

## 单细胞转录组测序技术与椎间盘退变的发病机制

程浩天, 赵晓峰, 陆向东, 赵轶波, 范志峰, 齐德泰, 王晓楠, 周润田, 靳鑫杰, 赵斌

<https://doi.org/10.12307/2023.768>

投稿日期: 2022-10-13

采用日期: 2022-12-24

修回日期: 2023-02-11

在线日期: 2023-02-28

中图分类号:

R459.9; R318; R608

文章编号:

2095-4344(2024)01-00093-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读: 单细胞转录组测序技术在椎间盘退变发病中的应用

## 文章特点一

文章阐述了单细胞转录组测序技术的原理, 综述了其在椎间盘退变发病机制中的研究进展。

髓核及髓核细胞亚群

纤维环及纤维环细胞亚群

终板软骨细胞

免疫细胞

分析细胞间的异质性, 识别不同的细胞亚群, 对椎间盘退变的发病机制研究及分子治疗具有指导意义。

## 文题释义:

**单细胞转录组测序技术:** 指在单个细胞水平上对mRNA进行扩增和测序的一项技术, 能够揭示单个细胞的基因表达状态, 反映细胞间的异质性, 识别不同的细胞亚群, 已经被广泛应用于各个研究领域。**椎间盘退变:** 是椎间盘组织与年龄相关的生物力学改变, 是一系列脊柱退行性疾病的发病基础, 严重时会导致椎间隙高度丢失、髓核突出甚至脱出, 引起脊髓受压、神经根刺激症状, 若不及时干预, 将严重影响生活质量。

## 摘要

**背景:** 椎间盘退变在临床上被认为是引起下腰痛的主要病因, 但由于椎间盘退变发病机制尚不明确, 目前仍缺乏有效手段来延缓疾病进展。单细胞转录组测序技术可以在单个细胞水平对mRNA进行扩增和测序, 揭示单个细胞的基因表达强度, 根据细胞的异质性发现组织中的不同细胞亚群, 在分子水平上研究椎间盘退变的发病机制, 为其早期诊断和治疗提供新的理论依据。**目的:** 介绍了单细胞转录组测序技术的基本原理并综述了近年来单细胞转录组测序技术在椎间盘退变发病机制中的研究进展。**方法:** 应用计算机系统检索PubMed、Web of Science、中国知网和万方数据库中2012-2022年出版的文献, 英文检索词为: “single-cell RNA sequencing, intervertebral disc degeneration, sequencing technology”; 中文检索词为“单细胞转录组测序, 椎间盘退变, 测序技术”。排除重复、质量较差及不相关的文献, 最终纳入70篇文献进行综述分析。**结果与结论:** ①鉴定了稳态软骨样细胞、肥大软骨样髓核细胞、纤维髓核细胞等新型细胞亚群, 识别了这几种细胞亚群的标记基因、转录因子, 并阐述了这几种细胞亚群在椎间盘退变发生发展过程中的功能及分化轨迹和细胞命运, 同时提出了祖细胞概念, 确定了具备祖细胞特性的细胞亚群, 在小鼠体内验证了该细胞亚群治疗椎间盘退变的有效性。②识别了兼具软骨特性和纤维特性的纤维软骨样纤维环细胞和纤维环干细胞, 并在体外结合纤维软骨诱导剂和丝素蛋白及透明质酸制备了一种新型复合水凝胶, 通过小鼠体内实验验证了这种水凝胶既能修复纤维环组织也能恢复软骨基质, 对于椎间盘退变有显著治疗效果。③在终板软骨组织中发现了调节性软骨细胞, 其在椎间盘退变进展中出现2种截然不同的命运并明确了2种命运中的差异基因, 细胞间通讯分析表示调节性软骨细胞与内皮细胞之间互相作用从而促进血管生成。④在退变椎间盘组织中鉴定出巨噬细胞、T细胞、髓系祖细胞和嗜中性粒细胞等免疫细胞, 证明了椎间盘退变过程中存在免疫反应, 并发现载脂蛋白诱导了巨噬细胞M1和M2亚型的极化, 这种极化过程通过MIF信号通路放大炎症反应来影响髓核祖细胞的活性。**关键词:** 单细胞转录组测序; 椎间盘退变; 发病机制; 测序技术

## Single-cell RNA sequencing and the pathogenesis of intervertebral disc degeneration

Cheng Haotian, Zhao Xiaofeng, Lu Xiangdong, Zhao Yibo, Fan Zhifeng, Qi Detai, Wang Xiaonan, Zhou Runtian, Jin Xinjie, Zhao Bin

Second Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Cheng Haotian, Master candidate, Second Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

**Corresponding author:** Zhao Bin, MD, Chief physician, Second Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Intervertebral disc degeneration is clinically considered to be the main cause of low back pain, but due to the unclear pathogenesis of intervertebral disc degeneration, there is still a lack of effective means to delay the progression of the disease. Single-cell RNA sequencing technology can amplify and sequence mRNA at the single-cell level, reveal the gene expression intensity of a single cell, discover different cell subsets in tissues according to the heterogeneity of cells, study the pathogenesis of intervertebral disc degeneration at the molecular level, and provide a new theoretical basis for its early diagnosis and treatment.

山西医科大学第二临床医学院, 山西省太原市 030001

第一作者: 程浩天, 男, 1997年生, 黑龙江省绥化市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事脊柱外科学方向研究。

通讯作者: 赵斌, 博士, 主任医师, 山西医科大学第二临床医学院, 山西省太原市 030001

<https://orcid.org/0000-0001-5933-2657> (程浩天); <https://orcid.org/0000-0001-5360-6725> (赵斌)

基金资助: 山西省科技成果转化引导专项项目 (201904D121008), 项目负责人: 赵斌

引用本文: 程浩天, 赵晓峰, 陆向东, 赵轶波, 范志峰, 齐德泰, 王晓楠, 周润田, 靳鑫杰, 赵斌. 单细胞转录组测序技术与椎间盘退变的发病机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(1):93-99.



**OBJECTIVE:** To introduce the basic principles of single-cell RNA sequencing technology and review the research progress of single-cell RNA sequencing technology in intervertebral disc degeneration in recent years.

**METHODS:** A computer was used to search PubMed, Web of Science, CNKI and WanFang databases for the literature published from 2012 to 2022. Key words were "single-cell RNA sequencing, intervertebral disc degeneration, sequencing Technology" in Chinese and English. Duplicate, poor-quality and irrelevant articles were excluded; a total of 70 articles were eventually included.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) We identified new cell subsets such as homeostatic chondrocytes, hypertrophy chondrocyte-like nucleus pulposus cells and fibrous nucleus pulposus cells, identified the marker genes and transcription factors of these cell subsets, and described the functions, differentiation paths and cell fate of these cell subsets during the development and progression of intervertebral disc degeneration, and proposed the concept of progenitor nucleus pulposus cells. A cell subpopulation with progenitor nucleus pulposus cells properties was identified and its effectiveness in treating intervertebral disc degeneration was verified in mice. (2) Fibro chondrocyte-like annulus fibrosus cells and annulus fibrosus stem cells with both cartilage and fiber properties were identified, and a new type of composite hydrogel was prepared by combining fibrous cartilage inducers silk fibroin and hyaluronic acid *in vitro*. Experiments in mice demonstrated that this hydrogel could repair both annulus fibrosus tissue and cartilage matrix, and was remarkably effective in the treatment of intervertebral disc degeneration. (3) Regulatory chondrocytes were found in endplate cartilage. Two distinct fates in the progression of intervertebral disc degeneration were analyzed and the differential genes in the two fates were identified. Intercellular communication analysis indicated that regulatory chondrocytes interact with endothelial cells to promote angiogenesis. (4) Immune cells such as macrophages, T cells, myeloid progenitor cells and neutrophils were identified in the degenerated intervertebral disc tissues, demonstrating the existence of immune response during intervertebral disc degeneration. It was found that apolipoprotein induced the polarization of macrophages M1 and M2 subtypes, and this polarization process affected the activity of progenitor nucleus pulposus cells by amplifying the inflammatory response through the MIF signaling pathway.

