

基于单细胞转录组测序分析构建花斑裸鲤三种造血器官细胞图谱

寇若彬^{①②} 刘丹^① 高强^① 晁燕^③ 张存芳^① 聂苗苗^①
贾军梅^① 谭瑾^{①②} 郭守全^{①②} 姚占雯^{①②} 祁得林^{①*}

① 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 西宁 810016; ② 青海大学生态环境工程学院

西宁 810016; ③ 青海大学农牧学院动物科学系 西宁 810016

摘要: 利用单细胞转录组测序技术在细胞水平探究花斑裸鲤 (*Gymnocypris eckloni*) 肾、肝和脾三种造血器官中的细胞组成类型, 系统描绘花斑裸鲤这三种造血器官的细胞图谱, 为进一步研究花斑裸鲤造血系统发育, 尤其是红细胞发育积累科学数据。研究方法包括花斑裸鲤肾、肝和脾三种造血器官的单细胞悬液制备、单细胞 RNA-seq 文库构建、测序以及降维聚类分析、细胞注释、差异基因分析和功能富集分析。结果表明, 花斑裸鲤三种造血器官内存在类型丰富的细胞, 包括红细胞、中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、树突状细胞、上皮细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、肌细胞、成纤维细胞、单核细胞和神经细胞。在三种器官中细胞分布存在较大的异质性: 脾中参与发挥红细胞功能的细胞群分布占比较大; 肾中参与免疫反应的细胞群分布占比较大; 肝中血管内皮细胞和肌细胞分布占比较大。在功能方面, 花斑裸鲤与多数硬骨鱼类相似, 它的肾、脾和肝不仅参与造血及红细胞的发育, 而且对于免疫系统的发育和应答等过程也发挥一定作用。本研究从单细胞角度对花斑裸鲤造血系统发育研究进行了一定的补充与完善, 展现了三种造血器官中细胞分布的特征与差异, 对于后续进一步预测花斑裸鲤的红细胞发育路径提供了一定的研究基础。

关键词: 单细胞转录组测序; 造血系统发育; 细胞图谱; 花斑裸鲤

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 01-069-11

Generating Cellular Atlases of Three Haematopoietic Organs of the *Gymnocypris eckloni* using Single-Cell RNA Sequencing

KOU Ruo-Bin^{①②} LIU Dan^① GAO Qiang^① CHAO Yan^③ ZHANG Cun-Fang^①
NIE Miao-Miao^① JIA Jun-Mei^① TAN Jin^{①②} GUO Shou-Quan^{①②}
YAO Zhan-Wen^{①②} QI De-Lin^{①*}

① State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016;

② College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016;

基金项目 青海省自然科学基金项目 (No. 2020-ZJ-907), 国家自然科学基金项目 (No. 31960127);

* 通讯作者, E-mail: delinqi@126.com;

第一作者介绍 寇若彬, 女, 硕士研究生; 研究方向: 生态学; E-mail: krb18009712507@163.com.

收稿日期: 2023-12-19, 修回日期: 2024-06-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202523233 CSTR: 32109.14.cjz.23233

③ *Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016, China*

Abstract: [Objectives] Single-cell RNA sequencing was used to investigate the cellular composition of the three hematopoietic organs—kidney, liver, and spleen of *Gymnocypris eckloni*. The study aims to systematically map the cellular composition of these organs, and to accumulate scientific data for the study of the haematopoietic system, particularly erythropoiesis, in this species. **[Methods]** Single-cell suspensions were prepared and sequenced using single cell RNA sequencing software to clarify the characteristics and differences in the distribution of cells in the haematopoietic organs and to construct a preliminary cellular atlas of the haematopoietic organs of *G. eckloni*. **[Results]** Cells within the three organs of *G. eckloni* were initially classified into 16 subpopulations based on the sequencing results (Fig. 2). This, combined with the expression of the top 20 differentially expressed genes and known marker genes for each cell population, identified a variety of cell types. These included erythrocytes, neutrophils, T cells, B cells, dendritic cells, epithelial cells, macrophages, vascular endothelial cells, myoblasts, fibroblasts, monocytes and neuronal cells. There is considerable heterogeneity in the distribution of cells in the three organs (Fig. 4). The *G. eckloni* had a relatively large distribution of cell populations involved in erythrocyte functions, the kidney had a relatively large distribution of cell populations involved in the immune response, and the liver had a relatively large distribution of vascular endothelial cells and myocytes. **[Conclusion]** The similarity to the haematopoietic cell types of the Zebrafish *Danio rerio* demonstrates the high conservation of haematopoietic cell development and evolution. According to functional enrichment analysis, *G. eckloni*, like most scleractinian fishes, has kidneys, spleen and liver, which are not only involved in haematopoiesis and erythropoiesis, but also play roles in immune system development, response and other processes. Meanwhile, the present study complements and improves the study of the haematopoietic phylogeny of *G. eckloni* from a single-cell perspective, shows the characteristics and differences of cell distribution in different haematopoietic tissues, and provides a certain research basis for further predicting the developmental path of erythrocytes in *G. eckloni*.

