



单细胞转录组测序在药物成瘾研究中的应用*

李 琮¹⁾ 王福艳²⁾ 张晓琴¹⁾ 余志鹏¹⁾ 唐梓航¹⁾ 沈昊伟^{1,3)**}

(¹⁾ 宁波大学医学院药理学系, 宁波 315211; (²⁾ 宁波大学医学院附属医院实验中心, 宁波 315020; (³⁾ 宁波康宁医院, 宁波 315201)

摘要 药物成瘾是复杂的中枢神经系统疾病, 相关基础与临床研究均证实药物成瘾的神经机制及神经环路在成瘾行为形成的不同阶段逐渐发生改变。利用全基因组关联研究、全基因组测序、全外显子测序或高通量转录组测序等技术的组学研究对包括药物成瘾在内的精神疾病遗传的脆弱性进行了深入研究。上述单核苷酸多态性检测技术或测序技术主要预测疾病的遗传风险位点。然而, 许多中枢神经系统疾病的发生与环境因素密切相关, 而且在疾病发展的不同阶段, 相关基因的表达存在脑区特异性的细胞异质性信息。因此, 传统研究对发病机制的解释存在一定的局限性。单细胞转录组测序技术是针对单个细胞进行转录水平的测定, 规避了传统测序对细胞群体平均转录水平检测的缺点, 可以定量描述细胞异质性。近年来, 单细胞转录组测序技术在神经精神科学研究中的应用逐渐受到关注, 本文总结了该技术在神经科学研究中的重要应用, 并以药物成瘾为例, 重点阐述说明其在中枢神经系统疾病中的应用价值。

关键词 单细胞转录组测序, 药物成瘾, 神经科学

中图分类号 R749, R446

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0121

转录 (transcription) 是调控基因表达的关键步骤, 具有可变性、适应性和动态性特征。转录动力学 (transcription dynamics) 是指在一定的时间跨度下, 以分钟量级对环境信号迅速反应到发育和疾病发生的缓慢变化^[1]。2009年, 汤富酬团队通过将改进的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术与高通量测序技术 (high-throughput sequencing, HTS)^[2] 结合起来, 实现了首次对单个细胞中的信使 RNA (message RNA, mRNA) 进行完全无偏倚的转录组学研究, 开创了单细胞转录组测序 (single-cell transcriptome sequencing, ScRNA-seq)^[3]。ScRNA-seq 通过直接测量数千到数百万个单个大脑细胞中的 mRNA 分子特征, 可以全面地表征大脑细胞类型的多样性^[4]。这种测量揭示了塑造细胞身份的基因调控机制, 并提供了对细胞群体之间发展和进化关系的洞察^[5]。现在, 通过将 ScRNA-seq 细胞分类学数据和全基因组关联研究 (genome wide association studies, GWAS) 数据中提供的位点 (loci) 进行整合分析, 可以发现大脑细胞类型和疾病性状的关联, 能够更好地理解基因和精神类疾病的关系, 推

动精神类疾病机制和药物靶点研究^[6]。

药物成瘾是一种慢性的、复发性的脑疾病, 是神经科学重要的研究对象。药物成瘾不同阶段和状态涉及不同的神经环路及分子机制^[7]。在成瘾形成的早期阶段, 觅药行为以目的导向为主, 依赖于行为-结果之间的关联, 行为由正性结果 (即奖赏) 调控。在该阶段成瘾药物需求弹性指数较大。在第二阶段, 随着反复用药, 目的导向行为演变为刺激-反应的过程。在这个阶段, 药物所带来的奖赏并不像之前那样显著, 觅药行为出现惯性特征, 结果对行为的调控作用不显著。在第三阶段, 长期使用成瘾药物的患者往往表现出强迫性觅药行为, 具体表现为尽管面临严重的伤害性或惩罚性后果, 成瘾者仍然无法控制自己的觅药及用药行为。与此同时, 还表现出过强的目的导向行为和药物刚性需求。然而这些复杂行为的分子编码仍不为人所知, 制约了对疾病机制的理解和有效的临床治疗策

* 国家自然科学基金 (32171017) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15988622731, E-mail: shenhaowei@nbn.edu.cn

收稿日期: 2022-03-30, 接受日期: 2022-06-24

略的开发。本文主要介绍了 ScRNA-seq 在神经科学研究中的应用,并以药物成瘾为例,重点阐述其在精神疾病中的应用进展。

1 ScRNA-seq技术

ScRNA-seq 是利用下一代测序技术 (next

generation sequencing, NGS)、在单个细胞水平基于高通量测序进行完全无偏倚的细胞类型和状态研究的方法。自 2009 年来,许多灵敏、准确的 ScRNA-seq 技术被开发出来,例如 Tang2009^[3]、CEL-seq2^[8]、Drop-seq^[9]、MARS-seq^[10]、Smart-seq2^[11]、Patch-seq^[12]等,满足各类实验需求。本文对上述几种技术做了对比总结(表1)。

