DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2022.03.15

· 综述 ·

单细胞测序技术在胃癌研究中的应用*

齐茜[1,2],刘鹏[1],王明义[1],王玉珊[2],罗红[2](1.威海市立医院中心实验室,山东威海 264200;2.大连医科大学检验医学院,辽宁大连 116044)

摘要:胃癌是一种高度侵袭性的癌症,在靶点、调控机制、免疫微环境的细胞种类、状态和亚群分布等方面具有很强的异质性,传统的群体水平分析无法精确揭示这些差异性。而单细胞测序技术(single cell sequencing,SCS)具有能够鉴定细胞异质性的优势,有助于为胃癌异质性的研究拓宽新思路,对胃癌的精准诊断、筛选潜在免疫治疗靶点和预后评估具有重要价值。该文综述了单细胞测序技术在胃癌免疫微环境、胃癌细胞异质性、早期胃癌病变和胃癌细胞图谱构建等方面的应用。

关键词:单细胞测序;胃癌;免疫微环境;异质性;精准医疗

中图分类号:R446;R735.2　　**文献标志码**:A

胃癌(gastric cancer,GC)作为一种高度侵袭性的癌症[1],死亡率高,预后差,平均 5 年生存率不到 20%[2-3]。幽门螺杆菌感染、吸烟、高盐饮食、高肉类摄入和胆汁反流等均是胃癌的临床危险因素[4-5]。基于胃癌的传统测序方法是多细胞水平的,比如转录组测序技术,是提取器官、肿瘤组织或者细胞群的混合 RNA 进行测序,最终得到的信号值代表多个细胞群体水平,无法精确揭示其中的基因表达差异等异质性的信息,而这些肿瘤生物学特征差异对于癌症的诊疗及预后有重要意义[6-7]。二代测序技术的飞速发展,极大地促进了对肿瘤发病机制的深入研究[8]。单细胞测序技术能更精准地从细胞、基因以及分子层面揭示 GC 的发生、发展和转移机制,提高 GC 的诊断和个体化治疗以及预后评估水平。

1　单细胞测序技术

随着流式细胞术(fluorescence activated cell sorting,FACS)[9-10]、激光捕获显微切割(laser capture microdissection,LCM)[11-12]以及微流控(microfluidics)[13]等单细胞分离技术的出现以及新一代测序平台的广泛应用,单细胞测序技术应运而生[14]。单细胞测序技术是对单个细胞进行测序分析的一项新技术,能够弥补传统高通量测序的局限性,对单个细胞进行无偏倚、高通量和高分辨率的转录组分析[15](图 1),从而揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态,反映细胞间的异质性并将其归类分析,进行个性化研究。因此,该技术可应用于检测循环肿瘤细胞的分子表型分型[16]、发现早期的肿瘤细胞、监测肿瘤内异质性以及指导靶向精准治疗等[17]。单细胞测序主要涵盖转录组和基因组两部分,通过分析比较单个细胞的 RNA 和 DNA 序列来反映转录组和基因组的变化。

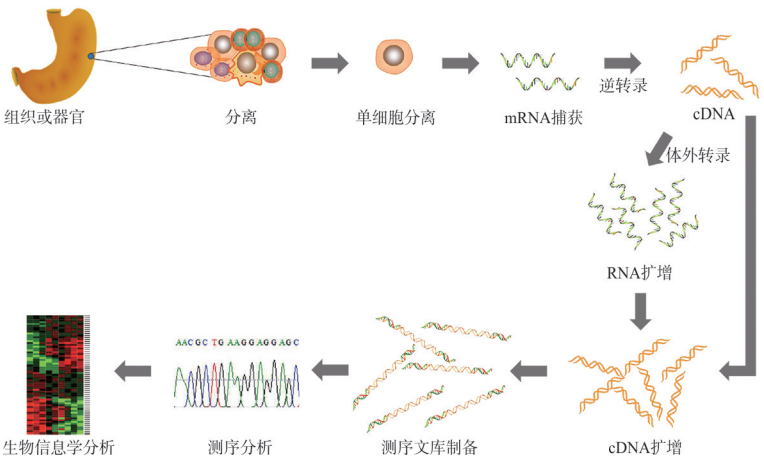


图 1　单细胞 RNA 测序工作流程

单细胞转录组是基因组和表观基因组的功能性读数。理想情况下,转录组分析应能准确地捕捉到生物体最小功

*　**基金项目**:山东省自然科学基金(ZR2021MH409);山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS230)。

