

单细胞转录组测序技术在肝纤维化中的研究进展

万令飞, 潘文婷, 雍雨婷, 李元帅, 赵悦, 阎新龙*

北京工业大学化学与生命科学学院, 北京 100124

摘要: 肝纤维化是一种严重威胁人类健康的疾病, 单细胞转录组测序技术为揭示其复杂的病理机制提供了全新途径。传统的研究方法在识别肝纤维化中不同细胞亚群及其基因表达变化方面存在局限, 难以深入理解疾病机制。概述了单细胞转录组测序技术在肝纤维化过程中对不同细胞亚群类型的研究进展, 单细胞 RNA 测序技术能够精确地解析不同细胞类型的基因表达及异质性, 揭示肝纤维化过程中细胞亚群的动态变化及相关基因的表达, 进而有助于理解各类细胞亚型在肝纤维化中的功能、相互作用及其对疾病进展的贡献。进一步探讨了该技术在肝纤维化研究中的重要意义与应用前景, 通过这一技术, 可以鉴定出与纤维化相关的关键基因和信号通路, 为早期诊断、治疗靶点的发现以及新疗法的制定提供理论依据。此外, 结合空间转录组测序技术, 研究者可以在空间维度上观察细胞在组织中的分布, 进一步提升对肝纤维化微环境的理解。该技术有助于深入理解肝纤维化的病理机制, 为寻找新的治疗靶点和制定早期诊断及治疗策略提供了创新思路。

关键词: 肝纤维化; 单细胞测序; 空间转录组; 纤维化机制; 细胞相互作用

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0078

中图分类号: Q789, R322.4+7

文献标志码: A

Research Progress of Single-cell Transcriptome Sequencing Technology in Liver Fibrosis

WAN Lingfei, PAN Wenting, YONG Yuting, LI Yuanshuai, ZHAO Yue, YAN Xinlong*

College of Chemistry and Life Science, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract: Hepatic fibrosis poses a significant threat to human health. Single-cell transcriptome sequencing technology offers a novel approach to elucidate its complex pathological mechanisms. Traditional research methods are limited in identifying the different cell subpopulations and their gene expression changes in hepatic fibrosis, making it difficult to fully understand the disease mechanisms. This paper summarized the research progress of single-cell transcriptome sequencing technology in identifying various cell subtypes during the process of hepatic fibrosis. Single-cell RNA sequencing technology can precisely analyze the gene expression and heterogeneity of different cell types, revealing the dynamic changes in cell subpopulations and their gene expression during hepatic fibrosis. This, in turn, helped in understanding the functions, interactions, and contributions of various cell subtypes to the progression of the disease. The paper further discussed the significance and prospects of this technology in hepatic fibrosis research. By using this technology, key genes and signaling pathways related to fibrosis can be identified, providing a theoretical basis for early diagnosis, the discovery of therapeutic targets, and the development of new treatments. Additionally, with the integration of spatial transcriptome sequencing technology, researchers can observe the spatial distribution of cells within tissues, further enhancing the understanding of the microenvironment of hepatic fibrosis. This technology aids in deepening the understanding of the pathological mechanisms of hepatic fibrosis and offers innovative ideas for discovering new therapeutic targets and developing strategies for early diagnosis and treatment.

Key words: liver fibrosis; single-cell sequencing; spatial transcriptomics; fibrosis mechanisms; cell-cell interactions

收稿日期: 2024-04-11; 接受日期: 2024-07-02

基金项目: 北京市自然科学基金和市教委基金联合基金重点项目(KZ202210005010); 中国博士后科学基金(2023M740168); 北京市博士后科研活动基金(2023-22-23)

联系方式: 万令飞 E-mail: wan-lingfei@outlook.com; *通信作者 阎新龙 E-mail: Yxlong2000@bjut.edu.cn

肝纤维化是由于肝脏长期炎症导致的渐进性纤维化发展导致的肝脏疾病。目前临床上面临的重大挑战是如何在早期发现和干预肝纤维化以阻止病程的进展。本综述重点介绍了单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中的进展和潜在应用,以期揭示单细胞尺度基因表达的变化,并寻找新的治疗靶点,为该疾病的早期诊断和治疗提供新的策略。单细胞 RNA 测序能够在单细胞尺度获得不同类型细胞的详细信息,包括肝细胞、肝星状细胞、肝内免疫细胞等,揭示肝纤维化过程中细胞类型和亚群的变化,纤维化相关的基因表达变化,不同细胞类型在肝纤维化中的功能和相互作用。根据这些发现,有望为肝纤维化治疗提供新的理论基础,从而寻找新的治疗靶点。

1 肝纤维化简述

当肝脏发生组织受损、酒精或药物损伤、免疫性疾病或自身代谢疾病、受到病毒感染时,往往伴随着肝纤维化的发生。肝纤维化是肝脏组织面对损伤时的一种保护机制,当组织受到损伤时,肝星状细胞激活为肌成纤维细胞,分泌炎症因子以及合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM),这些变化共同参与修复应对肝损伤。如果引发损伤的因素得到及时终止或移除,肝纤维化的部分可以恢复为正常肝脏组织^[1-5]。但如果损伤较为严重或持续反复发作时,ECM成分(主要为胶原蛋白与纤连蛋白)会持续过度累积,导致组织结构破坏,器官功能障碍甚至衰竭,有可能发展为肝硬化甚至肝癌^[6-8]。

