

单细胞转录组分析巨噬细胞帽状蛋白对食管鳞癌细胞增殖和转移的影响

李世浩 王玉姣 李子豪 吴彬 盛银良 齐宇

【摘要】 目的 探讨巨噬细胞帽状蛋白 (CAPG) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 组织中的表达水平及其对 ESCC 细胞体外迁移、增殖、侵袭的影响以及相关机制的影响。**方法** 通过对来自基因表达数据库 (GEO) 的 ESCC 单细胞转录组数据进行综合分析, 以揭示肿瘤间的异质性。整合和标准化 GSE188900 数据集的 ESCC 样本数据, 采用主成分分析 (PCA) 对标准化数据进行降维和聚类, 采用 Single R 算法注释细胞, 使用 inferCNV R 包识别肿瘤细胞。最终确定食管上皮细胞为肿瘤细胞来源, 并对高变基因进行基因集变异分析 (GSVA)。随后, 采用实时定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 验证 CAPG 在 ESCC 组织样本和正常样本中的表达量。靶向 CAPG 的小片段干扰 RNA (siRNA) 转染人 ESCC 细胞 EC1, 以降低 EC1 细胞中 CAPG 的表达。通过体外功能实验验证 CAPG 对 EC1 细胞的增殖、迁移和侵袭等能力的影响。最后, 通过 qRT-PCR 验证 CAPG 对 ESCC 细胞中上皮-间质转化 (EMT) 通路相关分子表达的影响。**结果** 通过对 ESCC 单细胞测序数据分析, 发现食管上皮细胞为肿瘤细胞来源, 而且 EMT 通路相关基因在食管上皮细胞中显著富集。将上皮细胞相关基因与 EMT 通路相关基因取交集得到核心基因: CAPG。与正常组织相比, ESCC 组织中 CAPG 表达明显上调。其次, 体外功能实验表明, CAPG 敲低显著影响人 ESCC 细胞 EC1 的增殖、迁移和侵袭, 而且 CAPG 敲除影响多个 EMT 相关分子的表达。最后, CAPG 作为 EMT 通路相关基因的成员, 促进 ESCC 中肿瘤细胞的克隆性增殖和转移。**结论** CAPG 在 ESCC 中高表达, 具有促进 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭的作用; 并且 CAPG 敲除影响多个 EMT 通路相关分子的表达。

【关键词】 食管鳞状细胞癌; 巨噬细胞帽状蛋白; 单细胞测序; 增殖; 迁移; 上皮-间质转化通路

Single cell transcriptome analysis of macrophage cap protein on proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells Li Shihao, Wang Yujiao, Li Zihao, Wu Bin, Sheng Yinliang, Qi Yu. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Qi Yu, Email: qiyu@zzu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the expression level of macrophage-capping protein (CAPG) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its effect on migration, proliferation and invasion of ESCC cells in vitro as well as the related mechanisms. **Methods** Comprehensive analysis for single cell transcriptome data of ESCC from Gene Expression Omnibus (GEO) datasets was performed in order to reveal the tumor heterogeneity. After raw data from GSE188900 was integrated and standardized, Principal Component Analysis (PCA) was used for dimensionality reduction and clustering of the standardized data. Then, the Single R algorithm was used for cell annotation, and the inferCNV R package was used to identify tumor cells. Esophageal epithelial cells were finally identified as tumor cells and Gene Set Variation Analysis (GSVA) was performed on highly variable genes. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the expression level of hub gene in esophageal squamous cell carcinoma patient samples. Next, small interfering RNA (siRNA) targeting CAPG was transfected

into human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC1 in order to knock down the expression of CAPG in EC1 cells. In vitro functional assays was performed to verify the effect of CAPG on EC1 cells, including proliferation, migration, invasion and wound-healing assays. Finally, the effect of CAPG knockout on the expression of EMT pathway-related genes in esophageal squamous cell carcinoma cells was verified by qRT-PCR. **Results** The single cell sequencing data of esophageal squamous cell carcinoma showed that esophageal epithelial cells were the source of tumor cells and EMT pathway-related genes were significantly enriched in esophageal epithelial cells. We intersected epithelial cells-related genes with EMT pathway-related genes to obtain the hub gene: CAPG. The expression of CAPG was significantly higher in esophageal squamous cell carcinoma tissues compared to normal tissues. In vitro functional experiments demonstrated that the knockout of CAPG markedly impeded the proliferation, migration and invasion abilities of esophageal squamous cell carcinoma cells. Furthermore, CAPG knockout influenced the expression of several genes associated with EMT pathway. Finally, CAPG acts as a member of EMT pathway-related genes and promotes clonal proliferation and metastasis of ESCC cells. **Conclusions** In esophageal squamous cell carcinoma tissue, CAPG is significantly up-regulated and promotes the proliferation, migration, and invasion abilities of ESCC cells. Additionally, knockout of CAPG affects the expression of several genes related to EMT pathway.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma; Macrophage-capping protein; Single cell sequencing; Proliferation; Invasion; Epithelial-mesenchymal transition pathway

食管癌是世界上最常见的癌症之一，食管癌的两个主要亚型是食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma, ESCC）和食管腺癌（esophageal adenocarcinoma, EAC）^[1]。食管癌预后差，是癌症死亡的第六大原因，发病率和死亡率都很高^[2]。且ESCC是中国河南省的特征性肿瘤类型。

上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）在肿瘤转移和侵袭中起重要作用^[3]。EMT最早由Greenburg等^[4]在1982年报道。EMT是指极化上皮细胞转化为间充质表型的动态变化过程，在组织纤维化、创面愈合和恶性肿瘤进展等多种生理和病理过程中起不可替代的作用^[5-6]。既往研究^[7]表明，EMT可导致癌细胞早期扩散，特别是早期淋巴结转移，是影响患者预后的重要因素，在癌症转移过程中常被激活。EMT与多种恶性肿瘤的不良预后密切相关，包括乳腺^[8]、胰腺^[9]、肺^[10]等肿瘤。

随着高通量测序技术的快速发展和不断完善，单细胞转录组分析技术已经应用到越来越多的领域，特别是在肿瘤异质性的研究中。其对肿瘤内部异质性的超高敏感性打开了肿瘤的“微观世界”。单细胞转录组分析使临床医生能够了解不同克隆肿瘤细胞群的不同功能，从而为癌症患者提供更个性化和更全面的治疗策略^[11-12]。本文利用基因表达数据库（Gene Expression Omnibus, GEO）中ESCC

