

基于单细胞 RNA 测序的接触性皮炎免疫微环境特征分析

刘培¹, 邓羽¹, 单霄², 程超^{1*}

1. 江苏师范大学生命科学与食品工程学院, 徐州; 2. 徐州市中医院皮肤科, 徐州

摘要 | 本研究利用单细胞转录组测序技术解析接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 皮损的免疫微环境特征。从 Gene Expression Omnibus (GEO) 获取 GSE267929 数据集 (9 例 ACD、12 例健康对照, 45,942 个细胞), 采用 Seurat v5 完成质控、降维聚类与细胞注释, 并结合 GSEA 通路富集、转录因子预测、配受体共表达与 CellChat 通讯分析及复合基因评分刻画候选调控网络。结果显示: 共注释 14 种细胞类型; 以各样本内比例为单位、组间采用 Wilcoxon 秩和检验, ACD 皮损中活化 T 细胞 (5.77%→40.27%)、增殖 T 细胞与应激角质形成细胞比例显著增加, Th2 细胞比例显著降低 (39.00%→7.12%) (均 $P < 0.05$); IFN- γ / α 反应、蛋白酶体及抗原加工呈递通路显著富集, 巨噬细胞中提示 NF- κ B-STAT-IRF 候选调控网络。配受体分析显示 IL-1、TNF 等轴在对照组更强、CD40LG-CD40 两组接近, CXCL9-CXCR3 为 ACD 组独有; 复合评分筛选出 CD40、CXCL9 等候选核心基因。结论: ACD 皮损以 Th1 型免疫活化、角质形成细胞应激及 CD40 等共刺激/抗原呈递分子上调为特征; 上述结果均为转录本层面的计算线索, 可为认识 ACD 免疫病理并筛选候选干预分子提供参考, 尚不能据此确立因果机制或治疗靶点。

关键词 | 接触性皮炎; 单细胞 RNA 测序; 免疫微环境; T 细胞; 角质形成细胞

Copyright © 2026 by the author(s).

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



1 引言

接触性皮炎是皮肤科门诊最常见的疾病之一, 也是最常见的职业与环境相关性皮肤病^[1]; 接触性皮

炎 (含刺激性与变应性两类) 约占所有职业性皮肤病的 90%~95%, 其中 ACD 约占职业性接触性皮炎的 20%~25%, 在一般人群中接触性致敏亦相当普遍^[1,3]。临床上将接触性皮炎分为刺激性接触性皮炎 (Irritant contact dermatitis, ICD) 和变应性接触

基金项目: National Natural Science Foundation of China (81703523)、Funded by Basic Research Program of Jiangsu (BK2017 0244)、Open Fund of Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources (TCMRPSU-2022-11)

作者简介: 刘培, 江苏师范大学生命科学与食品工程学院, 本科生, 主要从事炎症性皮肤病单细胞转录组方向研究; 程超, 江苏师范大学生命科学与食品工程学院副教授, 主要从事生理学与药理学方向研究。

文章引用: 刘培, 邓羽, 单霄, 程超. 基于单细胞 RNA 测序的接触性皮炎免疫微环境特征分析[J]. 医学健康与临床实践, 2026, 1 (2): 78-91.

<https://doi.org/10.68070/n1kv7s88>

性皮炎 (Allergic contact dermatitis, ACD)。ACD 是由接触过敏原后 T 细胞介导的 IV 型超敏反应性皮肤病, 其发病涉及先天免疫和适应性免疫的复杂交互^[2,3,4]。ACD 常反复发作、瘙痒明显, 可造成误工并显著影响生活质量; 其诊断依赖斑贴试验, 治疗以规避致敏原和外用糖皮质激素等对症处理为主, 长期用药安全性受限, 且缺乏安全、有效的靶向干预手段, 临床需求仍未得到充分满足。

皮肤本身是由角质形成细胞、朗格汉斯细胞与真皮树突细胞、T 细胞、巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞等共同构成的复杂免疫微环境。角质形成细胞既是物理屏障, 也是重要的固有免疫效应细胞, 在接触半抗原或受到损伤时可释放 IL-1、TNF- α 、IL-36、胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 以及 CCL17、CCL22 等警报素和趋化因子; 朗格汉斯细胞与真皮树突细胞摄取、处理抗原后迁移至引流淋巴结, 激活初始 T 细胞并促使其向 Th1、Th17 等效应亚群分化; 效应与记忆 T 细胞再循环进入皮损, 与巨噬细胞等髓系细胞协同放大炎症。在 ACD 的致敏与激发阶段, 上述细胞的组成、活化状态及彼此间的配受体通讯会发生动态重塑^[2,3,4], 且这种重塑具有明显的细胞类型与亚群特异性, 仅在组织整体水平难以分辨。在单细胞分辨率下系统刻画 ACD 皮损免疫微环境的细胞组成、功能状态与细胞间通讯, 并据此筛选候选调控分子, 有助于更精细地认识 ACD 的炎症环节。

尽管 ACD 的经典发病框架已被广泛认知, 但皮肤作为由多种细胞组成的复杂器官, 其在 ACD 发病中的细胞异质性、亚群特异性改变和细胞间调控关系仍未在单细胞分辨率下得到系统解析。传统研究方法受限于组织水平的平均化分析, 无法解析皮损内不同细胞类型的异质性和细胞间通讯网络^[5]。近年来, 单细胞转录组测序技术已在银屑病、镍过敏^[6]等炎症性皮肤病中得到应用, 为解析皮肤免疫微环境提供了新视角。

2025 年发表于 *Journal of Investigative Dermatology* 的研究利用负压水疱法采集 ACD、ICD 和健康对照的皮肤样本进行单细胞转录组测序 (GSE267929), 为解析 ACD 免疫微环境提供了宝贵数据资源^[7]。本研究假设: ACD 皮损中存在以特定免疫亚群 (如活化 T 细胞、应激角质形成细胞) 富集和髓系-T 细胞通讯重塑为核心的细胞类型特异性改变。基于该假设, 本研究利用 GSE267929 数据集中 ACD 与健康对照的 scRNA-seq 数据, 采用单细胞转录组分析、GSEA 通路富集、TRRUST 转录因子预测、配受体共表达与 CellChat 分组通讯分析及多维复合基因评分等方法, 刻画 ACD 皮损的免疫微环境特征, 并初步构建候选分子调控网络。

2 材料与方法

2.1 数据来源、研究对象与伦理声明

本研究数据来自 NCBI GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 公开的 GSE267929 数据集^[7]。该数据集并非临床就诊的 ACD 患者队列, 而是在健康成人志愿者中建立的人体实验性接触性皮炎模型: 志愿者先以半抗原方酸二丁酯 (squaric acid dibutyl ester, SADBE) 经皮肤涂抹完成致敏, 随后在同一志愿者的不同皮肤部位分别贴敷含 SADBE (诱导过敏反应)、十二烷基硫酸钠 (sodium lauryl sulfate, SLS, 诱导刺激性反应) 和丙酮载体 (阴性对照) 的斑贴, 并保留非皮损部位, 从而在同一受试者内并行诱导 ACD、ICD 与对照反应。

数据集共涉及 21 名志愿者, 包括 9 名经 SADBE 致敏并完成斑贴激发的志愿者 (编号 P1-P9, 作为 ACD 组) 和 12 名健康志愿者 (编号 CB17-CB48, 其非皮损皮肤作为对照组)。21 名志愿者中男性 9 名、女性 12 名; 其中 ACD 组男性 4 名、女性 5 名, 对照组男性 5 名、女性 7 名; 受试者均为健康成人, 原始文献按 MeSH 词表将其归入成人 (Adult) 与中年 (Middle Aged) 类别, 但未公开逐人具体年龄。斑贴与负压水疱取材部位为手臂 (ACD 组 7 名) 或腿部 (ACD 组 2 名)。需说明的是, 受试者隐私保护, 原始测序数据已提交 dbGaP, GEO 公开元数据不含志愿者的具体年龄与逐人用药信息, 故年龄范围、免疫抑制或其他系统用药情况在公开资料中未予报告, 本研究为二次分析, 亦无法据此进行校正。

SADBE 致敏的涂抹滴量 (drop volume) 为 2、3 或 8; 激发斑贴贴敷 2 天, SADBE 设 0.0001%~1.25% 的多个浓度, 丙酮载体与 SLS 斑贴同步贴敷; 除贴敷 2 天后取材的 2 天过敏反应外, 另设贴敷 2 天、休息 2 天后取材的 4 天过敏反应。过敏反应的成立, 以 SADBE 激发部位出现临床可见的湿疹样反应、并以皮损视觉评分 (Lesion_visual_score, 0~2 分) 和严重程度分级 (-、?/+、+、++) 作为判定依据, 丙酮载体部位无反应。各组皮肤均以不留瘢痕的负压水疱 (suction blister) 法取材, 离心收集组织间液中的浸润细胞。单细胞经微流控液滴法 (inDrop) 捕获, 采用 Illumina NextSeq/NovaSeq 系列测序 (GEO 平台 GPL21697; 表达数据以矩阵、条码、基因三件套格式存放)。本研究使用公开匿名数据, 无需额外伦理审批。

