

· 综 述 ·

单细胞转录组测序在视网膜发育及疾病发生和发展中的作用

徐曼鸿 综述 李筱荣 审校

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室, 天津 300384
通信作者: 李筱荣, Email: xiaorli@163.com

【摘要】 单细胞转录组测序(scRNA-seq)是在单细胞水平上进行的无偏性、高通量以及高分辨率的转录组分析。与普通转录组测序相比,scRNA-seq不是简单研究组织细胞的平均基因表达,而是将RNA映射到单个细胞,可用于发现全新的细胞类型,揭示细胞异质性,鉴定罕见细胞等方面。近年来,越来越多的scRNA-seq相关研究聚焦眼科,该技术有望成为一种能够揭示复杂的视网膜发育生物学过程和疾病发生机制的全新工具,对眼科临床治疗具有指导性意义。本文对scRNA-seq的发展和技术流程作简要介绍,详细阐述其在识别各种视网膜细胞亚型、分析视网膜细胞发育轨迹、视网膜类器官的应用等方面的研究。系统性总结了scRNA-seq在糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性等视网膜疾病的发生机制和诊疗方法研究中的最新研究进展,主要包含在疾病发生和发展中的细胞特异性分子和调控通路的变化信息等,将有助于寻找治疗视网膜疾病的潜在新靶点。

【关键词】 单细胞转录组测序; 视网膜; 视网膜疾病; 基因标记; 细胞异质性

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82171085); 天津市视网膜功能与疾病重点实验室自主与开放课题(2023tjswmq002, 2021tjswmq003)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221028-00499

Advances in single-cell RNA sequencing in retinal development and disease initiation and progression

Xu Manhong, Li Xiaorong

Tianjin Medical University Eye Hospital, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Tianjin 300384, China
Corresponding author: Li Xiaorong, Email: xiaorli@163.com

[Abstract] Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is an unbiased, high-throughput, and high-resolution transcriptome analysis method at the single-cell level. Unlike ordinary transcriptome sequencing, which study the average gene expression of all cells in tissues, scRNA-seq maps RNA to individual cells, which can be used to discover new cell types, reveal cell heterogeneity, and identify rare cells. Recently, more and more researches on scRNA-seq have focused on ophthalmology. This technology is expected to reveal the complex developmental biological processes of the retina and the pathogenesis of diseases, providing guidance for the clinical treatment of ophthalmology. This article briefly introduces the development and technical process of scRNA-seq, describes the identification of various retinal cell subtypes, the retinal cell development, and the application of retinal organoids in detail. This article systematically summarizes the latest research progress on scRNA-seq in the pathogenesis, diagnosis and treatment of retinal diseases, such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration, which mainly focuses on changes in cell-specific molecules and regulatory pathways in the occurrence and development of diseases, which will be helpful to search for potential new treatment targets for retinal diseases.

[Key words] Single-cell RNA sequencing; Retina; Retinal diseases; Genetic markers; Cellular heterogeneity

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82171085); Open Project of Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases (2023tjswmq002, 2021tjswmq003)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221028-00499



普通转录组测序得到的是群体细胞中基因的平均表达水平,主要用来比较不同组织、不同发育时间点之间转录组的差异,掩盖了单个细胞间存在的差异^[1-2]。而单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)并行检测成千上万个样本,能实现对单个细胞的无偏性、高通量以及高分辨率的转录组分析^[3-4]。scRNA-seq 检测细胞之间转录组差异敏感度更高,可用于识别细胞特异性标志物,揭示不同细胞间或细胞亚型间的转录差异和预测其对相关生物信号通路的影响,是研究复杂生物系统内细胞异质性的有效方法^[5]。目前,scRNA-seq 技术已广泛应用于多个领域,在眼科主要涉及揭示胚胎视网膜和类器官的发育及形成过程,以及视网膜疾病过程中的细胞本身状态变化、细胞间的复杂作用机制等,拓宽了对视网膜结构和正常生理功能的理解,并为视网膜疾病的起因、进展和治疗方面的研究奠定了理论基础。本文就 scRNA-seq 在视网膜发育及疾病发生和发展中的作用研究进展进行综述。

1 scRNA-seq 技术

1.1 scRNA-seq 技术起源和发展

2009 年, Tang 等^[6]首次提出 scRNA-seq 技术,将转录谱分析方法从一个或几个转录本发展到无偏倚的、同时分析数千个转录本。随着更灵敏、性价比更高的单细胞分离方法的出现,高通量技术的创新,以及不断优化操作流程、分析工具的提出,scRNA-seq 技术已经取得了巨大进步,其灵敏度和效率都得到了提高。

