

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230431

• 专题报道 •

单细胞转录组测序在黑色素瘤中的研究进展

陈珂欣¹, 熊俊^{2*}, 薛春雨^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院整形外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院组织胚胎学教研室, 上海 200433

[摘要] 黑色素瘤是皮肤癌中致死性最高的一种恶性肿瘤, 其发生、发展机制复杂, 具有高度侵袭性、转移性和致死性, 患者预后差。因此, 加强该病基础研究尤为重要。单细胞转录组测序作为近年来快速发展的新技术, 以其特有的优势如探索细胞亚群的异质性、鉴定稀有细胞、使用生物信息算法揭示不同组织细胞的分化轨迹等, 极大地推动了黑色素瘤的基础与临床研究发展。本文就黑色素瘤单细胞转录组测序研究中肿瘤异质性和肿瘤免疫方面的进展进行综述。

[关键词] 黑色素瘤; 单细胞测序; 免疫治疗; 肿瘤异质性

[引用本文] 陈珂欣, 熊俊, 薛春雨. 单细胞转录组测序在黑色素瘤中的研究进展[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(2): 155-160. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230431.

Single-cell transcriptome sequencing in melanoma: research progress

CHEN Kexin¹, XIONG Jun^{2*}, XUE Chunyu^{1*}

1. Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Melanoma is the most lethal type of malignant tumor among skin cancers. The mechanism of its development and progression is complex, and it is highly invasive, metastatic and lethal, with a poor prognosis. Therefore, it is particularly important to strengthen the basic research on this disease. Single-cell transcriptome sequencing, a rapidly developing new technology in recent years, has greatly promoted the basic and clinical research of melanoma with its unique advantages, such as exploring the heterogeneity of cellular subpopulations, identifying rare cells, and using bioinformatics algorithms to reveal the differentiation trajectories of different tissue and cells. This article reviews the progress in single-cell transcriptome sequencing studies of melanoma in terms of tumor heterogeneity and tumor immunity.

[Key words] melanoma; single-cell sequencing; immunotherapy; heterogeneity of tumor

[Citation] CHEN K, XIONG J, XUE C. Single-cell transcriptome sequencing in melanoma: research progress[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(2): 155-160. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230431.

黑色素瘤起源于黑色素细胞, 是一种主要发生于皮肤的恶性肿瘤, 尽管发病率相较于其他皮肤癌较低, 但其具有高度侵袭性、易发生广泛转移、致死率高的特点, 占皮肤癌死亡率的 75% 以上^[1-2]。作为一种高免疫原性的肿瘤, 黑色素瘤已被广泛作为开发免疫疗法的模型。目前, 基于免疫检查点的免疫治疗如靶向免疫调节受体细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein 4, CTLA-4) 和程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 或程序性死亡受体

配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 的抗体, 已经拓展了黑色素瘤的治疗方式。虽然针对转移性黑色素瘤的免疫治疗在缓解率上已有较大的提升, 但仍有很大一部分晚期患者无法从免疫治疗中获益, 或者在治疗早期就发生了肿瘤复发或进一步进展, 存活时间缩短^[3]。以往组织基因组和转录组数据大大推动了对黑色素瘤免疫治疗反应的生物学过程的探索, 但对数百万个细胞信号进行平均汇总使数据失去了肿瘤组织微环境中罕见和独特细胞亚群的信息, 而这些亚群有可能是确定肿瘤发生、发

[收稿日期] 2023-07-30

[接受日期] 2023-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81871578)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81871578).

[作者简介] 陈珂欣, 博士生. E-mail: drchenkx@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870960, E-mail: xiongjun2001@163.com; Tel: 021-31161811, E-mail: xcyfun@sina.com

展的关键^[4-5]。单细胞测序技术可以解析每一个细胞的转录组数据,能更深入地了解肿瘤发生、发展关键机制——驱动免疫治疗应答和耐药的內源和外源性机制^[6-7]。

