

单细胞技术在干细胞组织修复与药物研发中的应用

苏丹丹 程芳*

(中山大学药学院(深圳), 广州 510006)

摘要 近十几年来,单细胞技术飞速发展,突破了传统疾病只能对细胞群体进行研究的局限,将分辨率精确到单个细胞,解决了细胞异质性以及生物材料的低获取量等问题。该综述侧重介绍单细胞技术的方法学进展,并且详细阐述了其在干细胞组织修复药物研发中的最新进展,有助于读者了解如何利用单细胞技术寻找组织修复和相关疾病发生、发展中的特定干细胞群落和研究相关生理病理机制,并针对相关疾病建立二维(two-dimensional, 2D)和三维(three-dimensional, 3D)的体外新药筛选模型,从而进行高通量药物筛选。

关键词 单细胞技术;干细胞;组织修复;高通量筛选;药物研发

The Application of Single Cell Technologies in Stem Cell Tissue Repair and Drug Development

Su Dandan, Cheng Fang*

(School of Pharmaceutical Sciences (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract The rapid advancement of single cell technologies in recent years break the limit of traditional biomedical research from studying mixed cell population to a single-cell level, thus solving problems such as cellular heterogeneity and low access to rare biological materials. In this review, we provide an overview of recent progresses within key single-cell technologies, and focus on their applications in stem cell research and regeneration medicine. We present current developments within these areas and critically discuss how to use single-cell approaches to look for specific stem-cell subpopulation in tissue repair and disease, and to investigate the underlying cellular and molecular mechanisms. Finally we highlight high-throughput screening methods to identify disease-specific and cell-specific drugs using single-cell based two-dimensional and three-dimensional *in vitro* model systems.

Keywords single-cell technologies; stem cell; tissue repair; high-throughput screening; drug discovery

1 单细胞技术介绍

细胞是生物体的基本单位。不同细胞类型之间形态和功能不同,即使对同一类型的细胞在定义上是同质的,也是对细胞研究的极度简化;事实上,细胞是存在异质性的,基因、蛋白质和代谢物的随机表达会造成细胞的异质性^[1-2]。对细胞异质性的

研究应当是在单细胞层面上对其DNA、RNA和蛋白质等进行解析。但是,细胞中的DNA和RNA的量很小,如一个典型的癌细胞含有6~12 pg的DNA和10~50 pg的总RNA(1%~5% mRNA)^[3],单个细胞达不到测序仪需要毫克级的样品量的检测要求。过去由于技术的限制,为了满足测序分析的样品量,需要上

收稿日期: 2018-04-10 接受日期: 2018-09-27

国家自然科学基金青年基金(批准号: 81702750)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-84113997, E-mail: chengf9@mail.sysu.edu.cn

Received: April 10, 2018 Accepted: September 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81702750)

*Corresponding author. Tel: +86-20-84113997, E-mail: chengf9@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2018-12-28 12:46:05

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1245.004.html>

万个细胞,这会导致细胞信号平均化。同时,由于对于细胞群体的测序深度低导致具有关键作用的中低丰度的基因无法被测到。对于稀有细胞如干细胞以及循环肿瘤细胞(circulating tumour cell, CTC),由于技术限制,则无法获取足够的样品量。单细胞技术能够将起始样本量进行扩增,以获得足够的样品量用于构建文库,并且通过增加测序深度从而检测到中低丰度的基因,精准地分析细胞异质性,这是细胞群体技术无法达到的。近十年以来,单细胞技术得到迅速发展,使我们能够在单个细胞水平上探讨基因表达的差异,发现细胞异质性,从而改写传统生物学观点,并利用这类技术进行治疗疾病、修复组织、辅助生殖和筛选药物等。

1.1 单细胞分离技术

单细胞技术首要解决的问题是如何获得单细胞。从大量的细胞中获取单细胞主要采取以下几种分离方法(表1)。口吸管(mouth pipette)分离法操作简单,对细胞损伤小,但无法分辨细胞类型。显微操作法(micromanipulation)直观、肉眼可见,但对技术人员和机器的要求高。有限稀释法(limited dilution)操作简单,但是得到的实验结果有可能是假阴性、假阳性。免疫磁珠分离技术(magnetic activated cell sorting, MACS)可以通过特定的抗体富集目标细胞,广泛应用于稀少细胞,如CTC。荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)通过特异性的荧光标签分离细胞,但是FACS的缺点是需要大的起始量,使一些小体积或微量样本受到了制约,微流控技术(microfluidic)的出现是对FACS很好的补充。微流控技术能够从少量样本中根据细胞表面标志物分离特定的细胞,反应速度快,可运用于稀有细胞的

筛选、基因测序、单细胞分析等多个方面,尤其是稀有细胞的单细胞测序。然而,以上技术都只能在解离的细胞悬液中运用,无法判断细胞在组织中的位置,激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)技术解决了这个难题,但是要求操作者要非常小心,避免对染色体造成损伤从而影响后续的结果。FOCOT(facile one-cell-one-tube)技术通过微流控技术和液滴显微光学成像识别技术,分选出包裹单细胞的液滴,快速实现单个细胞的分离^[4]。这些单细胞分离技术各有利弊,应当根据实际具体情况进行选择合适的方法。

1.2 单细胞分析技术

单细胞分析技术是在单细胞水平上对基因组、转录组、蛋白质组、外显子组以及表观遗传学等进行分析的技术。随着第二代及第三代测序技术的出现,单细胞技术的组学领域发生了巨大的变革,并且因为成本的下降,单细胞分析技术得到了广泛的应用。