Key words: Single-cell RNA sequencing; Haematopoietic phylogeny; Cell mapping; *Gymnocypris eckloni*

造血系统是指生物体内制造血液的整个系统，由造血器官、造血组织和造血细胞组成。造血系统是生物体内重要且复杂的动态系统，是支持机体正常生理活动的重要组成部分，可根据机体生理需要和外界影响因素进行严格调控并维持动态平衡，从而为机体源源不断地提供各种功能不同的血细胞（Watcham et al. 2019）。造血系统的发育是胚胎发育过程中的重要环节之一，其发育异常会导致血液系统发育缺陷及造血功能紊乱，造成红细胞的结构或功能异常，进而引发多种血液疾病的发生，如溶血性贫血、地中海贫血、镰刀形贫血、不稳定血红蛋白病、家族性红细胞增多症和血红蛋白

M 病等（Lorenzo et al. 1994, Gordeuk et al. 2005）。

肾是鱼类体内重要的造血免疫器官，主要由淋巴细胞、网状细胞、单核细胞、颗粒细胞和巨噬细胞等组成（王新栋 2018）。南方鲇（*Silurus meridionalis*）的肾可分为内分泌区、淋巴细胞聚集区和颗粒细胞聚集区（岳兴建等 2008）。花鲈（*Lateolabrax maculatus*）的肾有丰富的血窦，且窦腔比较大，实质也分为淋巴细胞聚集区和粒细胞聚集区（马燕梅等 2008）。有些硬骨鱼，如斑马鱼（*Danio rerio*）的肾在不同年龄段的组成成分上存在一定差异，2 月龄的斑马鱼肾前端开始退化，由大量的淋巴细

胞和血窦代替，1 年龄斑马鱼的肾中肾小管退化至完全消失，说明 1 年龄斑马鱼肾主要功能是造血和参与免疫应答（初小雅 2016）。鱼类肝有发达的血液循环系统，供血丰富。肝的功能血管——门静脉，汇集来自胃肠、胰腺和脾等器官的大量血液进入肝，使肝成为处理消化产物、防御外源有害物质的第一个处理中心和第一道屏障（Hinton et al. 1990）。鱼类的脾是重要的造血器官。尽管鱼类脾的形态结构在不同种类中有一定的差异，但一般都有与造血功能密切相关的网状组织、红髓、白髓以及发达的血管网。此外，鱼类脾也行使免疫功能，在非特异性和特异性免疫体系中的作用弱于肾，居于次要地位（Dalmo et al. 1997）。

随着人类细胞图谱计划（human cell atlas project, HCA）的推进和单细胞测序技术的不断更新，使得各种参与机体生命活动的细胞逐渐展现，促使人们从单细胞水平以更为精准、更为完善的方式了解机体细胞，进而能够更为准确地认知各种生命现象及生命过程（陈仲扬等 2022）。单细胞测序技术已经在诸多领域取得了大量突破性成果，尤其在造血系统研究中进行了成功应用，揭示了造血细胞的异质性，绘制了多个血液相关的细胞图谱，重建了发育分化的调控网络（王军平等 2021）。单细胞测序技术不仅能够验证造血系统研究中的经典理论体系，还能结合细胞的动态变化全面解析各类细胞的发育历程和功能，进一步为临床鉴别诊断血液相关疾病提供更为精确的指导。

花斑裸鲤（*Gymnocypris eckloni*）隶属鲤形目（Cypriniformes）鲤科（Cyprinidae）裂腹鱼亚科（Sohizothoracinae）裸鲤属（武云飞等 1982），是裂腹鱼亚科鱼类的代表种之一，广布于黄河兰州以上干支流及柴达木盆地各水系，是黄河上游水域中生物多样性的重要组成部分（祁得林 2009）。作为青海省重要的水生野生动物种质资源，花斑裸鲤不仅在高原淡水生态系统的食物链中具有重要地位，而且其肉质细嫩、营养丰富，因此具有很高的生态保护价值

和开发利用价值（李华等 2014）。目前，随着单细胞测序技术的不断更新，人体内红细胞的发育分化路径已经比较清晰（Tusi et al. 2018），但由于对红细胞发育的探索多以模式生物为研究对象（Dong et al. 2020, Xia et al. 2021），对非模式物种红细胞的发育分化有待验证和深入分析。因此，本研究以花斑裸鲤为研究对象，利用单细胞转录组测序技术在单细胞水平探究其肾、肝和脾三种造血器官中红细胞分布的特征与差异，聚类鉴定造血器官内包含的细胞亚群，系统描绘花斑裸鲤造血器官细胞图谱，进一步分析各细胞亚群发挥的生物学功能，为后续红细胞发育及造血系统发育等研究积累科学数据。

1 材料与方法

实验选取 3⁺龄的雌性花斑裸鲤 1 尾，体长为 25.47 cm，体重为 120.54 g。实验用鱼来自青海大学冷水鱼循环水养殖中心，养殖水温（15 ± 1）℃，溶解氧（7.8 ± 0.5）mg/L。

1.1 单细胞悬液制备及建库测序

样品采集 实验前采用浓度为 180 mg/L 的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐麻醉实验用鱼（韩光明等 2015），解剖并采集肾、脾及肝，将取下的样品用预冷的 PBS 洗 2 或 3 次，转移到无菌无 RNase 培养皿中，用手术剪剪成小块（约 0.5 mm²），再次用 PBS 洗净，尽量去除血迹、脂肪层和结缔组织等非目的组织。

单细胞悬液制备 将上述处理后的组织样本进行消化分解。当消化液变浑浊且样品消失时，孵育结束。然后用 40 μm 细胞筛过滤。细胞悬浮液在 4 °C 300 r/min 下离心 5 min。弃去上清液，在离心管中加入适量 PBS 使细胞重新悬浮。4 °C 孵育 5 ~ 10 min，结束后立即 4 °C 300 r/min 离心 5 min，去上清液，加入适量 PBS 使细胞充分重悬备用。

建库与测序 将上述处理备用的单细胞悬浮液，通过细胞计数仪进行细胞计数和细胞活率测定，细胞活性大于 85%，团聚小于 15%。达到最终细胞浓度和活性后，将细胞置于冰上，

在 30 min 内进行单细胞测序芯片上机实验。使用 Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 在 Chromium Controller 上制备单细胞 RNA-seq 文库并进行转录组测序。此部分单细胞文库构建及转录组测序交由百迈克生物科技有限公司进行。

