

Agilent SureSelect 靶向 RNA 测序结合 iSort 软件实现实体组织样品细胞亚群表征及相对丰度分析

作者

Aki Nakao¹
Aaron M. Newman^{1,2}
Ash A. Alizadeh^{1,2}
Maximilian Diehn^{1,2}
Manjula Aliminati³
Mistuni Ghosh³
Jayati Ghosh³
Kristi Stephenson³
Ashutosh Ashutosh³

1. CiberMed, Inc.,
California, USA
2. Stanford University, Stanford,
California, USA
3. 安捷伦科技有限公司
California, USA

摘要

CiberMed 的 iSort 软件套装是一种广泛使用的数字流式分析解决方案，用于从总 RNA 测序 (Bulk RNA-seq) 数据中分析复杂组织的细胞组成。iSort Fractions “组织模式” 可通过组织基因表达数据定量分析 22 种功能免疫细胞亚群以及 3 种非免疫细胞（成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞）的相对占比。为实现新鲜/冰冻 (FF) 或福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样品中这 25 种细胞类型的准确计数，iSort Fractions 采用特有的方法来消除不同平台和不同样品保存条件导致的技术差异和数据噪音。在本研究中，我们使用 iSort Fractions 评估了 Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 的数据准确性、稳定性和重现性。开发这一 Panel 是为了能够高效、可靠地定量分析 FF 或 FFPE 组织中 25 种细胞类型的相对比例。

我们从配对的 FF 和 FFPE 肿瘤标本中提取制备了总 RNA，并使用 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel，基于 Agilent SureSelect XT HS2 RNA 实验流程进行靶向序列捕获及测序。我们使用 iSort Fractions（组织模式）分析测序数据。对于所有该方案覆盖的细胞类群 (n = 25)，由 iSort 分析获得的各类细胞占比在配对的 FF 和 FFPE 肿瘤样本之间高度一致 ($\rho = 0.93$)，远优于常规全转录组测序数据的分析结果 ($\rho = 0.78$)，同时靶向测序所需的测序数据量仅为全转录组的 1/20。此外，通过技术重复 (technical replicates)，我们发现基于靶向测序的细胞分群及比例分析展现出了极佳的数据重现性 (FF 样品 $\rho \geq 0.97$ ，FFPE 样品 $\rho \geq 0.96$)。SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 由安捷伦社区设计项目所支持，结合 iSort 软件，可对新鲜/冰冻和固定组织标本进行高度准确的细胞分析。

前言

细胞异质性和复杂的细胞间相互作用广泛存在，是多种组织生理状态和恶性肿瘤病理状态的基础。因此，研究病变状态下细胞亚群的表型和基因型显得尤为重要。此外，还需要在疾病进展过程中监测细胞亚群相对丰度的变化以及对治疗的反应。研究肿瘤微环境 (TME) 中细胞异质性和细胞亚群构成的重要性已得到充分证实^[1-3]。对样本细胞类群进行表征及定量分析，具有重要的临床预后价值，且有望帮助开发预测性肿瘤标志物^[4,5]。流式/质谱流式^[6,7]、免疫组化 (IHC)^[8] 和免疫荧光 (IF)^[9] 等传统方法常被用于分析组织的细胞异质性 (表 1)。然而，这些方法一次实验只能检测少量的标志物，并且往往需要在可测量的标志物数量与检测通量之间进行权衡。另外，飞行时间细胞计数法 (CyTOF)^[10] 对样品具有破坏性，且无法对样本细胞类群及各类细胞基因表达谱进行联合分析。近年来，单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 方法已成为在单细胞水平表征细胞类型组成和基因表达的一种手段。然而，scRNA-seq 的局限性在于样品前处理带来的干扰 (比如组织解离引起的细胞凋亡)，以及在进行大规模细胞分析时成本过高^[11]。类似，在常规临床护理中采集的 FFPE 组织标本，若解离成细胞悬液，则会导致部分细胞亚群丢失。

鉴于上述表征 FF 及 FFPE 样本细胞构成常规方法的技术局限性，通过组织表达谱确定细胞类型及其丰度的解卷积算法受到了广泛的关注^[1,2,12-16]。这些方法可以从测序数据中分离出标记细胞类型的特征信号。对 scRNA-seq、总表达谱的解卷积数据和 IHC 数据的比较分析表明，解卷积不受细胞分离和组织解离干扰^[17]。在这些解卷积方法中，CIBERSORT 和 CIBERSORTx 已成为用于定量分析血液和组织样品中细胞类型比例稳定而准确的工具^[3,17-28]。事实上，CIBERSORTx 最近已被评为生命科学领域发展最快的五种软件工具之一^[29]。

CiberMed 通过专有增强功能进一步优化和标准化 CIBERSORTx，并使用不同的测序平台和样品类型 (包括 FF 和 FFPE 保存状态) 验证了改进的算法。CiberMed 目前通过 iSort 数字流式分析套装中的两款旗舰产品提供两种算法 (图 1)。iSort Fractions 可以从组织或血液表达数据中可靠地确定各细胞亚群丰度，而 iSort HiRes 可以推断出细胞类型特异性基因表达谱。

表 1. 细胞分析方法的比较

	基于软件的解卷积	单细胞 RNA 测序	流式细胞术/CyTOF	IHC
通量	+++++	+	++	+++
需要组织解离	否	是	是	否
解离引入干扰	否	是	是	否
工作流程简单	+++++	+	++	++++
需要手动分析数据	否	是	是	是
细胞类型数量/细胞类型分离度	+++++	+++++	+++	+++

iSort Fractions “血液模式”通过应用成熟的 LM22 白细胞基因特征矩阵来区分 22 种血液免疫细胞亚群，进而通过总 RNA 测序数据分析各类群细胞丰度。LM22 特征矩阵已在纯白细胞亚群、血液样品和多种癌症类型的肿瘤中得到验证。CiberMed 的 iSort Fractions 组织模式使用 LM22 特征矩阵加上组织特异性特征谱来定量分析 FF 或 FFPE 生物标本 25 种细胞类型的组成和相对丰度，包括 22 种免疫亚群、成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞（细胞亚群的完整列表见表 2）^[3,27,30,47,48,49]。

在本应用简报中，我们展示了结合使用 iSort Fractions 与 Agilent SureSelect 靶向序列捕获解决方案对实体肿瘤样品进行稳定、准确且可重现的细胞分群及定量分析(图 2)。我们使用 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 靶向分析 LM22 特征矩阵中的基因以及其他组织特异基因的表达水平，并使用 iSort Fractions 组织模式区分免疫细胞（22 种）、成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞（Panel 详细信息见表 3）。评估实验入组了四对来自非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤活检的配对 FF 和 FFPE 样品。我们利用从每个样品提取的总 RNA 平行制备了三份 SureSelect XT HS2 RNA 文库，并用 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 进行靶基因富集。

