



中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）

BEIJING INSTITUTE OF GENOMICS CHINESE ACADEMY OF SCIENCES / CHINA NATIONAL CENTER FOR BIOINFORMATION

“单细胞组学前沿技术与多维组学整合分析”研讨会

单细胞转录组分析研究细胞异质性

国家生物信息中心

和夫红&史悦 副研究员

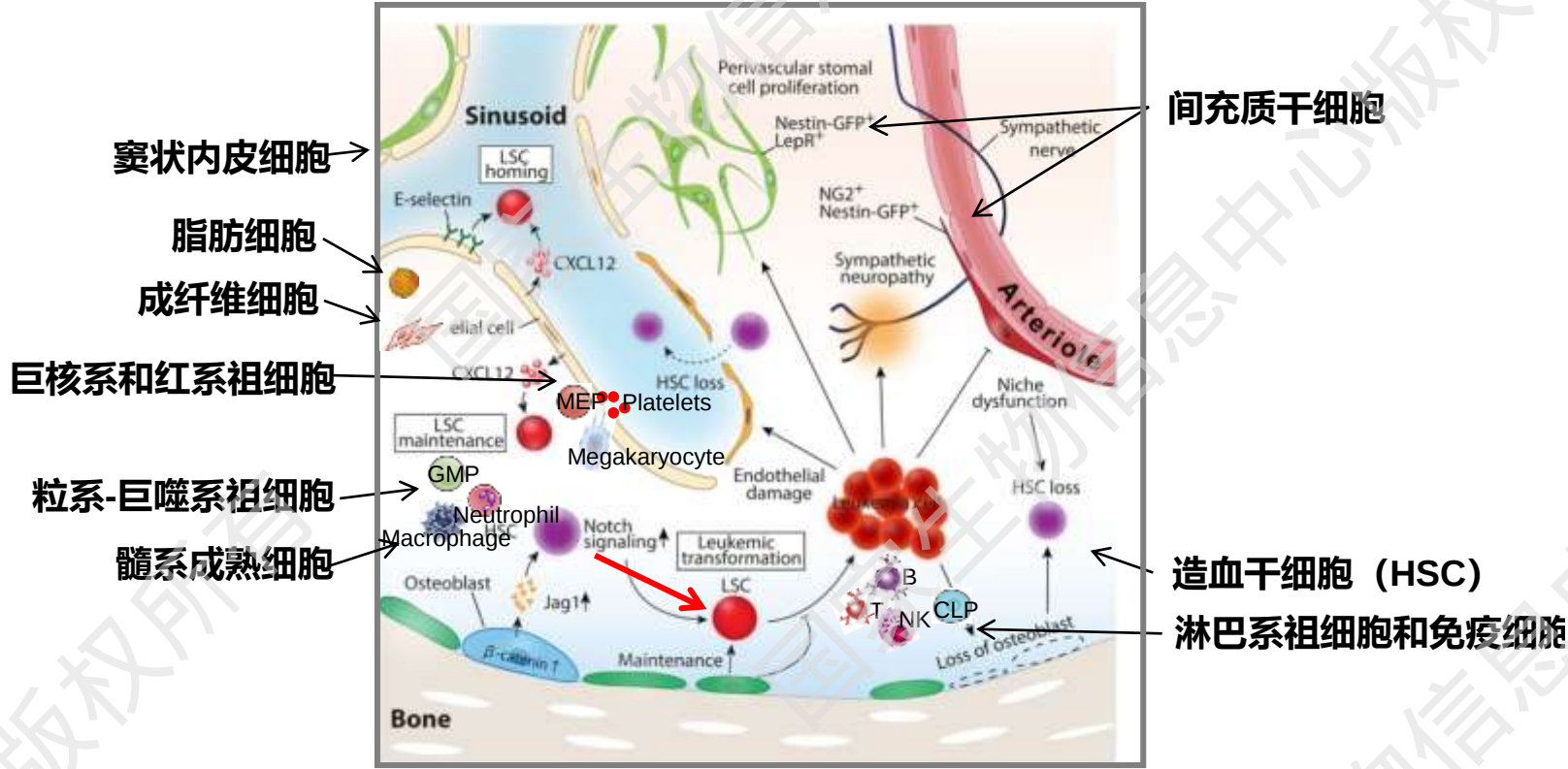
2025-05-07

内容

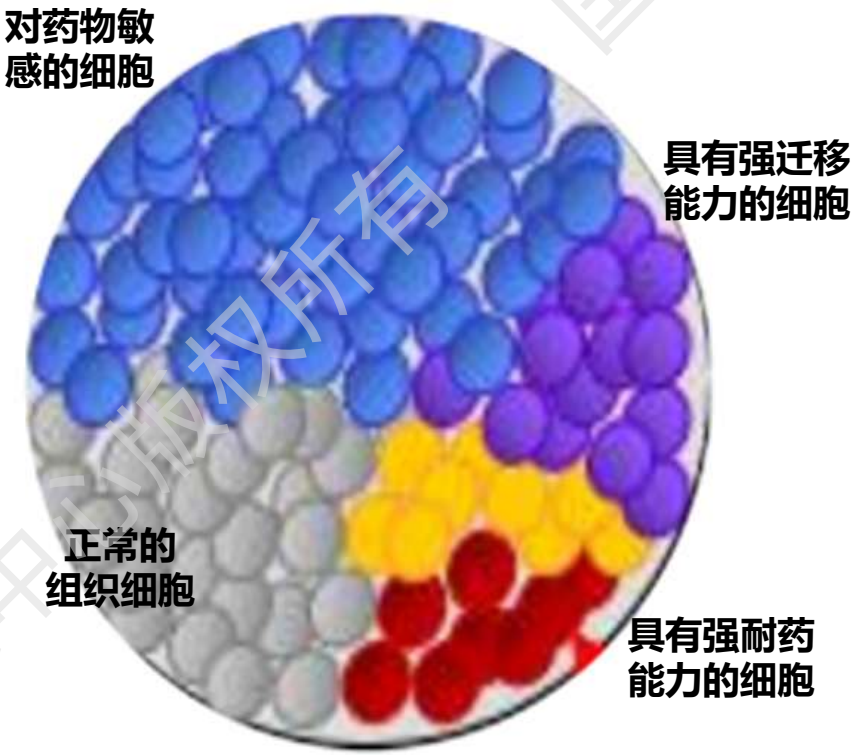
- **技术应用的背景**
- 解析异质性的分析流程
- 应用案例及实操

研究细胞异质性对于认识细胞发育和肿瘤治疗具有重要意义

细胞异质性：不同的基因表达、细胞形态、细胞功能、细胞-微环境互作



骨髓细胞



肿瘤组织

单细胞转录组测序

单细胞转录组测序
(single cell RNA-seq)

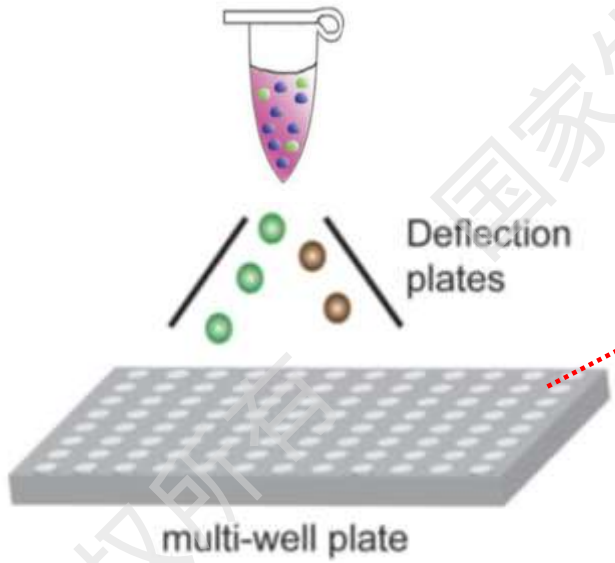


细胞群体的转录组测序
(bulk RNA-seq)

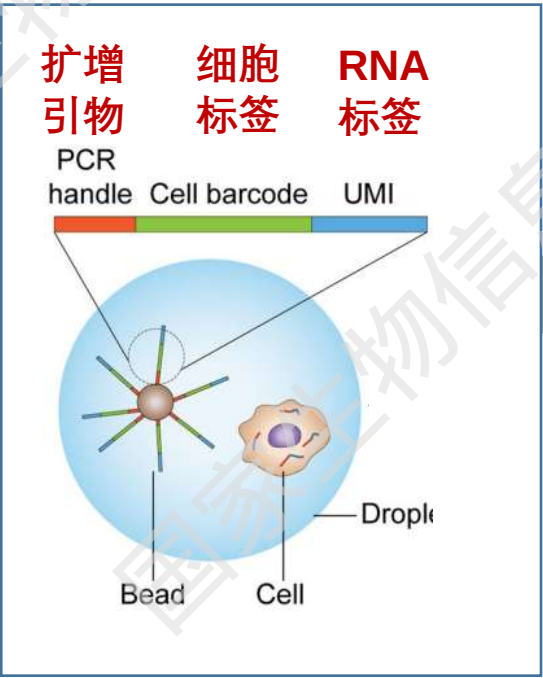


应用单细胞转录组技术解析异质性的原理

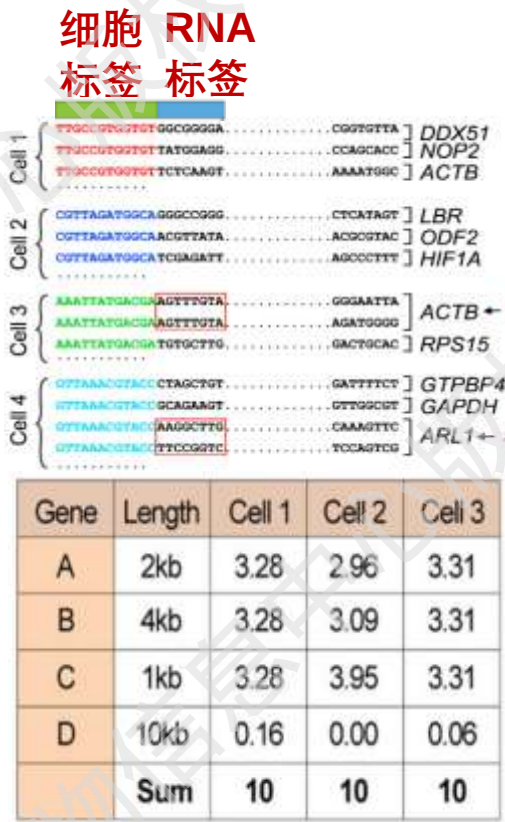
把组织样本
分隔单细胞



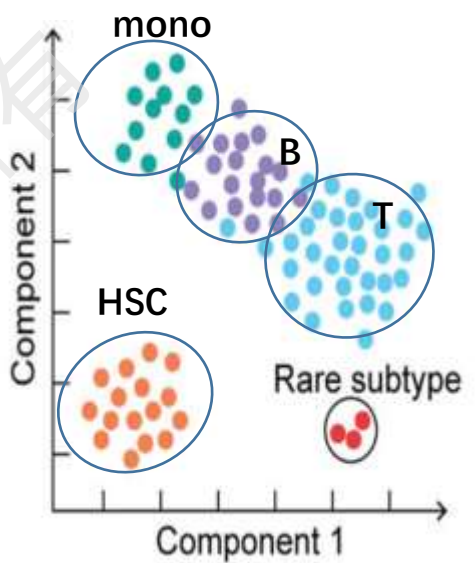
构建单细胞文库
(给每个细胞和基因加上特异标签)



