

# 单细胞转录组测序在阿尔茨海默病中的应用

黄凤琴 王欢 胡亚琳 罗兴梅

【中图分类号】 R742 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2024)05-0510-07

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.05.018

单细胞转录组测序技术(Single cell RNA sequencing, scRNA-seq)是一种在单细胞水平上对基因组、表观基因和转录组进行高通量分析的新技术,它可以显示单细胞的基因结构和表达状态,反应不同细胞的异质性,提高对组织、器官和生物复杂性的理解。目前单细胞转录组测序技术应用在神经生物学、发育生物学、肿瘤生物学、免疫学等多个领域并发挥重要作用。本研究将简要介绍 scRNA-seq 的技术流程,并重点阐述其在阿尔茨海默病的应用。

单细胞转录组测序技术(Single cell RNA sequencing, scRNA-seq)最初由 Tang 等<sup>[1]</sup>研究人员在 2009 年提出,这种技术能在单细胞层面对细胞转录组进行详细全面的分析。单细胞测序技术经过不断地探索和发展,已越来越多应用到各类医学领域包括肿瘤<sup>[2]</sup>、骨科疾病<sup>[3]</sup>、炎症性肠病<sup>[4]</sup>、心血管疾病<sup>[5]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[6]</sup>、呼吸系统<sup>[7]</sup>等领域中。与传统批量 RNA 测序相比,高通量单细胞转录组学技术能够揭示细胞间的异质性和基因表达的随机性,在识别新细胞类型、追踪发育过程和研究疾病异质性等方面展现出更高的精确度,单细胞 RNA 测序技术正逐渐成为人类疾病研究的流行工具<sup>[8]</sup>。典型的 scRNA-seq 技术包括以下几个步骤:样品采集、单细胞分离、进行单细胞裂解以获得 RNA、将 RNA 逆转录(Reverse transcription, RT)为 cDNA、使用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)或体外转录(In vitro transcription, IVT)扩增 cDNA、文库构建、测序和数据分析<sup>[9]</sup>。

## 1 scRNA-seq 流程

### 1.1 单细胞获取与分离

快速、高效、准确地获取单细胞是单细胞测序的主要挑战之一,从组织或细胞培养物中分离出单个细胞,获取高质量、未受损的单细胞悬浮液。目前有多种方法用于分离单细胞,包括手动细胞选择、有限稀释、激光捕获显微切割(Laser capture micromanipulation, LCM)、荧光激活细胞分选(Fluorescence activated cell sorting, FACS)、磁激活细胞分选

(Magnetic-activated cell sorting, MACS)和微流体(Microfluidics)<sup>[9]</sup>。这些分离方法都各有其特点,因此需要综合考虑具体研究目的、样本来源、细胞形态、细胞大小等因素综合选择最合适的分离技术。

### 1.2 测序方法

单细胞被捕获分离后细胞内的 RNA 被提取出来,并通过逆转录酶转化为 cDNA,对单个细胞的转录组进行条形码编码是所有可用单细胞实验方案的关键步骤,并体现了与批量 RNA 测序的主要区别。目前有两种方法是主流推荐,其一在细胞分离后向每个转录组添加细胞特异性条形码;其二在不进行物理区分的情况下向每个细胞转录组添加独特的索引组合[例如分裂测序(Split-pool sequencing, split-Seq)]<sup>[10]</sup>。另外,根据定量方法,单细胞测序技术可大致分为两类,第一类是全长方法,它提供整个基因长度的读取并提高整体灵敏度,这种方法的潜在缺陷就是对较短基因的计数常常会丢失;第二类是基于标签的方法,通常结合独特的分子标识符(Unique molecular identifiers, UMIs),仅捕获和测序 3'末端转录本或 5'末端转录本来识别和量化单个转录本<sup>[8]</sup>。当前使用的单细胞转录组测序平台包括线性扩增和测序的细胞表达(Cell expression by linear amplification and sequencing, CEL-seq)和 CEL-seq2、大规模并行 RNA 单细胞测序(Massively parallel RNA single-cell sequencing, MARS-seq)和 MARS-seq2、基于液滴的单细胞 RNA 测序(Drop-based single cell RNA sequencing, Drop-seq)和 10× Genomics、Seq-Well 单细胞 RNA 测序(Seq-well single-cell RNA sequencing, Seq-Well)和 Seq-Well S3、微孔单细胞 RNA 测序(Microwell single-cell RNA sequencing, Microwell-seq)和 Microwell-seq2.0、单细胞组合索引 RNA 测序(Single-cell combinatorial Indexing RNA Sequencing, sci-RNA-seq)、基于分裂池连接的转录组测序(Split-pool ligation-based transcriptome sequencing, SPLiT-seq)和带有扰动的单细胞组合索引测序(Single-cell combinatorial indexing with perturbation, sci-Plex)、RNA 模板 5'端转换机制测序(Switching Mechanism at 5' end of RNA template sequencing, Smart-seq)和全长可变剪接与杂交测序(Full-length alternative splicing and hybridization sequencing, FLASH-seq)、基于石英的单细胞 RNA 测序(Quartz-based single cell RNA sequencing, Quartz-seq)和 Quartz-seq2、单细胞染色质可及性与核小体定位测序(Single-cell chromatin accessibility and nucleosome positioning sequencing, SCAN-seq)和 SCAN-seq2、变异与剪接组装测序(Variant and splicing assembly

