



· 综述 ·

单细胞测序在口腔鳞状细胞癌研究中的价值

王小聪^{1, 2}, 李明^{1, 2}

1. 湖南中医药大学口腔医学院, 湖南长沙 410208;
2. 长沙市口腔医院特诊中心, 湖南长沙 410004

[摘要] 单细胞测序 (single-cell sequencing, SCS) 在口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 研究中具有巨大潜力。随着SCS技术的发展, 其灵敏度和准确度不断提高且成本逐渐降低, SCS将成为肿瘤研究的重要技术工具。SCS技术通过在单个细胞分辨率下识别基因组突变所导致的差异基因表达和表观遗传学信息改变, 为发现新的细胞特异性标志物和细胞类型提供巨大帮助。在OSCC研究中, SCS不仅有助于揭示癌细胞的异质性以及更准确地理解肿瘤微环境, 也有助于深入探讨恶性细胞、免疫细胞及基质细胞三者间的相互作用, 揭示它们在肿瘤发生、发展中的相互影响及作用。利用SCS对肿瘤中的免疫细胞进行分类、理解免疫逃逸机制, 将为免疫治疗的有效开展提供关键支持。本综述介绍SCS技术的发展现状, 并回顾和讨论该技术在OSCC领域中的最新研究进展和应用前景。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 单细胞测序; 肿瘤异质性; 肿瘤免疫反应; 肿瘤微环境
中图分类号: R739.85 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2024.05.007

The value of single-cell sequencing in oral squamous cell carcinoma research WANG Xiaocong^{1,2}, LI Ming^{1,2}
(1. School of Stomatology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China;
2. Changsha Stomatological Hospital Special Clinic Center, Changsha 410004, Hunan Province, China)

Correspondence to: LI Ming E-mail: liming@hnuucm.edu.cn

[Abstract] Single-cell sequencing (SCS) has great potential in oral squamous cell carcinoma (OSCC) research. With the development of SCS technology, its sensitivity and accuracy are gradually increasing, while its cost is gradually decreasing. SCS is poised to become a crucial technological tool in cancer research. SCS technology provides significant assistance in the discovery of new cell-specific markers and cell types by identifying differential gene expression and epigenetic information alterations caused by genomic mutations at the resolution of a single cell. In OSCC studies, SCS not only helps unveil the heterogeneity of cancer cells and provides more accurate understanding of the tumor microenvironment, but also facilitates a deeper exploration of the interactions between OSCC cells, immune cells and stromal cells. This sheds light on their mutual influences and roles in tumor initiation and progression. Utilizing SCS to classify immune cells in tumors and comprehend immune escape mechanisms is pivotal for the effective development of immunotherapy. This comprehensive review outlined the current status of SCS technology development and discussed its latest research advancements and prospective applications in the field of OSCC.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma; Single-cell sequencing; Tumor heterogeneity; Tumor immune response; Tumor microenvironment

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 的一种, 局部侵袭速度快, 复发率高, 占有口腔恶

性肿瘤的90%。尽管近年来在癌症治疗领域已取得了令人瞩目的进展, 包括治疗方法的多样化、分子靶向治疗和免疫治疗等新兴技术的出现, 但 OSCC患者的生存率在过去几十年中并未显著提

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目 (2022JJ30630); 湖南省教育厅科学研究项目 (22A0249); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目 (202108051626)。

第一作者: 王小聪 (ORCID: 0009-0001-8520-9131), 硕士。

通信作者: 李明 (ORCID: 0000-0002-8470-1888), 博士, 主任医师, 长沙市口腔医院副院长, E-mail: liming@hnuucm.edu.cn。

高^[1]。这一现状也说明了OSCC研究目前所面临的严峻挑战,例如,口腔癌症早期症状不明显,使其早期诊断和筛查十分困难^[2]。另外,OSCC具有很高的肿瘤异质性,肿瘤细胞之间存在巨大的遗传和表型差异,这可能让不同的细胞对治疗药物呈现不同的敏感性,加大了治疗难度^[3]。肿瘤细胞的免疫逃逸也在一定程度上限制了免疫治疗在OSCC治疗中的应用^[4]。为了解决这些问题,需要进一步探索OSCC发生、发展的分子机制,利用新兴技术深入研究肿瘤的异质性及免疫逃逸机制,并加强早期诊断方法的研发,为OSCC患者提供更有效的治疗策略和管理方案。

