

单细胞转录组测序在年龄相关性黄斑变性研究中的应用

安 宁^{1,2}, 张福燕^{1,3}, 秦 波^{1,2}

引用: 安宁, 张福燕, 秦波. 单细胞转录组测序在年龄相关性黄斑变性研究中的应用. 国际眼科杂志 2022;22(6):964-968

基金项目: 爱尔眼科医院集团科研基金项目 (No. AM2001D2, AM2101D1)

作者单位: ¹(550000) 中国贵州省贵阳市, 贵州医科大学; ²(518032) 中国广东省深圳市, 暨南大学附属深圳爱尔眼科医院; ³(550000) 中国贵州省贵阳市, 贵州医科大学附属医院眼科

作者简介: 安宁, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病、眼外伤。

通讯作者: 秦波, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病、眼外伤. qinbozf@163.com; 张福燕, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. simmonqiu1996@163.com

收稿日期: 2021-09-07 修回日期: 2022-04-26

摘要

年龄相关性黄斑变性 (ARMD) 是临床中常见的老年性致盲性眼病, 可造成中心视力的不可逆丧失, 其发病机制复杂, 尚未阐明, 治疗方法有限, 诊疗效果不佳。传统的转录组测序方法基于细胞群体水平获得细胞群的平均差异, 或反映数量占优势细胞的生物信息, 而单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 能对单个细胞的 mRNA 进行转录组分析, 可用于发现新的细胞亚型、揭示细胞异质性、鉴定罕见细胞、理解细胞分化。本文简述了 scRNA-seq 的技术原理, 及其在视网膜、脉络膜发育及 ARMD 研究中的应用, 提出了该项技术的缺陷和新兴技术的发展趋势, 为深入研究视网膜、脉络膜生理学、ARMD 疾病病理生理学及其发病机制提供新的思路及视角, 以期对 ARMD 的靶向治疗提供理论依据。

关键词: 单细胞; 转录组测序; 视网膜; 年龄相关性黄斑变性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.6.16

Application of single-cell RNA-sequencing in age-related macular degeneration

Ning An^{1,2}, Fu-Yan Zhang^{1,3}, Bo Qin^{1,2}

Foundation items: Science Research Grant of Aier Eye Hospital Group (No. AM2001D2, AM2101D1)

¹Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China; ²Shenzhen Aier Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518032, Guangdong Province, China; ³Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Bo Qin. Guizhou Medical University, Guiyang

550000, Guizhou Province, China; Shenzhen Aier Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518032, Guangdong Province, China. qinbozf@163.com; Fu-Yan Zhang. Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China; Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou Province, China. simmonqiu1996@163.com

Received: 2021-09-07 Accepted: 2022-04-26

Abstract

• Age-related macular degeneration (ARMD) is the most common eye disease that can cause irreversible loss of central vision in the elderly population. Since the complexity of the pathogenesis in ARMD, the underlying mechanism remains uncovered, and treatment limited. Conventional bulk transcriptome sequencing strategies can only provide the average gene profile in the dominant cells, while single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) is able to reveal the mRNA transcriptome at a single-cell level. The scRNA-seq has been applied to discover novel cell subtypes, reveal intercellular heterogeneity, and unveil the process of cell differentiation. In this paper, we reviewed the technical principle of scRNA-seq and its application in retinal, choroid development and ARMD research, raised the defect of scRNA-seq and trended in emerging technologies, provided the new insights and perspectives for the in-depth study of retinal and choroid physiology, pathophysiology, and pathogenesis of ARMD diseases. It is hoped to provide theoretical foundation for the targeted therapy of ARMD.

• KEYWORDS: single cell; transcriptome sequencing; retina; age-related macular degeneration

Citation: An N, Zhang FY, Qin B. Application of single-cell RNA-sequencing in age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(6):964-968

0 引言

细胞在多次分裂增殖期间发生分子生物学或基因的改变, 产生细胞状态或类型的多样性, 这种多样性被称为细胞异质性, 普遍存在于多细胞生物个体中。传统的测序方法忽视细胞异质性, 只能反映细胞群体的平均差异, 而单细胞技术可揭示细胞间异质性, 在更深层次上探究生命活动的本质和规律。2013年单细胞测序技术被 *Science* 评为年度最值得关注的六大领域榜首, *Nature Methods* 将该技术评为 2013 年度最重要的方法学, 2015 年再度登上 *Science*