基金项目:贵州省科学技术厅科学技术基金(黔科合基础-ZK[2024]一般 225);贵州医科大学附属医院国家自然科学基金(NS-FC)地区基金培育计划项目(gyfynsf[2023]-46);贵州医科大学附属医院博士科研启动基金(gyfybsky-2023-28)

作者单位:550004 贵阳,贵州医科大学附属医院[黄凤琴 王欢 胡亚琳 罗兴梅(通信作者)]

表 1 常用单细胞转录组测序技术优缺点

平台	分离方法	扩增方法	扩增范围	优点	缺点	参考文献
Tang-2009	FACS	PCR	3'末端	良好的再现性	成本高,低效率	[1]
CEL-seq	FACS	IVT	3'末端	重现性好,较高灵敏度	通量和扩增效率低	[11]
CEL-seq2	FACS	PCR	3'末端	高灵敏度、低成本	文库偏向基因 3'末端,高丰度转录本优先扩增	[12]
Smart	FACS	PCR	全长	较高单细胞覆盖率及基因分析能力	对低丰度转录本不敏感,成本高	[13]
Smart-seq2	FACS	PCR	全长	提高了转录组覆盖率和准确性	信息捕获有限	[14]
Smart-seq3	FACS	PCR	全长	更高的灵敏度和覆盖率	成本更高,技术更复杂	[15]
10X-Genomics	Droplet	PCR	3'末端	细胞捕获效率高、循环时间短,重现性好	只能对 3'末端进行测序	[16]
Drop-seq	Droplet	PCR	3'末端	快速、高通量、成本效益低	对单细胞悬浮液要求较高	[17]
inDrop-seq	Droplet	IVT	3'末端	低成本和线性放大	操作时间长,对样本要求高	[18]
MARS-seq	FACS	体外转录	3'末端	重现性好,有效控制偏差	实验操作及数据处理要求高	[19]
MARS-seq2	FACS	体外转录	3'末端	背景噪音大幅降低,最大限度减少采样偏差	实验操作及数据处理要求高	[20]

sequencing, VASA-seq) 等。这些方法在基因覆盖、文库扩增、通量、优势和劣势等方面均有所不同(表 1<sup>[9]</sup>)。它们为基础研究和精准医学提供了前沿工具,推动了在细胞发展和疾病多样性领域的新发现。

1.3 数据分析

由于单细胞分离和处理、数据库制备技术和测序平台的不同,不同数据集之间的批次效应是不可避免的。为了消除这些效应以有效高质量整合多个单细胞 RNA 测序(Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)数据集,基于不同的概念和方法开发了许多方法,总结主要包括以下三种:(1)线性分解方法,该方法分析步骤包括数据预处理(包括去噪声、标准化、数据缺失值等)、特征选择或提取(通过线性变化选出最能代表数据变异的特征)、模型建立(使用线性模型来分析变量之间的关系)、结果评估(通过统计检验来评估模型的解释和预测能力),该方法简单易懂,对计算效率有优势,但对于非线性关系无法处理;(2)降维空间中基于相似性的批量校正方法,该方法分析步骤包括降维、计算数据相似性、批量校正、数据重构,其优点能有效减少批次效应,提高数据质量,适用于大规模数据集,但降维可能会丢失重要信息;(3)使用变分法的生成模型自动编码器,该方法分析步骤包括模型设计、目标函数优化、特征学习、数据生成,该方法可以从少量样本学习数据分布,生成新的样本,且模型能学习到数据的深层特征,但该方法比较复杂,对计算资源要求较高。这三种方法各有特点和适用于不同的场景,选择合适的方法需要根据具体问题和数据特征来决定<sup>[21]</sup>。随着单细胞技术的快速迭代,该领域的分析方法也在不断发展和精确,但仍需要对比不同工具和分析方法的优缺点,集众家之所长、取其精华以便充分利用 scRNA-seq。

2 单细胞 RNA 测序在阿尔茨海默病中的应用

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种缓慢进展的神经退行性疾病,是痴呆最常见的病因。目前,全球约有 4400 万人患有痴呆症,而这一数字到 2050 年将增加到 3

倍以上<sup>[22]</sup>。AD 主要临床症状是记忆力丧失、认知功能障碍、语言能力下降、判断力减退、日常生活技能丧失、心理行为改变和社交或职业功能下降。AD 的发病机制尚不完全明确,尽管其诊断的病理学标准仍然是淀粉样  $\beta$  蛋白(Amyloid beta, A $\beta$ )斑块沉积和细胞内过度磷酸化 Tau 蛋白(Phosphorylated Tau, p-tau)积累,随着对 AD 病理生理机制的不断探索,大量研究表明神经变性、血脑屏障破坏、突触功能障碍、神经元胆固醇稳态失衡及脂肪酸代谢异常都参与 AD 发病机制<sup>[23]</sup>。然而,目前并无有效治愈 AD 的有效方案,治疗也只能缓解症状。随着 scRNA-seq 技术的快速发展为深入理解 AD 的分子机制提供了全新的途径和视角。scRNA-seq 技术已经越来越多应用于阿尔茨海默病的相关研究上,通过检测 AD 动物模型、体外模型及 AD 患者,分析疾病状态下不同细胞类型及其变化,将有助于人们清晰地重建神经系统图谱,确定它们在 AD 病程中的应用,并提供关键细胞群或细胞亚群的信息,帮助发现可能的致病亚群和 AD 的细胞状态转化。