目前,我们对OSCC在内的HNSCC的基因突变情况及机制的大部分认识都来自批量测序技术的基因组和转录组研究,如全外显子组测序和批量RNA测序^[5-6]。然而,传统的测序方法无法反映单个细胞和细胞亚群的多样性,也就是肿瘤内异质性。OSCC作为一种高度异质性肿瘤,其细胞成分非常复杂,除了主要组成部分OSCC细胞之外,成纤维细胞、基质细胞等间质细胞形成肿瘤的支持结构;另外,T细胞、巨噬细胞等免疫细胞在OSCC微环境中发挥重要作用^[7]。恶性细胞、基质细胞和免疫细胞之间的多样性,促成了免疫系统与癌症之间的复杂相互作用,以及肿瘤基质与癌细胞之间的相互影响。这种多样性进一步受到空间动力学和克隆进化的影响,并对肿瘤的发展和治理产生重要影响^[8]。

单细胞测序(single-cell sequencing, SCS)技术在过去十几年中发展迅速。与传统的批量RNA测序不同,单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)的特点是对单个细胞进行高通量和高分辨率的转录组分析。scRNA-seq可用于异质细胞群的评估、细胞发育轨迹的重建、随机基因转录动力学的模拟及基因调控网络的推断^[9]。SCS的快速发展必将在肿瘤生物学、转移、免疫肿瘤学以及治疗耐药性和反应方面带来新的发现。

1 SCS技术

1.1 细胞分离

单细胞的获取是SCS技术中的首要且关键的

步骤。不仅要从中准确地分离出单类型细胞,同时也要确保足够的活细胞数量和比例。目前较成熟的单细胞获取技术包括以下几种:

(1)显微操作:使用毛细管移液器手动提取悬浮液中的单个细胞,只适用于细胞数量较少的样本^[10]。

(2)激光捕获显微切割:在显微镜下直接分离固定组织中的细胞,其优势是能够保持组织切片的完整性和每个细胞的位置信息,甚至能分离亚细胞成分,但其通量较低且成本较高^[11]。

(3)荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS):基于流式细胞术,通过荧光标记特定细胞并根据细胞的DNA含量和散射信号进行分离。它的优点是速度快、通量高,但通常需要大量的样品细胞,也是现在单细胞分离的主流手段之一^[11]。

(4)微流控技术:近年来比较热门的单细胞分离技术,它利用流体动力学原理在微米级直径的通道中精准地操作细胞。这种技术的核心优势在于其能够使用极少量的样品和化学试剂来有效地识别和分离单个细胞。这使得微流控技术特别适用于检测罕见或数量稀少的细胞,并且极大地促进了大规模单细胞mRNA的并行测序^[12]。目前使用较广泛的微流控商业平台有Fluidigm C1和10x Genomics。

1.2 不同平台的SCS技术

1.2.1 基于二代测序(next generation sequencing, NGS)的SCS

SCS的首次应用是通过显微操作手动捕获单个细胞并在NGS平台上对单个细胞的cDNA进行改进的无偏倚扩增,实现了单个细胞水平的mRNA测序^[13]。推动SCS技术广泛普及的是一种快速分析数千个单个细胞的策略:高通量液滴测序Drop-seq,该策略是通过将大量细胞分离成纳升大小的水滴,将不同的条形码与每个细胞的RNA相关联,并对它们一起进行测序,同时记住转录本的来源细胞^[14]。基于微流控的自动化大规模并行scRNA-seq框架MARS-seq采用了3个级别的条形码(分子、细胞和板级标签)来促进高

