

· 新进展 ·

单细胞转录组测序及其在心血管疾病中的应用进展

扫描二维码
查看更多胡月^{1,2}, 赵卓^{1,2}

【摘要】 单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 是在单细胞水平对全转录组进行扩增与测序的一项新技术。研究表明, scRNA-seq除了可以揭示心血管细胞多样性、鉴定干细胞分化轨迹及明确细胞间的通讯外, 还可以描述心脏发育及遗传学图谱, 进而有助于促进心血管研究领域取得突破性进展。本文主要综述了scRNA-seq的流程、应用扩展、与其他单细胞技术的比较及其在心血管疾病中的应用进展, 旨在为心血管疾病发病机制及治疗靶点研究提供一定参考。

【关键词】 转录组测序; 单细胞转录组测序; 心血管疾病; 综述

【中图分类号】 R 394-33 R 54 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.027

Single-Cell RNA Sequencing and Its Application Advances in Cardiovascular Diseases HU Yue^{1,2}, ZHAO Zhuo^{1,2}

1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250000, China

2. Department of Cardiology, Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250000, China

Corresponding author: ZHAO Zhuo, E-mail: zhaozhuo1230@163.com

【Abstract】 Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a new technique to amplify and sequence the whole transcriptome at the single cell level. Studies have shown that, in addition to revealing cardiovascular cell diversity, identifying stem cell differentiation tracks and clarifying cellular communication, scRNA-seq can also describe cardiac development and genetic maps, thus contributing to breakthroughs in cardiovascular research. This article reviews scRNA-seq processes, application extensions, and comparison with other single-cell technologies and the advances in its application in cardiovascular diseases, in order to provide reference for the study of pathogenesis and therapeutic targets of cardiovascular diseases.

【Key words】 RNA-seq; scRNA-seq; Cardiovascular diseases; Review

近年随着解剖学、基因组学等学科发展及检查技术改进, 心血管疾病的诊疗水平不断提高, 但目前心脏发育轨迹和分化方向及病理状态下细胞异质性和基因间的相互作用尚不清楚。单细胞技术及组学分析的出现, 促进了心血管精准医学的发展。随着人类基因组计划的完成^[1], 单细胞测序技术呈现迅猛发展, 并为生物医学科学实验研究提供了强有力的技术支持, 其中单细胞转录组测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 是在保证高分辨率的前提下从复杂组织中捕获数千个单细胞的转录谱, 以识别和靶向控制心血管疾病的异常通路及基因, 协助临床医生制定有效的治疗策略。研究表明, scRNA-seq除了可以揭示心血管细胞多样性、鉴定干细胞分化轨迹及明确细胞间的通讯外^[2], 还可以描述心脏发育及遗传学图谱^[3], 进而有助于心血管领域取得突破性进展。本文主要综述了scRNA-seq的流程、应用扩展、与其他单细胞测序技术的比较及其在心血管疾病中的应用进展, 旨在为心血管疾病发病机制及治疗靶点研究提供一定参考。

1 scRNA-seq的流程

自2009年scRNA-seq流程建立以来, 多种scRNA-seq技术平台相继出现, 且在单细胞捕获手段、扩增方式、转录本

覆盖度等方面有不同程度的优化。目前, scRNA-seq基本流程为样品制备、单细胞捕获、扩增与文库制备、测序和数据分析^[4]。

1.1 样品制备 scRNA-seq的基础是使用机械分离和酶消化的方法从组织中分离出单细胞样本, 但不同组织或细胞类型中的细胞培养条件及活力不同, 故采取的组织处理及消化方法有所不同。因此, 研究人员应优化样品制备流程, 最大限度地增加单细胞数量及活性, 同时降低细胞死亡率^[4]。

1.2 单细胞捕获 目前, 单细胞捕获手段随着细胞体积不同而发生改变, 主流单细胞捕获方法有激光捕获、荧光激活细胞分选 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)、微液滴和微流控等^[5-7]。其中FACS是利用散射和荧光信号将细胞分选到96孔板或384孔板上, 细胞样本可以长时间保存, 这提高了实验的灵活性且对细胞的损伤较小, 但基于平板限制其分类的细胞数量有限。Fluidigm C1系统是微流控细胞捕获方法的主要代表之一, 其优点是使用较小体积的细胞悬浮液、细胞外部污染风险较低, 但该系统要求活细胞数量较多、分析规模受限, 且对细胞大小均匀性的要求高、成本较高^[4]。Drop-seq和10× Genomics Chromium系统属于微液滴细胞捕获方法, 其是利用DNA条形码技术对包裹在油滴中的单个细胞进行分析, 可以快速分析数千个单细胞, 大幅减少了每次分析所需时间和成本; 但其仍然存在对mRNA分子捕获率低、在基因检测方面效率不高等缺点^[8]。

作者单位: 1.250000山东省济南市, 山东大学齐鲁医学院

2.250000山东省济南市, 山东第一医科大学附属中心医院内科

通信作者: 赵卓, E-mail: zhaozhuo1230@163.com

1.3 扩增与文库制备 单细胞测序技术突破了传统技术以细胞群体为研究对象、忽略了细胞间异质性的缺点，其是以单细胞为研究对象，对单细胞裂解得到的超微量基因扩增几十万倍以构建能达到测序水平的cDNA文库，进而进行测序及数据分析^[9]。目前，常用的扩增方法主要有两类：基于单细胞全基因组扩增（ingle-cell whole-genome amplification, WGA）和单细胞转录组扩增（whole-transcriptome amplification, WTA），详见图1。