Translational Medicine 封面, 2018 年单细胞转录组测序 (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq) 被 *Science* 评为年度突破技术, 2019/2020 年单细胞多组学和单细胞空间转录组测序再次评为年度技术, 成为最值得期待的生物技术之一。scRNA-seq 在单细胞水平对转录组进行扩增与测序, 直接比较来自不同生物条件的细胞转录组信息, 对细胞分群、发现新的细胞类型、识别疾病进展中起重要作用的罕见细胞、理解细胞异质性、生物多样性等具有重要意义。目前 scRNA-seq 已被应用于眼科领域, 其在视网膜、脉络膜生理学、视网膜疾病如年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 中的研究日新月异, 为探究 ARMD 病因, 发展规律和靶向治疗提供新的视角。

1 scRNA-seq 技术简介

scRNA-seq 是在单细胞水平对转录组进行测序的一项新技术, 其技术路线包括单细胞捕获、mRNA 反转录、cDNA 扩增、测序文库构建、高通量测序和数据分析^[1]。目前提取单细胞的方法有: 荧光激活细胞分选、激光捕获显微切割、手动细胞分选、微流体和微孔等^[2]。一个单细胞中的总 RNA 量大约只有 10pg, 而其中的 mRNA 含量只有 0.2pg, 为获得足够的转录信息, 需要进行扩增, 目前常用的扩增方法包括 PCR 扩增法、IVT 扩增法、等温扩增法等, 其中 PCR 扩增法中的 Smart-seq (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript)/Smart-seq2 具有里程碑意义^[3-4], 其利用 mRNA 识别序列、MMLV 逆转录酶等方法既能将 mRNA 高效扩增到需要的数量级, 又可尽量避免 PCR 偏差而得到均一覆盖的文库。IVT 扩增如 CEL-seq (cell expression by linear amplification and sequencing)/CEL-seq2^[5] 采用线性扩增的测序方法使扩增错误率降低。利用 Phi29 聚合酶进行扩增的 PMA 法^[6] 属于等温扩增法, 但扩增随机性大, 时常会导致整个基因组不同区域的扩增倍数相差巨大。目前常用的单细胞测序平台是基于微流控体系的 10X Genomics 公司的液滴法^[7] 及 BD 公司的微孔法^[8], 它们把单细胞提取、附加 DNA 标签、mRNA 捕获、mRNA 反转录与扩增、cDNA 建库和高通量测序后的数据分析整合在一起, 大大提升了单细胞测序通量和成本, 还能得到带有独特分子标签的单细胞基因序列信息。液滴法通过微流控技术将带有 barcode、UMI 分子标签、引物及酶的凝胶微珠与单细胞混合形成颗粒, 做出一个基于油包水乳浊液酶反应原理的分子生物学分析系统。微孔法是将细胞悬液与标记磁珠加入含有约 200000 个孔的蜂窝板, 每个孔中容纳一个细胞, 不仅可一次性捕获大量细胞, 还能同时实现转录组和蛋白组测序。获得的海量数据需要进一步处理分析, 进行数据质控、基因组对比、数据归一化 (包括消除基因特异性偏差和调整细胞间计数分布差异等), 然后使用细胞聚类分析、主成分分析和 t-分布随机邻域嵌入算法等进行线性与非线性降维, 实现对高维数据的降维和可视化^[9-10], 最终获得大量单细胞基因序列信息。

2 scRNA-seq 在神经视网膜研究中的应用

2.1 scRNA-seq 在神经视网膜细胞类型鉴定中的应用

scRNA-seq 在眼科中的应用主要集中在视网膜细胞亚型、相关基因表达和通路的研究上。视网膜是高度异质性的组

织, 通过形态学、生理学和分子学标准将神经视网膜分为神经节细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞、光感受器细胞 5 种类型, scRNA-seq 还可将其再细分为 100 多种细胞亚型^[11]。例如, Rheaume 等^[12] 确定了 40 个不同的鼠视网膜神经节细胞簇, 并在每种细胞类型中鉴定了富集的基因, 且在视网膜神经节细胞亚型中确定了区分左右眼的特异性标记基因, Shekhar 等^[13] 将鼠双极细胞分为 15 个细胞簇, Macosko 等^[14] 在小鼠视网膜中鉴定了 21 个不同的无长突细胞簇。细胞亚型的进一步细化分类, 能将细胞的基因表达特征与其功能和形态学特征联系起来。

