

# 单细胞测序技术在生殖研究中的应用

高山凤<sup>1</sup> 肖轩<sup>1</sup> 张玲羽<sup>1</sup> 倪磊<sup>1</sup> 刘利英<sup>2</sup> 韩林<sup>2</sup> 杨娟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西安交通大学医学部基础医学院细胞生物学与遗传学系, 西安 710061;

<sup>2</sup>西安交通大学医学部生物医学实验中心, 西安 710061)

**摘要** 细胞是生命的基本单位, 而异质性是细胞的自然属性之一。获得单细胞水平的序列及表达信息对研究新型细胞、个体发育、器官发生、疾病发展进程及其关键信号通路等具有重要的意义。现今社会, 生活压力及社会竞争日益加剧, 不孕不育等问题逐渐凸显, 为家庭及社会带来沉重的负担。生殖细胞和胚胎的正常发育是生命延续的基础, 如何运用科学技术解决不孕不育等生殖问题成为当前的研究热点。随着测序技术的快速发展, 组学研究突飞猛进, 单细胞测序技术的出现, 为样本量较少的生殖细胞和胚胎干细胞的研究提供了新方法。近年来, 在单细胞测序技术的推动下, 生殖研究领域涌现出众多新的发现, 该文简要总结单细胞测序技术近年来的发展历程, 及其在生殖医学领域的研究应用。

**关键词** 单细胞测序技术; 生殖细胞; 辅助生殖

## The Application of Single-Cell Sequencing Technology in Reproductive Research

GAO Shanfeng<sup>1</sup>, XIAO Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Lingyu<sup>1</sup>, NI Lei<sup>1</sup>, LIU Liying<sup>2</sup>, HAN Lin<sup>2</sup>, YANG Juan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and Genetics, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China; <sup>2</sup>Biomedical Experiment Center, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China)

**Abstract** Cell is the basic unit of life. Heterogeneity is one of the basic properties of cell. Getting the sequence and expression information at the single-cell level is of great significance for studying the new types of cells, ontogeny, organogenesis, disease development and the key signaling pathways. Nowadays, infertility and other diseases are being seriously with the increasing of pressure and social competition, which causes heavy burden to many families. The normal development of germ cells and embryos is the basic condition for reproduction. How to solve the problem of reproduction has become a research hot-spot. With the rapid development of sequencing technology as well as omics researches, single-cell sequencing technology provides a new method for reproductive researches, especially for germ cells and embryo cells with small sample sizes. In recent years, driven by single-cell sequencing technology, there have been many new advances in the field of reproduction research. The current review has summarized the development of single-cell sequencing technology and its application in the field of reproduction in recent years.

**Keywords** single-cell sequencing technology; germ cells; assisted reproductive technology

生殖是遗传物质自然传递和筛选的重要方式。研究显示, 目前全球有10%~15%的夫妇受到不孕不

育的影响。导致夫妇生殖困难的原因众多, 例如激素问题、生理因素、性问题、生活方式、遗传因

收稿日期: 2020-06-02 接受日期: 2020-08-06

国家自然科学基金(批准号: 81671445)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 029-82655077, E-mail: yangjuan0112@xjtu.edu.cn

Received: June 2, 2020

Accepted: August 6, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671445)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-82655077, E-mail: yangjuan0112@xjtu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5413>

素等<sup>[1]</sup>。目前解决不孕不育的主要手段为辅助生殖技术<sup>[2]</sup>,但辅助生殖的活体分娩率仅为35%左右,存在较大的失败风险。此外,生殖缺陷也是当前面临的一个重要的生殖问题,我国生殖缺陷发生率约为5.6%,因此,生育前或移植前的胚胎诊断就变得尤为重要<sup>[3]</sup>。然而基于对胚胎后期健康发育的考虑,检测时应尽量取用最少量的胚胎细胞,但这会引起样本量过少的问题<sup>[4]</sup>。而单细胞测序是一种专门针对少量细胞进行精确基因检测的新兴技术,在生殖研究领域具有广泛的应用前景。

单细胞测序是在单细胞水平上完成细胞基因组、转录组或蛋白组测序,在多重组学皆获得相应的信息,以揭示细胞群体差异和细胞进化关系。传统测序技术获得的某个组织或器官的基因表达信息为多个细胞的平均值,无法分析少量细胞。与传统测序技术相比,单细胞测序技术在突出单个细胞之间的异质性方面具有很大优势<sup>[5]</sup>。2009年, TANG等<sup>[6]</sup>首次建立单细胞 mRNA测序全转录组的分析方法。LAO等<sup>[7]</sup>研究显示,在单细胞分辨率下进行基因表达谱分析是可行的,并且成熟的卵母细胞中大量的转座子和重复基因的转录异常上调。随着单细胞RNA测序技术的成功研发,科学家们得以获得单细胞图谱,解析单细胞的生物特性<sup>[8]</sup>。继人类基因组计划后,2016年10月,科学界正式发起了“人类细胞图谱(Human Cell Atlas, HCA)”的国际合作研究计划,采用特定的分子表达谱来确定构成人体的所有细胞的类型<sup>[8]</sup>。单细胞测序技术可实现对组织中的单个细胞进行测序,并获得单细胞水平的转录组或

基因组图谱<sup>[9]</sup>。

单细胞测序技术的出现加深了生命科学研究的深度,利用该技术不仅可以获取生物异质性信息,而且还便于对低数量的生物材料展开研究。利用该技术可以对肿瘤细胞进行分型,获取肿瘤内细胞异质性的信息<sup>[10]</sup>;也可借助该技术探索胚胎干细胞的分化命运,从而追踪生命的发生发展;通过单细胞测序技术,还可以构建新的生物系统进化树,追踪物种进化历程。自2011年单细胞测序技术被称为最有价值的技术以来,新的研究成果层出不穷,现将基于测序和质谱技术的单细胞分析方法、单细胞测序的主要过程及其在生殖发育领域中的应用总结如下。

## 1 单细胞分析方法

根据目前单细胞分析技术的应用,我们将单细胞单组学分析方法分为四类(图1):基于测序技术的单细胞基因组测序分析、单细胞转录组测序分析、单细胞表观修饰组学、以及基于质谱技术的单细胞蛋白组分析。多种技术相结合的多组学分析也是目前单细胞分析中常用的手段。

