

单细胞测序技术在精原干细胞研究中的应用进展

马 龙 颜宏利

摘 要 男性不育症正受到越来越多的关注,但其发生、发展的分子机制尚不明确,诊断、检测和治疗手段仍不完善。精原干细胞作为维持男性生育能力的基础,在男性不育症的发生和发展中起到决定性的作用。传统的测序技术是对大量的混合细胞进行分析,无法观察到各种类型细胞之间的区别,还会掩盖 SSC 这类重要且稀少细胞的独有特征。单细胞测序技术能够对单个细胞进行无偏倚、高通量和高分辨率的分析,为探究 SSC 在单细胞水平的变化提供了新的手段,同时也为发现新的生物学标志物和潜在靶点,促进男性不育症的个性化诊疗提供了新途径。

关键词 单细胞测序技术 精原干细胞 男性不育症

中图分类号 R256.56

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.03.002

目前,随着环境暴露的影响和生活方式的改变,不育症已经成为一个严重的社会问题,困扰着10%~15%的夫妇,其中与男性因素有关的病例约占50%^[1]。为了保护 and 保存男性生育能力,研究者们进行了大量研究,但是目前对精原干细胞(spermatogonia stem cells, SSC)维持自我更新和分化的机制和雄配子形成的调控机制等问题还缺乏明确的认知。利用单细胞测序可以解析包括 SSC 在内的各种生精细胞及其微环境的中体细胞的特点,更精准地从分子层面阐释 SSC 自我更新和分化、精原细胞分化和配子形成的过程,为 SSC 的研究以及男性不育症的诊断和治疗提供新的方向。

一、单细胞测序技术概述

传统的测序方法通常是从多个细胞中抽提 DNA 或 RNA 进行测序,其结果往往只能代表细胞的平均水平或其中数量占优势的细胞的水平,忽略了单个细胞独有的特性。单细胞测序技术是从单细胞水平揭示细胞基因组、转录组或表观遗传组变化的技术,从不同角度揭示细胞在不同阶段的功能和特性,可以通过一次建库,获得几千个单细胞的信息^[2]。单细胞测序技术能够解决罕见细胞的分析、人组织发育分化的特征研究、肿瘤的异质性和微进化研究等传统测序方法难以解决的问题。

1. 单细胞测序技术原理:单细胞测序技术大规模应用主要得益于微滴技术的发展^[3]。在实验中,每

个细胞被封装在一个纳米级微滴中(图1),该微滴中含有带条形码的聚胸腺嘧啶脱氧核苷酸。一个细胞的所有 DNA 或 RNA 与一个唯一的条形码相关联,使得研究者可以跟踪单个细胞信息,从而对合并的文库进行大规模的并列分析,可以在一次实验中对数千个单细胞进行分析^[4]。另一种基于小孔的策略,则不需要捕获微滴中的细胞。单个细胞被重力驱动进入芯片的微套管,在微套管中,孔的大小只允许单个带条形码的珠子和单个细胞结合,从而实现单细胞的分离分析^[5]。

单细胞测序技术实现的另一个重要技术突破是将唯一分子标识符(unique molecule identifier, UMI)合并进来,从而能够更好地量化单细胞测序的读取数。由于每个转录本都被唯一的 UMI 识别,因此这种方法可以区分反转录过程和 cDNA 扩增过程中合成的假阳性计数。其他重要的技术还有多次退火环状循环扩增技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)。MALBAC 利用特殊引物,使得扩增子的结尾互补而成环,从而很大程度上防止了 DNA 的指数性扩增,是目前应用最广的全基因组扩增技术。

2. 单细胞测序技术流程:单细胞测序技术主要涉及4个主要步骤,包括单细胞分离、文库构建、基因测序和数据分析。以最常用的睾丸组织单细胞转录组测序为例,如图1所示。(1)单细胞分离:睾丸组织通过机械和酶消化分离得到单细胞悬液,该单细胞悬液既可以直接进行无偏倚的筛选分析,也可以先利用流式细胞术(FACS)或免疫磁珠(MACS)等技术进行分选,再进行分析。(2)文库构建:以10× Genomics

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1005002)

