



• 大数据与人工智能技术在生物学多场景的应用 •

|| 论 著 ||

单细胞转录组鉴定阿尔茨海默病外周血生物标志物 $GZMK^+ CD8^+$ T细胞*

段婷婷¹, 初金语¹, 胡斐斐^{1,2Δ}

1. 武汉科技大学医学院 脑科学先进技术研究院(武汉 430081); 2. 武汉科技大学附属亚洲心脏病医院(武汉 430022)

【摘要】目的 基于单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)挖掘阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)外周血免疫特征作为生物标志物, 系统性探索AD外周血免疫细胞亚型丰度、基因表达特征和细胞通讯异常。**方法** 从GEO数据库中下载AD外周血免疫细胞scRNA-seq数据集GSE168522, 于RAD-Blood网页服务器(<http://www.bioinform.cn/RAD-Blood/>)中分析AD患者血液细胞组成成分变化, 利用CellChat分析AD患者血液中异常的细胞间通讯作用。**结果** AD患者和健康人血液中有两种 $CD8^+$ T细胞, 其中一类高表达颗粒酶K(granzyme K, *GZMK*) (伪发现率(false discovery rate, FDR)<0.05), 另一类高表达*GZMA*、*GZMB*和*GZMH*(FDR<0.05)。 $GZMK^+ CD8^+$ T细胞在AD患者血液中含有量升高32.9%($P=5.15E-21$), 与其他细胞类型的交互作用增加, 并可能通过主要组织相容性复合体 I类(major histocompatibility complex class I, MHC- I)信号转导异常与AD关联, 红细胞为 $GZMK^+ CD8^+$ T细胞MHC- I信号通路异常提供了主要配体, 即人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I类分子(*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*和*HLA-E*)。血液RESISTIN信号通路仅富集于AD患者血液中, 其可能是AD血液特异性信号通路。**结论** 外周血 $GZMK^+ CD8^+$ T细胞含量升高、 $GZMK^+ CD8^+$ T细胞与红细胞的交互作用增加、RESISTIN通路增强是潜在的AD标志物。

【关键词】 阿尔茨海默病 单细胞RNA测序 血液生物标志物 $CD8^+$ T细胞

Identification of Peripheral Blood $GZMK^+ CD8^+$ T Cells As Biomarkers of Alzheimer's Disease Based on Single-Cell Transcriptome DUAN Tingting¹, CHU Jinyu¹, HU Feifei^{1,2Δ}. 1. Brain Science and Advanced Technology Institute, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China; 2. Wuhan Asia Heart Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Δ Corresponding author, E-mail: hufeifei@wust.edu.cn

【Abstract】 Objective Based on single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) to explore immune characteristics in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease (AD) as biomarkers. **Methods** GSE168522, the scRNA-seq dataset of AD peripheral blood immune cells, was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database and was analyzed in the RAD-Blood web server (<http://www.bioinform.cn/RAD-Blood/>). The changes in blood cell composition in AD patients were analyzed. The abnormal communications between different types of cells in AD patients were investigated by the CellChat R package. **Results** There were two kinds of $CD8^+$ T cells in the blood of AD patients and healthy individuals, one of which highly expressed granzyme K (*GZMK*) (false discovery rate [FDR]<0.05), and the other highly expressed *GZMA*, *GZMB*, and *GZMH* (FDR<0.05). In the blood of AD patients, the content of $GZMK^+ CD8^+$ T cells was increased by 32.9% ($P=5.15E-21$), their interactions with other cell types were increased, and they might be associated with AD through the abnormal signal transduction of major histocompatibility complex class I (MHC- I). Erythrocyte provided the main ligands, that are, human leukocyte antigen (HLA) class I molecules, including *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, and *HLA-E*, for the abnormal MHC- I signaling pathway of $GZMK^+ CD8^+$ T cells. The RESISTIN signaling pathway was specifically enriched in the blood of AD patients. **Conclusion** The increased content of peripheral blood $GZMK^+ CD8^+$ T cells, the increased interaction between $GZMK^+ CD8^+$ T cells and erythrocytes, and the enhanced RESISTIN pathway are potential blood biomarkers of AD.

【Key words】 Alzheimer's disease scRNA-seq Blood biomarkers $CD8^+$ T cell

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性痴呆为主要特征的中枢神经系统退行性变性疾病,

是痴呆的最常见原因, 约占痴呆的60%~80%^[1]。目前尚无根治AD的有效方法, 现有的药物只能延缓疾病的进展。因此, AD的早期诊断和干预至关重要。

大量研究表明, 生物标志物对AD早期诊断具有重要意义。与现有的脑脊液生物标志物和影像标志物相比,

* 武汉亚心总医院科研创新基金项目(No. 2022KYCX1-B10)和武汉科技大学启动基金资助

Δ 通信作者, E-mail: hufeifei@wust.edu.cn

基于血液的AD生物标志物能够提供一种快速、非侵入性且成本低廉的AD早期检测策略。已有研究确定了外周免疫细胞在AD诊断中的关键作用,如单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和T细胞等可能参与AD的发病。例如,研究发现单核细胞通过调节血液 β 淀粉样蛋白水平参与AD的发展^[2],而外周单核巨噬细胞的浸润入脑会限制AD的进展^[3]。AD血液的中性粒细胞比例显著增加,并通过整合素淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen, LFA-1)促进AD发病^[4]。还有研究在AD患者的脑脊液中检测到CD8⁺ T淋巴细胞,其通过脉络丛浸润入脑参与适应性免疫反应^[5]。但少有研究系统揭示血液中免疫细胞亚型的丰度、基因表达特征和细胞通讯异常与AD发生发展的关系。

本研究收集了GEO(Gene Expression Omnibus)数据库的GSE168522^[6]数据集,通过对AD患者及健康对照的血液免疫细胞单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)数据进行细胞注释、细胞含量分析、差异表达分析、通路富集分析和细胞通讯分析,发现外周血高表达颗粒酶K(granzyme K, GZMK)的GZMK⁺ CD8⁺ T细胞是一种潜在的AD标志物,其在AD患者血液中含量升高,与其他细胞类型的交互作用增加,并可能通过主要组织相容性复合体 I 类(major histocompatibility complex class I, MHC- I)信号转导与AD关联。其中红细胞为GZMK⁺ CD8⁺ T细胞MHC- I 信号通路异常提供了主要配体,即人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)I类分子(HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E)。基于这些发现,本研究将为AD早期诊断和治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 数据收集

外周血单细胞转录组数据来源于GEO数据库的GSE168522^[6]数据集,该数据集提取并纯化了4例(GSM5145403、GSM5145404、GSM5145405和