度多重化的分子计数^[15]，其可以应用于正常和疾病状态的组织和器官，以重新定义其细胞类型和细胞组成，并将其与详细的全基因组转录谱联系起来。

1.2.2 基于三代测序（third generation sequencing, TGS）的SCS

由于NGS平台的读长限制，当前的短读长sc-RNAseq技术只能产生转录本末端附近的有限序列信息，限制了对剪接、嵌合转录本和序列多样性（如单核苷酸多态性、RNA编辑及基因组印记）等方面的细胞间异质性的深入理解。长读长测序（Nanopore、PacBio等）和单细胞技术的结合打破了这个限制。Nanopore纳米孔测序利用单链DNA或RNA通过微小的纳米孔时引起的电流变化来识别经过孔道的核苷酸序列，读长在理论上可达到数十万个核苷酸^[16]。PacBio则使用单分子实时测序技术，这一技术是在微孔底部进行DNA合成的同时通过识别带有荧光信号标记的核苷酸来读取序列信息，精度更高^[17]。单细胞亚型RNA测序（ScISOr-seq）技术通过微流控技术从细胞中获得全长cDNA，对每个单细胞产生的cDNA进行条形码标记，以便识别细胞来源，在用短读长测序鉴定基因表达量的基础上使用Nanopore及PacBio测序进行长读长测序，用于确定不同细胞亚型中的RNA亚型以及剪接位点的细胞类型特异性组合模式^[18]。ScNaUmi-seq技术则结合纳米孔测序的高通量以及精准的细胞条形码和唯一分子标识符（unique molecular identifier, UMI）分配策略，实现了在单细胞水平上鉴定剪接和单核苷酸变异^[19]。长读长测序技术对全长转录本进行测序可以直接量化等位基因和亚型水平的表达，但缺乏跨细胞大规模应用所需的测序深度^[18, 20]。基于Smart-seq2^[21]之上优化的Smart-seq3将全长转录组覆盖与5'UMI RNA计数策略相结合，提高了识别细胞类型和状态的能力，并且极大地增加了测序深度^[22]。Smart-seq3允许研究者在基因、亚型和等位基因表达水平上更准确地表征细胞类型及注释细胞图谱。基于TGS平台的单细胞全基因组测序策略SMOOTH-seq在基因组扩增时通过嵌入Tn5转座

酶和一个接头序列而非两个不同的接头序列，避免了在测序过程中原始DNA片段的丢失，尤其适用于在单细胞水平上检测结构变异和染色体外环状DNA^[23]。

1.2.3 SCS的数据分析

SCS的数据分析涉及多个关键步骤。首先，原始FASTQ数据通过细胞条形码和UMI进行处理，并进行严格质控以排除低质量细胞。然后，根据基因数量设定严格阈值来避免掺入低质量细胞。接着，利用MNN和kBET等方法减轻批量效应，最终生成基因计数矩阵。为了正确地解释结果，可以通过调整捕获效率、测序深度等参数来处理数据中的偏差和缺失值。用于归一化和插补常用工具包括SCnorm、SAVER、ScImpute、DrImpute等。校正后的计数矩阵可通过R包和Python工具进行细胞和基因水平的进一步分析。在细胞水平，可以采用降维算法如PCA、t-SNE、UMAP进行聚类以识别不同细胞亚群，也可以用Monocle2或CellRouter进行细胞谱系和细胞轨迹的重建。基因水平的分析可以通过DEsingle、Census及BCseq等差异基因表达算法以及SCENIC和PIDC等调控网络重建工具来实现。

2 SCS在OSCC研究中的应用

2.1 OSCC中的肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）

SCS技术已被用于描述HNSCC^[24]、转移性黑色素瘤^[25]、多形性胶质母细胞瘤^[26]、乳腺癌^[27]及肺癌^[28]，其对TME的分析是批量测序技术难以实现的。TME由非恶性细胞和细胞外基质（extracellular matrix, ECM）组成，与肿瘤以复杂的方式相互作用。非恶性细胞包括多种细胞群，如癌症相关成纤维细胞（cancer-associated fibroblast, CAF）、内皮细胞、周细胞及免疫炎症细胞等^[29]。在对OSCC的scRNA-seq分析^[24]中，非恶性细胞的单细胞图谱清晰地描述了TME的组成，研究者通过FACS分选结合t-SNE分析和DBscan聚类将3 363个非恶性细胞根据其表达状态分为8个主要簇：T细胞、B细胞/浆细胞、巨噬细胞、树突状细胞（dendritic cell, DC）、肥大

细胞、内皮细胞、成纤维细胞和肌细胞。每个簇都包含来自不同患者的细胞,表明TME中的细胞类型和表达状态在OSCC中是一致的,提示非恶性细胞在OSCC患者中不像恶性细胞那样具有明显的特异性,意味着这些TME细胞有着类似的疾病机制。因此,相似的靶向治疗方案可能适用于这些患者。