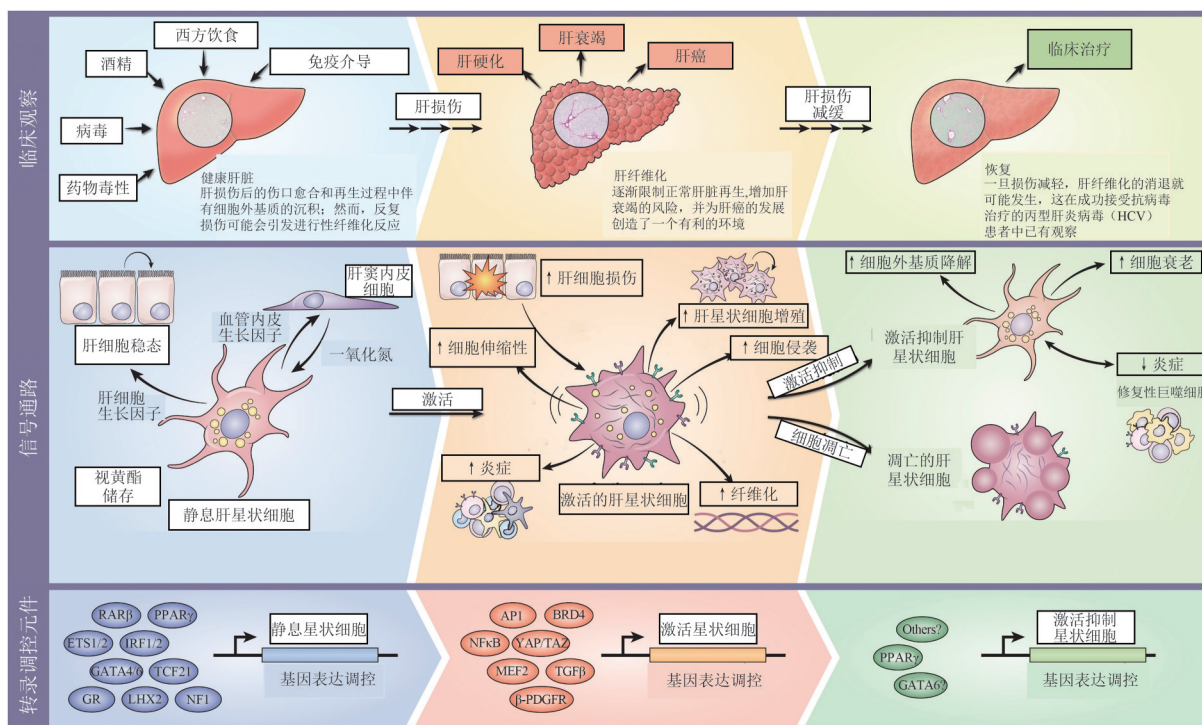


图1 肝纤维化病理示意图^[8]

Fig. 1 Liver fibrosis pathological diagram^[8]

肝纤维化的发展导致肝功能持续性受损,主要包括肝小叶结构的扭曲和破坏、血管分布的紊乱,以及肝细胞的坏死。这些改变会导致肝功能衰竭,影响身体的代谢、解毒以及免疫功能。早期研究认为肝纤维化是不可逆的^[9],但随着研究的深入,在小鼠肝纤维化模型以及一项针对乙型肝炎

炎患者的抗病毒治疗研究中发现,纤维化程度有所改善甚至恢复^[10],但可惜的是目前对于肝硬化晚期的患者,仍然缺乏有效的肝纤维化治疗手段,肝移植可能是唯一的治疗选择。因此,如何早期发现和干预肝纤维化,有效避免进一步的肝功能损伤和严重的并发症,成为亟待解决的关键问题。

此外,肝纤维化也是肝癌发展的重要因素之一。慢性炎症和纤维化的存在增加了肝癌的发生风险。通过了解和干预肝纤维化过程,可以降低肝癌的发生率。在最新的研究中,许多新的生物标志物和成像技术被用于评估肝纤维化的程度和进展。例如,临床上将血清标志物,如AST和血小板比率指数(aspartate aminotransferase to platelet ratio index, APRI)评分、肝纤维化4因子指数(fibrosis 4 score, FIB-4)、血清胶原蛋白、血清透明质酸、层黏连蛋白等作为非侵入性的指标用于评估肝纤维化的程度。此外,磁共振成像、超声瞬时弹性成像(transient elastography, TE)和血流动力学成像等技术也被广泛用于评估肝脏的纤维化程度。在治疗方面,药物治疗仍然是目前主要的治疗方法。临床上常用的抗纤维化药物包括肝素、非甾体抗炎药物和抗氧化剂等,一些中药方剂如安络化纤丸、复方鳖甲软肝片、扶正化瘀片,在动物实验和临床研究中均显示一定的抗纤维化作用^[11-14]。此外,近年来一些新的靶向治疗药物也显示出了一定的疗效,如法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)激动剂^[15]、奥达夫明(aldafermin,又名NGM282,一种成纤维细胞生长因子19类似物)、西尼昔洛韦(ceniviviroc, C-C趋化因子受体2/5拮抗剂)等。然而,这些治疗方法仍然存在一些限制,如副作用较大、疗效不稳定等,仍需进一步的研究和临床验证,以确定其安全性、有效性和长期疗效。

综上所述,肝纤维化是一种严重的肝脏疾病,对全球公共卫生和个体健康有重要的影响。利用单细胞RNA测序深入了解肝纤维化的病理生理过程,研究肝纤维化的机制和相关信号通路,有助于发现新的治疗靶点和开发有效药物,从而为肝纤维化的治疗提供指导,对于预防、早期诊断和治疗肝纤维化以及相关并发症具有重要的意义。

2 单细胞转录组测序技术的原理和方法

与传统研究方法相比,单细胞转录组测序技术能够以更高的分辨率揭示细胞内的异质性和功能差异,从而更全面地理解肝纤维化疾病发展过程中微环境的变化^[18-20]。这种技术的应用不仅能够帮助我们更深入地理解肝纤维化的发展过程,还为未来的研究提供了更为精准和全面的数据基

础。单细胞转录组测序技术的核心流程涵盖了单细胞样本的采集和处理、RNA测序和文库构建、高通量测序,以及随后的下游数据分析。这一技术最显著的优势在于其在单个细胞水平上的高分辨率,因此能够探测并鉴定新的细胞类型,揭示细胞的状态和功能,发现新的细胞亚型和转录变异。通过识别个体细胞之间的差异,单细胞转录组测序技术为精准医学奠定了基础,为疾病的诊断、治疗以及药物研发提供了更为精确的指导^[21-22]。其独特之处在于能够深入挖掘细胞层面的信息,为科学研究和医学实践提供了前所未有的细致洞察,为未来的生物医学研究和临床应用开辟了崭新的可能性。

2.1 单细胞样本的获取和处理

获取和处理单细胞样本是进行单细胞转录组测序的关键步骤,直接影响下游数据分析的可靠性。一般而言,常规的单细胞样本获取和处理流程包括细胞分离、单细胞捕获、RNA提取以及cDNA文库构建。

细胞分离的具体方法因样本来源和研究目的而异,常用策略包括机械分散、酶消化、化学溶解和离心等。对于血液等免疫细胞本身即为单个细胞的样本,可通过离心等方式直接富集,或者通过流式细胞术有选择地富集特定细胞类型,以供后续文库构建和测序。而对于实质器官组织如肝脏,通常需使用胶原酶等组织裂解液,在酶解后通过筛网分离获得单个细胞悬浮液,为后续流程提供样本。确保细胞完整性和细胞膜的完整性对后续的RNA提取和测序质量至关重要。因此,需要在实验条件方面严格控制,并对单细胞样本进行质控和验证。利用细胞计数仪准确计算细胞数目,进行RNA质量检测以及扩增效率的评估,这些步骤都是不可或缺的。这样的质控流程能够确保获得高质量的单细胞转录组测序数据,为后续的深入分析提供可靠的基础。

2.2 RNA测序和数据分析

在单细胞测序过程中,首先需要对提取的RNA进行逆转录,将RNA转录成互补DNA(cDNA)。这一步骤通常涉及逆转录酶的使用,结合随机引物或特定引物,以合成第一链cDNA。随后,对单个细胞的cDNA进行预扩增和文库构建,以便为后续的测序提供充分准备。这一过程包括将cDNA片段连接到特定的测序接头上,以便在高通