基于转录组覆盖率的不同,将 scRNA-seq 分为两类:(1)全长转录物测序方法(Tang method、Quartz-Seq、Smart-seq、Smart-seq2、MATQ-seq 和 SUPeR-seq);(2)3'末端转录物测序方法(CEL-seq、CEL-seq2、CytoSeq、Drop-seq、InDrop、Seq-Well、SPLiT-seq、MARS-seq 和 SCRB-seq 等)或 5'末端转录物测序方法(STRT-seq)^[7]。其中,Smart-seq 和 Smart-seq2 广泛应用于单细胞全长 mRNA 分析,可以提供基因突变、选择性剪接和等位基因特异性表达的信息^[8]。基于微滴的技术,例如 Drop-seq、InDrop 和 Chromium,通常可以提供更高的细胞通量和更低的测序成本,更适合定量测量大规模、低测序深度的细胞转录组,而基于微孔技术的 SCRB-seq、Smart-Seq2 适合定量测量小规模转录组^[9]。SUPeR-seq 和 MATQ-seq 可以同时捕获 polyA 阳性和 polyA 阴性的转录物,用于测序长链非编码 RNA 和环状 RNA,为在单细胞水平上全面探索编码和非编码 RNA 的表达动态提供了机会^[10-11]。每种 scRNA-seq 技术都有不同的特征、性能和自身的优缺点,应平衡研究目标和测序成本以采用特异性 scRNA-seq 方法^[7]。此外,研究发现 scRNA-seq 的单细胞分离过程会破坏细胞的空间定位和相互作用信息,而空间转录组测序技术能提供完整的组织空间位置信息^[12]。由于二者的天然互补性,Slide-seq、10xVisium 以及 Stereo-seq 等 scRNA-seq 联合空间转录组测序也正以迅猛的发展势头被生命科学研究广泛运用^[13]。

1.2 scRNA-seq 的技术流程

scRNA-seq 技术的代表性工作流程包括单细胞分离、提取

和纯化 RNA、制备测序文库、高通量测序以及数据分析^[14]。

进行 scRNA-seq 首先需要将组织消化解离成单细胞悬液,再进行清洗、过滤、计数和细胞活力评估。荧光激活细胞分选可根据细胞的大小、形状或细胞表面标志物的表达进行有偏向的选择,而基于微液滴技术的 10×Genomics Chromium 以及较晚推出的基于微孔技术的 BD Rhapsody 平台可实现细胞的无偏向分离^[7]。单细胞全转录组扩增是进行后续单细胞测序的前提,从 PCR 扩增、IVT 扩增到高保真 DNA 聚合酶扩增,扩增技术逐渐成熟,已可以实现稳定的单细胞建库流程^[15]。scRNA-seq 最主要的难点是如何在短时间内分离得到尽可能多的单个细胞,市场上现有高通量单细胞检测平台是基于微液滴技术的 10×Genomics Chromium 和基于微孔技术的 BD Rhapsody 平台^[16]。这 2 种技术将成千上万个细胞划分到纳米级别的水隔间中,在此生成的 cDNA 共享一个细胞条形码,并将其建库、排序,使用单元格条形码关联各个分区,最终可以做到单细胞及其每个转录本都获得特异性细胞/分子标签,以此实现高通量测序^[17]。前者的细胞通量高达 80 000 个细胞,细胞捕获率最高可达 65%,还拥有周期快速、成本低的优势;后者的细胞捕获效率最高可达 80%,具有多样本兼容性的特点和成像系统,能实现转录组-蛋白组联合分析。但两者对细胞总量及活性要求较高,仅适用于大量的新鲜组织样本,而以低温冻存状态进行保存的珍贵样本不适用于 scRNA-seq^[18]。

scRNA-seq 的数据分析流程为单细胞转录组数据预处理、数据归一化、数据降维与可视化、转录组亚群特征基因筛选、以及单细胞转录组数据挖掘。研究者也能根据不同的研究目标对 scRNA-seq 的数据做细胞聚类、细胞分类、细胞交流预测和轨迹重建等功能探究分析^[19]。

2 scRNA-seq 在视网膜细胞中的应用

越来越多的研究表明,scRNA-seq 是一类能够揭示视网膜发育生物学过程的全新、有力的工具,近年来已被用于识别各种视网膜细胞亚型、分析视网膜细胞发育轨迹等研究^[20]。

