·基础研究·

$CD8^+$ T细胞与活化的肝星状细胞在门静脉癌栓中的关键配体-受体轴驱动基质激活和T细胞重编程

杨春雨[1]，乔亦丹[1]，孙张玥[1]，王佳佳[1]，崔金晖[2]，陈　洁[1]
（1. 中山大学附属第三医院肿瘤内科，广东 广州 510630；2. 中山大学附属第三医院妇产科，广东 广州 510630）

摘　要：【目的】鉴定可能有助于优化伴门静脉癌栓（PVTT）肝细胞癌免疫治疗策略的关键配体-受体作用轴。【方法】从基因表达综合数据库（GEO）下载正常组织（Norm）和PVTT组织的单细胞转录组测序数据，并进行整合分析与细胞注释。采用CellChat推断细胞间通讯网络并比较信号通路活性，从而筛选差异显著的候选配体-受体作用轴。随后，利用多重免疫荧光（mIF）在组织水平评估候选作用轴相关信号的空间分布特征。在细胞水平上，进一步通过qPCR和流式细胞术检测外周血来源$CD8^+$T细胞及人肝星状细胞系LX-2中关键配体和受体的表达情况。最后，结合重组蛋白刺激以及拮抗剂或中和阻断实验，对其功能效应进行体外验证。【结果】分析结果显示，在PVTT中，$CD8^+$ T细胞与活化肝星状细胞（aHSCs）之间存在显著的双向通讯。由$CD8^+$ T细胞指向aHSCs的通讯中，SPP1-CD44轴最为突出；而在相反方向上，MIF-（CD74+CD44）轴获得了较强支持。上述两条作用轴均在生物信息学筛选、组织空间定位分析以及细胞与功能实验验证中得到一致支持。【结论】SPP1-CD44轴和MIF-（CD74+CD44）轴可能通过促进间质活化及诱导T细胞功能重塑，共同参与塑造PVTT的免疫抑制性肿瘤微环境（ITME），并有望成为提高PVTT患者免疫治疗应答的潜在干预靶点。

关键词：门静脉癌栓；肿瘤微环境；细胞间通讯；$CD8^+$ T细胞；激活态肝星状细胞
中图分类号：R73　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-3554（2026）03-0482-14
DOI：10.11714/jsysu.med.YX20260048

Key Ligand-receptor Axes Between $CD8^+$ T Cells and Activated Hepatic Stellate Cells in Portal Vein Tumor Thrombus Drive Stromal Activation and T-cell Reprogramming

YANG Chunyu[1], QIAO Yidan[1], SUN Zhangyue[1], WANG Jiajia[1], CUI Jinhui[2], CHEN Jie[1]
（1. Department of Medical Oncology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China）
Correspondence to: CHEN Jie, E-mail: chjie23@mail.sysu.edu.cn; CUI Jinhui, E-mail: cuijhui@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To identify key ligand-receptor axes that may improve immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus (PVTT).【Methods】Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) data from normal tissues (Norm) and PVTT cells were downloaded from the gene expression omnibus (GEO) database, integrated, and annotated. CellChat was used to infer intercellular communication and compare pathway activities to screen significantly differential candidate ligand-receptor axes. Multiplex immunofluorescence (mIF) was then performed to evaluate the spatial distribution of signals related to candidate axes at the tissue level. The expression of key ligands and receptors was validated by qPCR and flow cytometry in peripheral blood-derived $CD8^+$ T cells and the human hepatic stellate cell line LX-2. Functional effects were further assessed in vitro using recombinant proteins and antagonists or

收稿日期：2026-03-23　　**录用日期：**2026-04-29
基金项目：广东基础与应用基础研究基金（2023A1515011803，2022A1515010547）
作者简介：杨春雨，第一作者，研究方向：肝细胞癌，E-mail：yangchy65@mail2.sysu.edu.cn；陈洁，通信作者，副主任医师，E-mail：chjie23@mail.sysu.edu.cn；崔金晖，通信作者，副主任医师，E-mail：cuijhui@mail.sysu.edu.cn

neutralizing blockers.【Results】The analysis revealed strong bidirectional communication between CD8$^+$ T cells and activated hepatic stellate cells (aHSCs) in PVTT. The SPP1–CD44 axis was the most prominent in the direction from CD8$^+$ T cells to aHSCs, whereas the MIF–(CD74+ CD44) axis was strongly supported in the opposite direction. These axes were consistently supported by bioinformatic screening, tissue spatial analysis, and cellular or functional validation.【Conclusion】The SPP1–CD44 and the MIF–(CD74+ CD44) axes may collectively shape the immunosuppressive tumor microenvironment (ITME) of PVTT through stromal activation and T-cell functional reprogramming, suggesting potential targets for improving immunotherapeutic responsiveness in patients with PVTT.

Key words: portal vein tumor thrombus; tumor microenvironment; intercellular communication; CD8$^+$ T cells; activated hepatic stellate cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2026,47(3):482–495]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是全球范围内严重的公共卫生问题,也是癌症相关死亡的第三大原因[1-2]。在肿瘤发生发展的早期阶段,HCC通常缺乏特异性临床表现,因此约80%的患者在确诊时已处于相对晚期[3]。由于晚期HCC缺乏可靠且有效的治疗手段,患者确诊后的生存期通常仅为10~24个月[3]。受肝脏解剖结构特点以及HCC高度侵袭性生物学行为的共同影响,肿瘤极易侵犯门静脉系统,因此在初诊时约有10%~40%的患者已伴有门静脉癌栓(portal vein tumor thrombus,PVTT)[4-6]。PVTT患者不仅更容易发生肝内及肝外转移,还常伴随门静脉高压、恶性腹水及肝功能衰竭等严重并发症,进而导致病情迅速恶化、预后极差。在未接受干预的情况下,伴PVTT患者的中位生存期(overall survival,OS)仅为2.7~4.0个月[7-8]。现行国际指南通常建议,对于合并PVTT的HCC患者,以靶向治疗单药作为主要治疗策略[9]。然而,越来越多的研究表明,靶向单药治疗的疗效往往有限。例如,Nakazawa等[10]报道,对于主干型PVTT(Vp3–Vp4)患者,接受索拉非尼或仑伐替尼单药治疗后的中位OS仅为4.3~7.2个月。近年来,免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)为晚期HCC治疗带来了新的希望[11]。Ren等[12-14]研究显示,ICIs联合靶向治疗可进一步改善晚期HCC患者的生存获益,并已成为该类患者推荐的一线治疗方案。然而,即便联合治疗较既往方案显示出更优疗效,其总体治疗收益仍难言理想,客观缓解率(objective response rate,ORR)仅约为25%~35%。Liu等[15]最新研究表明,在HCC中,功能性抑制肿瘤内免疫抑制性B细胞群体,能够重塑肿瘤免疫微环境并增强CD8$^+$ T细胞介导的抗肿瘤免疫反应,从而显著提高STING激动剂或PD-1阻断治疗的疗效。这一发现提示,肿瘤免疫微环境在HCC免疫治疗中具有不可替代的重要作用。同时也提示,在免疫生态更具特殊性的PVTT微环境中,针对关键的免疫抑制或间质调控通路进行干预,以改善其免疫抑制状态,可能是提升免疫治疗效果的重要方向。既往研究已表明,细胞外基质失衡及局部黏附异常与PVTT形成密切相关[16-17];然而,PVTT相关的免疫成分及其在疾病进展中的具体作用,目前仍缺乏系统而深入的阐释。活化肝星状细胞(activated hepatic stellate cells,aHSCs)是肝脏间质重塑和纤维化反应中的关键效应细胞[18]。在肿瘤环境中,aHSCs不仅能够重构细胞外基质,还可分泌多种免疫调节因子,从而改变HCC的肿瘤免疫微环境[19]。另一方面,CD8$^+$ T细胞作为抗肿瘤免疫的核心效应细胞,其数量、浸润程度及功能状态(如活化、耗竭和细胞毒性)均与免疫治疗疗效密切相关[20-21]。Ma等[22]研究发现,抑制MMP9可恢复CD8$^+$ T细胞在肿瘤中的浸润和细胞毒作用,进而改善抑制性的肿瘤免疫微环境,并显著增强抗PD-1治疗的疗效。因此,CD8$^+$ T细胞与aHSCs可能是探索PVTT中关键间质–免疫互作机制、并进一步提高ICIs疗效的重要研究切入点。CellChat是一种用于解析细胞间通讯网络的计算工具,可用于识别单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing,scRNA-seq)数据集中细胞间通讯的关键特征,并预测相关信号通路可能发挥的生物学功能[23]。CellChat基于质量作用定律模型,整合了目前已知的多种分子互作信息,包括具有多聚亚基结构的配体–受体核心相互作用。此外,该工具还结合网络分析与模式识别方法,对不同细胞的主要信号输入与输出进行预测,并以可视化形式展示结果,从而有助于发掘具有潜在研究价值的关键配体

或受体[24-25]。基于上述研究背景,本研究整合正常组织(Norm)与PVTT组织的单细胞转录组数据,系统筛选$CD8^+$ T细胞与aHSCs之间相互作用强度存在显著差异的配体-受体互作轴,旨在揭示PVTT免疫微环境中的关键细胞互作机制。