测序分析获得
单个细胞的转录组



聚类分群,
鉴定细胞群体



常见单细胞转录组技术平台的性能比较



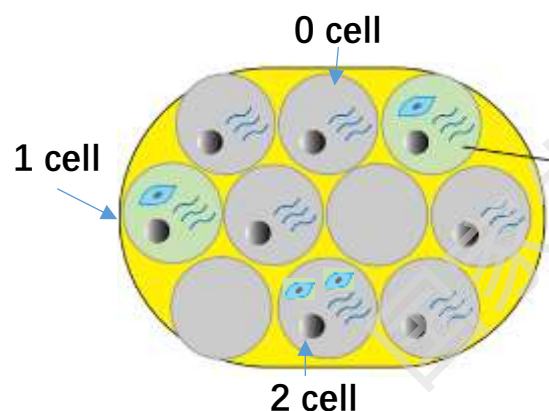
平台	Smart-seq Smart-seq2	MARS-seq	CEL-seq	Drop-seq (10X Genomics)
测序区域	Full-length	3' end	3' end	3' end; 5' end
序列总数/细胞	(10 ⁶)	(10 ⁴)–(10 ⁵)	(10 ⁴)–(10 ⁵)	(10 ⁴)–(10 ⁵)
基因数/细胞	1000 (2000-3000 RNAs)			3000 (17000 RNAs)
高质量的细胞数	1000-2000			5000-15000
特点	能用的信息多: 可变剪切, 融合基因, 突变	流式分选 多重编码	线性PCR扩增	低成本; 能发现罕见细胞

内容

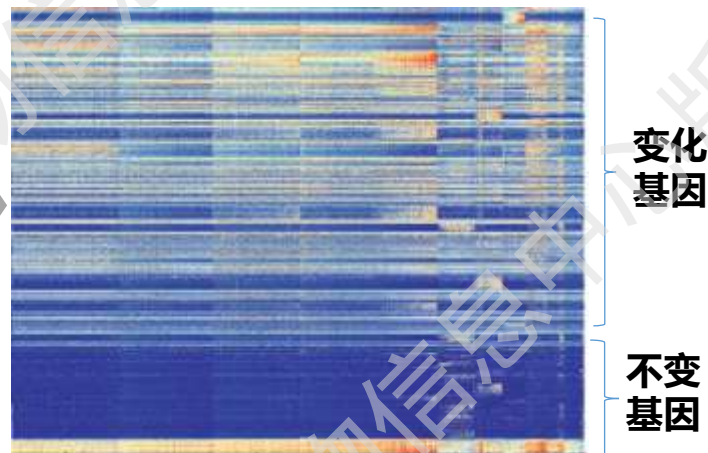
- 技术应用的背景
- **解析异质性的分析流程**
- 应用案例及实操

数据分析流程：分群前的数据处理

数据预处理
去除低质量的细胞

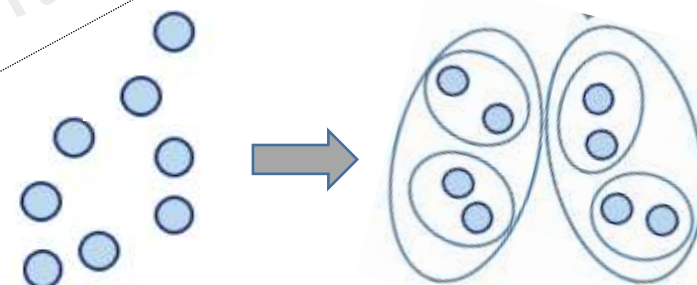
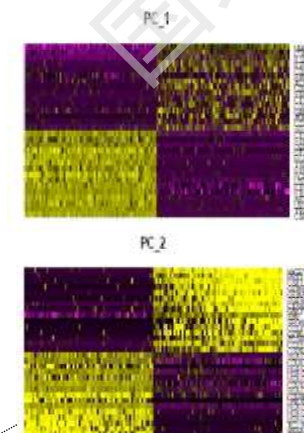


基因表达矩阵
(3000 基因 x 8000 细胞)



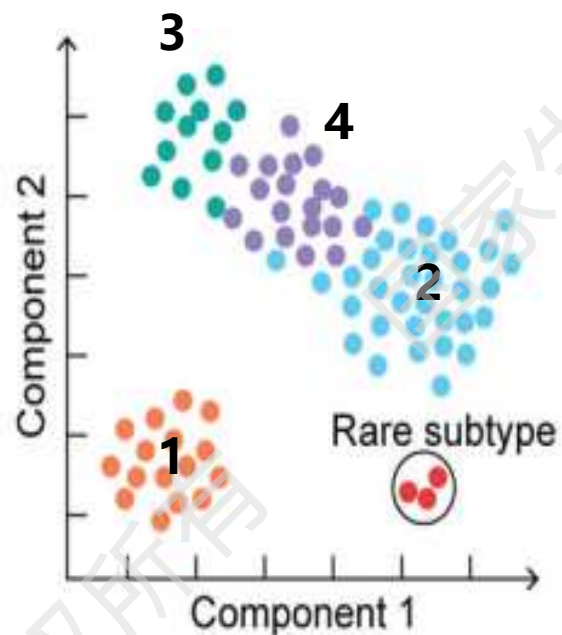
鉴定表达变化基因，进行数据降维

Gene	Length	Cell 1	Cell 2	Cell 3
A	2kb	3.28	2.96	3.31
B	4kb	3.28	3.09	3.31
C	1kb	3.28	3.95	3.31
D	10kb	0.16	0.00	0.06
Sum		10	10	10

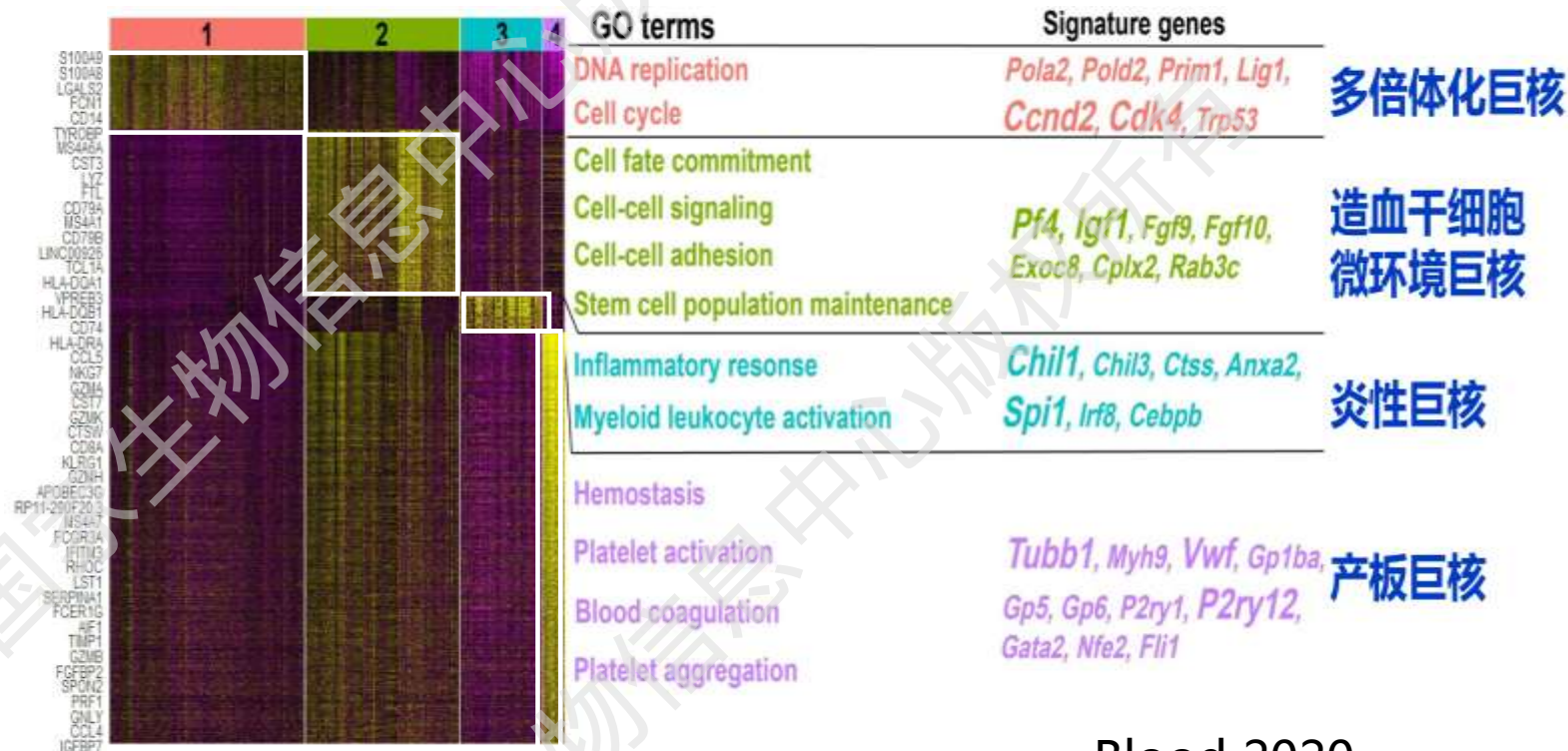


数据分析流程：鉴定细胞亚群的身份-1

聚类分群



- ① 鉴定marker基因，根据功能判断每个群体的细胞身份，用文献和已知分子特征作为指导或验证
(优势：发现新的亚群)

