

综述

单细胞测序技术在干细胞领域的研究进展

刘芳远 苏秀兰*

(内蒙古医科大学附属医院, 临床医学研究中心, 呼和浩特 010010)

摘要 细胞异质性是生物体内普遍存在的一种特性, 这种特性容易受外界因素的影响, 甚至是单一类型的细胞在生长环境发生改变时, 其基因表达也可能出现变化并产生差异。干细胞是一类具有无限自我更新和分化潜能的特殊类型的细胞, 在胚胎组织发育和成体组织的动态平衡中发挥了重要作用。单细胞测序为分析包括干细胞在内的细胞异质性提供了强有力的工具, 这种技术可通过更加准确的方式剖析细胞异质性。该文综述了近年来发展起来的单细胞测序技术, 包括单细胞分离、基因组扩增和测序分析, 并讨论了它们在干细胞(包括多能干细胞、肿瘤干细胞和组织特异性干细胞)研究中的应用。

关键词 单细胞分离; 细胞异质性; 单细胞测序

The Role of Single-Cell Sequencing in Stem Cell

LIU Fangyuan, SU Xiulan*

(Research Center for Clinical Medicine, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China)

Abstract Cellular heterogeneity is a fundamental characteristic in biological tissues and easily influenced by external stimulus. Even homologous cells could vary and express different genes when growing environment changes. Stem cell is a class of special cells with unlimited potential of self-renew and differentiation, acting as an essential role in the development of embryonic tissues and the dynamic balance in biological tissues. Single-cell sequencing technology provides a powerful tool for analyzing cellular heterogeneity in a more accurate way. In this review, we will describe the development of single-cell sequencing technology in recent years, including single-cell separation, genome amplification and sequencing analysis, and discuss the applications in multi-potential stem cells, tumor stem cells and tissue-specific stem cells.

Keywords cell separation; cell heterogeneity; single-cell sequencing

自1990年人类基因组计划启动以来, 高通量测序技术得到了快速的发展, 对测序数据进行分析也成为研究中的必要环节^[1]。然而, 由于技术限制, 人们进行转录组测序分析时需要从大量的细胞中提

取足够的DNA样品, 测序分析的对象仍然停留在群体细胞水平。因此, 普通测序分析难以辨别群体细胞中的异质性。为了弥补这种缺陷, 单细胞测序技术(single-cell sequencing)便产生了。单细胞测序技

收稿日期: 2019-01-31 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81660468)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-3451709, E-mail: xlsu@hotmail.com

Received: January 31, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660468)

*Corresponding author. Tel: +86-471-3451709, E-mail: xlsu@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5185>

术是利用高通量测序技术在单个细胞水平上进行分析, 由于能够更准确地体现每个细胞遗传信息的差异性, 目前已被广泛用于微生物群落多样性、肿瘤细胞之间的基因调控和胚胎干细胞分化等多个研究领域。本文重点介绍单细胞测序技术在干细胞领域的研究进展。

1 单细胞测序技术

单细胞测序技术是将通过分离实验得到的单个细胞的全部转录组信息扩增后进行高通量测序分析, 这样可以获得单个细胞的遗传信息和基因表达变化的信息, 是分析细胞异质性的重要手段。传统单细胞测序流程主要包括三个步骤^[2-4]: (1)获得单个细胞样本; (2)对所得单细胞的全基因组进行扩增;

(3)高通量测序分析(图1)。

1.1 单细胞分离

目前常用的分离单个细胞样品的方法主要包括梯度稀释法(serial dilution)^[5]、流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)^[6]、微流控技术(microfluidics)^[7]、激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)^[8-9]等(表1)。梯度稀释法是将细胞悬液以一定的比例进行连续稀释, 从而逐渐达到分离细胞的目的, 该方法具有操作简便、成本低廉的优点, 但容易出现操作误差, 而且无法对样品进行特异性分离。流式细胞荧光分选技术是使用流式细胞仪进行单个细胞或者特定细胞群的分选, 具有分选高度特异性的优势, 是目前使用最广泛的细胞分离手段, 其缺点是上样样品量大, 分选过程

