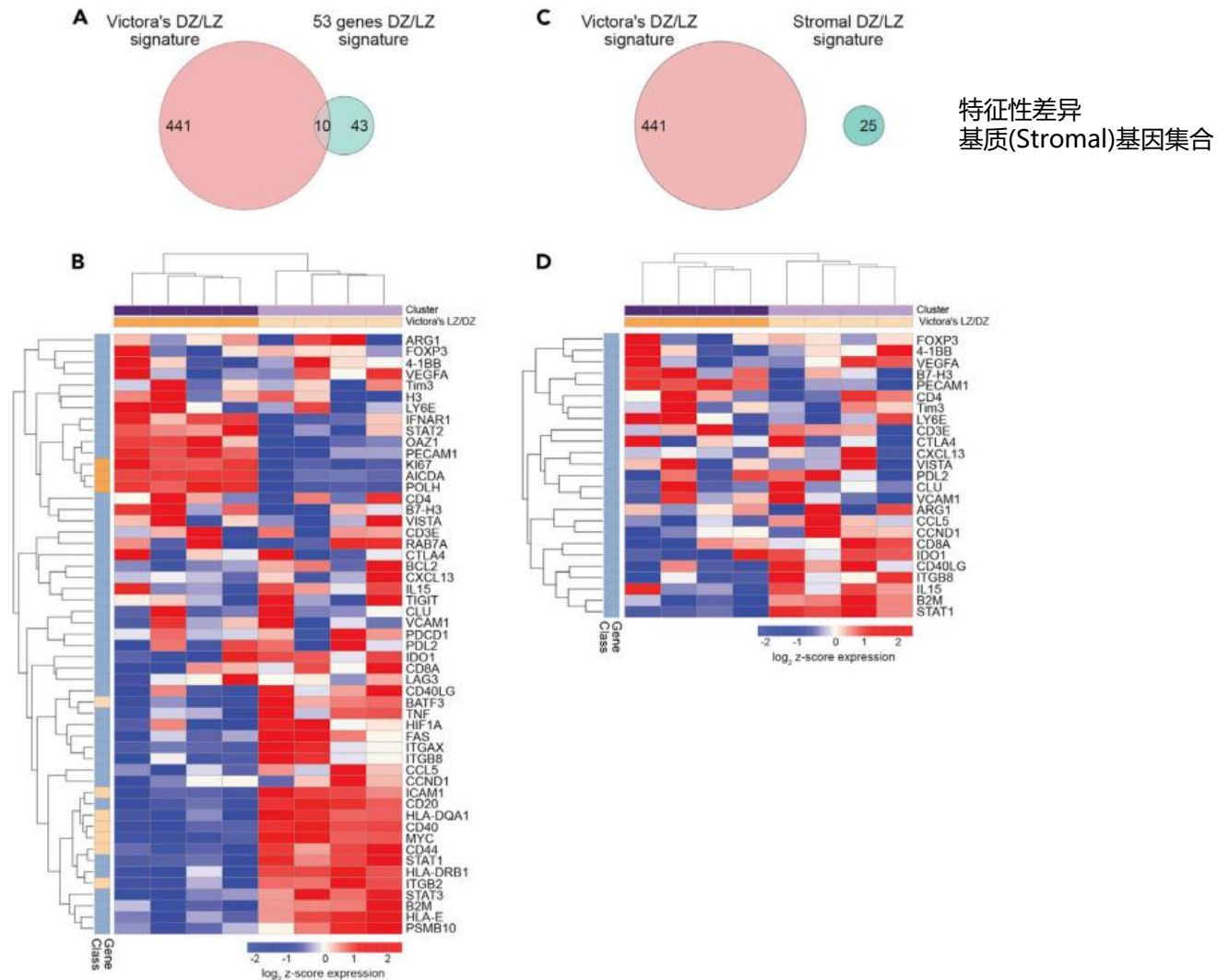
作者从DZ/LZ特征差异基因中选择了一些蛋白，在反应性淋巴结组织切片的GC与进行了多重染色分析进行验证。

结果显示:

- 组蛋白H3的表达(绿色信号)主要在DZ区域内Ki-67+(红色信号)增殖细胞中。
- MYC (棕色信号) 散在表达于Ki-67 (青色和红色信号) 低的CD20+ (紫色和绿色信号) 细胞中, 主要对应于LZ区域。
- CD44 (青色和红色信号) 在ki-67 (棕色信号) 低的B细胞(表达CD20, 紫色和绿色信号) 中表达更强烈, 主要对应于LZ区域。
- CD54/ICAM1 (青色和红色信号) 在ki-67 (棕色信号) 低的细胞中表达更强烈, 不过在CD20+和CD20-的细胞当中都有表达。



利用DSP技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关基因表达特征进行分析



特征性差异
基质(Stromal)基因集合

第四步:

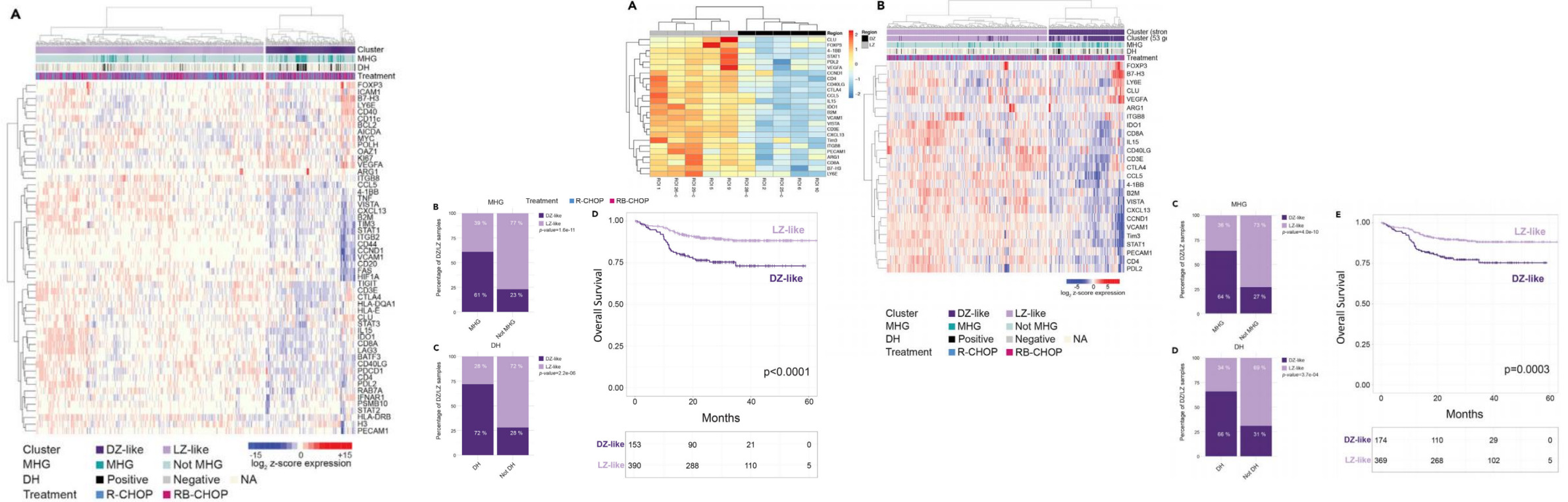
作者把自己发现的LZ/DZ特征差异基因集合与2012年Blood文献报道的特征基因集合进行了比对分析。

结果发现:

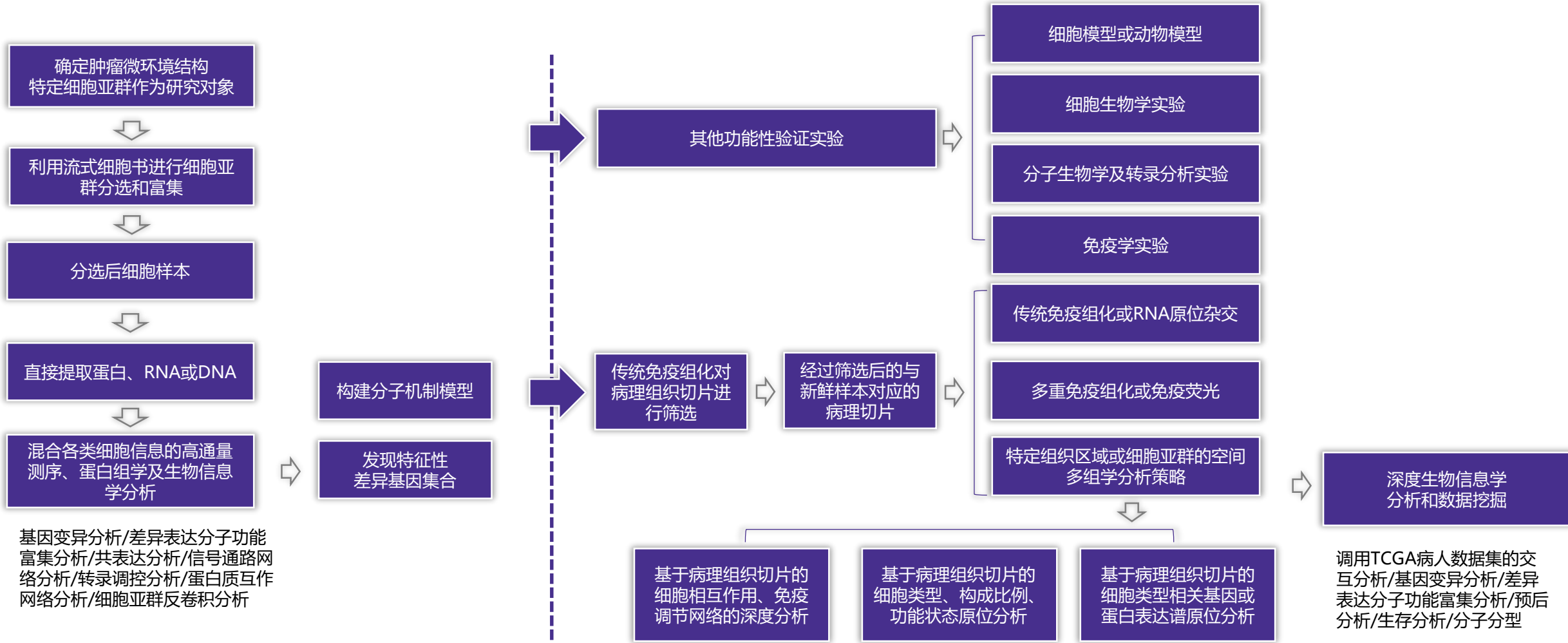
- (A和C)维恩图表示上述不同特征性差异基因集合比对后的重叠数量。其中, 作者鉴定的由53个基因组成的DZ/LZ特征差异基因集合(A)显示出重叠与Blood文献报道特征性差异基因集合有10个基因(3个在DZ中上调, 7个在LZ中上调)重合。
- 而作者鉴定的由25个基因组成的DZ/LZ特征差异基因集合(B)与与Blood文献报道特征性差异基因集合没有基因重合。
- (B和D)基于53个基因(B)和25个基因(D)的的DZ/LZ特征性差异基因集合无监督层次聚类分析与Blood文献报道特征性差异基因集合聚类结果吻合。



