



基于空间多组学解析NOTCH3介导的肝窦毛细血管-肿瘤基质相关成纤维细胞互作驱动肝细胞癌免疫逃逸的机制研究

季凡森^{1,2}, 李昊辰³, 王琪¹, 王小娟¹, 张家玮⁴, 肖颖⁵, 李欢⁵, 刘浩⁵, 龙潭清⁶, 吴博阳¹, 陈昊¹, 夏浩明¹, 刘芯权^{7,8}, 徐传瑞⁶, 高亦博^{7,8}, 唐炳钧¹, 柳娟¹, 杨世忠¹, 董家鸿¹

¹北京清华长庚医院肝胆胰中心, 数智肝胆病学教育部重点实验室, 清华大学临床医学院, 北京 102218, 中国

²清华-北大生命科学联合中心, 北京 100084, 中国

³清华大学医学院, 北京 100084, 中国

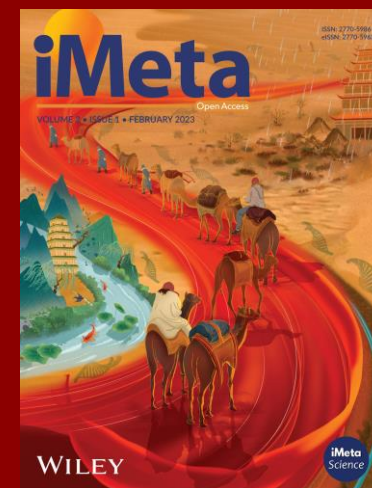
⁴首都医科大学附属北京积水潭医院健康管理中心, 北京 100035, 中国

⁵北京清华长庚医院病理科, 清华大学临床医学院, 北京 102218, 中国

⁶华中科技大学同济医学院药学院, 武汉 430030, 中国

⁷中国医学科学院肿瘤医院胸外科, 国家癌症中心, 北京协和医学院, 北京 100021, 中国

⁸深圳市肿瘤表观遗传和精准诊疗重点实验室, 中国医学科学院肿瘤医院深圳医院中心实验室, 国家癌症中心, 国家肿瘤临床医学研究中心, 中国医学科学院肿瘤医院深圳医院, 中国医学科学院北京协和医学院, 深圳 518116, 中国

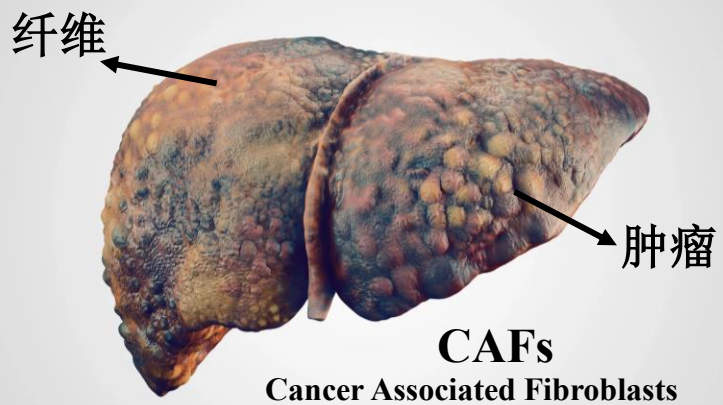
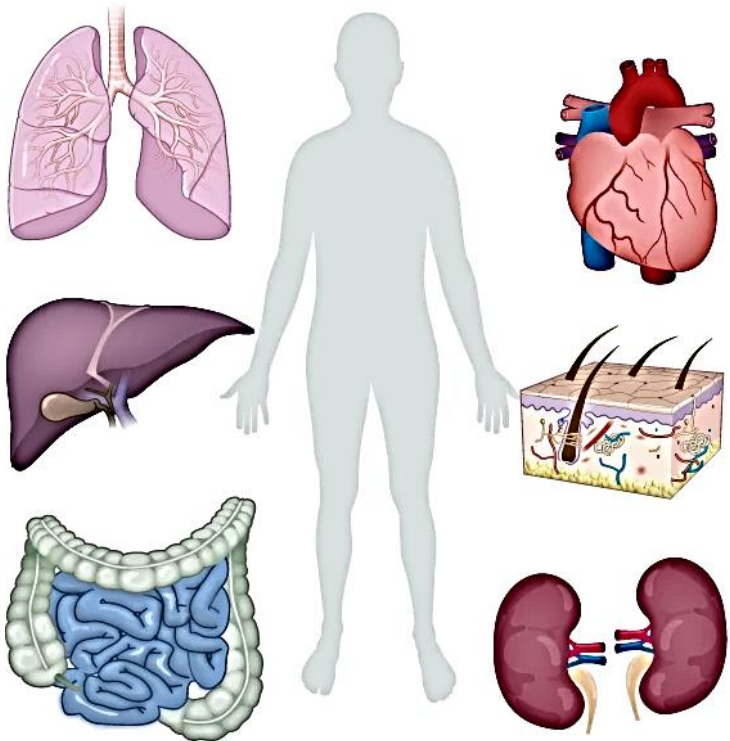


Fansen Ji, Haochen Li, Qi Wang, Xiaojuan Wang, Jiawei Zhang, Ying Xiao, Huan Li, et al. 2026. Spatial Multi-Omics Identifies a NOTCH3-Mediated Capillary–mCAF Crosstalk Driving Immune Exclusion in Hepatocellular Carcinoma. *iMeta* 5: e70117.

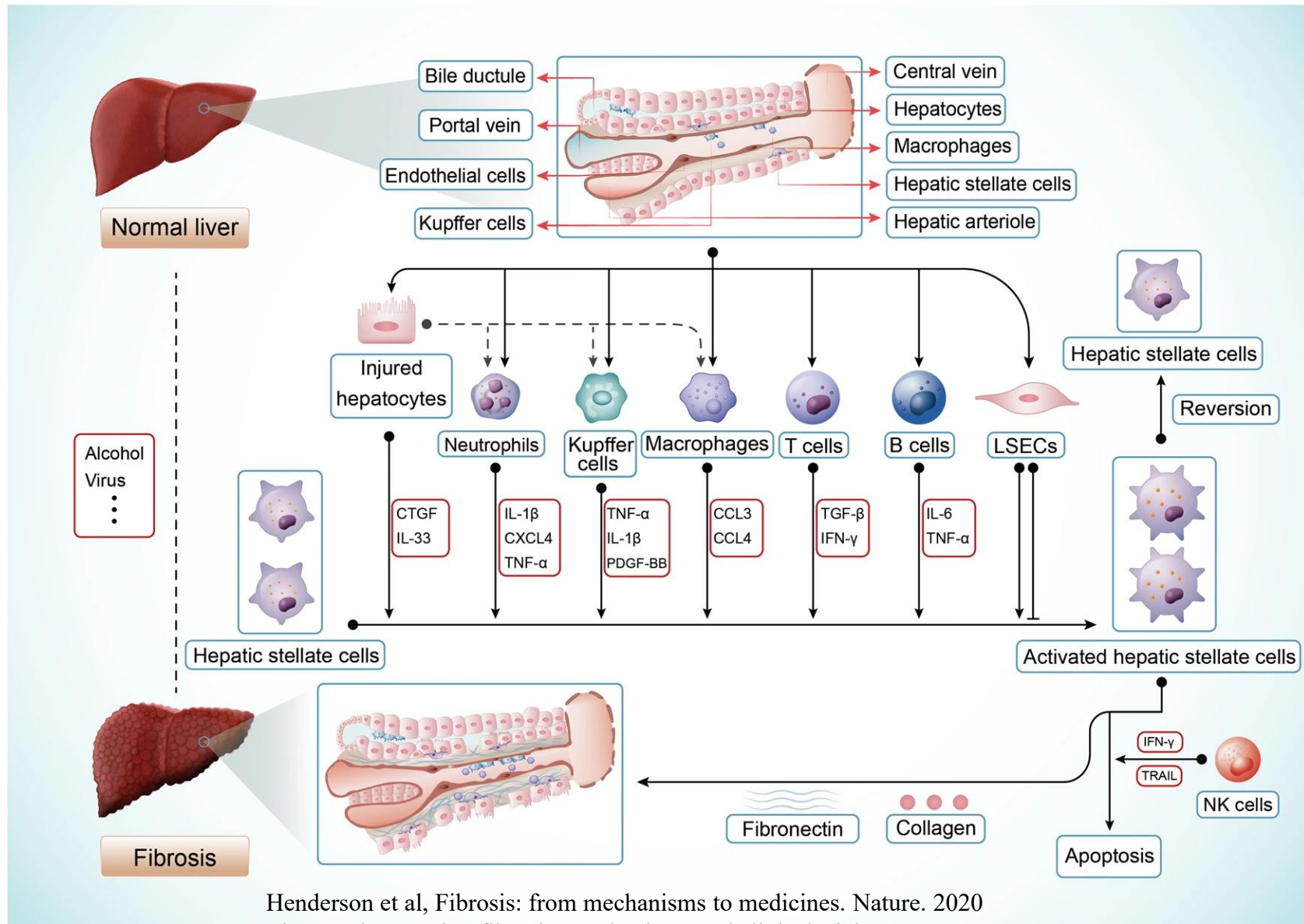
<https://doi.org/10.1002/imt2.70117>

背景: 纤维化普遍存在于多种组织器官并驱动疾病进展

容易发生纤维化的几类器官




肝脏纤维化的主要机制



Henderson et al, Fibrosis: from mechanisms to medicines. Nature. 2020
 Zhao et al, Targeting fibrosis: mechanisms and clinical trials. STTT. 2022.

背景:肿瘤相关成纤维细胞具有功能和分布上的异质性

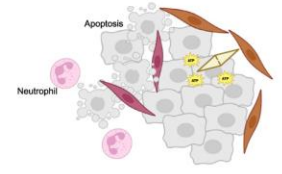
Matrix CAFs - mCAFs



MMP11, POSTN, *CTHRC1*, LRRC15, FAP

COL11A1, PDPN, *MMP14*, COL1A1, VIM, SMA/ACTA2, S100A4, *Dcn*, *Lum/LUM*, *Vcan*, *Col14a1*, *Fbln1*, *Fbln2*, *Smoc*, *Lox*, *Lox11*, *Cxcl14*, COL6A3, FN1, COL3A1, SPON2, COL5A1, PDGFRA, INHBA

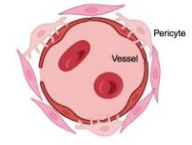
Tumor-like CAFs - tCAFs



CD73/*NT5E*, CD10/*MME*, FAP

PDPN, *NDRG1*, *GPR77*, *Slc2a1*, TSPAN8


Vessel-associated CAFs - vCAFs



CD146/*MCAM*, SMA/ACTA2, NOTCH3, COL18A1

NOTCH3, COL18A1, *Nr2f2*, VEGF

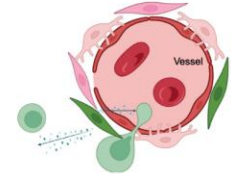
Dividing CAFs - dCAF



Cell division, Ki-67/*MKI67*

TUBA1B

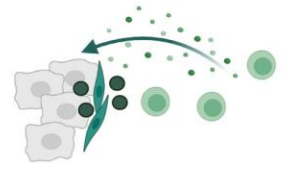
Inflammatory CAFs - iCAFs



IL6, IL1, CD34, PLA2G2A, DPP4, CFD, C3, Pi16

Il6, *Il1*, *CXCL12*, *CXCL14*, SMA/ACTA2, *CXCL1*, HGF, *CXCL2*, PDGFRA, FAP, VIM, IGF1, *CXCL13*, *ALDH1A1*, CCL19, CCL21, IL8, CCL2, C4b, PTGSDS, S100A4, DES

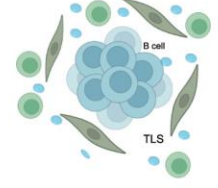
Interferon response CAFs - ifnCAFs



CXCL9, *CXCL10*, *CXCL11*, IDO/*IDO1*

SLC14A1, *NRG1*, *BMP5*, *STC1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *IL32*