的单细胞测序数据，分析ESCC细胞间的异质性，寻找并验证影响ESCC侵袭转移的关键基因。

资料与方法

一、单细胞测序数据的下载与处理

从GEO（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）下载GSE188900数据集，该数据集包括6个人类ESCC和1个正常样本的单细胞测序数据。将原始数据加载到Seurat R包中进行后续分析。通过质量控制去除低质量细胞和双细胞重合数据。随后，利用该包中的NormalizeData和FindVariableFeatures函数对初步处理后的数据进行标准化，之后鉴定出高变基因。接下来将标准化后的数据进行联合分析。首先，使用ScaleData函数对标准化后的数据进行归一化以确保在后续分析中给予标准化数据同等的权重。其次，使用RunPCA函数对归一化数据进行主成分分析（Principal Component Analysis, PCA），得到15个主成分，对其进行综合分析后，最终决定对前10个主成分进行后续分析。

二、细胞类型注释和肿瘤细胞鉴定

对前10个主成分进行聚类分析得到22个亚群。随后，提取每个亚群的特异性标志物，使用CellMarker2.0（<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>）配合Single R包对22个亚群进

行细胞注释。Single R细胞注释的参考文件为: Immune Cell Expression Data和Human Primary Cell Atlas。为了评估各个细胞类型的恶性程度,利用inferCNV R包评估每个细胞类型的拷贝数变异(copy number variation, CNV)。以T细胞作为CNV分析的参考细胞,利用箱线图展示每个细胞类型的CNV评分。

三、核心基因的获取

通过上述的细胞亚群CNV分析, CNV得分最高的细胞亚群为食管上皮细胞。然而, 食管上皮细胞共有4个亚群, 为了鉴定4个上皮细胞亚群的恶性程度, 以B细胞作为CNV分析的参考细胞, 利用inferCNV R包评估4个亚群的CNV, 箱线图展示4个亚群的CNV评分。随后, 对恶性程度最高的上皮细胞亚群进行后续分析。利用加权基因共表达网络分析(Weighted Correlation Network Analysis, WGCNA)评估该上皮细胞相关基因与临床性状(Stage、T、N和M分期)之间的相关性。之后, 对相关性最高的模块进行生存分析, 发现巨噬细胞帽状蛋白(macrophage-capping protein, CAPG)影响患者的预后。

四、细胞培养及转染

人ESCC细胞系EC1购自北京中国科学院。EC1细胞的培养条件如下: ①细胞培养基为含10%~15%胎牛血清的高糖DMEM培养基(Solarbio, 中国上海)。②培养环境为37℃, 5%CO₂的灭菌培养箱。③每36 h更换一次培养基, 2~3 d后传代。靶向CAPG的小片段干扰RNA(small interference RNA, siRNA)来自江苏吉凯科技有限公司, 分别命名为Si-CAPG和SiNC。通过脂质体对EC1细胞进行瞬时转染, 根据Lipofectamine 3000 Kit(Solarbio, 中国上海)的介绍, 完成转染过程。转染48 h后提取EC1细胞的RNA进行实时定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测转染效率。

五、RT-qPCR检测转染细胞CAPG基因的表达

使用NcmZol试剂(M5100; NCM Biotech, 中国)提取Si-CAPG和SiNC转染细胞中的RNA。使用反转录试剂(R2021; US Everbright Inc., 中国)合成cDNA。尚亚生物科技有限公司(北京)设计并合成CAPG引物。RT-qPCR反应采用SYBR染色反应试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 中国)。

每个样品上样3个副孔, 以减小误差。根据CAPG与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)表达量的差异, 得到CAPG的相对表达量。本研究已通过郑州大学第一附属医院伦理委员会审核批准, 并通过患者及其家属知情同意(审批号: 2019-KY-395)。

六、迁移和侵袭实验检测EC1细胞的迁移和侵袭能力

将EC1细胞(1×10^5)接种于含200 μL无血清培养液的Transwell板上室中, Transwell板下室为含有500 μL 10%胎牛血清的正常培养液。迁移实验和侵袭实验的区别在于侵袭实验需要将基质胶添加Transwell板上室底部, 而迁移实验则不需要。迁移实验需要在5% CO₂培养箱中孵育24 h, 而侵袭实验需要48 h。培养完成后, 4%多聚甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色30 min, 使用棉签去除未迁移的细胞。随机选择3个100×视野在显微镜下进行拍照和使用软件Image J进行细胞计数。

七、杀伤实验检测EC1细胞的生长和迁移能力

首先, 将细胞接种到六孔板中, 每孔 5×10^5 个细胞, 用含10%胎牛血清培养液培养至细胞密度接近100%。然后将无菌移液管尖端垂直划入细胞平面, 形成一个明显的无细胞间隙。其次, 用无菌生理盐水清洗六孔板, 去除附着的细胞和其他杂质。最后, 在显微镜下观察细胞48 h后的迁移距离。

八、细胞增殖实验检测EC1细胞的增殖能力

根据CCK-8试剂盒(Beyotime)的使用说明进行细胞增殖实验。将Si-CAPG和SiNC转染的EC1细胞制备成细胞悬液(100 μL, 4 000个细胞), 在96孔板中培养6 h。随后, 取10 μL CCK-8试剂加入96孔板, 继续培养2 h。使用SynergyMx(BioTek)酶标仪读取450 nm处的吸光度。采用CCK-8试剂检测转染siRNA后0、24、48、72、96 h EC1细胞的增殖能力。

九、CAPG敲除影响多个EMT通路相关分子的表达

在验证完CAPG在体外功能实验的作用后, 利用RT-qPCR对CAPG下游相关机制进行探索。

十、统计学分析

使用R 4.2.1和SPSS V.24软件对数据进行分析。采用*t*检验比较两组间CAPG的表达水平。采用Image J软件(v1.8.0)分析杀伤实验、迁移和侵袭实验结果。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、ESCC单细胞转录组分析和细胞亚群分析

