

基于单细胞RNA测序与TCGA数据整合的膀胱癌基质细胞核心亚群分析及分子分型

袁婷^{1,2,3}, 孙奇^{4,5}, 孙偲瑜^{5,6}, 吴晨华⁷, 宋西成^{1,2,3,4,5,6,7*}

¹青岛大学附属烟台毓璜顶医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东 烟台

²山东省神经免疫互动与调控重点实验室, 山东 烟台

³山东省耳鼻喉疾病临床医学研究中心, 山东 烟台

⁴气道疾病精准诊疗山东省工程研究中心, 山东 烟台

⁵烟台市耳鼻喉疾病重点实验室, 山东 烟台

⁶烟台市耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心, 山东 烟台

⁷南京Biomamba生物信息学基地, 生物信息学中心, 江苏 南京

收稿日期: 2026年4月14日; 录用日期: 2026年5月8日; 发布日期: 2026年5月18日

摘要

本研究旨在系统解析膀胱癌组织中基质细胞的异质性, 探索其与正常组织的差异, 并评估其在患者分型及预后中的潜在价值。利用从基因表达综合(GEO)数据库获取的单细胞RNA测序(scRNA-seq)数据, 系统解析了膀胱癌组织与正常膀胱组织间的差异, 并基于所鉴定的细胞亚群, 通过样本一致性聚类方法对TCGA患者的膀胱癌样本进行了分型研究, 批量RNA-seq数据来源于TCGA数据库。结果发现, 与正常组织相比, 膀胱癌组织中的成纤维细胞数量显著减少; 膀胱癌组织中的成纤维细胞亚群高表达ECM受体相互作用通路相关基因, 而内皮细胞亚群则高表达包括DLL4和NOTCH4在内的NOTCH信号通路基因。基于细胞亚群评分, 我们将TCGA膀胱癌患者分为三种亚型, 其中G3亚型的亚群评分最低且预后最佳。综上所述, 膀胱癌组织中的成纤维细胞和内皮细胞亚群可能促进肿瘤发生, 为进一步探索膀胱癌的具体机制提供了理论基础; 同时, 通过对TCGA膀胱癌患者进行分子分型, 本研究可能为膀胱癌的分期诊断提供新思路。这些结果增进了对膀胱尿路上皮癌患者间异质性的理解, 并为个体化治疗奠定了基础。

关键词

膀胱癌, 单细胞RNA测序, 细胞亚群, 肿瘤分型

*通讯作者。

Analysis of Core Stromal Cell Subpopulations and Molecular Subtyping in Bladder Cancer Based on Integration of Single-Cell RNA Sequencing and TCGA Data

Ting Yuan^{1,2,3}, Qi Sun^{4,5}, Siyu Sun^{5,6}, Chenhua Wu⁷, Xicheng Song^{1,2,3,4,5,6,7*}

¹Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University, Yantai Shandong

²Shandong Key Laboratory of Neuroimmune Interaction and Regulation, Yantai Shandong

³Shandong Clinical Medical Research Center for Otorhinolaryngology Diseases, Yantai Shandong

⁴Shandong Engineering Research Center for Precision Diagnosis and Treatment of Airway Diseases, Yantai Shandong

⁵Yantai Key Laboratory of Otorhinolaryngology Diseases, Yantai Shandong

⁶Yantai Clinical Medical Research Center for Otorhinolaryngology Diseases, Yantai Shandong

⁷Bioinformatics Center, Bioinformatics Base of Nanjing Biomamba, Nanjing Jiangsu

Received: April 14, 2026; accepted: May 8, 2026; published: May 18, 2026

Abstract

This study aimed to systematically characterize the heterogeneity of stromal cells in bladder cancer tissues, explore their differences from normal tissues, and evaluate their potential value in patient subtyping and prognosis. Using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, we systematically analyzed the differences between bladder cancer tissues and normal bladder tissues. Based on the identified cell subpopulations, we performed consensus clustering to classify bladder cancer samples from TCGA patients, with bulk RNA-seq data obtained from the TCGA database. The results showed that, compared with normal tissues, the number of fibroblasts was significantly reduced in bladder cancer tissues. Fibroblast subpopulations in bladder cancer tissues highly expressed genes related to the ECM-receptor interaction pathway, while endothelial subpopulations highly expressed NOTCH signaling pathway genes including DLL4 and NOTCH4. Based on cell subpopulation scores, we classified TCGA bladder cancer patients into three subtypes, among which the G3 subtype had the lowest subpopulation score and the best prognosis. In conclusion, fibroblast and endothelial cell subpopulations in bladder cancer tissues may promote tumorigenesis, providing a theoretical basis for further exploration of the specific mechanisms underlying bladder cancer. Furthermore, the molecular subtyping of TCGA bladder cancer patients in this study may offer new insights for staging diagnosis of bladder cancer. These findings enhance our understanding of interpatient heterogeneity in bladder urothelial carcinoma and lay a foundation for personalized treatment.

Keywords

Bladder Cancer, Single-Cell RNA Sequencing, Cell Subpopulations, Tumor Subtyping



1. 引言

膀胱癌(Bladder cancer, BLCA)作为最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,超过 90%的病例起源于尿路上皮细胞[1]。全球每年新增确诊病例约 54.9 万例,死亡病例约 20 万例[2]。病理学上主要分为非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)和肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC)两种类型,其中初诊患者中约 75%为 NMIBC,25%为 MIBC [3]。肌层浸润性尿路上皮膀胱癌具有高度侵袭性和致命性,其 5 年相对生存率仅为 5% [4]。目前公认的预后评估因素包括病理分期、分级、淋巴血管浸润、病变范围及前列腺原位癌扩散程度,这些指标对不同治疗方案的选择具有重要指导意义[5]。过去三十至四十年来,膀胱癌患者的生存预后改善有限:根治性膀胱切除术或放疗后的 5 年生存率约为 50%。因此,深入解析膀胱癌的生物学机制对于开发更有效的治疗方法具有重要意义。