GSM5145406)AD患者和2名(GSM5145401和GSM5145402)正常人的外周血单核细胞,并使用10 \times Genomics Chromium测序平台进行scRNA-seq。

1.2 数据预处理

使用FastQC和Trimmomatic^[7]软件进行数据质控,使用Cell Ranger(v.6.1.2)将测序数据与人参考基因组(GRCh38)进行比对,获得细胞表达定量矩阵。使用Seurat标准分析流程进行质控、标准化和细胞聚类。对于数据质控:筛选含200~2000个独特分子标签、线粒体基因比例<10%的细胞进入后续分析。对质控后的数据进行标准化并鉴定在细胞间表达高度变化的基因。然后使用主成分分析方法进行线性降维。最后,进行细胞聚类,得到21个细胞簇,通过t-SNE(t-distributed stochastic neighbor embedding)进一步降维并可视化。

1.3 细胞注释

采用人工鉴定细胞类型。首先使用Seurat^[8-9]R包进行细胞标记基因识别,然后根据基因表达差异倍数、表达比例差异和统计学意义,初步筛选出靶细胞群的标记基因。然后结合既往文献报道、实验中发现以及CellMarker数据库中的标记基因鉴定细胞类型。各种细胞类型的标记基因如表1所示。

1.4 差异表达分析

提取经过Seurat R包处理之后的表达量数据,通过秩和检验对基因表达量进行组间比较获得差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。使用AD组的每种细胞类型的基因平均表达量除以正常组的每种细胞类型的基因平均表达量,再以2为底取log值,得到基因表达差异倍数。用各组每种细胞类型表达靶基因的细胞数除以每种细胞类型的总细胞数,得到各组靶细胞群表达目标基因的细胞比例。

1.5 细胞间通讯分析

通过R的CellChat包进行细胞间的通讯分析:将注释好的数据导入CellChat分析,可视化整合细胞通讯网络。

表 1 鉴定细胞类型的标记基因

Table 1 Marker genes used for cell type identification

Cell type	Marker genes					
B cell	CD19	MS4A1	CD79A	CD79B	CD27	
CD4 ⁺ T cell	IL7R	GZMK	KLRB1	KLRG1	CD3D	
CD8 ⁺ T cell	CD8A	CD8B	CD3D	CD3E	CD3G	
Dendritic cell	FCER1A	CD1C	CLEC10A	HLA-DQA1	CST3	
Erythrocyte	ALAS2	HBA1	HBA2	HBB	GYPA	
Megakaryocyte	PPBP	PF4	GP9	MYL9	TUBB1	
Monocyte	S100A8	LYZ	S100A9	S100A12	AIF1	VCAN FCN1
Naive CD8 ⁺ T cell	LDHB	GAS5	CCR7	LEF1	TCF7	
Natural killer cell	TRDC	FGFBP2	NKG7	GNLY	KLRF1	
Plasmacytoid dendritic cell	LILRA4	PLD4	STMN1	TXN	PARK7	NUCB2

首先绘制条形图、气泡图、弦图和热图比较不同细胞群之间的相互作用数量和强度,其次绘制条形图和热图比较每个信号通路的信息流和传出(或传入)信号模式,最后绘制气泡图比较由某些细胞群到其他细胞组的配体-受体对调节的通信概率。

1.6 统计学方法

利用皮尔森卡方检验分析AD患者与健康人血液细胞类型含量的差异;在细胞间通讯分析中,利用单侧置换检验鉴定具有统计学意义的细胞间通讯; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用秩和检验比较AD患者与健康人之间的基因表达差异以及比较不同细胞类型间的基因表达差异,当伪发现率(false discovery rate, FDR) < 0.05 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AD患者血液中多种免疫细胞类型的含量异常

从AD患者与健康人血液中鉴定出10种主要免疫细胞类型,包括: B细胞(B cell, 簇1、2、3), CD4⁺ T细胞(CD4⁺ T cell), 初始CD8⁺ T细胞(Naive CD8⁺ T cell, 簇1、2、3), CD8⁺ T细胞(CD8⁺ T cell, 簇1、2), 红细胞(erythrocyte), 自然杀伤细胞(natural killer cell, 簇1、2), 单核细胞(monocyte, 簇1、2、3、4), 巨核细胞(megakaryocyte, 簇1、2), 树突状细胞(dendritic cell)和浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, 簇1、2)。

不同免疫细胞在AD患者血液中的含量变化的结果显示,虽然各细胞类型在AD患者和健康人血液中均有分布,但部分细胞类型的含量却存在差异(图1,表2)。其中,相较于健康人,AD患者血液中B细胞(簇3)、CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞(簇2)、单核细胞(簇1)、初始CD8⁺ T细胞(簇3)、自然杀伤细胞(簇1)的占比上升($P < 0.05$),而B细胞(簇2)、红细胞、巨核细胞(簇1、2)、单核细胞(簇3)、初始CD8⁺ T细胞(簇1、2)、自然杀伤细胞(簇2)的比例下降($P < 0.05$)。两种类型的CD8⁺ T细胞在AD患者和健康人中的含量变化趋势相反,相较于健康人血液,AD患者簇1在AD中下降了4.3%($P = 0.07$),簇2在AD中上升了32.9%($P = 5.15E-21$)。这表明血液CD8⁺ T细胞簇1和簇2的功能存在差异,簇2可能是AD的潜在标志物。

2.2 AD患者和健康人血液免疫细胞亚型比较分析

各血液免疫细胞类型间基因差异表达分析结果表明,AD患者血液中存在一类较特殊的B细胞类型,即B细胞簇3。B细胞簇3的表达特征与其他B细胞明显不同(图2),其高表达*CD27*基因($FDR = 4.93E-11$),而低表达跨膜4结构域A1(membrane spanning 4-domains A1, *MS4A1*)和*CD79B*基因($FDR < 0.05$)。CD8⁺ T细胞簇1和2的标记基因表达也存在区别,其中簇2除表达簇1的标记基因外,还高表达*GZMK*基因($FDR = 4.70E-05$)。

