

# 单细胞转录组测序技术在皮肤恶性黑色素瘤中的研究进展

王晓丽<sup>1</sup>, 韩中杰<sup>2</sup>, 韩梦洋<sup>1</sup>, 李雅琪<sup>1</sup>, 盛望<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北京工业大学环境与生命学部抗病毒药物北京市国际科技合作基地, 北京

<sup>2</sup>北京工业大学环境与生命学部生物医学工程系, 北京

收稿日期: 2023年2月15日; 录用日期: 2023年4月3日; 发布日期: 2023年4月13日

## 摘要

皮肤恶性黑色素瘤是恶性黑色素瘤的一种常见类型, 具有极强的转移性和侵袭性, 同时具有高突变负荷、肿瘤间和肿瘤内遗传异质性以及复杂的肿瘤微环境。黑色素瘤潜在机制的深度研究对于理解肿瘤进展和对治疗的反应至关重要。本文总结了单细胞转录组测序技术在黑色素瘤研究中的应用, 从构建皮肤黑色素瘤的基因表达图谱、表征肿瘤间和肿瘤内的异质性和探究肿瘤微环境等方面深度剖析其在皮肤恶性黑色素瘤中的研究进展。并且介绍了目前常用的单细胞转录组数据库及其特点。最后, 本文介绍了可与单细胞转录组测序技术结合应用的空间转录组技术, 作为当下的研究热点, 空间转录组技术与单细胞测序技术结合应用可从时间和空间两个维度重塑肿瘤微环境, 为深入了解肿瘤提供了可以继续扩展的框架。

## 关键词

黑色素瘤, 单细胞测序, 异质性, 肿瘤微环境, 耐药性

# Research Progress of Single Cell Transcriptome Sequencing Technology in Cutaneous Malignant Melanoma

Xiaoli Wang<sup>1</sup>, Zhongjie Han<sup>2</sup>, Mengyang Han<sup>1</sup>, Yaqi Li<sup>1</sup>, Wang Sheng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Beijing International Science and Technology Cooperation Base of Antivirus Drug, Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing

<sup>2</sup>Department of Bioengineering, Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing

Received: Feb. 15<sup>th</sup>, 2023; accepted: Apr. 3<sup>rd</sup>, 2023; published: Apr. 13<sup>th</sup>, 2023

文章引用: 王晓丽, 韩中杰, 韩梦洋, 李雅琪, 盛望. 单细胞转录组测序技术在皮肤恶性黑色素瘤中的研究进展[J]. 生物医学, 2023, 13(2): 199-210. DOI: 10.12677/hjbm.2023.132023

## Abstract

Cutaneous malignant melanoma is a common type of malignant melanoma, which has strong metastatic and invasive, high mutation load, genetic heterogeneity between and within tumors and complex tumor microenvironment. In-depth study of the underlying mechanisms of melanoma is essential for understanding tumor progression and response to treatment. This paper summarizes the application of single cell transcriptome sequencing technology in tumor research, and deeply analyzes its research progress in cutaneous malignant melanoma from the aspects of constructing gene expression map of cutaneous melanoma, characterizing heterogeneity between and within tumors, and exploring tumor microenvironment. The common single cell transcriptome databases and their characteristics are also introduced. Finally, this paper introduces the spatial transcriptome technology which can be combined with single cell transcriptome sequencing technology. As a current research hotspot, the combination of spatial transcriptome technology and single cell sequencing technology can reshape the tumor microenvironment from two dimensions of time and space, and provide a framework for further understanding of tumors.

## Keywords

Melanoma, Single Cell Sequencing, Heterogeneity, Tumor Microenvironment, Drug Resistance

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

黑色素瘤是一种起源已久的癌症类型，最早的历史记载可以追溯到公元前 5 世纪希波克拉底的描述中，而最早有证据表明黑色素瘤转移则是在大约 2400 年前的秘鲁，研究人员在前哥伦布时期的木乃伊中发现了黑色素细胞转移[1]。现代科学证实黑色素瘤起源于黑素细胞的恶性转化。黑素细胞起源于神经外胚层，然后广泛迁移到全身，包括皮肤、粘膜、葡萄膜、直肠和内耳，通过制造黑色素来抵御光损伤[2]。由于黑素细胞的分布相对广泛，就导致无论解剖位置或器官和组织的类型如何，黑色素瘤都可能无处不在。另外，不同国家的黑色素瘤发病率和死亡率各不相同，呈现出地域差异，在澳洲、欧洲和北美相对较高，非洲最低，这种差异与种族、生活方式和遗传背景有关[3]。皮肤恶性黑色素瘤是恶性黑色素瘤的一种常见类型，具有极强的转移性和侵袭性[4]。截至 2022 年 1 月 1 日，皮肤黑色素瘤已经成为美国最常见的癌症类型之一，在男性中排名第二，仅次于前列腺癌，在女性中排名第四[5]。大多数的皮肤黑色素瘤患者都被诊断为 I 期，通过手术切除，其 5 年存活率接近 100%。然而皮肤黑色素瘤一旦发生转移，则无法进行手术切除，其 5 年的生存率仅为 5%~10% [6]。虽然免疫药物相比于传统放化疗法显示出改善转移性黑色素瘤患者预后的潜力，但是只有一部分患者能够从中受益，仍然有许多患者没有表现出长期持续的反应。原因是免疫疗法成功与否取决于肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中免疫细胞的组成以及发挥的功能[7]，而在黑色素瘤的肿瘤微环境中，黑色素细胞向转移性黑色素瘤的恶性转化是一个过程的结果，该过程需要外源性和内源性的触发因素以及肿瘤微环境之间复杂的相互作用。目前我们可以确定的风险因素包括阳光照射和紫外线辐射、黑色素细胞痣、个人和家族黑色素瘤史等，但是对于皮肤黑色素瘤微环境的深入研究仍然欠缺。已经有证据表明肿瘤浸润淋巴细胞密度的增加与更好的预后相关，也与淋巴结转移的减少密切相关[8]。因此对肿瘤微环境的研究迫在眉睫。

近年来,高通量测序技术(next-generation sequencing, NGS)已经广泛应用到生命科学研究中,其中最主流的 RNA-seq (RNA sequencing)测序技术是对从整体组织中提取出的混合 RNA 进行测序,得到的是混合细胞群体中的基因表达平均值。然而在肿瘤微环境中,每个细胞接收外源和内源的信息以及做出的反应都是不相同的,这样就导致传统的 RNA-seq 技术无法准确反映肿瘤微环境里单个细胞所处的状态,从而无法了解肿瘤细胞群体之间的转录组异质性。单细胞测序(single-cell sequencing, SCS)技术的出现使我们能够以前所未有的深度分析肿瘤微环境[9]。与传统的 RNA-seq 技术相比,单细胞转录组测序技术可以对单个细胞进行转录组分析,在研究肿瘤异质性以及发生、发展、转移过程中具有独特的优势。

