

· 临床研究 ·

自体外周单核细胞治疗肌萎缩侧索硬化疗效及外周淋巴细胞变化观察

赵舒怡¹, 裘冯卓², 史明超¹, 康悦¹, 杨涛¹, 许迅¹, 李军荣³, 李圣华³, 李冠宇⁴, 金庆文^{1*}

¹南京医科大学附属逸夫医院神经内科, 江苏 南京 211166; ²宁波市杭州湾医院神经内科, 浙江 宁波 315336; ³南京医科大学江宁医院神经内科, 江苏 南京 211100; ⁴南京中医药大学附属南京医院神经内科, 江苏 南京 210003

[摘要] 目的:探讨体外扩增的自体外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)患者的治疗作用,以及外周血淋巴细胞亚群分类与症状改善之间的关系。方法:收集2019年10月—2021年8月南京医科大学附属逸夫医院神经内科和南京中医药大学附属南京医院神经内科符合标准的ALS患者65例,通过随机号码法将患者随机分为PBMC组(PBMC 1×10^6 个/kg 体重+20% 人体白蛋白 100 mL, 33例)和对照组(20% 人体白蛋白 100 mL, 32例)。分别于治疗前、治疗后第5天及第14天,以修订版ALS功能评定量表(revised ALS functional rating scale, ALSFRS-R)评分,并测定外周血CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞及CD16⁺CD56⁺ NK细胞数目。结果:①PBMC组ALSFRS-R评分于治疗后第5天[(30.1±3.4)分]、第14天[(26.5±2.0)分]均较治疗前[(25.3±1.4)分]升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组治疗前后ALSFRS-R评分变化差异无统计学意义($P > 0.05$);②PBMC组治疗后第5天、第14天CD8⁺ T细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞均增高,与对照组、PBMC治疗前比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CD4⁺ T细胞、CD16⁺CD56⁺ NK细胞在PBMC组治疗前后以及与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。对照组治疗前后上述细胞变化均无统计学意义($P > 0.05$);③患者在PBMC治疗后第5、14天时,CD8⁺ T细胞数量与ALSFRS-R分数呈负相关($P < 0.05$);CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞数量与ALSFRS-R分数呈正相关($P < 0.05$)。结论:体外扩增的自体PBMC回输治疗可以短期改善ALS患者的临床症状,且外周血CD8⁺ T细胞和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞数的变化与疾病临床进展有关系。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化;淋巴细胞亚群;外周血单核细胞;修订版肌萎缩侧索硬化功能评定量表;免疫

[中图分类号] R746.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)05-701-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20230516

Effect of autologous peripheral blood mononuclear cells on amyotrophic lateral sclerosis and changes of peripheral lymphocytes

ZHAO Shuyi¹, QIU Fengzhuo², SHI Mingchao¹, KANG Yue¹, YANG Tao¹, XU Xun¹, LI Junrong³, LI Shenghua³, LI Guanyu⁴, JIN Qingwen^{1*}

¹Department of Neurology, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Department of Neurology, Ningbo Hangzhou Bay Hospital, Ningbo 315336; ³Department of Neurology, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211100; ⁴Department of Neurology, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210003, China

[Abstract] **Objective:** To explore the therapeutic effect of expanded autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro on patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and the correlation between the peripheral blood lymphocyte subgroup classification and the improvement of symptoms. **Methods:** Between October 2019 and August 2021, a total of 65 ALS cases were enrolled from the Department of Neurology at Sir Run Run Hospital affiliated of Nanjing Medical University and Nanjing Hospital affiliated of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. The patients were randomly assigned to two groups: the PBMC group (33 cases) received a treatment of PBMCs (1×10^6 /kg body weight) and 20% human albumin (100 mL), while the control group (32

