

单细胞 RNA 测序探索多发性硬化患者外周血中免疫细胞特征

安惠娟 张亚恒 齐俊丽

【摘要】 目的 探讨多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)患者外周血中免疫细胞特征。**方法** 通过 GEO(Gene expression omnibus)数据库下载单细胞数据,利用 seurat 标准程序对数据进行质控、降维及分群后根据临床数据将各类细胞再次分为 MS 组和健康对照(Health Identify, HD)组,此后对细胞进行类型间和组间的比较分析;在对细胞类型间的转录组变化分析后对差异表达基因进行富集分析明确各细胞类型的功能;进一步对细胞组间基因差异最显著和最多的细胞类型进行亚群分析,比较其上调亚群和下调亚群的转录组变化并进行富集分析。**结果** 通过对数据标准化和过滤后共获得 71592 个细胞,经过线性和非线性降维分析后获得 21 个边界清晰的细胞群,对细胞群注释后将其分为 6 种细胞类型,包括 CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、初始 CD8 + T 细胞、单核细胞-巨噬细胞;转录组的富集分析显示这 6 种细胞主要与 T 细胞的活化和受体的激活信号通路相关;亚群的转录组分析显示 CD8 + T 细胞的上调亚群主要与先天性免疫、适应性免疫和 NK 细胞抑制有关,而 CD4 + T 的亚群主要富集在 Ras 信号通路相关的 T 细胞活化过程,并且其亚群中还发现 CCL5 基因的高表达。**结论** MS 血液中的基因表达存在明显的细胞类型特异性,并且还发现 CD8 + T 细胞亚群中的高表达基因与 NK 细胞抑制的通路有关,而在 CD4 + T 细胞的亚群中发现了 CCL5 基因的早期高表达。

【关键词】 多发性硬化 单细胞 免疫细胞 血液

【中图分类号】 R744.5⁺1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)01-0042-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.01.007

An exploration of immune cell signatures in peripheral blood of multiple sclerosis patients by single-cell RNA sequencing An Huijuan, Zhang Yaheng, Qi Junli. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital and College of Clinical Medicine of Henan University of Science, Luoyang Henan 471003

【Abstract】 Objective To investigate immune cell signatures in peripheral blood of patients with multiple sclerosis (MS). **Methods** The single cell data were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) database. Standard Seurat workflow was performed for quality control, dimensionality reduction and clustering. Then, each cell type was divided into MS or healthy control groups based on clinical data. Comparisons among cells types, as well as comparison between groups, were conducted. Transcriptomic analysis of changes among different cell types was performed to disclose genes with significantly different expression levels. The specific function of each cell type was identified by enrichment analysis. Subgroup analysis for cell types with the most significant gene expression differences was also performed. Transcriptome change comparison between up-regulated and down-regulated subgroups, as well as enrichment analysis, was conducted. **Results** Total 71592 cells were acquired by data standardization and filtration. Those cells were divided into 21 cell clusters through linear and nonlinear dimensionality reduction. The clusters were annotated into six cell types including CD4 + T cells, CD8 + T cells, B cells, natural killer (NK) cells, naive CD8 + T cells, and mononuclear macrophages. The enrichment analysis of transcriptome showed that the six cell types mostly correlated with activation and receptor-mediated activating pathways of T cells. And the enrichment analysis of transcriptome in subgroups demonstrated that up-regulation of CD8 + T cell subgroups was related to innate immunity, adaptive immunity and inhibition of NK cells. However, the enrichment of CD4 + T cell subgroups occurred in Ras associated activating process of T cells. And high expression of CCL5 gene was detected in these subgroups.

Conclusion We found the existence of cell type specificity for different gene expression in the blood of MS patients. We also found high expression of genes in CD8 + T subgroups was related to inhibition of NK cells, and CCL5 gene was highly expressed in the early stage in CD4 + T cell subgroups.

【Key words】 Multiple sclerosis Single cell Immune cell Blood

多发性硬化是一种自身免疫导致的不可逆的中枢神经退行性疾病^[1]。MS 常起病于年轻成年人,多数患者初期具有复发缓解的病程特点称为复发缓解型 MS (Relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS),其神经系统症状反复发生,在复发后会出现临床缓解期。最终大多数 RRMS 患者将发展为进行形式的疾病,包括原发进展型 MS (Primary progressive MS, PPMS)和继发进展型 MS (Secondary progressive MS, SPMS)。从机制上讲,在 RRMS 中观察到的复发与外周免疫细胞侵袭中枢神经系统有关,这些细胞会导致中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 的白质脱髓鞘病变^[2]。因此,靶向外周免疫系统可以抑制 RRMS 疾病活动。例如那他珠单抗阻断 CNS 中免疫细胞的外渗,防止它们迁移到血脑屏障 (Blood-brain barrier, BBB) 之外并有效抑制复发^[3]。然而与 RRMS 相比,包括那他珠单抗在内的相同治疗策略对进展型 MS 无效,这表明对于疾病活动期的 MS,其发病机制与外周免疫系统脱钩,免疫治疗将无法起到治疗效果,导致患者的病情进展迅速。因此,早期的治疗和预防复发是降低致残率和致死率的有效手段。即使目前大量临床研究已经证明靶向药物等免疫治疗方案可以有效地抑制复发,但是免疫抑制药物仅部分有效,并且通常伴随着严重的不良反应^[4]。同时,越来越多的人认识到尽管长期以来被批准的免疫治疗方法可以减少复发,但它们并不能实质性地阻止疾病的发展。因此,进一步了解 MS 患者循环免疫的调控机制将有助于对其 RRMS 的病程进一步细分,为 MS 各个阶段精准治疗提供更加有效的治疗方案,力求做到在疾病早期实现阻断发展的目的。

