



基于 CD8-Trm-KLRB1 细胞特征的结直肠癌肝转移微环境异质性解析及分子分型*

霍政春¹⁾ 罗旭¹⁾ 李劭康¹⁾ 蒋研¹⁾ 李洪颢¹⁾ 席齐乐木格^{2,3)} 杨磊^{1)**}

¹⁾ 哈尔滨医科大学生物信息科学与技术学院, 哈尔滨 150081; ²⁾ 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010070;

³⁾ 内蒙古大学省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010070)

摘要 **目的** 结直肠癌肝转移 (colorectal cancer liver metastasis, CRLM) 是导致结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者死亡的首要原因。虽然以 CD8⁺ T 细胞为核心的局部免疫在抑制肿瘤进展中至关重要, 但肝转移灶独特的免疫耐受微环境往往导致其功能发生异质性改变。目前, 特定 CD8⁺ 组织驻留记忆 T 细胞在 CRLM 进展中的谱系演变轨迹以及表型重塑的分子机制仍未完全阐明。因此, 本研究旨在探究 CRLM 微环境中特定 CD8⁺ 组织驻留记忆 T 细胞的谱系演变与表型重塑特征, 探讨其与微环境细胞的潜在通讯关系, 并构建基于该亚群扰动图谱的临床预测与分子分型方案。**方法** 本研究整合 3 套 CRC 单细胞转录组数据集, 涵盖正常、息肉、原发灶及肝转移灶样本。通过组织偏好性、T 细胞状态打分、拟时序及转录调控等多维分析, 鉴定并表征 CRLM 相关的关键细胞亚群, 并利用 CellChat 和 MultiNicheNet 分析细胞间通讯及潜在配体-受体互作。随后, 在癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 队列中基于该亚群的差异表达基因构建基因相互作用扰动网络, 利用共识聚类对患者进行临床分子分型, 并在基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 队列中进行独立验证。最后, 结合免疫治疗响应与药物敏感性分析, 评估不同临床分子分型患者的免疫治疗响应特征及潜在药物敏感性, 阐明该亚群对临床免疫治疗与精准靶向治疗的指导价值。**结果** 单细胞分析成功鉴定出 CRLM 相关的关键 KLRB1⁺ CD8⁺ 组织驻留记忆 T 细胞 (KLRB1⁺ CD8⁺ tissue-resident memory T cells, CD8-Trm-KLRB1) 亚群, 该亚群具有较强的组织驻留与免疫调节特征, 以及较低的细胞毒性效应。拟时序分析显示, CD8⁺ T 细胞可能经历由 GZMB⁺ CD8⁺ 效应 T 细胞 (GZMB⁺ CD8⁺ effector T cells, CD8-Teff-GZMB)、GZMK⁺ CD8⁺ 效应记忆 T 细胞 (GZMK⁺ CD8⁺ effector memory T cells, CD8-Tem-GZMK) 到 CD8-Trm-KLRB1 细胞的连续状态转变, 并伴随免疫相关功能重塑。抗原呈递及 T 细胞受体活性分析提示, 该状态变化并非单纯由抗原呈递不足或 T 细胞受体信号完全缺失所致。细胞通讯分析提示, CRLM 微环境中中性粒细胞与 CD8-Trm-KLRB1 之间的潜在免疫调节通讯增强, 其中抵抗素 (resistin, RETN) 与腺苷酸环化酶相关蛋白 1 (adenylyl cyclase-associated protein 1, CAPI) 介导的 RETN-CAPI 配体-受体互作较为突出; 同时, CD8-Trm-KLRB1 相关的 CD48 分子 (CD48 molecule, CD48) 与程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death 1, PDCD1) 介导的 CD48-PDCD1 配体-受体互作亦呈增强趋势。基于该亚群特征构建的临床分型 (subtype 1 与 subtype 2) 在 TCGA 和 GEO 队列中展现出高度的一致性。其中, 预后较差的 subtype 2 亚型不仅具有更高的肿瘤免疫功能障碍与排斥 (tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE) 评分及免疫排斥特征, 同时对阿昔替尼表现出更低的半抑制浓度, 提示该亚型对血管生成抑制剂类药物具有更高的潜在敏感性及临床获益可能。**结论** 本研究揭示了 CRLM 过程中 CD8-Trm-KLRB1 细胞的功能状态重塑, 提示其可能受到中性粒细胞相关 RETN-CAPI 等上游信号调控, 同时通过 CD48-PDCD1 等免疫调节通讯参与下游免疫细胞互作。基于该亚群扰动特征构建的临床分型方案能有效预测患者预后及治疗响应, 为 CRLM 的个体化治疗提供了全新的靶点与视角。

关键词 结直肠癌, 肝转移, 单细胞, Bulk 数据, 扰动网络, 分子分型

中图分类号 R735.34

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0345

CSTR: 32369.14.pibb.20260345

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球第三大常见恶性肿瘤, 也是癌症相关死亡的第二大原因^[1]。2020 年全球新发和死亡病例分别约为 193 万例和 94 万例, 预计至 2040 年新发病例将升至 320

* 国家自然科学基金 (62673171, 62461046) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-86622839, E-mail: leiyang@hrbmu.edu.cn

收稿日期: 2026-06-26, 接受日期: 2026-10-08

万例^[1]。尽管CRC在高收入国家的发病率仍居高位，但中低收入国家的疾病负担也正迅速增加，同时早发性CRC呈上升趋势，诊疗不平等日益突出^[1]。肝脏是CRC最常见的远程转移部位，约50%的患者在病程中出现肝转移，从而导致预后不良与治疗抵抗^[2-4]。临床上，基于数字病理的远处转移风险分层^[1]与局部消融^[1]等手段虽可为部分患者提供补充治疗选择，但结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastasis, CRLM)的整体诊疗仍面临大规模证据缺乏与精准分层不足的挑战。

近年来，单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术将CRC肿瘤微环境的细胞异质性与细胞间通讯网络的解析提升至单细胞精度。已有研究表明，CRC原发灶与肝转移灶在免疫抑制和基质重塑方面存在显著的微环境差异^[5-6]，这种高度复杂的微环境异质性正是导致临床上免疫治疗响应率低、化疗耐药及患者预后差异大的关键原因。CD8⁺组织驻留记忆T细胞(CD8⁺ tissue-resident memory T cells, CD8⁺ Trm)细胞作为外周组织免疫监视的主要效应群体，在局部抗肿瘤免疫应答中发挥关键作用^[7]。然而，在肿瘤微环境的慢性刺激下，CD8⁺ Trm细胞并非处于静止状态，而是表现出高度的功能可塑性。在持续抗原刺激、代谢压力以及免疫抑制性微环境作用下，CD8⁺ Trm可发生明显的转录和功能重塑，并在效应、记忆、耗竭及免疫调节等不同状态之间表现出较高的可塑性^[8-9]。既往研究主要关注肿瘤组织中CD8⁺ T细胞的耗竭及免疫检查点表达^[10]，而对于CRC由正常组织、癌前病变、原发肿瘤演进至肝转移过程中，特定CD8⁺ Trm细胞亚群如何出现、如何沿分化轨迹发生状态转换，以及其进入肝转移微环境后是否形成特异性的应激和免疫调节状态，目前仍缺乏系统研究。

此外，现有国内外研究多局限于原发灶与单一转移灶的横断面对比^[11]，未能系统解析微环境从正常黏膜、癌前息肉、原发肿瘤至肝转移这一连续恶性演化谱系中的动态重构规律，这种时空演进视角的缺失，极大地限制了对肿瘤恶性演变早期关键节点与转移定植机制的认知。另一方面，单细胞测序虽然能够揭示微观的细胞异质性，但受限于样本量，难以直接推广至宏观的临床应用^[12-15]。因此，亟须建立高效的分析策略，将关键细胞亚群的微观转录特征映射至大规模Bulk转录组数据，构

建稳健的基因相互作用扰动网络和临床分子分型方案，从而为精准预后评估和个体化靶向、免疫治疗提供指导。

针对上述问题，本研究整合正常黏膜、癌前息肉、原发肿瘤及肝转移4个连续阶段的高质量单细胞数据，动态重建CRLM演化过程中的单细胞图谱。重点识别并表征关键的肝转移相关CD8⁺ Trm细胞亚群，解析其功能障碍的转录特征，并揭示其与肝转移微环境中其他免疫细胞之间的潜在通讯关系。在此基础上，利用基因间的相互作用构建扰动网络，将该亚群的特征映射至癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)与基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)队列中，从而构建稳健的临床预后与分子分型方案，并进一步结合免疫治疗响应与药物敏感性分析，评估不同分子分型患者的免疫治疗响应特征及潜在药物敏感性。综上，本研究整合单细胞转录组与Bulk转录组数据，对CRC进行综合分析，阐明CRC向肝转移演进过程中微环境重构的关键机制。这些结果不仅为患者的精准风险分层提供了稳健的分子标志物，也为筛选靶向药物、制定克服免疫耐药的联合治疗方案提供了重要的理论依据。本研究的工作流程如图1所示。

