

基于单细胞测序技术分析缺血性脑卒中的转录图谱与疾病进展的生物信息学分析

刘飞,叶民

摘要 目的:通过单细胞测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术刻画缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的转录图谱并分析特定细胞亚群的特征。方法:从基因表达数据库(gene expression omnibus, GEO)中获取IS小鼠的脑组织和同侧的正常脑组织(Sham)scRNA-seq公共数据集GSE174574,对其中的3个IS病灶和3个Sham组织分别进行样本整合,完成过滤和质控后通过Harmony法去除批次效应进行下游分析。通过UMAP进行细胞亚群聚类。通过SingleR软件和手工完成各细胞亚群的注释。接着完成差异化表达和GSVA功能富集分析。使用Monocle2算法评估细胞的进化状态和发育轨迹。使用Cellchat算法刻画细胞间的通讯作用。结果:经严格质控后,3个IS样本共有29 920个细胞,经UMAP降维后共获得22个细胞亚群和10个注释出的亚群。其中内皮细胞和巨噬细胞在IS样本中比例较高。3个Sham样本共有27 259个细胞,UMAP降维获取18个细胞亚群和9个注释出的亚群。与IS相比,Sham组有明显较高的小胶质细胞比例,但巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞的比例相对偏低。对IS样本进行进一步分析,星形细胞可分为7个细胞亚群(C0~C6),C0~C3组具有明显正相关关系,C0组发育较早而C4、C5组发育较晚。少突细胞可分为6个细胞亚群(C0~C5),C3组的发育较早而C2组的发育较晚。少突胶质细胞间的信号传导主要在PSAP通路,C0和C1组与其他少突胶质细胞亚组的信号传导更加密切。免疫细胞包括粒细胞、巨噬细胞、单核细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞,粒细胞和单核细胞可介导巨噬细胞耐受和抗病毒免疫反应,NK细胞则对内源性刺激信号不敏感。轨迹分析提示粒细胞和单核细胞处于免疫细胞的发育早期阶段而NK细胞和巨噬细胞处于发育晚期阶段。细胞间的信号通路包括CCL、SPP1、CXCL等,其中CCL通路占比最大,单核细胞与其他细胞的互动较多,而NK细胞较少。结论:本研究从单细胞分辨率刻画了IS的转录图谱和各细胞亚群间的关系,并与Sham样本进行对比,揭示了大脑炎症微环境下星形细胞、少突细胞和各免疫细胞在IS疾病进展中的具体特征和重要作用。免疫细胞亚群在所有细胞中占有较大比例,具有免疫调节、抗炎反应和稳态的多种作用。

关键词 缺血性脑卒中;单细胞测序;转录图谱全景;生物信息学分析

中图分类号 R741;R743.3 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20230597

本文引用格式:刘飞,叶民.基于单细胞测序技术分析缺血性脑卒中的转录图谱与疾病进展的生物信息学分析[J].神经损伤与功能重建,2024,19(7):385-391,434.

作者单位

南京明基医院神经
内科

南京 210000

收稿日期

2023-09-07

通讯作者

叶民

Johson.Ye@

benqmedicalcenter.

com

Single-cell RNA Sequencing Analysis and Bioinformatics Analysis of the Transcriptional Profile of Ischemic Stroke and Disease Progression LIU Fei, YE Min. Department of Neurology, Nanjing Mingji Hospital, Nanjing 210000, China

Abstract Objective: To characterize the transcriptional profile of ischemic stroke (IS) and analyze the characteristics of specific cell subpopulations by single-cell sequencing (scRNA-seq). **Methods:** The public scRNA-seq dataset GSE174574 of IS mouse brain tissues and ipsilateral hemisphere (sham) tissues was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Samples of three IS lesions and three sham tissues were integrated respectively. Following filtering and quality control, batch effects were corrected using the Harmony method for downstream analysis. UMAP was used to generate cell subpopulation clusters, with annotations completed by SingleR and manual methods. Differential expression analysis and GSVA functional enrichment analysis were then performed. The Monocle2 algorithm was used to evaluate the evolutionary state and developmental trajectory of the cells. The CellChat algorithm was used to characterize cellular communication. **Results:** After rigorous quality control, a total of 29 920 cells from three IS samples were included. UMAP dimensionality reduction identified 22 cell subpopulations, of which 10 were annotated. Endothelial cells and macrophages were more prevalent in the IS samples. For the sham group, 27 259 cells were included, resulting in 18 cell subpopulations, with 9 annotated. Compared to the IS group, the sham group had a significantly higher proportion of microglia, whereas the proportions of macrophages, monocytes, and epithelial cells were lower. Further analysis of IS samples showed that astrocytes could be divided into seven subpopulations (C0~C6), with a significant positive correlation in C0~C3 group. The C0 group developed earlier, while the C4 and C5 groups developed later. Oligodendrocytes could be divided into six cell subpopulations (C0~C5), with C3 developing earlier and C2 developing later. Signal transduction between

oligodendrocytes mainly occurred via the PSAP pathway, with closer interactions between C0 and C1 groups and other oligodendrocyte subgroups. Immune cells included granulocytes, macrophages, monocytes and natural killer (NK) cells. Granulocytes and monocytes mediated macrophage tolerance and antiviral immune responses, while NK cells were less responsive to endogenous stimuli. Trajectory analysis showed that granulocytes and monocytes were in the early stage of immune cell development while NK cells and macrophages were in the later stages. Intercellular signaling pathways included CCL, SPP1, and CXCL pathways, with the CCL pathway being the largest proportion. Monocytes exhibited more interactions with other cells, while NK cells showed fewer interactions. **Conclusion:** This study characterized the transcriptional profile of IS and the relationships between various cell subpopulations at single-cell resolution. Comparison with sham samples revealed the specific characteristics and important roles of astrocytes, oligodendrocytes, and various immune cells in the progression of IS under the brain's inflammatory microenvironment. Immune cell subpopulations accounted for a large proportion of all cells, exhibiting multiple functions in immune regulation, anti-inflammatory response, and homeostasis.