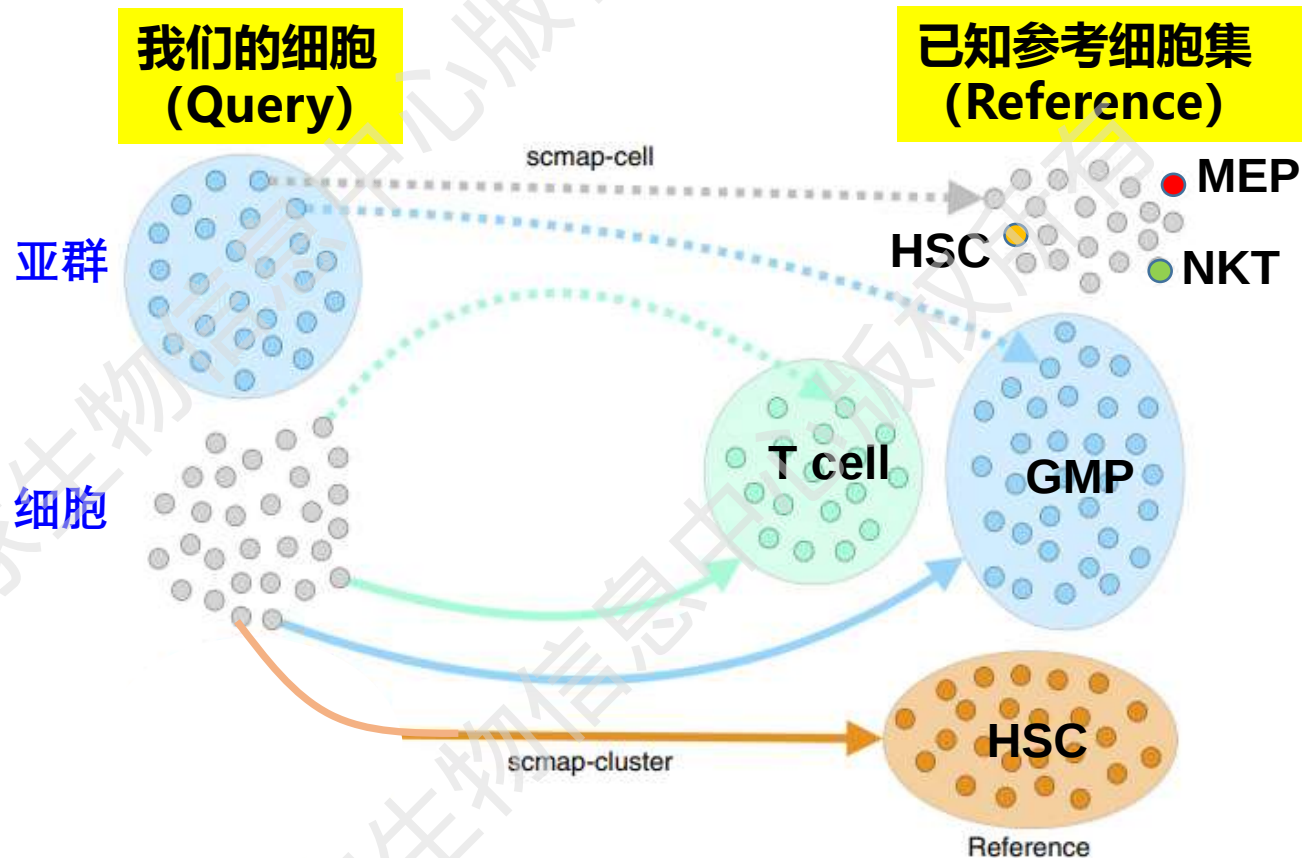
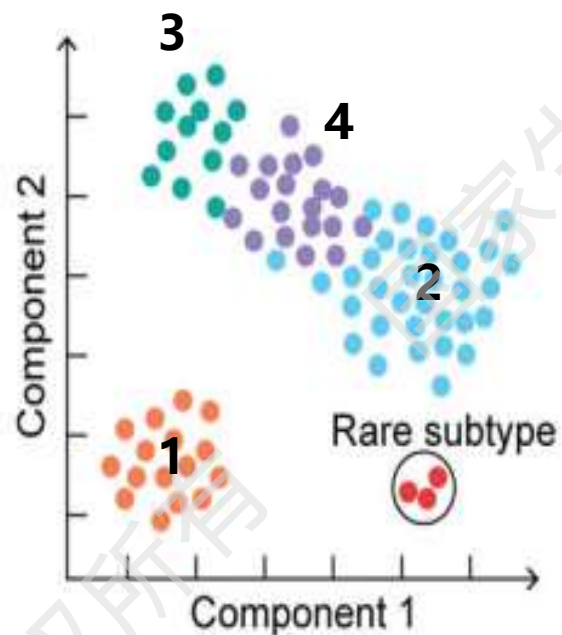


Blood 2020

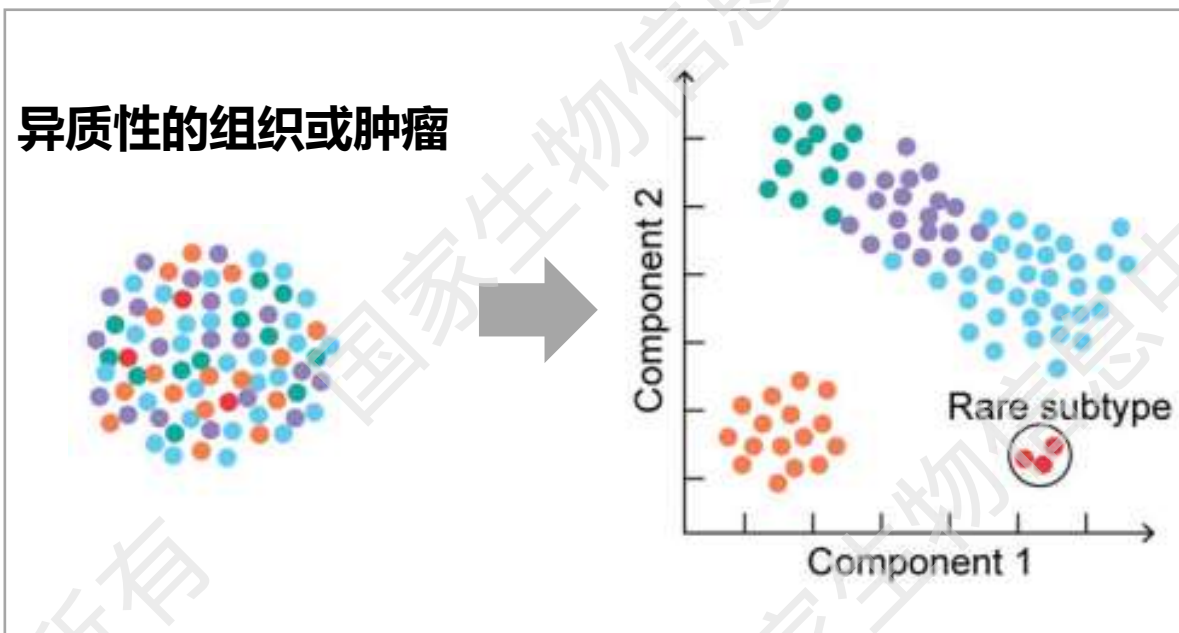
数据分析流程：鉴定细胞亚群的身份-2

- ② “投射”，在参考集中找出转录组最相似的细胞身份，
用文献和已知分子特征进行验证
(优势：研究肿瘤细胞)

