

文章编号 1006-8147(2023)01-0001-08

论 著

# 单细胞转录组探究胃癌转移过程中 MHC-Ⅱ 类分子的 演进缺失

胡逸恺<sup>1,2</sup>, 宋明坤<sup>2</sup>, 王旭东<sup>1</sup>, 姬倩颖<sup>1</sup>, 李龙<sup>2</sup>

(1.天津医科大学第二临床医学院 2018 级临床医学专业, 天津 300070; 2.天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 使用单细胞转录组数据绘制胃癌免疫微环境组成图谱, 探究胃癌转移过程中 MHC-Ⅱ 类分子演进缺失的免疫机制。方法: 在 GEO 数据库中获取胃癌原发癌和转移癌单细胞数据集, 基于 R(4.1.2)、Python(3.7), 对该数据集进行分群、拷贝数变异(CNV)、拟时序、基因集变异(GSVA)分析、转录因子分析、非负矩阵分解、免疫细胞细分亚群和基因集富集分析, 并结合来自 TCGA 等数据库的多个公共转录组数据集, 验证所得出的结论。结果: 拟时序分析反映 MHC-Ⅱ 类分子在癌症转移过程中演进缺失, 转录因子分析观察到 *IRF1*、*STAT1* 等转录因子在原发癌中的高表达, 非负矩阵分解探查在原发癌中独有的干扰素(*IFN*) $\gamma$  表达模块, 但原发癌展现了较冷的免疫微环境。免疫细胞的亚群分类展示了树突状细胞、巨噬细胞、T 细胞等在微环境中的分布。细胞通讯分析显示 MDSC 样和 *SPPI*<sup>+</sup> 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)抑制了转移癌中 *IFN* $\gamma$  的分泌并表现了促血管生成活性。基于这两种 TAM 的生物标志构建的评分在胃癌中具有预后意义(*Log-Rank*  $P < 0.05$ )。scPAGE 在较大规模的 bulk 转录组层面对单细胞分析获得的结果进行了验证。结论: TAM 介导 *IFN* $\gamma$  分泌抑制, 其在转移癌较原发癌中分泌相对较少, 是 MHC-Ⅱ 在两者间表达出现差异的原因之一。针对 MDSC 样 TAM 和 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 的研究可能是肿瘤免疫治疗的另一突破点。

**关键词** 胃癌; 单细胞分析; 单细胞 RNA 测序; TAM; *SPPI*; MHC-Ⅱ

中图分类号 R392.9

文献标志码 A

## Single-cell transcriptome analysis revealed the evolutionary deletion of MHC-Ⅱ expression in gastric cancer metastasis

HU Yi-kai<sup>1,2</sup>, SONG Ming-kun<sup>2</sup>, WANG Xu-dong<sup>1</sup>, JI Qian-ying<sup>1</sup>, LI Long<sup>2</sup>

(1. Class of 2018, Clinical Medicine, Second School of Clinical Medicine, Tianjin 300070, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To depict the immune microenvironment atlas of gastric cancer and to explore the immune mechanism under the evolutionary deletion of MHC-Ⅱ expression in gastric cancer metastasis with single-cell transcriptome data. **Methods:** A single-cell data set of primary and metastatic gastric cancer was obtained from the Gene Expression Omnibus(GEO) database, combined with multiple datasets like TCGA. With R(4.1.2) and Python(3.7), clustering, copy number variation(CNV) analysis, pseudotime analysis, gene set variation analysis(GSVA), transcription factor analysis, consensus non-negative matrix factorization analysis, immune cell subpopulation analysis and gene set enrichment analysis were conducted. Combined with multiple public transcriptome data sets from TCGA and other databases, the conclusions were verified. **Results:** The depleted expression of MHC-Ⅱ in metastatic cancer was observed by pseudotime analysis, while a high expression of *IRF1* and *STAT1* in primary carcinoma was observed by transcription factor analysis. Consensus Non-negative Matrix Factorization obtained a unique *IFN* $\gamma$  expression module from the primary tumor, but a colder immune microenvironment was observed in primary tumor. Immune cell subpopulation analysis reveals the distribution of dendritic cells, macrophages and T cells in the tumor microenvironment. Cell chat analysis shows that MDSC-like and *SPPI*<sup>+</sup> Tumor-associated Macrophages(TAM) were found to play a crucial part in angiogenesis. The score constructed on the basis of TAMs' biomarkers shows prognostic significance in gastric cancer (*Log-Rank*  $P < 0.05$ ). ScPAGE verified the results of single cell analysis at the bulk transcriptome level. **Conclusion:** The inhibition of *IFN* $\gamma$  emission mediated by TAM in metastatic tumor may contribute to the difference of MHC-Ⅱ expression between the primary and metastatic sites. Research on MDSC-like and *SPPI*<sup>+</sup> TAM may become another breakthrough point of tumor immunotherapy.

