

· 综述 ·

单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤研究中的应用

何奕婷^{1,2}, 祁婉婉³, 冯振卿^{1,2*}

¹南京医科大学国家卫生健康委员会抗体技术重点实验室, ²基础医学院病理学系, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学附属妇产医院妇科, 江苏 南京 210004

[摘要] 妇科恶性肿瘤包括宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌等, 具有高度的异质性, 一旦进入晚期, 预后往往不良。单细胞测序技术的出现和发展为在单个细胞水平上探究肿瘤发生发展的机制, 鉴定稀有细胞, 绘制细胞谱系, 指导肿瘤靶向精准治疗和预测患者预后等提供了更好的平台。本文就单细胞测序技术的兴起与发展及其在妇科恶性肿瘤研究中的应用进行综述。

[关键词] 单细胞测序技术; 卵巢癌; 宫颈癌; 子宫内膜癌; 异质性; 细胞图谱

[中图分类号] R737.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)04-553-08

doi: 10.7655/NYDXBNSN230971

Applications of single - cell sequencing technology in the research on gynecological malignancies

HE Yiting^{1,2}, QI Wanwan³, FENG Zhenqing^{1,2*}

¹National Health Commission Key Laboratory of Antibody Techniques, ²Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of Gynaecology, the Affiliated Obstetrics and Gynaecology Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China

[Abstract] Gynecological malignancies, such as cervical cancer, ovarian cancer, and endometrial cancer, are characterized by a high degree of heterogeneity. Once they enter the advanced stage, the prognosis is often poor. The emergence and development of single-cell sequencing technology have provided a better platform for investigating the mechanisms of tumor initiation and progression, identifying rare cells, mapping cellular lineages, guiding targeted precision therapies for tumors, and predicting patient outcomes at the single-cell level. This article provides a comprehensive review of the rise and development of single - cell sequencing technology and its applications in the research on gynecologic malignancies.

[Key words] single-cell sequencing technology; cervical cancer; ovarian cancer; endometrial cancer; heterogeneity; cell atlas

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(04): 553-560]

妇科恶性肿瘤主要包括宫颈癌(cervical cancer, CC)、卵巢癌(ovarian cancer, OC)、子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)、外阴癌、妊娠滋养细胞肿瘤等, 其中前三者在临床最为常见。根据2020年全球癌症数据统计显示, CC、OC和EC的新发病例数分别

约为60.4万、31.4万、41.7万, 死亡病例数分别约为34.2万、20.7万、9.7万^[1]。在中国, 根据最新数据统计显示, CC、OC和EC的发病率分别为17.69/10万、8.47/10万、10.54/10万, 病死率分别为5.52/10万、4.04/10万、2.53/10万^[2]。妇科恶性肿瘤的发病率不断增长并且呈现出年轻化的趋势^[3]。随着科学技术的不断发展, 单细胞测序技术的兴起为探究妇科恶性肿瘤的发生发展轨迹、免疫微环境的结构组成等提供了更为实用的平台。

单细胞测序技术是指在单个细胞水平上, 对基

[基金项目] 江苏省科技厅重点研发计划(社会发展)项目(BE2018613)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

基因组、转录组、表观基因组等遗传信息进行高通量测序分析的一项技术。随着技术的不断更新与突破,单细胞测序技术现已被广泛应用于癌症生物学、神经生物学、免疫学、临床诊断、胚胎学、产前诊断等多个领域的研究。本文将从单细胞测序技术的进展及其在妇科恶性肿瘤研究中的相关应用方面进行综述,并展望其发展前景。

1 单细胞测序技术的兴起与发展

传统测序技术有通量高、成本低、时间短等优点,但其所检测的DNA和RNA来源于大量细胞,最后获得的数据为整个细胞群的平均数值^[4]。然而,细胞之间的遗传信息往往存在差异,即细胞的异质性,大量细胞平均的结果可能会掩盖某一小群稀有细胞的基因表达信息,而了解肿瘤细胞的异质性对于肿瘤的诊断、明确肿瘤性质以及针对性个体化治疗均有重要影响^[5]。

