

马志红,张立红,曹源,等. 单细胞测序技术在多发性硬化研究中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 161-168.

Ma ZH, Zhang LH, Cao Y, et al. Research progress in the application of single-cell sequencing technology in multiple sclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 161-168.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.019

单细胞测序技术在多发性硬化研究中的应用进展

马志红¹, 张立红¹, 曹源¹, 程明^{1,2*}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院基础医学实验室, 济南 250031; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院神经内科, 济南 250031)

【摘要】 多发性硬化症是一种以神经炎症和神经变性为特征的慢性中枢神经系统自身免疫性疾病, 发病机制复杂, 由多种中枢神经系统和外周来源的细胞参与其中。最近, 单细胞测序技术逐渐应用于神经系统疾病中, 对于理解细胞间异质性、疾病发展机制和治疗策略有重要意义。本文对单细胞测序技术在多发性硬化疾病中应用进展进行综述。

【关键词】 多发性硬化; 单细胞测序技术; 中枢神经系统; 综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0161-08

Research progress in the application of single-cell sequencing technology in multiple sclerosis

MA Zhihong¹, ZHANG Lihong¹, CAO Yuan¹, CHENG Ming^{1,2*}

(1. Department of Basic Medical Sciences, the 960th Hospital of PLA, Jinan 250031, China.

2. Department of Neurology, the 960th Hospital of PLA, Jinan 250031)

【Abstract】 Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system characterized by neuroinflammation and neurodegeneration. The pathogenesis of the disease is complex, and involves various central nervous system and peripheral cells. Single-cell sequencing has recently been increasingly applied in the study of neurological disorders, leading to important advances in our understanding of intercellular heterogeneity, disease development mechanisms, and treatment strategies. This review summarizes research progress in single-cell sequencing and its applications in MS.

【Keywords】 multiple sclerosis; single-cell sequencing; central nervous system; review

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种免疫介导的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 慢性炎症脱髓鞘性疾病, 病变最常累及的部位为脑室周围白质、近皮质视神经脊髓、脑干和小脑^[1-2]。发病以青少年多见, 其病因复杂, 可能与遗传、环

境、生活方式等多种因素相关^[3]。MS 病理特征为炎症脱髓鞘和神经胶质增生, 伴有神经轴索的损伤。目前临床分型包括临床孤立综合征 (clinically isolated syndrome, CIS)、复发缓解型 MS (relapsing remitting multiple sclerosis, RRMS)、继发进展型 MS

【基金项目】山东省自然科学基金 (ZR2023MH370); 国家重点研发计划 (2019YFC160630504)。

【作者简介】马志红 (1988—), 女, 硕士, 研究方向: 神经病理和分子基础研究。E-mail: mmh1017@126.com

【通信作者】程明 (1981—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 神经内科疑难与变性病临床工作。E-mail: chengming960@163.com

(secondary progressive multiple sclerosis, SPMS)、原发进展型 MS (primary progressive multiple sclerosis, PPMS)^[2]。MS 的发病机制主要为由自身反应性淋巴细胞、固有免疫细胞、神经胶质细胞和细胞因子,以及针对髓鞘抗原的自身抗体的协同作用,但触发因素、部位、以及如何维系自身反应性和驱动疾病进展的机制,至今仍不清楚^[4]。多数学者认为,MS 的免疫发病机制是由外周反应性 T 细胞被激活后通过内皮黏附分子渗透到 CNS,被树突状细胞、小胶质细胞和 CNS 中其他细胞重新激活并分化为致病性 Th 细胞亚群, Th1 和 Th17 等细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-17、负责破坏血脑屏障的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 等细胞因子,同时招募更多的 CD8⁺T 细胞、B 细胞和单核细胞浸润,促进 CNS 损伤,并持续性激活巨噬细胞、树突状细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞进一步发挥作用,诱导髓鞘和少突胶质细胞损伤,促进神经变性^[5-7]。当前没有治愈 MS 症的疗法,随着对 MS 发病机制的深入认识,MS 的治疗策略和治疗目标也在不断改进和提高^[8-9]。在过去 20 年里, FDA 已经批准了十几种作用于某个与致病机制相关的靶细胞或分子而发挥治疗作用的药物,如 S1P1 受体调节剂、靶向 B 细胞 CD20 的单抗、CD52 抑制剂、减少炎症反应的干扰素等^[6,9-10]。获取 CNS 的组织样本非常困难,目前该疾病的诊断方法主要依赖于临床检查和神经影像学,使得采用新技术探索 MS 的发病机制十分必要^[11]。