**Key words** stomach neoplasms; single-cell analysis; single-cell RNA-seq; TAM; *SPPI*; MHC-Ⅱ

胃癌(gastric cancer, GC)的高发病率和不良预

后使其成为世界范围内的一个主要健康问题。转移是胃癌晚期病情进展、影响患者生存的重要事件<sup>[1]</sup>。探索主要组织相容性复合物(MHC)-Ⅱ在肿瘤中的调控机制一直是肿瘤免疫研究的热点, 促进 MHC-

基金项目 天津市高等学校大学生创新创业训练计划(202010062016)

作者简介 胡逸恺(2001-), 男, 学士在读, 研究方向: 肿瘤免疫; 通信

作者: 李龙, E-mail: Long.Li@tmu.edu.cn。

Ⅱ类分子在肿瘤细胞的表面表达一直被作为一种激活肿瘤免疫的方法。

新兴的单细胞转录组研究正在成为研究肿瘤发生、转移等机制的重要工具<sup>[2]</sup>。目前罕有文献使用单细胞转录组针对胃转移癌进行研究,且研究重心都在建立胃原发癌和转移癌的微环境图谱<sup>[3-4]</sup>。本文使用 scRNA-seq(single-cell RNA sequencing)分析技术对一公共单细胞数据集进行再次探索,发现了 MHC-Ⅱ分子在原发癌和转移癌中的差异表达并探索其相关机制(图 1A)。

## 1 材料与方法

**1.1 数据获取** GEO(Gene Expression Omnibus)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中序列号为 GSE163558 的单细胞数据集被选择作为本文主要数据。数据包括 3 个胃原发癌样本(PT1、PT2、PT3)、两个肝转移癌样本(Li1、Li2)、两个淋巴结转移样本(LN1、LN2)、一个腹膜转移癌样本(P1)、一个卵巢转移癌样本(O1)。使用 R 包 Seurat(4.1.0)读入、质控、分群。质控淘汰细胞标准有:(1)细胞表达基因<300 个。(2)线粒体基因组的 UMI(Unique Molecular Identifiers)>50%。(3)核糖体基因组的 UMI<3%。线粒体基因、MALAT1 管家基因和在少于 3 个细胞中检测到的基因被去除。根据标准流程进行归一化等处理,然后使用 R 包 Harmony(0.1.0)整合转移癌和原发癌样本。

### 1.2 癌细胞分析

**1.2.1 拷贝数变异(CNV)、拟时序、基因集变异(GSVA)分析** CNV(Copy Number Variation)探索使用了 R 包 inferCNV(1.11.2)。转移相关基因列表是根据前人对 TCGA 泛癌的转移研究制作<sup>[5]</sup>,并加入了 MHC-Ⅱ相关分子的基因。Monocle(2.22.0)标准流程用于拟时序分析。利用 CytoTRACE(0.3.3)从另一角度对癌症细胞进行拟时序分析<sup>[6]</sup>。GSVA(Gene Set Variation Analysis)分析中,按照亚群比例从每个样本抽取 1 200 个细胞,使用 R 包 scater(1.22.0)中函数 aggregateAcrossCell 获取伪 bulk(pseudobulk)值。按照样本表达特征的聚类使用了 R 包 ConsensusClusterPlus(1.58.0),使用 R 包 GSVA(1.42.0)进行基因集变异分析。通路评分的依据来自 Alexander Bagaev 等提出的免疫微环境分类<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 转录因子分析和非负矩阵分解** 使用 SCENIC(1.2.4)探索癌细胞中转录因子的表达情况。使用基于 Python 的 cNMF(Consensus Non-negative Matrix Factorization, <http://github.com/dylkot/cNMF>)模块对癌症细胞进行非负矩阵分解。采取 Chen 等<sup>[8]</sup>

的方法提取基因表达特征(signature)。使用 Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html>)网站对其进行基因富集注释。

**1.3 免疫细胞细分亚群和基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)** 按照 Seurat 标准流程处理亚群细胞。T 细胞和髓系细胞分群主要参考了张泽民团队<sup>[9-11]</sup>的文章,CAF(cancer associated fibroblast)的分群则参考了 Elyada 等<sup>[12]</sup>和 NuRmik 等<sup>[13]</sup>的研究。R 包 irGSEA(1.1.2)被用于细胞亚型功能的注释和分析。mregDC(mature DCs enriched in immunoregulatory molecules)标志来自 Maier 等<sup>[14]</sup>的文章。

**1.4 TCGA 和单细胞基因对特征(scPAGE)泛癌验证** 在 GDC(Genomic Data Commons)官网获取 TCGA 项目(The Cancer Genome Atlas)中所有具有转移癌数据肿瘤的表达数据信息,参考 Wang 等<sup>[15]</sup>的研究对其进行处理。选取同患者的原发癌和转移癌 RNA 测序数据,使用不同指标进行打分, Wilcoxon 秩和检验验证组间统计学差别意义。使用 FindMarker 函数提取在 *SPPI*<sup>+</sup>和 MDSC 样肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophage, TAM)两种细胞中的 TOP20 高变基因。一种基于主成分分析的权重确定方法<sup>[16]</sup>被用于确认 TAM 细胞各个标志基因在打分中的权重,在 MATLAB Online(<https://matlab.mathworks.com/>)上计算其权重( $\omega_i$ )并分别乘以对应的 40 个基因表达值,评分(Score)为:

$$Score = \sum_{i=1}^{40} E_i \omega_i$$

计算分数的预后价值时,使用时序检验验证分数的预后价值。生存分析借助了 GEPIA2。

单细胞基因对特征泛癌验证使用基于 Python(3.6)的 scPAGE(Single-Cell Gene Pair Signatures)模块(<https://github.com/rwang-z/scPAGE>)寻找在原发癌和转移癌中存在的基因对。在样本中按细胞亚群比例分别抽取原发癌和转移癌各 2 000 个细胞。因为 TCGA 数据库中没有胃癌转移灶的 RNA 表达数据,使用 TCGA 中结直肠癌 RNA 表达数据的原发癌和转移癌间差异基因作为输入的基因列表( $n=1\ 618$ ),获得的基因对在 14 个混合(bulk)转录组验证集中进行验证。