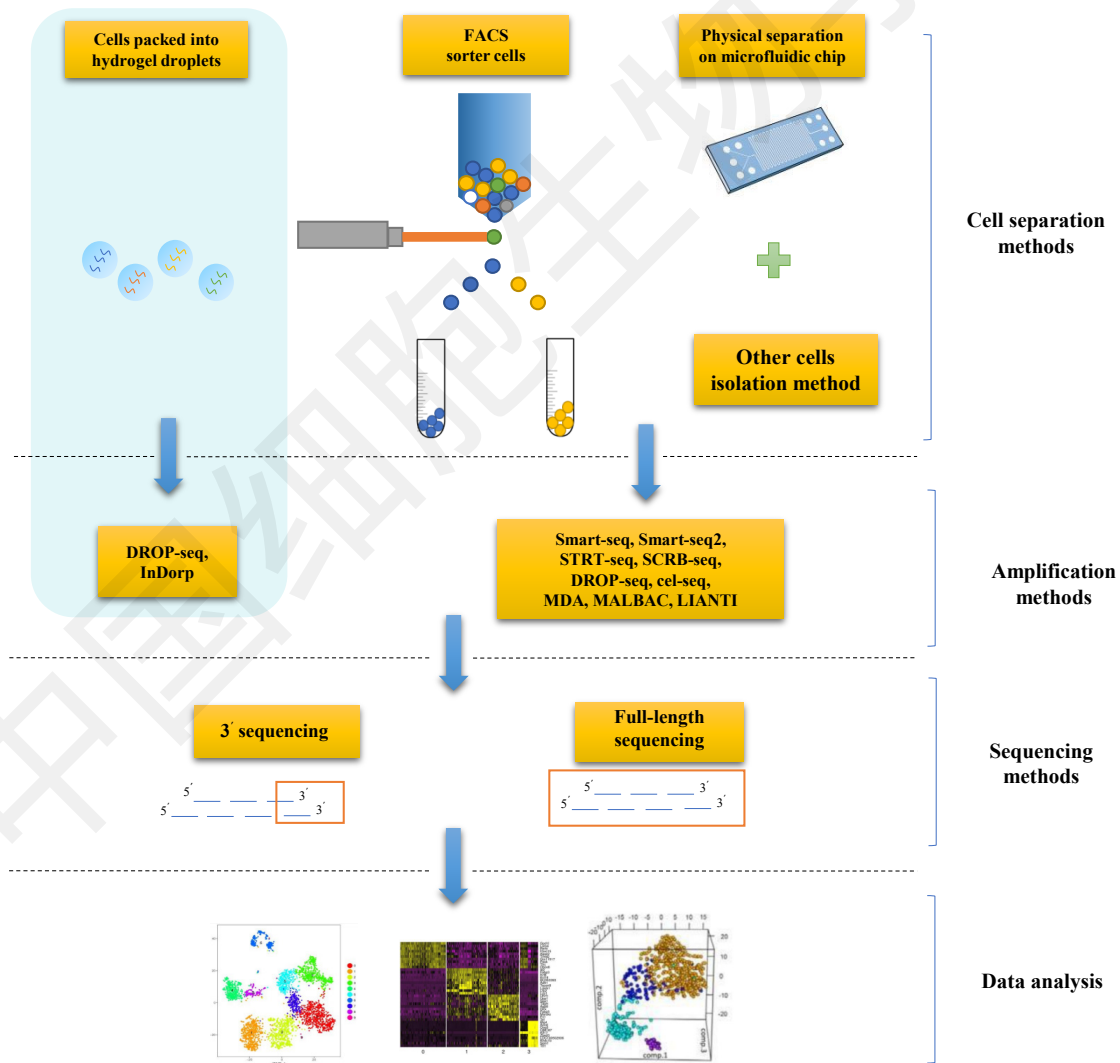


图1 单细胞测序流程

Fig.1 Single-cell sequencing process

中仪器对细胞会产生机械性损伤。微流控分选细胞技术是通过操控流体流动来进行细胞分离的,这一方法突破了传统细胞分选法的一些限制,具有样本消耗低、分选精度高、操作灵活的特点,但是成本过高,目前尚未普及。激光捕获显微切割是将目标细胞或组织切片固定在由乙烯乙酸乙烯酯(ethylene vinylacetate, EVA)材料组成的热塑膜上,然后使用低能红外激光进行脉冲, EVA膜软化后产生附着能力并黏附目标细胞或组织,从而使其与周围组织和细胞分离,使用LCM技术可以通过可视化操作从完整的组织样本中准确、快速地分离得到所需的细胞。其缺点除分选通量较低以外,在切割过程中极有可能对细胞核造成损伤,导致遗传物质受损或丢失,不利于后面进行的组学分析。ZHANG等^[10]将微流控技术加以改进,将细胞分散后包裹在油包水液滴中进行分选,然后将包裹单细胞的液滴分布于一系列试管中达到分离目的,实现了单细胞全基因组扩增与测序的直接对接。这些不断改进的新方法使细胞分离具有更高的准确性和通量。

1.2 单细胞基因组扩增方法

单细胞全基因组扩增是单细胞测序技术的关键环节。典型的动物细胞内mRNA含量约为0.5 pg,远低于进行深度测序所需的DNA含量(>200 ng)^[11-12],因此需要在进行反转录后,进行cDNA扩增。目前已知的扩增方法主要基于3种扩增策略,包括PCR指数扩增、phi29DNA聚合酶扩增、体外转录(*in vitro* transcription, IVT)线性扩增;方法包括Brady法^[13]、Smart-seq2^[14]、STRT-seq^[15]、SCRB-seq^[16]、DROP-seq^[17-18]、cel-seq^[19]等。TANG等^[20]在Brady法上进行改进,提高了覆盖率,从小鼠胚胎干细胞内检测到了10 815个基因;利用IVT方式进行线性扩增,有效减少了PCR指数扩增所造成的偏差,但其扩增效率要远低于PCR扩增^[21];多重置换扩增技术(multiple displacement amplification, MDA)是一种利用Phi29DNA聚合酶且不依赖PCR进行全基因组扩增的技术,与PCR技术相比,Phi29DNA聚合酶强大的聚合能力使这种方法具有更高的覆盖率,但是初期引物和模板结合的随机性导致MDA扩增会出现扩增偏倚。为此, XIE课题组^[22]于2012年提出了多重退火环状扩增循环技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC),这种技术首先进行MDA预扩增,获得闭合的扩增产物环状分子,然后

