

· 综述 ·

# 单细胞 RNA 测序在骨科常见疾病发病机制研究中的应用进展

程渊<sup>1</sup>, 张良童<sup>1</sup>, 谢兴文<sup>2</sup>, 宋鹏<sup>2</sup>, 陈欣<sup>2</sup>, 李鼎鹏<sup>3</sup>, 张人伟<sup>1</sup>, 张有良<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730000;

3. 甘肃省第二人民医院, 甘肃 兰州 730030)

**摘要** 类风湿关节炎、骨关节炎、椎间盘退变、骨质疏松症是骨科常见疾病,其发病机制目前尚未完全明确。单细胞 RNA 测序是近年来快速发展起来的一种高通量测序技术,已被应用于骨科常见疾病发病机制的研究中,并取得了一定的研究成果。本文概述了单细胞 RNA 测序,并对其在类风湿关节炎、骨关节炎、椎间盘退变、骨质疏松症等骨科常见疾病发病机制研究中的应用进展进行了综述。

**关键词** 关节炎;类风湿;骨关节炎;椎间盘退化;骨质疏松;RNA 测序;综述

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、骨关节炎(osteoarthritis, OA)、椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)、骨质疏松症(osteoporosis, OP)均是骨科临床常见疾病,在给患者带来痛苦的同时也给家庭和社会带来了沉重的经济负担<sup>[1-4]</sup>。随着医疗技术的不断发展,越来越多的新药物、新技术应用于这些疾病的治疗,并取得了一定的疗效。但这些疾病的发病机制目前尚未完全明确,揭示其发病机制、明确其治疗靶点,将有助于提高其预防、诊断和治疗水平。单细胞 RNA 测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)是近年来快速发展起来的一种高通量测序技术,能够在单项研究中分析数万个单细胞的转录组<sup>[5]</sup>。该技术可以用来探索组织细胞的异质性,能够在转录水平对同类细胞进行亚型划分,甚至识别出未知的细胞类型,进而为疾病发病机制的研究提供更加详细的信息<sup>[6]</sup>。本文概述了 scRNA-seq,并对其在 RA、OA、IDD、OP 等骨科常见疾病发病机制研究中的应用进展进行了综述,以期对这些疾病的深入研究提供参考。

## 1 scRNA-seq 概述

传统的基因表达分析,均集中于某一组织或组织中某一类细胞的基因表达。然而,有研究<sup>[7-8]</sup>发现,在相同生理条件下或相同外部刺激下,同一类细胞中

单个细胞的基因表达存在差异性。因此,以细胞群为单位进行基因表达分析的精确性欠佳。scRNA-seq 是一种高通量测序技术,能够快速检测数万个单细胞的基因转录情况<sup>[9]</sup>。该技术可以使我们对同类细胞在转录水平上进行亚组划分、发现新的或稀有的细胞类型、了解健康和疾病组织之间的细胞表达差异等。scRNA-seq 的基本步骤包括单细胞分离和捕获、细胞裂解、逆转录、cDNA 扩增和测序及数据分析等<sup>[10-11]</sup>: ①利用微流控技术、机械力或化学方法将组织解离,并基于特定的方法选择和捕获单个细胞;②裂解捕获的单细胞并获得 RNA;③将 RNA 逆转录为 cDNA;④通过 PCR 扩增 cDNA,并进行文库构建和测序;⑤根据研究目的对数据进行分析。目前,scRNA-seq 已被广泛应用于微生物学、免疫学、神经病学和肿瘤学等领域,在疾病的预防、诊断、治疗等方面具有巨大的应用潜力<sup>[12]</sup>。

## 2 scRNA-seq 在骨科常见疾病发病机制研究中的应用

### 2.1 RA

RA 是一种典型的自身免疫性疾病,其基本病理表现为慢性滑膜炎、血管翳形成等,可导致软骨和骨破坏<sup>[13]</sup>。RA 的发生与免疫细胞关系密切,但其具体机制尚未完全明确<sup>[14-15]</sup>。Zhang 等<sup>[16]</sup>为了分析 RA 和系统性红斑狼疮免疫细胞的差异性,对 RA 患者、系统性红斑狼疮患者及健康人外周血中单核细胞的 scRNA-seq 原始数据进行了处理和分析,结果显示,

