



单细胞分辨率下人类体内发育的时空图谱

分享人：尹冬梅

2021年01月26日

单细胞分辨率下人类肠道发育的时空图谱

Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution

◆ 实验材料: 肠道 (不同发育时间和组织部位)

◆ 研究单位: 英国牛津大学

◆ 发表期刊: cell

◆ 发表时间: 2021年1月5日

◆ 影响因子: 36.216



目录/content

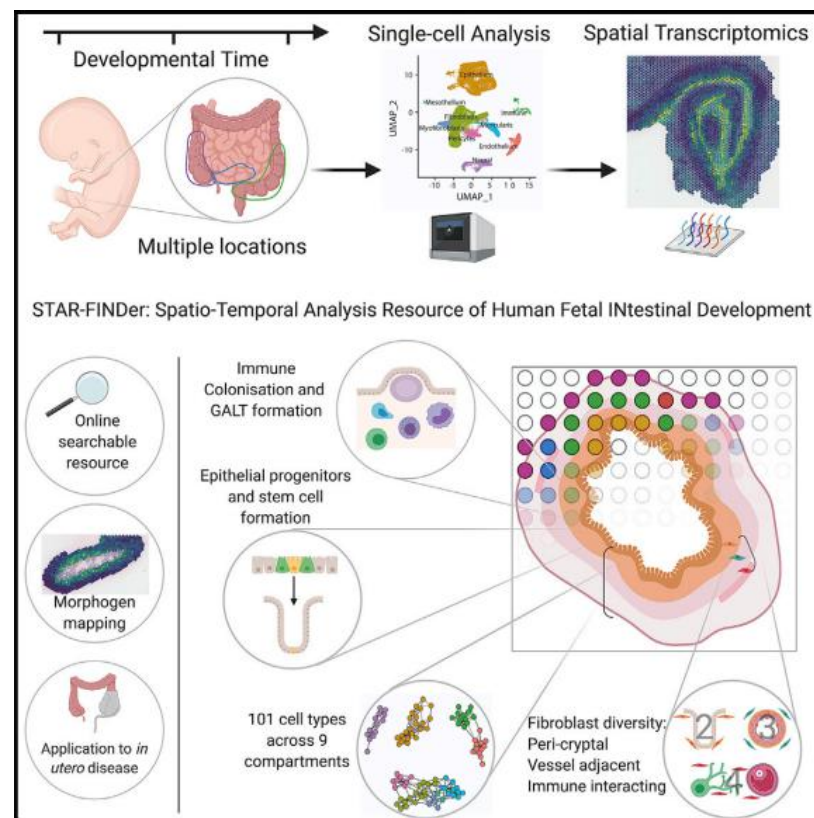
- 一、研究背景
- 二、研究思路
- 三、研究结果
- 四、亮点与不足

研究背景

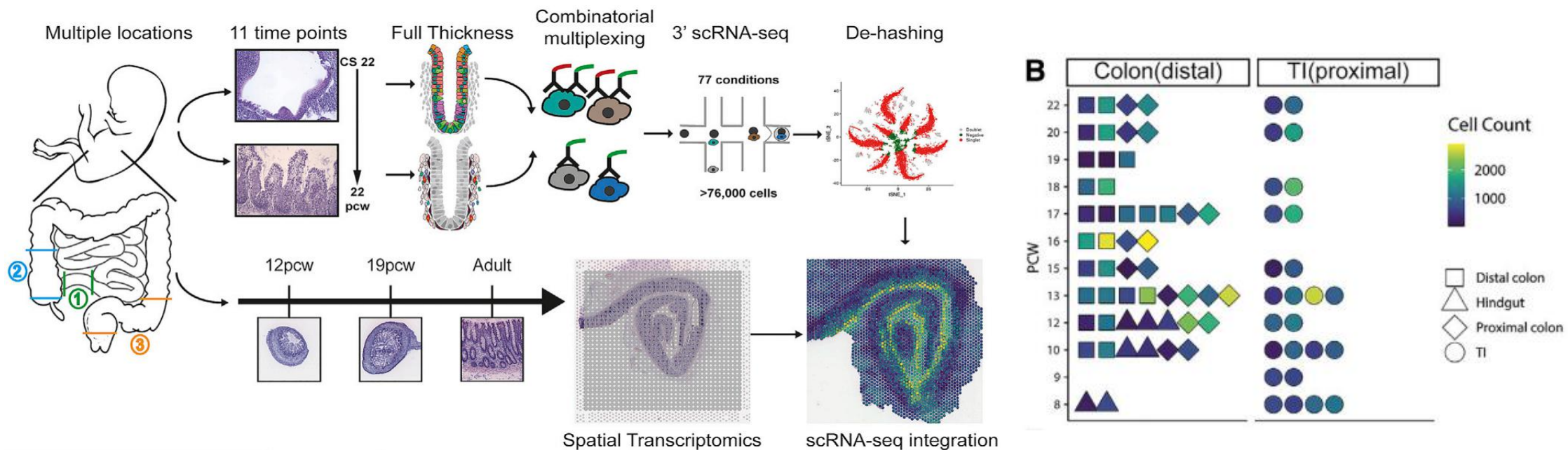
单细胞分辨率下人类肠道发育的时空图谱

Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution

- ◆ 肠道是人体最大的屏障器官，可与肠道菌群（共生）协调营养需求和免疫力，多种相互关联的细胞类型构成了成熟的肠道及其独特的形态，但是它们形成的分子基础仍然不清楚。
- ◆ 雏鸡模型和小鼠等物种的研究表明肠道发育过程需要细胞间的协调并且物种间存在特异性差异，因此直接研究人类肠道组织是必要的。
- ◆ 肠道是出生时免疫细胞初生的场所，肠道免疫细胞的本源性缺陷与疾病有关。人类肠道发育的分子基础可为先天性或出生后早期肠道疾病发病机制研究提供参考。



