

单细胞转录组测序技术在细胞分类中的应用

杨佳凤 陈鹏璐 龚熹*

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要 多细胞有机体的细胞类型多且复杂, 细胞间普遍存在异质性。目前, 单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术是一项新兴的研究单个细胞转录水平的技术, 其从数千个平行的细胞中生成转录谱, 揭示个体细胞基因组的差异性表达, 反映细胞间的异质性, 从而鉴定出不同细胞类型, 形成组织或器官的细胞图谱, 在生物和临床医学等领域发挥重要作用。该文在对scRNA-seq测序平台进行阐述和比较的基础上, 着重介绍其在神经系统和免疫系统细胞类型探索中的应用, 并且总结scRNA-seq与空间转录组技术相结合的研究成果。

关键词 单细胞转录组测序技术; 细胞类型; 空间转录组; 细胞图谱

Application of Single-Cell RNA Sequencing Technology in Cell Classification

YANG Jiafeng, CHEN Penglu, GONG Xi*

(School of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract The cell types of multicellular organisms are numerous and complex, and inter-cell heterogeneity is prevalent. The emerging scRNA-seq (single-cell RNA sequencing) technology is of great importance in researching the transcription levels of individual cells. This technology produces a transcription profile from thousands of parallel cells, reveals the differential expression of single cell genome, and reflects the heterogeneity between cells. This technology identifies different types of cells and forms a cell map of tissues or organs. Having a significant role in bioscience and clinical medicine, scRNA-seq technology is becoming a focal point of life science research. Based on the detailed description and comparison of scRNA-seq sequencing platform, this review focuses on the exploration of cell types in nervous system and immune system, and summarizes the application of scRNA-seq and space transcriptome technology.

Keywords single-cell RNA sequencing technology; cell type; spatial transcriptome; cell map

单细胞测序技术(single-cell sequencing)是基于单细胞水平, 对基因组和转录组进行高通量分子检测的一项新技术。之前的高通量测序技术, 是以混合细胞群作为目标进行测序的, 其研究结果忽略了单个细胞之间产生的基因表达差异, 因此许多低

丰度的信息会丢失。2009年, TANG等^[1]报道了单细胞转录组测序技术(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq), 之后该技术飞速发展, 多种技术平台被开发, 单细胞测序技术弥补了传统高通量测序的局限性, 实现了同时对大量样本进行测序, 为研究有机

收稿日期: 2020-11-10 接受日期: 2020-12-16

国家自然科学基金(批准号: 31960167)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13319417510, E-mail: gongxi413@163.com

Received: November 10, 2020 Accepted: December 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31960167)

*Corresponding author. Tel: +86-13319417510, E-mail: gongxi413@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5475>

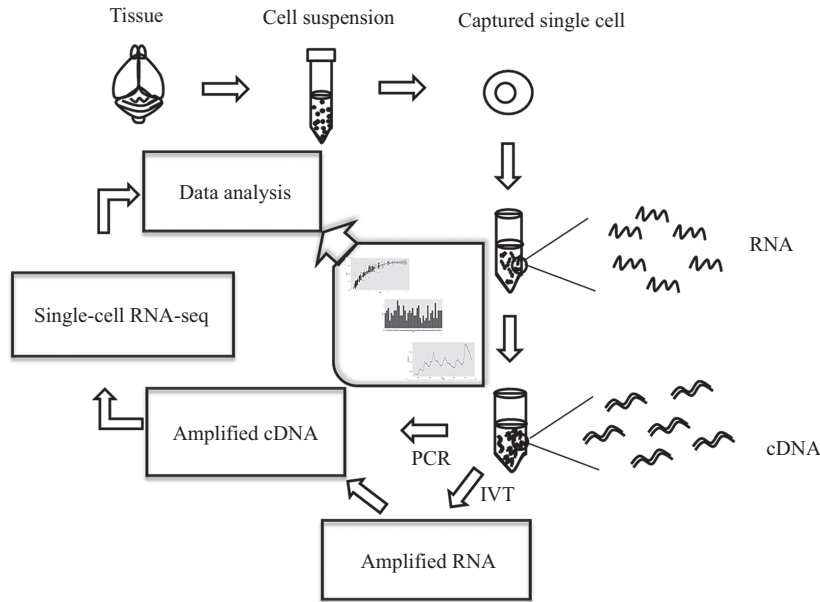


图1 scRNA-seq技术路线

Fig.1 The technical route of scRNA-seq

体的细胞分类和细胞发育的分子机制提供了有效的方法,其技术路线如图1所示。本文阐述单独使用scRNA-seq技术在单细胞水平下对细胞分类进行的研究,并结合空间转录组数据共同分析细胞信息,从细胞水平和空间水平描绘组织基因图谱,总结研究者运用scRNA-seq技术获得的研究成果。

