

单细胞测序技术在肿瘤相关成纤维细胞研究中的应用

沈一鸣^{1,2}, 邬咪², 王嘉宁¹, 王嘉达¹, 林晨¹, 宋江萍¹, 叶蒙蒙¹,
姚建作¹, 方绅哲¹, 沈志森^{1,2*}

(¹宁波大学医学院, 宁波 315211; ²宁波大学附属李惠利医院, 宁波 315040)

摘要: 肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)作为肿瘤基质的重要组成部分, 在肿瘤的发展中发挥重要的作用, 其异质性将影响肿瘤细胞的行为特征。单细胞测序技术是从单个细胞水平对遗传信息进行测序。该技术的发展为深入刻画肿瘤微环境、挖掘CAFs功能、鉴定新的CAFs亚群提供了前所未有的优势。目前, 针对CAFs的靶向药物研制极少, 但随着我们对肿瘤基质微环境的病理生理学的认知加深, 该领域的研发也有了很大进展。本文简单回顾了单细胞测序技术的发展及原理, 着重总结了其在CAFs研究中的成果, 以期为癌症的监测和潜在的精准治疗靶点提出新见解。

关键词: 单细胞测序; 肿瘤相关成纤维细胞; 肿瘤微环境

Application of single-cell sequencing in research of cancer-associated fibroblasts

SHEN Yiming^{1,2}, WU Mi², WANG Jianing¹, WANG Jiada¹, LIN Chen¹, SONG Jiangping¹,
YE Mengmeng¹, YAO Jianzuo¹, FANG Shenzhe¹, SHEN Zhisen^{1,2*}

(¹Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²The Affiliated Lihuli Hospital, Ningbo University, Ningbo 315040, China)

Abstract: Cancer-associated fibroblast (CAFs) subsets, an important component of the tumor matrix, play the important role in tumor development. The heterogeneity of CAFs can affect the behavioral characteristics of the tumor cell. Single-cell sequencing technology is the sequencing of genetic information at the individual cell level. The development of the technology provides unprecedented advantages to learn more about tumor microenvironment, explore new CAFs subtypes and functions. Currently, few targeted CAFs-targeting drugs are developed. But with the deepening of our understanding of the pathophysiology of tumor stromal microenvironment, this situation will be improved. This paper reviews the principle and the development of single-cell sequencing technology, summarizes findings in the CAFs study to provide novel insights into cancer monitoring and promising therapeutic targets for precision treatment.

Key Words: single cell sequencing; cancer-associated fibroblasts; tumor microenvironment

收稿日期: 2020-12-22

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY19H160014, LQ21H130001); 浙江省医药卫生科技计划项目(2019ZD018, 2021KY307); 宁波市“科技创新2025”重大专项(2020Z098, 2018B10015); 宁波市医疗卫生品牌学科建设项目(PPXK2018-02); 宁波市自然科学基金项目(202003N4239)

第一作者: E-mail: sym2505029112@icloud.com

*通信作者: E-mail: szs7216@163.com

尽管癌症治疗已有显著发展,但肿瘤目前仍是全球第二大死亡原因,晚期癌症的预后不佳。研究肿瘤细胞行为学的传统癌症观点不能完全解释癌症的发生、发展、复发及转移的内在机制。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的异质性是指支持肿瘤结构的基质细胞具有不同的基因型和表型。肿瘤在发生发展过程中,基质细胞持续产生新的突变,形成了许多亚细胞群,而这种异质性的动态变化将导致肿瘤细胞增殖侵袭能力的改变,并将对治疗疗效和耐药发生产生不可预估的影响。TME由具有高度异质性的细胞组成,包括肿瘤相关成纤维细胞、肿瘤相关巨噬细胞、内皮细胞、脂肪细胞、髓系来源的抑制性细胞以及其他免疫和炎症细胞。其中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是TME中最丰富的细胞种群之一,是公认的致癌以及癌症进展的关键调节剂^[1]。单细胞测序的出现解决了前几代测序存在的掩盖细胞异质性的问题,为研究人员探索肿瘤组织中存在的未曾报道的细胞类型、分析细胞演变过程中的基因表达变化、识别特定细胞类型在不同条件下差异表达的基因变化和其他类型细胞之间的协作关系提供了便捷,将丰富CAFs在TME这一异常复杂的“生态系统”所扮演的“角色”。因此,彻底理解非肿瘤基质成分在癌症进展中所起的作用至关重要,本文将对该技术在CAFs中的研究现状进行一一介绍。