Table 1 Comparison of ScRNA-seq methods

表1 ScRNA-seq方法对比

方法	扩增方法	细胞分选方法	通量	局限性
Tang2009 ^[3]	多聚腺嘌呤加尾法	微量移液管吸取	高	只能捕获有多聚腺嘌呤尾巴的信使RNA,距离mRNA的3'端超过3 kb的5'端将不会被检测到,不能区分正义和反义的转录本 ^[3]
CEL-seq2 ^[8]	基于随机引物的体外转录法	微流控技术	低	只能用于3'端测序,相较于全长转录组信息更少 ^[8]
Drop-seq ^[9]	模板转换法	液滴分选技术	高	细胞捕获率较低,不适于稀缺样本
MARS-seq ^[10]	体外转录法	荧光激活细胞分选技术	高	可出现3'偏差,链特异性信息丢失 ^[10]
Smart-seq2 ^[11]	模板转换法	荧光激活细胞分选技术	低	只能捕获有多聚腺嘌呤尾巴的信使RNA,不保留链或分子信息 ^[11]
Patch-seq ^[12]	模板转换法	膜片钳移液管吸取细胞内容物	低	捕获基因少

2017 年, 10×Genomics 公司开发出 10×Chromium^[13] 技术。该方法基于液滴的核酸条形码 (barcode, BC) 分配系统,对带有标签的互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA) 进行PCR扩增、文库构建,以获得样本的单细胞

基因表达数据。10×Chromium可以在几分钟内封装成千上万个的单细胞,实现高通量的同时保持敏感性,具有快速细胞封装和较高细胞捕获率的优势(图1)。

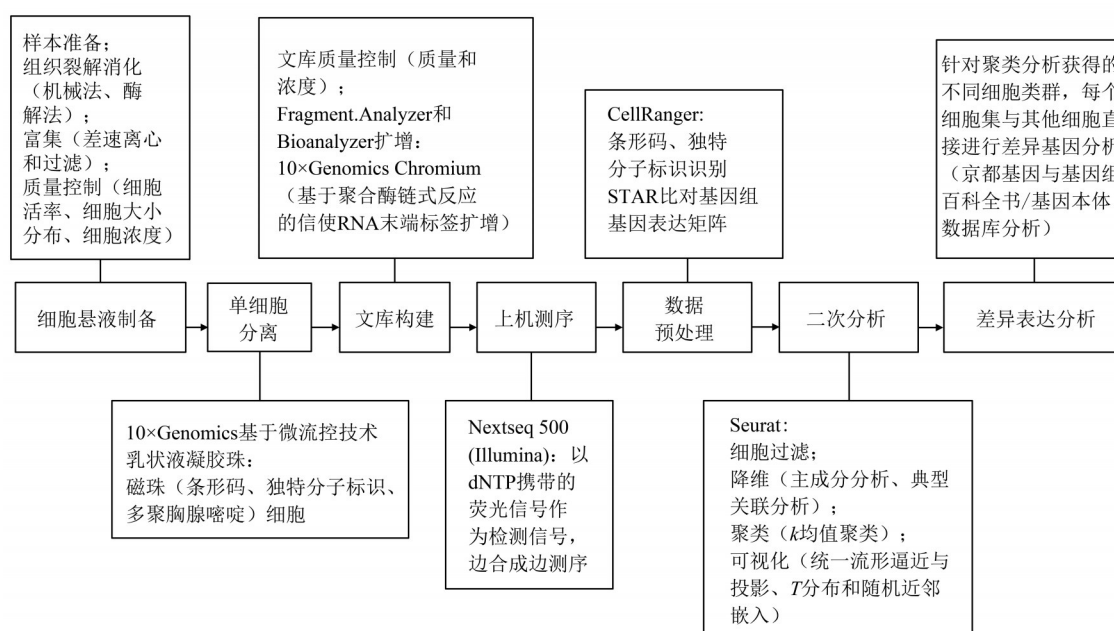


Fig. 1 The general flow of scRNA-seq

图1 单细胞转录组测序大致流程

每个神经元的形态、连接性和电生理特性方面都不相同, 运用 ScRNA-seq 技术剖析神经元细胞异质性, 在细胞水平分辨率提供特定解剖部位中神经元细胞不同类型、不同状态的基因表达信息, 对神经细胞进行无偏倚的分类^[14]。然而由于神经细胞的特殊结构, 如不规则的细胞体、神经元细胞轴突发达、整体细胞直径较大, 导致 RNA 捕获率低、上机起始材料低, 获得的数据有一定程度的丢失, 实验方案具有挑战性。Regev 团队^[15] 开发出 Div-Seq, 一种对神经元细胞进行抽提细胞核, 将获得的单个细胞核进行测序, 又称单核 RNA 测序 (single-nucleus RNA-seq, SnRNA-seq)。这项技术对于神经元细胞特殊性做了补充, 可以满足大脑组织难解离以及冷冻组织的需求。

