

# 单细胞转录组测序技术在动物学领域 血液研究中的应用

郭蕊 崔硕 汪继超\*

热带岛屿生态学教育部重点实验室, 海南省热带动植物生态学重点实验室, 海南师范大学生命科学院 海口 571158

**摘要:** 在动物学领域中, 血液研究的重要性体现在对动物健康、疾病治疗和生物多样性保护等多方面。随着分子生物学技术的不断进步, 特别是单细胞转录组测序技术的应用, 极大地推动了动物科学领域的血液研究。本文就单细胞转录组测序技术在动物学领域血液研究中的应用现状进行综述, 并对其目前存在的问题及未来发展趋势进行分析与展望, 以期推动该技术在动物科学领域中更广泛的应用。综述表明, 当前该技术在动物学领域血液研究中的应用非常有限, 主要应用在无脊椎动物(昆虫和甲壳类群)中, 在脊椎动物中应用相对较少, 研究内容主要集中在血细胞图谱绘制和描述及免疫防御和应答等方面。

**关键词:** 单细胞转录组测序技术; 血细胞; 动物学

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 04-629-11

## Application of Single-Cell Transcriptome Sequencing in Blood Research in Zoology

GUO Rui CUI Shuo WANG Ji-Chao\*

Ministry of Education Key Laboratory for Ecology of Tropical Islands, Key Laboratory of Tropical Animal and Plant Ecology of Hainan Province, College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China

**Abstract:** In the field of zoology, blood research is important in many aspects such as animal health, disease treatment, and biodiversity conservation. The continuous advancement of molecular biology technologies, particularly the application of single-cell transcriptome sequencing, has greatly promoted blood research in zoology. This paper reviews the application of single-cell transcriptome sequencing in blood research in zoology and analyzes current challenges and future development trends, aiming to expand the application of this technology in animal science. This review shows that the application of this technology in blood research in zoology is limited at present. This technology is mainly applied in invertebrate insects and crustaceans and less in vertebrates. The research content mainly focuses on blood cell mapping and description and immune

**基金项目** 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 322RC658), 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 320QN255);

\* 通讯作者, E-mail: wjc@hainnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 郭蕊, 女, 讲师; 研究方向: 动物生态学; E-mail: guor19@hainnu.edu.cn.

收稿日期: 2024-11-01, 修回日期: 2025-02-19 DOI: 10.13859/j.cjz.202524248 CSTR: 32109.14.cjz.24248

defense and response.

**Key words:** Single-cell transcriptome sequencing; Blood cells; Zoology

随着生物信息技术的迅猛发展, 单细胞转录组技术已成为动物学领域的最新研究手段之一, 与传统转录组获得混合细胞群的平均基因表达相比, 单细胞转录组技术是对单个细胞转录组进行高通量测序的一种技术, 为深入研究生物学过程提供了新思路。该技术自 2009 年问世以来, 不断更新升级, 现已成为解析细胞组成和分子特性的最佳手段, 被广泛应用于疾病、免疫学和发育学等重要研究领域 (Schaum et al. 2018, Fernandez et al. 2019, Xie et al. 2021, Kedlian et al. 2024)。相关最新研究进展加深了研究者们对动物心、肺、骨骼肌、卵巢、脑、血液及其他组织和器官的认识 (Schaum et al. 2018, Raredon et al. 2019, Xie et al. 2021, Farah et al. 2024, Kedlian et al. 2024, Wu et al. 2024)。

血液作为实现生物体各器官间相互交流的介质, 具备系统分析机体生物学机制的潜力, 在生物学研究中意义重大。对血液的深入研究有助于更好地理解动物的生理和病理过程, 可为动物的进化发育、疾病预防等提供重要的理论基础和科学依据。且与其他组织相比, 以血液为研究样本具有操作简便、代表性强、多样性丰富以及损伤小等优势。传统血细胞分类主要基于细胞形态和一些标记基因的表达 (Rizki 1957, 1962, Shrestha et al. 1982, Kurucz et al. 2007, Evans et al. 2014)。但可用于鉴定血细胞类型的标记物匮乏和细胞形态的低分辨率可能会阻碍稀有细胞类型的识别, 且无法区分瞬时状态。单细胞转录组测序技术的应用使血液的全面表征成为可能 (Satija et al. 2014)。并且, 单细胞转录组测序技术不仅可以识别细胞类型, 还可以解析隐藏在大量 RNA 数据中的细胞状态及其动态基因表达 (Trapnell 2015)。例如, 使用细胞转录组测序技术平台已经帮助鉴定了人类血液中单核细胞和树突状细胞中的新亚型和 T 细胞的激活状态 (Villani et al. 2017,

Szabo et al. 2019)。此外, 该技术也记录了不同物种造血谱系的连续分化谱 (MacAulay et al. 2016, Nestorowa et al. 2016, Zhang et al. 2018)。同时, 单细胞转录组测序数据允许对细胞进行伪时间排序, 以重新绘制细胞谱系的发育轨迹 (Cao et al. 2019)。因此, 单细胞转录组测序技术结合谱系轨迹算法, 可以精准表征: 1) 分化细胞类型及其亚型; 2) 瞬时中间态; 3) 祖或前体状态; 4) 激活状态。

但是, 目前单细胞转录组测序技术在血液方面的应用主要集中在人类血液系统疾病方面 (Zilionis et al. 2019, 朱玉茹晨等 2024), 在动物学研究领域的应用相对较少。本文通过对该技术在动物学领域血液研究中的应用现状进行简要综述, 探索该技术在动物学领域血液研究中的应用难点及潜在应用前景。