如前所述,相较于健康人,AD患者血液中两种CD8⁺ T细胞含量变化不一致,其中CD8⁺ T细胞簇1含量下降了

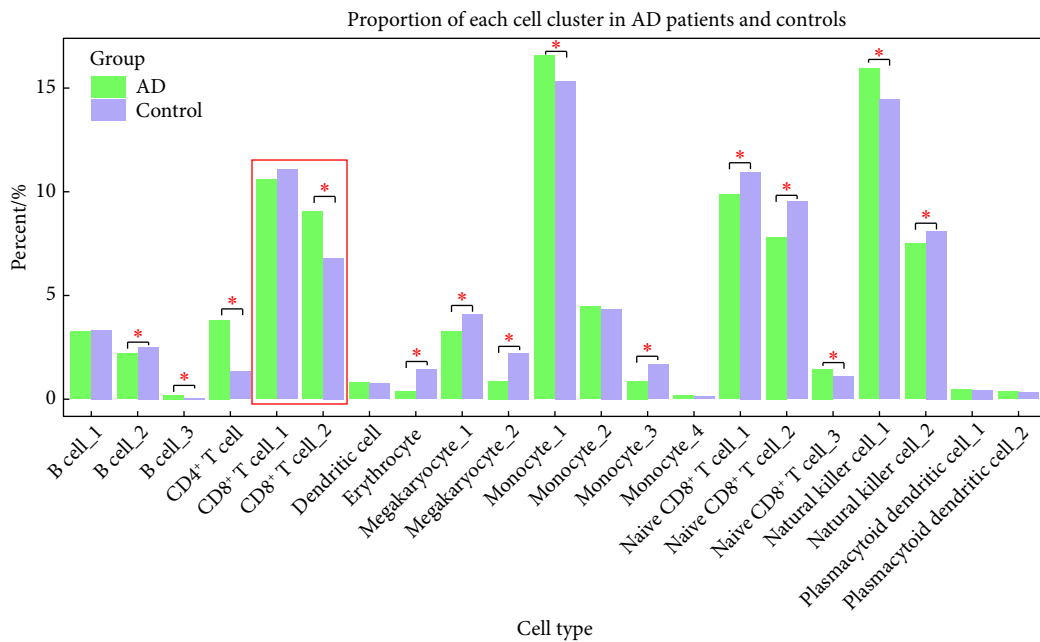


图 1 细胞类型分布情况

Fig 1 Distribution of the cell types

* $P < 0.05$.

表 2 细胞分布差异分析(卡方检验)
Table 2 Cell distribution difference analysis (Chi-square test)

Cell	AD (cell number)	Control (cell number)	χ^2	df	P
B cell_1	1563	629	0.29	1	0.59
B cell_2	1052	473	6.19	1	0.01
B cell_3	102	11	19.03	1	1.28E-05
CD4 ⁺ T cell	1830	250	277.14	1	3.15E-62
CD8 ⁺ T cell_1	5079	2083	3.22	1	0.07
CD8 ⁺ T cell_2	4333	1278	88.47	1	5.15E-21
Dendritic cell	385	141	0.50	1	0.48
Erythrocyte	172	270	237.99	1	1.08E-53
Megakaryocyte_1	1569	765	25.21	1	5.14E-07
Megakaryocyte_2	417	418	199.94	1	2.15E-45
Monocyte_1	7941	2887	14.77	1	1.21E-04
Monocyte_2	2139	818	0.41	1	0.52
Monocyte_3	420	316	80.01	1	3.72E-19
Monocyte_4	90	25	2.36	1	0.12
Naive CD8 ⁺ T cell_1	4730	2061	17.52	1	2.84E-05
Naive CD8 ⁺ T cell_2	3748	1792	51.74	1	6.34E-13
Naive CD8 ⁺ T cell_3	695	203	13.99	1	1.84E-04
Natural killer cell_1	7639	2717	22.97	1	1.65E-06
Natural killer cell_2	3604	1523	6.36	1	0.01
Plasmacytoid dendritic cell_1	238	85	0.56	1	0.45
Plasmacytoid dendritic cell_2	173	60	0.68	1	0.41

4.3%($P=0.07$), 而簇2含量则上升了32.9%($P=5.15E-21$) (图1)。提示CD8⁺ T细胞的两个簇在AD患者血液中可能参与不同的生物学过程。因此,本研究进一步分析CD8⁺ T细胞簇1和2的基因表达差异(图2),发现CD8⁺ T细胞簇1高表达GZMA、GZMB、GZMH、颗粒溶素(granulysin, GNLY)和穿孔素1(perforin 1, PRF1)基因($FDR<0.05$),而CD8⁺ T细胞簇2则高表达GZMK、含C-X9-C基序1(C-X9-C motif containing 1, CMC1)、CD74和淋巴毒素β(lymphotoxin beta, LTB)基因($FDR<0.05$)。进一步通过

对CD8⁺ T细胞簇1和2间的所有差异基因进行KEGG通路富集分析,发现与簇1相比,在簇2中上调的基因显著富集于AD相关通路,这进一步表明AD患者血液高表达GZMK的CD8⁺ T细胞可能在AD发生发展过程中发挥着重要的作用。

2.3 与健康人相比, AD患者血液CD8⁺ T细胞簇1中GZMK表达升高

AD患者和健康人之间不同类型的CD8⁺ T细胞基因差异表达分析结果显示,与健康人相比,GZMA、GZMH、CMC1、CD74基因在AD患者血液CD8⁺ T细胞的两个簇中均存在轻微上调($FDR<0.05$,但差异倍数小于1.5倍);GZMB、PRF1基因在AD患者血液CD8⁺ T细胞簇2中轻微上调,却在簇1中下调,但是GZMB在簇2中上调不显著,PRF1在簇1中下调不显著(均 $FDR>0.05$);GZMK基因在AD患者血液CD8⁺ T细胞簇1中显著上调($FDR<0.05$,差异倍数大于1.5倍),而在簇2中无显著变化(表3)。由于GZMK是簇2的特异表达基因,而簇2的含量在AD中上调,簇1的GZMK表达也在AD中上调,进一步表明GZMK高表达的CD8⁺ T细胞(GZMK⁺ CD8⁺ T细胞)可能是AD的标志物。AD患者血液中的CD8⁺ T细胞簇1可能倾向于上调GZMK而转化为簇2。另外,本研究分析了所有细胞在AD患者和健康人间的DEGs,发现仅红细胞和巨核细胞

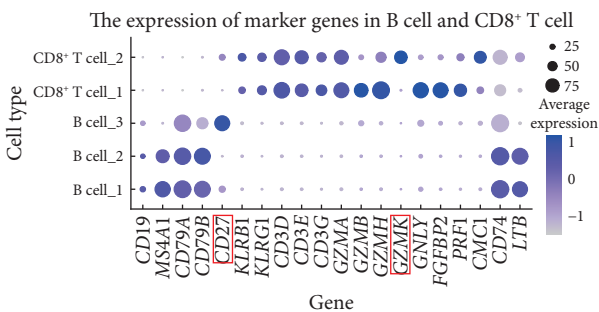


图 2 细胞间基因表达差异
Fig 2 Differences in gene expression between cells

Difference in gene expression between B cells and CD8⁺ T cells and other cell types. The size of the bubbles represents the fraction of genes in the subgroup; the shades of the color indicate the level of gene expression, with darker colors indicating higher gene expression.