### 1.1 单细胞单组学分析

1.1.1 单细胞全基因组测序 单细胞全基因组测序是在单细胞分离技术基础之上,获取单个细胞全基因组DNA,扩增后完成测序,从而获得单个细胞的全部基因信息,该技术常被用于获取细胞之间异质性信息和探索细胞群体之间的进化关系<sup>[11]</sup>。ANDOR等<sup>[12]</sup>使用单细胞DNA测序方法来表征9个胃癌细胞系的细胞多样性,并将这一信息与单细胞

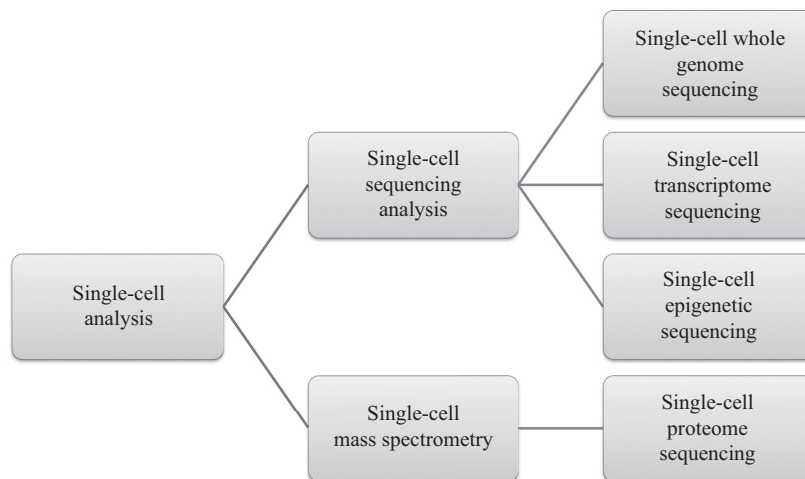


图1 单细胞单组学分析

Fig.1 The single-cell single-omics analysis

RNA测序相结合,独立地证实了88%的单细胞克隆结构。但通常一个细胞内只有1~2个DNA拷贝,所以单细胞全基因组扩增技术的发展较慢<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 单细胞转录组测序** 转录组广义上指某一研究对象在特定时间和环境内所有转录产物的总和,包括编码RNA和非编码RNA;狭义上指所有mRNA的总和<sup>[14]</sup>。单细胞RNA测序技术需要获取单个细胞的全部转录产物,构建成cDNA文库,然后再进行测序,从而获得单细胞的转录组图谱,该方法可以准确地辨别处于不同状态或发展阶段的细胞,揭示其基因表达的动态变化<sup>[15]</sup>。为了尽可能多的捕获单细胞转录产物,通常实验中会选择将转录产物反转录成cDNA<sup>[13]</sup>。2018年,WAGNER等<sup>[16]</sup>在研究中应用单细胞RNA测序对斑马鱼胚胎发育第一天的92 000个细胞进行测序,并构建了斑马鱼完整的细胞分化轨迹。

**1.1.3 单细胞表观修饰组分析** 在研究癌症和干细胞时,研究者发现即使来源于同一细胞克隆的细胞群体也会存在较大的差异性,而表观修饰是细胞异质性产生的一个重要原因。单细胞表观遗传测序是结合单细胞测序方法,来捕获DNA甲基化、染色质修饰、组蛋白修饰、染色体构象和复制动态以及非编码RNA修饰等的一种新方法。GUO等<sup>[17]</sup>开发了一种适合在单细胞水平上进行DNA甲基化分析的技术,并且通过该技术成功检测到了小鼠胚胎干细胞和单细胞精子中独立的CpG位点<sup>[17]</sup>。单细胞表观遗传测序可以帮助我们更好地理解表观遗传机制与基因调控错综复杂的关系。在疾病诊治中,单细胞表观遗传还可被用于定义细胞功能亚群和预测细胞微环境<sup>[18]</sup>。ZHAO等<sup>[19]</sup>为探索体外受精的胚泡来源的质量差异,利用单细胞全基因组甲基化测序技术进行分析,研究结果显示,卵母细胞体外成熟或玻璃化会显著损害DNA甲基化,造成胚胎质量下降。

**1.1.4 单细胞蛋白质组分析** 单细胞蛋白质分析是在单细胞分离技术的基础上,利用质谱技术来解析蛋白质的氨基酸序列<sup>[20-21]</sup>。由于蛋白质结构本身的复杂性和蛋白质胞外扩增受限,因此解析单细胞蛋白质组要比解析单细胞基因组和转录组困难,随着研究技术的进展,单细胞蛋白质组分析也取得了很大的进展。基于流式细胞技术或化学细胞术完成单细胞分离<sup>[26]</sup>,利用质谱鉴定平台可以完成少量细

胞的蛋白质分析<sup>[22]</sup>。XU等<sup>[23]</sup>开发了单细胞化学蛋白质组学方法,利用活性分子探针技术,对单细胞内部和膜表面蛋白进行识别标记,待细胞破碎后进行标记蛋白分离,并利用该方法发现了G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)家族中低拷贝的 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)受体GABAB亚家族成员。对细胞膜表面蛋白的分子探针进行跨膜改造后,可以将其用来表征位于细胞溶酶体中的功能蛋白<sup>[24]</sup>。虽然单细胞蛋白质组测序目前已经取得了一些研究成果,但针对性更强、应用范围更广的单细胞蛋白质组分析方法还有待进一步开发。

## 1.2 单细胞多组学分析

在多组学时代,存在许多研究基因组、转录组、蛋白质组和表观遗传修饰的方法。最初,组学的研究是对于多细胞或复杂组织的探究,从而产生平均效应,这种效应可能会掩盖多层数据之间的直接相关性<sup>[25]</sup>。但在单细胞水平上进行多组学分析就可以消除这种平均效应<sup>[26]</sup>。多组学分析有助于我们从不同分子水平对同一生命现象进行验证和探索,探讨各细胞基因组、转录组、蛋白质组和表观遗传之间的关系。除此之外,单细胞多组学分析降低了技术噪音和生物噪音对单一组学数据获取的影响,增加了数据分析的可靠性。

