

DOI:10.13350/j.cjpb.231122

• 综述 •

寄生原虫单细胞测序的研究进展*

彭涛¹, 李士琪², 张锦阳², 盛明宇², 刘功振^{2**}

(1. 河北农业大学动物医学院, 河北保定 071000; 2. 临沂大学农林科学学院)

【摘要】 近年来随着单细胞测序技术迅速发展,其在人体、动物、植物、肿瘤及病原微生物等领域已经广泛开展研究。与宿主体内的基因突变相似,大多数寄生虫也存在突变,其基因组测序研究多集中在数百万大样本单个虫体细胞中。目前针对改变特定的宿主-寄生虫系统,现已开发出寄生虫单细胞测序方法,此举使得复杂的寄生虫种群中的遗传多样性和亲缘关系得以破译,并能捕获遗传突变的基因序列。本研究以人兽共患的疟原虫和利什曼原虫为例,概述寄生虫单细胞基因组测序的方法和进展,以及这些方法在寄生虫生物学中的应用。

【关键词】 遗传多样性;单细胞分离;单细胞测序;全基因组扩增;单细胞多组学;综述

【中图分类号】 R382

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1350-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov.;18(11):1350-1354.]

Research progress of single-cell sequencing technology in protozoan parasites

PENG Tao¹, LI Shiqi², ZHANG Jinyang², SHENG Mingyu², LIU Gongzhen² (1. *College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China*; 2. *College of Agriculture and Forestry, Linyi University*)

【Abstract】 In recent years, single-cell sequencing technology has developed rapidly, and studied widely in human, animal, plant, tumor and pathogenic microorganism. There are a large number of genetic mutations in the host, most parasites also have mutations, and their genome sequencing studies are focused on a large sample in millions of individual parasitic cells. Single-cell sequencing of parasites has been developed to modify specific host-parasite systems, which allows the genetic diversity and phylogenetic relationships in complex parasite populations to be deciphered and the genetic sequences of inherited mutations to be captured. Taking plasmodium and leishmania parasite as examples, this study summarizes the methods and progress of single-cell genome sequencing in protozoa parasites, and the application of these methods in parasitological biology.

【Key words】 genetic diversity; single-cell isolation; single-cell sequencing; whole genome amplification; single-cell multi-omics; review

*** 寄生虫发生基因突变可能是因入侵单一或多种宿主造成的基因多态性^[1-4]。寄生虫感染动物模型中出现的单个宿主体内存在多个遗传基因差异的虫体,可以导致虫体毒力变化和宿主适应性、耐药性的演化^[1,4]。以夏氏疟原虫感染啮齿类动物模型为例,当不同基因型疟原虫发生共同感染时,其能够快速筛选出高毒力虫株。因此,研究不同宿主体内的虫体基因多样性,有助于探讨不同寄生虫在不同宿主体内感染机制研究。本文重点概述单细胞寄生虫的分离、扩增及测序的方法,阐述这些方法应用于寄生虫基因特征相关的生物学问题,展望单细胞测序技术在寄生原虫研究中的发展前景及应用。

1 单细胞测序

1.1 单细胞分离 单细胞测序技术首先便是要从复杂样本中识别并分离出具备某种特质的单细胞(图1)。从不同组织中分离单个细胞最困难的是保持靶细胞纯度和完整性^[5]。纯度多被定义为一个细胞或环境DNA的污染程度,完整性则是指细胞本身的损伤程度^[6]。分离细胞有多种方法,需根据特定实验要求而恰当选择。根据之前的研究,常见方法包括有限稀释法、激光捕获显微切割术(Laser capture microdissection, LCM)、显微操作法、流式细胞分选技术(Fluorescence activated

cell sorting, FACS)、和微流控技术等。后者都有着高通量、高效率、自动化的特点。与其相反,LCM和显微操作法通量低、耗时长、对技术有较高的要求,且二者对细胞易造成损伤,通常只有在细胞样本较少的时候才会应用这种方法。应用有限稀释法可以减少基因突变^[2],该方法通过标准移液器稀释并分离为单个细胞^[4],一般使用0.25个细胞/孔的浓度,因为这样可以最大限度的捕获细胞。随着该浓度增加,每孔捕获细胞数量的也会增加,例如分别设置0.5和0.9的细胞浓度,基于泊松分布获得每孔2个细胞的概率分别为8%和16%^[6]。有限稀释法初期常用于利什曼原虫计数以及捕获多种表型的疟原虫。在基因组时代,有限稀释法被用于分析多重感染以及检测疟原虫基因突变率^[2]。应用有限稀释法,优点在于保留细胞

* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金(No. 31502057); 临沂大学高层次人才引进启动基金(No. Z6122016)

** **【通讯作者】** 刘功振, E-mail: gongzhenliu@126.com

【作者简介】 彭涛(1995-),男,山东淄博人,博士在读,主要从事动物疾病防治研究。E-mail: 244764302@qq.com
彭涛和李士琪并列第一作者。

完整性和未来克隆细胞系表型特征,但是该法会耗费大量时间和精力,进行大规模实验较为繁琐,且需要在实验室培养。有限稀释法缺点是捕获基因突变并不能完全反映真实现状,而且在每个捕获基因组中可能产生新的突变。

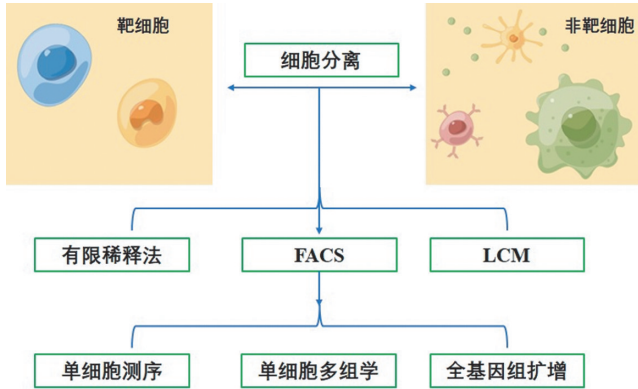


图1 单细胞分离及测序流程
Fig. 1 Single cell isolation and sequencing process

单细胞研究中应用最为广泛的方法是流式细胞荧光分选技术(FACS)。FACS分选技术主要是基于细胞染料或荧光标记抗体对细胞进行标记,然后通过FACS细胞仪激发、检测及评估细胞的荧光标记和形态特征(如大小和颗粒),对符合特定标准的细胞可以利用微孔板进行分选^[6]。因FACS具有广泛适用性及高度选择性^[5],所以荧光标记可以精确地分选特定表型细胞,成功弥补了费时费力的有限稀释法^[7]。然而,FACS依旧存在诸多弊端,如细胞分选不能保证不受潜在污染物的影响,所以必须制定污染物最小化和量化风险的指导方案^[3,8],此外该方法需制备大量的细胞悬浮液,会影响低丰度细胞亚群的产量且易对细胞造成机械性损伤。基于FACS的技术方案对于大部分疟疾感染的红细胞(Red blood cell, RBC)来说尤为适用,因为感染RBC含有疟原虫DNA,以此可以将其从缺乏该疟原虫DNA的、未感染的RBC中准确地分离出来。FACS还可以针对间日疟原虫和恶性疟原虫的研究进行优化,以便分选出单细胞虫体进行全基因组扩增和测序^[3,6]。与恶性疟原虫相比间日疟原虫在常规实验室不能培养,所以我们对其知之甚少。而基于FACS的技术方案则能够对间日疟原虫进行单细胞测序,有利于间日疟方面的研究。我们对几种常用的单细胞分离技术进行总结归纳(表1)。

