

刘普恒,韩辉,王宇虹. 骨髓潜伏态巨细胞病毒痕量反复激活诱导免疫衰老的单细胞 RNA 测序技术研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 91-95.

Liu PH, Han H, Wang YH. Advances in single-cell RNA sequencing of latent cytomegalovirus in bone marrow to investigate reactivation inducing immunosenescence [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 91-95.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.09.017

骨髓潜伏态巨细胞病毒痕量反复激活诱导免疫衰老的单细胞 RNA 测序技术研究进展

刘普恒,韩 辉*,王宇虹*

(哈尔滨医科大学附属第一医院 老年医学科,哈尔滨 100081)

【摘要】 全球老龄化是一个严峻的公共健康问题。免疫衰老作为衰老的核心机制之一,在抗衰老战略中发挥重要的作用。巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)是一个大型疱疹病毒,在人群中普遍携带。它一旦进入人体,即终生潜伏在骨髓干细胞中,因此,老年人群的CMV病毒携带率接近100%。这些终生潜伏在骨髓干细胞的CMV,通过一个分化依赖的痕量激活模式,反复诱导机体的T细胞免疫应答,产生大量CMV特异性“无效”克隆扩增,逐步消耗了纯真T细胞储备池的多样性,伴有持续低水平炎症细胞因子的表达,累积成为免疫衰老的核心诱导机制。由于骨髓干细胞获取困难,加上骨髓干细胞内的CMV潜伏比例很低,CMV痕量反复激活的表达量也很低,潜伏态CMV诱导免疫衰老的检测与评估常规很难获取。伴随单细胞RNA测序技术的发展,针对骨髓干细胞潜伏态CMV痕量激活诱导免疫衰老的机制研究,得到了一定程度的推进。

【关键词】 巨细胞病毒; 潜伏再激活; 免疫衰老; 单细胞测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)09-0091-05

Advances in single-cell RNA sequencing of latent cytomegalovirus in bone marrow to investigate reactivation inducing immunosenescence

LIU Puheng, HAN Hui*, WANG Yuhong*

(the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University Department of Geriatrics, Harbin 150081, China)

【Abstract】 Aging of the global population is a critical public health issue. Immunosenescence is a core mechanism of aging. The herpes virus, cytomegalovirus (CMV), can establish lifelong latency in bone marrow stem cells after its entry into a human host. Cytomegalovirus latency is ubiquitous in aging populations and cytomegalovirus seropositivity is close to 100% in elderly populations. In addition, latent CMV in bone marrow stem cells can chronically induce immune responses through differentiation-dependent reactivation. The process of reactivation causes expansion of a large proportion of CMV-specific T cell clones with reserve naïve T cells being gradually consumed. Thereafter, the diversity of adaptive T cells is reduced and inflammatory cytokines are consistently expressed at low levels, both of which are part of the core mechanism of immunosenescence. However, it is difficult to trace CMV latency and low level reactivation in bone marrow stem cells.

【基金项目】 国家自然科学基金(81671383)。

【作者简介】 刘普恒(1989—),女,在读硕士,主要从事免疫衰老的临床研究。E-mail:417315477@qq.com

【通信作者】 韩 辉(1957—),男,硕士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事老年缺血性脑血管病和免疫衰老研究。

E-mail:hydhanhui@sina.com

王宇虹(1974—),女,博士,副主任医师,主要从事免疫衰老的CMV致病机制研究。E-mail:Dr.yuhongwang@gmail.com

* 共同通信作者

The development of single cell-based RNA sequencing technology, however, enables the mechanism of latent CMV activation in bone marrow stem cells to be investigated in detail.