二、研究思路——材料与amp;方法

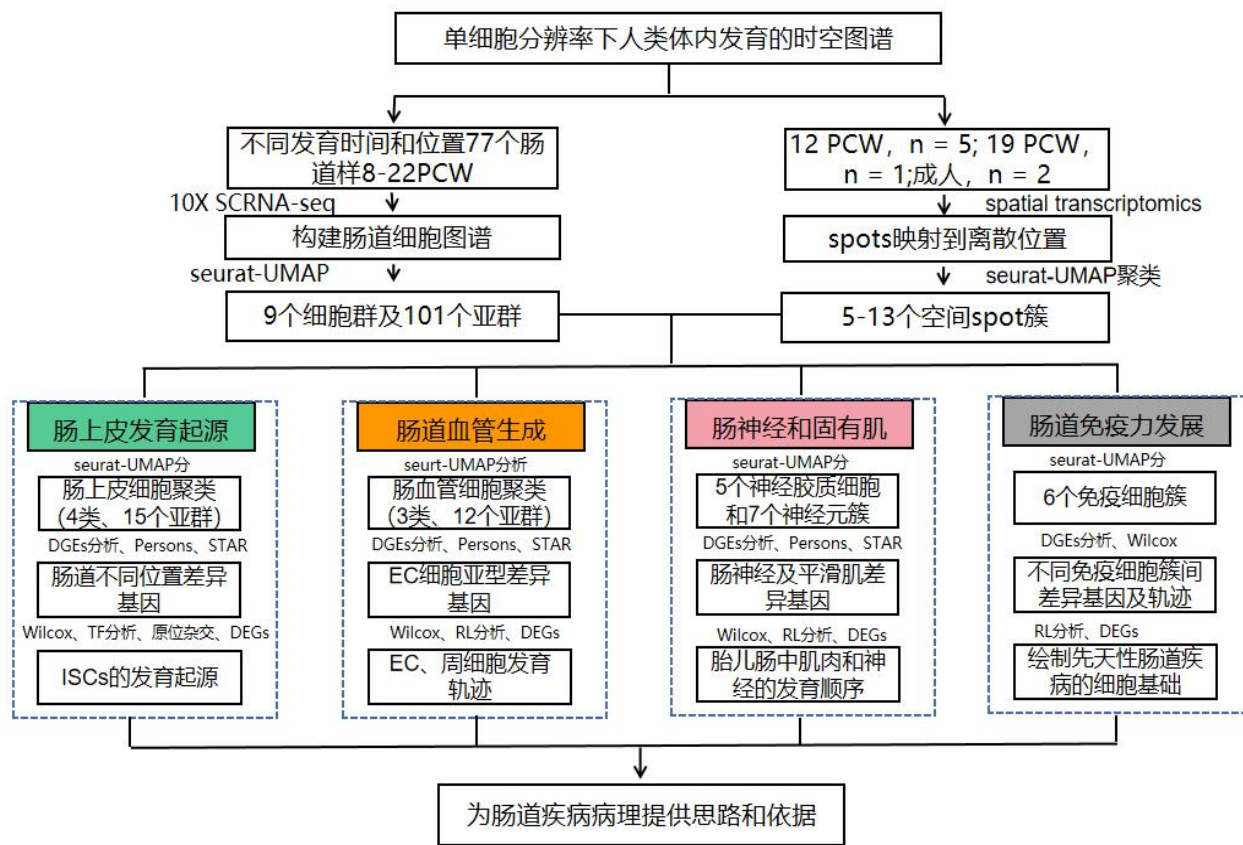


- **样本选择:** 胚胎肠道组织（不同胎龄范围），成人肠道组织
- **研究方法:** 10X Genomics scRNA-seq和空间转录组；流式细胞仪分析；免疫组学分析；原位杂交
- **解离方法:** Umbilical Cord Dissociationkit (Milteyni Biotec), 37°C, 20min

二、研究思路——材料与amp;方法

研究要点

- 构建胎儿肠道各种细胞格室的单细胞表达图谱，并定位到空间位置上；
- 筛选肠道不同位置、发育时间、细胞类型的差异基因；
- 揭示胎儿肠道神经、血管、间充质的形态发生以及发育中肠道的免疫群体。



三、研究结果

◆ 结果1：构建人胚胎肠道细胞图谱

- 17个胚胎的77肠道样品，共捕获76,592个细胞。9种细胞类型，进一步得到101个亚群。

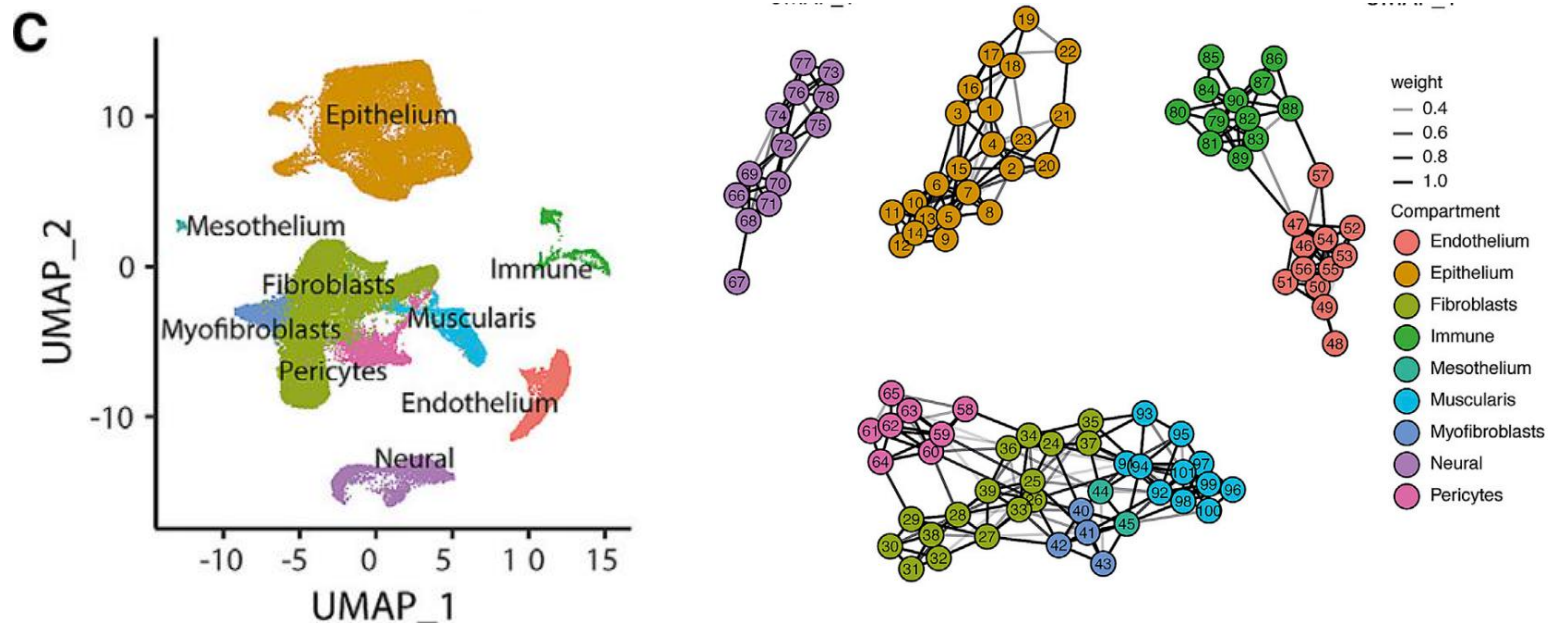


图 肠细胞图谱及关系图

按隔室上色，代表相互作用权重的线

研究方法：

- 10X SCRNA-seq
- STAR方法

主要结果：

- 发育时间从8PCW-22PCW，构建了人肠道细胞图谱，鉴定了9中肠细胞类型，及101个亚群，并利用基于划分的图形抽象来描述101个亚群之间的关系。

三、研究结果

◆ 结果2：空间转录组确定了单细胞的空间位置

- ST转录特征分析确定了每张图片中的5-13个斑点簇，并映射到空间位置上

研究方法：

- 空间转录组（ST）、scRNA-seq

- STAR

主要结果：

- 得到了每张切片种的5-13个空间spot簇；用scRNA图谱作为参考，在空间上定位所有scRNA-seq簇。
- 成对细胞类型信号相关性分析；鉴定了2,893个与深度相关的基因。大多数ST斑点簇是分层分布的，突出了与组织深度相对应的转录/细胞空间变异性的最大决定因素。