膀胱癌是具有显著组织学、分子学和临床表型异质性的疾病。研究显示 BLCA 的分子亚型呈现出不同的细胞类型特异性表达模式,提示其异质性可能源于不同的细胞[6]。肿瘤微环境(The tumor microenvironment, TME)作为肿瘤细胞生存的复杂生态系统,包含浸润免疫细胞、基质细胞、血管结构和细胞外基质等组分[7]。越来越多证据表明 TME 中的细胞与非细胞成分共同参与肿瘤发生、进展、侵袭及治疗应答的过程[8]。深入理解肿瘤微环境将有助于揭示肿瘤作用机制。在 TME 中,癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)被证实通过多种途径促进肿瘤发展[9]。从病理学角度,CAF 可通过沉积和改造细胞外基质(extracellular matrix, ECM)纤维网络、调控肿瘤信号传导等方式直接影响膀胱癌细胞的增殖与侵袭能力[10]。

本研究利用单细胞转录组数据分析,构建了膀胱癌的膀胱癌组织与正常组织图谱,旨在揭示疾病进程中不同细胞亚群的变化规律。通过信号通路分析识别潜在的关键信号转导途径,并整合单细胞 RNA 测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)与多组学数据,基于细胞亚群特征将膀胱癌患者划分为三种分子亚型,从而揭示 BLCA 的肿瘤异质性。这些发现不仅有助于阐明疾病发生机制,也为开发有效治疗策略提供了新方向。

2. 材料与方法

2.1. 数据来源

本研究从基因表达综合数据库(GEO, 网址: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获取四个 scRNA-seq 数据集: GSE192575 包含 2 例膀胱癌组织样本[11]; GSE130001 包含 2 例膀胱癌组织样本[12]; GSE135337 包含 7 例膀胱癌组织及 1 例癌旁正常组织; GSE129845 包含 3 例正常膀胱组织样本[13]。同时从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-BLCA>)获取 416 例膀胱癌样本的 RNA 测序数据及对应临床信息。

2.2. scRNA-seq 数据处理

对 scRNA-seq 数据进行质量控制,滤除基因数处于最高和最低 1%的细胞以及线粒体基因含量超过 10%的细胞。经质量控制后,采用 Seurat R 软件包中的 SCTransform 方法进行数据标准化与整合[14]。通过 FindNeighbors 和 FindClusters 函数识别细胞簇,并基于 UMAP 算法进行可视化呈现[15]。利用

FindAllMarkers 函数鉴定各细胞簇的特异性标记基因, 结合经典细胞标记物表达谱确定细胞类型。各细胞簇特异性高表达以下标记基因(图 1(A)): 膀胱癌细胞-KRT7; 成纤维细胞-COL1A1; 内皮细胞-VWF; 平滑肌细胞-DES; T 细胞-CD3D/CD3G; 树突状细胞-CD14; B 细胞-CD79A/CD79B; 巨噬细胞-CD68/CD163。

2.3. 细胞亚群分析

使用 Seurat 软件包对已识别的细胞进行亚群分析, 通过 FindAllMarkers 函数鉴定各细胞亚群表达的标记基因。根据高表达标记基因的特征对细胞亚群进行功能分类。

2.4. 基因集富集分析与信号通路分析

采用 R 软件包 clusterProfiler 进行基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析, 以确定各细胞亚群中分子通路的潜在功能。同时使用 clusterProfiler 进行基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA), 以 $P < 0.05$ 作为统计学显著性的阈值。通过 pathview 软件包实现功能可视化。

2.5. 细胞间通讯分析

运用 iTALK R 软件包研究 BLCA 微环境中的细胞间相互作用。该分析方法通过识别细胞簇中高表达或差异表达的基因, 并将其与内置的配体-受体数据库进行匹配, 从而确定细胞间高可信度的配体-受体相互作用关系。

2.6. 基因集变异分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSVA)

基于单细胞 RNA 测序数据中肿瘤细胞、成纤维细胞和内皮细胞等亚群的特征基因, 选取各亚群表达量前十的基因构成特征基因集。采用 R 软件包 GSVA 中的基因集变异分析方法, 对 TCGA 膀胱癌数据集中的每个样本进行亚群评分评估[16]。

2.7. 轨迹分析

使用 Monocle3 R 软件包默认参数对肿瘤细胞进行单细胞轨迹分析, 识别与时序进程相关的基因, 并构建细胞簇拟时序轨迹的单细胞图谱[17]。

2.8. 基因调控网络构建(Gene Regulatory Networks, GRNs)

基因调控网络决定并维持细胞类型特异性的转录状态, 活性转录因子及其靶基因共同构成基因调控网络。为探索膀胱癌中的关键调控因子, 我们构建以转录因子为核心的调控网络, 基于 SCENIC 方法进行共表达模块划分。转录因子结合模式数据来源于 JASPAR 数据库(<https://jaspar.genereg.net>)。