2.1 分析神经元

中枢神经系统(Central nervous system, CNS)是认知记忆思维活动存在的基础<sup>[30]</sup>。CNS 主要有两类细胞:神经元和胶质细胞,神经元是中枢神经系统的基本功能单位,负责接收、处理和传递信息。胶质细胞是神经系统中非神经细胞,它们提供支持和保护神经元的功能,其主要类型包括星形胶质细胞、少突胶质细胞、微胶质细胞等,这些细胞能够执行高度精细的电生理活动,并为大脑提供营养支持、信息传输和防御病原体等功能。AD 的核心病理特征为 A $\beta$  斑块和神经元纤维的缠结具有神经毒性,会导致突触和神经元丢失。因此,AD 患者的广泛的神经元损失,特别是在皮质和海马体中是 AD 的另 1 个病理学特征。这一背景下单细胞 RNA 测序技术(Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)的应用为我们深入理解 AD 中神经系统的细胞变化提供了独特的视角。Leng 等<sup>[31]</sup>人通过 scRNA 测序技术对 10 例具有不同程度 P-tau 神经病理进展[Braak 分期, (Braak 0 阶段、Braak 2 阶段、Braak6 阶段)的人类死后大脑,分别从内嗅皮

层和额上回分离出 42528 和 63608 个单核细胞,在内嗅皮层和额上回研究发现了 9 个和 11 个兴奋性神经细胞亚群,揭示了区域特异性基因的差异。特别是这 2 个区域的神经元亚群在病程早期和晚期显示出更高的退化倾向。视黄酸受体相关孤儿受体 B(RAR-related orphan receptor B, RORB) 基因作为内嗅皮质中易受损的兴奋性神经元的标志物,其识别为研究者提供了定位和研究 AD 进展中特别容易受损的神经元群体的新工具。此外,Mathys 等人分析了 24 例 AD 患者和 24 例年龄匹配的对照组的大脑前额叶皮层中 80660 个单核 RNA 序列,样本覆盖了男性和女性;研究发现六大主要脑细胞类型(兴奋性神经元、抑制性神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、微胶质细胞、少突胶质前体细胞)的转录组分化亚群;在神经元中观察到的转录组变化具有强烈的细胞类型特异性。兴奋性(Excitatory neurons, Ex)和抑制性(Inhibitory neurons, In)神经元表现出不同的基因表达变化模式,其中大部分差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)在 Ex 和 In 中表现为下调,这表明 AD 病理过程中神经元功能的广泛抑制。此外,在兴奋性和抑制性神经元中观察到与髓鞘化、轴突生长和再生相关的特异 DEGs,例如富含亮氨酸重复和免疫球蛋白样结构域蛋白 1(Leucine rich repeat and Ig domain containing 1, LINGO1)、ERBB2 相互作用蛋白(Erbp2 interacting protein, ERBB2IP)、接触蛋白相关蛋白 2(Contactin associated protein 2, CNTNAP2)、神经元生长调节因子 1(Neuronal growth regulator 1, NEGR1)、脑表达 X 连锁基因 1(Brain expressed X-linked 1, BEX1)和网膜蛋白 G1(Netrin G1, NTNG1)。这些基因的表达水平变化提示髓鞘化过程在 AD 中的潜在角色,可能指向新的疾病机制和治疗靶点<sup>[28]</sup>。

## 2.2 分析小胶质细胞

小胶质细胞是中枢神经系统的常驻免疫细胞,在发育、稳态调控以及对损伤、感染、微环境变化中发挥重要作用。神经炎症在 AD 病理中参与重要角色,而小胶质细胞是神经炎症中的关键细胞参与者。在 AD 小鼠模型和患者的大脑相关区域都发现了激活或功能改变的小胶质细胞<sup>[32]</sup>。据报道,小胶质细胞通过多种机制来参与 AD 病理变化,包括细胞因子产生和 A $\beta$  吞噬清除<sup>[33]</sup>、增强神经突触的消除<sup>[34-35]</sup>、脂质代谢失调和神经炎症<sup>[36]</sup>等。小胶质细胞在衰老和激活状态下形态和功能会发生变化,出现细胞质碎裂、含铁储存增加、铁蛋白表达增加、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生增加以及炎症细胞因子产生增加,这些变化会降低它们吞噬有毒物质的能力,并且产生更多的神经毒性蛋白复合物,这些变化与 AD 病理变化紧密联系,对于管理 A $\beta$ 、P-tau 和受损突触至关重要<sup>[37]</sup>。最初,小胶质细胞被简单地分类为促炎的 M1 型和抗炎的 M2 型。但近期来自人类和动物模型的研究数据揭示了 1 个更加复杂的情况:小胶质细胞的状态远非单一分型,而是显示出极高的可塑性。得益于单细胞测序技术的飞速进步,研究人员现在能够更精确地定义和识别小胶质细胞中的多种亚群及其不同功能以及在疾病中这些亚群的变化情况。Olah 等<sup>[26]</sup>人通过单细胞 RNA 测序技术鉴定了 9 个人类大脑皮层小胶质细胞亚群,分别是簇 1