利用单细胞转录组技术能够获得转录本的精确表达量,确定转录本的精确序列,解析细胞的异质性,鉴定复杂组织中的不同细胞类型,使人们能够对细胞有全面的认识^[5-6]。单细胞转录组技术由Tang等^[7]首次引入,随后,单细胞转录组技术不断涌现出新的方法(表2)。为了简化步骤,近期研究人员设计了直接的RNA测序(the direct RNA-seq),该技术利用纳米孔测序平台,绕过了逆转录和扩增步骤,产生全长的链特异性序列,能够直接检测RNA中的核苷酸类似物^[8]。为了对细胞群体有全面的认识,需要同时分析大量的细胞,提高分析通量可利用条码法或者基于微流控芯片的高通量单细胞定量聚合酶链式

表1 单细胞分离技术

Table 1 Methods of isolating single cells

方法 Method	通量 Throughput	样品量 Amount of samples	自动或手动 Manual or automatic	效率 efficiency	精确度 Accuracy	成本 Cost
Mouth pipette	Low	Low	Manual	Low	High	Low
Micromanipulation	Low	Low	Manual	Low	High	High
Limited dilution	Low	High	Manual	Low	Low	Low
LCM	Low	High	Automatic	High	High	High
FACS	High	High	Automatic	High	High	High
MACS	High	High	Automatic	High	High	High
Microfluidic	High	Low	Automatic	High	High	High
FOCOT	High	Low	Automatic	High	High	Low

反应(polymerase chain reaction, PCR)分析平台。CytoSeq技术使用带有细胞和分子条码捕获探针的珠子的组合文库, 重建数千个单细胞的数字基因表达谱, 可以同时分析数千个细胞, 甚至可扩展到10 000或100 000个细胞^[9]。另外, Datlinger等^[10]将基因组编辑技术(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)与单细胞RNA测序技术整合在一起, 开发了新技术CRISPR液滴测序(CRISPR droplet sequencing, CROP-seq), 通过构建出让单细胞测序实验可视化的CRISPR gRNA病毒载体, 再结合最新的用于单细胞RNA测序的液滴方法, 可同时研究上千个细胞的基因调控, 实现在规模和细节上高通量分析基因调控。但是, 以上方法不可避免地丢失细胞空间位置信息, 荧光原位RNA-Seq技术迈出了重要一步, 该技术利用交联剂将cDNA固定于原位, 但存在不够灵敏和核糖体RNA影响等问题^[11]。最近还报道了单细胞空间转录组测序新技术——Geo-Seq, 该技术通过整合优化单细胞测序和激光显微切割技术, 获得了空间位置信息的少量细胞转录组图谱, 可应用于外源的多能干细胞或者胚胎组织细胞, 将未知来源的干细胞定位于体内胚胎的相应部位^[12]。

单细胞基因组技术对揭示正常或患病组织中的遗传异质性和细胞谱系至关重要^[22-23]。萌芽于2011年的单细胞基因组技术是由Navin等^[24]将全转

录组扩增技术和下一代测序技术结合起来, 应用于研究乳腺癌细胞群体的结构和进化过程, 可以准确量化个体核内的基因组拷贝数。简并寡核苷酸引物聚合酶链反应(degenerate oligonucleotide primed-PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)和多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)是早期常用的经典单细胞基因组技术, 能够为基因组研究提供相比于细胞群体技术更深入的研究, 但存在着一些问题。与DOP-PCR、MDA、MALBAC相比, 通过插入转座子进行线性扩增方法(linear amplification via transposon insertion, LI-ANTI)的保真性和基因覆盖率都更高, 将分辨率提高到千碱基分辨率, 能检查到一小段碱基缺失, 直接观察到细胞的异质性, 更精准有效地检测遗传病^[25]。为了修复基因扩增过程中发生的核苷酸序列错误, Dong等^[26]开发了单细胞多重置换扩增(single-cell multiple displacement amplification, SCMDA)技术, 实现准确鉴定单细胞基因组基因突变。单细胞组合标记测序技术(single-cell combinatorial indexed sequencing, SCI-seq)利用多次对细胞进行条形码编码标记, 缩减了文库构建的成本, 并且扩大了能够绘制基因组图谱的单细胞数量, 使得该技术能够得到更加广泛的应用^[27]。近期研究人员开发的位置空间单细胞测序

表2 单细胞转录组分析技术的特点

Table 2 The characteristics of single-cell transcriptomic analytical technologies

方法 Method	关键技术 Key technology	扩增方法 Amplification method	位置偏倚 Position bias	细胞个数 Number of cells	参考文献 Reference
scRNA-Seq	Poly A tailing	Traditional PCR	3'-biased	1-100	[7]
SRTR	Template switching, DNA barcode	Modified PCR	Strongly 5'-biased	10-100	[13]
Smart-Seq	Template switching	Modified PCR	Weakly 3'-biased	1-100	[14]
Smart-Seq2	Template switching, LNA	Modified PCR	Weakly 3'-biased	1-100	[15]
SMA	Template switching	Traditional PCR	Weakly 5'-biased	1-100	[16]
PMA	Template switching	Phi29 DNA polymerase	Weakly 5'-biased	1-100	[16]
Quartz-Seq	Inhibition of PCR	<i>In vitro</i> transcription	5'-biased	1-100	[17]
CEL-Seq	Barcode, UMI	<i>In vitro</i> transcription	Strongly 3'-biased	10-100	[18]
CEL-Seq2	Barcode, UMI	<i>In vitro</i> transcription	Strongly 3'-biased	10-100	[19]
Drop-Sep	Barcode, UMI	Traditional PCR	3'-biased	>1 000	[20]
inDrop	Barcode, UMI	Traditional PCR	3'-biased	>1 000	[21]

scRNA-Seq: 单细胞RNA测序; SRTR: 单细胞标记逆转录测序; SMA: 半随机引物PCR mRNA转录组扩增; PMA: 基于Phi29 DNA聚合酶的mRNA转录组扩增; CEL-Seq: 细胞表达的线性放大和测序; inDrop: 索引液滴; LNA: 锁核酸; UMI: 独特分子标识符。

scRNA-Seq: single-cell RNA sequencing; SRTR: single-cell tagged reverse transcription sequencing; SMA: semirandom primed PCR-based mRNA transcriptome amplification; PMA: Phi29 DNA polymerase-based mRNA transcriptome amplification; CEL-Seq: cell expression by linear amplification and sequencing; inDrop: indexing droplets; LNA: locked nucleic acid; UMI: unique molecular identifier.