**Key words:** single-cell RNA sequencing; intervertebral disc degeneration; pathogenesis; sequencing technology

**Funding:** Shanxi Provincial Special Project for the Transformation and Guidance of Scientific and Technological Achievements, No. 201904D121008 (to ZB)

**How to cite this article:** CHENG HT, ZHAO XF, LU XD, ZHAO YB, FAN ZF, QI DT, WANG XN, ZHOU RT, JIN XJ, ZHAO B. Single-cell RNA sequencing and the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(1):93-99.

## 0 引言 Introduction

下腰痛是肌肉骨骼系统的一种常见退行性疾病，几乎每个人在一生中都会发作下腰痛，根据 2017 年全球疾病负担研究的系统分析，下腰痛在 354 种疾病中致残率最高，可影响全球约 80% 的人口<sup>[1]</sup>，在美国，下腰痛导致的经济成本超过 1 000 亿美元<sup>[2]</sup>。椎间盘退变是引起下腰痛的主要原因之一，研究表明，椎间盘退变随着年龄的增长而自然发生，老年人椎间盘退变的患病率高达 90%<sup>[3]</sup>，机械创伤、生活方式改变和某些遗传因素可导致一些继发性疾病的发生<sup>[4]</sup>，如椎间盘突出症、椎管狭窄症等，引起腰痛、感觉异常、肢体无力等症状<sup>[5]</sup>，严重影响患者的生活质量，给家庭和社会经济带来了巨大负担。然而，目前对于椎间盘退变的发病机制尚不完全明确，其危险因素复杂多样，相关的部分学术观点也一直存在争议。椎间盘退变目前的治疗方案分为药物治疗、物理治疗和手术治疗，针对早期椎间盘退变，往往采用口服非类固醇类抗炎药、对乙酰氨基酚等，也可以联合热敷、按摩及各种伸展、协调性锻炼，旨在缓解症状、改善生活质量<sup>[6]</sup>。一旦保守治疗失败并出现伴有严重症状的椎间盘疾病（神经根性疼痛、间歇性跛行、退行性脊柱侧凸、马尾综合征等），需要进行手术治疗，目的是控制症状并尽量避免残疾，但其成本昂贵，且可能出现术后复发、脊柱活动性丢失、邻近节段退变等并发症<sup>[7]</sup>。目前仍缺乏预防椎间盘退变发生或延缓椎间盘退变进展的有效手段<sup>[8]</sup>。因此，探索椎间盘退变的分子发病机制，寻找新的诊断和预防手段来延缓椎间盘退变进展，一直是骨科脊柱领域研究的焦点问题。

自 2009 年单细胞转录组测序技术 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 首次出现，近年来吸引了大量国内外学者的关注，相关的测序技术及方法不断更新，已经成为了新的研究热点。传统的转录组分析是使用批量 RNA 测序技术 (bulk RNA-seq) 进行的，这是对一细胞群体的总 RNA 进行测序的方法，可以测量细胞群体中每个基因的平均表达水平，但却无法分析样本中的细胞异质性，对于基因表达的本质研究还不够深入，而 scRNA-seq 能对组织中的细胞进行独立分析，在单细胞水平上构建每个细胞的表达谱，揭示单个细胞的基因表达状态，反映细胞间的异质性，发现新的稀有细胞类型并识别不同的细胞亚群，深入了解细胞发育分化过程中的表达调控机制。目前 scRNA-seq 技术已经广泛应用于肿瘤、心血管病、免疫、神经科学等领域<sup>[9-11]</sup>，但有关椎间盘退变的研究尚处于起步阶段，部分学者使用 scRNA-seq 技术在椎间盘退变进展中识别了不同的细胞亚群，并提出这些细胞亚群可能在疾病不同时期中发挥功能，在分子层面上对椎间盘退变的治疗提出了新的思路。文章通过总结国内外相关文献，就椎间盘退变的发病机制、scRNA-seq 技术方法及其在椎间盘退变发病机制中的研究进展进行综述，以期对椎间盘退变的预防及治疗提供新的参考。

## 1 资料和方法 Data and methods

### 1.1 资料来源

- 1.1.1 检索人及检索时间 第一作者在 2022 年 9 月进行检索。
- 1.1.2 检索文献时限 2012 年 1 月至 2022 年 9 月。
- 1.1.3 检索数据库 中文数据库：中国知网、万方数据库；英文数据库：PubMed、Web of Science 数据库。
- 1.1.4 检索词 中文检索词：单细胞转录组测序、椎间盘退变、测序技术；英文检索词：single-cell RNA sequencing, intervertebral disc degeneration, sequencing technology。
- 1.1.5 检索文献类型 研究原著、综述和荟萃分析。
- 1.1.6 检索策略 见图 1。

PubMed 数据库	中国知网数据库
#1 Single-cell RNA sequencing[Title/Abstract]	#1 单细胞转录组测序
#2 Intervertebral disc degeneration[Title/Abstract]	#2 椎间盘退变
#3 Sequencing Technology[Title/Abstract]	#3 测序技术
#4 #1 OR #2 OR #3	#4 #1 OR #2 OR #3
#5 #1 AND #2	#5 #1 AND #2
#6 #2 AND #3	#6 #2 AND #3
#7 #1 AND #2 AND #3	#7 #1 AND #2 AND #3

图 1 | PubMed 数据库和中国知网数据库检索策略

- 1.1.7 检索文献量 中文文献 384 篇，英文文献 2 350 篇。
- 1.2 纳入标准 ①研究内容与椎间盘退变的发病机制相关；②研究内容与 scRNA-seq 基本原理相关；③研究内容与 scRNA-seq 在椎间盘退变中识别不同细胞亚群、探索发病机制、提出组织工程治疗思路密切相关。
- 1.3 排除标准 ①与文章主题相关性低的文献；②研究质量较差、证据等级较低的文献；③重复性研究。
- 1.4 质量评估 共检索到 2 734 篇相关文献，排除 2 664 篇，实际纳入 70 篇，中文 4 篇，英文 66 篇。检索流程见图 2。

