

· 医药生物技术 ·

# 基于单细胞转录组数据解析大鼠背根神经节在出生后发育中非神经元细胞变化特征

张佳琪, 刘俊华, 马洁, 沈磐, 朱云平\*, 杨冬\*

军事科学院军事医学研究院生命组学研究所 国家蛋白质科学中心(北京)北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

张佳琪, 刘俊华, 马洁, 沈磐, 朱云平, 杨冬. 基于单细胞转录组数据解析大鼠背根神经节在出生后发育中非神经元细胞变化特征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3772-3786.

ZHANG Jiaqi, LIU Junhua, MA Jie, SHEN Pan, ZHU Yunping, YANG Dong. Deciphering the dynamic characteristics of non-neuronal cells in dorsal root ganglion of rat at different developmental stage based on single cell transcriptome data[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3772-3786.

**摘要:** 背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)是重要的外周神经系统组成部分, 是外周感觉传入中枢的枢纽。背根神经节在发育过程中神经元细胞及其基因表达的动态变化已有研究进行过单细胞转录组的解析, 而关于非神经元细胞的动态变化尚无系统研究。为了探究出生后不同发育时间点大鼠 DRG 内非神经元细胞的变化, 本研究选取 10 只 7 日龄(7 day, 7D)大鼠的 DRG 和 3 只 3 月龄(3 month, 3M)大鼠的 DRG, 制备单细胞悬液, 使用 10×Genomics 平台进行测序, 从单细胞水平解析了出生后发育中 DRG 非神经元细胞的转录图谱。结果表明, 7D 和 3M 各类非神经元细胞在细胞数目的分布比例上存在显著差异性。对拥有 4 个亚型的施旺细胞整体进行拟时分析, II型施旺细胞是最早出现的施旺细胞亚型, III型和IV型施旺细胞出现较晚。进一步对 2 个不同发育时间点细胞占比数差异显著的IV型施旺细胞进行了基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopaedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。从 7D 到 3M 的差异基因的 GO 分析结果表明, IV型施旺细胞的状态逐渐趋于稳定。KEGG 分析结果发现酪氨酸代谢通路的显著上调影响了细胞内的信号转导, 进而影响了细胞稳态的维持。从 7D 到 3M, 基因 *Col3a1*、*Col4a1* 显著下调, 且与细胞外基质的构建密切相关, 这表明IV型施旺细胞的细胞基质环境随着发育过程趋于稳定。上述结果提示IV型施旺细胞是一类趋于成熟且维持施旺细胞稳态的细胞。本研究关于 DRG 在发育过程中细胞类型和基因表达差异的分析结果为躯体感觉在发育过程中成熟机制的研

资助项目: “十三五”院自主科研计划项目(BIOX0102); 北京市科技新星计划(20220484230); 国家自然科学基金(32270711); 蛋白质组学国家重点实验室自主研究课题基金(SKLP-K202004)

This work was supported by the “13th Five Year” Research Project (BIOX0102), the Beijing Nova Program (20220484230), the National Natural Science Foundation of China (32270711), and the State Key Laboratory of Proteomics (SKLP-K202004).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHU Yunping, zhuyunping@gmail.com; YANG Dong, yangdong@ncpsb.org.cn

Received: 2022-11-08; Accepted: 2023-02-23; Published online: 2023-05-04

究提供了重要参考信息。

关键词：背根神经节；发育；单细胞转录组测序；非神经元细胞；施旺细胞

## Deciphering the dynamic characteristics of non-neuronal cells in dorsal root ganglion of rat at different developmental stage based on single cell transcriptome data

ZHANG Jiaqi, LIU Junhua, MA Jie, SHEN Pan, ZHU Yunping\*, YANG Dong\*

State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing Institute of Lifeomics, Beijing 102206, China

**Abstract:** Dorsal root ganglia (DRG) is an essential part of the peripheral nervous system and the hub of the peripheral sensory afferent. The dynamic changes of neuronal cells and their gene expression during the development of dorsal root ganglion have been studied through single-cell RNAseq analysis, while the dynamic changes of non-neuronal cells have not been systematically studied. Using single cell RNA sequencing technology, we conducted a research on the non-neuronal cells in the dorsal root ganglia of rats at different developmental stage. In this study, primary cell suspension was obtained from using the dorsal root ganglia (DRGs, L4–L5) of ten 7-day-old rats and three 3-month-old rats. The 10×Genomics platform was used for single cell dissociation and RNA sequencing. Twenty cell subsets were acquired through cluster dimension reduction analysis, and the marker genes of different types of cells in DRG were identified according to previous researches about DRG single cell transcriptome sequencing. In order to find out the non-neuronal cell subsets with significant differences at different development stage, the cells were classified into different cell types according to markers collected from previous researches. We performed pseudotime analysis of 4 types Schwann cells. It was found that subtype II Schwann cells emerged firstly, and then were subtype III Schwann cells and subtype IV Schwann cells, while subtype I Schwann cells existed during the whole development procedure. Pseudotime analysis indicated the essential genes influencing cell fate of different subtypes of Schwann cell in DRG, such as *Ntrk2* and *Pmp2*, which affected cell fate of Schwann cells during the development period. GO analysis of differential expressed genes showed that the up-regulated genes, such as *Cst3* and *Spp1*, were closely related to biological process of tissue homeostasis and multi-multicellular organism process. The down regulated key genes, such as *Col3a1* and *Col4a1*, had close relationship with the progress of extracellular structure organization and negative regulation of cell adhesion. This suggested that the expression of genes enhancing cell homeostasis increased, while the expression of related genes regulating ECM-receptor interaction pathway decreased during the development. The discovery provided valuable information and brand-new perspectives for the study on the physical and developmental mechanism of Schwann cell as well as the non-neuronal cell changes

in DRG at different developmental stage. The differential gene expression results provided crucial references for the mechanism of somatosensory maturation during development.

**Keywords:** dorsal root ganglion; development; single cell transcriptome sequencing; non-neuronal cell; schwann cell

背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)是重要的外周神经系统组织,负责接收来自身体感受器的全部神经冲动,包括一般躯体感觉和内脏感觉,然后通过向心纤维将它们传送到脊髓。既往研究表明,不同发育时间点的 DRG 中神经元细胞有着较高的异质性<sup>[1]</sup>,但对于发育不同阶段 DRG 中的非神经元细胞的关注度较为缺乏。因此,本研究着眼于不同发育时间点 DRG 中的非神经元细胞,使用单细胞转录组测序手段<sup>[2]</sup>,在单个细胞水平上解析不同发育时间点 DRG 中非神经元细胞异质性。DRG 中的非神经元细胞包括施旺细胞、卫星胶质细胞、成纤维细胞等、单核细胞等。相关研究表明 DRG 中的神经元和非神经元之间也存在着密切的相互作用关系,起源自 DRG 非神经元细胞的 FGF13 影响着 DRG 中痒觉神经元相关的钠离子通道,从而对痒觉产生影响<sup>[3]</sup>。研究表明提高 DRG 的成纤维细胞中与抑制线粒体缺陷相关的基因 *Drp1* 的表达有助于促进细胞内的线粒体修复,并进一步提高 DRG 中感觉神经元的可修复性<sup>[4]</sup>。Singhmar 等<sup>[5]</sup>的研究表明,起源自 DRG 中的成纤维细胞分泌的 PI16 蛋白影响着外周神经损伤后的慢性疼痛,在未表达 PI16 蛋白的小鼠中外周神经痛也随之消失。研究发现起源自 DRG 成纤维细胞的 Fn14 因子在外周神经损伤后的 DRG 中表达显著升高,该因子是通过活化核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 通路进而影响外周神经损伤后的神经痛<sup>[6]</sup>。起源自 DRG 施旺细胞(schwann cell)的外泌体有效缓解了 II 型糖尿病小鼠的外周神经痛,施旺细胞起源的血管内皮生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF)在体内外都可有效缓解糖尿病所引起的外周神经痛<sup>[7]</sup>。综上所述,DRG 中的非神经元细胞有着非常重要的基础生理学意义和临床研究价值。近年来单细胞测序技术的兴起大大促进了疾病机制在单个细胞水平上的解析。因此通过对 DRG 中的单个细胞进行转录组水平测序,鉴定出其中的非神经元细胞亚群并对其处在发育不同时间点的两类非神经元亚群进行差异性表达的研究,具有较好的创新性和较高的基础生理学意义。