1 单细胞测序技术回顾

近年来,随着基于下一代测序的单细胞测序(single cell sequencing, SCS)的迅速发展,测序技术进入了高通量的时代。2009年, Tang等^[2]开发出第一种在单细胞中基于高通量测序对mRNA进行无偏倚检测的方法。2011年, Navin等^[3]第一次通过应用单细胞基因组测序方法研究了两例乳腺癌患者的肿瘤群体的结构和进化,并对100个单细胞进行分析,证实存在一种异质性肿瘤具有三种不同的克隆亚群。2012年, Fluidigm公司推出了世界上第一款单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing, scRNA-Seq)自动化系统,其后越来越多的科学家开始利用SCS技术对生物学的许多不同领域进行探

索,包括神经生物学、发育学、免疫学和癌症研究等^[4,5]。机器学习辅助SCS技术,正在为由传统医学向精密医学的过渡奠定基础。与此同时,我们注意到,在癌症研究领域已有从肿瘤异质性研究到早期临床试验的转化^[6-8]。

2 SCS技术原理

SCS的步骤非常简单,主要分为三步:单细胞分离、核酸扩增、测序数据分析。

2.1 单细胞分离

SCS的关键步骤在于分离收集高质量纯正的目标细胞群,且细胞的各类特征保持不变。因此,单细胞分离技术具备以下几个优点:提供足够数量的细胞、保持细胞活力、细胞不易聚集、操作简便,并且可根据未来研究需要扩展。目前,除了流式细胞仪技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)外,还有微滴技术(microdroplets)及微流控技术(microfluidics)^[9]。这些单细胞分离方法有利有弊,其中,由于速度和通量上的优势, FACS是目前常用的单细胞分离方法之一,同时存在一些无法避免的缺点,如需要大量样本、操作复杂,在FACS分选过程中,会出现分选仪器诱导的细胞应激现象,限制了分选细胞在下游研究中的应用^[10]。与传统的FACS相比,新型微流体细胞分选仪具有不少优势。它们所需的样本量也较少,同时使用较低的分选压力,减少了出现细胞应激现象的可能性^[11]。

2.2 核酸扩增

由于分离出来的细胞中的RNA或者DNA含量仅处在皮克(picograms)级水平,远无法构建文库,需要对单细胞内的微量核酸分子扩增放大来获取转录信息,最终形成具有特异标签标记的单细胞文库。目前常用的核苷酸序列扩增方法有:简并寡核苷酸引物PCR扩增技术(degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增技术(multiple displacement amplification, MDA)、多重退火和基于环的扩增循环技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)、乳液全基因组扩增(emulsion whole-genome amplification, eWGA)、通过转座子插入和体外转录进行线性扩增技术(linear amplification via transposon insertion,

LIANTI)以及利用微流体反应器进行单链测序(single-stranded sequencing using microfluidic reactors, SISSOR)等^[12-15]。其中, DOP-PCR是早期经典基于热循环的扩增技术, 缺点是会由于聚合酶和引物浓度因素影响PCR扩增的效率, 并且不能完全覆盖整个基因组, 导致出现非特异性扩增产物等情况^[16]。MDA是一种基于等温反应的扩增方法, 它与高通量测序的结合使用, 已成为基因组扩增的金标准方法。MDA采用指数扩增法来达到从单个细胞基因组或外显子组中获得较高的覆盖度的目的; 不过, MDA往往存在与模板DNA无关的扩增。而另一项由哈佛大学谢晓亮团队研发的扩增技术MALBAC, 结合了MDA和PCR的优势, 采用线性扩增方式, 大大减少了与非线性扩增相关的实验偏倚^[17]。与DOP-PCR、MDA和MALBAC相比, eWGA不仅适用于所有全基因组扩增, 提高了基因组覆盖率, 而且能更精确地检测单核苷酸变异(single-nucleotide variant, SNV)和拷贝数目变异(copy number variant, CNV)^[18]。LIANTI可利用Tn5转座以及T7体外转录进行单细胞基因组扩增, 使CNV检测可以在千碱基分辨率下进行^[15,19]。此外, SISSOR在许多方面优于现有的单细胞扩增方法, 如应用微流体处理器将单细胞DNA双链分离, 进行单链测序, 减少序列错误^[20]。

