



· 综述 ·

# 单细胞测序在三阴性乳腺癌新辅助化疗中的应用研究进展

胡喜娥<sup>1</sup>, 杨振宇<sup>1</sup>, 薛景毅<sup>2</sup>, 杨平<sup>1</sup>, 彭书甲<sup>1</sup>, 袁利娟<sup>1</sup>, 包国强<sup>1</sup>

1. 空军军医大学第二附属医院普通外科, 陕西 西安 710038 ;
2. 陕西中医药大学第二临床医学院, 陕西 咸阳 712000

**[摘要]** 三阴性乳腺癌是最具侵袭性、恶性程度最高的乳腺癌类型, 目前多采用以化疗为主的综合治疗方案, 新辅助化疗在其中发挥重要作用, 但近半数患者会出现耐药, 而具体机制尚不明确。单细胞测序技术能够在单个细胞基础上精准评估肿瘤发生、发展过程中基因组、转录组和表观遗传学信息的改变, 为明确诊断肿瘤亚型、了解肿瘤耐药机制、发现治疗新靶点、评估疗效与预后等提供有力工具, 在三阴性乳腺癌的新辅助化疗中具有广阔的应用前景。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌; 单细胞测序; 新辅助化疗; 肿瘤异质性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.03.009

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)03-0221-06

## Research progress of single-cell sequencing in neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer

HU Xi'e<sup>1</sup>, YANG Zhenyu<sup>1</sup>, XUE Jingyi<sup>2</sup>, YANG Ping<sup>1</sup>, PENG Shujia<sup>1</sup>, YUAN Lijuan<sup>1</sup>, BAO Guoqiang<sup>1</sup> (1. General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China; 2. The Second Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shannxi Province, China)

Correspondence to: BAO Guoqiang E-mail: guoqiang@fmmu.edu.cn

**[Abstract]** Triple-negative breast cancer is the most invasive and malignant type of breast cancer. At present, therapy for triple-negative breast cancer is the comprehensive treatment regimens based on chemotherapy, in which neoadjuvant chemotherapy plays an important role. However, nearly half of the patients with triple-negative breast cancer are resistant to the treatment, and the specific mechanism is still unclear. Single-cell sequencing is based on accurate assessment of a single cell of tumor, which can evaluate the changes of genome, transcriptome and epigenetic information of tumor in its occurrence and progression. It provides a powerful tool for the diagnosis of tumor subtypes, understanding the mechanism of drug resistance of tumor, finding new therapeutic targets and evaluating efficacy and prognosis, and has a wide application prospect in the neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer.

**[Key words]** Triple-negative breast cancer; Single-cell sequencing; Neoadjuvant chemotherapy; Tumor heterogeneity

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指缺乏雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 表达的一类乳腺癌亚型, 占乳腺癌患者总数的12%~18%<sup>[1-2]</sup>。相对于乳腺癌其他亚型, TNBC患者在诊断时原发肿瘤大, 恶性程度高。由

于缺乏相关治疗靶点, TNBC对激素疗法和靶向治疗都不敏感, 目前采用以化疗为主的全身治疗方案。其中新辅助化疗 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) 是伴有较高肿瘤负荷的TNBC患者的首选治疗方案<sup>[3]</sup>。但约有50%的TNBC患者对NAC表现出耐药性, 导致该疾病整体的难治性<sup>[1, 4]</sup>。

有研究<sup>[5-8]</sup>表明, TNBC患者存在高水平

的体细胞突变、*TP53*频繁突变以及复杂的非整倍体重排, 导致广泛的瘤内异质性。以往关于TNBC患者化疗耐药性的研究仅基于靶向标志物或高通量基因组的组织分析, 而且在化疗期间重建克隆进化的能力有限<sup>[5, 9]</sup>。近年来, 随着高通量测序时代的来临, 单细胞测序 (single-cell sequencing, SCS) 技术不断发展, 逐渐成为一种研究TNBC肿瘤复杂性的理想方法。SCS可获得单个细胞基因组、转录组和表观遗传学信息, 从而可以有效地识别单个肿瘤细胞产生的独特突变表型, 是解决瘤内异质性、重建进化谱系和检测稀有亚种群的强大工具, 为提高TNBC的精准治疗水平提供了新思路<sup>[10-11]</sup>。