Keywords ischemic stroke; single-cell RNA sequencing; transcriptional profile; bioinformatic analysis

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是一种脑部血液供应障碍性疾病, 由多种因素引起。这种疾病会使得脑部局部组织发生不可逆的损伤, 导致脑组织出现缺血、缺氧、坏死等病变, 丧失正常的功能^[1-3]。颅内动脉粥样硬化可导致动脉管壁增厚、失去弹性, 长期作用后可导致动脉狭窄、闭塞, 这是导致 IS 发病的主要原因^[4]。我国总体 IS 终生发病率约为 39.9%, 位居全球第一, 且总体呈现不断上升的趋势^[5]。随着社会老龄化进程加快, 卒中危险暴露因素的不断增加, 我国的卒中负担将呈现爆发式增长并有年轻化的趋势, 预计在 2030 年脑血管事件的发病率将较 2010 年升高约 50%^[5]。而在 2018 年我国约有 194 万人死于卒中, 居民因脑血管病致死的比例超过 20%, 因持续人口老龄化, IS 的粗死亡率有进一步升高的趋势^[5]。对于急性 IS 患者, 在起病早期积极进行溶栓干预被认为是一种有效的治疗手段。此外, 血管内介入治疗、抗血小板治疗、降纤治疗、改善循环的药物治疗及营养神经治疗等也被用于 IS 的临床治疗中。

单细胞测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 技术是一种高通量测序技术, 它可以在单个细胞水平上获得全转录组的表达谱。这项技术通过将分离得到的单个细胞中的微量全转录组 RNA 扩增后进行高通量测序, 从而揭示特定生物学过程和疾病发生过程的分子调节机制。scRNA-seq 技术可以帮助研究人员深入了解复杂的细胞类型和状态的异质性, 探索不同细胞亚型之间的转录调控网络, 进一步加深对细胞发育和疾病发生机制的认识, 是生命科学研究的重要工具之一^[6]。ScRNA-seq 不仅能够满足常规 RNA 测序分析转录产物类别、结构及表达水平变化的需求, 还能够解决细胞间异质性的问题, 特别适用于神经细胞等异质性较大的细胞类型^[7,8]。鉴于 IS 作为一种常见疾病给我国居民的生活带来了严重负担, 同时

考虑到 scRNA-seq 在 IS 研究中的优势以及目前该领域研究证据偏少, 本研究旨在利用公共数据库中的单细胞测序数据, 通过生物信息学分析揭示 IS 的转录图谱和疾病进展的潜在机制; 与 Sham 组进行对比, 明确 IS 中特定细胞亚群的功能和特征, 为疾病的干预提出新见解。

1 材料与方法

1.1 ScRNA-seq 数据获取和预处理

ScRNA-seq 公共数据集 GSE174574 主要从基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中获取, 主要基于 R 软件的 Seurat 平台完成相关分析。GSE174574 主要来自于大脑中动脉阻塞和正常的小鼠模型, 均通过手术获取实验样本。其中三个样本来自于正常小鼠模型 (Sham) (GSM5319987、GSM5319988、GSM5319989), 剩下三个样本来自于大脑中动脉阻塞 (IS) 的小鼠模型 (GSM5319990、GSM5319991、GSM5319992), 基于 Illumina NovaSeq 6000 平台完成测序^[9]。对 IS 和 Sham 样本分别进行下游生物信息学分析。3 个 IS 样本和 3 个 Sham 样本分别有 29 920 和 27 259 个细胞通过质控和过滤 (feature 值 > 300; count 值 < 100 000; 线粒体基因含量 < 10%), 并按照 4% 的预测值去除双细胞。将数据校正后对排名前 2 000 位的高变基因 (highly variable genes, HVGs) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 降维过程中的批次效应使用 Harmony 法进行去除。UMAP 可聚类出 22 个细胞亚群, 通过 SingleR 软件进行细胞亚群的初步注释, 并结合自动注释的结果进行手工注释。在各细胞亚群之间完成差异化表达分析, 差异化表达的具体条件为: 差异倍数对数的绝对值 ($\log |\text{fold change (FC)}|$) > 2, 错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05, 并对

各亚群最显著的5或10个差异化表达基因(differently expressed genes, DEGs)可视化。

1.2 ScRNA-seq数据的处理

由limma包完成scRNA-seq数据集GSE174574的差异化表达,对各细胞亚群注释主要参考既往发表的研究。通过Monocle包完成细胞轨迹分析和拟时序分析,细胞间通讯基于CellPhoneDB数据库由Cellchat包完成^[10]。对于特定基因的GO注释和KEGG通路分析,可利用基因本体论(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG)数据库进行。这些分析会以 $P < 0.05$ 为显著性富集指标,并且由clusterProfiler包完成统计学分析^[11]。

1.3 免疫组化

对购买的6只成年雄性C57BL/6J小鼠(鼠龄60~70 d)在标准温度(22 °C ~ 24 °C)的无菌环境中进行饲养。将6只小鼠随机分成IS组和Sham组,采用大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)造模:用水合氯醛(30 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,分别对两组小鼠进行手术。将小鼠固定于仰卧位,沿颈线正中切开皮肤,分别暴露并结扎左颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。将硅胶橡胶层单丝缓慢插入颈内动脉,直至大脑中动脉完全阻塞。通过阻塞左侧大脑中动脉60 min以诱导短暂性局灶性脑缺血。之后,取出细丝以缓慢恢复脑血流量。Sham组采用类似的手术过程处理小鼠,但未对其大脑中动脉进行闭塞。最后,使小鼠从手术中恢复,并保持正常状态。本院动物委员会伦理批准号为:IOC-FEC-022-2.0。在小鼠缺血再灌注24 h后,再次将小鼠麻醉、固定,并用PBS灌注以去除血液。立即解剖IS组和Sham组以获取相关样本进行免疫组化。通过包埋切片、暴露抗原、血清封闭、一抗过夜、二抗孵育、显色、复染、脱水、封片等步骤制片。按照以下标准进行染色强度评分:细胞无染色为0分(阴性),出现黄染为1分(弱阳性),棕色染色为2分(阳性),褐色染色为3分(强阳性)。阴性和弱阳性代表检测基因低表达,阳性和强阳性代表检测基因高表达。