再进行PCR扩增,可以降低MDA的偏倚性,同时扩增产物的覆盖度提高到了93%。2017年, XIE课题组^[23]又开创了一种新的单细胞基因组线性扩增技术——LIANTI(linear amplification with transposon insertion),该方法利用含有可以线性扩增的T7启动子的转座子将基因片段化,再进行线性扩增放大,全程没有任何指数扩增步骤,将覆盖率提高到了97%(表2)。

这些误差经过扩增后会被放大,继而影响单细胞的测序数据,干扰整体结果。一些研究对同一单细胞扩增产物进行点突变测序,这种方法的缺陷是只能检测到子代测序错误,无法检测到扩增过程中的错误。另一种策略是进行多单元来相互验证,通过分析来自3个或多个单元^[22-24]中的单碱基误差(single-nucleotide variants, SNV)来检测误差,但是这种方法只适用于通过克隆培养的细胞,无法分析原代细胞以及细胞本身具备的SNV。要避免这种误差,可以对单个细胞内的核酸进行多次重复测序,在同一细胞内更准确地检测扩增误差,以更精准的验证单细胞中的真实突变,同时排除假阳性。

1.3 单细胞测序及分析方法

目前,对单细胞进行的测序主要是基于高通量测序技术,日渐发展且成熟的二代、三代测序技术保证了单细胞测序的准确性和效率。相比传统测序手段,单细胞测序数据通常存在较高的噪声和假阴性率,因此需要优化分析工具和算法来改善此类问题^[25]。在干细胞领域,研究人员利用无偏聚类和差异基因表达分析的方法从数据集中发现了不同的细胞类型和亚群体,以及它们的标记基因。ZEISEL等^[26]最近描述了一种基于双向聚类的算法,称为BackSPIN,它提高了从单细胞测序数据中识别细胞类型的准确性。GRUN等^[27]基于单细胞测序技术的特点,在应用独特的分子标识符(unique molecular identifiers, UMIS)来防止交叉污染,开发出了RaceID的算法,这种算法可以最大程度地降低假阳性错误率,虽然,不能有效降低假阴性率,导致忽略了个别基因在细胞中的表达。但是显著地改善了对干细胞或胚胎中单细胞测序数据分析结果。此外,已经应用的一些基于“拟时间”概念的生物信息分析算法,如Monocle算法和Waterfall算法显示出其优势。这些方法可通过单细胞测序的数据^[28-29],对发育或分化过程按照时间序列进行重建,通过计算最小生成树,再将数据降维产生“拟时间”轨迹。“拟时间”分析方

