

综述

单细胞测序技术在口腔鳞状细胞癌研究中的应用

曹澄¹, 王剑¹, 胡建道¹, 沈志森^{2*}(¹宁波大学附属人民医院, 宁波 315000; ²宁波大学附属李惠利医院, 宁波 315000)

摘要: 单细胞测序技术是在单细胞水平上对目标细胞遗传信息进行测序。该技术已应用于众多医学领域, 在研究肿瘤细胞的异质性、肿瘤的发生、发展及耐药性等方面具有独特的优势。口腔鳞状细胞癌是高侵袭性头颈部癌之一, 其局部复发风险高, 存活率低于一般头颈癌组, 以手术治疗为主, 放射和化学治疗为辅。然而, 多数口腔鳞状细胞癌患者预后不佳, 存在局部复发和高转移。本文总结了单细胞测序技术的发展及其在口腔鳞状细胞癌研究中的应用, 旨在为口腔鳞状细胞癌的精准诊治提供新的见解。

关键词: 单细胞测序; 口腔鳞状细胞癌; 肿瘤微环境; 精准医疗

Application of single-cell sequencing technology in oral squamous cell carcinoma research

CAO Cheng¹, WANG Jian¹, HU Jiandao¹, SHEN Zhisen^{2*}(¹The Affiliated People's Hospital of Ningbo University, Ningbo 315000, China;²The Affiliated Lihuili Hospital of Ningbo University, Ningbo 315000, China)

Abstract: Single-cell sequencing technology involves sequencing the genetic information of target cells at the single cell level. This technology has been applied across various medical fields and offers unique advantages in studying the heterogeneity of tumor cells, tumor initiation, tumor development and drug resistance. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the highly invasive cancers in the head and neck region, with a high risk of local recurrence and lower survival rates compared to other head and neck cancer types. Treatment primarily involves surgery, with radiation and chemotherapy as adjuvant therapies. However, the prognosis for most OSCC patients is poor, with a high incidence of local recurrence and metastasis. This review summarizes the development of single-cell sequencing technology and its applications in the study of OSCC. The aim is to provide new insights for the precision diagnosis and treatment of OSCC.

Key Words: single cell sequencing; tongue squamous cell carcinoma; tumor microenvironment; precision medicine

口腔癌是目前世界上常见的癌症之一, 仅2020年, 全世界有超过37万例新发病例, 超过17万人因此死亡^[1]。其中, 约90%口腔癌为口腔鳞状细胞

癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)。OSCC的发生跟复杂的遗传和环境因素密切相关。吸烟、饮酒、人乳头瘤病毒感染和嚼槟榔都是OSCC的主

收稿日期: 2023-08-20

基金项目: 宁波市科技发展专项项目(2022L005)

第一作者: E-mail: cao1588448@163.com

*通信作者: E-mail: szs7216@163.com

要原因^[2,3],虽然OSCC的治疗已经从手术切除发展到多学科综合性治疗,包括手术、放疗、化疗及免疫治疗,但5年总生存率仍保持在50%左右^[4]。为了寻求更积极的治疗方法,越来越多的研究聚焦在OSCC遗传生物学上。单细胞测序技术(single cell sequencing, SCS)已成为揭示肿瘤细胞分子图谱、研究肿瘤内在致病机制的革命性工具。与传统的多细胞测序方法相比,单细胞测序技术在很大程度上保留了肿瘤细胞间的异质性信息^[5]。而免疫特性、生长速度、侵袭能力等表型异质性最终导致肿瘤对不同抗肿瘤药物的敏感性差异或放射敏感性差异^[6]。本文将从肿瘤细胞异质性、肿瘤微环境、肿瘤发生发展、治疗与预后等方面综述单细胞测序技术在OSCC研究中的应用进展。这些进展将为OSCC的精确诊断和综合治疗策略开辟新的前景。

