

# 基于单细胞转录组测序解析肝外胆管癌

## 异质性：探索肿瘤奥秘与临床突破

### 一、引言

#### 1.1 研究背景

##### 1.1.1 肝外胆管癌概述

肝外胆管癌是一种源于肝外胆管（包括肝门区至胆总管下端）上皮细胞的恶性肿瘤，其发病隐匿，早期症状不明显，多数患者确诊时已处于中晚期。胆管癌发病率较低，在全球范围内，其发病率约为每 10 万人中 1 - 2 例，但近年来有逐渐上升的趋势。肝外胆管癌的发病与多种因素相关，包括胆管结石、原发性硬化性胆管炎、先天性胆管囊肿、肝吸虫感染等。其中，胆管结石长期刺激胆管上皮，引发慢性炎症，进而增加癌变风险；原发性硬化性胆管炎患者，由于胆管壁反复炎症和纤维化，胆管癌的发生风险可高达 10% - 30%。

肝外胆管癌严重威胁人类健康，其恶性程度高，预后较差。患者 5 年生存率通常低于 20%，中位生存期仅为 12 - 24 个月。手术切除是唯一可能治愈的方法，但由于早期诊断困难，仅有约 20% - 30% 的患者在确诊时可行根治性手术。对于无法手术切除的患者，治疗手段包括化疗、放疗、靶向治疗等，但疗效有限，患者生存质量和生存期均不理想。因此，深入了解肝外胆管癌的发病机制和生物学特性，寻找有效的诊断和治疗靶点，对于改善患者预后具有重要意义。

##### 1.1.2 肿瘤异质性的概念与影响

肿瘤异质性是指肿瘤细胞在生长、代谢、侵袭、转移以及对治疗的反应等方面存在的差异，这种差异不仅体现在肿瘤细胞之间，还包括肿瘤微环境中的非肿瘤细胞

。肿瘤异质性可分为肿瘤间异质性和肿瘤内异质性。肿瘤间异质性指不同患者的肿瘤细胞之间存在差异，导致不同患者对相同治疗方案的反应不同；肿瘤内异质性则是指同一肿瘤内部不同区域的肿瘤细胞之间存在差异，使得肿瘤内部细胞的生物学行为不一致。

肿瘤异质性对癌症治疗和预后产生诸多不良影响。在治疗方面，由于肿瘤细胞的异质性，部分肿瘤细胞可能对化疗药物、靶向药物或免疫治疗药物不敏感，导致治疗效果不佳，容易出现复发和转移。例如，在乳腺癌中，不同亚型的肿瘤细胞对内分泌治疗和靶向治疗的敏感性差异显著，HER2 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗等靶向药物敏感，而三阴性乳腺癌则缺乏有效的靶向治疗靶点，预后较差。在预后方面，肿瘤异质性增加了疾病进展和复发的风险，使得患者的生存时间缩短，生存质量下降。此外，肿瘤异质性还给癌症的诊断和监测带来困难，传统的检测方法难以全面反映肿瘤细胞的特征，容易导致误诊和漏诊。

鉴于肿瘤异质性在癌症发生发展和治疗中的重要作用，研究肝外胆管癌的异质性具有迫切性和重要意义。通过深入探究肝外胆管癌的异质性，有望揭示其发病机制，发现新的治疗靶点，为个性化治疗提供理论依据，从而提高肝外胆管癌的治疗效果和患者生存率。

## 1.2 单细胞转录组测序技术介绍

### 1.2.1 技术原理

单细胞转录组测序技术是在单细胞水平对全转录组进行扩增与测序的新技术，能够深入揭示细胞间的基因表达差异，为肿瘤异质性研究提供关键技术支持。其基本流程涵盖单细胞悬液制备、细胞捕获、RNA 提取、逆转录扩增、文库构建、测序及数据分析等多个关键步骤。

在单细胞悬液制备环节，需要从组织样本中获取单细胞。对于实体组织，常采用酶消化、机械解离等方法，将组织分散成单个细胞。例如，对于肝外胆管癌组织，可使用胰蛋白酶、胶原酶等消化酶，在适宜的温度和时间条件下，将组织消化成单细胞悬液，期间要严格控制消化条件，以避免细胞损伤和死亡。获取单细胞悬液后，便进入细胞捕获阶段。常见的细胞捕获技术有荧光激活细胞分选 (FACS)、微流控技术、微孔板技术等。FACS 依据细胞表面标志物的荧光信号，对目标细胞进行分选捕获；微流控技术则借助微芯片上的微小通道和反应腔室，实现单细胞的高效捕获和处理，如 10× Genomics 平台利用微流控技术，将单细胞与带有条形码的凝胶微珠包裹在油滴中，实现大规模单细胞捕获。