利用DSP技术对不同肿瘤微环境结构有关的免疫和基质相关基因表达特征进行分析

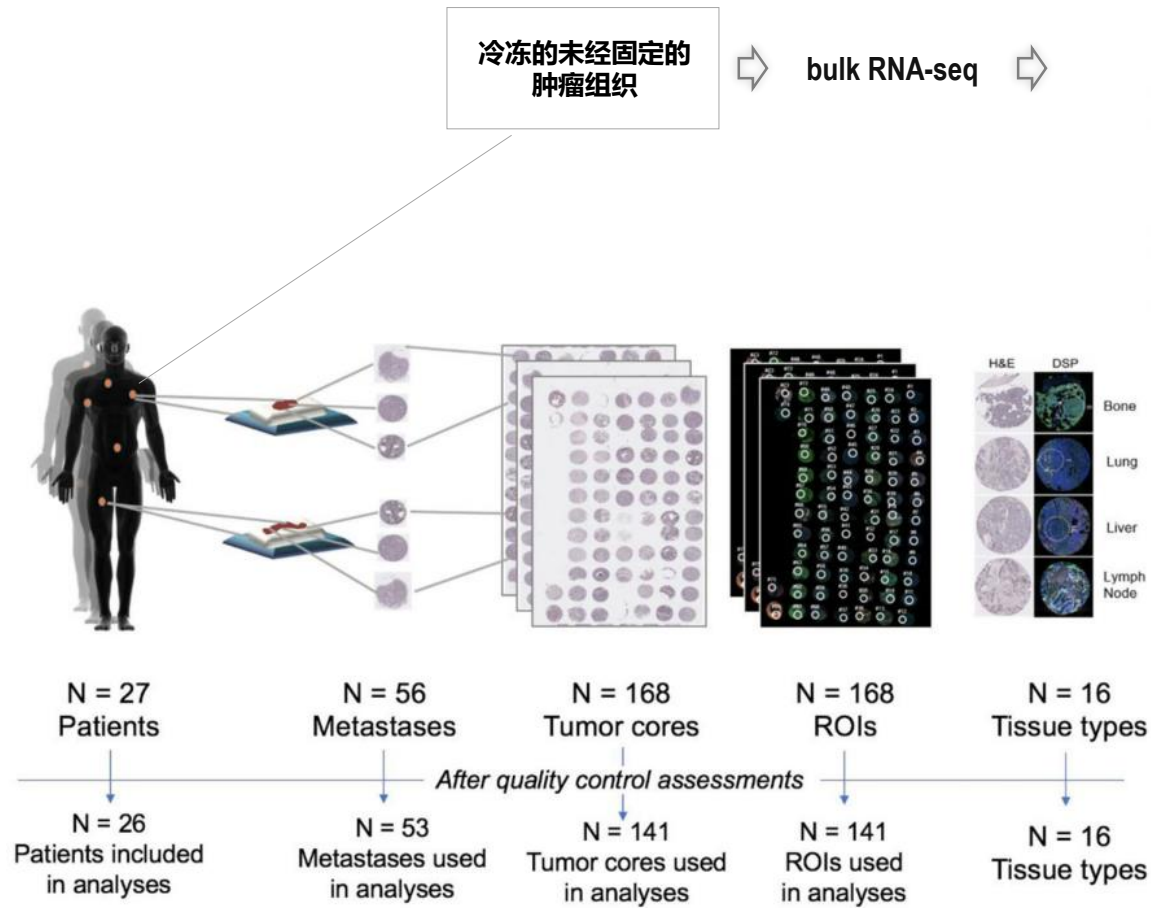


从病理学分析入手的研究策略总结



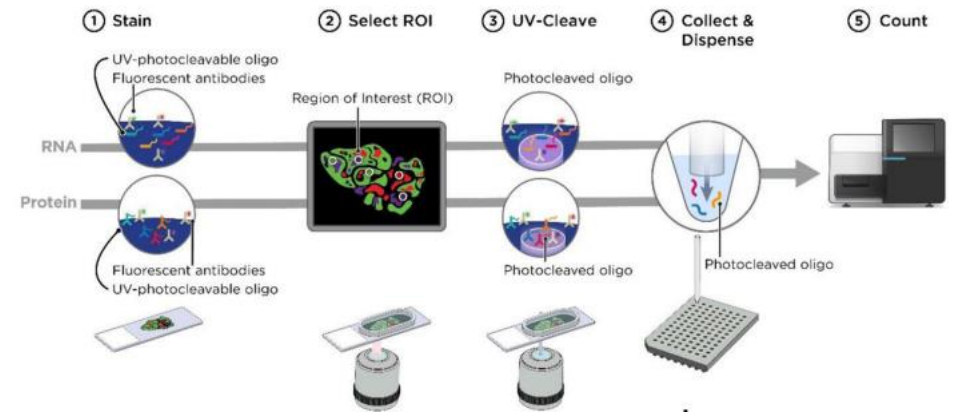
案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略

a



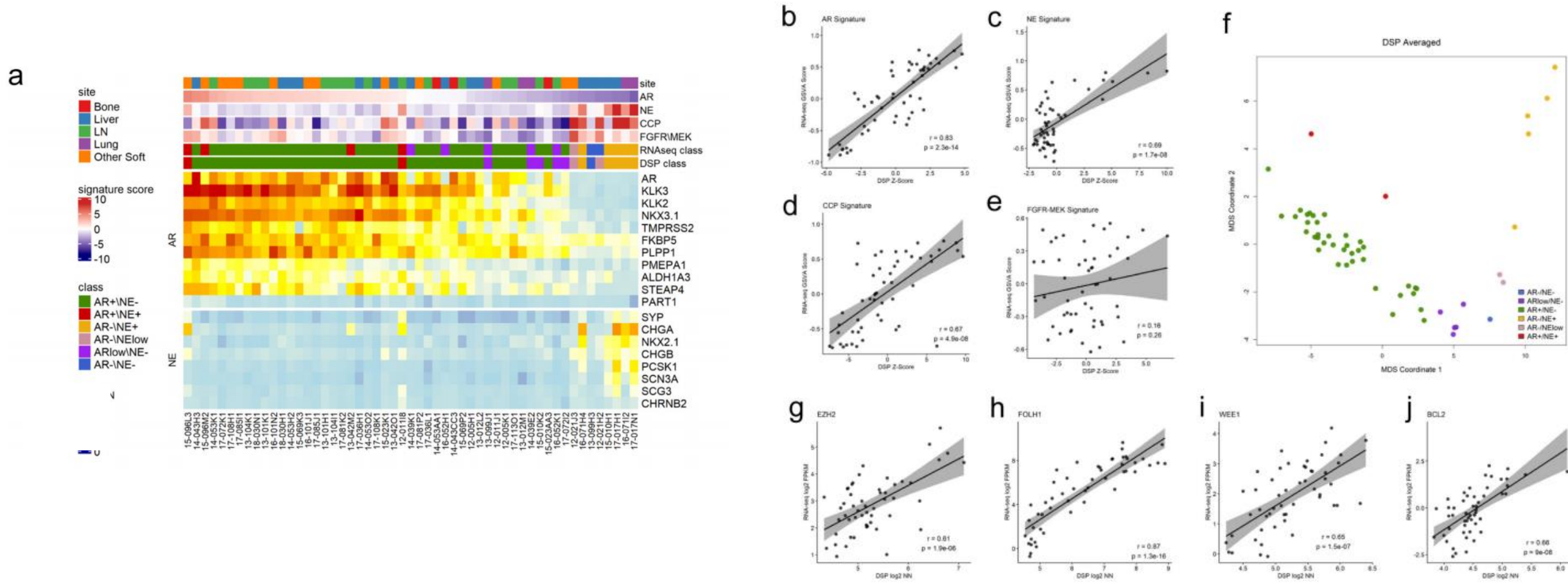
Digital Spatial Profiling (DSP)

b



案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略

基于DSP的AR和NE活性评分评估与基于bulk RNA-seq的分型结果具有很高的一致性

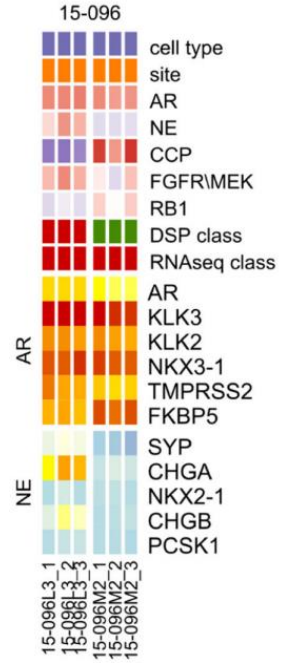
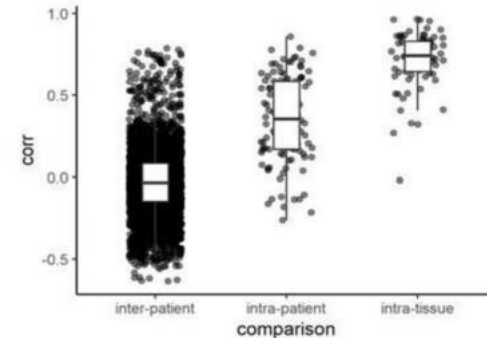
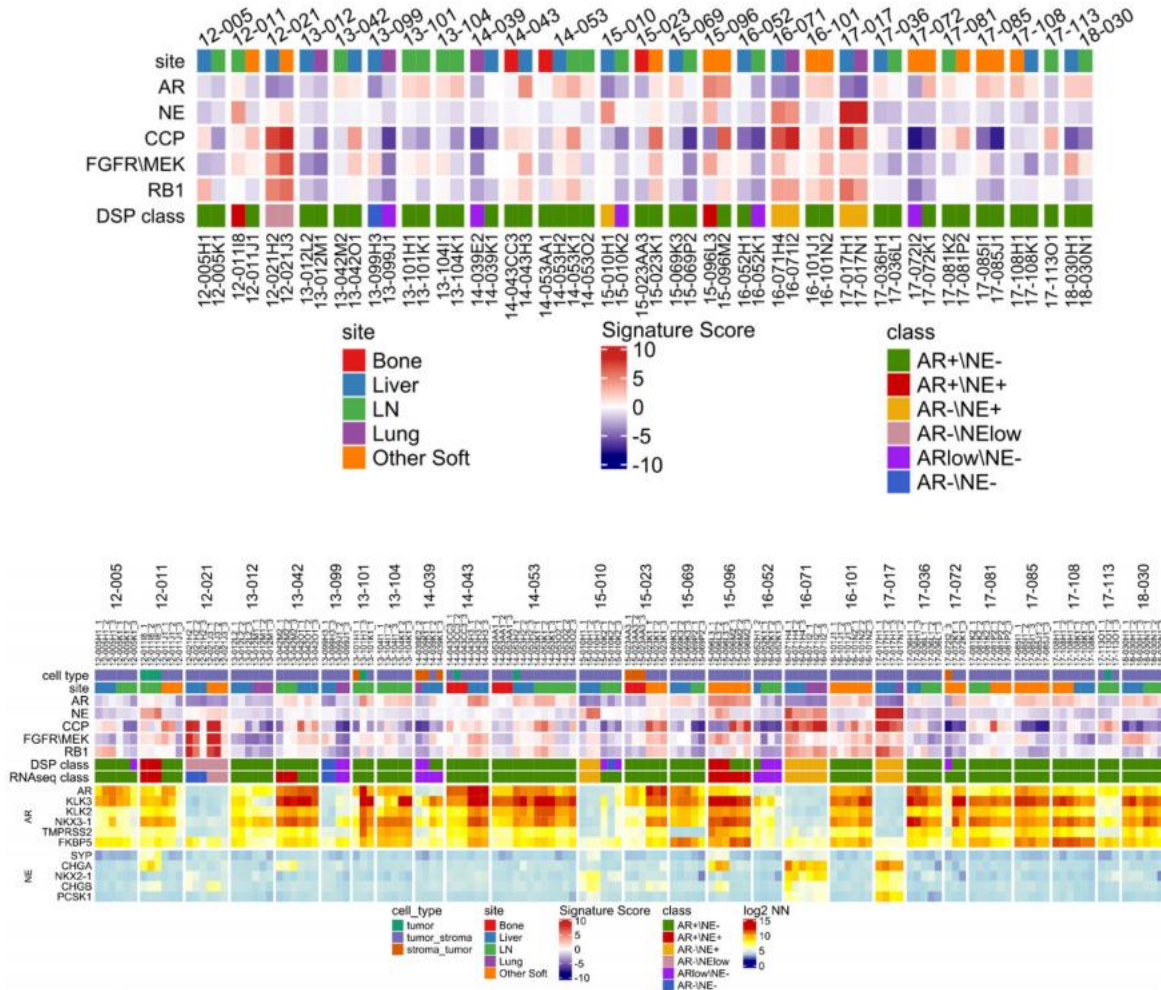