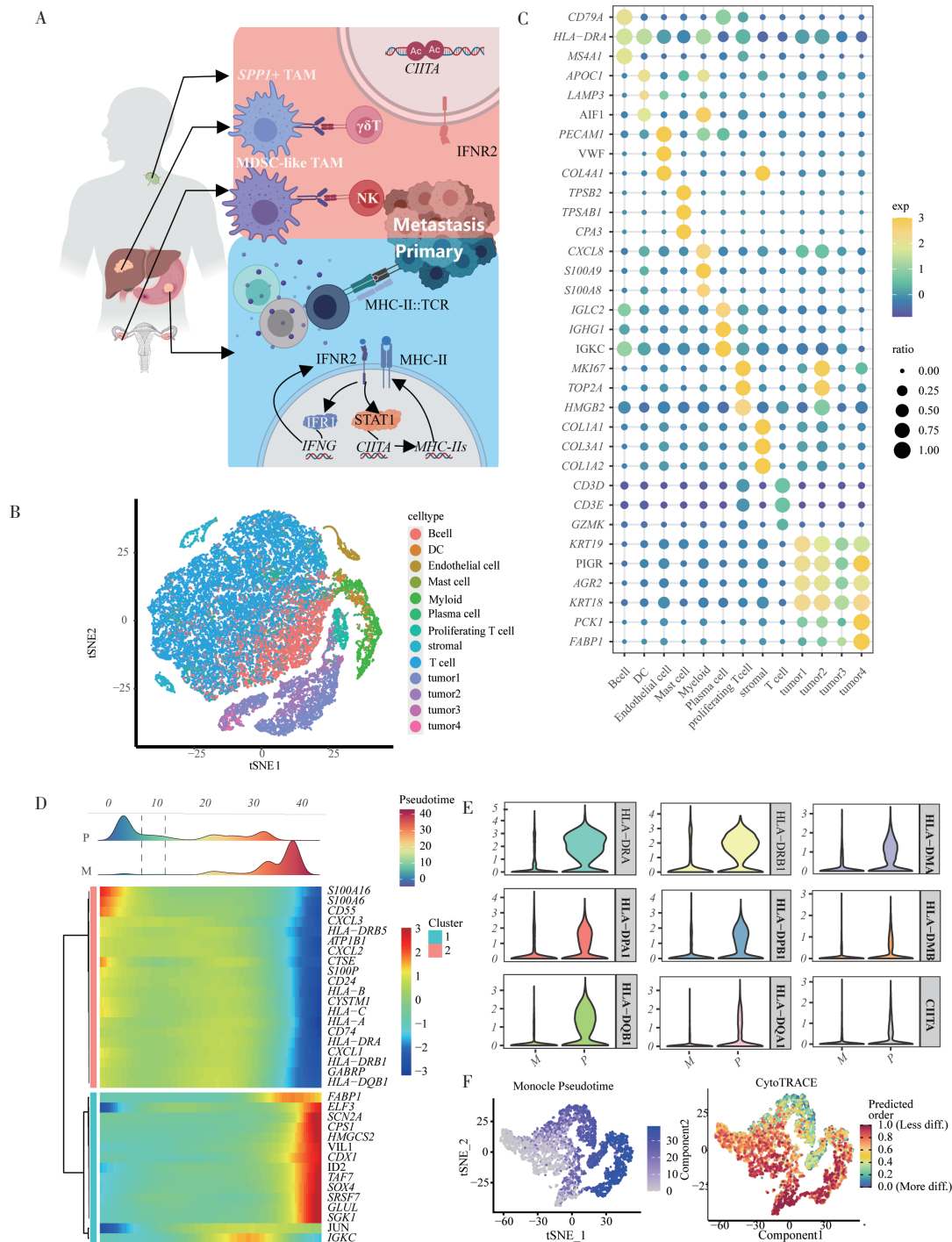
**1.5 统计学处理** 所有统计方法均采用 R 软件执行(4.1.2)。对非正态分布的数据采用 Wilcoxon 检验或 Kruskal-Wallis 检验。采用 R 包 survival 进行生存分析。采用 Log-Rank 检验来确定各组间的生存时间是否存在差异。

## 2 结果

**2.1 MHC-II 类分子在肿瘤演化中的“缺失”现象** 样本总计 41 367 个细胞,降维分群获得 13 个细胞亚群(图 1B)。示意图展示了部分标志基因(图 1C)。拟时序分析在基因层面探究了肿瘤的演化进程。monocle 热图展示了随着拟时序进化变化最为明显的 33 个基因,其中多个 MHC 相关基因(图 1D);在癌细胞中,

MHC-II 类分子在原发癌中特异性高表达,而在转移癌中表达“缺失”(图 1E)。基于 CytoTRACE 技术的探索验证了 monocle 计算中得出的拟时序结果(图 1F)。

关于原发癌和转移癌的免疫微环境,转移癌样本中 *FABP1*、*GLUL* 表达增加,*CXCL1* 等免疫抑制因子则出现了下降的趋势。对经过伪 bulk(pseudo-bulk)转化过的单细胞样本进行打分(图 2A)。TGCA



注:A:原发癌的免疫细胞分泌大量 IFN $\gamma$ ,一方面诱导肿瘤自身 IFN $\gamma$  的分泌,另一方面通过 JAK/STAT1 通路激活 CIITA,上调肿瘤细胞表面 MHC-II 类分子表达;转移癌中主要的 IFN $\gamma$  分泌细胞被抑制;肿瘤细胞 MHC-II 类分子缺失;原发癌的免疫微环境相对较“冷”,而转移癌较“热”;B:tSNE 降维图;C:细胞分群标志气泡图;D:原发癌和转移癌的拟时序关系。热图中,按拟时序上升和下降的基因被分开;E:小提琴图展示 MHC-II 类基因在原发癌和转移癌中差异表达(M:转移癌,P:原发癌);F:Cytotrace 与 Monocle 拟时序一致;IFN $\gamma$ :干扰素  $\gamma$ ;MHC-II:主要组织相容性复合物 II