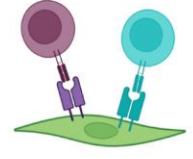
Reticular-like CAFs - rCAFs



CCL19, CCL21

CFD, *CXCL14*, *MMP14*, *ADH1B*, *CXCL12*, IL6, NOTCH3, PDGFA, VCAM1, *CXCL13*, CCL5

Antigen-presenting CAFs - apCAFs

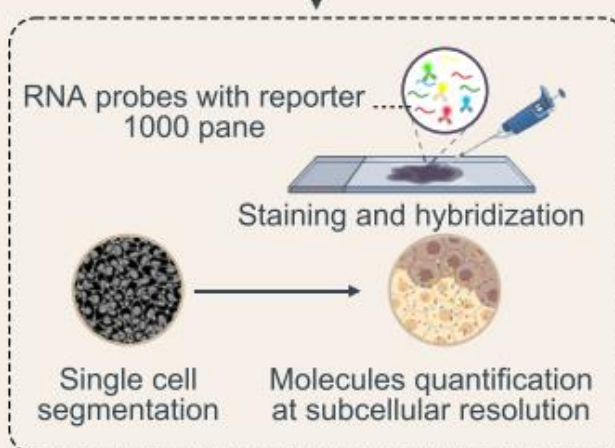
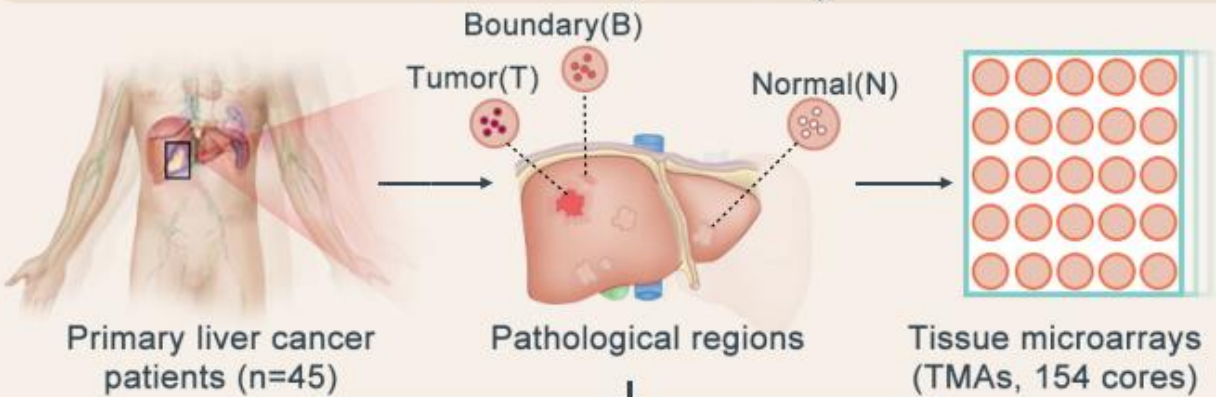


HLA-DR, HLA-DQ, CD74

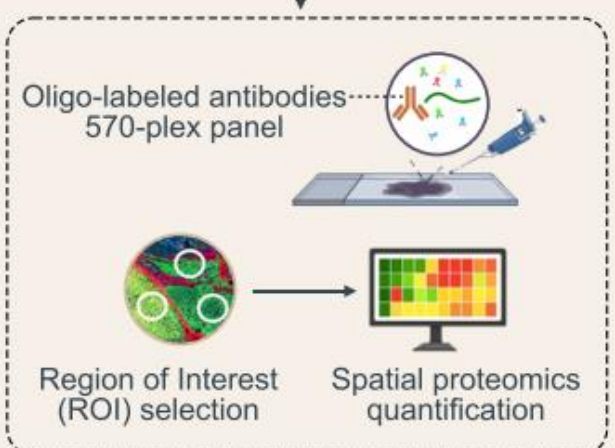
IGFBP3, *CXCL12*, *RBP1*, HLA-DPB1, *COLEC11*, *TMEM56*, CCL2

本研究亮点

Spatial profiling

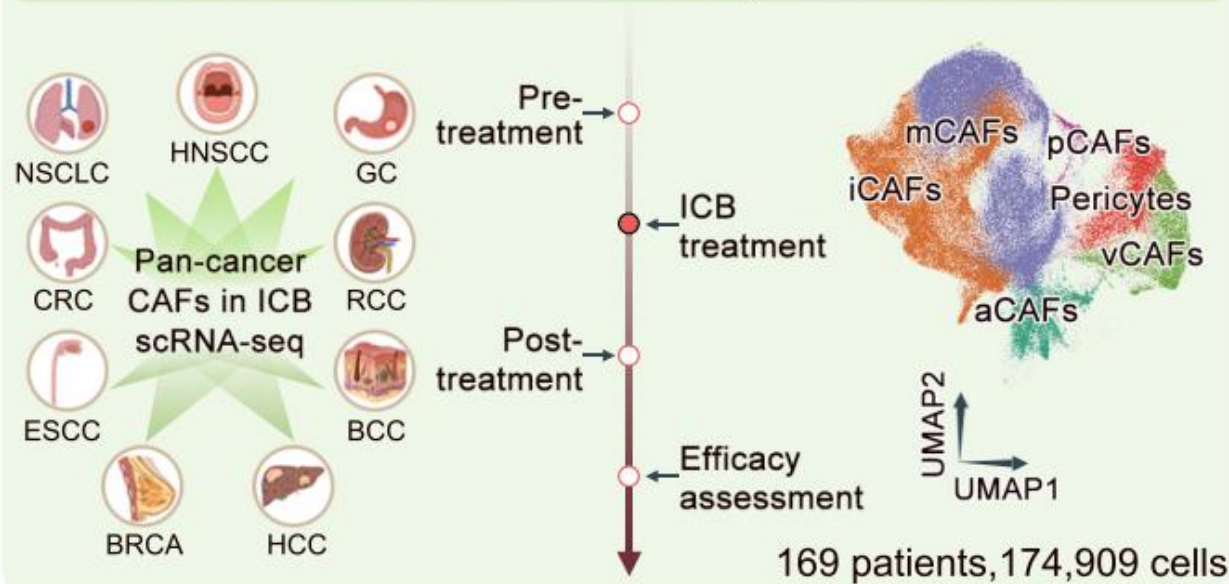


Spatial transcriptomics
(CosMx1000:70 cores, 371,250 cells
CosMx6000:34 cores, 217,120 cells)

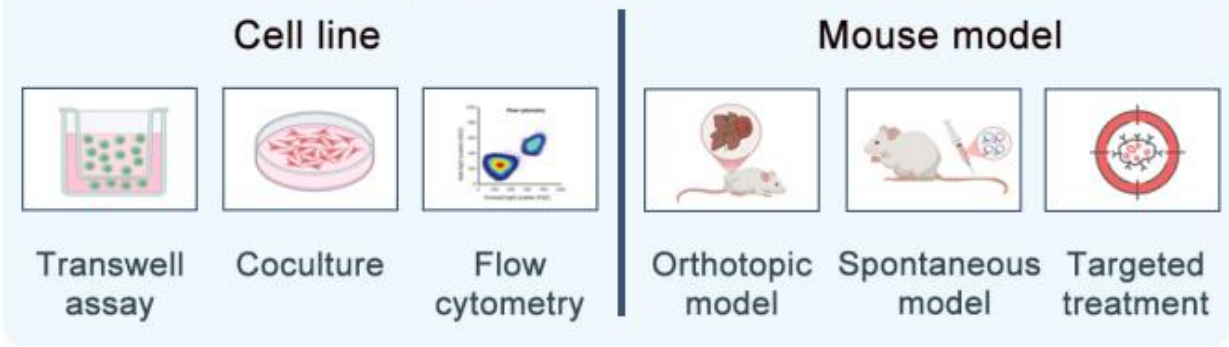


GeoMx 570 spatial proteomics
(50 cores)

Pan-cancer ICB efficacy association

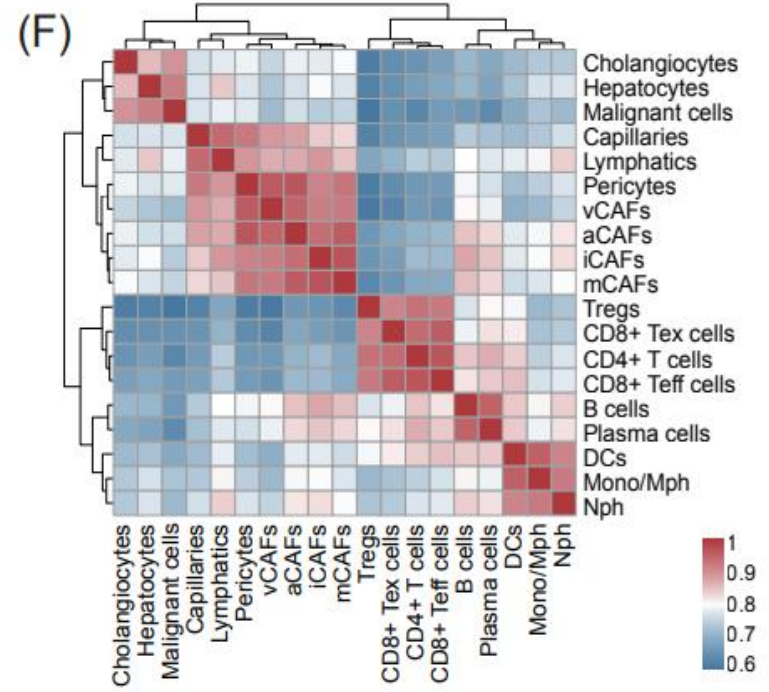
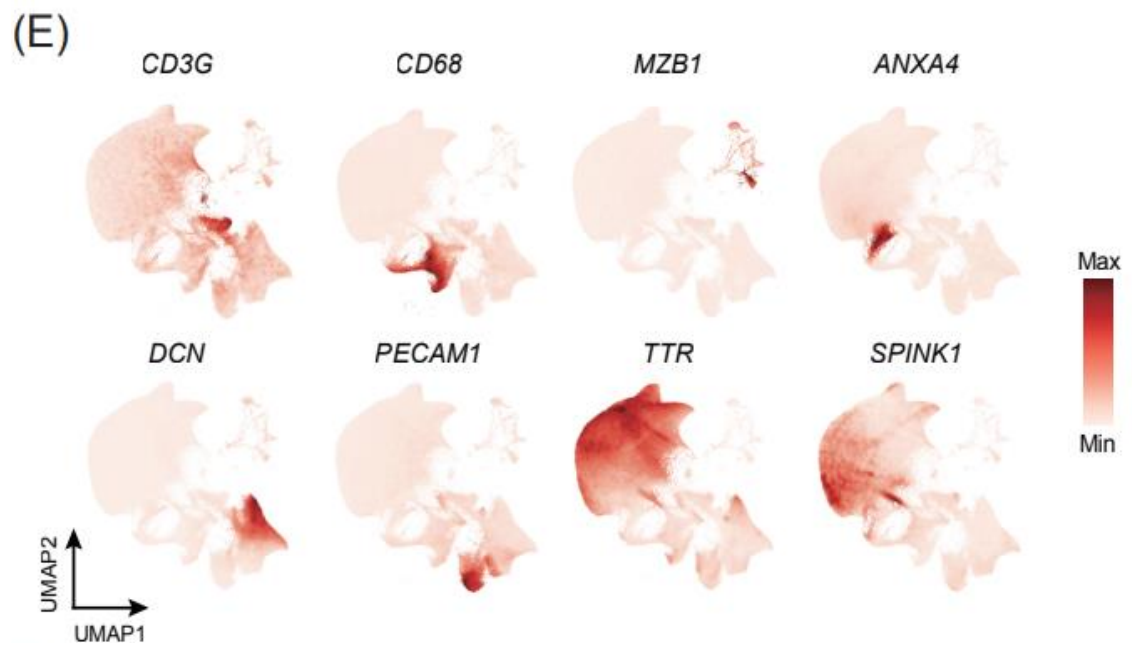
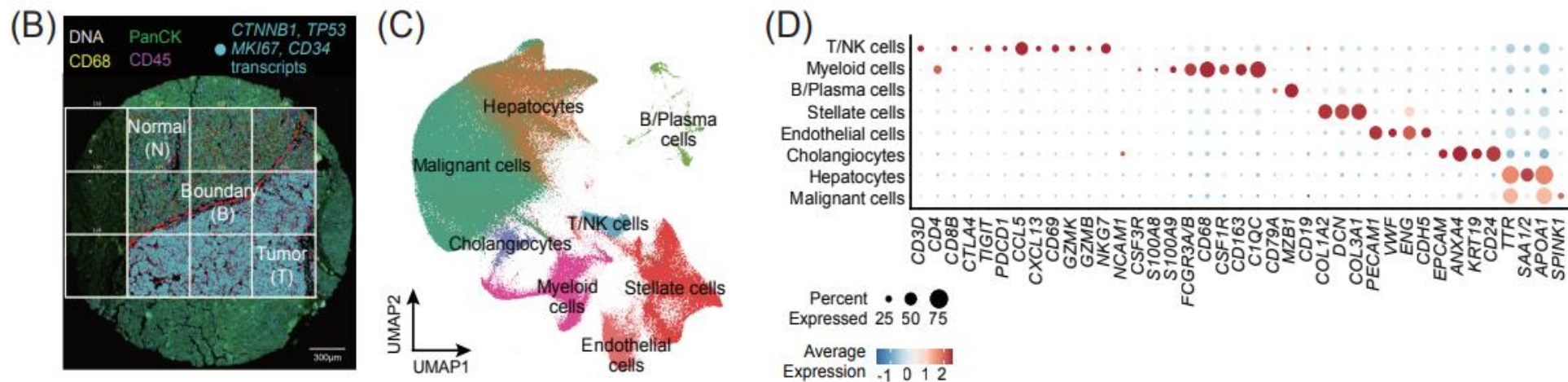


Experiment validation



- 构建肝细胞癌空间高分辨率多组学图谱，揭示DLL4-NOTCH3驱动的capillary-mCAF轴塑造纤维化、免疫排斥型肿瘤的关键机制。
- 整合泛癌种免疫治疗单细胞转录组数据与空间转录组数据，发现mCAF胶原极化是驱动免疫检查点阻断治疗耐药形成的关键因素。
- 靶向NOTCH3可有效缓解肿瘤纤维化，增强T细胞浸润，并与抗PD-1治疗产生协同效应，提出具有临床转化潜力的肝癌治疗新策略。