本文总结了单细胞转录组测序技术在皮肤恶性黑色素瘤中的应用和研究进展,介绍了目前常用的单细胞转录组数据库及其特点。最后,本文介绍了可与单细胞转录组测序技术结合应用的空间转录组技术以及发展前景。

## 2. 单细胞测序技术简介

单细胞测序技术是在单细胞水平对基因组进行扩增与测序的技术。自从 2009 年问世以来[10],得到了越来越多的重视并且获得了不断的发展。单细胞测序技术主要包括单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)、单细胞基因组测序(single-cell DNA-sequencing, scDNA-seq)、单细胞表观组测序(single cell epigenome sequencing)等[11]。其中 scRNA-seq 是在单个细胞水平对 mRNA 进行高通量测序的一项新技术,针对单个细胞研究其基因表达情况[12]。

单细胞转录组测序技术大体分为四步:单细胞分选、单细胞转录组文库制备、单细胞转录组测序和单细胞数据分析与可视化。1) 单细胞分选:单细胞测序的第一个步骤就是把单个细胞或者细胞核从组织中分离出来。Byungjin Hwang 等人[13]介绍的常用的单细胞分离方法包括:有限稀释法(limiting dilution assay, LDA) [14]、显微操作法(micromanipulation) [15]、荧光激活细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS) [16]、磁珠细胞分选法(magnetic activated cell sorting, MACS) [17]、激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM) [18]、微流控技术(microfluidic technology)、基于微滴的微流体技术(microdroplet-based microfluidics) [19]等。其中微流控技术由于其精确的流量控制以及低样品消耗和低分析成本的特点受到广泛的欢迎。2) 单细胞转录组文库制备:常见的技术包括:10xGenomics、SMART-seq [20]、SMART-Seq2 [21]、CEL-seq2 [22]、Drop-seq [23]、MARS-seq [24]、TargetAmp 等。其中 10xGenomics、SMART-seq 是目前主流的单细胞转录组建库的技术。SMART-seq 建库的常见步骤包括细胞裂解、cDNA 第一链合成、cDNA 第二链合成和 cDNA 扩增[13]。而 10xGenomics 方法是在细胞裂解之前将制备好的细胞悬液、10X barcode 凝胶磁珠和油滴分别加入到测序系统中,经由微流控交叉系统形成乳液凝胶珠(Gel Bead in emulsion, GEMs)。10xGenomics 技术与 SMART-seq 技术相比对具有更高的细胞通量但是也具有获得非全长转录本、噪声较高等缺点。而 SMART-seq 技术虽然灵敏度相对较高,基因表达更加均一,但是缺点是只能分析带 Poly(A)的 RNA [25]。3) 单细胞转录组测序:scRNA-seq 通过分析单个细胞的转录组,得到细胞群内不同细胞类型转录的特点,从而揭示细胞在不同生长阶段发挥的不同功能。目前国内外应用于单细胞高通量测序主流平台是 illumina 系列,其他平台逐渐被证明可用于单细胞测序,如 MGI 系列[26]、BGISEQ 系列[27]、Roche454、Ion Torrent [28]、ABI SOLiD 等。4) 单细胞数据分析与可视化:在单细胞数据分析的过程中,研究者根据不同的研究目的会选择不同的分析流程。对于 scRNA-seq 数据的分析来说,拟时序分析(trajjectory analysis)、细胞通讯分析、基因表达(gene expression)、转录因子分析等都是比较常见的分析方法,其中主流的软件包括 Seurat [29]、Scater [30]、scran [31]、monocle2 [32]、monocle3、TSCAN [33]、CellphoneDB [34]、CellChat [35]等。

### 3. 单细胞转录组测序技术在皮肤黑色素瘤研究中的应用

在皮肤黑色素瘤的研究中,单细胞测序技术通过将黑色素瘤细胞进行分群聚类,鉴定出不同功能的细胞亚群,直观的体现出肿瘤的异质性,进而深入研究肿瘤微环境的细胞组成,并具有阐明肿瘤发生、发展、转移的复杂机制的巨大潜力,从而为确立精准治疗策略提供新的思路。研究者还可以进行肿瘤微环境中的细胞与细胞通讯研究,推断出不同细胞之间的相互作用,使人们了解不同的细胞类型对肿瘤微环境的调节机制。单细胞拟时序技术的发展还能帮助研究者推断细胞发展进程,证明黑色素瘤细胞在不同的转录状态或表型之间发生动态转换以进行免疫逃逸,为研究黑色素瘤耐药性提供另一种角度。

#### 3.1. 黑色素瘤单细胞图谱类研究进展

随着医疗水平的进步和肿瘤研究水平的提升,人们对肿瘤异质性的认识越来越深刻。在临床治疗过程中,肿瘤的异质性也极大影响了治疗效果。但是目前对肿瘤细胞群体的分析远远不能满足研究肿瘤异质性的需要,因此,我们非常需要深入到单细胞层面开展基因表达研究。近年来,有越来越多研究致力于从单细胞的层面阐释皮肤黑色素瘤的基因表达图谱。Tirosh 等人[36] 2016年发表在 SCIENCE 期刊上的文章首次对 19 名黑色素患者中分离的 4645 个单细胞进行了单细胞转录组测序,探索黑色素瘤不同的基因型和表型状态,鉴定出了恶性黑色素瘤细胞、免疫细胞、基质细胞和内皮细胞,揭示了同一肿瘤内恶性细胞的转录异质性,指出肿瘤异质性与细胞周期、空间环境和耐药性的关系。研究人员将黑色素瘤细胞分为主要表达 MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor)和 AXL (AXL Receptor Tyrosine Kinase)基因的细胞,其中 MITF 高表达组细胞的标志基因主要包括 MITF、TYR、PMEL 和 MLANA, AXL 高表达组细胞的标志基因包括 AXL 和 NGFR,接下来通过单细胞水平的研究发现不同种类黑色素瘤都具有这两种类型的细胞,从而证明了 MITF 和 AXL 在黑色素瘤发生发展进程中的重要作用[36]。这项研究的出现从此揭开了构建皮肤黑色素瘤多组学图谱的序幕。Kunz [37]等人通过单细胞测序技术分析比较了黑色素细胞痣和原发性黑色素瘤,定义了两种转录组类型的黑素细胞痣(N1 和 N2)和原发性黑素瘤(M1 和 M2)。N1/M1 病变的特征是色素沉着和高表达 MITF 基因,以及 M1 黑色素瘤中 NRAS 突变的高患病率。N2/M2 病变的特征是炎症和高表达 AXL 基因。作者通过构建黑色素瘤单细胞图谱,继而根据单个细胞的基因表达特点分析黑色素瘤发生发展过程中的轨迹变化,确定了早期和晚期黑色素瘤发展的基因特征和相关调节机制。Karras [38]等人在一项基于单细胞测序分析展开的黑色素瘤生长和转移的研究中通过结合小鼠遗传学、单细胞和空间转录组学、细胞谱系追踪和定量建模,证实了胚胎神经嵴干细胞的分化特点。他们指出在所有的恶性黑色素瘤细胞中都可以检测到一定水平的 MITF 转录活性,而且 MITF 活性和转录过程联系密切,在黑素细胞中检测到高水平的 MITF,对应黑色素瘤增殖状态,而低水平的 MITF 在间充质样细胞中检测到,与之对应的是黑色素瘤的侵袭状态,从而揭示了黑色素瘤细胞状态的多样性。进一步的研究表明,具有间充质样状态的黑色素瘤细胞群体在促进原发肿瘤生长的过程中并没有发挥显著作用,而是构成了转移起始细胞池,其在扩散到次级器官的同时改变了细胞性质。转录因子 MITF 和 AXL 是黑色素瘤的关键调节因子,不同的转录状态与黑色素瘤表型有密切联系,相关基因的表达与预后也有一定的关系,已有多篇文章进行证实[39]。目前的黑色素瘤单细胞图谱研究更是印证了这一观点,为之后预测黑色素瘤疾病进展状态和药物靶向性研究提供了思路。

