

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.009

· 综述 ·

## 血液系统肿瘤研究中单细胞测序技术的应用

### Application of single cell sequencing in hematological malignancy

刘细细<sup>1</sup>综述;陈碧清<sup>2</sup>,朱学军<sup>3</sup>审阅(1.南京中医药大学附属医院、第一临床医学院,江苏 南京 210029; 2.南京中医药大学附属医院中心实验室,江苏 南京 210029; 3.南京中医药大学附属医院 血液科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 由于细胞强异质性的存在,血液肿瘤细胞呈现多样性,而这种多样性根源于基因层面的改变。随着精准医学时代的到来,对于基因层面的研究越来越依赖于层出不穷的二代测序技术。过去十几年的深度测序技术着重于细胞群体层面的整体分析,不能深入区分异质性的肿瘤细胞差异化的生命活动。近年来新兴的单细胞测序技术大大促进了血液肿瘤异质性研究的发展。本文着重介绍血液肿瘤发生发展和治疗耐药性中的细胞异质性及其分子机制,以及利用单细胞测序技术开发更精细层次的标志物、评估临床实验有效性和安全性方面的研究进展,并对其发展前景做了简要展望。

**[关键词]** 单细胞测序;细胞异质性;血液恶性肿瘤;临床应用

**[中图分类号]** R733;R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)08-0762-05

血液系统恶性肿瘤是一组危及生命的异质性血液疾病。血液肿瘤细胞亚群的异质性和克隆演变是疾病精确诊断、风险分层,乃至靶向治疗的主要障碍<sup>[1]</sup>。传统的异质性研究主要使用流式细胞术来鉴别血液中的各类型细胞,但是这种方法严重依赖于荧光标记的细胞膜表面分子标志物,而现有可用的分子标志物十分有限,而且很多胞内分子标志物无法检测。近年来新兴的单细胞测序技术很好地解决了这一问题,为细胞异质性的研究提供了有力的平台。单细胞测序在肿瘤研究等领域发挥着重要作用,正成为生命科学研究的焦点<sup>[2]</sup>。应用以单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)为主的单细胞测序技术来研究血液肿瘤,可以了解肿瘤细胞在基因表达水平的异质性,有助于实现更准确的疾病监测和分层、阐明疾病发生和发展的分子机制及制定精准的治疗方案<sup>[3]</sup>。

#### 1 化解肿瘤异质性难题

肿瘤组织样本中的细胞具有异质性。单细胞测序技术已广泛应用于肿瘤方向的研究,但是受限于肿瘤细胞没有明确的分子标记基因,很难直接通过转录组数据中的基因表达水平从肿瘤组织中区分正常细胞和恶性肿瘤细胞<sup>[4]</sup>。基于 scRNA-seq 数据进行单细胞拷贝数变异分析,就是利用不同样本或不同细胞类型之间的基因表达量预测大规模染色体水平的拷贝数变异,发现拷贝数异常的细胞,从而帮助区分肿瘤恶性细胞,为肿瘤异质性、克隆进化的研究奠定基础<sup>[5-6]</sup>。PETTI 等<sup>[7]</sup>通过全基因组测序与 scRNA-seq 相结合的方法,将急性髓系白血病细胞(包括正常

核型的白血病细胞)与正常细胞区分开来,识别与亚克隆突变相关的表达特征,并找到可用于纯化亚克隆以进行进一步研究的细胞表面标志物。

肿瘤细胞具有高度异质性,并随时间发生演变<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9]</sup>表明,肿瘤干细胞不是单克隆群体,而是由不同的恶性细胞亚群组成,这导致了肿瘤内的异质性。HALBRITTER 等<sup>[10]</sup>通过 scRNA-seq 制作了详细的朗格汉斯细胞组织细胞增生症(langerhans cell histiocytosis, LCH)的病变分子及细胞图谱,并利用数据库中单细胞高分辨率研究了 LCH 细胞间的异质性,证实 LCH 病变中存在的复杂发育层次,为 LCH 个性化治疗提供了新的方向。GUPTA 等<sup>[11]</sup>利用 scRNA-seq 分析技术,同时分析数百万儿童白血病细胞的表型和信号特征,识别出六种类型的恶性细胞,这些发现有助于精准诊疗和开展免疫疗法。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)具有异质性。TME 的异质性与肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[12]</sup>。TME 是由非肿瘤基质细胞构成,包括免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞等,其通过与肿瘤细胞之间的相互作用来影响肿瘤的发生发展<sup>[13]</sup>。免疫细胞的浸润牵涉到多种细胞的参与,这些细胞群可能具有

