

# 基于单细胞转录组测序分析人肋来源软骨细胞的异质性

https://doi.org/10.12307/2022.379

师航, 李佳, 刘霞, 蒋海越

投稿日期: 2021-03-23

采用日期: 2021-04-28

修回日期: 2021-08-04

在线日期: 2021-08-21

中图分类号:

R459.9; R318; Q291

文章编号:

2095-4344(2022)19-03011-07

文献标识码: B

## 文章快速阅读:

### 文章特点一

△通过对31岁患者的肋软骨组织进行单细胞转录组测序分析,初步将细胞分为4个亚群,包括肥大软骨细胞群、软骨细胞群、增殖性细胞群和干细胞群,提示在肋软骨发育中可能有多种干细胞参与;  
△明确细胞亚群间的转归和影响,深入了解各细胞亚群的特性和潜能,对后续绘制肋软骨细胞的发育轨迹及作为种子细胞构建组织工程软骨提供研究基础,也为明确软骨相关疾病的发生机制提供线索。

用10X Genomics平台对肋软骨单细胞悬液进行数据提取

根据单细胞转录组测序数据将细胞分为4个亚群

富集各细胞亚群标记基因参与的生物过程

提示在肋软骨发育中可能有多种干细胞参与

## 文题释义:

**单细胞转录组测序:**以单个细胞为单位通过全基因组或转录组扩增进行高通量测序,能够揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态,反映细胞间的异质性,其在肿瘤、干细胞研究、发育生物学等领域有重要应用,是现今生命科学研究的焦点。

**细胞异质性:**多细胞生物个体由多种形态功能不同的细胞组成,细胞在多次分裂增殖期间会发生分子生物学或基因方面的改变,从而产生细胞状态或类型的多样性,这种多样性为细胞异质性。研究细胞异质性,是一个单细胞层面的范畴,单细胞间的异质性存在于DNA、RNA、蛋白等各个层面。

## 摘要

**背景:**肋软骨是人体组织中一类重要的软骨来源,常作为软骨自体移植和组织工程构建的种子细胞来源。单细胞测序是分析细胞异质性的强大工具,可针对肋软骨细胞进行细胞异质性的深入研究。

**目的:**通过单细胞转录组测序分析人肋软骨组织细胞分群情况,以及每个细胞亚群参与的生物学过程。

**方法:**临床获取1例31岁小耳重建手术后废弃的肋软骨组织制成原代细胞悬液,经10X Genomics平台进行单细胞分离,使用Gel Bead Kit V3构建单细胞RNA-seq文库, Illumina Novaseq6000测序仪对文库进行测序,并利用主成分分析和T分布随机邻域嵌入进行降维,获得4个亚群细胞,进而获得不同亚群细胞的标记基因,再对每个细胞亚群的标记基因进行GO和KEGG分析,分析这些基因可能参与的生物学过程。

**结果与结论:**测序共获取6 634个细胞,符合质控标准。将肋软骨细胞划分为4个细胞亚群,分别为以COL10A1、S100A2为标记基因的肥大软骨细胞群;以BMP2、COL2A1为标记基因的软骨细胞群;以FOS、JUN为标记基因的增殖性细胞群;以MYLK、CD146为标记基因的干细胞群。将肋软骨细胞进一步划分细胞亚群,有利于深入了解肋软骨细胞的异质性,对其作为种子细胞应用及疾病认识都有积极意义。

**关键词:**单细胞转录组; 测序; 肋软骨; 软骨细胞; 标记基因; 细胞分群

## Heterogeneity of chondrocytes derived from human ribs based on single-cell transcriptome sequencing

Shi Hang, Li Jia, Liu Xia, Jiang Haiyue

Research Center of Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100144, China

Shi Hang, Master, Research Center of Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100144, China

**Corresponding author:** Liu Xia, MD, Researcher, Research Center of Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100144, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Costal cartilage is an important source of cartilage in human tissues. It is often used as a source of seed cells for cartilage autograft and tissue engineering. As a powerful tool for analyzing cell heterogeneity, single-cell sequencing can conduct in-depth research on costal chondrocyte heterogeneity.

**OBJECTIVE:** Single-cell transcriptome sequencing is used to analyze the cell grouping of human costal cartilage tissue and the biological processes involved in each cell subgroup.

中国医学科学院北京协和医学院整形外科医院研究中心, 北京市 100144

第一作者: 师航, 女, 1995年生, 黑龙江省双鸭山市人, 汉族, 2021年北京协和医学院毕业, 硕士。

通讯作者: 刘霞, 博士, 研究员, 中国医学科学院北京协和医学院整形外科医院研究中心, 北京市 100144

https://orcid.org/0000-0001-6484-3689 (师航)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81871575), 项目负责人: 刘霞; 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2017-I2M-1-007), 项目负责人: 蒋海越

引用本文: 师航, 李佳, 刘霞, 蒋海越. 基于单细胞转录组测序分析人肋来源软骨细胞的异质性[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):3011-3017.