表 2. 通过 iSort Fractions 的血液模式（22 种细胞类型）和组织模式（25 种细胞类型）对人细胞类型进行定量分析

亲本细胞亚群	细胞类型描述	血液	组织
B 细胞	初始 B 细胞		
	记忆 B 细胞		
浆细胞	浆细胞		
CD8 T 细胞	CD8 T 细胞		
CD4 T 细胞	初始 CD4 T 细胞		
	静息记忆 CD4 T 细胞		
	活化记忆 CD4 T 细胞		
	滤泡辅助 T 细胞		
	调节性 T 细胞 (Treg)		
γδ T 细胞	γδ T 细胞		
NK 细胞	静息 NK 细胞		
	活化 NK 细胞		
单核细胞和巨噬细胞	单核细胞		
	巨噬细胞 M0		
	巨噬细胞 M1		
	巨噬细胞 M2		
树突状细胞	静息树突状细胞		
	活化树突状细胞		
肥大细胞	静息肥大细胞		
	活化肥大细胞		
嗜酸性粒细胞	嗜酸性粒细胞		
PMN	中性粒细胞		
	成纤维细胞		
	内皮细胞		
	上皮细胞		

表 3. Panel 设计和每种设计的预期应用比较

	SureSelect CD CiberMed 组织	SureSelect CD CiberMed Heme [†]
预期应用	使用 iSort Fractions 定量表征 25 个细胞亚群（表 2）	使用 iSort Fractions 定量表征 22 个免疫细胞亚群（表 2）
样品类型	FF、FFPE	全血、PBMC
特征矩阵	LM22（免疫亚群）和 TR4（非免疫细胞类型）	LM22（免疫细胞类型）
靶标数量	1423 个基因	547 个基因
总捕获大小	5.7 Mb	1.8 Mb
建议的最小测序数据量（Reads/样本）	2 M（1 M × 2，150 bp）	500 k（250 k × 2，150 bp）

[†]如需阅读详细介绍 Agilent SureSelect CD CiberMed Heme Panel 的应用简报，请访问 www.agilent.com/cs/library/applications/ap-isort-sureselect-5994-6964en-agilent.pdf。

在所有 25 种可评估的细胞类型中，配对的 FF 和 FFPE 样品之间分析结果表现出高度一致性。使用 SureSelect CD CyberMed 组织 Panel 进行靶向 RNA 测序的一致性明显高于对相同样品的全转录组测序（图 3）。技术重复样品之间也具有出色的重现性（图 4）。由于几项专有的增强功能，我们发现 iSort Fractions 在细胞类型组成的定量分析方面优于 CIBERSORTx（图 3）。

值得注意的是，使用 SureSelect CD CyberMed 组织 Panel 进行靶向序列捕获，必需的测序数据量减少至每个样品仅 2 M (1 M × 2) reads，而全转录组测序则要求每个样品 40 M (20 M × 2) reads，是靶向序列捕获的 20 倍。综上所述，这些结果突出体现了 SureSelect/iSort 组合检测用于实体组织样品细胞类型丰度分析的准确性、可靠性和经济性。

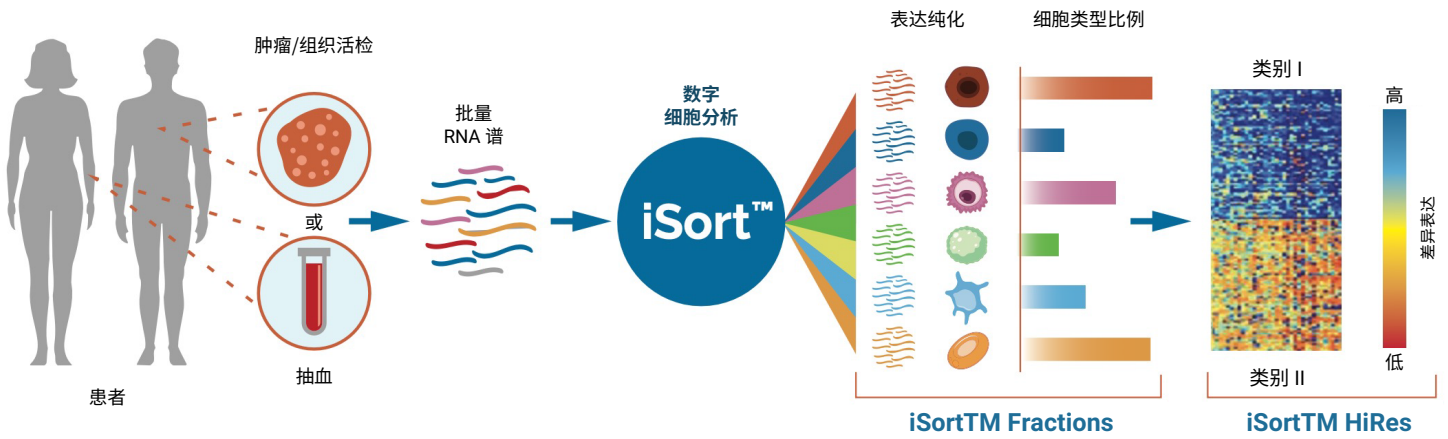


图 1. 用于数字流式分析的 iSort 算法示意图。iSort Fractions 确定细胞类型比例，iSort HiRes 根据组织表达数据确定细胞类型特异性基因表达谱

