

阅读

开放获取

# RNA 测序：癌症研究中的新技术和新应用

Mingye Hong<sup>1†</sup>, Shuang Tao<sup>2†</sup>, Ling Zhang<sup>3</sup>, Li-Ting Diao<sup>2</sup>, Xuanmei Huang<sup>1</sup>, Shaohui Huang<sup>1</sup>, Shu-Juan Xie<sup>2</sup>, Zhen-Dong Xiao<sup>2\*</sup> and Hua Zhang<sup>1\*</sup> 

## 摘要

在过去的几十年里, RNA 测序取得了长足的进步, 成为转录组分析的主要方法。从批量 RNA 测序到单分子、单细胞和空间转录组方法的革命, 使单个细胞分辨率与空间信息结合得越来越精确。癌症作为一种主要的恶性和异质性致死疾病, 仍然是医学研究和临床治疗的巨大挑战。作为一种重要工具, RNA 测序已被用于癌症研究和治疗的许多方面, 包括生物标记物的发现以及癌症异质性和进化、耐药性、癌症免疫微环境和免疫疗法、癌症新抗原等方面的表征。本综述总结了 RNA 测序技术的最新研究及其在癌症中的应用, 并探讨了 RNA 测序技术在癌症应用中未来面临的挑战和机遇。

**关键词** RNA 测序 应用 癌症

作者信息的完整列表见文章末尾

## 背景介绍

癌症仍然是危及人类生命和健康的主要恶性疾病之一, 它由复杂的生物系统组成, 需要精确而全面的分析。自 2005 年首次出现高通量测序技术[1]以来, 从分子水平了解生命活动并进行详细研究以阐明基因组和转录组已成为可能。作为高通量测序的重要组成部分, RNA 测序 (RNA-seq), 尤其是单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq), 可提供单个肿瘤细胞的生物逻辑信息, 分析肿瘤内表达异质性的决定因素, 并确定多种肿瘤形成的分子基础。

\*通信: [xiaozhd@mail2.sysu.edu.cn](mailto:xiaozhd@mail2.sysu.edu.cn); [huazhang@gdmu.edu.cn](mailto:huazhang@gdmu.edu.cn)

†Mingye Hong 和 Shuang Tao 对本研究做出了同样的贡献。

<sup>1</sup>广东医科大学医学技术学院检验医学研究所、广东省医学分子诊

断重点实验室, 中国东莞 523808

<sup>2</sup>中山大学附属第三医院生物治疗中心, 中国广州 510630

2, 3]。因此，RNA 测序为癌症研究和治疗提供了宝贵的见解。随着精准医疗时代的到来，RNA 测序技术将广泛应用于多种不同类型癌症的研究。本综述总结了 RNA 测序的发展历程，重点介绍了 RNA 测序技术在癌症应用中的最新研究，尤其是单细胞 RNA 测序和空间转录组测序。此外，我们还概括介绍了目前用于 RNA 测序的生物格式分析工具，并讨论了

RNA 测序技术在癌症应用中的未来挑战和机遇。

**RNA 测序技术的发展** 直到 1953 年沃森和克里克提出双螺旋结构，人们才真正从分子层面认识到生命的本质是基因相互作用的结果[4]。RNA 测序技术的不断发展将转录组分析带入了一个效率更高、成本更低的新时代。RNA



© 作者 2020。**开放存取** 本文采用知识共享署名 4.0 国际许可协议进行许可，该协议允许以任何媒介或格式使用、共享、改编、分发和复制本文，但需适当注明作者和来源，提供知识共享许可协议的链接，并说明是否进行了修改。本文中的图片或其他第三方材料均包含在文章的知识共享许可协议中，除非在材料的署名栏中另有说明。如果材料未包含在文章的知识共享许可协议中，且您打算使用的材料不符合法律规定或超出许可使用范围，则需要直接从版权所有者处获得许可。如需查看该许可的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。除非在数据的署名行另有说明，否则知识共享公共领域专用免责声明 (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) 适用于本文提供的数据。

RNA 测序技术的时间轴如图 1 所示。

第一代测序技术也称为桑格测序。1977年，桑格首创了链终止法，随后马克萨姆和吉尔伯特开发了化学降解法[5, 6]。同年，桑格测定了φX174噬菌体 5368 bp 的基因组，这是第一个 DNA 基因组测序[7]。DNA 微阵列自问世以来，在许多领域都取得了重大进展。然而，芯片需要事先了解基因序列，无法识别新基因的表达[8]。2005 年第一个高通量测序平台出现后[1]，多个新一代测序平台接踵而至（表 1，图 2、3）。不同平台的准确性和可重复性取决于多个因素，包括平台的固有特性和相应的分析管道[9, 10]。由 454 生命科学公司开发的热释光测序技术在 2016 年后不再受支持，它采用的是 "合成测序" 方法 [1, 11-13]。ion torrent 测序平台也是基于 "合成测序" 方法，其灵敏度优于热释光测序。SOLiD（通过寡核苷酸连接和检测进行测序）

由于每个碱基都要测序两次，因此测序精度高，但读取长度短[11-13]。DNBS（DNA 纳米球测序）可以同时收集大量 DNA 纳米球进行测序。基于 Illumina 的测序技术是一种 "可逆终止测序" 方法。高通量测序具有速度快、测序成本低、准确度高等优点，又称新一代测序（NGS）。与微阵列相比，它可以检测未知的基因表达序列，但耗时较长[14]。

除 NGS 外，还有第三代测序技术，可对单个 RNA 分子进行长线程测序 [15]。单分子 RNA 测序可生成全长 cDNA 转录本，无需克隆扩增或转录本组装。因此，第三代测序摆脱了 PCR 扩增和读图绘制所产生的缺陷。它可以大大降低剪接位点的假阳性率，捕捉转录本同工酶的多样性[15]。单分子测序平台包括太平洋生物科学公司（PacBio）的单分子实时（SMRT）测序[16]、Helicos 单分子荧光测序[17]和牛津纳米孔技术公司（ONT）的纳米孔测序[18]。此外、

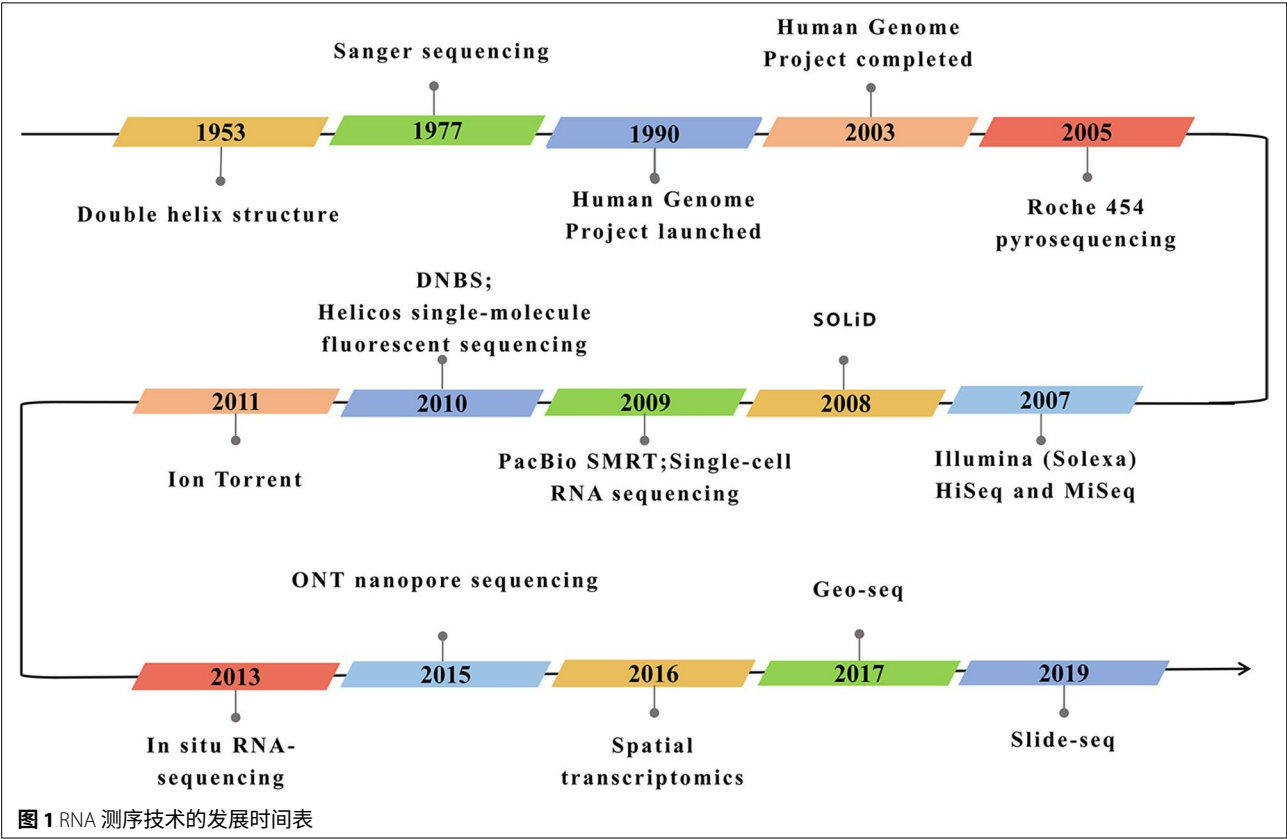


图 1 RNA 测序技术的发展时间表

表 1 不同 RNA 测序平台的比较

平台	公司名称	读数长度 (碱基 )	运行时间	每次运行量	费用	模板准备	测序化学
<b>第一代测序</b>							
桑格	生命科学	800 bp	2 h	1 读	每百万基数 2400 美元	细菌克隆	双脱氧核苷酸侧终止子
<b>新一代测序</b>							
罗氏 454 热测序	454 生命科学	700 bp	< 24 h	0.7 Gb	每百万基数 10 美元	乳液 PCR	合成测序、热测序
Illumina HiSeq	Illumina	100 bp	3-10 天	120-1500 Gb	每百万基数 0.02-0.07 美元	桥式 PCR	可逆末端排序
Illumina MiSeq	Illumina	100 bp	1-2 天	0.3-15 Gb	每百万基数 0.13 美元	桥式 PCR	可逆末端排序
SOLiD	应用生物系统仪器 (ABI)	50-75 bp	7-14 天	30 Gb	每百万基数 0.13 美元	乳液 PCR	连接测序
DNA 纳米球测序	全基因组学	440-500 bp	9 天	20-60 Gb	4400 美元/基因组	滚动圈复制	杂交和连接
离子激流	454 生命科学	200-500 bp	4-5 h	660 兆比特; 11 兆比特	每次 300 至 750 美元	乳液 PCR	合成测序
<b>第三代测序</b>							
SMRT	太平洋生物科学	> 900 bp	1-2 h	0.5-1 千兆字节	每百万基数 2 美元	无需	合成测序
螺旋排序	Helicos 生物科学	25-60 bp	8 天	21-35 Gb	每百万基数 0.01 美元	无需	杂交与合成
纳米孔测序	牛津纳米孔技术	最多 98 kb	48/72 h	高达 30 Gb	< 每百万基数 1 美元	无需	纳米孔