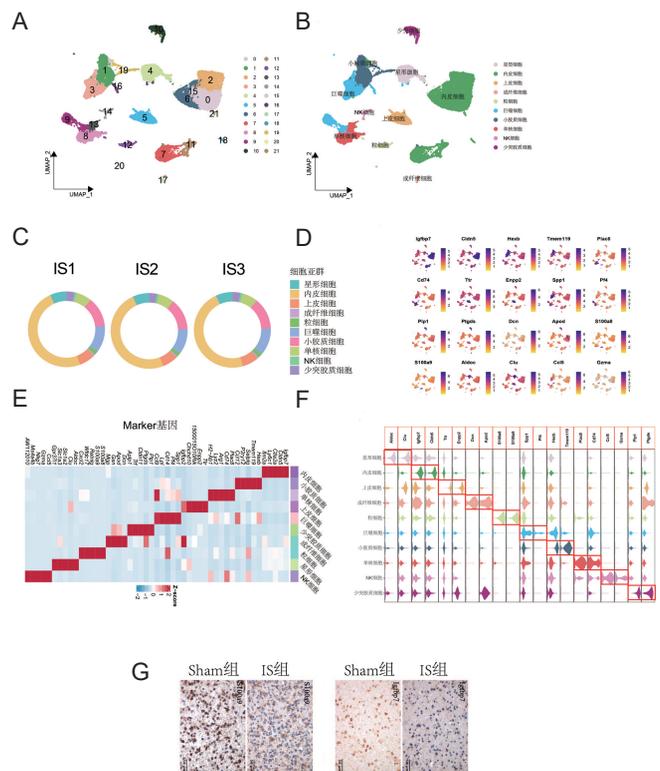
1.4 统计学处理

采用R软件4.2.1版本进行统计学分析和生信分析。计量资料以(均数±标准差)表示,若数据符合正态分布,组间差异比较采用独立样本t检验,不符合正态分布则采用Wilcoxon检验,多组间比较则采用K-W检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单细胞测序数据和结果

选取GSE174574数据集的三个小鼠IS样本,经过质控和过滤后共有29 920个细胞,平均每个细胞有1 518个基因。由UMAP降维后共获取22个细胞亚群(C0~C21)(图1A),经过SingleR和手动注释共注释出10个细胞亚群即:星形细胞亚群、内皮细胞亚群、上皮细胞亚群、成纤维细胞亚群、粒细胞亚群、巨噬细胞亚群、小胶质细胞亚群、单核细胞亚群、NK细胞亚群和少突细胞亚群(图1B)。由显示每个样本中不同细胞亚群比例的甜甜圈图可知,内皮细胞的含量最高,其次是巨噬细胞和小胶质细胞(图1C)。通过对10个注释出的细胞亚群进行差异化表达,并绘制热图,可以看出在不同细胞亚群中表达量居前5位的差异化表达基因(图1E)。同时将较为重要的高表达基因通过scRNA-seq的聚类特征图(图1D)和小提琴图(图1F)进行可视化。通过免疫组化展示S100a9和Igfbp3基因在IS组和Sham组的表达情况,可见S100a9基因在两组均具有较高表达,Igfbp7在IS组中的表达略高于Sham组(图1G)。



注:A. UMAP可鉴别出22个细胞亚群;B.可详细注释出10个细胞亚群;C.内皮细胞和巨噬细胞在3个IS样本中占有较大比例;D.特定差异化表达基因的降维特征图;E.5个最显著的差异化表达基因的热图;F.特定差异化表达基因的小提琴图。

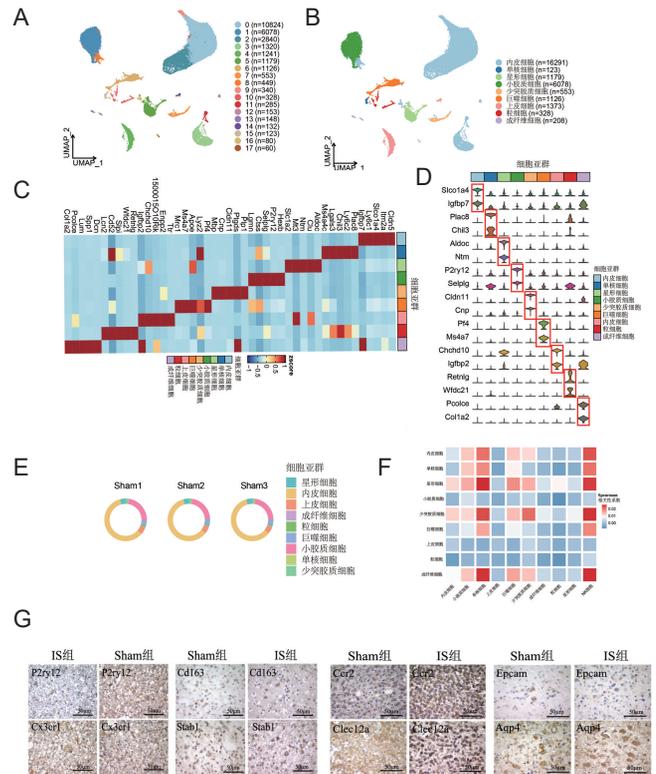
图1 IS样本的单细胞亚群划分

对3个Sham样本进行分析,质控和过滤后共有27 259个细胞,UMAP降维获取18个细胞亚群(图2A)并完成9个细胞亚群的注释(图2B),其中内皮细胞数目最多,有16 291个。在9个注释出的细胞亚群间进行差异化表达,将显著差异化表达的基因通过热图(图2C)和小提琴图(图2D)进行展示。三个Sham组样本间进行比较,占比最高的细胞亚群是内皮细胞、小胶质细胞、上皮细胞、巨噬细胞、星形细胞等(图2E)。在细胞构成比例上,IS组和Sham组有异有同,两者均具有较多的内皮细胞,但IS组的巨噬细胞、单核细胞和上皮细胞比例较Sham组高,而小胶质细胞较Sham组少。基于IS组和Sham组的细胞亚群进行Spearman相关性分析,IS组中的星形胶质细胞、少突胶质细胞、成纤维细胞与Sham细胞亚群中的单核细胞、NK细胞具有较强相关性,这提示在两组样本中,上述细胞亚群可能具有类似的生物学活动和功能(图2F)。免疫组化证实,P2ry12和Cx3cr1(小胶质细胞 biomarker)在Sham组有较高表达,Cd163、Stab1(巨噬细胞 biomarker),Ccr2、Clec12a(单核细胞 biomarker),Epcam、Aqp4(上皮细胞 biomarker)在IS组中有较高表达,在Sham组有较低表达(图2G)。

