

单细胞测序技术在食管癌研究中的应用

吕天琦 曹张磊 蔺元斌 李琳 郑建萍*

(中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 宁波慈溪生物医学工程研究所, 宁波 315300)

摘要 近年来, 单细胞测序技术不断发展, 为破译单个细胞的生物学特征提供了前所未有的机会。该技术能够解决细胞异质性的难题, 以其强大的技术优势正在将肿瘤学研究的精密度和准确度推动到新的高度。食管癌是最具“中国特色”的恶性肿瘤, 具有肿瘤高异质性的特征, 临床上尚缺乏有效的治疗策略。目前, 单细胞测序技术已被广泛应用于食管癌领域的研究, 并取得了丰富的研究成果。该文简要介绍了单细胞测序技术, 系统总结了该技术在食管癌中的应用, 并探讨了食管癌细胞异质性、肿瘤微环境、肿瘤的发生与发展机制以及耐药机制研究的最新进展, 期望能为食管癌的精准医疗提供新思路。

关键词 单细胞测序技术; 食管癌; 异质性; 肿瘤微环境; 精准医疗

The Application of Single-Cell Sequencing Technology in Esophageal Carcinoma

LÜ Tianqi, CAO Zhanglei, LIN Yuanbin, LI Lin, ZHENG Jianping*

(Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Science,
Ningbo Cixi Institute of Biomedical Engineering, Ningbo 315300, China)

Abstract In recent years, the rapid development of single-cell sequencing technologies have provided unprecedented opportunities to decipher the biological characteristics of individual cells. These techniques are able to resolve the difficult problem of cellular heterogeneity, driving the precision and accuracy of oncology to new heights with the powerful technical advantages. Esophageal carcinoma, with highly heterogeneous molecular characteristics, is a unique malignant tumor in China. There is still no effective clinical treatment strategy for esophageal cancer. At present, single-cell technologies have been widely used in esophageal cancer research and achieved favourable results. This review introduces methods of the single-cell sequencing, summarizing and discussing the latest progress in the aspects such as cellular heterogeneity, tumor microenvironment, tumor occurrence and development, and drug resistance mechanism research in esophageal cancer. It is hoped that this paper can provide novel insights into the precision medicine of esophageal cancer.

Keywords single-cell sequencing technology; esophageal carcinoma; heterogeneity; tumor microenvironment; precision medicine

食管癌是最具“中国特色”的恶性肿瘤, 全球食管癌患者约一半在我国。食管癌具有区域高发性和肿瘤高异质性的特点, 预后较差, 治疗后五年

生存率不足20%^[1-2]。根据病理类型的不同, 食管癌主要分为食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma,

收稿日期: 2022-01-24

接受日期: 2022-04-18

中国博士后科学基金(批准号: 2021M690158)和宁波市“3315”创新团队项目(批准号: E00006DL01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18091984088, E-mail: zhengjianping@nimte.ac.cn

Received: January 24, 2022

Accepted: April 18, 2022

This work was supported by the Postdoctoral Science Foundation of China (Grant No.2021M690158) and the “3315 Plan” Innovation Team Project of Ningbo City (Grant No.E00006DL01)

*Corresponding author. Tel: +86-18091984088, E-mail: zhengjianping@nimte.ac.cn

EAC)。在我国约90%的食管癌患者属于ESCC,而欧美国家食管癌患者的病理类型以EAC为主。中西方食管癌患者的肿瘤分子特征差异显著,目前临床上尚无针对我国食管癌患者的特异性生物标志物^[3]。因此,迫切需要提高对食管癌肿瘤细胞异质性分子特征的认识,以助于提高食管癌的精准确诊和个体化治疗水平。

单细胞测序技术是近年来发展迅速的新一代高通量测序技术,一经推出就受到广泛关注。目前,单细胞测序技术已成为揭示细胞分子图谱以及解决传统高通量测序技术无法解决的细胞异质性问题的革命性工具^[4-5],并被广泛应用于癌症、生殖发育、微生物以及植物等研究领域^[6-9]。单细胞测序技术在揭示食管癌肿瘤异质性以及内在致病机制等方面具有十分重要的研究意义,相关的研究成果有助于鉴定食管癌诊断与预后相关的生物标志物以及发现新的治疗靶点。本文总结了单细胞测序技术在食管癌细胞异质性、肿瘤微环境、肿瘤的发生与发展以及治疗耐药分子机制等方面的应用进展,期望能为食管癌的精准确诊与联合治疗策略奠定理论基础。

1 单细胞测序技术简介

近年来,单细胞测序技术不断发展,已经能够实现单个细胞在转录组、基因组和免疫组等水平进行深入分析,这一强大的高通量测序工具对生物医学研究产生了深远的影响和贡献,并将肿瘤分子生

物学研究的精密度和准确度推到了新的高度^[10-14]。与传统的大量样本测序不同,单细胞测序的工作流程通常包括单细胞分离与捕获、单细胞文库制备与测序、数据分析与可视化三个方面(图1)。

1.1 单细胞分离与捕获

从样本中分离和捕获高质量的单个细胞是单细胞测序的第一个关键步骤。目前,已经开发出了多种单细胞分离技术,包括显微操作、荧光激活细胞分选(fluorescent activated cell sorting, FACS)、激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、磁激活细胞分选(magnetically activated cell sorting, MACS)和微流体技术^[14]。其中,显微操作效率低、通量小,对操作人员的技术要求较高,适用于分离珍稀样本的少数细胞,如循环肿瘤细胞(circulating tumour cell, CTC)或生殖细胞^[15]。LCM适用于从福尔马林固定、石蜡包埋或冷冻固定的样本中分离单细胞^[16]。对于FACS、MACS和微流体技术,组织样本通常需要通过机械剪碎并结合酶消化法来将其制备成单细胞悬液。FACS利用荧光标记目标细胞表面标志物并使用光检测器来捕获被标记的细胞,该系统对初始单细胞悬液的细胞数目要求较高,不适用于无法获取足够细胞数目的研究项目^[17]。基于MACS的微孔芯片技术,通过重力、流体等方式将细胞悬液中的单个细胞分离至微孔中,随后用带有条形码的磁珠捕获单细胞,实现了高通量且低成本的单细胞捕获^[18]。基于液滴的微流体技术将单个