2.1 scRNA-seq 在鉴定视网膜细胞类型中的应用

视网膜主要由视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞、视网膜感光(retinal photoreceptor, RP)细胞、双极细胞(bipolar cell, BC)、视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)、水平细胞(horizontal cell, HC)、无长突细胞、Müller 胶质细胞(müller glial cell, MGC)等多种细胞组成^[21]。面对这种有着复杂的生理学和细胞多样性的视网膜组织,Drop-seq 具有更高的测序成本和通量优势^[22]。Macosko 等^[23]利用 Drop-Seq 技术在 12 h 内对 10 000 个单细胞文库进行快速测序和分析,将 44 808 个单细胞聚类到 39 个视网膜细胞群中,以更节省、高效的形式验证了传统研究中视网膜的主要细胞类型和相对丰度,并创建系统性的基因表达分子图谱,为视网膜生理学的研究提供了里程碑意义。此外, Yamagata 等^[24]使用 scRNA-seq 鉴定了雏鸡视网膜的 136 种细胞类型和 14 种视网膜发育中间体,填补了卵生动物视网膜细胞图谱。

针对于复杂的视网膜组织,普通转录组测序不能准确反映



细胞之间的特异性。而 scRNA-seq 能够在细胞分离和测序之前先确认细胞形态、功能和亚型标志物,从而精确反映单个视网膜细胞的基因表达情况^[25]。Shekhar 等^[26]通过对小鼠的 25 000 个 BC 的 scRNA-seq 数据进行无监督分析,将此前被认为是单一族群的 BC1、BC5 细胞划分为 BC1A、BC1B 和 BC5A-D,并前所未有地发现了稀有细胞 BC8、BC9 的内源性标志物神经丝氨酸蛋白酶 1 和分子伴侣蛋白 9。该研究还提出 BC1B 细胞在早期发育中的形态呈黄体样,而在成年期保持分子双极样,在以往的研究中容易被错误地归类为黄体素细胞而难以被发现^[26-28]。因此,随着 scRNA-seq 技术的应用和成熟,基于形态学的视网膜神经元类型也将有可能获得新的分类和定义。随后又有研究在成年小鼠视网膜的 scRNA-seq 数据中发现了 T-RGC 和 F-RGC 的新亚型,并根据 RGC 在视神经夹伤模型中的存活能力存在的相对强弱将 RGC 划分为耐受性 RGC 和易感性 RGC。使用基于 scRNA-seq 筛选出的耐受性尿皮质激素 (nurocortin, *Ucn*) 基因,腺相关病毒过表达 *Ucn* 以及注射 *Ucn* 重组蛋白可提高夹伤后 RGC 的存活率^[29]。

2.2 scRNA-seq 在视网膜发育研究中的应用

哺乳动物视网膜的发育是视网膜祖细胞 (retinal progenitor cell, RPC) 以时空特异性方式分化为不同类型神经元的过 程^[30]。传统的视网膜发育表达谱研究在解剖材料的规模上受到限制,而 scRNA-seq 技术可以对中枢神经系统的细胞类型以及控制其发育的基因调控网络进行全面分类,已被应用于动物模型、原发性人类视网膜和视网膜类器官研究中^[31]。

Clark 等^[32]对从神经发生开始 (胚胎期第 11 天) 到神经发育完成 (出生后第 14 天) 中 10 个发育时间点的 120 804 个视网膜细胞进行 scRNA-seq 分析,全面描述了视网膜神经发生过程中的基因表达变化,不仅揭示了小鼠视网膜发育的完整转录轨迹,还发现核因子 I (nucleus factor I, NFI) 转录因子促进了晚期 RPC 细胞周期的正常退出, *Nfia*、*Nfib* 或 *Nfix* 的功能丧失分别导致 MGC 分化缺陷和视网膜形态紊乱。眼部组织不能直接从活体患者身上获得,而死后人体组织常常无法对应其人口统计学和疾病特征,这是眼内单细胞基因表达研究的阻碍^[33]。而胚胎干细胞和诱导多能干细胞可以通过产生患者特异性视网膜细胞,即衍生出人类视网膜类器官以高度模拟原代组织^[34]。视网膜类器官作为一个更容易获得的组织来源,为研究人类视网膜的发育过程提供了一个窗口^[35]。Collin 等^[36]通过对人类视网膜类器官的 scRNA-seq 数据进行聚类分析和伪时间分析,确定了视网膜细胞类型的出现顺序,揭示在第 60 天时已存在大量 MGC、RGC 和视锥细胞,第 90 天开始出现视杆细胞和更多的 MGC,第 200 天时大量的 MGC 和少量的视杆细胞已发育成熟。Lu 等^[37]对视网膜发育的 16 个时间点以及人视网膜类器官分化的 4 个早期阶段进行了大规模 scRNA-seq 分析,确定了发育中视网膜黄斑、外周以及不同 HC 群体之间的基因表达差异,发现人类和小鼠在视网膜发育过程中在控制视锥细胞和 HC 的转录因子表达以及形成黄斑模式的基因调控网络的差异性。不仅为未来对人类视网膜发育的研究提供了路线图,还指出了现有动物模型在人类疾病研究方面的局限性。Mao 等^[38]