**METHODS:** A 31-year-old case of costal cartilage tissue discarded after a microtia reconstruction operation was obtained clinically and made into a primary cell suspension. Single-cell isolation was performed on the 10X Genomics platform. A single-cell RNA-seq library was constructed using Gel Bead Kit V3, and the library was analyzed by Illumina Novaseq6000 Sequencing and dimensionality reduction using Principal Component Analysis and t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding were used to obtain four subgroups of cells, and then to obtain marker genes for different subgroups of cells. GO and KEGG analyses were performed on the marker genes of each cell subgroup to analyze the biological processes that these genes may participate in.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A total of 6 634 cells were obtained by sequencing, which met the quality control standards. The costal chondrocytes are divided into four cell subgroups, namely, hypertrophic chondrocyte population with COL10A1 and S100A2 as marker genes; chondrocyte population with BMP2 and COL2A1 as marker genes; and proliferative cells with FOS and JUN as marker genes; stem cell population with MYLK and CD146 as marker genes. The further division of costal chondrocytes into cell subgroups is helpful for in-depth understanding of the heterogeneity of cost chondrocytes, and has positive significance for its application as seed cells and understanding of diseases.

**Key words:** single-cell transcriptome; sequencing; costal cartilage; chondrocytes; marker gene; cell grouping

**Funding:** General Program of the National Natural Science Foundation of China, No. 81871575 (to LX); Major Collaborative Innovation Project of Medical and Health Technology Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences, No. 2017-I2M-1-007 (to JHY)

**How to cite this article:** SHI H, LI J, LIU X, JIANG HY. Heterogeneity of chondrocytes derived from human ribs based on single-cell transcriptome sequencing. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(19):3011-3017.

## 0 引言 Introduction

肋软骨是主要的自体软骨来源<sup>[1]</sup>, 肋软骨细胞作为种子细胞<sup>[2]</sup>, 在细胞治疗<sup>[3-6]</sup>、组织工程等领域都有广泛应用<sup>[7-9]</sup>。因此, 对肋软骨细胞进行深度测序, 表征细胞异质性图谱, 甚至发现其中全新的细胞类型, 对其临床应用具有重要指导意义。

复杂的生物系统由单个细胞的协同功能共同决定, 传统方法虽然提供了大量的基因组或转录组数据, 但却无法揭示造成这种复杂性的细胞异质性<sup>[10]</sup>。新一代的高通量测序方法——单细胞转录组测序 (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq) 可以对单个细胞的 DNA 或 RNA 分子进行深度测序, 是研究单个目标细胞中基因组、转录组、非编码 RNA 的测序方法<sup>[11]</sup>。单细胞转录组测序是使用整个转录组的数千个细胞去鉴定细胞类型, 它的分析有助于深入理解干细胞多能性与发育分化<sup>[12]</sup>、细胞重编程<sup>[13]</sup>、疾病发生与治疗等过程的基因调节网络<sup>[14]</sup>。骨关节置换术后的软骨样本的单细胞测序结果表明, 关节软骨中有 7 个不同状态的软骨细胞群: 增殖性软骨细胞群、肥大软骨细胞群、肥大前软骨细胞群、纤维软骨细胞、效应软骨细胞、调控软骨细胞及自我平衡软骨细胞, 拟时间序列分析发现增殖软骨细胞比肥大软骨细胞发育更早期, 而纤维软骨在这些细胞中处于发育的最晚期<sup>[15]</sup>。对健康的半月板组织的单细胞测序, 聚类得到 7 个细胞亚群, 分别为软骨细胞祖细胞、纤维软骨细胞、预肥大软骨细胞及纤维软骨细胞祖细胞、增殖纤维软骨细胞、调节性软骨细胞、内皮细胞<sup>[16]</sup>。这些文章不仅明确了每个亚群的标记基因以及主要的生物功能, 深度挖掘了软骨发育轨迹, 还筛选出了相关疾病的候选基因。

该研究对肋软骨组织来源细胞的表达数据进行单细胞转录组测序分析, 将不同的细胞聚类为不同的亚群, 并对其进行注释, 得到各亚群细胞的标记基因。随后, 对于每个细胞亚群的标记基因进行 GO 分析和 KEGG 信号通路富集分析, 完成肋软骨细胞的亚群鉴定和功能分析。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 单细胞转录组测序分析。

### 1.2 时间及地点 实验于 2019 年 11 月至 2021 年 1 月在中国

医学科学院整形外科医院研究中心完成。

**1.3 材料** 样本来源于 1 例 31 岁女性患者经小耳重建手术后废弃肋软骨组织, 该研究获得了中国医学科医学院整形外科医院伦理委员会机构审查委员会的批准, 患者签署知情同意书。

**实验试剂和仪器:** PBS、1% 青霉素-链霉素-胰酶、4% 锥虫蓝 (Gibco, 美国); II 型胶原酶 (Sigma, 美国); 恒温摇床 (上海智诚分析仪器有限公司); S1000™ Touch Thermal Cycler (Bio Rad, 美国); Agilent 4200 (Capital Bio Technology, 北京); Countess® II Automated Cell Counter (Invitrogen, 美国)。