WTA与WGA不同：WTA首先将RNA反转录为cDNA，再以cDNA为对象进行扩增。其中CEL-seq在cDNA合成过程中使用了独特的分子标识，可线性扩增mRNA，从而减少扩增偏倚^[10]，且对于较大范围的转录组扩增具有成本效益。Smart-seq2优先选择全长cDNA作为其末端转移酶活性底物，且允许回收全长cDNA，这进一步完善了反转录过程，增加了单细胞cDNA文库的产量及长度，灵敏度高且扩增偏倚较低；同时，Smart-seq2还可以分析每个单细胞转录本的所有外显子，检测不同剪接变体，其应用领域更为广泛^[11]。

1.4 测序和数据分析 除单细胞基因组测序、scRNA-seq外，单细胞测序技术还包括单细胞表观组测序。单细胞表观组测序的优势为：其是以单细胞水平为基础，可获得全基因组的甲基化水平，这对于表观遗传学的时空特异性研究具有重要意义。与单组学测序技术相比，多组学测序技术可以更系统地了解生物异质性与多样性，通过空间维度信息与时间轨迹结合分析，弥补了单组学测序技术的缺点，丰富了实验结果。

细胞聚类分析是单细胞测序技术特有的数据分析内容，其通过数据库或现有的细胞标记基因，识别细胞特异性标记物，以区分不同的细胞亚群，是数据分析的前提^[12]，在此基础上，可以进行差异表达分析^[13-15]、GO功能聚类分析^[16]、拟时序分析^[17-19]等。

2 scRNA-seq的应用扩展

2.1 细胞互作 细胞互作指细胞间通过受体-配体相结合的

方式进行识别与信号传递，其是生物体维持复杂生命活动的重要前提^[20]。目前，基于scRNA-seq从基因层面探究细胞互作已经取得一定进展。如WANG等^[21]基于scRNA-seq比较健康状态和衰竭状态人心肌细胞和非心肌细胞的相互作用，揭示了非心肌细胞在调节心肌细胞行为方面具有积极作用。此外，多组学整合分析是开展细胞互作研究的新方向，其是将scRNA-seq与免疫检测相结合的单细胞RAID技术^[22]，可以在mRNA和磷酸化蛋白质水平上研究不同类型细胞对环境刺激的反应并捕捉细胞内磷酸化过程。同样，INS-seq技术^[23]是将scRNA-seq与细胞内蛋白质活性测定相结合，可以同时从细胞新陈代谢、信号活性、免疫标记等多个方面进行分析，增加了表观遗传学、分子信号通路、细胞代谢状态与细胞发育图谱多样性相结合的可能性。

2.2 空间转录组技术 scRNA-seq在提取单细胞的过程中破坏了单细胞在组织中的特定空间位置，进而不能有效识别基因在生理或病理微环境中的表达差异^[24]。而为了同时获得细胞的空间位置信息和基因表达数据，STÅHL等^[25]于2016年开发了“空间转录学”技术，其是通过独特的位置条形码对组织中的mRNA进行捕获，并保持其空间位置信息，这在一定程度上推进了基因分布的可视化发展。近年来，空间转录组学技术得到了快速发展，其具体分类见图2。其中，基于活细胞标记技术是最新的空间转录组学技术。HU等^[26]发明的ZipSeq技术是基于活细胞标记技术的代表之一，其是利用光控系统，将DNA条形码映射到活细胞上，进而获得细胞中基因的实时表达信息。目前，空间转录组技术已被广泛用于组织细胞空间异质性及基因表达的研究，且其为发育分化谱系绘制、细胞功能状态解读、疾病模型探索等多个领域提供了技术支持，已成为生物科学研究的核心技术。

2.3 轨迹分析 传统的谱系追踪方法是以细胞中特异的遗传标记为基础，通过追踪其在后代细胞中的表达完成的^[27]。但由于特异的遗传标记数量有限，无法准确追踪全部后代细胞类型，从而忽视了细胞的异质性，导致研究者对原始细胞分

