

邬建飞,刘宇,魏岱旭,等.单细胞转录组技术在神经退行性疾病上的应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 86-92.

Wu JF, Liu Y, Wei DX, et al. Application research progress of single cell RNA-sequencing technology in neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 86-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.013

单细胞转录组技术在神经退行性疾病上的应用研究进展

邬建飞¹, 刘宇¹, 魏岱旭^{1,2}, 蒲建林¹, 蔡端芳¹, 王丙龙^{1*}

(1.自贡市精神卫生中心自贡市脑科学研究院,四川 自贡 643020;2.西北大学生命科学与医学部,西安 710069)

【摘要】 神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)是一类与中枢神经系统密切相关的精神疾病,以特定神经元群的形态异常和功能进展性丧失为主要特征,神经退行性疾病主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD),目前还没有发现有效预防或治愈神经退行性疾病的策略。近年来,单细胞转录组技术(single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq)被广泛应用于各种神经退行性疾病研究,并发现神经退行性疾病发病机制与脑中免疫细胞状态密切相关,主要涉及线粒体功能、葡萄糖代谢途径、炎症和突触传递等生物学过程,诱导性多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)疗法是治疗神经退行性疾病的潜在方案。本文对单细胞转录组测序技术在各种神经退行性疾病上的研究进行综述,以期对将来神经退行性疾病的预防和治疗提供参考。

【关键词】 神经退行性疾病;单细胞转录组技术;中枢神经系统;发病机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0086-07

Application research progress of single cell RNA-sequencing technology in neurodegenerative diseases

WU Jianfei¹, LIU Yu¹, WEI Daixu^{1,2}, PU Jianlin¹, CAI Duanfang¹, WANG Binglong^{1*}

(1. Zigong Psychiatric Research Center Zigong Institute of Brain Science, Zigong 643020, China.

2. Department of Life Sciences and Medicine, Northwest University, Xi'an 710069)

【Abstract】 Neurodegenerative diseases (NDs) are closely related to the central nervous system and characterized by morphological abnormalities and progressive loss of function in specific neuron groups. The main NDs include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis and Huntington's disease. However, no direct therapies for NDs exist. In recent years, single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) has been widely used in various NDs. The pathogenesis of NDs is closely related to morphology of immune cells, and the pathogenesis mainly involves mitochondrial function, glucose metabolism, inflammation, and synaptic transmission. Induced pluripotent stem cells are a potential therapy for NDs. Ultimately, we review the application of scRNA-seq to various NDs and provide a reference for prevention and treatment of NDs.

【Keywords】 neurodegenerative diseases; single cell RNA-sequencing; central nervous system; pathogenesis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金(31900950);自贡市卫生健康委员会科研课题(22yb001, 22yb002);自贡市科技计划项目(2023YKY11)。

【作者简介】 邬建飞(1995—),男,硕士研究生,助理研究员,研究方向:神经发育生物学研究。E-mail:179507209@qq.com

【通信作者】 王丙龙(1994—),男,硕士研究生,助理研究员,研究方向:神经发育生物学研究。E-mail:1179518349@qq.com

人类大约由 3.72×10^{13} 个活细胞组成,不同类型的细胞相互作用,形成了众多动态平衡的微环境,维持着人体各项生命代谢活动^[1]。细胞是构成人体的基本结构单元和功能单位,各种细胞都由受精卵不断分裂和分化发育而来,几乎所有细胞都含有相同的遗传物质,但转录组信息的差异性决定了细胞功能的特异性,利用单细胞转录组测序(single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq)技术探究单细胞的异质性,有利于进一步揭示细胞多样性、识别细胞分化轨迹和阐明细胞间通讯,目前逐渐兴起的 scRNA-seq 技术已被广泛应用于各项临床医学研究^[2-4]。神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)是与中枢神经系统密切相关的慢性进行性疾病,主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等,NDs 已成为威胁人类健康的重要原因之一^[5]。NDs 主要由于大脑特定区域的细胞死亡所导致,从患者体细胞重编程的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)表现出良好的自我更新能力和具有分化成任何细胞类型的潜力,iPSC 的出现为 NDs 的治疗提供了全新的选择,目前 iPSC 已经应用于 AD、PD、ALS 等 NDs 的治疗研究^[6]。但 iPSC 重编程引入的遗传修饰、iPSC 分化过程中的遗传稳定性及 NDs 致病机制的复杂性都深刻影响着 NDs 的治疗效果,因此,利用 scRNA-seq 技术深入探究 NDs 发病过程中相关神经元细胞的变化情况,掌握 NDs 的发病进程,可以为进一步探索潜在的治疗靶点和研发新的治疗药物提供支持。