## 1 单细胞转录组测序技术在血细胞图谱绘制中的应用

单细胞转录组测序技术在动物学领域血液研究中的研究内容多聚焦于血细胞图谱的绘制及描述, 主要应用于无脊椎动物 (昆虫和甲壳类), 在脊椎动物 (除人类和模式动物) 中的应用相对较少。

### 1.1 昆虫

血淋巴是无脊椎动物的血样液体, 具有血液和淋巴样组织液的特性, 由血浆和血细胞构成, 具有防御、抗冻、免疫和损伤应答等重要作用。无脊椎动物血细胞有许多名称, 如血细胞、变形细胞、吞噬细胞、体腔细胞和免疫细胞 (Ottaviani et al. 1997)。这些细胞在塑造细胞外环境和帮助抵抗感染方面发挥关键作用。

研究表明, 昆虫血细胞在功能上与哺乳动物白细胞相似, 具有与单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞相似的功能, 如吞噬、趋化性和抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 等 (Lavine

et al. 2002, Buchmann 2014)。但与哺乳动物白细胞的既定分类不同, 昆虫血细胞分类是有争议的, 即使在同一昆虫目中, 不同的细胞形态也使用相同的术语(Brayner et al. 2005, Castillo et al. 2006, Ribeiro et al. 2006)。大多数关于昆虫血细胞的研究都集中在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 模型的胚胎和幼虫阶段 (Zdobnov et al. 2002, Wood et al. 2007, Vlisidou et al. 2015), 但因昆虫物种间血细胞类群也存在一定差异, 所以果蝇的研究结果并不适用于其他昆虫。单细胞转录组测序技术的应用可以解析昆虫血细胞亚型种类和异质性, 现有报道显示, 该技术主要应用于蚊子和果蝇中, 在其他类别的昆虫中应用极少。

蚊子血细胞是其抵抗病媒传播病原体的免疫力核心力量, 然而其分子特征和分类仍存在争议。传统上依据细胞形态结构将蚊子血细胞分为原血细胞 (prohemocytes)、类绛色细胞 (oenocytoids) 和粒细胞 (granulocytes) (Hillyer et al. 2002, Rodrigues et al. 2010, Smith et al. 2015)。单细胞转录组测序技术的应用, 加深了研究者们对蚊子血细胞的认识和理解, Severo 等 (2018) 最早联合应用该技术、高内涵成像流式细胞仪和 RNAscope® 原位杂交技术, 分析了冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 血细胞亚群的分子指纹, 并表征了两种转录不同的血细胞群, 类似于粒细胞和类绛色细胞。Raddi 等 (2020) 使用该技术分析了冈比亚按蚊和埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的血细胞, 建立了单细胞水平的转录图谱, 结果呈现出血细胞的功能多样性, 不同亚型的粒细胞表达不同且进化保守的效应基因亚群, 根据转录谱和分子标记定义了两种主要的血细胞系。Kwon 等 (2021) 采用该技术鉴定了冈比亚按蚊血液免疫细胞, 结果显示先前定义的原血细胞、类绛色细胞和粒细胞亚型的复杂性增加。以上蚊子血液单细胞转录组测序的相关研究结果丰富了昆虫血细胞的内容, 为蚊媒病毒传染研究提供了基础资料。

对模式动物果蝇的相关研究促进了遗传

学、发育生物学、神经生物学和细胞生物学等多个基础应用学科的发展。果蝇血细胞可形成一种有效的屏障, 防止感染和组织损伤。迄今为止, 在果蝇中仅描述了 3 种未分化的血细胞类型: 晶细胞 (crystal cells)、薄层细胞 (lamellocytes) 和浆细胞 (plasmatocytes)。单细胞转录组测序技术的应用打破了以往对果蝇血细胞的认知, Cattenoz 等 (2020) 采用该技术绘制了第一个果蝇血细胞图谱, 明确了果蝇幼虫有 14 种血细胞亚型, 并参与增殖、吞噬、代谢稳态和体液反应等过程。Fu 等 (2020) 为了更好地了解果蝇血液系统的复杂性, 利用该技术生成了果蝇三龄幼虫循环血细胞的综合基因表达谱。研究结果显示, 除已知细胞类型外, 还发现了两种新血细胞类型: 造血细胞 (thanacytes) 和原始细胞 (primocytes)。造血细胞表达许多刺激反应基因, 对不同类型的细菌有不同的反应。原始细胞则表达细胞命运承诺和信号基因, 似乎参与使干细胞留在血液中的过程。该研究还揭示了四种新的浆细胞亚型 (Ppn<sup>+</sup>、CAH7<sup>+</sup>、Lsp<sup>+</sup> 和 reservoir plasmatocytes), 每种细胞亚型都具有独特的分子特性和不同的功能。此外, 果蝇在变态过程中, 血细胞的形态结构和行为发生巨大变化, 为组织清除做准备。然而, 果蝇蛹血细胞的多样性和功能可塑性尚未得到充分的研究。Hirschhäuser 等 (2023) 通过单细胞转录组学结合高分辨率显微镜探究了果蝇蛹血细胞的异质性和可塑性, 鉴定了未分化和特异性的血细胞, 此研究还发现了一种高度迁移和免疫反应的果蝇蛹细胞群——PSC (the posterior signaling center) 样细胞。谱系分析进一步表明, PSC 样细胞可以在寄生蜂侵染后转分化为薄层细胞。