### 1.4 方法

**1.4.1 人软骨细胞的分离和扩增** 首先, 从手术室获取新鲜肋软骨, 并将其置于冰上的 PBS 和 1% 青霉素-链霉素的溶液中, 在 20 min 内运送到实验室。将肋软骨切成 1 mm<sup>3</sup> 的小块, 在含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的磷酸盐缓冲盐水溶液中洗涤, 添加 0.25% 胰酶, 在 37 °C, 80 r/min 下摇动 30 min, 弃去上清液, 添加 0.2% II 型胶原酶, 在 37 °C, 80 r/min 下摇动 8 h。使用锥虫蓝染色计数活细胞, 如果原代细胞活力高于 80%, 将用 10X Genomics 平台对样品进行上机处理。

**1.4.2 细胞捕获和单细胞文库的构建** 将样本细胞悬液送至博奥晶典 (北京) 公司进行测序, 使用微流体芯片将单个细胞与单个凝珠 (beads) 形成“油包水”的液滴, 在液滴中裂解捕获的细胞, 通过 Oligo(dT) 磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA, 随后在 Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版, 寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 反转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNA polymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 筛选 370-420 bp 的 cDNA 进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得文库。在测序的 flow cell 中加入 4 种荧光标记的 dNTP、DNA 聚合酶以及接头引物进行扩增, 在每一个测序簇延伸互补链时, 每加入一个被荧光标记的 dNTP 就能释放出相对应的荧光, 测序仪通过捕获荧光信号, 并用计算机软件将光信号转化为测序峰, 从而获得待测片段的序列信息。

**1.4.3 Cell Ranger 测序** Cell Ranger 软件是从 10X Genomics 网站

(<https://support.10Xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/downloads/>) 获得的。使用 cellranger 计数模块进行比对、过滤、条形码计数和单分子标签 (unique molecular identifier, UMI) 计数, 以生成特征条形码矩阵并确定聚类。使用主成分分析进行降维, T 分布随机邻域嵌入可视化后通过 K-means 算法和 Graph-based 算法生成聚类。

**1.4.4 主成分分析** 主成分分析是一种减少数据集的维数, 同时保持数据集之间最大差异的一种算法。这是通过保留低阶主成分, 忽略高阶主成分做到的, 这样低阶成分往往能够保留住数据的最重要方面。主成分分析限于线性维数, 它不能解释特征之间的复杂多项式关系, 但它降维相对较快, 当与稀疏的矩阵一起使用时, 它可以扩展到非常大的数据集。

**1.4.5 T 分布随机邻域嵌入** T 分布随机邻域嵌入非线性降维算法是通过识别具有多个相似特征的数据点, 投射到不同数据簇中的一种算法, 它也是一种用于大型高维数据可视化的统计方法, 它使用概率分布来估计嵌入的情况, 将数据投射到各个孤立的簇中, 实现细胞群的可视化。

**1.4.6 K-means 算法** K-means 聚类是一种划分聚类算法, 计算原理是先随机选择 k 个对象作为凝聚点, 按照就近原则将其余对象向凝聚点凝聚, 并计算其余对象与凝聚点的距离, 计算距离的方法一般选择欧氏距离。凝聚结束后, 计算出各个初始分类的中心位置, 用计算出的中心位置重新进行聚类, K-means 聚类通常适用于样本量较大的连续型变量, 并且要求已知类别数。

**1.4.7 簇细胞类型注释和标记基因鉴定** 使用 SingleR 突出显示已知的标记基因可识别簇, 分别对每个亚群与其他所有亚群的基因表达平均值进行比较, 获得每个亚群较高表达的基因集合, 即标记基因, 使用 VlnPlot 函数生成标记基因的小提琴图。

**1.5 主要观察指标** ①碱基含量的分布; ②基因数和单分子标签数比例; ③特异性基因在亚群中表达量分布。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 统计软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 行独立样本 t 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

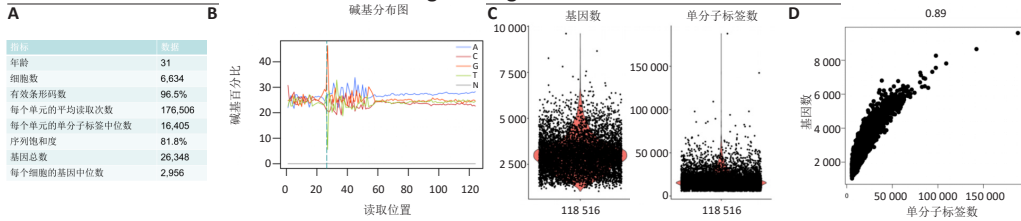
**2.1 10X Genomics 样品处理和 cDNA 文库制备** 人肋软骨组织制备成单细胞悬液, 使用 Countess® II Automated Cell Counter 进行细胞计数和细胞活率测定, 细胞活率为 85%, 将细胞浓度调整为  $1 \times 10^9 L^{-1}$ 。利用 Illumina HiSeq 测序平台进行测序和初级分析, 进行数据可视化, 在单细胞水平上生成了肋软骨组织中基因表达的深层转录图, 获得 6 634 个细胞进行分析, 检测到单个细胞的单分子标签和基因中位数分别为 16 405 和 2 956。81.8% 的测序饱和率表明对可用转录本进行了全面取样。以上数据见图 1A。

