

单细胞转录组测序在膀胱癌肿瘤微环境及预后研究中的应用[▲]

吴慧娴¹ 梁伟明¹ 王娟² 罗烧珊³

(1 广西科技大学第一附属医院药学部, 广西柳州市 545000;

2 桂林医科大学基础医学院, 广西桂林市 541000;

3 梧州医学高等专科学校临床学院, 广西梧州市 543000)

【摘要】 膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率居于我国泌尿系统肿瘤首位。单细胞转录组测序可用于分析肿瘤发生、发展及其演化过程机制,作为深入研究肿瘤微环境(TME)及鉴定肿瘤发展过程中起关键作用的免疫细胞亚群及异常表达基因的有效手段,为肿瘤诊疗提供精准遗传信息。本文针对单细胞转录组测序在膀胱癌TME、TME异质性、TME免疫细胞亚群及预后等研究中的应用进行综述,以期对膀胱癌的研究提供新的思路。

【关键词】 膀胱癌;单细胞转录组测序;肿瘤微环境;免疫;预后;综述

【中图分类号】 R 737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2025)03-0454-05

DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2025.03.18

研究表明,临床上90%~95%的尿路上皮癌为膀胱癌^[1]。膀胱癌是世界上十大最常见的癌症之一,根据全球癌症统计数据显示,2020年全球新发膀胱癌病例数为573 278例,膀胱癌是男性第6大常见癌症和第9大癌症死亡原因^[2]。根据浸润深度膀胱癌可分为非肌肉浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)和肌肉浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC),其中约75%的患者最初被诊断为NMIBC^[3]。膀胱癌的发病率高、预后较差,进展速度和复发率高于泌尿系统的其他肿瘤^[4]。晚期膀胱癌患者常出现肿瘤转移和化疗耐药性,给患者带来巨大的身心痛苦和经济负担^[5]。有研究结果显示,肿瘤细胞异质性和肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)细胞亚型或特征与膀胱癌进展和治疗反应密切相关,可显著影响膀胱癌患者的预后^[6]。

单细胞测序是一种细胞水平测序工具,可用于分析数千个单个细胞的转录组学、基因组学、蛋白质组学、表观遗传组学、代谢组学等多组学特征^[7-8]。单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)是单细胞测序技术之一,最早由Tang等^[9]于2009年报告,可以定量揭示基因表达谱、外显子剪接、等位基因特异性表达^[10]。scRNA-seq能够在单细胞层面高分辨率剖析药物异质性的靶向途径,在肿瘤细胞、TME的联合疗法中发挥重要作用^[11]。此外,与传统的转录组测序相比,scRNA-seq的主要优势是能够对

细胞类型特异性差异表达进行分析,并能够将识别出的细胞亚群进一步描述为已知的细胞类型,且基于计算和模拟数据可以重建细胞轨迹,从而推断癌细胞之间的状态转换^[12-13]。因此,将scRNA-seq应用于复杂多变的肿瘤组织及TME研究中,可以对肿瘤细胞定位、恶性细胞和基质细胞之间相互作用及恶性细胞异常表达的分析起到积极作用,为肿瘤的靶向治疗提供依据,也有助于深入了解TME在膀胱癌进展中的作用^[14-15]。本文就scRNA-seq在膀胱癌的TME、TME异质性、TME免疫细胞亚群及预后研究中的应用进行综述。

1 scRNA-seq在膀胱癌TME及其异质性研究中的应用

1.1 scRNA-seq在膀胱癌TME研究中的应用 肿瘤细胞的发生、发展和侵袭与其TME密切相关。膀胱癌是缺乏免疫侵袭性的癌症,其TME的组成尚不清楚^[16]。复杂的TME及其与肿瘤细胞内在机制之间的相互作用可能是膀胱癌进展、免疫治疗反应较差甚至治疗失败的原因之一^[17]。

scRNA-seq分析是定义异质群体中细胞类型或亚群的工具。Chen等^[18]利用scRNA-seq技术制作膀胱癌TME细胞图谱,发现膀胱癌细胞表达低水平的

▲基金项目:广西自然科学基金项目(2024GXNSFBA010036);广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z-B20220927)