图 1 降维聚类分群和 CNV 探索

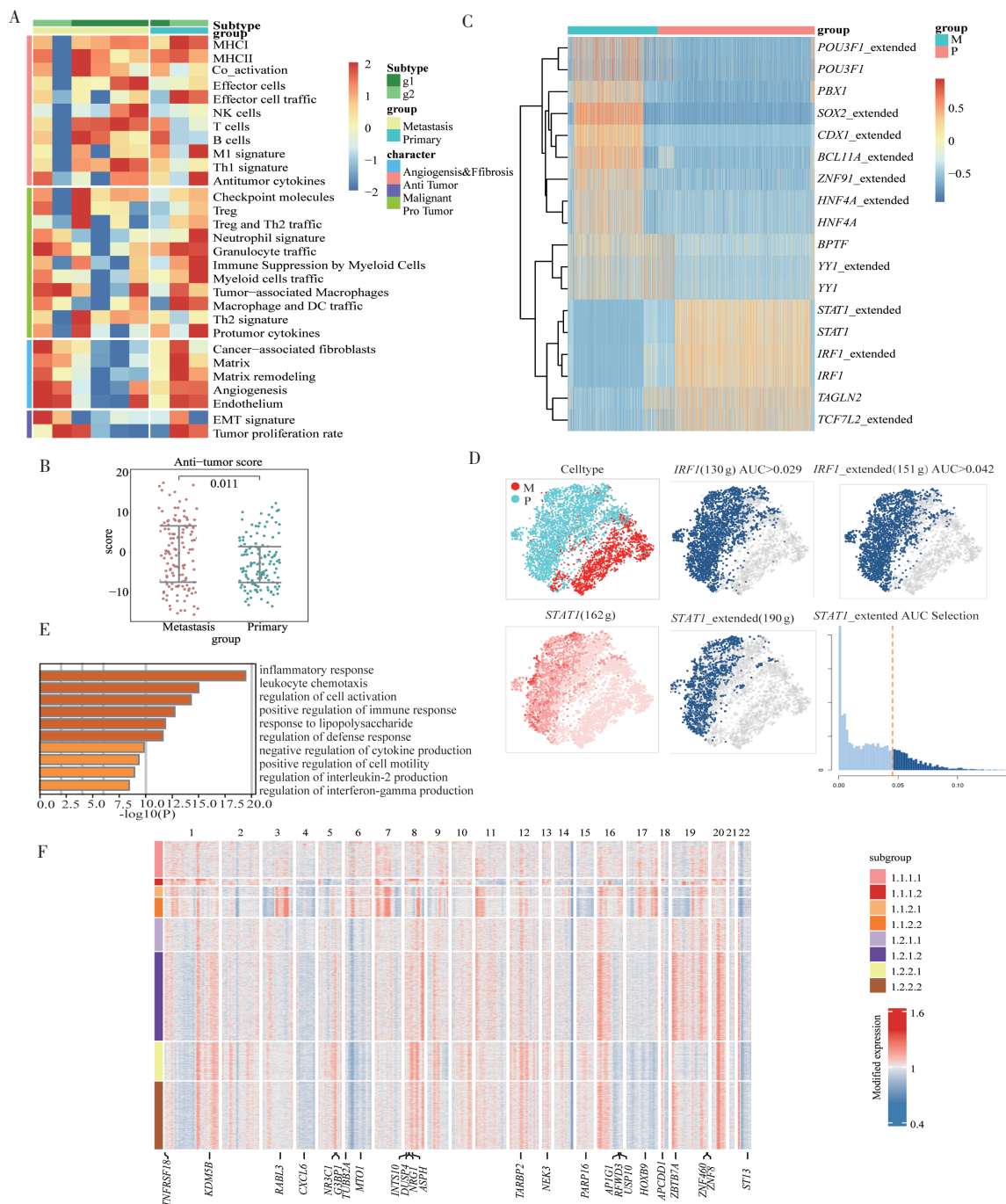
Fig 1 Dimensional reduction and exploration on CNV



中转移癌的抗癌分数(anti-tumor score)高于原发癌组( $P<0.05$ ,图 2B),对单细胞数据进行了验证。

**2.2 转录因子与 CNV 分析探究 MHC-II 分子演进丢失原因** 肿瘤演进过程中 MHC-II 类分子在转移癌中丢失,基于转录因子的研究对其原因进行了解释。转录因子 *STAT1*、*IRF1* 的作用在原发癌中更加明显,而转移癌中几乎不能探得(图 2C、2D)。采用非负矩阵分解(cNMF)验证前文拟时序结果在

样本间的相关性,在原发癌中得到了 3 个聚合模块(P1、P2、P3),在转移癌中也得到 3 个模块(P4、P5、P6)。富集分析(图 2E)发现 P1 与细胞对于干扰素( $\text{IFN}$ ) $\gamma$  的反应有关。其他模块中也观察到拟时序分析中相应的基因变化。癌症与体细胞拷贝数异常紧密相关,转移癌中发生 CNV 事件的转移相关基因映射在热图上对应的染色体位置(图 2F)。MHC 相关基因在转移癌细胞中并未发生 CNV 事件。