1 材料与方法

1.1 肝癌患者组织样本及多标记组织免疫荧光染色

本研究所用组织切片由中山大学附属第三医院肿瘤科提供,包含4例配对的PVTT组织及其对应的癌旁正常组织。PVTT组织切片编号分别为:L25-13523-5、22-13076-1、21-12020-4和19-13914-25;对应的癌旁正常组织切片编号分别为:L25-13523-12、22-13076-27、21-12020-8和19-13914-5。所有患者PVTT的病理诊断结果均由中山大学附属第三医院病理科医师进行确认。组织离体后,于1周内充分浸润于液体甲醛中固定,并进行石蜡包埋,以便长期保存。组织切片在脱蜡和水化后,采用EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)进行抗原修复,修复时间为15 min。所有患者均在组织样本采集前签署知情同意书。本研究已获得中山大学附属第三医院伦理委员会批准(伦理批准号:RG2023-106)。

进行免疫荧光染色时,首先将组织切片置于质量分数3%H_2O_2中孵育25 min,以封闭内源性过氧化物酶活性。随后,使用体积分数5%血清于25 ℃封闭30 min。封闭结束后,加入第一抗体,并于4 ℃孵育过夜;随后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)偶联的二抗,在室温下孵育50 min。之后加入TSA工作液,于室温避光孵育10 min。完成上述步骤后,使用EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)再次进行抗原修复,具体方法为采用微波炉进行加热处理:中火加热8 min,自然冷却8 min后,再以低温加热7 min。随后加入第二抗体,并于4 ℃孵育过夜。之后加入相应的HRP偶联二抗,于室温避光孵育50 min;再加入TSA,于室温避光孵育10 min。按照上述相同步骤,依次加入第三、第四及第五抗体,并分别进行相应的HRP偶联的二抗孵育及TSA显色处理。最后,采用DAPI对细胞核进行染色,在室温避光条件下孵育10 min。染色完成后,使用抗荧光淬灭封片剂进行封片,并在扫描仪下采集图像。mIF能够在同一张组织切片上同时标记和分析多种生物标志物,同时保留组织原有的空间结构信息。与传统免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)相比,mIF不仅能够节约宝贵的组织样本,还可减少由于连续切片之间空间位置偏差所带来的误差[26]。因此,mIF已被广泛应用于评估TME中不同细胞群体的分布特征及其空间关系[27-28]。α-SMA是aHSCs的特异性标志物[29],在本研究中,α-SMA^+细胞代表aHSCs。除特别说明外,本研究所使用的全部免疫荧光抗体均购自Servicebio公司。

1.2 数据收集

本研究从GSE149614数据集中筛选了8例非肿瘤肝组织样本和2例PVTT组织样本。LIHC的GSE149614单细胞RNA测序(scRNA-seq)数据集来源于基因表达综合(gene expression omnibus,GEO)数据库(https://www.ncbi.xyz/geo/)。

1.3 基于Seurat的scRNA-seq数据质控

将GSE149614数据集的结果矩阵导入R软件中的Seurat(version 4.0)包,以构建用于后续分析的Seurat对象[30]。本研究采用了较为严格的数据筛选标准。首先,仅保留在每个样本中至少有3个细胞共同表达的基因/特征。其次,仅纳入检测到特征数≥500且<6 000的细胞。此外,线粒体RNA所占比例超过20%的细胞予以剔除。随后,利用scDblFinder基于基因表达数据对双细胞(doublets)进行识别[31]。

我们对原始数据集进行了严格的质量控制:在原始71 915个PVTT细胞和25 713个Norm细胞中,初步筛选后分别保留6 971个PVTT单细胞表达谱和24 183个Norm单细胞表达谱。进一步去除双细胞后,最终获得2 460个PVTT单细胞表达谱和23 271个Norm单细胞表达谱,形成了更为可靠、稳健并适用于后续分析的单细胞数据集。最后,对细胞周期效应进行了去除。上述严格的筛选标准和质量控制流程旨在最大限度保证数据的质量与可靠性。

随后,使用NormalizeData函数对GSE149614数据集进行标准化处理。之后,根据以变异基因为输入ElbowPlot函数结果,进行主成分分析(principal component analysis,PCA),以筛选具有显著意义的主成分(principal components,PCs)。最终选取前30个主成分作为t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding(t-SNE)分析的输入参数(dims=30)。

1.4 scRNA-seq的聚类分析、细胞类型注释及细胞间通讯分析

基于前30个主成分，采用*t*SNE算法进行整体降维分析。随后，结合从CellMarker2.0数据库（http://117.50.127.228/CellMarker）下载的marker genes对细胞类型进行进一步注释。细胞聚类及各细胞簇的类型鉴定通过FindClusters函数完成[32]。除细胞类型注释外，本研究还使用ScType软件检索不同细胞群体之间的差异性marker genes[33]。同时，采用FindAllMarkers函数并结合Wilcoxon秩和检验，对不同细胞类型之间的基因表达进行比较，从而识别差异表达基因。

在细胞间通讯的推断与分析方面，本研究使用CellChat（version 1.6.1）工具，该工具是一个整合了配体、受体、辅因子及其相互作用关系的公共数据库和分析框架[24]。CellChat及其基于网页的Explorer平台（http://www.cellchat.org/）能够用于发掘新的细胞间通讯关系，并构建细胞-细胞通讯图谱。进行细胞互作分析时，表达水平是相对于所有转录组中同一组编码基因的总reads mapping量进行计算的。随后，在每一个单细胞簇内部，对表达值取平均，以用于后续的细胞间互作分析，在滤除通讯强度较低的相互作用关系后，以配体-受体水平计算通讯强度。随后，构建细胞-细胞通信网络，并对相互作用权重进行量化（附表1）。

1.5 重组蛋白及阻断试剂

重组人源蛋白MIF和SPP1，以及MIF受体拮抗剂ISO-1和抗SPP1中和抗体MPIIIB10，均购自中国陶术生物科技有限公司（Taosu Biotechnology）。各试剂的工作浓度如下：MIF为0.1 μg/mL，SPP1为0.1 μg/mL，ISO-1为2×10^{-5}mol/L，MPIIIB10为100 ng/mL。在阻断实验中，在加入相应重组蛋白之前，先将细胞与ISO-1或MPIIIB10在37 ℃条件下预处理1 h。

1.6 细胞培养及细胞增殖实验

来源于健康供者的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）采用淋巴细胞分离液（TBD Science）进行分离（所有供者均在样本采集前签署了知情同意书）。随后，使用EasySep™ Human CD8⁺ T Cell Isolation Kit从PBMCs中纯化获得人CD8⁺ T细胞，纯度大于90%。人原代CD8⁺ T细胞培养于RPMI 1640培养基中，培养基中含有体积分数10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和1%青霉素-链霉素，在37℃、体积分数5%CO_2条件下培养。采用抗CD3抗体（1 ng/mL，Biolegend）和抗CD28抗体（1 ng/mL，Biolegend）与细胞共培养72 h进行细胞刺激与初始扩增。

在CD8⁺ T细胞增殖实验中，取来源于健康供者的1×10^6个CD8⁺ T细胞，采用可溶性抗CD3抗体（1 ng/ml，Biolegend）和抗CD28抗体（1 ng/mL，Biolegend）进行细胞刺激[34]。根据试剂说明书，先使用CFSE对纯化后的CD8⁺ T细胞进行标记，随后将其置于RPMI 1640培养基中培养48 h。对于受体拮抗组，先加入ISO-1（2×10^{-5}mol/L），并于37 ℃条件下预孵育1 h后再进行配体刺激。之后，在相应处理组中加入重组人MIF（0.1 μg/mL）蛋白，而对照组中加入等体积DMSO。继续培养24 h后，基于CFSE稀释情况，采用流式细胞术检测CD8⁺ T细胞的增殖情况。

人肝星状细胞系LX-2购自中国典型培养物保藏中心（China Center for Type Culture Collection，CCTCC），并附有无支原体污染证明。LX-2目前被认为是最具代表性且应用最广泛的人肝星状细胞系，是体外研究HSC功能的“标准模型”[35]。LX-2细胞培养于含质量分数10%FBS和1%青霉素-链霉素的细胞培养基中，培养条件为37 ℃，体积分数5%CO_2。已有研究表明，LX-2细胞在TGF-β（5 ng/μL，24 h）刺激下可发生表型活化，其特征表现为活化标志物α-SMA表达上调[36]。LX-2细胞于10 cm培养皿中培养，并在达到适宜融合度时进行传代。细胞增殖能力采用商业化Cell Counting Kit-8（CCK-8；Beyotime，中国）检测试剂盒，按照说明书进行检测。将LX-2细胞以每孔2 000个细胞的密度接种于96孔板中培养。每种实验处理条件均设置4个复孔。在拮抗实验组中，于刺激前先将细胞与抗SPP1中和抗体MPIIIB10（100 ng/mL）在37℃条件下预处理1h。随后在相应处理组中加入重组人SPP1（0.1 μg/mL）蛋白，而对照组中加入等体积溶剂对照。处理后分别于24 h和48 h按照试剂说明书采用CCK-8法检测细胞活力。