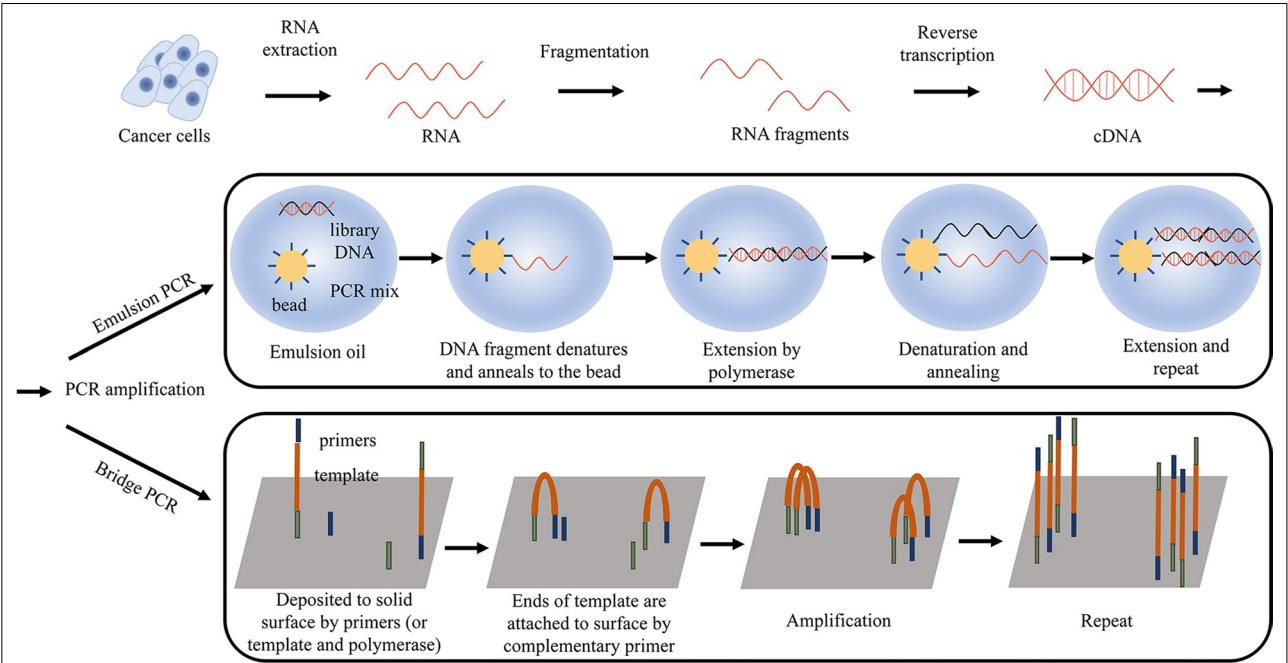
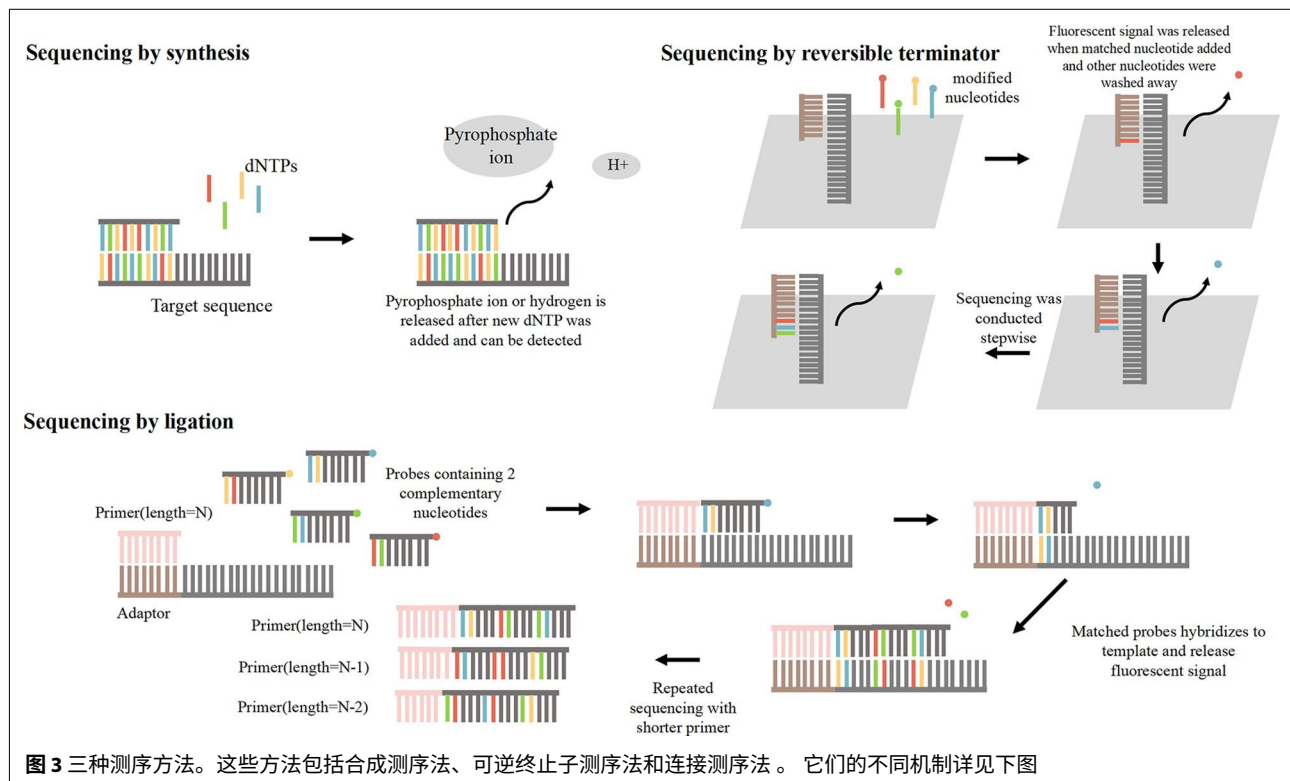


图 2 RNA 测序前的 RNA 提取和模板制备。从组织中提取 RNA，破碎后的 DNA 分子通过反转录转化为 cDNA，然后通过乳液 PCR 或桥式 PCR 扩增，制备测序文库。



RNA-seq 最近从批量测序发展到单细胞测序。单细胞 RNA 测序首次发表于 2009 年，用于分析单细胞分辨率的转录组[19]。Drop-Seq 和 InDrop 最初于 2015 年报道，通过分析小鼠视网膜细胞和胚胎干细胞转录组，确定了新的细胞类型。2017 年，单细胞组合索引 RNA 测序 Sci-RNA-seq 被开发出来，2018 年首次报道了 SPLiT-seq（基于分裂池连接的转录组测序）。这两种方法都采用了组合索引策略，即用条形码标记附着的 RNA，标明其细胞来源[20, 21]。

虽然单细胞数据可以进行单细胞转录组学研究，但在单细胞等距化过程中可能会丢失空间信息。为解决这一问题，空间转录组学应运而生。空间转录组学利用独特的位置条形码来可视化组织切片 RNA 测序中的 RNA 分布，于 2016 年首次发表[22]。2019 年报道的 Slide-seq 使用带有特定位置信息的 DNA 条形码珠[23]。Geo-seq 于 2017 年问世，将 scRNA-seq 与激光捕获显微切割（LCM）相结合，可分离出单个细胞[24]。原位测序指的是在不提取 RNA 的情况下，对形态保存完好的组织或细胞中的 RNA 片段进行靶向测序、

其中包括在荧光原位 RNA 测序（FISSEQ）中通过挂锁探针或稳定交联的 cDNA 扩增子原位合成 cDNA，以及通过滚圆扩增（RCA）进行原位扩增 [25, 26]。此外，基于 RNA-seq 的各种新技术已针对特定应用开发出来。例如，一种靶向 RNA 测序技术--CaptureSeq--采用生物酰化寡核苷酸探针，富集某些转录本以鉴定基因融合[27, 28]。

**RNA 测序数据的计算分析** RNA 测序的计算分析工具在过去十年中急剧增加。应根据应用目的和准确性来选择特定工具[29-31]。一般的 RNA 测序数据分析过程包括原始数据的质量控制、读取比对、转录本组装、表达定量和差异表达分析（图 4）。

数据分析的第一步是评估和清理原始测序数据，这些数据通常以 FASTQ 文件的形式提供[32]。质量控制直观地反映了测序的质量，目的是完全剔除低质量的读数，消除质量差的碱基，修剪适配序列[31]。常见

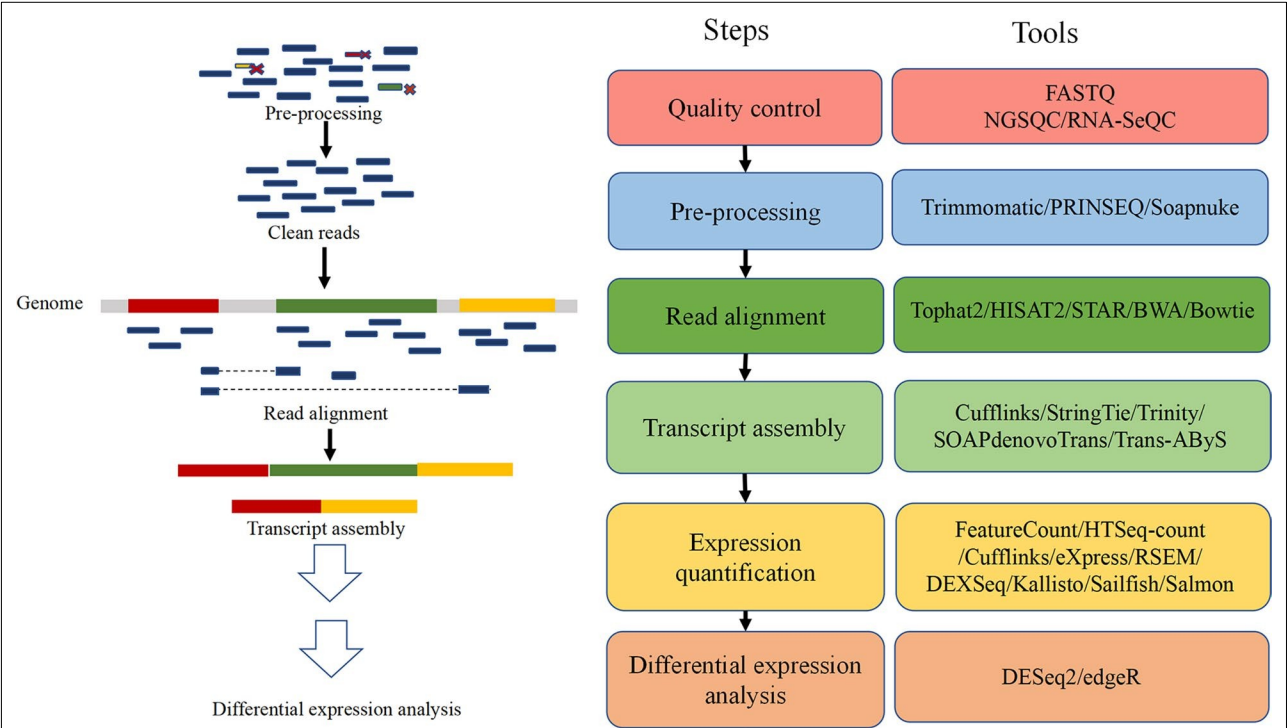


图 4 RNA-seq 数据分析中常用的生物信息学工具。这些工具主要用于 RNA-seq 数 据 分 析 的 四 个 主 要 过 程，包括质量控制、读数比对和转 录本组装、表达定量和差异表达分析。

工具包括 FASTQ [33]、NGSQC [34]、RNA-SeQC [35]、Trimmomatic [36]、PRINSEQ [37] 和 Soapnuke [38]。

下一步是将干净的读数映射到基因组或转录组。目前有一些映射工具，包括 Tophat2 [39]、HISAT2 [40]、STAR [41]、BWA [42] 和 Bowtie [43]。对齐后，可使用另一种软件，如 Cufflinks [44]、StringTie [45]、Trinity [46]、SOAPdenovoTrans [47] 和 Trans-ABys [48]，从短读数中组装转录本。转录本模型建立后，可在基因、转录本和外显子水平对其表达进行量化。常用的基因水平量化软件包括 Feature- Count [49] 和 HTSeq-count [50]。转录本水平的定量软件包括 Cufflinks [44], eXpress [51] 和 RSEM [52]。DEXSeq 是一款外显子水平量化软件[53]。此外，还有一些免配对量化工具，如 Kallisto [54]、Sailfish [55] 和 Salmon [56]，它们的优点是明显节省计算资源。经过归一化处理后，会生成表达矩阵，统计方法可用于识别差异表达基因。DESeq2 [57] 和