【Keywords】 cytomegalovirus; latency/reactivation; immunosenescence; single-cell sequencing

免疫衰老是老年人高发病率和高死亡率的核心机制之一。广泛潜伏在老年人群骨髓干细胞的人巨细胞病毒 CMV, 通过一个分化依赖的反复痕量激活机制, 长期诱导并累积 T 细胞的免疫衰老^[1]。由于 CMV 的痕量激活起始于骨髓干细胞, 且病毒潜伏的骨髓干细胞比例很低, 潜伏态 CMV 的激活表达量也很低^[2-3], 而且这些骨髓干细胞表面不产生任何 CMV 相关抗原标记物, 这个痕量激活通过偶联 CD34⁺ 全能干细胞的分化^[4-5], 通过细胞内的传递几近“无痕”的到达树突状细胞(dendritic cell, DC)。树突细胞中痕量激活的 CMV, 通过一个细胞-细胞间接触的方式进行抗原提呈, “沉默”地诱导 T 细胞发生 CMV 特异性的免疫应答^[6]。虽然这种应答不能有效地清除 CMV 潜伏库, 但是骨髓内的 CMV 在普通人群中(无免疫缺陷)启动大量激活而产生急性 CMV 病。通过潜伏态病毒和宿主的痕量反复互动, 纯真(naïve) T 细胞的多样性逐渐耗竭, “无效”记忆效应 T 细胞克隆扩增大量累积, 伴随每次痕量免疫应答产生的低水平炎性因子, 构成了一个漫长的免疫衰老的核心进程^[6-8]。由于该过程隐蔽, 痕量, 反复, 病毒-宿主互动, CMV 诱导免疫衰老的分子调控机制, 一直是全球公认的难题。伴随单细胞 RNA 测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术的发展, 免疫衰老的 CMV 诱导调控机制正逐渐被揭示。

1 骨髓潜伏态巨细胞病毒反复痕量的激活诱导外周血 T 细胞免疫衰老的概述

全世界绝大部分人会在不知不觉中携带感染人巨细胞病毒, 老年人群的携带率接近 100%。人巨细胞病毒(HCMV)是一个拥有巨大 DNA 基因组的疱疹病毒, 它初次感染后, 即在骨髓干细胞(称为允许细胞/Permissive cell)中建立终生潜伏感染。潜伏态 CMV 能通过一个痕量反复激活的机制, 诱导宿主发生反复痕量的免疫应答, 累积形成免疫衰老, 其主要累及 T 细胞的适应性免疫衰老。免疫衰老是老年人高发病率和高死亡率的核心机制之一。传统定义的病毒潜伏期, 是在不产生子代病毒的情况下维持病毒基因组, 但具有为随后的几轮复制而重新激活的能力。在潜伏期中, 病毒仅转录有限数

量的病毒 RNA, 蛋白质和 microRNA。人类巨细胞病毒(HCMV)潜伏在骨髓干细胞中, 具有干细胞分化依赖的基因累积表达特点, 它的潜伏期激活机制, 更为复杂^[9]。在普通人群中, CMV 的痕量反复激活能够诱导宿主产生免疫应答, 但是宿主无法识别清除病毒潜伏库, 这种痕量激活也不能导致宿主发生急性疾病。这种“病毒-宿主”之间存在的百万年共进化, 产生了复杂的共生(Co-pathogen)机制。

CMV 在骨髓的痕量机会, 伴随全能干细胞(CD34⁺ CD14⁻)分化为单核系前驱/祖细胞(CD34⁺ CD14⁺), 并且继续分化为单核/树突细胞(CD34⁻ CD14⁺)^[9-10]的过程^[5, 11]。大型 DNA 病毒 CMV 就是通过这种近乎完美的免疫逃避机制^[12], 将病毒从潜伏库干细胞, 传递至到抗原提呈 DC 细胞/单核细胞中。而且, 骨髓干细胞中的 CMV 潜伏细胞比例很低, 应用 PCR 结合原位杂交技术, 预测其潜伏细胞阳性率约为 1:10000~25000, 每个潜伏感染细胞的 CMV 拷贝数为 2~13 个基因组^[13]。即使应用基于单细胞的高敏感数字 PCR, 能提高人群的阳性率, 使接近一半的 HCMV 潜伏携带的骨髓干细胞中检测到病毒基因组, 但是细胞基因组的检测阳性率, 也少于 10/10000 个细胞^[14]。此外, 通过检测外周血中极少量干细胞来源的 CD14⁺ CMV 潜伏细胞中的 CMV 基因载量, 并未发现 CMV 潜伏感染率的年龄相关^[14], 这提示潜伏态 CMV 的痕量激活量, 是一个与宿主免疫功能息息相关的互动机制。目前的研究结果显示, 潜伏态 CMV 在分化偶联的痕量激活过程中, 未检测到足够量的病毒转录本和蛋白表达(无法通过普通 PCR 或者 Western blot 检测到), 也未检测到细胞表面表达的病毒特征性蛋白(无法通过流式细胞术检测), 这为潜伏态 CMV 痕量反复激活诱导免疫衰老的机制, 提出了严峻的挑战。