scRNA-seq数据显示,OSCC TME中的成纤维细胞有两种主要亚型,分别为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)和CAF,以及一种次要亚型(静息成纤维细胞)^[24]。MFB已被证明可以通过上调生长因子和基质蛋白的分泌以及重塑ECM来促进多种类型肿瘤细胞的运动^[30]。Marsh等^[31]进行的体内外实验也证明了MFB可以促进OSCC侵袭。CAF是肿瘤基质环境中异质的成纤维细胞样细胞群的统称,是导致恶性肿瘤发生、发展的TME改变过程中的关键因素^[32]。Puram等^[24]结合单细胞转录组数据和免疫组织化学结果,证实发生部分上皮-间充质转化(partial epithelial-mesenchymal transition, p-EMT)的细胞位于肿瘤的前缘,并与CAF相邻,发现CAF与恶性细胞之间的旁分泌相互作用可促进OSCC肿瘤前缘的p-EMT程序,在肿瘤侵袭中具有潜在作用。肿瘤细胞释放的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)可能诱导CAF分泌促肿瘤性趋化因子,分泌出的促肿瘤性趋化因子反过来对肿瘤细胞产生作用,促进癌细胞侵袭^[33]。Li等^[34]通过微流控技术结合NGS scRNA-seq将直肠癌患者中的CAF分为CAF-A和CAF-B两种类型。这与OSCC SCS中鉴定的CAF分类相似,CAF-A细胞表达ECM相关基因,CAF-B细胞表达ACTA2、PDGFA等MFB标志物^[24]。今后势必要对CAF亚型进行更精准的分类,对其表达状态、细胞间复杂的相互作用及对药物耐药性的影响等进行深度解析,显然在这些研究过程中SCS技术必不可少。

2.2 肿瘤异质性: 基因表达和突变分析

在深入分析数百例HNSCC患者的表达谱后,通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)研究识别出HNSCC的4种亚型:

基底型、间质型、经典型和非经典型。虽然已有大量数据,但这些数据未能充分揭示肿瘤内部复杂的异质性^[5]。scRNA-seq提供了替代解决方案。单细胞转录组分析研究通过FACS分选出OSCC中的恶性细胞、间质细胞和免疫细胞,并评估了这些细胞相应的亚型表现特征^[24]。该研究对10个OSCC肿瘤样本进行了基于Smart-seq2的单细胞转录组深度测序并对每个样本的恶性细胞与4种TCGA亚型表现特征的对应关系进行了评分,结果显示,每个样本都清楚地映射到4种亚型中的3种:基底型($n=7$)、经典型($n=2$)或非典型($n=1$),尽管间质型是口腔肿瘤中第二常见的亚型,但没有任何肿瘤样本映射到间质型,扩大分析范围后发现基质细胞群能够映射到间质型。因此,间质型可能反映的是包含大量基质细胞的恶性基底型的一部分,这一发现可能导致OSCC的重新分类,将其划分为恶性基底型、经典型和非典型性OSCC。这种OSCC的分类在临床上具有重要意义,可为治疗选择、预后预测和肿瘤进展监测提供有益指导。考虑到肿瘤内外的多样性,高分辨率的scRNA-seq可以提供更准确的肿瘤分类信息。

scRNA-seq数据不仅可以用于表征单细胞基因表达谱^[35],并且在研究序列多样性、转录调控异常及识别RNA编辑等方面比批量测序更具优势。Ramazzotti等^[36]对来自不同OSCC患者的两个细胞系(HN120和HN137)的scRNA-seq数据集进行分析,对检测出的数百万个独特变异进行严格质控并筛选出分别只在HN120P(P代表原发肿瘤)或HN137P中出现的变异,确定了分别代表HN120P和HN137P细胞身份的上百个单个核苷酸变异,与转移细胞和药物干预后的细胞的基因型进行对比后发现这些特异性变异只存在于原发肿瘤中,并在治疗后会发生变化。这种身份特异性变异的识别在药物治疗过程中出现的基因型改变等方面非常重要,为癌症进化和耐药性等复杂现象的解释提供了巨大便利。