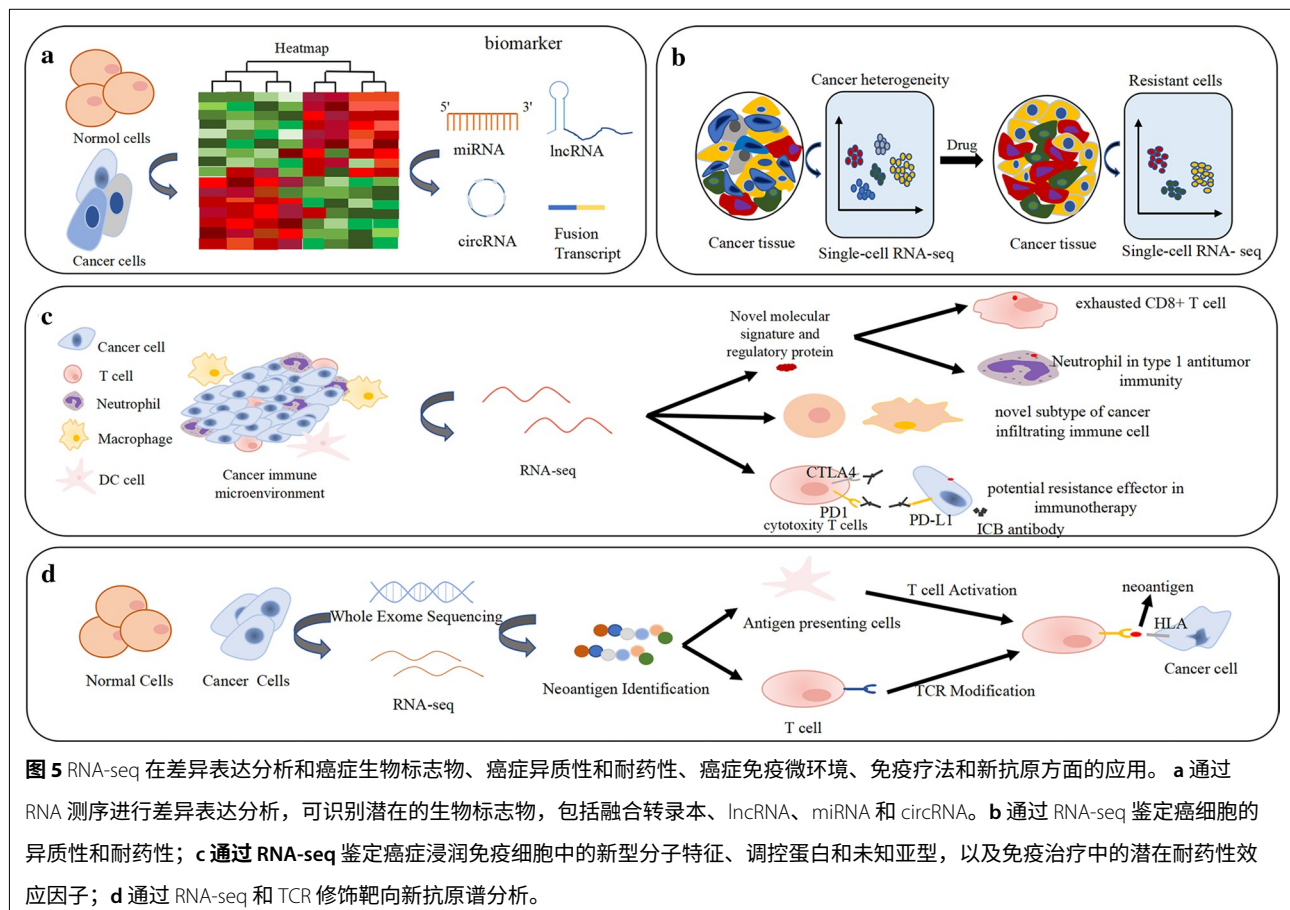
edgeR [58] 通常用于执行这项任务。



**RNA 测序在癌症研究中的应用** 由于高通量测序技术的普及, RNA-seq 等基因组数据已被广泛使用[59]。作为新一代测序技术的重要组成部分, RNA 测序在各个领域尤其是癌症研究中做出了巨大贡献, 包括差异基因表达分析和癌症生物标志物、癌症异质性和进化、癌症耐药性、癌症微环境和免疫疗法、新抗原等研究 (图 5)。

#### **差异基因表达分析和癌症生物标志物**

差异基因表达分析是 RNA 测序最常见的应用之一 [60]。来自不同背景 (不同物种、不同时期) 的样本可用于 RNA 测序, 以确定差异表达基因, 揭示其功能和潜在的分子机制 [61]。更重要的是, 差异基因表达分析有助于发现潜在的癌症生物标记物 [62]。许多研究表明, 基因融合与肿瘤发生密切相关, 既是理想的癌症生物标记物, 也是理想的治疗靶点, 因此受到重视



[63].临床样本中的基因融合主要通过 RNA-CaptureSeq 检测。与全转录组测序相比, RNA-CaptureSeq 的测序深度明显更高[27, 64, 65]。据报道, NUP98-PHF23 融合基因可能是急性髓性白血病 (AML) 的一个新的治疗靶点 [66]。最近, 包括 ESR1-CCDC170、SEC16A-NOTCH1、SEC22B-NOTCH2 和 ESR1-YAP1 在内的多种复发性基因融合也引起了人们的关注。这表明复发基因融合是导致癌症的关键因素之一 [67]。在结肠癌中发现了几种 BRAF、NTRK3 和 RET 基因融合的新构型 [68]。这些融合可能会促进恶性肿瘤的发展, 并为个性化治疗提供新的靶点 [68]。此外, 通过 RNA 测序发现了一些特殊的基因组因子作为生物标志物, 包括 miRNA、lncRNA 和 cir-cRNA, 它们广泛存在于各种类型的癌症中[69-71]。最近的一个例子是 circRNA\_0001178 和 circRNA\_0000826, 它们是结直肠癌肝转移的生物标志物[72]。通过同时应用 RNA 测序和小 RNA 测序, 一项研究



在胰腺癌中发现了简单重复序列 (SSR) 的差异表达, 并证明 SSR 主题的频率发生了显著变化, 有望成为肿瘤生物标记物 [73]。除核酸生物标志物外, RNA-seq 与免疫组织化学和 Western 印迹相结合, 也发现了某些可作为癌症生物标志物的蛋白质, 如核 COX2 (环氧化酶 2) 与 HER2 (人表皮生长因子受体 2 型) 结合, 可作为诊断和预后结直肠癌的潜在生物标志物[74]。利用 RNA-seq 图谱分析发现的类似例子包括鼻咽癌中的 ISG15 (干扰素刺激基因 15) [75] 和肝细胞癌中的 DMGDH (二甲基甘氨酸脱氢酶) [76]。对 RNA 测序数据和其他临床数据的数据挖掘分析发现, 过氧化物酶同工酶也有望成为预测乳腺癌总生存期和无复发生存期的预后生物标志物[77]。通过 RNA 测序发现的差异表达基因越来越多, 新的潜在癌症生物标志物也在不断被发现 (表 2)。然而、

表 2 通过 RNA-seq 确定的具有代表性的癌症潜在生物标记物

癌症类型	生物标志物名称	生物标志物类型	向上/向下	价值	参考资料
肝癌	tRNA-ValTAC-3/tRNA-GlyTCC-5/ tRNA-ValAAC-5/tRNA-GluCTC-5	tsRNA	向上	诊断	[92]
	ACVR2B-AS1	LncRNA		向上诊断/治疗目标	[93] 肺癌
	LINC01537	LncRNA		下行诊断/治疗靶点	[94] circFARSA
		循环 RNA	向上非	侵入性生物标志物	[95]
	LINC01123	LncRNA		胃癌 CTD2510F5.4	
		LncRNA	向上	诊断/预后	[97] MEF2C-AS1/FENDRR
		LncRNA	下降	诊断/预测	
前列腺癌	PSLNR	LncRNA	下诊断	/治疗靶点	[99]
大肠癌	RAMS11	LncRNA		向上治疗目标	[100]
	CRCAL-1/CRCAL-2/CRCAL-3/CRCAL-4	LncRNA		向上治疗目标	[101]
结肠癌	AFAP1-AS1	LncRNA	上诊断	/治疗靶点	[102]
头颈部鳞状细胞癌	LINC00460	LncRNA	向上	预后	[103]
	HCG22	LncRNA	下降	预后	[104]
	HOXA11-AS/LINC00964/MALAT1	LncRNA	向上	诊断	[105]
透明细胞肾细胞癌	SLINKY	LncRNA	上升	预后	[106]
白血病	LUCAT1	LncRNA		向上治疗目标	[107]
	circ-HIPK2	CircRNA	下降	诊断/预后	[108]

需要充分的临床实践来证实这些生物标记物在癌症诊断和预测方面的应用。

RNA-seq 可检测早期突变和高分子风险突变，从而发现新型癌症生物标记物和潜在治疗靶点，在早期治疗决策中监测疾病并指导靶向治疗。肿瘤突变负荷（TMB）被认为是免疫检查点治疗和预后的潜在生物标记物[78, 79]。RNA-seq可用于探索TMB在弥漫性胶质瘤中的应用价值[78]。通过 RNA-seq，MET 第 14 号外显子突变和异柠檬酸脱氢酶 1（IDH1）突变分别被确定为肺腺癌和软组织瘤患者新的潜在治疗靶点[80, 81]。多项研究表明，RNA 测序可在 DNA 测序的基础上有效提高检出率，提供更全面的检测结果，为靶向治疗取得更好的疗效[82]。此外，RNA-seq 还证明 IDH 突变是胶质瘤良好的预后标志物[83]。靶向治疗还被认为可以增强或取代包括急性髓细胞性白血病在内的癌症的细胞毒性化疗方案[84-86]。

ScRNA-seq 在诊断方面也有一些新发现。例如，scRNA-seq 数据可用于推断拷贝数变异（CNV）和区分恶性与非恶性细胞。用于胶质母细胞瘤研究的推断 CNV 算法使用了

平均大基因组区域的相对表达水平来推断染色体拷贝数变异[87]。类似的例子包括头颈癌 [88] 和人类少突胶质瘤 [89]。据报道, 肿瘤教育血小板 (TEPs) 的 RNA 序列也可成为一种基于血液的癌症诊断方法 [90]。值得注意的是, 在血小板 RNA 研究领域, 血小板中已发现的 RNA 缺乏详细的功能意义, 这也是一个亟待解决的问题[91]。

### 癌症的异质性和演变

在正常细胞向癌细胞转化的过程中, 异质性一直存在。异质性的不断积累可能反映了癌症的演变过程 [109]。早期的 RNA 测序检测特定组织或细胞群中的所有 RNA 转录本, 忽略了单个细胞的差异。单细胞 RNA 测序的转录组轮廓分析通过提供转录组的单细胞分辨率解决了这一问题 [3]。在黑色素瘤中, 利用单细胞 RNA-seq 分析了来自 19 名患者的 4645 个肿瘤细胞, 包括癌细胞、免疫细胞、间质细胞和内皮细胞。来自不同单细胞的转录组数据显示, 同一罐内细胞的异质性与细胞周期、空间背景和耐药性有关 [110]。最近一项对 49 个转移性肺癌样本进行的单细胞 RNA-seq 研究显示, 非小细胞肺癌诱导的可塑性变化与细胞周期、空间背景和耐药性有关[110]。