1 基因测序技术的发展历程

基因是生命的“密码”,1977 年,英国科学家弗雷德里克·桑格利用双脱氧链终止法(Sanger 法)完成了噬菌体 phi-X174 的完整基因组测序,开启了人类通过基因序列探索生命奥秘的新篇章^[7]。2005 年,能够高通量并行测序的下一代测序(next-generation sequencing, NGS)技术成功问世,NGS 技术的出现极大地推动了基因测序技术革命,但 NGS 技术存在读取片段(reads)不足、试验耗时长、后续处理分析复杂等局限,因此以单分子实时测序(single-molecule real-time sequencing, SMRT)技术和

纳米孔测序技术为代表的第三代测序(third-generation sequencing, TGS)技术应运而生,TGS 技术无需对模板进行 PCR 扩增即可实现核苷酸分子的测序,这有利于减少偏差和提供更均匀的基因组覆盖度,同时 TGS 技术操作简单,文库构建过程简化、reads 长度增加^[8]。NGS 技术和 TGS 技术都是基于光信号的测序技术,测序成本相对较高,近年来兴起了依赖电信号的第四代测序技术,其根据 DNA 或 RNA 通过纳米孔时的电流畸变率来确定碱基序列,第四代测序技术的 reads 长度进一步增加,速度更快,性价比更高,已在基因修饰、表观遗传学研究、癌症诊断等相关领域表现出广阔的应用前景^[9]。

scRNA-seq 技术在 NGS 技术的基础上衍生而来,2009 年,Tang 等^[10]成功对小鼠的单个卵裂球和卵母细胞的转录组完成测序,实现了测序技术在单细胞水平上的重大突破。近十余年,越来越多的 scRNA-seq 技术被开发出来,科学家在单细胞分离、空间条形码逆转录、cDNA 扩增、文库制备、测序和数据分析等方面不断进行改进,目前已有 STRT-seq (2011 年)、Smart-seq (2012 年)、CEL-seq (2012 年)、Smart-seq2 (2013 年)、Fluidigm C1 (2013 年)、MARS-seq (2014 年)、Drop-seq (2015 年)、10X Chromium (2016 年)、MATQ-seq (2017 年)、Seq-well (2017 年)、Quartz-seq2 (2018 年)和 DNBelab C4 (2019 年)等十余种 scRNA-seq 技术成功问世,这些技术在细胞分离方法、cDNA 扩增方式、转录组覆盖度和独特的分子识别符等方面存在一定差异,其中 MARS-seq、Smart-seq2、Fluidigm C1 和 10X Chromium 等测序技术越趋成熟,生物公司基于这些方法开发了众多商业测序平台,如 10X Genomics ChromiumTM 系统、BD RhapsodyTM 系统、Fluidigm C1 系统等,这些系统被广泛应用于神经生物学、癌症、血管生物学、生殖发育、免疫生物学等各领域研究^[11-12]。

2 scRNA-seq 的基本流程

随着测序技术的不断发展,scRNA-seq 种类日趋多样,但 scRNA-seq 基本都包括五个步骤:(1)单细胞或单核样品制备;(2)逆转录;(3)cDNA 扩增;(4)测序;(5)数据分析。

2.1 单细胞或单核样品制备

单细胞分离是从单个细胞中获取转录组信息的第一步,通常先利用物理分离和酶解的组合方式获得细胞悬液,再根据细胞大小、细胞活力以及其

他特性分离单细胞。目前最常见的单细胞分离策略包括:极限稀释法、显微操作法、荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)、激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、微流控和微滴^[11-13]。