单细胞组学 (single-cell omics) 已成为揭示单个细胞内 RNA 转录物异质性和复杂性,以及揭示组织/器官/生物体中不同细胞类型和功能组成的新兴研究方向^[12]。自 2009 年 Tang 等^[13]首次对单个卵裂球和卵母细胞的转录组进行了单细胞测序,近十几年来已被广泛应用于各项临床医学研究^[12,14]。单细胞测序技术种类众多,可以测不同类型的遗传物质,包括基因组、转录组和蛋白组,以及检测组织中不同细胞类型的基因空间表达模式的空间转录组测序 (spatial transcriptomics sequencing) 等^[15]。单细胞测序研究不仅在单细胞水平上揭示了疾病组织及正常组织的细胞异质性,推动了疾病发病分子机制的解析,有利于疾病诊断和治疗,分子标志物的发现和相关通路的研究^[16]。近年来单细胞测序技术在神经系统疾病上的研究,主要集中在神经发育、神经肿瘤、神经感染性疾病和神经退行性疾病

等方向^[17-21],充分体现了其在疾病研究中的优势和临床价值。本文将对单细胞测序技术在 MS 中各类细胞类型的研究进行总结,探讨其在 MS 中的应用进展。

1 T 细胞和 B 细胞

T 细胞和 B 细胞作为适应性免疫的主要参与者,在体液免疫和细胞免疫中均发挥多重作用。传统观点认为, T 细胞在 MS 致病过程中发挥了核心的作用,这些 T 细胞穿过血脑屏障并靶向 CNS 的髓鞘^[7]。越来越多的证据表明 B 细胞及其不同亚群也可通过多种途径影响 MS 的发病^[22-23]。Beltrán 等^[24]对 6 名临床健康个体的脑脊髓液 (cerebrospinal fluid, CSF) 进行单细胞 RNA 测序 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq),这些个体是 MS 患者的同卵双胞胎,发现 CD8⁺T 细胞和 B 细胞克隆性扩增,表明早期适应性免疫激活,这些无症状但高危的个体是否会转变为临床 MS 仍有待确定,但研究结果表明 scRNA-seq 具有识别极早期病理改变的潜力。Ban 等^[25]利用 scRNA-seq 对 MS 和其他神经系统疾病 (other neurological diseases, ONDs) 患者 CSF 分析,发现 MS 患者中抑制受体上调的罕见 CD8⁺T 细胞群增加,并进一步鉴定出 ZC3HAV1 和 IFITM 两个控制病毒反应相关的基因。Ingelfinger 等^[26]利用质谱流式细胞术 (cytometry by time-of-flight, CyTOF)、单细胞转录组和表面蛋白测序 (cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing, CITE-seq) 等多组学技术,研究了 61 对 MS 症不一致的同卵双胞胎的外周免疫特征,以剖析遗传易感性和环境因素的影响。发现 MS 双胞胎的单核细胞群出现了炎症性转变,同时出现了 IL-2 高反应的过渡性幼稚辅助 T 细胞群,这些可作为 MS 相关的免疫改变,该研究揭示多发性硬化发病的潜在免疫学机制。Kendirli 等^[27]在 MS 大鼠模型中进行了一项体内全基因组 CRISPR 筛选,并确定了 T 细胞向 CNS 迁移的 5 个关键抑制因子和 18 个关键促进因子。并结合对 MS 患者 T 细胞进行的 scRNA-seq 分析,进一步证实调节因子黏附分子 $\alpha 4$ -整合素和趋化因子受体 CXCR3 的表达与 CD4⁺T 细胞向 CNS 迁移的倾向性相关。该研究揭示了诱导 MS 病变的关键调节因子。Ramesh 等^[28]对 RRMS 型患者、ONDs 患者和健康对照者的 CSF 和血液进行 scRNA-seq 分析,部分患者进行单细胞免

