

基于单细胞核转录组测序的多发性大动脉炎外周血单个核细胞图谱分析

何川^{1,2}, 丁洋¹, 万圣云¹

摘要 目的 基于单细胞核转录组测序(snRNA-seq)技术描绘多发性大动脉炎(TAK)外周血单个核细胞(PBMC)基因和功能的异质性改变,阐述TAK可能的免疫机制。方法

收集确诊为TAK患者的PBMC共6例为疾病组(TAK组),同期就诊的健康人群6例PBMC为正常组(NC组)。基于snRNA-seq工作流程建库测序,下机数据采用R 3.6.2软件进行主成分分析(PCA)及t-分布随机邻域嵌入(tSNE)分析等手段对两组PBMC样本池的单个核细胞的基因表达进行检测。结果 TAK患者PBMC的免疫细胞的相对比例和含量都发生了改变;高克隆TCR可高度同源性匹配整合素beta-3的氨基酸序列;T细胞介导的干扰素 γ 和TNF α 通路显著上调;TNFRSF13B+记忆B细胞比例明显升高;所有细胞类型中单核细胞所形成的的配体受体相互作用始终最多。结论 TAK的发生发展过程中PBMC参与了复杂的调节,多种免疫炎症因子异常表达,其中单核细胞在PBMC的相互作用中占据了重要地位。

关键词 单细胞核转录组测序;多发性大动脉炎;外周血单个核细胞;免疫

中图分类号 R 654.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1068-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.024

多发性大动脉炎(takayasu arteritis, TAK)是病因不明的罕见大血管炎,亚洲女性高发,主要累及主动脉及其主要分支。该疾病会导致动脉狭窄或动脉阻塞,或使动脉壁变得脆弱,可能导致膨出(动脉瘤)和撕裂,也会导致手臂或胸部疼痛、高血压,最终导致心力衰竭或卒中。目前病因仍不明,缺乏积极有效的预防及治疗手段,但炎性损伤及自身免疫参与其中^[1]。

2024-03-15 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究项目重点项目(编号:2022AH050764);安徽医科大学校级基金项目临床项目(编号:2022xkj187)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院血管与胃肠外科,合肥 230601

²皖南医学院第二附属医院介入科,芜湖 241000

作者简介:何川,男,硕士研究生,主治医师;

万圣云,男,主任医师,责任作者,E-mail:wshy63@sina.com

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)是指拥有圆形细胞核的外周血细胞^[2],包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞,为自身免疫系统疾病的重要参与成分。该研究利用单细胞核转录组测序(single nuclei RNA sequencing, snRNA-seq)刻画TAK患者PBMC的免疫图谱,探讨各种免疫细胞类型在疾病下的真实改变,试图从转录组层面加深对TAK分子机制的认识,有助于从崭新视角对该病进行诊疗。

1 材料与方法

1.1 病例资料及标本采集 收集2021-2023年间就诊于安徽医科大学第二附属医院和皖南医学院第二附属医院确诊为TAK且近期未接受药物治疗的患者共6例为疾病组(TAK组),同期在医院体检中心就诊的健康人群6例为正常组(NC组)。各组患者收集EDTA抗凝的外周血标本10 ml。其中TAK的诊断按照根据2021年美国风湿病学会制定的分类标准^[3]:发病年龄为40岁或以下;四肢跛行;一侧或两侧肱动脉搏动减少;双臂收缩压相差至少1.33 kPa;一侧或双侧锁骨下动脉或腹主动脉杂音;整个主动脉、其主要分支或上肢或下肢大动脉的动脉造影狭窄或闭塞。符合上述6条中3条者即可诊断为TAK,同时需去除由于动脉硬化、纤维肌性发育不良或其他原因。该研究经过医院伦理委员会审批(审批号:WYEFYLS202103),所有患者均签署知情同意书。

1.2 snRNA-seq 测序流程 标本解冻后提取两组PBMC各自混合为两个样本池,制备浓度为700~1 200细胞核/ μ l的细胞核悬液置入Chromium微流控芯片(10X Genomics,美国),根据制造商的说明采用Chromium Single Cell v3试剂盒(10X Genomics,美国)的试剂对RNA进行逆转录和测序文库构建,并使用Illumina(HiSeq 2500)进行测序。使用Cell Ranger单细胞软件套件(version 2.2.0)对数据进行预处理,以进行质量控制、样品解路、条形码处理和单细胞3'基因计数。

1.3 降维聚类分析 使用 Seurat 软件包 (version 2.3.4) 对数据进行归一化、降维、聚类和差异表达。采用 Seurat 校准方法典型性相关分析 (canonical correlation analysis, CCA) 对数据集进行综合分析。聚类时,选取变异较大的基因,并基于这些基因的主成分构建图,以 0.6 的分辨率对图进行分割。