1 材料与方法

1.1 数据收集与预处理

为全面解析CRC肿瘤微环境的分子景观，本研究整合单细胞与Bulk转录组数据集。在单细胞数据层面，研究纳入GSE261388、GSE221575及GSE178318三套单细胞转录组数据集，并使用R包Seurat(v.5.0.1)进行预处理(表S1)。参考原始文献^[6, 16-17]分别设定各数据集特异性的质控阈值以剔除低质量细胞。各数据集具体质控标准如下，针对GSE178318数据集，percent.mt < 10%、nFeature_RNA > 200且< 1 500、nCount_RNA < 10 000；针对GSE221575数据集，percent.mt < 15%、nFeature_RNA > 200且< 2 500、nCount_RNA < 10 000；针对GSE261388数据集，percent.mt < 15%、nFeature_RNA > 200且nFeature_RNA < 2 500、nCount_RNA > 1 000。其中，percent.mt表示线粒体基因转录本比例，nFeature_RNA表示检测到的基因数，nCount_RNA表示总UMI(unique molecular identifier)数。并使用R包DoubletFinder(v.2.0.6)去除双细胞。对整合后的数据进行标准

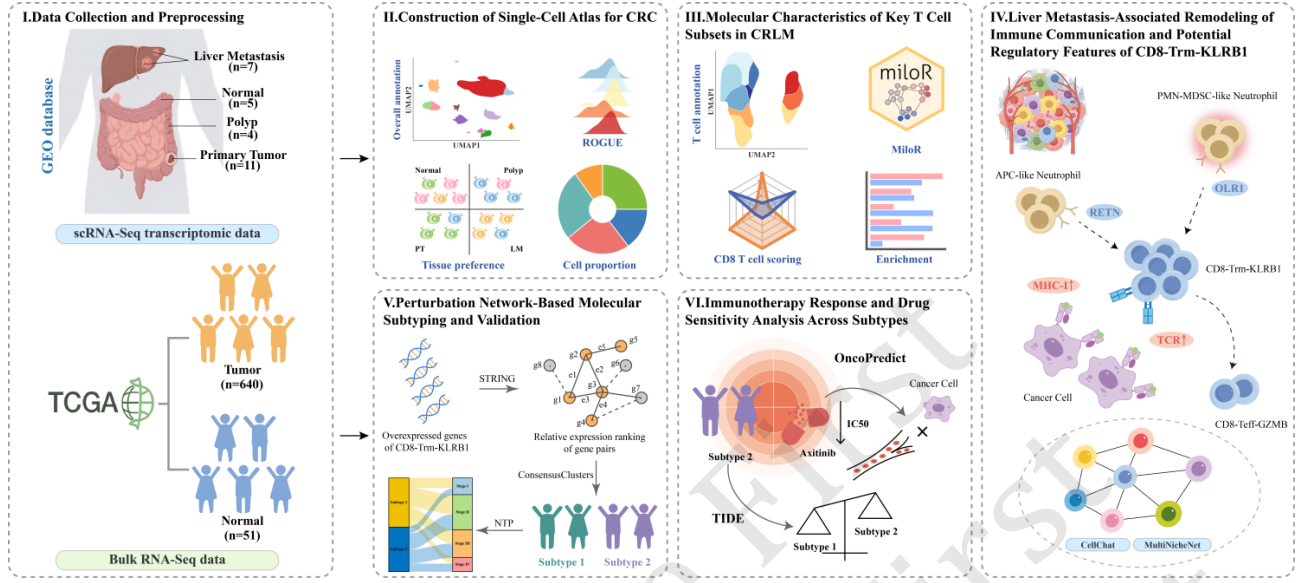


Fig. 1 Overview of the study workflow

化和高变基因筛选, 提取前2 000个高变基因进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。采用Harmony算法消除批次效应, 并基于校正后的低维特征进行邻近图构建和无监督聚类, 使用UMAP (uniform manifold approximation and projection) 可视化聚类结果。采用FindAllMarkers识别各细胞簇的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 参数设置为 min.pct = 0.25, log₂FC.threshold = 0.25。

在Bulk数据层面, 本研究合并TCGA-COAD及TCGA-READ两套数据集作为训练集, 合并GSE39582及GSE17536两套数据集作为独立测试集, 并使用ComBat方法消除不同数据集间的批次效应 (表S7)。

1.2 单细胞转录组学分析

本研究使用 TCellSI (v1.2.0) [18] 计算静息 (quiescence)、免疫调节 (regulating)、增殖 (proliferation)、辅助功能 (helper)、细胞毒性 (cytotoxicity)、祖细胞耗竭 (progenitor exhaustion)、终末耗竭 (terminal exhaustion) 以及衰老 (senescence) 共8种功能状态得分, 以此评估CD8⁺ T细胞的功能状态, 并将原发和转移分组之间平均得分的差值定义为:

$$\Delta = \bar{X}_{LM} - \bar{X}_{PT} \quad (1)$$

其中, $\bar{X}_{LM}$ 和 $\bar{X}_{PT}$ 分别表示对应功能状态得分在肝转移灶 (liver metastasis, LM) 和原发灶 (primary

tumor, PT) 中的均值。

此外, 本研究通过CytoTRACE (v.1.1.0) 计算CD8⁺ T细胞亚群的干性得分, 为基于Slingshot (v. 2.14.0) 的轨迹推断确定分化起点。鉴于Slingshot采用顺序主曲线算法, 从最小生成树构建平滑曲线来计算伪时间, 本研究同时使用基于DDRTree逆图嵌入方法构建伪时间树的Monocle 2来验证推断的分化轨迹。

1.3 基因间相互作用扰动网络的构建

为了在单样本水平上系统评估通路及相互作用组的动态变化, 本研究构建了基于秩次的基因相互作用扰动网络 [19]。首先, 识别CD8-Trm-KLRB1细胞亚群的DEGs, 并保留在训练集和测试集中均出现的基因。将这些基因映射至STRING (v12.0, <https://cn.string-db.org/>) 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并以0.7的置信度对网络进行修剪。接着, 对于训练集中的每个独立疾病样本, 将原始的基因表达值转换为样本内的相对表达秩次。通过计算网络中每对相互作用基因 (边) 的秩次差值, 生成单样本的delta向量。正常样本中的每个基因取平均值用于计算基准delta秩。最后, 从每个疾病样本的delta向量中减去该基准向量, 推导出样本特异性的边扰动矩阵。

1.4 Bulk转录组学分析

在TCGA训练集中, 本研究使用R包ConsensusClusterPlus (v.1.70.0) 进行共识聚类来

解码潜在的分子亚型, 最佳聚类数通过累积分布函数 (cumulative distribution function, CDF) 曲线确定。基于共识聚类划分的分子亚型, 绘制 Kaplan-Meier 曲线并使用 Log-rank 检验评估各亚型的生存差异。在 GEO 测试集中, 使用最近模板预测 (nearest template prediction, NTP) 验证分子分型的稳健性, 并构建多因素 Cox 回归模型评估分型的独立预后价值。

对于治疗响应的预测, 本研究使用基于癌症药物敏感性基因组学数据库 (genomics of drug sensitivity in cancer, GDSC) 的 R 包 oncoPredict (v.1.2) 预测临床样本对常见化疗药物及靶向小分子化合物的半抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}), 以评估不同亚型的药物敏感性。同时使用肿瘤免疫功能障碍与排斥 (tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE) 模型评估免疫治疗反应, 并分析 CD8-Trm-KLRB1 细胞的浸润水平与 TIDE 评分的关系, 以预测不同样本的免疫治疗获益。

1.5 统计学分析

本研究中所有统计分析均在 R (v4.2.2) 中实现。两组间连续变量的差异显著性通过 Wilcoxon 秩和检验来评估; Bulk 转录组的差异表达分析采用基于经验贝叶斯方法的线性模型实现。 P 值的显著性如下表示: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; ns : 无显著差异。

1.6 数据与代码可获得性

为保证研究结果的可重复性, 本研究所使用的分析代码、关键参数配置及相关分析流程文件均已上传至 GitHub ([GitHub URL, <https://github.com/LeiyangHarbin/CRC-code>])。

2 结果

2.1 CRC 单细胞转录组图谱的构建

为构建正常和癌变结直肠组织的单细胞分辨率转录组图谱, 本研究整合了 GEO 中的 3 套单细胞数据集, 包括 5 例正常样本、4 例息肉样本、11 例原发样本和 7 例肝转移样本 (表 S1)。经过质量控制与双细胞剔除等预处理过程, 最终获得 120 956 个高质量单细胞。为表征正常及癌变结直肠组织的细胞组成, 我们在消除不同数据集间批次效应后进行无监督聚类, 在分辨率为 1 的条件下, 得到 29 个细胞簇 (图 S1a, b)。基于经典标记基因, 我们识别到包括 B 细胞、树突状细胞、内皮细胞、上皮细

