

## 单细胞转录组测序在眼科相关疾病研究中的应用现状

姜波 综述 陆培荣 审校

苏州大学附属第一医院眼科, 苏州 215006

通信作者: 陆培荣, Email: lupeirong@suda.edu.cn

**【摘要】** 单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 是一种强大且快速发展的新兴技术, 与传统 RNA-seq 技术相比, 其使全面剖析细胞异质性和获取从整体分析中无法获得的生物信息成为可能。近年来, 该技术已被广泛应用于单个细胞的表征检测和细胞水平的生物学机制研究等领域。目前, 在眼科领域中, 不断有应用 scRNA-seq 技术的相关研究报道。单细胞水平的基因表达已经在动物模型、视网膜类器官、初级人类视网膜、视网膜色素上皮和脉络膜的视觉系统中进行了研究。同样, scRNA-seq 技术测序研究已经确定了许多眼部疾病背景下基因表达的变化模式, 包括脉络膜血管内皮细胞如何在年龄相关性黄斑变性中发生改变、退化的糖尿病小鼠视网膜中不同细胞的功能亚型及近视小鼠视网膜纤维层组织中的各类异质细胞群等。另外, scRNA-seq 技术也确定了一些眼部肿瘤的分子、细胞及生理学等特征, 包括视网膜母细胞瘤的细胞起源及靶向分子、葡萄膜黑色素瘤的异质性及新的治疗靶点等。本文主要阐述了 scRNA-seq 技术在眼科相关疾病研究中的最新应用情况, 为研究者提供参考, 以期扩展该技术到更多的眼部研究中。

**【关键词】** 单细胞; RNA 测序; 基因; 异质性; 眼科

**基金项目:** 江苏省卫生计生委“科教强卫”医学领军人才培养项目 (CXTDA2017039); 苏州市科技计划项目 (SLT201916)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210419-00265

### Application of single-cell RNA sequencing in the study of ophthalmologic diseases

Jiang Bo, Lu Peirong

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Lu Peirong, Email: lupeirong@suda.edu.cn

**【Abstract】** Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a powerful and rapidly developing emerging technology that allows complete analysis of cellular heterogeneity and provides bioinformation that is not available from holistic analysis compared to traditional bulk RNA sequencing (bulk RNA-seq). In recent years, the technique has been widely used in the characterization and detection of single cells and the study of biological mechanisms at the cellular level. Currently, the application of scRNA-seq in the field of ophthalmology has been reported. Gene expression at the single cell level has been studied in animal models, retinal organoids, primary human retina, retinal pigment epithelium (RPE), and choroidal visual systems. Similarly, scRNA-seq research has identified many ocular diseases under the background of the change of gene expression patterns, including how choroid blood vessel endothelial cell changes in age-related macular degeneration (AMD), the degradation of the function of cells in the retina of diabetic mice subtypes and myopic sclera fiber layer in the organization of various types of heterogeneous cells in mice, and so on. In addition, the scRNA-seq has identified the molecular, cellular and physiological characteristics of several eye tumors, including the cell origin and target molecules of retinoblastoma, the heterogeneity of uveal melanoma, and new therapeutic targets. This article mainly introduces the latest application of scRNA-seq technology in ophthalmology-related diseases to provide a reference for researchers, hoping that the technology can be extended to more related research in ophthalmology.

**【Key words】** Single cell; RNA sequencing; Gene; Heterogeneity; Ophthalmology

**Fund program:** Jiangsu Provincial Medical Innovation Team (CXTDA2017039); Suzhou Science and Technology Plan Project (SLT201916)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210419-00265

自 2009 年单细胞测序技术问世以来,单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)已经成为大规模研究单个细胞转录信息的有力工具<sup>[1]</sup>。该技术具有高分辨率,不仅继承了传统的大量细胞基因测序(bulk-RNA-seq)的优点,还提供了剖析单个细胞转录模式的机会,为生物学研究打开了一扇新的大门。scRNA-seq 技术不仅能够研究单个细胞基因表达的动态变化和分化轨迹,还可以研究细胞之间的通讯调节过程,并识别新的细胞类型等<sup>[2-3]</sup>。在大规模样本研究中,基因表达是整个细胞群的平均值,而 scRNA-seq 技术可以查看单个细胞的真实“状态”<sup>[4]</sup>。因此,在单细胞水平上研究基因表达,并比较单个细胞之间的基因表达谱,可以发现以往未发现的细胞种群,并揭示新的调控途径。

目前,在眼科领域中,不断有应用 scRNA-seq 技术的相关研究报道。单细胞水平的基因表达已经在动物模型、视网膜类器官、人类初级视网膜、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和脉络膜的视觉系统中进行了研究<sup>[5]</sup>。同样,scRNA-seq 技术测序研究已经确定了许多眼部疾病背景下基因表达的变化模式,包括年龄相关性黄斑变性中脉络膜血管内皮细胞的改变、退化的糖尿病小鼠视网膜中不同细胞的功能亚型、近视小鼠巩膜纤维层组织中各类异质细胞群等<sup>[6-8]</sup>。在本文中,我们主要介绍 scRNA-seq 技术在眼科相关疾病研究中的最新应用情况,为研究者提供参考,并展望该技术在眼科相关疾病研究领域中的巨大应用前景。