注:A:29个基因分类评分对 pseudobulk 转化后的单细胞样本评分,亚型(subtype)按照表达特征自动聚类;B:对应抗肿瘤特性(anti-tumor)的评分在 TCGA 转移癌相对原发癌中显著上升(*Wilcoxon test*,  $P<0.05$ );C:转录因子分析热图;D:tSNE 降维图展示了 *STAT1* 和 *IRF1* 两个转录因子在原发癌和转移癌间的差异表达;E:Metascape 富集得出 P1 对应的通路;F:CNV 热图,出现在 CNV 事件的转移相关基因被映射在热图上

图 2 MHC-II 在转移癌细胞中的缺失

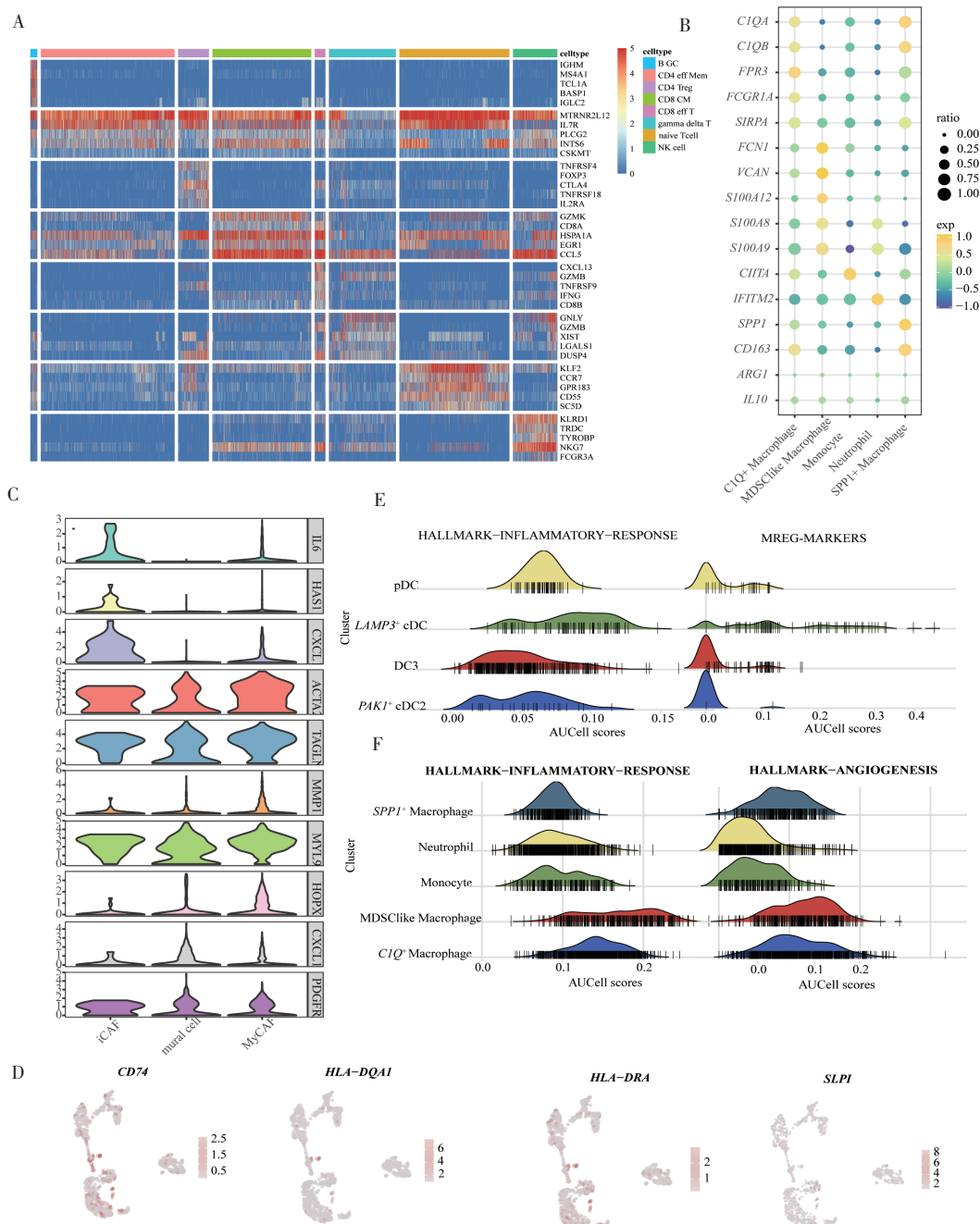
Fig 2 Evolutionary deletion of MHC-II expression in cancer cell



**2.3 免疫细胞在胃癌中的微环境图谱揭示 TAM 细胞亚群特殊意义** 免疫细胞的亚群分类展示了复杂的免疫微环境组成(图 3A、3B、3C)。在免疫细胞群中,MyCAF 和 iCAF 可以被清晰地鉴定出来,而 apCAF 的相关基因也可以在间质细胞中鉴定得出(图 3D)。成熟树突状细胞(DC)亚群的 *LAMP3*<sup>+</sup> DC 亚群在免疫细胞亚群中被探得。mregDC 标志基因对细胞进行的评分结果显示了部分 *LAMP3*<sup>+</sup> DC 的免疫抑制属性(图 3E)。SPPI<sup>+</sup> TAM 在免疫细胞群中出现。GSEA 分析展示了 SPPI<sup>+</sup> TAM、MDSC 样 TAM