传统的测序方法虽然提供了大量的转录组数据<sup>[8]</sup>,但无法实现在单个细胞的水平上解释造成这种特质的细胞异质性。本文采用的单细胞转录组测序(single cell transcriptome sequencing)技术,可深入理解罕见组织的转录本信息<sup>[9]</sup>,DRG 作为外周神经系统的一部分,通过该种手段也可以得到很好的细胞类型解析和细胞分型以及新细胞亚群的找寻<sup>[10]</sup>,同时有助于深入理解 DRG 中的非神经元细胞随着发育时间点产生显著变化的细胞类型有哪些,有助于了解非神经元细胞在 DRG 中发挥的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 取材

#### 1.1.1 实验动物

于斯贝福(北京)生物技术有限公司购入 7 日龄健康远交群(Sprague Dawley, SD)雄性大鼠 10 只,三月龄健康 SD 雄性大鼠 3 只,体重均为 220–240 g,在国家蛋白质科学中心实验动物平台饲养,每笼 3 只群养,12 h/12 h 昼夜循环照明,自由饮水和进食。该实验获得国家蛋

白质科学中心伦理委员会批准(批准号: IACUC-20200120-22RB)。

### 1.1.2 实验仪器和试剂

体视显微镜、咬骨钳、显微剪刀、外科手术镊、离心管、戊巴比妥钠、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、DMEM 基础培养基、10%胎牛血清、1%双抗、胶原酶、胰蛋白酶。

### 1.1.3 大鼠背根神经节组织的分离

首先,用戊巴比妥钠麻醉大鼠;剃毛暴露背部皮肤,切开皮肤钝性分离肌肉组织,用小鼠咬骨钳分离脊椎骨,暴露 DRG。然后用显微剪刀剪掉 L4、L5 节段 DRG 迅速放入加有预冷 PBS 的培养皿中。在体视显微镜下用显微解剖镊分离 DRG 的运动纤维,用显微剪刀剪掉两端残留的感觉纤维,只保留感觉神经节。最后,将 DRG 移入装有预冷 PBS 的 1.5 mL 离心管中,放在冰上备用(图 1)。

### 1.1.4 大鼠背根神经节组织消化

配制 DMEM 完全培养基<sup>[1]</sup>: DMEM 基础培养基中加入 10%胎牛血清和 1%双抗;向 10×背根神经节组织消化液 8 mL DMEM 基础培养基

中加入 80 mg 胶原酶、32 mg 胰蛋白酶。将足够数量的 DRG 用 DMEM 基础培养基漂洗 3 遍,用 DMEM 基础培养基将 10×消化液配制成 1×消化液,在水浴锅 37 °C 消化 35–40 min,消化过程中每隔 5–6 min 摇晃一次。消化结束后,加入 DMEM 完全培养基终止消化,同时用 DMEM 基础培养基漂洗 3 遍。用不同口径大小(直径分别为 2 mm、1 mm 和 0.5 mm)的移液管,从大至小对 DRG 组织进行吹打,每根移液管 5–10 次。将细胞悬液通过 35 μm 细胞筛网过滤。

## 1.2 数据分析

### 1.2.1 数据预处理及质控

细胞捕获和单细胞文库的构建:将制备好的样本细胞悬液送至北京博奥晶典生物技术有限公司利用 10×Genomics 平台进行测序。采用 Seurat<sup>[11]</sup> R 包进行测序后数据预处理及分析,分析软件及软件版本见表 1。用于质控筛选高质量细胞的参数为:基因数目 400–2 500、单个细胞基因数 < 8 000、线粒体基因百分比小于 25% (附图 1 及附表 1,相关附图及数据已提交国家微生物科学数据中心,登录号: cobain)。

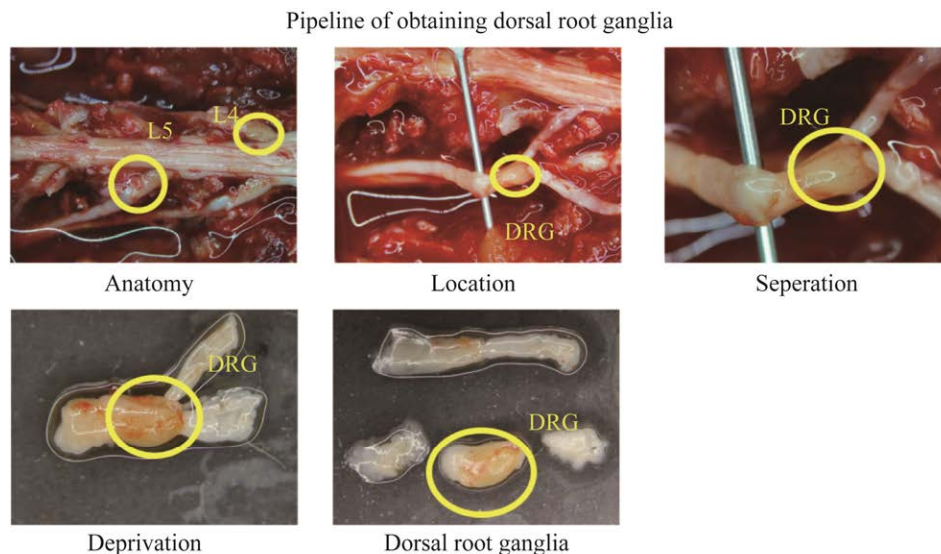


图 1 取样流程 背根神经节的解剖和分离流程

Figure 1 Procedure for obtaining DRG samples. Anatomy and separation process of dorsal root ganglion.

表 1 分析软件

Table 1 Analysis softwares

Software/Package	Version
R	4.2.0
ggplot2	3.3.6
dplyr	1.0.10
tidyverse	1.3.1
patchwork	1.1.2
clusterprofile	3.18.1
Or.Rn.eg.db	3.12.0
harmony	0.1.0
Monocle	2.18.0

### 1.2.2 降维聚类分析及细胞注释

使用 FINDVARIABLEFEATURES 函数寻找前 3 000 个高变基因。使用 RUNPCA 进行降维聚类分析(N=50), resolution 设定为 0.5, 用调度举例(shortest completion time, SCT)算法对数据集进行标准化处理<sup>[12]</sup>, 然后使用 RUNHARMONY 函数去除批次效应<sup>[13]</sup>。使用统一流形逼近与投影(uniform manifold approximation and projection, UMAP)非线性聚类降维对结果进行可视化。使用 FINDMARKERS 函数对提取出的IV型施旺细胞亚群进行不同时间点的细胞间差异基因找寻。

### 1.2.3 拟时分析

使用 MonocleR 包进行拟时分析<sup>[14]</sup>, 分析软件及软件版本见表 1。分析对象为 4 个亚型的全部施旺细胞, 数据预处理后(cores=8), 进行基因排序, 降维后分别按照判刑的细胞状态、施旺细胞亚型进行可视化。

### 1.2.4 差异基因筛选及功能分析结果

本研究最终选取在不同发育时间点的 4 个亚型的施旺细胞进行差异表达基因的找寻, 基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopaedia of genes and genomes, KEGG)分析。2 个发育时间点施旺细胞内的差异基因筛选的显著性阈值标准为:

$p\_val\_adj < 0.05$ ,  $|avg\_log_2 FC| > 0.25$ 。针对 2 个时间点筛选出的差异基因进行 GO 分析<sup>[15]</sup>和 KEGG 分析<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DRG 单细胞转录组图谱绘制

对测序后的数据进行质控去除低质量的细胞后, 共保留 17 366 个细胞用于后续分析。其中 9 137 个细胞来自于 7D, 8 229 个细胞来自于 3M, 采用 UMAP 对全部细胞分布进行投影可视化, 结果显示存在较为明显的批次效应(图 2A), 使用 HARMONY<sup>[13]</sup>去批次效应后效果较好(图 2B)。