作者单位:200433 上海,中国人民解放军海军军医大学第一附属医院生殖医学中心

通讯作者:颜宏利,电子邮箱:sdlyml@126.com

平台为例,其技术核心是油滴包裹的凝胶珠。该系统有 75 万种唯一的带条形码的凝胶珠,每种珠子上有 (40~80)万个探针。油滴将含单个细胞的凝胶珠包裹起来,形成一个微滴,在微滴内完成细胞裂解、RNA 反转录和 cDNA 扩增等连续步骤,最终生成文库,其中来自单个细胞的所有 cDNA 共享一个条形码。(3) 基因测序:对构建得到的带条形码的文库进行高通量测序。(4) 数据分析:单细胞测序技术提供了大量的数据,必须利用复杂的计算工具来解释这些数据。原始数据处理包括:①质量控制和过滤,以消除低质量序列、死细胞和多个细胞捕获产生的干扰;基于微滴条码分配的解码;测序结果与参考数据库的比对;②测序结果的标准化和量化;③聚类分析,通过拟时序分析形成细胞发展轨迹。

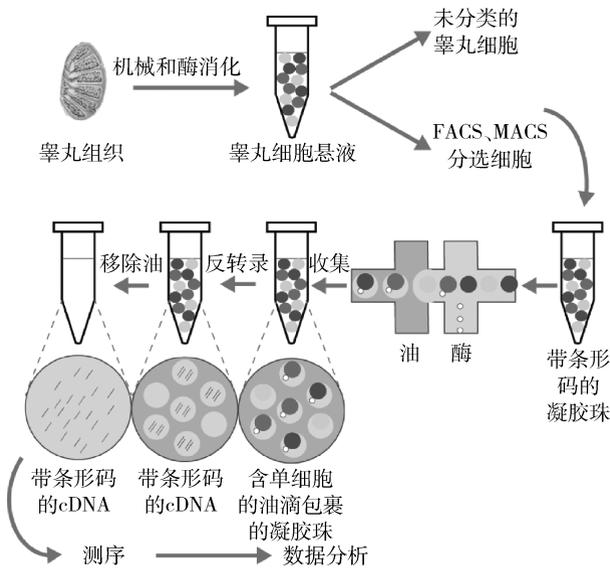


图 1 睾丸组织单细胞转录组测序示意图

二、单细胞测序技术在 SSC 研究中的应用

1. 揭示 SSC 的异质性:很多研究在对单细胞测序结果进行聚类和单细胞轨迹推断后发现,人类 SSC 具有高度异质性^[6-10]。不同的研究将 SSC 到分化精原细胞分成了 3 种、4 种或 5 种不同的细胞状态。Wang 等^[7]对正常供者和非梗阻性无精子症供者的睾丸进行单细胞测序,将精原细胞分成了 3 个细胞群。2017 年,Guo 等^[10]对 SSEA4 + SSC 和 c-KIT + 分化精原细胞进行单细胞转录组和 DNA 甲基化组测序分析,确定了 4 个细胞群,并将其命名为“状态 1~4”。2018 年,Guo 等^[9]对完整的睾丸细胞悬液进行了无偏倚实验,又确定了附加“状态 0”。“状态 0”被排除在先前的实验之外,可能与其参与 SSEA4 表达

的 ST3GAL2 基因的低转录有关。“状态 0”和“状态 1”可能代表两种不同的静止 SSC 状态。Hermann 等^[6]对 SSC 使用拟时序分析时还发现,表达已知 SSC 标志物的细胞位于发育轨迹的中间,提示 SSC 的同一性和异质性可能比预期的更为复杂。