ScRNA-seq 通过对单个细胞中多种标记物的定量分析, 解析大脑细胞分子基因特征。一种常见的方法是分析单个细胞中多个基因的表达, 然后基于基因共表达模式, 通过聚类将细胞分成组。Yao 等^[16] 联合分析了 7 个 ScRNA-seq 和 SnRNA-seq 数据集, 将小鼠初级运动皮层 (primary motor cortex, MOp) 的细胞划分为 59 种 γ -氨基丁酸能 (GABAergic) 抑制性神经元、31 种谷氨酸能兴奋性神经元和 26 种非神经元, 建立了 MOp 的细胞转录图谱。研究对成年小鼠 MOp 的细胞类型多样性进行了全面的分类和注释, 基于转录特征对单个细胞类型进行靶向研究, 使设计针对小鼠 MOp 中特定细胞类型在神经回路和行为中的功能分析成为可能。Zeisel 等^[17] 使用系统的 ScRNA-seq 来测序小鼠横跨整个中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 和外周神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 的细胞, 利用获得的所有细胞类型基因表达数据, 讨论哺乳动物神经系统的总体结构, 构建了其细胞转录图谱。大脑细胞的异质性给神经科学的研究带来了较大困难, 极大地限制了人们对于精神类疾病的机制和药物靶点的研究。ScRNA-seq 对于细胞和细胞亚型精确细致的分类^[14], 使人们对于大脑细胞异质性的认识达到一个前所未有的分辨率, 解析大脑细胞异质性对于神经科学的研究是至关重要的。以上研究揭示了小鼠神经系统的分子特征, 提供了更清晰的神经系统细胞多样性图谱, 为哺乳动物神经系统提供了参考图谱。该图谱可用于基因靶向细胞的化学遗传、光遗传、基因靶向调控等操作, 并为了解特定基因的功能提供帮助。

2 ScRNA-seq在药物成瘾机制研究的应用

2.1 药物成瘾

精神病学研究中动物模型对临床情况的转化价值是评判该模型的最佳标准, 临床试验的失败通常被归因于临床前动物模型的预测能力有限。基于《精神障碍诊断和统计手册 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-5)》^[18] 构建的操作性条件的自我给药 (self-administration) 成瘾模型, 被广泛应用于临床前成瘾研究, 该模型涵盖了药物成瘾全过程: a. 形成, 偶然用药、规律用药和强迫用药; b. 戒断和消退; c. 线索、药物或应激诱导的复吸。该模型较好地满足了动物模型的表现效度、结构效度和预测效度^[19]。此外, 被动给药方式也用于观察药物对机体及行为的直接药理学影响, 对于自我给药和被动给药引起的基因表达差异性尚需进一步研究。慢性暴露于成瘾药物会诱导大脑奖赏区域的分子适应性变化, 从而导致行为的持久改变。通过关注药物成瘾相关大脑奖赏区域的分子基础, 可确定治疗成瘾障碍的新靶点^[20]。既往研究中已发现, 一些关键的分子靶点能改变模型动物的成瘾行为。例如, N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA 受体) 2B 亚基拮抗剂通过调节皮质-边缘系统投射的可塑性、内源性大麻素模拟药通过促进星型胶质细胞谷氨酸释放可有效抑制可卡因成瘾动物的复吸行为^[21-22]; 而具有拮抗 5-羟色胺 (5-HT)₃ 受体和激动 $\alpha 7$ 尼古丁受体的复合作用的托烷司琼可减少可卡因成瘾动物的强迫觅药行为^[23]。然而, 迄今为止, 药物成瘾领域的基础研究在临床上成功转化应用的例数甚少。其中一个原因是, 过去对药物成瘾模型的研究大都关注特定的分子或信号通道。可是, 药物成瘾涉及认知、情感、本能等方面, 单个分子改变难以解释这种极为复杂的行为模式。而且, 如果缺少神经细胞类型特异性信息, 药物成瘾精确的分子机制难以充分阐明。因此, ScRNA-seq 在药物成瘾研究领域的应用有望为上述问题的解决带来曙光。

2.2 解析药物成瘾相关神经环路中关键脑区的细胞异质性

成瘾药物的奖赏作用主要依赖于伏隔核 (nucleus accumbens, NAc) 中的多巴胺信号。成瘾药物反复使用导致的动机强化涉及更为广泛的神经环路, 其中皮质中脑边缘系统、皮质-纹状体-丘脑-

