



DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.008

· 临床研究 ·

通过单细胞测序揭示结直肠癌浸润性B细胞的异质性及其预后价值

和倩,王志刚(上海交通大学医学院附属第六人民医院 普通外科,上海 200233)

[摘要] 目的:利用单细胞RNA测序(scRNA-seq)解析结直肠癌(CRC)肿瘤微环境(TME)中B细胞的异质性特征,为基于B细胞的预后评估与免疫治疗提供理论依据。方法:采集原发CRC患者的新鲜手术切除样本($n=36$),进行scRNA-seq。采用Seurat(v5.0)进行细胞分群,Monocle3(v1.3)和scVelo(v0.3.0)分析细胞分化轨迹,GSEA识别功能通路,pySCENIC(v0.11.2)构建基因调控网络。结果:识别B细胞(24 652个)和浆细胞(49 138个)共11个功能亚型。拟时序分析显示B细胞从初始态向组织驻留态分化。应激适应性B细胞在肿瘤中富集(10.39%),其NOD样受体信号和抗原提呈通路显著激活。组织驻留性B细胞在肿瘤中占9.09%,其C型凝集素信号和内吞作用增强。迁移性B细胞在TNM II期组织中比例最低(16.42%),氧化磷酸化等代谢通路显著富集。浆细胞呈终末分化状态,肿瘤中以IgG型为主(20.68%)。结论:应激适应性和组织驻留性B细胞可能促进肿瘤免疫逃逸,迁移性B细胞或具抗肿瘤潜力;同时,IgG型浆细胞可能与免疫抑制有关。

[关键词] 结直肠癌;单细胞RNA测序;肿瘤浸润性B细胞;肿瘤微环境;预后;异质性

[中图分类号] R735.3;R730.3;R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 11-1159-10

Single-cell RNA sequencing unravels heterogeneity and prognostic significance of tumor-infiltrating B cells in colorectal cancer

HE Qian, WANG Zhigang (Department of General Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China)

[Abstract] Objective: To characterize the heterogeneity of B cells in the colorectal cancer (CRC) tumor microenvironment (TME) through single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), thereby providing a theoretical foundation for B cell-based prognostic assessment and immunotherapy. Methods: Fresh surgical specimens from patients with primary colorectal cancer ($n=36$) were collected and subjected to scRNA-seq. Cell clustering was performed using Seurat (v5.0). Cell differentiation trajectories were analyzed with Monocle3 (v1.3) and scVelo (v0.3.0). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was employed to identify relevant functional pathways, and the gene regulatory network was constructed using pySCENIC (v0.11.2). Results: 11 functional subtypes were identified from 24 652 B cells and 49 138 plasma cells. Pseudotime analysis revealed a differentiation trajectory of B cells from a naive to a tissue-resident state. Stress-adapted B cells were enriched in tumor tissues (10.39%), exhibiting significant activation of the NOD-like receptor signaling pathway and antigen processing and presentation. Tissue-resident B cells accounted for 9.09% of tumor-infiltrating B cells and showed enhanced C-type lectin receptor signaling and endocytosis. Migratory B cells were least abundant in stage II tumors (16.42%), with significant enrichment of metabolic pathways such as oxidative phosphorylation. Plasma cells were terminally differentiated, with IgG-type cells predominating in tumor tissues (20.68%). Conclusion: Stress-adapted and tissue-resident B cells may promote immune escape, while migratory B cells potentially exert anti-tumor effects. IgG-type plasma cells appear to be associated with immunosuppression.

[Key words] colorectal cancer (CRC); single-cell RNA sequencing (scRNA-seq); tumor-infiltrating B cell; tumor microenvironment (TME); prognosis; heterogeneity

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(11): 1159-1168. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.008]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,其年新增病例与病死例数约占全球总病例的10%,也是导致癌症相关死亡的主要原因。CRC是女性中第二常见的肿瘤类型,也是男性中第三常见的肿瘤类型。在女性中,CRC的发病率和病死率均比男性低约25%^[1]。现有的单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)

应用多聚焦于T细胞和髓系细胞研究^[2-3],而针对B细胞及浆细胞动态特征的系统性解析则相对缺乏。B细胞在肿瘤免疫中具有双重作用:一方面通过抗原

[作者简介] 和倩(1999—),女,博士生,主要从事肿瘤免疫微环境调控机制研究

[通信作者] 王志刚(扫码获取作者通信方式)





提呈和抗体分泌激活抗肿瘤免疫,另一方面通过调节性B细胞分泌IL-10或表达PD-L1介导免疫抑制^[4]。非小细胞肺癌的scRNA-seq研究^[5]揭示了B细胞亚群与肿瘤预后的关联。然而有关CRC的scRNA-seq研究尚不系统,且缺乏临床转化验证。值得注意的是,肠道作为人体最大的免疫器官,拥有极其丰富的B细胞和浆细胞群^[6],提示其可能在CRC的动态变化中具有特殊意义。浆细胞作为终末分化的B细胞,其功能具有微环境依赖性:黏膜屏障中IgA⁺浆细胞维持局部免疫稳态,而肿瘤内富集的IgG⁺浆细胞可能通过分泌促血管生成因子(如VEGFA)或免疫抑制因子(如IL-10)重塑肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)^[7]。然而,CRC中浆细胞IgA/IgG同种型转换的分子机制及其空间分布特征尚未明确,阻碍了靶向B细胞谱系的治疗策略开发。本研究通过对18例CRC患者的肿瘤及癌旁组织进行scRNA-seq,构建了CRC肿瘤浸润性B细胞及浆细胞的高分辨率分子图谱,系统阐明CRC中B细胞的功能状态与动态演变,揭示其双重免疫调节作用,为识别预后生物标志物和开发新的免疫治疗策略提供关键依据。

1 材料与方法

1.1 病例样本采集

本研究纳入于2023年11月至2024年4月在上海市第六人民医院接受手术治疗的原发性TNM分期I期到III期的CRC患者,年龄30~85岁,所有患者均未合并其他类型肿瘤,没有远处转移,没有合并其他严重类型的疾病,一般状况良好,进行了根治性手术(R0切除),检测了KRAS、NRAS、BRAF等基因突变情况,检测了微卫星状态,均未接受新辅助治疗。本研究共收集了18例患者的肿瘤组织及配对癌旁组织,均经病理学确诊为结直肠腺癌。所有样本离体30 min内分离为单细胞悬液,送往实验室进行后续操作,验证细胞活性大于85%后进行scRNA-seq文库构建。本研究经上海市第六人民医院伦理委员会批准,批号:2025-KY-010[K]。患者均签署知情同意书。

1.2 scRNA-seq与数据预处理

采用10×Genomics公司Chromium平台进行scRNA-seq。质控标准为每个细胞检测基因数2 000~6 000个,线粒体基因占比<20%。遵循标准的单细胞分析流程:首先使用Cell Ranger(v7.1.0)进行序列比对与基因定量;随后,在Seurat(v5.0)环境中,依次使用SCTransform方法进行数据标准化、基于高变基因进行主成分分析,并应用Harmony算法以校正批次效应;最后,采用t分布随机邻域嵌入(*t*-distributed stochastic neighbor embedding, tSNE)和UMAP(均匀流形近似与投影)进