1.2 单细胞全基因组扩增及测序 单细胞中存在的DNA含量并不足以直接进行基因测序和靶向基因分型。单个细菌或人类细胞所含DNA的数量级为1fg-1pg,而标准细胞的最小基因组文库构建量约为100 ng DNA。为了生产足够用于测序的DNA用量,必须进行全基因组扩增(Whole-genome amplification, WGA)^[9]。寡核苷酸引物聚合酶链反应(Degenerate oligonucleotide primer-polymerase chain reaction, DOP-PCR)是首个用于WGA的方法,通过应用简并寡核苷酸引物随机引发位点密集覆盖基因组以启动体外DNA复制,该技术会产生高度可重复的DNA复制图谱,从而降低检测基因CNVs(Copy number variations, CNVs)干扰。然而,聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)所需的热稳定聚合酶会导致较高的碱基互补配错率^[10],其替代方案是基于PCR方法使用

多重置换扩增(Multiple displacement amplification, MDA)技术^[9,11],MDA使用随机六聚体引物和Phi29 DNA聚合酶扩增DNA,反应在恒温条件下(通常为30℃)进行,其扩增DNA碱基互补配错率非常低^[11]。但是MDA缺点是会出现更明显的扩增偏差^[9,12],这限制了其用于CNV分析。在目前研究中,将DOP-PCR的低干扰扩增与MDA的低碱基配错率相结合的思路产生诸多混合方案,包括PicoPLEX(Takara)、多次退火环状循环扩增技术(Multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)^[12-13]。由于WGA方法中存在不同的读取覆盖率、均匀性、误差率和试剂污染程度,因此扩增方法的选择较大程度取决于下游的应用^[9,13]。考虑到单细胞的遗传变异,因此我们亟待需要进一步针对寄生虫进行方案优化,以保证均匀性和覆盖率最大化。

目前正在研发针对寄生虫的专用WGA方案,以应对不同物种带来的挑战。Imamura等^[13]比较了PicoPLEX(Takara)和RepliG(Qiagen)两种WGA方法,确定二者保存杜氏利什曼原虫和巴西利什曼原虫维持非整倍体水平和单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)的能力,研究表明,PicoPLEX是最适合评估染色体非整倍体的方案。基于优化MALBAC的WGA方案,旨在解决恶性疟原虫基因组的极端核苷酸偏差(约80%富含AT),可以成功地扩增疟原虫基因组并产生较高覆盖率,并且在单细胞中检测到小规模CNV,该方法将为耐药性和环境适应机制的研究提供新的思路。对于恶性疟原虫,现已开发了基于基因组测序前MDA的WGA方案^[8]。Trevino等^[3]优化了在后期阶段通过对靶向寄生虫基于FACS进行DNA复制的方法,达到了捕获恶性疟原虫90.7%基因组的水平。获得高覆盖率的完整的基因组后,应用高通量测序技术能够对识别单个细胞的特异性变异,可以检测出更多的非编码区和结构变异,有利于细胞异质性及生物基因组学等方面的研究。

表1 常见单细胞分离方法比较
Table 1 Comparison of Common Single Cell Separation Methods

单细胞分离方法 Single cell separation method	成本 Cost	技术门槛 Technology threshold	细胞数量 Cell number	分离速度 Separation velocity	应用 Application
荧光激活细胞分选	仪器价格昂贵	自动化操作,简单方便	数百个	快速	DNA含量分析,免疫表型分析,肿瘤诊断,可溶性分子定量等。样本广阔,适用性强
微流控技术	耗材昂贵,需特殊试验仪器	通过计算机控制细胞分选	数万	快速	单肿瘤循环细胞测序,药物分析,基因测序等
有限稀释法	成本低	操作简单,但费时费力	少	耗时	基因突变率检测、分析多重感染、杂交瘤细胞筛选等
显微操作法	成本低廉	工作量大,对技术人员操作要求较高	少	耗时	微生物分离培养,胚胎细胞、造血干细胞分离
激光捕获显微切割术	需小型激光切割平台,成本较高	方法简单,但操作较为困难	少	快速	细胞异质性研究

1.3 单细胞转录组扩增及测序 截止目前,高通量测序技术只能以DNA为对象进行测序,而对mRNA进行测序需将其反转录为cDNA,其关键在于将细胞内少量的RNA高效扩增出