胞、成纤维细胞、巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、浆细胞、增殖细胞、施万细胞、平滑肌细胞和 T 细胞在内的 14 种细胞类型 (图 S2a, 表 S2)。通过检查主要细胞类型的标记基因表达情况, 如上皮细胞 (*EPCAM*)、内皮细胞 (*PECAM1*)、B 细胞 (*MS4A1*)、浆细胞 (*JCHAIN*)、巨噬细胞 (*CIQC*)、中性粒细胞 (*S100A8*)、T 细胞 (*CD3D*) 和自然杀伤细胞 (*GNLY*), 本研究进一步验证了这些细胞的身份 (图 S2c, 图 S1c)。这些细胞类型在不同组织中的分布表现出显著差异, 巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞和自然杀伤细胞在癌变组织中显著富集, 特别是 T 细胞在四种组织中均维持较高丰度, 并随肿瘤进展呈现递增趋势 (图 S2b, d, 图 S1d)。此外, 组织偏好性分析表明, 树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和 T 细胞在肝转移灶中显著富集, 暗示其在肝转移微环境演变中发挥重要作用 (图 S2e, 表 S4)。ROGUE (ratio of global unshifted entropy) 分析结果表明, 14 种细胞类型的 ROGUE 得分均超过 0.90, 有力证实了在当前聚类分辨率下, 各细胞类型均具备较高的纯度与良好的生物学区分度 (图 S1e, 表 S3)。

2.2 CRC 肝转移灶中关键 T 细胞亚群的识别与分子特征

鉴于 T 细胞在结直肠癌恶性演进过程中展现出显著富集特征与其核心的免疫调控作用, 本研究进一步对其细分亚群及分子特征进行深入解析。通过整合各细胞簇的特征差异基因进行生物学注释, 我们识别出包括 CD4-T-GPR15、CD4-T-PreTreg、CD4-Tfh-CXCL13、CD4-Treg-FOXP3、CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK、CD8-Trm-KLRB1、 $\gamma\delta$ T-TRDC 和 MAIT-KLRB1 在内的 9 种功能特异的 T 细胞亚群 (图 2a, 图 S3a)。ROGUE 分析结果表明, 9 种亚群的 ROGUE 得分均超过 0.925, 进一步证实了各细胞亚群具备较高的纯度与良好的生物学同质性 (图 2b, 表 S3)。

由于不同亚群在肿瘤演进过程中的贡献各异, 本研究通过差异及富集分析来解析各亚群的功能特征。结果显示, CD8-Trm-KLRB1 亚群表现出显著的蛋白质合成与转化潜能, 其胞质翻译及核糖体生物发生通路高度激活, 为其在肝转移微环境中的功能重塑奠定了物质基础。另一方面, 早期富集的 CD4-T-GPR15 亚群高度富集白细胞间黏附通路, 这与其标志性分子 GPR15 介导的肠道趋化及定植

功能高度吻合^[20], 也合理解释了该亚群在脱离肠道环境后丰度急剧下降的现象。在效应与代谢功能方面, CD8-Teff-GZMB与 $\gamma\delta$ T-TRDC亚群共同富集细胞杀伤及白细胞介导的细胞毒性通路, 其中CD8-Teff-GZMB亚群协同富集前体代谢物与能量生成通路, 反映了杀伤过程对能量供应的高度依赖。类似地, CD4-Tfh-CXCL13与CD4-Treg-FOXP3亚群富集氧化磷酸化及ATP合成通路, 暗示其在肿瘤微环境能量匮乏状态下维持功能活性的代谢适应性(图2c, 图S4c, b)。

组织偏好性与细胞比例分析揭示了各T细胞亚群在CRC恶性演进过程中的动态变化。结果表明, CD8-Teff-GZMB、CD8-Trm-KLRB1及MAIT-KLRB1亚群在正常黏膜及息肉组织中几乎不分布, 但随肿瘤进展其浸润丰度稳步提升, 并在肝转移灶中达到峰值, 揭示其在肝转移微环境的构建与演化中发挥关键作用。与之相反, CD4-T-GPR15与CD4-T-PreTreg等肠道相关亚群主要分布于早期正常及息肉组织, 其丰度随肿瘤进展急剧下降, 并在肝转移灶处于极低水平, 暗示肝转移微环境对其发生了选择性重塑或归巢限制, 这一现象与功能富集分析结果一致(图2d, e, 图S3b, 图S4a, b, 表S4)。此外, Milo差异丰度分析进一步证实, CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK及CD8-Trm-KLRB1亚群在肝转移组织中显著富集(图S3c, d)。

CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK及CD8-Trm-KLRB1亚群的T细胞功能状态得分显示, 各亚群在分化、杀伤及免疫调节维度上异质性显著, 且在肝转移微环境中发生了深刻的功能重塑。其中, CD8-Trm-KLRB1亚群展现出较强的组织驻留与免疫调节特征, 在两处病灶中均维持最高静息度与最低增殖活性, 符合CD8⁺ Trm细胞的经典表型; 值得注意的是, 其免疫调节评分显著高于其他亚群, 并由原发灶的0.656进一步升高至肝转移灶的0.761, 达到峰值, 这表明该亚群在肝转移微环境中可能具有更强的免疫调节特征。与之相比, CD8-Teff-GZMB亚群呈现高效能与高耗竭并存的表型, 其细胞毒性与增殖潜能均处于较高水平, 但伴随着极高的前体与终末耗竭评分, 属于高度激活与深度耗竭并存的效应T细胞。而CD8-Tem-GZMK亚群各项得分均介于两者之间, 呈现中间过渡态特征(图2f, 表S5)。综上, 原发灶与肝转移灶的对比分析揭示, 随着肿瘤进展, 三个亚群的终末耗竭与免疫调节评分随肿瘤进展上调, 提示肝

转移微环境可能诱导富集的CD8⁺ T细胞向高耗竭与强免疫抑制状态转变。

2.3 CD8⁺ T细胞状态演变与转录调控重塑

为了进一步探究CD8⁺ T细胞亚群之间的分化关系与内在调控机制, 我们围绕CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK及CD8-Trm-KLRB1三个关键亚群展开拟时序分析。首先通过CytoTRACE推断分化潜力, 将发育潜能最高的CD8-Teff-GZMB亚群确立为发育起点(图S5a, b)。基于Slingshot的拟时序分析揭示了由CD8-Teff-GZMB亚群向CD8-Trm-KLRB1亚群分化的连续轨迹, CD8⁺ T细胞自发育起点CD8-Teff-GZMB亚群出发, 历经中间态CD8-Tem-GZMK亚群转换后演变为CD8-Trm-KLRB1亚群(图S6a, b)。在此过程中, 各阶段标志性基因的表达随拟时序推进呈现显著变化。轨迹起始阶段, CD8-Teff-GZMB亚群高表达GZMB和CCL4, 维持较强的细胞毒性; 随着拟时序向中间阶段推进, CD8-Tem-GZMK亚群相关基因GZMK与转录因子JUNB同步显著上调, 表明该过程伴随着从效应态向记忆态演变的关键转录调控事件。然而, 当轨迹进入分化末端时, GZMK的表达水平大幅下调。与此同时, CD8-Trm-KLRB1亚群特异性高表达KLRB1及与肝驻留密切相关的趋化因子受体CXCR6^[21]。这种转录模式的动态转变表明, CD8⁺ T细胞在进入肝转移微环境后, 完成了从高杀伤效应态向组织驻留及免疫调节的表型重塑(图S6c)。

为进一步验证分化轨迹的生物学合理性, 我们使用Monocle 2算法将3个CD8⁺ T细胞亚群重新映射至拟时序演变树中。结果显示, CD8-Teff-GZMB亚群主要占据单一主支, 且处于分化的起始位置, CD8-Tem-GZMK亚群分布于两个分支, 在轨迹中表现为明显的中间过渡态; 而CD8-Trm-KLRB1亚群则集中于两个末端分支, 处于发育分化的终点, 与Slingshot的分析结果高度一致(图S5c, d)。随后, 我们对动态表达基因进行了动力学聚类分析, 识别到4种不同的动态表达模式, 涵盖了从发育早期到末期的不同生物学功能。Cluster 1与Cluster 2中的基因, 如CD63、CLIC1等, 在分化起始阶段呈现极高的表达水平, 并随发育进程迅速下调。基因本体论(gene ontology, GO)富集分析显示, 这些基因显著富集于氧化磷酸化、ATP合成以及细胞杀伤等通路, 这表明处于发育起点的CD8-Teff-GZMB亚群具有旺盛的代谢

