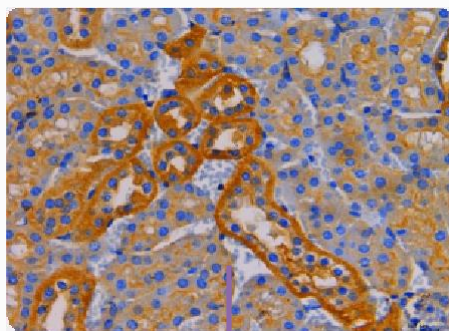


基于TMA组织芯片策略的DSP空间组学研究设计

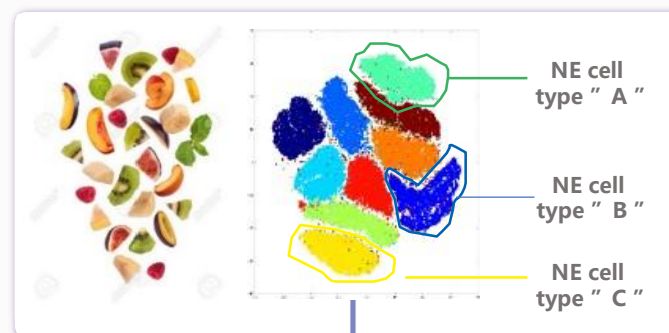
空间生物学的革命正在发生

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。

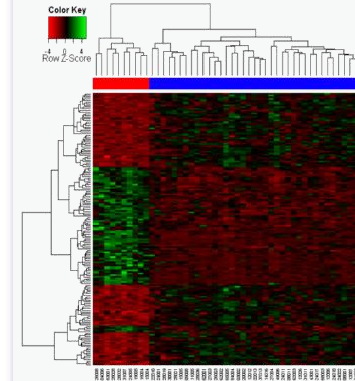


解决现有技术存在问题，可进行RNA - 蛋白共分析

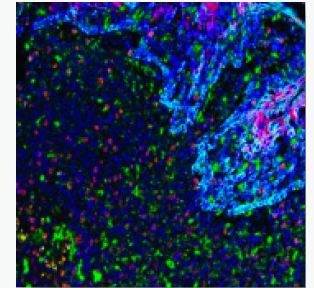
高维度表达谱分析

OR

低维度图像分析



+ 高维度 -
- 空间性 +
+ 定量性 -
+ 准确性 -



▸ 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)

高维度分析与空间表达信息的解决方案

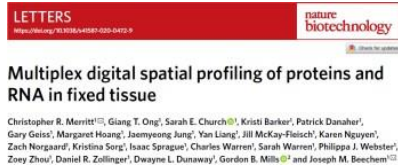
Gordon B. Mills



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。



适用于FFPE样本和新鲜样本



样本制备简便容易



兼顾形态学与原位信息对应关系



适用于大样本空间组分析 (TMA)



样本覆盖区域大，不同组织区域或结构异质性信息更为全面丰富



可同时分析蛋白和RNA，可实现原位全转录组高通量分析



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
- 前处理简单, 无需优化, 视野区域广阔, 无需盲选

- 靶向检测, 对中低表达靶点友好
- 自动化程度高, 结果可重复性强

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



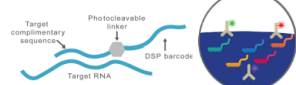
蛋白检测

待测靶点抗体+特定标记荧光抗体(或探针)共孵育

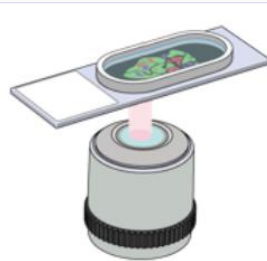
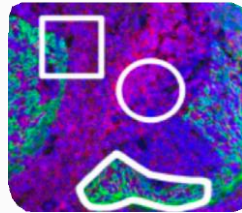


RNA 检测

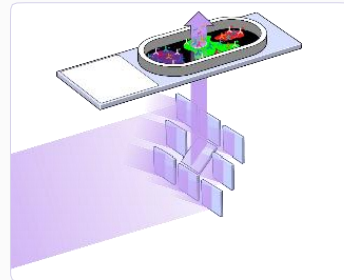
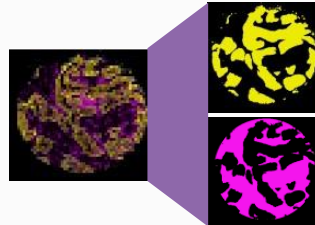
探针孵育+特定标记荧光抗体(或探针)共孵育