分析并整合来自GSE188900的6个原发性ESCC组织样数据，这6个肿瘤样本的数据。经过对原始数据的初步过滤，标准化和归一化，最后进行PCA和降维分析得到10个主成分用于后续的聚类分析和细胞注释。这10个主成分进行聚类分析得到22个细胞亚群，提取每个细胞亚群的特异性标志物用于细胞注释，附图1为亚群0~8的特异性标志物，附图2为亚群10~15的特异性标志物，附图3为亚群16~21的特异性标志物。之后，利用特异性标志物，CellMaker2.0网站以及Single R算法将22个细胞亚群进行了注释，得到了单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、单核-巨噬细胞、T细胞、上皮细胞、CD4⁺T细胞、内皮细胞、B细胞、成纤维细胞、CD8⁺T细胞、组织干细胞和CMP等不同的细胞亚群。接下来，为了评估各个细胞类型的恶性程度，利用inferCNV R包评估每个细胞类型的CNV，结果显示：CNV得分最高的细胞亚群为食管上皮细胞。然而，食管上皮细胞共有4个亚群，为了鉴定4个上皮细胞亚群的恶性程度，以B细胞作为CNV分析的参考细胞，利用inferCNV R包评估4个亚群的CNV（图1A），箱线图展示4个亚群的CNV评分（图1B），其中上皮细胞（1）亚群CNV评分最高，即恶性度最高。基于此，本研究认为在ESCC肿瘤组织中，肿瘤细胞大部分来源于上皮细胞（1）亚群，由此对该亚群进行后续分析。

二、核心基因的获取

利用TCGA表达矩阵和临床数据，结合上皮细胞（1）亚群基因进行WGCNA。通过平均层次聚类和动态树裁剪，将无标度mRNA网络聚类为9个模块（图1C）。红色模块与临床性状（Stage、T、N和M分期）呈正相关（图1D）。随后，对红色模块中的8个基因进行生存分析，仅CAPG的表达水平对ESCA患者预后具有显著的影响（图1E）。所有基因的生存分析在附图4中。

三、CAPG在各个细胞亚群中的分布情况

图2A显示22个细胞亚群注释后的分布状态。图2B显示CAPG在22个亚群中的整体分布情况。图2C显示CAPG在22个亚群中具体的表达

情况，CAPG在髓系祖细胞（common myeloid progenitor, CMP）表达最高，其次是单核细胞。随后，利用拟时序分析对不同细胞亚群进行分化状态和分化顺序的分析。图2D显示T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞分化顺序，随着时间的推移，CD8⁺T细胞逐渐向CD4⁺T细胞和T细胞2个方向分化。图2E显示4个上皮细胞亚群的分化状态和顺序，随着时间的推移，上皮细胞（1）为主要的起始状态，逐步向上皮细胞（2）和上皮细胞（4）分化，最后向上皮细胞（3）分化。

四、CAPG在ESCC组织显著上调

通过TCGA数据库对CAPG进行分析，发现CAPG ($t=6.784$, $P<0.01$) 在ESCC组织中的表达水平明显高于正常组织。此外，收集ESCC患者肿瘤组织标本，采用RT-qPCR检测发现CAPG在ESCC组织中的表达水平明显高于正常组织 [(8.635 ± 1.056) 比 (5.237 ± 1.213)], $t=4.823$, $P<0.01$]。

五、CAPG对EC1细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell迁移和侵袭实验结果显示，相比于SiNC组，Si-CAPG组细胞的迁移能力 [(445 ± 22) 个比 (896 ± 24) 个, $t=30.65$, $P<0.01$]、侵袭能力 [(228 ± 19) 个比 (659 ± 29) 个, $t=41.79$, $P<0.001$] 均显著低于对照组。

六、CAPG对EC1细胞生长和迁移能力的影响

杀伤实验结果显示，经过48 h的培养，敲低CAPG组的迁移距离明显短于对照组 ($P<0.001$)。

七、CAPG对EC1细胞增殖能力的影响

CCK-8细胞增殖实验结果表明，相比较于SiNC组，Si-CAPG组EC1细胞在0、24、48 h的增殖能力均无明显差别 ($P>0.05$)。但是，在72 h ($P<0.01$) 和96 h ($P<0.001$) 时，Si-CAPG组EC1细胞的增殖能力显著低于对照组，差异均有统计学意义。

八、CAPG对EMT通路的影响

CAPG敲低的EC1细胞中E-cadherin表达 ($t=5.642$, $P<0.01$) 显著上调，N-cadherin ($t=7.812$, $P<0.001$) 和Vimentin ($t=9.642$, $P<0.001$) 表达显著下调。同时，评估CAPG敲低对MMP家族相关分子的影响，在CAPG敲低的EC1细胞中，MMP1 ($t=3.682$, $P<0.05$)、MMP2 ($t=4.113$, $P<0.05$)、MMP3 ($t=5.389$, $P<0.01$) 和MMP9 ($t=4.961$, $P<0.01$) 的表达明显下调。

九、LncRNA AC026412.3与CAPG的表达呈正相关

为了探索与CAPG表达相关的lncRNA，基于TCGA肺腺癌lncRNA表达矩阵，使用WGCNA算法构建lncRNA共表达网络。通过平均层次聚类 and 动态树裁剪（图3A），确定了8个模块，其中绿色模块与临床性状（Stage、T和N分期）和CAPG表达呈正相关（图3B）。使用最大集团中心性算

法（maximal clique centrality algorithm, MCC）确定绿色模块的12个核心lncRNAs（图3C）。随后，验证了核心lncRNAs与CAPG表达水平的相关性，其中AC026412.3与CAPG的表达呈显著正相关（图3D）。此外，分析AC026412.3表达水平对ESCC患者预后的影响，发现低表达的患者具有较高的存活率，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ，附图5A）。