量测序平台,如Illumina或其他测序平台上进行测序。构建好文库后进行高通量测序,通过生成大量短序列来记录单个细胞的转录组信息^[23]。

得到下机数据文件后,就可以对其利用的生物信息学数据分析方法进行数据处理,分析流程包括以下步骤。①质控(quality control),对测序数据进行质量控制,包括检查测序质量、序列长度和碱基质量。这有助于确定数据的可靠性,并且可以筛除低质量的序列。②比对(alignment),将测序读取与参考基因组或转录组进行比对。这可以确定每个读取的起源和定位,以便后续的基因表达定量和分析。③基因表达定量(gene expression quantification),通过将测序读取映射到参考基因组或转录组,计算每个基因的表达量。这可以得到每个细胞中基因的表达水平,用于后续的细胞聚类和分析。④标准化(normalization),对基因表达数据进行标准化,以消除不同细胞之间的技术偏差和批次效应。常用的标准化方法包括每千个碱基的转录每百万映射的转录本数(transcripts per million, TPM)和每千个碱基的转录每百万映射读取的读长数(fragments per kilobase of exon model per million mapped reads, FPKM)等。⑤细胞聚类与降维(cell clustering and dimensionality reduction),使用聚类算法(如k-means、DBSCAN等)将细胞根据基因表达模式进行聚类,并使用降维方法,如主成分分析(principal component analysis, PCA)、t-SNE、uMAP等,将高维数据可视化为二维或三维图形,以揭示细胞的异质性和亚群分布。⑥差异表达基因分析(differential expression gene analysis, DEGA),通过比较不同细胞群体之间的基因表达水平,鉴定差异表达的基因。这有助于理解细胞类型的特征和功能。⑦功能注释和通路分析(functional annotation and pathway analysis)对差异表达的基因进行功能注释,鉴定关键的生物学通路和功能模块。这有助于理解细胞状态和功能的调控机制。

以上只是单细胞RNA测序中RNA测序和数据分析的一般流程,具体的方法和工具选择可能会根据研究目的和数据特点而有所不同。随着该领域的不断发展,也涌现出了许多专门用于单细胞转录组数据分析的软件和工具,如Seurat^[24]、Scanpy^[25]、CellRanger^[26]、Monocle^[27]等,它们提供了丰富的功能和算法,以支持单细胞数据分析。

3 单细胞RNA测序鉴定肝纤维化微环境细胞类型与分类

3.1 肝星状细胞

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏中的重要细胞类型,主要分布于肝小叶的腔隙间质。在正常情况下,肝星状细胞保持静止状态(quiescent HSCs, qHSCs),表达desmin和卵磷脂视黄醇酰基转移酶(lecithin retinol acyltransferase, LRAT),具有储存维生素A和其他脂溶性物质的功能^[28-29]。然而,当肝脏受到损伤时,肝星状细胞被激活,迁移至损伤部位,并转化为表达平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和胶原蛋白的肌成纤维细胞^[30-31]。这一转变导致激活的肝星状细胞开始产生胶原蛋白和其他胶原样基质蛋白,从而促使肝组织中纤维化的形成。

通过单细胞RNA测序的研究,发现肝纤维化的肌成纤维细胞中,有62%~67%来源于特异表达Tcf21⁺qHSCs亚群的激活,同时85%的癌相关成纤维细胞也来源于这个亚群^[32]。此外,另一项研究通过CCl₄诱导肝纤维化小鼠的单细胞测序结果显示,静息状态的HSCs相对保守,而肌成纤维细胞分为4个亚群,分别是高表达平滑肌肌动蛋白以及胶原蛋白的MFB I,表达炎症相关基因的MFB II,由增殖的成纤维细胞构成的MFB III和混合表型的MFB IV^[33]。在肝损伤的刺激下,HSCs减少LRAT的表达,进而转化为高表达 α -SMA的肌成纤维细胞^[34]。另外,通过深入研究HSCs的特性和功能,可以更好地理解肝脏纤维化的机制。研究者利用单细胞RNA测序解析出小鼠NASH肝脏富集了4个不同的HSC簇,其中一个代表经典的活化肌成纤维细胞簇,其他3个HSC簇包括一个增殖相关簇、一个中间激活状态簇以及一个免疫炎症相关簇^[35]。然而,对于HSCs的研究仍面临一些挑战,包括分离和纯化方法的改进,以及HSCs与其他细胞类型相互作用机制的深入揭示。

总之,肝星状细胞作为肝脏纤维化的关键细胞类型,在激活和转化为肌成纤维细胞过程中扮演着重要角色。未来的研究应该持续深入探究HSCs的来源、功能和调控机制,为肝脏纤维化的治疗和预防提供更有效的策略。

3.2 门静脉成纤维细胞

门静脉成纤维细胞(portal fibroblasts, PFs)在肝脏纤维化中与肝星状细胞类似,是肌成纤维细胞的主要来源,负责产生关键的结缔组织成分,特别是胶原蛋白。研究人员通过单细胞RNA测序技术对肝纤维化患者的门静脉成纤维细胞进行详细分析,揭示了其特殊的功能和表达特征。

在研究中发现,门静脉成纤维细胞不仅具有肌成纤维细胞的功能,还表现出间充质干细胞的特征。这种双重身份使得它们在肝纤维化的微环境中具有更广泛的影响。具体而言,门静脉成纤维细胞的增殖能力使其能够响应肝脏损伤,并迅速转化为肌成纤维细胞,进一步推动了纤维化的进程。有趣的是,通过对小鼠肝脏的研究,研究者成功地鉴定出Slit2⁺门静脉间充质细胞(portal mesenchymal cell, PMSC)。这一亚群不仅具备间充质干细胞的特性,而且表现出生成增殖性肌成纤维细胞的潜能^[36]。这个新的发现拓展了我们对门静脉成纤维细胞异质性的认识,进一步强调了它们在纤维化过程中的复杂作用。此外,通过对比HSCs与PFs之间的差异基因表达特征,研究人员发现一氧化氮受体可溶性鸟苷酸环化酶仅在HSCs中特异性表达,而PFs则不表达。谱系追踪数据和单细胞RNA测序分析进一步显示,对于胆汁淤积性肝损伤过程,活化并经历显著扩增的PFs是胶原沉积的主要来源,而HSCs对过度胶原沉积的贡献较小。这突显了门静脉成纤维细胞在不同类型肝损伤中的动态响应和不同贡献。尽管已经取得了一些重要的发现,门静脉成纤维细胞的研究仍面临一些挑战。细胞分离和纯化方法的改进仍然是一个关键问题,解决该问题可以确保从混合群体中准确获取门静脉成纤维细胞并保持其特性的完整。此外,进一步阐明与其他细胞类型的相互作用机制也是未来研究的重要方向。

综上所述,门静脉成纤维细胞在肝脏纤维化中的复杂性与其间充质干细胞特性相结合,使其成为肝脏损伤响应中不可或缺的关键参与者。深入研究门静脉成纤维细胞的特性和功能将有助于更全面地理解肝脏纤维化的机制,为预防和治疗提供新的策略。

3.3 上皮细胞

在过去的研究中,有广泛的观点认为在组织

纤维化的演变过程中,上皮细胞可能通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)成为肌成纤维细胞的一个潜在来源^[37-38],然而,最近的研究结果强调,在肝脏纤维化中,无论是肝细胞还是胆管细胞,都被实验证明并非是肝纤维化肌成纤维细胞的来源^[39-40]。因此,对于肝脏纤维化的特定背景而言,上皮细胞似乎更倾向于通过分泌细胞因子的机制来激活肝星状细胞,从而推动肝纤维化的进展。