[基金项目] 国家自然科学基金(81671117)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qingwen_jin@126.com

cases) received only 20% human albumin (100 mL). The revised ALS Functional Rating Scale (ALSFRS-R) was scored before and on the day 5 and day 14 after the treatment. The number of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells, and CD16⁺CD56⁺ NK cells in peripheral blood were measured. **Results:** ①The ALSFRS-R scores in PBMC group were significantly higher on the 5th day (30.1 ± 3.4 points) and the 14th day (26.5 ± 2.0 points) after treatment than that before treatment (25.3 ± 1.4 points) ($P < 0.05$). There was no significant difference in ALSFRS-R score before and after treatment in the control group ($P > 0.05$); ②CD8⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in PBMC group were increased on the 5th and 14th day after treatment, which were significantly higher than those in control group and PBMC group before treatment ($P < 0.05$). There was no statistical significance in CD4⁺ T cells and CD16⁺CD56⁺ NK cells before and after treatment in PBMC group and compared with the control group ($P > 0.05$). Also there was no statistical significance in all the changes of the above in control group before and after treatment ($P > 0.05$); ③At the 5th and 14th day after PBMC treatment, the number of CD8⁺ T cells was negatively correlated with the ALSFRS-R score ($P < 0.05$); The number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells was positively correlated with the ALSFRS-R score ($P < 0.05$). **Conclusion:** The reinfusion therapy of autologous PBMC expanded in vitro can improve the clinical symptoms of ALS patients in a short time, and the changes in the number of CD8⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in peripheral blood are correlated to the clinical progression of the disease.

[**Key words**] amyotrophic lateral sclerosis; lymphocytesubsets; peripheral blood mononuclear cell; revised amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale; immunity

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05):701-707]

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种成人致命的神经退行性疾病,涉及皮层、脑干和脊髓的上、下运动神经元进行性丢失,通常在症状出现后的3~5年内因呼吸肌麻痹死亡^[1-2]。ALS发病机制未明,神经炎症被归为ALS病情发展的重要原因,其中外周免疫系统起到关键作用。有研究表明,ALS患者外周血中的CD4⁺ T淋巴细胞水平降低,其中调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)的比例与ALS的疾病进展呈负相关^[3];外周血中CD8⁺ T细胞的数量变化存在争议,可能与个体变异性有关^[4-6]。然而,外周免疫系统在ALS进展中的具体作用尚不清楚,并且最近发现ALS患者血液和脑脊液中免疫和细胞因子谱的结果并不完全一致^[7-11]。在ALS小鼠模型中,Treg的减少助长了神经炎症过程,降低了运动神经元的存活率且加速其死亡,被动进行Treg细胞输入可抑制神经炎症和延长小鼠存活时间;从ALS患者中分离功能失调的Treg细胞在体外扩增时加入白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和雷帕霉素刺激可以恢复Treg细胞功能^[12];近日,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)授予一种自体扩增的Treg细胞疗法(ALS001)为ALS的孤儿药。以上提示,Treg细胞有可能为ALS的治疗带来希望。

为了进一步探索外周免疫在ALS疾病进展中的作用,本研究选取在体外扩增的自体外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)回输治疗后短期内临床症状显著改善的ALS患者,观察

其在治疗前后不同时间点临床症状与外周血淋巴细胞亚群间的变化关系。细胞亚群方面主要观察了CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞、CD16⁺CD56⁺自然杀伤(natural killer, NK)细胞的数量变化,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究选取了2019年10月—2021年8月在南京医科大学附属逸夫医院神经内科和南京中医药大学附属南京医院神经内科诊治的病例,分别来自江苏、安徽、福建、上海、浙江等地,起病年龄32~69岁。所有病例经过至少2名具有3~5年ALS诊疗经验的神经内科主治医师诊断,均严格按照EI Escorial诊断标准进行确诊。最终入选65例患者,根据随机表领取随机号码,随机分为两组:接受回输体外扩增自体细胞的PBMC组(PBMC 1×10⁶个/kg体重+20%人体白蛋白100 mL, n=33)及对照组(20%人体白蛋白100 mL, n=32)。分别在治疗前和治疗后第5、14天收集每位受试ALS患者的血液各5 mL。此外,记录年龄、性别、疾病分期、体重指数(body mass index, BMI)、疾病持续时间(从第1个症状到样本收集日期之间的时间)、修订版ALS功能评定量表(revised ALS functional rating scale, ALSFRS-R)分数以及是否使用利鲁唑治疗。本研究经南京中医药大学附属南京医院医学伦理委员会批准(伦理号:2019-LS-ky012),并知情同意,所有方法均按照相关指南和法