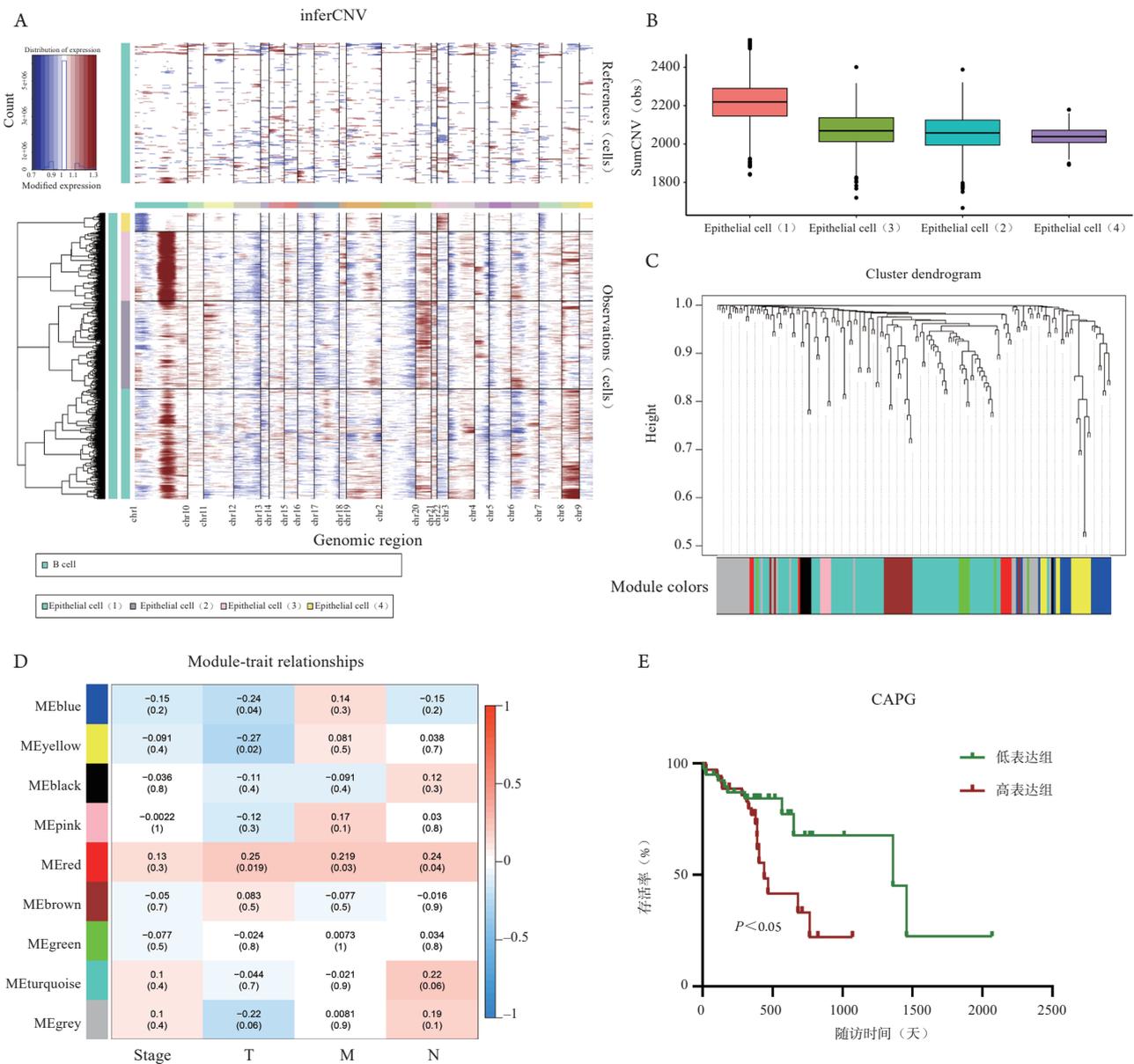


图1 上皮细胞亚群的分析以及核心基因的获取。A：4个上皮细胞亚群的inferCNV分析，以B细胞作为参考亚群。B：箱式图展示4个上皮细胞亚群的CNV评分，其中上皮细胞（1）CNV评分最高。C：通过平均层次聚类和动态树裁剪，将无标度mRNA网络聚类为9个模块。D：热图展示上皮细胞（1）相关基因与ESCA患者Stage、T、N和M分期的关系。E：利用TCGA表达矩阵和临床数据进行CAPG生存分析