这一系列的研究结果进一步加深了我们对纤维化过程中上皮细胞作用的理解。尽管以往的研究主要关注上皮-间质转化作为上皮细胞参与纤维化的途径,但在肝脏纤维化中,上皮细胞更多地表现为通过分泌调节激活HSCs的方式,从而间接地促进肝纤维化的进程。一些研究发现,当肝细胞中的Notch通路被激活^[41],或者Anxa2基因过表达时^[42],这些上皮细胞通过旁分泌的方式显著增加了骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达,从而促使肝星状细胞激活,并在肝纤维化的发展中发挥着重要作用^[43]。

总体而言,上皮细胞的角色在纤维化中不同于其他组织,对于肝脏纤维化的理解需要更深入的研究。这将有助于揭示肝脏纤维化的更多机制,并为未来针对性的治疗策略提供新的方向。

3.4 巨噬细胞

巨噬细胞作为免疫系统中的关键成员,不仅具备吞噬、清除病原体和细胞垃圾的功能,同时也是炎症反应和组织修复中不可或缺的参与者。在肝纤维化的早期阶段,巨噬细胞参与对损伤的应答,通过释放炎症介质如细胞因子和趋化因子来调节炎症反应。这一过程释放的炎症介质可促进其他免疫细胞的迁移和激活,进一步加剧肝脏炎症反应,并促使纤维化过程的启动。

近期通过单细胞RNA测序技术的应用,研究者在肝纤维化中发现了两个特异性亚群,它们被定义为瘢痕相关巨噬细胞(scar-associated macrophages, SAMΦ)。这些细胞在纤维化的肝脏组织中显著富集,表达特异性标记物如TREM2和CD9,表现出促进纤维化的表型^[44]。这一发现不仅在CCl₄诱导的纤维化小鼠中得到验证,而且在非酒精性脂肪肝(NAFLD)中同样能发现SAMΦ的存在,并且与纤维化程度呈正相关。另一项研究发现,在CCl₄诱导的肝纤维化中,脾脏来源的

CD11b⁺细胞在肝脏内积聚为Ly6C^{lo}巨噬细胞,加快了肝脏纤维化的进程。通过脾脏切除和脾细胞输注的实验,研究者观察到脾细胞能够迁移至纤维化的肝脏。通过单细胞RNA测序对纤维化肝脏中纯化的脾脏来源的CD11b⁺细胞进行注释,发现了一种CD11b⁺CD43^{hi}Ly6C^{lo}的脾单核细胞亚型(sM-1s),在纤维化的脾脏和肝脏中显著增加并转化为巨噬细胞^[45]。在肾脏损伤纤维化的研究中,巨噬细胞通过巨噬-肌成纤维转化(macrophage-to-myofibroblast transition, MMT)现象,被发现能够转分化为肌成纤维细胞,从而促进纤维化的进程^[46-48]。在肝纤维化方面的一项研究中,通过对临床肝纤维化组织样本和多个动物模型进行免疫荧光染色,发现巨噬细胞在这些样本中发生了MMT。此外,研究还发现在CCl₄诱导的肝纤维化模型、高脂饮食(high fat diet, HFD)引起的非酒精性脂肪肝模型以及乙醇诱导的酒精性脂肪肝模型中,巨噬细胞可以转化为肌成纤维细胞。不过,尽管这些发现十分引人注目,目前还缺乏单细胞层面的研究来充分证实这一观点。

尽管当前已经取得了一些重要的发现,但仍然有许多亟需解决的问题。对于巨噬细胞的单细胞层面的更深入研究将有助于全面理解它们在纤维化中的动态变化和相互作用。此外,对于巨噬细胞是否经历MMT的详细认识仍然需要更多的验证。这些进一步的研究将为未来的治疗策略提供更具针对性的方向,以应对肝脏纤维化这一复杂而具有挑战性的疾病。

3.5 淋巴细胞

研究者使用单细胞RNA测序技术对人体正常肝脏中的免疫细胞进行了详细的研究,对B细胞和T细胞进行了深入的分析。研究发现,在人体肝脏中存在多个离散的细胞群落,包括4种CD4⁺T细胞、7种CD8⁺T细胞、2种NK细胞、7种B细胞、4种浆细胞和8种髓系细胞亚群。特别是发现了4种CXCR6⁺的T和NK细胞亚群,它们在肝脏中具有显著的异质性、不同的功能和突出的稳态增殖能力。研究还提出了一种基于不同趋化因子受体的T和NK细胞的普遍分类系统,并通过表型、转录因子和功能进行了验证。此外,研究还在人体脾脏和肝脏中全面揭示了B细胞和浆细胞亚群^[49]。另外,在利用单细胞RNA测序技术解析日本血吸虫感染小鼠肝纤维化免疫网络的研究中发

现,CD4⁺T(4)和Prf1⁺T(5)两种T细胞亚群只存在于感染组中,并且在感染组中,NKT细胞、CD8⁺T细胞和NK细胞中的FasI表达较高。通过CellChat分析发现在血吸虫病肝纤维化进程中,FASLG信号通路(FasI-Fas)与T(5)亚型细胞和内皮细胞密切相关。另外在纤维化肝脏中,表达M2标记基因的单核吞噬细胞[mononuclear phagocyte (1), MP(1)]主要表达*Arg1*、*Retnla*和*Chil3*,这表明Kupffer细胞可能发生M2样极化。通过CellChat进行的CXCL和CCL信号通路分析显示,Cxcl16-Cxcr6、Ccl6-Ccr2和Ccl5-Ccr5是最主要的受配体分子对,并且T细胞与单核吞噬细胞之间存在密切的相互作用^[50]。另一项关于胆道闭锁(biliary atresia, BA)的单细胞转录组的研究中,揭示了与纤维化相关的免疫景观,在纤维化病变区域存在着包括“中间型”CD14⁺CD16⁺单核细胞、瘢痕相关巨噬细胞、NKT细胞、过渡性B细胞和FCN3⁺中性粒细胞等免疫亚群。

鉴于淋巴细胞在免疫应答中的关键作用,需要不断深化对肝脏疾病免疫学的理解以及开发相关疾病的治疗手段,随着单细胞RNA测序技术的不断发展,我们期待未来进一步揭示淋巴细胞在肝纤维化过程中的精细调控网络,为制定更加精准的干预手段和治疗策略打下坚实基础。

3.6 肝窦内皮细胞

研究表明,肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)在肝纤维化中的失调与炎症反应、血管重塑和纤维化过程密切相关^[51-53]。LSECs的功能异常可能导致血管内皮屏障的破坏,进而促进炎症因子的释放和血小板聚集,进一步加剧肝损伤和纤维化^[54]。此外,LSECs还能通过分泌细胞因子和调节血管张力等方式参与肝纤维化的调控。