近几年,单细胞多组学测序分析技术也已经被应用到生殖研究领域。2017年,北京大学汤富酬团队<sup>[27]</sup>开发了一种单细胞表观多组学测序技术(single-cell COOL sequencing, scCOOL-seq),可以同时分析单细胞的染色质状态,染色体倍性,核小体定位、DNA甲基化、拷贝数变异,并利用该技术解析了植入前小鼠胚胎发育过程中染色质状态和DNA甲基化的动态变化。GU等<sup>[28]</sup>对scCOOL-seq技术进行了改进,开发了iscCOOL-seq(improved single-cell COOL sequencing)技术,揭示了小鼠卵母细胞生长过程中的表观遗传改变和全能性的建立。联合单细胞转录组和甲基化测序,分析诱导多能干细胞,结果表明,基于基因组特征和DNA甲基化信息可以准确预测外显子的不同剪接模式<sup>[29]</sup>。生殖细胞和胚胎细胞的多组学分析,有助于我们深入探索表观遗传调控和染色质动态变化在细胞全能性维持和细胞发育中的重要意义。基于测序技术和质谱技术的单细胞多组学分析,将为我们揭开更多的生殖奥秘,解决更多的生殖难题。

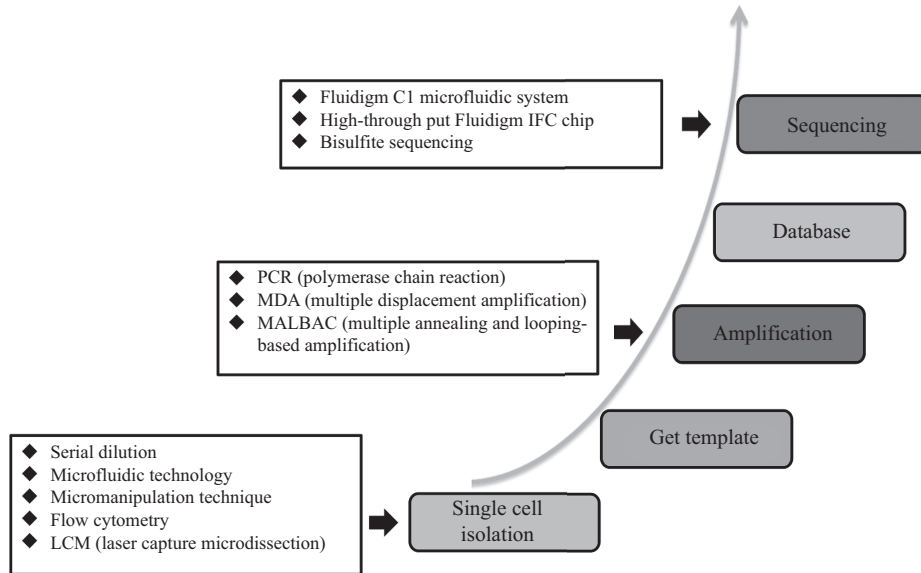


图2 单细胞测序技术的流程图

Fig.2 Flow chart of single-cell sequencing technology

## 2 单细胞测序的流程

单细胞测序的主要流程包括: 单细胞分离、扩增、建库、测序(图2)。

单细胞分离: 迄今为止, 常用的单细胞分离方法有连续稀释法<sup>[30]</sup>、显微操作分离法<sup>[18]</sup>、流式细胞分离技术<sup>[32]</sup>、微流控技术<sup>[18,32-34]</sup>和激光捕获显微切割术<sup>[31]</sup>等。

扩增: 由于单细胞基因组DNA水平低至6 pg, 每个基因只含有2个拷贝数, 所以必须进行基因组扩增<sup>[35]</sup>。三种常用的扩增方法为聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、多重置换扩增(multiple placement amplification, MDA)和多重退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)<sup>[36]</sup>。最早在2002年, 就有研究团队开发出了MDA技术, 利用Phi29DNA聚合酶和随机六聚体引物, 在常温下即可实现扩增, 但是此方法的扩增均匀性不高<sup>[31]</sup>。2012年, ZONG等<sup>[36]</sup>开发了MALBAC技术, 使用该技术对人类细胞进行扩增和测序, 基因组覆盖率可达93%。

建库: 模板扩增后, 扩增产物就构成了一个高通量测序的基因文库。通过单细胞转录组测序构建的测序文库是cDNA文库, 从单细胞中获取mRNA后, 将其反转录成cDNA, 之后将cDNA扩增形成单细胞RNA测序文库<sup>[37]</sup>。单细胞全基因组测序文库是DNA文库, 将单细胞DNA纯化后, 利用MDA和MALBAC法进行扩增, 就完成了单细胞DNA建库。

测序: 在单细胞DNA或RNA测序文库构建完成后, 利用各种测序方法, 获取全基因组或转录组碱基序列, 分析基因的表达遗传修饰。利用RNA-Seq技术<sup>[38]</sup>完成单细胞转录组测序任务。Fluidigm C1微流体系统<sup>[39]</sup>和High-through put Fluidigm IFC芯片技术<sup>[40]</sup>的引入提升了细胞检测的容量和效率。除此之外, 亚硫酸氢盐测序(single-cell reduced representation bisulfite sequencing, scRRBS)技术, 主要被用来检测细胞的表现遗传修饰, 尤其是细胞的DNA甲基化水平<sup>[41]</sup>。此外, 还可以同时进行多组学测序, 利用DR-seq测序方法可同时进行单细胞DNA和mRNA测序, 单细胞三重组学测序(single-cell triple omics sequencing, scTrio-seq)可同时检测单细胞内的基因组、转录组和表现遗传修饰的信息<sup>[42-43]</sup>。

## 3 单细胞测序技术在生殖研究中的应用

单细胞测序技术现已经被广泛地应用在干细胞研究、疾病病程监控等各个方面。生殖生物学是单细胞测序技术最早运用的领域, 其中仍有诸多问题亟待探索, 如生殖细胞的形成、早期胚胎发育和细胞命运决定。接下来从精子、卵细胞发育和着床前胚胎发育以及辅助生殖这几个方面来探讨单细胞测序在生殖领域的应用(图3)。

