



高强, 博士, 复旦大学附属中山医院主任医师、教授、博士生导师, 教育部“长江学者”特聘教授, 国家“万人计划”、国家优青, 上海市优秀学科带头人和优秀学术带头人、曙光学者, 担任中国抗癌协会青年理事会理事、中国病生学会免疫分会青委会主任委员。主持国家自然科学基金重点项目在内科研课题20余项。研究聚焦“肿瘤异质性与个体化诊疗”, 以第一作者或通讯作者身份发表SCI论文50余篇, 成果被*Cell*、*J Clin Oncol*、*Cancer Cell*、*Cancer Discov*、*Cell Res*、*J Hepatol*、*Gut*、*Gastroenterology*等高水平期刊收录。

肝癌微环境时空异质性与个体化免疫治疗

成怡斐 高强*

(复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所, 上海 200032)

摘要 肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TIME)是一个高度复杂的生态系统, 肿瘤细胞与免疫细胞在时间、空间维度动态互动, 产生时空异质性(spatiotemporal heterogeneity)。值得注意: 肝癌免疫微环境异质性与临床表型显著相关; 抗原呈递、趋化因子、免疫代谢等相关机制参与了免疫微环境异质性的时空调控。未来, 随着研究工具不断进步、对时空异质性解析逐渐深入, 基于个体免疫微环境动态特征, 建立个体化免疫治疗(personalized immunotherapy)新策略, 将使更多肿瘤患者获益。

关键词 肿瘤微环境; 时空异质性; 免疫治疗; 肿瘤异质性

Spatiotemporal Heterogeneity of Liver Cancer Microenvironment and Personalized Immunotherapy

CHENG Yifei, GAO Qiang*

(Department of Liver Surgery and Transplantation, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract TIME (tumor immune microenvironment) is a highly organized ecosystem made of cancer cells and surrounding immune cells. These two components communicate and interact with each other at spatial and temporal levels, resulting in spatiotemporal heterogeneity. It's noteworthy that spatiotemporal TIME heterogeneity closely correlates with clinically relevant neoplastic phenotypes. And antigen presentation, chemokine programs, and immune metabolism play key roles in the regulation of spatial and temporal TIME heterogeneity. With the application of novel research approaches, spatiotemporal TIME heterogeneity will be further decoded, prompting

收稿日期: 2022-01-30 接受日期: 2022-02-24

国家自然科学基金(批准号: 82130077、81961128025)和上海市优秀学科带头人计划(批准号: 19XD1420700)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-64041990, E-mail: gaoqiang@fudan.edu.cn

Received: January 30, 2022 Accepted: February 24, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82130077, 81961128025) and the Shanghai Municipal Health System Outstanding Academic Leaders Foundation Program (Grant No.19XD1420700)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64041990, E-mail: gaoqiang@fudan.edu.cn

personalized liver cancer immunotherapy strategies based on distinct spatiotemporal TIME patterns. Advances in spatiotemporal TIME heterogeneity research will ultimately bring benefits to patients in clinical settings.

Keywords tumor microenvironment; spatiotemporal heterogeneity; immunotherapy; tumor heterogeneity

肿瘤异质性(tumor heterogeneity)是肿瘤区别于正常组织的重要特征,包括肝癌在内的多种实体瘤中,高度异质性均被报道与临床不良预后显著相关^[1-3]。肿瘤与微环境相互作用,异质性不断演化:异质性增高促进肿瘤发生免疫逃逸(immune escape),进而导致肿瘤不断进展^[4]及出现治疗耐药^[5]。在肿瘤内部不同部位、肿瘤演化不同时期、治疗的不同节点,肿瘤异质性存在显著差异,即时空异质性(spatiotemporal heterogeneity)^[6-7]。

肿瘤异质性源于肿瘤细胞本身的异质性和微环境异质性(microenvironment heterogeneity)。靶向治疗(targeted therapy)主要针对肿瘤细胞,其在肺癌(如ALK突变)^[8]及黑色素瘤(如BRAF突变)^[9]中取得了较好的临床疗效。然而,由于肝癌细胞缺乏“癌基因依赖(oncogene addiction loop)”^[10],尚没有靶向特定突变的肝癌治疗药物,目前一线靶向药物均为多激酶靶点抑制剂,且临床疗效欠佳:仑伐替尼(RE-FLECT研究^[11])和索拉非尼(SHARP研究^[12])治疗进展期肝癌患者,客观缓解率分别仅18.8%和2.0%。

近来,靶向微环境异质性的免疫治疗取得了显著进展:免疫治疗联合抗血管生成药物(anti-angiogenic agents)显著改善晚期肝癌患者生存(IM-brave150研究^[13]、ORIENT-32研究^[14]),免疫治疗联合靶向药物成功实现晚期肝癌降期(downstaging)转化治疗,变“不可切除”为“可切除”^[15]。这提示靶向微环境异质性的综合治疗思路或将为治疗模式带来变革。

在本综述中,我们主要以肝癌为对象,系统性探讨了肿瘤微环境时空异质性演化机制和研究进展,并展望了基于时空异质性关键要素进行“精确打击”的临床免疫治疗新策略。

1 肝癌异质性驱动微环境时空演化

肝脏在生理状态下即具有异质性^[16]。成人肝脏由50~100万个肝小叶组成,每个小叶构成一个独立功能单元(functional zonation)。小叶自中央静脉至门脉区,形成了辐射状的局部微环境,氧气、营养物质、激素浓度、基因表达、代谢功能^[17]呈现显著梯

度分布,肝脏的生理异质性可能是肝癌时空异质性的演化基础。

1.1 肝癌具有广泛异质性

肝癌是异质性最强的实体瘤之一^[18]。肿瘤异质性的程度与肝癌临床预后显著相关^[19]。肝癌的异质性是多层次、多水平、多维度的。肝癌患者间存在个体间异质性(inter-patient heterogeneity)^[20],同一个患者个体内异质性(intra-patient heterogeneity),按观察的病灶数量不同,又可分为单灶肿瘤内异质性(intra-tumor heterogeneity)和多灶肿瘤间异质性(inter-tumor heterogeneity)^[21]。在表型水平,混合型肝癌的单个病灶内部,肉眼即可分辨出两种组织类型^[22];在直径为1.3 cm的小肝癌中^[23],显微镜下能观察到高、中、低三种不同分化程度的肝癌细胞,对应区域局部免疫浸润水平也截然不同。在分子水平,我们观察到肝癌患者间在基因组、转录组、蛋白组、磷酸蛋白组水平存在显著的异质性^[20],系统衡量以上异质性因素,我们鉴定到三种分子亚型(肝脏代谢驱动亚型、微环境失调亚型、增殖驱动亚型),较TNM分期有更好的预后预测能力。此外,利用高通量技术,我们进一步揭示了表型异质性的克隆起源、进化轨迹^[24-25]、驱动模式^[26-28]以及肿瘤与微环境的相互作用^[20]。

1.2 肝癌克隆演化塑造免疫微环境

伴随肿瘤基因组异质性演化,肿瘤抗原谱也呈现动态变化。肝癌亚克隆与微环境相互作用,最终形成免疫抑制性微环境^[29]。在癌前病变时期,驱动突变发生,肝癌相关突变位点产生肿瘤新抗原(tumor neoantigens, TNA)并特异性激活微环境中的T细胞。克隆演化过程中,异质性不断增强,长期、持续性抗原刺激将导致T细胞功能障碍,出现免疫忽视(immune ignorance)和免疫治疗原发耐药。对19例人肝癌临床样本进行高通量测序发现,在异质性高的肿瘤中,免疫微环境发生重编程(reprogramming),T细胞群向耗竭表型分化^[19];体内实验研究通过模拟高度异质性胰腺癌克隆,成功诱导了免疫逃逸表型和“T细胞豁免”(non-T-cell-inflamed)微环境,进一步支持了肿瘤进化中的异质性变化对于局部免疫