作者简介:齐茜,1996 年生,女,硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学。

通信作者:罗红,副教授,硕士研究生导师,E-mail:dlmaluo@163.com。

能单元(单个细胞)中所有种类的全长 RNA 的精确数量。Tang 等[18] 首次使用单细胞转录组测序(single cell RNA-Seq, scRNA-Seq)技术在单个小鼠卵母细胞和卵裂球进行分析,随后经过不断优化,包括单细胞 mRNA 深度测序文库构建方法、提高测序通量等,使得单细胞转录组测序能够适用于更多研究中。诸如单细胞标记反转录测序(single-cell tagged reverse transcription sequencing, STRT-seq)[19-20]、模板转换法(switching mechanism at 5′end of the RNA transcript, SMART-seq)[7]、体外线性(IVT)扩增单细胞转录组的方法(cell expression by linear amplification and sequencing, CEL-seq)[17]、单细胞全转录扩增技术(whole-transcript amplification for single cells, Quartz-seq)[21] 以及日本理化所开发的 Quartz-seq2[22] 等方法的发展和运用,大大拓展了 scRNA-seq 分析技术的应用范围。目前,scRNA-seq 分析逐渐成为研究细胞间转录组的差异性,揭示细胞类型、亚型、状态和发展轨迹等的有效方法[23],在揭示肿瘤发生发展、细胞异质性、微量样品的转录组分析、真核生物转录组基因复杂性等方面被广泛应用。

单细胞基因组扩增和测序技术在肿瘤发生机制研究和临床诊断中发挥了不可替代的作用。2011 年,Navin 等[24] 利用简并寡核苷酸引物 PCR(degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)全基因组扩增及 DNA 测序技术对来自多基因组肿瘤的 100 个单细胞和单株原发肿瘤及其肝转移的 100 个单细胞进行测序分析,揭示了乳腺癌单细胞水平的基因组拷贝数变异(copy number variations, CNV),推断出肿瘤的克隆演化过程。而后,随着多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)[25] 和多重退火和基于环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)[26] 等技术的涌现,基因组覆盖率得到了提高,PCR 错误率也迅速降低[27]。近年来,随着科研人员对单细胞全基因组测序的精确度及覆盖度的高要求,单细胞全基因组扩增技术也在不断改善与提高中,比如利用微流体反应器进行单链测序(single-stranded sequencing using microfluidic reactors, SISSOR)方法[28],通过转座子插入的线性扩增(linear amplification with transposon insertion, LIANTI)方法[29] 等。

2 单细胞测序技术在 GC 研究中的应用

2.1 GC 免疫微环境方面的单细胞测序技术研究 肿瘤免疫微环境(TME)的重要组成部分是肿瘤浸润的免疫细胞,包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等细胞亚群;这些免疫细胞既对肿瘤细胞起杀伤作用(例如 $CD8^+$T 细胞、自然杀伤细胞),又能够促进肿瘤发展[30]。因此,肿瘤微环境已成为一个潜在的抗癌靶点,对其的研究已成为肿瘤生物学的热点[31]。单细胞测序技术是分析 TME 中细胞成分异质性的有力工具,通过 scRNA-seq 分析可以检测到使用内窥镜切除的肿瘤组织中更多样的 TME 免疫细胞,甚至可以检测肿瘤中的 B 细胞或 Treg 细胞的亚群[32],故而可作为分析肿瘤微环境高度可行的平台。