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 82001206, No. 81673771),江苏省中医院高峰学术人才培养工程资助项目(No. y2021rc42),医学免疫学国家重点实验室开放课题资助项目(No. GZ2021O2),江苏省中医药管理局科技项目(No. ZT202106);江苏省研究生科研与实践创新计划资助项目(No. KYCX22-1899)

**[作者简介]** 刘细细(1993—),女,硕士生,主要从事临床中西医结合血液病的研究,E-mail: 750299305@qq.com

**[通信作者]** 陈碧清,E-mail: bq\_chen@qq.com;朱学军,E-mail: zhuxuejun@njucm.edu.cn

促进肿瘤生成或抗肿瘤的作用。识别免疫细胞的异质性是导致肿瘤治疗失败和肿瘤演进的关键因素<sup>[14-15]</sup>。VILLANI等<sup>[16]</sup>通过scRNA-seq在外周血单个核细胞中发现了新型树突状细胞、单核细胞和祖细胞,将实现更准确的功能和发育分析及健康和疾病的免疫监测。BARYAWNO等<sup>[17]</sup>使用scRNA-seq技术定义了小鼠骨髓基质中17个不同的细胞亚群及其基因特征,发现了在稳态造血中表达关键生态位因子的基质细胞,揭示了急性髓系白血病扰乱间充质干细胞分化、损害正常造血功能的致病机制。为探究滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)的潜在转录网络,ANDOR等<sup>[18]</sup>分析了6个原发性FL患者的34 188个细胞的转录本,通过基因表达鉴别每一个肿瘤的正常免疫亚群和恶性B细胞,揭示淋巴瘤与T细胞免疫检查点的共表达基因。

## 2 探究肿瘤发生发展和治疗耐药性的分子机制

血液肿瘤的高度异质性是病情进展和出现耐药性的主要因素<sup>[19-20]</sup>。现阶段大多数治疗手段没有靶向肿瘤异质性,而是将肿瘤当作同质的群体,从而导致肿瘤药物治疗失败。患者在接受化疗后的缓解期可形成新突变及增加克隆进化概率,进而导致复发,而复发与不良预后有关,故了解耐药的分子机制有助于减少疾病复发率、提高治愈率。BELL等<sup>[21]</sup>应用scRNA-seq监测急性髓系白血病的幼稚细胞对BET抑制剂耐药过程的转录轨迹,发现耐药出现在表观遗传层面,而不是遗传层面,转录层面不断动态地出现适应性改变。BUUS等<sup>[22]</sup>利用scRNA-seq发现了一些组蛋白去乙酰化酶抑制剂治疗Sézary综合征耐药的恶性细胞亚群。同时,scRNA-seq提供了一种在单细胞水平上区分不同恶性细胞亚群变化的针对性方法,可以帮助设计新疗法来对抗耐药性。COHEN等<sup>[23]</sup>通过scRNA-seq发现肽基脯氨酰异构酶A是多发性骨髓瘤耐药的潜在有效治疗新靶点。

了解一个正常的造血细胞如何发展成一个潜在的恶性肿瘤干细胞并最终导致血液恶性肿瘤,有助于认识克隆演变的过程以及肿瘤耐药复发的分子机制。单细胞测序可以用来检测肿瘤异质性、发现疾病治疗过程中由于克隆演变引起的耐药及复发相关的恶性克隆。由于个体患者的恶性克隆具有异质性且处于不断演变中,运用单细胞测序方法相比于传统统一标准化治疗方案而言,可以更详细地了解血液肿瘤细胞亚群的基因组结构和克隆进化,促进血液肿瘤的个体化靶向治疗的实现<sup>[24]</sup>。ADELMAN等<sup>[25]</sup>研究者通过对急性髓系白血病患者的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的单细胞测序分析发