2.2 数据预处理与质控

使用 R 4.5.1 和 Seurat v5 包进行单细胞数据分析; 分析框架参考 Seurat 的整合分析流程^[8,9]。质控

标准：每个细胞检测基因数 200-6000，线粒体基因比例< 20%。随后进行标准化（NormalizeData）、高变基因筛选（FindVariableFeatures, nfeatures= 2000）、数据缩放（ScaleData）、PCA 降维、UMAP 可视化和聚类（FindNeighbors、FindClusters, resolution= 0.5）。

2.3 细胞类型注释与亚群细分

基于已知细胞类型标记基因进行手动注释，主要标记基因包括：基底型角质形成细胞（KRT5、KRT14、TP63）、分化型角质形成细胞（KRT1、KRT10、KRTDAP）、活化型角质形成细胞（KRT6A、KRT16、S100A7/8/9）、CD4⁺ T 细胞（CD3D、CD4）、CD8⁺ T 细胞（CD3D、CD8A）、巨噬细胞（CD68、CD163）、朗格汉斯细胞（CD207、CD1A）等。对所有 T 细胞进行亚群细分，重新进行标准化、高变基因筛选、PCA、UMAP 和聚类（resolution= 0.6）。基于 FindAllMarkers 标记基因富集方法进行自动化注释，使用 8 个亚群标记基因集（T_activated、Th2、gdT、CD8_effector、T_naive、CD8_activated、Treg、T_proliferating），富集得分= 匹配标记基因数×平均 log2FC，选择得分最高的亚群作为聚类注释。仅当最佳亚群的匹配标记基因数不少于 2 个，或其富集得分不低于次优亚群得分的 1.5 倍时，方采纳该最佳注释；否则将该聚类标记为 T_other（角质形成细胞分析中相应为 KC_other），不单独报告。对角质形成细胞进行类似的状态细分，使用 7 个状态标记基因集（KC_basal、KC_differentiating、KC_activated、KC_stress、KC_apoptotic、KC_proliferating、KC_inflammatory）。细胞类型及 T 细胞、角质形成细胞亚群的比例均以各样本内比例为分析单位，组间比较采用双侧 Wilcoxon 秩和检验（无结时采用精确检验，存在结时采用带连续性校正的正态近似）；上述比例比较属于探索性分析，报告未经多重比较校正的 P 值，相关结果作为候选线索解读。

2.4 差异表达基因与GSEA通路富集分析

全局水平的差异表达分析采用按生物学样本聚合的样本水平（pseudo-bulk）分析策略，以避免将单个细胞视为独立生物学重复所导致的假重复（pseudoreplication）：按样本来源（orig.ident）将原始计数聚合为 21 个生物学样本（9 例 ACD、12 例对照）的样本水平表达矩阵（pseudo-bulk expression profile），使用 edgeR 包构建 DGEList，经 filterByExpr 低表达过滤、TMM 标准化后，以分组为设计变量进行 glmQLFit/glmQLFTest 检验并以 BH 法校正，筛选标准为校正 P 值（FDR）<0.05 且 |平均 log2 倍数变化|>0.5。分细胞类型的差异表达分析仍使用 FindMarkers 函数（Wilcoxon 秩和检验，BH 校正），对 6 种主要细胞类型（CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞、M2 巨噬细胞、朗格汉斯

细胞、活化 KC）进行分析，其结果用于后续 GSEA 通路富集。

使用 msigdb 包获取 Hallmark（H 类，50 个基因集）^[10]和 KEGG（C2 类 CP:KEGG_LEGACY）基因集；KEGG 通路资源参考其数据库文献^[11]。使用 fgsea 包执行基因集富集分析（Gene Set Enrichment Analysis, GSEA）（nperm= 10000，minSize= 15，maxSize= 500）^[12]。以平均 log2FC 排序的基因列表作为输入，筛选 padj< 0.05 且 NES> 0 的显著富集通路。

2.5 转录因子富集与细胞通讯分析

使用 enrichR 包^[13]对接 TRRUST_Transcription_Factors_2019 数据库^[14]，对各细胞类型的显著上调基因（p_val_adj< 0.05 且 avg_log2FC> 0.25）进行转录因子富集分析，筛选 Adjusted.P.value< 0.05 的显著转录因子。基于 Top10 核心转录因子及其显著靶基因构建调控网络。

（1）配受体共表达分析：采用配受体共表达分析评估细胞间通讯，分析全程按分组独立进行并设置表达门控，以避免两组合并造成的虚假互作。基于 ACD 相关文献^[2,3,7]选取 48 对免疫相关配受体对（涵盖细胞因子、趋化因子、TNF 超家族、共刺激分子等），其中 46 对的配体与受体基因均存在于本数据表达矩阵（IL17A、IL18R1 分别因配体、受体基因未检出而排除），并对这 46 对无偏地施加后续分组门控筛选。在 ACD 组与对照组内，分别计算每一配体在其发送细胞类型、每一受体在其接收细胞类型中的平均表达（log 标准化数据）与表达细胞比例。设置表达门控：仅当配体在发送细胞、受体在接收细胞中的表达细胞比例均≥10%（min.pct=0.10）时判定该配体-受体-细胞对为可检测互作，其互作强度定义为配体与受体平均表达的乘积，否则记为 0。由此分别获得两组的互作强度矩阵，并按组比较方向与强弱。需说明，本研究配受体互作一律按配体在前、受体在后（信号发送→接收）的方向命名，如 CD40LG-CD40。

（2）CellChat 交叉验证：为交叉验证，另使用 CellChat（v2.2.0）独立建模：分别在 ACD 组与对照组内以细胞类型为分组、基于原始计数构建 CellChat 对象，采用完整人类配受体数据库 CellChatDB.human（同时包含分泌型与细胞-细胞接触型互作，以纳入 CD40LG-CD40 等接触依赖通路），依次完成过表达基因与配受体筛选、基于蛋白-蛋白互作网络的表达平滑（截断均值 truncatedMean, trim=0.1）。计算通讯概率时设 population.size=FALSE：以平均表达概率而非细胞总数加权，从而保证两组可比，并以 min.cells=10 过滤稀有互作。

（3）目标通路选择：CellChat 验证属于假设驱动的定向复核，而非对全库互作的无偏筛选。依据

前述配受体共表达结果与 ACD 炎症机制, 仅锁定 IL-1、CD40、TNF 三条目标信号轴, 并在每条通路内只保留可传导该通路经典信号的功能性配受体组合: IL-1 通路保留 IL1A、IL1B 与信号受体复合物 IL1R1+IL1RAP, 剔除无胞内信号段的诱饵受体 IL1R2 以及 IL33、IL36、IL18 等 IL-1 家族旁系配体; CD40 通路保留细胞接触型共刺激互作 CD40LG-CD40, 剔除 CD40LG 与整合素的黏附组合; TNF 通路保留 TNF 与其两个功能性受体 TNFRSF1A、TNFRSF1B, 共计 5 对配受体。分别提取这 5 对配受体在各发送-接收细胞对的通讯概率 (prob) 进行两组并列比较, 并以每个发送-接收细胞对在两组通讯概率中的逐对较大值由高到低排序、对每对配受体取前 6 个细胞对展示。该概率为确定性表达量指标, 本研究不使用其置换检验 P 值。

2.6 候选核心基因筛选 (五维复合评分)

构建五维复合评分体系筛选候选核心基因: (1) 差异基因评分 ($\text{de_score} = -\log_{10}(\text{p_val_adj}) \times |\text{avg_log2FC}|$); (2) GSEA leadingEdge 出现频率评分; (3) 转录因子靶基因调控网络 degree 评分; (4) 配受体参与评分; (5) 伪时间相关基因评分。第 (5)

维基于 T 细胞轨迹分析获得: 对 T 细胞标准化表达矩阵进行主成分分析, 取前 10 个主成分, 采用 Slingshot^[24]推断分化轨迹 (基于最小生成树与主曲线拟合, 不预设根细胞/分化起点), 获取第一条谱系的伪时间, 随后计算各高变基因表达量与伪时间的 Pearson 相关系数 (该系数可正可负), 并以其绝对值作为该维的原始取值。因取相关系数绝对值, 伪时间方向 (根的选择) 不影响该维评分。各维度归一化至 0-1 后取等权重平均值, 筛选 Top50 候选核心基因。

3 结果

3.1 ACD 皮损单细胞转录组图谱

质控后共纳入 45,942 个细胞, 聚类为 15 个簇, 注释为 14 种细胞类型 (图 1A)。主要细胞类型按细胞数排序为: 分化型角质形成细胞、基底型角质形成细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞、M2 巨噬细胞、朗格汉斯细胞、成纤维细胞、内皮细胞等。ACD 组与对照组的细胞分布存在明显差异 (图 1B)。