规进行。整个试验由医院指定的第三方监察员安排、控制。

1.2 方法

1.2.1 PBMC的采集

入组患者需进行五项检测(血常规、尿常规、梅毒抗体、HIV抗体、乙型肝炎五项),确定合格后由医院输血科通过一次性采血袋(内含抗凝剂)采集外周血100 mL,充分混合并于2 h内进行PBMC分离。

在锂肝素管(Sarstedt公司,德国)中收集外周血样本(PBMC组15例和对照组13例)。通过Ficoll-Hypaque(Biochrom公司,英国)密度离心制备PBMC,然后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤并手动计数^[13]。将用于细胞因子分析的血清样品收集在7.5 mL管中,并在2 000 g下离心10 min,等分并在收集后20 min内在-80 °C下冷冻。①稀释:取50 mL离心管,在室温下加入等体积的RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清),轻轻吹打混匀;②加样:再取50 mL离心管,用移液管吸取15 mL淋巴细胞分离液放到离心管里,保持管45°倾斜,把经过稀释的血液于Ficoll液面上方顺着管壁缓慢添加至Ficoll上;③离心:设置参数18~20 °C,1 500 r/min,20 min(在减速的时候应将刹车关闭),离心后管中液体从管底至液面分4层:依次为红细胞和粒细胞层、分层液层、云雾层(PBMC)、血浆层;④回收:在云雾层中插入巴氏管,将其中的云雾层吸出后转入到新离心管中,动作轻柔;⑤洗涤:向其中加入一定量RPMI 1640培养液(至少大于PBMC体积3倍,含10%胎牛血清),18~20 °C,1 500 r/min,5 min,重复1~2次。

1.2.2 PBMC的体外扩增培养

①激活:将分离成功的PBMC接种于25 cm²培养瓶中,每个培养瓶中含10 mL RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素),10 μL植物血凝素-L(phytohemagglutinin-L, PHA-L, 1.25 μg/mL), 25 μL IL-2(5×10³ U/mL),置于37 °C、5%CO₂饱和湿度培养箱培养。3 d后离心换液;②扩增:取1/6~1/5细胞继续培养,余冻存。观察培养状况,每隔3~4 d以RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素)和IL-2(5×10³ U/mL)换液或添加1次,扩增后的原代细胞计数并鉴定。每份(25 cm²培养瓶)细胞数量为2×10⁷个。

FDA已批准对于人体临床试验使用胎牛血清^[14];依据现行药典中关于生物制品标准,国内近年来也在临床用细胞培养方面积累了更多经验^[15]。考虑

到胎牛血清输入人体后可能会影响患者,回输前的最后2次培养将10%胎牛血清更换为15%患者本人的自体血清。

1.2.3 体外扩增培养PBMC的自体回输

PBMC体外扩增培养6周后,经含20%人体白蛋白的PBS液洗涤3次,再次进行细胞鉴定及纯度测定,按1×10⁶个/kg体重取PBMC细胞置于20%人体白蛋白100 mL中,然后装入200 mL输血袋;对照组使用的输血袋装入100 mL 20%人体白蛋白(安慰剂)用于对照。两组液体在外观、透明度、包装上完全一致。由床位护士直接到输血科领取并在30 min内输入受试者体内。

1.2.4 质控

出于质控需要,每位受试者在每次回输前均需留存0.5 mL液体送检病原微生物(细菌、病毒、真菌)检测及内毒素检测,用同一支20%人体白蛋白0.5 mL作为阴性对照。