表3 CD8⁺ T细胞中AD患者和健康人差异基因表达情况
Table 3 DEGs in CD8⁺ T cells between AD patients and controls

Gene	CD8 ⁺ T cell_1		CD8 ⁺ T cell_2	
	Marker	AD vs. Control	Marker	AD vs. Control
GZMA	Yes	Up	No	Up
GZMB	Yes	Down	No	Up (Not significant)
GZMH	Yes	Up	No	Up
GZMK	No	Up	Yes	Down (Not significant)
LTB	No	Up (Not significant)	Yes	Down
CMC1	No	Up	Yes	Up
CD74	No	Up	Yes	Up
PRF1	Yes	Down (Not significant)	No	Up
GNLY	Yes	Down (Not significant)	No	Down (Not significant)

Up represents log₂ fold change>0 and FDR<0.05; Down represents log₂ fold change<0 and FDR<0.05; Not significance represents FDR>0.05.

(簇2)中大量基因上调,少量下调。而其余细胞类型均是大量基因下调,少量上调。表明AD患者血液中的免疫细胞功能多偏向于降低而非增强。

2.4 AD患者血液GZMK⁺ CD8⁺ T细胞的细胞交互数目及强度增强

细胞通讯分析结果表明,与其他细胞类型相比,CD8⁺ T细胞与其他细胞间存在更多的交互作用数量和更高的交互强度(图3A)。进一步对GZMK⁺ CD8⁺ T细胞与其他各细胞类型之间交互作用的数量和强度进行分析。结果表明,与健康人相比,AD患者血液GZMK⁺ CD8⁺ T细胞(簇2)作为信号输出细胞时,其与浆细胞样树突状细胞簇2的交互强度上升(图3B);当GZMK⁺ CD8⁺ T细胞作为信号接收细胞时,其与所有细胞类型的交互强度均上升(图3B、3C)。与此同时,与健康人相比,CD8⁺ T细胞簇1作为信号接收细胞时,与几乎所有细胞类型之间的相互作用强度均下调(图3C),除了红细胞。而红细胞作为信号发出细胞,与GZMK⁺ CD8⁺ T细胞的交互作用上升最明显(图3C),提示血液红细胞与CD8⁺ T细胞之间的通讯作用增强可能与AD进展相关。

2.5 AD患者血液中介导细胞间通讯作用的特异性信号通路

AD患者和健康人间信号通路信息流差异分析结果表明,与健康人相比,AD患者血液中抵抗素(RESISTIN)、内皮细胞选择性黏附分子(endothelial cell-selective adhesion molecule, ESAM)、MHC- I、CD99介导的信息流更强。其中RESISTIN信号通路在AD患者血液中高度活跃,而在健康人血液中无富集,这表明RESISTIN可能是AD患者血液中的特异性信号通路(图4A)。通过分析RESISTIN通路在不同细胞类型中的富集情况,发现

RESISTIN相关信号在AD患者血液单核细胞(簇1、2、3、4)中高度活跃(图4B)。

同时,RESISTIN也介导了AD血液CD8⁺ T细胞的信息流增强(图4B、4C),但贡献十分有限。进一步对GZMK⁺ CD8⁺ T细胞输入和输出信号模式分析发现,AD患者血液GZMK⁺ CD8⁺ T细胞中,由MHC- I、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)、CD99、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, LCK)、c型凝集素受体(c-type lectin receptors, CLEC)、半乳糖凝集素(GALECTIN)、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)和RESISTIN等介导的输入信号强度增强,由MHC- I、CD99、CLEC、LCK和整合素亚基β2(integrin subunit beta 2, ITGB2)等介导的输出信号强度增强(图4C)。表明AD患者血液中GZMK⁺ CD8⁺ T细胞通过多条通路增强其与其他细胞类型之间的通讯。其中,MHC- I介导的GZMK⁺ CD8⁺ T细胞输入、输出信号增强均是最显著的。

2.6 GZMK⁺ CD8⁺ T细胞与其他细胞类型间相互作用的配体-受体差异

分析介导GZMK⁺ CD8⁺ T细胞与其他细胞间相互作用的配体-受体对的通讯强度情况,结果表明,由配体HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E与受体CD8A和CD8B组成的配体-受体对介导的信号转导通路是GZMK⁺ CD8⁺ T细胞接收其他免疫细胞信号传输的主要途径(图5A)。且这些配体-受体信号在AD患者血液中的强度要高于健康人($P < 0.01$)。而在作为信号输出细胞时,由配体HLA-A、HLA-B和HLA-C与受体CD8A和CD8B组成的配体-受体基本只介导CD8⁺ T细胞之间的通讯(图5B)。由此可见,MHC- I信号通路在AD患者血液中的活性一