1 单细胞转录组测序技术

1.1 单细胞捕获

scRNA-seq技术的关键是如何精确完整地群体细胞中捕获具有细胞活性的单个细胞。单细胞分离技术越来越成熟,从手动的显微操作到自动化的微流控系统(microfluidics)均被广泛应用于市场。

GROSS等^[2]对单细胞捕获技术进行市场调查,发现荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)是目前应用最多的一项分离技术,其样本覆盖绝大多数细胞类型。WAGNER等^[3]对人卵巢皮质的研究、LANGE等^[4]对斑马鱼的神元研究以及KIM等^[5]对小鼠下丘脑的研究均使用FACS进行单细胞的捕获。FACS细胞分选技术是利用流式细胞仪将事先通过特异性抗体标记的目的细胞从单细胞悬液中分选出来,该方法的优点在于可以对特定类型细胞进行初步富集,但该技术对于细胞起始量有一定要求,因此对于少量或稀有细胞不适用^[6]。

在倒置显微镜下,用吸管直接将单个细胞吸出

的显微操作方法,看似简便,但操作难度大、通量低,同批次只能检测几十或上百个细胞。对于固体组织样品的单细胞捕获可以采用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)来实现^[2],利用激光脉冲融化靶细胞上方的透明热塑性薄膜,薄膜融化过程中与靶细胞融合,当移去薄膜后,靶细胞结合在薄膜上,非目的细胞被留下,从而实现单细胞的分离^[6]。

自动化检测的微流控系统,广泛应用于单细胞基因组的异质性检验和肿瘤细胞的分离。对比其他几种分离方法,微流控系统所需的样品量少,有助于提高样品的通量和mRNA检测的灵敏度^[6-9]。Fluidigm公司开发的Fluidigm C1微流控系统能够快速完成800多个单细胞样本的捕获和制备。Droplets微流控芯片是基于液滴实现单细胞捕获,该技术的单细胞捕获效率高达65%。Drop-seq^[10]以及10× Genomics^[11]技术平台均采用Droplets技术捕获单细胞。

1.2 scRNA-seq技术平台

scRNA-seq技术在获得单细胞之后,需要裂解细胞,将RNA转化成cDNA,扩增cDNA以生成高通量的测序文库。目前,已建立多种scRNA-seq平台(表1),大致可将其分为两大类,一类是基于全长序列的测序方法,如SMART-seq(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript sequencing)和SMART-seq2(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript sequencing 2)^[12];另一类是基于独特的分子标

表1 主要scRNA-seq技术汇总

Table 1 Summary of major scRNA-seq technologies

技术平台 Technology platform	捕获单细胞 Captured single cell			cDNA扩增 Amplified cDNA		测序方法 Sequencing method	
	Fluidigm C1	FACS	Droplets	PCR	IVT	Full length	UMIs
CEL-seq2	√				√		√
Drop-seq			√	√			√
MARS-seq		√			√		√
SCRB-seq		√		√			√
SMART-seq2		√		√		√	
SMART-seq	√			√		√	
10× Genomics			√	√			√

识符(unique molecular identifiers, UMIs)的测序方法,包括CEL-seq2(cell expression by linear amplification and sequencing 2)^[13]、Drop-seq^[10]、MARS-seq(massively parallel RNA single-cell sequencing)^[14]、10× Genomics^[15]等。

1.2.1 基于全长序列的测序方法 SMART-seq是一种全长scRNA-seq方法^[12,16-17]。其使用Fluidigm C1微流控系统自动分离并裂解单细胞,并且使用带有poly(T)的引物进行逆转录生成cDNA的第一条链,然后使用含有oligo(dC)的引物合成第二条链,经过PCR技术获得纳克级的DNA。