1.7 流式细胞术

在检测前，先使用PBS对细胞进行清洗并收集。随后，将制备好的单细胞悬液与不同抗体共同孵育20 min。针对CD8⁺ T细胞表型检测所使用的抗体包括：Brilliant Violet 421™ anti-mouse/human CD44（clone IM7，Biolegend）和PE anti-human CD74（clone LN2，Biolegend）。用于鉴定CD8⁺ T细胞的抗体包括：Alexa Fluor® 488 anti-human CD3

(clone HIT3a, Biolegend)和Brilliant Violet 510™ anti-human CD8a(clone RPA-T8, Biolegend)。对于胞内染色,按照说明书要求,使用BD Cytofix/Cytoperm kit对细胞进行固定和破膜处理。随后采用以下抗体进行染色:eFluorTM 660 SPP1(clone 2F10, Thermo)、Anti-MIF antibody(clone EPR18149-128, Abcam)、PE anti-human/mouse Granzyme B Recombinant(clone QA16A02, Biolegend)、APC anti-human CD279(PD-1)(clone EH12.2H7, Biolegend)、Brilliant Violet 421™ anti-human TNF-α(clone MAb11, Biolegend)、Alexa Fluor® 647 anti-α Smooth Muscle Actin(clone 1A4, Biolegend)以及PE anti-human IL-10(clone JES3-9D7, Biolegend)。染色完成后,采用BD LSRFortessa流式细胞仪对样本进行检测,所得数据使用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR)进行分析。

1.8 qPCR分析

将LX-2细胞和$CD8^+$ T细胞用PBS清洗后,以500×*g*离心5 min收集细胞。按照试剂说明书,使用EZ-press RNA Purification kit(EZBioscience)提取总RNA。随后,采用PrimeScript reverse transcription(RT) reagent kit(TaKaRa, 日本)将总RNA逆转录合成cDNA。定量实时PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)使用SYBR Premix Ex Taq Ⅱ kit(TaKaRa, 日本)在实时荧光定量PCR检测系统上进行,具体操作按照试剂盒说明书执行。各目标基因的循环阈值(cycle threshold, Ct)由仪器默认阈值设定获得。对于$CD8^+$ T细胞,选用GAPDH作为内参基因;对于LX-2细胞,则选用TBP作为内参基因[37]。所有目标基因的引物序列见附表2。目标基因的相对表达水平采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法进行计算。

1.9 酶联免疫吸附实验

LX-2细胞和$CD8^+$ T细胞培养上清中人TNF-α水平采用商业化ELISA试剂盒(human TNF-α ELISA set, Dakewei)进行检测,具体操作按照生产厂家说明书进行。

1.10 统计学分析

统计学分析采用GraphPad Prism v10.1软件(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)完成。定量数据以均值±标准差(mean ± standard deviation, SD)表示。统计学显著性标注标准如下:$^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$。已在图注处补充描述。

2 结果

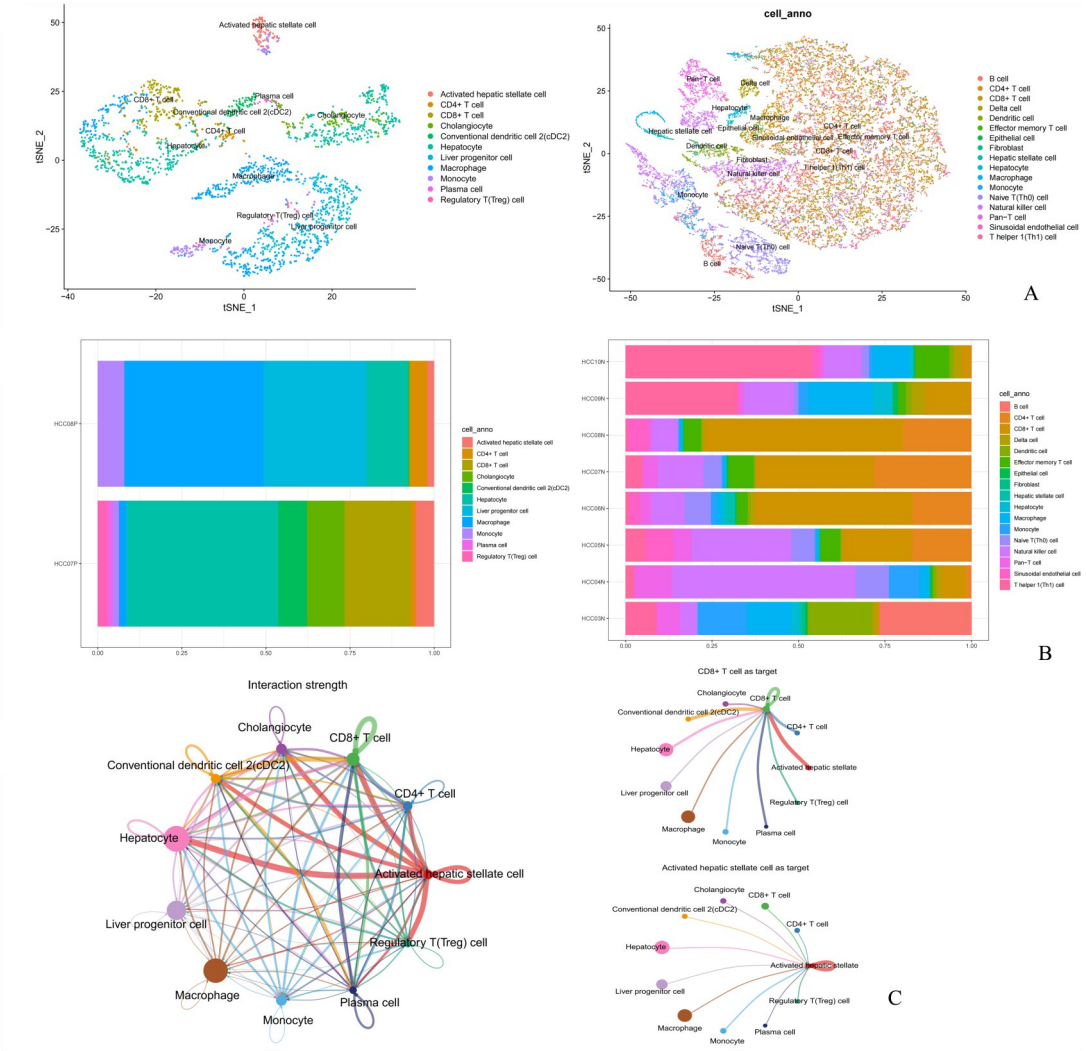
2.1 单细胞通讯分析提示PVTT中$CD8^+$ T细胞与aHSCs之间存在显著的双向通信

在获取Zhao等[38]研究中的相关数据后,我们对来源于GEO数据库的8例正常组织样本(Norm)和2例PVTT组织样本的scRNA-seq数据进行了分析。结合CellMarker2.0数据库及原始研究中报道的marker genes[39]对细胞类型进行注释后,在PVTT中共识别出11种细胞类型,包括aHSCs、$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、胆管细胞、经典2型树突状细胞(cDC2)、肝细胞和浆细胞等(图1A)。正常组织细胞则被注释为17种类型,包括B细胞、$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、树突状细胞、NK细胞、肝星状细胞和成纤维细胞等(图1A)。进一步对细胞类型比例进行分析发现,在相同样本来源条件下,正常组织中$CD8^+$ T细胞所占比例高于PVTT组织(图1B),提示PVTT组织中$CD8^+$ T细胞可能存在增殖能力下降,或肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中其他细胞群体发生了更明显的扩增与富集。

基于上述结果,我们进一步构建了PVTT特异性的细胞通信网络,并对细胞间相互作用强度进行了量化。各类细胞均表达特定的配体和受体,而细胞通讯分析正是通过研究这些配体-受体之间的相互作用,以揭示细胞间的串扰关系。首先,我们应用CellChat量化了细胞间通讯网络,同时以细胞间通讯互作图的形式进行可视化展示(图1C)。分析结果显示,当$CD8^+$ T细胞作为信号发送方时,其与aHSCs的相互作用强度最高;而当aHSCs作为信号发送方时,其与$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞、胆管细胞、cDC2细胞和肝细胞之间的相互作用强度均相对较高。上述结果提示,$CD8^+$ T细胞与aHSCs之间可能存在高强度的双向通讯。为更加直观地观察不同细胞群之间的互作关系,我们进一步分析了以$CD8^+$ T细胞和aHSCs作为信号发送方时与其他细胞亚群之间的加权相互作用情况(图1C)。基于上述结果,我们将$CD8^+$ T细胞和aHSCs选定为后续研究的重点细胞亚群。

2.2 信号模式和配体-受体相互作用分析鉴定PVTT中$CD8^+$ T细胞与aHSCs相互作用的候选轴

随后,我们对信号通路进行了模式分解分析,以识别不同细胞群体在信号输出和输入中的主要模式,从而筛选出Norm与PVTT组织之间活性存在



A: tSNE dimensionality reduction plots and cell type annotations for normal tissue (Norm) and PVTT single-cell data. B: Composition proportions of major cell types in Norm and PVTT samples. C: Cell interaction weight map in PVTT. Thicker lines indicate more frequent interactions and stronger interaction weights (intensities) between two cell types.