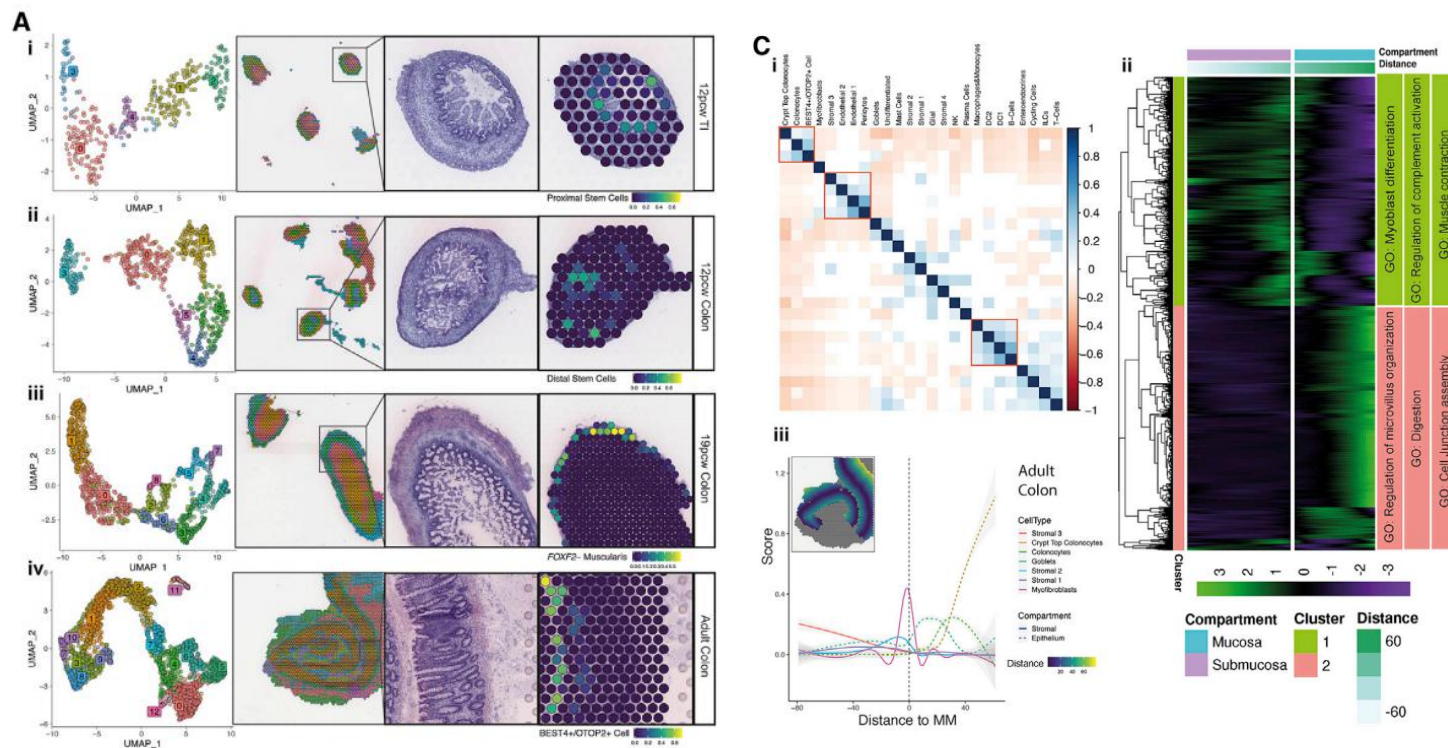
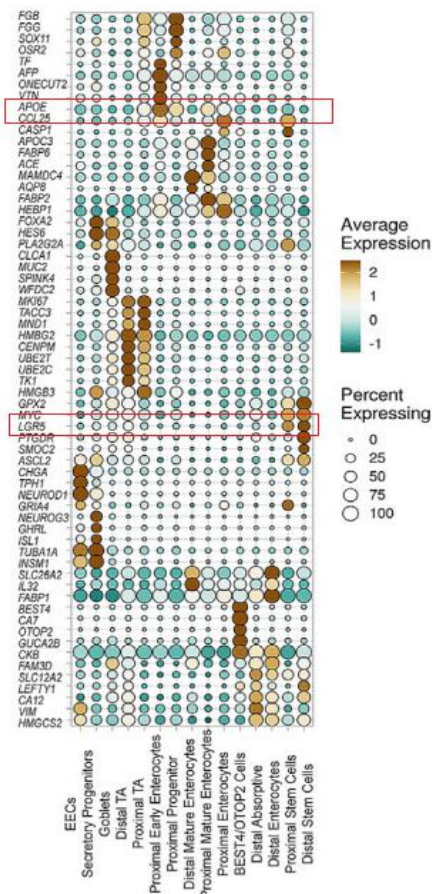
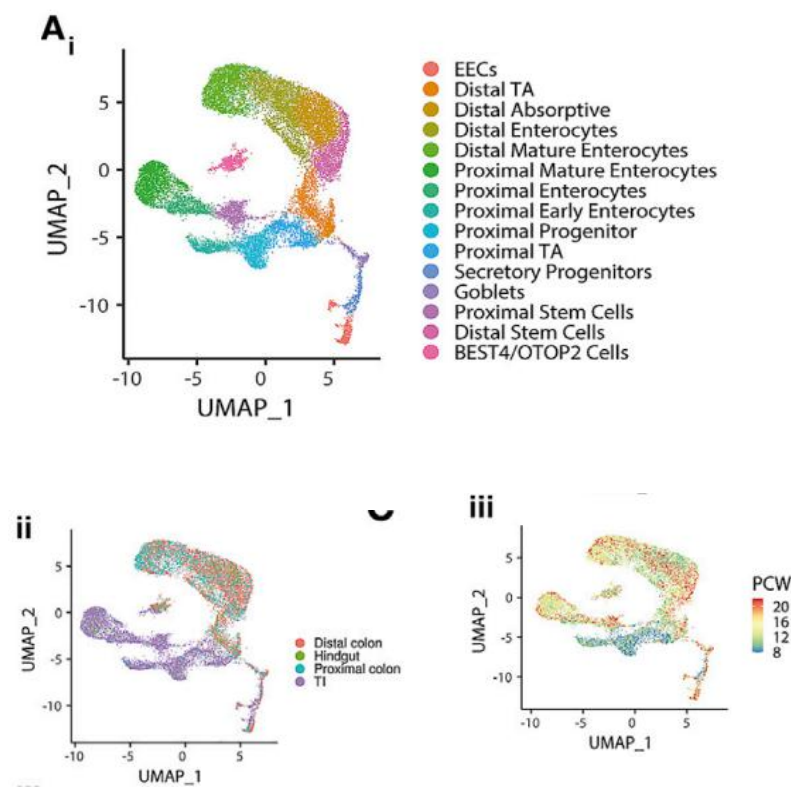


图 整合ST和scRNA-seq对肠道发育的时空分析

三、研究结果

◆ 结果3：人肠上皮的发育

- 捕获了17,622个上皮细胞



研究方法：

- 10X SCRNA-seq
- STAR、UMAP

主要结果：

- 发现由高特异性基因表达（如 CCL25和APOE）划定的近端（小肠）和远端（结肠）样品之间的位置差异很大，这表明，在隐窝形成之前，位置特异性转录程序就已经建立起来了。

图 肠内上皮的成熟

三、研究结果

◆ 结果3：人肠上皮的发育

- ISC的发展起源再发育早期

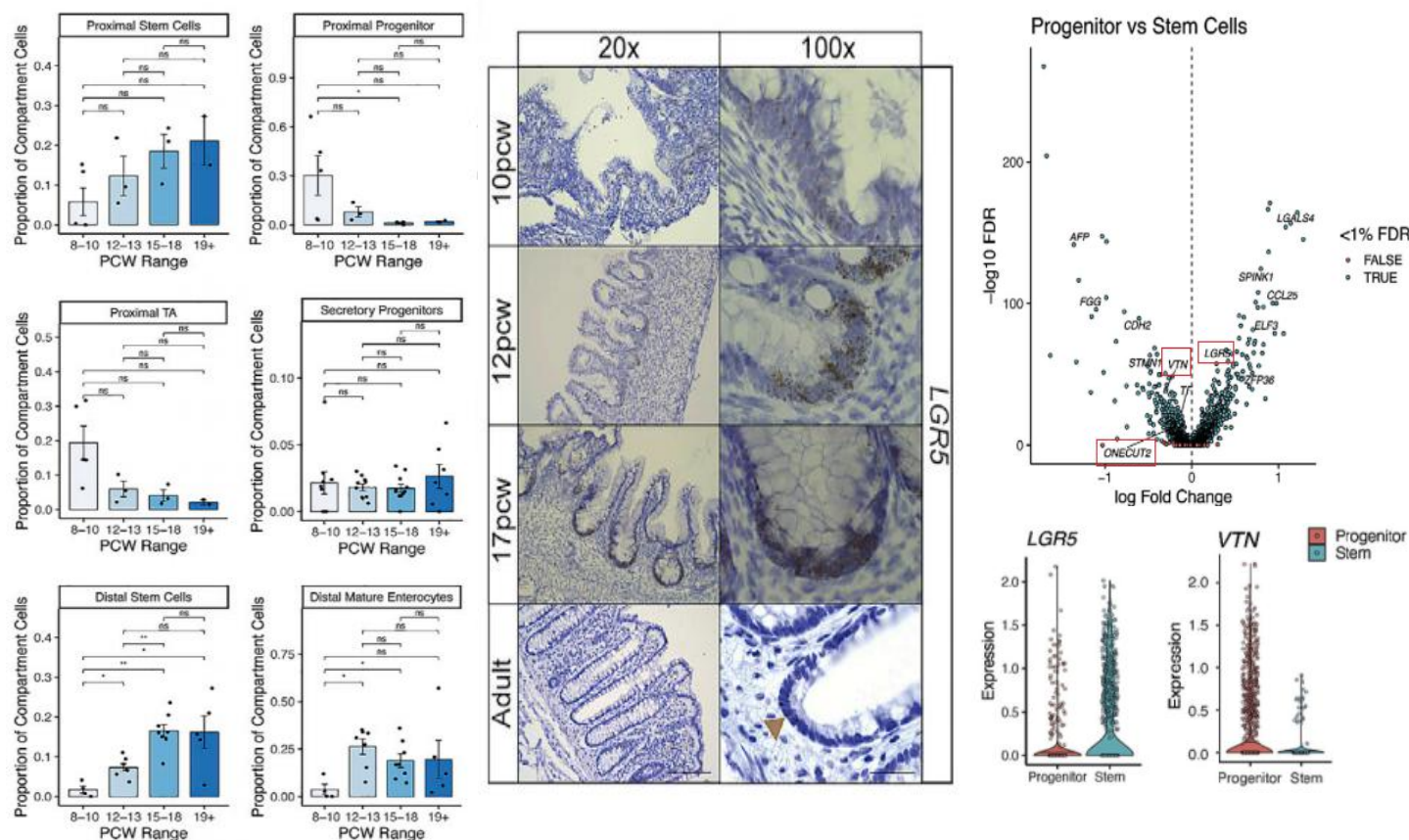


图 肠上皮的成熟

研究方法：

- 10X SCRNA-seq
- 原位杂交 (ISH)