1.2.2 基于独特分子标识符的测序方法 CEL-seq(cell expression by linear amplification and sequencing)发表于2012年,是一种基于体外转录(*in vitro* transcription, IVT)扩增的技术,具有较高的重现性和灵敏性^[18]。CEL-seq2是在CEL-seq基础上,进行优化形成的新系统,其比CEL-seq灵敏度更高、手动操作时间更少且价格更低^[13]。Drop-seq利用微流体装置形成纳米级的液滴,单个细胞与带有明显条码(Barcode)的微粒被封装在其中,细胞在液滴中裂解,通过与其伴生的微粒捕获特定细胞的mRNA,形成附着在微粒上的单细胞转录组(single-cell transcriptomes attached to microparticles, STAMPs)。STAMPs条码可以用来推断每个转录本的细胞来源。Drop-seq可以实现对成千上万个单细胞的mRNA进行平行分析^[10]。MARS-seq基于FACS将单细胞分选至384孔板中,随后进行自动化处理,通过严格控制扩增偏差和标记错误,极大地提高了细胞的产量和实验的可重复性^[14]。10× Genomics,基于微滴的核酸条形码分配系统,是单细胞测序领域中的后起之秀,具有测序深度高、细胞通量高以及基于UMIs

消除PCR测序偏差等特点^[15], DURANTE等^[19]和SRIDHAR等^[20]均用10× Genomics进行单细胞测序。10× Genomics通过微流控系统,将单个细胞与带有Barcode、poly(dT)引物和UMIs信息的磁珠包裹在凝胶珠(gel beads)中,形成油包水微体系(gel bead in emulsion microsystem, GEM),使得细胞带上特定的条码,细胞裂解后mRNA被释放出来,最后通过逆转录产生用于测序的带有特殊标记的cDNA。

1.2.3 各测序方法的比较 ZIEGENHAIN等^[21]通过分析小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的scRNA-seq测序数据,对6种主要的scRNA-seq测序方法的敏感度、准确性和精密性进行了评估。评估结果表明,SMART-seq2检测到的基因最多;基于UMIs的CEL-seq2、Drop-seq、MARS-seq和SCRB-seq(single-cell RNA barcoding and sequencing)量化了mRNA水平;通过最小成本计算,Drop-seq是最具成本效益的方法,然后是SCRB-seq、MARS-seq和SMART-seq2。由于Drop-seq的建库成本较低,在分析大量低覆盖率的细胞时,它可能是更好的选择;但Drop-seq对细胞量的需求较大,当细胞量较少或稀有时,可以考虑选用SCRB-seq和MARS-seq。ZHANG等^[22]比较了Drop-seq、10× Genomics和in-Drop这3种基于液滴的高通量scRNA-seq系统,结果表明,10× Genomics具有较高的灵敏度和精密性,其技术噪音也比另外2个系统要低。

2 单细胞水平下的细胞分类

2.1 scRNA-seq应用于已知细胞类型的研究

神经系统和免疫循环系统是机体的两大系统,绝大多数疾病都跟这两大系统有关,因此,研究神经和免疫系统的结构和功能是了解人体机能和解决医

学难题的关键。

2.1.1 神经系统细胞亚群 多细胞有机体的细胞类型多且复杂, 哺乳动物的大脑神经系统尤为复杂^[23]。哺乳动物的神经元类型具有异质性, 但许多细胞类型还未被发现^[24-25], 因此, 通过scRNA-seq技术研究神经系统的细胞类型是生物学上的重大举措。

目前, 神经系统细胞类型主要有神经元细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞、血管内皮细胞、小胶质细胞等^[26-27], 每种细胞类型均可通过scRNA-seq技术研究其细胞亚群。神经元是神经系统的基本结构, 是脑的主要成分, 每个神经元之间能够实现信息传递, 是大脑正常运转的重要工具, 因此, 研究神经元的发生和作用机制对了解神经系统功能是必不可少的, ZEISEL等^[26]在小鼠脊髓、背根神经节、交感神经节以及肠神经系统等19个区域中取样, 通过FACS技术分别从*Wnt1-Cre;R26Tomato*转基因小鼠和*vGat-Cre;TdTomato*细胞株中获得神经嵴源性细胞和抑制性神经元, 运用10× Genomics技术平台对约50万个细胞进行测序, 通过分析特定的基因来定义主要的细胞类型, 这些特定的基因能够实现某一类细胞的特定功能, 并且研究者发现神经元在神经系统中是最多样化的。TASIC等^[28]通过FACS分选细胞, 而后用Illumina智能超低RNA试剂盒进行反转录和cDNA扩增, 并用Illumina Nextera XT DNA试剂盒构建文库, 测序分析了成年小鼠初级视觉皮层中的1 679个细胞, 其中测序转录本为500万的细胞占98%以上, 共鉴定出23个γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)能神经元簇、19个谷氨酸能神经元簇和7个非神经元细胞, 发现转录细胞类型表现出特定的电生理和轴突投射属性, 证实单细胞转录特征可以与特定的细胞属性相关联。