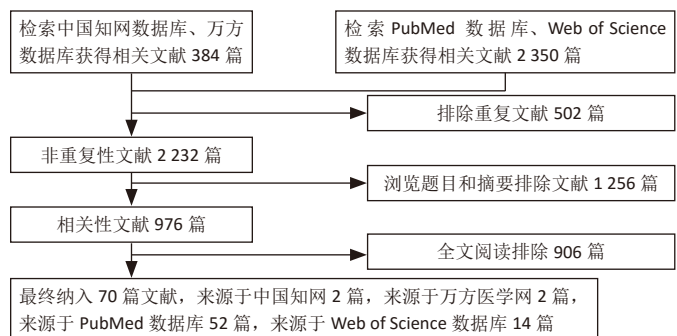


图 2 | 文献检索流程图

## 2 结果 Results

### 2.1 椎间盘退变概述

**2.1.1 正常椎间盘结构** 椎间盘是连接邻近椎体的纤维软骨组织，它通过脊柱传递由体质量和肌肉活动引起的轴向负荷，并在一定程度上维持脊柱的屈曲、伸展、侧弯和旋转等功能<sup>[12]</sup>。椎间盘由中央的髓核组织、外层的纤维环及上下软骨终板三部分组成，健康成人椎间盘中不含神经和血管。髓核组织是最重要的功能单位，在维持椎间隙高度和缓冲脊柱轴向负荷中起到关键作用<sup>[13]</sup>。髓核组织由髓核细胞和细胞外基质组成，髓核细胞负责维持细胞稳态<sup>[14]</sup>，可以合成并分泌蛋白聚糖、II型胶原等细胞外基质成分，其中 Aggrecan 是髓核细胞分泌最丰富的蛋白聚糖，可与透明质酸结合、聚集形成多聚体，富含带有负电荷的硫酸化基团侧链，通过调节渗透压来维持水合作用，保持髓核组织的亲水性，对脊柱承受的轴向负荷起缓冲作用。纤维环组织是由 15-25 个同心层组成的层状结构，可以划分为外层纤维环和内层纤维环，每层包含平行排列的 I 型胶原纤维和 II 型胶原纤维<sup>[15]</sup>，此外弹性蛋白纤维在胶原纤维之间创建了一个跨层桥接网络，具有强大的弹性和可膨胀性，在脊柱负荷期间抵抗椎间盘的横向扩张并维持完整的结构<sup>[16]</sup>。软骨终板位于椎体和椎间盘之间，约为 0.6 mm 厚，结构类似于透明关节软骨，能够通过毛细血管的弥散功能将营养物质运输至椎间盘内，维持了椎间盘内的正常代谢<sup>[17]</sup>。

**2.1.2 椎间盘退变发病机制** 椎间盘退变是由椎间盘生理结构变化引起的，随着年龄的增长持续进展。据报道，椎间盘退变的病因可能与遗传易感性、糖尿病、年龄、吸烟、感染、异常的生物力学负荷相关<sup>[18]</sup>，在影像学上表现为 T2 加权 MRI 上髓核组织的含水量减少，由高亮信号影转变为低信号黑影。根据影像学表现的不同，先后有学者依据髓核组织的信号强度、髓核组织与纤维环组织的界限及椎间隙高度分别提出了 Pfirrmann 分级和改良的 Pfirrmann 分级<sup>[19-20]</sup>，用来指示椎间盘退变的发展与变化。

目前多数学者认为，椎间盘退变发生的病理生理学机制可能与多种致病因素导致的细胞外基质合成/分解代谢失衡有关，见图 3，过度的机械负荷使 DNA 损伤，促进细胞衰老，导致转化生长因子  $\beta$ 、胰岛素样生长因子等合成代谢因子的分泌减少，抑制了细胞外基质的合成<sup>[21]</sup>，髓核细胞、纤维环细胞及免疫细胞（如巨噬细胞、T 细胞、嗜中性粒细胞等）产生炎症因子，如肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\alpha/\beta$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 17、白细胞介素 8、白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 10、干扰素  $\gamma$  和各种趋化因子<sup>[22]</sup>，这些炎症因子的激活诱导线粒体损伤，导致椎间盘组织能量供应不足<sup>[23]</sup>，同时促进细胞外基质分解酶的合成，如基质金属蛋白酶和聚蛋白多糖酶，促进了细胞外基质的降解，引起细胞外基质代谢的不平衡<sup>[24]</sup>。此外，过度的机械负荷和炎症刺激还会诱导氧化应激，产生大量活性氧，进一步加速细胞衰老并诱导细胞凋亡<sup>[25-26]</sup>。因椎间盘组织存在于无血管、高渗、缺氧的微环境中，产生的细胞废物无法得到彻底处理，这些刺激的积累使椎间盘微环境稳态进一步失调，还会损伤组织的自我更新能力，加速椎间盘退变的进展，形成恶性循环<sup>[27]</sup>。当椎间盘组织的结构发生严重改变时，椎间隙高度大量丢失，椎间盘失去其生物力学功能，纤维环组织开始出现裂隙，大量炎症因子聚集，促进脑源性神经营养因子、神经生长因子及血管内皮生长因子生成<sup>[28]</sup>，诱导椎间盘组织中新生血管形成和神经生长，这些炎症刺激的增加与神经血管生长引起的痛觉过敏导致了椎间盘源性疼痛。当纤维环组织的完整性被破坏，在长期椎间盘退变的条件下会引起椎间盘突出症、椎管狭窄症，从而出现神经压迫的症状如疼痛、麻木、无力等。

**2.2 scRNA-seq 技术方法** scRNA-seq 技术方法包括单细胞分离、mRNA 反转录及 cDNA 扩增、高通量测序、数据分析 4 个步骤<sup>[29]</sup>，见图 4，其中单细胞分离、mRNA 反转录及 cDNA 扩增是整个技术流程的重点，对最终结果的准确性起关键作用<sup>[30]</sup>。

**2.2.1 单细胞分离** scRNA-seq 的第一步是在样本中分离捕获单个细胞。常用的单细胞分离方法包括连续稀释 (serial dilution)、激光捕获显微切割 (laser capture microdissection, LCM)、荧光激活细胞分选 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 和微流控分选 (Microfluidics)<sup>[31]</sup>，见表 1。

**2.2.2 mRNA 反转录及 cDNA 扩增** 根据细胞类型的不同，单个细胞的 RNA 含量仅为 1-50 pg<sup>[37]</sup>，但高通量测序所需要的 DNA 样品量为 200 ng 以上，无法满足测序的要求，因此要将 mRNA 反转录为 cDNA 后进行扩增。

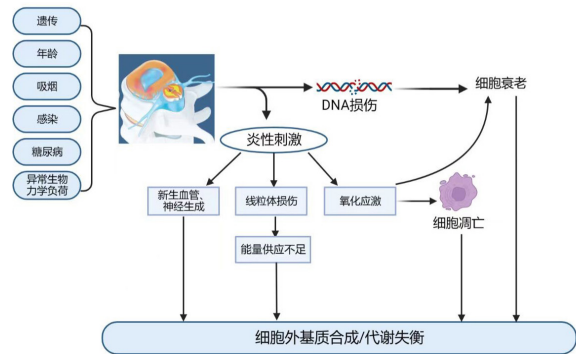


图 3 | 椎间盘退变的发病机制

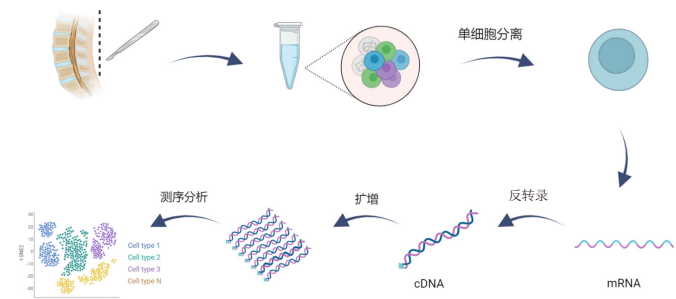


图 4 | 单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 的技术方法

表 1 | 单细胞分离方法

分离方法	原理	优缺点
连续稀释	连续稀释细胞群	操作简便，但精确度低、可重复性差
激光捕获显微切割 (LCM)	在显微镜下通过可视化直接对特定区域细胞进行精确切割，保留空间位置信息，但容易破坏细胞的完整性	对特定区域的细胞进行精确切割，保留空间位置信息，但容易破坏细胞的完整性 <sup>[32]</sup>
荧光激活细胞分选 (FACS)	将待测细胞制成单细胞悬液，通过荧光标记的方法对特定细胞进行分选	精确度高、通量高，但起始时需要大量细胞，在分选过程中易造成细胞损伤 <sup>[34]</sup>
微流控分选	将细胞分离至纳升级的微容器后捕获单个细胞	所需起始样本量低、通量高、成本低 <sup>[35-36]</sup>