#### 3.2. 单细胞测序技术应用于皮肤恶性黑色素瘤异质性研究

异质性几乎是所有肿瘤都具有的特点之一,而黑色素瘤的异质性被认为是临床治疗反应差,治疗耐药以及治疗后早期复发的主要机制[40]。不同的黑色素瘤细胞表型通过转录重编程过程使异质性肿瘤经历黑色素瘤进展的不同阶段,并在治疗期间适应药物暴露[41]。由于肿瘤内复杂的异质性,对大块肿瘤的整体

研究是远远不够的。近些年,单细胞测序分析技术的发展使得定义不同表型的基因特征成为可能,从而为我们从单个细胞层面研究黑色素瘤异质性提供了帮助。黑色素瘤中肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)的状态是重要预后参数之一。Deng [42]等人运用单细胞 RNA 测序技术探索 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群的异质性,并确定了 7 个主要亚群。作者发现高浸润的样本往往与不良的预后关系密切,进而鉴定了仅在 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭亚群 2 中表达的三个过表达基因 PMEL、TYRP1 和 EDNRB 作为黑色素瘤的新型治疗靶点。Francesca [43]等通过将组织微阵列核心中的 CD8<sup>+</sup>T 细胞中高表达 CD69 和/或高表达 OX40 的细胞定义为活性状态,高表达 TIM3、低表达 CD69、低表达 OX40 的细胞定义为耗竭状态,以此来评估同一患者黑色素瘤不同区域免疫反应的异质性。异质性球体最近在黑色素瘤研究中获得了突出的地位,因为它们结合了与黑色素瘤生长相关的微环境因素。最近有研究团队[44]通过运用单细胞 RNA 测序和相关生物信息学技术来分析黑色素瘤异质性球体 3D 模型,确定了异质性球体中成纤维细胞的功能多样性。通过免疫组织化学分析与黑色素瘤活检验证,最终区分了原代人类成纤维细胞和黑色素瘤球体中的三个功能簇,这三个功能簇在细胞外基质相关基因表达、促炎因子表达和 TGF $\beta$  信号超家族表达上都具有显著差别,因此为研究成纤维细胞的异质性对皮肤黑色素瘤的发生发展提供了思路。单细胞测序分析的出现为剖析肿瘤的复杂性提供了独特的机会从而加深了我们对于皮肤黑色素瘤异质性的认识,为我们提出更好的靶向治疗手段克服免疫治疗的耐药性提供了帮助。

### 3.3. 单细胞测序技术应用于皮肤恶性黑色素瘤微环境研究

肿瘤微环境由许多细胞类型组成,通常包括基质细胞、免疫细胞和恶性肿瘤细胞。由于肿瘤异质性的存在,更是为我们探索肿瘤微环境增添了难度。单细胞测序技术的出现使我们研究肿瘤微环境中不同细胞的数量占比以及相互作用关系成为了可能。CIBERSORTx 是斯坦福大学的 Newman [45]等人开发的一种可用于分析 scRNA 数据的工具,它可用于从完整组织的 RNA 图谱中准确推断不同细胞类型的比例和不同细胞类型特异性基因的表达。他们依次应用了三项技术评估了 CIBERSORTx 在黑色素瘤研究中的应用,包括高分辨率表达纯化、群模式表达纯化和使用单细胞参考图谱分析不同平台的细胞组成。众所周知,目前对转移性黑色素瘤最有效的治疗方案采用靶向耗竭性 T 细胞上表达的 PD-1 或 CTLA4 的免疫检查点阻断[46]。尽管一部分患者获得了持久的抗肿瘤的 T 细胞反应,但临床结果仍然是异质性的,并且缺乏有效的预测生物标志物[47]。CIBERSORTx 的应用有助于提高我们对肿瘤微环境内异型相互作用的理解,并为依赖于靶向特定细胞类型的诊断和治疗提供有用信息。

肿瘤细胞与正常细胞之间的交流也会导致肿瘤的发生、恶化和转移。研究肿瘤微环境中的细胞互作也是目前的重点课题之一。基于单细胞测序数据分析细胞与细胞受体配体相互作用的工具有很多,比如 CellChat [35]、CellPhoneDB [34]、SingleCellSignalR [48]、iTALK [49]、NicheNet [50]等。Liu [51]等人在研究与黑色素瘤患者预后相关的铁死亡相关基因的过程中,运用了 CellChat 工具对黑色素瘤微环境进行了细胞通讯分析,表明不同细胞之间的交互强度具有显著差异。CellChat 将不同的信号通路根据其功能相似性分成 4 组,分别具有炎症、免疫等不同的功能。通讯模式分析揭示了多个细胞群和信号通路如何协同工作。另外,交叉参照和靶信号分析可以为特定细胞类型中的自分泌和旁分泌途径的分析提供思路,从而对黑色素瘤微环境中复杂的细胞间相互作用形成了一个相对完整和具体的分析。Wang [52]等人首先通过核心免疫逃逸基因分子图谱的分析,提出 LCK 是黑色素瘤的免疫相关预后生物标志物,LCK 的高表达与多种肿瘤代谢信号通路以及免疫相关途径的激活显著相关。之后 CellChat 分析证实,C2 亚群和 T 细胞亚群中的 LCK 通过结合 CD8 受体在细胞间发挥免疫促进作用,更加有力的证明 LCK 是黑色素瘤的可靠生物标志物,并将有助于提高免疫治疗的效果。针对肿瘤微环境的免疫治疗是人类抗击癌症历程中具有里程碑意义的治疗方法。近年来,单细胞测序技术及相关算法的出现为人类更加深入了解黑色素瘤

肿瘤微环境的活动提供了全新的视角，随着算法的演进和计算速度的提升，肿瘤微环境的分析将更加深入、准确，我们对肿瘤微环境的了解将越来越清晰，从而帮助我们研究更加有针对性的治疗方案，进而有机会帮助更多的黑色素瘤患者能从免疫治疗中获益。