### 3.1 精子的发育

精子作为男性生殖细胞, 对生命物质的传递具

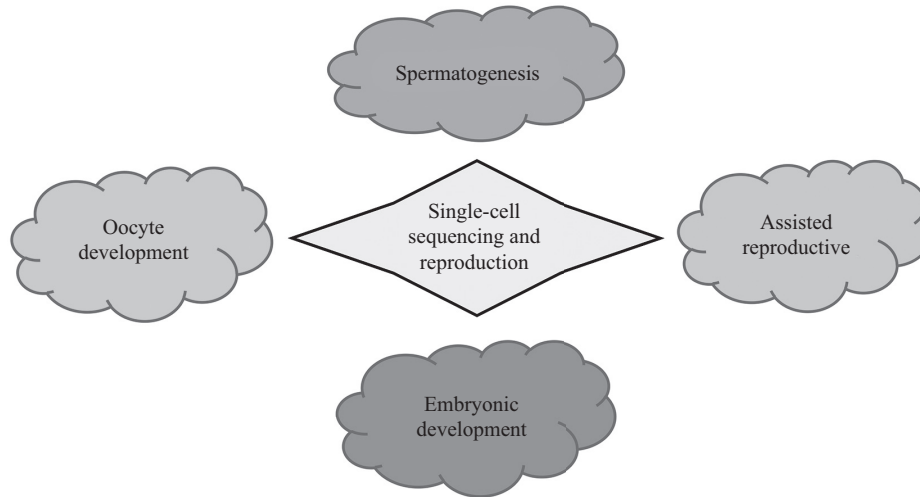


图3 单细胞测序技术在生殖研究领域的应用

Fig.3 Application of single-cell sequencing technology in the field of reproductive research

有重要的作用。当前男性问题造成的不育在所有不孕不育案例中所占比例高达20%~30%，而引起男性不育的主要原因是精子功能异常，所以对精子发育过程的监测，有助于解决男性问题引起的不育症。

通过单细胞测序完成了精子基因图谱的绘制。早在2012年，就有研究团队对超过100个人类精子进行了单细胞全基因组测序，利用其中91个精子的数据构建了个体精子重组图谱，通过比较个体精子和二倍体细胞基因组序列，观察到单倍体精子染色体发生重组的位点，并且在精子中发现二倍体细胞中不存在的碱基突变<sup>[44]</sup>。2018年，WANG等<sup>[45]</sup>通过对男性的睾丸组织细胞进行单细胞转录组测序分析，揭示了人类精子发育轨迹并首次完成精子基因表达图谱的绘制。

通过单细胞测序技术发现了一些与精子发育相关的基因和分子。FANG等<sup>[46]</sup>对A-激酶锚定蛋白4(A-kinase anchoring protein 4, *AKAP4*)敲除小鼠和正常小鼠进行睾丸单细胞RNA测序分析，发现*AKAP4*与精子形态、运动和精子活力密切相关。MAKINO等<sup>[47]</sup>通过对生殖细胞进行单细胞RNA测序发现，基本螺旋-环-螺旋家族成员e41(basic helix-loop-helix family, member e41, *Dec2*)是精原细胞分化的抑制因子，通过抑制精子发生和卵子发生特定的基本螺旋-环-螺旋蛋白1(spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1, *Sohlh1*)的表达，来维持生殖细胞在新生儿睾丸发育期间不完全分化的状态。HINCH等<sup>[48]</sup>通过对217只杂交小鼠的

精子进行单细胞全基因组测序，绘制了小鼠精子的全基因组交叉图谱，以此来确定影响交叉概率的因素。小鼠胚胎睾丸单细胞RNA测序显示，类胰岛素生长因子1(insulin like growth factor 1, *IGF1*)和类胰岛素生长因子2(insulin like growth factor 2, *IGF2*)在间质性类固醇祖细胞中表达旺盛，间质祖细胞分泌的IGFs以旁分泌的方式通过IGF/PTEN/PI3K通路促进未成熟睾丸支持细胞的增殖<sup>[49]</sup>。对人类精子形成过程、功能执行和分子调控机制的进一步探索，对早日破译男性相关生殖疾病具有重要意义。

### 3.2 卵细胞发育

卵母细胞的正常发育为生命的延续提供了保障。利用单细胞测序技术，可以捕获卵母细胞染色质信息、表观遗传修饰信息、对卵母细胞进行细胞分型等。乔杰院士课题组<sup>[4]</sup>利用单细胞测序技术揭示了卵母细胞发育过程中染色体的形态和动态变化，通过对卵细胞进行全基因组测序，绘制精确的个人遗传图谱，揭示在减数分裂过程中女性生殖细胞染色体的变化规律和特征。表观遗传调控在卵母细胞正常发育中发挥重要的作用，有学者利用单细胞亚硫酸氢盐测序(single-cell bisulfite sequencing, scBS-seq)来评估卵母细胞皮层下母细胞复合体(subcortical maternal complex, SCMC)组件为纯合子的葡萄胎患者的卵母细胞的甲基化，发现与正常人类卵母细胞相比，其存在全基因组的DNA甲基化缺陷，首次证明SCMC的完整性对于女性生殖系的从头甲基化是至关重要的<sup>[50]</sup>。利用单细胞测序技术对

卵母细胞进行分型, 探索卵母细胞老化的机制。在对年轻和年老的非灵长类动物的卵母细胞进行单细胞转录组分析后, 发现了卵母细胞在分步发育阶段有四种亚型, 卵母细胞衰老可能与线粒体功能紊乱、内质网应激及抗氧化能力降低有关<sup>[51-52]</sup>。