在 cDNA 扩增过程中，为避免不等比例扩增造成的测序结果偏倚，特异性分子标签 (unique molecular identifiers, UMI) 被当前大部分 scRNA-seq 技术所应用，每个 UMI 分别代表一个单独的转录本，使每个细胞和基因的转录本数量被量化，以校正偏倚，提高定量准确性<sup>[38]</sup>。目前常用的单细胞转录组扩增方法有模板转换法扩增技术 (SMART-seq/SMART-seq2)、体外线性扩增技术 (CEL-seq/CEL-seq2)、大规模平行扩增技术 (MARS-seq)、微流体技术 (Drop-seq)，见表 2。

表 2 | 常用单细胞转录组测序技术 (scRNA-seq) 方法

技术名称	发表年份	第一作者	转录区域	特点
SMART-seq	2012	RAMSKÖLD <sup>[39]</sup>	全长	可以得到 cDNA 全长，提高转录本的测序覆盖率，但通量低、灵敏度低
SMART-seq2	2013	PICELLI <sup>[40]</sup>	全长	在保证转录本全长覆盖的基础上较 SMART-seq 灵敏度提高
CEL-seq	2012	HASHIMSHONY <sup>[41]</sup>	3' 端	采用线性扩增技术，较传统 PCR 技术灵敏度高
CEL-seq2	2016	HASHIMSHONY <sup>[42]</sup>	3' 端	在 CEL-seq 的基础上进一步提高了灵敏度，约为其 3 倍
MARS-seq	2014	JAITIN <sup>[43]</sup>	3' 端	通量大，可以同时检测多个细胞，在检测基因表达方面有较高的准确性 <sup>[44]</sup>
Drop-seq	2015	MACOSKO <sup>[45]</sup>	3' 端	快速、廉价、高通量，但测序深度较浅，通常每个细胞只能检测到 10%-50% 的转录组

(1) SMART-seq: SMART-seq 是一个具有里程碑意义的重要技术，由 RAMSKÖLD 等<sup>[39]</sup> 学者在 2012 年提出，在 cDNA 的 3' 末端添加几个超过模板的 C 碱基，再进行模板转换和 PCR 扩增得到 cDNA 全长。SMART-

seq技术的优势是可以提高转录本的测序覆盖率,但具有通量低、成本高、耗时长等缺点,且灵敏度不高,在实际中应用较少。SMART-seq2是在SMART-seq的基础上优化而来,在灵敏度和准确度上有所提高,降低了扩增偏向<sup>[40]</sup>。

(2) CEL-seq: HASHIMSHONY等<sup>[41]</sup>通过反转录带有poly-A尾巴的mRNA片段,利用体外转录(IVT)对mRNA进行线性扩增,获得足够的cDNA构建文库。这解决了以往mRNA提取量不足的问题,相比于传统的PCR扩增技术也具有更高的灵敏度。随后该研究者对CEL-seq进行改进研发出CEL-seq2,它通过使用3'端标记法显著提高了灵敏度<sup>[42]</sup>,大约是CEL-seq的3倍。

(3) MARS-seq: MARS-seq是一种自动化的scRNA-seq方法,由JAITIN等<sup>[43]</sup>学者提出,通过对来自目标样本的单个细胞进行荧光激活细胞分选,可以高效地识别不同组织和疾病的独特细胞类型。MARS-seq采用3'末端计数mRNA测序方法,可生成部分cDNA转录本(非全长),在初始反转录步骤中,cDNA在体外转录(IVT)汇聚和扩增之前使用UMI标记、定量单个细胞内单个基因的表达水平,从而减少扩增步骤带来的操作偏向,实现了cDNA扩增的多重检测,既简化了过程,又显著提高了样品通量,对复杂组织中的高效采样具有显著优势<sup>[44]</sup>。

(4) Drop-seq: MACOSKO等<sup>[45]</sup>学者开发了以微流控技术为基础的Drop-seq,他们利用微流控装置将带有UMI的oligo-dT引物和细胞一起装入微小的液滴,在各单管中平行进行反转录、PCR扩增,建立了快速、廉价、高通量的单细胞转录组测序方法,据报道其成本是荧光激活细胞分选的十分之一。但Drop-seq技术只能对3'端转录的mRNA进行测序,可能会有少量信息丢失。

2.2.3 高通量测序及平台 高通量测序技术可以对数百万个DNA同时进行测序<sup>[46]</sup>,主要有全长测序与基于标签测序2种方法。目前最常用的单细胞测序平台主要是10X Genomics公司的Chromium系统和BD公司的Rhapsody系统,此外还有ICELL8单细胞分析平台、Illumina® Bio-Rad®和Fluidigm C1单细胞全自动制备系统<sup>[47]</sup>。10X Genomics Chromium单细胞平台的测序原理与Drop-seq技术相似,基于微流控液滴捕获细胞,能高效地进行单细胞标记、测序和分析,在短时间内每个样本可以测得几万个细胞的转录组信息,在降低成本的同时显著提高了单细胞转录组测序分析的效率。

2.2.4 数据处理及分析 scRNA-seq数据处理及分析流程包括数据预处理(质量控制、归一化、数据标准化等)、细胞和基因水平的后续分析<sup>[48]</sup>。完成高通量测序后会产生大量基础数据,在scRNA-seq数据分析前必须严格过滤数据并进行质量控制,在预处理中把特异分子标签序列、连接序列、接头序列去除,并通过移除低质量碱基和被污染的DNA等来控制数据质量,提高了数据分析的精度及效率。数据标准化是预处理的关键步骤,直接关系到下游分析结果的可靠性,目前常用的方法是CPM、Scran、Seurat和Scater等<sup>[49]</sup>,通过这些统计学方法消除各单细胞文库之间的差异,降低因测序深度、表达模式不同而导致的偏向,提高数据的可信度<sup>[50]</sup>。细胞和基因水平的后续分析是利用生物信息学手段将所得到的数据进行过滤和可视化处理,基于过滤后获得高质量的细胞基因表达谱,对细胞进行差异基因表达的鉴定、降维分析、聚类分析、细胞轨迹推测、寻找marker基因、功能富集分析等。

### 2.3 scRNA-seq在椎间盘退变发病机制中的研究

2.3.1 髓核及髓核细胞亚群 髓核是位于椎间盘中心的凝胶状组织,因其细胞外基质中含有大量的蛋白聚糖而具有高水平的水合作用,为椎间盘提供了独特的生物力学特性。髓核细胞是球形的软骨样细胞,分布密度约为 $4 \times 10^6/cm^2$ ,目前被广泛认为是调控合成代谢和分解代谢并维持细胞外基质稳态的主要细胞群<sup>[51]</sup>,有学者认为,髓核细胞表型和功能的变化、髓核细胞的衰老及凋亡在诱导髓核组织失水和促进椎间盘退变进展方面起着重要作用。CHERIF等<sup>[52]</sup>学者对同一个体的非退变椎间盘和退变椎间盘进行了scRNA-seq分析,基于差异基因表达的聚类分析描绘了14个不同的细胞亚群,鉴定了大量与椎间盘退变相关的生物标志物,与非退变椎间盘相比,退变椎间盘中与氧化应激反应相关的线粒体基因(MT-CYB、MT-ND2)的表达量明显下降,提示氧化应激可能是椎间盘退变发展的重要机制,此外,该团队还提出了SPTSSB、S100A1、MGP和DCN等基因通过抑制细胞外基质分解酶的活性在炎症反应、离子转运和