对数据分析之前进行了严格的数据质控, 首先检测了碱基含量的分布, 见图 1B, 其用于检测有无 AT、GC 分离现象。理论上普通文库的 G 和 C 碱基及 A 和 T 碱基含量每个测序

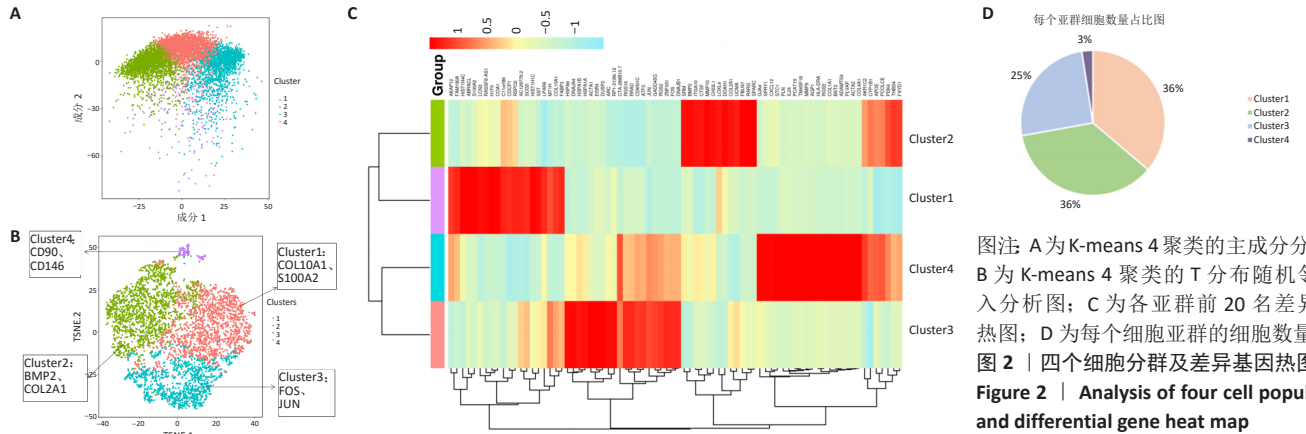
循环上应分别相等, 且整个测序过程稳定不变, 呈水平线。由于随机引物扩增偏差等原因, 常常会导致在测序得到的每个 read 前几个碱基有较大的波动, 这种波动属于正常情况。由图 1B 中 GC 含量分布看出, 未检测到 AT、GC 分离现象。在文库构建过程中可能会掺入死细胞, 或者多个细胞被捕获在同一个液滴中, 产生潜在的多重细胞, 因此利用基因数和单分子标签数进行质控, 见图 1C, 基因数大于 5 000、大部分细胞的单分子标签数大于 10 000, 是一组高质量的测序数据。随着测序数据量的增加, 单细胞检测到的基因数量和单分子标签的数量也随之增加, 两者之间呈明显正相关, 见图 1D。细胞的单分子标签数与基因数的相关性可以确定是否有大量死亡或濒死细胞的线粒体污染, 此次数据得分为 0.89, 符合要求, 可以进行后续分析。

**2.2 根据单细胞转录组测序数据进行细胞分群** 为了深入剖析肋软骨细胞的异质性, 首先对表达数据单分子标签归一化, 然后主成分分析降维, 见图 2A, 选取 K-means 聚类算法进行细胞分群, 同时利用 T 分布随机邻域嵌入进行可视化的聚类分析, 获得了 4 个聚类 (Cluster) 的细胞群, 不同类的细胞亚群标记为不同的颜色, 见图 2B。每个亚群都有特异的标记基因, 图中显示了各亚群中前 20 名的差异基因, 见图 2C。结合软骨细胞特征性基因在各群中的表达情况, 发现 Cluster1 是以 COL10A1、S100A2 为标记基因的细胞群, 这群细胞在该样本中占比 36%; Cluster2 是以 BMP2、COL2A1 基因为标记基因的细胞群, 细胞数占总样本的 36%; Cluster3 是以 FOS、JUN 基因为标记基因的细胞群, 细胞数占总样本的 25%; Cluster4 是以 CD90、CD146 基因为标记基因的细胞群, 细胞数占总样本的数量最少, 仅为 3%, 见图 2D。

为了进一步区分每个聚类, 基于基因平均表达量和亚群之间的差异表达基因进行协方差统计分析, 研究发现标记基因均具有较高的特异性, 可以识别细胞类型, 见图 3。Cluster1 中肥大软骨基因 COL10A1、钙调蛋白 S100A2、抑制基质降解蛋白 SERPINE2、软骨标记基因 SOX9 表达比较高, 成软骨基因 COL2A1、COL9A1、增殖调控基因 FOS、JUN、BCL2, 热调蛋白基因 HSPA1A 表达相对较低, 因此这群细胞高表达肥大软骨细胞标记基因, 将 Cluster1 注释为肥大软骨细胞群。Cluster2 中成软骨基因 COL2A1、COL9A1、SOX9、BMP2, 钙调蛋白 S100A2 的基因表达相对较高, 增殖性基因 FOS、JUN, 热调蛋白 HSPA1A, 干细胞基因 CD90、CD146 的表达均比较低, 因此 Cluster2 是一群向软骨分化完全, 但增殖能力不强的软骨细胞群。Cluster3 中增殖性基因 FOS、JUN, 抑制凋亡的基因 BCL2, 调控细胞生长的基因 HSPA1A、HAPA1B 特异性高表达, 软骨分化基因 SOX9、COL2A1, 干细胞基因 CD146 在 Cluster3 的表达相对较少, 因此 Cluster3 被定义为一类增殖性细胞群。Cluster4 中肥大软骨基因 COL10A1, 成软骨基因 SOX9、COL2A1 表达均较少, 但调控细胞发育相关的基因 MYLK、干细胞标记基因 CD146、CD90 等在 Cluster4 中特异性表达, 将 Cluster4 注释为干细胞群。