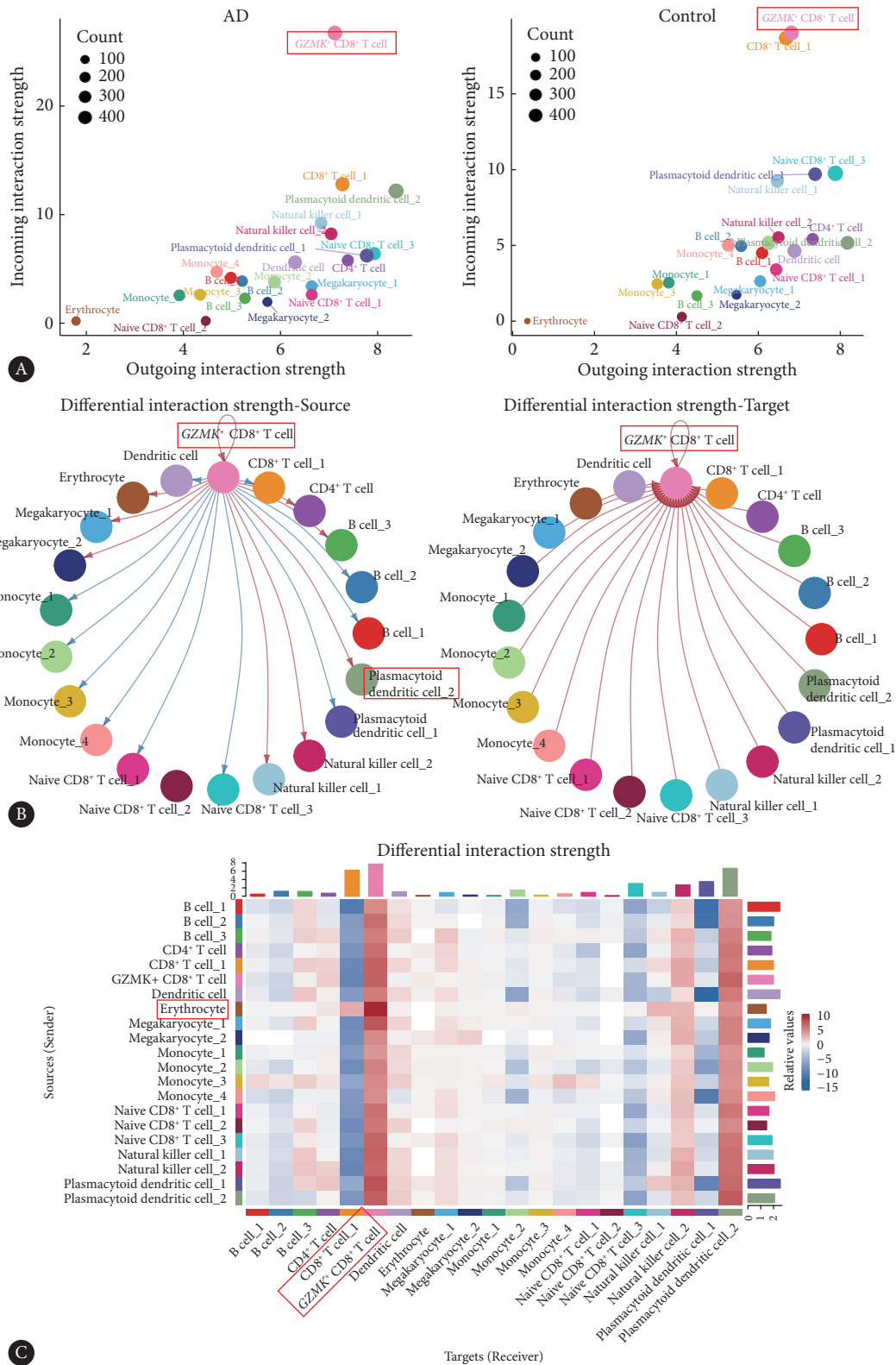


图 3 AD患者和健康人血液中细胞交互数目及强度差异

Fig 3 Differences in the number and strength of cell interactions between AD patients and controls

A, Bubble plots of the number (left) and strength (right) of cellular interactions in $GZMK^+ CD8^+$ T cell. B, $GZMK^+ CD8^+$ T cell as signal sender (left) and receiver (right) versus other cell interactions between AD patients and controls. Red (or blue) arrows indicate increased (or decreased) signals in AD patients compared with controls. C, The differences in the strength of inter-cellular communication between AD patients and controls. The colored bar charts at the top (or right) represent the sum of absolute values of the column values (or row values) shown in the heat map. The red (or blue) in each cell indicates an increased (or decreased) signal in AD patients compared to controls.

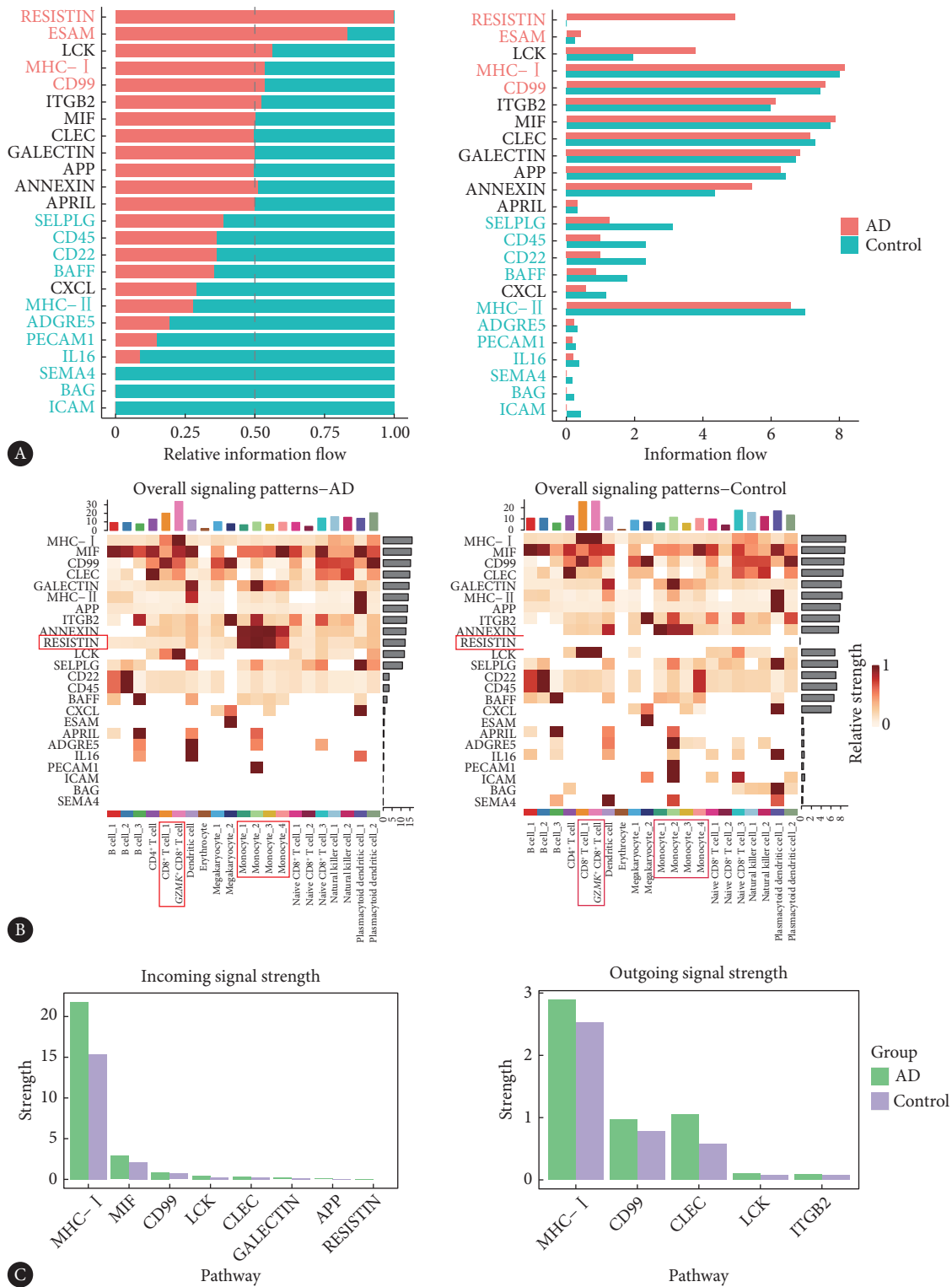


图 4 AD患者和健康人的血液免疫细胞通讯网络中的信号通路信息流差异

Fig 4 Difference in information flow of signal pathway in cellular communication network between AD patient and control blood samples

A, The bar chart shows the difference in overall information flow between AD patients and controls. The red signal pathway is enriched in AD patients, while the green signal pathway is enriched in healthy controls. The font color on the ordinate represents the significance of the Wilcoxon test, with red and green representing $P < 0.05$ and black representing $P > 0.05$. B, The overall signal pattern in AD patients and controls. The top (or right) bar graph represents the sum of column values (or row values) displayed in the heat map and the darker the color, the higher the signal strength. C, Statistical of the incoming (left) and outgoing (right) signal patterns of *GZMK*⁺ *CD8*⁺ T cell in AD patients and controls.