## 1 SCS概述

与传统高通量测序技术分析细胞整体性特征信息不同, SCS技术是在单个细胞基础上实现对基因组、转录组和表观遗传组等的高通量测序分析, 从而能够剖析单个细胞基因表达的动态信息, 揭示不同细胞的差异和进化关系<sup>[12-13]</sup>。由于组成生物机体的每个细胞都是独一无二的, 传统的高通量测序通过检测混合样本中集合细胞的平均基因表达情况, 只能粗略地揭示细胞间的生物学差异, 因此可能掩盖了一些关键基因表达变化及细胞具体分化机制, 不利于一些生物学变化过程中详细机制的研究。而SCS技术很好地解决了这一问题。因此, 利用SCS技术可以帮助我们更好地解释机体精细变化的分子机制, 为传统的生物学研究提供新的视野。目前, SCS主要分为单细胞基因组测序、转录组测序、表观遗传学测序及多组学测序; 其具体流程包括单细胞分离捕获及测序与数据分析。

### 1.1 单细胞分离捕获

单细胞分离捕获是SCS的首要步骤, 也是SCS成功的关键。单细胞分离捕获的方法主要包括连续稀释法、单细胞显微镜操作法、流式细胞术 (flow cytometry, FCM)、微流控技术、激光捕获显微切割术 (laser-capture microdissection, LCM) 等<sup>[14-20]</sup>, 这些方法大多数都需要从新鲜的癌症组织中制备细胞悬浮液。不论起始样本如何, 制备高质量的单细胞悬浮液对于单细胞分离

捕获及后续的序列扩增与测序至关重要。

## 1.2 SCS

### 1.2.1 单细胞基因组测序

单细胞基因组测序需要在分离得到的单细胞中提取DNA, 然后对提取到的DNA进行进一步的全基因组扩增 (whole-genome amplification, WGA), 再通过DNA二代测序技术进行测序分析, 最终检测出多种不同类型的基因改变。WGA的主要方法包括多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA)、退行性寡核苷酸聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和多重退火环状循环扩增等。其中, MDA由于对全基因组的覆盖率高, 因此多用于单核苷酸突变的检测, 而后两者对基因组扩增的均一性好, 对大于1 Mb拷贝数变异的检测具有更高的灵敏度和特异度<sup>[21-22]</sup>。

### 1.2.2 单细胞转录组测序

单细胞转录组测序可直观地反映基因的表达情况, 能更准确地辨别处于不同状态或发展阶段的细胞。具体方法为: 在单细胞分离和RNA提取后, 先将捕获的mRNA反转录为cDNA, 再用PCR或体外转录的方法进行全转录组扩增, 最终进行测序分析。主要方法包括: Tang法、5'末端转换的RNA转录本测序、Quartz测序法 (Tang法的简化和改进版本)、细胞表达的线性扩增测序、单细胞标记反转录测序、数组基和乳化基测序法等<sup>[23]</sup>。由于每个单细胞都有成千上万份mRNA转录本, 而染色体DNA分子只有2份, 因此单细胞RNA测序的发展相较于DNA测序已取得显著进展。

### 1.2.3 单细胞表观遗传学测序

表观修饰包括DNA甲基化、羟甲基化、非编码RNA调控、组蛋白修饰、染色质重构及与染色质结合的结构调节蛋白等<sup>[24]</sup>。除基因组本身以外, 其表观修饰也对基因表达调控起着重要作用, 尤其是DNA甲基化。目前, DNA甲基化可以用多种方法绘制全基因组图谱, 如甲基化特异性限制性内切酶、亲和纯化以及单细胞简化代表性亚硫酸氢盐测序法 (single-cell reduced-representation bisulfite sequencing, scRRBS) 等,

其中, scRRBS已被广泛用于单细胞DNA甲基化的研究中, 因其允许单碱基分辨率和DNA甲基化水平的绝对定量, 被认为是金标准<sup>[25]</sup>。

#### 1.2.4 单细胞多组学测序

单细胞多组学测序为研究实体瘤发生、发展过程中的各种分子机制以及进一步探讨各细胞基因组、转录组和表观遗传学三者之间的关系提供了极大帮助。Hou等<sup>[26]</sup>开发了一种单细胞三重测序技术, 可同时分析单个哺乳动物细胞的基因组拷贝数变异以及DNA甲基化组和转录组信息, 为分析基因组和表观基因组异质性对细胞群中转录组异质性的复杂贡献提供了新途径。Macaulay等<sup>[27]</sup>利用G&T-seq(一种从单细胞分离和测序基因组DNA和全长mRNA的方法), 对来自小鼠和人类的220多个单细胞平行测序, 最终同时获得了单个细胞的基因组和转录组信息。