2.2 scRNA-seq 在黄斑中心凹与外周神经视网膜差异基因分析中的应用

黄斑中心凹处的神经元信息传递呈单线连接, 故此区视觉非常敏锐, 当黄斑区病变时, 视力明显下降, 为比较黄斑中心凹与外周神经视网膜细胞的区别, 有研究从死亡后 6h 内处理的三组人类供体眼获得中心凹和外周神经视网膜样本, 得到 8217 个细胞, scRNA-seq 发现外周神经视网膜视锥细胞明显少于中心凹, 且中心凹视锥细胞富含 PCP4、YBX1、PRDX1 等, 其分别在突触可塑性蛋白形成、细胞增殖和应激反应中发挥作用^[15-17]。此外, Banin 等^[18] 报道了黄斑区 20 个高表达基因 (如 SLC17A6、SNCG、NEFL、NET1、STMN2、YWHAH、UCHL1、DPYSL2、APP、NDRG4、TUBA1B、MDH1、EEF2) 和 23 个在视网膜周边区域高表达的基因 (如 SAG、RCVRN、UNC119、GPX3、PDE6G、ROM1、ABCA4、DDC、PDE6B、GNB1、NRL)。中心凹 Müller 细胞也表现出不同于外周神经视网膜的基因表达谱, 中央凹 Müller 细胞富含 FABP5 (参与神经元分化和神经元损伤的恢复^[19])、HES5 (与胶质形成有关), 外周 Müller 细胞富含转铁蛋白和金属硫蛋白基因家族成员 MT1G 和 MT3。且总体而言, Müller 细胞的许多基因在不同的单细胞数据集上表现出一致的中心凹或外周神经视网膜富集。这些研究提供了黄斑中心凹具有敏锐视觉的理论支持。

3 scRNA-seq 在视网膜色素上皮层和脉络膜研究中的应用

3.1 scRNA-seq 在视网膜色素上皮层和脉络膜生理学中的应用

视网膜色素上皮层 (retinal pigment epithelium, RPE) 与脉络膜联系紧密, RPE-玻璃膜-脉络膜毛细血管复合体对维持光感受器微环境有重要作用, RPE 为感觉层视网膜的外层细胞提供营养, 吞噬和消化光感受器细胞外节膜盘维持新陈代谢。脉络膜是一种多样化的结缔组织, 包括施万细胞、黑素细胞、成纤维细胞和几类常驻白细胞, scRNA-seq 鉴定了两组在转录上不同的施万细胞簇^[20], 它们均表达典型的施万细胞标志物 PLP1, 其中簇 1 高表达髓鞘蛋白 (MPZ) 和髓鞘碱性蛋白 (MBP), 簇 2 高表达非髓鞘施万细胞基因 SCN7A 和 NCAM1^[21], 有髓轴突的传导速度更快, 但缺少髓鞘的轴突是受损轴突的快速反应者^[22]。脉络膜血管丰富, 在解剖学上分为三层, 深大口径血管 (Haller 层), 中等口径血管 (Sattler 层), 以及致密的浅表毛细血管网, 此血管系统向外层视网膜供应约 85% 的血液。scRNA-seq 检测了上述三层的特异表达基因, 动脉表达 SEMA3G、HEY1, 静脉表达 DARC, 脉络膜毛细血管表达 CA4、PLVAP^[20]。ARMD 的发病特征为光感受器细胞的进行性损伤, 因此, 研究 RPE-玻璃膜-脉络膜毛细血管复合体生理学为进一步理解 ARMD 发病机制有较大意义。