现,人类HSC的表观遗传重编程随着年龄的增长而增加,这些表观遗传改变的基因表达水平下调,继而导致了分化受损,表明髓系恶性肿瘤的风险增加与衰老和HSC的功能衰退有关。

## 3 探索更精细层次的标志物

疾病状态的无创监测、早期进展预测、治疗反应评估和复发的早期发现均依赖于分子标志物,单细胞测序技术为发现新的分子标志物提供了可靠工具。多发性骨髓瘤通过血液转移时会在外周血中残留微量的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC),这些CTC的遗传信息与骨髓中的骨髓瘤细胞相同,具有相似的异质性<sup>[26]</sup>。LOHR等<sup>[27]</sup>应用scRNA-seq分析了从2名多发性骨髓瘤患者的骨髓和外周血中收集的骨髓瘤细胞和B细胞,发现可以通过CD45、CD27和CD56标记物来区分CTC。区分这些CTC的分子特征可建立肿瘤克隆之间的相关性。因此,对外周血中的CTC应用单细胞测序可在临床环境中监测多发性骨髓瘤,定量评估与预后和治疗相关的基因,并且在揭示突变方面甚至比骨髓活检更敏感。这些研究结果揭示了单细胞测序结合CTC取代骨髓活检的潜力,可以广泛应用于更多涉及活检的血液肿瘤疾病。LEDERGOR等<sup>[28]</sup>利用scRNA-seq对从正常浆细胞到多发性骨髓瘤的整个临床进展谱进行敏感表征,在早期无症状和治疗后有微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)的患者中,能够灵敏而精确地检测罕见的残留肿瘤细胞,其分子特征与活动期骨髓瘤相似,这可能为个体化治疗提供依据。ZHU等<sup>[29]</sup>通过对T淋巴细胞急性白血病小鼠模型的scRNA-seq,确定了一个白血病干细胞特异性表达的调控因子SPI1,该基因决定了白血病干细胞的分子特征和活性,可作为急性白血病治疗的潜在新靶点。GAYDOSIK等<sup>[30]</sup>则通过对比探究侵袭性皮肤T细胞淋巴瘤的基因表达异质性,揭示了PCNA、ATP5C1、NUSPA1和TOX基因的共表达模式可作为该疾病的晚期诊断分子标志物。

单细胞测序使得研究者能够获得患者来源的肿瘤细胞的无偏性基因表达谱,可以前瞻性地识别肿瘤进展过程中最重要的基因或受影响的分子通路,为精准诊断和疾病风险分层、预测患者的进展风险提供了更多分子标签,有助于制定相对应的个体化治疗方案。已有利用单细胞测序鉴定急性髓系白血病骨髓中各亚型细胞的基因表达谱<sup>[31]</sup>,以及辅助多发性骨髓瘤的分期和定量评估预后基因的实例<sup>[27]</sup>。JANG等<sup>[32]</sup>通过单细胞测序数据分析将骨髓活检中的CD138阳性细胞分为4组,对应于递增的多发性骨

髓瘤进展风险水平,并证明了氧化磷酸化、Myc靶点和mTORC1信号通路的高表达与肿瘤进展相关。ZHANG等<sup>[33]</sup>通过scRNA-seq对B-ALL细胞进行识别,并纵向分析了诊断阶段、治疗阶段到复发阶段的肿瘤细胞分化状态,发现了缺氧信号通路这一有价值的治疗MRD的靶点,深入了解了MRD细胞的转录组特征,为其他血液系统恶性肿瘤和实体癌症的治疗提供了研究思路。

