



贝锦新博士, 中山大学肿瘤防治中心研究员、二级教授、博士生导师, 实验研究部副主任, 华南恶性肿瘤防治全国重点实验室PI。国家优青、“新世纪优秀人才”、广东省“特支计划”百千万领军人才、广东省杰出青年医学人才获得者。课题组主要从事恶性肿瘤等复杂疾病精准医学和转化医学研究, 研究内容围绕“精准医学”核心理念, 紧密结合临床和基础研究, 旨在通过基因组、表达谱、基因组编辑、单细胞测序等组学手段, 发现与恶性肿瘤等重大疾病早期诊断、个性化治疗靶点或方案、疗效判断等相关的生物标志物和策略, 并阐明疾病致病分子机制, 为实现肿瘤的个性化精确诊治提供有效产品。至今已在 *Cell*、*Lancet Oncol*、*Nat Genet*、*STTT*、*J Clin Invest*、*Adv Sci*、*Nat Commun*、*Genome Biol*、*Leukemia* 等国际知名专业杂志上发表论文120余篇, 申请专利13项(其中已获授权7项)。

单细胞测序技术在人胚胎免疫系统发育中的应用进展

何帅 贝锦新*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要 免疫系统发育在胚胎发育早期便已启动, 涵盖了免疫细胞的生成、播散、分化和成熟等关键过程。这些过程不仅对胚胎组织的正常发育至关重要, 还为新生儿出生后的免疫防御能力奠定了基础。然而, 由于组织细胞的复杂性, 以往基于组织块的研究方法难以充分揭示胚胎免疫系统分化发育的精细过程。单细胞测序作为一种高通量单细胞分析技术, 显著提升了对细胞、组织和器官复杂性的理解。该技术的发展为研究人胚胎免疫系统的发育提供了强大支持, 使研究者能够在单细胞水平上解析免疫细胞的多样性、动态变化及发育轨迹, 从而为探索胚胎期免疫细胞的组织分布、发育路径、谱系关系和功能特性提供了全新视角。此外, 单细胞测序技术在研究免疫细胞与微环境相互作用方面也展现了重要价值, 揭示了免疫系统发育异常对胚胎发育的关键影响。该文综述了单细胞测序技术在人胚胎免疫系统发育研究中的最新进展, 包括关键技术方法、重要发现及其在临床应用中的潜力。通过对这些前沿研究进行总结, 期望为全面理解胚胎免疫系统的复杂性和多样性提供有价值的参考, 为免疫系统疾病研究和治疗策略带来新的启发。

关键词 单细胞测序; 胚胎免疫系统; 免疫细胞; 相互作用; 分化发育; 微环境

Advances in Single-Cell Sequencing Technology in Human Embryo Immune System Development

HE Shuai, BEI Jinxin*

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

收稿日期: 2024-12-09

接受日期: 2025-02-10

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 82103329)资助的课题

*通信作者。Tel: 020-39336779, E-mail: beijx@sysucc.org.cn

Received: December 9, 2024

Accepted: February 10, 2025

This work was supported by the Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82103329)

*Corresponding author. Tel: +86-20-39336779, E-mail: beijx@sysucc.org.cn

Abstract The development of immune system begins early during embryonic life, encompassing essential processes such as the generation, dispersion, differentiation, and maturation of immune cells. These processes are crucial not only for the development of embryonic tissues but also for establishing the foundation of immune defense mechanisms in newborns. However, due to the complexity of tissue cells, traditional methods based on tissue block have struggled to fully reveal the intricate processes of immune system differentiation and development in embryos. Single-cell sequencing, a high-throughput technique for single-cell analysis, has significantly enhanced the understanding of the cellular complexity within tissues and organs. This technology has provided powerful support for studying the development of the human embryonic immune system, enabling researchers to analyze the diversity, dynamic changes, and developmental trajectories of immune cells at the single-cell level. This approach offers new perspectives for investigating the tissue distribution, developmental pathways, lineage relationships, and functional characteristics of immune cells during embryogenesis. Moreover, single-cell sequencing has proven to be valuable for studying the interactions between immune cells and their microenvironment, highlighting the critical impact of immune system developmental abnormalities on embryo development. This review aims to summarize the latest progress in the application of single-cell sequencing technology in human embryonic immune system, including key technical methods, major discoveries, and its potential clinical applications. By consolidating these cutting-edge studies, it is expected to provide valuable insights for a comprehensive understanding of the complexity and diversity of the embryonic immune system, offering new inspiration for immune system disease research and therapeutic strategies.

Keywords single-cell sequencing; embryonic immune system; immune cells; interactions; differentiation and development; microenvironment

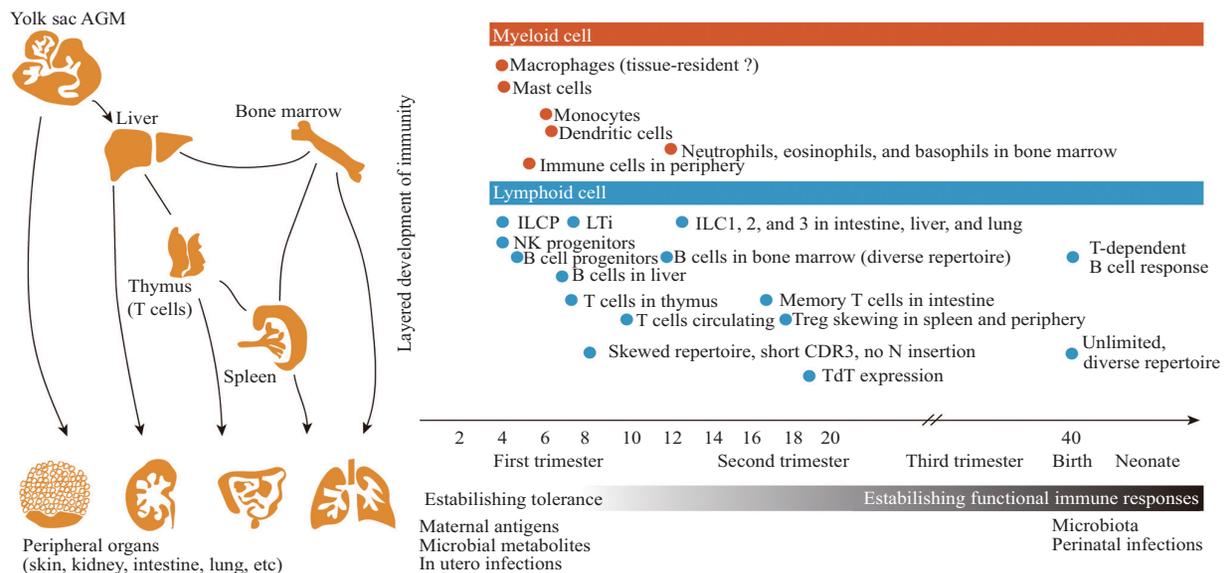
胚胎发育是一个复杂而精密的调控过程,在这一阶段,多个器官和系统逐渐形成并开始发挥生物学功能。其中,免疫系统的正常发育对胚胎发育、出生后个体健康维持和疾病防御至关重要^[1-2]。胚胎时期免疫系统不仅负责在早期生命阶段提供基本的防御功能,也为胎儿的免疫耐受和新生儿自我防御奠定基础^[2]。因此,研究胚胎期免疫系统的发育过程有助于我们更好地理解免疫系统的建立机制以及可能影响个体后续免疫功能的关键因素。在胚胎发育过程中,免疫系统的早期发育依赖于造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的分化和迁移,最早的造血活动发生在卵黄囊(yolk sac, YS)中,接着在胎儿肝脏和骨髓中开始造血^[3]。HSC在不同的发育阶段逐渐成熟,产生了不同谱系的免疫细胞,包括髓系细胞(如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞)和淋巴系细胞(如T细胞和B细胞),并在胎儿发育的不同阶段进入外周循环,逐渐形成与成年免疫系统相似的细胞群体(图1)^[1,4-5]。

传统的免疫学研究方法,如流式细胞术和基于组织块的基因表达分析,已经帮助科学家们揭示了胚胎期免疫系统的基本发育过程,然而,这些方法存在相当大的局限性。基于组织块的研究方法只能

提供细胞群体的平均信息,掩盖了不同细胞之间的异质性,这可能导致关键的细胞亚群以及细胞之间相互作用发挥的重要功能被忽略。因此,研究者迫切需要一种能够精确分析单个细胞的技术,以揭示免疫系统发育过程中更细微的变化。单细胞测序技术的出现为解决这一难题提供了可能,这一技术能够在单细胞水平上获取基因组、转录组或表观遗传等组学数据,从而帮助研究者识别单个细胞的类型、状态和分子特征。单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)是其中应用最为广泛的一种方法,通过检测单个细胞中的mRNA分子,揭示不同细胞的基因表达谱,为分析胚胎期免疫细胞的发育提供了全新的视角。

单细胞测序技术在胚胎免疫系统研究中取得了几项重要突破。首先,它帮助研究者识别了胚胎早期免疫细胞的种类。科学家们利用scRNA-seq发现了多个新的免疫细胞亚群,并阐明了这些细胞在胚胎发育不同阶段的动态变化。其次,单细胞测序揭示了免疫系统发育过程中细胞间的相互作用。此外,单细胞测序技术还揭示了新的胚胎免疫耐受机制。总的来说,单细胞测序技术的引入为研究胚胎免疫系统的发育带来了新的契机。这一技术不仅揭

Developmental timeline of the human immune system



在人类早期生命中,血液和免疫系统的发育发生在多个解剖部位。造血的主要部位从胚外YS转移至胚内主动脉-性腺-中肾区(AGM)、肝脏和骨髓。T细胞的分化和成熟仅限于胸腺。免疫细胞随后迁移至其他淋巴或外周器官,包括淋巴结、皮肤、肠道、肾脏和肺部,并适应各自器官的微环境。不同类型的免疫细胞在妊娠不同阶段发育并成熟,以满足建立免疫耐受和功能性应答的发育需求。这个过程使发育中的胚胎为妊娠期及出生后可能的抗原暴露做好准备。ILCP: ILC前体; CDR3: 互补决定区3; TdT: 末端脱氧核苷酸转移酶。

During early human life, the development of blood and immune systems occurs in multiple anatomical sites. The primary site of hematopoiesis shifts from the extraembryonic YS (yolk sac) to the intra-embryonic AGM (aorta-gonad-mesonephros) region, liver, and BM (bone marrow). The differentiation and maturation of T cells are confined to the thymus. Immune cells then migrate to other lymphoid or peripheral organs, including lymph nodes, skin, gut, kidneys, and lungs, adapting to the microenvironment of each organ. Different types of immune cells develop and mature at different stages of pregnancy to meet the developmental requirements of establishing immune tolerance and functional responses. This process prepares the developing embryo for potential antigen exposure during pregnancy and after birth. ILCP: ILC precursor; CDR3: complementary-determining region 3; TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase.