图注：图中 A 为测序数据质控统计表；B 为 GC 含量分布图；C 为基因和单分子标签数小提琴图；D 为基因数与单分子标签数相关性图  
Figure 1 | Quality control results of single-cell transcriptome data



图注 A 为 K-means 4 聚类的主成分分析图 B 为 K-means 4 聚类的 T 分布随机邻域嵌入分析图；C 为各亚群前 20 名差异基因热图；D 为每个细胞亚群的细胞数量占比图  
Figure 2 | Analysis of four cell populations and differential gene heat map

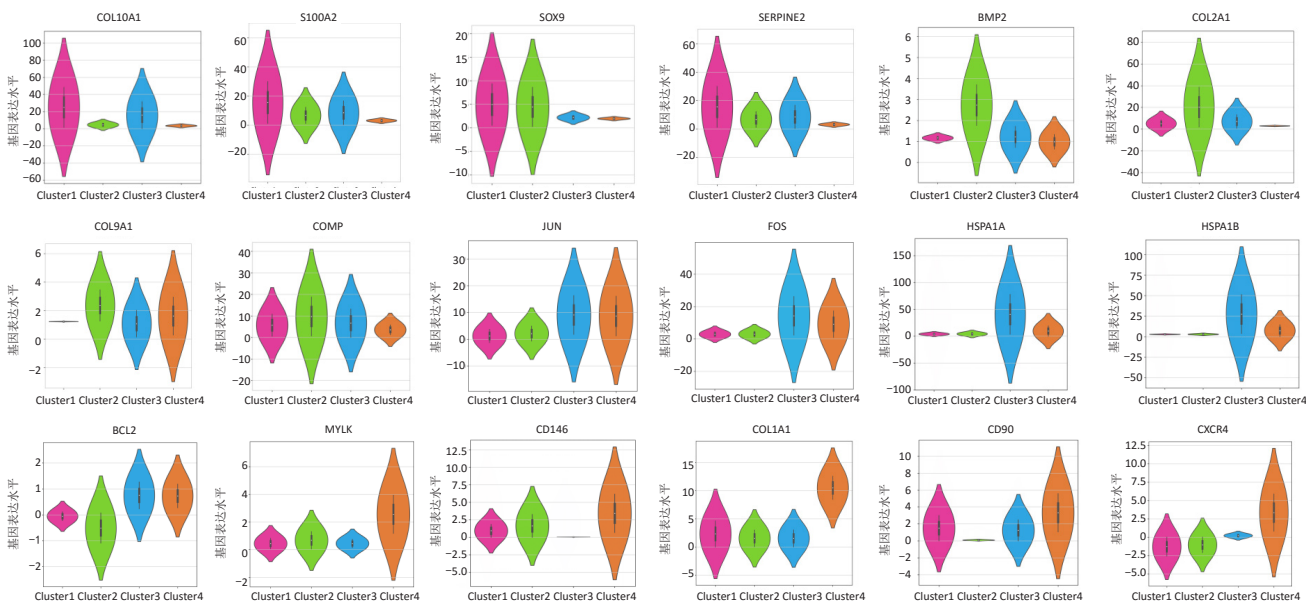


图 3 | 标记基因在各 Cluster 中表达的小提琴图  
Figure 3 | Violin diagram of the expression of marker genes in each Cluster

2.3 细胞亚群标记基因参与的生物过程 为了进一步研究肋软骨组织中各细胞亚群相关的功能状态和潜在的调控因子，对每个细胞群中富集的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 分析，见图 4，结果显示：在被注释为肥大软骨细胞群的 Cluster 1 中，生物学功能方面主要富集细胞间的黏附和对细胞迁移的调控；在细胞组分方面主要富集在细胞外基质、细胞外泌体之中；在分子功能方面主要富集蛋白质结合和细胞黏附等功能。在被注释为软骨细胞群的 Cluster 2 中，生物学功能方面主要富集软骨细胞分化、Wnt 信号通路的调节、细胞增殖和凋亡的调节；在细胞组分方面主要富集在细胞外泌体，细胞外基质中；在分子功能方面主要富集

