

DOI:10.13350/j.cjpb.220926

• 综述 •

单细胞转录组测序技术及其在寄生虫学研究中的应用*

杨清清¹, 韩秀敏^{2**}, 汪伟^{3**}

(1. 青海大学医学院, 青海西宁 810000; 2. 青海省人民医院; 3. 国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所)

【摘要】 在过去几十年中, 生物技术多从群体细胞水平开展基因组学和转录组学研究。随着近年来高通量测序技术和单细胞分离方法的快速发展, 单细胞转录组测序技术(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)可以对单个细胞进行无偏倚、高通量和高分辨率转录组分析, 极大促进了转录组学发展。目前, scRNA-seq 已经成为研究细胞组成、鉴定细胞亚群、发现稀有细胞、分析转录动态变化和基因调控关系等领域的一项主要技术。寄生虫是危害人类和动物健康的主要病原体之一。本文主要就目前常见寄生虫 scRNA-seq 方案中的单细胞分离方法、mRNA 反转录、cDNA 扩增和测序技术进行简要概述, 并综述了 scRNA-seq 在寄生虫学研究中的应用进展。

【关键词】 转录组学; 高通量测序; 单细胞转录组测序; 寄生虫学; 综述

【中图分类号】 R38 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2022)09-1106-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 1106-1110.]

Single-cell RNA sequencing and its application in parasitological research

YANG Qing-qing¹, HAN Xiu-min², WANG Wei³ (1. Medical College of Qinghai University, Xi'ning, Qinghai 810000, China; 2. Qinghai Provincial People's Hospital; 3. National Health Commission Key Laboratory on Technology for Parasitic Diseases Prevention and Control, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasites and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases)

【Abstract】 During the past decades, the lack of advanced biotechnology skills restrained genomic and transcriptomic studies at a cell-population level. However, with the recent rapid developments in sequencing and single-cell isolation techniques, emerging single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) allows an unbiased, high-throughput, and high-resolution transcriptomic analysis of a single cell, which greatly advances the development of transcriptomics. This sequencing protocol has become an important tool for studying cell composition, identifying cell subpopulations, characterizing rare cells, analyzing transcriptomic dynamics, and examining gene regulation relationships. This review describes the most common techniques in scRNA-seq protocols, including single-cell isolation, mRNA reverse-transcription, cDNA amplification and sequencing, as well as the progress of scRNA-seq applications in parasitological research.

【Key words】 transcriptomics; high-throughput sequencing; single-cell RNA sequencing; parasitology; review

*** 在过去十几年中, 转录组测序已经成为分子生物学研究中不可或缺的技术之一, 几乎影响着研究人员对于基因功能理解的各个方面^[1]。自 2005 年以来, 随着二代测序技术的快速发展, 相继推出的 454 GS FLX+, SOLiD, Solexa GA 和 PacBio RSII 等测序平台促进了大规模转录组测序研究。微阵列和 bulk RNA-seq 等群体细胞水平的转录组测序技术, 其结果仅能反映细胞群中基因表达的平均值。然而, 密切相关的细胞在转录活性和状态上也存在显著异质性^[2]。2009 年, Tang 等^[3]首次利用单细胞转录组测序技术(scRNA-seq)对小鼠单个胚胎细胞进行测序分析, 比微阵列技术鉴定出多达 5 270 个基因表达, 同时还发现了 1 753 个既往未知的剪切体。随后, scRNA-seq 技术得到快速发展, 多种不同 scRNA-seq 方案相继出现, 促进了转录组学研究。

流行病学数据显示, 寄生虫是危害人类和动物健康的主要病原体之一, 全球有超过 30 亿人感染寄生虫, 这些寄生虫引起的各种慢性疾病导致了极大的全球疾病和经济负担^[4]。scRNA-seq 技术已在研究寄生虫生命周期、致病机制和诱导宿

