

学号 2017300030039

密级 _____

武汉大学本科毕业论文

基于 GRN 的垂体基因表达差异分析

院（系）名称：弘毅学堂

专业名称：计算机科学与技术

学生姓名：郑晖

指导教师：蔡朝晖 副教授

二〇二一年四月

郑重声明

本人呈交的学位论文，是在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果，所有数据、图片资料真实可靠。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含他人享有著作权的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确的方式标明。本学位论文的知识产权归属于培养单位。

本人签名：_____ 日期：_____

摘要

诸如病毒或细菌感染之类的免疫挑战会引起组织炎症，并对下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴产生深远影响。其中，垂体是大脑的内分泌中心，并积极参与炎症事件的调节。然而，我们对免疫攻击过程中垂体细胞的转录反应知之甚少。

在这项研究中，我们使用免疫刺激剂（例如脂多糖（LPS）和多肌苷酸：聚胞苷酸（poly I:C））以一系列剂量和持续时间建立了炎症小鼠模型，并在其上对来自小鼠垂体的 4000 多个单细胞进行了单细胞 RNA 测序（Smart-seq2）。

我们在垂体腺中鉴定了 6 个主要细胞簇，并带有相应的标记物，这与先前的知识是一致的。在这些细胞中，短期、大剂量的 LPS 给药引起与免疫反应、细胞因子/趋化因子释放和反应相关的基因中 mRNA 水平的急剧增加。在恢复 3 - 5 周后，这些细胞的转录状态恢复正常，但与对照组相比，某些基因似乎被上调。对单细胞转录组轨迹的伪时间分析也证实了炎症反应的过程是随后恢复到正常状态。

这项研究的结果扩展了我们对炎症激发过程中垂体单细胞转录反应的了解，并提供了有关炎症反应过程中 HPA 轴激素调节的有价值的信息。

关键词：基因调控网络；单细胞测序；系统性神经炎症；垂体

ABSTRACT

Immune challenges such as viral or bacterial infections cause tissue inflammations and have profound effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Pituitary gland is the endocrine center of the brain and is actively involved in the regulation of inflammatory events. However, very little is known about the transcriptional response of pituitary cells during immune challenge.

In this study, we established inflammatory mouse models using immune stimuli such as lipopolysaccharides (LPS) and polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) with a series of doses and durations, and performed single-cell RNA sequencing (Smart-seq2) on over 4000 individual cells from mouse pituitary gland.

Concordantly, we identified 6 major cell clusters (Somatotropes, Corticotropes, Melanotropes, Lactotropes, Thyrotropes, Gonadotropes) in the pituitary gland with corresponding markers, which is consistent with previous knowledge. Within these cells, short-term, high-dose LPS administration invoked dramatic increase of mRNA levels in genes related to immune response, cytokine/chemokine release and response. The transcriptional state of these cells returns to normal after 3-5 weeks of recovery, but some genes appear to be upregulated compared to control group. Pseudo-time analysis of single-cell transcriptome trajectory also confirmed that the procedure of inflammatory response was followed by recovery to normal state.

The results from this study extends our knowledge of the transcriptional response of pituitary single cell during inflammatory challenge, and provide valuable information regarding the hormonal regulation with HPA-axis during inflammatory responses.

Key words: GRN; single cell sequencing; systemic neuroinflammation; pituitary

目 录

1 绪论	1
2 相关工作	3
2.1 单细胞测序	3
2.1.1 什么是单细胞测序	3
2.1.2 单细胞测序技术的发展	3
2.1.3 单细胞测序技术在垂体研究中的使用	5
2.2 基因调控网络	5
2.2.1 什么是基因调控网络	5
2.2.2 SCENIC 算法原理	6
3 实验设计	9
3.1 小鼠垂体单细胞测序	9
3.1.1 假设	9
3.1.2 研究方法与技术路线	9
3.1.3 可行性分析及潜在问题讨论	11
3.2 建立炎症小鼠模型	12
3.2.1 假设	12
3.2.2 研究方法与技术路线	13
3.2.3 可行性分析及潜在问题讨论	13
3.3 验证炎症条件下生物标志物	14
3.3.1 假设	14
3.3.2 研究方法与技术路线	15
3.3.3 可行性分析及潜在问题讨论	16
4 实验数据分析	17

4.1 测序数据预处理	17
4.1.1 Scater 质控	17
4.1.2 Seurat 初步分析	18
4.2 测序数据 SCENIC 分析	19
4.2.1 分析处理条件与垂体细胞状态之间的关系	20
4.2.2 分析不同细胞在炎症状态下的基因表达差异	20
4.2.3 分析导致炎症状态的转录因子	20
4.2.4 讨论和未来工作	21
5 结论	23
参考文献	25
致谢	29

1 緒論

在病毒或细菌感染期间，免疫因子会在人体中释放，通常会导致组织发炎并导致严重的疾病行为，例如食欲不振，嗜睡，退出正常的社交活动，疲劳，探索力下降，嗜睡，运动性快感不足，并减少情绪。

人们认为疾病行为是由可溶性促炎性细胞因子触发的，该因子由感染部位的免疫细胞产生。一些主要的促炎细胞因子包括 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha α (TNF- α) 和 interleukin-6 (IL-6)。如所报道的，这些源自免疫系统和免疫细胞的促炎细胞因子可对神经内分泌系统，特别是下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴产生深远的影响。

HPA 轴是体内的压力反应中心，连接中枢神经系统 (CNS) 和内分泌系统。HPA 轴的激活导致下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)，促使垂体释放肾上腺皮质激素 (ACTH) 和肾上腺糖皮质激素 (人体内糖皮质激素的活性形式是皮质醇，而啮齿动物中的皮质激素是皮质甾酮)。糖皮质激素作用于下丘脑和垂体，对免疫细胞产生负反馈，以抑制细胞因子的进一步合成和释放 (图1.1)，从而保护宿主免受过度活跃的免疫反应的有害影响。

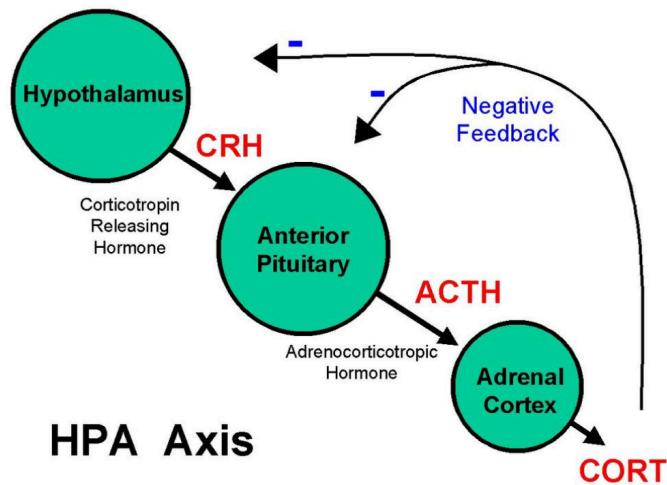


图 1.1 炎症状态下的 HPA 轴

重要的是，由炎症事件诱导的细胞因子 (IL1, IL6, TNF- α , IFN- γ) 通常循环至垂体前叶，并主要作用于垂体的促肾上腺皮质激素，从而促进释放抗炎激素，例如肾上腺皮质激素 (ACTH)。ACTH 被携带到肾上腺并作用于 ACTH 受体，从

而上调肾上腺皮质肾上腺皮质细胞中皮质醇的释放。随后，皮质醇在下丘脑和垂体在 HPA 轴上产生负反馈，以抑制促炎性细胞因子的进一步合成和释放。

此外，卵泡细胞代表垂体前叶中唯一的非内分泌细胞类型，并释放可能潜在影响垂体局部激素产生的 IL1 和 IL6，从而构成调节炎症反应的复杂系统。

因此，垂体积极参与炎症事件的调节。我们推测，基于垂体细胞转录谱的分析，对垂体细胞进行彻底和详细的分类，可以为后续研究其在炎症事件中的功能提供有价值的资源。

文章的主要贡献如下：

- 建立了一个涉及多种免疫刺激剂、多尺度给药剂量与恢复时程的小鼠炎症模型，并在单细胞水平上提供了其垂体细胞测序数据。
- 揭示了不同种类垂体细胞在参与中枢神经内分泌炎症调节的过程中的转录水平差异，表明其在炎症调节过程中扮演不同的角色。
- 发现了一类在不同种类垂体细胞中统一表达的转录因子，表明其在垂体参与中枢神经内分泌炎症调节过程中的重要地位。

