

牙髓干细胞分化轨迹的构建与差异基因筛选

何超 金铁男* 刘毅铮 刘博玉 欧健男

(佳木斯大学 黑龙江)

摘要: 目的: 利用 GEO 数据库中正常牙髓组织的单细胞测序数据, 对牙髓间充质干细胞的测序数据经过分离, 分析牙髓间充质干细胞的发育轨迹, 并探究在其发育过程中影响其分化方向的因素。

方法: 使用 R 语言进行聚类、分群, 提取出其中的牙髓间充质干细胞, 并进行二次的聚类、分群, 以及伪时序分析, 确定出不同时间点的牙髓间充质干细胞的差异基因。

结果: 对 GSE161267 数据进行分析, 通过降维分群, 共分出 15 群细胞, 并鉴定出 DPSCs 子细胞群, 进行二次降维聚类, 筛选出了 10 个变化率最高的基因。伪时序分析的结果表明, DPSCs 存在 4 个初步的分化方向, 为成肌分化、成牙分化、成骨分化。其中成牙分化与成骨分化的时间节点相似。

结论: DPSCs 的分化过程中, ASPN、ACTA2、THY21 等基因存在特异性的高表达, 且牙髓干细胞成牙分化与成骨分化的节点相似, 能够作为诱导分化的最佳时间点。

DPSCs 可分化为包括成骨细胞、成牙本质细胞、成纤维细胞以及神经细胞在内的多种构成牙体以及牙周组织的细胞, 同时, DPSCs 也具有分化为上皮细胞、脂肪细胞等其他细胞的潜力^[1]。大量研究表明, DPSCs 的多能性可以媲美骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs), 这也使得 DPSCs 在再生医学领域中具有巨大的潜力^[2]。

本文利用单细胞转录组测序数据, 就 DPSCs 的分化轨迹进行构建, 同时希望寻找出 DPSCs 在成牙/成骨分化过程中的差异基因, 为今后的定向分化研究提供新的思路。

1 材料与与方法

1.1 数据下载

DPSCs 的 scRNA-seq 数据均来源于基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库中的 GSE164157 数据集^[7]。该数据集为 GSE161267 数据集的子集, 含有 5 组牙髓样本, 共计 32378 个单细胞转录组。牙髓样本均来源于 18~35 岁患者的拔除牙, 由苏黎世大学口腔外科所收集, 并在 10X 平台进行单细胞转录组测序, 获得单细胞转录组表达数据。

1.2 数据读取、质量控制以及分群

使用 R 中的 Seurat 包, 读取原始数据的表达矩阵以及注释文件, 合并样本为新的 S4 类^[8]。对原始单细胞转录组数据进行如下条件的筛选: 每个细胞中检测到的的基因数量大于 200 且小于 2500、线粒体基因的比例小于 5%、蛋白编码基因的比例高于 95%。将转录组数据归一化后进行归一化, 随后进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 法进行转录组数据降维, 选取前 10 个主成分进行聚类分析, 得到分群数据, 计算并筛选出有统计学意义的差异基因 (筛选条件: $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$)。

1.3 DPSCs 发育轨迹构建与差异分析

使用 R 中的 monocle 包进行分析。构建 monocle 对象后, 估算离散度, 并进行二次的质量控制 (过滤小于 10 个细胞中表达的基因)。利用高变化率基因作为伪时序分析的排序基因, 降维, 进行细胞排序并进行可视化。通过检索相关文献, 寻找特异性表达的分化标志基因, 以鉴定出 DPSCs 的成牙分化与成骨分化的轨迹。

2 结果

2.1 DPSCs 细胞的提取

对牙髓的单细胞转录组测序的数据集分析, 进行数据的读取、合并, 在质量控制后, 进一步通过 PCA、tSNE 降维后展示出细胞聚类的结果。全部细胞共被分为 15 群。(见图 1) 为了筛选出其中的 DPSCs, 根据文献中的表达趋势, 以 TAGLN、FRZB、THY1 和 NOTCH3 作为 DPSCs 的标志基因, 并在聚类结果中进行四种标志基因的定位 (定位结果见图 2)。结果显示, 2、3 号细胞群当中, 四种标志基因均出现特异性的高表达。因此确定 2、3 号细胞群为