TCGA是一项意义重大的研究成果,为我们认识肿瘤突变全景和机制以及寻找肿瘤治疗靶点提供了巨大便利^[5]。但批量RNA测序在肿瘤细

胞亚型鉴定及探究潜在治疗靶点的细胞特异性方面存在缺陷。CXC族趋化因子配体14 (CXC chemokine ligand 14, CXCL14) 是一种功能上具有多效性的趋化因子^[37], 对不同类型肿瘤的生长有不同的影响^[38-39]。在OSCC中, 已有研究^[40]证明, 肿瘤组织中的CXCL14表达相对于邻近的正常组织或口腔不典型增生组织更低。较早的研究^[41]也证明, CXCL14对体内OSCC的肿瘤进展具有抑制活性。在人乳头状瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 阳性的HNSCC模型中, CXCL14表达可诱导T细胞激活并恢复主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) I类表达, 从而导致肿瘤细胞死亡^[42]。在HPV阴性的OSCC中, CXCL14的分泌起源及详细机制尚未阐明。虽然批量RNA测序产生的数据可反映所有细胞的平均表达, 但可能会淹没癌细胞关键亚群的转录组变化信息。scRNA-seq可以弥补这个缺陷。在对人类scRNA-seq数据的分析中, 研究者发现相比于原发肿瘤, CXCL14在转移淋巴结内的恶性细胞中下调最为明显^[43]。在动物模型实验中, 研究者证明了CXCL14表达与肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) 相关, 肿瘤细胞中较高的CXCL14表达与TIL增加及抑制肿瘤生长相关^[43]。在人类样本scRNA-seq数据中, CXCL14表达仅与恶性细胞中的TIL相关, 在其他非恶性细胞中未发现, 表明CXCL14表达具有细胞特异性^[43]。在以批量RNA测序为背景的TCGA队列中, 未曾发现CXCL14的整体表达与TIL相关, 这也充分说明了在癌症研究中应用SCS技术的必要性。CXCL14可能通过调节DNA甲基化和白细胞迁移而在OSCC的病理生理学过程中发挥关键作用, 其表达水平可能是预测OSCC患者预后的一个有价值的参数, 并可能是一个潜在的治疗靶点^[40]。CXCL14也可用于筛查对西妥昔单抗有反应的HNSCC患者^[44]。上述研究结果均表明, SCS技术在检测传统测序技术难以发现或容易疏漏的OSCC分子靶点时颇具优势。

2.3 免疫细胞反应

通过激活人体的免疫系统来对抗恶性肿瘤

是癌症治疗中一个快速发展的研究方向。编辑的工程化淋巴细胞 [如嵌合抗原受体T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞]^[45]或以程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) / 程序性死亡蛋白配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 轴为靶点的免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 等免疫疗法已经逐渐成为抗肿瘤治疗的有效策略之一^[46]。ICI虽然已经在OSCC及其他HNSCC治疗中获准使用, 但只在少数患者中取得满意疗效^[47-48]。因此, 肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 自然成为了研究焦点, scRNA-seq在这一领域有不可或缺的作用。T细胞在抗肿瘤免疫及免疫治疗中起到关键作用, 因此多项单细胞研究的目标也集中于此。为了研究OSCC中浸润T细胞的复杂性, 研究者通过微流控技术 (10x Genomics) 对OSCC患者的肿瘤及邻近正常组织中的T细胞进行分选, 并进行了基于Illumina平台的scRNA-seq, 结果显示, 肿瘤组织中CD8⁺ T细胞的百分比远高于对应的邻近正常组织 (70.6% vs 52.4%)^[49], 终末耗竭CD8⁺ T细胞 (CD8⁺ Tex-term) 和调节性CD4⁺ T细胞 (CD4⁺ Treg) 在OSCC肿瘤中富集, PD-1和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4) 被确定为终末耗竭CD8⁺ T细胞的标记基因, 而叉头框蛋白P3 (forkhead box protein P3, FOXP3) 和CTLA4是CD4⁺ Treg的标志基因。T细胞表面的PD-1、CTLA-4及Treg细胞中的FOXP3的免疫抑制作用已被证明是促进肿瘤逃逸T细胞免疫的重要原因^[50]。慢性病毒感染和癌症会破坏CD8⁺ T细胞正常分化, 导致其衰竭, 这也是当前癌症免疫治疗的主要障碍^[51]。耗竭的T细胞也具有异质性, 前体耗竭T细胞 (Tpex) 可以分化为耗尽中期T细胞 (Tex-int), 随后分化为Tex-term且在分化时逐渐失去增殖能力和效应器功能^[52-54]。为了描述CD8⁺ T细胞耗竭在免疫治疗过程中的动态变化, 研究者通过结合质谱流式分析、scRNA-seq及循环肿瘤细胞测序对局部转移性HNSCC (包括OSCC) 患者的TME和淋巴结中