单细胞测序技术可以针对单个细胞进行分析,包括单个细胞的基因组、转录组、表观遗传学和蛋白质组等信息,发现和比较不同细胞的基因表达差异。单细胞测序技术自2009年首次被报道以来,已广泛应用于生命科学领域^[6]。2013年,单细胞测序技术被《自然·方法》(*Nature Methods*)杂志评为年度技术^[7]。同年,《科学》(*Science*)杂志将单细胞测序列为年度最值得关注的六大领域榜首,认为该项技术将改变生物学和医学界的许多领域^[8]。单细胞测序技术的出现和发展在阐明肿瘤发生发展机制、肿瘤分子分型、鉴定稀有细胞、绘制细胞谱系、指导肿瘤靶向精准治疗和预测患者预后等方面发挥了重要作用。

单细胞测序主要包括基因组学、转录组学、表观基因组学和蛋白质组学等方向的测序技术。单细胞基因组测序(single-cell DNA sequencing, scDNA-seq)是在单细胞水平通过全基因组扩增技术对单个细胞微量全基因组DNA进行扩增,获得高覆盖率的完整基因组后进行外显子捕获进而高通量测序,scDNA-seq主要用于检测细胞中的染色体数目变异、拷贝数变异、单核苷酸多态性等信息,了解细胞之间的遗传差异、探究细胞进化关系等^[9]。单细胞转录组学测序主要包括单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)和单核转录组测序(single nuclei RNA sequencing, snRNA-seq)。scRNA-seq是一种在单个细胞水平对转录组信息进行高通量测序的技术,其应用最为广泛,有助于识

别和表征细胞类型、状态、谱系和分化方向,尤其是在肿瘤学领域,它已成为深入研究肺癌^[10]、肝癌^[11]、乳腺癌^[12]等肿瘤的核心工具。基于液滴的10×Genomics Chromium和基于平板的RNA模板测序5'端切换机制(plate-based switching mechanism at the 5' end of RNA template sequencing, SMART-seq2)是scRNA-seq的两种常用方法^[13-14]。snRNA-seq是通过提取并标记样本的细胞核,制成单细胞核悬液进行测序,从而研究单个细胞核内转录本的技术,其被广泛运用于核膜完整的不同组织和细胞类型的冷冻样品分析,尤其是脑肿瘤分析,因为其难以获得新鲜脑组织用于研究^[15]。表观遗传学是连接基因组学和细胞表型的重要调控环节,单细胞表观基因组学测序主要涉及单个细胞的DNA甲基化、组蛋白修饰、核小体排列、染色质的三维构象等,以便研究基因调控的特异性。单细胞蛋白质组学测序的基础在于质谱分析,研究人员为减少蛋白质损失改进了蛋白质制备和分离的程序,发展了质谱流式细胞术和成像质谱流式技术^[16],促进了在单细胞分辨率下更深入的定量蛋白质组学测序。单细胞蛋白质组学测序对于在蛋白层面揭示肿瘤异质性及治疗耐药性具有重要意义^[17]。

单细胞测序技术主要包括4个步骤:①从细胞群中分离单个细胞;②提取、处理和扩增每个细胞的遗传物质;③制备包括细胞遗传物质的测序库;④使用第二代测序仪对该库进行测序。

2 单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤研究中的应用

2.1 单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤发生发展机制及异质性研究中的应用

2.1.1 CC

CC是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤^[1]。90%以上的CC发生于宫颈外鳞状上皮和宫颈内柱状上皮的过渡区^[18],在某些生理或病理条件下,过渡区的柱状上皮被鳞状上皮所取代,即化生。过渡区活跃性化生与人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染的风险相关^[19],HPV是CC的主要高危因素,但HPV感染导致正常宫颈组织到宫颈癌前病变,再到CC这种转变过程的潜在机制尚不清楚。

研究人员通过对2例HPV⁻正常子宫颈组织、2例HPV⁺正常子宫颈组织、2例HPV⁺高级别鳞状上皮内瘤变(high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)和3例HPV⁺CC组织进行scRNA-seq及空间转录组学测序(spatial transcriptomics sequencing,