单细胞空间转录组解析涵盖肿瘤、交界和癌旁区肝癌的空间全貌



(B) 组织芯片 (TMA) 芯点的代表性免疫荧光图像: 展示肿瘤区 (T)、边界区 (B) 与正常区 (N), 并将CTNNB1、MKI67、TP53 与CD34的所有转录本叠加到各视野 (FOV) 中, 同时勾勒出侵袭性边界区域。

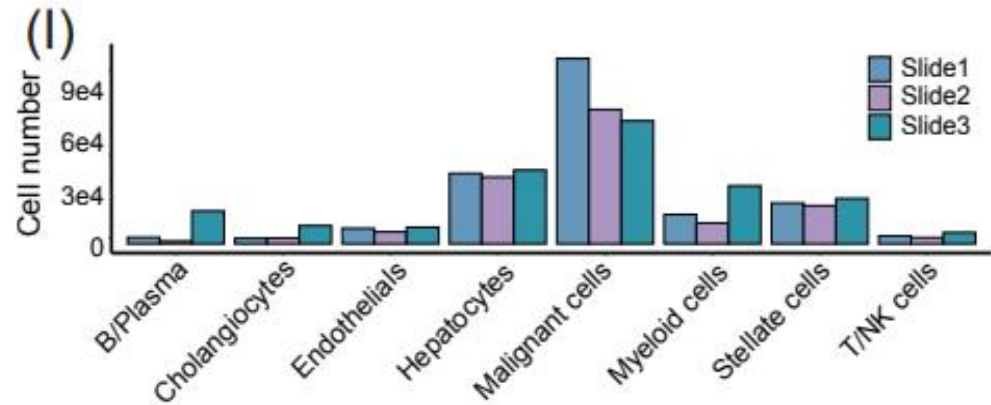
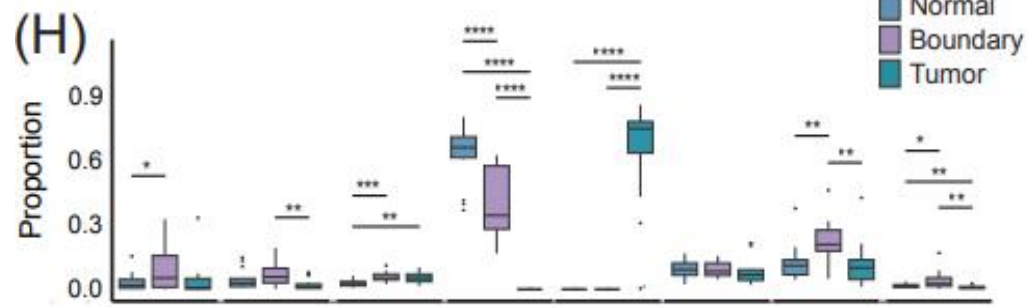
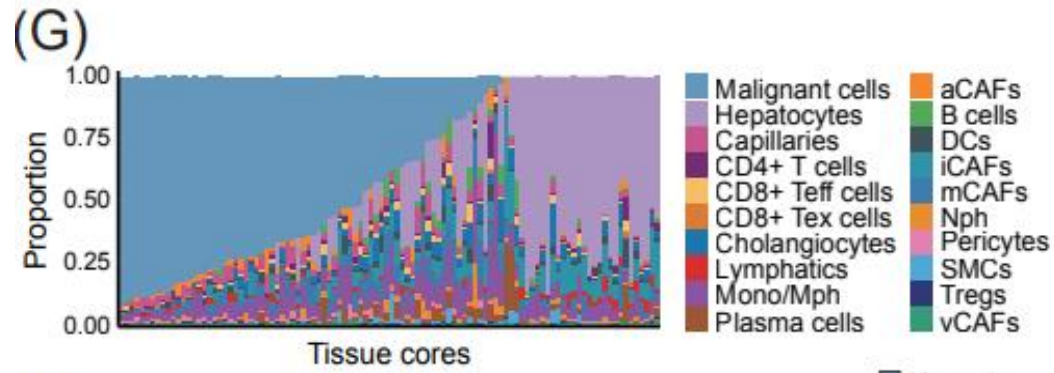
(C) CosMx1000数据中全部细胞的UMAP可视化, 按注释的细胞谱系着色, 包括恶性细胞、肝细胞、胆管细胞、髓系细胞、星状细胞、内皮细胞以及B细胞/浆细胞。

(D) 点图展示主要谱系中经典标记基因的表达。

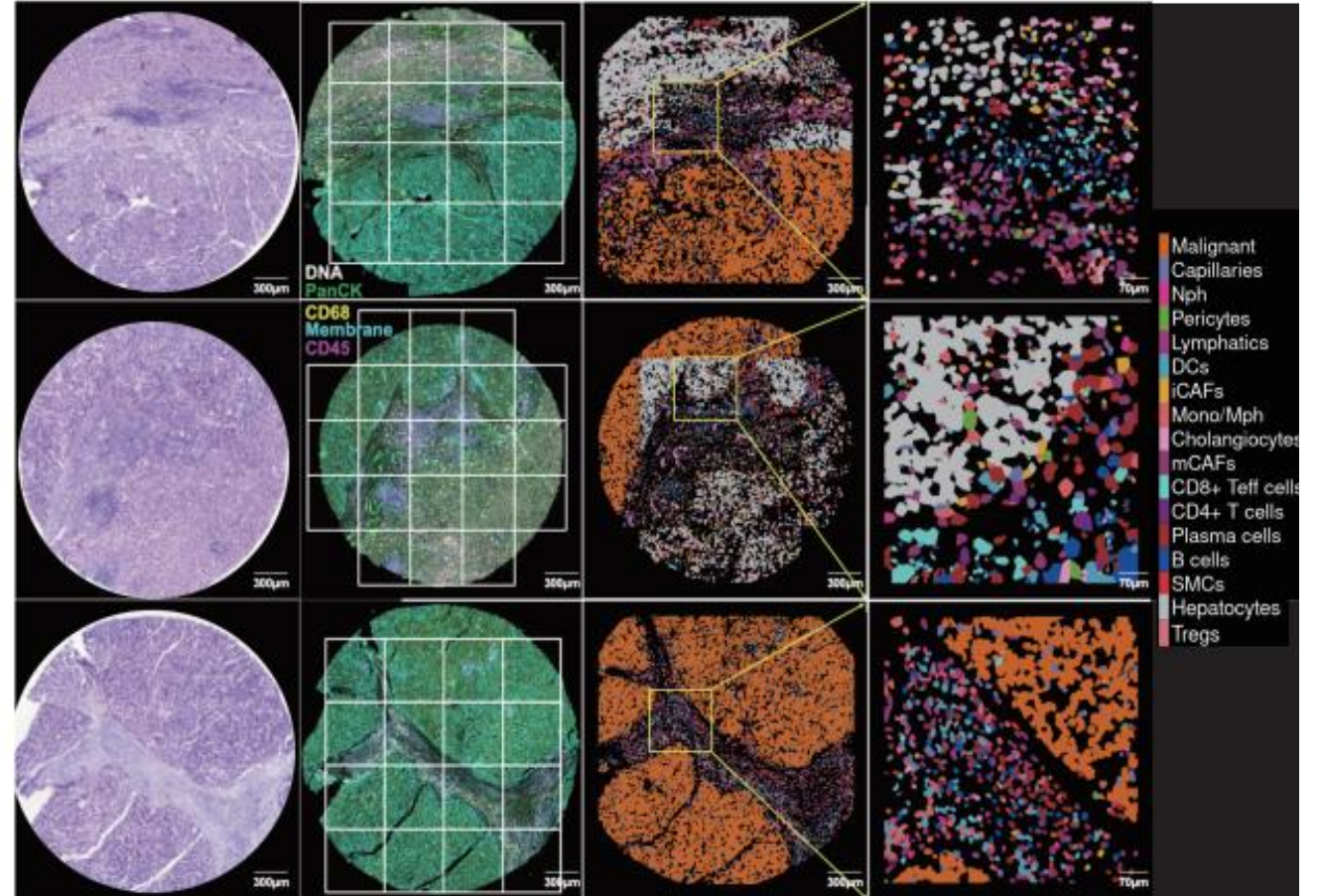
(E) CosMx1000队列中主要细胞类型的经典标记基因表达谱。

(F) CosMx1000队列中不同细胞类型间的基因表达相关性矩阵。

CosMx SMI空间组学技术实现HE、IF和空间转录组的精准匹配

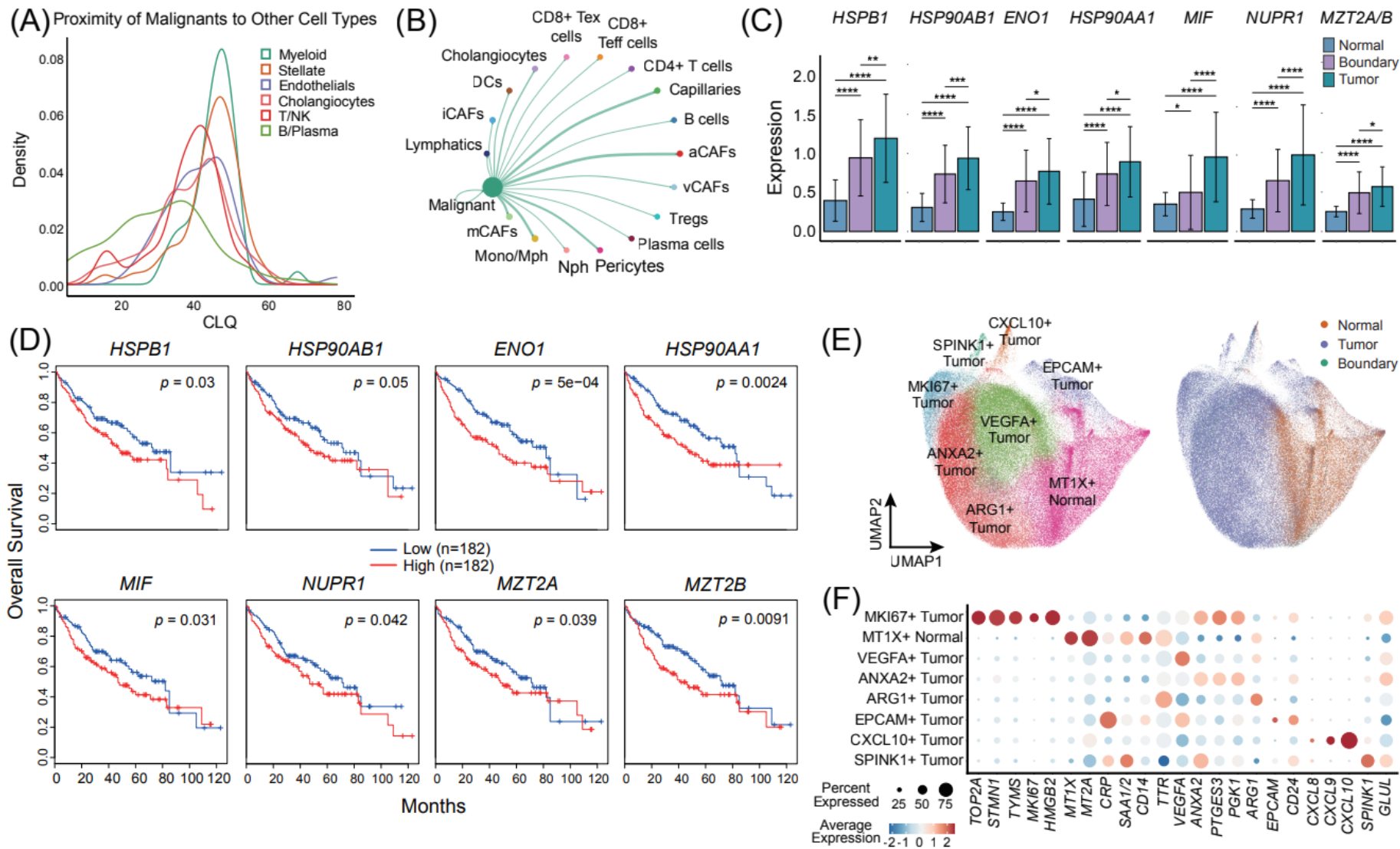


(J)



(G) 各组织芯点中主要细胞类型的相对比例。(H) 肿瘤区、边界区与正常区之间细胞类型比例的比较。x轴表示各谱系，与(I)中x轴一致。(I) 不同空间转录组检测切片之间的细胞类型组成比较(切片1、2: CosMx1000; 切片3: CosMx6000)。(J) 选定组织芯点的代表性空间分布图: 将细胞类型空间图与H&E及免疫荧光(IF)染色叠加, 展示肿瘤微环境的空间组织结构。