形态学标记荧光成像 ROI (感兴趣区域) 圈选

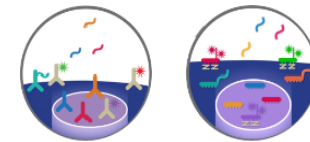


区域划分 (Segment, 可选) 紫外光解 DSP barcode

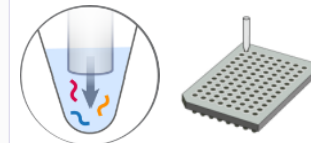


逐个 ROI 收集 DSP barcode 到 96 孔收集板

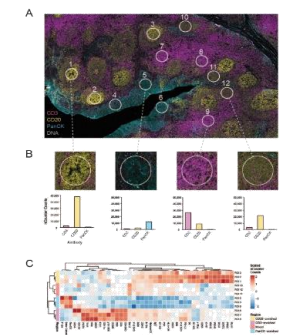
紫外光照射, linker断裂, DSP barcode解离至上层缓冲液



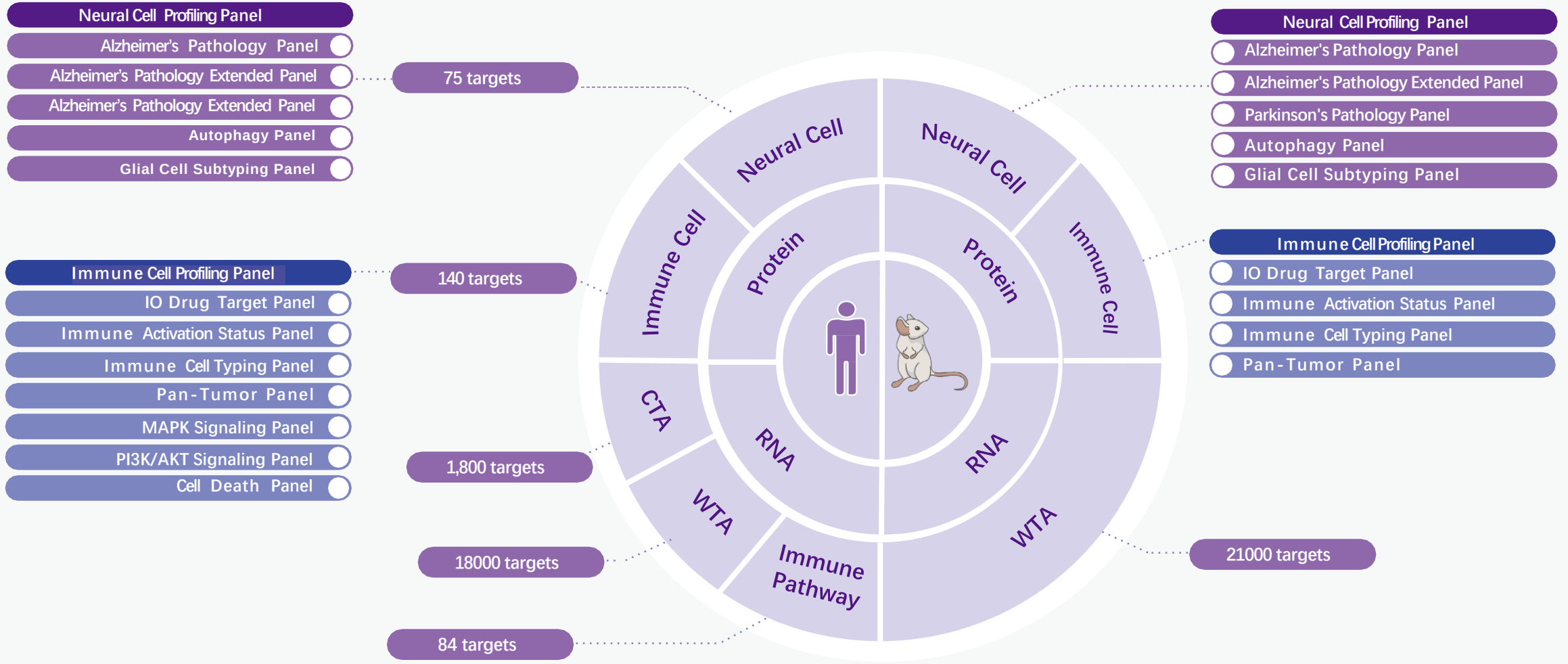
毛细管将解离的DSP barcode收集至96孔板



计数、测序和数据分析



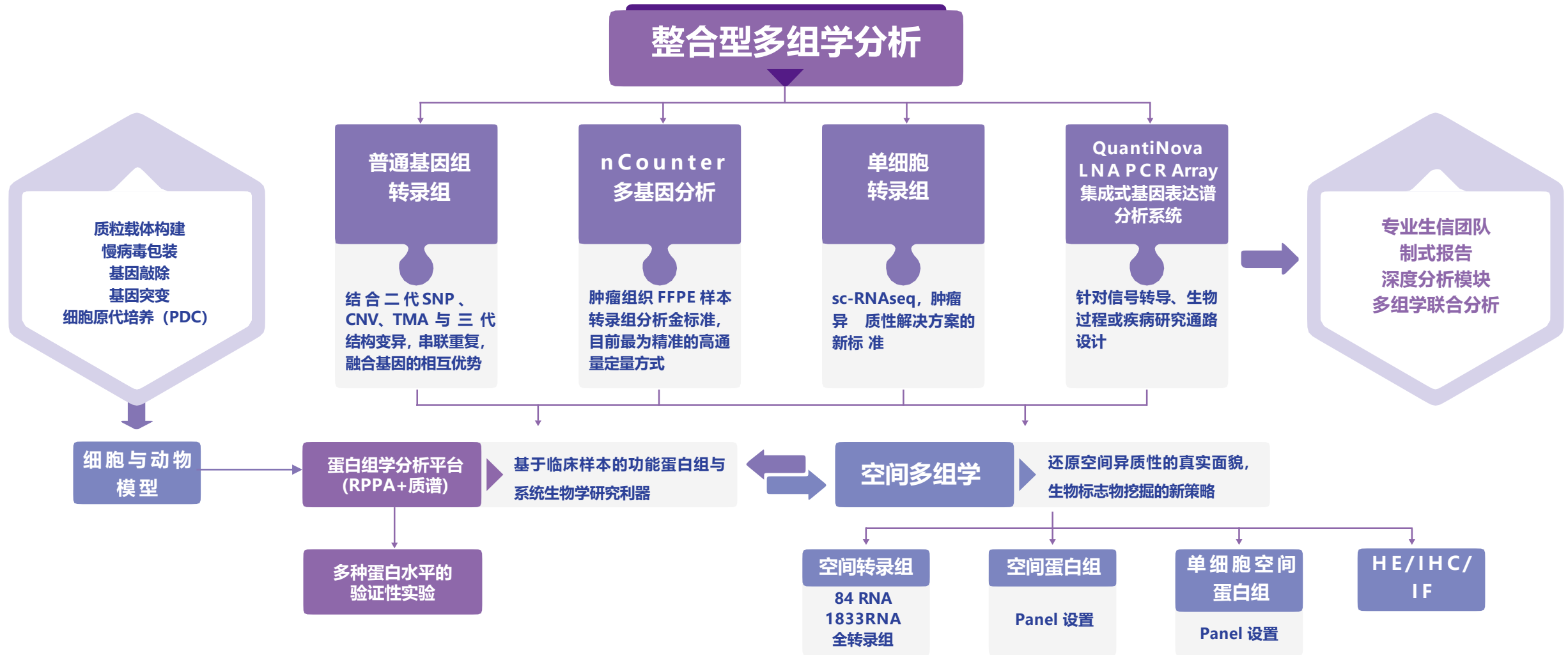
肿瘤微环境相关DSP检测panel 设置 (蛋白+RNA)



蛋白组 and 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



■ 本次系列讲座探讨的核心内容

- 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？



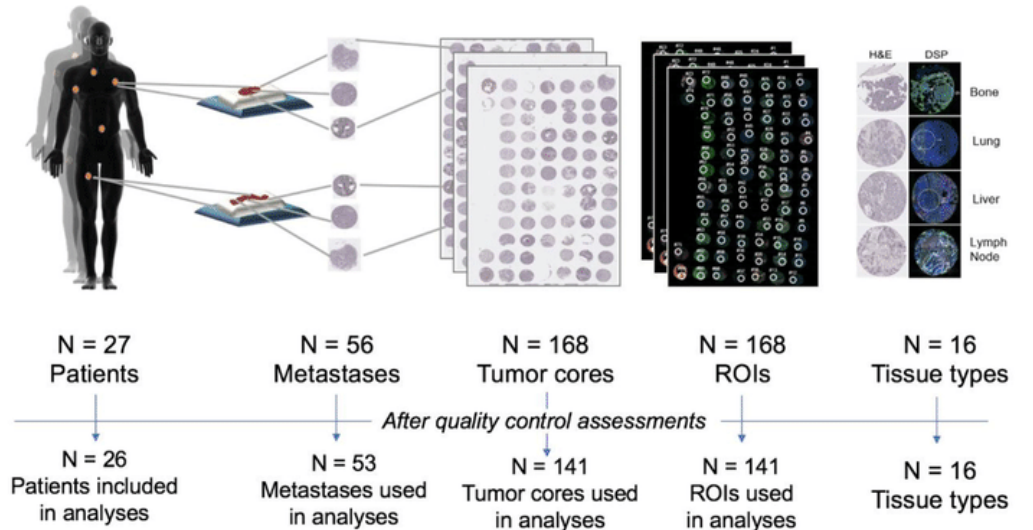
DSP空间组学的样本规划



普通组织切片

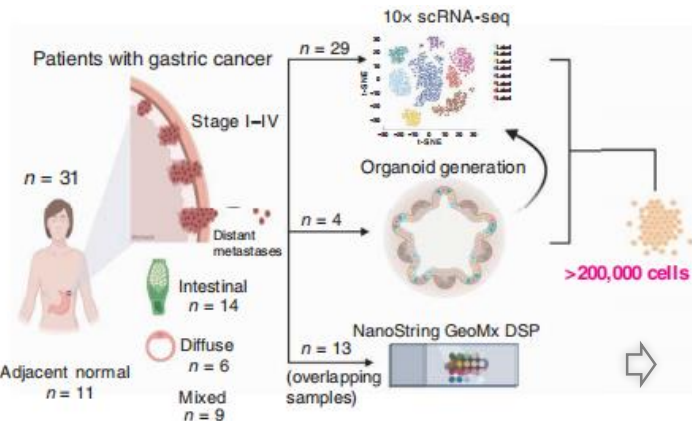
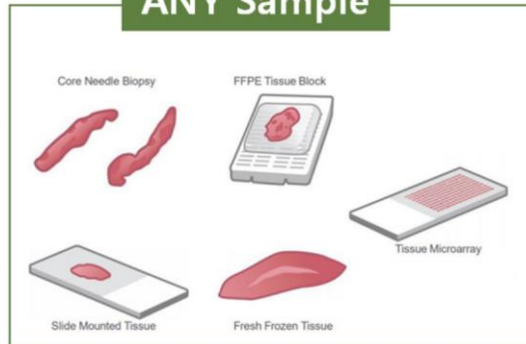


组织芯片(TMA)



满足DSP分析的样品类型

ANY Sample



DSP空间组学的样本规划

样本收集 (穿刺/手术)

瘤内异质性

Clinical Cancer Res 2020 (软骨肉瘤)