大量 cDNA 且保证反转录准确性。常用 Oligo(dT) 引物对携带 poly(A) 的 mRNA 分子进行反转录后扩增, 捕获 RNA 精度较高, 但效率较低, 这也是现如今 mRNA 捕获技术的缺点。单细胞转录组较为常用方法有 PCR 和体外转录线性扩增。利用前者的单细胞转录组测序技术主要有 10 x Chromium, Smart-Seq 及 Smart-Seq2, Drop-seq, Seq-Well 等技术方案; 利用后者的方案主要有 CEL-seq2/C1, inDrops 等^[14]。cDNA 表达量存在差异, 是选择转录组扩增技术的重要考量因素。

现如今, 已经开发了多种不同单细胞转录组测序 (Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 技术方案。其中 10 x Genomics Chromium 系统可以从下一代测序读数中破译转录组信息, 其主要基于微流控液滴技术, 操作简单并且能够同时处理数千个细胞, 不仅能够从单个细胞中捕获转录产物和遗传信息, 而且可以结合生物信息学软件进行遗传学分析。与全长转录组测序方法相比, 10x Genomics Chromium 系统对单细胞分离到测序所需的设备去繁就简, 在细胞通量和测序成本方面表现极佳, 更适用于鉴别复杂组织样本或肿瘤中的细胞亚群, 常用于组织异质性方面的研究, 但是该技术只能获取 3' 端转录本信息且对样本有着较高的要求。Ramskold 等^[15] 开发的 Smart-Seq 技术与其有相似的分子生物学原理且能够检测 mRNA 全长, 并且有着较高的转录覆盖率, 缺点则是测序成本较高。Picelli 等^[16] 在其基础上进行改进开发出 Smart-Seq2, 相较于前一代, 该方法在灵敏度、准确性、转录本覆盖率和成本等诸多方面均有所提高, 但无论是 Smart-Seq 还是 Smart-Seq2 都只能对具有 poly(A) 尾的 mRNA 进行扩增和检测分析。近期 Ziegenhain 等^[17] 对 6 种不同的 scRNA-seq 方法进行对比分析, 研究表明 Smart-seq2 检测到单个细胞和总细胞的基因数最多, 在灵敏度、准确性、测序细胞数等方面均有明显优势, 但相较于其他高通量测序技术, 其测序成本处于较高水平^[18]。

2 单细胞测序在寄生虫中应用

单细胞测序以高准确度获得单个细胞完整基因组序列。迄今为止, 单细胞测序技术解决了诸多关于病原传播和种群结构变化、基因突变以及虫体与宿主关系的问题。

2.1 病原传播和种群结构变化

寄生虫病的传播会受到宿主免疫、遗传多样性以及本身疾病特征的影响^[19], 例如在复杂的疟疾感染中, 疟原虫的遗传多样性主要来自两方面: 一是多只携带一种单倍型疟原虫蚊子的叮咬; 二是携带多种寄生虫单倍型蚊子的单次叮咬^[1] 或多次叮咬。单个单倍型疟原虫可以进行单细胞测序, 以获得与蚊虫叮咬携带密切相关的疟原虫感染信息。在疟疾感染中, 感染途径可分为“重复感染”或“共同传播”, 但两者并不是毫无联系的, 重复感染和共同传播都能以不同的方式使得单一宿主产生遗传多样性和基因突变。共同传播会将紧密联系的寄生虫寄生到宿主体内^[2, 20-21], 而重复感染将导致关系并不紧密的寄生虫存活^[21]。当出现多种基因型疟原虫感染时, 单细胞测序技术很难准确分析虫体传播数量^[20], 而且单一宿主中多种虫体感染情况复杂, 这样会增加病原传播和基因突变的机会。

利用单细胞基因测序技术, Nkhoma 等^[7] 对恶性疟原虫感染开展调研, 这项研究得以开展主要是基于高危传播环境 (估计每人每年 183 次叮咬) 重复感染的机会很高。虽然大多数感染都含有相关的疟原虫, 但这些虫体很可能通过一次蚊虫叮咬

进行传播。研究发现, 共同传播和重复感染占主导地位, 在高传播环境地区, 共同传播对遗传多样性和基因突变的产生发挥重要作用。将单细胞测序方法应用于疟疾感染流行区, 可以掌握疟原虫在共同传播和重复感染过程中遗传多样性和基因突变规律。