## 1 scRNA-seq 的概念和方法

术语“转录组”指的是细胞内的整套转录产物集合,这包括细胞的总基因表达,以及其隐含的表型和功能状态。转录组包括蛋白质编码信使 RNA,以及核糖体功能的关键分子(核糖体 RNA 和转移 RNA)和具有调节功能的非编码 RNA<sup>[9]</sup>。RNA 测序是一种用于检测和定量分析生物样品中信使 RNA 分子的基因组方法,有助于研究细胞反应。2005 年高通量测序技术的出现使得在核苷酸水平上分析 RNA 成为可能,可以更深入地研究转录组,在医学领域推动了许多发现和创新<sup>[10]</sup>。RNA 测序通常是应用于包含数千到数百万个细胞的样本,这阻碍了对生物基本单位——细胞的直接评估。随着高通量测序技术的出现,使研究单个细胞的生物学特性达到了前所未有的分辨率,使得 scRNA-seq 技术获得飞速发展。

scRNA-seq 是在单细胞水平上对全转录组进行扩增与测序的一项新技术,能够获得每个细胞的信使 RNA 表达信息,发现不同的细胞亚群以及相关信息,揭示细胞间基因表达的异质性并鉴定稀有细胞类型<sup>[11]</sup>。scRNA-seq 的技术难点是全转录扩增,主要包括信使 RNA 的逆转录和 cRNA 扩增等。根据细胞和 RNA 捕获及 cRNA 扩增的方法等不同,scRNA-seq 的实现方法也有多种,主要包括 Smart-seq、Smart-seq2、CEL-seq 及 STRT-seq 等。目前,scRNA-seq 技术实现平台主要包括 Illumina<sup>®</sup> Bio-Rad<sup>®</sup> Single-Cell Sequencing Solution、BD Rhapsody<sup>™</sup> Single-Cell Analysis System、10x Chromium Single Cell Gene Expression Solution、ICELL8 Single-Cell System 和 C1<sup>™</sup> 单细胞全自动制备

系统等,应用最多的是 Illumina 平台。而由 10x Genomic 公司推出的 Single Cell Gene Expression Solution 平台具有低成本、高通量等优点,已被越来越多的研究者所青睐<sup>[12]</sup>。

## 2 scRNA-seq 在眼科疾病研究中的应用

### 2.1 scRNA-seq 与糖尿病视网膜病变及年龄相关性黄斑变性相关研究

视网膜是中枢神经系统的分支,包含多种神经元,在视觉成像过程中具有特定作用<sup>[13]</sup>。由于视网膜组织结构复杂,传统的 RNA-seq 方法不能准确反映细胞之间的异质性,而 scRNA-seq 则能够精确分辨单个不同视网膜细胞的基因表达情况<sup>[14]</sup>。Lehmann 等<sup>[15]</sup>通过结合 scRNA-seq 技术和传统的 RNA-seq 技术,对小鼠 RPE 和脉络膜细胞类型进行了分类,表征了脉络膜血管内皮细胞的组织特异性转录组特征,并揭示 Hedgehog 信号通路在体内遗传损伤导致脉络膜肥大细胞的功能显著丧失,以及视网膜损伤后炎症反应的改变和视觉功能缺陷的加重。这为视网膜血管疾病和脉络膜相关炎症性致盲疾病的研究和治疗开辟了新的途径。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的常见并发症,是导致视力损害和致盲的主要原因之一<sup>[16]</sup>。尽管相关研究报道不少,但对其发病机制的理解仍然不够全面。Van 等<sup>[7]</sup>对患有 DR 的小鼠视网膜组织进行 scRNA-seq 检测,得到了 9 474 个视网膜细胞的转录组数据,并成功区分出 8 种不同的视网膜细胞类型,并研究了神经元、胶质细胞和免疫细胞中的差异表达基因网络,结果表明大胶质亚群具有不同的纤维化、炎症和胶质细胞特征。这项研究在动物模型中确定了 DR 中的炎症、代谢和氧化应激介导变化的分子途径,并区分了不同功能亚型的炎症细胞和大胶质细胞。Niu 等<sup>[17]</sup>对诱导的 2 型 DR 小鼠模型进行 scRNA-seq 检测,结果发现糖尿病小鼠的视网膜视黄醛结合蛋白 1 表达降低,其在 Müller 胶质细胞中的过表达可减轻 DR 相关的神经血管变性,提示视黄醛结合蛋白 1 可能是治疗 DR 的一个新靶点。Mao 等<sup>[18]</sup>通过使用 scRNA-seq 技术,比较健康和糖尿病患者视网膜之间的转录起始位点表达情况,发现了糖尿病患者视网膜患者的 Müller 神经胶质细胞和小胶质细胞中细胞凋亡信号升高,提示其可以作为糖尿病视网膜病变发病的早期指标。有研究者将晚期糖尿病视网膜病变患者的视网膜前膜组织进行 scRNA-seq 检测,差异表达基因分析显示,脂肪细胞增强子结合蛋白 1(adipocyte enhancer-binding protein 1, AEBP1)在肌成纤维细胞簇中显著上调;在进行体外细胞验证后表明,该分子可能在周细胞-肌成纤维细胞转化中发挥作用<sup>[19]</sup>。