1.4 细胞间通讯分析 使用 R 软件包 CellChat (version 1.1.3) 分析细胞间通信,以揭示两组所有细胞群的主要信号输入和输出。在分析细胞间通信之前,基于 Seurat 的细胞聚类是使用 CellChat 包的先决条件。使用综合信号分子相互作用数据库匹配已知的配体-受体相互作用的结构组成。采用 Trimean 算法计算每细胞组平均基因表达量,截断平均值为 10%。

1.5 伪时间轨迹分析 使用软件包 Monocle 2 (version 2.10.1) 进行轨迹分析。利用 BEAM 功能检测分支间差异表达基因,利用 Monocle 2 的 graph_test 功能鉴定共表达基因模块。在至少 5% 的细胞中表达的基因被选择进行排序,并以编程方式指定轨迹的根。

1.6 基因富集分析 标记基因的基因本体 (GO) 富集分析由 clusterProfiler R 包,将基因长度偏差进行校正后 P 值小于 0.05,标记为显著富集基因。使用 clusterProfiler R 包进行测试 KEGG 通路中标记基因的统计学富集。

2 结果

2.1 TAK 疾病下 PBMC 组成和差异基因的异质性改变 NC 和 TAK 组样本各自获取了 214 G 和 217 G 的数据量。两组 PBMC 的组成细胞类型包括 TCF7 + T 细胞、MS4A7 + Monocyte、MS4A1 + B 细胞、KLRC1 + NK 细胞、IRF4 + DC 细胞及少量 PPBP + 巨核细胞,其中 T 细胞簇包括 CD8 + T 细胞和 CD4 + T 细胞 (图 1A、B)。与 NC 组 PBMC 相比,TAK 患者 PBMC 的免疫细胞的相对比例和含量发生了显著改变。CD4 + T 细胞、B 细胞和 NK 细胞在 TAK 组的比例降低,CD8 + T 细胞和 Monocyte 在 TAK 组比例上升,CD4/CD8 的比值也相对下降 (图 1C)。且每种细胞类型的 markers 也出现了异质性的上调或下调,或许与 TAK 的发生发展有着密切的关联。通过将两样本融合,行差异表达分析 (DEG analysis) 对比 NC 组,得到各类细胞在 TAK 状态下整体上调 S100A11、GNLY、MND4、S100A4、DYNLL1 等基因表达,整体下调 NFKBIA、TSC22D3、PER1、

TSC22D3、ZFP36 等基因表达 (图 1D、E)。

2.2 TAK 下高克隆 TCR 特征及其提示的可能抗原 对 TAK 状态下 T 细胞受体 (TCR) 进行测序 (图 2A),共获得 6 885 个克隆型,有 82.8% (8 076/9 750) 被捕获的细胞至少具有一条 TCR α 或 β 链,而 78.9% (6 376/8 076) 被捕获的细胞则同时显示了 α 和 β 链。其中两种克隆型占据了绝对优势的克隆丰度,分别以 131 个和 106 个同种克隆型占据 1.62% (131/8 076) 和 1.31% (106/8 076) 的丰度比例,其 α 和 β 链的 CDR3 区的氨基酸序列分别为 CATATR-GANSKLTF—CASSQLTVFQYYEQYF, CADDGNTPLVF—CASSLRGRPSYNSPLHF (图 2B)。将 NC 组和 TAK 组 TCR CDR3 区进行比较,V 区为变化最为明显的区域, α 链中 TRAV8-3 在疾病样本中的 barcode 比例下降,TRAV12-2 和 TRAV17 在疾病样本中比例升高; β 链中 TRBV10-1 在疾病状态下比例降低,TRBV4-1、TRBV27 在疾病状态下比例升高 (图 2C)。将高克隆表型的已知 CDR3 区序列转换为氨基酸序列,进行同源性抗原的匹配,显示其中 β 链来源的氨基酸序列 CASSQLTVFQYYEQYF,可匹配人源整合素 beta-3,匹配度高达 90% (图 2D)。

2.3 特异性 T 细胞亚簇可能在疾病进展中发挥协同效应 TAK 特异性 TCR 来自于特异性 T 细胞亚簇,为明确定义真正发挥效应的 T 细胞,将疾病样本中所有 T 细胞抽提细分亚簇,一共得到 6 簇 T 细胞 (图 3A): cluster0 簇 CD4 + T cells,参与包括 T 细胞在内的淋巴细胞分化; cluster1 簇 CD4 + T cells,参与正向调节白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4)、IL-12 生成,促进 Th 细胞的极化; cluster2/4/5/6 簇为 CD8 + T 细胞,其中 cluster4、cluster6 簇 CD8 + T 参与 T 细胞分化和活化,而 cluster2 和 cluster5 簇 CD8 + T 在调节炎症反应和免疫效应等方面发挥重要作用 (图 3B)。