ST-seq)联合分析,首次鉴定出了代表3个不同疾病阶段特有的“HPV相关簇”。“HPV相关正常上皮簇”特异性表达肿瘤抑制因子SLC5A8和DERL3,表明HPV感染后保护机制将相应地被激活;“HPV相关HSIL簇”高度表达癌前病变关键分子VSIG1和CASC9;“HPV相关CC簇”特异性表达CALML5和CASP14,曾被证明与头颈癌和口咽癌等HPV相关癌症患者的复发和生存结局密切相关。另外,对不同疾病阶段的各种细胞亚群的空间结构分析表明,在HPV⁺正常子宫颈组织中,HPV感染上皮的病毒滴度较低,而在HPV⁺HSIL组织中,HPV基因整合主要发生在HSIL病灶,而不是腺体和结缔组织区域。鳞状细胞癌组织中HPV基因表达呈现广泛空间分布,证实了持续性HPV感染对CC发生的决定性影响。这项研究发现了可能决定CC进展的关键节点基因,为HPV相关的CC发生研究提供了新的见解^[20]。

Chumhuri等^[21]关于子宫颈上皮细胞及间质细胞scRNA-seq的研究表明,柱状上皮细胞和鳞状上皮细胞来自不同的子宫颈驻留的特异性干细胞群,它们分别受到来自间质的正向和反向Wnt信号的调控,相反的间质信号构成生理状态下过渡区的内稳态。他们利用小鼠宫颈化生模型,进一步证明宫颈间质在化生过程中经历了广泛的重塑,Wnt抑制因子DKK2的表达增加,激活了静止的鳞状干细胞并促进其生长,这些干细胞侵入过渡区的柱状上皮或作为宫颈内的化生灶。这项研究表明子宫颈过渡区的稳态并不完全是通过一种上皮细胞向另一种上皮细胞的转分化来维持的,为阐明维持宫颈上皮连接的机制提供了重要的概念性进展。

2.1.2 OC

OC是病死率最高的妇科恶性肿瘤,预后差^[1]。由于早期大多无症状,OC被诊断时多为晚期,其5年生存率仅为30%。手术切除和全身辅助化疗仍然是OC的主要治疗方法。然而,高达75%的患者会出现化疗耐药性。此外,大多数患者存在术后复发,预后较差^[22]。因此,探索OC复发转移的生物学机制、建立新的特征模型作为OC患者的有效预测指标迫在眉睫。

研究人员搜集了4例原发性OC样本,2例未经治疗的OC腹膜转移肿瘤样本和2例复发OC样本进行scRNA-seq,通过对单细胞基因表达数据进行时间分辨分析来确定转移性OC中肿瘤细胞的发育序列,并确定细胞的起始亚群,接下来将转移性肿瘤中鉴定出的起始细胞追溯到原发性肿瘤,以了解其

原始特征并鉴定具有代表性的生物标志物。研究结果显示,在不同的OC亚群中,复发通常由特异性表达CYR61的原发性肿瘤细胞亚群引发。此外,研究发现表达RGS5的癌症相关成纤维细胞亚群对肿瘤转移起到重要作用,联合CYR61/RGS5表达的评分与OC患者的无复发生存率显著相关。用于免疫组织化学双染色的新型生物标志物CYR61/RGS5对预测临床OC的复发具有巨大潜力^[23]。

高级别浆液性卵巢癌(high-grade serous ovarian cancer, HGSOC)是最具侵袭性和最常见的OC亚型,约占所有病例的70%^[24]。为揭示OC关键的遗传、表观遗传和转录组学特征及其相互调控关系,探索HGSOC新的分子机制和寻找潜在的治疗靶点,研究人员改进了单细胞多组学测序技术(single cell chromatin overall omic-scale landscape sequencing, scCOOL-seq),同时分析单个癌细胞的体细胞拷贝数变化、DNA甲基化、染色质可及性和转录组。研究发现,OC细胞中与干扰素(interferon, IFN)信号、金属硫蛋白和代谢相关的基因表达水平普遍上调,IFN信号和金属硫蛋白表达水平的上调受到启动子去甲基化和卫星细胞、LINE1低甲基化的影响。此外还发现基因表达和DNA甲基化在匹配的原发和腹部转移肿瘤细胞中显示出相似的模式,这表明转移细胞可能存在于原发肿瘤亚克隆中。另外,残留DNA甲基化水平高、CCN1和HSP90AA1表达上调的癌细胞系具有更大的潜在转移特性^[25]。