主免疫反应等领域得以应用。本文综述了 scRNA-seq 技术在疟疾、血吸虫病和棘球蚴病研究中的应用进展。

1 单细胞转录组测序技术

scRNA-seq 是在单个细胞水平研究基因表达模式的一项技术, 目前已经开发了多种不同的测序方案。大部分 scRNA-seq 步骤包括制备单细胞悬液、捕获单细胞和裂解、mRNA 反转录、cDNA 扩增、构建测序文库。测序文库的构建对于 scRNA-seq 下游分析至关重要, 通常是基于 Tn5 转座酶来完成, 随后利用 Illumina 平台进行测序^[5]。测序片段的数量代表

* **【基金项目】** 青海省科技计划项目(No. 2021-ZJ-933); 无锡市卫生健康委重大科研项目(No. Z202116); 江苏省无锡市“太湖之光”科技攻关项目(No. Y20212012)。

** **【通讯作者】** 韩秀敏, E-mail: qhxn_66@163.com
汪伟, E-mail: wangwei@jipd.com

【作者简介】 杨清清(1994-), 男, 湖南人, 在读硕士研究生, 主要从事棘球蚴病组学研究。E-mail: 1432868959@qq.com

基因表达水平,构成了用于生物信息分析的数字基因表达矩阵^[6]。

1.1 单细胞分离方法 scRNA-seq 需要提前制备单细胞悬液,大多数情况下是利用一组特定的酶对组织样本进行酶促反应来完成。然而,通过酶促反应方式从组织样本中分离细胞可能会影响细胞活力和转录谱,对于后续测序结果产生一定影响^[7]。多种方法捕获单细胞如极限稀释法、显微操作法、激光捕获显微切割法(laser capture microdissection, LCM)、荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)和微流控技术可快速、准确和高效捕获单细胞 scRNA-seq。前3种方法共有特点是通量低、耗时且操作技术难度较大,当组织样本中细胞数量较少时才会考虑采用^[8]。极限稀释法是一种相对简单的方法,通过对细胞群进行不同梯度倍比稀释获取单细胞,无需要特殊设备^[9]。显微操作法需要手动或机器人操作完成,其原理是在高倍显微镜下基于细胞形态学或荧光标记特性利用显微操作器来分离单细胞,可以对稀有细胞实现精准捕获,常用于从早期胚胎或培养的微生物中分离单细胞^[10]。LCM是从固体组织样本中分离单细胞的一种先进技术,利用激光束将靶细胞与周围组织分离,可以直接得到靶细胞^[11],该方法优点是采用荧光标记物标记,可从组织切片中收集特定细胞类型;不足之处是需要预先对组织样本冷冻或石蜡包埋,而且在激光切割过程中会破坏细胞完整性和促进 RNA 降解,分析结果与实际情况不完全一致。

目前最常用的单细胞捕获方法是 FACS 和微流控技术,两者都实现了高通量、自动化和低成本分选单细胞。FACS 是一种特殊的流式细胞术,在单细胞分离方面表现出强大能力,技术原理是依据细胞形态、大小和荧光特性对细胞进行分类。首先需要利用荧光单克隆抗体标记细胞,这种抗体可以识别特定细胞表面标记物,再通过仪器检测被荧光蛋白标记的细胞,甚至可以在充分表征的细胞群中鉴定新细胞亚群^[12]。FACS 要求分选样本中细胞数量不少于 10 000 个,同时要存在针对靶细胞的抗体,因此其适用条件有限^[13]。将微流控技术成功应用到单细胞分离,通过细微结构来精确控制流体体积从而达到捕获单细胞的目的,可以利用重力离心、流体力学和电场力等捕获细胞,其强大的集成能力可以将细胞捕获、细胞裂解、反转录和 cDNA 文库构建集中到一个微流控芯片中完成^[14]。采用微流控技术捕获单细胞主要通过两种方法实现:第一种是基于微阵列技术,依靠特定的微流控芯片捕获单细胞^[15];第二种是基于液滴技术,依靠微液滴生成装置将单个细胞和带标签的凝胶微珠快速封装到油滴中形成油包水结构^[8]。目前各种单细胞分离方法均有自身优势和不足,最终选择何种方法还依赖于样本性质和来源以及分离后需要对细胞进行的处理和分析。