主要结果

- 近端和远端ISCs随时间逐渐增加；由ISC的marker基因LGR5用ISH证实了在10 PCW处弥漫的LGR5表达，后来定位于隐窝碱基。
- 发现了近端上皮干样祖细胞群，该细胞群发展为早期肠上皮细胞。这些细胞表现出许多原始功能，包括在中胚层分化重要的VTN基因高表达，与ISCs相比，LGR5表达较少，ONECUT2表达参与上皮发育。

三、研究结果

◆ 结果3：人肠上皮的发育

- 特异的神经-上皮回路引导ISC的发育

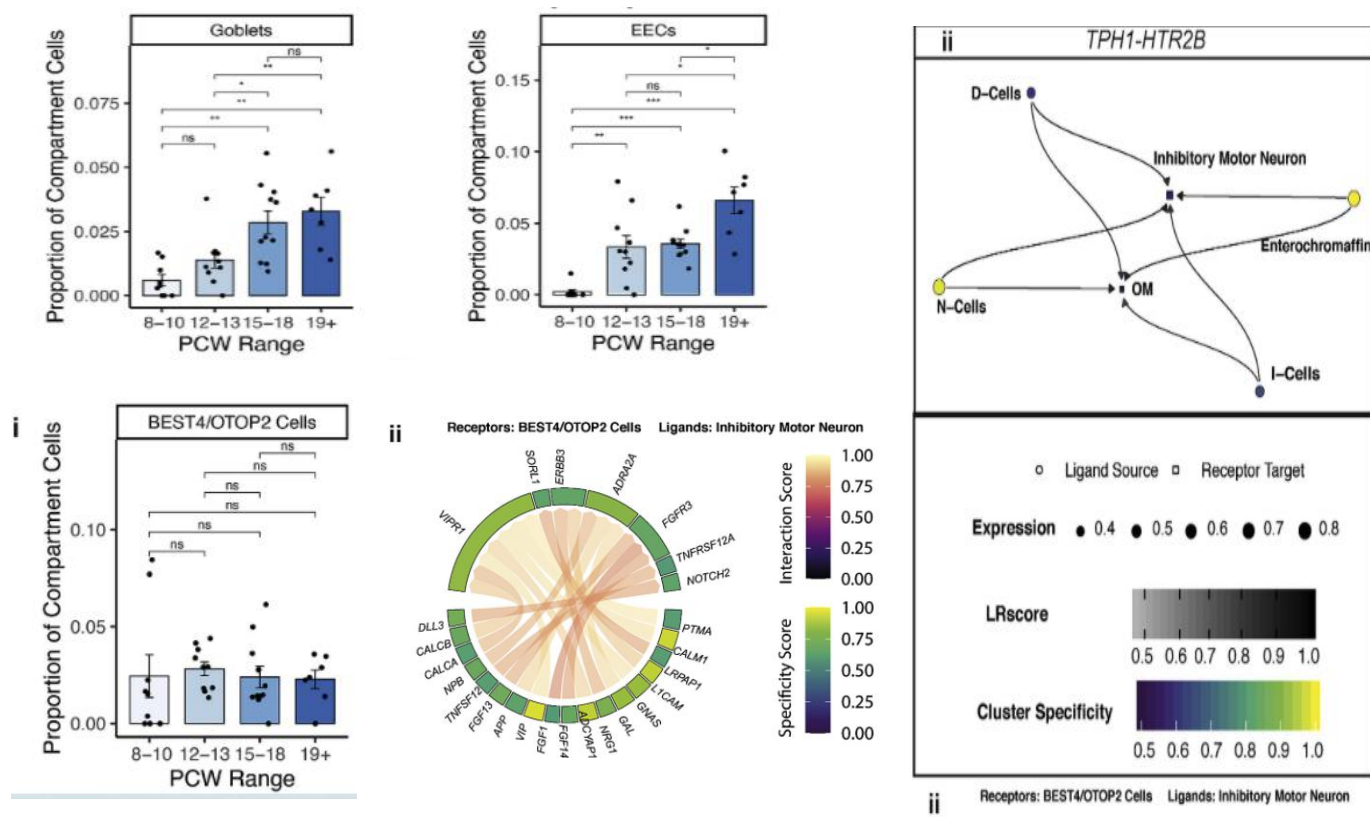


图 肠上皮细胞与神经元相互作用

研究方法：

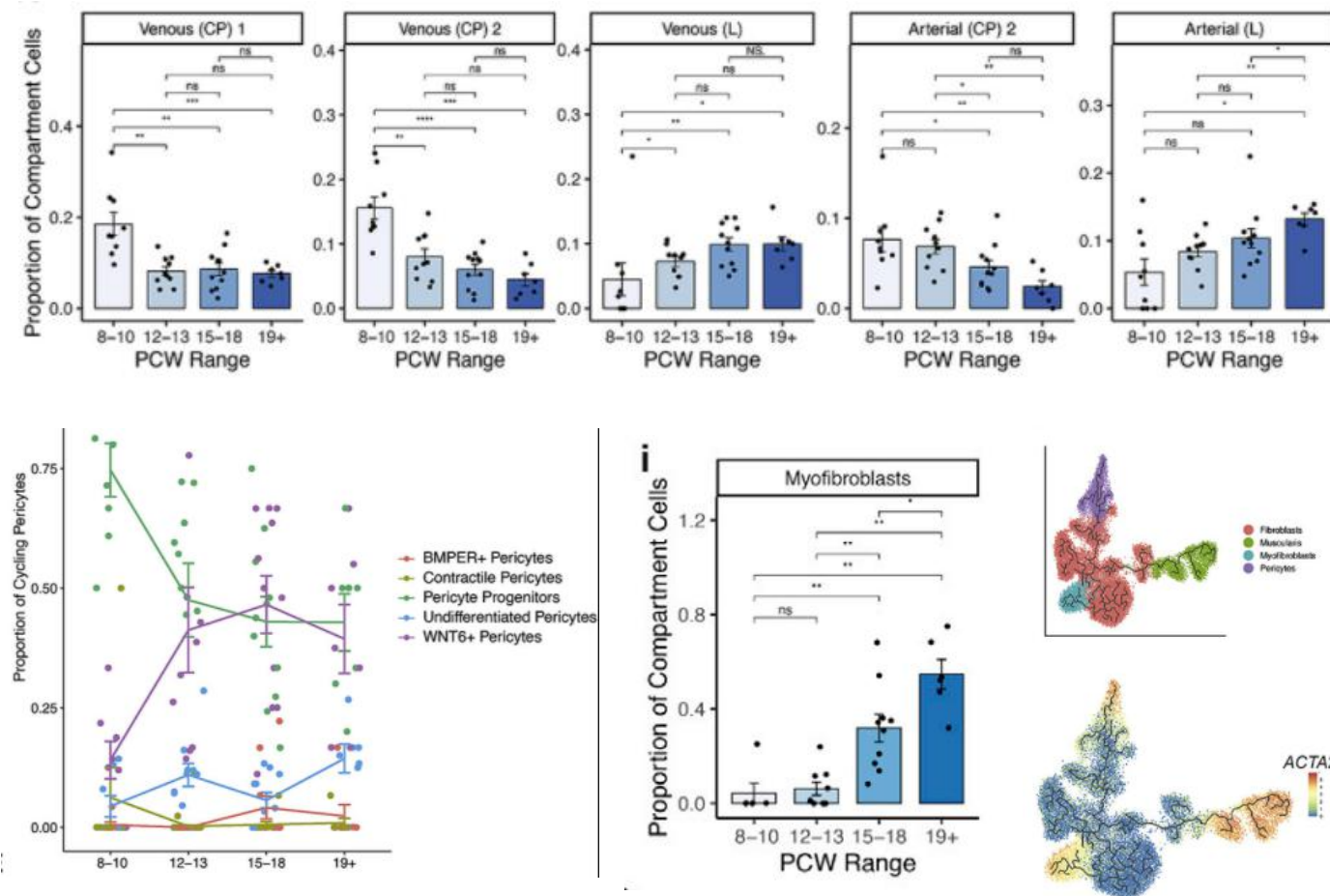
- 10X SCRNA-seq
- Wilcox rank test、RL映射

主要结果

- EEC信号通路，如肠嗜chromaffin细胞，常见于结肠12pcw，通过多种途径与抑制性运动神经元相互作用，包括TPH1-HTR2B。
- BEST4/OTOP2与神经元细胞之间有很强的相互作用.如抑制性运动神经元表达神经递质VIP，通过受体VIPR1的表达介导分泌BEST4 / OTOP2细胞

