

高通量单细胞及空间转录组技术在肝脏疾病中的应用*

李洁 陈晨 邹菊 陈若蝉*

中南大学湘雅医院病毒性肝炎湖南省重点实验室, 湖南长沙 410008

摘要 肝脏是人体重要的免疫器官,在检测、捕获、清除病原体 and 外来抗原中发挥着重大作用。本文主要简述高通量单细胞及空间组学技术解析肝脏在感染性疾病中的应用。随着高通量单细胞技术的发展,现在可以在单细胞水平上破译复杂器官和疑难疾病的异质性、分化、细胞间通信等,从而认识到过去未知的致病途径和疾病机制,有利于开发新的治疗靶点。并且随着技术不断成熟,单细胞转录组可以和空间转录组学、表观遗传组、蛋白组、代谢组、微生物组以及临床数据进行整合分析,有益于将患者分层并进行精准治疗。

关键词 肝脏; 感染; 单细胞转录组技术; 空间转录组

中图分类号 R392 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20230301

Role of liver in infectious diseases through high-throughput single-cell technology and spatial transcriptomics

Li Jie, CHEN Chen, ZOU Ju, CHEN Ruo-chan*. Hunan Key Laboratory of Viral Hepatitis, Xiangya Hospital of Zhongnan University, Hunan Changsha 410008, China

Corresponding author: CHEN Ruo-chan, E-mail: 84172332@qq.com

Abstract The mammalian liver is a front-line immune organ that plays a vital role in the detection, capture and clearance of pathogens and foreign antigens entering the human body. With advancement of burgeoning high-throughput single-cell technology, we can now decipher the heterogeneity, differentiation, and intercellular crosstalk at single cell level, in sophisticated organs and diseases. In this concise review, we summarize how emerging high-throughput single-cell technologies have advanced or re-defined our understanding of the liver function toward infection, and unravel unknown pathogenic pathways and disease mechanisms for the development of new therapeutics. Moreover, as these technologies mature, their integration into spatial transcriptomics, epigeneticomics, proteomics, metabolomics, microbiome and clinical data analysis will aid in patient stratification and in developing treatment plans for patients suffering from infectious disease.

Key words Liver; Infection; Single-cell RNA sequencing; Spatial transcriptomics

哺乳类动物肝脏是由多种细胞组成的复杂器官,其生理功能包括:消化、合成、代谢、解毒等。同时肝脏也是重要的免疫器官,在抗感染、维持自身免疫稳定、抗肿瘤中都发挥了重要作用。肝脏具有独特的免疫学优势,肝实质细胞和非实质细胞都可以发挥免疫功能参与免疫调节来维持内环境稳态。在生理情况下,肝脏因为其独特解剖学位置,比其他器官或组织更容易暴露于微生物及其内毒素^[1]。因此,肝脏通常维持免疫耐受状态,防止发生不必要的免疫激活和过度自身免疫反应^[2,3]。然而肝脏的免疫耐受也使得病毒、寄生虫和其他微生物持续存在并对机体造成长期的损伤^[4,5]。肝脏保持免疫平衡

状态对于人体健康和生存十分重要。急慢性感染期间,肝脏从免疫耐受状态转变成免疫激活状态,组成一道抵御侵袭性病原体的重要防线^[6~9]。肝脏的防御机制主要依赖于免疫细胞及非免疫细胞组成的复杂网络,包括:库普弗细胞(KCs)、树突细胞(DC)、中性粒细胞、自然杀伤细胞(NK)以及B和T淋巴细胞^[10]。此外非免疫细胞如:肝细胞、软骨细胞、肝星状细胞(HSC)、窦状内皮细胞(LSEC),通过募集促炎免疫细胞同时产生炎症细胞因子,如:急性期蛋白、补体因子、细胞粘附分子而发挥免疫作用^[11~13]。由于肝脏在微生物防御中扮演的重要角色,构建健康/疾病状态下的全面的肝脏单细胞空间图谱对于

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81703149);湖南省杰青(No:2023JJ10095);湖南省创新人才工程(No:2022RC1212)