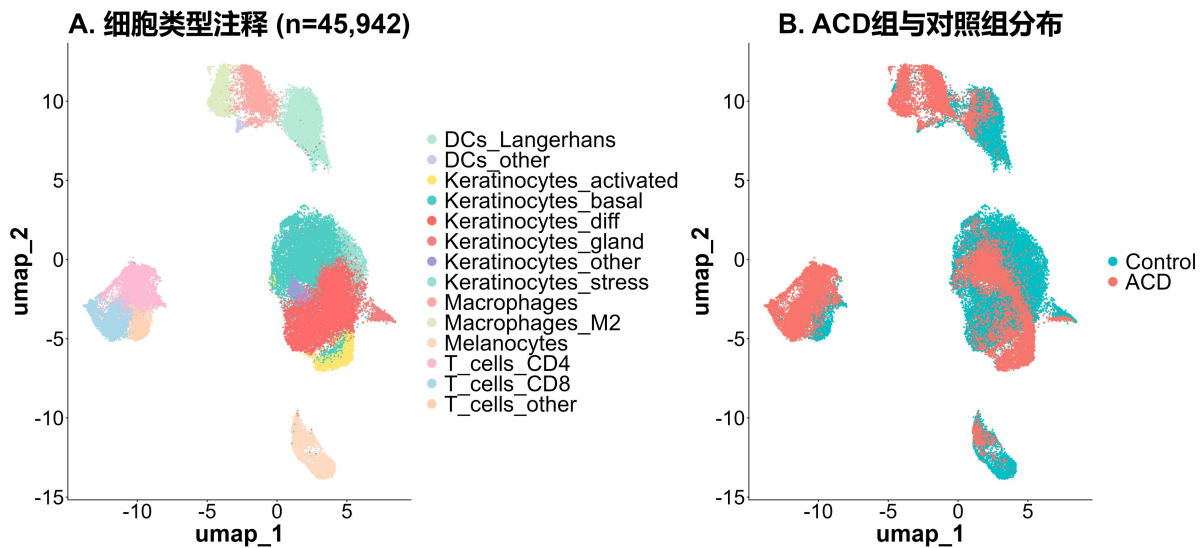


图 1 ACD 皮损单细胞转录组图谱。A: 14 种细胞类型注释 UMAP 图 (n= 45,942); B: ACD 组与对照组分布 UMAP 图

3.2 细胞类型组成差异

细胞比例分析以各样本内比例为分析单位, 正文与图中标注的各组百分比均为该组每样本比例的算术均值, 组间采用 Wilcoxon 秩和检验。结果显示 (图 2): ACD 皮损中 CD4⁺ T 细胞比例由对照组的 2.13% 显著升高至 18.23% ($P = 1.36 \times 10^{-5}$), 是浸润增加最显著的免疫细胞类型; 巨噬细胞

(2.18% → 10.62%, $P = 6.60 \times 10^{-4}$) 及 M2 型巨噬细胞 (0.34% → 11.41%, $P = 1.87 \times 10^{-4}$) 亦显著增多; CD8⁺ T 细胞比例虽呈升高趋势 (0.12% → 4.44%), 但组间差异未达统计学显著 ($P = 0.064$), 朗格汉斯细胞比例差异亦无统计学意义 (12.92% → 6.84%, $P = 0.148$); 角质形成细胞中, 活化型和应激型角质形成细胞比例显著增加, 而基底型和分化型比例降低。

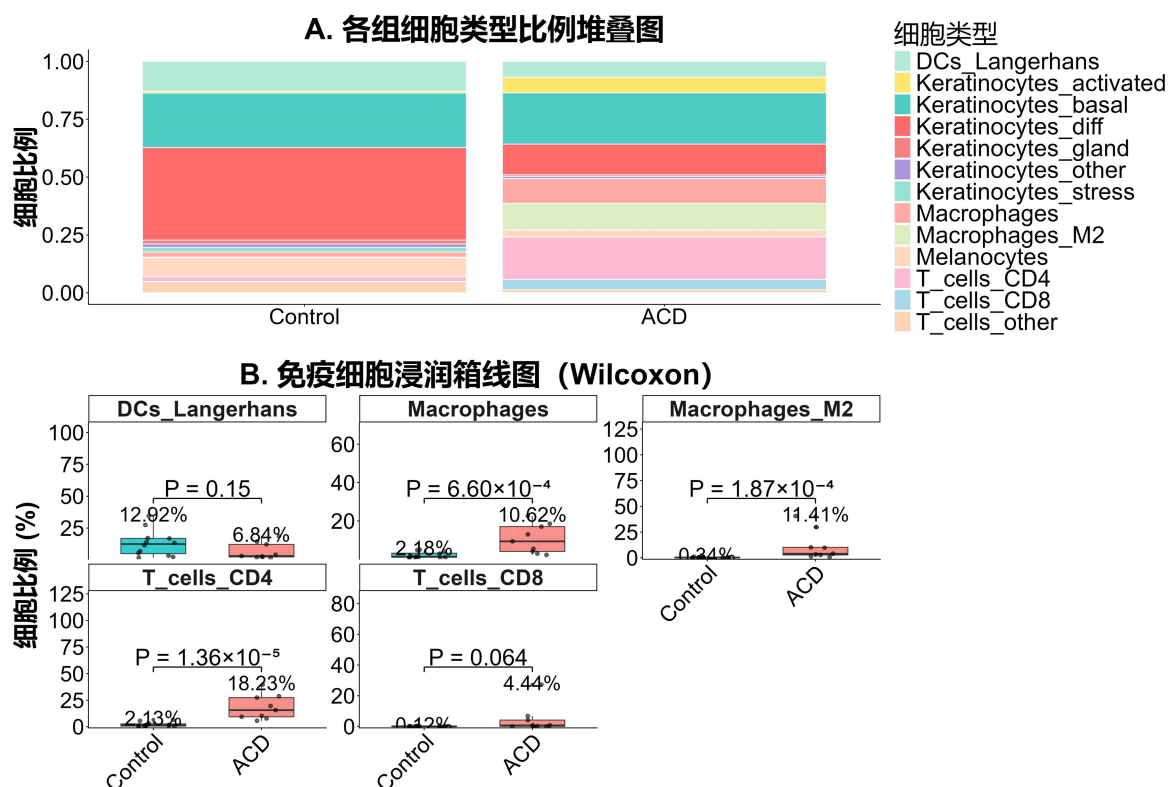


图 2 细胞类型组成差异。A: 各组细胞类型比例堆叠图; B: 免疫细胞浸润箱线图

3.3 差异表达基因分析

为避免单细胞水平差异分析的假重复问题, 全局差异表达采用 edgeR 分析。8271 个基因通过低表达过滤进入检验, 按 $FDR < 0.05$ 且|平均 $\log_2$ 倍数变化| > 0.5 共鉴定出 1329 个显著差异基因, 其中上调 681 个、下调 648 个(图 3A)。上调基因以髓系活化与细胞毒性相关分子最为突出, 包括 MMP12、GZMB、GNLY、F13A1、ITGAX、S100A8/S100A9、

IL1B 以及 Th2 趋化因子 CCL17 和共刺激分子 CD40 等, 其中 SLC34A2 上调幅度最大 ($\log_2FC=6.11$); 下调基因以黑素细胞谱系与发育相关基因为主, 如 MSX1、DPP6、OCA2、PAX3、SOX6 等, 与 ACD 皮损中黑素细胞比例下降相吻合。Top 差异基因在各细胞类型中的表达热图显示, 这些基因主要在巨噬细胞、T 细胞和活化角质形成细胞中高表达(图 3B)。

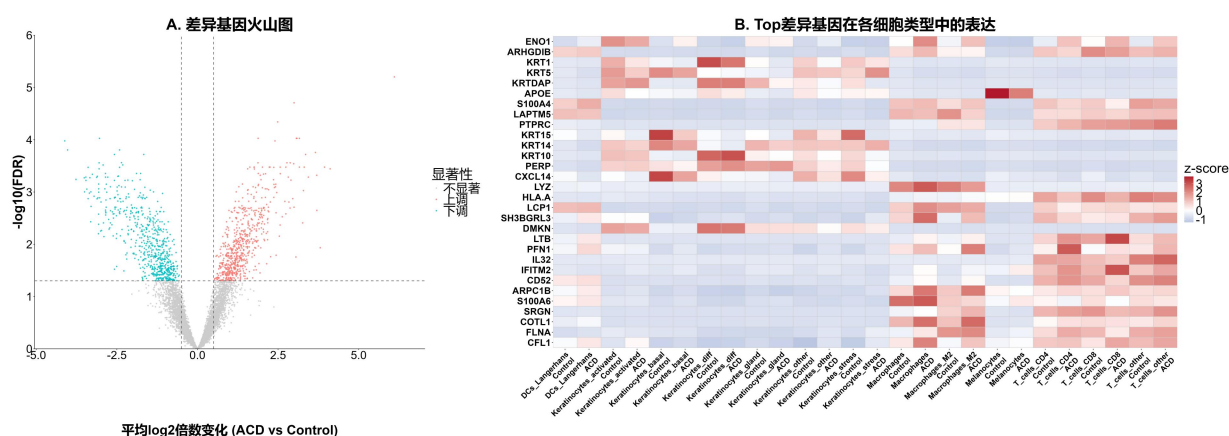


图 3 差异基因分析。A: 差异基因火山图(红色=上调, 青色=下调, 阈值 $FDR < 0.05$ 且|avg_ $\log_2FC$ | > 0.5 , 纵轴为 $-\log_{10}(FDR)$); B: Top 差异基因在各细胞类型中的表达热图

