

## • 继续教育 •

## 单细胞测序技术在动脉粥样硬化研究的应用进展\*

周阳<sup>1</sup> 尚莎莎<sup>2</sup> 王建茹<sup>2</sup> 王莉<sup>2</sup> 陈玉善<sup>2</sup> 于莉莉<sup>1</sup> 王婷婷<sup>1</sup> 沈祥丽<sup>1</sup>

**[摘要]** 单细胞测序技术作为近10年来高速发展起来的一门新兴技术,能够在单个细胞水平上对基因组、转录组、表观遗传组、蛋白组甚至多组学联合进行高通量测序,以揭示细胞的异质性,并通过分析获得不同组织器官细胞的基因表达谱,从而帮助我们更加深入理解各个组织器官的细胞多样性。动脉粥样硬化是许多心血管疾病病理的主要原因,其所引起的并发症如心肌梗死和卒中是导致全球性死亡的重要原因。近年来,单细胞测序技术已被广泛地应用于动脉粥样硬化的研究,并取得了重要进展。本文主要就单细胞测序技术在动脉粥样硬化研究中的最新应用进展作一综述。

**[关键词]** 单细胞测序技术;单细胞转录组测序;动脉粥样硬化

**DOI:**10.13201/j.issn.1001-1439.2023.06.013

**[中图分类号]** R543 **[文献标志码]** A

### Application progress of single cell transcriptome sequencing in the study of atherosclerosis

ZHOU Yang<sup>1</sup> SHANG Shasha<sup>2</sup> WANG Jianru<sup>2</sup> WANG Li<sup>2</sup> CHEN Yushan<sup>2</sup> YU Lili<sup>1</sup>  
WANG Tingting<sup>1</sup> SHEN Xiangli<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046, China;<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine)

Corresponding author: CHEN Yushan, E-mail: rain13633711226@126.com

**Abstract** Single-cell sequencing technology is an emerging technology that has developed rapidly in the past decade. It can perform high-throughput sequencing of the genome, transcriptome, epigenome, proteome and even multi-omics at the single cell level to reveal cellular heterogeneity. By analyzing the gene expression profiles of cells in different tissues and organs, it helps us to better understand the cellular diversity of various tissues and organs. Atherosclerosis is the main cause of pathology of many cardiovascular diseases, and its complications such as myocardial infarction and stroke are important causes of global death. In recent years, single-cell sequencing technology has been widely used in the study of atherosclerosis and has made important progress. This article mainly reviews the latest application progress of single-cell sequencing technology in the study of atherosclerosis.

**Key words** single cell sequencing; single-cell RNA-sequencing; atherosclerosis

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,其特征表现为在大中型动脉中形成富含细胞和脂质的粥样斑块。它的基本发展过程为起初由各种危险因素(包括高脂血症、高血压、糖尿病、吸烟、肥胖、年龄等)引起内皮损伤,内皮细胞出现功能障碍,导致低密度脂蛋白(LDL)在局部内膜下大量积聚,这些LDL易于被氧化修饰形成氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL),进一步促进炎症。在 ox-LDL 和各种炎症因子的诱导下血单核细胞迁入内

膜并分化为巨噬细胞,以清除氧化的 LDL,随着 LDL 的不断摄入,最后形成泡沫细胞<sup>[1]</sup>。在摄入过量的 LDL 后,巨噬细胞发生凋亡,凋亡细胞通过胞葬作用再被其他巨噬细胞吞噬清除,而随着斑块的进展,凋亡细胞越来越多,当其数量超出巨噬细胞的清除能力,就会发生凋亡后坏死,导致坏死核心的形成<sup>[2]</sup>。随着炎症反应的持续进行,迁入内膜的血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡,弹性纤维被破坏,纤维帽变薄,斑块变得不稳定,最终出现斑块破裂,引发血栓栓塞或管腔堵塞,从而导致心肌梗死或卒中。整个过程由包括巨噬细胞、淋巴细胞、单核细胞、VSMC、内皮细胞等在内的多种细胞及各种细胞因子相互作用驱动形成,了解动脉粥样硬化斑块细胞成分的多样性并阐明动脉粥样硬化中的

\*基金项目:国家自然科学基金项目(No: 82004311, 81803940);河南省中医管理局中医药科学研究专项课题(No:2019ZY1004)

<sup>1</sup>河南中医药大学(郑州,450046)

<sup>2</sup>河南中医药大学第一附属医院

通信作者:陈玉善,E-mail:rain13633711226@126.com

引用本文:周阳,尚莎莎,王建茹,等.单细胞测序技术在动脉粥样硬化研究的应用进展[J].临床心血管病杂志,2023,39

(6):474-480. DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2023.06.013.