第一作者简介:吴慧娴,硕士,药师,研究方向为肿瘤药物活性研究。

通信作者简介:罗烧珊,硕士,助理研究员,研究方向为分子生物学。

主要组织相容性复合物 II 类分子,提示下调的免疫原性可能有助于避免免疫检测。此外该研究还发现溶酶体相关膜蛋白 3 阳性的树突状细胞亚群表达多种细胞因子,如 CCL17、CCL19 和 CCL22,这有助于免疫抑制 TME 的形成。Zheng 等^[19]通过 scRNA-seq 对膀胱癌组织及癌旁组织样本进行检测,发现肿瘤细胞附近的间质细胞可能会募集肿瘤相关巨噬细胞,推测 TME 的形成可能早于肿瘤细胞的产生,并为肿瘤细胞的生长提供适宜的环境,这说明 scRNA-seq 有助于加深对高级别和转移性膀胱癌的细胞和分子异同新特征的理解,这可能为肿瘤治疗提供潜在的治疗靶点。Lee 等^[20]使用 scRNA-seq 描绘化疗耐药的转移性肌肉浸润性膀胱尿路上皮癌的肿瘤图谱,并分析治疗时的肿瘤演变和 TME 变化,发现 scRNA-seq 具有可视化难治性癌症 TME 并识别分子治疗靶点和细胞治疗靶点的能力。

1.2 scRNA-seq 在膀胱癌 TME 异质性研究中的应用 Kerzeli 等^[21]在研究 NMIBC 向 MIBC 转变的关键步骤的实验中,利用 scRNA-seq 分析鉴定了 8 个起源于尿路上皮的异质性细胞群,这些异质性细胞与健康膀胱中的尿路上皮细胞不同,在致癌物诱导的膀胱肿瘤中存在高度增殖或癌干性基因表达特征,这提示存在细胞周期失调基因表达谱的细胞可能是具有侵略性的肿瘤细胞亚克隆。这些结果与 Heide 等^[22]观察到的人类尿路上皮性膀胱癌肿瘤内异质性研究结果一致,可根据尿路上皮性膀胱癌细胞的遗传特征将其识别为克隆突变。Yu 等^[23]对取自膀胱癌患者的健康膀胱组织样本中的 12 423 个细胞和来自小鼠膀胱的 12 884 个细胞进行 scRNA-seq,并对这些膀胱细胞的类型及其基本功能进行分类,从而获得人类膀胱和小鼠膀胱的单细胞转录组图谱(包括 16 个人类膀胱细胞簇和 15 个小鼠膀胱细胞簇),研究结果揭示了人类膀胱细胞和小鼠膀胱细胞类型的同源性和异质性,以及人类膀胱细胞和小鼠膀胱细胞进化的保守性和异质性,为研究膀胱细胞类型及特定细胞标志物、信号受体和基因提供了理论依据,有助于了解膀胱细胞类型与疾病之间的关系。

肿瘤细胞和 TME 的异质性与尿路上皮癌患者的临床结局和治疗反应显著相关^[6]。Jin 等^[24]对 7 个肿瘤组织和 6 个邻近正常组织进行 scRNA-seq 分析,并结合公开发表的两项 scRNA-seq 研究数据(涉及 8 个肿瘤组织和 6 个正常组织),阐明了肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞的转录组学异质性,以及尿路上皮癌组织和正常尿路上皮组织中细胞亚簇之间的相互作用。

复发的膀胱癌比原发膀胱癌具有更高的异质性,其免疫细胞、基质细胞的复杂性更高。研究表

明,在各种类型的肿瘤中,肿瘤内异质性与染色体不稳定性、肿瘤侵袭性、耐药性有关,高水平的异质性可能导致预后不良,并可能传递到复发的肿瘤组织中^[25-26]。为研究原发膀胱癌和复发膀胱癌的 TME 异质性及绘制膀胱癌复发图谱,Liang 等^[27]对 3 个原发膀胱癌组织、4 个复发膀胱癌组织及 1 个正常膀胱组织(共 62 460 个高质量细胞)进行 scRNA-seq,发现 2 种肿瘤干细胞亚型、1 种炎症性肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast, CAF)亚型与膀胱癌的复发有关。