空间组学数据显示肿瘤细胞具有空间表达的异质性



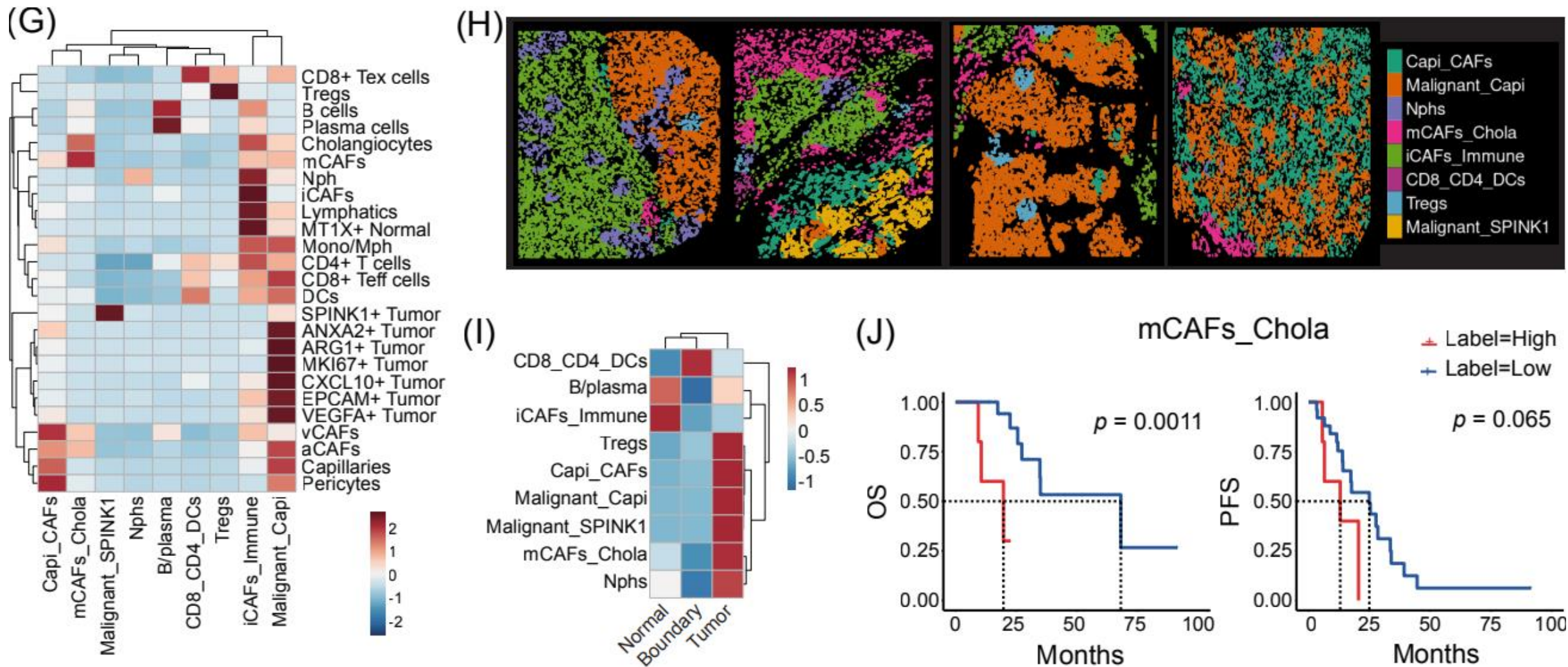
(A) 共定位熵 (Colocalization Quotient, CLQ) 的密度分布, 用于刻画恶性细胞与其他谱系细胞的空间邻近性。CLQ衡量观测到的空间共定位与期望共定位之比 (方法学部分), 峰值向右偏移表示强共定位事件的频率更高。(B) CosMx1000数据集中恶性细胞与其他细胞类型的细胞—细胞通讯网络分析。分析纳入空间约束: 依据可扩散分子与接触依赖信号的预设作用距离范围, 将推断的相互作用限定在生物学可行距离内。连线粗细表示相互作用强度 (通讯概率), 基于配体—受体对的表达水平计算。

(C) 关键致癌基因与应激反应基因 (*HSPB1*、*HSP90AB1*、*HSP90AA1*、*ENO1*、*MIF*、*NUPR1*、*MZT2A/B*)

在正常区、边界区与肿瘤区的表达水平。(D) 关键致癌及应激反应基因高表达 (红线) 与低表达 (蓝线) 患者的Kaplan–Meier生存曲线。(E) 所有肝细胞亚型 (包括恶性与正常肝细胞, 左) 及其对应的正常区、边界区与肿瘤区分布 (右) 的UMAP可视化。(F) 点图展示肝细胞亚型的经典标记基因表达。



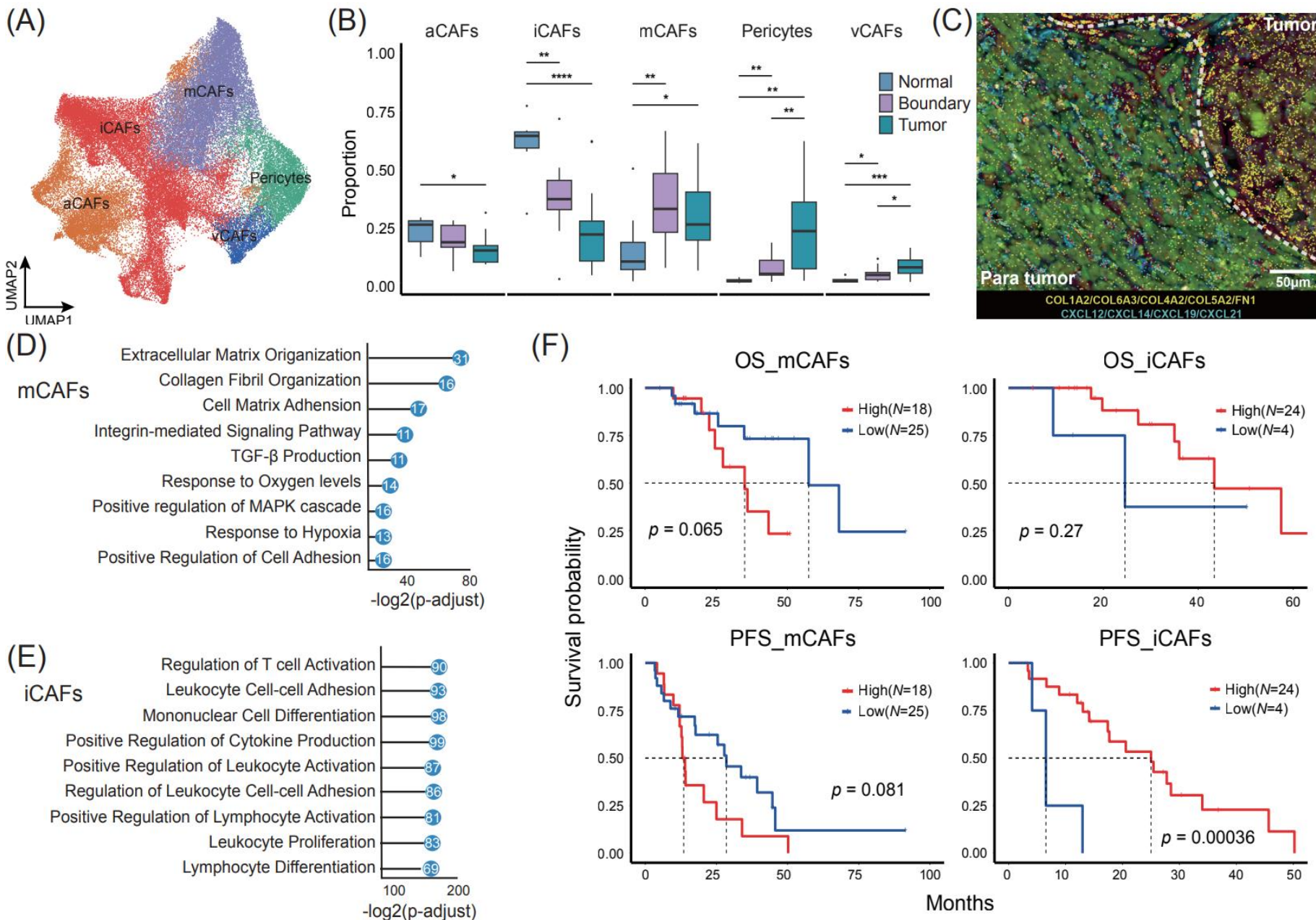
空间邻域分析表明mCAF相关邻域和患者预后显著负相关



(G) 热图展示各识别空间生态位 (spatial niche) 中不同细胞类型组成的标准化富集程度。(H) 识别出的空间生态位的代表性空间图示。(I) 热图展示不同组织区域 (正常区、边界区、肿瘤区) 内空间生态位组成的标准化富集程度。(J) mCAFs_Chola生态位高丰度与低丰度患者的Kaplan-Meier生存曲线, 显示其与较差总生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS) 显著相关。



肿瘤微环境中成纤维细胞具有显著的功能和空间异质性

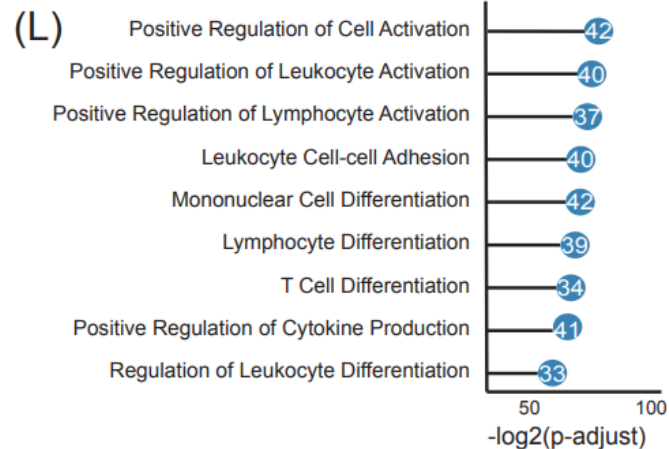
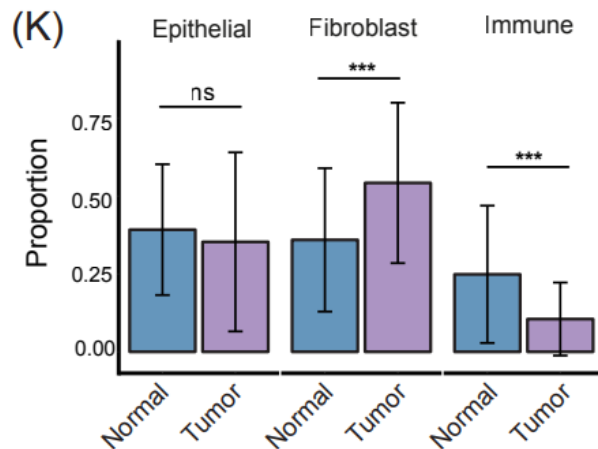
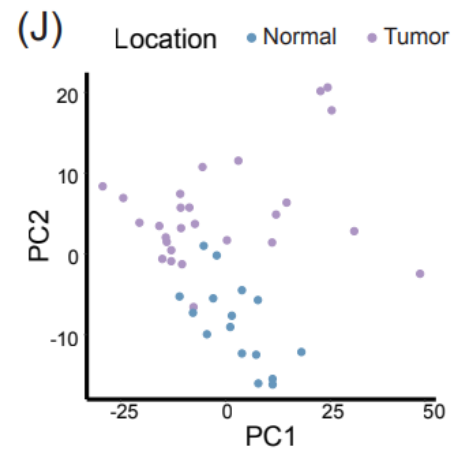
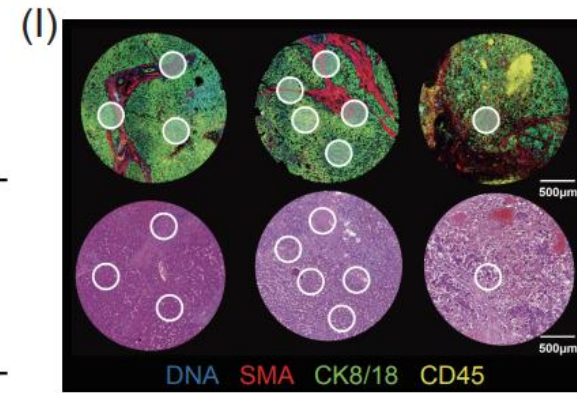
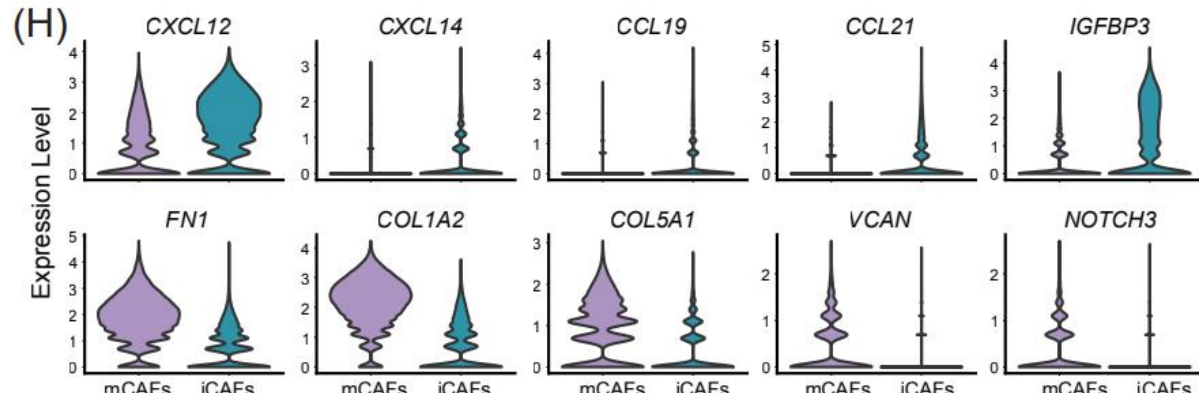
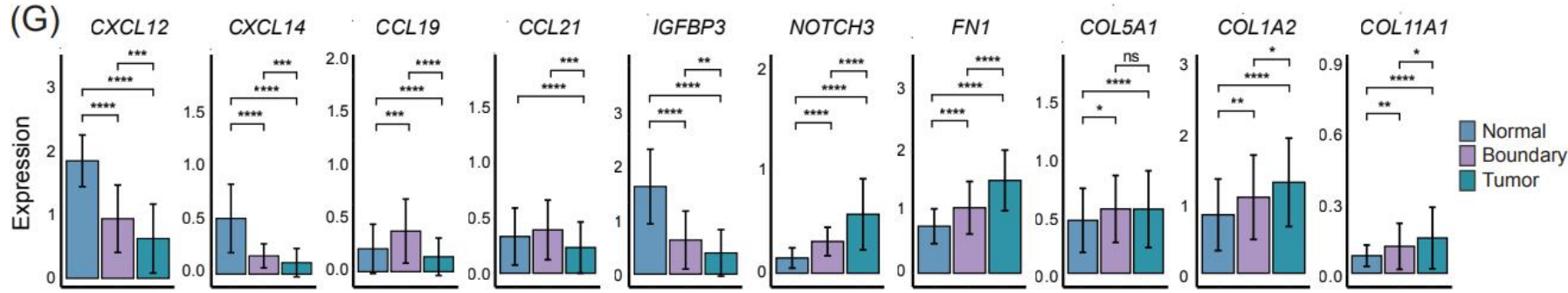