(topographic single cell sequencing, TSCS)是单细胞基因组技术的里程碑,能准确地测量和描述单个肿瘤细胞的具体特征,更加有力地揭示细胞的异质性^[28]。

单一组学的单细胞技术对于生命科学研究不可避免地具有局限性,结合多种单细胞组学技术能够对细胞进行更加全面的了解。单细胞多组学技术能够同时从单细胞的几个组学获取信息,如基因组和转录组测序(genome and transcriptome sequencing, G&T-seq)能够获取转录组和基因组的信息^[29],单细胞全基因组甲基化组和转录组测序(single-cell genome-wide methylome and transcriptome sequencing, scM&T-seq)则能够对转录组和DNA甲基化组进行测序分析,探究转录和表观遗传变异之间的关联^[30]。单细胞三联组学测序技术(single-cell triple omics sequencing technique, scTrioSeq)甚至能同时对基因组、DNA甲基化组和转录组进行分析^[31]。由于是在单细胞水平上进行多组学分析,通量较低,为了提高通量,研究人员发明了通过测序对转录组和表位进行细胞索引(cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, CITE-seq),能够对数千个单细胞的表面蛋白标记物进行测定,在同一尺度同时测量转录组和蛋白质组,实现了在8 000个单细胞转录组中监测10种表面蛋白,完成了迄今为止最大规模的多维单细胞分析论证^[32]。在提高通量的基础上,单细胞多组学技术有望能够筛选出药物开发的靶点,研究人员结合单核基于液滴测序(single-nucleus droplet-based sequencing, snDrop-seq)和单细胞转座体过敏位点测序(single-cell transposome hypersensitive site sequencing, scTHS-seq)改进的高通量方法,从人脑中获取了超过60 000个单细胞的核转录组学和DNA可及性图谱,揭示了作为区别细胞类型的调节元件和转录因子,明确了35种不同的神经元和神经胶质细胞,对易受到大脑疾病的危险因素影响的神经元或胶质细胞在基因层面上进行排序,虽然还不能明确这类细胞诱导疾病发生的机制,但能够对于未来的药物开发提供可能的作用靶点^[33]。可见,综合的单细胞多组学方法能够实现复杂的器官和组织在单细胞水平上进行更详细的研究,未来将会实现对单个细胞的高通量、多组学分析,从而对包括人类在内的高等生物的细胞谱系树进行详细了解,这些研究将对基础生物学和医学领域具有重要意义。

1.3 单细胞技术的应用

当前,单细胞技术已开始被广泛地运用,对生物学和临床上的众多领域产生了广泛的影响,包括微生物学、神经生物学、免疫学、组织修复、胚胎发育和癌症等。特别是对于稀有细胞,如胚胎干细胞、CTC等,单细胞技术起到不可忽视的作用,其不仅有助于解析罕见细胞类型的基因表达网络,而且能够探索不同时间和空间的复杂细胞群的基因表达异质性(表3)。

单细胞技术相较于传统的研究技术,存在着较大的差别,能够对细胞进行更精确的研究。例如,Toriello等^[34]使用集成的微流控生物处理器进行单细胞基因表达分析,比较在细胞群和单细胞中的基因表达。研究人员主要是通过检测在Jurkat细胞中敲除*GAPDH*基因的siRNA,结果发现,两个不同的细胞群分别表现为*GAPDH*基因的中度沉默和完全沉默,在相同条件下,单个细胞的*GAPDH*基因的表达下降至原始值的 $(21\pm 4)\%(n=4)$,这说明常规细胞群体测量不能代表单个细胞,其会掩盖单细胞的基因表达和沉默的随机变异^[34]。在过去,研究人员使用细胞群体测序方法估计,许多人类癌症的平均突变率比正常细胞高210倍^[35]。然而有研究发现,使用nuc-seq调查人类乳腺肿瘤的突变率,估计出的三阴乳腺癌的突变率为13.3倍,而雌激素受体阳性乳腺癌的突变率与正常细胞相似,这和细胞群体测序方法得到的结果相差甚远^[36]。

利用单细胞技术,研究人员能够对细胞生物学领域进行深入探索研究。Tang等^[7,37-39]利用单细胞技术对胚胎发育过程进行了大量的研究。2009年,研究人员首次使用单细胞转录组技术对胚胎进行研究,随后不断优化和开发单细胞技术以对胚胎发育进行深入研究^[7,37-39]。他们采用核小体占位和甲基化测序法(nucleosome occupancy and methylation sequencing, NOME-seq)^[37]、单碱基分辨率的5fC测序技术(chemical-labeling-enabled C-to-T conversion sequencing, CLEVER-seq)^[38]、单细胞DNA甲基化测序技术^[39]等追踪分析了同一胚胎内单细胞的遗传谱系。在研究过程中,随着技术的不断进步,研究也越来越深入,揭示了细胞异质性,深入解析了胚胎发育过程,这将会为生物学和临床医学提供新见解。