根据测序分子对象的差异,单细胞测序主要包括单细胞基因组测序、单细胞转录组测序、免疫组学测序、拷贝数测序、转座酶和核染色质测序以及单细胞表面蛋白检测等^[8]。单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)是目前应用最广泛的单细胞测序方法,该技术使得研究人员能够以单细胞分辨率对数百个、数千个甚至上万个分析物进行无偏倚检测,并充分表征不同细胞类型和细胞间相互作用的多样性^[9]。研究者通过对肿瘤和肿瘤微环境进化的动力学及其相互作用的研究,能深入了解黑色素瘤发生、发展的机制和肿瘤治疗反应的生物学过程。本文综述了scRNA-seq在黑色素瘤肿瘤异质性方面和肿瘤免疫方面的研究进展。

1 scRNA-seq在解析黑色素瘤异质性方面的进展

作为一种高度恶性的肿瘤,黑色素瘤不仅存在肿瘤间异质性,肿瘤内部也具有高度异质性,而且对于目前的治疗也存在异质性,这些被scRNA-seq结果进一步证实。

1.1 肿瘤间和肿瘤内异质性 肿瘤和肿瘤微环境的异质性可大致分为肿瘤间异质性和肿瘤内异质性^[10-11]。肿瘤间异质性也称为患者间的异质性,指患者之间不同肿瘤基因型的变化^[12]。肿瘤异质性是肿瘤进展、治疗耐药和复发的主要驱动因素^[13]。

Tirosch等^[14]在2016年首次应用scRNA-seq评估19个转移性黑色素瘤,发现了一种罕见的耐药黑色素瘤细胞亚群,该亚群在含有小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)的异质性肿瘤中表达高水平的受体酪氨酸激酶AXL,这是通过Raf丝氨酸/苏氨酸激酶(Raf proto-oncogene, RAF)/丝裂原活化的细胞外信号调节激酶(mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)抑制剂靶向治疗后的克隆选择实现的。MITF通过对黑色素细胞分化、增殖和转移潜力的多途径影响,对黑色素瘤的异质性发挥重要作用。特别是黑色素瘤中的低MITF被证明可诱导表型转换,是黑色素瘤的另一种侵袭机制^[15],这种转录因子的表达变化可导致

抗性黑色素瘤亚群的产生^[16]。

scRNA-seq能够检测肿瘤亚克隆,确定单个细胞的转录状态和表型差异^[17-19]。不同的转录程序和细胞命运的不同阶段有助于肿瘤内异质性的产生,即在患者的单个肿瘤中存在具有独特遗传特征的不同肿瘤细胞亚群,这些细胞亚群可以出现在肿瘤的不同区域,获得克隆优势并随着时间的推移而进化^[12,20]。Durante等^[21]通过分析葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)患者原发和转移性肿瘤中肿瘤微环境、非肿瘤细胞的基因组及转录状态变化,发现具有低转移率和标志性驱动突变(真核翻译起始因子1AX连锁和剪接因子3B亚基1)的UM亚克隆1随着有助于肿瘤进展的典型/非典型畸变的发展而继续进化;而具有乳腺癌易感基因相关蛋白1失活突变的UM亚克隆2创造了免疫抑制微环境,通过免疫逃逸促进肿瘤转移。这种潜在的肿瘤微环境异质性为患者最初对免疫治疗抵抗或治疗后复发的成因提供了更深入的解释。

Gerber等^[22]通过对3个不同基因突变型黑色素瘤转移患者307个单细胞的scRNA-seq分析,发现了参与增殖、氧化磷酸化、色素沉淀和细胞基质的基因表达模式,描述了黑色素瘤短期培养的瘤间和瘤内异质性,提示可能与患者的生存情况相关。有趣的是,基因表达模式与具有相关患者生存数据的临床基因表达研究一致,进一步证明了这些单细胞分析的临床意义^[23]。他们鉴定了1个低丰度的亚克隆,该亚克隆高表达ATP结合盒转运蛋白、表面标志物CD271和CD133以及多种醛脱氢酶^[22]。因此,单细胞基因表达模式可能提供优于B-Raf原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; BRAF)/MAPK抑制剂治疗的新治疗靶标。Wouters等^[23]通过对10个黑色素瘤培养物的scRNA-seq分析探讨了黑色素瘤细胞是否会在不同的分化状态之间转换,分化的一端是黑色素细胞,另一端是间质样状态,结果发现共享的基因调控网络是黑色素细胞和间质样状态的基础,这2种状态都存在于1个中间状态中;在这2种状态中,Y染色体性别决定区-盒转录因子(sex-determining region of Y chromosome-box transcription factor, SOX)9在去分化阶段和SOX10在分化阶段发挥着重要作用。中间状态与黑色素细胞状态共享一些转录调节子如SOX10、