3.4 T细胞亚群特征（基于标记基因富集的自动化注释）

对所有 T 细胞进行亚群细分，共得到 10 个聚类。基于标记基因富集方法进行注释，最终鉴定出 7 个主要亚群（图 4A）：T_activated（高表达 CD69、IL2RA、HLA-DRA，活化增殖状态）、T_proliferating（高表达 MKI67、TOP2A、PCNA，增殖活跃）、Treg（高表达 FOXP3、CTLA4、IL2RA）、T_naive（高表达 CCR7、LEF1、TCF7）、Th2（高表达 GATA3、IL4、IL13、CCR4）、CD8_effector（高表达 GZMB、PRF1、NKG7）、gdT（高表达 TRDC、TRGC1）。需要说明的是，预设的 8 个亚群标记基因集中，CD8_activated 未成为任一聚类的最佳注释（仅作为 CD8_effector 等聚类的次优匹配），故最终报告 7 个主要亚群；按前述注释阈值未获可靠注释的聚类将并入 T_other，本数据集中并无聚类落入 T_other。

以各样本内 T 细胞为分母（各组百分比均为每样本比例的算术均值，下同）、组间采用 Wilcoxon 秩和检验的亚群比例分析显示，ACD 组中 T 细胞亚

群组成发生明显改变（图 4B）：T_activated 亚群比例由对照组的 5.77% 升至 ACD 组的 40.27% ($P=5.44\times 10^{-4}$)；T_proliferating 由 1.04% 升至 3.40% ($P=0.011$)；与之形成对比的是，Th2 亚群由 39.00% 降至 7.12% ($P=1.36\times 10^{-5}$)，是比例下降最显著的亚群；CD8_effector 由 18.64% 降至 4.86%，差异处于临界水平 ($P=0.050$)；gdT (9.46%→15.28%， $P=0.199$)、Treg (4.36%→7.23%， $P=0.476$) 和 T_naive (21.73%→21.85%， $P=0.917$) 比例的组间差异均无统计学意义。需特别说明的是，Th2 亚群在 T 细胞中所占比例（以 T 细胞为分母）的下降，与 3.2 中 CD4⁺ T 细胞在全部细胞中所占比例（以全部细胞为分母）的升高 (2.13%→18.23%) 方向相反。两项比较的分母与指标并不相同，故其 P 值相同（均为 1.36×10^{-5} ）并不表示同一变化；P 值相等仅因两项比较均为 9 例 ACD 对 12 例对照（共 108 个跨组配对）、样本间近乎完全分离且各仅有 1 个配对方向相反，对应的 Mann-Whitney U 统计量分别为 1 和 107，而双侧精确检验对 U 与 (108-U) 对称，因而给出相等的 P 值。

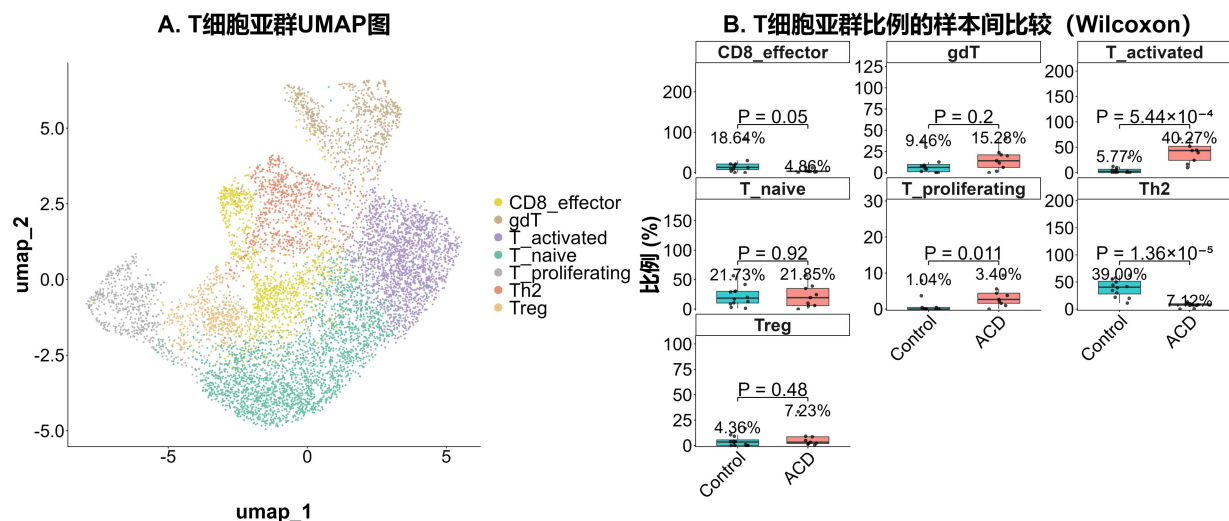


图 4 T 细胞亚群分析。

A: T 细胞亚群 UMAP 图; B: 各亚群在 ACD 组与对照组中的比例差异 (以各样本内 T 细胞比例为单位, 组间 Wilcoxon 秩和检验)

为进一步明确 Th2 反应的真实状态, 图 5 从亚群比例与分子表达两个层面加以佐证: 在样本水平, Th2 亚群占 T 细胞的相对比例由对照组的 39.00% 降至 ACD 组的 7.12% (Wilcoxon 检验, $P=1.36\times 10^{-5}$, 图 5A); 与此同时, edgeR 差异分析显示 Th2 趋化与信号轴分子 CCL17 ($\log_2FC=3.94$)、JAK3 ($\log_2FC=2.16$)、IKZF2 ($\log_2FC=2.00$) 和

IL4R ($\log_2FC=1.41$) 在 ACD 组显著上调, CCR4、CCL22、IL13RA1 呈同向变化但未达显著, 而 GATA3、STAT6 等 Th2 核心转录因子基本不变, IL4、IL5、IL13 因表达过低未通过表达过滤 (图 5B)。上述结果提示, ACD 的 2 型反应主要表现为 CCL17-CCR4 趋化招募与 IL4R-JAK3 信号激活, 而非 Th2 克隆的扩增。

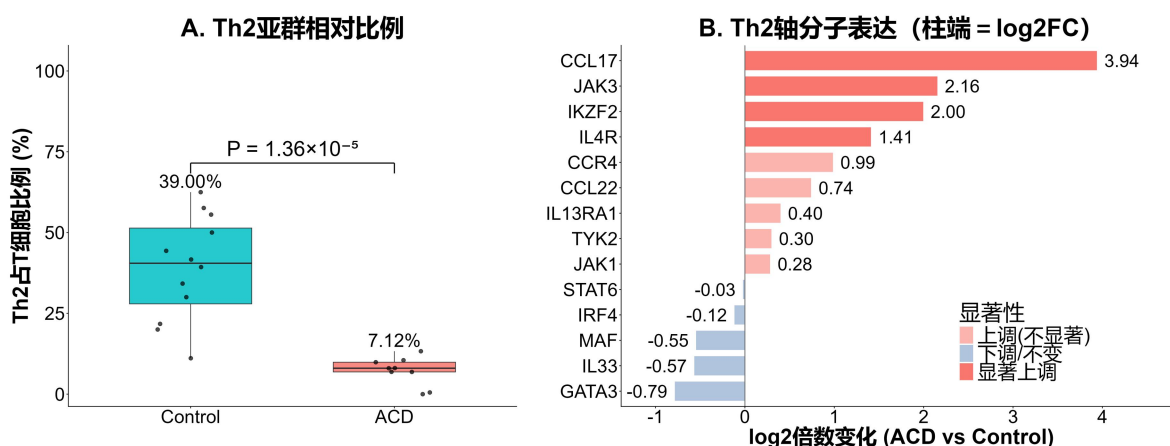


图 5 Th2 亚群比例与 Th2 趋化/信号轴分子的佐证。A: 各样本 Th2 亚群占 T 细胞比例的箱线图 (Control 与 ACD 比较, 样本级 Wilcoxon 检验, $P = 1.36 \times 10^{-5}$); B: edgeR 分析中 Th2 趋化与信号轴分子的 log2 倍数变化 (ACD 相对于 Control), 深红色为 $FDR < 0.05$ 且 $\log_2 FC > 0$ 的显著上调基因, 浅红色为同向但不显著基因, 蓝色为下调或基本不变基因, 柱端数值为 $\log_2 FC$ 。