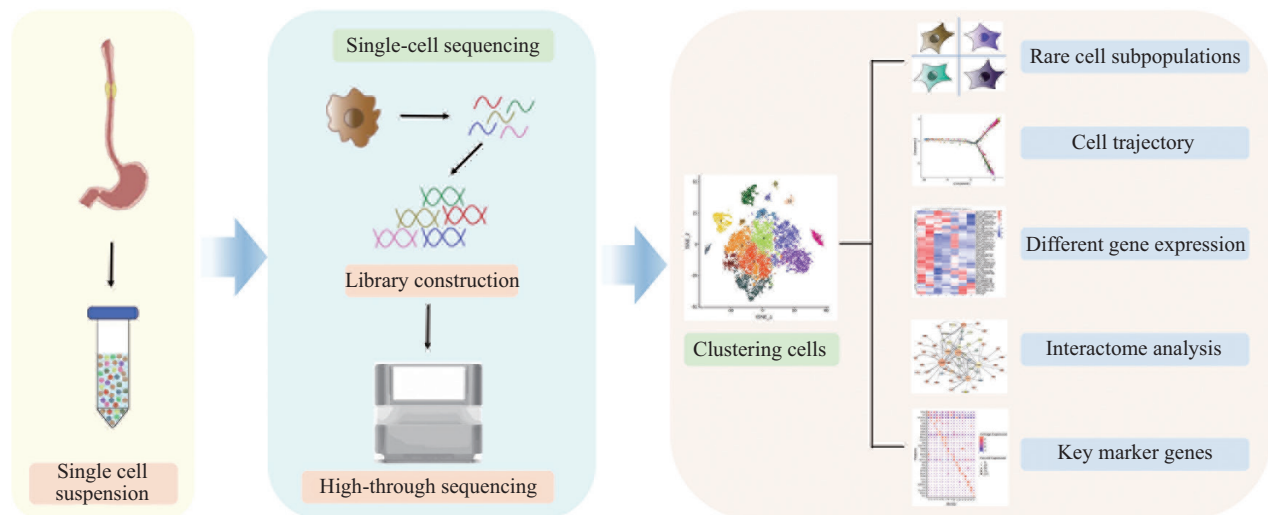


图1 单细胞测序流程简图

Fig.1 Schematic diagram of the single-cell sequencing workflow

细胞、反应试剂等通过微滴生成装置包被在一个“油包水”的乳液滴中,在保证分选效率的同时降低了成本,对于稀有细胞以及成千上万个单细胞均适用^[19]。微流体技术还被广泛应用于从血液中分离并捕获CTC,利用细胞表面标记以及物理特性实现了CTC的自动化富集和分离^[20]。

1.2 单细胞文库制备与测序

2009年, TANG等^[5]首次报道了单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术。此后, scRNA-seq不断发展,其文库制备通常包括3个步骤:反转录、cDNA第二链合成和cDNA扩增^[21]。根据文库制备过程中cDNA扩增方式的不同将scRNA-seq分为全长转录本测序和转录本3'或5'端测序。其中,单细胞全长转录本测序,例如SMART-seq2和SCRBS-seq等,能够在每个细胞中检测到更多的基因数,可以分析等位基因的特异性表达,但细胞通量较低,而且单个细胞的建库成本较高^[22-23]。考虑到scRNA-seq的成本问题,诸如CEL-seq2、STRT-seq、Drop-seq、MARS-seq、Microwell-seq和SCRBS-seq等只对转录本的3'或5'端进行测序,通过在反转录过程中对细胞内的每个mRNA分子使用独特的分子标识符以消除PCR(polymerase chain reaction)偏差,从而大大提高扩增的精确度^[24-26]。

scRNA-seq技术的发展也为单个细胞的T细胞受体测序(single-cell T cell receptor sequencing, scTCR-seq)开辟了新的道路^[27]。通过scRNA-seq与配对scTCR-seq联合分析,可以重建参与免疫反应的T细胞克隆,从而理解T细胞的异质性和可塑性,并探究适应性免疫的相关机制^[28-29]。在单细胞基因组测序(single-cell DNA sequencing, scDNA-seq)方面,对单个细胞极微量DNA的高保真和无偏的全基因组扩增是限制该技术发展的主要因素。目前,单细胞全基因组扩增方法主要包括简并寡核苷酸引物PCR(degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、多次退火循环扩增技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)以及通过转座子嵌入的线性扩增(linear amplification via transposon insertion, LIANTI)^[30-33]。其中, DOP-PCR和MDA这两种方法都涉及PCR指数扩增,因此会产生序列依赖性偏差,导致某些基因组区域过度扩增而其他区域扩增不足,最终获得不完

整的基因组。MALBAC采用基于循环的线性扩增方式,实现了仅对原始基因组进行扩增,减少了PCR指数扩增带来的序列依赖性偏差^[32]。在LIANTI中,单个细胞的基因组被独特设计的含有T7启动子的Tn5转座酶随机片段化,使得DNA片段能够通过体外转录得以线性扩增^[34]。最近, XING等^[35]报道了一种新的单细胞全基因组扩增方法,被称为互补链的多重末端标记扩增(multiplexed end-tagging amplification of complementary strands, META-CS)。该方法能够在单管反应中分别标记和扩增两条DNA链,通过DNA互补性几乎消除了所有的假阳性,达到了目前已有方法中最高的精确度。

1.3 数据分析与可视化

单细胞测序生成的数据通常需要经过两个分析处理程序:预处理和下游分析。其中,预处理主要包括数据的质量控制、批次效应校正和标准化3个步骤^[36-37]。单细胞测序的下游数据分析通常需要根据具体的实验需求来制定。以scRNA-seq为例,下游数据分析通常包括细胞聚类、细胞轨迹和拟时序的重建、差异基因表达、基因通路富集分析和细胞相互作用推断等^[38]。细胞聚类是单细胞测序研究的主要目标之一,通过细胞聚类结合细胞类型注释绘制肿瘤单细胞图谱。通过拟时序分析重建细胞发育轨迹,对于理解癌症发生和进展过程中细胞的动态转变过程以及发现中间过渡状态细胞具有重要意义。分析差异基因表达可以检测肿瘤进展过程中的关键基因,基因通路分析可以鉴定与肿瘤发生、上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及免疫应答等信号通路相关的细胞亚群。通过分析配体-受体相互作用,推测肿瘤细胞与免疫细胞、非免疫细胞之间的相互作用,有助于了解疾病进展过程中的免疫反应并鉴定新的治疗靶点^[39-40]。

2 单细胞测序技术在食管癌研究中的应用

目前,运用单细胞测序技术进行的食管癌研究越来越多,并取得了丰富的研究成果(表1)。现有的研究集中在探索食管癌肿瘤细胞图谱和细胞异质性、鉴定肿瘤发生和发展期间动态基因表达谱,揭示免疫微环境复杂成分、发现新细胞亚群以及解析耐药机制等方面。这些研究进展为全面理解食管癌发生和致病机制奠定了丰富的理论基础,并为改善

表1 单细胞测序在食管癌中的研究总结

Table 1 Summary of the studies in esophageal cancer using single-cell technologies