微环境具有塑造作用, 而微环境中细胞的丰度、位置、功能分化也反映了肿瘤异质性的变化^[30]。此外, 在乳腺癌肺转移模型中, 高度异质性的原发肿瘤的不同亚克隆合作, 通过局部和系统性免疫反应, 在转移靶器官间质构建起一个“促转移”微环境(prometastatic niche), 提示肿瘤异质性也可能通过影响转移性肝癌及肝癌远处转移微环境, 进而促进转移过程的发生^[31]。

1.3 免疫压力与肿瘤进化相互博弈

肿瘤是一个复杂的生态系统(tumor ecosystem), 肿瘤异质性是在微环境选择压力下逐渐累积形成的, 免疫微环境则是选择压力中至关重要的因素之一。肝癌克隆演化是肿瘤细胞与免疫微环境共同进化的过程, 随着肿瘤克隆的异质性不断增强^[20,27], 微环境也历经演化^[25,32], 即“免疫编辑(immunoediting)”过程, 主要包括: “免疫清除(elimination)”、“免疫平衡(equilibrium)”和“免疫逃逸(escape)”三个阶段^[33]。

在肿瘤时空演化的动态过程中, 肿瘤的内在因素(如: 基因组不稳定性、异倍体性)以及微环境的外在因素(如: 免疫编辑、肿瘤与间质)紧密互作。肿瘤基因组和表观组的改变, 显著影响肿瘤浸润淋巴细胞的丰度和活性^[34], 而免疫浸润反过来也会影响肿瘤增殖潜能与克隆组成^[35-36]。肿瘤与微环境的相互作用, 克隆演化和免疫压力相互博弈、动态变化, 形成了微环境的时空异质性。

2 微环境时空异质性的研究进展

对于患者个体而言, 微环境时空异质性(图1)有三大特征。(1) 时间异质性(temporal heterogeneity): 在肿瘤演化和治疗前后的不同时间点, 微环境存在显著差异^[23];(2) 空间异质性(spatial heterogeneity): 在同一病灶内部, 不同部位病灶间, 微环境存在显著差异^[25,36-38];(3) 免疫细胞的多样性(diversity)和可塑性(plasticity): 关键细胞亚型及组成比例动态变化^[39-40], 对于外界变化产生快速响应, 具有很强的可塑性和缓冲能力^[40-41]。目前, 对于上述特征的认识尚不全面。

此外, 只有适度的异质性有利于肿瘤时空演化^[42]: 异质性过低会导致微生态可塑性和适应性不足, 而异质性过高又会影响肿瘤生存和微环境整体功能, 因此明确时空异质性调控机制至关重要。深入解析微环境时空异质性特征及其调控机制, 将极大丰富

我们对肿瘤生物学的理解, 有助于更好地指导肿瘤临床诊疗。

2.1 肿瘤异质性研究工具

过去, 由于测序技术通量和分辨率的限制, 我们对肿瘤异质性的认识存在过度简化: 免疫组织化学能够标记的微环境成分在个位数, 而批量测序(bulk sequencing)无法将微环境和肿瘤区分开, 因而产生的数据解释度有限。近年来, 研究工具的发展提供了更高分辨、更高通量、更多维度的数据, 是驱动时空异质性研究向前的重要力量。具体来说, 高维单细胞技术^[43](如: 单细胞多组学^[44]、空间组学^[45]、高通量流式^[46]、高通量成像^[47])、微环境细胞示踪(肿瘤细胞^[48-49]、免疫细胞^[50])、高通量基因筛选^[51]、转基因肿瘤模型^[52]和图像深度学习^[53-54]等多种新方法、新技术问世, 这些技术和方法已经能够在单细胞分辨率下, 揭示完整的组织空间结构, 追踪肿瘤演化的动态过程。这为我们研究微环境异质性的时空变化特征及其调控机制, 从肿瘤与微环境互作角度解释临床现象, 解决临床问题提供了重要保障。

2.2 微环境时间异质性

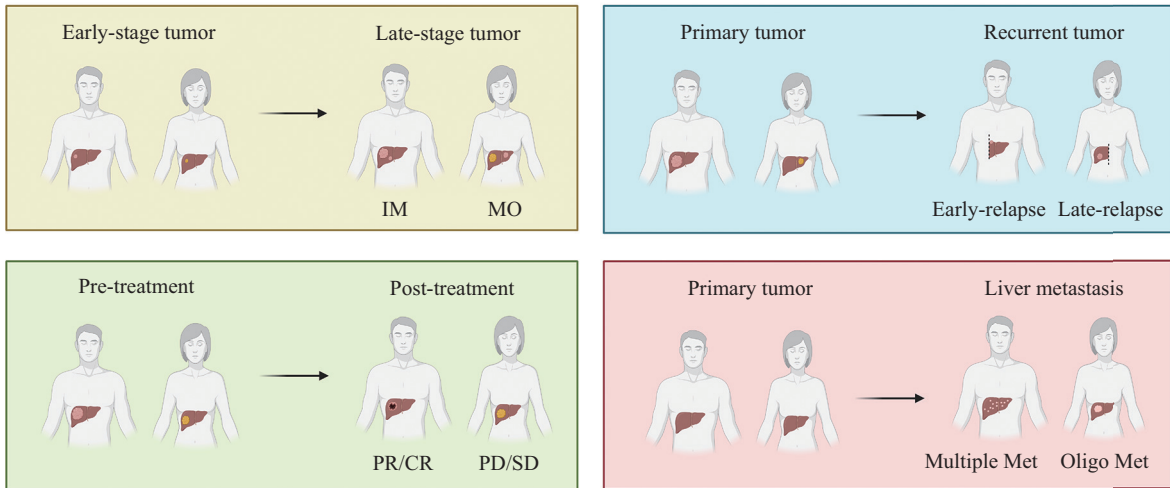
微环境中的肿瘤和免疫成分能够快速响应环境变化, 因而在时间维度上呈现动态特点, 构成了微环境时间异质性。在肝癌中, 通过高通量的研究方法, 我们得以从多角度包括早期与晚期、原发与复发、治疗响应与治疗耐药、原位与转移等理解肝癌的时间异质性。具体来说: (1) 对晚期肝癌和早期肝癌进行单细胞测序, 揭示了CTL时间序列显著不同, 且晚期肝癌中浸润的CTL显著下调杀伤分子, 提示进展期病灶免疫抑制增强^[55]。(2) 在进展期肝癌中, 对比肝内转移(intrahepatic metastases, IM)和原发病灶, 转移灶侵袭前沿显著富集M2巨噬细胞, 该群巨噬细胞高比例表达免疫耗竭分子, 提示转移过程中微环境趋向免疫抑制^[25]。(3) 在配对原发和复发病灶中, 我们鉴定到JAK1和RB1等新的驱动突变, 同时表征到复发癌中CTL浸润数量减少且肿瘤核心浸润呈现“荒漠化”, 提示突变可能通过显著改变肿瘤免疫原性促进免疫抑制和免疫逃逸^[25]; 此外, 早期复发肝癌单细胞测序也证实, 复发肿瘤细胞特异性上调PD-L1和CTLA-4, 提示复发微环境中肿瘤免疫逃逸增加^[56]。(4) 比较转移性肝癌新辅助治疗队列中敏感和耐药的样本, 我们发现巨噬细胞的分化状态与治疗响应显著相关, 并在单细胞水平鉴定到一群

MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞与治疗耐药显著相关, 提示治疗耐药与微环境免疫抑制之间显著相关^[38]。未来, 多时间点(特别是治疗前后)采样整合高维单细胞分析技术, 细化分群更好地表征时间异质性, 并为临床疗效预测提供重要参考; 在动物模型上研究肿瘤时间异质性的分子机制, 将提示新的治疗靶点。