## 2 SCS在TNBC的NAC中的应用

NAC最初仅用于局部进展期或炎性乳腺癌, 而现在用于可手术的患者中, 特别是在TNBC患者中更为常见。NAC使患者能够进行保乳手术, 实时监测治疗反应, 有利于在术前评估个体肿瘤的化疗敏感性; NAC过程中还可以同时添加其他系统性疗法以改善治疗效果并预测未来复发风险; 此外, 以原发性肿瘤对NAC的反应特性作为主要结果的临床试验设计加速了新药的评估和批准<sup>[28]</sup>。因此, 在如今强调个体化治疗的年代, NAC在TNBC中的意义愈发突出。

有研究<sup>[29]</sup>表明, 约2/3的局部TNBC患者在NAC后出现残留疾病, 复发风险很高。如何优化化疗应用是TNBC研究领域的重要课题之一。TNBC患者NAC耐药性的基因组和分子基础至今尚不明确, 部分原因可能是缺乏在罕见亚群中检测及分析基因组信息的方法。因此, SCS技术由于前文所述优点, 或可成为解决这一难题的有力工具, 其具体应用前景有以下几个方面。

### 2.1 确定肿瘤亚型, 分群精准治疗

目前在TNBC的NAC领域一个重要课题就是如何在达到最大治疗效果的同时尽可能地减少不必要的治疗及药物不良反应, 从而使患者真正受益。肿瘤的异质性是指肿瘤细胞增殖过程中不同

时间、空间细胞遗传物质在复制、转录和翻译的不同层面发生变化, 导致子代细胞在基因型和表型中均存在差异, 从而促进肿瘤的进化<sup>[30]</sup>。根据乳腺癌ER/PR/HER2表达谱及Ki-67标记指数的不同, 共分为5个亚型; 而TNBC是所有亚型中突变数量最多的、具有广泛瘤内异质性的肿瘤。

NAC后未达到病理学完全缓解的TNBC患者预后通常较差, 可能与存在少数对传统化疗不敏感的TNBC细胞亚群有关, 从而导致后续转移<sup>[4]</sup>。Navin等<sup>[19]</sup>应用SCS对2例乳腺癌患者肿瘤中的100个单细胞进行分析, 发现了3个不同的单克隆亚群, 其中1个扩增形成了原发肿瘤并由此导致播散转移, 该研究表明, 乳腺癌的生长是由于不间断地克隆扩增造成的。正是因为乳腺癌不同克隆亚群的不间断生长, 使得乳腺癌分化出不同的亚型。因此, 运用SCS技术精准识别和表征这些不同的细胞亚型, 可以监测和指导TNBC靶向治疗, 从而有助于生存率的提高。

此外, SCS能够发现具有潜在治疗靶点的细胞亚群, 在促进个体化治疗方面是一种很有前景的工具。来自哈佛大学医学院的研究小组<sup>[31]</sup>应用单细胞图谱发现了TNBC的亚克隆异质性和侵袭性疾病状态, 研究人员通过对未治疗的原发性TNBC的肿瘤细胞进行单细胞RNA测序, 证实其具有细胞异质性, 并通过聚类分析确定了5个不同的上皮细胞簇; 其中第2簇具有较高的增殖能力, 进一步研究表明, 该细胞簇与乳腺癌细胞起源的管腔祖细胞特征相关, 是一类恶性细胞亚群, 其快速增殖可能驱动肿瘤进展, 从而导致TNBC较差的生存结果。另外, Chung等<sup>[32]</sup>利用单细胞转录组测序技术对11例乳腺癌患者的515个细胞进行研究, 发现乳腺癌细胞在不同亚型和关键的癌症相关通路上表现出瘤内异质性。

上述证据表明, SCS技术有助于加深我们对于TNBC肿瘤异质性的理解, 能够在TNBC的NAC前发现瘤体中可能存在的恶性程度不同的肿瘤亚型以指导精确诊断, 不仅有助于实现不同亚型的患者分类, 选择NAC受益群体, 而且还可能为预后不良的TNBC患者提供潜在的预测因子或治疗靶点, 从而有效指导TNBC的精准治疗。