2.2 基因突变

如上所述, 寄生虫种群的遗传基因变异可分为在宿主体内的持续变异和感染期间产生的从头变异。从头突变引入的变异尤受研究人员青睐, 因为它可能会导致新特征出现 (如免疫系统逃逸或耐药性)。现如今, 基因组测序的研究重心主要有三方面, 首先是确定导致耐药性的基因突变^[19, 21], 其次是跟踪总结基因突变规律^[22], 最后进行定量宿主内等位基因突变频率^[22-23]。以此从单细胞测序应用到表征耐药性基因单倍型来获取关键信息。

与病毒和细菌不同, 疟原虫感染中的耐药性很少由新突变产生; 相反, 它一般被选择、遗传和传播^[19]。当存在多个耐药性突变时, 蚊子中肠内的基因重组可以将耐药性基因组合或分离为单个基因组, 该方法已用于鉴定恶性疟原虫和间日疟原虫单次感染中的多种耐药虫体^[4]。除了鉴定耐药性, 还可以筛选携带其他功能基因的突变个体。Trevino 等^[3] 单细胞测序数据显示, 参与宿主细胞重塑 (PHIST) 和营养摄取 (CLAG3. 1/32) 的基因^[24-26] 在单次感染特定谱系中已经被删除。这些基因缺失存在于多种相关遗传背景中, 不是从头突变, 而是持续基因突变。

高通量测序技术又称下一代测序 (Next generation sequencing, NGS) 其为遗传进化的直接测序提供了可能。如今几乎所有关于自然界中寄生虫种群的研究都集中在遗传进化方面, 然而, 在种群水平上整体对突变的描述尚不足以理解寄生虫遗传基础, 确定新突变及其对宿主个体的影响程度仍然很有必要。在细胞群体样本中, 频繁出现突变的恶性疟原虫基因组的突变率约为每代 3.3×10^{-10} 个碱基对^[27], 例如一位带 1% 虫血症患者会携带大约 10^{10} 种寄生虫, 这意味着每 48 h 内 23 Mb 寄生虫基因组中的每一个碱基对都至少会发生三次突变。这些突变中的每个基因位点都会出现在单个基因组中, 并且不会被大规模基因组测序检测到。所以只有通过单个寄生虫基因组进行测序, 才能发现更多基因组中的突变^[28]。在实验培养群体中, 单细胞测序现已应用于疟原虫和杜氏利什曼原虫, 研究表明恶性疟原虫在长期培养过程中会发生选择性突变, 而在杜氏利什曼原虫染色体出现了耐药性的变化^[29-30]。目前研究人员正努力将这些方法应用于常见的寄生虫感染, 以捕获新突变, 这些研究对了解寄生虫如何适应个体宿主非常重要。

基于 NGS 准确捕获新的低频突变是一项重大挑战^[28]。在批量样本分析中, 大多数罕见突变 (频率 < 1% 的突变) 通过任何方法都无法检测到, 因此单细胞测序正成为捕获罕见突变、重要突变的替代方法。虽然这些方法尚未广泛应用于寄生虫感染, 但是利用单细胞测序捕获从头突变的相关数据的技术方案正逐步广泛地应用于人类基因的遗传变异和癌症研究^[31]。例如, 癌症细胞的单细胞测序显示, 耐药性是通过从肿瘤内预先存在的耐药基因型中进行适应性选择而产生。通过识别、区分临床相关谱系的突变, 我们能够揭示、了解癌细胞与正常细胞之间的明显差异, 特别是对出现多种适应谱系并显示出彼此竞争现象 (称为克隆干扰) 的癌细胞, 而且在寄生虫领域

的研究中,恶性疟原虫也被证实存在类似特征^[1,29]。在拥有足够数量的宿主细胞的前提下,研究胞内寄生虫与宿主细胞之间的适应性,并进一步探讨单细胞测序在寄生虫病研究中的限制性,是我们亟待进行的任务。