的CD8⁺ T细胞进行了分析^[55], 结果显示, Tpex在未受累区域淋巴结中大量存在, 而TME中的CD8⁺ T细胞更趋向于Tex-term状态, 且淋巴结中的Tpex与TME中的Tex-term有克隆相关性。由于CD8⁺ T细胞从Tpex向Tex-term分化时会丧失效应功能, 这个结果更强调了淋巴结在维持人类功能性抗肿瘤CD8⁺ T细胞克隆方面的重要性。研究还发现, 接受抗PD-L1免疫治疗的患者的未受累区域淋巴结中Tpex数量下降, 同时伴随着邻近的Tex-int数量的增加, 治疗后血液中Tex-int增加与此同步, 说明治疗可能导致Tpex转变为Tex-int。这些定位于DC附近的Tpex和Tex-int在治疗后表现出较高的PD-1表达, 这支持了未受累区域淋巴结中的DC在介导抗肿瘤CD8⁺ T细胞反应中的作用。此外, 有肿瘤转移的区域淋巴结 (egional lymph nodes with tumor metastasis, metLN) 表现出对ICI治疗的反应受损, 这与metLN中Tpex和Tex-int周围的细胞表现出的更高的免疫抑制特性 (较高的IDO、TIM3、PD-L1表达) 及循环CD8⁺ T细胞反应的减少有关。上述结果强调了通过SCS技术识别与抗肿瘤免疫及肿瘤免疫逃逸相关的免疫细胞亚群和标志物将非常有利于新型免疫治疗药物的研发。

scRNA-seq也有助于表征OSCC的T细胞亚群及其基因表达谱, 从而推进OSCC的检查点免疫治疗。由TCF7编码的转录因子TCF1在T细胞分化及维持中发挥关键作用^[56]。研究者通过NGS scRNA-seq在OSCC中鉴定出了TCF7阳性的T细胞亚群, 并结合多重免疫组织化学描绘了TCF7在T细胞中的分布, 发现TCF7在不同的T细胞亚群中表达, 尤其是CD4⁺ T细胞, TCF7⁺ T细胞则分布在三级淋巴结构 (tertiary lymphoid structures, TLS) 内部及周围, 生存分析结果显示, TLS阳性的患者更易获得较长的总生存期和无进展生存期^[57]。单细胞全转录组数据分析发现, OSCC中有一小群有CXCL13⁺及PDCD1/PD-1⁺表达特征的外周辅助T (peripheral helper T, Tph) 细胞^[58], 这类细胞协助炎症组织及肿瘤组织中的B细胞免疫, 与癌症患者的生存率提高相关^[59]。Tph细胞表达的CXCL13也被证明可以支

持肿瘤内TLS的形成, 并与肿瘤进展及复发密切相关^[60]。这些细胞可以通过慢性炎症TME中的适应性抗肿瘤体液反应, 成为OSCC靶向治疗的潜在免疫策略。

3 结 语

迄今为止, SCS技术在OSCC相关研究中帮助我们对肿瘤生物学有了更细致的理解, 包括对恶性细胞、免疫细胞和基质细胞亚群的识别, 促进侵袭、转移的细胞间相互作用, 以及在抗肿瘤免疫和肿瘤免疫逃逸等方面。其未来发展方向涉及多个层面。高通量、高灵敏度的SCS平台的不断发展, 有望揭示OSCC异质性更为精细的层次, 帮助研究者更全面地了解肿瘤的发展和演变过程。在临床转化层面, SCS技术同时也是寻找新的药物靶点以及进一步改良免疫治疗的强大工具。然而, SCS产生的数据量巨大, 如何更加有效地处理、分析和解释这些数据, 以得出可靠的结论, 是当前亟待解决的难题之一。尽管单细胞研究揭示了癌症生物学中的许多新发现和假设, 但同时也突显了肿瘤生态系统的复杂性和细微差别。

综上所述, SCS技术在OSCC研究中的未来发展方向充满希望, 但需要综合考虑技术、数据解释和应用等方面的挑战, 以确保其在OSCC研究中的有效应用。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王小聪: 文献获取和分析, 文章撰写和修订;

李明: 文章选题, 指导文章修订。

[参 考 文 献]

- [1] ONG Y L R, TIVEY D, HUANG L, et al. Factors affecting surgical mortality of oral squamous cell carcinoma resection [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2021, 50(1): 1-6.
- [2] HOWARD A, AGRAWAL N, GOOI Z. Lip and oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2021, 35(5): 895-911.
- [3] MROZ E A, TWARD A D, PICKERING C R, et al. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J].