利用 seurat 软件包进行投射和匹配,显示上述 TAK 组两种疾病特异性 TCR 来自 cluster2 和 cluster5 CD8 + 效应 T 细胞亚簇。准确勾选出产生两种疾病特异性 TCR 的 T 细胞 (图 3C)。cluster2 大量生成 CDR3 区为 TRAV17/TRAJ56/TRAC—TRBV4-1/TRBD1/TRBJ2-7/TRBC2 的 TCR, cluster5 大量生成 CDR3 区为 TRAV12-2/TRAJ29/TRAC—TRBV27/TRBD1/TRBJ1-6/TRBC1 的 TCR (图 3D)。对 cluster2 和 cluster5 的 CD8 + 效应 T 细胞亚簇分别行功能富集, cluster2 主要功能是应答干扰素- γ , cluster5 功能涉及促进 TNF- α 生成 (图 3E)。

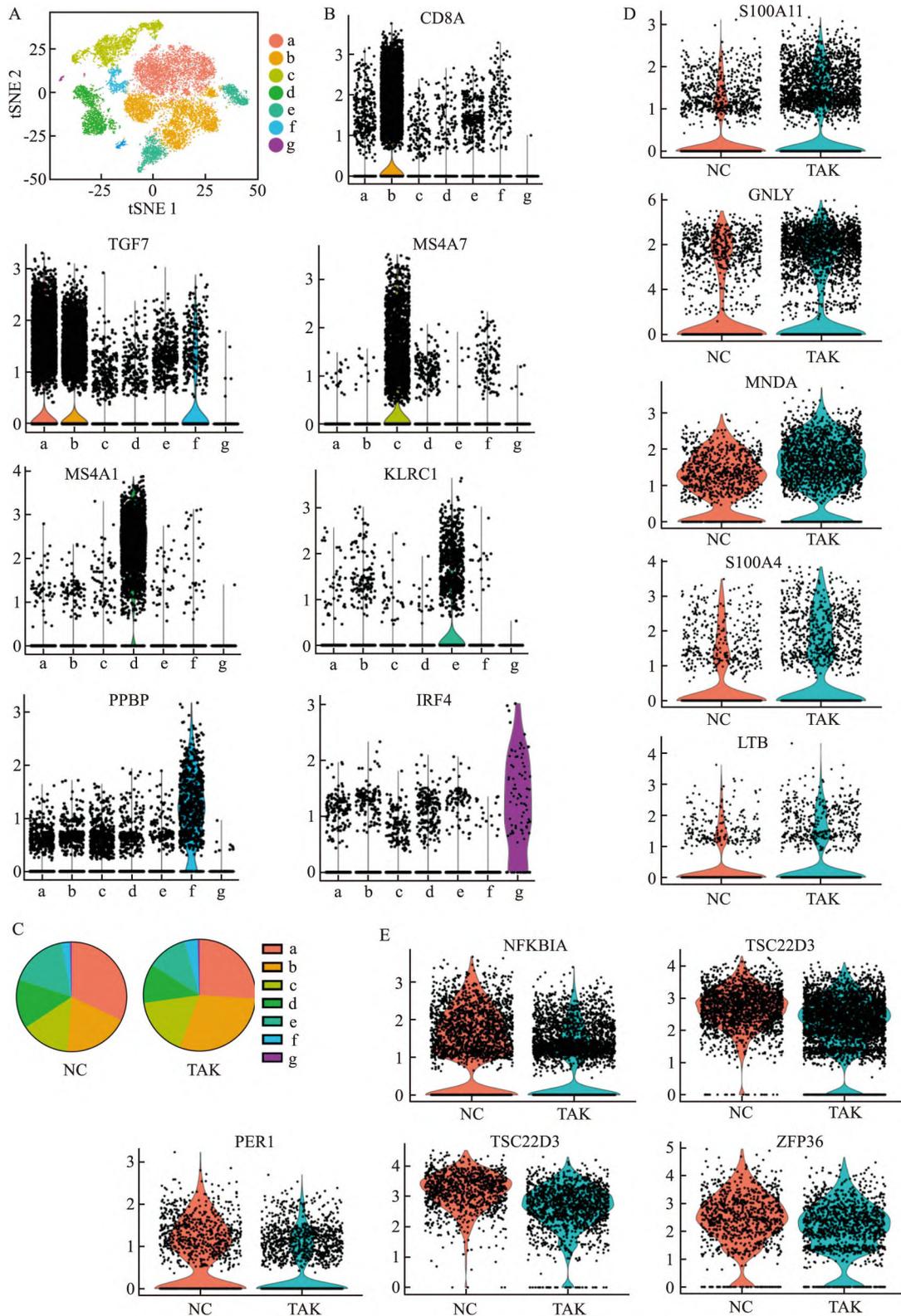


图1 TAK疾病下PBMC的主要细胞类型及差异基因

A:融合样本 t-NE 图展示下 PBMC 的 7 种细胞组成;B:每种细胞类型特异性的标记基因的小提琴图;Y 轴:相对表达量;C:NC 组与 TAK 组每种细胞类型占该样本所有细胞数量的比例;D、E:相对 NC 组,TAK 组 PBMC 中上调(D)和下调(E)的特征性基因的小提琴图;Y 轴:相对表达量;a:CD4 + T 细胞;b:CD8 + 细胞;c:单核细胞;d:B 细胞;e:NK 细胞;f:巨核细胞;g:DC 细胞

