

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230181

· 专题报道 ·

单细胞转录组测序联合空间转录组测序在纤维化疾病研究中的应用进展

胡懿凡¹, 胡静涵¹, 蒋俊锋², 熊俊^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院学员队, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院组织胚胎学教研室, 上海 200433

[摘要] 单细胞转录组测序联合空间转录组测序可解析组织内每一个细胞的转录组表达谱和空间位置信息, 有助于探究细胞的基因表达水平和组织的三维重建, 解读细胞异质性, 理解细胞间的联系和相互作用, 对于深入探讨疾病发生和发展的细胞与分子机制具有重要意义。纤维化疾病累及全身多个器官, 病程极为复杂, 缺乏有效的抗纤维化治疗方法, 因此仍需加强对这类疾病的全面认识。近年来, 单细胞转录组测序联合空间转录组测序已应用于纤维化疾病的病理生理机制研究中, 取得了较多进展。本文简要介绍单细胞转录组测序联合空间转录组测序技术, 并对其在纤维化疾病研究中的应用进展作一综述。

[关键词] 转录组学; 单细胞转录组测序; 空间转录组测序; 纤维化; 纤维化疾病

[引用本文] 胡懿凡, 胡静涵, 蒋俊锋, 等. 单细胞转录组测序联合空间转录组测序在纤维化疾病研究中的应用进展[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(7): 808-815. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230181.

Single-cell transcriptome sequencing combined with spatial transcriptome sequencing in fibrotic diseases: research progress

HU Yifan¹, HU Jinghan¹, JIANG Junfeng², XIONG Jun^{2*}

1. Student Team, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] The combination of single-cell transcriptome sequencing and spatial transcriptome sequencing can analyze the transcriptome and spatial location information of each cell within the tissue, which helps to explore the gene expression level of cells and the 3-dimensional reconstruction of tissue, decipher cell heterogeneity, understand the connections and interactions between cells, and deeply explore the cellular and molecular mechanisms of disease development and progression. Fibrotic diseases involve multiple organs, the course of the disease is extremely complex, and there is a lack of effective anti-fibrotic treatment; it is still necessary to strengthen the comprehensive understanding of the disease. In recent years, single-cell transcriptome sequencing combined with spatial transcriptome sequencing has been applied for the research on pathophysiological mechanisms of fibrotic diseases, and more progress has been made. This article briefly introduces single-cell transcriptome sequencing combined with spatial transcriptome sequencing and reviews its research progress in fibrotic diseases.

[Key words] transcriptomics; single-cell transcriptome sequencing; spatial transcriptome sequencing; fibrosis; fibrotic disease

[Citation] HU Y, HU J, JIANG J, et al. Single-cell transcriptome sequencing combined with spatial transcriptome sequencing in fibrotic diseases: research progress [J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(7): 808-815. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230181.

当组织受到某种损伤因素刺激后, 成纤维细胞被激活, 增加收缩力的同时, 分泌炎症介质并合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 这些成分共同启动损伤修复反应。当损伤轻微或非重复性

[收稿日期] 2023-04-07 [接受日期] 2023-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81972397), 上海市青年科技启明星计划(22QA1411500)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81972397) and Shanghai Rising Star Program for Young Scientists (22QA1411500).

[作者简介] 胡懿凡. E-mail: hyf3452413548@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870960, E-mail: xiongjun2001@163.com

损伤时,损伤修复反应是有效的,仅导致过量ECM成分的短暂积累,然后迅速消除,促进正常组织结构的恢复。然而,当损伤严重或重复损伤时,ECM成分持续积累,就可能破坏组织结构,发生器官功能障碍,最终导致器官衰竭。组织ECM成分过度积累就会形成纤维化,可累及全身多个器官,导致纤维化疾病^[1-2]。纤维化的病因除感染炎症反应外,还包括衰老、机械性损伤、代谢性损伤(如高血糖、高血脂)、基因突变和自身免疫性损伤等^[2]。纤维化是一个高度动态的过程,如果持续进展最终会引发器官功能障碍乃至个体死亡,在工业化国家有高达45%的死因是由纤维化疾病造成的^[1]。目前,此类疾病的治疗除尽可能消除病因外,仍缺乏有效的抗纤维化治疗方法。

多种细胞参与纤维化疾病发病过程。成纤维细胞是一种间充质细胞,存在明显的异质性和可塑性,激活状态成纤维细胞通过产生复杂的ECM参与组织稳态维持和组织重构^[3]。免疫细胞是炎症反应和组织损伤修复的主要调节细胞,包括巨噬细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞等细胞类型及其亚类,均受到感染情况、组织损伤修复程度和自身免疫状况的影响,在纤维化疾病进程中发挥重要作用^[4-6]。关于纤维化疾病的研究还涉及病变部位实质细胞及内皮细胞的作用、各种细胞谱系来源及发展、细胞间相互作用及其与微环境之间的相互作用等,相关研究虽然取得了一定的进展,但仍存在许多未解之谜。单细胞RNA(转录组)测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)^[7]联合空间RNA(转录组)测序(spatial RNA sequencing, spRNA-seq)^[8]的出现和发展,拓展了纤维化疾病的研究途径,使得在空间分辨率水平上解码纤维化疾病的细胞和分子基础、进而在组织原位解析细胞间相互作用及其机制成为可能,这势必会加快推动抗纤维化治疗新策略的出现。本文在简要介绍该联合技术的基础上,着重讨论其在