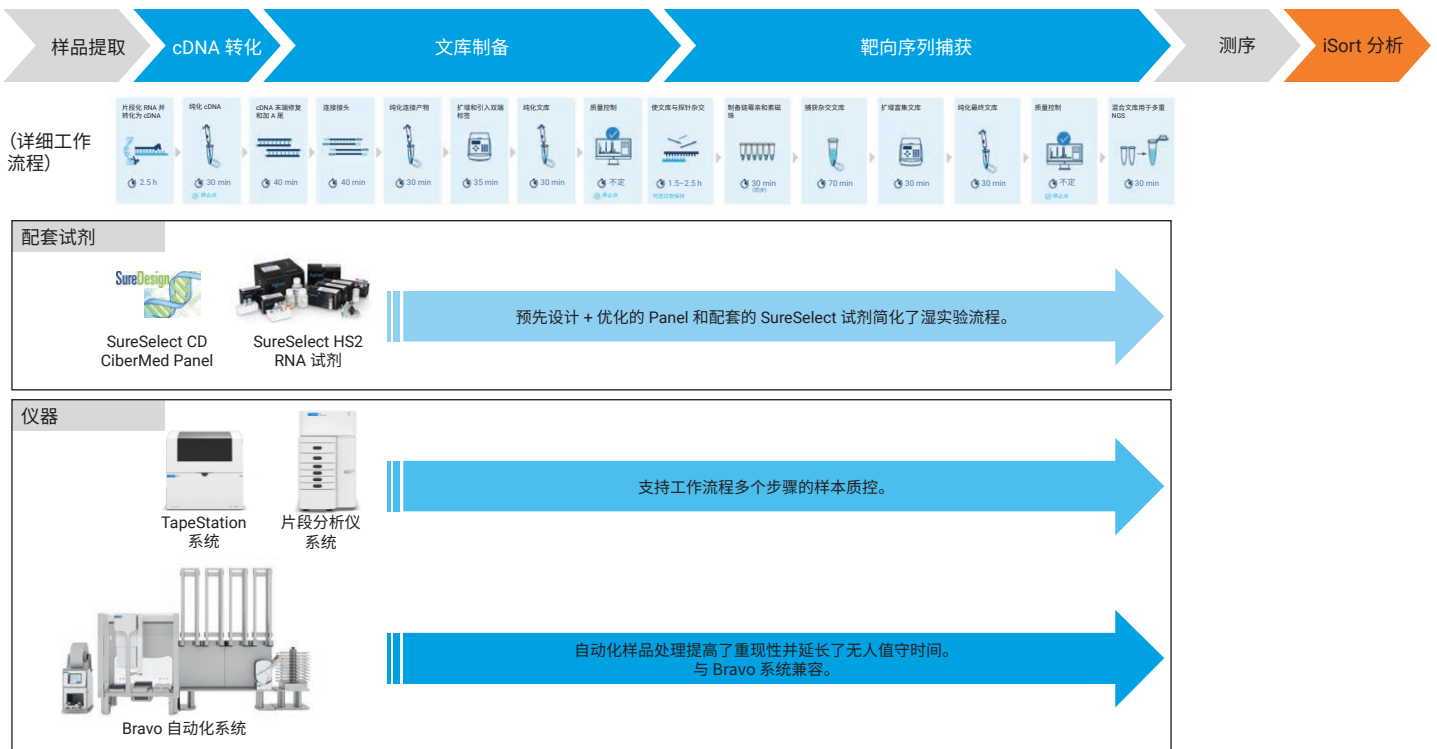


图 2. 由安捷伦的配套试剂和仪器以及 CyberMed 的集成分析解决方案支持的端到端工作流程

材料与方法

样品

四名 NSCLC 患者的配对 FF 和 FFPE 肿瘤样品采购自 Proteogenex (Inglewood, CA, USA)。使用 AllPrep DNA/RNA Micro 试剂盒 (Qiagen) 提取 FF 样品的总 RNA。使用 AllPrep DNA/RNA FFPE 试剂盒 (Qiagen) 提取一个 FFPE 样品 (FFPE-1) 的 RNA。使用 RNAsort FFPE RNA 提取试剂盒 (Biotium, 原 Cell Data Sciences) 从剩余三个 FFPE 样品中提取 RNA。使用 Agilent RNA 6000 Pico 试剂盒 (安捷伦 部件号 5067-1513) 评估 RNA 质量, 并使用 Qubit RNA HS 分析试剂盒 (赛默飞世尔科技部件号 Q32855) 测定 RNA 浓度。所有 FF 样品的 RIN 均 > 6, 而 FFPE 样品的 DV200 值为 52-82。

靶向 RNA 测序的文库制备和靶向序列捕获

按照 Agilent SureSelect XT HS2 RNA 系统用户指南 G9993-90010, 使用 Agilent Bravo NGS 工作站选项 B 进行文库制备和靶向序列捕获^[31]。采用 Agilent SureSelect XT HS2 RNA 试剂盒 G9991A 和 G9991B 为每个样品生成三个技术重复文库, 每个文库以 30 ng 总 RNA 为起始样品。采用 Agilent SureSelect XT HS2 RNA 靶向序列捕获试剂盒部件号 G9994A, 通过 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 富集样品文库。

使用 Agilent SureDesign 软件创建 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel。执行手动修正, 确保完全覆盖每个所包含基因的编码区域。

富集文库在 Illumina NovaSeq 6000 仪器上以 150 bp × 2 paired-end reads 模式进行测序。每个样品的测序总数据量约为 50 M (25 M × 2) reads, 以便在不同的覆盖深度下进行全面的性能评估。

数据处理

作为 iSort 的输入, 首先将 RNA 测序读出序列 (FASTQ 格式) 汇总为以每百万 reads 转录本数 (TPM) 为单位的基因表达值。虽然可以使用任何标准映射/比对方法来完成此过程, 但对于本文中的数据, 我们使用 Salmon v1.9^[32] 对 RNA 测序读出序列进行映射和定量。然后将 TPM 值作为 iSort Fractions v1.4 的输入, 确定每个组织样品中 25 个免疫亚群的相对占比 (表 2)。

CiberMed 软件工具 iSort Fractions 和 iSort HiRes 目前以 Docker 容器化工具的形式提供, 可在本地运行。iSort Fractions 还可通过用户友好的 Web 界面登录, 该界面可通过 AWS (Amazon Web Services) 在 <https://isort.cibermed.com> 网站安全运行。有关 iSort 数字流式分析套件的更多详细信息, 请参阅 https://isort.cibermed.com/iSort_ProductsAndServices.pdf 上的产品样本, 或直接通过 <https://cibermed.com/contact> 联系 CiberMed 咨询相关问题。

性能评估

使用 Spearman rho、Pearson r 和均方根误差 (RMSE) 评估 iSort Fractions 的准确性, 定量分析配对 FF 及 FFPE 样本组内及组间不同类型细胞占比的一致性。

Reads titration 分析

为了确定每个样品的测序通量对解卷积准确性和重现性的影响, 我们对每个样品的 paired reads 进行了随机抽样, 有效 reads 数量分别为 5 M、2 M、1 M、500 k、100 k 和 10 k。有效 reads 定义为映射到 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 中包含的基因的“在靶”reads 数量。输入 reads 按 [有效 reads 最小值]/[映射在靶率] 计算。

结果

本研究中产生的所有 RNA 测序数据均符合内部质量控制要求。

准确度

使用 iSort Fractions 组织模式分析了来自 NSCLC 肿瘤活检的四对配对 FF 和 FFPE 样品，每对样品重复分析三次，该模式可定量分析 25 种细胞类型，包括 22 种免疫细胞亚群和 3 种非免疫细胞类型：成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞。

图 3 汇总了 FF 和 FFPE 样品中 25 种细胞类型（上图）和 23 种细胞类型（下图）的 iSort Fractions 分析结果的一致性评估，后者不包括成纤维细胞和上皮细胞，以更好地显示 0%–10% 的占比丰度范围。可以看出 iSort 的性能优于 CIBERSORTx（图 3b 与图 3a），而使用 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 进行的靶向测序的性能远远优于对同样品进行的全转录组测序（图 3c 与图 3b）。这些数据表明，使用 SureSelect 和 iSort 的靶向数字流式分析可以克服与 FFPE 相关的干扰，从而对固定组织标本进行可靠的细胞分群及定量分析。

