

单细胞测序技术在传染病及微生物领域的应用研究进展

陈碧清¹, 刘细细², 朱学军^{*3}

1 南京中医药大学附属医院江苏省中医院中心实验室, 江苏 南京 210029

2 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029

3 南京中医药大学附属医院江苏省中医院血液科, 江苏 南京 210029

陈碧清, 刘细细, 朱学军. 单细胞测序技术在传染病及微生物领域的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4886-4892

Chen Biqing, Liu Xixi, Zhu Xuejun. Application of single-cell sequencing in infectious diseases and microbiology: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4886-4892

摘要: 单细胞测序技术正逐渐成为生物学基础研究的“必备工具”, 为我们理解各种生物学现象带来革命性的洞见。很多传染性疾病均涉及免疫细胞的差异化功能, 而这些免疫细胞之间具有较大的异质性。与传统的批量高通量测序相比, 近年来新兴的单细胞转录组测序使得研究者能够分析感染过程的免疫细胞异质性, 充分挖掘珍贵的临床样本的分子信息, 还能获取难以培养的病原微生物的遗传信息。本文着重介绍了当前单细胞测序在传染性传染病及病原微生物研究领域中的应用情况, 并对其发展前景做了简要展望。

关键词: 单细胞测序; 传染病; 微生物; 免疫图谱; 宿主-微生物互作

基金项目: 国家自然科学基金(82001206, 81673771); 江苏省中医院高峰学术人才培养工程项目(y2021rc42); 医学免疫学国家重点实验室开放课题(NKMI2021K18); 江苏省中医药管理局科技项目(ZT202106)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82001206, 81673771); Developing Program for High-Level Academic Talent in Jiangsu Hospital of Chinese Medicine (y2021rc42); Open Program of State Key Laboratory of Medicine Immunology (NKMI2021K18); Foundation of Administration of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province (ZT202106)

***Corresponding author:** E-mail: zhuxuejun@njucm.edu.cn

Received: 2022-04-12; **Accepted:** 2022-05-08; **Published online:** 2022-06-14

Application of single-cell sequencing in infectious diseases and microbiology: a review

CHEN Biqing¹, LIU Xixi², ZHU Xuejun^{*3}

1 Central Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine/Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

2 The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

3 Department of Hematology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine/Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China

Abstract: Single-cell sequencing is becoming an essential tool for the basic research of biology, which brings revolutionary insights for us to understand biological phenomena. Many infectious diseases involve diversified functions of immune cells with great heterogeneity. Compared with high-throughput sequencing, the emerging single-cell transcriptome sequencing enables researchers to explore immune cell heterogeneity during infection, to fully excavate molecular information from precious clinical samples, and to obtain the genetic information of unculturable pathogenic microorganisms. Herein, we review the application status of single-cell sequencing in the research on infectious diseases and pathogenic microorganisms and make a brief prospect of this technology.

Keywords: single-cell sequencing; infectious diseases; microorganisms; immune landscape; host-microbe interaction

人体的免疫系统时刻面临着各种病原体的侵袭与危害。感染是病原微生物与人体免疫细胞复杂相互作用的结果。影响传染病传播速率的因素不仅来自各种环境因子^[1], 还来自病原微生物和宿主之间的相互作用, 以及宿主免疫细胞群的响应机制。细胞间的差异(即细胞异质性)可能成为传染性疾病发生、进展的关键因素。应用单细胞测序技术(以单细胞转录组测序为主)来研究传染病患者的血液、痰液等组织, 有助于分析感染过程中的免疫图谱及相应的免疫信号通路、鉴别新的免疫细胞亚型和传染病生物标志物; 而对于微生物的单细胞水平测序和生物信息学分析则对检测未知病原微生物及了解其遗传信息起到关键性作用。在单细胞水平认识宿主和微生物的交互作用有助于制定恰当的治疗方案, 比如根据面对病原体入侵时不同细胞的易感性来确定特定传染病防治中需要

重点关注的靶细胞。单细胞测序方法目前在传染病及微生物领域已逐渐被广泛应用。

1 单细胞测序在传染病研究领域的运用

1.1 分析感染过程的免疫细胞图谱

免疫细胞承担了宿主对病原感染防御的启动功能。免疫细胞图谱表征了特定(生理或感染)条件下免疫细胞的组成架构, 为理解传染病的致病机制提供了关键信息。单细胞测序技术使得免疫细胞图谱的构建变得容易和标准化, 单细胞测序可以识别感染期间免疫细胞图谱的全局变化。Han 等^[2]通过单细胞转录组测序绘制艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染期间的猴外周血免疫细胞图谱发现, 新生猴的免疫系统比成年猴的保护反应更强, 表现在 T 细胞、B 细胞、自然杀伤