1.2 反转录和 cDNA 扩增方法 由于单细胞中总 RNA 含量较低(约 10 pg),而目标 mRNA 分子仅有 0.1 ~ 0.5 pg^[6],高效捕获 mRNA 分子对于后续实验步骤十分关键。通常情况下,利用 oligo(dT)引物捕获带 polyA⁺的 mRNA 分子,目的是为了避免捕获其它结构的 RNA。然而,捕获 mRNA 效率较低,只有 10%~20%的转录本能够被反转录成 cDNA^[16]。因此,现有 scRNA-seq 方案都面临着较低 mRNA 捕获效率,急需开发一种更高效的细胞裂解和 mRNA 捕获方法。当前发布的大部分 scRNA-seq 方案都是利用 RNase H 活性低和热稳定性

高的莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶合成 cDNA 一链,第二链可以使用末端加尾法或模板转换机制生成^[3,16]。SMART-seq^[17]和 Drop-seq^[18]是利用 RNA 模板 5'端的模板转换法合成 cDNA 第二链,这种方法的优点是可以确保均匀覆盖,不会丢失链特异性。SUPeR-seq^[19]和 MATQ-seq^[20]则是利用 poly(A)或 poly(C)尾连接 cDNA 的 5'端,生成下游 PCR 扩增的共同接头(adapters),可以用于长链非编码 RNAs 和环状 RNAs 的测序分析。随后,对于合成的微量 cDNA 可以通过常规 PCR 或体外转录线性扩增两种方式进行扩增。PCR 是一种常见的指数扩增方法,可以对微量起始物质进行扩增生成足够量的 cDNA,该方法可能会使基因表达谱的表达倾向于较短且富含 G-C 的扩增子^[5]。为了避免这种情况,Hashimshony 等^[21]开发的 CEL-seq 利用了体外转录线性扩增技术,将 T7 启动子结合到 poly(dT)引物中,在第二链合成后进行体外转录,体外转录省略了模板切换步骤,然而这种方法需要进行额外一轮的反转录,其结果会增加 3'端覆盖偏好。

1.3 单细胞转录组测序平台 目前,已经开发了多种不同 scRNA-seq 平台,其中一些方法可以测序全长转录组,其它方法仅对转录本 3'或 5'端进行测序。全长转录组 scRNA-seq 在研究等位基因特异性表达和剪接变体方面相比于 3'或 5'端测序技术更具优势。此外,对于某些低表达的基因/转录本的检测,全长转录组 scRNA-seq 可能较 3'端测序方法更好^[22]。2012 年, Ramskold 等^[23]开发的 SMART-seq 是一项具有里程碑意义的全长转录组测序技术,能够检测 mRNA 全长,并且转录本覆盖率也有所提高。Picelli 等^[17]在 SMART-seq 基础上进行改进开发出 SMART-seq2,该方法的灵敏度、准确性、转录本覆盖率和成本均优于前者,但是只能对具有 poly(A)尾的 mRNA 进行扩增和检测分析。2015 年,通过微流控技术将单个细胞和带标签序列的微珠包裹在一个液滴中,两者不同之处在于 cDNA 扩增方式,相同之处是基于转录本 3'端测序^[18,24]。2017 年, Genomics Chromium 单细胞转录组测序协议问世^[25],通过基于液滴的技术实现了数千个细胞的测序分析,然而该技术也是基于转录本 3'端测序。基于液滴的技术在细胞通量和测序成本方面要优于全长转录组 scRNA-seq 技术,更适用于生成大量细胞来鉴别复杂组织样本或肿瘤中的细胞亚群。在 2018 年, Microwell-seq 是利用琼脂糖材料的高通量单细胞捕获系统,这种方法构建测序文库的降低了成本^[26]。随后, Ziegenhain 等^[22]对 6 种不同的 scRNA-seq 方法进行比较分析,结果表明 SMART-seq2 是众多方法中能够检测到基因表达数量最多的一种,但是在检测低丰度基因方面不如 MATQ-seq。各种单细胞转录组测序方法的比较见表 1。