2.3 虫体与宿主 寄生虫与宿主的关系十分复杂,寄生虫病尤其是疟疾目前仍是全球公共卫生事业的重要负担,探究虫体与宿主的互作关系,能够有效控制疟疾的发生。富拉尼人对恶性疟原虫相对不易感,对参与疟疾免疫反应的其他候选基因的靶向 SNP 分析无法解释其原因,而 Quin 等^[32]通过转录组分析技术发现了富拉尼人有着较高的炎性小体组分基线水平,致使恶性疟原虫感染后炎性小体激活水平较高,其进一步表明炎性小体的激活具有保护作用,并能增强机体免疫反应。Chen 等^[33]利用 scRNA-seq 技术对感染夏氏疟原虫的小鼠将复发期高峰(感染后第 16 d)的脾淋巴细胞群与急性感染期高峰(接种后第 8 d)的脾脏淋巴细胞群进行比较。利用 UMAP 分析基于细胞特异性分子标记的八种淋巴细胞,结果证实 CD4⁺ T 淋巴细胞在急性感染期中发挥关键作用。在复发期,树突状细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和骨髓巨噬细胞水平明显升高,以此说明非特异性免疫在控制疟疾感染中扮演着重要角色。Xie 等^[34]通过基于 scRNA-seq 的 T-SNE 分析,在受约氏疟原虫感染的小鼠 $\gamma\delta$ T 细胞中鉴定出 11 个表面受体,并发现受体 4、5 和 7 表达了诸多参与免疫反应的蛋白,证实了约氏疟原虫感染的 C57BL/6 小鼠脾脏中 $\gamma\delta$ T 细胞在蛋白质和 RNA 水平上的多样性,并表明 $\gamma\delta$ T 细胞在受体 4、5 和 7 相关基因的扩增可以促进机体免疫反应。Du 等^[35]通过全血 RNA-seq、人外周血单核细胞的单细胞细胞表面蛋白和 RNA 同时测序(Cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, CITEseq)技术对初始恶性疟原虫 RAS 免疫(Plasmodium falciparum RAS-immunized, PiRAS)后收集的血样进行综合分析,以及对受免疫保护和未受免疫保护的志愿者进行横向比较,结果发现接种 PiRAS 疫苗后 1 d 内诱导的非经典单核细胞和早期 I 型干扰素反应与免疫力受损相关,未受免疫保护的个体也表现出 Th2 细胞的极化,同时发现 Th1 细胞、CD8⁺ T 细胞、自然杀伤细胞及 T-bet 转录因子在免疫调节中发挥着重要作用,这些发现为有效疟疾疫苗研发和相关免疫反应提供新见解。利用单细胞测序相关技术,可以让我们更好地认识疟原虫与宿主机体之间作用机制和免疫反应,以期更好地对疟疾进行防治。

3 结语

单细胞基因组学是我们了解寄生虫生物学和宿主-寄生虫相互作用的强有力工具。正如本文所概述,利用相关技术我们能够在单个细胞遗传信息平台中搜索并获取信息,但是这些方法并不是一成不变的,而是要根据试验需求进行灵活选用。然而即使有多种可供利用的技术方案,但单细胞技术仍受到诸多限制与挑战,例如在处理单细胞时,必须确保制定的方案安全可靠,以尽量减少来自环境和其他目标细胞的污染,且必须确保这些方案的有效性。在此篇综述中,应用单细胞测序技术可以获取多方面、多层次的基因变异信息;而且可以直接从感染的样本中分离单倍型,并评估与虫体与单个细胞之间的相关性;同时捕获潜在的与抗药性、临床相关表型相同的遗传背景下有关的任何基因突变,从而鉴定种群中任何低频率分离的新生突变。随着单细胞技术的发展,其揭示了一些寄生原虫生物