疫球蛋白测序 (chromatin immunoprecipitation single-cell sequencing, scIg-Seq) 分析。结果表明,胆固醇和核因子 κ B (NF- κ B) 生物合成途径被激活,CSF 记忆 B 细胞中特定的细胞因子和趋化因子受体被上调。此外,SMAD/TGF- β 1 信号在 CSF 浆细胞/浆细胞中下调。总之,CSF 中 B 细胞被驱动至炎症和克隆性扩展记忆和浆母细胞/浆细胞表型。Shi 等^[29]对 RRMS 患者和 SPMS 患者的血液样本进行 scRNA-seq 分析,结果显示 SPMS 患者除初始 CD8⁺T 细胞减少外,活化 CD8⁺T 细胞亚群升高。同时,这种异常扩增的外周 CD8⁺T 细胞不仅表现出表达 GzmB 的终末分化效应 (terminal differentiated effector, EMRA) 表型,而且具有明显的克隆扩增轨迹,并且 GzmB 在 CD8⁺T 细胞中的表达与 MS 的疾病进展呈正相关。因此,GzmB⁺ CD8⁺-TEMRA 细胞可以作为区分 SPMS 和 RRMS 的生物标志物。Teschner 等^[30]对克拉屈滨 (cladribine) 治疗前后的 MS 患者进行 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 CD19⁺B 细胞进行 bulk-RNA-seq 以及外周血的 scRNA-seq 分析,结果显示,治疗后记忆 B 细胞亚群显著且持续减少,而 T 细胞亚群则以更均匀的模式略有减少。因此使用 cladribine 对选择性记忆 B 细胞簇的减少程度可以预测治疗反应。Schafflick 等^[31]利用 scRNA-seq 技术对 MS 和特发性颅内高压患者确定了 CSF 与血液的细胞图谱,发现 MS 患者 CSF 细胞组成多样性增加,并鉴定到 CSF 中未知的髓样树突状细胞 (myeloid dendritic cells, mDC) 富集。通过开发的细胞集富集分析 (cell set enrichment analysis, CSEA) 新方法,观察到 B 细胞、滤泡辅助 T 细胞 (follicular helper T cell, Tfh) 的扩增,在两种不同的 MS 动物模型中,证实该 Tfh 细胞可促进 CNS 自身免疫和局部 B 细胞浸润。综合以上研究,研究者利用单细胞测序技术进一步确定了 T 细胞和 B 细胞是导致 MS 发病的主角,并鉴定出免疫细胞亚群和炎症性信号转导通路表达谱的差异性。EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 感染一直与 MS 症相关,但这种感染是如何导致 MS 的尚不清楚^[32],利用单细胞测序技术对 T 细胞和 B 细胞进行进一步分析,发现病毒感染可能与 MS 的发病有关。Lanz 等^[33]通过对 MS 患者血液和配对的 CSF 中的 B 细胞库测序,然后基于蛋白质微阵列检测针对 MS 相关病毒的重组表达的 CSF 来源的抗体,初步鉴定出一种交叉反应性 CSF 来源的抗体,证明 EBV 转录因子 EBNA1 与

CNS 蛋白 GlialCAM 之间的高亲和力分子拟态,并为其相关性提供了晶体结构和体内功能证据,详细描述了这种拟态在 MS 病理生理学中的潜在意义,从而为 MS 和 EBV 之间的关联提供了一个新的机制联系,并可用于指导新型 MS 疗法的开发。Gottlieb 等^[34]分析了 RRMS 患者的 CSF 和血液中的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 序列,以及对 EBV 感染的 B 细胞 (淋巴母细胞系或 LCL) 和其他抗原产生应答的 T 细胞。发现 MS 首发症状患者 CSF 中的 T 细胞对感染 EBV 的自体 B 淋巴细胞具有特异性,这些 LCL 特异性 T 细胞可能识别与 EBV 或人体蛋白质交叉反应的 CNS 抗原。这些重要的发现暗示 EBV 感染是 MS 发病机制的驱动因素,为针对 EBV 或其 CNS 交叉反应的表位提供了理论依据。

2 神经胶质细胞

CNS 中的神经胶质细胞主要有星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等^[35]。小胶质细胞是作为一种特殊的免疫细胞,当神经炎症性刺激发生时,其通过调节血脑屏障、释放信号,迅速激活炎症反应,并在炎症后期清除炎症因子和修复受损的组织。近年来发现小胶质细胞,在 MS 神经炎中发挥重要作用^[36-37]。Masuda 等^[38]对 MS 患者和实验性变态反应性脑脊髓炎动物模型 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) 的大脑组织分别进行 scRNA-seq 分析,发现了特异性状态的小胶质细胞簇。Schirmer 等^[39]对 12 名生前患有 MS 和 9 名无 MS 的大脑组织样本采用单细胞核转录组测序 (single nuclei RNA sequencing, snRNA-seq) 结合原位杂交等技术,发现多种应激及活化状态小胶质细胞位于 MS 斑块边缘,空间转录组提示选择性皮质神经元损伤和神经胶质激活相关的谱系和区域特异性转录组变化,可以预测 MS 进展。Esaulova 等^[40]对 2 名 RRMS 型患者和 1 名抗 MOG 障碍患者的 CSF 和血液样本进行 scRNA-seq 分析,发现正常对照者 CSF 均存在小胶质细胞,且与疾病类型无关。以上发现进一步证实小胶质细胞是 MS 免疫病理学的关键参与者,并通过空间转录组学对小胶质细胞进行定位。

星形胶质细胞在 CNS 中扮演关键角色,参与发育、维持平衡及疾病反应,这些细胞在 MS 中显示出功能异质性^[41-42]。Absinta 等^[43]通过使用 snRNA-seq 来研究活动性病变的核心、边缘和斑块周围以