2 scRNA-seq 在膀胱癌 TME 免疫细胞亚群研究中的应用

TME 是一个复杂的系统,是各种细胞和生化分子的集合,包括 CAF、免疫细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、基质细胞等^[28]。一旦 TME 形成,许多免疫细胞如巨噬细胞、T 淋巴细胞可通过趋化作用募集到 TME 中,帮助肿瘤细胞实现免疫逃逸,进一步促进肿瘤的生长增殖^[29]。TME 中的两个主要非肿瘤成分免疫细胞和基质细胞,细胞间的相互作用会影响癌症的发生和对治疗的反应^[30]。还有研究表明,肿瘤表型不仅取决于癌细胞的内在特性,还取决于 TME 中免疫细胞的活性^[31]。

2.1 CAF CAF 是 TME 中的主要基质细胞类型,与多种癌症的发病机制有关^[32],因此 CAF 被认为是癌症治疗的靶标^[33]。在 TME 中成纤维细胞可被重编码为 CAF,并已被证明其细胞外基质重塑、细胞因子分泌与 TME 耐药性有关^[34-35]。CAF 在构建细胞外基质结构及 TME 的代谢和免疫重编程中发挥作用,从而影响肿瘤细胞对化疗药物的适应性耐药^[36]。

scRNA-seq 是分析 CAF 异质性及不同 CAF 簇之间差异的有效方法。Zhang 等^[37]通过整合不同肿瘤组织和邻近正常组织的多个 scRNA-seq 数据集,构建了多种肿瘤成纤维图谱和多组织细胞图谱,并明确了促进肿瘤进展的 CAF 簇。此外,还通过比较肿瘤组织中特异存在的成纤维细胞与正常组织中的成纤维细胞之间的差异,发现肿瘤特异性成纤维细胞是活化程度更高的 CAF 簇,可以促进免疫抑制微环境的形成,同时可能通过调节细胞外基质重塑和抗肿瘤免疫反应来促进肿瘤进展。

2.2 肿瘤浸润淋巴细胞 肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)是肿瘤间质中的异质性淋巴细胞,大多数情况下以 CD3⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞为主,是机体淋巴细胞侵入到肿瘤组织中并对肿瘤起到识别、抵抗和攻击作用的细胞群体。T 淋

巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞和细胞毒性细胞的活性,在TIL抗肿瘤免疫中发挥核心作用,但可被TME内的免疫抑制细胞所抑制^[38]。机体识别外来抗原后,CD8⁺T淋巴细胞可以通过释放细胞毒素或细胞表面表达死亡配体来诱导细胞凋亡。在MIBC中位于肿瘤邻近基质的TIL已被证明可以预测免疫表型、患者存活率和肿瘤亚型,其中,肿瘤亚型可根据TIL的浸润程度进行分类,即未发炎且TIL低浸润的肿瘤、发炎且TIL低或高浸润的肿瘤、TIL中度浸润但缺乏程序性死亡配体1阳性免疫细胞的肿瘤^[39]。

scRNA-seq和大规模细胞计数等单细胞技术的进展,为学者们深入了解TIL的功能多样性提供更多途径。Shi等^[40]通过结合大量scRNA-seq和RNA测序数据,构建并验证了由7个T淋巴细胞标记基因组成的预后特征,为T淋巴细胞标记基因在膀胱癌患者预后中的作用提供了新的见解,并为免疫治疗临床实践提供指导。对于非转移性膀胱癌患者,根治性膀胱切除术前以顺铂为基础的新辅助化疗是标准的一线治疗方案^[41]。然而,由耐药性导致的治疗失败较常见,约40%的患者在膀胱切除术后出现复发和转移^[42]。Liu等^[43]通过对scRNA-seq数据集进行综合分析,发现外核苷三磷酸二磷酸水解酶1抑制剂(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 inhibitor, CD39i)在膀胱癌组织中过表达,并与免疫抑制相关,而且CD39i与顺铂有协同作用,因此,CD39i可能成为膀胱癌的治疗靶点,而且CD39i和顺铂联合可能是首选的治疗方法。