预防组织损伤方面发挥重要作用,这些不同细胞类型及细胞亚群之间的特异性生物标志物和相互作用为椎间盘退变的治疗提出了具有潜在治疗靶点的新研究路径。

HAN等<sup>[53]</sup>通过scRNA-seq技术对正常髓核组织和退变髓核组织在基因组和转录组水平上进行分析,鉴定了稳态软骨样细胞(homeostatic chondrocytes, HomCs)并识别其上游调控因子FOS和JUN, HomCs是早期椎间盘退变细胞,功能富集于调节翻译过程及蛋白质/RNA代谢,面对拓扑不正确的蛋白质、温度异常、转化生长因子 $\beta$ 等细胞因子的刺激, HomCs具有显著的抗应激、维持细胞稳态的功能,能够有效地延缓椎间盘退变的进展。剖析细化细胞分化轨迹,研究发现了髓核组织中软骨样细胞在椎间盘退变进展中分化的2种截然不同的命运,命运2(F2-C)中的软骨样细胞过表达多种炎症趋化因子如CXCL2和CXCL8,上调了COL1A1、COL1A2、COL3A1和MMP13多种与细胞外基质分解相关的基因,这可能与干扰素信号通路的激活、IFIT1和IFIT2等基因的上调相关,通过发挥抗增殖和促凋亡作用来促进椎间盘退变进展,并提出干扰素诱导基因的上游调控成分JAK1/STAT1可能成为下一步从分子机制上治疗椎间盘退变的新靶点。

为了深入探究髓核细胞不同亚群与椎间盘退变发生发展的相关性, TU等<sup>[54]</sup>通过对8例椎间盘退变患者髓核组织的39 372个细胞进行了无偏转录的scRNA-seq分析,根据不同功能鉴定了髓核细胞的6个亚群,发现肥大软骨样髓核细胞(hypertrophy chondrocyte-like nucleus pulposus cells, HT-CLNPs)几乎存在于椎间盘退变全程,在其亚群HT-CLNPs-II中发现一种独特的细胞标志物CHRD2,可以通过竞争性抑制骨形态发生蛋白来抑制软骨细胞的发育,而其亚群HT-CLNPs-I中功能高度富集于抑制细胞凋亡、调节昼夜节律等通路,可以促进细胞外基质的合成,在椎间盘退变的进展过程中发挥潜在的保护作用,为椎间盘退变的治疗提供新的方向。纤维髓核细胞主要存在于IV级和V级退变髓核组织中,是晚期椎间盘退变细胞,其中纤维化相关基因CRTAC1、COL3A1和MMP2表达水平显著上调,可能通过促进细胞外基质分解、加速细胞衰老及凋亡发挥功能,纤维髓核细胞还可以在白细胞介素 $1\beta$ 介导下上调血管内皮生长因子的表达,从而促进椎间盘中的新生血管形成,这些新生血管的形成可以带来细胞因子、免疫细胞和神经生长因子,在加速椎间盘退变进展的同时引起慢性腰痛。为探究髓核组织是否存在祖细胞(progenitor nucleus pulposus cells, ProNPCs),该学者还进行了细胞分化轨迹分析,发现在髓核和纤维环交界区域内一类高表达CD90的髓核细胞,称之为CD90<sup>+</sup> NPCs,并通过实验验证CD90<sup>+</sup> NPCs可以分化为成骨细胞、脂肪细胞和其他髓核细胞亚型,在轻度退变个体中,CD90<sup>+</sup> NPCs具有较强的成软骨能力,因此可以认为CD90<sup>+</sup> NPCs具有祖细胞特性,但对于其起源、分化及生态位还需进一步研究。

GAO等<sup>[55]</sup>通过scRNA-seq技术发现一类表达尿紧张素II受体(urotensin II receptor, UTS2R)的髓核细胞群对细胞迁移、生长具有调控功能,谱系示踪表明UTS2R ProNPCs以其生态位因子tenascin-C(TNC)存在于髓核组织外围,产生功能性髓核细胞,经分析参与细胞分化、发育和稳态相关的几条信号通路(如转化生长因子 $\beta$ 、表皮细胞生长因子等),随后通过体内实验将UTS2R ProNPCs联合TNC移植到小鼠受伤的椎间盘中,结果发现治疗组可明显延缓椎间盘退变的进展,确定了具有祖细胞特性的UTS2R ProNPCs,为椎间盘退变的治疗提供新的线索和策略。这些结果为在单细胞分辨率和全转录组范围内鉴定髓核细胞亚群提供了新的见解,通过识别关键细胞亚群、祖细胞、信号通路和转录因子,模拟细胞亚群间的相互作用,深入了解细胞命运的确切,有效地为人类椎间盘退变发生发展相关的生物修复和医疗保健提供新的线索。

2.3.2 纤维环及纤维环细胞亚群 纤维环组织的承重功能由I型胶原蛋白和细胞外基质实现<sup>[56]</sup>,纤维环细胞外基质由纤维蛋白和软骨基质组成,当受到较高的机械应力时,纤维环细胞外基质的分解促进椎间盘退变发生<sup>[57]</sup>,长期的生物力学变化还会导致纤维环组织的急性撕裂,进一步引起椎间盘突出症。FERNANDES等<sup>[58]</sup>以正常髓核组织与纤维环组织为样本绘制2种不同细胞群的基因表达谱,通过scRNA-seq对差异基因表达及功能富集分析,发现纤维环细胞的标志转录因子FOXM1可以结合和激活其靶基因CENPF、CCNB1、CCNB2、KPNA2和PLK1来调节细胞周期和有丝分裂的进展,同时FOXM1也可以激活生存蛋白BIRC5,能够有

效抑制细胞凋亡,在维持健康纤维环细胞数量和活力方面发挥重要功能。KDM4E可能参与髓核细胞转录组细胞外基质相关基因的调控,进一步调节细胞外基质代谢,此外正常的髓核细胞可能通过表达DKK3抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路来预防椎间盘退变的发生。

WANG等<sup>[59]</sup>通过scRNA-seq技术绘制了小鼠的纤维环单细胞图谱,分析了纤维环细胞的异质性,确定了共表达纤维化标志物SP7和软骨标志物Sox9的纤维软骨样纤维环细胞(fibro chondrocyte-like annulus fibrosus cells, FcAFs)以及纤维环干细胞(annulus fibrosus stem cells, AFSCs),设计了一种可以在体外诱导AFSCs产生FcAFs的纤维软骨诱导剂,根据纤维环细胞外基质的双重特征,将纤维软骨诱导剂结合到甲基化的丝素蛋白和透明质酸中制备出一种可光固化的新型复合水凝胶,将其植入到椎间盘退变小鼠模型的纤维环组织中,可以促进损伤的纤维环层状组织修复,同时还能有效地恢复软骨基质,为椎间盘退变提供了新的组织工程治疗思路。

**2.3.3 终板软骨细胞** 软骨终板是位于椎间盘上下方的透明软骨,是椎体和椎间盘的连接部分,其功能是通过弥散机制为椎间盘供给营养<sup>[60]</sup>。软骨终板是中央凹陷式结构,作为椎体和椎间盘之间的压力传递器,在压力传递过程中软骨终板可以分散部分压力,当过度的机械负荷使软骨终板区域受损时,相邻椎间盘的营养供应明显受限,促进了椎间盘退变的发生<sup>[61]</sup>。为探究终板软骨细胞间的异质性,LI等<sup>[62]</sup>学者通过scRNA-seq技术对人体非退变椎间盘组织中的终板软骨进行分析,鉴定了调节性软骨细胞,并通过拟时序分析研究其分化轨迹,在调节性软骨细胞的发育、分化过程中发现了2种截然不同的命运,命运I的细胞功能富集于激活内在外在的凋亡信号通路、蛋白质复叠、促进血管生成等功能,诱导软骨终板的退变;命运II的细胞功能富集于促进成骨细胞分化、Ras蛋白信号转导和转录正向调节等功能,有助于软骨生长、维持稳态,而这2种命运受COL10A1、SPP1、IBSP、MT1G、MT1X、OGN等基因调控,研究学者认为维持这几种差异基因表达的平衡至关重要,一旦平衡状态被打破,可能发生不同的细胞功能和细胞命运。细胞间通讯分析还发现RegCs产生血管内皮生长因子A(VEGFA),通过旁分泌或自分泌的方式与内皮细胞中的血管内皮生长因子受体(VEGFA/KDR或VEGFA/FLT1信号通路)结合,这表明着调节性软骨细胞与内皮细胞之间的相互作用具有促血管生成的功能,进一步促进了椎间盘退变。因此,对于调节性软骨细胞更深层次的了解、靶向治疗的研究在将来可能成为减缓甚至逆转椎间盘退变的新方法。