为了筛选 GC 潜在的、新的免疫治疗标志物和靶点,Sathe 等[33] 从 7 例 GC 患者和 1 例肠道上皮化生(GIM)患者中获取组织,对其进行单细胞转录组分析,结果发现与正常胃组织相比,同一种类型的细胞具有异质性。这种异质性在肿瘤内和肿瘤间均存在,如巨噬细胞具有转录异质性,不符合 M1/M2 型巨噬细胞;细胞毒性 T 细胞(CTL)内具有肿瘤耗竭 T 细胞型亚组等。此外,该学者通过单细胞测序和受体配体相互作用分析了 TME 专有的细胞间通讯,有助于了解肿瘤生物学,对筛选 GC 的潜在免疫治疗靶点具有重要价值。

GC 的发展过程是从非萎缩性胃炎到慢性萎缩性胃炎,再到肠上皮化生,最终进展为 GC。在 GC 进展过程中 TME 细胞的变化尚未阐明,因此,scRNA-seq 技术可以帮助检测特定的细胞和转录特征,以揭示 TME 细胞与 GC 的关联。Yin 等[34] 使用单细胞测序技术在 GC 发展过程中的各个阶段生成了各种 TME 细胞的动态转录组图谱,检测出一组与 TME 细胞致癌相关的关键转变标记,如 *PLAU*、*S100A8* 和 *CLEC10A* 基因,并描绘了这些细胞的动态致癌轨迹。因此,未来可以基于上述的关键转变基因确定免疫抑制检查点靶点,从而创立新的免疫疗法,以有效预防和控制肿瘤的发生和转移[35]。

2.2 GC 免疫细胞方面的单细胞测序技术研究 近年来,肿瘤免疫疗法已成为肿瘤治疗领域的热点,但由于难以确定可用于临床的生物标志物,肿瘤免疫疗法仍面临诸多困难。单细胞测序技术作为研究肿瘤免疫的一个有力工具,能够预测潜在的抗癌靶点,在 GC 的免疫治疗中有极高的实用价值。2020 年,Fu 等[36] 利用 scRNA-seq 对 2 例 GC 患者的组织和 3 例 GC 患者的外周血进行转录组分析,发现与癌旁组织相比,GC 癌组织中耗竭性 $CD8^+$ T 细胞中的干扰素调节因子 8(interferon regulatory factor 8, IRF8)表达下调,且 GC 患者外周血中 $CD8^+$ T 细胞中 IRF8 的表达也降低,提示 IRF8 的表达与 GC 相关,可能成为免疫治疗的潜在靶点。该研究从肿瘤浸润 T 细胞表型的转换机制切入,对不同的免疫细胞亚群进行鉴定,并对其发育轨迹进行描述,在单个细胞水平上揭示了 GC 患者 T 细胞的异质性。另有学者揭示了 GC 的免疫抑制机制,并为 GC 的免疫检查点疗法筛选了潜在靶点[35]。

肿瘤免疫中,$CD8^+$效应 T 细胞起到重要的抗肿瘤作用,但肿瘤介导的 T 细胞耗竭阻碍了 $CD8^+$ T 细胞正常发挥细胞毒性,从而导致免疫抑制[37]。研究表明,在肿瘤发生发展过程中可变启动子(alternative promoters)在肿瘤特异基因表达的调控方面发挥了相当重要的作用[38]。Sundar 等[39] 用 scRNA-seq 分析证实了 GC 中可变启动子高负荷表达的 T 细胞活性水平降低,并表现出免疫耗竭的特征。进一步对接受免疫治疗的胃肠道癌症患者分析发现,可变启动子高负荷表达与低负荷表达相比,GC 的无进展生存期更短。这提示了可变启动子与 GC 患者免疫细胞之间具有相关性,借助单细胞测序技术进一步揭示了 GC 的免疫抑制机制,为今后 GC 患者的临床治疗提供了潜在的免疫治疗新思路。