图1 来自正常样本和PVTT样本的单细胞RNA测序数据分析

Fig. 1 Analysis of scRNA-seq data from Norm and PVTT samples

差异的配体或受体。首先,以CD8⁺ T细胞作为信号发送方、aHSCs作为信号接收方,筛选信号强度相对较高的配体和受体(附图1A-B)。比较Norm与PVTT后发现,在CD8⁺ T细胞的输出信号模式中,存在强度差异的信号包括CD46、ECTIN、ITGB2、SPP1、TNF、VISFATIN和CD99(附图1A);而在aHSCs的输入信号模式中,存在强度差异的信号包括CD46、CD99、TNF、SPP1和FN1(附图1B)。随后,我们进一步比较相同信号在输出与输入模式中的强度差异是否一致。若某一信号仅在输出模式或仅在输入模式中存在差异,则提示该信号可能未被有效接收,或其来源于其他细胞。经过一致性筛选,最终确定4个有效配体或受体,分别为CD46、CD99、TNF和SPP1。

接着,以aHSCs作为信号发送方、CD8⁺ T细胞作为信号接收方,筛选信号强度相对较高的配体和受体(附图1C-D),并展示这些配体或受体在各细胞群输出和输入信号模式中的相对信号强度。比较Norm与PVTT后,在aHSCs的输出信号模式中,存在强度差异的信号包括ANTPTL、ANNEXIN、APP、CD99、CHEMERIN、COLLAGEN、CSF、FN1、LAMININ、MIF、PTN、SPP1、THBS和THY1(附图1C);而在CD8⁺ T细胞的输入信号模式中,存在强度差异的信号包括ANNEXIN、APP、CCL、CD99、CHEMERIN、COLLAGEN、CSF、FN1、ICAM、LAMININ、MHC-Ⅱ、MIF、PTN、SPP1和THY1(附图

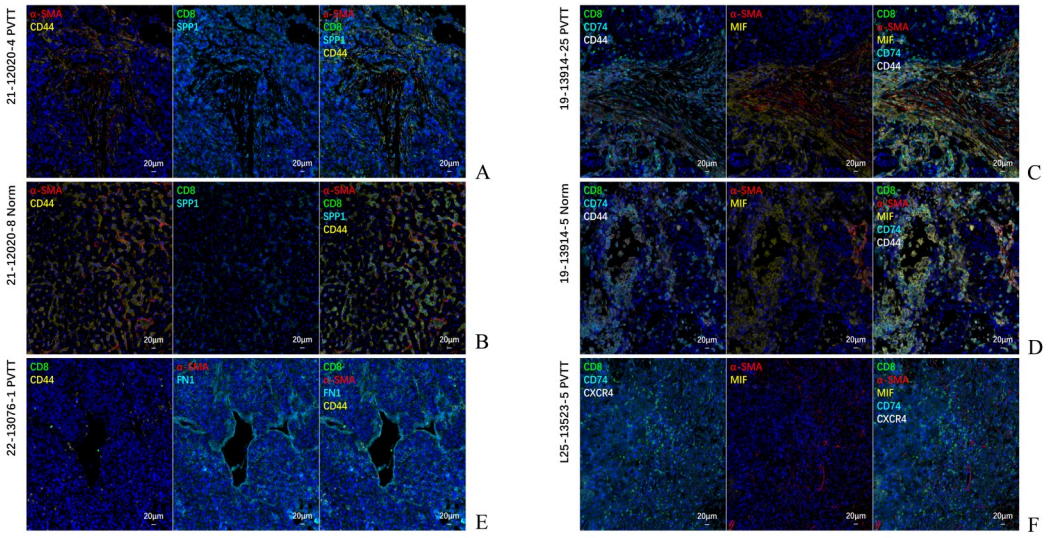
1D)。经过同样的一致性筛选后,最终获得12个有效配体或受体,分别为ANNEXIN、APP、CD99、CHEMERIN、COLLAGEN、CSF、FN1、LAMININ、MIF、PTN、SPP1和THY1。

为进一步锁定细胞间通讯的核心配体-受体对,我们将PVTT相关数据定义为疾病组、Norm相关数据定义为对照组,分别以$CD8^+$ T细胞和aHSCs作为信号发送方、各类细胞群作为信号接收方,利用CellChat分析PVTT与Norm中细胞之间配体-受体对相互作用强度的差异,并绘制配体-受体互作气泡图(附图1E-F)。结合前述筛选得到的有效配体和受体,我们发现,当$CD8^+$ T细胞作为信号发送方、aHSCs作为信号接收方时,SPP1-CD44配体-受体对具有较高的相互作用强度及较大的强度差异(附图1E)。当肝星状细胞作为信号发送方、$CD8^+$ T细胞作为信号接收方时,FN1-CD44、MIF-(CD74+ CD44)以及MIF-(CD74+ CXCR4)配体-受体对表现出较高的相互作用强度和较明显的强度差异(附图1F)。因此,我们将上述配体-受体对选定为后续在组织空间水平和细胞功能水平上进行实验验证的重点目标。

2.3 在组织空间水平验证SPP1-CD44和MIF-(CD74+ CD44)之间的特异性互作关系

为验证筛选得到的配体-受体对是否真实存在于组织微环境中,我们对正常组织和PVTT组织切片进行了多重免疫荧光(multiplex immunofluorescence,mIF)染色,并对其空间分布特征进行了评估。

在对SPP1-CD44配体-受体对进行验证时,结果显示,在PVTT组织切片中,SPP1阳性信号更常见于$CD8^+$ T细胞富集区域,并呈现出与$CD8^+$ T细胞伴随分布的趋势。与此同时,CD44阳性信号则表现出与α-SMA阳性细胞伴随分布的趋势,并与SPP1信号呈相邻分布(图2A);而在正常组织切片中,并未观察到上述分布模式(图2B)。该结果证实,SPP1-CD44轴真实存在于组织微环境中,并提示在PVTT组织内,$CD8^+$ T细胞与aHSCs之间可能通过SPP1-CD44发生相互作用:即位于aHSCs邻近区域的$CD8^+$ T细胞分泌SPP1,并与aHSCs表面的CD44受体结合。



A-B: mIF for the SPP1-CD44 axis:Comparison of DAPI (nuclei), CD8, α-SMA (aHSCs), SPP1, and CD44 signal distribution in PVTT and normal tissues.C-D:mIF for the MIF-(CD74+ CD44) axis:Comparison of DAPI (nuclei), CD8, α-SMA, MIF, CD74, and CD44 signal distribution in PVTT and normal tissues.E:mIF for the FN1-CD44 axis:Distribution of DAPI (nuclei), CD8, α-SMA, FN1, and CD44 signals in PVTT tissue. F:mIF for the MIF-(CD74+ CXCR4) axis:Distribution of DAPI (nuclei), CD8, α-SMA, MIF, CD74, and CXCR4 signals in PVTT tissue.

图2 多重免疫荧光染色验证候选配体-受体对在正常组织与门静脉癌栓组织中的表达情况

Fig. 2 Multiplex immunohistochemistry staining confirming the presence or absence of candidate ligand-receptor pairs in Norm and PVTT tissues

在对MIF-(CD74+CD44)轴进行验证时,PVTT组织染色结果显示,MIF信号与$α\text{-}SMA^+$细胞在空间分布上具有一致性,并呈现出与$α\text{-}SMA^+$细胞伴随分布的趋势。与此同时,与其相邻的$CD8^+$ T细胞表达CD74和CD44信号,且MIF信号与CD74及CD44信号呈空间邻近分布(图2C)。而在正常组

织切片中，并未观察到这一分布模式（图2D）。该结果证实，MIF-（CD74+ CD44）轴同样存在于真实的组织微环境中，并提示在PVTT组织内，aHSCs与CD8⁺ T细胞之间可能通过MIF-（CD74+ CD44）发生互作：即位于CD8⁺ T细胞邻近区域的aHSCs分泌MIF，并与CD8⁺ T细胞表面的CD44和CD74受体结合。

然而，在所检测的PVTT组织切片中，并未观察到FN1-CD44或MIF-（CD74+ CXCR4）轴对应配体和受体信号具有明确的空间共富集一致性或相邻分布特征（图2E-F）。因此，基于上述结果，我们进一步选择SPP1-CD44和MIF-（CD74+ CD44）这2条作用轴，开展后续细胞水平的表达验证及功能干预实验。