较强的促血管生成能力(图 3F)。

**2.4 TAM 的细胞通讯研究和胃癌预后评分的构建、验证** 细胞通讯分析解释了细分亚群和 GSEA 发现的现象(图 4A)。首先是 IFN $\gamma$ ,其对原发癌和转移癌的作用的差异与 MHC-II 变化一致:在转移癌中,IFN $\gamma$  对转移癌几乎没有作用;而原发癌中, $\gamma\delta$ T 细胞、NK 细胞、CIQ<sup>+</sup>细胞和 CD8 效应 T 细胞分泌了大量的 IFN $\gamma$ 。SPPI<sup>+</sup> TAM 和 MDSC 样 TAM 通过 CD80-CTLA4 相互作用在转移癌中对 IFN $\gamma$  主要分泌细胞发挥了抑制作用。CIQ<sup>+</sup> TAM 亦在原发癌和



注:A:热图展示 T 细胞细分亚群的高表达基因;B:气泡图展示髓系细胞分群标志;C:小提琴图展示 CAF 分群标志;D:Feature plot 展示 ap-CAF 标志在 CAF 中有检出;E:峰峦图展示 DC 细胞炎症反应和 mreg 标志物评分;F:峰峦图展示了 TAM 炎症反应和血管生成打分

图 3 胃原发癌和转移癌中的免疫细胞组成和功能

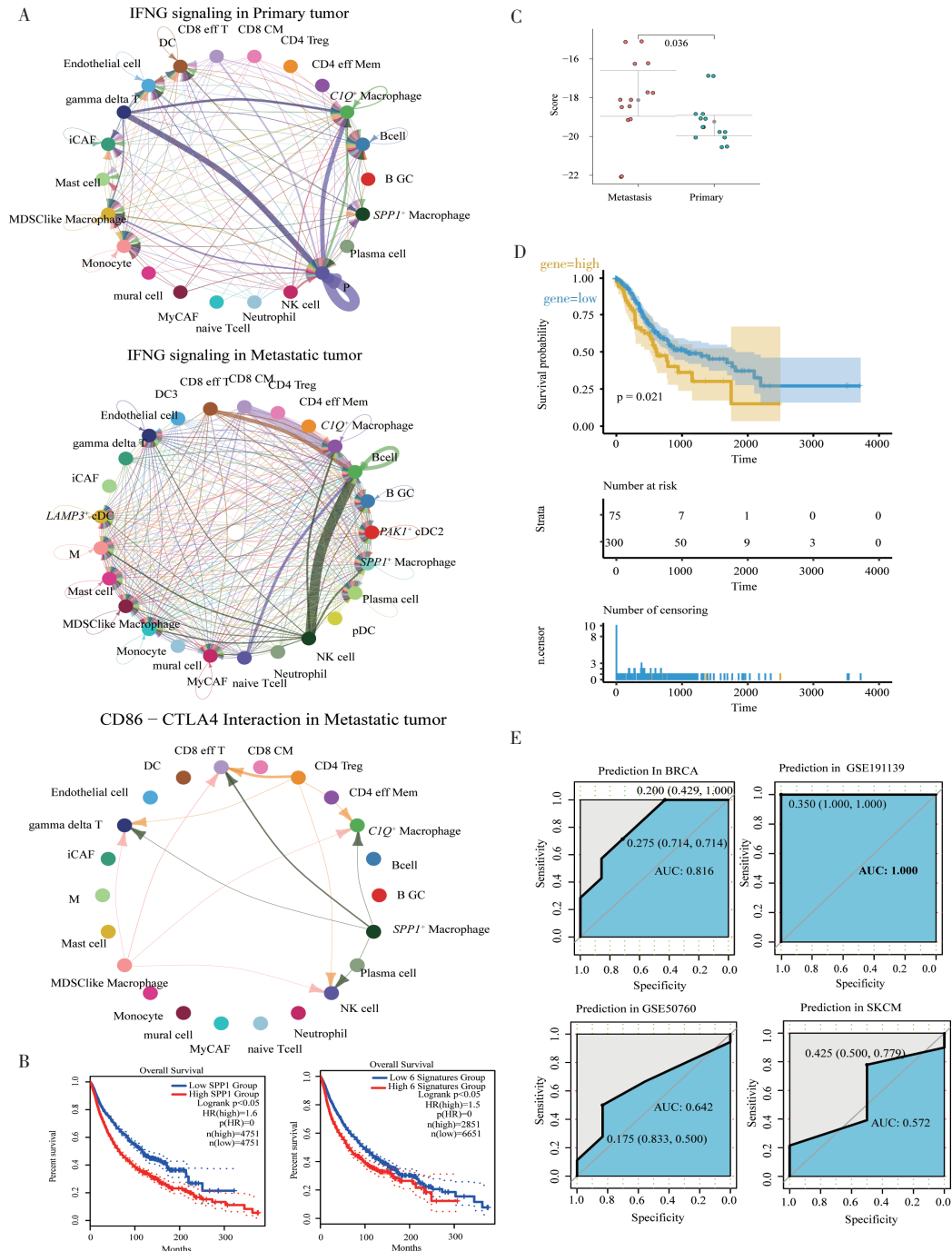
Fig 3 The functions of the immune cell components in primary and metastatic GC

转移癌中起到了重要的免疫抑制作用。

血管内皮细胞的细胞通讯分析显示, MyCAF 主要通过介导胶原纤维分泌和内皮细胞相互作用影响血管内皮细胞参与血管生成。 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 主要通过分泌型磷蛋白 1 (SPP1) 蛋白的分泌影响血管生成。 MDSC 样 TAM 通过血管内皮生长因子 (VEGFA) 的作用促进血管生成 (数据未展示)。