文章结构安排如下：第二章介绍单细胞测序和基因调控网络（GRN）的相关工作；第三章介绍实验设计，包括小鼠垂体单细胞测序、搭建小鼠炎症模型以及验证炎症条件下生物标志物；第四章介绍使用 GRN 对小鼠垂体单细胞测序数据进行分析；第五章总结了我们的结论。

2 相关工作

2.1 单细胞测序

2.1.1 什么是单细胞测序

人类各种组织之间细胞的类型，状态和相互作用差异巨大。而单细胞 RNA 测序 (snRNA-seq) 技术提供了在单细胞水平观测基因表达的方法，可以更好地研究这些组织及其中存在的不同类型的细胞。

这一技术可以用于：

- 研究一个组织中到底存在哪些种类的细胞
 - 识别未知或少见的细胞类型或状态
 - 阐明在分化过程或时间及状态变化中基因表达的改变
 - 找出在不同条件下（如加药组和疾病组）在某一特定类型的细胞中差异表达的基因
 - 探究一种细胞类型之间基因表达的变化，同时纳入空间，调控和蛋白质信息
- 单细胞测序中解决一些较常见问题的方法 [1, 2] 包括：
- 探究异质性 (Studying heterogeneity)
 - 谱系路径分析 (Lineage tracing study)
 - 随机基因表达研究 (Stochastic gene expression study)

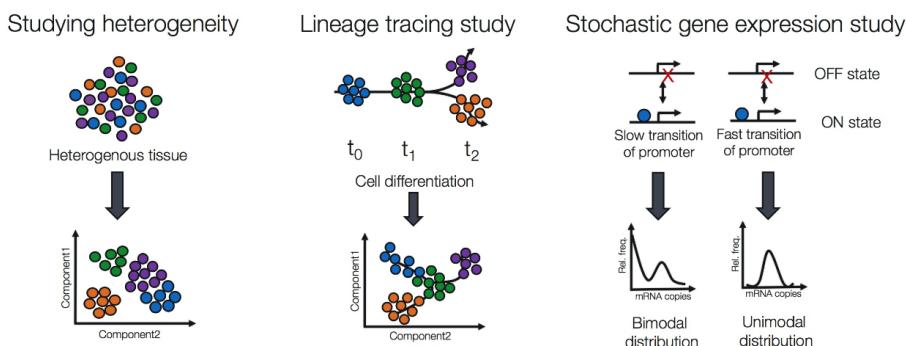


图 2.1 单细胞测序中解决一些较常见问题的方法

2.1.2 单细胞测序技术的发展

单细胞测序技术是本课题所主要依赖的一项技术，下面将对单细胞测序技术近年来的发展进行介绍。

单细胞测序技术最初起于 2006 年 Kurimoto 等人在 Nucleic Acids Research 上

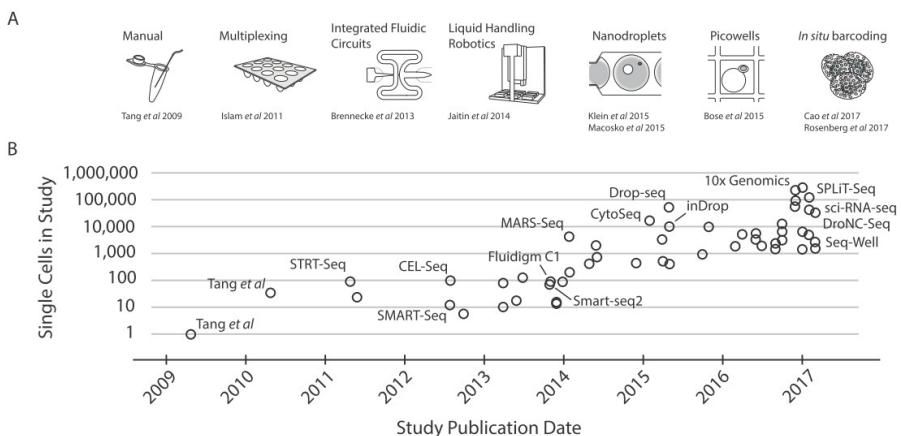


图 2.2 单细胞测序技术近年来的发展

发表的一篇文章 [3]，这篇文章对于后来单细胞转录组测序的原理发展有很大的影响。该研究主要特点在于加入了 T7 启动子，主要有如下两点考虑：

- cDNA 经历了两次扩增，分别为 20 个循环和 9 个循环，这将比直接扩增 29 个循环减少 PCR 扩增的偏差
- 由于试验后期并不是直接测序，而是通过 T7 启动子逆转录 cDNA 为 RNA，再通过 Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array 芯片杂交获得转录本信息。

到 2009 年，汤富酬等人在 *Nature Methods* 上发表了一篇关于单细胞测序的文章 [4]，正式拉开了单细胞转录组的大门。这项研究延用了 Kurimoto 等人在 2006 年工作 [3] 在末端加 A 思路，但是在最后读取 cDNA 信息的时候，这里使用了 Applied Biosystem 的二代测序 SOLiD system 平台，也就是取代了芯片的读取方式。值得注意的是，2005 年 454 系统问世，2007 年 SOLiD system 问世。可以说，是二代测序成就了这篇文章。

目前应用最广泛的是模板转换法，主要代表技术便是 SMART-seq[5, 6]，这也是我们在本课题中主要使用的测序技术。其实，在 2011 年的 START-seq[7]，就已经用到模板转换法，同时运用 Barcode 标记思路来达到相对高通量的单细胞转录组测序方法。稍微改进这种方法，将 Barcode 加在 3' 端，便可以富集 3' 端测序，同时在一开始就将测序接头设计到引物里去，以后不用再引入，便可以做高通量。如若再不加 Barcode，一个细胞的 cDNA 建立一个库，这样就可以获得全长的 cDNA 信息，也就是有了后来的 SMART-seq1&2。

2.1.3 单细胞测序技术在垂体研究中的使用

现在，这种技术的应用范围从微生物生态系统的多样性到人类癌症的基因组学。近年来，有很多使用单细胞测序技术探究在生理、病理等状态下细胞异质性的研究 [8–13]。在关于垂体的研究中也广有使用，但以往的研究 [14–17] 主要关注于某个发育过程中的静态分类问题，很少有研究使用单细胞转录组测序来进行动态功能研究。

这项研究中，我们主要关注不同的垂体细胞如何响应炎症刺激。我们将基于病毒或细菌感染建立炎症小鼠模型，并主要使用单细胞转录组测序以及数据分析和数据挖掘来找出炎症、垂体和激素之间的关系，动态炎症研究将成为我们实验中最重要的部分。

这项研究可以使我们对人体对病毒或细菌感染的免疫防御具有更清晰的认识。更重要的是，它具有非常重要的临床意义，我们希望获得用于免疫诊断的特定标记。此外，这项研究也可以为我们提供关于单细胞转录组测序技术应用的新思路。

2.2 基因调控网络

2.2.1 什么是基因调控网络

基因调控网络 (GRN) 定义并维持特定于细胞类型的转录状态，这反过来又是细胞形态和功能的基础。每种细胞类型或稳定状态均由活性转录因子 (TF) 的特定组合定义，这些转录因子与基因组中的一组顺式调节区域相互作用（与染色质结构相互作用），以产生特定的基因表达谱 [18, 19]。活性 TF 及其靶基因的组合通常表示为 GRN。

揭露 GRN 是基因组研究领域的主要挑战之一。一旦确定了驱动并维持细胞状态行为的关键调节剂，它们最终就可以用来干扰这些调节程序。实例包括通过 Yamanaka 等人 [20] 提出的 TF 组合，将成纤维细胞重编程为诱导性多能干细胞 (iPS)，还有许多其他重编程途径，它们使用 TF 的特定组合将 GRN 从一种状态引导到另一种状态 [21, 22]，以及最近在癌症治疗中的尝试，其中癌细胞被推入易受特定药物影响的状态 [23, 24]。

基于大规模转录组和表观基因组数据来计算预测 GRNs 是一个广泛研究的领域。相关算法包括 GENIE3[25]、GRNBoost[26] 和 BEELINE[27] 等。在这项研究中我们主要使用基于 GRNBoost 的 SCENIC[28, 29]，进行基因调控网络推断。

2.2.2 SCENIC 算法原理

SCENIC 的工作流程主要有 3 步：GRNBoost，基于共表达确定潜在的 TF 靶标；RcisTarget，进行 TF 基序富集分析并确定直接的靶标（调节子）；AUCCell，用于对单个细胞上调节子（或其他基因集）的活性进行评分。下面我们将对每一步算法原理进行介绍。