2.4 在细胞水平证实相应细胞中关键配体/受体的表达

为进一步确认候选配体-受体作用轴具有明确的分子表达基础，我们分别在人外周血来源的CD8⁺ T细胞和人肝星状细胞系LX-2中检测了关键受体和配体的表达情况。

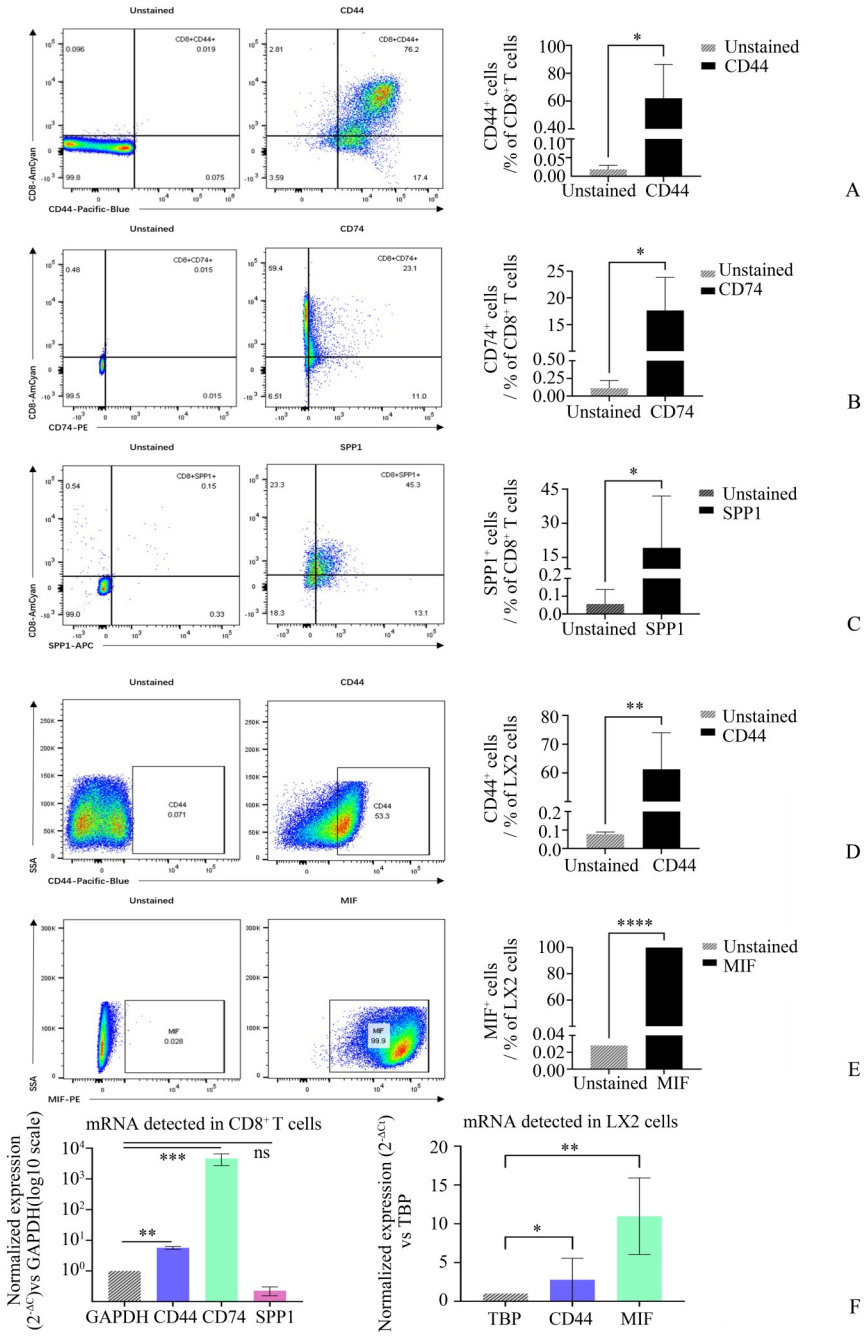
流式细胞术结果显示，在CD8⁺ T细胞表面可检测到CD44和CD74受体的表达，同时也可检测到SPP1阳性信号（图3A-C）；qPCR结果同样表明，CD8⁺ T细胞中存在CD44、CD74和SPP1的转录表达（图3F）。在经重组人源蛋白TGF-β活化后的LX-2细胞中，流式细胞术显示细胞表面可检测到CD44受体的表达，并可检测到MIF阳性信号（图3D-E）。与上述结果一致的是，qPCR结果表明LX-2细胞中存在CD44和MIF的转录表达（图3F）。

综上结果表明，在体外细胞模型中，CD8⁺ T细胞和LX-2细胞均表达候选配体-受体作用轴对应的受体及配体分子，其表达模式与单细胞分析结果的预测基本一致，从而为后续开展功能干预实验提供了分子层面的依据。

2.5 外源性配体添加及拮抗/中和阻断实验验证MIF-（CD74+ CD44）和SPP1-CD44对靶细胞的功能调控作用

为评估候选配体-受体对是否能够对靶细胞产生功能性影响，以及该作用是否具有可干预性，我们分别向CD8⁺ T细胞和LX-2细胞中加入外源性配体（重组人源蛋白）MIF和SPP1。此外，在CD8⁺ T细胞实验中加入CD74受体拮抗剂ISO-1，以阻断MIF与CD74之间的相互作用[39]；在LX-2细胞实验中加入抗SPP1单克隆抗体MPIIIB10，通过结合并中和SPP1，间接阻断SPP1-CD44相互作用[40]。上述实验设计旨在验证所观察到的细胞功能变化是否可归因于相应的配体-受体相互作用，并进一步评估这些功能变化是否能够通过人为干预加以调控。

为了解MIF对CD8⁺ T细胞具体的功能影响，我们检测了Granzyme B和TNF-α的分泌水平、PD-1的表达情况（分别反映CD8⁺ T细胞的杀伤能力、细胞因子分泌功能及耗竭状态），以及CD8⁺ T细胞的增殖能力。实验前，先从外周血中分离CD8⁺ T细胞，并在anti-CD3和anti-CD28共刺激条件下进行细胞活化。随后将细胞分为3组：对照组（不加入重组人源蛋白MIF）、实验组（加入重组人源蛋白MIF）和受体拮抗组（同时加入重组人源蛋白MIF和CD74受体拮抗剂ISO-1）。分组培养24 h后采用流式细胞术进行检测。结果显示，与对照组相比，实验组的Granzyme B阳性细胞和PD-1阳性细胞的比例均降低；而在受体拮抗组中，这两类阳性细胞比例较实验组升高，且与对照组相比无显著差异（图4A-B）。该结果提示，MIF可降低CD8⁺ T细胞的杀伤能力，这可能在一定程度上参与了PVTT免疫抑制性微环境的形成。值得注意的是，MIF似乎同时维持了CD8⁺ T细胞的低耗竭状态。进一步采用CFSE增殖实验评估CD8⁺ T细胞增殖能力的变化。结果发现，实验组中已分裂细胞的比例显著高于对照组，而受体拮抗组则较实验组下降，且与对照组相比无显著差异（图4C）。这一结果提示，MIF可增加处于分裂状态的CD8⁺ T细胞比例，即促进其增殖。在受体拮抗组中，上述由MIF所致的表型变化均被ISO-1部分逆转，说明MIF的作用至少部分依赖于CD74相关受体轴。此外，我们收集了细胞上清培养液，并通过ELISA检测TNF-α浓度。结果显示，实验组上清中TNF-α浓度低于对照组，而受体拮抗组上清中的TNF-α浓度较实验组升高，且与对照组相比无显著差异（图4D）。这一结果表明，MIF可降低CD8⁺ T细胞分泌TNF-α的能力，从而存在使细胞处于相对低炎症状态的可能性。而受体拮抗剂ISO-1能够减轻MIF对TNF-α分泌的抑制作用。综合上述结果，MIF可降低CD8⁺ T细胞耗竭标志物的表达，增强其增殖能力，同时削弱其细胞毒性作用和炎症效应，呈现出一种功能分离现象。这提示MIF可能驱动CD8⁺ T细胞向一种“高扩增能力但低效应功能”的状态转变，并且MIF-（CD74+ CD44）轴可能不仅仅影响细胞功能本身，



A–C: Representative flow cytometry plots and quantitative analyses of CD44 (n=4, independent donors), CD74 (n=3, independent donors), and SPP1(n=3, independent donors) staining in human peripheral blood-derived $CD8^+$ T cells. Specifically, for A, t=4.42, P=0.047 5; for B, t=4.81, P=0.040 6; and for C, t=4.75, P=0.041 5. D–E: Representative flow cytometry plots and quantitative analyses of CD44 (n=3,independent experiments) and MIF (n=3, independent experiments) staining in the LX-2 cell line. Specifically, for D, t=5.92, P=0.0024; and for E, t=8.314, $P<$ 0.000 1. F: qPCR analysis. Transcriptional expression of CD44, CD74, and SPP1 in $CD8^+$ T cells relative to the reference gene GAPDH(n=3, independent donors; three technical replicates were performed for each sample, and the mean value was used for statistical analysis); TBP was used as the reference gene to assess the transcriptional expression of CD44 and MIF in LX-2 cells (n=3, independent experiments; three technical replicates were performed for each experiment, and the mean value was used for statistical analysis). In $CD8^+$ T cells, CD44 *vs*. GAPDH: t=7.96, P=0.001 3; CD74 *vs*. GAPDH: t=8.21, $P<$ 0.001; SPP1 *vs*. GAPDH: t=2.44, P=0.070 8. In LX-2 cells, CD44 *vs*. TBP: t=2.61, P=0.039; MIF *vs*. TBP: t=3.92, P=0.007 9. Significance is indicated as follows: ns: no significant, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, compared with the unstained control or reference gene transcriptional expression: two-tailed Student's t-test.