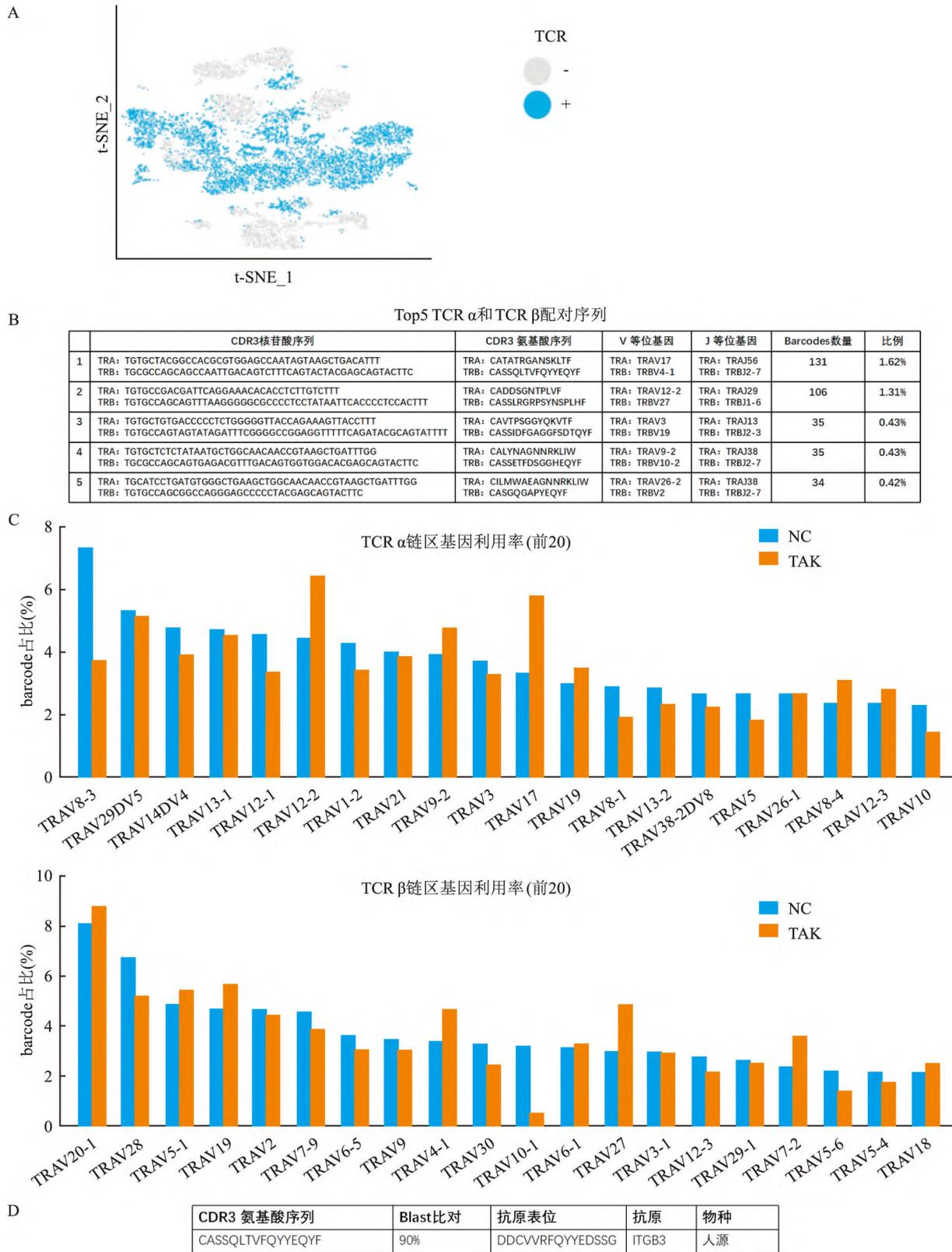


图2 TAK 高克隆 TCR 及匹配抗原

A: 单细胞 5'(D)J-seq 拥有重排的 TCR 克隆型 PBMC 的 t-SNE 图; B: T 细胞中前 5 位成对的 TCR 克隆型; C: NC 和 TAK 组中前 20 位 V 基因利用率为 TCR α 和 β 链; D: CDR3 氨基酸序列比对到人的抗原