纤维化疾病研究中的应用进展。

1 scRNA-seq 联合 spRNA-seq 简介

转录组这一术语于1999年被提出^[9],特指在细胞、组织或生物体中表达的所有RNA分子的完整集合,转录组学则是针对转录组所进行的研究。在过去的20余年里,转录组学经历了3个发展阶段^[10]:(1)bulk转录组学,所得到的是组织中所有细胞基因表达数据的均值;(2)单细胞转录组学,将组织解离后得到每个单细胞的基因表达数据;(3)空间转录组学,在组织原位同时获得基因表达数据和空间分布数据。转录组学的迅猛发展依赖于高通量测序技术^[11]和不断涌现的革命性技术^[12-13],包括微流控技术、细胞标识(条形码标签)和核酸标识[唯一分子标识符(unique molecular identifiers, UMI)]技术、原位捕获技术、数据分析技术等。

目前,scRNA-seq和spRNA-seq已进入高通量高速发展时代,这2种技术的基本实验流程相似,即顺序进行样本制备、核酸捕获、cDNA合成、核酸扩增、文库构建及测序、数据可视化,但两者在样本制备和核酸捕获方面方法不同,最终数据可视化后结果有所区别(表1)。由于scRNA-seq需将组织转化为单细胞悬液,因而细胞必然失去了原有的空间位置信息。spRNA-seq可以解决scRNA-seq空间定位不足的问题,但至今该技术得到的大多是组织原位微细区域(含1个到数个细胞)的基因表达数据,较少能够达到真正意义上的单细胞水平。近年来常将这2种技术联合使用,既可以优势互补,又可以弥补各自的局限性,在诸如发现新的细胞类型和微量细胞亚群、理解组织中细胞异质性、追踪细胞发育谱系及发展遗传轨迹、探索细胞微环境相互作用和免疫应答反应、解析正常组织发育和疾病病理生理进程、研究治疗策略和研发新型药物等众多领域均具有无可限量的应用前景。

表1 单细胞RNA测序和空间RNA测序的差异

Tab 1 Differences between single-cell RNA sequencing and spatial RNA sequencing

Item	Single-cell RNA sequencing	Spatial RNA sequencing
Sample preparation methods	Dissociation of fresh tissue into single cell suspensions (enzymatic digestion, mechanical separation, physical precipitation, etc.)	Fresh tissue being either frozen in isopentane or embedded in optimal cutting temperature compound-or formalin-fixed and paraffin-embedded sample, sectioned, and imaged
Nucleic acid capture methods (tagging process)	Microfluidics (water-in-oil or micropores)	<i>In situ</i> capture, bidirectional microfluidics, laser microdissection, gel beads, etc.
Data visualization results	Gene expression data for each single cell	Gene expression data of tissue <i>in situ</i> microregions (containing 1 to several cells)

2 scRNA-seq 联合 spRNA-seq 在纤维化疾病研究中的应用

纤维化疾病可以发生在身体里的多个器官,常见的有肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、皮肤

瘢痕、心脏纤维化等,这些纤维化疾病在临床上最为常见,且临床意义重大,因此成为重点研究的对象。近几年来,scRNA-seq 联合 spRNA-seq 已应用于很多纤维化疾病的研究(表2)^[14-28]。

表2 单细胞 RNA 测序联合空间 RNA 测序在纤维化疾病中的研究

Tab 2 Single-cell RNA sequencing combined with spatial RNA sequencing in fibrotic disease research