1 单细胞测序技术

随着测序技术的迅速发展,SCS已成功实现对单个细胞在转录组、免疫组、表观组等水平进行多样性分析。其中,单细胞转录组测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)是目前生物医学研究及临床应用中运用最广泛的一种,其基本原理是通过扩增微量RNA分离单个细胞,然后通过高通量测序获得单个细胞的表达谱,鉴定细胞类型,分析细胞发育的时空过程,计算细胞间的通讯和调控网络^[7]。SCS的出现,为提高分子生物学研究的准确度、探索遗传和功能异质性、检测罕见细胞簇和重建进化谱系提供了强大的工具^[8,9]。SCS的步骤主要分为三步:单细胞分选、核酸扩增、高通量测序与数据分析^[10]。

1.1 单细胞分选

单细胞分选是单细胞测序的首要步骤,其关键在于分离和收集大批量高质量完整的目标细胞群,尽可能保留细胞的各种特征。Gross等^[11]详细介绍了5种单细胞分选方法,即限制稀释法、显微

操作法、荧光激活细胞分选术(fluorescence activated cell sorting, FACS)、激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)和微流体技术^[10,12]。这些单细胞分选方法各有利弊,可根据实验需要选择合适的分选方法(表1)。FACS具有高通量和分选能力强的主要优点,但可能对某些细胞有损害^[13]。LCM是唯一能够获取目标细胞空间位置的技术,但操作难度高。显微操纵器辅助细胞拾取是一个手动过程,因此速度很慢,但可以最大程度地控制单个细胞。限制稀释依赖于统计分布,易于实施并且可以自动化。然而,单细胞的存在通常需要随后进行验证。除了这些成熟的技术外,新型微流体细胞分选仪亦具有众多优点,如需要的样本量小、分选压力比较低、细胞应激现象发生的概率也较低^[14]。

1.2 核酸扩增

组织或细胞群体中的每个单细胞因累积的新生突变而具有自己独特的基因组,如单核苷酸变异(single-nucleotide variant, SNV)、结构变异(structural variations, SVs)、拷贝数变异(copy number variant, CNV)和非整倍体等。突变的频率反映了细胞群体基因组完整性的丧失,这是癌症和衰老问题的关键所在^[15]。为了检测单细胞特有的突变,需要单细胞全基因组测序,所以全基因组扩增是必不可少的。全基因组扩增包括:简并寡核苷酸引物聚合酶链式反应(degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)、多次位移扩增(multiple displacement amplification, MDA)、多次退火和基于环的循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)、乳化全基因组扩增(emulsion whole-genome amplification, eWGA)、通过转座子插入的线性扩增技术(linear amplification via transposon insertion, LIANTI)以及互补链多重末端标记扩增技术(multiplexed end-tagging amplification of

表1 单细胞分选技术优缺点比较

分选技术	操作难度	费用	分选功能	自动化	通量	对细胞完整性的影响
微流体	容易	低	不可分选	自动	高	少
LCM	难	高	可分选	半自动	低	经常损害
FACS	容易	低	可分选	自动	高	经常损害
显微操作法	难	低	不可分选	人工	低	少
限制稀释法	容易	低	不可分选	自动	高	少

complementary strands, META-CS)等^[16,17]。其中, MDA不适合固定后的单细胞样本扩增,但适用于新鲜样本的单细胞基因组扩增^[18]。MALBAC运用线性扩增,显著减少了实验偏倚,既可用于新鲜样本的单细胞基因组扩增,也可用于固定后样本的单细胞基因组扩增。而eWGA不仅能精确地检测SNV和CNV,且适用于所有全基因组扩增^[19]。LIANTI可以克服传统扩增方法中的偏好性扩增,不仅保持了扩增的均一性,而且降低了扩增错误率及等位基因丢失率^[16,20]。此外, META-CS可在单管反应中对两条DNA链进行标记和扩增,借助DNA互补性几乎消除了所有假阳性,其精确度是目前已知方法中最高的^[21]。

1.3 高通量测序与数据分析

纵观测序技术的发展历史,提高测序速度、降低测序成本和提升测序精确度是测序技术发展的目标。近十年众多高通量测序技术应运而生,如Salmen等^[22]开发了一种基于平板和微流控的单细胞测序技术(vast transcriptome analysis of single cells by dA-tailing, VASA-seq),应用于3万多个小鼠胚胎细胞的测序,通过对整个单细胞转录组动态变化的分析,发现了大量非编码RNA的细胞类型标记。该技术不仅可高通量捕获细胞群体,而且操作省时、成本低,为单细胞测序领域的发展提供了新的助力。