* 通信作者:陈若蝉,E-mail:84172332@qq.com,湖南省长沙市湘雅路87号

揭示新的致病机制以及开发有效的治疗靶标至关重要。

传统技术下,一般使用肝组织块(含有混合细胞群体)测序来研究健康/疾病状态下肝脏基因表达图谱,因而很难诠释单个细胞和细胞-细胞通讯在生理和病理过程中的具体作用^[14]。随着高通量单细胞技术的发展,现在能从单个细胞水平上来破译复杂器官和疑难疾病的异质性、分化、细胞间通信。单细胞测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)可以大规模批量检测单个细胞完整的转录组。scRNA-seq 流程包括组织解离、单细胞捕获、细胞裂解和由细胞标记码标记的 mRNA 捕获,逆转录和扩增、cDNA 文库的构建,二代测序,生物信息学分析等^[15,16],通过单次实验就能收集到数千甚至上万个细胞的完整转录组数据。越来越多研究证明 scRNA-seq 能更好地从单细胞水平、细胞分化轨迹以及不同细胞亚群通讯互作来多角度、多层次解析细胞基因变化和病理机制,并为疾病病理学提供新的细胞和生物学见解^[15,16]。

scRNA-seq 在肝脏研究中的优缺点

传统 RNA 测序已广泛用于鉴别健康和疾病情况下组织转录组水平的差异,它可以提供每一样本分子信号的平均值,这个值代表了同一样本内不同细胞混合的 RNA 内容物含量,因此会受到细胞类型及细胞丰度的显著影响^[17,18]。并且,传统 RNA 测序不能用于研究细胞异质性(细胞亚群),发现稀有细胞亚群以及细胞互作通讯(如免疫细胞和非免疫细胞之间、免疫细胞亚群之间以及不同实质细胞之间)^[19]。scRNA-seq 是指在单个细胞水平上对转录组或基因组进行扩增并测序,由于其高精确性和高特异性,它已经成为单细胞研究的理想研究工具^[20]。scRNA-seq 可以使用最小起始样本量进行无偏倚的高通量研究,同时,scRNA-seq 也可以与基因组、表观遗传组、蛋白质组和代谢组学联合进行多组学分析。它可以评估单个细胞的功能状态,以无偏倚方式识别和发现新的细胞类型;也可以用来建立细胞谱系的分化轨迹,绘制细胞发育谱系的分子图谱^[21]。与传统的测序相比,在事先未知 RNA 序列信息的情况下,scRNA-seq 展现出更强大的新基因检测以及鉴定罕见突变的能力^[22]。更重要的是,scRNA-seq 避免了聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增的偏倚,因为它计算的是实际值,而不是扩增后核酸序列的相对丰度。

scRNA-seq 目前也存在一些应用上的局限。第一,它对进行测序的细胞活力和质量的要求很高,但有时获取合格单细胞悬浮液在实际操作中是十分困难的。scRNA-seq 存在一些固有的方法学缺陷,如“人为诱导的应激反应”,指的是在组织解离过程中可以诱导应激基因的表达,从而导致细胞转录组模式发生改变。因此,应仔细优化整个解离过程,以在不产生偏倚的情况下实现最大产量^[23,24]。第二,与传统测序比较,高通量单细胞技术费用更加昂贵。尽管由于高通量技术平台的不断涌现,实验费用正在逐年降低,但其仍然是一项非常昂贵的技术,单个样本花费将近 2 万人民币。第三,高通量 scRNA-seq 的数据分析复杂耗时,需要专业人员运用复杂的生物信息学技术进行整理分析。因此,应当加强建立高通量 scRNA-seq 的标准化流程和核心分析平台,以确保临床科学家能一步步克服这些困难。

肝脏研究中的空间转录组学技术

scRNA-seq 需要将器官和组织裂解成单个细胞悬液,这会导致细胞及其基因的空间信息的完全缺失。肝脏是具有独特空间结构、高度复杂的器官,深入阐明空间异质性对理解健康/疾病状态下肝脏结构和功能十分重要^[23,25]。既往的研究通常采用荧光原位杂交、免疫组织化学、选择性灌注隔离或显微切割技术通过“标志基因”定位小静脉和门静脉周围肝细胞独特的转录和蛋白表达模式^[26]。鉴于这些方法的种种局限,空间转录组技术(spatial transcriptomics, ST)应运而生。ST 可以消除对标志基因或周围细胞的依赖,在获取跨组织空间 mRNA 表达模式的高分辨率景观,克服与组织解离相关缺陷等方面有独特优势^[27,28]。因此,可以将肝脏切片的 ST 数据与高通量 scRNA-seq 结合起来分析,获得对肝脏微环境(小叶)、肝脏大环境(组织)及单细胞进行空间注释的全面数据。