皮质环路以及海马 (hippocampus, HA) 的功能改变最为引人关注^[24]。Ho 等^[25]应用 ScRNA-seq 对小鼠背内侧纹状体 (dorsomedial striatum) 的中型多棘神经元 (medium spiny neurons, MSNs) 进行检测, 通过确认已建立的标记基因——多巴胺 1 受体 (dopamine 1 receptor, D1R) 和多巴胺 2 受体 (dopamine 2 receptor, D2R) 识别新的亚型特异性标记基因, 进行分辨率更高 MSNs 亚型分类。MSNs 的功能和失衡与基底神经节和多巴胺系统的疾病高度相关, 如药物成瘾, 通过认识不同 MSN 亚型的分子组成, 对于了解细胞功能分子机制和治疗药物使用障碍的药物靶点是非常重要的。Saunders 等^[26]使用 ScRNA-seq 对成年小鼠大脑的海马、下丘脑 (thalamus, TH) 等 9 个区域检测了 69 万个单细胞的 mRNA 表达, 确定了 565 个不同的细胞群。研究发现了谷氨酸能神经元表现出皮层中的区域特化性, 而非神经元细胞类别, 如那些组成血管系统的细胞类别, 表现出皮层和皮层下区域特化性。Tasic 等^[27]利用 ScRNA-seq 测序了来自小鼠新皮层 (neocortex) 两个区域 23 822 个细胞: 初级视觉皮层 (primary visual cortex, VISp) 和前外侧运动皮层 (anterior lateral motor cortex, ALM), 将获得的单细胞基因表达谱数据进行聚类分析, 绘制了新皮层的细胞转录图谱。研究发现, 几乎所有类型的含 γ -氨基丁酸能神经元在这两个区域都共享, 而大多数类型的谷氨酸能神经元都只出现在这两个区域中的其中一个, 谷氨酸能神经元分布具有区域特异性。研究通过分析逆行示踪病毒标记的 2 204 个谷氨酸能神经元的转录组, 发现 VISp 或 ALM 中的大多数谷氨酸能神经元类型投射到不同的皮质和皮层下区域, 而几乎所有的 γ -氨基丁酸能神经元都形成局部连接。谷氨酸能神经递质系统可以增强神经元的兴奋性并调节神经可塑性, 中枢兴奋类成瘾药物反复使用导致的多巴胺能释放可诱导该系统发生神经适应^[28]。分析谷氨酸能神经元投射特异性的转录组特征将有助于理解成瘾相关神经环路功能, 对于药物成瘾的机制研究具有重要意义。

2.3 ScRNA-seq在药物成瘾动物模型中的应用

药物成瘾是一种多基因疾病, 涉及遗传背景和环境依赖的细胞反应之间复杂的相互作用, 使用多路基因调控和细胞特异性操作可使我们能够更全面地理解最初的药物强化如何过渡到长期的药物滥用障碍。Ribeiro 等^[29]通过对转基因小鼠 NAc 进行荧光激活细胞分选 (fluorescence activating cell sorter,

FACS) 特异性将表达生长抑素 (somatostatin, SST) 的中间神经元 (Interneuron, IN) 细胞单个核分离出来, 对搜集的单个核进行 RNA 测序 (RNA sequence, RNA-seq)。研究发现, 反复的可卡因给药会诱导 NAc SST+ IN 内基因表达的转录组变化, 确定了 JunD 转录因子是可卡因作用的关键调控因子, 并通过病毒介导的基因转移证实, SST+ IN 中的 JunD 活性影响对可卡因的行为反应, 为设计针对可卡因成瘾患者 NAc IN 的治疗方法提供了新的见解。Savell 等^[30]对可卡因给药雌鼠和雄鼠 NAc 15 631 个核内 RNA 进行测序, 定义了在大鼠模型中急性可卡因诱导的性别和细胞类型特异性反应, 提供了单细胞分辨率水平的可卡因诱导转录特征。研究发现了即刻早期基因 (immediate early gene, IEG) 表达程序, 该程序在体内可卡因诱导和在体外多巴胺受体激活后上调。通过基因编辑技术多路诱导该基因程序, 启动次级突触中心转录谱, 改变体外纹状体生理功能, 增强了可卡因致敏作用, 验证了这一程序在可卡因诱导成瘾中发挥的作用。Avey 等^[31]通过对急性吗啡治疗后小鼠 NAc 进行 ScRNA-seq 检测, 将获得的数据进行差异表达分析, 揭示了少突胶质细胞 (oligodendroglia, Oligo) 和星形胶质细胞 (astrocyte, Astro) 独特的吗啡依赖转录反应。研究发现, 受影响的基因在与 Oligo 成熟和髓鞘形成密切相关的细胞通路中被富集, 阐明了 Oligo 产生的吗啡依赖性转录反应, 并为阿片类药物滥用相关的髓鞘形成缺陷提供了可能的机制研究。Miller 等^[32]通过激光显微切割 (laser capture microdissection, LCM) 结合 RNA-seq 实现了对在青春期和成年期暴露于四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC) 大鼠模型前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC) 中单个细胞和皮层特异性基因表达的转录水平检测。研究发现, 青春期暴露于 THC 的大鼠会在分子和形态水平上影响 PFC 的边缘前皮质 (prelimbic, PrL) 亚区第三层锥体神经元 (pyramidal neurons), 从而改变中脑边缘 (mesolimbic) 环路的发育轨迹。中脑边缘环路是药物成瘾中的一条重要环路, 因此这种改变可能会增强它们对药物成瘾的脆弱性。Bhattacharjee 等^[33]通过对幼年、成年小鼠以及基于自我给药构建可卡因成瘾小鼠模型, 在戒断后不同时期的 PFC 进行 ScRNA-seq 检测, 揭示了发生在 PFC 的细胞类型特异性转录学变化进程, 阐明了在自然适应 (自然适