利用单细胞技术进行绘制细胞图谱、器官图谱,更加深入地解析细胞的机制以及区分不同类型

表3 单细胞技术的应用

Table 3 Application of single-cell technologies

应用例子 Application case	技术 Technology	参考文献 Reference
Small intestinal epithelium	Modified Smart-Seq2, droplet-based scRNA-seq	[40]
Renal cell carcinoma stem cells	Single-cell exome sequencing	[41]
Human sperm	MDA	[42]
Embryonic cortical neurons	RNA-Seq	[43]
Immune cells	Smart-Seq	[44]
Human ovirus	MALBAC	[45]
CTCs	Smart-Seq	[14]

表4 干细胞在修复组织中的应用

Table 4 Application of stem cells in repairing tissues

干细胞类型 Stem cell types	应用例子 Application cases	参考文献 Reference
Skin stem cells	Junctional epidermolysis bullosa	[48]
Hematopoietic stem cells	Scleroderma	[49]
Pluripotent stem cells	Hair follicle development	[50]
Heart stem cells	Heart injury	[51]
Induced pluripotent stem cells (iPSCs)	Muscular dystrophies	[52]
Mesenchymal stem cells	Prostate cancer	[53]

的细胞。Haber等^[40]利用单细胞RNA测序技术共获得53 193个小肠上皮细胞的表达谱,绘制了首张高分辨率的小肠上皮细胞表达图谱,这使得以前未知的肠上皮细胞亚型及其基因标志得到识别和表征,并且构建了新确定的亚型分类,区分了绒毛细胞的两种亚型,详细说明了细菌和病原体入侵感染时,小肠上皮发生的变化,并将感应分子与细胞类型联系起来,揭示肠道内稳态和对病原体反应的原理。目前,科学家正在致力于推进“人类细胞图谱计划”,利用单细胞技术对人类的所有组织器官进行绘制图谱,发现新的细胞类型并对细胞的机制进行详细的阐述,这将为研究人员提供前所未有的机会,能够在更精准的条件上对于疾病进行治疗。

2 单细胞技术在干细胞研究中的应用

干细胞是具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的未分化细胞^[46],其细胞群体量很小,而且干细胞中的DNA和RNA量也很少。越来越多的证据表明,不同类型的干细胞以及“同质”干细胞群体中的细胞其实也存在着细微的差异^[47],并且与干细胞相关的疾病往往在单细胞水平上发生,如癌症、骨髓增生综合征、白血病等,因此,在细胞群体水平上进行干

细胞研究具有很大的局限性。单细胞技术为干细胞领域的研究提供了更高的平台,它可作为全面分析细胞异质性的有力工具,能够了解干细胞的更新和分化过程,深入分析干细胞的生物学功能和在疾病中的相关机制,进而发展新的诊断手段、预防手段和治疗手段。

2.1 干细胞具有修复组织的作用

干细胞在现代的再生医学领域掀起了研究热潮,因为干细胞具有多向分化潜能,在移植入体内后,较明显的趋化迁移到受损伤部位,并在局部微环境的诱导下,分化成修复所需的组织细胞,从而置换功能缺陷的细胞,促进修复损伤组织,恢复组织功能。这使人们看到了组织再生和修复的曙光,为数以百万计的各类患者带来了希望,已被广泛应用于多种疾病的临床研究中,包括罕见疾病(表4)。

2.2 单细胞技术在干细胞研究上的应用

干细胞存在表型和功能的异质性,可以运用单细胞技术研究不同的干细胞类型的增殖和自我更新潜力^[54]、分化方式^[55]、寿命^[56]以及谱系分化^[57]等(表5),追踪干细胞分化增殖不同阶段的基因表达变化,分析基因调控网络,发现细胞内一些关键调控因子对于干细胞自我更新及分化的影响,更好地理解单

表5 单细胞技术应用在不同类型的干细胞

Table 5 The application of single cell technologies in different types of stem cells

细胞类型 Cell type	技术 Technology	参考文献 Reference
Embryonic stem cells	Smart-seq, CLEVER-seq	[38,66]
Mesenchymal stem cells	InDrop	[58]
Hematopoietic stem cells	Smart-seq	[57,62]
Cancer stem cells	Smart-seq, single-cell exome sequencing	[41,67]
Epithelial stem cells	Smart-seq2	[60]
Neural stem cells	Smart-seq2	[61]
Induced pluripotent stem cells	RNA-seq and miRNA-seq	[52]

个干细胞之间差异的原因以及所导致的后果, 还可以建立疾病模型, 了解干细胞在疾病发生、发展中的相关机制。

2.2.1 监测干细胞的动态变化 干细胞的自我更新和分化过程是错综复杂的, 若是在细胞群体上对该过程进行研究, 细胞信号会被平均化, 难以识别信号通路或者关键调控因子对于具体干细胞的精密调控, 而单细胞研究将精确追踪特定干细胞的更新分化过程。Zepp等^[58]使用inDrop得到高分辨率的转录组数据, 确定了调节肺泡上皮自我更新和分化的关键信号转导通路, 包括IL-6/Stat3、BMP和FGF等。Yan等^[59]对13 102个小肠谱系干细胞进行单细胞RNA测序, 结果显示, Lgr5⁺细胞由循环干细胞、非循环干细胞和过渡-扩增细胞这3种主要细胞群体组成, 还发现Wnt和RSPO(R-spondin)信号通路的扰动会对这三个不同亚群的Lgr5⁺细胞产生各自独特的影响, 最终证明Wnts是启动因素, 使干细胞通过在细胞表面表达RSPO受体而成熟, 而RSPO则是干细胞数量增加的自我更新因素。Lee等^[60]利用Smart-Seq2结合遗传谱系示踪和3D组织共培养系统来证明Lgr5和Lgr6是肺上皮组织中干细胞的标志物, 揭示了肺中的Lgr5⁺间充质细胞可能是肺泡疾病的靶点, 而Lgr6⁺间充质细胞可能是气道疾病的特异性靶点。Llorens-Bobadilla等^[61]使用单细胞RNA测序技术对于成人脑室下区神经干细胞的转录组进行分析, 确定了离散、休眠的神经干细胞亚群, 揭示了神经干细胞激活的基本原理, 并为脑再生医学开辟了潜在的途径。这些研究有力地说明了单细胞技术监测离散干细胞状态及其动态变化的实用性, 对于通过不同的信号通路精确控制组织再生具有广泛的意义。