### 3.4. 单细胞测序技术应用用于皮肤黑色素瘤耐药研究

除了化疗之外，皮肤黑色素瘤的药物治疗主要包括小分子抑制剂治疗和免疫检查点抑制剂治疗。小分子抑制剂的治疗方法是靶向皮肤黑色素瘤中的基因突变。根据体细胞突变状态，皮肤黑色素瘤可以分为四种亚型，分别是 BRAF 突变、NRAS 突变、NF1 突变以及野生型突变[53]。目前常见的小分子抑制剂靶向治疗方案是使用靶向突变型 BRAF 的小分子抑制剂 vemurafenib、dabrafenib 和 encorafenib 的一种联合下游靶向抑制剂如丝裂原激活的细胞外信号调节激酶(mitogen-activated extracellular signaling-regulated kinases, MEK1/2)进行治疗[3]。虽然联合治疗使 BRAF 突变患者的总生存率显著提高，但是由于黑色素瘤的异质性以及可塑性，导致其效果也并不乐观。另外，在非 BRAF 突变黑色素瘤肿瘤中，大约一半发生了 NRAS 突变，由于 NRAS 突变黑色素瘤的高侵袭性和快速耐药性，目前仍然缺乏有效的治疗，导致 NRAS 突变黑色素瘤患者的总体预后较差[54]。了解这些关键突变如何驱动黑色素瘤产生治疗耐药性，对于开发出更有效和特异性的治疗方法至关重要。最近，具有异质性的细胞群体的拟时序(pseudotime, PT)动力学分析已被确立为研究发育过程的方法之一[55]。单细胞拟时序分析技术的发展能过帮助我们去动态分析黑色素瘤细胞的重编程过程，Schmidt [56]等人运用生物信息学的方法分析了经过小分子抑制剂治疗前后的 BRAF<sup>V600E</sup> 突变黑色素瘤细胞的 scRNA-seq 数据。通过结合 pseudotime 和 RNA velocity 分析的方法，在单细胞水平上推断产生治疗耐药性的途径。发育轨迹显示黑色素瘤细胞从神经嵴样状态到更具增殖性状态的转变，随后表现出 MAPK 途径再激活和多能性特征的状态，表明治疗后肿瘤细胞的高度可塑性。单细胞测序中拟时序分析对发育轨迹的研究加深了我们对治疗诱导的黑色素瘤细胞重编程和可塑性的理解，并确定了与治疗耐药性相关的潜在靶点。

在皮肤黑色素瘤的免疫治疗中，基于 nivolumab 和 pembrolizumab 的抗 PD-1 疗法在大约 30%的转移性黑色素瘤患者中取得了良好的临床效果，然而，大约三分之二的患者有耐药性，需要进一步治疗[57]。目前普遍认为，皮肤黑色素瘤出现治疗耐药性不仅取决于基因突变，黑色素瘤在不同的转录状态或表型之间动态转换以逃避免疫治疗也是导致治疗耐药性的重要因素。Karras [58]等人利用单细胞测序技术分析皮肤黑色素瘤 scRNA 数据，通过 SCENIC 转录因子分析，确定每种细胞状态特定的调节子，确定了转录因子 MITF 在黑色素瘤表型转换过程中发挥的重要作用，之后通过 AUCcell 工具分析每簇基因表达标记活性，证明了黑色素瘤细胞的转录异质性。黑色素细胞性黑色素瘤由于处于增殖相对活跃的阶段，免疫细胞的数量也相对较多，免疫疗法的治疗效果也相对较好。而神经嵴样黑色素瘤由于处于未分化状态，缺乏活化的免疫细胞，免疫疗法的治疗效果也相对较差。由于转录因子的调节，黑色素瘤细胞通过表型转换到干细胞样状态，从而完成免疫逃逸，对免疫治疗产生耐药性。另外，也有研究指出黑色素瘤细胞可塑性与免疫细胞和癌症相关成纤维细胞中基因表达的改变以及细胞外基质的变化有关，这些变化驱动转移级联反应和治疗耐药性的发生[59]。总之，不同患者皮肤黑色素瘤的细胞状态是复杂多变的，肿瘤微环境也是各不相同的，单细胞测序技术的发展，能够通过多种方法量化不同患者肿瘤细胞的构成以及所处状态，从而为患者提供更加精准更加有效的治疗，从而节约治疗成本，提高存活率。

### 3.5. 皮肤黑色素瘤单细胞测序公共数据的挖掘

随着单细胞测序技术的迅速发展，全球各地的单细胞测序计划正在广泛推进，单细胞公共数据库也在不断的完善。本文将单细胞公共数据库进行整理，详见表 1。比如 scRNASeqDB 数据库，主要收录的

**Table 1.** scRNA-seq database resources  
**表 1.** scRNA-seq 数据库资源汇总

数据库	发布时间	网址	特点	参考文献
GEO	2005 年	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>	GEO 数据库是第一个基因表达数据的公共数据库, 具有强大的数据收录功能, 记录各类芯片数据和测序数据。	[67]
scRNASeqDB	2017 年	<a href="https://bioinfo.uth.edu/scrnaseqdb/">https://bioinfo.uth.edu/scrnaseqdb/</a>	主要收录的是来自 GEO 数据库的生物学单细胞测序数据, 并提供分析和可视化功能	[59]
JingleBells	2017 年	<a href="http://jinglebells.bgu.ac.il/">http://jinglebells.bgu.ac.il/</a>	免疫相关的单细胞数据库	[60]
The Human Cell Atlas	2017 年	<a href="https://data.humancellatlas.org/">https://data.humancellatlas.org/</a>	大型国际合作项目, 致力于建立一个健康人体所包含的所有细胞的参考图谱, 具有权威性	[68]
Single Cell Expression Atlas	2018 年	<a href="https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home">https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home</a>	目前包括 20 个物种, 304 项研究的 1000 多万单细胞的测序数据	[69]
PanglaoDB	2019 年	<a href="https://panglaodb.se/">https://panglaodb.se/</a>	包含了 6000 多个 marker 基因, 可用于细胞分群注释, 适合零基础的研究者使用、探索和挖掘	[70]
Single Cell Portal	2019 年	<a href="https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell">https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell</a>	除了数据集检索和下载功能外, 部分数据集支持在线差异表达分析, 展示不同细胞群之间基因表达的差异, 截至目前收录了 508 项研究的将近 3000 万个单细胞的测序数据	-
SCDevDB	2019 年	<a href="https://scdevdb.deepomics.org">https://scdevdb.deepomics.org</a>	数据构成主要是正常组织, 侧重于研究不同发育途径中的单细胞基因表达谱	[62]
CancerSEA	2019 年	<a href="http://bioce.hrbmu.edu.cn/CancerSEA/">http://bioce.hrbmu.edu.cn/CancerSEA/</a>	旨在全面探索癌细胞不同功能状态的单细胞数据库	[61]
TMEExplorer	2022 年	R package: <a href="https://bioconductor.org/packages/release/data/">https://bioconductor.org/packages/release/data/</a>	收集了肿瘤微环境特异的单细胞数据集, 具有全面的搜索工具, 允许用户根据更多的特征选择数据集	[71]