神经胶质细胞广泛存在于中枢神经系统中, 其能支持和滋养神经元。脑细胞发育也依赖于神经胶质细胞。少突胶质细胞、星形胶质细胞以及小胶质细胞均是神经胶质细胞的类型。ZEISEL等^[27]结合FACS和Fluidigm C1平台对小鼠体感皮层(S1)和海马CA1区的细胞进行捕获和建库, 在基于UMIs的测序分析后, 他们开发了一种用于鉴定不同细胞种类的双聚类方法BackSPIN, 通过分析3 005个细胞发现了9大类细胞和47个在分子水平上不同的细胞亚类, 其中包括代表着从少突胶质前体细胞到成熟少突胶质细胞的发育过程的6种少突胶质细胞, 表明细胞在

成熟过程中具有特异性, 这项研究能够为描绘大脑图谱和研究疾病提供重要信息。随后, ZEISEL等^[26]研究了小鼠神经系统, 观察到7种表达*Apq4*的星形胶质细胞, 这些细胞呈现区域特异性分布, 研究者还发现了嗅觉特异性(ACOB)的星形胶质细胞和端脑特异性(ACTE1和ACTE2)的星形胶质细胞。视网膜神经细胞能够将光转换成神经信号, 通过神经节传递到大脑, 造成成人失明的主要原因是遗传性视网膜疾病, 因此, 了解单个视网膜细胞类型的相关基因对治疗视网膜疾病非常重要。MENON等^[29]运用10× Genomics 3' v3平台研究老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的相关遗传变异, 利用多分辨率网络分析6例死后人视网膜的3 248个细胞的测序数据, 使用已知细胞类型特异性标记基因来识别主要的视网膜细胞类型及基因表达特征, 发现AMD危险基因与视网膜大胶质细胞、小胶质细胞和血管细胞显著相关。

2.1.2 循环免疫细胞亚群 免疫系统遍布全身, 具有许多种类的细胞, 现已知的主要细胞类型有干细胞、单核细胞和树突状细胞等。造血系统是维持机体正常生理活动的重要结构, 造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)经过中间祖细胞产生成熟的血细胞, 其在增殖、自我更新和分化中具有异质性^[30-31]。NESTOROWA等^[31]通过scRNA-seq技术分析1 656个造血干细胞和祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC), 他们首先用FACS进行细胞分选和捕获, 再用Illumina Nextera XT DNA试剂盒进行文库构建, 将制备好的文库在Illumina HiSeq 2500系统和Illumina HiSeq 4000系统中进行测序, 最终建立了12个HSPC的细胞类群, 获得了HSPC分化的表达图谱。VILLANI等^[32]采用FACS从人类血液中分选出树突状细胞(dendritic cells, DCs)群和单核细胞群, 运用SMART-seq2技术进行单细胞RNA测序, 使用不依赖于已知标记的无监督聚类分析, 在质控(quality control, QC)后的2 400个细胞中鉴定出6个DCs和4个单核细胞亚型, 并从中揭示了一种新的DCs亚群, 该亚群与浆细胞样DCs(plasmacytoid DCs, pDCs)具有相同的特性, 但能有效激活T细胞, 从而重新定义pDCs。新的DCs亚群的发现, 为研究疾病中的DCs提供新的方向, 为构建免疫细胞图谱提供有效的信息。

CAI等^[33]采用10× Genomics 3' v2平台, 对结核

病患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)进行单细胞测序分析,他们将双细胞、总基因表达<500和线粒体基因表达>7%的细胞去除后保留了约62 000个高质量的细胞,使用Seurat R包进行无监督聚类分析,确定了29个细胞亚类。通过比较来自健康者(healthy control, HC)、潜伏性结核感染者(latent tuberculosis infection, LTBI)和结核病患者(tuberculosis, TB)的scRNA-seq数据集,发现感染改变了TB免疫细胞亚群的密度。即自然杀伤(natural killer, NK)细胞亚类(CD3⁻CD7⁺GZMB⁺)的密度变化可以区分健康者、潜伏性患者和活跃性结核者,表明NK细胞亚类(CD3⁻CD7⁺GZMB⁺)可以作为鉴定结核病的生物标志物。