利用单细胞测序技术探索了生殖相关疾病对卵母细胞基因表达的影响。单细胞转录组测序发现宫内缺氧大鼠从F1代到F2代共遗传了多个差异表达基因, 这些差异表达基因主要涉及脂质和胰岛素代谢的过程, 间接表明卵母细胞基因表达的改变可能与某些代谢性疾病有关<sup>[53]</sup>。YANG等<sup>[54]</sup>开发了一种单细胞小RNA测序方法, 通过该方法分析了人类卵母细胞和胚胎中的小RNA, 发现了一类长度为20 nt的小RNA, 其主要在人类和猴子的卵母细胞中表达, 而在小鼠卵母细胞中不表达。FERRERO等<sup>[55]</sup>在单细胞转录组测序的基础上, 比较子宫内膜异位症患者的卵母细胞和健康个体的卵母细胞转录组数据, 发现多个差异表达基因, 包括上调的基因载脂蛋白E(apolipoprotein E, *APOE*)、双重特异性磷酸酶1(dual specificity phosphatase 1, *DUSP1*)、G0/G1开关基因2(G0/G1 switch 2, *G0S2*)、H2A组蛋白家族成员Z(H2A histone family, member Z, *H2AFZ*)、DNA结合抑制蛋白4(inhibitor of DNA binding 4, *ID4*)、微粒体谷胱甘肽S-转移酶1(microsomal glutathione S-transferase 1, *MGST1*)、G2检查点激酶WEE1(WEE1 G2 checkpoint kinase, *WEE1*)和一个下调基因含有丝氨酸/苏氨酸激酶的PX域(PX domain containing serine/threonine kinase like, *PXK*)。LIU等<sup>[56]</sup>通过对猪的单卵母细胞进行测序, 发现细胞分裂周期相关基因*CDC5L*(cell division cycle 5 like)可能在猪卵母细胞减数分裂和早期胚胎发育中发挥作用, 使卵母细胞有更高的减数分裂成熟率, 能更好地卵裂和发育成囊胚, 具有更低的死亡率。运用单细胞测序技术取得的这些研究成果, 提升了我们对卵细胞发育的认知, 也为辅助生殖过程中高质量卵细胞的获取和筛选提供了新的策略。

### 3.3 早期胚胎发育

干细胞生物学的最新发展使得研究人类早期发育过程中细胞命运的决定成为可能。单细胞测序技术的发展推动了干细胞体外研究。CUOMO等<sup>[57]</sup>通过对125个来自供体的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)进行单细胞RNA测序, 发

现了可以预测个体品系分化效率的分子标记, 并利用个体遗传背景的异质性绘制了数百个表达定量性状位点。胚胎干细胞作为生命早期的形式, 其分化发展对生命形成来说异常重要, 胚胎干细胞的单细胞测序也已经有所报道。YAN等<sup>[58]</sup>通过对不同来源的124个正常胚胎干细胞进行全基因组测序, 发现有至少20 000多个基因表达, 包括众多的长链非编码RNA。STÉVANT等<sup>[59]</sup>开发了一种基于转座子的条形码方法来重建单细胞谱系历史, 利用单细胞转录组测序能够跟踪细胞的发育轨迹, 在不久的将来也可以作为我们了解哺乳动物性别决定的补充手段。

目前, 探索人类胚胎早期发育过程中表观遗传修饰的研究还比较匮乏。LI等<sup>[60]</sup>应用单细胞染色质整体组学规模景观测序, 发现转录与染色质开放维持之间存在反馈机制, 为剖析早期胚胎发育过程中复杂但高度协调的表观遗传重编程铺平了道路。ZHU等<sup>[61]</sup>通过对生殖细胞和植入前胚胎细胞进行全基因组DNA甲基化测序, 发现了数以万计的DNA甲基化新位点, 详细揭示了人类植入前胚胎DNA甲基化重编程的动态过程。除此之外, 胚胎早期在母体内的生存环境, 与生殖成功和健康发育关系密切。VENTO-TORMO等<sup>[62]</sup>利用单细胞测序技术对怀孕早期的胚胎细胞进行了转录组测序分析, 绘制了胚胎细胞图谱, 鉴定了怀孕早期孕妇子宫的蜕膜层血管周细胞和基质细胞亚群, 除此之外, 还揭示了孕期母体免疫反应的调节机制, 增加生殖成功率。研究表观遗传调控和母体环境与生殖成功之间的相互作用, 有助于了解胚胎发育过程中的调控网络和保护机制, 对妊娠相关疾病的诊断和治疗具有重要意义。

利用早期胚胎单细胞测序, 可以进行遗传疾病预测, 有助于生殖健康。北京大学的生殖医学团队开发了单倍型分析方法——scHaplotyper, 追踪胚胎中每个单倍型区域的起源, 从而检测每个胚胎中疾病等位基因的携带状态, 并且成功在临床上对有遗传病史的家庭进行健康胚胎筛查<sup>[63]</sup>。产前诊断方法学的进步, 对遗传疾病预防和诊断具有重要意义, 是健康生殖的助力。

### 3.4 辅助生殖

辅助生殖技术是目前解决不育问题的主要技术手段, 主要被分为体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)和胞质内单精子注射(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)。

双亲心理状况和辅助生殖技术是影响辅助生殖成功率的主要因素。关于双亲心理因素对辅助生殖结果的影响,此前的研究普遍认为,抑郁、焦虑和压力会对辅助生殖的结果产生影响,但国外的一项研究发现,男性的心理状态不会影响女性伴侣的焦虑水平和不育压力,对卵巢的正常功能也没有影响<sup>[3]</sup>。许常龙等<sup>[64]</sup>利用单细胞转录组测序技术对IVF和ICSI过程中的发育阻滞废弃胚胎进行检测,发现阻滞胚胎与正常胚胎在染色体、DNA等分子结构和细胞代谢等生物过程中都存在差异,IVF和ICSI技术造成胚胎发育阻滞的主要原因可能是,对胚胎细胞线粒体造成了不可逆的损伤,影响了胚胎细胞正常的能量供应路径。

单细胞测序技术具有可以精确检测少量细胞的优势,可被应用于产前诊断。MALBAC是临床生殖医学中最成功的单细胞测序应用技术之一<sup>[65]</sup>,基于MALBAC的胚胎植入前体外受精基因组筛选技术使胚胎移植时能够准确、经济地选择正常受精卵<sup>[66]</sup>。LI等<sup>[67]</sup>研究表明,在辅助生殖技术中,基于MALBAC的胚胎植入前遗传学诊断(*preimplantation genetic diagnosis*, PGD)有助于选择无突变的胚胎,以阻止常染色体显性遗传性多囊性肾脏疾病(*autosomal dominant polycystic kidney disease*, ADPKD)从父母传给其后代。SHANG等<sup>[68]</sup>的研究基于MALBAC-NGS的单细胞测序方法,在单细胞水平上同时对81对体外受精胚胎的染色体和线粒体基因组进行了分析,观察到母亲年龄与胚胎内线粒体数量呈正相关。YUAN等<sup>[69]</sup>结合了下一代测序和MALBAC的新方法MARSALA,发现一种具有非整倍体的突变等位基因,允许在单分子分辨率下对胚胎进行诊断,大大减少了假阳性或假阴性错误。通过单细胞测序检测受精卵或胚胎细胞,选择健康的胚胎进行移植,可降低先天性遗传疾病新生儿的出生率,有助于预防遗传疾病<sup>[66,70]</sup>。结合了单细胞测序技术的产前诊断方法提升了胚胎移植前的筛选效率,避免将突变基因和遗传疾病传给后代。