免疫反应有望对该疾病产生进一步的认识,并为临床提供新的治疗策略。

在单细胞测序技术出现之前,研究者们通常所使用的高通量测序技术需要从整个群体的批量细胞中获得足够的样本,因而测得的实际是这个细胞群体平均水平的基因表达,而不是单个细胞<sup>[3]</sup>,由于细胞异质性的存在,即使是相同来源的细胞,也可能携带差异明显的遗传信息,因此可能导致测序的结果也出现一定程度的偏差。随着单细胞测序技术的发展与应用,传统高通量测序技术的局限性得到弥补,新兴的技术和知识让我们能够有机会去详细的探究细胞异质性,发现并识别罕见的细胞亚群以及研究包括动脉粥样硬化在内的各种疾病中所涉及的细胞之间的相互作用。

## 1 单细胞测序技术概述

单细胞测序技术目前主要可分为基因组测序、转录组测序、表观遗传组测序、蛋白组测序以及多组学联合测序分析。每种测序技术也各有其不同的代表性的测序方法,已经有许多文章对各种测序方法优势和局限性作了详细讨论<sup>[4-6]</sup>,本文主要聚焦于单细胞转录组测序技术在动脉粥样硬化方面的研究讨论,对其他组学技术不再赘述。研究者们可以根据实验目的、项目规模、所需成本、细胞类型和数量、测序深度等选择不同的测序技术。

### 1.1 单细胞 RNA 测序技术简介

单细胞转录组测序(single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq)技术主要指在单细胞水平上扩增和测序整个转录组。它也包含了一大类广泛的技术和方法,每种技术和方法都有其各自的优势和局限性。自2009年来,Tang等<sup>[7]</sup>开发了第一种单细胞RNA测序方法(Tang RNA-seq),此后10余年来,多种单细胞RNA测序技术逐渐被开发应用,scRNA-seq技术得到了飞速的发展和突破,这些技术在处理细胞数目(数百到数万)的能力,分离单细胞的方法,转录本的覆盖率等等都各有不同,但所有的这些技术都遵循一个一般的工作步骤,即①分离单个细胞;②获得和处理RNA;③将RNA反向转录成cDNA;④扩增cDNA;⑤文库制备和测序;⑥数据处理和分析。其中单细胞的分离作为测序的第一步也是关键的一步,对后续的测序处理具有极其重要的影响。接下来本文将主要讨论单细胞分离和代表性的单细胞RNA测序技术。

### 1.2 单细胞的分离

进行单细胞测序的第1步是获得高质量的单细胞悬液。由于死亡细胞释放的游离RNA往往会影响单细胞RNA数据的质量,因此在细胞分离过程中必须考虑保持细胞活性以保证样本的可靠性。对于从血液和骨髓等液体组织或胸腺、脾、淋巴结等软组织中分离获取活细胞的处理方法相对容易,而对从像血管、心肌等组织中分离获取活细

胞则需要进行更优化的酶消解和机械分离方法,以保证所获得样本的活性。不同的血管组织对解离方案的耐受各有不同,需要采取各自单独的解离程序,包括使用不同的解离酶及不同的酶解顺序等,甚至青年或老年来源的血管也需要区分考虑以优化解离方案。解离过程中不可避免会发生细胞死亡并产生细胞碎片,而细胞碎片的存在会降低测序深度,因此在解离时需要尽量消除细胞碎片。此外,制备细胞悬液所花的时间长短也会改变转录结果,并可能导致错误的读数,尤其是像血管内皮细胞和平滑肌细胞这样容易发生失巢凋亡的细胞,需要尽快处理以保持细胞活性,因此,组织处理的速度也至关重要。总之,解离方案的设计应当在保证速度的同时,优化解离方案以产生均匀的细胞悬浮液、去除碎片并使该过程具有可重复性。McDonald等<sup>[8]</sup>采用并验证了一种具有高度可重复性的分离小鼠主动脉的方法,首先用乙二胺四乙酸(EDTA)进行灌注和去除主动脉,然后解剖外膜,用小剪刀沿其长度切开主动脉,并将其内皮朝上固定在硅胶覆盖的平板上,随后,将切开的血管置于37℃的胰酶中5 min,用薄手术刀将其切碎,再将细胞悬液放置在含有5%胎牛血清的组织培养液的试管中,以灭活胰酶。然后进行细胞离心并用含有BSA的PBS洗涤,暴露在核糖核酸酶A(RNaseA)中5 min以去除结合在内皮表面的RNA,再用离心机低速短时离心并洗涤2次。最后对细胞悬液进行计数并评估其活性。该团队使用该方案,已经重复性地获得了97%的细胞存活率,并且这种解离方案可以使内皮细胞得到显著的富集<sup>[9]</sup>。该方法通过循环的低速短时离心和洗涤来减少细胞碎片,在分离过程中使用EDTA可以有效整合钙,帮助减少内皮细胞之间的黏附,通过机械破碎来提高组织解离的速度,并且使用手术刀相比剪刀造成的损伤更少,因此尽可能同时保证了速度与细胞活性,并减少了误差。此外,关于其他器官组织的解离方法也已有较为详细的探索和研究<sup>[10-11]</sup>,研究人员应该根据组织标本类型选择合适的方法,尽可能减少细胞损伤。获得单细胞悬液后的下一步则是进行单细胞分离,目前为止,已有多种技术方法用于分离单细胞,包括荧光活化细胞分选技术(FACS)、免疫磁珠细胞分选(MACS)、显微操作法、微流控、梯度稀释法和激光捕获显微分离法(LCM)。其中FACS目前应用最为广泛。