技术 Technology	样本 Sample	主要成果 Main achievement	参考文献 Reference
scRNA-seq	Tumors from three ESCC patients and two EAC patients	NOTCH signaling was exclusively activated in ESCC, but not in EAC	[41]
	scRNA-seq data SRP119465	Cell cycle-associated genes were correlated with EAC cells stemness, and DNA replication and DNA damage repair were correlated with ESCC cells stemness	[42]
	Five human ESCC tumors and five matched adjacent samples	Identified a list of tumor-specific genes and four malignant signatures, LAG3 and HAVCR2 were regarded as potential targets for immunotherapy in ESCC	[47]
	Blood, tumors and matched adjacent samples from 11 ESCC patients	Tumor-specific CST1 ⁺ myofibroblast was associated with poor prognosis in ESCC	[51]
	Tumors from eight ESCC patients	FGF2 as an important regulator of SPRY1 expression involved in establishing the dysfunctional state of CD8 ⁺ T cells in ESCC	[52]
	Tumors from one ESCC mouse model	Hypomethylation-induced CCL20 promotes ESCC progression and immune disorder	[53]
	Seven human ESCC tumors and paired adjacent tissues	IL-32 has different roles in Treg cells and CD8 ⁺ T cells, and it can potentially be a target for ESCC cancer immunosuppressive therapy	[57]
	Esophageal samples of 4NQO-induced mice	Identified a set of key transitional signatures associated with oncogenic evolution of epithelial cells and depict the landmark dynamic tumorigenic trajectories	[59]
	Duodenal, gastric, oesophageal and BE samples from eight patients	BE was marked by LEFTY1 and OLFM4, and exhibited a profound transcriptional overlap with oesophageal submucosal gland cells	[62]
	Gastroesophageal junction tissues from healthy and ESCC patients	BE originates from the gastric cardia and that EAC arises from undifferentiated BE cells	[65]
	Squamous esophagus tissues and BE tissues from two patients	Loss of RNF128 Iso2-UBCH5C and persistence of the Iso1-UBCH5A complex favors mutant p53 stability to promote BE cell survival	[66]
	KYSE-30 ESCC cells and paclitaxel resistant cells	The existence of an intrinsic paclitaxel resistance in KYSE-30 cells, carfilzomib could attenuate the paclitaxel resistance in Taxol-R cancer cell	[69]
	Tumors from five SA-ESCC patients and five NACT-ESCC patients	CD8 ⁺ T cell levels were significant different between NACT-ESCC and SA-ESCC patients, and LAG3 was suggested as a potential immunotherapeutic target	[71]
	KYSE-180 ESCC cells and radiation resistant cells	Identified genes and pathways related to development of radioresistance in ESCC	[73]
	KYSE-180 ESCC cells and radiation resistant cells	Radioresistance-associated genes and signaling pathways that were aberrantly expressed in radioresistant ESCC cells were identified	[74]
	scRNA-seq data SRP119465	Six novel biomarkers for diagnosis and prognosis of ESCC were validated	[76]
scRNA-seq scTCR-seq	Seven tumors and matched adjacent tissues	Exhausted T and NK cells, Tregs, alternatively activated macrophages and tolerogenic dendritic cells are dominant in the TME	[50]
	Sixty human ESCC tumors and four adjacent normal tissue samples	Dissecting the tumor microenvironment compositions of ESCC, and identify several markers significantly associated with patients' survival	[46]
scRNA-seq scDNA-seq	BE and gastric cells from two human biopsies	Identified seven genes that facilitate the distinction between different BE stages on histological sections	[64]
scWES-seq	Tumors from two ESCC patients	Forty-two recurrent radioresponsive genes was identified in ESCC patients	[75]

scRNA-seq, single-cell RNA sequencing; scTCR-seq, single-cell T cell receptor sequencing; scDNA-seq, single-cell DNA sequencing; scWES-seq, single-cell whole exome sequencing; ESCC, esophageal squamous cell carcinoma; EAC, esophageal adenocarcinoma; 4NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; BE, Barrett's esophagus; NACT, neoadjuvant chemotherapy; SA, surgery alone; TME, tumor microenvironment.

食管癌的临床治疗和患者预后提供重要依据。

2.1 食管鳞癌和食管腺癌肿瘤异质性方面的单细胞研究

ESCC和EAC具有截然不同的分子特征,从而

导致了广泛的食管癌肿瘤内和肿瘤间异质性。揭示ESCC与EAC的异质性细胞图谱,并阐明不同病理类型肿瘤细胞群体的分子特征,将有助于针对两种食管癌制定不同的治疗策略,并为研发新的靶向治疗

药物提供希望。

为了深入解析食管癌肿瘤细胞异质性, WU等^[41]对来自3例ESCC和2例EAC患者的368个肿瘤细胞进行了scRNA-seq。分析细胞之间的相关性, 发现来自ESCC和EAC的肿瘤细胞聚类为不同的细胞亚群, 并且它们各自具有独特的肿瘤微环境特征, 这些结果进一步证实了食管癌中存在固有的和特异的肿瘤异质性。重点分析癌症关键调控因子相关的信号转导途径, 作者发现WNT信号在ESCC和EAC中均被显著激活, 但是相关的配体和受体却不相同。值得关注的是, NOTCH信号仅在ESCC而不在EAC中被激活, 并且ESCC中的NOTCH信号激活与患者生存相关, 这可以指导ESCC的临床治疗。WU等^[42]继续在单细胞水平上探究ESCC和EAC之间的肿瘤干细胞异质性, 并确定了与之相关的特征基因和信号转导途径。该研究表明, 细胞周期信号转导途径与EAC的肿瘤干细胞特性高度相关, 而DNA复制和DNA损伤修复途径相关基因在ESCC的肿瘤干细胞中高度富集。之前的研究已经证明PARP4在多种人类复杂肿瘤中均表现为上调^[43], WU等^[42]的研究验证了PARP4可作为ESCC潜在的新型肿瘤干细胞标志物, 其高表达与患者不良预后相关。值得关注的是, 目前临床上已有几种PARP类抑制剂, 并且它们在非小细胞肺癌的治疗中表现出优异的疗效^[44-45]。因此, 此类PARP抑制剂可作为ESCC治疗的有效补充疗法, 这对于开发针对ESCC干细胞的靶向治疗新方法具有至关重要的意义。运用单细胞测序取得的这些研究成果, 提升了我们对ESCC和EAC肿瘤细胞异质性的认识, 已经鉴定的若干个生物标志物可能为未来的食管癌临床治疗提供一些指导。