#### 4 精准区分恶性血液肿瘤种类及测评预后

血液恶性肿瘤包括各种形式的白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等,其中大部分血液肿瘤的发病机制均涉及多种基因突变引起的异常基因表达<sup>[34]</sup>。鉴于恶性血液病的不同种类疾病、不同患者群体、疾病不同阶段的巨大差异<sup>[35]</sup>,scRNA-seq能够进行更精准的区分疾病种类、危度分层,从而制定并及时改善治疗方案<sup>[36]</sup>。有研究<sup>[37-38]</sup>发现,利用scRNA-seq在骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)患者体内也检测到TP53突变,但该突变在不同的恶性血液病(AML、CLL、ALL)中具有异质性,这对MDS精准化诊断具有重要意义。FRAWLEY等<sup>[39]</sup>利用scRNA-seq对JAK2、MPL、CALR基因进行测序,有助于提高骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasm, MPN)患者的检出率,为传统的MPN突变基因筛选提供一种稳健的解决方案。KUENDGEN等<sup>[40]</sup>运用scRNA-seq检测了多名使用阿扎胞苷治疗MDS患者的常见突变基因(ASXL1、RUNX1、DNMT3A、IDH1、IDH2、TET2、TP53、NRAS、KRAS、FLT3、KMT2A-PTD、EZH2、SF3B1、SRSF2),以此来评估阿扎胞苷的远期疗效,并试图找到能够反映其预后的指标,发现MPN患者具有一定风险进展为MDS或AML。LANGABEER等<sup>[41]</sup>利用scRNA-seq发现携带CBLL380P基因突变的患者,尽管没有JAK2、MPL exon10、CA-LR exon9突变,但其仍然具有进展为MDS或AML的高风险。近年来研究发现t(8;21)AML患者的预后具有异质性,远期复发率约40%,因此需要对其进行危险分层治疗,进一步提高根治率。XIONG等<sup>[42]</sup>对2名t(8;21)AML患者进行了scRNA-seq分析,发现可用3个生物标志物来预测t(8;21)AML的预后。

#### 5 评估临床试验有效性和安全性的利器

单细胞测序可识别各类型细胞对药物或干预处理的响应差异,探索临床干预的动态调节网络<sup>[43]</sup>。近年来,单细胞测序被广泛用于精细衡量临床试验中新药的有效性和安全性,如监测急性淋巴细胞白血

病和淋巴瘤的患者接受治疗时外周血中的体细胞突变。ESCOBAR等<sup>[44]</sup>通过scRNA-seq发现,对TME实施免疫刺激(即IFN基因治疗)可通过单核细胞介导的IFN- $\alpha$ 基因传递来抑制模型小鼠的急性淋巴母细胞白血病。嵌合抗原受体(CAR)和T细胞受体(TCR)修饰的T细胞是当前过继性细胞治疗技术中两大核心技术,通过工程化编辑使得T细胞表达人工合成受体并具有特异性识别靶细胞的能力,可实现对血液相关肿瘤(如白血病和淋巴瘤)的长期缓解甚至治愈,正在彻底改变癌症的治疗景观。SHEIH等<sup>[45]</sup>通过scRNA-seq测序鉴定人脑中的CD19阳性壁细胞,表明正常脑组织中的一小部分壁细胞表达CD19,并被CD19 CAR-T细胞作为靶细胞,该治疗可能通过增加脑血管通透性导致神经毒性。scRNA-seq可能提供前所未有的高分辨率表达谱,能够根据罕见细胞亚群中靶细胞的表达来了解CAR治疗的有效性和安全性。PARKER等<sup>[46]</sup>通过scRNA-seq分析和免疫组库测序技术对CAR-T细胞输注到患者体内前后的克隆型多样性变化、输注后不同时期细胞基因表达特征和具体判断何种细胞类型会有更强的克隆动力进行了深入、细致的探究,为CAR-T细胞的治疗效果提升奠定了重要基础。STADTMAUER等<sup>[47]</sup>利用单细胞测序探究CRISPR-Cas9编辑的TCR-T细胞在人体临床试验的安全性和可行性,了解了基因编辑后细胞突变比例、基因表达及体内动态特征。在细胞免疫治疗研究中应用单细胞测序可以区分不同的免疫细胞组,分析浸润淋巴细胞的不同CAR-T细胞亚型和克隆扩增,从而有助于个性化的一线治疗。推进CAR-T细胞疗法的一个重要方向是利用scRNA-seq开发预测临床结果的生物标志物。目前,CAR-T细胞是使用患者自身的T细胞生产的,因此CAR-T质量和个体差异可能有很大关系。单细胞测序研究可以将输注前将CAR-T细胞产品中的T细胞特性与患者反应联系起来,有助于开发预测疗效的生物标志物。