(1) GRNBoost

GENIE3 训练预测数据集中每个基因表达的随机森林模型，并将 TF 的表达用作输入。然后使用不同的模型来得出 TF 的权重，并测量它们各自的相关性以预测每个靶基因的表达。权重最高可以转化为 TF 目标监管链接。

GRNBoost 基于与 GENIE3 相同的概念：纯粹从基因表达矩阵中推断每个靶基因的调节子。但是，GRNBoost 使用 Gradient-Boosting Machines (GBM) [30] 实现。GBM 是一种集成学习算法，它使用 boosting[31] 作为一种策略，将浅树等多个弱学习者组合成一个强者。这与 GENIE3 使用的随机森林相反，该方法使用装袋 (bootstrap 聚合) 进行模型平均以提高回归准确性。GRNBoost 使用 gradient-boosted stumps (深度为 1 的回归树) [32] 作为基础学习器。

GRNBoost 的主要贡献是将这种多元回归方法转换为基于 Apache Spark[33] 的 Map/Reduce[34] 框架。在 GRNBoost 中，核心数据条目是基因名称的元组和基因表达值的载体。使用 Spark RDD，GRNBoost 首先在计算集群中可用的节点上划分基因表达载体。随后，它构建了一个预测矩阵，其中包含所有候选调节基因的表达值。使用 Spark 广播变量，将预测变量矩阵广播到不同的计算分区。在框架的映射阶段，GRNBoost 遍历基因元组 (表达向量)，并使用预测变量矩阵来训练 XGBoost 回归模型，并将表达向量作为各自的训练标签。从训练有素的模型中，可以得出监管者与目标之间的关系强度，并将其作为一组网络边缘发出。在缩减阶段，所有边缘集合都组合到最终的监管网络中。

(2) RcisTarget

RcisTarget 可为基因列表识别富集的 TF 结合基序和候选转录因子。简而言之，RcisTarget 基于两个步骤。首先，它选择在基因组中的基因转录起始位点 (TSS) 的周围环境中显着过量表达的 DNA 基序。这是通过在数据库中应用基于恢复的方法来实现的，该数据库包含每个基序的全基因组跨物种排名。保留了注释为相应 TF 并获得归一化富集得分 (NES) > 3.0 的基序。接下来，对于每个基序和基因

组，RcisTarget 预测候选目标基因（即，基因组中排在最前沿的基因）。该方法基于 Aerts 等人 [35] 描述的方法，该方法也可以在 i-cisTarget（网络界面）[36] 和 iRegulon（Cytoscape 插件）[37] 中实现。因此，当使用相同的参数和数据库时，RcisTarget 可提供与 i-cisTarget 或 iRegulon 相同的结果，并以 Janky 等人 [37] 中的其他 TFBS 富集工具为基准。

(3) AUCell

AUCell 是一种新方法，可让研究人员在单细胞 RNA-seq 数据中鉴定具有活跃基因调控网络的细胞。AUCell 的输入是一个基因集，输出是每个单元格中“活动”的基因集。在 SCENIC 中，这些基因集是调控因子，由 TF 及其推定的靶标组成。

AUCell 会计算特定细胞中所有基因的排名，将其作为恢复曲线下的面积（在恢复曲线下的面积）来计算调节子的富集程度，从而根据基因的表达值对其进行排名。然后，AUCell 使用 AUC 来计算输入基因集的关键子集是否在每个细胞的排名顶部都得到了富集。通过这种方式，AUC 代表了基因签名中表达基因的比例及其与细胞内其他基因相比的相对表达值。

3 实验设计

3.1 小鼠垂体单细胞测序

在小鼠垂体单细胞中进行转录组测序，然后在垂体细胞中定义和分类特定的细胞类型。

3.1.1 假设

垂体是下丘脑的重要输出靶，并且是许多生理功能（例如生长，繁殖和内分泌释放）的中央调节器。鉴于我们了解其在释放几种主要激素中的作用，垂体细胞，特别是位于垂体前叶的垂体细胞（腺垂体）可分为五种细胞类型。

考虑到日益发展的单细胞测序技术，可以并行分析数百个细胞，从而提供了种群中单个细胞异质性的无偏见。单细胞测序方法有很多，例如 STRT（单细胞标记逆转录），CEL-seq（通过线性扩增和测序的细胞表达），Smart-seq，Smart-seq2，这些技术为我们提供了强大的工具投资很多生物学问题。尽管由于金钱和时间的浪费，这些方法只能对少量的单个细胞进行测序，但我们无法获得大型的样品库。虽然 Drop-seq 是一种通过将细胞包裹在微小液滴中来分析数千个单个细胞中 mRNA 表达的方法，但液滴-通过在微流体装置中精确结合水流和油流形成的纳升级水室已被用作 PCR 的微小反应室和逆转录。这种方法似乎具有很多优点，例如便宜，高效，文库质量不高，基因检测率不高等，例如每个细胞只能检测 2000-3000 个基因。对我们而言，重要的是选择一种基于高通量和高度自动化的适当单细胞测序方法，以确保我们可以获得高灵敏度和准确性的测序数据。

我们从 Tang Lab (FuChou Tang 博士) 那里获得了一种新的改进的 Smart-seq2 方法，该方法可最大程度地减少操作并利用单管反应来避免部分材料损失。反转录时，它将为每个细胞提供特定的细胞条形码，除了为每个 mRNA 提供不同的独特分子标识符 (UMI) 外，我们还可以将细胞集中在一起以进行测序文库构建，并使用 UMI 进行质量控制，以便获得高质量的单细胞基因表达数据。

3.1.2 研究方法与技术路线

(1) 垂体细胞解剖和消化方法的研究

尽管看似微不足道，但快速高效地捕获单个细胞却是单细胞测序的主要挑战之一。由于没有用于单细胞消化的标准方法，因此我们需要开发一种用于获取垂体细胞的有效方案。垂体位于下丘脑下方的颅骨底部。通过举起小鼠大脑，垂体

很容易暴露，并可以直接收获结构。用无菌手术刀将腺切成小块，然后将小组织片在室温下分别在 1mg / mL 胶原酶 ii 和 iv 中孵育 22 分钟，并在消化期间上下吸移。胶原酶孵育后，在消化管中加入等体积的 0.25% 胰蛋白酶 2 分钟。消化一段时间后，我们可以使用 40um 过滤器收集单个细胞，然后添加相同体积的 DPBS。然后将细胞悬液以 1000g 离心 5 分钟。离心后，我们丢弃上清液并将细胞重悬于 DMEM 培养基中。我们可以使用显微镜观察细胞状态并计数细胞数量（图3.1）。

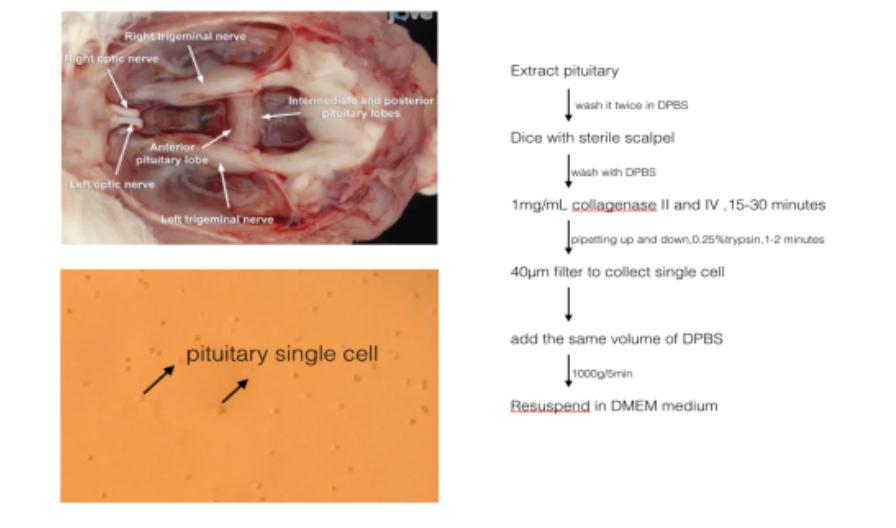


图 3.1 垂体细胞解剖和消化

(2) 使用基于 smart-seq2 测序的单细胞转录组分析方法获得垂体单细胞转录组

我们使用了改良的 Smart-seq2 协议，该协议是从 Tang Lab 获得的应用于单细胞 RNA-seq 的协议。简短地，垂体消化后，用白蛋白牛血清（BSA）溶液洗涤单个垂体细胞，然后通过移液管将其置于裂解缓冲液中。在逆转录反应之前，将细胞剧烈涡旋 40 秒，以完全裂解细胞。逆转录反应使用 25 nt oligo (dT) 引物进行锚定，该引物锚定有 8 nt 细胞特异性条形码和 8 nt 唯一分子标识符 (UMI)。第一链合成功后，合成第二链 cDNA，并通过 16 个 PCR 循环扩增 cDNA。然后将单个细胞的扩增 cDNA 汇集在一起 以进行以下步骤。使用生物素化的预索引引物，通过另外 4 个 PCR 循环进一步扩增 PCR 产物，以将生物素标签引入扩增的 cDNA 的 3' 末端。Covaris S2 将大约 300 ng cDNA 剪切至大约 300 bp，并通过 Dynabeads MyOne 链霉亲和素 C1 珠 (Thermo Fisher) 捕获 cDNA 的 3' 末端。RNA-seq 文库使用 Kapa Hyper Prep 试剂盒 (Kapa Biosystems) 构建，并在 Illumina HiSeq 4000 平台（由 Novogene 测序）上进行 150 bp 的末端测序（图3.2）。