2.1.3 EC

EC是全世界女性生殖系统第二大常见的恶性肿瘤,在北美、东欧地区发病率最高^[1]。在美国,EC已超过宫颈癌成为最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,并且发病率与死亡率呈现连年增长的趋势^[26-27]。子宫内膜样癌(endometrioid endometrial cancer, EEC)是最常见的子宫内膜癌类型,占病例的75%~85%^[28]。目前治疗方式以全子宫、双附件加淋巴结切除术为主,根据病理报告是否有高危因素辅以放化疗。然而,一些年轻患者可能需要保留生育能力,因此常规手术治疗并不是最好的选择^[29]。

在雌激素依赖的EEC发生过程中,子宫内膜在长时间雌激素影响且无孕激素保护下不受控制地增生,可由正常子宫内膜发展到非典型子宫内膜增生(atypical endometrial hyperplasia, AEH),再逐步发展到EEC^[30],但目前EEC的起源尚不明确。研究人员应用scRNA-seq分析了正常子宫内膜、AEH和EEC的细胞,发现EEC来源于子宫内膜无纤毛的腺

上皮细胞, LCN2⁺/SAA1/2⁺细胞是 EEC 发生的一个特征亚群, 其在正常子宫内膜组织鲜有表达, 但在 AEH 和 EEC 的表达呈递增趋势, 提示固有的 LCN2⁺/SAA1/2⁺ 上皮细胞亚群可能是 EEC 的早期标志物。根据子宫内膜病变 LCN2⁺/SAA1/2⁺ 标记计算出的高危评分患者在 TCGA-EEC 队列中的生存率明显较低^[31]。

Cochrane 等^[32]应用 scRNA-seq 研究来自正常子宫内膜的类器官模型系统及 EC 组织, 发现纤毛细胞标志物(DYDC2、CTH、FOXJ1 和 p73)和分泌细胞标志物(MPST)在 EC 中高表达, 并与 EC 患者的总生存率呈正相关, 这些标志物表达高的女性预后较好。此外, MPST 可与目前用于管理 EC 患者的临床病理参数(如年龄、体重指数、肿瘤分期和分级、组织学亚型、淋巴血管间隙侵犯、淋巴结状态等)相结合从而预测患者预后, MPST 表达能够区分错配修复缺陷和 p53 野生型 EC 患者的临床结局, MPST 高表达的患者预后较好, 而低表达的患者往往预后不良。MPST 表达水平提供了这些临床病理特征未捕捉到的额外信息, 显著改善了与患者结局的相关性。综上所述, 这些标志物可用于 EC 患者的风险分层, 从而改善 EC 患者的临床管理。

2.2 单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)研究中的应用

TME 主要是由肿瘤细胞及其周围的免疫细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞等, 以及各种细胞外成分(如细胞因子、激素、细胞外基质和生长因子等)组成的一个复杂生态系统。不同肿瘤所构成的微环境中, 各种细胞类型的比例差异较大, 提示个体差异性较大。TME 不仅在肿瘤发生、发展和转移过程中起着关键作用, 还对患者预后和免疫治疗效果有深远的影响^[33]。

研究通过对 3 例正常宫颈、2 例宫颈高级别上皮内瘤变(high-stage intraepithelial lesion, HSIL)、4 例宫颈原位癌和 1 例转移淋巴结组织进行了 scRNA-seq, 发现 HSIL 产生了一些早期免疫浸润, 但活性较低, 主要是组织驻留 CD8⁺T 细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞及 M1 样巨噬细胞等的浸润; 原位癌表现出免疫抑制状态, 其特征为耗竭性 CD8⁺T 细胞、组织驻留 NK 细胞和 M2 样巨噬细胞的高度浸润; 而转移淋巴结的免疫反应则被激活, 表现出 CD4⁺T 细胞(初始 T 细胞和中央记忆 T 细胞)、细胞毒性 CD8⁺T 细胞、循环 NK 细胞和效应性记忆 CD8⁺T 细胞的高度浸润, 这 3 个阶段免疫细胞浸润种类及水平的差异表