2.3 肿瘤相关巨噬细胞 巨噬细胞是一种多功能免疫细胞,参与调节组织稳态、抵御病原体和促进伤口愈合。浸润在肿瘤组织中或聚集在实体TME中的巨噬细胞被定义为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),具有高度的可塑性和异质性,可随TME的变化调整其功能状态^[44]。巨噬细胞传统上被分为M1或M2巨噬细胞,M1巨噬细胞具有抗肿瘤作用,并表达高水平的肿瘤坏死因子 α 、诱导型一氧化氮合酶或主要组织相容性复合物II类分子;M2巨噬细胞具有促肿瘤作用,表达CD163、CD206和高水平的精氨酸酶1、白细胞介素10,从膀胱癌患者分离出的TAMs主要为M2巨噬细胞^[45]。目前已有关于巨噬细胞在其他类型肿瘤中作用的研究,但仅用少数研究探讨了膀胱癌中巨噬细胞的丰度、极化状态与预后、临床结局的关联^[46]。Xu等^[47]利用免疫功能正常小鼠构建三重敲除(敲除*Trp53*、*Pten*及*Rb1*基因)尿路上皮癌模型,并使用scRNA-seq分析TAMs在抗程序性死亡受体1免疫治疗反应中的作用,发现该模型表现出对抗程序性死亡受体1免疫治疗的混合反应模式,应答者的巨噬细胞浸润程度较高,表明先天免疫微环境在调节免疫检查点抑制剂治疗反应中具有潜在作用。

3 scRNA-seq在膀胱癌预后研究中的应用

TME中存在大量肿瘤相关基质细胞及免疫细胞,这些细胞亚群与尿路上皮癌预后存在密切联系。可靠的预后预测对于指导临床治疗至关重要,可以避免治疗失败和耐药^[48]。Xiang等^[49]从4例行根治性膀胱切除术的膀胱癌患者中采集膀胱癌样本并进行scRNA-seq,识别出15种与铁蛋白相关的预后长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),并以此构建铁蛋白相关lncRNA风险模型,提示这15种与铁蛋白相关的lncRNA在膀胱癌TME中特异性表达,可能为潜在的治疗靶点。Yu等^[50]通过scRNA-seq绘制人类膀胱细胞图谱,揭示了细胞亚型和肿瘤细胞谱系之间的关系,确认了上皮间充质转化样细胞不是一组肿瘤细胞,提出上皮间充质转化样细胞亚型与膀胱癌预后不良密切相关。甘氨酸-tRNA合成酶1(glycyl-tRNA synthetase 1, GARS1)属于氨基酰基tRNA合成酶家族,在蛋白质合成中起着至关重要的作用,但在人类癌症预后中的作用及其对免疫治疗的影响仍不清楚。Nie等^[51]分析GARS1 mRNA和蛋白表达水平并评估其在泛癌中的预后影响,利用scRNA-seq分析GARS1的生物学功能,最后通过细胞实验验证GARS1在膀胱癌细胞中的生物学意义,指出GARS1有望成为膀胱癌免疫治疗的潜在预后标志物和治疗靶点。

T淋巴细胞已被证明在抗肿瘤和TME塑造中发挥重要作用,但这些作用在膀胱癌中尚未得到解释。Shi等^[40]对基因表达综合数据库的scRNA-seq数据进行全面分析,鉴定出72个T淋巴细胞标记基因,并构建了由7个基因组成的预后特征模型,为膀胱癌的免疫治疗提供了新的靶点和理论支持。Zhang等^[52]对TME进行细胞表型和转录谱分析,并分析不同细胞亚群和基因与膀胱癌预后的关联,发现TIL和TME相关基因可以影响患者的预后,并且可能是膀胱癌患者预后和免疫治疗反应的重要决定因素。Seiler等^[53]对343例MIBC患者在新辅助化疗前经尿道切除的标本进行了全转录组测序分析,开发出一个单样本基因组亚型分类器,用于预测新辅助化疗背景下具有最高临床影响的共识分子亚型。