2 单细胞转录组测序技术在寄生虫学研究中的应用

2.1 疟疾 疟疾是由疟原虫感染引起的一种危害严重的寄生虫病,通过雌性按蚊叮咬传播^[27]。疟原虫对宿主免疫反应的抑制作用是疾病复发主要原因,其次是抗原变异^[28]。疟疾急性感染期促使 Th0 分化为 CD4⁺ Th1 和 CD4⁺ Tfh 细胞, CD4⁺ Th1 细胞通过分泌干扰素-γ(IFN-γ)促进巨噬细胞降解寄生虫,而 CD4⁺ Tfh 细胞通过辅助 B 细胞产生抗体对抗寄生虫感染^[29-30]。Imai 等^[31]研究显示细胞毒性 CD8⁺ T 细胞能够识别和破坏感染间日疟原虫的网织红细胞,并与巨噬细胞协

作,共同抵抗血液期感染。在慢性感染期 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞大量耗竭,程序性细胞死亡基因-1(PD-1)和淋巴细胞激活基因 3(LAG3)表达上调^[28,32],提示免疫系统受损。疟疾慢性感染期 γδT 细胞显著增加,其通过分泌巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)参与控制疾病的复发^[33]。Junqueira 等^[34]认为 γδT 细胞还可以通过直接杀伤或吞噬的方式杀灭恶性疟原虫,表明 γδT 细胞在控制疟疾复发中发挥着重要作用。Chen 等^[35]利用 scRNA-seq 技术对夏氏疟原虫感染小鼠不同阶段的脾脏淋巴细胞进行测序分析,共鉴定出 8 个不同的细胞类型,并且发现 CD4⁺ T 在急性感染期中发挥关键作用,在复发感染期时树突状细胞(DC)、γδT 细胞和红髓巨噬细胞(RPM)明显升高,表明先天性免疫反应在控制感染复发中起关键作用。Witmer 等^[36]利用 scRNA-seq 技术研究伯氏疟原虫动合子的转录变异情况,结果表明绝大部分转录变异是由发育导致,还鉴定出 11 个依赖于载体物种表达的基因、12 个依赖于个体表达的基因。Bogale 等^[37]利用 scRNA-seq 技术对斯氏按蚊体内不同部位的 16 038 伯氏疟原虫子孢子进行测序分析,结果显示在子孢子发育过程中基因表达发生变化,导致了不同部位之间孢子的差异。此外,同一部位来源的子孢子之间也存在广泛的转录异质性,表明按蚊体内的疟原虫发育是不同步的,受到内在因素和环境因素的双重调节。Sa 等^[38]利用 scRNA-seq 技术对来自夜猴和松鼠猴血液中的 9 215 个间日疟原虫进行测序分析,揭示了间日疟原虫在红细胞内发育过程中基因表达的复杂性和动态变化。

表 1 单细胞转录组测序方法比较
Table 1 Comparison of single-cell RNA sequencing methods

方法 Methods	捕获 RNA Captured RNA	扩增技术 Amplification technology	cDNA 覆盖度 cDNA coverage	文献 Reference
SUPeR-seq	polyA ⁺ , polyA ⁻ RNAs	PCR	全长 RNA	[19]
MATQ-seq	polyA ⁺ , polyA ⁻ RNAs	PCR	全长 RNA	[20]
Smart-seq	polyA ⁺ RNAs	PCR	全长 mRNA	[23]
Smart-seq2	polyA ⁺ RNAs	PCR	全长 mRNA	[17]
Drop-seq	polyA ⁺ RNAs	PCR	mRNA 3'端	[18]
CEL-seq	polyA ⁺ RNAs	体外转录	mRNA 3'端	[21]
inDrop	polyA ⁺ RNAs	体外转录	mRNA 3'端	[24]