最近一项研究利用单细胞转录组测序技术,对来自健康人体供体肝脏的异质肝内皮细胞(endothelial cells, EC)进行了详细的转录组分析。研究结果发现,肝内存在3种不同的EC亚群,分别是1区域的肝窦内皮细胞(LSECs)、2和3区域的LSECs以及血管EC^[55]。另外一项研究通过配对细胞RNA测序,揭示了小鼠肝脏内皮细胞基因的分区模式,并根据肝细胞的基因表达确定了内皮细胞在肝小叶中的定位^[56]。根据Ramachandran等^[44]的研究,他们在单个人体肝脏细胞水平上解

析了人类肝硬化的纤维化病灶。其中,他们鉴定了新的内皮细胞亚群,包括 ACKR1⁺和 PLVAP⁺内皮细胞,这些细胞在肝硬化中扩增,并且局限于纤维化区域,增强了白细胞的穿越。通过多线路的配体-受体模型,他们还揭示了这些内皮细胞与纤维化相关的巨噬细胞和 PDGFR α ⁺胶原蛋白产生的间充质细胞之间的相互作用,揭示了包括 TNFRSF12A、PDGFR 和 NOTCH 信号通路在内的多种促纤维化途径在纤维化病灶内的活动。近年来的研究还发现, LSECs 在肝纤维化中可能经历内皮向间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)的过程。EndMT 是一种细胞转化现象,内皮细胞失去特征性的内皮标记物,并获得间质细胞的特征^[57-60]。这种转化可能导致 LSECs 的功能改变和纤维化相关基因的表达增加,从而促进肝纤维化的进展。

在单细胞 RNA 测序的引领下,对肝纤维化细胞类型和分类研究取得了显著进展。通过对肝星状细胞、门静脉成纤维细胞、上皮细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和肝窦内皮细胞的精细解析,不仅能够更全面地理解它们在纤维化过程中的角色,而且还发现许多以往未知的亚群和功能。这一系列的研究不仅深化了对纤维化细胞表型和功能的认识,也揭示了它们之间复杂的相互作用网络。然而,当前的研究仍面临着一些挑战,包括细胞分离和纯化方法的改进、对细胞互作机制的深入解析以及对动态变化的更全面理解。

未来的研究应该继续聚焦于肝纤维化的细胞层面细节,推动技术的不断创新,解决现有技术的局限性问题,从而更全面、深入地理解纤维化过程中不同细胞类型的互动和调控机制。这将为未来治疗策略的开发提供更具针对性的方向,为肝纤维化的防治做出更大的贡献。

4 单细胞转录组测序技术在肝纤维化疾病研究中的意义和前景

4.1 鉴定与纤维化相关的关键基因和通路

近年来,单细胞转录组测序技术的发展使得我们能够更好地理解纤维化发展中的关键基因和通路。在肝纤维化的研究中,一些关键基因和通路已被鉴定,并且对于理解纤维化的发病机制和

寻找新的治疗策略具有重要意义。

在纤维化的信号通路中,TGF- β 信号通路被认为是一个关键的调控因子。TGF- β 信号通路的活化能够促进纤维化细胞的增殖和胶原合成,并抑制胶原酶的活性。Wnt/ β -catenin 信号通路也被发现在纤维化过程中发挥重要作用,它参与了肝星状细胞的活化和胶原合成。此外,NF- κ B 信号通路的异常活化也与纤维化的发展紧密相关。

此外,研究还发现一些细胞增殖和凋亡相关基因如 PCNA、Bcl-2 和 Bax 等在纤维化过程中发挥重要的调控作用^[61]。尽管已经鉴定了一些与纤维化相关的关键基因和通路,但仍然有许多挑战需要应对。需要更深入地了解这些基因和通路的调控机制,以及它们在纤维化发展的不同阶段中的作用。此外,还需要开发新的治疗策略,针对这些关键基因和通路进行干预,以实现纤维化的逆转和治疗效果的提高。

通过对肝纤维化相关基因和通路的鉴定和研究,对于纤维化的发病机制和治疗有了更深入的了解。然而,还有许多工作需要进行,以进一步揭示纤维化的复杂调控网络,并寻找新的治疗策略来改善患者的预后。

4.2 单细胞转录组与空间转录组联用在肝纤维化研究领域中的应用

在利用 scRNA-seq 研究肝脏生理学时的一个主要挑战是将单个细胞的 RNA 数据与空间信息整合起来。为了克服这个障碍,空间转录组测序技术可以对肝脏区带化提供新的见解。Halpern 等^[62]通过将 scRNA-seq 与单分子 RNA 荧光原位杂交(single-molecule RNA FISH, smRNA-FISH)相结合,对小鼠肝脏区带化进行空间分辨率的 RNA 测序,证明肝脏中约 50% 的基因在空间上表现出明显的分区特征,包括一些在肝小叶中间层达到峰值的非单调分区特征,Dobie 等^[63]利用单细胞 RNA 测序来解析健康和肝脏纤维化小鼠中的肝间质,揭示了 HSCs 在肝小叶中的空间分区,其中将 HSCs 在肝小叶的拓扑对称区域中分布定义为门静脉相关 HSCs (portal vein-associated HSCs, PaHSCs) 和中央静脉相关 HSCs (central vein-associated HSCs, CaHSCs),并且确定 CaHSCs 为中央小叶纤维化模型中主要的致病性胶原产生细胞。这些发现为深入理解肝脏纤维化的机制和治疗靶点提供了重要的见解。未来的研究将进一步探索

肝脏细胞间的空间相互作用以及其在疾病进展中的作用,为肝脏疾病的治疗策略提供新的方向和思路。

4.3 对肝纤维化发病机制的理解

单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中发挥了重要作用,使研究者对肝纤维化发病机制的理解更深入。传统的组织 bulk 转录组测序技术在肝脏中提供了关于基因表达的整体信息,但它无法解析不同细胞类型之间的细胞异质性和细胞亚群的多样性。而单细胞转录组测序技术可以对单个细胞进行高通量分析,揭示不同细胞类型和亚群之间的异质性,并提供更详细的细胞级别的基因表达信息。

单细胞转录组测序可以帮助鉴定肝脏中不同细胞类型和亚群的存在。通过对大量单个细胞的基因表达数据进行聚类和分析,可以识别出肝细胞、肝星状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等不同细胞类型,并进一步细分为更具体的细胞亚群。这有助于深入了解不同细胞类型在肝纤维化过程中的功能和相互作用。单细胞转录组测序可以揭示肝脏中炎症反应和免疫细胞的状态和功能。通过分析单个免疫细胞(如巨噬细胞、T细胞、B细胞等)的基因表达模式,可以了解它们在肝纤维化中的激活状态、细胞因子的分泌模式以及与其他细胞类型的相互作用。这有助于揭示炎症反应和免疫调节在肝纤维化中的重要性,以及不同免疫细胞类型之间的协同作用。单细胞转录组测序可以帮助了解纤维化过程中的细胞和基质的变化。通过分析肌成纤维细胞和其他纤维化相关细胞类型的基因表达模式,可以揭示它们在纤维化过程中的活性和功能。此外,单细胞转录组测序还可以提供有关细胞外基质成分和调节因子的信息,从而帮助我们进一步了解纤维化过程中基质的动态变化。单细胞转录组测序可以通过追踪不同时间点的肝组织或模型中的单个细胞,揭示肝纤维化过程中病理过程的时间轴。通过比较不同时间点的细胞转录组数据,可以了解在纤维化的不同阶段细胞类型的变化、基因表达的动态变化以及纤维化过程的调控机制。