聚类降维分析将全部细胞分为 20 个 cluster (图 2C), 接着对每个细胞亚群进行细胞类型注释, 通过和文献中相应类型的标记基因匹配及参考 Cellmarker 数据库<sup>[17]</sup>, 最终注释的细胞亚群类型包括: 神经元、I型施旺细胞<sup>[18]</sup>、II型施旺细胞<sup>[18]</sup>、III型施旺细胞<sup>[18]</sup>、IV型施旺细胞<sup>[18]</sup>、成纤维细胞<sup>[18]</sup>、卫星胶质细胞<sup>[18]</sup>、平滑肌细胞、周细胞、单核细胞、内皮细胞以及未判定明确细胞类型的部分其他细胞(others) (图 2D)。结果表明, DRG 细胞内的转录图谱整体具有一致性, 但部分细胞类型, 如II型施旺细胞、III型施旺细胞、IV型施旺细胞和成纤维细胞, 在不同发育时间点具有细胞数目上的差异性。使用不同的标记基因对 DRG 中各类细胞进行细胞注释, 根据标记基因 *Tubb3*、*Uchl1*、*Smn2* 标记神经元细胞, 使用 *LOC100134871*、*Hbb* 基因标记 I 型施旺细胞, 使用 *Fabp7*、*Mmd2* 标记的卫星胶质细胞<sup>[18]</sup>, 各细胞亚群标记基因可视化气泡图见图 2E。

### 2.2 DRG 内施旺细胞异质性及拟时分析

本研究展示了不同发育时间点 DRG 内各类细胞的细胞占比数差异, 用于比较 2 个时间点细胞组成比例差异, 进而发现差异显著的细

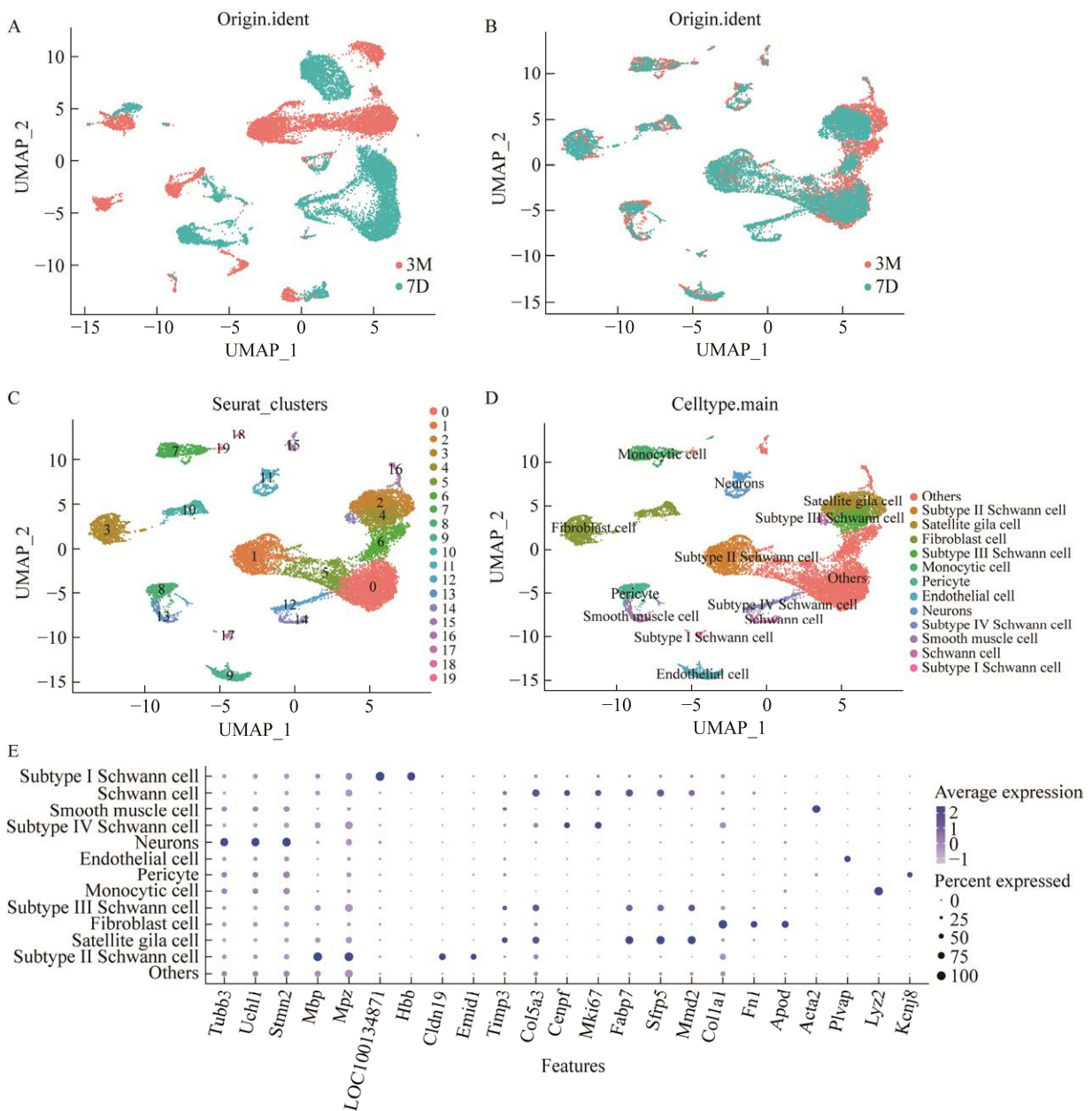


图 2 细胞分群及注释

Figure 2 Cell clustering and annotation. A: The results before batch effect corrected (grouped by Origin.ident). B: The results after batch effect corrected (grouped by Origin.ident). C: Dimensional reduction and clustering results of the data after quality control. D: Clustering results by cell type annotated manually. E: Dotplot of marker genes in different cell types in the data after quality control.

胞类型。数据显示,随着发育时间的进展,7D和3M的DRG内的几类非神经元细胞亚群发生了改变。对DRG中的细胞按照发育时间点(图3A)和细胞类型(图3B)分别进行了细胞数目(表2)

及细胞占比数的统计。其中7D和3M的各类细胞占该时间点的所有细胞百分比为:神经元细胞为2.2%和3.4%,卫星胶质细胞为9.6%和11.4%,成纤维细胞为9.0%和6.0%,I型施旺