应改变出现在幼年时期)和药物诱导(慢性可卡因成瘾诱导的转录变化)条件下多种神经元亚型的转录动力学。

上述研究将 ScRNA-seq 应用于药物成瘾啮齿类动物模型, 提供了成瘾模型在关键奖赏脑区 NAc 和 PFC 中单个细胞转录组的数据, 使药物成瘾的疾病机制以及药物靶点研究进展到特定脑区细

胞分辨率水平。然而, 药物成瘾机制复杂, 对于所涉及到的大脑奖赏区域测序研究并不完全, 需要做进一步的研究。对于 ScRNA-seq 在药物成瘾动物模型中的应用, 涉及到各种不同药物的不同给药方式, 如急性和慢性暴露模型、主动和被动给药模型, 所涉及的脑区也各有不同(表2)。

Table 2 Application of ScRNA-seq in animal models of drug addiction

表2 ScRNA-seq在药物成瘾动物模型中的应用

发表年份 作者	成瘾模型	脑区	细胞/细胞核数量	细胞分类
2018 Ribeiro等 ^[29]	雄性成年小鼠7 d连续注射可卡因	伏隔核	~50 000个细胞核	γ-氨基丁酸能和胆碱能中间神经元
2018 Avey等 ^[31]	雄性成年小鼠腹腔注射吗啡急性暴露	伏隔核	23 276个细胞	少突胶质细胞1-4型、星型胶质细胞、少突胶质前体细胞等18个细胞群
2019 Miller等 ^[32]	雄性青春期大鼠3 d内8次腹腔注射四氢大麻酚	前额叶皮层	750个细胞每3张连续切片	锥体和非锥体神经元细胞
2019 Bhattacharjee等 ^[33]	雄性成年小鼠静脉自我给药(食物训练→静脉插管手术→重新食物训练回到基线→可卡因训练)	前额叶皮层	29 864个细胞	少突胶质细胞、新形成的少突胶质细胞、星型胶质细胞、少突胶质前体细胞等8个细胞群
2020 Savell等 ^[30]	雄性和雌性大鼠大腹腔注射盐酸可卡因急性暴露	伏隔核	15 631个细胞核	多巴胺1/2型受体中型多棘神经细胞、少突胶质细胞1-3型等16个细胞群

ScRNA-seq 同样应用于人类死后脑组织研究, Tran 等^[34]对来自人类奖赏回路中相互连接的大脑腹侧纹状体(ventral striatum)、边缘系统(杏仁核(amygdala, AMY)和海马)和两个皮质亚区域(亚属前扣带皮层(subgenual anterior cingulate cortex, sACC)和背外侧PFC)的70 615个单个细胞核进行了 SnRNA-seq, 定义了107个细胞类别并确定了这些细胞类别之间的分子关系和特殊 MSNs 的分化模式。研究还提供一种交互式应用程序整合药物成瘾和神经精神疾病的遗传学研究, 发现了与神经精神疾病或药物成瘾风险位点相关基因的差异表达, 将各种精神疾病和药物成瘾的遗传风险被量化, 为理解人类大脑中细胞类型和区域特异性表达的临床相关性提供见解。

2.4 ScRNA-seq联合GWAS在药物成瘾及其他精神类疾病中的应用

GWAS 是一种利用基因组中数以百万计的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)为分子遗传标记, 进行全基因组水平上的对照相关性分析, 比较发现影响复杂性状的基因变异的方法^[35]。药物成瘾是一种高度多基因的疾病, 疾病的形成与基因突变和基因表达受损有关^[24],