3.5 角质形成细胞状态特征

对角质形成细胞进行状态分析, 共得到 13 个聚类。基于标记基因富集方法进行注释, 最终鉴定出 5 种主要状态 (图 6A): KC_basal (KRT5+, KRT14+, TP63+), KC_differentiating (KRT1+, KRT10+, KRTDAP+), KC_activated (KRT6A+, KRT16+, S100A7+, S100A8+, S100A9+), KC_stress (HSPA1A+, HSPA1B+, DNAJB1+, ATF3+), KC_proliferating (MKI67+, TOP2A+, PCNA+)。预设的 7 个状态标记基因集中, KC_apoptotic 与 KC_inflammatory 均未成为任一聚类的最佳注释 (亦

未进入次优匹配), 故最终鉴定 5 种主要状态; 按前述注释阈值未获可靠注释的聚类将并入 KC_other, 本数据集中并无聚类落入 KC_other。以各样本内角质形成细胞为分母、组间采用 Wilcoxon 秩和检验的状态比例分析显示, ACD 组中 KC_stress 状态比例由对照组的 4.11% 升至 55.26% ($P = 0.011$); KC_activated 由 1.04% 升至 12.89% ($P = 1.43 \times 10^{-4}$); 与之相对, KC_differentiating 由 56.67% 降至 19.36% ($P = 4.56 \times 10^{-4}$), KC_basal 由 29.57% 降至 8.27% ($P = 0.0043$), KC_proliferating 由 5.94% 降至 2.46% ($P = 0.039$) (图 6B)。

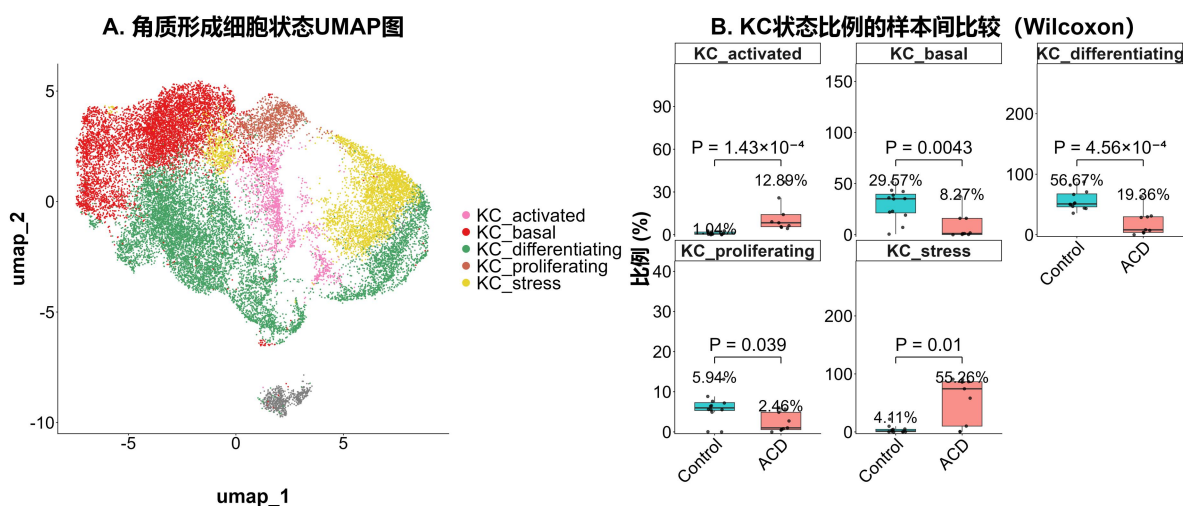


图 6 角质形成细胞状态分析。A: KC 状态 UMAP 图; B: 各状态在 ACD 组与对照组中的比例差异 (以各样本内角质形成细胞比例为单位, 组间 Wilcoxon 秩和检验)

3.6 GSEA通路富集分析

对 6 种主要细胞类型进行 GSEA 分析, 共鉴定出多条显著富集通路 ($p_{adj} < 0.05$ 且 $NES > 0$) (图 7)。主要富集通路按 NES 排序包括: IFN- γ 反应通路 ($NES = 2.43$)、IFN- α 反应通路 ($NES = 2.19$)、

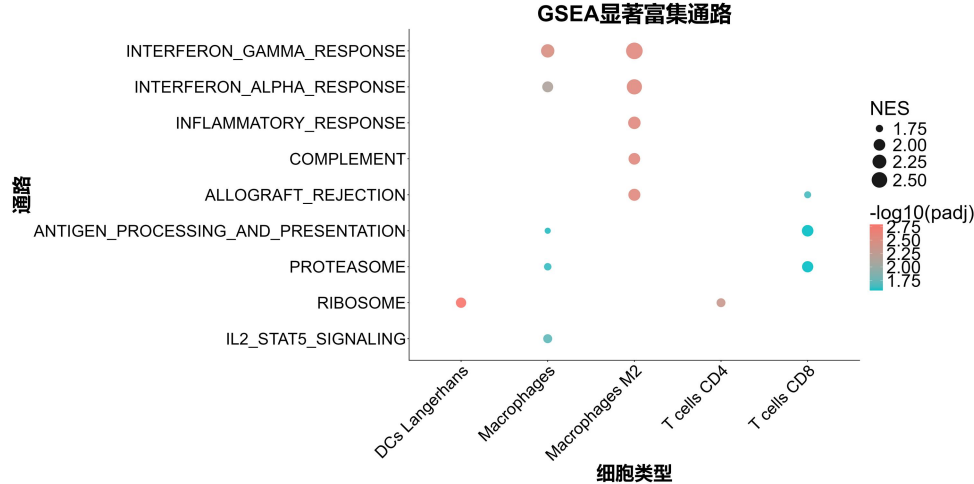


图 7 GSEA 显著富集通路气泡图 (横轴=细胞类型, 纵轴=通路, 气泡大小=NES, 颜色= $-\log_{10}(p_{adj})$, 阈值 $p_{adj} < 0.05$ 且 $NES > 0$)

3.7 上游转录因子富集与候选调控网络

TRRUST 转录因子 (TF) 富集分析显示: HSF1 (热休克因子 1) 在 4 种细胞类型 (巨噬细胞、M2 巨噬细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞) 中显著富集, 是 ACD 中分布最广的上游转录因子, 可能作为通用应激调控因子参与多种细胞类型的炎症应答。HIF1A 在巨噬细胞和 M2 巨噬细胞 2 种细胞类型中显著富集 (校正 P 分别为 9.7×10^{-5} 、 8.9×10^{-3})。在巨噬细胞中, TRRUST 富集提示 NFKB1/RELA、SPI1、STAT6、STAT1、IRF1 等转录因子可能构成

一个候选转录调控网络; 该结果基于转录因子-靶基因富集关系的计算预测, 这些因子是否协同参与巨噬细胞的促炎活化仍需实验验证。

基于 Top10 核心转录因子及其显著靶基因构建调控网络 (图 8)。网络分析显示: CDKN1A (细胞周期抑制因子) 和 HSPA1A (热休克蛋白) 是 degree 最高的靶基因, 被多个转录因子共同调控, 提示细胞周期阻滞与应激反应可能是 ACD 中的潜在共同下游事件; 该推断基于 TRRUST 预测的转录因子-靶基因关系, 尚需实验验证。

转录因子-靶基因调控网络 (红=TF, 青=靶基因, 节点大小=degree)

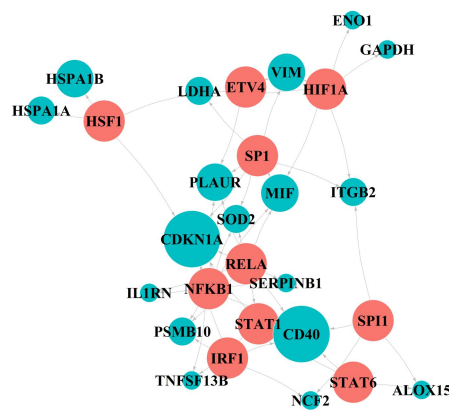


图 8 转录因子-靶基因调控网络图 (红色节点= 转录因子, 蓝色节点= 靶基因, 节点大小= degree, 箭头表示调控方向)

3.8 细胞通讯分析

配受体共表达分析在 ACD 组与对照组内独立计算并施加表达细胞比例 $\geq 10\%$ 的门控: 48 对候选配受体中 46 对的配体与受体基因被检出 (IL17A、IL18R1 分别因配体、受体未检出而排除), 门控后共 11 对存在可检测互作。分组比较显示出清晰的方向差异 (图 9): IL1B-IL1R1、TNF-TNFRSF1A 及 TGF β 1-TGFR1 均以对照组更强, 其中 TNF-TNFRSF1A 在 ACD 组无一对通过门控; CD40LG-CD40 两组互动强度接近, 受体 CD40 在 ACD 组髓系细胞的表达比例上调, 而配体 CD40LG 在 T 细胞以对照组更高; CXCL9-CXCR3 是唯一在对照组完全缺失、而在 ACD 组稳定存在的互作, 方向为髓系细胞 $\rightarrow$ T 细胞, 与 CXCL9 在差异分析和复合评分中的上调一致; TNFSF14-TNFRSF14 与 CD86-CTLA4 两组均广泛存在且 ACD 组略高; 其余配受体