2.2.2 解析干细胞的异质性 解析细胞的异质性,

就必须将分辨率精确到单细胞水平甚至是碱基水平, 才能了解不同类型的干细胞群体的异质性和相似性, 确定干细胞群体间的细胞异质的来源, 这有助于诱导干细胞在相关的疾病上发挥组织修复的作用。Tsang等^[57]使用Smart-Seq分析了180个高度纯化的造血干细胞的转录组, 详细分析了RNA-seq数据, 将细胞周期活动鉴定为造血干细胞转录组变异的主要来源。Kowalczyk等^[62]使用Smart-Seq分析来自不同年龄小鼠的造血干细胞和造血祖细胞群的变异性, 研究结果表明, 随着小鼠年龄的增长, 内在细胞状态和组成会发生变化, 同时细胞周期和造血干细胞自我更新分化之间的关系受年龄影响, 这可能会促成老化的造血干细胞的功能衰退。以上研究表明, 单细胞技术可提供有关干细胞群体在不同条件下的丰富信息, 有助于理解相关疾病的发病机制。

2.2.3 鉴定新的干细胞类型 Zepp等^[58]使用inDrop分析鉴定了5种不同的肺间充质细胞类型, 每个间充质谱系具有明显独特的空间位置和转录谱, 并作出了肺间质的空间图和转录图。进一步研究发现, 间充质肺泡壁龛细胞对肺泡再生至关重要, 另一种被称作Axin2⁺肌成纤维祖细胞的肺间充质细胞可以分化成为肌成纤维细胞, 而且在肺部遭受损伤后, 所产生的肌成纤维细胞形成瘢痕组织, 可能导致慢性阻塞性肺病和特发性肺纤维化等疾病。这项研究有助于了解肺中的各种细胞类型以及肺部疾病的发病机制, 为哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维化和其他肺部疾病提供了新的治疗策略。

2.2.4 了解癌症发生、发展的分子机制 肿瘤环境为干细胞的归巢和生存提供了有利的微环境, 从而影响肿瘤的生长和迁移, 如原发性和转移性肿瘤的微环境吸引间充质干细胞, 并分化成肿瘤相关的成纤维细胞, 影响肿瘤细胞的存活和血管生成。

肿瘤干细胞的快速异常分裂往往被认为是肿瘤细胞的主要来源,如骨髓间充质干细胞吸引肿瘤细胞,并形成骨溶解、肿瘤生长存活和耐药性的微环境^[63]。急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)有容易复发的显著特征,白血病干细胞被认为是AML容易复发的根源,能够抵抗化疗药物的作用^[64]。利用单细胞DNA测序结合患者来源的肿瘤异种移植模型,发现针对不同白血病干细胞亚型,同时抑制两个血液细胞中的FLT3-ITD(FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication)和B细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, BCL-2)信号通路,可有效地消除AML症状^[65]。随着单细胞技术的发展,解析干细胞在癌症环境中的复杂机制,将有助于寻找药物来控制成熟肿瘤细胞和肿瘤干细胞的分裂和繁殖,发展新的治疗癌症的手段。

3 单细胞技术结合高通量筛选技术进行药物研发

3.1 高通量筛选技术的介绍

药物研发的重点在于药物发现阶段,随着组合化学、计算机辅助设计等技术的出现,现代药物的研发已经告别了随机偶然不可控的药物发现方法。药物筛选已经变成现代药物研发中不可或缺的技术,尤其是本世纪发展的高通量筛选技术,使得新药筛选过程变得自动化、高灵敏、高通量和微量。采用该技术,每天可以轻松筛选上万到几十万化合物。单细胞技术现在已经开始用于构建疾病特异性和细胞特异性的药物筛选模型,结合高通量筛选技术,在药物研发的过程中发挥着不可忽视的作用。

3.2 建立分子和细胞水平的药物筛选模型

在单细胞水平上全面探索生物活性分子对细胞的影响,这对生物医学研究意义重大。单细胞技术可为药物高通量筛选提供作用的靶点,通过药物和靶点相互作用,筛选出与靶点有亲和力的药物。同时,基于单细胞研究后建立的疾病模型,可进行药效、药理、毒理试验,直接反映药物对于细胞整体的影响,进一步准确地解析药物的生物学意义。

早前大多数单细胞技术能够在单细胞水平上进行深度的测序分析,虽然可以提供有价值的信息,但却仅限于一次只分析一个到几个样品,细胞条形码技术的出现正在消除这个限制^[68],使得单细胞技