原发转移灶异质性

Journal of Immunotherapy of Cancer
2022 (肉瘤)

外周基质微环境

Journal of Immunotherapy of Cancer
2020 (前列腺癌骨转移)

特定细胞亚群

Cancer Cell 2021 (胰腺癌)

特定病理学形态学结构

Nature 2019 (黑素瘤相关三级淋巴结构)

样本收集(组织芯片)

肿瘤核心/病灶异质性

Nat Comm 2020 (前列腺癌---常规转录组/
基因组联用)

肿瘤免疫微环境

Clinical Cancer Res 2020 (肺癌生物
标志物挖掘)

外周基质微环境

Cell Rep 2021 (神经母细胞瘤相关基质微环境)

特定细胞亚群

Clinical Cancer Res 2019 (黑素瘤-巨噬细胞/免疫基质)

特定病理学特征/形态学结构

Nature 2019 (黑素瘤相关三级淋巴结构)



DSP-TMA研究策略

CLINICAL CANCER RESEARCH

[Home](#) [About](#) [Articles](#) [For Authors](#) [Alerts](#) [News](#) [COVID-19](#) [Webinars](#) [Search Q](#)

Precision Medicine and Imaging

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

Maria I. Toki, Christopher R. Merritt, Pok Fai Wong, James W. Smithy, Harriet M. Kluger, Konstantinos N. Syrigos, Giang T. Ong, Sarah E. Warren, Joseph M. Beechem, and David L. Rimm

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0104 Published September 2019 [Check for updates](#)

nature cancer

[Explore content](#) [About the journal](#) [Publish with us](#)

[nature](#) > [nature cancer](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Published: 08 April 2021](#)

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

[Katherine L. McNamara](#), [Jennifer L. Caswell-Jin](#), [Rohan Joshi](#), [Zhicheng Ma](#), [Eran Kotler](#), [Gregory R. Bean](#), [Michelle Kriner](#), [Zoey Zhou](#), [Margaret Hoang](#), [Joseph Beechem](#), [Jason Zoeller](#), [Michael F. Press](#), [Dennis J. Slamon](#), [Sara A. Hurvitz](#) & [Christina Curtis](#) [✉](#)

CLINICAL CANCER RESEARCH

[Home](#) [About](#) [Articles](#) [For Authors](#) [Alerts](#) [News](#) [COVID-19](#) [Webinars](#) [Search Q](#)

Translational Cancer Mechanisms and Therapy

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

Jon Zugazagotia, Swati Gupta, Yuting Liu, Kit Fuhrman, Scott Gettinger, Roy S. Herbst, Kurt A. Schalper, and David L. Rimm

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0175 Published August 2020 [Check for updates](#)



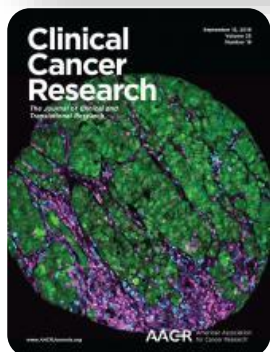
Article

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

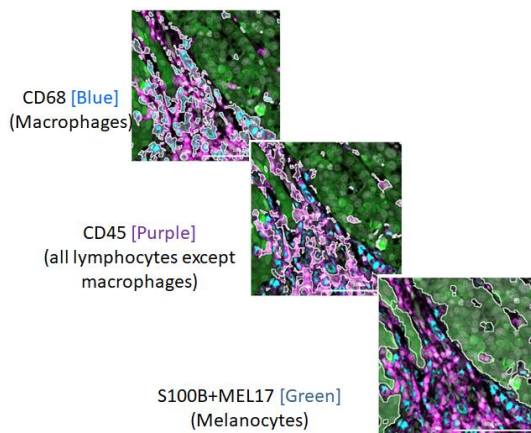
James Monkman ^{1,2,3} [ORCID](#), Touraj Taheri ^{4,5}, Majid Ebrahimi Warkiani ⁶, Connor O’Leary ^{1,2,3,7}, Rahul Ladwa ^{5,7}, Derek Richard ^{1,2,3}, Ken O’Byrne ^{1,2,3,7} and Arutha Kulasinghe ^{1,2,3,8,*} [ORCID](#)



应用案例1——黑素瘤免疫治疗生物标志物微环境探索



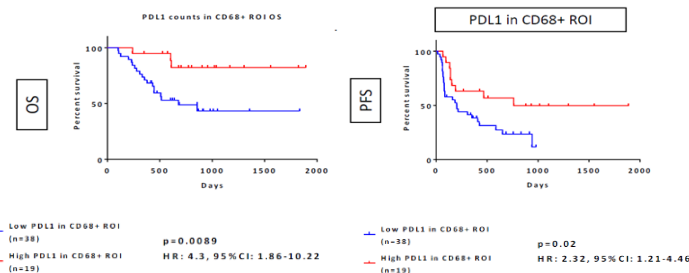
杂志封面展示了黑色素瘤在DSP系统的镜下染色情况：黑色素瘤（绿色），CD68+（蓝色），CD45+（紫色）



44 蛋白靶标
60 免疫检查点抑制剂病人TMA样本

空间信息对新型标志物的发现非常重要

- PDL1 在CD68富集区表现出与OS强相关, (而不在淋巴细胞与肿瘤细胞中)
- B2M 在CD45富集区域与PFS和OS均相关
- 结果独立于术前治疗方案

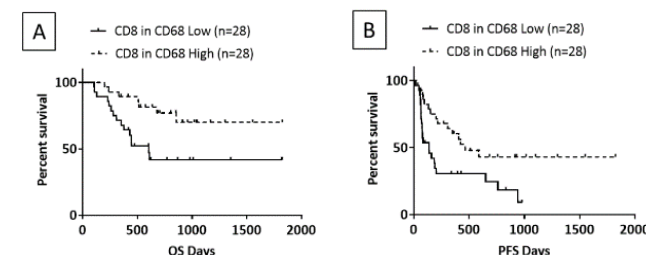


DSP实验

确定区域划分 (Segment) 策略
黑色素瘤 (S100B+MEL17, 绿色)
巨噬细胞 (CD68+, 蓝色)
淋巴细胞 (CD45+, 紫色)

不同靶点在不同空间位置的表达情况不同
不同位置的表达情况相同但与预后的关系不同

- CD8在CD68+ 和CD45+ 区域中的表达.
- CD8 在CD68+ (Macrophages) 区域高表达和 OS and PFS相关
- CD8 在CD45+ (Lymphocytes) 区域高表达与 OS and PFS无显著相关