2.2 食管癌上皮细胞异质性方面的单细胞研究

食管癌是起源于食管上皮的恶性肿瘤, 评估食管癌上皮细胞的异质性分子特征, 对于揭示食管癌肿瘤细胞起源具有重要意义。最新的研究中, ZHANG等^[46]通过对来自多达60例ESCC患者的超20万个细胞进行scRNA-seq, 解析了ESCC肿瘤细胞的异质性。该研究共鉴定了8个主要细胞亚群, 其中上皮细胞表现出显著的拷贝数变异(copy number variations, CNV), 被认定是恶性细胞。通过二次聚类, 将这些上皮细胞分为38个亚群, 其中多达24个上皮细胞亚群来自不同患者的肿瘤, 并且这些细胞表现出高度细胞增殖和EMT通路的激活, 而其余的14个细

胞亚群则显示出免疫相关通路被激活的特征, 这些结果再次证实了ESCC中普遍存在肿瘤异质性。重要的是, 该研究通过队列分析证明恶性上皮细胞的黏膜程序相关基因(*AGR2*、*CXCL17*和*MUC20*等)的表达水平与ESCC患者的存活率显著相关, 并且高黏膜活性的肿瘤细胞迁移和促血管生成能力均受到抑制, 进而表现为患者预后良好。与此同时, CHEN等^[47]也在单细胞水平上揭示了ESCC的恶性上皮细胞表现出高度异质性的CNV状态。通过分析恶性和非恶性上皮细胞之间的差异基因表达, 确定了一系列可能促进ESCC肿瘤进展的特异性基因(例如*IGFBP2*、*IGFBP3*、*ODC1*和*SOX4*)。此外, 该研究发现与非恶性细胞相比, ESCC恶性细胞表现出代谢途径的显著富集, 其中氧化磷酸化途径的异质性最高, 这不同于之前报道的氧化磷酸化代谢途径主要非恶性细胞中富集^[48]。这些研究表明, ESCC的上皮细胞具有高度异质性, 并且在肿瘤发生和发展过程中起促进作用, 为深入了解ESCC的发病机制和进展机制提供了研究基础。

2.3 食管癌肿瘤微环境方面的单细胞研究

肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生长和发展的复杂环境, 阐明肿瘤发生过程中肿瘤微环境的细胞组成及相关转录组的动态变化, 对于探究肿瘤的免疫疗法至关重要^[49]。最近, 免疫治疗药物已被用于一线治疗失败的晚期ESCC患者的临床试验, 但是仅显示出对总体存活率的中度改善。目前, 临床上的食管癌免疫疗法还十分有限, 因此亟待需要探索食管癌的肿瘤微环境并鉴定潜在的免疫治疗新靶点。

为了全面表征ESCC的肿瘤微环境图谱, ZHENG等^[50]利用scRNA-seq结合scTCR-seq对从7例ESCC患者的肿瘤及其癌旁组织中分离出的80 787个免疫细胞进行分析。结果显示, ESCC的肿瘤微环境细胞主要由耗竭T细胞、耗竭NK细胞、调节性T细胞(Treg)、激活的巨噬细胞以及耐受性树突细胞组成, 这表明ESCC肿瘤微环境存在炎症且受到免疫抑制。在这些免疫抑制细胞群中, 耗竭CD8⁺T细胞表现出了从耗竭前期状态至耗竭末期状态的连续进展过程, 并且耗竭中期的两个细胞亚群CD8-C5-CCL5和CD8-C6-STMN1可能是更适合的ESCC免疫疗法靶点。目前的免疫疗法旨在恢复耗竭T细胞的免疫反应, 为了深入探究T细胞在食管癌免疫治疗中的调控机制, CHEN等^[51]利用scRNA-seq对食管癌的T

细胞耗竭过程进行了详细的描述。通过分析T细胞的基因表达,发现SPRY1在两个细胞亚群(CD8_C7-PRDM1和CD8_C8-SPRY1 T_{EX})中特异高表达。此外,该研究还揭示了FGF2作为SPRY1表达的重要调节剂,共同参与了食管癌CD8⁺T细胞功能耗竭状态的建立,为阻断FGF2-SPRY1信号通路以改善T细胞功能以及杀伤肿瘤活性提供了重要依据。此外,CHEN等^[47]发现免疫抑制受体LAG3和HAVCR2在ESCC的NK细胞和CD8⁺T细胞中高度表达,可作为ESCC免疫治疗的潜在检查点分子。

肿瘤微环境中的趋化因子通过影响肿瘤免疫在肿瘤发生和进展中发挥重要作用。最新的研究发现,低甲基化诱导上皮细胞中CCL20的表达上调,进而导致ESCC肿瘤微环境中的CD4⁺T细胞免疫紊乱并促进了ESCC的进展,因此靶向CCL20可能是ESCC潜在的一种有效治疗方法^[52]。促炎细胞因子也被证明与肿瘤免疫相关,LI等^[53]发现,IL-32在ESCC的肿瘤微环境中同时具有抗肿瘤和抗免疫反应的功能,既能促进CD8⁺T细胞中IFN γ 的表达来增强抗肿瘤活性,同时又能诱导CD4⁺T细胞中的Foxp3表达来抑制肿瘤免疫反应,因此,IL-32可能成为ESCC癌症免疫抑制治疗的靶点。值得关注的是,已有的一些报道认为B细胞在免疫疗法中也具有潜在的重要功能^[54]。CHEN等^[47]发现,食管癌的两种B细胞亚群具有潜在的异质性,并且与肿瘤细胞增殖、分化以及炎症反应高度相关,这就为ESCC的B细胞免疫疗法提供了研究证据。

在肿瘤微环境中,巨噬细胞、树突细胞和成纤维细胞等非免疫细胞在破坏适应性免疫和促进肿瘤生长方面也具有关键作用^[49,55-56],ZHENG等^[50]发现,高表达巨噬细胞正相关基因(CD163和CD206等)的ESCC患者具有较好的预后效果,可以将这类基因作为ESCC的预后生物标志物。类似地,CHEN等^[47]证实了ESCC存在复杂的具有促肿瘤功能的巨噬细胞异质性表型,并且高表达MHC II的巨噬细胞可能是ESCC的潜在免疫治疗靶点。此外,ZHANG等^[46]发现,树突细胞的一个亚群(tDC)高表达免疫检查点基因(PD-L1和PD-L2),并且能够与多种T细胞亚群相互作用,表明该tDC细胞亚群参与ESCC免疫异质性肿瘤微环境的形成。通过发育轨迹分析,ZHANG等^[46]还发现ESCC肿瘤微环境中的成纤维细胞具有两种中间状态,并且这些细胞能够产生各种促炎细胞因子

和募集免疫细胞的细胞因子,进而可能在ESCC进展中起关键作用。在最近的研究中,DINH等^[57]也证明了ESCC肿瘤微环境中的免疫细胞和髓系细胞具有复杂的异质性特征,其中CST1⁺肌成纤维细胞具有高度的肿瘤异质性特征,并且与患者的不良预后有关。这些研究深入探索了食管癌的肿瘤微环境,揭示了其中浸润免疫细胞与非免疫细胞的详细分子特征,并挖掘了潜在的治疗靶点,这将为开发出针对食管癌的特异免疫疗法提供坚实的理论基础。