术能够以高通量的条件用于分析细胞。Bodenmiller等^[68]推出大量标签细胞条形码(mass-tag cellular barcoding, MCB)的方法,该方法使用96孔板来探索27种抑制剂作用于14种类型的人外周血单核细胞的信号动力学,监测信号动态、细胞间的信息交流以及8个供体之间的信号变异性,实现了高通量筛选,它的优点是不仅仅分析了相关蛋白质,还揭示了靶上和靶外药物如何相互作用影响信号传导网络。条形码技术还能运用于液滴微流体中, Brouzes等^[69]提出了一种基于微滴的微流控技术,可以对单个哺乳动物细胞进行高通量筛选,将单个细胞和试剂封装在不混溶载体油的独立水性微滴中(1 pL~10 nL的体积),生成了8个不同药物样品的文库,对完整液滴内的细胞活力和生长进行定量评分,监测药物样品的细胞毒性。总之,虽然单细胞技术还有很多的局限性,发展还不够成熟,如灵敏度不够高,但是具有广泛的潜在应用,在识别药物作用靶点和细胞亚群,监测药物作用于细胞的药效、毒性等方面,正在发挥着越来越大的作用。

3.3 建立三维干细胞模型筛选药物

虽然利用细胞模型进行药物筛选得到了广泛的应用,但是它是基于静态二维的条件,缺乏对于细胞功能的调节和发挥,不能很好地模拟体内的条件,如来自于健康供体的原代肝细胞是一种宝贵的功能性资源,但是在传统的2D细胞培养皿中培养后容易失去功能。而常使用的动物模型,存在伦理问题,动物和人对于药物反应也存在多方面差异,而且因为动物模型的个体差异,导致药物反应的不均一性和不确切性,不能用于高通量筛选。因此,寻找合适的模型对药物进行精准而高通量的筛选成为药物研发的关键。

目前,利用以干细胞为主的多种细胞培育而成的类器官模型已经成功在体外构建出了脑部类器官、肺部类器官、乳腺癌类器官等,这些类器官模型能够更好地模拟体内环境以进行研发药物。此外,器官芯片作为一种将微加工技术和生物技术相结合的新兴技术,能够制备微型三维人体细胞体外培养系统,精准地控制流体运动和细胞-细胞界面动态模型,如可利用人源iPSC重构出多种具有生理学和力学功能的模型,与实际人体内器官和组织结构具有高度相似性,更好地模拟药物在体内的作用,为药物筛选提供了一个更高的平台。目前,研究人员已经

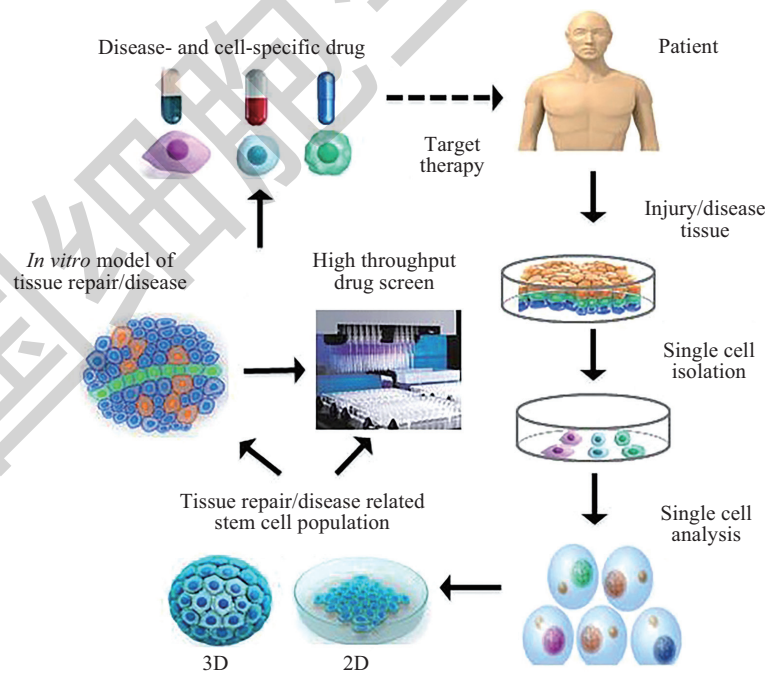
开发出肺部芯片、肠道芯片、淋巴结芯片和脉管系统等,已被用于研究生理学和病理生理学,发现药物靶点,实现高通量筛选新药物。

之所以选择干细胞,是因为相比数量有限的原代体细胞,以及基因突变难以反映人体生理状况的永生化细胞,干细胞来源丰富,可体外扩增且具有自我更新和分化的潜能,很适合作为用于高通量筛选的细胞,目前已广泛用于多种疾病的药物筛选。结合单细胞技术,发现并分选出疾病特异性干细胞作为类器官药物筛选模型,优势明显,可筛选出靶向肿瘤干细胞的药物^[70]。Pattabiraman等^[71]通过高通量筛选得到靶向药物,可用于诱导肿瘤干细胞从间质细胞状态向上皮细胞状态转化(mesenchymal-to-epithelial transition, MET),利用单细胞mRNA测序比较间充质N8(NAMEC8)细胞和MET诱导转化后的N8-CTx(NAMEC8-cholera toxin)细胞的全基因组表达谱发现,药物作用后引起蛋白激酶A(protein kinase A, PKA, PHF2)促进肿瘤干细胞内上皮相关基因的去甲基化,从而解除了这些基因的转录抑制,最后促进细胞转化成为上皮细胞状态,使得具有高侵袭能力的肿瘤干细胞转化成上皮细胞。综上所述,干细胞在药

物研发的过程中扮演着重要的作用,运用高通量筛选技术和单细胞技术,有助于研发药物和修复组织,如治疗癌症等(总结性示意图见图1)。

4 单细胞技术的展望

单细胞技术已经成为现代生命科学研究中不可或缺的有力工具,通过单细胞技术得到的数据没有掩盖细胞群体的内在异质性,随着其在分离、标记、通量和深度等方面的进步,该技术将会提供更深刻的生物学观点。然而,单细胞技术的新颖性也意味着会出现各种局限性,如深入分析单细胞数据的算法和验证实验平台还不成熟,各研究组之间的技术也不尽相同,对于日益庞大的数据集如何进行有效的可视化和解释仍是很大的挑战。随着实验方案、试剂和计算分析程序等方面变得更加标准化,单细胞技术将会以其强大的功能应用到各个领域。尤其令人兴奋的是,将单细胞技术运用到干细胞研究上,研究干细胞的自我更新和分化的过程,鉴定用于调控组织损伤修复的新型干细胞群体和关键调控因子,在此基础上通过结合高通量筛选技术,制定疾病特异性和细胞特异性的药物研发和治疗策略。展



