

空间组学技术在头颈部肿瘤个体化诊疗中的研究进展*

徐晨阳¹ 王寅¹ 魏东敏¹ 李文明¹ 钱晔¹ 潘新良¹ 雷大鹏¹

[摘要] 空间组学是继单细胞测序技术之后的另一个生物技术研究热点,其能够弥补单细胞测序技术无法获取细胞空间分布信息的缺陷。空间组学主要研究细胞在组织样品中的相对位置关系,以揭示细胞空间分布关系对疾病的影响。近年来,空间组学在头颈肿瘤的发生机制、靶点探索、药物研发等诸多方面有了新的进展,本文围绕空间组学技术在头颈肿瘤诊疗多方面的最新进展做一概述。

[关键词] 空间组学;头颈肿瘤;个体化诊疗

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2023.09.008

[中图分类号] R739.6 **[文献标志码]** A

Advances of spatial omics in the individualized diagnosis and treatment of head and neck cancer

XU Chenyang WANG Yin WEI Dongmin LI Wenming QIAN Ye

PAN Xinliang LEI Dapeng

(Department of Otorhinolaryngology, Qilu Hospital of Shandong University, National Health Commission Key Laboratory of Otorhinolaryngology[Shandong University], Jinan, 250012, China)

Corresponding author: LEI Dapeng, E-mail:leidapeng@sdu.edu.cn

Abstract Spatialomics is another research hotspot of biotechnology after single-cell sequencing technology, which can make up for the defect that single-cell sequencing technology can not obtain cell spatial distribution information. Spatialomics mainly studies the relative position of cells in tissue samples to reveal the effect of cell spatial distribution on diseases. In recent years, spatialomics has made new progress in the pathogenesis, target exploration, drug development and many other aspects of head and neck tumors. This paper summarizes the latest progress of spatialomics in the diagnosis and treatment of head and neck cancer.

Key words spatialomics; head and neck cancer; individualized diagnosis and treatment

头颈肿瘤(head and neck cancer, HNC)是全球第6大最常见的癌症,且发病率逐年上升,每年新增约108万例^[1-3],最常见类型为头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC),占有头颈部恶性肿瘤的90%以上^[4]。头颈癌是一种异质性疾病,可累及头颈部区域内的多个部位,例如鼻旁窦、鼻腔、口腔、咽、喉、唾液腺和甲状腺。同时,不同部位的头颈癌组织学类型差异也很大,例如,口咽黏膜癌分为角化型鳞癌、非角化型鳞癌和腺样囊性癌^[5],常见的甲状腺癌病理组织学为乳头状癌、滤泡状癌、髓样癌和未分化癌^[6]。然而,复杂的空间异质性成为当前有效治疗HNC患者的主要障碍^[7]。

空间组学技术是指利用在单细胞或亚细胞分

辨率水平捕获的高通量空间分布信息差异,进行空间异质量化、空间域识别和差异微环境分析,探究基因组、转录组、蛋白组、代谢组信息等在细胞状态及组织形态变化的空间异质性^[8]。空间组学技术的诞生使肿瘤及瘤周细胞的分布特点、免疫环境状态、应激水平以及细胞之间相互作用有了全新的、精准的研究方法。本文旨在讨论空间组学在HNC个体化诊疗中的研究进展,从空间异质性的角度探索HNC的诊疗靶点。

1 空间组学概述

在过去5年间,单细胞转录组分析技术(scRNA-seq)的蓬勃发展彻底改变了我们评估细胞异质性的方式,该类技术可以基于转录组信息对细胞类型进行精细划分,揭示了肿瘤组织与非肿瘤组织在细胞和分子水平的动态性和多样性^[9-10]。尽管在肿瘤分子生物学和细胞生物学领域取得了革命性的突破,这类技术并未在高分辨率下揭示不

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:82071918)

¹山东大学齐鲁医院耳鼻咽喉科,国家卫生健康委员会耳鼻喉科学重点实验室(山东大学)(济南,250012)