Disease	Etiology	Subject	Result	Reference
Pulmonary fibrosis	Silica suspension was injected into the trachea (silicosis)	Mice	Inflammatory proliferating fibroblasts regulate the cell cycle, drive inflammatory response, and promote fibrosis through the GREM1/PP2R3A pathway.	[14]
	Crocidolite asbestos fibres suspension was injected into the trachea (asbestosis)	Human, mice	Monocyte-derived alveolar macrophages self-sustain through M-CSF/M-CSFR signaling and contribute to fibroblasts proliferation through PDGFA.	[15]
	Respiratory viral infections	Human, mice	In severe respiratory viral infections, injury-reactive lung fibroblasts produce ADAMTS4 to remodel the ECM and promote intense immune cell infiltration, leading to ARDS.	[16]
	IPF	Human	In the IPF fibrosis niche, abnormal basal cells are located at the edge of myofibroblast foci, and macrophages derived from profibrotic monocytes promote the formation of ectopic bronchial vascularization.	[17]
Liver fibrosis	End-stage cirrhosis	Human	The spatial transcriptome distinction between parenchymal and fibrotic regions of the liver is highly consistent with conventional histology, with a significant increase in heterogeneous mesenchymal cells, monocytes, hepatic macrophages, T cells and B cells in the fibrotic regions.	[18]
	Biliary atresia	Human	In the fibrotic niche in biliary atresia, transcriptome enrichment of immune cell subsets in profibrosis-related pathways may be the root cause of abnormally rapid liver fibrosis.	[19]
	Mice model of developmental early-onset liver failure (TD mice)	Mice	Submicron resolution spatial barcoding technology (Seq-scope) shows that inflammatory macrophages and hepatic stellate cells in TD liver increased and intertwined, and new cell populations such as Hep Injured population have increased significantly.	[20]
Renal fibrosis	Chronic kidney disease, mice model of unilateral ureteral obstruction	Human, mice	Pdgfra ⁺ /Pdgfrb ⁺ myofibroblasts are the main ECM-producing cells in renal fibrosis, which specifically express Nkd2 and have been shown to be potential targets for renal fibrosis therapy in cells and organoids.	[21]
	Mice model of ischemia-reperfusion injury and unilateral ureteral obstruction	Mice	The epithelial cells have common and segment-specific damage and repair responses, and the 2 distinct proximal tubular cell states after injury have different metabolic characteristics, with transiently activated lipid metabolism and PLIN2 ⁺ lipid droplets appearing early in ischemia-reperfusion injury.	[22]
	Diabetic kidney disease	Human	Vascular endothelial cells, fibroblasts with elevated expression of CCL19, and immune cells are enriched mainly in areas of renal fibrosis. Differentially expressed genes in parenchymal cells are enriched in inflammatory signaling pathways. Intercellular crosstalk revealed that most cell interactions are associated with chemokines.	[23]
Skin scarring	A stented wound model (mimics the wound healing kinetics of tight-skinned humans)	Mice	In the process of skin wound healing, there is a significant increase in the expression of fibrosis-related markers in some fibroblasts. Subsequently, fibroblasts undergo migration and differentiation. Ultimately, the fibrosis state is maintained through continuous inflammatory signals within the scar tissue.	[24]
	Skin dermis	Human, mice	The different fibroblast subgroups in the dermis have different functions in promoting human epidermal reconstruction in terms of Wnt signal transduction, interferon γ responsiveness, and introducing acellular dermis.	[25]
	Keloids	Human	The cells within scar tissue exhibit heterogeneity, with activation of mesenchymal transition in endothelial cells and dysregulation of TGF β /SMAD signaling pathway, leading to reciprocal interaction between fibroblasts and endothelial cells.	[26]

续表 2

Disease	Etiology	Subject	Result	Reference
Cardiac fibrosis	Heart failure, myocardial infarction model	Human, mice	Cardiac fibroblasts maintain quiescent state by degrading TGFβ, and regulate cardiomyocyte homeostasis and fibrosis through the Htra3-TGFβ-IGFBP7 pathway.	[27]
	Hypertrophic cardiomyopathy	Human	Potential key genes for cardiomyocyte transition to failure and fibroblast activation are identified, in which knockdown <i>AEBP1</i> promoting fibroblast activation and overexpressing <i>AEBP1</i> attenuating TGFβ-induced fibroblast activation.	[28]

GREM1: Gremlin 1; PPP2R3A: Protein phosphatase 2 regulatory subunit B" α; M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor; M-CSFR: Macrophage colony-stimulating factor receptor; PDGFA: Platelet derived growth factor subunit A; ADAMTS4: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4; ECM: Extracellular matrix; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis; PLIN2: Perilipin 2; CCL19: C-C chemokine ligand 19; TGFβ: Transforming growth factor β; IGFBP7: Insulin like growth factor binding protein 7; AEBP1: AE binding protein 1.

2.1 肺纤维化 肺纤维化是一种慢性进行性肺部疾病,因肺部逐渐形成大量的纤维化组织导致肺功能逐渐下降。肺尘埃沉着病(又称尘肺)是肺纤维化的常见病因之一,其中较为严重的是吸入二氧化硅(SiO₂)所致的硅肺,是目前职业病防治中的首要疾病,它会增加肺结核等肺部感染、慢性阻塞性肺疾病和癌症的风险^[29]。Shi等^[14]对比了硅肺模型小鼠和对照小鼠,通过scRNA-seq确定所有主要的细胞类型并生成成纤维细胞的转录图谱,通过spRNA-seq确定不同类型细胞的精确定位,设置7d和56d的时间点以确定细胞谱系发育,结果鉴定出在病变区域存在的炎症增殖成纤维细胞以炎症和增殖基因高表达为特征,表达TGFβ超家族成员gremlin 1(GREM1),GREM1通过靶向蛋白磷酸酶2调节亚单位B"α(protein phosphatase 2 regulatory subunit B"α,PPP2R3A)调节细胞周期,并驱动炎症反应,导致成纤维细胞活化、增殖和迁移,随后发展为SiO₂诱导的不可逆肺纤维化。该研究提示,GREM1/PPP2R3A通路可能是硅肺早期治疗的潜在靶点。

