



华中农业大学  
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

## 研究生学位论文开题报告

研 究 生： 石梦威

学 号： 2018304110160

学 院： 生命科学技术学院

专 业： 发育生物学

学位级别： 博士

学位类型： 学术型

研究方向： 癌症基因组学

课题名称： 结直肠癌的性别差异机制研究

导 师： 陈振夏 教授

指导小组： 张 勇 教授

高 歌 教授

李川昀 教授

顾正龙 教授

华中农业大学研究生院制

2020 年 5 月 22 日

# 目录

摘要 .....	- 1 -
Abstract.....	- 2 -
1. 立论依据 .....	- 3 -
1.1 研究问题的由来 .....	- 3 -
1.2 国内外研究现状分析 .....	- 3 -
1.3 研究的目的和意义 .....	- 11 -
2 研究内容 .....	- 11 -
3 材料、方法和技术路线 .....	- 13 -
3.1 实验材料 .....	- 13 -
3.2 实验方法 .....	- 14 -
3.3 技术路线 .....	- 17 -
3.4 可能的问题和应对措施 .....	- 18 -
4 工作基础和已有进展 .....	- 18 -
4.1 工作基础 .....	- 18 -
4.2 工作进展 .....	- 21 -
5 计划研究进度 .....	- 22 -
6 预期目标 .....	- 23 -
7 创新之处 .....	- 23 -
8 参考文献 .....	- 24 -
9 经费预算 .....	- 29 -

## 摘要

很多疾病在不同性别上存在症状表现、患病率和发病年龄上的明显差异。目前认为，造成这种差异的主要原因是性别间免疫系统中不同免疫细胞的数量以及活性不同。癌症也属于性别上有差异的疾病之一。结直肠癌就是一种性别相关的癌症，男性的发病率明显高于女性。同时，有大量研究表明，炎症反应在癌症发生发展过程中有着重要作用，比如患有炎症性肠病的人，患结直肠癌的概率更高。基于性别对免疫细胞和炎症对癌症的影响，结直肠癌的性别差异可能就是由不同性别间肿瘤微环境中的免疫细胞的差异造成的。本研究使用 AOM/DSS 炎癌转化小鼠模型模拟炎症性肠病导致结直肠癌的过程，在小鼠肿瘤发生的几个关键时间点进行取样，使用单细胞测序对整个癌症发生过程进行谱系追踪，同时分析性别间肿瘤微环境中的各种免疫细胞对癌症的影响，以此研究癌症中性别差异的原理和炎症过程在肿瘤发展中的作用。

**关键词：**炎癌转化；结直肠癌；性别差异；免疫；谱系追踪；

## Abstract

Many diseases have obvious differences in symptom manifestations, prevalence and age of onset between different genders. It is currently believed that the main reason for this difference is the difference in the number and activity of different immune cells in the immune system between the sexes. Cancer is also a kind of sex-differentiated disease. Colorectal cancer is a gender-related cancer. The incidence of men is significantly higher than that of women. Simultaneously, a large number of studies have shown that the inflammatory response plays an important role in the development of cancer. For example, people with inflammatory bowel disease have a higher probability of developing colorectal cancer. Based on the effects of gender on immune cells and inflammation on cancer, we speculate that the gender differences in cancer may be caused by differences in immune cells in the tumor microenvironment between different genders. In this study, the AOM / DSS inflammatory cancer transformed mouse model was used to simulate the process of inflammatory bowel disease leading to colorectal cancer. Sampling was performed at a critical time point of mouse tumor development. Single cell sequencing was used to trace the entire cancer development process. At the same time, the differences in the effects of various immune cells of different genders in the tumor microenvironment on cancer development are analyzed to study the principles of gender differences in cancer and the role of inflammatory processes in tumor development.

**Key Words:** inflammation-cancer transformation; Colorectal cancer; Gender difference; immunity; lineage tracing;

## 1. 立论依据

### 1.1 研究问题的由来

男性和女性在疾病的症状表现、患病率和发病年龄等特征上往往存在显著差异。其中最常报道的性别差异疾病包括有，自身免疫疾病，传染性感染以及癌症。很多疾病中性别差异的研究发现，性染色体基因以及性激素会导致不同性别间免疫细胞的数量以及活性有差异，这种免疫系统上的差异正是疾病在性别上出现差异的主要原因。同时大量的研究表明，癌症中常常会伴随着炎症反应(Mantovani et al 2008)，并在肿瘤发展的各个阶段，包括产生、增殖以及恶化转移，都起到了非常重要的作用(Grivennikov et al 2010)。目前，对炎症诱导癌症发生的机制一直是癌症研究的热点。其中结直肠癌就是一种和炎症反应紧密相关的癌症，同时受性别的影响也很大，在男性中的发生率明显高于女性。联系性别对炎症反应中免疫细胞的影响，我们推测，这种性别的差异可能是由于不同性别间，炎症免疫细胞在癌症过程中作用的差异造成的。在单细胞谱系追踪技术出现后，我们得以能够追踪癌症细胞中各细胞组成以及不同细胞的发展轨迹，并借此来确认整个炎症诱导过程中癌症细胞以及炎症免疫细胞的状态以及互相作用，方便我们对他们在性别中的差异进行比较。对癌症中性别差异的研究能帮助理解炎症在肿瘤发生发展中的作用，为癌症的治疗提供有效指导，并有助于临床中不同性别癌症的诊断筛查。

### 1.2 国内外研究现状分析

#### 1.2.1 性别对免疫的影响

许多的疾病对男性与女性的影响并不相同。许多疾病在发生后存在着病理生理学、临床表现以及治疗上的性别差异。一些自身免疫疾病，包括系统性红斑狼疮和甲状腺疾病，在发病率上具有明显的性别差异，女性患病的概率比男性高很多(Mohammad et al 2018)。在癌症中，性别同样是影响肿瘤发生以及肿瘤预后的重要因素，在绝大多数的癌症中，男性的患病率都要高于女性(Cook et al 2011)。在性别上

差异巨大的疾病还有传染性疾病(Sue 2017)和心理疾病。关于造成其中差异的原因, 猜测有很多。目前, 研究工作者认为造成这些偏倚的主要原因是性别对免疫系统的影响。免疫系统的性别差异导致男性和女性对自身免疫疾病、恶性肿瘤和传染性疾病的敏感性不同。男性和女性对外源和自身抗原的免疫反应有所区别, 通常而言女性比男性具有更强的先天性和适应性免疫反应, 这会让女性可以更好地抵抗病原体的攻击, 但也让女性对炎症以及自身免疫性疾病的敏感性增加。在先天免疫反应中, 很多途径的相关基因表达量在女性中明显更高。例如 TLR 途径, TLR7 是先天免疫与适应性免疫的桥梁, 在病原体识别以及先天免疫激活中其重要作用。TLR7 基因位于 X 染色体上, 当 TLR7 逃避了 X 染色体失活时, 女性中的 TLR7 表达水平就会高于男性(Cook et al 2011), 而 TLR7 过高会导致 IFN- $\alpha$  过表达, TLR 途径的失调是系统性红斑狼疮的发病因素之一。除了 X 染色体上基因的原因, 有一些先天免疫基因的启动子上具有雌激素或者雄激素反应元件, 这让性别类固醇可以直接引起一定的免疫反应(Hannah et al 2008)。性别还影响着先天免疫细胞的细胞因子和趋化因子的产生。在男性中, 激活的 TLR9 诱导产生的 IL-10 (白细胞介素 10) 水平比女性高, 而且程度与雄激素水平呈正相关。在脂多糖刺激下, 男性的外周血单核细胞会表达更多种类的 TNF (肿瘤坏死因子)(Asai et al 2001), 中性粒细胞产生的 TLR4 和 TNF 水平也更高(Aomatsu et al 2013)。不同性别间, 先天免疫细胞的数量和活性也有差异。男性拥有更多的 NK 细胞数量, 而女性的中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬活性则更高(Spitzer 1999)。在适应性免疫中, 女性的 CD4+ T 细胞数量比男性多, 而男性则拥有更高的 CD8+ T 细胞频率(Lee et al 1996)。另外有文章通过转录组分析发现女性的细胞毒性 T 细胞活性更高, 而且, 女性 T 细胞中一半的激活基因在启动子中都有雌激素反应元件存在(Hewagama et al 2009)。性别间影响免疫的因素很多, 包括性染色体上的相关基因以及性激素的影响。例如, 雌二醇会影响免疫系统的多个方面, 本身会在各种淋巴细胞和巨噬细胞中表达, 而雄激素通常表现为抑制免疫细胞活性。目前, 对于性别影响免疫系统的具体机制还有很多疑问, 相信对这些问题的解答能为疾病的治疗提供更多的帮助。