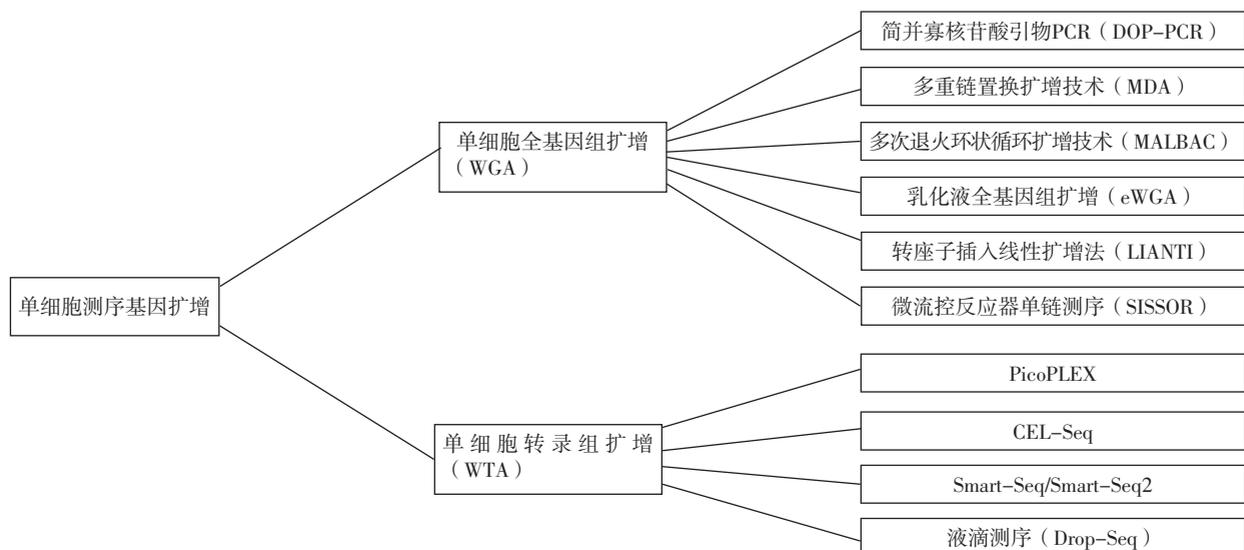


图1 单细胞测序技术的扩增方法分类

Figure 1 Amplification method classification of single cell sequencing technology

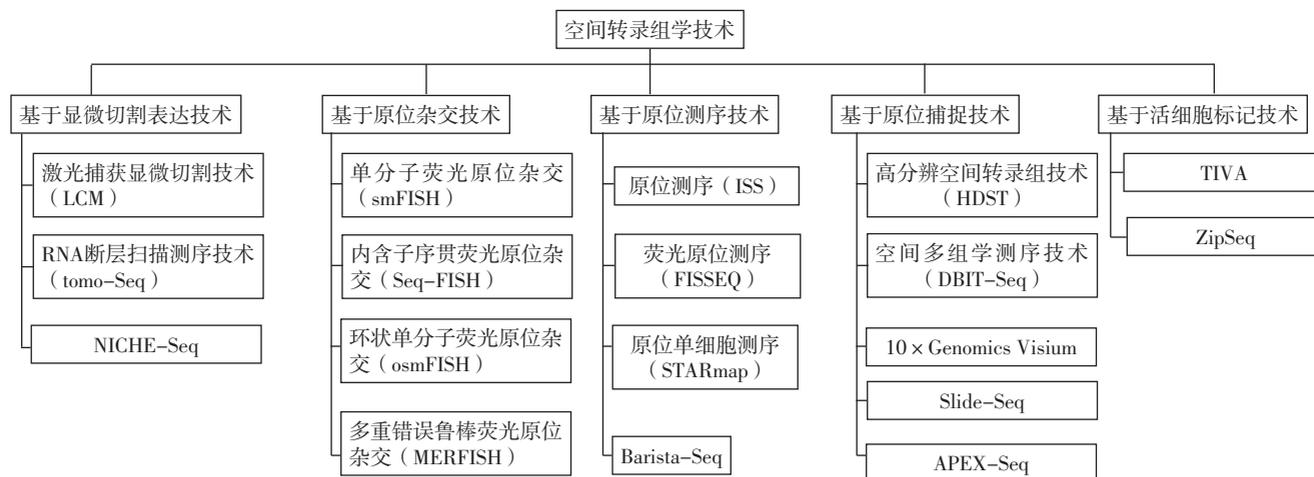


图2 空间转录组学技术分类

Figure 2 Classification of spatial transcriptome techniques

化及发育方向的把握存在偏差。近年随着scRNA-seq及计算方法的发展,基于scRNA-seq数据的轨迹分析在无明显特异的遗传标记的状态下仍能够对细胞发育及分化谱系进行追踪^[28]。其中基于Monocle算法的伪时序轨迹分析最具代表性^[29],其原理是根据测序细胞之间表达模式的相似性进行推断,进而对单细胞进行排序并沿轨迹放入一维空间中,在此基础上于高维空间中构建谱系树,进而得到细胞复杂的动态分化过程^[30]。但伪时序轨迹分析因存在非线性中间产物干扰、测序深度不稳定、批次效应明显等缺点,并不能完全替代传统谱系追踪方法^[28]。因此,伪时序轨迹分析的计算方法仍在不断改进,目前基于Monocle算法改进的Monocle 3算法已被用于角膜缘基底上皮细胞的轨迹分析^[31]及肿瘤细胞变异基因的捕捉^[32]。未来随着技术不断进步,有望实现空间转录组、发育轨迹分析和细胞分子属性的相互结合,以揭示不同细胞、不同发育阶段的基因密码及构建未开发物种的胚胎发育图谱。

3 scRNA-seq与其他单细胞技术的比较

3.1 单细胞核RNA测序 (single-nucleus RNA sequencing, snRNA-seq) 与scRNA-seq相比,snRNA-seq不受解离条件限制,且有解离偏差小、与冰冻样品相容度高、能消除解离诱导的转录应激反应等优势^[33],且能更准确地反映原始组织中的细胞组成和基因表达。WOLFIEN等^[34]通过对成年哺乳动物心脏进行snRNA-seq发现,成熟的心肌细胞起源并不单一,且其还鉴定出具有双重作用的内皮细胞起源的心肌细胞亚群。但细胞核中mRNA含量相对较低,故snRNA-seq并不是对所有细胞及基因捕捉、分析均具有高敏感性。THRUPP等^[29]研究发现,与scRNA-seq相比,snRNA-seq鉴别载脂蛋白E (apolipoprotein E, ApoE)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂3 (recombinant cystatin 3, CST3)等与阿尔茨海默病有关的部分基因的敏感性较差。此外,SLYPER等^[35]对新鲜和冷冻的临床肿瘤样本进行scRNA-seq和snRNA-seq,结果显示,snRNA-seq对免疫细胞的分析能力较scRNA-seq差。因此,研究人员应将snRNA-seq数据与细胞表型、蛋白质组学单细胞技术结合,以便准确而全面地把握研究对象。