在 GWAS 时代, 通过候选基因相关分析(candidate gene association study, CGAS)以及 GWAS, 已经发现了药物成瘾多个全基因组关键基因位点^[36], 揭示了其突变与药物成瘾相关的候选基因^[36-37], 但是关于这些基因位点发挥其作用的功能机制尚不明确^[38]。在后 GWAS 时代, 研究关注根据药物成瘾相关性状在基因表达遗传调控中的作用, 识别和功能注释与其相关的位点^[39]; 同时, 解析对于药物成瘾和共病性状之间遗传重叠的基因途径^[40]。为了分析成瘾相关候选基因涉及的细胞类型和大脑区域, Srinivasan 等^[41]应用分层连锁不平衡回归(stratified LD score regression, s-LDSC)分析, 将 GWAS 与通过单细胞染色质转座酶可及性高通量测序(assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq)获得来自人类和小鼠开放染色质区域(open chromatin regions, OCRs)的数据进行比较, 结果显示与顺式调节元件(cis-regulatory element, CRE)活性相关。CRE 具有高度细胞类型特异性, 可能在成瘾神经环路的功能发展发挥作用。研究还根据人类 OCRs 数据分类将神经元分为皮质兴奋性或纹状体 D1R 和 D2R 神经元, 预测了成瘾相关基

因变异的功能影响,显示奖赏系统中不同的神经元亚型在导致成瘾的各种特征中发挥着不同的作用。

基于GWAS研究联合药物成瘾个体ScRNA-seq数据的分析方法,可以发现细胞类型和性状之间的关联,有利于帮助理解疾病机制和细胞类型特异性药物干预靶点。Calderon等^[6]开发出一个用于分析单细胞基因表达和GWAS汇总统计的多基因程序,可以根据GWAS汇总的统计数据 and 基因表达数据对性状相关的细胞类型和基因进行优先排序,将新的单细胞类型和感兴趣的表型联系起来。疾病/性状相关的SNP更有可能定位在调控元件中,并对基因表达产生调控作用,这通常被称为表达数量性状位点(expression quantitative trait loci, eQTL)。李毅等^[42]通过结合GWAS和ScRNA-seq的数据,分析观察到精神分裂症的位点表现出细胞亚型特异性的转录动力学。该研究确定了患有精神分裂症的多个潜在风险基因,进一步发现了一些基因在胎儿大脑发育和兴奋性神经元中高表达,验证了精神分裂症的多基因性质,并强调了该疾病中早期神经发育异常的参与^[43]。该研究提供了联合GWAS和ScRNA-seq数据在药物成瘾等精神疾病中的研究思路及方法,对于包括药物成瘾在内的精神疾病研究具有重要意义。随着不同疾病模式动物ScRNA-seq数据的补充,对于疾病的了解深入到单个细胞基因表达水平,对于基因和精神疾病相关症状之间的关联也将越来越清晰。

3 总结和展望

药物成瘾是一种复杂的进展性疾病,在疾病的不同阶段表现为不同的状态,包括强迫用药、戒断、消退、复吸。临床上较难在疾病进展的不同阶段进行时间横截面的ScRNA-seq研究。例如,很难解释成瘾患者死后脑样本测序研究中发现的差异基因表达代表着药物成瘾的后果还是原因。有研究进行了人类和大鼠NAc和背外侧PFC细胞类别相关性分析^[34],显示部分细胞类型之间存在整体的保守性,提示在动物模型中得到的数据具有参考性。因此,可以选用不同的成瘾动物模型模拟人类在药物成瘾的进展。例如,强迫性觅药模型^[44-45]模拟成瘾者对药物的渴求以及觅药行为的强迫性行为特征等。目前,药物成瘾研究ScRNA-seq主要应用于成瘾药物的急性暴露^[31]及自身给药模型^[33],对于成瘾的特征行为及脑区特异性的关联研究仍然欠缺。

ScRNA-seq为药物成瘾的分子机制研究提供了很好的方法。然而,药物成瘾个体的大脑细胞组织来源有很大的限制,如人类组织稀缺、动物模型的有效性存在争议等。因此,SnRNA-seq在药物成瘾研究中的应用还面临许多困难和挑战。为了突破技术的限制,ScRNA-seq可以结合提供基因空间信息的空间转录组学^[32, 46]、表观遗传组学^[4, 41]以及各类蛋白组学发展多模式单细胞方法学(multi-model single-cell methodologies),应对药物成瘾在组学方面的研究挑战。未来研究将涉及药物成瘾不同阶段,深度解析疾病发展的分子特征,发现影响疾病进展的关键分子,通过对细胞分子层面进行干预更好的做到靶向治疗药物成瘾。