为临床治疗提供了新的方向[111]。单细胞 RNA 测序还能整合单个癌细胞的各种信息,破译癌症异质性和进化的秘密 [112]。与 scRNA-seq 相比,另一种新兴技术空间转录组测序整合了细胞的空间位置信息。在前列腺癌中,利用空间转录组学技术分析了近 6750 个组织区域的转录组,揭示了整个多灶性前列腺癌的全组织基因表达异质性,准确描述了癌症病灶的范围 [113]。在一项关于乳腺癌组织的研究中,空间转录组测序的结果显示,不同区域之间的基因表达竟然具有高度异质性[22]。近年来,单核 RNA 测序 (snRNA-seq) 也受到广泛关注,因为它解决了单细胞 RNA 测序无法应用于冷冻标本、无法获得特定组织中所有细胞类型的问题 [114, 115]。新兴的 RNA 测序技术将有助于癌症异质性和进化方面的研究。

### 癌症抗药性

耐药性是导致癌症治疗失败的一个主要原因。然而,人们对耐药性的分子机制仍然知之甚少 [116]。RNA 测序成为揭示癌症耐药机制的重要工具。在乳腺癌中,单细胞 RNA 测序发现了一种导致耐药性的肿瘤免疫抑制性未成熟髓系细胞 [117]。另一项研究通过单细胞 RNA 测序在癌细胞中发现了一个与铂耐药性有关的新 COX7B 基因和一个替代标记物 CD63 [118]。RNA 测序还证明,从休眠状态苏醒的癌细胞会产生大量 BORIS (印记位点调节因子的兄弟),它能调节耐药神经母细胞瘤细胞中生存基因的表达 [119]。识别介导这些过程的特殊分子有助于我们了解耐药性的发生。单细胞转录组学可用于研究肿瘤细胞的不同化疗耐药模式,研究表明,已存在的耐药细胞可通过较高的表型瘤内异质性被选择,而表型均一的细胞则在药物选择下利用其他机制进行转分化 [120]。在一项关于胰腺导管腺癌的研究中,通过对人类胰腺癌 (PANC-1) 细胞和吉西他滨耐药的 PANC-1 细胞系进行 RNA 测序比较,发现两个 circRNA 既是新的生物标志物,也是吉西他滨耐药患者的潜在治疗靶点[121]。

RNA-seq 也对血液恶性肿瘤的耐药性进行了深入研究。通过 RNA-seq,人们发现非编码 RNA 和融合基因在介导血液恶性肿瘤耐药性方面发挥着重要作用 [122]。一个很好的例子是比较耐药急性髓性白血病细胞与其母细胞的 circRNA 表达谱,确定参与耐药的 circRNA [123]。同样,通过 RNA-seq 鉴定出的新型 MEF2D-BCL9 融合转录本被发现会增加 HDAC9 (组蛋白去乙酰化酶 9) 的表达,并增强急性淋巴细胞白血病 (ALL) 对地塞米松的耐药性[124]。白血病干细胞 (LSCs) 被认为是导致复发的罕见细胞群,它对改善患者的预后至关重要 [125, 126]。RNA-seq 分析表明, LSCs 具有独特的 lncRNA 特征,具有功能相关性和治疗潜力,为化疗耐药和疾病复发提供了解释[127]。

### 癌症微环境与免疫疗法

免疫系统在癌症微环境中发挥着关键作用,通过肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 影响癌症发展的多个阶段,包括肿瘤发生、进展和转移[128]。肿瘤浸润淋巴细胞及其与恶性肿瘤细胞和基质细胞的相互作用构成了癌症免疫微环境。由于癌症的异质性,很难界定某些免疫细胞确切的促癌或抗癌功能。由于不同亚克隆的反应不同,癌症的异质性也导致接受免疫疗法治疗的患者临床疗效各异[129]。通过 RNA-seq (尤其是 scRNA-seq) 进行转录组分析,可提供有关肿瘤微环境 (TME) 中细胞活动和细胞间相互作用的全面信息。ScRNA-seq 可对高质高量的单个免疫细胞进行基因组和分子谱分析,并评估细胞异质性,从而描绘癌症微环境中的免疫系统谱[130-132]。ScRNA-seq 数据表明,与正常组织相比,癌症组织的免疫微环境表现出明显更高的异质性,并且发现了多克隆 T 细胞和异质性抗原递呈细胞导致的 T 细胞激活的连续性 [133]。

对黑色素瘤中肿瘤浸润 T 细胞的 ScRNA 测序发现,转录因子 NFATC1 (活化 T 细胞核因子 1) 是 T 细胞衰竭原的潜在分子特征,并揭示了扩增克隆 T 细胞中低衰竭 T 细胞的耗竭情况 [110]。将 scRNA 测序与组



序列, 确定了肝细胞癌 (HCC) 中的 11 个 T 细胞亚群, 如 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 调节样细胞及其基因组特征, 为了解 HCC 中浸润 T 细胞的免疫格局提供了有价值的见解 [134]。癌症浸润 T 细胞还通过损害自噬蛋白 LC3 (微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3, 通常简称为 LC3) -相关吞噬 (LAP) 发挥抗肿瘤作用, 这证明了 scRNA-seq 揭示的自噬在肿瘤发生和抑制中的作用 [135]。除实体瘤外, 急性髓性白血病患者的 scRNA-seq 还检测到多种抑制 T 细胞功能的免疫调节基因 [136]。通过用于 scRNA-seq 的计算工具 CSOmap, Tregs 和 T<sub>ex</sub>s 之间的 CCL4-CCR8 定向相互作用, 以及的特点 [137]。值得注意的是, 研究结果还显示, 肿瘤浸润 T 细胞之间的相互作用多于与外周血 T 细胞的相互作用, 而肿瘤与 T 细胞之间的相互作用也不尽相同, 这表明肿瘤对免疫疗法的反应各不相同, 并有可能出现免疫逃逸的趋势 [137]。

在癌症免疫微环境中, 除 T 细胞外, 中性粒细胞也是癌症进展和癌症耐药性的关键组成部分 [138-141]。通过对小鼠肉瘤和某些人类癌症进行 scRNA 测序, 发现表达 CSF3R (集落刺激因子 3 受体) 的中性粒细胞是抗癌免疫中与非常规 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>αβ T 细胞 (UTCαβ) 相关的 1 型抗肿瘤免疫的一部分, 预示着较好的预后 [142]。对转移性乳腺癌和原发性癌症的 CD45 细胞进行 ScRNA 序列分析发现, 中性粒细胞具有亲肿瘤性和抗肿瘤性或转移性, 其中亲肿瘤性和转移性中性粒细胞由表达 IL11 的癌症亚克隆诱导, 导致多克隆转移 [143]。这一观察结果也为针对中性粒细胞的抗癌免疫疗法提供了新的思路 [143]。通过对 CD4 和 CD8 T 细胞进行 scRNA 序列分析, 发现了几种具有抗癌功能的关键通路 [144]。

#### 免疫反应与免疫之间的平衡

从单个淋巴结黑色素瘤转移灶分离出的单核细胞和树突状细胞 (DCs) 的 scRNA 测序发现了一个由细胞因子抑制因子-2 (SOCS2) 蛋白和 IFN<sub>γ</sub> 调节的保守稳态模块 [145]。SOCS2 在抗肿瘤免疫和通过 DC 诱导 T

细胞中发挥着重要的调节作用。这种高度保守的同源程序建立了



免疫疗法，尤其是免疫检查点阻断疗法（ICB），为抗癌治疗揭开了新的篇章，靶向程序性死亡 1（PD1）、程序性死亡配体 1（PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA4）的治疗效果显著 [146-148]。然而，只有少数患者能从 ICB 中获益，而且还观察到了严重的副作用 [149, 150]。显然，除了 PD1/PD-L1/CTLA-4 表达和错配修复缺陷等众所周知的因素外，还有各种未知因素与免疫疗法的结果相关 [151-155]。因此，确定 ICB 疗效的潜在效应因子至关重要。通过分析接受抗 PD1 和抗 CTLA4 治疗的黑色素瘤患者的 RNA-seq 数据，发现了潜在的 ICB 抗性效应因子 SERPINB9（丝氨酸蛋白酶抑制剂（serpin）家族成员）以及细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）浸润水平与 ICB 反应之间的联系 [156]。通过 scRNA-seq 鉴定了具有免疫治疗持久性的亚群细胞，发现它们具有干细胞样状态，表达干细胞抗原-1（Sca-1）和 Snail [157]。

另一种免疫疗法--髓系靶向免疫疗法，是基于 scRNA-seq 揭示的肿瘤浸润髓系细胞（包括 DC 和肿瘤相关巨噬细胞（TAMs））的复杂性 [158]。通过对结直肠癌患者的免疫细胞进行 scRNA-seq，发现了  $C1QC^+$  和  $SPP1^+$  TAMs 这两个 TAMs 子集，并揭示了抗 CSF1R（集落刺激因子 1 受体）和 CD40 激动剂等髓系靶向免疫疗法的机制 [159]。细胞内染色和测序（INs-seq）是一种整合了 scRNA-seq 和细胞内蛋白质活性测量的新型技术，它发现了新型  $Arg1^+$   $Trem2^+$  调节性髓系（Mreg）细胞，并证明了消耗 Trem2 会导致 CD8 T 细胞衰竭，NK 和细胞毒性 T 细胞增加，并通过减少瘤内 Mreg 细胞的增殖来抑制癌症 [160]。

### 癌症新抗原

新抗原是肿瘤生长过程中癌症特异性体细胞突变或基因融合产生的与人类白细胞抗原（HLA）结合的多肽，是免疫疗法临床反应的另一个重要调节因素 [161]。在黑色素瘤和晚期非小细胞肺癌患者中，较高的瘤内新抗原异质性和克隆新抗原负荷可增加对 ICB 的敏感性，并有助于改善临床疗效 [162]。这类

抗原是抗癌免疫疗法的最佳靶点，可增强新抗原特异性，从而提高治疗效果。

T 细胞活性, 并已开发出针对黑色素瘤患者个人新抗原的疫苗 [163, 164]。鉴于以肿瘤新抗原为靶点的个体化药物的所有这些前景看好的特点, 为了提高临床疗效和深入了解新抗原的情况, 有必要对肿瘤新抗原负担进行大规模的旁侧谱分析。在许多研究中, 基于 RNA-seq 的转录组学方法是新抗原谱分析的有效工具。研究发现, 新抗原和体细胞突变诱导的病原体的同源性对抗 CTLA4 治疗黑色素瘤的反应预测非常重要 [165]。除黑色素瘤外, 其他研究还发现三negative 和 HER2 乳腺癌中的新抗原负荷减少 [166], 非小细胞肺癌患者在不同治疗策略下的新抗原丰度不同 [167], 复发胶质瘤中新抗原表达与预测新抗原的比例因免疫选择压力而降低 [168]、选定实体瘤中新抗原丰度与临床结果之间的负相关 [169], 以及唾液腺癌 (SGC) 患者中基于组织学的免疫过滤和 T 细胞功能障碍的不同新抗原景观 [170]。

新抗原预测程序 Neopepsee 基于 RNA-seq 数据和体细胞突变, 可用于检测潜在的新抗原, 以开发个人疫苗, 与结合亲和力预测相比, 可降低假阳性率 [171]。ScanNeo 是另一种基于 RNA-seq 的预测计算管道, 旨在识别插入和缺失衍生的新抗原, 已在前列腺癌中得到验证 [172]; ASNEO 则可识别个人特异性原生剪接改变衍生的新抗原 [173]。有几种新抗原已被确认与癌症预后有关, 可能成为免疫疗法的潜在靶点, 如 HCC 患者的 TP53 新抗原 [174]。对于癌症中的抗新抗原免疫疗法, 有人提出了一种新策略, 即对新抗原特异性 TCRs 进行修饰, 并应用 scRNA-seq 分离出新抗原特异性 TCRs 以供进一步临床应用 [175]。

## 结论和展望

高通量 RNA-seq 技术已成为探索转录组的重要工具。RNA-seq 技术的快速发展不仅节省了时间和成本, 还为许多新的研究领域带来了曙光。然而, RNA-seq 技术仍有一些局限性需要改进。