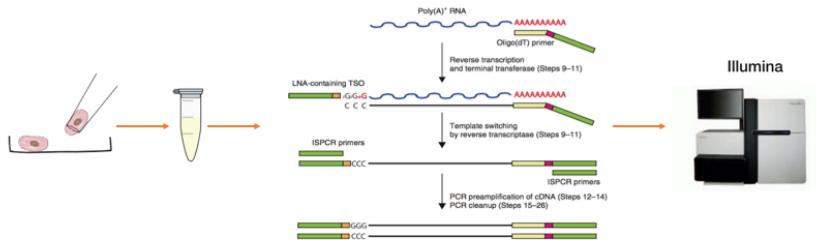


图 3.2 SMART-seq2 工作流程

(3) 单细胞测序数据分析

原始读段将首先被附加在双端读段的读段 2 中的特定细胞条形码信息分隔。将 UMI 信息与相应的读取 1 对齐，然后对其进行修剪以除去模板开关寡核苷酸 (TSO) 序列和 poly A 尾序列。随后，去除带有接头污染物和低质量碱基的读数 ($N > 10\%$)。G1 周期以外的单元也将被删除。接下来，使用 TopHat (2.0.12 版) 将干净的读数与 mm10/GRCm38 对齐。然后，使用 HTSeq 包中的 htseq-count 对唯一映射的读数进行计数，并按特定于细胞的条形码分组。根据 UMI 信息，删除每个基因具有相同 UMI 序列的重复转录本。最后，将给定细胞内每个基因的不同 UMI 计为该基因的转录本拷贝数。对于最终的测序数据，我们将量化每个细胞中基因和转录本的数量。检测到的基因少于 2000 个或转录本少于 100,000 个的细胞将被过滤掉。表达水平通过 $\log_2(TPM/10 + 1)$ 进行归一化，其中 TPM (每百万转录本) 的计算方法是：每个基因的 UMI 数除以给定细胞的所有 UMI。

Seurat 方法将用于分析关于 $\log_2(TPM/10 + 1)$ 表达值的单细胞数据。我们将使用 t-SNE (t 分布随机邻居嵌入) 对收集单元进行分离和分类。我们将使用垂体细胞标记物来验证已测序的单个细胞实际上是来自垂体。

3.1.3 可行性分析及潜在问题讨论

我们期望描绘小鼠垂体细胞的基因表达情况，并定义垂体中特定的细胞类型。

因为在许多转录本测序案例中，尤其是对于单细胞测序，细胞消化可能非常具有挑战性，因为用胰蛋白酶或胶原酶对组织进行酶处理可能会对细胞活力产生未知影响，从而可能影响每个细胞的转录谱。因此，我们首先要关注的是常规的全细胞消化程序是否会人为地引起线粒体应激和转录干扰。为了解决这个问题，我们首先可以通过台盼蓝排斥试验来测试消化细胞的活力。锥虫蓝排除测试基于以

下原理：活细胞具有完整的细胞膜，不包含某些染料，例如锥虫蓝，曙红或丙啶，而死细胞则没有。因此，在细胞解离后，垂体单个细胞将悬浮在含锥虫蓝的 PBS 中，然后进行检查以确定具有透明细胞质的细胞（活细胞）相对于具有蓝色细胞质的细胞（非活细胞）的百分比。这样，我们可以确保要测序的细胞是健康的和存活的。我们还可以通过在细胞消化过程中使用转录抑制剂（例如放线菌素 D (ActD)）来最大程度地减少人为诱导的转录干扰，并忠实检测基线转录谱和急性转录变化。ActD 抑制所有三种真核 RNA 聚合酶介导的转录过程，并提供广谱，快速的转录抑制作用，几乎没有可逆的可逆性。

该实验的主要挑战是通过手工收集可获取的垂体细胞数量有限，以及通过手工收集垂体细胞引起的潜在偏倚。细胞捕获非常耗时，并且获取足够的细胞用于细胞类型分类将花费大量的精力。除此之外，由于我们只是一厢情愿地选择完整且丰满的细胞更适合测序，因此我们会选择单个细胞，因此我们可能会错过许多看起来不如完整细胞的细胞。为了解决这个问题，我们可以将我们的原始数据与垂体发育论文上的先前论文进行比较，并更仔细地分析我们的测序数据，试图找到与 300 个垂体单细胞的基因相关性。我们还将尝试获取尽可能多的单个单元格以扩大样本量。

3.2 建立炎症小鼠模型

建立病毒或细菌感染的炎症小鼠模型，并检查该炎症小鼠模型的可行性。

3.2.1 假设

垂体在调节人体的生长，发育及许多其他重要功能中起着关键作用，它是 HPA 轴的一部分，并且是大脑的内分泌中心，它控制激素的分泌。炎性细胞因子可以刺激垂体释放激素的分泌，例如肾上腺皮质激素和 β -内啡肽，它们对炎症或应激刺激具有抗炎特性。垂体前叶细胞可产生 IL1 和 IL6，这可能会影响局部激素的产生。因此，垂体积极参与免疫反应和炎症过程。

LPS 和 Poly I:C 在炎症过程中是有效的免疫刺激。它们的行为就像细菌或病毒感染一样。将此类免疫激活剂应用于小鼠可引起严重的免疫反应。我们建议使用行为范式和细胞因子 Elisa 方法来测试使用 LPS 和 Poly I:C 诱导炎症小鼠模型的可行性。使用可靠的炎症反应小鼠模型，可以轻松地进行进一步的测序实验，以测试炎症诱导的小鼠垂体细胞转录谱的变化。

3.2.2 研究方法与技术路线

(1) 给小鼠外周注射 LPS 或 Poly I:C 以模仿细菌或病毒感染，或外周注射 TNF- α 模仿炎症反应

由于垂体内分泌细胞与激素分泌有关，而垂体细胞可能受到雌性激素水平的影响，因此我们选择只使用雄性小鼠进行实验，以保证实验数据的一致性。我们将分析急性 LPS 和细胞因子刺激后的免疫反应。

将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每公斤体重 50 mg 的剂量通过细菌性脂多糖（来自大肠杆菌 O111: B4, Sigma 的 LPS）进行腹膜内（ip）注射，并使用双链 RNA Polyinosinic–聚胞苷酸钠盐（Sigma 公司生产的 Poly I:C），每公斤体重 20mg。对于外周细胞因子治疗，将以重组小鼠细胞因子 TNF- α 处理小鼠，剂量为每公斤体重 500 μ g。用于对照实验的小鼠将接受媒介物注射（盐水）。注射药物后，等待约 6 个小时，对小鼠进行开放式试验，并从眼眶中收集全血。

(2) 通过行为测试范例测试炎性小鼠模型的可行性

免疫刺激注射已显示出诱导免疫攻击和疾病行为，运动能力的持续下降表明。我们使用开放式试验中运动的减少作为检验炎症诱导小鼠模型的功效和可行性的基准。

免疫刺激约 6 小时后，将对小鼠进行公开测试。野外测试使用一个大的立方体箱，长 1m \times 宽 1m \times 高 1m。立方体的顶部通常不被覆盖。我们将鼠标放在底部表面的中间，随着鼠标自由移动并探索环境，在 5 分钟的过程中记录了鼠标的移动。在测试过程中，我们将通过相机记录其运动轨迹。测试完成后，将使用计算机跟踪程序（MATLAB）分析动物随时间的运动。在野外试验之后，我们将比较炎症诱发小鼠和对照小鼠之间的运动，以得出有关炎症诱发小鼠模型可行性的结论。