图1 人类免疫系统的时间和空间发育过程(根据参考文献[4]修改)

Fig.1 Temporal and spatial development of the human immune system (modified from the reference [4])

示了免疫细胞的发育轨迹和功能状态,还帮助科学家理解了免疫系统如何与其他细胞相互作用,维持胚胎发育的平衡。随着技术的不断进步,单细胞测序将进一步推动对胚胎免疫系统复杂性的研究,为未来的临床应用奠定坚实的基础。

1 单细胞测序技术进展

scRNA-seq首次出现于2009年,允许在单个细胞水平上以更高的分辨率研究基因表达,避免了对不同细胞类型的基因表达水平进行平均,可以表征样本中存在的细胞类型及其基因表达,此后成为研究人体各种组织和器官中单细胞水平基因表达的标准^[6]。此外,该方法允许识别和表征基因表达谱异常的细胞,这反过来可能为疾病发展机制提供新的见解^[7]。

主要的scRNA-seq技术实验策略是相似的。首先,必须通过解离组织器官来分离单个细胞。然后,

提取单个细胞的RNA并将其反转录成互补cDNA、加条形码并扩增。最后,产生用于高通量测序的文库,紧接着进行后续生物信息学分析和实验验证^[8]。与bulk RNA-seq相比,scRNA-seq文库通常包含用于识别不同细胞身份的额外序列片段(细胞条形码)以及独特的分子标识符(unique molecular identifiers, UMIs)^[9]。UMIs的使用极大地提高了单细胞转录本定量的准确性,从而可以识别和去除因cDNA的大量扩增而产生的重复序列。根据捕获的转录本覆盖率,这些方法可以分为两类:(1)全长转录本测序(Smart-seq^[10]、SUPeR-seq^[11]和MATQ-seq^[12]);(2)5'-或3'-末端转录本测序(Drop-seq^[13]、Seq-Well^[14]、10x Genomics Chromium^[15]、DroNC-seq^[16]或STRT-seq^[17])。目前,最流行的scRNA-seq方法是商业化平台,例如BD Rhapsody^[18]、TaKaRa/Clontech iCell^[19]和10x Chromium技术^[15],而10x Genomics几乎主导了scRNA-seq市场。尽管10x Genomics在市场上很

流行,但迄今为止仍然没有适合所有需求的scRNA-seq方法。因此,平台或方法的选择取决于特定研究的目的和所选用测序平台的优势。这些商业化的平台往往需要专业的仪器设备,因此价格高昂,这限制了单细胞测序技术的大规模普及。2017年,CAO等^[20]利用细胞自身作为反应容器,开发了一种组合索引策略来分析单个细胞核的转录组,称为sci-RNA-seq(单细胞组合索引RNA测序)。类似地,ROSENBERG等^[21]在2018年描述了一种基于分割池连接的转录组测序(SPLiT-seq)的策略,该策略使用组合条形码来分析单细胞转录组。除此之外,HAN等^[22]利用琼脂糖凝胶作为物理分割孔并与定制化磁珠相结合,替代了商业微孔板或者油包水仪器。这些方法使得单细胞测序不再依赖于外部商业化仪器,极大地降低了成本,使得单细胞测序技术应用能够大范围普及。

虽然单细胞测序技术能以单细胞分辨率分析每个细胞基因表达谱,但由于需要将组织解离成单个细胞,这一过程丢失了细胞在组织器官内的位置信息,从而忽略了依赖于特定空间结构的细胞间相互调控关系。空间单细胞组学方法的兴起,允许在组织原位环境中以亚细胞或者单细胞分辨率研究转录组,同时保留细胞空间位置信息,真实地反映组织内调控网络和生态位。单细胞空间多组学技术被*Nature*列为2022年值得关注的七大技术之一,其发展和持续创新的基础是一系列已建立的空间单组学方法。这些方法可分为基于测序的方法和基于成像的方法。基于测序的空间转录组学利用数千个阵列和空间条形码寡聚dT点(10× Genomics Visium)、或者独特的DNA条形码磁珠(Slide-seq^[23])甚至条形码DNA纳米球(Stereo-seq^[23])附着在载玻片表面上,通过将原位细胞中的RNA逆转录成cDNA后构建文库并测序,以获取特定位置细胞的基因表达谱信息。基于成像的空间转录组学利用单分子荧光原位杂交(single molecule fluorescence *in situ* hybridization, smFISH),例如MERFISH^[24]和seqFISH^[25],能够以高精度和亚细胞分辨率对单细胞中数千个基因转录本和基因组位点进行成像,从而能够在其天然组织环境中对RNA进行单分子检测。最近商业化的几个空间组学平台可用于以单细胞分辨率对组织切片进行基于自动成像或者测序的空间转录组分析,包括NanoString CosMx(基于smFISH)^[26]、Vizgen MER-

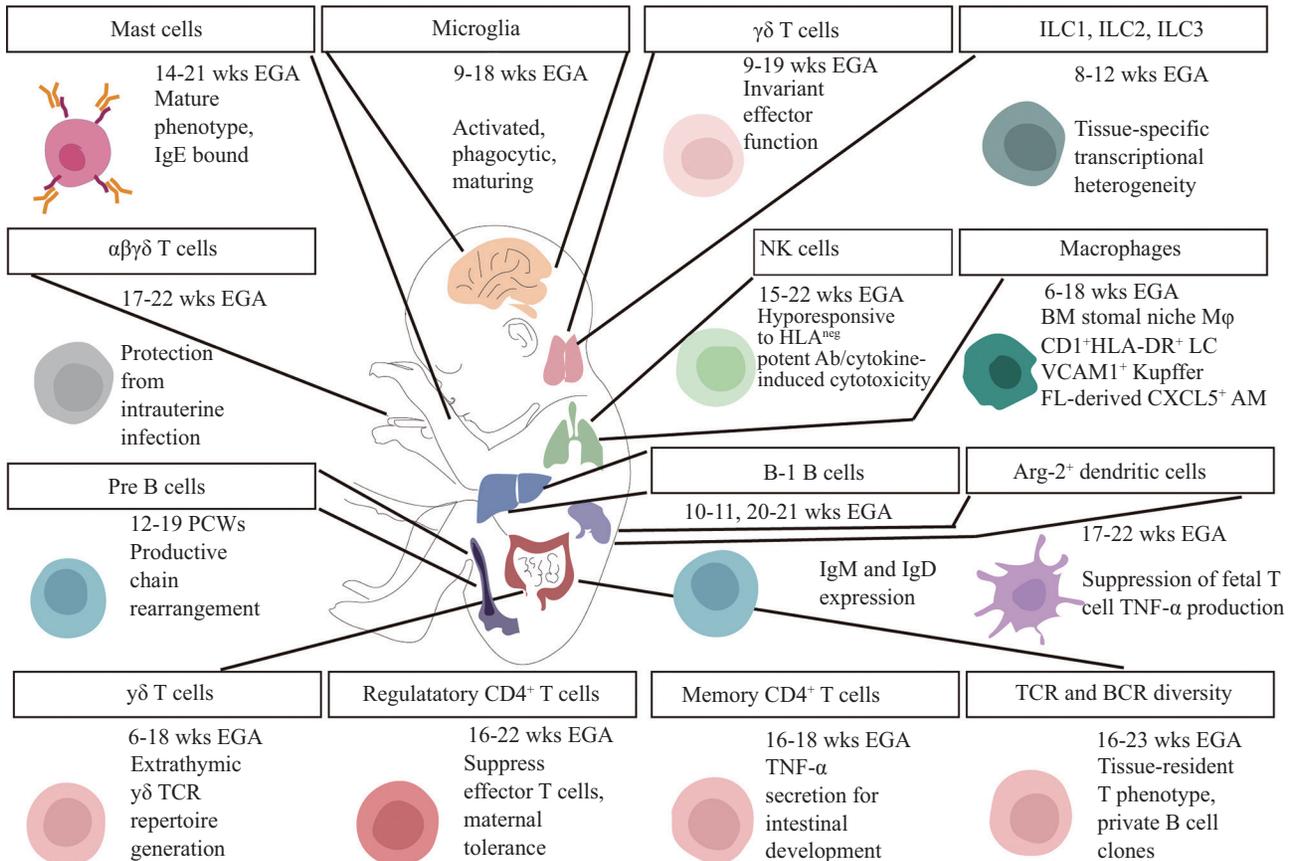
SCOPE(基于MEFISH)^[27]和10× Genomics Xenium^[28]平台,使得单细胞空间组学可操作性极大增强。其中10× Genomics Xenium平台允许同时对转录组和几十个蛋白质进行基于成像及测序的联合分析,降低了空间转录组测序的操作难度,同时增加了捕获同一个细胞的组学信息维度。尽管有这些优势,空间转录组学技术因操作及数据分析复杂、单分子检测灵敏度有限、成本高昂以及对高质量组织切片的依赖仍然面临实际应用限制。此外,不同平台之间缺乏标准化流程导致研究结果难以被比较,且该技术只能显示静态空间分布,无法揭示细胞的动态变化。同时,大多数空间转录组学仅聚焦于mRNA水平,缺乏蛋白质及表观修饰层面的信息,这可能不足以全面了解细胞的功能状态。尽管存在这些不足,但随着分辨率提升、多组学整合和标准化流程的改进,空间转录组学在未来依然具有巨大的应用潜力。

2 单细胞测序技术在胚胎免疫系统最新研究进展

以往对于胚胎免疫系统的研究大多基于bulk水平(图2),这限制了我们对人免疫系统发育精细过程的理解。近年来,单细胞测序技术的发展使得胚胎免疫系统的研究取得了突破性进展。科学家们利用scRNA-seq、单细胞TCR测序(scTCR-seq)、空间转录组以及其他单细胞组学技术,描绘了胚胎发育过程中免疫细胞谱系图,揭示了免疫细胞与微环境的相互作用,并深入研究了胚胎免疫系统发育异常导致胎儿疾病的关键分子机制。这些研究为理解胚胎免疫系统发育提供了全新的视角,并为未来的临床应用奠定了基础。以下本文将对单细胞测序在不同免疫细胞类型中的研究进展进行综述。