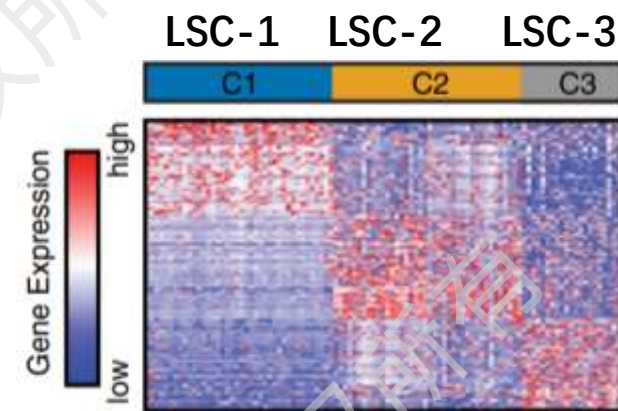
聚类分群



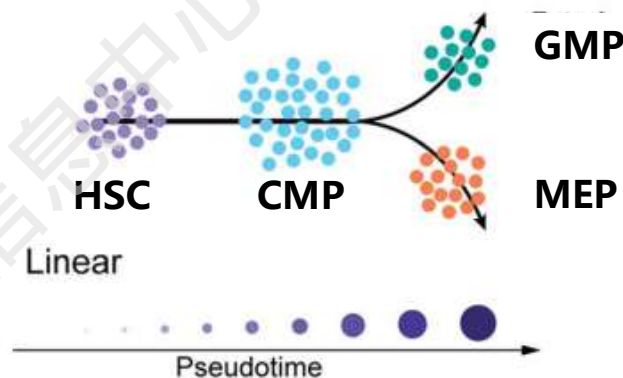
技术应用：研究细胞异质性、谱系发育



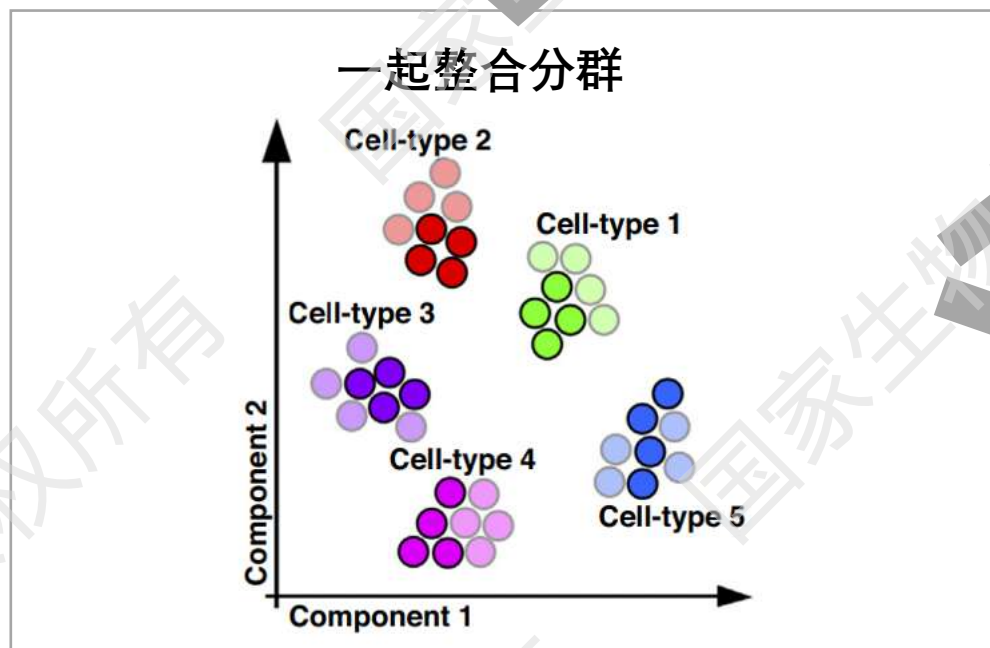
① 分析亚群转录特征，研究各自的生物特性



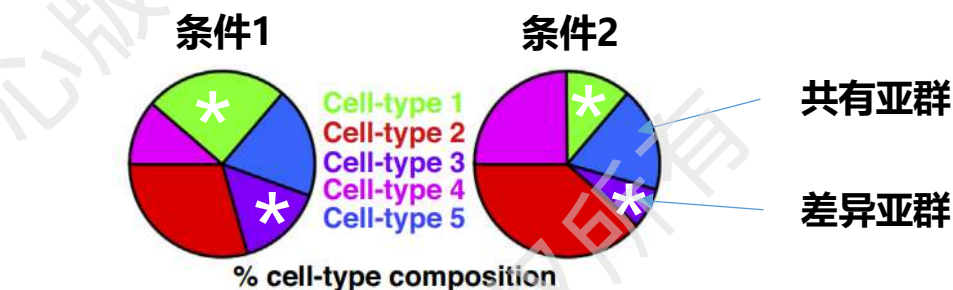
② 分析表达渐变性，研究谱系发育轨迹



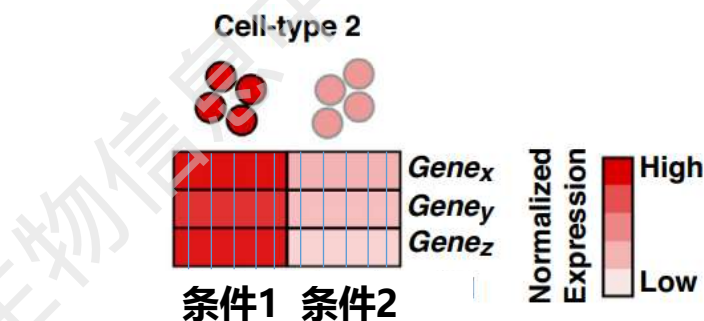
技术应用：找出导致不同表型/状态的关键亚群



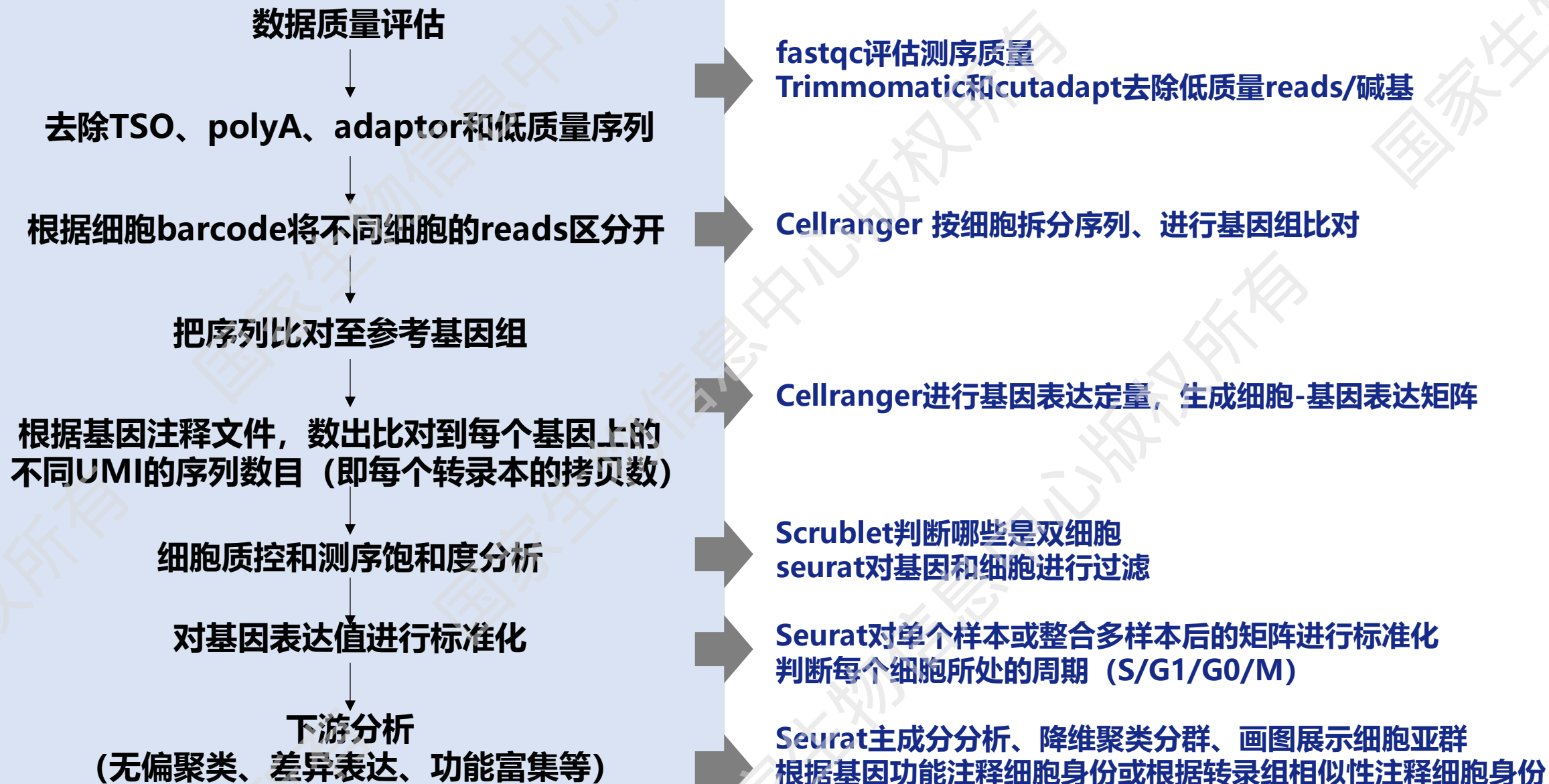
比较不同状态下的亚群组成，找差异或共有的亚群



分析亚群在不同状态下的基因差异表达

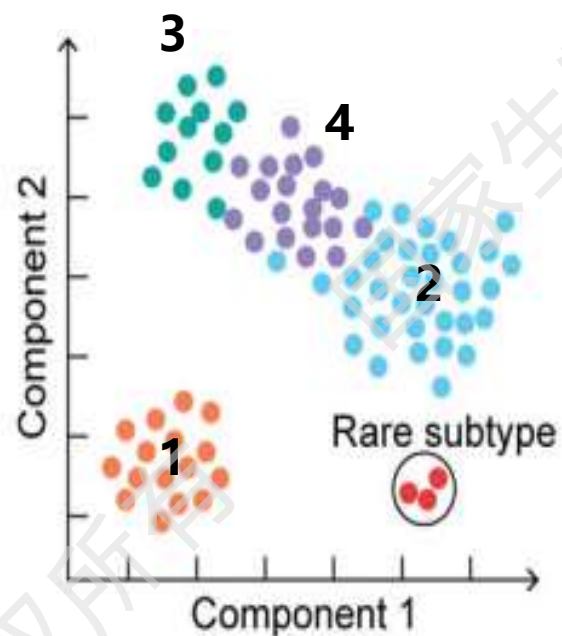


单细胞转录组数据分析流程



scRNA-seq亚群差异表达分析的原理

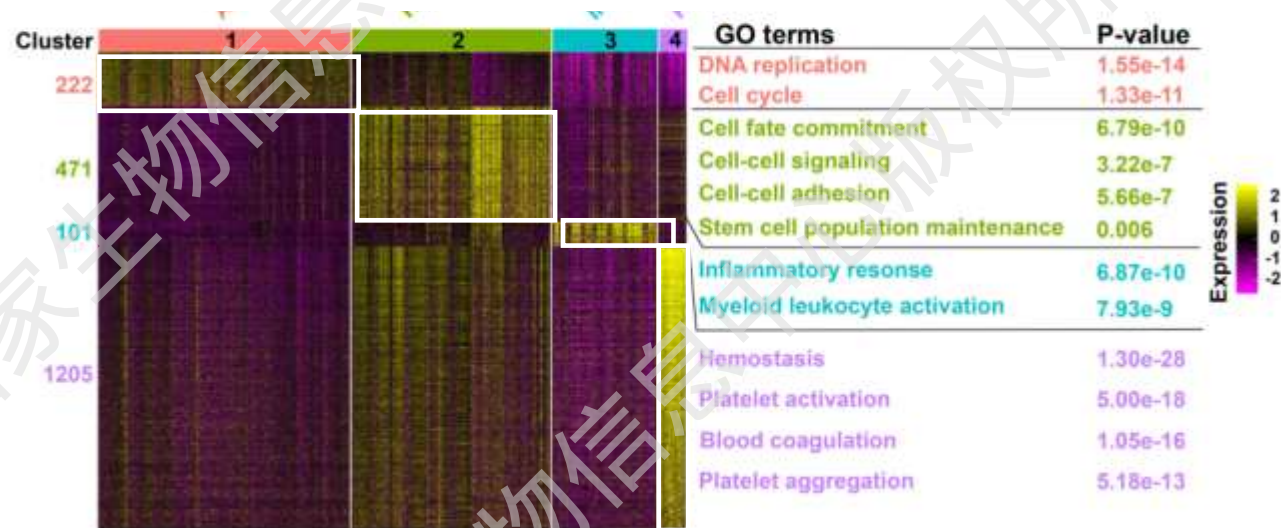
聚类分群



① 鉴定细胞亚群身份，研究群体异质性。

鉴定marker基因，根据功能判断每个群体的细胞身份，
用文献和已知分子特征作为指导或验证
(优势：发现新的亚群)