2.2 血吸虫病 血吸虫病是由血吸虫感染引起的一种被忽视的热带病。血吸虫生活史复杂,其通过改变自身构造方式来适应不同宿主的新环境,血吸虫可在哺乳动物宿主脉管系统中存活数 10 年^[39]。Wendt 等^[40]认为,一种被称为体被(tegument)的表皮样组织是血吸虫能够逃避宿主免疫攻击和长期存活的关键,体被的维持和修复可能是通过成体干细胞来完成。Collins 等^[41]在血吸虫成虫体内发现了成体干细胞,并表明这些细胞都表达成纤维细胞生长因子受体同源物,但是没有阐明这些成体干细胞的来源。Wang 等^[42]利用 scRNA-seq 技术对从曼氏血吸虫体外转化母孢中分离的干细胞进行测序分析,根据各自的标志物鉴定出 3 种具有共同转录组特征的干细胞类别:κ 细胞(*klf⁺ nanos-2⁺*)、φ 细胞(*fgfrA⁺*)和 δ 细胞(*nanos-2⁺ fgfrA⁺*),并且发现只有少量 κ 细胞和 δ 细胞能够进入哺乳动物体内,表明这 2 种细胞可能是成虫体内的成体干细胞来源。在 2020 年,曼氏血吸虫在哺乳动物体内第一个发育阶段的单

细胞图谱已经完成,Diaz 等^[43]利用 scRNA-seq 技术对 2 d 龄曼氏血吸虫童虫进行了测序分析,鉴定出 13 种具有不同转录特征的细胞群,并且还发现童虫中的神经元细胞在转录和空间上存在异质性。Li 等^[44]利用 scRNA-seq 技术构建了曼氏血吸虫童虫所有组织细胞的完整图谱,并鉴定出了控制生殖干细胞增殖和分化的遗传程序。为了更好的理解细胞类型和组织分化,Wendt 等^[45]利用 scRNA-seq 技术对曼氏血吸虫成虫的 43 642 个细胞进行测序分析,鉴定出 68 个具有独特转录组特征的细胞群,结果表明神经元细胞和肌细胞都表现出显著的异质性。随后,研究人员对 3 类不同的成体干细胞亚群进行分析,发现了一个表达 *hnf4* 的成体干细胞(*eled⁺ neoblasts*)亚群,并证明了该细胞对于寄生虫生长和产生虫卵诱导病理改变都是必要的。

2.3 棘球蚴病 人体棘球蚴病主要是指囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE)和泡型棘球蚴病(alveolar echinococcosis, AE)2 种。棘球蚴虫在长期的进化过程中,已经进化出多种精细策略用以逃避宿主的免疫攻击,并且在宿主保护和自身生长之间建立了平衡^[46]。肝 CE 包裹周围聚集了大量浸润免疫细胞形成了免疫微环境。scRNA-seq 技术从单个细胞水平进行转录组测序分析,相比于传统的依赖于细胞表面标记物进行细胞类型分类,其在鉴定细胞类型和发现稀有细胞方面更具优势。2021 年, Yasen 等^[47]首次利用 scRNA-seq 技术对来自肝囊型棘球病患者外周血、病变肝组织和正常肝组织的 81 865 个免疫细胞进行测序分析,共鉴定得到 23 个细胞亚群,并分析了不同组织中免疫细胞的表型变异,结果显示 2 型先天淋巴细胞(ILC2)和浆细胞样树突状细胞(pDC)在不同样本中存在显著异质性。随后对病变肝组织和正常肝组织中的 ILC2 和 pDC 进行富集分析,结果显示差异基因显著富集到白细胞活化的调节、toll 样受体信号通路、NF-κB 信号通路和免疫系统过程的负调控。机体对细粒棘球蚴虫感染的免疫炎症反应是由 NF-κB 信号通路介导^[48]。长期以来,棘球蚴病的早期诊断和治疗亟待寻找一种特异性诊断标志物和治疗靶点。目前 Yan 等^[49]鉴定出 ARHGAP3 可能是甲状腺乳头状癌复发和转移的诊断标志物和治疗靶点。