2.1 单细胞测序应用于胚胎造血干细胞发育

HSC通过自我更新和多向分化产生所有类型的血细胞,在人类整个生命周期中维持造血。人类HSC出现在卡内基分期(carnegie stage, CS)13~17[4~6孕周(post-conceptual weeks, PCWs)]之间的AGM区域,可能通过主动脉内造血窦(intra-aortic haematopoietic cluster, IAHC)^[29]发育而来。尽管,主动脉内皮细胞(aortic endothelial cells, AEC)发育为HSC已在小鼠模型中证明,但其详细过程、调控元件以及HSC与微环境细胞相互作用在人中仍不清楚,这妨碍了将人类多能干细胞(pluripotent stem



插图展示了目前妊娠早期和中期发育组织中先天和适应性免疫细胞的分布以及它们在器官发育中的作用。组织驻留巨噬细胞包括中枢神经系统中的小胶质细胞、皮肤中的朗格汉斯细胞(LC)、肝脏中的库普弗细胞、基质巨噬细胞(MΦ), 以及潜在的红髓和肺泡巨噬细胞(AM)。肺NK细胞具有强效抗体(Ab)和细胞因子诱导的细胞毒性, 但倾向于耐受HLA⁻细胞表型。在皮肤中, 成熟的肥大细胞通过IgE对过敏原敏感, 红系祖细胞的分化可能补充胎儿肝脏红细胞。先天B1 B细胞在胎儿肝脏和骨髓中占主导地位, 并伴有幼稚和记忆B-2 B细胞出现, 而肠道中的B细胞主要是单克隆, 并且不同个体之间没有B细胞受体(B cell receptor, BCR)共享。B细胞谱系扩增发生在妊娠中期的骨髓中。脾树突状细胞(DC)具有抗原呈递能力, 但也用以维持T细胞耐受。T细胞在胸腺、皮肤和肠道中具有先天样的快速反应表型(γδ T细胞), 但强烈偏向于介导(母体)耐受性表型, 在肠道黏膜中显示TCR多样性和效应记忆表型。脐带血CD71⁺红细胞(未显示)是围产期免疫抑制剂, 可能源自胎儿肝脏红细胞前体。The illustration depicts the distribution of innate and adaptive immune cells in early and mid-gestational tissues, along with their roles in organ development. Tissue-resident macrophages include microglia in the central nervous system, LC (Langerhans cells) in the skin, Kupffer cells in the liver, stromal MΦ (macrophages), and potentially red pulp and AM (alveolar macrophage). Pulmonary NK (natural killer) cells exhibit potent Ab (antibody)- and cytokine-induced cytotoxicity but tend to exhibit a tolerant HLA⁻ cell phenotype. In the skin, mature mast cells are sensitized to allergens via IgE, and the differentiation of erythroid progenitors may supplement fetal liver erythrocytes. Innate B1 B cells dominate in the fetal liver and bone marrow, accompanied by the appearance of immature and memory B-2 B cells. B cells in the gut are primarily monoclonal, with no BCR sharing between different individuals. B cell lineage expansion occurs in the mid-gestation bone marrow. Splenic DC (dendritic cell) possesses antigen-presenting abilities but is also involved in maintaining T cell tolerance. T cells exhibit an innate-like rapid-response phenotype (γδ T cells) in the thymus, skin, and gut but are strongly skewed toward mediating (maternal) tolerance. In the intestinal mucosa, they show TCR diversity and an effector memory phenotype. Cord blood CD71⁺ erythrocytes (not shown) are perinatal immune suppressors, possibly derived from fetal liver erythroid progenitors.

图2 人类胚胎组织驻留免疫细胞和功能特征(根据参考文献[5]修改)

Fig.2 Tissue-resident immune populations and functional features in human fetuses (modified from the reference [5])

cell, PSC)诱导分化为HSC后应用于移植和建立相关疾病模型。虽然, IAHC含有大量造血细胞, 但可用于移植的HSC很少^[30], 这表明其功能不成熟^[31]。新生HSC定植于肝脏、成熟并获得强大的骨髓移植能力, 这一过程与小鼠HSC不同, 至今仍然无法在培养物中重现人类HSC的成熟或精确定位其成熟阶段^[32-33]。

HSC出现之前有几个不依赖于HSC的祖细胞起源^[34-35]。YS首先产生原始红细胞和巨噬细胞, 然后产生启动胎儿肝脏造血的红髓祖细胞(erythromyeloid progenitor, EMP), 至少在小鼠中是这样的^[35-36]。在人类中, YS源性骨髓祖细胞(YS-derived myeloid-biased progenitor, YSMP)在CS12^[37]时期迁移到肝脏。最近的谱系追踪研究表明祖细胞会

产生长寿的子代细胞, 包括小胶质细胞和组织驻留巨噬细胞^[37-38], 从而对免疫细胞均来自于HSC这一教条提出了挑战。此外, 在不依赖于HSC的祖细胞中观察到了淋巴细胞谱系分化潜能, 而这一特性以往被认为是HSC特有的能力^[34,39-41]。尽管发育性造血在小鼠中涉及多个解剖部位, 包括卵黄囊、胎盘、大动脉, 甚至头部和心脏^[42-44], 但他们对人HSC发育的贡献尚不清楚^[30]。

GOH等^[45]对3~8 PCWs时期的YS组织进行了单细胞测序分析, 重建了从YS造血内皮细胞到早期HSC祖细胞的分化发育轨迹。他们发现YS中的HSC似乎是由 $IL33^+ ALDH1A1^+$ AEC通过造血内皮细胞(hemogenic endothelium, HE)产生的, 这与CALVANES等^[39]的发现一致。HSC可早于AGM出现, AGM前的早期HSC具有偏向分化为红系、巨核细胞(megakaryocyte, MK)和髓系细胞的潜能。然而AGM期以后, 剩余的早期HSC偏向分化为红系和MK, 而晚期HSC偏向分化为淋巴细胞和MK。这与CS14时期后在YS内首次观察到淋巴细胞(ILC祖细胞、NK细胞和B谱系细胞)一致^[45]。YS微环境中的内皮细胞(endothelial cell, EC)可通过产生干细胞因子($KITLG$)和 $NOTCH1/2$ 来维持和支持HSC池^[46]。这些在AGM期以前产生的HSC可能是胎肝造血前胚胎免疫细胞的重要来源。

发育中的HSC嵌入AGM区域并受其微环境影响。与许多其他发育过程一样, HSC发育依赖于和相邻组织及区域之间的相互作用。CROSSE等^[47]在单细胞分辨率下描绘了主动脉(CS16时期)中HE的异质性, 发现 $CDH5^+ CD45^+$ HSC群体与中央内皮网络密切相关, 并通过动脉特征下调的桥接内皮细胞群与动脉细胞亚群间接相关。此外, EDN1可能通过表达内皮素受体的其他AGM群体(包括内皮细胞、周细胞、间充质细胞、神经嵴和巨噬细胞)间接作用于HSC发育^[47]。最近早期CS12~CS14(排卵后27~32天)的单细胞转录组学分析也表明人内皮细胞与HSC之间存在谱系分化关系。通过将 $CD34^+ CD45^- CD44^+$ 作为标志物可从EC群体中10倍富集HE细胞。HSC发育过程中, 间充质和上皮细胞可能是潜在的生态位成分, $DLK1$ -NOTCH、 $SPP1$ - $CD44$ 、 $WNT2B$ - $FZD4$ 和 $IL11$ - $IL11RA$ 以及间充质细胞表达的 $BMP4$ 在HE分化为HSC中发挥潜在作用^[48]。同时发现EC或AEC与HE之间的相互

作用包括NOTCH(JAG -NOTCH和 DLL -NOTCH)、 $TGFB$ ($TGFB1$ - $TGFB1$ 、 $TGFB1$ - $TGFB2$ 和 $BMP2$ - SMO)和 $VEGF$ ($VEGFA$ - $FLT1$ 、 $VEGFA$ - KDR 和 $VEGFA$ - $NRP1$)相关配体-受体^[49]。这些研究在单细胞层面揭示了人胚胎HE发育为HSC的精细调控路径及相互作用微环境。

目前用于鉴定人类HSC的特征性分子缺乏区分度, 无法识别在不同造血部位的HSC及成熟的HSC。CALVANES等^[39]构建了人类造血组织的单细胞转录组图谱, 发现了HSC特征 $RUNX1^+ HOXA9^+ MLLT3^+ MECOM^+ HLF^+ SPINK2^+$ 能够在整个妊娠期将HSC与其他祖细胞区分开。除了AGM区域外, 新生HSC还存在于胎盘和YS中, 这与GOH等^[45]的发现一致。AGM区域的HSC在6周时定植于肝脏, HSC转录因子机制的建立则是在HSC出现时确定的, 而它们的表面蛋白分子在整个发育过程中不断演变。AGM HSC向肝脏定植, 并在这一过程中获得了HSC成熟标记物 $PROM1/CD133$ 和 $HLA-DR$ ^[50]。

在人类胎儿发育过程中HSC逐渐定植于骨髓, 在此自我更新并维持出生后个体终身造血。XU等^[51]通过单细胞测序进一步明确了HSC转录组从胚胎向成人转变是一个连续变化过程而不是跳跃式进展, 这与GOH等^[45]发现HSC表型在发育过程中不断演变的结论一致, 也与LI等^[52]在小鼠中观察到的结果相似。scRNA-seq分析人类胎儿骨髓和脾脏中HSC及其微环境细胞转录组图谱, 揭示了骨髓HSC在12 PCWs后才具备在NOG小鼠中重建长期多谱系造血功能, 而在14 PCWs及其以前的脾脏中未检测到功能性HSC^[53], 并且早期造血干细胞和多能祖细胞(hematopoietic stem cell/multipotent progenitor, HSC/MPP)的功能活性低于晚期细胞。XIE等^[54]的研究也支持HSC/MPP在妊娠中期开始具备干性特征, 然后维持到出生。HSC的维持和自我更新调节可能依赖于NF- κ B通路(涉及 $NFKB2$ 、 REL 和 $RELB$)的参与^[55-56]。在妊娠早期, HSC/MPP的干性降低以及祖细胞中干扰素信号较强, 使得HSC更接近于白血病细胞。而中期妊娠后, HSC谱系分化潜力增强, 伴随着有氧代谢水平的上调^[54]。细胞间通讯分析发现网状细胞(reticular cells, CAR)和 $DLL4$ 阳性EC是人胎儿骨髓中HSC生态位调控因子的主要来源, 通过 $CD44$ 、 $NOTCH1/2$ 和 $CD74$ 支持造血, 并通过 $SELE$ 、 $CXCL12$ 和 PTN 调节HSC迁移和驻留。这些研究揭示了人类胎儿骨髓中HSC定植机制及开始造血精确