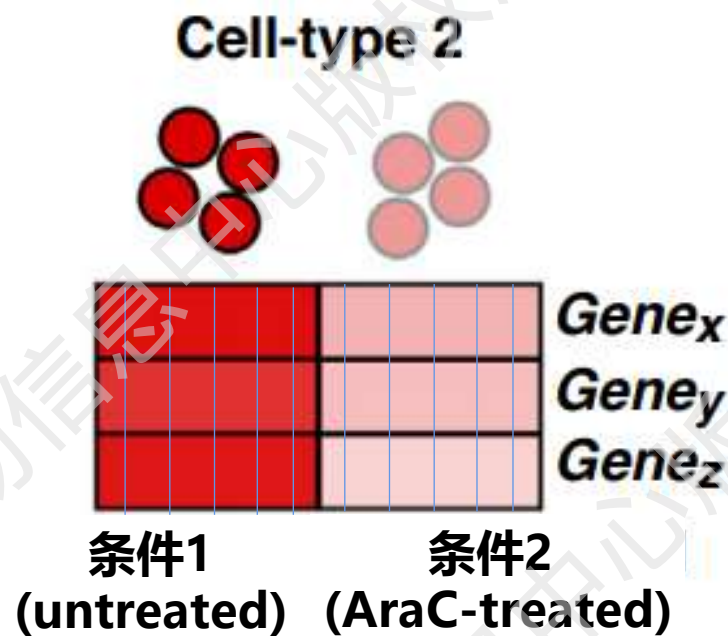
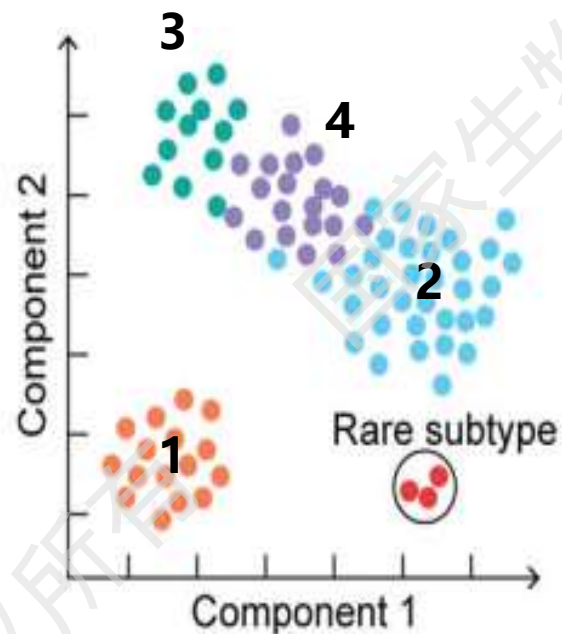
Seurat经典算法 (findAllMarkers)



scRNA-seq亚群差异表达分析的原理

2. 某亚群出现不同表型/状态，找出背后的关键基因

聚类分群



Seurat经典算法 (findMarks)

scRNA-seq分析：不同场景下分析差异表达基因的考虑

单细胞RNA-seq数据

1. 单细胞聚类后的亚群，找特征基因

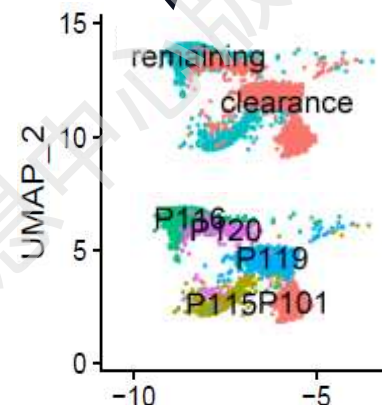
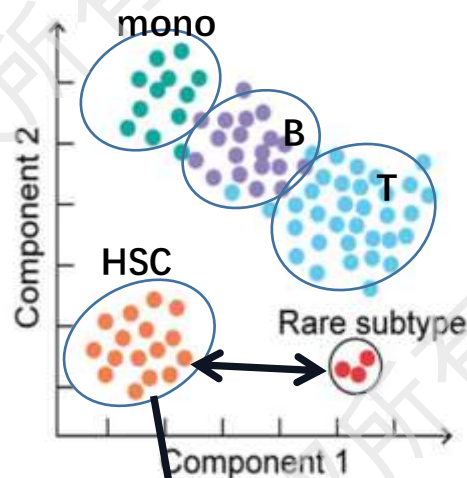
Seurat经典分析(findAllMarks),
只筛选**上调**基因

2. 鉴定两个亚群间的差异表达基因

Seurat经典分析(findMarks),
筛选**上调和下调**基因

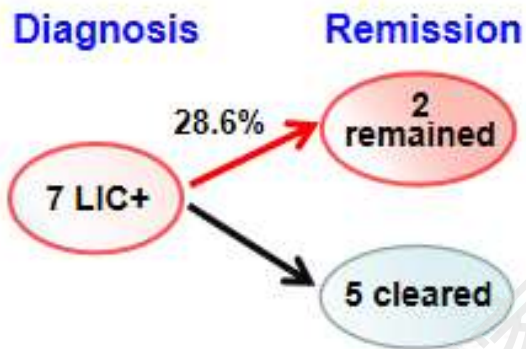
3. 不同病人来源的细胞间找差异表达基因

要考虑病人有异质性,
基于2, 筛选**病人间重现**的



scRNA-seq分析：两组间分析差异表达基因

Seurat经典算法 (findMarks)

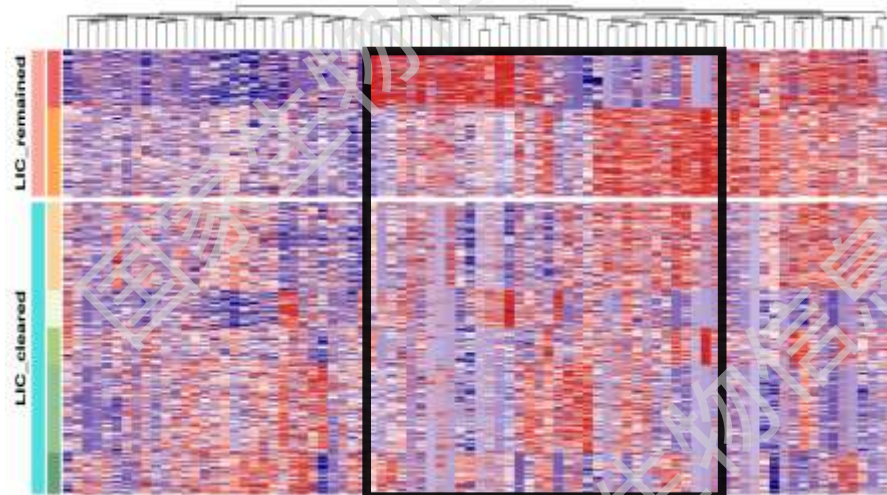


	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj
TPSAB1	0	1.364382	0.595	0.11	0
S100A10	0	1.133745	0.85	0.492	0
RUNX1T1	0	1.055024	0.721	0.111	0
JUN	0	0.986513	0.522	0.048	0
LIMS1	0	0.916389	0.926	0.701	0
HLA-DQB1	0	0.88146	0.811	0.429	0

按FDR/p value和Fold change、细胞% 筛选

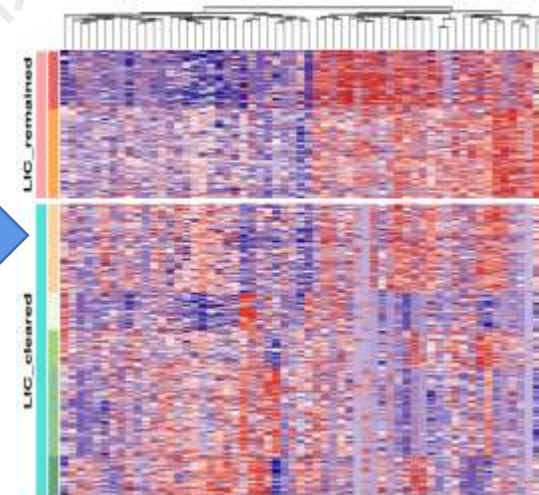
2个病人
化疗后残留

5个病人
化疗后清除



病人重现
的DEG

排除可能的
假阳性

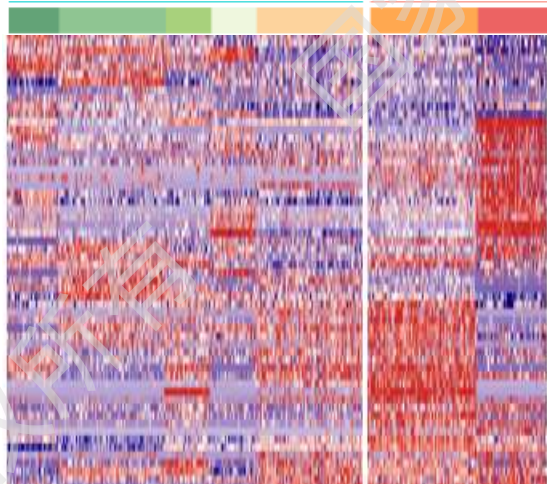


scRNA-seq分析：病人异质性存在时的GSEA分析

某亚群细胞 vs 其他细胞：

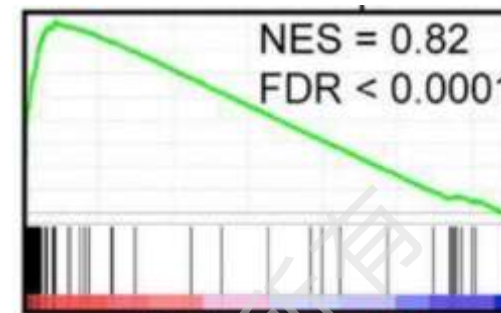
- 无病人间的差异：GSEA经典分析（每个样本都是独立的）
- 有病人间的差异：

原始矩阵：

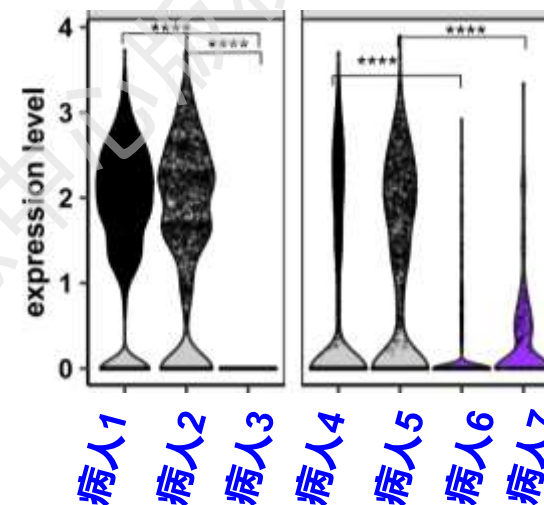


每个病人取相同的细胞数（让计算时的权重相同），用于GSEA

GSVA单细胞水平，对每个印记打分，筛选同组内病人变化一致的印记



组内病人一致



内容

- 技术应用的背景
- 解析异质性的分析流程
- **应用案例及实操**



中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）

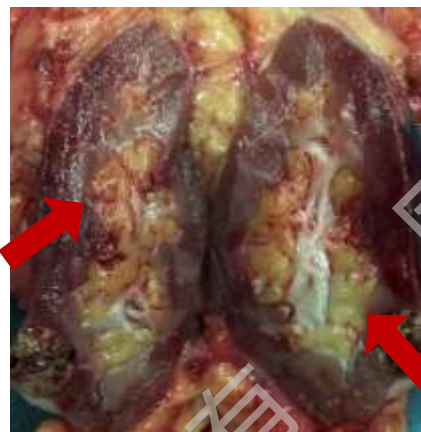
BEIJING INSTITUTE OF GENOMICS CHINESE ACADEMY OF SCIENCES / CHINA NATIONAL CENTER FOR BIOINFORMATION