根据研究目的和测序类型的不同,数据分析方法也会有所不同。在单细胞表观组测序和单细胞基因组测序中,数据分析流程与传统高通量测序的方法相似。而单细胞转录组测序数据分析常包括质量控制、数据标准化、批效应校正、细胞周期分配、特征选择、降维可视化、细胞聚类、差异性表达、拟时序分析、细胞相互作用推测、基因通路富集分析等步骤^[23]。质量控制、数据标准化、批效应校正又称预处理,是scRNA-seq数据分析的第一步。细胞聚类是进一步scRNA-seq数据分析的基础。Lin等^[24]通过鉴定细胞类群,构建首个下咽癌单细胞转录组学图谱,为下咽癌的研究提供了全新的、系统性的视角。基因差异性表达分析可揭示肿瘤发生发展中的关键基因,不但可以对单个基因值进行比较,还可以对基因表达水平分布进行比较。而基因通路富集分析则可用于识别肿瘤发生与发展、免疫应答、上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等信号通路相关的细胞亚群^[25,26]。

2 单细胞测序技术在OSCC研究中的应用

近年来,研究者已将SCS广泛应用于OSCC研究,主要集中在OSCC肿瘤异质性与微环境、OSCC发生与发展以及探讨OSCC治疗和预后预测等方面。这些研究成果(表2)为OSCC发病机制的探

表2 单细胞测序在口腔鳞状细胞癌研究中应用的汇总

分析方法	研究对象	主要成果	参考文献
scWES-seq	5个OSCC标本	在所有亚位点中识别出0~2个相同的突变,异质性与物理分离呈负相关,且一对分化良好的样本比分化较差的样本更相似	[27]
scRNA-seq	TCGA数据库下载头颈鳞状细胞癌和正常人体样本数据	揭示了头颈部恶性肿瘤的代谢异质性,绘制头颈部恶性肿瘤微环境中的细胞代谢基因表达谱	[28]
scRNA-seq	23个OSCC标本	发现CD4 ⁺ 细胞毒性T淋巴细胞表达颗粒酶的扩增,颗粒酶具有独特的基因表达模式,可诱导细胞凋亡	[29]
scRNA-seq	131个OSCC标本	揭示了口腔鳞状细胞的多步转录组景观,并证明TDO2+肌成纤维细胞是免疫治疗的潜在靶标	[30]
scRNA-seq	TCGA数据库下载OSCC和正常人体样本数据	利用12个代谢相关基因特征构建风险预测模型,评估了这12个基因在肿瘤和非肿瘤细胞中的表达情况,验证了两簇在细胞水平上存在不同程度恶性肿瘤的肿瘤细胞	[31]
scRNA-seq	小鼠模型	鉴定出17种参与致癌作用的细胞亚型,第七种(干细胞)和第九种(角质形成细胞)致癌亚型在与MYC相关的途径中参与最显著	[32]
scRNA-seq	GEO和TCGA数据库下载OSCC和正常人体样本数据	CCDC43在更晚期的口腔鳞状细胞中上调,并且是生活条件差的独立预后因素,CCDC43的高表达可能会损害人体的抗肿瘤免疫力,促进口腔鳞状细胞的转移	[33]
scRNA-seq	28个OSCC标本	强调了CAF和p-EMT肿瘤细胞间的相互作用机制,为OSCC的诊断和预后提出了生物标志物	[34]
scRNA-seq	6个未经治疗的OSCC标本	TCF1/TCF7 T细胞可作为调节OSCC免疫应答的新治疗靶点,有望成为新的预后标志物	[35]