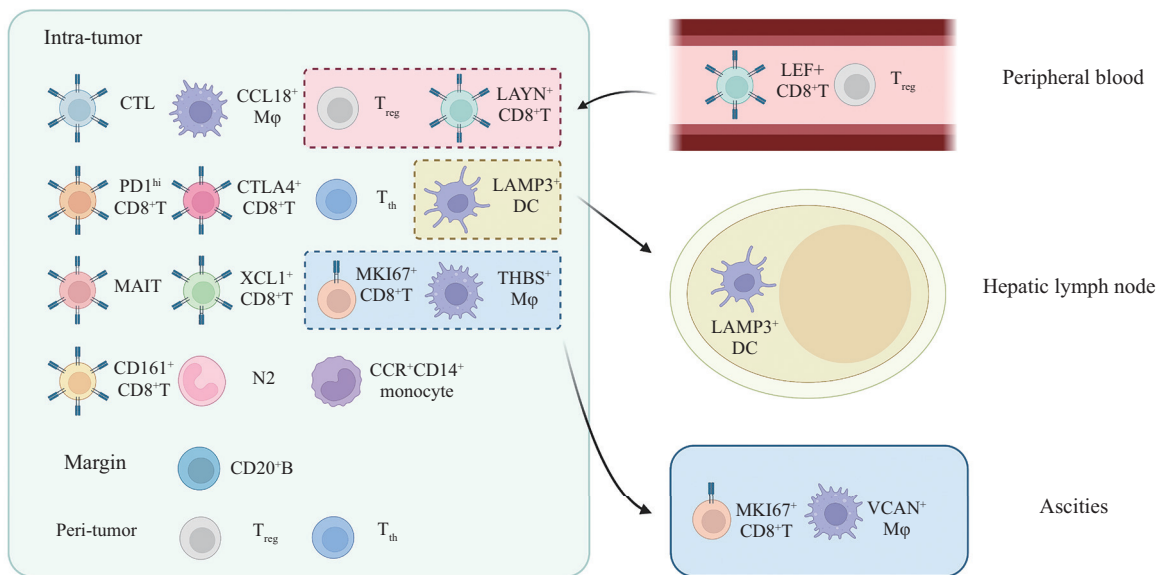
2.3 微环境空间异质性

微环境中不同空间区域, 免疫细胞组成的空间分布、相对丰度和功能状态存在显著差异, 构成了微环境空间异质性, 且微环境空间特征与肿瘤进展和治疗响应密切相关^[57]。微环境空间异质性的代表性研究来自卵巢癌^[37], 该研究揭示了同一卵巢癌

Temporal heterogeneity of liver cancer TIME



Spatial heterogeneity of liver cancer TIME



肝癌免疫微环境时间异质性研究的不同维度: 肿瘤演化和治疗前后的不同时间点, 微环境存在显著差异。肝癌免疫微环境空间异质性研究的不同维度: 在同一病灶内部, 不同部位病灶间, 微环境存在显著差异。MO: 多中心发生; IM: 肝内转移; CR: 完全缓解; PR: 部分缓解; SD: 疾病稳定; PD: 疾病进展; oligo-Met: 寡转移; multiple-Met: 多发转移。

Temporal heterogeneity of liver cancer TIME: distinct immune features can be observed along the course of tumor evolution and clinical interventions. Spatial heterogeneity of liver cancer TIME: specific immune cell subtypes are skewed in intrahepatic and extrahepatic microenvironment. MO: multicentric origin; IM: intrahepatic metastases; CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: partial disease; oligo-Met: oligo-metastases; multiple-Met: multiple-metastases.

图1 肝癌免疫微环境的时空异质性

Fig.1 Spatiotemporal heterogeneity of liver cancer TIME

患者的不同转移灶间, 分别存在“冷”(T细胞排斥)和“热”(T细胞浸润)两种微环境状态, 且治疗反应(敏感或耐药)与微环境的冷与热显著相关。

我们在肝癌中应用多重荧光技术, 在大样本分析中纳入空间分布特征, 首次揭示了一群在肿瘤边缘区富集的边缘浸润B淋巴细胞(margin-infiltrating B lymphocytes, MIL-B)。MIL-B细胞在肿瘤侵袭前沿分布显著高于癌和癌旁, 且MIL-B数量与肿瘤大小、血管侵犯呈显著负相关, MIL-B富集对应肿瘤患者的积极预后^[58]。这提示仅根据免疫浸润数量进行“冷”、“热”肿瘤“二分法”, 存在对微环境过度简化的问题, 还需考虑微环境空间异质性。

三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS)是高度有序且具有特殊功能的免疫单位, 在空间局部形成免疫热点, TLS内部树突状细胞(dendritic cell, DC)、B细胞和T细胞显著富集。肝癌内部TLS是抗肿瘤免疫起始的重要战场^[59], 免疫浸润空间特征是肝癌预后的重要因素之一^[54]。利用深度学习技术^[53], 我们发现TLS空间位置与预后显著相关: 癌旁TLS对应不良预后, 而肿瘤内部TLS对应积极预后; 依据以上发现, 我们提出基于微环境TLS空间异质性的免疫分型(immune class)和预后指数(C-index), 预测效果显著优于传统的TNM分期(0.73 vs 0.63, $P < 0.001$)。以空间异质性为切入点, 利用高维技术解析空间定位信息、免疫细胞亚型和功能分化状态, 结合临床特征, 或将鉴定出更多具有重要意义的空间免疫精细结构。

除单灶的空间微环境特征外, 我们勘察多发病灶发现: 多中心起源(multicentric origin, MO)多发肝癌的不同病灶间^[25]、同一患者的不同转移灶间^[38]微环境显著不同。另外, 对肝癌样本多组织位点(肿瘤、淋巴结、外周血、腹水等)单细胞测序^[60]分析揭示, 肝癌浸润免疫细胞存在跨组织时空异质性, 如: LAMP3⁺树突状细胞能从肿瘤中迁移至引流淋巴结, THBS⁺巨噬细胞具有向腹水迁移分化的潜能。在同一时间点, 进行多位点采样和高维单细胞分析技术, 或将为全面在体肿瘤空间异质性监测提供新的思路。