2.3 GC 细胞异质性方面的单细胞测序技术研究 肿瘤异质性是导致肿瘤药物治疗耐药性的重要原因,也是肿瘤精

准医疗所面临的挑战。胃腺癌(GAC)作为一种高度侵袭性的癌症,死亡率高,分子和临床特征复杂[40]。对 GC 肿瘤细胞进行分群分析有助于发现对药物治疗耐药的细胞类群,对 GC 的精准治疗有重要的参考意义。单细胞测序技术可实现更精准无偏倚地对 GC 细胞进行分群。2020 年,Zhang 等[41]对 9 例 GC 患者和 3 例非肿瘤患者样本中的 27 677 个细胞进行无偏倚的单细胞测序,确定了 5 个肿瘤细胞亚群(C1~C5),并对其分子特征进行了描述。该研究发现 C4 亚群特异性表达基因 *RNF43* 富集了 WNT 相关信号通路,这与主细胞主导型胃底腺癌(GA-FG-CCP)具有一致性。另外,在单细胞层面描述了主细胞有可能向解痉肽表达化生细胞(SPEM)转变的途径。该研究在单细胞水平上阐述了胃化生细胞的起源和胃癌异质性,说明在可预见的未来,单细胞测序技术可用于检测罕见肿瘤类型(如 GA-FG-CCP)及准确诊断 GA。

腹膜转移(PC)是晚期 GC 患者死亡的首要原因之一,发生在约 45%的晚期 GAC 患者中。Ajani 等[42]使用单细胞测序技术结合免疫组化染色检测出 PC 肿瘤细胞具有高度异质性,证明了 YAP1 在 PC 细胞中呈高表达,并使得 PC 细胞具有肿瘤干细胞的性质。该研究还通过联合使用单细胞测序技术发现 YAP1 高表达可作为 GC 患者发生 PC 的靶标。因此,干扰或抑制 YAP1 的功能,或与目前的化疗药(如多西紫杉醇)联合治疗可能对 GC 治疗有效。YAP1 抑制剂可成为新的抗癌药物,为 GC 患者带来希望。

2.4　癌前病变和早期胃癌病变方面的单细胞测序技术研究

癌前病变向侵袭性疾病进展过程中,肿瘤细胞通常是罕见的群体,不会大量出现,无法轻易通过常规的针对细胞集合的测序获得数据。Zhang 等[43]对非萎缩性胃炎(NAG)、慢性萎缩性胃炎(CAG)、肠上皮化生(IM)或早期胃癌(EGC)患者的 13 例胃窦黏膜样本进行活检,获取 32 332 个高质量的细胞并进行单细胞转录组分析,以构建单细胞图谱,同时在细胞和分子 2 个层面构建不同病变胃上皮的的单细胞转录组网络。基于单细胞图谱,该研究团队发现了一组胃癌特异性标记基因,其在其他细胞类型中低表达,但在癌细胞中显著上调,该组基因包括 *SLC11A2*、*KLK7*、*SULT2B1* 和 *LMTK3* 等。这些基因作为 GC 细胞特异性分子标记,可在 GC 早期阶段识别癌细胞发育,进而识别早期 GC[33]。另外,该研究团队还发现 *OR51E1* 可用来标记早期癌变中的内分泌细胞,HES6 可能标记出杯状前细胞簇,这为鉴别早期化生提供重要价值。

Owen 等[44]从 6 名 Barrett 食管(Barrett′s Esophagus, BE)患者和 2 名无食管病变患者中获取组织,对其进行单细胞测序,发现癌前病变细胞中与 GC 进展相关的标记基因,如 *SPINK4* 和 *ITLN1* 基因标记 Barrett 食管杯状细胞分化的早期阶段的细胞,有助于鉴别化生。另外,该研究团队还发现以 *LEFTY1* 和 *OLFM4* 基因为标记的 Barrett 食管中的细胞与食管黏膜下腺细胞有转录重叠,但与胃或十二指肠细胞没有重叠。这些研究揭示了癌前状态下正常组织和细胞间的转录关系,有助于对癌前病变或 GC 早期诊断。