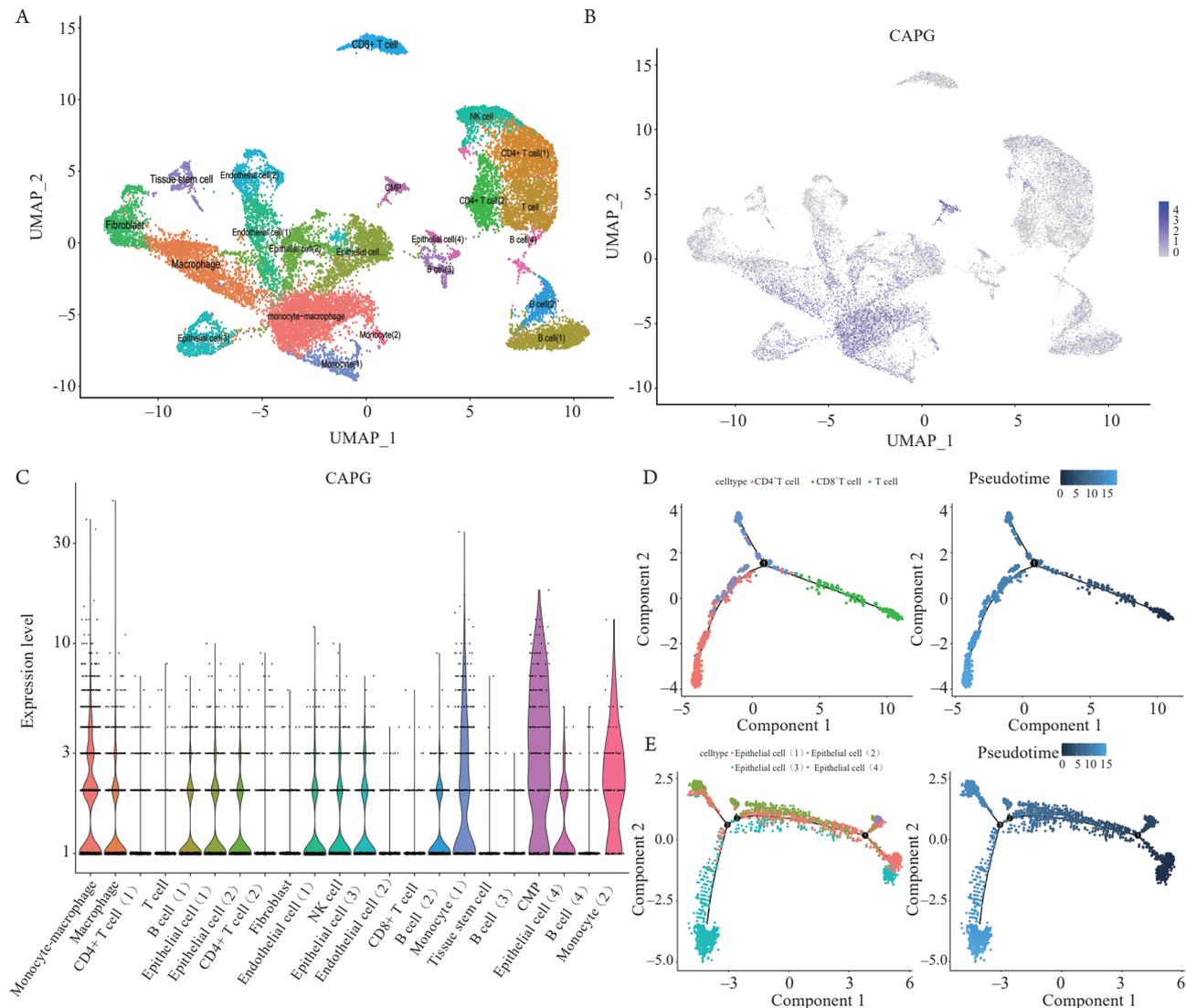


图2 CAPG在各个亚群中的分布以及相应亚群的拟时序分析。A: 22个细胞亚群注释后的分布状态。B: CAPG在22个细胞亚群中的整体分布情况。C: CAPG在22个细胞亚群中的表达水平。D: T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的拟时序分析。E: 4个上皮细胞亚群的拟时序分析

讨 论

食管癌是世界上第6大致死率最高的肿瘤，主要有2种亚型：①ESCC，占食管癌的70%，主要发生在东亚和非洲部分地区；②EAC，主要见于西方国家^[13-14]。食管癌患者生活质量较差，随着病情的发展，患者体重会持续下降。并且食管癌患者预后较差，5年生存率仅为19%^[15-16]。

随着高通量测序技术的不断发展，肿瘤微环境的探索不断深入。为了满足医学科学研究的需要，单细胞测序技术应运而生，该技术可以从更

微观的角度分析肿瘤的异质性，评估单个肿瘤细胞在癌症样本中的表达谱，从而鉴定不同的细胞簇以及新的肿瘤预后标志物，探索新的治疗方式和治疗靶点^[11]。本研究通过对GEO数据库中ESCC单细胞转录组数据进行分析，发现肿瘤内部存在不同的细胞亚群，包括免疫细胞、内皮细胞和上皮细胞等。随后，使用inferCNV算法来识别肿瘤细胞的来源并进行下一步的分析。