是来自 GEO 数据库的生物学单细胞测序数据[59]。Single Cell Portal (SCP)数据库是由麻省理工大学和哈佛大学的 Broad 研究所建立的, 截至 2023 年 2 月 1 日, Single Cell Portal 收录了 508 项研究的将近 3000 万个单细胞的测序数据, 并提供了研究项目检索和基因检索两种检索模式。人类细胞图谱(Human Cell Atlas)计划是一项类似于“人类基因组计划”的大型国际合作项目, 致力于建立一个健康人体所包含的所有细胞的参考图谱, 包括细胞类型、数目、位置、相互关联与分子组分等, 最终建立全息生命信息网络。这项计划目前已收录 313 个组织、将近 5000 位供体、3600 万个单细胞的测序数据, 并在持续更新中。对于生信研究来说, 人类细胞图谱计划无疑提供了一个大型、权威的单细胞测序数据来源。JingleBells [60]是免疫相关的 scRNA-Seq 数据集的数据库, 用于在单细胞水平上进行分析 and 可视化。CancerSEA [61]根据来自 25 种癌症类型的 41,900 个癌症单细胞描绘了癌症单细胞功能状态图谱, 涉及 14 种功能状态, 包括干性、侵袭性、转移、增殖、上皮细胞-间充质转化、血管生成、凋亡、细胞周期、分化、DNA 损伤、DNA 修复、缺氧、炎症反应和静止, 旨在全面探索癌细胞不同功能状态。SCDevDB [62]是一个致力于研究不同发育途径中的单细胞基因表达谱的数据库, 这个数据库中收集了 10 个人类单细胞 RNA-seq 数据

集，并且将这些数据集分成 176 个发育细胞组，构建了 24 个不同的发育途径。最近也推出了名为 CReSCENT [63] 的包含 scRNA-seq 数据的工具包，其中只有癌症细胞数据，主要侧重于分析，算不上一个完整的数据库。虽然单细胞公共数据库越来越完善，但是目前尚无专门针对皮肤黑色素瘤的单细胞数据库。对于研究者来说，只能在公共数据库中检索皮肤黑色素瘤相关的数据集，这可能会耗费大量时间去搜集数据，如果能建立专门的黑色素瘤单细胞数据库，将简化在单细胞水平上研究黑色素瘤所需的数据收集步骤，降低研究人员进入这类研究的门槛。

#### 4. 单细胞测序技术应用于皮肤黑色素瘤研究的挑战及思考

虽然单细胞分析技术对于肿瘤研究具有非常广阔的前景，但是目前仍然存在很大局限性。首先，在单个细胞分离和捕获过程中，细胞需要经过机械分离或酶解消化成单细胞悬液，才能进行接下来的测序，在这个过程中细胞的活性和完整性可能受到影响。另外，目前单细胞测序两种主流的分析方法都具有一定的不足之处，对于 10xGenomics 技术来说，其采用的液滴捕获技术，在操作过程中，存在空液滴或者双液滴的情况，需要后续的质控去筛选过滤，油包水的微环境与在机体内的环境有很大差异，细胞间的通讯网络也被打破。另一方面，对于没有生物信息学和数据背景的研究者来说，分析实验中生成的海量数据是一项不小的挑战，进而影响后续对实验结果的阐释与总结。随着单细胞测序技术的迅速发展，人们对肿瘤微环境异质性的理解越来越深刻，单细胞分析已经从转录组学扩展到基因组学、蛋白质组学和表观遗传学[64]。通过各种分析方法的结合，我们可以重建肿瘤组织中细胞实际的空间结构。近些年，单细胞转录组研究越来越多地与空间转录组(spatial transcriptomics, ST)学相结合，后者可以根据每个芯片上每个点的基因表达信息进行聚类，然后将点根据地址序列放回到组织的图像上，同时可以对每个基因在组织上表达的空间位置进行定位，从而进一步了解不同细胞类型和状态的细微差别。应用范围最广的研究方法是基于图像的空间分辨转录组学和基于原位条形码的空间分辨转录组学，但是目前空间转录组技术还达不到单细胞分辨率，而单细胞转录组数据则能够起到一定的补充作用，将两者的数据进行锚定和整合，使我们能够获得目标组织的三维空间转录组图谱。Biermann [65] 等人在一项黑色素瘤脑转移的单细胞研究中结合了空间转录组技术，推定出癌症免疫逃逸的独特空间位置，为证明脑转移黑色素瘤淋巴样聚集体中肿瘤内 B 细胞向浆细胞分化提供更丰富的证据。Thrane [66] 等人使用空间转录组技术来表征皮肤黑色素瘤淋巴结转移，在单个肿瘤活检中突出不同的基因表达谱以及同一区域的多个黑色素瘤特征，以及根据其空间位置和基因表达谱表征的淋巴组织的共享谱，揭示了黑色素瘤转移的详细情况。

#### 5. 总结

单细胞测序技术结合了生物技术和生物信息分析技术，是实验科学与计算科学的综合体。单细胞测序技术的快速发展能够使人们深度了解皮肤黑色素瘤的高突变负荷、肿瘤间和肿瘤内遗传异质性以及复杂的肿瘤微环境等特点，为我们确立精准治疗策略提供新的思路，也为之后预测黑色素瘤疾病进展状态和药物靶向性研究提供了思路。针对肿瘤微环境的免疫治疗是人类抗击癌症历程中具有里程碑意义的治疗方法，而单细胞测序技术及相关算法的出现为人类更加深入了解黑色素瘤肿瘤微环境的活动提供了全新的视角，进而有机会帮助更多的黑色素瘤患者能从免疫治疗中获益。单细胞测序技术的发展也需要多方专家积极合作及沟通，在生物学实验中广泛结合大数据分析的优势，促进生命科学的发展。

#### 参考文献

- [1] Mitra, S. (2020) Exploring the Molecular Landscape of Cutaneous Melanoma. Ph.D. Thesis, Lund University, Lund.