(A) 在空间数据中鉴定5类CAF相关亚群:

mCAFs、iCAFs、抗原呈递CAF (aCAFs)、血管相关CAF (vCAFs) 及周细胞 (pericytes)。(B) 不同CAF亚型在正常区、边界区与肿瘤区的比例分布。(C) 将mCAF与iCAF标记在正常区、边界区与肿瘤区的空间分布叠加于IF图像: mCAF相关标记基因以黄色标注, iCAF相关标记基因以青色标注, 侵袭性边界以白色描边。(D) mCAFs的Gene Ontology (GO) 功能富集分析, 突出其相关通路。(E) iCAFs的GO功能富集分析, 突出其相关通路。(F) Kaplan-Meier生存曲线显示mCAF与iCAF比例的预后意义: mCAF高浸润与更差的OS与PFS相关。



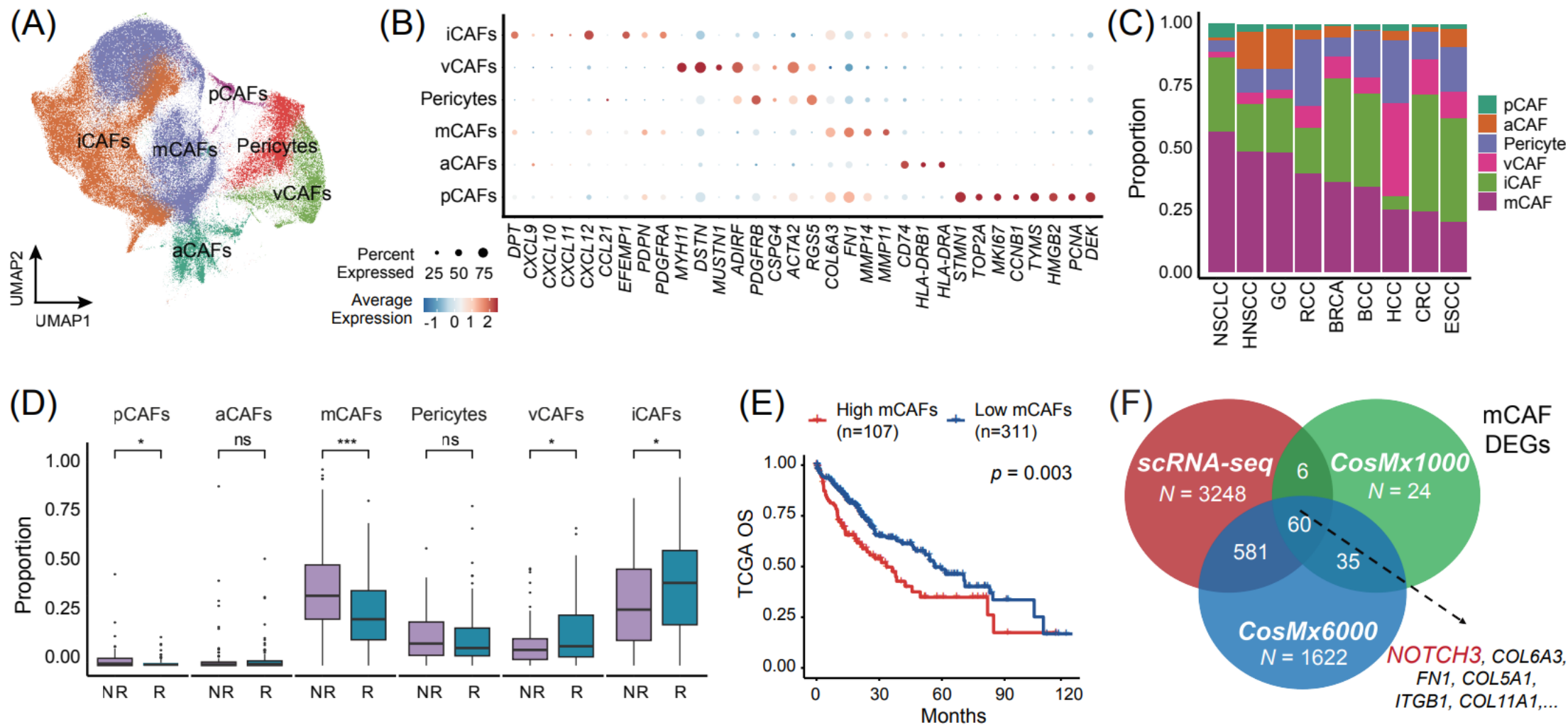
炎症纤维iCAF与基质生成纤维mCAF对患者预后有指示作用



(G) iCAF 相关基因 (CXCL12、CXCL14、CCL19、CCL21) 与 mCAF 相关基因 (FN1、COL1A2、COL11A1、COL5A1、NOTCH3) 在 CAF 中跨正常区、边界区与肿瘤区的表达。(H) 小提琴图比较 iCAFs 与 mCAFs 之间标记基因表达差异。(I) 配对的 IF 与 H&E 图像展示在 HCC 患者 FFPE 样本上进行 GeoMx 肿瘤免疫蛋白面板的空间蛋白组检测。共选择 95 个感兴趣区域 (ROI)，覆盖肿瘤、边界与正常组织。

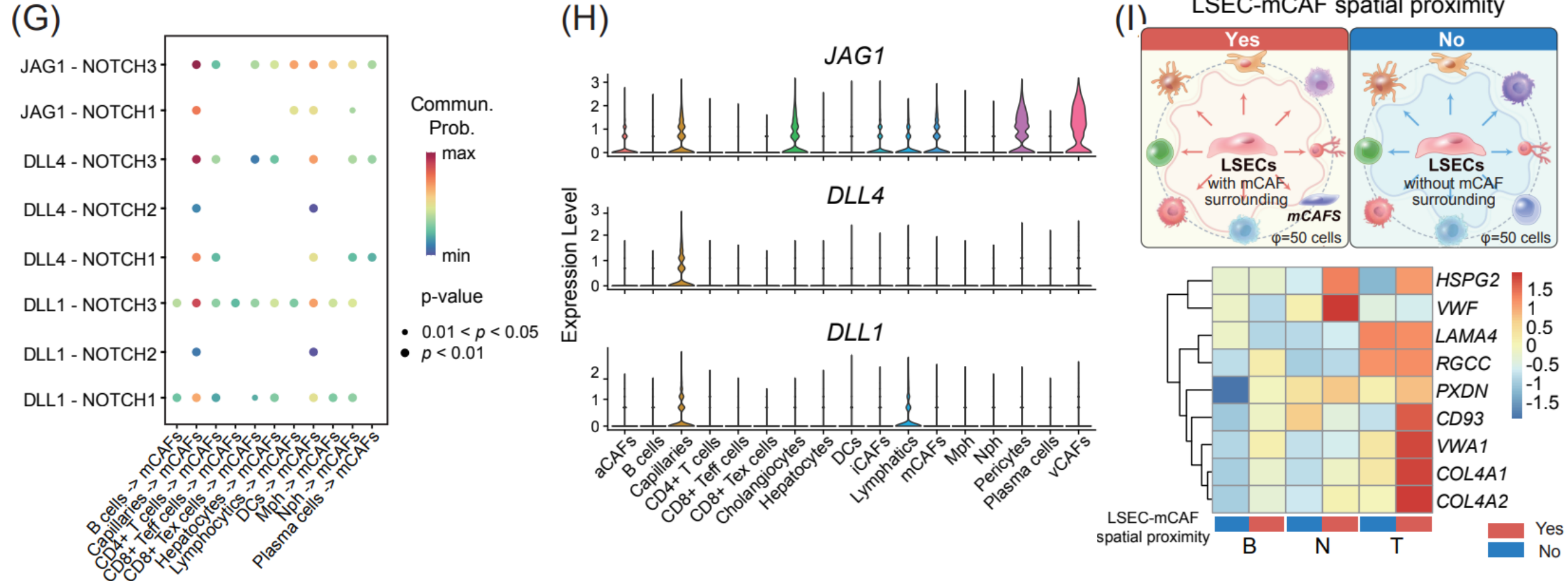
(J) 主成分分析 (PCA) 显示肿瘤区与正常区的蛋白组谱明显分离。(K) 肿瘤区与正常区中上皮、成纤维与免疫细胞区室的定量细胞比例。(L) GeoMx 空间蛋白组数据中，正常区 ROI 差异蛋白的 GO 富集分析。

CAF的胶原极化与患者免疫治疗的应答状态相关



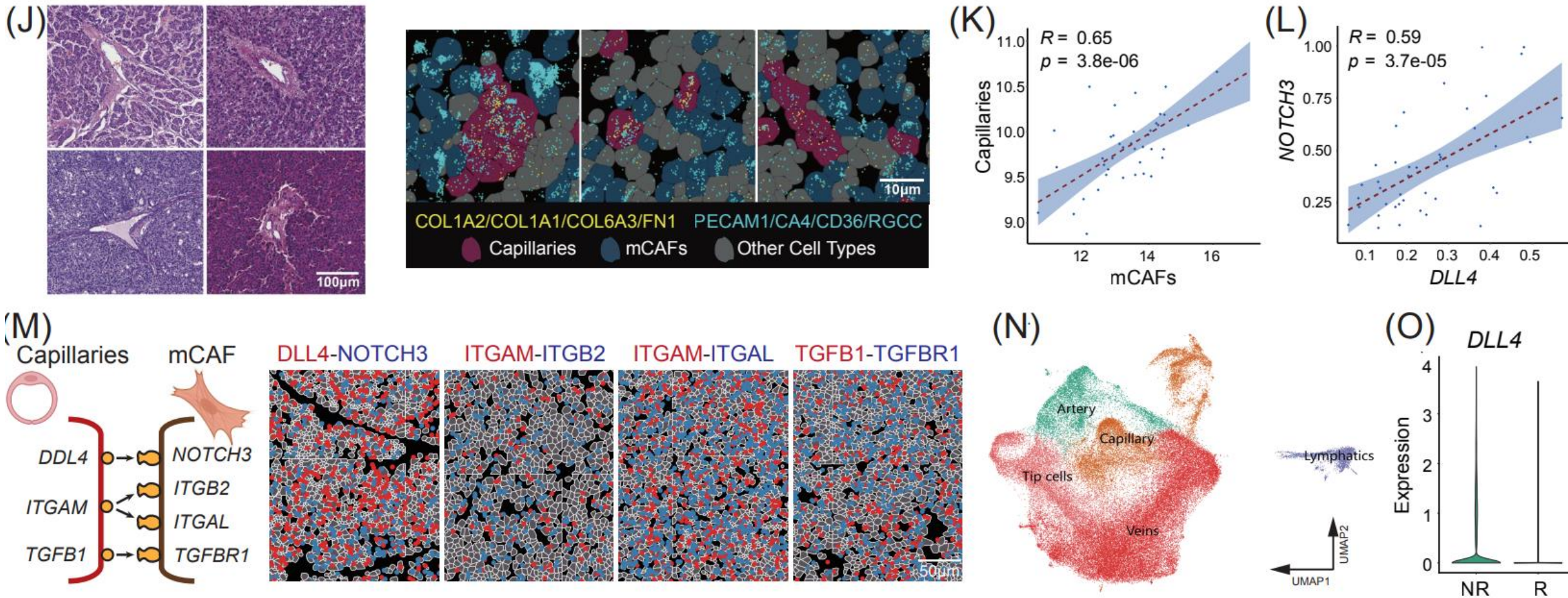
(A) ICB治疗背景下泛癌scRNA-seq数据中不同CAF亚型聚类的UMAP图。(B) 点图展示各CAF亚型选择性标记基因的平均表达水平。(C) 堆叠柱状图展示不同癌种中CAF亚型的分布。(D) 箱线图比较ICB治疗非应答者(NR)与应答者(R)中各CAF亚型比例差异。(E) TCGA-LIHC数据中mCAF比例与OS的Kaplan-Meier生存关联分析。(F) Venn图展示来自scRNA-seq与两套空间转录组数据(CosMx1000与CosMx6000)的mCAF差异表达基因(DEGs)交集。