2.9. 一致性聚类与预后分析

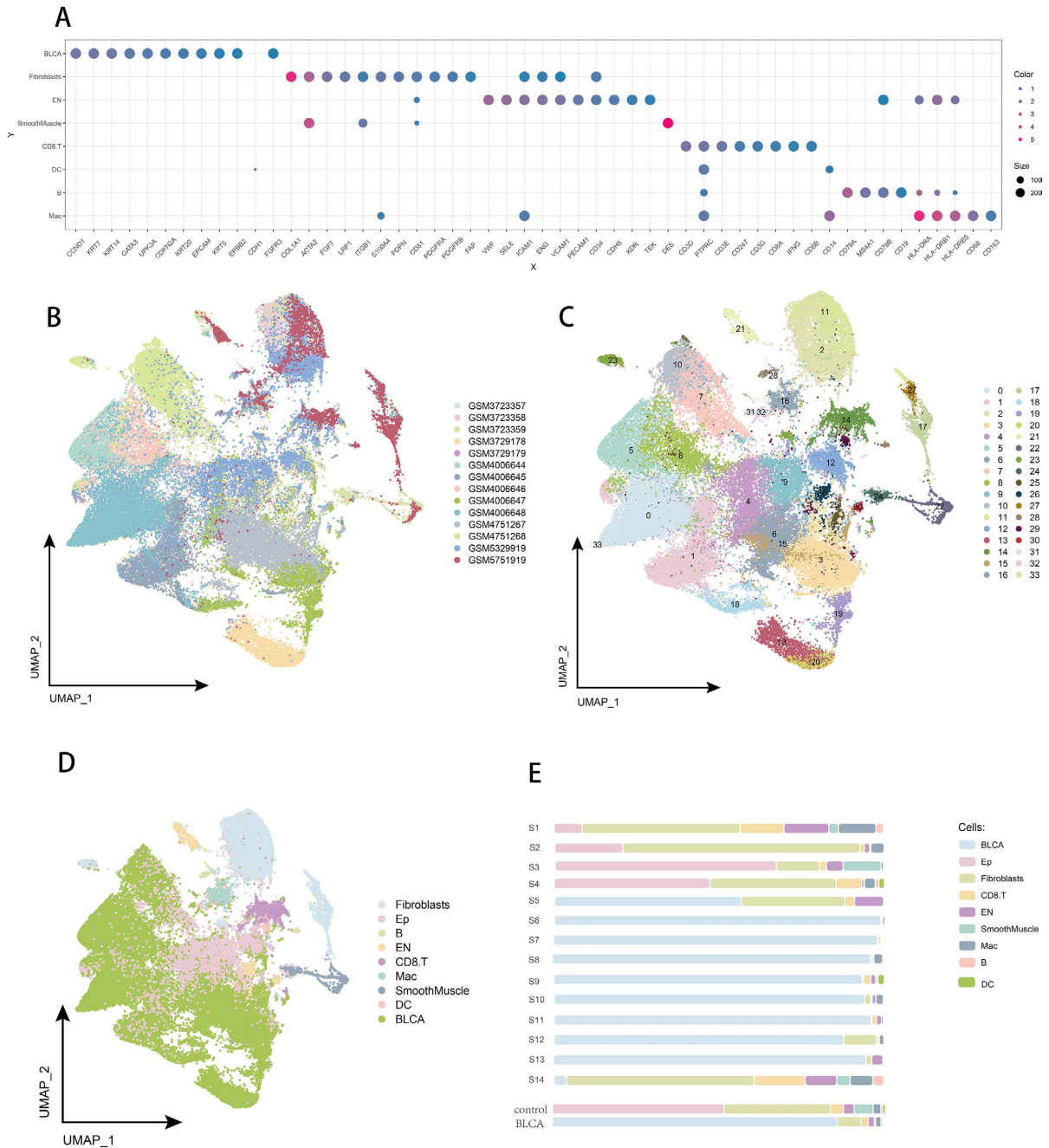
基于细胞亚群评分, 采用 R 包 ConsensusClusterPlus 中的无监督一致性聚类算法评估患者分型的变异性与稳定性。利用 survminer 软件包绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 可视化不同亚群评分患者的总生存期差异, 并通过 log-rank 检验进行统计学比较[18]。

3. 结果

3.1. 膀胱癌单细胞图谱

为解析膀胱癌的发病机制, 我们对公共数据库中的 3 例健康膀胱组织、1 例癌旁组织及 10 例膀胱癌

组织开展 10X Genomics 单细胞 RNA 测序分析。经质控后共获得 61,596 个细胞，构建包含 33 个细胞簇的单细胞图谱(图 1(B), 图 1(C))。将样本分为对照组(健康膀胱组织与癌旁组织)和 BLCA 组(膀胱癌组织)，鉴定出 8 种主要细胞类型(图 1(D))：膀胱癌细胞(BLCA)、成纤维细胞、内皮细胞(EN)、巨噬细胞(Mac)、平滑肌细胞、T 细胞、B 细胞和树突状细胞。



A: 细胞注释标记基因表达图谱; B: UMAP 图谱显示各细胞簇的样本分布情况; C: 膀胱癌单细胞图谱经降维聚类后获得的 33 个细胞簇; D: 标注不同细胞类型的膀胱肿瘤细胞图谱; E: 条形图显示对照组与 BLCA 组九种细胞类型组成的差异，以及从正常膀胱组织到膀胱癌组织过程中各细胞类型百分比的变化。

Figure 1. Single-cell transcriptional landscape of bladder cancer
图 1. 膀胱癌单细胞转录组图谱

图 1(E)展示了各样本中细胞类型的比例分布及从正常组织到癌组织的细胞比例动态变化。分析显示,与对照组相比, BLCA 组的成纤维细胞比例显著下降($P < 0.001$),而恶性细胞比例呈现明显上升趋势。值得注意的是,我们后续发现膀胱癌细胞表现出显著的转录组异质性。通过构建膀胱癌生态系统的单细胞图谱,本研究揭示了膀胱癌发生过程中的生态系统重塑特征,包括免疫细胞浸润模式的改变和基质细胞组成的重构。这些发现为深入理解膀胱癌的发展机制提供了重要的细胞生物学基础。

3.2. 成纤维细胞与膀胱癌发生发展的关联性研究

研究显示,成纤维细胞在膀胱癌变过程中可能发挥重要作用[9]。通过聚类分析,我们在成纤维细胞中鉴定出 8 个亚群,并构建了单细胞图谱(图 2(A))。细胞亚群分析确定了各成纤维细胞亚群的特异性标记基因表达谱(图 2(B))。柱状图显示成纤维细胞在对照组与肿瘤组中的比例分布(图 2(C))。

研究发现, CLEC3B 阳性成纤维细胞亚群(图 2(D))在 BLCA 组中的比例显著低于对照组(图 2(C))。既往研究表明, C 型凝集素结构域家族 3 成员 B 基因(CLEC3B)在多种癌症的血清和肿瘤组织中表达下调。GSEA 分析显示,该亚群高表达 ECM 受体相互作用通路相关基因(图 2(E), 图 2(F)),提示其可能通过调控细胞外基质影响肿瘤发生。

值得注意的是, MCAM 阳性成纤维细胞亚群(图 3(A))在肿瘤组中显著增加且占比最高(图 3(B))。为探究该亚群与预后的关联,我们选取其前 10 个高表达标记基因,通过 GSVA 方法计算 TCGA 膀胱癌样本的亚群评分并进行预后分析。生存曲线显示, MCAM 阳性成纤维细胞评分高的患者组预后显著较差(图 3(C))。GSEA 分析表明该亚群显著富集于 WNT 信号通路(图 3(D)),提示可能存在自分泌或旁分泌的 WNT 信号激活模式,我们推测 MCAM 可能通过调控 WNT 通路影响肿瘤微环境。在膀胱癌 TME 重塑中, WNT 通路的持续激活可诱导成纤维细胞向癌相关成纤维细胞(CAF)表型转化,促进细胞外基质重塑、血管生成及免疫抑制细胞募集。这些发现提示, MCAM 阳性成纤维细胞通过激活 WNT 通路驱动 TME 重塑,进而促进膀胱癌进展,靶向该亚群或其上游 WNT 信号成分可能成为新的治疗策略。