临床应用

高通量单细胞技术已经广泛应用在各种临床环境中,作为精准医学方法的体现,未来临床应用前景光明。高通量 scRNA-seq 可用于追踪丙肝病毒(hepatitis virus C, HCV)治疗前后患者的特异性应答轨迹,旨在阐明抗病毒治疗是否有助于恢复 T 细胞反应性^[29~31]。也可以用于评估各种肝病临床试验中的治疗效果和疾病进展,构建以基因组学、表观遗传学、转录组学、蛋白组学和基于细胞景观的治疗

策略框架^[32]。例如,通过在临床多发性骨髓瘤患者队列的临床研究中应用高通量 scRNA-seq 确定新的耐药机制和生物标志物,从而对患者进行分层并指导个性化治疗决策^[33,34]。在不久的将来,患者特异性肝脏活组织检查单细胞分析可以通过帮助评估患者的结果和治疗效果来揭示个体化免疫差异,实现精准治疗。单细胞技术广泛应用将彻底改变我们判断患者疗效的手段及方法,并为当前诊疗受限的疾病定制有效的治疗策略。

未来研究方向

在精准医学时代,需要更高分辨率的数据来鉴别组织的异质性以及复杂疾病如微生物感染的发病机制。单细胞多组学联合 ST 可以从单细胞分辨率以及空间立体视角让我们更全面了解肝脏的生理和病理。未来研究将会专注于降低高通量单细胞技术的成本,并进一步明确疾病相关分子、细胞、组织、放射等生物标志物,有助于精准预测患者疗效和预后。随着高通量单细胞技术的进一步发展,对健康和疾病状况下肝脏中单细胞分析会更加综合全面,可能会发现新的治疗靶标。为了获取更丰富、多维度的信息和数据,我们需要进一步推进前沿的生物信息学算法来从获取的海量大数据中提取最佳的相关信息,并不断同步发展计算分析流程与方法学,为单细胞组学数据集可视化、查询、注释以及理解提供新的方法和策略。

结 论

高通量单细胞和空间多组学技术正彻底改变我们对健康和疾病状态下肝脏生理和病理理解。这些不断发展的前沿科技迅速而深刻地加速肝脏微环境中罕见细胞亚群的鉴定和发现,细胞-细胞互作通讯,以及全新的发病机制阐明。随着我们对这项技术的精通,可以不断扩展它的应用范围,如绘制人体各个器官在应对感染的初始阶段,或者随着感染的不断进展纵向进行肝组织取样检测,有助于鉴定全新的有效治疗靶标和制定治疗各种感染的个体化诊疗方案。

参 考 文 献

- Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8 + T cells via TLR4 signaling[J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2197-2204.
- Wang JY, Ma JP, Nie HY, et al. Hepatic regulator of G protein signaling 5 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by suppressing

- transforming growth factor beta-activated kinase 1-c-Jun-N-terminal kinase/p38 signaling[J]. Hepatology, 2021, 73(1): 104-125.
- Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(11): 753-766.
- Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver - from homeostasis to disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(2): 88-110.
- Knolle PA, Thimme R. Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection[J]. Gastroenterology, 2014, 146(5): 1193-1207.
- Kubes P, Jenne C. Immune responses in the liver[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 247-277.
- Guo JL, Li Y, Shan YH, et al. Humanized mice reveal an essential role for human hepatocytes in the development of the liver immune system[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 667.
- Chung KW, Kim KM, Choi YJ, et al. The critical role played by endotoxin-induced liver autophagy in the maintenance of lipid metabolism during sepsis[J]. Autophagy, 2017, 13(7): 1113-1129.
- Yan J, Li S, Li SL. The Role of the Liver in Sepsis[J]. Int Rev Immunol, 2014, 33(6): 498-510.
- Mao KR, Baptista AP, Tamoutounour S, et al. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism[J]. Nature, 2018, 554(7691): 255-259.
- Megahed FAK, Zhou XL, Sun PN. The Interactions Between HBV and the innate immunity of hepatocytes[J]. Viruses, 2020, 12(3): 285.
- Davies SP, Terry LV, Wilkinson AL, et al. Cell-in-Cell structures in the liver: a tale of four Es[J]. Front Immunol, 2020, 11: 650.
- Halpern KB, Shenhav R, Massalha H, et al. Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(10): 962-970.
- Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science[J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(9): 618-630.
- Morrison JK, DeRossi C, Alter IL, et al. Single-cell transcriptomics reveals conserved cell identities and fibrogenic phenotypes in zebrafish and human liver[J]. Hepatol Commun, 2022, 6(7): 1711-1724.
- 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.
- Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2009, 69(18): 7385-7392.
- Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets[J]. Hepatology, 2007, 45(1): 42-52.
- Yamada S, Nomura S. Review of single-cell RNA sequencing in the heart[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8345.
- Gao S. Data analysis in single-cell transcriptome sequencing[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1754: 311-326.
- Lee J, Hyeon DY, Hwang D. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods[J]. Exp Mol Med, 2020, 52(9): 1428-1442.
- Sklavenitis-Pistofidis R, Getz G, Ghobrial I. Single-cell RNA sequen-