DPSCs 细胞。提取第 2、3 群中的细胞信息并单独建立新的 S4 类。

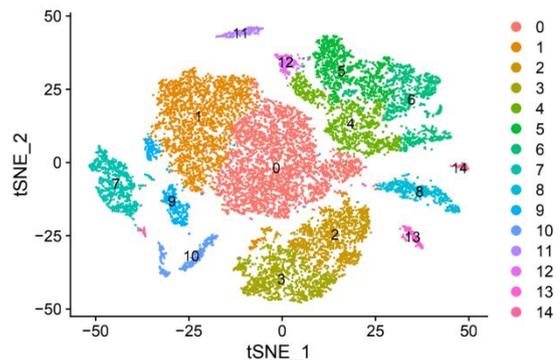


图 1. 全部牙髓细胞分群的 tSNE 展示图

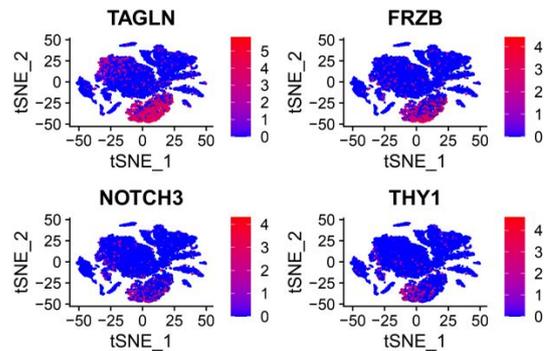


图 2. 标志基因在全体细胞中的表达量

2.2 DPSCs 细胞的亚群划分与差异分析

为了继续对 DPSCs 细胞亚群进行划分, 进行了二次的聚类分群。tSNE 降维后的聚类结果见图 3。在此基础上, 对全部分群进行差异分析, 挑选出 2000 个在不同亚群中的差异基因 (见图 4), 其中变化率最高的 10 个基因已在图中标明。

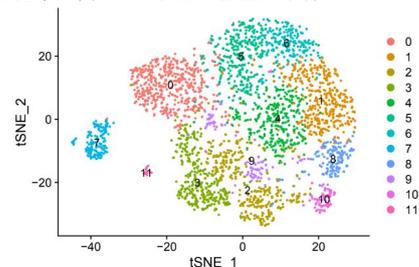


图 3. DPSCs 细胞的 tSNE 展示图

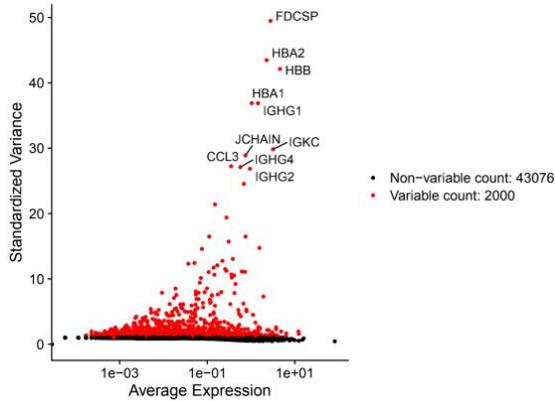
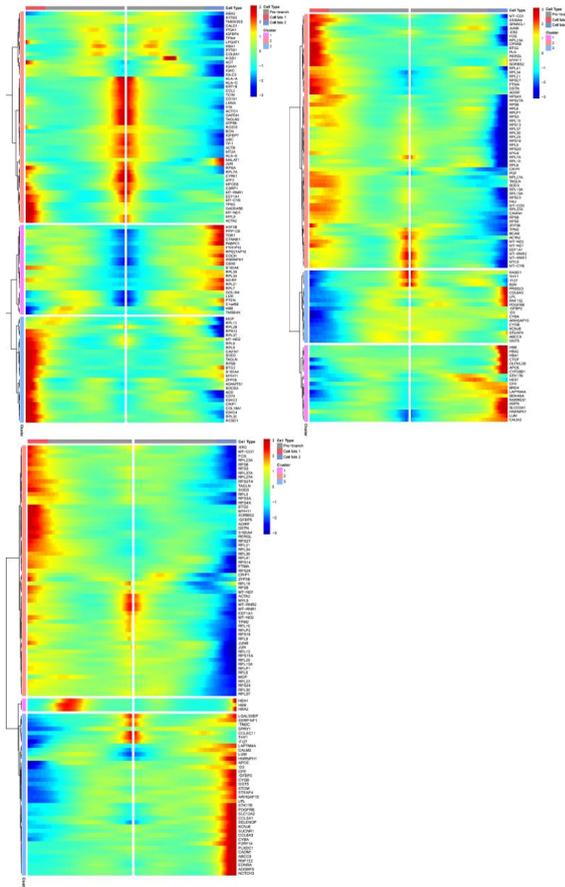