3.2 质谱流式细胞技术 (cytometry by time-of-flight, CyTOF) 由于基因翻译后的修饰过程是基因调控和信号通路激活中的关键过程,所以细胞中mRNA水平与蛋白质表达并不是一一对应。因此,利用单细胞测序技术分析蛋白质组学对探究疾病的发病机制具有重要作用。其中CyTOF作为一种高维多参的单细胞测序技术,因其对单细胞识别正确率高、测量参数广泛,故可精确分析细胞内的信号通路网络及免疫分型,是分析单细胞蛋白质组学的主要工具之一^[36]。如FERNANDEZ等^[37]通过对AS患者颈动脉斑块及血液中T淋巴细胞进行CyTOF和scRNA-seq发现,AS患者CD₄⁺T淋巴细胞亚群与健康人群不同,其部分T淋巴细胞亚群表现出耗竭状态,且进一步鉴定出与斑块易损性相关的巨噬细胞亚群,进而推动了心血管免疫靶向治疗进展。同样,CHEN等^[38]通过对动脉瘤小鼠模型主动脉平滑肌细胞进行CyTOF发现,KLF4基因促进了转化生长因子β (transforming growth factor-β, TGF-β)信号的缺失,其与高血脂症结合可促进收缩型平滑肌细胞重新编程为间充质干细胞,进而促进动脉瘤的发生及发展。

3.3 组学分析 表观基因组学分析是多组学分析的重要分支,包括DNA甲基化、组蛋白乙酰化、磷酸化等^[39]。ASARE等^[40]通过对高血脂症小鼠进行骨髓重建实验发现,组蛋白去乙酰化酶9 (histone deacetylase 9, HDAC9)通过与κB抑制蛋白激酶 (inhibitor of kappa B kinase, IKK)结合而导致IKK去乙酰化及激活,进而诱发巨噬细胞和内皮细胞的炎症反应,提示抑制HDAC9有利于延缓AS进展。此外,代谢组学分析可以发现位于基因组下游的新陈代谢变化,能更好地评估疾病的生理学改变^[41]。MURASHIGE等^[42]通过对110例心力衰竭患者及非心力衰竭患者动脉、冠状静脉和股静脉血液进行代谢组学分析发现,脂肪酸是心脏的主要能量来源,心力衰竭患者心脏酮类和乳酸消耗更多,并伴有较高的蛋白水解率。与scRNA-seq相比,代谢组学将上游遗传信息、转录和蛋白质组变异及细胞微环境进行整合,能够更好地反映疾病的分子机制。目前,单细胞多组学结合分析技术正在迅速

发展,分析转录组和开放染色质及组蛋白修饰的多组学技术已被逐步开发,并成为推动精准医学发展的重要工具。

4 scRNA-seq鉴定发育与成熟心脏细胞的异质性

scRNA-seq的发展使揭示心脏新的细胞类型、细胞亚群异质性及描述不同细胞类型的空间和时间表达模式成为可能。如XIAO等^[43]通过对小鼠胚胎心脏进行scRNA-seq发现, Hippo信号通路中的Lats1和Lats2通过抑制YAP的靶基因Dhrs3而使心外膜下细胞分化为心脏成纤维细胞,且介于心外膜和心脏成纤维细胞之间的过渡细胞亚群C20发出的异常信号会导致心脏构型改变。此外, Lats1和Lats2促进心外膜祖细胞向心脏成纤维细胞转变的同时,在控制细胞外基质成分和血管重塑等方面也发挥了重要作用。scRNA-seq可以鉴定发育与成熟心脏细胞的异质性,这对于心脏发育分子机制的研究具有重要意义。

5 scRNA-seq在心血管疾病中的应用

5.1 先天性心脏病 SURYAWANSHI等^[44]通过对自身免疫性先天性心脏传导阻滞(congenital heart block, CHB)患儿的心脏及健康胎儿心脏进行scRNA-seq发现,干扰素刺激基因过表达及干扰素信号激活过程对CHB的发生具有重要意义,且基质细胞对促进基质沉积和纤维化导致CHB发生具有潜在作用。HU等^[45]对线粒体心肌病及正常小鼠心脏细胞核进行scRNA-seq,发现线粒体心肌病小鼠心脏细胞生长分化因子15(growth differentiation factor 15, GDF-15)表达上调,揭示了心脏细胞中GDF-15特异性基因调控网络。上述研究表明, scRNA-seq有助于发现先天性心脏病新的基因和机制。