三、研究结果

◆ 结果4：肠道血管生成的建立



研究方法：

- 10X SCRNA-seq
- Monocle 3、Wilcox分析

主要结果

- 确定了小血管EC到大血管EC的过渡；
- 周细胞种群显示出发育滞后，在较早时间点的大多数细胞是高度循环的祖细胞，这些种群与成纤维细胞和原始的ACTA2 + 细胞共享转录特征，这一结果受到轨迹分析的支持。
- 提出了早期成纤维细胞向周细胞的转变，然后是来自未成熟WNT6表达细胞的第二波周细胞增殖-分化。

图 肠道血管发育

三、研究结果

◆ 结果4：肠神经系统和固有肌层

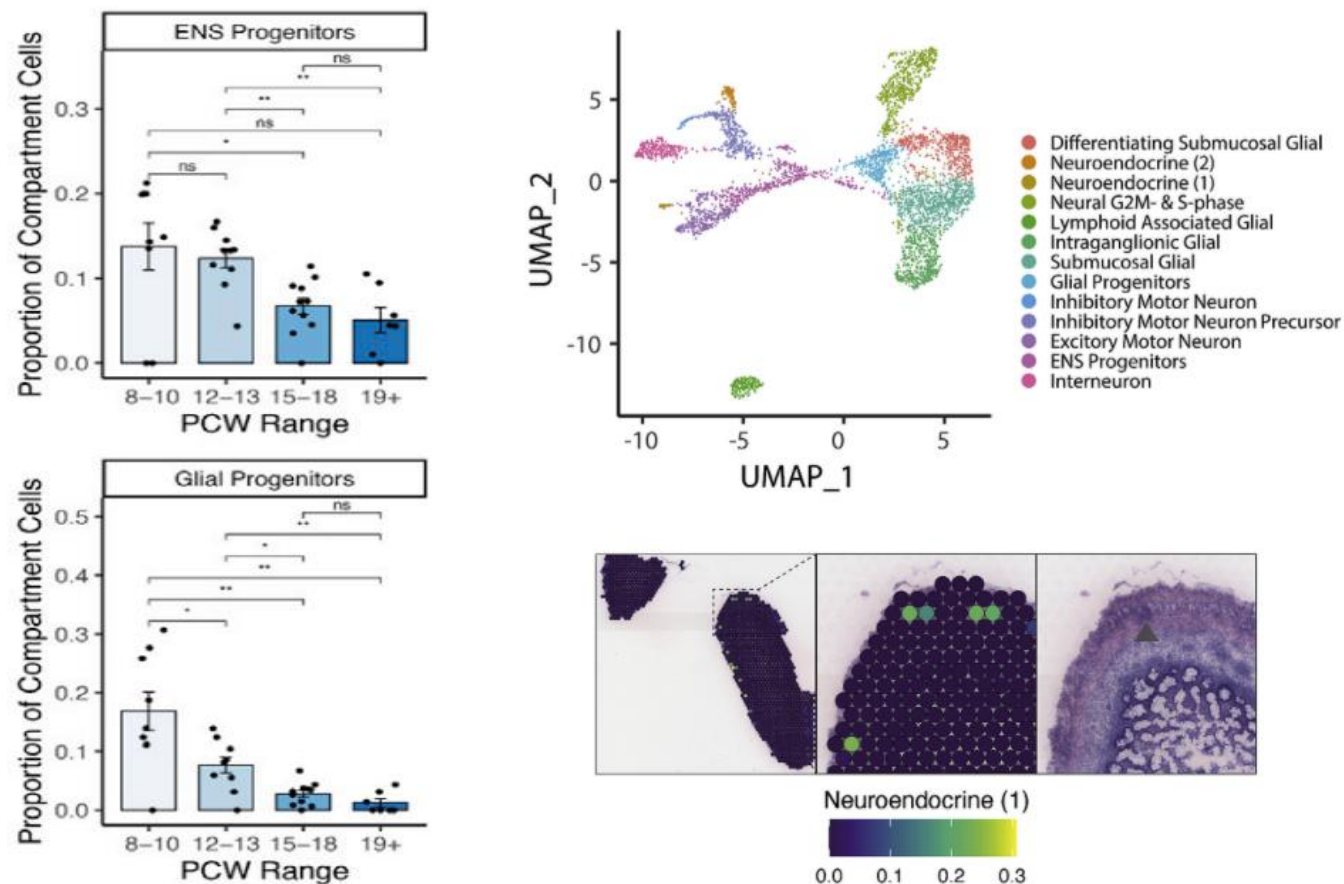


图 肠神经发育

研究方法:

- seurat-UMAP、Monocle 3
- Wilcox分析

主要结果

- 本研究的最早时间点，确定了不同的神经元和神经胶质祖细胞，并捕获了5个神经胶质细胞和7个神经元簇；
- RL分析突出的不同ENS通路。；
- 在ST中，ENS成分也被清楚地看作是肌间神经；