目前已知的 MS 复发与缓解与血液中包括 T 细胞和 B 细胞、单核细等多种细胞均有错综复杂的关系^[1]。不同细胞类型的功能状态将会导致不同的治疗效果和病程。这些免疫细胞的异质性和其亚群的变化与 MS 的关系以及各个异质性细胞的功能在 MS 中可能起到的作用确定均有助于 MS 诊断和治疗的细胞靶点的明确。

1 对象与方法

1.1 研究对象

数据收集和提取:本研究使用的数据集下载自美国国家生物技术信息中心基因表达综合数据库 GEO (Gene expression omnibus)。所下载的单细胞数据集的实验组包含有未治疗 RRMS、靶向治疗后的 RRMS, PPMS 和 SPMS 患者,与其年龄匹配的健康成年人作为健康对照 (HI) 组,以血液为样本。本研究仅提取数据集中的未治疗 RRMS 组和相匹配的健康对照组的相应数据进行后续分析。

1.2 数据分析

质控及过滤低质量的细胞和基因:为了排除死亡的细胞和细胞碎片的干扰,本研究控制了数据集中每个细胞样本的基因数量、唯一分子标识符计数和线粒体基因百分比。本研究将基因数 ≤ 300 、唯一分子标识符计数 ≥ 8000 及线粒体基因百分比 $\geq 14\%$ 的细胞排除。

1.3 通过降维进行细胞类型识别

本研究遵循 Seurat 指导分析中描述的工作流程。首先对过滤后的矩阵进行对数归一化,并使用 Find variable features 函数 (Selection. method = vst, Nfeatures = 1000) 确定每个样本的高度可变特征;为了整合所有样本,本研究使用 Find integration anchors 函数 (dims = 1:30) 确定了锚定样本的特征,并使用 Integrate data 函数整合数据集;随后使用 Run PCA 函数对细胞做主成份分析 (Principal component analysis, PCA) 执行初步的线性降维;使用 Elbow Plot 函数可视化每个主成分的 PC 值分布,用肉眼观察,当曲线进入平台期没有明显继续下降的趋势的 PC 值就被认为是聚类的分群数量。

本研究使用 RunTSNE 函数 (dims = 1:20) 执行 T 分布和随机近邻嵌入 (t-Distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) 方法进行非线性降维,使用 Find neighbors 和 Find clusters 函数 (dims = 1:20, resolution = 0.5) 识别细胞类群,并产生了 21 个细胞簇。使用 Find all markers 函数 (logfc. threshold = 0.25, test. use = wilcox) 通过 Wilcoxon 秩和检验确定了每

个细胞簇中特异表达的差异基因(Different express genes, DEGs);然后,根据已知细胞类型标记基因目录为每个细胞簇确定1个细胞类型名称。

1.4 检查细胞类型特异性转录组变化

为了检查 MS 中细胞类型的特异性和细胞类型之间的转录组变化,在对细胞进行分类后再根据临床数据将各类细胞分为 MS 组和健康对照组,然后对各类细胞间和组间的细胞数目进行对比和可视化;最后使用 Find all markers 函数(logfc. threshold = 0.25、test. use = wilcox)筛选出各个细胞类型间差异表达的基因,再对各细胞类型特异性差异表达基因进行通路富集分析明确各个细胞类型的功能;然后再次使用 Find all markers 函数(logfc. threshold = 0.25、test. use = wilcox)筛选出基于细胞类型的 MS 和 HI 组间的 DEGs;转录组变化的统计显著性水平设置为调整后的 $P(\text{adjusted } P) < 0.1$ 和 \log_2 倍数变化($\log_2 \text{ Fold Change}, \log_2 \text{FC}) \geq 0.1$ 或 ≤ -0.1 。

1.5 亚群分析

对于亚群分析,本研究首先使用 Subset 函数从原始 Seurat 数据集中分离出单个细胞类型矩阵;随后使用类似于我们此前的聚类的方法对每种细胞类型进行了再次重新聚类;使用 Run PCA 函数和 Elbow Plot 函数执行线性降维和确定分群数量;使用 Run TSNE 函数进行非线性降维,使用 Find neighbors 和 Find clusters 函数识别各细胞类群的相应亚群并可视化,观测 HI 和 MS 组的亚群间细胞数目变化并分别标记为“上调亚群”、“下调亚群”和“无差异亚群”;使用 Find markers 函数比较上调和下调亚群的转录组表达情况并确定亚群间的 DEGs;统计显著性水平设置为 $\text{adjusted } P < 0.1$ 和 $\log_2 \text{FC} \geq 0.1$ 或 ≤ -0.1 ;最后对差异表达的亚群转录组差异基因进行富集分析确定其功能。