胶原结合、蛋白质结合、细胞外基质结合等功能。在被注释为增殖性软骨细胞群的 Cluster 3 中，生物学功能主要富集信号传导、细胞周期调控等方面；细胞组分方面主要富集在细胞质、细胞核、细胞外基质等部位；在分子功能方面主要富集蛋白结合、ATP 结合等方面。在被注释为干细胞的 Cluster 4 中，生物学功能主要富集在细胞增殖、细胞分化、细胞黏附、胶原分解代谢等方面；细胞组分主要在细胞外基质、细胞外泌体、细胞膜等部位；分子功能主要富集在激活金属酶等方面。综上所述，在细胞组分方面 4 个亚群都主要富集在细胞外基质，在分子功能方面都与蛋白质结合有关。



图注：图中 A 为 Cluster1 中富集的差异基因 GO、通路分析；B 为 Cluster2 中富集的差异基因 GO、通路分析；C 为 Cluster3 中富集的差异基因 GO、通路分析；D 为 Cluster4 中富集的差异基因 GO、通路分析。BP：生物过程；CC：细胞组分；MF：分子功能

图 4 | 各亚群富集的 GO 分析和通路分析

Figure 4 | GO analysis and pathway analysis of each subpopulation enrichment

### 3 讨论 Discussion

肋软骨是人体组织中一类重要的软骨来源,与耳软骨、关节软骨相比,其来源更为丰富,取出一部分后对正常生理功能影响较小,常作为软骨自体移植和组织工程构建的种子细胞来源<sup>[17]</sup>。针对肋软骨细胞的深入研究对其作为种子细胞应用及疾病认识都有积极意义。

该研究通过单细胞转录组测序分析,初步将细胞分为4个亚群,包括肥大软骨细胞群、软骨细胞群、增殖性细胞群和干细胞群。与JI等<sup>[15]</sup>报道的有关骨关节炎单细胞测序的分群结果基本一致,其在研究中发现关节软骨中也含有肥大软骨细胞群、增殖性细胞群、前体细胞群。但在骨关节炎的细胞分群中有一群标记为稳态软骨细胞的亚群,在肋软骨中未发现。稳态软骨细胞群中特异性高表达调节生物节律的PER1基因和调节细胞周期的SIRT1基因<sup>[18-19]</sup>,但这2个基因在肋软骨各亚群中分布比较少且无特异性。骨关节炎测序结果还将软骨细胞细分出一群调节软骨细胞群,其基因集富集分析结果显示调节软骨细胞群具有大量与抗原处理和抗原呈递相关的基因表达,表明这些细胞可能具有免疫细胞功能。作者分析,肋软骨与关节软骨同样作为透明软骨,因此在细胞类型上有一致性,但文献中患骨关节炎的关节软骨是病损组织,因此在细胞分群上会有区别。

目前关于小耳畸形患者的肋软骨是否有发育异常的相关研究证实:小耳畸形患者除耳郭发育异常外,常伴有其他器官系统畸形,其中肋软骨畸形达32.6%<sup>[20]</sup>。该研究样本来源于31岁小耳畸形患者的肋软骨组织,在术前对其进行胸部CT和X射线片检查,排除患者肋软骨发育不全、肋软骨畸形、肋骨或肋软骨骨折、肋软骨高度钙化等情况,此样本肋软骨有轻微钙化,结合其年龄属于正常情况。从软骨细胞向肥大细胞分化进而骨化是透明软骨随年龄变化的一个特征<sup>[21]</sup>。COL2A1和SOX9是已知的软骨细胞标记基因,COL10A1是肥大软骨特异性基因,可促进细胞外基质的钙化<sup>[22]</sup>。根据这些特征基因,看到在31岁女性肋软骨中的成熟软骨细胞和肥大细胞各占到36%左右。软骨细胞肥大化是从成软骨分化到软骨基质矿化的中间过程,软骨细胞进入增殖、肥大阶段,表达COL10A1使软骨降解,会进一步钙化<sup>[23]</sup>。随着年龄增加,肥大软骨细胞亚群比例是否会进一步增加,还需要后续不同年龄样本的测序比较研究。该研究同时也为这些细胞发现新的标志物,比如在肥大软骨细胞中特异性高表达SERPINE2。该基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的一员,可以多种方式影响细胞外基质蛋白的代谢,调节细胞外基质微环境<sup>[24]</sup>。结合肥大软骨细胞的特性,SERPINE2可以作为肥大软骨细胞的候选标记基因。COMP在软骨细胞亚群中特异性高表达,该基因通过与其他细胞外基质蛋白(例如胶原蛋白和纤连蛋白)相互作用,在软骨的结构完整性中发挥作用<sup>[25]</sup>,COMP可作为透明软骨细胞的标记基因。

在细胞亚群中,看到有一群软骨表型表达不明显,但是其增殖能力较强,在功能上与细胞周期相关的增殖性软骨细

胞群。这群细胞不仅高表达调节细胞增殖的基因如BCL2、FOS,热休克蛋白家族基因如HSPA1A、HSPA1B等表达也具有特异性。该家族不仅是机体应激反应迅速产生的特异性蛋白,同时也可与端粒酶协同作用,具有重要的抗凋亡作用<sup>[26]</sup>,可作为增殖性细胞亚群的候选标记基因。增殖性软骨细胞占比达1/4左右,其中富集大量调控RNA代谢过程的基因,该群细胞在肋软骨细胞作为种子细胞应用时的作用应受到重视。