1.2 单细胞转录组测序数据处理及分析

数据处理 对测序数据的处理与分析方法主要参考文献(陈仲扬等 2022, 张成鹏 2022, 王胜涛等 2023)。使用 Cell Ranger 软件(v2.1.1)对下机数据进行预处理及基因表达定量与细胞鉴定。为了更加准确地分析细胞表达结果,利用 Seurat 软件对上述结果进一步筛选,用高质量的表达数据再次进行细胞分群和差异表达基因分析。

降维聚类 质控后的数据经过标准化、筛选高变异基因和归一化处理后,利用主成分分析法(principal component analysis, PCA)提取对表达谱影响最大的基因,进行一定的数据映射转换,作为反映所有基因表达量的低维表示,确定可用于聚类的差异主成分。为了更好地可视化降维结果,对 PCA 结果进一步降维。通过共享近邻(shared nearest neighbor, SNN)聚类算法、t-分布随机邻近嵌入(t-stochastic neighbor embedding, t-SNE)的非线性降维算法与统一流形逼近与投影(uniform manifold approximation and projection, UMAP),进行细胞聚类,实现聚类结果的可视化分析。先基于 SNN 聚类算法对细胞进行聚类和分群,构建细胞间的聚类关系。然后将降维后的数据传递到 t-SNE 与 UMAP 进行可视化展示,细胞之间的基因表达模式越相似,在 t-SNE、UMAP 图中的距离也越接近。

差异分析 通过聚类分析将相似的细胞进行归类之后,进行不同分类间的差异表达基因分析。在特定一类细胞中显著表达的基因通常可以作为该类细胞的 marker 基因,根据不同类型细胞 marker 基因的表达水平、不同样本表

达的差异基因以及基因的功能富集情况,确定该类别的细胞类型。通过 Seurat(4.0.1)中的 FindAllMarkers 函数,使用默认参数的“bimod”确定每个聚类的标记基因。从计算结果中筛选确定各细胞亚群的标记基因。使用 SingleR(v1.4.1)自动识别细胞类型,除此之外,结合文献和各数据库手动添加补充细胞注释。完成注释后,使用细胞标记数据库(<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/CellMarker/>)进一步校正细胞类型。

功能富集分析 对每个 cluster 的差异表达基因集,采用 ClusterProfiler 对基因分别进行生物学过程、分子功能和细胞组分的富集分析,富集分析采用超几何检验方法来寻找与整个基因组背景相比显著富集的 GO 条目。从 GO 富集结果中,选取 20 个最显著的 GO 条目绘制柱状图,进行可视化展示。

2 结果

2.1 花斑裸鲤三种造血器官单细胞转录组测序数据质控分析

对分析结果进行质控(表 1),在花斑裸鲤肾样本中,共读取了 3 亿多条 reads,测到约 6 123 个细胞,共 21 200 个基因的表达。有效条形码(barcode)标签,即有效测序细胞数为 98.10%,细胞内测得有效 reads 数占 58.60%,测序质量合格。平均每个细胞内测得 reads 数 54 701 条,每个有效细胞内测得的有效基因中位数为 963 个。在花斑裸鲤肝样本中,共读取了 3 亿多条 reads,测到约 1 901 个细胞,共 19 847 个基因的表达。有效测序细胞数为 98.40%,细胞内测得有效 reads 数占 56.00%,测序质量合格。平均每个细胞内测得 reads 数 175 065 条,每个有效细胞内测得的有效基因中位数为 783 个。在花斑裸鲤脾样本中,共读取 3 亿多条 reads,测到约 5 349 个细胞,共 19 501 个基因的表达。有效测序细胞数为 98.50%,细胞内测得有效 reads 数占 84.00%,测序质量合

格。平均每个细胞内测得 reads 数 62 069 条，每个有效细胞内测得的有效基因中位数为 614 个。在花斑裸鲤肾、肝、脾样本细胞中基因表达数目与唯一分子标记（unique molecular identifiers, UMI）数目呈现正相关，细胞中检测到的 UMI 数目越多，表达的基因数目越多。数据过滤后相关性分析散点图如图 1 所示。

2.2 花斑裸鲤三种造血器官细胞聚类分析

聚类后在花斑裸鲤三种造血器官中共得到 16 个细胞亚群（图 2），即 0 至 15 亚群，且每

个亚群之间的界限清晰可辨。花斑裸鲤肾中细胞类型最丰富，其中 2、4、6、8 和 12 亚群占比较肝和脾更突出；肝的细胞类型数量较肾和脾少，但 9 亚群占比较高；脾中 1、5、10 和 13 亚群占比较肾和肝更多。

2.3 花斑裸鲤三种造血器官中各细胞亚群注释分析

根据不同类型细胞的 marker 基因的表达水平、不同样本表达的差异基因以及基因的功能富集情况（表 2），将前述 16 个细胞亚群注

表 1 单细胞转录组测序数据质控结果

Table 1 Quality control results of single-cell RNA sequencing data

样本 Sample	原始数据量 Raw reads	有效条形码 (%) Valid barcodes	映射数 (%) Mapping reads	细胞数 Cells	比例数 (%) Fraction reads	平均数 Mean reads	基因中位数 Median genes	基因总数 Total genes
肾 Kidney	334 936 175	98.1	80.2	6 123	58.6	54 701	963	21 200
肝 Liver	332 799 455	98.4	86.7	1 901	56.0	175 065	783	19 847
脾 Spleen	332 005 910	98.5	86.9	5 349	84.0	62 069	614	19 501