4 小结与展望

scRNA-seq作为一种强大的高通量测序工具,能够以超高分辨率检测稳态和致病细胞群,目前已被广泛应用于识别或研究膀胱尿路上皮细胞和膀胱肿

瘤细胞的异质性、TME特征、治疗耐药性、膀胱癌干细胞等,从而将膀胱癌生物医学研究推向更高精度水平。scRNA-seq可提供广泛的转录表达谱,对发现罕见的细胞亚群、识别肿瘤内异质性、监测膀胱肿瘤动态进展及揭示耐药机制至关重要。尽管近年来scRNA-seq技术在癌症领域取得了重要的进展,但与其他人类恶性肿瘤相比,scRNA-seq技术在识别膀胱癌,以及对膀胱癌细胞基质成分、TME和耐药机制等方面的了解还远远不够。全面了解膀胱肿瘤的细胞或分子机制是一个长期而艰巨的过程,需要进行大量研究,而scRNA-seq过程复杂且昂贵,无法应用于大量肿瘤样本筛查,在临床实际中也不能应用于个体化治疗。未来还需拓展scRNA-seq技术在膀胱癌耐药和转移机制研究中的应用。随着scRNA-seq技术的不断发展,其有望成为高通量、低成本、简化数据分析过程、减少时间支出的技术,为膀胱癌的更大规模单细胞测序工作提供准确性和灵敏度更高的结果。

参 考 文 献

- [1] Milojevic B, Dzamic Z, Kajmakovic B, et al. Urothelial carcinoma: recurrence and risk factors [J]. J BUON, 2015, 20(2): 391-398.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TA, T1, and carcinoma *in situ*) [J]. Eur Urol, 2022, 81(1): 75-94.
- [4] Robertson AG, Groeneveld CS, Jordan B, et al. Identification of differential tumor subtypes of T1 bladder cancer [J]. Eur Urol, 2020, 78(4): 533-537.
- [5] Catto JWF, Downing A, Mason S, et al. Quality of life after bladder cancer: a cross-sectional survey of patient-reported outcomes [J]. Eur Urol, 2021, 79(5): 621-632.
- [6] Ren XW, Kang BX, Zhang ZM. Understanding tumor ecosystems by single-cell sequencing: promises and limitations [J]. Genome Biol, 2018, 19(1): 211.
- [7] Murphy N, Shah P, Shih A, et al. Single-cell sequencing in genitourinary malignancies [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1255: 153-164.
- [8] Kashima Y, Sakamoto Y, Kaneko K, et al. Single-cell sequencing techniques from individual to multiomics analyses [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(9): 1419-1427.
- [9] Tang FC, Barbacioru C, Wang YZ, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.
- [10] Zhang XY, Marjani SL, Hu ZY, et al. Single-Cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects [J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1305-1312.
- [11] Shalek AK, Benson M. Single-cell analyses to tailor treatments [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(408): eaan4730.
- [12] Boeva V, Popova T, Bleakley K, et al. Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data [J]. Bioinformatics, 2012, 28(3): 423-425.
- [13] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [14] Puram SV, Parikh AS, Tirosh I. Single cell RNA-seq highlights a role for a partial EMT in head and neck cancer [J]. Mol Cell Oncol, 2018, 5(3): e1448244.
- [15] Wei W, Rong Y, Sanhe L, et al. Single-cell sequencing and its applications in bladder cancer [J]. Expert Rev Mol Med, 2022, 24: e6.
- [16] Lee HO, Park WY. Single-cell RNA-seq unveils tumor microenvironment [J]. BMB Rep, 2017, 50(6): 283-284.
- [17] Chen YP, Zhang Y, Lv JW, et al. Genomic analysis of tumor microenvironment immune types across 14 solid cancer types: immunotherapeutic implications [J]. Theranostics, 2017, 7(14): 3585-3594.
- [18] Chen ZH, Zhou LJ, Liu LL, et al. Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5077.
- [19] Zheng Y, Wang X, Yang XF, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the cellular and molecular characteristics of high-grade and metastatic bladder cancer [J]. Cellular Oncol (Dordr), 2023, 46(5): 1415-1427.
- [20] Lee HW, Chung W, Lee HO, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the tumor microenvironment and facilitates strategic choices to circumvent treatment failure in a chemorefractory bladder cancer patient [J]. Genome Med, 2020, 12(1): 47.
- [21] Kerzeli IK, Lord M, Doroszko M, et al. Single-cell RNAseq and longitudinal proteomic analysis of a novel semi-spontaneous urothelial cancer model reveals tumor cell heterogeneity and pretumoral urine protein alterations [J]. PLoS One, 2021, 16(7): e0253178.
- [22] Heide T, Maurer A, Eipel M, et al. Multiregion human bladder cancer sequencing reveals tumour evolution, bladder cancer phenotypes and implications for targeted therapy [J]. J Pathol, 2019, 248(2): 230-242.
- [23] Yu ZY, Liao JL, Chen Y, et al. Single-cell transcriptomic map of the human and mouse bladders [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(11): 2159-2176.
- [24] Jin XW, Wang QZ, Luo FX, et al. Single-cell transcriptomic analysis of tumor heterogeneity and intercellular networks in human urothelial carcinoma [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(6): 690-706.