应用实例

单细胞转录组测序揭示晚期肾癌和癌栓的肿瘤微环境差异

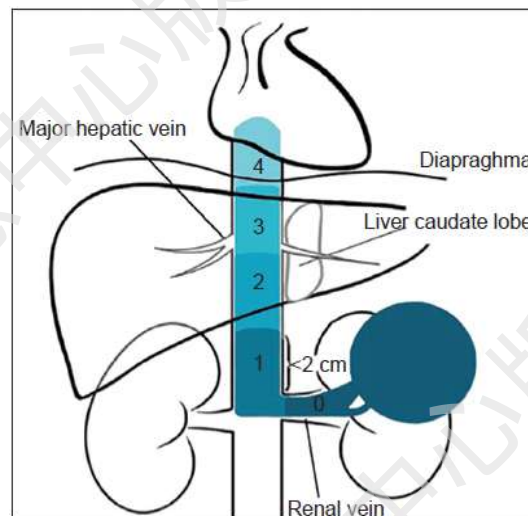
肾癌伴癌栓生长是肾癌恶性特征之一

肾癌是泌尿系统三大肿瘤之一



- 最常见肾透明细胞癌(ccRCC)
- 富含脂质, 切面呈金黄色
- 肿瘤血管丰富, 可靶向治疗
- 恶性特征: 肉瘤样分化、转移、形成**癌栓**等

癌栓: 肾癌细胞侵犯到静脉血管内生长形成



Ramazan et al. Turk J Urol. 2019

- 发生率约为4%~15%
- Mayo分级: 0~IV级
- 未治疗中位生存期5个月
- 手术难度极高, 并发症多

临床治疗提示同一患者肾癌(PT)和癌栓(TT)之间存在差异

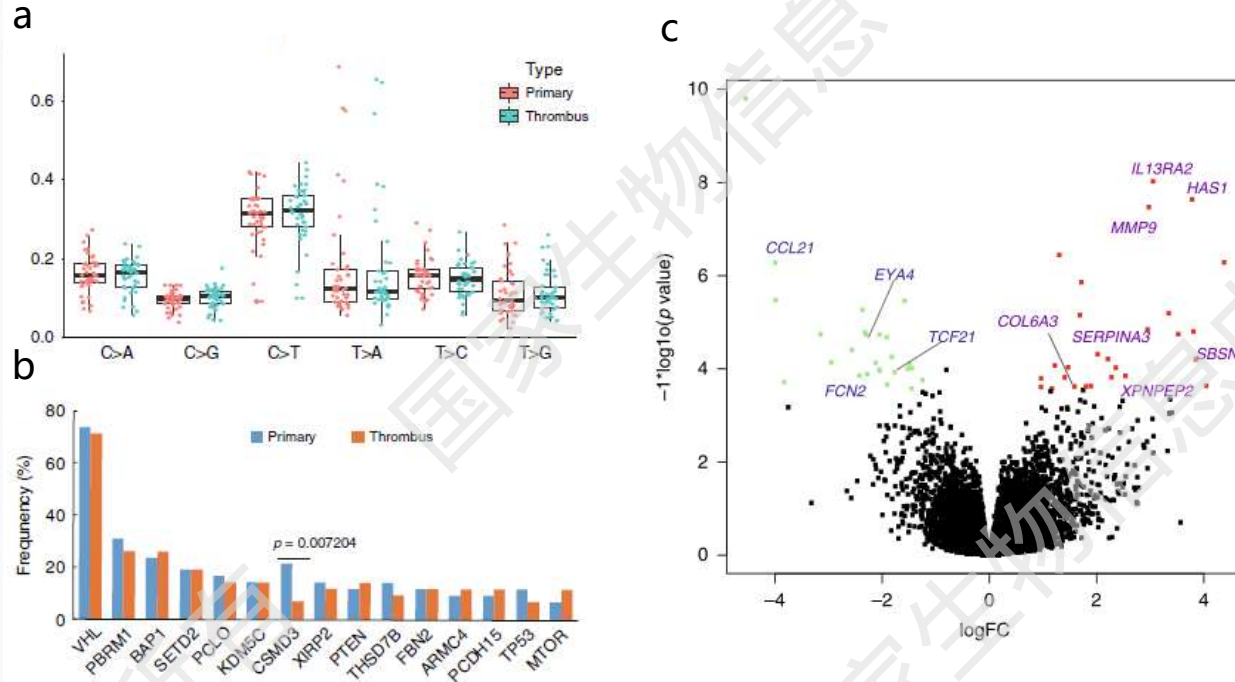
靶向血管内皮(VEGFR) 治疗对患者肾癌和癌栓疗效不同

Table 3 Clinical outcomes following presurgical targeted molecular therapy for renal cell carcinoma with venous tumor thrombus						
References	N	Tumor Thrombus Level Before and After Diagnosis	Effect on Tumor Thrombus Level	Targeted Agents and Duration of Treatment	Tumor Size Reduction	Overall Outcomes
Shuch et al, ³² 2008	1	II → 0/I	Reduction	Sunitinib (4 cycles)	Stable	RN and tx without bypass; no complications
Di Silverio et al, ³⁷ 2008	1	II → 0 (renal vein)	Reduction	Sorafenib (6 mo)	NA	Open RN and tx; no complications
Karakiewicz et al, ³⁸ 2008	1	IV → II	Reduction	Sunitinib (2 cycles)	Decreased size (27%, 11–8 cm)	RN and IVC tx; noted increased bleeding tendency and wound-healing complications
Harshman et al, ⁴⁸ 2009	1	I → 0	Reduction	Sunitinib (4 cycles)	Marked reduction	Laparoscopic RN and tx; no complications
Robert et al, ⁴⁷ 2009	1	III → III	No change in level; partial reduction in thickness	Sunitinib (5 cycles)	35% reduction	RN and IVC tx; no complications
Kroeger et al, ⁴⁹ 2010	1	IV → II	Reduction	Sunitinib (2 cycles)	2% reduction (12–11.8 cm)	RN and IVC tx (avoided thoracic procedure/bypass); no complications

MBBS, et al. *Urol Clin N Am*. 2017

Bulk组学未能解析出肾癌原发灶(PT)和癌栓(TT) 差异

肾癌和癌栓bulk基因组及转录组差异小



- ◆ 肾癌原发灶(PT)和癌栓(TT)基因组变异差异小
- ◆ 与肾癌原发灶相比, 癌栓仅有25个基因上调表达

提出科学问题



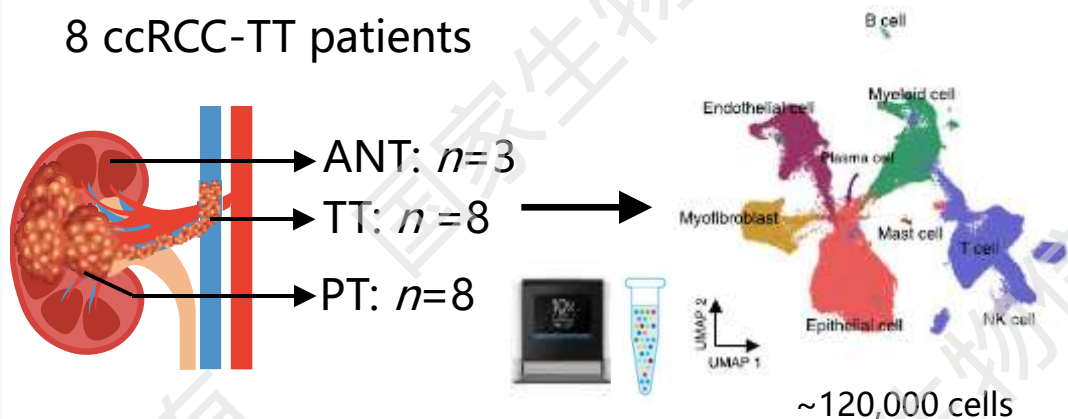
scRNA-seq

- ✓ 原发肾癌与癌栓肿瘤微环境, 尤其是免疫微环境有何差异?
- ✓ 可否筛选到新靶点, 为临床缩减癌栓治疗提供理论依据?

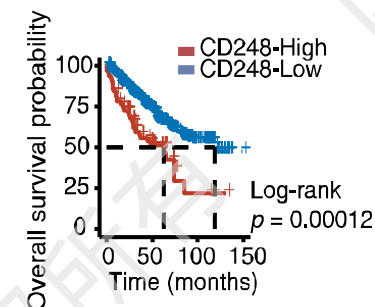
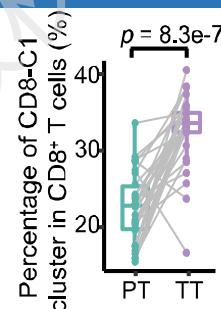
Wang, et al. Nature Communications. 2020