## 2.2 揭示耐药机制, 监测药物反应

TNBC是一种侵袭性亚型, 容易对化疗产生耐药性, 使其治疗面临重大挑战。目前该领域有一个尚未解决的问题, 即化疗耐药是由于先前存在的稀有亚克隆的选择和适应而产生的(适应性耐药), 还是通过诱导新突变而产生了新的化学耐受表型(获得性耐药)。这个问题已经在细菌系统中研究了几十年, 但在大多数人类癌症中仍然知之甚少。

SCS的结果强调了肿瘤内遗传异质性在肿瘤发展进化中发挥重要作用, 并表明未经治疗的肿瘤内遗传异质性是肿瘤耐药的关键因素<sup>[30, 33]</sup>。Kim等<sup>[34]</sup>应用单细胞DNA和RNA测序分析了20例在NAC期间的TNBC患者的纵向样本, 发现TNBC耐药基因型是先前存在的, 并且是由NAC自适应选择, 而TNBC患者化疗后可自适应地发生基因组突变和拷贝数畸变, 并通过转录重编程进化出耐药表型, 该研究通过SCS技术表明, TNBC患者的耐药模型是由适应性耐药与获得性耐药共同建立。因此, 运用SCS技术有助于揭示TNBC在NAC中的耐药发生机制, 从而指导临床医师及时调整NAC方案, 使TNBC患者获得最佳治疗效果。

此外, Lee等<sup>[35]</sup>将单细胞转录组测序技术分别应用于未经化疗、对紫杉醇化疗敏感以及对紫杉醇化疗耐药的转移性乳腺癌中进行研究, 结果显示, 耐药细胞含有38种特定的变异RNA, 后者参与微管稳定、细胞黏附和细胞表面信号转导, 且耐药细胞的基因表达谱与未处理细胞相似, 只是在数量上翻了几番。因此, SCS技术对于揭示细胞在药物刺激下动态的应激反应机制具有巨大潜力。

以上研究表明, SCS技术不仅可阐述肿瘤的耐药机制, 解释部分TNBC患者NAC失败和复发的原因, 还预示着耐药TNBC患者进一步治疗的潜在可能, 提示SCS技术的应用可为TNBC患者NAC耐药的检测与评估开辟新道路, 对于NAC过程具有重要意义。

## 2.3 阐明转移机制, 发现治疗靶点

TNBC是一种高侵袭性和转移性的乳腺癌亚

型, 多项研究<sup>[36-38]</sup>表明, 该亚型的患者在一线治疗后有频繁转移和高复发率。探索和阐明乳腺癌肿瘤细胞转移机制、发现NAC新靶点一直都是该领域研究者不遗余力追求的目标, 而SCS技术或可为其提供有力工具。

乳腺导管原位癌(ductal carcinoma *in situ*, DCIS)是一种早期乳腺癌, 仅10%~30%的DCIS病例会进展为浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)<sup>[39]</sup>。在分析DCIS患者大块组织样本的研究中很难精确区分克隆谱系。Casasent等<sup>[40]</sup>在2018年开发了一种结合激光弹射的单细胞DNA测序方法, 将其应用于10例同时患有DCIS和IDC患者的1 293个单细胞中, 最终发现原位癌与侵袭性癌各亚群之间存在直接的基因组谱系, 大多数突变和拷贝数畸变于侵袭前就在导管内完成了进化。Aceto等<sup>[41]</sup>将单细胞RNA测序用于乳腺癌骨转移患者的外周血循环肿瘤细胞分析中发现, 雄激素受体(androgen receptor, AR)的剪接变体AR-v7可组成性地激活AR信号通路, 在乳腺癌骨转移过程中发挥重要作用, 因此推断转移性乳腺癌患者可能受益于AR靶向治疗。

以上研究表明, SCS技术不仅有助于发现TNBC侵袭和转移中的亚克隆细胞群, 还有利于探究有关其转移的潜在分子机制, 发现NAC中新的有效靶点, 有望为TNBC患者的NAC带来新的突破。

## 2.4 探究免疫进化, 评估治疗效果

乳腺癌中肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的种类和数量是改善患者生存的一个强有力的预后因素, 特别是在TNBC中, TIL更具有疗效预测作用<sup>[42]</sup>。Azizi等<sup>[43]</sup>对来自人类乳腺癌中的6 311个T淋巴细胞进行了单细胞RNA测序, 结果表明, 具有大量TIL的乳腺癌含有具有组织驻留记忆T(tissue-resident memory T, TRM)细胞分化特征的CD8<sup>+</sup>T细胞, 这些CD8<sup>+</sup>TRM细胞表达高水平的免疫检查点和效应蛋白, 与早期TNBC患者的生存改善显著相关。进一步了解TRM细胞的发育、维持和调控将是TNBC免疫治疗成功的关键, 而SCS技