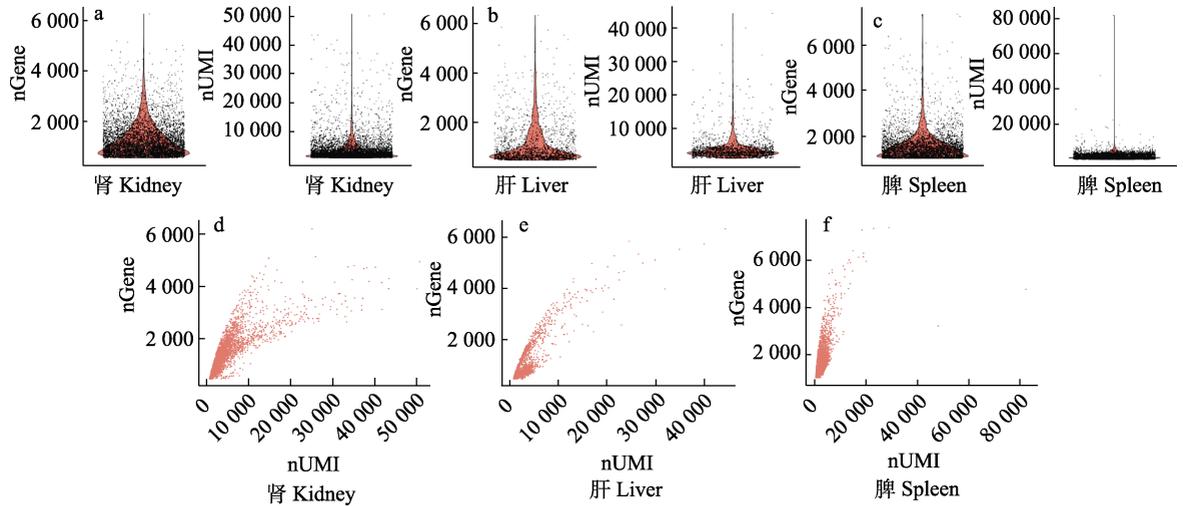


图 1 肾、肝和脾单细胞转录组测序数据过滤后细胞信息图

Fig. 1 Map of filtered cellular information of the single-cell RNA sequencing data for kidney, liver and spleen

a~c. 过滤后细胞信息小提琴图：a. 肾，b. 肝，c. 脾；d~f. 过滤后细胞的散点图：d. 肾，e. 肝，f. 脾。nGene. 过滤后各个样本单个细胞中检测到的基因数量分布；nUMI. 过滤后各个样本单个细胞中检测到的唯一分子标记数量分布

a - c. Filtered cellular information violin diagram: a. Kidney, b. Liver, c. Spleen; d - f. Scatter plot of filtered cells: d. Kidney, e. Liver, f. Spleen. nGene. Distribution of number of genes detected in individual cells of each sample after filtration; nUMI. Distribution of number of unique molecular identifiers detected in individual cells of each sample after filtration

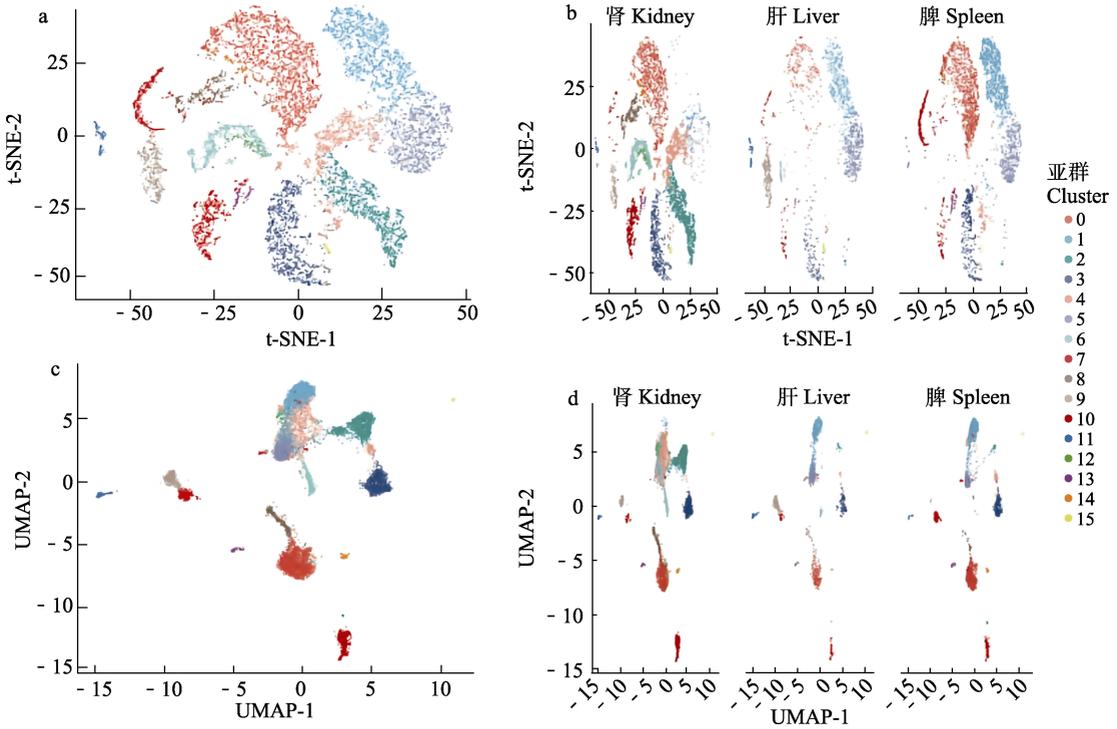


图 2 花斑裸鲤肾、肝和脾细胞聚类图

Fig. 2 Clustering plot of kidney, liver and spleen cells of *Gymnocypris eckloni*

a. 所有亚群 t-SNE 图; b. 肾、肝和脾中的不同细胞亚群 t-SNE 图; c. 所有亚群 UMAP 图; d. 肾、肝和脾中的不同细胞亚群 UMAP 图。
t-SNE. t-分布随机邻近嵌入; UMAP. 非线性降维算法与统一流形逼近与投影

a. t-SNE plot for all clusters; b. t-SNE plot for different clusters in kidney, liver and spleen; c. UMAP plot for all clusters, d. UMAP plot for different clusters in kidney, liver and spleen. t-SNE. t-stochastic neighbor embedding; UMAP. Uniform manifold approximation and projection