2.4 免疫亚群多样性与可塑性

免疫微环境是一个高度复杂的整体。研究微环境中不同免疫亚群的多样性及其临床意义, 为全面理解微环境演化提供了重要支持。利用高通

量流式、多重免疫荧光、单细胞测序等技术, 我们在肝癌中进行了系列探索。(1) 细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL)和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)平衡^[61]: 首次在肝癌中提出瘤内免疫平衡(intratumoral balance), 发现杀伤性免疫细胞CTL和抑制性免疫细胞Treg, 较单一指标能更好地预测患者预后; (2) 微环境B细胞多样性^[62]: 揭示了肝癌微环境中7种不同分化状态的B细胞亚型, 并鉴定出5种B细胞亚型与肝癌的积极预后显著相关; (3) 黏膜相关恒定T(mucosal-associated invariant T, MAIT)细胞^[63]: 发现了抑制性MAIT细胞在肝癌微环境中显著富集, 其密度增高与肝癌不良预后显著相关。(4) 抑制性PD1^{hi}CD8⁺T细胞^[64]: 根据细胞表面PD-1表达水平, 细分微环境中的CD8⁺T细胞亚群, 筛选到一群特征性的PD1^{hi}CD8⁺T细胞。该群细胞具有免疫抑制表型: 高表达LAG3、TIGIT在内的多种耗竭相关抑制性分子, 而低表达杀伤性分子, 是肝癌微环境由“活化”转为“耗竭”的重要指征; (5) 滤泡辅助性T细胞(T follicular helper cell, T_h)与Treg共定位^[53]: 在肿瘤内部的免疫热点TLS中我们观察到, T_h显著富集, 局部抗肿瘤免疫激活, 提示良好预后; 但同时该区域内Treg细胞比例同步升高, 提示局部免疫抑制因素和免疫激活因素相互博弈; 此外, 肿瘤内部TLS与肿瘤癌旁TLS中的Treg细胞数量呈正相关, 提供了癌旁TLS导致肝癌不良预后^[65]的新线索。(6) CCL18⁺巨噬细胞与XCL1⁺CD8⁺T细胞^[55]: 系统性阐明了肝细胞肝癌免疫微环境中29种特征细胞亚型($n=41$, 698细胞), 其中CCL18⁺巨噬细胞富集与肝癌预后呈显著负相关, 而XCL1⁺CD8⁺T细胞富集与肝癌预后呈显著正相关; (7) MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞与CTLA4⁺CD8⁺T细胞^[38]: 绘制了肠癌肝转移时空免疫全景($n=178$, 630细胞), 揭示了肝转移灶内富集多种免疫抑制细胞, 如: CTLA4⁺CD8⁺T细胞和MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞, 进一步发现MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞与肿瘤细胞之间存在密切通讯, 可能通过SIRPA-CD47相互作用。

基于微环境中关键免疫亚群复杂的时空异质性(表1), 用单独一种微环境细胞功能状态, 或单独一个肿瘤演化过程中的横截面, 尚不足以代表微环境的特征。肿瘤-免疫调定点学说(cancer-immune set point)^[40]指出, 在时空演化进程中, 多种细胞因子、趋化因子、免疫与非免疫细胞等不同要素动

表1 肝癌微环境关键免疫细胞、空间定位及其预后价值

Table 1 Cell subtypes, location and features of key immune cells in liver cancer TIME

细胞亚群 Cell subtype	空间定位 Location	功能/预后 Function/prognosis	参考文献 References
CTL	Intra-tumor	+	[61]
Treg	Intra-tumor	-	[53,61]
	Peri-tumor	-	[53]
MAIT	Intra-tumor	-	[63]
PD1 ^{hi} CD8 ⁺ T	Intra-tumor	-	[64]
XCL1 ⁺ CD8 ⁺ T	Intra-tumor	+	[55]
CTLA4 ⁺ CD8 ⁺ T	Intra-tumor	-	[38]
LAYN ⁺ CD8 ⁺ T	Intra-tumor	-	[66]
CD161 ⁺ CD8 ⁺ T	Intra-tumor	-	[56]
MKI67 ⁺ CD8 ⁺ T	Ascites	-	[60]
T _h	Intra-tumor	+	[53]
	Peri-tumor	-	[65]
CCL18 ⁺ Mφ	Intra-tumor	-	[55]
VCAN ⁺ Mφ	Ascites	-	[60]
LAMP3 ⁺ DC	Intra-tumor	-	[60]
	lymph node	-	[60]
CCR1 ⁺ CD14 ⁺ monocyte	Intra-tumor	-	[67]
CD20 ⁺ B	Tumor margin	+	[58]
N2	Intra-tumor	-	[68-69]

微环境细胞亚群功能或预后特征。+: 抗肿瘤/积极预后; -: 促肿瘤/不良预后。

Function and prognostic features of immune cell subtypes. +: anti-tumor/good prognosis; -: pro-tumor/poor prognosis.

态互作, 赋予微环境高度可塑性: 微环境中的免疫耐受因素(tolerogenic determinants)和免疫激活因素(immunogenic determinants)共同构成连续谱(continuum), 使整个肿瘤微生态处于连续不断的动态平衡。

2.5 微环境时空异质性调控机制

CHEN和MELLMAN^[41]在2013年提出了肿瘤免疫循环(cancer-immune cycle)的模型, 阐明了肿瘤-免疫互作的基本过程, 也揭示了微环境时空异质性演化的基本机制。针对基本过程中的三个重要步骤, 我们聚焦(1) 肿瘤抗原呈递(antigen presentation); (2) 免疫细胞迁移; (3) 免疫细胞杀伤, 从抗原性(antigenicity)、趋化因子(chemokine)和免疫代谢(immune metabolism)三方面, 探讨肝癌时空异质性调控的调控机制。

2.5.1 抗原呈递时空调控 抗原呈递是微环境时空异质性的重要调控因素。肿瘤抗原表达量下降以及肿瘤抗原呈递机制的异常, 显著降低肿瘤抗原性, 影响CTL对肿瘤的识别与杀伤, 阻遏抗肿瘤免疫^[70]。抗原性调控具有显著时空异质性。(1) 空间异质性:

抗原性改变的单位是亚克隆, 空间上肿瘤不同区域的抗原性并不是均一的; (2) 时间异质性: 肿瘤发生发展过程中, 抗原性随着克隆演化过程也呈现动态变化。应用免疫基因组学技术^[25], 我们发现, 抗原呈递机制异常在肝癌中较为普遍, 最常见的HLA杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)发生在HLA-C03:02、HLA-B24:02等位点。LOH导致抗原性异常, 肿瘤细胞表面呈递抗原肽无法被TCR识别, 肝癌细胞由此成功躲避T细胞攻击与杀伤, 实现免疫逃逸。此外, 应用多组学联合预测^[71], 我们发现*FGFR2*基因融合突变在不同肝癌患者间的分布存在异质性, 合成并验证了突变对应多肽(新抗原)能够被有效递呈, 并特异性激活免疫细胞。应用高通量筛选结合免疫表型分析(immunophenotyping)技术, 进一步解析肝癌抗原呈递机制及免疫响应, 将极大促进我们对时空异质性形成和演化的理解。靶向抗原性的治疗策略, 也将为肝癌治疗提供新思路。

2.5.2 趋化因子时空调控 除了抗原呈递异常外, 趋化因子介导的肿瘤-免疫互作也是肿瘤免疫抑制的又一重要机制。趋化因子与趋化因子受体相互作用

用, 将特定的免疫细胞亚型招募到肿瘤微环境局部, 导致多样的微环境表型和治疗响应^[72]。在肝癌微环境中, 我们研究发现: (1) 肝癌细胞CCL15高表达, 趋化局部CCR1⁺免疫细胞聚集, 微环境中的CCR1⁺CD14⁺单核细胞显著上调免疫抑制相关基因^[67]; (2) 通过分泌CXCL5、IL-8、IL-17等, 肝癌细胞将肿瘤相关中性粒细胞(tumor associated neutrophil, TAN)招募到肿瘤局部, 在肝癌微环境中TAN分化为N2亚型^[68-69]。微环境通过调控趋化因子, 招募多种抑制性免疫细胞, 共同参与构建抑制性微环境, 促进肝癌发生发展。利用高通量测序结合空间分析技术, 解析微环境多种趋化因子和免疫细胞亚型空间分布特征, 将为全面理解微环境中免疫细胞迁移和区域免疫功能带来新突破。针对不同患者的微环境趋化因子特点, 联合靶向特定的趋化因子/趋化因子网络(chemokine networks), 预期能够增敏现有的肿瘤治疗方案, 特别是调控微环境的免疫治疗。

2.5.3 免疫代谢时空调控 代谢是微环境中所有细胞生存和发挥功能的关键因素。相比于趋化因子、抗原呈递, 微环境代谢的时空变化更为迅速, 且高度复杂^[73]。肿瘤细胞和免疫细胞共享基础代谢, 但两者之间代谢也存在差异, 即代谢异质性(metabolic heterogeneity)。深入解析微环境中不同细胞的代谢异质性, 特别是免疫细胞的代谢特征, 将为选择性调控微环境中免疫细胞功能, 进而增强抗肿瘤免疫反应提供新思路。