利用 scRNA-seq 报道了从视网膜神经发生前后 6 个时间点获取的三维视网膜类器官中分离的 457 个单细胞的转录组学研究,发现细胞周期蛋白 D1 通过激活神经母细胞特异性转移因子 1 的表达增加视网膜发育过程中神经元的比例,而 RP 细胞的比例保持不变。

3 scRNA-seq 在视网膜疾病诊疗中的应用

近年来,scRNA-seq 技术已经广泛应用于视网膜疾病研究,空前详细地提供了糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR)、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、自身免疫性葡萄膜炎 (autoimmune uveitis, AU)、视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 发生和发展中的细胞特异性分子和调控通路的变化信息,有助于寻找治疗视网膜疾病的潜在靶点。

3.1 scRNA-seq 在 DR 中的应用

DR 是指由长期高糖环境引起的视网膜局部微血管病理改变^[39],其早期起病隐匿,实现 DR 的早期诊断和治疗尤为重要^[40-41]。Sun 等^[20]在对照组和链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠视网膜构建的大规模转录组图谱中发现糖尿病小鼠视网膜细胞中 DR 特异性内皮细胞的代谢、剪切应力和血管通透性通路的相关基因下调,白细胞介素 (interleukin, IL) 17 信号通路的炎症因子基因表达通路上调,这些结果为探究 DR 的潜在治疗靶点提供了新线索。一项应用 scRNA-seq 技术分析 Akimba 小鼠视网膜细胞的研究指出,在 Akimba 小鼠视网膜大胶质细胞中,细胞骨架、细胞周期、肽酶调节等反应性胶质增生标志物上调,此发现支持大胶质细胞在视网膜神经退行性疾病中起关键作用的新观点^[42]。另一项 scRNA-seq 研究报道了自发性 II 型糖尿病猴视网膜的 scRNA-seq 图谱,发现肿瘤坏死因子 α 通过自分泌的方式介导小胶质细胞激活,而视锥细胞分泌的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 2 抑制 MGC 的激活^[43],首次证实了在 DR 早期 MGC 的活化会被细胞间相互作用所限制^[44]。Niu 等^[45]通过对瘦素受体缺陷的 II 型糖尿病小鼠视网膜进行 scRNA-seq 分析,指出视黄醛结合蛋白 1 将有希望成为 DR 的治疗新靶点。他们发现视黄醛结合蛋白 1 在 DR 视网膜中表达降低,且其在 MGC 中的过表达减轻了 DR 相关的神经血管变性。

在增生性 DR 中,尖端细胞分化和发芽使视网膜组织血管重建,尖端细胞若无法形成适当的血管将发展为渗漏和易出血的病理性改变^[46-47]。Zarkada 等^[48]通过分析氧诱导性视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型的 scRNA-seq 数据,观察到在诱导后第 17 天时视网膜中存在异常的 S 样尖端细胞,并证实酪氨酸激酶 5 基因缺失抑制了 OIR 期间视网膜的血管重建,而非典型 TGF- β 信号可以改善视网膜血管重建和神经缺血性视网膜病变。Smith 等^[49]对第 14 天的 OIR-内皮型一氧化氮合成酶 (endothelin nitric oxide synthase, eNOS)^{+/+} 和 eNOS^{-/-} 小鼠视网膜血管内皮细胞进行 scRNA-seq 分析,发现抑制 eNOS 会促进尖端细胞极化,这有利于血管生成以及 DR 病理性新生血管的正常化。而在以往传统的研究中很难确定

eNOS 是否可以参与内皮细胞发芽期间内皮尖端细胞的极化过程。此外,以 scRNA-seq 技术为核心的研究已探索出有助于 DR 治疗的药物,例如,舒地尔可以改善由增生性 DR 中间变性淋巴瘤激酶 5 表达降低所引起的深层血管的形成,并减少新生血管丛的数量^[47,50]。