表 2 各细胞亚群标记基因

Table 2 Marker genes for each cell subpopulation

细胞类型 Type of cell	标记基因 Marker genes
红细胞 Erythrocyte	<i>hbba2, hbae4, cahz, hemgn, npm1a, gata1, cmyb, klf17</i>
中性粒细胞 Neutrophil	<i>mmp13a, mmp9, mki67, mfap4</i>
T 细胞 T cell	<i>trag28, zap70, rps29</i>
B 细胞 B cell	<i>cd79a, ebf1a, epb41a, tnfrsf17</i>
上皮细胞 Epithelial cell	<i>epcam, cyt1, krt4</i>
巨噬细胞 Macrophage	<i>grn1, grn2, c1qc</i>
血管内皮细胞 Vascular endothelial cell	<i>spry2, etv2, oit3</i>
肌细胞 Muscle cell	<i>actc1b, mylpfa, mylz3, acta2</i>
成纤维细胞 Fibroblast	<i>colza1a, tcf21, mme2</i>
单核细胞 Mononuclear cell	<i>lyz, csf1r</i>
神经细胞 Nerve cell	<i>elavl3, tubalc, rtn1a</i>
树突状细胞 Dendritic cell	<i>tmsb4x</i>

释为 12 种主要细胞类型，分别为红细胞、中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、树突状细胞、上皮细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、肌细胞、成纤维细胞、单核细胞和神经细胞。各亚群细胞呈均匀散在分布，批次效应整合较好（图 3）。各细胞类型标记基因的表达具有特异性，表明细胞注释结果较准确。根据常见的红细胞相关转录因子及红细胞标记基因的表达情况，同时结合各亚群基因功能富集情况，初步确定 0、1、5 和 10 亚群为参与发挥红细胞功能的细胞群体。

2.4 花斑裸鲤三种造血器官中红细胞亚群功能富集分析

根据各细胞亚群 GO 功能富集分析（电子附录 1），0 亚群主要涉及到免疫系统发育、造血或淋巴组织发育和红细胞分化生物过程；1 亚群主要涉及细胞活化免疫应答、免疫系统发育和造血与淋巴组织发育生物过程；5 亚群主要涉及到细胞活化免疫应答、免疫系统、造血或淋巴组织生成生物过程；10 亚群主要涉及到造血作用、血小板活化和凝血生物过程。由此