应用案例2：PD-L1蛋白表达数字化测定在非小细胞肺癌组织微阵列中的诊断应用研究思路

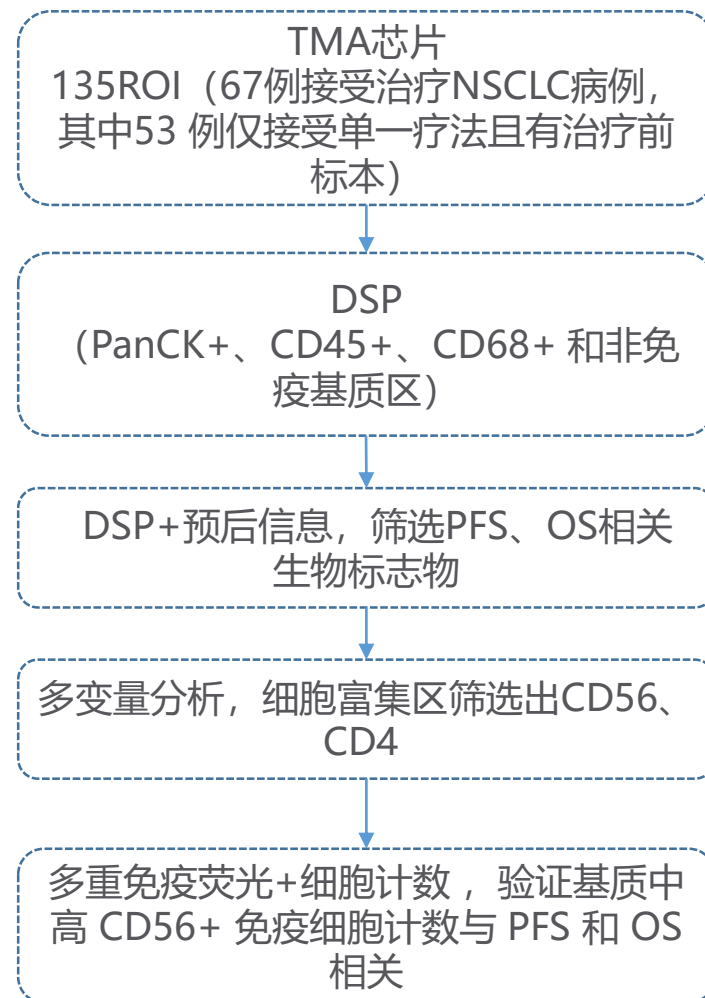
CLINICAL CANCER RESEARCH

IF:12.534

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

研究背景

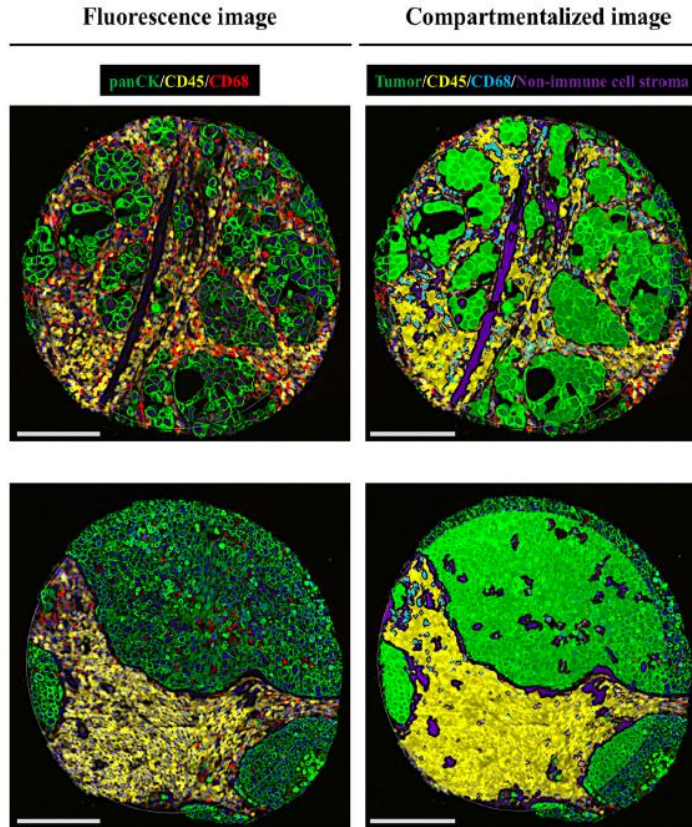
PD-1检查点阻断是治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的标准疗法。然而，只有少数NSCLC患者真正受益于这些药物，特别是当单药治疗时，因此需要更可靠的疗效预测生物标志物。



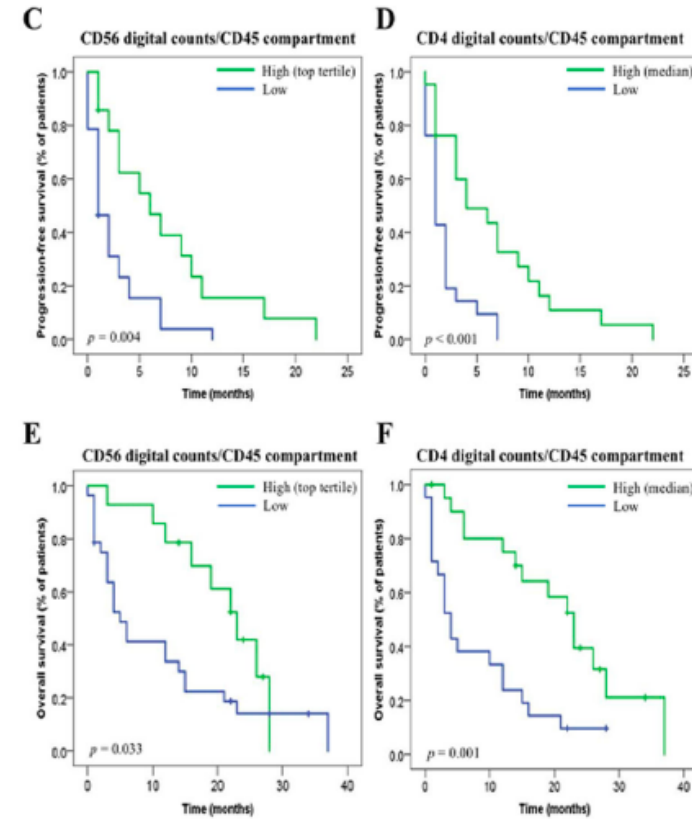
应用案例2：PD-L1蛋白表达数字化测定在非小细胞肺癌组织微阵列中的诊断应用

DSP

多变量分析



每个ROI中定义4个组织区域肿瘤细胞 (panCK+)、白细胞 (CD45+)、巨噬细胞 (CD68+) 和非免疫基质区 (SYTO13+/panCK-/CD45-/CD68-)，同时量化了39个蛋白标记物



淋巴细胞群落中的CD56+ NK细胞和CD4+ T 细胞高表达患者的无进展生存期和总生存期更优



应用案例2：PD-L1蛋白表达数字化测定在非小细胞肺癌组织微阵列中的诊断应用

Table 2. Markers significantly associated with PFS and/or OS benefit under PD-1 checkpoint blockade.