2.5　利用单细胞测序技术构建 GC 细胞图谱　2018 年 9 月,人类肿瘤图谱网络(Human Tumor Atlas Network, HTAN)计划启动。2020 年 4 月,HTAN 研究取得的进展发表于 Cell 杂志。该图谱将使人们全面深入了解癌症生物学,对肿瘤预防、监测和治疗有重要的指导价值。2020 年 6 月,Gut 杂志发表了全方位的胃癌表达谱图谱[41],并建立了一种新型的区分良恶性上皮细胞的分类方法。该研究着眼于非恶性上皮细胞,阐述了胃化生细胞的起源;着眼于恶性上皮细胞,构建了一种量化细胞分化程度的计算方法,并揭示分化程度与 GC 的预后密切相关;发现了一种新型的 GC 类型:主细胞主导型 GC,并在大规模数据库中验证了这种类型 GC 的存在。该研究为剖析 GC 异质性、预后和解析 GC 化生演变进程提供了宝贵的数据资源。现今,GC 的基因组图谱已经被描绘出来。每个分子亚型的分子特征和新的治疗靶点已被鉴定。这些进展使临床将基于基因组和基于表型的诊断和治疗方法结合起来并应用于精确医学时代的个体 GC 患者成为可能[8]。

3　小结及展望

单细胞测序技术能表征大量细胞异质性,并为 GC 异质性的研究提供有价值的资源,为 GC 的诊断和预后评估提供宝贵的参考资料。然而,单细胞测序技术还有许多不足之处,迫切需要改进与创新。如在获取单细胞时形成的单细胞悬液,在细胞分选过程中其转录状态是否发生改变,单细胞检测样品是否能够较为准确地揭示细胞在组织中的空间结构信息,单细胞是否会打破组织和器官的整体性。另外,检测样品的制备受到捕获效率的限制,由于现有技术的破坏效应或其低效率,珍稀的细胞类群很可能被忽略。因此,提高样品制备的效率及转录组和基因组在扩增时的覆盖率、降低错配率和减少噪音影响,以及建立更完善的生物信息算法用于评估群体发展趋势,对单细胞测序技术体系进行优化等都十分必要。

随着单细胞测序技术不断发展,人们对 GC 研究的新思路也不断涌现,特别是基于单细胞多组学研究技术,不仅可以对来自同一个细胞的多种分子形式进行联合分析,还可进行多个肿瘤细胞间的多维数据分析,如同步检测单细胞 ATAC 和单细胞 RNA 信息的单细胞测序技术(simultaneous high-throughput ATAC and RNA expression with sequencing, SHARE-seq)[45-46]的开发,实现了在单细胞中同时高质量、高通量的检测基因表达,为单细胞多组学研究提供了一个可以参考的范例。随着单细胞测序技术中具有创新性和创造性的方法被不断开发和应用,其在未来精准医疗的应用前景将十分广阔。

4　参考文献

[1] Che K, Zhao Y, Qu X, *et al*. Prognostic significance of tumor budding and single cell invasion in gastric adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1039-1047.

[2] Fu DJ, Wang L, Chouairi FK, *et al*. Gastric squamous-columnar junction contains a large pool of cancer-prone immature osteopontin responsive Lgr5-CD44$^+$ cells[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 84.