(3) 测量血液促炎细胞因子水平

对我们而言，收集小鼠炎症信息很重要。免疫刺激约 6 小时后，我们将通过 Elisa 试剂盒从眼眶收集全血并测量血液促炎细胞因子，例如 IL-1, IL-6, TNF- α 。同时，将通过定量 PCR 评估垂体解剖中 TNF- α , IL-1, IL-6 的 mRNA 水平。

3.2.3 可行性分析及潜在问题讨论

在可行的炎症诱导的小鼠模型中，我们期望看到减少的运动，通过 Elisa 血液样本测定的促炎因子水平升高以及通过 qPCR 评估的垂体细胞促炎因子 mRNA 水平升高。这些指标在治疗（注射 Poly I:C, LPS, TNF- α ）与对照组之间的小鼠重复

测量中应保持一致，这将有助于我们得出结论：炎症诱导的小鼠模型是可行的。

该实验的主要挑战将是 Poly I:C 注射是否会导致对小鼠的一致性免疫作用。在我们的一些初步测试中，我们发现即使高剂量的 Poly I:C 注射后，一部分小鼠仍对 Poly I:C 表现出极大的抵抗力。这些小鼠保持活跃，垂体细胞转录组的测序数据与对照小鼠一样正常。这使我们相信，在进行以下实验之前，必须进行行为测试和细胞因子测试。根据我们的协议，如果在行为测试和血液细胞因子测试中，鼠标碰巧显示出对 Poly I:C 注射的抗性，我们将不会对鼠标执行单细胞测序。

我们将尝试找到一种更稳定的方法来建立病毒/细菌感染的小鼠模型。

3.3 验证炎症条件下生物标志物

剖析垂体功能性单细胞命运的变化，并验证炎症条件下分泌激素的功能以及生物标志物。

3.3.1 假设

单细胞 RNA 测序技术的快速发展为我们提供了高效的工作流程，即使我们以前的基因知识有限或猜测工作繁重，也使我们能够获取单个细胞的转录信息。这项技术已在科学的研究的各个方面使用。例如，在开发领域，它扩展了我们在个体开发过程中的知识，并帮助我们识别了未知的细胞标志物和多种细胞类型。在癌症领域，这项技术已帮助我们识别癌症类型，并帮助进行特定的医学诊断和个性化治疗。

单细胞 RNA 测序技术对免疫研究也有很大影响。例如，最近，对免疫细胞的研究表明，即使是从看似均一的种群中衍生出来的，单个细胞在其基因表达，蛋白质水平或表型输出方面也可能表现出对外部刺激的不同反应。麻省理工学院和哈佛大学的研究小组使用单细胞 RNA 测序方法发现，LPS 处理后，骨髓来源的树突状细胞（BMDC）在每个细胞中的基因表达和剪接模式都有很大的差异。显然，单小区技术可用于发现小区与小区网络之间的各种功能或响应。这些对健康和疾病组织的初步研究为我们进一步研究免疫刺激反应的单个细胞功能铺平了道路。

在这里，我们将使用免疫刺激来研究炎症激发是否会导致参与免疫应答的垂体细胞转录的改变。我们将使用不同剂量的相同免疫刺激，并将免疫刺激在不同时间点应用于小鼠。根据我们的初步数据，我们想知道当垂体单细胞受到免疫刺激时是否存在命运改变点。我们相信，每种炎症都有一个独特的生物标志物，经过仔细的数据分析，可以得到用于免疫诊断的标志物。在此过程中，我们将尝试

基于单细胞转录组测序分析寻找垂体中未知的分泌激素，并通过 RNA 原位杂交或免疫染色找出激素的靶向脑区域。

3.3.2 研究方法与技术路线

(1) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 LPS，在不同时间点应用刺激剂，以探索细菌对小鼠的影响

我们仅使用雄性小鼠来保证实验数据的一致性，并避免雌性激素引起的可能干扰。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每公斤体重 50 mg（高剂量）和每公斤体重 10 mg（低剂量）的剂量腹膜内（i.p.）注射 LPS。对于每剂 LPS，我们将采用两种不同的时间范围，一种是 6 小时（急性反应较长时间），另一种是 3 小时（急性反应较短时间）。免疫刺激后，将对小鼠进行野外试验，并从眼眶中收集全血。垂体细胞的单细胞测序将随后进行。我们将通过解剖提取垂体小鼠，并将细胞消化成单细胞悬液。然后，我们将使用基于 smart-seq2 测序的单细胞转录组分析方法来获得响应 LPS 给药的垂体单细胞转录谱，并分析剂量和时间尺度对垂体细胞的影响。

(2) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 Poly I:C，在不同的时间应用刺激，以探索病毒对小鼠的影响

如上所述，我们仅使用雄性小鼠进行实验。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以 20 mg / kg 体重（高剂量）和 10mg / kg 体重（低剂量）的剂量腹膜内（ip）注射 poly I:C。Poly I:C 的剂量我们将使用两种不同的时间尺度，一种是 6 小时（急性反应较长时间），另一种是 3 小时（急性反应较短时间）。在免疫刺激后，对小鼠进行免疫进行野外测试，并从轨道收集全血。垂体细胞的单细胞测序将随后进行。我们将使用 smart-seq2 获得响应 poly I:C 给药的垂体单细胞转录谱，并分析剂量和时间尺度对垂体细胞的影响。

(3) 给小鼠外周注射高剂量或低剂量的 TNF- α ，以探讨促炎作用对小鼠的影响

我们使用雄性小鼠进行实验。将两个月大的小鼠随机分配至治疗组，并以每千克体重 500 μ g 的剂量腹膜内（ip）注射促炎性 TNF- α （小鼠，Sigma），并等待 6 小时和 1 mg / kg 体重，等待 6 小时。注射免疫刺激后，我们测试小鼠的运动能力并从眼眶中提取全血以进行垂体单细胞 RNA 测序。我们将使用 smart-seq2 获得对高剂量或低剂量 TNF- α 响应的垂体细胞的转录谱（图3.3）。

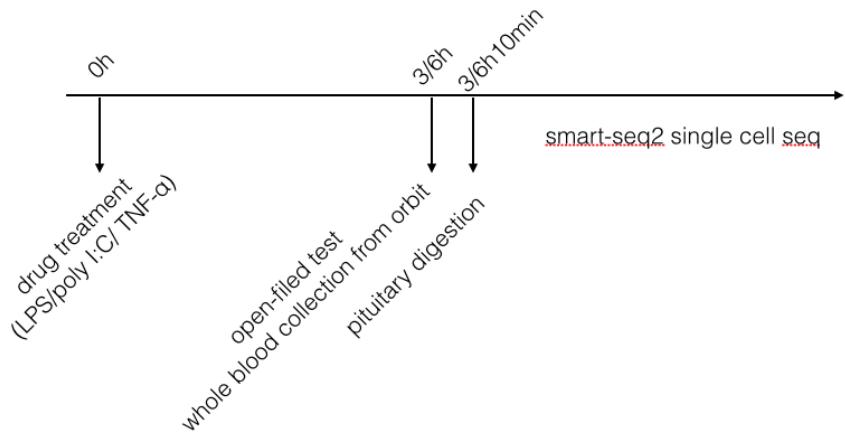


图 3.3 实验工作流程

(4) 对四种药物治疗的转录谱进行数据分析

根据测序结果，我们将使用 t-SNE（t 分布随机邻居嵌入）对我们收集的转录谱进行分组和分类，并使用垂体细胞标记物验证测序数据。将制作细胞谱图，以找出炎症治疗与基因表达谱之间的关系。如果我们能够在不同的免疫挑战条件和不同的免疫刺激时间尺度下鉴定出特定的炎症生物标记，那将是理想的。

(5) 通过原位杂交，细胞因子 Elisa 或 Western blot 验证炎症测序结果

收集数据后，我们将使用 RT PCR 或原位杂交来验证测序数据。如果观察到未知的分泌激素，我们将尝试通过免疫染色鉴定其靶标大脑区域或通过体外筛选测定法找到其靶标受体。

3.3.3 可行性分析及潜在问题讨论

我们期望观察在不同的免疫挑战条件下获得的特异性生物标志物。但是，主要问题是数据批处理效果和数据质量。因为我们使用移液器收集单个细胞，所以收集到的细胞可能会有偏差。而且，由于长的细胞采摘时间，细胞活力将被削弱。不同的人和不同的操作时间将导致对细胞的未知影响。为了降低主观效果，将需要对细胞分类进行更多的实践以缩短拣选时间，并且必须优化细胞拣选工作流程。我们还将每次都准备更多的细胞库以降低批次效应。