三、研究结果

◆ 结果4：肠神经系统和固有肌层

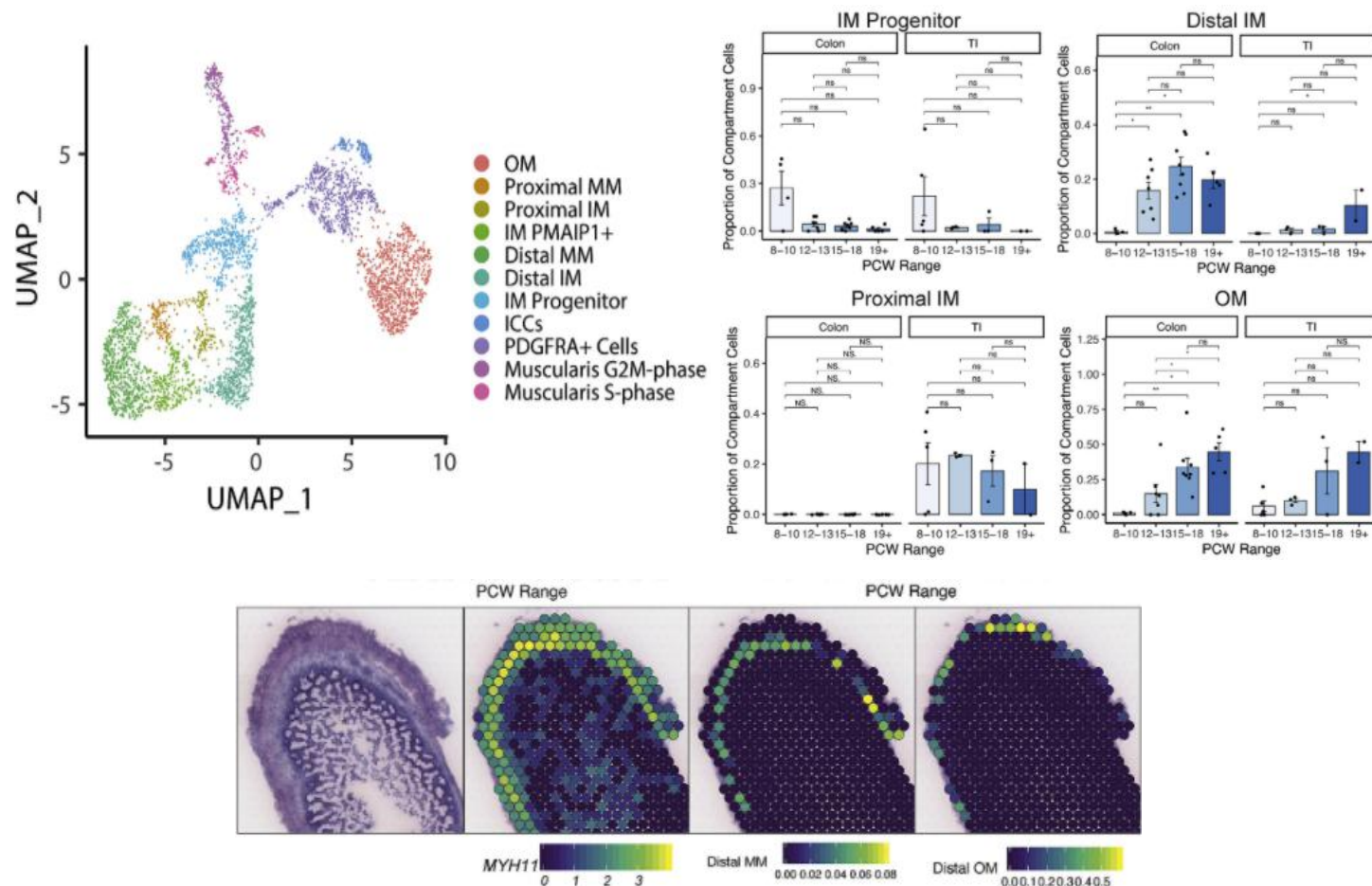


图 肠固有肌发育

研究方法:

- seurat-UMAP、Wilcox分析、ST

主要结果:

- 在成年肠道中，神经元丛被肌肉包围，本研究种确定了11个与分化的肠平滑肌细胞 (iSMCs) 相关的簇；
- 结肠肌层滞后于较成熟的近端组织，早期样品以祖细胞为主，而分化的远端肌层粘膜 (MM)，OM和IM细胞在12岁后大量出现PCW；
- 在19 PCW处 (非12PCW) 的结肠ST中，肌肉层是分开的并且在视觉上是不同的；

三、研究结果

◆ 结果5：引导肠道发育形态发生梯度的无偏映射

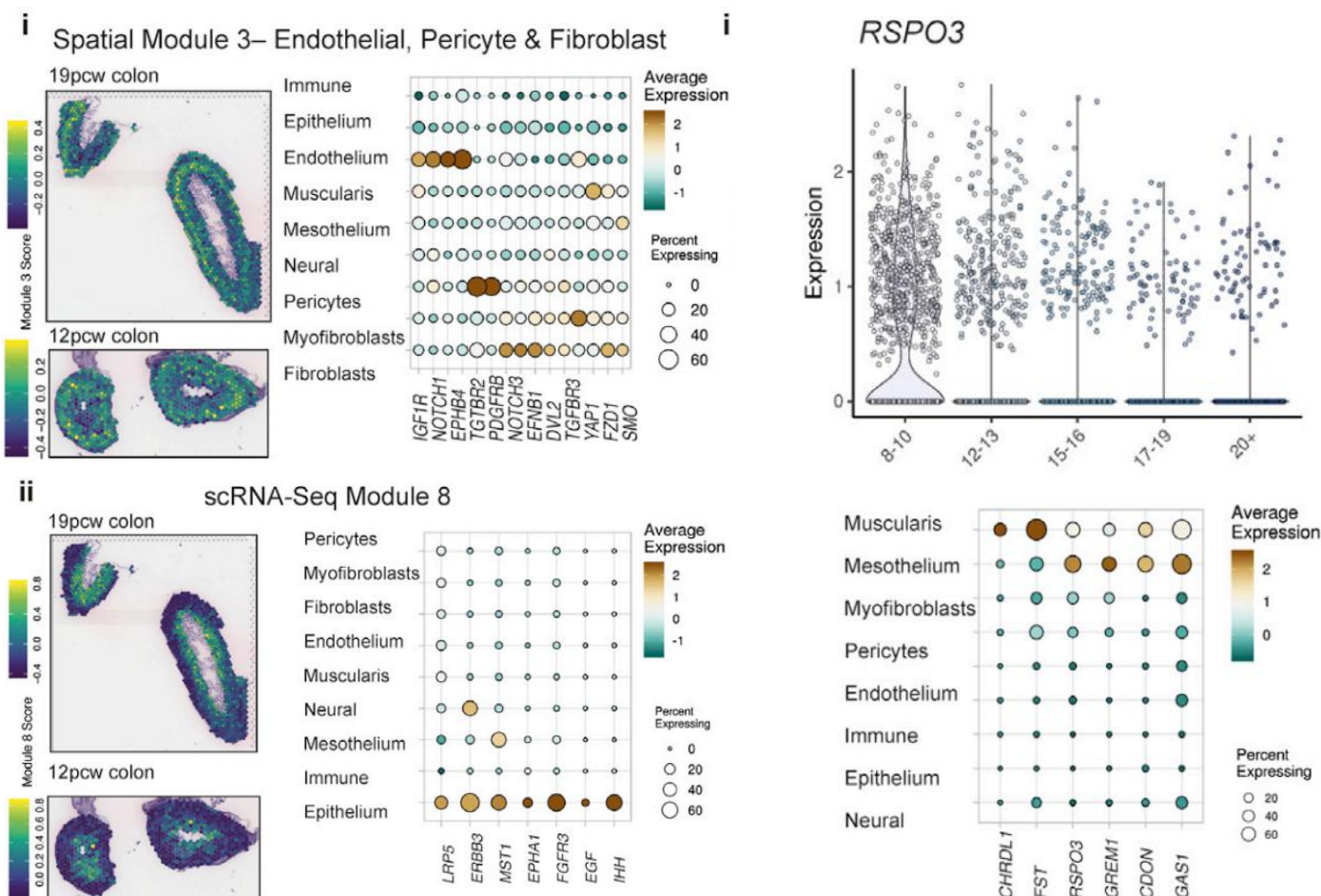


图 与发育中的初始有关的细胞类型或和空间形态发生子梯度

研究方法：

- seurat-UMAP、DEGs、ST

主要结果：

- 空间模块3由来自EC、成纤维细胞和周细胞起源的形态发生子组成，并且在组织深处；
- 上皮特异性模块表达了IHH通路的基因，例如在Wnt信号中起重要作用的位于管腔附近的共受体LRP5；
- 随着肠的生长，原本可能因层间物理距离的增加而被打破的形态梯度，可以通过依次发育的细胞类型的表达而恢复。