**2.3.4 免疫细胞** 椎间盘已经被普遍认为是无免疫器官,有学者提出由纤维环、软骨终板组成的血液-髓核屏障将髓核组织从宿主免疫系统中分离出来,限制了免疫细胞和免疫介质进入髓核组织中引起炎症反应<sup>[63]</sup>。当血液-髓核屏障受损时,髓核组织会触发免疫反应,失去蛋白聚糖并变得纤维化<sup>[64]</sup>,同时基质金属蛋白酶和炎症因子如白细胞介素1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 等在椎间盘微环境中过量表达<sup>[65]</sup>,据报道,这些细胞因子是由免疫细胞产生,如巨噬细胞、CD8 T细胞等,促进椎间盘组织产生炎症疼痛并加速了椎间盘退变的进展。LEE等<sup>[66]</sup>在小鼠针刺椎间盘模型的组织学分析中发现椎间盘退变组有明显的巨噬细胞浸润,这与SILVA等<sup>[67]</sup>的研究结果是一致的,即巨噬细胞可能在白细胞介素1 $\beta$ 介导下调节蛋白聚糖和II型胶原相关基因的表达来干扰细胞外基质合成,诱导椎间盘的退变;WANG等<sup>[68]</sup>通过scRNA-seq技术推测在椎间盘退变的病理过程中产生了一种特殊类型的免疫微环境,募集到多种类型的巨噬细胞和调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs),这些免疫细胞通过转化生长因子 $\beta$ 和MAPK等信号通路调节ID1、PTPRK和RAP2C基因的异常表达,从而促进椎间盘的病理改变。

LING等<sup>[69]</sup>对3例Pfirsman II级、III级、IV级的人髓核组织进行scRNA-seq分析,鉴定了包括巨噬细胞、T细胞、髓系祖细胞和中性粒细胞在内的免疫细胞,功能分析显示这些免疫细胞大部分参与中性粒细胞活化、中性粒细胞脱颗粒、凋亡信号等相关通路。轨迹分析发现在椎间盘退变的进展过程中载脂蛋白诱导了M1型巨噬细胞的活化,M2型巨噬细胞的比例下降,这表明巨噬细胞M1和M2两种亚型的动态极化可能在放大炎症级联反应中发挥重要作用,通过细胞间的相互作用分析,研究者们推测核因子 $\kappa$ B介导的巨噬细胞极化可能通过MIF信号通路诱导炎症反应来影响髓核祖细胞的活性。总体而言,这些结果表明,椎间

盘退变过程中由免疫细胞介导的炎症性改变是一个复杂的过程,涉及多种细胞类型在疾病不同阶段的相互作用,了解椎间盘中的巨噬细胞积累、定位和表型转变可以提高对椎间盘退变病理生理学的了解,可能有助于确定未来的治疗靶点,见表3。

**表3 | 单细胞转录组测序技术(scRNA-seq)在椎间盘退变发病机制中的研究**

第一作者	发表年份	组织来源	细胞类型	主要成果与结论
CHERIF <sup>[52]</sup>	2022	人	髓核细胞	鉴定了大量与椎间盘退变进展相关的生物标志物,提出氧化应激可能是椎间盘退变发展的重要机制
HAN <sup>[53]</sup>	2022	人	髓核细胞	鉴定了稳态软骨样细胞并分析其具有抗应激、调节代谢的功能,提出了软骨样细胞的2种分化命运及相应的调控因子
TU <sup>[54]</sup>	2022	人	髓核细胞	识别了肥大软骨样髓核细胞和纤维髓核细胞并标记了相应的细胞标志物,初步识别了一类具有祖细胞特性的髓核细胞
GAO <sup>[55]</sup>	2022	小鼠	髓核细胞	在小鼠体内发现了一类髓核祖细胞并标记其生态位,通过小鼠体内实验验证其对椎间盘退变有显著治疗效果
FERNANDES <sup>[58]</sup>	2020	人	纤维环细胞	绘制了纤维环细胞的基因表达谱,识别了纤维环的标志性转录因子和靶基因,提出细胞凋亡是椎间盘退变发生的重要机制
WANG <sup>[59]</sup>	2022	小鼠	纤维环细胞	在小鼠体内鉴定了纤维软骨样纤维环细胞和纤维环干细胞,并以其为基础制备了新型水凝胶应用于小鼠椎间盘退变的治疗,取得了良好的疗效
LI <sup>[62]</sup>	2022	人	终板软骨细胞	鉴定了调节性软骨细胞并探索其2种相反的分化命运,识别了2种命运的调控基因,并发现调节性软骨细胞与内皮细胞相互作用从而促进血管生成
WANG <sup>[68]</sup>	2021	人	免疫细胞(来源于髓核组织)	识别了多种椎间盘退变发展过程中的免疫细胞,并推测了这些免疫细胞发挥作用的调控基因和相应通路
LING <sup>[69]</sup>	2022	人	免疫细胞(来源于髓核组织)	发现了在椎间盘退变进展中载脂蛋白通过调控巨噬细胞表型的极化放大炎症反应,进一步影响髓核祖细胞的活性来促进椎间盘退变发展

### 3 总结与展望 Summary and prospects

**3.1 既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题** 自DIAZ-HERNANDEZ等<sup>[70]</sup>首次将scRNA-seq技术应用于椎间盘退变领域以来,引导了大量学者的深入研究,近年来研究员们通过scRNA-seq技术取得了如下成果:①在获取的椎间盘样本中绘制单细胞图谱,明确了细胞类型,识别了新的细胞亚群,鉴定了不同的细胞标记物,分析了每个细胞中各个基因的表达强度;②剖析了细胞分化轨迹并发现分化过程中不同的细胞命运,同时鉴定不同细胞命运中的关键调控基因;③构建了细胞互作网络,明确细胞间的相互作用机制。随着测序技术的不断完善,研究的重心也会转移到对其他类型分子的测量和分析上,如DNA甲基化、染色质可及性以及蛋白质丰度等,此外单细胞多组学、空间转录组技术也是未来的一大热门方向。然而,如何整合这些不同的数据类型是将来所要面临的挑战。

**3.2 作者综述区别于他人他篇的特点** 在文献检索过程中作者发现,作为近年来的热点技术,scRNA-seq技术被国内外大量学者广泛应用于肿瘤、心血管病、免疫、神经科学等领域,但在椎间盘退变领域中研究较少,而且尚不全面、系统的文章将scRNA-seq技术在椎间盘退变领域的研究成果进行综述。此文详细介绍了scRNA-seq的技术方法,更加全面、深入地阐述了scRNA-seq技术在椎间盘退变发病机制领域的应用,并总结了多位学者近年来在椎间盘退变发生发展过程中发现的关键细胞亚群及调控基因,提出了可能存在的分子治疗靶点。

**3.3 综述的局限性** scRNA-seq技术目前仍存在局限性,成千上万个细胞的遗传物质组成的数据库所含数据量庞大,样本的制备及构建文库的成本高,分析起来更为复杂,所需时间及成本较高。scRNA-seq技术的另一个问题是在mRNA反转录和cDNA扩增时会造成转录样本的丢失,尤其是Drop-seq技术的测序深度较浅,通常每个细胞只能检测到10%-50%的转录组,这导致细胞中部分基因未被检测到,细胞间的基因表达