4 实验数据分析

4.1 测序数据预处理

通过图4.1a 所示的流程，我们获取了小鼠垂体细胞的单细胞测序数据。将测序得到的 fastq 文件利用 CellRanger 软件进行上游分析，序列回帖参考基因组选用 Ensembl (GRCm38)。回帖得到的基因表达矩阵通过 Scater[38] 进行质量控制，筛除低质量细胞，再用 Seurat v3[39, 40] 进行基础下游分析。

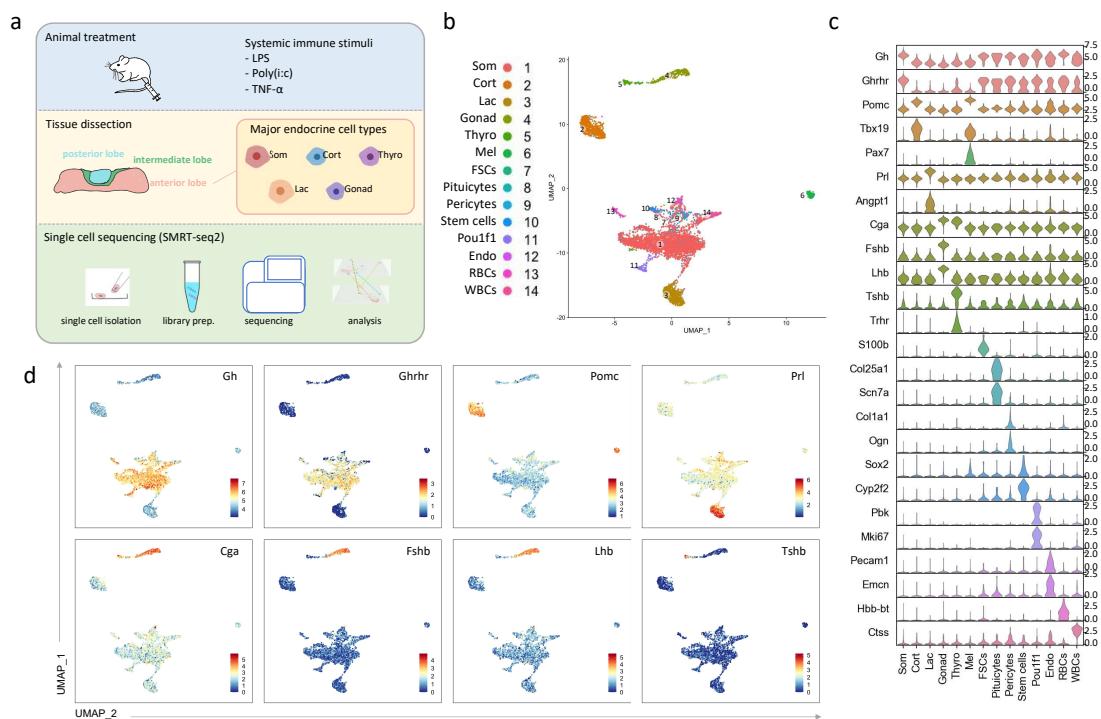


图 4.1 单细胞测序数据预处理

4.1.1 Scater 质控

将测序数据读入 R 工作环境中，将表达矩阵转换为 SingleCellExperiment (SCE) 对象，对该 SCE 对象依次在细胞水平 (Cell-level QC)、基因水平 (Feature-level QC) 以及变量水平 (Variable-level QC) 执行质控。在细胞水平质控中，去除文库含量小 (low library size)、基因含量少 (low features) 和线粒体基因含量高 (high mitochondrial percentage) 的细胞；在基因水平质控中，去除表达量为 0 的基因以及线粒体基因、核糖体基因，以避免在 PCA 部分影响主成分判别；在变量水平中，对每个变量方差解释的贡献率 (variance explained) 做统计，查看是否有异常变量

出现。

通过 CellRanger 上游管线处理后，我们共收集到 6727 个细胞，平均每个细胞检测到 3546 个基因。在经过 Scater 质控后，保留了 5506 个细胞。

4.1.2 Seurat 初步分析

经过质控处理后的数据转换为 Seurat 对象，执行 Seurat 基础分析流程：归一化、特征选择、放缩、线性降维、构建最短临近图、Louvain 聚类以及 UMAP 可视化。

在此基础上，结合聚类信息以及中枢神经系统各细胞类型已知的基因 marker（表4.1），对数据进行细胞类型注释。我们在垂体腺中鉴定了 6 个主要细胞簇（Somatotropes, Corticotropes, Melanotropes, Lactotropes, Thyrotropes, Gonadotropes），这与先前的知识是一致的。详见图4.1。

表 4.1 中枢神经系统各细胞类型已知的基因 marker

细胞类型	基因 marker
Somatotropes	Gh, Ghrhr, Pappa2, Gnm
Lactotropes	Prl, Angpt1
Corticotropes	Pomc, Crhr1, Tbx19
Melanotropes	Pomc, Tbx19, Pax7, Pcsk2, Rbfox3
Gonadotropes	Fshb, Lhb, Gnrhr, Cga, Nr5a1
Thyrotropes	Tshb, Trhr, Cga
Pou1f1 progenitors	Pbk, Top2a, Mki67
RBCs	Hbb-bt, Hbb-bs
WBCs	C1qa, Ctss, Ptprc
Folliculostellate cells	S100b, Fxyd1
Endothelial cells	Pecam1, Emen, Plvap
Pituicytes	Gja1, Scn7a, Col25a1
Pericytes	Colia1, Dcn, Ogn, Lum, Pdgfrb
Stem cells	Sox2, Aldh3a1, Aldh1a2, Cgp2f2

在这项研究中，我们主要关注的是系统性神经炎症对于垂体细胞的单细胞转录水平影响。因而，我们依据上面得到的细胞注释对数据进行筛选，只留下 Somatotropes、Corticotropes、Lactotropes、Thyrotropes 以及 Gonadotropes 五类细胞，共 3788 个细胞。我们之后的分析便都以此数据上开展。

4.2 测序数据 SCENIC 分析

我们对筛选出来的测序数据进行 SCENIC 分析，以推断其潜在转录因子及对应目的基因。这一步的输出是一个 AUC-score 矩阵，矩阵的每一个单元表示每一个细胞中对每个基因集合的整体趋势评分，当其符号为正时上调，反之下调。我们对该矩阵进行降维聚类，并用其聚类结果作为细胞是否处于炎症状态的判别标准，如图4.2a,b。对于每一类细胞，该分类结果显然可以很好地匹配 UMAP 可视化后的数据分布。

在这里，我们使用 SCENIC 的聚类结果，代替原始基因表达矩阵聚类结果，作为细胞是否处于炎症状态的判别标准。其原因是 SCENIC 能够觉察到一整个基因集合的整体趋势，去除批次效应所带来的影响，获得更为生物合理的结果。这里所指的批次效应，是由于我们在从多只小鼠上收集数据，会引入一些与生物处理无关的噪声（如温度、研磨程度等），而这些噪声会极大影响基于原始基因表达矩阵的聚类过程。相较之下，SCENIC 的结果则可以尽可能降低批次效应所带来的影响。其在 GRNBoost 之后添加了 RcisTarget 过程，使得其在推理 GRN 的时候不再单纯地依赖 GRNBoost 得到的相关性，而是对 GRNBoost 推理得到的相关性利用生物学的先验知识进行修剪，只留下具备因果关系的转录因子及其目标基因。