时间节点,并为未来研究HSC发育及定植机理提供了宝贵参考^[53]。

SOMMARIN等^[57]使用CITE-seq对胎儿肝脏中祖细胞的分子表达谱进行了分析。发现HSC的经典标记,例如CD90和CD49F,在成人和胚胎中是保守的,而CD135和CD123在不同细胞表达广泛,可捕获不同的细胞亚群。分子特征分析发现胎儿HSC核心特征与儿童白血病特征相似,这一发现与XIE等^[54]发现早期HSC具有接近于白血病细胞的特征一致。这些发现强调了胎儿和成人血细胞之间的分子和免疫表型差异,这对于未来研究儿童白血病和一般血液细胞发育机理具有重要意义^[57]。

这些发现极大地扩展了我们对胚胎HSC起源、分化、定植机理的认知。同时通过分析细胞间相互作用,揭示HSC与微环境相互作用的细胞类型及调控信号,强调HSC更新及维持受到内在转录及外界微环境信号的共同调控,为体外培育功能完善、存活率高的HSC提供了新的见解,推动了体外诱导HSC向临床应用转化。

2.2 单细胞测序应用T细胞分化发育

胸腺介导T细胞的成熟和选择,在适应性免疫和中枢耐受的建立中发挥着重要作用。先前对人类胎儿胸腺器官发育和早期T淋巴细胞生成的研究主要局限于形态学描述^[58-59]。在妊娠第6周胸腺器官开始发育,在第8周初(CS20)胸腺上皮细胞(thymus epithelial cell, TEC)发生分化,早期淋巴祖细胞从胎儿肝脏迁移到胸腺,胸腺播种祖细胞(thymic seeding progenitor, TSP)在胸腺中出现,幼稚T细胞在此发育^[60]。早期胸腺祖细胞发育成初始T细胞并迁移到其他组织中^[40,61]。功能性胸腺和循环T细胞在妊娠10~11周时产生^[62]。第12周后,皮质和髓质上皮区域明显分离,出现CD4⁺和CD8⁺单阳性(single positive, SP) T淋巴细胞^[60,63]。除TEC外,其他几种基质细胞,如间充质细胞和内皮细胞,协同促进T淋巴细胞生成^[58,64-66]。然而,这些基质细胞的构成和分子特征以及它们与胸腺中造血细胞的潜在相互作用仍然不清楚。新的证据表明,T淋巴祖细胞的存在可独立甚至早于CS14时期AGM区域出现的HSC^[30,67-69]。此外,具有长期单系T细胞植入能力的造血祖细胞出现在CS16时期AGM区域,然后才出现在CS17时期的胚胎肝脏中^[30]。这些发现对传统T细胞分化自HSC提出了挑战,此外,这些具有分化成T细胞能力的祖细胞特征在人中知

之甚少。最近,scRNA-seq揭示了小鼠胸腺器官发生过程中TEC的变化图谱^[70-72]。然而,人体器官以物种特有的模式和节奏成熟^[58,73-74],小鼠发育模式与人存在很大差别,仍需要对人类胸腺进行全面的研究和表征。

ZENG等^[40]对人类跨越胚胎和胎儿阶段胸腺、AGM区域、肝脏以及血液进行了单细胞测序,发现了早在第5周时独特类型的前胸腺T淋巴祖细胞就出现在AGM区域。胎儿胸腺中的第一个早期胸腺祖细胞(early thymic progenitor, ETP)与胎儿肝脏中TSP具有相同的转录特征,通过轨迹分析揭示了ETP可能来源于TSP。胚胎ETP和胎儿ETP细胞亚群1(ETP1)表达干细胞和祖细胞标记物CD34和SPINK、T细胞受体(T cell receptor, TCR)基因TRDC^[75]、T细胞谱系相关转录因子RUNX3^[76]和B淋巴谱系相关基因IGLL1^[77],表明其具有分化为多谱系细胞的潜力。胚胎ETP(仅在第8周出现)与胎儿ETP1(主要在第9周和第10周)相比,与细胞迁移和黏附相关的基因CXCL12和TPGSI在胚胎ETP中富集,但在胎儿ETP1中缺乏,表明造血功能祖细胞可能在胸腺血管化前后通过不同的途径迁移到胸腺原基中。分化发育路径分析表明,在人类胎儿肝脏中的淋巴祖细胞有两种不同发育潜力:一种分化为T淋巴谱系,另一种则保留B淋巴谱系潜力。此外,造血细胞和基质细胞之间的细胞相互作用参与了T淋巴细胞生成和胸腺器官发生。无论是胚胎或者胎儿ETP,都与TEC具有强烈的相互作用,这提示TEC在造血祖细胞定植于胸腺和T淋巴细胞发育中发挥关键作用。内皮细胞参与调控T淋巴细胞祖细胞和前体细胞的迁移和运动,通过MADCAM1-CD44、CFH-SELL和CD34-SELL与T淋巴细胞祖细胞和前体细胞进行通讯。同时,间充质细胞和ETP还可通过IGF-IGFR相互作用,这与胰岛素样生长因子在小鼠早期T淋巴细胞发育中的功能一致^[40]。这些发现为造血细胞和TEC的生物学功能提供了丰富的见解,为设计成功的T淋巴细胞再生策略、体外免疫重建及重构各种获得性及先天性T细胞缺陷综合征的胸腺提供了重要参考。

PARK等^[61]对人类一生中胸腺细胞进行了全面的单细胞表征,发现在早期胎儿样本(7至8 PCWs)中,淋巴室包含NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和ILC3,而分化的 $\alpha\beta$ T细胞很少且主要出现在双阴性(double negative, DN)阶段,此后他们逐渐从双阳性(double posi-

tive, DP)阶段发育到SP阶段, 在12 PCWs左右达到平衡。相反, 先天淋巴细胞的比例减少。通过分化发育轨迹分析, 揭示了从 $CD4^+CD8^-$ DN细胞开始, 逐渐表达CD4和CD8成为 $CD4^+CD8^+$ DP细胞, 然后通过CCR9高表达T $\alpha\beta$ (进入)阶段转变为成熟 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ SP细胞的清晰分化发育过程。此外, 从DN-DP连接处分出的独立细胞谱系最终发育为 $\gamma\delta$ T细胞。DN和DP细胞包括早期高增殖和晚期静息两个阶段。分析还显示胸腺可能存在两个不同来源的Treg祖细胞, $CD25^+FOXP3^-$ Treg(高表达MIR155HG)和 $CD25^+FOXP3^{low}$ 细胞亚群。单细胞TCR分析表明, 非常规T细胞的TCR库相对有限, 部分表达 $\alpha\beta$ TCR, 少数表达 $\gamma\delta$ TCR, 呈现有限的克隆扩增。 $\alpha\beta$ T细胞与DP T细胞使用相似的基因编码TCR, 暗示其可能源于胸腺细胞-胸腺细胞正选择, 而非通过皮质TEC正向选择^[61]。这些发现首次在单细胞水平揭示了人胸腺中T细胞的分化发育过程及其与微环境的相互作用^[61]。

以往研究表明, 胎儿受到保护不会暴露于非母体抗原, 但在胎儿肠道中发现了 $CD45RO^+$ T细胞, 这提示其受到过抗原刺激并产生了记忆表型。LI等^[78]通过质谱流式细胞术、单细胞RNA测序和高通量TCR测序系统分析了人类胎儿肠道中的 $CD4^+$ T细胞亚群, 发现记忆型 $CD4^+$ T细胞高表达*Ki-67*(细胞分裂标志物)和 $CD5$ (TCR亲和性标志物), 并产生细胞因子IFN- γ 和IL-2, 同时表现出细胞激活和促炎效应功能相关的分化轨迹。TCR库分析表明这些记忆型 $CD4^+$ T细胞亚群存在克隆扩增、特异的库特征以及亚群之间的相互联系。总体而言, 这些结果表明人类胎儿肠道中记忆 $CD4^+$ T细胞的存在可能与外来抗原暴露相关^[78]。

屏障组织中的淋巴细胞在宿主防御和稳态维持中发挥关键作用。这些细胞在特定的发育窗口期间定居于组织中, 并表现出独特的表型和功能。DHARIWALA等^[79]发现, 虽然胎儿皮肤中的大多数常规 $\alpha\beta$ T细胞(Tconv)具有初始、增殖性表型, 但部分 $CD4^+$ T和 $CD8^+$ 细胞表现出记忆样特征, 并倾向于产生干扰素IFN γ 。皮肤Treg在妊娠中期逐步积累, 与毛囊发育的时间和区域相关。这些胎儿皮肤Treg表现为效应记忆表型, 但在关键效应分子表达上与成人Treg不同。T细胞在人类皮肤中还扮演着对抗病原体和肿瘤的重要免疫防御角色。REITER-

MAIER等^[80]通过单细胞分析, 发现了一种在胎儿皮肤和肠道中富集的 $\alpha\beta\gamma\delta$ T细胞, 其在总 $CD3^+$ T细胞中所占比例在妊娠过程显著下降, 足月分娩的新生儿皮肤和出生后1~2年的非发炎包皮样本中不存在 $\alpha\beta\gamma\delta$ T细胞。TCR测序数据显示, $\alpha\beta\gamma\delta$ T细胞与单阳性 $\alpha\beta$ T细胞的CDR3序列重叠较少, 表明他们可能是独立发育的谱系。此外, 单阳性 $\alpha\beta$ T细胞基因特征、细胞因子表型和体外受体-配体相互作用分析表明, 该细胞参与早期皮肤发育。 $\alpha\beta\gamma\delta$ T细胞对磷酸抗原原有反应性, 提示它们参与了保护胎儿在子宫内免受感染。这些发现揭示了胚胎皮肤中存在独特的T细胞类型, 这些T细胞参与了胎儿皮肤的免疫监督和分化发育^[80]。

2.3 单细胞测序应用于B细胞分化发育

B-1前体细胞的生成始于YS和主动脉旁脏壁膜, 而在中期妊娠时在骨髓和胎肝中生成。在胎儿发育末期, B-1前体细胞减少而B-2细胞生成激增^[81-82]。成熟的B-1细胞可以由主动脉旁脏壁膜的B-1前体细胞和卵黄囊发育而来。在8周时胎肝和大网膜中可检测到B细胞, 而在13~23 PCWs时可以在脾脏中检测到B细胞^[83]; 在15 PCWs时在胸腔和腹腔中可检测到明显的 $CD5^+$ B细胞^[83]。在妊娠8~13 PCWs的胎儿肝脏中, 已检测到M链的表达, 以及表面IgM、IgD和CD20的表达^[84]。胎儿外周血循环中的B细胞出现在妊娠12 PCWs, 在妊娠16~20 PCWs时可以在骨髓中发现它们的踪迹, 这些细胞表达 $CD19$ 、 $CD20$ 、 $CD21$ 、 $CD22$ 、 $HLA-DR$ 、 IgM 和 IgD ^[85]。与成人相比, 胎儿 $CD5^+$ B细胞(B-1 B细胞)比例更高, 被认为是新生儿的第一道防线^[86]。