果蝇淋巴腺是由造血前细胞和成熟血细胞组成的幼虫造血器官, 是了解造血和免疫机制的重要模型。在果蝇淋巴腺中有 3 种类型的成熟血细胞, 浆细胞、薄层细胞和晶细胞, 它们类似于脊椎动物的髓细胞, 但对淋巴腺血细胞

的分子基础研究较少。Cho 等 (2020) 使用单细胞转录组测序全面分析了果蝇淋巴中发育的血细胞异质性, 并发现以前未描述的血细胞类型, 包括脂血细胞 (adipohemocytes)、干细胞样原血细胞 (stem-like prohemocytes) 和中间原血细胞 (intermediate prohemocytes); 此外, 还确定了正常发育过程中血细胞的发育轨迹, 以及由寄生蜂侵染引起的活跃细胞免疫后薄层细胞谱系的出现; 最后, 明确了胚胎来源和幼虫淋巴血细胞之间的异同。

以上研究在单细胞分辨率上丰富了昆虫血细胞图谱内容, 提供了昆虫血细胞发育及免疫的新见解。

## 1.2 甲壳类

甲壳类动物是一个物种丰富且具有重要生态意义的类群, 其循环血细胞在病原体识别、吞噬和抗菌防御等方面发挥至关重要的作用。为了更好地了解甲壳类动物对不同病原体的免疫反应, 研究者必须识别具有不同功能的不同血细胞亚群, 并更好地了解这些细胞的形成过程。虾类是单细胞转录组测序技术在甲壳类动物血液研究中应用最多的类群, 学者们利用该技术对虾类血液免疫系统进行了深入研究, 绘制了多种虾类血细胞图谱, 筛选出潜在的标记基因, 从细胞生物学层面揭示了虾类免疫防御系统的组成和功能。

Koiwai 等 (2021) 使用单细胞转录组测序技术对日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 血细胞进行了分析, 共鉴定出 6 种血细胞亚群, 并确定了每个亚群的标记基因, 预测了参与血细胞成熟过程中涉及的分化途径和发挥关键作用的细胞生长因子。免疫相关基因的差异表达分析表明, 血细胞亚群之间存在不同的免疫作用。Yang 等 (2022) 通过单细胞转录组测序确定了南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 血淋巴中有 3 种主要免疫细胞, 单核血细胞 (monocytic hemocytes)、原血细胞和粒细胞, 并定义了一种新的巨噬细胞样亚群——单核血细胞 2 (monocytic hemocytes 2, MH2), 该细胞能够

吞噬入侵机体的有害病原微生物副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*), 且该细胞表达的标记基因与哺乳动物巨噬细胞标记基因有一定的一致性。Cui 等 (2022) 通过对健康南美白对虾血细胞进行单细胞转录组测序, 结合 RNA-fish 和流式细胞术分选, 鉴定出 TGase<sup>+</sup> 细胞、CTL<sup>+</sup> 细胞和 Crustin<sup>+</sup> 细胞 3 个血细胞亚群。其中, TGase<sup>+</sup> 细胞主要负责凝血, 处于分化末期的 CTL<sup>+</sup> 细胞和 Crustin<sup>+</sup> 细胞主要参与识别外来病原体和启动免疫防御反应, 具有独特的含颗粒血细胞特征。此研究结果揭示了对虾血细胞的多样性, 为血细胞分类提供了新的理论依据, 也有助于甲壳类动物免疫系统的研究。Söderhäll 等 (2022) 对淡水小龙虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 的造血组织 (hematopoietic tissue, HPT) 细胞和血细胞进行了单细胞转录组测序, 共鉴定出 8 种血细胞簇。此外, 此研究在造血组织 (HPT) 中发现了具有明确前体特征的细胞群, 且参与铁稳态, 是以前未发现的细胞类型。此发现可能会提高研究者对甲壳类动物和其他动物造血干细胞调控的理解。Xin 等 (2023) 采用单细胞转录组测序技术对具有代表性的两种甲壳类动物日本对虾和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的血细胞进行了异质性分析, 结果表明, 日本对虾和克氏原螯虾分别含有 11 种和 12 种血细胞类型, 每种不同类型的血细胞都特异性表达潜在的标记基因。

## 1.3 贝类

血液单细胞转录组测序技术在贝类中应用极少, 仅采用该技术分析了香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 血细胞类型及异质性, 研究结果显示, 香港牡蛎血细胞共有 13 个细胞亚群, 分为 3 种主要类型, 分别是透明细胞 (hyaline)、粒细胞和半颗粒细胞 (semi-granular), 其中, 粒细胞主要参与免疫应答和自噬过程 (Meng et al. 2022a)。