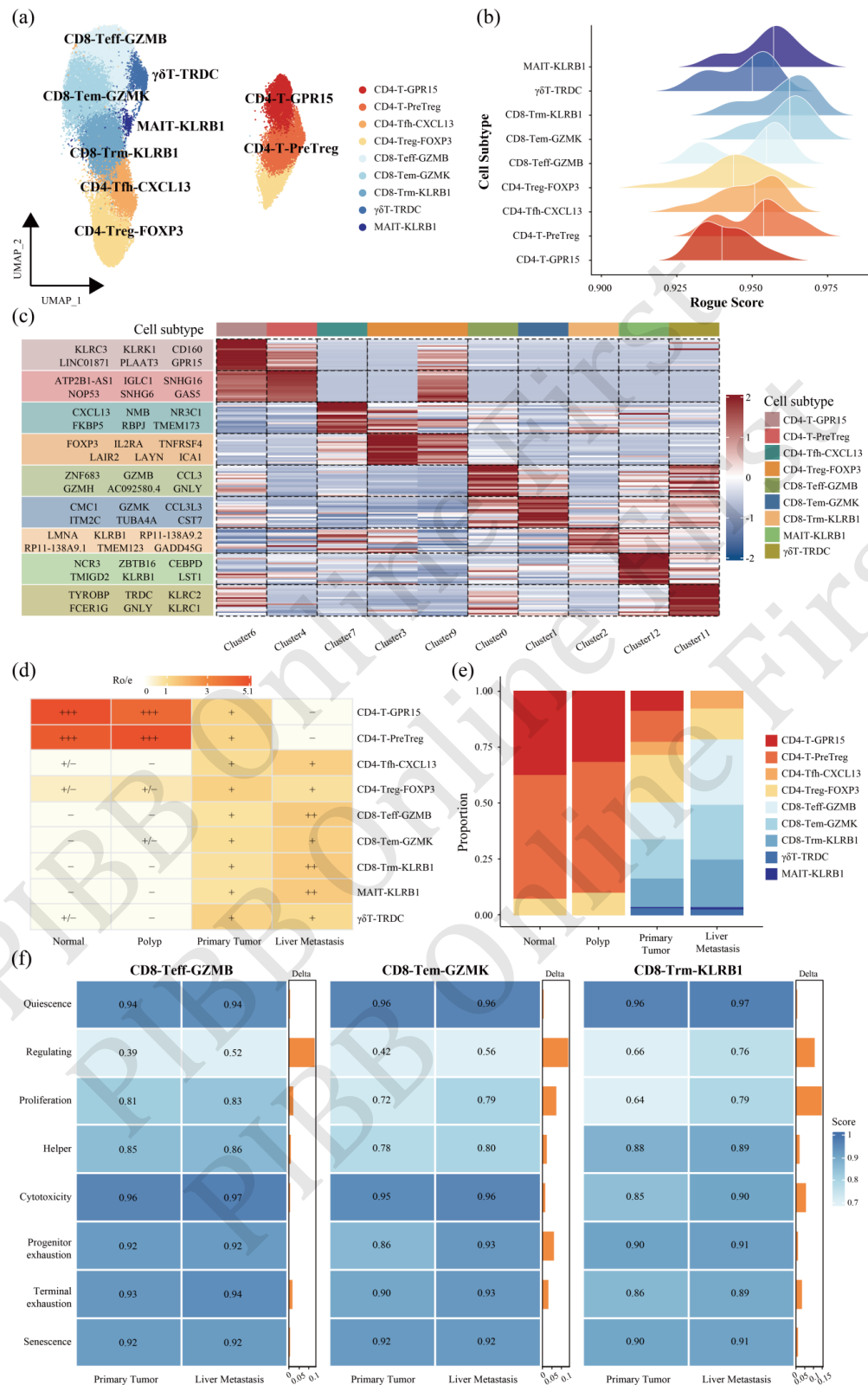


Fig. 2 Identification and molecular characterization of key T cell subsets in CRLM

(a) UMAP plot showing the major T cell subsets identified. (b) Ridge plot showing the purity of each T cell subset. (c) Heatmap showing the top 6 DEGs for each T cell subset. Rows represent DEGs, and columns represent T cell subsets. Color indicates normalized gene expression levels, with red indicating high expression and blue indicating low expression. (d) Heatmap showing the distribution preference of each T cell subset across tissue types. (e) Stacked bar plot showing the relative proportions of each T cell subset across four tissues. (f) Heatmaps showing the scores of eight functional states for three key CD8⁺ T cell subsets (CD8-Teff-GZMB, CD8-Tem-GZMK, and CD8-Trm-KLRB1) in primary tumors and liver metastases. The bar plot on the right (Delta) shows the changes in function scores in liver metastases relative to primary tumors.

水平和强大的效应杀伤功能。Cluster 4簇的基因在分化中期出现表达峰值, 随后逐渐回落。其功能主要涉及 mRNA 代谢过程的调节和 RNA 剪接, 这暗示 CD8-Tem-GZMK 亚群在从效应状态向记忆状态转换的中间阶段, 经历了活跃的转录组重塑与信号调控。Cluster 3 簇基因, 如 SRGN、SLC2A3 在分化末期呈现显著上调趋势。GO 功能富集分析显示, 这些基因与 T 细胞激活及细胞分化密切相关, 对应了轨迹末端的 CD8-Trm-KLRB1 亚群, 表明细胞在进入发育终点后, 确立了组织驻留记忆相关的特定功能表型 (图 S5e)。

转录因子调控分析进一步从分子机制层面阐明了上述分化轨迹。我们利用 SCENIC (Single-Cell rEgulatory Network Inference and Clustering) 算法对三个亚群进行了转录因子调控网络分析, 并通过计算调控子特异性评分 (regulon specificity score, RSS) 进行优先级排序。结果显示, 处于发育起点的 CD8-Teff-GZMB 亚群中, ATF3 调控子具有最高的 RSS, 提示其介导了效应 T 细胞的早期应答与激活。在中间态 CD8-Tem-GZMK 亚群中, 参与 T 细胞命运重塑的核心转录因子 JUNB 和 FOSB 的活性达到峰值, 对应了细胞从效应表型向记忆表型转换的过渡阶段。值得注意的是, 位于分化轨迹末端的 CD8-Trm-KLRB1 亚群表现出高度特异性的 RORA 调控子活性, 其 RSS 得分显著高于其他亚群, 进一步在分子水平上证实了 CD8⁺ Trm 在肝转移灶中的组织驻留特征, 并与前述拟时序分化轨迹高度互证, 解析了该谱系演变的核心调控网络 (图 S6d~f, 表 S6)。

随后, 进一步探究终末分化的 CD8-Trm-KLRB1 亚群的功能状态变化, 我们利用 Slingshot 拟时序分析追踪其由原发灶向肝转移灶的状态变化。结果显示, CD8-Trm-KLRB1 细胞沿原发灶至肝转移灶方向呈现连续性的状态转变, 并伴随多种应激相关基因表达逐渐增强。其中, HSPA1A、HSPA1B、HSPA6 以及 DNAJB1 等热应激相关基因的表达水平随着拟时序进展明显升高, 提示肝转移微环境可能促进 CD8-Trm-KLRB1 细胞进入应激适应性状态 (图 S7a, e)。GO 功能富集分析显示, 上调基因主要涉及蛋白折叠、未折叠蛋白响应及热应激反应等过程, 进一步提示 CD8-Trm-KLRB1 细胞在肝转移过程中发生应激相关功能状态重塑 (图 S7b)。为深入验证 CD8-Trm-KLRB1 细胞的应激状态变化, 我们构建氧化应激评分并比较其在不同组

织来源细胞中的差异。结果显示, 相较于原发灶, 肝转移灶来源的 CD8-Trm-KLRB1 细胞表现出更高的氧化应激评分, 提示肝转移相关因素可能促进该亚群发生氧化应激状态转换 (图 S7c)。并且, 原发灶来源的 CD8-Trm-KLRB1 细胞主要分布于拟时序早期阶段, 而肝转移灶来源细胞则更多分布于拟时序后期阶段, 进一步支持肝转移微环境与 CD8-Trm-KLRB1 细胞状态迁移相关 (图 S7d)。

2.4 肝转移相关免疫通讯重塑及 CD8-Trm-KLRB1 潜在调控特征

基于上述 CD8-Trm-KLRB1 细胞在肝转移过程中呈现的状态重塑, 我们进一步从抗原刺激及细胞间通讯层面探讨其功能变化的潜在微环境机制。我们分析了主要组织相容性复合体 I 类 (major histocompatibility complex class I, MHC-I) 抗原呈递及 T 细胞受体 (T-cell receptor, TCR) 信号活性。结果显示, 肝转移灶中肿瘤细胞和髓系细胞的 MHC-I 抗原呈递评分均高于原发灶, 且 CD8-Trm-KLRB1 亚群的 TCR 信号活性较原发灶显著升高, 提示其低效应状态并非简单源于抗原呈递不足或 TCR 信号缺失, 可能与肝转移微环境中的细胞间通讯重塑有关 (图 S9c, d)。

为进一步探究 CD8-Trm-KLRB1 细胞状态变化是否伴随细胞间通讯模式改变, 我们利用 CellChat 分析了以 CD8-Trm-KLRB1 细胞为受体细胞的细胞通讯关系。结果显示, CD8-Trm-KLRB1 亚群与多个免疫细胞亚群存在广泛互作。在通讯强度方面, CD8-Trm-KLRB1 亚群与 CD4-T-GPR15 和 CD4-T-PreTreg 等肠道浸润相关的 CD4⁺ T 细胞亚群展现出高权重的信号交换, 表现出一定的肠道免疫稳态特征。在通讯数量方面, CD8-Trm-KLRB1 亚群受中性粒细胞的影响最为显著 (图 3a)。进一步比较原发灶与肝转移灶整体细胞通讯网络发现, 相较于原发灶, 肝转移灶总体细胞通讯数量及强度均呈下降趋势, 提示肝转移过程中细胞间通讯模式发生重构 (图 3b)。尽管整体通讯活性降低, 部分信号通路呈现选择性增强, 其中 RESISTIN、SPP1、MK 及 GALECTIN 等通路在肝转移灶中表现出较高的信息流强度, 而原发灶则主要富集 PTN、CXCL 等通讯模块, 提示原发灶与肝转移灶具有特异性的细胞通讯特征 (图 3d)。鉴于 RESISTIN 信号在肝转移灶中的增强趋势, 我们进一步分析其细胞来源及互作模式。结果显示, RESISTIN 信号主要来源于中性粒细胞, 并且在肝转移灶中的通讯强度高于原发