转录因子家族激活蛋白 2 和 MITF, 但也与间质样状态共享其他转录调节子如 FOS 样抗原 1 (FOS like antigen 1, FOSL1)、干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 及信号转导和转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)。在 *SOX10* 敲除后, 通过时间序列监测和对细胞进行拟时序分析, 发现了 2 个极端状态 (*SOX10* 和 *SOX9* 的表达) 之间的顺序过渡。因此, 转录中间状态确实存在并以独特的基因调节网络为特征, 而不是以细胞的异质性混合为特征, 进一步支持不同黑色素瘤细胞状态之间转录可塑性的概念。

1.2 治疗反应异质性 临床上对肿瘤治疗反应异质性越来越重视, 特别是对于治疗后复发或复发并出现疾病进展的患者^[24]。靶向单一生物途径的药物可能诱导肿瘤细胞出现新的突变, 导致复发和进展^[25], 这些药物可以引起肿瘤细胞分子组成的变化, 导致对治疗抵抗的克隆优势生长^[26]。

目前关于黑色素瘤治疗反应异质性的研究大多来自于靶向药物治疗。Tirosh 等^[14] 分析了表达不同水平 AXL 恶性细胞的异质性混合细胞群, 结果发现 AXL 高表达细胞在接受维罗非尼 (BRAF 抑制剂) 或达帕菲尼 (BRAF 抑制剂) 和曲美替尼 (MEK 抑制剂) 治疗的肿瘤中具有耐药性。因此推测, 传统靶向治疗失败的患者应使用基于检查点的免疫疗法。此外, 低 MITF/AXL 比值被认为是早期耐药的预测因子^[27], 因此 miRNA 调控 MITF 表达可作为一个新的治疗靶点, 以逆转黑色素瘤中许多其他 miRNA 通路失调的耐药表型^[28-30]。MITF 的表达通过色素沉着基因 [包括编码多巴色素异构酶的多巴色素互变异构酶 (dopachrome tautomerase, DCT)] 的活跃转录来调节黑色素的生成^[31]。Ho 等^[32] 发现, 在使用 BRAF 抑制剂治疗之前, DCT 在人类黑色素瘤细胞的罕见耐药亚群中表达上调, 从亲代细胞中分选的细胞显示 DCT 富集的细胞比整个培养的细胞更能抵抗 BRAF 抑制剂。研究还发现了一个以 WNT 家族成员 5A、AXL、表皮生长因子受体、血小板源生长因子受体 B 和 JUN 表达为特征的过渡群体, 该群体接近耐药群体, 处于预耐药状态^[33]。通过检测单细胞的拷贝数变异发现这一过渡 (预耐药) 群体来自几个不相关的克隆谱系, 很可能反映了一个短暂的阶段,

而不是特定的克隆^[32]。因此, DCT 被确定为未治疗群体中单个耐药克隆的标志, 与瞬时基因调控耐药的机制联合可能是潜在的治疗靶点。

Rambow 等^[34] 以皮下注射患者来源的 BRAF V600E 突变型黑色素瘤细胞的小鼠进行 BRAF 抑制剂达帕菲尼治疗, 待移植瘤在治疗中消退后对微小残留病灶 (minimal residual disease, MRD) 进行了 scRNA-seq, 发现 MRD 的亚克隆结构中富集了神经嵴干细胞 (neural crest stem cell, NCSC)、侵袭性细胞、饥饿样黑色素瘤细胞 (starved-like melanoma cell, SMC) 和色素细胞等 4 种不同的细胞状态。从拟时序分析的单细胞轨迹显示, 早期增殖状态通过 2 种不同的发育轨迹发展为 NCSC 和 SMC。该研究确定了不同的药物耐受性转录状态, 其不同的组合共同出现在异体移植模型和治疗中患者的活检 MRD 中; 其中一个表现为 NCSC 的转录程序, 主要由核受体维甲酸 X 受体 γ 驱动, 维甲酸 X 受体拮抗剂减少了 MRD 中 NCSC 的积累并延迟了抗性的发展。总之, 治疗耐药似乎沿着单细胞转录组学确定的不同发育轨迹发展, 这一发现可能推动新治疗方法的出现。综上所述, 不同异质性药物反应的时序分析加深了研究者对耐药发生的理解, 对未来的有效治疗组合产生影响。