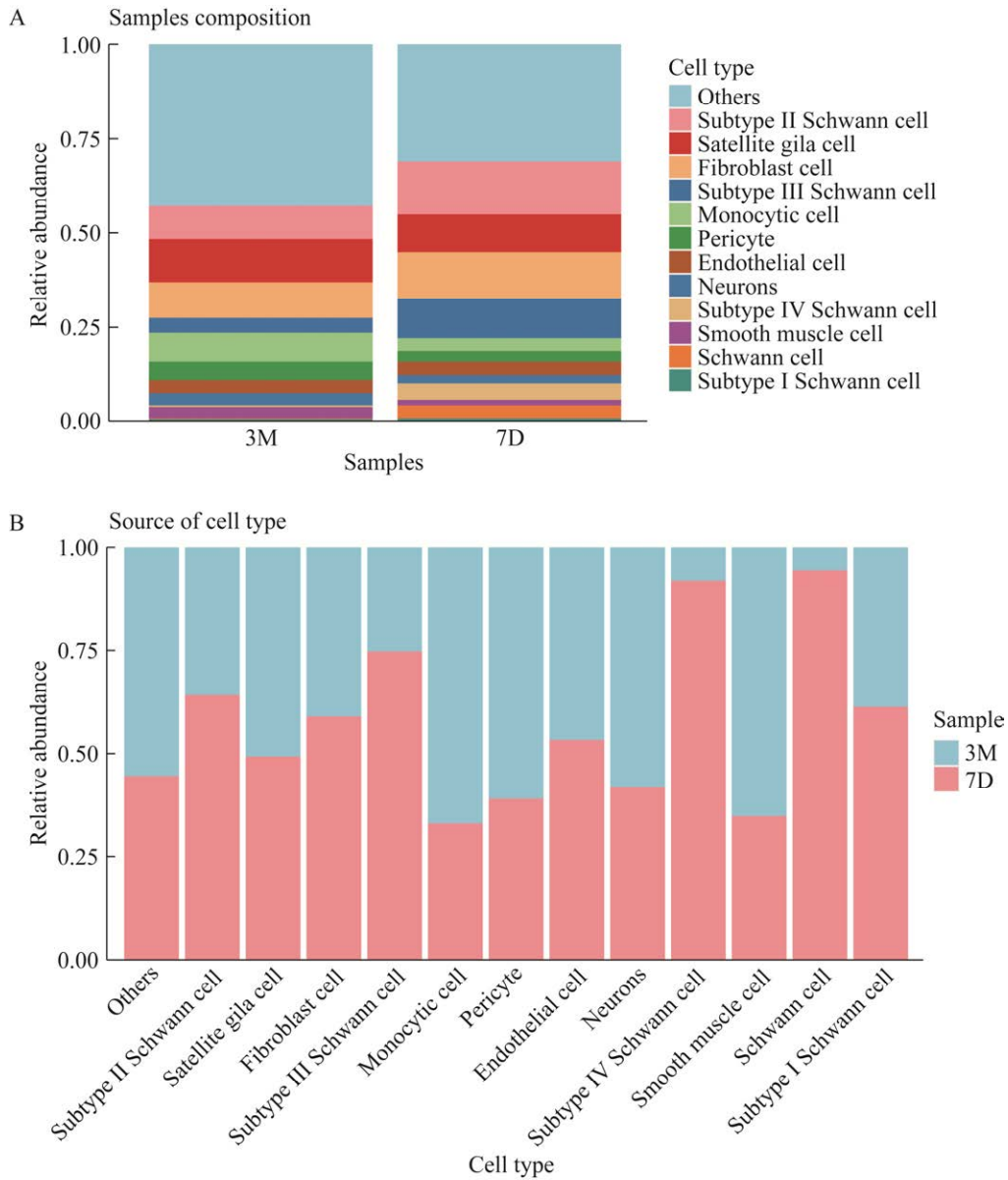


图 3 各类细胞占比情况

Figure 3 Percentage of identified cell type. A: Classified by development time point. B: Classified by cell types.

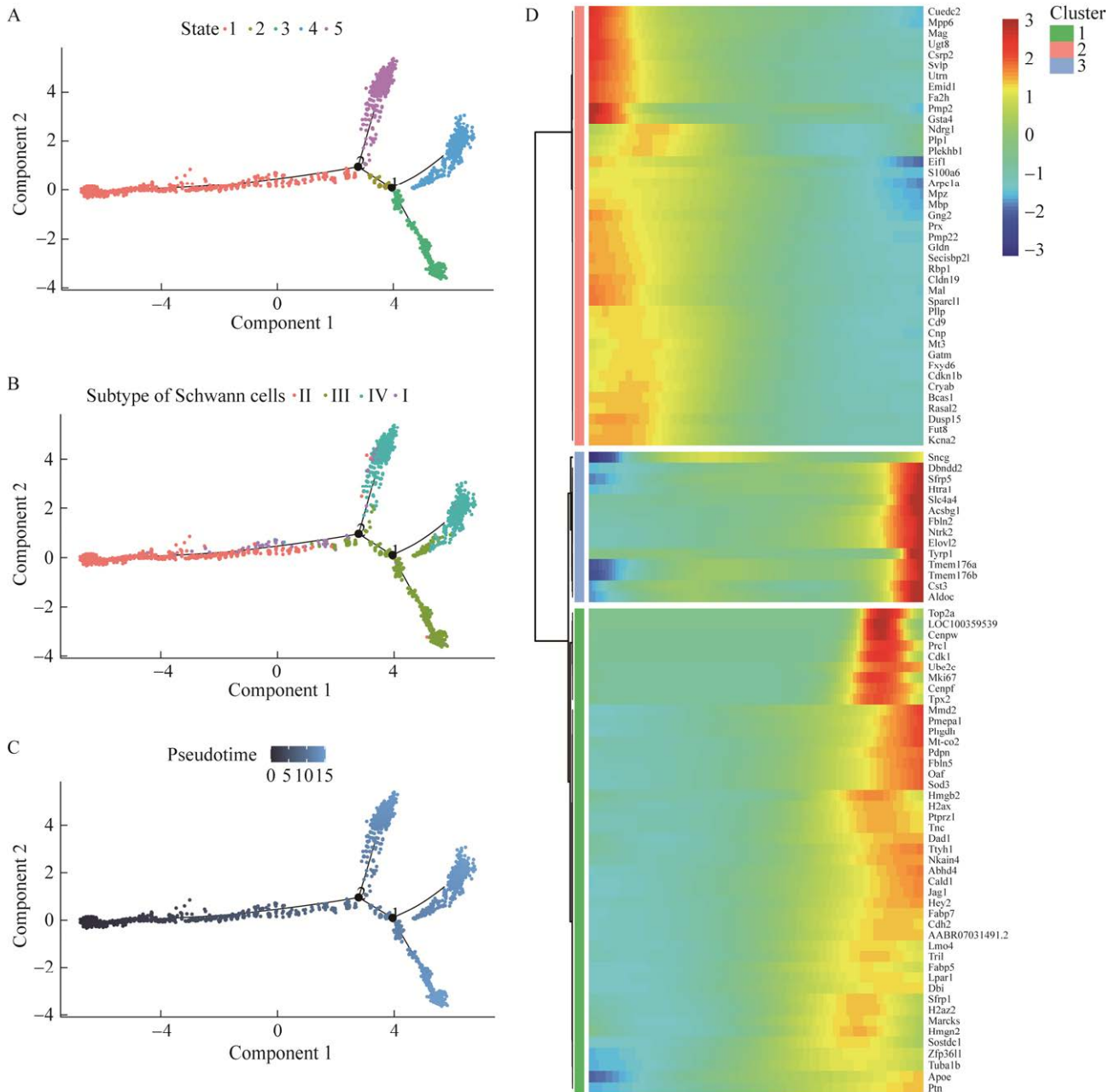
表 2 各类细胞在不同发育时间点数目

Table 2 Numbers of different cell type at two developmental time point

	Satellite glia cell	Fibroblast cell	Subtype I Schwann cell	Subtype II Schwann cell	Subtype III Schwann cell	Subtype IV Schwann cell	Pericyte	Monocytic cell	Smooth muscle cell	Neurons	Endothelial cell
7D	910	819	68	1 288	964	415	292	311	130	201	130
3M	936	490	43	720	326	36	591	630	243	278	243

细胞为 0.7%和 0.5%，II型施旺细胞为 14.1%和 8.7%，III型施旺细胞为 10.6%和 4.0%，IV型施旺细胞为 4.5%和 0.4%，周细胞为 3.2%和 7.2%，单核细胞为 3.4%和 7.7%，平滑肌细胞为 1.4%和 3.0%，内皮细胞 1.4%和 3.0%。将这几类非神经元细胞进行提取和降维聚类分析，发现IV型施旺细胞在 2 个发育时间点异质性较高，细胞占

比数差异性显著，对其进行后续的 GO 分析和 KEGG 分析。此外，对大鼠 DRG 内的 4 个亚型的施旺细胞进行了拟时分析(图 4A–4C)，绘制了 4 类施旺细胞亚群的细胞命运轨迹图谱，分别根据发育状态(图 4A)、细胞类型(图 4B)进行了施旺细胞拟时分析图谱的绘制。II型施旺细胞是施旺细胞中较早产生的一种细胞，而III型施旺





