

# 单细胞测序技术及其在毛囊发育中的应用

叶娜<sup>1, 2</sup> 张晓兰<sup>2</sup> 包鹏甲<sup>2</sup> 王兴东<sup>1, 2</sup> 阎萍<sup>2</sup> 潘和平<sup>1</sup>

(1. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 甘肃省牦牛繁育工程重点实验室, 兰州 730050)

**摘要:** 毛囊是一种具有独特结构的、呈周期性生长的微型器官, 其形态发生始于胚胎期, 由表皮上皮、间质真皮及特殊衍生物经过一系列相互作用诱导形成。出生后个体的毛囊开始进行周期性循环, 包括生长期、退行期和休止期。单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequence, scRNA-seq) 是一种新的测序方法, 通过制备单细胞悬液或细胞群, 利用二代测序 (next generation sequencing) 来识别单个细胞的基因表达信息, 主要用于分析细胞间遗传和基因表达水平的差异, 更好地了解单个细胞在微环境中的具体作用。通过单细胞转录组测序可以揭示复杂和稀有细胞群体以及基因之间的调节关系, 跟踪不同细胞谱系在发育过程中的轨迹。本文就单细胞转录组测序技术及其在毛囊发育调控研究中的应用展开叙述, 以期揭示毛囊发育的分子调控机制研究提供理论参考。

**关键词:** 单细胞转录组测序; 单细胞分离技术; 毛囊发育

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1491

## Single Cell Sequencing Technology and Its Application in Hair Follicle Development

YE Na<sup>1, 2</sup> ZHANG Xiao-lan<sup>2</sup> BAO Peng-jia<sup>2</sup> WANG Xing-dong<sup>1, 2</sup> YAN Ping<sup>2</sup> PAN He-ping<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030; 2. Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050)

**Abstract:** Hair follicle is a kind of micro-organ with unique structure and periodic growth, its morphogenesis begins in the embryonic stage and is induced by a series of interactions among epidermis epithelium, interstitial dermis and special derivatives. After birth, individual hair follicles begin to cycle periodically, including growth period, retrogression period and resting period. Single-cell RNA sequence (scRNA-seq) is a new sequencing method, mainly through the preparation of single cell suspension or cell groups and using the next generation sequencing to identify the gene expression information of the single cell. It is mainly used to analyze the differences of genetic and gene expression levels among cells, to better understand the specific role of a single cell in the microenvironment. The regulatory relationship between complex and rare cell populations and genes may be revealed via scRNA-seq, and the developmental trajectories of different cell lineages can be traced. This paper describes the scRNA-seq and its application in the regulation of hair follicle development, aiming to provide theoretical reference for revealing the molecular regulation mechanism of hair follicle development.

**Key words:** single-cell RNA sequencing; single cell isolation technique; hair follicle development

皮肤是哺乳动物中最大、最复杂的器官之一, 主要由表皮及其附属器官构成<sup>[1]</sup>。小鼠表皮主要由不同生理功能的两个部分组成, 滤泡间上皮 (interfollicular epithelium, IFE) 和毛囊 (hair follicle,

收稿日期: 2020-12-09

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31660636)

作者简介: 叶娜, 女, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: 1573030432@qq.com

通讯作者: 潘和平, 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: panheping62@163.com;

阎萍, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种; E-mail: pingyanlz@163.com

HF), 还包括皮脂腺 (sebaceous gland, SG)<sup>[2]</sup>。滤泡间上皮细胞是构成上皮细胞和扁平复层上皮的主要成分, 在保护皮肤屏障功能方面起着关键作用<sup>[3]</sup>。毛囊的形成是表皮上皮和间质真皮及其特殊衍生物真皮浓缩物 (dermal concentrate, DC)、真皮乳头 (dermal papilla, DP) 等相互作用并进行信号传递的结果。成熟的 HF 结构复杂, 主要由毛干和内根鞘上皮细胞组成的同心环、隆起部储备的干细胞以及毛球底部的基质细胞等构成<sup>[4-6]</sup>。胚胎期 HF 的形态发生经历诱导期、器官发生和细胞分化 3 个时期。出生后 HF 的生长会发生动态变化, 并以周期性的方式持续下去。毛发生长周期可分为 3 个阶段: 休止期、生长期和退行期<sup>[7-10]</sup>, 每个阶段都受到特定遗传模式的调节<sup>[11]</sup>。在毛发的生长阶段, DP 起着信号指导的作用<sup>[12-14]</sup>, 促使转运扩大祖细胞增殖、向上迁移并分化为几层轴鞘和内根鞘细胞系<sup>[14-15]</sup>。目前 HF 的复杂性还未得到充分的揭示, 在 HF 周期性生长分子调控机制的研究中, 多以多种类型组织 (真皮、表皮、HF) 等混合的皮肤做为起始样本, 没有从中分离出匀质性单细胞, 这使得细胞之间相互作用的生物差异有可能被平均值所掩盖或是被误认做为技术噪音。或仅对 HF 自身进行了研究, 而忽略了 HF 组织周围真皮、表皮与 HF 互作对周期性生长的影响。但随着技术的更新, HF 的研究更上一个层次。有报道利用 scRNA-seq 对 HF 形态发生过程中的调控机制进行研究<sup>[16-18]</sup>。亦有对小鼠成熟 HF 不同发育阶段的空间调控机制的研究<sup>[19-20]</sup>。但 HF 发育调控机制上还有许多问题没有解决, 有待进一步的研究。

由于技术限制, 传统的转录组测序只能测得细胞群体中多数基因表达水平的“平均数据”, 主要反映优势细胞亚群的生物学信息, 而小细胞亚群的作用往往被忽视, 从而可能掩盖了这部分细胞所携带的重要信息<sup>[21]</sup>。随着高通量测序技术的发展, 大规模测序平台使大量 DNA 和 RNA 分子同时测序成为可能, 这为各个领域的研究人员同时研究生物体的遗传信息和转录信息提供很大帮助。因此, 利用全基因组、转录组和表观遗传修饰的数据进行更深入的分析, 对全面揭示基因表达调控的异质性更为必要<sup>[22]</sup>。理解器官的发育和功能需要对其成分加以