行降维可视化,并基于Louvain聚类算法(分辨率=0.8)进行细胞分群。统计分析肿瘤组织和配对癌旁组织中T细胞、上皮细胞、浆细胞和B细胞4种细胞类型的占比。细胞亚群的注释依据经典标记基因进行:MS4A1(跨膜结构域A1)与CD79A标记B细胞;SDC1(多配体蛋白聚糖1)与XBP1(X盒结合蛋白1)标记浆细胞;EPCAM(上皮细胞黏附分子)标记上皮细胞;CD3E(CD3ε链)、CD3D(CD3δ链)标记T细胞。

1.3 拟时序分析

基于Monocle3(v1.3)进行拟时序分析,选取前2 000个高变基因,构建最小生成树,利用反向图嵌入(DDRTree)算法推断B细胞分化轨迹。通过分支依赖性检验识别关键调控基因模块。

1.4 RNA速率分析

使用scVelo(v0.3.0)整合剪接/未剪接mRNA信息,基于随机动力学模型推断细胞状态转移方向。结合细胞周期评分按照cyclone算法回归技术噪声,验证拟时序分析结果。

1.5 功能富集分析

基于ClusterProfiler(v4.6)进行基因集富集分析(GSEA),参考MSigDB Hallmark基因集(v7.5),显著性阈值设为FDR<0.25。

1.6 统计学与差异分析

采用Wilcoxon秩和检验比较组间差异表达基因(DEG, 阈值: |log₂FC| > 0.25, P_{adj} < 0.05),采用Kruskal-Wallis检验分析多组间非参数差异。使用FDR方法校正多重假设检验。

2 结果

2.1 CRC中肿瘤浸润淋巴细胞与上皮细胞的单细胞图谱

本研究收集了在上海市第六人民医院进行根治性手术切除的原发性CRC样本($n=36$),包括肿瘤与配对的癌旁组织各18份,患者临床病历信息见表1。本研究共筛选了189 252个肿瘤浸润淋巴细胞和上皮细胞进行降维聚类并可视化为tSNE图(图1A)。经典标记基因进行细胞类型鉴定,结果(图1B、C)显示,从样本的肿瘤浸润淋巴细胞与上皮细胞内,共鉴定出96 932个T细胞(CD3D⁺/CD3E⁺)、24 652个B细胞(MS4A1⁺)、49 138个浆细胞(CD38⁺/JCHAIN⁺/SDC1⁺)以及18 530个上皮细胞(EPCAM⁺)。统计分析肿瘤组织和配对癌旁组织中T细胞、上皮细胞、浆细胞和B细胞4种细胞类型的占比(图1D)。采用Wilcoxon检验比较了各细胞亚群在肿瘤组织与癌旁组织中的分布差异,T细胞在肿瘤组织中的占比为59.34%,高于癌旁组织(44.16%, $P<0.05$);浆细胞在肿瘤组织中的占比为19.31%,低于癌旁组织(31.75%, $P<0.05$);B细胞在肿瘤组织中的占比为8.76%,

低于癌旁组织(16.73%, $P < 0.05$)。

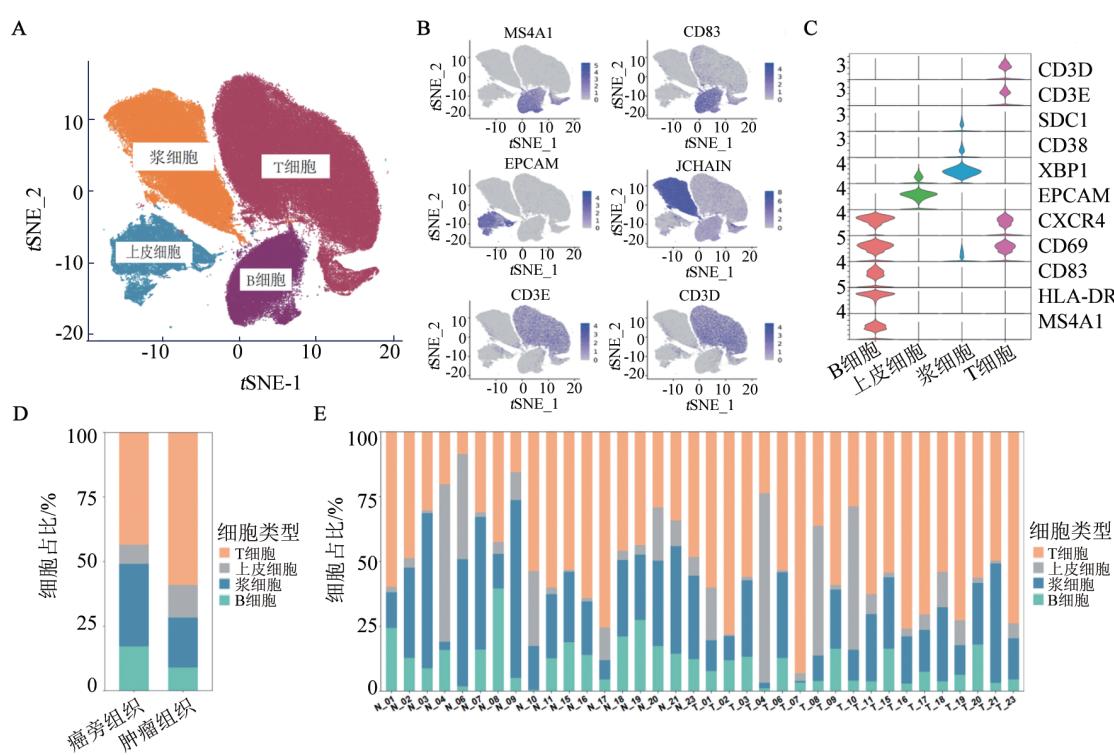
样本细胞占比统计结果(图1E)显示, 不同临床病理特征的样本, 细胞占比不同, 如微卫星不稳定

(microsatellite instability, MSI)的样本(样本编号04和10)中上皮细胞占比(>50%)有高于微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)的样本(<20%)的倾向。

表1 患者临床病理信息

患者编号	肿瘤位置	pTNM			TNM分期	肿瘤体积 /cm ³	微卫星状态
		T	N	M			
患者-01	结肠	3	2b	0	IIIC	4.7 × 4.5 × 1.8	MSS
患者-02	直肠	3	1b	0	IIIB	4.3 × 3.2 × 1.8	MSS
患者-03	直肠	3	2b	0	IIIC	2.6 × 2.0 × 1.0	MSS
患者-04	结肠	3	0	0	II A	7.0 × 9.0 × 2.5	MSI
患者-06	结肠	3	2a	0	IIIB	2.8 × 2.8 × 1.0	MSS
患者-07	结肠	3	0	0	II A	4.0 × 3.8 × 1.5	MSS
患者-08	结肠	3	0	0	II A	6.0 × 5.5 × 1.0	MSS
患者-09	结肠	3	0	0	II A	5.5 × 4.0 × 1.5	MSS
患者-10	结肠	3	0	0	II A	8.5 × 5.7 × 2.5	MSI
患者-11	结肠	2	0	0	I	3.5 × 3.5 × 0.6	MSS
患者-15	直肠	3	0	0	II A	7.5 × 5.0 × 3.0	MSS
患者-16	直肠	1	0	0	I	2.5 × 2.0 × 2.8	MSS
患者-17	直肠	3	0	0	II A	3.5 × 3.0 × 0.5	MSS
患者-18	直肠	1	0	0	I	4.0 × 3.5 × 2.0	MSS
患者-19	直肠	2	0	0	I	4.5 × 3.5 × 0.6	MSS
患者-20	直肠	3	1b	0	IIIB	4.5 × 3.0 × 1.5	MSS
患者-21	结肠	3	1a	0	IIIB	3.0 × 2.0 × 1.5	MSS
患者-23	结肠	2	0	0	I	3.0 × 2.6 × 1.5	MSS