三、研究结果

◆ 结果6：人类肠道免疫力的发展

淋巴组织形成过程中的免疫细胞异质性

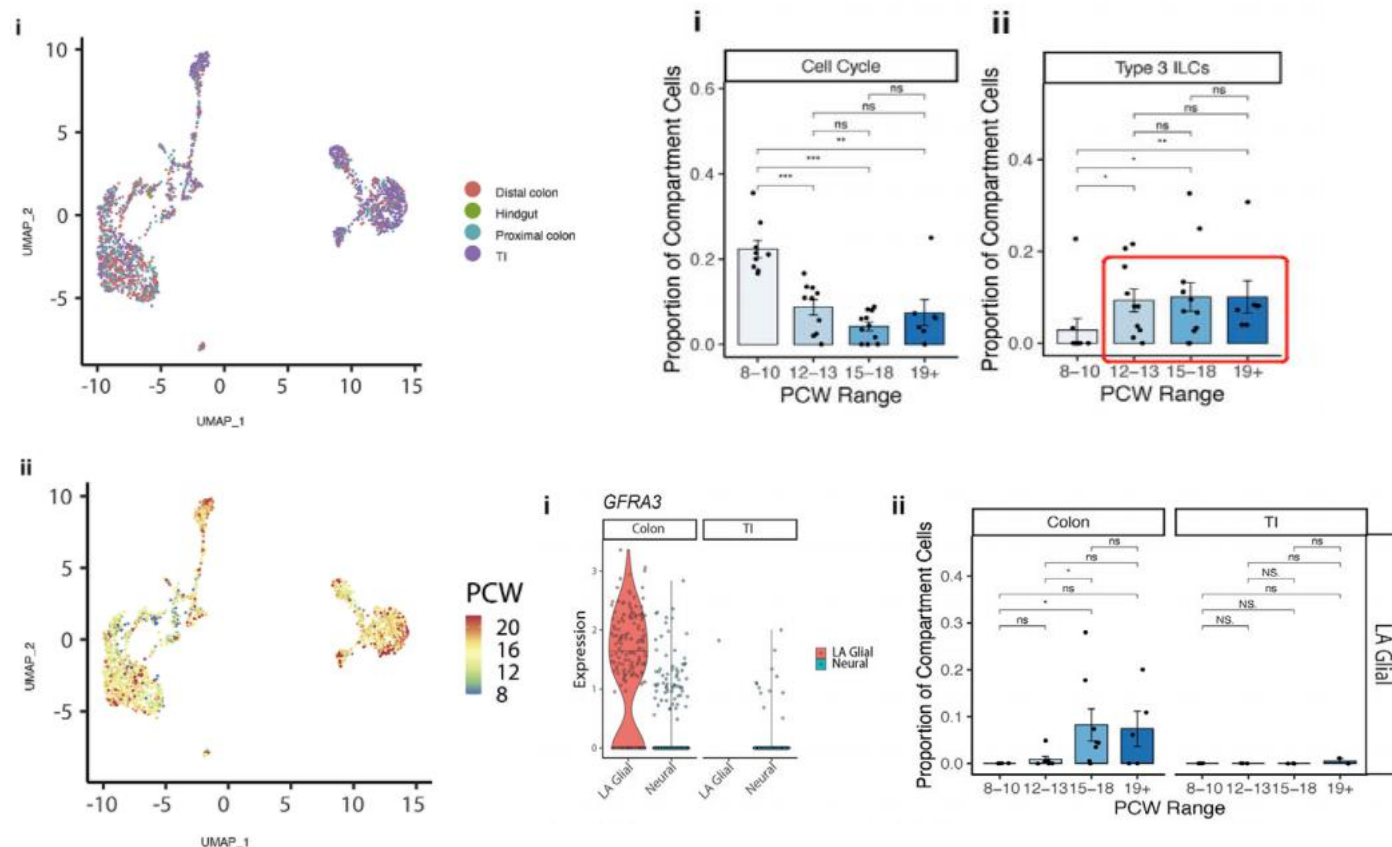


图 淋巴组织形成过程中的免疫细胞异质性

研究方法:

- seurat-UMAP、差异分析、Wilcox分析

主要结果:

- 捕获了发育过程中来自6个谱系的2199个免疫细胞;
- 10 PCW之前, 观察到了髓样细胞富集,而在12 PCW时, 涌入了大量的幼稚T细胞, 杀伤细胞 (NK), 1型/3型先天性淋巴样细胞 (ILC) 。
- 确定了一个独特的结肠的神经胶质种群, 是发育过程中唯一的GFRA3来源, 并在15 PCW时扩展,表明在人类结肠发育过程中可能存在类似的神免疫回路。

三、研究结果

◆ 结果6：人类肠道免疫力的发展

S4成纤维细胞是淋巴结构形成和维持的关键

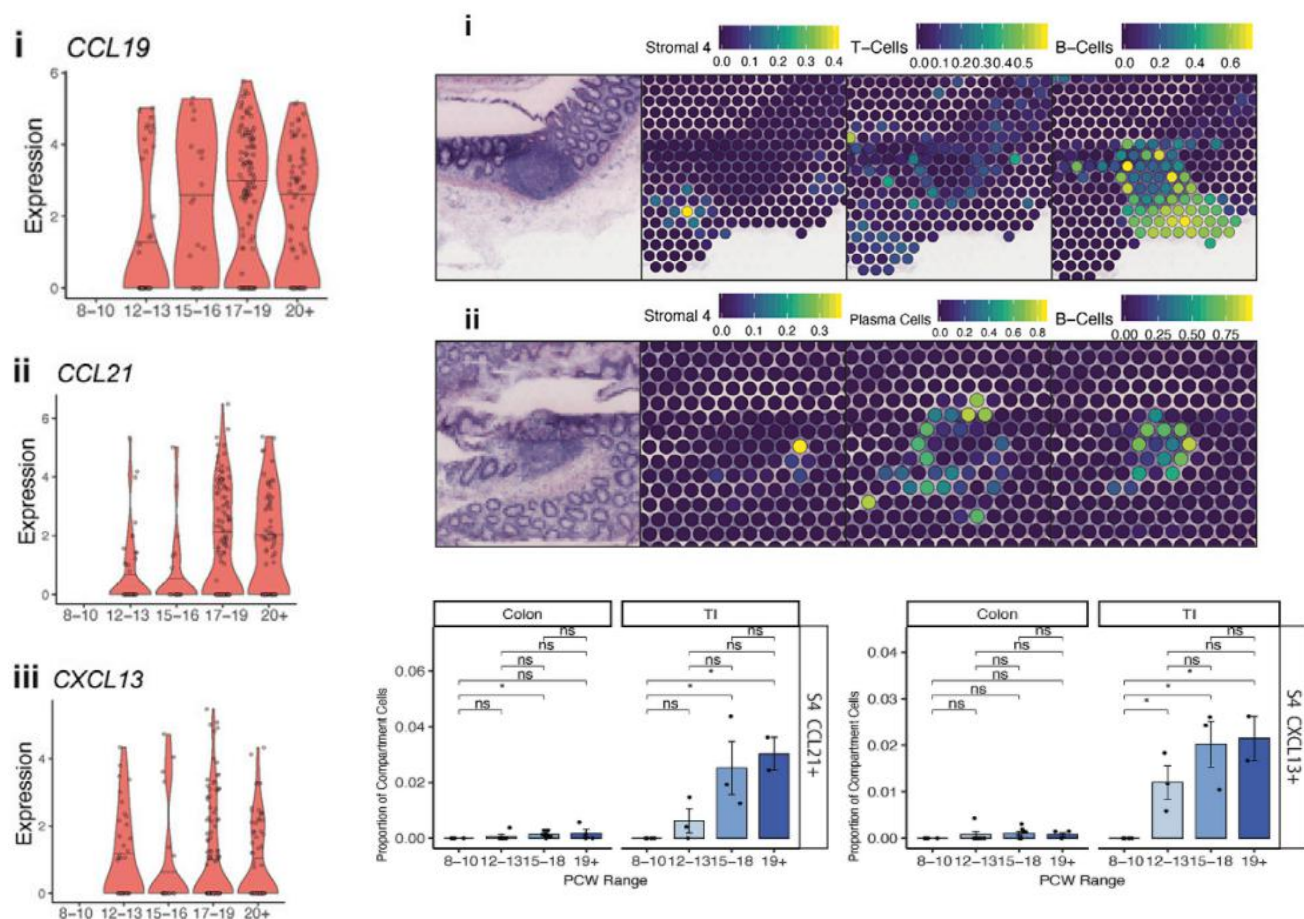


图 淋巴组织形成过程中的免疫细胞异质性

研究方法：

- seurat-UMAP、差异分析、ST

主要结果：

- PPs形成的关键介质包括通过CCL19, CCL21和CXCL13促进LTi组织归巢的基质组织细胞，这些特异性地定位于两个S4成纤维细胞簇，并且表达随着发育而增加；S4簇是GALT（肠道相关淋巴样组织）形成所必需的；
- 两个S4簇在很大程度上都是SI特异的，维持PP的子宫发育，但不维持结肠GALT，并且在12 PCW之前完全不存在。

