

单细胞转录组测序在视觉系统研究中的应用

刘一帆 综述 沈吟 审校

武汉大学人民医院眼科中心 430060

通信作者:沈吟,Email:yinshen@whu.edu.cn

【摘要】 单细胞转录组测序(scRNA-seq)是一种在细胞水平观测单个细胞之间转录组差异的新兴技术,其基本策略是捕获单细胞,经裂解得到微量 mRNA,逆转录后扩增,cDNA 用于制备测序文库。目前该技术已被广泛应用于多个学科领域。视觉神经系统在结构上包括视网膜、外侧膝状体及视皮层等,负责视觉信息的获取和处理,进而形成视觉。视觉信息占全部感觉信息的 70% 以上,故对视觉神经系统的研究显得尤为重要。随着科学技术的快速发展,单细胞转录组测序技术的研究成果也越来越多,该技术正逐渐成为指导临床实践的重要工具,为基础研究向临床转化搭建了桥梁。本文介绍单细胞转录组测序技术的主要技术路线和方法,并详述其在视觉系统研究中的应用。

【关键词】 单细胞; 转录组测序; 异质性; 视觉系统

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81470628); 政府间国际科技创新合作重点专项项目(2017YFE0103400); 武汉市青年科技晨光计划项目(2016070204010153)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200509-00325

Application of single-cell RNA sequencing in visual system

Liu Yifan, Shen Yin

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

【Abstract】 Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is an emerging technology that observes transcriptomes' differences between individual cells at the cellular level. The basic strategy is to capture single cells and lysis the cells to get mRNA, then amplify them after reversing transcriptions, finally cDNA is used to build sequencing libraries. At present, this technology has been widely used in many subject areas. Visual system includes retina, lateral geniculate nucleus, and visual cortex, etc. It's responsible for the acquisition and processing of visual information and the formation of vision. Visual information accounts for more than 70% of all sensory information. Therefore, the study of the visual system is particularly important. With the rapid development of science and technology, there are more and more research results on scRNA-seq. This technology is gradually becoming an important tool for guiding clinical practice, and has provided a bridge for basic research transforming to clinical research. In this review, we introduce the main technical routes and methods of scRNA-seq and detail its application in visual system.

【Key words】 Single-cell; RNA sequencing; Heterogeneity; Visual system

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470628); International Science & Technology Cooperation Program of China (2017YFE0103400); Wuhan Morning Light Plan of Youth Science and Technology (2016070204010153).

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200509-00325

细胞是生命结构和功能的基本单位^[1-2]。同种细胞亦存在微观的不均一性,由于基因组和表观基因组的重编程以及细胞分裂和分化过程中的 DNA 复制错误,不同细胞,甚至来自相同细胞系或个体的细胞,可呈现不同的基因组,转录组和表观基因组^[3-4]。细胞间变异和高度异质性是胚胎发育早期细胞群体的基本内在特征,生命科学研究以大量细胞为研究对象。基于细胞群体的基因表达功能分析难以区分细胞间差异。因此,基

于单细胞的科学研究将更能揭示细胞之间的差异,识别可能在疾病进展中起重要作用的罕见细胞,为探究重大疾病起因、发展和治疗提供科学依据。单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)是近几年兴起的一种新的技术手段,为解析单个细胞的行为、机制及其与机体的关系等提供了新的研究手段。scRNA-seq 利用高通量测序技术对单个细胞进行基因表达谱分析,均从细胞的 RNA 转化为 cDNA 开始,通过分子生

生物学方法,如 PCR 和体外转录进行扩增,最后通过不同的测序手段进行高通量测序。2009 年, Tang 等^[5]首次对小鼠的单个卵裂球进行了 scRNA-seq, 检测出比基因芯片技术多 75% (5 270) 的基因表达, 并确定了至少 1 753 个先前未知的剪切位点。哺乳动物的视觉神经系统神经元数量众多, 且具有多样性, 导致我们对其细胞类型的了解都不甚全面^[6-7], 但要了解复杂的组织如何工作, 了解每种细胞类型的功能和特定条件下的反应是很重要的, 每个细胞的功能主要取决于转录程序, 哺乳动物细胞的转录组可以准确地反映其多能性或分化状态, 所以在单细胞的水平上探索细胞转录组的多样性和发育变化有重要意义。本文对 scRNA-seq 的主要技术路线和方法进行总结与分析, 阐述该技术在视觉系统研究中的应用。