(可能与免疫监视有关)、簇 2(可能参与中枢神经系统的常规维护)、簇 3(表达应激反应基因,可能代表应激状态的细胞)、簇 4~7(在 AD 患者的大脑皮层中表达减少,该亚群与疾病相关基因表达富集有关,可能在 AD 发展中扮演重要角色)、簇 8~9。这些分析结果不仅为靶向小胶质细胞治疗提供了方向,也为 AD 的治疗提供了新思路。Mathys 等<sup>[28]</sup>人使用单细胞 RNA 测序方法,发现与 AD 相关病理和认知功能衰退的患者的小胶质细胞中 CD81 分子(CD81 molecule, CD81)、载脂蛋白 C1(Apolipoprotein C1, APOC1)、补体 C1q 链(Complement C1q subcomponent subunit C, C1QC)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体型 G(Protein tyrosine phosphatase receptor Type G, PTPRG)、骨桥蛋白(Secreted phosphoprotein 1, SPP1)和载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, APOE)的表达随时间推移增加,而这些发现与中性粒细胞介导的免疫、蛋白质折叠、内在凋亡信号传导途径以及不同 AD 相关小胶质细胞亚型中蛋白质稳定性调节相关途径改变有关,这些细胞的上调表明细胞应激反应的增加,将会带来细胞功能的变化。Lee 等<sup>[38]</sup>人通过单细胞 RNA 测序技术对小胶质细胞进行亚型分类,总共鉴定为 6 个细胞簇:簇 1 表征静息小胶质细胞[表达跨膜蛋白 119(Transmembrane protein 119, Tmem119)、嘌呤受体 P2Y12(Purinergic receptor P2Y12, P2ry12)、葡萄糖转运蛋白 5(Solute carrier family 2 member 5, Slc2a5)、富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白(Secreted protein acidic and rich in cysteine, Sparc)基因]、簇 2 少量表达致病性小胶质细胞(Disease-associated microglia, DAM)、簇 3 和簇 4 高度富集 DAM[表达糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白 B(Glycoprotein non-metastatic melanoma protein B, Gpnmb)、二聚酮酶样蛋白 2(Dickkopf 2, DKK2)、整合素亚基  $\alpha$ X(Integrin subunit alpha X, Itgax)基因]、簇 5 高表达干扰素相关小胶质细胞反应基因[如干扰素刺激基因 15(Interferon-stimulated gene 15, Isg15)、Z-DNA 结合蛋白 1(Z-DNA binding protein 1, Zbp 1)]、簇 6 表达高水平激活标志物[肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, Tnf)、白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin 1 beta, Il1b)基因];研究还表明在缺乏 P-tau 和  $\beta$  蛋白的小鼠模型中小胶质细胞主要聚集在静息细胞簇中;与之相反,在 AD 小鼠模型中稳态小胶质细胞基因表达减少,而大量 AD 相关风险基因表达上调,包括载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, Apoe)、脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, Lpl)、靶向髓系细胞触发受体 2(Triggering receptor expressed on myeloid Cells 2, Trem2)及时发现这些保护性小胶质细胞及相关危险基因的表达变化对疾病的发生、进展有关键作用。不同亚群的小胶质细胞在 AD 病理中的相对比例变化可能影响疾病的进程和严重程度。了解这些亚群的特定角色对于开发针对 AD 的新治疗策略至关重要<sup>[39]</sup>。

## 2.3 分析星形胶质细胞

星形胶质细胞是神经系统重要的神经胶质细胞,它们在中枢神经系统中扮演着重要角色:支持和保护神经元、调节神经递质、维护神经递质稳态、突触的形成、血脑屏障的稳定、提供能量代谢支持、参与神经修复和炎症反应等<sup>[40]</sup>。星形胶质细胞不仅保持大脑活动的正常运行,还能对各种疾病

做出响应。在阿尔茨海默病和类似的痴呆症中星形胶质细胞表现出不同的基因表达模式和功能特性,例如星形胶质细胞中转录激活应答区 DNA 结合蛋白 43(Transactivating response region DNA-binding protein 43, TDP-43)的异常积累可以导致记忆损失。此外,它们在阿尔茨海默病中通过尿素循环的激活来响应高氨水平,这可能导致神经递质失衡和记忆障碍<sup>[41]</sup>。激活的星形胶质细胞在大脑中以区域特异性方式表现出不同的表型,并与  $\beta$ -淀粉蛋白、Tau 蛋白和  $\alpha$ 突触核蛋白物种以及小胶质细胞和神经元回路相互作用<sup>[42]</sup>。星形胶质细胞在损伤和疾病状态下经历形态、分子和功能重塑,成为反应性星形胶质细胞。Liddel 等<sup>[43]</sup>人对全身注射脂多糖治疗和接受大脑中动脉闭塞诱导缺血的小鼠模型纯化反应性星形胶质细胞并进行基因分型,将反应性星形胶质细胞分为两类(神经毒性 A1 和神经保护性 A2 反应性星形胶质细胞)。A1 星形胶质细胞表型是由激活的小胶质细胞因子诱导的,其中包括补体因子 1q(Complement component 1q, C1q)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素- $\alpha$ (Interleukin- $\alpha$ , IL- $\alpha$ ),衰老的大脑会形成大量 A1 反应性星形胶质细胞,这些细胞增殖会导致脆弱大脑区域的认知能力下降;A2 星形胶质细胞表现出神经保护性,它会增加多种神经保护因子的表达,以促进神经元的突触修复、生长和存活。反应性星形胶质细胞被证实与 AD 患者脑能量代谢<sup>[44-45]</sup>、AD 模型小鼠肠道微生物组(Gut microbiome, GMB)的改变<sup>[46]</sup>、AD 模型小鼠脂质代谢<sup>[47-48]</sup>有关。此外,另有研究显示小鼠和人类反应性星形胶质细胞之间的基因表达模式有时存在较差的一致性<sup>[49]</sup>,这从另一方面启示我们对人类反应性星形胶质细胞变化的研究的必要性。Qian 等<sup>[50]</sup>研究人员通过单细胞 RNA 测序技术检测到 8 个星形胶质细胞新亚群,包括簇 0~1 高表达稳态特征,涉及氨基酸转运、血脑屏障转运和突触传递的正向调节;簇 2 高表达反应性胶质细胞、氧化应激途径且与蛋白质稳态相关;簇 3 表达少突胶质细胞标记基因[髓鞘碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)和蛋白脂质蛋白 1(Proteolipid protein 1, PLP1)]和更高的少突胶质细胞转录因子 2(Oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2);簇 4 表达许多参与细胞骨架形成的微管相关基因;簇 5 富含炎症星形胶质细胞特征并且高表达免疫应答基因;簇 6 特别表达突触相关基因[例如突触融合蛋白 1(Synaptotagmin 1, SYT1)、神经连接蛋白 1(Neurexin 1, NLGN1)和谷氨酸离子型受体 NMDA 型亚基 2B(Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B, GRIN2B)]并参与突触维持;簇 7 高表达反应性胶质细胞,代表星形胶质细胞激活。Dang 等<sup>[51]</sup>人通过收集分析来自 AD 患者及健康对照者大脑内嗅皮层区域的 sc-RNA 数据集,结果鉴定多个细胞簇,包括少突胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞前体细胞、神经元、小胶质细胞、双联体和内皮细胞,并发现 AD 患者中星形胶质细胞铁死亡被激活,且发现星形胶质细胞中的 FTH1 和 SAT1 被鉴定为与铁死亡有关的中枢 mRNA,与 AD 情绪和认知功能显著相关。因此,神经胶质细胞在 AD 中的作用是多方面的,既有可能促进疾病的发展,也可能成为治疗的潜在靶点。单细胞测序技术对于