明在 CC 进展过程中, TME 呈现动态变化, 其对研究抑制 CC 发生和进展的新的免疫治疗方法具有重要意义^[34]。

一项对 7 例不同阶段的 HGSOE 患者及 5 例年龄匹配的正常卵巢样本的 scRNA-seq 测序分析^[35]表明, 上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物 NOTCH1、SNAI2、TGFB1 和 WNT11 的组合可用于预测 HGSOE 患者的不良预后; 表达 α -SMA、Vimentin、COL3A、COL10A 和 MMP11 的基质癌相关成纤维细胞(matrix cancer-associated fibroblasts, mCAF)被证实可以诱导肿瘤细胞 EMT, EMT 是介导 OC 侵袭、转移及化学耐药性的主要机制, 具有激活 EMT 转录程序的 HGSOE 患者表现出更差的结局。此外, 一种免疫检查点抑制受体 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domain, TIGIT)在耗竭性 CD8⁺T 细胞上高表达, 封闭 TIGIT 靶点可以显著抑制小鼠中卵巢肿瘤的生长, 提示 TIGIT 可以作为 HGSOE 免疫治疗的潜在分子靶点。

Horeweg 等^[36]通过对 B 细胞进行 scRNA-seq 在 EC 中发现了三级淋巴结构(tertiary lymphoid structures, TLS)的存在, TLS 是后天在非淋巴组织中形成的含有免疫细胞的组织聚集体, B 细胞在 TLS 中的聚集对于抑制肿瘤具有关键作用。差异基因表达分析显示 TLS 与 L1CAM 过表达相关。通过免疫组化和共免疫荧光显示 L1CAM 在成熟的具有生发中心的 TLS 中表达极高, 与肿瘤中 L1CAM 的表达无关, 提示 L1CAM 可作为成熟 TLS 的标志物。多变量 Cox 回归分析显示存在 TLS 的 EC 患者具有更好的预后, 该指标对 EC 预后的影响是独立的, 不受其他临床病理特征和分子分型的干扰。使用 L1CAM 作为免疫组织化学标志物以评估成熟 TLS 的存在, 可以提高预测 EC 患者复发和预后的准确性。

2.3 单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤细胞学检测及耐药研究中的应用

恶性腹水在晚期 HGSOE 患者中经常发生, 与肿瘤耐药和预后不良相关^[22]。腹水由多种细胞类型组成, 1/3 的卵巢癌患者在诊断时存在恶性腹水, 常见于化疗耐药患者^[37]。Izar 等^[38]使用单细胞 scRNA-seq 对 11 例 HGSOE 患者的 22 份腹水标本中的大约 11 000 个细胞进行分析, 发现恶性和非恶性细胞之间的细胞生物学功能和免疫功能存在显著差异。恶性细胞具有分化和增殖的作用, 而在非恶性细胞中, 癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibro-

blasts, CAF)亚群具有免疫调节作用,其表达的细胞因子白介素-6和趋化因子CXCL12能够在肿瘤中激活JAK/STAT信号,从而促进肿瘤生长和耐药。上述研究表明在腹水生态系统中不同细胞行使着不同的功能,不同细胞间的通讯和相互作用可能平衡疾病进展和对治疗的反应,从治疗上改变这种平衡可能是重塑耐药环境的一个途径。有研究收集了来自14例OC患者的包括原发灶、转移灶、腹水、外周血以及盆腔淋巴结在内的5个部位共39个样本,进行scRNA-seq联合T细胞受体测序(T cell receptor sequencing, TCR-seq),发现OC患者腹水中的记忆T细胞是肿瘤原发灶及转移灶中终末态T细胞的重要补充池,揭示了肿瘤组织及腹水中巨噬细胞功能表型和起源的异质性,为深入理解OC腹水对肿瘤进展的影响以及进一步探索靶向OC腹水的免疫治疗策略提供了重要的实验依据^[39]。

为给具有复发风险的子宫内膜癌患者提供更多的信息,从而提高免疫治疗的效果, Dou等^[40]利用包括全基因组测序、全外显子组测序、甲基化阵列、总RNA测序、微小RNA测序、靶向蛋白质组学、全局蛋白质组学、磷酸化蛋白质组学、乙酰蛋白质组学和糖蛋白质组学这10个组学平台对138例EC肿瘤和20例来自健康供体的正常子宫内膜标本进行了全面的蛋白质基因组学分析。关于MYC活性与二甲双胍治疗之间的关联分析表明,二甲双胍对于治疗MYC活性升高的EC具有潜在作用;PTEN和PIK3R1基因突变与AKT磷酸化水平升高及对AKT抑制剂敏感性增加相关,PIK3R1或许可以成为对AKT抑制剂产生应答的潜在生物标志物。另外,CTNNB1热点突变阻断了磷酸化诱导的 β -catenin降解,并可能使Wnt-FZD拮抗剂对具有CTNNB1热点突变的EC耐药。这些发现明确了一些分子标志物,对于深入探究EC耐药的机制、指导EC患者分层管理和精准治疗具有重要意义。