案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略

大多数mPC患者有多个肿瘤扩散部位，包括淋巴结、骨、肝脏、肾上腺和肺。接下来，研究者基于DSP数据，比较了每个患者的表型分类，并评估了细胞周期进程(CCP)、FGF/MAPK活性和RB1丢失的情况。在来自同一患者的转移瘤之间，有82%的患者DSP分型类似，随机抽取的ROI具有相同的表型分类，说明单独个体内不同转移灶肿瘤间表型一致性较高。

对于患者15-096，15-096L和15-096M转移灶肿瘤细胞基于bulk RNAseq基因分类为AR+/NE+，而通过DSP，每个来自15-096M2的ROI被归类为AR+/NE-，但都来自于15-096L3所有的ROI被归类为AR+/NE+。

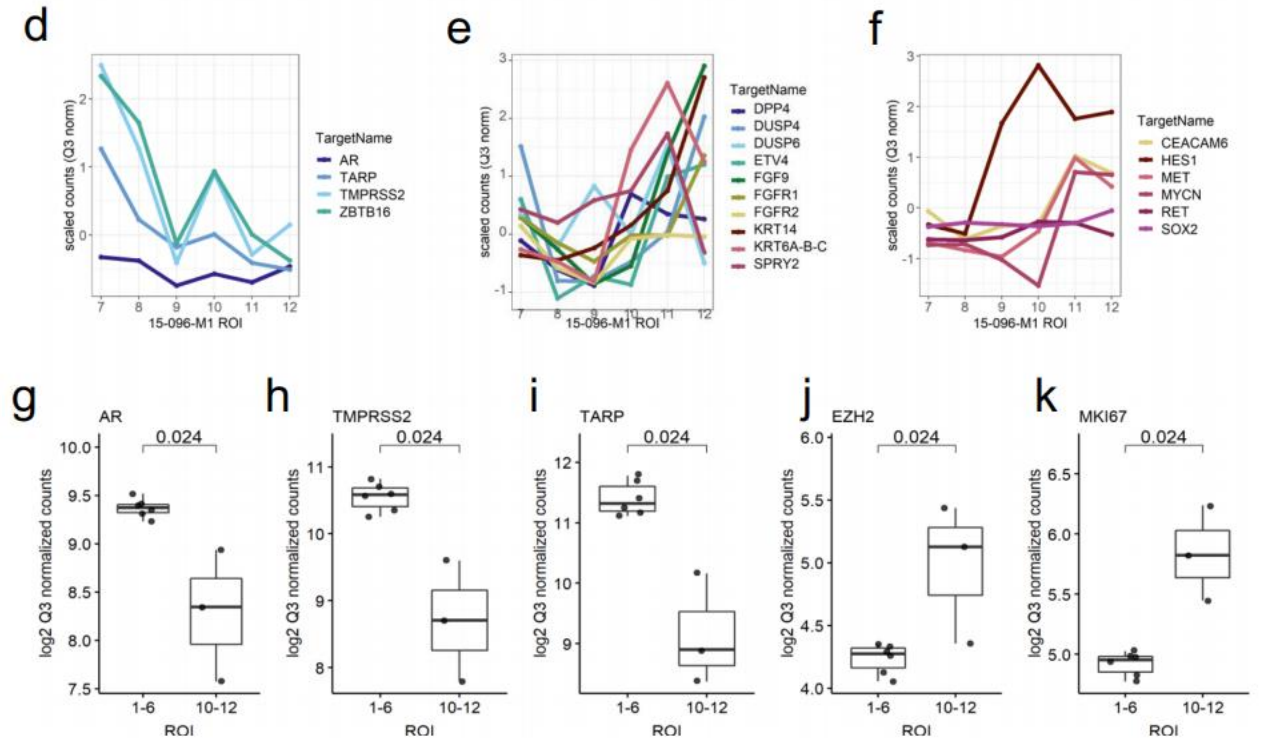
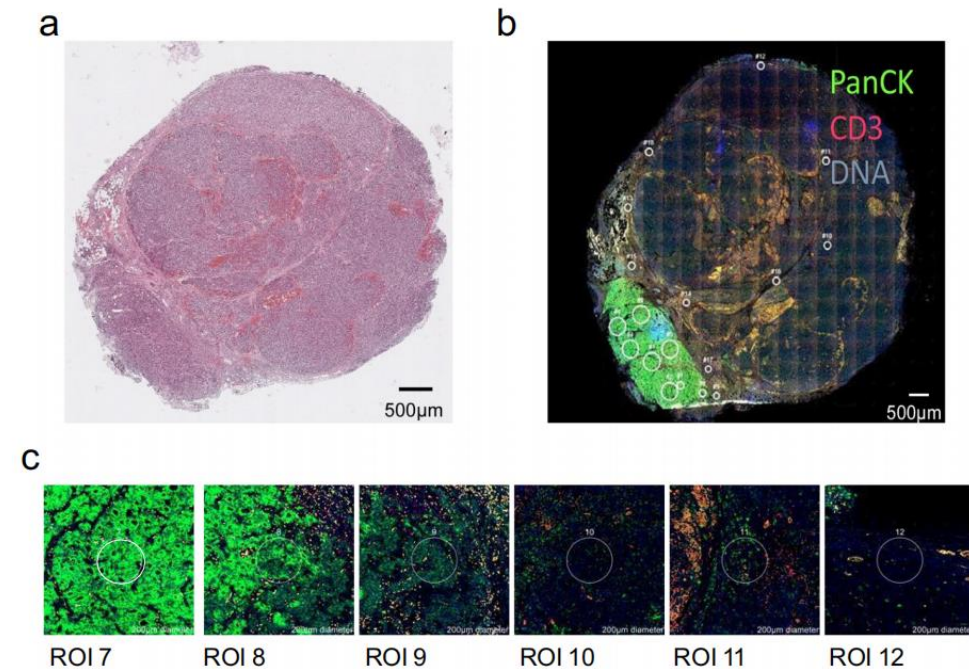
为了评估肿瘤内异质性，研究者比较了同一个转移灶中获得的三个ROI之间的转录本测量值，肿瘤表型有很高的肿瘤内一致性。



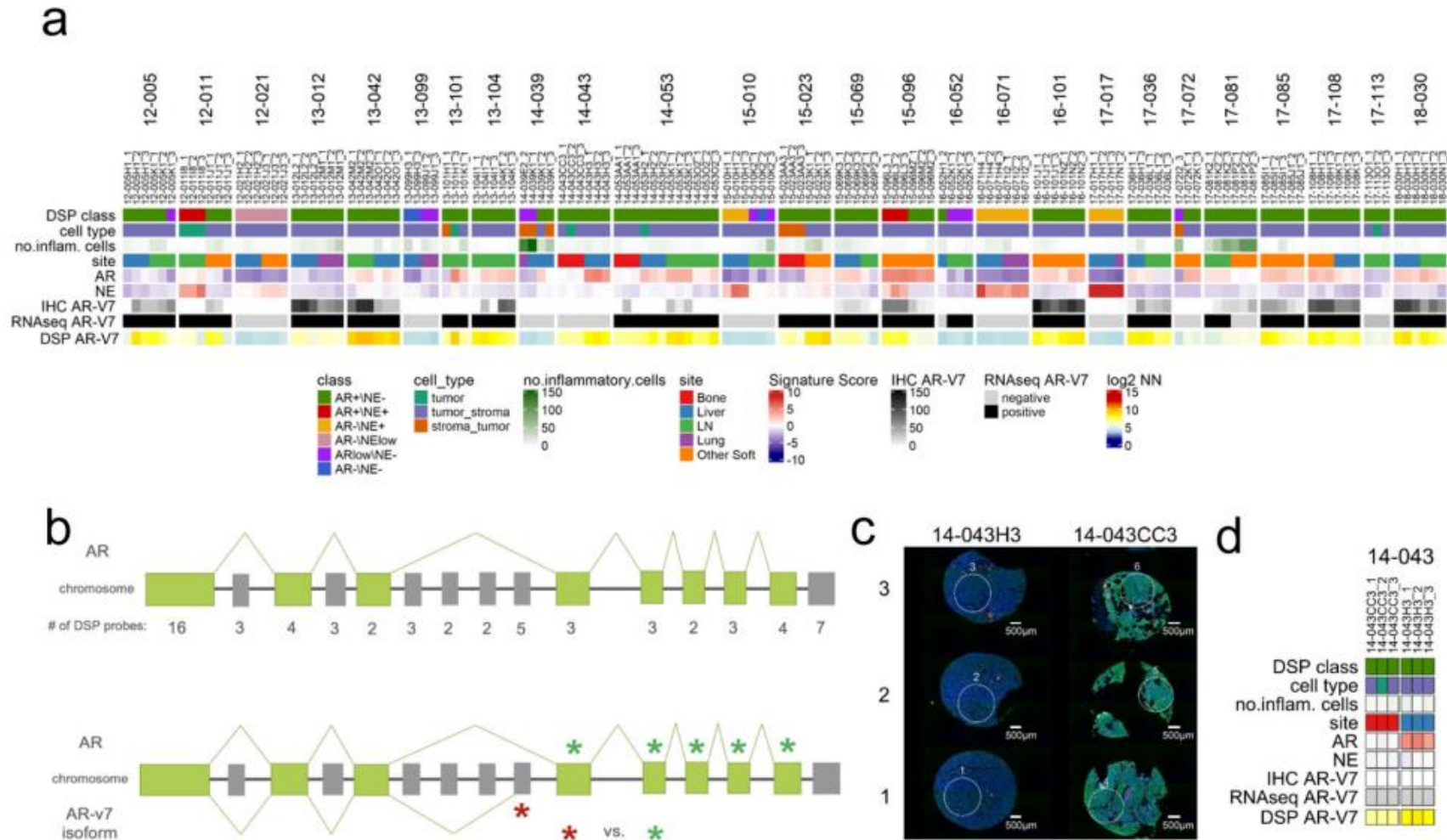
案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略

使用像RNAseq这样的混杂细胞来源RNA分析的方法，不能区分肿瘤细胞群是否由单独表达两个程序的同质肿瘤细胞群，或真正的双分泌细胞，或肿瘤团块是否由异质细胞组成。
为了更深入地评估肿瘤内异质性，研究者取15-096M1淋巴结转移位的切片，选择12个直径为200-500μM的圆形ROI，并进行通过DSP进行的转录水平定量分析。

PanCK阳性区域的多个ROI均为基因分型为AR+/NE-。远离PanCK阳性细胞的ROI区域细胞分类为AR-/NE+或AR-/NE-，AR低表达，AR调节基因如TMPRSS2也是低表达，与转分化、细胞可塑性和增殖相关的基因，如EZH2和Ki67，表达量增高。



案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略



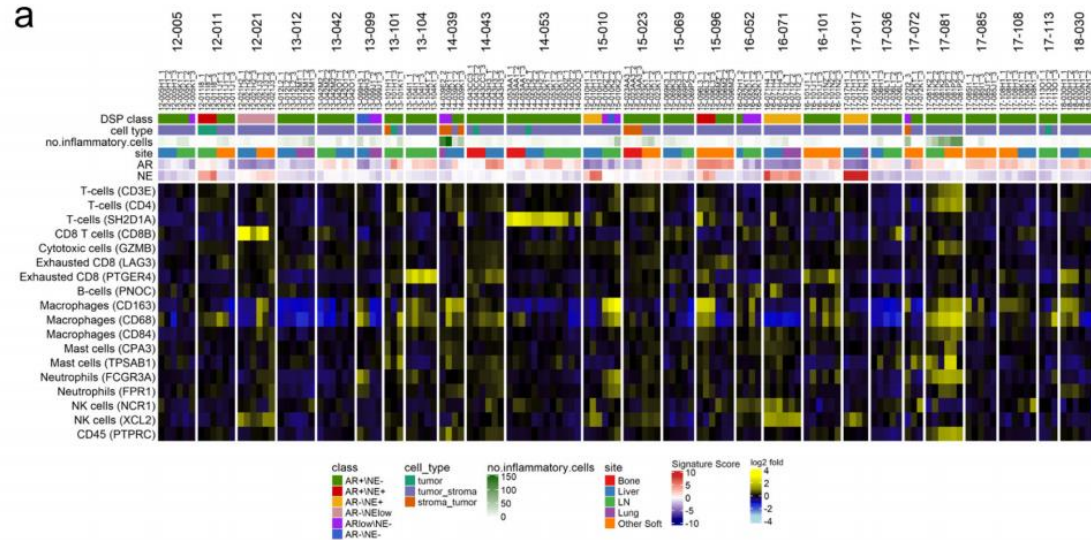
基因转录本的选择性剪接在癌症中很常见，如AR- v7亚型可能促进对二代AR抑制剂的耐药性。使用DSP进一步评估AR-V7的肿瘤内异质性，有些ROI区域高表达AR-V7，而其他区域缺乏可检测的AR-V7转录本。