理解神经胶质细胞的多样性和复杂性提供了重要的工具,未来的研究将依赖于这些技术来揭示神经胶质细胞如何影响神经系统的健康与疾病。这些研究有望提供对神经退行性疾病更深入的理解。

## 2.4 分析 APOE 基因

AD 的核心病理特征是  $\beta$ -淀粉样蛋白(Amyloid beta, A $\beta$ )斑块的细胞外沉积和神经元纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFT)的积累。NFT 是 Tau 蛋白和载脂蛋白 E 的聚集体。在对 AD 相关的各种遗传因素中载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, APOE)(一种脂质转运蛋白)是众所周知的关键遗传风险因素,具体来说携带 APOE4 等位基因的个体表现出更高的患病风险,载脂蛋白 E(APOE)在生理病理情况下介导脑脂质稳态的多个方面,有证据表明新陈代谢、细胞内运输和先天免疫途径(尤其是神经胶质细胞)的缺陷是 APOE4 变体对 AD 治病作用的基础,因此了解 APOE4 如何使个体易患疾病需要对大脑细胞内和细胞间 APOE 的运输机制有更加深入的了解<sup>[52]</sup>。Blanchard 等<sup>[53]</sup>人对 APOE4 携带者和非携带者的死后人脑组织进行了单细胞 RNA 测序技术分析发现, APOE4 与脑内多种细胞类型的基因表达改变有关,特别是在少突胶质细胞中, APOE4 改变了与胆固醇合成、运输和储存有关的基因表达,导致胆固醇在少突胶质细胞中异常积累。这种胆固醇的异常积累与神经纤维的减少髓鞘化有关。另外,实验还表明通过药物促进胆固醇运输可以改善髓鞘化并提高 APOE4/4-TR 小鼠学习和记忆,改善认知能力。APOE 在星形胶质细胞中导致胆固醇积累对线粒体呼吸功能产生负面影响,通过使用胆固醇消耗剂治疗可以恢复自噬活性、线粒体动力学和相关蛋白组,并能挽救 APOE4 星形胶质细胞的线粒体呼吸功能<sup>[54]</sup>。另外,探讨小胶质细胞中载脂蛋白在阿尔茨海默病(AD)病理学中的作用,研究者通过使用特定条件的小鼠模型,研究表明 APOE 的不同亚型(APOE3 和 APOE4)对小胶质细胞活化、功能以及 AD 病理的影响存在显著差异。在小胶质细胞中 APOE3 的表达促进了认知功能的改善、增加了淀粉样斑块周围的小胶质细胞数量,并减少了淀粉样蛋白病理及其相关毒性;相反, APOE4 的表达则通过损害脂质代谢,且研究者通过单细胞 RNA 测序技术分析进一步揭示了 APOE3 与抗原呈递和干扰素途径的增加有关,而 APOE4 则下调补体和溶酶体途径,并促进应激相关反应, APOE4 的表达加剧了淀粉样蛋白病理<sup>[55]</sup>。这些发现揭示了小胶质细胞中 APOE 表达对 AD 病理学的关键影响,特别是 APOE4 如何显著增加 AD 风险的新见解。Lee 等<sup>[56]</sup>人通过综合多组学研究方法(包含单细胞 RNA 测序技术)系统地研究 APOE 基因型对年龄、神经炎症以及淀粉样蛋白反应的影响,研究发现 APOE 是 AD 病理发展中免疫代谢反应功能失调的驱动因素。APOE4 在 AD 模型小鼠血管壁细胞中大量表达,损害小鼠的行为和脑血管功能,包括损害 AD 模型小鼠的空间学习,增加了焦虑样表型以及减少小动脉血流量,并且对 AD 模型小鼠的血管和神经胶质细胞的单细胞 RNA 测序显示血管壁细胞中的 APOE4 与星形胶质细胞活化有关,而 APOE3 与周细胞中的血管生成相关<sup>[57]</sup>。单细胞 RNA 测序技术作为一种强大的