5.2 成人心脏病 scRNA-seq的出现更新了人们对心脏病发病机制和新型治疗靶点的认识。NOMURA等^[46]通过对单个心肌细胞进行scRNA-seq,构建了心肌细胞重构轨迹,阐明了编码心肌肥大和衰竭形态和功能特征的基因程序。在心肌肥厚早期,心肌细胞激活了与心肌细胞大小有关的线粒体代谢基因,并与ERK1/2和Nrf1/2转录网络相连,开启了心肌重构程序;在心肌肥厚晚期, p53信号通路被特异性地激活,随后进入心肌细胞体积增大和心力衰竭过程^[46]。此外, scRNA-seq还可追踪心肌梗死早期、发展期和恢复期的细胞转变。在心肌梗死早期阶段,成纤维细胞被激活,形成胶原蛋白瘢痕,进而减少了心脏破裂的发生。但在心肌梗死恢复期,成纤维细胞最终会导致心力衰竭^[47]。因此,研究激活后的成纤维细胞有助于研究人员更好地理解其在心肌梗死发病机制中

的作用。

5.3 血管病变 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,与血管内皮细胞功能障碍、髓细胞富集、脂质沉积及泡沫细胞形成等相关^[48-49]。scRNA-seq在AS中应用的研究^[50-54]见表1。此外,随着scRNA-seq在腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)中的应用及空间转录组学的发展,人们对AAA的细胞异质性及不同细胞功能有了更深入的理解。如YANG等^[55]通过对AAA早期主动脉细胞进行scRNA-seq发现,在AAA进展过程中平滑肌细胞密度下降,其中收缩型平滑肌细胞表达减少、合成型平滑肌细胞表达增加;该实验还鉴定出炎症性巨噬细胞M ϕ -2是AAA早期主要富集的巨噬细胞类型,提示通过scRNA-seq可揭示AAA发展过程中平滑肌细胞、巨噬细胞的异质性。

5.4 COVID-19相关心脏损伤 SARS-CoV-2可与血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体结合,并经过跨膜蛋白酶丝氨酸蛋白酶2(transmembrane serine proteinase 2, TMPRSS2)切割病毒S蛋白^[56],进入宿主细胞并导致COVID-19及心脏损伤的发生^[57]。LIU等^[58]对胎儿及成人肺组织和心脏组织进行单细胞RNA测序,结果显示,与肺组织相比,心脏组织中ACE2表达相对较高,但TMPRSS2表达相对较低,这在一定程度上降低了心脏对SARS-CoV-2的易感性,故心脏损伤较轻;而组织蛋白酶L和碱性氨基酸裂解酶表达上调又增加了心脏对SARS-CoV-2的易感性。此外,研究人员通过对成人冠状动脉单细胞测序发现,心脏内皮细胞中ACE2表达水平较高,但TMPRSS2表达水平较低^[58]。上述研究提示,内皮细胞可能是使心脏组织免受SARS-CoV-2感染的一道屏障,而单细胞测序技术有助于了解SARS-CoV-2对心血管系统造成的损伤及潜在机制。

5.5 瓣膜疾病 HULIN等^[59]通过对出生7 d和30 d小鼠主动脉瓣及二尖瓣的2 840个单细胞进行基于液滴的scRNA-seq发现,在出生后瓣膜发育过程中内皮细胞和免疫细胞亚群相对稳定,但在原始瓣膜和成熟瓣膜中间质细胞亚群的表达水平和功能均发生了明显改变,该研究首次揭示了心脏瓣膜重塑过程中细胞的多样性,为研究心脏瓣膜动态平衡及瓣膜疾病的分子机制提供了新的思路。

6 小结

近年来单细胞捕获方法的革新、基因扩增方法的发展、多个测序平台的出现及数据分析方式的多样化极大地推动了

表1 scRNA-seq在AS中应用的研究
Table 1 Studies of application of scRNA-seq in AS

作者	种属	组织类型	细胞类型	研究结果
COLE等 ^[50]	小鼠	主动脉	CD45+白细胞群	描绘了AS小鼠动脉内免疫细胞组成及转化趋势
WIRKA等 ^[51]	小鼠/人	主动脉	平滑肌细胞	转录因子21可调控AS中平滑肌细胞向纤维肌细胞转变,后者可通过向病变部位浸润而对AS起保护作用
BUTCHER等 ^[52]	小鼠	主动脉	CCR5+Th细胞及调节性T淋巴细胞	AS可增加调节性T淋巴细胞的可塑性,促进干扰素 γ (+) Th1细胞及调节性T淋巴细胞功能紊乱性亚群积聚,进一步促进动脉炎症
YAO等 ^[53]	人	主动脉	平滑肌细胞	组蛋白H2A变异体H2A.Z在AS平滑肌细胞中表达下调,其过表达后可抑制损伤引起的血管平滑肌细胞去分化和新生内膜形成,对AS起保护作用
GU等 ^[54]	小鼠	主动脉	血管外膜细胞	描绘了血管外膜中异质细胞群的细胞图谱,揭示了AS中血管外膜巨噬细胞和间质细胞的动态作用

注: AS=动脉粥样硬化

scRNA-seq在心血管研究领域的应用,如其可以描绘心脏细胞发育异质性、完善干细胞模型、揭示疾病分子机制及潜在的治疗靶点。但scRNA-seq仍存在一定局限性:首先,心肌细胞体积较大,单细胞分选平台对其捕获存在限制;其次,与snRNA-seq相比,scRNA-seq有与冰冻样品相容度低、转录应激反应强烈、无法提供核基因表达信息等局限;此外,与CyTOF相比,scRNA-seq无法在研究基因表达的同时兼顾蛋白质信息,故无法准确判断基因翻译后修饰异常引起的病理状态。未来应将scRNA-seq用于糖尿病心脏病、代谢性心脏病、X综合征等冠状动脉微循环障碍性疾病,以寻找新的突破。此外,scRNA-seq还应在数据类型多样化及结果可视化等方面进行改进,以适应实验研究中多组学整合分析的需要。相信随着技术的不断革新,scRNA-seq将会在心血管疾病研究领域发挥更大作用。