此外，在6个肿瘤中，DSP和 bulk RNA-seq结果不一致。为了进一步评估AR-V7的表达，我们通过肿瘤组织TMA核心区的免疫组化来评估AR-V7蛋白。AR-V7免疫组化与DSP检测转录本水平显著正相关。

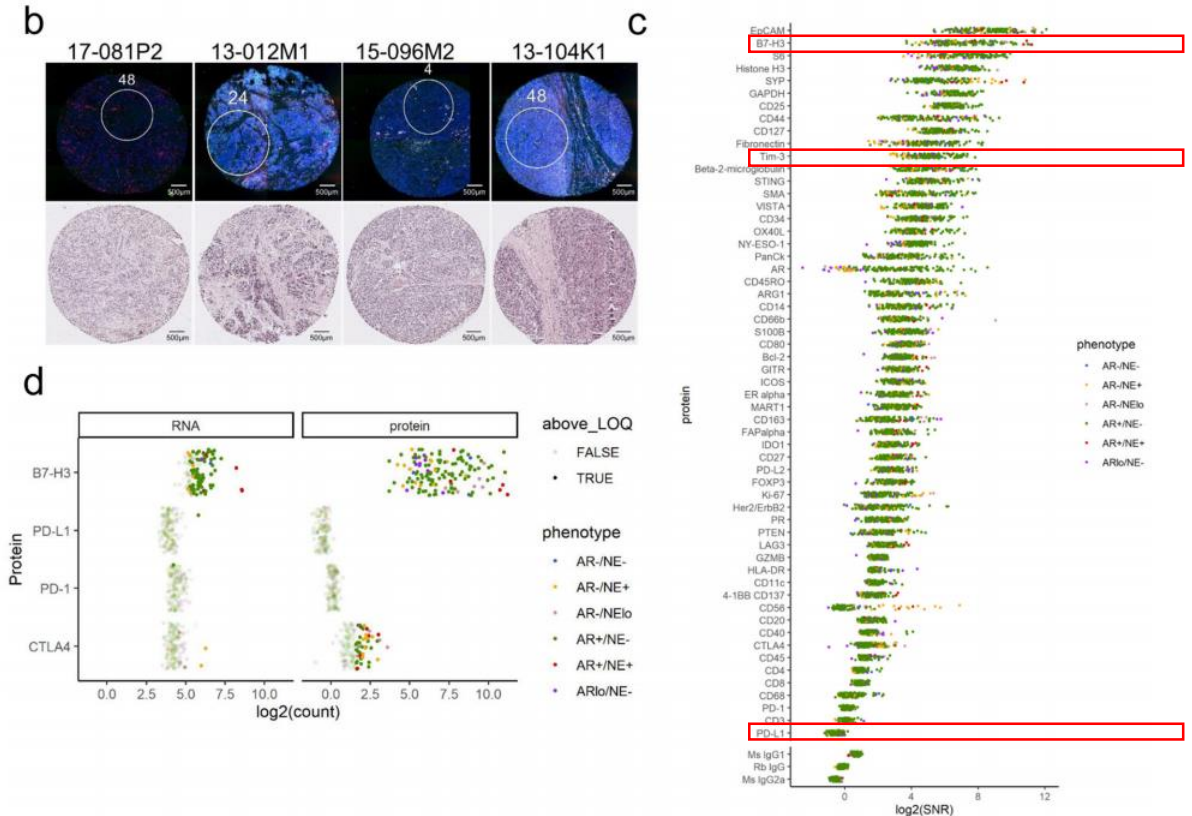


案例三：从基于RNA-seq的基因表达谱分型入手的肿瘤异质性研究策略

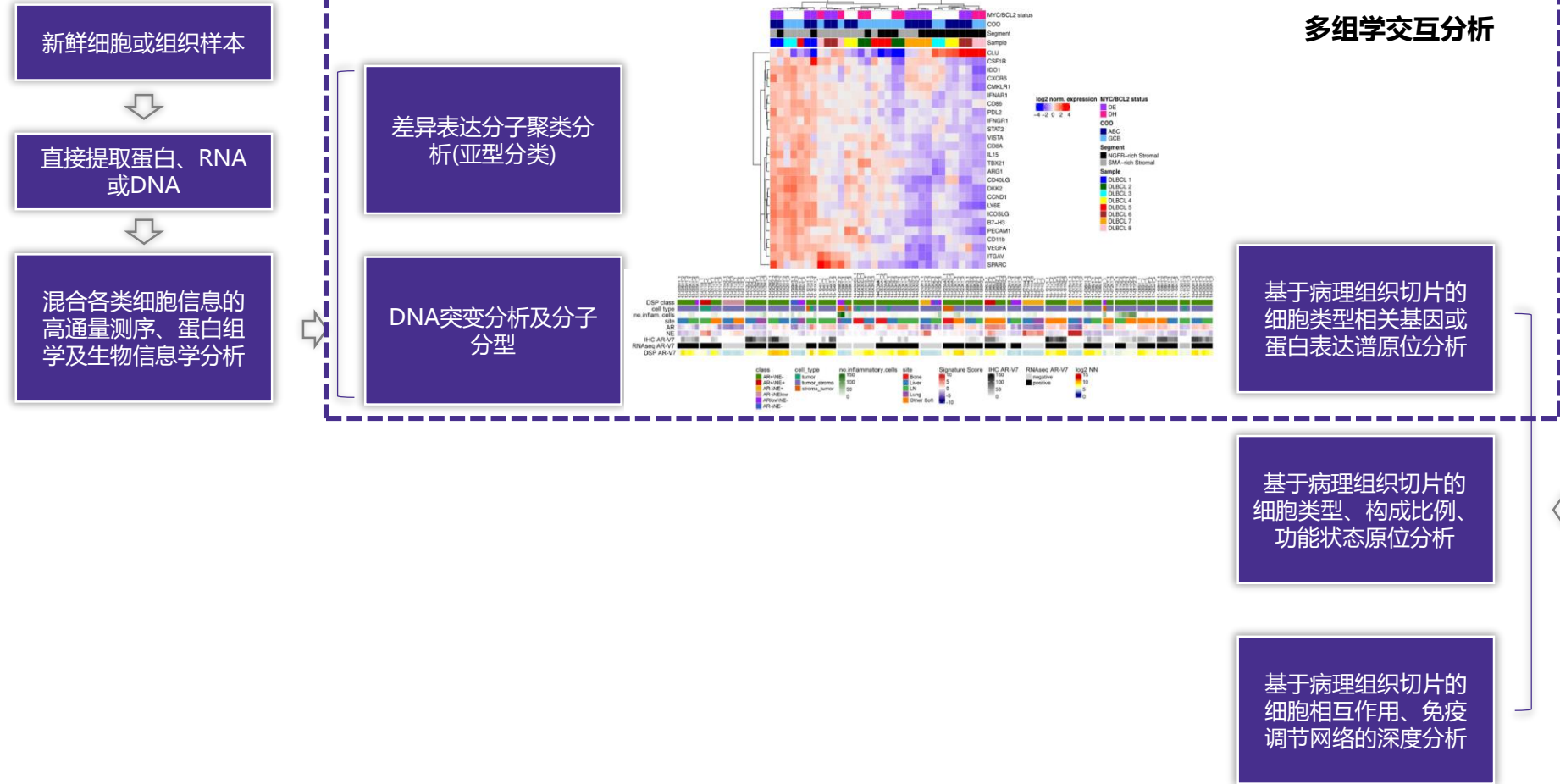
为了评估免疫细胞群的存在，研究者使用DSP来定量编码相关蛋白的转录本，包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、NK细胞、骨髓源性抑制细胞，以及一系列趋化因子、细胞因子和检查点蛋白。结果显示，这些肿瘤细胞富集区域大部分缺乏免疫细胞，巨噬细胞是最常见的细胞类型，CD4或CD8 T细胞的标记物很少被检测到。



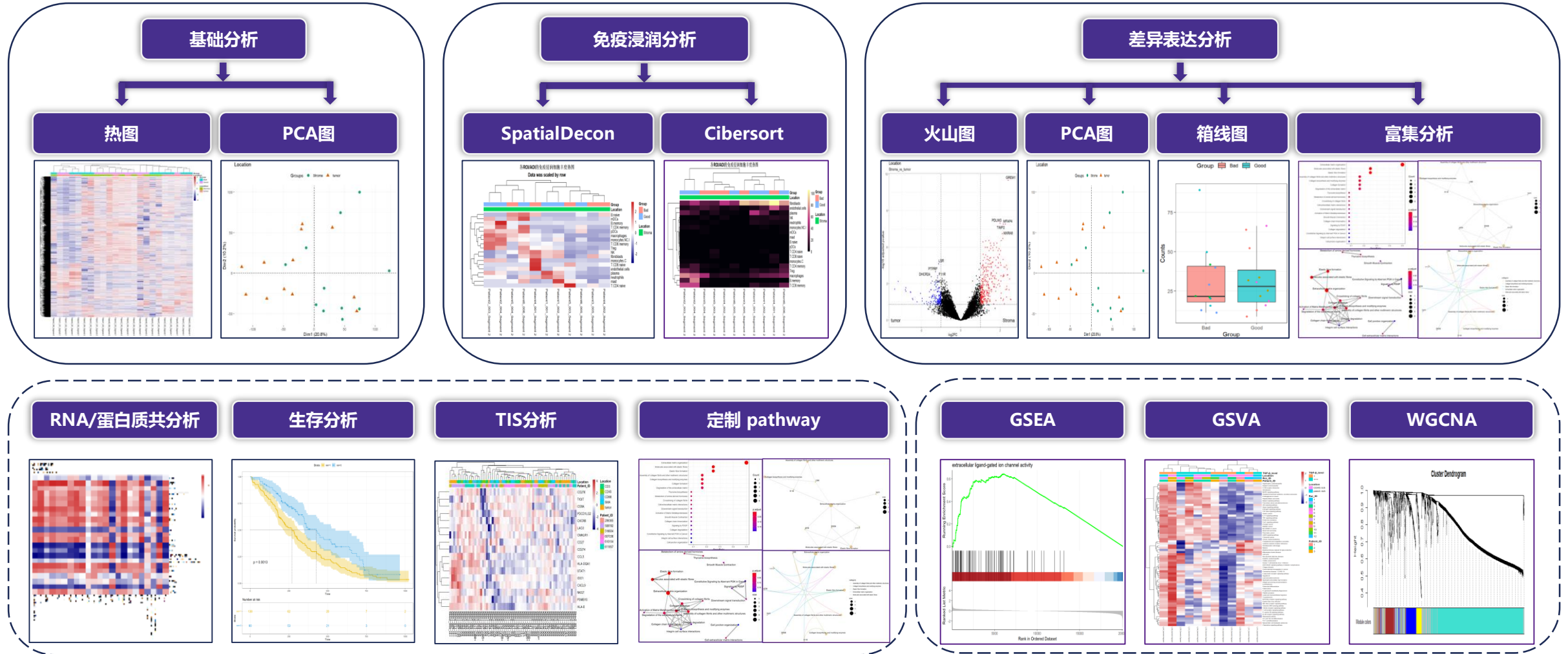
另外评估了多个免疫检查点靶点的表达，在任何肿瘤或肿瘤ROI中都检测不到PD-L1蛋白水平，B7-H3/CD276和TIM3表达相对较高。