1 scRNA-seq 的技术

1.1 单细胞分离

从组织或培养的细胞中分离单细胞的方法有显微操作、激光捕获显微切割、荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和微流体技术。显微操作和激光捕获显微切割 (laser-capture-microdissection, LCM) 是在显微镜下基于细胞的形态和荧光颜色手动分离细胞, 通量较低^[8-9]。显微操作用来从培养的细胞系或早期胚胎中分离单个细胞, 而 LCM 主要用以从固定后组织或切片中分离单细胞。然而, 由于切片上的细胞可能不会被完整地保留在玻璃片上, 并且细胞间黏附较紧密, 通过 LCM 分离的单个细胞的完整性可能被破坏^[10]。这 2 种方法对操作者技术的要求较高, 难度较大, 耗时长而产出相对较低, 故都不是分离单细胞较理想的方法。FACS 和微流体技术是基于荧光标记特定细胞的特征, 根据光散射、大小等参数的不同来分离单细胞的方法, 它们具有全自动和高通量的特点。FACS 对样本细胞数量的要求较高, 不适用于从少量细胞群中分离单细胞。微流体技术是一种新型的单细胞分离技术,

是在微米直径大小的通道中利用可控的液体流动来分离和捕获单个细胞, 此外该技术还可用于在微流体芯片中培养单细胞, 并可通过特定因素按序处理单细胞并裂解以用于下游单细胞测序^[11-14]。微流体技术是目前较好的单细胞分离方法。

1.2 scRNA-seq

scRNA-seq 的关键步骤是全转录组扩增, 包括 mRNA 逆转录以及 cDNA 扩增。基于不同的细胞捕获、RNA 捕获、cDNA 扩增方法, 以及测序文库的建立策略, 单细胞 RNA-seq 的方法多种多样, 常用的包括 Smart-seq^[15] 和 Smart-seq2^[16]、CEL-seq^[17]、STRT-seq^[18]、Quartz-seq^[19]、Phi29 聚合酶法 (如 PMA^[20])、Patch-seq^[21]、MARS-seq^[22]、Cytoseq^[23]、Drop-seq^[24] 和 inDrop^[25] 等 (表 1)。

Smart-seq (Switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 是一项具有里程碑意义的技术, 在 2012 年由美国和瑞典的科学家共同开发。作为一种单细胞测序方案, 它改善了转录本的序列覆盖度, 完整地覆盖了基因组, 从而实现了选择性转录本异构体和单核苷酸变异的检测。Smart-seq2 对最初的 Smart-seq 方案做了进一步改进。新方案使用锁核酸等物质, 不再需要纯化的步骤, 可大大提高产量。CEL-Seq (cell expression by linear amplification and sequencing) 是一种采用线性扩增的测序方法, 虽然错误率比较低, 但线性扩增和 PCR 都存在序列偏好。CytoSeq 技术是将单细胞悬液加入微孔中反应来进行基因分析, 主要用于研究细胞表达的差异, 对罕见细胞类型的发现作用较大, 该方法是直接对混合细胞群体进行研究, 只能用于检测已知基因。2015 年, 2 个来自哈佛大学的团队将微流体技术引入 scRNA-Seq 领域, 分别研发了 Drop-seq 和 inDrop, 它们都是利用微流体装置将带有标识的微珠和细胞一起装入微小的液滴, 从而检测数以千计的细胞。标识码附着到每个细胞的某些基因, 可一次测序所有标识上的基因, 并追踪每个基因来源的细胞。该技术可快速、自动化、低成本地分析数千个单细胞的基因活性。Macosko 等^[24] 利用 Drop-seq 分析