2 骨髓潜伏态巨细胞病毒痕量反复激活体外实验的单细胞研究进展

CMV 的潜伏库建立在骨髓全能造血干细胞中, 而骨髓造血干细胞是一个具有动态分化程序的异质细胞群, 而且对体外刺激很敏感。这些 CD34⁺ 造血干细胞分化依赖的细胞群中, 仅很小一部分携带

CMV 转录本,且始终伴随干细胞的分化,潜伏态 HCMV 逐步发生了痕量复制和转录的动态变化。由于骨髓潜伏态 CMV 的病毒载量和表达水平均极低,加上携带 CMV 基因组的骨髓细胞群具有动态变化特点,宿主的免疫功能又显著影响“病毒-宿主”的互作模式,因此,应用单细胞 RNA 测序进行 CMV 基因表达的探索,具有突破的意义。一个单细胞测序分析数据显示,25 名 CMV 血清阳性的造血干细胞转录本库(1.5×10^{10} 序列),未能成功比对获取 CMV 序列^[15]。进一步比对基因组表达(Genotype-Tissue Expression/GTEx)数据库,一个收集人类健康尸检组织 RNA 测序信息的数据库,对 31 个组织 549 个样本($> 4.33 \times 10^{12}$ 核苷酸)进行 CMV 序列比对,仅从 40 个样本中比对得到了潜伏期激活基因(Immediate Early/IE)基因的序列^[15]。体外对 3.655 个原代感染 CMV 的 CD14⁺ 细胞进行经时(time-dependent)单细胞测序,分别构建宿主和病毒转录本库,发现 CMV 的痕量激活仅发生在一个特定表达细胞集落刺激因子的细胞亚群,这些细胞富含线粒体激活基因,细胞增殖基因, RNA 加工基因和蛋白质合成基因,且始终保持较高转录水平;同时,干扰素相关基因的表达下调,提示 CMV 发生集落刺激和分化诱导的激活^[16]。此外,这些单细胞数据显示 CMV 从早期痕量表达状态逐渐演进而为病毒裂解和大量表达,是否存在一个演进门槛值需要深入研究^[15]。需要指出的是,体外原代感染的 CD14⁺ 细胞,主要显示骨髓干细胞分化偶联的从痕量潜伏期过渡至大量激活期的转录本的后期过程,无法模拟慢性潜伏态 CMV 分化偶联的痕量激活转录特点^[15]。Galinato 等^[16]对原代感染的 7.000 个骨髓干细胞进行单细胞测序,发现大多数干细胞中检测到了 CMV 的 DNA 序列,表明病毒的入侵潜伏不受限制,其激活可能受到宿主的限制。Shnayder 等^[17]分别检测了造血干细胞(HSPC)和多系祖细胞中的 CMV 转录本,证实 CMV 转录仅在造血干细胞的单核细胞祖细胞中检测得到,且与宿主抗病毒免疫应答降低有关。这些单细胞 RNA 测序数据,明确了潜伏态 CMV 干细胞分化诱导的痕量激活机制。