及健康白质中的转录谱。研究发现了两个仅存在于病变活动边缘的细胞群, MS 中的小胶质细胞 (microglia inflamed in MS, MIMS) 和 MS 中的星形胶质细胞 (astrocytes inflamed in MS, AIMS)。病变活动边缘的特异性体现在补体因子 C1q 在 MIMS 表达上调。Wheeler 等^[44]通过对 EAE 小鼠进行 scRNA-seq 分析中枢神经细胞的基因表达, 发现星形胶质细胞的确存在多种不同的转录状态的亚群。CNS 中星形胶质细胞 NRF2 表达降低、MAFG 表达升高, 促进甲基化过程从而限制基因表达、抑制抗炎症因子的转录过程。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子驱动 MAFG、MAT2α 以及促炎症因子的转录, 促进了中枢神经系统 EAE 的病理性发展, 该工作鉴定出了 MS 症在临床治疗方面可能的新靶点。Lee 等^[45]通过对细胞因子刺激和对照条件下的 B6 小鼠分选的星形胶质细胞进行了 scRNA-seq 和染色质转座酶可及性测序 (assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing, ATAC-Seq) 分析。鉴定出星形胶质细胞亚群, 这些细胞在神经系统疾病中记忆炎症刺激, 促进病理过程, 还发现这种记忆由 ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, ACLY) 控制, 影响疾病模型中炎症反应。Clark 等^[46]通过核酸检测和测序对细胞进行聚焦探究 (focused interrogation of cells by nucleic acid detection and sequencing, FIND-seq) 和 scRNA-seq 对 EAE 小鼠和 MS 患者样本进行分析, 发现了一个以前未知的核受体 NR3C2 及其核心压迫因子 NCOR2 调控机制, 它控制着一个星形细胞亚群, 是潜在的 MS 中枢神经系统发病机制。以上研究利用单细胞测序技术对星形胶质细胞异质性和分子特征的认识有了极大的扩展, 加速了其作为治疗靶点奠定坚实的基础。

3 其他

骨髓作为成人主要的造血器官, 也是成人 T 细胞发育的中枢免疫器官, 对启动和维持机体免疫应答具有核心作用。Shi 等^[47]通过对 MS 患者骨髓细

胞进行 scRNA-seq 分析以及对 MS 小鼠模型骨谱系分析和流式细胞术, 发现 MS 患者骨髓造血系统上游的造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 发生活化, 进而向髓系偏倚, 造成下游单核细胞和中性粒细胞明显增加, 这种异常的骨髓生成涉及 CCL5-CCR5 轴并增加 CNS 炎症和脱髓鞘, 这些发现表明, 骨髓异常髓系增生驱动 MS 进展。中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞组成了 CNS 感染后早期动员的主要先天免疫细胞类型。Skinner 等^[48]在小鼠肝炎病毒感染的小鼠模型中, 利用 scRNA-seq 技术分析了小鼠脊髓的免疫细胞, 发现 CNS 浸润中性粒细胞有一个独特的 mRNA 表达谱, 这些表达与中性粒细胞外渗激活、趋化性和效应功能增加有关。这些发现揭示了中性粒细胞可能参与脑白质脱髓鞘的多种途径, 并为改善脱髓鞘提供了新的治疗靶点。Kang 等^[49]对患者和 MS 小鼠模型 CSF 和血液样本进行 scRNA-seq 分析, 结果显示, AXL⁺ Siglec6⁺ DCs (ASDCs)、ACY3⁺DCs 和 LAMP3⁺DCs 三种树突状细胞亚型在 CSF 中的表达高于血液。其中 ASDCs 表现出多黏附和刺激特征, 经常与 T 细胞密切接触。以上分析表明 ASDCs 可能参与了 CNS 自身免疫的发病机制。Müller-Miny 等^[50]利用 scRNA-seq 对 2 名使用过抗 CD52 抗体阿仑单抗 (alemtuzumab) 的 RRMS 患者 CSF 和外周血分析。结果显示在使用过 alemtuzumab 的患者 CSF 中维持了浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), 但从血液中消失了。转录方面, alemtuzumab 治疗后, 与迁移相关的基因仅在 CSF 中升高。因此显示即使对血液产生深远影响的治疗, 也只能部分进入 CNS。

综上所述, 研究者均利用单细胞测序技术, 分析了 MS 患者各类细胞的特征及其对疾病的影响, 如表 1 所示。Masuda 等^[38]、Schirmer 等^[39]和 Esaulova 等^[40]研究突出了小胶质细胞的发现。Schirmer 等^[39]、Wheeler 等^[44]、Absinta 等^[43]、Lee 等^[45]和 Clark 等^[46]发现星形胶质细胞的不同亚群和表达模式。Beltrán 等^[24]和 Ingelfinger 等^[26]通过

表 1 多发性硬化单细胞组学研究
Table 1 Summary of researches on single-cell omics involving MS

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Masuda 等 ^[38] (2019 年) Masuda et al. ^[38] (2019)	MS 患者大脑组织、实验性自身免疫性 脑脊髓炎小鼠脑组织 Brain tissue from MS patients and mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 scRNA-seq	发现了特异性状态的小胶质细胞簇。 Specific microglial clusters were identified.