仅见于单一组别且强度很低。各配受体在两组间的互作强度及对应细胞对的完整数值见图 9 及随图数据。

CellChat 分组独立建模对上述结果进行了复核 (表 1, 图 9): IL-1、CD40、TNF 通路的通讯概率整体极低 (量级为 $10^{-6} \sim 10^{-4}$), 且 ACD 组整体未高于对照组。IL1B-(IL1R1+IL1RAP)以对照组更高 (约为 ACD 组的数十倍), 绝大多数发送-接收细胞对均为对照组更高; CD40LG-CD40 两组接近, 仅少数细胞对表现为 ACD 组更高, IL1A-IL1R1/IL1RAP、TNF-TNFRSF1A、TNF-TNFRSF1B 亦均以对照组更高。两种独立方法方向一致: IL1B-IL1R1、CD40LG-CD40、TNF-TNFRSF1A 均不支持在 ACD 中增强, CXCL9-CXCR3 为 ACD 独有的趋化招募轴, TNFSF14-TNFRSF14、CD86-CTLA4 为两组共有、ACD 轻度占优的共刺激/检查点互作。需强调, 上述通讯概率绝对值很低, 两组高低差异仅为描述性比较; 本研究未就通讯概率进行置换检验, 不据此推断组间差异的统计学显著性。

表 1 5 对目标配受体在 ACD 组与对照组的组内总通讯概率

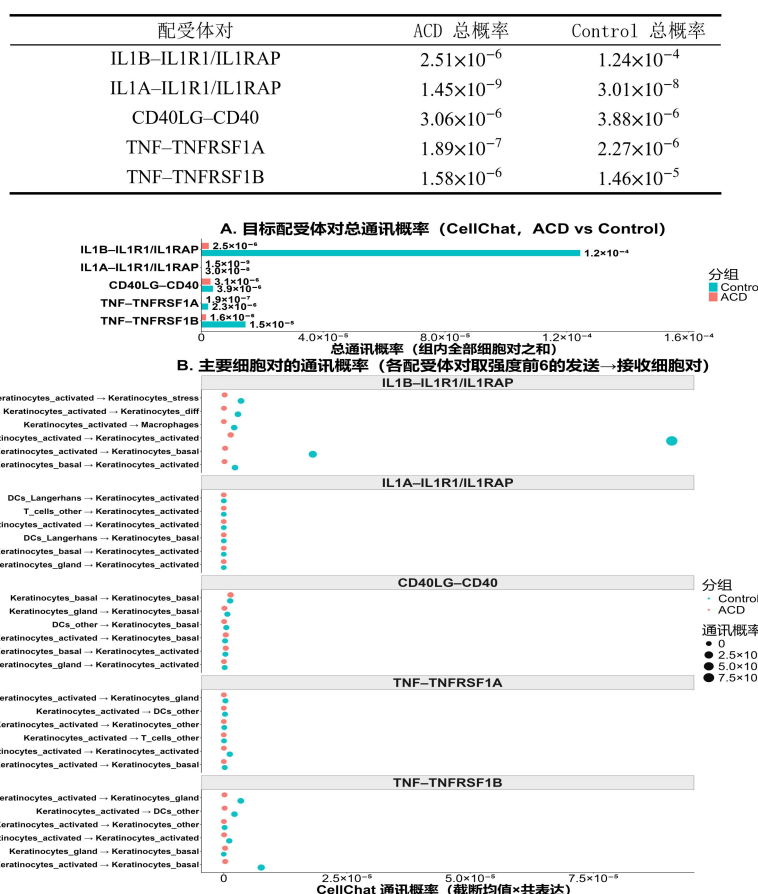


图 9 CellChat 分组细胞通讯定向验证。针对配受体共表达分析提示的 IL-1、CD40、TNF 三条目标炎症信号轴开展假设驱动的验证性复核 (非全库无偏筛选), 通路内仅纳入可传导经典信号的功能性配受体组合 (IL1A/IL1B-IL1R1/IL1RAP、CD40LG-CD40、TNF-TNFRSF1A/TNFRSF1B, 共 5 对, 选择依据见 2.5)。A: 5 对配受体在 ACD 组与对照组的组内总通讯概率 (组内全部发送-接收细胞对概率之和, 数值以科学计数法标注); B: 对每对配受体, 以每个发送细胞 $\rightarrow$ 接收细胞对在 ACD 组与对照组通讯概率中的较大值 (两组逐对最大值) 由高到低排序, 取前 6 个细胞对, 并列绘制其在两组各自的通讯概率。

3.9 候选核心基因筛选（五维复合评分）

五维复合评分体系筛选出 Top50 候选核心基因。评分居前者依次为（图 10）：CD40（0.529，免疫受体，被多个转录因子调控、出现在多条 GSEA 通路 leadingEdge 中并参与 CD40LG-CD40 细胞通讯）、CXCL9（0.329，IFN- γ 诱导趋化因子）、CDKN1A（0.236，细胞周期抑制因子 p21）；其后 HIF1A、PSMB10、SOD2 评分均为 0.207，分别为转录因子、免疫蛋白酶体亚基与氧化应激相关分子，HSF1 评分 0.200，为热休克转录因子。

Top50 候选核心基因按功能可分为免疫受体（如 CD40、FAS、CXCR3、CD40LG、CCR5、CCR2 等）、细胞因子/趋化因子（如 CXCL9、CXCL10、CCL5、CCL2、FASLG 等）、转录因子（如 HIF1A、HSF1 等）、蛋白酶体/抗原加工相关分子（如 PSMB10、

PSME1、UBE2L6、LAP3 等）以及 CDKN1A、SOD2、LY6E 等其他功能基因。CXCL9/CXCL10-CXCR3 轴参与 T 细胞募集，故 CXCR3 的上调可作为炎症细胞迁移相关信号加以解释^[15,16]。其中 CD40 作为评分最高的候选核心基因，同时处于转录调控网络与五维候选评分的交汇节点：它既是 NF κ B1、RELA、STAT1 等转录因子的共同靶基因，又作为受体参与 CD40LG-CD40 细胞通讯，但其功能意义仍需实验验证。需说明的是，五维中的伪时间（轨迹相关）维度仅在少数随 T 细胞轨迹变化的基因中取值非零：Top50 候选核心基因中仅 5 个基因该维得分大于 0，且均排在第 45 至 49 位；本文报告的 Top 候选核心基因主要由差异表达、GSEA 的 leadingEdge、转录因子靶基因网络与配受体参与前四维共同支撑，伪时间维度作为轨迹相关性的补充信息，不改变上述候选基因的排序与结论。

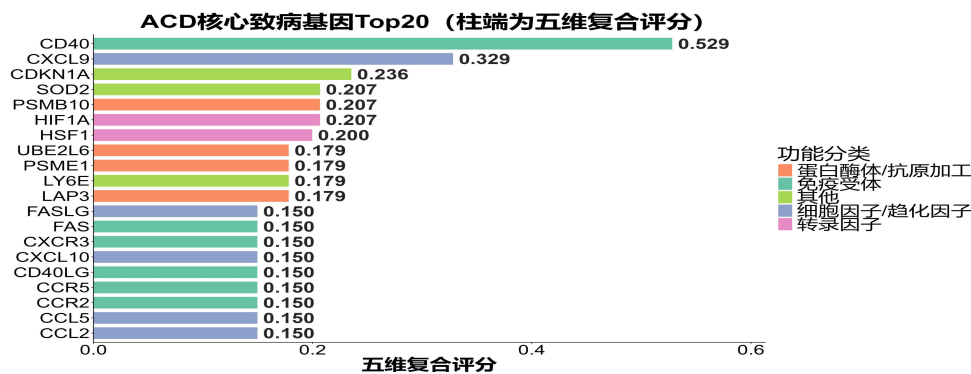


图 10 候选核心基因分析。ACD Top20 候选核心基因五维复合评分柱状图

4 讨论

本研究基于 GSE267929 单细胞数据集，在单细胞分辨率下系统刻画了 ACD 皮损的免疫微环境组成、细胞状态与细胞间通讯，并通过通路富集、转录因子预测和复合基因评分等计算分析，初步勾勒出若干候选分子调控网络。需要首先说明的是，本研究为单一公共数据集的纯生物信息学、描述性分析，下述通路、转录调控网络和候选分子均属基于转录本的相关性线索与计算预测，尚不能确立因果关系或证实具体机制，相关假说有待独立数据集和功能实验检验。在此前提下，研究结果提示 ACD 皮损以 T 细胞活化、增殖增加和 Th2 亚群比例显著降低为特征；IFN- γ 反应是富集最为显著的一组通路，巨噬细胞中 NF- κ B、STAT、IRF 家族转录因子的富集提示其可能存在协同的候选上游调控网络；CD40 则是在转录调控、通路富集和细胞通讯多个维度同时受到提示、但功能尚未验证的候选分子，而非已证实的治疗靶点。以下结合各层面结果展开讨论，并注意区分转录相关性证据与机制性推断。