3.2 scRNA-seq 在 AMD 中的应用

AMD 是老年人盲的主要原因,先前关于 AMD 的遗传学研究认为主要的危险因素包括基因遗传、紫外线暴露、饮食习惯和心血管疾病等^[51]。随着 scRNA-seq 技术的研究进展,研究者更多地将 AMD 发病机制与基因联系起来。Menon 等^[52]使用微流控和 Seq-Well scRNA-seq 平台,对 6 例 AMD 患者死后的视网膜细胞悬液进行测序,发现与 AMD 相关的多个基因表达增加,其中包括 IV 形胶原蛋白 $\alpha 3$ 链 (collagen alpha-3IV chain, COL4A3)。COL4A3 是一种与 Alport 综合征相关的基因,研究发现大多数 Alport 综合征患者出现眼部黄斑疾病,支持了 COL4A3 是 AMD 易感基因的观点^[53]。此外,利用 scRNA-seq 联合全基因组关联分析进一步探究视网膜细胞的基因特征,还发现与 AMD 遗传风险明显相关的细胞是视锥细胞、大胶质细胞、MGC 和血管内皮细胞,这与传统的 AMD 主要由 RP 细胞和 RPE 细胞的病理改变引起的观点不一致^[52,54]。Voigt 等^[33]利用 scRNA-seq 技术发现,与外周视网膜相比,中央凹转铁蛋白表达量少,这提示中央凹转铁蛋白的相对缺乏可能会通过增加中央凹区域氧化损伤的易感性而促使 AMD 的发生。该研究还证明细胞周期调控基因在 AMD 的脉络膜中特异性上调,细胞周期调控基因能够响应补体激活并诱导内皮细胞凋亡,为 AMD 中视网膜毛细血管损伤机制研究提供了新的思路。

3.3 scRNA-seq 在 AU 中的应用

AU 是一种威胁视力的眼内炎症性疾病,通常具有复发性和病程缓慢的特点^[55]。scRNA-seq 通过分析组织和血液中的复杂细胞成分,提供了解 AU 复杂免疫调节网络的工具。IL-38 通过各种免疫细胞参与炎症和自身免疫,但 IL-38 对 AU 中的各种免疫细胞的调节作用仍缺乏综合全面的分析^[56]。Li 等^[57]使用 scRNA-seq 分析来自正常、实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 和 IL-38 处理的小鼠颈部引流淋巴结 (cervical draining lymph node, CDLN) 的免疫细胞谱,阐明 IL-38 对 EAU 的影响及其潜在机制,即 IL-38 下调 IL-17 信号通路以降低辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 17 致病性相关基因 (集落刺激因子 2、IL-23 受体) 的表达。IL-38 的给药可以通过降低视网膜和 CDLN 中 Th17 的比例来减轻 EAU 症状,进而提出 Th17 是 IL-38 在 EAU 中作用的中心介质的新观点。自身免疫调节剂 Aire 基因敲除小鼠是一种自发性和慢性进行性 AU 的动物模型^[58]。Heng 等^[59]对该模型的 64 196 个视网膜细胞进行 scRNA-seq 分析,表示 AU 是一种 T 细胞驱动的疾病,揭示浸润在 AU 中的多种免疫细胞 Th1、CD8a⁺T 细胞、T 滤泡辅助细胞和调节性 T 细胞中的高表达基因,支持 Th1 在 AU 中发挥着核心作用的观点,对临床治疗具有重要意义。

3.4 scRNA-seq 在 Rb 中的应用

scRNA-seq 技术能以其高细胞分辨率的优势辨别肿瘤因子

和细胞特征,是研究肿瘤细胞异质性的有效方法,可以指示肿瘤细胞的来源,为靶向治疗提供依据。

Rb 是由视网膜细胞的 Rb 肿瘤抑制蛋白基因的双等位失活或 MYCN 癌基因扩增所引起的儿童视网膜癌症^[60]。scRNA-seq 能够追溯 Rb 的肿瘤细胞起源,有助于阐述肿瘤发生的机制^[61]。Collin 等^[62]报道了由 RBL 双等位基因突变引起的 2 例 Rb 患者的 scRNA-seq 和 scATAC-seq 分析,将 G2/M 锥体前体细胞鉴定为 Rb 的起源细胞,并揭示 p53 介导的细胞凋亡可能是导致 Rb 锥体特异性亚团受损的最终事件,从而导致 Rb 的发生。虽然该研究样本量小,但为引入 Rb 单细胞分析奠定了基础,为有效的肿瘤靶向治疗开辟了新的途径。