### 1.2.2 炎症微环境与结直肠癌

机体的先天免疫系统在面对刺激、损伤或者感染时会发生炎症反应，用以移除有害刺激或病原体及促进组织修复，这是一种局部保护性反应(Aggarwal et al. 2006) 炎症反应根据持续时间的不同可分为急性炎症和慢性炎症。急性炎症是身体对损伤因子发生的自然防御，反应迅速，过程短暂，通常在短时间内消退。在致炎因子侵入人体时，触发急性的炎症反应，帮助身体抵抗感染，但是如果致炎因子一直无法清除，免疫系统会继续募集白细胞和化学信使来延长炎症反应过程，这就是慢性炎症。慢性炎症是由持续存在的致炎因子引起的，持续时间长，且一般无明显症状，在炎症反应一段时间后白细胞组成会发生变化，巨噬细胞和淋巴细胞开始取代中性粒细胞，持续释放活性氧(ROS)以及各种炎性细胞因子、生长因子等物质，从而对周围的组织细胞造成损伤。在流行病学研究中，很多疾病都与慢性炎症相关，如慢性呼吸系统疾病，心脏病、关节炎和癌症等(Pahwa and Jialal 2019)。

关于炎症与肿瘤之间的关系的研究，最早是由 Rudolf Virchow 进行的。Rudolf Virchow 在 1863 年描述了炎症在癌症发展中的作用。他观察到肿瘤组织中有大量淋巴细胞浸润，提出肿瘤起源于炎症部位(Balkwill and Mantovani 2001)，然而该发现在当时并没有引起重视。直到近 20 年，炎症在癌症中的作用才慢慢被人意识到，随后陆续有学者报道炎症与癌症的关系。2005 年，Barry J. Marshall 和 J. Robin Warren 发现幽门螺杆菌感染会增加患胃癌几率(Warren 2006)，并因此获得当年的诺贝尔生理和医学奖。2009 年，Harald zur Hausen 证实了人乳头瘤病毒能引发宫颈癌，并借此开发了预防性疫苗(zur Hausen 2009)，这项发现让他获得了 2008 年诺贝尔生理和医学奖。除此之外，慢性乙型肝炎病毒感染也被证实与肝癌相关。除了病毒感染引发的炎症外，机体自身免疫性疾病，比如炎症性肠炎同样也会增加结直肠癌的患病几率。基于肿瘤微环境中存在的大量炎症细胞因子，Hanahan D 在原本肿瘤的六大特征上，又将炎症归为癌症的第八大生物学特征(Hanahan and Weinberg 2011)。

结直肠癌(CRC)是世界上最常见的癌症之一。在 2018 年，全球结直肠癌新发患者超过 180 万，在所有癌症中排第三位，死亡近 90 万，仅次于肺癌(Feng et al 2019)。结直肠癌就是与炎症非常相关的一种肿瘤，患有炎症性肠病的人的结直肠癌风险要

比普通人高很多，并且结直肠癌的几种动物模型也都是利用肠道炎症来促使肿瘤产生的。在已报道的研究中，TNF 和 IL-9 等细胞因子在炎症性肠病诱发的结直肠癌(CAC)中起着核心作用，可以激活 NF- $\kappa$ B 和 STAT3，NF- $\kappa$ B 激活后会产生大量活性氧(ROS)诱导 DNA 损伤，促进肠上皮细胞的增殖和抗凋亡能力(Vlahopoulos et al 2015)，而活化的 STAT3 会上调很多细胞周期相关蛋白表达，抗凋亡蛋白和血管生长因子基因的表达，对肿瘤的增殖抗凋亡和侵袭迁移都有着重要作用(Liang et al 2013)。另外，陆续发现其他细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-22 等，也在肿瘤发生中发挥作用。整个结直肠癌中炎症细胞与炎症因子的作用网络如图 1 所示。在肿瘤发生阶段，众多免疫细胞募集，释放出各种炎症因子诱导细胞发生突变，共同完成癌症发生。在肿瘤发生的早期，细胞因子的作用会一定程度上抑制癌症的进展，比如 IL-15 和 IL-21 的细胞因子可以增强 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞的毒性反应，GM-CSF（粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子）会激活巨噬细胞以及树突状细胞，IL-17F 会抑制血管生成，TGF- $\beta$ （转化生长因子  $\beta$ ）会阻止癌细胞的生长和扩散。而与此同时，另一些细胞因子，如 IL-6 和 TGF- $\beta$  等，又具有着抑制免疫的功能可以帮助肿瘤逃避免疫，促进肿瘤进一步发展。这些炎症细胞释放的细胞因子在癌症的早期既促进肿瘤的增殖发展，也在一定程度上发挥着免疫的功能清除肿瘤细胞。当结直肠癌进一步发展后，成熟的肿瘤细胞可能已经发展出适应性，能够抵抗特定细胞因子的损害。这时候，许多的细胞因子都可以通过促进增殖，抑制凋亡，促进血管生成，以及促进上皮向间充质转化（如 TGF- $\beta$ ，可以上调该转化过程的关键诱导因子 N-cadherin）来促进肿瘤的进一步发展(West et al 2015)。



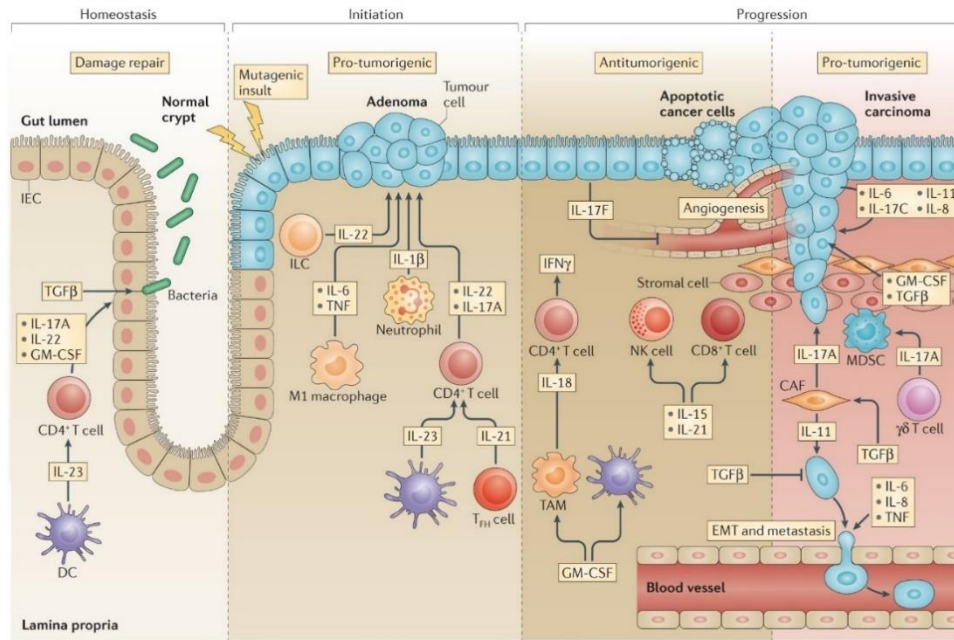


图 1 结直肠癌中细胞因子网络(West et al 2015)

Fig. 1 Cytokine network in colorectal cancer (West et al 2015)

在结直肠癌中，炎症细胞以及其释放的各种细胞因子都对肿瘤的发展命运有着巨大的作用。这也导致慢性炎症导致的结直肠癌(CAC)与非炎症诱导的结直肠癌在肿瘤发展过程并不相同。在肿瘤的发展过程中，有两个基因突变非常的重要，一个是 *TP53*，另一个是 *APC*。如图，在非炎症诱导的结直肠癌中，一般是 *APC* 基因首先发生突变，使细胞极性丧失，细菌入侵，产生促炎细胞因子，并伴随着一定的肿瘤抑制副炎症，随后发展成为早期腺癌。早期腺癌继续发展，一般过程中伴随着 *KRAS* 和 *TP53* 的突变，最后发展成为结直肠癌，*TP53* 突变一般发生在这个过程的晚期。而在炎症诱导的结直肠癌中，*TP53* 会在早期发生突变，并造成 *NF-κB* 激活时间的延长，使炎症反应增强。接着由于上皮细胞屏障功能障碍，肠道中的细菌入侵，炎症反应进一步加强，炎性环境中产生的 ROS 不断造成 DNA 损伤，最终导致 *APC* 的突变，让细胞进一步发展成肿瘤(Lasry et al 2016)。