续表

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Schirmer 等 ^[39] (2019 年) Schirmer et al. ^[39] (2019)	MS 患者和健康对照大脑组织 Brain tissue from MS patients and healthy controls	单细胞核转录组测序 snRNA-seq	发现多种应激及活化状态小胶质细胞位于 MS 斑块边缘。 Various stressed and activated microglial cells were found at the edges of MS plaques.
Beltrán 等 ^[24] (2019 年) Beltrán et al. ^[24] (2019)	MS 不协调双生子和对照组的 CSF 样本 CSF samples from MS-discordant twin pairs and controls	单细胞转录组测序 scRNA-seq	发现 CD8 ⁺ T 细胞和 B 细胞克隆性扩增,表明早期适应性免疫激活。 Clonal expansion of CD8 ⁺ T cells and B cells indicated early adaptive immune activation.
Esaulova 等 ^[40] (2020 年) Esaulova et al. ^[40] (2020)	RRMS 患者、抗 MOG 患者 CSF 和 PBMC 样本 CSF and PBMC samples from RRMS patients and anti-MOG patients	单细胞转录组测序 scRNA-seq	正常对照和 MS 患者 CSF 均存在小胶质细胞。 Microglial cells were present in the CSF of both normal controls and MS patients.
Ramesh 等 ^[28] (2020 年) Ramesh et al. ^[28] (2020)	正常对照、RRMS 型患者外周血和 CSF Peripheral blood and CSF from healthy controls and RRMS patients	单细胞转录组测序 、单细胞免疫球蛋白测序 scRNA-seq, scIg-Seq	CSF 中 B 细胞向炎性细胞、Bm 细胞和浆母/浆细胞表型分化。 B cells in the CSF differentiated into inflammatory cells, Bm cells, and plasma/plasmablast phenotypes.
Schafflick 等 ^[31] (2020 年) Schafflick et al. ^[31] (2020)	MS 患者 CSF 和外周血,实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织和脊髓 CSF and peripheral blood from MS patients, brain and spinal cord from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 scRNA-seq	鉴定到 CSF 中未知的髓样树突状细胞(mDC)富集,观察到 B 细胞、滤泡辅助 T 细胞(Tfh)的扩增。 Unknown myeloid dendritic cells (mDC) were enriched in the CSF, along with expanded B cells and follicular helper T cells (Tfh).
Wheeler 等 ^[44] (2020 年) Wheeler et al. ^[44] (2020)	MS 患者脑组织,实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织 Brain tissue from MS patients and mice with experimental autoimmune encephalomyelitis	单细胞转录组测序 、染色质免疫共沉淀测序、染色质转座酶可及性测序 scRNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq	鉴定出星形胶质细胞的确存在多种不同的转录状态的亚群及关键转录调控因子 NRF2。 Various subpopulations of astrocytes with distinct transcriptional states and the key regulatory factor NRF2 were identified.
Absinta 等 ^[43] (2021 年) Absinta et al. ^[43] (2021)	MS 患者脑组织 Brain tissue from MS patients	单细胞核转录组测序 snRNA-seq	小胶质细胞亚型 MIMS 和星形胶质细胞 AIMS。 Microglial subtypes, MIMS; astrocyte subtypes, AIMS.
Skinner 等 ^[48] (2022 年) Skinner et al. ^[48] (2022)	JHMV 感染的实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脊髓 Spinal cord from the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model infected with JHMV	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	CNS 浸润中性粒细胞有一个独特的 mRNA 表达谱。 CNS-infiltrating neutrophils displayed a unique mRNA expression profile.
Ingelfinger 等 ^[26] (2022 年) Ingelfinger et al. ^[26] (2022)	同卵双胞胎 MS 患者 PBMC PBMC from monozygotic twin MS patients	质谱流式技术、单细胞转录组和表面蛋白测序 CyTOF, CITE-seq	MS 双胞胎的单核细胞群出现了炎症性转变,同时出现了 IL-2 高反应的过渡性幼稚辅助 T 细胞群,这些可作为 MS 相关的免疫改变。 Monocyte populations from MS twins showed inflammatory changes, along with a transition to IL-2 high-reactive naïve helper T cell populations, indicative of MS-related immune alterations.
Lanz 等 ^[33] (2022 年) Lanz et al. ^[33] (2022)	RRMS 患者外周血和 CSF Peripheral blood and CSF from RRMS patients	单细胞核转录组测序、B 细胞受体测序 scRNA-seq, BCR-seq	鉴定出交叉反应性 CSF 衍生抗体。 Cross-reactive antibodies derived from CSF were identified.
Shi 等 ^[47] (2022 年) Shi et al. ^[47] (2022)	MS 患者和健康对照的骨髓细胞 Bone marrow cells from MS patients and healthy controls	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	MS 患者中,骨髓造血干细胞和祖细胞偏向骨髓谱系,T 细胞异常扩增。 In MS patients, bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells skewed toward the myeloid lineage, with abnormal T cell expansion.