了解, 即组成器官或组织的不同细胞类型。剖析器官的细胞组成类型或探索同一类型细胞间转录组异质性的理想方法是对样本中随机抽取的单个细胞进行单独的分析。单细胞水平的分析方法包括 RNA 原位杂交, 蛋白质免疫染色, 或荧光嵌合蛋白, 都是基于细胞特异性表达的表面标记物或荧光报告蛋白进行, 这些方法只能监测每个试验中的少数基因。单细胞转录组测序技术是一种能够获得细胞中所有 mRNA 的单细胞水平的分析方法, 它可对单个细胞进行无偏、高通量以及高分辨率的转录组测序分析。2009 年, 北京大学的汤富酬教授在 *Nature Methods* 上首次报道了单细胞转录组测序的研究, 从此掀起了单细胞测序技术的篇章<sup>[23]</sup>。scRNA-seq 是通过二代测序技术 (next generation sequencing) 来识别单个细胞的转录组表达信息, 分析细胞间遗传和基因表达水平的差异, 同时解决用组织样本测序无法解决的细胞异质性难题, 从而更好地了解单个细胞在微环境中的功能<sup>[24]</sup>, 并可以揭示复杂和稀有的细胞群体以及基因之间的调节关系, 跟踪不同细胞谱系在发育过程中的轨迹, 揭示单个细胞的独特性, 进而解决批量分析中无法解决的问题<sup>[25-26]</sup>。目前, scRNA-seq 已被应用于鉴别健康组织的细胞类型<sup>[27]</sup>、发现新的细胞类型<sup>[28-30]</sup>、探索发育生物学过程的动力学<sup>[31-32]</sup>、识别基因调控机制<sup>[33]</sup>, 以及描述肿瘤的异质性等<sup>[34-35]</sup>。本文就单细胞技术的发展、分离技术及其在 HF 发育调控研究中的应用展开叙述, 以期揭示 HF 发育的分子调控机制研究提供理论参考。

## 1 scRNA-seq 的发展历程

scRNA-seq 始于单细胞 qPCR 的发展, 跟单分子 FISH 一样, 都是对转录物靶向分析的一种方法<sup>[36]</sup>。2009 年, 汤富酬首次报道单细胞测序的研究, 但是该方法只适用于少数珍贵细胞基因表达的深度测序<sup>[23]</sup>, 2011 年, Islam 等<sup>[37]</sup>研发了一种基于单细胞标记逆转录测序方法, 即单细胞标记逆转录测序 (single-cell tagged reverse transcription sequencing, STRT-seq), 它是利用 5' tag 计数转录本的单细胞方法之一, 在 microfluidigm C1 平台 (STRT-C1) 上进行的 STRT-seq 是一种灵活的 scRNA-seq 方法, 可

在单细胞水平上对转录本进行准确、敏感和重要的分子计数<sup>[38]</sup>。随后, Hashimshony 等<sup>[39]</sup>又研发出 CEL-seq (cell expression by linear amplification and sequencing), 该方法克服了 RNA 在细胞中由于起始量小的局限, 通过给样本汇集条形码来满足 IVT (*in vitro* transcription) 线性扩增对材料的要求, 从而允许从单个细胞中高效线性扩增 RNA, 同时通过测序对其进行分析。扩增后 DNA 的两端深度测序能够准确检测两条链的序列, 该方法比基于 PCR 的扩增方法具有更高的重复性、敏感性, CEL-Seq 支持转录组量化, 将有助于不同细胞类型群体的复杂组织的转录组分析。这种方法的缺点是具有强烈的 3' 端偏好。2013 年, Picelli<sup>[40]</sup>引入了 Smart-seq2, 该方法可以完整覆盖转录本的全长, 实现了转录本异构体和 SNV 检测, 同时改进了逆转录、模板转换和前置扩增等功能, 以增加单个细胞生成的 cDNA 文库的产量和长度。与 Smart-seq<sup>[41]</sup> 转录组库相比, Smart-seq2 转录组库在检测、覆盖率、偏倚和准确性方面都有所提高, 并且使用现成的试剂生成, 成本更低, 但其只能对具有 poly(A) 尾巴的 mRNA 进行扩增和检测。2014 年, Jaitin<sup>[27]</sup>研发的 MARS-seq (massively parallel single cell RNA-seq) 问世, 它是一种自动化的大规模单细胞 RNA 测序方法, 用于分析数千个单个细胞的体内转录状态。2015 年, 哈佛大学的两个团队开发出 inDrop<sup>[42]</sup> 和 Drop-seq<sup>[43]</sup> 两种单细胞测序技术, 两种方法都是基于高通量液滴微流控装置, 将数千个细胞分离成纳米大小的液滴, 然后不同的条形码再与每个细胞的 RNA 联系起来并通过二代测序进行后续分析。2017 年, 商业化的 10× Genomics Chromium 出现, 该项技术由 10× Genomics 公司和 Fred Hutchinson 癌症研究中心共同研发, 它可实现大量细胞的快速标记、测序与分析, 并获得单细胞水平的基因表达谱和差异情况, 通过对复杂的细胞群体进行的细致分析, 绘制大规模单细胞表达图谱<sup>[44]</sup>。2017 年, 浙大教授开发了 microwell-seq, 一个使用简单、廉价设备的高通量、低成本的 scRNA-seq 平台, 利用该平台, 该团队首次绘制出哺乳动物的细胞图谱, 还构建了一个基于单细胞数字表达精确定义细胞类型的“单细胞 MCA (ScMCA)”工具<sup>[45]</sup>。同年还有一种基于微孔阵列的

Seq-Well 技术, 这是一个简单、便携、低成本的大规模并行的 scRNA-seq 平台, 它将单个细胞和条形码 mRNA 捕获珠密封在微孔阵列板中, 从而实现高效的细胞裂解和转录本捕获<sup>[46]</sup>。另外还有一种基于组合标记的 SPLiT-seq<sup>[47]</sup>, 该技术成本低廉, 能够在一次试验中对成千上万个固定的细胞或细胞核进行转录分析且不需要将单个细胞划分为单独的隔间(液滴、微孔), 而是依赖于细胞本身作为隔间。测序的整个工作流程只包括移液步骤, 不需要复杂的仪器。

## 2 单细胞制备

### 2.1 单细胞悬液准备

单细胞分离是单细胞测序最关键的步骤, 为了在下游分析过程中保持细胞的存活力, 寻找温和有效的单细胞分离方法非常必要。单细胞测序前需将组织解离为单细胞悬液, 其分离方法多样, 一般用酶消化法, 对于结构较复杂的组织多采用机械和酶组合的方式解离, 比如毛囊单细胞的解离, 对皮肤组织进行清洗消毒后, 剪成 0.5 cm × 0.2 cm 的小长条用 dispase 酶消化 2 h, 在体式显微镜下拔出单根毛囊置于培养皿中, 再添加 0.25% 胰蛋白酶消化 0.5 h 后经反复吹打、过滤、离心制备成单细胞悬液。之后再通过清洗、稀释、利用微流控或者是 FACS 对细胞进行捕获。为减少细胞聚团, 在酶消化过程中可加入 Dnase I 消化核酸而不损伤完整的细胞。

在细胞捕获前, 原代解离的细胞悬液会存在一定的杂质、较大的细胞碎片或者团块, 一般采用孔径大于最大细胞直径的细胞筛过滤, 过滤两次, 较小的杂质可采用离心清洗来去除, 离心过程中要使细胞汇集不能太紧实, 而且上清液中的细胞要尽可能少, 一般使用 300 × g, 离心 5 min<sup>[48]</sup>, 由重力差细胞汇集到底部, 杂质会漂浮在上清液中, 弃上清后用含 0.04% 牛血清蛋白无钙镁离子的磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行重悬, 为尽量减少剪切力对细胞的损伤, 一般采用宽移液管对细胞进行重悬。细胞悬液制备好后, 防止细胞放置时间长导致活率降低应尽快完成后续试验。