TCGA 泛癌水平 (Pan-cancer) 的生存分析显示,

*SPPI*<sup>+</sup> 和 MDSC 样细胞的标志基因高表达预示了较差的预后 (图 4B, *Log-Rank*  $P < 0.05$ )。提取 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 和 MDSC 样 TAM 的基因标志, 通过一种基于主成分分析的算法确定其权重, 构建评分。在 TCGA 数据库腺癌的 RNA 测序数据集中, 与原发癌相比, 转移癌的评分较高 ( $P < 0.05$ ) (图 4C); 在基于 TCGA 数据库胃癌数据的预后分析中, 评分较高组有较差的预后 (图 4D, *Log-Rank*  $P < 0.05$ )。



注: A: 细胞通讯分析展示了原发癌和转移癌中 IFN $\gamma$  的分泌情况, TAM 抑制了转移癌中的 IFN $\gamma$  分泌细胞; B: TCGA 泛癌中 *SPPI* 基因和 MDSC-like TAM 标志评分的预后; C: 根据 *SPPI*<sup>+</sup> 和 MDSC-like TAM 构建的分数在原发和转移癌间有显著差异 (*Wilcoxon test*,  $P < 0.05$ ); D: K-M (Kaplan-Meier) 图展示了根据 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 和 MDSC-like TAM 标志基因构建的评分在 TCGA 胃癌中的预后分析价值; E: scPAGE 寻找得到的基因对在腺癌如 BRCA (乳腺癌)、GSE191139 (胃癌)、预测效果较好, 在其他癌种中如 SKCM (黑色素瘤) 则预测效果不佳

图 4 细胞通讯和评分构建、验证

Fig 4 Cell communication and validation of the established score

在 GEO 数据库获得的胃腺癌、乳腺癌等腺癌测序数据集中,利用 scPAGE 基因对的预测获得了较高的曲线下面积(AUC)分数,来自 GSE191139 的 AUC 值达到了 1,TCGA 数据库中 6 种腺癌 AUC 值达到了 0.75 以上,但在其他肿瘤中得分较低(图 4E)。

### 3 讨论

在本研究的样本中,转移癌 MHC-II 分子的表达较胃原发癌有明显下降且与肿瘤演进的轨迹相符合。转录因子分析发现了 *IRF1* 和 *STAT1* 在原发癌中相对高表达,CNV 分析排除了 MHC-II 类基因的丢失,细胞通讯发现了原发癌相对转移癌癌细胞所接受 IFN $\gamma$  作用上调。Zhou 等<sup>[17]</sup>研究提示,*IRF1* 可以在 IFN $\gamma$  作用下表达上调,分泌 IFN 以应对病毒和肿瘤的危害,这样的活动在肿瘤中形成了一个正反馈的作用,本文的细胞通讯分析证明了这一现象。JAK-STAT1 通路也可以在 IFN $\gamma$  作用下激活,从而上调 *CIITA* 表达,而后者是 MHC-II 表达的强有力的促进因素,这和前文中观察到 *CIITA* 与 MHC-II 在原发癌和转移癌间的差异表达是相符合的<sup>[18-19]</sup>。因此,IFN $\gamma$  表达差异引起的 JAK-STAT1 通路激活状态改变是 MHC-II 表达差异的重要原因之一。

幽门螺杆菌导致胃癌免疫微环境中 IFN $\gamma$  表达下降的现象已被广泛报道<sup>[20]</sup>,由瘤内细菌引起的 IFN $\gamma$  升高暂可排除。研究显示,*FABP1* 和 *GLUL* 与胃癌和肝癌较好的预后相关<sup>[21-22]</sup>,*CXCL1* 可促进多种肿瘤的转移<sup>[23]</sup>。但本研究样本中 *FABP1* 和 *GLUL* 转移癌表达增加,*CXCL1* 表达减少,即在转移癌中,与原发灶相比,与较好预后相关的基因上调,与较差预后相关的基因下调,而与较好预后相关的基因基本代表了“热”的免疫微环境,反之亦然。可以由此推测,转移癌的免疫微环境相对于原发癌更接近“热肿瘤”。TCGA 泛癌水平的免疫微环境分型证明了这一点。所以,原发癌中的微环境并不更“热”,刺激产生 IFN $\gamma$  的原因更多还是来自肿瘤细胞自身。转移癌细胞通讯分析发现了 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 和 MDSC 样 TAM 通过 CTLA-4 抑制 IFN $\gamma$  分泌细胞。Gao 等<sup>[24]</sup>研究中观察到 IFN $\gamma$  相关基因的丢失诱导了 Anti-CTLA-4 免疫治疗耐药,提示 CTLA-4 和 IFN $\gamma$  间的调节关系。同时,表观遗传修饰对 IFN $\gamma$ 、*CIITA* 和 MHC-II 类基因表达的演进缺失也可能起到了重要作用<sup>[25]</sup>。

除了对 IFN $\gamma$  的抑制作用,*SPPI*<sup>+</sup> TAM 和 MDSC 样 TAM 还在血管生成、免疫抑制中展示了重要作用。基于这两种细胞生物标志构建的评分在区别原

发和转移腺癌、预测胃癌预后中取得了成功。针对 MDSC 样和 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 的清除、分化措施或促进 IFN- $\gamma$  在肿瘤环境中的分泌可能会是未来腺癌免疫治疗的一个突破点。值得一提的是,*SPPI*<sup>+</sup> TAM 在前人对胃癌的单细胞探索中并未被探得<sup>[26]</sup>,本研究证实了 *SPPI*<sup>+</sup> TAM 在胃原发和转移癌中的存在。

scPAGE 技术将单细胞水平的结论推广到了大样本量的混合转录组层面。基因对在腺癌中表现出了良好的预测能力,但是在其他肿瘤中效力不佳,这一定程度上也说明了转移相关基因在肿瘤之间的异质性。