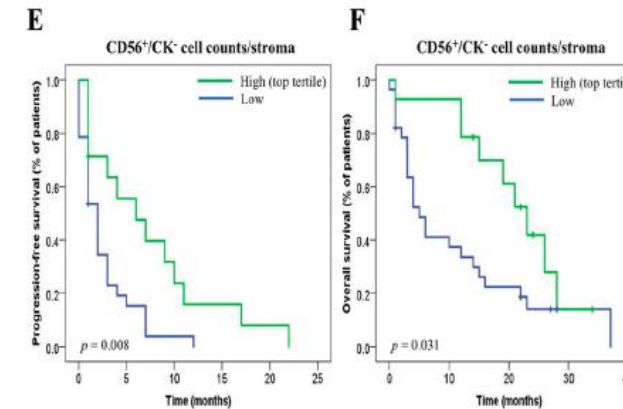
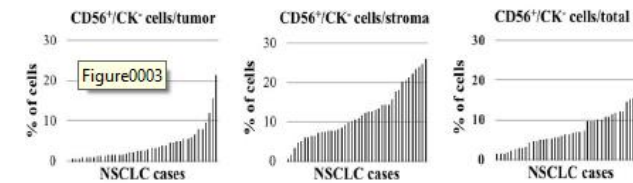
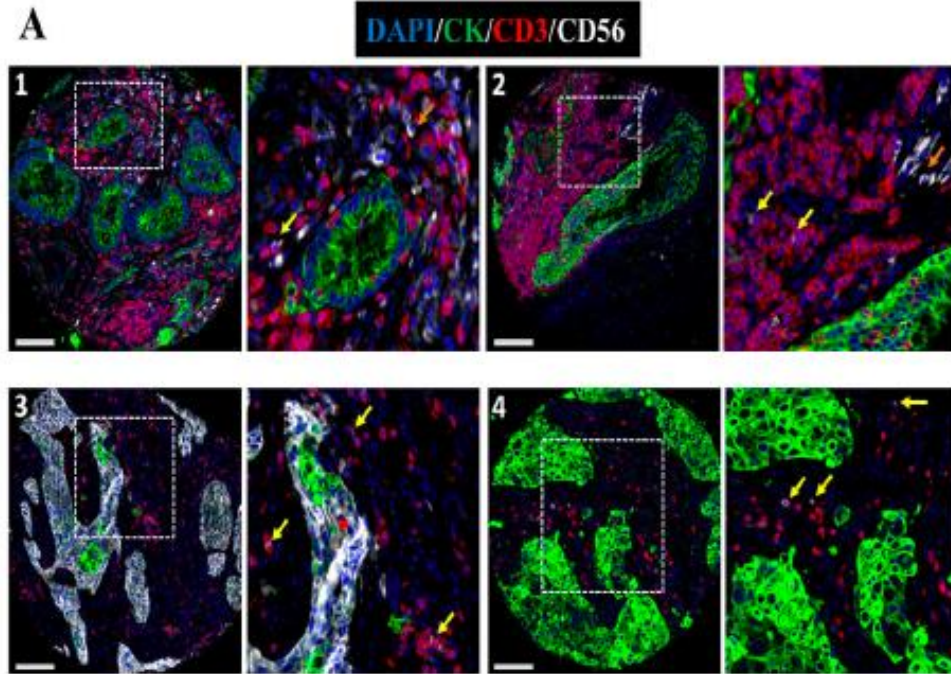
Markers associated with PFS benefit									
Compartment	Marker	Cut-off point	Log-rank <i>P</i>	Adjusted log-rank <i>P</i>	Univariate HR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P</i> _{adjusted}	Multivariate HR (95% CI)	<i>P</i>
Tumor compartment	VISTA	Top tertile	0.001	0.014	2.60 (1.37–4.92)	0.003	0.043	2.49 (1.15–5.40)	0.020
	CD127	Top tertile	0.001	0.014	2.65 (1.41–4.98)	0.002	0.043	2.39 (1.07–5.34)	0.033
CD45 compartment	CD56	Top tertile	0.004	0.124	0.38 (0.18–0.80)	0.011	0.341	0.24 (0.08–0.66)	0.006
	CD4	Median	<0.001	<0.001	0.33 (0.16–0.67)	0.002	0.062	0.31 (0.12–0.76)	0.011
CD68 compartment	ARG1	Median	0.006	0.18	0.43 (0.21–0.86)	0.018	0.279	0.37 (0.16–0.83)	0.016
	CTLA4	Top tertile	0.023	0.736	1.95 (1.01–3.77)	0.044	0.858	2.36 (1.06–5.25)	0.035
Markers associated with OS benefit									
Compartment	Marker	Cut-off point	Log-rank <i>P</i>	Adjusted log-rank <i>P</i>	Univariate HR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P</i> _{adjusted}	Multivariate HR (95% CI)	<i>P</i>
Tumor compartment	STING	Top tertile	0.002	0.058	0.31 (0.14–0.69)	0.004	0.116	0.33 (0.12–0.89)	0.029
CD45 compartment	CD45	Median	0.003	0.022	0.35 (0.16–0.73)	0.005	0.045	0.47 (0.15–1.44)	0.19
	CD56	Top tertile	0.033	0.127	0.44 (0.20–0.97)	0.044	0.169	0.26 (0.09–0.75)	0.014
CD68 compartment	PD-L1	Median	0.038	0.167	0.48 (0.23–0.99)	0.049	0.20	0.43 (0.15–1.23)	0.11
	CD68	Top tertile	0.024	0.119	0.43 (0.20–0.93)	0.033	0.159	0.16 (0.05–0.47)	0.001
	CD4	Median	0.001	0.015	0.31 (0.15–0.66)	0.002	0.030	0.23 (0.08–0.66)	0.007
	B2M	Median	0.001	0.015	0.28 (0.12–0.61)	0.002	0.030	0.35 (0.12–0.96)	0.041
	CD20	Median	0.008	0.048	0.38 (0.18–0.82)	0.014	0.084	0.83 (0.32–2.16)	0.71
	CD3	Median	<0.001	<0.001	0.24 (0.11–0.53)	<0.001	<0.001	0.24 (0.09–0.64)	0.005
CD68 compartment	CD8	Top tertile	0.016	0.117	0.38 (0.17–0.87)	0.023	0.159	0.54 (0.21–1.39)	0.20
	TIM3	Median	0.003	0.022	0.32 (0.14–0.72)	0.006	0.045	0.62 (0.24–1.60)	0.32
	CD40	Median	0.039	0.167	0.48 (0.24–0.99)	0.049	0.20	0.47 (0.17–1.28)	0.14
	ICOS	Top tertile	0.006	0.093	0.35 (0.16–0.78)	0.010	0.155	0.26 (0.08–0.79)	0.018
	CD45	Top tertile	0.004	0.064	0.33 (0.15–0.74)	0.008	0.128	0.31 (0.11–0.87)	0.026
	PD-L1	Top tertile	0.035	0.243	0.45 (0.21–0.98)	0.045	0.288	0.55 (0.22–1.39)	0.17
	CD20	Top tertile	0.004	0.064	0.33 (0.14–0.74)	0.007	0.128	0.56 (0.21–1.45)	0.23
	GNZB	Top tertile	0.023	0.243	0.42 (0.18–0.93)	0.032	0.288	0.55 (0.20–1.47)	0.23



应用案例2：PD-L1蛋白表达数字化测定在非小细胞肺癌组织微阵列中的诊断应用

多重免疫荧光

细胞计数



基于多重免疫荧光和细胞计数的正交方法(inForm)，同队列验证间质中高 CD56+ 免疫细胞计数与 PFS 和 OS 相关。



应用案例3：绘制非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤微环境图谱



IF: 6.126



Article

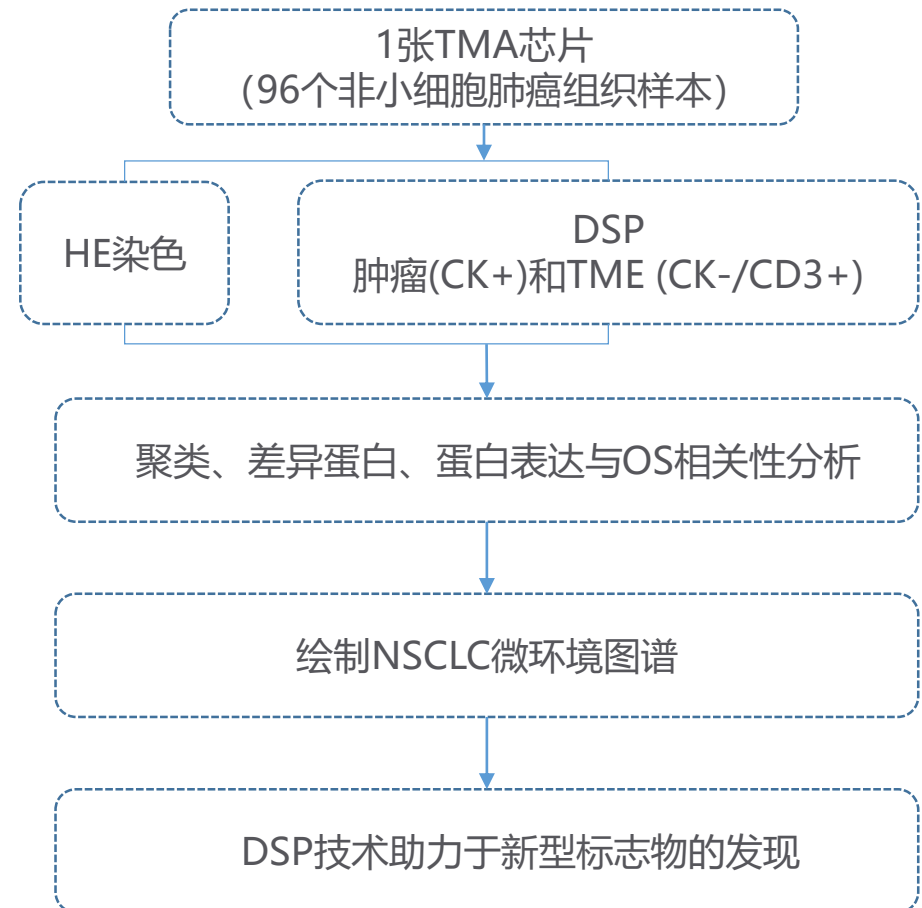
High-Plex and High-Throughput Digital Spatial Profiling of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)