pTNM: 术后肿瘤病理分期。



A: 肿瘤浸润淋巴细胞和上皮细胞的tSNE展示图; B: T细胞、上皮细胞、浆细胞和B细胞4种细胞类型关键基因的tSNE展示图; C: T细胞、上皮细胞、浆细胞和B细胞4种细胞类型标记基因的表达情况的小提琴图; D: 癌旁组织和肿瘤组织中的4种细胞占比的柱状堆叠图; E: 36个样本中T细胞、上皮细胞、浆细胞和B细胞4种细胞类型的细胞占比柱状堆叠图。横坐标所示的样本编号和患者编号一致, 即患者-01的癌旁组织样本为N_01, 肿瘤组织样本为T_01。

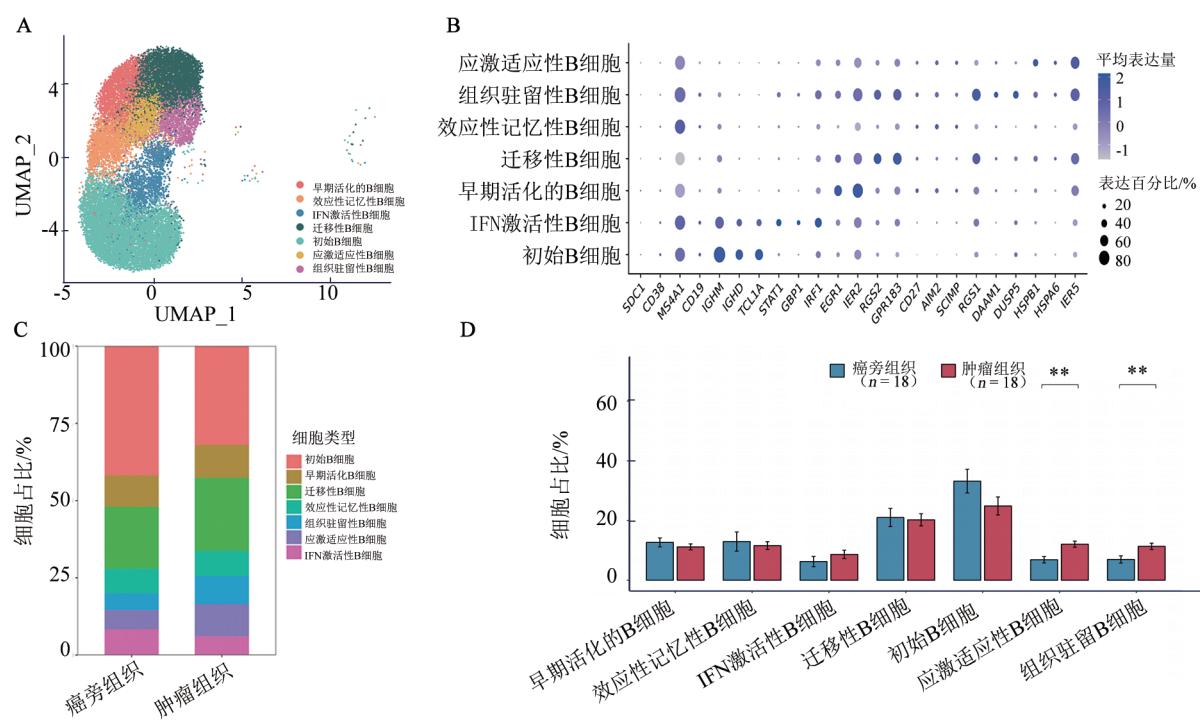
图1 免疫浸润淋巴细胞的单细胞特征

2.2 B 细胞亚群鉴定及其在肿瘤与癌旁组织中的差异分布

对样本进行无监督聚类分析分离出的24 652个高质量B细胞中,共识别出7个转录组特征迥异的B细胞亚群(图2A)。基因表达水平可视化结果(图2B)显示,所有B细胞亚群均高表达经典广谱B细胞标记基因MS4A1(CD20)和CD19,而浆细胞的标记基因SCD1(CD138)与CD38在所有亚群中均未检测到显著表达。

这些亚群在肿瘤组织与配对癌旁组织中的分布呈现出差异(图2C),在肿瘤组织中,初始B细胞亚群的细

胞数量为2 230,占肿瘤浸润性B细胞总数的31.96%;在癌旁组织中,初始B细胞亚群细胞数量为6 579,占比为41.82%。采用Wilcoxon检验比较了B细胞各亚群在肿瘤组织与癌旁组织中的占比,结果(图2D)显示,应激适应性B细胞和组织驻留性B细胞占比在组织间存在显著差异:应激适应性B细胞在肿瘤组织中的占比为10.39%,高于癌旁组织(6.29%, $P < 0.005$);组织驻留性B细胞在肿瘤组织中的占比为12.5%,高于癌旁组织(9.09%, $P < 0.005$),提示应激适应性B细胞和组织驻留性B细胞可能参与TME重塑。



A: B细胞再分群UMAP展示图;B: B细胞亚群的标记基因表达情况;C: 瘤旁组织和肿瘤组织中B细胞亚群的占比柱状堆叠图;
D: 瘤旁组织与肿瘤组织中B细胞亚群占比的柱状统计图。 $*P < 0.05$, $**P < 0.005$ 。