EMT一直是影响肿瘤发生发展的重要因素。EMT指逐渐将上皮细胞转变为间质细胞状态从而更加利于细胞的扩散和转移^[17]。EMT由Elizabeth

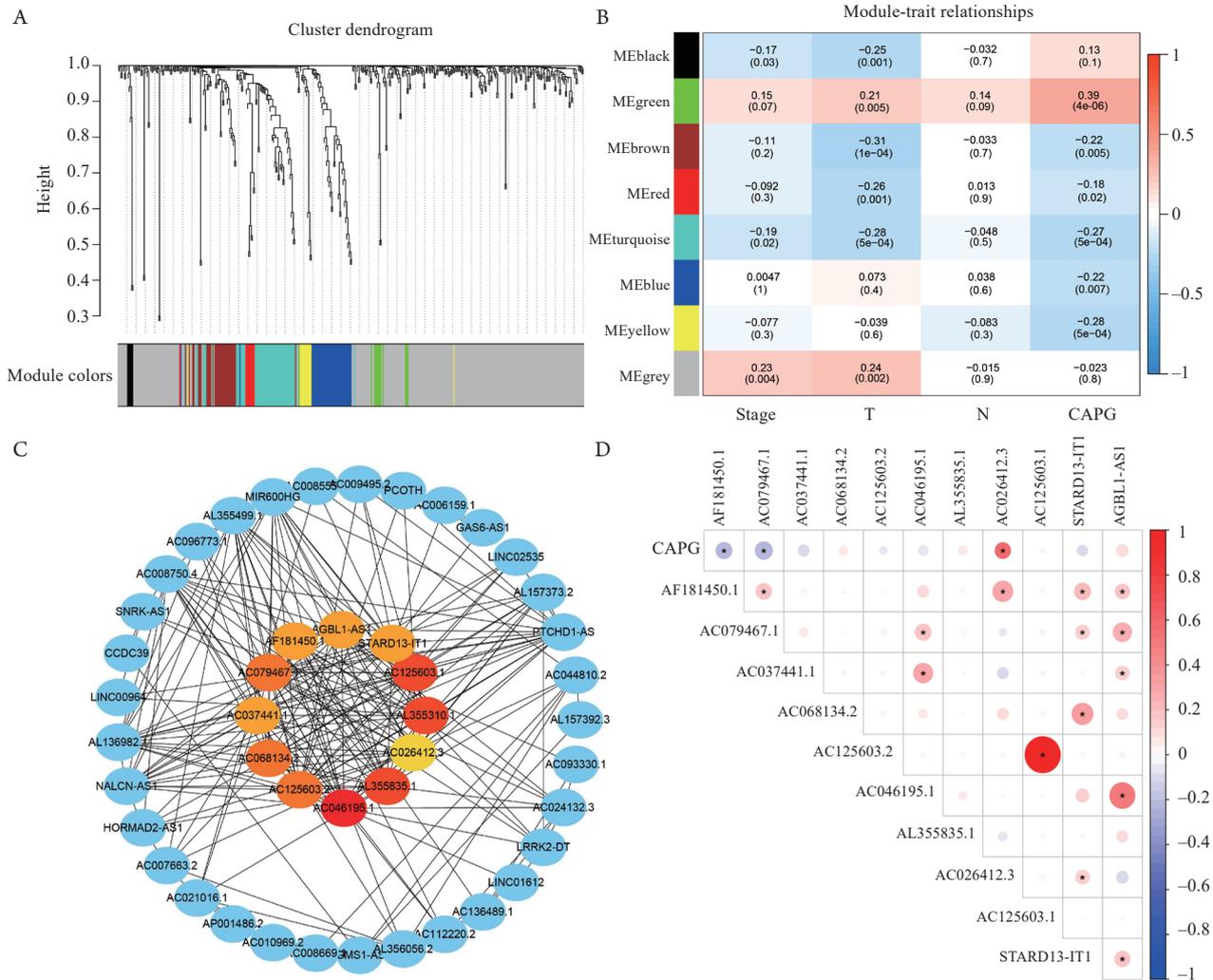


图3 CAPG相关的lncRNAs的研究。A: 通过平均层次聚类和动态树裁剪，将无标度lncRNA网络聚类为8个模块。B: 热图显示模块与临床性状（Stage、T和N分期）、CAPG表达水平之间的相关性。C: 通过MCC算法识别绿色模块前12位的核心lncRNAs。D: 核心lncRNAs与CAPG表达水平之间的相关性

Hay在1982年首次报道^[4]，目前已知在胚胎生长和发育的多个步骤中具有重要作用^[5,18-19]。巧合的是，本文分析的核心基因CAPG是EMT通路相关基因的成员，CAPG是凝溶胶蛋白家族的成员^[20]。以往研究^[21]表明，CAPG主要分布于细胞质和细胞核中。CAPG与肌动蛋白细胞骨架相互作用，促进肌动蛋白丝的正确聚合、排列和定位，使细胞在组织基质中变形和迁移^[20,22-24]。核CAPG和细胞质CAPG的功能不同，核CAPG在诱导肿瘤细胞侵袭过程中发挥重要作用^[25]。以往研究^[26]报道CAPG促进乳腺癌细胞转移。然而，CAPG如何促进ESCC细胞的侵袭和转移仍不清楚。本研究结果表明，CAPG可能通过影响EMT通路相关分子的表达从而

促进ESCC肿瘤细胞的增殖和转移。

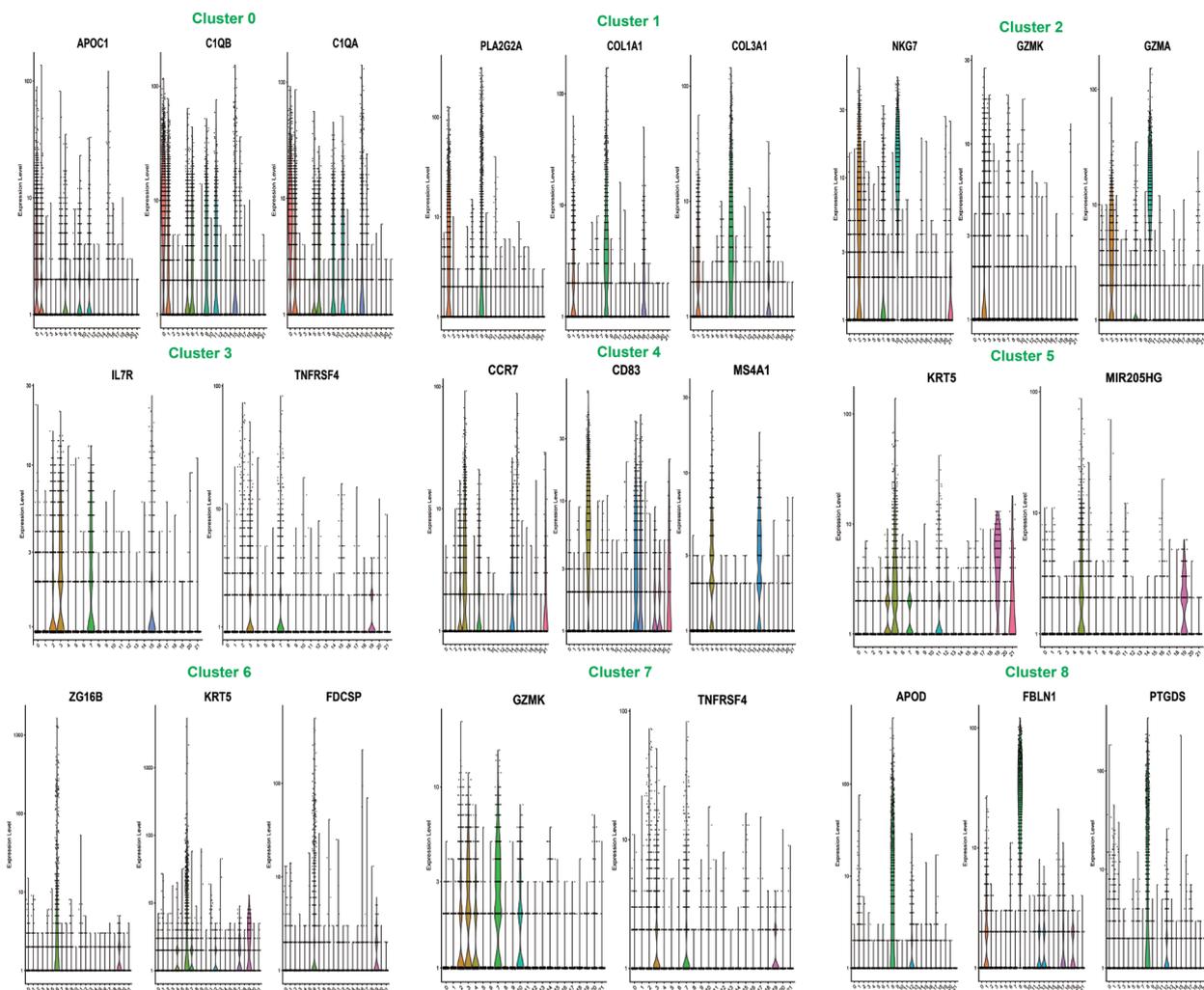
本研究通过调控EMT通路相关基因CAPG的转录，促进了ESCC的侵袭和转移。与以往乳腺癌的报道^[26]一致。CAPG可以作为ESCC的生物标志物，特别适用于晚期ESCC患者。CAPG可为ESCC患者提供个体化和针对性的治疗理论依据。当然，本研究也有不足之处。由于资金不足，缺乏进一步的实验验证，如动物实验等，体内实验有待进一步证实。