3 巨细胞病毒激活诱导外周血免疫衰老的单细胞水平研究进展

T 细胞受体(TCR)提供的抗原特异性细胞毒性 T 细胞,是宿主抗病毒的核心机制。这些 TCR 多样性通过一个建立在基因重排基础上的单个细胞抗

原特异性受体储备库实现。因此,TCR 多样性储备的逐渐降低,是 T 细胞免疫衰老的核心机制。巨大 DNA 病毒 CMV 的痕量反复激活,能诱导产生外周血最庞大的 TCR 记忆效应 T 细胞克隆扩增。Atsushi 等利用荧光标记的抗原肽四聚体技术,结合高识别度单细胞微矩阵,筛选人 CMV 的抗原特异性 TCR β 储备库,获取了外周血比例约 0.05%~8.5% 的 CMV-pp65 克隆扩增^[18]。检测感染鼠巨细胞病毒(MCMV)的小鼠脾以及肠道淋巴组织中病毒特异性 T 细胞,得到了 MCMV 特异性记忆效应 CD8⁺ T 细胞的单细胞转录谱^[19],这些肠道淋巴组织内的循环 CD8⁺ T 记忆细胞(T_{PM})克隆扩增相关基因(KLRG1, KLRK1(NKG2D), KLRG1, CX3CR1)以及常驻记忆 T 细胞(resident memory T-cells(T_{RM}), S1PR1, S1PR5, ITGAE, KLRG1)相关基因存在交互表达。与循环记忆 T 细胞高表达 CX3CR1 而不表达 KLRG1 相比,CMV 抗原激活的 T 细胞克隆显示出相对静止(activated yet resting)的免疫衰老相关特点,即高表达 KLRG1 和 CX3CR1。通过外周血 TCR 的单细胞数据,进一步证实了 CMV 反复痕量激活诱导 T 细胞免疫衰老的特点^[19]。研究者比较了潜伏感染 MCMV 的老年小鼠和无 MCMV 潜伏的老年鼠针对新抗原(OVA)的特异性 CD8⁺ T 细胞受体 β (TCR β)转录本,克隆扩增多样性最广泛的宿主,是老年 MCMV 潜伏感染小鼠,这些小鼠识别新抗原肽的能力更高;老年 MCMV 潜伏感染的小鼠发生了针对 OVA 的强烈适应性 T 细胞免疫应答,而无 MCMV 潜伏感染的小鼠,其 TCR 多样性明显降低。这些单细胞数据提示,潜伏态 CMV 痕量反复激活可能对老年人群的适应性免疫发挥“疫苗样”积极影响,证实了与宿主长期共进化的病毒与宿主衰老之间的复杂关系^[20]。另一个单细胞 RNA 测序研究则显示,针对新抗原入侵的高亲和力 TCR 在 TCR 组谱(TCR repertoire)中优先扩增,这种进化依赖的亲合力适应性,能被潜伏态 CMV 的反复痕量激活削减^[21]。因此,为了揭示宿主共进化 CMV 的终身潜伏激活,宿主 TCR 多样性和 TCR 亲和力,以及新抗原入侵的 T 细胞免疫应答之间的关系,需要更多基于单细胞 RNA 测序的研究数据。外周血人类自然杀伤(NK)细胞也在免疫衰老中也发挥重要作用,由于 NK 的功能细胞表型非常复杂,通过对 NK 细胞进行单细胞测序,能获得伴有或不伴有 CMV 潜伏感染的 NK 细胞表型差异表达谱。CMV 的潜伏感染能显著改

变 NK 细胞的功能集簇,提高适应性 NK 亚群的比例,诱导 CMV 适应性的 NK 应答^[22]。

4 针对骨髓 CMV 潜伏感染调控机制的单细胞研究展望

通过单细胞的研究,研究者发现骨髓 CMV 潜伏期的转录,其实并非休眠和沉默^[1,23],越来越多的 CMV 潜伏期转录信息通过单细胞技术的改良而获得。需要指出的是,普通单细胞测序平台仅提供基因表达的“快照”,无法动态传达转录的过程,而且每个单个细胞的 RNA 谱只能分析一次,因此,大部分体外原代感染的 CD14⁺细胞内未测到 CMV 的基因表达 (<0.1% HCMV 读数)。这个结果或提示 CMV 基因组受到高度抑制,或者提示该细胞并未被感染,因为骨髓干细胞中的 CMV 细胞阳性率很低。同时,CD34⁺干细胞的病毒转录水平,显著低于 CD14⁺细胞,提示骨髓干细胞能抑制 CMV 的激活。为了鉴别低水平 CMV 转录本是“真正的”的零转录,还是初始潜伏在干细胞病毒拷贝比例低,需要动态比较 CD34⁺干细胞与 CD14⁺单核细胞的单细胞转录谱。这种同时描绘病毒和宿主异质性的单细胞 RNA 测序平台,能够揭示宿主细胞环境与病毒基因表达之间的功能联系,已经用于多个“宿主-病毒”互作研究,对宿主免疫应答的复杂性和病毒的细胞允许性,提出了很多新颖的见解^[16,24-30]。