图 4.Mscs 细胞各亚群中差异基因的表达, 其中差异性前 10 的基因在图中被指出。

2.3 DPSCs 发育分支的差异基因筛选以及鉴定

根据所构建的发育轨迹进行 BEAM 分析, 确定出 3 个主要分化方向的差异基因。见图 7-9。



(图 5 发育分叉点 3 的差异热图; 图 6 发育点 5 的差异热图; 图 7 发育点 6 的差异热图)

不难发现, 在发育分支点 5 的一端中, LUM、CTGF、APSN 等成牙本质细胞的标志基因存在显著的表达; 同样地, 在发育分支点 6 的一端中, 成骨细胞相关标志基因 THY1、NOTCH3 存在有显著的表达。同时, DPSCs 在上述分化分支中, 核糖体基因以及线粒体基因的表达显著降低。故可初步判断, 发育分支点 5 为 DPSCs 的成牙分化点, 发育分支点 6 为 DPSCs 的成骨分支点。

3 讨论

本研究利用 scRNA-seq 数据, 进一步地验证了目前所报道的文献中各类细胞标志物的表达情况, 并初步构建出了 DPSCs 的分化轨迹。在轨迹中, 有效的发育分叉点共计四个。对分叉点前后的差异基因进行整理, 并以现有的文献进行细胞类型的注释。

对于分叉点 3 的基因, 其位于 Mscs 分化过程的末端。可以明显的发现, 在两个分化方向上, 线粒体基因以及核糖体基因的表达量均显著降低, 说明细胞周期逐渐趋于间期, 细胞的分化程度增加。在分化的一端, ACTA2、TEMP2、TAGLN 为首的肌球蛋白、肌动蛋白的表达量显著升高, 说明其具有分化成肌细胞的潜能。而在分化的另一端, 没有观察到显著增加的细胞分群标志物。

对于分叉点 5, 由于 APSN、LUM (在前牙本质和牙本质中显著表达)、CTGF (在修复性牙本质中显著阳性表达) 的表达增加, 我们推测该群细胞的分化方向更加趋向于成牙本质细胞。

对于分叉点 6, 由于 THY1 (骨髓组织中 THY1 高表达的基因, 表现出了较好的骨再生能力) NOTCH3 (NOTCH 信号的增加通常证明了较强的成骨能力) 的表达增加, 我们推测该群细胞的分化方向更加趋向于成骨细胞。

通过对伪时序的分析, 据此推测, 在人体中 DPSCs 成牙分化与成骨分化的时间节点也具有相似性, 二者可能均来源于同一种阶段的 DPSCs。而在这个接近的时间点内, 对 DPSCs 细胞进行定向的分化诱导, 能够达到最佳的成牙分化以及成骨分化的效果。

4. 结论

综上所述, 本研究构建出了 DPSCs 的发育轨迹, 并初步筛选出了不同发育方向的差异基因, 为临床的干细胞定向治疗提供了理论性的指导。同时, 本研究也有不足之处。构建轨迹的伪时序分析算法, 构建出转录组变化的轨迹, 而并非真正的细胞发育轨迹。因此, 在后续的研究中, 应通过细胞生物学实验 DPSCs 的成牙分化与成骨的生物学时间点。

参考文献:

[1]NUTI N, CORALLO C, CHAN B M F, 等. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review[J/OL]. Stem Cell Reviews and Reports, 2016, 12(5): 511-523. DOI:10.1007/s12015-016-9661-9.

[2]TATSUI T. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications[J/OL]. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, 2020, Volume 13: 33-42. DOI:10.2147/SCCAA.S166759.

[3]GIULIANI A, MANESCU A, LANGER M, 等. Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications[J/OL]. STEM CELLS Translational Medicine, 2013, 2(4): 316-324. DOI:10.5966/sctm.2012-0136.

[4]NAKASHIMA M, IOHARA K, MURAKAMI M, 等. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study[J/OL]. Stem Cell Research & Therapy, 2017, 8(1): 61. DOI:10.1186/s13287-017-0506-5.

[5]PAGELLA P, DE VARGAS RODITI L, STADLINGER B, 等. A single-cell atlas of human teeth[J/OL]. iScience, 2021, 24(5): 102405. DOI:10.1016/j.isci.2021.102405.

[6]STUART T, BUTLER A, HOFFMAN P, 等. Comprehensive Integration of Single-Cell Data[J/OL]. Cell, 2019, 177(7): 1888-1902.e21. DOI:10.1016/j.cell.2019.05.031.

黑龙江省大学生创新创业项目编号: S202210222109