James Monkman^{1,2,3} , Touraj Taheri^{4,5}, Majid Ebrahimi Warkiani⁶, Connor O'Leary^{1,2,3,7}, Rahul Ladwa^{5,7}, Derek Richard^{1,2,3}, Ken O'Byrne^{1,2,3,7} and Arutha Kulasinghe^{1,2,3,8,*} 

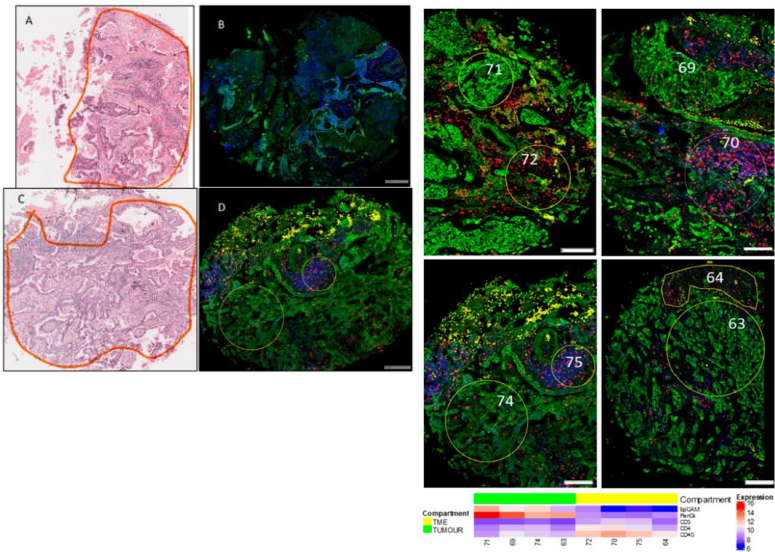
研究背景

肺癌被称为头号癌症杀手，非小细胞肺癌占肺癌总数的85%。肺癌常在晚期被确诊，导致其预后很差，五年生存率低于20%。随着新兴疗法免疫检查点阻断疗法的成功应用，15-40%的患者生存期延长，因此需要更为准确的预前分子标志物来指导患者分层治疗。肿瘤微环境（细胞类型、密度和位置以及表型和免疫细胞功能）已被用于更深入地了解肿瘤-免疫细胞相互作用，可以为免疫检查点疗法的突破提供全新的治疗线索。传统的IHC无法判断细胞的空间信息及相互作用。

研究思路



应用案例3：绘制非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤微环境图谱



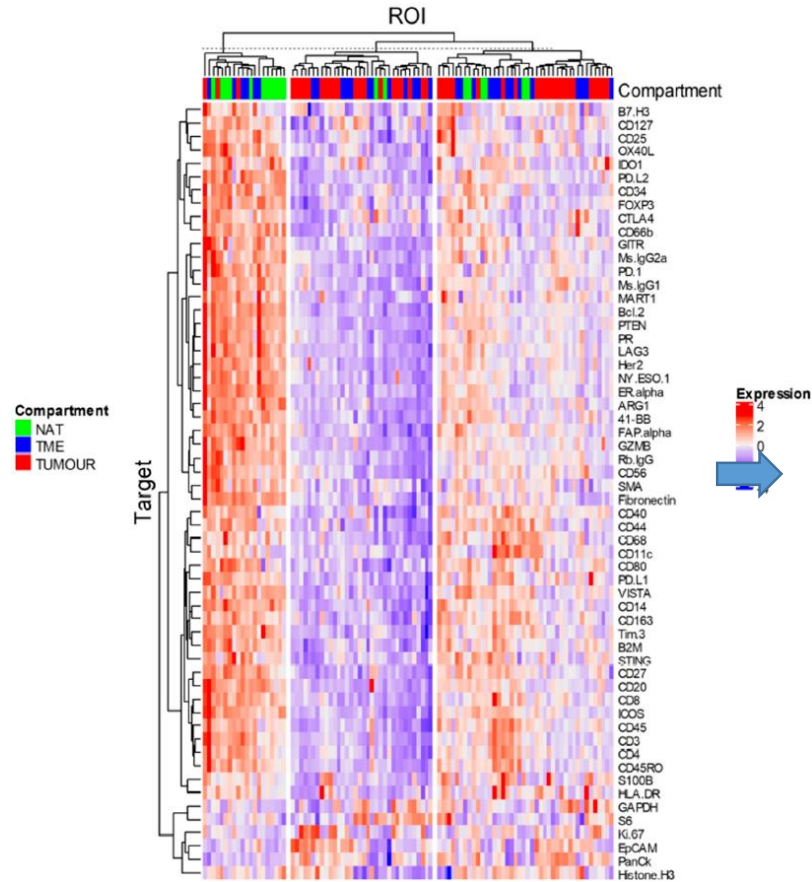
根据H&E标出肿瘤区域，与**PanCK**（绿色）、**CD45**（黄色）、**CD3**（红色）和**核染**（蓝色）的形态学标记一起使用来选择肿瘤（CK+）、TME（CK-/CD3+）、癌旁正常组织的**感兴趣区域 (ROI)**

Table 1. Target proteins within Nanostring Digital Spatial Profiler (DSP) modules.

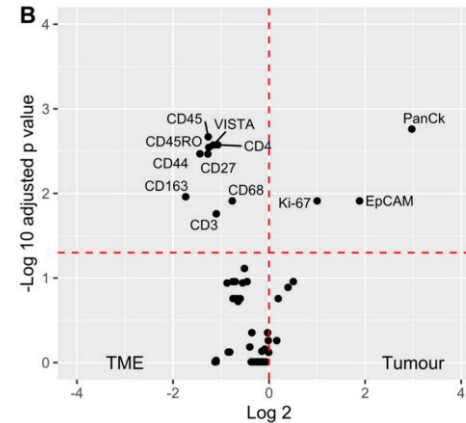
Controls	Immune Cell Profiling	IO Drug Target	Immune Activation Status	Immune Cell Typing	Pan-Tumour Module
Rb IgG	PD-1	4-1BB	CD127	CD45RO	MART1
Ms IgG1	CD68	LAG3	CD25	FOXP3	NY-ESO-1
Ms IgG2a	HLA-DR	OX40L	CD80	CD34	S100B
Histone H3	Ki-67	Tim-3	ICOS	CD66b	Bcl-2
S6	Beta-2M	VISTA	PD-L2	FAP-alpha	EpCAM
GAPDH	CD11c	ARG1	CD40	CD14	Her2
	CD20	B7-H3	CD44	CD163	PTEN
	CD3	IDO1	CD27		ER-alpha
	CD4	STING			PR
	CD45	GITR			
	CD56				
	CD8				
	CTLA4				
	GZMB				
	PD-L1				
	PanCk				
	SMA				
	Fibronectin				



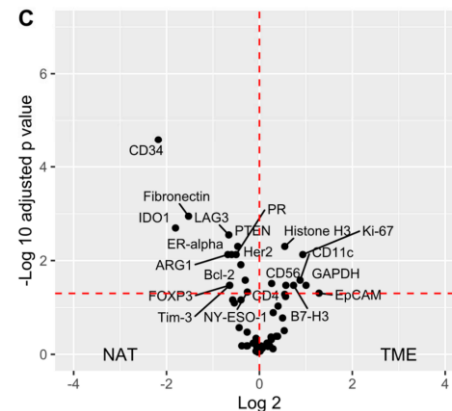
应用案例3：绘制非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤微环境图谱



使用K-means聚类进一步将ROI分组，大多数NAT分在一组（图左），大多数蛋白高表达。另一类包括TME和肿瘤（图中），大多数蛋白表达较低，而第三类所有蛋白质表达相对差异较大（图右）