3.2 scRNA-seq 在黄斑区和外周视网膜色素上皮层或脉络膜差异基因表达研究中的应用 ARMD 的解剖学异常集中在黄斑区 RPE 和脉络膜,而某些遗传性视网膜疾病如视网膜色素变性病变位于外周视网膜,这种损伤模式被认为是由于黄斑区和外周 RPE 或脉络膜之间的分子差异导致,激发了学者对这两个区域分子差异的研究。Mullins 等^[23]利用 RNA 测序和 qPCR 研究发现黄斑和外周 RPE 或脉络膜之间存在差异表达的基因,例如,BEST1 在外周 RPE 细胞中高表达,ICAM1 在黄斑区脉络膜中高表达,此结果在 scRNA-seq 中得到印证。以往的转录组测序技术比较黄斑区和外周 RPE 或脉络膜基因后发现许多 RPE 特异性基因,如 LRAT、RPE65,总体表现为在外周视网膜中的高度富集^[24],然而 scRNA-seq 中,这些 RPE 特异性基因在黄斑和外周的表达量非常相似。这种差异归因于黄斑区与外周脉络膜细胞密度的不同,脉络膜在黄斑以下最厚,径向变薄^[25],RPE 特异性基因表达量被黄斑区中更多的脉络膜细胞稀释,使这类基因在外周视网膜表达显得更高,scRNA-seq 消除这一误差,体现了其区别于传统测序技术只反映细胞群平均差异的优势。scRNA-seq 为深刻了解视网膜和脉络膜生理学提供了巨大帮助,突出各种细胞类型之间的特征,提高对视网膜生理和疾病区域特异性的理解,为如何应对视网膜损伤提供新的方向。

4 scRNA-seq 在 ARMD 研究中的应用

ARMD 能导致患者中心视力的不可逆损伤,是严重的致盲性眼病,临床上将其分为以视网膜玻璃膜疣为特征的干性 ARMD 和以新生血管生长为特征的湿性 ARMD,其与炎症反应、免疫反应、氧化应激等的相关性成为近年的研究热点。

4.1 scRNA-seq 在 ARMD 与炎症反应相关性研究中的应用 Newman 等^[26]从基因组水平发现 ARMD 与炎症反应的相关性,其与许多趋化因子的高表达有关。年龄是 ARMD 最重要的危险因素,Voigt 等^[20]通过 scRNA-seq 确定了婴儿和成人脉络膜内皮细胞转录组的差异,婴儿内皮细胞富含的 KLF2、NR4A1、NR2F2 能下调炎性表面黏附分子的表达,成人内皮细胞则表现出更多促炎基因的表达,包括黏附分子 VCAM1、ICAM1、SELE、SELP 以及趋化因子受体 ACKR3 等^[27]。随着年龄的增长,脉络膜内皮细胞炎症介质的产生有诱发 ARMD 的可能。

4.2 scRNA-seq 在 ARMD 与免疫系统相关性研究中的应用 Newman 等^[26]提出细胞介导的免疫反应是 ARMD 的核心特征,推断 ARMD 可能是一类具有共同免疫反应过程的疾病。ARMD 的蛋白质组学研究表明,脉络膜毛细血管内皮细胞高度表达 HLA-A 抗原、CA4 和 PLVAP^[28] 等免疫因子。肥大细胞脱颗粒^[29] 和巨噬细胞向脉络膜募集增加^[30] 与 ARMD 的发病有关。补体系统是一个复杂的固有免疫监视系统,补体基因的多态性与 ARMD 易感性密切相关^[31],补体因子 H (complement factor H, CFH) 是补体替代途径的负调节因子,CFH 可增强 RPE 抗氧化应激的能力,该基因的单核苷酸多态性能显著增加 ARMD 的患病风险^[32]。多种补体基因如补体因子 B (CFB)、补体因子 I (CFI)、C3、C5 等的单核苷酸多态性也发现与 ARMD 的发病存在显著相关性^[33]。scRNA-seq 发现 CFH 主要在脉络