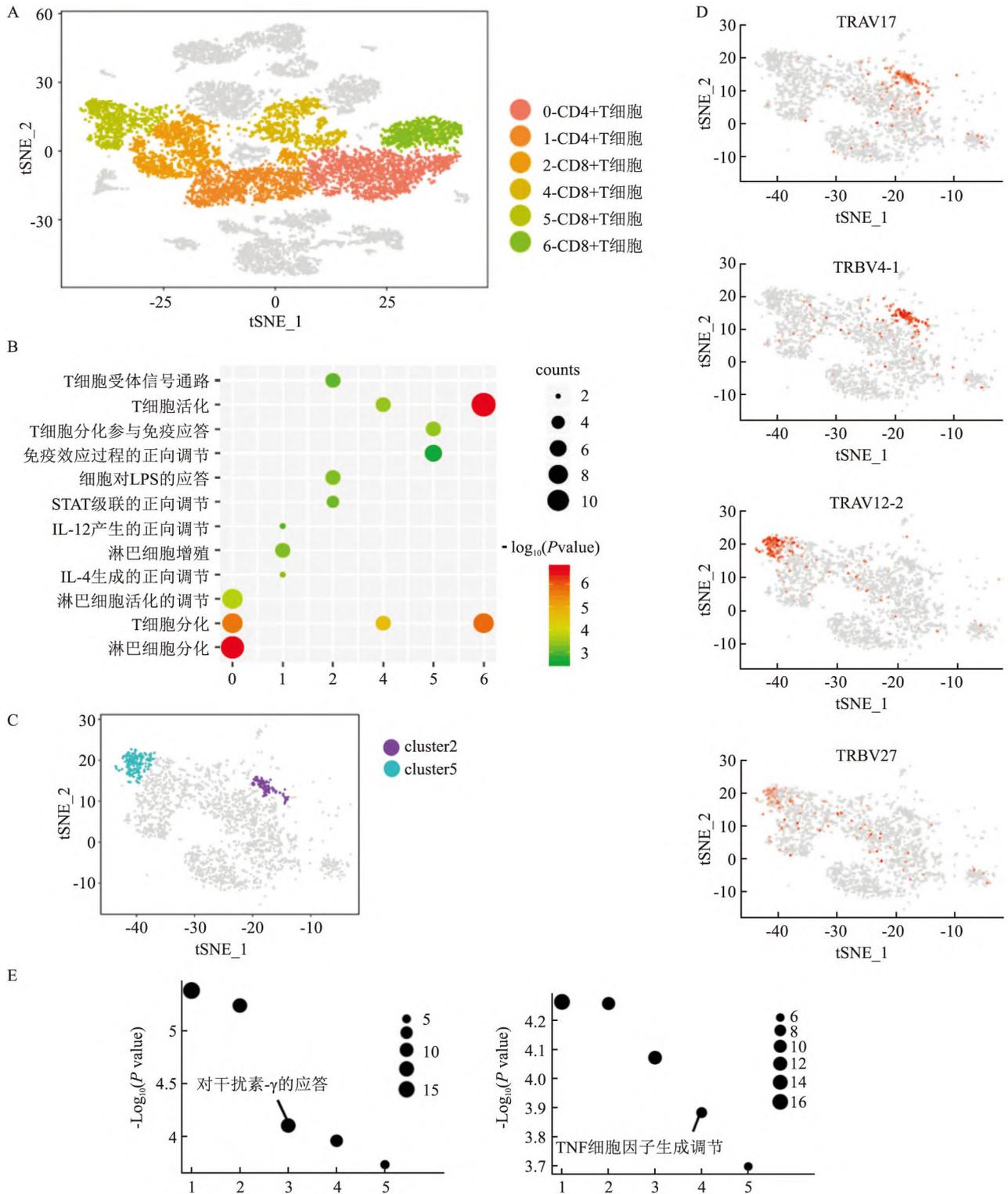


图3 TAK来源PBMC中T细胞各簇的聚类分析

A: 各簇T细胞的t-SNE; B: 各个T细胞簇特征性基因的功能富集, 横坐标为细胞簇, 纵坐标为富集功能, 点的大小代表参与该功能的基因数量, 颜色代表 $-\log_{10}(P\text{value})$; C: 表达TAK组特异性TCR克隆型的T细胞亚簇的t-SNE图; D: 特异性TCR基因的t-SNE图; E: 特异性TCR克隆型的T细胞亚簇的功能富集展示图

2.4 拟时序分析提示 TAK 相关的 B 细胞亚簇及其参与的重要通路 为了明确 TAK 下 B 细胞的变化, 寻找 B 细胞与 TAK 的相关发病机制, 抽提出融

合样本中的所有 B 细胞首先进行细分亚簇, 共得到 s0-s3 四个亚簇(图 4A): s0 亚簇为 TCL1A + FCER2 + immature B 细胞, s1 亚簇为 CD27 + TNFRSF13B