### 2.2 单细胞的分离技术

近年来, 众多研究者对单细胞分离的方法进行

持续的探究和改进,常用的单细胞分离技术有:有限稀释法、荧光激活细胞分选、显微操作技术、微流控技术和激光捕获显微切割技术(图1)。

**2.2.1 有限稀释法** 有限稀释法(limiting dilution)多用于不同组织的干细胞或前体细胞的体外克隆分析,该方法将细胞悬液经过一系列不同梯度稀释,直至获取单个细胞(图1-a),凭借梯度稀释计算,不能直观的分选单细胞,这种方法对设备和操作的要求较小,操作简单,成本低廉,但分离单细胞的成功率不高,对梯度稀释的计算依赖性强,容易出现分离误差或细胞丢失,耗时长,通量低,不能准确地过滤靶细胞<sup>[49-51]</sup>。

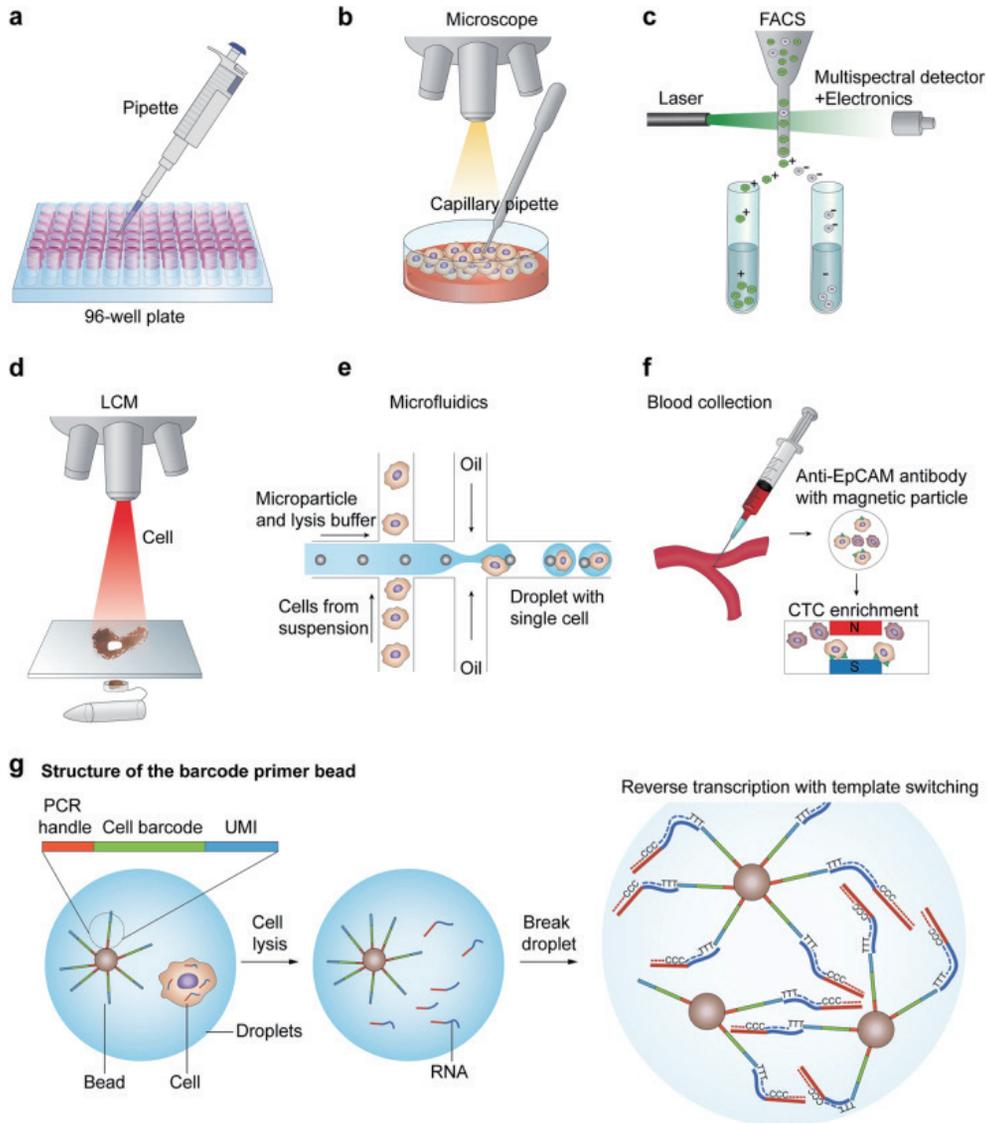
**2.2.2 显微操作法** 显微操作法(micromanipulation)主要在目标细胞稀少的情况下应用,利用显微操作仪联合显微镜观察,操作者选择一个特定的细胞,近距离移动口吸管,并通过对口吸管施加吸力来对单个细胞进行挑选,挑选出来再对其进行更深一步的研究(图1-b)。显微操作主要用于培养细胞系或者是从早期胚胎中分离单个细胞。这种方法对细胞的活性和状态影响较小,成本低,但容易造成RNA降解、通量低、投入人力较多,不利于规模化应用<sup>[52-53]</sup>。

**2.2.3 荧光激活细胞分选技术** 流式细胞术是一种通过单种或多种激光对PBS中的单个细胞或者离子快速分析的技术<sup>[54]</sup>(图1-c)。流式细胞仪的荧光激活分选系统通过激光激发,被荧光抗体标记物标记的细胞经过特定的激光束,再根据不同细胞接收的激光信号的偏转情况捕获单个细胞,该过程细胞悬液是通过流动细胞的压力驱动的,细胞流迅速通过激光束被光激发,下游使用光学检测器来捕获细胞特定的信号而达到分选的目的。虽然实验过程复杂,但是实验技术已经成熟,且有统一的标准可供参考。该技术的准确度和通量都很高,能快速检测细胞的物理和化学参数;但是对悬浮细胞的数量要求较大(>10 000),不适用于低丰度的细胞以及没有表面标记抗体和未知的细胞的分选。

**2.2.4 激光捕获显微切割技术** 激光显微切割技术(laser capture microdissection)是单细胞水平上对固体组织分析的有力工具,多用于从固定组织样本中分离单个细胞<sup>[55]</sup>(图1-d)。基本原理是在显微镜下

使用UV(320-400 nm)激光选择性地从冰冻或石蜡包埋组织切片热塑膜的涂片上准确的切割单细胞,但是该技术成本高、通量低、精度有限。细胞核很容易被切割掉,导致一些染色体片段在操作过程中丢失,切割过程中可能涉及原生质体成份或相邻细胞受损的细胞核,且分离过程中原始的RNA极易降解,没有全长分子用于反转录,RNA失去了它的完整性从而导致细胞群体出现偏差<sup>[56-57]</sup>。最近一项名为Smart-3SEQ<sup>[58]</sup>的新技术避免了该情况的出现,它结合了SMART<sup>[41]</sup>方法中的模板切换和Smart-seq2<sup>[40]</sup>的优化步骤采用3SEQ<sup>[59]</sup>的3'端表达定位法而产生一个非常简单的程序。在3SEQ中,RNA在反转录之前被碎裂,这样便消除了完整样品和降解样品之间的差异。反转录仍然是由锚定寡核苷酸(dT)引物启动的,在每个转录物中,只有含poly(A)尾部起始的片段被测序。Smart-3SEQ与石蜡切片组织的相容性打开了大量存档的临床样本,与LCM相结合,它允许对小细胞群体和原位分离的单个细胞进行前所未有的研究<sup>[58]</sup>。