细胞捕获后，进行 **RNA** 提取。由于单细胞中的 **RNA** 含量极少，对提取技术要求极高。通常采用特殊的试剂盒或方法，如基于磁珠的 **RNA** 提取方法，利用磁珠表面的特异性基团与

RNA 结合，经过多次洗涤和洗脱，获得高纯度的 RNA。RNA 提取后，进行逆转录和扩增。逆转录是将 RNA 转化为 cDNA，常使用逆转录酶和随机引物或 oligo (dT) 引物来实现。扩增则是为了增加 cDNA 的量，满足后续测序需求，常用的扩增方法有 PCR 扩增和体外转录扩增 (IVT)。在这一过程中，UMI (Unique Molecular Identifier) 技术被广泛应用，它为每个 mRNA 分子添加独特的分子标签，能够有效区分真实的转录本和扩增过程中产生的重复序列，提高定量准确性。

扩增后的 cDNA 用于文库构建。文库构建需在 cDNA 两端添加特定的接头序列，使其能够与测序平台适配。常用的文库构建方法有基于 PCR 的文库构建和基于连接的文库构建。基于 PCR 的文库构建通过 PCR 反应引入接头序列；基于连接的文库构建则利用 DNA 连接酶将接头序列连接到 cDNA 上。构建好的文库在高通量测序平台上进行测序，目前常用的测序平台如 Illumina 测序平台，采用边合成边测序的原理，能够快速、准确地测定 cDNA 的序列信息。

测序完成后，便进入数据分析阶段。数据分析涉及多个步骤，首先进行数据质量控制，去除低质量的测序数据和接头序列；然后进行数据比对，将测序 reads 映射到参考基因组或转录组上；接着进行基因表达定量，计算每个基因在单细胞中的表达水平；再通过降维、聚类分析，识别不同的细胞亚群；最后进行差异基因分析、功能富集分析等，挖掘细胞亚群间的差异基因及其功能，揭示细胞的生物学特性和潜在的调控机制。

### 1.2.2 在癌症研究中的优势

与传统测序技术相比，单细胞转录组测序在癌症研究中展现出诸多显著优势。首先，单细胞转录组测序能够精准揭示细胞间差异。传统测序技术以大量细胞为研究对象，所获结果是细胞群体的平均信号，会掩盖细胞间的异质性。例如，在研究肝外胆管癌时，传统测序可能无法区分肿瘤细胞、癌旁细胞及免疫细胞等不同细胞类型的基因表达差异，而单细胞转录组测序能够对单个细胞进行分析，清晰展现每个细胞的基因表达谱，从而准确识别不同细胞亚群及其特征基因，为深入了解肿瘤细胞的生物学行为提供关键信息。

其次，单细胞转录组测序有助于发现罕见细胞类型。肿瘤组织中存在一些罕见细胞类型，如肿瘤干细胞、循环肿瘤细胞等，它们在肿瘤的发生、发展、转移和耐药中起着关键作用，但由于其数量稀少，在传统测序中易被忽视。

。单细胞转录组测序凭借其单细胞分辨率，能够有效检测到这些罕见细胞类型，深入研究其基因表达特征和生物学功能，为肿瘤治疗提供新的靶点和策略。

再者，单细胞转录组测序能够深入解析肿瘤微环境。肿瘤微环境由肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞等多种细胞以及细胞外基质组成，对肿瘤的生长、侵袭和转移具有重要影响。单细胞转录组测序可以全面分析肿瘤微环境中各种细胞的基因表达谱，揭示细胞间的相互作用和信号传导网络，例如研究免疫细胞与肿瘤细胞之间的免疫逃逸机制、肿瘤血管生成的调控机制等，为肿瘤免疫治疗和抗血管生成治疗提供理论依据。

此外，单细胞转录组测序还可用于肿瘤的早期诊断和预后评估。通过对肿瘤组织或外周血中的单细胞进行测序分析，能够检测到早期肿瘤细胞的分子特征，实现肿瘤的早期诊断；同时，根据肿瘤细胞的基因表达特征，预测肿瘤的复发、转移风险和患者的预后情况，为临床治疗决策提供重要参考。

### 1.3 研究目的和意义

本研究旨在运用单细胞转录组测序技术，全面且深入地剖析肝外胆管癌的异质性，明确不同细胞亚群的特征及其在肿瘤发生发展中的作用，为揭示肝外胆管癌的发病机制、开发新型治疗策略提供关键的理论依据和潜在靶点。