表1 单细胞分离技术及其优点和缺点

Table 1 Comparisons of different technologies of single-cell separation

分离方法 Separation method	样本类型 Sample type	优点 Advantage	缺点 Shortcoming
Serial dilution	Cell suspension	Simple operation and low cost	Low specificity and precision
FACS	Cell suspension	High specificity and sensitivity	More samples and more chance to damage
Microfluidics	Cell suspension	High specificity, fewer samples and wide applicability	High cost
LCM	Tissue	Better sample integrity	Difficult to operate and easy to pollute RNA
Optical tweezer	Cell suspension	High flux and high specificity	High cost, limited applicability and optical damage
TIVA	Tissue	Better sample integrity	Low flux

表2 扩增方法覆盖率和假阴性比较

Table 2 Comparison of coverage and false negative of amplification methods

扩增方法 Method	假阴性率/% False negative rate /%	覆盖率/% Coverage /%
PCR	90.0	46.0
MDA	60.0	87.3
MALBAC	67.0	93.1
LIANTI	46.0	97.0

法能够更加直观地体现细胞分化的线性状态, 这种方法是将整个分化过程中分为几个时间间隔, 分别对这些时间间隔内的细胞进行测序得到表达数据, 形成一组体现细胞状态的连续“快照”, 将“快照”整合后, 便能把整个细胞分化和表达状态以线性的方式展现出来。“拟时间”分析方法仍存在不足之处, 比如整个细胞的分化过程有待更加精确, 个别细胞会出现分化延迟的现象, 这些都会影响最终的分析结果。我们认为可以通过缩短细胞采样时间间隔的方式来提高准确度; 而对于细胞分化延迟的问题, 则可以通过对测序结果添加阈值从而提高结果的可靠性^[30]。

2 单细胞测序技术在干细胞研究领域的应用

2.1 单细胞测序对干细胞研究的意义

干细胞的特性是具有无限自我复制能力, 以及分化为其他功能细胞的潜能, 通常分为全能干细胞、多能干细胞和专能干细胞。细胞异质性也是干细胞的基本特性, 外部生理和病理条件变化引起的刺激常会导致基因表达发生变化, 并且随机分布于不同的细胞时期。这些小的干细胞群体与成体组织中各种分化和中间类型的细胞混合在一起, 使用常规的

测序手段往往会掩盖这些特异性, 而单细胞测序技术为分析干细胞的异质性提供了强有力的工具, 能以全面和无偏的方式对干细胞进行剖析^[31]。

2.2 胚胎干细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)是早期胚胎或原始性腺中分离出来的一类多能干细胞, 它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。在适当的培养条件下, 囊胚的内细胞团可以发育形成胚胎干细胞。HAN等^[32]利用优化的高通量微流控芯片C1-HTIFC技术进行细胞分选, 进行单细胞测序分析后绘制出了人多能干细胞的体外分化图谱, 发现人多能干细胞在分化早期包含有多个分化谱系, 揭示了这些祖细胞的发育轨迹和分化过程中的基因表达动态。BLAKELEY等^[33]通过比较hESCs和多能外胚层的转录信息后, 发现与多能性相关基因具有保守性且在不同的通路中富集, 在hESCs内, 与细胞增殖和FGF、MAPK、Wnt信号通路相关的基因呈现相对高表达, 这表明, 植入前外胚层和hESCs维持多能性机制并不完全相同。

尽管ESCs具有同质性, 但其仍然包含不同的亚群体。WU等^[34]利用单细胞测序分析后发现, 在单个mESCs中基因表达的情况均有所不同, 并依据转录水平的差异确定几个亚群体。KLEIN等^[17]通过使用