2.2 逆转录

逆转录是将单细胞 RNA 转化为 cDNA 的过程,是确保 scRNA-seq 灵敏度和提高测序准确度的重要步骤^[11]。

2.3 cDNA 扩增

将单链 cDNA 利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)或体外转录(*in vitro* transcription, IVT)进行扩增的过程^[13]。

2.4 测序

生成的单细胞条形码 cDNA 可以使用多种深度测序平台进行测序分析,目前已经开发出十余种测序技术,根据细胞特性和试验需求选择适合的测序技术有利于获得有效的数据和实现个性化分析^[11-12]。

2.5 数据分析

scRNA-seq 数据的分析是呈现测序结果的关键步骤,scRNA-seq 数据分析主要包括数据预处理、一般性分析和探索性分析^[14]。

3 scRNA-seq 在神经退行性疾病上的应用

3.1 scRNA-seq 在 AD 上的应用

AD 是最常见的神经退行性疾病,也是导致痴呆的主要原因,AD 患者通常出现记忆力下降、语言功能缺陷、运动和认知功能障碍等病症,这些病症主要是由病变神经元的不断累积所导致,其中包括细胞外 β 淀粉样蛋白斑块沉积和细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化而形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)^[15-18]。小胶质细胞的状态与 AD 的进展密不可分,Keren-Shaul 等^[19]利用 scRNA-seq 技术鉴定出一类新的与 AD 相关的小胶质细胞,这种激活的小胶质细胞能够有效吞噬 β 淀粉样蛋白沉积。Sierksma 等^[20]也发现 AD 小鼠小胶质细胞激活数量显著增加,同时发现 β 淀粉样蛋白沉积将导致 AD 风险基因表达上调,证实 AD 遗传风险基因位于 β 淀粉样蛋白途径下游。小胶质细胞 TAM 受体酪氨酸激酶被证实与 AD 相关,Huang 等^[21]发现 TAM 缺陷小鼠比正常 AD 小鼠出现更少的 β 淀粉样蛋白斑块,表明 TAM 受体是小胶质细胞识别和吞噬淀粉样

斑块的重要介质,TAM 表达将促进 β 淀粉样蛋白斑块的形成。小胶质细胞免疫受体 TREM2 变异将增加 AD 风险,Zhou 等^[22]通过单核转录组测序技术发现 AD 小鼠和 AD 人类的转录组特征存在差异,并发现 TREM2 R47H 和 R62H 携带者小胶质细胞反应性表型比非携带者更少,表明小鼠和人类的 AD 疾病都与 TREM2 密切相关,但同时也存在物种差异性。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 是影响 AD 的另一遗传因素,Fitz 等^[23]向 Cx3cr1^{GFP} 小鼠注射 A β E3 或 A β E4,结果发现与注射 A β E4 相比,A β E3 注射小鼠的小胶质细胞的转录谱含有更丰富的天然免疫反应相关基因,说明 APOE3 脂蛋白能够诱导小胶质细胞更迅速地吞噬 β 淀粉样蛋白,以改善对认知功能的影响。上述研究提示单细胞转录组研究对小胶质细胞具有更敏感的分析,这为 AD 中小胶质细胞的异质性提供了新的认识,有利于进一步揭示小胶质细胞在 AD 中的重要作用。