图3 qPCR和流式细胞术验证$CD8^+$ T细胞及LX-2细胞中候选信号轴相关配体/受体的表达

Fig. 3 Validation of candidate axis-related ligand/receptor expression in $CD8^+$ T cells and LX-2 cells by qPCR and flow cytometry

还可能参与调控CD8⁺ T细胞的分化轨迹。

为验证SPP1对活化LX-2细胞的功能影响,我们检测了IL-10和TNF-α的分泌水平、α-SMA的表达情况(分别反映LX-2细胞的活化效率及细胞因子分泌功能),以及活化的LX-2细胞的增殖能力。细胞共分为4组:未激活对照组(不加入TGF-β诱导LX-2活化)、激活对照组(仅加入TGF-β诱导LX-2活化)、实验组(加入TGF-β和重组人源蛋白SPP1)以及拮抗组(加入TGF-β、重组人源蛋白SPP1和抗SPP1单克隆抗体MPIIIB10)。其中,MPIIIB10为抗SPP1单克隆抗体,通过结合并中和SPP1,间接阻断SPP1-CD44相互作用。培养24 h后,采用流式细胞术进行检测。结果显示,激活对照组中α-SMA阳性细胞和IL-10阳性细胞的比例与未激活对照组相比无显著变化;而实验组中α-SMA阳性细胞和IL-10阳性细胞的比例高于激活对照组,拮抗组则低于实验组(图5A-B)。这一结果提示,未使用TGF-β仍能有部分LX-2细胞处于激活状态,这可能与LX-2细胞属于半永生化且本身就处于部分激活状态有关[41]。同时,这些结果也表明,SPP1可进一步增强LX-2细胞的活化效率及IL-10分泌能力。此外,我们收集了细胞上清培养液,通过ELISA检测激活对照组、实验组和拮抗组中的TNF-α浓度。结果显示,实验组上清中的TNF-α浓度显著高于激活对照组和拮抗组(图5C),提示SPP1可促进LX-2细胞分泌TNF-α。随后采用CCK8实验检测不同处理组中LX-2细胞的增殖能力。结果显示,实验组的相对细胞活力高于激活对照组,而在拮抗组培养条件下的LX-2细胞相对活力有所下降(图5D)。该结果表明,SPP1可增强LX-2细胞的增殖能力,同时MPIIIB10能够有效阻断此影响。

综上所述,MIF-(CD74+ CD44)和SPP1-CD44这两条配体-受体作用轴分别在CD8⁺ T细胞和aHSCs中引起了相应的功能改变。尽管其具体分子机制尚未完全明确,但这两条配体-受体轴很可能参与了PVTT免疫抑制性肿瘤微环境的形成。

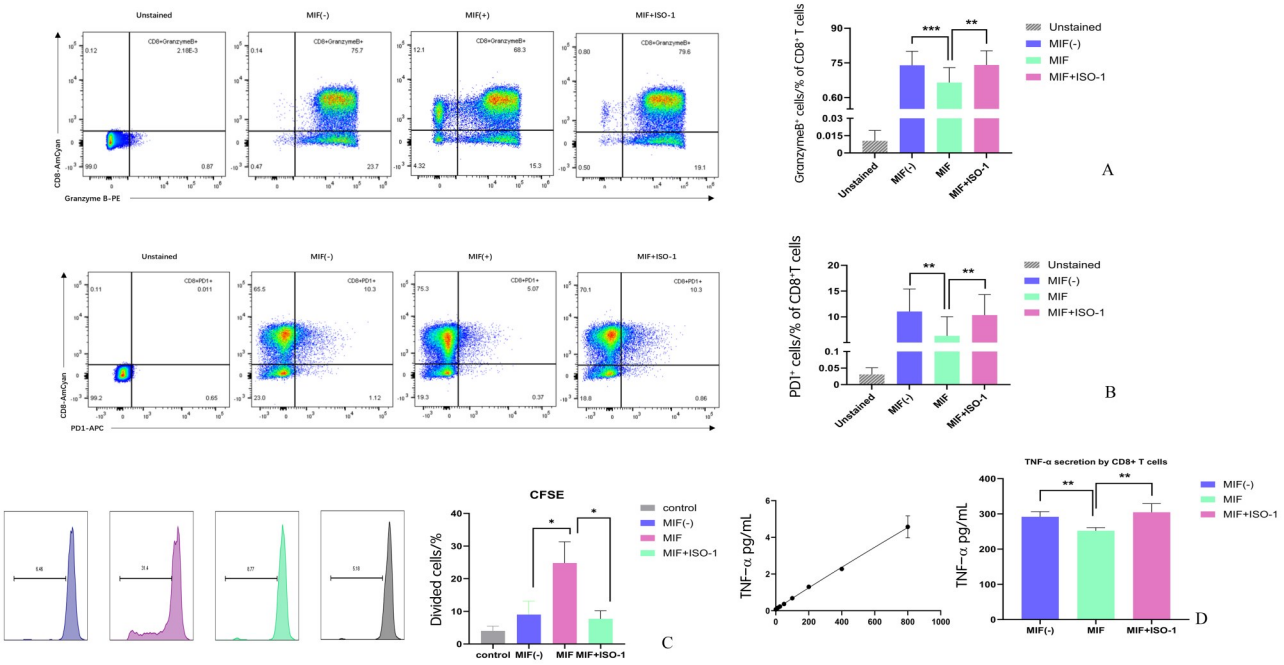
3 讨 论

3.1 主要发现

本研究通过逐步开展单细胞通讯筛选、组织空间水平验证以及体外功能干预实验,提示在PVTT微环境中,CD8⁺ T细胞与aHSCs之间存在显著的双向相互作用,并支持两条候选互作轴:SPP1-CD44和MIF-(CD74+ CD44)。在当前免疫治疗背景下,越来越多的证据表明,改善肿瘤免疫微环境(ITME)可显著增强HCC对免疫治疗的应答。例如,通过抑制免疫抑制性细胞群并重塑ITME,可增强CD8⁺ T细胞介导的抗肿瘤免疫反应,从而提高抗PD-1治疗的效果[15];与此同时,恢复CD8⁺ T细胞的肿瘤浸润和细胞毒功能也已被证实能够改善肿瘤免疫抑制性微环境,并增强抗PD-1治疗疗效[22]。我们的结果提示,PVTT中的aHSCs-CD8⁺ T细胞互作轴可能构成影响免疫治疗应答的重要"间质-免疫节点(stromal-immune node)"。

3.2 可能机制

在anti-CD3/anti-CD28诱导CD8⁺ T细胞活化后,外源性MIF可降低CD8⁺ T细胞中的PD-1表达并增强其增殖能力。PD-1既是T细胞活化的标志物,也是T细胞耗竭的标志物[42]。在常规活化过程中,PD-1通常会在T细胞受到刺激后的早期上调[43]。本研究中观察到的PD-1表达下降,可能提示MIF阻止了T细胞进入终末分化阶段,而是使其趋向于一种"高增殖"状态。与此同时,Granzyme B和TNF-α分泌减少,呈现出一种典型的"功能分离(function dissociation)"表型,即细胞扩增能力增强,但效应功能受限。这一表型提示,MIF-CD74可能通过功能重编程作用于CD8⁺ T细胞,使其扩增能力与细胞毒性发生解耦,从而形成一种"数量增加但杀伤效率不足"的免疫状态。在TME中,这种状态可能表现为虽有CD8⁺ T细胞浸润,但抗肿瘤效应不足,进而影响ICI治疗的应答效果。这可能代表了一种潜在的新型免疫逃逸机制。既往研究表明,MIF可抑制T细胞的活化[44],MIF-CD74/CXCR4/CD44轴可能协同介导了免疫功能障碍,并阻碍T细胞浸润[39]。同时,aHSCs还可增强其他细胞MIF的表达,从而促进HCC中免疫抑制性细胞的募集[5]。结合本研究的结果,即aHSCs本身能够分泌MIF,因此其不仅可能通过募集免疫抑制性细胞参与调控ITME,还可能直接作用于CD8⁺ T细胞,削弱其效应功能,进一步促进ITME的免疫抑制状态。另外,本研究发现ISO-1可部分阻断上述影响,提示MIF的作用至少部分依赖于CD74相关受体复合物(CD74为主要受体,CD44为共受体)。