续表

文献 Literature	组织来源 Tissue source	单细胞测序技术 Single-cell sequencing technology	主要发现 Main findings
Ban 等 ^[25] (2024 年) Ban et al. ^[25] (2024)	MS 患者和 ONDs 患者 CSF CSF from MS patients and ONDs patients	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	表达 HAVCR2 和 TIGIT 的罕见 CD8 ⁺ T 细胞群的上调。 Upregulation of a rare CD8 ⁺ T cell population expressing HAVCR2 and TIGIT. 在 MS 患者 CNS 迁移倾向的 T 细胞群中, 调节因子黏附分子 α 4-整合素和趋化因子受体 CXCR3 显著表达。 T cell populations with a tendency to migrate to the CNS in MS patients showed significant expression of regulatory factors; adhesion molecule α 4-integrin and chemokine receptor CXCR3.
Kendirli 等 ^[27] (2023 年) Kendirli et al. ^[27] (2023)	MS 患者外周血、CSF Peripheral blood and CSF from MS patients	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	SPMS 患者活化 CD8 ⁺ T 细胞亚群升高, 并表达 GzmB ⁺ EMRA 表型。 Activated CD8 ⁺ T cell subpopulations were elevated in SPMS patients, expressing the GzmB ⁺ EMRA phenotype.
Shi 等 ^[29] (2023 年) Shi et al. ^[29] (2023)	RRMS 患者和 SPMS 患者的外周血 Peripheral blood from RRMS and SPMS patients	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	治疗后记忆 B 细胞亚群显著且持续减少。 Memory B cell subpopulations significantly and persistently decreased after treatment.
Teschner 等 ^[30] (2023 年) Teschner et al. ^[30] (2023)	克拉屈滨 (cladribine) 治疗前后的 MS 患者外周血 Peripheral blood from MS patients before and after cladribine treatment	批量 RNA 测序、单细胞核转录组测序 bulk-RNA-seq, scRNA-seq	核受体 NR3C2 及其核心压迫因子 NCOR2 在限制 XBP1 驱动的致病星形细胞反应中的新作用。 A novel role of the nuclear receptor NR3C2 and its corepressor NCOR2 in restricting XBP1-driven pathogenic astrocyte responses was identified.
Clark 等 ^[46] (2023 年) Clark et al. ^[46] (2023)	实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型和 MS 患者样本 Samples from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis and MS patients	通过核酸检测和测序对细胞进行聚焦探究、单细胞核转录组测序 FIND-seq, scRNA-seq	AXL ⁺ Siglec6 ⁺ 树突状细胞在 CSF 中表达量高于血液, 可能参与了 CNS 自身免疫的发病机制。 AXL ⁺ Siglec6 ⁺ dendritic cells are expressed at higher levels in the CSF than in the blood, and may be involved in the pathogenesis of CNS autoimmunity.
Kang 等 ^[49] (2023 年) Kang et al. ^[49] (2023)	实验性自身免疫性脑脊髓炎模型和 IDD 患者外周血、CSF Peripheral blood and CSF from experimental autoimmune encephalomyelitis model and patients with IDD	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	浆细胞样树突状细胞 (pDCs) 仅在使用过阿仑单抗患者的 CSF 中维持, 而在血液中消失。 Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were maintained only in the CSF of patients who had received alemtuzumab, while they disappeared from the blood.
Müller-Miny 等 ^[50] (2023 年) Müller-Miny et al. ^[50] (2023)	使用过抗 CD52 抗体阿仑单抗 (alemtuzumab)RRMS 患者 CSF 和血液 CSF and blood from RRMS patients treated with the anti-CD52 antibody alemtuzumab	单细胞核转录组测序 scRNA-seq	MS 患者早期阶段的 CSF 中存在大量 EBV 特异性的 T 细胞。 A large number of EBV-specific T cells were found in the early stages of CSF from MS patients.
Gottlieb 等 ^[34] (2024 年) Gottlieb et al. ^[34] (2024)	RRMS 患者外周血和 CSF Peripheral blood and CSF from RRMS patients	T 细胞受体测序 TCR-seq	确定了 ACLY ⁺ p300 ⁺ 星形胶质细胞的一个独特亚群, 这些亚群在 EAE 和 MS 病变中扩增。 A unique subpopulation of ACLY ⁺ p300 ⁺ astrocytes was identified, which was expanded in EAE and MS lesions.
Lee 等 ^[45] (2024 年) Lee et al. ^[45] (2024)	实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型脑组织 Brain tissue from experimental autoimmune encephalomyelitis mice	单细胞核转录组测序、染色质转座酶可及性测序 scRNA-seq, ATAC-seq	