表 1 scRNA-seq 技术总结
Table 1 Summary of scRNA-seq technology

方法	单细胞捕获策略	cDNA 扩增策略	检测内容	UMI	检测细胞数量	参考文献
Smart-seq/Smart-seq2	显微操作或 FACS	PCR	全长 mRNA	无	1-100	[15-16]
CEL-seq	显微操作或 FACS	体外转录	mRNA 3'端	有	10-100	[17]
Quartz-seq	显微操作或 FACS	PCR	全长 mRNA	无	1-100	[19]
MARS-seq	机器人自动化	体外转录	mRNA 3'端	有	100-1 000	[22]
Cytoseq	以微珠为基础	体外转录	mRNA 3'端	有	>1 000	[23]
Drop-seq	以微滴和微珠为基础	PCR	mRNA 3'端	有	>1 000	[24]
inDrop	以微滴和微珠为基础	体外转录	mRNA 3'端	有	>1 000	[25]
Patch-seq	通过膜片钳玻璃微电极吸入	PCR	mRNA 5'端或全长 mRNA	有/无	10-100	[21]
PMA	显微操作或 FACS	Phi29 聚合酶	全长 mRNA	无	1-100	[20]
STRT-seq	显微操作或 FACS	PCR	mRNA 5'端	有	10-100	[18]

注: scRNA-seq: 单细胞转录组测序; MARS: 大规模平行单细胞 RNA 测序; PMA: Phi29-mRNA 扩增; FACS: 荧光激活细胞分选; UMI: 独特的分子识别符

Note: scRNA-seq: single-cell RNA sequencing; MARS: massively parallel signature sequencing; PMA: phi29-mRNA amplification; FACS: fluorescence activated cell sorting; UMI: unique molecular identifier

了来自小鼠视网膜的 44 800 多个细胞的基因,鉴定出了 39 种不同类型的视网膜细胞,而 Klein 等^[25]利用 inDrop 分析小鼠的数千个胚胎干细胞和分化细胞,以便更好地了解干细胞分化。各类单细胞测序方法被陆续开发,且准确性相近,其中 Smart-seq2 可以检测到单个细胞的基因最多,CEL-seq2、Drop-seq 和 MARS-seq 等方法由于使用了独特的分子标识符(unique molecular identifier, UMI),可定量 mRNA 水平,其扩增噪音会更低。有研究证明 Drop-seq 对于测量大量细胞转录组时性价比更高,而 MARS-seq 和 Smart-seq2 在分析数量较少的细胞转录组时效率则更高^[26]。

目前,大多数单细胞测序实验是使用 Nextera 试剂盒进行文库制备,使用 Illumina 平台进行测序。然而,扩增后获得的 cDNA 文库与其他测序平台也兼容。例如,SC3-seq (single-cell mRNA 3-prime end sequencing, SC3-seq) 是使用 SOLiD 系统进行测序^[27]。最新的 Chromium™ Single Cell 3'Solution 平台是 10X Genomics 公司新开发的一种低成本、高通量的单细胞测序方法,一次能分离 500~10 000 个单细胞,可一次性获得大量的单细胞基因表达数据^[28]。

1.3 scRNA-seq 的应用

转录组指在某一特定条件下细胞内所有转录产物 RNA 的集合,包括信使 RNA、核糖体 RNA、转运 RNA 及非编码 RNA。精确深入地研究转录组有助于全面理解细胞基因表达和调控网络的作用。传统的转录组研究需要的细胞数量巨大,且基于群体水平的转录组研究无法揭示细胞之间的异质性,也难以对诸如早期胚胎及异质性的组织干细胞等极少量细胞进行分析,故 scRNA-seq 被开发出以在单细胞水平研究转录组的差异表达。通过此技术,研究人员在单细胞水平上探索了许多疾病和生物学过程,如神经元基因异质性^[29]、癌症发生与肿瘤演变^[30-31]、早期胚胎发育^[15,32]等。

2 scRNA-seq 在视觉系统研究中的应用

2.1 scRNA-seq 在视网膜研究中的应用

神经元的分类可使相同类型神经元在不同时间、实验室和条件下重现以被反复研究,由于某些疾病主要影响特定类型的细胞、在发育和疾病发展过程中也有起决定性作用的特定类型细胞,对神经元的分类还可促进遗传学层面的功能研究,以及发育、进化和疾病的分析^[33]。通过形态学、生理学和分子学标准分类将视网膜划分为神经节细胞、双极细胞、水平细胞、光感受器和无长突细胞 5 种神经元类型。研究表明,每类细胞又可分为多个亚型^[34]。

Macosko 等^[24]利用 scRNA-seq 平台分析了 44 808 个小鼠视网膜细胞的转录本,确定了 39 个不同的细胞群,绘制了一个视网膜细胞类别和新的候选细胞亚型的基因表达分子图谱。Shekhar 等^[35]则是从 2.5 万个小鼠的视网膜双极细胞中开发了一种分类的方案,确定了 15 种双极细胞的类型,并结合荧光原位杂交、稀疏病毒标记等多种分子生物学实验方法验证了他们的结果,该研究开发并使用了一个全新的验证细胞类型图谱的策略。Philips 等^[36]对视网膜的研究则是通过对人来源多能干