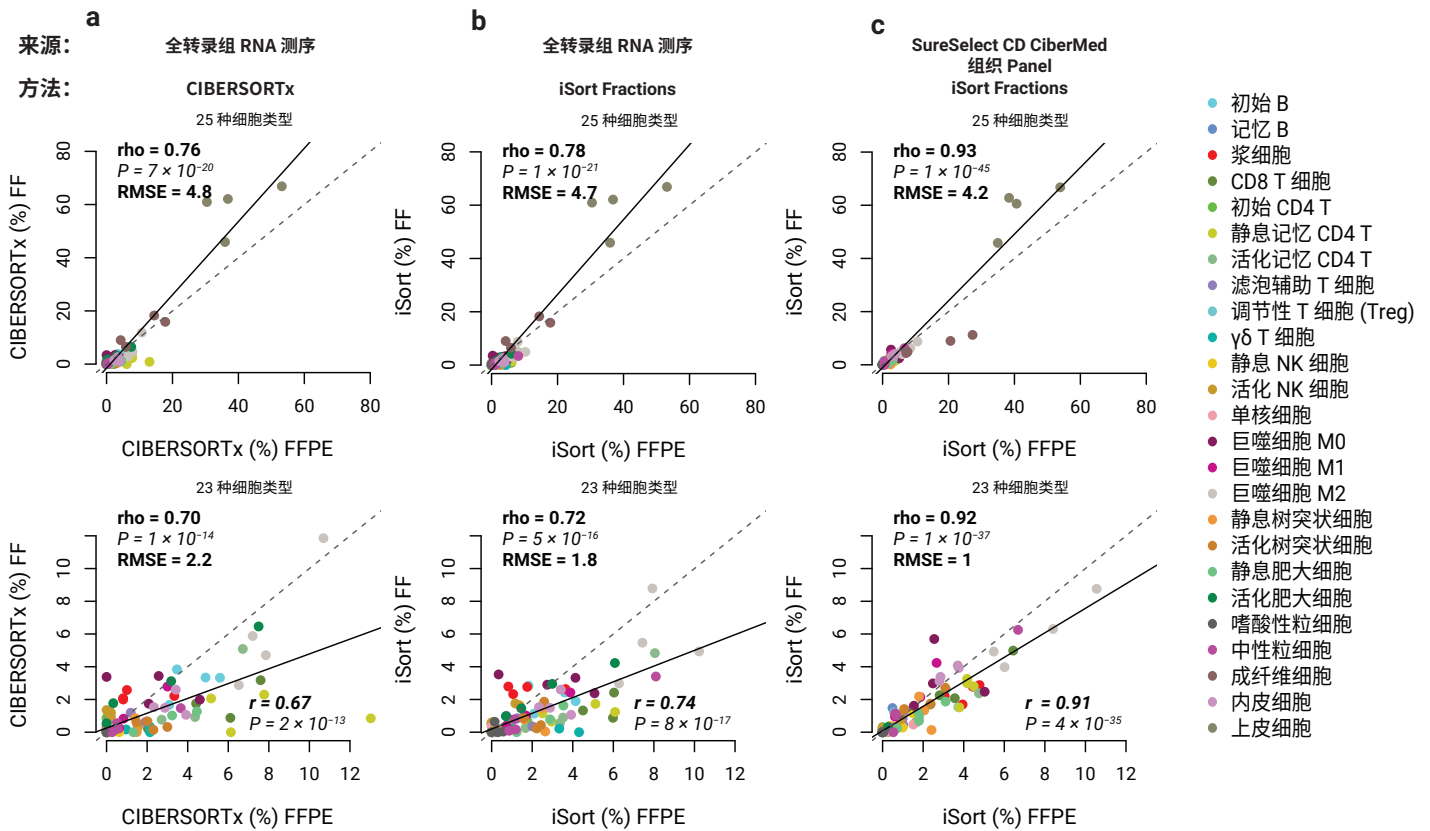


图 3. 通过对配对的 FF (y 轴) 和 FFPE (x 轴) 肿瘤表达谱 (n = 4 对) 进行解卷积确定的细胞类型占比的散点图；比较 (a) 由 CIBERSORTx 分析的全转录组测序数据、(b) 由 iSort Fractions 分析的全转录组测序数据和 (c) 由 iSort Fractions 分析的 Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 数据。结果显示所有 25 种可评估细胞类型 (上图) 和 23 种细胞类型 (下图)，下图扩大了占比丰度的下限范围 (0%–10%)。每个点代表一个按细胞类型着色的样品

重现性

图 4 总结了 FF 和 FFPE 细胞类型占比之间的样品水平一致性。在所有四个样品中，SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 的性能均优于全转录组测序。

为了评估重现性，对所有样品的 RNA 进行了三次重复处理和测序，并评估了不同技术重复样品中 iSort Fractions 结果的一致性。三个重复样品的所有成对比较结果均表现出优异的重现性，所有样品的相关性几乎完美（图 5）。

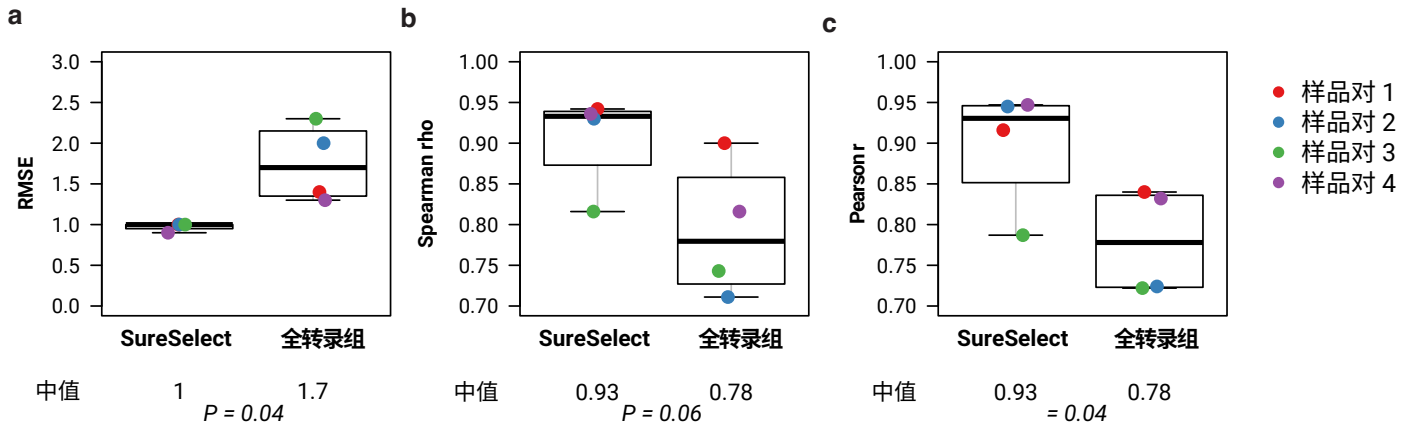


图 4. 箱线图总结了配对的 FF 和 FFPE NSCLC 标本中细胞类型占比的样品水平一致性，使用 23 种细胞类型的样品对进行分析，并通过测序分析进行分层（Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 与全转录组测序）。排除成纤维细胞和上皮细胞，重点关注丰度占比在 0%–10% 范围内的细胞类型。通过 (a) 均方根误差 (RMSE)、(b) Spearman rho 和 (c) Pearson r 评估一致性。采用双侧配对 t 检验来确定统计学意义。所有结果均使用 iSort Fractions 组织模式获得