2. 揭示 SSC 的分子特征:很多研究利用单细胞测序技术,对已有的 SSC 分子标志物进行了验证,发现了大量新的 SSC 分子标志物,同时也发现了调控 SSC 自我更新和维持未分化状态的机制。Hermann 等^[6]利用拟时序轨迹分析,在起点附近发现了典型的 SSC 基因:GFRA1、ID4、ETV5、NANOS2、PAX7、TS-PAN8、RHOX10 和 ZBTB16,同时还发现了一组新的基因:DUSP6、EPHA2、PTPN13、PVR 和 TCL1。DUSP6 是一种双特异性磷酸酶,能调节有丝分裂原活化蛋白激酶活性,PTPN13 是已知的一种磷酸酶,可抑制激酶级联活性并影响细胞代谢和增殖状态,TCL1 是丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 的共刺激因子。这提示细胞内信号通路的调控可能在 SSC 功能中发挥关键作用。其他表达量较大的基因和通路有:参与翻译控制的基因(EIF4E、EIF4EBP1、PABPC1、RPTOR)和通路(EIF2、mTOR),控制细胞内信号转导的基因(F2R、GNAQ、PLCE1、PPP1CB、SHC1)和通路(PLC、Thrombin)。同时,在拟时序轨迹的中点发现了翻译控制基因(EIF4B、MLST8、PABPC1)和通路(EIF2、mTOR)、糖酵解基因(ALDOA、ENO3、PFKL、TPI1)和已知的 SSC 基因(ID4、NANOS2)。在 SSC 亚群中也能观察到 GDNF、FGF2 和 WNT 信号通路的上调^[7,10]。这些基因和信号通路在调控 SSC 的自我更新和维持未分化状态中发挥了关键作用^[11,12]。

3. 揭示睾丸体细胞的分子特征:除了生精细胞系的特征,单细胞测序技术还探索了构成睾丸组织的体细胞群之间的相互作用,包括在维持 SSC 自我更新、诱导 SSC 分化中发挥重要作用的龛位细胞。目前,对睾丸细胞的单细胞测序实验已经提供了大量关于小鼠、人类新生儿、人类婴儿、有生育能力的成年男性和非阻塞性无精子症男性的 SSC 龛位信息^[8,9]。Guo 等^[9]从成人睾丸中分离出了 5 类细胞: Sertoli 细胞、肌样细胞、Leydig 细胞、内皮细胞和巨噬细胞,这与 Green 等^[13]在成年小鼠睾丸中分离出的细胞一致。Guo 等^[9]研究发现,在内皮细胞中,NOTCH 通路受体 NOTCH4 和下游信号因子 JAG1、HES1 和 MAML1 被特异性上调。在成人肌样细胞和 Leydig 细胞中, Hedgehog 通路的受体 PTCH1 和 PTCH2 以及下游信

号元件 GLI 和 IGF6 均有高表达。在 Sertoli 细胞中,整合素 ITGA6 高表达,这是一种主要存在于人类输精管基膜中的蛋白。在 Sertoli 细胞还表达 WFDC2 和 PRND,前者是一种已知的可以促进精子成熟的附睾蛋白,后者编码一种糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白。PDGFB 在内皮细胞中表达,其受体 PDGFRA 和 PDGFRB 则存在于肌样细胞和 Leydig 细胞中,这提示内皮细胞可能通过与其他体细胞的串扰机制间接影响生精细胞的发育。

4. 揭示精子形成的详细过程:精子形成是一个复杂而又高度有序的过程。受标本限制,对于人类男性生殖系统的研究很大程度上需要依赖动物模型。Wang 等^[7]和 Green 等^[13]于 2018 年分别绘制了成年男性和雌性小鼠生殖细胞成熟过程的基因表达动态图谱。他们的工作证实了小鼠和人类精子形成过程的相似性,确认了小鼠作为研究与人类不育有关的同源基因的模型的可行性。Hermann 等^[6]也对小鼠和人类的生精细胞中的 RNA 进行了平行分析,其研究结果支持小鼠和人类之间存在转录组同源性的观点,并提出可以利用小鼠生精细胞的分子标志物来鉴定人类生精细胞,为人类精子形成的探索提供支持。Law 等^[14]对 E16.5、P0、P3 和 P6 的小鼠睾丸进行单细胞测序分析发现,小鼠 SSC 的发育轨迹早在胚胎期就已经被提前设定。