图2 CRC中B细胞的单细胞亚群鉴定及其组织分布差异

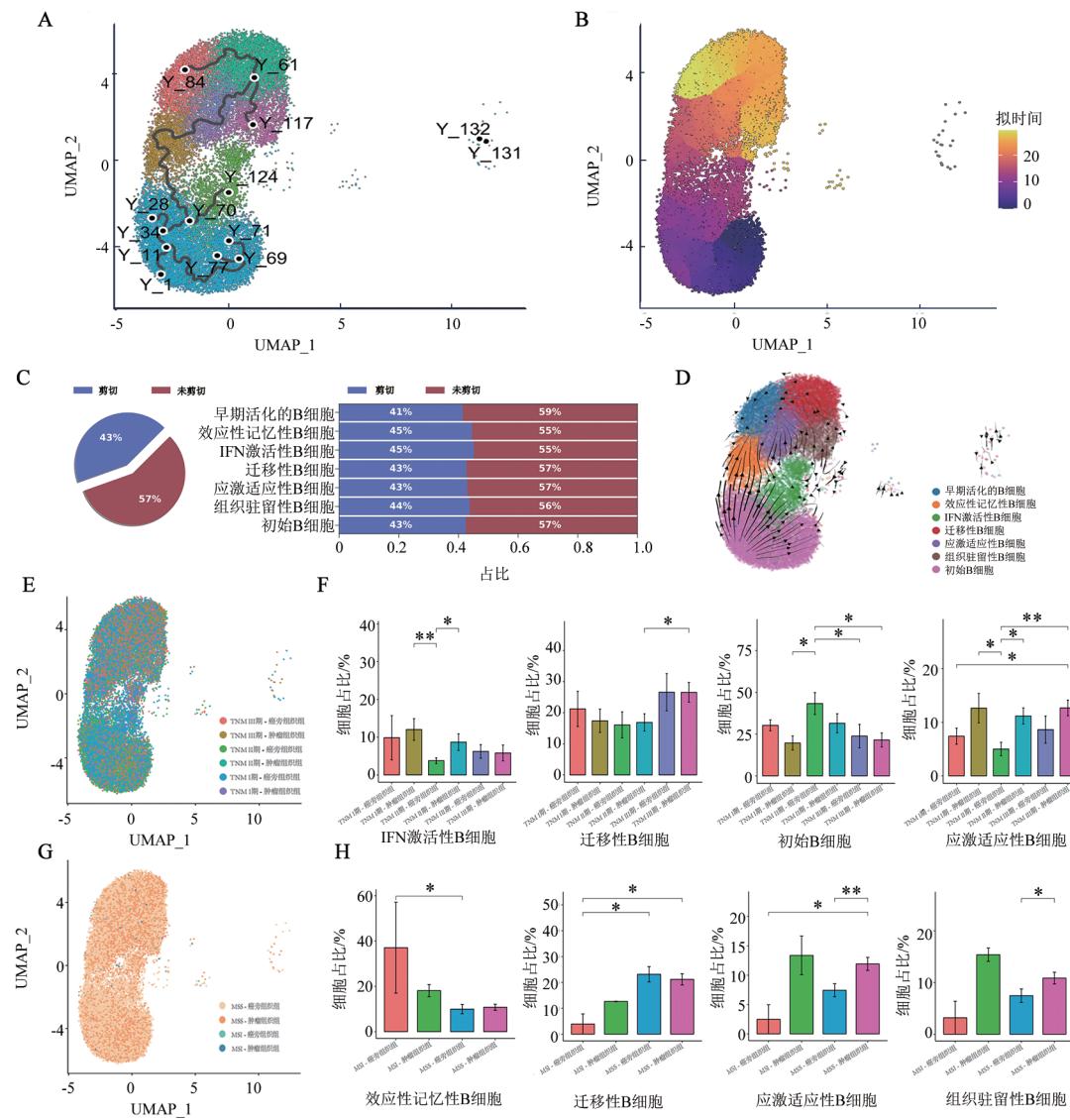
2.3 CRC中肿瘤浸润性B细胞的发育轨迹、转录动力学及临床关联分析

拟时序分析探究肿瘤浸润性B细胞各亚群间的发育关系与动态变化,结果(图3A)显示,起始节点1(Y_1)位于初始B细胞富集的区域,而轨迹的终点则延伸至组织驻留性B细胞所在的区域。将细胞按其拟时间值进行可视化(图3B),呈现出从蓝色(早)到黄色(晚)的连续过渡,该颜色梯度在UMAP空间中的分布与细胞亚群的注释结果具有一致性。

RNA速率分析进一步解析B细胞的转录动力学,数据(图3C)显示,剪接mRNA的平均占比为($40.2 \pm 3.1\%$),未剪接mRNA的平均占比为($59.8 \pm 3.1\%$)。按亚群细分后,各亚群的剪接与未剪接mRNA比例均与整体分布相近,无显著偏离。基于

RNA速率推断的细胞状态转移向量被投射在UMAP图上,结果(图3D)显示,向量箭头从初始B细胞区域发出,主要指向早期活化B细胞、效应性记忆B细胞及组织驻留性B细胞等区域。

B细胞按照TNM分期I-III期进行分组,并将分组结果展示在UMAP图中(图3E)。采用多组间的Kruskal-Wallis检验分析比较了B细胞各个亚群在不同TNM分期肿瘤组织的分布差异,结果(图3F)显示,迁移性B细胞在TNM II期肿瘤中占比16.42%,显著低于在TNM III期肿瘤中的占比(30.67%, $P < 0.05$),提示迁移性B细胞在肿瘤进展中可能起到重要作用。最后将肿瘤按照微卫星状态进行UMAP展示(图3G)和数据分析(图3H),MSS肿瘤组与MSI肿瘤组之间未发现有统计学差异的结果,可能与MSI型肿瘤的样本数量少($n = 2$)有关。



A: 拟时序分析按照肿瘤浸润性B细胞注释展示的分化轨迹图, 图中各黑点表示分化节点, 分化顺序由点1(Y_1)到点132(Y_132); B: 拟时序分析按照分化预测时间(拟时间)展示的分化轨迹图, 分化顺序由0开始(蓝色), 到30结束(黄色)。C: 按照B细胞亚型分类的基因剪接与未剪接率的占比图(速率分析); D: 速率分析按照B细胞注释绘制的分化流线图, 箭头指向方向为模拟的细胞分化方向; E: B细胞进行TNM分组, 将分组结果展示在UMAP图上; F: B细胞按照TNM分组后的细胞占比统计, 多组间采用Kruskal-Wallis分析, 任意两组间采用Wilcoxon分析; G: 将所有B细胞按照微卫星状态进行分组, 分组结果展示在UMAP图上; H: 所有B细胞按照微卫星状态分组后的细胞占比统计, 多组间采用Kruskal-Wallis分析, 任意两组间采用Wilcoxon分析。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ 。

图3 肿瘤浸润性B细胞的发育轨迹、转录动力学及临床关联分析

2.4 CRC中关键B细胞亚群的功能特征与转录调控机制解析

基于前述分析中鉴定出的、在组织分布或临床分期上呈现显著差异的3种B细胞亚型:应激适应性B细胞、组织驻留性B细胞和迁移性B细胞, 本研究进一步开展了深入的分子特征研究。