利用单细胞技术从病人获取的损伤组织中分离单细胞,并分析疾病相关的干细胞群落,建立2D/3D模型。可在体外模拟组织修复和高通量筛选药物,研发出药物来对病人进行靶向治疗。

We can use single-cell technologies to isolate the single cell from patients' damaged tissue, and analyze the disease-related stem cell communities to establish 2D/3D models. In this way, we can simulate tissue repair and high-throughput screening drugs *in vitro*, and develop drugs to target patients.

图1 单细胞技术在干细胞组织修复与药物研发中的应用的总结性示意图

Fig.1 Summary diagram of the application of single cell technologies in stem cell tissue repair and drug development

望未来, 相信随着定量、通量和易用性的单细胞分析工具的增加, 单细胞技术的影响可能会从根本上改变生物学科以及相关的应用学科, 促进药物的发现和开发。

参考文献 (References)

- Cai L, Friedman N, Xie XS. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* 2006; 440(7082): 358-62.
- Rosenfeld N, Young JW, Alon U, Swain PS, Elowitz MB. Gene regulation at the single-cell level. *Science* 2005; 307(5717): 1962-5.
- Livesey FJ. Strategies for microarray analysis of limiting amounts of RNA. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003; 2(1): 31-6.
- Zhang Q, Wang T, Zhou Q, Zhang P, Gong Y, Gou H, *et al.* Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms. *Sci Rep* 2017; 7: 41192.
- Jaitin DA, Kenigsberg E, Keren-Shaul H, Elefant N, Paul F, Zaretzky I, *et al.* Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 2014; 343(6172): 776-9.
- Shalek AK, Satija R, Shuga J, Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 2014; 510(7505): 363-9.
- Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6(5): 377-82.
- Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, Sipos B, Lloyd JH, Bruce M, *et al.* Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods* 2018; 15(3): 201-6.
- Fan HC, Fu GK, Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science* 2015; 347(6222): 1258367.
- Datlinger P, Rendeiro AF, Schmid C, Krausgruber T, Traxler P, Klughammer J, *et al.* Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods* 2017; 14(3): 297-301.
- Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Yang JL, Ferrante TC, *et al.* Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science* 2014; 343(6177): 1360-3.
- Chen J, Suo S, Tam PP, Han JJ, Peng G, Jing N. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq. *Nat Protoc* 2017; 12(3): 566-80.
- Islam S, Kjallquist U, Moliner A, Zajac P, Fan JB, Lonnerberg P, *et al.* Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 2011; 21(7): 1160-7.
- Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, *et al.* Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012; 30(8): 777-82.
- Picelli S, Bjorklund AK, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 2013; 10(11): 1096-8.
- Pan X, Durrett RE, Zhu H, Tanaka Y, Li Y, Zi X, *et al.* Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(2): 594-9.
- Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, *et al.* Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals nongenetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 2013; 14(4): R31.
- Hashimshony T, Wagner F, Sher N, Yanai I. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2012; 2(3): 666-73.
- Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, Klochendler A, de Leeuw Y, Anavy L, *et al.* CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol* 2016; 17: 77.
- Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemes J, Shekhar K, Goldman M, *et al.* Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015; 161(5): 1202-14.
- Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, *et al.* Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* 2015; 161(5): 1187-201.
- Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 2013; 14(9): 618-30.
- Cai X, Evrony GD, Lehmann HS, Elhosary PC, Mehta BK, Poduri A, *et al.* Single-cell, genome-wide sequencing identifies clonal somatic copy-number variation in the human brain. *Cell Rep* 2014; 8(5): 1280-9.
- Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011; 472(7341): 90-4.
- Chen C, Xing D, Tan L, Li H, Zhou G, Huang L, *et al.* Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science* 2017; 356(6334): 189-94.
- Dong X, Zhang L, Milholland B, Lee M, Maslov AY, Wang T, *et al.* Accurate identification of single-nucleotide variants in whole-genome-amplified single cells. *Nat Methods* 2017; 14(5): 491-3.
- Vitak SA, Torkenczy KA, Rosenkrantz JL, Fields AJ, Christiansen L, Wong MH, *et al.* Sequencing thousands of single-cell genomes with combinatorial indexing. *Nat Methods* 2017; 14(3): 302-8.
- Casasent AK, Schalck A, Gao R, Sei E, Long A, Pangburn W, *et al.* Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing. *Cell* 2018; 172(1/2): 205-17.
- Macaulay IC, Haerty W, Kumar P, Li YI, Hu TX, Teng MJ, *et al.* G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods* 2015; 12(6): 519-22.
- Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, Hu TX, *et al.* Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 2016; 13(3): 229-32.
- Hou Y, Guo H, Cao C, Li X, Hu B, Zhu P, *et al.* Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res* 2016; 26(3): 304-19.
- Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, *et al.* Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* 2017; 14(9): 865-8.
- Lake BB, Chen S, Sos BC, Fan J, Kaeser GE, Yung YC, *et al.* Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nat Biotechnol* 2018; 36(1): 70-