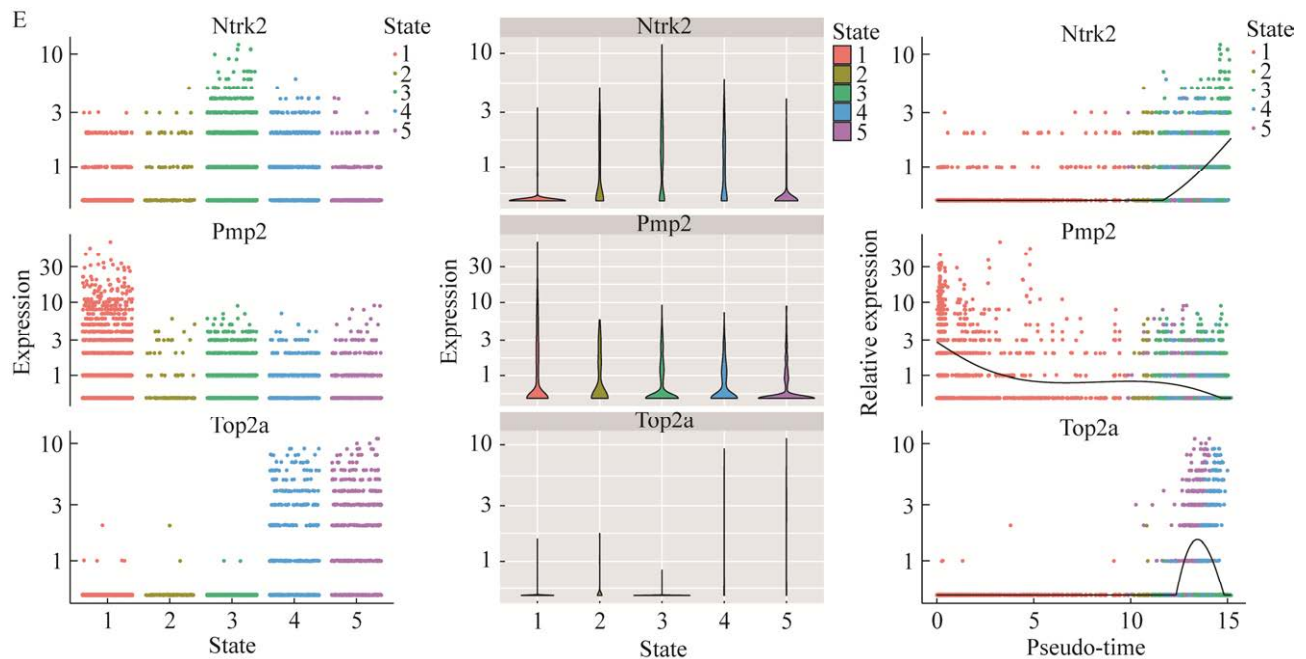


图 4 施旺细胞拟时分析结果

Figure 4 Pseudotime analysis of Schwann cells. A: Classified by cell fate state. B: Classified by cell types. C: Pseudotime order. D: Heatmap of variable features. E: Crucial genes related to developmental branches.

细胞和IV型施旺细胞的出现晚于II型施旺细胞,通过绘制不同时序状态的差异基因热图(图 4D),对决定细胞命运的差异性基因也进行了筛选,其中包括 *Ntrk2*、*Pmp2*、*Top2a* 等(图 4E)。

### 2.3 IV型施旺细胞差异基因的识别筛选及功能通路分析结果

对 2 个时间点 DRG 内施旺细胞(7D: 415 个细胞; 3M: 36 个细胞)的差异基因进行了判定,以及 GO 分析和 KEGG 分析,2 个时间点的细胞差异基因选取的显著性阈值标准为:  $p\_val\_adj < 0.05$ ,  $|avg\_log_2 FC| > 0.25$ , 得到显著上调基因 32 个,显著下调基因 7 个,本文选取差异性最为显著的上下调基因分别进行了统计(表 3)。

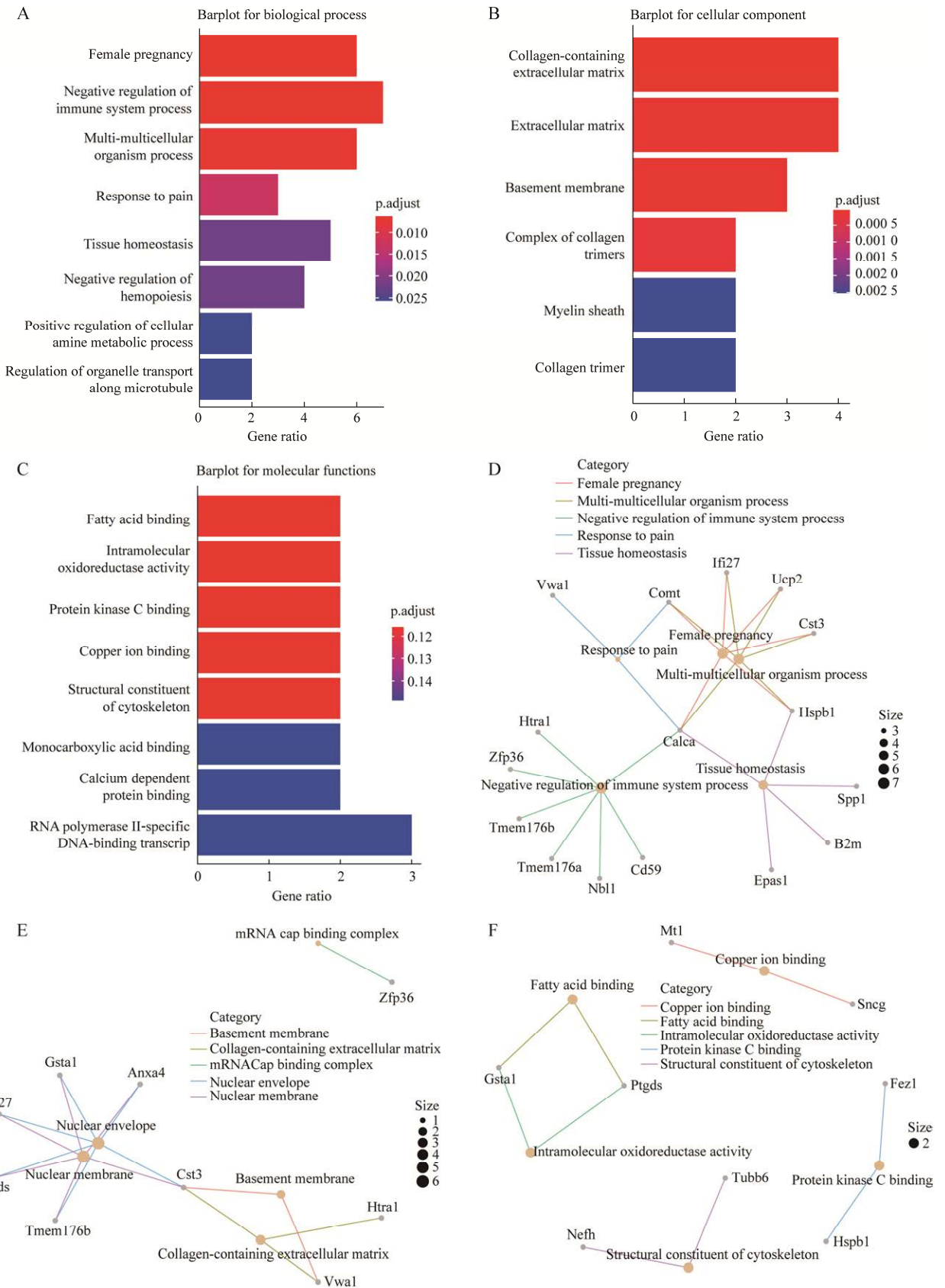
在 GO 分析中,从 7D 到 3M,与多种多细胞生物过程相关的基因 *Cst3* 和与组织稳态维持生物学过程相关的基因 *Spp1* 显著上调(图 5A、5D),同时 *Spp1* 的显著上调也提示,IV型施旺

细胞也许具有巨噬细胞的部分功能,巨噬细胞是人体内重要的免疫细胞,维护着机体的健康,这也与IV型施旺细胞维持稳态的功能相辅相成。与细胞核膜分子亚定位相关的基因 *Cst3* 显著上调(图 5B、5E),与细胞骨架分子功能相关的基因 *Nefh* 上调(图 5C、5F),KEGG 分析结果

表 3 IV型施旺细胞中 TOP4 上调、下调基因

Table 3 Top 4 up-regulated and down-regulated genes

TOP 4 up-regulated and down-regulated genes	FC
Up-regulated gene	
<i>Cst3</i>	3.03
<i>Tyrp1</i>	2.52
<i>S100b</i>	2.18
<i>Spp1</i>	2.06
Down-regulated gene	
<i>Col3a1</i>	0.39
<i>Marcks</i>	0.40
<i>Mpz</i>	0.55
<i>Col4a1</i>	0.57