三、研究结果

◆ 结果7：先天性肠道疾病的细胞基础

将749个已知的疾病基因与scRNA-seq数据整合在一起

| HPO ID | Phenotype | Fetal-Expressed Disease Genes | Cell-Type Specific Disease Genes (AUC > .8) |
|------------|--|-------------------------------|---|
| HP:0002242 | Abnormal intestine morphology | 641 | 115 |
| HP:0004362 | Abnormality of enteric ganglion morphology | 116 | 19 |
| HP:0100016 | Abnormality of mesentery morphology | 5 | 0 |
| HP:0012732 | Anorectal anomaly | 244 | 32 |
| HP:0001543 | Gastroschisis | 3 | 0 |
| HP:0002037 | Inflammation of the large intestine | 52 | 11 |
| HP:0011100 | Intestinal atresia | 45 | 10 |
| HP:0002566 | Intestinal malrotation | 86 | 15 |
| HP:0200008 | Intestinal polyposis | 53 | 11 |
| HP:0002576 | Intussusception | 7 | 1 |
| HP:0003006 | Neuroblastoma | 41 | 7 |
| HP:0001539 | Omphalocele | 66 | 14 |
| HP:0030736 | Sacroccygeal teratoma | 5 | 0 |
| HP:0002933 | Ventral hernia | 4 | 0 |
| HP:0011473 | Villous atrophy | 19 | 3 |
| HP:0002580 | Volvulus | 8 | 2 |

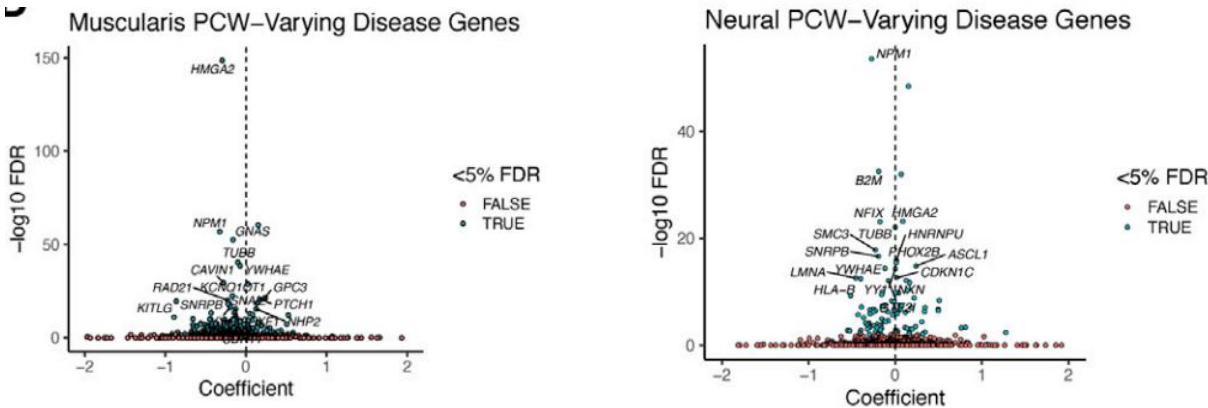


图 淋巴组织形成过程中的免疫细胞异质性

研究方法：

- scRNA-seq、HPO、STAR方法

主要结果

- 将数据与人类表型本体论(HPO)中注释了遗传表型的围产期肠道疾病的分类列表相关联。通过将749个已知的疾病基因与scRNA-seq数据整合在一起，将先天性疾病与表型联系起来，这些表型可能通过高度细胞类型特异性缺陷，表现出来，并导致肠道、腹侧、会阴、神经节、炎症或肿瘤病理障碍

三、研究结果——思路及总结

◆**材料:** 胚胎肠道组织（不同胎龄范围），成人肠道组织

◆**方法:** 10x Genomics单细胞3' 转录组+空间转录组

◆**内容:** (1) 亚群划分
(2) 单细胞空间为位置分析
(3) 不同PCW细胞组成差异分析
(4) 不同空间、时间细胞类型差异基因筛选

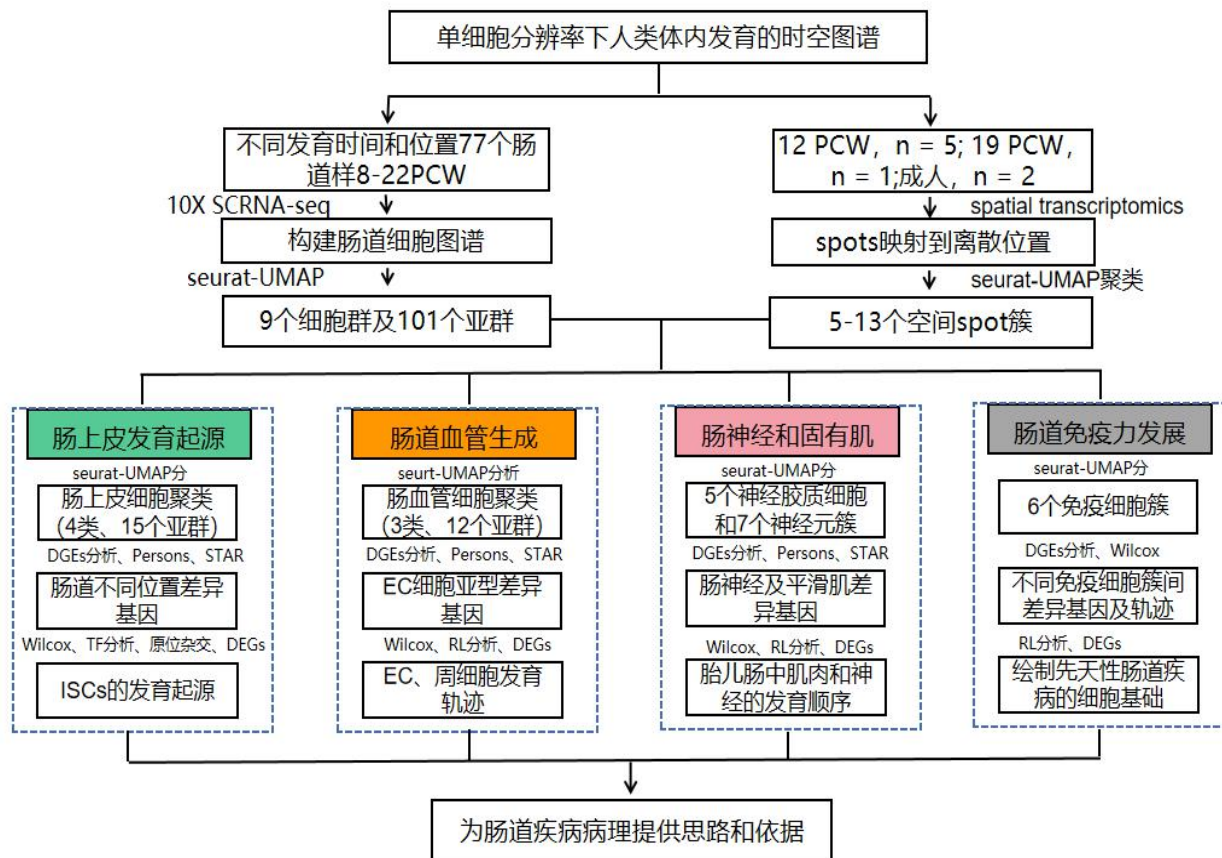
选

结果:

(1) 共鉴定了101种细胞状态，包括上皮和间充质祖细胞群以及与关键形态发生的程序。

(2) 描述了隐窝-绒毛轴形成的原理，神经、血管、间充质的形态发生以及发育中肠道的免疫群体。

(3) 成纤维细胞在干细胞，脉管系统和GALT形成中的功能多样性。



四、亮点与不足

◆ 文章亮点

- 开发了一个公开的胎儿肠道发育的时空分析资源：STAR-FINDer
- 揭示了未成熟上皮的较多可能导致早产儿坏死性小肠结肠炎等疾病
- 为研究子宫内肠道疾病病理提供思路 and 依据

◆ 文章不足

- 对于肠道疾病方面的探究和讨论较少；

Thank You!



官方网站



官方微信

www.berrygenomics.com