也会有明显误差。这些问题与挑战需要现存技术的更新和发展以及开发新的技术来解决。且该综述的内容是研究学者们对椎间盘退变发病机制的探索，目前这些研究成果尚未广泛应用于人类椎间盘退变的治疗中。

**3.4 综述的重要意义** 椎间盘由髓核、纤维环、软骨终板三部分组成，每个组成部分的细胞也有较强的异质性，传统的批量 RNA 测序技术 (bulk RNA-seq) 只能对一个细胞群体进行测序，在椎间盘组织中只能分析退变和非退变组织中的差异基因，但是对于细胞间异质性的分析，差异基因的来源和定位、新型细胞亚群的识别、转录因子的发现、细胞分化轨迹的探索是不足的，而通过 scRNA-seq 就能很好地解决这些问题，尤其是细胞亚群、差异基因和细胞标志物的鉴定具有重要意义。

该文章介绍了 scRNA-seq 技术的基本原理，综述了 scRNA-seq 技术在椎间盘退变发病机制中的国内外研究进展。髓核细胞是调控细胞外基质合成和分解代谢的重要功能单位，被普遍认为是椎间盘退变发病中的关键因素，多位学者通过 scRNA-seq 技术鉴定了髓核细胞的多个细胞亚群，如稳态软骨样细胞、肥大软骨样髓核细胞、纤维髓核细胞，揭示了各细胞亚群的功能状态，阐述了细胞亚群表型转变的调控因素，发现了多个在椎间盘退变进展中异常表达的靶标基因、转录因子，推测了多条可能参与其中的信号通路，同时深入探索具备高分化、增殖能力的髓核祖细胞。此外，纤维环细胞外基质的损失也会导致纤维环组织纤维化，终板软骨细胞的退变可能会导致营养供应受限，免疫细胞的激活和浸润是导致椎间盘微环境中炎症因子产生的原因，通过 scRNA-seq 技术对纤维环细胞、终板软骨细胞和免疫细胞进行分析，既寻找了纤维环细胞中的新型细胞亚群，并以其为基础研制椎间盘退变的组织工程治疗方案，又剖析了终板软骨细胞中调节性软骨细胞的分化轨迹及命运，认为调节性软骨细胞作为关键细胞亚群可能发挥促进和减缓椎间盘退变的双重作用，还分析了椎间盘退变发展过程中不同免疫细胞的功能，推测出巨噬细胞的动态极化在椎间盘退变发展过程中放大了炎症反应。

临床上椎间盘退变的发病机制多种多样且尚无定论，早期通常采用非手术治疗手段，往往出现严重症状时进行手术干预，对于早期的椎间盘退变目前缺乏延缓、终止甚至逆转疾病进展的有效手段，文章综述了多个在椎间盘退变中的关键细胞亚群，以期能够更加深入地了解椎间盘退变的发病机制，未来能够通过关键细胞亚群及其调控基因制定靶向治疗方案。

**3.5 课题专家组对未来的建议** 尽管目前 scRNA-seq 技术仍存在局限性、挑战性，但其在椎间盘退变领域已经取得了一定的研究成果，下一步应继续改善 scRNA-seq 的技术方法，结合单细胞多组学、空间转录组等技术应用于椎间盘退变领域研究中，并根据这些研究制定个性化的治疗方案，开发以分子机制为基础的治疗策略，必要时可以联合 3D 打印手段重建椎间盘的生理结构和生物力学特性，实现精准靶向治疗。

**作者贡献:** 程浩天负责综述构思设计，陆向东、赵轶波、赵晓峰负责文章写作校对，范志峰、齐德泰、王晓楠、周润田、靳鑫杰参与文献收集、分析总结，赵斌负责项目指导。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南); 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-1858.

[2] BELITSKAYA-LEVY I, CLARK JD, SHIH MC, et al. Treatment Preferences for Chronic Low Back Pain: Views of Veterans and Their Providers. *J Pain Res*. 2021;14:161-171.

[3] SAFIRI S, KOLAHI AA, CROSS M, et al. Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years Due to Musculoskeletal Disorders for 195 Countries and Territories 1990-2017. *Arthritis Rheumatol*. 2021;73(4):702-714.

[4] KRUT Z, PELLED G, GAZIT D, et al. Stem Cells and Exosomes: New Therapies for Intervertebral Disc Degeneration. *Cells*. 2021;10(9):2241.

[5] YANG S, ZHANG F, MA J, et al. Intervertebral disc ageing and degeneration: The antiapoptotic effect of oestrogen. *Ageing Res Rev*. 2020;57:100978.

[6] THOMPSON T, DIAS S, POULTER D, et al. Efficacy and acceptability of pharmacological and non-pharmacological interventions for non-specific chronic low back pain: a protocol for a systematic review and network meta-analysis. *Syst Rev*. 2020;9(1):130.

[7] HEINDEL P, TUCHMAN A, HSIEH PC, et al. Reoperation Rates After Single-level Lumbar Discectomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017;42(8):E496-E501.

[8] DOWDELL J, ERWIN M, CHOMA T, et al. Intervertebral Disk Degeneration and Repair. *Neurosurgery*. 2017;80(3S):S46-S54.

[9] FILBIN MG, TIROSH I, HOVESTADT V, et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science*. 2018;360(6386):331-335.

[10] SKELLY DA, SQUIERS GT, MCLELLAN MA, et al. Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Rep*. 2018;22(3):600-610.

[11] SHAH PT, STRATTON JA, STYKEL MG, et al. Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell*. 2018;173(4):1045-1057.e9.

[12] MOLLADAVOODI S, MCMORRAN J, GREGORY D. Mechanobiology of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells in intervertebral discs. *Cell Tissue Res*. 2020;379(3):429-444.

[13] KHAN AN, JACOBSEN HE, KHAN J, et al. Inflammatory biomarkers of low back pain and disc degeneration: a review. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1410(1):68-84.

[14] MORRIS H, GONÇALVES CF, DUDEK M, et al. Tissue physiology revolving around the clock: circadian rhythms as exemplified by the intervertebral disc. *Ann Rheum Dis*. 2021;80(7):828-839.

[15] GHEZELBASH F, ESKANDARI AH, SHIRAZI-ADL A, et al. Modeling of human intervertebral disc annulus fibrosus with complex multi-fiber networks. *Acta Biomater*. 2021;123:208-221.

[16] KHAN AN, JACOBSEN HE, KHAN J, et al. Inflammatory biomarkers of low back pain and disc degeneration: a review. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1410(1):68-84.

[17] VADALÀ G, AMBROSIO L, RUSSO F, et al. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and Intervertebral Disc Microenvironment: From Cell Therapy to Tissue Engineering. *Stem Cells Int*. 2019;2019:2376172.

[18] RISBUD MV, SHAPIRO IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):44-56.

[19] PFIRRMANN CW, METZDORF A, ZANETTI M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873-1878.

[20] GRIFFITH JF, WANG YX, ANTONIO GE, et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(24):E708-E712.

[21] WANG F, CAI F, SHI R, et al. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(3):398-408.

[22] HIYAMA A, SUYAMA K, SAKAI D, et al. Correlational analysis of chemokine and inflammatory cytokine expression in the intervertebral disc and blood in patients with lumbar disc disease. *J Orthop Res*. 2022;40(5):1213-1222.

[23] SONG Y, LU S, GENG W, et al. Mitochondrial quality control in intervertebral disc degeneration. *Exp Mol Med*. 2021;53(7):1124-1133.

[24] LI Z, CHEN X, XU D, et al. Circular RNAs in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif*. 2019;52(6):e12704.