## 1.4 鱼类

单细胞转录组测序技术在鱼类中主要应用

于免疫机制和生殖发育调控等方面, 在血液中的应用相对较少。Perdiguero 等 (2021a, b) 利用单细胞转录组技术绘制了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 血液 B 细胞图谱, 将其分为 10 个细胞亚群, 分别代表处于不同成熟和分化阶段的循环 B 细胞, 说明了其 B 细胞标记基因与哺乳动物的 B 细胞标记基因存在实质性差异。该研究还解析了不同重排 *V<sub>H</sub>JLCL* 基因在虹鳟单个 B 细胞中的转录, 研究表明, 虹鳟单个 B 细胞可以产生不同特异性的 Igs, 说明鱼类 B 细胞可产生不同特异性的抗体。Parker 等 (2022) 使用单细胞转录组技术绘制了海龙科鱼类 *Syngnathus typhle* 血液和头肾的免疫细胞图谱, 共鉴定出 12 个细胞群, 其中 8 个属于具有免疫功能的细胞群。Pan 等 (2023) 绘制了草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的 B 细胞单细胞转录组图谱, 主要包括成熟 B 细胞、固有 B 细胞、增殖 B 细胞、浆细胞、CD22<sup>+</sup> 细胞和 CD34<sup>+</sup> 细胞 6 个群体, 其中固有 B 细胞和增殖 B 细胞是罕见的 B 细胞亚群, 具有新的特征。此外, 还发现了 3 种功能性 IgM, 认为草鱼 B 细胞可能通过共表达重排的 IgM 亚类基因产生多种抗体, 提出了“一细胞多抗体”的新猜想。该研究不仅有助于揭示早期脊椎动物 B 细胞的独特异质性, 而且为最近提出的“一细胞多抗体”范式提供了重要的新证据, 挑战了“一细胞一抗体”的经典规则。

### 1.5 爬行类

单细胞转录组测序技术在爬行动物中的应用极少, 已有研究通过该技术从血细胞角度阐述了红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 入侵机制, 在红耳龟外周血中共鉴定出 14 种血细胞亚型, 包括血栓细胞 (thrombocytes)、2 种红细胞 (erythrocytes 1 和 erythrocytes 2)、2 种单核细胞 (CSF1R monocytes 和 POF1B monocytes)、中性粒细胞 (neutrophils)、2 种嗜碱性粒细胞 (GATA2 high basophils 和 GATA2 low basophils)、2 种 T 细胞 (CD4 T cells 和 CD7 T cells)、B 细胞和 3 种新细胞亚型 (ACKR4

cells、serotriflin cells 和 ficolin cells) (Guo et al. 2024)。Guo 等 (2022) 通过该技术比较了 4 种不同生境龟鳖动物外周血免疫细胞的组成和功能, 包括海洋龟类绿海龟 (*Chelonia mydas*) 以及淡水龟类红耳龟、淡水底栖的中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 和陆生的红腿陆龟 (*Chelonoidis carbonaria*), 研究表明, 红耳龟免疫细胞亚群组成结构最复杂, 绿海龟免疫细胞亚群组成结构最简单, 且物种间免疫细胞功能也存在差异。

### 1.6 哺乳类与鸟类

传统血液转录组测序已被广泛应用于哺乳动物, 包括猪 (*Sus scrofa domesticus*) (Mach et al. 2013, Zhong et al. 2022)、羊 (*Capra aegagrus hircus*) (Li et al. 2019, 赵晨晨 2021)、狼 (*Canis lupus*) (刘广帅 2017)、家犬 (*Canis lupus familiaris*) (杨秀峰 2016) 和大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) (Shen et al. 2022, Yang et al. 2022) 等, 主要用于检测动物由于健康、繁殖状态、饮食、营养或应激而产生的生理状态变化及开发新的传染病生物标记物等。单细胞转录组测序技术可以实现单细胞水平上解析细胞状态及其动态基因表达, 已有研究显示该技术在哺乳类血液中主要用于血细胞或外周血免疫细胞图谱的绘制。

Herrera-Urbe 等 (2021) 采用单细胞转录组测序技术从猪 (*Sus scrofa domesticus*) 的外周血单核细胞 (peripheral blood monocyte cell, PBMC) 鉴定出 4 种细胞类型, 分别是髓样细胞、NK 细胞、T 细胞和 B 细胞的特定群体。Gao 等 (2022) 通过单细胞转录组测序技术比较分析了脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理前后奶牛 (*Bos taurus*) PBMCs 血细胞图谱, 研究结果显示, 奶牛 PBMCs 有 7 种主要细胞类型, 包括 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞、B 细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、固有淋巴样细胞和树突状细胞。Friedrichs 等 (2022) 采用单细胞转录组测序对比分析了不同年龄组 (幼体、亚成体、成体) 埃及果蝠 (*Rousettus aegyptiacus*)

外周血免疫细胞图谱,共发现有 22 种白细胞亚群,其中,中性粒细胞、T 细胞和 CD206<sup>+</sup>骨髓细胞在成年埃及果蝠中富集,而 B 细胞和 CD11b<sup>+</sup>T 细胞在幼年埃及果蝠中更为丰富;随着年龄的增长,免疫细胞获得了假定的调节表型。

单细胞转录组测序技术在鸟类血液研究中的应用仅有 1 例报道,Qu 等(2022)通过该技术绘制了鸡(*Gallus gallus domesticus*)外周血细胞图谱,共鉴定了 8 个细胞群及其潜在的标记基因。

## 2 在血液免疫防御和应答中的应用

凭借单细胞分辨率,单细胞转录组测序技术在动物学领域血液免疫防御和应答研究中具有精准揭示响应病毒感染或环境胁迫的主要细胞类型及其分子机制的绝对优势。因此,该技术被广泛应用于动物的免疫应答和环境响应机制研究。