灶(图3c, e)。配体-受体分析显示, RETN-CAP1是中性粒细胞相关RESISTIN信号中的主要预测互作模式, 其在肝转移微环境中的通讯概率升高, 提示中性粒细胞来源的RETN-CAP1信号可能参与肝转移过程中细胞通讯网络的重塑(图3f)。

为进一步解析肝转移过程中中性粒细胞的异质性, 我们对其进行精细分群注释, 最终鉴定出两个具有功能异质性的亚群, 即抗原呈递细胞样亚群(antigen-presenting cell-like, APC-like)与多形核髓源性抑制细胞样亚群(polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell-like, PMN-MDSC-like)(图S8a, c)。差异表达分析显示, APC-like亚群高表达*THBS1*、*JAML*及*S100A12*等基因, 而PMN-MDSC-like亚群高表达*SPPI*、*GPMB*及*APOC1*等基因(图S8b)。我们进一步构建中性粒细胞免疫抑制评分, 结果显示, PMN-MDSC-like亚群的免疫抑制表现显著高于APC-like亚群, 并伴随免疫抑制相关分子OLR1的表达显著升高。同时, PMN-MDSC-like亚群在肝转移灶中的比例较原发灶显著增加, 提示该亚群具有更强的免疫抑制特征(图S8d~g)。此外, RETN在APC-like亚群中的表达水平显著升高, 而在PMN-MDSC-like亚群中未表现出明显差异, 提示APC-like中性粒细胞可能是肝转移微环境中RETN-CAP1相关细胞通讯的重要潜在来源, 而PMN-MDSC-like亚群则可能主要参与免疫抑制性微环境形成(图S8g)。

进一步分析CD8-Trm-KLRB1细胞作为配体细胞时与其他免疫细胞亚群之间的潜在通讯关系, 我们利用MultiNicheNet进行配体-受体互作预测。结果显示, CD8-Trm-KLRB1细胞可与CD4-Tfh-CXCL13、CD4-Treg-FOXP3、CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK以及PMN-MDSC-like等多种免疫细胞亚群形成预测性通讯网络, 提示其可能参与肝转移微环境中的多细胞互作(图S9a)。进一步比较原发灶与肝转移灶的预测通讯模式发现, CD8-Trm-KLRB1来源的CD48-PDCD1(CD48 molecule-programmed cell death 1)等免疫调节相关互作在肝转移灶中呈增强趋势, 其中CD48-PDCD1可能参与CD8-Trm-KLRB1与CD8-Teff-GZMB之间的潜在通讯。相比之下, CD8-Trm-KLRB1与PMN-MDSC-like等髓系细胞之间的潜在通讯主要在原发灶中增强, 提示CD8-Trm-KLRB1与不同免疫细胞群之间的通讯模式具有组织来源特异性(图S9b)。

综上, CRLM过程中免疫细胞通讯网络发生显

著重塑。肝转移灶中, 中性粒细胞相关RETN-CAP1信号增强并伴随PMN-MDSC-like亚群富集, 同时CD8-Trm-KLRB1与CD8-Teff-GZMB之间的CD48-PDCD1相关潜在通讯增强, 提示肝转移相关微环境可能通过重塑髓系细胞与T细胞间的通讯网络, 参与CD8-Trm-KLRB1细胞功能状态的调节。

2.5 基于CD8-Trm-KLRB1特征基因的扰动网络分析揭示具有独立预后价值的临床亚型

为了进一步探究CRLM相关CD8-Trm-KLRB1亚群的临床意义, 我们利用基因间相互作用构建扰动网络, 并基于扰动矩阵对TCGA数据集进行共识聚类。结果显示, 当聚类数 $k=2$ 时, CDF曲线下面积的相对变化量达到最高, 且随着聚类数增加, 面积增益显著下降并趋于平缓(图S10a)。结合共识聚类热图, 我们将样本初步划分为两类分子亚型, subtype 1与subtype 2(图S10b)。此外, UMAP降维分析表明, 不同亚型的样本在低维空间中实现了显著的分离(图S10c), 这表明本研究构建的边扰动特征具有良好的样本区分能力。

随后, 我们评估了该分型系统的预后预测效力。在TCGA训练集中, Kaplan-Meier生存分析显示subtype 1患者的预后显著优于subtype 2(图S10d)。差异表达分析显示, 两组间存在显著的基因表达差异, 其中*HSPA1A*、*HSPB1*、*HSPA1B*等基因在subtype 2中显著上调, 而*POLR2B*、*CIAO2A*等则显著下调(图S11a)。为了进一步阐明其背后的生物学机制, 我们进行了多数据库的基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)和GO富集分析。结果表明, subtype 2中上调的基因显著富集在细胞外基质组织构建、胶原纤维形成以及心肌病变等通路中。而下调的基因则主要与细胞周期、染色体分离、有丝分裂核分裂等细胞增殖核心通路, 以及免疫相关反应密切相关(图S11b-E)。为了验证该分型系统在外部数据集稳健性, 我们引入了GEO独立测试集, 将TCGA训练集筛选出的具有显著统计学意义的DEGs作为各亚型的特征基因模板, 利用NTP算法将测试集样本映射至对应的亚型中。生存分析结果显示, 两组患者在测试集中的生存趋势与训练集高度一致, subtype 1同样表现出显著的生存获益(图S10e), 这有力地证实了基于扰动特征识别的亚型在不同测序平台及患者群体中均具有高度的分型稳健性与预后预测价值。

此外, 我们探讨了分子分型与肿瘤病理分期之

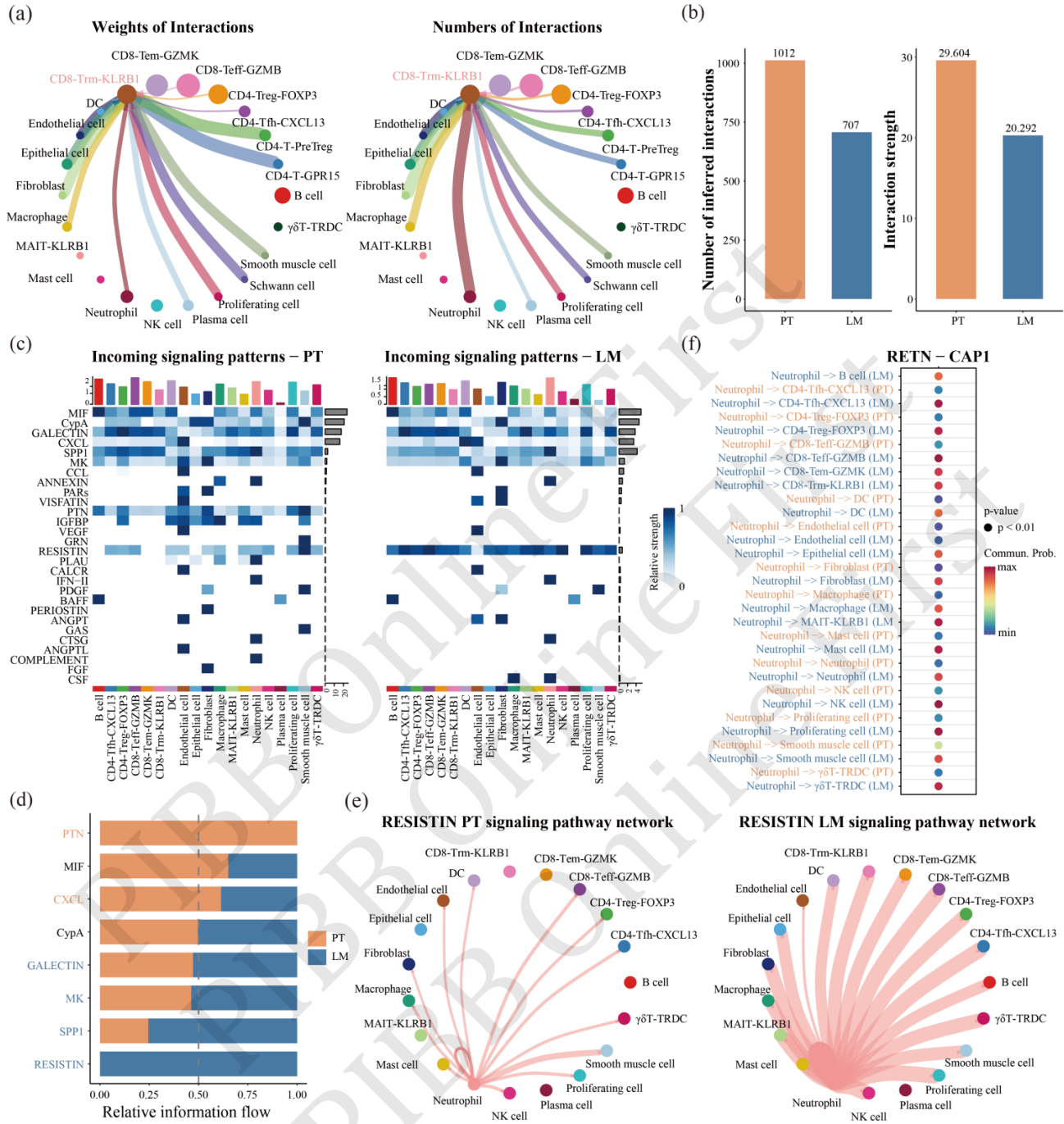


Fig. 3 Cellular interactions between the CD8-T_{RM}-KLRB1 cell subset and other cell subsets in the tumor microenvironment