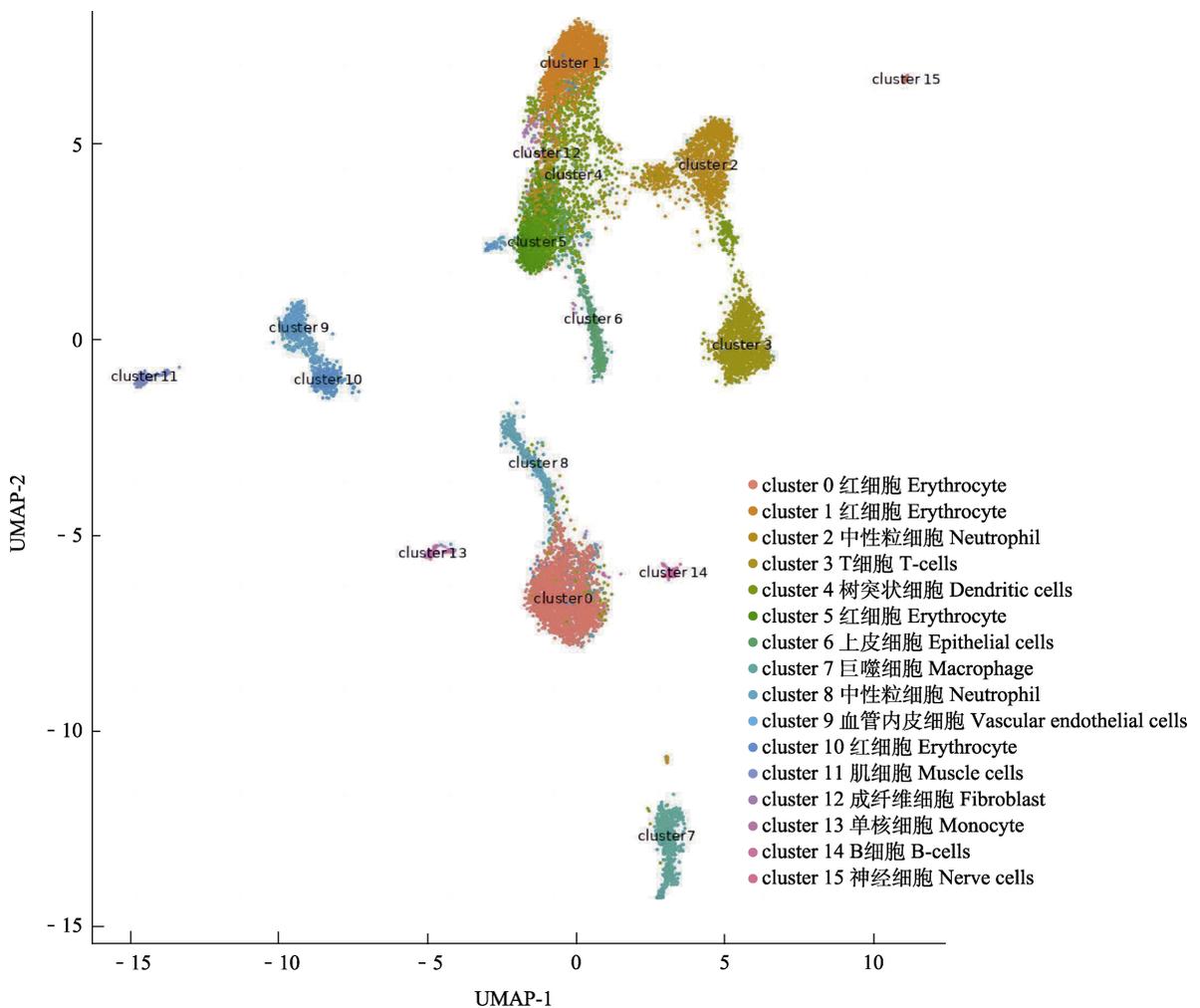


图 3 花斑裸鲤肾、肝和脾中所有细胞亚群的细胞注释

Fig. 3 Cellular annotation of all cell subpopulation in kidney, liver and spleen of *Gymnocypris eckloni*

UMAP. 非线性降维算法与统一流行逼近与投影 UMAP. Uniform manifold approximation and projection

可以推断，花斑裸鲤的三种造血器官中的红细胞亚群不仅涉及红细胞生成发育、白细胞活化和淋巴细胞生成发育等造血与免疫系统发育过程，还参与各类物质代谢、氧化还原反应、调节磷酸化及调控信号传导生物过程。

2.5 花斑裸鲤三种造血器官细胞异质性分析

对花斑裸鲤三种造血器官中各类细胞的分布及占比分析发现（图 4），三种器官中各细胞类型的分布存在差异，肾中分布的细胞类型较肝与脾最丰富。且三种器官中各类细胞的占比也明显不同，其中，脾的红细胞群分布占比较大，肾的中性粒细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和成纤维细胞分布占比较大，肝中血管内皮细胞和肌细胞分布占比较大。由此，推断花斑裸鲤的肾与其他硬骨鱼相似，不仅能够进行机体的造血作用，而且还能发挥一定的免疫功能。花斑裸鲤脾中参与发挥红细胞功能的细胞亚群占比较大，推测脾也是花斑裸

鲤进行造血作用的重要器官。花斑裸鲤肝中的细胞类型较少，但也存在参与红细胞生成及发育的细胞亚群，推测花斑裸鲤的肝具有一定的造血功能。

3 讨论

3.1 单细胞测序技术在造血系统研究中的应用

在经典的造血分化级联模型中，不同自我更新能力的造血干/祖细胞依次构成造血分化的主体，根据分化谱系的差异分为淋系和髓系两大分支并生成最终的功能细胞（Akashi et al. 2000）。通过经典的细胞表面标志分选得到的各类群干/祖细胞，无论淋系或髓系，在单细胞测序分析时，都表现出高度的异质性，存在多个亚群（Paul et al. 2015, Wilson et al. 2015, Nestorowa et al. 2016, Alberti-Servera et al. 2017）。从单细胞的角度分析，造血细胞的分化进程是渐进推行的，自我更新和谱系分化能力

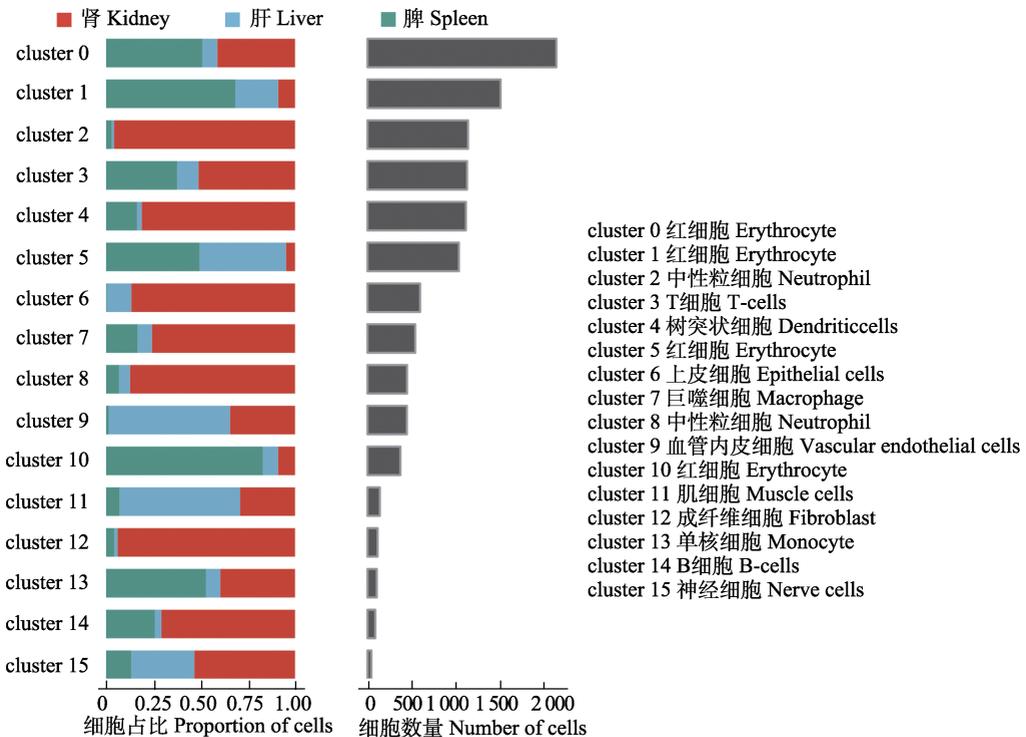


图 4 花斑裸鲤三种造血器官细胞异质性分析

Fig. 4 Analysis of cellular heterogeneity in three haematopoietic tissues of *Gymnocypris eckloni*