### 2.1 无脊椎动物

Cattenoz 等(2020)采用单细胞转录组测序技术研究发现,寄生蜂侵染会引起果蝇幼虫血细胞集群发生变化,触发一种新的血细胞类型分化,即薄层细胞,此项发现为研究果蝇免疫细胞在生理和病理条件下的生物学过程奠定了基础。Tattikota 等(2020)使用该技术比较分析了正常和不同炎症条件下(受伤和寄生蜂侵染 24 h 后)果蝇幼虫的血细胞图谱,根据参与细胞周期、抗菌反应和代谢的基因表达将浆细胞划分为不同的状态,并鉴定了中间状态。此外,在晶细胞和薄层细胞中发现了罕见的亚群,分别表达成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)配体和受体,证明了这些 FGF 成分是介导针对拟寄生蜂卵的有效免疫应答所必需的,强调了 FGF 信号在血细胞间的新作用。该研究也揭示了果蝇血细胞的多样性,并为系统理解其功能提供了丰富的基因表达谱资源。Feng 等(2021)采用单细胞转录组测序技术比较分析了感染和未感染家蚕核型多角体

病毒(*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, BmNPV)的家蚕(*B. mori*)幼虫血细胞组成及每个血细胞亚群的特定分子和细胞特征,结果显示,家蚕幼虫共有 20 个血细胞亚群,BmNPV 感染可引起家蚕幼虫血细胞亚群分布发生巨大变化。感染组主要以原血细胞为主,浆细胞和粒细胞大量减少,且 BmNPV 感染抑制了主要血细胞类型的 RNA 干扰和免疫应答。以上研究在单细胞水平上阐述了昆虫响应病毒感染的主要血细胞类型及其免疫应答的分子机制。

Xin 等(2023)利用该技术根据日本对虾和克氏原螯虾对白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染和脂多糖作用的反应,将甲壳类动物的免疫血细胞分为 4 种类型,分别是参与产生抗菌肽的半粒状血细胞、负责产生抗菌肽的粒状血细胞、与细胞增殖有关的血细胞和处于免疫激活状态的血细胞。同时, Koiwai 等(2023)通过液滴测序技术(Drop-seq)对比研究了健康和感染白斑综合征病毒(white spot syndrome virus)的日本对虾血细胞数量变化,研究表明,WSSV 感染减少了日本对虾循环血淋巴中特定细胞群,抑制了抗菌肽的表达。Cui 等(2024)使用单细胞转录组测序绘制了 WSSV 感染的南美白对虾血细胞的转录组图谱,共鉴定出 16 个转录不同的细胞簇,且在健康和感染 WSSV 的血细胞中占不同的比例,在抗病毒免疫应答中发挥不同的作用。此研究揭示了 WSSV 感染后对虾血细胞的差异反应和免疫功能分化过程,为系统地了解不同血细胞亚型之间对抗病毒感染的协同免疫反应机制提供了重要的资源。

Liang 等(2023)使用单细胞转录组测序技术研究了南美白对虾不同细胞群的血细胞在亚硝酸盐暴露下的反应。研究结果显示,在 9 个血细胞簇中共鉴定出 394 个特异性亚硝酸盐应答基因,并发现 3 个血细胞亚群,即透明细胞、半粒细胞和颗粒细胞(granular cells),在亚硝酸盐应答中存在异质性,半粒细胞和颗粒细胞是南美白对虾在亚硝酸盐胁迫下异质

性反应的主要类型。在半颗粒细胞中，过量的氨会干扰氧化磷酸化和抗氧化系统，从而诱导活性氧的产生。在颗粒细胞中，氨积累引起的尿素循环异常是主要的毒性因素，其主要作用是抑制精氨酸酶和精氨酸激酶。此研究采用单细胞转录组测序技术从血细胞角度揭示了南美白对虾亚硝酸盐暴露相关的毒性机制。Li 等（2022）利用单细胞转录组测序技术构建了斑节对虾（*Penaeus monodon*）肝胰腺和血细胞图谱，鉴定出 7 个细胞类群。且在氨氮胁迫下，斑节对虾的抗氧化系统和酚氧化酶原（prophenoloxidase, proPO）系统被激活。大量的差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs）参与氧化应激、解毒代谢和免疫防御。其中抗菌肽、酚氧化酶原和谷胱甘肽 S 转移酶（glutathione S transferase, GST）等重要应答基因不仅是鉴定细胞群的标记基因，而且在斑节对虾的细胞分化和功能可塑性中发挥着重要作用。此研究首次构建了氨氮胁迫下斑节对虾先天免疫应答的肝胰腺细胞和血细胞图谱，确定了斑节对虾先天免疫系统对应激反应的分子事件。以上研究加深了对甲壳类动物免疫系统的理解。

Meng 等（2022b）采用单细胞转录组测序技术研究了铜胁迫下香港牡蛎血细胞的异质性反应，研究结果显示，粒细胞、半颗粒细胞和透明细胞均有特异性应答，其中粒细胞是最重要的应答细胞类型，且其两个亚型的应答表现出异质性。在一个亚型中，铜通过金属转运体运输，并在细胞质中与铜伴侣整合，过量的铜干扰氧化磷酸化并诱导活性氧的产生。在另一亚型中，内吞作用主要负责铜的内化，铜被隔离在膜结合颗粒中。总的来说，以上研究结果揭示了铜暴露下血细胞的异质性反应，对理解软体动物门动物血细胞的免疫防御进化和功能分化具有重要意义。