- [25] WANG B, KE W, WANG K, et al. Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Activated by Matrix Stiffness Regulates Oxidative Stress-Induced Senescence and Apoptosis in Human Intervertebral Disc Degeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:8884922.
- [26] WANG J, XIA D, LIN Y, et al. Oxidative stress-induced circKIF18A downregulation impairs MCM7-mediated anti-senescence in intervertebral disc degeneration. *Exp Mol Med*. 2022;54(3): 285-297.
- [27] NASTO LA, ROBINSON AR, NGO K, et al. Mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res*. 2013;31(7):1150-1157.
- [28] STEFANAKIS M, AL-ABBASI M, HARDING I, et al. Annulus fissures are mechanically and chemically conducive to the ingrowth of nerves and blood vessels. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(22):1883-1891.
- [29] KOLODZIEJCZYK AA, KIM JK, SVENSSON V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Cell*. 2015;58(4):610-620.
- [30] LIU T, WU H, WU S, et al. Single-Cell Sequencing Technologies for Cardiac Stem Cell Studies. *Stem Cells Dev*. 2017;26(21):1540-1551.
- [31] MURPHY TW, ZHANG Q, NALER LB, et al. Recent advances in the use of microfluidic technologies for single cell analysis. *Analyst*. 2017; 143(1):60-80.
- [32] AGUILAR-BRAVO B, SANCHO-BRU P. Laser capture microdissection: techniques and applications in liver diseases. *Hepatol Int*. 2019;13(2): 138-147.
- [33] ESPINA V, WULFKUHLE JD, CALVERT VS, et al. Laser-capture microdissection. *Nat Protoc*. 2006;1(2):586-603.
- [34] CAI Y, WANG J, ZOU K. The Progresses of Spermatogonial Stem Cells Sorting Using Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):94-102.
- [35] ZHOU WM, YAN YY, GUO QR, et al. Microfluidics applications for high-throughput single cell sequencing. *Nanobiotechnology*. 2021;19(1):312.
- [36] ZHANG X, LI T, LIU F, et al. Comparative Analysis of Droplet-Based Ultra-High-Throughput Single-Cell RNA-Seq Systems. *Mol Cell*. 2019; 73(1):130-142.e5.
- [37] 孙睿男, 王佐林. 单细胞转录组测序技术进展及其在间充质干细胞研究中的应用 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2019,29(3):174-179.
- [38] POTTER SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(8):479-492.
- [39] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*. 2012;30(8):777-782.
- [40] PICELLI S, BJÖRKLUND ÅK, FARIDANI OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*. 2013; 10(11):1096-1098.
- [41] HASHIMSHONY T, WAGNER F, SHER N, et al. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep*. 2012;2(3):666-673.
- [42] HASHIMSHONY T, SENDEROVICH N, AVITAL G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol*. 2016;17:77.
- [43] JAITIN DA, KENIGSBERG E, KEREN-SHAUL H, et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science*. 2014;343(6172):776-779.
- [44] SEE P, LUM J, CHEN J, et al. A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front Immunol*. 2018;9:2425.
- [45] MACOSKO EZ, BASU A, SATIJA R, et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*. 2015;161(5):1202-1214.
- [46] HEDLUND E, DENG Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications. *Mol Aspects Med*. 2018;59: 36-46.
- [47] 周健, 张子安, 赵海波, 等. 单细胞转录组测序技术在骨关节炎中的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021,29(7):628-631.
- [48] LUECKEN MD, THEIS FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 2019;15(6):e8746.
- [49] STUART T, BUTLER A, HOFFMAN P, et al. Comprehensive integration of single-cell data. *Cell*. 2019;177(7):1888-1902.e21.
- [50] 李琳, 钱四化, 吕天琦, 等. 新一代测序技术的文库制备方法研究进展 [J]. *应用化学*, 2021,38(1):11-23.
- [51] SILAGI ES, SHAPIRO IM, RISBUD MV. Glycosaminoglycan synthesis in the nucleus pulposus: Dysregulation and the pathogenesis of disc degeneration. *Matrix Biol*. 2018;71-72:368-379.
- [52] CHERIF H, MANNARINO M, PACIS AS, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Cells from Degenerating and Non-Degenerating Intervertebral Discs from the Same Individual Reveals New Biomarkers for Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3993.
- [53] HAN S, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Single-Cell RNA Sequencing of the Nucleus Pulposus Reveals Chondrocyte Differentiation and Regulation in Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:824771.
- [54] TU J, LI W, YANG S, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals Multicellular Ecosystem of Nucleus Pulposus during Degeneration Progression. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(3):e2103631.
- [55] GAO B, JIANG B, XING W, et al. Discovery and Application of Postnatal Nucleus Pulposus Progenitors Essential for Intervertebral Disc Homeostasis and Degeneration. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(13):e2104888.
- [56] TAVAKOLI J, DIWAN AD, TIPPER JL. Advanced Strategies for the Regeneration of Lumbar Disc Annulus Fibrosus. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(14):4889.
- [57] CHU G, SHI C, WANG H, et al. Strategies for Annulus Fibrosus Regeneration: From Biological Therapies to Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:90.
- [58] FERNANDES LM, KHAN NM, TROCHEZ CM, et al. Single-cell RNA-seq identifies unique transcriptional landscapes of human nucleus pulposus and annulus fibrosus cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):15263.
- [59] WANG H, WANG D, LUO B, et al. Decoding the annulus fibrosus cell atlas by scRNA-seq to develop an inducible composite hydrogel: A novel strategy for disc reconstruction. *Bioact Mater*. 2022;14:350-363.
- [60] 张艳琳, 黄国付, 邹璟, 等. 终板软骨细胞衰老在腰椎间盘突出中的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2022,51(7):173-176,134.
- [61] XIAO L, NI C, SHI J, et al. Analysis of Correlation Between Vertebral Endplate Change and Lumbar Disc Degeneration. *Med Sci Monit*. 2017;23:4932-4938.
- [62] LI W, ZHANG S, ZHAO Y, et al. Revealing the Key MSCs Niches and Pathogenic Genes in Influencing CEP Homeostasis: A Conjoint Analysis of Single-Cell and WGCNA. *Front Immunol*. 2022;13:933721.
- [63] SUN Z, LIU B, LUO ZJ. The Immune Privilege of the Intervertebral Disc: Implications for Intervertebral Disc Degeneration Treatment. *Int J Med Sci*. 2020;17(5):685-692.
- [64] BRIDGEN DT, FEARING BV, JING L, et al. Regulation of human nucleus pulposus cells by peptide-coupled substrates. *Acta Biomater*. 2017;55: 100-108.
- [65] WANG Y, CHE M, XIN J, et al. The role of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother*. 2020;131: 110660.
- [66] LEE S, MILLECAMP S, FOSTER DZ, et al. Long-term histological analysis of innervation and macrophage infiltration in a mouse model of intervertebral disc injury-induced low back pain. *Orthop Res*. 2020; 38(6):1238-1247.
- [67] SILVA AJ, FERREIRA JR, CUNHA C, et al. Macrophages Down-Regulate Gene Expression of Intervertebral Disc Degenerative Markers Under a Pro-inflammatory Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:1508.
- [68] WANG L, HE T, LIU J, et al. Revealing the Immune Infiltration Landscape and Identifying Diagnostic Biomarkers for Lumbar Disc Herniation. *Front Immunol*. 2021;12:666355.
- [69] LING Z, LIU Y, WANG Z, et al. Single-Cell RNA-Seq Analysis Reveals Macrophage Involved in the Progression of Human Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:833420.
- [70] DIAZ-HERNANDEZ ME, KHAN NM, TROCHEZ CM, et al. Derivation of notochordal cells from human embryonic stem cells reveals unique regulatory networks by single cell-transcriptomics. *J Cell Physiol*. 2020;235(6):5241-5255.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)