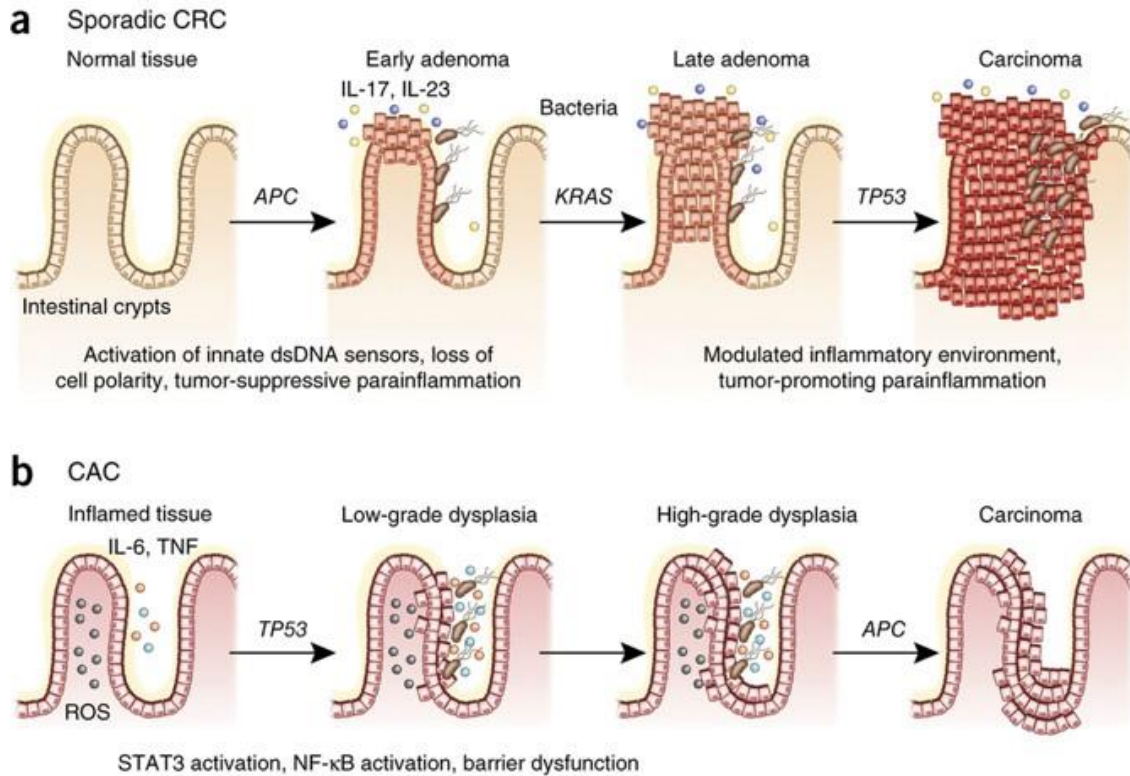


图 2 散发性结直肠癌与炎症相关结直肠癌的区别(Lasry et al 2016)

Fig. 2 Difference between sporadic CRC and CAC (Lasry et al 2016)

总之，肿瘤微环境中的各种炎症介质对肿瘤的发生发展以及转移都有着相当重要的作用，炎性微环境对肿瘤的影响已成为科研工作者们的研究重点。近年来，随着研究工作的深入，各种炎症因子对肿瘤的影响也慢慢得到解答，但是炎症相关免疫细胞与肿瘤的相互作用依然是一个复杂的过程，难以描述癌症过程中各种细胞在其中受到的影响和作用。

### 1.2.3 性别对结直肠癌的影响

结直肠癌是一种受性别影响很大的肿瘤，其中男性的发生率明显高于女性。而且随着年龄的增加，这种趋势越明显，然后继续增加时，这种趋势就会降低，在 2012-2014 年英国的调查中显示，在 45 岁以上的成年人中，男性的发病率明显高于女性，在 70 - 74 岁时差距最大，女性和男性的比率为 1.7 : 1，在 74 岁之后差距越来越低 (White et al 2018)。在结直肠癌中，近端结直肠癌比远端的结直肠癌更具侵袭性，虽然男性的发生率更高，但是女性患近端直肠癌的比例高于男性。有研究发现女性的

基因组甲基化程度更高，具有微卫星不稳定性，而且发现 *BRAF* 更容易在女性中发生突变，以及女性的 CpG 岛甲基化高(Kim et al 2015)，这些因素都可能是女性的近端直肠癌比例更高的原因。当然，目前对结直肠癌中的性别差异的原因依然还知之甚少，具体是哪些因素在里面起着主要作用还犹未可知。联系炎症相关免疫细胞在结直肠癌中的重要作用以及免疫细胞在性别上的差异，我个人猜测，这种差别极有可能是因为免疫细胞的差别导致的，现在还需要对这个猜测进行进一步的验证。相信对结直肠癌性别差异分子机制的研究必然有助于对结直肠癌发生发展机制以及肿瘤微环境中各种免疫细胞作用的理解，帮助结直肠癌治疗靶点的发现和肿瘤的治疗。

#### 1.2.4 炎症诱导小鼠模型

癌症小鼠模型对于研究癌症机制具有着重要的意义。目前炎症诱导癌症的小鼠模型主要是 AOM/DSS 炎症诱导结直肠癌小鼠模型，该方法简单，成癌率高。炎症性肠病是结直肠癌发病的重要原因，多数结直肠癌与炎症性肠病相关(Wang et al 2018)，目前关于炎症性肠病到结直肠癌的演变过程的机制研究一直是研究的热点。诱变剂氧化偶氮甲烷(AOM)是一种致癌物，可以诱导 DNA 中的 G 到 A 的突变。致炎剂葡聚糖硫酸钠(DSS)是一种肝素样多糖，会对结肠上皮造成损害，诱发结肠炎(Parang et al 2016)。AOM / DSS 小鼠模型是利用 AOM 对 DNA 的损伤后，持续的炎症性肠病来诱导肿瘤发生的。模型的肿瘤位置多出现在结肠的远端，而且病理特征与人类的结直肠癌相似(Snider et al 2016)，很大程度上能反应人类炎症性肠病到结直肠癌的发展过程，所以 AOM/DSS 炎症诱导结直肠癌的小鼠模型是目前炎症转化研究的主要模型。

#### 1.2.5 癌症的谱系追踪技术

对细胞的谱系追踪是为了研究一个细胞生长分裂形成组织器官的整个过程的研究方法。最早在 19 世纪初，John Sulston 利用光写显微镜观察到无脊椎动物早起的卵裂发生，这就是细胞谱系追踪的起源(Lemaire 2009)。谱系追踪的方法包括有，直接观察、染色标记、遗传标记、测序识别的基因组标记。2007 年，有学者提出了癌症干细胞的假设，认为癌症和其他组织器官一样，是由少数干细胞分化而来。但是

当时，由于癌症本身存在的异质性，对癌症的谱系追踪非常的困难，无法定位到癌症干细胞(Kelly et al 2007)。直到 2012 年，在 *Nature* 和 *Science* 上发表了三篇文章，分别利用药物驱动的荧光标记系统对小鼠的癌症进行谱系追踪，发现了鳞状皮肤癌，胶质母细胞瘤和小肠腺癌中的癌症干细胞(Driessens et al 2012; Chen et al 2012; Schepers et al 2012)。之后，其他癌症中的谱系追踪研究也陆续出现，虽然方法略有不同，但是原理依然是利用的荧光标记。虽然对癌症的谱系追踪已经可以成功追溯到癌症干细胞。但是传统的谱系追踪技术局限于组织形态学技术，无法检测到细胞内部的变化。而且，早期可用的遗传标记较少，对细胞的分类比较粗糙。癌症细胞的谱系追踪一直没能进一步发展，直到两个关键技术出现。一个是 CRISPR 技术，另一个是单细胞测序技术，单细胞测序技术可以在单细胞水平对癌症进行测序，成功解决了癌症自身的异质性，让谱系追踪成为可能。2016 年，Jay Shendure 和 Alexander F. Schier 一起在 *Science* 上发表了利用 CRISPR 和单细胞测序进行谱系追踪的文章。他们利用 Cas 9 对序列的靶序列的定向切割和非同源末端的修复能力，向细胞内敲入 Cas 9 靶向的 barcode 序列，在其中导入 Cas 9 和对应的 guide RNA，这样，在细胞分裂时，Cas 9 不断为 barcode 引入插入和缺失，从而让 barcode 在每次分裂时累积突变，然后根据这些突变信息构建谱系树(McKenna et al 2016)。近来又有学者证明可以用某些表观遗传标记和 mtDNA 作为谱系追踪的标记。单细胞测序谱系追踪技术出现后，癌症的谱系追踪研究也重新火热起来，因为单细胞不仅仅可以对癌症的过程进行追踪，还能对癌症周围的细胞进行检测。之后陆续有文章利用该技术进行癌症的研究。例如，2018 年，有文章对人结直肠癌的原发瘤、淋巴转移和远端转移区域分别采样，并对结直肠癌的发生和转移过程进行了谱系追踪并描述基因组变异情况(Bian et al 2018)。2019 年，有学者对肝癌细胞进行谱系追踪，分析揭示了肝癌和淋巴细胞在肿瘤微环境、肝淋巴结和腹水中的不同谱系和迁移关系(Zhang et al 2019)。目前，单细胞测序进行癌症细胞的谱系追踪已经渐渐成为热点，对于癌症的发展中各种细胞间相互作用的探索必将为癌症的治疗带来新的发展。