的改变也是逐渐形成的。单细胞测序不仅可以验证已知标记的细胞群体，而且还能挖掘未知的细胞类型，结合功能分析，对存在的亚群进行归纳和细化（王军平等 2021）。单细胞测序技术能突显关键调控因子在异质性细胞群体中的表达差异，是补充和完善造血转录调控网络的有利工具。Giladi 等（2018）证实，*Cebpa* 是调控进入髓系命运的关键因子，*Irf8* 和 *PU.1* 的缺失会阻止后期向单核细胞或粒细胞命运的分化。

3.2 花斑裸鲤造血器官细胞图谱的构建

随着单细胞测序技术在造血系统发育中的成功应用，人体内红细胞的发育分化路径已经比较清晰，但关于其他物种体内红细胞的发育分化情况研究还并不全面。裂腹鱼亚科鱼类经过长期高寒低氧的适应生存成为现在青藏高原鱼类区系的主体成分之一（武云飞等 1991）。花斑裸鲤作为裂腹鱼亚科鱼类的代表物种，构建其造血器官细胞图谱可以为解析高原土著鱼类红细胞发育分化情况，包括分化路径和分化时间的确定等积累科学数据。

本研究利用三种造血器官的单细胞转录组测序数据进行了细胞聚类分析、差异分析、功能富集分析和细胞分布异质性分析，确定了花斑裸鲤三种造血器官内的基础细胞类型。根据测序结果将三种器官内的细胞初步分为 16 个亚群，结合每个细胞群的前 20 个差异表达基因和已知标记基因的表达（陈涛 2022，张向辉 2022，李玉邦 2023），认为 0、1、5 和 10 亚群为不同类型的红细胞，2 和 8 亚群为中性粒细胞，3 亚群为 T 细胞，4 亚群为树突状细胞，6 亚群为上皮细胞，7 亚群为巨噬细胞，9 亚群为血管内皮细胞，11 亚群为肌细胞，12 亚群为成纤维细胞，13 亚群为单核细胞，14 亚群为 B 细胞，15 亚群为神经细胞。李玉邦（2023）通过单细胞 RNA 测序绘制了斑马鱼头肾的细胞图谱，鉴定了 13 种细胞群，包含造血干细胞、造血祖细胞、1 种特殊的淋巴系祖细胞、3 种不同时期的红细胞、2 种不同时期的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞分化来的巨噬细胞、

B 淋巴细胞、T 淋巴细胞以及内皮细胞。黄英毅（2022）通过对斑马鱼肝进行单细胞转录组测序，鉴定出 10 种细胞类型，包括 Hep1、Hep2、Hep3、T 细胞、中性粒/单核细胞、非炎性巨噬细胞、炎性巨噬细胞、嗜酸性细胞、B 细胞和红细胞。这些研究结果与本文的研究结果相似，细胞类型主要聚集在髓系、淋系和红系三种分化方向上，证明了硬骨鱼造血系统发育的高度保守性。虽然造血细胞和血细胞的类型在脊椎动物中是高度保守的，但对比人等高等脊椎动物主要造血器官中的细胞类型，还存在一些差异。Paul 等（2015）对早期髓系祖细胞群体进行分析，将传统定义的共同髓系祖细胞及其下游的粒系-单核系祖细胞和巨核-红系祖细胞详细划分为 18 种亚群，并发现其对红细胞、巨核细胞及单核细胞等下游细胞均具有不同程度的转录特异性。Villani 等（2017）选取正常人外周血样本结合功能及表型特点、将树突细胞重新划分为 6 个亚群，并新增加两个单核细胞亚群，进一步拓展了人体免疫细胞图谱及临床治疗新靶点。Xie 等（2020）建立了正常情况下造血干/祖细胞的单细胞转录图谱，共鉴定了 32 种造血细胞，绘制了较为完整的人血液单细胞图谱。但是，在本研究的结果中，不同分化时间的细胞并没有细致分类，这可能是由于单纯地整合细胞内的信息作为各细胞类型分类依据还是不够精准、不够完善，所以导致鉴定的细胞类型相对较少且比较粗略。也有一种可能是，花斑裸鲤作为相对低等的物种，造血过程也相对简单，许多中间过程可能存在时间较短，导致无法捕捉这一时间内的细胞。

通过基因功能富集，进一步确定了这些细胞类型并发现了它们各自可能行使的功能，发现花斑裸鲤三种造血器官内的细胞不仅参与造血、红细胞的发育，而且对于免疫系统的发育、应答等过程也发挥一定作用。对于硬骨鱼，肾不仅是造血器官，还是一种二级淋巴器官，在诱导和管理免疫反应中发挥重要作用（Kaattari et al. 1985）。研究发现（Ferguson et al. 1982），

当放射性同位素标记的细菌注射到虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 体内, 超过 70% 的放射性都是在肾中发现。脾的黑色素巨噬细胞中心是破碎红细胞主要的聚集地, 可以当作新陈代谢废物的堆积中心, 并且可以长时间以免疫复合物的形式保持抗原 (Agius 1980)。

根据细胞分布异质性分析, 发现三种器官中各细胞类型分布存在明显差异, 脾中参与涉及红细胞功能的细胞群分布占比较大, 肾的中性粒细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、巨噬细胞及成纤维细胞分布占比较大, 肝中血管内皮细胞和肌细胞分布占比较大, 推测花斑裸鲤脾也是其进行造血作用的重要器官, 肾与其他硬骨鱼相似, 不仅能够参与机体的造血作用, 而且还能发挥一定的免疫功能。虽然肝中的细胞类型较少, 但也存在参与涉及红细胞功能的细胞亚群, 推测花斑裸鲤的肝也具有一定的造血功能。