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是导致不可逆盲的常见疾病之一。RPE 和脉络膜及视网膜关系密切,而 AMD 被认为是影响 RPE 和脉络膜的疾病之一<sup>[20-21]</sup>。为了阐明 RPE 和脉络膜内基因的表达情况,以进一步了解 AMD 的发病机制,Voigt 等<sup>[6]</sup>采用 scRNA-seq 对 7 个捐献的人类眼球进行了 RPE 或脉络膜单细胞转录组分析;在第一阶段研究中,鉴定出了 2 个雪旺细胞群体,差异表达分析表

明,这些群体对应于髓鞘化和非髓鞘化的雪旺细胞表型;有趣的是,64%的无髓鞘雪旺细胞来源于新生血管性 AMD 供者的黄斑,这些雪旺细胞中补体因子 D 的表达显著增加,提示非髓鞘化雪旺细胞可能在新生血管性 AMD 发病中发挥一定作用。在第二阶段研究中发现表达差异最大的 2 个基因是绒毛膜毛细血管特异的 *CA4* 和 *PLVAP*。另外,研究还关注到绒毛膜内皮细胞中第六大富集基因 *RGCC*,该基因被定位于黄斑脉络膜新生血管膜的内皮细胞,提示其可能在 AMD 的脉络膜血管内皮损伤中发挥作用。Orozco 等<sup>[22]</sup>检测了来自 129 个供体的黄斑和非黄斑组织的全基因组表达定量性状位点数据,包括黄斑特异性视网膜和 RPE 或脉络膜,共鉴定出 15 个可能的 AMD 致病基因,包括 *TSPAN10* 和 *TRPM1* 等。Luthert 等<sup>[23]</sup>分析了在脉络膜、RPE 和视网膜神经上皮组织中存在的 17 种细胞类型的 scRNA-seq 数据集,并利用基因本体数据库,发现 AMD 的主要遗传风险与补体途径和 *HTRA1/ARMS2* 位点密切相关,这为确定关键的治疗靶点提供了新的思路。在最近的一项研究中,研究者将数据库中关于 AMD 的 scRNA-seq 测序结果进行再次分析发现,*SPP1* 和小胶质细胞活化可能在 AMD 的病理生理学中发挥重要作用。因此,*SPP1* 可能作为 AMD 的潜在治疗靶点<sup>[24]</sup>。

## 2.2 scRNA-seq 与视网膜母细胞瘤及葡萄膜黑色素瘤相关研究

视网膜母细胞瘤是儿童最常见的眼内恶性肿瘤,在 2~3 岁高发,全球平均生存率仅约为 30%<sup>[25]</sup>。长期以来,其肿瘤发病起源尚有争论,这对其防治有较大阻碍。Liu 等<sup>[26]</sup>将人类胚胎干细胞分别进行视网膜母细胞瘤基因 1 (retinoblastoma, *RB1*) 的靶向高频突变 (*RB1*Mut/Mut) 及敲除 (*RB1*<sup>-/-</sup>) 后,进行单细胞 RNA 测序分析,结果显示此肿瘤起源于正在成熟的视锥前驱细胞,同时表达抑制蛋白 3 和细胞增殖核抗原。随后,该研究团队基于其显著激活的 *PI3K-Akt* 信号通路特征,通过靶向该通路的激动剂脾源性酪氨酸激酶,成功筛选到 2 个候选新药分子。Collin 等<sup>[27]</sup>利用 10×Genomics 平台,将 2 个具有 2 种致病性 *RB1* 突变特征的视网膜母细胞瘤组织分离成单个细胞,并对其进行了 scRNA-Seq 和单细胞 ATAC 测序处理。此外,9 个人类胚胎和胎儿视网膜样本被分离成单个细胞,并接受 scRNA-Seq 和 ATAC 测序分析。scRNA-Seq 分析显示,视网膜母细胞瘤在细胞周期的不同阶段主要存在于锥状前体。单细胞 ATAC 测序分析发现了 2 个富含视网膜母细胞瘤的锥体亚簇,每个亚簇的特征是激活不同的上游调控因子和信号通路,使增殖的锥状前体能够逃脱细胞周期阻滞和/或凋亡。Yang 等<sup>[28]</sup>对来自 2 个视网膜母细胞瘤样本的 14 739 个细胞进行了 scRNA-seq 检测,确定了人类视网膜母细胞瘤中的 2 种主要细胞类型。细胞轨迹分析共发现 5 种细胞状态,分为 2 个主要分支,细胞周期相关视锥细胞前体是视网膜母细胞瘤的起源细胞,是启动视网膜母细胞瘤分化和恶性肿瘤过程所必需的。在最近的另一项研究中,研究者对 4 个视网膜母细胞瘤样本 (2 个来自眼内,2 个来自眼外) 进行 scRNA-seq 检测,并整合了公共数据库中的 5 个正常视网膜样本、4 个眼内样本和 3 个眼外视网膜母细胞