单细胞水平揭示肾癌原发灶(PT)和癌栓(TT)肿瘤微环境差异

单细胞转录组图谱鉴定PT和TT主要细胞亚群



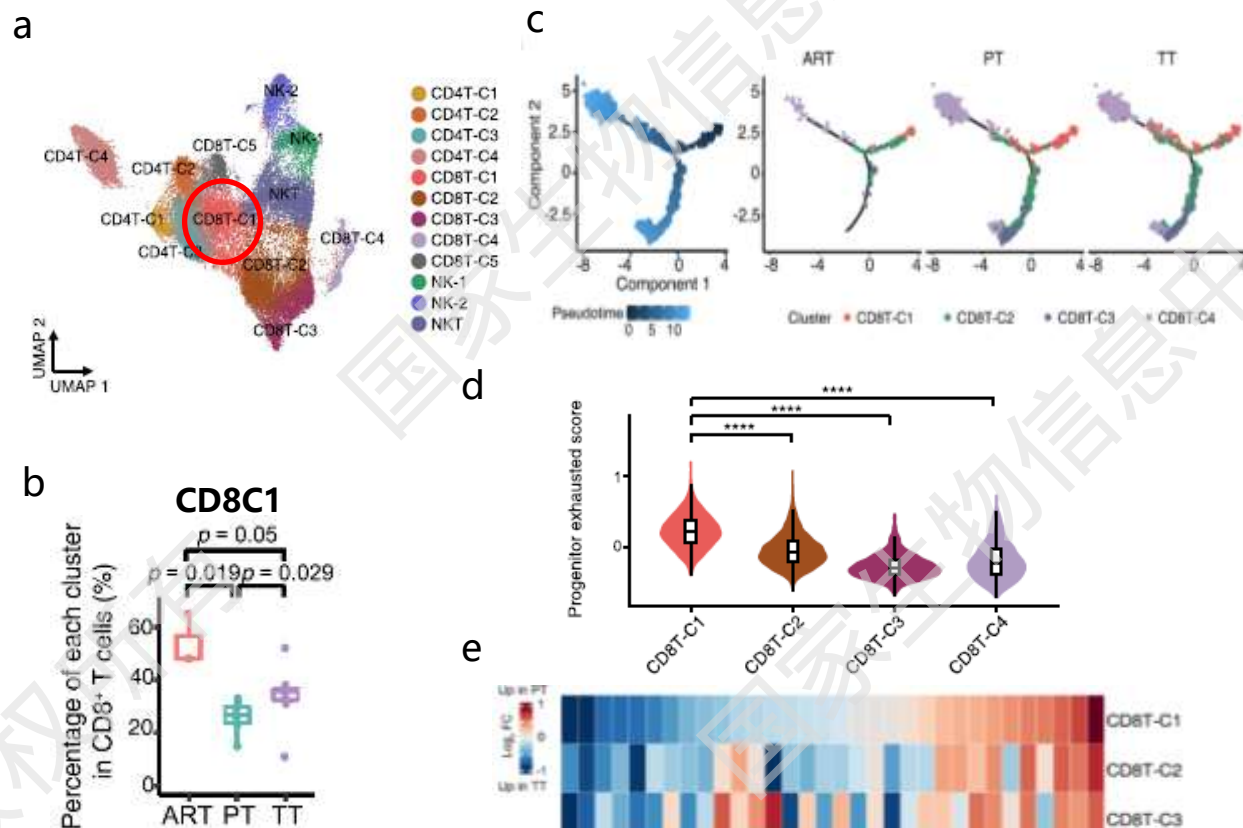
Bulk 转录组验证主要结论



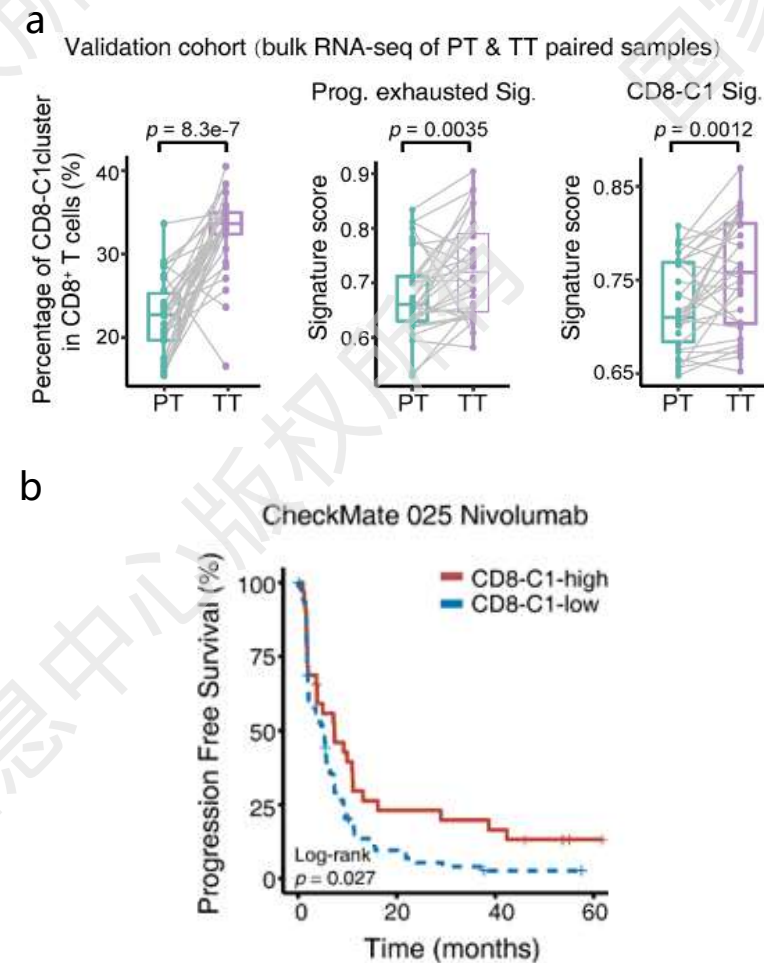
- 30例配对肾癌原发灶和癌栓转录组
- Check Mate 025 队列($n=120$, anti-PD-1治疗)
- TCGA-KIRC 队列($n=531$)
- IMmotion150 队列 ($n=82$, sunitinib治疗)