双胞胎方法的配对分析使我们能够分辨出 MS 相关的免疫特征的遗传和环境决定的特征。Lanz 等^[33]、Shi 等^[47]和 Gottlieb 等^[34]发现 MS 发病机制的新驱动因素, Teschner 等^[30]和 Müller-Miny 等^[50]对免疫治疗过程中的患者 CSF 和血液中不同的细胞类型进行了评估。

4 小结与展望

单细胞测序技术在神经系统疾病中的应用,可以揭示与疾病发展密切相关的细胞类型、差异基因和信号通路,同时还有助于理解疾病免疫应答调控、免疫细胞亚型及其相互作用,挖掘早期诊断的新靶点和生物标志物。综上研究发现该技术在 MS 中的应用如表 1 所示,揭示了发病过程中 T 细胞、B 细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞等在发病过程中细胞亚群变化和细胞类型间的差异表达基因,解析了遗传及病毒感染等驱动因素的发病机制。随着空间转录组学、原位测序等更多测序技术的发展,以及和细胞病理学多平台的组合应用,使我们能更深入地确定 MS 疾病相关细胞的真实丰度、空间分布和在整个疾病过程中的细胞间相互作用,寻找可作为治疗的靶点。其次,随着临床研究数据的不断地积累,该技术可以有效地评估免疫治疗过程中患者 CSF 和血液中不同的细胞类型及其功能上的差异,有助于更好地了解免疫治疗的机制,制定更精准的免疫治疗方案,成为预后评估、疾病治疗和监测的有力工具之一。总之,随着单细胞多组学测序技术和应用的发展,越来越多的测序数据有望被生成并整合到一个可公开访问的数据库中,结合其他大规模基因筛选工具、数据分析和可视化平台将进一步扩大该技术的应用范围,为探索 MS 的发病机制、新治疗方法的研究提供新的思路。

参考文献:

[1] MARCUS R. What is multiple sclerosis? [J]. JAMA, 2022, 328(20): 2078.

[2] 中华医学会神经病学分会神经免疫学组, 中国免疫学会神经免疫分会. 中国多发性硬化诊断和治疗专家共识 [J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(7): 516-521.

Neuroimmunology Group, Chinese Society of Neurology, Chinese Society of Immunology. Expert consensus on diagnosis and treatment of multiple sclerosis in China [J]. Chin J Neurol, 2010, 43(7): 516-521.

[3] WARD M, GOLDMAN M D. Epidemiology and pathophysiology of multiple sclerosis [J]. Continuum, 2022, 28(4): 988

-1005.

[4] LASSMANN H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3116.

[5] RODRÍGUEZ MURÚA S, FAREZ M F, QUINTANA F J. The immune response in multiple sclerosis [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 121-139.

[6] LIU R, DU S, ZHAO L, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target [J]. Front Immunol, 2022, 13: 996469.

[7] SMOLDERS J, VAN LUIJN M M, HSIAO C C, et al. T-cell surveillance of the human brain in health and multiple sclerosis [J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(6): 855-867.

[8] YONG H Y F, YONG V W. Mechanism-based criteria to improve therapeutic outcomes in progressive multiple sclerosis [J]. Nat Rev Neurol, 2022, 18(1): 40-55.

[9] CHARABATI M, WHEELER M A, WEINER H L, et al. Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting [J]. Cell, 2023, 186(7): 1309-1327.

[10] BAECHER-ALLAN C, KASKOW B J, WEINER H L. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy [J]. Neuron, 2018, 97(4): 742-768.

[11] SHANKAR G M, BALAJ L, STOTT S L, et al. Liquid biopsy for brain tumors [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2017, 17(10): 943-947.

[12] JOVIC D, LIANG X, ZENG H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview [J]. Clin Transl Med, 2022, 12(3): e694.

[13] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.

[14] PAOLILLO C, LONDIN E, FORTINA P. Single-cell genomics [J]. Clin Chem, 2019, 65(8): 972-985.

[15] RAO A, BARKLEY D, FRANÇA G S, et al. Exploring tissue architecture using spatial transcriptomics [J]. Nature, 2021, 596(7871): 211-220.

[16] PAPALEXI E, SATIJA R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(1): 35-45.

[17] HEMING M, BÖRSCH A L, WIENDL H, et al. High-dimensional investigation of the cerebrospinal fluid to explore and monitor CNS immune responses [J]. Genome Med, 2022, 14(1): 94.

[18] POZOJEVIC J, SPIELMANN M. Single-cell sequencing in neurodegenerative disorders [J]. Mol Diagn Ther, 2023, 27(5): 553-561.

[19] ZENG Z, MIAO N, SUN T. Revealing cellular and molecular complexity of the central nervous system using single cell sequencing [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 234.