### 1.3 单细胞 RNA 测序技术

目前已经开发出来的单细胞RNA测序技术有10多种,根据转录覆盖率的不同,这些方法可以分为两种类型,即全长转录测序方法和基于标签的方法<sup>[12]</sup>。全长转录测序方法主要包括Smart-seq、Smart-seq2、MATQ-seq等,其中最具有代表性的方法就是Smart-seq2。其原理是利用FACS技术将

单个细胞分离并放置在 96 孔板或 384 孔板中进行 cDNA 的逆转录合成,再加入 PCR 引物和细胞识别条形码,然后将细胞转移到单个试管进行 PCR 扩增。由于使用了高保真逆转录酶、模板转换和预扩增来提高 cDNA 产量,因此不需要额外的专门设备就可以获得覆盖良好的全长转录本<sup>[13]</sup>。基于标签的方法是通过与唯一分子标识符(unique molecular identifiers, UMIs)结合以提高定量准确度,UMI 是 1 个由几个核苷酸组成的序列,可以通过逆转录将其整合到每个转录本中,当提供大量的 UMIs 时,每个转录本最终都有 1 个随机的唯一条形码,因此相同的随机条形码序列仅由于 PCR 扩增而出现。通过对唯一条形码进行计数,可以准确地评估转录本的复制数量,因此基于标签的方法主要用于基因表达定量。大部分的 scRNA-seq 技术都采用了基于标签的方法,主要方法有 10×Chromium、Drop-seq、inDrop、CEL-seq、CEL-seq2、MARS-seq、STRTS-seq 等。这些方法中最具代表性的是基于液滴的 10×Chromium 技术,也是目前商业化最成功的技术<sup>[14]</sup>,该技术通过微流控芯片将 UMIs、引物和酶凝胶珠与单个细胞混合,并包裹在液滴中进行反应。细胞在这些液滴中裂解,裂解后释放的 mRNA 与凝胶珠上的细胞标签序列结合,形成单细胞凝胶珠(GEMS),随后, mRNA 在液滴中进行逆转录产生 cDNA,然后液滴破裂释放 cDNA,从而以统一的方式构建文库。该技术的细胞捕获效率可达 65%,每个微流控芯片可以在 10~20 min 内处理来自 8 个样本的数万个细胞,每次允许同时无偏向地选择大量细胞进行测序,与 Smart-seq2 相比,该技术大大提高了吞吐量,且无需严格要求细胞同质性,与同样基于液滴的高通量 scRNA-seq 技术 Drop-seq 和 inDrop 相比,10×Chromium 具有更高的分子灵敏度和精密度以及更少的技术噪音,10×Chromium 的出现极大地降低了 scRNA-seq 的成本,加速推动了单细胞转录组学的发展<sup>[14-15]</sup>。作为目前商业化最成熟的技术,10×Chromium 技术已被广泛应用于动脉粥样硬化领域的单细胞研究,是目前在小鼠<sup>[16-18]</sup>及人<sup>[19]</sup>动脉粥样硬化斑块的研究中使用最多的单细胞测序技术。但该技术仍存在转录覆盖率较低,不能用于异构体的识别剪接及等位基因表达分析等缺点,且对需要测序的细胞总量和活性要求较高。

## 2 单细胞转录组测序在动脉粥样硬化中的应用

动脉粥样硬化的形成是一个持续且复杂的慢性炎症反应过程,参与组成动脉粥样硬化斑块的主要成分包括内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和沉积的脂质及各种胶原、弹性纤维等。近年来随着单细胞测序技术在动脉粥样硬化中的应用,使得这些参与形成动脉粥样硬化斑块的细胞的异质性被进一步揭示出来,为动脉粥样硬化斑块