基金项目:国家自然科学基金项目(82374491);甘肃省陇原青年创新创业人才(团队)项目(甘组通字[2023]20号)

通讯作者:谢兴文 E-mail:827975272@qq.com

RA 患者中 CD8<sup>+</sup> T 细胞占比和 FCGR3A<sup>+</sup> 单核细胞占比高于健康人, CD8<sup>+</sup> T 细胞占比和自然杀伤细胞占比高于系统性红斑狼疮患者。Zhang 等<sup>[17]</sup>建立了 RA 小鼠模型, 并采用 scRNA-seq 分析了 RA 模型小鼠和正常小鼠股骨和胫骨骨髓中单核细胞的类型, 发现 RA 模型小鼠 RANK<sup>+</sup> TLR2<sup>-</sup> 单核细胞亚群较正常小鼠增加, 进一步研究发现 RANK<sup>+</sup> TLR2<sup>-</sup> 单核细胞亚群对破骨细胞形成起重要作用。Zhang 等<sup>[18]</sup>通过 scRNA-seq、蛋白组学分析等方法对 79 例 RA 患者的滑膜组织进行细胞分析, 并构建了 314 000 个滑膜组织细胞的单细胞基因转录图谱。Zhang 等<sup>[19]</sup>采用流式细胞仪分离了 RA 患者滑膜组织中的 T 细胞、B 细胞、单核细胞和成纤维细胞等, 并采用 scRNA-seq 进行分析, 建立了 5265 个单细胞基因转录图谱, 并发现了 18 个稀有细胞亚型。scRNA-seq 在揭示 RA 免疫细胞异质性方面具有独特的优势, 为 RA 的发病机制研究提供了新思路。

## 2.2 OA

OA 是骨科临床上常见的关节退行性疾病, 以关节软骨破坏、滑膜病变及软骨下骨硬化等为主要病理特征<sup>[20]</sup>。慢性炎症在关节软骨破坏和滑膜病变的进展中起着重要作用。Zhou 等<sup>[21]</sup>从 Gene Expression Omnibus 数据库中获得 OA 患者和健康人半月板组织单核细胞的 scRNA-seq 数据, 其中包括了 6833 个单细胞的数据, 属于 OA 患者的单细胞 3577 个、健康人的单细胞 3256 个; 通过分析发现, OA 患者 HLA-DRA<sup>+</sup>、CD74<sup>+</sup> 和 itga6<sup>+</sup> 单核细胞占比较低, 健康人 S100A9<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup> 和 ms4a7<sup>+</sup> 单核细胞占比较高。Zheng 等<sup>[22]</sup>通过分析 Gene Expression Omnibus 数据库中 OA 和 RA 的 RNA 微矩阵数据和 scRNA-seq 数据, 发现了 OA 和 RA 的 RNA 修饰相关的差异表达基因, 并采用 scRNA-seq 等方法分析 OA 和 RA 患者的关节滑膜组织样品以及小鼠模型的组织样品, 进而对数据分析的差异表达基因进行了验证。Zhao 等<sup>[23]</sup>为了进一步探究肥大细胞在 OA 中的作用, 采用 scRNA-seq 分析了 OA 患者的滑膜细胞, 结果显示 OA 患者的滑膜肥大细胞除了表达典型标志物 KIT、TPSAB1、CPA3 和 HDC 外, 还表达特有标志物如 HPGD、CAVIN2、IL1RL1、PRG2 和 CKLF。Yoshimoto 等<sup>[24]</sup>通过分析 OA 患者的 scRNA-seq 数据探究软骨细胞衰老与蛋白糖基化的关系, 结果发现 OA 进展过程中, 细胞衰

老与蛋白糖基化相关, 尤其与 O-连接的糖基化关系密切; 在 OA 患者的软骨细胞中, N-乙酰半乳糖胺基转移酶家族(O-连接的糖基化起始阶段的关键蛋白)的表达显著上调, 而 N-乙酰半乳糖胺基转移酶家族的表达水平与软骨细胞衰老进程相关。