TME vs Tumor(paired): CD3, CD4, CD44, CD45, CD45RO, CD68, CD163, CD27, and VISTA

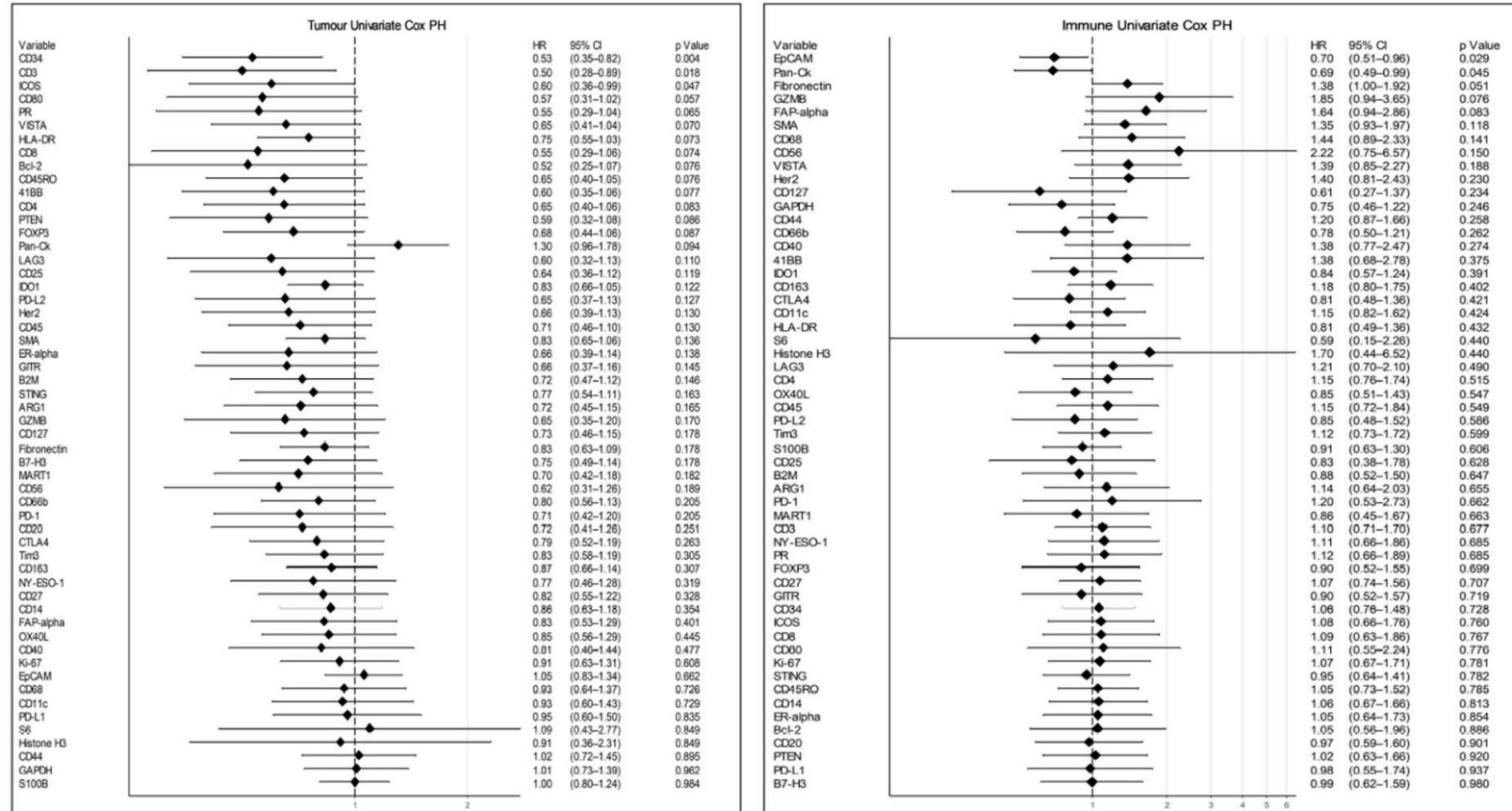


NAT vs TME(unpaired): CD34, fibronectin, IDO1, LAG3, ARG1, and PTEN

差异蛋白表达分析



应用案例3：绘制非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤微环境图谱



通过单变量Cox比例风险回归对蛋白表达和OS关联进行评估。发现，ROI（免疫TME内）的EpCAM和cytokeratin表达与更好的OS相关，而肿瘤ROI区域中CD34、CD3和ICOS的存在与更好的OS相关



应用案例4: 利用空间蛋白组技术预测HER-2阳性乳腺癌对于新辅助治疗的响应

medRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES

CSH Cold Spring Harbor Laboratory
BMJ Yale

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

Katherine L. McNamara, Jennifer L. Caswell-Jin, Rohan Joshi, Zhicheng Ma, Eran Kotler, Gregory R. Bean, Michelle Kriner, Zoey Zhou, Margaret Hoang, Joseph Beechem, Jason Zoeller, Michael F. Press, Dennis J. Slamon, Sara A. Huvitz, Christina Curtis
doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.23.20199091>

研究背景:

联合HER2靶向治疗的新辅助化疗疗法显著提高了早期HER2阳性乳腺癌的病理完全缓解(pCR)率。在早期HER2阳性乳腺癌中,许多生物标志物被认为可以帮助指导个性化靶向治疗,但目前还没有十分有效的生物标志物可以指导患者分层。

研究样本:

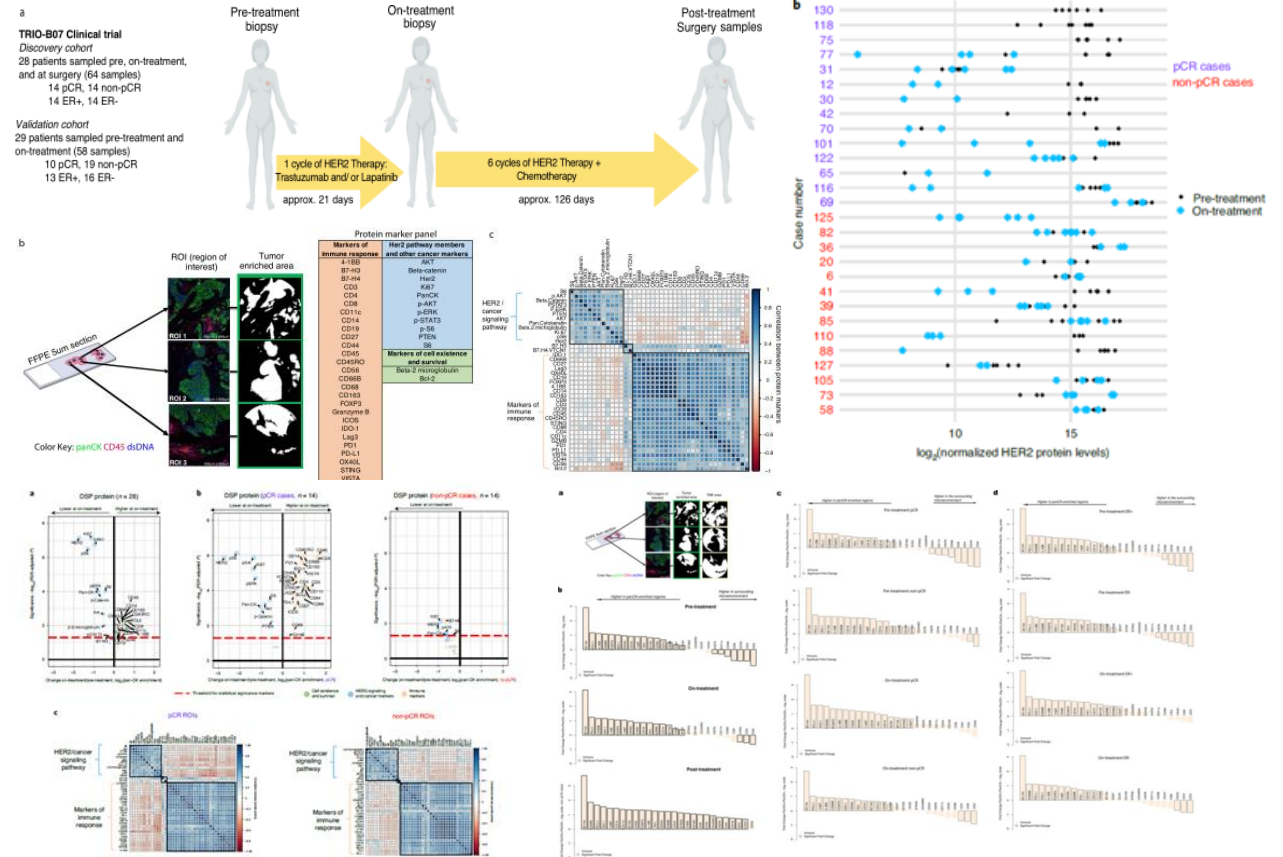
新辅助疗法TRIO-US B07临床队列中57名(Discovery Cohort,n=28; Validation cohort,n=29)HER2阳性的乳腺癌患者的122个组织样本,这些样本取自三个阶段:治疗前样本(Pre-treatment);经过14-21天的HER2靶向治疗的样本(After 14-21d of HER2-targeted therapy);手术切除的样本(Surgery)