表 2 单细胞转录组技术在 AD 中的应用

组织来源	主要细胞类型	主要成果及结论	大脑区域	细胞数目	参考文献	技术
6 例 AD 患者和 6 例性别、年龄匹配的对照组	神经胶质细胞、神经元、内皮细胞等	特定细胞亚群与 AD 遗传风险因子表达模式差异。	大脑内嗅皮层	13214	[24]	SnRNA-seq
5× 家族性阿尔茨海默病模型小鼠 (Familial Alzheimer's disease mouse, FAD) 小鼠和野生型 (Wild type mouse, WT) 小鼠	神经胶质细胞、神经元	5× FAD 小鼠中的小胶质细胞比例显著高于野生型对照组,而星形胶质细胞和神经元的比例有所下降	脑组织	59000	[25]	ScRNA-seq
14 例 AD 患者尸检样本 3 个对照	所有细胞类型	确认了 9 种人类小胶质细胞亚群,其中 1 个亚群 (Cluster) 在 AD 患者皮层中表达水平下降	大脑背外侧前额叶皮质	16242	[26]	ScRNA-seq
26 例 AD 患者和 6 例性别、年龄匹配的对照组	神经元和非神经元细胞	AD 大脑中神经元与非神经元 (特别是胶质细胞) 存在显著转录差异	大脑前额叶皮质	25000	[27]	ScRNA-seq
24 例对照组和 24 例 AD 患者死后冷冻大脑	所有细胞	在 AD 患者大脑神经元和神经胶质细胞中观察到基因表达失调	前额叶皮层	80660	[28]	SnRNA-seq
2 例 AD 患者和 1 例携带早老素 1 (Presenilin 1, PSEN1) 突变的患者	所有细胞	共鉴定了 14 个细胞簇,在比较 AD 患者和突变携带者每个簇细胞比例发现兴奋性神经元比例减少	顶叶	30000	[29]	SnRNA-seq

工具,使我们能够在细胞层面上深入理解 APOE4 影响 AD 进展的细节。未来的研究可以通过该技术在单细胞水平上揭示 APOE4 如何影响不同脑细胞类型的基因表达和功能,进一步导致 AD 的病理变化。此外,通过将单细胞 RNA 测序技术与其他测序技术联合应用,可以提供更全面的生物学信息,这种多维度的分析方法不仅能够加深我们对 APOE4 在 AD 中作用的理解,而且还将促进识别疾病的新分子靶点和机制,为开发新的治疗方法提供更精准的科学依据(表 2)。

3 单细胞 RNA 测序技术在 AD 的临床运用

大量研究表明,生物标志物对 AD 的早期诊断具有重要作用,与现有的脑脊液标记物和影像学标记物相比,基于外周血的标志物具有低廉、快速、非侵入性等优势。Duan 等研究组通过研究展示了 AD 患者和健康人血液中 66724 个免疫细胞在单细胞水平上的基因表达变化和细胞通讯分析结果,发现 AD 患者和健康人血液中细胞亚群的比例和基因表达模式存在一定区别,还发现血液中有两种 CD8 + T 细胞,其中一类高表达颗粒酶 K(Granzyme K,GZMK)的 CD8 + T 细胞在 AD 患者血液中表达水平显著上升,发现外周血 GZMK + CD8 + T 细胞可能是一种潜在的 AD 标志物<sup>[58]</sup>。Llorens-Bobadilla<sup>[59]</sup>研究小组通过单细胞转录组学技术研究成年小鼠亚脑室区(Subventricular zone,SVZ)的神经干细胞(Neural stem cells,NSCs),成功分离出 130 个细胞,并成功表征了该区域内的一组休眠神经干细胞(NSC)。这项研究对于理解大脑维持和再生,特别是神经疾病的修复机制具有重要意义,为神经再生医学开辟了新的研究方向和潜在治疗策略。利用单细胞 RNA 测序和生物信息学分析,研究人员通过对野生型小鼠、5x 家族性阿尔茨海默病模型小鼠(Familial Alzheimer's disease mouse,FAD)和经活化蛋白 C(Activated protein C,APC,是一种血浆酶原,具有良好的细胞保护、抗炎和抗凋亡特性<sup>[60]</sup>)处理的 5xFAD 模型小鼠的研究不仅发现它们不同细胞类型基因组之间的差异,还发现 APC 治疗显著减少淀粉样  $\beta$ (A $\beta$ ) 负担,并改善了 5xFAD 小鼠 AD 模型的认

知功能。这些效果与 AD 相关基因和生物标志物的表达变化相关,为 APC 对 AD 产生益处的机制提供了洞察<sup>[25]</sup>。scRNA-seq 为 AD 的新治疗靶点和生物标志物的发现提供了可能。scRNA-seq 帮助识别了疾病进展中关键的细胞亚群及其相关的病理生理过程,评估治疗疗效,探索新的疾病机制为疾病的早期诊断和治疗策略的开发提供了基础。

4 总结和展望

scRNA-seq 技术在 AD 的研究和临床治疗中展现出巨大潜力,但目前还面临着技术和数据解析上的挑战如高成本、数据处理和解释复杂性等;未来随着 scRNA-seq 技术的不断革新,预计单细胞测序技术将发挥更加重要作用。另外,将 scRNA-seq 与其他组学技术结合,如蛋白质组学和代谢组学,可以从多个维度全面理解 AD,促进疾病机制的全景图构建。未来研究将进一步探索单细胞技术在揭示疾病机制和促进个性化医疗方面的应用潜力,促进神经科学的不断发展。

参 考 文 献

[1] Tang FC, Barbacioru C, Wang YZ, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.