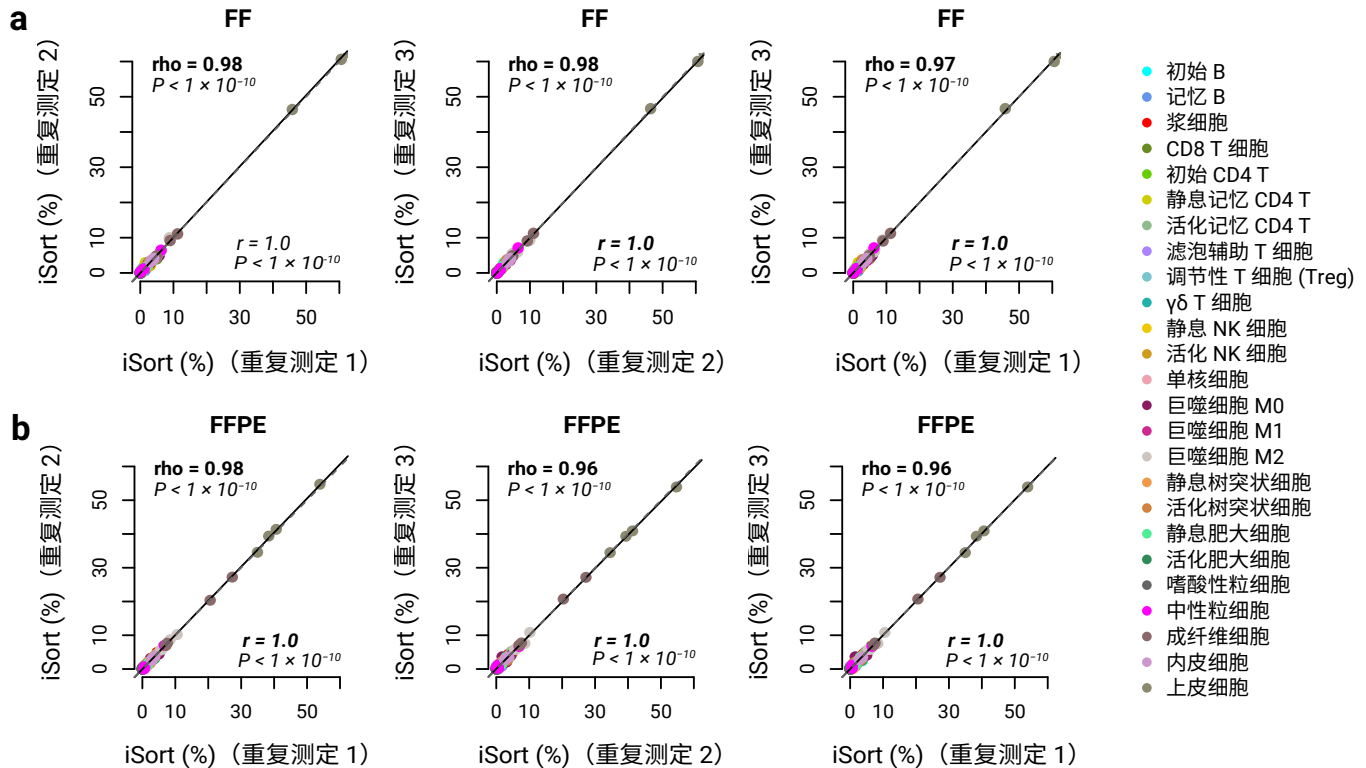


图 5. 比较测序重复样品之间 iSort Fractions 结果的散点图，显示 (a) 四个 FF 样品和 (b) 四个 FFPE 肿瘤样品。每个数据点代表一个按细胞类型着色的样品。Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 应用于所有样品

测序要求

对于 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel，样品测序的平均 reads 为 50 M (25 M × 2) 条。为了在不影响性能的情况下确定每个样品所需的最少 reads 数量，我们进行了 titration 实验。在该实验中，在运行 iSort Fractions 之前，将每个样品的有效 reads 数量向下采样至预定义数量（其中“有效 reads”仅指在靶 reads）。图 6 总结了使用预定义数量的有效 reads 的所有三个重复样品的 FF 和 FFPE 细胞类型占比之间的一致性评估结果。所有三个重复样品在有效 reads 低至 1 M (500 k × 2) 的情况下均保持准确、稳定的性能（图 6）。图 7 显示了重复样品 1 在向下采样至 1 M (500 k × 2) 条有效 reads 之前和之后的所有数据点。

根据这些数据，当使用 SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 时，预计每个样品所需的输入 reads 总数范围约为 1.3 M (假设在靶映射率为 75%) 到约 2 M (假设在靶率为 50%)。因此，保守估计每个样品的总输入 reads 为 2 M (1 M × 2) 就已足够。相比全转录组测序中为 iSort Fractions 输入至少 40 M (20 M × 2) reads，SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 可将测序成本降低 20 倍，同时实现卓越的性能。

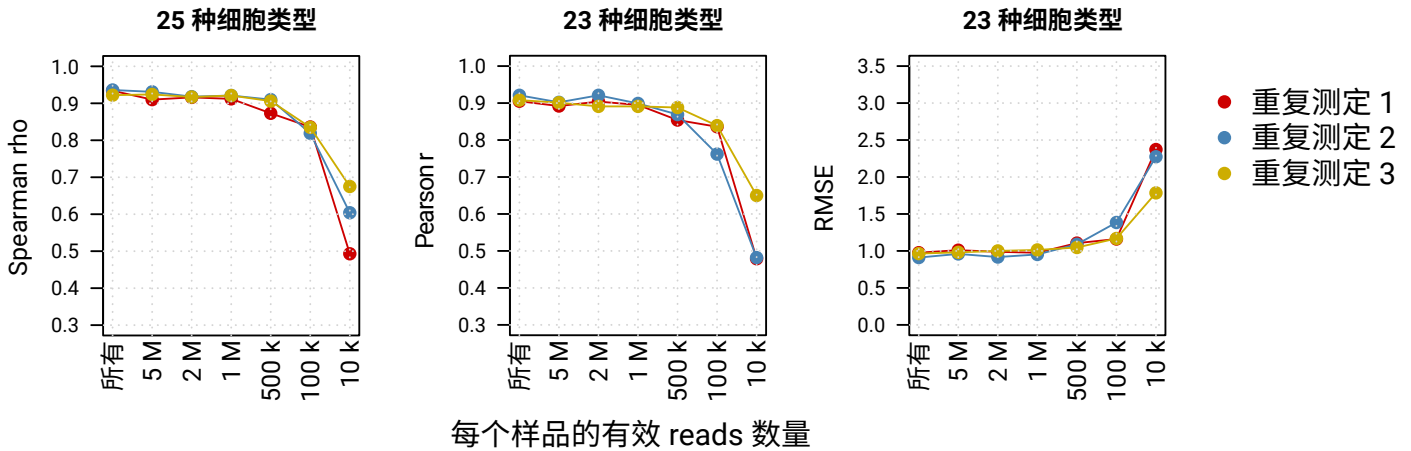


图 6. 每个样品的 reads 对 iSort Fractions 确定的 FF 和 FFPE 细胞类型比例一致性的影响。“所有”表示每个样品的所有可评估 reads。在所有三个重复样品中，Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 在每个样品的有效（“在靶”）reads 低至 1 M (500 k × 2) 时仍能保持稳定的性能。由于 Pearson r 和 RMSE 主要受大量成纤维细胞和上皮细胞的影响，因此显示时不包含这两种细胞类型。RMSE：均方根误差