**2.2.5 微流控技术** 近年来,基于液滴技术的微流控或者芯片设备被开发出来用于单细胞的分离与分析<sup>[60-61]</sup>(图1-e)。随着微流控装置的引入,迅速使其成为分离细胞的首选技术,相对于先前使用方法,它需要的试剂体积更小。在微流控器件中,流体动力通量使得细胞在几十到几百微米的通道中被分离和处理,此外,微流控设备还可以自动处理一些下游的RNA反应,并允许测量和控制细胞外试剂浓度<sup>[62]</sup>。微流控技术(microfluidics)的基本原理是微液滴技术通常利用油相来剪切水相,形成表面活性剂稳定的水液滴,两种不混溶的流体在T型管中汇合时,来自水相的单细胞被包裹在液滴中,形成油包水的状态<sup>[63]</sup>。该技术不仅可以在短时间内产生大量的油包水液滴,而且可以提供独立的分离室进行单细胞分析,防止交叉污染。虽然基于液滴的单细胞分离取得了巨大的进展,但要保证油包水中不超过一个细胞的封装仍然是一个挑战。传统的方法是根据泊松分布使用有限的稀释,这将导致单细胞的占用率低,且会出现大量的空液滴。为了最大限度地提高单细胞液滴的比例,可以在乳化前通过惯性聚焦均匀间隔单细胞,将单细胞占用效率提高到



a : 有限稀释法 ; b : 显微操作法 ; c : 荧光激活细胞分选技术 ; d : 激光捕获显微切割技术 ; e : 微流控技术

a : Serial dilution. b : Micromanipulation. c : Fluorescence activated cell sorting technique. d : Laser capture microdissection. e : Microfluidic technology

图 1 常用的单细胞分离技术 部分引自 [26]

Fig. 1 Commonly used single cell isolation techniques Part cited from [26]

80%<sup>[63]</sup>。综上所述，基于液滴的技术具有成本低、通量高、制作简单、规模大、速度快等优点，但仍存在着单细胞含液滴率低、实时监控不便的问题。

### 3 scRNA-seq 不同测序方法比较

scRNA-seq 方法可分为 3 个步骤进行：(1) 反转录；(2) cDNA 扩增；(3) 测序文库构建。反转录非常关键，scRNA-seq 的效果很大程度上取决于这一步的效率。反转录过程中，约有 10%–20% 转

录本被成功的反转录为 cDNA<sup>[64]</sup>，这就导致一些低表达量的基因无法被检测到，从而引入较高的技术偏差，也即技术噪音 (technical noise)。单细胞测序中，常以尽量减少操作和利用单管反应来避免部分 RNA 损失，再用反转录法合成 cDNA。除了基于引物设计的 RNA 测序 DP-Seq<sup>[65]</sup>，为了防止捕获核糖体 RNA 或转移 RNA 占比较高的细胞 RNA，一般使用 poly (T) 启动来执行反转录，使用这个方法，非

多聚腺苷酸化编码蛋白质的 RNA 不会被捕获<sup>[66]</sup>。后来开发的 SUPeR-seq 弥补了这一缺陷, 它被用于对单个细胞中的多聚嘌呤化和非多聚腺苷化 RNA 进行测序<sup>[67]</sup>。该方法使用具有固定锚定序列的随机引物 (AnchorX-T15N6) 代替常用的寡核苷酸 (DT) 进行 cDNA 的合成。SUPeR-seq 能检测到单个细胞的多聚腺苷酸和非多聚腺苷酸 RNA, 且基因组 DNA 和 rRNAs 的污染可忽略不计<sup>[67]</sup>。但是该方法还没有与除了 Tang 2009 以外的其他较广泛使用的方法相比较。据后来报道称 MATQ-seq 比 Smart-seq2 更为敏感和准确<sup>[68]</sup>。MATQ-seq 提供了完整的基因覆盖和允许检测总 RNA, 这是一个很大的改进, 这种改进是基于 MALBAC (多重退火和循环扩增循环) 引物的使用。这些 MALBAC 引物包含 27 个常用序列, 其后是 5 个随机核苷酸, 它们仅在 3' 端不同, 分别为 T20 或 G3/A3/T3, 这样大大提高了反转录和 PCR 扩增的效率。

反转录后, 可以采用不同的方法合成第二链, 一是 SMART 技术采用转录酶和 M-MLV 转录酶 (小鼠白血病病毒逆转录酶) 的一链转换活性将模板转换寡核苷酸作为下游 PCR 扩增的接头<sup>[69]</sup>。SC3-

seq<sup>[70]</sup>、STRT-seq<sup>[71]</sup>、Smart-Seq2<sup>[40]</sup> 三个平台都是使用 PCR 的方法进行扩增, PCR 虽然是一种快速和广泛使用的方法, 但其缺点是会导致指数扩增, 使得高表达的转录物最终在文库中被过度表达<sup>[72]</sup>。此外, 由于对不同转录种的扩增效率不同, PCR 扩增会造成定量偏差, 导致原始转录物丰度信息的丢失和非特异性转录片段的积累。为了避免这一情况的出现, CEL-seq2<sup>[73]</sup> 和 MARS-Seq<sup>[27]</sup> 利用 IVT 线性扩增来合成 cDNA, 通过在 polyd (T) 引物中加入 T7 启动子, 在第二链合成后进行 IVT。互补 RNAs 要么被碎片化与 3' 端接头连接, 要么用随机引物进行另一轮反转录以提高敏感性 (CEL-seq2)。与 PCR 相比, IVT 优势在于线性扩增, 即使实验中对低表达转录物的敏感性很低, 它也不会以指数的形式消耗难以处理的序列。IVT 比 PCR 工作强度更大, 因为它需要对扩增的 RNA 进行额外的一轮的反转录, 这通常会导致提前终止和富集 3' 端 RNA 片段的积累 (强烈的 3' 端偏好性), 从而无法检测到样本完整的转录组信息<sup>[74-75]</sup>。以上涉及的单细胞测序技术均列表比较 (表 1)。