## 1.3 研究的目的和意义

男性和女性在疾病的症状表现、患病率和发病年龄等特征上往往存在显著差异。这些差异目前正受到越来越多的重视，比如 NIH 最近发布政策以确保临床前考虑性别差异。目前的研究发现这种疾病上的性别差异可能就是由免疫系统在性别上的差异导致的。而很多癌症也是一种性别上有差异的疾病，例如结直肠癌在男性中发病率要比女性高。癌症中常常伴随着炎症反应，是肿瘤重要的特征之一。炎症反应在肿瘤发展的各个阶段，包括产生、增殖以及恶化转移，都起到了非常重要的作用。结直肠癌就是与炎症联系紧密的癌症之一，患有炎症性肠病的人有更高的结直肠癌风险。基于炎症对癌症的重要作用，我们推测在结直肠癌中的性别差异很可能就是免疫系统上的性别差异导致的。本研究旨在利用最新的单细胞测序技术对不同性别的炎症诱导的结直肠癌进行谱系追踪，详细探讨各种炎症细胞与肿瘤细胞之间的发育轨迹和相互作用，探索性别对炎症诱导癌症过程的影响，帮助理解性别在癌症中的差异以及炎症反应在癌症中的作用。为癌症的治疗提供新的治疗靶点和生物标志物，同时帮助临床上对性别癌症的诊断筛查。

## 2 研究内容

本研究计划对不同性别的炎癌转化小鼠的转化过程进行谱系追踪以及比较肿瘤微环境中的免疫细胞组成和互相作用的差异来探究，性别如何影响结直肠癌的发生发展，以及炎症对结直肠癌的作用过程，期待能实际筛选出性别相关的免疫因子以及癌症发生过程中的重要标记。进行的研究内容主要分为四个阶段，构建炎癌转化小鼠模型并取样测序，鉴定新的早期癌症的特异分子标记，探索癌症的性别差异机制，以及对分析结果进行实验验证。

- (1) 构建 AOM/DSS 小鼠模型，于第 0、1、4、7、10 周最后，随机选择四只雌鼠和四只雄鼠，取直肠末端进行 SMART-seq2 和单细胞 10× genomics 测序，并对该部位进行石蜡切片观察病理特征，同时保存部分组织样品用来做后续实验验证。
- (2) 对测序数据进行生物信息学分析。首先对测到的单细胞数据进行下游处理，

使用 harmony 将两种类型的数据结合，进行将未处理以及聚类，并对细胞类型注释。之后利用 mtDNA 作为 barcode 对结直肠癌的发生过程进行谱系追踪。然后对结直肠癌病变前和早期病变的样本，根据细胞相似度进行网络构建，选择其中与肿瘤形成最相关的细胞类型，对癌症细胞以及该细胞类型进行差异表达，选择其中仅在癌细胞中显著上调的基因作为早期癌症的特异标记分子。

- (3) 对不同性别间的癌症谱系进行比较，探究其中发展差异的地方，并对差异明显的阶段的癌细胞进行基因表达量的差异分析，获得差异的基因列表，比较两者的功能差异。注释好细胞簇后，选择其中的炎症免疫细胞，计算各个样本中免疫细胞的组成。比较不同性别间，免疫细胞在肿瘤发展中的组成的变化。同时，利用受配体分析构建各细胞簇间的相互作用情况，根据组成变化与想租作用情况，选择出变化明显且对癌症具有较强相互作用的细胞簇作为候选的导致肿瘤性别差异的免疫细胞类型。计算各个样本中的各个细胞簇中炎症细胞释放的细胞因子和趋化因子的表达量，将该表达量的变化与肿瘤性别差异的关键免疫细胞的数量变化进行比较，得到对应的细胞因子和趋化因子，这些细胞因子和趋化因子可能就是实际造成肿瘤性别差异的关键因子，同时也对肿瘤的发展期关键作用。
- (4) 用 qPCR 对癌变前组织、早期癌变组织以及晚期癌变组织进行特异标记分子的检测，看是否能够在癌变组织中特异的检测到该基因的表达。然后利用组织切片进行组织病理学检测，检测分析中得到的免疫细胞是否真的在癌症发展过程中募集情况不同。再利用得到的细胞因子或趋化因子在同性别小鼠上进行补给实验，确认其在肿瘤发生过程中的作用。

## 3 材料、方法和技术路线

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 实验动物

C57BL /6 品系实验小鼠。

#### 3.1.2 主要分析软件

本研究用到的分析软件见表 1。

表 1 主要分析软件及数据库

Table 1 Main analysis software and database

名称 name	来源 source	备注 remark
DropUtils	(Dobin et al 2013)	<a href="https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/DropletUtils.html">https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/DropletUtils.html</a>
FeatureCounts	(Liao et al 2014)	<a href="https://bioinformaticshome.com/tools/rna-seq/descriptions/FeatureCounts.html">https://bioinformaticshome.com/tools/rna-seq/descriptions/FeatureCounts.html</a>
dropUtils	(Lun et al 2019)	<a href="https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/DropletUtils.html">https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/DropletUtils.html</a>
scrn	(Lun et al 2016)	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scrn.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scrn.html</a>
Scrublet	(Wolock et al 2019)	<a href="https://github.com/AllonKleinLab/scrublet">https://github.com/AllonKleinLab/scrublet</a>
harmony	(Korsunsky et al 2019)	<a href="https://github.com/immunogenomics/harmony">https://github.com/immunogenomics/harmony</a>
celltalker		<a href="https://arc85.github.io/celltalker/">https://arc85.github.io/celltalker/</a>
STRING	(Szklarczyk et al 2019)	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>
Mouse reference genome	gencode	<a href="https://www.gencodegenes.org/mouse/">https://www.gencodegenes.org/mouse/</a>

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌转化模型

建立 AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌转化模型。使用健康、生命力旺盛、周龄 6 周左右的 C57BL/6 小鼠，雌雄各 20 只。每只小鼠在第一周时皮下注射 10 mg/kg 的 AOM。之后给予正常饮用水一周。与第二周时将饮用水替换为 2.5% 浓度的 DDS 一周，第三周与第四周时继续给予正常饮用水。之后第五周与第八周给予 2.5% 浓度 DDS，其他时间给予正常饮用水，培养 10 周后，小鼠炎癌转化完毕。培养过程中，第 0、1、4、7、10 周最后，随机选择雌雄各四只小鼠，在结肠末端取样测序。

### 3.2.2 scRNA-seq 下游数据分析

单细胞数据的预处理是略微修改了的 2019 年 *Cell* 上的方法(Zhang et al 2019)，其中双峰细胞去除的部分使用了相关软件替代，read 归一化过程使用了 *scran* 的包进行，避免手动计算出错。对于 10× genomics 的单细胞数据使用 Cell Ranger 单细胞软件套件进行比对和定量。首先是单细胞数据的质量控制，利用 R 包 *dropUtils* 中的 *emptyDrops* 函数评估 barcode 相关的 RNA 含量与背景 RNA 的差异， $p < 0.01$  的进一步质控，下一步质控的三个指标分别是：（1）每个细胞的总 UMI 计数数量；（2）测到的基因数量；（3）线粒体基因的比例。如果细胞大小或者检测到的基因数量低于所有细胞的中位数  $- 3 \times$  绝对中位差，则过滤掉。如果线粒体基因计数的比例高于所有细胞的中位数  $- 3 \times$  绝对中位差，也过滤掉。接着需要鉴定双峰细胞，这里使用 *Scrublet* 进行鉴定，去掉双峰细胞后保留的细胞用于下游分析。使用 R 的 *scran* 包进行归一化计算，然后使用  $\log_2$  转换。