2 scRNA-seq 在解析黑色素瘤肿瘤免疫方面的进展

作为一种高免疫原性肿瘤, 多种免疫细胞参与构成了黑色素瘤的肿瘤微环境, 这些免疫细胞对肿瘤的进化施加了微环境选择压力, 并介导了对一些全身性治疗的应答。通过测序技术对肿瘤微环境的无偏倚分析越来越多地被用于研究肿瘤微环境和黑色素瘤中的细胞相互作用和分子变化。

2.1 肿瘤微环境中的免疫细胞及细胞间互作 scRNA-seq 在针对肿瘤微环境中的免疫细胞最常见的应用之一是表征肿瘤浸润淋巴细胞 (tumour-infiltrating lymphocyte, TIL) 的组库和数量。通过转移性黑色素瘤的 scRNA-seq 分析, Deng 等^[5] 发现不同的 T 细胞亚群和 TIL 的比例与免疫治疗反应及患者结局相关。值得注意的是, 代谢途径异常激活的耗竭 T 细胞比例较高与不良预后相关, 而幼稚/记忆细胞和细胞毒性 T 细胞比例较高与良好预后相关。Sade-Feldman 等^[35] 对接受免疫治疗的黑色素瘤患者 48 个样本中约 16 000 个免疫细胞的转录组学

特征进行分析,发现了2种不同的 $CD8^+$ T细胞状态, $CD8^+$ T细胞与特异性转录因子7(transcription factor 7, TCF7)的关联被鉴定为免疫应答的预测标志物。此外,Li等^[36]发现了黑色素瘤中功能失调的T细胞区室的形成,即早期效应 $CD8^+$ T细胞在肿瘤微环境内转变为耗竭状态,功能失调特征的强度反映了肿瘤对免疫反应的反应性。与此相反,B细胞主导的三级淋巴结构的形成被证明可以逆转T细胞耗竭,并提高肿瘤对免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)的反应性^[37-38]。

肿瘤微环境中的髓源性免疫细胞群异质性也已被进行了深入分析。在抗PD-1治疗有效的黑色素瘤患者中,单核细胞来源的树突状细胞显著富集;在小鼠模型中,用激动型抗CD40抗体靶向树突状细胞这一抗原呈递细胞群导致效应T细胞扩增和抗肿瘤免疫的应答^[39]。对接受ICI治疗的黑色素瘤患者进行的scRNA-seq分析发现,在无应答者中 $\gamma\delta$ T细胞和骨髓细胞表达的触发受体2(triggering receptor expressed on myeloid cell 2, TREM2)巨噬细胞上调^[40]。通过对这些固有免疫细胞特征的研究,研究者对免疫应答启动有了更深入的了解,从而更好地指导抗肿瘤T细胞应答。

scRNA-seq也可用于研究细胞间的相互作用。33个黑色素瘤的scRNA-seq结果揭示了促进T细胞排斥的恶性细胞状态,并确定了与免疫治疗应答不良相关的冷免疫生态位的基因组特征^[41]。对19例黑色素瘤患者的4 600多个细胞(包括恶性细胞、免疫细胞、基质细胞和上皮细胞)进行的scRNA-seq表明,肿瘤微环境极大地影响了黑色素瘤细胞的基因表达程序^[14]。总之,这些研究构建了通过scRNA-seq确定新的免疫治疗靶点的平台。

2.2 肿瘤微环境中的免疫逃逸与治疗抵抗 对免疫治疗抵抗和应答的分析一直是单细胞研究的重点领域^[35-36,41]。Kakavand等^[42]使用靶向单细胞的方法观察到,对PD-1治疗产生获得性耐药的转移性黑色素瘤患者中分别有28%和22%的患者肿瘤微环境中发生了肿瘤磷酸酯酶与张力蛋白同源物缺失和人类白细胞抗原A调节受损,这表明不同患者的肿瘤通过不同的方式实现耐药。Jerby-Amon等^[41]对33个人类黑色素瘤进行scRNA-seq分析,确定了一种由恶性细胞表达的与T细胞排斥和免疫逃逸相关的耐药程序;这一程序在一个由112例黑色素瘤患者组成的独立队列中得到验证,该程序在免疫治疗