作者贡献:胡月进行文章的构思与设计、可行性分析,文献/资料收集、整理,撰写、修订论文;赵卓负责文章的质量控制及审校,并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] AUFFRAY C, CAULFIELD T, GRIFFIN J L, et al. From genomic medicine to precision medicine: highlights of 2015 [J]. *Genome Med*, 2016, 8 (1): 12. DOI: 10.1186/s13073-016-0265-4.
- [2] ALEXANIAN M, PRZYTYCKI P F, MICHELETTI R, et al. A transcriptional switch governs fibroblast activation in heart disease [J]. *Nature*, 2021, 595 (7867): 438-443. DOI: 10.1038/s41586-021-03674-1.
- [3] ASP M, GIACOMELLO S, LARSSON L, et al. A spatiotemporal organ-wide gene expression and cell atlas of the developing human heart [J]. *Cell*, 2019, 179 (7): 1647-1660. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.025.
- [4] PAIK D T, CHO S, TIAN L, et al. Single-cell RNA sequencing in cardiovascular development, disease and medicine [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (8): 457-473. DOI: 10.1038/s41569-020-0359-y.
- [5] FEI C J, NIE L, ZHANG J H, et al. Potential applications of fluorescence-activated cell sorting (FACS) and droplet-based microfluidics in promoting the discovery of specific antibodies for characterizations of fish immune cells [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 771231. DOI: 10.3389/fimmu.2021.771231.
- [6] LIN S C, LIU Y L, ZHANG M X, et al. Microfluidic single-cell transcriptomics: moving towards multimodal and spatiotemporal omics [J]. *Lab Chip*, 2021, 21 (20): 3829-3849. DOI: 10.1039/d1lc00607j.
- [7] KARAMITROS C S, MORVAN M, VIGNE A, et al. Bacterial expression systems for enzymatic activity in droplet-based microfluidics [J]. *Anal Chem*, 2020, 92 (7): 4908-4916. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04969.
- [8] YAMADA S, NOMURA S. Review of single-cell RNA sequencing in the heart [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (21): 8345. DOI: 10.3390/ijms21218345.
- [9] WANG Y, NAVIN N E. Advances and applications of single-cell sequencing technologies [J]. *Mol Cell*, 2015, 58 (4): 598-609. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.005.
- [10] GRÜN D, VAN OUDENAARDEN A. Design and analysis of single-cell sequencing experiments [J]. *Cell*, 2015, 163 (4): 799-810. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.039.
- [11] PICELLI S, FARIDANI O R, BJÖRKLUND A K, et al. Full-length RNA-seq from single cells using smart-seq2 [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9 (1): 171-181. DOI: 10.1038/nprot.2014.006.
- [12] ZHAO T Y, LYU S X, LU G L, et al. SC₂ disease: a manually curated database of single-cell transcriptome for human diseases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (D1): D1413-1419. DOI: 10.1093/nar/gkaa838.
- [13] FINAK G, MCDAVID A, YAJIMA M, et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 278. DOI: 10.1186/s13059-015-0844-5.
- [14] QIU X J, HILL A, PACKER J, et al. Single-cell mRNA quantification and differential analysis with census [J]. *Nat Methods*, 2017, 14 (3): 309-315. DOI: 10.1038/nmeth.4150.
- [15] CHEN L, ZHENG S K. BCseq: accurate single cell RNA-seq quantification with bias correction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (14): e82. DOI: 10.1093/nar/gky308.
- [16] WANG J J, GE W, ZHAI Q Y, et al. Single-cell transcriptome landscape of ovarian cells during primordial follicle assembly in mice [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18 (12): e3001025. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001025.
- [17] SHIN J, BERG D A, ZHU Y H, et al. Single-cell RNA-seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neurogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17 (3): 360-372. DOI: 10.1016/j.stem.2015.07.013.
- [18] JI Z C, JI H K. TSCAN: pseudo-time reconstruction and evaluation in single-cell RNA-seq analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44 (13): e117. DOI: 10.1093/nar/gkw430.
- [19] JULIÁ M, TELENTI A, RAUSELL A. Sincell: an R/Bioconductor package for statistical assessment of cell-state hierarchies from single-cell RNA-seq [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (20): 3380-3382. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv368.
- [20] ARMINGOL E, OFFICER A, HARISMENDY O, et al. Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression [J]. *Nat Rev Genet*, 2021, 22 (2): 71-88. DOI: 10.1038/s41576-020-00292-x.
- [21] WANG L, YU P, ZHOU B Y, et al. Single-cell reconstruction of the adult human heart during heart failure and recovery reveals the cellular landscape underlying cardiac function [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22 (1): 108-119. DOI: 10.1038/s41556-019-0446-7.
- [22] GERLACH J P, VAN BUGGENUM J A G, TANIS S E J, et al. Combined quantification of intracellular (phospho-) proteins and transcriptomics from fixed single cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 1469. DOI: 10.1038/s41598-018-37977-7.
- [23] KATZENELNBOGEN Y, SHEBAN F D, YALIN A, et al. Coupled scRNA-seq and intracellular protein activity reveal an immunosuppressive role of TREM2 in cancer [J]. *Cell*, 2020,