## 2.3 IDD

IDD 是导致腰椎间盘突出症等脊柱退行性疾病的主要原因, 与创伤、衰老等因素有关<sup>[25]</sup>。髓核是椎间盘的重要组成部分, IDD 发病机制的相关研究也多集中于髓核细胞。Zhang 等<sup>[26]</sup>采用 scRNA-seq 分析了 IDD 患者与健康人的髓核细胞, 根据基因表达差异将髓核中的软骨细胞分为 7 个亚型, 其中有 4 个亚型是首次报道, 进而为 IDD 发病机制的研究提供了新思路。Zhao 等<sup>[27]</sup>采用 scRNA-seq 分析、加权基因共表达网络分析、差异性表达分析等方法探索 IDD 发展过程中髓核细胞亚型的改变及关键基因的表达, 结果发现了 5 个具有重要生物学功能的髓核细胞亚型, 且在 IDD 发展过程中 Reg 髓核细胞亚型数量减少, Eff 髓核细胞亚型数量增加。Wang 等<sup>[28]</sup>在腰椎间盘突出症免疫浸润机制探索和诊断生物标志物鉴定的研究中, 采用 scRNA-seq 对椎间盘细胞进行分类, 分析 IDD 过程中椎间盘细胞的分化轨迹, 结果显示椎间盘细胞可分为软骨细胞、纤维母细胞、脂肪细胞和上皮细胞, 而多数椎间盘退变的关键基因在软骨细胞中高表达。Zhang 等<sup>[29]</sup>通过对 IDD 的微阵列数据和 scRNA-seq 数据进行分析发现, IDD 发展过程中 LRP-PRC、GREM1、XPO1、HNRNPA2B1 和 UGP2 基因表达上调, SLC39A4 基因表达下调, 进一步验证分析发现 GREM1、LRPPRC 和 SLC39A4 是 IDD 发展的关键蛋白, 可作为 IDD 的潜在生物标志物。Zhang 等<sup>[30]</sup>为了分析再生髓核细胞与从胚胎脊索发育的髓核细胞的差异, 采用 scRNA-seq 分析了不同阶段的髓核细胞的差异表达基因, 结果显示成熟的髓核细胞中聚集蛋白聚糖、胶原蛋白 II、胶原蛋白 VI 等细胞外基质蛋白的表达水平升高, 且转化生长因子-β、磷脂肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B 等信号分子的表达上调; 此外, CD9<sup>+</sup> 是成熟髓核细胞的表面标记物, 且随着 IDD 进展 CD9<sup>+</sup> 髓核细胞数量减少。

## 2.4 OP

OP 是一种全身性代谢性骨骼疾病, 伴随着骨组织微结构改变、骨量减少, 会导致骨折风险增加<sup>[31]</sup>。

目前尚缺乏有效治疗 OP 的方法。Zhou 等<sup>[32]</sup>分析了 1 例 OP 患者的 scRNA-seq 数据,发现了 12 个与免疫功能密切相关的枢纽基因,其中 CDKN1A 和 TEFM 这 2 个枢纽基因的表达水平在间充质干细胞向成骨细胞转化过程中发生显著变化,提示 OP 与免疫系统之间存在密切的联系。Zheng 等<sup>[33]</sup>为了探究二甲双胍预防高血糖诱导的骨质疏松的作用机制,以二甲双胍干预高糖诱导的小鼠 MC3T3-E1 细胞骨质疏松模型,发现 MC3T3-E1 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)- $\gamma$  的表达量降低,而通过分析人骨组织的 scRNA-seq 数据发现,在 OP 患者骨组织中 PPAR $\gamma$  的表达量会升高,提示 PPAR $\gamma$  在二甲双胍预防高血糖诱导的骨质疏松中起重要作用。Zhang 等<sup>[34]</sup>分析了人骨髓间充质干细胞的 scRNA-seq 数据,并通过网络药理学分析鉴定了与 OP 相关的诊断基因和治疗药物,结果显示, F9 基因在 OP 诊断方面具有潜在研究价值,而化合物 DB03742 可能是 F9 的潜在抑制剂。Wang 等<sup>[35]</sup>通过分析人 OP 相关的 scRNA-seq 数据,发现了许多新的巨噬细胞亚型,且在破骨细胞形成过程中,锌指蛋白 36、ZFP36L1、DEFA3 等基因的表达量增加;这些发现提示免疫微环境在 OP 的发生过程中起重要作用。