#### 6 结 语

结合二代测序技术的单细胞测序分析在揭示免疫细胞异质性和深入理解血液肿瘤发病与耐药机制、疾病分层、疾病进展监测和靶向治疗反应性等方面已经显示出了良好的实用价值。目前,结合质谱、光谱等其他领域尖端技术的单细胞基因组、单细胞蛋白组等技术手段,以及已摆脱单细胞分离难题的空间转录组技术层出不穷,未来这些技术将与scRNA-seq结合起来,互相补充,共同促进对血液系统肿瘤的生理和病理过程在单个细胞精度和细胞网络层面上的综合认知。可以预见的是,未来单细胞测

序相关技术将更广泛地应用于各种血液肿瘤和免疫的研究,助力开发更好的诊断及预后测评的生物标志物,促进设计个体化的抗肿瘤方案,以提高治疗效果并避免耐药性。总之,未来单细胞测序的应用将具有深远和广阔的临床前景。

### [参考文献]

- [1] SHI M Y, DONG X Y, HUO L, *et al.* The potential roles and advantages of single cell sequencing in the diagnosis and treatment of hematological malignancies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1068: 119-133. DOI:10.1007/978-981-13-0502-3\_10.
- [2] 朱忠旭, 陈新. 单细胞测序技术及应用进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(5): 902-908. DOI:10.13417/j.gab.034.000902.
- [3] ZHU Y, HUANG Y, TAN Y, *et al.* Single-cell RNA sequencing in hematological diseases[J/OL]. *Proteomics*, 2020, 20(13): e1900228 [2022-07-02]. <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201900228>. DOI: 10.1002/pmic.201900228.
- [4] GAO R L, BAI S S, HENDERSON Y C, *et al.* Delineating copy number and clonal substructure in human tumors from single-cell transcriptomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(5): 599-608. DOI: 10.1038/s41587-020-00795-2.
- [5] TIROSH I, IZAR B, PRAKADAN S M, *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 189-196. DOI: 10.1126/science.aad0501.
- [6] GAO Y, NI X H, GUO H, *et al.* Single-cell sequencing deciphers a convergent evolution of copy number alterations from primary to circulating tumor cells[J]. *Genome Res*, 2017, 27(8): 1312-1322. DOI:10.1101/gr.216788.116.
- [7] PETTI A A, WILLIAMS S R, MILLER C A, *et al.* A general approach for detecting expressed mutations in AML cells using single cell RNA-sequencing[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3660 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31413257/>. DOI:10.1038/s41467-019-11591-1.
- [8] MANIER S, SALEM K Z, PARK J, *et al.* Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(2): 100-113. DOI:10.1038/nrclinonc.2016.122.
- [9] EUN K, HAM S W, KIM H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(3): 117-125. DOI:10.5483/bmbrep.2017.50.3.222.
- [10] HALBRITTER F, FARLIK M, SCHWENTNER R, *et al.* Epigenomics and single-cell sequencing define a developmental hierarchy in langerhans cell histiocytosis[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(10): 1406-1421. DOI:10.1158/2159-8290.CD-19-0138.
- [11] GUPTA R K, KUZNICKI J. Biological and medical importance of cellular heterogeneity deciphered by single-cell RNA sequencing[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(8): 1751 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32707839/>. DOI:10.3390/cells9081751.
- [12] THOMAS P D, KAHN M. Kat3 coactivators in somatic stem cells and cancer stem cells: biological roles, evolution, and pharmacologic manipulation[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(1): 61-81. DOI:10.1007/s10565-016-9318-0.
- [13] ZHANG D, CHEN Z, WANG D C, *et al.* Regulatory T cells and potential immunotherapeutic targets in lung cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(2): 277-290. DOI: 10.1007/s10555-015-9566-0.