细胞进行分化为视囊泡作为视网膜体外发育的模型,发现了视网膜发育过程中细胞类型和基因表达的变化规律和在神经网络发育过程中一些潜在的重要基因。

2.2 scRNA-seq 在视觉高级中枢脑皮质研究中的应用

大脑皮层是神经系统的最高级中枢,执行最高阶的认知功能,如记忆、认知能力、决策和社会行为^[37-38],有着十分广泛而复杂联系的神经元。尽管神经回路形成于人类胚胎发育的后期阶段,甚至在出生后仍在发育,但是不同种类和功能的细胞会在发育早期产生并迁移到适当的位置。大脑皮质功能障碍导致认知、智力等功能的丧失,甚至不能维持正常生命活动。视皮质是视觉投射中枢,其发生病理损伤时,不仅发生视觉障碍,还存在记忆缺陷和运动知觉障碍。Pfeffer 等^[39]利用 Patch-seq 的单细胞测序方法将小鼠视皮质中不同功能和位置的神经元用膜片钳玻璃微电极挑出,再进行转录组分析,从而将单个神经元的功能、位置、生理特性与基因表达模式关联起来,该方法使我们获得了一个多层面但一致的单个视皮层神经元的定义,并为研究视觉神经环路的解剖结构、基因组成原则和基本功能提供了帮助。若是利用数量更多的样本或更大的测序深度就能揭示更微小的基因表达谱与功能和解剖特征的相关性。随着单细胞测序技术的日益进步,高通量、低成本、自动化的单细胞测序平台逐渐增多。Zhong 等^[40]利用高通量 scRNA-seq 方法测定了妊娠 8~26 周人类胚胎的前额叶皮层中超过 2 300 个单细胞,最终确定了在人类胚胎前额叶皮层中的 6 种细胞类型,包括神经祖细胞、兴奋性神经元、中间神经元、星形胶质细胞、少突胶质祖细胞和小胶质细胞,并进一步将这六大类细胞又细分成 35 个亚类,追踪这些细胞的发育轨迹,发现中间祖细胞新的分子标记基因和独特的发育特征,绘制了在前额叶皮层中兴奋性神经元的神经发生时间轴,并检测出早期发育的前额叶皮层中有中间祖细胞的存在,揭示了调控神经元和神经环路形成的发育依赖信号。该研究为理解人类前额叶皮层在早中期的发育提供了蓝图,为系统剖析前额叶皮层中细胞分子调控水平打下了基础。Lake 等^[41]则对成人神经细胞的细胞核进行了单核细胞测序,使用神经元细胞核是为了减少来自其他细胞转录组的污染和解离神经元时的降解,他们选取 6 个经典定义 Brodmann 区域的皮层神经元,对其中 4 488 个细胞的细胞核进行了测序,最终确定 6 个新皮层区域的 16 个神经元亚型,在单个神经元转录层中发现额外异质性可能进一步反映了复杂神经网络的活动,这些神经网络随着功能和时间的变化而变化。该研究绘制了人类大脑转录组映射,进一步加深了我们对大脑功能的认识。以上高通量单细胞测序方法的运用为我们研究视觉系统中视皮质神经元的转录组图谱提供了极好的范例和可行的技术路线。

2.3 scRNA-seq 在视觉相关其他脑区域研究中的应用

在生物的视觉神经系统中,大脑皮质是最后也是最重要的视觉信息处理中心,视觉的形成仍离不开其他部分对视觉信息的处理与整合,比如视束、外侧膝状体视觉传导通路中的组分。然而 Zhang 等^[42]在对斑马鱼的研究中发现,缰核也有视觉输入的功能。光偏好行为是动物界中广泛存在的一种本能行为,对