的组成及治疗提供了新的见解。

### 2.1 单细胞转录组测序与 T 细胞

T 细胞作为一种免疫调节细胞,在动脉粥样硬化的发展及斑块形成中发挥重要作用。scRNAseq 首次用于动脉粥样硬化领域,是在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>(ApoE<sup>-/-</sup>)缺陷小鼠模型中研究叉头盒 P3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞(Forhead box P3<sup>+</sup> Tregs)的可塑性和异质性,Butcher 等<sup>[17]</sup>利用 270 个细胞生成的 scRNAseq 数据鉴定了 3 个主要的 T 细胞亚群,包括 Treg、1 型 T 辅助细胞(Th1)和中间可塑性 Th1/Treg 亚群。scRNAseq 数据确认了先前未表征的 Th1/Tregs 亚群的存在,这种中间表型的特点是多种免疫抑制基因的表达降低,如 Tnfrsf4、Tnfrsf9、Tnfrsf18 等和 Treg 谱系转录因子的表达下调,包括 Ikzf2、Ikzf4 和 Foxp3。Winkels 等<sup>[18]</sup>使用 ApoE<sup>-/-</sup>和 Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠建立动脉粥样硬化模型,并对其主动脉 CD45<sup>+</sup> 白细胞进行测序,鉴定了 11 个白细胞亚群,其中 5 个 T 细胞亚群,分别是记忆型 T 细胞群、TH17、TH2、CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 混合细胞群。这其中记忆型 T 细胞群的频率超过了 TH17 细胞群,此外,Winkels 等<sup>[18]</sup>利用质谱流式细胞术(CyTOF)检测主动脉白细胞,检测到两个 CD4<sup>+</sup> T 细胞群:CD5<sup>med</sup>Ly-6C<sup>high</sup> 和 CD5<sup>high</sup>Ly-6C<sup>neg</sup>,这与 scRNAseq 数据中记忆型 T 细胞亚群中低 CD5 和高 Ly6c1 的基因表达相同,而与 TH17 亚群的表达正好相反。这两个亚群中 CD5 的表达与 Ly-6C 呈负相关,Ly-6C 可以作为记忆 T 细胞的标志之一,CD5 的表达水平与 TCR 信号转导和抗原诱导的增殖相关,在抑制性较低且易于转变为效应 T 细胞的诱导 Tregs 上高度表达。Tregs 的标志性标记 CD25(IL-2 受体)的缺乏也表明这两个亚群可能是中央记忆型 T 细胞或效应 T 细胞。这一发现可能说明动脉粥样硬化中的主要 T 细胞亚群是效应或记忆型 T 细胞,而不是调节性 T 细胞,其原因则可能是由于 T 细胞发生了表型转化,部分调节性 T 细胞转化为了效应 T 细胞。Depuydt 等<sup>[19]</sup>对 18 例患者颈动脉斑块的 3 282 个细胞进行了 scRNA-seq 分析,T 细胞占有细胞的 50%以上,是人类斑块中最多的细胞群,再根据不同的分化和激活状态对 CD4<sup>+</sup> T 细胞进行亚聚类,从而确定了 5 个不同亚群,其中两个亚群呈现细胞毒性基因表达谱,高表达 GZMA、GZMK 和 PRF1,而 GMZB 水平较低,表明病变血管中存在细胞毒性 CD4<sup>+</sup> T 细胞。其他亚群中则包括有显示幼稚和中央记忆型基因表达特征的 CD4<sup>+</sup> T 细胞。对 CD8<sup>+</sup> T 细胞的亚聚类揭示了 3 个 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群,分别为表达 CD69 的效应记忆细胞亚群、具有细胞毒性特征并缺乏 CD69 表达的终末分化细胞毒性 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群和 1 个中央记忆 T 细胞样亚群。

## 2.2 单细胞转录组测序与 B 细胞

B 细胞通过其产生抗体和分泌细胞因子的能力在先天性和适应性免疫中发挥关键作用,在动脉粥样硬化的发展进程中也起着重要的调控作用。在动脉粥样硬化斑块中 B 细胞仅少量存在,大多数 B 细胞主要存在于外膜中<sup>[20]</sup>。B 细胞通常被分为 B1 和 B2 两个亚型,B1 型发挥预防和抑制动脉粥样硬化的作用,B2 细胞则能够促进动脉粥样硬化发展;根据分布位置和表面标志物等的不同,B1 和 B2 细胞还可以被进一步划分为不同亚群<sup>[21]</sup>。为了验证 scRNA-seq 是否可以从斑块中检测出 B 细胞的这种异质性,Winkels 等<sup>[18]</sup>通过 scRNA-seq 和质谱流式细胞术(CyTOF)对小鼠和人的动脉粥样硬化病变进行了研究,与先前的研究相同,动脉粥样硬化主动脉中的 B 细胞含量很小,研究者们通过对西方饮食诱导的小鼠动脉粥样硬化主动脉中 CD19<sup>+</sup> 细胞进行亚聚类确定了 3 个不同的亚群,一个亚群显示出与 B1 细胞核心标志物特征相匹配的表达(CD43<sup>High</sup> B220<sup>neg</sup> CD11b<sup>High</sup>),另外两个亚群的表面标志物(CD43<sup>neg</sup> B220<sup>high</sup>、CD43<sup>low</sup> B220<sup>high</sup>)则为具有促动脉粥样硬化 B2 细胞表面标志物特征,并显示高表达促动脉粥样硬化形成的递质干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的特点,验证并进一步揭示了斑块中 B 细胞的异质性特点。B 细胞具有强大的特性和作用,对动脉粥样硬化的形成既有保护也有促进的作用,利用单细胞测序技术,揭示出斑块中 B 细胞异质性,绘制动脉粥样硬化中的 B 细胞免疫网络,将可能为动脉粥样硬化的治疗提供新的策略。