膜中表达^[20],表达量为:脉络膜内皮细胞(动脉>毛细血管>静脉)>脉络膜基质细胞(成纤维细胞和周细胞),且脉络膜比视网膜表达更多的补体抑制剂及大量重要的补体调节因子 CD46、CD55、CD59、CD93,提示 ARMD 的补体系统异常主要发生在脉络膜^[20]。补体旁途径的异常激活使膜攻击复合物(membrane attack complex,MAC)在脉络膜毛细血管上大量沉积^[34],是导致脉络膜毛细血管内皮细胞死亡和功能障碍进而诱发 ARMD 的重要原因^[35]。Mullins 等^[36]发现老年人尤其是 ARMD 供体眼的 MAC 表达量高于青年供体眼,且青年供体眼脉络膜不受 MAC 的影响。RGCC 基因为重要的补体应答基因,MAC 一旦被激活,RGCC 就会增加炎症基因的表达^[37]并驱动血管功能障碍,scRNA-seq 发现 ARMD 脉络膜毛细血管中含有丰富的 RGCC^[20],认为其可能作为 ARMD 治疗的靶标基因。细胞介导的免疫反应、补体基因的异常表达、补体旁途径的异常激活与 ARMD 的易感性密切相关,scRNA-seq 加强了对 ARMD 发病机制与免疫反应相关性的深入理解,对靶向免疫治疗 ARMD 有重要意义。

4.3 scRNA-seq 在 ARMD 与氧化应激反应相关性研究中的应用 氧化应激是 ARMD 的发病机制之一,视网膜内的铁代谢失调被认为是导致自由基产生进而诱发氧化应激的原因,转铁蛋白在 ARMD 患者中的表达增加^[38],缺乏视网膜铁结合蛋白的小鼠会出现 RPE 和脉络膜损伤^[39]。scRNA-seq 发现^[20]与外周视网膜相比,中心凹转铁蛋白表达量少,提示中心凹转铁蛋白的相对缺乏可能会增加该区域内氧化损伤的易感性。人类和灵长类动物中心凹含有大量的叶黄素类胡萝卜素,它能保护视网膜免受氧化损伤,scRNA-seq 中^[20],类胡萝卜素裂解酶 BCO2 在外周视锥感光细胞中富集,而在中心凹较少^[15],提示类胡萝卜素在中心凹积累的机制。因此,使用抗氧化应激类药物可能对 ARMD 的治疗有效。

4.4 scRNA-seq 在湿性 ARMD 基因表达研究中的应用 湿性 ARMD 又称渗出性或新生血管性 ARMD,较干性 ARMD 少见,但能迅速导致视力下降、视物变形或中心暗点。基于 scRNA-seq 对湿性 ARMD 的研究中,脉络膜毛细血管内皮细胞富集基因 Egr1^[20] 能在细胞应激反应中迅速激活,被视为内皮细胞损伤反应的关键介质,且能上调与血管功能有关基因如 PDGF、FGF、TGFB、TNFA、ICAM1 等的表达。ATF3 基因在湿性 ARMD 供体的脉络膜毛细血管中富集,并能被包括 DNA 损伤和氧化应激的多种细胞应激源激活。Menon 等^[40]从 6 个 ARMD 人类供体眼黄斑部和外周视网膜中获得约 23339 个细胞,发现 TIMP3、VEGFA、COL4A3 基因在 ARMD 患者的视网膜中高表达,TIMP3 和 VEGFA 被证实与新生血管有关^[41]。Rohlenova 等^[42]诱导小鼠产生脉络膜新生血管,进行了一项针对小鼠脉络膜新生血管内皮细胞基因表达变化的 scRNA-seq 研究,发现这些内皮细胞表现出与糖酵解、ATP 合成和膜运输有关的几个代谢基因的异常表达,说明此状态下的内皮细胞代谢需求极高。来自这个小鼠脉络膜新生血管细胞模型中的 15 个最丰富的基因,其中有 11 个在人类湿性 ARMD 供体中表现出一定程度的富集。基于 scRNA-seq 发现与湿性 ARMD 相关基因的表达,为临床针对靶基因治疗湿性 ARMD 提供理论依据。

5 新兴单细胞测序技术的不断探索

虽然 scRNA-seq 已成为剖析细胞异质性的重要工具,但细胞异质性体现在基因组、表观基因组、转录组、蛋白组、空间,甚至时间等多个维度上,scRNA-seq 仅局限于一维层面的测序是不完整的,因此,许多新兴的单细胞测序技术应运而生。空间转录组学从一个完整的组织样本中获取全部的转录组数据,能够定位和区分功能基因在特定组织区域内的表达情况^[43]。目前的 scRNA-seq 和空间转录组学只提供了基因表达的静态信息,这违背了 RNA 动力学和转录活动的随机性,基于时间序列的单细胞转录组分析可以揭示细胞生物信息的时间动态^[44]。单细胞的异质性本质上是由基因组、转录组、蛋白组、表观基因组共同定义的,单细胞多组学能对同一细胞同时整合多种组学数据,更完善了细胞的遗传信息^[45]。然而,这些技术在眼科领域中的应用仍相对局限单薄,随着研究者持续不断的探索,相信单细胞测序技术多元化、多维化、多方面的研究在不久后将惠及眼科研究领域。