4 小结与展望

scRNA-seq 以单细胞分辨率分析基因表达水平,具有高通量和高分辨率的特点,该技术已在多个学科的探索过程中取得了巨大进步。在眼科领域中,scRNA-seq 不仅为研究人员提供极有价值的基因表达数据库,还提供了视网膜发育的关键调控因子和视网膜疾病相关细胞亚型、特异性标记基因和信号通路研究等病理生理机制的重要见解,对于临床治疗有指导性意义。然而,scRNA-seq 成本高、覆盖率低、长链非编码 RNA 难以检测等不足仍是 scRNA-seq 成为常规诊断工具的限制因素。目前大多数基于 scRNA-seq 的临床研究仍处于探索阶段,主要集中在更好地理解疾病过程以及确定疾病诊断和治疗的标志物。但随着测序平台的成熟、更优算法的产生,以及 scRNA-seq 联合空间转录组等多领域技术的进步和融合,scRNA-seq 技术正以迅猛的发展势头被生命科学研究广泛运用,未来也极有可能成为临床医生强有力的工具,使以 scRNA-seq 为基础的个性化治疗成为现实。

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-sequencing protocols for cell atlas projects [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 747-755. DOI: 10. 1038/s41587-020-0469-4.
- [2] Shalek AK, Satija R, Shuga J, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation [J]. Nature, 2014, 510(7505): 363-369. DOI: 10. 1038/nature13437.
- [3] Yip SH, Sham PC, Wang J. Evaluation of tools for highly variable gene discovery from single-cell RNA-seq data [J]. Brief Bioinform, 2019, 20(4): 1583-1589. DOI: 10. 1093/bib/bby011.
- [4] Ye Y, Song H, Zhang J, et al. Understanding the biology and pathogenesis of the kidney by single-cell transcriptomic analysis [J]. Kidney Dis (Basel), 2018, 4(4): 214-225. DOI: 10. 1159/000492470.
- [5] Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(1): 35-45. DOI: 10. 1038/nri. 2017. 76.
- [6] 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.
- [7] Chen G, Ning B, Shi T. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis [J/OL]. Front Genet, 2019, 10: 317 [2024-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31024627/>. DOI: 10. 3389/fgene. 2019. 00317.