1.6 数据可视化

本研究在适当的情况下使用 Morpheus, Seurat 的 DoHeatmap 或 DotPlot 函数或 Cytoscape(版本 3.7.0)将数据可视化;根据基因本体论(GO)分析(geneontology.org)和 STRING 分析(<https://string-db.org>),对 DEG 进行功能注释。

2 结果

2.1 数据收集

为了研究与健康受试者比较,MS 患者血液中的分子和细胞变化特征,本研究对 MS 患者($n = 9$)

和 HI 者($n = 11$)的血液标本在单细胞水平上通过单核 RNA 测序;排除死亡和不达标的细胞后共获得 71592 个细胞,其中 MS 和 HI 分别为 32596 和 38996 个细胞。

2.2 根据细胞类型分群并标记

为了对细胞进行聚类,本研究对来自 MS 和 HI 的所有样本中的细胞进行了线性和非线性降维分析并可视化;该方法共产生了 21 个边界清晰的细胞簇(图 1),根据他们各自的转录组测序普所检测到的特异性表达基因和先前报告的细胞类型标记,共鉴定出六种主要的免疫细胞类型,包括具有典型标记基因 CD3D, CD3E, CD3G 和 CD4 的 CD4 + T 细胞(簇 2, 4, 5);具有标记基因 CD3D, CD3E, CD3G, CD8A 和 CD8B 的 CD8 + T 细胞(簇 3, 7, 11, 16, 17);具有标记基因 CD19, CD79A 和 CD79B 的 B 细胞(簇 13);具有标记基因自然杀伤细胞颗粒蛋白 7(Natural killer cell granule protein 7, NKG7)、粒酶 B(Granzyme B, GZMB)、粒溶素(Granulysin, GN-LY)和自然细胞毒性触发受体 1(Natural cytotoxicity triggering receptor 1, NCR1)的自然杀伤(Natural killer cell, NK)细胞(簇 6, 9, 12);具有标记基因淋巴增强结合因子 1(Lymphoid enhancer binding factor 1, LEF1)、选择素 L(Selectin L, SELL)的初始 CD8 + T 细胞(naïve CD8 + T)细胞(簇 0, 10)和具有标记基因 CD14 和 CD163 的单核细胞-巨噬细胞(簇 1, 8, 19, 18)(图 1)。此外,14、15、20、21 这些簇并未被标记,考虑为非免疫细胞,被排除在后续分析之外。

2.3 细胞类型特异性分析和转录组富集分析

根据最初的细胞类型分类,本研究比较了 MS 和 HI 血液标本之间不同免疫细胞类型的比例。t-SNE 聚类分析显示,MS 和 HI 血液样本的单核巨噬细胞、naïve CD8 + T, NK 细胞群之间的细胞比例差异较大,其中相较于 HI 患者,单核巨噬细胞在 MS 患者血液中数量明显增多,naïve CD8 + T 和 NK 细胞在 MS 患者血液中明显减少;B, CD4 + T, CD8 + T 的细胞比例差异较小(图 2)。为了进一步检查各细胞类型的组间转录组变化,本研究比较了 MS 和 HI 样本之间的各细胞群的转录组谱。在 MS 和 HI 血液样本之间鉴定了 2273 个差异表达基因(表 1)。未观察到在所有细胞类型中均差异表达的基因,即 MS 血液相关的转录组变化存在明显的细胞类型特异性。