对于 SMART-seq2 数据，采用 STAR 将 read 比对到注释文件上，然后使用 *featureCounts* 进行 read 统计。

然后是降维以及无监督聚类，我们使用 *harmony* 算法，将 10× genomics 和 SMART-seq2 结合在一起。接着利用 *scran* 包中的 *TrendVar* 函数拟合了  $\log_2$  转化后的归一化计数的方差与每个基因的丰度之间的趋势。接着，使用 *decomposeVar* 函数



来计算每个基因的生物学变异(Lun et al 2016)。根据基因的生物学变异对基因进行排序，在同一个平台中，生物学变异大于 0 且 FDR 小于 0.01 的基因用作信息基因。通过 `scrn` 包中实现的 `MultiBatchPCA` 函数使用此类信息基因计算出 PCA 矩阵。之后将 PCA 矩阵输入 `Harmony` 包中的 `HarmonyMatrix` 函数中。利用 `Harmony` 矫正平台的差异。然后使用 `louvain` 算法进行社区检测，进行聚类。

### 3.2.3 基于线粒体突变的谱系追踪

利用 2019 年 *Cell* 的方法(Ludwig et al 2019)，对 SMART-seq 数据进行线粒体的谱系追踪。对于 10× genomics 数据，使用 `VarTrix` 计算替代等位基因频率和线粒体染色体位置的覆盖率。将线粒体基因组中等位基因频率小于等于 0.1 的去掉。将所有碱基连成一条长的 DNA 序列，按照位置比对所有序列来构建多重比对。接着为其中每个细胞的线粒体 DNA 构建多重比对，删去所有相同的序列，然后使用 `RAxML` 构建系统发育树来估计样本内的细胞谱系。

### 3.2.4 细胞簇注释

细胞簇的注释需要根据已知的标记分子来进行，从 `CellMarker` 获得 marker gene，利用 `scrn` 包的 `findMarkers` 函数来测试表达差异，识别簇特异标记基因，然后将识别到的簇特异标记基因与获得的 marker gene 比较，从而识别对应的细胞类型。

### 3.2.5 细胞间配受体的相互作用分析

细胞间的相互作用分析是基于受体和配体的表达进行的。从 `celltalker` 网站获取已经经过注释的配受体列表。只是用至少 5 个细胞且占样本细胞总数 10% 的细胞类型。使用一个细胞簇的配体的平均表达水平与另一个细胞簇的对应受体的平均水平的乘积来估算这两个特定配体与受体介导的两种细胞的相互作用。为了检测相互作用的统计显著性，对单个细胞簇进行 1000 次的置换检验，用置换后结果大于真实相互作用的数量估计 p 值，然后使用 Bonferroni 校正 p 值。然后对相互作用强度进行阈值限制，高于某个阈值且 p 值小于 0.01 的就是存在相互作用，该阈值设置需要

根据数据的实际情况来设置。SMART-seq2 的数据会显著高于 10× genomics 的单细胞数据。

### 3.2.6 单细胞转录组相关性网络构建

通过评估每对细胞类型相似以及每种代表细胞类型的连接标记基因来构建单细胞转录组相关性网络。首先对每对细胞类型进行转录组相似性的相关性计算，作为细胞网络连接的厚度。然后根据差异表达分析，选择其中  $\log_2\text{foldchange}$  大于 1，FDR 小于 0.01 的基因作为每个转录组的标记基因。最后，利用 STRING 数据库中已知的蛋白-蛋白相互作用来连接网络。

### 3.2.7 特异标记分子和性别间免疫细胞差异验证

在癌变前组织、早期癌变组织以及晚期癌变组织中使用 qPCR 对筛选到的特异标记分子进行表达量鉴定。对筛选出的肿瘤性别差异的免疫细胞在对应的组织中进行免疫细胞染色观察，验证其性别间组成的实际差异。利用慢病毒基因转染法在实验中对同性的 AOM/DSS 小鼠的结直肠部位进行相关细胞因子或趋化因子进行上调表达，比较其中肿瘤发生情况，验证筛选的细胞因子或趋化因子对肿瘤的影响。

### 3.3 技术路线

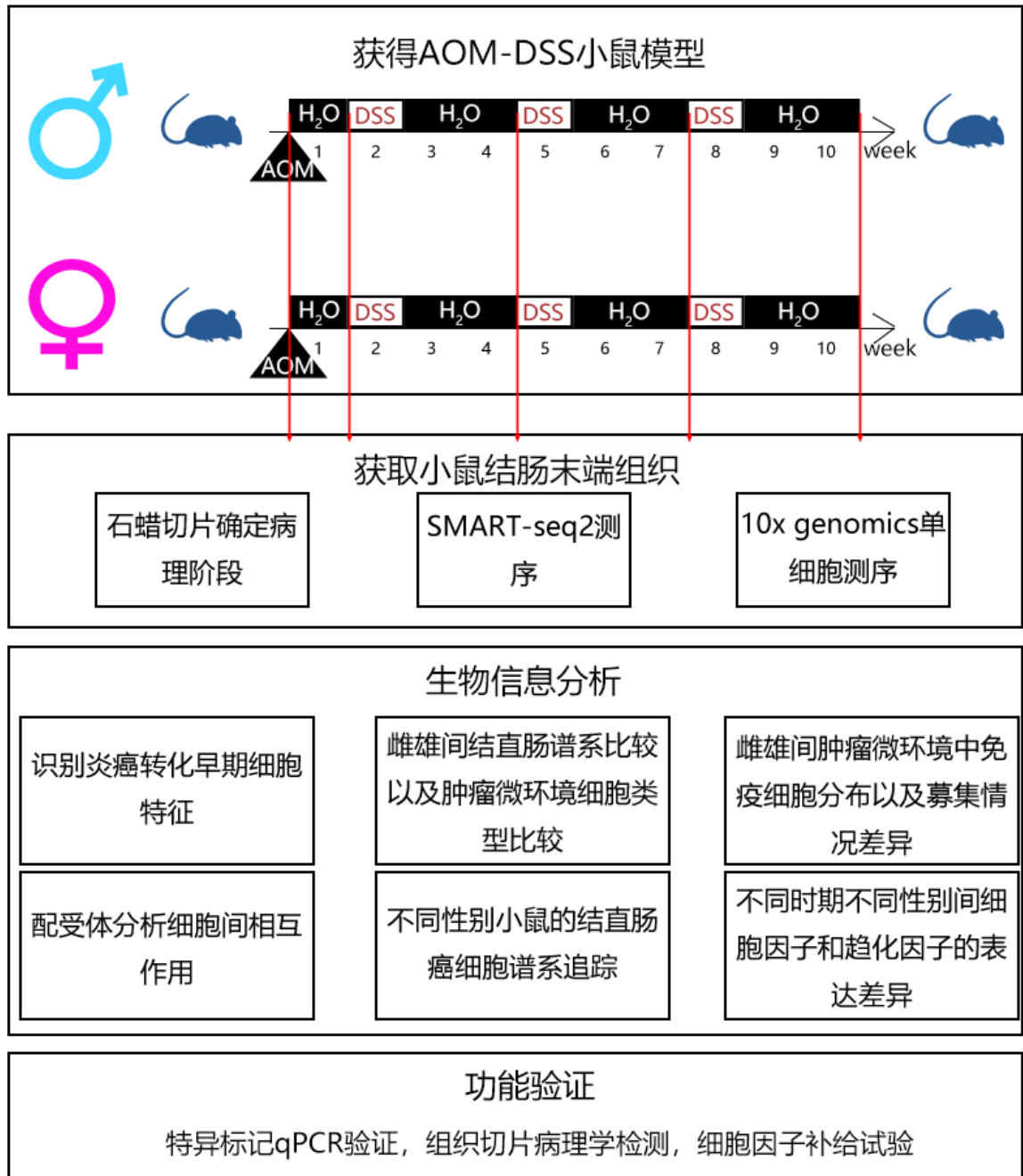


图 3 技术路线图

Fig. 3 Technology pipeline

### 3.4 可能的问题和应对措施

在实验中，可能遇到以下几个问题：

- (1) 在小鼠培养阶段，可能会有小鼠因为意外死亡，所以需要准备多个重复，避免实验组重复不足。
- (2) 在取样阶段，可能出现数据标签错误等问题导致样品混乱，可以在数据分析时对数据进行聚类，查看异常情况，根据聚类情况进行校正分组。如果聚类情况无法很好的校正错误，则将异常的样品去除，避免其对分歧结果造成干扰，为此需要在组中准备多个重复。
- (3) 在数据分析阶段，数据的质量可能有较大差异，需要对整体质量进行严格的控制，并且，对于相对差异大的样本进行单独的质控，提高其可用性。在特异基因的鉴定中，数据聚类时癌症相似的细胞类群可能与癌症混杂在一起，可以查询相应文献，找到该细胞类群的实际分类，并借助其自身的分子特征来进行区分。
- (4) 在实验验证阶段，由于本人主要从事生物信息工作，对于实验技术比较生疏，可能造成实验过程中的各种误差，所以应当与相应的实验室合作，辅助实验部分的完成。