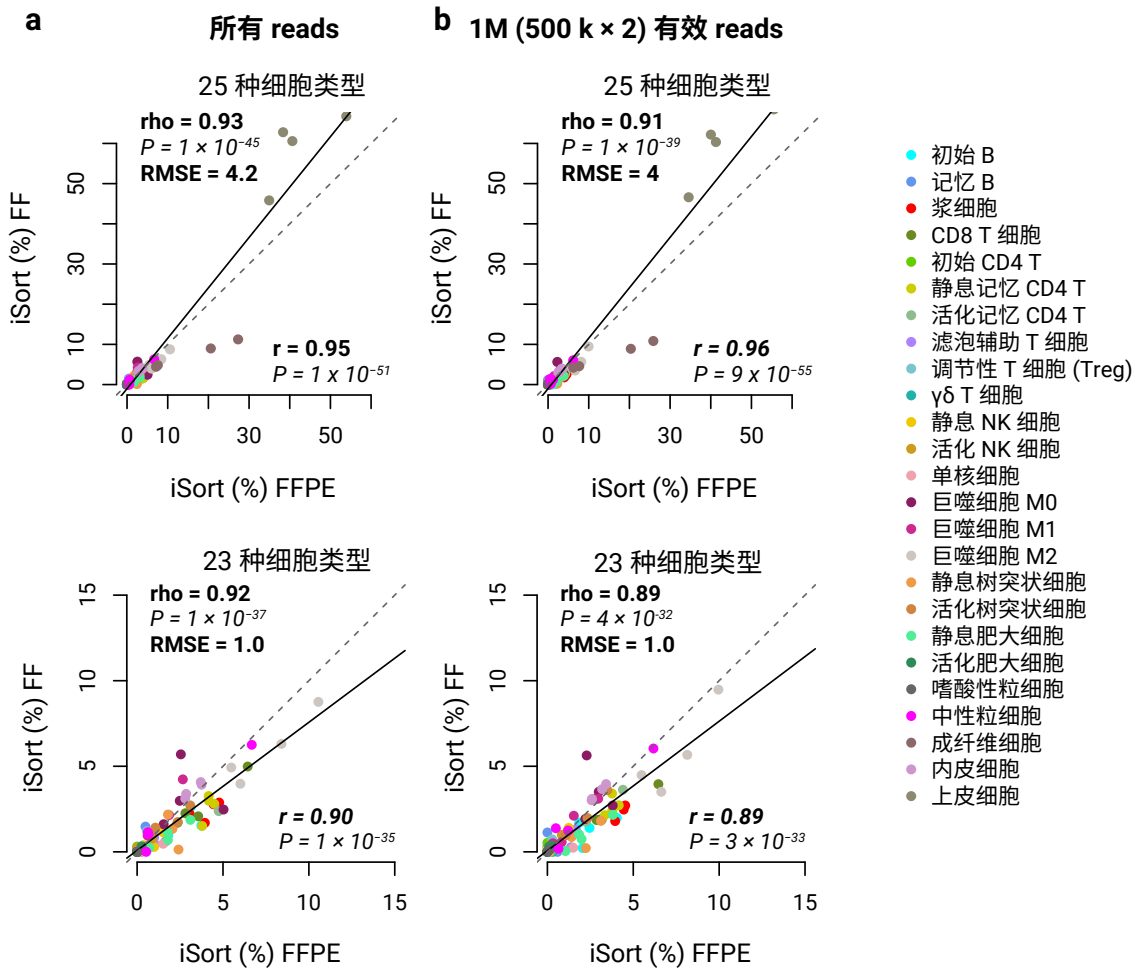


图 7. 每个样品的 reads 数量对配对 FF 和 FFPE 样品中细胞类型占比分析结果一致性的影响, 比较 (a) 每个样品的所有可评估 reads (无向下采样) 与 (b) 每个样品的 1 M (500 k × 2) 有效 reads (每个样品的在靶 reads)。显示所有 25 种细胞类型 (上图) 和 23 种细胞类型 (下图) 的结果, 后者将占比丰度范围扩大到 0%–15% 之间。每个数据点代表一个按细胞类型着色的样品。使用 Agilent SureSelect CD CiberMed 组织 Panel 对四对配对的 FF (y 轴) 和 FFPE (x 轴) 肿瘤标本进行计算

结论

在本应用简报中，我们介绍了 SureSelect CD 组织 Panel 联合 iSort (CiberMed 提供的最先进的数字流式分析软件解决方案) 分析 FF 和 FFPE 组织样品的性能特征。通过测序进行细胞分析的这一新型联合检测方法具有更高的稳定性、准确性和经济性，可使多种应用受益。其中包括常规和转化组织分析^[35]，组织表达数据的回顾性表征，以获得有关细胞组成的新见解^[1]，以及测序分析的大规模验证^[36]。其他应用包括不同生理和病理条件下细胞类型组成的总体评估，这些应用都不需要抗体、新鲜标本、活体材料或大量细胞。

如前所示，通过将 FFPE 样品与配对的 FF 进行比较，我们发现本文的方法可抵抗 FFPE 标本对数据稳定性的干扰，并能有效表征不同细胞类型在样本中的丰度。此外，Agilent SureSelect CD 组织 Panel 的性能远远优于全转录组分析，有可能大大降低测序成本。

核心 iSort 方法的实用性已在不同组织和各种癌症中得到证实^[27,30,47,48]。其效用在免疫肿瘤学^[37,38]、器官移植^[39]、心脏病学^[40]、克罗恩病^[30] 和新生儿败血症^[41] 等其他多个领域中也得到了验证。还有其他报道证明了 iSort 对其他基因组数据类型 (包括甲基化和蛋白质组学图谱) 进行解卷积的能力^[19,42]。此外，iSort 还在全血、新鲜/冰冻组织、固定肿瘤标本等不同生物样本中进行了分析验证^[27,30]。iSort 的核心算法已成为大型癌症研究项目和数据集 (如癌症基因组图谱 (TCGA)) 中解卷积的标准方法，并正在临床试验中应用^[43-46]。鉴于本文所展示的性能提升，用于数字流式分析的 SureSelect/iSort 检测方法有望促进许多令人兴奋且有影响力的未来应用。