(a) Network diagrams showing the interaction weight (left) and interaction numbers (right) between the CD8-T_{RM}-KLRB1 cell subset and other cell subsets in the tumor microenvironment. (b) Bar plots comparing the overall communication topological strength between the primary tumors and liver metastases microenvironments, including the inferred interaction numbers (left) and interaction strength (right). (c) Heatmaps showing the incoming communication patterns in the primary tumor (left) and liver metastasis (right). Rows represent signaling pathways, and columns represent receiver cell types. (d) Ranking of signaling pathway enrichment based on significantly different relative information flow. Pathways marked in yellow are enriched in the primary tumor, and pathways marked in blue are enriched in the liver metastasis. (e) Network diagrams showing cellular interactions of the RESISTIN signaling pathway in the primary tumor (left) and liver metastasis (right). (f) Bubble plot showing the communication probability of neutrophils with other target cells mediated by the RETN-CAP1 ligand-receptor pair. Bubble size represents the *P* value, and color from red to blue represents communication probability from high to low.

间的关系。结果显示, subtype 1 和 subtype 2 均分布于 stage I – IV 各病理阶段, 但两种亚型在不同病理阶段的分布有所差异。subtype 1 在 stage I 和 stage II 中的分布相对较多, 而 subtype 2 在 stage III 和 stage IV 中的分布相对增加, 提示不同分子亚型可能具有不同的临床病理特征, 并可能与肿瘤病理分期存在一定关系 (图 S10f)。此外, 我们纳入了年龄及病理分期等常规临床指标, 进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示, 该扰动分型与患者预后独立相关 (图 S10g)。

2.6 基于分子分型的CRLM潜在治疗药物筛选与免疫治疗响应预测

为了评估该扰动分型在个体化治疗中的临床指导价值, 我们利用 oncoPredict 算法预测 TCGA 数据集中两种亚型患者对化疗及靶向药物的敏感性。结果显示, 两组患者在药理学响应上存在显著的异质性。其中, 在 12 种常见 CRC 治疗药物中, 有 7 种药物 (包括奥沙利铂 (包含 1806 与 1089 两个 GDSC 药物条目)、厄洛替尼、阿昔替尼、伊立替尼、帕博西尼、吉非替尼及 5-氟尿嘧啶) 的 IC_{50} 预测分布在两种亚型间呈现出显著差异 (图 S12a)。值得注意的是, 相较于 subtype 1, subtype 2 亚型对阿昔替尼表现出更低的 IC_{50} 预测值, 提示该亚型可能具有更高的阿昔替尼预测敏感性, 为进一步探索不同分子亚型与抗血管生成治疗敏感性的关系提供线索 (图 S12b)。

此外, 我们利用 TIDE 算法对患者的免疫逃逸潜能及微环境特征进行了综合评估。结果显示, subtype 2 在肿瘤免疫功能障碍与排斥 (tumor immune dysfunction and exclusion, TIDE)、免疫功能障碍 (dysfunction)、免疫排斥 (exclusion) 及癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblast, CAF) 评分上均显著高于 subtype 1, 这表明 subtype 2 患者的肿瘤细胞具有更明显的免疫逃逸特征, 其免疫系统难以有效识别或杀伤肿瘤, 这与该亚型临床预后不佳的特征高度吻合。与之相对, subtype 1 在 IFNG、MSI Score、CD274 及 CD8 评分上均显著高于 subtype 2。这种免疫景观的对比提示, subtype 1 呈现出更为活跃的免疫浸润型特征, 对免疫治疗可能具有更好的潜在响应, 而 subtype 2 则表现为典型的免疫冷肿瘤或免疫排除型特征, 其低免疫原性与高抑制性微环境共同构成了其不良预后的核心因素 (图 S12c)。

综上, 该分型方案在预后层面表现出稳定的分

层能力, 并揭示了不同亚型在化疗、靶向治疗及免疫治疗潜在响应方面的差异, 为 CRLM 患者的个体化精准用药及临床方案优化提供了坚实的理论支撑。

3 讨论

本研究整合多套 CRC 单细胞转录组数据, 从疾病进展、细胞状态及细胞间通讯等多个层面解析 CRLM 免疫微环境的动态变化, 并进一步将关键细胞特征映射至 Bulk 转录组队列进行临床分型。研究发现, $CD8^+$ T 细胞可能沿 $CD8\text{-Teff-GZMB}$ 、 $CD8\text{-Tem-GZMK}$ 至 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 的连续转录状态发生重塑, 其中 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 在肿瘤及肝转移灶中逐渐富集, 提示其可能是 CRLM 进展过程中重要的组织驻留 T 细胞状态。

首先, $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 在肝转移灶中表现出较为明显的组织驻留和免疫调节特征, 而保持低细胞毒性状态。拟时序分析显示, 该亚群位于 $CD8^+$ T 细胞状态轨迹的末端, 并伴随 CXCR6 等组织驻留相关特征增强。值得注意的是, 进入肝转移微环境后, $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 进一步表现出热应激及氧化应激增强, 提示肝转移微环境可能推动该细胞进入一种具有应激适应特征的功能状态。与此同时, 肝转移灶中肿瘤及髓系细胞的 MHC-I 抗原呈递评分以及 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 的 TCR 信号活性均有所升高, 提示其功能状态变化并非简单源于抗原刺激不足, 而可能与持续抗原刺激背景下的功能重塑有关。

其次, 本研究进一步从微环境通讯角度探讨 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 状态变化的潜在调控因素。结果显示, 肝转移灶中性粒细胞相关 RESISTIN 信号增强, RETN-CAP1 配体 – 受体通讯较为突出, 同时 PMN-MDSC-like 中性粒细胞比例增加, 提示中性粒细胞可能参与肝转移免疫微环境的重塑。RETN-CAP1 通讯增强可能构成连接中性粒细胞与 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 状态变化的候选调控轴, 但目前该结果主要来源于细胞通讯算法预测, 尚不能证明 RETN-CAP1 能够直接抑制 $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 的细胞毒性。因此, 该信号轴更适合作为潜在调控机制进行讨论。此外, $CD8\text{-Trm-KLRB1}$ 相关 CD48-PDCD1 通讯亦呈增强趋势, 提示其可能进一步参与局部 T 细胞间的免疫调节。已有研究显示, KLRB1/CD161 可与 PD-1、TIGIT 等抑制性受体呈共表达, 并可能形成相互关联的免疫检查点网络,

提示CD161信号与PD-1/TIGIT通路可能共同参与Trm细胞的功能调节^[22-27]。在本研究中, CD8-Trm-KLRB1高表达KLRB1且伴随CD48-PDCD1通讯增强, 提示该亚群可能同时参与多重抑制性信号调控, 并在肝转移微环境中表现出免疫调节特征增强的状态。但目前CD161与PD-1/TIGIT之间是否存在直接协同作用, 以及其与CD48-PDCD1轴之间是否具有功能联系, 仍缺乏直接实验依据。因此, CRLM中的CD8-Trm-KLRB1状态可能是肿瘤细胞、髓系细胞及T细胞多重相互作用共同塑造的结果。

最后, 本研究进一步将单细胞层面的发现拓展至患者层面的临床分型。基于CD8-Trm-KLRB1相关基因构建基因相互作用扰动网络, 并通过共识聚类获得subtype 1和subtype 2, 两种亚型在TCGA及GEO队列中表现出较为一致的预后分层特征。subtype 2具有较差的生存结局, 同时TIDE、dysfunction、exclusion及CAF评分较高, 而subtype 1的IFNG、MSI Score、CD274及CD8评分相对较高, 提示不同CD8-Trm-KLRB1相关分子状态伴随明显不同的免疫微环境特征。进一步的药物敏感性分析显示, 多种药物存在亚型间预测敏感性差异, 其中subtype 2对阿昔替尼表现出较低的预测 IC_{50} , 为进一步探索不同免疫微环境状态与抗血管生成治疗敏感性的关系提供了线索。需要强调的是, TIDE及药物敏感性结果均属于计算预测, 不能直接等同于真实临床疗效。