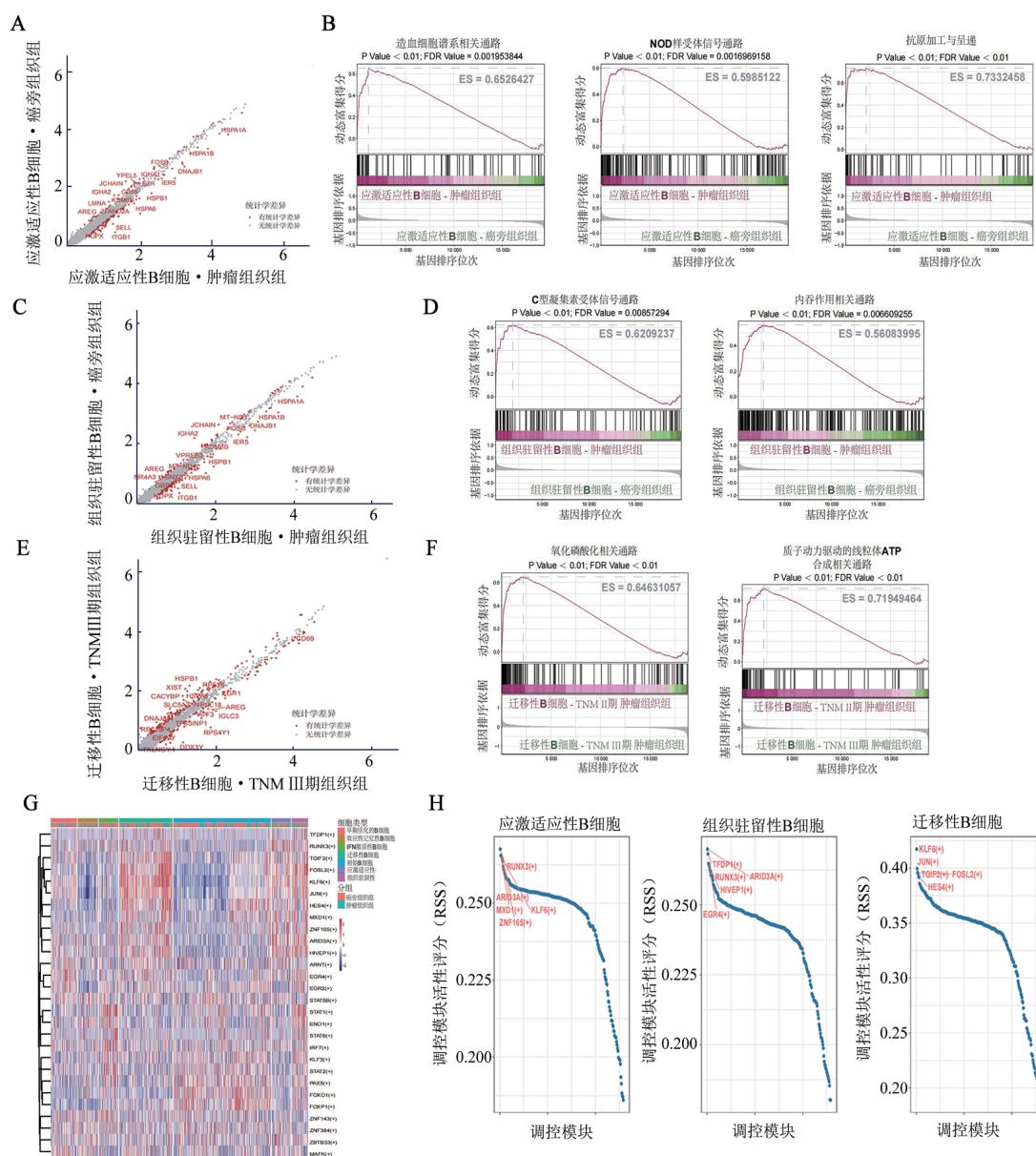
分析应激适应性B细胞和组织驻留性B细胞在肿瘤组织与癌旁组织环境中的转录组差异, 结果(图4A)显示, 与癌旁组织相比, 肿瘤组织来源的应激适应性B细胞中HSPA1A、HSPA1B等热激蛋白家族成员基因显著上调。为了系统阐释这些差异表达基因

所涉及的生物学过程, 本研究进行了基因集富集分析(GSEA), 结果(图4B)显示, 在肿瘤组织的应激适应性B细胞中, 包括造血细胞谱系(NES = 1.896)、NOD样受体信号通路(NES = 1.912)以及抗原加工与提呈(NES = 2.103)在内的多条信号通路与生物学过程显著富集。同样, 在肿瘤组织的组织驻留性B细胞中也观察到了HSPA1A、HSPA1B等热激蛋白家族成员基因的显著上调(图4C)。对肿瘤组织中的组织驻留性B细胞进行GSEA分析, 结果(图4D)显示, 组织驻留性B细胞中C型凝集素受体信号通路(NES = 1.853)和内吞作用(NES = 1.840)等通路特异性富集。

为了探讨迁移性B细胞的基因表达特征是否随肿瘤进展(TNM分期)而发生变化,本研究寻找TNM II期与TNM III期肿瘤组织中迁移性B细胞的差异表达基因,结果(图4E)显示,在TNM II期肿瘤组织中,CD69是表达水平上调最为显著的基因之一。进一步的GSEA分析(图4F)表明,在TNM II期肿瘤组织的迁移性B细胞中,氧化磷酸化(NES = 2.249)及质子动力驱动的线粒体ATP合成(NES = 2.305)等与能量代谢密切相关的通路显著富集。

为探索驱动B细胞亚型异质性的潜在上游调控

机制,本研究系统性分析了所有B细胞亚型的转录因子活性,结果(图4G)显示,不同的B细胞亚型呈现出不同的Regulons活性模式。通过调控模块特异性评分(RSS)鉴定各亚型中特异性最高的Regulons发现,转录因子RUNX3(runt相关转录因子3)和ARID3A(AT丰富结构域结合蛋白3A)在应激适应性B细胞与组织驻留性B细胞中均表现出高度特异性。转录因子KLF6为迁移性B细胞中特异性最高的Regulons之一(图4H)。



A:应激适应性B细胞在肿瘤组织与癌旁组织转录组差异分析结果,显著上调的前10个差异基因展示在火山图上,采用FDR校正后的P值;**B:**应激适应性B细胞GSEA基因富集结果;**C:**组织驻留性B细胞在肿瘤组织与癌旁组织转录组差异分析结果,显著上调的前10个差异基因展示在火山图上;**D:**组织驻留性B细胞GSEA基因富集结果;**E:**迁移性B细胞在TNM II期肿瘤与TNM III期肿瘤转录组差异分析结果,显著上调的前10个差异基因展示在火山图上;

期肿瘤的转录组差异分析结果,差异性最强的前10个基因展示在火山图上;F:迁移性B细胞的GSEA富集分析结果;