- [8] Chen H, Ye F, Guo G. Revolutionizing immunology with single-cell RNA sequencing[J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(3): 242–249. DOI: 10.1038/s41423-019-0214-4.
- [9] 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.
- [10] Fan X, Zhang X, Wu X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos [J/OL]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 148 [2024-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26201400/>. DOI: 10.1186/s13059-015-0706-1.
- [11] Sheng K, Cao W, Niu Y, et al. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(3): 267–270. DOI: 10.1038/nmeth.4145.
- [12] Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution[J]. *Cell*, 2021, 184(3): 810–826. DOI: 10.1016/j.cell.2020.12.016.
- [13] Longo SK, Guo MG, Ji AL, et al. Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics[J]. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(10): 627–644. DOI: 10.1038/s41576-021-00370-8.
- [14] Pasquini G, Rojo Arias JE, Schäfer P, et al. Automated methods for cell type annotation on scRNA-seq data[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 961–969. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.015.
- [15] Shi H, Zhou Y, Jia E, et al. Bias in RNA-seq library preparation: current challenges and solutions[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6647597 [2024-10-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33987443/>. DOI: 10.1155/2021/6647597.
- [16] 蒋敏, 李慧莉, 庞盼盼, 等. 高通量单细胞转录组测序发展与展望[J]. *生命科学*, 2020, 32(12): 1280–1287. DOI: 10.13376/j.cbls/2020152.
Jiang M, Li HL, Pang PP, et al. Development and prospect of high-throughput single-cell transcriptome sequencing[J]. *Chin Bulletin Life Sci*, 2020, 32(12): 1280–1287. DOI: 10.13376/j.cbls/2020152.
- [17] Gao C, Zhang M, Chen L. The comparison of two single-cell sequencing platforms; BD rhapsody and 10x genomics chromium [J]. *Curr Genomics*, 2020, 21(8): 602–609. DOI: 10.2174/1389202921999200625220812.
- [18] Jovic D, Liang X, Zeng H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications; a brief overview [J/OL]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e694 [2024-10-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35352511/>. DOI: 10.1002/ctm2.694.
- [19] Wagner A, Regev A, Yosef N. Revealing the vectors of cellular identity with single-cell genomics [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(11): 1145–1160. DOI: 10.1038/nbt.3711.
- [20] Sun L, Wang R, Hu G, et al. Single cell RNA sequencing (scRNA-Seq) deciphering pathological alterations in streptozotocin-induced diabetic retinas[J/OL]. *Exp Eye Res*, 2021, 210: 108718 [2024-10-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34364890/>. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108718.
- [21] Hartl D, Krebs AR, Jüttner J, et al. Cis-regulatory landscapes of four cell types of the retina [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(20): 11607–11621 [2024-10-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29059322/>. DOI: 10.1093/nar/gkx923.
- [22] Biočanin M, Bues J, Dainese R, et al. Simplified Drop-seq workflow with minimized bead loss using a bead capture and processing microfluidic chip[J]. *Lab Chip*, 2019, 19(9): 1610–1620. DOI: 10.1039/c9lc00014c.
- [23] 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.
- [24] Yamagata M, Yan W, Sanes JR. A cell atlas of the chick retina based on single-cell transcriptomics[J/OL]. *Elife*, 2021, 10: e63907 [2024-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33393903/>. DOI: 10.7554/eLife.63907.
- [25] 纪艳丽, 彭广华. 单细胞转录组测序在眼科研究中的应用[J]. *眼科新进展*, 2018, 38(1): 84–88. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0019.
- Ji YL, Peng GH. Application of single-cell RNA-sequencing in ophthalmology[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(1): 84–88. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0019.
- [26] 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.
- [27] Euler T, Haverkamp S, Schubert T, et al. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(8): 507–519. DOI: 10.1038/nrn3783.
- [28] Wässle H, Puller C, Müller F, et al. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(1): 106–117. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4442-08.2009.
- [29] 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.
- [30] Agathocleous M, Harris WA. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25: 45–69. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113259.
- [31] Fan X, Dong J, Zhong S, et al. Spatial transcriptomic survey of human embryonic cerebral cortex by single-cell RNA-seq analysis [J]. *Cell Res*, 2018, 28(7): 730–745. DOI: 10.1038/s41422-018-0053-3.
- [32] Clark BS, Stein-O'Brien GL, Shiao F, et al. Single-cell RNA-seq analysis of retinal development identifies NFI factors as regulating mitotic exit and late-born cell specification[J]. *Neuron*, 2019, 102(6): 1111–1126. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.04.010.
- [33] 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 [2024-10-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33383180/>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100934.
- [34] Tucker BA, Scheetz TE, Mullins RF, et al. Exome sequencing and analysis of induced pluripotent stem cells identify the cilia-related gene male germ cell-associated kinase (MAK) as a cause of retinitis pigmentosa [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(34): E569–576 [2024-10-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21825139/>. DOI: 10.1073/pnas.1108918108.
- [35] Giacalone JC, Miller MJ, Workalemahu G, et al. Generation of an immortalized human choroid endothelial cell line (iChEC-1) using an endothelial cell specific promoter [J]. *Microvasc Res*, 2019, 123: 50–57. DOI: 10.1016/j.mvr.2018.12.002.
- [36] Collin J, Queen R, Zerti D, et al. Deconstructing retinal organoids: single cell RNA-seq reveals the cellular components of human pluripotent stem cell-derived retina [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(5): 593–598. DOI: 10.1002/stem.2963.
- [37] Lu Y, Shiao F, Yi W, et al. Single-cell analysis of human retina identifies evolutionarily conserved and species-specific mechanisms controlling development [J]. *Dev Cell*, 2020, 53(4): 473–491. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.04.009.
- [38] Mao X, An Q, Xi H, et al. Single-cell RNA sequencing of hESC-derived 3D retinal organoids reveals novel genes regulating RPC commitment in early human retinogenesis [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 13(4): 747–760. DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.08.012.
- [39] Amoaku WM, Ghanchi F, Bailey C, et al. Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management; UK Consensus Working Group[J]. *Eye (Lond)*, 2020, 34(Suppl 1): 1–51. DOI: 10.1038/s41433-020-0961-6.
- [40] Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group[J]. *Ophthalmology*, 1991, 98(5 Suppl): 823–833.
- [41] Song P, Yu J, Chan KY, et al. Prevalence, risk factors and burden of diabetic retinopathy in China: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *J Glob Health*, 2018, 8(1): 010803 [2024-10-13].