之前表达并可用于预测抗PD-1治疗的临床应答。阻断周期蛋白依赖性激酶4/6(耐药程序的一部分)与免疫治疗联合应用,可以抑制恶性细胞中的这一程序,抑制黑色素瘤细胞在体外和黑色素瘤小鼠模型中的生长。综上所述,scRNA-seq确定了一种与T细胞排斥有关的恶性细胞程序,可预测ICI的耐药性,并提出了克服免疫治疗耐药的新治疗策略。

Sade-Feldman等^[35]从32例抗PD-1抑制剂单独使用或联合抗CTLA-4治疗的转移性黑色素瘤患者的48个肿瘤样本中生成单细胞转录组,发现在 $CD45^+$ 细胞定义的11个亚群转录组模式中,耐药基因亚群富集于T细胞耗竭相关基因(淋巴细胞激活基因3、PD-1、甲型肝炎病毒细胞受体2、T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域、CD38)和细胞周期基因(周期蛋白依赖性激酶1、细胞周期蛋白B1、增殖标志物Ki-67和周期蛋白依赖性激酶4)。治疗有效的个体标志物为淋巴毒素 β 、TCF7和趋化因子受体7,治疗无效的个体标志物为趋化因子配体3、CD38和甲型肝炎病毒细胞受体2。随后研究重点分析了 $CD8^+$ T细胞,该细胞由2克隆状态(记忆/生存状态和耗竭状态)组成,分别命名为 $CD8_G$ 和 $CD8_B$ 细胞,应答的主要群体是 $TCF7^+/CD8^+$ T细胞(TCF7是Wnt信号的一部分,对分化和自我更新至关重要)。T细胞受体分析显示,T细胞受体在耗竭亚群中更常见。总之,该研究有助于根据亚克隆T细胞状态选择对抗PD-1治疗应答的患者。在一项研究中,Thibaut等^[43]将8例未经治疗的黑色素瘤患者的单细胞测序数据进行重新分析,借助B细胞淋巴瘤和黑色素瘤模型讨论了 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)在肿瘤微环境中作为肿瘤免疫主要介质的时空活动,通过联合注射 $CD8^+$ 卵清蛋白特异性T细胞诱导了肿瘤细胞表面主要组织相容性复合体I类分子的同源表达和PD-L1的上调,但这与T细胞和黑色素瘤细胞的近距离接触无关,支持了免疫细胞可以远距离活动的观点。结果还证实 $CD8^+$ T细胞确实是IFN- γ 的主要来源,并且在巨噬细胞和中性粒细胞等不同的细胞群中发现了IFN- γ 标记,而黑色素瘤细胞在这些样本中很少。上述发现提示,人类黑色素瘤中的肿瘤细胞也可能是微环境中远处免疫细胞的靶标。

3 小 结

肿瘤的异质性和微环境的复杂性是导致治疗

反应和临床结局不同的主要因素,单细胞测序有助于研究肿瘤微环境引起的肿瘤异质性和耐药性。scRNA-seq是目前应用最广泛的单细胞测序方法之一,伴随着各种互补的单细胞基因组、表观基因组和蛋白质组学分析技术,包括单细胞测量基因组序列、染色质可及性、DNA甲基化、细胞表面蛋白、小RNA、组蛋白修饰和染色体构象等^[8],可以更加全面深入解析疾病发生、发展的机制和规律。

scRNA-seq揭示的新的关键因素和表型改变,不仅促进了肿瘤进展,而且导致治疗抵抗。单细胞图谱为了解治疗应答和耐药性提供了珍贵的见解,识别关键和稀有的细胞亚群和分子过程也将有助于加强对癌症患者的诊断,加快新药物开发进程。在黑色素瘤和其他类型的肿瘤中,scRNA-seq为发现与免疫治疗反应和耐药相关的多维生物标志物铺平了道路,并将有助于开发可能改善癌症患者生存结局的下一代免疫疗法。

目前最常用的scRNA-seq局限于新鲜肿瘤组织,但该局限已被突破,正在开发并逐渐成熟的针对冷冻肿瘤组织的单细胞核转录组测序以及针对石蜡包埋肿瘤组织的甲醛固定和石蜡包埋单细胞转录组测序方法大大增加了样本的获取途径,提高了临床样本的利用率。