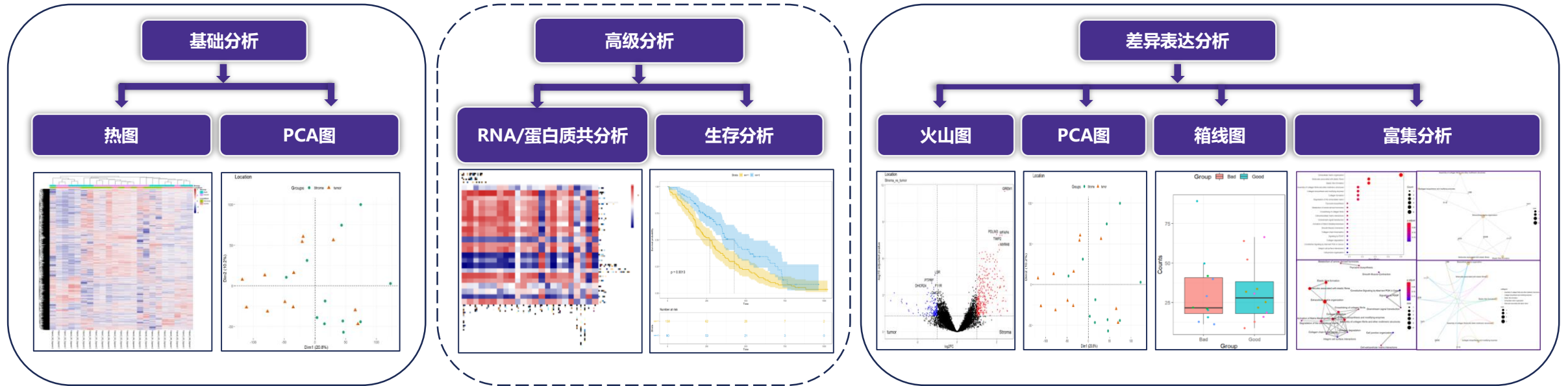
多样本类型的空间分析策略组合



非因生物DSP标准分析模块 (WTA)

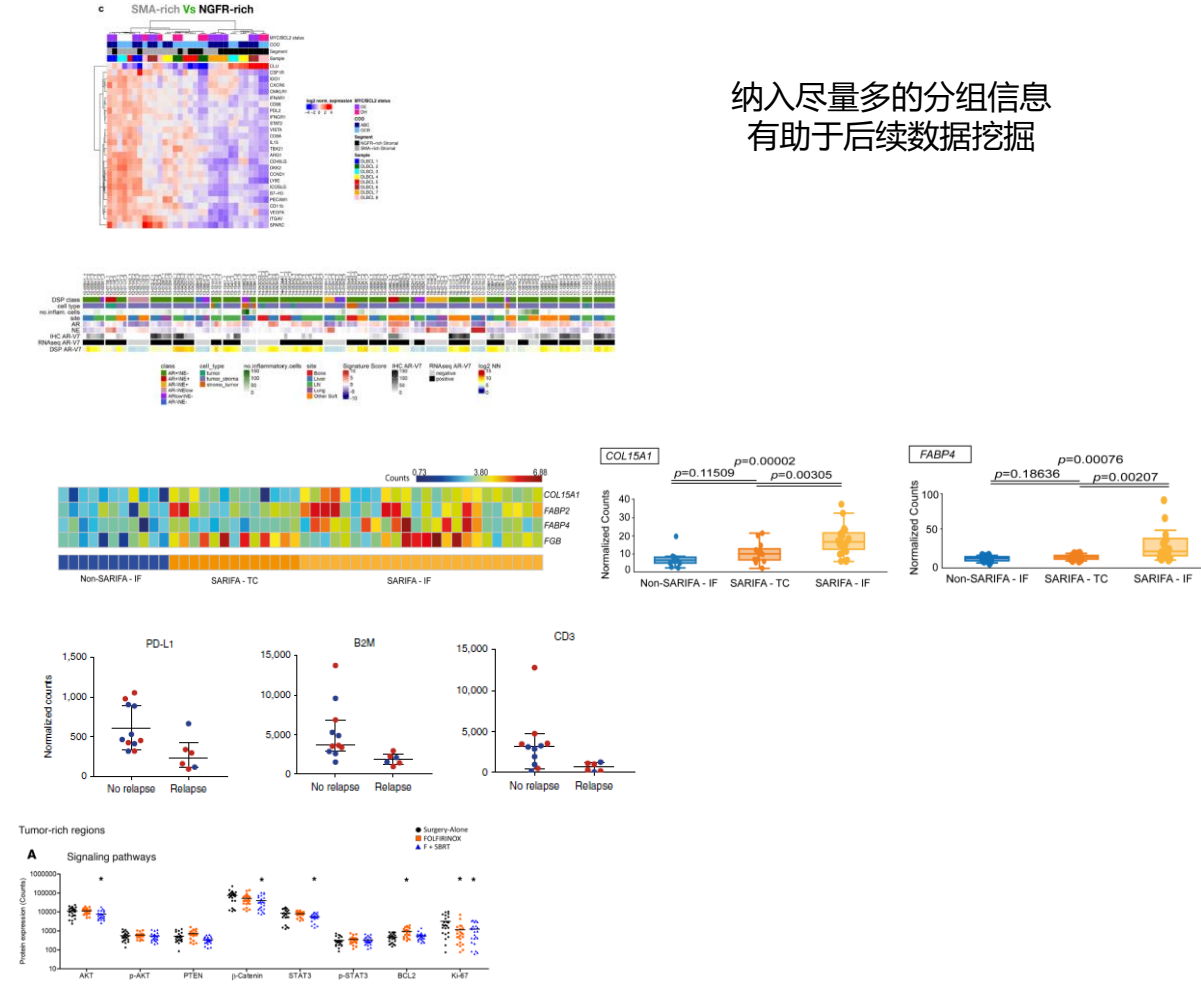
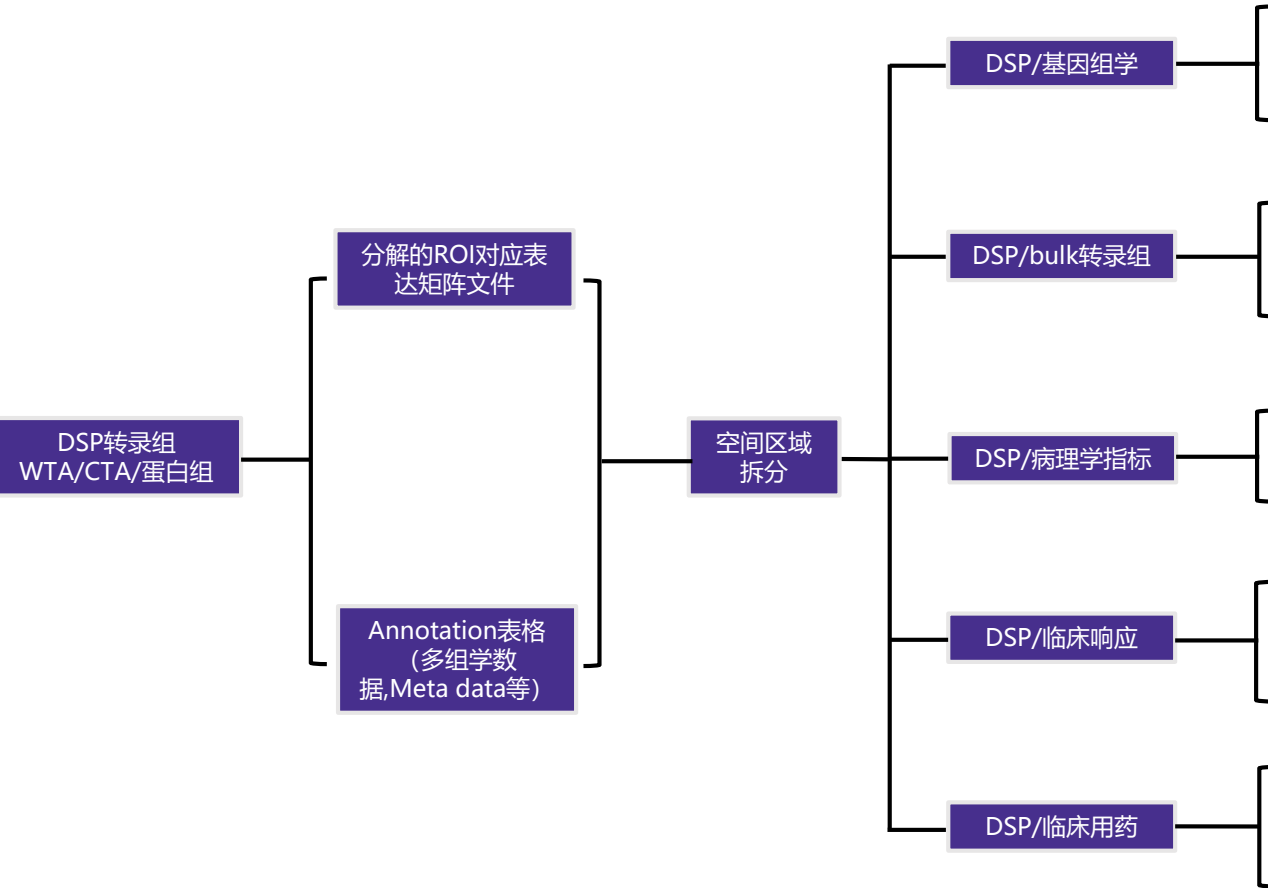