目前, 大多数测序都是使用 NextEra 试剂盒进

表 1 单细胞测序技术汇总

Table 1 Summary of single cell sequencing techniques

方法 Method	cDNA 合成 cDNA synthesis	扩增方法 Amplification method	捕获细胞量 Quantity of captured cells	cDNA 覆盖 cDNA cover	Barcode	UMI	参考文献 Reference
Tang2009	polyA 尾	PCR	~10	3' 端偏移的全长	No	No	[23]
Quartz-seq	polyA 尾	PCR	1 000-10 000	3' 端偏移的全长	No	No	[76]
SUPeR-seq	polyA 尾	PCR	~10	全长	Yes	No	[67]
MATQ-seq	polyA 尾	PCR	10-100	全长	Yes	Yes	[68]
STRT-seq	5' 端模板转换	PCR	100-1 000	5' 末端	Yes	Yes	[37]
Smart-seq	5' 端模板转换	PCR	100-1 000	3' 偏倚的全长	No	No	[41]
10xGenomics	5' 端模板转换	PCR	1 000-10 000	3' 末端	Yes	Yes	[44]
Seq-well	5' 端模板转换	PCR	100-1 000	3' 末端	Yes	Yes	[46]
Microwell-seq	5' 端模板转换	PCR	100-10 000	全长	Yes	Yes	[45]
Drop-seq	5' 端模板转换	PCR	1 000-10 000	3' 末端	Yes	Yes	[43]
CEL-seq	IVT	IVT	100-1 000	3' 末端	Yes	Yes	[73]
MARS-seq	IVT	IVT	1 000-5 000	3' 末端	Yes	Yes	[27]
inDrops	IVT	IVT	1 000-10 000	3' 末端	Yes	Yes	[42]

行文库构建, Illumina 平台进行测序, 然而, 扩增后得到的 cDNA 文库与所有平台都兼容, 比如: SC3-

seq 被设计使用 SOLiD 系统进行测序<sup>[70]</sup>。最近使用唯一分子标识符 (UMIs) 来改善 scRNA-seq 建库,

它在反转录过程中对细胞内的每个单独的 mRNA 分子标记上条形码。从 PCR 复制标签产生的排序读数将具有相同的随机条形码序列。因此，如果考虑到实验的初始 RNA 捕获率（或效率），则给定细胞裂解物中转录本的拷贝数等于与映射到转录本的所有标签相关联的 UMI 的数量。使用 UMIs 时的一个重要考虑因素是，为了实现转录本丰度的准确量化，需要进行饱和测序。到目前为止，最广泛使用的方法是在反应细胞裂解物中加入外部 mRNA，这提供了关于分子输入数量和观察到的测序读数之间的关系的信息。

#### 4 scRNA-seq 在 HF 发育研究中的应用

scRNA-seq 对揭示组织、器官以及胚胎的发育过程的异质性具有很好的优势，HF 的发育是一个非常复杂的过程，如果能够通过高通量测序技术识别 HF 形态发生和周期性生长阶段不同细胞亚群的基因表达谱，从基因表达调控的整体特征上研究 HF 形态发生和周期性生长阶段的分子机制，筛选特异调控 HF 形态发生和周期性生长阶段的调控元件或功能基因，从而揭示参与 HF 发育整个过程的细胞群体的异质性，将对畜禽品种的培育以及治疗人类毛发疾病具有很好的理论指导。利用 scRNA-seq 对 HF 的研究最早在 2016 年，Joost 等<sup>[19]</sup>利用 scRNA-seq 对成年小鼠 HF 进行测序，通过对休止期 HF 的 1 422 个单细胞进行了转录组学分析，聚类到 25 类不同转录水平的细胞亚群，解释了表皮的转录异质性是由表皮分化和 HF 近 - 远轴相关的基因表达模式的相互作用形成的，并揭示了形成表皮和 HF 的分化轨迹和空间特征。后来又运用 scRNA-seq 和单分子 RNA 荧光原位杂交（FISH）对小鼠生长期和休止期 HF 的分子解剖学进行研究，并得到 56 个表皮细胞和基质细胞群的基因表达谱和空间位置，并揭示了协调毛发生长的细胞类型和状态的分子机制、潜在的祖细胞谱系分化、成纤维细胞的异质性和上皮 - 基质细胞的相互作用的细胞类型和状态<sup>[20]</sup>。还有研究运用 scRNA-seq 对绒山羊胚胎期 HF 形态发生过程进行测序，鉴定到胚胎期 HF 形态发生过程中的主要细胞类型以及相关细胞的标记基因，构建

了绒山羊真皮以及表皮细胞谱系在 HF 形态发生中的分化轨迹<sup>[77]</sup>。

##### 4.1 发现新的细胞亚群

单细胞质控完成后，相同类型的细胞一般具有相似的表达谱。因此可以通过表达相似性对细胞进行聚类，从而将各细胞类型的细胞分离成独特的细胞群。小鼠休止期 HF 单细胞测序研究人员<sup>[19]</sup>对其进行两个水平的聚类，一水平的聚类分为外凸（outer bulge）、内凸（inner bulge）、毛囊上部（upper HF）、上皮基部（basal IFE）四大类，第二水平将这 4 类再进行亚聚类，经再次聚类 upper HF 分为 7 个亚群，其中 5 个是已知的（uHF III-VII），发现两个新的细胞群（uHF I and uHF I）<sup>[19]</sup>。新的亚群位于皮脂腺开口的周围，通过 Rbp1 表达以及 Defb6 和 Cst6 高表达来区分。接着研究人员又利用单细胞 RNA 测序和单分子 RNA FISH 来对小鼠生长期和休止期皮肤进行了研究，作者鉴定出毛囊外根鞘（ORS）部分，并定义了 3 个细胞群。分别为 Msx2 progeny cluster（Msx2+）、Suprabasal outer layers cluster1（sbOL）、basal outer layers cluster2（bOL），其中后面两个细胞群之前未报道过，在 UMAP 上，bOL 和 sbOL 簇之间的表观距离表明，这两个细胞群体在成熟的生长期 HF 中是不通过中间状态连接的。后面根据未剪接和剪接的 mRNA 的表达模式（RNA 速率）来验证了这两类细胞身份的动态<sup>[78]</sup>，并发现 bOL 和 sbOL 在生长后期是不同的细胞群，因为 RNA 速率中并未发现两个细胞簇之间有任何过渡迹象。这些新的发现揭示了 ORS 和内部 HF 层如何协调头发的产生。

##### 4.2 发现新的标记基因

由于技术的更新，发现很多保守的标记基因已经不仅仅在特定组织中特异性表达，而是在不同类型的细胞中也能监测到。在 2015 年，Sennett 等<sup>[79]</sup>利用免疫荧光对不同类型的早期胚胎 HF 细胞进行了标记，通过流式分选，得到 8 个不同类型细胞群，经 RNA-seq 测序建立了整个胚胎皮肤不同类型细胞的基因表达谱，并发现了许多标记基因。这是首次对 HF 形态发生过程中不同类型细胞的特异性分子进行描述。流式分选对表面抗原标记基因的保守性

要求很严格,只有分选到高纯度的目的细胞群才能反映其特异的基因表达谱。在当时还没发现某些细胞群体在分化过程中会经历不同的阶段,因此这样得到的特异性分子保守性并不高。