学方面悬而未决的问题以及它们如何与宿主相互作用,并为发现新的治疗药物靶点和方法奠定基础。

【参考文献】

- [1] Read AF, Taylor LH. The ecology of genetically diverse infections [J]. Science, 2013, 292(5519):1099-1102.
- [2] Nkhoma SC, Nair S, Cheeseman IH, et al. Close kinship within multiple-genotype malaria parasite infections [J]. Proc Biol Sci, 2012, 279(1738):2589-2598.
- [3] Trevino SG, Nkhoma SC, Nair S, et al. High-resolution single-cell sequencing of malaria parasites [J]. Genome Biol Evol, 2017, 9(12):3373-3383.
- [4] Alizon S, de Roode JC, Michalakis Y. Multiple infections and the evolution of virulence [J]. Ecol Lett, 2013, (4):556-567.
- [5] Valihrach L, Androvic P, Kubista M. Platforms for single-cell collection and analysis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3):807.
- [6] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for single-cell isolation [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):16897-16919.
- [7] Nkhoma SC, Trevino SG, Gorena KM, et al. Co-transmission of related malaria parasite lineages shapes within-host parasite diversity [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(1):93-103.
- [8] Nair S, Nkhoma SC, Serre D, et al. Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections [J]. Genome Res, 2014, 24(6):1028-1038.
- [9] de Bourcy CF, De Vlaminck I, Kanbar JN, et al. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods [J]. PLoS One, 2014, 9(8):e105585.
- [10] L hneemann D, Koster J, Szczurek E, et al. Eleven grand challenges in single-cell data science [J]. Genome Biol, 2020, 21(1):31.
- [11] Dean FB, Hosono S, Fang L, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8):5261-5266.
- [12] Zong C, Lu S, Chapman AR, et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell [J]. Science, 2012, 338(6114):1622-1626.
- [13] Imamura H, Monsieurs P, Jara M, et al. Evaluation of whole genome amplification and bioinformatic methods for the characterization of Leishmania genomes at a single cell level [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):15043.
- [14] 褚梦洁, 宋雅菲, 卢惠红等. 单细胞测序技术在人兽共患寄生虫病研究中的应用进展 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53(02):231-238.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell rna sequencing methods [J]. Mol Cell, 2017, 65(4):631-643.
- [18] 杨清清, 韩秀敏, 汪伟. 单细胞转录组测序技术及其在寄生虫学研究中的应用 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(9):1106-1110.
- [19] Volkman SK, Neafsey DE, Schaffner SF, et al. Harnessing ge-

- nomics and genome biology to understand malaria biology[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(5): 315-328.
- [20] Zhu SJ, Hendry JA, Almagro-Garcia J, et al. The origins and relatedness structure of mixed infections vary with local prevalence of *P. falciparum* malaria[J]. Elife, 2019, 8: e40845.
- [21] Neafsey DE, Taylor AR, MacInnis BL. Advances and opportunities in malaria population genomics[J]. Nat Rev Genet, 2021, 22(8): 502-517.
- [22] Cheeseman IH, Miller B, Tan JC, et al. Population structure shapes copy number variation in malaria parasites[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(3): 603-620.
- [23] Auburn S, Campino S, Miotto O, et al. Characterization of within-host *Plasmodium falciparum* diversity using next-generation sequence data[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32891.
- [24] Warncke JD, Vakonakis I, Beck HP. *Plasmodium* Helical Interspersed Subtelomeric (PHIST) proteins, at the center of host cell remodeling[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2016, 80(4): 905-927.
- [25] Sargeant TJ, Marti M, Caler E, et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites[J]. Genome Biol, 2006, 7(2): R12.
- [26] Nguitraogool W, Bokhari AA, Pillai AD, et al. Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells[J]. Cell, 2011, 145(5): 665-677.
- [27] Hamilton WL, Claessens A, Otto TD, et al. Extreme mutation bias and high AT content in *Plasmodium falciparum*[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(4): 1889-1901.
- [28] Wang K, Lai S, Yang X, et al. Ultrasensitive and high-efficiency screen of de novo low-frequency mutations by o2n-seq[J]. Nature Communication, 2017, 8: 15335.
- [29] Treeratanapiboon L, Psathaki K, Wegener J, et al. In vitro study of malaria parasite induced disruption of blood-brain barrier[J]. Biochem Biophysical Res Comm, 2005, 335(3): 810-818.
- [30] Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(3): 175-188.
- [31] Wang J, Fan HC, Behr B, et al. Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm[J]. Cell, 2012, 150(2): 402-412.
- [32] Quin JE, Bujila I, Ch rif M, et al. Major transcriptional changes observed in the Fulani, an ethnic group less susceptible to malaria[J]. Elife, 2017, 6: e29156.
- [33] 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.
- [34] Xie H, Xie S, Wang M, et al. Properties and roles of $\gamma\delta$ T cells in *Plasmodium yoelii* nigeriensis nsm infected C57BL/6 mice[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 11: 788546.
- [35] Du Y, Hertoghs N, Duffy FJ, et al. Systems analysis of immune responses to attenuated *P. falciparum* malaria sporozoite vaccination reveals excessive inflammatory signatures correlating with impaired immunity[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(2): e1010282.