近年来,空间转录组测序在组织原位同时获得基因表达数据和空间分布数据,通过在空间分辨率水平上解码肿瘤疾病的细胞和分子基础,使在组织原位解析细胞间相互作用及其机制成为可能,不仅能提供关于肿瘤异质性的信息,还将揭示不同细胞群的空间组成,这可能与ICI治疗特别相关。随着定制技术的出现,单细胞外显子组测序的新兴技术将进一步提高我们对具有特定遗传特征耐药克隆出现的认识,并已在血液系统恶性肿瘤中取得了初步进展。此外,单细胞和空间等多组学平台的联合发展以及这些大规模数据集的整合分析,为识别驱动肿瘤异质性发展的内在、外在和交互过程带来了巨大的希望,也为预防和治疗肿瘤提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] TÍMÁR J, LADÁNYI A. Molecular pathology of skin melanoma: epidemiology, differential diagnostics, prognosis and therapy prediction[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5384. DOI: 10.3390/ijms23105384.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [3] LARKIN J, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(16): 1535-1546. DOI: 10.1056/NEJMoa1910836.
- [4] HUGO W, ZARETSKY J M, SUN L, et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma[J]. *Cell*, 2016, 165(1): 35-44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065.
- [5] DENG W, MA Y, SU Z, et al. Single-cell RNA-sequencing analyses identify heterogeneity of CD8⁺ T cell subpopulations and novel therapy targets in melanoma[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 105-118. DOI: 10.1016/j.omto.2020.12.003.
- [6] IORGULESCU J B, BRAUN D, OLIVEIRA G, et al. Acquired mechanisms of immune escape in cancer following immunotherapy[J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 87. DOI: 10.1186/s13073-018-0598-2.
- [7] SHARMA P, HU-LIESKOVAN S, WARGO J A, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-723. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.017.[PubMed]
- [8] STUART T, SATIJA R. Integrative single-cell analysis[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(5): 257-272. DOI: 10.1038/s41576-019-0093-7.
- [9] LUECKEN M D, THEIS F J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial[J]. *Mol Syst Biol*, 2019, 15(6): e8746. DOI: 10.15252/msb.20188746.
- [10] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 613-628. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
- [11] GRZYWA T M, PASKAL W, WŁODARSKI P K. Intratumor and intertumor heterogeneity in melanoma[J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(6): 956-975. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.09.007.
- [12] JIA Q, WANG A, YUAN Y, et al. Heterogeneity of the tumor immune microenvironment and its clinical relevance[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 24. DOI: 10.1186/s40164-022-00277-y.
- [13] JUNTILA M R, DE SAUVAGE F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 346-354. DOI: 10.1038/nature12626.
- [14] TIROSH I, IZAR B, PRAKADAN S M, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 189-196. DOI: 10.1126/science.aad0501.
- [15] NOGUCHI K, DALTON A C, HOWLEY B V, et al. Interleukin-like EMT inducer regulates partial phenotype switching in MITF-low melanoma cell lines[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177830. DOI: 10.1371/journal.pone.0177830.
- [16] SIMMONS J L, PIERCE C J, AL-EJEH F, et al. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10909. DOI: 10.1038/s41598-017-11366-y.
- [17] SATAS G, ZACCARIA S, MON G, et al. SCARLET: single-cell tumor phylogeny inference with copy-