+ memory B 细胞, S2 亚簇为 FCER2 + IGLC3 + naive B 细胞, S3 亚簇为 IL4R + IGKV1-39 + plasma B 细胞(图 4B)。其中, S1 亚簇 CD27 + TNFRSF13B + 记忆 B 细胞在 TAK 中的组成比例特异升高(图 4C)。对以上 4 个 B 细胞亚簇进行拟时序分析,记

忆 B 细胞特异性 marker 基因 CD27 在发育末期的高表达(图 4D、E)。

2.5 各个细胞类型间复杂的配体受体相互作用

TAK 的发生发展中, PBMC 各种细胞类型共同参与, 通过理论上配体受体对结合产生相互作用, 对 TAK

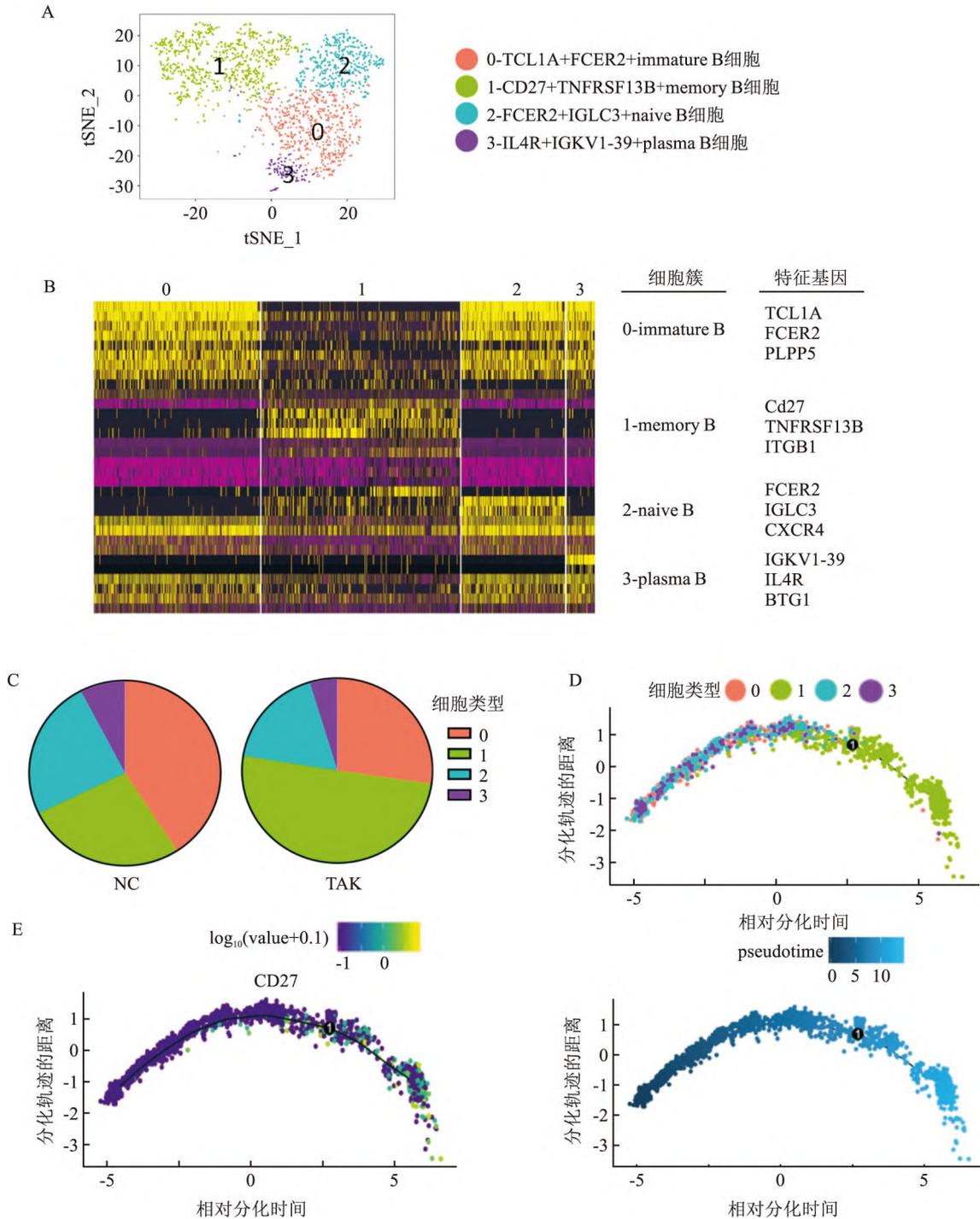


图 4 TAK 来源 PBMC 中 B 细胞各簇的聚类分析及拟时序分析

A: 各簇 B 细胞的 t-SNE 图; B: 每簇 B 细胞前 10 为特征基因展示热图; C: NC 组与 TAK 组每个 B 细胞亚簇占该样本所有 B 细胞数量的比例; D: B 细胞亚簇根据细胞分簇(上)或时序(下)的拟时序分化轨迹图; E: CD27 在拟时序图中各个分支上的表达情况