## 2.3 单细胞转录组测序与巨噬细胞

巨噬细胞在动脉粥样硬化的发病机制中起主要作用,是动脉粥样硬化斑块中最主要的免疫细胞类型,在斑块形成、发育及破裂中发挥重要作用。目前已有较多利用 scRNAseq 技术对小鼠和人的正常或动脉粥样硬化病变血管的巨噬细胞进行的研究,这些研究提供了更详细的动脉粥样硬化巨噬细胞转录图谱和细胞亚群<sup>[18-19,22-24]</sup>,大多数研究表明,巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块中最主要的免疫细胞类型,并且晚期动脉粥样硬化小鼠的巨噬细胞总数比例还会进一步增加<sup>[22]</sup>。巨噬细胞具有高度的可塑性,在受到不同的微环境因素作用如各种细胞因子、流体剪切力等影响下会极化为不同表型<sup>[23]</sup>,以前的组织学研究主要将巨噬细胞分为促炎型 M1 巨噬细胞和抗炎型 M2 巨噬细胞,随着研究的进展,现在我们已经发现并划分了更广泛更细致的巨噬细胞表型<sup>[24]</sup>。通过使用 scRNAseq 等技术,利用 Apoe<sup>-/-</sup> 和 Ldlr<sup>-/-</sup> 小鼠建立动脉粥样硬化模型,目前的研究数据显示斑块巨噬细胞可以细分为至少 3 个主要的巨噬细胞群,包括常驻型巨噬细胞、炎性巨噬细胞和 TREM2<sup>hi</sup> 巨噬细胞,其中促

炎巨噬细胞和 TREM2<sup>hi</sup> 巨噬细胞几乎只存在于病变的主动脉中,健康小鼠的主动脉中只发现常驻型巨噬细胞亚型<sup>[22]</sup>。TREM2<sup>hi</sup> 巨噬细胞不属于以往的巨噬细胞分型(M1 和 M2)中的任何一种,富集分析显示其具有独特的转录特征,包括胆固醇代谢、胆固醇流出和氧化磷酸化功能,类似于泡沫表型。Cochain<sup>[22]</sup>、Kim<sup>[25]</sup> 和 Lin<sup>[26]</sup> 等 3 个团队各自独立的研究都单独描述了 Trem2<sup>hi</sup> 巨噬细胞,证实了这一巨噬细胞亚型存在的可靠性。Depuydt 等<sup>[19]</sup>对人颈动脉斑块的研究也发现了 3 个巨噬细胞亚群,其中 2 个为炎性巨噬细胞亚群,富集经典的促炎和免疫途径,其炎症小体活化增加并且表达 TNF 和 TOLL 样受体(TLR);第 3 个巨噬细胞亚群则表达泡沫细胞和促纤维化标志物中的基因,该亚群还被检测出同时表达平滑肌细胞标志物 ACTA2 和巨噬细胞标志物 LGALS3 和 CD68,表明这一巨噬细胞亚群还可能获得平滑肌细胞(SMC)的部分特征。Fernandez 等<sup>[27]</sup>使用 scRNA-seq 和 CITE-seq 对来自 6 个人类动脉粥样硬化斑块的总共 7 169 个 CD45<sup>+</sup> 细胞进行单细胞免疫细胞测序和绘制细胞图谱,其研究结果显示斑块巨噬细胞的转录改变与小鼠动脉粥样硬化实验中巨噬细胞的异质性类似,包括炎性细胞亚群和泡沫细胞亚群,其中泡沫巨噬细胞亚群的表型可能与小鼠动脉粥样硬化斑块中发现的 TREM2<sup>hi</sup> 巨噬细胞相当,进一步揭示了炎性和泡沫巨噬细胞亚群的存在。

单细胞测序技术为我们揭示了小鼠和人类动脉粥样硬化中的巨噬细胞亚群,泡沫和非泡沫巨噬细胞的鉴定及作用可能作为预防动脉粥样硬化进展的潜在治疗靶标,但不同的研究之间仍然存在着差异,这些差异可能与各个团队使用的 scRNA-seq 技术的不同以及实验条件、人员操作等有关,而综合这些研究,我们能够从中得到一些一致性的结果,相信随着技术的发展和研究的深入,巨噬细胞亚群还可能得到进一步表征,而与其他如单细胞蛋白质组学及表观遗传组学等技术的联合应用,也可能进一步揭示其调控途径和细胞功能。

## 2.4 单细胞转录组测序和内皮细胞

除了免疫细胞,非免疫细胞也在动脉粥样硬化的形成过程中发挥重要作用,内皮细胞功能障碍会导致脂质、炎症细胞和凝血物质等的聚集,以及 VSMC 的增殖和迁移,从而促进动脉粥样硬化斑块的形成。越来越多的单细胞技术已经被应用于小鼠及人类正常和动脉粥样硬化血管非免疫细胞的研究,以更深入地了解它们在疾病中的作用。最近,Kalluri 等<sup>[28]</sup>研究揭示了来自健康小鼠主动脉的 3 个内皮细胞亚群,差异基因表达分析显示最大的亚群表达内皮细胞标记(VCAM1),另一个亚群表达参与脂质转运的基因(Cd36、Fabp4、Lpl 和 Gpihbp1)和血管生成标志物(Flt1),第三个亚群则