G:对所有B细胞亚型进行转录因子分析;H:将3种B细胞亚型的调控模块按照特异性评分,排名最高的前5个转录调控因子展示在图上。

图4 应激适应性B细胞、组织驻留性B细胞和迁移性B细胞亚型的功能特征与转录调控分析

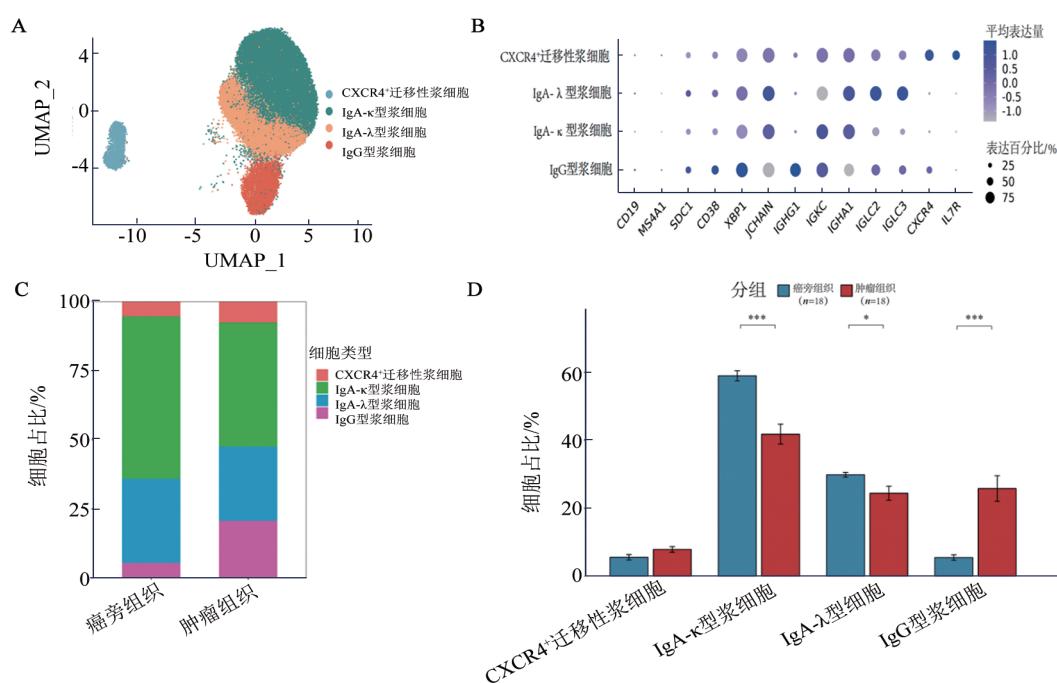


2.5 肿瘤浸润浆细胞的异质性及其组织分布特征

为深入解析CRC TME中浆细胞的异质性,本研究对从所有样本中鉴定出的49 138个浆细胞进行了再聚类分析。经过降维和聚类,共识别出4个具有不同转录组特征的浆细胞亚群(图5A)。细胞亚群的特征基因表达模式分析结果(图5B)显示,所有亚群均一致性高表达浆细胞的经典标记基因,包括JCHAIN以及SDC1(CD138)。同时,所有亚群均未检测到B细胞的典型标记基因MS4A1(CD20)与CD19的显著表达,证实了细胞注释的准确性。根据特异性高表达的基因,4个浆细胞亚群被分别注释并命名:IgG型浆细胞,IgA-κ型浆细胞,IgA-λ型浆细胞,CXCR4⁺迁

移性浆细胞。

对这些亚群在肿瘤组织与配对癌旁组织中的分布进行统计,并可视化为柱状图(图5C)。采用Wilcoxon检验比较了各亚群在肿瘤组织与癌旁组织中的占比,结果(图5D)显示,在肿瘤组织中IgG型浆细胞亚群占所有浆细胞的20.68%,显著高于癌旁组织(5.44%, $P < 0.0001$)。在肿瘤组织中IgA-κ型浆细胞亚群占所有浆细胞的44.87%,低于癌旁组织(58.75%, $P < 0.0001$)。在肿瘤组织中IgA-λ型浆细胞亚群占所有浆细胞的26.83%,低于癌旁组织(30.45%, $P < 0.05$)。



A:肿瘤浸润浆细胞的再分群结果;B:浆细胞各亚型标记基因表达情况的气泡图;C:4种浆细胞亚型在癌旁组织和肿瘤组织中占比的柱状堆叠图;D:4种浆细胞亚型在肿瘤组织与癌旁组织中占比的柱状图,组间差异分析采用Wilcoxon检验。 $*P < 0.05$, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 。

图5 浆细胞亚群异质性解析及其在肿瘤组织中的分布重塑

2.6 浆细胞亚群的发育轨迹、临床关联及转录调控分析

拟时序分析进一步探究浆细胞各个亚群之间的潜在发育关系,结果(图6A)显示,4个亚群在转录组空间中形成有差异但相邻的分布。拟时序分析构建的细胞发育轨迹图(图6B)显示,4个浆细胞亚群均分布于拟时间轴的中后端,拟时间值整体处于较高水平。

为解析浆细胞亚群的转录动力学,本研究进行了RNA速率分析。浆细胞各个亚群的mRNA剪接状态分析结果(图6C)显示,剪接mRNA的平均占比为($40.2 \pm 2.8\%$),未剪接mRNA的平均占比为

($59.8 \pm 2.8\%$),各亚群间比例高度一致。基于RNA速率推断的细胞状态转移向量投影在UMAP图上,形成流线图(图6D)。该流线图显示,不同浆细胞亚群区域内的向量箭头方向各异,未呈现统一的指向性。

本研究根据TNM分期(I-III期)对浆细胞进行分组,分析浆细胞亚群与肿瘤临床病理特征的关系并在UMAP图中展示(图6E)。对浆细胞亚群占比的组间比较发现(图6F),IgA-λ型浆细胞在TNM I期肿瘤组的占比(31.62%)显著高于TNM II期肿瘤组(23.5%, $P < 0.05$)。浆细胞按照微卫星状态进行分组UMAP展示(图6G)。采用Wilcoxon检验比较了



各亚群在不同组别中的占比,结果(图6H)显示,在MSS组中IgA-λ型浆细胞亚群占癌旁组织所有浆细胞的30.50%,高于在肿瘤组织中的占比(20.17%, $P < 0.005$)。同时,在MSS组中IgA-κ型浆细胞亚群占癌旁组织所有浆细胞的58.67%,高于在肿瘤组织中的占比(45.34%, $P < 0.0001$)。在MSS组中IgG型浆细胞亚群占肿瘤组织所有浆细胞的19.86%,显著高于在癌旁组织中的占比(5.44%, $P < 0.0001$)。

对所有浆细胞亚群进行转录因子分析,使用AUCell软件进行活性评分,生成相应的活性矩阵数据,并可视化为热图(图6I)。使用RSS对细胞中的活性Regulons状态进行判定,图中标注出活性排名前5的Regulons,结果(图6J)显示,IgG型浆细胞亚群中转录因子ZNF460(锌指蛋白460)和POU2F2(POU类2同源盒2)高表达。

3 讨论

B细胞是TME中的重要免疫细胞,其在肿瘤的进展和治疗上均起着重要作用。研究^[8-9]发现肿瘤浸润性B细胞中FCRL4⁺亚群可以通过分泌IFN-γ激活CD8⁺T细胞,使CRC患者的5年生存率上升30%。浆细胞分泌的IgG1可通过FcγR介导抗体依赖的细胞吞噬作用,增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬。同时IgA⁺浆细胞可通过TGF-β促进调节性T细胞扩增,从而调控免疫^[10-11]。因此,靶向免疫微环境中的肿瘤浸润性B细胞是肿瘤治疗的一个有前景的方向。现有的探索性临床研究发现,使用daratumumab等CD38单抗可直接清除免疫抑制性浆细胞^[12];其次,调控B细胞活化信号(如使用BAFF抑制剂tabalumab)则能影响三级淋巴结构的稳态,进而改变局部免疫应答^[13]。这些证据表明,针对B细胞/浆细胞轴进行干预,无论是通过直接耗竭免疫抑制群体,还是通过调节其发育与功能环境,均有望成为重塑CRC免疫微环境、增强抗肿瘤免疫力的创新治疗途径。