于动物生存至关重要。缰核是脊椎动物中高度保守的核团,在神经生理学和行为学中起着重要作用,它接受大量来自大脑的输入信息,影响着许多社会行为,如睡眠、疼痛反应、奖励学习和恐惧等^[43-45]。该区域的异常发育与神经障碍如抑郁症、精神分裂和成瘾有关^[46]。Zhang 等^[42]研究首次揭示了左边背侧缰核通过视网膜神经节细胞和隆凸丘脑组成非对称性视觉通路,介导了斑马鱼的光偏好行为。Pandey 等^[47]使用 scRNA-seq 技术分析了斑马鱼从幼年到成年缰核区域的细胞,构建和验证了缰核中神经元类型的一个全面图谱,该研究还发现了斑马鱼缰核中 13 种新的神经元类型和几十个新的缰核神经元的标记基因,该发现有助于研究缰核的发育和功能,并为研究视觉的信息传导提供了新的重要内容。

2.4 scRNA-seq 在视觉系统疾病研究中的应用

视觉系统中的遗传性致盲疾病目前并没有很好的治疗手段。了解变异的基因如何影响表达,特别是受疾病影响的组织中基因的表达差异,有助于疾病的诊断和治疗。视觉神经系统起源的肿瘤都具有高度恶性且通常都是年幼时发病,肿瘤的分子学特征和细胞学特征所提示的肿瘤起源是肿瘤靶向治疗的依据。然而在肿瘤的研究中,其异质性对于诊断和分析来说是一个重大挑战。scRNA-seq 技术可全面分析细胞、组织异质性并识别不同细胞类型的基因表达谱。视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 是婴幼儿中常见的眼内恶性肿瘤,其起源一直备受争议,Rb 可能来自祖细胞^[48]、神经胶质细胞或者无长突细胞^[49]。McEvoy 等^[50]对小鼠和人类的 Rb 细胞进行了单基因表达谱分析,发现 Rb 的肿瘤细胞表达多种细胞类型的特异性表达基因,包括光感受器、中间神经元和祖细胞,这种现象在正常视网膜却不存在,说明该肿瘤的产生可能是由于在视网膜发育的过程中受到了不同细胞类型差异表达信号通路的干扰,为 Rb 的潜在治疗靶点提供了重要依据。

2.5 scRNA-seq 在神经干细胞研究中的应用

神经干细胞可以自我更新以及产生新的神经元。在正常状态下,它在体内处于静止和激活之间的一个平衡状态^[51-52]。如果神经系统受伤,内源性神经干细胞将被激活以修复受损的组织^[53]。由于眼球的易及性、易随访和免疫特异性,眼球被认为是干细胞治疗的理想微环境。将神经干细胞移植到大鼠视网膜下腔发现,视网膜可与移植细胞整合^[54]。在视网膜感光细胞退化性病变小鼠模型中行干细胞移植,视觉得到改善,但其具体疗效程度仍不清楚^[55]。成体干细胞促进组织发生、稳态和再生是一个有序的过程,旧技术遇到的技术挑战是不能解决细胞异质性的问题,故不能捕获动态的发育。Llorens-Bobadilla 等^[56]利用单细胞测序方法研究了脑损伤后神经干细胞被激活的特点,该研究确定了神经干细胞的亚群的新基因标记,发现在脑缺血期间,休眠的神经干细胞通过干扰素 γ 信号进行活化。Shin 等^[57]专注于成体静止期神经干细胞 (quiescent neural stem cell, qNSC) 活化和形成神经细胞时这个狭窄的时间窗,使用 Nestin-CFP^{trc} 转基因遗传标记系统,从不同发育阶段的混合前体细胞群中获得了单细胞转录组信息,揭示神经干细胞分子表征及其体内分化的发育动力学特征,提供了成体

qNSC 的分子特征,描绘了成体神经细胞发生初始阶段基础的动态分子级联全貌图。神经系统 V-SVZ 区的 GFAP^{trc} 神经干细胞是已经被公认的神经干细胞,而室管膜细胞的神经干性一直存在争议,由于室管膜细胞数量远超 V-SVZ 区的神经干细胞,这对临床上神经系统的治疗具有重要意义,然而由于这 2 种细胞的许多表型标记类似,在体内难以区分。Shah 等^[58]利用 scRNA-seq 分离得到了室管膜细胞的转录组学数据并对该细胞进行了体内外的干细胞诱导刺激,这项研究发现室管膜细胞有别于神经干细胞和祖细胞谱系,它表达较多与纤毛相关的基因,证实了绝大多数室管膜细胞不能作为潜在的神经干细胞或祖细胞发挥作用,在脑损伤或外源性生长因子刺激后也不能诱导其神经干性作用。