B细胞发育过程包括严格的多步骤调控。B细胞发育始于BM, 其中共同淋巴祖细胞(common lymphoid progenitor, CLP)通过表达转录因子(如PAX5)控制CLP向B细胞谱系分化^[87]。BENDALL等^[88]应用质谱流式细胞术基于已知B细胞发育的经典标志物($CD34$ 、 $CD38$ 、 $CD10$ 、 $CD19$ 、 IGH 和 $CD20$)的表达, 利用Wanderlust轨迹分析揭示了其他关键发育标志物(包括*Tdt*、 $CD24$ 、 $CD79B$ 、 $VPREB$ 和 $IL7RA$)的特定顺序。这些标志物对应着重链和轻链重排等重要事件的关键时间点。然而, 质谱流式细胞术具有偏倚和局限性, 因为它仅探测44种已知的蛋白标志物, 而不考虑未知标志物的转录组特征。为了解决这一问题, 在另一项研究中, 对人类和小鼠骨髓B细胞进

行scRNA-seq分析,以研究缺氧诱导因子-1 α 对B细胞发育的影响^[89]。BURROWS等^[89]基于B细胞的经典标志物(*IL7R*、*CD19*、*RAG1*、*RAG2*、*EIF4EBP1*、*TNFRSF13C*和*CD20*)进行了聚类分析,构建了B细胞分化轨迹。分析发现了一组独特的基因标志物,能够区分HSC、Pro-B细胞、Pre-B细胞、未成熟B细胞和成熟B细胞^[89]。另一项scRNA-seq研究也报道了人类胎肝和骨髓中B细胞谱系的类似基因表达特征^[87]。分析不同B细胞状态下依赖缺氧的基因表达模式揭示了HIF-1 α 通过限制免疫球蛋白重链-可变基因的编辑并诱导细胞凋亡,来限制前B细胞中的谱系多样性^[89]。尽管已有研究通过整合空间转录组学和scRNA-seq研究骨髓微环境^[90],但它们尚未阐明B细胞发育过程中B细胞区室内的空间结构和细胞间通讯模式。

SUO等^[91]研究发现,在胚胎第二孕期的肠道、脾脏、皮肤和肝脏等组织内部存在B细胞前体和未成熟B细胞,表明骨髓以外的组织也具备促进前体B细胞成熟分化的特定微环境,颠覆B细胞仅在骨髓中成熟的传统认知。这与BARNES等^[92]发现胚胎肺部存在不同发育阶段的B细胞一致,表明B细胞可在胎儿肺部发育。此外,这些B1细胞高表达*CD5*、*CD27*、*CCR10*和*SPN*,比成熟B细胞具有更高的增殖能力和*IGHM*表达水平以及较低的*IGHD*表达水平。B1细胞在早期胚胎阶段比例最高,随后逐渐被其他非祖B细胞亚群取代,而在胸腺中则持续存在。B1细胞在BCR重链和轻链中的N/P添加及CDR3连接区域都比成熟B细胞更短,突变频率也更低。此外,B1细胞还表现出持续BCR信号转导特征、TNF- α 和NF- κ B信号通路转录因子活化以及较强的自发分泌IgM能力。这些发现首次在单细胞水平细致地描绘了人类产前B1细胞的特征及功能。

STRAS等^[93-94]通过单细胞测序发现,胎儿肠道B细胞持续产生多种细胞因子(例如IL-8和TNF- α),这提示胎儿B细胞通过IL-8及TNF- α 促进血管生成。相比于婴儿B细胞,胎儿B细胞上调IL-17、IL-21和IL-6,后两者对于B细胞增殖、成熟和激活至关重要^[95-97]。这些证据提示胎儿和婴儿B细胞可能具有不同的功能。此外,BCR多样性分析表明,即使在检测到有限数量序列的样本中,BCR库在14周时就已经具有多样性并随年龄增加。小肠样本中B细胞

CDR3H区域的平均长度在整个妊娠第二个月和出生后逐渐增加。儿童CDR3H区域发生的体细胞突变多于胎儿或婴儿样本,这表明B细胞在儿童时期进一步成熟^[98]。这些发现为我们理解胚胎B细胞分化发育及功能提供了重要的参考。

2.4 单细胞测序应用于巨噬细胞分化发育

巨噬细胞是一种先天免疫细胞,存在于所有组织中形成3D网络,不仅保护宿主免受微生物侵害,还参与了血管形成、脂肪生成、新陈代谢及神经系统功能调节,在器官发育和组织稳态维持中发挥重要作用^[99]。在胚胎发育早期,巨噬细胞便出现在器官中,并能自我更新,无需HSC补充^[45,100]。小鼠的单细胞图谱研究也表明,巨噬细胞在胚胎造血过程中出现时间比功能性HSC发育要早得多^[101]。这提示部分巨噬细胞发育可能不依赖于HSC的生成。通过小鼠模型,已经发现最早的祖细胞在卵黄囊中在至少两个不同时间段出现,第一波中从不依赖于c-Myb的红髓系祖细胞原位分化为巨噬细胞,迁移到大脑锥形中成为小胶质细胞的主要来源^[38]。第二波祖细胞由c-Myb依赖性红骨髓祖细胞原位分化为巨噬细胞,并迁移到胎儿肝脏中,产生多种谱系,包括单核细胞。它们将迁移到不同的发育组织中,并在出生前开始分化为组织驻留巨噬细胞^[102]。然而,出生后,一些组织的巨噬细胞群体依赖于成人HSC源性单核细胞的持续补充^[103],另一些则由胚胎早期发育巨噬细胞在原位增殖补充^[99]。由于材料的限制以及细胞数量的稀少性,我们对人类胚胎中巨噬细胞的起源和分化的了解仍然十分有限。

BIAN等^[39]对CS11~CS23阶段人类胚胎中的CD45⁺造血细胞进行了单细胞转录组分析,发现了CD45⁺CD34⁺CD44⁺祖细胞亚群以及巨噬细胞亚群是YS中(CS11时期)最早出现的CD45⁺造血细胞之一。YS衍生的CD45⁺CD34⁺CD44⁺在体外培养中具有偏向分化为髓系细胞的特性,其在肝脏中则可分化为单核及中性粒细胞两种类型。而*HBE1*(卵黄囊来源的有核原始红细胞的标志^[104])基因在YS以及头部巨噬细胞中均表达,表明它们是YS衍生的原始巨噬细胞。如同在小鼠中观察到的一样,其中一些YS巨噬细胞作为小胶质细胞前体在发育早期迁移到头部,发育成神经胶质细胞^[38]。由YSMP产生的单核细胞,仅在CS17之后发育为脑部单核细胞,且数量有限,表明其对头部巨噬细胞数量贡献有限。通过

整合分析儿童与胚胎头部、肝脏、皮肤以及肺部数据,发现小胶质细胞亚群特性在胚胎早期已经发生特化,肝脏驻留巨噬细胞命运决定发生在胚胎早期但程度低于头部,CS23时期皮肤驻留巨噬细胞中仅存在少量CD207阳性细胞,而在该时期胚胎肺中巨噬细胞尚未发生特化,与成人有较大的区别,提示肺部组织驻留巨噬细胞在胚胎发育后期或者出生后发生特化^[39]。这些发现首次在单细胞分辨率水平探索了发育早期巨噬细胞的特化和异质性,明确了人胚胎早期巨噬细胞发育起源及动态发育过程,填补了人胚胎巨噬细胞发育精确路径的空白。同时也为开发基于诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)衍生的各种组织驻留巨噬细胞方案的改进和应用提供了理论支持^[105]。

巨噬细胞具有异质性,在发育和疾病中发挥着关键作用,但在人类发育过程中的组织分布、分子特征、基因表达谱以及特化功能的研究仍然缺乏。WANG等^[106]通过对横跨4~26 PCWs时期19个组织的免疫细胞进行单细胞测序,鉴定了15种巨噬细胞亚群,发现了小胶质细胞样和促血管生成巨噬细胞亚群在不同组织器官中广泛存在。小胶质样细胞在分子和形态上与中枢神经系统中的小胶质细胞相似,广泛存在于胎儿表皮、睾丸和心脏中。它们是早期表皮中的主要免疫群体,沿着背侧-外侧-腹轴呈现极化分布,并与神经嵴细胞相互作用,调节它们向黑素细胞谱系分化。而促血管生成巨噬细胞位于胎儿器官的血管周围,并且可能源自卵黄囊。XU等^[51]发现在10~17 PCWs CD163⁺和CX3CR1⁺巨噬细胞在发育早中期遍布整个真皮,CD163⁺巨噬细胞富集分布在真皮中,这使得巨噬细胞有更多的机会靠近表皮基底层和毛囊凸出细胞(K14⁺细胞),提示该群巨噬细胞可能是参与胎儿皮肤发育的主要巨噬细胞群。BARNES等^[92]发现在胚胎阶段,包括巨噬细胞在内的分泌IL-1 β 的髓细胞遍布肺部,且靠近顶端上皮。体外共培养实验证实IL-1 β 可促进人类肺上皮发育^[92]。而MUNERA等^[107]发现多能干细胞来源的人类结肠类器官中多种细胞(包括HE样细胞和经历典型分化步骤的红髓系祖细胞)共同发育,最终生成具有功能的巨噬细胞。人类结肠类器官巨噬细胞获得了与人类胎儿小肠和大肠组织驻留巨噬细胞相似的转录特征。这些巨噬细胞在接受促炎和抗炎信号时能够调节细胞因子的分泌,且能

够吞噬病原体并对病原细菌产生强烈的免疫反应。在移植至小鼠体内后,HCO巨噬细胞在结肠类器官组织中保持,并与结肠上皮形成密切联系,不会被宿主骨髓来源的巨噬细胞取代。这表明HCO中的HE可产生多能造血祖细胞和功能性组织驻留巨噬细胞,进而促进组织稳态^[107]。这些发现描绘了人类巨噬细胞功能的复杂性和发育动力学,揭示了它们在发育过程中的多样化功能。