对于短读数长度的 RNA-seq 技术来说, 偏差和缺陷主要产生于测序文库制备和短读数组装过程中。这些

方法很难正确识别多种同工酶

为了克服短读数长度的缺点，需要提高读数覆盖率和测序深度。长读数长度 RNA-seq 技术避免了模板扩增的缺点，降低了剪接接头检测的假阳性率，并能识别未注释的长转录本，克服了短读数测序的普遍局限性 [176, 177]。不过，这种方法也存在通量降低、成本较高、测序错误率（尤其是插入-缺失错误）较高等缺点。为了减少随机误差，开发了 PacBio 循环共识测序（CCS），通过多次重读分子来增加测序深度。然而，这也降低了独特同工酶的鉴定率。此外，与短线程测序相比，长线程测序鉴定差异表达基因的灵敏度较低 [178-180]。因此，有报告称长读程测序与短读程测序杂交可产生更全面、更准确的分析[181]。

RNA 测序技术吞吐量的提高带来了数十亿测序读数，给数据存储、传输、质量控制和数据分析（包括读数映射、转录本组装和读数归一化）等计算过程带来了巨大挑战。因此，生物信息学必须跟上 RNA-seq 技术不断发展的步伐。值得注意的是，由于读数数据处理的不同，可能会产生偏差，因此有必要改进当前的生物信息学管道。

RNA-seq 通过读数计数来测量基因表达量，而读数计数总是包含缺失值，从而导致特定基因的信息丢失，并对下游分析产生负面影响。为克服这一问题，需要对缺失数据进行归类，并通过多种方法进行分析，如缺失值最优聚类 [182]。对于 scRNA-seq，由于生物或技术偏差，不同细胞中零表达或低表达基因的比例各不相同。例如，批次效应可能来自在不同条件下捕获和测序的细胞[183]。对于 scRNA-seq，推荐使用 SAVER、MAGIC 和 kNN 平滑等估算方法 [184]。另一种名为 "scRNA-seq 数据未知亚型批次效应校正"（BUSseq）的方法利用贝叶斯分层模型，也可用于校正批次效应和缺失数据 [185]。

结合多组学测序的数据无疑可以扩大 RNA-seq 的应用范围。例如，Assay for Transposase-Accessible Chromatin（ATAC-seq）就是利用超活性 Tn5 转座酶来鉴定开放染色质区域和转录因子（TF）结合位点的[186]。

ATAC-seq 与 RNA-seq 的整合可以揭示 TF 靶向基因及其转录本 [187, 188]。染色质构象捕获分析 (3C) 技术及其衍生技术, 包括环状染色体构象捕获 (4C)、碳拷贝染色体构象捕获 (5C)、ChIP-Loop、Hi-C 和捕获 Hi-C, 被开发和改进用于检测染色质结构和未知相互作用区 [189-191]。据报道, RNA-seq 和染色质结构的联合分析可检测与结构变异相关的差异表达基因 [192-194]。

表转录组学是基因表达的重要组成部分, 其中以 N6 位腺苷的甲基化 (m6A) 最为丰富 [195]。传统的 RNA-seq 测序需要在测序前进行反转录, 因此容易丢失转录组复杂性的信息。使用纳米孔测序等方法对原生 RNA 分子直接测序可以克服这一缺陷。由于经过修饰的 RNA 分子通过纳米孔时会产生一种特有的暂时性电流阻断, 因此可以从电流信号中推断出转录本的修饰, 从而检测出 m6A 或 5-甲基胞嘧啶 (m5C) 等多种修饰 [196-198]。

ScRNA-seq 是促进癌症研究进一步探索的强大技术, 也已被用于检测癌症干细胞亚群、癌症淋巴结的代谢转换以及治疗诱导的癌细胞适应性 [111、199、200]。结合细胞分选或配体-受体相互作用, scRNA-seq 被用于细胞间作用、细胞空间组织以及分子串扰表征 [137、201、202]。scRNA-seq 与并行的 CRISPR (聚类规则间隔短回文重复序列) 池筛选相结合, 可同时分析基因组扰动和转录活性, 从而检测异质性细胞类型以及复杂性调控机制的关键因素 [203-205]。单细胞代谢标记新 RNA 标签测序技术 ScNT-seq 通过识别不同阶段转录的 RNA, 将 RNA-seq 技术带入时间解析阶段 [206]。利用基于 SNP 的 scRNA-seq 数据去多重化技术, MIX-Seq 被开发用于研究癌细胞对药物治疗的反应 [207]。另一项技术, snRNA-seq, 对检测癌症的细胞异质性具有重要价值, 已被用于鉴定调控癌症发生的脂肪细胞亚群 [208]。

总之, RNA-seq 已广泛应用于癌症研究领域, 令人印象深刻。癌症研究中的所有应用都有赖于先进 RNA-seq 技术的推动, 尤其是结合了以下优点

scRNA-seq 和空间转录组学以及多组学数据将把 RNA-seq 技术带入单细胞分辨率和组织级转录组学, 为癌症诊断、治疗和预防提供新的视角。

#### 缩略语

RNA-seq: RNA 测序; ScRNA-seq: 单细胞 RNA 测序; SOLiD: 寡核苷酸连接和检测测序; DNBS: DNA 纳米球测序; NGS: 下一代测序; PacBio SMRT: 太平洋生物科学单分子实时测序; ONT: 牛津纳米孔技术公司; Sci-RNA-seq: 单细胞组合索引 RNA 测序; SPLiT-seq: 基于分割池连接的转录组测序; LCM: 基于分割池连接的转录组测序; Sci-RNA-seq: 单细胞组合索引 RNA 测序; SPLiT-seq: 基于分离池连接的转录组测序; LCM: 激光捕获显微切割; FISSEQ: 荧光原位 RNA 测序; RCA: 滚动圈扩增; AML: 急性髓性白血病; 急性髓性白血病; SSRs: COX2: 环氧化酶2; HER2: 人类表皮生长因子受体2型; ISG15: 干扰素刺激基因15; DMGDH: 二甲基甘氨酸脱氢酶; TMB: 肿瘤突变负荷; IDH: 异柠檬酸脱氢酶; CNV: 拷贝数变异; TEPs: BORIS: Brother of the regulator of imprinted sites; ALL: 急性淋巴细胞白血病; LSCs: 白血病干细胞; TILs: TME: 肿瘤微环境; NFATC1: 活化 T 细胞核因子 1; TCR: T 细胞受体; HCC: 肝细胞癌; LAP: CSF3R: 集落刺激因子 3 受体; UTCaβ: 非常规 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> αβ T 细胞; DCs: 树突状细胞; SOCS2: 细胞因子抑制因子-2 蛋白; ICB: 免疫检查点阻断; PD1: 靶向程序性死亡 1; PD-L1: PD-L1 蛋白; PD-L1: 程序性死亡配体 1; CTLA4: 细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4; CTL: 细胞毒性 T 淋巴细胞; Sca-1: 干细胞抗原-1; TAMs: CSF1R: 集落刺激因子 1 受体; INs-seq: 细胞内染色和测序; Mreg: 调节性髓系细胞; HLA: 人类白细胞抗原; SGC: 唾液腺癌; CCS: CCS: 循环共识测序; ATAC-seq: 利用测序进行转座酶可访问染色质的分析; TF: 转录因子; 3C: 染色质构象捕获分析; 3C: 染色质构象捕获分析; 4C: 环状染色体构象捕获; 5C: 碳拷贝染色体构象捕获; m6A: N6 位置; m5C: 5-甲基胞嘧啶; CRISPR: 簇状规则间隔短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)。

#### 致谢

不适用。

#### 作者的贡献

M.H.和S.T.撰写和编辑了本手稿, 并制作了图表。L.Z.、L.T.D.、X.M.H.、S.H.H.、S.J.X.、Z.D.X.和H.Z.审阅并修改了手稿。Z.D.X.和H.Z.自始至终提供了指导和指引。

参与了手稿的撰写。所有作者都阅读并批准了最终手稿。

#### 资金筹措

本研究得到国家自然科学基金 (81300398、81974436)、广东省重点领域研究发展计划 (2020B1111030005)、广东省引进创新创业团队计划 (2019ZT08Y485)、广东省海洋经济发展重点项目 (六大海洋产业) 专项基金 (粤自然资发[2020]070)、中央高校基本科研业务费 (19ykk) 等的资助; 广东省自然资源厅海洋经济发展重点项目 (海洋六大产业) 专项基金 (粤自然研[2020]070); 中央高校基本科研业务费 (19ykzd06) 和

*Oncol*

**数据和材料的可用性**

不适用。

**伦理批准和参与同意书**

不适用。

**同意出版**

不适用。

## 利益冲突

作者声明他们没有利益冲突。

## 作者详细信息

<sup>1</sup>广东省重点实验室检验医学研究所

广东医科大学医学技术学院医学分子诊断研究所, 中国东莞 523808。 <sup>2</sup>

中山大学附属第三医院生物治疗中心, 中国广州 510630。

<sup>3</sup>美国德克萨斯大学健康科学中心, 休斯顿 77030。

收到: 接收: 2020 年 10 月 31 日 接受: 2020 年 11 月 22 日

Published online: 04 December 2020

## 参考资料

1. Margulies M、Egholm M、Altman WE、Attiya S、Bader JS、Bemben LA 等。在微加工高密度皮升反应器中进行基因组测序。《自然》。2005;437:376-80.
2. Cieřlik M, Chinnaiyan AM.癌症转录组剖析在临床转化的关头- ture。Nat Rev Genet.2018;19:93-109.
3. Suvà ML, Tirosh I. 癌症中的单细胞 RNA 测序: 经验教训 和新出现的挑战。Mol Cell.2019;75:7-12.
4. Watson JD, Crick FH.核酸的分子结构; 脱氧核糖核酸的结构。自然。1953;171:737-8.
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.使用链终端抑制剂进行 DNA 测序- ing inhibitors.美国国家科学院院刊。1977;74:5463-7.
6. Maxam AM, Gilbert W. 一种新的 DNA 测序方法。Proc Natl Acad Sci USA.1977;74:560-4.
7. Sanger F、Air GM、Barrell BG、Brown NL、Coulson AR、Fiddes CA 等噬菌体 phi X174 DNA 的核苷酸序列。自然。1977;265:687-95.
8. Russo G、Zegar C、Giordano A. 微阵列 技术在人类癌症中的优势和局限性。Oncogene.2003;22:6497-507.
9. Li S、Tighe S、Nicolet C、Grove D、Levy S、Farmerie W 等. ABRF 下代测序研究中使用 RNA-seq 进行转录组分析的多平台评估。Nat Biotechnol.2014;32:915-25.
10. 测序质量控制联盟对 RNA-seq 的准确性、可重复性和信息含量的全面评估。Nat Biotechnol.2014;32:903-14.
11. Mardis E. 下一代 DNA 测序方法。Annu Rev Genomics Hum Genet.2008;9:387-402.
12. Shendure J, Ji H. 下一代 DNA 测序。Nat Biotechnol.2008;26:1135-45.
13. Mardis E. 下一代测序平台。Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif ).2013;6:287-303.
14. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: 技术可重复性评估及与基因 表达阵列的比较。Genome Res. 2008; 18:1509-17.
15. Schadt EE、Turner S、Kasarskis A. 第三代 测序之窗。Hum Mol Genet.2010;19:R227-40.
16. Eid J、Fehr A、Gray J、Luong K、Lyle J、Otto G 等从单聚合酶分子进行实时 DNA 测序。科学。2009;323:133-8.
17. Hart C, Lipson D, Ozsolak F, Raz T, Steinmann K, Thompson J, et al. Single-molecule sequencing: sequence methods to enable accurate quantitation.Methods Enzymol.
18. Bayley H. Nanopore sequencing: from imagination to reality.Clin Chem.2015;61:25-31.
19. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, et al.Nat Methods.2009;6:377-82.
20. Cao J, Packer J, Ramani V, Cusanovich D, Huynh C, Daza R, et al. 多细胞生物的单细胞转录谱分析。Science.2017;357:661-7.
21. Rosenberg A, Roco C, Muscat R, Kuchina A, Sample P, Yao Z, et al. 利用分裂池条形码对发育中的小鼠大脑和脊髓进行单细胞分析。Science.2018;360:176-82.