肝脏是人体的“代谢工厂”, 肝癌中也存在多项肝脏特异性代谢通路改变。我们已知, 肿瘤代谢是肝癌区别于其他肿瘤的重要特征之一^[20], 但免疫代谢在肝癌中的作用尚未被阐明。在转移性肝癌中^[38], 我们初步揭示了免疫代谢对于微环境的时空调控: (1) 肝转移灶抑制性的MRC1⁺巨噬细胞高表达代谢相关基因, 富集众多代谢相关通路, 提示该群细胞在肝转移灶中发生代谢重编程; (2) 转移灶和原发灶相比, MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞代谢活性(以氨基酸代谢为特征)显著增高; 化疗敏感和耐药样本相比, 巨噬细胞代谢通路差异巨大, 提示免疫细胞代谢存在时空异质性; (3) 转移灶MRC1⁺CCL18⁺巨噬细胞同时上调IL4I1、MIF等巨噬细胞功能分子, 提示免疫代谢时空异质性与免疫功能时空异质性存在平行关系。最近一项研究应用FDG探针检测微环境中的代谢物^[74], 证实肿瘤细胞和免疫细胞间存在营养分配

(nutrient partitioning)现象: 癌细胞选择性摄取谷氨酰胺和脂肪酸, 免疫细胞选择性摄取葡萄糖, 形成了分明的代谢生态位(metabolic niche)。如能利用高维单细胞技术结合代谢组学, 揭示微环境免疫代谢通路及代谢物的异质性, 将有助于开发全新的生物学标志物用于临床检测, 联合增强微环境免疫代谢或进一步提升免疫治疗疗效。

3 基于时空异质性的个体化免疫治疗

微环境时空异质性参与到肿瘤演化、免疫逃逸等多个环节, 与肿瘤进展和治疗抵抗密切相关。解读个体微环境时空异质性的“罗塞塔石碑”(空间异质性、时间异质性、免疫亚群的多样与可塑性、时空异质性调控机制), 用基础研究发现指导临床诊断标准和治疗方法, 有望实现个体化免疫治疗, 具有极大的临床转化价值。

针对微环境时空异质性, 我们可以从诊断和治疗两方面, 设计免疫治疗综合策略(图2), 主要思路包括: 筛选新型生物标志物(biomarker), 建立综合免疫分型(classification); 联合免疫治疗增敏(immunotherapy sensitization), 设计肿瘤新抗原疫苗(cancer neoantigen vaccine)、细胞免疫治疗(adoptive cell therapy, ACT)等。

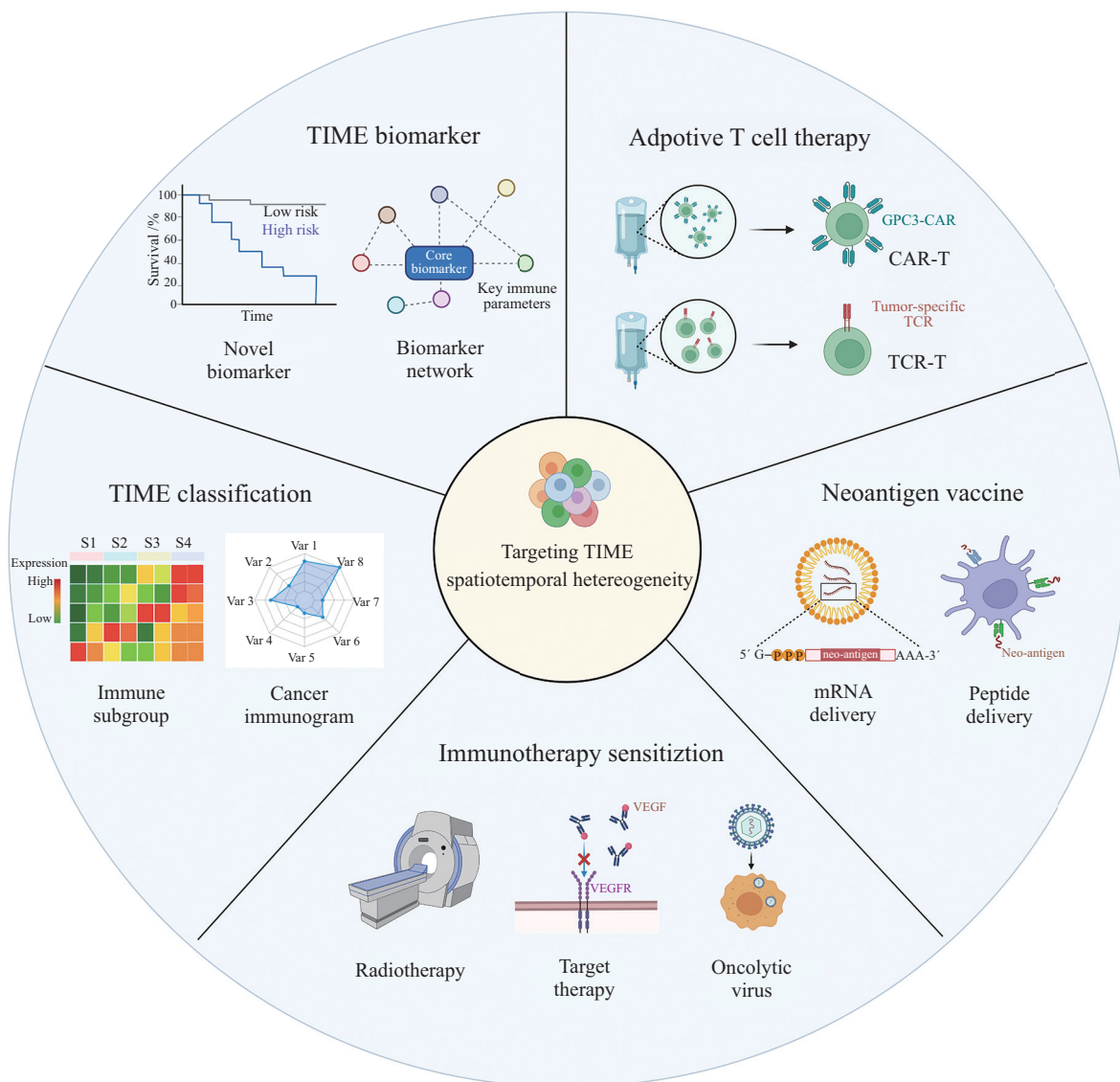
3.1 靶向微环境时空异质性——个体化诊断

3.1.1 生物标志物 肝癌中各类已知免疫细胞亚型空间异质性与其抗肿瘤/促肿瘤作用已有系统性回顾^[29], 如: 肿瘤边缘区的CD20⁺B细胞是抗肿瘤的, 是预后良好的生物标志物; 而肿瘤内部的MAIT细胞是促肿瘤的, 是预后不良的标志物。然而, 以单一免疫细胞作为预后标志物, 过度简化了肿瘤与微环境间、微环境中多种细胞类型间复杂的时空互作, 甚至会得到互相矛盾的结论。未来, 一方面要以微环境中各种细胞亚型为单位, 细分免疫细胞亚群的表型和功能; 另一方面要从时空异质性出发, 揭示某一时间点、特定区域内不同免疫细胞类型组合共定位背后的生物学意义及相关临床特征, 鉴定关键免疫参数(key immune parameters), 构建基于微环境的生物标志物网络模型(biomarker network), 预计将进一步提升临床预后和疗效预测效能。

3.1.2 综合免疫分型 CNLC^[75-76]、BCLC^[77]、以及TNM^[78]是我国肝癌治疗指南推荐的分期方案^[79]; 但临床上经常观察到, 处于同一分期的患者会出现