小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞,在组织发育和维护中发挥重要作用,并且与中枢神经系统疾病有关,但我们对人类胎儿小胶质细胞的发育缺乏了解。KRACHT等^[108]生成了人类胎儿9~18 PCWs小胶质细胞的单细胞基因表达和染色质可及性图谱,发现了不同发育周数的小胶质细胞是异质性群体。小胶质细胞在早期胚胎发育时期开始成熟,并逐渐获得类似于具有中枢神经系统监视特性的成年小胶质细胞表型。随着发育过程中与成人小胶质细胞特性相关的基因表达水平升高,这些基因的染色质可及性也逐渐增加。因此,在胎儿早期发育过程中,小胶质细胞朝着更成熟、具有免疫感应能力的表型发展,这可能导致怀孕早期正在发育的人类中枢神经系统容易受到环境干扰。小胶质细胞在人类胎儿发育过程中高表达吞噬相关基因,如AXL、APOE和CD68。此外,早期小胶质细胞中细胞周期(E2F2)、形态发生(SOX4/11)以及分化和染色质重塑(SPI1)^[103]相关的转录因子活性增加。而老年小胶质细胞中与其特性相关转录因子,例如ETS1/2、ELF1、ELK3和SPI1活性上调。这些结果表明,小胶质细胞在人类胎儿早期发育过程中具有高度异质性,并在妊娠中期成熟。这解释了正在发育的人类中枢神经系统在怀孕期间对环境扰动的敏感性,这些神经系统扰动可能对胎儿产生长期的影响^[108]。

2.5 单细胞测序应用于其他免疫细胞分化发育

尽管先天淋巴细胞(innate lymphoid cell, ILC)在成人中的关键作用越来越受到重视,但它们在早期人类胎儿中的发育过程以及分子特征仍然不清楚。CHEN等^[109]在单细胞水平详细描绘了8~12周的胎儿不同种类ILC细胞及其祖细胞亚群在肝脏、肺部、胸腺、脾脏、肠道和皮肤中随着发育进展的异质性分布,鉴定了IL-3RA作为人胎肝中T、B、ILC和髓系分化潜能的淋巴祖细胞标志物。发现IL-3RA⁺淋巴祖细胞具有向T、B、ILC和髓系谱系的多能分

化潜力,而IL-3RA⁻CD45⁺CD127⁺CD34⁺细胞主要定向分化为B谱系。通过对10~17 PCWs胎儿皮肤进行单细胞测序分析,发现*GATA3*和*RORA*可能是ILC早期分化的核心调控因子^[110],*RORA*、*IRF8*、*ID2*和*NR4A2*等因子调控其分化与成熟^[111]。妊娠中期时,*TOX2*、*JDP2*、*EGR4*、*NFIB*、*NFE2L2*和*MITF*等转录因子促进ILC特化及存活,而*TWIST2*则与ILC的抑制功能相关。*PPARα*在中期NK细胞中发挥重要作用,与Th2样细胞因子调节有关,提示其可驱动细胞分化并促进胎儿皮肤发育过程^[51]。这些发现阐明了具有显著时空异质性的人类胎儿ILC逐步形成过程的精确细胞和分子特征^[109]。

GU等^[112]通过整合不同阶段的胎儿小肠单细胞测序,发现迁移性DC在妊娠后期出现,表达免疫调节基因(*CD274*、*PDCD1LG2*和*CD200*)、Th2应答基因(*IL4R*、*IL411*、*CCL17*、*CCL22*和*BCL2L1*)以及激活标记(*CD80*、*CD83*和*CD86*)^[113-114]。成熟DC的存在支持了胎儿DC具备抗原呈递功能的观点。此外,在迁移性DC中观察到IL15及其受体IL2RG的高表达,表明IL-15在DC存活和CD8⁺CD44^{hi}T细胞记忆状态分化中发挥重要作用^[112]。胎儿和婴儿肠道中存在大量CCR7⁺DC,尤其是CD103⁺DC,这对MHC I类抗原的交叉呈递至关重要,该群DC可通过CCR7迁移到肠系膜淋巴结进行抗原呈递。其在胎儿肠道中的存在可能暗示胎儿发育早期活跃的抗原呈递和T细胞招募过程^[98]。

对天然免疫细胞的深入表征揭示了这些细胞在不同组织中的异质性分布、分化及发育调控因子。此外,这些研究还揭示了天然免疫细胞在胚胎组织发育中的关键作用,丰富了我们对胚胎免疫系统发挥功能机制的理解。

3 单细胞测序在胚胎免疫系统疾病中的应用

单细胞测序为研究胚胎免疫系统发育异常导致的疾病提供了全新的研究方法。通过细致解析胚胎免疫系统的发育过程,单细胞测序能够揭示免疫细胞在胚胎期的分化路径和调控网络,从而识别发育异常致病的关键基因和信号通路。这对于发现影响免疫细胞生成和功能的基因突变、结构异常及早期发育中的异常调控机制至关重要。此外,单细胞测序还可以揭示胚胎期免疫耐受机制的建立过程,

帮助我们理解免疫系统如何在早期发育中避免对自体组织的攻击,从而加深对自体免疫反应成因的认识。通过分析不同免疫细胞亚群在胚胎期的发育和功能差异,这项技术为胚胎免疫系统发育异常致病的细胞基础提供了重要信息,为开发新的诊断和治疗方法提供了理论依据。

人类造血干细胞具有很强的再生潜力,可以用于疾病治疗。在早期发育过程中,胎儿肝脏中的造血干细胞经历主动扩增,同时保持强大的植入能力,但负责其有效植入的潜在分子程序仍不清楚。VANUYTSEL等^[115]在单细胞转录和蛋白质水平上分析了胎儿HSC,以鉴定植入潜力细胞的详细分子特征。综合分析确定了CD201可以专门富集具有移植潜力的HSC标志物。这种对植入能力的全面多模式分析,将关键发育时间点的生物功能与潜在的分子驱动因素关联起来,为进一步探索保留造血干细胞离体植入潜力或在体外造血干细胞生成过程中诱导这种潜力奠定了基础。

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)和炎症性肠病IBD的发生与小肠免疫系统发育异常密切相关。GU等^[112]发现在NEC患者的小肠组织中,特定骨髓细胞群体(特别是NC slan⁺单核细胞)显著增多,而部分关键的巨噬细胞和迁移性树突状细胞则显著减少。此外,NEC组织中主要免疫分子MHC-II的表达下调,表明髓系细胞抗原呈递能力减弱。这一变化可能削弱记忆T细胞的生成和维持,导致CD4⁺和CD8⁺记忆T细胞比例显著下降。与此同时,NEC组织中的髓系细胞表现出增强的炎症特性,伴随大量炎症基因(如*IL1B*、*CXCL8*和*CSF3*)上调,反映了免疫系统异常激活的状态。NEC相关的记忆CD4⁺T细胞则与儿童和成人T细胞相似,呈现出NF-κB信号通路的活化状态,表明其处于高度炎症性环境中。此外,受体-配体分析显示,NEC样本中特定受体-配体(如NC slan⁺单核细胞的CD55/ICAM1与Treg细胞的ADGRE5)之间的相互作用增强,抑制了T细胞的调节功能,进而加剧了NEC组织中的免疫失衡^[112]。总体而言,NEC组织中髓系细胞和T细胞的数量、功能和相互作用发生了显著改变,表现出抗原呈递功能减弱、炎症因子丰富和调节功能失衡等特征。这些免疫特征可能是NEC组织炎症反应和组织损伤的关键驱动力,为理解其发病机制提供了新的线索。

尽管胎儿的免疫系统被认为具有耐受性, 早产儿仍可能罹患严重的肠道炎症, 包括 NEC。SCHREURS 等^[116]发现人类胎儿肠道中主要含有表达肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 CD4⁺CD69⁺效应记忆(T effector memory, Tem) T 细胞。这些 CD4⁺ T 表现出 Th1 表型及介导上皮生长和细胞周期的基因表达。类器官共培养实验显示, 胎儿肠道 CD4⁺ T 细胞通过 TNF- α 产生剂量依赖性效应: 少量 T 细胞促进上皮发育, 大量则抑制肠道干细胞(intestinal stem cell, ISC)的增殖。在患有 NEC 的早产儿的炎症肠道中, CD4⁺ Tem 细胞比例高于健康婴儿肠道, TNF 信号通路显著增强。这些发现揭示了一种独特的产生 TNF- α 的 CD4⁺ T 细胞亚群, 其在胎儿肠道中促进黏膜发育, 但在早产情况下也可能介导炎症反应^[116]。

维持母胎界面蜕膜免疫微环境的稳态对于胎盘与母体稳定连接和顺利妊娠至关重要。尽管已经鉴定出维持稳态的关键蜕膜免疫细胞亚群, 但对反复流产过程中人类蜕膜白细胞图谱和异质性的系统了解仍不清楚。GUO 等^[117]以单细胞分辨率分析了从复发性流产(recurrent pregnancy loss, RPL)患者和健康对照中分离出的 18 646 个蜕膜免疫细胞, 发现 RPL 患者中 NK 细胞发育异常, 维持胚胎生长的蜕膜 NK 细胞亚群减少, 而发挥促炎功能的 dNK 增加。RPL 患者体内促进体内平衡的巨噬细胞亚群减少, 该状态下巨噬细胞而不是 dNK 细胞更容易与 Th1 样 T 细胞相互作用。这些发现提供了对 RPL 蜕膜免疫微环境紊乱的更深入理解, 为改善该疾病的诊断和治疗提供了新的理论依据。

这些发现揭示了疾病状态下胚胎免疫细胞组分和分化调控的异常过程, 阐明了免疫系统发育异常导致胚胎疾病的分子机制, 为鉴定和治疗胚胎免疫系统相关疾病提供了新的理论依据和潜在治疗方案。

4 结论与展望

单细胞测序技术的应用为我们理解胚胎免疫系统的发育提供了前所未有的视角, 使研究者能够在单细胞水平上探究免疫细胞的生成、分化、功能及其在胚胎早期中的动态变化。通过这一技术, 我们得以细致地描绘胚胎免疫细胞谱系, 识别不同发育阶段的关键调控因子, 揭示免疫耐受机制的建立过程, 并阐明胚胎免疫细胞在不同生理条件下的多

样化表现。未来的研究可以依托单细胞测序技术, 对免疫系统相关疾病的发生机制进行更深入的剖析, 从而推动对先天免疫缺陷、自身免疫疾病及相关病理状态的认知。

随着多组学技术的整合应用, 单细胞测序不仅可以揭示转录水平的变化, 还可以与表观遗传学、蛋白质组学和代谢组学等数据相结合, 构建全方位的多组学数据图谱, 从而提供更丰富的生物学信息。例如, 通过单细胞 ATAC-seq, 我们可以探讨胚胎期免疫细胞的染色质状态及其基因调控网络, 而结合蛋白质组学数据, 可以进一步明确蛋白表达和细胞功能之间的关系。这些多层次的数据整合将帮助我们全面解析胚胎免疫细胞的调控机制, 识别疾病相关的分子标记, 并为药物靶点的发现奠定基础。