23. Rodriques SG, Stickels RR, Goeva A, Martin CA, Murray E, Vanderburg CR, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science*.2019;363:1463-7.
24. Chen J, Suo S, Tam PP, Han JJ, Peng G, Jing N. 利用 geo-seq 对冰冻组织样本进行空间转录组学分析。 *Nat Protoc*.2017;12:566-80.
25. Ke R, Mignardi M, Pacureanu A, Svedlund J, Botling J, Wählby C, et al. 在保存的组织和细胞中进行 RNA 分析的原位测序。 *Nat Methods*.2013;10:857-60.
26. Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Yang JL, Ferrante TC, 高复用亚细胞 RNA 原位测序。 *Science*.2014;343:1360-3.
27. Mercer TR, Gerhardt DJ, Dinger ME, Crawford J, Trapnell C, Jeddelloh JA, et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat Biotechnol*.2011;30:99-104.
28. Heyer EE, Deveson IW, Wooi D, Selinger CL, Lyons RJ, Hayes VM 等. 使用靶向 RNA 测序诊断融合基因。 *Nat Commun*.2019;10:1388.
29. Soverini S, Abruzzese E, Bocchia M, Bonifacio M, Galimberti S, Gozzini A 等. 用于慢性髓性白血病患者 BCR-ABL1 激酶域突变检测的新一代测序：立场文件。 *J Hematol Oncol*.2019;12:131.
30. Chatterjee A, Ahn A, Rodger EJ, Stockwell PA, Eccles MR. RNA-seq 数据设计与分析指南。 *Methods Mol Biol*. 2018;1783:35-80.
31. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. RNA-seq 数据分析最佳实践调查。 *Genome Biol*.
32. Cock PJ, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. Sanger FASTQ 文件用于质量分数序列的匹配, 以及 Solexa/Illumina FASTQ 变异。 *Nucleic Acids Res*. 2010; 38:1767-71.
33. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ pre-processor. *生物信息学*. 2018;34:i884-90.
34. Patel RK, Jain M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*.2012;7:e30619.
35. DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazeir MD, Williams C, et al. RNA-SeQC: 用于质量控制和流程优化的 RNA-seq 指标。 *生物信息学*. 2012;28:1530-2.
36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *生物信息学*. 2014;30:2114-20.
37. Schmieder R, Edwards R. 元基因组数据集的质量控制和预处理。 *生物信息学*. 2011;27:863-4.
38. Chen Y, Chen Y, Shi C, Huang Z, Zhang Y, Li S, et al. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *Gigascience*.2018;7:1-6.
39. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2 : 在存在插入、删除和基因融合的情况下精确比对转录组。 *Genome Biol*.
40. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: 低内存要求的快速剪接配准器。 *Nat Methods*.2015;12:357-60.
41. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *生物信息学*. 2013;29:15-21.
42. Li H, Durbin R. 利用 Burrows-Wheeler 变换进行快速准确的短读数比对。 *生物信息学*. 2009;25:1754-60.
43. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 短 DNA 序列与人类基因组的超快高效比对。 *Genome Biol*.
44. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, et al. RNA-Seq 的转录本组装和定量揭示了细胞分化过程中的无名转录本和同工酶转换。 *Nat Biotechnol*.2010;28:511-5.
45. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie 使 RNA-seq reads 重建转录组的工作得以改进。 *Nat Biotechnol*.2015;33:290-5.
46. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. *Nat Biotechnol*.2011;29:644-52.

47. Hurgobin B. 使用 SOAP2 进行短读数比对。 *Methods Mol Biol.* 2016;1374:241-52.
48. Robertson G, Schein J, Chiu R, Corbett R, Field M, Jackman SD, et al. *Nat Methods.* 2010;7:909-12.
49. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30:923-30.
50. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq: a python framework to work with high-throughput sequencing data. *生物信息学.* 2015;31:166-9.
51. Roberts A, Pachter L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat Methods.* 2013;10:71-3.
52. Li B, Dewey CN. RSEM: 无论有无参考基因组, 都能从 RNA-Seq 数据中准确量化转录本。 *BMC Bioinform.* 2011;12:323.
53. Anders S, Reyes A, Huber W. 从 RNA-seq 数据中检测外显子的不同用法。 *Genome Res.* 2012; 22:2008-17.
54. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 2016;34:525-7.
55. Patro R, Mount SM, Kingsford C. Sailfish 使用轻量级算法从 RNA-seq 读数中实现无配准同工酶定量。 *Nat Biotechnol.* 2014;32:462-4.
56. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon 提供了快速且可感知偏差的转录本表达量化方法。 *Nat Methods.* 2017;14:417-9.
57. Love MI, Huber W, Anders S. 使用 DESeq2 对 RNA-seq 数据的折叠变化和 分散进行调节性估计。 *Genome Biol.*
58. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *生物信息学》*。 2010;26:139-40.
59. Moon M, Nakai K. 基于集合 L (1)- 规范支持向量机的稳定特征选择用于生物标记物发现。 *BMC Genomics.* 2016;17:1026.
60. Zubovic L, Piazza S, Tebaldi T, Cozzuto L, Palazzo G, Sidarovich V, et al. RNA 测序揭示了小儿骨髓增生异常综合征 的 转录组变化。 *J Hematol Oncol.* 2020;13:135.
61. Oshlack A, Robinson MD, Young MD. 从 RNA-seq 读数到差异 表达结果。 *Genome Biol.*
62. Govindarajan M, Wohlmuth C, Waas M, Bernardini MQ, Kislinger T. High-throughput approaches for precision medicine in high-grade serous ovarian cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13:134.
63. Wu H, Li X, Li H. 基因融合和嵌合 RNA 及其对癌症的影响。 *Genes Dis.* 2019;6:385-90.
64. Reeser JW, Martin D, Miya J, Kautto EA, Lyon E, Zhu E, et al. 实体瘤激酶融合检测的 靶向 RNA 测序测定的验证。 *J Mol Diagn.* 2017;19:682-96.
65. Mercer TR, Clark MB, Crawford J, Brunck ME, Gerhardt DJ, Taft RJ, et al. 使用 RNA CaptureSeq 进行基因发现和定量的靶向测序。 *Nat Protoc.* 2014;9:989-1009.
66. Togni M, Masetti R, Pigazzi M, Astolfi A, Zama D, Indio V, et al. 通过全转录组测序发现小儿细胞遗传学正常急性髓性白血病中的 NUP98-PHF23 融合基因。 *J Hematol Oncol.* 2015;8:69.
67. Veeraraghavan J, Ma J, Hu Y, Wang XS. 乳腺癌的复发性和病理性基因融合: 基因组发现的最新进展及 临床意义。 *乳腺癌研究治疗》*。 2016;158:219-32.
68. Kloosterman WP, Coebergh van den Braak RRJ, Pieterse M, van Roosmalen MJ, Sieuwerts AM, Stangl C, et al. 原发性结肠癌致癌基因融合的系统分析。 *Cancer Res.* 2017;77:3814-22.
69. Sun YM, Chen YQ. 解密非编码 RNA 的原理和创新技术: 从发现和功能预测到临床应用。 *J Hematol Oncol.* 2020;13:109.
70. Zhou X, Zhan L, Huang K, Wang X. circRNAs 在血液恶性肿瘤中的功能和临床意义。 *J Hematol Oncol.* 2020;13:138.
71. Liu Y, Cheng Z, Pang Y, Cui L, Qian T, Quan L, et al. microRNA、circRNA 和长非编码 RNA 在急性髓性白血病中的作用。 *J Hematol Oncol.* 2019;12:51.
72. Xu H, Wang C, Song H, Xu Y, Ji G. 人类结肠癌肝转移中环状RNA的 RNA-Seq 图谱分析及其潜在的生物标记物。 *Mol Cancer.* 2019;18:8.

- SSRs and small RNA-seq SSRs: new approaches in cancer biomarker discovery. Gene. 2015;560:34-43.
74. Zhou FF, Huang R, Jiang J, Zeng XH, Zou SQ. 非核COX2和低HER2表达相关性使结肠癌预后良好. Saudi J Gastroenterol. 2018;24:301-6.
75. Chen RH, Du Y, Han P, Wang HB, Liang FY, Feng GK, et al. ISG15 预测鼻咽癌的不良预后并促进癌症干细胞表型. Oncotarget. 2016;7:16910-22.
76. Liu G, Hou G, Li L, Li Y, Zhou W, Liu L. 潜在的诊断和预后标志物二甲氨基甘氨酸脱氢酶 (DMGDH) 可抑制肝细胞癌在体外和体内的转移. Oncotarget. 2016;7:32607-16.
77. Mei J, Hao L, Liu X, Sun G, Xu R, Wang H, et al. 乳腺癌过氧化物酶表达谱及预后价值的 综合分析. Biomark Res. 2019; 7:16.
78. Wang L, Ge J, Lan Y, Shi Y, Luo Y, Tan Y, et al. 肿瘤突变负荷与弥漫性胶质瘤的不良预后相关. BMC Cancer. 2020;20:213.
79. Jiang T, Shi J, Dong Z, Hou L, Zhao C, Li X, et al. 中国肺鳞状细胞癌的基因组图谱及其与肿瘤突变负荷、PD-L1表达和免疫细胞浸润的相关性. J Hematol Oncol. 2019;12:75.
80. Seo JS, Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee JK, Bleazard T, et al. Genome Res. 2012;22:2109-19.
81. Nakagawa M, Nakatani F, Matsunaga H, Seki T, Endo M, Ogawara Y, et al. DS-1001b 对突变 IDH1 的选择性抑制可改善骨肉瘤的异常组蛋白修饰并削弱肿瘤活性. Oncogene. 2019;38:6835-49.
82. Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, Yourshaw M, Bocsi GT, Camidge DR 等: 基于 DNA 与基于 RNA 的肺癌 MET 外显子 14 跳 ping 事件检测. J Thorac Oncol. 2019;14:737-41.
83. Unruh D, Zewde M, Buss A, Drumm MR, Tran AN, Scholtens DM, et al. 与其他IDH突变癌症相比, IDH突变 胶质瘤的甲基化和转录模式截然不同. Sci Rep. 2019;9:8946.
84. Yu J, Jiang PYZ, Sun H, Zhang X, Jiang Z, Li Y, et al. 生物标志研究》, 2020;8:17。
85. Yang X, Wang J. 急性髓性白血病的精准治疗. J Hematol Oncol. 2018;11:3.
86. Gu R, Yang X, Wei H. 急性 骨髓性白血病的分子图谱与靶向治疗. Biomark Res. 2018;6:32.
87. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. 单细胞RNA-seq突显 原发性胶质母细胞瘤的瘤内异质性. Science. 2014;344:1396-401.
88. Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S 等: 头颈癌原发和转移性肿瘤生态 tems 的单细胞转录组分析. Cell. 2017;171(1611-24):e24.
89. Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C, Escalante LE, Patel AP, Yizhak K, et al. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. 自然》杂志. 2016;539:309-13.
90. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. Cancer Cell. 2015;28:666-76.
91. Best MG, Vancura A, Wurdinger T. 血小板 RNA 作为血液循环中的 " 酵素"。癌症诊断的生物标志物宝库. J Thromb Haemost. 2017;15:1295-306.
92. Zhu L, Li J, Gong Y, Wu Q, Tan S, Sun D, et al. 外泌体tRNA衍生的小RNA是一种很有前景的癌症诊断生物标记物. Mol Cancer. 2019;18:74.
93. Nie Y, Jiao Y, Li Y, Li W. lncRNA ACVR2B-As1在肝癌中的临床意义及预后价值研究. Biomed Res Int. 2019;2019:4602371.
94. Gong W, Yang L, Wang Y, Xian J, Qiu F, Liu L, et al. 生存相关lncRNA 格局分析确定了LINC01537在能量 代谢和肺癌进展中黄褐斑的 28 Int J Mol Sci.
95. Hang D, Zhou J, Qin N, Zhou W, Ma H, Jin G, et al. 一种新型血浆环状RNA circFARSA 是非小细胞肺癌的潜在生物标记物. Cancer Med. 2018;7:2783-91.