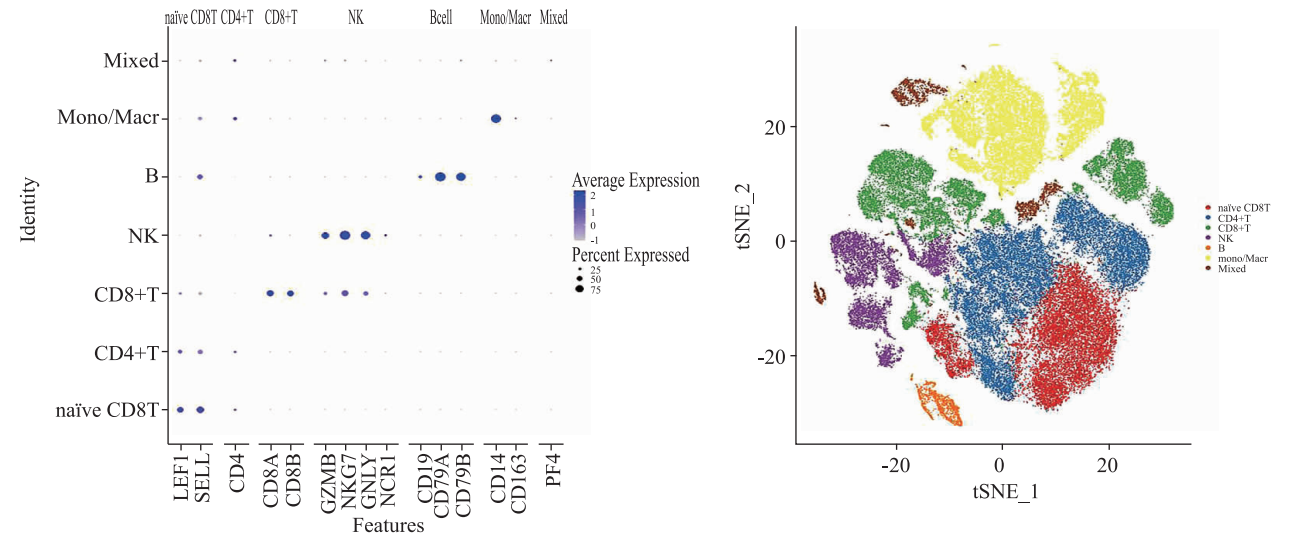


图 1 根据已知细胞标记基因对各细胞群进行分类标记

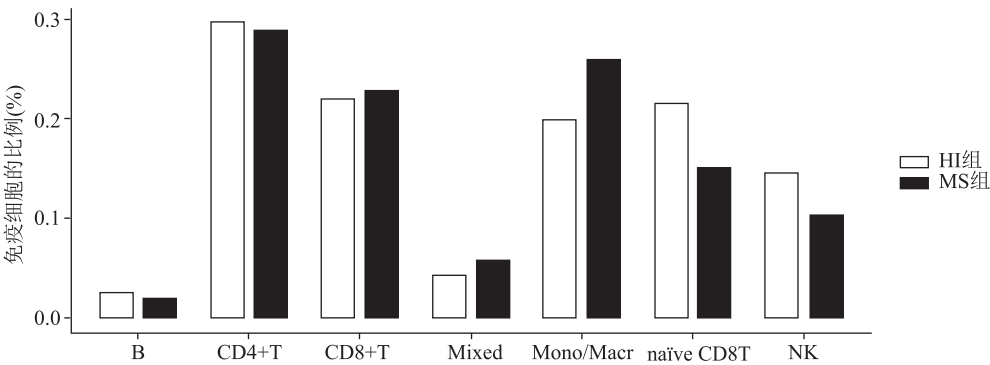


图 2 HI 和 MS 组的各类免疫细胞的比例

表 1 各细胞类型中的差异表达基因							
类别	Naïve CD8T	CD4 + T	CD8 + T	NK	B	Mono/Macr	Mixed
上调	184	371	425	203	32	203	141
下调	139	147	197	175	22	175	46
总和	323	518	622	378	54	378	187

由于分子表型的变化提供了对各细胞类型功能变化的依据,本研究对每个细胞类型的差异表达基因进行了通路分析表明 CD4 + T, naïve CD8T, CD8 + T, NK, B 及单核巨细胞分别和 IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号通路、辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)细胞分化、细胞受体信号通路相关。即 MS 中细胞类型特异性转录组变化主要与 T 细胞的活化和受体的激活有关。

2.4 细胞亚群分析

接下来,本研究探讨了 MS 和 HI 样本的单个细胞类型的组间亚群的异质性。此前,通过比较各细胞类群的 MS 和 HI 组间的转录组谱,本研究发

现 CD4 + T(上调 371,下调 147)和 CD8 + T(上调 425,下调 197)上调和下调 DEG 的差异最明显且差异表达的基因数目也最多,因此对这 2 个细胞簇进行了进一步的亚群分析。CD8 + T 细胞的亚群分析确定了 9 个边界清晰的亚群;对亚群细胞数进行 MS 和 HI 的组间比较发现 a2, a7 和 a8 的差异较小;然而,与 HI 样本比较,MS 样本中 a1, a4 和 a5 亚群的细胞数目明显增多,而 a3 和 a6 的细胞明显降低(图 3)。即将 a1、a4 和 a5 归类为“MS 上调”亚群, a3 和 a6 归类为“MS 下调”亚群(图 3)。

比较上调和下调亚群细胞的转录组变化后对上调亚群的上调 DEGs(表 1)进行通路富集分析发现 CD8 + T 细胞的 MS 上调亚群 a1, a4 和 a5 中的 DEGs 主要展示出与先天性免疫、适应性免疫和 NK 细胞抑制有关的富集。例如碱性亮氨酸拉链转录因子[Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor, BATF]可激活 Th 亚群中的谱系特异性细胞因子,包括 Th9 细胞中的细胞白介素 9(Interleukin, IL-9)和 Th17 细胞中的 IL-17。已知 IL-9 和产生 IL-9 的细胞与自身免疫、过敏性疾病、哮喘、寄生虫

免疫和抗肿瘤免疫有关^[5-6]。在 MS 患者中 CD8 + T 细胞、Th 细胞、B 细胞和固有免疫细胞一旦被激活,就会浸润中枢神经系统,导致炎症和组织损伤。高表达的淋巴细胞特异蛋白酪氨酸激酶(Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, LCK)主要编码酪氨酸蛋白激酶,该酶对胸腺中 T 细胞的成熟以及成熟 T 细胞的功能具有重要作用,并且在 T 细胞抗原受体相关的信号转导通路中起关键作用^[7]。高表达的 CD2 主要编码免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白,表达于 T 细胞、NK 细胞、胸腺细胞和树突状细胞的表面^[8-9]。CD2 表达的跨膜蛋白可以在记忆 T 细胞以及活化的 T 细胞上上调,并且在记忆 T 细胞的活化中起重要作用^[10]。同时本研究也发现高表达的基因 CD300A,该基因编码 CD300 糖蛋白家族的成员,在自然杀伤细胞中被发现是一种抑制细胞毒活性的抑制性受体^[11],有助于下调自然杀伤细胞的溶细胞活性,抑制杀伤细胞的激活以及 NKG2-