【收稿日期】 2023-06-17 【修回日期】 2023-09-14

(上接 1349 页)

- [8] Gao F, Shen J, Zhao L, et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-activated neuroinflammation via modulation of miR-199b-5p/I κ B kinase β (IKK β)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway in microglia[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1): 9801-9810.
- [9] 菲韦格. 脊柱手术指南[M]. 北京大学医学出版社, 2013.
- [10] 孙祥耀, 海涌. 脊柱术后手术区域感染的临床现状[J]. 中国骨与关节杂志, 2017, 6(4): 313-317.
- [11] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 第4版. 南京: 人民卫生出版社, 2014: 192.
- [12] Daldal I, Senkoylu A. Strategies of management of deep spinal infection; from irrigation and debridement to vacuum-assisted closure treatment[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(2): 33-39.
- [13] Yurube T, Han I, Sakai D. Concepts of regeneration for spinal diseases in 2021[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8356-8360.
- [14] Bielewicz J, Kamieniak M, Szymoniuk M, et al. Diagnosis and management of neuropathic pain in spine diseases[J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1380-1405.
- [15] Santiago K, Cheng J, Jivanelli B, et al. Infections following interventional spine procedures: a systematic review[J]. Pain Physician, 2021, 24(2): 101-116.
- [16] Zhou J, Wang R, Huo X, et al. Incidence of surgical site infection after spine surgery: A systematic review and meta-analysis[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2020, 45(3): 208-216.
- [17] 董锡亮, 杨子斌, 吕乔. 脊柱手术后切口感染患者血清炎症因子变化及临床意义分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(7): 43-46.
- [18] 郑如庚, 邸玉娜, 朱浩, 等. 脊柱外科手术后感染患者 NLR、DD、PLR、IL-35、PCT、IL-10 表达水平及预后分析[J]. 检验医学, 2021, 36(1): 92-94.
- [19] Li F, Zhang L, Xue H, et al. SIRT1 alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury via the miR-182-mediated XBP1/NLRP3 pathway[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 23(1): 1066-1077.
- [20] Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as disease progression biomarkers and therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(10): 1831-1837.
- [21] 张强, 卢红艳, 蒋峰, 等. 羊水中微核糖核酸-182 表达与早产宫内感染和脑损伤的关系[J]. 中国儿童保健杂志, 2020, 28(7): 729-732.
- [22] Ding C, Ding X, Zheng J, et al. miR-182-5p and miR-378a-3p regulate ferroptosis in I/R-induced renal injury[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 929-942.
- [23] Zhou HJ, Wang LQ, Xu QS, et al. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK β -NF- κ B signaling pathway activating microglial cells[J]. Exp Cell Res, 2016, 349(1): 60-67.
- [24] Wang Z, Shen W, Zhu M, et al. MiR-199-3p suppressed inflammatory response by targeting MECP2 to alleviate TRX-induced PHN in mice[J]. Cell Transplant, 2022, 31(1): 1-9.
- [25] Zhang R, Qin L, Shi J. MicroRNA 199a 3p suppresses high glucose induced apoptosis and inflammation by regulating the IKK β /NF- κ B signaling pathway in renal tubular epithelial cells[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 2161-2171.

【收稿日期】 2023-06-10 【修回日期】 2023-09-08