Capillary-mCAF通过DLL4-NOTCH3配受体进行互作串扰



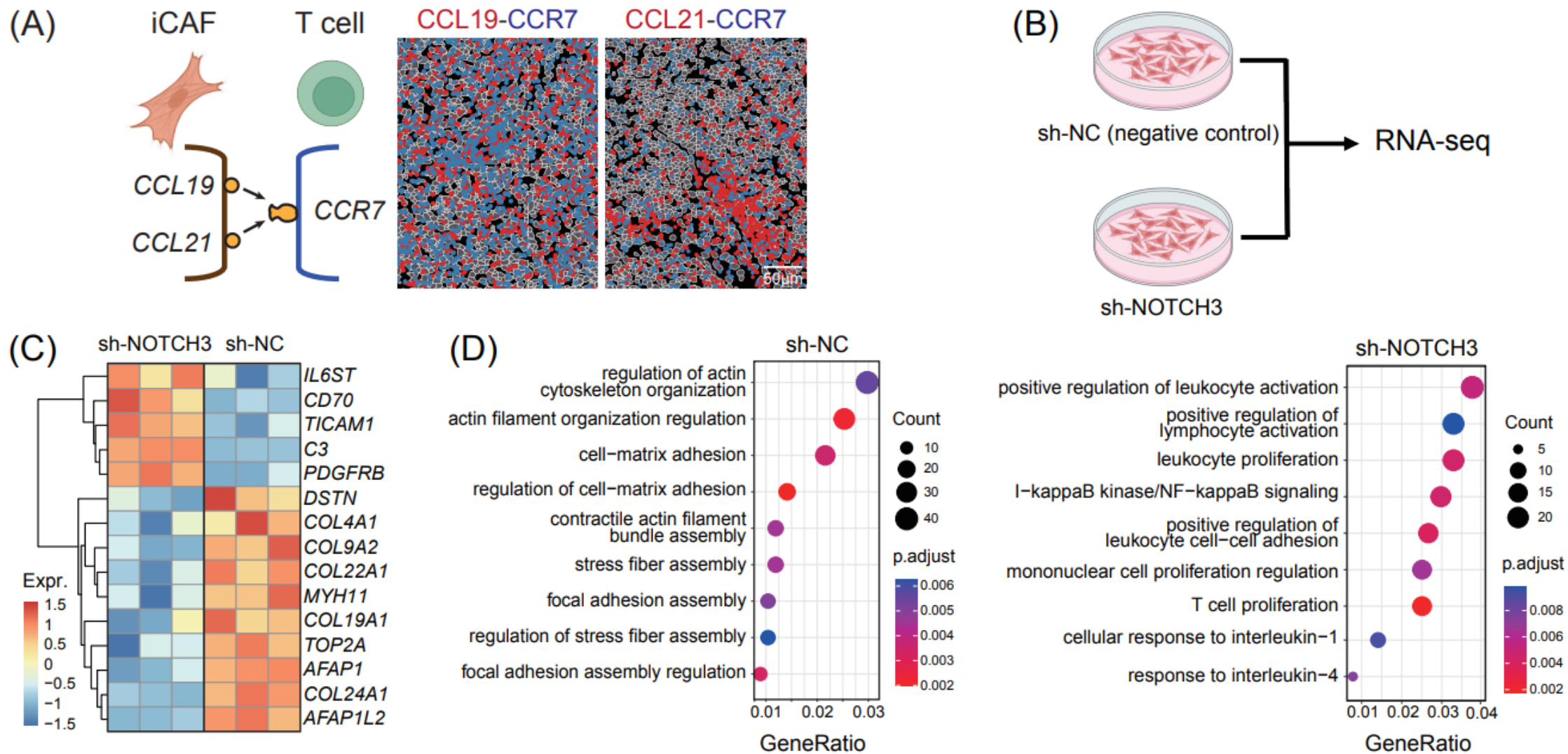
(G) CellChat配体—受体互作分析显示NOTCH信号通路在毛细血管与mCAFs之间存在显著串扰，主要由DLL4/NOTCH3、JAG1/NOTCH3与DLL1/NOTCH3介导。(H) DLL1、DLL4与JAG1在不同细胞类型中的表达水平，指示这些配体的来源细胞。(I) 示意图：定义每个肝窦样内皮细胞(LSEC)在其50个空间邻居内是否与mCAFs存在空间邻近(Yes/No)。下方热图：比较与mCAFs空间邻近(Yes, 红)或不邻近(No, 蓝)的LSECs中血管生成相关基因表达水平。

mCAF的胶原极化受到肝窦毛细血管来源的DLL4触发



(J) H&E染色与CosMx空间图像展示毛细血管与mCAFs的空间邻近性。H&E提供独立队列的组织病理学背景；IF/ISH面板为CosMx空间转录组分析中识别到的毛细血管与mCAFs共定位模式的代表性图像。(K) 点图展示GeoMx空间蛋白组数据中，每个ROI的mCAF与毛细血管特征的空间相关性。(L) CosMx数据中各FOV的DLL4与NOTCH3表达相关性。(M) CosMx空间成像展示不同配体—受体组合介导的毛细血管—mCAF相互作用。(N) ICB治疗背景下泛癌内皮细胞亚型的UMAP可视化。(O) 比较ICB非应答者 (NR) 与应答者 (R) 中毛细血管细胞的DLL4表达差异。

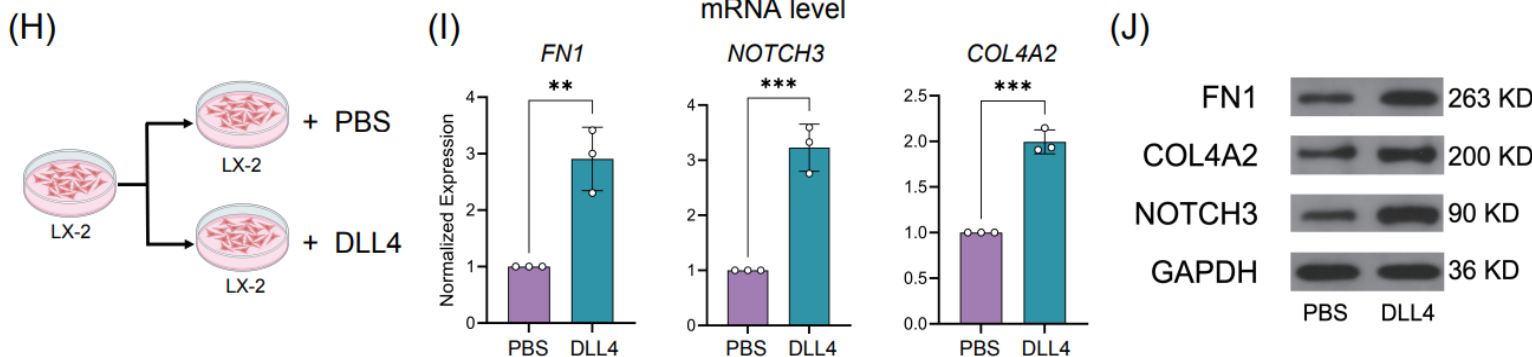
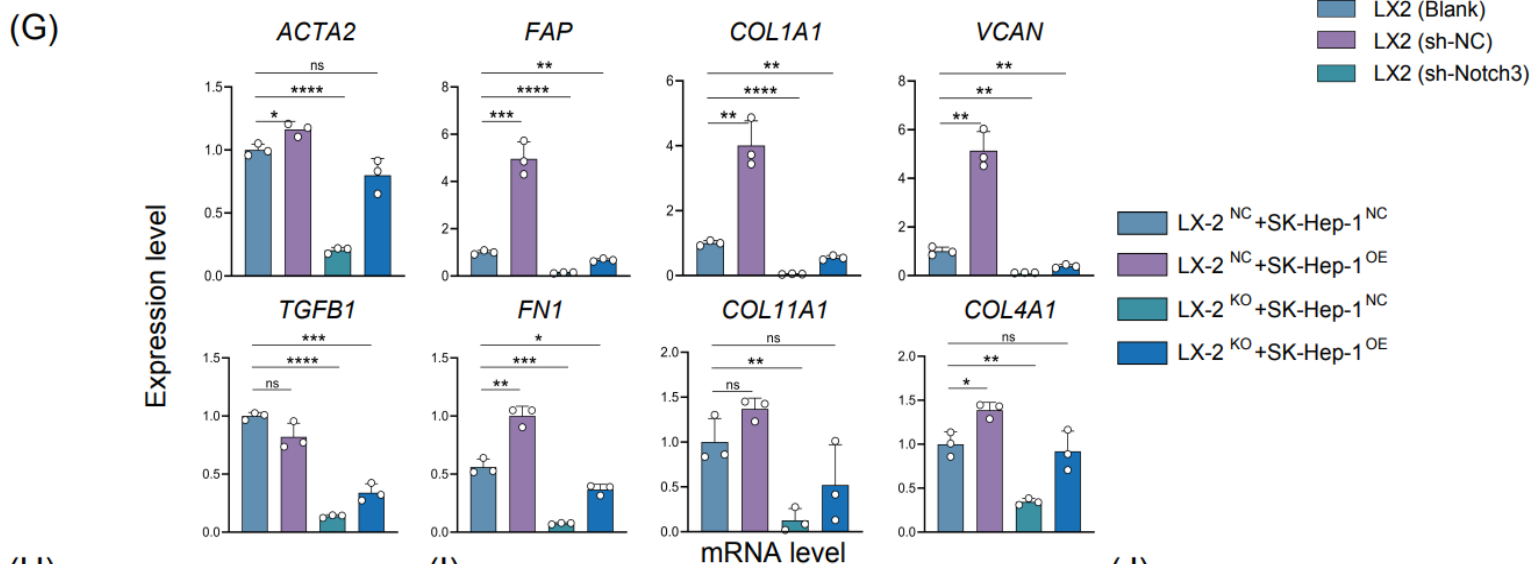
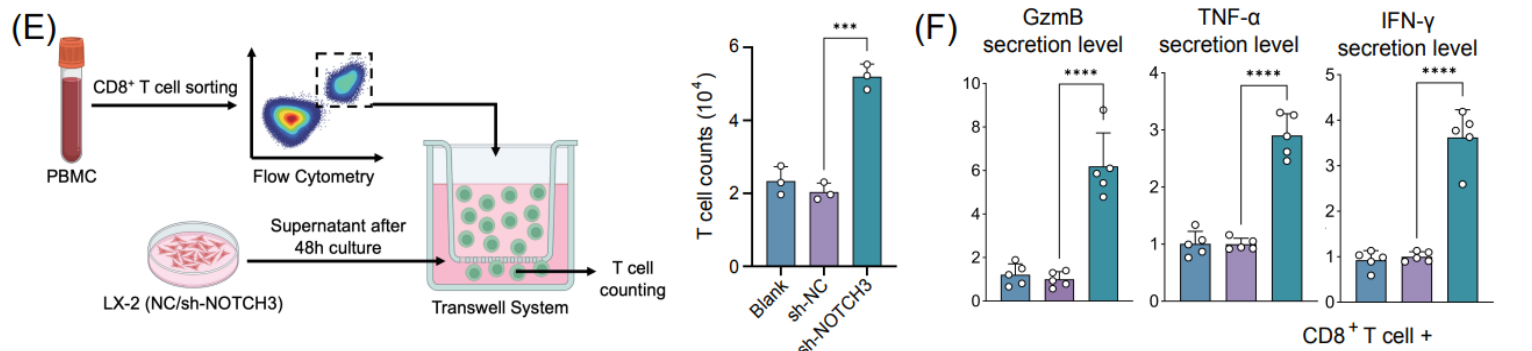
体外实验表明NOTCH3介导的胶原极化能促进免疫逃逸



(A) iCAF与T细胞通过CCL19/CCL21-CCR7介导相互作用的空间成像示意图。(B) 人肝星状细胞系LX-2中进行NOTCH3敲除(KO)并开展bulk RNA-seq的实验示意图。(C) NOTCH3-KO与sh-NC对照LX-2细胞之间的上调与下调基因。(D) NOTCH3-KO与sh-NC对照LX-2细胞差异基因的GO富集条目。