- Cancer, 2013, 119(16): 3034–3042.
- [4] BOXBERG M, LEISING L, STEIGER K, et al. Composition and clinical impact of the immunologic tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma [J] . J Immunol, 2019, 202(1): 278–291.
- [5] CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas [J] . Nature, 2015, 517(7536): 576–582.
- [6] STRANSKY N, EGLOFF A M, TWARD A D, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma [J] . Science, 2011, 333(6046): 1157–1160.
- [7] RIVERA C. Essentials of oral cancer [J] . Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11884–11894.
- [8] REN X W, KANG B X, ZHANG Z M. Understanding tumor ecosystems by single-cell sequencing: promises and limitations [J] . Genome Biol, 2018, 19(1): 211.
- [9] HAQUE A, ENGEL J, TEICHMANN S A, et al. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications [J] . Genome Med, 2017, 9(1): 75.
- [10] LEE M N, HWANG H S, OH S H, et al. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression [J] . Exp Mol Med, 2018, 50(11): 1–16.
- [11] YAMADA S, NOMURA S. Review of single-cell RNA sequencing in the heart [J] . Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8345.
- [12] GAO C X, ZHANG M N, CHEN L. The comparison of two single-cell sequencing platforms: BD rhapsody and 10x genomics chromium [J] . Curr Genomics, 2020, 21(8): 602–609.
- [13] TANG F C, BARBACIORU C, WANG Y Z, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J] . Nat Methods, 2009, 6(5): 377–382.
- [14] 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.
- [15] JAITIN D A, KENIGSBERG E, KEREN-SHAUL H, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types [J] . Science, 2014, 343(6172): 776–779.
- [16] BRANTON D, DEAMER D W, MARZIALI A, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing [J] . Nat Biotechnol, 2008, 26(10): 1146–1153.
- [17] RHOADS A, AU K F. PacBio sequencing and its applications [J] . Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13(5): 278–289.
- [18] GUPTA I, COLLIER P G, HAASE B, et al. Single-cell isoform RNA sequencing characterizes isoforms in thousands of cerebellar cells [J] . Nat Biotechnol, 2018. [Online ahead of print]
- [19] LEBRIGAND K, MAGNONE V, BARBRY P, et al. High throughput error corrected Nanopore single cell transcriptome sequencing [J] . Nat Commun, 2020, 11(1): 4025.
- [20] BYRNE A, BEAUDIN A E, OLSEN H E, et al. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells [J] . Nat Commun, 2017, 8: 16027.
- [21] 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.
- [22] HAGEMANN-JENSEN M, ZIEGENHAIN C, CHEN P, et al. Single-cell RNA counting at allele and isoform resolution using Smart-seq3 [J] . Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 708–714.
- [23] FAN X Y, YANG C, LI W, et al. SMOOTH-seq: single-cell genome sequencing of human cells on a third-generation sequencing platform [J] . Genome Biol, 2021, 22(1): 195.
- [24] PURAM S V, TIROSH I, PARIKH A S, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer [J] . Cell, 2017, 171(7): 1611–1624.e24.
- [25] TIROSH I, IZAR B, PRAKADAN S M, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq [J] . Science, 2016, 352(6282): 189–196.
- [26] DARMANIS S, SLOAN S A, CROOTE D, et al. Single-cell RNA-seq analysis of infiltrating neoplastic cells at the migrating front of human glioblastoma [J] . Cell Rep, 2017, 21(5): 1399–1410.
- [27] AZIZI E, CARR A J, PLITAS G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment [J] . Cell, 2018, 174(5): 1293–1308.e36.
- [28] GUO X Y, ZHANG Y Y, ZHENG L T, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing [J] . Nat Med, 2018, 24(7): 978–985.
- [29] BELLI C, TRAPANI D, VIALE G, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors [J] . Cancer Treat Rev, 2018, 65: 22–32.
- [30] WEVER O D, DEMETTER P, MAREEL M, et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth [J] . Int J Cancer, 2008, 123(10): 2229–2238.
- [31] MARSH D, SUCHAK K, MOUTASIM K A, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients [J] . J Pathol, 2011, 223(4): 470–481.
- [32] GASCARD P, TLSTY T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy [J] . Genes Dev, 2016, 30(9): 1002–1019.
- [33] KUZET S E, GAGGIOLI C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil [J] . Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 607–619.
- [34] LI H P, COURTOIS E T, SENGUPTA D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors [J] . Nat Genet, 2017, 49(5): 708–718.
- [35] QI Z T, BARRETT T, PARIKH A S, et al. Single-cell sequencing and its applications in head and neck cancer [J] . Oral Oncol, 2019, 99: 104441.