综上, 本研究围绕CD8⁺T细胞状态演变及其微环境重塑, 进一步解析了CD8-Trm-KLRB1在CRLM进展中的潜在作用, 并将单细胞层面的细胞特征拓展至患者层面的分子分型。研究结果提示, CD8-Trm-KLRB1可能是反映CRLM免疫微环境异质性及患者临床差异的重要细胞状态。未来仍需通过空间多组学、体外功能实验及动物模型进一步验证RETN-CAP1等潜在通讯轴的空间关系及因果作用, 并在具有真实治疗信息的临床队列中进一步验证该分型的预后及治疗预测价值。

4 结论

本研究整合多套CRC单细胞转录组及Bulk转录组数据, 从细胞状态演变、肿瘤微环境通讯及患者分子特征三个层面系统解析CRLM相关免疫异质性。研究发现, CD8⁺T细胞可能沿CD8-Teff-GZMB、CD8-Tem-GZMK至CD8-Trm-KLRB1的连

续状态轨迹发生演变, 其中CD8-Trm-KLRB1在CRC进展及肝转移过程中逐渐富集, 表现出显著的组织驻留和免疫调节特征, 并伴随相对较低的细胞毒性及应激相关功能重塑, 提示其可能是CRLM免疫微环境中具有重要意义的细胞状态。

进一步分析显示, CD8-Trm-KLRB1的功能状态可能受到肿瘤微环境中多种细胞通讯网络的共同影响。肝转移灶中中性粒细胞来源的RETN-CAP1信号增强, PMN-MDSC-like中性粒细胞表现出更明显的免疫抑制特征; 同时, CD8-Trm-KLRB1与CD8-Teff-GZMB之间CD48-PDCD1相关潜在通讯呈增强趋势, 提示CD8-Trm-KLRB1可能参与由髓系细胞及其他T细胞共同构成的复杂免疫调控网络。但上述细胞通讯关系及其功能作用主要基于生物信息学预测, 仍需通过空间多组学、体外实验及动物模型进一步验证。

在患者层面, 基于CD8-Trm-KLRB1相关基因相互作用扰动特征构建的分子分型可将CRC患者划分为两个具有不同预后和免疫微环境特征的分子亚型, 并在独立GEO队列中得到验证。subtype 2与较差的生存结局、更高的免疫排斥及免疫功能障碍特征相关, 同时表现出较低的阿昔替尼预测 IC_{50} , 提示不同分子亚型可能存在潜在的药物敏感性差异。需要指出的是, TIDE及药物敏感性结果均属于计算预测, 尚不能替代真实临床疗效评价。

综上, 本研究构建了从CD8⁺T细胞状态演变、CD8-Trm-KLRB1功能重塑、肿瘤微环境通讯到患者分子分型的研究体系, 揭示了CD8-Trm-KLRB1与CRLM免疫微环境异质性之间的潜在联系, 并为CRLM患者风险分层及个体化治疗研究提供了新的分子依据。未来仍需结合具有真实治疗信息的临床队列及功能实验, 进一步验证CD8-Trm-KLRB1相关调控机制及分子分型的临床应用价值。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20260345_Figure S1.pdf

PIBB_20260345_Figure S2.pdf

PIBB_20260345_Figure S3.pdf

PIBB_20260345_Figure S4.pdf

PIBB_20260345_Figure S5.pdf

PIBB_20260345_Figure S6.pdf

PIBB_20260345_Figure S7.pdf

PIBB_20260345_Figure S8.pdf

PIBB_20260345_Figure S9.pdf
 PIBB_20260345_Figure S10.pdf
 PIBB_20260345_Figure S11.pdf
 PIBB_20260345_Figure S12.pdf
 PIBB_20260345_Table S1.xlsx
 PIBB_20260345_Table S2.xlsx
 PIBB_20260345_Table S3.xlsx
 PIBB_20260345_Table S4.xlsx
 PIBB_20260345_Table S5.xlsx
 PIBB_20260345_Table S6.xlsx
 PIBB_20260345_Table S7.xlsx

参考文献

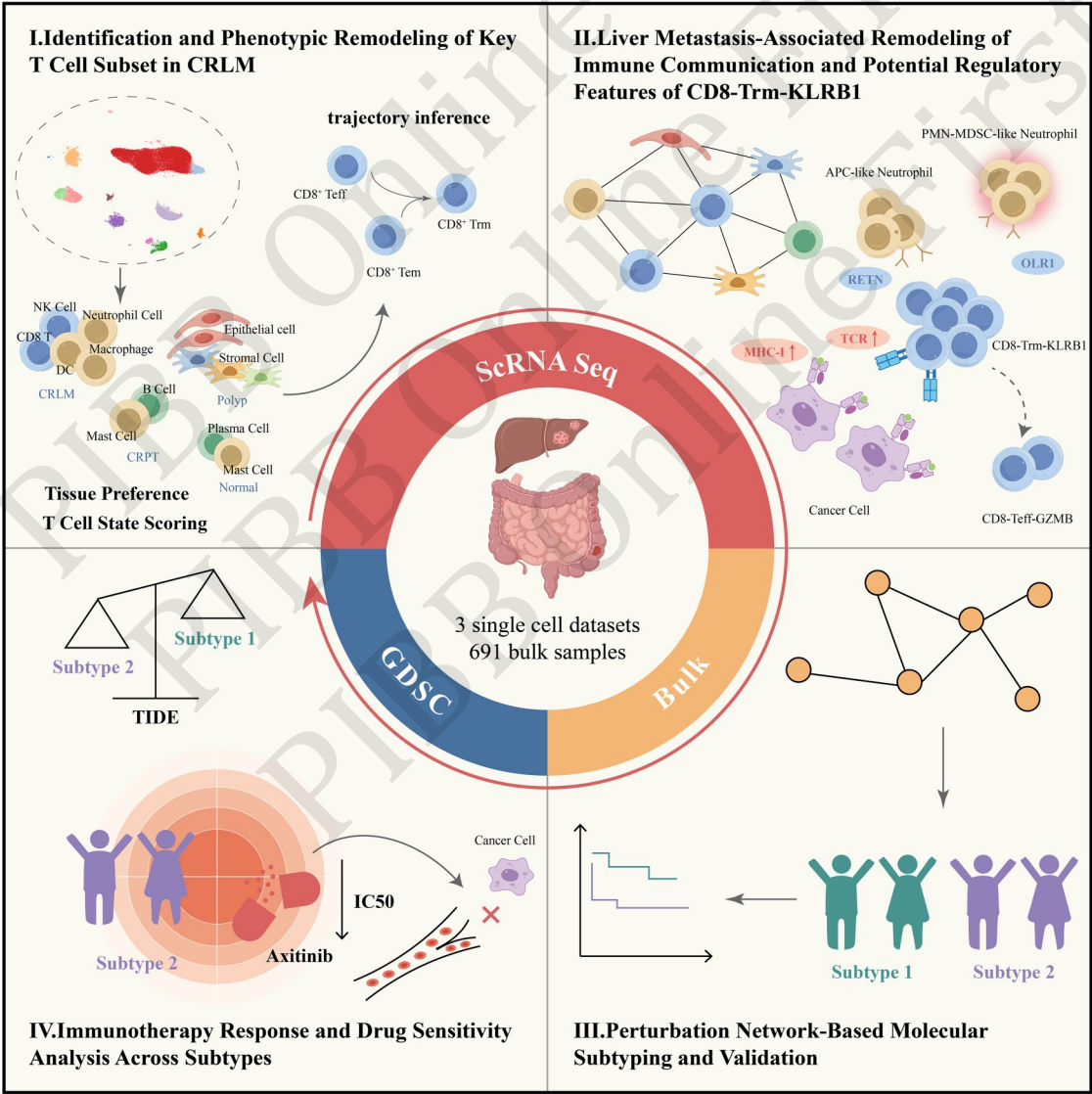
- [1] Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*, 2021, **14**(10): 101174
- [2] Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, *et al.* Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1): 78
- [3] Guo Y, Liang Y, Liu M, *et al.* Clinical deployment of interpretable AI: bridging routine clinical tests and proteomic signatures for preeclampsia risk stratification. *Curr Drug Targets*, 2026, **27**(4): 266-280
- [4] Chen Q, Mao R, Zhao J, *et al.* Upgraded nomograms for the prediction of complications and survival in patients with colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy followed by hepatic resection. *Ann Transl Med*, 2021, **9**(3): 265
- [5] Wei X L, Luo X, Sheng H, *et al.* PD-L1 expression in liver metastasis: its clinical significance and discordance with primary tumor in colorectal cancer. *J Transl Med*, 2020, **18**(1): 475
- [6] Che L H, Liu J W, Huo J P, *et al.* A single-cell atlas of liver metastases of colorectal cancer reveals reprogramming of the tumor microenvironment in response to preoperative chemotherapy. *Cell Discov*, 2021, **7**(1): 80
- [7] Liu S, Wang P, Wang P, *et al.* Tissue-resident memory CD103⁺CD8⁺ T cells in colorectal cancer: its implication as a prognostic and predictive liver metastasis biomarker. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, **73**(9): 176
- [8] Burn T N, Schröder J, Gandolfo L C, *et al.* Antigen reactivity defines tissue-resident memory and exhausted T cells in tumors. *Nat Immunol*, 2026, **27**(1): 98-109
- [9] Raynor J L, Chi H. Immunometabolic and spatiotemporal control of tissue-resident memory T cell biology. *Barrier Immun*, 2026, **2**(1): 6-22
- [10] Li Z, Liu D, He J, *et al.* The proximity of PD-1 (-) CD103⁺ tissue-resident CD8⁺ T cells to tumor cells is correlated with improved clinical outcomes in patients with cholangiocarcinoma. *Cancers*, 2026, **18**(4): 680
- [11] Shin W, Yun J, Han K, *et al.* Comparison of genetic variation between primary colorectal cancer and metastatic peritoneal cancer. *Genes Genom*, 2023, **45**(8): 989-1001
- [12] Nesari A M, MotieGhader H, Ghorbian S. Advances and challenges in single-cell RNA sequencing data analysis: a comprehensive review. *Brief Bioinform*, 2026, **27**(1): bbaf723
- [13] Rao B, Tang Y, Hu J, *et al.* Improving B-cell linear epitope prediction *via* multiple feature fusion and an integrated machine learning algorithm. *Curr Drug Targets*, 2026, **27**(2): 132-144
- [14] Riasat H, Alkhalifah T, Alturise F, *et al.* XCPP: a multi-model explainable deep learning framework for Accurate identification of cell-penetrating peptides from StructuredSequence features. *Curr Drug Targets*, 2026, DOI: 10.2174/0113894501416864251212082231
- [15] Rajpoot K. Role of artificial intelligence in nanomedicine and organ-specific therapy: an updated review. *Curr Drug Targets*, 2025, **26**(13): 921-953
- [16] Sheng J, Li N, Li S, *et al.* A dynamic molecular landscape in colorectal cancer progression at single-cell resolution. *J Transl Med*, 2025, **23**(1): 723
- [17] Ji L, Fu G, Huang M, *et al.* scRNA-seq of colorectal cancer shows regional immune atlas with the function of CD20⁺ B cells. *Cancer Lett*, 2024, **584**: 216664
- [18] Yang J M, Zhang N, Luo T, *et al.* TCellSI: a novel method for T cell state assessment and its applications in immune environment prediction. *iMeta*, 2024, **3**(5): e231
- [19] Chen Y, Gu Y, Hu Z, *et al.* Sample-specific perturbation of gene interactions identifies breast cancer subtypes. *Brief Bioinform*, 2021, **22**(4): bbaa268
- [20] Cui J, Chen Z, Cheng Y H, *et al.* GPR15-guided CD8⁺ T regulatory cells control intestinal inflammation. *Nature*, 2026, **656**(8129): 1003-1012
- [21] Ji J, Chen Z, He W, *et al.* CXCR6 defines a distinct resident state in $\gamma\delta$ T cells for protecting from liver cirrhosis. *Hepatology*, 2026, **84**(2): 487-502
- [22] Pearce H, Croft W, Nicol S M, *et al.* Tissue-resident memory T cells in pancreatic ductal adenocarcinoma coexpress PD-1 and TIGIT and functional inhibition is reversible by dual antibody blockade. *Cancer Immunol Res*, 2023, **11**(4): 435-449
- [23] Liu C R, Zhang M, Wang M Q, *et al.* CD161⁺CD8⁺ T cells in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol*, 2026, **18**(4): 114547
- [24] Mo J, Zheng L, Gao Z, *et al.* The study of mucosal-associated invariant T cells in colon cancer and roles in immune activities. *Onco Targets Ther*, 2021, **14**: 5263-5273
- [25] Mathewson N D, Ashenberg O, Tirosh I, *et al.* Inhibitory CD161 receptor identified in glioma-infiltrating T cells by single-cell analysis. *Cell*, 2021, **184**(5): 1281-1298.e1226.
- [26] Momanyi B M, Temesgen S A, Grace-Mercure B K, *et al.* RWRGDR: random walk and GraphSAGE-based framework for enhanced drug repositioning. *Curr Drug Targets*, 2026, **27**(7): 496-506
- [27] Li Q, Sun C, Wang D, *et al.* RMNet: an RNA m6A cross-species methylation detection method for nanopore sequencing. *Curr Drug Targets*, 2025, **26**(11): 799-812