(nature killer, NK)细胞等各大类免疫细胞对感染的反应性表达模式差异,其中,活化的 B 细胞可能在控制 HIV 感染方面发挥着至关重要的作用。单细胞测序近两年被应用于构建新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19)患者的外周免疫细胞图谱,通过上百人的数百万个细胞的单细胞测序,全方位地揭示了与 COVID-19 临床特征相关的免疫细胞表型^[3]。新型冠状病毒感染会重构外周血的免疫细胞图谱,包括淋巴细胞减少、T 细胞衰竭、浆母细胞增多,并上调单核细胞中的干扰素刺激分子、下调 HLA-II (human leukocyte antigen-II)类分子^[4]。另外,COVID-19 重症患者康复后仍然存在单核细胞增加和 HLA-II 类分子下调^[5],而普通/轻症 COVID-19 患者康复后体内细胞毒性效应 T 细胞大量扩增^[6],记忆性 T 细胞及 T 细胞分化通路上调^[5]。这些感染相关的免疫细胞图谱特征为下一步开发治疗药物提供了靶标。

1.2 识别新的免疫细胞亚型

当面对各种传染性病原体时,各种特定类型的免疫细胞参与了各自相应的生物学过程,如病原体识别、杀伤和抗原呈递。免疫细胞的不同亚型往往表明它们具有不同的起源或不同的感染微环境,因此,精确地识别、区分各类免疫细胞亚群并了解它们在感染过程中的分子特征、动力学和功能有助于促进我们对传染病机制的理解和治疗,还可用于评估宿主控制和疫苗模式。单细胞测序恰恰在精确表征细胞、鉴定新的免疫细胞亚型方面具有独特的优势。Gierahn 等^[7]通过单细胞测序技术,鉴定了来自结核患者的 3 个肺巨噬细胞亚型,这些巨噬细胞中与生长、代谢和缺氧相关的基因的表达水平有所不同。Waickman 等^[8]利用单细胞测序定义了一组表达 CD38 分子的细胞,用来识别

最持久的疫苗反应性记忆前体 CD8⁺T 细胞,以确定疫苗引发的细胞免疫的大小、多样性和持久性。

1.3 鉴定感染相关的免疫信号通路

单细胞转录组测序不仅能了解各种免疫细胞亚群的数目和具体的某项分子特征,更是转录组层面的全方位刻画,对于每个细胞而言,均可以知道其中所有信号通路的基因表达情况。因而单细胞测序不仅可以用于鉴定感染相关的免疫细胞亚型,还可以精细区分各类免疫细胞中感染引发的信号通路变化差异。通过单细胞测序,研究者们发现 COVID-19 激活了单核细胞等特定的免疫细胞亚群中的炎症和细胞因子相关的信号通路^[9]。这提示研究者未来可以从遏制炎症和细胞因子相关信号通路的角度来治疗 COVID-19。正如血液肿瘤临床试验评价中的应用,单细胞测序也被用于评估疫苗接种后的体液免疫反应,了解疫苗对各种 B 细胞亚型的分子层面的影响。流感疫苗接种后只激活一部分外周记忆 B 细胞,并差异化调控了这部分激活的记忆 B 细胞中与宿主防御流感病毒相关的信号通路^[10]。详细了解感染相关的细胞异质性免疫信号通路将加深我们对整个感染过程的分子免疫变化的理解,并有助于为处于不同感染阶段的患者开发治疗方法。

1.4 检测炎症反应的变化

炎症因子主要由受刺激的免疫细胞分泌,具有多种生物学功能,包括调节先天和适应性免疫反应、募集免疫细胞等。监测炎症反应的变化并确定感染后的关键炎症因子对于了解传染性疾病的发病机理及开发新的治疗策略必不可少。对感染者特定组织(如外周血、呼吸道黏液)的单细胞测序使我们能够理清大量产生的炎症因子来源于何种免疫细胞,从而找到抗炎治疗中的潜在药物靶标。最近,一项截至目