A–D: $CD8^+$ T cells were divided into the Control(without MIF ligand), Experimental (MIF ligand only), and Receptor antagonist (CD74 receptor antagonist ISO–1 added for 1 h of co–culture, followed by addition of MIF ligand).E–H:LX–2 cells were divided into the Unactivated control(without TGF–β), Activation control (TGF–β only), Experimental (TGF–β and SPP1 ligand), and Antagonist(anti–SPP1 monoclonal antibody MPIIIB10 was added after 1h of co–culture, followed by the addition of TGF–β and SPP1 ligand).A–B: Representative flow cytometry plots and quantitative analyses of Granzyme B (n=3,independent donors) and PD–1 (n=4,independent donors) staining in $CD8^+$ T cells under different culture conditions. In A, MIF(–) versus MIF: t=32.31, P < 0.001; MIF versus MIF+ ISO–1:t=18.25, P=0.002 989. In B, MIF(–) versus MIF: t=24.97, P=0.001 6; MIF versus MIF+ ISO–1:t=18.22,P=0.002 999. C:Representative flow cytometry plots and quantitative analyses of the CFSE proliferation assay in $CD8^+$ T cells under different culture conditions in each experimental group(n=3, independent donors; two technical replicates were performed for each sample, and the mean value was used for statistical analysis). MIF(–) versus MIF: t=3.54, P=0.023 9;MIF versus MIF+ ISO–1: t=4.25, P=0.013 1. D:Quantitative analysis of TNF–α concentration in the $CD8^+$ T cells supernatant under different culture conditions in each experimental group, measured by ELISA, and corresponding fitted curves(n=3,independent donors; three technical replicates were performed for each sample, and the mean value was used for statistical analysis). MIF(–) versus MIF: t=4.62, P=0.003 6; MIF versus MIF+ ISO–1: t=4.03, P=0.006 8. For the flow cytometry results and ELISA quantitative analyses of $CD8^+$ T cells, comparisons between the experimental group and the control group or receptor antagonist group were performed using a two–tailed Student's t–test. Significance was defined as follows: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

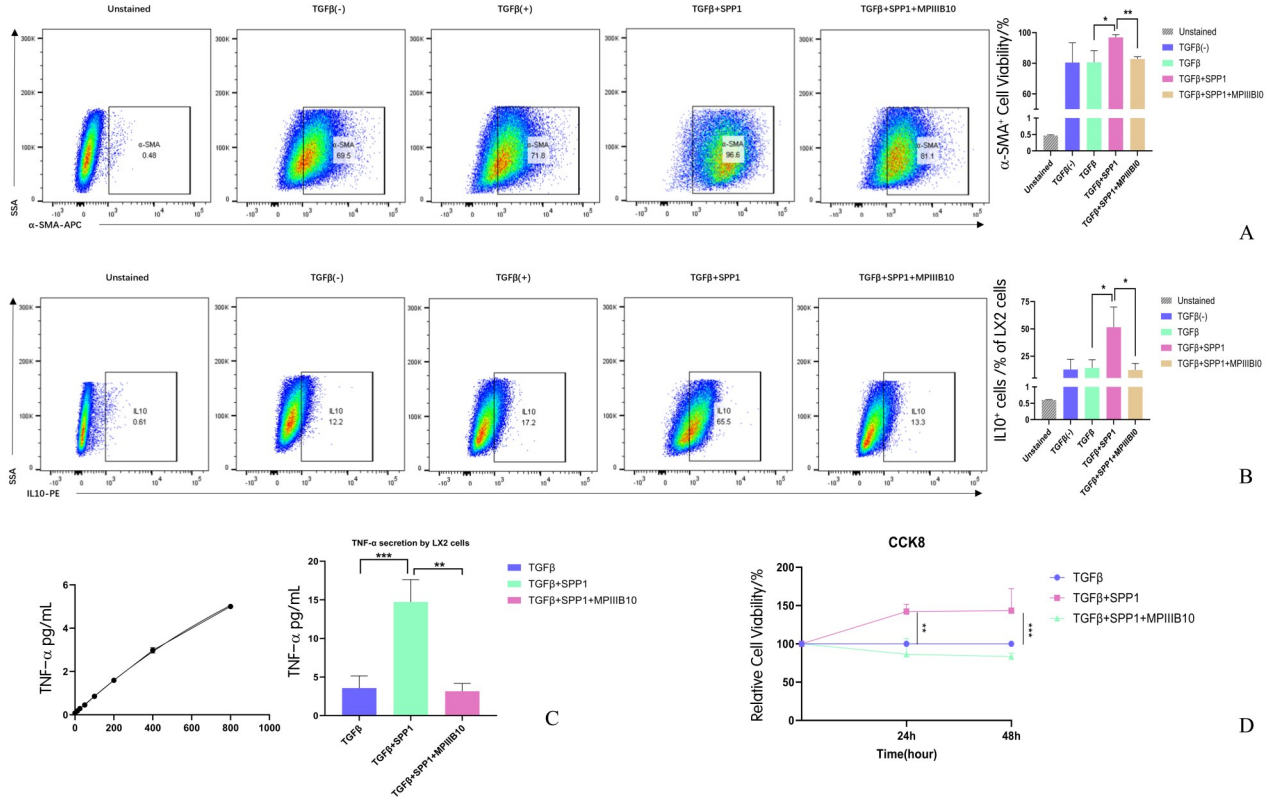
图4 外源性人重组蛋白补充及拮抗/中和阻断揭示了候选配体–受体轴对$CD8^+$ T细胞表型的功能重塑作用

Fig.4 Exogenous human recombinant protein addition and antagonistic or neutralizing blockade reveal functional reprogramming effects of candidate ligand–receptor axes on $CD8^+$ T cells phenotypes

SPP1–CD44轴对已被报道与多种肿瘤中的间质重塑、免疫抑制及T细胞浸润受阻相关[19]。例如,Ge等[26]首次在葡萄膜黑色素瘤中发现,肿瘤内氧化还原代谢重编程可驱动SPP1–CD44轴的活化,并通过该通路建立免疫抑制性微环境,从而抑制了抗肿瘤免疫。以及Tong等[41]发现肿瘤来源的SPP1与aHSCs表面CD44结合,参与了细胞外基质的重塑和细胞迁移。在本研究中,体外实验结果显示,加入外源性SPP1也许能进一步提高LX–2细胞的活化效率和增殖能力。此外,SPP1也许还可促进LX–2细胞分泌IL–10和TNF–α。在多数实体瘤的肿瘤免疫微环境中,IL–10通常被认为主要发挥免疫抑制作用[44],这可能部分解释了肿瘤免疫微环境中免疫抑制状态的形成。至于TNF–α分泌增加的潜在机制,目前尚不清楚。长期来看,TNF–α分泌的增加可能通过驱动慢性炎症影响$CD8^+$ T细胞功能,进一步导致T细胞功能障碍[45],这也可能参与了ITME的形成。总体而言,无论是aHSCs分泌MIF作用于$CD8^+$ T细胞,还是$CD8^+$ T细胞分泌SPP1作用于aHSCs,这两类细胞之间的相互作用都可能直接或间接地促进PVTT中ITME的形成。

我们观察到,TGF–β并未显著增加α

–SMA⁺ LX–2细胞的比例,这与LX–2细胞本身常呈现“部分活化”背景状态的特征一致[28]。然而,在加入重组SPP1后,实验组α–SMA⁺细胞比例显著升高,提示在加入SPP1之前,LX–2细胞尚未达到活化平台期。这可能与所加入TGF–β的浓度不足,或活化持续时间过短有关。



A–B: Representative flow cytometry plots and quantitative analyses of α–SMA (n=3, independent experiments) and IL–10 (n=3, independent experiments) staining in LX–2 cells from each experimental group under different culture conditions. In A, TGFβ versus TGFβ+ SPP1: t=6.44, P = 0.022 8; TGFβ+ SPP1 versus TGFβ+ SPP1+ MPIIIB10: t=10.34, P=0.009 2. In B, TGFβ versus TGFβ+ SPP1: t=5.51, P=0.031 3; TGFβ+ SPP1 versus TGFβ+ SPP1+ MPIIIB10: t=4.96, P=0.038 3. C: Quantitative analysis of TNF–α concentrations in the supernatants of LX–2 cells under different culture conditions in each experimental group, measured by ELISA, and corresponding fitted curves(n=3, independent experiments; three technical replicates were performed for each experiment, and the mean value was used for statistical analysis). TGFβ versus TGFβ+ SPP1: t=35.33, P=0.000 8; TGFβ+ SPP1 versus TGFβ+ SPP1+ MPIIIB10: t=12.54, P=0.006 3.D:Quantitative analysis of relative cell viability in the CCK–8 proliferation assay of LX–2 cells from each experimental group under different culture conditions (n=3,independent experiments; three technical replicates were performed for each experiment, and the mean value was used for statistical analysis). At 24h, TGFβ versus TGFβ+ SPP1: F(4, 12)=6.373, P=0.005 5; at 48h, TGFβ versus TGFβ+ SPP1: F(2, 6)=21.28, P=0.000 8. For the flow cytometry results and ELISA quantitative analyses of LX–2 cells, comparisons between the experimental group and the activated control group or antagonist group were performed using a two–tailed Student’s t–test; for the CCK–8 assay results, comparisons between the experimental group and the activated control group or antagonist group were performed using two–way analysis of variance (two–way ANOVA). Significance was defined as follows: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

图5 外源性人重组蛋白补充及拮抗/中和阻断揭示了候选配体–受体轴对LX–2细胞表型的功能重塑作用

Fig. 5 Exogenous human recombinant protein addition and antagonistic or neutralizing blockade reveal functional reprogramming effects of candidate ligand–receptor axes on LX–2 phenotypes

3.3 研究的不足

本研究仍存在若干局限性。第一,基于scRNA–seq的细胞间互作分析具有推断性,并不能代表真实组织环境中的互作情况,且PVTT单细胞数据集样本量有限,这可能影响研究结论的普适性。第二,用于mIF验证的PVTT标本样本量同样较少(n= 4),因此相关结论目前主要以代表性图像和趋势性描述为主,其外推性仍有待进一步验证。第三,CD8⁺ T细胞与LX–2细胞的体外细胞实验向体内PVTT微环境的外推仍存在边界。

3.4 结 论

综上所述,PVTT中aHSCs-$CD8^+$ T细胞之间通过SPP1-CD44和MIF-(CD74+ CD44)2条作用轴发生的相互作用,与HSC的活化和免疫调节以及$CD8^+$ T细胞的功能重编程密切相关,同时也显示出应用拮抗剂或中和抗体进行干预的可行性。考虑到近期研究中关于改善ITME增强HCC免疫治疗效果的见解,本研究提出的间质-免疫互作轴为PVTT人群改善ICI疗法提供了可供验证的候选靶点。未来的研究应重点关注以下2个方面:①进一步阐明MIF诱导$CD8^+$ T细胞"增殖-效应分离"现象的分子机制;②评估这些互作轴对免疫治疗疗效的预测价值,并探索其与靶向治疗联合应用的潜在策略。

附表和附图
Appendix table and figure

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.