参 考 文 献

- [1] Hager G L, McNally J G, Misteli T. Transcription dynamics. *Mol Cell*, 2009, **35**(6): 741-753
- [2] Margulies M, Egholm M, Altman W E, *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, **437**(7057): 376-380
- [3] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, **6**(5): 377-382
- [4] Armand E J, Li J, Xie F, *et al.* Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes. *Neuron*, 2021, **109**(1): 11-26
- [5] Aldridge S, Teichmann S A. Single cell transcriptomics comes of age. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4307
- [6] Calderon D, Bhaskar A, Knowles D A, *et al.* Inferring relevant cell types for complex traits by using single-cell gene expression. *Am J Hum Genet*, 2017, **101**(5): 686-699
- [7] Liu J F, Li J X. Drug addiction: a curable mental disorder?. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, **39**(12): 1823-1829
- [8] Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, *et al.* CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-seq. *Genome Biol*, 2016, **17**: 77
- [9] Macosko E Z, Basu A, Satija R, *et al.* Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, **161**(5): 1202-1214
- [10] Jaitin D A, 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
- [11] Picelli S, Björklund Å K, Faridani O R, *et al.* Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*, 2013, **10**(11): 1096-1098
- [12] Cadwell C R, Palasantza A, Jiang X, *et al.* Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(2): 199-203
- [13] Zheng G X, Terry J M, Belgrader P, *et al.* Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14049
- [14] Poulin J F, Tasic B, Hjerling-Leffler J, *et al.* Disentangling neural

- cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nat Neurosci*, 2016, **19**(9): 1131-1141
- [15] Habib N, Li Y, Heidenreich M, *et al.* Div-Seq: single-nucleus RNA-seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science*, 2016, **353**(6302): 925-928
- [16] Yao Z, Liu H, Xie F, *et al.* A transcriptomic and epigenomic cell atlas of the mouse primary motor cortex. *Nature*, 2021, **598**(7879): 103-110
- [17] Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, *et al.* Molecular architecture of the mouse nervous system. *Cell*, 2018, **174**(4): 999-1014.e1022
- [18] American Psychiatric Association D, Association A P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013
- [19] Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, 2006, **11**(1): 2-38
- [20] Robison A J, Nestler E J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2011, **12**(11): 623-637
- [21] Shen H, Moussawi K, Zhou W, *et al.* Heroin relapse requires long-term potentiation-like plasticity mediated by NMDA2b-containing receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(48): 19407-19412
- [22] Zhang L Y, Zhou Y Q, Yu Z P, *et al.* Restoring glutamate homeostasis in the nucleus accumbens *via* endocannabinoid-mimetic drug prevents relapse to cocaine seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, 2021, **46**(5): 970-981
- [23] Zhou Y Q, Zhang L Y, Yu Z P, *et al.* Tropisetron facilitates footshock suppression of compulsive cocaine seeking. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2019, **22**(9): 574-584
- [24] Volkow N D, Michaelides M, Baler R. The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol Rev*, 2019, **99**(4): 2115-2140
- [25] Ho H, Both M, Siniard A, *et al.* A guide to single-cell transcriptomics in adult rodent brain: the medium spiny neuron transcriptome revisited. *Front Cell Neurosci*, 2018, **12**: 159
- [26] Saunders A, Macosko E Z, Wysoker A, *et al.* Molecular diversity and specializations among the cells of the adult mouse brain. *Cell*, 2018, **174**(4): 1015-1030.e1016
- [27] Tasic B, Yao Z, Graybuck L T, *et al.* Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature*, 2018, **563**(7729): 72-78
- [28] Schindler A G, Tsutsui K T, Clark J J. Chronic alcohol intake during adolescence, but not adulthood, promotes persistent deficits in risk-based decision making. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, **38**(6): 1622-1629
- [29] Ribeiro E A, Salery M, Scarpa J R, *et al.* Transcriptional and physiological adaptations in nucleus accumbens somatostatin interneurons that regulate behavioral responses to cocaine. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 3149
- [30] Savell K E, Tuscher J J, Zipperly M E, *et al.* A dopamine-induced gene expression signature regulates neuronal function and cocaine response. *Sci Adv*, 2020, **6**(26): eaba4221
- [31] Avey D, Sankararaman S, Yim A K Y, *et al.* Single-cell RNA-seq uncovers a robust transcriptional response to morphine by glia. *Cell Rep*, 2018, **24**(13): 3619-3629.e3614
- [32] Miller M L, Chadwick B, Dickstein D L, *et al.* Adolescent exposure to $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol alters the transcriptional trajectory and dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons. *Mol Psychiatry*, 2019, **24**(4): 588-600
- [33] Bhattacharjee A, Djekidel M N, Chen R, *et al.* Cell type-specific transcriptional programs in mouse prefrontal cortex during adolescence and addiction. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 4169
- [34] Tran M N, Maynard K R, Spangler A, *et al.* Single-nucleus transcriptome analysis reveals cell-type-specific molecular signatures across reward circuitry in the human brain. *Neuron*, 2021, **109**(19): 3088-3103.e3085
- [35] Visscher P M, Wray N R, Zhang Q, *et al.* 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet*, 2017, **101**(1): 5-22
- [36] Hall F S, Drgonova J, Jain S, *et al.* Implications of genome wide association studies for addiction: are our a priori assumptions all wrong?. *Pharmacol Ther*, 2013, **140**(3): 267-279
- [37] Karlsson Linnér R, Mallard T T, Barr P B, *et al.* Multivariate analysis of 1.5 million people identifies genetic associations with traits related to self-regulation and addiction. *Nat Neurosci*, 2021, **24**(10): 1367-1376
- [38] Bühler K M, Giné E, Echeverry-Alzate V, *et al.* Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol*, 2015, **20**(5): 845-871
- [39] Marees A T, Gamazon E R, Gerring Z, *et al.* Post-GWAS analysis of six substance use traits improves the identification and functional interpretation of genetic risk loci. *Drug Alcohol Depend*, 2020, **206**: 107703
- [40] Cabana-Domínguez J, Shivalikanjli A, Fernández-Castillo N, *et al.* Genome-wide association meta-analysis of cocaine dependence: shared genetics with comorbid conditions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, **94**: 109667
- [41] Srinivasan C, Phan B N, Lawler A J, *et al.* Addiction-associated genetic variants implicate brain cell type- and region-specific *cis*-regulatory elements in addiction neurobiology. *J Neurosci*, 2021, **41**(43): 9008-9030
- [42] Wu Y, Yu X L, Xiao X, *et al.* Joint-tissue integrative analysis identified hundreds of schizophrenia risk genes. *Mol Neurobiol*, 2021, **59**(1): 107-116
- [43] Skene N G, Bryois J, Bakken T E, *et al.* Genetic identification of brain cell types underlying schizophrenia. *Nat Genetics*, 2018, **50**(6): 825-833
- [44] Lüscher C, Janak P H. Consolidating the circuit model for addiction. *Annu Rev Neurosci*, 2021, **44**: 173-195
- [45] 余志鹏, 徐鹏. 药物成瘾的强迫觅药模型. 中国药物依赖性杂志, 2018, **27**(1): 13-17
- Yu Z P, Xu P. China J Drug Depend, 2018, **27**(1): 13-17
- [46] Zhang M, Eichhorn S W, Zingg B, *et al.* Spatially resolved cell