非因生物DSP标准分析模块（蛋白）

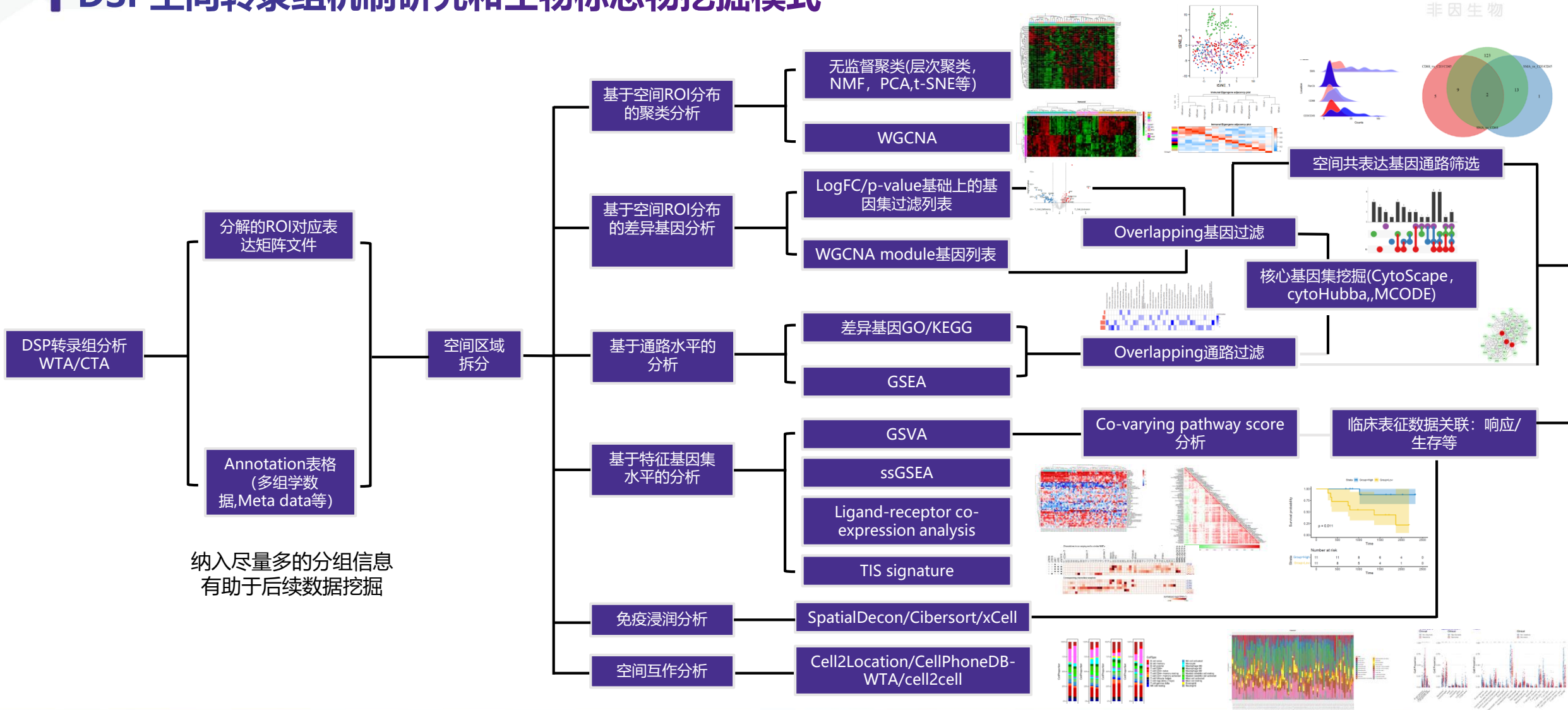


DSP空间组学与多组学交互分析模式

纳入尽量多的分组信息
有助于后续数据挖掘



DSP空间转录组机制研究和生物标志物挖掘模式



转录组学数据挖掘基本套路

- **差异分析套路路线**

先分析差异基因，然后分不同方向进行深度分析：常规功能富集、GSEA/GSVA、PPI分析（找Hub基因）。

- **WGCNA路线**

这种方法旨在寻找协同表达的基因模块(module)，并探索基因网络与关注的表型之间的关联关系，挖掘网络关系中的核心基因或驱动基因（比如转录因子）。

- **细胞成分分析路线**

使用CiberSort、xCell（ssGSEA）等计算各类间质细胞的比例，进行细胞成分分析。

- **无监督聚类路线**

这个适用于探索新的疾病分类模式，除了常规的聚类，还可以尝试NMF、一致性聚类等方法。对于聚类所得的各个分类，有必要探索该类别的功能特征。也有必要对比现有分类与已有分类的优缺点、交集及相互分布关系。

- **与其他组学联合分析**

- **单细胞测序结果深度分析**



多组学交互分析的外部数据集（部分举例）

1. 从g:Profiler web server下载Gene Ontology(GO)的生物学过程和来自Reactome数据库的分子通路数据。
2. ICGC-TCGA PCAWG project的全基因数据，包括蛋白质编码序列，启动子，增强子和非翻译区域等。
3. 已知癌症基因：COSMIC Cancer Gene Census (CGC) database
4. METABRIC 数据库的不同亚型肿瘤样本的mRNA表达和拷贝数变异数据。
5. GTEx v7 data portal 的RNA-seq数据。
6. KEGG 数据库的不同通路靶点相关基因列表调用。
7. ENCODE project转录因子结合位点 (TFBS) 对应基因ChIP-seq数据。



免疫细胞浸润相关生信分析工具及分析流程

免疫细胞浸润相关生信分析工具

Tool	Type	Method	Cell types	Code availability	CellMix
TIminer	M	PrerankedGSEA	Different gene sets with 31 [10], 28 [11], and 64 cell types [12]	http://icbi.i-med.ac.at/software/timiner/timiner.shtml (Docker image)	
xCell	M	ssGSEA	64 immune and non-immune cell types	http://xcell.ucsf.edu/ (R script, web tool)	
MCP-counter	M	Geometric mean of expression of marker genes	8 immune cells, fibroblasts, and endothelial cells	http://github.com/ebecht/MCPcounter (R script)	
-	P	Linear least squares regression	17 immune cell types		lsfit
-	P	Constrained least square regression	-		qprog
DeconRNASeq	P	Constrained least square regression	-	DeconRNASeq package available on Bioconductor (R package)	
PERT	P	Non-negative maximum likelihood	-	Supplementary material in the original publication (Octave)	
CIBERSORT	P	Nu support vector regression	22 immune cell types	https://cibersort.stanford.edu/ (R script, java executable, web tool)	
TIMER	P	Linear least square regression	6 immune cell types	https://cistrome.shinyapps.io/timer/ (web tool)	
EPIC	P	Constrained least square regression	6 immune cell types, fibroblasts, endothelial cells, and uncharacterized cells	https://gfellerlab.shinyapps.io/EPIC_1-1 (R script, web-interface)	
quanTIseq	P	Constrained least square regression	10 immune cell types, uncharacterized cells	http://icbi.i-med.ac.at/software/quantiseq/doc/index.html (Docker image)	
deconf	C	Non-negative matrix factorization	-	Supplementary material in the original publication (R package)	deconf
ssKL	C	Non-negative matrix factorization	-		ssKL
ssFrobenius	C	Non-negative matrix factorization	-		ssFrobenius
DSA	C	Quadratic programming	-	https://github.com/zhandong/DSA (R package)	dsa
MMAD	C	Maximum likelihood over the residual sum of squares	-	http://sourceforge.net/projects/mmada/ (Matlab)	