[2] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380(15):1450-1462.

[3] Yeung YP, Lo CM, Liu CL, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma[J]. AM J Gastroenterol, 2005, 100(9):1995-2004.

[4] Zhang ZM, Lai EC, Zhang C, et al. The strategies for treating primary hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus[J]. Int J Surg, 2015, 20:8-16.

[5] Cheng S, Chen M, Cai J, et al. Chinese expert consensus on multidisciplinary diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus (2018 Edition)[J]. Liver Cancer, 2020, 9(1):28-40.

[6] 沈未, 鲁迪, 徐骁. 肝癌肝移植适应证的科学演进[J]. 器官移植, 2025, 16(2): 202-207.
Shen W, Lu D, Xu X. Scientific evolution of indications for liver transplantation in hepatocellular carcinoma[J]. Organ Transpl, 2025, 16(2): 202-207.

[7] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822):1245-1255.

[8] Pawarode A, Voravud N, Sriuranpong V, et al. Natural history of untreated primary hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 157 patients[J]. Am J Clin Oncol, 1998, 21(4): 386-391.

[9] Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2018, 67(1):358-80.

[10] Nakazawa T, Hidaka H, Shibuya A, et al. Overall survival in response to sorafenib versus radiotherapy in unresectable hepatocellular carcinoma with major portal vein tumor thrombosis: propensity score analysis[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14:84.

[11] Cheng AL, Qin S, Ikeda M, et al. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2022, 76(4):862-873.

[12] Ren Z, Xu J, Bai Y, et al. Sintilimab plus a bevacizumab biosimilar (IBI305) versus sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENT-32): a randomised, open-label, phase 2-3 study[J]. Lancet Oncol, 2021, 22(7):977-990.

[13] Qin S, Chan SL, Gu S, et al. Camrelizumab plus rivoceranib versus sorafenib as first-line therapy for unresectable hepatocellular carcinoma (CARES-310): a randomised, open-label, international phase 3 study[J]. Lancet, 2023, 402(10408):1133-1146.

[14] Lin T, Lin Z, Mai P, et al. Identification of prognostic biomarkers associated with the occurrence of portal vein tumor thrombus in hepatocellular carcinoma[J]. Aging, 2021, 13(8):11786-11807.

[15] Liu X, Liu Z, Zhu C, et al. Inhibiting B cells enhances the efficacy of STING agonism or immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Commun., 2025, 16(1): 10416.

[16] Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. Comprehensive integration of single-cell data[J]. Cell, 2019, 177(7):1888-1902.

[17] Zhou XH, Li JR, Zheng TH, et al. Portal vein tumor thrombosis in hepatocellular carcinoma: molecular mechanism and therapy[J]. Clin Exp Metastas, 2023, 40(1):5-32.

[18] Wang PW, Lin TY, Yang PM, et al. Hepatic stellate cell modulates the immune microenvironment in the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10777.

[19] Cai N, Cheng K, Ma Y, et al. Targeting MMP9 in CTNNB1 mutant hepatocellular carcinoma restores CD8(+) T cell-mediated antitumour immunity and improves anti-PD-1 efficacy[J]. Gut, 2024, 73(6):985-999.

[20] Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data[J]. Cell, 2021, 184(13): 3573-3587.

[21] Germain PL, Lun A, Garcia Meixide C, et al. Doublet

identification in single-cell sequencing data using scDblFinder[J]. F1000Res, 2021, 10:979.
[22] Ma G, Liu X, Jiang Q, et al. Identification of a stromal immunosuppressive barrier orchestrated by SPP1(+)/C1QC(+) macrophages and CD8(+) exhausted T cells driving gastric cancer immunotherapy resistance[J]. Front Immunol, 2025, 16:1618591.
[23] Weiskirchen R, Weimer J, Meurer SK, et al. Genetic characteristics of the human hepatic stellate cell line LX-2 [J]. PloS one, 2013, 8(10):e75692.
[24] Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, et al. The role of PD-1 in acute and chronic infection [J]. Front Immunol, 2020, 11:487.
[25] Strijker JGM, Pascual-Pasto G, Grothusen GP, et al. Blocking MIF secretion enhances CAR T-cell efficacy against neuroblastoma[J]. Eur J Cancer, 2025, 218:115263.
[26] Ge T, Yang Y, Zhang W, et al. Tumor-intrinsic redox programming drives an SPP1-CD44 axis of immune suppression in uveal melanoma[J]. Redox Biol, 2026, 90: 104011.
[27] Zhao F, Niu X, Song G, et al. Hepatic stellate cell-specific miR-214 expression alleviates liver fibrosis without boosting steatosis and inflammation [J]. Transl Med, 2025, 23 (1):810.
[28] Park I, Shin SJ, Go H, et al. Spatial analysis of tumor immune microenvironment of TNBC with different neoadjuvant chemotherapy outcomes using multiplex Immunofluorescence[J]. Breast Cancer RES : BCR, 2025, 27(1):181.
[29] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1):142-151.
[30] Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1161067.
[31] Fang S, Yuan J, Shi Q, et al. Downregulation of UBC9 promotes apoptosis of activated human LX-2 hepatic stellate cells by suppressing the canonical NF-κB signaling pathway [J]. PloS one, 2017, 12(3):e0174374.
[32] Gao Z, Feng Y, Xu J, et al. T-cell exhaustion in immune-mediated inflammatory diseases: new implications for immunotherapy[J]. Front Immunol, 2022, 13:977394.
[33] Pelizzaro F, Farinati F, Trevisani F. Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma: current strategies and biomarkers predicting response and/or resistance [J]. Biomedicines, 2023, 11(4):1020.
[34] Akkız H, Gieseler RK, Canbay A. Liver fibrosis: from basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7873.
[35] Shi Y, Wu W, Wan T, et al. Impact of polyclonal anti-CD3/CD28-coated magnetic bead expansion methods on T cell proliferation, differentiation and function[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15(1):129-137.
[36] Casalegno Garduño R, Spitschak A, Pannek T, et al. CD8⁺T cell subsets as biomarkers for predicting checkpoint therapy outcomes in cancer immunotherapy[J]. Biomedicines, 2025, 13(4):930.
[37] Shigehara K, Kawai N, Shirosaki T, et al. The size of CD8+ infiltrating T cells is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2025, 15(1):26638.
[38] Zhao J, Lu Y, Wang Z, et al. Tumor immune microenvironment analysis of non-small cell lung cancer development through multiplex immunofluorescence [J]. TLCR, 2024, 13(9):2395-2410.
[39] Wang J, Liu C, Wang T, et al. Single-cell communication patterns and their intracellular information flow in synovial fibroblastic osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Immunol Lett, 2023, 263:1-13.
[40] Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):1088.
[41] Tong W, Wang T, Bai Y, et al. Spatial transcriptomics reveals tumor-derived SPP1 induces fibroblast chemotaxis and activation in the hepatocellular carcinoma microenvironment[J]. Transl Med, 2024, 22(1):840.
[42] Ionescu F, Nguyen J, Segura CM, et al. Multiplex immunofluorescence captures progressive immune exhaustion with advancing penile squamous cell cancer stage [J]. Cancers, 2024, 16(2):303.
[43] Zhao J, Lu Y, Wang Z, et al. Tumor immune microenvironment analysis of non-small cell lung cancer development through multiplex immunofluorescence [J]. TLCR, 2024, 13(9):2395-2410.
[44] Yang J, Tang X, Liang Z, et al. Taurocholic acid promotes hepatic stellate cell activation via S1PR2/p38 MAPK/YAP signaling under cholestatic conditions[J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(2):465-481.
[45] Zhao F, Niu X, Song G, et al. Hepatic stellate cell-specific miR-214 expression alleviates liver fibrosis without boosting steatosis and inflammation [J]. Transl Med, 2025, 23 (1):810.
[46] Jeon EY, Baek SE, Kim JO, et al. A pivotal role for AP-1-mediated osteopontin expression in the increased migration of vascular smooth muscle cells stimulated with HMGB1 [J]. Front Physiol, 2021, 12:775464.

(编辑 孙慧兰)