通信作者:雷大鹏, E-mail:leidapeng@sdu.edu.cn

同细胞类型的空间分布关系,不同类型的细胞之间的互动方式也尚不明确^[11]。同时,肿瘤细胞与微环境中的免疫细胞是否存在竞争或协作关系,血管内皮细胞在特定区域内如何促进肿瘤细胞增殖和转移,细胞内基质如何促使肿瘤发生免疫逃逸等诸多与空间异质性相关的问题尚未解决^[12]。空间组学技术可以更深入地了解组织内感兴趣区域(ROI)中的肿瘤细胞及微环境各组分的相互作用。在此背景下,我们回顾了近年来空间组学在 HNC 中的应用进展,总结归纳早期诊断和个体化治疗的重要手段。

2 HNC 空间基因组学研究进展

2.1 空间基因组学概述

作为最早被提出的一门交叉生物学学科,基因组学主要研究生物体内基因组的结构、功能、进化、定位和编辑等,以及它们对生物体的影响,从而对生物体所有基因进行体表征、定量研究及不同基因组间的比较研究。2009 年单细胞测序技术的问世将基因组学研究推进到空间层面,科研人员可以通过对特定肿瘤区域的单个细胞的遗传信息测序分析,在分子水平充分了解肿瘤内各类细胞间的基因组差异及他们在微环境中的可能存在的相互作用。

2.2 空间基因组学在头颈部肿瘤的研究现状

Qi 等^[13]的头颈鳞状细胞癌的单细胞测序报告中发现,HNC 患者的非肿瘤细胞可以按细胞类型分为 8 个大类:T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞和肌细胞。然而,到目前为止计算分析发现,这些非肿瘤细胞的差异表达基因并未完全按照细胞的起源进行聚类,这表明了肿瘤微环境各组分间存在空间异质性,也说明了不同患者的基因组表达更加多样化。因此,单个细胞的特定空间环境的治疗靶点成为科研人员的研究热门方向。Yost 等^[14]结合使用单细胞转录组测序(scRNA-seq)和单细胞 T 细胞受体测序(TCR-seq)对基底细胞癌进行研究,表明肿瘤相关成纤维细胞(CAF)在肿瘤发生、肿瘤存活、细胞外基质重构、免疫系统抑制、肿瘤侵袭中的作用。Leung 等^[15]专注于单细胞基因组测序(scRNA-seq)、外显子组测序和靶向深度测序,研究了 2 例结直肠癌患者转移过程中的细胞克隆及分化。这项研究强调,了解肿瘤中单细胞水平的克隆性对于同时捕获和维持空间信息至关重要。Nichterwitz 等^[16]报道了一种称为地形图单细胞测序(TSCS)的方法,该方法结合使用激光捕获显微切割技术(LCM)和单细胞基因组测序来测量乳腺癌患者中单个肿瘤细胞的基因组拷贝数概况。这种方法保留了单个细胞的空间环境,这对于特定位置的治疗靶向策略至关重要。尽管以上研究并非针对 HNC 空间基因组进行,但它们成功地提出了应对

与空间组学分析相关挑战的策略。

3 HNC 空间转录组学研究进展

3.1 空间转录组学概述

转录组学作为一门在整体水平上研究细胞中基因转录情况及转录调控规律的学科,已经成为当下在 RNA 水平研究基因表达情况的主流手段之一。常规转录组测序和单细胞转录组测序无法还原细胞所处的原始位置信息,而传统的原位杂交技术又很难实现高通量检测。近年来兴起并发展的空间转录组学技术弥补了这一局限^[17],并在肿瘤空间异质性的研究中发挥了重要的作用。目前已经开发出了多种空间转录组学技术,包括以单分子荧光原位杂交技术(smFISH)^[18]和多重容错性荧光原位杂交(MERFISH)^[19]为主的转录组空间定位技术,和以原位测序技术(ISS)^[20]和原位转录组测序(slide-seq)^[21]、高分辨率空间转录组技术(HDST)^[22]为主的转录组测序技术。目前可以大范围商用空间转录组学技术包括 10XGenomics 公司的 Visium 技术^[23]、Nanostring 公司的 GeoMx^[24]和 CosMx^[25]技术,通过将冷冻的组织切片定位到排列有反转录引物与独特的定位条形码阵列的特殊载玻片上,最终提供高质量的转录组数据以及它们完整的二维位置信息。目前,这项技术已经在乳腺癌^[26]、黑色素瘤^[27]、前列腺癌^[28]、胰腺癌^[29]、头颈癌^[30]和心脏疾病^[31]等多种肿瘤或疾病的空间异质性研究中取得进展。