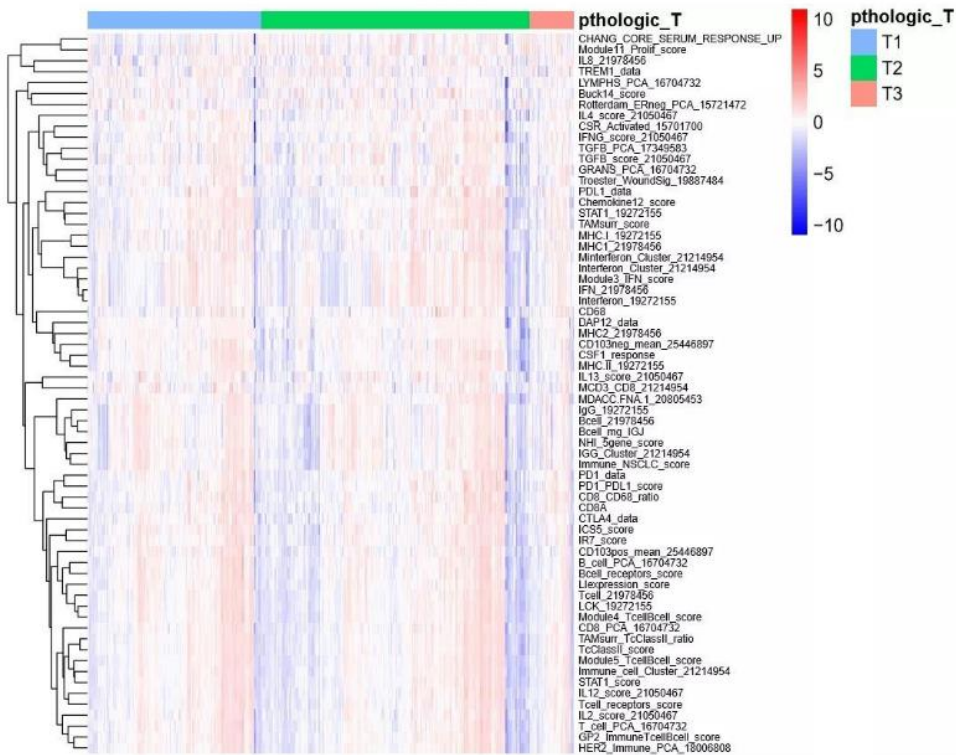
基于CIBERSORT工具的分析流程



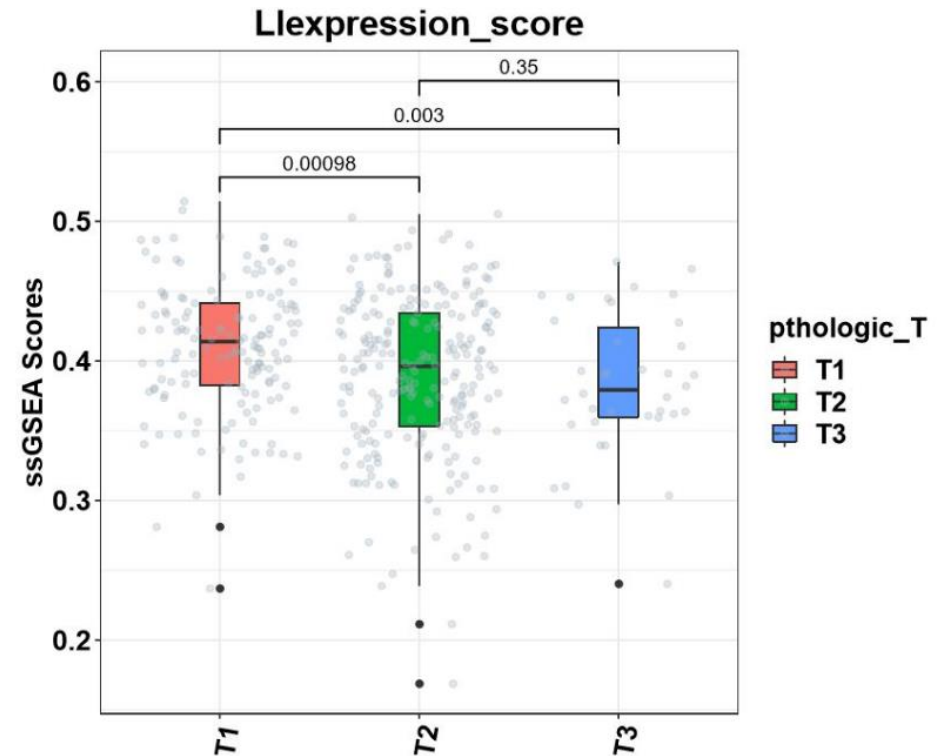
数据挖掘——肿瘤免疫浸润分析常见结果

免疫富集比较

根据样本的细胞类型和免疫激活相关基因集富集情况对不同临床分期的肿瘤人群进行聚类分析（如下图）



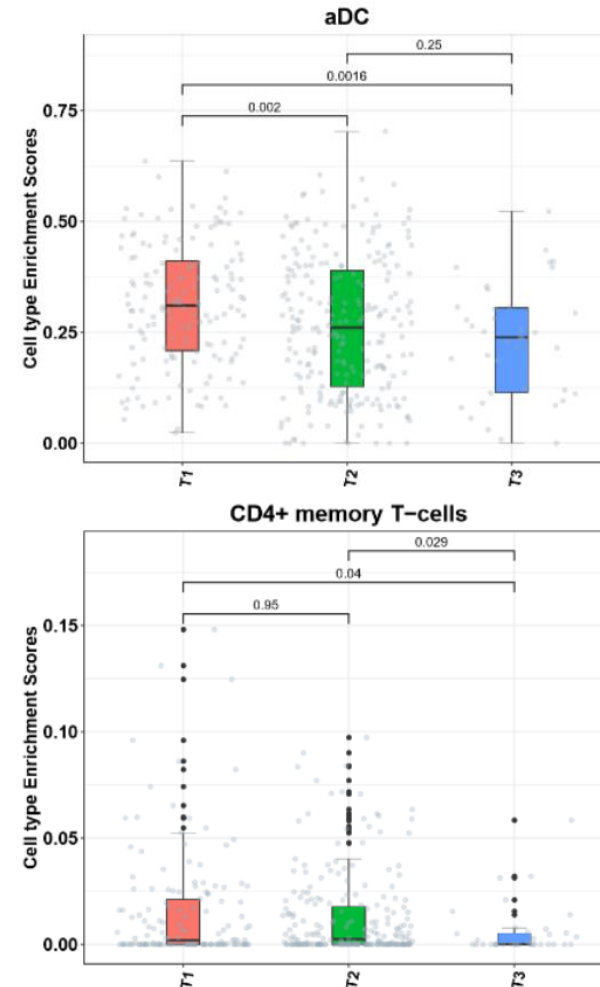
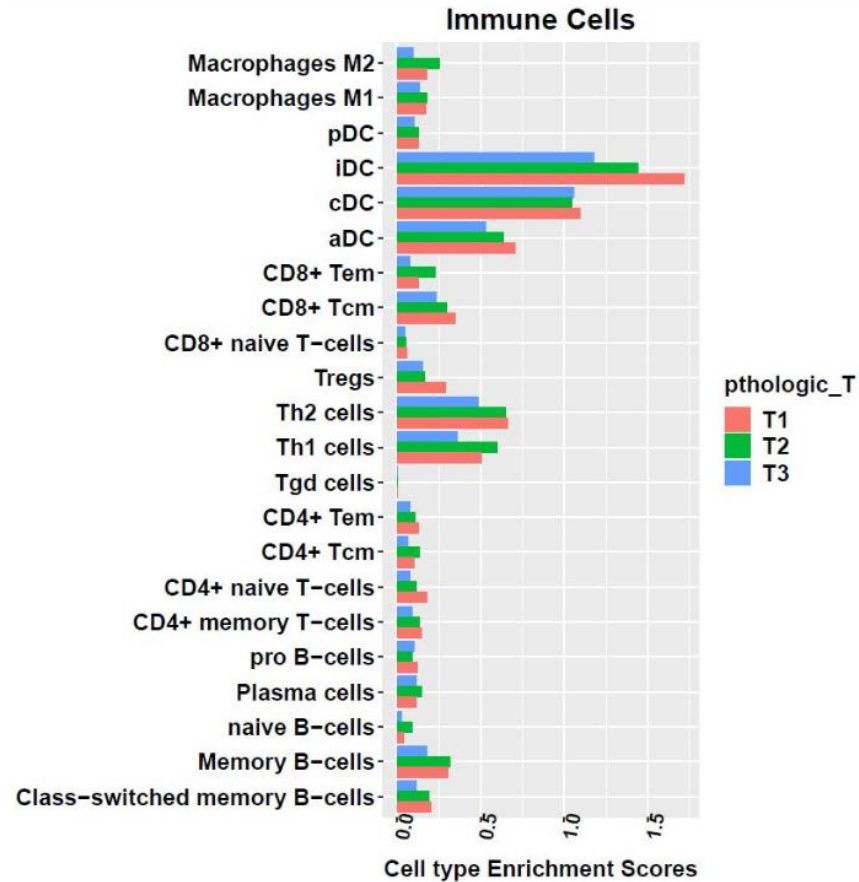
也可以根据每个免疫基因集的富集分数进行差异分析，分析不同临床分期的肿瘤病人显著差异的免疫功能（如下图）



数据挖掘——肿瘤免疫浸润分析常见结果

免疫细胞评分比较

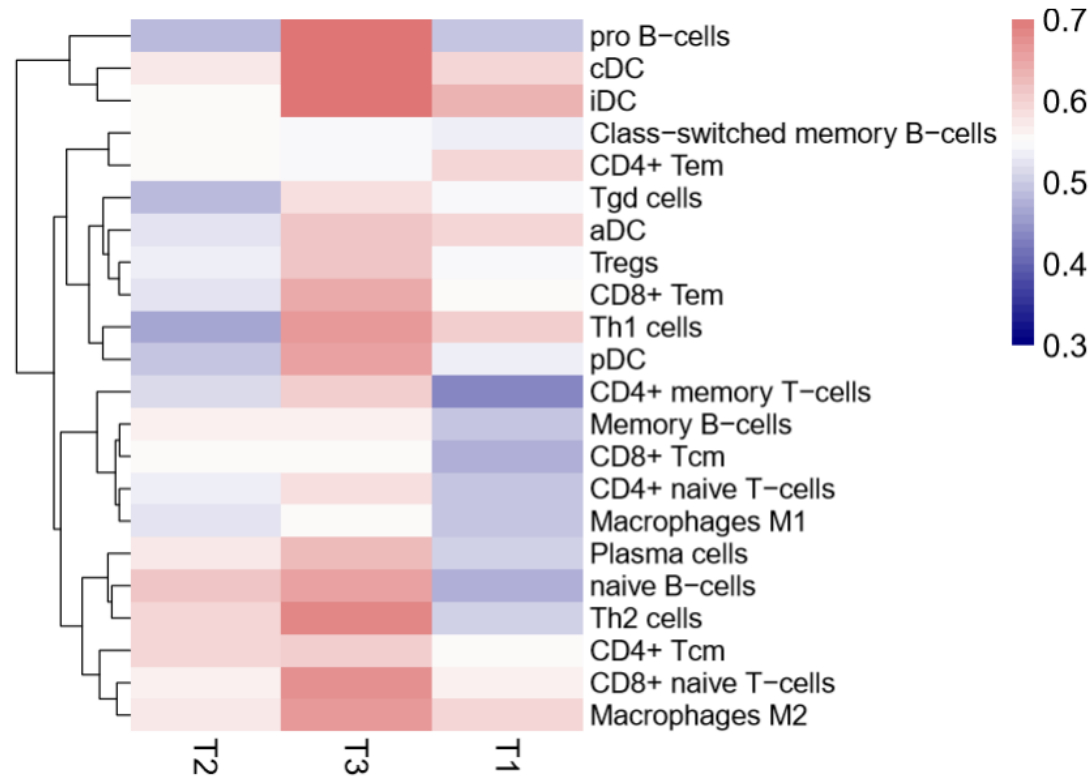
根据转录组数据基因表达的情况，我们可以计算免疫相关细胞类型比例评分，然后比较不同临床分期的肿瘤病人的每种免疫细胞类型的分布差异（如下图）