未来的研究还可以探索胚胎免疫系统与其他生理系统的互动关系, 如免疫系统与神经系统、循环系统和代谢系统的相互作用。胚胎期是多个生理系统共同发育、建立相互联系的重要时期, 未来单细胞测序可以帮助揭示这些系统如何协调彼此发育和功能, 避免免疫反应对胚胎自体组织的损伤。这种跨系统的研究将有助于我们理解胚胎发育中的免疫耐受、器官发育和稳态调控, 为疾病的多系统综合治疗提供理论依据。

在临床应用方面, 单细胞测序的进展为诊断和治疗与胚胎免疫系统相关的疾病带来了新的可能。未来的研究可能会将单细胞测序与人工智能和机器学习相结合, 通过对大量胚胎免疫细胞数据的分析, 开发疾病预测模型, 从而实现疾病的早期检测和干预。此外, 随着基因编辑技术的发展, 单细胞测序还可用于筛选治疗靶点, 并评估基因编辑的效果, 为个性化免疫治疗策略的设计提供数据支持。

此外, 肿瘤的发生过程与正常的胚胎发育密切相关, 许多肿瘤相关基因影响胚胎的正常分化^[118]。在早期的胚胎发育过程中, 胚胎细胞和肿瘤细胞在基因表达、增殖、分化及免疫逃逸等方面存在明显的相似性^[119-120]。研究表明, 肿瘤细胞与早期胚胎细胞在基因去甲基化、细胞增殖、自我更新和转化为未分化干细胞状态等方面具有共同特征^[119]。例如, 胎源性肿瘤标志物如甲胎蛋白在肿瘤和胚胎发育中都高度表达, 并与细胞的增殖和免疫逃逸机制相关^[121-122]。肿瘤与胚胎发育的相似性表明, 肿瘤细胞可能在胚胎微环境中发生转化, 参与正常组织分化。

因此,深入研究胚胎发育与肿瘤发生之间的相互作用,有助于揭示肿瘤的发生及免疫逃逸机制,寻找新的治疗策略。

总之,单细胞测序技术在胚胎免疫系统发育研究中的应用潜力巨大。随着技术的不断发展及其与多组学整合应用的深入,单细胞测序将为揭示胚胎免疫系统的分子机制、开发新型免疫治疗方案和推动包括恶性肿瘤等复杂疾病的研究提供广阔前景。

参考文献 (References)

- [1] HOSSAIN Z, REZA A, QASEM W A, et al. Development of the immune system in the human embryo [J]. *Pediatr Res*, 2022, 92(4): 951-5.
- [2] HUSSAIN T, MURTAZA G, KALHORO D H, et al. Understanding the immune system in fetal protection and maternal infections during pregnancy [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 7567708.
- [3] IVANOV S, RYBTSOV S, NG E S, et al. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish [J]. *Development*, 2017, 144(13): 2323-37.
- [4] PARK J E, JARDINE L, GOTTEGENS B, et al. Prenatal development of human immunity [J]. *Science*, 2020, 368(6491): 600-3.
- [5] FEYAERTS D, URBSCHAT C, GAUDILLIERE B, et al. Establishment of tissue-resident immune populations in the fetus [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(6): 747-66.
- [6] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-82.
- [7] SHAFFER S M, DUNAGIN M C, TORBORG S R, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance [J]. *Nature*, 2017, 546(7658): 431-5.
- [8] CHAVKIN N W, HIRSCHI K K. Single cell analysis in vascular biology [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 42.
- [9] LAFZI A, MOUTINHO C, PICELLI S, et al. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies [J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(12): 2742-57.
- [10] PICELLI S, BJORKLUND A K, FARIDANI O R, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(11): 1096-8.
- [11] FAN X, ZHANG X, WU X, et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos [J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 148.
- [12] SHENG K, CAO W, NIU Y, et al. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(3): 267-70.
- [13] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1202-14.
- [14] GIERAHN T M, WADSWORTH M H, 2ND, HUGHES T K, et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(4): 395-8.
- [15] ZHENG G X, TERRY J M, BELGRADER P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14049.
- [16] HABIB N, AVRAHAM-DAVIDI I, BASU A, et al. Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(10): 955-8.
- [17] ISLAM S, KJALLQUIST U, MOLINER A, et al. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(5): 813-28.
- [18] SHUM E Y, WALCZAK E M, CHANG C, et al. Quantitation of mRNA transcripts and proteins using the BD rhapsody single-cell analysis system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1129: 63-79.
- [19] GOLDSTEIN L D, CHEN Y J, DUNNE J, et al. Massively parallel nanowell-based single-cell gene expression profiling [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 519.
- [20] CAO J, PACKER J S, RAMANI V, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism [J]. *Science*, 2017, 357(6352): 661-7.
- [21] ROSENBERG A B, ROCO C M, MUSCAT R A, et al. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding [J]. *Science*, 2018, 360(6385): 176-82.
- [22] HAN X, WANG R, ZHOU Y, et al. Mapping the mouse cell atlas by Microwell-seq [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1091-107, e17.
- [23] CHEN A, LIAO S, CHENG M, et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1777-92, e21.
- [24] XIA C, FAN J, EMANUEL G, et al. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(39): 19490-9.
- [25] SU J H, ZHENG P, KINROT S S, et al. Genome-scale imaging of the 3D organization and transcriptional activity of chromatin [J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1641-59, e26.
- [26] HE S, BHATT R, BROWN C, et al. High-plex imaging of RNA and proteins at subcellular resolution in fixed tissue by spatial molecular imaging [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(12): 1794-806.
- [27] LIU J, TRAN V, VEMURI V N P, et al. Concordance of MERFISH spatial transcriptomics with bulk and single-cell RNA sequencing [J]. *Life Sci Alliance*, 2023, 6(1): e202201701.
- [28] JANESICK A, SHELANSKY R, GOTTSCHO A D, et al. High resolution mapping of the tumor microenvironment using integrated single-cell, spatial and in situ analysis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8353.
- [29] TAVIAN M, HALLAIS M F, PEAULT B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo [J]. *Development*, 1999, 126(4): 793-803.
- [30] IVANOV S, RYBTSOV S, WELCH L, et al. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(12): 2417-27.
- [31] BOISSET J C, CLAPES T, KLAUS A, et al. Progressive maturation toward hematopoietic stem cells in the mouse embryo aorta [J]. *Blood*, 2015, 125(3): 465-9.
- [32] HADLAND B K, VARNUM-FINNEY B, POULOS M G, et al. Endothelium and NOTCH specify and amplify aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 2032-45.
- [33] IVANOV S, RYBTSOV S, ANDERSON R A, et al. Vast self-renewal potential of human AGM region HSCs dramatically declines in the umbilical cord blood [J]. *Stem Cell Rep*, 2020, 15(4): 811-6.

- [34] GHOSN E, YOSHIMOTO M, NAKAUCHI H, et al. Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis and the origins of innate-like B lymphocytes [J]. *Development*, 2019, 146(15): dev170571.
- [35] PALIS J. Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(22): 3965-74.
- [36] SOARES-DA-SILVA F, FREYER L, ELSAID R, et al. Yolk sac, but not hematopoietic stem cell-derived progenitors, sustain erythropoiesis throughout murine embryonic life [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(4): e20201729.
- [37] GOMEZ PERDIGUERO E, KLAPPROTH K, SCHULZ C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors [J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 547-51.
- [38] GINHOUX F, GRETER M, LEBOEUF M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages [J]. *Science*, 2010, 330(6005): 841-5.
- [39] BIAN Z, GONG Y, HUANG T, et al. Deciphering human macrophage development at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2020, 582(7813): 571-6.
- [40] ZENG Y, LIU C, GONG Y, et al. Single-cell RNA sequencing resolves spatiotemporal development of pre-thymic lymphoid progenitors and thymus organogenesis in human embryos [J]. *Immunity*, 2019, 51(5): 930-48.e6.
- [41] ZHOU F, LI X, WANG W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 487-92.
- [42] GEKAS C, DIETERLEN-LIEVRE F, ORKIN S H, et al. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(3): 365-75.
- [43] LI Z, LAN Y, HE W, et al. Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 663-75.
- [44] ROBIN C, BOLLEROT K, MENDES S, et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(4): 385-95.
- [45] GOH I, BOTTING R A, ROSE A, et al. Yolk sac cell atlas reveals multiorgan functions during human early development [J]. *Science*, 2023, 381(6659): eadd7564.
- [46] FROBEL J, LANDSPERSKY T, PERCIN G, et al. The hematopoietic bone marrow niche ecosystem [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 705410.
- [47] CROSSE E I, GORDON-KEYLOCK S, RYBTSOV S, et al. Multi-layered spatial transcriptomics identify secretory factors promoting human hematopoietic stem cell development [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(5): 822-39.e8.
- [48] ZENG Y, HE J, BAI Z, et al. Tracing the first hematopoietic stem cell generation in human embryo by single-cell RNA sequencing [J]. *Cell Res*, 2019, 29(11): 881-94.
- [49] STURGEON C M, DITADI A, AWONG G, et al. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 554-61.
- [50] CALVANESE V, CAPELLERA-GARCIA S, MA F, et al. Mapping human haematopoietic stem cells from haemogenic endoderm to birth [J]. *Nature*, 2022, 604(7906): 534-40.
- [51] XU Y, ZHANG J, HU Y, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals the dynamics of human immune cells during early fetal skin development [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(6): 109524.
- [52] LI Y, KONG W, YANG W, et al. Single-cell analysis of neonatal HSC ontogeny reveals gradual and uncoordinated transcriptional reprogramming that begins before birth [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(5): 732-47.e7.
- [53] ZHENG Z, HE H, TANG X T, et al. Uncovering the emergence of HSCs in the human fetal bone marrow by single-cell RNA-seq analysis [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(11): 1562-79.e7.
- [54] XIE X, GOU F, ZHENG Z, et al. Decoding human bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells from fetal to birth [J]. *iScience*, 2024, 27(8): 110445.
- [55] ZHAO C, XIU Y, ASHTON J, et al. Noncanonical NF-kappaB signaling regulates hematopoietic stem cell self-renewal and microenvironment interactions [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4): 709-18.
- [56] ESPIN-PALAZON R, TRAVER D. The NF-kappaB family: key players during embryonic development and HSC emergence [J]. *Exp Hematol*, 2016, 44(7): 519-27.
- [57] SOMMARIN M N E, OLOFZON R, PALO S, et al. Single-cell multiomics of human fetal hematopoiesis define a developmental-specific population and a fetal signature [J]. *Blood Adv*, 2023, 7(18): 5325-40.
- [58] FARLEY A M, MORRIS L X, VROEGINDEWEIJ E, et al. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development [J]. *Development*, 2013, 140(9): 2015-26.
- [59] VARGA I, POSPISILOVA V, JABLONSKA-MESTANOVA V, et al. The thymus: picture review of human thymus prenatal development [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2011, 112(7): 368-76.
- [60] HAYNES B F, HEINLY C S. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(4): 1445-58.
- [61] PARK J E, BOTTING R A, DOMINGUEZ CONDE C, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation [J]. *Science*, 2020, 367(6480): eaay3224.
- [62] HAYNES B F, MARTIN M E, KAY H H, et al. Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues [J]. *J Exp Med*, 1988, 168(3): 1061-80.
- [63] LOBACH D F, HAYNES B F. Ontogeny of the human thymus during fetal development [J]. *J Clin Immunol*, 1987, 7(2): 81-97.
- [64] FOSTER K, SHERIDAN J, VEIGA-FERNANDES H, et al. Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3183-9.
- [65] GRIFFITH A V, CARDENAS K, CARTER C, et al. Increased thymus- and decreased parathyroid-fated organ domains in *Splotch* mutant embryos [J]. *Dev Biol*, 2009, 327(1): 216-27.
- [66] KOHN L A, HAO Q L, SASIDHARAN R, et al. Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(10): 963-71.
- [67] TAVIAN M, ROBIN C, COULOMBEL L, et al. The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm [J]. *Immunity*, 2001, 15(3): 487-95.