索、治疗预后判定、新靶向药物的研制等提供了重要依据。

2.1 OSCC肿瘤异质性方面的单细胞研究

OSCC中呈现出具有异质性的肿瘤干细胞样细胞群,被鉴定为舌癌干细胞,肿瘤的复发、不良预后归因于这些细胞亚群,它们对传统的放射治疗和化学治疗具有抵抗力,又称“化学抗性细胞亚群”^[36]。Zandberg等^[27]对5个OSCC标本进行全外显子组测序(scWES-seq),在所有亚位点中仅识别出0~2个相同的突变,异质性与物理分离呈负相关,且一对分化良好的样本比分化较差的样本更相似。在OSCC标本多个活检位点中仅发现TP53突变,而未发现其他所谓的“驱动突变”。Xiao等^[28]应用scRNA-seq揭示了头颈部恶性肿瘤的代谢异质性,绘制头颈部恶性肿瘤微环境中的细胞代谢基因表达谱。Silva等^[37]验证了舌癌干细胞中CD44基因高表达,EGFR基因低表达,且舌癌干细胞具有抗紫杉醇治疗的能力。OSCC细胞在放疗或应用顺铂和5-氟尿嘧啶后获得癌症干细胞样特性和EMT特征,这归因于癌症干细胞主要处在非活性G₀期,促使分裂活跃的癌细胞避免被针对性辅助放疗或化疗药物破坏。因此,放疗或化疗后的癌细胞群中存在这种癌症干细胞的富集效应,是导致肿瘤局部复发或远处转移的重要因素^[38]。由此可见,能否根除或限制舌癌干细胞,是预防OSCC复发、转移的关键。

2.2 OSCC肿瘤微环境方面的单细胞研究

OSCC的发生发展、侵袭转移、免疫抑制与其复杂的肿瘤微环境(the tumor micro-environment, TME)密切相关。Tao等^[39]认为,口腔肿瘤微环境是肿瘤发生和转移的关键因素,口腔肿瘤微环境的探索可以为治疗提供指导,提高患者的整体生存率和生活质量。口腔肿瘤微环境由适应性免疫细胞(如T细胞和B细胞)、先天免疫细胞(如单核细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突状细胞和髓源性抑制细胞)、癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、致癌细胞及细胞外基质等组成^[40]。其中,主要的T细胞分为细胞毒性CD8⁺ T细胞、常规CD4⁺ T辅助细胞、调节性T细胞等亚群。Chen等^[29]采用scRNA-seq和多色免疫荧光染色,检测浸润于OSCC病变的CD4⁺ T细胞、CD8⁺

T细胞和B细胞的免疫应答和效应功能,发现CD4⁺细胞毒性T淋巴细胞表达颗粒酶的扩增。颗粒酶具有独特的基因表达模式,可诱导细胞凋亡。通过这些T细胞的表达状态可分析出OSCC相关免疫治疗预后。CAFs是口腔肿瘤微环境中重要的侵袭催化剂,亦可调节肿瘤药物敏感性,且可通过上皮-间质转化起到促进肿瘤侵袭的作用^[41,42]。CAFs不仅与OSCC局部复发显著相关,并在区域淋巴结转移瘤中充当了OSCC的共同迁移者。Hu等^[30]研究揭示了口腔鳞状细胞的多步转录组景观,并证明TDO2⁺肌成纤维细胞是免疫治疗的潜在靶标。通过划分OSCC相关的成纤维细胞群体亚型,分析其不同的表达状态,可深入探讨OSCC中成纤维细胞的异质性对治疗抵抗的影响。这些研究也表明,虽然非肿瘤细胞在OSCC中的占比有所差异,但它们的类型和表达基本是一致的。因此,针对免疫细胞、CAFs的治疗方案可能对多数肿瘤有效,但OSCC还需要针对性的靶向治疗策略。

2.3 OSCC发生与发展方面的单细胞研究

OSCC发生与发展是一个极其复杂的动态致病过程,我们对其了解甚少。随着测序技术的突飞猛进,越来越多OSCC的遗传特征被发现及证实^[43]。通过揭示OSCC发生发展中相关的分子机制,深入探索其发生与发展过程,对OSCC早期诊断及治疗具有至关重要的意义。Chen等^[31]通过分析scRNA-seq数据,证明了EPCAM、SOX2、CSGALNACT1、FMOD等12个代谢相关基因标记在OSCC发生与发展中的临床意义,评估了这12个基因在肿瘤和非肿瘤细胞中的表达情况,验证了两簇在细胞水平上存在不同恶性程度的肿瘤细胞。为了研究OSCC的发生和发展过程,Huang等^[32]利用槟榔碱和4-硝基喹1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4NQO)诱导小鼠OSCC的发展来模拟人的OSCC发展过程,采用scRNA-seq分析16周和29周实验组小鼠舌部病变,并与对照组舌部病变进行比较,鉴定出17种参与致癌的细胞亚型,其中第七种(干细胞)和第九种(角化细胞)致癌亚型在与MYC相关的途径中具有最显著的作用。MCM5、RANBP1和HSP90AB1过表达的顺铂耐药细胞系HONE1-CIS6的存在进一步验证了这一结果。这些