## 4 工作基础和已有进展

### 4.1 工作基础

在之前，本人已经在性别、癌症以及演化发育上开展了大量工作，积累了丰富的癌症分析经验以及性别差异相关背景。

#### 4.1.1 性别相关数据库开发

本人前期开发了性别相关基因数据库 SAGD(Shi et al 2019)，整合了 Expression Atlas、NCBI 的 SRA 和 GEO 数据库中的 RNA-seq 数据集。从中选出可以进行性别

差异分析的数据，最终获得了 2828 个样本的 RNA-seq 数据。分析后得到 21 个物种中的 27793 个雌性偏向基因以及 646043 个雄性偏向基因。其中小鼠的样本总共 276 样本，总共 1698 个性别相关基因。目前，该工作已经，发表在了 *Nucleic Acids Research* 上，本人为该文章的共同一作。该工作积累的大量性别相关基因数据，可以利用其中的性别相关基因，帮助研究小鼠在结直肠癌发展中的性别差异。

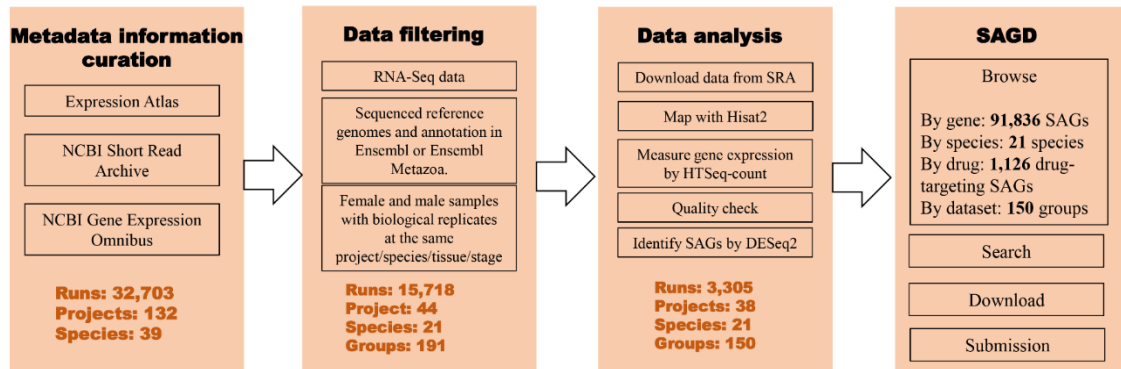


图 4 SAGD 数据收集和分析流程

Fig. 4 the pipeline of data collection and analysis process in SAGD

#### 4.1.2 前列腺癌数据分析

利用 dbGAP 上的公共数据对前列腺癌从原位癌发展成为去势抵抗前列腺癌 (CRPC) 的过程进行分析。过程中发现 CRPC 的 circRNA 都存在显著的分型情况。一种倾向于表达 circRNA，另一种倾向于不表达 circRNA。对前列腺癌的特征变异进行检测之后如图 5，在 *TP53* 基因突变情况下，circRNA 倾向于不表达。在该工作中为我在癌症分析中积累了大量经验。

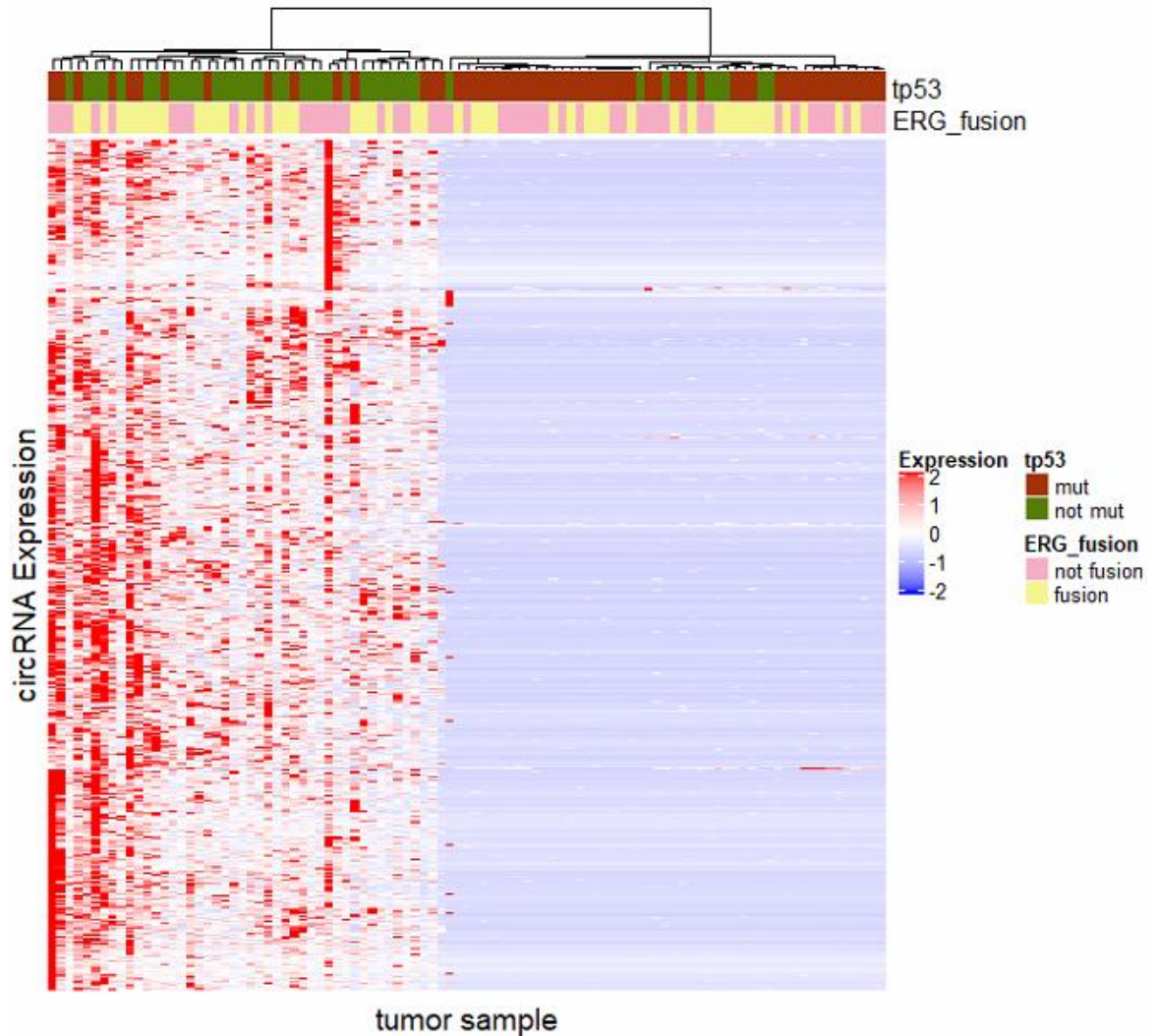


图 5 CRPC 中 circRNA 的表达情况以及 TP53 突变和 ERG 融合在其中的分布

Fig. 5 The expression of circRNA and the distribution of tp53 mutation and ERG fusion in CRPC

### 4.1.3 GenOrigin 数据库开发

本人利用公共数据库的相关信息开发了一个演化方面的基因年龄数据库 (GenOrigin)，该数据库收集了大量的物种间同源基因信息。利用这些同源信息，我们对每个基因的年龄进行的回溯，利用时间尺度的物种树对回溯的节点标记时间。整个过程如图 6 所示。总共收集了 565 个物种并对其年龄进行计算。目前该工作正在投稿 *Nucleic Acids Research*，还在根据编辑的意见进行修改。在 GenOrigin 的工作