2.2 星形胶质细胞在IS中的特征

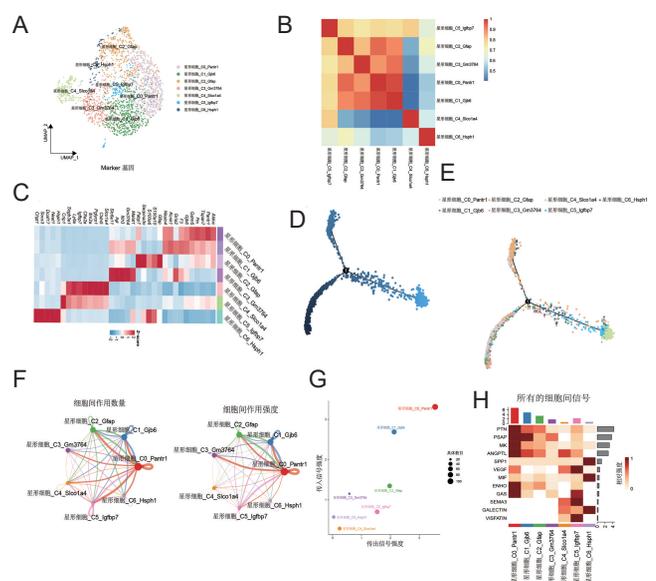
既往研究表明星形细胞在IS形成的炎症免疫微环境中具有重要生物学意义。与小胶质细胞类似,星形细胞的亚群和多样性对维持机体的发育和内部稳态多种疾病发生进展具有重要作用^[12]。对获取的2 095个星形细胞进行分析,平均每个细胞具有1 564个基因。通过UMAP算法可将其分为7个细胞亚群(C0~C6)(图3A),对7个亚群进行Spearman相关性分析可知C0~C3及C5之间呈较显著的正相关(图3B)。对7个星形细胞亚群做差异化表达,差异化表达的基因如图3C所示。通过拟时序和轨迹分析可知C0、C1、C2亚群多处于所有星形细胞分化的早期阶段,而C4、C5多处于分化的晚期阶段(图3D~E)。细胞间通讯分析展示出不同细胞亚群的相互作用特征和信号通路,C0细胞亚群与其他亚群的相互作用最为密切,其与C1、C2、C3亚群作用强度较大(图3F),汇总传入和传出信号强度,C0和C1亚群最为活跃,紧随的是C2、C3、C5亚组(图3G)。星形细胞亚群间的信号通路主要有PTN、PSAP、MK、ANGPTL、SPP1、VEGF、MIF等12种,PTN通路所占比重最大,其后为PSAP、MK和ANGPTL等(图3H)。

2.3 少突胶质细胞在IS中的特征



注:A. UMAP可鉴别出18个细胞亚群;B. 可详细注释出9个细胞亚群;C. 5个最显著差异化表达基因的热图;D. 特定差异化表达基因的小提琴图;E. 3个Sham样本中的细胞比例;F. IS和Sham组各细胞亚群的Spearman相关性分析(横轴代表IS组的细胞亚群,纵轴代表Sham组的细胞亚群);G. P2ry12、Cx3cr1、Cd163、Stab1、Ccr2、Clec12a、Epcam、Aqp4等基因在IS组和Sham组的免疫组化结果。

图2 Sham样本的单细胞亚群划分



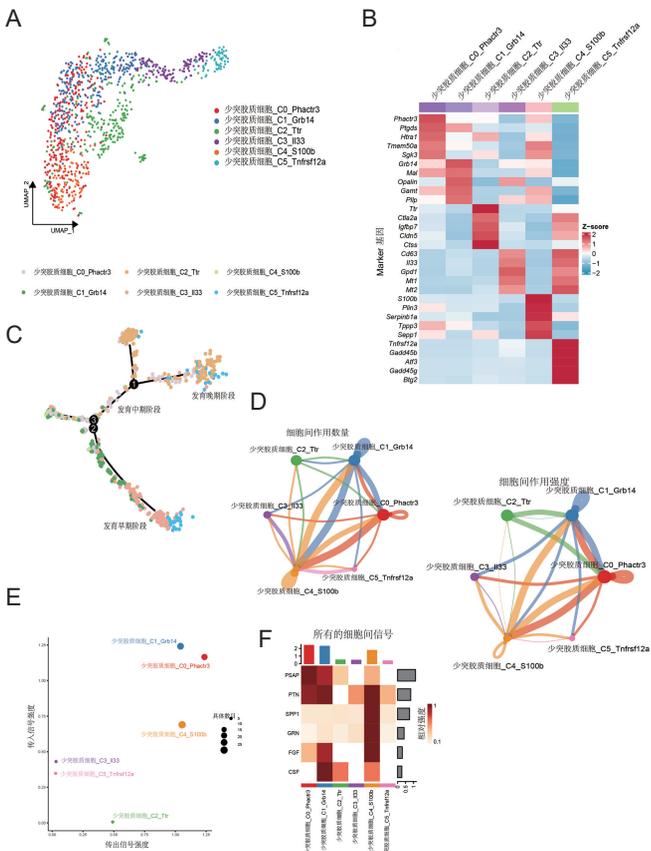
注:A. UMAP可鉴别出7个细胞亚群;B. 7个细胞亚群间的相关性分析;C. 不同细胞亚群间差异化表达基因的热图;D~E. 不同细胞亚群的发育轨迹,D图点颜色越深提示细胞发育越早;F. 不同星形细胞亚群间的通讯数量和强度;G. 汇总的传入和传出信号强度;H. 所有细胞亚群及其涉及的信号通路强度。