- [14] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 613-628. DOI:10.1016/j.cell.2017.01.018.
- [15] BRIERLEY C K, MEAD A J. Single-cell sequencing in hematology [J]. *Curr Opin Oncol*, 2020, 32(2): 139-145. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000613.
- [16] VILLANI A C, SATIJA R, REYNOLDS G, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors[J/OL]. *Science*, 2017, 356(6335): eaah4573 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28428369/>. DOI: 10.1126/science.aah4573.
- [17] BARYAWNO N, PRZYBYLSKI D, KOWALCZYK M S, *et al.* A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia[J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1915-1932. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.040.
- [18] ANDOR N, SIMONDS E F, CZERWINSKI D K, *et al.* Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints[J]. *Blood*, 2019, 133(10): 1119-1129. DOI:10.1182/blood-2018-08-862292.
- [19] LITZENBURGER U M, BUENROSTRO J D, WU B J, *et al.* Single-cell epigenomic variability reveals functional cancer heterogeneity[J/OL]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 15 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118844/>. DOI: 10.1186/s13059-016-1133-7.
- [20] LEE J Y, YOON J K, KIM B, *et al.* Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an epithelial ovarian cancer investigated using next-generation sequencing[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 85 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25881093/>. DOI: 10.1186/s12885-015-1077-4.
- [21] BELL C C, FENNELL K A, CHAN Y C, *et al.* Targeting enhancer switching overcomes non-genetic drug resistance in acute myeloid leukaemia[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2723 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31222014/>. DOI: 10.1038/s41467-019-10652-9.
- [22] BUUS T B, WILLERSLEV-OLSEN A, FREDHOLM S, *et al.* Single-cell heterogeneity in sézary syndrome[J]. *Blood Adv*, 2018, 2(16): 2115-2126. DOI:10.1182/bloodadvances.2018022608.
- [23] COHEN Y C, ZADA M, WANG S Y, *et al.* Identification of resistance pathways and therapeutic targets in relapsed multiple myeloma patients through single-cell sequencing[J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 491-503. DOI:10.1038/s41591-021-01232-w.
- [24] 杨夏婉, 孙恺. 单细胞测序在血液系统疾病诊断和治疗中的研究进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(5): 443-446. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.020.
- [25] ADELMAN E R, HUANG H T, ROISMAN A, *et al.* Aging human hematopoietic stem cells manifest profound epigenetic reprogramming of enhancers that may predispose to leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1080-1101. DOI:10.1158/2159-8290.CD-18-1474.
- [26] GARCÉS J J, SIMICEK M, VICARI M, *et al.* Transcriptional profiling of circulating tumor cells in multiple myeloma: a new model to understand disease dissemination[J]. *Leukemia*, 2020, 34(2): 589-603. DOI:10.1038/s41375-019-0588-4.
- [27] LOHR J G, KIM S, GOULD J, *et al.* Genetic interrogation of

- circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(363): 363ra147[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27807282/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7037.
- [28] LEDERGOR G, WEINER A, ZADA M, *et al.* Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma[J]. *Nat Med*, 2018, 24(12): 1867-1876. DOI: 10.1038/s41591-018-0269-2.
- [29] ZHU H C, ZHANG L Z, WU Y L, *et al.* T-ALL leukemia stem cell 'stemness' is epigenetically controlled by the master regulator SPI1 [J/OL]. *eLife*, 2018, 7: e38314[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30412053/>. DOI:10.7554/eLife.38314.
- [30] GAYDOSIK A M, TABIB T, GESKIN L J, *et al.* Single-cell lymphocyte heterogeneity in advanced cutaneous T-cell lymphoma skin tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(14): 4443-4454. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0148.
- [31] YAN B, HU Y L, BAN K H K, *et al.* Single-cell genomic profiling of acute myeloid leukemia for clinical use: a pilot study[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1625-1630. DOI:10.3892/ol.2017.5669.
- [32] JANG J S, LI Y, MITRA A K, *et al.* Molecular signatures of multiple myeloma progression through single cell RNA-Seq[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2019, 9(1): 2[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30607001/>. DOI:10.1038/s41408-018-0160-x.
- [33] ZHANG Y C, WANG S C, ZHANG J L, *et al.* Elucidating minimal residual disease of paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia by single-cell analysis[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(2): 242-252. DOI: 10.1038/s41556-021-00814-7.
- [34] SAEZ B, WALTER M J, GRAUBERT T A. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2017, 129(10): 1260-1269. DOI:10.1182/blood-2016-10-692400.
- [35] 王明镜, 刘为易, 胡晓梅. 单细胞测序技术在恶性血液病诊疗中的应用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(3): 1059-1063. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2020.03.057.
- [36] BACHER U, SHUMILOV E, FLACH J, *et al.* Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(11): 113[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30420667/>. DOI:10.1038/s41408-018-0148-6.
- [37] STENGEL A, KERN W, HAFERLACH T, *et al.* The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases[J]. *Leukemia*, 2017, 31(3): 705-711. DOI:10.1038/leu.2016.263.
- [38] LODÉ L, AMEUR A, COSTE T, *et al.* Single-molecule DNA sequencing of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple TP53 alterations[J/OL]. *Haematologica*, 2018, 103(1): e13-e16[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29079597/>. DOI:10.3324/haematol.2017.176719.
- [39] FRAWLEY T, O'BRIEN C P, CONNEALLY E, *et al.* Development of a targeted next-generation sequencing assay to detect diagnostically relevant mutations of JAK2, CALR, and MPL in myeloproliferative neoplasms[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2018, 22(2): 98-103. DOI:10.1089/gtmb.2017.0203.
- [40] KUENDGEN A, MÜLLER-THOMAS C, LAUSEKER M, *et al.* Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics-an analysis of 128 patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(45): 27882-27894. DOI:10.18632/oncotarget.25328.
- [41] LANGABEER S E, CONNEALLY E, FLYNN C M. Myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia arising in idiopathic erythrocytosis [J/OL]. *Case Rep Hematol*, 2018, 2018: 4378310[2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29682367/>. DOI:10.1155/2018/4378310.
- [42] XIONG Q, HUANG S, LI Y H, *et al.* Single-cell RNA sequencing of t(8;21) acute myeloid leukemia for risk prediction[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(4): 1278-1288. DOI:10.3892/or.2020.7507.
- [43] SEE P, LUM J, CHEN J M, *et al.* A single-cell sequencing guide for immunologists[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2425 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30405621/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02425.
- [44] ESCOBAR G, BARBAROSSA L, BARBIERA G, *et al.* Interferon gene therapy reprograms the leukemia microenvironment inducing protective immunity to multiple tumor antigens[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2896 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30042420/>. DOI:10.1038/s41467-018-05315-0.
- [45] SHEIH A, VOILLET V, HANAFI L A, *et al.* Clonal kinetics and single-cell transcriptional profiling of CAR-T cells in patients undergoing CD19 CAR-T immunotherapy[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 219 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31924795/>. DOI:10.1038/s41467-019-13880-1.
- [46] PARKER K R, MIGLIORINI D, PERKEY E, *et al.* Single-cell analyses identify brain mural cells expressing CD19 as potential off-tumor targets for CAR-T immunotherapies[J]. *Cell*, 2020, 183(1): 126-142. DOI:10.1016/j.cell.2020.08.022.
- [47] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer[J/OL]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365 [2022-07-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029687/>. DOI:10.1126/science.aba7365.

[收稿日期] 2022-05-12

[修回日期] 2022-07-15

[本文编辑] 黄静怡, 沈志超