3.2 空间转录组学在头颈部肿瘤的应用

空间转录组学使我们对 HNC 的病理特征与基因表达的相关性有了全新的认识。肿瘤基因组图谱(TCGA)将肿瘤基因组分为经典型、间充质型、基础型和非典型^[32]。最近的一项研究通过对头颈鳞癌的组织芯片进行 HPV 原位杂交,按照 HPV 相关性对 HNC 重新分为 5 个亚型:HPV+ 间充质型、HPV- 间充质型、HPV+ 经典型、HPV- 经典型和基础亚型。结合生物信息学分析得出,无论 HPV 状态如何,与烟草使用相关的基因组突变在经典亚型中高表达,这说明了缺氧可能是导致 HPV 相关 HNC 发生发展的关键因素^[33]。Brooks 等^[30]为探究缺氧对肿瘤进展的机制,对 163 例口咽鳞癌的石蜡包埋组织切片(FFPE)样本进行免疫浸润相关的 CD3⁺和缺氧调控蛋白 LAG3 多重免疫荧光处理后,使用空间转录组测序技术对基因表达进行量化,结果发现,缺氧^高/免疫^低组相对缺氧^低/免疫^高组在一部分基因中表现出很大的差异,包括 CA9、SLC2A1 (GLUT1) 和 SLC16A1 (MCT1),其产物大多参与 pH 调节和葡萄糖代谢,缺氧特征中代表的 26 个基因中的 23 个在缺氧^低/免疫^高和缺氧^高/免疫^低或混合亚组之间表现出显著差异表达,这给予我们从代谢干预水平治疗 HPV

相关 HNC 新的方向。Schmidt 等^[34]对 142 例口腔鳞癌患者的组织切片使用 S100 和细胞角蛋白抗体染色区分肿瘤区域与神经浸润区域,评估了神经截面直径和神经到肿瘤的距离,并对距离肿瘤不同距离的神经进行空间转录组学分析。结果表明,人类肿瘤切片中神经的空间转录组学分析显示基因表达梯度取决于神经-肿瘤距离。此外,转录组数据揭示了对肿瘤的增殖、侵袭和免疫反应有关的基因在更接近肿瘤的神经中表达上调。在体外培养的神经元细胞系中,神经元细胞显著上调 *Anxa2*、*Cfl1*、*Marcks* 和 *Hnrnpa1*,并下调 *Pdcd2*,这与患者转录组数据一致。Schwann 细胞上调 *Fabp5* 并下调 *Mbp* 和 *Pdcd2*,这也与空间转录组数据一致。由于轴突可以从体细胞延伸超过 1 米到神经支配部位,因此神经元高度分隔并在轴突中表达转录基因以促进对局部环境的快速反应^[35-36]。例如,转录水平受细胞外信号的调节,并导致损伤部位蛋白质的快速翻译^[37-38]。神经转录组的研究结果促使我们开发针对微小神经肿瘤的精准治疗与个性化治疗。

4 HNC 空间蛋白组学研究进展

4.1 空间蛋白组学概述

空间蛋白组学技术是通过获得组织空间层面的蛋白定位表达谱对蛋白质定位、蛋白质相关基因表达通路、蛋白质-蛋白质相互作用、组织微环境等解析,在蛋白水平反映肿瘤组织空间变化的组学分析技术^[39]。近 5 年间出现的多重免疫荧光显微成像技术、超微结构蛋白质定量测序技术、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术等将空间蛋白组学研究推向了亚细胞级^[40]。目前,针对蛋白组开发的空间检测技术颇多,根据定量方法的差异可以分为两大类:基于测序的空间蛋白组学技术和基于质谱的空间组学技术。

4.2 空间蛋白组在头颈部肿瘤的应用

4.2.1 基于测序的 HNC 空间蛋白组学 基于组织样本的蛋白组数字空间分析(DSP)是当前主流的空间蛋白组测序分析方法。该方法使用寡核苷酸标签对蛋白质进行多重标记,利用光裂解接头将亲和抗体链接到寡核苷酸标签上,然后将切割光束投射到组织样本上,在覆盖 1~5 000 个细胞的感兴趣区域(ROI)中以待研究空间的模式释放寡核苷酸。DSP 能够在 ROI 内实现单细胞水平的抗体计数,并可以使用 nCounter 系统对靶蛋白及靶基因的空间分析^[41]。然而,DSP 不仅可以用于分析组织芯片样本中的蛋白质和 RNA,还可以用于分析患者样本中的免疫标记,不论是在肿瘤免疫微环境研究,还是生物标志物筛查方向,都具有重要的实用价值。近几年国内外学者也尝试将 DSP 技术在 HNC 领域应用,Kulasinghe 等^[42]对 2 例口咽鳞癌患者的未染色肿瘤组织载玻片进行 DSP 分析发