前最大规模的 COVID-19 单细胞测序研究发现, COVID-19 重症患者体内的大量炎症性细胞因子主要来源于外周血中的单核细胞和巨核细胞, 以单核细胞为主, 这些炎症性细胞中的 S100A8/A9 系统性上调可能导致了细胞因子风暴^[3]。另一项单细胞转录组测序研究发现, 新型冠状病毒感染诱导产生的炎症因子促进了棒状细胞分泌粘蛋白, 可能导致了急性呼吸窘迫综合征^[11]。这些研究表明, 应用单细胞测序技术有助于研究感染过程中炎症因子水平的变化, 揭示重要的分子致病机制。

1.5 传染病的生物标志物发现

目前已发现的各种传染病的生物标志物十分有限, 而新兴的单细胞测序技术极大地方便了疾病相关生物标志物的鉴定。例如, 登革热患者发病前, 其外周血中的幼稚 B 细胞的 MX2、CD14⁺CD16⁺单核细胞的 CD163 和 IFIT1 均已显著上调^[12], 因此这些表达水平显著改变的基因有潜力成为预测登革热疾病的生物标志物。Cai 等^[13]通过单细胞测序发现, CD3⁻CD7⁺GZMB⁺NK 细胞亚群可以作为识别活动性结核病患者和监测治疗反应的一种新的生物标记。在现今传染病研究中, 将单细胞转录组测序用于监测与特定感染相关的基因表达模式, 可以发现更多感染性疾病诊断和预后的候选生物标志物。

2 人体微生物研究中的单细胞测序

微生物研究领域传统的测序方法以 16S 核糖体核糖核酸 (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) 基因特征区域测序和宏基因组测序为主, 前者主要用于鉴定菌落和量化菌群丰度, 后者除能实现前者功能外还可以量化菌群中的主要信号通路表达水平。但是两种传统方法都强烈依赖已知的微生物遗传信息, 无法对自然

界中不易培养的微生物进行测序和研究。近年来, 随着细菌单细胞测序技术的开发, 研究者突破了微生物单个个体 RNA 含量低及缺少通用扩增识别片段[如真核细胞信使 RNA (message RNA, mRNA) 的 poly-A 片段]的技术局限, 拥有了更多、更精细化的手段来研究细菌、真菌等人体密切相关微生物。区别于宏基因组研究, 单细胞测序无需对微生物的已有知识就可以对单个微生物进行测序分析, 进而发现新的微生物物种、构建新的微生物进化树、获取新的微生物基因组序列, 加深研究者对微生物生命活动过程的理解, 尤其是对包括病原微生物和人体共生菌群在内的人体相关微生物的发现和认知有助于研究人员、医护人员更深层次地认识各种涉及微生物的疾病的致病规律和分子机制。

2.1 获取难以培养微生物的遗传信息

目前地球上大约 99% 的细菌不能够在实验室实现人工培养, 采用单细胞测序为发现尚不能培养的微生物提供了可能^[14]。使用结合荧光激活细胞分选技术的单细胞测序可以发现并鉴定引起慢性牙周炎的 TM7 门细菌, 这类细菌尚无法培养^[15]。Pamp 等^[16]对哺乳动物肠道共生菌分节丝状菌进行了单细胞全基因组测序, 为该菌与宿主的互作研究提供了思路。

2.2 检测未知的病原微生物和耐药菌株

通过对致病性微生物和宿主细胞的基因组学和转录组学研究, 可以更清楚地了解微生物的分子进化机制和病毒感染的动力学, 有助于检测和鉴定新的微生物物种。Combe 等^[17]对水泡性口炎病毒感染的 90 个细胞的 881 个病毒斑进行测序, 发现单个感染单元内存在多个有遗传差异的病毒基因组, 意味着多种病毒共存网络对疾病发挥作用。此外, 一些日渐兴起的超灵敏的单细胞测序新技术使得研究者能够快速

检测各种病毒突变体, 同时也可用于挖掘抗病毒药物耐受相关基因^[18]。

2.3 剖析微生物种群异质性

细胞异质性在原核生物和真核生物中普遍存在, 通过对微生物群落的单细胞转录组分析也有助于了解微生物群落的异质性。微生物构成的群落随着外界环境改变而不断发生着变化。研究表明, 即使是相同环境条件的微生物群落, 在 RNA 组成方面通常也是异质的^[19]。