[2] Sun BY, Xun ZY, Zhang N, et al. Single-cell RNA sequencing in cancer research: discovering novel biomarkers and therapeutic targets for immune checkpoint blockade[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 313.

[3] Wang T, Wang L, Zhang LP, et al. Single-cell RNA sequencing in orthopedic research[J]. Bone Research, 2023, 11(1): 10.

[4] Zheng HB. Application of single-cell omics in inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(28): 4397-4404.

[5] Khan SU, Huang YQ, Ali H, et al. Single-cell RNA Sequencing (scRNA-seq): advances and challenges for cardiovascular diseases (CVDs)[J]. Curr Probl Cardiol, 2024, 49(2): 102202.

[6] Yang XL, Hou XA, Zhang JN, et al. Research progress on the application of single-cell sequencing in autoimmune diseases[J].

Genes Immun, 2023, 24(5): 220-235.

- [7] Hu YS, Shao XJ, Xing L, et al. Single-cell sequencing of lung macrophages and monocytes reveals novel therapeutic targets in COPD[J]. Cells, 2023, 12(24): 2771.
- [8] Lu JR, Sheng YQ, Qian WH, et al. scRNA-seq data analysis method to improve analysis performance[J]. IET Nanobiotechnol, 2023, 17(3): 246-256.
- [9] Huang DZ, Ma NY, Li XL, et al. Advances in single-cell RNA sequencing and its applications in cancer research[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 98.
- [10] Slovin S, Carissimo A, Panariello F, et al. Single-cell RNA sequencing analysis: a step-by-step overview[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2284: 343-365.
- [11] Grün D, Kester L, van Oudenaarden A. Validation of noise models for single-cell transcriptomics[J]. Nat Methods, 2014, 11(6): 637-640.
- [12] Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq[J]. Genome Biol, 2016, 17: 77.
- [13] Ramsköld D, Luo SJ, 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.
- [14] 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.
- [15] Hagemann-Jensen M, Ziegenhain C, Chen P, et al. Single-cell RNA counting at allele and isoform resolution using smart-seq3[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 708-714.
- [16] Wang XL, He Y, Zhang QM, et al. Direct comparative analyses of 10X genomics chromium and smart-seq2[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2021, 19(2): 253-266.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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 (1979), 2014, 343(6172): 776-779.
- [20] Keren-Shaul H, Kenigsberg E, Jaitin DA, et al. MARS-seq 2.0: an experimental and analytical pipeline for indexed sorting combined with single-cell RNA sequencing[J]. Nat Protoc, 2019, 14(6): 1841-1862.
- [21] Ryu Y, Han GH, Jung E, et al. Integration of single-cell RNA-Seq datasets: a review of computational methods[J]. Mol Cells, 2023, 46(2): 106-119.
- [22] Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, et al. Dementia prevention, intervention, and care[J]. Lancet, 2017, 390(10113): 2673-2734.
- [23] 陈小坤, 包新杰, 高俊, 等. 神经干细胞移植治疗阿尔茨海默病的机制研究进展[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(7): 1148-1151.
- [24] Grubman A, Chew G, Ouyang JF, et al. A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(12): 2087-2097.
- [25] Fatmi MK, Wang H, Slotabec L, et al. Single-cell RNA-seq reveals transcriptomic modulation of Alzheimer's disease by activated protein C[J]. Aging, 2024, 16(4): 3137-3159.
- [26] Olah M, Menon V, Habib N, et al. Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6129.
- [27] Soreq L, Bird H, Mohamed W, et al. Single-cell RNA sequencing analysis of human Alzheimer's disease brain samples reveals neuronal and glial specific cells differential expression[J]. PLoS One, 2023, 18(2): e0277630.
- [28] Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng ZY, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease[J]. Nature, 2019, 570(7761): 332-337.
- [29] Del-Aguila JL, Li ZR, Dube U, et al. A single-nuclei RNA sequencing study of mendelian and sporadic AD in the human brain[J]. Alzheimers Res Ther, 2019, 11(1): 71.
- [30] Huang LN, Nakamura Y, Lo EH, et al. Astrocyte signaling in the neurovascular unit after central nervous system injury[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 282.
- [31] Leng K, Li E, Eser R, et al. Molecular characterization of selectively vulnerable neurons in Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci, 2021, 24(2): 276-287.
- [32] Wang HS. Microglia heterogeneity in Alzheimer's disease: insights from Single-Cell technologies[J]. Front Synaptic Neurosci, 2021, 13: 773590.
- [33] Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease[J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(1): 28-41.
- [34] Lv ZZ, Chen LX, Chen P, et al. Clearance of  $\beta$ -amyloid and synapses by the optogenetic depolarization of microglia is complement selective[J]. Neuron, 2024, 112(5): 740-754. e7.
- [35] Zhang C, Qi H, Jia D, et al. Cognitive impairment in Alzheimer's disease FAD(4T) mouse model: synaptic loss facilitated by activated microglia via C1qA[J]. Life Sci, 2024: 122457.
- [36] Gao C, Jiang JW, Tan YY, et al. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1): 359.
- [37] Malvaso A, Gatti A, Negro G, et al. Microglial senescence and activation in healthy aging and alzheimer's disease: systematic review and neuropathological scoring[J]. Cells, 2023, 12(24): 2824.
- [38] Lee SH, Meilandt WJ, Xie LK, et al. Trem2 restrains the enhancement of tau accumulation and neurodegeneration by  $\beta$ -amyloid pathology[J]. Neuron, 2021, 109(8): 1283-1301. e6.
- [39] Maksour S, Ooi L. Innovations advancing our understanding of microglia in Alzheimer's disease: from in vitro to in vivo models[J]. J Neurochem, 2023, 166(3): 497-516.
- [40] Gao MY, Wang JQ, He J, et al. Single-cell RNA-sequencing in astrocyte development, heterogeneity, and disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 2023, 43(7): 3449-3464.
- [41] Barnett D, Bohmbach K, Grelot V, et al. Astrocytes as drivers and disruptors of behavior: new advances in basic mechanisms and therapeutic targeting[J]. J Neurosci, 2023, 43(45): 7463-7471.