截然不同的临床结局。依据肿瘤细胞的突变谱,可以将肝癌分为增殖型(proliferation class)和非增殖型(non-proliferation class)两大类^[80],但这样“二分法”的结果对于临床特征差异和治疗响应的解释性也不强。肿瘤和微环境的复杂互作产生时空异质性,是导致以肿瘤细胞为中心(tumor-cell-centric)分型效果不佳的主要原因。2011年首次提出的Immunoscore评分:基于病理切片中CD3⁺T细胞和CD8⁺T细胞密度和空间位置,将结直肠癌患者分为Immunoscore0至Immunoscore4五型,在I-III期结直肠癌患者中,较

TNM分期能更好地预测患者预后^[81-82]。由此,研究者进一步基于TNM分期,提出TNM免疫(TNM-immune, TNM-I)分期^[83]。2017年发表的泛癌免疫分析^[84]揭示了肝癌微环境主导的特点:炎症环境(inflammatory)和淋巴细胞耗竭(lymphocyte depleted),Immunoscore评分在肝癌中应用有限,肝癌免疫分型研究资料也相对其他肿瘤缺乏^[85]。根据最新肝癌免疫分型^[86],约35%为浸润型(inflamed class),其中约15%免疫活化型(active),约7%免疫耗竭型(exhausted),约13%类免疫反应型(immune-like);约65%的患



靶向微环境时空异质性设计免疫治疗综合策略的主要思路包括:筛选新型生物标志物、建立综合免疫分型、联合免疫治疗增敏、设计肿瘤新抗原疫苗以及应用细胞免疫治疗。

Personalized immunotherapy approaches based on TIME heterogeneity of liver cancer will be prompted by advances in novel TIME biomarker discovery, integrative immune classification, combined treatment for immunotherapy sensitization, cancer neoantigen vaccine, and adoptive T cell therapy.

图2 靶向肝癌微环境时空异质性的个体化免疫治疗

Fig.2 Targeting TIME spatiotemporal heterogeneity of liver cancer for personalized immunotherapy

者为非浸润型(non-inflamed class), 其中约45%中等浸润型(intermediate), 约20%免疫排斥型(excluded), 不同分型对应着不同的浸润特征、转录组特征和基因组特征。

与上述单一因素分型不同, 我们从微环境和肿瘤两个角度, 基于多组学提出三分型^[20]: 其中一型以微环境失调为特征(S-Me), 而另外两型分别以肿瘤增殖(S-Pf)和肿瘤代谢(S-Mb)为特征, 其分型预测效果显著优于TNM分期。后续, 我们整合微环境免疫浸润和肿瘤免疫编辑, 提出了肝癌“肿瘤-微环境”整合预后模型^[25], 将肝癌分为高免疫逃逸组(high evasion group)和低免疫逃逸组(low evasion group), 并在多发肝癌队列和TCGA队列中验证了该分型的预后价值。未来, 通过整合多组学分析, 解析分子、基因、蛋白多水平特征和特定微环境亚型的对应关系, 纳入肿瘤和微环境两方面、多因素考量, 建立个体化的综合肿瘤-免疫图表(cancer immunogram)^[87], 将为定制治疗方案的设计提供重要参考。

3.2 靶向微环境时空异质性——个体化治疗

3.2.1 免疫检查点抑制剂的联合增敏策略 在肝癌中, 目前免疫检查点抑制剂单药(monotherapy) III期临床试验报道的客观缓解率均不足20.0%(Checkmate459研究^[88]为15.0%, KEYNOTE-240研究^[89]为18.3%), 而联合抗血管生成和免疫治疗^[13-14]显著提升了治疗疗效。这一临床现象提示, 施予免疫治疗靶向免疫细胞的同时, 调节微环境中的其余要素, 能够实现治疗增敏(immunotherapy sensitization), 使患者进一步获益。

肿瘤高度异质性塑造了以耗竭、免疫抑制、纤维化为特点的微环境, 免疫效应细胞难以浸润到肿瘤局部发挥作用是一个关键问题。一方面, 从微环境出发, 促进血管正常化^[90], 改善局部氧供、血供、营养物质在肿瘤和微环境细胞中的分配; 另一方面, 从肿瘤出发, 促进肿瘤抗原呈递^[70], 通过诱导肿瘤细胞免疫源性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)^[91], 局部肿瘤抗原、细胞因子等大量释放, 将促进免疫细胞迁移并浸润到肿瘤局部, 激活抗肿瘤免疫反应。这两方面相辅相成, 促进免疫细胞迁移并浸润到肿瘤局部与肿瘤细胞竞争生存, 激活抗肿瘤免疫反应。目前代表性的联用治疗策略包括: 以抗血管生成治疗^[92]为主的靶向治疗(单独联用抗血管生成药物或联用多激酶抑制剂^[93])、放射治疗(radiotherapy)^[94]以

及溶瘤病毒(oncolytic viruses)^[95]等。未来, 有望发现更多潜在的综合治疗靶标, 开发新的联合免疫治疗组合(synergetic therapy)。

3.2.2 肿瘤新抗原疫苗 除了免疫检查点治疗和细胞治疗外, 通过原位递送肿瘤新抗原疫苗, 也能增强抗肿瘤免疫应答反应^[96]。免疫系统能够识别肿瘤突变产生的新抗原, 进而启动特异性的攻击和杀伤。2017年首次报道个体化新抗原疫苗NeoVax对微环境的激活作用及其临床有效性^[97]。2021年跟踪报道NeoVax诱导的T细胞效应在治疗后4年内仍然持续存在, 新抗原特异性T细胞克隆多样性也有所增加^[98]。将新抗原(及新抗原组合)递送到肿瘤原位, 能够重启肿瘤免疫时空周期, 促进T细胞迁移到肿瘤原位, 起始后续一系列的抗肿瘤免疫效应^[96]。由于肝癌高度异质性, 靶向单一突变克隆开发疫苗可能导致其他突变克隆激增^[5,26], 大概率会导致治疗失败; 而同时靶向多个突变的组合新抗原疫苗或将有效降低治疗耐药和免疫逃逸, 并有望最终消灭肿瘤。通过大队列蛋白基因组学研究, 我们初步揭示了中国肝癌患者队列的总体抗原谱特征^[20]。未来, 优化新抗原预测算法鉴定抗原谱中的肿瘤特异性突变(tumor-specific mutation), 结合TCR克隆群分析、单细胞测序技术、液体活检技术对环境进行高分辨率微环境分析, 设计个体化新抗原组合疫苗, 同时联合免疫检查点疗法逆转抑制性微环境, 将有望实现对个体肿瘤的长期、有效控制。

3.2.3 细胞免疫治疗 与疫苗作用机制类似, 细胞免疫治疗也通过靶向特定的TNA杀伤肿瘤^[99]: 通过测序鉴定肿瘤中的TNA抗原谱, 从TNA谱中预测、选择部分TNA用于编辑和筛选患者来源的T细胞(patient derived T cell), 构建为工程化细胞回输入患者体内, 激活抗肿瘤免疫反应。微环境时空异质性给细胞免疫治疗抛出了难题: 随着肿瘤进化, TNA谱也会发生动态变化, 部分TNA丢失, 导致工程化T细胞无法靶向肿瘤, 出现治疗耐药。一种思路是, 靶向主克隆突变产生的TNA(突变对于肿瘤存活和进展是必要的), 但部分肿瘤由于高度异质性(如肝癌)主克隆TNA并不在肿瘤细胞上广泛表达, 应用细胞免疫治疗反而作为筛选压力, 促进其他突变克隆的免疫逃逸, 目前在肝癌中尚未有治疗报道。另一种思路是, 靶向肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)进行设计, 一般认为TAA在肿瘤细胞中表达