### 参考文献:

- [1] SEENEVASEN L, BESSÈDE E, MÉGRAUD F, et al. Gastric cancer: advances in carcinogenesis research and new therapeutic strategies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3418.
- [2] LAWSON D A, KESSENBROCK K, DAVIS R T, et al. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(12): 1349-1360.
- [3] JIANG H, YU D, YANG P, et al. Revealing the transcriptional heterogeneity of organ-specific metastasis in human gastric cancer using single-cell RNA Sequencing[J]. Clin Transl Med, 2022, 12(2): e730.
- [4] WANG B, ZHANG Y, QING T, et al. Comprehensive analysis of metastatic gastric cancer tumour cells using single-cell RNA-seq[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1141.
- [5] CHEN F, ZHANG Y, VARAMBALLY S, et al. Molecular correlates of metastasis by systematic pan-cancer analysis across the cancer genome atlas[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(2): 476-487.
- [6] GULATI G S, SIKANDAR S S, WESCHE D J, et al. Single-cell transcriptional diversity is a hallmark of developmental potential[J]. Science, 2020, 367(6476): 405-411.
- [7] BAGAEV A, KOTLOV N, NOMIE K, et al. Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy[J]. Cancer Cell, 2021, 39(6): 845-865.e7.
- [8] CHEN Y, YIN J, LI W, et al. Single-cell transcriptomics reveals regulators underlying immune cell diversity and immune subtypes associated with prognosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Res, 2020, 30(11): 1024-1042.
- [9] GUO X, ZHANG Y, ZHENG L, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 978-985.
- [10] LIU Y, ZHANG Q, XING B, et al. Immune phenotypic linkage between colorectal cancer and liver metastasis[J]. Cancer Cell, 2022, 40(4): 424-437.e5.
- [11] REN X, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Insights gained from single-cell analysis of immune cells in the tumor microenvironment[J]. Annu Rev Immunol, 2021, 39: 583-609.
- [12] ELYADA E, BOLISSETTY M, LAISE P, et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts[J]. Cancer Discov, 2019, 9(8): 1102-1123.



- [13] NURMIK M, ULLMANN P, RODRIGUEZ F, et al. In search of definitions; cancer-associated fibroblasts and their markers [J]. Int J Cancer, 2020, 146(4): 895-905.
- [14] MAIER B, LEADER A M, CHEN S T, et al. A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity [J]. Nature, 2020, 580(7802): 257-262.
- [15] WANG R, ZHENG X, WANG J, et al. Improving bulk RNA-seq classification by transferring gene signature from single cells in acute myeloid leukemia [J]. Brief Bioinform, 2022, 23(2): bbac002.
- [16] 韩小孩, 张耀辉, 孙福军, 等. 基于主成分分析的指标权重确定方法 [J]. 四川兵工学报, 2012, 33(10): 124-126.
- [17] ZHOU H, TANG Y, ZHENG C. Revisiting IRF1-mediated antiviral innate immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 64: 1-6.
- [18] ADHIKARI A, COBB B, EDDINGTON S, et al. IFN- $\gamma$  and CHITA modulate IL-6 expression in skeletal muscle [J]. Cytokine X, 2020, 2(2): 100023.
- [19] CORRY J, MOTT H R, OWEN D. Activation of STAT transcription factors by the Rho-family GTPases [J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(5): 2213-2227.
- [20] ITO N, TSUJIMOTO H, UENO H, et al. Helicobacter pylori-mediated immunity and signaling transduction in gastric cancer [J]. J Clin Med, 2020, 9(11): 3699.
- [21] ONSTENK W, SIEUWERTS A M, MOSTERT B, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59058-59069.
- [22] SCHMIDT A, ARMENTO A, BUSSOLATI O, et al. Hepatoblastoma: glutamine depletion hinders cell viability in the embryonal subtype but high GLUL expression is associated with better overall survival [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(11): 3169-3181.
- [23] KEMP S B, CARPENTER E S, STEELE N G, et al. Apolipoprotein E promotes immune suppression in pancreatic cancer through NF- $\kappa$ B-mediated production of CXCL1 [J]. Cancer Res, 2021, 81(16): 4305-4318.
- [24] GAO J, SHI L Z, ZHAO H, et al. Loss of IFN- $\gamma$  pathway genes in tumor cells as a mechanism of resistance to anti-CTLA-4 therapy [J]. Cell, 2016, 167(2): 397-404.e9.
- [25] IVASHKIV L B. IFN $\gamma$ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(9): 545-558.
- [26] CHENG S, LI Z, GAO R, et al. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells [J]. Cell, 2021, 184(3): 792-809.

(2022-05-05 收稿)

·读者·作者·编者·

## 《天津医科大学学报》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号: 按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计: 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究), 实验设计(应告知具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等), 临床试验设计(应告知属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等); 主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明, 尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述: 用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料, 用  $M(QR)$  表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选择合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析; 对具有重复实验数据检验回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达: 应写明所用统计学方法的具体名称(如: 成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等), 统计量的具体值(如  $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$  等); 在用不等式表示  $P$  值的情况下, 一般情况下选用  $P>0.05$ 、 $P<0.05$  和  $P<0.01$  3 种表达方式, 无须再细分为  $P<0.001$  或  $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 应再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部