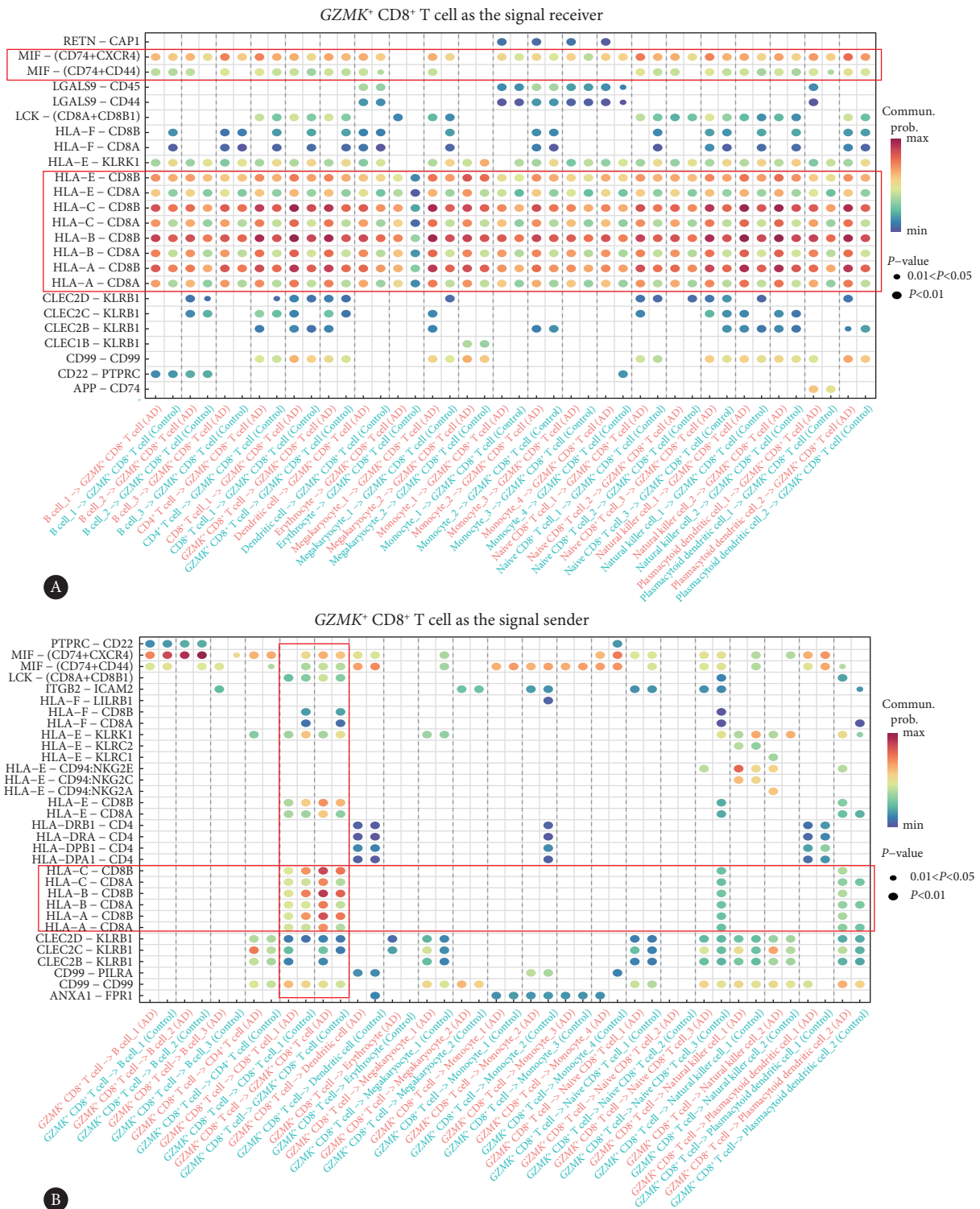


图 5 AD患者和健康人血液中GZMK⁺ CD8⁺ T细胞与其他细胞间配体-受体对变化差异

Fig 5 Differences in changes between AD patients and controls in intercellular ligand-receptor pairs between GZMK⁺ CD8⁺ T cell and other cells

A, Probability of communication mediated by ligand-receptor pairs from other cell types to GZMK⁺ CD8⁺ T cell; B, probability of communication mediated by ligand-receptor pairs from GZMK⁺ CD8⁺ T cell to other cell types.

致增强。另外,本研究还观察到由配体MIF与受体CD74及CXCR4组成的配体-受体信号在AD患者血液中增强($P < 0.01$) (图5A)。接下来为了探究AD患者血液

GZMK⁺ CD8⁺ T细胞中MHC- I 信号通路的基因表达分布,进行了差异表达分析。结果表明,与健康人相比,CD8A和CD8B在AD患者的GZMK⁺ CD8⁺ T细胞中一致小

幅上调(FDR<0.05)(图6A),配体HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E的表达则在红细胞中显著上调(FDR<0.05)