- number constrained mutation losses[J]. *Cell Syst*, 2020, 10(4): 323-332. DOI: 10.1016/j.cels.2020.04.001.
- [18] MALIKIC S, JAHN K, KUIPERS J, et al. Integrative inference of subclonal tumour evolution from single-cell and bulk sequencing data[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2750. DOI: 10.1038/s41467-019-10737-5.
- [19] WU F, FAN J, HE Y, et al. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2540. DOI: 10.1038/s41467-021-22801-0.
- [20] VERGARA I A, MINTOFF C P, SANDHU S, et al. Evolution of late-stage metastatic melanoma is dominated by aneuploidy and whole genome doubling[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1434. DOI: 10.1038/s41467-021-21576-8.
- [21] DURANTE M A, RODRIGUEZ D A, KURTENBACH S, et al. Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 496. DOI: 10.1038/s41467-019-14256-1.
- [22] GERBER T, WILLSCHER E, LOEFFLER-WIRTH H, et al. Mapping heterogeneity in patient-derived melanoma cultures by single-cell RNA-seq[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 846-862. DOI: 10.18632/oncotarget.13666.
- [23] WOUTERS J, KALENDER-ATAK Z, MINNOYE L, et al. Robust gene expression programs underlie recurrent cell states and phenotype switching in melanoma[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(8): 986-998. DOI: 10.1038/s41556-020-0547-3.
- [24] BRADISH J R, RICHEY J D, POST K M, et al. Discordancy in BRAF mutations among primary and metastatic melanoma lesions: clinical implications for targeted therapy[J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(4): 480-486. DOI: 10.1038/modpathol.2014.136.
- [25] GIDE T N, QUEK C, MENZIES A M, et al. Distinct immune cell populations define response to anti-PD-1 monotherapy and anti-PD-1/anti-CTLA-4 combined therapy[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(2): 238-255.e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.003.
- [26] GREMEL G, LEE R J, GIROTTI M R, et al. Distinct subclonal tumour responses to therapy revealed by circulating cell-free DNA[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(10): 1959-1965. DOI: 10.1093/annonc/mdw278.
- [27] MÜLLER J, KRIJGSMAN O, TSOI J, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5712. DOI: 10.1038/ncomms6712.
- [28] GOSWAMI S, TARAPORE R S, POENITZSCH STRONG A M, et al. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) mRNA is inhibited by coding region determinant-binding protein (CRD-BP)[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(1): 384-395. DOI: 10.1074/jbc.M114.590158.
- [29] QIAN H, YANG C, YANG Y. MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on MITF gene[J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17028. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.28.
- [30] GHAFOURI-FARD S, GHOLIPOUR M, TAHERI M. MicroRNA signature in melanoma: biomarkers and therapeutic targets[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 608987. DOI: 10.3389/fonc.2021.608987.
- [31] KAWAKAMI A, FISHER D E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(6): 649-656. DOI: 10.1038/labinvest.2017.9.
- [32] HO Y J, ANAPARTHY N, MOLIK D, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies markers of resistance to targeted BRAF inhibitors in melanoma cell populations[J]. *Genome Res*, 2018, 28(9): 1353-1363. DOI: 10.1101/gr.234062.117.
- [33] SHAFFER S M, EMERT B L, REYES HUEROS R A, et al. Memory sequencing reveals heritable single-cell gene expression programs associated with distinct cellular behaviors[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 947-959.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.003.
- [34] RAMBOW F, ROGIERS A, MARIN-BEJAR O, et al. Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma[J]. *Cell*, 2018, 174(4): 843-855. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.025.
- [35] SADE-FELDMAN M, YIZHAK K, BJORGAARD S L, et al. Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma[J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 404. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.034.
- [36] LI H, VAN DER LEUN A M, YOFE I, et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma[J]. *Cell*, 2019, 176(4): 775-789.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.043.
- [37] CABRITA R, LAUSS M, SANNA A, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 561-565. DOI: 10.1038/s41586-019-1914-8.
- [38] HELMINK B A, REDDY S M, GAO J, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 549-555. DOI: 10.1038/s41586-019-1922-8.
- [39] SCHETTERS S T T, RODRIGUEZ E, KRUIJSSEN L J W, et al. Monocyte-derived APCs are central to the response of PD1 checkpoint blockade and provide a therapeutic target for combination therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000588. DOI: 10.1136/jitc-2020-000588.
- [40] XIONG D, WANG Y, YOU M. A gene expression signature of TREM2^{hi} macrophages and $\gamma\delta$ T cells predicts immunotherapy response[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5084. DOI: 10.1038/s41467-020-18546-x.
- [41] JERBY-ARNON L, SHAH P, CUOCO M S, et al. A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2018, 175(4): 984-997. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.006.
- [42] KAKAVAND H, WILMOTT J S, MENZIES A M, et al. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes define different subsets of MAPK inhibitor-treated melanoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(14): 3140-3148. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-14-2023.
- [43] THIBAUT R, BOST P, MILO I, et al. Bystander IFN- γ activity promotes widespread and sustained cytokine signaling altering the tumor microenvironment[J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(3): 302-314. DOI: 10.1038/s43018-020-0038-2.