2.3 测序数据分析

随着SCS的快速发展, 测序数据信息量暴增, 且越来越复杂, 对数据分析方法提出了更高的要求。为挖掘数据背后有用的生物信息, 研究者开发出各种分析工具及流程。SCS数据在经过序列比对、表达水平量化、质量控制、缺失值填充、数据标准化、高变异基因的选择、降维分析、聚类分析、细胞类型注释、差异表达基因的鉴定及富集分析等一般流程后^[21], 使用进阶分析探索细胞之间以及和药物反应的深层次关系, 如轨迹推理分析(trajecory inference, TI)、基因调控网络(gene regulatory network, GRN)、细胞通讯(cell-cell communication)以及药物预测。

轨迹推理分析又称为伪时间分析, 根据测序的细胞之间表达模式的相似性进行计算, 并将每个细胞按照时间排列在对应轨迹上, 形成直观的谱系发育树状图, 以此来模拟预测细胞周期、分

化以及激活等动态变化的过程^[22]。TI可用于验证单细胞分辨率下的已知的细胞分化关系, 描绘细胞发育的轨迹路线, 监测免疫细胞的动态变化, 探索分化的细胞亚群以及其关键基因^[23-26]。TI主要用于细胞发育及细胞分化的研究, 包括胚胎生长发育、组织细胞的发育、细胞重编程、疾病的进展、癌细胞的动态演变等。而另一种细胞轨迹分析RNA速率(RNA velocity)则是通过拟合未剪接的和剪接的mRNA丰度之间的比值来获得基因特异性速度, 得出可能的细胞状态变化, 从而追溯细胞的起源和潜在的命运, 不需要指定起点和终点^[27]。

基因调控网络大致由四个部分组成: (1)细胞中相互联系的若干DNA片段; (2)RNA和蛋白质表达产生相互作用; (3)与其他基因产物相互作用; (4)调控基因转录或mRNA速率。转录因子(transcription factors, TFs)可以调节基因组的转录, 允许在特定条件下激活, 决定细胞类型、细胞发育形式和生物反应的过程。目前, 主要有七种模型用于研究转录因子调控网络分析, 分别为布尔网络模型(boolean networks)、线性组合网络模型(linear networks)、权重矩阵模型(weight matrix networks)、互信息关联模型(mutual information relevance networks)、微分方程模型(differential equation networks)、贝叶斯网络模型(bayesian networks)和模块网络模型(module networks)。精确推断转录因子调控网络有助于深入挖掘细胞异质性背后的生物学意义, 为疾病的诊断、治疗以及发育分化的研究提供强有力的支撑^[28]。

在生物体中, 多种细胞类型和组织之间的细胞通讯严格控制着细胞及组织的正常功能, 并广泛地依赖分泌配体和细胞表面受体之间的相互作用, 以协调生物的发育和体内稳态^[29]。当细胞不能正确地相互作用或不正确地解码生物信息时, 疾病便随之而来。在癌症中, 肿瘤细胞与免疫细胞或基质细胞之间具有十分复杂的相互作用, 这些相互作用在癌症生物学中起至关重要的作用。因此, 细胞通讯分析成为单细胞测序分析中必不可少的一环。当前已经开发了几种方法用于在单细胞测序数据中推断细胞间的通讯关系, 如SingleCellSignalR、iTALK、NicheNet、Celltalker、