石棉沉着病又称石棉肺,是因长期吸入石棉粉尘而引起的以肺纤维化为主要病变的职业性尘肺。肺组织中存在着几种巨噬细胞群体,包括:(1)肺泡巨噬细胞,来源于胎儿单核细胞,在胎儿出生后不久就在肺泡内增殖,能够自我更新,持续存在;(2)间质巨噬细胞,包括血管周围和支气管周围巨噬细胞,表现出不同的组织定位和功能;(3)单核细胞衍生的肺泡巨噬细胞,由受损局部微环境中存在的因素驱动其募集和分化^[30]。Joshi等^[15]利用scRNA-seq与spRNA-seq等技术研究石棉诱导的肺纤维化小鼠模型和人肺纤维化组织,发现单核细胞衍生的肺泡巨噬细胞特异性定位于纤维化区域成纤维细胞附近,并表达血小板源生长因子亚基A

(platelet derived growth factor subunit A, PDGFA)等促成纤维细胞增殖的分子,该细胞还表达巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF),以自分泌的方式参与自身细胞类型的维持;阻断M-CSF/巨噬细胞集落刺激因子受体(macrophage colony-stimulating factor receptor, M-CSFR)信号转导可使纤维化生态位的单核细胞衍生的肺泡巨噬细胞缺失并改善肺纤维化。该研究提示,M-CSF/M-CSFR信号通路是控制致病性巨噬细胞自我维持和持续存在的新靶点。

ECM由结构蛋白、降解或修饰ECM的蛋白酶和糖苷酶等组成^[31]。肺感染呼吸道病毒后,ECM蛋白酶上调并重塑ECM,与非免疫肺细胞(上皮细胞、内皮细胞等)一起协同促进免疫细胞迁移到损伤部位,激活特定细胞群(如肌成纤维细胞),影响感染的结局并引起肺纤维化。Boyd等^[16]通过scRNA-seq发现呼吸道病毒感染能诱导肺成纤维细胞产生多种功能状态,包括ECM合成状态、损伤反应状态、干扰素反应状态;通过spRNA-seq发现损伤反应性成纤维细胞在病毒感染期间主要分布于炎症间质区域,并检测到该区域高表达血小板反应蛋白解整合素金属肽酶4(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4, ADAMTS4)。研究表明在严重流感病毒感染期间,过度激活的损伤反应性肺成纤维细胞驱动了致命的免疫病理,通过产生ADAMTS4等ECM重塑酶及炎症因子改变肺部微环境,以牺牲肺功能为代价促进强烈的免疫细胞浸润,导致急性呼吸窘迫综合征的发生。该研究提示,靶向损伤反应性肺成纤维细胞ECM蛋白酶活性,有望成为严重呼吸道感染时保护肺功能的有效途径。

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明、以弥漫性肺泡炎和肺泡结

构紊乱最终导致肺纤维化为特征的疾病,预后差。近来对其发病模式的认识已从由成纤维细胞驱动转变为由上皮驱动^[32],这尚待进一步确证。Adams等^[17]通过对IPF患者、吸烟和非吸烟对照、慢性阻塞性肺疾病患者的肺组织进行scRNA-seq分析,绘制了IPF的单细胞转录图谱,证实其上皮、内皮和基质细胞中的异常细胞群体极具复杂性和多样性,同时还鉴定出包括促纤维化巨噬细胞群在内的18种免疫细胞亚群。该研究描述了IPF中的纤维化生态位,异常基底细胞(共表达基底上皮、间充质、衰老和发育标志物)与肌成纤维细胞灶交界,在促纤维化单核细胞衍生的巨噬细胞存在的情况下,形成异位支气管血管化的病变,即在纤维化区域出现XV型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type XV $\alpha 1$ chain, COL15A1)⁺CD31⁺内皮细胞,而正常肺中COL15A1⁺细胞局限在大气道附近的血管内皮。该研究使用免疫组织化学方法对细胞进行空间定位,如果利用spRNA-seq将更有利于解读复杂多样的异常细胞群体间的关联,为其治疗提供有效的解决方案和理论基础。

2.2 肝纤维化病 病毒性肝炎或代谢性慢性肝病是引起肝纤维化和肝硬化的主要原因,纤维化程度与肝脏疾病进展相关,是影响肝脏疾病结局和罹患肝癌风险的关键因素^[33]。Chung等^[18]将scRNA-seq、spRNA-seq数据与基因去卷积分析相结合,以鉴定终末期肝硬化时肝实质区域和纤维化区域富集的特定细胞类型,并分析相关基因的表达。研究中spRNA-seq结果清楚地识别出了存在不同基因表达的组织区域,与常规组织学区分的肝实质区域和纤维化区域高度一致,在纤维化区域中异质性间充质细胞、单核细胞、肝巨噬细胞、T细胞和B细胞明显增多,提示scRNA-seq联合spRNA-seq可完善细胞谱系的定位和确定基因表达含量,有助于寻找抗纤维化靶点。