## 2.2 脊椎动物

Loh 等（2024）采用单细胞转录组测序技术绘制了暴露于鳞屑病病毒（scale-drop disease

virus, SDDV）后恢复期尖吻鲈（*Lates calcarifer*）的血液免疫细胞图谱。共鉴定出 24 种不同的白细胞簇，与未感染组相比，恢复期组的 B 细胞、粒细胞和 T 细胞比例升高，同时，恢复期组活化和分泌抗体的 B 细胞百分比增加。此研究提供了对未感染鳞屑病病毒和感染恢复期亚洲鲈鱼免疫细胞动力学的重要见解，为 SDDV 感染的潜在免疫反应提供了有价值的信息。Qu 等（2022）通过单细胞转录组测序技术比较分析感染禽白血病病毒亚组 J（Avian leukosis virus subgroup J, ALV-J）和空白对照组鸡外周血单核细胞，发现鸡外周血 T 细胞群对 ALV-J 感染的反应最强，B 细胞表现不明显，明确了鸡外周血单核细胞亚群及其特定的分子细胞特征，鉴定出 8 个细胞群及其潜在的标记基因。

## 3 存在的问题与展望

单细胞转录组测序技术在动物学领域血液方向研究的应用，解决了长期以来动物学领域血细胞不同亚群界限模糊、功能不清晰等问题。该技术为动物血细胞图谱构建、血细胞谱系追踪以及免疫响应机制等研究提供了强有力的工具。但目前该技术在动物学领域血液研究中，尤其在野生动物类群中的应用还非常有限，仍存在以下问题：1）血液样本的收集，如无脊椎动物血淋巴收集。由于血淋巴比较容易黑化，需在低温环境下迅速取血。2）动物（非模式动物）细胞和分子基础研究较少，血细胞标记基因的匮乏增加了血细胞类群注释的难度。3）动物类群丰富多样，但已公开发表的参考基因组相对较少，且已发表的基因组质量参差不齐。4）没有统一的血细胞命名方法，传统血细胞主要依据血细胞形态结构进行分类和命名，现代分子血细胞新分型没有统一的命名方式。5）细胞聚类分群分辨率不同，可被分为主要类型“primary types”和次要类型“secondary types”。因此很难进行物种间或动物谱系间血细胞图谱异同比较。

单细胞转录组测序技术作为一项新兴技术,其在动物学领域的血液研究中应用前景非常广阔。该技术能够在单细胞水平上提供基因表达的动态变化信息,为理解细胞层面的生物学过程提供了一种强有力的工具。单细胞转录组测序技术以其独特的优势,在单细胞转录组分析领域中占据了举足轻重的地位。它不仅为单个细胞的生物学特性和功能提供了全新的研究视角,而且在揭示复杂生物过程的细胞层面机制方面具有不可替代的作用。随着技术的不断进步和成本的进一步降低,单细胞转录组测序技术的应用范围和影响力预计将继续扩大,为生命科学领域带来更多的创新和突破。

## 参 考 文 献

- Brayner F A, Araújo H R C, Cavalcanti M G S, et al. 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron*, 36(4): 359–367.
- Buchmann K. 2014. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*, 5: 459.
- Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. 2019. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 566(7745): 496–502.
- Castillo J C, Robertson A E, Strand M R. 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(12): 891–903.
- Cattenoz P B, Sakr R, Pavlidaki A, et al. 2020. Temporal specificity and heterogeneity of *Drosophila* immune cells. *The EMBO Journal*, 39(12): e104486.
- Cho B, Yoon S H, Lee D, et al. 2020. Single-cell transcriptome maps of myeloid blood cell lineages in *Drosophila*. *Nature Communications*, 11(1): 4483.
- Cui C, Tang X, Xing J, et al. 2022. Single-cell RNA-seq uncovered hemocyte functional subtypes and their differentional characteristics and connectivity with morphological subpopulations in *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Immunology*, 13: 980021.
- Cui C, Tang X Q, Xing J, et al. 2024. Single-cell RNA-seq revealed heterogeneous responses and functional differentiation of hemocytes against white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Virology*, 98(3): e0180523.
- Evans C J, Liu T, Banerjee U. 2014. *Drosophila* hematopoiesis: Markers and methods for molecular genetic analysis. *Methods*, 68(1): 242–251.
- Farah E N, Hu R K, Kern C, et al. 2024. Spatially organized cellular communities form the developing human heart. *Nature*, 627(8005): 854–864.
- Feng M, Xia J, Fei S, et al. 2021. Identification of silkworm hemocyte subsets and analysis of their response to baculovirus infection based on single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Immunology*, 12: 645359.
- Fernandez D M, Rahman A H, Fernandez N F, et al. 2019. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nature Medicine*, 25(10): 1576–1588.
- Friedrichs V, Toussaint C, Schäfer A, et al. 2022. Landscape and age dynamics of immune cells in the Egyptian rousette bat. *Cell Reports*, 40(10): 111305.
- Fu Y, Huang X, Zhang P, et al. 2020. Single-cell RNA sequencing identifies novel cell types in *Drosophila* blood. *Journal of Genetics and Genomics*, 47(4): 175–186.
- Gao Y, Li J, Cai G, et al. 2022. Single-cell transcriptomic and chromatin accessibility analyses of dairy cattle peripheral blood mononuclear cells and their responses to lipopolysaccharide. *BMC Genomics*, 23(1): 338.
- Guo R, Ma G, Zhai X, et al. 2022. Comparison of the single-cell immune landscape of testudines from different habitats. *Cells*, 11(24): 4023.
- Guo R, Ma G, Zhai X, et al. 2024. Single-cell transcriptomic landscape of peripheral blood cells provides insights into adaptation of red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Integrative Zoology*, 19(3): 468–479.
- Herrera-Urbe J, Wiarda J E, Sivasankaran S K, et al. 2021. Reference transcriptomes of porcine peripheral immune cells created through bulk and single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Genetics*, 12: 689406.
- Hillyer J F, Christensen B M. 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(5): 431–440.