- [25] Lindskog SV, Prip F, Lamy P, et al. An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2301.
- [26] Gambardella G, Viscido G, Tumaini B, et al. A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1714.
- [27] Liang T, Tao T, Kai W, et al. Cancer-associated fibroblast-induced remodeling of tumor microenvironment in recurrent bladder cancer[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(31): e2303230.
- [28] Annels NE, Simpson GR, Pandha H. Modifying the non-muscle invasive bladder cancer immune microenvironment for optimal therapeutic response[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 175.
- [29] Casey SC, Amedei A, Aquilano K, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35 Suppl(Suppl): S199–S223.
- [30] Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response[J]. *Cancer Lett*, 2017, 387: 61–68.
- [31] Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 7175–7180.
- [32] Su SC, Chen JN, Yao HR, et al. CD10⁺GPR77⁺ Cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 841–856.e16.
- [33] Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(12): 792–804.
- [34] Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(3): 174–186.
- [35] Biffi G, Tuveson DA. Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts[J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(1): 147–176.
- [36] Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 582–598.
- [37] Zhang J, Lu S, Lu T, et al. Single-cell analysis reveals the COL11A1⁺ fibroblasts are cancer-specific fibroblasts that promote tumor progression[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1121586.
- [38] Cao R, Yuan LS, Ma B, et al. Tumour microenvironment (TME) characterization identified prognosis and immunotherapy response in muscle-invasive bladder cancer (MIBC) [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(1): 1–18.
- [39] Tran L, Xiao JF, Agarwal N, et al. Advances in bladder cancer biology and therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2): 104–121.
- [40] Shi X, Dong A, Jia X, et al. Integrated analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing identifies a signature based on T-cell marker genes to predict prognosis and therapeutic response in lung squamous cell carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 992990.
- [41] Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines [J]. *Eur Urol*, 2021, 79(1): 82–104.
- [42] Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2020, 77(4): 420–433.
- [43] Liu LL, Hou YX, Deng CQ, et al. Single cell sequencing reveals that CD39 inhibition mediates changes to the tumor microenvironment[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6740.
- [44] DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(6): 369–382.
- [45] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(11): 549–555.
- [46] van Dorp J, van der Heijden MS. The bladder cancer immune micro-environment in the context of response to immune checkpoint inhibition[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1235884.
- [47] Xu DB, Wang L, Wieczorek K, et al. Single-cell analyses of a novel mouse urothelial carcinoma model reveal a role of tumor-associated macrophages in response to anti-PD-1 therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(10): 2511.
- [48] Wu X, Lv D, Cai C, et al. A TP53-associated immune prognostic signature for the prediction of overall survival and therapeutic responses in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 590618.
- [49] Xiang X, Yi G, Chen Z, et al. A prognostic risk prediction model based on ferroptosis-related long non-coding RNAs in bladder cancer: a bulk RNA-seq research and scRNA-seq validation[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(51): e32558.
- [50] Yu L, Hu R, Peng G, et al. Prognostic significance of lineage diversity in bladder cancer revealed by single-cell sequencing [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 862634.
- [51] Nie J, Liu T, Mao T, et al. Transcriptome sequencing and single-cell sequencing analysis identify GARS1 as a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker for multiple cancers, including bladder cancer [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1169588.
- [52] Zhang Y, Ou DH, Zhuang DW, et al. In silico analysis of the immune microenvironment in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 265.
- [53] Seiler R, Ashab HAD, Erho N, et al. Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy [J]. *Eur Urol*, 2017, 72(4): 544–554.

(收稿日期:2024-12-08 修回日期:2025-02-14)