单细胞转录组测序技术为肝纤维化的研究提供了更全面、细致的基因表达信息,能够揭示不同细胞类型和亚群之间的异质性和功能差异,帮助了解肝纤维化的发病机制。

4.4 新的治疗靶点和策略的发现

单细胞 RNA 测序在肝纤维化的研究中已经发现了一些新的治疗靶点和策略。通过对单个细胞的基因表达进行深入分析,可以揭示不同细胞类型在肝纤维化中的功能和相互作用,从而为治疗提供新的线索。

单细胞 RNA 测序揭示了肝纤维化中免疫细胞的活化和调控状态,为发现免疫调节靶点提供了线索。例如,研究发现在肝纤维化过程中,巨噬细胞和T细胞等免疫细胞的活化状态显著增加。因此,针对这些免疫细胞的调控因子和信号通路可能成为治疗肝纤维化的新靶点。例如,通过抑制特定免疫调节分子或调节免疫细胞的活化状态,可以阻断炎症反应和纤维化过程。单细胞 RNA 测序还有助于揭示纤维化细胞(如肌成纤维细胞)的功能和调控机制,为发现纤维化细胞的靶点提供了线索。研究发现,纤维化细胞在肝纤维化中起着重要作用,参与胶原沉积和基质重塑过程。通过分析纤维化细胞的基因表达,可以发现与其活性和功能相关的关键基因和信号通路^[64]。因此,靶向调控纤维化细胞的关键基因或信号通路可能成为治疗肝纤维化的新策略。单细胞 RNA 测序还有助于研究和了解肝纤维化中细胞外基质的变化和调控。细胞外基质在纤维化过程中发挥重要作用,影响纤维化细胞的转化和胶原沉积。通过分析细胞外基质成分的变化和相关基因的表达模式,可以发现新的靶点和策略。例如,靶向调控特定细胞外基质成分或调节基质降解和沉积的信号通路,可以干预纤维化的发展进程。

单细胞 RNA 测序的发现需要进一步的验证和研究,以确保其在治疗肝纤维化中的可行性和有效性。此外,肝纤维化是一个复杂的疾病,涉及多种细胞类型和信号通路的相互作用,因此综合多个靶点和策略可能是更有效的治疗方法。未来的研究将进一步探索单细胞 RNA 测序在肝纤维化治疗中的应用,并加深对该疾病的理解和治疗策略的发展。

4.5 个体化治疗和精准医学的应用

单细胞转录组测序技术为肝纤维化的个体化治疗和精准医学开辟了新的途径。这项技术通过深入分析单个细胞的基因表达,揭示了不同患者之间的细胞异质性和个体差异,为个性化治疗提供了关键信息。

首先,单细胞转录组测序可以帮助鉴别肝纤维化患者中的不同细胞亚群和基因表达模式。通过比较不同患者之间的细胞表达谱,可以发现不同亚群的存在和相关的生物学特征。这一信息可用于确定患者的疾病状态、预测疾病进展的风险以及预测患者对特定治疗方法的反应性。其次,单细胞转录组测序揭示了个体患者肝纤维化中的分子机制和信号通路的变化。通过分析细胞表达谱,可以发现不同患者之间的分子特征和潜在的治疗靶点。这有助于确定适合特定患者的个性化治疗靶点,并开发相应的药物或治疗策略。最后,单细胞转录组测序还可以用于监测治疗过程中不同细胞类型的变化,并评估治疗效果和预后。通过比较治疗前后的细胞表达谱,可以评估治疗对纤维化细胞、免疫细胞和其他相关细胞类型的影响。这有助于监测治疗效果的动态变化,及早发现治疗失败或复发的风险,并及时调整治疗方案。

个体化的药物筛选和治疗能够提高治疗的有效性和患者的生活质量及治疗体验。

4.6 技术挑战和未来发展方向

单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中已经取得了重要进展,但仍然面临一些技术挑战。

单细胞转录组测序需要高质量的细胞样本,而肝组织在采集和处理过程中存在一定的困难。肝组织是一个复杂的器官,由多种细胞类型组成,而且在纤维化过程中存在细胞异质性。因此,如何获取足够数量和质量的单个细胞,并正确地分离和处理它们是一个挑战。未来的发展方向包括改进样本采集和处理方法,以提高单细胞转录组测序的效率和准确性。单细胞转录组测序产生的数据量庞大且复杂,需要高级的数据分析和解释方法。由于细胞异质性和噪音的存在,如何准确地鉴定和分类不同细胞亚群,如何解释细胞之间的相互作用和信号通路,以及如何从大规模的数据中提取有价值的信息,都是研究者面临的挑战。未来的发展方向包括开发更加高效和准确的数据分析算法和工具,以提高数据解读的速度和准确性。

单细胞转录组测序技术仍然在不断发展和改进中。当前的技术仍存在一些局限性,如RNA降解、低覆盖度和扩增偏差等。此外,由于不同实验室和平台之间的差异,数据的可重复性和比较性也面临一定的挑战。未来的发展方向包括改进测

序技术、提高测序的灵敏度和准确性;同时,推动技术的标准化和规范化,以确保数据的一致性和可比性。单细胞转录组测序技术提供了对细胞状态和功能的详细信息,但它仅提供了基因表达信息。细胞的功能和相互作用受到多种分子层面的调控,如蛋白质、代谢产物等。因此,未来的发展方向包括整合多组学数据,如蛋白质组学、代谢组学和表观遗传组学等,以全面了解细胞状态和疾病机制。

最终目标是将单细胞转录组测序技术应用于临床实践和转化医学。这需要将研究结果转化为可靠的临床指标和治疗策略,以指导临床决策和个体化治疗。未来的发展方向还包括开展大规模的临床研究,验证并且优化单细胞转录组测序在肝纤维化诊断、预测和治疗中的应用,以实现个体化治疗和精准医学的目标。

5 展望

肝纤维化是一种严重的肝脏疾病,对全球公共卫生和个体健康具有重要影响,尽管对驱动肝纤维化的细胞和分子机制的理解取得了重大进展,但目前仍然没有FDA或EMA批准的抗纤维化治疗方法,因此,亟需进一步深入了解肝脏和其他器官中纤维化生态位的复杂机制。本文介绍了肝纤维化的背景和治疗的重要性,以及单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中的进展。通过深入研究肝纤维化的发病机制和相关治疗策略,可以为预防、早期诊断和治疗肝纤维化及其相关并发症提供重要的指导。

肝纤维化是多种肝脏疾病的共同终末阶段,会导致肝功能受损、肝硬化和肝癌等严重后果。全球范围内肝纤维化和肝硬化是重要的健康问题,每年导致数百万人死亡。因此,对肝纤维化的研究具有重要意义。单细胞转录组测序技术是一种高通量基因表达分析方法,具有独特的优势。与传统的均质组学方法相比,单细胞转录组测序技术能够提供更详细和全面的细胞内基因表达信息,揭示细胞的异质性和功能多样性。通过识别个体细胞的差异性,单细胞转录组测序技术为精准医学提供了基础,为疾病诊断、治疗和药物研发提供了更精确的指导。在单细胞转录组测序技术的应用中,获取和处理单细胞样本是关键步骤。