3 人体微生物-宿主相互作用研究中的单细胞测序

人体不断暴露于各种微生物中, 人体细胞与各种共生或致病病原体之间不断发生着多种相互作用。这一相互作用一方面作用于宿主的免疫系统, 另一方面影响微生物的存活繁殖, 因此, 理解人体内各种微生物与宿主的相互作用对于了解人体微生态的正常生理过程和传染性疾病发病机制有着重要意义。转录组测序是不受已有知识和预先假设限制来研究微生物-宿主分子网络联系的重要工具。不同于普通人体细胞的转录组测序, 涉及人体微生物的测序研究需要解决的一大难题是区分微生物和宿主的 RNA。目前针对人体微生物-宿主相互作用的研究已发展出一些专门的转录组测序技术, 主要包括宏转录组、双重 RNA 测序(同时测病原体 and 感染的宿主细胞)、三重 RNA 测序(同时测两种功能类型的微生物和宿主细胞)、宿主单细胞测序、病原体单细胞测序、生态位测序等^[20]。其中, 单细胞转录组测序从单个细胞、细菌层面分析感染的病理生理学, 探究宿主细胞对病原的表现及出现不同易感性的原因, 完善了对传染性感染到发病机制的理解。

一方面, 单细胞测序在挖掘病原体感染的

靶细胞特征、探索易感性的分子学特征方面具有独特的优势。Golumbeanu 等^[21]用单细胞转录组测序表明, HIV 潜伏后疾病是否发作及易感性取决于 HIV 病毒感染的 CD4⁺T 细胞亚群的转录特征。Zanini 等^[12]对登革热患者的单细胞转录组测序则发现了登革热疾病发作之前 B 细胞及单核细胞的转录组变化特征。这些免疫细胞的转录组变化可能是病原体-宿主相互作用的后果, 而后决定了感染性疾病的进展方向。在研究新型冠状病毒的靶细胞表面受体特征方面, 研究者通过对患者组织的单细胞测序发现了 TMPRSS2、ANPEP、DPP4、ENPEP 等膜蛋白与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的棘突蛋白的受体 ACE2 共表达, 可能协助病毒入侵^[22-24]。

另一方面, 单细胞测序还可以用于评估各类细胞中潜伏病毒的遗传物质含量, 有助于确定病毒的宿主细胞。最近一项大规模 COVID-19 的单细胞测序研究发现, SARS-CoV-2 病毒的 RNA 主要存在于巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞、NK 细胞等免疫细胞及少部分纤毛上皮细胞和鳞状上皮细胞中, 而且以巨噬细胞和中性粒细胞为主, 病毒负载量大^[3]。这一发现暗示承担了先天性固有免疫功能的免疫细胞可能是与 SARS-CoV-2 病毒互作的主要宿主细胞。

从微生物角度而言, 针对人体内特定组织部位菌群的单细胞转录组测序能够帮助我们研究这些病原微生物在人体内的活动和功能, 更接近病原体-宿主交互作用的真实环境, 减少体外培养环境带来的潜在人为误差。

4 小结与展望

利用单细胞测序技术不仅可以检测未知的

病原微生物, 还可以监测到耐药株的出现、跟踪病原体的抗性, 从而进行传染病的诊断和机制研究。目前的单细胞测序绝大多数集中于转录组层面, 仅能反映 RNA 水平, 未来随着新技术的发展, 结合基因组、表观修饰组、蛋白质组、宏基因组、宏转录组等多组学技术的综合研究将使得我们能够更加全面地分析单个细胞或微生物的功能, 系统地阐明各种感染性疾病的致病机制。单细胞测序相关技术未来将更广泛地应用于各种感染性疾病和微生物领域研究, 助力开发更好的诊断和预后生物标志物, 辅助设计更准确的靶向抗感染疗法, 以提高传染病治疗效果并避免耐药性。