除了小胶质细胞与 AD 进展密切相关外,其他多种细胞转录组变化也深刻影响着 AD 的进程,Habib 等^[24]从 AD 小鼠海马体中鉴定出一类疾病相关星形胶质细胞(disease associated astrocytes, DAA),这类 DAA 出现于 AD 发病早期,主要与 β 淀粉样蛋白斑块相邻,其激活数量随着年龄增长而增加,因此抑制 DAA 的活性可能是治疗 AD 的新的治疗手段。AD 的发生还与海马区葡萄糖代谢异常有关,Choi 等^[25]发现 AD 小鼠海马区小胶质细胞葡萄糖转运、糖酵解、氧化磷酸化等代谢途径与正常小鼠相比表达下调,代谢异常是小胶质细胞发生炎症的关键变化,而小胶质细胞炎症被认为是 AD 进展的重要病理生理学表现,因此改善 AD 患者海马区葡萄糖代谢成为治疗 AD 新方法。APOE4 是 AD 遗传风险因素,Blanchard 等^[26]分别对 APOE4 携带者和正常人的脑组织进行 scRNA-seq 分析,结果发现携带 APOE4 会破坏胆固醇稳态,胆固醇异常沉积会阻碍神经元髓鞘形成,研究提示促进胆固醇转运可以增加轴突髓鞘形成,进而达到改善 APOE4 小鼠学习和记忆能力的目的。Wang 等^[27]发现线粒体富集基因在 AD 患者大脑皮层兴奋性神经元、抑制性神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞、内皮细胞等细胞中表达上调,表明 AD 患者大脑线粒体功能出现障碍,揭示细胞能量代谢异常可能是影响 AD 进展的重要原因。上述研究利用 scRNA-seq 技术对 AD 患者的多种类型的单细胞进行了多维度的检测,发现

AD 与葡萄糖代谢、神经元髓鞘形成、线粒体功能障碍等存在密切联系,这些发现为深入探究 AD 的发病机制和探索新的治疗方案提供了思路。

3.2 scRNA-seq 在 PD 上的应用

PD 是第二常见的神经退行性疾病,PD 患者主要出现运动迟缓、肌肉僵硬、静止性震颤和姿势不稳等运动症状和认知障碍、感觉异常、焦虑、抑郁等非运动症状,PD 的病理特征主要包括黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNpc)多巴胺能神经元早期死亡造成纹状体多巴胺水平下降,以及神经元核内 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -SYN)错误折叠和聚集形成路易体^[28-30]。多巴胺能神经元主要存在于中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)和 SNpc,而 PD 患者的病理特征包括 VTA 退化和 SNpc 神经元失活,La Manno 等^[31]发现人类和小鼠中脑腹侧发育过程中非神经细胞(内皮细胞、周细胞、小胶质细胞、红核等)和神经细胞(神经母细胞、多巴胺能神经元前体细胞)的总细胞类型高度保守,但在细胞增殖、发育时间轴和多巴胺能神经元发育方面又存在显著差异。*Pitx3* 是多巴胺能神经元的标志性基因,Tiklová 等^[32]发现表达 *Pitx3* 的神经元发育成 7 种神经元亚型,其中包括 5 种多巴胺能神经元、1 种谷氨酸能神经元和 1 种 γ -氨基丁酸能神经元,这为阐明哺乳动物多巴胺能神经元亚群的发育和功能研究提供了启示。在另一项研究中,Agarwal 等^[33]发现 PD 的遗传风险与多巴胺能神经元基因特异性表达密切相关,这些基因主要涉及线粒体功能、蛋白质折叠和泛素化等生物学过程,作者还发现 PD 与小胶质细胞关联并不紧密。Badanjak 等^[34]发现炎症相关因子 IL10 与 IL1 β 在特发性 PD 患者的小胶质细胞中表达上调,证实小胶质细胞在特发性 PD 的神经炎症过程中发挥重要作用,这与 Agarwal 发现的小胶质细胞不参与 PD 炎症过程存在差异,需要后续的相关研究进一步证实小胶质细胞在 PD 上发挥的作用^[33]。

iPSC 诱导分化的神经元被应用于 PD 的治疗研究,Fernandes 等^[35]鉴定出人 iPSC 分化的多巴胺神经元主要由 2 种祖细胞和 4 种多巴胺神经元组成,不同的细胞类型对毒性和遗传应激源表现出不同的敏感性和不同的转录特征,这为细胞替代疗法提供指导。*PINK1* 基因与 PD 密切相关,Novak 等^[36]以携带 *PINK1* 基因的人类 iPSC 分化而来的多巴胺能神经元细胞为试验目标,利用 scRNA-seq 技术对