单细胞测序技术在动物育种研究中有广泛的应用。有研究者结合单细胞测序技术与实时定量技术,筛选与雌性动物生殖细胞发育有关的基因,研究基因下游调控机制,以此来提高家畜配子和胚胎的发育潜力,还可以通过该技术筛选出与家畜发情相关的基因<sup>[71-72]</sup>。

## 4 结语与展望

单细胞测序技术是目前在基因组水平上分析细胞间异质性的有力工具。它的应用已经极大地影响了我们对各种生物过程的深入理解,尤其是在单细胞层面上揭示基因的动态变化,这对基础研究和临床研究均具有广泛的意义。该技术的应用范围非常广泛,如癌症研究<sup>[10]</sup>、各种疾病的细胞样本检测<sup>[73-74]</sup>、探究细胞命运决定<sup>[61]</sup>,甚至可被用于帕金森病和阿尔茨海默病<sup>[75-76]</sup>等精神疾病的研究。

单细胞测序研究面临众多挑战,首先是可用的材料非常少,无论是实验材料的来源还是有效的测序样本。每个细胞平均只含有约10  $\mu\text{g}$ 的总RNA,而其中仅有约0.1  $\mu\text{g}$ 是mRNA<sup>[77]</sup>。对于许多基因,每个细胞中只有几十个转录本。因此,在测序前需要扩增以获得足够的cDNA,但cDNA在扩增过程中由于技术限制很有可能会造成cDNA的比例失调,使得测序结果不够准确。而实验所用的细胞资源,如胚胎细胞、干细胞、生殖细胞等的获取在伦理上还饱受争议,这也造成了单细胞测序技术的应用局限。该方法的另一个局限性是由细胞的特性所决定的,基因表达的脉动性和突发性会产生生物噪音<sup>[78]</sup>。基因不是以稳定的方式表达,而是在短时间内以零星的方式主动转录,所以对于一个给定的细胞,各种基因转录水平处于不断变化的状态,且大多数单细胞测序技术只能检测到大约10%的mRNA分子,这意味着单细胞测序所能获得的信息量存在很大的局限性<sup>[79]</sup>。除此之外,单细胞测序技术还存在很多技术上的问题,现有的单细胞分离技术都会在不同程度上对细胞造成损伤,即使是现在被广泛应用于细胞筛选和分离的流式细胞分离技术,对细胞的损伤也是不容忽视的,普通的细胞分离技术,又受到技术的限制无法获得大量样本材料。所以还有很多问题有待我们去解决,如如何高效获取单细胞样本,如何降低生物噪音,如何实现单细胞测序技术低成本推广等。

单细胞测序技术存在不足的同时还存在无限潜能。每一次科学研究的重大进步都伴随着科学技术的突破,如果没有单细胞测序技术的出现,众多的生殖问题都无法解决,众多的疾病机制都无法完善。生殖是关系到种族存续的重要问题,与生命起源、生物资源可持续发展、物种多样性息息相关。单细胞测序技术特有的高精度性在未来将会对发育生物学、生殖生物学、精准医学的发展产生深远的影响。