现,PD-L1 均在 2 例患者的肿瘤 ROI 中高表达,在同一患者的免疫细胞区域,发现 PD-1 的蛋白质表达较低,但 PD-L1 较高。2 例患者在发生区域转移后均接受了 ICI 治疗(Nivolumab 和 Pembrolizumab),ICI 治疗后肿瘤区域 PD-L1 表达较低,且具有低中度肿瘤突变负荷(TMB)^[43]。通过 NanoString GeoMx™ DSP 数据分析显示,免疫细胞类型蛋白质标记物(CD4、CD68、CD45、CD44、CD66b)与口咽癌疾病进展有关。这些免疫标志物从空间蛋白组学的角度,为 HNC 的免疫治疗提供了重要信息。

4.2.2 基于质谱的 HNC 空间蛋白组学 质谱分析(Mass Spectrometry,MS)是对小分子蛋白质的相对分子量测定、化学式的确定及结构鉴定最常用的方法。基质辅助激光解析电离质谱成像技术(MALDI-MSI)是近年来发展起来的一种新型的质谱成像分析方法^[44]。该技术能在冷冻切片或石蜡包埋组织切片上使用二次离子质谱对激光激发后的抗体进行成像,理论上一次可鉴定 50~100 个多肽^[45]。同时,组织切片图像可以通过光栅扫描同时生成,使质谱定量及定性分析数据与蛋白空间位置一一对应^[46]。基于质谱的空间蛋白组学已被证明可以在胃癌、肝癌、肺癌等多种实体瘤中解决异质组织标本中蛋白质空间模式的复杂性,HNC 也有相关报道^[47-48]。Chi 等^[49]使用 MALDI-MSI 对 11 个头颈部新鲜冷冻组织切片样本进行蛋白质分析,其中包含 2 例正常下咽黏膜,1 例 II 期、1 例 III 期和 1 例 IV 期下咽癌组织样本,结果发现 TMSB4X 是 HNC 的潜在标志物,且其在 MALDI 图像中呈现其信号强度与癌症分期之间的正相关。在后续的验证实验中,在 HNSCC 细胞系中沉默 TMSB4X 降低了肿瘤的增殖和侵袭能力,在体外及体内试验中证实了 TMSB4X 抑制淋巴结转移的作用。该研究用空间蛋白组学发现了治疗 HNC 的潜在靶点。Piga 等^[50]的工作证实了 MALDI-MSI 能够根据空间蛋白质组学特征揭示不同类别的非浸润甲状腺肿瘤(NIFTP)的存在,散发结节型、嗜酸性细胞分化型和普通型 NIFTP 具有很大的空间异质性。此外,该研究还利用质谱成像分析了 RAS 突变和 RAS 野生型 NIFTP 在蛋白质组学图谱中的异质性,给甲状腺癌精准分型和个体化诊疗指明了新的方向。

5 HNC 空间代谢组学研究进展

5.1 空间代谢组学概述

空间代谢组学技术是指利用质谱成像技术对不同组织中的代谢物进行定性、定量、定位三个维度的分析技术^[51]。细胞代谢水平的改变是大多数癌症的特征^[52]。在现代肿瘤研究中,小分子代谢产物研究可能为了解肿瘤组织中不同生物途径、酶