6 总结与展望

scRNA-seq 从单细胞水平分析细胞异质性,是鉴别细胞与细胞间转录组差异的新兴技术。本文总结了 scRNA-seq 在视网膜、脉络膜发育及 ARMD 研究中的应用,展示细胞发挥生理学作用与其所表达基因的相互关系,加深了对视网膜细胞生物学和疾病病理生理学的理解。scRNA-seq 将转录信息与 ARMD 发病机制相结合,为深入理解 ARMD 发病机制及靶向诊治方案提供了全新的思路。随着 scRNA-seq 测序成本的不断降低,学者实现更多方面的生物学和技术重复,从而提高了不同生物学条件下检测的多样性和一致性,大量的研究将促进新一代视网膜疾病诊治的发展。但 scRNA-seq 局限于对细胞异质性一维层面的理解仍存在较大缺陷,空间转录组学、时间分辨测序、多组学以多维、丰富的研究赋予细胞异质性更完整多态的理解,随着众多突破性技术的出现,单细胞测序在眼科领域中的应用将会朝着更多元化的方向发展。

参考文献

- 1 Gupta RK, Kuznicki J. Biological and medical importance of cellular heterogeneity deciphered by single-cell RNA sequencing. *Cells* 2020; 9(8):E1751
- 2 Zeng ZW, Miao N, Sun T. Revealing cellular and molecular complexity of the central nervous system using single cell sequencing. *Stem Cell Res Ther* 2018;9(1):234
- 3 Ramsköld D, Luo SJ, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 2012;30(8):777-782
- 4 Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nature Methods* 2013;10(11):1096-10985
- 5 Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol* 2016;17:77
- 6 Pan XH, Durrett RE, Zhu HY, et al. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *PNAS* 2013;110(2):594-599
- 7 Eisenstein M. Startups use short-read data to expand long-read sequencing market. *Nat Biotechnol* 2015;33(5):433-435

- 8 Bose S, Wan ZM, Carr A, et al. Scalable microfluidics for single-cell RNA printing and sequencing. *Genome Biol* 2015;16:120
- 9 Treutlein B, Brownfield DG, Wu AR, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 2014;509(7500):371-375
- 10 Saadatpour A, Guo GJ, Orkin SH, et al. Characterizing heterogeneity in leukemic cells using single-cell gene expression analysis. *Genome Biol* 2014;15(12):525
- 11 Ying PX, Huang C, Wang Y, et al. Single-cell RNA sequencing of retina: new looks for gene marker and old diseases. *Front Mol Biosci* 2021; 8:699906
- 12 Rheaume BA, Jereen A, Bolisetty M, et al. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nat Commun* 2018;9(1):2759
- 13 Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, et al. Comprehensive classification of retinal bipolar neurons by single-cell transcriptomics. *Cell* 2016;166(5):1308-1323.e30
- 14 Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015; 161(5):1202-1214
- 15 Voigt AP, Whitmore SS, Flamme-Wiese MJ, et al. Molecular characterization of foveal versus peripheral human Retina by single-cell RNA sequencing. *Exp Eye Res* 2019;184:234-242
- 16 Wei P, Blundon JA, Rong YQ, et al. Impaired locomotor learning and altered cerebellar synaptic plasticity in pep-19/PCP4-null mice. *Mol Cell Biol* 2011;31(14):2838-2844
- 17 Chidlow G, Wood JPM, Knoop B, et al. Expression and distribution of peroxiredoxins in the retina and optic nerve. *Brain Struct Funct* 2016;221(8):3903-3925
- 18 Banin E, Gootwine E, Obolensky A, et al. Gene augmentation therapy restores retinal function and visual behavior in a sheep model of CNGA3 Achromatopsia. *Mol Ther* 2015;23(9):1423-1433
- 19 Figueroa JD, Serrano-Illan M, Licero J, et al. Fatty acid binding protein 5 modulates docosahexaenoic acid-induced recovery in rats undergoing spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2016;33(15):1436-1449
- 20 Voigt AP, Mullin NK, Stone EM, et al. Single-cell RNA sequencing in vision research: insights into human retinal health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2021;83:100934
- 21 Liu ZY, Jin YQ, Chen LL, et al. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture *in vitro*. *PLoS One* 2015; 10(4):e0123278
- 22 Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 2008;56(14):1518-1531
- 23 Mullins RF, Kuehn MH, Faidley EA, et al. Differential macular and peripheral expression of bestrophin in human eyes and its implication for best disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(7):3372-3380
- 24 Whitmore SS, Wagner AH, DeLuca AP, et al. Transcriptomic analysis across nasal, temporal, and macular regions of human neural retina and RPE/choroid by RNA-Seq. *Exp Eye Res* 2014;129:93-106
- 25 Hoseini-Yazdi H, Vincent SJ, Collins MJ, et al. Wide-field choroidal thickness in myopes and emmetropes. *Sci Rep* 2019;9(1):3474
- 26 Newman AM, Gallo NB, Hancox LS, et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med* 2012;4(2):16
- 27 Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, et al. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12