- 182 (4) : 872–885.e19.DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.032.
- [24] VAN DEN BRINK S C, SAGE F, VÉRTESY Á, et al. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations [J]. *Nat Methods*, 2017, 14 (10) : 935–936. DOI: 10.1038/nmeth.4437.
- [25] STÄHL P L, SALMÉN F, VICKOVIC S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics [J]. *Science*, 2016, 353 (6294) : 78–82. DOI: 10.1126/science.aaf2403.
- [26] HU K H, EICHHORST J P, MCGINNIS C S, et al. ZipSeq: barcoding for real-time mapping of single cell transcriptomes [J]. *Nat Methods*, 2020, 17 (8) : 833–843. DOI: 10.1038/s41592-020-0880-2.
- [27] KESTER L, VAN OUDENAARDEN A. Single-cell transcriptomics meets lineage tracing [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23 (2) : 166–179. DOI: 10.1016/j.stem.2018.04.014.
- [28] TAM P P L, HO J W K. Cellular diversity and lineage trajectory: insights from mouse single cell transcriptomes [J]. *Development*, 2020, 147 (2) : dev179788. DOI: 10.1242/dev.179788.
- [29] THRUPP N, SALA FRIGERIO C, WOLFS L, et al. Single-nucleus RNA-seq is not suitable for detection of microglial activation genes in humans [J]. *Cell Rep*, 2020, 32 (13) : 108189. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108189.
- [30] QIU X J, MAO Q, TANG Y, et al. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories [J]. *Nat Methods*, 2017, 14 (10) : 979–982. DOI: 10.1038/nmeth.4402.
- [31] LI D Q, KIM S, LI J M, et al. Single-cell transcriptomics identifies limbal stem cell population and cell types mapping its differentiation trajectory in limbal basal epithelium of human cornea [J]. *Ocul Surf*, 2021, 20: 20–32. DOI: 10.1016/j.jtos.2020.12.004.
- [32] KOLAT D, KALUZINSKA Z, ORZECZOWSKA M, et al. Functional genomics of AP-2 α and AP-2 γ in cancers: in silico study [J]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13 (1) : 174. DOI: 10.1186/s12920-020-00823-9.
- [33] WU H J, KIRITA Y, DONNELLY E L, et al. Advantages of single-nucleus over single-cell RNA sequencing of adult kidney: rare cell types and novel cell states revealed in fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30 (1) : 23–32. DOI: 10.1681/ASN.2018090912.
- [34] WOLFIEN M, GALOW A M, MÜLLER P, et al. Single-nucleus sequencing of an entire mammalian heart: cell type composition and velocity [J]. *Cells*, 2020, 9 (2) : 318. DOI: 10.3390/cells9020318.
- [35] SLYPER M, PORTER C B M, ASHENBERG O, et al. A single-cell and single-nucleus RNA-Seq toolbox for fresh and frozen human tumors [J]. *Nat Med*, 2020, 26 (5) : 792–802. DOI: 10.1038/s41591-020-0844-1.
- [36] CHATTOPADHYAY P K, WINTERS A F, LOMAS W E 3rd, et al. High-parameter single-cell analysis [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2019, 12 (1) : 411–430. DOI: 10.1146/annurev-anchem-061417-125927.
- [37] FERNANDEZ D M, RAHMAN A H, FERNANDEZ N F, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (10) : 1576–1588. DOI: 10.1038/s41591-019-0590-4.
- [38] CHEN P Y, QIN L F, LI G X, et al. Smooth muscle cell reprogramming in aortic aneurysms [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26 (4) : 542–557.e11. DOI: 10.1016/j.stem.2020.02.013.
- [39] FISCHER M A, VONDRISKA T M. Clinical epigenomics for cardiovascular disease: diagnostics and therapies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 154: 97–105. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2021.01.011.
- [40] ASARE Y, CAMPBELL-JAMES T A, BOKOV Y, et al. Histone deacetylase 9 activates IKK to regulate atherosclerotic plaque vulnerability [J]. *Circ Res*, 2020, 127 (6) : 811–823. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316743.
- [41] BARBA I, ANDRÉS M, GARCIA-DORADO D. Metabolomics and heart diseases: from basic to clinical approach [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26 (1) : 46–59. DOI: 10.2174/0929867324666171006151408.
- [42] MURASHIGE D, JANG C, NEINAST M, et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart [J]. *Science*, 2020, 370 (6514) : 364–368. DOI: 10.1126/science.abc8861.
- [43] XIAO Y, HILL M C, ZHANG M, et al. Hippo signaling plays an essential role in cell state transitions during cardiac fibroblast development [J]. *Dev Cell*, 2018, 45 (2) : 153–169. e6. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.03.019.
- [44] SURYAWANSHI H, CLANCY R, MOROZOV P, et al. Cell atlas of the foetal human heart and implications for autoimmune-mediated congenital heart block [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116 (8) : 1446–1457. DOI: 10.1093/cvr/cvz257.
- [45] HU P, LIU J, ZHAO J J, et al. Single-nucleus transcriptomic survey of cell diversity and functional maturation in postnatal mammalian hearts [J]. *Genes Dev*, 2018, 32 (19/20) : 1344–1357. DOI: 10.1101/gad.316802.118.
- [46] NOMURA S, SATOH M, FUJITA T, et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1) : 4435. DOI: 10.1038/s41467-018-06639-7.
- [47] TALMAN V, RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 365 (3) : 563–581. DOI: 10.1007/s00441-016-2431-9.
- [48] WINKELS H, EHINGER E, GHOSHEH Y, et al. Atherosclerosis in the single-cell era [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29 (5) : 389–396. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000537.
- [49] GU L, SAHA S T, THOMAS J, et al. Targeting cellular cholesterol for anticancer therapy [J]. *FEBS J*, 2019, 286 (21) : 4192–4208. DOI: 10.1111/febs.15018.
- [50] COLE J E, PARK I, AHERN D J, et al. Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114 (10) : 1360–1371. DOI: 10.1093/cvr/cvy109.