96. Hua Q, Jin M, Mi B, Xu F, Li T, Zhao L, et al. LINC01123 (一种 c-Myc 激活的长非编码 RNA) 通过 miR-199a-5p/c-Myc 轴促进非小细胞肺癌的增殖和有氧糖酵解。 *J Hematol Oncol*.2019;12:91.
97. Wang Z, Qin B. 长非编码RNA CTD-2510F5.4在胃癌中的预后和临床病理学意义胃癌。 2019;22:692-704.
98. Luo T, Zhao J, Lu Z, Bi J, Pang T, Cui H, et al. 弥漫性胃癌中非编码 RNA 的特征及MEF2C-AS1作为新型生物标志物的鉴定。 *Transl Oncol*.2018;11:1080-9.
99. Wang D, Wan X, Zhang Y, Kong Z, Lu Y, Sun X, et al. A novel androgen-reduced prostate-specific lncRNA, PSLNR, inhibits prostate-cancer progression in part by regulating p53-dependent pathway. *Prostate*.2019;79:1362-77.
100. Silva-Fisher JM, Dang HX, White NM, Strand MS, Krasnick BA, Rozycki EB, et al. 长非编码 RNA RAMS11 促进转移性结直肠癌进展。 *Nat Commun*.2020;11:2156.
101. Yamada A, Yu P, Lin W, Okugawa Y, Boland CR, Goel A. A RNA-Sequencing approach for the identification of novel long non-coding RNA biomarkers in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2018;8:575.
102. Bo H, Fan L, Li J, Liu Z, Zhang S, Shi L, et al. lncRNA AFAP1-AS1 的高表达促进结肠癌的进展并预测不良预后。 *J Cancer*.2018;9:4677-83.
103. Chen Q, Hu L, Chen K. 基于缺氧相关lncRNA特征构建提名图以改善胃癌预后预测 *Front Genet*.2020;11:570325.
104. Guo YZ, Sun HH, Wang XT, Wang MT. 转录组分析揭示头颈部鳞状细胞癌核糖体生物发生和表皮差异相关的关键lncRNAs *浙江大学学报 (自然科学版)*.2018;19:674-88.
105. Yao Y, Chen X, Lu S, Zhou C, Xu G, Yan Z, et al. 循环长非编码RNA作为预测头颈部鳞状细胞癌的生物标志物。 *细胞生理生化*. 2018;50:1429-40.
106. Gong X, Siprashvili Z, Eminaga O, Shen Z, Sato Y, Kume H, et al. Novel lincRNA SLINKY is a prognostic biomarker in kidney cancer. *Oncotarget*.2017;8:18657-69.
107. James AR、Schroeder MP、Neumann M、Bastian L、Eckert C、Gökbuget N 等。长非编码 RNA 定义 B 细胞前体的主要亚型 sort 急性淋巴细胞白血病。 *J Hematol Oncol*.2019;12:8.
108. Li S, Ma Y, Tan Y, Ma X, Zhao M, Chen B, et al. 急性早幼粒细胞白血病环状RNA的谱分析和功能分析及其在全反式维甲酸治疗过程中的动态调控。 *细胞死亡 Dis*.2018;9:651.
109. Guo M, Peng Y, Gao A, Du C, Herman JG. 癌症的表观遗传异质性。 *Biomark Res*. 2019; 7:23.
110. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH 2nd, Treacy D, Trombetta JJ, et al. 通过单细胞 RNA-seq 分析转移性黑色素瘤的多细胞生态系统。 *Science*.2016;352:189-96.
111. Maynard A, McCoach CE, Rotow JK, Harris L, Haderk F, Kerr DL, et al. 单细胞 RNA 测序揭示的人类肺癌治疗诱导演化。 *细胞*. 2020;182(1232–51):e22.
112. Nam AS, Chaligne R, Landau DA. 通过单细胞多组学整合癌症进化的遗传和非遗传决定因素。 *Nat Rev Genet*.2020.
113. Berglund E, Maaskola J, Schultz N, Friedrich S, Marklund M, Bergenstråhle J, et al. 前列腺癌转录组空间图揭示了未探索的异质性景观。 *Nat Commun*.2018;9:2419.
114. Bakken TE, Hodge RD, Miller JA, Yao Z, Nguyen TN, Aeversmann B, et al. 匹配的 皮肤细胞类型的单核和单细胞转录组比较。 *PLoS ONE*.2018;13:e0209648.
115. Selewa A, Dohn R, Eckart H, Lozano S, Xie B, Gauchat E, et al. 心肌细胞分化过程中高通量单细胞和单核转 scriptomes 的系统比较。 *Sci Rep*. 2020;10:1535.
116. Lim ZF, Ma PC. 肺癌靶向治疗中肿瘤异质性和耐药机制的新认识。 *J Hematol Oncol*.2019;12:134.
117. Wang Q, Guldner IH, Golomb SM, Sun L, Harris JA, Lu X, et al. 单细胞图谱引导的组合免疫疗法治疗快速发展的 CDK4/6 抑制剂耐药的 HER2 阳性乳腺癌。 *Nat Commun*.2019;10:3817.

Hong 等人. *J Hematol Oncol*. (2020) 13:166.

118. Hongo H, Kato S, Reddy A, Nishimura K, Niwa N, Hongo H, et al. **单细胞RNA-seq分析揭示了铂抗性基因 COX7B和替代标记物 CD63。** *Cancer Med*.2018;7:6193-204.

119. Debruyne DN, Dries R, Sengupta S, Seruggia D, Gao Y, Sharma B, et al. **BORIS 促进抗 癌细胞中染色质的调控相互作用。** *自然》杂志*。2019;572:676-80.

120. Sharma A、Cao EY、Kumar V、Zhang X、Leong HS、Wong AML 等：**病人原代细胞的纵向单细胞 RNA 测序揭示了药物诱导的干细胞分层不忠。** *Nat Commun*.2018;9:4931.

121. Shao F, Huang M, Meng F, Huang Q. Circular RNA Signature predicts gemcitabine resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma.*Front Pharmacol*.2018;9:584.

122. Wang WT, Han C, Sun YM, Chen TQ, Chen YQ.**癌症耐药性和靶向药物开发中的非编码 RNA。** *J Hematol Oncol*.2019;12:55.

123. Shang J, Chen WM, Liu S, Wang ZH, Wei TN, Chen ZZ, et al. CircPAN3 通过 调控自噬促进急性髓性白血病的耐药性。 *Leuk Res*. 2019;85:106198.

124. Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, Muramatsu H, Okuno T, Wang X, et al. **青少年 B 细胞前体淋巴细胞白血病。** *J Clin Oncol*.2016;34:3451-9.

125. Pallarès V, Unzueta U, Falgàs A, Sánchez-García L, Serna N, Gallardo A, et al. **细胞可阻止急性髓性白血病的扩散。** *J Hematol Oncol*.2020;13:36.

126. Ding Y, Gao H, Zhang Y, Li Y, Vasdev N, Gao Y, et al. **金刚烷内酯选择性消融急性髓性白血病干细胞和祖细胞。** *J Hematol Oncol*.2016;9:93.

127. Bill M, Papaioannou D, Karunasiri M, Kohlschmidt J, Pepe F, Walker CJ, et al. **急性髓性白血病干细胞中长非编码 RNA 的表达和功能相关性。白血病。** 2019;33:2169-82.

128. Fan X, Rudensky AY.**组织驻留淋巴细胞的特征。** *细胞》*。2016;164:1198-211.

129. Burrell RA, Swanton C. **重新评估癌症进化中的克隆优势** tion.*Trends Cancer*.2016;2:263-76.

130. Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R, et al. **单细胞转录组学揭示了免疫细胞中表达和剪接的双峰性。** *自然》*。2013;498:236-40.

131. Pan Y, Lu F, Fei Q, Yu X, Xiong P, Yu X, et al. **单细胞RNA测序揭示了抗CD47靶向胰腺癌诱导的肿瘤浸润免疫细胞的区系重塑。** *J Hematol Oncol*.2019;12:124.

132. Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, et al. **使用纳升液滴对单个细胞进行高并行全基因组表达谱分析。** *Cell*.2015;161:1202-14.

133. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, et al. **乳腺肿瘤 微环境中多种免疫表型的单细胞图谱。** *Cell*.2018;174:1293-308.

134. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, Guo H, Zhang Y, Guo X, et al. **单细胞测序揭示肝癌中浸润T细胞的分布。** *Cell*.2017;169:1342-56.

135. Cunha LD, Yang M, Carter R, Guy C, Harris L, Crawford JC, et al. **髓样细胞中与 LC3 相关的吞噬作用促进了肿瘤免疫 耐受。** *Cell*.2018;175:429-41.

136. van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth li MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-cell RNA-seq reveals AML hierarchies related b disease progression and immunity.*Cell*.2019;176:1265-81.

137. Ren X, Zhong G, Zhang Q, Zhang L, Sun Y, Zhang Z.**基于配体-受体介导的自组装的单细胞RNA测序数据重构细胞空间组织。** *细胞研究》*，2020;30:763-78。

138. Wculek SK、Malanchi I.**中性粒细胞支持引发转移的乳腺癌细胞在肺部定植。** *自然》*。2015;528:413-7.

139. Coffelt SB、Wellenstein MD、de Visser KE。**癌症中的中性粒细胞：不再中立。** *Nat Rev Cancer*.2016;16:431-46.

140. Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, Moon EK, Garfall AL, Rao AS,

et al. **早期人类肺癌中具有抗原递呈细胞特征的肿瘤相关中性粒细胞亚群的起源和作用。** *Cancer Cell*.2016;30:120-35.