表1 SCS技术在CAFs研究中的应用

肿瘤类型	分析方法	研究对象	CAFs亚群名称	CAFs亚群特征
乳腺癌	单细胞RNA测序	人	纤维母细胞性CAFs	主要合成细胞外基质
	单细胞RNA测序	人	炎症性CAFs	显著富集于细胞毒性T淋巴细胞功能障碍相关的基因
	单细胞RNA测序	人	分化的血管周样细胞	富集于与肌肉系统和收缩力相关的通路
	单细胞RNA测序	人	未成熟的血管周样细胞	富集在与细胞黏附相关的通路
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	血管CAFs	高表达血管发育和血管生成功能相关的基因, 并且在肿瘤核心中心基因 <i>Desmin</i> 表达更高
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	基质CAFs	特异性表达多种ECM相关基因的转录本, 如糖蛋白(Dcn、Lum和Vcan)、结构蛋白(Col14a1)、基质蛋白(Fbln1、Fbln2和Smoc), 以及基质修饰酶(Lox和Loxl1)
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	周期CAFs	在高度差异基因中细胞周期相关的基因集占据主导, 但仍属于血管CAFs亚群的增殖子集
胰腺癌	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	发育CAFs	发育CAFs的高度差异基因同肿瘤上皮细胞和间质间充质细胞中的相重叠表达
	单细胞RNA测序	人	纤维母细胞性CAFs	相对于其他类型CAFs, Hedgehog通路相关基因在纤维母细胞性CAFs中表达更高
	单细胞RNA测序	人	炎症性CAFs	与对照组相比, LDE225治疗的KPC(KrasLSL-G12D/+; Trp53LSL-R172H/+;Pdx1-Cre)肿瘤中炎症性CAFs标记基因表达上调
	单细胞RNA测序	人	基质CAFs	分泌的TGF- β 等因子激活MAPK和STAT3信号通路, 影响胰腺导管癌中具有EMT特性或增殖特性的细胞比例
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	纤维母细胞性CAFs	激活调节因子TGFB1和SMAD2, 并且与心肌细胞的分化和纤维化有关的非典型的WNT信号分子(WNT2和WNT5A)也被激活
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	炎症性CAFs	激活调节因子IL1R1和STAT3
	单细胞RNA测序	人+基因工程鼠	抗原提呈CAFs	抗原提呈CAFs表达MHC II 相关基因 <i>H2-Ab1</i> 和 <i>Cd74</i> 。与纤维母细胞性CAFs和炎症性CAFs相比, 表现出更高的STAT1活性(STAT1介导MHC II 的表达)
结直肠癌	结合单细胞基因组和转录组测序	人	CAFs	鉴定出5种CAFs特异性表达的肿瘤标志基因(<i>BGN</i> 、 <i>RCN3</i> 、 <i>TAGLN</i> 、 <i>MYL9</i> 和 <i>TPM2</i>)
	结合单细胞RNA测序和空间转录测序	人	cS28和cS29	在MMRD和MMRp两种结直肠癌类型中表达炎症程序
胃癌	单细胞RNA测序	人	STF1-3	STF1和STF3是与 <i>LUM</i> 基因相关的成纤维细胞, 而STF2则由促血管生成的周细胞所组成的, 并且STF2上调PDGF信号通路相关基因, 而STF3上调基质金属蛋白酶的激活相关基因
前列腺癌	结合单细胞ATAC和RNA测序	人	循环CAFs	上调 <i>EGF</i> 、 <i>FGF2</i> 、 <i>FGFR1</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>PDGFB</i> 、 <i>PDGFC</i> 和 <i>TGFB1</i> 基因
头颈癌	单细胞RNA测序	人	CAFs	CYLD的表达可以通过NF- κ B通路改变TME中CAFs的浸润, 从而调节肿瘤的生长
	单细胞RNA测序	人	纤维母细胞性CAFs	表达 <i>ACTA2</i> 、 <i>MYLK</i> 和 <i>MYL9</i> 基因
	单细胞RNA测序	人	静息成纤维细胞	缺乏肌成纤维细胞和CAFs标记的表达
	单细胞RNA测序	人	CAF-1	表达 <i>COL1A1</i> 、 <i>VIM</i> 、 <i>THY1</i> 、 <i>MMP11</i> 和 <i>CAV1</i> 基因
	单细胞RNA测序	人	CAF-2	表达 <i>JUN</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>FGF7</i> 和 <i>TGFB1</i> 基因