### 3 小 结

scRNA-seq 能够在转录水平对同类细胞进行亚组划分,分析细胞间的差异表达基因,进而揭示疾病发生时病变组织的细胞特征。因此,scRNA-seq 能够从细胞水平探索 RA、OA、IDD、OP 等骨科常见疾病的发病机制,进而为这些疾病的精准治疗提供研究方向。RA、OA、OP 等疾病的发生与免疫微环境关系密切,多项研究通过 scRNA-seq 揭示了与这些疾病发生相关的免疫细胞及其基因表达特点;而髓核细胞的基因差异性表达在 IDD 的发生过程中起重要作用。总之,scRNA-seq 在骨科常见疾病发病机制研究中的应用将为相关疾病治疗靶点的发现提供新的思路。

### 参 考 文 献

- [1] ZHU R, WANG Y, OUYANG Z, et al. Targeting regulated chondrocyte death in osteoarthritis therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 215: 115707.
- [2] ZHU X, BAI W, ZHENG H. Twelve years of GWAS discoveries for osteoporosis and related traits: advances, challenges and applications [J]. *Bone Res*, 2021, 9(1): 23.
- [3] ZOU Y, XU H. Involvement of long noncoding RNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases [J]. *J Transl Autoimmun*, 2020, 3: 100044.
- [4] ZHU S, WANG J, SUO M, et al. Can extracellular vesicles be considered as a potential frontier in the treatment of intervertebral disc disease? [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 92: 102094.
- [5] 王卓, 申笑涵, 施奇惠. 单细胞基因组测序技术新进展及其在生物学中的应用 [J]. *遗传*, 2021, 43(2): 108-117.
- [6] ZHAO M, JIANG J, ZHAO M, et al. The application of single-cell RNA sequencing in studies of autoimmune diseases: a comprehensive review [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 60(1): 68-86.
- [7] ZONG Y, XIAO S, LEI D, et al. Discoveries in retina physiology and disease biology using single-cell RNA sequencing [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(10): 247.
- [8] ZHU D, GAO J, TANG C, et al. Single-cell RNA sequencing of bone marrow mesenchymal stem cells from the elderly people [J]. *Int J Stem Cells*, 2022, 15(2): 173-182.
- [9] ZAONGO S D, HARYPURSAT V, CHEN Y. Single-cell sequencing facilitates elucidation of HIV immunopathogenesis: a review of current literature [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828860.
- [10] ZHANG Z, CUI F, WANG C, et al. Goals and approaches for each processing step for single-cell RNA sequencing data [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(4): bbab314.
- [11] ZUCHA D, KUBISTA M, VALIHRACH L. Tutorial: guidelines for single-cell RT-qPCR [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2607.
- [12] ZYLA J, PAPIEZ A, ZHAO J, et al. Evaluation of zero counts to better understand the discrepancies between bulk and single-cell RNA-Seq platforms [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023, 21: 4663-4674.
- [13] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗类风湿关节炎临床应用指南(2022 年) [J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(3): 261-273.
- [14] OMATA Y, FRECH M, SAITO T, et al. Inflammatory arthritis and bone metabolism regulated by type 2 innate and adaptive immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1104.
- [15] ZUO J, TANG J, LU M, et al. Glycolysis rate-limiting enzymes: novel potential regulators of rheumatoid arthritis pathogenesis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 779787.
- [16] ZHANG Y, LEE T Y. Revealing the immune heterogeneity between systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis based on multi-omics data analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5166.
- [17] ZHANG W, NOLLER K, CRANE J, et al. RANK + TLR2 + myeloid subpopulation converts autoimmune to joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Elife*, 2023, 12: e85553.
- [18] ZHANG F, JONSSON A H, NATHAN A, et al. Deconstruc-