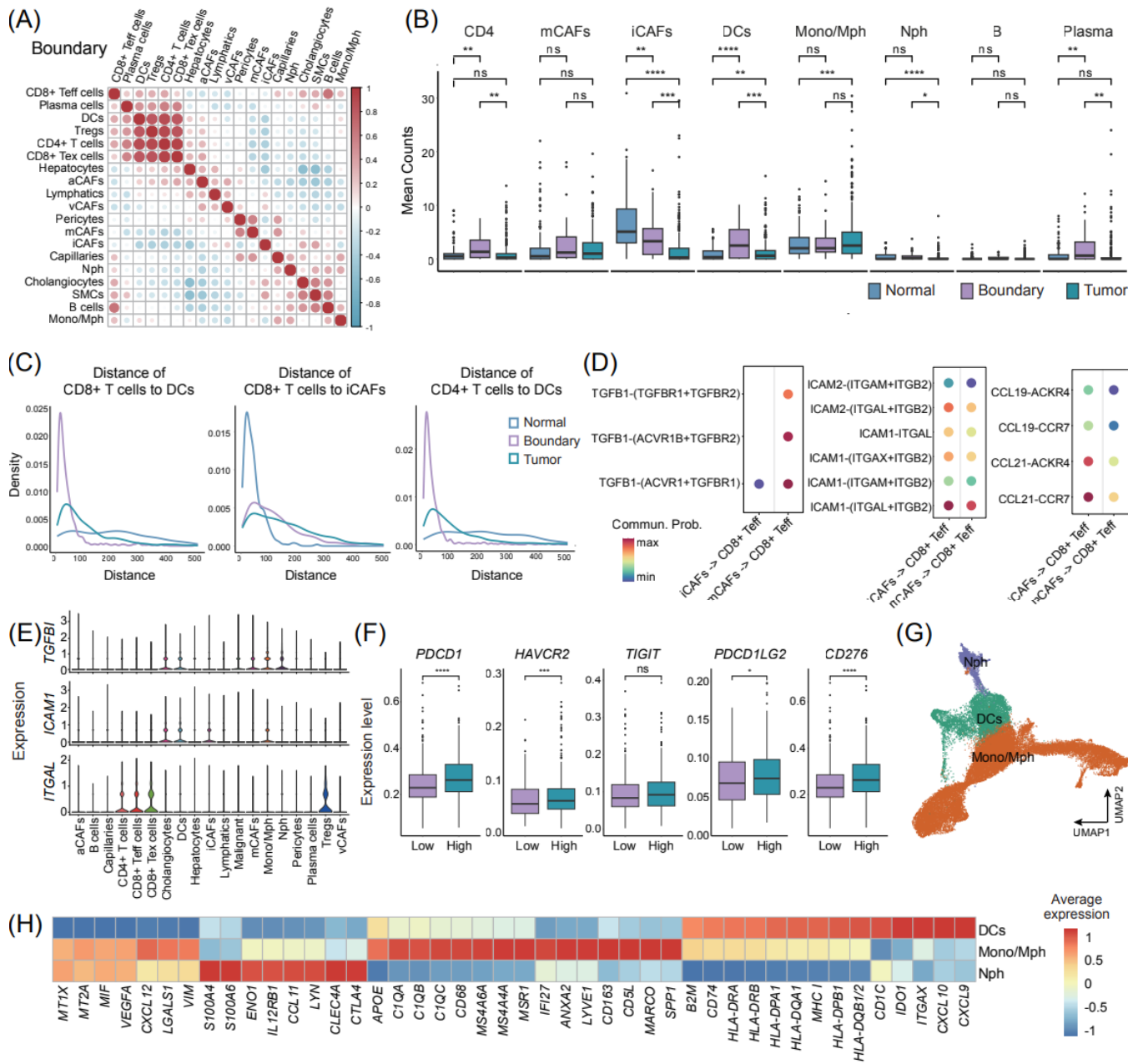


体外细胞共培养提示DLL4-NOTCH3轴促进胶原基质生成



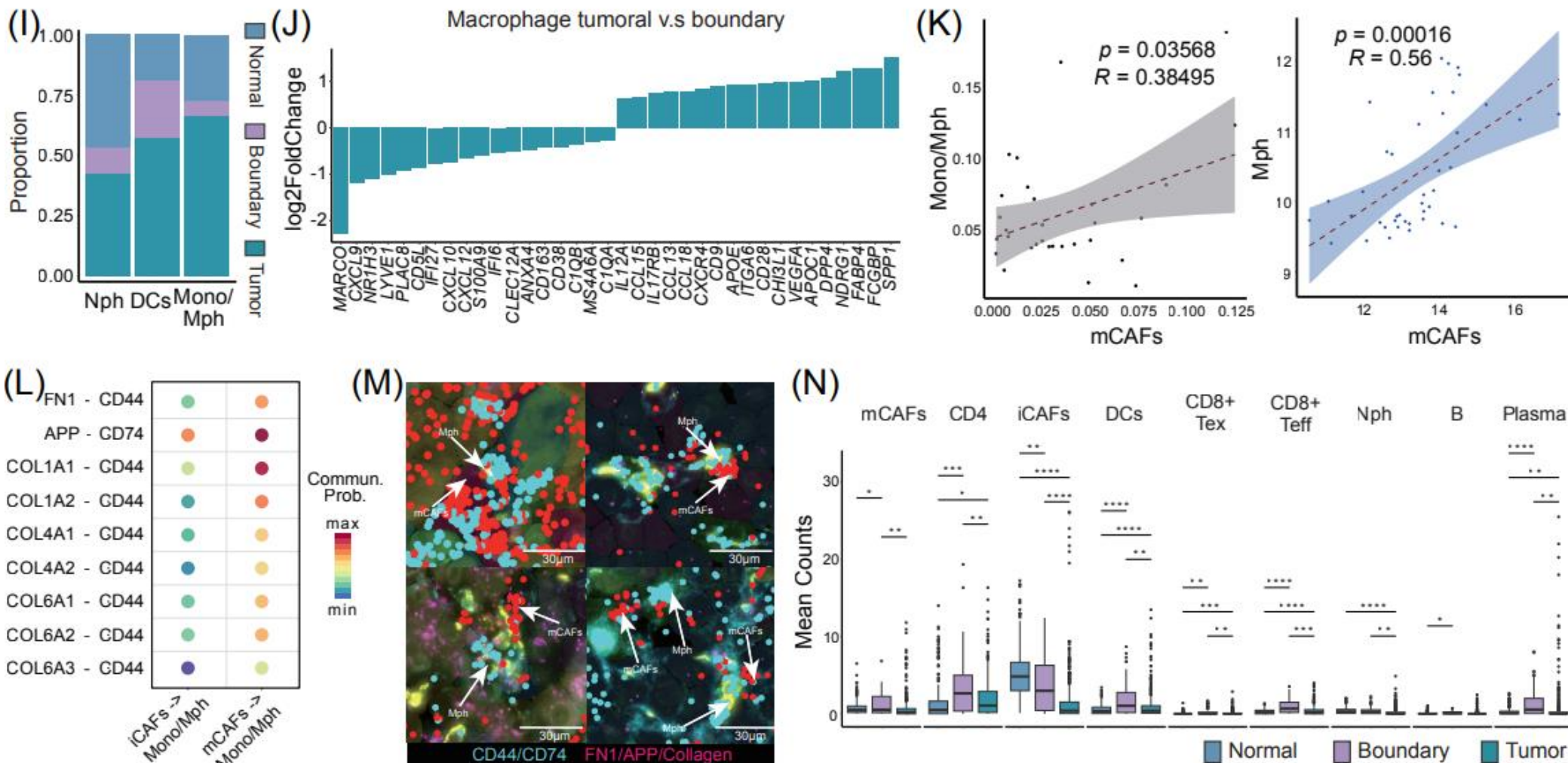
(E) Transwell实验及T细胞迁移与细胞毒性测定的示意图。(F) 通过ELISA检测上清液中GzmB、TNF α 与IFN γ 的相对水平。(G) qPCR检测不同共培养组中与纤维化胶原极化相关基因的表达：SK-Hep-1 DLL4过表达 (OE) 与空载体对照 (NC)；NOTCH3-KO LX-2成纤维细胞与sh-NC LX-2对照 (NC)。(H) DLL4刺激LX-2细胞的示意图。(I) qPCR比较DLL4刺激与否条件下LX-2细胞FN1、NOTCH3与COL4A2的mRNA水平。(J) Western blot比较DLL4刺激与否条件下FN1、NOTCH3与COL4A2的蛋白水平。

mCAF与巨噬细胞存在空间共定位介导免疫逃逸



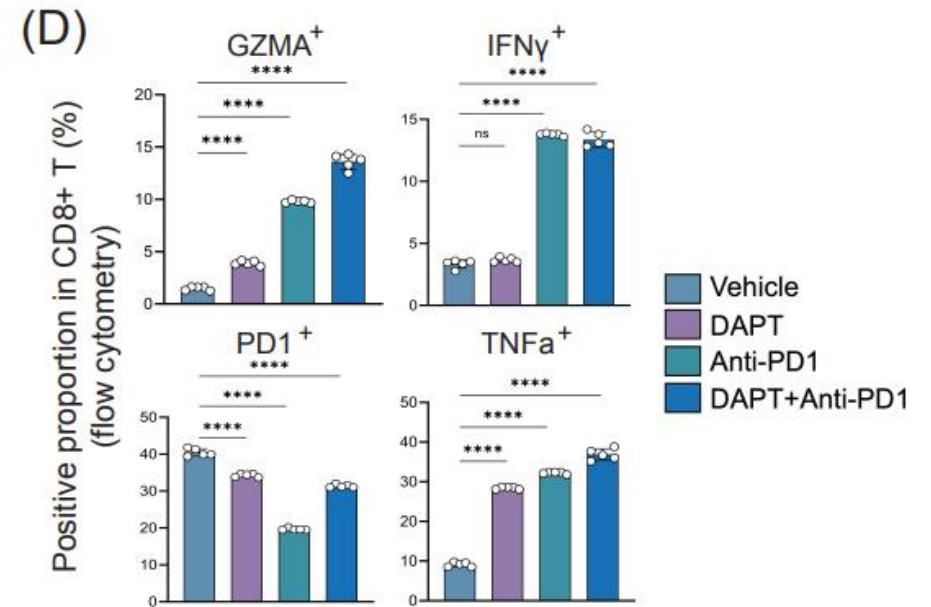
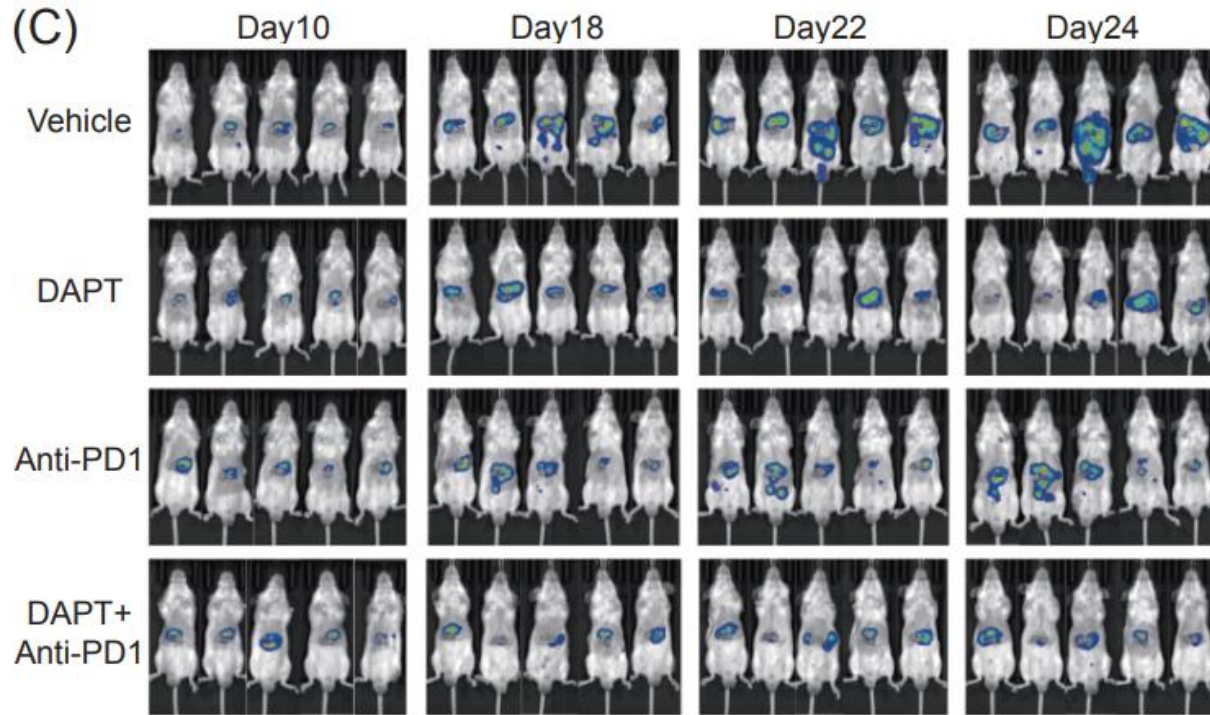
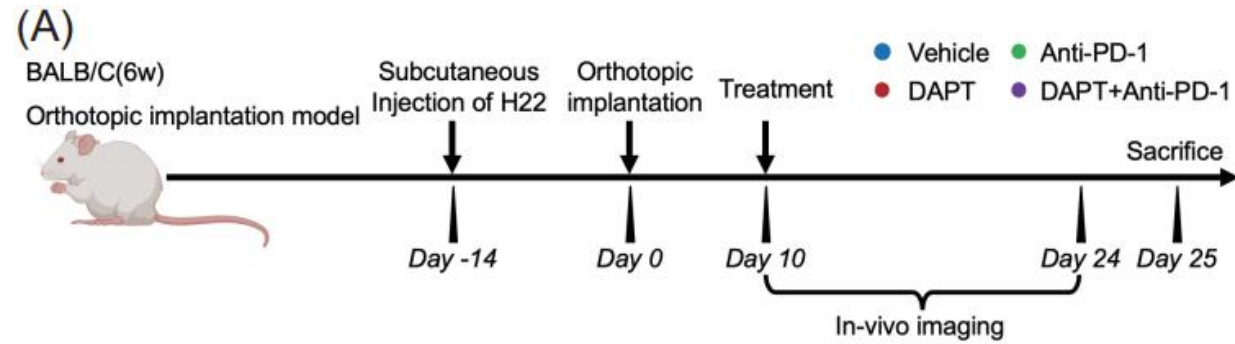
(A) 侵袭性肿瘤边界处的细胞类型频率相关性分析显示：CD4⁺ T细胞、DC与CD8⁺ T细胞协同共定位。(B) 以CD8⁺ T细胞为中心、取其周围50个邻近细胞的空间邻域内，不同细胞类型在正常区、边界区与肿瘤区的平均计数。(C) 密度图展示CD8⁺ T细胞到DC、iCAFs与mCAFs的距离分布（正常区、边界区与肿瘤区）。(D) iCAFs/mCAFs与CD8⁺ T cell之间的CellChat通讯分析。(E) TGFBI、ICAM1与ITGAL在不同细胞类型中的表达。(F) 箱线图比较mCAF高/低组中免疫检查点基因（PDCD1、HAVCR2、TIGIT、PDCD1LG2、CD276）的表达水平。(G) 不同髓系亚型的UMAP可视化。(H) 热图展示髓系亚型的标记基因表达。

mCAF与巨噬细胞存在空间共定位介导免疫逃逸



(I) CosMx1000数据中，不同髓系细胞亚型在正常区、边界区与肿瘤区的堆叠柱状图分布。(J) 肿瘤区与边界区巨噬细胞差异表达基因 (DEGs) 的排序结果。(K) 散点图: CosMx1000数据集中mCAF比例与Mono/Mph比例的相关性 (左); GeoMx 570数据集中mCAF特征评分与Mono/Mph特征评分的相关性 (右)。(L) iCAF/mCAF与巨噬细胞 (Mph) 之间的CellChat通讯分析。(M) 空间成像图: 将mCAF与巨噬细胞的共定位叠加到IF图像上, mCAF相关配体基因以红色标注, Mph相关受体基因以青色标注。(N) 以Mph为中心、取其周围50个邻近细胞的空间邻域内, 不同细胞类型在正常区、边界区与肿瘤区的平均计数。