液滴条形码方法对近1 000个单个mESCs进行测序后,发现了几个新的亚群体,包括类表皮型、Prdm1高表达型和hsp90高表达型;对数千个细胞进行了测序,观察白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)戒断后mESCs的分化情况,发现在撤掉LIF后第4天细胞分化表现出最大的异质性,有趣的是,7天后分化细胞与mESC细胞出现了部分的重叠。通过对数据的进一步降维后,发现了几种未知细胞类型的亚群:在撤掉LIF后的第2天和第4天筛选出了表达2细胞标志物Zscan4和Tcstv1/3全能细胞;而在第4天和第7天,则出现了表达母本印迹基因(H19、Rhox6/9、Peg10、Cdkn1等)的细胞亚群(图2)。这种方法体现了mESC在分化过程中的动态变化,表明单细胞测序技术可以用于分析检测细胞亚群及找出这些细胞亚群的标记基因。

2.3 肿瘤干细胞

早在20世纪70年代,人们就证实了肿瘤组织中存在多种细胞亚群,这些不同的细胞在抗药性、增殖、转移能力等方面都存在差异,从而揭开了肿瘤

细胞异质性研究的序幕^[35]。在肿瘤细胞顶端有一个高度恶性干细胞类型群体,将其定义为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs),然而,在许多癌症中是否存在干细胞仍然存在较大争议。单细胞测序则为洞察肿瘤细胞异质性提供了一种新的检验手段。

FELTHAUS等^[36]通过对口腔鳞状细胞癌肿瘤细胞进行单细胞分析,发现口腔鳞状细胞癌的干细胞样细胞对常规化疗具有抵抗作用。DALERBA等^[37]利用单细胞-PCR技术对人正常结肠和结肠癌上皮细胞的组织进行了分析,在人结肠癌组织中发现了与正常结肠的细胞谱系相似细胞亚群,这表明,谱系分化是造成肿瘤细胞异质性的一个重要原因。PATEL等^[38]通过对来自5组胶质母细胞瘤样本进行筛选过滤后,对得到的430个单细胞进行了测序发现,每组肿瘤标本在拷贝数变化、细胞周期差异和免疫响应等许多方面均表现出较高的细胞异质性,并且与来自不同肿瘤细胞相比,来自同一肿瘤样本的单细胞彼此之间的相关性更高。他们后来又检测了5组肿瘤样本中干性相关的基因,包括细胞周期