研究方法:

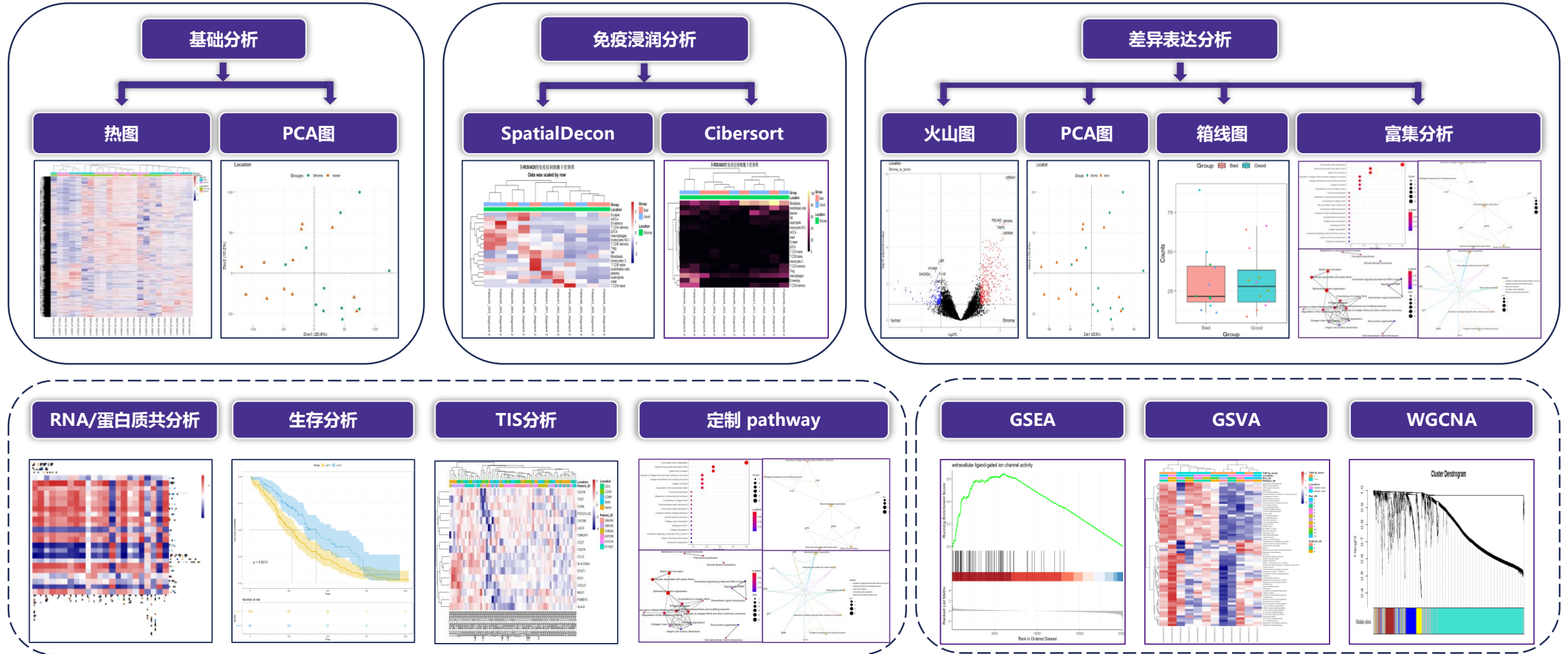
使用 GeoMx DSP, 标记肿瘤细胞(广谱细胞角蛋白panCK+)、淋巴细胞(CD45+),对40个肿瘤和免疫标志物进行空间蛋白组学分析。平均每个组织有4个roi

研究结论:

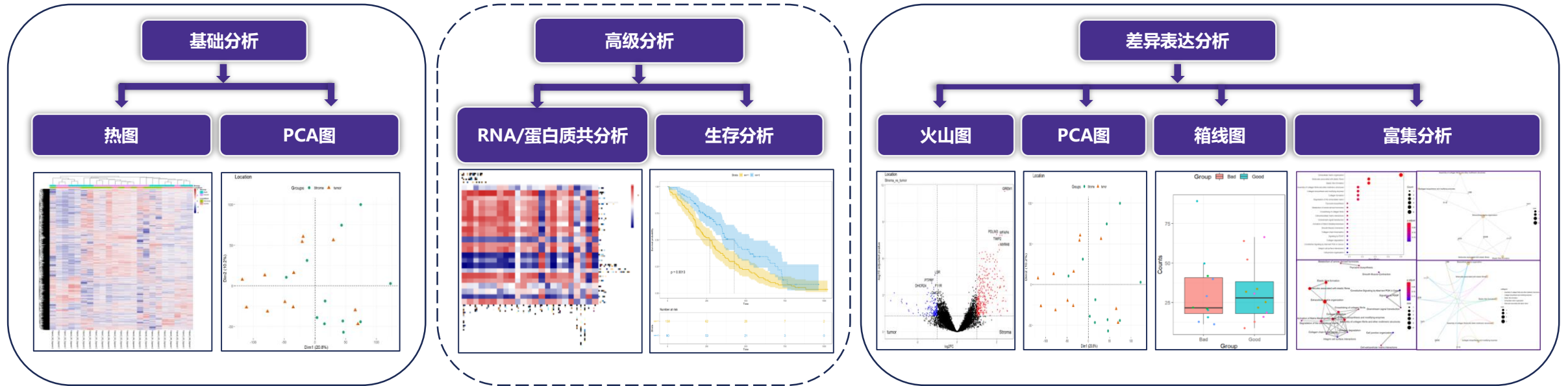
通过对样本中多个Pan-CK富集区域中40种肿瘤和免疫蛋白的检测,分析了乳腺癌治疗前样本的空间异质性,以及对应的在治疗过程中以及治疗后样本中肿瘤信号通路和微环境的变化。最终取得pCR的肿瘤患者,在治疗过程中的蛋白表达发生了显著变化。基于该结果并结合Discovery Cohort数据集的训练,研究团队开发出了一套用于肿瘤个性化检测进而帮助指导治疗决策的分析工具,并比较发现相比于基于转录组数据的预测模型,该Classifier有更好的预测表现,同时还可以预测PAM50亚型和TILs。同时,在Validation cohort中,该模型的表现也得到了验证。



非因生物DSP标准分析模块 (WTA)



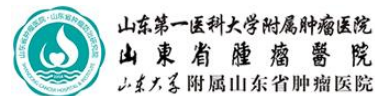
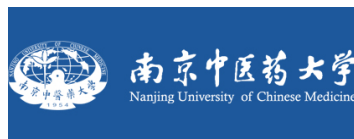
非因生物DSP标准分析模块（蛋白）



部分合作单位



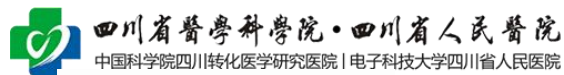
清华大学



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
浙江省肿瘤医院 (浙江省癌症中心)



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

☎ 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