REFERENCES

- [1] Chen BQ, Liang H, Yuan XM, Hu YY, Xu M, Zhao YT, Zhang BF, Tian F, Zhu XJ. Predicting the local COVID-19 outbreak around the world with meteorological conditions: a model-based qualitative study[J]. *BMJ Open*, 2020, 10(11): e041397
- [2] Han QF, Bradley T, Williams WB, Cain DW, Montefiori DC, Saunders KO, Parks RJ, Edwards RW, Ferrari G, Mueller O, et al. Neonatal rhesus macaques have distinct immune cell transcriptional profiles following HIV envelope immunization[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(5): 1553-1569
- [3] Ren XW, Wen W, Fan XY, Hou WH, Su B, Cai PF, Li JS, Liu Y, Tang F, Zhang F, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas[J]. *Cell*, 2021, 184(7): 1895-1913
- [4] Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martínez-Colón GJ, McKechnie JL, Ivison GT, Ranganath T, Vergara R, Hollis T, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(7): 1070-1076
- [5] Li X, Garg M, Jia TT, Liao QJ, Yuan LF, Li M, Wu ZY, Wu WH, Bi YL, George N, et al. Single-cell analysis reveals the immune characteristics of myeloid cells and memory T cells in recovered COVID-19 patients with different severities[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 12: 781432
- [6] Zhang JY, Wang XM, Xing XD, Xu Z, Zhang C, Song JW, Fan X, Xia P, Fu JL, Wang SY, et al. Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(9): 1107-1118
- [7] Gierahn TM, Wadsworth MH, Hughes TK, Bryson BD, Butler A, Satija R, Fortune S, Love JC, Shalek AK. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 395-398
- [8] Waickman AT, Victor K, Li T, Hatch K, Rutvisuttinunt W, Medin C, Gabriel B, Jarman RG, Friberg H, Currier JR. Dissecting the heterogeneity of DENV vaccine-elicited cellular immunity using single-cell RNA sequencing and metabolic profiling[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3666
- [9] Wen W, Su WR, Tang H, Le WQ, Zhang XP, Zheng YF, Liu XX, Xie LH, Li JM, Ye JG, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 31
- [10] Horns F, Dekker CL, Quake SR. Memory B cell activation, broad anti-influenza antibodies, and bystander activation revealed by single-cell transcriptomics[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(3): 905-913
- [11] He JP, Cai SJ, Feng HJ, Cai BM, Lin LH, Mai YB, Fan YQ, Zhu AR, Huang H, Shi JJ, et al. Single-cell analysis reveals bronchoalveolar epithelial dysfunction in COVID-19 patients[J]. *Protein & Cell*, 2020, 11(9): 680-687
- [12] Zanini F, Robinson ML, Croote D, Sahoo MK, Sanz AM, Ortiz-Lasso E, Albornoz LL, Rosso F, Montoya JG, Goo L, et al. Virus-inclusive single-cell RNA sequencing reveals the molecular signature of progression to severe dengue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(52): E12363-E12369
- [13] Cai Y, Dai YC, Wang YJ, Yang QQ, Guo JB, Wei CL, Chen WX, Huang HP, Zhu JL, Zhang C, et al. Single-cell transcriptomics of blood reveals a natural killer cell subset depletion in tuberculosis[J]. *EBio Medicine*, 2020, 53: 102686
- [14] 宋章永, 王光西. 单细胞测序技术在人体病原微生物研究中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(11): 1116-1118
- [15] Song ZY, Wang GX. Progress in single cell sequencing to study pathogenic microbes in humans[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2017, 12(11): 1116-1118 (in Chinese)

- Martin HG, Szeto E, Platt D, Hugenholtz P, Relman DA, et al. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth[J]. PNAS, 2007, 17; 104(29): 11889-11894
- [16] Pamp SJ, Harrington ED, Quake SR, Relman DA, Blainey PC. Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB)[J]. Genome Research, 2012, 22(6): 1107-1119
- [17] Combe M, Garijo R, Geller R, Cuevas JM, Sanjuán R. Single-cell analysis of RNA virus infection identifies multiple genetically diverse viral genomes within single infectious units[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 18(4): 424-432
- [18] Boltz VF, Rausch J, Shao W, Hattori J, Luke B, Maldarelli F, Mellors JW, Kearney MF, Coffin JM. Ultrasensitive single-genome sequencing: accurate, targeted, next generation sequencing of HIV-1 RNA[J]. Retrovirology, 2016, 13(1): 87
- [19] De Bekker C, Bruning O, Jonker MJ, Breit TM, Wösten HAB. Single cell transcriptomics of neighboring hyphae of *Aspergillus niger*[J]. Genome Biology, 2011, 12(8): R71
- [20] WestermannAJ, Vogel J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22(6): 361-378
- [21] Golumbeanu M, Cristinelli S, Rato S, Munoz M, Cavassini M, Beerenwinkel N, Ciuffi A. Single-cell RNA-seq reveals transcriptional heterogeneity in latent and reactivated HIV-infected cells[J]. Cell Reports, 2018, 23(4): 942-950
- [22] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. Cell, 2020, 181(2): 271-280. e8
- [23] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. Cell, 2020, 181(2): 281-292.e6
- [24] Qi FR, Qian S, Zhang SY, Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 526(1): 135-140