PINK1-ILE368ASN 细胞系进行测序分析,结果发现多巴胺能神经元在分化过程中存在大量差异表达基因(differential expressed genes, DEGs),这些基因形成了包括泛素化、蛋白质加工、RNA 代谢、囊泡转运等通路的核心网络,这在一定程度上解释了 PD 表型的异质性。上述研究利用 scRNA-seq 技术,从 SNpc、VTA、多巴胺能神经元等时空发育来揭示 PD 的疾病机制,同时还对 iPSC 衍生神经元治疗 PD 进行了深入研究,为将来的相关临床治疗提供了基础研究。

3.3 scRNA-seq 在 ALS 上的应用

ALS 又被称为运动神经元病,是一种复杂而又常见的多病因神经退行性疾病,以运动皮质的上运动神经元以及脑干和脊髓的下运动神经元的选择性丢失为主要特征^[37]。ALS 的全球发病率约为 0.006%,患者表现为神经肌肉系统持续性退化,多数患者在发病 3 至 5 年后死于呼吸衰竭,目前还未发现治愈 ALS 的疗法^[38]。超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)是第一个被证实与 ALS 相关的基因,*SOD1* 基因表达异常会导致 ALS, Liu 等^[39]对 *SOD1*^{G93A} 小鼠脑干中的 3199 个细胞进行 scRNA-seq 测序分析,结果发现 ALS 小鼠脑干中大多数细胞的转录组数据发生改变,其中 DEGs 主要涉及神经形成、应激反应、炎症、突触传递以及线粒体功能等生物学通路,揭示脑干基因表达异常是 ALS 发病的重要诱因。Mifflin 等^[40]从 *SOD1*^{G93A} 小鼠中鉴定出一类依赖受体相互作用蛋白激酶 1(receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)调节炎症的小胶质细胞亚型,抑制 *RIPK1* 的表达成为治疗 ALS 的潜在方案。在另一项研究中, Humphrey 等^[41]发现 ALS 患者脊髓样本中小胶质细胞和星形胶质细胞的标记基因都表达上调,证实这两类细胞在 ALS 发病过程中将被大量激活。利用 iPSC 分化成运动神经元是治疗 ALS 的另一可能方案, Namboori 等^[42]鉴定出 *SOD*-ALS-iPSC 来源运动神经元中神经变性的关键驱动因子是 *Smad2*,而 *Smad2* 是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)信号通路的下游基因,提示了 TGF- β 信号通路是 ALS 神经元病变的重要媒介。但是, iPSC 治疗过程中遗传变异引起的细胞异质性是临床应用的巨大障碍, Ho 等^[43]发现家族性 ALS 和散发性 ALS 的 iPSC 诱导治疗神经元的早期发育具有共同特征,揭示相关转录组学活动发生在治疗早期并可能导

致后续的表型差异,这为明确治疗时间节点提供了参考。

3.4 scRNA-seq 在 MS 上的应用

MS 是一种影响中枢神经系统的慢性自身免疫性、炎症性和神经退行性疾病,其已成为全球范围内青少年非创伤性神经功能障碍的主要原因^[44-45]。MS 患者会产生持续性的脱髓鞘和轴突变性,Absinta 等^[46]发现脱髓鞘白质病变边缘的免疫细胞呈多样性表达,MS 患者小胶质细胞 (microglia inflamed in MS, MIMS) 的转录谱与其他神经退行性疾病中小胶质细胞的转录谱相似,说明小胶质细胞的激活是原发性和继发性神经退行性的共同特征,其中补体 C1q 是 MIMS 激活的关键媒介,抑制 C1q 的表达是解决慢性白质炎症的潜在方案。少突胶质细胞在形成髓鞘中必不可少,Jäkel 等^[47]对 MS 患者和正常人的大脑白质进行 scRNA-seq 测序分析,结果作者在正常人的白质中发现了特异性少突胶质细胞亚群,这些亚型在 MS 患者相应组织表达不足,说明少突胶质细胞的异质性是 MS 发病的重要诱因。除小胶质细胞和少突胶质细胞会对 MS 的致病机制产生重要调控外,有研究表明巨噬细胞也会发挥重要作用,Miedema 等^[48]发现 MS 患者正常表现白质 (normal appearing white matter, NAWM) 的巨噬细胞标记基因表达强烈,说明 NAWM 区域巨噬细胞的变化可能影响 MS 病程的进展。

脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 具有保护中枢神经系统的作用,分析 CSF 的变化有助于诊断 MS, Schafflick 等^[49]发现 MS 患者 CSF 中细胞类型多样性增加,细胞毒性 CD4⁺T 辅助细胞增多,并且发现 CSF 中 T 细胞和 B 细胞之间存在局部相互作用,这提示免疫细胞参与了 MS 发病过程。另一项研究发现 MS 患者 CSF 中 CD14⁺和 CD16⁺细胞的激活标志物 (CD86、CD40) 和抗炎细胞因子 IL10 的表达均显著上调,而 CD14⁺和 CD16⁺已被证实与多种自身免疫性疾病有关,这两类细胞表达增加会破坏血脑屏障,说明脑脊液微环境的改变是 MS 发病的另一诱因^[50]。综合上述研究,我们发现小胶质细胞、少突胶质细胞和巨噬细胞的状态在 MS 发病过程中发生变化,CSF 发生异常,使针对这些变化探究新的治疗手段成为可能。

3.5 scRNA-seq 在 HD 上的应用

HD 是一种常见的显性遗传神经退行性疾病,由位于常染色体 4p16.3 上的亨廷顿 (huntingtin,

Htt) 基因内的胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤 (CAG) 三核苷酸重复扩增导致 Htt 蛋白突变,进而致使海马、皮质、纹状体和丘脑等部位神经元病变所引起的^[51-52]。突变的 Htt 蛋白导致神经元死亡的机制尚未明确, Lee 等^[53]发现 HD 患者纹状体棘突投射神经元中的线粒体 RNA (mitochondrial RNA, mtRNA) 释放增加,释放的 mtRNA 直接与先天性免疫因子传感器蛋白激酶 R (protein kinases R, PKR) 结合以激活先天性免疫通路,进而增加 HD 患者神经元脆弱性,导致纹状体神经元死亡加剧。Htt CAG 敲入小鼠模型表现出与人类 HD 相似的行为障碍,HD 小鼠 scRNA-seq 测序表明 *Cbx4*、*Tcf7*、*Cap1* 和 *Tmc3* 等基因在纹状体各细胞中均高度表达,这些基因主要与运动行为和学习记忆相关^[54]。另一项研究发现扣带皮层中星胶质细胞的变化也与 HD 密切相关, Al-Dalahmah 等^[55]发现 HD 患者扣带皮层中星胶质细胞中金属硫蛋白基因、热休克蛋白基因和胶质纤维状酸性蛋白基因显著上调,同时发现参与谷氨酸、 γ -氨基丁酸、神经肽 Y 通路的相关基因表达下调,提示星形胶质细胞基因表达异常会改变扣带皮层的稳态,并导致神经元功能障碍,这有利于进一步探究 HD 的发病机制,为 HD 的治疗提供新的思路。

4 小结与展望

scRNA-seq 技术的问世促进了各项生物医学的研究,使得人类可以从单细胞转录组水平探究疾病发生机制。综上所述,scRNA-seq 技术已经广泛应用于各种 NDs 研究,并发现:(1) 小胶质细胞、星形胶质细胞、巨噬细胞和 CD4⁺T 细胞等免疫细胞在 NDs 发病过程中多发挥重要作用;(2) NDs 发病过程通常涉及线粒体功能、蛋白质折叠、葡萄糖代谢、神经发育、应激反应、炎症和突触传递等生物学通路;(3) iPSC 诱导分化治疗有望成为治愈部分 NDs 的新方法。scRNA-seq 技术的引入让 NDs 的相关研究有了突破性进展,但是 NDs 的疾病进展可能涉及多种细胞的共同作用,因此探究细胞间相互作用有利于进一步深入探索 NDs 发病机制,同时 iPSC 诱导治疗过程中的细胞异质性严重阻碍着临床应用,这些问题亟待在后续的相关研究中解决。随着 scRNA-seq 技术的不断发展和研究的不断深入,相信人类未来能够实现对 NDs 的有效预防和治疗。