CellphoneDB、CellChat以及Connectome等, 本文不再一一赘述^[30-34]。

化疗和靶向治疗耐药是目前癌症治疗面临的

重大挑战。单细胞测序发现, 在肿瘤进化中存在肿瘤内遗传异质性的现象, 加之大量疾病相关基因及作用靶点被挖掘出来, 使我们不仅可以加速

对药物靶标的识别以及候选药物的筛选和完善,而且可以对药物的副作用以及耐药性进行预测^[35]。利用单细胞测序可以解析TME所得的遗传学数据,整合药物数据库进行药物敏感性的预测。同时也可以监测不同药物或同种药物不同浓度处理前后,表达基因及功能的变化,证实药物的作用机制,为癌症治疗提供新型药物治疗方式^[36,37]。

3 利用SCS技术对CAFs特征的探索

在癌症组织中活性基质细胞的积累通常预示着癌症预后差和易复发^[38,39]。TME中的基质细胞包括CAFs、内皮细胞、脂肪细胞和周细胞^[1,40]。CAFs是一个高度异质性的细胞群,可以起源于不同的成纤维细胞谱系和细胞类型,影响肿瘤发展的多个方面,其与免疫细胞的相互作用在其中发挥作用。尽管如此,这些相互作用如何控制癌症以及如何靶向CAFs来有效对抗癌症尚不清楚。下文介绍SCS技术在癌症研究中的应用,特别是CAFs亚群如何影响肿瘤的进展(表1)。

3.1 乳腺癌

CAFs作为乳腺恶性肿瘤内环境中的重要组成成分,不仅具有抑制肿瘤发生发展的作用,也参与了乳腺恶性肿瘤的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、肿瘤启动及生长、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、肿瘤细胞侵袭转移等。

Wu等^[41]对5例三阴乳腺癌患者的基质细胞进行单细胞RNA测序,发现4种CAFs亚群:纤维母细胞性CAFs(myofibrotic CAFs, MyCAFs)、炎症性CAFs(inflammatory-like CAFs, ICAFs)、分化的血管周样细胞(differentiated perivascular-like cell, dPVL)和未成熟的血管周样细胞(imature perivascular-like cell, imPVL)。在三阴乳腺癌患者队列中,ICAFs释放趋化因子CXCL12,这种信号分子能够抑制T细胞的抗肿瘤活性。另外,研究者还发现,ICAFs和dPVL亚群在多个独立的三阴乳腺癌队列中与免疫逃避密切相关,因此可以作为乳腺癌潜在的治疗靶点。

Bartoschek等^[42]结合来源于乳腺癌基因工程鼠模型的768个间充质细胞单细胞RNA测序,找到三个不同类型的CAFs。对实验模型鼠和人类肿瘤标

本进行转录和蛋白质水平上的验证,揭示了三个CAFs亚群在空间上的分布有各自不同的来源,包括血管周围细胞、驻留的成纤维细胞以及发生上皮-间充质转化的恶性细胞。每个CAFs亚群的基因特征都与独特的功能相关,在临床队列中具有独立的预后能力。另外,MyCAFs还可以预测乳腺癌对新辅助化疗的耐药性。综上所述,深化CAFs亚群的细分为治疗乳腺癌、精确靶向CAFs的药物开发提供了可能。

3.2 胰腺癌

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是一种含有广泛纤维炎症间质的肿瘤,其中包括丰富的CAFs。PDAC中的CAFs是具有异质性的,但这种异质性的本质还不完全清楚。

Steele等^[43]结合药理抑制、功能得失的遗传学实验,质谱流式和单细胞RNA测序等方法发现,Hedgehog信号是成纤维细胞中唯一激活的,在MyCAFs和ICAFs中差异表达。Sonic Hedgehog过表达促进肿瘤生长,而拮抗剂LDE225抑制Hedgehog通路会抑制肿瘤生长。此外,Hedgehog通路的抑制使MyCAFs的数量减少,ICAFs的数量增加,这与细胞毒性T细胞的减少和调节性T细胞的增加有关,同时与免疫抑制的增加是一致的。抑制Hedgehog通路改变了胰腺癌微环境中成纤维细胞的组成和免疫浸润。