A/NKG2-BII 型整合膜蛋白(Killer cell lectin like receptor C1, KLRC1)基因的高表达,其编码的蛋白也是 NK 的主要抑制受体之一^[12]。即 AD 上调的 CD8 + T 细胞亚群的转录组谱以碱性亮氨酸拉链 ATF 样转录因子(Basic leucine zipper atf-like transcription factor, BATF)、CD2, LCK 的丰富表达为主要特征,这将使 CD8 + T 等免疫细胞被激活而诱发过度的免疫反应;本研究还意外地发现 CD300A, KLRC1 的丰富表达,这些基因主要抑制 NK 细胞的激活和下调其数量(本研究的细胞比例差异分析也发现,MS 患者 NK 细胞数量相较于 HI 在 6 种免疫细胞中降低最为明显)。

对 CD4 + T 细胞簇的亚群分析确定了 8 个亚群。MS 和 HI 样本之间亚群 b1, b2, b8 和 b9 的细胞数目差异较小;然而,与 HI 样本比较,MS 样本中 b3 和 b6 亚群的细胞增多,而 b4, b5 和 b7 的相对数目降低(图4)。对上调和下调亚群的转录组分析后

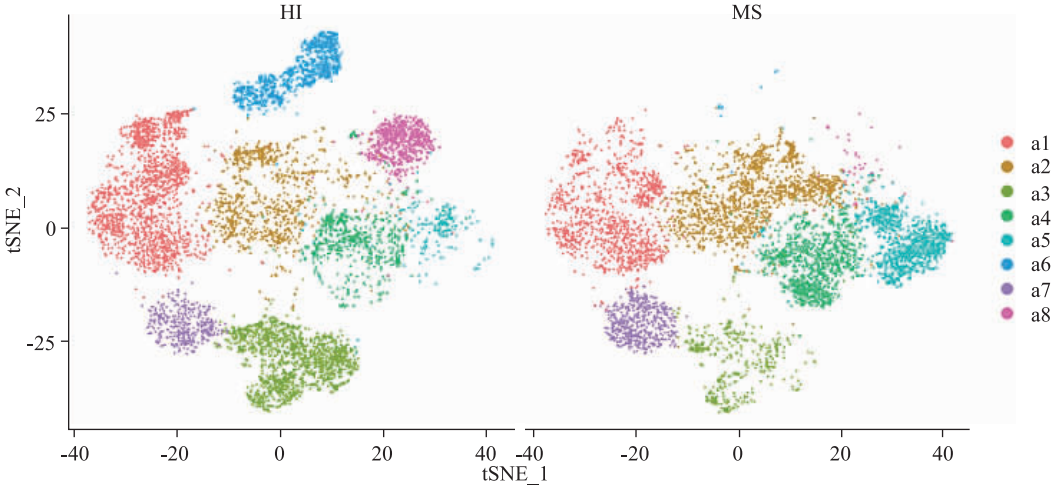


图3 CD8 + T 细胞簇的亚群分析

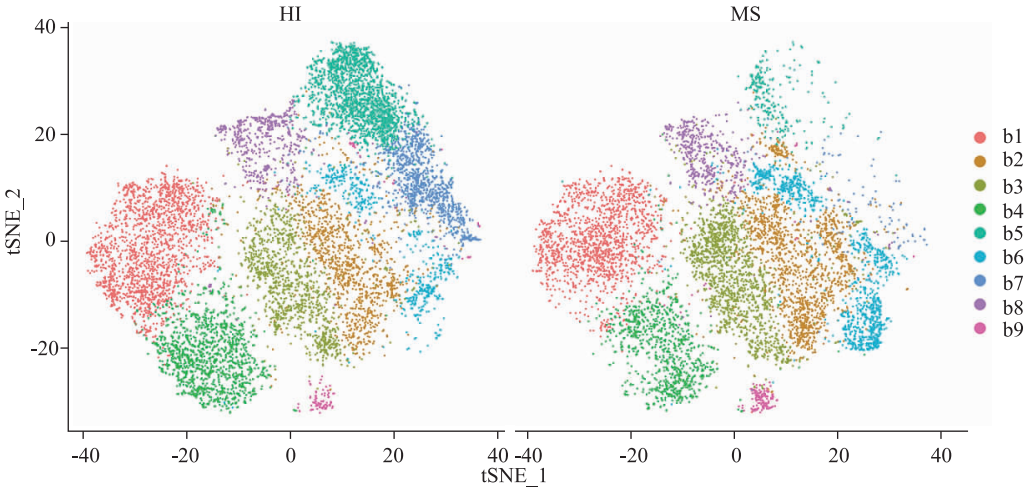


图4 CD4 + T 细胞簇的亚群分析

得到的 DEGs(表 1)进一步的途径分析显示,其上调亚群的上调 DEGs 主要富集在大鼠肉瘤(Rat sarcoma,Ras)信号通路相关的 T 细胞活化过程,如 Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1(Ras-Related C3 botulinum toxin substrate 1,RAC1)基因,该基因编码的蛋白质是一种三磷酸鸟苷(Guanosine triphosphate,GTP)酶,属于小 GTP 结合蛋白的 Ras 超家族。这个超家族的成员似乎可以调节多种细胞事件包括控制细胞生长、细胞骨架重组和蛋白激酶的激活;T-淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋白 1/Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1(T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1/Ras-related c3 botulinum toxin substrate 1,Tiam1/Rac1)复合物已被证实可以调节白细胞介素 17A(Interleukin 17A,IL17A)转录、促进自身免疫反应加剧^[13]、破坏弥散性 B 细胞淋巴瘤(Diffuse b-cell lymphoma,Dbl)结构域,实现对 CDC25 Ras 鸟嘌呤核苷酸交换因子活性的抑制来起到激活丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase,MAPK)途径的作用^[14-15]。在复发缓解型 MS 患者的外周血的 CD4 + T 细胞亚群中本研究发现了 CC 基序趋化因子 5(CC motif chemokine ligand 5,CCL5)的高表达,该基因编码的趋化因子是血液单核细胞、记忆 T 辅助细胞和嗜酸性粒细胞的趋化剂,通常在患有继发性进展型 MS 患者的外周血单核细胞中可以检测到最高水平的趋化因子。以往在 RRMS 患者的外周血单核细胞中观察到的趋化因子往往处于较低水平^[16]。