- [2] Lo, J.A. and Fisher, D.E. (2014) The Melanoma Revolution: From UV Carcinogenesis to a New Era in Therapeutics. *Science*, **346**, 945-949. <https://doi.org/10.1126/science.1253735>
- [3] Schadendorf, D., van Akkooi, A.C.J., Berking, C., Griewank, K.G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A. and Ugurel, S. (2018) Melanoma. *The Lancet*, **392**, 971-984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- [4] Ozretic, P., Hanzic, N., Proust, B., Sabol, M., Trnski, D., Radic, M., Musani, V., Ciribilli, Y., Milas, I., Puljiz, Z., Bosnar, M.H., Levanat, S. and Slade, N. (2019) Expression Profiles of p53/p73, NME and GLI Families in Metastatic Melanoma Tissue and Cell Lines. *Scientific Reports*, **9**, 12470. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48882-y>
- [5] Miller, K.D., Nogueira, L., Devasia, T., Mariotto, A.B., Yabroff, K.R., Jemal, A., Kramer, J. and Siegel, R.L. (2022) Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **72**, 409-436. <https://doi.org/10.3322/caac.21731>
- [6] Sun, L., Guan, Z., Wei, S., Tan, R., Li, P. and Yan, L. (2019) Identification of Long Non-Coding and Messenger RNAs Differentially Expressed Between Primary and Metastatic Melanoma. *Frontiers in Genetics*, **10**, 292. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00292>
- [7] Trujillo, J.A., Sweis, R.F., Bao, R.Y. and Luke, J.J. (2018) T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer Immunology Research*, **6**, 990-1000. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0277>
- [8] Azimi, F., Scolyer, R.A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S.W., Saw, R.P. and Thompson, J.F. (2012) Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade Is an Independent Predictor of Sentinel Lymph Node Status and Survival in Patients with Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **30**, 2678-2683. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.8539>
- [9] Ren, X., Zhang, L., Zhang, Y., Li, Z., Siemers, N. and Zhang, Z. (2021) Insights Gained from Single-Cell Analysis of Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Annual Review of Immunology*, **39**, 583-609. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-110519-071134>
- [10] Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., Lao, K. and Surani, M.A. (2009) mRNA-Seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell. *Nature Methods*, **6**, 377-382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- [11] 操利超, 巴颖, 张核子. 单细胞测序方法研究进展[J]. 生物信息学, 2022, 20(2): 91-99.
- [12] 刘强, 方仪, 王靖. 单细胞测序技术在乳腺癌研究中的应用进展[J]. 中国癌症杂志, 2022, 32(7): 635-642.
- [13] Hwang, B., Lee, J.H. and Bang, D. (2018) Single-Cell RNA Sequencing Technologies and Bioinformatics Pipelines. *Experimental & Molecular Medicine*, **50**, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
- [14] Greenfield, E.A. (2019) Single-Cell Cloning of Hybridoma Cells by Limiting Dilution. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2019**, 726-728. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot103192>
- [15] Xu, W.H. (2018) Microinjection and Micromanipulation: A Historical Perspective. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1874**, 1-16. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_1)
- [16] Pan, J. and Wan, J. (2020) Methodological Comparison of FACS and MACS Isolation of Enriched Microglia and Astrocytes from Mouse Brain. *Journal of Immunological Methods*, **486**, Article ID: 112834. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112834>
- [17] Guneykaya, D., Ivanov, A., Hernandez, D.P., et al. (2018) Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Reports*, **24**, 2773-2783.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.001>
- [18] Mickler, E.A., Zhou, H.X., Phang, T.L., et al. (2021) Low-Coverage Whole Genome Sequencing Using Laser Capture Microscopy with Combined Digital Droplet PCR: An Effective Tool to Study Copy Number and Kras Mutations in Early Lung Adenocarcinoma Development. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 12034. <https://doi.org/10.3390/ijms22112034>
- [19] Bowman, E.K. and Alper, H.S. (2020) Microdroplet-Assisted Screening of Biomolecule Production for Metabolic Engineering Applications. *Trends in Biotechnology*, **38**, 701-714. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.11.002>
- [20] Picelli, S., Björklund, Å.K., Faridani, O.R., Sagasser, S., Winberg, G. and Sandberg, R. (2013) Smart-seq2 for Sensitive Full-Length Transcriptome Profiling in Single Cells. *Nature Methods*, **10**, 1096-1098. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2639>
- [21] Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, Å.K., Winberg, G., Sagasser, S. and Sandberg, R. (2014) Full-Length RNA-seq from Single Cells Using Smart-seq2. *Nature Protocols*, **9**, 171-181. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006>
- [22] Hashimshony, T., Senderovich, N., Avital, G., et al. (2016) CEL-Seq2: Sensitive Highly-Multiplexed Single-Cell RNA-Seq. *Genome Biology*, **17**, 77. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0938-8>
- [23] Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., et al. (2015) Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*, **161**, 1202-1214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.002>

- [24] Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A. and Amit, I. (2014) Massively Parallel Single-Cell RNA-seq for Marker-Free Decomposition of Tissues into Cell Types. *Science*, **343**, 776-779. <https://doi.org/10.1126/science.1247651>
- [25] Zhang, Q.M., He, Y., Luo, N., et al. (2019) Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, **179**, 829-845.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.003>
- [26] Jeon, S.A., Park, J.L., Park, S.-J., Kim, J.H., Goh, S.-H., Han, J.-Y. and Kim, S.-Y. (2021) Comparison between MGI and Illumina Sequencing Platforms for Whole Genome Sequencing. *Genes & Genomics*, **43**, 713-724. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01096-x>
- [27] Sandoval-Velasco, M., Rodríguez, J.A., Perez Estrada, C., Zhang, G.J., Lieberman Aiden, E., Marti-Renom, M.A., Gilbert, M., Thomas, P. and Smith, O. (2020) Hi-C Chromosome Conformation Capture Sequencing of Avian Genomes Using the BGISEQ-500 Platform. *Giga Science*, **9**, gaa087. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa087>
- [28] Yin, Y.X., Butler, C. and Zhang, Q.H. (2021) Challenges in the Application of NGS in the Clinical Laboratory. *Human Immunology*, **82**, 812-819. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.03.011>
- [29] Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. and Satija, R. (2018) Integrating Single-Cell Transcriptomic Data across Different Conditions, Technologies, and Species. *Nature Biotechnology*, **36**, 411-420. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>
- [30] McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L. and Wills, Q.F. (2017) Scater: Pre-Processing, Quality Control, Normalization and Visualization of Single-Cell RNA-seq Data in R. *Bioinformatics*, **33**, 1179-1186. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw777>
- [31] Lun, A.T., McCarthy, D.J. and Marioni, J.C. (2016) A Step-by-Step Workflow for Low-Level Analysis of Single-Cell RNA-seq Data with Bioconductor. *F1000research*, **5**, 2122. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9501.2>
- [32] Cao, J.Y., Spielmann, M., Qiu, X.J., Huang, X.F., Ibrahim, D.M., Hill, A.J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F.J., Trapnell, C. and Shendure, J. (2019) The Single-Cell Transcriptional Landscape of Mammalian Organogenesis. *Nature*, **566**, 496-502. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>
- [33] Ji, Z.C. and Ji, H.K. (2016) TSCAN: Pseudo-Time Reconstruction and Evaluation in Single-Cell RNA-seq Analysis. *Nucleic Acids Research*, **44**, e117-e117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw430>
- [34] Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S.A. and Vento-Tormo, R. (2020) CellPhoneDB: Inferring Cell-Cell Communication from Combined Expression of Multi-Subunit Ligand-Receptor Complexes. *Nature Protocols*, **15**, 1484-1506. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0292-x>
- [35] Jin, S.Q., Guerrero-Juarez, C.F., Zhang, L.H., Chang, I., Ramos, R., Kuan, C.-H., Myung, P., Plikus, M.V. and Nie, Q. (2021) Inference and Analysis of Cell-Cell Communication Using CellChat. *Nature Communications*, **12**, 1088. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9>
- [36] Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H.N., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., Fallahi-Sichani, M., Dutton-Regester, K., Lin, J.R., Cohen, O., Shah, P., Lu, D., Genshaft, A.S., Hughes, T.K., Ziegler, C.G., Kazer, S.W., Gaillard, A., Kolb, K.E., Villani, A.C., Johannessen, C.M., Andreev, A.Y., Van Allen, E.M., Bertagnolli, M., Sorger, P.K., Sullivan, R.J., Flaherty, K.T., Frederick, D.T., Jane-Valbuena, J., Yoon, C.H., Rozenblatt-Rosen, O., Shalek, A.K., Regev, A. and Garraway, L.A. (2016) Dissecting the Multicellular Ecosystem of Metastatic Melanoma by Single-Cell RNA-seq. *Science*, **352**, 189-196. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>
- [37] Kunz, M., Löffler-Wirth, H., Dannemann, M., Willscher, E., Doose, G., Kelso, J., Kottek, T., Nickel, B., Hopp, L., Landsberg, J., Hoffmann, S., Tüting, T., Zigrino, P., Mauch, C., Utikal, J., Ziemer, M., Schulze, H.-J., Hölzel, M., Roesch, A., Kneitz, S., Meierjohann, S., Bosserhoff, A., Binder, H. and Scharl, M. (2018) RNA-seq Analysis Identifies Different Transcriptomic Types and Developmental Trajectories of Primary Melanomas. *Oncogene*, **37**, 6136-6151. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0385-y>
- [38] Karras, P., Bordeu, I., Pozniak, J., Nowosad, A., Pazzi, C., Van Raemdonck, N., Landeloos, E., Van Herck, Y., Pedri, D., Bervoets, G., Makhzami, S., Khoo, J.H., Pavie, B., Lamote, J., Marin-Bejar, O., Dewaele, M., Liang, H., Zhang, X., Hua, Y., Wouters, J., Browaeys, R., Bergers, G., Saeys, Y., Bosisio, F., van den Oord, J., Lambrechts, D., Rustgi, A.K., Bechter, O., Blanpain, C., Simons, B.D., Rambow, F. and Marine, J.C. (2022) A Cellular Hierarchy in Melanoma Uncouples Growth and Metastasis. *Nature*, **610**, 190-198. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05242-7>
- [39] Goding, C.R. and Arnheiter, H. (2019) MITF—The First 25 Years. *Genes & Development*, **33**, 983-1007. <https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>
- [40] McGranahan, N. and Swanton, C. (2017) Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, **168**, 613-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
- [41] Arozarena, I. and Wellbrock, C. (2019) Phenotype Plasticity as Enabler of Melanoma Progression and Therapy Resistance. *Nature Reviews Cancer*, **19**, 377-391. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4>
- [42] Deng, W., Ma, Y., Su, Z., Liu, Y., Liang, P., Huang, C., Liu, X., Shao, J., Zhang, Y., Zhang, K., Chen, J. and Li, R.