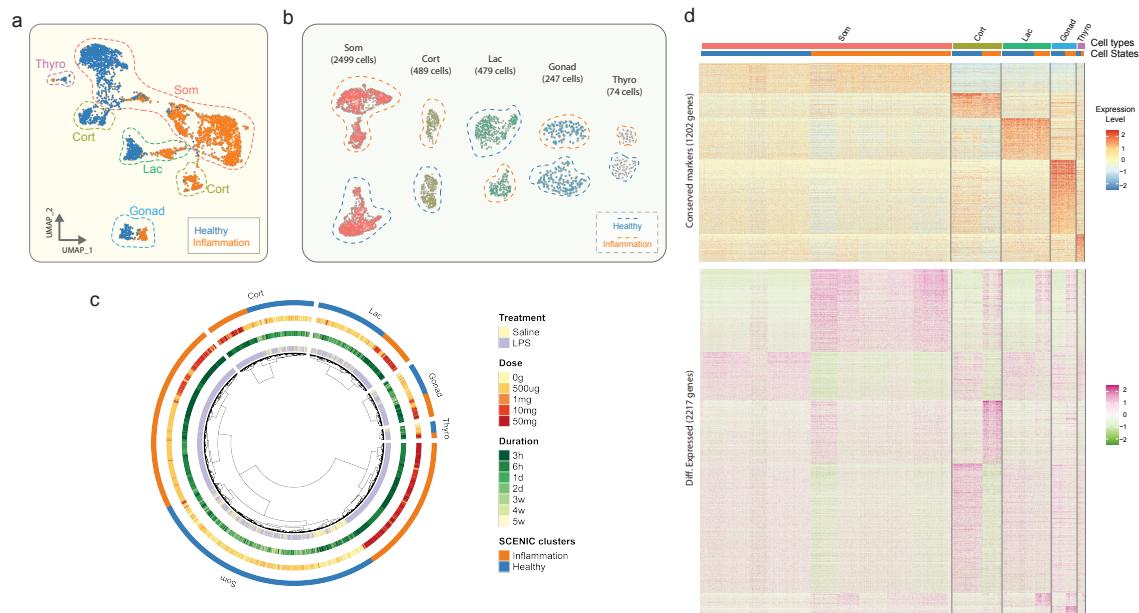


图 4.2 单细胞测序数据 SCENIC 分析

4.2.1 分析处理条件与垂体细胞状态之间的关系

在我们所构建小鼠炎症模型中，我们依据免疫刺激剂、给药剂量与恢复时间尺度等因素建立了一系列实验。为了揭示这一系列因素与垂体细胞状态之间的关系，我们将这些处理条件与 SCENIC 聚类结果进行整合，如图4.2c 所示。

我们可以看到所有注射 saline 的处理组，基本都处于健康 (healthy) 状态。除此之外，还有注射 LPS 的处理组也对应到了健康 (healthy) 状态。通过观察给药剂量与恢复时间尺度因素，我们可以发现这些细胞大多是注射低剂量 LPS 或者经历了长时程的恢复，在这种情况下神经系统仅有少量垂体细胞处于免疫应激状态。相比之下，注射高剂量 LPS 且仅经历短时程恢复的处理组则大多处于炎症 (inflammation) 状态。

4.2.2 分析不同细胞在炎症状态下的基因表达差异

我们进一步比较了垂体中不同细胞在炎症状态下的基因表达差异，见图4.2d。该图的上半部分是垂体各类细胞在其对应基因 marker 上的基因表达热图。同类细胞对应的基因 marker 无论中枢神经系统是否处于炎症状态，都会在该类细胞中稳定表达。然后，我们对每一类细胞分析其炎症状态与健康状态下的差异表达基因集合，并将其整合，便得到了该图的下半部分。

我们发现同处于炎症状态，垂体中不同细胞应对炎症所做出的基因表达调整并不一致。例如，在炎症状态 Somatotropes 中上调最显著的基因集合并不是在炎症状态 Corticotropes 中上调最显著的基因集合。这便说明，在中枢神经内分泌系统处于炎症状态时，垂体内各类细胞会采取不同的应激方式，组成一个调节炎症反应的复杂系统。

4.2.3 分析导致炎症状态的转录因子

我们依据 SCENIC 过程得到的 AUC-score 矩阵，统计出每个转录因子的 AUC-score 密度分布，我们希望找到具备双峰分布或者重尾分布的转录因子。对这些转录因子的分布进行自适应二值化，我们发现其标签可以和之前使用 SCENIC 聚类结果判定的细胞状态很好地匹配起来（见图4.3）。

我们通过上面过程找到的转录因子涉及 Stat、Irf 以及 NfkB 等转录因子家族，这些转录因子大多是与免疫过程相关的。例如，Irf7 编码干扰素调节因子 7，以往实验数据表明其在病毒诱导的细胞基因（包括 I 型干扰素基因）的转录中起作用。这些转录因子并没有像之前分析的差异表达基因那样展现出细胞种类特异性，而

是在整个炎症状态的垂体细胞中广泛表达。

这就表明 Stat、Irf 以及 Nfk2 等转录因子家族在垂体参与中枢神经内分泌炎症调节过程中扮演着重要的角色，影响着各类垂体细胞的调控路径。换句话说，Stat、Irf 以及 Nfk2 等转录因子家族是垂体参与中枢神经内分泌炎症调节过程中的 Master Regulator Genes(MRs)[41]。

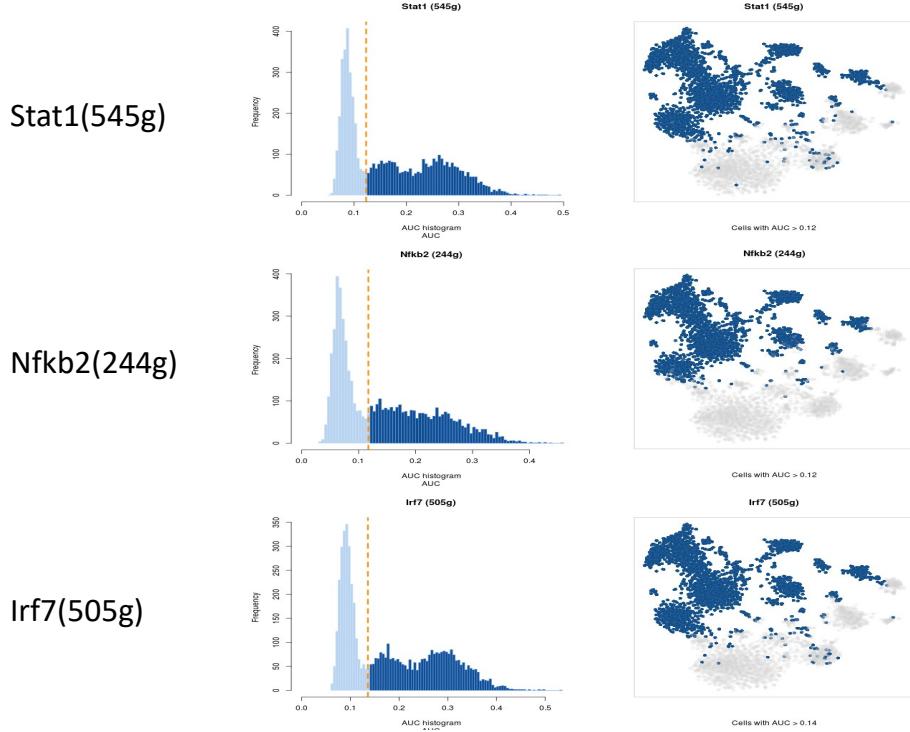


图 4.3 具备双峰分布或者重尾分布的转录因子

4.2.4 讨论和未来工作

我们在实验中发现，在给以小鼠 $TNF - \alpha$ 刺激之后，其部分垂体细胞在经历 UMAP 可视化降维之后，呈现出与其他炎症状态细胞相分离的现象。这似乎意味着垂体细胞在参与中枢神经内分泌炎症调节过程中，会因免疫刺激不同而进入不同的调节状态。

我们初步推断是 $TNF - \alpha$ 作为一种较强的免疫刺激剂，使垂体细胞进入一种不可逆转的免疫状态。在实验设计上，针对 LPS、saline 与 Ploy I:C，我们都设计了长短恢复时程的对比试验，但 $TNF - \alpha$ 只有短时程恢复处理。其原因在于 $TNF - \alpha$ 相比 LPS、Ploy I:C 产生的免疫反应过于剧烈，小鼠在被腹腔注射 500ug $TNF - \alpha$ 之后无法恢复，6h 内便会死亡。

我们未来的工作便打算在该研究的基础上，进一步探讨面对不可恢复炎症刺

激与可恢复炎症刺激时垂体细胞在转录水平上的差异，揭示由健康（healthy）状态向这两种炎症（inflammation）状态转变的关键转录因子。

5 结论

诸如病毒或细菌感染之类的免疫挑战会引起组织炎症，并对下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴产生深远影响。其中，垂体是大脑的内分泌中心，并积极参与炎症事件的调节。在这项研究中，我们对免疫攻击过程中垂体细胞的转录反应进行了探究。

我们首先建立了一个涉及多种免疫刺激剂、多尺度给药剂量与恢复时程的小鼠炎症模型，并在单细胞水平上提供了其垂体细胞测序数据。LPS 和 Poly I:C 在炎症过程中是有效的免疫刺激，将此类免疫激活剂应用于小鼠科引起严重的免疫反应。我们使用 LPS、Poly I:C 与炎症事件诱导的细胞因子 $TNF - \alpha$ 通过变换给药剂量与恢复时程建立了一个小鼠炎症模型。并在该小鼠炎症模型上进行单细胞测序，建立了其相对应的转录水平数据库，弥补了垂体单细胞测序数据在炎症状态下的空缺。