3 讨论

MS 虽然是主要累及中枢神经系统的脱髓鞘疾病,但已经确定 RRMS 的发病原因主要是来自于外围异常的免疫反应导致的淋巴细胞浸润。其具体的发病机制至今尚未完全明确,但可以确定的是先天性和适应性免疫都参与疾病的发病机制,骨髓细胞和淋巴细胞在介导疾病过程中也起到了关键作用^[17-19]。该病在不同的疾病状态对治疗的反应也差别巨大,这进一步使 MS 的诊治变得困难重重。本研究通过单细胞层面的研究揭示了 MS 患者免疫细胞的变化特点,通过对各个细胞类型的 DEGs 的分析确定了 MS 和 HI 之间的差异表达基因存在明显的细胞类型特异性。在 CD4 + T 和 CD8 + T 细胞亚群中的差异基因主要富集在 Ras 信号途径和先天性免疫和适应性免疫中,同时本研究还意外地发现了 CCL5 的高表达,

提示 CCL5 可能在疾病的早期出现高表达,可能是继发进展性 MS 的良好诊断标志物。

通过对各类免疫细胞的特定分析,本研究发现没有任何 1 个差异基因在六种免疫细胞中均表达的情况,提示对于 MS 这种病因复杂的疾病,仅简单地全血进行不区分细胞类型的高通量测序是不能达到精确定位差异表达基因的目的。本研究观察到,MS 患者血液中存在各种类型的细胞差异,主要集中在单核巨噬细胞、NK 细胞和 naïve CD8 + T 细胞。自然杀伤(NK)细胞是大颗粒淋巴细胞,具有识别和杀死外来、感染和恶性细胞的固有能力,并通过其快速产生大量细胞因子和趋化因子来调节免疫系统^[20-21],因此 NK 细胞是血液中主要的免疫调节细胞,可在自身免疫中发挥保护作用。Naïve CD8 + T 细胞的激活将诱导增殖和分化程序,导致产生大量效应 CD8 + T 细胞,而过度的 naïve CD8 + T 细胞活化也将引起自身免疫性疾病。最近的证据显示 naïve CD8 + T 细胞其实并非处于“静止”状态而是一直处于“活跃”状态,只是这种“活跃”状态一直被表观遗传机制等多种因素限制并形成类似于“阈值”的屏障而使其无法被活化,只有当受到足够的强度的信号刺激后才能突破“阈值”,从而实现活化^[22],因此本研究推测自身免疫疾病的发生也可能是由于“阈值”的降低导致 naïve CD8 + T 过度激活引起的。总之,本研究发现 naïve CD8 + T 细胞的明显减少提示可能存在过度免疫激活,如前所述这种免疫激活可能是由于某些信号刺激导致的,这是否与本研究观察到的 NK 细胞的减少所致的 MS 患者的免疫保护功能受抑制有关有待进一步研究确定。

在细胞类型的差异分析中并没有观察到明显的 CD4 + T 和 CD8 + T 细胞的组间数量差异,但是在后续的各类细胞的转录组分析中发现了明显的上调和下调基因的差异,因此对 CD4 + T 和 CD8 + T 细胞群进行了进一步的亚群分析,并对亚群中的高表达基因进行富集后发现 CD8 + T 的亚群主要富集在先天性和适应性免疫和 NK 细胞抑制通路中,其中 CD300A 和 KLRC1 这 2 个基因所编码的 NK 抑制受体可以显著下调 NK 细胞数量来削弱其免疫保护能力。有研究发现 CD300a 分子与几种病毒感染有关,并且能够通过与其配体磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺的相互作用来减轻 NK 细胞对感染细胞的杀伤。最新关于人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus,HIV)感染的免疫治疗研究发现