和小分子之间的相互作用提供了新的视角^[53]。空间代谢组学的出现提供了检测小分子代谢物在微环境定位和解剖学关联的机会^[54]。

5.2 空间代谢组在 HNC 的应用

有研究表明,以赖氨酸为主的某些氨基酸是口咽鳞状细胞癌潜在的手术安全切缘生物标志物^[54]。为探索口咽鳞癌中赖氨酸代谢重编程相关靶点,Sun 等^[55]收集了包含手术切缘的肿瘤组织和对应的癌旁组织标本,8 例进行基于气相色谱-质谱(GC-MS)的非靶向代谢分析,20 例用于超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)靶向代谢组学定量分析,通过检测代谢产物在肿瘤细胞、成纤维细胞和肿瘤浸润淋巴细胞中的空间表达模式,证实了调控赖氨酸羧化的关键酶——2-酮戊二酸-5-双加氧酶 2(PLOD2)的上调与口咽鳞癌的增殖、转移有关,有望成为治疗原发性口咽鳞癌的新靶点。Schmidt 等^[56]使用质谱成像和免疫组织化学技术筛选并鉴定了头颈鳞状细胞癌中一系列蛋白质和脂质,并发现头颈鳞癌增殖和侵袭可能依赖于溶血磷脂的供应。此外,空间代谢组学还可用于定量评估药物分布和疗效,Menetrey 等^[57]创新性的使用定量质谱成像(QMSI)和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)在头颈鳞癌快速冰冻切片上的肿瘤组织、正常上皮、唾液腺、肌肉、神经和血管区域测定凋亡蛋白拮抗剂 xevinapant(Debio 1143)抑制剂浓度,在空间维度证实了 xevinapant 对肿瘤组织的高亲和力。

6 空间组学肿瘤研究的挑战与展望

空间组学技术将生物体内关键信息投射到组织区域空间水平,提供了肿瘤空间异质性研究方法。基于病变组织不同分子水平的多重分析研究进展将会推动病理学诊断向着精准化、个体化发展。然而,当前的技术仍有诸多问题亟待解决,例如固定组织中遗传物质的降解,切片厚度仍达不到单层细胞水平,细胞色素沉着干扰图像分析等,因此多组学空间分析技术仍然是未来几十年转化医学研究中最激动人心的挑战之一。当前,空间组学的大多数研究展示出了对肿瘤异质性全新的生物学见解,更广泛地采用空间组学技术无疑会带来新的癌症诊断和治疗手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Berthiller J, Straif K, Agudo A, et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis [J]. *Int J Epidemiol*, 2016, 45(3): 835-845.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(10): 777-789.
- Concu R, Cordeiro M. Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer [J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, 18(3): 192-198.
- 李江, 张春叶. 口腔癌及口咽癌病理诊断规范 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2020, 18(4): 289-296.
- 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 甲状腺癌诊疗指南(2022 年版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(12): 1343-1357, 1363.
- Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(1): 11-26.
- Yuan Z, Li Y, Shi M, et al. SOTIP is a versatile method for microenvironment modeling with spatial omics data [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7330.
- Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(5): 257-272.
- 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.
- Fang R, Xia C, Close JL, et al. Conservation and divergence of cortical cell organization in human and mouse revealed by MERFISH [J]. *Science*, 2022, 377(6601): 56-62.
- Lewis SM, Asselin-Labat ML, Nguyen Q, et al. Spatial omics and multiplexed imaging to explore cancer biology [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(9): 997-1012.
- Qi Z, Barrett T, Parikh AS, et al. Single-cell sequencing and its applications in head and neck cancer [J]. *Oral Oncol*, 2019, 99: 104441.
- Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2019, 25(8): 1251-1259.
- Leung ML, Davis A, Gao R, et al. Single-cell DNA sequencing reveals a late-dissemination model in metastatic colorectal cancer [J]. *Genome Res*, 2017, 27(8): 1287-1299.
- Nichterwitz S, Chen G, Aguila Benitez J, et al. Laser capture microscopy coupled with Smart-seq2 for precise spatial transcriptomic profiling [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12139.
- Burgess DJ. Spatial transcriptomics coming of age [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 317.
- Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, et al. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells [J]. *Science*, 2015, 348(6233): aaa6090.
- Moffitt JR, Bambach-Mukku D, Eichhorn SW, et al. Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region [J]. *Science*, 2018, 362(6416): eaau5324.