具体而言，本研究具有以下重要目的。其一，通过单细胞转录组测序，精准鉴定肝外胆管癌组织中的各种细胞类型，包括肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞等，以及它们各自的亚群，绘制高分辨率的肝外胆管癌单细胞图谱，揭示肿瘤组织中细胞组成的复杂性和多样性。其二，深入分析不同细胞亚群的基因表达特征，挖掘与肿瘤发生、发展、转移、耐药相关的关键基因和信号通路，阐明肿瘤细胞异质性的分子基础。其三，研究肿瘤微环境中不同细胞亚群之间的相互作用和信号传导网络，探讨肿瘤微环境对肿瘤细胞生物学行为的影响，以及肿瘤细胞如何通过与微环境中的细胞相互作用来逃避机体免疫监视和促进肿瘤进展。其四，基于单细胞转录组测序数据，筛选出具有潜在诊断和预后价值的生物标志物，为肝外胆管癌的早期诊断、病情监测和预后评估提供新的指标和方法。

本研究对于肝外胆管癌的治疗和患者生存率的提升具有重要意义。从发病机制理解方面来看，深入探究肝外胆管癌的异质性，有助于揭示其发病的分子机制，明确肿瘤细胞的起源、分化和演进过程，以及肿瘤微环境在肿瘤发生发展中的作用，从而为从根本上攻克肝外胆管癌提供理论支持。

。在治疗策略改进方面，精准识别肿瘤细胞的异质性和肿瘤微环境中的关键细胞亚群及信号通路，能够为开发更具针对性的治疗靶点和个性化治疗方案奠定基础。例如，针对特定的肿瘤细胞亚群或肿瘤微环境中的关键细胞和信号通路，设计靶向药物或免疫治疗策略，有望提高治疗效果，减少不良反应。此外，筛选出的生物标志物可用于早期诊断，实现疾病的早发现、早治疗，提高患者的治愈率；同时，也可用于病情监测和预后评估，帮助医生及时调整治疗方案，改善患者的生存质量和生存期。综上所述，本研究对推动肝外胆管癌的基础研究和临床治疗具有重要的理论和实践意义，有望为患者带来新的希望。

## 二、肝外胆管癌异质性的理论基础

### 2.1 肝外胆管癌的异质性表现

#### 2.1.1 细胞水平异质性

在细胞水平上，肝外胆管癌表现出显著的异质性。从细胞形态来看，肿瘤细胞呈现出多样化的形态特征。部分肿瘤细胞可能呈多边形，细胞边界相对清晰，细胞核较大且染色质丰富；而另一部分肿瘤细胞则可能呈梭形，细胞形态较为细长，细胞核也相应地呈长椭圆形。这些不同形态的细胞在肿瘤组织中混合存在，增加了细胞形态的复杂性。例如，在一些肝外胆管癌组织切片中，可以观察到多边形细胞和梭形细胞交错分布，它们在细胞大小、核质比等方面均存在明显差异。

肝外胆管癌细胞的增殖能力也存在显著差异。通过对肿瘤组织中不同区域细胞的增殖活性检测，发现部分细胞处于快速增殖状态，其增殖标记物如 **Ki - 67** 的表达水平较高。这些细胞具有较强的分裂能力，能够快速增加肿瘤细胞的数量，促进肿瘤的生长。而另一部分细胞则增殖相对缓慢，**Ki - 67** 表达水平较低，它们在肿瘤生长中可能起到相对稳定的作用。研究表明，增殖能力强的细胞亚群更容易导致肿瘤的快速进展和转移，对患者的预后产生不利影响。

肿瘤细胞的侵袭能力同样表现出异质性。部分肿瘤细胞具有较强的侵袭能力，能够突破基底膜，侵入周围组织和血管。这些细胞通常表达高水平的基质金属蛋白酶 (**MMPs**)，如 **MMP - 2**、**MMP - 9** 等，它们能够降解细胞外基质，为肿瘤细胞的侵袭提供条件。而侵袭能力较弱的细胞亚群则 **MMPs** 表达水平较低，在肿瘤的侵袭转移过程中相对处于劣势。例如，在体外侵袭实验中，不同细胞亚群穿过基质胶的能力存在显著差异，侵袭能力强的细胞亚群能够在较短

时间内穿过更多的基质胶，而侵袭能力弱的细胞亚群则穿过基质胶的数量较少

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/625040031241012124>