3 结语

scRNA-seq 技术改变了对于多种生物学现象的理解,开辟了一个新研究领域,已经成为研究组织细胞异质性、鉴定罕见细胞类型、检测病变组织和正常组织之间细胞及分子变化、追踪细胞谱系和分化领域的一项强大技术。然而,目前的 scRNA-seq 方案仍然存在不足:一是对于组织样本要求较高,主要用于新鲜组织和新鲜培养的细胞,难以用于大部分冻存样本;另一方面,通过酶解消化能够制备较好的单细胞悬液,在细胞捕获和裂解过程中,可能会发生转录谱改变,导致结果与真实情况有差异。目前为止,scRNA-seq 在研究寄生虫不同发育阶段和致病机制方面得到了广泛应用,并且已经产生了大量数据。当前由于无标准的分析和可视化平台,其在寄生虫病学领域的应用仍有待进一步拓展,从而为有效防控甚至消除寄生虫病的公共卫生危害提供有效工具。

【参考文献】

[1] Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage

- years [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 631-656.
- [2] Kolodziejczyk AA, Lonnberg T. Global and targeted approaches to single-cell transcriptome characterization [J]. *Brief Funct Genomics*, 2018, 17(4): 209-219.
- [3] 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.
- [4] Hoffmann KF, Brindley PJ, Berriman M. Medicine. Halting harmful helminths [J]. *Science*, 2014, 346(6206): 168-169.
- [5] Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications [J]. *Mol Aspects Med*, 2018(59): 36-46.
- [6] Chen H, Ye F, Guo G. Revolutionizing immunology with single-cell RNA sequencing [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(3): 242-249.
- [7] Li H. Single-cell RNA sequencing in Drosophila: Technologies and applications [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2021, 10(5): e396.
- [8] Dal Molin A, Di Camillo B. How to design a single-cell RNA-sequencing experiment: pitfalls, challenges and perspectives [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1384-1394.
- [9] Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, et al. Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2012, 17(2): 119-123.
- [10] Kirkness EF, Grindberg RV, Yee-Greenbaum J, et al. Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome [J]. *Genome Res*, 2013, 23(5): 826-832.
- [11] Datta S, Malhotra L, Dickerson R, et al. Laser capture microdissection: Big data from small samples [J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(11): 1255-1269.
- [12] Shapiro E, Biezuner T, Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(9): 618-630.
- [13] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for Single-Cell Isolation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 16897-16919.
- [14] Jo Y, Shen F, Hahn YK, et al. Magnetophoretic Sorting of Single Cell-Containing Microdroplets [J]. *Micromachines (Basel)*, 2016, 7(4): 56.
- [15] Lin CH, Chang HC, Hsu CH. A Microfluidic Platform for High-throughput Single-cell Isolation and Culture [J]. *J Vis Exp*, 2016, (112): 54105.
- [16] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 1-14.
- [17] Picelli S, Faridani OR, Bjorklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(1): 171-181.
- [18] 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.
- [19] Fan X, Zhang X, Wu X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos [J]. *Genome Biol*, 2015(16): 148.
- [20] Sheng K, Cao W, Niu Y, et al. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(3): 267-270.
- [21] Hashimshony T, Wagner F, Sher N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 666-673.
- [22] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-643.
- [23] Ramskold D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 777-782.
- [24] Klein A M, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1187-1201.
- [25] Zheng GX, Terry JM, Belgrader P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049.
- [26] Han X, Wang R, Zhou Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-Seq [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1091-1107.
- [27] Barry A, Bradley J, Stone W, et al. Higher gametocyte production and mosquito infectivity in chronic compared to incident *Plasmodium falciparum* infections [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2443.
- [28] Horne-Debets JM, Faleiro R, Karunaratne DS, et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(5): 1204-1213.
- [29] Lonnberg T, Svensson V, James KR, et al. Single-cell RNA-seq and computational analysis using temporal mixture modelling resolves Th1/Tfh fate bifurcation in malaria [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(9): eaal2192.
- [30] Perez-Mazliah D, Nguyen MP, Hosking C, et al. Follicular Helper T Cells are Essential for the Elimination of *Plasmodium* Infection [J]. *EBioMedicine*, 2017(24): 216-230.
- [31] Imai T, Ishida H, Suzue K, et al. Cytotoxic activities of CD8+ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria [J]. *Elife*, 2015, 4: e04232.
- [32] Butler NS, Moebius J, Pewe LL, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection [J]. *Nat Immunol*, 2011, 13(2): 188-195.
- [33] Mamedov MR, Scholzen A, Nair RV, et al. A macrophage colony-stimulating-factor-producing gammadelta T cell subset prevents malarial parasitemic recurrence [J]. *Immunity*, 2018, 48(2): 350-363.
- [34] Junqueira C, Polidoro RB, Castro G, et al. gammadelta T cells suppress *Plasmodium falciparum* blood-stage infection by direct killing and phagocytosis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(3): 347-357.
- [35] Chen S, Gao Y, Fan Y, et al. The Dynamic Change of Immune Responses Between Acute and Recurrence Stages of Rodent Malaria Infection [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 844975.
- [36] Witmer K, Dahalan FA, Metcalf T, et al. Using scRNA-seq to identify transcriptional variation in the malaria parasite ookinete stage [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 604129.
- [37] Bogale HN, Pascini TV, Kanatani S, et al. Transcriptional heter-