## 参考文献 (References)

- [1] BABAKHANZADEH E, NAZARI M, GHASEMIFAR S, et al. Some of the factors involved in male infertility: a prospective review [J]. *Int J Gen Med*, 2020, 13: 29-41.
- [2] 李丽莉, 孙楠, 张文新, 等. 应用二代测序技术进行胚胎植入前遗传学筛查及诊断的基本原理[J]. *中国医学装备* (LI L L, SUN N, ZHANG W X, et al. The basic principle of NGS in implementing PGS and PGD [J]. *Medical Equipment*), 2019, 16(7): 7-14.
- [3] DONARELLI Z, LO COCO G, GULLO S, et al. Infertility-related stress, anxiety and ovarian stimulation: can couples be reassured about the effects of psychological factors on biological responses to assisted reproductive technology [J]. *Reprod Biomed Soc Online*, 2016, 3: 16-23.
- [4] 何文茵, 夏勇. 基于单细胞的分子技术在胚胎植入前遗传学检测中的应用[J]. *中华检验医学杂志* (HE W Y, XIA Y. Application of single-celled molecular techniques in preimplantation genetic testing [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*), 2016, 41(4): 270-4.
- [5] 杨凯莉, 孙昭, 白春梅, 等. 单细胞RNA测序技术在肿瘤免疫微环境研究中的应用[J]. *中国医学科学院学报* (YANG K L, SUN Z, BAI C M, et al. Application of single-cell RNA sequencing in research on tumor immune microenvironment [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*), 2020, 42(1): 117-23.
- [6] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-82.
- [7] LAO K Q, TANG F, BARBACIORU C, et al. mRNA-sequencing whole transcriptome analysis of a single cell on the SOLiD system [J]. *J Biomol Tech*, 2009, 20(5): 266-71.
- [8] OLSEN T K, BARYAWNO N. Introduction to single-cell RNA sequencing [J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018, 122(1): e57.
- [9] GTEx CONSORTIUM, HUMAN GENOMICS. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans [J]. *Science*, 2015, 348(6235): 648-60.
- [10] POTTER S S. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 479-92.
- [11] 张慧, 徐楚帆, 江来. 单细胞测序相关技术及其在生物医学研究中的应用[J]. *实用医学杂志* (ZHANG H, XU C F, JIANG L. Monocyte sequencing and its applications in biomedical research [J]. *The Journal of Practical Medicine*), 2020, 36(3): 410-3.
- [12] ANDOR N, LAU B T, CATALANOTTI C, et al. Joint single cell DNA-seq and RNA-seq of gastric cancer cell lines reveals rules of *in vitro* evolution [J]. *NAR Genom Bioinform*, 2020, 2(2): lqaa016.
- [13] 李羽翡, 吴霞明, 许敬东, 等. 单细胞分析技术的发展及应用[J]. *生命的化学* (LI Y F, WU X M, XU J D, et al. The development and application of single cell analysis technology [J]. *Chemistry of Life*), 2016, 36(5): 683-90.
- [14] 贾昌路, 张璐, 朱玲, 等. 转录组测序技术在生物测序中的应用研究进展[J]. *分子植物育种* (JIA C L, ZHANG Y, ZHU L, et al. Application progress of transcriptome sequencing technology in biological sequencing [J]. *Molecular Plant Breeding*), 2015, 13(10): 2388-94.
- [15] 杜璐, 王少军, 彭广华. 单细胞转录组测序数据分析算法在干细胞研究中的应用[J]. *现代生物医学进展* (DU L, WANG S J, PENG G H. Application of algorithms in the analysis of the stem cell scRNA-Seq data [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2018, 18(1): 155-9.
- [16] WAGNER D E, WEINREB C, COLLINS Z M, et al. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo [J]. *Science*, 2018, 360(6392): 981-7.
- [17] GUO H, ZHU P, WU X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing [J]. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2126-35.
- [18] 郑小翠. 单细胞测序技术在实体瘤研究中的应用进展[J]. *中国癌症杂志* (ZHENG X C. Progress of single-cell sequencing in solid tumors [J]. *China Oncology*), 2019, 29(7): 535-9.
- [19] ZHAO Y H, WANG J J, ZHANG P P, et al. Oocyte IVM or vitrification significantly impairs DNA methylation patterns in blastocysts as analysed by single-cell whole-genome methylation sequencing [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2020, 32(7): 676-89.
- [20] SEUNGJIN N A, EUNOK P A E K. Computational methods in mass spectrometry-based structural proteomics for studying protein structure, dynamics, and interactions [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1391-402.
- [21] 李洪东, 朱晓姝, 王建新. 生物信息学研究进展[J]. *玉林师范学院学报* (LI H D, ZHU X S, WANG J X. Progress in bioinformatics [J]. *Journal of Yulin Normal University*), 2018, 39(5): 2-6.
- [22] LINDSTRÖM S, ANDERSSON-SVAHN H. Overview of single-cell analyses: microdevices and applications [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(24): 3363-72.
- [23] XU F, ZHAO H, FENG X J, et al. Single-cell chemical proteomics with an activity-based probe: identification of low-copy membrane proteins on primary neurons [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2014, 53(26): 6730-3.
- [24] CHEN D J, FAN F K, ZHAO X F, et al. Single cell chemical proteomics with membrane-permeable activity-based probe for identification of functional proteins in lysosome of tumors [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(4): 2466.
- [25] PHILPOTT M, CRIBBS A P, BROWN T J R, et al. Advances and challenges in epigenomic single-cell sequencing applications [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 57: 17-26.
- [26] MACAULAY I C, PONTING C P, VOET T. Single-cell multiomics: multiple measurements from single cells [J]. *Trends Genet*, 2017, 33(2): 155-68.
- [27] FAN G, LIN L, JING Y, et al. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells [J]. *Cell Res*, 2017, 27(8): 967-88.
- [28] GU C, LIU S L, WU Q H, et al. Integrative single-cell analysis of transcriptome, DNA methylome and chromatin accessibility in mouse oocytes [J]. *Cell Res*, 2019, 29(2): 110-23.
- [29] LINKER S M, URBAN L, CLARK S J, et al. Combined single-cell profiling of expression and DNA methylation reveals splicing regulation and heterogeneity [J]. *BioMed Central*, 2019, 20(1): 30.
- [30] FOX E J, LOEB L A. Cancer: one cell at a time [J]. *Nature*, 2014, 512(7513): 143-4.
- [31] ZHANG X, LIU L. Applications of single cell RNA sequencing to research of stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(10): 722-8.
- [32] 梁国婷. 单细胞测序技术研究进展概述[J]. *生物学教学* (LIANG G T. Progress in single cell sequencing technology is re-