Ligorio等^[44]结合单细胞RNA和蛋白质分析研究间质中CAFs在PDAC模型系统中调节异质性的作用,发现MAPK和STAT3信号通路在CAFs分泌的TGF- β 等因子刺激下激活,影响胰腺导管癌中具有EMT特性或增殖特性的细胞比例,从而对瘤内结构进行重塑。

Elyada等^[45]对来自人和小鼠模型的PDAC样本进行单细胞RNA测序,分析肿瘤及肿瘤内环境,发现一群表达MHC-II类分子以及CD74却不表达典型协同刺激分子的新型CAFs,将其命名为抗原呈递型CAFs(apCAFs),并用离体培养以及OT II小鼠来对这类细胞进行研究,证实这类细胞具有可塑性和呈递抗原的作用。

3.3 结直肠癌

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)通过何种机制影响TME中的成纤维细胞转化仍有大量空白领域有待研究。为了解析CAFs在CRC中的改变,

Zhou等^[46]开发了一种结合单细胞转录组和基因组测序的方法,对21例微卫星稳定的CRC患者和6例正常个体进行单细胞转录组分析和基因组分析。研究人员发现,体细胞拷贝数改变(somatic copy number alterations, SCNAs)存在于TME和正常组织中的免疫细胞、成纤维细胞和内皮细胞的现象十分普遍。但是,肿瘤中带有SCNAs的成纤维细胞比例远高于癌旁组织中的成纤维细胞比例,且肿瘤组织在Chr7, X、Y染色体上富集。该研究为CRC的TME中间质细胞的普遍基因组改变提供了证据和功能相关性。

Pelka等^[47]应用一种基于scRNA-seq的转录组学方法对来自34名错配修复型(mismatch repair-deficient, MMRd)个体和28名错配修复完整型(mismatch repair-proficient, MMRp)个体的结直肠癌肿瘤,以及邻近正常组织的371 223个细胞进行分析,发现两种CAF亚群在两种肿瘤类型中表达炎症程序,在MMRd肿瘤中具有更高的活性,并且在原发性MMRd和MMRp肿瘤的管腔表面形成由恶性细胞、单核细胞、成纤维细胞和中性粒细胞组成的炎症相互作用网络。

3.4 胃癌

Kumar等^[48]利用scRNA-seq数据绘制了世界上迄今为止最大、分辨率最高的胃癌单细胞图谱。在研究中,根据临床分期和组织学亚型比较了肿瘤成纤维细胞簇(STF1-3),观察到三个STF簇会随临床分期增加,其中STF3为优势群体。在9个激活素-抑制素信号模块相关基因中,只有*INHBA*在肿瘤相关的STF2和STF3成纤维细胞簇中显著上调。同时,成纤维细胞簇STF3中FAP⁺和*INHBA*⁺细胞数量随肿瘤分期的延长而增加。并且通过敲除和重组*INHBA*等实验证实,*INHBA*是胃癌成纤维细胞群STF3中FAP的正调节因子。

3.5 前列腺癌

尽管循环基质细胞(circulating cancer stromal cells, CSTC)在转移性疾病中起重要作用,但目前还没有检测CSTC的方法。Rivello等^[49]对转移性前列腺癌患者高代谢活性细胞(hm细胞)的单细胞mRNA测序分析显示,约10%为典型的EpCAM⁺hm-CSTC,3%为前列腺相关基因上调的EpCAM-hm-CSTC,87%为具有肿瘤相关成纤维细胞、间充质