1.2.5 ALSFRS-R评分

患者的病情进展由ALSFRS-R评估。每位入组患者均由专科医生在治疗前、治疗后第5天与第14天进行ALSFRS-R评分并记录得分。ALSFRS-R量表总分48分,包括语言、流涎、吞咽、书写、切割食物、着装和卫生、床上翻身、行走、上楼、呼吸困难、端坐呼吸、呼吸功能不全等12个评估项目,得分越低,病情越重。

1.2.6 荧光激活细胞分选(fluorescence activating cell sorter, FACS)的免疫细胞表型

取5 mL新鲜外周血制备的PBMC,采用荧光标记抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗CD14、抗CD25、抗CD16、抗CD56(MiltenyiBiotec公司,德国)对T细胞和NK细胞亚群进行表面染色。阴性对照包括直接标记或未标记的同种型匹配的不相关抗体(BD Biosciences公司,美国)。所有细胞都在LSR-Fortessa(BD Biosciences公司,美国)上测量,并由FACS-Diva Software(BD Bioscience公司,美国)进行评估。

1.2.7 FACS分析的细胞内染色

为了进一步表征细胞内标志物,将PBMC悬浮在由RPMI 1640、5%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素组成的培养基中。胞内染色前用2 mL PBS(含0.5% Triton)处理细胞20 min。随后,使用荧光标记的抗FoxP3抗体(MiltenyiBiotec公司,德国)或同种型匹配的不相关抗体(BD Biosciences公司,美国)对细胞进行染色。染色程序后,通过流式细胞术评估细胞。在

LSR-Fortessa (BD Bioscience 公司, 美国) 上测量细胞, 并由 FACS-Diva Software (BD Bioscience 公司, 美国) 进行评估。

1.3 统计学方法

使用软件程序 GraphPad Prism6.0 和 SPSS 25.0 分析数据。所有数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。由于样本通过 Shapiro-Wilk 检验计算呈正态分布, 因此使用配对 *t* 检验分别对两组数据进行比较。采用 Pearson 相关分析, 相关系数 *r* 值在 0.2~0.4 为弱相关, 0.4~0.6 为中等相关, >0.6 为强相关。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 安全报告

输注细胞鉴定及纯度测定由南京医科大学药学院协作完成, 相关结果在整理发表中, 所有入组患者输液后无不良反应且没有治疗相关的不良事件或不良事件导致受试者退出试验。

2.2 研究人群的临床特征

PBMC 组男 22 例, 女 11 例; 年龄 (56.8 ± 9.9) 岁; BMI (19.6 ± 3.0) kg/m^2 ; 出现临床症状的时间为 (19.98 ± 14.26) 个月; 有 2 例 ALS II 期, 17 例 ALS III 期, 14 例 ALS IV 期; 13 例使用利鲁唑。对照组男 20 例, 女 12 例; 年龄 (58.1 ± 10.1) 岁; BMI (21.2 ± 3.8) kg/m^2 ; 出现临床症状的时间为 (20.29 ± 14.18) 个月; 有 2 例 ALS II 期, 16 例 ALS III 期, 14 例 ALS IV 期; 12 例使用利鲁唑。

2.3 治疗前后 ALSFRS-R 评分的变化

PBMC 组患者 ALSFRS-R 评分于治疗后第 5 天 [(30.1 ± 3.4) 分]、第 14 天 [(26.5 ± 2.0) 分] 均较治疗前 [(25.3 ± 1.4) 分] 升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。对照组 ALSFRS-R 于治疗后第 5 天 [(25.5 ± 1.9) 分]、第 14 天 [(24.9 ± 1.8) 分] 与治疗前 [(25.3 ± 1.4) 分] 比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05, 图 1)。