后来,该团队带着 DC 特化的时间过程与祖细胞和信号传递之间的关系等问题进一步利用实时成像、流式分选、scRNA-seq 和 RNA-seq 等方法根据特化过程中基因的动态变化和细胞在发育中的拟时序命运的分子时间推移,定义了从 Fb 到 DC 前体的细胞命运轨迹。DC 特化过程总共经历了 fibroblast、pre-DC、DC1 以及 DC2 四个阶段,但是在前面的研究中中间的分化阶段是不存在的,技术的发展借助于单细胞测序,使得细胞之间的异质性得以展现,且还发现了新的标记基因,pre-DC 阶段的标记基因有 *Smad3*、*Lef1* 和 *Twist2*; DC1 阶段特异性表达 *Foxd1*、*Prdm1*、*Sox18* 和 *Trps1*; DC2 阶段特异性表达 *Glis2*、*Foxp1*、*Alx4*、*Hey1* 以及 *Hes5*<sup>[18, 77]</sup>。葛伟<sup>[77]</sup>在研究绒山羊胚胎期 HF 形态发生过程中决定表皮与真皮细胞命运的基因表达转录谱中发现绒山羊与小鼠的 DC 细胞特化过程的基因表达谱与分化阶段是一致的,都依次经历 fibroblast、pre-DC、DC1 以及 DC2 四个阶段<sup>[18]</sup>。

scRNA-seq 在 IFE 和 HF 的亚型分类研究中具有较高的分辨率,可以区分基底和漏斗处干细胞群的静止和中间细胞状态<sup>[80]</sup>。毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)位于 HF 永久部分的下部的隆起区<sup>[5-6]</sup>,在哺乳动物的毛发周期中参与自我更新、迁移和分化。近期,研究者采用单细胞测序阐述 HFSCs 在生长中期自我更新的异质性研究中,在主要类群中发现了一个由增殖细胞组成的亚群(Proli)不与任何凸起(Bu)或 ORS 种群聚集,并通过基因富集分析(GSEA)鉴定到新的标记基因,分别为 Bu 新标记基因 *Dmkn1*、*Crip1*、*Sostdc1*、*Ptn* 和 *Calml3*; 外根鞘上基底层(upORS-BL)新标记基因 *Gnmt*、*Abi3bp*、*Edn2*、*Angptl4* 和 *Igfbp4*; 外根鞘下基底层(lowORS-BL)新标记基因 *Tagln*、*Slc39a10*、*Acta2*、*Igfbp7* 和 *Rasl11a*; 外根鞘上基部(ORS-SB)新标记基因 *Pthlh*、*Ctsc*、*Mgst1*、*Wfdc18*、*Cldn*<sup>[81]</sup>。这些标记基因在未来可作为细胞消融、谱系追踪和

基因靶向研究的有力工具。

#### 4.3 揭示 HF 发育过程的分化轨迹

单细胞基因表达研究使人们能够对复杂的生物过程和高度异质性的细胞群体中涉及的转录调控进行进一步的认知。HF 的形态发生是一个连续的过程,在发育过程中经历了许多的中间分化状态,而这些中间分化状态最好的展现就是分化轨迹图,分化轨迹的出现有利于发现某些细胞亚群在阶段分化过程中的特异性表达基因。在对细胞的异质性以及基因表达谱描述之后,利用细胞谱系关系构建分化轨迹图,细胞间的变化轨迹图能清晰的反应细胞随着时间的变化过程,例如:在绒山羊胚胎期 HF 不同发育阶段分化过程的细胞轨迹图中表现出真皮谱系分化主要涉及 DP 和 DC 细胞的特化过程,而表皮细胞谱系分化主要涉及角化细胞、毛干细胞以及上皮细胞的特化过程<sup>[77]</sup>。细胞谱系关系在分化轨迹上呈现之后,就可以分析参与阶段性分化过程的关键基因的表达趋势,进而挖掘到新的标记基因。这样也可以使我们对 HF 发育过程中细胞之间关系了解得更加透彻。

#### 4.4 揭示 HF 发育过程中的关键调控因子

HF 发育的谱系分化过程经分化轨迹图展示以后,将进一步探索整个命运获取过程中的基因表达谱和参与转录调控的关键转录因子。上述的研究通过 scRNA-seq 分析建立从 Fb 到 DC2 的分化轨迹的伪时间排序后,单细胞拟时序分析发现在 pre-DC 命运获取、DC1 聚类和 DC2 毛发胚生长下降阶段出现了 3 处基因上调的峰,这 3 处峰包含了许多的转录因子,比如在 pre-DC 阶段, *Lef1*、*Twist2*、*Smad3* 等显著高表达。这表明这些因子在 DC 特化过程的 pre-DC 阶段起到了关键作用。有报道称,小鼠的 *Twist2* 基因敲除之后背部皮肤会出现毛发稀少,还伴随着其他异常情况<sup>[82]</sup>, *Lef1* 敲除则会导致胡须和背部毛囊无法形成<sup>[83]</sup>,为了验证这一结果,研究人员通过 FISH 证实了 *Twist2* 基因只在 pre-DC 阶段的 mRNA 中表达,而在随后的 DC1 阶段却不表达,这一结果更加证实了这些转录因子在阶段表达中起到的重要作用。到了 DC1 阶段中间表达的转录因子包

括 *Prdm1*、*Trps1*、*Sox18*、*Tshz1* 和 *Foxd1*。这一点与前人相关研究报道一致，*Trps1* 基因的突变与阿姆布拉斯综合征（一种高度变性疾病，表现为毛囊数量异常增多）高度相关<sup>[84]</sup>。*Sox18* 在小鼠中的突变会影响真皮乳头的分化<sup>[85]</sup>，另外，在 DC2 阶段有许多特异性高表达的转录因子，包括 *Hey1*、*Hes5*、*Glis2*、*Foxp1* 和 *Alx4*。其中 *Foxp1* 是一个已知的在毛囊发育过程中维持 HFSCs 静止（未分化）状态的重要转录因子<sup>[86]</sup>。通过以上的研究可知，scRNA-seq 对 HF 发育研究是一个非常有利的工具。

## 5 展望

近年来，scRNA-seq 技术取得了很大进步，多种 scRNA-seq 平台相继问世。scRNA-seq 的发展和创新很大程度上促进了单细胞转录组的研究，并为调控皮肤表皮和 HF 相关细胞的表达特异性和动态平衡提供了更大的清晰度。原位杂交联合单细胞测序的方法为我们对 HF 的研究带来很大的便利，通过这些方法可以让我们对研究方向有更进一步的认知，利用单细胞测序技术解析哺乳动物 HF 形态发生以及生长发育的调控机制，对于治疗人类毛发疾病也将有一定的借鉴意义。此外，随着细胞条形码和微流控技术的进步，scRNA-seq 的通量得到显著增加。同时，对固定和冷冻样品的 scRNA-seq 方法最近被提出，这将极大地有利于高度异质性临床样品的研究。但是，目前可用的 scRNA-seq 方法仍然存在基因丢失率高的问题，这种情况下低表达的基因会在检测过程中被遗漏。近些年随着对 HF 单细胞由于分离技术限制性的克服，对 HF 单细胞水平的调控机制研究正在兴起。我们相信不久的将来随着技术的不断发展，一定会为 HF 发育的分子调控机制和动力学提供更科学、深入的解析。