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29899983/>. DOI: 10. 7189/jogh. 08. 010803.
- [42] 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.
- [43] Xiao Y, Hu X, Fan S, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals the suppressive role of retinal neurons in microglia activation under diabetes mellitus [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 680947 [2024–10–13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34434927/>. DOI: 10. 3389/fcell. 2021. 680947.
- [44] Kinuthia UM, Wolf A, Langmann T. Microglia and inflammatory responses in diabetic retinopathy [J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 564077 [2024–10–13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33240260/>. DOI: 10. 3389/fimmu. 2020. 564077.
- [45] 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.
- [46] Sapienza P, Joyal JS, Rivera JC, et al. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3022–3032. DOI: 10. 1172/JCI42142.
- [47] Zarkada G, Howard JP, Xiao X, et al. Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(15): 2237–2251. DOI: 10. 1016/j. devcel. 2021. 06. 021.
- [48] Zarkada G, Howard JP, Xiao X, et al. Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(15): 2237–2251. DOI: 10. 1016/j. devcel. 2021. 06. 021.
- [49] Smith TL, Oubaha M, Cagnone G, et al. eNOS controls angiogenic sprouting and retinal neovascularization through the regulation of endothelial cell polarity [J/OL]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1): 37 [2024–10–13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34971428/>. DOI: 10. 1007/s00018-021-04042-y.
- [50] Mäe MA, He L, Nordling S, et al. Single-cell analysis of blood-brain barrier response to pericyte loss [J/OL]. *Circ Res*, 2021, 128(4): e46–e62 [2024–10–14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375813/>. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 120. 317473.
- [51] Heesterbeek TJ, Lorés-Motta L, Hoyng CB, et al. Risk factors for progression of age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2020, 40(2): 140–170. DOI: 10. 1111/opo. 12675.
- [52] 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/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4902 [2024–10–14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31653841/>. DOI: 10. 1038/s41467-019-12780-8.
- [53] Savage J, Liu J, DeBuc DC, et al. Retinal basement membrane abnormalities and the retinopathy of Alport syndrome [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(3): 1621–1627. DOI: 10. 1167/iov. 08-3323.
- [54] van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, et al. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities [J]. *J Pathol*, 2014, 232(2): 151–164. DOI: 10. 1002/path. 4266.
- [55] Forrester JV, Kuffova L, Dick AD. Autoimmunity, autoinflammation, and infection in uveitis [J]. *Am J Ophthalmol*, 2018, 189: 77–85. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2018. 02. 019.
- [56] Xie L, Huang Z, Li H, et al. IL-38: a new player in inflammatory autoimmune disorders [J/OL]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 345 [2024–10–14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387327/>. DOI: 10. 3390/biom9080345.
- [57] Li H, Zhu L, Wang R, et al. Therapeutic effect of IL-38 on experimental autoimmune uveitis: reprogrammed immune cell landscape and reduced Th17 cell pathogenicity [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(15): 31 [2024–10–14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34967854/>. DOI: 10. 1167/iov. 62. 15. 31.
- [58] Fujikado N, Mann AO, Bansal K, et al. Aire inhibits the generation of a perinatal population of interleukin-17A-producing $\gamma\delta$ T cells to promote immunologic tolerance [J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 999–1012. DOI: 10. 1016/j. immuni. 2016. 10. 023.
- [59] Heng JS, Hackett SF, Stein-O'Brien GL, et al. Comprehensive analysis of a mouse model of spontaneous uveoretinitis using single-cell RNA sequencing [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(52): 26734–26744 [2024–10–15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31843893/>. DOI: 10. 1073/pnas. 1915571116.
- [60] 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.
- [61] 刘一帆, 沈吟. 单细胞转录组测序在视觉系统研究中的应用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(8): 704–709. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200509-00325.
- Liu YF, Shen Y. Application of single-cell RNA sequencing in visual system [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(8): 704–709. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200509-00325.
- [62] 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 [2024–10–15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34003213/>. DOI: 10. 1167/iov. 62. 6. 18.

(收稿日期: 2024–10–20 修回日期: 2025–05–19)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本刊对稿件的学术要求

文稿须有较高的学术价值, 具有创新性、科学性、导向性和实用性。文稿要求资料翔实、实事求是、立论新颖、方法学正确、论据充分、图表恰当、结果客观、结论可靠、论述严谨、符合逻辑、层次清晰、数据准确、语句通顺。

本期英文缩略语名词解释

LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser-assisted laser in situ keratomileusis)

OCT: 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography)

(本刊编辑部)



中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究