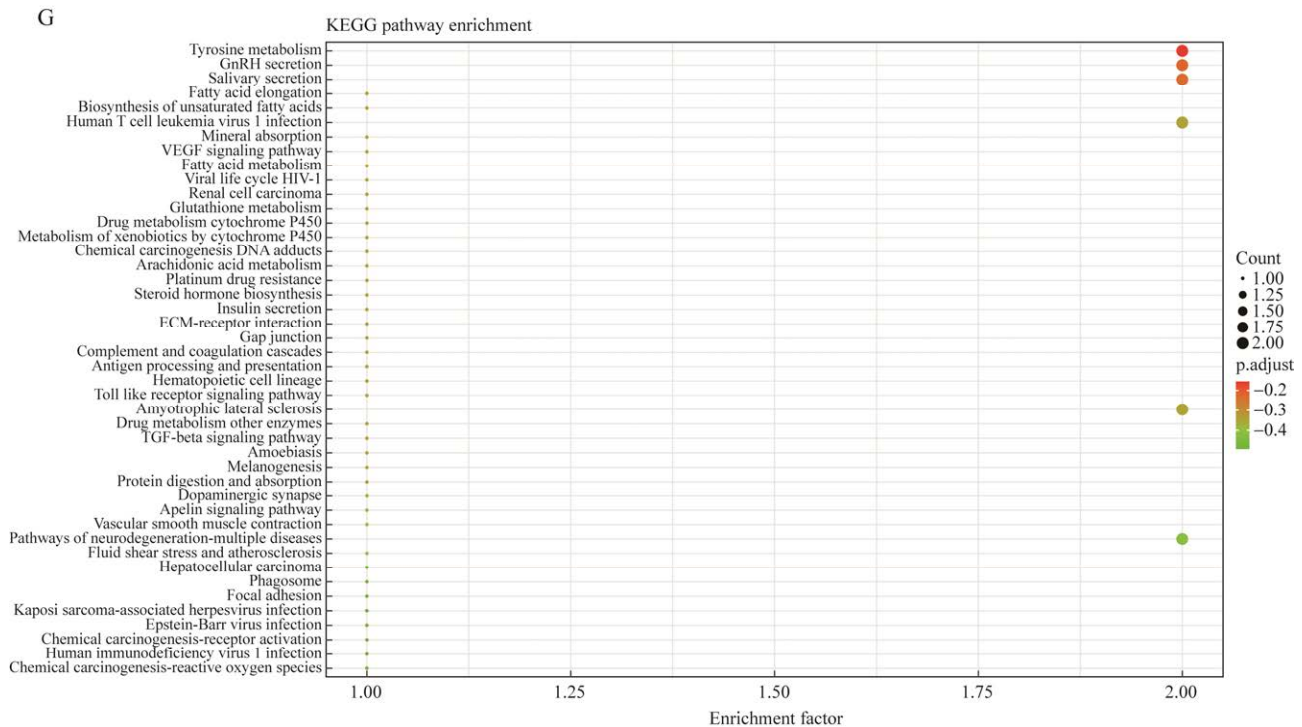


图 5 IV型施旺细胞上调基因 GO 分析结果

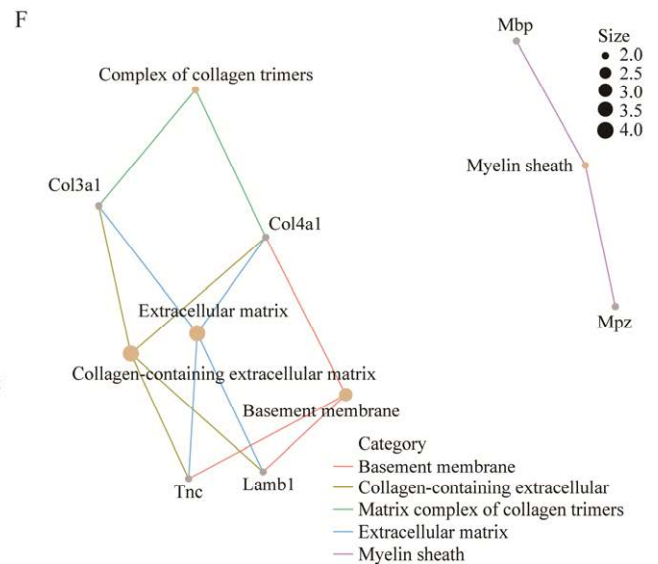
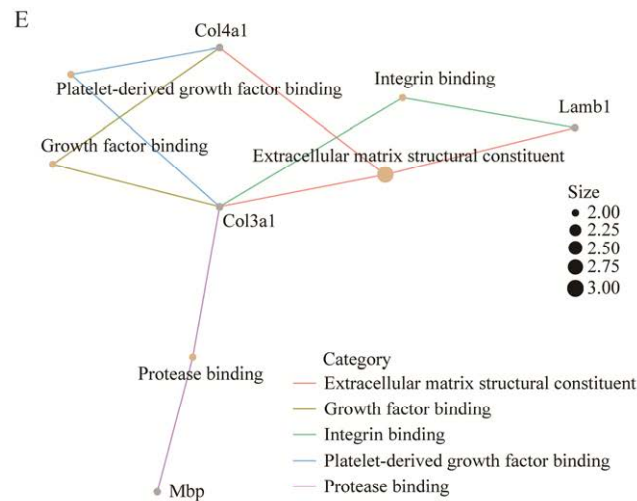
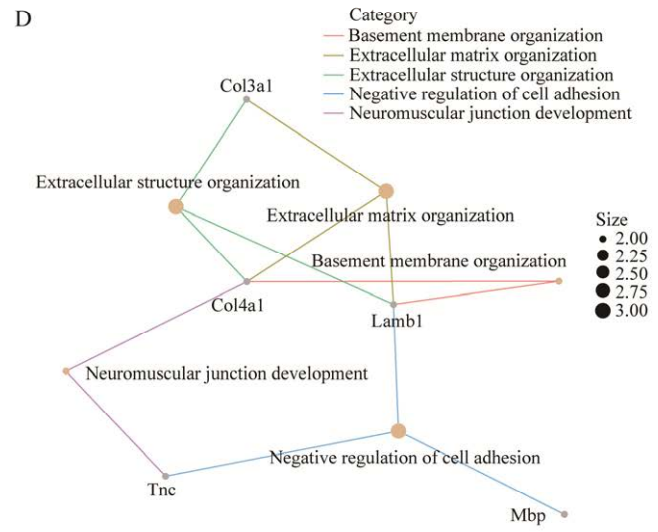
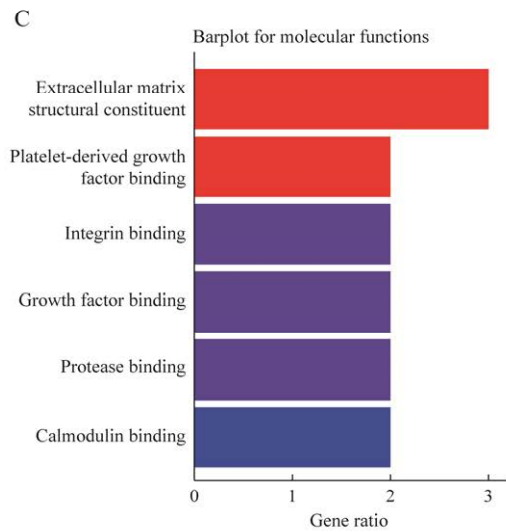
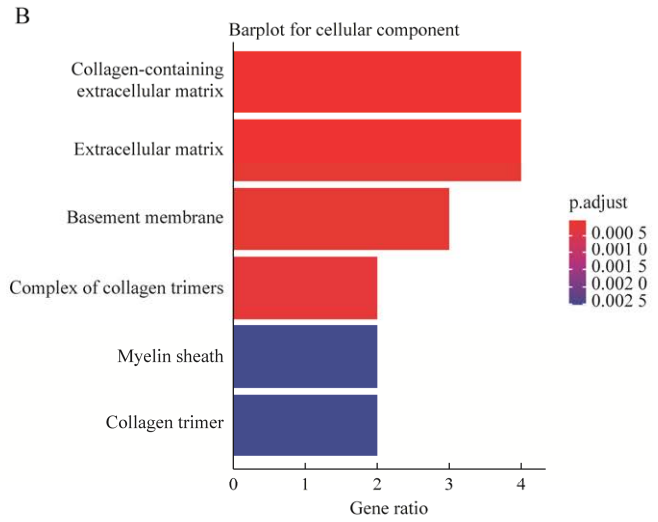
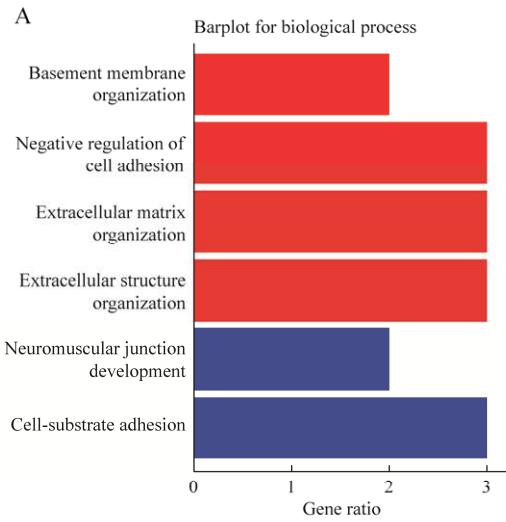
Figure 5 GO analysis results of the up-regulated genes of Schwann cells. Barplot of up-regulated genes in A: Biological process. B: Cell component. C: Molecular function. Cneplot of up-regulated genes in D: Biological process. E: Cell component. F: Molecular function. G: KEGG pathway analysis of up-regulated genes in Schwann cells.