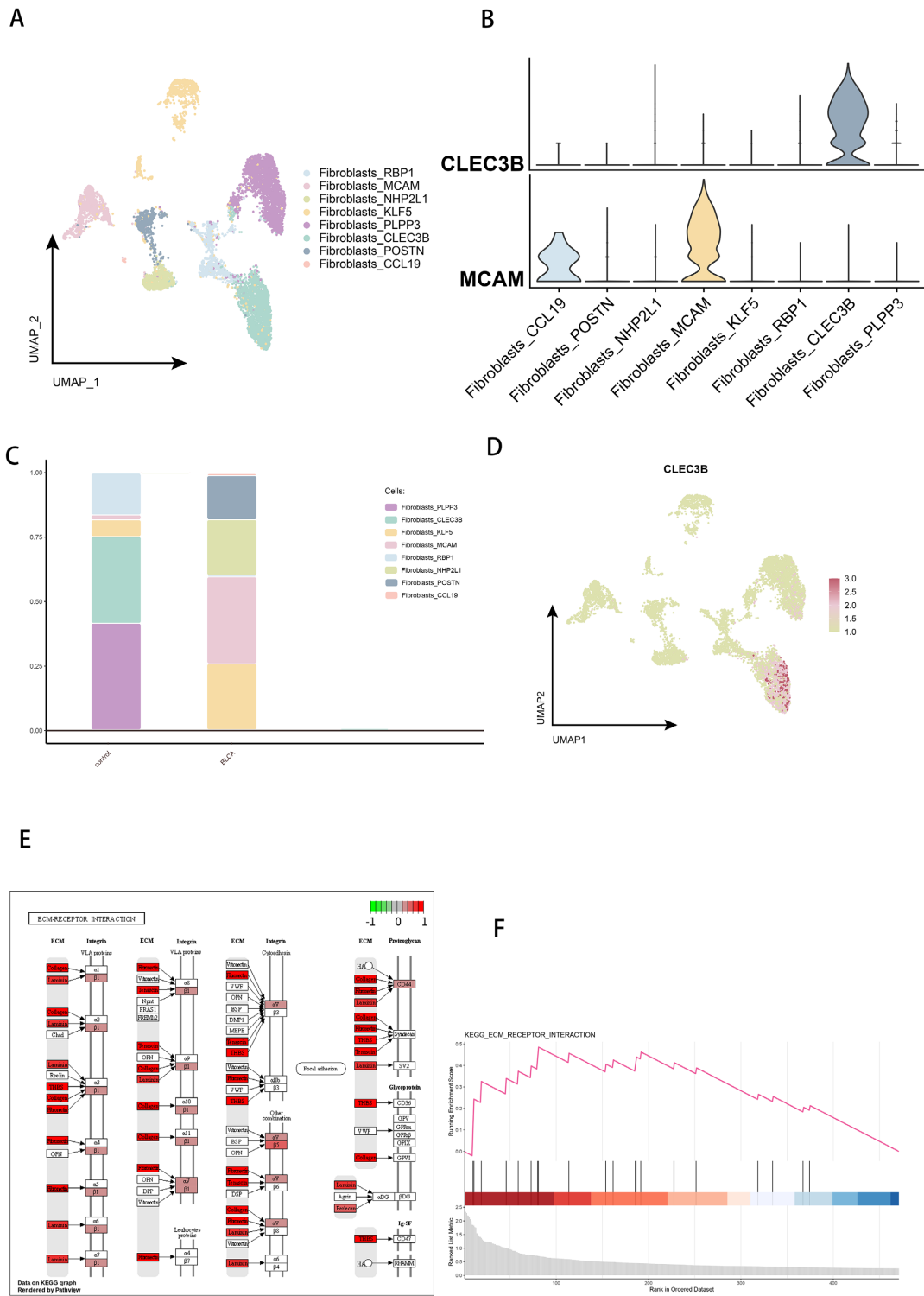
细胞通讯分析发现, CLEC3B 阳性成纤维细胞与肿瘤细胞存在显著相互作用,主要通过 COL1A1/ITGA2、B2M/EGFR 等配体-受体对实现。而 MCAM 阳性成纤维细胞则可通过 IL8、CCL5 等细胞因子作用于肿瘤细胞(图 3(E))。这些发现揭示了不同成纤维细胞亚群通过特异性分子机制参与肿瘤微环境调控。

为进一步阐明成纤维细胞亚群的调控机制,我们构建了成纤维细胞的基因调控网络(GRN)。该网络可划分为八个共表达模块(图 3(F)),分别调控成纤维细胞中特定基因的表达。特别发现, MCAM 阳性亚群伴随转录因子 ASCL2 上调,而 CLEC3B 阳性亚群则伴随 KLF13 转录因子上调。这一发现从表观遗传层面揭示了成纤维细胞异质性的调控基础。

3.3. DLL4_NOTCH4 阳性内皮细胞亚群在膀胱癌中的关键作用

为探究内皮细胞在膀胱癌中的作用,我们将其进一步划分为 10 个亚群并构建单细胞图谱(图 4(A))。通过细胞亚群分析鉴定了各内皮细胞亚群的特征标记基因(图 4(B))。研究发现在 BLCA 组中 DLL4_NOTCH4 阳性内皮细胞亚群占比最高(图 4(C))。信号通路分析显示,该亚群高表达 DLL4、NOTCH4、HEY1 等 NOTCH 信号通路基因及其他肿瘤相关通路基因(图 4(D)),提示其可能通过 NOTCH 信号通路参与肿瘤新生血管形成等过程。

拟时序轨迹分析重构了内皮细胞的分化路径,结果显示 EN_DLL4_NOTCH4 亚群由起始亚群 EN_SELE 分化而来,并位于轨迹分支的末端(图 4(E), 图 4(F))。这一发现揭示了该亚群在内皮细胞分化过程中的特殊地位,表明其可能是内皮细胞在肿瘤微环境中终末分化的关键状态。



A: 本研究鉴定的成纤维细胞亚群 UMAP 可视化; B: CLEC3B 与 MCAM 在成纤维细胞各亚群中表达水平的小提琴图; C: 对照组与 BLCA 组八种成纤维细胞亚群比例构成的差异; D: CLEC3B 在成纤维细胞亚群中表达分布的降维图谱; E~F: CLEC3B 阳性成纤维细胞亚群通路富集分析(E)与 GSEA 分析(F)结果。

Figure 2. Identification, key marker expression, and functional enrichment analysis of bladder cancer-associated fibroblast subpopulations