3 单细胞测序技术的不足和改进

自从单细胞水平层面探究疾病以来,研究人员对肿瘤的异质性、肿瘤微环境的复杂性有了进一步理解,单细胞测序技术被广泛应用于生命科学领域。近年来,单细胞测序技术在妇科恶性肿瘤研究中的应用层出不穷,其在阐明肿瘤发生发展机制、检测肿瘤细胞亚型分类、鉴定稀有细胞、绘制细胞谱系、指导靶向精准治疗及疾病预后等方面发挥了重要作用(表1)。然而,单细胞测序技术在肿

瘤研究方面的应用仍然存在一定局限性,如在scRNA-seq中,一些编码具有重要调控或信号功能蛋白质的低表达基因即使被检测到,也容易丢失,并且容易受到技术噪声的影响^[41];由于技术和经费的限制,来自大块组织的细胞只有小部分可以被测序^[42],测序的细胞在多大程度上代表了整个组织中感兴趣的细胞尚不清楚,故亟待解决进一步提高细胞捕获的通量。此外,在分离过程中,组织中单细胞的空间信息经常丢失^[43]。因此,单细胞测序数据通常不能显示细胞是如何构成组织的,以实现感兴趣组织中的协调功能。为了解决这些问题,研究人员不断研发一些新技术,如荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、单分子荧光原位杂交(single molecule fluorescence *in situ* hybridization, smFISH)、激光捕获显微解剖、激光扫描显微镜(包括双光子激光扫描显微镜)和荧光原位测序等,从而保存或恢复测序单细胞的空间信息^[44]。近期,有研究人员研发了活细胞转录组测序技术^[45],兼具全基因表达分辨率和动态解析能力,在单细胞进行转录组测序后依然能够保持细胞存活。空间解析转录组学(spatially resolved transcriptomics, SRT)是继scRNA-seq后出现的新一代技术,通过SRT可以帮助揭示亚细胞RNA分布模式、空间标志和空间调节的生物过程,这对于理解复杂组织中的基因表达和调控至关重要^[46]。

4 小结与展望

目前,妇科恶性肿瘤的发病率和病死率居高不下,并呈现年轻化趋势,单细胞测序技术的出现为在单个细胞水平上进一步深入研究妇科恶性肿瘤提供了新的方向。将scDNA-seq、scRNA-seq、单细胞蛋白质组学测序以及联合TCR-seq等多种技术广泛应用于妇科恶性肿瘤的研究,在识别肿瘤细胞特殊亚群、发现肿瘤发生发展中关键性的节点基因、挖掘TME中的丰富信息、探究耐药性肿瘤细胞的特征等方面发挥了重要作用,这些发现对于帮助临床确立精准有效的诊断标志物、治疗靶点、疗效及预后评价指标等具有重要意义。然而,单细胞测序技术仍然存在一些不足之处,比如对低表达基因的检出率不高、缺乏细胞或组织的空间信息等。未来,活细胞转录组学测序、SRT等技术将会逐步发展并进一步完善,这些技术的成熟与推广,以及多组学之间的联合应用将为妇科恶性肿瘤个性化与精准化的诊断、治疗及预后提供新的思路和理论基础。

表1 利用单细胞测序获得的与妇科恶性肿瘤相关的关键发现

Table 1 Key findings relating to gynecological malignancies obtained using single-cell sequencing