参考文献:

[1] Sender R, Milo R. The distribution of cellular turnover in the

- human body [J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 45–48.
- [2] Haque A, Engel J, Teichmann SA, et al. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 75.
 - [3] Mostafa HKK. Different cells of the human body: categories and morphological characters [J]. *J Microsc Ultrastruct*, 2021, 10(2): 40–46.
 - [4] Xiang Y, Wang QQ, Lan XQ, et al. Function and treatment strategies of β -hydroxybutyrate in aging [J]. *Smart Materials in Medicine*, 2023, 4: 160–172.
 - [5] Chehimi SN, Crist RC, Reiner BC. Unraveling psychiatric disorders through neural single-cell transcriptomics approaches [J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(3): 771.
 - [6] Luo HM, Xu J, Huang DX, et al. Mitochondrial dysfunction of induced pluripotent stem cells-based neurodegenerative disease modeling and therapeutic strategy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 1030390.
 - [7] Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA [J]. *Nature*, 1977, 265(5596): 687–695.
 - [8] Athanasopoulou K, Boti MA, Adamopoulos PG, et al. Third-generation sequencing: the spearhead towards the radical transformation of modern genomics [J]. *Life (Basel)*, 2021, 12(1): 30.
 - [9] Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore technology and its applications in gene sequencing [J]. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11(7): 214.
 - [10] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377–382.
 - [11] Jovic D, Liang X, Zeng H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e694.
 - [12] Li Q, Wang M, Zhang S, et al. Single-cell RNA sequencing in atherosclerosis: mechanism and precision medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 977490.
 - [13] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 1–14.
 - [14] Rossin EJ, Sobrin L, Kim LA. Single-cell RNA sequencing: an overview for the ophthalmologist [J]. *Semin Ophthalmol*, 2021, 36(4): 191–197.
 - [15] 崔雨沙, 路欣, 李峰. 疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 132–136.
 - [16] Graff-Radford J, Yong KXX, Apostolova LG, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(3): 222–234.
 - [17] Ahmadi A, Gispert JD, Navarro A, et al. Single-cell transcriptional changes in neurodegenerative diseases [J]. *Neuroscience*, 2021, 479: 192–205.
 - [18] Wang BL, Wu JF, Xiao D, et al. 3-hydroxybutyrate in the brain; biosynthesis, function, and disease therapy [J]. *Brain-X*, 2023, 1(1): e6.
 - [19] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276–1290.
 - [20] Sierksma A, Lu A, Mancuso R, et al. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- β but not to TAU pathology [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(3): e10606.
 - [21] Huang Y, Happonen KE, Burrola PG, et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 586–594.
 - [22] Zhou Y, Song WM, Andhey PS, et al. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease [J]. *Nat Med*, 2020, 26(1): 131–142.
 - [23] Fitz NF, Nam KN, Wolfe CM, et al. Phospholipids of APOE lipoproteins activate microglia in an isoform-specific manner in preclinical models of Alzheimer's disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3416.
 - [24] Habib N, McCabe C, Medina S, et al. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(6): 701–706.
 - [25] Choi H, Choi Y, Lee EJ, et al. Hippocampal glucose uptake as a surrogate of metabolic change of microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 190.
 - [26] Blanchard JW, Akay LA, Davila-Velderrain J, et al. APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes [J]. *Nature*, 2022, 611(7937): 769–779.
 - [27] Wang XL, Li L. Cell type-specific potential pathogenic genes and functional pathways in Alzheimer's disease [J]. *BMC Neurol*, 2021, 21(1): 381.
 - [28] 杨东明, 杨利峰, 赵德明, 等. 帕金森病动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 397–404.
 - [29] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2464.
 - [30] Dinter E, Saridakis T, Diederichs L, et al. Parkinson's disease and translational research [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 43.
 - [31] La Manno G, Gyllborg D, Codeluppi S, et al. Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem cells [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 566–580, e19.
 - [32] Tiklová K, Björklund ÅK, Lahti L, et al. Single-cell RNA sequencing reveals midbrain dopamine neuron diversity emerging during mouse brain development [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 581.
 - [33] Agarwal D, Sandor C, Volpato V, et al. A single-cell atlas of the human substantia nigra reveals cell-specific pathways associated with neurological disorders [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4183.
 - [34] Badanjak K, Mulica P, Smajic S, et al. iPSC-derived microglia as a model to study inflammation in idiopathic Parkinson's disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 740758.