2.4 食管癌发生和发展方面的单细胞研究

快速发展的测序技术已经揭示了食管癌的许多遗传特征,但食管癌的发展是从炎症到浸润性癌症的多步复杂的致病过程,目前我们对于食管癌的动态发生过程还知之甚少^[58]。深入解析食管癌的发生和发展过程并揭示相关的分子机制,对于食管癌的早期诊断与有效治疗意义至关重要。

为了揭示ESCC的发生和发展方式,YAO等^[59]利用化学致癌物4-硝基喹-1-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4NQO)诱导小鼠ESCC的发展来模拟人的ESCC致癌过程,重点分析ESCC发生过程中上皮细胞和肿瘤微环境细胞的表达变化。分析上皮细胞的动态转变轨迹,发现从EpiC1细胞亚型开始食管上皮细胞即存在两种分化命运,其中一些细胞转化为非恶性的EpiC4细胞,而另一些细胞则转化为恶性的EpiC6细胞。通过分析非上皮细胞的动态转录组变化,研究人员发现从增生阶段开始,成纤维细胞高表达趋化因子,且伴随着髓样细胞抗原呈递的减少,从而导致了肿瘤发生过程中细胞应答的下调。这也导致了巨噬细胞和中性粒细胞的积聚和激活,最终形成慢性炎症环境,并促进致癌物转化的上皮细胞的存活和增殖。这些发现为阐明ESCC的发生和发展做出了突出的贡献,然而获得同一患者的食管连续病变样本是极其艰难的,该研究还局限在小鼠模型中,未来将该研究成果应用于人食管癌研究中还需更多的实验来证明。

巴雷特食管(barrett's esophagus, BE)是EAC的癌前病变阶段,其发病率在过去几十年中急剧增加。BE是食管下段多层鳞状上皮转化为单层柱状上皮的一种病理现象,其不同的形态学外观发生阶段与发展为EAC的风险程度有关^[60-61]。为了探究BE的细胞起源,OWEN等^[62]对来自同一患者的正常食管、BE、胃、十二指肠分别进行scRNA-seq。通过分析基因表达

谱和细胞相关性,发现与肠道或胃细胞基因表达特征不同, BE与食道黏膜下腺细胞具有明显相似的转录组特征和最稳定的细胞关联强度,并且它们共同表达干细胞基因 *OLFM4*,暗示着它们具有相同的细胞起源。此外,多达71%的BE细胞富集表达 *LEFTY1* 蛋白,而 *LEFTY1*和 *OLFM4*共同标记了BE的祖先细胞群。西方国家通常以 *MUC2*标记的杯状细胞形态来诊断BE^[63], OWEN等^[62]发现, *ITLN1*和 *SPINK4*能够标记识别更早期的杯状细胞,这可能有助于鉴定食管的早期化生。BUSSLINGER和同事^[64]对BE活检组织样本分别进行了 *scRNA-seq*和 *scDNA-seq*分析,发现发育异常的BE细胞通常含有染色体不稳定区域,并且这些区域具有特定的 T>C和 T>G突变特征。此外,该研究确定了BE的两组标记基因,能够用于区分BE的柱状上皮与发育异常阶段,并通过组织学实验验证了 *CLDN2*的表达上调与BE的发育不良阶段相关。NOWICKI-OSUCH等^[65]使用单细胞测序方法进一步研究了BE的细胞起源以及发展为EAC的分子机制。作者对源于健康和疾病患者的胃食管连接组织分别进行 *scRNA-seq*、甲基化水平、染色质开放状态和体细胞突变等分析,发现BE起源于胃贲门细胞,并且是由 *c-MYC*和 *HNF4A*转录程序所驱动的。此外,该研究还发现EAC起源于未分化的BE细胞,这就为EAC的早期检查策略提供了新启示。与此同时, RAY等^[66]揭示了BE进展为EAC的过程与 *TP53*的频繁突变有关,并且改变E2泛素连接酶 *UBCH5A*的催化活性可以减弱其与E3泛素连接酶 *RNF128 Iso1*的相互作用,从而使得含有 *TP53*突变的BE前体细胞死亡。这些研究为深入了解BE的细胞起源以及BE发展为EAC阶段的基因突变景观和基因表达模式提供了丰富的数据资源,有助于鉴定EAC特异性生物标志物,进而指导EAC的早期诊断。

2.5 食管癌治疗方面的单细胞研究

早在三十多年前,紫杉醇已被用于食管癌的临床治疗中,并且在治疗初期表现出良好的治疗效果。但部分患者会对紫杉醇产生化疗耐药性,使得食管癌患者的总体生存期并没有显著提高,预后五年生存率仍较低^[67-68]。探索食管癌中获得性紫杉醇耐药性的分子机制,将为开发更加有效的食管癌化疗策略提供潜在的应用价值。WU等^[69]使用低剂量的紫杉醇长期诱导获得了ESCC细胞株系 *KYSE-30*的紫杉醇耐药细胞株 *Taxol-R*,并通过 *scRNA-seq*分

析它们的细胞表达谱和潜在的耐药调控途径。通过鉴定细胞亚群,发现高表达 *KRT19*的 *KYSE-30*细胞亚群具有高紫杉醇耐药性,表明ESCC中存在固有的紫杉醇抗性。此外, WU等^[69]发现,诱导获得紫杉醇抗性的 *Taxol-R*细胞具有高蛋白酶体表达和低 *HIF-1*信号基因表达的特征,并且使用蛋白酶体抑制剂卡非佐米可以减弱 *Taxol-R*细胞的紫杉醇耐药性,这为ESCC的联合治疗提供了新策略。近年来,术前采用紫杉醇联合铂类化疗,即新辅助化疗(*neoadjuvant chemotherapy*, *NACT*),能够显著改善ESCC患者的生存率,但治疗效果仍不十分理想^[70]。最新的研究中, CHEN等^[71]采用 *scRNA-seq*探讨了 *NACT-ESCC*肿瘤的细胞特征,期望为 *NACT-ESCC*患者提供潜在治疗靶点。CHEN等^[71]发现,接受术前新辅助化疗的 *NACT-ESCC*患者具有高比例的免疫细胞,而上皮细胞和基质细胞比例显著较低。此外, *NACT*改变了ESCC患者肿瘤微环境中的免疫细胞组分,具体表现为耗竭 *CD8⁺* T细胞以及血浆B细胞比例显著增加,同时巨噬细胞高表达抑制 *CD8⁺* T细胞活性的因子,并且单核细胞中促炎相关的免疫检查点分子的表达水平也显著升高。重要的是,该研究发现免疫检查点 *LAG3*可能是 *NACT-ESCC*患者以及未接受 *NACT*患者的潜在免疫治疗靶点。