图3 星形细胞及亚群的具体特征

少突胶质细胞对平衡颅内微环境的稳态也十分重要^[13]。对获取的1012个少突胶质细胞进行重新聚类,共获得6个亚群(C0~C5)(图4A),6个细胞亚群间差异化表达的基因也展示在热图中(图4B)。刻画少突胶质细胞的发育轨迹,其共有3个簇,最下端的是发育早期阶段,通过节点2和3之后过渡到节点1,靠近右上端的是发育晚期阶段(图4C),进一步分析特定细胞的演变模式,C1、C3亚群处于所有细胞发育的早期阶段,C2亚群处于细胞发育的相对晚期阶段,C5亚群较为特殊,在发育早期和晚期都有出现,未来研究可对C5亚群进行更加详细地划分(图4C)。C1和C0亚群与其他细胞亚群的通讯传导更加频繁(图4E),C0与C4、C1亚群的互作更多,类似地C1与C4、C0亚群的互作较多(图4D)。少突胶质细胞间信号通路主要有PSAP、PTN、SPP1、GRN等6种,其中PSAP、PTN和SPP1是占比较大的信号通路(图4F)。

2.4 免疫细胞在IS中的特征

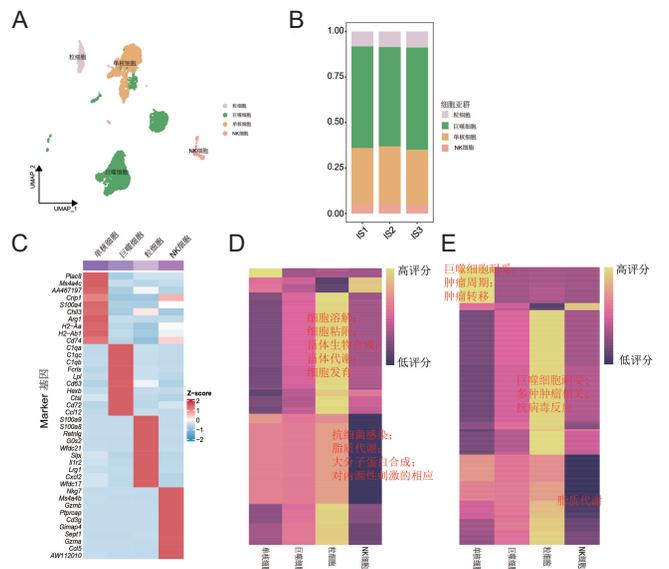
对IS样本中6120个免疫细胞进行分群和注释,共可分为4个细胞亚群:粒细胞亚群(521个)、巨噬细胞亚群(3393个)、单核细胞亚群(1909个)、NK细胞亚群(297个)(图5A)。由不同免疫细胞亚群在不同患者中的百分比比例图可知巨噬细胞和单核细胞占有绝对优势比例,说明髓系细胞较淋巴细胞在IS的微环境中更加常见(图5B)。对各免疫细胞亚群进行差异化表达,将前10位最为显著的基因展示在热图中(图5C)。利用基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)算法评估4个细胞亚群间基因本体论(gene ontology, GO)和免疫信号通路的差异,粒细胞在细胞溶解、粘附、甾体代谢与合成、细胞发育中具有重要作用,同时其还兼具介导巨噬细胞耐受,抗病毒与肿瘤作用;单核细胞也可以介导巨噬细胞耐受并与肿瘤细胞的演进和侵袭有关;NK细胞则承担相对较少的抗炎反应作用,对内源性刺激信号较为不敏感,同时其与脂质代谢关系不密切(图5D~E)。



注:A. UMAP可鉴别出6个细胞亚群;B. 不同细胞亚群间差异化表达基因的热图;C. 不同细胞亚群的发育轨迹;D. 不同少突胶质细胞亚群间的通讯数量和强度;E. 汇总的传入和传出信号强度;F. 所有细胞亚群及其涉及的信号通路强度。

图4 少突胶质细胞及亚群具体特征

粒细胞亚群(521个)、巨噬细胞亚群(3393个)、单核细胞亚群(1909个)、NK细胞亚群(297个)(图5A)。由不同免疫细胞亚群在不同患者中的百分比比例图可知巨噬细胞和单核细胞占有绝对优势比例,说明髓系细胞较淋巴细胞在IS的微环境中更加常见(图5B)。对各免疫细胞亚群进行差异化表达,将前10位最为显著的基因展示在热图中(图5C)。利用基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)算法评估4个细胞亚群间基因本体论(gene ontology, GO)和免疫信号通路的差异,粒细胞在细胞溶解、粘附、甾体代谢与合成、细胞发育中具有重要作用,同时其还兼具介导巨噬细胞耐受,抗病毒与肿瘤作用;单核细胞也可以介导巨噬细胞耐受并与肿瘤细胞的演进和侵袭有关;NK细胞则承担相对较少的抗炎反应作用,对内源性刺激信号较为不敏感,同时其与脂质代谢关系不密切(图5D~E)。

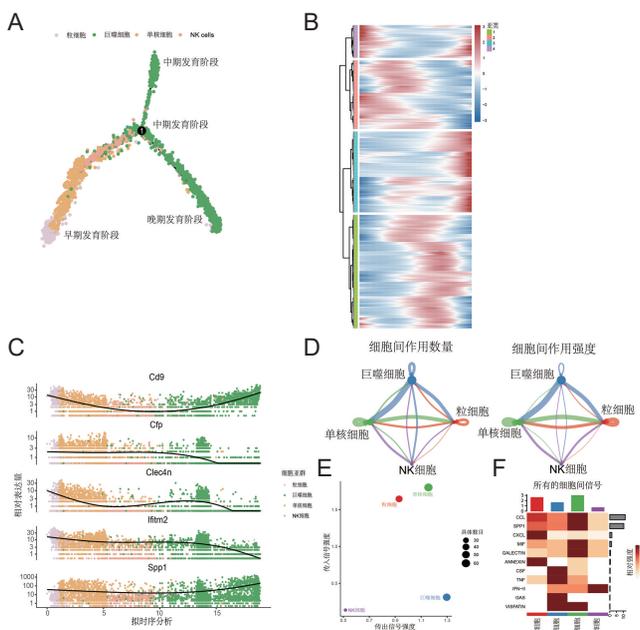


注:A. UMAP可手动注释出4个细胞亚群;B. 百分比堆积图显示巨噬细胞和单核细胞等髓系细胞占有较高比重;C. 不同细胞亚群间差异化表达基因的热图;D. 不同细胞亚群的GO富集差异;E. 不同细胞亚群的免疫通路差异。