状态下 PBMC 各个细胞类型进行研究。将 NC 组单个样本和 TAK 组单个样本中形成的受体配体对进行对比,尽管单核细胞在 PBMC 中只有 15% 左右的比例,在所有细胞类型中单核细胞所形成的的配体受体相互作用始终是最多,提示单核细胞或许在 TAK 发展中占据细胞间通讯的主导地位(图 5)。

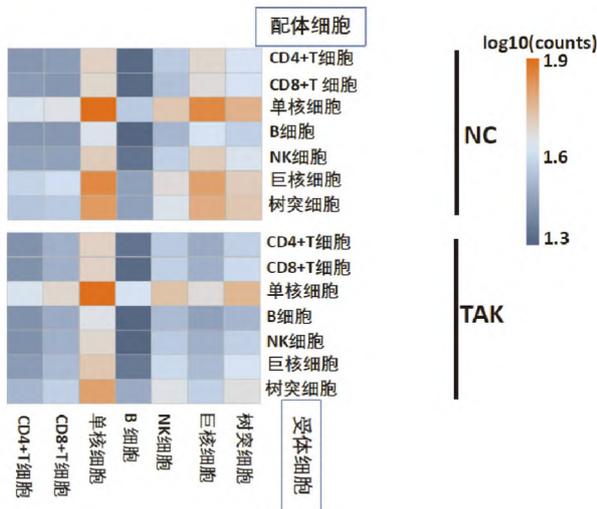


图 5 TAK 疾病下 PBMC 中各细胞类型配体受体相互作用

3 讨论

TAK 作为罕见的特发性全身炎症性疾病,影响大动脉,包括主动脉、其主要分支和肺动脉^[4]。TAK 目前详尽发病机制尚未明确,自身免疫和炎症反应参与其中^[5]。既往研究^[6]认为,CD4 + 和 CD8 + T 细胞的细胞介导免疫可能在大动脉炎的病理生理学中发挥关键作用,对其他免疫细胞的参与知之甚少。单细胞 RNA 测序技术,能反映细胞功能的表达谱特征、疾病状态下细胞群功能的改变以及揭示细胞间相互作用。该研究采用的 snRNA-seq 技术规避了 scRNA-seq 要求新鲜离体标本,对于罕见病人类受试者标本难以收集应用等的特点,同时精确聚焦到各种类型单个细胞,更加深入和真实反映疾病本身表达谱的改变。

本研究中,TAK 组 PBMC 中单核细胞上调 MN-DA,该蛋白仅在粒单核细胞系的细胞核中可被检测,同时当机体暴露于干扰素- α 状态时发生上调,提示 TAK 状态下外周血干扰素- α 异常表达^[7];CD4 + T 下调了 NFKBIA,提示 CD4 + T 对参与炎症反应的 NF- κ B / REL 复合物的抑制作用减弱^[8];CD8 + T 下调 TSC22D3,提示 CD8 + T 抑制促炎因子作用减

弱^[9];NK 细胞下调 ZFP36,提示 NK 细胞通过负反馈以限制炎症反应的作用减弱^[10]。以上结果表明 TAK 状态下机体处于促炎状态,且各种类型的免疫细胞都参与其中。

课题组将高克隆表型的已知 CDR3 区序列匹配到人源整合素 beta-3。已有报道^[11]该蛋白通过激活 MAPK,促进细胞毒性 T 细胞的活化,参与细胞因子 IL-2, IFN- γ , IL-4, and IL-17 的分泌,同时参与包括硬皮病在内的多种自身免疫性疾病,或许对 TAK 的发病机制具有一定的提示价值^[12]。对两种 TCR 克隆型占据了绝对优势的 T 细胞亚簇进行功能富集,提示分别具有干扰素- γ 和 TNF- α 相关信号通路高度富集的功能^[13]。既往有研究提示 TNF- α 和 IFN- γ 的协同作用可引发 SARS-CoV-2 感染和细胞因子休克综合征中的炎症细胞死亡和组织损伤,在 TAK 的发生发展中可发挥类似协同作用。此外,TAK 中数量明显上升的 CD27 + TNFRSF13B + memoryB 细胞可能是在 TAK 中发挥特殊功能的 memory B 细胞亚簇,参与体液免疫。既往研究^[14]已证明 TNFRSF13B 参与包括系统性红斑狼疮在内的多种自身免疫病的发病,但是在自身免疫为主导发病机制的 TAK 领域尚无相关的研究。这或许是 TAK 治疗的靶标之一。