表达淋巴管内皮的特征性标志物(Lyve1等),Hu等<sup>[29]</sup>对来自人类的未患病心脏动脉的单细胞测序发现了4个内皮细胞亚群,其中3个血管内皮细胞亚群,1个淋巴管内皮细胞亚群,3个血管内皮细胞亚群中1个亚群(EC1)高表达炎症基因(ACKR1、CCL14和SELE等),主要功能是调节炎症,1个亚群(EC2)表达IGFBP3和HEY1,参与调节细胞生长和心血管发育,第3个亚群(EC3)主要高表达SULF1和EDN1,其中SULF1对伤口修复过程中上皮细胞的迁移具有重要作用,免疫荧光则显示与正常动脉相比,EC3在动脉粥样硬化中数量减少,因此推断EC3可以预防动脉粥样硬化和血管钙化,而EC1可能有助于动脉粥样硬化的进展。Depuydt等<sup>[19]</sup>对人颈动脉斑块的研究也揭示了4个不同的内皮细胞亚群,有3个亚群表达经典的内皮标记CD34和PECAM1,以及血管内皮标记TIE1,其中一个亚群高表达ACKR1,参与血管生成和受损内皮的再生,另外2个亚群都表达VCAM1,可以促进白细胞的黏附和迁移,这些表达提示这3个亚群代表活化的内皮细胞,通过细胞黏附和新血管形成以及介导白细胞外渗而加重晚期病变中的炎症。最后1个亚群除了表达内皮细胞标志物外,还表达典型的平滑肌细胞标志物(AC-TA2、NOTCH3和MYH11),再加上其平滑肌细胞相关通路的富集,表明这一细胞亚群可能正处于由内皮细胞转化为间充质细胞或是间充质细胞转化为内皮细胞的过程中,显示出内皮细胞相当大的异质性,这一过程也被称为内皮-间充质转化(EndoMT),已经有许多研究显示EndoMT在动脉粥样硬化病变进展中发挥作用,并且与炎症应激和内皮功能障碍有关<sup>[30-31]</sup>,该研究进一步佐证了EndoMT可能发生在人类晚期动脉粥样硬化斑块中。总之,scRNA-seq在患病动物和人类动脉粥样硬化动脉中的应用将更好地了解内皮细胞的活化状态和过渡阶段,从而确定内皮病理变化期间的治疗靶点。

## 2.5 单细胞转录组测序与平滑肌细胞

VSMCs是血管壁的主要组成部分,也是斑块形成各个阶段主要成分之一。VSMC早已被证明在血管中具有显著异质性和可塑性,如在血管钙化中由收缩型转化为成骨细胞表型<sup>[32]</sup>,在动脉粥样硬化过程中由收缩型向合成型转化,其不同表型的调节转变可以直接影响动脉粥样硬化的进展<sup>[33-35]</sup>,单细胞测序技术的应用使平滑肌细胞的表型调节被进一步揭示出来。Dobnikar等<sup>[36]</sup>利用成年小鼠健康主动脉进行scRNA-seq研究,鉴定了一个罕见的表达多能祖细胞标记Sca1的MYH11系VSMCs亚群,这一亚群呈现收缩相关基因的表达下调,但增加了与炎症和生长因子反应相关的基因表达。Wirka等<sup>[37]</sup>利用小鼠主动脉和分离的人类

冠状动脉的scRNA-seq研究确定了VSMCs分化为成纤维细胞样细胞的表型改变,这一过程部分依赖于TCF21的表达,结合全基因组关联研究(GWAS)推断TCF21促进VSMC向纤维肌细胞转化,从而促进动脉粥样硬化病变和纤维帽内纤维化的形成,这表明提高TCF21活性可能是降低斑块破裂发生率的一个潜在治疗策略。Pan等<sup>[38]</sup>结合SMC特异性图谱和小鼠与人类动脉粥样硬化斑块的单细胞RNA测序鉴定了一种由VSMC衍生的过渡性多能细胞亚群,因其细胞中同时检测到干细胞标志物Ly6a、内皮细胞标志物Vcam1和单核/巨噬细胞标志物Ly6c1的富集,而被称为SEM细胞,以表现它具有多种细胞标志的特点。通过对SEM的定位并结合单细胞基因组分析表明SEM细胞可能分化成多种SMC衍生的其他表型细胞,从而促进动脉粥样硬化的进展,包括分化为巨噬细胞样和纤维软骨细胞样细胞,并且还具恢复为SMC样表型的潜力。Alencar等<sup>[39]</sup>利用scRNA-seq研究确定干细胞多能性基因Klf4和Oct4是动脉粥样硬化进展过程中VSMC转变为多种表型的关键调节因子。