- Hirschhäuser A, Molitor D, Salinas G, et al. 2023. Single-cell transcriptomics identifies new blood cell populations in *Drosophila* released at the onset of metamorphosis. *Development*, 150(18): dev201767.
- Kedlian V R, Wang Y, Liu T, et al. 2024. Human skeletal muscle aging atlas. *Nature Aging*, 4(5): 727–744.
- Koiwai K, Kondo H, Hirono I. 2023. scRNA-seq analysis of hemocytes of penaeid shrimp under virus infection. *Marine Biotechnology*, 25(3): 488–502.
- Koiwai K, Koyama T, Tsuda S, et al. 2021. Single-cell RNA-seq analysis reveals penaeid shrimp hemocyte subpopulations and cell differentiation process. *eLife*, 10: e66954.
- Kurucz É, Váczi B, Márkus R, et al. 2007. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biologica Hungarica*, 58(Suppl): 95–111.
- Kwon H, Mohammed M, Franzén O, et al. 2021. Single-cell analysis of mosquito hemocytes identifies signatures of immune cell subtypes and cell differentiation. *eLife*, 10: e66192.
- Lavine M D, Strand M R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10): 1295–1309.
- Li W, Mao L, Shu X, et al. 2019. Transcriptome analysis reveals differential immune related genes expression in bovine viral diarrhea virus-2 infected goat peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *BMC Genomics*, 20(1): 516.
- Li Y, Zhou F, Yang Q, et al. 2022. Single-cell sequencing reveals types of hepatopancreatic cells and haemocytes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and their molecular responses to ammonia stress. *Frontiers in Immunology*, 13: 883043.
- Liang Q, Dong B, Li A, et al. 2023. scRNA-seq analysis reveals toxicity mechanisms in shrimp hemocytes subjected to nitrite stress. *Chemosphere*, 316: 137853.
- Loh Z, Lim T W, Howland S W, et al. 2024. Single-cell transcriptome profiling of scale drop disease virus-infected Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Journal*, 4(2): 28–43.
- MacAulay I C, Svensson V, Labalette C, et al. 2016. Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells. *Cell Reports*, 14(4): 966–977.
- Mach N, Gao Y, Lemonnier G, et al. 2013. The peripheral blood transcriptome reflects variations in immunity traits in swine: towards the identification of biomarkers. *BMC Genomics*, 14: 894.
- Meng J, Wang W X. 2022b. Highly sensitive and specific responses of oyster hemocytes to copper exposure: single-cell transcriptomic analysis of different cell populations. *Environmental Science & Technology*, 56(4): 2497–2510.
- Meng J, Zhang G, Wang W X. 2022a. Functional heterogeneity of immune defenses in molluscan oysters *Crassostrea hongkongensis* revealed by high-throughput single-cell transcriptome. *Fish & Shellfish Immunology*, 120: 202–213.
- 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.
- Ottaviani E, Franceschi C. 1997. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunology Today*, 18(4): 169–174.
- Pan Y R, Wu C S, Zhong Y Q, et al. 2023. An atlas of grass carp IgM<sup>+</sup> B cells in homeostasis and bacterial infection helps to reveal the unique heterogeneity of B cells in early vertebrates. *Journal of Immunology*, 211(6): 964–980.
- Parker J, Guslund N C, Jentoft S, et al. 2022. Characterization of pipefish immune cell populations through single-cell transcriptomics. *Frontiers in Immunology*, 13: 820152.
- Perdiguero P, Morel E, Díaz-Rosales P, et al. 2021a. Individual B cells transcribe multiple rearranged immunoglobulin light chains in teleost fish. *iScience*, 24(6): 102615.
- Perdiguero P, Morel E, Tafalla C. 2021b. Diversity of rainbow trout blood B cells revealed by single cell RNA sequencing. *Biology*, 10(6): 511.
- Qu X, Li X, Li Z, et al. 2022. Chicken peripheral blood mononuclear cells response to avian leukosis virus subgroup J infection assessed by single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 13: 800618.
- Raddi G, Barletta A B F, Efremova M, et al. 2020. Mosquito cellular immunity at single-cell resolution. *Science*, 369(6507): 1128–1132.
- Raredon M S B, Adams T S, Suhail Y, et al. 2019. Single-cell connectomic analysis of adult mammalian lungs. *Science Advances*, 5(12): eaaw3851.
- Ribeiro C, Brehélin M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52(5): 417–429.