干细胞特征的hm-CSTC。

3.6 头颈癌

Deng等^[50]通过体外和体内功能分析,结合单细胞RNA测序,研究CYLD对调节NF- κ B信号通路的影响及其对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)发展的贡献,以了解NPC的TME。在NPC临床标本和多个细胞系中,CYLD表达下调。功能分析显示,CYLD在体外抑制鼻咽癌细胞的增殖和迁移,并通过负性调节NF- κ B信号通路在体内抑制NPC的癌细胞生成和转移。此外,CYLD能够抑制CAFs和内皮细胞浸润到NPC的TME中。

Puram等^[51]对18例头颈癌患者的肿瘤标本进行scRNA-seq分析,将CAFs分成四类亚型:MyCAFs、静息成纤维细胞、CAF-1和CAF-2。MyCAFs表达ACTA2、MYLK和MYL9;静息成纤维细胞缺乏肌成纤维细胞和CAF标记的表达;CAF-1表达COL1A1、VIM、THY1、MMP11和CAV1;而CAF-2表达JUN、FOS、FGF7和TGFB。另外,他们还发现,来自淋巴结的成纤维细胞群里富含肌成纤维细胞和CAF-1亚群。

4 总结与展望

单细胞测序分析是肿瘤研究的一项重大突破,它将直接比较细胞表达平均值的测序水平提高到了在单个细胞水平上捕获表达,极大地加深对肿瘤生物学的理解。具体而言,它帮助我们更好地理解和研究具有高度多样性的肿瘤内环境中不同细胞的生物学行为,丰富了对肿瘤相关成纤维细胞如何影响各类肿瘤进展和靶向药物研发的见解。目前大多数针对肿瘤成纤维细胞的研究层次仍处于单细胞基因组水平,在单细胞多组学测序和空间组学的研究方面存在空缺,对肿瘤相关成纤维细胞改变肿瘤的发生发展和复发转移的内在机制仍不能完全解析。

参考文献

- [1] Cheng HS, Lee JXT, Wahli W, et al. Exploiting vulnerabilities of cancer by targeting nuclear receptors of stromal cells in tumor microenvironment. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 51
- [2] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*,

- 2009, 6(5): 377-382
- [3] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-94
- [4] Wang Y, Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 598-609
- [5] Lim B, Lin Y, Navin N. Advancing cancer research and medicine with single-cell genomics. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 456-470
- [6] Zhao T, Chiang ZD, Morriss JW, et al. Spatial genomics enables multi-modal study of clonal heterogeneity in tissues. *Nature*, 2021, 601(7891): 85-91
- [7] Rodon J, Soria JC, Berger R, et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nat Med*, 2019, 25(5): 751-758
- [8] Sicklick JK, Kato S, Okamura R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study. *Nat Med*, 2019, 25(5): 744-750
- [9] Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 610-620
- [10] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(2): 163-176
- [11] Zhou WM, Yan YY, Guo QR, et al. Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 312
- [12] Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(13): 5847-5851
- [13] Hou Y, Fan W, Yan L, et al. Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 2013, 155(7): 1492-1506
- [14] Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338(6114): 1622-1626
- [15] Chen C, Xing D, Tan L, et al. Single-cell whole-genome analyses by linear amplification via transposon Insertion (LIANTI). *Science*, 2017, 356(6334): 189-194
- [16] Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2015, 16(1): 79-102
- [17] Chen M, Song P, Zou D, et al. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114520
- [18] Fu Y, Li C, Lu S, et al. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(38): 11923-11928
- [19] Li N, Jin K, Bai Y, et al. Tn5 transposase applied in genomics research. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8329
- [20] Chu WK, Edge P, Lee HS, et al. Ultraaccurate genome sequencing and haplotyping of single human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(47): 12512-12517
- [21] Ji F, Sadreyev RI. Single-cell rna-seq: introduction to bioinformatics analysis. *Curr Protocols Mol Biol*, 2019, 127(1): e92
- [22] Saelens W, Cannoodt R, Todorov H, et al. A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(5): 547-554
- [23] Guo J, Nie X, Giebler M, et al. The dynamic transcriptional cell atlas of testis development during Human Puberty. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(2): 262-276
- [24] Zeng Y, Liu C, Gong Y, et al. Single-cell RNA sequencing resolves spatiotemporal development of pre-thymic lymphoid progenitors and thymus organogenesis in human embryos. *Immunity*, 2019, 51(5): 930-948
- [25] Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma. *Cell*, 2019, 179(4): 829-845
- [26] Zhao T, Fu Y, Zhu J, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic early embryonic-like programs during chemical reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(1): 31-45.e7
- [27] Gojo J, Englinger B, Jiang L, et al. Single-cell RNA-seq reveals cellular hierarchies and impaired developmental trajectories in pediatric ependymoma. *Cancer Cell*, 2020, 38(1): 44-59
- [28] Fiers MWEJ, Minnoye L, Aibar S, et al. Mapping gene regulatory networks from single-cell omics data. *Briefings Funct Genomics*, 2018, 17(4): 246-254
- [29] Armingol E, Officer A, Harismendy O, et al. Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(2): 71-88
- [30] Cabello-Aguilar S, Alame M, Kon-Sun-Tack F, et al. SingleCellSignalR: inference of intercellular networks from single-cell transcriptomics. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(10): e55
- [31] Browaeys R, Saelens W, Saeys Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat Methods*, 2020, 17(2): 159-162
- [32] Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, et al. Immune landscape of viral- and carcinogen-driven head and neck cancer. *Immunity*, 2020, 52(1): 183-199.e9
- [33] Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA, et al. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc*, 2020, 15(4): 1484-1506