目前已经有很多单细胞测序研究对人类样本进行了分析,得到了从胎儿期的原始生殖细胞到成熟精子细胞的人类男性生殖谱系的关键信息^[6-10,15-19]。Sohni 等^[8]研究发现新生儿睾丸中存在两种生殖细胞,其中一种细胞的表达谱与胎儿期的原始生殖细胞的表达谱高度相似,另一种细胞的转录模式与成人 SSC 相似,被认为是 SSC 前体细胞^[16]。这表明,新生儿期的 SSC 前体细胞可能由胎儿期的原始生殖细胞发育而来。Guo 等^[9]也发现婴儿(13 个月)的生殖细胞和成人(17~24 岁)的“状态 0”细胞的基因表达相似,并将婴儿的生殖细胞定位在发育轨迹的起点,随后是“状态 0”。这些婴儿生殖细胞代表着从 1 岁到青春期一直存在的静态储备 SSC 池。在人类青春期的精子第 1 波形成中出现的生殖细胞类型与在成年阶段精子持续稳定形成中出现的生殖细胞类型不同,这个现象与出生后 1 周的小鼠模型中观察到的现象一致^[8,20]。为了描述这个过程,Guo 等^[19]分析了 4 个青春期男孩的睾丸细胞,得到了男性青春期第 1 波精子形成的关键信息。

结合已有的单细胞测序数据和免疫组化研究,人类 SSC 从胎儿期至成年期可分为 4 个相对独立的阶段:①胎儿期到新生儿期,原始生殖细胞变为 SSC 阶段;②新生儿期到青春期前,SSC 静止或缓慢自我更新阶段;③青春期早期,短暂的 SSC 增殖,有限且不完全的 SSC 分化阶段;④成年期,SSC 稳定的自我更新和分化发育为完整的精子细胞阶段。

三、单细胞测序技术在 SSC 研究中的局限性和改进方向

单细胞测序技术在 SSC 研究中也有着局限性,现阶段发展的单细胞测序技术存在耗时长、费用高、样本要求高等问题,同时不同实验的测序结果数据可能有很大的差异。除了各种实验标本的生物学差异外,一个主要原因是不同实验使用的单细胞测序的技术参数不同^[21]。因此在设计和评价单细胞测序研究时,应严格考虑以下因素:(1)生物学重复数:不同批次处理的样品可能会产生差别,不同的细胞分离方法也可能影响其转录谱,因此,最好使用多个生物学重复,以增强数据的可靠性与稳健性^[22,23]。(2)最终分析的细胞数量以及是否预先分选:最终分析的细胞数量对于单细胞测序是一项关键参数,尤其对于检测罕见细胞类型至关重要。罕见细胞的低表达转录本很可能由于扩增的差异和基因缺失导致假阴性事件,因此对罕见细胞的研究可能需要预先进行细胞的分选。然而,预先使用抗体进行分选又可能会使分析产生偏倚,因此设计实验时应当根据实验目的选择是否进行预先分选。(3)其他技术参数:如测序深度也必须考虑。不同测序方法中的测序深度可能有很大的差异,Svensson 等^[24]研究表明,单细胞测序技术的敏感度比准确性更依赖于测序深度。

单细胞转录组测序捕捉选定细胞特定时间点的基因表达谱,但这个表达谱是缺乏任何时间或空间的背景,而空间位置是又细胞功能和命运的决定因素。荧光原位杂交(FISH)靶向的方法可以用来弥补空间信息的缺失和补充单细胞测序数据集。利用互补的荧光标记探针,RNA 可以在其自然环境中定位。RNA 荧光原位杂交技术通过使用针对单个 mRNA 分子的多种探针,实现了组织中少数基因的表达的量化和定位。后来又研发出连续 FISH 法,例如 Lubeck 等用的与目标 RNA 的顺序杂交的方法,增加了可检测 RNA 的种类,并且实现了不同种类 RNA 的同时量化^[25-28]。

四、展 望

2018 年,美国《Science》杂志将单细胞基因活性

分析技术列为年度头号科学突破,自此引起了应用单细胞测序技术的浪潮,不少研究者认为,单细胞测序技术将会在未来 10 年内改变基础生物学和医学研究的格局。

单细胞测序技术使得 SSC 研究有了突破性的进展,通过对上万个单细胞进行高通量测序,不仅可揭示精原干细胞的异质性,还可以提供精原干细胞及其微环境的分子特征,建立精子形成的动态图谱。同时,单细胞测序技术也为男性不育症的诊疗提供的新的方向:(1)可以辅助男性不育症的诊断,实现男性不育症更精细的分类,为后续的治疗提供理论基础。(2)可以评估可能导致精子生成受损的基因组、转录组或表观遗传组变化,实现对患者的分子靶向治疗或细胞治疗。(3)可以明确维持 SSC 体外增值的生长因子或细胞因子配方,实现 SSC 的体外培养,或者进一步诱导分化得到成熟的精子细胞。