图 2. 膀胱癌相关成纤维细胞亚群的分群、关键标志物表达及功能富集分析

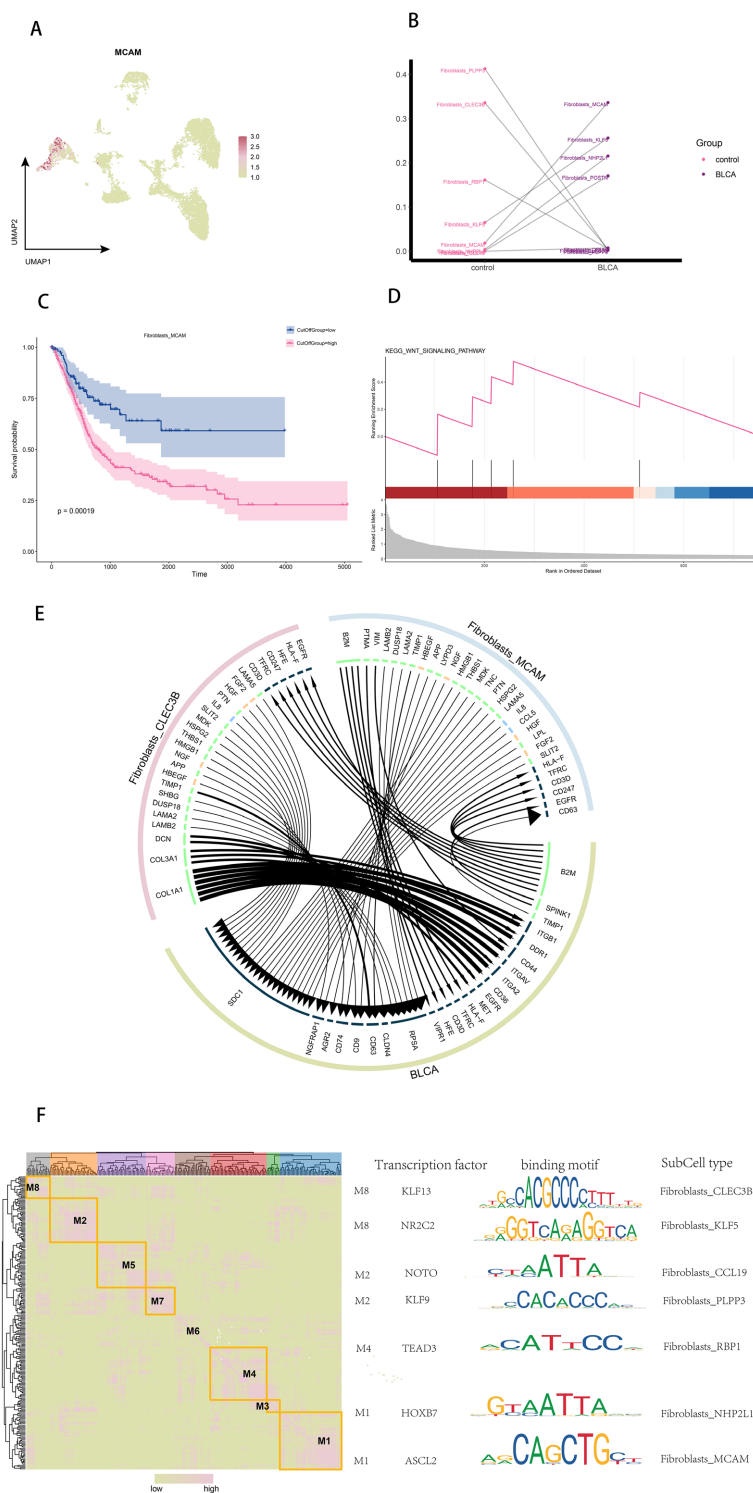
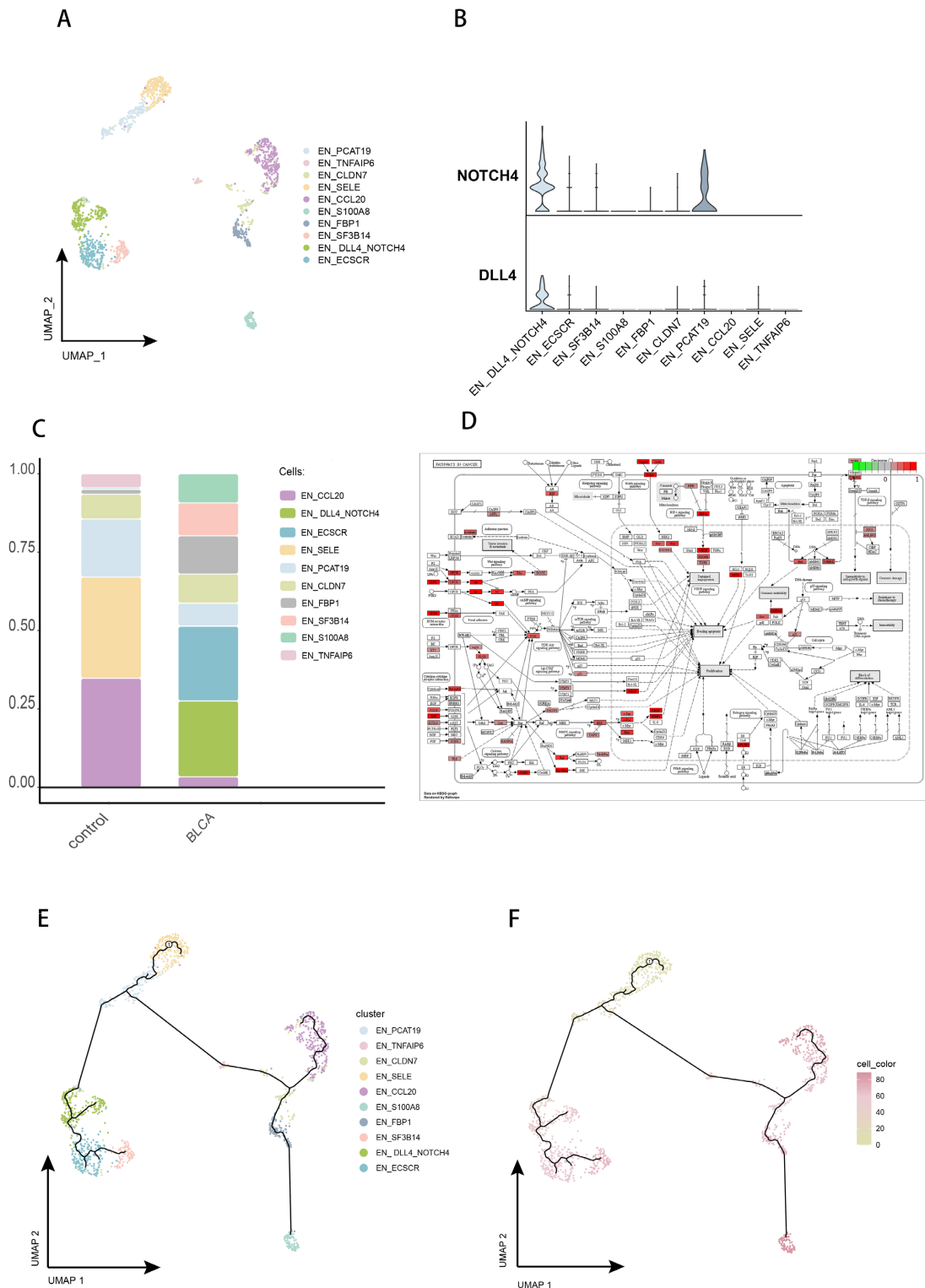