目前,放射治疗仍然是食管癌联合治疗的标准方法,然而肿瘤的先天性或后天性放射抗性是影响ESCC放射治疗功效的关键问题^[72]。YANG等^[73]使用 *scRNA-seq*探究 *KYSE-180* ESCC细胞暴露于12 Gy至30 Gy累积辐射剂量的动态转录组变化情况。结果显示, *KYSE-180-12Gy*细胞具有显著的异质性特征,并验证了五个相关的差异表达基因(包括 *CFLAR*、*LAMA5*、*ITGA6*、*ITGB4*和 *SDC4*)可以作为ESCC的放射抗性基因。同时, WU等^[74]也使用 *KYSE-180* ESCC细胞并将其连续暴露于五个不同的累积辐射剂量以诱导放射抗性,模拟了ESCC患者的放射治疗过程。通过分析单细胞水平的抗辐射转录组特征, WU等^[74]发现,放射抗性基因的表达在治疗期间会发生动态变化,并且 *scR4*抗辐射细胞亚群中的放射抗性相关基因的表达水平最高,应当被特别关注。为了更好地了解ESCC放射治疗抗性的遗传特征, YANG等^[75]对放射治疗过程中的ESCC患者的肿瘤样本进行单细胞全外显子测序,鉴定了多个放射敏感和耐药性基因(包括 *NOTCH1*、*MAML3*、

CDKN2A、*NFE2L2*、*GAS2L2*、*OBSCN*和*TP53*等共42个基因),其中10个敏感性基因突变以及18个耐药性基因突变特征被验证能够改善ESCC患者的预后,具有潜在的临床实用性。基于对ESCC放射抗性遗传特征的新见解,这些基因突变区域以及放射抗性相关的信号分子将为ESCC放射治疗提供新机会,但相关的研究成果还需大量临床样本的验证。

2.6 食管癌诊断和预后方面的单细胞研究

目前,临床上尚无有效的ESCC生物标志物,使得多数患者不能得到及时的诊断和治疗,导致预后不良。因此,迫切需要寻找有效的ESCC诊断和预后生物标志物,以提高相关的治疗效率。最近,ZHENG等^[76]通过再分析来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中的ESCC高通量测序数据集的差异表达基因,并通过功能注释和通路分析筛选出了若干个能够同时预测ESCC诊断和预后的候选生物标志物(包括*PBK*、*KIF2C*、*NUF2*、*KIF20A*、*RAD51API*和*DEPDC1*),为了验证这些候选基因的表达水平,使用来自3名ESCC患者的scRNA-seq数据集(SRP119465)。对细胞亚群进行聚类 and 注释,分析候选基因在细胞亚群中的表达水平,结果显示这些候选基因主要在癌细胞中表达。进一步在6个ESCC肿瘤组织及配对癌旁组织中通过qPCR验证这些已识别基因的表达水平,结果表明与癌旁组织相比,肿瘤组织中所有候选基因的表达水平均显著升高。此外,通过免疫浸润分析以更好地了解候选生物标志物的功能,结果显示这些基因的表达水平与树突细胞浸润呈显著负相关,而其他免疫细胞浸润没有明显相关性。该研究首次在单细胞水平上验证了ESCC的候选生物标志物,为ESCC的诊断和预后提供了新的靶点。

3 总结与展望

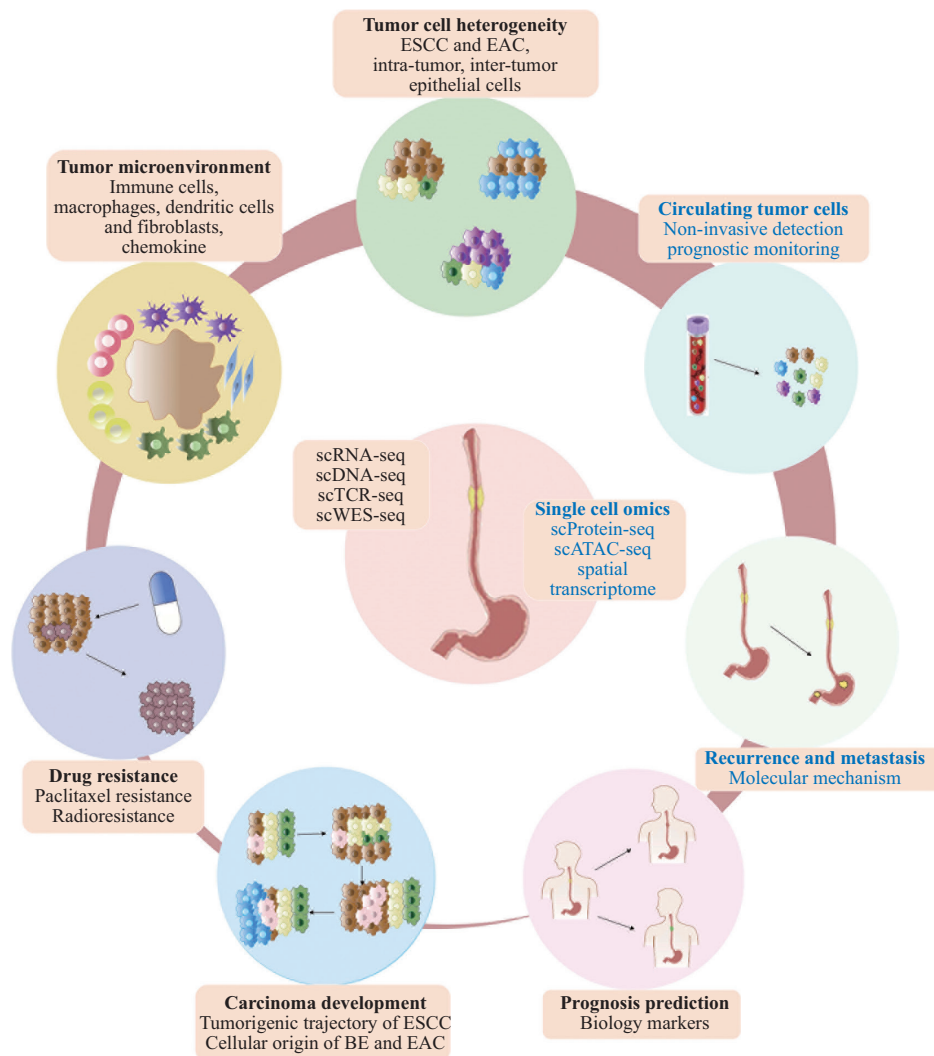
单细胞测序技术作为一种强大的高通量测序工具,能够以前所未有的高分辨率探究致病细胞群,正在将食管癌研究推向新的精度水平。单细胞测序技术已广泛应用于食管癌细胞异质性、肿瘤微环境特征、治疗耐药和预后预测等方面的研究。应用单细胞测序技术能够提供详细的食管癌上皮细胞与肿瘤细胞的转录表达谱,这对于我们发现稀有细胞类群,了解肿瘤内和肿瘤间异质性,解析食管癌动态