- cing; one step closer to the clinic [J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 375-376.
- 23 van den Brink SC, Sage F, Vertesy A, et al. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(10): 935-936.
- 24 Adam M, Potter AS, Potter SS. Psychrophilic proteases dramatically reduce single-cell RNA-seq artifacts; a molecular atlas of kidney development [J]. *Development*, 2017, 144(19): 3625-3632.
- 25 Aizarani N, Saviano A, Sagar, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors [J]. *Nature*, 2019, 572(7768): 199-204.
- 26 MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4383.
- 27 Halpern KB, Shenhav R, Matcovitch-Natan O, et al. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver [J]. *Nature*, 2017, 542(7641): 352-356.
- 28 Chu AL, Schilling JD, King KR, et al. The power of single-cell analysis for the study of liver pathobiology [J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 437-448.
- 29 Hensel N, Gu Z, Sagar, et al. Memory-like HCV-specific CD8(+) T cells retain a molecular scar after cure of chronic HCV infection [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(2): 229-239.
- 30 Abdel-Hakeem MS, Manne S, Beltra JC, et al. Epigenetic scarring of exhausted T cells hinders memory differentiation upon eliminating chronic antigenic stimulation [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(8): 1008-1019.
- 31 Burchill MA, Salomon MP, Golden-Mason L, et al. Single-cell transcriptomic analyses of T cells in chronic HCV-infected patients dominated by DAA-induced interferon signaling changes [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(8): e1009799.
- 32 Keener AB. Single-cell sequencing edges into clinical trials [J]. *Nat Med*, 2019, 25(9): 1322-1326.
- 33 Kashif M, Alici E, Nahi H. Predicting drug resistance by single-cell RNASeq in patients with multiple myeloma [J]. *Clin Chem*, 2021, 67(10): 1309-1311.
- 34 Cohen YC, Zada M, Wang SY, et al. Single cell RNA sequencing in patients enrolled in a selinexor clinical trial reveals overexpression of alternative nuclear export pathways associated with resistance to selinexor in refractory multiple myeloma [J]. *Blood*, 2021, 138: 2725.

(2023-03-31 收稿)

欢迎订阅 2024 年《内科急危重症杂志》

《内科急危重症杂志》于 1995 年由国家科委批准, 中华人民共和国教育部主管, 华中科技大学同济医学院主办, 同济医院承办。1997 年被清华全文期刊数据库收录, 2001 年被中国科技信息研究所万方数据库收录, 2002 年被列入国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊。历年公布的被引用总次数呈逐年上升态势, 表明本刊在学术交流中的重要作用。

《内科急危重症杂志》是我国第一个以内科各专科及神经内科、传染科、皮肤科、ICU 等临床急危重症为主要内容的杂志。以广大临床医师及医学院校师生和有关科研人员为主要读者对象。其宗旨和任务是刊载大内科范围急危重症医学领域的临床诊治经验总结, 以及紧密结合临床的基础研究, 国内外重症监护 (ICU) 新进展等。设有: 专家论坛、临床研究、基础研究、诊疗经验、临床病例讨论、个案等栏目。特色是每期邀请国内著名专家就某一专题谈国内外最新诊断治疗指南与临床治疗经验。本刊编辑部从 2014 年 6 月起, 开始使用新的投稿采编系统平台。作者、读者可通过网站首页进行投稿和稿件审理状态查询。

《内科急危重症杂志》为双月刊, 大 16 开, 88 页。国际刊号: ISSN1007-1042, 国内统一刊号: CN42-1394/R。每册 12 元, 全年 6 期 72 元, 热忱欢迎广大医务工作者订阅和积极投稿。

订阅方式: 全国各地邮局, 邮发代号 38-223。漏订可直接与编辑部联系。

编辑部地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院《内科急危重症杂志》编辑部

邮政编码: 430030 电话: 027-69378378

E-mail: nkjwzzzz@163.com 网址: <http://nkjwzzzz.chmed.net>