瘤样本的测序信息<sup>[29]</sup>。在 9 种主要细胞类型中共获得 128 454 个细胞。在细胞异质性分析中,分别在视锥前体细胞、视网膜瘤样细胞和 *MKI67* 光感受性降低 (*MKI67* PhrD) 细胞中鉴定出了 10、8 和 7 个细胞亚群。在眼外样本的细胞中检测到 *SOX4* 水平高表达,尤其是在 *MKI67* PhrD 细胞中。这为视网膜母细胞瘤的防治研究提供了新的思路。

葡萄膜黑色素瘤 (uveal melanoma, UM) 是一种易转移的眼内恶性肿瘤,与皮肤黑色素瘤相比,UM 对免疫治疗不敏感。因此,UM 的治疗研究一直是热点。Durante 等<sup>[30]</sup>对 8 个原发和 3 个转移 UM 样本的 59 915 个肿瘤和非肿瘤细胞进行单细胞 RNA 测序分析,结果显示 UM 中 *CD8*<sup>+</sup> T 细胞上的主要检查点标记物不是常提到的 *CTLA4* 和 *PD1*,而是 *LAG3*。这为 UM 生物学研究提供了新的见解,*LAG3* 被认为可能是高危 UM 患者免疫检查点阻断的潜在候选新药分子。Pandiani 等<sup>[31]</sup>使用单细胞 RNA 测序对 6 种不同的原发性 UM 进行多尺度分析,发现了在基因组和转录组水平上的肿瘤内异质性,破译了部分由转录因子 *HES6* 驱动的侵袭性和不良预后状态下的基因调控网络,证明 *HES6* 在 UM 中具有重要作用,并认为其可能是阻止 UM 进展的有效靶点。Nell 等<sup>[32]</sup>采用数字 PCR 技术对良性脉络膜痣和原发性葡萄膜黑色素瘤进行分子分析,并利用单细胞 RNA 测序分析进一步研究突变型和野生型 *CYSLTR2* 在原发性和转移性葡萄膜黑色素瘤中的作用。研究结果表明,*CYSLTR2* 参与了葡萄膜黑色素瘤的早期和晚期发展,最后认为,*CYSLTR2* 可能是治疗 UM 的一个有效靶点。在最近的一项报道中,研究者对公共数据库中的 scRNA-Seq 检测数据进行分析后发现,*ITGB2-ICAM1* 轴通过保留缺氧和细胞外基质相关特征,可能在 *BAP1* 相关 UM 转移中发挥关键作用,这为预防 *BAP1* 突变患者 UM 转移提供了新的思路<sup>[33]</sup>。

## 2.3 scRNA-seq 与近视相关研究

近视的发生与眼轴的异常延长以及细胞外基质重塑引起的巩膜强度和厚度的同时下降密切相关,具体表现为眼轴延长、脉络膜和巩膜变薄、I 型胶原含量减少<sup>[34]</sup>。既往研究已明确近视发生时脉络膜厚度变薄,巩膜细胞外基质减少,表明巩膜胶原合成减少和巩膜胶原降解增加导致近视形成<sup>[35]</sup>。然而,在近视中诱导巩膜细胞外基质重塑的分子和信号传导途径尚不明确。Zhao 等<sup>[36]</sup>通过动物实验明确巩膜缺氧微环境是诱导巩膜成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,导致细胞外基质重塑,从而引发近视形成的关键因素。Wu 等<sup>[8]</sup>利用小鼠及豚鼠近视动物模型,采用单细胞测序和分析技术,发现在近视诱导期巩膜缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达升高,且在去除诱导因素后其表达恢复至正常水平,证明在形觉剥夺性近视小鼠巩膜中,成纤维细胞分化加剧,低表达胶原的肌成纤维细胞亚群比例升高,并发现这一过程可能受缺氧诱导因子信号通路调控,这使得治疗巩膜缺氧有望成为近视防控的重要突破点,具有深远的基础和临床意义。余嘉珍等<sup>[37]</sup>应用 scRNA-Seq 技术对小鼠近视和巩膜成纤维细胞之间的关系做了进一步研究,发现成纤维细胞功能障碍在近视进展过程中发挥重要作用,且与炎症反应、缺氧、蛋白质的调节及内质网应激的相关基因表达和通路的调节