参考文献

1. Thorsson, V.; Gibbs, D. L.; Brown, S. D.; Wolf, D.; Bortone, D. S.; Yang, T. H. O.; Porta-Pardo, E.; Gao, G. F.; Plaisier, C. L.; Eddy, J. A.; et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*. **2018**, *48* (4), P812-830. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.023>.
2. Farc, O.; Cristea, V. An Overview of the Tumor Microenvironment, from Cells to Complex Networks (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *21* (1). <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9528>
3. Newman, A. M.; Liu, C. L.; Green, M. R.; Gentles, A. J.; Feng, W.; Xu, Y.; Hoang, C. D.; Diehn, M.; Alizadeh, A. Robust Enumeration of Cell Subsets from Tissue Expression Profiles. *Nat. Methods* **2015**, *12* (5), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3337>.
4. Gentles, A. J.; Newman, A. M.; Liu, C. L.; Bratman, S. V.; Feng, W.; Kim, D.; Nair, V. S.; Xu, Y.; Khuong, A.; Hoang, C. D.; et al. The Prognostic Landscape of Genes and Infiltrating Immune Cells across Human Cancers. *Nat. Med.* **2015**, *21* (8), 938–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>.
5. Bentham, R.; Litchfield, K.; Watkins, T. B. K.; Lim, E. L.; Rosenthal, R.; Martínez-Ruiz, C.; Hiley, C. T.; Bakir, M. A.; Salgado, R.; Moore, D. A.; et al. TRACERx Consortium. Using DNA Sequencing Data to Quantify T Cell Fraction and Therapy Response. *Nature* **2021**, *597* (7877), 555–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03894-5>.
6. Herold, N. C.; Mitra, P. *Immunophenotyping*; StatPearls Publishing, **2023**.
7. Alfonso, B.-F.; Al-Rubeai, M. Flow Cytometry. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, **2011**; pp 559–578.
8. Dixon, A. R.; Bathany, C.; Tsuei, M.; White, J.; Barald, K. F.; Takayama, S. Recent Developments in Multiplexing Techniques for Immunohistochemistry. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15* (9), 1171–1186. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1069182>
9. Rashid, R.; Gaglia, G.; Chen, Y.-A.; Lin, J.-R.; Du, Z.; Maliga, Z.; Schapiro, D.; Yapp, C.; Muhlich, J.; Sokolov, A.; et al. Highly Multiplexed Immunofluorescence Images and Single-Cell Data of Immune Markers in Tonsil and Lung Cancer. *Sci. Data* **2019**, *6* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0332-y>.

10. Palit, S.; Heuser, C.; de Almeida, G. P.; Theis, F. J.; Zielinski, C. E. Meeting the Challenges of High-Dimensional Single-Cell Data Analysis in Immunology. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01515>.
11. Lähnemann, D.; Köster, J.; Szczurek, E.; McCarthy, D. J.; Hicks, S. C.; Robinson, M. D.; Vallejos, C. A.; Campbell, K. R.; Beerenwinkel, N.; Mahfouz, A.; et al. Eleven Grand Challenges in Single-Cell Data Science. *Genome Biol.* **2020**, *21* (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1926-6>.
12. Aran, D.; Hu, Z.; Butte, A. J. xCell: Digitally Portraying the Tissue Cellular Heterogeneity Landscape. *Genome Biol.* **2017**, *18* (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1349-1>.
13. Racle, J.; Gfeller, D. EPIC: A Tool to Estimate the Proportions of Different Cell Types from Bulk Gene Expression Data. In *Bioinformatics for Cancer Immunotherapy*; Springer US: New York, NY, **2020**; Vol. 2120, pp 233–248.
14. Li, B.; Li, T.; Liu, J. S.; Liu, X. S. Computational Deconvolution of Tumor-Infiltrating Immune Components with Bulk Tumor Gene Expression Data. In *Bioinformatics for Cancer Immunotherapy*; Springer US: New York, NY, **2020**; Vol. 2120, pp 249–262.
15. Becht, E.; Giraldo, N. A.; Lacroix, L.; Buttard, B.; Elarouci, N.; Petitprez, F.; Selves, J.; Laurent-Puig, P.; Sautès-Fridman, C.; Fridman, W. H.; de Reyniès, A. Estimating the Population Abundance of Tissue-Infiltrating Immune and Stromal Cell Populations Using Gene Expression. *Genome Biol.* **2016**, *17* (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1070-5>.
16. Shen-Orr, S. S.; Tibshirani, R.; Butte, A. J. Gene Expression Deconvolution in Linear Space. *Nat. Methods* **2012**, *9* (1), 9–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1831>.
17. 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.; et al. Determining Cell Type Abundance and Expression from Bulk Tissues with Digital Cytometry. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37* (7), 773–782. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0114-2>.
18. Bionetworks, S. Synapse. Synapse.org. <https://www.synapse.org/> (accessed 2023-10-30).
19. Nadel, B. B.; Oliva, M.; Shou, B. L.; Mitchell, K.; Ma, F.; Montoya, D. J.; Mouton, A.; Kim-Hellmuth, S.; Stranger, B. E.; Pellegrini, M.; Mangul, S. Systematic Evaluation of Transcriptomics-Based Deconvolution Methods and References Using Thousands of Clinical Samples. *Brief. Bioinform.* **2021**, *22* (6). <https://doi.org/10.1093/bib/bbab265>.
20. Avila Cobos, F.; Alquicira-Hernandez, J.; Powell, J. E.; Mestdagh, P.; De Preter, K. Benchmarking of Cell Type Deconvolution Pipelines for Transcriptomics Data. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19015-1>.
21. Le, T.; Aronow, R. A.; Kirshtein, A.; Shahriyari, L. A Review of Digital Cytometry Methods: Estimating the Relative Abundance of Cell Types in a Bulk of Cells. *Brief. Bioinform.* **2021**, *22* (4). <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa219>.
22. Chen, B.; Khodadoust, M. S.; Liu, C. L.; Newman, A. M.; Alizadeh, A. A. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. In *Methods in Molecular Biology*; Springer New York: New York, NY, **2018**; Vol. 1711, pp 243–259.
23. Sutton, G. J.; Poppe, D.; Simmons, R. K.; Walsh, K.; Nawaz, U.; Lister, R.; Gagnon-Bartsch, J. A.; Voineagu, I. Comprehensive Evaluation of Deconvolution Methods for Human Brain Gene Expression. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28655-4>.
24. Breen, M. S.; Ozcan, S.; Ramsey, J. M.; Wang, Z.; Ma'ayan, A.; Rustogi, N.; Gottschalk, M. G.; Webster, M. J.; Weickert, C. S.; Buxbaum, J. D.; Bahn, S. Temporal Proteomic Profiling of Postnatal Human Cortical Development. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0306-4>.
25. Li, L.; Shen, L.; Ma, J.; Zhou, Q.; Li, M.; Wu, H.; Wei, M.; Zhang, D.; Wang, T.; Qin, S.; Xing, T. Evaluating Distribution and Prognostic Value of New Tumor-Infiltrating Lymphocytes in HCC Based on a scRNA-Seq Study with CIBERSORTx. *Front. Med. (Lausanne)* **2020**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00451>.
26. Newman, A.M.; Gulati, S.G.; Clarke, M.F.; Sikandar, S.S. Methods Utilizing Single Cell Genetic Data for Cell Population Analysis and Applications Thereof. US202003700112 A1, November 26, **2020**.