3 小结

scRNA-seq 可全面分析细胞异质性并识别不同表型细胞类型,随着分子生物学与生物信息学技术的飞速发展,目前已有许多商业化测序平台被开发出来,这些测序平台具有耗时短、费用低、高通量、所需样本少的特点,现已广泛用于胚胎植入前诊断、胚胎器官的发育、肿瘤的发生、免疫系统、干细胞分化等多个研究领域。目前单细胞转录组测序技术在视觉系统中的研究也日益增多,scRNA-seq 可鉴别大脑、视网膜及其他神经系统中复杂的神经元种类和特殊标记的基因,有助于发现罕见的细胞类型。该技术与生物信息学技术的结合可揭示视觉神经系统神经元发育和分化过程的基因表达调控网络,在视觉神经系统发育中的应用为其他神经系统或其他系统的研究提供了一个可行的技术路线,为以后描绘人类视觉环路细胞图谱打下了坚实基础。scRNA-seq 还可追溯视觉神经系统来源的肿瘤,如 Rb 的肿瘤细胞起源,阐述了肿瘤发生的机制,为临床治疗此类肿瘤提供了一个新的治疗靶点。scRNA-seq 技术用于视觉系统其他疾病,能为遗传性致盲疾病提供新的临床治疗依据和防治手段。鉴于干细胞移植在视网膜光感受器退化性疾病中的研究增多,scRNA-seq 技术的应用将会促进干细胞移植治疗从基础实验到临床的转化。目前该技术在视觉系统中的应用尚且较局限,仍然存在覆盖率低、长非编码 RNA 难以检测等不足,随着技术的发展,该技术会被逐步优化和改进。相信在未来数年内,该技术可能会迅速扩展到视觉系统的研究中,推广至临床工作,可描绘人类视觉系统细胞转录组图谱,也可指导临床对视觉系统疾病的诊断和治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Arendt D, Musser JM, Baker CVH, et al. The origin and evolution of cell types [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17 (12): 744-757. DOI: 10.1038/nrg.2016.127.
- [2] Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society [J]. *Notes Rec R Soc Lond*, 2004, 58 (2): 187-201. DOI: 10.1098/rsnr.2004.0055.
- [3] Schatz DG, Swanson PC. V(D)J recombination; mechanisms of initiation [J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 167-202. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132552.
- [4] Echols H, Goodman MF. Fidelity mechanisms in DNA replication [J].