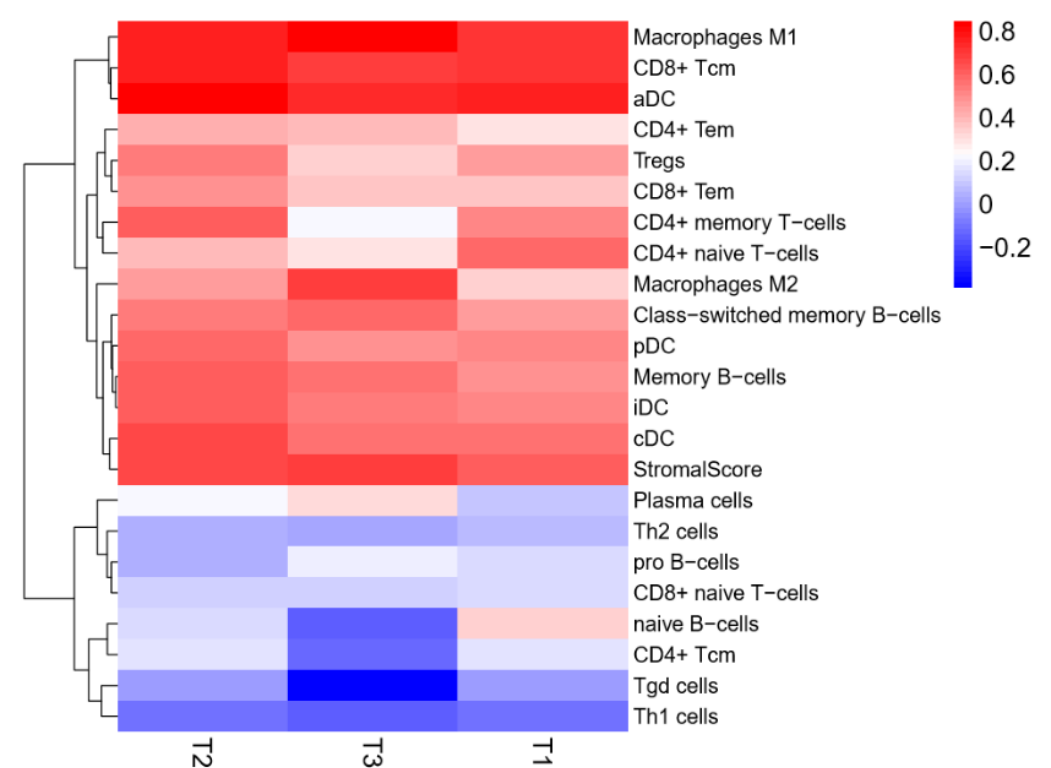
数据挖掘——肿瘤免疫浸润分析常见结果

免疫细胞类型在不同分组中对预后的影响

计算不同临床分期中免疫细胞类型对生存影响的c-index。c-index越大说明细胞类型对预后的影响越大。

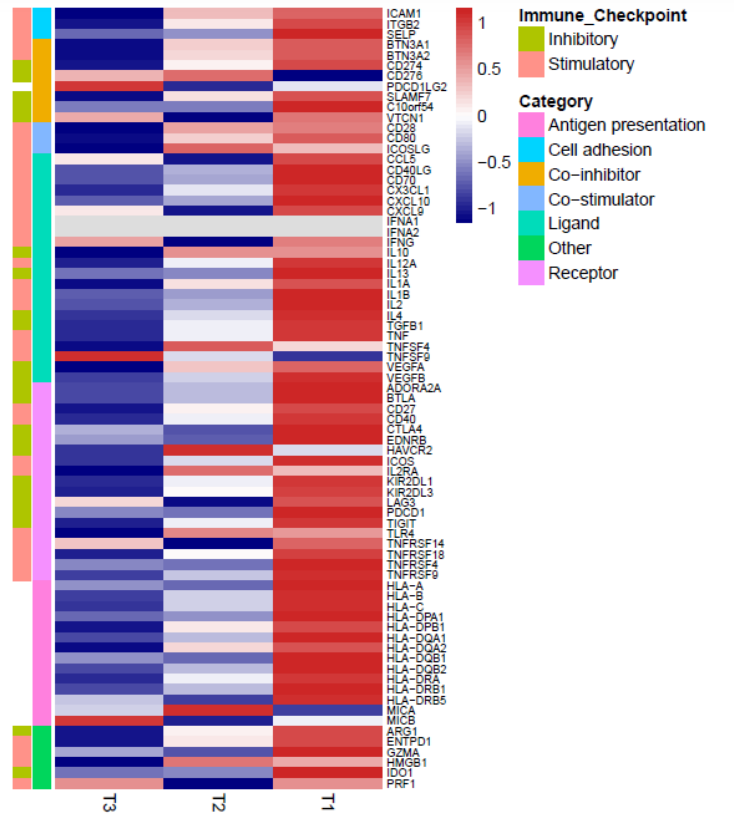


肿瘤组织中的基质和免疫评分比较

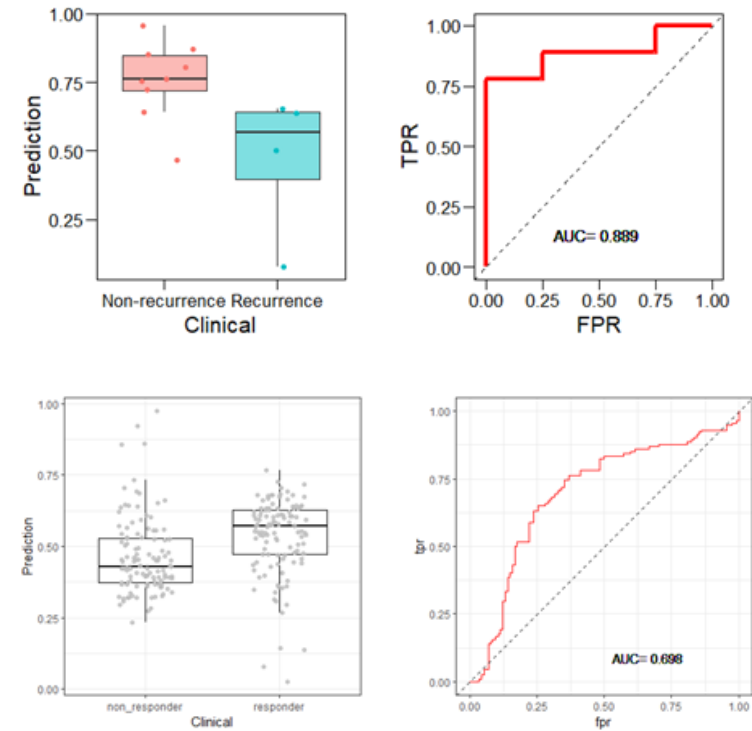


数据挖掘——肿瘤免疫浸润分析常见结果

免疫调节基因表达分析



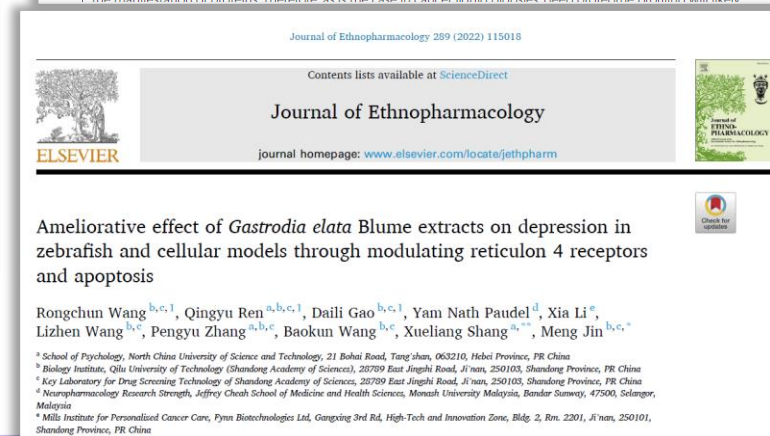
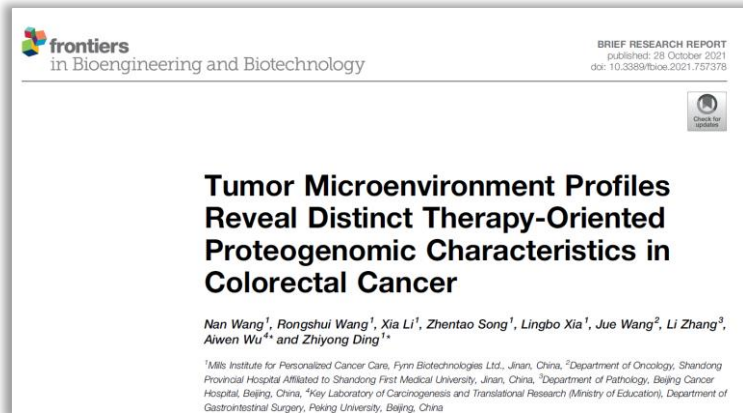
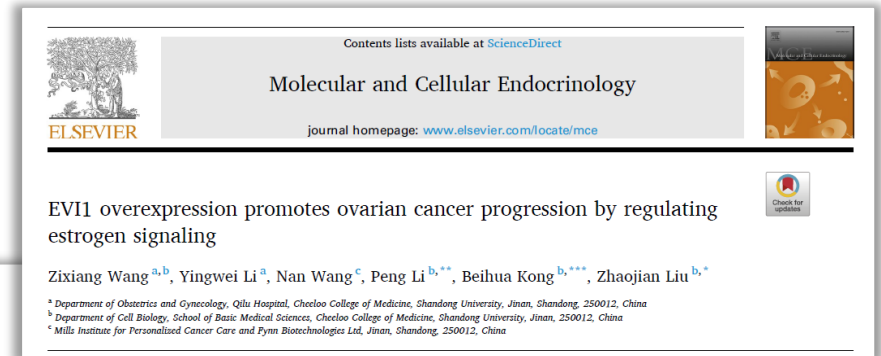
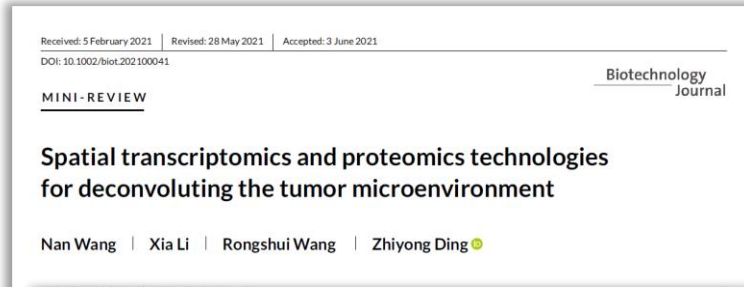
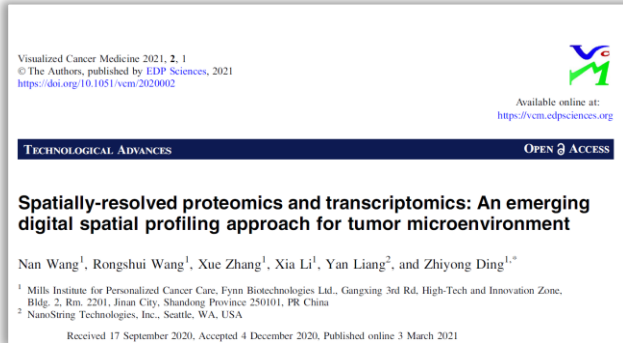
特征筛选/模型建立
Lasso, Cox, PLS-DA



非因生物多组学研究策略——助力转化医学研究



非因生物助力科学研究



非因生物简介——技术与团队



团队传承 MD 安德森的价值理念，以 TCGA 蛋白组学研究策略为核心技术，精心打造了全球领先，国内首个高通量 DSP 蛋白组学研发实验室，并成为国内唯一的 DSP 靶向蛋白组学技术服务商。

站在巨人肩膀上，结合多项国内领先的空间组学技术，建立基于中国人群的特有的癌症靶向蛋白组数据库，从空间多组学角度，为肿瘤异质性和肿瘤微环境研究开拓新的科研和临床转化制高点，助力癌症精准医疗。



非因生物简介——全球领先的临床蛋白组学和空间多组技术服务商



非因生物

非因生物是以新型癌症蛋白组学和空间多组学为核心技术、以癌症精准医疗研究与临床服务为核心业务的创新型生物医学公司, 在癌症的基础研究、转化医学、临床研究、药物开发、临床诊疗等各方面开展自主及合作研究, 并提供全方位高水准的科研及临床服务。

FynnBio



国际领先 国内领跑

- ◎ 拥有国际领先国内唯一的商业化 DSP 靶向蛋白组学技术
- ◎ 拥有多项全国领先的空間多组学技术
- ◎ 聚焦癌症靶向治疗与免疫治疗研究前沿

多领域 整合

- ◎ 新型多组学整合研究
- ◎ 药物联合治疗策略研究
- ◎ 癌症精准诊疗技术临床转化
- ◎ 伴随诊断标志物转化与临床应用

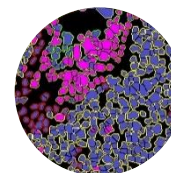
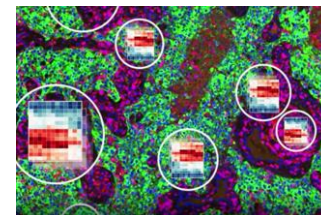
聚焦进阶

- ◎ 高通量靶向蛋白组学与微环境研究一站式解决方案
- ◎ DSP 反相蛋白微阵列技术
- ◎ 空间多组学技术

RPPA反相蛋白微阵列蛋白组学平台



空间多组学平台



非因生物简介——聚焦痛点问题解决

临床蛋白组学

难取材，样本难处理

- 专属的蛋白提取液。
- 简单的操作方式，与传统 western blot一致的样本处理流程。
- 无需额外处理步骤。

难以解决的批次效应

- 所有样本在同一实验流程中完成，完全消除时空造成的差异。
- 标志物筛选的下游大样本验证最佳解决方案。

有价值的生物学信息被淹没

- 基于高通量免疫反应的靶向蛋白组学，更适合中低丰度表达蛋白的定量研究。

下游验证的便利性

- 弥补高通量表达谱分析下游验证的瓶颈。
- 结果更容易在 western blot, IHC等传统技术层面得到验证，大大提升研究水平与完整。

空间多组学

难取材，样本难处理

- 无需单细胞研究中复杂细胞解离与活性要求。
- 适用于各类临床样本：FFPE，TMA组织芯片，新鲜冰冻组织等。
- 适用于临床前瞻性研究和回溯性研究。

单细胞无法获取微环境空间信息

- 在异质性研究同时，实现空间分布信息获取；
- 高通量基因蛋白组共分析，可实现原位18000重转录组与100重蛋白组共分析数据挖掘工作
- 单细胞研究的下游验证挖掘工具，提升微环境研究的深度

数据解读中的困境

- 标准化和模块化的分析流程，详尽的研究报告，支持到各类分析需求。
- 专业的售后技术支持团队，全程配合并满足分析需求，达到既定研究目标。



非因生物简介——致力于转化医学

转化医学研究综合解决方案

基础研究

◆ RPPA 蛋白组学

国内唯一技术服务商；
350+ 经严格验证的抗体资源库；
1700+ 学术论文，8+ 平均影响因子

◆ DSP空间多组学

DSP技术合作开发方；
国内首个官方认证技术服务商；
80+项目，800+样本；
100+学术论文，10+平均影响因子

◆ 单细胞空间蛋白组学

国内领先的空间单细胞蛋白组学服务商；
350+经严格验证的抗体资源库；
40+学术论文，5+平均影响因子

转化医学

◆ RPPA蛋白组学

临床蛋白生物标志转化的完美解决方案；
高样本通量（单次上样多达1000+）；
多标志物平行分析（同时分析10-500个潜在生物标志物）；
高度可定制化（靶点根据需求开发）；
高准确度（基于高度定量的免疫学反应原理）；
广泛适用于组织和体液来源的样本

◆ 空间多组学

基于微环境的生物标志物转化解决方案

临床应用

◆ RPPA蛋白组学

作为新型的LDT药物伴随诊断技术，已经在2021年开始实现临床应用；

临床适应症开发涵盖乳腺癌，结直肠癌，肺癌，胰腺癌等领域；

非因生物致力打造以DSP技术为核心竞争力的临床伴随诊断产品。



非因生物Mills癌症个体化诊疗研究中心(MIPCC)——国际标准的精准医疗研究中心



Mills癌症个体化诊疗研究中心



RPPA蛋白组学平台



细胞学平台



分子生物学平台



nCounter及空间生物学平台



空间单细胞表型平台



病理学平台



单细胞转录组平台

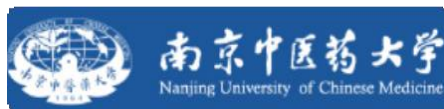
部分合作单位



Henlius



清华大学



山东第一医科大学附属省立医院
山东省立医院



山东第一医科大学附属肿瘤医院
山东省肿瘤医院
山东大学附属山东省肿瘤医院



深圳市第三人民医院
THE THIRD PEOPLE'S HOSPITAL OF SHENZHEN



中国科学院大学附属肿瘤医院
Cancer Hospital of The University of Chinese Academy of Sciences
浙江省肿瘤医院(浙江省癌症中心)



郑州大学第一附属医院
The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University
郑州大学第一临床学院(原河南医科大学第一附属医院)



中国医学科学院肿瘤医院
Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences



复旦大学附属
中山医院
ZHONGSHAN HOSPITAL



非因生物 专注癌症精准医疗 / 全球领先的蛋白组学·空间多组学技术平台



非因生物 专注癌症精准医疗 全球领先的蛋白组学·空间多组学技术平台



技术服务
热线

400-800-3119



网址

/ www.fynnbio.com



地址

/ 济南市高新区未来创业广场 2 号楼 22 层

合作共赢 非因助力



非因生物科技（山东）有限公司
Fynn Biotechnologies Ltd.



非因生物微信公众号