atlas of the mouse primary motor cortex by MERFISH. *Nature*,

2021, **598**(7879): 137-143

Application of Single Cell Transcriptome Sequencing in Drug Addiction Research *

LI Qiong¹⁾, WANG Fu-Yan²⁾, ZHANG Xiao-Qin¹⁾, YU Zhi-Peng¹⁾,
TANG Zi-Hang¹⁾, SHEN Hao-Wei^{1,3)**}

¹⁾Department of Pharmacology, Medicine School of Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²⁾Experimental Center, Affiliated Hospital of Ningbo University School of Medicine, Ningbo 315020, China;

³⁾Ningbo Kangning Hospital, Ningbo 315201, China)

Abstract Drug addiction is a complicated central nervous system (CNS) disorder. Both basic and clinical studies have confirmed that the neural mechanisms of drug addiction are progressively altered at different stages of the development of addictive behaviors. Genomic studies using technologies such as whole-genome association studies, whole-genome sequencing, whole-exome sequencing or high-throughput transcriptome sequencing have provided insight into the genetic vulnerability of mental disorders, including drug addiction. The single nucleotide polymorphism detection techniques or sequencing technologies mainly predict genetic risk loci for diseases. However, the occurrence of many CNS disorders is closely related to environmental factors and there is brain region-specific cellular heterogeneity information on the expression of relevant genes at different stages of disease development. Therefore, traditional molecular genetic studies have limitations in explaining the pathogenesis of CNS disorder. Single-cell RNA sequencing (ScRNA-seq) technologies, which target individual cells for transcript level determination, avoid the disadvantages of traditional sequencing for detecting the average transcript level of cell populations and can quantitatively describe cellular heterogeneity. In recent years, single-cell transcriptional sequencing technology has been applied to the study of drug addiction. The cortico-mesolimbic system, cortico-striatal-thalamo-cortical pathway and the hippocampus are important brain regions associated with drug addiction. It was found that more neuronal subtypes exist in both the striatum and hippocampus than previously known. In the cortex, pyramidal neurons exhibit a projection-specific gene expression profile. In rodent models experiencing from cocaine, morphine, and tetrahydrocannabinol, recent studies have identified single-cell transcriptome alterations in the nucleus accumbens and prefrontal cortex, the key brain regions for rewarding. These studies have advanced the mechanisms of drug addiction and drug development to the level of cellular resolution in specific brain regions. This review summarizes the important applications of single-cell RNA-Seq in neuroscience research and uses drug addiction as an example to illustrate its value in the study of CNS disorders.

Key words single cell transcriptome sequencing, drug addiction, neuroscience

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0121

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32171017).

** Corresponding author.

Tel: 86-15988622731, E-mail: shenhaowei@nbu.edu.cn

Received: March 30, 2022 Accepted: June 24, 2022