- [68] YOKOTA T, HUANG J, TAVIAN M, et al. Tracing the first waves of lymphopoiesis in mice [J]. *Development*, 2006, 133(10): 2041-51.
- [69] YOSHIMOTO M, PORAYETTE P, GLOSSON N L, et al. Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence [J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5706-14.
- [70] KERNFELD E M, GENGA R M J, NEHERIN K, et al. A single-cell transcriptomic atlas of thymus organogenesis resolves cell types and developmental maturation [J]. *Immunity*, 2018, 48(6): 1258-70.e6.
- [71] BORNSTEIN C, NEVO S, GILADI A, et al. Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells [J]. *Nature*, 2018, 559(7715): 622-6.
- [72] MILLER C N, PROEKT I, VON MOLTKE J, et al. Thymic tuft cells promote an IL-4-enriched medulla and shape thymocyte development [J]. *Nature*, 2018, 559(7715): 627-31.
- [73] MESTAS J, HUGHES C C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 2731-8.
- [74] KUMAR B V, CONNORS T J, FARBER D L. Human T cell development, localization, and function throughout life [J]. *Immunity*, 2018, 48(2): 202-13.
- [75] DIK W A, PIKE-OVERZET K, WEERKAMP F, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(11): 1715-23.
- [76] TOKUNAGA T, HAYASHI A, KADOTA Y, et al. Regulation of Th-POK and Runx3 in T cell development in human thymoma [J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(8): 653-60.
- [77] KUO Y H, GERSTEIN R M, CASTILLA L H. Cbfbeta-SMMHC impairs differentiation of common lymphoid progenitors and reveals an essential role for RUNX in early B-cell development [J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1543-51.
- [78] LI N, VAN UNEN V, ABDELAAL T, et al. Memory CD4⁺ T cells are generated in the human fetal intestine [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(3): 301-12.
- [79] DHARIWALA M O, KARTHIKEYAN D, VASQUEZ K S, et al. Developing human skin contains lymphocytes demonstrating a memory signature [J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1(8): 100132.
- [80] REITERMAIER R, KRAUSGRUBER T, FORTELYN N, et al. $\alpha\beta\gamma\delta$ T cells play a vital role in fetal human skin development and immunity [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(4): e20201189.
- [81] HERZENBERG L A, TUNG J W. B cell lineages: documented at last [J]! *Nat Immunol*, 2006, 7(3): 225-6.
- [82] TUNG J W, MRAZEK M D, YANG Y, et al. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(16): 6293-8.
- [83] NAMIKAWA R, MIZUNO T, MATSUOKA H, et al. Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen [J]. *Immunology*, 1986, 57(1): 61-9.
- [84] HOFMAN F M, DANILOVS J, HUSMANN L, et al. Ontogeny of B cell markers in the human fetal liver [J]. *J Immunol*, 1984, 133(3): 1197-201.
- [85] BOFILL M, JANOSSY G, JANOSSA M, et al. Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus [J]. *J Immunol*, 1985, 134(3): 1531-8.
- [86] TUCCI A, MOUZAKI A, JAMES H, et al. Are cord blood B cells functionally mature [J]? *Clin Exp Immunol*, 1991, 84(3): 389-94.
- [87] RANZONI A M, TANGHERLONI A, BEREST I, et al. Integrative single-cell RNA-seq and ATAC-seq analysis of human developmental hematopoiesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(3): 472-87.e7.
- [88] BENDALL S C, DAVIS K L, AMIR EL A D, et al. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development [J]. *Cell*, 2014, 157(3): 714-25.
- [89] BURROWS N, BASHFORD-ROGERS R J M, BHUTE V J, et al. Dynamic regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha activity is essential for normal B cell development [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1408-20.
- [90] BACCIN C, AL-SABAH J, VELTEN L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(1): 38-48.
- [91] DOMINGUEZ CONDE C, XU C, JARVIS L B, et al. Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans [J]. *Science*, 2022, 376(6594): eab15197.
- [92] BARNES J L, YOSHIDA M, HE P, et al. Early human lung immune cell development and its role in epithelial cell fate [J]. *Sci Immunol*, 2023, 8(90): eadf9988.
- [93] LI A, DUBEY S, VARNEY M L, et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis [J]. *J Immunol*, 2003, 170(6): 3369-76.
- [94] SAINSON R C, JOHNSTON D A, CHU H C, et al. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype [J]. *Blood*, 2008, 111(10): 4997-5007.
- [95] SCHLEGEL P M, STEIERT I, KOTTER I, et al. B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82580.
- [96] ETTINGER R, SIMS G P, FAIRHURST A M, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells [J]. *J Immunol*, 2005, 175(12): 7867-79.
- [97] ARKATKAR T, DU S W, JACOBS H M, et al. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(11): 3207-17.
- [98] STRAS S F, WERNER L, TOOTHAKER J M, et al. Maturation of the human intestinal immune system occurs early in fetal development [J]. *Dev Cell*, 2019, 51(3): 357-73.e5.
- [99] MASS E, NIMMERJAHN F, KIERDORF K, et al. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(9): 563-79.
- [100] JENKINS S J, ALLEN J E. The expanding world of tissue-resident macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(8): 1882-96.
- [101] YONA S, KIM K W, WOLF Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 79-91.
- [102] MCGRATH K E, FRAME J M, FEGAN K H, et al. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo [J]. *Cell*

- Rep, 2015, 11(12): 1892-904.
- [103] DICK S A, WONG A, HAMIDZADA H, et al. Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(67): eabf7777.
- [104] PESCHLE C, MAVILIO F, CARE A, et al. Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of $\zeta \rightarrow \alpha$ and $\epsilon \rightarrow \gamma$ -globin switches in primitive and definite erythropoietic lineage [J]. *Nature*, 1985, 313(5999): 235-8.
- [105] LEE C Z W, KOZAKI T, GINHOUX F. Studying tissue macrophages in vitro: are iPSC-derived cells the answer [J]? *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(11): 716-25.
- [106] WANG Z, WU Z, WANG H, et al. An immune cell atlas reveals the dynamics of human macrophage specification during prenatal development [J]. *Cell*, 2023, 186(20): 4454-71, e19.
- [107] MUNERA J O, KECHELE D O, BOUFFI C, et al. Development of functional resident macrophages in human pluripotent stem cell-derived colonic organoids and human fetal colon [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(11): 1434-51, e9.
- [108] KRACHT L, BORGGREWE M, ESKANDAR S, et al. Human fetal microglia acquire homeostatic immune-sensing properties early in development [J]. *Science*, 2020, 369(6503): 530-7.
- [109] LIU C, GONG Y, ZHANG H, et al. Delineating spatiotemporal and hierarchical development of human fetal innate lymphoid cells [J]. *Cell Res*, 2021, 31(10): 1106-22.
- [110] YUDANIN N A, SCHMITZ F, FLAMAR A L, et al. Spatial and temporal mapping of human innate lymphoid cells reveals elements of tissue specificity [J]. *Immunity*, 2019, 50(2): 505-19, e4.
- [111] MACE E M, BIGLEY V, GUNESCH J T, et al. Biallelic mutations in IRF8 impair human NK cell maturation and function [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 306-20.
- [112] GU W, EKE C, GONZALEZ SANTIAGO E, et al. Single-cell atlas of the small intestine throughout the human lifespan demonstrates unique features of fetal immune cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2024, 17(4): 599-617.
- [113] MCGOVERN N, SHIN A, LOW G, et al. Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2 [J]. *Nature*, 2017, 546(7660): 662-6.
- [114] MAIER B, LEADER A M, CHEN S T, et al. A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity [J]. *Nature*, 2020, 580(7802): 257-62.
- [115] VANUYTSEL K, VILLACORTA-MARTIN C, LINDSTROM-VAUTRIN J, et al. Multi-modal profiling of human fetal liver hematopoietic stem cells reveals the molecular signature of engraftment [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1103.
- [116] SCHREURS R, BAUMDICK M E, SAGEBIEL A F, et al. Human fetal TNF-alpha-cytokine-producing CD4⁺ effector memory T cells promote intestinal development and mediate inflammation early in life [J]. *Immunity*, 2019, 50(2): 462-76, e8.
- [117] GUO C, CAI P, JIN L, et al. Single-cell profiling of the human decidual immune microenvironment in patients with recurrent pregnancy loss [J]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 1.
- [118] MANZO G. Similarities between embryo development and cancer process suggest new strategies for research and therapy of tumors: a new point of view [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 20.
- [119] KELLEHER F C, FENNELLY D, RAFFERTY M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer [J]. *Acta Oncol*, 2006, 45(4): 375-88.
- [120] MA Y, ZHANG P, WANG F, et al. The relationship between early embryo development and tumorigenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(12): 2697-701.
- [121] WANG X, WANG Q. Alpha-Fetoprotein and hepatocellular carcinoma immunity [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 2018: 9049252.
- [122] WANG S, ZHU M, WANG Q, et al. Alpha-fetoprotein inhibits autophagy to promote malignant behaviour in hepatocellular carcinoma cells by activating PI3K/AKT/mTOR signalling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1027.