需要指出的是,针对无偏见转录组的单细胞测序敏感度,需要细胞内转录 ≥ 50000 个核苷酸序列^[31],很多病毒低水平激活达不到这个水平。骨髓 CMV 的痕量激活转录组,甚至低于 1.0000 个核苷酸,这导致单细胞测序的数据稀疏 (sparsity of the data),即零读数的占比 (proportion of zero read counts) 过高^[32-33]。“稀疏”的病毒转录本很可能因为低丰度表达而“被弃 (dropouts)”^[32]。通过基于单细胞的液滴样数字 PCR (Droplet digital PCR, DD-PCR),理论能够测到低于 100 个核苷酸的转录本,从而检测到极低水平的核苷酸拷贝数^[34]。然而,单细胞测序,无论单细胞 RNA 测序,还是单细胞 DD-PCR,均存在固有的随机性,需要加强样品的质控和标准化。基于唯一分子标识符 (UMI) 技术,理论上可以消除测序深度偏差^[35],但是 UMI 仍然无法解决捕获效率或细胞 mRNA 含量差异的问题。

伴随单细胞测序技术的迭代,用光反应核苷类似物 (4sU) 进行核苷代谢标记 (U-to-C conversion) 的单细胞测序 (scSLAM-seq),通过区分生化核苷代

谢程度 (转录顺序的早晚),对每个细胞中数千个基因的转录活性 (核苷生化代谢程度) 和表达差异进行同步可视化。用 scSLAM-seq 动态检测小鼠成纤维细胞中巨细胞病毒原代感染的细胞转录本,能建立宿主转录动力学 (TBP-TATA-box 相互作用和 DNA 甲基化) 相关的基因表达差异,通过 RNA 转录时间 (新旧程度) 推断细胞周期状态,结合病毒感染剂量,获取由 CMV 感染诱导导致的单个细胞之间的转录组异质性,得到病毒相关的宿主转录数据,是目前针对 CMV 转录的最全面数据^[36]。总之,单细胞测序研究平台的发展和迭代,为揭示潜伏态 CMV 痕量反复激活诱导免疫衰老的复杂调控机制,展示了光明的前景。

参考文献:

- [1] Cheng S, Caviness K, Buehler J, et al. Transcriptome-wide characterization of human cytomegalovirus in natural infection and experimental latency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E10586-E10595.
- [2] Reeves M, Sinclair J. Regulation of human cytomegalovirus transcription in latency: beyond the major immediate-early promoter [J]. *Viruses*, 2013, 5: 1395-1413.
- [3] Dag F, Dolken L, Holzki J, et al. Reversible silencing of cytomegalovirus genomes by type I interferon governs virus latency [J]. *PLoS pathogens*, 2014, 10: e1003962.
- [4] Goodrum F, Jordan CT, Terhune SS, et al. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations [J]. *Blood*, 2004, 104(3): 687-695.
- [5] Goodrum FD, Jordan CT, High K, et al. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16255-16260.
- [6] Van Damme E, Thys K, Tuffeerd M, Van Hove C, Aerssens J, Van Loock M. HCMV displays a unique transcriptome of immunomodulatory genes in primary monocyte-derived cell types [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164843.
- [7] Solana R, Tarazona R, Aiello AE, et al. CMV and immunosenescence: from basics to clinics [J]. *Immun Ageing*, 2012, 9(1): 23.
- [8] Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, et al. New advances in CMV and immunosenescence [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 55: 54-62.
- [9] Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, et al. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(11): 4140-4145.
- [10] Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers [J]. *J Virol*