血管疾病是导致死亡的主要原因,然而我们对血管细胞成分的了解是非常有限的。研究者通过SMART-seq2对来自小鼠大脑的3 436个细胞和肺的1 504个细胞进行测序分析,采用BackSPIN算法将细胞分为不同的细胞类型,定义了小鼠大脑和肺部的血管相关细胞类型^[34],构建了小鼠大脑和肺部的血管相关细胞的分子图谱,为今后的血管发育和疾病研究提供了坚实的基础。

2.2 新细胞类型的探索及细胞图谱的创建

自1665年罗伯特·虎克发现细胞之后,人们不断对细胞类型进行探索,但现有的细胞分类的依据都不相同,而且相互之间缺乏联系。scRNA-seq技术能够实现同时对成千上万个单细胞的转录本检测,鉴定出不同细胞类型,创建一个完整的细胞图谱(cell atlas)。细胞图谱的阐明将带来对细胞发展、组织学、生理学、病理学及细胞外调控等方面的新认知,并提高对细胞变化及其影响的判断能力。

scRNA-seq的出现是生物医学史上的福音,随着其技术的不断优化,越来越多的科学家发现了罕见的甚至是新的细胞类型,这不仅能促进完整细胞图谱的绘制,还能打破人们对某些系统或疾病的认识。以下总结了近几年来,利用scRNA-seq技术鉴定出新细胞类型的成果(表2)。2018年, *Nature*同时报道了两篇利用scRNA-seq技术发现同一种新细胞的文章,2个研究团队分别对小鼠气道组织^[35]、小鼠气管上皮和人支气管上皮^[36]进行测序分析,均发现了囊性纤维化突变基因*CFTR*活性的主要来源——肺部离子细胞,这是一种新型的肺细胞类型。MON-TORO等^[35]同时用SMART-seq2和10× Genomics对

小鼠气道组织进行测序,分别分析了301个和7 193个细胞,他们用Foxil-GFP报告小鼠和抗Foxil免疫反应证实了肺部离子细胞是新的细胞亚群,还建立小鼠肺部离子细胞损伤模型,进一步验证了肺部离子细胞与囊性纤维化突变基因*CFTR*的相关性,这一发现为医学界提供了治疗囊性纤维化疾病的新思路。肾脏是一种跟机体健康息息相关的器官,它是机体的过滤器,调节机体的酸碱平衡并且能够分泌调节血液和血压的激素, *PARK*等^[37]通过基于液滴的scRNA-seq分析40 000多个健康小鼠肾脏细胞,发现3种未被报道过的细胞亚群,其中包括肾集合管的新细胞类型和2个还未被定义的细胞,并绘制了完整的小鼠肾脏细胞图谱,他们用双重免疫荧光染色和原位杂交验证了肾集合管新细胞类型存在,并用Monocle R工具包进行细胞轨迹分析,发现新细胞是一种过渡细胞类型,其位于负责钠-钾平衡的主要细胞类型(principal cell types, PCs)和负责酸-碱平衡的插层细胞(intercalated cells, ICs)之间,说明PCs和ICs存在相互转换的可能,并且新的肾集合管细胞可能是导致代谢性酸中毒的原因之一。

scRNA-seq不仅可应用于模式生物的新细胞类型探索,而且还可应用于人类组织的新细胞群研究。2019年, *Nature*先后报道了两篇关于人类新细胞类型的研究, *PARIKH*等^[38]通过10× Genomics 3' v2平台分析了正常人和溃疡性结肠炎(inflammatory bowel disease, IBD)患者的11 175个结肠上皮细胞,运用聚类分析发现,在正常人的样本中存在一种对pH敏感并表达*OTOP2*基因和饱腹肽(uroguanylin)的新型吸收性细胞(BEST4/OTOP2细胞)。为了进一步了解BEST4/OTOP2细胞,研究者用SMART-seq2对BEST4/OTOP2细胞进行单细胞测序,采用半监督聚类的方式发现这类细胞在炎症和结肠癌中丢失,并且在炎症样本中发现了杯状细胞和上皮内免疫细胞,这将成为结肠炎治疗的新靶点。之后, *AIZARANI*等^[39]研究了9例人类正常肝组织中的约10 000个细胞,通过mCEL-Seq2测序平台构建了人肝细胞图谱,鉴定了未知的内皮细胞、肝枯否细胞和肝细胞类型,发现了一种能够形成类器官的罕见EPCAM⁺细胞,他们通过RaceID3d分析、StemID2和FateID进行谱系构建以及类器官实验,证实了EPCAM⁺细胞是具有双向分化潜能的前体细胞,能够分化为肝细胞和胆管细胞。近期, *HAN*等^[40]使用自主研发的