abundance during autoimmunity. *J Exp Med* 2011;208(2):327-339

28 Yuan XL, Gu XR, Crabb JS, *et al.* Quantitative proteomics; comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(6):1031-1046

29 Bhutto IA, McLeod DS, Jing T, *et al.* Increased choroidal mast cells and their degranulation in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2016;100(5):720-726

30 McLeod DS, Bhutto I, Edwards MM, *et al.* Distribution and quantification of choroidal macrophages in human eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(14):5843-5855

31 Whitmore SS, Sohn EH, Chirco KR, *et al.* Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy. *Prog Retin Eye Res* 2015;45:1-29

32 Fritsche LG, Igl W, Cooke Bailey JN, *et al.* A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet* 2016;48(2):134-143

33 Clark SJ, Bishop PN. The eye as a complement dysregulation hotspot. *Semin Immunopathol* 2018;40(1):65-74

34 Kumar-Singh R. The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD - From hypothesis to clinical trials. *Exp Eye Res* 2019;184:266-277

35 Chirco KR, Tucker BA, Stone EM, *et al.* Selective accumulation of the complement membrane attack complex in aging choriocapillaris. *Exp Eye Res* 2016;146:393-397

36 Mullins RF, Schoo DP, Sohn EH, *et al.* The membrane attack complex

in aging human choriocapillaris: relationship to macular degeneration and choroidal thinning. *Am J Pathol* 2014;184(11):3142-3153

37 Cui XB, Chen SY. Response gene to complement 32 in vascular diseases. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:128

38 Chowers I, Wong R, Dentichev T, *et al.* The iron carrier transferrin is upregulated in retinas from patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(5):2135-2140

39 Hadziahmetovic M, Dentichev T, Song Y, *et al.* Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(6):2728-2736

40 Menon M, Mohammadi S, Davila-Velderrain J, *et al.* Single-cell transcriptomic atlas of the human retina identifies cell types associated with age-related macular degeneration. *Nat Commun* 2019;10(1):4902

41 Qi JH, Dai GY, Luthert P, *et al.* S156C mutation in tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces increased angiogenesis. *J Biol Chem* 2009;284(30):19927-19936

42 Rohlenova K, Goveia J, García-Caballero M, *et al.* Single-cell RNA sequencing maps endothelial metabolic plasticity in pathological angiogenesis. *Cell Metab* 2020;31(4):862-877.e14

43 Chen YW, Song J, Ruan QY, *et al.* Single-cell sequencing methodologies: from transcriptome to multi-dimensional measurement. *Small Methods* 2021;5(6):e2100111

44 Qiu Q, Hu P, Qiu XJ, *et al.* Massively parallel and time-resolved RNA sequencing in single cells with scNT-seq. *Nat Methods* 2020;17(10):991-1001

45 Hao YH, Hao S, Andersen-Nissen E, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 2021;184(13):3573-3587.e29