27. Newman, A. M.; Nakao, A.; Li, K.; Liu, C.-L.; Mathi, K.; Sigal, N.; Maecker, H.; Diehn, M.; Alizadeh, A. A. Analytical Validation of Digital Cytometry (iSort) for Leukocyte Enumeration Using Stored Blood. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38* (15_suppl), 3542–3542. https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.3542.
28. Chakravarthy, A.; Furness, A.; Joshi, K.; Ghorani, E.; Ford, K.; Ward, M. J.; King, E. V.; Lechner, M.; Marafioti, T.; Quezada, S. A.; Thomas, G. J.; Feber, A.; Fenton, T. R. Pan-Cancer Deconvolution of Tumour Composition Using DNA Methylation. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05570-1>.
29. Hutson, M. Hunting for the Best Bioscience Software Tool? Check This Database. *Nature* **2023**. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-00053-w>.
30. Chen, H.; Chen, C.; Yuan, X.; Xu, W.; Yang, M.-Q.; Li, Q.; Shen, Z.; Yin, L. Identification of Immune Cell Landscape and Construction of a Novel Diagnostic Nomogram for Crohn's Disease. *Front. Genet.* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00423>.
31. A, V. Agilent.com. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9993-90010.pdf> (accessed 2023-10-30).
32. Patro, R.; Duggal, G.; Love, M. I.; Irizarry, R. A.; Kingsford, C. Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression. *Nat. Methods* **2017**, *14* (4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.
33. Dobin, A.; Davis, C. A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29* (1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
34. Li, B.; Dewey, C. N. RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.
35. Orange, D. E.; Yao, V.; Sawicka, K.; Fak, J.; Frank, M. O.; Parveen, S.; Blachere, N. E.; Hale, C.; Zhang, F.; Raychaudhuri, S.; et al. RNA Identification of PRIME Cells Predicting Rheumatoid Arthritis Flares. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383* (3), 218–228. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2004114>.
36. Gohil, S. H.; Iorgulescu, J. B.; Braun, D. A.; Keskin, D. B.; Livak, K. J. Applying High-Dimensional Single-Cell Technologies to the Analysis of Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18* (4), 244–256. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00449-x>.
37. Nabet, B. Y.; Esfahani, M. S.; Moding, E. J.; Hamilton, E. G.; Chabon, J. J.; Rizvi, H.; Steen, C. B.; Chaudhuri, A. A.; Liu, C. L.; Hui, A. B.; et al. Noninvasive Early Identification of Therapeutic Benefit from Immune Checkpoint Inhibition. *Cell* **2020**, *183* (2), 363–376.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.001>.
38. Lozano, A. X.; Chaudhuri, A. A.; Nene, A.; Bacchiocchi, A.; Earland, N.; Vesely, M. D.; Usmani, A.; Turner, B. E.; Steen, C. B.; Luca, B. A.; et al. T Cell Characteristics Associated with Toxicity to Immune Checkpoint Blockade in Patients with Melanoma. *Nat. Med.* **2022**, *28* (2), 353–362. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01623-z>.
39. Huang, S.; Chen, H.; Guo, Z.; He, X. A Comprehensive Cibersort Study and Gene-Expression Based Transcriptomic Analysis on Patterns of Immune Infiltration in Ischemia-Reperfusion Injury Livers Post Liver Transplantation. *Transplantation* **2020**, *104* (S3), S195–S195. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000699368.56252.17>.
40. Journal-of-cardiology.com. [https://www.journal-of-cardiology.com/article/S0914-5087\(20\)30289-6/fulltext](https://www.journal-of-cardiology.com/article/S0914-5087(20)30289-6/fulltext) (accessed 2023-10-30).
41. Jiang, Z.; Luo, Y.; Wei, L.; Gu, R.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Zhang, S. Bioinformatic Analysis and Machine Learning Methods in Neonatal Sepsis: Identification of Biomarkers and Immune Infiltration. *Biomedicines* **2023**, *11* (7), 1853. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071853>.
42. Voss, M. H.; Buros Novik, J.; Hellmann, M. D.; Ball, M.; Hakimi, A. A.; Miao, D.; Margolis, C.; Horak, C.; Wind-Rotolo, M.; De Velasco, G.; et al. Correlation of Degree of Tumor Immune Infiltration and Insertion-and-Deletion (Indel) Burden with Outcome on Programmed Death 1 (PD1) Therapy in Advanced Renal Cell Cancer (RCC). *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36* (15_suppl), 4518–4518. https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.4518.

43. Metzger Filho, O.; Stover, D. G.; Asad, S.; Ansell, P. J.; Watson, M.; Loibl, S.; Geyer, C. E.; O'Shaughnessy, J.; Untch, M.; Rugo, H. S.; et al. Immunophenotype and Proliferation to Predict for Response to Neoadjuvant Chemotherapy in TNBC: Results from BrighTNess Phase III Study. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37* (15_suppl), 510–510. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.510.
44. CTG labs - NCBI. Clinicaltrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03979508> (accessed 2023-10-30).
45. Clinicaltrials.gov. https://classic.clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/10/NCT03955510/Prot_000.pdf (accessed 2023-10-30).
46. Medjebbar, S.; Richard, C.; Fumet, J.-D.; Malo, J.; Elkrief, A.; Blais, N.; Tehfe, M.; Florescu, M.; Boidot, R.; Truntzer, C.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Prescription Is Associated with Decreased Progression-Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) in Patients with Lung Cancers Treated with PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockers. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37* (15_suppl), e20512–e20512. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e20512
47. Steen, C. B.; Liu, C. L.; Alizadeh, A. A.; Newman, A. M. Profiling Cell Type Abundance and Expression in Bulk Tissues with CIBERSORTx. *Methods in Molecular Biology* **2020**, 135–157. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0301-7_7
48. Craven, K. E.; Gökmen-Polar, Y.; Badve, S. S. CIBERSORT Analysis of TCGA and METABRIC Identifies Subgroups with Better Outcomes in Triple Negative Breast Cancer. *Scientific Reports* **2021**, *11* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83913-7>
49. Newman, A.M. et al, *J. Clinical Oncology*, 38, Supp. e15243 (**2020**) https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15243

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

PR7001-2303

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2024
2024年3月20日, 中国出版
5994-7248ZHCN