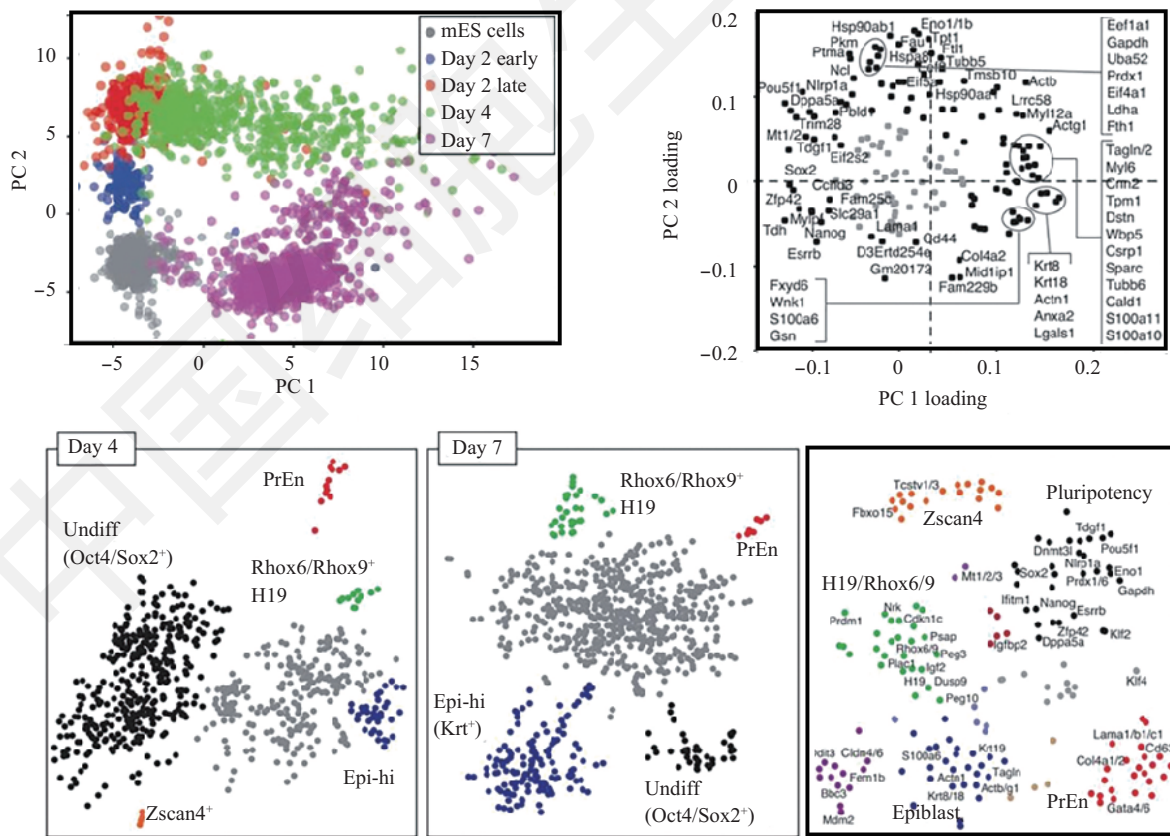


图2 mESC在分化过程中体现的异质性(根据参考文献[17]修改)

Fig.2 Heterogeneity of mESC in differentiation process (modified from reference [17])

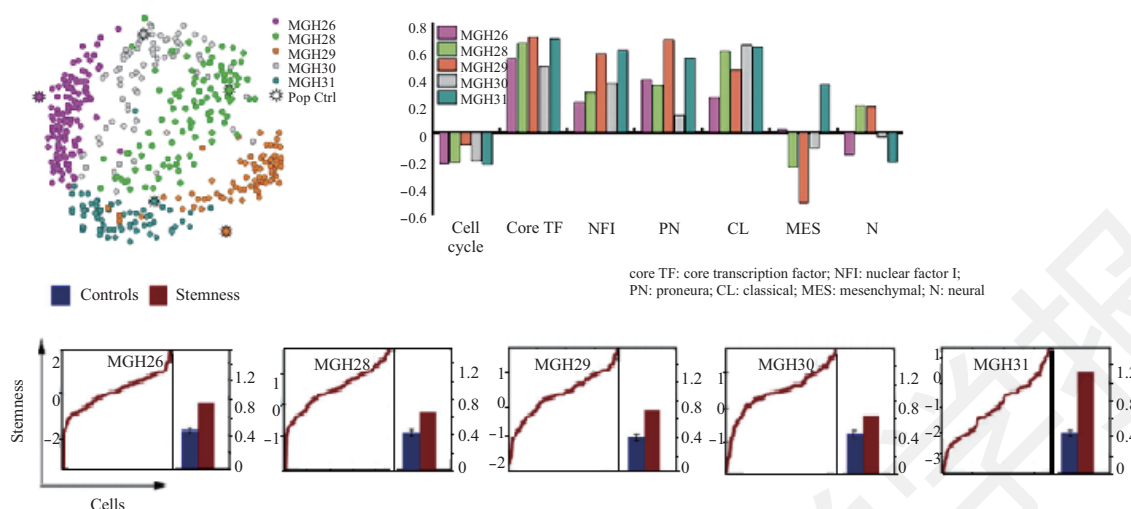


图3 430个肿瘤细胞单细胞测序分析结果及5组样本干性梯度情况(根据参考文献[38]修改)

Fig.3 Single-cell sequencing analysis of 430 tumor cells and single-cell transcriptional profiles revealed stemness gradient in 5 samples (modified from reference [38])

的标记基因、核转录标记基因、前神经元、肿瘤经典标记基因、间充质干细胞标记基和神经细胞标记基因,发现这些干性基因在肿瘤细胞内呈现出连续的表达状态而不是离散表达的状态,表明原发性肿瘤细胞中存在着一系列的干细胞状态(图3)。相信随着单细胞测序在准确性和通量方面的发展,研究人员将有望获得更完整、更准确的各种肿瘤异质性的谱图。