- ogeneity and tightly regulated changes in gene expression during *Plasmodium berghei* sporozoite development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(10): e2023438118.
- [38] Sa JM, Cannon MV, Caleon RL, et al. Single-cell transcription analysis of *Plasmodium vivax* blood-stage parasites identifies stage- and species-specific profiles of expression [J]. PLoS Biol, 2020, 18(5): e3000711.
- [39] Nanes SD, Li P, Tarashansky AJ, et al. Single-cell deconstruction of stem-cell-driven schistosoma development [J]. Trends Parasitol, 2021, 37(9): 790-802.
- [40] Wendt GR, Collins JN, Pei J, et al. Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni* [J]. Elife, 2018, 7: e33221.
- [41] Collins JJ, Wang B, Lambrus BG, et al. Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Nature, 2013, 494(7438): 476-479.
- [42] Wang B, Lee J, Li P, et al. Stem cell heterogeneity drives the parasitic life cycle of *Schistosoma mansoni* [J]. Elife, 2018, 7: e35449.
- [43] Diaz SCL, Lee J, Chong T, et al. Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6411.
- [44] Li P, Nanes Sarfati D, Xue Y, et al. Single-cell analysis of *Schistosoma mansoni* identifies a conserved genetic program controlling germline stem cell fate [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 485.
- [45] Wendt G, Zhao L, Chen R, et al. A single-cell RNA-seq atlas of *Schistosoma mansoni* identifies a key regulator of blood feeding [J]. Science, 2020, 369(6511): 1644-1649.
- [46] Gottstein B, Soboslay P, Ortona E, et al. Immunology of alveolar and cystic echinococcosis (AE and CE) [J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 1-54.
- [47] Yasen A, Sun W, Aini A, et al. Single-Cell RNA Sequencing reveals the heterogeneity of infiltrating immune cell profiles in the hepatic cystic echinococcosis microenvironment [J]. Infect Immun, 2021, 89(12): e0029721.
- [48] Tilioua S, Mezioug D, Amir-Tidadini ZC, et al. Potential role of NF-kappaB pathway in the immuno-inflammatory responses during human cystic echinococcosis [J]. Acta Trop, 2020, 203: 105306.
- [49] Yan T, Qiu W, Song J, et al. ARHGAP36 regulates proliferation and migration in papillary thyroid carcinoma cells [J]. J Mol Endocrinol, 2021, 66(1): 1-10.