细胞亚型生物标志物在口腔癌致癌过程中可应用于检测癌前病变患者, 识别高危人群并作为治疗靶点。这些发现为阐明OSCC的发生和发展提供了实验证据支持, 然而获取同一患者口腔连续病变样本是非常困难的。该研究还受限于小鼠模型的局限性, 将这些研究成果应用于人口腔鳞状细胞癌的研究中, 仍需要更多实验证据来加以证明。

2.4 OSCC治疗和预后方面的单细胞研究

面对OSCC, 尽管有手术、放疗、化疗等治疗方法, 但复发和转移的风险仍然不可避免^[44]。对于难治性口腔鳞状细胞癌, 问题在于肿瘤细胞中是否始终存在一个在选择性治疗压力存活下来的细胞亚群, 或者是否获得了能够生存的突变。Cui等^[45]整合了来自癌症基因组图谱数据库(TCGA)的部分OSCC标本mRNA表达谱和当地OSCC患者的相关临床信息, 进行scRNA-seq分析, 建立了一种新的T淋巴细胞增殖调节因子特征, 有助于研究OSCC中的T细胞增殖和免疫微环境, 预测预后和改善免疫治疗反应。Huynh等^[34]整合分析了OSCC单细胞RNA测序数据集, 强调CAFs和部分上皮-间充质转化(p-EMT)肿瘤细胞的细胞间相互作用网络, 并为转移期间OSCC的诊断和预后提供了生物标志物。Peng等^[35]应用单细胞测序分析发现, TCF1/TCF7 T细胞亚群、三级淋巴结构(TLS)和预后之间存在很强的关联, 还描述了这些单元所依赖的上游驱动序, TCF1/TCF7 T细胞可作为新的预后标志物, 有望成为调节OSCC免疫应答的新治疗靶点。Wang等^[33]通过基因表达数据库(GEO)和TCGA下载相匹配的OSCC样本和正常样本数据, 运用单细胞测序分析发现, CCDC43的表达在更晚期的口腔鳞状细胞中上调, 并且是生活条件差的独立预后因素。除此之外, CCDC43的高表达可能会损害人体的抗肿瘤免疫力, 促进口腔鳞状细胞的转移。SCS应用研究为OSCC的免疫学研究提供了深刻的见解, 也是未来药物发现的重要线索。

3 单细胞测序技术面临的挑战

SCS作为一种单细胞高通量测序技术, 与传统多细胞水平测序技术相比, 在探究各种细胞群时, 具有突出的高分辨率, 但也有其局限性。制备单细胞悬液的过程中, 组织的整体性已破坏,

一定程度上影响了其转录状态; 而且目标细胞在组织中的空间结构信息很难通过SCS准确获取; 对单细胞中极微量的RNA或DNA进行高质量扩增时, 存在扩增不全、扩增不均, 会影响测序准确性; 海量的测序数据、高额的测序费用, 给后续工作也带来了艰巨挑战。

近年来, 随着空间组学测序、基于深度学习的人工智能、云平台等多种新技术应用于OSCC基础邻域研究, 多方位弥补了单细胞测序的局限性, 有益于对OSCC生物学特征的全面了解。Sun等^[46]对8例口咽鳞癌肿瘤组织和癌旁组织标本进行空间组学测序, 验证了调控赖氨酸羧化的关键酶——2-酮戊二酸-5-双加氧酶2(2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, PLOD2)的上调与口咽鳞癌的增殖、转移有关, 弥补了单细胞测序技术无法获取细胞空间分布信息的缺陷。Nagasaki等^[47]介绍了能够解决庞大基因数据处理需求的日本京都大学基因组医学中心部署的云平台系统。Huang等^[48]使用各种基于深度学习的模型对12种癌症进行了广泛的分析, 验证了其优越性。在未来几年, 基于深度学习的人工智能将为单细胞测序数据分析提供重要的技术支撑。