- (2021) Single-Cell RNA-Sequencing Analyses Identify Heterogeneity of CD8(+) T Cell Subpopulations and Novel Therapy Targets in Melanoma. *Molecular Therapy-Oncolytics*, **20**, 105-118. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.12.003>
- [43] Bosio, F.M., Antoranz, A., van Herck, Y., Bolognesi, M.M., Marcelis, L., Chinello, C., Wouters, J., Magni, F., Alexopoulos, L., Stas, M., Boecxstaens, V., Bechter, O., Cattoretti, G. and van den Oord, J. (2020) Functional Heterogeneity of Lymphocytic Patterns in Primary Melanoma Dissected through Single-Cell Multiplexing. *eLife*, **9**, e53008. <https://doi.org/10.7554/eLife.53008>
- [44] Novotný, J., Strnadová, K., Dvořánková, B., Kocourková, Š., Jakša, R., Dunder, P., Pačes, V., Smetana, K., Kolář, M. and Lacina, L. (2020) Single-Cell RNA Sequencing Unravels Heterogeneity of the Stromal Niche in Cutaneous Melanoma Heterogeneous Spheroids. *Cancers*, **12**, 3324. <https://doi.org/10.3390/cancers12113324>
- [45] Newman, A.M., Steen, C.B., Liu, C.L., Gentles, A.J., Chaudhuri, A.A., Scherer, F., Khodadoust, M.S., Esfahani, M.S., Luca, B.A., Steiner, D., Diehn, M. and Alizadeh, A.A. (2019) Determining Cell Type Abundance and Expression from Bulk Tissues with Digital Cytometry. *Nature Biotechnology*, **37**, 773-782. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0114-2>
- [46] Postow, M.A., Callahan, M.K. and Wolchok, J.D. (2015) Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, **33**, 1974-1982. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>
- [47] Redman, J.M., Gibney, G.T. and Atkins, M.B. (2016) Advances in Immunotherapy for Melanoma. *BMC Medicine*, **14**, 20. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0571-0>
- [48] Cabello-Aguilar, S., Alame, M., Kon-Sun-Tack, F., Fau, C., Lacroix, M. and Colinge, J. (2020) Single Cell Signal R: Inference of Intercellular Networks from Single-Cell Transcriptomics. *Nucleic Acids Research*, **48**, e55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa183>
- [49] Wang, Y.X., et al. (2019) iTALK: An R Package to Characterize and Illustrate Intercellular Communication. <https://doi.org/10.1101/507871>
- [50] Browaeys, R., Saelens, W. and Saeys, Y. (2020) NicheNet: Modeling Intercellular Communication by Linking Ligands to Target Genes. *Nature Methods*, **17**, 159-162. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0667-5>
- [51] Liu, Y.T., Shou, Y.H., Zhu, R.H., et al. (2022) Construction and Validation of a Ferroptosis-Related Prognostic Signature for Melanoma Based on Single-Cell RNA Sequencing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article ID: 818457. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.818457>
- [52] Wang, F., Zheng, A.F., Zhang, D.L., et al. (2022) Molecular Profiling of Core Immune-Escape Genes Highlights LCK as an Immune-Related Prognostic Biomarker in Melanoma. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 1024931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1024931>
- [53] Hayward, N.K., Wilmott, J.S., Waddell, N., Johansson, P.A., Field, M.A., Nones, K., et al. (2017) Whole-Genome Landscapes of Major Melanoma Subtypes. *Nature*, **545**, 175-180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- [54] Randic, T., Kozar, I., Margue, C., Utikal, J. and Kreis, S. (2021) NRAS Mutant Melanoma: Towards Better Therapies. *Cancer Treatment Reviews*, **99**, Article ID: 102238. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238>
- [55] Loeffler-Wirth, H., Binder, H., Willscher, E., Gerber, T. and Kunz, M. (2018) Pseudotime Dynamics in Melanoma Single-Cell Transcriptomes Reveals Different Mechanisms of Tumor Progression. *Biology*, **7**, 23. <https://doi.org/10.3390/biology7020023>
- [56] Schmidt, M., Sünke M., Lena, L.-W., et al. (2021) Single-Cell Trajectories of Melanoma Cell Resistance to Targeted Treatment. *Cancer Biology and Medicine*, **19**, 56-73. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0267>
- [57] Pires Da Silva, I., Ahmed, T., Reijers, I.L.M., Weppler, A.M., et al. (2021) Ipilimumab Alone or Ipilimumab plus Anti-PD-1 Therapy in Patients with Metastatic Melanoma Resistant to Anti-PD-(L)1 Monotherapy: A Multicentre, Retrospective, Cohort Study. *The Lancet Oncology*, **22**, 836-847. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00097-8)
- [58] Hossain, S.M. and Eccles, M.R. (2023) Phenotype Switching and the Melanoma Microenvironment; Impact on Immunotherapy and Drug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 1601. <https://doi.org/10.3390/ijms24021601>
- [59] Cao, Y., Zhu, J.J., Han, G.C., Jia, P.L. and Zhao, Z.M. (2017) scRNASeqDB: A Database for Gene Expression Profiling in Human Single Cell by RNA-seq. <https://doi.org/10.1101/104810>
- [60] Ner-Gaon, H., Melchior, A., Golan, N., Ben-Haim, Y. and Shay, T. (2017) JingleBells: A Repository of Immune-Related Single-Cell RNA-Sequencing Datasets. *The Journal of Immunology*, **198**, 3375-3379. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700272>
- [61] Yuan, H.T., Yan, M., Zhang, G.X., Liu, W., Deng, C.Y., Liao, G.M., et al. (2019) CancerSEA: A Cancer Single-Cell State Atlas. *Nucleic Acids Research*, **47**, D900-D908. <https://doi.org/10.1093/nar/gky939>
- [62] Wang, Z.S., Feng, X.K. and Li, S.C. (2019) SCDevDB: A Database for Insights into Single-Cell Gene Expression Profiles during Human Developmental Processes. *Frontiers in Genetics*, **10**, 903.