中，本人积累了大量演化的知识以及研究技术，为本课题的癌症细胞谱系追踪提供了经验和技术基础。

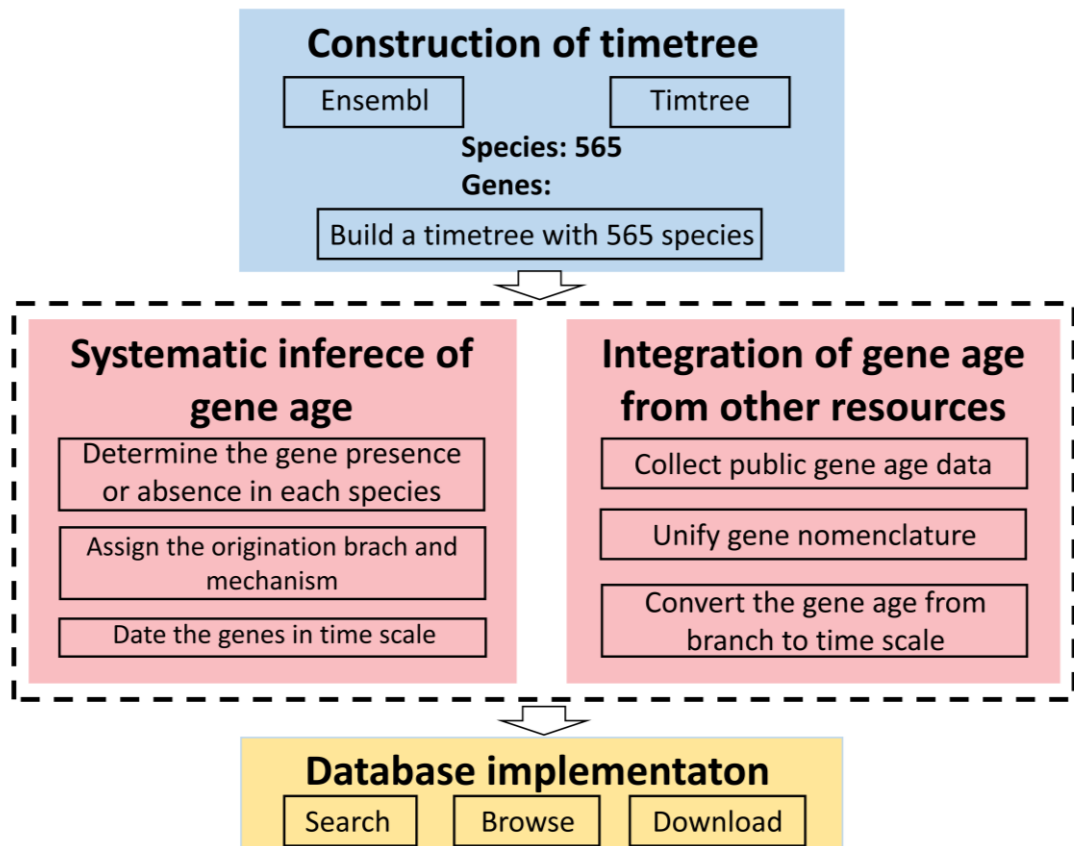


图 6 GenOrigin 数据收集和分析流程

Fig. 6 the pipeline of data collection and analysis process in GenOrigin

## 4.2 工作进展

本实验室已经利用 AOM/DSS 小鼠模型对结直肠癌发展过程中的转录以及表观变化进行了一定的研究。实验中，对 6 周龄的小鼠 C57BL/6 小鼠进行腹腔注射 AOM(10 mg/kg 体重)。在 1、4、7 周时用 2.5%浓度的 DSS 代替饮用水。AOM 注射后，小鼠的体重会缓慢增长，而使用 DSS 处理后，体重会减轻。10 周时，所有小鼠都患上了结直肠癌，其中 2/10 只死亡。在过程中取样测序，获得了该模型小鼠转录组在炎癌转化过程中的转录组变化。将基因根据各阶段的时间表达模式进行分类，总共分为 9 个 cluster(图 7)，其中在整个过程中上调的是 cluster 1、4 和 6，的是 cluster 2、3、7、9。其中 cluster 的功能富集主要和免疫相关，这表示免疫相关基因的变化，确实在结直肠癌发展发生中起到了一定的作用，且这种变化可以在表达的模式上进

行检测。表明更进一步利用单细胞测序对其中免疫细胞的作用进行分析应当是可行的。

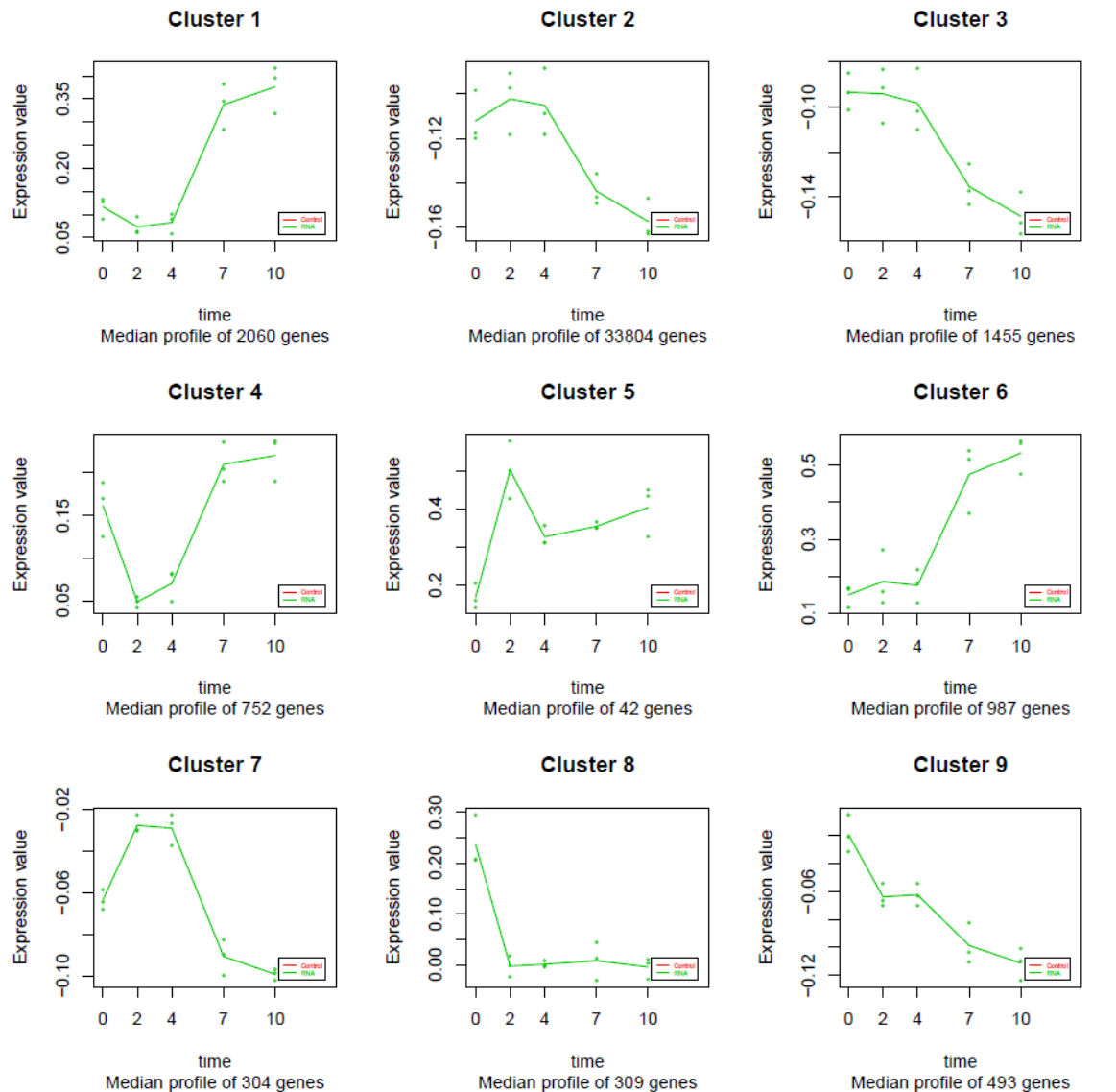


图 7 AOM/DSS 处理期间小鼠的转录组变化模式

Fig. 7 Changes in the transcriptome pattern of mice during AOM / DSS treatment

## 5 计划研究进度

- (1) 2020.05-2020.11 AOM/DSS 小鼠模型构建完毕，对所有小鼠的结肠末端完成取样和测序。
- (2) 2020.11-2021.01 完成单细胞数据的前期处理，对细胞分型注释完毕。
- (3) 2021.01-2021.03 完成癌症与其他细胞类型的网络构建，筛选出对应的特异