## 参考文献

- [1] Fuchs E. Scratching the surface of skin development [J]. *Nature*, 2007, 445 (7130): 834-842.
- [2] Niemann C, Watt FM. Designer skin : lineage commitment in postnatal epidermis [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12 (4): 185-192.
- [3] Fuchs E. Epidermal differentiation : the bare essentials [J]. *J Cell Biol*, 1990, 111 : 2807-2814.
- [4] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells [J]. *Cell*, 2001, 104 (2): 233-245.
- [5] Guasch G, Blanpain C. Defining the epithelial stem cell niche in skin [J]. *Med Sci ( Paris )*, 2004, 20 (3): 265-267.
- [6] Morris RJ, Liu Y, Marles L, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22 (4): 411-417.
- [7] Wu Z, Sun L, Liu G, et al. Hair follicle development and related gene and protein expression of skins in Rex rabbits during the first 8 weeks of life [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2019, 32 (4): 477-484.
- [8] Messenger AG, Botchkareva NV. Unraveling the secret life of the hair follicle : from fungi to innovative hair loss therapies [J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26 (6): 471.
- [9] Botchkarev VA, Paus R. Molecular biology of hair morphogenesis : development and cycling [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2003, 298 (1): 164-180.
- [10] Watabe R, Yamaguchi T, Kabashima-Kubo R, et al. Leptin controls hair follicle cycling [J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23 (4): 228-229.
- [11] Mikkola ML. Genetic basis of skin appendage development [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18 (2): 225-236.
- [12] Clavel C, Grisanti L, Zemla R, et al. Sox2 in the dermal papilla niche controls hair growth by fine-tuning BMP signaling in differentiating hair shaft progenitors [J]. *Dev Cell*, 2012, 23 (5): 981-994.
- [13] Morgan BA. The dermal papilla : an instructive niche for epithelial stem and progenitor cells in development and regeneration of the hair follicle [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4 (7): a015180.
- [14] Yang H, Adam RC, Ge Y, et al. Epithelial-mesenchymal micro-niches govern stem cell lineage choices [J]. *Cell*, 2017, 169 (3): 483-496. e413.
- [15] Sequeira I, Nicolas JF. Redefining the structure of the hair follicle by 3D clonal analysis [J]. *Development*, 2012, 139 (20): 3741-3751.
- [16] Ge W, Tan SJ, Wang SH, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals dermal and epithelial cell fate decisions during embryonic hair follicle development [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (17): 7581-7598.

- [ 17 ] Saxena N, Mok KW, Rendl M. An updated classification of hair follicle morphogenesis [ J ] . *Exp Dermatol*, 2019, 28 ( 4 ) : 332-344.
- [ 18 ] Mok KW, Saxena N, Heitman N, et al. Dermal condensate niche fate specification occurs prior to formation and is placode progenitor dependent [ J ] . *Dev Cell*, 2019, 48 ( 1 ) : 32-48. e35.
- [ 19 ] Joost S, Zeisel A, Jacob T, et al. Single-cell transcriptomics reveals that differentiation and spatial signatures shape epidermal and hair follicle heterogeneity [ J ] . *Cell Syst*, 2016, 3 ( 3 ) : 221-237. e229.
- [ 20 ] Joost S, Annusver K, Jacob T, et al. The molecular anatomy of mouse skin during hair growth and rest [ J ] . *Cell Stem Cell*, 2020, 26 ( 3 ) : 441-457. e447.
- [ 21 ] Dexter DL, Spremulli EN, Fligiel Z, et al. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma [ J ] . *Am J Med*, 1981, 71 ( 6 ) : 949-956.
- [ 22 ] Yasen A, Aini A, Wang H, et al. Progress and applications of single-cell sequencing techniques [ J ] . *Infect Genet Evol*, 2020, 80 : 104198.
- [ 23 ] 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.
- [ 24 ] Tang X, Huang Y, Lei J, et al. The single-cell sequencing : new developments and medical applications [ J ] . *Cell Biosci*, 2019, 9 : 53.
- [ 25 ] Stegle O, Teichmann SA, Marioni JC. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics [ J ] . *Nat Rev Genet*, 2015, 16 ( 3 ) : 133-145.
- [ 26 ] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [ J ] . *Exp Mol Med*, 2018, 50 ( 8 ) : 96.
- [ 27 ] 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.
- [ 28 ] Crow M, Paul A, Ballouz S, et al. Characterizing the replicability of cell types defined by single cell RNA-sequencing data using MetaNeighbor [ J ] . *Nat Commun*, 2018, 9 ( 1 ) : 884.
- [ 29 ] Usoskin D, Furlan A, Islam S, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing [ J ] . *Nat Neurosci*, 2015, 18 ( 1 ) : 145-153.
- [ 30 ] Papalexli E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [ J ] . *Nat Rev Immunol*, 2018, 18 ( 1 ) : 35-45.
- [ 31 ] Farrell JA, Wang Y, Riesenfeld SJ, et al. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis [ J ] . *Science*, 2018, 360 ( 6392 ) : eaar 3131.
- [ 32 ] Semrau S, Goldmann JE, Soumillon M, et al. Dynamics of lineage commitment revealed by single-cell transcriptomics of differentiating embryonic stem cells [ J ] . *Nat Commun*, 2017, 8 ( 1 ) : 1096.
- [ 33 ] Packer J, Trapnell C. Single-cell multi-omics : an engine for new quantitative models of gene regulation [ J ] . *Trends Genet*, 2018, 34 ( 9 ) : 653-665.
- [ 34 ] Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq [ J ] . *Science*, 2017, 355 ( 6332 ) : eaai 8478.
- [ 35 ] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [ J ] . *Science*, 2014, 344 ( 6190 ) : 1396-1401.
- [ 36 ] Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing [ J ] . *Mol Cell*, 2015, 58 ( 4 ) : 610-620.
- [ 37 ] 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.
- [ 38 ] Natarajan KN. Single-cell tagged reverse transcription ( STRT-Seq ) [ J ] . *Methods Mol Biol*, 2019, 1979 : 133-153.
- [ 39 ] 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.
- [ 40 ] 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.
- [ 41 ] 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.
- [ 42 ] 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.
- [ 43 ] 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.
- [ 44 ] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [ J ] . Nat Commun, 2017, 8 : 14049.
- [ 45 ] Han X, Wang R, Zhou Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by microwell-seq [ J ] . Cell, 2018, 172 ( 5 ) : 1091-1107. e1017.
- [ 46 ] Gierahn TM, Wadsworth MH, Hughes TK, et al. Seq-Well : portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput [ J ] . Nat Methods, 2017, 14 ( 4 ) : 395-398.
- [ 47 ] Rosenberg AB, Roco CM, Muscat RA, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding [ J ] . Science, 2018, 360 ( 6385 ) : 176-182.
- [ 48 ] Lafzi A, Moutinho C, Picelli S, et al. Tutorial : guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies [ J ] . Nat Protoc, 2018, 13 ( 12 ) : 2742-2757.
- [ 49 ] Navin NE. Cancer genomics : one cell at a time [ J ] . Genome Biol, 2014, 15 ( 8 ) : 452.
- [ 50 ] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumor evolution inferred by single cell sequencing [ J ] . Nature, 2011, 472 ( 7341 ) : 90-94.
- [ 51 ] Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, et al. Determining mammosphere-forming potential : application of the limiting dilution analysis [ J ] . J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012, 17 ( 2 ) : 119-123.
- [ 52 ] 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.
- [ 53 ] Sato T, Hongoh Y, Noda S, et al. Candidatus Desulfovibrio trichonymphae, a novel intracellular symbiont of the flagellate Trichonympha agilis in termite gut [ J ] . Environ Microbiol, 2009, 11 ( 4 ) : 1007-1015.
- [ 54 ] McKinnon KM. Flow cytometry : an overview [ J ] . Curr Protoc Immunol, 2018, 120 : 5. 1. 1-5. 1. 11.
- [ 55 ] Nakamura N, Ruebel K, Jin L, et al. Laser capture microdissection for analysis of single cells [ J ] . Methods Mol Med, 2007, 132 : 11-18.
- [ 56 ] Tang F, Hajkova P, Barton SC, et al. 220-plex microRNA expression profile of a single cell [ J ] . Nat Protoc, 2006, 1 ( 3 ) : 1154-1159.
- [ 57 ] Sansonno D, Lauletta G, Dammacco F. Detection and quantitation of HCV core protein in single hepatocytes by means of laser capture microdissection and enzyme-linked immunosorbent assay [ J ] . J Viral Hepat, 2004, 11 ( 1 ) : 27-32.
- [ 58 ] Foley JW, Zhu C, Jolivet P, et al. Gene expression profiling of single cells from archival tissue with laser-capture microdissection and Smart-3SEQ [ J ] . Genome Res, 2019, 29 ( 11 ) : 1816-1825.
- [ 59 ] Beck AH, Weng Z, Witten DM, et al. 3'-end sequencing for expression quantification ( 3SEQ ) from archival tumor samples [ J ] . PLoS One, 2010, 5 ( 1 ) : e8768.
- [ 60 ] Sims CE, Allbritton NL. Analysis of single mammalian cells on-chip [ J ] . Lab Chip, 2007, 7 ( 4 ) : 423-440.
- [ 61 ] Lecault V, White AK, Singhal A, et al. Microfluidic single cell analysis : from promise to practice [ J ] . Curr Opin Chem Biol, 2012, 16 ( 3-4 ) : 381-390.
- [ 62 ] Luni C, Giulitti S, Serena E, et al. High-efficiency cellular reprogramming with microfluidics [ J ] . Nat Methods, 2016, 13 ( 5 ) : 446-452.
- [ 63 ] Xu X, Wang J, Wu L, et al. Microfluidic single-cell omics analysis [ J ] . Small, 2020, 16 ( 9 ) : e1903905.
- [ 64 ] Islam S, Zeisel A, Joost S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers [ J ] . Nat Methods, 2014, 11 ( 2 ) : 163-166.
- [ 65 ] Bhargava V, Ko P, Willems E, et al. Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification [ J ] . Sci Rep, 2013, 3 : 1740.
- [ 66 ] Hebenstreit D. Methods, Challenges and potentials of single cell RNA-seq [ J ] . Biology ( Basel ) , 2012, 1 ( 3 ) : 658-667.
- [ 67 ] Fan X, Zhang X, Wu X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos [ J ] . Genome Biol, 2015, 16 ( 1 ) : 148.
- [ 68 ] 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.
- [ 69 ] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching : a SMART approach for full-length cDNA library construction [ J ] . Biotechniques, 2001, 30 ( 4 ) : 892-897.
- [ 70 ] 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.
- [ 71 ] Islam S, Kjällquist U, Moliner A, et al. Highly multiplexed and

- strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing [ J ] . Nat Protoc, 2012, 7 ( 5 ) : 813-828.
- [ 72 ] Aird D, Ross MG, Chen WS, et al. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries [ J ] . Genome Biol, 2011, 12 ( 2 ) : R18.
- [ 73 ] Hashimshony T, Senderovich N, Avital G. et al. CEL-Seq2 : sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq [ J ] . Genome Biol, 2016, 17 ( 1 ) : 1-7.
- [ 74 ] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [ J ] . Mol Cell, 2017, 65 ( 4 ) : 631-643. e634.
- [ 75 ] Liang J, Cai W, Sun Z. Single-cell sequencing technologies : current and future [ J ] . J Genet Genomics, 2014, 41 ( 10 ) : 513-528.
- [ 76 ] Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, et al. Erratum to : Quartz-Seq : a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity [ J ] . Genome Biol, 2017, 18 ( 1 ) : 9.
- [ 77 ] 葛伟. 单细胞分辨率解析绒山羊及小鼠毛囊发生的转录调控机制 [ D ] . 杨凌 : 西北农林科技大学, 2019.
- Ge W. Dissecting the transcriptional regulatory mechanism underlying Cashmere goat and murine hair follicle morphogenesis at single-cell resolution [ D ] . Yangling : Northwest A & F University, 2019.
- [ 78 ] La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, et al. RNA velocity of single cells [ J ] . Nature, 2018, 560 ( 7719 ) : 494-498.
- [ 79 ] Sennett R, Wang Z, Rezza, A, et al. An integrated transcriptome atlas of embryonic hair follicle progenitors, their niche, and the developing skin [ J ] . Dev Cell, 2015, 34 ( 5 ) : 577-591.
- [ 80 ] He W, Ye J, Xu H, et al. Differential expression of  $\alpha 6$  and  $\beta 1$  integrins reveals epidermal heterogeneity at single-cell resolution [ J ] . J Cell Biochem, 2020, 121 ( 3 ) : 2664-2676.
- [ 81 ] Chovatiya G, Ghuwalewala S, Walter LD, et al. High-resolution single-cell transcriptomics reveals heterogeneity of self-renewing hair follicle stem cells [ J ] . Exp Dermatol, 2021, 30 ( 4 ) : 457-471.
- [ 82 ] Šošić D, Richardson JA, Yu K, et al. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity [ J ] . Cell, 2003, 112 ( 2 ) : 169-180.
- [ 83 ] van Genderen C, Okamura RM, Fariñas I, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice [ J ] . Genes Dev, 1994, 8 ( 22 ) : 2691-2703.
- [ 84 ] Fantauzzo KA, Tadin-Strapps M, You Y, et al. A position effect on TRPS1 is associated with Ambras syndrome in humans and the Koala phenotype in mice [ J ] . Hum Mol Genet, 2008, 17 ( 22 ) : 3539-3551.
- [ 85 ] Villani R, Hodgson S, Legrand J, et al. Dominant-negative Sox18 function inhibits dermal papilla maturation and differentiation in all murine hair types [ J ] . Development, 2017, 144 ( 10 ) : 1887-1895.
- [ 86 ] Leishman E, Howard JM, Garcia GE, et al. Foxp1 maintains hair follicle stem cell quiescence through regulation of Fgf18 [ J ] . Development, 2013, 140 ( 18 ) : 3809-3818.

( 责任编辑 张婷婷 )