细胞分群中,还有极少比例的干细胞。作者发现注释为干细胞的亚群中既有CD146标记的内皮来源干细胞,也有CXCR4标记的神经来源干细胞,还有COL1A1标记的纤维母细胞,CD90标记的间质来源干细胞,提示在肋软骨发育中可能有多种干细胞参与。

胶原蛋白家族在标记细胞亚群中发挥了重要作用。一直以来,II型胶原被认为是软骨细胞的特征性标志,肋软骨中软骨基质以II型胶原蛋白为主,也含有少量的I、IX型胶原蛋白,肋软骨胶原蛋白特别是II型胶原蛋白的表达量及分布决定了其生物学特性<sup>[27]</sup>,II型胶原向I型胶原的转换,是被公认为去分化过程的标志<sup>[18]</sup>,此过程使软骨细胞转变为类似成纤维样细胞,进而失去软骨形成能力<sup>[28]</sup>。该研究中,COL2A1在Cluster2中表达量最多,在Cluster4中表达最少,COL1A1基因的表达情况正好相反,在Cluster2中表达最少,在Cluster4中表达最多,这个去分化过程是如何进行的,Cluster1和Cluster3在此过程中发挥了怎样的作用,可以后续通过Monocle轨迹分析进行发育轨迹方面的探索。

GO分析和Pathway通路分析显示,Cluster1-4的细胞组分大部分都在细胞外基质中,且生物功能也都与蛋白聚糖的合成有关,在组织工程化软骨的构建研究中,细胞外基质是细胞附着的支架<sup>[29]</sup>,为细胞提供生长和代谢的场所<sup>[30]</sup>。蛋白多糖聚集体是软骨两大特异性基质成分之一<sup>[31]</sup>,细胞外基质中蛋白多糖聚集体的含量可作为判断体外大量培养扩增软骨细胞分泌基质功能的可靠依据<sup>[32]</sup>,因此,可以从单细胞角度上判断肋软骨细胞是种植于组织工程支架的良好种子细胞。

该研究利用单细胞转录组测序技术对1例31岁女性肋软骨细胞进行分群,初步探讨了肋软骨细胞的异质性。既往研究表明,肋软骨随年龄的增长会出现不同程度的钙化<sup>[33-34]</sup>,不同年龄和性别会导致软骨细胞群体生物学特性有差异性<sup>[35-36]</sup>,吴迎等<sup>[37]</sup>对70例女性肋软骨进行双源CT三维重建发现肋软骨的钙化率随年龄增加,但并不呈正相关。GUO等<sup>[38]</sup>用320例连续小耳畸形患者的CT影像学数据进行分析,发现女性患者的软骨钙化率高于男性( $P < 0.05$ )。在6-15岁组中,男性和女性的钙化率相似,而其他3组中女性的钙化率均高于男性。此外,女性的中至重度钙化率高于男性,因此下一步将增加不同年龄、不同性别来源软骨细胞分群研究,进一步明确细胞亚群间的转归和影响,深入了解各细胞亚群的特性和潜能,对后续绘制肋软骨细胞的发育轨迹及作为种子细

胞构建组织工程软骨提供研究基础,也为明确软骨相关疾病发生机制提供线索。

**作者贡献:** 实验设计为刘霞, 实验实施为师航, 实验评估为蒋海越, 资料收集为李佳。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81871575)”和“中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2017-12M-1-007)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究的实施获得了中国医学科医学院整形外科医院伦理委员会机构审查委员会的批准[医院伦理批件号: 2017注册第(37)号]。

**知情同意问题:** 1例31岁女性患者经小耳重建手术后废弃肋软骨组织由中国医学科学院整形外科医院提供, 已签署知情同意书。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已通过中国医学科学院北京协和医学院专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- VILA PM, JEANPIERRE LM, RIZZI CJ, et al. Comparison of Autologous vs Homologous Costal Cartilage Grafts in Dorsal Augmentation Rhinoplasty: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;146(4):347-354.
- CHOI SW, HONG KY, MINN KW, et al. Chondrogenesis of Adipose-Derived Stem Cells on Irradiated Cartilage. *Plast Reconstr Surg.* 2020;145(2):409-418.
- JUNG SN, RHIE JW, KWON H, et al. In vivo cartilage formation using chondrogenic-differentiated human adipose-derived mesenchymal stem cells mixed with fibrin glue. *J Craniofac Surg.* 2010;21(2):468-472.
- ZHAO M, CHEN Z, LIU K, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015;16(11):914-923.
- SAN-MARINA S, SHARMA A, VOSS SG, et al. Assessment of Scaffolding Properties for Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Nasal Reconstruction. *JAMA Facial Plast Surg.* 2017;19(2):108-114.
- DION J, COSTEDOAT-CHALUMEAU N, SÈNE D, et al. Relapsing Polychondritis Can Be Characterized by Three Different Clinical Phenotypes: Analysis of a Recent Series of 142 Patients. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(12):2992-3001.
- ENOMURA M, MURATA S, TERADO Y, et al. Development of a Method for Scaffold-Free Elastic Cartilage Creation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8496.
- 靳小兵. 自体组织工程生长板修复兔长骨生长板损伤的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2004.
- 姜疆. 在体构建组织工程软骨的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- CHEN R, WU X, JIANG L, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep.* 2017;18(13):3227-3241.
- HWANG B, LEE JH, BANG D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-14.
- GULATI GS, SIKANDAR SS, WESCHE DJ, et al. Single-cell transcriptional diversity is a hallmark of developmental potential. *Science.* 2020;367(6476):405-411.
- MAHMOUDI S, MANCINI E, XU L, et al. Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature.* 2019;574(7779):553-558.