Tumor	Technology	Key findings
CC	scRNA-seq, ST-seq	Produced a spatial map illustrating the four developmental stages of HPV-related CC and identified three distinct ‘HPV-related epithelial clusters’ ^[20]
	scRNA-seq	Revealed dynamic changes in the TME during the progression of CC, the primary tumor exhibited an immune-suppressive state, whereas an immune response in metastatic lymph nodes was activated ^[34]
	scRNA-seq	Revealed that squamous and columnar epithelia originate from distinct lineage-specific populations of ectocervical resident stem cells; These stem cell populations were regulated by opposing Wnt signals from the stroma, and disruption of Wnt signaling led to carcinogenesis ^[21]
OC	scRNA-seq, bulk-seq	Identified seven subtypes within the primary tumor, and among them, the CYR61 ⁺ subtype was determined to be associated with recurrence, while the RGS5 ⁺ CAF subtype promoted tumor metastasis; CYR61 and RGS5 could serve as predictive factors for recurrent EOC ^[23]
	scCOOL-seq	Revealed mechanisms associated with the upregulation of genes involved in IFN signaling transduction, metallothioneins, and metabolism in OC; established new potential therapeutic targets for the treatment of OC ^[25]
	scRNA-seq	Revealed the cellular landscape of HGSOC and elucidated the mechanisms by which mCAFs enhance the invasive capabilities of ovarian tumor cells; detected TIGIT as a potential immunotherapeutic molecular target for HGSOC ^[35]
	scRNA-seq	Elucidated the distinct functions exercised by different cell types within the HG-SOC ascites ecosystem. The communication and interaction among these different cells may play a balancing role in disease progression and response to treatment. Consequently, altering this balance therapeutically could be a therapeutic pathway to reshaping the drug-resistant environment ^[38]
	scRNA-seq, TCR-seq	Depicted the single-cell landscape of five sites associated with OC, including omentum metastasis and malignant ascites; revealed the interconnections between the malignant ascites ecosystem and tumor sites ^[39]
EC	scRNA-seq	Identified a characteristic subpopulation associated with the development of EEC, which is rarely expressed in normal endometrial tissue, but shows an increasing expression pattern in AEH and EEC ^[31]
	scRNA-seq	Revealed ciliated cell markers DYDC2, CTH, FOXJ1, and p73 as well as the secretory cell marker MPST, which can be utilized to improve clinical risk stratification for EC patients ^[32]
	scRNA-seq	Detected the presence of the mature tertiary lymphoid structure marker LICAM, which serves as a TLS immunohistochemical marker, improving the accuracy of predicting recurrence and prognosis in EC patients ^[36]
	scDNA-seq, scRNA-seq, single-cell proteomics	Identified molecular biomarkers such as PIK3R1 and CTNNA1 which contribute to the investigation of drug resistance mechanisms in EC and guide stratified management and precision treatment research for EC patients ^[40]

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J].

CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249
 [2] ZHENG R, ZHANG S, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1–9
 [3] ALFANO C M, LEACH C R, SMITH T G, et al. Equitably