胆道闭锁是一种严重的炎症性和纤维化性的胆道疾病,异常快速肝纤维化致使该病预后不佳。Ye等^[19]通过scRNA-seq和spRNA-seq揭示了胆道闭锁纤维化生态位的分子表达、细胞谱系和空间免疫微环境。该研究发现,纤维化生态位内的免疫细胞亚群包括“中间”CD14⁺⁺CD16⁺单核细胞、瘢痕相关巨噬细胞、自然杀伤T细胞、过渡性B细胞和纤维胶凝蛋白3(ficolin-3, FCN3)⁺中性粒细胞;基因功能和信号通路富集分析显示,平滑肌细胞/成纤维细胞增殖的正向调节通路及血管内皮生长因子受体/血管内皮生长因子/

表皮生长因子受体/成纤维细胞生长因子的正向调节/反应通路在这些细胞中富集,提示这些免疫细胞在胆道闭锁所致肝纤维化中起到关键性作用,可能是胆道闭锁异常快速肝纤维化的根本原因。

Cho等^[20]开发了一种亚微米分辨率的空间条形码技术,称为Seq-Scope。该技术中点对点分辨率平均约为0.6 μm ,其在单细胞水平得到的数据量与常规单细胞测序数据量相当(4 700 UMI/细胞)。该技术可在亚细胞水平上呈现空间组织细胞的基因表达数据。研究者将Seq-Scope用于早发型肝衰竭小鼠发育模型(TD小鼠),揭示了病态肝脏中异常转录组信息。该技术在肝细胞氧化应激导致的局部肝损伤、炎症和纤维化反应中可以检测相关细胞类型,同时也能区分出细胞核、细胞质和线粒体等结构。研究发现,TD肝脏中炎症巨噬细胞和肝星状细胞大量增加并相互交织,新的细胞类群如Hep Injured(损伤反应肝细胞)类群等显著上升。研究结果为理解肝纤维化的细胞类群及其相互作用提供了实验证据。

2.3 肾纤维化 肾纤维化是慢性肾脏疾病进展的标志,其中纤维化形成的细胞起源、功能异质性和免疫调节等仍存在争议^[34]。Kuppe等^[21]使用scRNA-seq分析了人健康肾脏和纤维化肾脏的近端、非近端小管细胞的转录组,绘制人类肾脏转录图谱;通过在小鼠中使用遗传命运追踪、scRNA-seq和染色质转座酶可及性测序(assay for transposase-accessible chromatin using sequencing, ATAC-seq)以及人纤维化肾的spRNA-seq,在高分辨率水平下揭示了人类肾肌成纤维细胞及其前体细胞的起源和分化。该研究发现血小板源生长因子受体 α /血小板源生长因子受体 β 双阳性的终末分化的肌成纤维细胞是肾纤维化时主要的ECM产生细胞,裸露角质蛋白同源物2(naked cuticle homolog 2, Nkd2)在该细胞中特异性表达,并且在纤维化过程中持续增加,在人Pdgfrb细胞系和肾脏类器官中均证实Nkd2可作为肾纤维化的潜在治疗靶标。

为进一步研究肾纤维化的分子和代谢机制,Li等^[22]利用sci-RNA-seq3技术(一种可实现多样本高通量检测的scRNA-seq技术),对肾脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury, IRI)模型和单侧输尿管梗阻模型小鼠肾纤维化早期、中期、晚期进行了全时间尺度的鉴定,研究涵盖整个肾脏上皮、内皮、基质和免疫系统在内的50种细胞类型或细胞态,发现肾单位上皮具有共同的和节段特异性的损伤和修复反应,确定了2种损伤的近端小管细胞

状态具有不同的代谢特征。进一步通过 spRNA-seq 发现 IRI 早期出现瞬时激活的脂质代谢和围脂滴蛋白 2 (perilipin 2, PLIN2)⁺ 脂滴, PLIN2 在近端小管细胞的代谢和能量调控中发挥重要的动态调节作用。这些全新的发现将加深对此类疾病的认知。

尽管糖尿病激活的纤维化信号在各种组织中具有共同的特征,但一些器官如心脏、肾脏和肝脏,会发生更明显和临床意义更显著的纤维化^[35]。糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病主要的并发症之一,也是全球慢性肾脏疾病的主要原因。Chen 等^[23]对 DKD 患者的肾脏标本进行了 scRNA-seq 和 spRNA-seq 分析,发现在 DKD 的肾纤维化区域中富含静脉内皮细胞、C-C 基序趋化因子配体 19 (C-C chemokine ligand 19, CCL19) 表达升高的成纤维细胞及免疫细胞,且静脉内皮细胞与成纤维细胞共定位。DKD 中大多数肾实质细胞的差异表达基因主要富集在炎症信号通路中。细胞间串扰揭示了 DKD 中的大多数细胞相互作用与趋化因子有关。这些结果丰富了对肾纤维化中细胞群、细胞间相互作用和信号通路的了解。