[42] Edison P. Astroglial activation; current concepts and future directions[J]. *Alzheimers & Dementia*, 2024, 20(4): 3034-3053.

[43] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.

[44] Hirata K, Matsuoka K, Tagai KJ, et al. Altered brain energy metabolism related to astrocytes in Alzheimer's disease[J]. *Ann Neurol*, 2024, 95(1): 104-115.

[45] Salvadó G, Milà-Alomà M, Shekari M, et al. Reactive astrogliosis is associated with higher cerebral glucose consumption in the early Alzheimer's continuum[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2022, 49(13): 4567-4579.

[46] Chandra S, Di Meco A, Dodiya HB, et al. The gut microbiome regulates astrocyte reaction to Aβ amyloidosis through microglial dependent and independent mechanisms[J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18(1): 45.

[47] Litvinchuk A, Suh JH, Guo JL, et al. Amelioration of Tau and APOE4-linked glial lipid accumulation and neurodegeneration with an LXR agonist[J]. *Neuron*, 2024, 112(3): 384-403. e8.

[48] Staurenghi E, Giannelli S, Testa G, et al. Cholesterol dysmetabolism in Alzheimer's disease; a starring role for astrocytes? [J]. *ANTIOXIDANTS*, 2021, 10(12): 1890.

[49] Das S, Li ZZ, Noori A, et al. Meta-analysis of mouse transcriptomic studies supports a context-dependent astrocyte reaction in acute CNS injury versus neurodegeneration[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 227.

[50] Qian ZW, Qin JL, Lai YW, et al. Large-Scale integration of Single-cell RNA-Seq data reveals astrocyte diversity and transcriptomic modules across six central nervous system disorders[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(4): 692.

[51] Dang YN, He Q, Yang SY, et al. FTH1- and SAT1-Induced astrocytic ferroptosis is involved in Alzheimer's disease: evidence from single-cell transcriptomic analysis [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(10): 1177.

[52] Windham IA, Cohen S. The cell biology of APOE in the brain [J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(4): 338-348.

[53] Blanchard JW, Akay LA, Davila-Velderrain J, et al. APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes[J]. *Nature*, 2022, 611(7937): 769-779.

[54] Lee H, Cho S, Kim MJ, et al. APOE4-dependent lysosomal cholesterol accumulation impairs mitochondrial homeostasis and oxidative phosphorylation in human astrocytes[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(10): 113183.

[55] Liu CC, Wang N, Chen YX, et al. Cell-autonomous effects of APOE4 in restricting microglial response in brain homeostasis and Alzheimer's disease[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(11): 1854-1866.

[56] Lee S, Devanney NA, Golden LR, et al. APOE modulates microglial immunometabolism in response to age, amyloid pathology, and inflammatory challenge[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(3): 112196.

[57] Yamazaki Y, Liu CC, Yamazaki A, et al. Vascular APOE4 impairs behavior by modulating gliovascular function[J]. *Neuron*, 2021, 109(3): 438-447. e6.

[58] Duan T, Chu J, Hu F. Identification of peripheral blood GZMK + CD8 + T cells as biomarkers of Alzheimer's disease based on single-cell transcriptome [J]. *Journal of Sichuan University Medical science edition*, 2023, 54(5): 863-873.

[59] 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.

[60] Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, et al. Activated protein C [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(Suppl 1): 73-80.

(2024-03-27 收稿)

· 消 息 ·

2025 年《卒中与神经疾病》征订启事

《卒中与神经疾病》为中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,是全国各地广大医务工作者,特别是从事神经内科临床和科学研究工作人员,切磋技艺、交流学术经验和更新知识的园地。辟有论著与学术交流、短篇与病例报告、综述、述评、专题讲座、专刊评价、临床药物治疗、会议(座谈)纪要、临床病理(病例)讨论、技术信息、新药新仪器、新书介绍以及国内外学术动态报道等多个栏目,欢迎您向当地邮局或本刊编辑部订阅(邮发代号:38-305,订价:20 元/册,年订价:120 元)。地址:430060 武汉市武昌区张之洞路 9 号《卒中与神经疾病》编辑部,业务联系人:吴国祥,联系电话:(027)88138803,帐号:557379073786,开户行:中国银行紫阳路支行,开户名:卒中与神经疾病。