- [34] Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1088
- [35] Yofe I, Dahan R, Amit I. Single-cell genomic approaches for developing the next generation of immunotherapies. *Nat Med*, 2020, 26(2): 171-177
- [36] Shin D, Lee W, Lee JH, et al. Multiplexed single-cell RNA-seq via transient barcoding for simultaneous expression profiling of various drug perturbations. *Sci Adv*, 2019, 5(5): 2249
- [37] Ye C, Ho DJ, Neri M, et al. DRUG-seq for miniaturized high-throughput transcriptome profiling in drug discovery. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4307
- [38] Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(5): 443-453
- [39] Alcaraz J, Carrasco JL, Millares L, et al. Stromal markers of activated tumor associated fibroblasts predict poor survival and are associated with necrosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2019, 135: 151-160
- [40] Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 84
- [41] Wu SZ, Roden DL, Wang C, et al. Stromal cell diversity associated with immune evasion in human triple-negative breast cancer. *EMBO J*, 2020, 39(19): e104063
- [42] Bartoschek M, Oskolkov N, Bocci M, et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 5150
- [43] Steele NG, Biffi G, Kemp SB, et al. Inhibition of Hedgehog signaling alters fibroblast composition in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(7): 2023-2037
- [44] Ligorio M, Sil S, Malagon-Lopez J, et al. Stromal microenvironment shapes the intratumoral architecture of pancreatic cancer. *Cell*, 2019, 178(1): 160-175
- [45] Elyada E, Bolisetty M, Laise P, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1102-1123
- [46] Zhou Y, Bian S, Zhou X, et al. Single-cell multiomics sequencing reveals prevalent genomic alterations in tumor stromal cells of human colorectal cancer. *Cancer Cell*, 2020, 38(6): 818-828
- [47] Pelka K, Hofree M, Chen JH, et al. Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer. *Cell*, 2021, 184(18): 4734-4752
- [48] Kumar V, Ramnarayanan K, Sundar R, et al. Single-cell atlas of lineage states, tumor microenvironment, and subtype-specific expression programs in gastric cancer. *Cancer Discov*, 2022, 12(3): 670-691
- [49] Rivello F, Matua K, Piruska A, et al. Probing single-cell metabolism reveals prognostic value of highly metabolically active circulating stromal cells in prostate cancer. *Sci Adv*, 2020, 6(40): 3849
- [50] Deng M, Dai W, Yu VZ, et al. Cyldromatosis lysine 63 deubiquitinase (CYLD) regulates NF- κ B signaling pathway and modulates fibroblast and endothelial cells recruitment in nasopharyngeal carcinoma. *Cancers*, 2020, 12(7): 1924
- [51] Puram SV, Tirosh I, Parkh AS, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell*, 2017, 171(7): 1611-1624