- [20] Ke R, Mignardi M, Pacureanu A, et al. In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(9):857-860.
- [21] Stickels RR, Murray E, Kumar P, et al. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(3):313-319.
- [22] Vickovic S, Eraslan G, Salmén F, et al. High-definition spatial transcriptomics for in situ tissue profiling [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(10):987-990.
- [23] Eltager M, Abdelaal T, Mahfouz A, et al. scMoC: single-cell multi-omics clustering [J]. *Bioinform Adv*, 2022, 2(1):vbac011.
- [24] Hernandez S, Lazcano R, Serrano A, et al. Challenges and Opportunities for Immunoprofiling Using a Spatial High-Plex Technology: The NanoString GeoMx® Digital Spatial Profiler [J]. *Front Oncol*, 2022, 12:890410.
- [25] Tang Z, Zhang T, Yang B, et al. spaCI: deciphering spatial cellular communications through adaptive graph model [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 24(1):bbac563.
- [26] Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics [J]. *Science*, 2016, 353(6294):78-82.
- [27] Thrane K, Eriksson H, Maaskola J, et al. Spatially Resolved Transcriptomics Enables Dissection of Genetic Heterogeneity in Stage III Cutaneous Malignant Melanoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(20):5970-5979.
- [28] Berglund E, Maaskola J, Schultz N, et al. Spatial maps of prostate cancer transcriptomes reveal an unexplored landscape of heterogeneity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2419.
- [29] Moncada R, Barkley D, Wagner F, et al. Author Correction: Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(12):1476.
- [30] Brooks JM, Menezes AN, Ibrahim M, et al. Development and Validation of a Combined Hypoxia and Immune Prognostic Classifier for Head and Neck Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(17):5315-5328.
- [31] Asp M, Giacomello S, Larsson L, et al. A Spatiotemporal Organ-Wide Gene Expression and Cell Atlas of the Developing Human Heart [J]. *Cell*, 2019, 179(7):1647-1660.
- [32] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Nature*, 2015, 517(7536):576-582.
- [33] Keck MK, Zuo Z, Khattri A, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4):870-881.
- [34] Schmitd LB, Perez-Pacheco C, Bellile EL, et al. Spatial and Transcriptomic Analysis of Perineural Invasion in Oral Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(16):3557-3572.
- [35] Zivraj KH, Tung YC, Piper M, et al. Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(46):15464-15478.
- [36] Holt CE, Martin KC, Schuman EM. Local translation in neurons: visualization and function [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(7):557-566.
- [37] Willis DE, van Niekerk EA, Sasaki Y, et al. Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(6):965-980.
- [38] Mofatteh M. mRNA localization and local translation in neurons [J]. *AIMS Neurosci*, 2020, 7(3):299-310.
- [39] Thul P J, Åkesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome [J]. *Science*, 2017, 356(6340):eaal3321.
- [40] Kretz R, Walter L, Raab N, et al. Spatial Proteomics Reveals Differences in the Cellular Architecture of Antibody-Producing CHO and Plasma Cell-Derived Cells [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(10):100278.
- [41] Merritt CR, Ong GT, Church SE, et al. Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5):586-599.
- [42] Kulasinghe A, Taheri T, OByrne K, et al. Highly Multiplexed Digital Spatial Profiling of the Tumor Microenvironment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:607349.
- [43] Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2):202-206.
- [44] Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):100-111.
- [45] Ahmed M, Broeckx G, Baggerman G, et al. Next-generation protein analysis in the pathology department [J]. *J Clin Pathol*, 2020, 73(1):1-6.
- [46] Wang N, Li X, Wang R, et al. Spatial transcriptomics and proteomics technologies for deconvoluting the tumor microenvironment [J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(9):e2100041.
- [47] Erich K, Reinle K, Müller T, et al. Spatial Distribution of Endogenous Tissue Protease Activity in Gastric Carcinoma Mapped by MALDI Mass Spectrometry Imaging [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(1):151-161.
- [48] Marko-Varga G, Fehniger TE, Rezel M, et al. Drug localization in different lung cancer phenotypes by MALDI mass spectrometry imaging [J]. *J Proteomics*, 2011, 74(7):982-992.
- [49] Chi LH, Chang WM, Chang YC, et al. Global Proteomics-based Identification and Validation of Thymosin Beta-4 X-Linked as a Prognostic Marker for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9031.

- CALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10166): 51-60.
- [29] Rischin D, King M, Kenny L, et al. Randomized Trial of Radiation Therapy With Weekly Cisplatin or Cetuximab in Low-Risk HPV-Associated Oropharyngeal Cancer (TROG 12.01)-A Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021, 111(4): 876-886.
- [30] Yom SS, Torres-Saavedra P, Caudell JJ, et al. Reduced-Dose Radiation Therapy for HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma (NRG Oncology HN002) [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(9): 956-965.
- [31] Chera BS, Amdur RJ, Green R, et al. Phase II Trial of De-Intensified Chemoradiotherapy for Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(29): 2661-2669.
- [32] Tsai CJ, McBride SM, Riaz N, et al. Evaluation of Substantial Reduction in Elective Radiotherapy Dose and Field in Patients With Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Carcinoma Treated With Definitive Chemoradiotherapy[J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(3): 364-372.
- [33] Misiukiewicz K, Gupta V, Miles BA, et al. Standard of care vs reduced-dose chemoradiation after induction chemotherapy in HPV+ oropharyngeal carcinoma patients; The Quarterback trial[J]. *Oral Oncol*, 2019, 95: 170-177.
- [34] Marur S, Li S, Cmelak AJ, et al. E1308: Phase II Trial of Induction Chemotherapy Followed by Reduced-Dose Radiation and Weekly Cetuximab in Patients With HPV-Associated Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx-ECOG-ACRIN Cancer Research Group[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(5): 490-497.
- [35] Villaflor VM, Melotek JM, Karrison TG, et al. Response-adapted volume de-escalation (RAVD) in locally advanced head and neck cancer [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(5): 908-913.
- [36] Ferris RL, Flamand Y, Weinstein GS, et al. Phase II Randomized Trial of Transoral Surgery and Low-Dose Intensity Modulated Radiation Therapy in Resectable p16 + Locally Advanced Oropharynx Cancer: An ECOG-ACRIN Cancer Research Group Trial (E3311) [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(2): 138-149.
- [37] Swisher-McClure S, Lukens JN, Aggarwal C, et al. A Phase 2 Trial of Alternative Volumes of Oropharyngeal Irradiation for De-intensification (AVOID): Omission of the Resected Primary Tumor Bed After Transoral Robotic Surgery for Human Papilloma Virus-Related Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020, 106(4): 725-732.
- [38] Seiwert TY, Foster CC, Blair EA, et al. OPTIMA: a phase II dose and volume de-escalation trial for human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(10): 1673.
- [39] Price K, Van Abel KM, Moore EJ, et al. Long-Term Toxic Effects, Swallow Function, and Quality of Life on MC1273: A Phase 2 Study of Dose De-escalation for Adjuvant Chemoradiation in Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2022, 114(2): 256-265.
- [40] Owadally W, Hurt C, Timmins H, et al. PATHOS: a phase II/III trial of risk-stratified, reduced intensity adjuvant treatment in patients undergoing transoral surgery for Human papillomavirus (HPV) positive oropharyngeal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 602.

(收稿日期: 2023-07-18)

(上接第 733 页)

- [50] Piga I, Capitoli G, Clerici F, et al. Molecular trait of follicular-patterned thyroid neoplasms defined by MALDI-imaging [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2020, 1868(11): 140511.
- [51] 王希, 汤冬娥, 蔡晚霞, 等. 空间代谢组学研究进展 [J]. *临床医学工程*, 2021, 28(S1): 36-40.
- [52] Sullivan LB, Gui DY, Vander Heiden MG. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 680-693.
- [53] He MJ, Pu W, Wang X, et al. Comparing DESI-MSI and MALDI-MSI Mediated Spatial Metabolomics and Their Applications in Cancer Studies [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 891018.
- [54] Yang XH, Zhang XX, Jing Y, et al. Amino acids signatures of distance-related surgical margins of oral squamous cell carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 81-91.
- [55] Sun Y, Wang S, Zhang X, et al. Identification and Validation of PLOD2 as an Adverse Prognostic Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1842.
- [56] Schmidt J, Kajtár B, Juhász K, et al. Lipid and protein tumor markers for head and neck squamous cell carcinoma identified by imaging mass spectrometry [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(28): 2702-2717.
- [57] Menetrey A, Legouffe R, Haouala A, et al. Tumor Distribution by Quantitative Mass Spectrometry Imaging of the Inhibitor of Apoptosis Protein Antagonist Xevinapant in Patients with Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (EudraCT Number: 2014-004655-31) [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(36): 12333-12341.

(收稿日期: 2023-06-20)