综上所述, 本研究采用单细胞转录组测序技术初步构建花斑裸鲤三种造血器官的细胞图谱, 挖掘补充各细胞亚群的标记基因, 分析各细胞亚群的主要功能, 比较三种造血器官的细胞分布异质性。主要鉴定出 12 种细胞类型, 分别是红细胞、中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、树突状细胞、上皮细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、肌细胞、成纤维细胞、单核细胞和神经细胞。根据功能富集分析, 花斑裸鲤的肾、脾和肝不仅参与造血、红细胞的发育, 而且对于免疫系统的发育、应答等过程也发挥一定作用。根据三种器官细胞分布异质性分析, 推断脾和肾可能是花斑裸鲤重要的造血器官, 肝可能为辅助造血器官。本研究从单细胞角度对花斑裸鲤造血系统发育研究进行了一定的补充与完善, 展现了不同造血器官中细胞分布的特征与差异, 对于后续进一步预测花斑裸鲤的红细胞的发育路径提供一定的研究基础。

电子附录 电子附录 1 见本文网络版 (<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-1-1>)。

参 考 文 献

- Agius C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *Journal of Zoology*, 191(1): 11–31.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404(6774): 193–197.
- Alberti-Servera L, von Muenchow L, Tsapogas P, et al. 2017. Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity among early lymphoid progenitors. *The EMBO Journal*, 36(24): 3619–3633.
- Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bøgvold J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4): 241–273.
- Dong F, Hao S, Zhang S, et al. 2020. Differentiation of transplanted haematopoietic stem cells tracked by single-cell transcriptomic analysis. *Nature Cell Biology*, 22(6): 630–639.
- Ferguson H W, Claxton M J, Moccia R D, et al. 1982. The quantitative clearance of bacteria from the bloodstream of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Veterinary Pathology*, 19(6): 687–699.
- Giladi A, Paul F, Herzog Y, et al. 2018. Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis. *Nature Cell Biology*, 20(7): 836–846.
- Gordeuk V R, Stockton D W, Prchal J T. 2005. Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica*, 90(1): 109–116.
- Hinton D, Lauren J. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 8: 51–66.
- Kaattari S L, Irwin M J. 1985. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental & Comparative Immunology*, 9(3): 433–444.
- Lorenzo F, Dalla Venezia N, Morlé L, et al. 1994. Protein 4.1 deficiency associated with an altered binding to the spectrin-actin complex of the red cell membrane skeleton. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4): 1651–1656.

- Nestorowa S, Hamey F K, Pijuan Sala B, et al. 2016. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood*, 128(8): e20–e31.
- Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. 2015. Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell*, 163(7): 1663–1677.
- Tusi B K, Wolock S L, Weinreb C, et al. 2018. Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies. *Nature*, 555(7694): 54–60.
- Villani A C, Satija R, Reynolds G, et al. 2017. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, 356(6335): eaah4573.
- Watcham S, Kucinski I, Gottgens B. 2019. New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing. *Blood*, 133(13): 1415–1426.
- Wilson N K, Kent D G, Buettner F, et al. 2015. Combined single-cell functional and gene expression analysis resolves heterogeneity within stem cell populations. *Cell Stem Cell*, 16(6): 712–724.
- Xia J, Kang Z X, Xue Y Y, et al. 2021. A single-cell resolution developmental atlas of hematopoietic stem and progenitor cell expansion in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(14): e2015748118.
- Xie X W, Liu M Y, Zhang Y W, et al. 2020. Single-cell transcriptomic landscape of human blood cells. *National Science Review*, 8(3): nwaal180.
- 陈涛. 2022. 单细胞整合分析解析小鼠早期造血发育. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文.
- 陈仲扬, 马艳妮, 余佳. 2022. 基于单细胞转录组测序分析描绘人类早期胚胎红细胞发育图谱. *基础医学与临床*, 42(5): 776–781.
- 初小雅. 2016. 斑马鱼胸腺和头肾的结构特征及其组织样品的制备程序. 南京: 南京农业大学硕士学位论文.
- 韩光明, 毕建花, 张家宏, 等. 2015. 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐对泥鳅的麻醉效果. *广东海洋大学学报*, 35(4): 17–23.
- 黄英毅. 2022. 基于单细胞测序的斑马鱼肝脏细胞异质性研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 李华, 邓林. 2014. 黄河花斑裸鲤肌肉中矿物质元素测定与营养评价. *四川动物*, 33(6): 923–925.
- 李玉邦. 2023. 单细胞 RNA 测序分析揭示了斑马鱼头肾中的造血通路. 济南: 山东师范大学硕士学位论文.
- 马燕梅, 林树根, 王全溪, 等. 2008. 花鲈头肾的显微结构和超显微结构. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 37(2): 190–193.
- 祁得林. 2009. 黄河上游花斑裸鲤 *Cyt b* 基因的序列变异和遗传多样性. *动物学研究*, 30(3): 255–261.
- 王军平, 陈乃成. 2021. 单细胞测序在造血系统研究中的应用与展望. *第三军医大学学报*, 43(17): 1603–1610.
- 王胜涛, 朱浩然, 徐淑娟, 等. 2023. 基于单细胞测序数据的骨肉瘤预后相关细胞亚群特征分析. *中国医学科学院学报*, 45(5): 773–782.
- 王新栋. 2018. 斑马鱼脾脏、心脏与体肾的微细结构及其样品制备标准化. 南京: 南京农业大学硕士学位论文.
- 武云飞, 谭齐佳. 1991. 青藏高原鱼类区系特征及其形成的地史原因分析. *动物学报*, 37(2): 135–152.
- 武云飞, 吴翠珍. 1982. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.
- 岳兴建, 张耀光, 敖磊, 等. 2008. 南方鲇前肾的发生及头肾的形成. *西南大学学报: 自然科学版*, (7): 110–116.
- 张成鹏. 2022. 单细胞测序技术及其应用综述. *河南科学*, 40(9): 1390–1397.
- 张向辉. 2022. 单细胞测序探究斑马鱼红细胞发育及细胞核保留机制. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文.