4 总结与展望

单细胞测序技术已广泛应用于OSCC研究, 为我们展现了OSCC细胞异质性、细胞亚群分化差异性、肿瘤微环境对癌组织的影响及细胞间相互作用机制, 有助于寻找有效的OSCC诊断和预后标志物, 拓展了OSCC的治疗方案。随着基于深度学习的人工智能、云平台等新技术的发展, SCS的测序通量将不断提高, 测序成本将更低, 数据分析将更智能化, 耗时将更短, 准确度将不断提高。这将加快OSCC相关研究项目的进程, 促进相关研究成果的转化, 加快OSCC个性化精准医疗时代的来临。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249

- [2] Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92
- [3] Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(1): 35-45
- [4] Wang W, Adeoye J, Thomson P, et al. Multiple tumour recurrence in oral, head and neck cancer: characterising the patient journey. *J Oral Pathol Med*, 2021, 50(10): 979-984
- [5] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 1-14
- [6] Bonin S, Stanta G. Pre-analytics and tumor heterogeneity. *New Biotechnol*, 2020, 55: 30-35
- [7] Liu X, Yi J, Li T, et al. DRMref: comprehensive reference map of drug resistance mechanisms in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D1253-D1264
- [8] Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(5): 257-272
- [9] Lei Y, Tang R, Xu J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 91
- [10] 操利超, 巴颖, 张核子. 单细胞测序方法研究进展. *生物信息学*, 2022, 20(2): 91-99
- [11] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 16897-16919
- [12] Lohani V, A.r A, Kundu S, et al. Single-cell proteomics with spatial attributes: tools and techniques. *ACS Omega*, 2023, 8(20): 17499-17510
- [13] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(2): 163-176
- [14] Zhou W, Yan Y, Guo Q, et al. Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 312
- [15] Vijg J, Dong X. Pathogenic mechanisms of somatic mutation and genome mosaicism in aging. *Cell*, 2020, 182(1): 12-23
- [16] Zhou X, Xu Y, Zhu L, et al. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in limited DNA sequencing based on tube and droplet. *Micromachines*, 2020, 11(7): 645
- [17] 沈一鸣, 郭咪, 王嘉宁, 等. 单细胞测序技术在肿瘤相关成纤维细胞研究中的应用. *生命的化学*, 2022, 42(4): 691-698
- [18] Lu N, Qiao Y, An P, et al. Exploration of whole genome amplification generated chimeric sequences in long-read sequencing data. *Brief BioInf*, 2023, 24(5): bbad275
- [19] Yaldiz B, Kucuk E, Hampstead J, et al. Twist exome capture allows for lower average sequence coverage in clinical exome sequencing. *Hum Genomics*, 2023, 17(1): 39
- [20] Li N, Jin K, Bai Y, et al. Tn5 transposase applied in genomics research. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8329
- [21] Xing D, Tan L, Chang CH, et al. Accurate SNV detection in single cells by transposon-based whole-genome amplification of complementary strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(8): e2013106118
- [22] Salmen F, De Jonghe J, Kaminski TS, et al. High-throughput total RNA sequencing in single cells using VASA-seq. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(12): 1780-1793
- [23] Chen G, Ning B, Shi T. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis. *Front Genet*, 2019, 10: 317
- [24] Lin C, Li Y, Chu Y, et al. Single-cell discovery of the scene and potential immunotherapeutic target in hypopharyngeal tumor environment. *Cancer Gene Ther*, 2022, 30(3): 462
- [25] 吕天琦, 曹张磊, 蔺元斌, 等. 单细胞测序技术在食管癌研究中的应用. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(9): 1801-1811
- [26] Reed ER, Jankowski SA, Spinella AJ, et al. β -catenin/CBP activation of mTORC1 signaling promotes partial epithelial-mesenchymal states in head and neck cancer. *Transl Res*, 2023, 260: 46-60
- [27] Zandberg DP, Tallon LJ, Nagaraj S, et al. Intratumor genetic heterogeneity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*, 2019, 41(8): 2514-2524
- [28] Xiao Z, Dai Z, Locasale JW. Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3763
- [29] Chen H, Sameshima J, Yokomizo S, et al. Expansion of CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes with specific gene expression patterns may contribute to suppression of tumor immunity in oral squamous cell carcinoma: single-cell analysis and *in vitro* experiments. *Front Immunol*, 2023, 14: 1305783
- [30] Hu S, Lu H, Xie W, et al. TDO2⁺ myofibroblasts mediate immune suppression in malignant transformation of squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*, 2022, 132(19): e157649
- [31] Chen H, Liu X, Yao F, et al. Identification of metabolic signatures related to metastasis and immunotherapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res*, 2023, 15(1): 373-391
- [32] Huang LY, Hsieh YP, Wang YY, et al. Single-cell analysis of different stages of oral cancer carcinogenesis in a