发现酪氨酸代谢通路显著上调(图 5G)。从 7D 到 3M, 与细胞外基质构建生物学过程和与细胞外基质相关的显著下调的基因为 *Col3a1*、*Col4a1* (图 6A、6D、6C、6F), 以及与髓鞘发育相关的基因 *Mpz* 显著下调(图 6B、6E), 同时 KEGG 分析结果表明, 细胞外基质相关通路显著下调(图 6G)。

### 3 讨论与结论

本研究的创新点在于, 采用自产大鼠 DRG 数据, 着眼于大鼠出生后 DRG 不同发育时间点(7D 和 3M)的非神经元细胞, 从单细胞水平解析了细胞异质性, 解析了 DRG 中非神经元细胞在发育不同时间点的差异性。利用单细胞转录

组测序技术对 10 只 7 日龄大鼠的 32 个 DRG 组织和 3 只 3 月龄大鼠的 11 个 DRG 组织内的细胞进行分析, 初步探讨了背根神经节内非神经元的异质性与发育时间点的问题。测序共获取 17 366 个细胞(7D: 9 137 个; 3M: 8 229 个), 质控后第一步, 将测序获得数据进行聚类降维分析并根据标记基因进行细胞注释; 第二步, 将已判定的不同发育时间点的非神经元细胞亚群进行差异分析。施旺细胞的几类细胞亚群在发育过程中, 均产生了细胞比例的变化。施旺细胞作为神经系统中一种重要的胶质细胞, 起着维护神经系统稳态和维持神经系统功能的作用<sup>[19]</sup>, 并与神经炎症的发生机制密切相关, 施旺细胞主要与神经系统的髓鞘发生相关, 对于





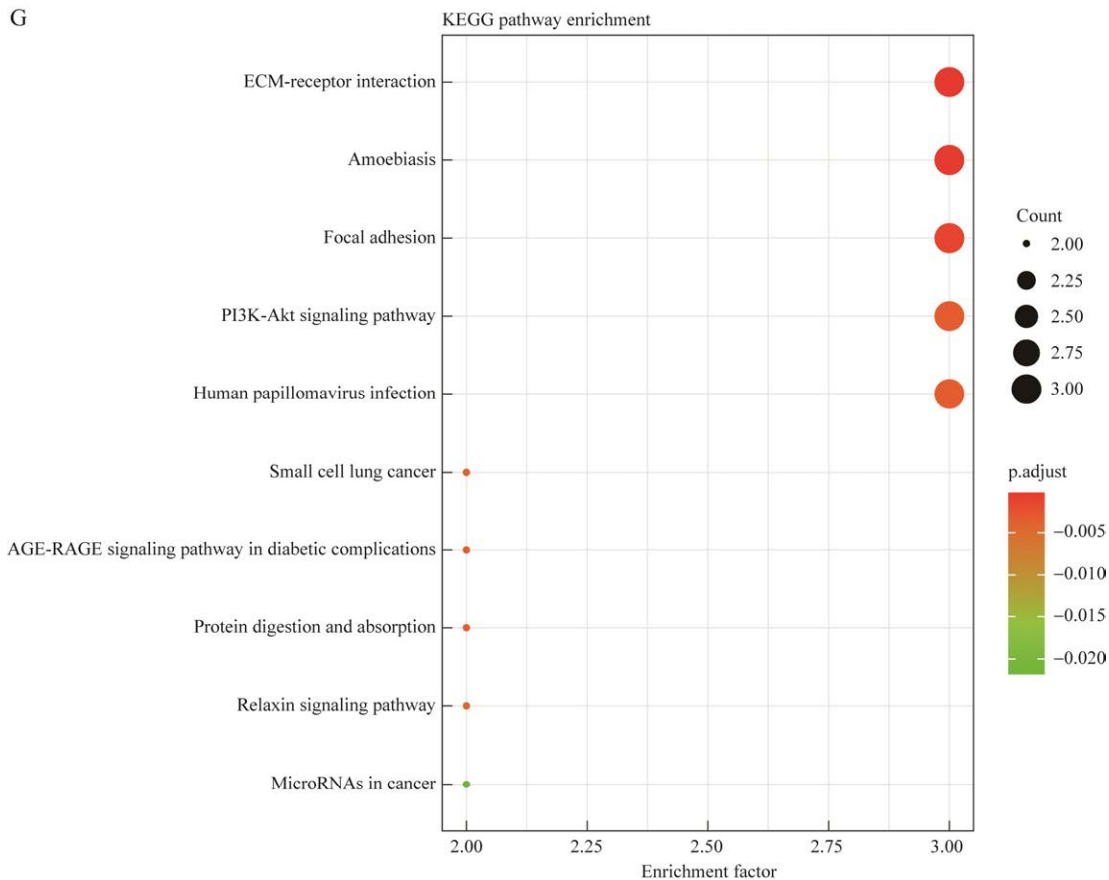


图 6 施旺细胞下调基因 GO 分析结果

Figure 6 GO analysis results of the down-regulated genes of subtype IV Schwann cells. Barplot of down-regulated genes in A: Biological process. B: Cellular component. C: Molecular function. Cneplot of down-regulated genes in D: Biological process. E: Cellular component. F: Molecular function. G: KEGG pathway analysis of down-regulated genes in Schwann cells.

神经轴突的髓鞘化起着至关重要的作用<sup>[19]</sup>，此前的研究表明，I型施旺细胞因高表达与成纤维细胞类似的标记基因，因此具有显著的连接细胞特性<sup>[18]</sup>，II型施旺细胞则与髓鞘的发生密切相关<sup>[18]</sup>，III型施旺细胞高表达与组织发育相关的基因，因此被推断与神经组织的发育有关<sup>[18]</sup>，IV型施旺细胞则与细胞的分裂以及增殖分化有紧密联系<sup>[18]</sup>。且关于施旺细胞的细胞通讯研究表明，III型施旺细胞与IV型施旺细胞间的细胞通讯较强<sup>[18]</sup>。这些结论对于后续进一步研究不同亚型施旺细胞具有重要生理学意义。

通过对样品中的4个亚型的所有施旺细胞进行拟时分析，II型施旺细胞是最早出现的施旺细胞亚型，III型施旺细胞和IV型施旺细胞出现于发育的后期，而I型施旺细胞在整个发育过程中变化不显著，发现IV型施旺细胞属于出现较晚的一种细胞，但在成体后，它的数目又显著减少，可能它正是属于这种发育中的过渡态细胞。在此基础上，找出了影响不同亚型施旺细胞命运轨迹的关键基因，如 *Pmp2*、*Ntrk2* 等(图 4E)。已有研究表明，*Ntrk2* 的拮抗剂可以引起髓鞘损害<sup>[20]</sup>，*Pmp2* 与外周神经系统髓鞘的再生密切相

关<sup>[21]</sup>, *Top2a* 与细胞增殖分化密切相关<sup>[22]</sup>, 这 3 个基因均为决定不同亚型施旺细胞发育的关键基因。这些基因的发现对于研究施旺细胞的发育进程有着重要的基础生理学意义, 为进一步研究施旺细胞的发育生理学提供了坚实基础和新视角。