参考文献

- Devlin DJ, Nozawa K, Ikawa M, *et al.* Knockout of family with sequence similarity 170 member A (Fam170a) causes male subfertility, while Fam170b is dispensable in mice? [J]. *Biol Reprod*, 2020, 103(2): 205–222
- 孙凤环, 陈健, 张鹏. 单细胞测序在肿瘤基因检测中的研究进展 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2019, 40(1): 117–122
- Gille AS, Lapoujade C, Wolf JP, *et al.* Contribution of single-cell transcriptomics to the characterization of human spermatogonial stem cells: toward an application in male fertility regenerative medicine? [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 1–22
- 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
- Gierahn TM, Wadsworth MH, 2nd, 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
- Hermann BP, Cheng K, Singh A, *et al.* The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(6): 1650–1667
- Wang M, Liu X, Chang G, *et al.* Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 599–614
- Sohni A, Tan K, Song HW, *et al.* The neonatal and adult human testis defined at the single-cell level [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(6): 1501–1517
- Guo J, Grow EJ, Mlcochova H, *et al.* The adult human testis transcriptional cell atlas [J]. *Cell Res*, 2018, 28(12): 1141–1157
- Guo J, Grow EJ, Yi C, *et al.* Chromatin and single-cell RNA-Seq profiling reveal dynamic signaling and metabolic transitions during human spermatogonial stem cell development [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(4): 533–546
- Oatley JM, Brinster RL. The germline stem cell niche unit in mammalian testes [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 577–595
- Kitadate Y, Jörg DJ, Tokue M, *et al.* Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 79–92
- Green CD, Ma Q, Manske GL, *et al.* A comprehensive roadmap of murine spermatogenesis defined by single-cell RNA-Seq [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(5): 651–667
- Law NC, Oatley MJ, Oatley JM. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2787
- Neuhaus N, Yoon J, Terwort N, *et al.* Single-cell gene expression analysis reveals diversity among human spermatogonia [J]. *Mol Human Reprod*, 2017, 23(2): 79–90
- Guo F, Yan L, Guo H, *et al.* The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells [J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1437–1452
- von Kopylow K, Schulze W, Salzbrunn A, *et al.* Isolation and gene expression analysis of single potential human spermatogonial stem cells [J]. *Mol Human Reprod*, 2016, 22(4): 229–239
- Li L, Dong J, Yan L, *et al.* Single-cell RNA-Seq analysis maps development of human germline cells and Gonadal Niche Interactions [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(6): 858–873
- Guo J, Nie X, Giebler M, *et al.* The dynamic transcriptional cell atlas of testis development during human puberty [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(2): 262–276
- Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, *et al.* The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage [J]. *Development*, 2006, 133(8): 1495–1505
- 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
- Saelens W, Cannoodt R, Todorov H, *et al.* A comparison of single-cell trajectory inference methods [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(5): 547–554
- Stegle O, Teichmann SA, Marioni JC. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(3): 133–145
- Svensson V, Natarajan KN, Ly LH, *et al.* Power analysis of single-cell RNA-sequencing experiments [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 381–387
- Lubeck E, Coskun AF, Zhiyentayev T, *et al.* Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 360–361
- Moffitt JR, Hao J, Bambach - Mukku D, *et al.* High-performance multiplexed fluorescence in situ hybridization in culture and tissue with matrix imprinting and clearing [J]. *PNAS*, 2016, 113(50): 14456–14461
- Moffitt JR, Bambach - Mukku D, Eichhorn SW, *et al.* Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region [J]. *Science (New York, NY)*, 2018, 362(6416): eaau5324
- Xia C, Fan J, Emanuel G, *et al.* Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression [J]. *PNAS*, 2019, 116(39): 19490–19499

(收稿日期: 2020-09-10)

(修回日期: 2020-10-09)