进展过程,并揭示耐药机制是非常必要的。在肿瘤微环境分析方面,单细胞测序能够描绘食管癌肿瘤微环境景观,指导临床治疗方案。总的来说,单细胞测序技术正在彻底改变我们对食管癌分子特征的认识,并提供了对食管肿瘤细胞学和癌症免疫学的深入洞见,为未来药物发现提供了重要资源。

但与其他复杂肿瘤相比,单细胞测序技术在表征食管癌方面的应用还受到许多限制。现有的研究局限于提供少数特定类型食管癌患者的转录组或基因组信息。因此,我们对食管癌的细胞层次、肿瘤微环境和耐药机制等的理解还不完全。随着技术的不断发展,单细胞测序技术将变得更加高通量、费用将降低、数据分析流程将简化、耗时更短,准确度和灵敏度等各种指标也将得到提升,这将有利于开展更大规模的食管癌单细胞测序工作,并加速相关研究成果在临床中的应用。在不远的将来,单细胞多组学方法和空间转录组学等新技术将加深我们对食管癌发病机制和耐药机制的理解,并帮助我们更全面地了解食管癌的细胞类型和细胞状态,从而能够为各种食管癌患者识别新的治疗靶点。更重要的是,复发和转移在食管癌患者中经常发生,未来尤其需要开拓单细胞测序在食管癌转移机制方面的研究。此外,未来还应拓展单细胞测序技术与基于CTC的液体活检技术的结合,这将为食管癌的无创检测及预后监测提供一种极具前景的分析方法(图2)。随着对食管癌细胞动力学的深入了解,我们将迎来食管癌诊治的精准医学新时代,极大提高个体化医疗疗效,最终能够挽救更多食管癌患者的生命。

参考文献 (References)

- [1] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma [J]. *Lancet*, 2013, 381(9864): 400-12.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 7-30.
- [3] LIN L, LIN D C. Biological significance of tumor heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1156.
- [4] CUI Y, CHEN H, XI R, et al. Whole-genome sequencing of 508 patients identifies key molecular features associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Res*, 2020, 30(10): 902-13.
- [5] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 377-82.
- [6] 张路遥, 时永全. 单细胞测序技术在消化系统肿瘤研究中的应用及进展[J]. 西南国防医药(ZHANG L Y, SHI Y Q. Application



已经开展的研究用黑色字体标记, 未来的潜在研究方向用蓝色字体标记。

Existing studies are marked in black, and potential future studies are marked in blue.

图2 单细胞测序在食管癌研究中的应用

Fig.2 Application of single-cell sequencing in esophageal cancer research

- and progress of single-cell sequencing technology in digestive system tumor research [J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China, 2020, 30(11): 4.
- [7] 高山凤, 肖轩, 张玲羽等. 单细胞测序技术在生殖研究中的应用[J]. 中国细胞生物学报(GAO S F, XIAO X, ZHANG L Y, et al. The application of single-cell sequencing technology in reproductive research [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(12): 10.
- [8] 王丹蕊, 沈文丽, 魏子艳, 等. 单细胞测序技术在微生物生态领域中的应用[J]. 生物技术通报(WANG D R, SHEN W L, WEI Z Y, et al. Applications of single-cell sequencing technology in microbial ecology [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(10): 237-46.
- [9] 何其邹洪, 鄂一岚, 李瑞丽. 单细胞测序技术及其在植物中的研究进展[J]. 中国细胞生物学报(HE Q Z H, E Y L, LI R L. Single-cell sequencing technology and its research progress in plant cells [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(4): 9.
- [10] SATIJA R, FARRELL J A, GENNERT D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33: 495-502.
- [11] PAPALEXI E, SATIJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18: 35-45.
- [12] STUART T, SATIJA R. Integrative single-cell analysis [J]. Nat Rev Genet, 2019, 20: 257-72.
- [13] LEI Y, TANG R, XU J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14: 91.
- [14] LIU J, QU S, ZHANG T, et al. Applications of single-cell omics in tumor immunology [J]. Front Immunol, 2021, 12: 697412.
- [15] HU P, ZHANG W, XIN H, et al. Single cell isolation and analysis [J]. Front Cell Dev Biol, 2016, 4: 116.
- [16] GROSS A, SCHOENDEUDE J, ZIMMERMANN S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):