术在其中的应用显示出巨大潜力。

因此,SCS有助于更全面地了解免疫微环境在TNBC肿瘤进化中的作用,探索肿瘤相关免疫细胞中较为关键的突变基因和表面标记,从而便于发现TNBC的NAC过程中应用免疫相关制剂的新靶点;同时,临床上利用SCS技术对肿瘤免疫微环境进行分析,以评估患者免疫治疗效果<sup>[44]</sup>,协助制定新的免疫治疗反应评价标准,由此或可推动TNBC个性化治疗进入新阶段。

### 3 结语与展望

SCS领域正在快速发展,为我们从单个细胞的精细角度了解肿瘤的遗传、变异、发生、发展、侵袭和转移等提供有力武器,对生物医学的发展和进步发挥重要作用。尤其在乳腺癌精准化、个性化治疗方面显示出广阔的应用前景,对TNBC的NAC发展进步更具深远意义。但是,任何一项技术都有其优势与不足,SCS技术及其衍生的相关技术也存在一定缺陷。首先,在单细胞分离提取过程中,准确筛选目标细胞且防止被污染仍然是一个挑战,且各单细胞分离技术都或多或少存在弊端,需要改善和提升的空间还很大。其次,在目标分子扩增和测序过程中,覆盖范围不均、噪音的存在、测序数据定量不准等时有发生。此外,虽然SCS技术为TNBC患者NAC疗效监测带来了福音,但由于生物信息学分析的惊人成本及高昂价格,使已经承受着沉重疾病负担的患者更加难以接受,从而在一定程度上限制了该技术在临床上的广泛应用。因此,SCS作为一项新兴技术目前尚面临着一些挑战,但相信在不久的将来,SCS技术将能够攻破上述难题,真正造福于所有TNBC患者。

#### [参 考 文 献]

- [1] FOULKES W D, SMITH I E, REIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-1948.
- [2] WOLFF A C, HAMMOND M E H, HICKS D G, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(2): 241-256.
- [3] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2019年版) [J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(8): 609-680.
- [4] LIEDTKE C, MAZOUNI C, HESS K R, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [5] BALKO J M, GILTNANE J M, WANG K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(2): 232-245.
- [6] YANG H, WANG K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(10): 1556-1566.
- [7] GAO R, DAVIS A, MCDONALD T O, et al. Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(10): 1119-1130.
- [8] WANG Y, WATERS J, LEUNG M L, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing [J]. *Nature*, 2014, 512(7513): 155-160.
- [9] ALMENDRO V, CHENG Y K, RANGLES A, et al. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity [J]. *Cell Rep*, 2014, 6(3): 514-527.
- [10] BASLAN T, HICKS J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 557-569.
- [11] PAPALEXI E, SATIJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(1): 35-45.
- [12] ZIEGENHAIN C, VIETH B, PAREKH S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-643. e4.
- [13] CHAMBERS D C, CAREW A M, LUKOWSKI S W, et al. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing [J]. *Respirology*, 2019, 24(1): 29-36.
- [14] NAVIN N E. Cancer genomics: one cell at a time [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(8): 452.
- [15] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(3): 175-188.
- [16] ADAMS J M, STRASSER A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4018-4021.
- [17] HAM R G. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1965, 53: 288-293.
- [18] GOLE J, GORE A, RICHARDS A, et al. Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(12): 1126-1132.