- <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00903>
- [63] Mohanraj, S., Díaz-Mejía, J.J., Pham, M.D., Elrick, H., Husić, M., Rashid, S., *et al.* (2020) Crescent: Cancer Single Cell Expression Toolkit. *Nucleic Acids Research*, **48**, W372-W379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa437>
- [64] Li, P.-H., Kong, X.-Y., He, Y.-Z., Liu, Y., Peng, X., Li, Z.-H., Xu, H., Luo, H. and Park, J. (2022) Recent Developments in Application of Single-Cell RNA Sequencing in the Tumour Immune Microenvironment and Cancer Therapy. *Military Medical Research*, **9**, 52. <https://doi.org/10.1186/s40779-022-00414-y>
- [65] Biermann, J., Melms, J.C., Amin, A.D., Wang, Y., Caprio, L.A., Karz, A., Tagore, S., Barrera, I., Ibarra-Arellano, M.A., Andreatta, M., Fullerton, B.T., Gretarsson, K.H., Sahu, V., Mangipudy, V.S., Nguyen, T.T.T., Nair, A., Rogava, M., Ho, P., Koch, P.D., Banu, M., Humala, N., Mahajan, A., Walsh, Z.H., Shah, S.B., Vaccaro, D.H., Caldwell, B., Mu, M., Wunnemann, F., Chazotte, M., Berhe, S., Luoma, A.M., Driver, J., Ingham, M., Khan, S.A., Rapisuwon, S., Slingluff, C.L., Eigentler, T., Rocken, M., Carvajal, R., Atkins, M.B., Davies, M.A., Agustinus, A., Bakhoun, S.F., Azizi, E., Siegelin, M., Lu, C., Carmona, S.J., Hibshoosh, H., Ribas, A., Canoll, P., Bruce, J.N., Bi, W.L., Agrawal, P., Schapiro, D., Hernando, E., Macosko, E.Z., Chen, F., Schwartz, G.K. and Izar, B. (2022) Dissecting the Treatment-Naive Ecosystem of Human Melanoma Brain Metastasis. *Cell*, **185**, 2591-2608.e30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.007>
- [66] Thrane, K., Eriksson, H., Maaskola, J., Hansson, J. and Lundeberg, J. (2018) Spatially Resolved Transcriptomics Enables Dissection of Genetic Heterogeneity in Stage III Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Research*, **78**, 5970-5979. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0747>
- [67] Barrett, T., Suzek, T. O., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ngau, W.C., Ledoux, P., Rudnev, D., Lash, A.E., Fujibuchi, W. and Edgar, R. (2005) NCBI GEO: Mining Millions of Expression Profiles—Database and Tools. *Nucleic Acids Research*, **33**, D562-D566. <https://doi.org/10.1093/nar/gki022>
- [68] Regev, A., Teichmann, S.A., Lander, E.S., Amit, I., Benoist, C., Birney, E., Bodenmiller, B., Campbell, P., Carninci, P., Clatworthy, M., Clevers, H., Deplancke, B., Dunham, I., Eberwine, J., Eils, R., Enard, W., Farmer, A., Fugger, L., Gottgens, B., Hacohen, N., Haniffa, M., Hemberg, M., Kim, S., Klenerman, P., Kriegstein, A., Lein, E., Linnarsson, S., Lundberg, E., Lundeberg, J., Majumder, P., Marioni, J.C., Merad, M., Mhlanga, M., Nawijn, M., Netea, M., Nolan, G., Pe'er, D., Phillipakis, A., Ponting, C.P., Quake, S., Reik, W., Rozenblatt-Rosen, O., Sanes, J., Satija, R., Schumacher, T.N., Shalek, A., Shapiro, E., Sharma, P., Shin, J.W., Stegle, O., Stratton, M., Stubbington, M.J.T., Theis, F.J., Uhlen, M., van Oudenaarden, A., Wagner, A., Watt, F., Weissman, J., Wold, B., Xavier, R. and Yosef, N. (2017) The Human Cell Atlas. *eLife*, **6**, e27041. <https://doi.org/10.7554/eLife.27041>
- [69] Papatheodorou, I., Moreno, P., Manning, J., Fuentes, A.M., George, N., Fexova, S., Fonseca, N.A., Fullgrabe, A., Green, M., Huang, N., Huerta, L., Iqbal, H., Jianu, M., Mohammed, S., Zhao, L., Jarnuczak, A.F., Jupp, S., Marioni, J., Meyer, K., Petryszak, R., Prada, M.C.A., Talavera-Lopez, C., Teichmann, S., Vizcaino, J.A. and Brazma, A. (2020) Expression Atlas Update: From Tissues to Single Cells. *Nucleic Acids Research*, **48**, D77-D83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz947>
- [70] Franzen, O., Gan, L.M. and Björkgrén, J.L.M. (2019) PanglaoDB: A Web Server for Exploration of Mouse and Human Single-Cell RNA Sequencing Data. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, **2019**, baz046. <https://doi.org/10.1093/database/baz046>
- [71] Christensen, E., Naidas, A., Husic, M. and Shooshitari, P. (2020) TMExplorer: A Tumour Microenvironment Single-Cell RNAseq Database and Search Tool. *PLOS ONE*, **17**, e0272302. <https://doi.org/10.1101/2020.10.31.362988>