比例较高,但TAA和TNA相比,其对于抗肿瘤免疫的激活作用逊色不少。目前肝癌中在研(尚未进入II期临床试验)的包括:靶向AFP的TCR-T^[100],靶向CD133^[101]或GPC3^[102]的CAR-T,仅观察到初步有效性。目前,细胞免疫治疗在各类实体瘤疗效尚不理想,且治疗风险较高,诱导包括正常组织非特异性损伤、细胞因子风暴(cytokine-release syndrome)及免疫相关神经毒性(immunological neurotoxicity)等^[103]严重不良反应。总体而言,实体瘤的个体化细胞免疫治疗目前面临诸多挑战,联合多种其他免疫治疗方法并对时空异质性进行深入解析,或许能够为细胞治疗设计提供新思路。

4 总结与展望

肿瘤与微环境共同组成肿瘤微生态,这是一个高度复杂、不可拆分的整体。肿瘤与微环境互作是一个动态的过程,产生微环境时空异质性。微环境时空异质性对解释临床现象、指导临床诊疗具有重要意义。得益于研究工具的进展,目前已有针对微环境异质性和时空演化的初步探索,但是这一领域仍是方兴未艾。“时空分子医学”理念^[104]为微环境时空异质性研究提供了重要框架:整合组学数据与影像和病理资料进行多模态分析^[105],或将进一步发现分子证据与临床表型之间的联系。

我们认为,以微环境时空异质性为核心,以临床问题为导向,以系统生物学为框架,合理运用新方法、新技术,在患者样本和实验模型中,多组学、多层次深入理解微环境时空异质性的变化,解析免疫亚群的异质性和可塑性,阐明微环境与肿瘤互作调控微环境的机制,建立个体化免疫治疗新策略,将为基础研究成果向临床应用转化带来新视角与新突破!

参考文献 (References)

- [1] LIN D C, MAYAKONDA A, DINH H Q, et al. Genomic and epigenomic heterogeneity of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2255-65.
- [2] JAMAL-HANJANI M, WILSON G A, MCGRANAHAN N, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(22): 2109-21.
- [3] LI S, GARRETT-BAKELMAN F E, CHUNG S S, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia [J]. *Nat Med*, 2016, 22(7): 792-9.
- [4] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 613-28.
- [5] DAGOGO-JACK I, SHAW A T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(2): 81-94.
- [6] GILLIES R J, VERDUZCO D, GATENBY R A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(7): 487-93.
- [7] JUNTILLA M R, DE SAUVAGE F J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 346-54.
- [8] SOLOMON B J, MOK T, KIM D W, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23): 2167-77.
- [9] HYMAN D M, PUZANOV I, SUBBIAH V, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(8): 726-36.
- [10] WEINSTEIN I B. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer [J]. *Science*, 2002, 297(5578): 63-4.
- [11] KUDO M, FINN R S, QIN S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163-73.
- [12] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-90.
- [13] FINN R S, QIN S, IKEDA M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-905.
- [14] 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): 977-90.
- [15] ZHU X D, HUANG C, SHEN Y H, et al. Downstaging and resection of initially unresectable hepatocellular carcinoma with tyrosine kinase inhibitor and anti-PD-1 antibody combinations [J]. *Liver Cancer*, 2021, 10(4): 320-9.
- [16] BEN-MOSHE S, ITZKOVITZ S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(7): 395-410.
- [17] DROIN C, KHOLTEI J E, BAHAR HALPERN K, et al. Space-time logic of liver gene expression at sub-lobular scale [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(1): 43-58.
- [18] KHATIB S, POMYEN Y, DANG H, et al. Understanding the cause and consequence of tumor heterogeneity [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(4): 267-71.
- [19] MA L, HERNANDEZ M O, ZHAO Y, et al. Tumor cell biodiversity drives microenvironmental reprogramming in liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(4): 418-30.e6.
- [20] GAO Q, ZHU H, DONG L, et al. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2019, 179(5): 1240.
- [21] REBOUSSOU S, NAULT J C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 215-29.
- [22] XU J, LIANG X, CAI X. A ring in the liver [J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116(1): 220-2.

- [23] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(3): 139-52.
- [24] GAO Q, WANG X Y, ZHOU J, et al. Multiple carcinogenesis contributes to the heterogeneity of HCC [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(1): 13.
- [25] DONG L Q, PENG L H, MA L J, et al. Heterogeneous immunogenomic features and distinct escape mechanisms in multifocal hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(5): 896-908.
- [26] DONG L Q, SHI Y, MA L J, et al. Spatial and temporal clonal evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(1): 89-98.
- [27] DUAN M, HAO J, CUI S, et al. Diverse modes of clonal evolution in HBV-related hepatocellular carcinoma revealed by single-cell genome sequencing [J]. *Cell Res*, 2018, 28(3): 359-73.
- [28] GAO Q, WANG Z C, DUAN M, et al. Cell culture system for analysis of genetic heterogeneity within hepatocellular carcinomas and response to pharmacologic agents [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 232-42, e4.
- [29] HOU J, ZHANG H, SUN B, et al. The immunobiology of hepatocellular carcinoma in humans and mice: basic concepts and therapeutic implications [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 167-82.
- [30] LI J, BYRNE K T, YAN F, et al. Tumor cell-intrinsic factors underlie heterogeneity of immune cell infiltration and response to immunotherapy [J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 178-93, e7.
- [31] JANISZEWSKA M, TABASSUM D P, CASTANO Z, et al. Subclonal cooperation drives metastasis by modulating local and systemic immune microenvironments [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(7): 879-88.
- [32] XIE D, SUN Q, WANG X, et al. Immune checkpoint inhibitor plus tyrosine kinase inhibitor for unresectable hepatocellular carcinoma in the real world [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 652.
- [33] MITTAL D, GUBIN M M, SCHREIBER R D, et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape [J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 27: 16-25.
- [34] MCGRANAHAN N, ROSENTHAL R, HILEY C T, et al. Allele-specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution [J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1259-71, e11.
- [35] ROSENTHAL R, CADIEUX E L, SALGADO R, et al. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution [J]. *Nature*, 2019, 567(7749): 479-85.
- [36] ZHANG A W, MCPHERSON A, MILNE K, et al. Interfaces of malignant and immunologic clonal dynamics in ovarian cancer [J]. *Cell*, 2018, 173(7): 1755-69, e22.
- [37] JIMÉNEZ-SÁNCHEZ A, MEMON D, POURPE S, et al. Heterogeneous tumor-immune microenvironments among differentially growing metastases in an ovarian cancer patient [J]. *Cell*, 2017, 170(5): 927-38, e20.
- [38] WU Y, YANG S, MA J, et al. Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 134-53.
- [39] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218.
- [40] CHEN D S, MELLMAN I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 321-30.
- [41] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle [J]. *Immunity*, 2013, 39(1): 1-10.
- [42] VITALE I, SHEMA E, LOI S, et al. Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2021, 27(2): 212-24.
- [43] DAVIS-MARCISAK E F, DESHPANDE A, STEIN-O'BRIEN G L, et al. From bench to bedside: single-cell analysis for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(8): 1062-80.
- [44] REN X, KANG B, ZHANG Z. Understanding tumor ecosystems by single-cell sequencing: promises and limitations [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 211.
- [45] WU Y, CHENG Y, WANG X, et al. Spatial omics: navigating to the golden era of cancer research [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(1): e696.
- [46] LIM C J, LEE Y H, PAN L, et al. Multidimensional analyses reveal distinct immune microenvironment in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2019, 68(5): 916-27.
- [47] SHENG J, ZHANG J, WANG L, et al. Topological analysis of hepatocellular carcinoma tumour microenvironment based on imaging mass cytometry reveals cellular neighbourhood regulated reversely by macrophages with different ontogeny [J]. *Gut*, 2021, doi: 10.1136/gutjnl-2021-324339.
- [48] WANG X, ZHOU R, XIONG Y, et al. Sequential fate-switches in stem-like cells drive the tumorigenic trajectory from human neural stem cells to malignant glioma [J]. *Cell Res*, 2021, 31(6): 684-702.
- [49] QUINN J J, JONES M G, OKIMOTO R A, et al. Single-cell lineages reveal the rates, routes, and drivers of metastasis in cancer xenografts [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabc1944.
- [50] AALIPOUR A, CHUANG H Y, MURTY S, et al. Engineered immune cells as highly sensitive cancer diagnostics [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(5): 531-9.
- [51] JIN H, SHI Y, LÜ Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib [J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 730-4.
- [52] HILL W, CASWELL D R, SWANTON C. Capturing cancer evolution using genetically engineered mouse models (GEMMs) [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(12): 1007-18.
- [53] DING G Y, MA J Q, YUN J P, et al. Distribution and density of tertiary lymphoid structures predict clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2021, 76(3): 608-18.
- [54] SHI J Y, WANG X, DING G Y, et al. Exploring prognostic indicators in the pathological images of hepatocellular carcinoma based on deep learning [J]. *Gut*, 2021, 70(5): 951-61.
- [55] SONG G, SHI Y, ZHANG M, et al. Global immune characterization of HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma identifies macrophage and T-cell subsets associated with disease progression [J]. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 90.
- [56] SUN Y, WU L, ZHONG Y, et al. Single-cell landscape of the ecosystem in early-relapse hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2021, 184(2): 404-21, e16.
- [57] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy [J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 541-50.
- [58] SHI J Y, GAO Q, WANG Z C, et al. Margin-infiltrating CD20⁺ B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(21): 5994-6005.