2.4 皮肤瘢痕皮肤 伤口创面愈合是通过纤维化和瘢痕形成实现的。瘢痕由成纤维细胞沉积的致密 ECM 组成,组织僵硬、血管少、缺少正常皮肤附件,因此缺乏皮肤的固有功能。Foster 等^[24]利用小鼠支架式伤口模型限制肉环收缩模拟人类伤口,通过 scRNA-seq 联合 spRNA-seq 以及 scATAC-seq,证实成纤维细胞在伤口愈合过程中的迁移、增殖和分化是对其局部机械环境破坏的适应性动态反应。该研究发现在损伤愈合过程中,部分成纤维细胞纤维化相关标记物 (如 Engrailed-1、Colla1、Tgfb2 和 Jun) 表达显著提高,随后在向伤口中心迁移时开始分化,最终愈合的伤口通过瘢痕组织内持续的炎症信号维持稳定的纤维化状态。该研究定义了成纤维细胞对损伤反应的时空动态。

为探索人皮肤真皮中成纤维细胞异质性的程度,Philippeos 等^[25]结合人类和小鼠真皮的 spRNA-seq 和人类真皮成纤维细胞的 scRNA-seq,确定了至少 4 种人真皮成纤维细胞亚群及其定位。既往研究将 CD26 确定为关键的谱系标志物,且认为 CD26⁺ 成纤维细胞有助于皮肤纤维化^[36-37],但 Philippeos 等^[25]研究发现,存在于大部分成人真皮中的 CD26 却并不存在于真皮最上层 (乳头层) 成纤维细胞中。该研究还发现不同的成纤维细胞亚群在 Wnt 信号转导、对干扰素 γ 的反应性及引入脱细胞真皮时,对促进人表皮重建有不同的功能。这些

结果对于了解损伤反应细胞的起源、激活和分化轨迹至关重要,并有助于制订针对特定成纤维细胞亚群的治疗策略以促进组织修复。

以往瘢痕疙瘩发病机制的研究主要集中在成纤维细胞及其功能障碍上。Shim 等^[26]应用 scRNA-seq 和 spRNA-seq 分析瘢痕疙瘩组织样本和正常皮肤对照样本,scRNA-seq 结果揭示了瘢痕疙瘩内的成纤维细胞、内皮细胞和肌成纤维细胞等细胞的异质性;spRNA-seq 结果显示与疾病相关的成纤维细胞在瘢痕疙瘩较深的区域富集,主要位于有内皮转录物的斑点周围。在瘢痕疙瘩内皮细胞中观察到间充质标志物激活和 TGF β /SMAD (线虫 Sma 和果蝇 Mad 的同源基因) 信号失调,对间充质和血管标志物的多重免疫荧光共定位提示瘢痕疙瘩内皮细胞的间充质活化。细胞-细胞相互作用分析确定了瘢痕疙瘩成纤维细胞和内皮细胞之间的重要网络,spRNA-seq 共定位分析支持这种细胞串扰。该研究提示纤维血管通信和内皮细胞间充质激活可能参与瘢痕疙瘩的发病机制。

2.5 心脏纤维化 心脏纤维化是由不同病因所致心脏疾病的常见病理表现,ECM 蛋白的异常沉积使心脏间质扩张,最终纤维化的程度会干扰心脏收缩和舒张功能,并在心律失常的发病机制中发挥作用^[38]。Ko 等^[27]通过 scRNA-seq 与 spRNA-seq 等技术阐明,高温需求 A 丝氨酸肽酶 3 (high temperature requirement A serine peptidase 3, Htra3) 通过降解 TGF β 维持心脏成纤维细胞的静止状态。Htra3 是心脏纤维化和心力衰竭的关键调节因子,压力过载将下调心脏成纤维细胞中 Htra3 的表达,激活 TGF β 信号促进纤维化,并通过 DNA 损伤积累和诱导衰竭心肌细胞分泌表型而导致心力衰竭,胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (insulin like growth factor binding protein 7, IGFBP7) 是 TGF β 下游的一种细胞因子,由衰竭的心肌细胞分泌,是晚期心力衰竭最可预测的标志物。该研究提示心脏成纤维细胞通过 Htra3-TGF β -IGFBP7 途径调节心肌细胞稳态和纤维化的作用,为心力衰竭的治疗提供了潜在的治疗靶点。

肥厚型心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) 是最常见的心脏遗传性疾病,其特征是心肌细胞肥大和心脏纤维化,可发展为心力衰竭。深入阐明 HCM 病理性心脏重塑中的谱系特异性变化,对于开发缓解进展的疗法至关重要。Liu 等^[28]通过对 HCM 患者和健康供体的心脏组织进行单细胞核转录组测序,并对患者的组织切片进行 spRNA-

seq, 发现了HCM中基因表达、亚群组成和细胞间通信的谱系特异性变化。根据拟时序分析、差异表达分析和差异调节网络分析的结果, 鉴定了心肌细胞向衰竭状态过渡过程中的潜在关键基因, 如成纤维细胞生长因子12、白细胞介素31受体A和cAMP反应元件结合蛋白5, 还揭示了心脏成纤维细胞活化的转录组动力学, 并获知了参与心脏纤维化的潜在关键基因, 如AE结合蛋白1(AE binding protein 1, *AEBP1*)、*runt*相关转录因子1、间充质同源盒1、淋巴增强结合因子1和神经毒素3。利用spRNA-seq数据, 在患者组织切片上确认了候选基因、途径和亚群的空间活动模式。实验结果表明, 敲低*AEBP1*可以促进成纤维细胞的活化, 而过表达*AEBP1*则可以减弱TGFβ诱导的活化。该研究全面分析了HCM的细胞谱系和转录图谱, 为开发靶向治疗药物奠定了理论基础。