4.1 ACD 的 Th1 型免疫应答与 Th2 亚群显著降低

在 T 细胞亚群层面，本研究发 ACD 皮损中 Th2 亚群占 T 细胞的比例由对照组的 39.00% 降至 ACD 组的 7.12% ($P=1.36\times 10^{-5}$)，是比例下降最显著的亚群。该结果与既往皮肤炎症免疫分型中 ACD 以 Th1 型应答为主、特应性皮炎以 2 型炎症为主的总体认识一致^[17]。与既往研究对比：Frisoli 等^[7]的 ACD 单细胞研究也发现了 Th1 型效应 T 细胞在 ACD 皮损中的富集，但未详细报道 Th2 亚群的比例变化。需要指出的是，Th2 亚群相对比例的下降并不等同于 2 型免疫信号的整体缺失：图 5 显示，在 Th2 亚群比例下降的同时，其趋化与信号轴分子 CCL17 ($\log_2FC=3.94$, $FDR=3.34\times 10^{-4}$)、JAK3、IKZF2 和 IL4R 在样本水平 (pseudo-bulk) 差异分析中显著上调，CCR4、CCL22 同向变化但未达显著，而 GATA3、STAT6 等 Th2 谱系转录因子基本不变，IL4、IL5、IL13 因表达过低未通过表达过滤。这提示 ACD 皮损中的 2 型反应更多体现为 CCL17-CCR4 介导的趋化招募与 IL4R-JAK3 信号激活，而非 Th2 克隆的扩增；Th2 相对比例的下降也

可能与活化、增殖 T 细胞显著扩张造成的相对稀释或 Th2 向其他效应状态的转换有关,其确切方向仍需谱系示踪等实验进一步验证。与之相对应, T_activated 亚群比例由 5.77% 升至 40.27%, T_proliferating 亚群由 1.04% 升至 3.40%,提示 ACD 皮损中存在明显的 T 细胞活化和增殖信号。本研究中 Treg 亚群比例虽略有升高 (4.36%→7.23%),但组间差异无统计学意义 ($P=0.476$),仅可作为趋势性现象:Treg 高表达 FOXP3、CTLA4、IL2RA 等调节性标记,可能通过多种机制限制效应 T 细胞活化和增殖^[18],但本研究未直接评估 Treg 抑制功能,其在 ACD 皮损中的功能状态仍需结合功能实验进一步验证。

4.2 角质形成细胞的异常活化及其与免疫细胞的潜在交互

在角质形成细胞层面,本研究发现 ACD 皮损中 KC_stress 状态比例显著增加 (4.11%→55.26%), KC_activated 状态也显著增加 (1.04%→12.89%)。KC_stress 高表达 HSPA1A、HSPA1B、DNAJB1、ATF3 等热休克和应激反应基因, KC_activated 高表达 KRT6A、KRT16、S100A7/8/9 等损伤相关分子模式 (DAMP) 基因,提示 ACD 皮损中角质形成细胞处于显著的应激和活化状态。与既往研究对比:角质形成细胞异常活化在 ACD 和其他炎症性皮肤病中已有广泛报道。本研究中 ACD 的角质形成细胞以应激和活化状态为主,与 IFN- γ 相关的 Th1 型免疫微环境一致。活化的角质形成细胞分泌 S100A8/A9 等 DAMP 分子^[19],可能参与先天免疫细胞活化。上述结果提示, KC 活化与免疫细胞浸润之间或存在相互放大的潜在联系;但本研究缺乏支持闭合式正反馈环路的细胞通讯或时间序列证据,该联系仍需空间转录组或共培养等功能研究验证。

4.3 IFN- γ 反应通路富集与免疫蛋白酶体相关信号

GSEA 分析显示, IFN- γ 反应通路是本数据中富集程度最高的通路之一 (NES=2.43);需要强调, GSEA 反映的是通路基因集整体表达的相关性变化,并不直接证明 IFN- γ 蛋白分泌或其下游的因果激活。IFN- γ 主要由活化的 Th1 细胞和 CD8⁺ T 细胞分泌,通过与巨噬细胞表面的 IFNGR1/IFNGR2 受体结合,激活 JAK-STAT1 信号通路,进而诱导大量 IFN 刺激基因 (ISG) 的表达。本研究的分细胞类型 GSEA 显示 IFN- γ 反应通路在巨噬细胞和 M2 巨噬细胞中富集最为显著, CXCL9 等 IFN 诱导趋化因子亦在五维复合评分中位居前列,从通路富集与候选基因两个层面共同提示 IFN- γ 相关转录信号的活跃,但这仍属相关性证据。这一发现与既往 ACD 研究中 IFN- γ 通路活化的报道一致^[2,7]。在转录层面, IFN- γ 反应信号与免疫蛋白酶体、抗原加工呈递相关基因

的富集相伴出现。GSEA 分析显示蛋白酶体通路 (NES=1.91) 和抗原加工呈递通路 (NES=1.87) 均显著富集。IFN 刺激可促使组成型蛋白酶体替换部分催化亚基并形成免疫蛋白酶体;后者有利于产生可与主要组织相容性复合体 I 类 (major histocompatibility complex class I, MHC I) 分子结合的肽段^[20]。这一结果提示, ACD 中 IFN- γ 相关转录反应可能与抗原呈递增强并存,但其因果关系仍需实验验证。

4.4 巨噬细胞NF- κ B-STAT-IRF候选转录调控网络与IL-1 β 轴

在转录调控层面, TRRUST 富集提示巨噬细胞中 NFKB1/RELA、SPI1、STAT6、STAT1、IRF1 等转录因子可能构成一个候选转录调控网络 (而非已证实的线性级联)。NFKB1/RELA 是经典的炎症转录因子,被 TNF- α 、IL-1 β 等促炎信号激活; SPI1 (PU.1)是髓系细胞特异性转录因子; STAT1/STAT6 分别被 IFN- γ 和 IL-4/IL-13 激活; IRF1 是 IFN 信号下游的关键转录因子。这些转录因子可能协同参与巨噬细胞的促炎活化。需要指出的是, TRRUST 分析仅基于转录因子-靶基因调控关系的预测,该网络的实际存在、上下游方向及其功能作用均尚需后续实验验证。在按分组独立计算并施加 10%表达门控的配受体共表达分析中, IL1B-IL1R1 反而以对照组更强 (对照组组内互作强度之和约为 ACD 组的 7 倍), CellChat 分组复核同样显示其通讯概率极低且 ACD 组未高于对照组 (图 9)。两种方法一致表明 IL1B-IL1R1 并非 ACD 中增强的活跃信号, M2 巨噬细胞自分泌在 ACD 组亦未增强。IL-1 β 是关键促炎细胞因子,属于 IL-1 家族^[21],其可能参与朗格汉斯细胞抗原呈递功能活化与 T 细胞活化分化,但在本数据中的实际激活程度仍需蛋白水平或功能实验确认,不宜仅凭共表达推断其与 NF- κ B 已形成正反馈环路。

4.5 CD40LG-CD40候选共刺激轴及其干预潜力

在候选核心基因筛选中, CD40 以五维复合评分 0.529 排名第一,且在按生物学样本聚合的样本水平差异分析中亦显著上调 ($\log_2FC=1.90$, $FDR=2.37\times 10^{-3}$),是同时在转录调控、GSEA 通路和配受体共表达多个维度受到提示的基因。CD40 是肿瘤坏死因子受体超家族成员,表达于抗原呈递细胞 (DC、巨噬细胞、B 细胞) 表面,其配体 CD40LG 主要表达于活化的 CD4⁺ T 细胞表面。值得注意的是,分组加门控的共表达分析显示 CD40LG-CD40 两组互作强度接近、最强细胞对以对照组略高,受体 CD40 在 ACD 组髓系细胞表达比例上调,而配体 CD40LG 在 T 细胞以对照组更高; CellChat 分组分析亦显示其整体通讯概率两组接近且 ACD 组未升高。两

种方法一致提示该轴在 ACD 中可能处于受体致敏、配体受限的状态(图 9)。CD40LG-CD40 通路是 T 细胞依赖性免疫应答的关键共刺激信号,能够增强抗原呈递细胞的活化、细胞因子分泌和抗原呈递能力^[22]。与既往研究对比,CD40LG-CD40 通路在自身免疫性疾病中的作用已有广泛研究,靶向该通路的生物制剂已在系统性红斑狼疮等疾病中开展临床研究^[23]。在 ACD 中,CD40 受体在髓系抗原呈递细胞的上调提示其处于致敏或待命状态,但其能否与诱导表达的 CD40LG 形成功能性共刺激、进而维持慢性炎症,仍需蛋白与功能实验验证;若该轴激活获证,靶向 CD40LG-CD40 可能是 ACD 的潜在干预策略。需要注意,本研究为纯生物信息学分析,CD40 作为干预靶点的有效性仍需实验验证。