有一定关系。该研究进一步揭示了巩膜成纤维细胞在近视进展中的作用机制,为近视防控寻找新的靶点提供了思路。

#### 2.4 scRNA-seq 与眼外伤相关研究

眼外伤是全世界导致失明和视力低下的主要原因之一,也是低收入和中等收入国家单侧视力丧失的主要原因。它影响了近五十万人,通常需要手术干预,并给社会带来巨大负担<sup>[38]</sup>。眼外伤在低收入和中等收入国家中普遍存在,与其相关的危险因素众多,包括职业危险、爆炸物、机械工作以及与机动车辆碰撞等<sup>[39]</sup>。眼球爆炸伤在严重损坏视功能的同时还会导致基因出现改变。Struebing 等<sup>[40]</sup>利用 50 psi (1 psi = 6.895 kPa) 的高压空气波构建 54 只小鼠眼球爆炸伤模型,5 天后利用 scRNA-seq 技术对视网膜 RNA 的表达进行分析,发现约 40% 的基因表达发生变化。Tran 等<sup>[41]</sup>为研究小鼠视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 在视神经挤压后的变化情况,损伤性切断视网膜神经节细胞的轴突,并利用 scRNA-seq 技术检测出视网膜中 46 种 RGCs 的全面分子图谱,鉴定出每种类型选择性表达的基因,并发现 *Thy1* 等基因的表达显著增加,这与 RGC 细胞大小和 *Thy1*-cfp 荧光的增加相对应。该研究为分析该型特异性损伤反应提供了一个系统的框架,差异表达基因可能是干预治疗的靶点。

#### 2.5 scRNA-seq 与葡萄膜炎相关研究

葡萄膜炎是一种常见的、威胁视力的炎症性眼病,其具有多种异质性临床特征,且约 35% 的患者可能出现视力受损。不同类型葡萄膜炎的发病取决于多种因素,以往报道显示,其发病可能与 60 余种病因有关,例如年龄、性别、种族、地理分布、环境影响、遗传及生活习惯等<sup>[42-43]</sup>。自身免疫性葡萄膜炎是一种自身免疫性疾病,而实验小鼠模型构建的实现为研究该病发病机制提供了机会。Hsu 等<sup>[44]</sup>利用 scRNA-seq 技术对自发性葡萄膜炎 *Aire*<sup>-/-</sup> 型小鼠的葡萄膜和视网膜进行鉴定,根据不同免疫细胞类型的丰度,免疫细胞和视网膜细胞的基因表达模式,以及免疫染色的结果等显示,不同 T 细胞群的分类显示 Th1 细胞是 *Aire*<sup>-/-</sup> 型小鼠视网膜中 T 辅助细胞的主要类别,三级淋巴结构的发育构成是 *Aire*<sup>-/-</sup> 型小鼠视网膜表型的一个组成部分,以及 *IFN $\gamma$*  基因在 *Aire*<sup>-/-</sup> 型小鼠的葡萄膜和视网膜的炎症病变中发挥重要作用。这项研究表明眼部炎症在分子机制和所涉及的免疫细胞类型方面具有特定的背景,这为识别眼部炎症疾病的生物标志物和治疗靶点提供了新的思路。Zhu 等<sup>[45]</sup>在对自身免疫性葡萄膜炎模型小鼠的淋巴结细胞进行 scRNA-seq 检测后发现,缺氧诱导因子 1 $\alpha$  可能通过调节辅助性 T 细胞 Th-17、Th1 和调节性 T 细胞参与自身免疫性葡萄膜炎的发病。

#### 2.6 scRNA-seq 与青光眼相关研究

青光眼是世界范围内导致不可逆盲的主要原因之一,其发病机制与 RGCs 的缺失密切相关<sup>[46]</sup>。主要的危险因素包括年龄、种族和家族史等,而唯一可调控的是眼压 (intraocular pressure, IOP)<sup>[47]</sup>。目前唯一被证明有效的治疗策略就是控制患者 IOP,而通过控制房水来调控 IOP 是临床中常用的治疗手段。但由于我们对组织如何控制 IOP 以及 IOP 升高导致 RGCs

损失的机制仍不甚了解,因此治疗的研究进展受到了一定限制。van Zyl 等<sup>[48]</sup>利用 scRNA-seq 技术在成人小梁网和周围组织中提取大约 24 000 个单细胞,分析了构成房水流出通路的细胞,绘制了这些组织的细胞图谱,并识别了每种细胞类型的标志物。然后使用图谱来定位与青光眼相关的基因表达。这些发现不仅深化了我们对小梁网细胞分子结构的理解,还突出了非小梁网细胞类型在维持前房角度眼压稳态中的潜在作用。Patel 等<sup>[49]</sup>采用 scRNA-seq 技术从 8 只人类捐献眼球中提取了 8 758 个细胞,分析出 17 757 个基因的表达谱。通过聚类分析,鉴定出 12 种不同的细胞类型,强调了参与房水流出功能调控和 IOP 控制的细胞的多样性。除了揭示了 Schlemm 管独特的淋巴管或血管表达特征外,还确定了传统流出通路中小梁网细胞具有 2 种不同类型。这些研究为鉴定培养中的小梁网和 Schlemm 管细胞、设计细胞特异性启动子和测试新型青光眼药物治疗靶点提供了重要数据。Teotia 等<sup>[50]</sup>对原发性开角型青光眼患者特异性 hRGCs 和对照 hRGCs 进行单细胞转录组分析,比较谱系特异性和阶段特异性转录特征的发育轨迹,以识别失调阶段基因。该研究揭示了 hRGCs 生成过程中正常发育轨迹的再现,偏离正常发育轨迹可能与 *SIX6* 风险等位基因相关的发育相关信号通路失调,进而引发表型不成熟,包括 RGCs 亚型减少有关。这提示对 RGCs 变性具有抗性的 RGCs 亚型的缺失可能使 RGCs 易受青光眼影响而发生变性。