表2 scRNA-seq探索新细胞类型的成果

Table 2 Achievements of scRNA-seq in exploring new cell types

研究团队 Research team	新细胞类型 New cell type	作用 Action	细胞图谱 Cell atlas	参考文献 References
MONTORO D T, et al & PLASSCHAERT L W, et al	Pulmonary ionocyte	The main source of CFTR activity of cystic fibrosis mutant gene	-	[35-36]
PARK J, et al	Renal collecting duct transitional cell	It may be one of the causes of metabolic acidosis	Kidney cell atlas	[37]
PARIKH K, et al	Crypt top absorptive cell	It expresses the proton channel OTO2 and the satiety peptide uroguanylin, which is sensitive to pH and is dysregulated in inflammation and cancer	-	[38]
AIZARANI N, et al	EPCAM ⁺ cell	Progenitor cells with bidirectional differentiation potential, which can differentiate into hepatocytes and bile duct cells	Human hepatocyte atlas	[39]

-: 该研究团队未构建细胞图谱。

-: the research team did not construct a cell atlas.

Microwell-seq单细胞测序平台测定人类胚胎和成年时期的所有主要器官的细胞类型, 该技术平台相比于其他平台, 其双细胞概率低和细胞适用性广, 并且成本效益较高, 即使在低测序深度情况下, 也可以识别稀有细胞类型。HAN团队^[40]研究分析约70万个细胞, 每个细胞测序了大约3 000条转录本, 鉴定了102种主要细胞类型和843种细胞亚类, 其中包括30余种新细胞亚型, 并且绘制了世界首个人类细胞图谱, 这是在单细胞研究水平上的一个重大成果, 对研究人体机能和攻克疾病起着重要作用。

2.3 scRNA-seq结合空间转录组揭示细胞生态位

在多细胞有机体中, 单个细胞的基因表达具有时间和空间特异性, scRNA-seq技术能够在时间维度上分析细胞类型和基因表达情况, 但无法还原单个细胞在组织上的原始位置, 无法获取细胞在空间维度上的信息^[41]。传统的原位杂交技术可以获取空间特异性信息, 但其通量低, 无法满足高通量的需求, 空间转录组测序由此诞生。

空间转录组(spatial transcriptome, ST)主要是用组织冰冻切片作为样本, 无需经过组织解离, 降低了细胞损伤概率, 从ST问世以来, 已有许多技术手段被报道, 其中包括Slide-seq、LCM-seq、seqFISH(single molecule fluorescence *in situ* hybridization)、Geo-seq、Tomo-seq和10× Genomics Visium^[42-47]。该技术将组织冰冻切片置于含有条形码引物的载破片上, 条形码引物会从组织中捕获mRNA, 进行文库构建, 得到含有条形码的cDNA, 从而将每个mRNA转录的序列

对应到组织切片的原始位置上。

由于ST技术捕获的mRNA不一定是单个细胞的信息, 而scRNA-seq能够有效捕获单个细胞, 但其不能在空间上展示单个细胞的信息, 因此scRNA-seq可以与ST互补, 从而揭示细胞在时间和空间上的完整基因信息。ASP等^[48]先后用了ST、10× Genomics 3' v2和原位测序(*in situ* sequencing, ISS)对人类不同孕期的胚胎心脏进行测序分析, 利用ST检测了3 115个空间位点, 用10× Genomics分析了3 717个细胞, 用降维聚类 and 差异表达分析手段分析出多种细胞类型, 并将细胞信息定位于组织的原始位置中, 用ISS和pciSeq方法确定了胚胎心脏的空间细胞图谱, 从而构建了人类胚胎心脏全面的基因表达图谱。BACCIN等^[49]通过10× Genomics技术鉴定了骨髓(bone marrow, BM)驻留细胞类型, 并确定了几种罕见的细胞群, 其中包括雪旺细胞(*Mog*、*Mag*)、平滑肌细胞(*Tagin*、*Acta2*)、PDGFRA⁺间充质群和内皮细胞(*cdh5*、*pecam*), 为了进一步了解BM细胞的空间信息, 研究团队整合了10× Genomics的7 497个细胞的分析数据和LCM-seq数据, 并用免疫荧光染色验证了测序结果, 确定了各类型的BM细胞空间位置并分析了骨髓造血因子的来源。MONCADA等^[50]对胰腺癌组织分别进行inDrop-seq和ST测序, 在2 500~3 300 UMIs的inDrop-seq数据中发现表达*TM4SF1*和*SI00A4*的群体代表癌细胞群, 并采用石蜡切片双重荧光染色进行验证, 将inDrop-seq数据和约2 400 UMIs的ST数据用MIA(multimodal intersection analysis)方法进行整合,