4.6 研究的局限性

本研究存在以下局限性:第一,本研究为纯生物信息学分析,所有结论均基于公共数据集的计算预测,缺乏实验验证,候选核心基因和通路的功能作用需要后续体外细胞实验和动物模型验证。第二,本研究仅使用 GSE267929 单一数据集,样本量有限(9 例 ACD、12 例对照),可能存在批次效应和人群偏倚,需要更多独立数据集验证。第三,细胞通讯分析本质上属于基于转录本共表达的推断:本研究虽已按分组独立计算并设置 10%表达门控、另以 CellChat 交叉验证,但两类方法得到的互作强度与通讯概率仍为统计推断而非功能证据,且单细胞悬液制备可能丢失诱导性、瞬时性配体(如活化 T 细胞诱导表达的 CD40LG)、低估病灶局部的原位互作,相关结论仍需空间转录组、流式检测或共培养等功能实验验证。第四,T 细胞亚群注释基于标记基因富集方法,存在一定主观性,需要结合流式细胞术等实验方法进一步验证。第五,全局差异表达采用按生物学样本聚合的样本水平(pseudo-bulk)方法,部分仅在少数免疫细胞中表达的基因(如 CXCL9、CXCL10)因全局表达稀疏未通过表达过滤,其证据主要来自分细胞类型分析,后续可通过细胞类型特异性的样本水平聚合(pseudo-bulk)分析进一步验证。

4.7 结论

本研究利用单细胞 RNA 测序技术在单细胞分辨率下刻画了 ACD 皮损的免疫微环境特征,鉴定出 14 种细胞类型,发现 ACD 皮损中 T 细胞活化亚群(T_activated、T_proliferating)和 KC 应激/活化状态(KC_stress、KC_activated)比例显著增加,而 Th2 亚群比例显著降低。GSEA 分析显示 IFN- γ 反应、IFN- α 反应、蛋白酶体和抗原加工呈递通路显著富集。转录因子富集提示巨噬细胞中可能存在 NF- κ B-STAT-IRF 候选调控网络。分组加门控的配受

体共表达分析与 CellChat 交叉验证显示:IL1B-IL1R1、TNF-TNFRSF1A 在 ACD 中不增强、CD40LG-CD40 两组接近,CXCL9-CXCR3 为 ACD 独有的髓系-T 细胞趋化招募轴,TNFSF14-TNFRSF14、CD86-CTLA4 两组共有且 ACD 轻度占优。五维复合评分筛选出 CD40、CXCL9、CDKN1A、HIF1A、PSMB10 等候选核心基因,其中 CD40 同时处于转录调控网络与五维候选评分的交汇位置,是值得进一步验证的候选干预分子,尚不能据此认定为治疗靶点。上述结果均来自单一数据集的转录水平计算分析,为认识 ACD 的免疫病理过程提供了单细胞分辨率的线索和可检验的假说,但其涉及的通路和分子仍需独立数据集以及蛋白、细胞和动物层面的功能实验加以验证。

参考文献

- [1] Scheinman PL, Vocanson M, Thyssen JP, et al. Contact dermatitis[J]. Nat Rev Dis Primers. 2021;7(1):38. doi:10.1038/s41572-021-00271-4.
- [2] Vocanson M, Hennino A, Rozières A, et al. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis[J]. Allergy. 2009;64(12):1699-1714. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x.
- [3] Peiser M, Tralau T, Heidler J, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects[J]. Cell Mol Life Sci. 2012;69(5):763-781. doi:10.1007/s00018-011-0846-8.
- [4] Martin SF, Esser PR, Weber FC, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis[J]. Allergy. 2011;66(9):1152-1163. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x.
- [5] Ma F, Plazyo O, Billi AC, et al. Single cell and spatial sequencing define processes by which keratinocytes and fibroblasts amplify inflammatory responses in psoriasis[J]. Nat Commun. 2023;14(1):3930. doi:10.1038/s41467-023-39020-4.
- [6] Schmidt M, Knorz A, Meder K, et al. Single cell analysis reveals dynamic changes of distinct cell populations in human nickel allergy[J]. Allergy. 2026;81:1138-1148. doi:10.1111/all.70108.
- [7] Frisoli ML, Ko WC, Martinez N, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular signatures that distinguish allergic from irritant contact dermatitis[J]. J Invest Dermatol.

- 2025;145(5):1117-1126.e14.
doi:10.1016/j.jid.2024.09.008.
- [8] Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data[J]. *Cell*. 2021;184(13):3573-3587.e29.
doi:10.1016/j.cell.2021.04.048.
- [9] Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. Comprehensive integration of single-cell data[J]. *Cell*. 2019;177(7):1888-1902.e21.
doi:10.1016/j.cell.2019.05.031.
- [10] Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection[J]. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425.
doi:10.1016/j.cels.2015.12.004.
- [11] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG: biological systems database as a model of the real world[J]. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D672-D677.
doi:10.1093/nar/gkae909.
- [12] Sergushichev A. An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation[preprint]. *bioRxiv*. 2016:060012. doi:10.1101/060012.
- [13] Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update[J]. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W90-W97.
doi:10.1093/nar/gkw377.
- [14] Han H, Cho JW, Lee S, et al. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions[J]. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D380-D386.
doi:10.1093/nar/gkx1013.
- [15] Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions[J]. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(2):207-215.
doi:10.1038/icb.2010.158.
- [16] Lim RJ, Salehi-Rad R, Tran LM, et al. CXCL9/10-engineered dendritic cells promote T cell activation and enhance immune checkpoint blockade for lung cancer[J]. *Cell Rep Med*. 2024;5(9):101479.
doi:10.1016/j.xcrm.2024.101479.
- [17] Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Analysis of cytokine expression in dermatology[J]. *Arch Dermatol*. 2002;138(9):1189-1196.
doi:10.1001/archderm.138.9.1189.
- [18] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. *Cell*. 2008;133(5):775-787.
doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
- [19] Wang S, Song R, Wang Z, et al. S100A8/A9 in inflammation[J]. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
doi:10.3389/fimmu.2018.01298.
- [20] Miyauchi S, Kim SS, Jones RN, et al. Human papillomavirus E5 suppresses immunity via inhibition of the immunoproteasome and STING pathway[J]. *Cell Rep*. 2023;42(6):112508.
doi:10.1016/j.celrep.2023.112508.
- [21] Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines[J]. *Immunol Rev*. 2008;223(1):20-38.
doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00624.x.
- [22] Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system[J]. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-172.
doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
- [23] Boumpas DT, Furie R, Manzi S, et al. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis[J]. *Arthritis Rheum*. 2003;48(3):719-727. doi:10.1002/art.10856.
- [24] Saelens W, Cannoodt R, Todorov H, et al. A comparison of single-cell trajectory inference methods[J]. *Nat Biotechnol*. 2019;37(5):547-554.
doi:10.1038/s41587-019-0071-9.

Single-Cell RNA Sequencing-Based Characterization of the Immune Microenvironment in Allergic Contact Dermatitis

Liu Pei¹, Deng Yu¹, Shan Xiao², Cheng Chao^{1*}

1. School of Life Sciences and Food Engineering, Jiangsu Normal University, Xuzhou; 2. Department of Dermatology, Xuzhou City Hospital of TCM, Xuzhou

Abstract: In this study, we used single-cell RNA sequencing to characterize the immune microenvironment of allergic contact dermatitis (ACD) lesions. The GSE267929 dataset was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) and included 9 ACD samples, 12 healthy controls, and 45,942 cells. Seurat v5 was used for quality control, dimensionality reduction, clustering, and cell annotation. We also integrated GSEA pathway enrichment, transcription factor prediction, ligand–receptor co-expression analysis, CellChat-based cell–cell communication analysis, and composite gene scoring to characterize candidate regulatory networks. A total of 14 cell types were annotated. Using within-sample cell proportions as the unit and the Wilcoxon rank-sum test for between-group comparisons, we found that ACD lesions showed significantly increased proportions of activated T cells (5.77% → 40.27%), proliferating T cells, and stressed keratinocytes, along with a significantly decreased proportion of Th2 cells (39.00% → 7.12%) (all $P < 0.05$). Pathways related to IFN- γ/α response, proteasome, and antigen processing and presentation were significantly enriched, and macrophages showed a candidate NF- κ B–STAT–IRF regulatory network. Ligand–receptor analysis showed that IL-1 and TNF signaling axes were stronger in the control group, CD40LG–CD40 signaling was similar between the two groups, and CXCL9–CXCR3 signaling was unique to the ACD group. Composite scoring identified candidate core genes such as CD40 and CXCL9. In conclusion, ACD lesions are characterized by Th1-type immune activation, keratinocyte stress, and upregulation of costimulatory/antigen-presentation molecules such as CD40. These findings provide computational clues at the transcript level and may help in understanding ACD immunopathology and identifying candidate intervention molecules. However, they cannot establish causal mechanisms or identify therapeutic targets.

Keywords: Contact dermatitis; Single-cell RNA sequencing; Immune microenvironment; T cells; Keratinocytes