- 1994, 68(3): 1597–604.
- [11] Poole E, Sinclair J. Sleepless latency of human cytomegalovirus [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204: 421–429.
- [12] McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, et al. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses [J]. *J Mol Biol*, 1995, 247(3): 443–458.
- [13] Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus [J]. *J Virol* 1999, 73(6): 4806–4812.
- [14] Jackson SE, Sedikides GX, Okecha G, et al. Latent cytomegalovirus (CMV) infection does not detrimentally alter T cell responses in the healthy old, but increased latent CMV carriage is related to expanded CMV-specific T cells [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 733.
- [15] Shnayder M, Nachshon A, Krishna B, et al. Defining the transcriptional landscape during cytomegalovirus latency with single-cell RNA sequencing [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00013–18.
- [16] Galinato M, Shimoda K, Aguiar A, et al. Single-cell transcriptome analysis of CD34⁺ stem cell-derived myeloid cells infected with human cytomegalovirus [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 577.
- [17] Shnayder M, Nachshon A, Rozman B, et al. Single cell analysis reveals human cytomegalovirus drives latently infected cells towards an anergic-like monocyte state [J]. *Elife*, 2020, 9: e52168.
- [18] Arakaki A, Ooya K, Akiyama Y, et al. TCR-beta repertoire analysis of antigen-specific single T cells using a high-density microcavity array [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2): 311–318.
- [19] Highton AJ, Zinsler ME, Lee LN, et al. Single-cell transcriptome analysis of CD8⁺ T-cell memory inflation [J]. *Wellcome Open Res*, 2019, 4: 78.
- [20] Smitley MJ, Venturi V, Davenport MP, et al. Lifelong CMV infection improves immune defense in old mice by broadening the mobilized TCR repertoire against third-party infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(29): E6817–E6825.
- [21] Schober K, Voit F, Grassmann S, et al. Reverse TCR repertoire evolution toward dominant low-affinity clones during chronic CMV infection [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21: 434–441.
- [22] Smith SL, Kennedy PR, Stacey KB, et al. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(7): 1388–1406.
- [23] Crawford LB, Kim JH, Collins-McMillen D, et al. Human cytomegalovirus encodes a novel FLT3 receptor ligand necessary for hematopoietic cell differentiation and viral reactivation [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00682–18.
- [24] Douam F, Hrebikova G, Albrecht YE, et al. Single-cell tracking of flavivirus RNA uncovers species-specific interactions with the immune system dictating disease outcome [J]. *Nature communications*, 2017, 8: 14781.
- [25] Drayman N, Patel P, Vistain L, et al. HSV-1 single-cell analysis reveals the activation of anti-viral and developmental programs in distinct sub-populations [J]. *Elife*, 2019, 8: e46339.
- [26] Rato S, Rausell A, Muñoz M, et al. Single-cell analysis identifies cellular markers of the HIV permissive cell [J]. *PLoS pathogens*, 2017, 13(10): e1006678.
- [27] Russell AB, Trapnell C, Bloom JD. Extreme heterogeneity of influenza virus infection in single cells [J]. *Elife*, 2018, 7: e32303.
- [28] Steurman Y, Cohen M, Peshes-Yaloz N, et al. Dissection of influenza infection *in vivo* by single-cell RNA sequencing [J]. *Cell systems*, 2018, 6: 679–691.
- [29] Wyler E, Franke V, Menegatti J, et al. Single-cell RNA-sequencing of herpes simplex virus 1-infected cells connects NRF2 activation to an antiviral program [J]. *Nature communications*, 2019, 10(1): 4878.
- [30] Zanini F, Pu SY, Bekerman E, et al. Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection [J]. *Elife*, 2018, 7: e32942.
- [31] Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, et al. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(10): 1053–1058.
- [32] Lun AT, Bach K, Marioni JC. Pooling across cells to normalize single-cell RNA sequencing data with many zero counts [J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 75.
- [33] Kharchenko PV, Silberstein L, Scadden DT. Bayesian approach to single-cell differential expression analysis [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(7): 740–742.
- [34] Jones M, Williams J, Gartner K, et al. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, ‘definetherain’ [J]. *J Virol Methods* 2014, 202(100): 46–53
- [35] Vallejos CA, Risso D, Scialdone A, et al. Normalizing single-cell RNA sequencing data: challenges and opportunities [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 565–571.
- [36] Erhard F, Baptista MAP, Krammer T et al. scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells [J]. *Nature*, 2019, 571(7765): 419–423.