揭示胰腺肿瘤微环境中不同细胞类型的位置和肿瘤亚区内细胞类型之间的关系。3个研究团队^[49-50]均用scRNA-seq和ST对组织器官进行研究,除了鉴定出细胞亚群之外,还将不同细胞类型定位于原始位置中,提供了在细胞水平和空间水平的详细信息。ST的出现弥补了scRNA-seq的缺点,为构建器官的3D模型以及肿瘤的治疗和预后提供了重要手段,很可能成为未来生命科学领域中的一个热门工具。

3 展望

细胞是构成生物体的基本单位,细胞与细胞间的异质性及其所属亚类的不同,使得每个细胞都有不同的生物活性和功能。为了全面了解生物有机体的内部结构,十年间,多种scRNA-seq测序平台被不断建立起来,实现同时对成千上万个细胞的表达谱分析,鉴定已知细胞类型和探索新细胞类型,这使得描绘人类细胞图谱成为可能。2019年, *Nature Methods*报道了一种新的单细胞分析工具ECCITE-seq(expanded CRISPR-compatible cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing),其是在同时测定细胞表面抗原和细胞内RNA水平的CITE-seq(cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing)基础上优化而来的技术,ECCITE-seq能够在单个细胞中检测至少5种细胞信息,该技术建立在10× Genomics单细胞免疫分析的基础之上,这有利于重建单个免疫细胞的克隆型^[51]。未来,将会有更多功能多样化的单细胞测序工具被开发,scRNA-seq技术在生物医学领域的快速应用,为探索疾病发病机制,实现精准治疗提供重要的技术手段。

参考文献 (References)

- [1] 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.
- [2] GROSS A, SCHOENDUBE J, ZIMMERMANN S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 16897-919.
- [3] WAGNER M, YOSHIHARA M, DOUAGI I, et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1147-61.
- [4] LANGE C, ROST F, MACHATE A, et al. Single cell sequencing of radial glia progeny reveals the diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain [J]. *Development*, 2020, 147(1): dev185595.
- [5] KIM D W, YAO Z, GRAYBUCK L T, et al. Multimodal analysis of cell types in a hypothalamic node controlling social behavior [J]. *Cell*, 2019, 179(3): 713-28, e17.
- [6] HU P, ZHANG W, XIN H, et al. Single cell isolation and analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 116-27.
- [7] KIM S, DE JONGHE J, KULESA A B, et al. High-throughput automated microfluidic sample preparation for accurate microbial genomics [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 13919-28.
- [8] RZHEVSKIY A S, RAZAVI BAZAZ S, DING L, et al. Rapid and label-free isolation of tumour cells from the urine of patients with localised prostate cancer using inertial microfluidics [J]. *Cancers*, 2019, 12(1): 81.
- [9] STREETS A M, ZHANG X, CAO C, et al. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(19): 7048-53.
- [10] 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.
- [11] VALIHRACH L, ANDROVIC P, KUBISTA M. Platforms for single-cell collection and analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 807-26.
- [12] 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.
- [13] HASHIMSHONY T, SENDEROVICH N, AVITAL G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 77-83.
- [14] JAITIN D A, KENIGSBERG E, KEREN-SHAUL H, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types [J]. *Science*, 2014, 343(6172): 776-9.
- [15] PRASHANT N M, LIU H Y, BOUSOUNIS P, et al. Estimating the allele-specific expression of SNVs from 10× genomics single-cell RNA-sequencing data [J]. *Genes*, 2020, 11(3): 240-54.
- [16] VARDI O, SHAMIR I, JAVASKY E, et al. Biases in the SMART-DNA library preparation method associated with genomic poly dA/dT sequences [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172769.
- [17] WALZER K A, FRADIN H, EMERSON L Y, et al. Latent transcriptional variations of individual *Plasmodium falciparum* uncovered by single-cell RNA-seq and fluorescence imaging [J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(12): e1008506.
- [18] 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.
- [19] DURANTE M A, RODRIGUEZ D A, KURTENBACH S, et al. Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 496-505.
- [20] SRIDHAR A, HOSHINO A, FINKBEINER C R, et al. Single-cell transcriptomic comparison of human fetal retina, hPSC-derived retinal organoids, and long-term retinal cultures [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(5): 1644-59, e4.
- [21] ZIEGENHAIN C, VIETH B, PAREKH S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-43, e4.
- [22] ZHANG X, LI T, LIU F, et al. Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-seq systems [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(1): 130-42, e5.