## 3 总结与展望

单细胞测序技术的快速发展为解决动脉粥样硬化等复杂心血管疾病提供了新的手段。总体而言,单细胞测序技术是绘制动脉粥样硬化组织细胞组成图谱和描述细胞异质性的理想选择,单细胞转录组分析将有助于表征细胞在动脉粥样硬化发生和进展过程中通过不同亚型和状态的转变轨迹。在动脉粥样硬化的各个阶段应用scRNA-seq将识别推动疾病进展及不同表现的这一阶段的特定转录特征,并将是靶向针对患者特定疾病机制的关键因素。未来的scRNA-seq研究最终可能会帮助我们直接识别促进疾病的细胞亚群表型,以及调控它们的途径、细胞因子或其他炎症线索,以获得更精确的靶向治疗和诊断标记。ScRNA-seq作为一种很有前景的工具,还可以比较患者样本中细胞间的通信路径和细胞成分,从而能够更好地对患者进行分类和治疗。对小鼠和人类动脉粥样硬化绘制全面系统的细胞图谱,将提高对相关小鼠模型的精确选择,并从机制上验证人类已识别的靶点和信号通路,以为疾病的临床治疗提供测试新的免疫疗法的策略和机会。

复杂心血管疾病的发展过程,往往涉及基因组、转录组、蛋白组和表观遗传水平等多方面的变化和调节。多组学技术联合应用可以阐明与疾病相关的整体生理变化,并为心血管疾病内在调节机制的研究和精确医学提供全面的解决方案。在未来的研究中,scRNA-seq技术应该与其他组学技术相结合,在多个水平上解释包括动脉粥样硬化在内的心血管疾病发生发展机制,通过结合其他组学信

息甚至可能会发现疾病中细胞亚群之间潜在的更大的异质性。同时,单细胞测序在中药的应用研究也将为理解中药复杂的分子作用机制、指导中药对包括动脉粥样硬化在内的多种疾病的临床治疗以及对中药的创新研发提供新的见解。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Linton MF, Babaev VR, Huang J, et al. Macrophage apoptosis and efferocytosis in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Circ J*, 2016, 80:2259-2268.
- [2] Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy[J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33:303-312.
- [3] 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.
- [4] Yasen A, Aini A, Wang H, et al. Progress and applications of single-cell sequencing techniques [J]. *Infect Genetics Evolution*, 2020, 80:104198.
- [5] Kashima Y, Sakamoto Y, Kaneko K, et al. Single-cell sequencing techniques from individual to multiomics analyses [J]. *Experi Mol Med*, 2020, 52(9):1419-1427.
- [6] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4):631-643, e4.
- [7] 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.
- [8] McDonald A I, Shirali A S, Aragón R, et al. Endothelial regeneration of large vessels is a biphasic process driven by local cells with distinct proliferative capacities [J]. *Cell stem cell*, 2018, 23(2):210-225. e6.
- [9] Ma F, Hernandez G, Romay M, et al. Single Cell RNAseq to study vascular diversity and function [J]. *Current Opin Hematol*, 2021, 28(3):221.
- [10] Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature [J]. *Nature*, 2018, 554(7693):475-480.
- [11] Su T, Stanley G, Sinha R, et al. Single-cell analysis of early progenitor cells that build coronary arteries [J]. *Nature*, 2018, 559(7714):356-362.
- [12] Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 59:36-46.
- [13] Picelli S. Full-Length Single-Cell RNA Sequencing with Smart-seq2 [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1979:25-44.
- [14] Zhang X, Li T, Liu F, et al. Comparative analysis of droplet-based ultra-high-throughput single-cell RNA-seq systems [J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(1):130-142. e5.
- [15] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14049.
- [16] Wolf D, Gerhardt T, Winkels H, et al. Pathogenic autoimmunity in atherosclerosis evolves from initially protective apolipoprotein B100-reactive CD4+ T-regulatory cells [J]. *Circulation*, 2020, 142(13):1279-1293.
- [17] Butcher MJ, Filipowicz AR, Waseem TC, et al. Atherosclerosis-driven Treg plasticity results in formation of a dysfunctional subset of plastic IFN $\gamma$  + Th1/Tregs [J]. *Circ Res*, 2016, 119(11):1190-1203.
- [18] Winkels H, Ehinger E, Vassallo M, et al. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell RNA-sequencing and mass cytometry [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12):1675-1688.
- [19] Depuydt MAC, Prange KHM, Slenders L, et al. Microanatomy of the human atherosclerotic plaque by single-cell transcriptomics [J]. *Circ Res*, 2020, 127(11):1437-1455.
- [20] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2):315-327.
- [21] Sage AP, Tsiantoulas D, Binder CJ, et al. The role of B cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(3):180-196.
- [22] Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzis P, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12):1661-1674.
- [23] 张苏慧, 张颖倩, 惠辉, 等. 流体剪切力作用于单核-巨噬细胞对动脉粥样硬化的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2022, 38(5):412-417.
- [24] 田嘉珉, 陈羽斐, 沈伟. M2型巨噬细胞极化及其对动脉粥样硬化的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2022, 38(10):838-843.
- [25] Kim K, Shim D, Lee JS, et al. Transcriptome analysis reveals nonfoamy rather than foamy plaque macrophages are proinflammatory in atherosclerotic murine models [J]. *Circ Res*, 2018, 123(10):1127-1142.
- [26] Lin JD, Nishi H, Poles J, et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(4):110.
- [27] Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques [J]. *Nat Med*, 2019, 25(10):1576-1588.
- [28] Kalluri AS, Vellarikkal SK, Edelman ER, et al. Single-cell analysis of the normal mouse aorta reveals functionally distinct endothelial cell populations [J]. *Circulation*, 2019, 140(2):147-163.
- [29] Hu Z, Liu W, Hua X, et al. Single-cell transcriptomic atlas of different human cardiac arteries identifies cell types associated with vascular physiology [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2021, 41