- tion of rheumatoid arthritis synovium defines inflammatory subtypes[J]. *Nature*, 2023, 623(7987): 616 – 624.
- [19] ZHANG F, WEI K, SLOWIKOWSKI K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(7): 928 – 942.
- [20] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021 年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41(18): 1291 – 1314.
- [21] ZHOU J, ZHAO Z, HE C, et al. Single-cell transcriptome analysis profile of meniscal tissue macrophages in human osteoarthritis[J]. *J Immunol Res*, 2020; 8127281.
- [22] ZHENG H, AIHAITI Y, CAI Y, et al. The m6A/m1A/m5C-related methylation modification patterns and immune landscapes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis revealed by microarray and single-cell transcriptome [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 5001 – 5025.
- [23] ZHAO X, YOUNIS S, SHI H, et al. RNA-seq characterization of histamine-releasing mast cells as potential therapeutic target of osteoarthritis [J]. *Clin Immunol*, 2022, 244: 109117.
- [24] YOSHIMOTO M, SADAMORI K, TOKUMURA K, et al. Bioinformatic analysis reveals potential relationship between chondrocyte senescence and protein glycosylation in osteoarthritis pathogenesis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1153689.
- [25] 陈孝平, 汪建平, 赵继宗. 外科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 731.
- [26] ZHANG Y, HAN S, KONG M, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies unique chondrocyte subsets and reveals involvement of ferroptosis in human intervertebral disc degeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29(9): 1324 – 1334.
- [27] ZHAO Y, MU Y, ZOU Y, et al. Integrated analysis of single-cell transcriptome and structural biology approach reveals the dynamics changes of NP subtypes and roles of Menaquinone in attenuating intervertebral disc degeneration [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023; 1 – 24.
- [28] WANG L, HE T, LIU J, et al. Revealing the immune infiltration landscape and identifying diagnostic biomarkers for lumbar disc herniation[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 666355.
- [29] ZHANG Z, HUO J, JI X, et al. GREM1, LRPPRC and SLC39A4 as potential biomarkers of intervertebral disc degeneration: a bioinformatics analysis based on multiple microarray and single-cell sequencing data[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2023, 24(1): 729.
- [30] ZHANG C, ZHONG L, LAU Y K, et al. Single cell RNA sequencing reveals emergent notochord-derived cell subpopulations in the postnatal nucleus pulposus [J]. *FASEB J*, 2024, 38(1): e23363.
- [31] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南[J]. *中医正骨*, 2023, 35(1): 1 – 9.
- [32] ZHOU Z, HUANG Z, KHAN H M, et al. Identification of 12 hub genes associated to the pathogenesis of osteoporosis based on microarray and single-cell RNA sequencing data[J]. *Funct Integr Genomics*, 2023, 23(2): 186.
- [33] ZHENG L, SHEN X, XIE Y, et al. Metformin promotes osteogenic differentiation and prevents hyperglycaemia-induced osteoporosis by suppressing PPAR $\gamma$  expression[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(3): 394 – 403.
- [34] ZHANG Z, ZHANG T, ZHOU L, et al. Identification of diagnostic genes and effective drugs associated with osteoporosis treatment by single-cell RNA-Seq analysis and network pharmacology [J]. *Mediators Inflamm*, 2022: 6830635.
- [35] WANG Y, WANG Q, XU Q, et al. Single-cell RNA sequencing analysis dissected the osteo-immunology microenvironment and revealed key regulators in osteoporosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109302.

(收稿日期: 2024-01-03 本文编辑: 吕宁)

(上接第 61 页)

- [27] YUAN S, MIAO Y, RUAN X, et al. Therapeutic role of interleukin-1 receptor antagonist in pancreatic diseases: mendelian randomization study [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1240754.
- [28] HAN Y, ZHANG Y, ZENG X. Assessment of causal associations between uric acid and 25-hydroxyvitamin D levels [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1024675.
- [29] LI J, BAI H, QIAO H, et al. Causal effects of COVID-19 on cancer risk: a Mendelian randomization study [J]. *J Med Virol*, 2023, 95(4): e28722.
- [30] DOBRIJEVIC E, VAN ZWIETEN A, KIRYLUK K, et al. Mendelian randomization for nephrologists [J]. *Kidney Int*, 2023, 104(6): 1113 – 1123.
- [31] CORDEIRO C, MUÑOZ-BARUS J I, WASTERLAIN S, et al. Predicting adult stature from metatarsal length in a Portuguese population [J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 193(1/3): 131. e1 – 131. e4.

(收稿日期: 2023-12-19 本文编辑: 吕宁)