[3] Allemani C, Weir HK, Carreira H, *et al*. Global surveillance of

cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)[J]. Lancet, 2015, 385(9972): 977-1010.
[4] Uno Y. Prevention of gastric cancer by *Helicobacter pylori* eradication: a review from Japan[J]. Cancer Med, 2019, 8(8): 3992-4000.
[5] Martinson H, Mallari D, Richter C, *et al.* Molecular classification of gastric cancer among Alaska native people[J]. Cancers, 2020, 12(1): 198.
[6] Hu XY, Bao MY, Huang JC, *et al.* Identification and validation of novel biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2020, 10: 541479.
[7] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, *et al.* Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8): 777-782.
[8] 张濛, 张青云, 徐国宾. 新一代测序技术在肿瘤临床中的应用[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(9): 641-646.
[9] 陈军浩. 流式细胞术在临床及科研中的应用[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 861-864.
[10] Wallberg F, Tenev T, Meier P. Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2016, 2016(4): pdb.prot087387.
[11] Aguilar-Bravo B, Sancho-Bru P. Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases[J]. Hepatol Int, 2019, 13(2): 138-147.
[12] Yang LX, Yang YD, Yuan JM, *et al.* Transcriptomic landscape of von economo neurons in human anterior cingulate cortex revealed by microdissected-cell RNA sequencing[J]. Cereb Cortex, 2019, 29(2): 838-851.
[13] Streets AM, Zhang X, Cao C, *et al.* Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing[J]. PNAS, 2014, 111(19): 7048-7053.
[14] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, *et al.* Technologies for single-cell isolation[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 16897-16919.
[15] Natarajan KN, Miao Z, Jiang M, *et al.* Comparative analysis of sequencing technologies for single-cell transcriptomics[J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 70.
[16] Winterhoff B, Talukdar S, Chang Z, *et al.* Single-cell sequencing in ovarian cancer: a new frontier in precision medicine[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2019, 31(1): 49-55.
[17] Rantalainen M. Application of single-cell sequencing in human cancer[J]. Brief Funct Genomics, 2018, 17(4): 273-282.
[18] Tang F, Barbacioru C, Nordman E, *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell[J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 516-535.
[19] Natarajan KN. Single-cell tagged reverse transcription (STRT-seq)[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1979: 133-153.
[20] Luo G, Gao Q, Zhang S, *et al.* Probing infectious disease by single-cell RNA sequencing: Progresses and perspectives[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2020, 18: 2962-2971.
[21] Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, *et al.* Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity[J]. Genome Biol, 2013, 14(4): R31.
[22] Sasagawa Y, Danno H, Takada H, *et al.* Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads[J]. Genome Biol, 2018, 19(1): 29.
[23] 王娜, 赵利楠, 韩泽广. 单细胞测序技术在肝癌研究中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(5): 488-493.
[24] Navin N, Kendall J, Troge J, *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. Nature, 2011, 472(7341): 90-94.
[25] Wang WH, Ren Y, Lu Y, *et al.* Template-dependent multiple displacement amplification for profiling human circulating RNA[J]. BioTechniques, 2017, 63(1): 21-27.
[26] Chen C, Li J, Wan J, *et al.* A low cost and input tailing method of quality control on multiple annealing, and looping-based amplification cycles-based whole-genome amplification products[J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(3): e22697.
[27] 徐晓丽, 吴凌娟, 鄢仁祥. 单细胞全基因组扩增技术与应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(4): 342-352.
[28] Chu WK, Edge P, Lee HS, *et al.* Ultraaccurate genome sequencing and haplotyping of single human cells[J]. PNAS, 2017, 114(47): 12512-12517.
[29] Chen C, Xing D, Tan L, *et al.* Single-cell whole-genome analyses by linear amplification via transposon insertion (lianti)[J]. Science, 2017, 356(6334): 189-194.
[30] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
[31] Lee HO, Park WY. Single-cell RNA-Seq unveils tumor microenvironment[J]. BMB Rep, 2017, 50(6): 283-284.
[32] Kashima Y, Togashi Y, Fukuoka S, *et al.* Potentiality of multiple modalities for single-cell analyses to evaluate the tumor microenvironment in clinical specimens[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 341.
[33] Sathe A, Grimes SM, Lau BT, *et al.* Single-cell genomic characterization reveals the cellular reprogramming of the gastric tumor microenvironment[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(11): 2640-2653.
[34] Yin H, Guo R, Zhang H, *et al.* A dynamic transcriptome map of different tissue microenvironment cells identified during gastric cancer development using single-cell RNA sequencing[J]. Front Immunol, 2021, 12: 728169.
[35] Kashima Y, Togashi Y, Fukuoka S, *et al.* Potentiality of multiple modalities for single-cell analyses to evaluate the tumor microenvironment in clinical specimens[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 341.
[36] Fu K, Hui B, Wang Q, *et al.* Single-cell RNA sequencing of immune cells in gastric cancer patients[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(3): 2747-2763.
[37] Wherry EJ. T cell exhaustion[J]. Nat Immunol, 2011, 12(6): 492-499.
[38] Hashimoto K, Suzuki AM, Dos Santos A, *et al.* CAGE profiling of ncRNAs in hepatocellular carcinoma reveals widespread activation of retroviral LTR promoters in virus-induced tumors[J]. Genome Res, 2015, 25(12): 1812-1824.
[39] Sundar R, Huang KK, Kumar V, *et al.* Epigenetic promoter alterations in GI tumour immune-editing and resistance to immune checkpoint inhibition[J]. Gut, 2021: gutjnl-2021.
[40] Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. Nature, 2014, 513(7517): 202-209.
[41] Zhang M, Hu S, Min M, *et al.* Dissecting transcriptional heteroge-