其次，我们揭示了不同种类垂体细胞在参与中枢神经内分泌炎症调节的过程中的转录水平差异，表明其在炎症调节过程中扮演不同的角色。我们对收集到的测序数据进行基因调控网络推断，得到每一个细胞对于各基因调控通路的 AUC-score 矩阵。并据此进行了 Louvain 聚类，将聚类结果作为判别细胞处于健康 (healthy) 状态还是炎症 (inflammation) 状态的标准。我们对不同种类垂体细胞在两种细胞状态下的基因表达差异进行了分析，发现不同种类垂体细胞在炎症状态下表达量主要调整的基因集合并不相近。我们从转录水平上证明了不同细胞在参与中枢神经内分泌炎症调节的过程中扮演着不同的角色。

最后，我们发现了一类在不同种类垂体细胞中统一表达的转录因子，表明其在垂体参与中枢神经内分泌炎症调节过程中的重要地位。在转录因子的 AUC-score 密度分布中，我们找出具备双峰分布或者重尾分布的转录因子，比如 Stat、Irf 和 NfkB 等转录因子家族，这些转录因子大多是与免疫过程相关的。我们发现这些转录因子在不同种类垂体细胞中有统一的表达，这表明其在垂体参与中枢神经内分泌炎症调节的过程中在多条调节路径上扮演着重要角色。

总之，在论文中从单细胞转录水平分析了垂体细胞在参与中枢神经内分泌炎症调节过程中的共性与差异，并为未来的中枢神经内分泌炎症调节过程研究分析了方向，作为我们的未来工作。

参考文献

- [1] LIU S, TRAPNELL C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges[J]. *F1000Research*, 2016, 5.
- [2] JUNKER J P, van OUDENAARDEN A. Every cell is special: genome-wide studies add a new dimension to single-cell biology[J]. *Cell*, 2014, 157(1) : 8 – 11.
- [3] KURIMOTO K, YABUTA Y, OHINATA Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis[J]. *Nucleic acids research*, 2006, 34(5) : e42 – e42.
- [4] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nature methods*, 2009, 6(5) : 377 – 382.
- [5] RAMSKÖLD D, LUO S, WANG Y-C, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nature biotechnology*, 2012, 30(8) : 777 – 782.
- [6] PICELLI S, BJÖRKLUND Å K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. *Nature methods*, 2013, 10(11) : 1096 – 1098.
- [7] ISLAM S, KJÄLLQUIST U, MOLINER A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq[J]. *Genome research*, 2011, 21(7) : 1160 – 1167.
- [8] HAMMOND T R, DUFORT C, DISSING-OLESEN L, et al. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes[J]. *Immunity*, 2019, 50(1) : 253 – 271.
- [9] KEREN-SHAUL H, SPINRAD A, WEINER A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer’ s disease[J]. *Cell*, 2017, 169(7) : 1276 – 1290.
- [10] LI Q, CHENG Z, ZHOU L, et al. Developmental heterogeneity of microglia and brain myeloid cells revealed by deep single-cell RNA sequencing[J]. *Neuron*, 2019, 101(2) : 207 – 223.
- [11] MASUDA T, SANKOWSKI R, STASZEWSKI O, et al. Spatial and temporal het-

- erogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution[J]. *Nature*, 2019, 566(7744) : 388–392.
- [12] MASUDA T, AMANN L, SANKOWSKI R, et al. Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS[J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(7) : 802–815.
- [13] MATCOVITCH-NATAN O, WINTER D R, GILADI A, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis[J]. *Science*, 2016, 353(6301).
- [14] CHEN Q, LESHKOWITZ D, BLECHMAN J, et al. Single-cell molecular and cellular architecture of the mouse neurohypophysis[J]. *Eneuro*, 2020, 7(1).
- [15] CHEUNG L Y, GEORGE A S, MCGEE S R, et al. Single-cell RNA sequencing reveals novel markers of male pituitary stem cells and hormone-producing cell types[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(12) : 3910–3924.
- [16] HO Y, HU P, PEEL M T, et al. Single-cell transcriptomic analysis of adult mouse pituitary reveals sexual dimorphism and physiologic demand-induced cellular plasticity[J]. *Protein & Cell*, 2020 : 1–19.
- [17] FLETCHER P A, SMILJANIC K, MASO PRÉVIDE R, et al. Cell type-and sex-dependent transcriptome profiles of rat anterior pituitary cells[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10 : 623.
- [18] FIERS M W, MINNOYE L, AIBAR S, et al. Mapping gene regulatory networks from single-cell omics data[J]. *Briefings in functional genomics*, 2018, 17(4) : 246–254.
- [19] ARENDT D, MUSSER J M, BAKER C V, et al. The origin and evolution of cell types[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(12) : 744–757.
- [20] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *cell*, 2006, 126(4) : 663–676.
- [21] MARRO S, PANG Z P, YANG N, et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons[J]. *Cell stem cell*, 2011, 9(4) : 374–382.
- [22] IEDA M, FU J-D, DELGADO-OLGUIN P, et al. Direct reprogramming of fibrob-

lasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. *Cell*, 2010, 142(3) : 375 – 386.

- [23] CREIXELL P, SCHOOF E M, ERLER J T, et al. Navigating cancer network attractors for tumor-specific therapy[J]. *Nature biotechnology*, 2012, 30(9) : 842 – 848.
- [24] WOUTERS J, ATAK Z K, AERTS S. Decoding transcriptional states in cancer[J]. *Current opinion in genetics & development*, 2017, 43 : 82 – 92.
- [25] HUYNH-THU V A, IRRTHUM A, WEHENKEL L, et al. Inferring regulatory networks from expression data using tree-based methods[J]. *PloS one*, 2010, 5(9) : 1 – 10.
- [26] MOERMAN T, AIBAR SANTOS S, BRAVO GONZÁLEZ-BLAS C, et al. GRNBoost2 and Arboreto: efficient and scalable inference of gene regulatory networks[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(12) : 2159 – 2161.
- [27] PRATAPA A, JALIHAL A P, LAW J N, et al. Benchmarking algorithms for gene regulatory network inference from single-cell transcriptomic data[J]. *Nature methods*, 2020, 17(2) : 147 – 154.
- [28] AIBAR S, GONZÁLEZ-BLAS C B, MOERMAN T, et al. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering[J]. *Nature methods*, 2017, 14(11) : 1083 – 1086.
- [29] Van de SANDE B, FLERIN C, DAVIE K, et al. A scalable SCENIC workflow for single-cell gene regulatory network analysis[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(7) : 2247 – 2276.
- [30] FRIEDMAN J H. Greedy function approximation: a gradient boosting machine[J]. *Annals of statistics*, 2001 : 1189 – 1232.
- [31] FREUND Y, SCHAPIRE R, ABE N. A short introduction to boosting[J]. *Journal-Japanese Society For Artificial Intelligence*, 1999, 14(771-780) : 1612.
- [32] ŚLĄWEK J, ARODŹ T. ENNET: inferring large gene regulatory networks from expression data using gradient boosting[J]. *BMC systems biology*, 2013, 7(1) : 1 – 13.
- [33] ZAHARIA M, CHOWDHURY M, DAS T, et al. Fast and interactive analytics over Hadoop data with Spark[J]. *Usenix Login*, 2012, 37(4) : 45 – 51.

- [34] DEAN J, GHEMAWAT S. MapReduce: simplified data processing on large clusters[J]. *Communications of the ACM*, 2008, 51(1) : 107–113.
- [35] AERTS S, QUAN X-J, CLAEYS A, et al. Robust target gene discovery through transcriptome perturbations and genome-wide enhancer predictions in *Drosophila* uncovers a regulatory basis for sensory specification[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(7) : e1000435.
- [36] HERRMANN C, Van de SANDE B, POTIER D, et al. i-cisTarget: an integrative genomics method for the prediction of regulatory features and cis-regulatory modules[J]. *Nucleic acids research*, 2012, 40(15) : e114–e114.
- [37] VERFAILLIE A, IMRICOVÁ H, Van de SANDE B, et al. iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections[J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(7) : e1003731.
- [38] MCCARTHY D J, CAMPBELL K R, LUN A T, et al. Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(8) : 1179–1186.
- [39] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species[J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(5) : 411–420.
- [40] STUART T, BUTLER A, HOFFMAN P, et al. Comprehensive integration of single-cell data[J]. *Cell*, 2019, 177(7) : 1888–1902.
- [41] MATTICK J S, TAFT R J, FAULKNER G J. A global view of genomic information—moving beyond the gene and the master regulator[J]. *Trends in genetics*, 2010, 26(1) : 21–28.

致谢

以简短的文字表达作者对完成论文和学业提供帮助的老师、同学、领导、同事及亲属的感激之情。