- 350–358.DOI: 10.3760/cma.j.cn112148-20200317-00224.
- [22] ALI Z A, GAO R L, KIMURA T, et al.Three-year outcomes with the absorb bioresorbable scaffold: individual-patient-data meta-analysis from the ABSORB randomized trials [J]. *Circulation*, 2018, 137 (5): 464–479.DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031843.
- [23] KIMURA T, KOZUMA K, TANABE K, et al.A randomized trial evaluating everolimus-eluting Absorb bioresorbable scaffolds vs. everolimus-eluting metallic stents in patients with coronary artery disease: ABSORB Japan [J]. *Eur Heart*, 2015, 36 (47): 3332–3342.DOI: 10.1093/eurheartj/ehv435.
- [24] STONE G W, KIMURA T, GAO R L, et al.Time-varying outcomes with the absorb bioresorbable vascular scaffold during 5-year follow-up: a systematic meta-analysis and individual patient data pooled study [J]. *JAMA Cardiol*, 2019, 4 (12): 1261–1269.DOI: 10.1001/jamacardio.2019.4101.
- [25] CAI X, SU J Y, SHEN W Y, et al.Clinical outcomes of five-year follow-up of early and long-term treatment with captopril on the patients with acute myocardial infarction [J]. *Journal of Shanghai Second Medical University (Foreign Language Edition)*, 2004, 14 (1): 7–10, 29.
- [26] SERRUYS P W, ONUMA Y.Dmax for sizing, PSP-1, PSP-2, PSP-3 or OCT guidance: interventionalist's jargon or indispensable implantation techniques for short-and long-term outcomes of Absorb BRS? [J]. *EuroIntervention*, 2017, 12 (17): 2047–2056. DOI: 10.4244/EIJY17M02_01.
- [27] STONE G W, ELLIS S G, GORI T, et al.Blinded outcomes and angina assessment of coronary bioresorbable scaffolds: 30-day and 1-year results from the ABSORB IV randomised trial [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10157): 1530–1540.DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32283-9.
- [28] PANOULAS V F, MIYAZAKI T, SATO K, et al.Procedural outcomes of patients with calcified lesions treated with bioresorbable vascular scaffolds [J]. *EuroIntervention*, 2016, 11 (12): 1355–1362.DOI: 10.4244/EIJY15M03_11.
- [29] POLIMENI A, ANADOL R, MÜNZEL T, et al.Bioresorbable vascular scaffolds for percutaneous treatment of chronic total coronary occlusions: a meta-analysis [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2019, 19 (1): 59.
(收稿日期: 2022-09-26; 修回日期: 2022-12-29)
(本文编辑: 谢武英)
-
- (上接第128页)
- [51] WIRKA R C, WAGH D, PAIK D T, et al.Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (8): 1280–1289.DOI: 10.1038/s41591-019-0512-5.
- [52] BUTCHER M J, FILIPOWICZ A R, WASEEM T C, et al.Atherosclerosis-driven treg plasticity results in formation of a dysfunctional subset of plastic IFN γ + Th1/tregs [J]. *Circ Res*, 2016, 119 (11): 1190–1203.DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309764.
- [53] YAO F, YU P, LI Y, et al.Histone variant H2A.Z is required for the maintenance of smooth muscle cell identity as revealed by single-cell transcriptomics [J]. *Circulation*, 2018, 138 (20): 2274–2288.DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033114.
- [54] GU W D, NI Z C, TAN Y Q, et al.Adventitial cell atlas of wt (wild type) and ApoE (apolipoprotein E)-deficient mice defined by single-cell RNA sequencing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39 (6): 1055–1071.DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312399.
- [55] YANG H, ZHOU T, STRANZ A, et al.Single-cell RNA sequencing reveals heterogeneity of vascular cells in early stage murine abdominal aortic aneurysm—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41 (3): 1158–1166.DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315607.
- [56] LUKASSEN S, CHUA R L, TREFZER T, et al.SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells [J]. *EMBO J*, 2020, 39 (10): e105114.DOI: 10.15252/embj.20105114.
- [57] ZHENG Y Y, MA Y T, ZHANG J Y, et al.COVID-19 and the cardiovascular system [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (5): 259–260.DOI: 10.1038/s41569-020-0360-5.
- [58] LIU H N, GAI S J, WANG X Y, et al.Single-cell analysis of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and spike protein priming expression of proteases in the human heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116 (10): 1733–1741.DOI: 10.1093/cvr/cvaa191.
- [59] HULIN A, HORTELLS L, GOMEZ-STALLONS M V, et al.Maturation of heart valve cell populations during postnatal remodeling [J]. *Development*, 2019, 146 (12): dev173047. DOI: 10.1242/dev.173047.
(收稿日期: 2022-10-06; 修回日期: 2022-12-10)
(本文编辑: 谢武英)