- Annu Rev Biochem, 1991, 60 : 477–511. DOI: 10. 1146/annurev. bi. 60. 070191. 002401.
- [5] 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. DOI: 10. 1038/nmeth. 1315.
- [6] Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, et al. Petilla terminology; nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(7) : 557–568. DOI: 10. 1038/nrn2402.
- [7] Luo L, Callaway EM, Svoboda K. Genetic dissection of neural circuits: a decade of progress [J]. Neuron, 2018, 98(2) : 256–281. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2018. 03. 040.
- [8] Kvist T, Ahring BK, Lasken RS, et al. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(4) : 926–935. DOI: 10. 1007/s00253-006-0725-7.
- [9] Kirkness EF, Grindberg RV, Yee-Greenbaum J, et al. Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome [J]. Genome Res, 2013, 23(5) : 826–832. DOI: 10. 1101/gr. 144600. 112.
- [10] Espina V, Wulfkühle JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdissection[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2) : 586–603. DOI: 10. 1038/nprot. 2006. 85.
- [11] Cho BS, Schuster TG, Zhu X, et al. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm [J]. Anal Chem, 2003, 75(7) : 1671–1675. DOI: 10. 1021/ac020579e.
- [12] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, et al. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(29) : 11889–11894. DOI: 10. 1073/pnas. 0704662104.
- [13] Walters EM, Clark SG, Beebe DJ, et al. Mammalian embryo culture in a microfluidic device[J]. Methods Mol Biol, 2004, 254 : 375–382. DOI: 10. 1385/1-59259-741-6: 375.
- [14] Kellogg RA, Gómez-Sjöberg R, Leyrat AA, et al. High-throughput microfluidic single-cell analysis pipeline for studies of signaling dynamics[J]. Nat Protoc, 2014, 9(7) : 1713–1726. DOI: 10. 1038/nprot. 2014. 120.
- [15] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8) : 777–782. DOI: 10. 1038/nbt. 2282.
- [16] Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. Nat Methods, 2013, 10(11) : 1096–1098. DOI: 10. 1038/nmeth. 2639.
- [17] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. Cell Rep, 2012, 2(3) : 666–673. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2012. 08. 003.
- [18] Islam S, Kjällquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq[J]. Genome Res, 2011, 21(7) : 1160–1167. DOI: 10. 1101/gr. 110882. 110.
- [19] Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, et al. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity[J]. Genome Biol, 2013, 14(4) : R31 [2019–08–18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054835/>. DOI: 10. 1186/gb-2013-14-4-r31.
- [20] Pan X, Durrett RE, Zhu H, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(2) : 594–599. DOI: 10. 1073/pnas. 1217322109.
- [21] Cadwell CR, Palasantza A, Jiang X, et al. Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(2) : 199–203. DOI: 10. 1038/nbt. 3445.
- [22] Jaitin DA, 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) : 776–779. DOI: 10. 1126/science. 1247651.
- [23] Fan HC, Fu GK, Fodor SP. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry [J]. Science, 2015, 347(6222) : 1258367 [2019–18–20]. <https://science.sciencemag.org/content/347/6222/1258367>. long. DOI: 10. 1126/science. 1258367.
- [24] Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. Cell, 2015, 161(5) : 1202–1214. DOI: 10. 1016/j. cell. 2015. 05. 002.
- [25] Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells [J]. Cell, 2015, 161(5) : 1187–1201. DOI: 10. 1016/j. cell. 2015. 04. 044.
- [26] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. Mol Cell, 2017, 65(4) : 631–643. DOI: 10. 1016/j. molcel. 2017. 01. 023.
- [27] Nakamura T, Yabuta Y, Okamoto I, et al. SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(9) : e60 [2019–08–20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482058/>. DOI: 10. 1093/nar/gkv134.
- [28] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. Nat Commun, 2017, 8 : 14049 [2018–08–21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241818/>. DOI: 10. 1038/ncomms14049.
- [29] McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, et al. Mosaic copy number variation in human neurons [J]. Science, 2013, 342(6158) : 632–637. DOI: 10. 1126/science. 1243472.
- [30] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing [J]. Nature, 2011, 472(7341) : 90–94. DOI: 10. 1038/nature09807.
- [31] Potter NE, Ermini L, Papaemmanuil E, et al. Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer [J]. Genome Res, 2013, 23(12) : 2115–2125. DOI: 10. 1101/gr. 159913. 113.
- [32] 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) : 2126–2135. DOI: 10. 1101/gr. 161679. 113.
- [33] Zeng H, Sanes JR. Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward [J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(9) : 530–546. DOI: 10. 1038/nrn. 2017. 85.
- [34] Masland RH. The neuronal organization of the retina [J]. Neuron, 2012, 76(2) : 266–280. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2012. 10. 002.
- [35] Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, et al. Comprehensive classification of retinal bipolar neurons by single-cell transcriptomics [J]. Cell, 2016, 166(5) : 1308–1323. DOI: 10. 1016/j. cell. 2016. 07. 054.
- [36] Phillips MJ, Jiang P, Howden S, et al. A novel approach to single cell rna-sequence analysis facilitates in silico gene reporting of human pluripotent stem cell-derived retinal cell types [J]. Stem Cells, 2018, 36(3) : 313–324. DOI: 10. 1002/stem. 2755.
- [37] Roth G, Dicke U. Evolution of the brain and intelligence in primates [J]. Prog Brain Res, 2012, 195 : 413–430. DOI: 10. 1016/B978-0-444-53860-4. 00020-9.
- [38] O’Rahilly R, Müller F. Significant features in the early prenatal development of the human brain [J]. Ann Anat, 2008, 190(2) : 105–118. DOI: 10. 1016/j. aanat. 2008. 01. 001.
- [39] Pfeffer CK, Beltramo R. Correlating anatomy and function with gene expression in individual neurons by combining *in vivo* labeling, patch clamp, and single cell RNA-seq [J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11 : 376 [2019–08–21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5714881/>. DOI: 10. 3389/fncel. 2017. 00376.
- [40] Zhong S, Zhang S, Fan X, et al. A single-cell RNA-seq survey of the developmental landscape of the human prefrontal cortex [J]. Nature, 2018, 555(7697) : 524–528. DOI: 10. 1038/nature25980.
- [41] Lake BB, Ai R, Kaeser GE, et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain [J]. Science, 2016, 352(6293) : 1586–1590. DOI: 10. 1126/science. aaf1204.
- [42] Zhang BB, Yao YY, Zhang HF, et al. Left habenula mediates light-preference behavior in zebrafish via an asymmetrical visual pathway [J]. Neuron, 2017, 93(4) : 914–928. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2017. 01. 011.
- [43] Bianco IH, Wilson SW. The habenular nuclei: a conserved asymmetric