### 3 总结与展望

scRNA-seq 技术的出现为研究者研究单个细胞的遗传、表观遗传、空间、蛋白质组学和谱系信息等提供了一个革命性的新方法。随着科学技术的不断发展,市场上涌现出许多测序平台,这些平台已被广泛应用于研究肿瘤异质性、胚胎组织、大脑神经元、免疫学领域及干细胞分化等。目前,scRNA-seq 技术在眼科研究中的应用日益广泛,如其在 DR、年龄相关性黄斑变性、视网膜母细胞瘤及脉络膜黑色素瘤等眼科疾病研究中的应用,是在基于单细胞水平上的科学研究,揭示了细胞间的异质性,并明确了某些细胞在疾病发生发展过程中所起的作用,为探索疾病的病因、进展及防治策略提供了强有力的科学依据。此外,scRNA-seq 在视觉神经系统研究中也展现出巨大潜力,可鉴别出大脑、视网膜及其他神经元中的特殊种类和特定基因等,对罕见细胞的发现和相关疾病的治疗策略开发十分有益<sup>[13]</sup>。通过该技术,研究人员能够深入探讨分步法诱导胚胎干细胞分化并构建组织工程角膜上皮的不同分化阶段的基因表达和表型变化,观察组织工程角膜上皮构建过程中的细胞分子印迹,为角膜上皮干细胞的发育和分化研究提供了新视角<sup>[51]</sup>。scRNA-seq 被用于鉴别眼部细胞类型特异性标志物,有助于发现新罕见细胞类型及细胞亚型,深入了解细胞间的异质性,如眼前节异质性研究,发掘新的眼前节发育或功能标记基因<sup>[52]</sup>。scRNA-seq 还应用于分析干细胞移植治疗视网膜退行性病变后的基因转录组变化,帮助发现新的生物靶点和标记物,极大地推动了干细胞移植疗法在眼科临床中的应用<sup>[53]</sup>。目前,该技术在眼科相关疾病中的研究应用仍较局限,存在覆