neity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing[J]. Gut, 2021, 70(3): 464-475.
[42] Ajani JA, Xu Y, Huo L, *et al*. YAP1 mediates gastric adenocarcinoma peritoneal metastases that are attenuated by YAP1 inhibition [J]. Gut, 2021, 70(1): 55-66.
[43] Zhang P, Yang M, Zhang Y, *et al*. Dissecting the single-cell transcriptome network underlying gastric premalignant lesions and early gastric cancer[J]. Cell Rep, 2019, 27(6): 1934-1947.e5.
[44] Owen RP, White MJ, Severson DT, *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.
[45] Erhard F, Baptista MAP, Krammer T, *et al*. scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells[J]. Nature, 2019, 571(7765): 419-423.
[46] Ma S, Zhang B, LaFave LM, *et al*. Chromatin potential identified by shared single-cell profiling of RNA and chromatin[J]. Cell, 2020, 183(4): 1103-1116.e20.

（收稿日期：2021-07-14）
（本文编辑：许晓蒙）

（上接第 193 页）

[6] 中华医学会医学遗传学分会临床遗传学组中国医师协会医学遗传医师分会遗传病产前诊断专业委员会中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会遗传病防控学组. 低深度全基因组测序技术在产前诊断中的应用专家共识[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(4): 293-296.
[7] 龙洋, 罗艳梅, 徐聚春, 等. 无创 DNA 检测在诊断高龄孕妇胎儿非整倍体中的应用[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(5): 373-375.
[8] 钱飞燕, 许平, 曾艳, 等. 3912 份胎儿羊水细胞染色体核型分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(3): 393-394.
[9] Wang J, Chen L, Zhou C, *et al*. Prospective chromosome analysis of 3429 amniocentesis samples in China using copy number variation sequencing[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 219(3): 287.e1-287.e18.
[10] Zhu Y, Lu S, Bian X, *et al*. A multicenter study of fetal chromosomal abnormalities in Chinese women of advanced maternal age [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2016, 55(3): 379-384.
[11] Wang H, Dong Z, Zhang R, *et al*. Low-pass genome sequencing versus chromosomal microarray analysis: implementation in prenatal diagnosis[J]. Genet Med, 2020, 22(3): 500-510.
[12] 罗小金, 郭岩芸, 黄和明, 等. 全基因组拷贝数变异测序检测胎儿生长受限染色体异常的诊断价值[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(12): 886-890.
[13] 刘文, 徐晶晶, 彭亚琴, 等. CNV-Seq 联合核型分析在羊水穿刺胎儿染色体嵌合体诊断中的应用[J]. 安徽医学, 2020, 41(10): 1115-1118.
[14] 邓新娥, 黄杏玲, 王远流, 等. 拷贝数变异测序在胎儿先天性心脏病产前遗传学诊断中的应用[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(2): 137-142.
[15] Wang Y, Chen Y, Tian F, *et al*. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing[J]. Clin Chem, 2014, 60(1): 251-259.
[16] Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, *et al*. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(3): 332.e1-332.e9.

（收稿日期：2021-07-17）
（本文编辑：许晓蒙）