2.4 组织特异性干细胞

组织特异性干细胞是一类存在于发育中或分化组织中的干细胞,同样具备自我更新和分化为特异性细胞的潜能。

TREUTLEIN等^[39]用微流控单细胞测序技术对来自肺泡分化中4个不同阶段的198个细胞进行了转录组分析,确定了小鼠远端肺上皮的发育状态和细胞层次,发现一种新的干细胞类型——一种肺泡1型和肺泡2型的标记基因共同表达的干细胞亚型,具有同时分化肺泡1型和肺泡2型的潜能。造血干细胞可以分为长期造血干细和短期造血干细胞。KOWALCZYK等^[40]和TSANG等^[41]的研究发现,细胞周期的差异导致了不同类型造血干细胞的细胞异质性,他们利用单细胞转录组的测序数据重建了HSCs的细胞周期过程,为研究静止期和增殖期的干细胞特性提供了一种新的方法。成年哺乳动物大脑中脑室下区和齿状回颗粒下区的神经干细胞可不断生成

新的神经元和胶质细胞。神经发生过程从静止的神经干细胞开始,成为激活的神经干细胞,随后成为早期的中间祖细胞。SHIN等^[28]利用“拟时间”方法分析单细胞转录组数据,绘制出神经干细胞从静止到激活再分化为早期中间祖细胞的神经元发生轨迹。TREUTLEIN等^[39]的研究获得相似的结果,这两项研究都是在给定的时间点对组织中一定数量的单细胞进行测序,这表明,利用单细胞测序技术可以描绘出发育过程中转录组动态的谱图。TANG课题组^[42-43]利用单细胞测序技术分别对肾脏和食道、胃、小肠、大肠的发育进程在基因表达调控层面进行解析,绘制出了肾脏和消化道的发育细胞图谱,为鉴定组织特异性干细胞分化的基因表达特征提供一定的依据。

3 讨论与展望

近年单细胞测序技术得到快速的发展,已经广泛应用于胚胎干细胞、肿瘤研究、神经学科等领域,利用单细胞测序技术可以从单个细胞中获得所需的转录组、基因组^[44]、DNA甲基化组^[45-46]等多组学的信息,这有利于分析来自肿瘤组织和胚胎干细胞分化、增殖过程中产生的异质性。不仅如此,单细胞测序技术在准确性和通量方面也取得了巨大的进步,基于Microwell-seq平台的测序方法利用小鼠的转录组信息构建了首个哺乳动物细胞图谱^[47],对人

类细胞图谱的构建有指导性的意义。这些单细胞分析技术的发展将为分析干细胞和肿瘤细胞中的特异性基因提供强有力的工具,通过“拟时间”分析可以跟踪干细胞分化过程中基因变化动态,帮助我们了解早期胚胎分化过程,进而优化分化方案。

尽管如此,目前单细胞测序技术还有很多有待改进的地方,尤其是在扩增偏倚、测序噪声和测序精度等方面。随着扩增技术的不断改进和测序技术的不断发展,单细胞测序技术的准确性和通量将会不断得到提升,分析方法也会日益丰富,而这将有助于发掘细胞水平上基因型和表型之间的深层联系,为我们了解疾病和生命科学的真谛提供帮助。

参考文献 (References)