- QI F, QIAN S, ZHANG S, et al. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;526(1):135-140.
- JI Q, ZHENG Y, ZHANG G, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(1):100-110.
- SUN H, WEN X, LI H, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies meniscus progenitors and reveals the progression of meniscus degeneration. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(3):408-417.
- 胡坤, 陈竹, 罗翎伟, 等. 组织工程软骨的研究新进展[J]. 西部医学, 2020,32(6):927-932.
- FU S, KUWAHARA M, UCHIDA Y, et al. Circadian production of melatonin in cartilage modifies rhythmic gene expression. *J Endocrinol.* 2019;JOE-19-0022.R2.
- MEI R, LOU P, YOU G, et al. 17β-Estradiol Induces Mitophagy Upregulation to Protect Chondrocytes via the SIRT1-Mediated AMPK/mTOR Signaling Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;11:615250.
- 杨美蓉. 先天性小耳畸形伴发胸廓畸形的临床研究及初步遗传学分析[D]. 北京: 协和医学院, 2018.
- PRETEMER Y, KAWAI S, NAGATA S, et al. Differentiation of Hypertrophic Chondrocytes from Human iPSCs for the In Vitro Modeling of Chondrodysplasias. *Stem Cell Reports.* 2021;16(3):610-625.
- 薛松, 姜亚飞, 桑伟林, 等. 肥大软骨细胞在骨关节炎发病中的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2020,28(6):522-526.
- 陈海涛, 倪曲波, 陈廖斌. 关节软骨的发育及调控[J]. 武汉大学学报(医学版), 2021,42(2):333-337.
- SANTORO A, CONDE J, SCOTECHE M, et al. SERPINE2 Inhibits IL-1α-Induced MMP-13 Expression in Human Chondrocytes: Involvement of ERK/NF-κB/AP-1 Pathways. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135979.
- DANG QT, HUYNH TD, INCHINGOLO F, et al. Human Chondrocytes from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Dermal-Derived Collagen Matrix Sheet: Our Preliminary Results for a Ready to Go Biotechnological Cartilage Graft in Clinical Practice. *Stem Cells Int.* 2021;2021:6664697.
- ZHAO C, WANG E. Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal.* 2004;16(3):313-321.
- 杜俊杰, 罗卓荆, 胡蕴玉, 等. rhBMP-2 在体内诱导成骨中 I, II 型胶原及碱性磷酸酶的表达[J]. 第四军医大学学报, 2001,22(11):981-983.
- 张艳, 柴岗, 刘伟, 等. 人肋软骨细胞体外培养中生长代谢及功能的变化[J]. 中华整形外科杂志, 2004,20(5):372-376.
- IANNONE F, CORRADO A, GRATAGLIANO V, et al. Phenotyping of chondrocytes from human osteoarthritic cartilage: chondrocyte expression of beta integrins and correlation with anatomic injury. *Reumatismo.* 2001;53(2):122-130.
- KURKOV A, GULLER A, FAYZULLIN A, et al. Amiantoid transformation of costal cartilage matrix in children with pectus excavatum and pectus carinatum. *PLoS One.* 2021;16(1):e0245159.
- KATO Y, GOSPODAROWICZ D. Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J Cell Biol.* 1985;100(2):486-495.
- SATO K, MOY OJ, PEIMER CA, et al. An experimental study on costal osteochondral graft. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(2):172-183.
- 赵琴琴, 蔡震, 游晓波, 等. 不同性别不同层次肋软骨的生物力学性能研究[J]. 中华整形外科杂志, 2020,36(9):1042-1046.
- FORMAN JL, KENT RW. The effect of calcification on the structural mechanics of the costal cartilage. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2014;17(2):94-107.
- KIM A, MOON J, LIM SY, et al. The Interchondral Joints of Thorax in Microtia Surgery: Classification and Fabrication Strategies. *Ann Plast Surg.* 2021 Feb 1. doi: 10.1097/SAP.0000000000002582.
- 周志文, 鞠黎, 楼跃. 不同年龄软骨组织多肽的定量分析[J]. 中国组织工程研究, 2018,22(8):1178-1183.
- 吴迎, 王先成, 熊祥, 等. 70 例女性第 6-8 肋软骨组织量及钙化特点分析[J]. 中华整形外科杂志, 2019,35(8):764-771.
- GUO F, YU X, CHEN W, et al. Preliminary Analysis on Characteristics of Rib Cartilage Calcification in Patients With Congenital Microtia. *J Craniofac Surg.* 2019;30(1):e28-e32.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)