细胞特征。

- (4) 2021.03-2021.06 完成对免疫细胞的组成变化追踪，以及受配体网络分析，筛选出可能的肿瘤性别差异的关键细胞因子和免疫细胞类型。
- (5) 2021.06-2022.02 实验验证筛选得到的细胞特征和性别相关细胞因子。
- (6) 2022.02-2022.06 完善实验结果，整理数据，撰写 sci 文章进行投稿。

## 6 预期目标

- (1) 成功建立炎癌转化过程的结直肠癌细胞追踪图谱。
- (2) 找到雌雄间癌症细胞图谱发展上的差异。
- (3) 构建免疫细胞对结直肠癌相互作用时间上的动态过程。
- (4) 找到雌雄间肿瘤微环境中免疫细胞的分布差异，解释结直肠癌的性别偏倚原因。
- (5) 得到结直肠癌性别偏倚的关键细胞因子。
- (6) 成功获得结直肠癌恶性病变前的关键阶段，并获得对应的细胞特征，帮助癌症诊断。

## 7 创新之处

- (1) 单细胞出现后，利用单细胞进行的癌症谱系追踪是目前的热点，目前还没有人进行结直肠癌发生过程的谱系追踪。
- (2) 结直肠癌在性别上有显著的差异，而这种差异可能就是性别间免疫细胞数量以及活性上的差异导致的，本研究利用 AOM/DSS 炎癌转化小鼠模型对雌雄小鼠的癌症发展过程进行追踪比较，将性别，免疫和癌症串联起来，以此探索性别的结直肠癌发生发展的影响，确定其中发挥主要作用的免疫细胞类型和细胞因子。

## 8 参考文献

1. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*, 2006, 72: 1605-1621.
2. Aomatsu M, Kato T, Kasahara E, Kitagawa S. Gender difference in tumor necrosis factor-alpha production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441: 220-225.
3. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*, 2001, 16: 340-343.
4. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, 357: 539-545.
5. Bian S, Hou Y, Zhou X, Li X, Yong J, Wang Y, Wang W, Yan J, Hu B, Guo H, Wang J, Gao S, Mao Y, Dong J, Zhu P, Xiu D, Yan L, Wen L, Qiao J, Tang F, et al. Single-cell multiomics sequencing and analyses of human colorectal cancer. *Science*, 2018, 362: 1060-1063.
6. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 2012, 488: 522-526.
7. Cook MB, McGlynn KA, Devesa SS, Freedman ND, Anderson WF. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20: 1629-1637.
8. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*, 2012, 488: 527-530.
9. Feng RM, Zong YN, Cao SM, Xu RH. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer Commun (Lond)*, 2019,

- 39: 22.
10. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, 140: 883-899.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
12. Hannah MF, Bajic VB, Klein SL. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain Behav Immun*, 2008, 22: 503-516.
13. Hewagama A, Patel D, Yarlagadda S, Strickland FM, Richardson BC. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun*, 2009, 10: 509-516.
14. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007, 317: 337.
15. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 5167-5175.
16. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, Baglaenko Y, Brenner M, Loh PR, Raychaudhuri S. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods*, 2019, 16: 1289-1296.
17. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*, 2016, 17: 230-240.
18. Lee BW, Yap HK, Chew FT, Quah TC, Prabhakaran K, Chan GS, Wong SC, Seah CC. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood. *Cytometry*, 1996, 26: 8-15.
19. Lemaire P. Unfolding a chordate developmental program, one cell at a time: invariant cell lineages, short-range inductions and evolutionary plasticity in ascidians. *Dev Biol*, 2009, 332: 48-60.
20. Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, Hait NC, Allegood JC, Price MM, Avni D, Takabe K, Kordula T, Milstien S, Spiegel S.

- Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 2013, 23: 107-120.
21. Ludwig LS, Lareau CA, Ulirsch JC, Christian E, Muus C, Li LH, Pelka K, Ge W, Oren Y, Brack A, Law T, Rodman C, Chen JH, Boland GM, Hacohen N, Rozenblatt-Rosen O, Aryee MJ, Buenrostro JD, Regev A, Sankaran VG. Lineage Tracing in Humans Enabled by Mitochondrial Mutations and Single-Cell Genomics. *Cell*, 2019, 176: 1325-1339 e1322.
  22. Lun AT, Bach K, Marioni JC. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts. *Genome Biol*, 2016, 17: 75.
  23. Lun AT, McCarthy DJ, Marioni JC. A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Res*, 2016, 5: 2122.
  24. Lun ATL, Riesenfeld S, Andrews T, Dao TP, Gomes T, participants in the 1st Human Cell Atlas J, Marioni JC. EmptyDrops: distinguishing cells from empty droplets in droplet-based single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol*, 2019, 20: 63.
  25. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, 454: 436-444.
  26. McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA, Horwitz MS, Schier AF, Shendure J. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*, 2016, 353: aaf7907.
  27. Mohammad I, Starskaia I, Nagy T, Guo J, Yarkin E, Vaananen K, Watford WT, Chen Z. Estrogen receptor alpha contributes to T cell-mediated autoimmune inflammation by promoting T cell activation and proliferation. *Sci Signal*, 2018, 11.
  28. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*, 2011, 128: 1668-1675.

29. Pahwa R, Goyal A, Bansal P, Jialal I. 2020. Chronic Inflammation, In: StatPearls.*Treasure Island (FL)*.
30. Parang B, Barrett CW, Williams CS. AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 297-307.
31. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 2012, 337: 730-735.
32. Shi MW, Zhang NA, Shi CP, Liu CJ, Luo ZH, Wang DY, Guo AY, Chen ZX. SAGD: a comprehensive sex-associated gene database from transcriptomes. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D835-D840.
33. Snider AJ, Bialkowska AB, Ghaleb AM, Yang VW, Obeid LM, Hannun YA. Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods Mol Biol*, 2016, 1438: 245-254.
34. Spitzer JA. Gender differences in some host defense mechanisms. *Lupus*, 1999, 8: 380-383.
35. Sue K. The science behind "man flu". *BMJ*, 2017, 359: j5560.
36. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
37. Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N, Agan J, Moschovi M, Critselis E, Adamaki M, Bacopoulou F, Copland JA, Boldogh I, Karin M, Chrousos GP. Dynamic aberrant NF-kappaB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26: 389-403.
38. Wang L, Wang E, Wang Y, Mines R, Xiang K, Sun Z, Zhou G, Chen KY, Rakhilin N, Chao S, Ye G, Wu Z, Yan H, Shen H, Everitt J, Bu P, Shen X. miR-34a is a microRNA safeguard for Citrobacter-induced inflammatory colon

- oncogenesis. *Elife*, 2018, 7.
39. Warren JR. Helicobacter: the ease and difficulty of a new discovery (Nobel lecture). *ChemMedChem*, 2006, 1: 672-685.
  40. West NR, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 615-629.
  41. White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston-Smith N, Crawford C, Seims A. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*, 2018, 18: 906.
  42. Wolock SL, Lopez R, Klein AM. Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in Single-Cell Transcriptomic Data. *Cell Syst*, 2019, 8: 281-291 e289.
  43. Zhang Q, He Y, Luo N, Patel SJ, Han Y, Gao R, Modak M, Carotta S, Haslinger C, Kind D, Peet GW, Zhong G, Lu S, Zhu W, Mao Y, Xiao M, Bergmann M, Hu X, Kerkar SP, Vogt AB, et al. Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 2019, 179: 829-845 e820.
  44. zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48: 5798-5808.

## 9 经费预算

经 费 预 算 *	科 目	预算经费(万元)	备注
	实验材料费	10	小鼠购买以及喂养，和 众多试剂
	测试/化验/加工费	8	两种单细胞测序
	差旅费	2	
	出版/文献/知识产权事务费	3	
	劳务费	2	

指导教师意见：

指导教师签字：

年 月 日

论证小组意见：

论证小组组长签字：

年 月 日

论 证 小 组 成 员	姓 名	职 称	学科（专业）	工作单位	签名

学院（系）意见：

学院（系）（盖章）

年 月 日