CD300a 可能通过抑制 NK 细胞的脱粒和细胞因子和趋化因子的产生来减少 NK 细胞对 HIV 感染细胞的杀伤。KLRC1 基因编码的蛋白属于杀伤细胞凝集素样受体家族, 又称 NKG2 家族, 是一类优先在 NK 细胞中表达的跨膜蛋白, NKG2A 与 CD94 配对形成异二聚体受体是最突出的 NK 抑制受体之一^[12]。它可以与最小多态性的非经典主要组织相容性复合物(Histocompatibility complex, HLA) Ib 分子主要组织相容性复合物, I 类, E(Histocompatibility complex, Class I, E, HLA-E)结合, HLA-E 通过与 HLA Ia/-Ib 类蛋白的前导肽组合作为其同源肽而发挥作用^[23-26]。通过与负载肽的 HLA-E 连接后通过 2 个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序来转导抑制性信号, 从而抑制 NK 细胞因子分泌和细胞毒性^[27-29]。在 CD4 + T 亚群中主要表现出 Ras 通路相关调控基因的过表达。在 T 淋巴细胞中 Ras 信号通路的异常表达和激活似乎在自身免疫疾病的发展中发挥重要作用^[30-31]。除了 Ras 通路相关基因的激活外, 本研究还发现了 CCL5 基因在疾病早期的高表达, 在 MS 患者和实验性变态反应性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠的中枢神经系统中 CCL5 水平也有升高^[32-33]。中枢神经系统中的 CCL5 水平的大幅升高主要取决于外周趋化因子产生的增加, 可见 CCL5 在 MS 患者疾病的发展中具有由外周到中枢神经的广泛表达特点。因此, CCL5 可能与更高的疾病发病风险相关, 将有望成为良好的治疗靶点。

同时, 本研究也有局限性。首先, 本研究样本量相对较小; 其次, 由于缺乏脑脊液或脑样本, 故无法完成血液与脑脊液或脑之间的重叠分析; 最后, 虽然本研究已经确定了 MS 中的一些关键基因, 但它们的功能并未通过体外或体内实验得到验证。这些问题将在未来的研究进一步解决。

本研究在单细胞水平上分析了 MS 患者血液中免疫细胞的变化特点, 并通过检测各免疫细胞类型的转录组变化发现了其基因表达存在明显的细胞类型特异性; 同时本研究意外地发现 CD8 + T 细胞中的高表达基因与 NK 细胞抑制通路有关, 在 CD4 + T 细胞的亚群中发现了 CCL5 基因的早期高表达。

参 考 文 献

- [1] Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple sclerosis[J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 169-180.
- [2] Dendrou CA, Fugger L, Friese M. Immunopathology of multiple sclerosis[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(9): 545-558.
- [3] Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis[J]. N Engl J Med, 2006, 354(9): 899-910.
- [4] Saidha S, Eckstein C, Calabresi PA. New and emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1247(1): 117-137.
- [5] Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity[J]. Trends Immunol, 2014, 35(2): 61-68.
- [6] Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(5): 295-307.
- [7] Straus DB, Weiss A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor[J]. Cell, 1992, 70(4): 585-593.
- [8] Krensky AM, Sanchez-Madrid F, Robbins E, et al. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions[J]. J Immunol, 1983, 131(2): 611-616.
- [9] Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions[J]. J Immunol, 2009, 182(11): 6815-6823.
- [10] Binder C, Cvetkovski F, Sellberg F, et al. CD2 immunobiology [Z], 2020: 1090.
- [11] Bachelet I, Munitz A, Moretta A, et al. The inhibitory receptor IRp60 (CD300a) is expressed and functional on human mast cells[J]. J Immunol, 2005, 175(12): 7989-7995.
- [12] Lazetic S, Chang C, Houchins JP, et al. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits[J]. J Immunol, 1996, 157(11): 4741-4745.
- [13] Kurdi AT, Bassil R, Olah M, et al. Tiam1/Rac1 complex controls Il17a transcription and autoimmunity[Z], 2016: 13048.
- [14] Chardin P, Camonis JH, Gale NW, et al. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2 [J]. Science, 1993, 260(5112): 1338-1343.
- [15] Modzelewska K, Elgort MG, Huang J, et al. An activating mutation in sos-1 identifies its Dbl domain as a critical inhibitor of the epidermal growth factor receptor pathway during Caenorhabditis elegans vulval development [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(10): 3695-3707.
- [16] Furlan R, Rovaris M, Martinelli BF, et al. Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients[J]. J Neuroimmunol, 2005, 165(1/2): 192-200.
- [17] Weber MS, Hemmer B. Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis[J]. Results Probl Cell Differ, 2010, 51(1): 115-126.
- [18] Yu X, Graner M, Kennedy P, et al. The role of antibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis[Z], 2020: 533388.
- [19] Ziemssen T, Ziemssen F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [J]. Autoimmun Rev, 2005, 4(7): 460-467.
- [20] Caligiuri M. Human natural killer cells[J]. Blood, 2008, 112(3): 461-469.