盖率低及技术难度高等问题,但仍展现出广阔的应用前景。随着技术的不断发展完善,相信在不久的将来,scRNA-seq 会被推广到更多眼科相关疾病的研究中,并为临床疾病的诊断和治疗提供指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Mereu E, Lafzi A, Moutinho C, et al. Benchmarking single-cell RNA-seq protocols for cell atlas projects [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 747-755. DOI: 10.1038/s41587-020-0469-4.
- [2] Dal Molin A, Di Camillo B. How to design a single-cell RNA-seq experiment: pitfalls, challenges and perspectives [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1384-1394. DOI: 10.1093/bib/bby007.
- [3] Choi JR, Yong KW, Choi JY, et al. Single-cell RNA sequencing and its combination with protein and DNA analyses [J/OL]. *Cells*, 2020, 9(5): 1130 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32375335>. DOI: 10.3390/cells9051130.
- [4] Wu Y, Zhang K. Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7): 408-421. DOI: 10.1038/s41581-020-0262-0.
- [5] Voigt AP, Mullin NK, Stone EM, et al. Single-cell RNA sequencing in vision research: insights into human retinal health and disease [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100934 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33383180>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100934.
- [6] Voigt AP, Mulfaul K, Mullin NK, et al. Single-cell transcriptomics of the human retinal pigment epithelium and choroid in health and macular degeneration [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(48): 24100-24107 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31712411>. DOI: 10.1073/pnas.1914143116.
- [7] Van Hove I, De Groef L, Boeckx B, et al. Single-cell transcriptome analysis of the Akimba mouse retina reveals cell-type-specific insights into the pathobiology of diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(10): 2235-2248. DOI: 10.1007/s00125-020-05218-0.
- [8] Wu H, Chen W, Zhao F, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(30): E7091-E7100 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29987045>. DOI: 10.1073/pnas.1721443115.
- [9] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621-628. DOI: 10.1038/nmeth.1226.
- [10] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380. DOI: 10.1038/nature03959.
- [11] Olsen TK, Baryawno N. Introduction to single-cell RNA sequencing [J/OL]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018, 122(1): e57 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29851283>. DOI: 10.1002/cpmb.57.
- [12] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049 [2023-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28091601>. DOI: 10.1038/ncomms14049.
- [13] Hoshino A, Ratnapriya R, Brooks MJ, et al. Molecular anatomy of the developing human retina [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(6): 763-779. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.10.029.
- [14] Liang Q, Dharmat R, Owen L, et al. Single-nuclei RNA-seq on human retinal tissue provides improved transcriptome profiling [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5743 [2023-11-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31848347>. DOI: 10.1038/s41467-019-12917-9.
- [15] Lehmann GL, Hanke-Gogokai C, Hu Y, et al. Single-cell profiling reveals an endothelium-mediated immunomodulatory pathway in the eye choroid [J/OL]. *J Exp Med*, 2020, 217(6): e20190730 [2023-11-14]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32196081>. DOI: 10.1084/jem.20190730.
- [16] Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes [J]. *Ophthalmic Res*, 2019, 62(4): 211-217. DOI: 10.1159/000499541.
- [17] Niu T, Fang J, Shi X, et al. Pathogenesis study based on high-throughput single-cell sequencing analysis reveals novel transcriptional landscape and heterogeneity of retinal cells in type 2 diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2021, 70(5): 1185-1197. DOI: 10.2337/db20-0839.
- [18] Mao P, Shen Y, Mao X, et al. The single-cell landscape of alternative transcription start sites of diabetic retina [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2023, 233: 109520 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37236522>. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109520.
- [19] Corano Scheri K, Lavine JA, Tedeschi T, et al. Single-cell transcriptomics analysis of proliferative diabetic retinopathy fibrovascular membranes reveals AEBP1 as fibrogenesis modulator [J/OL]. *JCI Insight*, 2023, 8(23): e172062 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37917183>. DOI: 10.1172/jci.insight.172062.
- [20] Blasiak J. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(5): 789-805. DOI: 10.1007/s00018-019-03420-x.
- [21] Guymer RH, Campbell TG. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2023, 401(10386): 1459-1472. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02609-5.
- [22] Orozco LD, Chen HH, Cox C, et al. Integration of eQTL and a single-cell atlas in the human eye identifies causal genes for age-related macular degeneration [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(4): 1246-1259. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.12.082.
- [23] Luthert PJ, Kiel C. Combining gene-disease associations with single-cell gene expression data provides anatomy-specific subnetworks in age-related macular degeneration [J]. *Netw Syst Med*, 2020, 3(1): 105-121. DOI: 10.1089/nsm.2020.0005.
- [24] Lei S, Hu M, Wei Z. Single-cell sequencing reveals an important role of SPP1 and microglial activation in age-related macular degeneration [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1322451 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38259505>. DOI: 10.3389/fncel.2023.1322451.
- [25] Dimaras H, Corson TW. Retinoblastoma, the visible CNS tumor: a review [J]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(1): 29-44. DOI: 10.1002/jnr.24213.
- [26] Liu H, Zhang Y, Zhang YY, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(52): 33628-33638 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33318192>. DOI: 10.1073/pnas.2011780117.
- [27] Collin J, Queen R, Zerti D, et al. Dissecting the transcriptional and chromatin accessibility heterogeneity of proliferating cone precursors in human retinoblastoma tumors by single cell sequencing-opening pathways to new therapeutic strategies? [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(6): 18 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34003213>. DOI: 10.1167/iovs.62.6.18.
- [28] Yang J, Li Y, Han Y, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals intratumoural heterogeneity and malignant progression in retinoblastoma [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1100 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34815392>. DOI: 10.1038/s41419-021-04390-4.
- [29] Liu Y, Hu W, Xie Y, et al. Single-cell transcriptomics enable the characterization of local extension in retinoblastoma [J/OL]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 11 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38172218>. DOI: 10.1038/s42003-023-05732-y.
- [30] Durante MA, Rodriguez DA, Kurtenbach S, et al. Single-cell analysis

- reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma[J/OL]. Nat Commun, 2020, 11(1): 496 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31980621>. DOI: 10.1038/s41467-019-14256-1.
- [31] Pandiani C, Strub T, Nottet N, et al. Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity in primary uveal melanomas and identifies HES6 as a driver of the metastatic disease[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(6): 1990-2000. DOI: 10.1038/s41418-020-00730-7.
- [32] Nell RJ, Menger NV, Versluis M, et al. Involvement of mutant and wild-type CYSLTR2 in the development and progression of uveal nevi and melanoma[J/OL]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 164 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33588787>. DOI: 10.1186/s12885-021-07865-x.
- [33] Li J, Cao D, Jiang L, et al. ITGB2-ICAM1 axis promotes liver metastasis in BAP1-mutated uveal melanoma with retained hypoxia and ECM signatures[J]. Cell Oncol (Dordr), 2024, 47(3): 951-965. DOI: 10.1007/s13402-023-00908-4.
- [34] Boote C, Sigal IA, Grytz R, et al. Scleral structure and biomechanics[J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2020, 74: 100773 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31412277>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100773.
- [35] Jiang B, Shi CS. Dynamic changes of periostin and collagen I in the sclera during progressive myopia in guinea pigs[J]. Arq Bras Oftalmol, 2020, 83(3): 190-195. DOI: 10.5935/0004-2749.20200034.
- [36] Zhao F, Zhang D, Zhou Q, et al. Scleral HIF-1 $\alpha$  is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis[J/OL]. EBioMedicine, 2020, 57: 102878 [2023-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32652319>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102878.
- [37] 余嘉珍, 莫亚. 近视小鼠巩膜成纤维细胞的基因表达谱: 基于单细胞 RNA 测序的生物信息学分析[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(7): 1087-1092. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.07.18. Yu JZ, Mo Y. Gene expression profiles of myopic mouse scleral fibroblasts: a bioinformatics analysis based on single-cell RNA sequencing[J]. J South Med Univ, 2021, 41(7): 1087-1092. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2021.07.18.
- [38] Li C, Fu Y, Liu S, et al. The global incidence and disability of eye injury: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2019[J/OL]. EClinicalMedicine, 2023, 62: 102134 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37599904>. DOI: 10.1016/j.eclinm.2023.102134.
- [39] Jovanovic N, Peek-Asa C, Young T, et al. Eye injury and demographic parameters associated with poor visual outcome[J]. J Fr Ophthalmol, 2019, 42(8): 864-873. DOI: 10.1016/j.jfo.2019.03.018.
- [40] Struebing FL, King R, Li Y, et al. Transcriptional changes in the mouse retina after ocular blast injury: a role for the immune system[J]. J Neurotrauma, 2018, 35(1): 118-129. DOI: 10.1089/neu.2017.5104.
- [41] Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, et al. Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes[J]. Neuron, 2019, 104(6): 1039-1055. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.11.006.
- [42] Tsirouki T, Dastiridou A, Symeonidis C, et al. A focus on the epidemiology of uveitis[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2018, 26(1): 2-16. DOI: 10.1080/09273948.2016.1196713.
- [43] Chang MH, Shantha JG, Fondriest JJ, et al. Uveitis in children and adolescents[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2021, 47(4): 619-641. DOI: 10.1016/j.rdc.2021.07.005.
- [44] Hsu YR, Huang JC, Tao Y, et al. Noninfectious uveitis in the Asia-Pacific region[J]. Eye (Lond), 2019, 33(1): 66-77. DOI: 10.1038/s41433-018-0223-z.
- [45] Zhu L, Li H, Wang R, et al. Identification of Hif1 $\alpha$  as a potential participant in autoimmune uveitis pathogenesis using single-cell transcriptome analysis[J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(5): 24 [2024-08-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37227746>. DOI: 10.1167/iovs.64.5.24.
- [46] Wei X, Cho KS, Thee EF, et al. Neuroinflammation and microglia in glaucoma: time for a paradigm shift[J]. J Neurosci Res, 2019, 97(1): 70-76. DOI: 10.1002/jnr.24256.
- [47] McMonnies CW. Glaucoma history and risk factors[J]. J Optom, 2017, 10(2): 71-78. DOI: 10.1016/j.optom.2016.02.003.
- [48] van Zyl T, Yan W, McAdams A, et al. Cell atlas of aqueous humor outflow pathways in eyes of humans and four model species provides insight into glaucoma pathogenesis[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(19): 10339-10349 [2023-12-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32341164>. DOI: 10.1073/pnas.2001250117.
- [49] Patel G, Fury W, Yang H, et al. Molecular taxonomy of human ocular outflow tissues defined by single-cell transcriptomics[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(23): 12856-12867 [2023-12-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32439707>. DOI: 10.1073/pnas.2001896117.
- [50] Teotia P, Niu M, Ahmad I. Mapping developmental trajectories and subtype diversity of normal and glaucomatous human retinal ganglion cells by single-cell transcriptome analysis[J]. Stem Cells, 2020, 38(10): 1279-1291. DOI: 10.1002/stem.3238.
- [51] Li DQ, Kim S, Li JM, et al. Single-cell transcriptomics identifies limbal stem cell population and cell types mapping its differentiation trajectory in limbal basal epithelium of human cornea[J]. Ocul Surf, 2021, 20: 20-32. DOI: 10.1016/j.jtos.2020.12.004.
- [52] Van Der Meulen KL, Vöcking O, Weaver ML, et al. Spatiotemporal characterization of anterior segment mesenchyme heterogeneity during zebrafish ocular anterior segment development[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 379 [2023-12-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32528955>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00379.
- [53] Jones MK, Lu B, Saghizadeh M, et al. Gene expression changes in the retina following subretinal injection of human neural progenitor cells into a rodent model for retinal degeneration[J]. Mol Vis, 2016, 22: 472-490.

(收稿日期:2024-01-13 修回日期:2024-08-11)

(本文编辑:张宇 骆世平)

## 广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

中华医学期刊全文数据库 《中华医学杂志》社有限责任公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

中华医学会杂志社英文系列期刊 《中华医学杂志》社有限责任公司……封三

迈达科技 天津迈达医学科技股份有限公司……封底