- viewed [J]. *Biology Teaching*, 2019, 44(8): 5-7.
- [33] 朱翔, 浦春, 武其文. 单细胞转录组测序的方法原理及应用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*(ZHU X, PU C, WU Q. Principle and application of single cell transcriptome analysis [J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*), 2016, 8(1): 61-5.
- [34] 丁钟欢. 单细胞分析研究进展 [J]. *检验医学与临床*(DING Z H. Advances in single cell analysis [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*), 2018, 15(7): 1043-6.
- [35] ZHANG P, HAN X, YAO J, et al. High-throughput isolation of cell protrusions with single-cell precision for profiling subcellular gene expression [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(39): 13700-5.
- [36] ZONG C, LU S, CHAPMAN A R, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. *Science*, 2012, 338(6114): 1622-6.
- [37] 李彤, 徐家伟, 孙莹璞. 单细胞转录组测序在生殖发育领域应用进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*(LI T, XU J W, SUN Y P. Advances in the application of single cell transcriptomic sequencing in reproductive development [J]. *International Journal of Reproductive Health/Family Planning*), 2019, 38(3): 217-21.
- [38] 王曦, 汪小我, 王立坤, 等. 新一代高通量RNA测序数据的处理与分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*(WANG X, WANG X W, WANG L K, et al. A review on the processing and analysis of next-generation RNA-seq data [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2010, 37(8): 834-46.
- [39] XIN Y, KIM J, NI M, et al. Use of the Fluidigm C1 platform for RNA sequencing of single mouse pancreatic islet cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3293-8.
- [40] DELAUGHTER D M, BICK A G, WAKIMOTO H, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development [J]. *Dev Cell*, 2016, 39(4): 480-90.
- [41] CLARK S J, LEE H J, SMALLWOOD S A, et al. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 72.
- [42] HU Y, GUO H H, CAO C, et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas [J]. *Cell Res*, 2016, 26(3): 304-19.
- [43] ZHANG X Y, MARJANI S L, HU Z Y, et al. Single-cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects [J]. *Pubmed*, 2016, 76(6): 1305-12.
- [44] WANG J, FAN H C, BEHR B, et al. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm [J]. *Cell*, 2012, 150(2): 402-12.
- [45] WANG M, LIU X, CHANG G, et al. Single-cell rna sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 599-614.
- [46] FANG X, HUANG L L, XU J, et al. Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis [J]. *Dev Biol*, 2019, 454(2): 118-27.
- [47] MAKINO Y, JENSEN N H, YOKOTA N, et al. Single cell RNA-sequencing identified Dec2 as a suppressive factor for spermatogonial differentiation by inhibiting Sohlh1 expression [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6063.
- [48] HINCH A G, ZHANG G, BECKER P W, et al. Factors influencing meiotic recombination revealed by whole-genome sequencing of single sperm [J]. *Science*, 2019, 363(6433): eaau8861.
- [49] NEIRIJNCK Y, KÜHNE F, MAYÈRE C, et al. Tumor suppressor pten regulates negatively sertoli cell proliferation, testis size, and sperm production *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(2): 387-98.
- [50] DEMOND H, ANVAR Z, JAHROMI B N, et al. A KHDC3L mutation resulting in recurrent hydatidiform mole causes genome-wide DNA methylation loss in oocytes and persistent imprinting defects post-fertilisation [J]. *Genome Med*, 2019, 11(1): 84.
- [51] ZHANG T, XI Q, WANG D, et al. Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress involved in oocyte aging: an analysis using single-cell RNA-sequencing of mouse oocytes [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 53.
- [52] WANG S, ZHENG Y, LI J, et al. Single-cell transcriptomic atlas of primate ovarian aging [J]. *Cell*, 2020, 180(3): 585-600.e19.
- [53] LI T, LIU Y, YUE S, et al. Analyzing the effects of intrauterine hypoxia on gene expression in oocytes of rat offspring by single cell transcriptome sequencing [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1102.
- [54] YANG Q, LI R, LYU Q, et al. Single-cell CAS-seq reveals a class of short PIWI-interacting RNAs in human oocytes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3389.
- [55] FERRERO H, CORACHÁN A, AGUILAR A, et al. Single-cell RNA sequencing of oocytes from ovarian endometriosis patients reveals a differential transcriptomic profile associated with lower quality [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(7): 1302-12.
- [56] LIU X M, WANG Y K, LIU Y H, et al. Single-cell transcriptome sequencing reveals that cell division cycle 5-like protein is essential for porcine oocyte maturation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(5): 1767-80.
- [57] CUOMO A S E, SEATON D D, MCCARTHY D J, et al. Single-cell RNA-sequencing of differentiating iPS cells reveals dynamic genetic effects on gene expression [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 810.
- [58] YAN L, YANG M, GUO H, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(9): 1131-9.
- [59] STÉVANT I, NEF S. Single cell transcriptome sequencing: a new approach for the study of mammalian sex determination [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 468: 11-8.
- [60] LI L, GUO F, GAO Y, et al. Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 847-58.
- [61] ZHU P, GUO H, REN Y, et al. Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(1): 12-9.
- [62] VENTO-TORMO R, EFREMOVA M, BOTTING R A, et al. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans [J]. *Nature*, 2018, 563(7731): 347-53.
- [63] YAN Z Q, ZHU X H, WANG Y Q, et al. scHaplotype: haplotype construction and visualization for genetic diagnosis using single cell DNA sequencing data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21(1): 41.
- [64] 许常龙, 李春苑, 杨华, 等. 单细胞转录组测序分析人类胚胎发育阻滞的潜在机制 [J]. *同济大学学报(医学版)*(XU C L, LI C Y, YANG H, et al. Single cell transcriptomic sequencing analysis in human developmental arrested embryos [J]. *Journal of Tongji University (Medical Science)*), 2019, 40(1): 28-33.
- [65] YAO Y X, LA Y F, DI R, et al. Comparison of different single cell whole genome amplification methods and MALBAC appli-

- cations in assisted reproduction [J]. *Hereditas*, 2018, 40(8): 620-31.
- [66] HOU Y, FAN W, YAN L, et al. Genome analyses of single human oocytes [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1492-506.
- [67] LI W, MA Y, YU S, et al. The mutation-free embryo for *in vitro* fertilization selected by MALBAC-PGD resulted in a healthy live birth from a family carrying PKD 1 mutation [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(12): 1653-8.
- [68] SHANG W, ZHANG Y, SHU M, et al. Comprehensive chromosomal and mitochondrial copy number profiling in human IVF embryos [J]. *Reprod Biomed*, 2018, 36(1): 67-74.
- [69] YUAN P, YAN L Y, QIAO J. Application of single-cell sequencing technologies in reproductive medicine [J]. *Reproductive and Developmental Medicine*, 2017, 1(1): 30-5.
- [70] TANG X, HUANG Y, LEI J, et al. The single-cell sequencing: new developments and medical applications [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 53.
- [71] 蔡缪荧. 羔羊JIVET相关技术及影响其卵母细胞发育功能基因的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [72] 兰道亮, 熊显荣, 柴志欣, 等. 牦牛发情期卵巢比较转录组学研究[J]. *畜牧兽医学报*(LAN D L, XIONG X R, CHAI Z X, et al. Comparative transcriptome analysis between yak and cattle estrus ovary [J]. *Acta Vet Et Zootech Sin*), 2016, 47(9): 1830-9.
- [73] ZAKHAROV P N, HU H, WAN X, et al. Single-cell RNA sequencing of murine islets shows high cellular complexity at all stages of autoimmune diabetes [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(6): e20192362.
- [74] DER E, SURYAWANSHI H, MOROZOV P, et al. Author correction: tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type and fibrosis relevant pathways [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(11): 1556.
- [75] MATHYS H, DAVILA-VELDERRAIN J, PENG Z, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2019, 570(7761): 332-7.
- [76] YASEN A, AINI A, WANG H, et al. Progress and applications of single-cell sequencing techniques [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 80: 104198.
- [77] SVENSSON V, NATARAJAN K N, LY L H, et al. Power analysis of single-cell RNA-sequencing experiments [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 381-7.
- [78] WANG Y, NAVIN N E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 598-609.
- [79] ROSS I L, BROWNE C M, HUME D A. Transcription of individual genes in eukaryotic cells occurs randomly and infrequently [J]. *Immunol Cell Biol*, 1994, 72(2): 177-85.