参 考 文 献

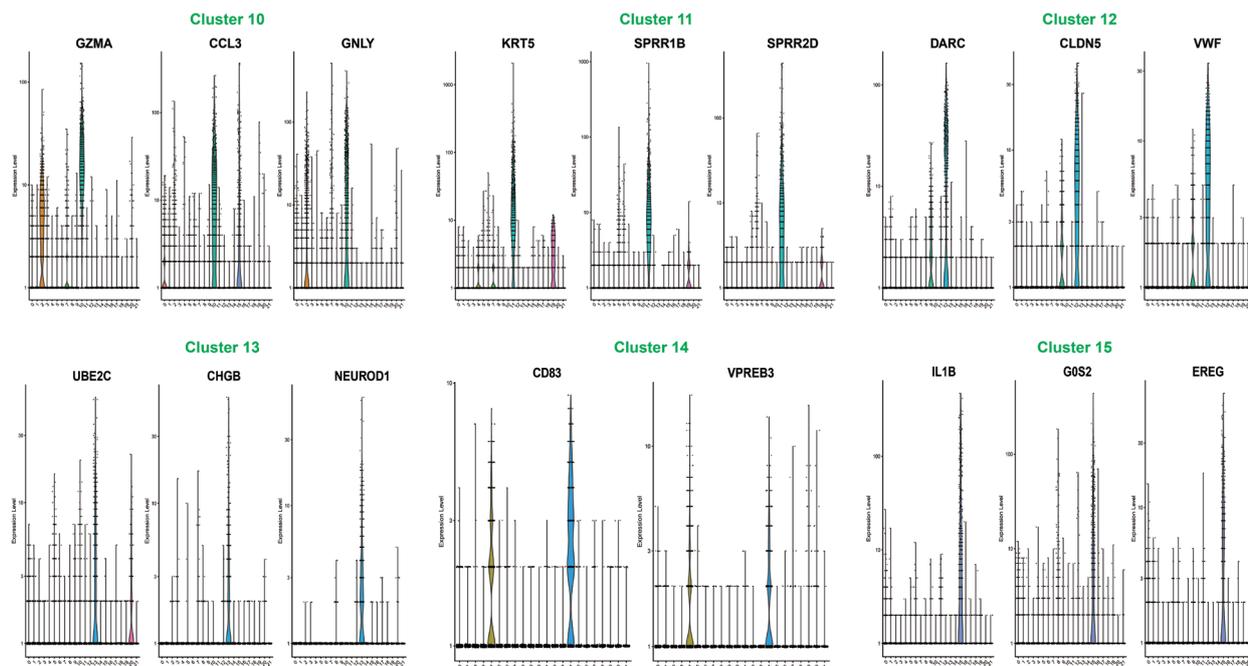
1 Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma[J]. N Engl J

- Med, 2014, 371 (26): 2499-2509.
- 2 Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas Á, Lanas Arbeloa Á. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (26): 7933-7943.
 - 3 Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer[J]. *Molecules*, 2016, 21 (7): 965.
 - 4 Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. *J Cell Biol*, 1982, 95 (1): 333-339.
 - 5 Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166 (1): 21-45.
 - 6 Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14 (10): 611-629.
 - 7 Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11 (1): 28-39.
 - 8 Zeng K, He B, Yang BB, et al. The pro-metastasis effect of circANKS1B in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17 (1): 160.
 - 9 Tonack S, Patel S, Jalali M, et al. Tetracycline-inducible protein expression in pancreatic cancer cells: effects of CapG overexpression[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17 (15): 1947-1960.
 - 10 Che D, Zhang S, Jing Z, et al. Macrophages induce EMT to promote invasion of lung cancer cells through the IL-6-mediated COX-2/PGE (2)/ β -catenin signalling pathway[J]. *Mol Immunol*, 2017, 90: 197-210.
 - 11 Liu Y, Ye G, Huang L, et al. Single-cell transcriptome analysis demonstrates inter-patient and intra-tumor heterogeneity in primary and metastatic lung adenocarcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (21): 21559-21581.
 - 12 Kim KT, Lee HW, Lee HO, et al. Single-cell mRNA sequencing identifies subclonal heterogeneity in anti-cancer drug responses of lung adenocarcinoma cells[J]. *Genome Biol*, 2015, 16 (1): 127.
 - 13 Bettermann K, Mehta AK, Hofer EM, et al. Keratin 18-deficiency results in steatohepatitis and liver tumors in old mice: A model of steatohepatitis-associated liver carcinogenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (45): 73309-73322.
 - 14 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
 - 15 Ahmed O, Ajani JA, Lee JH. Endoscopic management of esophageal cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2019, 11 (10): 830-841.
 - 16 Barsouk A, Rawla P, Haddadinicolaou AV, et al. Targeted Therapies and Immunotherapies in the Treatment of Esophageal Cancers[J]. *Med Sci (Basel)*, 2019, 7 (10): 100.
 - 17 Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. *Front Med*, 2018, 12 (4): 361-373.
 - 18 Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (4): 265-273.
 - 19 Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development[J]. *Development*, 2012, 139 (19): 3471-3486.
 - 20 Johnston PA, Yu FX, Reynolds GA, et al. Purification and expression of gCap39. An intracellular and secreted Ca2 (+)-dependent actin-binding protein enriched in mononuclear phagocytes[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (29): 17946-17952.
 - 21 Watari A, Takaki K, Higashiyama S, et al. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG[J]. *Oncogene*, 2006, 25 (56): 7373-7380.
 - 22 Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, et al. Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing[J]. *J Cell Biol*, 2001, 154 (4): 775-784.
 - 23 Parikh SS, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, et al. CapG (-/-) mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG (+/+) mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection[J]. *Infect Immun*, 2003, 71 (11): 6582-6590.
 - 24 Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells[J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 545-576.
 - 25 De Corte V, Van Impe K, Bruyneel E, et al. Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 22): 5283-5292.
 - 26 Huang S, Chi Y, Qin Y, et al. CAPG enhances breast cancer metastasis by competing with PRMT5 to modulate STC-1 transcription[J]. *Theranostics*, 2018, 8 (9): 2549-2564.
- (收稿: 2022-12-29; 修回: 2023-02-05; 接受: 2023-05-15)
(本文编辑: 丁玮)