【收稿日期】 2022-05-25 【修回日期】 2022-07-15

(上接 1105 页)

本次研究中共检出 26 株病原菌, 其中革兰阴性菌 13 株, 真菌 9 株, 革兰阳性菌 4 株。革兰阴性菌中肺炎克雷伯菌检出数量最多, 其次是铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌, 同时也检出了较少见的洋葱伯克霍尔德菌和产吡啶黄杆菌。真菌中以白色假丝酵母菌为主, 同时检出了曲霉菌和隐球菌, 这与 Scrivero 等^[14]研究一致。革兰阳性菌仅检出了肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌。同时本次研究中也检出了 12 株病毒分别为巨细胞病毒、EB 病毒和单纯疱疹病毒。引起 ILD 并发肺部感染的病原体具有多样性, 因而一旦发生感染应尽快进行病原学检测, 并及时进行有效的治疗。治疗革兰阳性菌和革兰阴性菌的常见药物有喹诺酮类抗生素、氨基糖甙类抗生素和 β 内酰胺类抗生素等, 治疗真菌则常用伏立康唑和伊曲康唑等。在抗感染治疗时也需要考虑到不常见的病原体或一些存在天然耐药的病原菌, 如嗜麦芽假单胞菌对氨基糖甙类等多种抗生素天然耐药。

【参考文献】

- [1] Demoruelle MK, Mittoo S, Solomon JJ. Connective tissue disease-related interstitial lung disease[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2016, 30(1): 39-52.
- [2] She S, Steinfors DP, Ing AJ, et al. Transbronchial cryobiopsy in interstitial lung disease: safety of a standardized procedure[J]. J Bronchology Interv Pulmonol, 2020, 27(1): 36-41.
- [3] 李展, 党强, 门翔, 等. 成人间质性肺疾病肺部真菌感染的危险因素[J]. 热带医学杂志, 2021, 21(11): 1428-1432.
- [4] 骆毅, 郭春燕, 李倩雨, 等. 结缔组织病合并肺部真菌感染的临床特点及危险因素分析[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(12): 2178-2181.
- [5] Chen D. Infection in southern chinese patients with systemic lupus erythematosus: spectrum, drug resistance, outcomes, and risk factors[J]. J Rheumatol, 2016, 43(9): 1650-1656.
- [6] Marie I, Menard JF, Hachulla E, et al. Infectious complications in polymyositis and dermatomyositis: a series of 279 patients [J]. Semin Arthritis Rheum, 2011, 41(1): 48-60.
- [7] 吴华香, 薛静, 王巧宏, 等. 肺炎和多发性肌炎合并间质性肺炎死亡原因分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2006(9): 837-839.
- [8] 张小飞. 结缔组织病相关间质性肺疾病合并肺部感染的临床特点及危险因素分析[D]. 广州医科大学, 2018.
- [9] Juarez MR, Misischia G, Alarcon S. Infections in systemic connective tissue diseases: systemic lupus erythematosus, scleroderma, and polymyositis/dermatomyositis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2003, 29(1): 163-184.
- [10] Matsumoto Y. Risk factors for infection in patients with remitted rheumatic diseases treated with glucocorticoids [J]. Acta Med Okayama, 2011, 65(5): 329-334.
- [11] Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(7): 909-917.
- [12] 张文龙. 结缔组织相关性间质性肺疾病 486 例临床特点分析 [D]. 新疆医科大学, 2018.
- [13] Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein [J]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 48487-48490.
- [14] Scrivero R, Armignacco O. Tuberculosis risk and anti-tumour necrosis factor agents in rheumatoid arthritis: a critical appraisal of national registry data [J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(7): 716-724.

【收稿日期】 2022-05-20 【修回日期】 2022-08-01