- 80.
- 34 Toriello NM, Douglas ES, Thaitrong N, Hsiao SC, Francis MB, Bertozzi CR, *et al.* Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20173-8.
- 35 Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (48): 18238-42.
- 36 Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, *et al.* Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 2014; 512(7513): 155-60.
- 37 Guo H, Hu B, Yan L, Yong J, Wu Y, Gao Y, *et al.* DNA methylation and chromatin accessibility profiling of mouse and human fetal germ cells. *Cell Res* 2016; 27(2): 165-83.
- 38 Zhu C, Gao Y, Guo H, Xia B, Song J, Wu X, *et al.* Single-cell 5-formylcytosine landscapes of mammalian early embryos and escs at single-base resolution. *Cell Stem Cell* 2017; 20(5): 720-31.e5.
- 39 Zhu P, Guo H, Ren Y Hou Y, Dong J, Li R, *et al.* Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet* 2018; 50(1): 12-9.
- 40 Haber AL, Biton M, Rogel N, Herbst RH, Shekhar K, Smillie C, *et al.* A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* 2017; 551(7680): 333-9.
- 41 Li C, Wu S, Yang Z, Zhang X, Zheng Q, Lin L, *et al.* Single-cell exome sequencing identifies mutations in KCP, LOC440040, and LOC440563 as drivers in renal cell carcinoma stem cells. *Cell Res* 2017; 27(4): 590-3.
- 42 Wang J, Fan HC, Behr B, Quake SR. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell* 2012; 150(2): 402-12.
- 43 Mi D, Li Z, Lim L, Li M, Moissidis M, Yang Y, *et al.* Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science* 2018; 360(6384): 81-5.
- 44 Shalek AK, Satiya R, Adiconis X, Gertner RS, Gaubblomme JT, Raychowdhury R, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 2013; 498(7453): 236-40.
- 45 Hou Y, Fan W, Yan L, Li R, Lian Y, Huang J, *et al.* Genome analyses of single human oocytes. *Cell* 2013; 155 (7): 1492-506.
- 46 Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100(1): 157-68.
- 47 Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 690-7.
- 48 Hirsch T, Rothoefl T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, *et al.* Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 2017; 551(7680): 327-32.
- 49 Sullivan KM, Goldmuntz EA, Keyes-Elstein L, McSweeney PA, Pinckney A, Welch B, *et al.* Myeloablative autologous stem-cell transplantation for severe scleroderma. *New Engl J Med* 2018; 378(1): 35-47.
- 50 Lee J, Bscke R, Tang PC, Hartman BH, Heller S, Koehler KR. Hair follicle development in mouse pluripotent stem cell-derived skin organoids. *Cell Rep* 2018; 22(1): 242-54.
- 51 Tang J, Su T, Huang K, Dinh PU, Wang Z, Vandergriff A, *et al.* Targeted repair of heart injury by stem cells fused with platelet nanovesicles. *Nat Biomed Eng* 2018; 2(1): 17-26.
- 52 Giacomazzi G, Holvoet B, Trenson S, Caluwe E, Kravic B, Grosemans H, *et al.* MicroRNAs promote skeletal muscle differentiation of mesodermal iPSC-derived progenitors. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1249.
- 53 Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD, *et al.* Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* 2008; 15(21): 1446-53.
- 54 Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, Dick JE. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2001; 2(1): 75-82.
- 55 Kim TH, Saadatpour A, Guo G, Saxena M, Cavazza A, Desai N, *et al.* Single-cell transcript profiles reveal multilineage priming in early progenitors derived from Lgr5⁺ intestinal stem cells. *Cell Rep* 2016; 16(8): 2053-60.
- 56 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242-5.
- 57 Tsang JC, Yu Y, Burke S, Buettner F, Wang C, Kolodziejczyk AA, *et al.* Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol* 2015; 16: 178.
- 58 Zepp JA, Zacharias WJ, Frank DB, Cavanaugh CA, Zhou S, Morley MP, *et al.* Distinct mesenchymal lineages and niches promote epithelial self-renewal and myofibrogenesis in the lung. *Cell* 2017; 170(6): 1134-48.
- 59 Yan KS, Janda CY, Chang J, Zheng GXY, Larkin KA, Luca VC, *et al.* Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5⁺ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* 2017; 545(7653): 238-42.
- 60 Lee J-H, Tammelaq T, Hofree M, Choi J, Marjanovic ND, Han S, *et al.* Anatomically and functionally distinct lung mesenchymal populations marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell* 2017; 170(6): 1149-63.
- 61 Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A. Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury. *Cell Stem Cell* 2015; 17(3): 329-40.
- 62 Kowalczyk MS, Tirosh I, Heckl D, Rao TN, Dixit A, Haas BJ, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells. *Genome Res* 2015; 25(12): 1860-72.
- 63 Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(2): 249-61.
- 64 Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* 2007; 25(11): 1315-21.
- 65 Saito Y, Mochizuki Y, Ogahara I, Watanabe T, Hogdal L, Takagi S, *et al.* Overcoming mutational complexity in acute myeloid leukemia by inhibition of critical pathways. *Science Transl Med* 2017; 9(413): pii: eaao1214.
- 66 Biase FH, Cao X, Zhong S. Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Genome Res* 2014; 24(11): 1787-96.
- 67 Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; 344(6190):

- 1396-401.
- 68 Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, Chen TJ, Savig ES, Brugner RV, *et al.* Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. *Nat Biotechnol* 2012; 30(9): 858-67.
- 69 Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, Marran D, Twardowski M, Hutchison JB, *et al.* Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(34): 14195-200.
- 70 Sachlos E, Risueño Ruth M, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, *et al.* Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell* 2012; 149(6): 1284-97.
- 71 Pattabiraman DR, Bieri B, Kober KI, Thiru P, Krall JA, Zill C, *et al.* Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science* 2016; 351(6277): aad3680.

中国细胞生物学学报