- mouse model. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8171
- [33] Wang Z, Zhang H, Zhai Y, et al. Single-cell profiling reveals heterogeneity of primary and lymph node metastatic tumors and immune cell populations and discovers important prognostic significance of CCDC43 in oral squamous cell carcinoma. *Front Immunol*, 2022, 13: 843322
- [34] Huynh NCN, Huang TT, Nguyen CTK, et al. Comprehensive integrated single-cell whole transcriptome analysis revealed the p-EMT tumor cells—CAFs communication in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6470
- [35] Peng Y, Xiao L, Rong H, et al. Single-cell profiling of tumor-infiltrating TCF1/TCF7+ T cells reveals a T lymphocyte subset associated with tertiary lymphoid structures/organs and a superior prognosis in oral cancer. *Oral Oncol*, 2021, 119: 105348
- [36] Xie SL, Fan S, Zhang SY, et al. SOX8 regulates cancer stem-like properties and cisplatin-induced EMT in tongue squamous cell carcinoma by acting on the Wnt/ β -catenin pathway. *Int J Cancer*, 2018, 142(6): 1252-1265
- [37] Silva Galbiatti-Dias AL, Fernandes GMM, Castanhole-Nunes MMU, et al. Relationship between CD44high/CD133high/CD117high cancer stem cells phenotype and cetuximab and paclitaxel treatment response in head and neck cancer cell lines. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(8): 1633-1641
- [38] Varun BR, Jayanthi P, Ramani P. Cancer stem cells: a comprehensive review on identification and therapeutic implications. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2020, 24(1): 190
- [39] Tao W, LiJuan Z, Kan L, et al. The microenvironment of tongue cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1296: 49-78
- [40] Agrawal A, Lasli S, Javanmardi Y, et al. Stromal cells regulate mechanics of tumour spheroid. *Mater Today Bio*, 2023, 23: 100821
- [41] Dong L, Sun Q, Song F, et al. Identification and verification of eight cancer-associated fibroblasts related genes as a prognostic signature for head and neck squamous cell carcinoma. *Heliyon*, 2023, 9(3): e14003
- [42] Kato K, Miyazawa H, Kawashiri S, et al. Tumour: fibroblast interactions promote invadopodia-mediated migration and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oncol*, 2022, 2022: 5277440
- [43] Chattopadhyay T, Gupta P, Nayak R, et al. Genome-wide profiling of dysregulated piRNAs and their target genes implicated in oncogenicity of tongue squamous cell carcinoma. *Gene*, 2023, 849: 146919
- [44] Bhutia SK, Naik PP, Praharaj PP, et al. Identification and characterization of stem cells in oral cancer. *Methods Mol Biol*, 2019, 2002: 129-139
- [45] Cui Y, Cheng Y, Huang W, et al. A novel T-cell proliferation-associated gene predicts prognosis and reveals immune infiltration in patients with oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*, 2023, 152: 105719
- [46] Sun Y, Wang S, Zhang X, et al. Identification and validation of PLOD2 as an adverse prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1842
- [47] Nagasaki M, Sekiya Y, Asakura A, et al. Design and implementation of a hybrid cloud system for large-scale human genomic research. *Hum Genome Var*, 2023, 10(1): 6
- [48] Huang Z, Johnson TS, Han Z, et al. Deep learning-based cancer survival prognosis from RNA-seq data: approaches and evaluations. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(S5): 41