Figure 3. Functional characteristics and interaction network analysis of fibroblasts in bladder cancer
图 3. 成纤维细胞在膀胱癌中的功能特征与互作网络解析

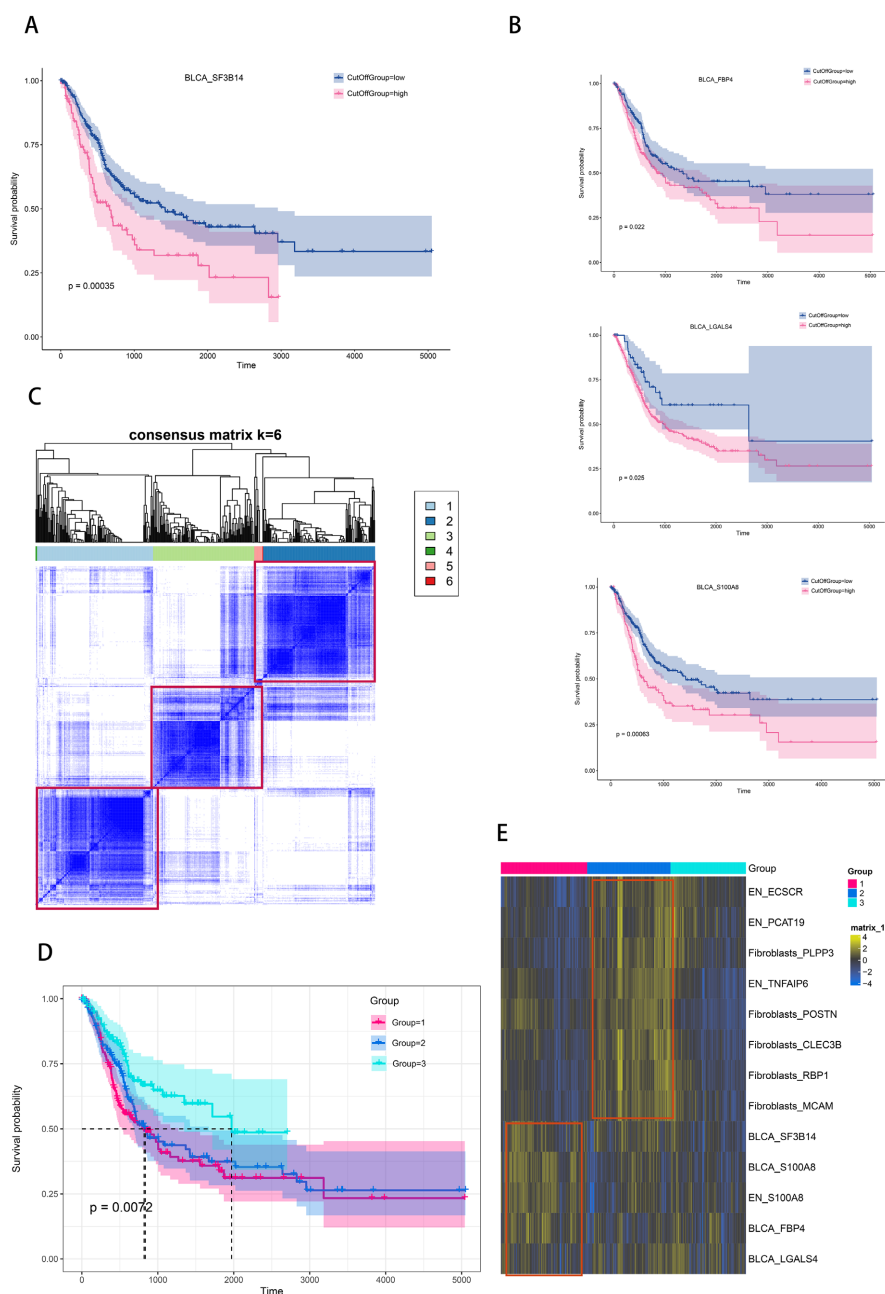


A: 本研究鉴定的内皮细胞亚群 UMAP 可视化; B: 小提琴图显示 DLL4 与 NOTCH4 在内皮细胞各亚群中的表达分布; C: 条形图展示对照组与 BLCA 组内皮细胞亚群组成的差异; D: 信号通路图展示 DLL4_NOTCH4 阳性内皮细胞亚群的 NOTCH 信号通路富集结果; E~F: 内皮细胞亚群的拟时序分化轨迹(E)及发育路径示意图(F)。

Figure 4. Heterogeneity, key molecule expression, and differentiation trajectory analysis of endothelial cell subpopulations
图 4. 内皮细胞亚群的异质性、关键分子表达及分化轨迹分析

3.4. 一致性聚类鉴定膀胱癌三种分子亚型

基于肿瘤细胞各亚群的前 10 个标记基因，结合 TCGA 膀胱癌患者的转录组数据，采用 GSVA 方法计算每个肿瘤亚群的样本评分。通过生存分析筛选出高分且预后不良的亚群(图 5(A), 图 5(B))，并对内皮细胞和成纤维细胞进行相同分析。选择这三种细胞类型作为聚类依据是因为它们共同构成肿瘤微环境的核心功能单元。