141. Massara M, Bonavita O, Savino B, Caronni N, Mollica Poeta V, Sironi M, et al. ACKR2 在造血前体中是中性粒细胞释放和抗转移活性的检查点。 *Nat Commun.*2018;9:676.
142. Ponzetta A, Carriero R, Carnevale S, Barbagallo M, Molgora M, Peruchini C, et al. 中性粒细胞驱动非常规 T 细胞介导对小鼠肉瘤和特定人类肿瘤的抵抗。 *Cell.*2019;178(346–60):e24.
143. Janiszewska M, Tabassum DP, Castaño Z, Cristea S, Yamamoto KN, Kingston NL, et al. Subclonal cooperation drives metastasis by modulating local and systemic immune microenvironments. *Nat Cell Biol.* 2019;21:879-88.
144. Rath J, Bajwa G, Carreres B, Hoyer E, Gruber I, Martínez-Paniagua M, et al. 单细胞转录组学确定了 TCR- 和 CD8αβ- 工程化人 CD4 T 细胞抗肿瘤功能的多种通路。 2020;6:eaaaz7809.
145. Nirschl CJ, Suárez-Fariñas M, Izar B, Prakadan S, Dannenfels R, Tirosh I 等人 肿瘤微环境中依赖于 IFN $\gamma$  的组织免疫稳态被共同利用。 *Cell.*2017;170(127–41):e15.
146. Wang D, Lin J, Yang X, Long J, Bai Y, Yang X, et al. PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗胃肠道恶性肿瘤的联合方案。 *J Hematol Oncol.*2019;12:42.
147. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM.免疫检查点阻断：癌症治疗的通用方法。 *Cancer Cell.*2015;27:450-61.
148. Zhao Z, Zheng L, Chen W, Weng W, Song J, Ji J. 癌症免疫疗法的传递策略：最新进展与未来展望。 *J Hematol Oncol.*2019;12:126.
149. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. 癌症免疫疗法的原发性、适应性和获得性抗药性。 *细胞*。 2017;168:707-23.
150. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ.联合癌症免疫疗法和新的免疫调节靶点。 *Nat Rev Drug Discov.*2015;14:561-84.
151. Yi M, Yu S, Qin S, Liu Q, Xu H, Zhao W, et al. 肠道微生物组调节免疫检查点抑制剂的疗效。 *J Hematol Oncol.*2018;11:47.
152. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. 黑色素瘤患者对 CTLA-4 阻断剂临床反应的遗传学基础。 *N Engl J Med.*2014;371:2189-99.
153. Li Z, Song W, Rubinstein M, Liu D.癌症免疫疗法 的最新进展：2018 中国癌症免疫疗法北京研讨会的全面回顾与展望。 *J Hematol Oncol.*2018;11:142.
154. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD 等：PD-1 阻断剂在错配修复缺陷肿瘤中的应用。 *N Engl J Med.*2015;372:2509-20.
155. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM.指导癌症治疗中免疫检查点阻断的机制驱动生物标记物。 *Nat Rev Cancer.*2016;16:275-87.
156. Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, et al. T 细胞功能障碍和排斥的特征预测癌症免疫治疗反应。 *Nat Med.*2018;24:1550-8.
157. Sehgal K, Portell A, Ivanova E, Lizotte P, Mahadevan N, Greene J 等：动态单细胞 RNA 测序识别 PD-1 阻断后的免疫治疗顽固细胞。 *J Clin Invest.*2020。 <https://doi.org/10.1172/JCI135038>。
158. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, Savova V, Zemmour D, Saatioglu HD, et al. 人类和小鼠肺癌的单细胞转录组学揭示了跨个体和物种的保守髓系群体。 *Immunity.*2019;50:1317-34.
159. Zhang L, Li Z, Skrzypczynska KM, Fang Q, Zhang W, O'Brien SA, et al. Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer. *细胞*。 2020;181:442-59.
160. Katzenelenbogen Y, Sheban F, Yalin A, Yofe I, Svetlichnyy D, Jaitin DA 等人. scRNA-Seq 和细胞内蛋白活性耦合揭示了 TREM2 在癌症中的免疫抑制作用。 *细胞*。 2020;182:872-85.
161. Jiang T, Shi T, Zhang H, Hu J, Song Y, Wei J, et al. 肿瘤新基因：从基础研究到临床应用。 *J Hematol Oncol.*2019;12:93.
162. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK 等：克隆新抗原激发 T 细胞免疫反应和对免疫检查点阻断的敏感性。 *Science.*2016;351:1463-9.



164. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al.自然》杂志。2017;547:217-21.
165. Nathanson T, Ahuja A, Rubinsteyn A, Aksoy BA, Hellmann MD, Miao D, et al. Somatic mutations and neoepitope homology in melanomas treated with CTLA-4 blockade.Cancer Immunol Res. 2017;5:84-91.
166. Safonov A, Jiang T, Bianchini G, Györfy B, Karn T, Hatzis C, et al. Immune gene expression is associated with genomic aberrations in breast cancer.Cancer Res. 2017;77:3317-24.
167. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori JI, Sato M, Anraku M, et al. Prediction and prioritization of neoantigens: integration of RNA sequencing data with whole-exome sequencing.Cancer Sci. 2017;108:170-7.
168. Nejo T, Matsushita H, Karasaki T, Nomura M, Saito K, Tanaka S, et al. Longitudinal multiomics揭示的胶质瘤新抗原表达减少可能是一种免疫逃避机制。Cancer Immunol Res. 2019;7:1148-61.
169. Lv JW, Zheng ZQ, Wang ZX, Zhou GQ, Chen L, Mao YP, et al. 泛癌症基因组分析揭示了14种实体瘤类型的肿瘤褪黑激素微环境的预后和免疫原性特征。J Pineal Res. 2019;66:e12557.
170. Linxweiler M, Kuo F, Katabi N, Lee M, Nadeem Z, Dalin MG, et al. 侵袭性唾液腺癌的免疫微环境和新抗原景观因亚型而异。Clin Cancer Res. 2020;26:2859-70.
171. Kim S, Kim HS, Kim E, Lee MG, Shin EC, Paik S 等. Neopepsee : 利用序列和 氨基酸免疫原性信息准确预测新抗原的基因组水平。Ann Oncol.2018;29:1030-6.
172. Wang TY, Wang L, Alam SK, Hoepfner LH, Yang R. ScanNeo: identifying indel-derived neoantigens using RNA-Seq data.Bioinformatics.2019;35:4159-61.
173. Zhang Z, Zhou C, Tang L, Gong Y, Wei Z, Zhang G, et al. ASNEO: Identification of personalized alternative splicing based neoantigens with RNA-seq. Aging (Albany NY).2020;12:14633-48.
174. Yang H, Sun L, Guan A, Yin H, Liu M, Mao X, et al.Cancer Immunol Immunother.https:// doi.org/10.1007/s00262-020-02711-8.
175. Lu YC, Zheng Z, Robbins PF, Tran E, Prickett TD, Gartner JJ, et al. 一种识别新抗原特异性 细胞受体的高效单细胞RNA-seq方法。Mol Ther.2018;26:379-89.
176. Engström P, Steijger T, Sipos B, Grant G, Kahles A, Rätsch G, et al.Nat Methods.2013;10:1185-91.
177. Sharon D, Tilgner H, Grubert F, Snyder M. A single-molecule longread survey of the human transcriptome.Nat Biotechnol.2013;31:1009-14.
178. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR 等. 三个新一代测序平台的故事: Ion Torrent、Pacific Biosciences 和 Illumina MiSeq 测序仪的比较。BMC Genomics.2012;13:341.
179. Tilgner H, Grubert F, Sharon D, Snyder MP.定义个人、等位基因特异性性和单分子长读数转录组。Proc Natl Acad Sci USA.2014;111:9869-74.
180. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA 测序: 青少年时期。Nat Rev Genet.2019;20:631-56.
181. Antipov D, Korobeynikov A, McLean J, Pevzner P. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads.Bioinformatics.2016;32:1009-15.
182. Boluki S, Zamani Dadaneh S, Qian X, Dougherty E. 有缺失值的最优聚类 .BMC Bioinform.2019;20:321.
183. Hicks S, Townes F, Teng M, Irizarry R. 单细胞 RNA 测序实验中的缺失数据和技术变异。生物统计学。2018;19:562-78.
184. Hou W, Ji Z, Ji H, Hicks S.单细胞 RNA 测序估算方法的系统评估。Genome biol.2020;21:218.
185. Song F, Chan G, Wei Y.允许批次效应校正的有效单细胞 RNA 序列实验的灵活实验设计。Nat Commun.2020;11:3274.

186. Buenrostro J, Giresi P, Zaba L, Chang H, Greenleaf W. 移植原生染色质以快速灵敏地分析开放染色质、DNA 结合蛋白和核小体位置的表观基因组。 *Nat Meth- ods*.2013;10:1213-8.
187. Yang C, Ma L, Xiao D, Ying Z, Jiang X, Lin Y. Sparassis latifolia 的 ATAC-Seq 和 RNA-Seq 整合鉴定了光诱导 初生质形成的关键基因。 *Int J Mol Sci*.
188. Wu X, Yang Y, Zhong C, Guo Y, Wei T, Li S, et al. *Epinephelus coioides*. *Int J Mol Sci*.
189. Simonis M, Kooren J, de Laat W. 对基于 3C 的 DNA 相互作用捕捉方法的评估。 *Nat Methods*.2007;4:895-901.
190. Lieberman-Aiden E, van Berkum N, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A 等人 长程相互作用的综合图谱揭示了人类基因组的折叠原理。 *科学*. 2009;326:289-93.
191. Mifsud B, Tavares-Cadete F, Young A, Sugar R, Schoenfelder S, Ferreira L, et al. 利用高 分辨率捕获 Hi-C 绘制人体细胞长程启动子接触图。 *Nat Genet*.2015;47:598-606.
192. Crane E, Bian Q, McCord R, Lajoie B, Wheeler B, Ralston E, et al. 在剂量补偿过程中, X 染色体拓扑结构的重塑是由康氏硬度蛋白驱动的。 *自然*》。 2015;523:240-4.
193. Chen H, Seaman L, Liu S, Ried T, Rajapakse I. Chromosome conformation and gene expression patterns differ in human fibro- blasts grown in spheroids versus monolayers. *Nucleus*.2017;8:383-91.
194. Vara C, Paytuví-Gallart A, Cuartero Y, Le Dily F, García F, Salvà-Castro J, et al. 与精子发生过程中的转录活动相关。 *Cell Rep*. 2019;28(352-67):e9.
195. Zeng C, Huang W, Li Y, Weng H. Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting. *J Hematol Oncol*.2020;13:117.
196. Jenjaroenpun P, Wongsurawat T, Wadley T, Wassenaar T, Liu J, Dai Q, et al. 序列。 *Nucleic Acids Res*. 2020. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa6.20>.
197. Parker M, Knop K, Sherwood A, Schurch N, Mackinnon K, Gould P, et al. Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of Arabidopsis mRNA processing and mA modification. *eLife*.2020;9.
198. Zhang S, Li R, Zhang L, Chen S, Xie M, Yang L, et al. *Nucleic Acids Res*. 2020;48:7700-11.
199. Pan X, Zhang H, Xu D, Chen J, Chen W, Gan S, et al. *Int J Biol Sci*. 2020;16:3149-62.
200. Li Y, Chen C, Chen J, Lai Y, Wang S, Jiang S, et al. 单细胞分析揭示了肿瘤引流 淋巴结的免疫调节和代谢转换。 *肿瘤免疫学*》。 2020;9:1830513.
201. Giladi A, Cohen M, Medaglia C, Baran Y, Li B, Zada M, et al. *Nat Biotechnol*.2020;38:629-37.
202. Caruso F, Garofano L, D'Angelo F, Yu K, Tang F, Yuan J 等: 胶质瘤中单细胞分辨率的肿瘤-宿主相互作用图谱。 *GigaScience*.2020;9.
203. Jaitin D, Weiner A, Yofe I, Lara-Astiaso D, Keren-Shaul H, David E, et al. *Cell*.2016;167:1883-96.
204. Datlinger P, Rendeiro A, Schmidl C, Krausgruber T, Traxler P, Klughammer J, et al. *Nat Methods*.2017;14:297-301.
205. Genga R, Kernfeld E, Parsi K, Parsons T, Ziller M, Maehr R. 基于单细胞 RNA 测序的 CRISPRi 筛选解决了 早期人类内胚层发育的分子驱动因素。 *Cell Rep*. 2019;27:708-18.
206. Qiu Q, Hu P, Qiu X, Govek K, Cámara P, Wu H. 利用 scNT-seq 在单细胞中进行大规模并行和时间分辨 RNA 测序。 *Nat Meth- ods*.2020;17:991-1001.
207. McFarland J, Paoletta B, Warren A, Geiger-Schuller K, Shibue T, Rothberg M, et al. *Nat commun*.2020;11:4296.
208. Sun W, Dong H, Balaz M, Slyper M, Drokhlyansky E, Colletuori G, et al. snRNA-seq 揭示了调控肿瘤发生的脂肪细胞亚群。 *自然*》。 2020;587:98-102.

## 出版商说明

施普林格-自然》杂志对出版 地图和机构隶属关系中的管辖权主张保持中立。

准备好提交您的研究报告了吗? 选择 BMC 并从中获益:

- 快速、便捷的在线提交
- 由您所在领域经验丰富的研究人员进行全面的同行评审
- 接受后迅速出版
- 支持研究数据, 包括大型复杂数据类型
- 金牌开放存取, 促进更广泛的合作和更多的引用
- 最大限度地提高研究成果的知名度: 每年网站浏览量超过 1 亿次

在 BMC, 研究始终在进行中。了解更多信息



[biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)