- [1] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [2] PAPALEXI E, SATIJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(1): 35-45.
- [3] POTTER S S. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 479-92.
- [4] 文路, 汤富酬. 单细胞转录组高通量测序分析新进展[J]. *遗传 (WEN L, TANG F C. Recent progress in single-cell RNA-Seq analysis. Hereditas)*, 2014, 36(11): 1069-76.
- [5] ZHANG K, MARTINY A C, REPPAS N B, et al. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(6): 680-6.
- [6] STEPANAUSKAS R, SIERACKI M E. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time [J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 2007, 104(21): 9052-7.
- [7] MARCY Y, ISHOEY T, LASKEN R S, et al. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(9): 1702-8.
- [8] FRUMKIN D, WASSERSTROM A, ITZKOVITZ S, et al. Amplification of multiple genomic loci from single cells isolated by laser micro-dissection of tissues [J]. *BMC biotechnology*, 2008, 8: 17.
- [9] RAMSER K, HANSTORP D. Optical manipulation for single-cell studies [J]. *J biophotonics*, 2010, 3(4): 187-206.
- [10] ZHANG Q, WANG T, ZHOU Q, et al. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41192.
- [11] CHIN C S, SORENSON J, HARRIS J B, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(1): 33-42.
- [12] RASKO D A, WEBSTER D R, SAHL J W, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 709-17.
- [13] BRADY G, BARBARA M, ISCOVE N. Representative *in vitro* cDNA amplification from individual hemopoietic cells and colonies [J]. *Methods Mol Cel Biol*, 1990, 2(1): 17-25.
- [14] PICELLI S, FARIDANI O, BJRKLUND A K, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(1): 171-81.
- [15] ISLAM S, KJALLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq [J]. *Genome Res*, 2011, 21(7): 1160-7.
- [16] ZILIONIS R, NAINYS J, VERES A, et al. Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(1): 44-73.
- [17] KLEIN A M, MAZUTIS L, AKARTUNA I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1187-201.
- [18] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1202-14.
- [19] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-73.
- [20] TANG F, BARBACIORU C, BAO S, et al. Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis [J]. *Cell stem cell*, 2010, 6(5): 468-78.
- [21] KLEIN C A, SEIDL S, PETAT-DUTTER K, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 387-92.
- [22] 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.
- [23] CHEN C, XING D, TAN L, et al. Single-cell whole-genome analyses by linear amplification via transposon insertion (LIANTI) [J]. *Science*, 2017, 356(6334): 189-94.
- [24] WANG Y, WATERS J, LEUNG M L, et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing [J]. *Nature*, 2014, 512(7513): 155-60.
- [25] STEGLE O, TEICHMANN S A, MARIONI J C. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(3): 133-45.
- [26] ZEISEL A, MUNOZ-MANCHADO A B, CODELUPPI S, et al. Brain structure. cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq [J]. *Science*, 2015, 347(6226): 1138-42.
- [27] GRUN D, LYUBIMOVA A, KESTER L, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types [J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 251-5.
- [28] SHIN J, BERG D A, ZHU Y, et al. Single-cell RNA-seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neurogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(3): 360-72.
- [29] TRAPNELL C, CACCHIARELLI D, GRIMSBY J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 381-6.
- [30] WEN L, TANG F. Single-cell sequencing in stem cell biology [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 71.
- [31] 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.
- [32] HAN X, CHEN H, HUANG D, et al. Mapping human pluripotent stem cell differentiation pathways using high throughput single-cell RNA-sequencing [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 47.

- [33] BLAKELEY P, FOGARTY N M, DEL VALLE I, et al. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3151-65.
- [34] WU A R, NEFF N F, KALISKY T, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 41-6.
- [35] FIDLER I J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 1978, 38(9): 2651-60.
- [36] FELTHAUS O, ETTL T, GOSAU M, et al. Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 28-33.
- [37] DALERBA P, KALISKY T, SAHOO D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(12): 1120-7.
- [38] PATEL A P, TIROSH I, TROMBETTA J J, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [J]. *Science*, 2014, 344(6190): 1396-401.
- [39] TREUTLEIN B, BROWNFIELD D G, WU A R, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq [J]. *Nature*, 2014, 509: 371-5.
- [40] KOWALCZYK M S, TIROSH I, HECKL D, et al. Single cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells [J]. *Genome Res*, 2015, 25(12): 1860-72.
- [41] TSANG J C, YU Y, BURKE S, et al. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 178.
- [42] GAO S, YAN L, WANG R, et al. Tracing the temporal-spatial transcriptome landscapes of the human fetal digestive tract using single-cell RNA-sequencing [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(6): 721-34.
- [43] WANG P, CHEN Y, YONG J, et al. Dissecting the global dynamic molecular profiles of human fetal kidney development by single-cell RNA sequencing [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(13): 3554-67, e3.
- [44] MACAULAY I C, HAERTY W, KUMAR P, et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 519-22.
- [45] ANGERMUELLER C, CLARK S J, LEE H J, et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(3): 229-32.
- [46] 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.
- [47] HAN X, WANG R, ZHOU Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by microwell-seq [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1091-107, e17.