A~B: 展示不同肿瘤细胞亚群总生存期的 Kaplan-Meier 生存曲线; C: 基于一致性聚类分析的样本分群结果; D: 各亚组生存曲线展示不同亚组间的预后差异; E: 热图显示各亚组间细胞亚群评分的差异特征。

Figure 5. Prognostic value of tumor cell subpopulations and consensus clustering analysis in bladder cancer

图 5. 膀胱癌肿瘤细胞亚群的预后价值与一致性聚类分析

基于上述细胞亚群评分,采用一致性聚类方法将膀胱癌样本划分为三个主要亚型(图 5(C))。热图显示各亚型在不同细胞亚群评分上的特征差异(图 5(E))。生存分析表明 G3 亚型预后显著优于 G1 和 G2 亚型(图 5(D))。这些结果证实基于细胞亚群的分子分型与肿瘤临床进展及疾病预后密切相关。

4. 讨论

本研究利用膀胱癌相关单细胞转录组数据,构建了 BLCA 患者与健康对照样本的单细胞图谱。通过细胞亚群分析,我们揭示了膀胱癌中不同细胞亚群的比例变化,并探讨了与疾病相关的信号通路。研究结果表明,膀胱癌组织中的成纤维细胞和内皮细胞亚群在患者中发生显著改变,这些亚群可能通过 ECM 受体相互作用通路、WNT 信号通路及血管生成等途径参与肿瘤进程。同时,基于细胞亚群特征将 TCGA 膀胱癌样本划分为三种分子亚型,证实膀胱癌的异质性与细胞亚群组成密切相关。我们对肿瘤微环境的解析发现了在 BLCA 微环境中具有潜在特定功能的细胞亚群,为阐明膀胱癌发生机制提供了新的理论基础。

CAF 是肿瘤微环境中的主要基质细胞类型,与多种癌症的发病机制相关。本研究发现,成纤维细胞亚群 CLEC3B 在膀胱癌组织中表达下调。C 型凝集素结构域家族 3 成员 B (CLEC3B)编码的四连蛋白是一种纤溶酶原 kringle-4 结合蛋白,分布于细胞质、细胞外基质和外泌体中[19]。该蛋白通过诱导纤维蛋白原激活参与细胞外蛋白水解过程,与肿瘤侵袭和转移密切相关[20]。现有研究表明 CLEC3B 在肝细胞癌、卵巢癌和口腔鳞状细胞癌等多种癌症中异常表达,但其在癌症进展中的分子机制和具体功能仍需深入探索[21] [22]。在肺腺癌中, CLEC3B 下调可通过促进上皮-间质转化增强肿瘤细胞的迁移侵袭能力[23];而在肝细胞癌中, CLEC3B 低表达提示预后不良,其外泌体可促进肿瘤细胞和内皮细胞的迁移侵袭及上皮-间质转化进程[19]。本研究提示 CLEC3B 下调可能同样参与膀胱癌的发生发展。

另一方面,我们发现膀胱癌组织中 MCAM 阳性成纤维细胞亚群表达升高。MCAM(黑色素瘤细胞黏附分子,亦称 CD146 或 MUC18)在骨髓血管周围基质细胞中高表达[24],同时存在于内皮细胞、黑色素瘤细胞、周细胞和 CAFs 中[25]。研究显示内皮细胞和黑色素瘤细胞中的 MCAM 可通过促进癌细胞生长、血管生成和转移来推动癌症进展[26]。值得注意的是,MCAM 可直接与成纤维细胞中的 Wnt1 结合,通过 Wnt/ β -catenin 通路激活成纤维细胞,这种相互作用对 Wnt1 诱导的成纤维细胞增殖和 ECM 生成至关重要[27]。本研究发现高表达 MCAM 的亚群显著富集于 Wnt1 通路,这与既往研究结果相互印证。

EN_DLL4_NOTCH4 内皮细胞亚群在膀胱癌中显著富集。NOTCH 信号通路与新生血管形成密切相关,当 DLL/JAG 激动配体触发 Notch 受体蛋白水解切割后,产生的 NICD 通过 CSL 依赖性转录激活靶基因 HEY1。研究表明 HEY1 表达与不良预后、总体生存率、肿瘤分级、化疗耐药性、淋巴转移及血管增殖特征显著相关[28]。这些发现提示 Hey 蛋白可能通过调控癌细胞行为及重塑肿瘤微环境促进肿瘤进展,表明 EN_DLL4_NOTCH4 亚群可能通过 Hey 蛋白在膀胱癌中发挥作用。

本研究分别对 TME 中内皮细胞、CAF 及上皮细胞进行了独立分析,揭示了它们对肿瘤的作用。然而,这些细胞并非孤立运作,我们推测它们之间存在错综复杂的相互作用,共同驱动肿瘤恶性进展。内皮细胞不仅对经典促血管生成信号产生应答,更可能受到 CAF 的显著促进,产生结构及功能异常的肿瘤血管。CAF 在重塑 ECM 方面发挥重要作用,可能作用于上皮细胞,促进其增殖、上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)及干性特征。内皮细胞通过新生血管,间接支持上皮细胞的恶性增殖与存活。我们推测内皮细胞、CAF 与上皮细胞可能通过血管生成、ECM 重塑及上皮功能调控等环节相互作用,共同促进肿瘤进展。

本研究基于细胞亚群特征将 TCGA 膀胱癌样本划分为三种亚型。既往研究已证实膀胱癌存在多种分子特征与亚型:非肌层浸润性膀胱癌可分为具有基底样和管状样特征的三大亚类,其临床结局各异;肌

层浸润性膀胱癌的分子分型则包括管腔乳头状型(LumP)、管腔非特异型(LumNS)、管腔内不稳定型(LumU)、基质富集型、基底/鳞状型(Ba/Sq)及神经内分泌样型(NE-like)等共识亚型[29]。本研究创新性地依据单细胞转录组图谱中的细胞亚群特征对TCGA膀胱癌患者进行分型,为膀胱癌分型研究提供了新视角,揭示了异常细胞亚群在膀胱癌异质性中的重要角色。

需要指出的是,本研究存在一定局限性。基于生物信息学分析和单细胞测序的研究方法缺乏临床实验验证,同时样本规模有限。在后续研究中,我们将扩大样本量以获取更全面的数据。