图5 免疫细胞及亚群具体特征

进一步刻画免疫细胞的发育演进轨迹,其发育过程中只有1个簇,靠近左下端为发育的早期阶段,中间和右上方为发育的中期阶段,右下方为发育的晚期阶段(图6A)。可以看到粒细胞、单核细胞和NK细胞发育的较早,而巨噬细胞则相对发育较晚(图6A)。对节点1前后的免疫细胞亚群进行分析并绘制随拟时序发展的基因表达热图,共有1412个基因在节点1前后表达量随拟时序发展存在显著变化,由层次聚类可将1412个基因划分为4个亚类(图6B),进一步展示变化最显著的5个基因: Cd9、Cfp、Clec4n、Ifitm2、Spp1,

Cfp、Clec4n、Ifitm2 在细胞发育晚期的表达量较早期明显升高, Spp1 在晚期的表达量较早期显著升高, 而 Cd9 在发育中期的表达量最低, 在发育早期与晚期均较高 (图 6C)。分析细胞间通讯方式, 单核细胞和粒细胞与其他细胞亚群的作用较为密切 (图 6D ~ E), 细胞间通讯主要包含 CCL、SPP1 等 11 条信号通路, CCL 和 SPP1 在其中占比较大 (图 6F)。上述结果也强调了星形细胞、少突胶质细胞和免疫细胞在 IS 中的具体特征与疾病进展中的重要作用。总之, 对 IS 细胞亚群间的分析揭示出大脑原有细胞的生物学功能以及微环境中免疫细胞的动态变化间的相关关系, 这可以帮助进一步掌握 IS 的转归和寻找临床有效干预的时机。



注: A. 粒细胞、巨噬细胞、单核细胞和NK细胞的不同发育特征; B. 在节点1前后随拟时序表达变化显著的基因热图; C. 在图B基础上, 表达变化最显著的5个基因; E. 汇总的传入和传出信号强度; F. 所有细胞亚群及其涉及的信号通路强度。

图6 免疫细胞亚群的分化和细胞通讯特征

3 讨论

数据显示, 目前中国 40 ~ 74 岁之间的居民首次卒中标准化发病率平均每年增长 8.3%。从 2012 年至 2018 年, 年龄不低于 40 岁的中国居民卒中标准化患病率由 1.89% 上升至 2.32%^[14]。据推算, 当前约有 1 318 万居民患有卒中, 每年因卒中死亡的人数达到 190 余万。作为卒中的主要类型, 缺血性卒中的防治工作仍需进一步加强, 中国在此方面仍面临着巨大的挑战^[15,16]。IS 的发病机制目前仍不明确, 主要发病机制可能涉及能量衰竭、乳酸中毒、兴奋性氨基酸毒性、氧化应激、炎症和细胞凋亡等机制^[17,18]。既往的基础研究多是通过构

建 IS 的小鼠模型、体外培养和细胞实验来开展, 缺乏对脑组织 IS 细胞和内部异质性的直接刻画, 另外研究者对 IS 的炎症微环境的认识仍然不足。本研究利用公共数据库中的 IS 小鼠 scRNA-seq 数据, 通过生物信息学分析将 IS 细胞划分为 22 个细胞亚群, 并可进一步地注释成 10 个具体的细胞亚群, 对其中的星形细胞、少突胶质细胞和免疫细胞进行具体分析并揭示了不同细胞亚群的发育轨迹和细胞通讯模式, 指明了承担主要生物学功能的细胞亚群和信号通路。总之上述结果揭示了 IS 炎症微环境下各种细胞亚群的联系, 有助于研究者从单细胞分辨率进一步理解发病机制和寻找有效的治疗方案。

星形细胞是中枢神经系统中数目最多的细胞之一, 在维护大脑的正常功能中承担重要作用^[19]。星形细胞不仅是突触的重要组成部分, 与神经元、少突胶质细胞、内皮细胞等之间具有细胞通讯关系^[19]。在 IS 发生后, 星形细胞对脑局部炎症微环境的反应可能会加重缺血性病变, 但其亦能通过抗兴奋性毒性作用和释放一定的神经营养因子来限制病变的扩展, 协助保留了一定的神经功能^[20,21]。另外星形细胞也有助于血管生成、神经发生、突触发生和轴突重塑, 从而促进 IS 后神经功能的恢复^[22]。因此星形细胞在正常大脑功能和对缺血性病变的反应中的关键作用使其成为改善 IS 后脑功能的良好干预靶点。本研究发现星形 C0 和 C1 亚群较为活跃, 可着重通过 PTN 和 PSAP 通路来干预 C0 和 C1 星形细胞亚群的功能。少突胶质细胞功能出现异常可伴随脱髓鞘和髓鞘形成障碍, 严重影响轴突功能、结构与代谢活动^[23]。目前的临床研究和临床前研究证实靶向于少突胶质细胞的治疗可改善成人发病卒中、脑白质软化症和卒中后的认知功能障碍。在将来可针对少突胶质细胞进行治疗以降低脑缺血损伤并协助 IS 后脑功能恢复^[24,25]。本研究认为可主要通过 PSAP、PTN、SPP1 等信号通路干预或维持少突胶质细胞的正常功能。