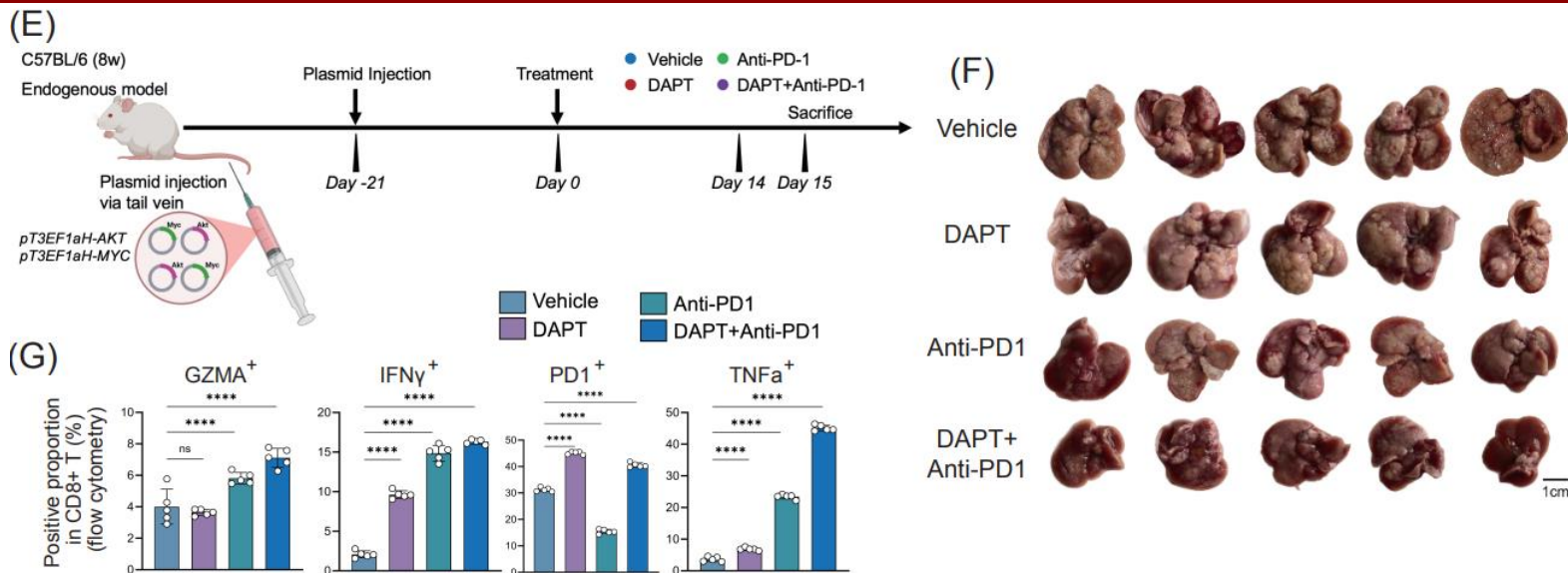
小鼠原位移植肿瘤模型提示靶向抑制NOTCH通路增敏免疫治疗



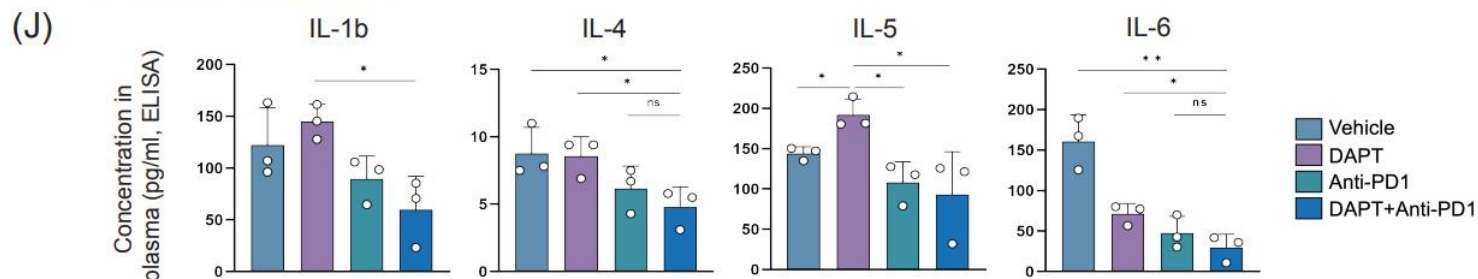
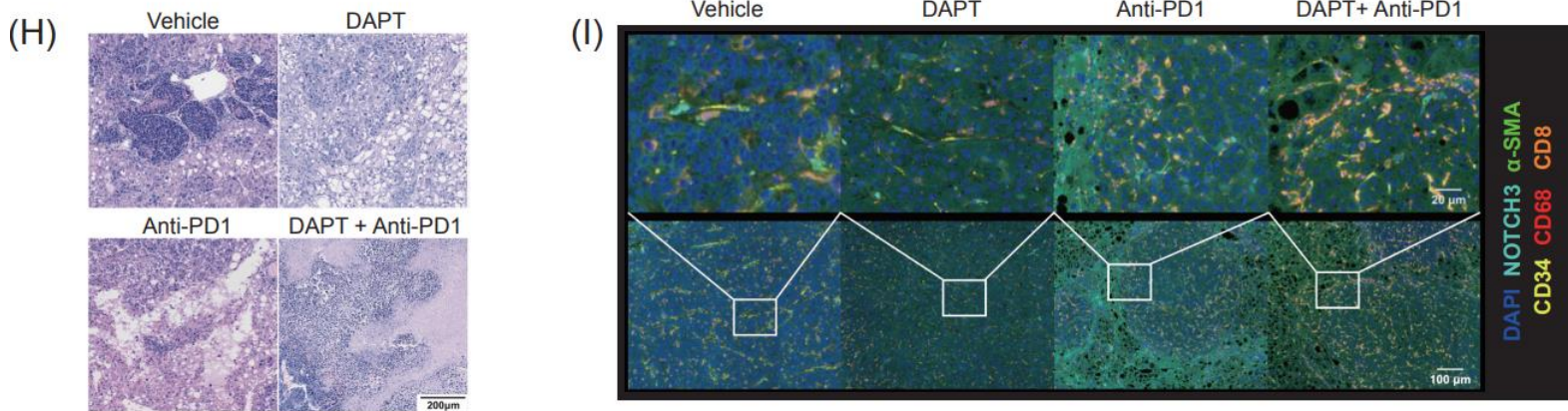
(A) 建立小鼠肝癌原位移植模型并进行给药与体内成像的示意图 (DAPT: 小分子NOTCH抑制剂)。(B) 原位移植模型中不同治疗组肿瘤大小的代表性图像。(C) 原位移植模型在不同时间点的体内活体成像, 比较不同治疗组的荧光信号。(D) 原位移植模型中CD8⁺ T细胞内GZMA⁺、IFN γ ⁺、PD1⁺与TNF α ⁺细胞比例在不同治疗组间的比较。



小鼠自发成瘤模型提示靶向抑制NOTCH通路增敏免疫治疗



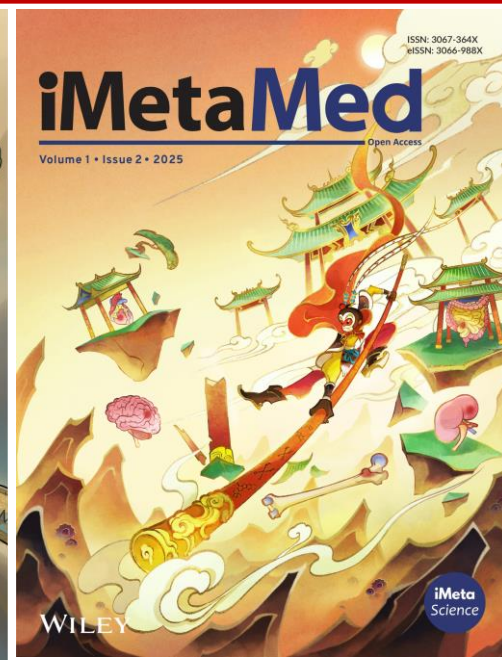
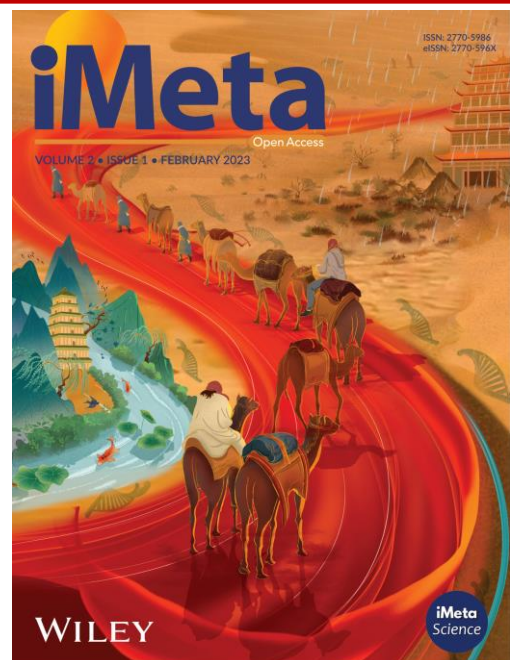
(E) 建立内源性肝癌小鼠模型并进行治疗的示意图。(F) 内源性模型中不同治疗组肝脏大小的代表性图像。(G) 内源性模型中CD8⁺ T细胞内GZMA⁺、IFN γ ⁺、PD1⁺与TNF α ⁺细胞比例在不同治疗组间的比较。(H, I) 内源性模型不同治疗组的HE及多重免疫组化染色图像。(J) 内源性模型不同治疗组小鼠血浆中IL-1b、IL-4、IL-5与IL-6浓度。





总结

- 基于肝癌空间多组学与泛癌种ICB单细胞数据整合，首次系统解析肝窦毛细血管-mCAF跨细胞互作网络，提出血管-基质协同驱动免疫排斥的新机制框架。
- 揭示内皮DLL4-NOTCH3信号轴介导mCAF极化与基质重塑，构建“纤维化屏障-T细胞排斥”的机制轴线，阐明纤维化驱动免疫逃逸的关键分子基础。
- 功能实验证实阻断NOTCH信号可逆转mCAF分化、增强T细胞浸润，并显著提高ICB疗效，建立从机制到干预的完整证据链。
- 提出靶向NOTCH3的血管-基质调控策略，为突破肝癌“硬冷肿瘤”免疫治疗瓶颈提供具有临床转化潜力的新方向。



iMeta (宏)期刊是由宏科学和威立共同出版，对标**Cell**的生物/医学期刊，主编刘双江和傅静远教授，欢迎高影响力的研究、方法和综述投稿。已被**SCIE**、**PubMed**等收录，最新影响因子(IF)33.2，位列全球第65，中国第5，**分区表生物学1区Top**，CNS级成果发表平台，外审平均21天，投稿至发表中位数87天。

iMetaOmics (宏组学)，定位IF>15对标**NC/SA**的生物/医学综合期刊，已被**ESCI**、**PubMed**等收录。

iMetaMed (宏医学)定位IF>15的医学综合期刊，欢迎投稿！

主页: <http://www.imeta.science>
出版社: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/imeta>

投稿: iMetaOmics: <https://wiley.atyponrex.com/journal/IMO2>
iMetaMed: <https://wiley.atyponrex.com/journal/IMM3>

 office@imeta.science
imetaomics@imeta.science

 [宣传片](#)  [iMeta](#)



更新日期
2026/3/30