- 16897-919.
- [17] HAYASHI T, SHIBATA N, OKUMURA R, et al. Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research [J]. *Dev Growth Differ*, 2010, 52: 131-44.
- [18] HAN X, WANG R, ZHOU Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-seq [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1091-107.
- [19] 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: 1202-14.
- [20] ZHU Z, QIU S, SHAO K, et al. Progress and challenges of sequencing and analyzing circulating tumor cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2018, 34(5): 405-15.
- [21] KOLODZIEJCZYK A, KIM J K, SVENSSON V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 610-20.
- [22] PICELLI S, ÅK B, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. *Nat Methods*, 2013, 10: 1096-8.
- [23] ZIEGENHAIN C, VIETH B, PAREKH S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-43, e634.
- [24] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-73.
- [25] 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): 776-9.
- [26] ZHANG X, LI T, LIU F, et al. Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-Seq systems [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(1): 130-42, e135.
- [27] GOHIL S H, IORGULESCU J B, BRAUN D A, et al. Applying highdimensional single-cell technologies to the analysis of cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18: 244-56.
- [28] REDMOND D, PORAN A, ELEMENTO O. Single-cell TCR seq: paired recovery of entire T-cell alpha and beta chain transcripts in T-cell receptors from single-cell RNA seq [J]. *Genome Med*, 2016, 8: 80.
- [29] DE S M, ROSSETTI G, PAGANI M. Single cell T cell receptor sequencing: techniques and future challenges [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1638.
- [30] DEAN F B, NELSON J R, GIESLER T L, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification [J]. *Genome Res*, 2001, 11: 1095-9.
- [31] TELENUS H, CARTER N P, BEBB C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer [J]. *Genomics*, 1992, 13: 718-25.
- [32] ZONG C, LU S, CHAPMAN A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338: 1622-6.
- [33] 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(1): 79-102.
- [34] CHEN C, XING D, TAN L, et al. Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LANTI) [J]. *Science*, 2017, 356(6334): 189.
- [35] XING D, TAN L, CHANG C H, et al. Accurate SNV detection in single cells by transposon-based whole-genome amplification of complementary strands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(8): e2013106118.
- [36] JIANG P, THOMSON J A, STEWART R. Quality control of single-cell RNA-seq by SinQC [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(16): 2514-6.
- [37] 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.
- [38] CHEN G, NING B, SHI T. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 317.
- [39] CAO J, SPIELMANN M, QIU X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis [J]. *Nature*, 2019, 566(7745): 496-502.
- [40] LI L, XIONG F, WANG Y, et al. What are the applications of single-cell RNA sequencing in cancer research: a systematic review [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 163.
- [41] WU H, YU J, LI Y, et al. Single-cell RNA sequencing reveals diverse intratumoral heterogeneities and gene signatures of two types of esophageal cancers [J]. *Cancer Lett*, 2018, 438: 133-43.
- [42] WU H, LI Y, HOU Q, et al. Single-cell intratumoral stemness analysis reveals the involvement of cell cycle and DNA damage repair in two different types of esophageal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(6): 3201-8.
- [43] FUGAZZOLA L. Genetic variants of PARP4 gene and PARP4P2 pseudogene in patients with multiple primary tumors including thyroid cancer [J]. *Mutat Res*, 2019, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2019.111672.
- [44] LORD C J, ASHWORTH A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic [J]. *Science*, 2017, 355: 1152-8.
- [45] RAMALINGAM S, BLAIS N, MAZIERES J, et al. Randomized, placebo-controlled, phase II study of veliparib in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced/metastatic non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 1937-44.
- [46] ZHANG X, PENG L, LUO Y, et al. Dissecting esophageal squamous-cell carcinoma ecosystem by single-cell transcriptomic analysis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5291.
- [47] CHEN Z, ZHAO M, LIANG J, et al. Dissecting the single-cell transcriptome network underlying esophagus non-malignant tissues and esophageal squamous cell carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2021, 69: 103459.
- [48] LI X, WENES M, ROMERO P, et al. Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(7): 425-41.
- [49] 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): 1293-308.
- [50] ZHENG Y, CHEN Z, HAN Y, et al. Immune suppressive landscape in the human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6268.
- [51] CHEN Q Y, LI Y N, WANG X Y, et al. Tumor fibroblast-derived FGF2 regulates expression of SPRY1 in esophageal tumor-infiltrating T cells and plays a role in T-cell exhaustion [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(24): 5583-96.

- [52] NAN H, ZHOU L, LIANG W, et al. Epigenetically associated CCL20 upregulation correlates with esophageal cancer progression and immune disorder [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 228: 153683.
- [53] HAN L, CHEN S, CHEN Z, et al. Interleukin 32 promotes foxp3⁺ Treg cell development and CD8⁺ T cell function in human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 704853.
- [54] GRISS J, BAUER W, WAGNER C, et al. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4186.
- [55] MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23: 549-55.
- [56] LAMBRECHTS D, WAUTERS E, BOECKX B, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1277-89.
- [57] DINH H, PAN F, WANG G, et al. Integrated single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity of esophageal squamous cell carcinoma microenvironment [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7335.
- [58] LI R, LI P, XING W, et al. Heterogeneous genomic aberrations in esophageal squamous cell carcinoma: a review [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1553-68.
- [59] YAO J, CUI Q, FAN W, et al. Single-cell transcriptomic analysis in a mouse model deciphers cell transition states in the multi-step development of esophageal cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3715.
- [60] LAVERY D, NICHOLSON A, POULSOM R, et al. The stem cell organisation, and the proliferative and gene expression profile of Barrett's epithelium, replicates pyloric-type gastric glands [J]. *Gut*, 2014, 63: 1854-63.
- [61] LEEDHAM S, PRESTON S L, MCDONALD S A C, et al. Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus [J]. *Gut*, 2008, 57: 1041-8.
- [62] OWEN R, WHITE M, SEVERSON D, et al. Single cell RNA-seq reveals profound transcriptional similarity between Barrett's oesophagus and oesophageal submucosal glands [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4261.
- [63] SPECHLER S, SHARMA P, SOUZA R, et al. American gastroenterological association medical position statement on the management of Barrett's esophagus [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1084-91.
- [64] BUSSLINGER G A, BARBANSON B, OKA R, et al. Molecular characterization of Barrett's esophagus at single-cell resolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(47): e2113061118.
- [65] NOWICKI-OSUCH K, ZHUANG L, JAMMULA S, et al. Molecular phenotyping reveals the identity of Barrett's esophagus and its malignant transition [J]. *Science*, 2021, 373(6556): 760-7.
- [66] RAY P, NANCARROW D, FERRER-TORRES D, et al. The cell of origin for Barrett's esophagus UBCH5 family members differentially impact stabilization of mutant p53 via RNF128 Iso1 during Barrett's progression to esophageal adenocarcinoma [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(1): 129-49.
- [67] AJANI J A, LLLSON D H, DAUGHERTY K, et al. Paclitaxel in the treatment of carcinoma of the esophagus [J]. *Semin Oncol*, 1995, 22: 35-40.
- [68] HE Y F, JI C S, HU B, et al. A phase II study of paclitaxel and nedaplatin as front-line chemotherapy in Chinese patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19: 5910-6.
- [69] WU H, CHEN S, YU J, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal molecular signals to intrinsic and acquired paclitaxel resistance in esophageal squamous cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 420: 156-67.
- [70] WAGENER-RYCAEK S, SCHOEMMEL M, KRAEMER M, et al. Immune profile and immunosurveillance in treatment-naive and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69: 523-33.
- [71] CHEN Z, HUANG Y, HU Z, et al. Dissecting the single-cell transcriptome network in patients with esophageal squamous cell carcinoma receiving operative paclitaxel plus platinum chemotherapy [J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(10): 71.
- [72] OEHLER C, CIERNIK I F. Radiation therapy and combined modality treatment of gastrointestinal carcinomas [J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32: 119-38.
- [73] YANG L, ZHANG X, HOU Q, et al. Single-cell RNA-seq of esophageal squamous cell carcinoma cell line with fractionated irradiation reveals radioresistant gene expression patterns [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 611.
- [74] WU H, YU J, KONG D, et al. Population and single-cell transcriptome analyses reveal diverse transcriptional changes associated with radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(6): 1237-48.
- [75] YANG L, ZHANG X, MACKAY M, et al. Identification of radioresponsive genes in esophageal cancer from longitudinal and single cell exome sequencing [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020, 108(4): 1103-14.
- [76] ZHENG L, LI L, XIE J, et al. Six novel biomarkers for diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: validated by scRNA-seq and qPCR [J]. *J Cancer*, 2021, 12(3): 899-911.