[20] ARMAND E J, LI J, XIE F, et al. Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes [J]. Neuron, 2021, 109(1): 11-26.

[21] PIEHL N, VAN OLST L, RAMAKRISHNAN A, et al.

Cerebrospinal fluid immune dysregulation during healthy brain aging and cognitive impairment [J]. *Cell*, 2022, 185 (26): 5028–5039.

[22] ULUTEKIN C, GALLI E, SCHREINER B, et al. B cell depletion attenuates CD27 signaling of T helper cells in multiple sclerosis [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(1): 101351.

[23] BHARGAVA P, HARTUNG H P, CALABRESI P A. Contribution of B cells to cortical damage in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2022, 145(10): 3363–3373.

[24] BELTRÁN E, GERDES L A, HANSEN, et al. Early adaptive immune activation detected in monozygotic twins with prodromal multiple sclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (11): 4758–4768.

[25] BAN M, BREDIKHIN D, HUANG Y, et al. Expression profiling of cerebrospinal fluid identifies dysregulated antiviral mechanisms in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2024, 147(2): 554–565.

[26] INGELFINGER F, GERDES L A, KAVAKA V, et al. Twin study reveals non-heritable immune perturbations in multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 152–158.

[27] KENDIRLI A, DE LA ROSA C, LÄMMLE K F, et al. A genome-wide *in vivo* CRISPR screen identifies essential regulators of T cell migration to the CNS in a multiple sclerosis model [J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(10): 1713–1725.

[28] RAMESH A, SCHUBERT R D, GREENFIELD A L, et al. A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (37): 22932–22943.

[29] SHI Z, WANG X, WANG J, et al. Granzyme B⁺ CD8⁺ T cells with terminal differentiated effector signature determine multiple sclerosis progression [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20 (1): 138.

[30] TESCHNER V E, FLECK A K, WALTER C, et al. Single-cell profiling reveals preferential reduction of memory B cell subsets in cladribine patients that correlates with treatment response [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2023, 16: 17562864231211077.

[31] SCHAFFLICK D, XU C A, HARTLEHNERT M, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 247.

[32] SOLDAN S S, LIEBERMAN P M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(1): 51–64.

[33] LANZ T V, BREWER R C, HO P P, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM [J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 321–327.

[34] GOTTLIEB A, PHAM H P T, SALTARRELLI J G, et al. Expanded T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are specific for Epstein-Barr-virus-infected B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121 (3): e2315857121.

[35] JESSEN K R. Glial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1861–1867.

[36] CIGNARELLA F, FILIPELLO F, BOLLMAN B, et al. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(4): 513–534.

[37] VOET S, PRINZ M, VAN LOO G. Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(2): 112–123.

[38] MASUDA T, SANKOWSKI R, STASZEWSKI O, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2019, 566 (7744): 388–392.

[39] SCHIRMER L, VELMESHEV D, HOLMQVIST S, et al. Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2019, 573(7772): 75–82.

[40] ESAULOVA E, CANTONI C, SHCHUKINA I, et al. Single-cell RNA-seq analysis of human CSF microglia and myeloid cells in neuroinflammation [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2020, 7(4): e732.

[41] LEE H G, WHEELER M A, QUINTANA F J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(5): 339–358.

[42] SCHIRMER L, SCHAFFER D P, BARTELS T, et al. Diversity and function of glial cell types in multiple sclerosis [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(3): 228–247.

[43] ABSINTA M, MARIC D, GHARAGOZLOO M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2021, 597(7878): 709–714.

[44] WHEELER M A, CLARK I C, TJON E C, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation [J]. *Nature*, 2020, 578 (7796): 593–599.

[45] LEE H G, RONE J M, LI Z, et al. Disease-associated astrocyte epigenetic memory promotes CNS pathology [J]. *Nature*, 2024, 627(8005): 865–872.

[46] CLARK I C, WHEELER M A, LEE H G, et al. Identification of astrocyte regulators by nucleic acid cytometry [J]. *Nature*, 2023, 614(7947): 326–333.

[47] SHI K, LI H, CHANG T, et al. Bone marrow hematopoiesis drives multiple sclerosis progression [J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2234–2247.

[48] SKINNER D D, SYAGE A R, OLIVARRIA G M, et al. Sustained infiltration of neutrophils into the CNS results in increased demyelination in a viral-induced model of multiple sclerosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 931388.

[49] KANG J, KIM M, YOON D Y, et al. AXL⁺SIGLEC6⁺ dendritic cells in cerebrospinal fluid and brain tissues of patients with autoimmune inflammatory demyelinating disease of CNS [J]. *Clin Immunol*, 2023, 253: 109686.

[50] MÜLLER-MINY L, HEMING M, LAUTWEIN T, et al. Alemtuzumab treatment exemplifies discordant immune effects of blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2023, 378: 578088.