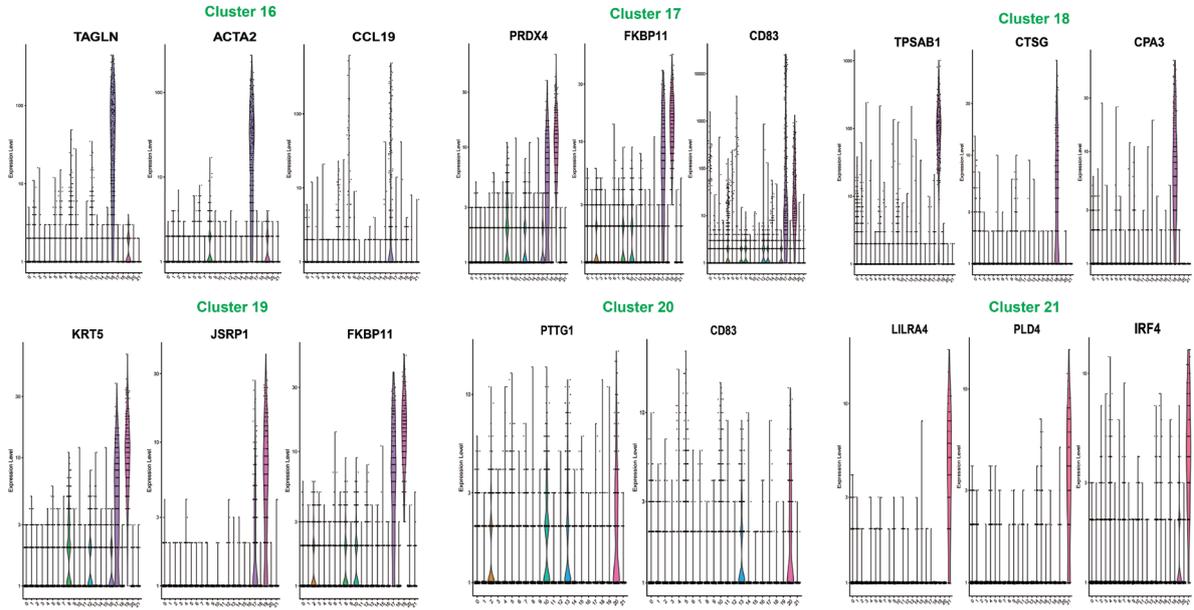
李世浩, 王玉姣, 李子豪, 等. 单细胞转录组分析巨噬细胞帽状蛋白对食管鳞癌细胞增殖和转移的影响[J/OL]. *中华胸部外科电子杂志*, 2023, 10 (2): 98-105.



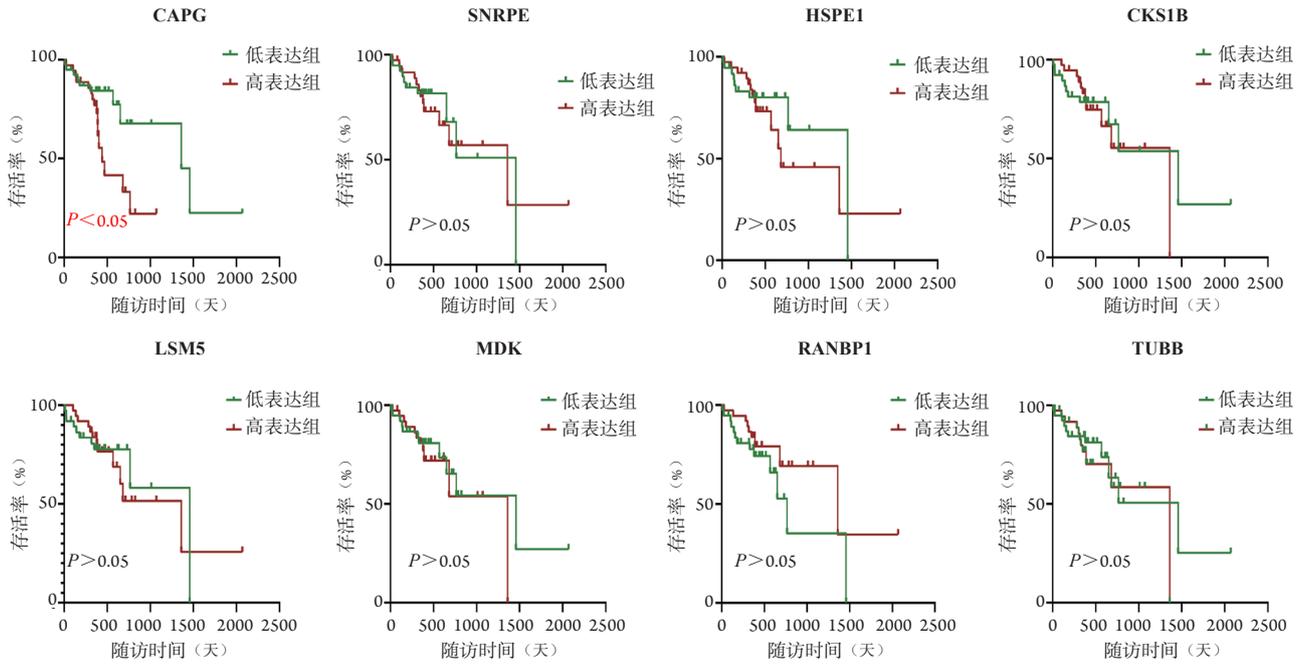
附图1 亚群0~8的特异性Marker



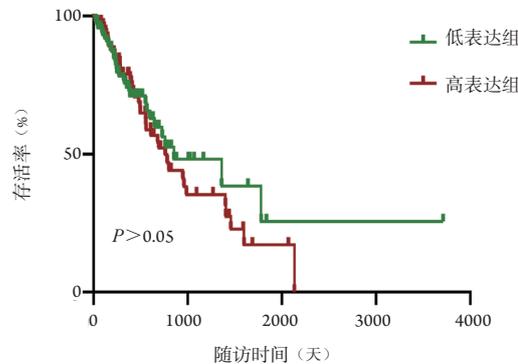
附图2 亚群10~15的特异性Marker



附图3 亚群16-21的特异性Marker



附图4 利用TCGA表达矩阵和临床数据，对红色模块中的8个基因进行生存分析



附图5 LncRNA AC026412.3生存分析