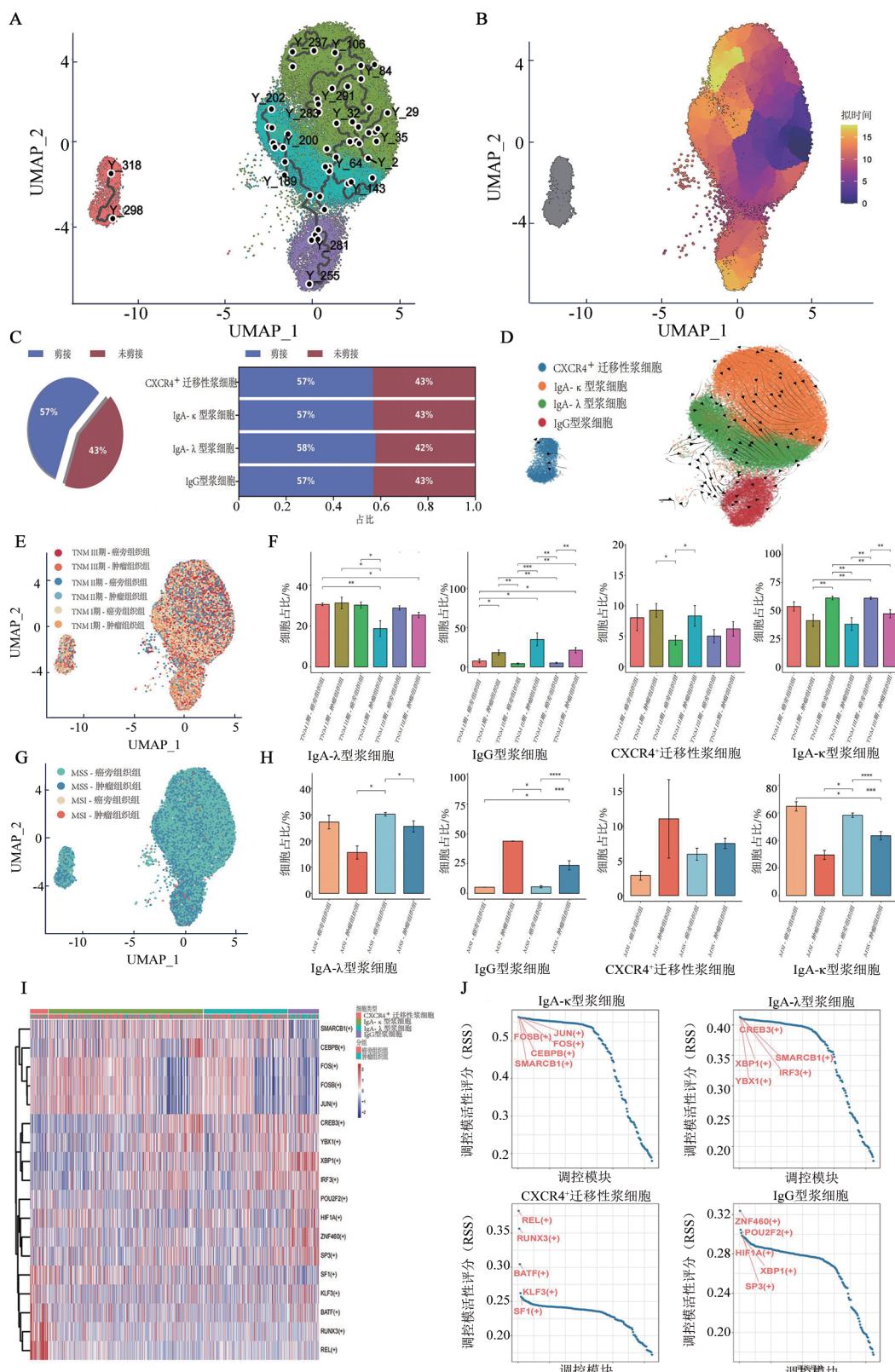
本研究通过scRNA-seq,系统解析了CRC的TME中B细胞与浆细胞的分布格局及B细胞的异质性。与癌旁组织相比,肿瘤组织中B细胞与浆细胞的比例均相对降低。对B细胞的再分群聚类分析共鉴定出7个功能特异的亚群,其中,应激适应性B细胞与组织驻留性B细胞在肿瘤组织中的占比显著高于癌旁组织。拟时序分析构建了从初始B细胞(轨迹起点)到组织驻留性B细胞(轨迹终点)的连续发育路径,而RNA速率分析进一步提示了细胞状态从初始B细胞向组织驻留性B细胞方向的动态转变。功能富集分析显示,在肿瘤组织的应激适应性B细胞中,

包括造血细胞谱系、NOD样受体信号通路以及抗原加工与提呈在内的多条信号通路与生物学过程被显著富集,提示肿瘤相关慢性炎症对造血过程的调控^[14],以及CRC可能通过NLRP3炎性小体促进肿瘤增殖和转移^[15]。而迁移性B细胞在TNM II期肿瘤中高表达CD69,并显著富集氧化磷酸化等能量代谢通路,此型细胞可能通过维持细胞活化状态,支持终末分化所需的持续信号^[16]。转录因子调控网络分析进一步揭示了各亚群的特异性调控机制:应激适应性B细胞与组织驻留性B细胞中特异性激活RUNX3和ARID3A因子,ARID3A可能通过激活MYC和抑制TP53通路,促进B细胞存活和增殖^[17]。

对浆细胞亚群的占比统计分析显示,与癌旁组织相比,肿瘤组织中IgG型浆细胞的比例显著增加(20.68% vs 5.44%, $P < 0.0001$),表明TME可能特异性促进IgG型浆细胞的富集或分化,IgG抗体可能通过激活补体或Fc受体信号,促进肿瘤血管生成或基质重塑^[18]。同时IgG型浆细胞可能分泌促炎因子或免疫抑制性抗体,间接支持肿瘤进展^[19]。而IgA-κ型(44.87% vs 58.75%, $P < 0.0001$)和IgA-λ型(26.83% vs 30.45%, $P < 0.005$)浆细胞的比例则相对降低,IgA-λ型浆细胞可能通过诱导髓系细胞分泌细胞因子,抑制效应T细胞功能^[20]。发育轨迹分析显示,各浆细胞亚群均处于相对成熟的分化阶段。同时, RNA速率分析形成的流线图显示不同浆细胞亚群区域内的向量箭头方向各异,表明这些亚群可能代表着平行的终末分化状态。转录因子分析显示,IgG型浆细胞亚群特异性高表达转录因子ZNF460和POU2F2,在TME中这两者可能协同调控浆细胞终末分化与功能适应^[21]。这些发现为理解B细胞谱系在CRC中的双重作用提供了新的分子视角。

相较于既往研究,本研究的创新点包括:(1)基于本单位的原始测序数据在单细胞层面系统描绘CRC中B细胞及浆细胞的完整分化轨迹,结合拟时序与RNA速率分析揭示了其持续激活特征;(2)鉴定了组织驻留性B细胞亚群的促瘤新机制,提出“应激适应性”作为免疫逃逸的潜在标志;(3)明确了浆细胞Ig型别转换的意义,为靶向B细胞谱系的治疗策略提供了参考依据。

然而,本研究存在一定局限性:首先,样本量($n = 36$)和单中心研究限制了亚群与临床分期的统计学关联深度;其次,基于转录组的功能预测需通过空间多组学(如CODEX)或类器官共培养进一步验证;此外,队列中MSI亚型患者数量较少,可能影响结论的普适性。