细胞分离通常采用机械分散、酶消化、化学溶解和离心等方法。确保细胞的完整性和细胞膜完整性对后续的RNA提取和测序质量至关重要。此外, RNA测序和数据分析是单细胞转录组测序的重要环节。通过逆转录、文库构建和高通量测序, 可以获得大量的短序列读取, 对应于单个细胞的转录组信息。生物信息学数据分析包括质量控制、比对、基因表达定量和标准化等步骤, 以获得准确的基因表达信息。通过单细胞转录组测序技术的应用, 研究人员在肝纤维化领域取得了一些重要的进展, 他们发现了新的细胞类型和转录变异, 揭示了细胞状态和功能。这些研究有助于深入理解肝纤维化的发病机制, 并为肝纤维化的治疗提供了指导。研究人员还通过识别肝纤维化中的关键信号通路, 发现了新的治疗靶点, 为开发有效的药物提供了新的思路。

综上所述, 单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中发挥着重要作用。通过深入研究肝纤维化的发病机制和相关信号通路, 可以为肝纤维化的预防、早期诊断和治疗提供更精确的指导。然而, 尽管单细胞转录组测序技术在研究中展现了巨大的潜力, 但仍然存在一些挑战和限制。例如, 单细胞转录组测序技术在样本处理、测序深度、数据分析和解释等方面仍需进一步改进。此外, 技术成本和数据处理的复杂性也是需要克服的问题。未来, 在肝纤维化研究中, 单细胞转录组测序技术将继续发挥重要作用。随着技术的进一步改进和成本的降低, 单细胞转录组测序技术将更广泛地应用于肝纤维化的研究和临床实践中。通过深入研究肝纤维化的病理生理过程, 可以发现新的治疗靶点, 并开发出更有效的药物。此外, 单细胞转录组测序技术还有助于个体化治疗的实现, 为每个患者提供针对性的治疗策略, 提高治疗效果。

总之, 单细胞转录组测序技术在肝纤维化研究中具有广阔的应用前景。通过深入研究肝纤维化的发病机制和相关治疗策略, 可以为预防、早期诊断和治疗肝纤维化及其相关并发症提供重要的指导。尽管仍面临一些挑战和限制, 但随着技术的不断进步, 单细胞转录组测序技术将提供更深入和全面的认识, 为肝纤维化的预防和治疗带来新的希望。

参 考 文 献

- [1] HAMMEL P, COUVELARD A, O'TOOLE D, *et al.*. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct[J]. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344(6): 418-423.
- [2] KWEON Y O, GOODMAN Z D, DIENSTAG J L, *et al.*. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B[J]. *J. Hepatol.*, 2001, 35(6): 749-755.
- [3] ARTHUR M J P. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(5): 1525-1528.
- [4] CZAJA A J, CARPENTER H A. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis[J]. *J. Hepatol.*, 2004, 40(4): 646-652.
- [5] DIXON J B, BHATHAL P S, HUGHES N R, *et al.*. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss[J]. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1647-1654.
- [6] BURT A D. Liver fibrosis[J]. *Br. Med. J.*, 1992, 305(6853): 537-538.
- [7] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Ann. Rev. Pathol. Mechan. Disease*, 2011, 6(1): 425-456.
- [8] ROCKEY D C, BELL P D, HILL J A. Fibrosis: a common pathway to organ injury and failure[J]. *N. Engl. J. Med.*, 2015, 372(12): 1138-1149.
- [9] WANG S, FRIEDMAN S L. Hepatic fibrosis: a convergent response to liver injury that is reversible[J]. *J. Hepatol.*, 2020, 73(1): 210-211.
- [10] DREW L. Tipping the balance[J/OL]. *Nature*, 2018, 564(7736): S74-S75[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07760-9>.
- [11] 杨瑞华, 李芹, 陈玮. 扶正化瘀胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效的 Meta 分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(4): 295-296.
YANG R H, LI Q, CHEN W. Efficacy and safety of Fuzheng-huayu capsule for treating liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis[J]. *Chin. J. Hepatol.*, 2015, 23(4): 295-296.
- [12] 苗亮, 杨婉娜, 董晓琴, 等. 安络化纤丸联合恩替卡韦治疗可显著提高慢性乙型肝炎病毒感染者肝纤维化的改善率[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(7): 521-526.
MIAO L, YANG W N, DONG X Q, *et al.*. Combined anluo-huaxianwan and entecavir treatment significantly improve the improvement rate of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Chin. J. Hepatol.*, 2019, 27(7): 521-526.
- [13] JI D, CHEN Y, BI J, *et al.*. Entecavir plus Biejia-Ruangan compound reduces the risk of hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B[J]. *J. Hepatol.*, 2022, 77(6): 1515-1524.
- [14] LIU Y Q, ZHANG C, LI J W, *et al.*. An-Luo-Hua-Xian pill improves the regression of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients treated with entecavir[J]. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 2023,