- [35] Fernandes HJR, Patikas N, Foskolou S, et al. Single-cell transcriptomics of Parkinson's disease human *in vitro* models reveals dopamine neuron-specific stress responses [J]. Cell Rep, 2020, 33(2): 108263.
- [36] Novak G, Kyriakis D, Grzyb K, et al. Single-cell transcriptomics of human iPSC differentiation dynamics reveal a core molecular network of Parkinson's disease [J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 49.
- [37] Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation [J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(3): 185–212.
- [38] Zhao J, Wang X, Huo Z, et al. The impact of mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Cells, 2022, 11(13): 2049.
- [39] Liu W, Venugopal S, Majid S, et al. Single-cell RNA-seq analysis of the brainstem of mutant SOD1 mice reveals perturbed cell types and pathways of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurobiol Dis, 2020, 141: 104877.
- [40] Mifflin L, Hu Z, Dufort C, et al. A RIPK1-regulated inflammatory microglial state in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(13): e2025102118.
- [41] Humphrey J, Venkatesh S, Hasan R, et al. Integrative transcriptomic analysis of the amyotrophic lateral sclerosis spinal cord implicates glial activation and suggests new risk genes [J]. Nat Neurosci, 2023, 26(1): 150–162.
- [42] Namboori SC, Thomas P, Ames R, et al. Single-cell transcriptomics identifies master regulators of neurodegeneration in SOD1 ALS iPSC-derived motor neurons [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(12): 3020–3035.
- [43] Ho R, Workman MJ, Mathkar P, et al. Cross-comparison of human iPSC motor neuron models of familial and sporadic ALS reveals early and convergent transcriptomic disease signatures [J]. Cell Syst, 2021, 12(2): 159–175, e9.
- [44] Wang H. microRNAs, multiple sclerosis, and depression [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7802.
- [45] Stoiloudis P, Kesidou E, Bakirtzis C, et al. The role of diet and interventions on multiple sclerosis; a review [J]. Nutrients, 2022, 14(6): 1150.
- [46] Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis [J]. Nature, 2021, 597(7878): 709–714.
- [47] Jäkel S, Agirre E, Mendanha Falcão A, et al. Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 543–547.
- [48] Miedema A, Gerrits E, Brouwer N, et al. Brain macrophages acquire distinct transcriptomes in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 8.
- [49] Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 247.
- [50] Straeten F, Zhu J, Börsch AL, et al. Integrated single-cell transcriptomics of cerebrospinal fluid cells in treatment-naïve multiple sclerosis [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 306.
- [51] Kim A, Lalonde K, Truesdell A, et al. New avenues for the treatment of Huntington's disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8363.
- [52] Kumar A, Kumar V, Singh K, et al. Therapeutic advances for Huntington's disease [J]. Brain Sci, 2020, 10(1): 43.
- [53] Lee H, Fenster RJ, Pineda SS, et al. Cell type-specific transcriptomics reveals that mutant huntingtin leads to mitochondrial RNA release and neuronal innate immune activation [J]. Neuron, 2020, 107(5): 891–908, e8.
- [54] Huang L, Fang L, Liu Q, et al. Integrated analysis on transcriptome and behaviors defines HTT repeat-dependent network modules in Huntington's disease [J]. Genes Dis, 2021, 9(2): 479–493.
- [55] Al-Dalahmah O, Sosunov AA, Shaik A, et al. Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 19.

[收稿日期]2023-03-15