- [59] CALDERARO J, PETITPREZ F, BECHT E, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 58-65.
- [60] ZHANG Q, HE Y, LUO N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2019, 179(4): 829-45, e20.
- [61] GAO Q, QIU S J, FAN J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(18): 2586-93.
- [62] ZHANG Z, MA L, GOSWAMI S, et al. Landscape of infiltrating B cells and their clinical significance in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(4): e1571388.
- [63] DUAN M, GOSWAMI S, SHI J Y, et al. Activated and exhausted MAIT cells foster disease progression and indicate poor outcome in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(11): 3304-16.
- [64] MA J, ZHENG B, GOSWAMI S, et al. PD1^{hi} CD8⁺ T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 331.
- [65] FINKIN S, YUAN D, STEIN I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(12): 1235-44.
- [66] ZHENG C, ZHENG L, YOO J K, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1342-56, e16.
- [67] LIU L Z, ZHANG Z, ZHENG B H, et al. CCL15 recruits suppressive monocytes to facilitate immune escape and disease progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 143-59.
- [68] GAO Q, ZHAO Y J, WANG X Y, et al. CXCR6 upregulation contributes to a proinflammatory tumor microenvironment that drives metastasis and poor patient outcomes in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(14): 3546-56.
- [69] ZHOU S L, DAI Z, ZHOU Z J, et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2242-54.
- [70] JHUNJHUNWALA S, HAMMER C, DELAMARRE L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(5): 298-312.
- [71] DONG L, LU D, CHEN R, et al. Proteogenomic characterization identifies clinically relevant subgroups of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2021, 40(1): 70-87, e15.
- [72] NAGARSHETH N, WICHA M S, ZOU W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 559-72.
- [73] LEONE R D, POWELL J D. Metabolism of immune cells in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(9): 516-31.
- [74] REINFELD B I, MADDEN M Z, WOLF M M, et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2021, 593(7858): 282-8.
- [75] ZHOU J, SUN HC, WANG Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2017 edition) [J]. *Liver Cancer*, 2018, 7(3): 235-60.
- [76] XIE D Y, REN Z G, ZHOU J, et al. 2019 Chinese clinical guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: updates and insights [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2020, 9(4): 452-63.
- [77] LLOVET J M, BRÚ C, BRUIX J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification [J]. *Semin Liver Dis*, 1999, 19(3): 329-38.
- [78] AMIN M B, GREENE F L, EDGE S B, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(2): 93-9.
- [79] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 临床肝胆病杂志(General Office of National Health Commission. Standard for diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition) [J]. *J Clin Hepatol*), 2022, 38(2): 288-303.
- [80] CHIANG D Y, VILLANUEVA A, HOSHIDA Y, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6779-88.
- [81] MLECNIK B, TOSOLINI M, KIRILOVSKY A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(6): 610-8.
- [82] PAGÈS F, MLECNIK B, MARLIOT F, et al. International validation of the consensus immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study [J]. *Lancet*, 2018, 391(10135): 2128-39.
- [83] MLECNIK B, BIFULCO C, MARLIOT F, et al. O-17 A TNM-Immune (TNM-I) classification staging system for predicting survival in colon cancer in a multicenter international SITC study [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31: 238.
- [84] THORSSON V, GIBBS D L, BROWN S D, et al. The immune landscape of cancer [J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 812-30, e14.
- [85] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [86] LLOVET J M, CASTET F, HEIKENWALDER M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 19(3): 151-72.
- [87] BLANK C U, HAANEN J B, RIBAS A, et al. The "cancer immunogram" [J]. *Science*, 2016, 352(6286): 658-60.
- [88] YAU T, PARK J W, FINN R S, et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 23(1): 77-90.
- [89] FINN R S, RYOO B Y, MERLE P, et al. Pembrolizumab as second-Line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma in KEYNOTE-240: a randomized, double-blind, phase III trial [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(3): 193-202.
- [90] SANMAMED M F, CHEN L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization [J]. *Cell*, 2018, 175(2): 313-26.
- [91] GALLUZZI L, VITALE I, WARREN S, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000337.
- [92] HUIJINEN Z R, HUIJIBERS E J M, VAN BEIJNUM J R, et al. Anti-angiogenic agents-overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(8): 527-40.
- [93] TORRENS L, MONTIRONI C, PUIGVEHÍ M, et al. Immunomodulatory effects of lenvatinib plus anti-programmed cell death protein 1 in mice and rationale for patient enrichment in hepato-

- cellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 74(5): 2652-69.
- [94] MCLAUGHLIN M, PATIN E C, PEDERSEN M, et al. Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(4): 203-17.
- [95] BOMMAREDDY P K, SHETTIGAR M, KAUFMAN H L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(8): 498-513.
- [96] SAHIN U, TÜRECI Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1355-60.
- [97] OTT P A, HU Z, KESKIN D B, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 217-21.
- [98] HU Z, LEET D E, ALLESØE R L, et al. Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma [J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 515-25.
- [99] YAMAMOTO T N, KISHTON R J, RESTIFO N P. Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors [J]. *Nat Med*, 2019, 25(10): 1488-99.
- [100] ZHU W, PENG Y, WANG L, et al. Identification of α -fetoprotein-specific T-cell receptors for hepatocellular carcinoma immunotherapy [J]. *Hepatology*, 2018, 68(2): 574-89.
- [101] DAI H, TONG C, SHI D, et al. Efficacy and biomarker analysis of CD133-directed CAR T cells in advanced hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase II trial [J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1846926.
- [102] SHI D, SHI Y, KASEB A O, et al. Chimeric antigen receptor-glypican-3 T-cell therapy for advanced hepatocellular carcinoma: results of phase I trials [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15): 3979-89.
- [103] WEBER E W, MAUS M V, MACKALL C L. The emerging landscape of immune cell therapies [J]. *Cell*, 2020, 181(1): 46-62.
- [104] WANG X, FAN J. Spatiotemporal molecular medicine: a new era of clinical and translational medicine [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(1): e294.
- [105] WANG X, FAN J. Spatiotemporal molecular imaging is a critical part of spatiotemporal molecular medicine [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(3): e347.