- 11(2): 304-313.
- [15] NEUSCHWANDER-TETRI B A. Targeting the FXR nuclear receptor to treat liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(4): 704-706.
 - [16] HARRISON S A, RINELLA M E, ABDELMALEK M F, *et al.* NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1174-1185.
 - [17] QIAN T, FUJIWARA N, KONERU B, *et al.* Molecular signature predictive of long-term liver fibrosis progression to inform antifibrotic drug development[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1210-1225.
 - [18] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nat. Methods*, 2009, 6(5): 377-382.
 - [19] GAWAD C, KOH W, QUAKE S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science[J]. *Nat. Rev. Genet.*, 2016, 17(3): 175-188.
 - [20] TANAY A, REGEV A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism[J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 331-338.
 - [21] BASLAN T, HICKS J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing[J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2017, 17(9): 557-569.
 - [22] VAN DE SANDE B, LEE J S, MUTASA-GOTTGENS E, *et al.* Applications of single-cell RNA sequencing in drug discovery and development[J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2023, 22(6): 496-520.
 - [23] QUAIL M A, KOZAREWA I, SMITH F, *et al.* A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system[J]. *Nat. Methods*, 2008, 5(12): 1005-1010.
 - [24] HAO Y, STUART T, KOWALSKI M H, *et al.* Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2024, 42(2): 293-304.
 - [25] WOLF F A, ANGERER P, THEIS F J. SCANPY large-scale single-cell gene expression data analysis[J/OL]. *Genome Biol.*, 2018, 19(1): 15[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1382-0>.
 - [26] ZHENG G X, TERRY J M, BELGRADER P, *et al.* Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2017, 8: 14049[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>.
 - [27] TRAPNELL C, CACCHIARELLI D, GRIMSBY J, *et al.* The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(4): 381-386.
 - [28] FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. *Physiol. Rev.*, 2008, 88(1): 125-172.
 - [29] SHERMAN M H. Stellate cells in tissue repair, inflammation, and cancer[J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2018, 34: 333-355.
 - [30] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, 14(7): 397-411.
 - [31] BAGHAEI K, MAZHARI S, TOKHANBIGLI S, *et al.* Therapeutic potential of targeting regulatory mechanisms of hepatic stellate cell activation in liver fibrosis[J]. *Drug Discov. Today*, 2022, 27(4): 1044-1061.
 - [32] WANG S S, TANG X T, LIN M, *et al.* Perivenous stellate cells are the main source of myofibroblasts and cancer-associated fibroblasts formed after chronic liver injuries[J]. *Hepatology*, 2021, 74(3): 1578-1594.
 - [33] KRENKEL O, HUNDERTMARK J, RITZ T P, *et al.* Single cell RNA sequencing identifies subsets of hepatic stellate cells and myofibroblasts in liver fibrosis[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(5): 503[2024-05-13]. <https://doi.org/10.3390/cells8050503>.
 - [34] TSUCHIYA Y, SEKI T, KOBAYASHI K, *et al.* Fibroblast growth factor 18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2023, 14(1): 6304[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42058-z>.
 - [35] ROSENTHAL S B, LIU X, GANGULY S, *et al.* Heterogeneity of HSCs in a mouse model of NASH[J]. *Hepatology*, 2021, 74(2): 667-685.
 - [36] LEI L, BRUNEAU A, MOURABIT H E L, *et al.* Portal fibroblasts with mesenchymal stem cell features form a reservoir of proliferative myofibroblasts in liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2022, 76(5): 1360-1375.
 - [37] IWANO M, PLIETH D, DANOFF T M, *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110(3): 341-350.
 - [38] OMENETTI A, PORRELLO A, JUNG Y, *et al.* Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans[J]. *J. Clin. Invest.*, 2008, 118(10): 3331-3342.
 - [39] TAURA K, MIURA K, IWAISAKO K, *et al.* Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3): 1027-1036.
 - [40] CHU A S, DIAZ R, HUI J J, *et al.* Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1685-1695.
 - [41] ZHU C, KIM K, WANG X, *et al.* Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis[J/OL]. *Sci. Transl. Med.*, 2018, 10(468): eaat0344[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0344>.
 - [42] WANG G, DUAN J, PU G, *et al.* The Annexin A2-Notch regulatory loop in hepatocytes promotes liver fibrosis in NAFLD by increasing osteopontin expression[J/OL]. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2022, 1868(8): 166413[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166413>.
 - [43] SCHULIEN I, HOCKENJOS B, SCHMITT-GRAEFF A, *et al.* The transcription factor c-Jun/AP-1 promotes liver fibrosis during non-alcoholic steatohepatitis by regulating Osteopontin expression[J]. *Cell Death Differ.*, 2019, 26(9): 1688-1699.
 - [44] RAMACHANDRAN P, DOBIE R, WILSON-KANAMORI J R, *et al.* Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level[J]. *Nature*, 2019, 575(7783): 512-518.
 - [45] ZHANG S, WAN D, ZHU M, *et al.* CD11b⁺CD43^{hi} Ly6C^{lo} splenocyte-derived macrophages exacerbate liver fibrosis *via* spleen-liver axis[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1612-1629.

- [46] MENG X M, WANG S, HUANG X R, *et al.*. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis[J/OL]. *Cell Death Dis.*, 2016, 7(12): e2495[2024-05-12]. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.402>.
- [47] WANG Y Y, JIANG H, PAN J, *et al.*. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury[J]. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2017, 28(7): 2053-2067.
- [48] LITTLE K, LLORIÁN-SALVADOR M, TANG M, *et al.*. Macrophage to myofibroblast transition contributes to subretinal fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration[J/OL]. *J. Neuroinflamm.*, 2020, 17(1): 355[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02033-7>.
- [49] ZHAO J, ZHANG S, LIU Y, *et al.*. Single-cell RNA sequencing reveals the heterogeneity of liver-resident immune cells in human[J/OL]. *Cell Discov.*, 2020, 6: 22[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0157-z>.
- [50] ZHANG Y, LI J, LI H, *et al.*. Single-cell RNA sequencing to dissect the immunological network of liver fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2022, 13: 980872[2024-05-13]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.980872>.
- [51] SCHLEDZEWSKI K, GÉRAUD C, ARNOLD B, *et al.*. Deficiency of liver sinusoidal scavenger receptors stabilin-1 and-2 in mice causes glomerulofibrotic nephropathy *via* impaired hepatic clearance of noxious blood factors[J]. *J. Clin. Invest.*, 2011, 121(2): 703-714.
- [52] POISSON J, LEMOINNE S, BOULANGER C, *et al.*. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases[J]. *J. Hepatol.*, 2017, 66(1): 212-227.
- [53] SHETTY S, LALOR P F, ADAMS D H. Liver sinusoidal endothelial cells-gatekeepers of hepatic immunity[J]. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, 15(9): 555-567.
- [54] MARRONE G, SHAH V H, GRACIA-SANCHO J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration[J]. *J. Hepatol.*, 2016, 65(3): 608-617.
- [55] MACPARLAND S A, LIU J C, MA X Z, *et al.*. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1): 4383[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06318-7>.
- [56] HALPERN K B, SHENHAV R, MASSALHA H, *et al.*. Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(10): 962-970.
- [57] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, *et al.*. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. *Nat. Med.*, 2007, 13(8): 952-961.
- [58] ZHANG Y, WU X, LI Y, *et al.*. Endothelial to mesenchymal transition contributes to arsenic-trioxide-induced cardiac fibrosis[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 33787[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/srep33787>.
- [59] GONZALES J, HOLBERT K, CZYSZ K, *et al.*. Hemin-induced endothelial dysfunction and endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of pulmonary hypertension due to chronic hemolysis[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(9): 4763[2024-05-13]. <https://doi.org/10.3390/ijms23094763>.
- [60] NIE X, WU Z, SHANG J, *et al.*. Curcumin suppresses endothelial-to-mesenchymal transition *via* inhibiting the AKT/GSK3 β signaling pathway and alleviates pulmonary arterial hypertension in rats[J/OL]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2023, 943: 175546[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175546>.
- [61] SHI Z, ZHANG K, CHEN T, *et al.*. Transcriptional factor ATF3 promotes liver fibrosis *via* activating hepatic stellate cells[J/OL]. *Cell Death Dis.*, 2020, 11(12): 1066[2024-05-13]. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03271-6>.
- [62] HALPERN K B, SHENHAV R, MATCOVITCH-NATAN O, *et al.*. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver[J]. *Nature*, 2017, 542(7641): 352-356.
- [63] DOBIE R, WILSON-KANAMORI J R, HENDERSON B E P, *et al.*. Single-cell transcriptomics uncovers zonation of function in the mesenchyme during liver fibrosis[J]. *Cell Rep.*, 2019, 29(7): 1832-1847.e8.
- [64] 王惠,赵鹏翔,张旭娟,等.间充质干细胞在疾病治疗中的应用潜力[J].*生物技术进展*,2021,11(6):688-693.
WANG H, ZHAO P X, ZHANG X J, *et al.*. The application potential of mesenchymal stem cells in the treatment of diseases[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2021, 11(6): 688-693.