3 小结

纤维化疾病具有共性的细胞学基础, ECM的异常积聚由异常激活状态的成纤维细胞产生, 而先天性和适应性免疫反应在组织损伤修复过程中发挥重要的调节作用, 其中巨噬细胞和T细胞被募集并产生相应表型, 进而调节成纤维细胞的活性状态影响ECM的重塑。近年来scRNA-seq联合spRNA-seq研究进一步证实了纤维化疾病的上述机制, 解码了纤维化的细胞和分子基础。在细胞方面的研究结果加深了对成纤维细胞、免疫细胞的复杂异质性的认识, 并重新认识了上皮细胞、内皮细胞和纤维化时出现的异常细胞群体。研究中鉴定出的部分细胞类群, 如硅肺病变区域中的炎症增殖性成纤维细胞、石棉肺中表达M-CSF的单核细胞衍生的肺泡巨噬细胞、呼吸道病毒感染时损伤反应性肺成纤维细胞、肾纤维化时的Pdgfra⁺/Pdgfrb⁺终末分化的肌成纤维细胞、皮肤真皮深部的CD26⁺成纤维细胞等, 有望成为抗纤维化治疗的靶细胞。在分子方面的研究发现, 如GREM1/PPP2R3A通路、M-CSF/M-CSFR通路、ECM重塑酶ADAMTS4、Nkd2、Htra3-TGFβ-IGFBP7通路、AEBP1、TGFβ/SMAD通路等, 有望成为抗纤维化治疗的靶分子或靶通路。另外, IPF中的异位内皮细胞、DKD中的静脉内皮细胞与成纤维细胞共定位、瘢痕疙瘩中的纤维血管通信和内皮细胞间充质激活等, 提示内皮细胞在纤维化进程中扮演重要角色, 仍需加深这一方面的探索。

scRNA-seq联合spRNA-seq在纤维化疾病中的研究刚刚起步, 所取得的海量数据也有待深度挖

掘, 目前所取得的一些研究进展仍较多依赖于以往的认识, 因此需要开发出新的计算工具和创造性的分析方法, 并且结合纤维化疾病和动物模型的时间性差异变化, 构建起纤维化疾病的多细胞时空数字模型; 同时随着单细胞其他组学如蛋白质组学、代谢组学、糖基化组学等取得的研究进展, 综合多组学研究将更加有利于对纤维化疾病的认识和理解, 从而制订精准的纤维化评估体系和治疗策略, 推动抗纤维化治疗的发展。

[参考文献]

- [1] HENDERSON N C, RIEDER F, WYNN T A. Fibrosis: from mechanisms to medicines[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 555-566. DOI: 10.1038/s41586-020-2938-9.
- [2] WYNN T A, RAMALINGAM T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028-1040. DOI: 10.1038/nm.2807.
- [3] PLIKUS M V, WANG X, SINHA S, et al. Fibroblasts: origins, definitions, and functions in health and disease[J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3852-3872. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.024.
- [4] HUANG E, PENG N, XIAO F, et al. The roles of immune cells in the pathogenesis of fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5203. DOI: 10.3390/ijms21155203.
- [5] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 450-462. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
- [6] ZHANG M, ZHANG S. T cells in fibrosis and fibrotic diseases[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1142. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01142.
- [7] ANDREWS T S, KISELEV V Y, MCCARTHY D, et al. Tutorial: guidelines for the computational analysis of single-cell RNA sequencing data[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(1): 1-9. DOI: 10.1038/s41596-020-00409-w.
- [8] MOSES L, PACHTER L. Museum of spatial transcriptomics[J]. *Nat Methods*, 2022, 19(5): 534-546. DOI: 10.1038/s41592-022-01409-2.
- [9] PIÉTU G, MARIAGE-SAMSON R, FAYEIN N A, et al. The Genexpress IMAGE knowledge base of the human brain transcriptome: a prototype integrated resource for functional and computational genomics[J]. *Genome Res*, 1999, 9(2): 195-209.
- [10] LI X, WANG C Y. From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing[J]. *Int J Oral Sci*, 2021, 13(1): 36. DOI: 10.1038/s41368-021-00146-0.
- [11] REUTER J A, SPACEK D V, SNYDER M P. High-throughput sequencing technologies[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 586-597. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.
- [12] LEE J, HYEON D Y, HWANG D. Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods[J].