- [ 19 ] NAVIN N, KENDALL J, TROGE J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing [ J ] . Nature, 2011, 472(7341): 90-94.
- [ 20 ] 高仕君, 张海英, 王 焱, 等. 单细胞分析技术在干细胞异质性研究中的应用 [ J ] . 中国组织工程研究, 2020, 24(31): 5057-5063.  
GAO S J, ZHANG H Y, WANG T, et al. Single cell analysis applied to stem cell heterogeneity [ J ] . Chin J Tissue Eng Res, 2020, 24(31): 5057-5063.
- [ 21 ] HOU Y, WU K, SHI X, et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing [ J ] . Gigascience, 2015, 4: 37.
- [ 22 ] HUANG L, MA F, CHAPMAN A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications [ J ] . Annu Rev Genomics Hum Genet, 2015, 16: 79-102.
- [ 23 ] PICELLI S. Single-cell RNA-sequencing: the future of genome biology is now [ J ] . RNA Biol, 2017, 14(5): 637-650.
- [ 24 ] 张 强, 顾明亮. 单细胞测序技术及其在乳腺癌研究中的应用 [ J ] . 遗传, 2020, 42(3): 250-268.  
ZHANG Q, GU M L. Single-cell sequencing and its application in breast cancer [ J ] . Hereditas, 2020, 42(3): 250-268.
- [ 25 ] CLARK S J, LEE H J, SMALLWOOD S A, et al. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity [ J ] . Genome Biol, 2016, 17: 72.
- [ 26 ] HOU Y, GUO H H, CAO C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas [ J ] . Cell Res, 2016, 26(3): 304-319.
- [ 27 ] MACAULAY I C, HAERTY W, KUMAR P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes [ J ] . Nat Methods, 2015, 12(6): 519-522.
- [ 28 ] CHAUDHARY L N, WILKINSON K H, KONG A. Triple-negative breast cancer: who should receive neoadjuvant chemotherapy? [ J ] . Surg Oncol Clin N Am, 2018, 27(1): 141-153.
- [ 29 ] HANCOCK B A, CHEN Y H, SOLZAK J P, et al. Profiling molecular regulators of recurrence in chemorefractory triple-negative breast cancers [ J ] . Breast Cancer Res, 2019, 21(1): 87.
- [ 30 ] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future [ J ] . Cell, 2017, 168(4): 613-628.
- [ 31 ] KARAAYVAZ M, CRISTEA S, GILLESPIE S M, et al. Unravelling subclonal heterogeneity and aggressive disease states in TNBC through single-cell RNA-seq [ J ] . Nat Commun, 2018, 9(1): 3588.
- [ 32 ] CHUNG W, EUM H H, LEE H O, et al. Single-cell RNA-seq enables comprehensive tumour and immune cell profiling in primary breast cancer [ J ] . Nat Commun, 2017, 8: 15081.
- [ 33 ] DAGOGO-JACK I, SHAW A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies [ J ] . Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 81-94.
- [ 34 ] KIM C, GAO R, SEI E, et al. Chemoresistance evolution in triple-negative breast cancer delineated by single-cell sequencing [ J ] . Cell, 2018, 173(4): 879-893.e13.
- [ 35 ] LEE M C, LOPEZ-DIAZ F J, KHAN S Y, et al. Single-cell analyses of transcriptional heterogeneity during drug tolerance transition in cancer cells by RNA sequencing [ J ] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(44): E4726-E4735.
- [ 36 ] VENKITARAMAN R. Triple-negative/basal-like breast cancer: clinical, pathologic and molecular features [ J ] . Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(2): 199-207.
- [ 37 ] RAKHA E A, ELLIS I O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review [ J ] . Pathology, 2009, 41(1): 40-47.
- [ 38 ] TOFT D J, CRYNS V L. Minireview: basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies [ J ] . Mol Endocrinol, 2011, 25(2): 199-211.
- [ 39 ] ALLRED D C. Ductal carcinoma *in situ*: terminology, classification, and natural history [ J ] . J Natl Cancer Inst Monogr, 2010, 2010(41): 134-138.
- [ 40 ] 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. e12.
- [ 41 ] ACETO N, BARDIA A, WITTNER B S, et al. AR expression in breast cancer CTCs associates with bone metastases [ J ] . Mol Cancer Res, 2018, 16(4): 720-727.
- [ 42 ] DENKERT C, VON MINCKWITZ G, DARB-ESFAHANI S, et al. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as predictive and prognostic biomarker in different subtypes of breast cancer treated with neoadjuvant therapy—a meta-analysis of 3771 patients [ J ] . Cancer Res, 2017, 77(4): S1-09.
- [ 43 ] 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.
- [ 44 ] 郑小翠, 汪希鹏. 单细胞测序技术在实体瘤研究中的应用进展 [ J ] . 中国癌症杂志, 2019, 29(7): 535-539.  
ZHENG X C, WANG X P. Progress of single-cell sequencing in solid tumors [ J ] . China Oncol, 2019, 29(7): 535-539.

( 收稿日期: 2020-10-12 修回日期: 2021-02-17 )