(图6B),提示血液红细胞为AD患者血液CD8⁺T细胞受体激活提供了主要的配体。

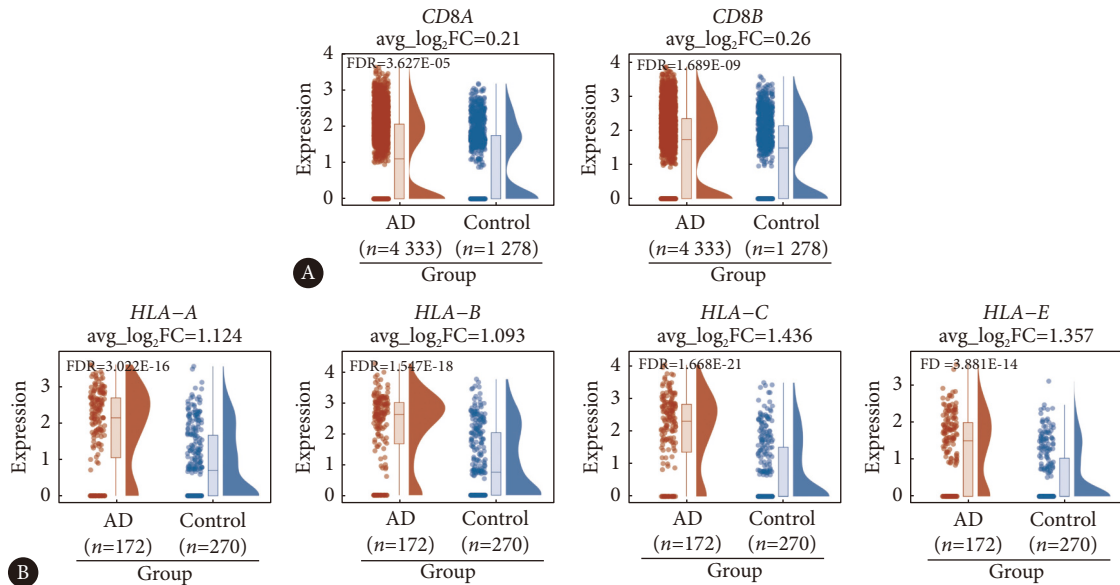


图6 MHC-I通路的配体和受体基因的表达情况

Fig 6 Expression of ligand and receptor genes of MHC-I pathway

A, Expression difference of CD8A and CD8B genes between AD patients and controls in GZMK⁺CD8⁺T cell; B, expression difference of HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-E genes in erythrocyte between AD patients and controls. The abbreviation avg_log₂FC represents average log₂ fold change.

3 讨论

本研究展示了AD患者和健康人血液中66724个免疫细胞在单细胞水平上的基因表达变化和细胞通讯分析结果,揭示了血液中10种主要的免疫细胞亚群,并发现AD患者和健康人血液中细胞亚群的比例和基因表达模式存在一定区别。本研究发现血液中有两种CD8⁺T细胞,其中高表达GZMK的CD8⁺T细胞在AD患者血液中含显著上升;除此之外,AD患者血液中CD4⁺T细胞的数量也上升,这与以往利用流式细胞技术获得的研究结果一致^[10-11],但CD8⁺T细胞比例的变化仍没有得出一致的结论。如一些研究发现AD患者的血液CD8⁺T细胞显著减少^[12-13],而另一部分研究则得出相反的结论^[14]。还有研究发现在轻度AD患者中,活化的CD8⁺T细胞在外周血和脑脊液中的比例显著增加^[5,15]。这也提示需进一步细分细胞亚群以探究CD8⁺T细胞的含量变化。外周血T细胞亚群分布异常提示AD患者可能存在适应性免疫功能障碍,而这种免疫功能异常可能与认知功能相关。如研究表明,外周血中含量升高的活化CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞与AD患者的认知缺陷和特定脑区的磁共振成像变化密切相关^[5]。另外,已有部分研究揭示了外周血T细胞影响中枢神经系统的机制。如一项单细胞测序研究表明,在血

液和脑脊液中都检测到了具有相同克隆类型的CD8⁺T细胞,这表明外周血CD8⁺T细胞似乎可以进入大脑然后发挥作用^[15]。因此,笔者推测外周免疫细胞亚群的比例和功能异常可能与中枢神经系统免疫环境的恶化相关。

为了探究可能引起中枢神经免疫环境恶化的细胞类型及其功能异常,本研究进一步聚焦于CD8⁺T细胞。结果发现两种CD8⁺T细胞在AD患者血液中的变化趋势并不一致,其中簇1含量下降,簇2含量则显著上升,提示CD8⁺T细胞的分化可能与AD相关。进一步比较两种CD8⁺T细胞亚型的基因表达差异,发现GZMA、GZMB、GZMH、GNLY、PRF1基因在CD8⁺T细胞簇1中高表达,而GZMK、CMC1、CD74、LTB基因在簇2中高表达。因此CD8⁺T细胞簇2是一种GZMK⁺CD8⁺T细胞。研究表明,GZMK⁺CD8⁺T细胞是具有低细胞毒性潜能的主要细胞因子生产者,在抗原依赖性和抗原非依赖性刺激下产生细胞因子,具有驱动炎症的潜力^[16]。而本研究发现AD患者血液中GZMK⁺CD8⁺T细胞的含量比健康人更高,表明AD患者血液炎症水平要高于健康人,这与既往研究一致^[7]。与此同时,本研究分别对两种CD8⁺T细胞亚型进行了AD-健康人差异表达分析。进一步发现GZMK基因在AD患者血液CD8⁺T细胞簇1中显著上调,而在簇2中无显著变化。由于GZMK是簇2的特异表达基因,而簇2含量

在AD患者血液中上升。因此,笔者推测AD患者血液中的CD8⁺ T细胞簇1可能通过上调GZMK分化为CD8⁺ T细胞簇2。综上所述,GZMK⁺ CD8⁺ T细胞可能是AD外周血标志物。

本研究进一步探究了GZMK⁺ CD8⁺ T细胞在AD患者血液中与其他细胞类型间的通讯异常及相关的分子通路。首先,在通讯强度和数量水平上,作为与其他细胞类型通讯数量最多、强度最高的细胞,GZMK⁺ CD8⁺ T细胞的通讯活性在AD患者血液中进一步增强。特别是当GZMK⁺ CD8⁺ T细胞作为信号接收细胞时,其与所有细胞类型的交互强度均上升。其中,当红细胞作为信号发出细胞,与GZMK⁺ CD8⁺ T细胞的交互作用在AD患者血液中上升最明显。而相对地,GZMK⁻ CD8⁺ T细胞作为信号接收细胞时,与几乎所有细胞类型之间的相互作用强度均下调。其次,在信号通路水平上,RESISTIN是特异富集于AD患者血液中的信号通路。这表明血液RESISTIN水平可能是AD标志物,且具有特异性。这与已发表的一项研究一致,该研究是一项基于38例AD患者和32例对照受试者的小型临床研究,作者观察到AD患者血清RESISTIN水平升高,使用血浆RESISTIN测定作为AD的诊断标志物具有较高的灵敏度和特异性^[18]。另外,ESAM、MHC- I、CD99相关通路在AD患者血液中更活跃。本研究基于配体-受体对的分析还发现,血液红细胞与CD8⁺ T细胞之间的通讯作用增强主要通过MHC- I通路介导。其中涉及到的配体主要包括HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E,受体主要为CD8A和CD8B分子。对这些受体和配体进行差异表达分析发现,与健康人相比,CD8A和CD8B在AD患者的GZMK⁺ CD8⁺ T细胞中上调,配体HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E的表达则在红细胞中显著上调。目前已经有研究表明生理条件下MHC- I基因在神经元中表达水平相对较低,而在兴奋性应激、癫痫发作、损伤和衰老后表达增加^[19-22]。基于以上研究,笔者推测GZMK⁺ CD8⁺ T细胞中的MHC- I信号通路及相关的配体-受体异常可能与AD发病有关。