- [23] JORGENSEN L A, NEWSOME W T, ANDERSON D J, et al. The BRAIN initiative: developing technology to catalyse neuroscience discovery [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1668): 20140164.
- [24] HAWRYLYCZ M J, LEIN E S, GUILLOZET-BONGAARTS A L, et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome [J]. *Nature*, 2012, 489(7416): 391-9.
- [25] RHEAUME B A, JEREEN A, BOLISSETY M, et al. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2759-75.
- [26] ZEISEL A, HOCHGERNER H, LÖNNERBERG P, et al. Molecular architecture of the mouse nervous system [J]. *Cell*, 2018, 174(4): 999-1014.e22.
- [27] ZEISEL A, MUÑOZ-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.
- [28] TASIC B, MENON V, NGUYEN T N, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(2): 335-46.
- [29] MENON M, MOHAMMADI S, DAVILA-VELDERRAIN J, et al. Single-cell transcriptomic atlas of the human retina identifies cell types associated with age-related macular degeneration [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4902-10.
- [30] COPLEY M R, BEER P A, EAVES C J. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 690-7.
- [31] NESTOROWA S, HAMEY F K, PIJUAN SALA B, et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation [J]. *Blood*, 2016, 128(8): e20-31.
- [32] VILLANI A C, SATIJA R, REYNOLDS G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors [J]. *Science*, 2017, 356(6335): eaah4573.
- [33] CAI Y, DAI Y, WANG Y, et al. Single-cell transcriptomics of blood reveals a natural killer cell subset depletion in tuberculosis [J]. *EBioMedicine*, 2020, 53: 102686-96.
- [34] HE L, VANLANDEWIJCK M, MÄE M A, et al. Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types [J]. *Sci Data*, 2018, 5: 180160.
- [35] MONTORO D T, HABER A L, BITON M, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 319-24.
- [36] PLASSCHAERT L W, ŽILIONIS R, CHOO-WING R, et al. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte [J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 377-81.
- [37] PARK J, SHRESTHA R, QIU C, et al. Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease [J]. *Science*, 2018, 360(6390): 758-63.
- [38] PARIKH K, ANTANAVICIUTE A, FAWKNER-CORBETT D, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2019, 567(7746): 49-55.
- [39] AIZARANI N, SAVIANO A, SAGAR, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors [J]. *Nature*, 2019, 572(7768): 199-204.
- [40] HAN X, ZHOU Z, FEI L, et al. Construction of a human cell landscape at single-cell level [J]. *Nature*, 2020, 581(7808): 303-9.
- [41] VICKOVIC S, ERASLAN G, SALMÉN F, et al. High-definition spatial transcriptomics for in situ tissue profiling [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(10): 987-90.
- [42] RODRIQUES S G, STICKELS R R, GOEVA A, et al. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution [J]. *Science*, 2019, 363(6434): 1463-7.
- [43] 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(1): 12139.
- [44] ENG C L, LAWSON M, ZHU Q, et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH [J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 235-9.
- [45] XUE Y, LIU D, CUI G, et al. A 3D atlas of hematopoietic stem and progenitor cell expansion by multi-dimensional RNA-seq analysis [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(5): 1567-78.e5.
- [46] BURKHARD S B, BAKKERS J. Spatially resolved RNA-sequencing of the embryonic heart identifies a role for Wnt/ β -catenin signaling in autonomic control of heart rate [J]. *Elife*, 2018, 7: e31515.
- [47] 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): 2419-31.
- [48] 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): 1647-60.e19.
- [49] BACCIN C, AL-SABAH J, VELTEN L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(1): 38-48.
- [50] MONCADA R, BARKLEY D, WAGNER F, et al. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(3): 333-42.
- [51] MIMITOU E P, CHENG A, MONTALBANO A, et al. Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(5): 409-12.