- Exp Mol Med, 2020, 52(9): 1428-1442. DOI: 10.1038/s12276-020-0420-2.
- [13] SANSONE A. Spatial transcriptomics levels up[J]. Nat Methods, 2019, 16(6): 458. DOI: 10.1038/s41592-019-0441-8.
- [14] SHI X, WANG J, ZHANG X, et al. GREM1/PPP2R3A expression in heterogeneous fibroblasts initiates pulmonary fibrosis[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 123. DOI: 10.1186/s13578-022-00860-0.
- [15] JOSHI N, WATANABE S, VERMA R, et al. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages[J]. Eur Respir J, 2020, 55(1): 1900646. DOI: 10.1183/13993003.00646-2019.
- [16] BOYD D F, ALLEN E K, RANDOLPH A G, et al. Exuberant fibroblast activity compromises lung function via ADAMTS4[J]. Nature, 2020, 587(7834): 466-471. DOI: 10.1038/s41586-020-2877-5.
- [17] ADAMS T S, SCHUPP J C, POLI S, et al. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Sci Adv, 2020, 6(28): eaba1983. DOI: 10.1126/sciadv.aba1983.
- [18] CHUNG B K, ØGAARD J, REIMS H M, et al. Spatial transcriptomics identifies enriched gene expression and cell types in human liver fibrosis[J]. Hepatol Commun, 2022, 6(9): 2538-2550. DOI: 10.1002/hep4.2001.
- [19] YE C, ZHU J, WANG J, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal the fibrosis-related immune landscape of biliary atresia[J]. Clin Transl Med, 2022, 12(11): e1070. DOI: 10.1002/ctm2.1070.
- [20] CHO C S, XI J, SI Y, et al. Microscopic examination of spatial transcriptome using Seq-Scope[J]. Cell, 2021, 184(13): 3559-3572.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2021.05.010.
- [21] KUPPE C, IBRAHIM M M, KRANZ J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis[J]. Nature, 2021, 589(7841): 281-286. DOI: 10.1038/s41586-020-2941-1.
- [22] LI H, DIXON E E, WU H, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling defines shared and unique epithelial injury responses during kidney fibrosis[J]. Cell Metab, 2022, 34(12): 1977-1998.e9. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.09.026.
- [23] CHEN D, SHAO M, SONG Y, et al. Single-cell RNA-seq with spatial transcriptomics to create an atlas of human diabetic kidney disease[J]. FASEB J, 2023, 37(6): e22938. DOI: 10.1096/fj.202202013RR.
- [24] FOSTER D S, JANUSZYK M, YOST K E, et al. Integrated spatial multiomics reveals fibroblast fate during tissue repair[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(41): e2110025118. DOI: 10.1073/pnas.2110025118.
- [25] PHILIPPEOS C, TELERMAN S B, OULÈS B, et al. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(4): 811-825. DOI: 10.1016/j.jid.2018.01.016.
- [26] SHIM J, OH S J, YEO E, et al. Integrated analysis of single-cell and spatial transcriptomics in keloids: highlights on fibrovascular interactions in keloid pathogenesis[J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(8): 2128-2139.e11. DOI: 10.1016/j.jid.2022.01.017.
- [27] KO T, NOMURA S, YAMADA S, et al. Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- β -IGFBP7 axis[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3275. DOI: 10.1038/s41467-022-30630-y.
- [28] LIU X, YIN K, CHEN L, et al. Lineage-specific regulatory changes in hypertrophic cardiomyopathy unraveled by single-nucleus RNA-seq and spatial transcriptomics[J]. Cell Discov, 2023, 9(1): 6. DOI: 10.1038/s41421-022-00490-3.
- [29] CĂLUȚU I M, SMĂRĂNDESCU R A, RASCU A. Biomonitoring exposure and early diagnosis in silicosis: a comprehensive review of the current literature[J]. Biomedicines, 2022, 11(1): 100. DOI: 10.3390/biomedicines11010100.
- [30] AEGERTER H, LAMBRECHT B N, JAKUBZICK C V. Biology of lung macrophages in health and disease[J]. Immunity, 2022, 55(9): 1564-1580. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.08.010.
- [31] HYNES R O, NABA A. Overview of the matrisome: an inventory of extracellular matrix constituents and functions[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(1): a004903. DOI: 10.1101/cshperspect.a004903.
- [32] CONFALONIERI P, VOLPE M C, JACOB J, et al. Regeneration or repair? the role of alveolar epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)[J]. Cells, 2022, 11(13): 2095. DOI: 10.3390/cells11132095.
- [33] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875. DOI: 10.3390/cells9040875.
- [34] FALKE L L, GHOLIZADEH S, GOLDSCHMEDING R, et al. Diverse origins of the myofibroblast—implications for kidney fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(4): 233-244. DOI: 10.1038/nrneph.2014.246.
- [35] TULETA I, FRANGOIANNIS N G. Diabetic fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(4): 166044. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.166044.
- [36] RINKEVICH Y, WALMSLEY G G, HU M S, et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential[J]. Science, 2015, 348(6232): aaa2151. DOI: 10.1126/science.aaa2151.
- [37] HU M S, LONGAKER M T. Dipeptidyl peptidase-4, wound healing, scarring, and fibrosis[J]. Plast Reconstr Surg, 2016, 138(5): 1026-1031. DOI: 10.1097/prs.0000000000002634.
- [38] FRANGOIANNIS N G. Cardiac fibrosis[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(6): 1450-1488. DOI: 10.1093/cvr/cvaa324.