- Rizki M T M. 1957. Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, 100(3): 437–458.
- Rizki T M. 1962. Experimental analysis of hemocyte morphology in insects. *Integrative and Comparative Biology*, 2(2): 247–256.
- Rodrigues J, Brayner F A, Alves L C, et al. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*, 329(5997): 1353–1355.
- Satija R, Shalek A K. 2014. Heterogeneity in immune responses: from populations to single cells. *Trends in Immunology*, 35(5): 219–229.
- Schaum N, Karkanias J, Neff N F, et al. 2018. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a *Tabula Muris*. *Nature*, 562(7727): 367–372.
- Severo M S, Landry J J M, Lindquist R L, et al. 2018. Unbiased classification of mosquito blood cells by single-cell genomics and high-content imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(32): E7568–E7577.
- Shen H B, Li C W, He M, et al. 2022. Whole blood transcriptome profiling identifies candidate genes associated with alopecia in male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *BMC Genomics*, 23(1): 297.
- Shrestha R, Gateff E. 1982. Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*: (drosophila/hematopoiesis/blood cells/ultrastructure/cytochemistry). *Development, Growth & Differentiation*, 24(1): 65–82.
- Smith R C, Barillas-Mury C, Jacobs-Lorena M. 2015. Hemocyte differentiation mediates the mosquito late-phase immune response against *Plasmodium* in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26): E3412–E3420.
- Söderhäll I, Fasterius E, Ekblom C, et al. 2022. Characterization of hemocytes and hematopoietic cells of a freshwater crayfish based on single-cell transcriptome analysis. *iScience*, 25(8): 104850.
- Szabo P A, Levitin H M, Miron M, et al. 2019. Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nature Communications*, 10(1): 4706.
- Tattikota S G, Cho B, Liu Y F, et al. 2020. A single-cell survey of *Drosophila* blood. *eLife*, 9: e54818.
- Trapnell C. 2015. Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Research*, 25(10): 1491–1498.
- 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.
- Vlisidou I, Wood W. 2015. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *The FEBS Journal*, 282(8): 1368–1382.
- Wood W, Jacinto A. 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: Masters of multitasking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7): 542–551.
- Wu M, Tang W C, Chen Y, et al. 2024. Spatiotemporal transcriptomic changes of human ovarian aging and the regulatory role of FOXPI. *Nature Aging*, 4(4): 527–545.
- Xie X W, Liu M Y, Zhang Y W, et al. 2021. Single-cell transcriptomic landscape of human blood cells. *National Science Review*, 8(3): nwaa180.
- Xin F, Zhang X B. 2023. Hallmarks of crustacean immune hemocytes at single-cell resolution. *Frontiers in Immunology*, 14: 1121528.
- Yang M, Huang Y, Wu H L, et al. 2022. Blood transcriptome analysis revealed the immune changes and immunological adaptation of wildness training giant pandas. *Molecular Genetics and Genomics*, 297(1): 227–239.
- Yang P, Chen Y H, Huang Z Q, et al. 2022. Single-cell RNA sequencing analysis of shrimp immune cells identifies macrophage-like phagocytes. *eLife*, 11: e80127.
- Zdobnov E M, von Mering C, Letunic I, et al. 2002. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, 298(5591): 149–159.
- Zhang Y F, Gao S, Xia J, et al. 2018. Hematopoietic hierarchy—an updated roadmap. *Trends in Cell Biology*, 28(12): 976–986.
- Zhong Z J, Zhu X X, Tang Q Z, et al. 2022. Temporal microRNA expression profile of pig peripheral blood during postnatal development. *Animal Biotechnology*, 33(4): 680–689.
- Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, et al. 2019. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity*, 50(5): 1317–1334.e10.
- 刘广帅. 2017. 基于血液转录组分析的狼 (*Canis lupus*) 免疫系统和高原适应研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文.

杨秀峰. 2016. 基于高通量测序的狼和家犬血液转录组研究. 曲阜:  
曲阜师范大学硕士学位论文.  
赵晨晨. 2021. 基于绒山羊血液转录组标记辅助管理研究. 呼和浩

特: 内蒙古农业大学硕士学位论文.  
朱玉茹晨, 李宇, 王越. 2024. 单细胞转录组测序技术及其在免疫  
学研究中的应用. 海军军医大学学报, 45(2): 145–154.

## 陕西西安发现田鸫

### Fieldfare *Turdus pilaris* Found in Xi'an, Shaanxi, China

2022年3月29日, 在陕西西安长安区沣河梁家滩运动公园人工草坪(108°45'06" E, 34°08'23" N, 海拔399 m)中观察到1只雀形目(Passeriformes)鸫科(Turdidae)鸟类(图1), 该鸟与斑鸫(*Turdus eunomus*)混群在草地上觅食。该鸟主要特征为, 灰色的头部和腰部与栗褐色的背部形成对比, 下体白色, 胸部和两胁布满黑色纵纹, 两胁具有不同程度的赤褐色, 尾部深色。经查阅《中国鸟类野外手册: 马敬能新编版: 上下册》(约翰·马敬能 2022)和《中国鸟类观察手册》(刘阳等 2021), 确认其为田鸫(*T. pilaris*)。田鸫体长25~28 cm, 个体较一般的鸫大, 主要栖息于林缘疏林灌丛地带, 常成小群活动, 主要以昆虫和昆虫幼虫为食(赵正阶 2001)。该物种在国内繁殖于新疆北部, 越冬于新疆南部和青海西部, 内蒙古西部和东北部以及甘肃西部冬季有偶见记录; 北京和内蒙古赤峰有迷鸟记录(刘阳等 2021, 约翰·马敬能 2022)。经查阅《中国鸟类分类与分布名录》(第3版, 郑光美 2017)及中国观鸟记录中心(<http://www.birdreport.cn/>)记录, 确定田鸫为陕西省鸟类分布新记录种, 其在陕西的居留型有待进一步观察。



图1 田鸫

Fig. 1 Fieldfare *Turdus pilaris*

孟令微 李想\*

西北农林科技大学风景园林艺术学院 咸阳 712100

\* 通讯作者, E-mail: lx@nwafu.edu.cn;

第一作者介绍 孟令微, 女, 硕士研究生; 研究方向: 景观生态学; E-mail: mlw@nwafu.edu.cn。

收稿日期: 2022-05-04, 修回日期: 2022-10-18 DOI: 10.13859/j.cjz.202322112 CSTR: 32109.14.cjz.22112