IS 发生后, 神经元坏死和炎症介质的释放会导致中枢胶质细胞的激活以及外周免疫细胞 (如单核/巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等) 在脑缺血区的聚集和激活。这些细胞介导了脑组织的炎症瀑布效应, 从而加速、扩大或者延缓与减轻原有的缺血性脑损伤^[26]。目前的研究表明, 在 IS 发生后的 3 ~ 7 d, 巨噬细胞会大量聚集在 IS 病灶周围。Schilling 等^[27]的研究发现, 在巨噬细胞浸润至缺血区之前, 小胶质细胞已经被激活。在大脑中动脉阻塞的大鼠模型中, 小胶质细胞的

激活在IS发生的1~7 d内占主导地位,而7 d后则主要是巨噬细胞的激活^[28]。在IS发生后,如果血流没有完全恢复,受损的神经元会释放多种促炎介质和活性氧分子。这些物质会进一步破坏血脑屏障,促使循环中的巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞聚集到病灶处,加重缺血后的炎症反应^[29]。也有一些证据表明,IS发生之前,血脑屏障的通透性就已经发生了变化,并且巨噬细胞处于早期激活状态。这些变化可能是脑卒中发生的诱因之一^[30]。由此可知巨噬细胞的激活可导致IS的发生,而IS发生后可进一步促进巨噬细胞的激活。本研究发现IS的微环境中巨噬细胞在所有免疫细胞中占有较大比重,且巨噬细胞多出现在发育的中晚期阶段。与既往研究类似,此时的巨噬细胞基本已发育成熟(IS发生约7 d后),处于抗炎反应阶段和稳态阶段,共同协调对缺血后微环境的炎症应答。

事实上,星形细胞、少突胶质细胞和免疫细胞在IS的发病和转归中具有重要作用,但因其整体比例偏少而经常被研究者所忽略^[31]。本研究利用了单细胞数据高分辨率、基于细胞水平分析的优势,可以通过细胞注释将上述三种细胞挑出并单独进行分析。将IS组样本和Sham组样本进行比较显示出两组样本中细胞亚群的异质性,由相关性分析可知IS组中的星形胶质细胞、少突胶质细胞、成纤维细胞和Sham组中的单核细胞、NK细胞具有强相关性,这提示上述细胞亚群可能具有类似的生物学活动,也可通过干预上述细胞亚群的互作来影响IS病程。本研究的局限性在于:首先公共的scRNA-seq数据集是来自IS的小鼠模型,可能与临床真实数据具有一定差异,且因为种系不同在对细胞亚群进行注释时可能存在一定偏差。其次缺血介导的神经元/神经细胞死亡较快,获取小鼠IS样本时可能部分神经细胞已死亡,导致获取的细胞数目偏少且实验结果出现偏差。本研究只分析了星形细胞、少突胶质细胞和各免疫细胞,其他细胞亚群如内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞等并未分析,在未来可能会结合更大的样本量进行探讨。

综上所述,本研究利用scRNA-seq数据展示了IS和Sham组中细胞亚群的相关性和异同。基于IS样本,将星形细胞、少突胶质细胞和免疫细胞分别分为7、6、4个亚群。免疫细胞中巨噬细胞处于发育晚期阶段,此时巨噬细胞基本发育成熟,处于抗炎反应阶段和稳态阶段,共同协调微环境中的炎症作用。上述结果刻画了IS的转录图谱和各细胞亚群间的关系,揭示了大脑炎症微环境下星形细胞、小胶质细胞和免疫细胞在

IS疾病发生发展中的重要特征和作用,从而进一步理解IS的进展机制和基于特定细胞亚群探索更加直接、有效的IS治疗方案。

参考文献

- [1] Hajat C, Heuschmann PU, Coshall C, et al. Incidence of aetiological subtypes of stroke in a multi-ethnic population based study: the South London Stroke Register[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82: 527-533.
- [2] Favate AS, Younger DS. Epidemiology of Ischemic Stroke[J]. *Neurol Clin*, 2016, 34: 967-980.
- [3] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 137: e67-e492.
- [4] Gupta A, Giambroloni AE, Gialdini G, et al. Silent Brain Infarction and Risk of Future Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Stroke*, 2016, 47: 719-725.
- [5] 《中国脑卒中防治报告2019》编写组.《中国脑卒中防治报告2019》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2020, 17: 272-281.
- [6] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 377-382.
- [7] Fuzik J, Zeisel A, Mate Z, et al. Integration of electrophysiological recordings with single-cell RNA-seq data identifies neuronal subtypes[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 175-183.
- [8] Johnson MB, Walsh CA. Cerebral cortical neuron diversity and development at single-cell resolution[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 42: 9-16.
- [9] Zheng K, Lin L, Jiang W, et al. Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape in ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42: 56-73.
- [10] Trapnell C, Cacchiarelli D, Grimsby J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 381-386.
- [11] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *Omics*, 2012, 16: 284-287.
- [12] Peng L, Hu G, Yao Q, et al. Microglia autophagy in ischemic stroke: A double-edged sword[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1013311.
- [13] Li C, Zhao Z, Luo Y, et al. Macrophage-Disguised Manganese Dioxide Nanoparticles for Neuroprotection by Reducing Oxidative Stress and Modulating Inflammatory Microenvironment in Acute Ischemic Stroke[J]. *Adv Sci*, 2021, 8: e2101526.
- [14] Hankey GJ. Stroke[J]. *Lancet*, 2017, 389: 641-654.
- [15] Campbell BCV, Khatri P. Stroke[J]. *Lancet*, 2020, 396: 129-142.
- [16] Campbell BCV, De Silva A, Macleod MR, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 70.
- [17] Marsh JD, Keyrouz SG. Stroke prevention and treatment[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56: 683-691.
- [18] Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144: 103-120.
- [19] Patabendige A, Singh A, Jenkins S, et al. Astrocyte Activation in Neurovascular Damage and Repair Following Ischaemic Stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4280.
- [20] 张奕飞, 李大伟, 陈鹏辉, 等. 周围神经损伤后再生的表观遗传学调控机制研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2023, 18: 154-157.
- [21] Qiu YM, Zhang CL, Chen AQ, et al. Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy?[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678744.
- [22] Huang S, Ren C, Luo Y, et al. New insights into the roles of oligodendrocytes regulation in ischemic stroke recovery[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 184: 106200.
- [23] Hayakawa K, Snyder EY, Lo EH. Meningeal Multipotent Cells: A Hidden Target for CNS Repair?[J]. *Neuromolecular Med*, 2021, 23:

100%,单纯CTS组与DM+CTS组正中神经出现DML延长或CMAP波幅减小分别为25例(25/43, 58.14%)患肢和42例(42/49, 85.71%)患肢,异常率较感觉神经明显减低,与前文相印证。

本研究中,单纯CTS组及DM+CTS组分别与对照组相比,正中神经各指-腕SNCV与SNAP波幅差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$),且DML显著延长,CMAP波幅显著减小。单纯CTS组与对照组之间腕-肘的SNCV与MNCV无显著差异且数值均为正常范围内,提示单纯CTS易累及正中神经各指-腕段,但损伤范围局限于腕部,此结果与周媛媛等^[16]研究结果相符。但DM+CTS组正中神经的腕-肘SNCV及MNCV分别较对照组及单纯CTS组显著减慢,超出腕部节段范围,且尺神经与单纯CTS组及对照组比较DML显著延长,MNCV、SNCV显著减慢,SNAP波幅显著减小,提示全身糖代谢异常可能会导致多外周神经损伤,因此,DM合并CTS可能是DM多发周围神经病变的早期表现之一,这与赖明君等^[17]的结果相一致。

综合本研究内容,DM患者首次发现CTS时其CTS严重程度已经较无DM病史患者重,且电生理检测结果重于患者的临床症状,提示电生理检查可以早期识别CTS及DM引起的周围神经损伤。本研究通过电生理检测数据客观展现DM可加重CTS患者的正中神经损伤,并且可以提示患者的亚临床神经损伤。因此,DM患者的治疗除了关注血糖的控制,更要早期行电生理检查,及早识别DM周围神经并发症的发生发展,对改善患者预后、提高患者的生活质量具有重要意义。

参考文献

- [1] Alanazy MH. Clinical and electrophysiological evaluation of carpal tunnel syndrome: approach and pitfalls[J]. *Neurosciences(Riyadh)*, 2017, 22: 169-180. DOI: 10.17712/nsj.2017.3.20160638.
- [2] Pourmemari MH, Shiri R. Diabetes as a risk factor for carpal tunnel syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabet Med*, 2016, 33: 10-16. DOI:10.1111/dme.12855.
- [3] 陈明月,蔡慧敏,陈江云,等. 糖尿病合并腕管综合征患者神经传导

速度的分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2016, 32: 273-276. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2016.04.003.

- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22: 后插2-后插42. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2014.08.027.
- [5] Wilder-Smith EP, Seet RC, Lim EC. Diagnosing carpal tunnel syndrome-clinical criteria and ancillary tests[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2: 366-374. DOI: 10.1038/ncpneuro0216.
- [6] 陈德松. 周围神经卡压[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 34, 35, 192.
- [7] 汤晓芙. 临床肌电图学[M]. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1996: 33-122.
- [8] 李美君,谢箐,胡进,等. 肌电图定位定量电刺激治疗腕管综合征的疗效观察[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2020, 46: 281-283. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0152.2020.05.005.
- [9] 毕晓芳. 糖尿病合并腕管综合征的电生理早期诊断[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 3: 161-162. DOI: CNKI:SUN:WMIA.0.2017-03-143.
- [10] 柳三凤,许超尘,周泉腾,等. 肌电图在腕管综合征诊断中的应用价值[J]. *现代电生理学杂志*, 2019, 26: 77-80. DOI:10.3969/j.issn.1672-0458.2019.02.004.
- [11] 姜静雯,黄淑玉,廖世波,等. 凝血功能与2型糖尿病周围神经病变的相关性研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17: 791-793. DOI: 10.16780/j.cnki.sjssngcj.20220130.
- [12] Sharma D, Jaggi AS, Bali A. Clinical evidence and mechanisms of growth factors in idiopathic and diabetes-induced carpal tunnel syndrome[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837: 156-163. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.08.017.
- [13] Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, et al. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1083-1092. DOI: 10.1172/JCI12188.
- [14] Chikenji T, Gingery A, Zhao C, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β) expression is increased in the subsynovial connective tissues of patients with idiopathic carpal tunnel syndrome[J]. *J Orthop Res*, 2014, 32: 116-122. DOI: 10.1002/jor.22485.
- [15] Preston D. 肌电图与神经肌肉疾病: 从临床到电生理学[M]. 朱冬青,黎鸣,朱愈,译. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 258.
- [16] 周媛媛,何帆,牛家苑,等. 感觉神经节段法在腕管综合征中的诊断价值[J]. *现代电生理学杂志*, 2022, 29: 222-225. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0458.2022.04.006.
- [17] 赖明君,潘小平,苏常春,等. 糖尿病合并轻度腕管综合征的神经电生理研究[J]. *中国医学创新*, 2019, 16: 124-127. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2019.15.032.

(本文编辑:雷琪)

(上接第391页)

- 339-343.
- [24] Franklin RJM, Frise NJ, Lyons DA. Revisiting remyelination: Towards a consensus on the regeneration of CNS myelin[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 116: 3-9.
- [25] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184: 53-68.
- [26] Schilling M, Strecker JK, Schabitz WR, et al. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient

- focal cerebral ischemia in mice[J]. *Neuroscience*, 2009, 161: 806-812.
- [27] Michaud JP, Pimentel-Coelho PM, Tremablay Y, et al. The impact of Ly6Clow monocytes after cerebral hypoxia-ischemia in adult mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34: e1-9.
- [28] Yamori Y. Predictive and preventive pathology of cardiovascular diseases[J]. *Acta Pathol Jpn*, 1989, 39: 683-705.
- [29] 彭涛,张紫霓,朱碧峰,等. 急性基底动脉闭塞患者血管内治疗不良预后的预测因素[J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17: 753-756.

(本文编辑:王晶)