Characterization of Tumor Microenvironmental Heterogeneity and Molecular Subtyping of Colorectal Cancer Liver Metastasis Based on CD8-Trm-KLRB1 Cell Features*

HUO Zheng-Chun¹⁾, LUO Xu¹⁾, LI Shao-Kang¹⁾, JIANG Yan¹⁾, LI Hong-Hao¹⁾,
XI Qi-Le-Mu-Ge^{2,3)}, YANG Lei^{1)**}

¹⁾College of Bioinformatics Science and Technology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China;
²⁾College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China;
³⁾State Key Laboratory of Reproductive Regulation and Breeding of Grassland Livestock, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Colorectal cancer liver metastasis (CRLM) is a leading cause of mortality in patients with colorectal cancer (CRC). Although local immunity centered on CD8⁺ T cells plays a critical role in suppressing

tumor progression, the unique immunotolerant microenvironment of liver metastases often induces heterogeneous functional alterations in these cells. However, the lineage trajectory and molecular mechanisms underlying phenotypic remodeling of specific CD8⁺ tissue-resident memory T cells during CRLM progression remain incompletely understood. Therefore, this study aimed to investigate the lineage evolution and phenotypic remodeling characteristics of specific CD8⁺ tissue-resident memory T cells in the CRLM microenvironment, explore their potential communication with microenvironmental cells, and establish a clinical prediction and molecular subtyping strategy based on the perturbation profile of this cell subset. **Methods** This study integrated three single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) datasets of CRC, spanning normal tissue, polyps, primary tumors, and liver metastases. Tissue preference analysis, T-cell state scoring, trajectory inference, and transcriptional regulatory analysis were performed to identify and characterize key CRLM-associated cell subsets. CellChat and MultiNicheNet were further employed to investigate intercellular communication and potential ligand-receptor interactions. Subsequently, differentially expressed genes of the identified subset were used to construct a gene interaction perturbation network in the cancer genome atlas (TCGA) cohort, followed by consensus clustering for molecular subtyping and independent validation in a gene expression omnibus (GEO) cohort. Finally, immunotherapy response and drug sensitivity analyses were performed to evaluate differences in immune microenvironmental characteristics and potential therapeutic responses among molecular subtypes. **Results** Single-cell analysis successfully identified a key CRLM-associated KLRB1⁺ CD8⁺ tissue-resident memory T-cell subset (CD8-Trm-KLRB1), which exhibited prominent tissue-resident and immunoregulatory features, together with relatively low cytotoxic activity. Pseudotime analysis suggested that CD8⁺ T cells may undergo a continuous state transition from GZMB⁺ CD8⁺ effector T cells (CD8-Teff-GZMB), through GZMK⁺ CD8⁺ effector memory T cells (CD8-Tem-GZMK), to CD8-Trm-KLRB1 cells, accompanied by stress-related functional remodeling. Antigen presentation and T-cell receptor activity analyses suggested that this state transition was not simply attributable to insufficient antigen presentation or complete loss of T-cell receptor signaling. Cell-cell communication analysis indicated enhanced potential immunoregulatory communication between neutrophils and CD8-Trm-KLRB1 cells in the CRLM microenvironment, with the resistin (RETN)-adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1)-mediated RETN-CAP1 ligand-receptor interaction being particularly prominent. Meanwhile, the CD48 molecule (CD48)-programmed cell death 1 (PDCD1)-mediated CD48-PDCD1 ligand-receptor interaction associated with CD8-Trm-KLRB1 cells also showed an increasing trend. The clinical molecular subtypes (subtype 1 and subtype 2) established based on the characteristics of this cell subset showed high consistency across TCGA and GEO cohorts. Subtype 2, which was associated with poorer prognosis, exhibited higher tumor immune dysfunction and exclusion (TIDE) scores and stronger immune exclusion features, while also showing a lower half-maximal inhibitory concentration (*IC50*) for axitinib, suggesting greater potential sensitivity to anti-angiogenic agents and a possible greater clinical benefit from such treatment. **Conclusion** This study reveals dynamic functional remodeling of CD8-Trm-KLRB1 cells during CRLM progression and suggests that their state may be regulated by upstream signals from the metastatic microenvironment, including neutrophil-associated RETN-CAP1 signaling, while their interactions with downstream immune cells through immunoregulatory communication such as CD48-PDCD1 may contribute to local immune microenvironmental remodeling. The molecular subtyping framework based on the perturbation characteristics of CD8-Trm-KLRB1-associated genes stratifies patients according to distinct prognostic and immune microenvironmental features and suggests potential differences in therapeutic response, providing a new perspective for understanding the CRLM microenvironment and developing individualized treatment strategies.

Key words colorectal cancer, liver metastasis, single cell, bulk data, perturbation network, molecular subtyping

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0345

CSTR: 32369.14.pibb.20260345

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (62673171, 62461046).

** Corresponding author.

Tel: 86-451-86622839, E-mail: leiyang@hrbmu.edu.cn

Received: June 26, 2026 Accepted: October 8, 2026