A: 拟时序分析按照肿瘤浸润性浆细胞注释展示的分化轨迹图, 图中每个黑点表示分化节点(点1表示为Y₋₁), 分化顺序按照数字顺序由1到318; **B:** 拟时序分析按照分化预测时间展示的分化轨迹图, 分化顺序由0(蓝色)到20(黄色); **C:** 速率分析按照浆细胞亚型分类的基因剪接与未剪接率的占比图; **D:** 速率分析按照浆细胞注释绘制的分化流线图, 箭头指向为模拟的分化方向; **E:** 将所有浆细胞进行TNM分组, 将分组结果展示在UMAP图上; **F:** 所有B细胞按照TNM分组后的细胞占比统计, 多组间Kruskal-Wallis分析, 任意两组间进行Wilcoxon分析; **G:** 浆细胞按照微卫星状态进行分组, 将分组结果展示在UMAP图上; **H:** 浆细胞按照微卫星状态分组后的细胞占比统计, 多组间Kruskal-Wallis分析, 任意两组间进行Wilcoxon分析。 **I:** 浆细胞亚型进行转录因子分析; **J:** 浆细胞亚型的调控模块特异性评分最高的前5个转录调控因子展示在图上。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ 。

图6 浆细胞亚群的发育动力学、临床关联及转录调控分析

未来将扩大样本规模并整合多瘤种数据,解析B细胞异质性在不同免疫表型CRC中的共性规律;同时开发靶向IgG⁺浆细胞或应激适应性B细胞的双特异性抗体,探索其与PD-1抑制剂联用的协同效应;结合代谢组与表观组学,揭示TME驱动B细胞功能极化的上游调控网络。本研究为CRC免疫治疗药物研发提供了新的思路,亦为基于B细胞分型的精准免疫分层提供了理论基础。

伦理声明:

所有参与者均根据赫尔辛基宣言提供了书面知情同意书,并获得了上海市第六人民医院伦理委员会的批准(伦理批准编号:2025-KY-010[K])。

数据声明:

本研究中分析的CRC单细胞数据集已上传至GEO数据库(GEO: GSE294300):<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE294300>。在当前研究期间使用和分析的数据集可应合理要求从通信作者处获得。

利益冲突声明:

本研究团队声明,在撰写和提交本文稿时,不存在任何可能影响稿件公正性或客观性的利益冲突。

[参考文献]

- [1] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- [2] LIU Y D, ZHANG Q M, XING B C, et al. Immune phenotypic linkage between colorectal cancer and liver metastasis[J]. Cancer Cell, 2022, 40(4): 424-437.e5. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.02.013.
- [3] CHEN Y Q, WANG D F, LI Y J, et al. Spatiotemporal single-cell analysis Decodes cellular dynamics underlying different responses to immunotherapy in colorectal cancer[J]. Cancer Cell, 2024, 42(7): 1268-1285.e7. DOI: 10.1016/j.ccr.2024.06.009.
- [4] DOWNS-CANNER S M, MEIER J, VINCENT B G, et al. B cell function in the tumor microenvironment[J]. Annu Rev Immunol, 2022, 40: 169-193. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101220-015603.
- [5] LI K, ZHANG C H, ZHOU R X, et al. Single cell analysis unveils B cell-dominated immune subtypes in HNSCC for enhanced prognostic and therapeutic stratification[J/OL]. Int J Oral Sci, 2024, 16(1): 29[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38622125/>. DOI: 10.1038/s41368-024-00292-1.
- [6] SPENCER J, BEMARK M. Human intestinal B cells in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(4): 254-265. DOI: 10.1038/s41575-023-00755-6.
- [7] PLAYOUST E, REMARK R, VIVIER E, et al. Germinal center-dependent and-independent immune responses of tumor-infiltrating B cells in human cancers[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(9): 1040-1050. DOI: 10.1038/s41423-023-01060-7.
- [8] SORRENTINO C, D'ANTONIO L, FIENI C, et al. Colorectal cancer-associated immune exhaustion involves T and B lymphocytes and conventional NK cells and correlates with a shorter overall survival [J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 778329[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34975867/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.778329.
- [9] JOURDAN M, ROBERT N, CREM M, et al. Characterization of human FCRL4-positive B cells[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179793[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28636654/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0179793.
- [10] GOLAY J, ANDREA A E, CATTANEO I. Role of fc core fucosylation in the effector function of IgG1 antibodies[J/OL]. Front Immunol, 2022, 13: 929895[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35844552/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.929895.
- [11] JIN Y B, HE Y D, LIU B, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the dynamics and heterogeneity of lymph node immune cells during acute and chronic viral infections[J/OL]. Front Immunol, 2024, 15: 1341985[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38352870/>. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1341985.
- [12] VERHOEVEN D, GRINWIS L, MARSHMAN C, et al. B-cell targeting with anti-CD38 daratumumab: implications for differentiation and memory responses[J/OL]. Life Sci Alliance, 2023, 6(9): e202302214[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37419630/>. DOI: 10.26508/lsci.202302214.
- [13] RAJE N S, FABER E A Jr, RICHARDSON P G, et al. Phase 1 study of tabalumab, a human anti-B-cell activating factor antibody, and bortezomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(23): 5688-5695. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-16-0201.
- [14] HUANG S X, ZHANG B Y, FAN W Y, et al. Identification of prognostic genes in the acute myeloid leukemia microenvironment[J]. Aging, 2019, 11(22): 10557-10580. DOI: 10.18632/aging.102477.
- [15] ZENG F, ZHANG Y, LUO T, et al. Daidzein inhibits non-small cell lung cancer growth by pyroptosis[J]. Curr Pharm Des, 2025, 31(11): 884-924. DOI: 10.2174/0113816128330530240918073721.
- [16] JIN J, LIN L, MENG J, et al. High-multiplex single-cell imaging analysis reveals tumor immune contexture associated with clinical outcomes after CAR T cell therapy[J]. Mol Ther, 2024, 32(5): 1252-1265. DOI: 10.1016/j.mt.2024.03.023.
- [17] ANDREWS J M, PYFROM S C, SCHMIDT J A, et al. Loss of synergistic transcriptional feedback loops drives diverse B-cell cancers [J/OL]. EBioMedicine, 2021, 71: 103559[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34461601/>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103559.
- [18] CURCIO C, MUCCIOLO G, ROUX C, et al. PI3K γ inhibition combined with DNA vaccination unleashes a B-cell-dependent antitumor immunity that hampers pancreatic cancer[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 157[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38824552/>. DOI: 10.1186/s13046-024-03080-1.
- [19] GAO J C, GU D L, YANG K L, et al. Infiltrating plasma cells maintain glioblastoma stem cells through IgG-Tumor binding[J]. Cancer Cell, 2025, 43(1): 122-143.e8. DOI: 10.1016/j.ccr.2024.12.006.
- [20] KIM C, BREALEY J, JOBERT A, et al. A case of monoclonal gammopathy of renal significance presenting as atypical amyloidosis with IgA lambda paraproteinemia[J]. J Pathol Transl Med, 2020, 54(6): 504-507. DOI: 10.4132/jptm.2020.09.18.
- [21] SHI H C, WANG W Q, LUO J, et al. POU2F2 $^{+}$ B cells enhance antitumor immunity and predict better survival in non small cell lung cancer[J/OL]. Sci Rep, 2025, 15(1): 6549[2025-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39994401/>. DOI: 10.1038/s41598-025-90817-3.

[收稿日期] 2025-02-08

[修回日期] 2025-08-06

[本文编辑] 邢一凡, 黄静怡