- (4):1408-1427.
- [30] Cho J G, Lee A, Chang W, et al. Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:294.
- [31] Chen PY, Qin L, Baeyens N, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12):4514-4528.
- [32] 薛新月, 畅智慧, 刘兆玉. 血管平滑肌细胞在血管钙化中的调控机制研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2020, 36(9):870-873.
- [33] Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1998, 18(3):333-338.
- [34] Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003, 23(9):1510-1520.
- [35] Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, et al. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):540-550.
- [36] Dobnikar L, Taylor AL, Chappell J, et al. Disease-relevant transcriptional signatures identified in individual smooth muscle cells from healthy mouse vessels[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1-17.
- [37] Wirka RC, 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.
- [38] Pan H, Xue C, Auerbach B J, et al. Single-cell genomics reveals a novel cell state during smooth muscle cell phenotypic switching and potential therapeutic targets for atherosclerosis in mouse and human[J]. *Circulation*, 2020, 142(21):2060-2075.
- [39] Alencar GF, Owsiany KM, Karnewar S, et al. Stem cell pluripotency genes Klf4 and Oct4 regulate complex SMC phenotypic changes critical in late-stage atherosclerotic lesion pathogenesis [J]. *Circulation*, 2020, 142(21):2045-2059.

(收稿日期:2022-08-02)

(上接第 473 页)

害。术后半年的随访未发现起搏器电极各参数异常。所以高频电刀对起搏器功能的干扰和对电极的损害都是可以避免的。

综上,术中充分止血是预防囊袋血肿的有效措施,高频电刀用于起搏器囊肿止血是安全、有效的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Michael G, Jens Cosedis N, Mads Brix K, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy[J]. *Euro Heart J*, 2021, 42:3427-3520.
- [2] 张建军. 永久性起搏器植入围手术期需要考虑的细节及技术要点[J]. *临床心血管病杂志*, 2021, 37(11):975-978.
- [3] Alexander K, Hermann B, Karim S, et al. An electrical plasma surgery tool for device replacement-retrospective evaluation of complications and economic evaluation of costs and resource use[J]. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 2015, 38:28-34.
- [4] Haran B, Christoph S, Angelo A, et al. EHRA expert consensus statement and practical guide on optimal implantation technique for conventional pacemakers and implantable cardioverter-defibrillators; endorsed by the Heart Rhythm Society(HRS), the Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHS), and the Latin-American Heart Rhythm Society (LAHRS) [J]. *Europace*, 2021, 30:1-26.
- [5] 程典, 顾凯, 杨兵. 美国心律学会和美国麻醉医师学会关于心血管植入型电子器械患者围术期处理专家共识解读[J]. *中华心律失常学杂志*, 2017, 21(5):4.
- [6] 徐白鸽, 梁延春, 高阳, 等. 高频电刀应用对心血管植入型电子器械囊袋血肿发生率的影响[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2016, 24(9):502-505.
- [7] Jiyoun S, Agacnp B, Aluem T, et al. The relationship between pocket hematoma and risk of wound infection among patients with a cardiovascular implantable electronic device: An integrative review [J]. *Heart Lung*, 2020, 49(1):92-98.
- [8] 王涛, 鲍慧慧, 程晓曙. 心脏植入式电子装置感染预防的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2020, 36(8):765-767.
- [9] Boyle TA, Uslan DZ, Prutkin JM, et al. Reimplantation and Repeat Infection After cardiac-implantable electronic device infections: experience from the MEDIC (Multicenter Electrophysiologic Device Infection Cohort) Database [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2017, 10(3):e004822.
- [10] Francesco D, Gennaro M, Alberto C, et al. Pocket Hematoma: A Call for Definition[J]. *Circ*, 2015, 38:909-913.
- [11] Birnie DH, Healey JS, Wells GA, et al. Continued vs. interrupted direct oral anticoagulants at the time of device surgery, in patients with moderate to high risk of arterial thrombo-embolic events (BRUISE CONTROL-2)[J]. *Euro Heart J*, 2018, 44:3973-3979.

(收稿日期:2022-10-24)