综上所述,TAK 的发生发展不仅是传统研究关注的 T 细胞作为主要参与类型,而是各种免疫细胞类型参与的复杂调节,包括 B 细胞、单核细胞在内多种外周血免疫细胞都呈现出细胞亚簇比例和通路表达的异常。当然本研究也具有一定的局限性,例如由于罕见发病,入组病例数较少,同时本研究采用的标本为 PBMC 而非病变的血管本身,需要在接下来的研究工作中进一步探索。

参考文献

- [1] Trinidad B, Surmachevska N, Lala V. Takayasu arteritis[M]. StatPearls Publishing, 2023.
- [2] Delves P J, Martin S J, Burton D R, et al. Roitt's essential immunology[M]. John Wiley & Sons, 2017.
- [3] Maz M, Chung S A, Abril A, et al. 2021 American college of rheumatology/vasculitis foundation guideline for the management of giant cell arteritis and Takayasu arteritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73(8): 1349 - 65.
- [4] 余杨红, 邓克学, 许实成. 多发性大动脉炎的多层螺旋 CT 诊断[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(11): 1221 - 2.
- [5] Watanabe R, Berry G J, Liang D H, et al. Pathogenesis of giant cell arteritis and Takayasu arteritis—similarities and differences [J]. Curr Rheumatol Rep, 2020, 22(10): 68.

- [6] Arnaud L, Haroche J, Mathian A, et al. Pathogenesis of Takayasu's arteritis: a 2011 update[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 11(1): 61–7.
- [7] Briggs R C, Briggs J A, Ozer J, et al. The human myeloid cell nuclear differentiation antigen gene is one of at least two related interferon-inducible genes located on chromosome 1q that are expressed specifically in hematopoietic cells[J]. *Blood*, 1994, 83(8): 2153–62.
- [8] Yang W, Li J, Zhang M, et al. Elevated expression of the rhythm gene NFIL3 promotes the progression of TNBC by activating NF- κ B signaling through suppression of NFKBIA transcription[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 67.
- [9] Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor *via* inhibition of nuclear factor κ B[J]. *Blood*, 2001, 98(3): 743–53.
- [10] Emmons J, Townley-Tilson W H D, Deleault K M, et al. Identification of TTP mRNA targets in human dendritic cells reveals TTP as a critical regulator of dendritic cell maturation[J]. *RNA*, 2008, 14(5): 888–902.
- [11] Elizondo D M, Andargie T E, Marshall K M, et al. Dendritic cell expression of ADAM23 governs T cell proliferation and cytokine production through the α (v) β (3) integrin receptor[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(5): 855–64.
- [12] Banerjee S, Nara R, Chakraborty S, et al. Integrin regulated autoimmune disorders: understanding the role of mechanical force in autoimmunity[J]. *Fronat Cell Dev Biol*, 2022, 10: 852878.
- [13] Karki R, Sharma B R, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes[J]. *Cell*, 2021, 184(1): 149–68.
- [14] Wen L, Zhu C, Zhu Z, et al. Exome-wide association study identifies four novel loci for systemic lupus erythematosus in Han Chinese population[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(3): 417.

Analysis of peripheral blood mononuclear cells in Takayasu arteritis based on single cell nuclear transcriptome sequencing

He Chuan^{1,2}, Ding Yang¹, Wan Shengyun¹

(¹Dept of Vascular and Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Dept of Intervention, The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000)

Abstract *Objective* To characterize the genetic and functional heterogeneity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in Takayasu arteritis (TAK) based on single cell nuclear transcriptome sequencing (snRNA-seq) technology and to elucidate the immune mechanisms that may be involved. *Methods* A total of 6 PBMC specimens were collected from patients who were diagnosed with TAK and had not received drug treatment recently and were admitted to the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University and the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College as the disease group (TAK group). During the same period, PBMC specimens were collected from patients who visited the hospital's physical examination center. Six cases of PBMC in the population were in the normal group (NC group). Based on the snRNA-seq workflow, library construction and sequencing were performed, and R3.6.2 software was used to carry out PCA and tSNE analysis on the off-machine data from the two groups of PBMC sample pools for detection of gene expression in mononuclear cells. *Results* The relative proportion and content of immune cells in PBMC of TAK patients had changed; highly cloned TCR could match the amino acid sequence of integrin beta-3 with high homology; T cell-mediated interferon gamma and TNF α pathways were significantly up-regulated. The proportion of TNFRSF13B + memory B cells increased significantly. Monocytes consistently formed the largest number of ligand-receptor interactions of all cell types. *Conclusion* During the occurrence and development of TAK, PBMC are involved in complex regulation, and a variety of immune and inflammatory factors are abnormally expressed, among which monocytes play an important role in the interaction of PBMC. **Key words** single nuclei RNA sequencing; takayasu arteritis; peripheral blood mononuclear cell; immunity