- improving outcomes for cancer survivors and supporting caregivers: a blueprint for care delivery, research, education, and policy[J]. *CA a Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 35-49
- [4] LIAO J, QIAN J Y, FANG Y, et al. *De novo* analysis of bulk RNA-seq data at spatially resolved single-cell resolution[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6498
- [5] GAVISH A, TYLER M, GREENWALD A C, et al. Hallmarks of transcriptional intratumour heterogeneity across a thousand tumours[J]. *Nature*, 2023, 618(7965): 598-606
- [6] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole - transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382
- [7] Method of the year 2013[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 1
- [8] The biology of genomes. Single - cell sequencing tackles basic and biomedical questions [J]. *Science*, 2012, 336(6084): 976-977
- [9] ZONG C H, LU S J, CHAPMAN A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1622-1626
- [10] 张雯晴, 田书凝, 冯振卿. 单细胞RNA测序技术在非小细胞肺癌研究中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(6): 864-870
- [11] 王 娜, 赵利楠, 韩泽广. 单细胞测序技术在肝癌研究中的应用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(5): 488-493
- [12] 杨 帅, 王新恒, 吴佳乐, 等. 单细胞测序技术在乳腺癌中的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2023, 37(3): 287-292
- [13] ZHENG G X Y, TERRY J M, BELGRADER P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049
- [14] PICELLI S, BJÖRKLUND Å K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1096-1098
- [15] LAKE B B, AI R Z, KAESER G E, et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain [J]. *Science*, 2016, 352(6293): 1586-1590
- [16] VEENSTRA J, DIMITRION P, YAO Y, et al. Research techniques made simple: use of imaging mass cytometry for dermatological research and clinical applications [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(4): 705-712
- [17] LABIB M, KELLEY S O. Single-cell analysis targeting the proteome[J]. *Nat Rev Chem*, 2020, 4(3): 143-158
- [18] BURGHARDT E, OSTÖR A G. Site and origin of squamous cervical cancer: a histomorphologic study [J]. *Obstet Gynecol*, 1983, 62(1): 117-127
- [19] HWANG L Y, MA Y, SHIBOSKI S C, et al. Active squamous metaplasia of the cervical epithelium is associated with subsequent acquisition of human papillomavirus 16 infection among healthy young women [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(4): 504-511
- [20] GUO C, QU X, TANG X, et al. Spatiotemporally deciphering the mysterious mechanism of persistent HPV-induced malignant transition and immune remodelling from HPV-infected normal cervix, precancer to cervical cancer: integrating single-cell RNA-sequencing and spatial transcriptome[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(3): e1219
- [21] CHUMDURI C, GURUMURTHY R K, BERGER H, et al. Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(2): 184-197
- [22] JAYSON G C, KOHN E C, KITCHENER H C, et al. Ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2014, 384(9951): 1376-1388
- [23] KAN T, ZHANG S, ZHOU S, et al. Single-cell RNA-seq recognized the initiator of epithelial ovarian cancer recurrence[J]. *Oncogene*, 2022, 41(6): 895-906
- [24] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4): 284-296
- [25] WANG Y, XIE H, CHANG X, et al. Single-cell dissection of the multiomic landscape of high-grade serous ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(21): 3903-3916
- [26] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33
- [27] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33
- [28] BELL D W, ELLENSON L H. Molecular genetics of endometrial carcinoma [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 339-367
- [29] KOH W J, ABU-RUSTUM N R, BEAN S, et al. Uterine neoplasms, version 1.2018, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2018, 16(2): 170-199
- [30] MURALI R, SOSLOW R A, WEIGELT B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e268-e278
- [31] REN X J, LIANG J Q, ZHANG Y M, et al. Single-cell transcriptomic analysis highlights origin and pathological process of human endometrioid endometrial carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6300

[32] COCHRANE D R, CAMPBELL K R, GREENING K, et al. Single cell transcriptomes of normal endometrial derived organoids uncover novel cell type markers and cryptic differentiation of primary tumours [J]. *J Pathol*, 2020, 252 (2): 201–214

[33] JIN M Z, JIN W L. The updated landscape of tumor micro-environment and drug repurposing [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 166

[34] LI C, HUA K. Dissecting the single-cell transcriptome network of immune environment underlying cervical pre-malignant lesion, cervical cancer and metastatic lymph nodes [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 897366

[35] XU J, FANG Y, CHEN K, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the tissue architecture in human high-grade serous ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28 (16): 3590–3602

[36] HOREWEG N, WORKEL H H, LOIERO D, et al. Tertiary lymphoid structures critical for prognosis in endometrial cancer patients [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1373

[37] AHMED N, STENVERS K L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research [J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 256

[38] IZAR B, TIROSH I, STOVER E H, et al. A single-cell landscape of high-grade serous ovarian cancer [J]. *Nat Med*, 2020, 26(8): 1271–1279

[39] ZHENG X, WANG X, CHENG X, et al. Single-cell analyses implicate ascites in remodeling the ecosystems of primary and metastatic tumors in ovarian cancer [J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(8): 1138–1156

[40] DOU Y, KATSNELSON L, GRITSENKO M A, et al. Proteogenomic insights suggest druggable pathways in endometrial carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41 (9): 1586–1605

[41] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161 (5): 1202–1214

[42] KIM C, GAO R L, SEI E, et al. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 879–893

[43] CASASSENT A K, SCHALCK A, GAO R L, et al. Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing [J]. *Cell*, 2018, 172 (1/2): 205–217

[44] ACHIM K, PETTIT J B, SARAIVA L R, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 503–509

[45] CHEN W, GUILLAUME-GENTIL O, RAINER P Y, et al. Live-seq enables temporal transcriptomic recording of single cells [J]. *Nature*, 2022, 608(7924): 733–740

[46] HUANG D, GOU Y, WANG X, et al. A bibliometric analysis and visualization of spatially resolved transcriptomics [J]. *Blood Genom*, 2023, 7(1): 22–33

[收稿日期] 2023–10–19

(本文编辑: 蒋 莉)