综上所述,本研究表明膀胱癌肿瘤微环境中存在特定功能细胞亚群,其异质性可能与细胞亚群组成相关。若这些发现能得到进一步证实,将意味着通过早期检测膀胱组织细胞亚群的变化,可能为膀胱癌患者提供更精准有效的治疗方案。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2017) Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology*, **71**, 96-108. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.010>
- [3] Babjuk, M., Burger, M., Capoun, O., *et al.* (2022) European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma *in Situ*). *European Urology*, **81**, 75-94. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.010>
- [4] Alfred Witjes, J., Le Bret, T., Compérat, E.M., *et al.* (2017) Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology*, **71**, 462-475. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.020>
- [5] Babjuk, M., Burger, M., Capoun, O., *et al.* (2019) European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (Ta1 and Carcinoma *in Situ*)—2019 Update. *European Urology*, **76**, 639-657. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.016>
- [6] Lai, H., Cheng, X., Liu, Q., *et al.* (2021) Single-Cell RNA Sequencing Reveals the Epithelial Cell Heterogeneity and Invasive Subpopulation in Human Bladder Cancer. *International Journal of Cancer*, **149**, 2099-2115. <https://doi.org/10.1002/ijc.33794>
- [7] Chen, Z., Zhou, L., Liu, L., *et al.* (2020) Single-Cell RNA Sequencing Highlights the Role of Inflammatory Cancer-Associated Fibroblasts in Bladder Urothelial Carcinoma. *Nature Communications*, **11**, Article No. 5077. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18916-5>
- [8] Jin, M.Z. and Jin, W.L. (2020) The Updated Landscape of Tumor Microenvironment and Drug Repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 166. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00280-x>
- [9] Biffi, G. and Tuveson, D.A. (2021) Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiological Reviews*, **101**, 147-176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>
- [10] Burley, A., Rullan, A. and Wilkins, A. (2022) A Review of the Biology and Therapeutic Implications of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article ID: 1000888. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1000888>
- [11] Wang, M., Chen, X., Tan, P., *et al.* (2022) Acquired Semi-Squamization During Chemotherapy Suggests Differentiation as a Therapeutic Strategy for Bladder Cancer. *Cancer Cell*, **40**, 1044-1059.E8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.08.010>
- [12] Wang, L., Sebra, R.P., Sfakianos, J.P., *et al.* (2020) A Reference Profile-Free Deconvolution Method to Infer Cancer Cell-Intrinsic Subtypes and Tumor-Type-Specific Stromal Profiles. *Genome Medicine*, **12**, Article No. 24. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-0720-0>
- [13] Yu, Z., Liao, J., Chen, Y., *et al.* (2019) Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Bladders. *Journal of the American Society of Nephrology*, **30**, 2159-2176. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019040335>
- [14] Hafemeister, C. and Satija, R. (2019) Normalization and Variance Stabilization of Single-Cell RNA-Seq Data Using Regularized Negative Binomial Regression. *Genome Biology*, **20**, Article No. 296. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>
- [15] Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., *et al.* (2018) Integrating Single-Cell Transcriptomic Data Across Different Conditions, Technologies, and Species. *Nature Biotechnology*, **36**, 411-420. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>

-
- [16] Hänzelmann, S., Castelo, R. and Guinney, J. (2013) GSVA: Gene Set Variation Analysis for Microarray and RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, **14**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- [17] Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., *et al.* (2014) The Dynamics and Regulators of Cell Fate Decisions Are Revealed by Pseudotemporal Ordering of Single Cells. *Nature Biotechnology*, **32**, 381-386. <https://doi.org/10.1038/nbt.2859>
- [18] Wilkerson, M.D. and Hayes, D.N. (2010) Consensusclusterplus: A Class Discovery Tool with Confidence Assessments and Item Tracking. *Bioinformatics*, **26**, 1572-1573. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq170>
- [19] Dai, W., Wang, Y., Yang, T., *et al.* (2019) Downregulation of Exosomal CLEC3B in Hepatocellular Carcinoma Promotes Metastasis and Angiogenesis via AMPK and VEGF Signals. *Cell Communication and Signaling*, **17**, Article No. 113. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0423-6>
- [20] De Vries, T.J., De Wit, P.E., Clemmensen, I., *et al.* (1996) Tetranection and Plasmin/Plasminogen Are Similarly Distributed at the Invasive Front of Cutaneous Melanoma Lesions. *Journal of Pathology*, **179**, 260-265. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199607\)179:3<260::AID-PATH586>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199607)179:3<260::AID-PATH586>3.0.CO;2-T)
- [21] Qadir, F., Lalli, A., Dar, H.H., *et al.* (2019) Clinical Correlation of Opposing Molecular Signatures in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer*, **19**, Article No. 830. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6059-5>
- [22] Arellano-Garcia, M.E., Li, R., Liu, X., *et al.* (2010) Identification of Tetranection as A Potential Biomarker for Metastatic Oral Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 3106-3121. <https://doi.org/10.3390/ijms11093106>
- [23] Lu, X., Shen, J., Huang, S., *et al.* (2022) Down-Regulation of CLEC3B Facilitates Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration and Invasion of Lung Adenocarcinoma Cells. *Tissue Cell*, **76**, Article 101802. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101802>
- [24] Corselli, M., Chin, C.J., Parekh, C., *et al.* (2013) Perivascular Support of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Blood*, **121**, 2891-2901. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-451864>
- [25] Brechbuhl, H.M., Finlay-Schultz, J., Yamamoto, T.M., *et al.* (2017) Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen. *Clinical Cancer Research*, **23**, 1710-1721. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2851>
- [26] Xing, S., Luo, Y., Liu, Z., *et al.* (2014) Targeting Endothelial CD146 Attenuates Colitis and Prevents Colitis-Associated Carcinogenesis. *American Journal of Pathology*, **184**, 1604-1616. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.031>
- [27] Wang, Z., Xu, Q., Zhang, N., *et al.* (2020) CD146, from A Melanoma Cell Adhesion Molecule to a Signaling Receptor. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, Article No. 148. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>
- [28] Liu, Z., Sanders, A.J., Liang, G., *et al.* (2017) Hey Factors at the Crossroad of Tumorigenesis and Clinical Therapeutic Modulation of Hey for Anticancer Treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, **16**, 775-786. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0576>
- [29] Tran, L., Xiao, J.F., Agarwal, N., *et al.* (2021) Advances in Bladder Cancer Biology and Therapy. *Nature Reviews Cancer*, **21**, 104-121. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00313-1>