- [36] RAMAZZOTTI D, ANGARONI F, MASPERO D, et al. Variant calling from scRNA-seq data allows the assessment of cellular identity in patient-derived cell lines [J] . *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2718.
- [37] HARA T, TANEGASHIMA K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals [J] . *J Biochem*, 2012, 151(5): 469–476.
- [38] SJÖBERG E, AUGSTEN M, BERGH J, et al. Expression of the chemokine CXCL14 in the tumour stroma is an independent marker of survival in breast cancer [J] . *Br J Cancer*, 2016, 114(10): 1117–1124.
- [39] LIN K Z, ZOU R M, LIN F, et al. Expression and effect of CXCL14 in colorectal carcinoma [J] . *Mol Med Rep*, 2014, 10(3): 1561–1568.
- [40] NAKAYAMA R, ARIKAWA K, BHAWAL U K. The epigenetic regulation of CXCL14 plays a role in the pathobiology of oral cancers [J] . *J Cancer*, 2017, 8(15): 3014–3027.
- [41] OZAWA S, KATO Y, KOMORI R, et al. BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2): 406–412.
- [42] WESTRICH J A, VERMEER D W, SILVA A, et al. CXCL14 suppresses human papillomavirus-associated head and neck cancer through antigen-specific CD8⁺ T-cell responses by upregulating MHC-I expression [J] . *Oncogene*, 2019, 38(46): 7166–7180.
- [43] PARIKH A, SHIN J, FAQUIN W, et al. Malignant cell-specific CXCL14 promotes tumor lymphocyte infiltration in oral cavity squamous cell carcinoma [J] . *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001048.
- [44] KONDO T, OZAWA S, IKOMA T, et al. Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma [J] . *Oncogenesis*, 2016, 5(7): e240.
- [45] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J] . *Nature*, 2017, 543(7643): 113–117.
- [46] WALDMAN A D, FRITZ J M, LENARDO M J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice [J] . *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(11): 651–668.
- [47] BURTNES B, HARRINGTON K J, GREIL R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study [J] . *Lancet*, 2019, 394(10212): 1915–1928.
- [48] HARRINGTON K J, BURTNES B, GREIL R, et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: updated results of the phase III KEYNOTE-048 study [J] . *J Clin Oncol*, 2023, 41(4): 790–802.
- [49] CHEN J T, YANG J F, LI H, et al. Single-cell transcriptomics reveal the intratumoral landscape of infiltrated T-cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma [J] . *Mol Oncol*, 2021, 15(4): 866–886.
- [50] TOGASHI Y, SHITARA K, NISHIKAWA H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression-implications for anticancer therapy [J] . *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(6): 356–371.
- [51] BELTRA J C, MANNE S, ABDEL-HAKEEM M S, et al. Developmental relationships of four exhausted CD8⁺ T cell subsets reveals underlying transcriptional and epigenetic landscape control mechanisms [J] . *Immunity*, 2020, 52(5): 825–841.e8.
- [52] IM S J, HASHIMOTO M, GERNER M Y, et al. Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy [J] . *Nature*, 2016, 537(7620): 417–421.
- [53] HUDSON W H, GENSHEIMER J, HASHIMOTO M, et al. Proliferating transitory T cells with an effector-like transcriptional signature emerge from PD-1⁺ stem-like CD8⁺ T cells during chronic infection [J] . *Immunity*, 2019, 51(6): 1043–1058.e4.
- [54] ZEH D, THIMME R, LUGLI E, et al. ‘Stem-like’ precursors are the fount to sustain persistent CD8⁺ T cell responses [J] . *Nat Immunol*, 2022, 23(6): 836–847.
- [55] RAHIM M K, OKHOLM T L H, JONES K B, et al. Dynamic CD8⁺ T cell responses to cancer immunotherapy in human regional lymph nodes are disrupted in metastatic lymph nodes [J] . *Cell*, 2023, 186(6): 1127–1143.e18.
- [56] RAGHU D, XUE H H, MIELKE L A. Control of lymphocyte fate, infection, and tumor immunity by TCF-1 [J] . *Trends Immunol*, 2019, 40(12): 1149–1162.
- [57] PENG Y, XIAO L P, RONG H X, 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 [J] . *Oral Oncol*, 2021, 119: 105348.
- [58] HUYNH N C, HUANG T T, NGUYEN C T, et al. Comprehensive integrated single-cell whole transcriptome analysis revealed the p-EMT tumor cells-CAFs communication in oral squamous cell carcinoma [J] . *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6470.
- [59] YOSHITOMI H, UENO H. Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases [J] . *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(3): 523–527.
- [60] GU-TRANTIEN C, MIGLIORI E, BUISSERET L, et al. CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer [J] . *JCI Insight*, 2017, 2(11): e91487.

(收稿日期: 2024-01-18 修回日期: 2024-03-28)