综上所述,本研究通过对AD患者及健康对照的血液免疫细胞scRNA-seq数据进行细胞注释、细胞含量分析、差异表达分析、通路富集分析和细胞通讯分析,发现外周血GZMK⁺ CD8⁺ T细胞是一种潜在的AD标志物,其在AD患者血液中含量升高,与其他细胞类型的交互作用增加,并可能通过MHC- I信号转导异常推动AD发生发展,红细胞为GZMK⁺ CD8⁺ T细胞MHC- I信号通路异常提供了主要配体,即HLA I类分子(HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-E)。以上发现将为AD外周血免疫相关标志物

后续的研究与应用提供新思路。

* * *

作者贡献声明 胡斐斐负责论文构思、数据审编、经费获取、调查研究、研究方法、研究项目管理、提供资源、监督指导、验证、可视化、初稿写作和审读与编辑写作,段婷婷负责数据审编、正式分析、调查研究、研究方法、软件、验证、可视化和初稿写作,初金语负责正式分析、研究方法、软件、验证和可视化。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(4): 1598-1695. doi: 10.1002/alz.13016.
- [2] CHEN S H, TIAN D Y, SHEN Y Y, *et al.* Amyloid-beta uptake by blood monocytes is reduced with ageing and Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 423. doi: 10.1038/s41398-020-01113-9.
- [3] YAN P, KIM K W, XIAO Q, *et al.* Peripheral monocyte-derived cells counter amyloid plaque pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 2022, 132(11): e152565. doi: 10.1172/JCI152565.
- [4] ZENARO E, PIETRONIGRO E, DELLA BIANCA V, *et al.* Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*, 2015, 21(8): 880-886. doi: 10.1038/nm.3913.
- [5] UNGER M S, LI E, SCHARNAGL L, *et al.* CD8⁺ T-cells infiltrate Alzheimer's disease brains and regulate neuronal- and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain Behav Immun*, 2020, 89: 67-86. doi: 10.1016/j.bbi.2020.05.070.
- [6] XIONG L L, XUE L L, DU R L, *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals B cell-related molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Mol Med*, 2021, 53(12): 1888-1901. doi: 10.1038/s12276-021-00714-8.
- [7] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- [8] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, *et al.* Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(5): 411-420. doi: 10.1038/nbt.4096.
- [9] HAO Y, HAO S, ANDERSEN-NISSEN E, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 2021, 184(13): 3573-3587.e29. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.048.
- [10] OBERSTEIN T J, TAHA L, SPITZER P, *et al.* Imbalance of circulating Th17 and regulatory T cells in Alzheimer's disease: a case control study. *Front Immunol*, 2018, 9: 1213. doi: 10.3389/fimmu.2018.01213.
- [11] FU J, DUAN J, MO J, *et al.* Mild cognitive impairment patients have higher regulatory T-cell proportions compared with Alzheimer's disease-related dementia patients. *Front Aging Neurosci*, 2021, 12: 624304. doi: 10.3389/fnagi.2020.624304.
- [12] HUANG L T, ZHANG C P, WANG Y B, *et al.* Association of peripheral blood cell profile with Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 888946. doi: 10.3389/fnagi.2022.888946.

- [13] XU H, JIA J. Single-cell RNA sequencing of peripheral blood reveals immune cell signatures in Alzheimer's disease. *Front Immunol*, 2021, 12: 645666. doi: [10.3389/fimmu.2021.645666](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645666).
- [14] LI J, ZHANG Y, LU T, *et al.* Identification of diagnostic genes for both Alzheimer's disease and Metabolic syndrome by the machine learning algorithm. *Front Immunol*, 2022, 13: 1037318. doi: [10.3389/fimmu.2022.1037318](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1037318).
- [15] GATE D, SALIGRAMA N, LEVENTHAL O, *et al.* Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Nature*, 2020, 577(7790): 399–404. doi: [10.1038/s41586-019-1895-7](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1895-7).
- [16] JONSSON A H, ZHANG F, DUNLAP G, *et al.* Granzyme K^+ CD8 T cells form a core population in inflamed human tissue. *Sci Transl Med*, 2022, 14(649): eabo0686. doi: [10.1126/scitranslmed.abo0686](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo0686).
- [17] ISMAIL R, PARBO P, MADSEN L S, *et al.* The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 151. doi: [10.1186/s12974-020-01820-6](https://doi.org/10.1186/s12974-020-01820-6).
- [18] KIZILARSLANOĞLU M C, KARA Ö, YEŞİL Y, *et al.* Alzheimer disease, inflammation, and novel inflammatory marker: resistin. *Turk J Med Sci*, 2015, 45(5): 1040–1046.
- [19] MANGOLD C A, MASSER D R, STANFORD D R, *et al.* CNS-wide sexually dimorphic induction of the major histocompatibility complex 1 pathway with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017, 72(1): 16–29. doi: [10.1093/gerona/glv232](https://doi.org/10.1093/gerona/glv232).
- [20] ZALOCUSKY K A, NAJM R, TAUBES A L, *et al.* Neuronal ApoE upregulates MHC- I expression to drive selective neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2021, 24(6): 786–798. doi: [10.1038/s41593-021-00851-3](https://doi.org/10.1038/s41593-021-00851-3).
- [21] KOMAL P, MANJARI S K V, NASHMI R. An opinion on the debatable function of brain resident immune protein, T-cell receptor beta subunit in the central nervous system. *IBRO Neurosci Rep*, 2022, 13: 235–242. doi: [10.1016/j.ibneur.2022.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.09.003).
- [22] DAS R, CHINNATHAMBI S. Microglial priming of antigen presentation and adaptive stimulation in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(19): 3681–3694. doi: [10.1007/s00018-019-03132-2](https://doi.org/10.1007/s00018-019-03132-2).

(2023-06-12 收稿, 2023-08-29 修回)

编辑 余琳



开放获取 本文遵循知识共享署名—非商业性使用

4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 允许第三方对本刊发表

的论文自由共享 (即在任何媒介以任何形式复制、发行原文)、演绎 (即修改、转换或以原文为基础进行创作), 必须给出适当的署名, 提供指向本文许可协议的链接, 同时标明是否对原文作了修改; 不得将本文用于商业目的。

CC BY-NC 4.0 许可协议访问 <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

© 2023 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有