认为联合治疗疗效更佳,有待今后研究中扩大样本量进一步探讨。不良反应方面,3组不良反应发生率比较差异无统计学意义,提示联合治疗安全性较可靠,可作为临床治疗的又一选择。

综上所述,CT引导下脉冲射频调节术联合胸椎旁神经阻滞治疗带状疱疹后神经痛疗效显著,有助于减轻患者疼痛程度,改善睡眠质量,减少焦虑和抑郁发生,提高生活质量,且安全性较高,临床可根据实际情况进行选择。本研究尚存在不足之处,大致分为两点,一是样本量较少,未能明确联合治疗与单纯CT引导下脉冲射频调节术治疗间疗效是否存在显著差异,拟在今后研究中进一步探讨;二是本研究随访时间较短,未能分析远期疗效,拟在今后研究中分析。

参 考 文 献

- [1] 徐文体,王奇凡.带状疱疹及带状疱疹后神经痛流行病学及经济负担研究进展[J]. 天津医药,2018,46(5):552-556.
 - [2] 陈新,廖鹏飞,石强,等.益气活血止痛汤联合高频重复经颅磁刺激对老年带状疱疹后遗神经痛患者疼痛,睡眠质量及近远期疗效的影响[J]. 中国全科医学,2021,24(17):2174-2178.
 - [3] Putri MW, Jusuf NK, Yosi A. The impact of pain intensity on quality of Life of postherpetic neuralgia patients[J]. Med Glas (Zenica), 2020, 17(2): 439-444.
 - [4] Mounsey AL, Matthew LG, Slawson DC. Herpes zoster and postherpetic neuralgia: prevention and management[J]. Am Fam Physician, 2005, 72(6): 1075-1080.
 - [5] 覃万翔,石英,崔剑,等.带状疱疹后遗神经痛患者用药依从性及影响因素的横断面调查研究[J]. 重庆医学,2018,47(8):1084-1086.
 - [6] 张万云,贺纯静.带状疱疹后神经痛治疗进展[J]. 临床皮肤科杂志,2019,48(11):710-713.
 - [7] 张艳茹,封卫征,邵徽英,等.超声引导椎旁神经阻滞治疗带状疱疹后遗神经痛的疗效及可行性分析[J]. 影像科学与光化学,2019,37(2):163-168.
 - [8] 胡鑫,蒋宗滨,何睿林,等.背根神经节脉冲射频治疗老年急性期带状疱疹神经痛的研究[J]. 实用医学杂志,2020,36(6):779-783.
 - [9] 带状疱疹后神经痛诊疗共识编写专家组.带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志,2016,22(3):161-167.
 - [10] Bulilete O, Leiva A, Rullán M, et al. Efficacy of gabapentin for the prevention of postherpetic neuralgia in patients with acute herpes zoster: A double blind, randomized controlled trial [J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0217335.
 - [11] 王家双.顽固性带状疱疹后神经痛现代诊疗及研究[J]. 中华疼痛学杂志,2020,16(3):188-193.
 - [12] 金雨颖,秦春晖,段宝霖,等.草乌甲素片联合加巴喷丁治疗带状疱疹后神经痛的临床疗效[J]. 中华医学杂志,2021,101(43):3575-3580.
 - [13] 王一哲,陈健.针灸联合微波治疗带状疱疹后遗神经痛临床观察[J]. 实用中医药杂志,2018,34(3):356-357.
 - [14] 夏焱志,查俊,陈洁梅,等.带状疱疹后神经痛三种治疗方法对比分析[J]. 中国现代神经疾病杂志,2018,18(9):674-677.
 - [15] Dong X, Liu Y, Yang Q, et al. Comparison of therapeutic effects of continuous epidural nerve block combined with drugs on postherpetic neuralgia[J]. Int J Neurosci, 2021, 131(2): 191-195.
 - [16] 陈杨,蒲勋,肖智,等.带状疱疹及带状疱疹后神经痛病人受累神经分布特点[J]. 中国疼痛医学杂志,2022,28(4):295-298.
 - [17] Matthews I, Duong M, Parsons VL, et al. Burden of disease from shingles and post-herpetic neuralgia in the over 80 year olds in the UK[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0229224.
 - [18] 曹丽.疼痛护理干预对带状疱疹后遗神经痛患者视觉模拟评分及睡眠质量的影响[J]. 中国药物与临床,2020,20(2):309-310.
(2022-07-21 收稿)
-
- (上接第 48 页)
- [21] Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance[J]. Cell, 2010, 142(6): 847-856.
 - [22] Bennett TJ, Udupa V, Turner SJ. Running to stand still: naive CD8(+) T cells actively maintain a program of quiescence [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9773.
 - [23] Braud VM, Allan DS, O, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A,B and C[J]. Nature, 1998, 391(6669): 795-799.
 - [24] Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9): 5199-5204.
 - [25] Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, et al. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen(HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis [J]. J Exp Med, 1998, 187(5): 813-818.
 - [26] Miller JD, Weber DA, Ibegbu C, et al. Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2[J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1369-1375.
 - [27] Houchins JP, Lanier LL, Niemi EC, et al. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C[J]. J Immunol, 1997, 158(8): 3603-3609.
 - [28] Carretero M, Cantoni C, Bell n T, et al. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(2): 563-567.
 - [29] Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(8): 765-772.
 - [30] Mor A, Philips MR, Pillinger MH. The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis[J]. Clin Immunol, 2007, 125(3): 215-223.
 - [31] Reedquist KA, Tak PP. Signal transduction pathways in chronic inflammatory autoimmune disease: small GTPases [J]. Open Rheumatol J, 2012, 6(1): 259-272.
 - [32] Bonfiglio T, Olivero G, Merega E, et al. Prophylactic versus Therapeutic Fingolimod: Restoration of Presynaptic Defects in Mice Suffering from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170825.
 - [33] Pittaluga A. CCL5-Glutamate Cross-Talk in Astrocyte-Neuron communication in multiple sclerosis[Z],2017:1079.
(2022-07-14 收稿)