- relay station in the vertebrate brain [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009, 364 (1519) : 1005-1020. DOI: 10. 1098/rstb. 2008. 0213.
- [44] Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11 (7) : 503-513. DOI: 10. 1038/nrn2866.
- [45] Namboodiri VM, Rodriguez-Romaguera J, Stuber GD. The habenula [J]. *Curr Biol*, 2016, 26 (19) : R873-R877. DOI: 10. 1016/j. cub. 2016. 08. 051.
- [46] Proulx CD, Hikosaka O, Malinow R. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors [J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17 (9) : 1146-1152. DOI: 10. 1038/nm. 3779.
- [47] Pandey S, Shekhar K, Regev A, et al. Comprehensive identification and spatial mapping of habenular neuronal types using single-cell RNA-seq [J]. *Curr Biol*, 2018, 28 (7) : 1052-1065. DOI: 10. 1016/j. cub. 2018. 02. 040.
- [48] Zhong X, Li Y, Peng F, et al. Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121 (10) : 2125-2131. DOI: 10. 1002/ijc. 22880.
- [49] Johnson DA, Zhang J, Frase S, et al. Neuronal differentiation and synaptogenesis in retinoblastoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (6) : 2701-2711. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-06-3754.
- [50] McEvoy J, Flores-Otero J, Zhang J, et al. Coexpression of normally incompatible developmental pathways in retinoblastoma genesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20 (2) : 260-275. DOI: 10. 1016/j. ccr. 2011. 07. 005.
- [51] Lugert S, Basak O, Knuckles P, et al. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6 (5) : 445-456. DOI: 10. 1016/j. stem. 2010. 03. 017.
- [52] Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals [J]. *Science*, 2010, 327 (5965) : 542-545. DOI: 10. 1126/science. 1180794.
- [53] Benner EJ, Luciano D, Jo R, et al. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4 [J]. *Nature*, 2013, 497 (7449) : 369-373. DOI: 10. 1038/nature12069.
- [54] 陈冲林, 邹婷, 黎其友, 等. 神经干细胞与大鼠 RPE 细胞间的线粒体转运及对 RPE 细胞凋亡的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39 (11) : 1112-1116. DOI: 10. 16016/j. 1000-5404. 201701031. Chen CL, Zou T, Li QY, et al. Mitochondrial transfer from neural stem cells rescues apoptosis of retinal pigment epithelial cells isolated from RCS rats [J]. *J Third Military Med Univer*, 2017, 39 (11) : 1112-1116. DOI: 10. 16016/j. 1000-5404. 201701031.
- [55] MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors [J]. *Nature*, 2006, 444 (7116) : 203-207. DOI: 10. 1038/nature05161.
- [56] Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, et al. Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17 (3) : 329-340. DOI: 10. 1016/j. stem. 2015. 07. 002.
- [57] Shin J, Berg DA, Zhu Y, et al. Single-cell RNA-seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neurogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17 (3) : 360-372. DOI: 10. 1016/j. stem. 2015. 07. 013.
- [58] Shah PT, Stratton JA, Stykel MG, et al. Single-cell transcriptomics and fate mapping of ependymal cells reveals an absence of neural stem cell function [J]. *Cell*, 2018, 173 (4) : 1045-1057. DOI: 10. 1016/j. cell. 2018. 03. 063.

(收稿日期:2020-05-09 修回日期:2020-06-02)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后,稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志上通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为,但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html),属于以不同语言文字二次发表者,请作者在首次接受稿件的期刊发表后1周再另行投稿,并请提供首次发表期刊同意以不同语言发表的同意函。

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再审稿的稿件,如2个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过Email发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期2个月不修回者,视作自行撤稿。

(本刊编辑部)