癌栓中显著富集前体耗竭型CD8⁺T细胞

CD8-C1具有较高的前体耗竭型CD8⁺T细胞特征

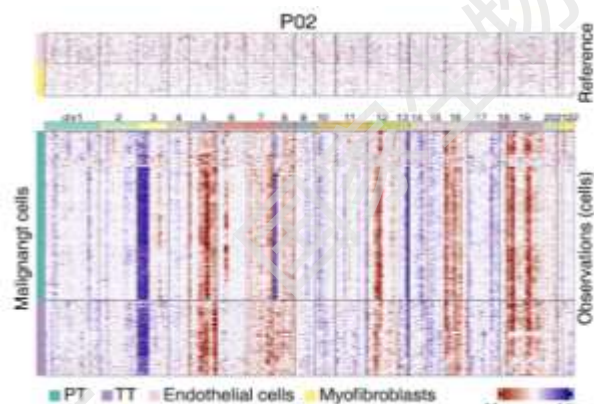


Bulk PT & TT 数据集验证



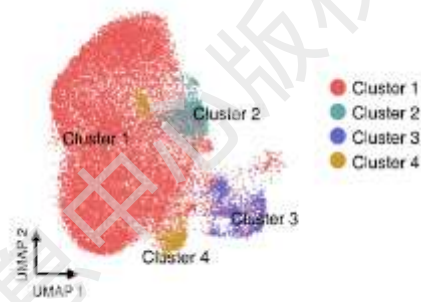
癌栓(TT)中肿瘤细胞胞外基质重塑(ECM)通路增强

PT和TT肿瘤细胞
拷贝数变异差异小

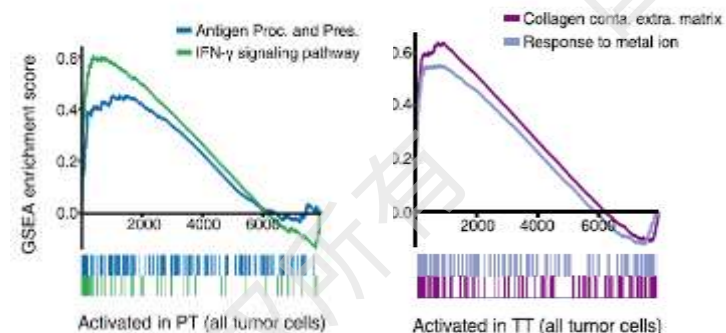


TT肿瘤细胞中上调胶原相关ECM通路
PT肿瘤细胞中上调抗原呈递和干扰素通路

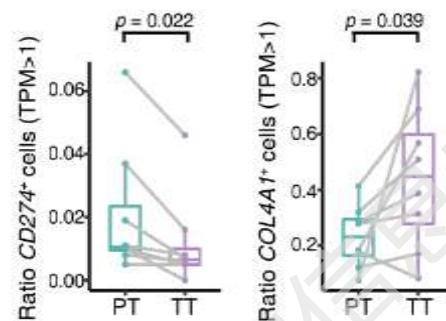
a



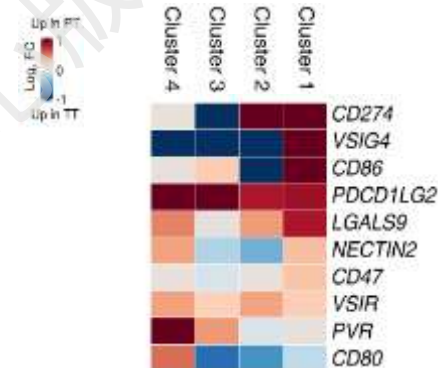
b



c

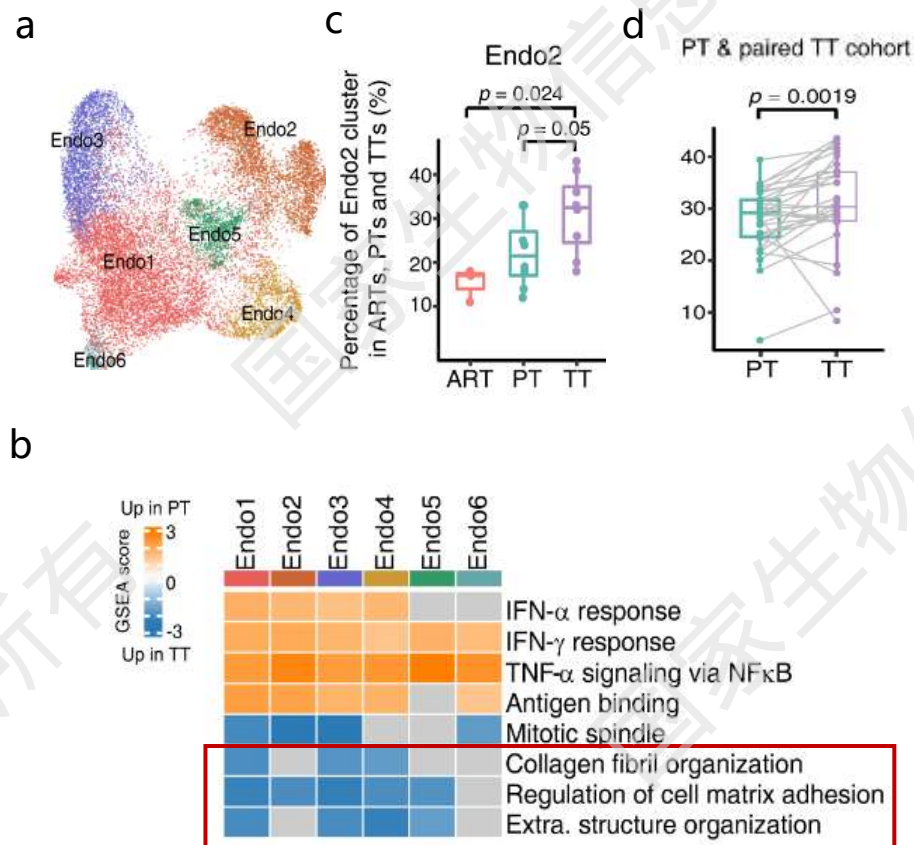


d

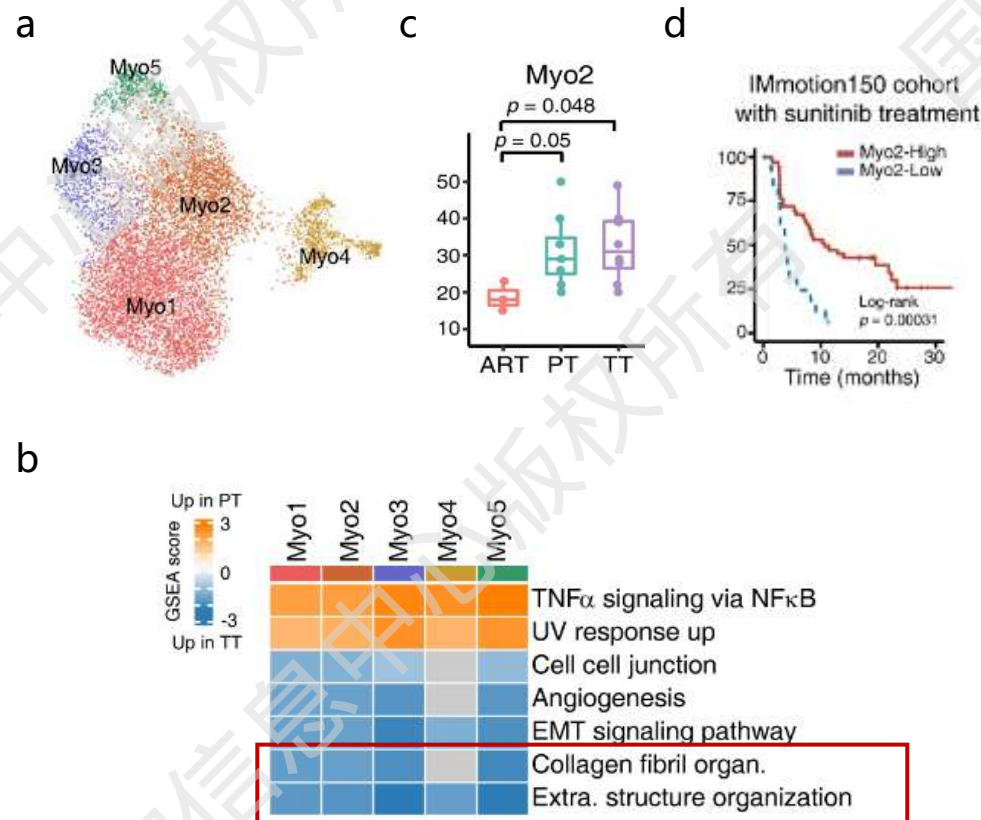


癌栓(TT)中内皮和成纤维细胞胞外基质重塑(ECM)通路更加活跃

癌栓中内皮细胞ECM相关通路更加活跃

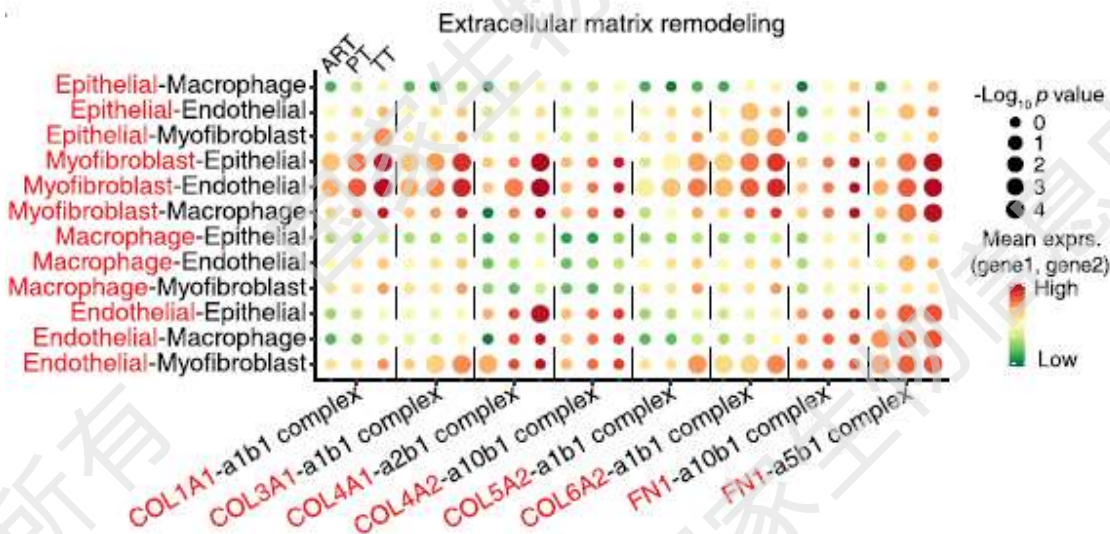


Myo2特征高的患者，针对血管内皮的靶向治疗可能更有效

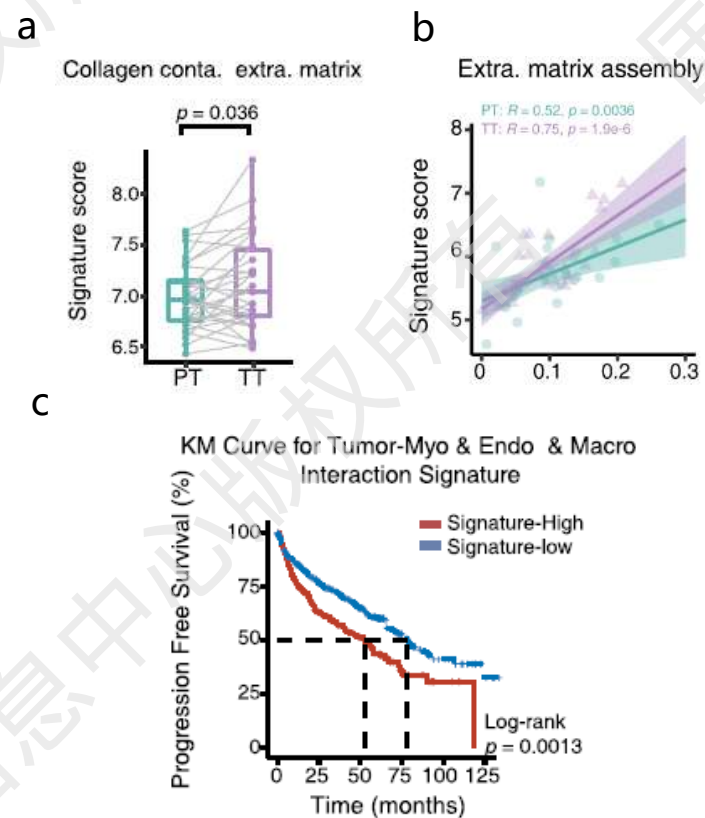


癌栓(TT)中肿瘤细胞与间质细胞ECM相互作用显著增强

癌栓中肿瘤细胞与间质细胞之间胞外基质重塑相互作用更强

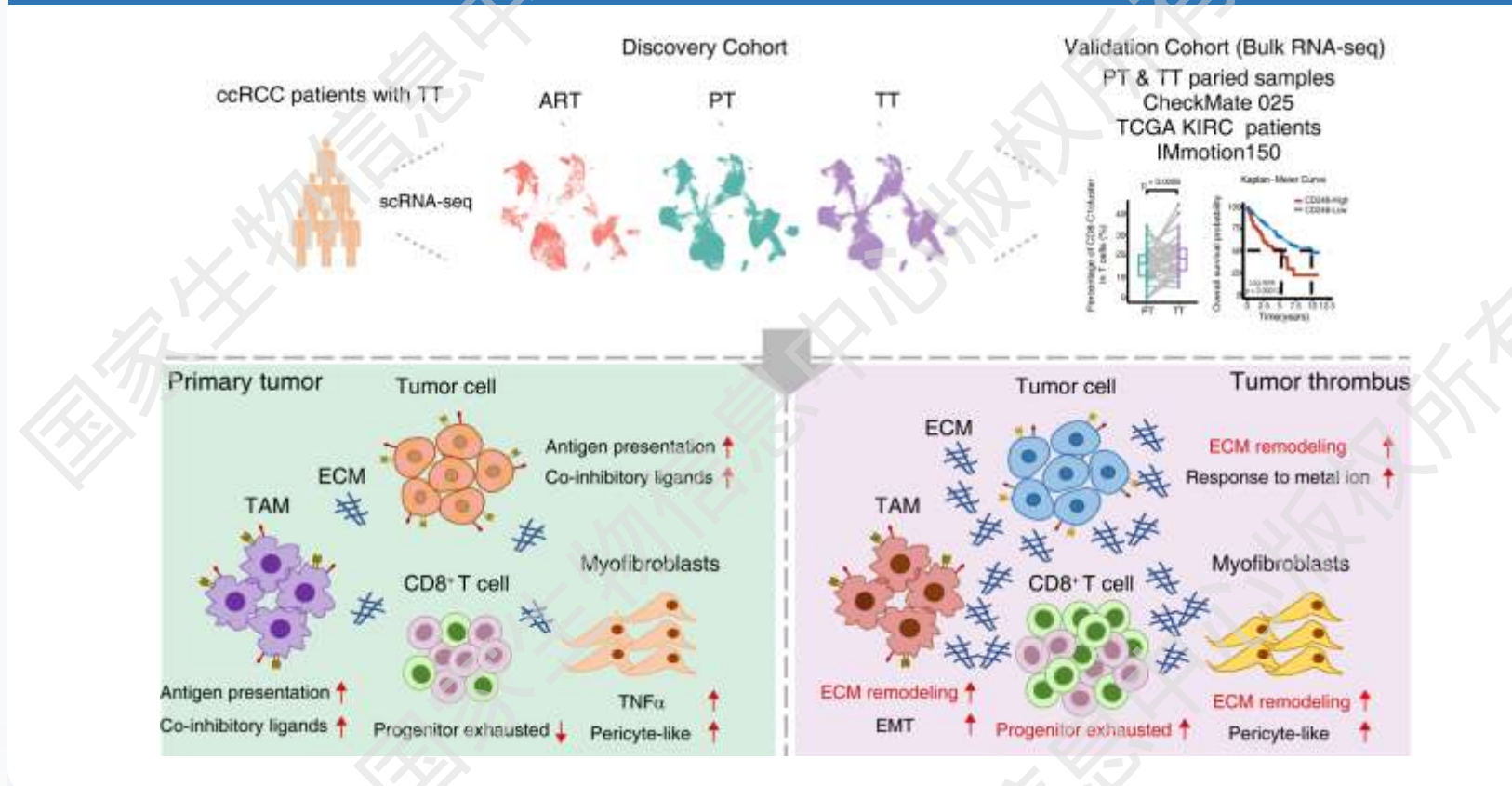


Bulk PT & TT 数据集验证



总结

单细胞水平刻画肾癌原发灶(PT)和癌栓(TT)肿瘤微环境全景差异及潜在免疫治疗策略



Shi et al. *Genome Biology*. 2022

研究意义:

1. 为晚期肾癌缩减癌栓提供潜在**治疗通路及靶点**, 如Myo2特征细胞, ECM通路相关基因;
2. 找到潜在肾癌**免疫治疗标记物 (CD8-C1)**, 为肾癌和癌栓免疫治疗提供理论依据

单细胞转录组相关课题分析总体思路





中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）

BEIJING INSTITUTE OF GENOMICS CHINESE ACADEMY OF SCIENCES / CHINA NATIONAL CENTER FOR BIOINFORMATION

感谢聆听!
THANK YOU