IV型施旺细胞是在 2 个不同发育时间点细胞占比数差异最大的施旺细胞亚型, 因此针对其进行了后续深入分析。在 GO 分析中, 从 7D 到 3M, 与组织稳态维持生物学过程相关的基因 *Spp1* 显著上调, 与多种多细胞生物过程相关及与细胞核膜分子亚定位相关的基因 *Cst3* 显著上调, *Cst3* 基因对于细胞内稳态的维持和调节具有重要意义<sup>[23]</sup>, 这表明随着发育的成熟, 细胞的状态逐渐趋于稳定, 细胞的状态逐渐趋于稳定, 3M 的施旺细胞在细胞稳态的维持和细胞调节功能上都要优于 7D 的IV型施旺细胞, 由此可见, IV型施旺细胞也许与外周神经施旺细胞组织的形态维持功能有关。同时 *Spp1* 的上调也提示, IV型施旺细胞也许具有巨噬细胞的部分功能<sup>[24]</sup>。KEGG 分析结果发现酪氨酸代谢通路随着发育成熟出现了显著上调, 最新研究表明, 酪氨酸激酶受体可以调节信号转导进而维持细胞状态的稳定<sup>[25]</sup>。从 7D 到 3M, 显著下调的基因为与细胞外基质构建和胞膜构建生物学过程密切相关的 *Col3a1*、*Col4a1*<sup>[26]</sup>, 这表明发育成熟时, IV型施旺细胞的细胞基质环境趋于稳定, 构建细胞外基质的活动减弱, 这也佐证了其维持细胞稳态的生物学功能。综上所述, 本研究认为IV型施旺细胞是一类趋于成熟且维持施旺细胞稳态的一类细胞, 这与 4 类施旺细胞拟时分析的结果也是一致的。KEGG 分析结果表明, 细胞外基质受体应答相关通路显著下调, 这表明 3M 的IV型施旺细胞趋于稳定状态。这些发现对于后续进一步研究IV型施旺细胞的生理机制具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] SHARMA N, FLAHERTY K, LEZGIYEVA K, WAGNER DE, KLEIN AM, GINTY DD. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons[J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 392-398.
- [2] WANG KK, WANG SS, CHEN Y, WU D, HU XY, LU YJ, WANG LP, BAO L, LI CL, ZHANG X. Single-cell transcriptomic analysis of somatosensory neurons uncovers temporal development of neuropathic pain[J]. *Cell Research*, 2021, 31(8): 904-918.
- [3] DONG F, SHI HX, YANG L, XUE HQ, WEI MY, ZHONG YQ, BAO L, ZHANG X. FGF13 is required for histamine-induced itch sensation by interaction with Nav1.7[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2020, 40(50): 9589-9601.
- [4] GU YL, GUERRA F, HU MZ, POPE A, SUNG K, YANG WL, JETHA S, SHOFF TA, GUNATILAKE T, DAHLKAMP O, SHI LZ, MANGANELLI F, NOLANO M, ZHOU Y, DING JQ, BUCCI C, WU CB. Mitochondria dysfunction in Charcot Marie tooth 2B peripheral sensory neuropathy[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 717.
- [5] SINGHMAR P, TRINH RTP, MA JC, HUO XJ, PENG B, HEIJNEN CJ, KAVELAARS A. The fibroblast-derived protein PI16 controls neuropathic pain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(10): 5463-5471.
- [6] HUANG LN, ZOU Y, WU SG, ZHANG HH, MAO QX, LI JB, TAO YX. Fn14 participates in neuropathic pain through NF-κB pathway in primary sensory neurons[J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(10): 7085-7096.
- [7] LEI W, MICHAEL C, ALEXANDRA S, XUE RL, Yi Zhang, WANG XL, CHAO L, PASQUALE C. Exosomes derived from schwann cells ameliorate peripheral neuropathy in type 2 diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2020, 69(4): 749-759.
- [8] GAO S. Data Analysis in single-cell transcriptome sequencing[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2018: 311-326.
- [9] LIANG JL, CAI WS, SUN ZS. Single-cell sequencing technologies: current and future[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(10): 513-528.
- [10] OSORIO D, YU X, ZHONG Y, LI GX, SERPEDIN E, HUANG JZ, CAI JJ. Single-cell expression variability implies cell function[J]. *Cells*, 2019, 9(1): 14.
- [11] VALIAN N, HERAVI M, AHMADIANI A, DARGAHI



- L. Comparison of rat primary midbrain neurons cultured in DMEM/F12 and neurobasal mediums[J]. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, 2021, 12(2): 205-212.
- [12] HAFEMEISTER C, SATIJA R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 1-15.
- [13] KORSUNSKY I, MILLARD N, FAN J, SLOWIKOWSKI K, ZHANG F, WEI K, BAGLAENKO Y, BRENNER M, LOH PR, RAYCHAUDHURI S. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with harmony[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1289-1296.
- [14] CHEN CJ, KAJITA H, TAKAYA K, ARAMAKI-HATTORI N, SAKAI S, ASOU T, KISHI K. Single-cell RNA-seq analysis reveals cellular functional heterogeneity in dermis between fibrotic and regenerative wound healing fates[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 875407.
- [15] CARBON S, DOUGLASS E, BENJAMIN M et al. Gene ontology C: the gene ontology resource: enriching a GOld mine[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D325-D334.
- [16] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [17] ZHANG XX, LAN YJ, XU JY, QUAN F, ZHAO EJ, DENG CY, LUO T, XU LW, LIAO GM, YAN M, PING YY, LI F, SHI AA, BAI J, ZHAO TT, LI X, XIAO Y. CellMarker: a manually curated resource of cell markers in human and mouse[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D721-D728.
- [18] ZHANG RR, CHEN SL, WANG XH, GU XS, YI S. Cell populations in neonatal rat peripheral nerves identified by single-cell transcriptomics[J]. *Glia*, 2021, 69(3): 765-778.
- [19] YUN W, KIM YJ, LEE G. Direct conversion to achieve glial cell fates: oligodendrocytes and schwann cells[J]. *International Journal of Stem Cells*, 2022, 15(1): 14-25.
- [20] GERAGHTY AC, GIBSON EM, GHANEM RA, GREENE JJ, OCAMPO A, GOLDSTEIN AK, NI LJ, YANG T, MARTON RM, PAŞCA SP, GREENBERG ME, LONGO FM, MONJE M. Loss of adaptive myelination contributes to methotrexate chemotherapy-related cognitive impairment[J]. *Neuron*, 2019, 103(2): 250-265.e8.
- [21] STETTNER M, ZENKER J, KLINGLER F, SZEPAŃOWSKI F, HARTUNG HP, MAUSBERG AK, KLEINSCHNITZ C, CHRAST R, KIESEIER BC. The role of peripheral myelin protein 2 in remyelination[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, 38(2): 487-496.
- [22] DUAN YH, FU HJ, HUANG JY, YIN NL, LIU LH, LIU XR. TOP2A deficiency leads to human recurrent spontaneous abortion and growth retardation of mouse pre-implantation embryos[J]. *Molecular Medicine*, 2022, 28(1): 1-17.
- [23] ALAM J, YAZDANPANAH G, RATNAPRIYA R, BORCHERDING N, de PAIVA CS, LI DQ, PFLUGFELDER SC. Single-cell transcriptional profiling of murine conjunctival immune cells reveals distinct populations expressing homeostatic and regulatory genes[J]. *Mucosal Immunology*, 2022, 15(4): 620-628.
- [24] QI JJ, SUN HX, ZHANG Y, WANG ZT, XUN ZZ, LI ZY, DING XY, BAO RJ, HONG LW, JIA WQ, FANG F, LIU HZ, CHEN L, ZHONG J, ZOU DW, LIU LX, HAN L, GINHOUX F, LIU YB, YE YQ, et al. Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP+fibroblasts and SPP1+macrophages in colorectal cancer[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1742.
- [25] LIN CC, SUEN KM, JEFFREY PA, WIETESKA L, LIDSTER JA, BAO P, CURD AP, STAINTHORP A, SEILER C, KOSS H, MISKA E, AHMED Z, EVANS SD, MOLINA-PARÍS C, LADBURY JE. Receptor tyrosine kinases regulate signal transduction through a liquid-liquid phase separated state[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(6): 1089-1106.e12.
- [26] LOHI J, KORHONEN M, LEIVO I, KANGAS L, TANI T, KALLURI R, MINER JH, LEHTO VP, VIRTANEN I. Expression of type IV collagen  $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$  polypeptides in normal and developing human kidney and in renal cell carcinomas and oncocytomas[J]. *International Journal of Cancer*, 1997, 72(1): 43-49.

(本文责编 郝丽芳)