2.4 ALS 患者 PBMC 治疗前后淋巴细胞亚群变化

淋巴细胞监测人数根据临床症状改善决定, 从两组症状改善明显、症状改善不明显人群中盲选抽取, 最后统计时, PBMC 组 15 例, 对照组 13 例接受细胞亚群监测。PBMC 组患者治疗前测得 1 mL 外周血中 CD4^+ T 细胞数量为 (49.60 ± 21.04) $\times 10^4$ 个, 接受 PBMC 治疗后第 5 天细胞数为 (54.40 ± 20.66) $\times 10^4$ 个, 第 14 天细胞数为 (51.60 ± 20.86) $\times 10^4$ 个; 对照组患者治疗前 1 mL 外周血中 CD4^+ T 细胞数量为 (49.20 ± 22.66) $\times 10^4$ 个, 接受安慰剂治疗后第 5 天细胞数为

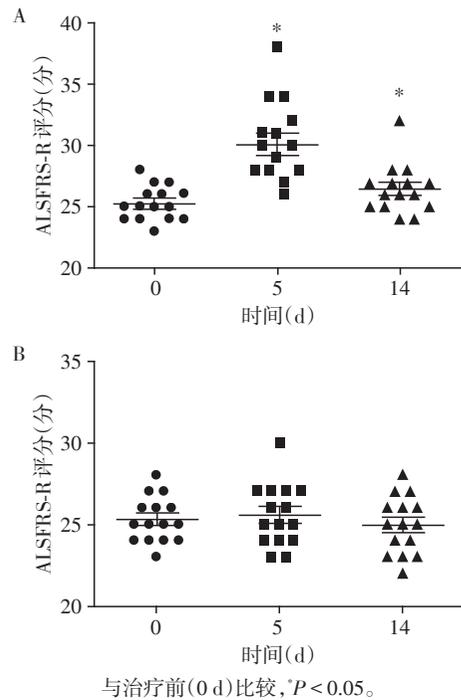


图1 ALS 患者 PBMC 组 (A) 和对照组 (B) 治疗前后 ALSFRS-R 量表分数变化

Figure 1 Changes of ALSFRS-R score in ALS patients before and after treatment in the PBMC group (A) and the placebo group (B)

(53.80 ± 20.81) $\times 10^4$ 个, 第 14 天细胞数为 (51.00 ± 20.59) $\times 10^4$ 个。 CD4^+ T 细胞数治疗前、治疗后第 5 天和第 14 天两组患者间均无明显差异 (*P* > 0.05); 两组患者治疗后第 5 天和第 14 天细胞数与治疗前相比, 均无明显差异 (*P* > 0.05, 图 2A)。

PBMC 组患者治疗前 1 mL 外周血中 CD8^+ T 细胞数量为 (29.20 ± 9.15) $\times 10^4$ 个, 接受 PBMC 治疗后第 5 天细胞数为 (56.20 ± 11.17) $\times 10^4$ 个, 第 14 天细胞数为 (40.20 ± 9.76) $\times 10^4$ 个, 治疗后第 5 天、第 14 天 CD8^+ T 细胞数均有显著升高 (*P* < 0.05, 图 2B); 对照组患者治疗前 1 mL 外周血中 CD8^+ T 细胞数量为 (28.60 ± 4.67) $\times 10^4$ 个, 治疗后第 5 天细胞数为 (28.60 ± 2.61) $\times 10^4$ 个, 第 14 天细胞数为 (28.60 ± 5.08) $\times 10^4$ 个, 均低于 PBMC 组 (*P* < 0.05)。

PBMC 组治疗前 1 mL 外周血中 CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ Treg 细胞数量为 (1.20 ± 0.28) $\times 10^4$ 个, 接受 PBMC 治疗后第 5 天细胞数为 (15.10 ± 2.01) $\times 10^4$ 个, 第 14 天细胞数为 (14.40 ± 2.08) $\times 10^4$ 个, 治疗后第 5 天、第 14 天 CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ Treg 细胞数有显著升高 (*P* < 0.001, 图 2C); 对照组治疗前 1 mL 外周血中 CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ Treg 细胞数量为 (1.10 ± 0.29) $\times 10^4$ 个, 接受对照治疗后第 5 天细胞数为 (1.26 ± 0.09) \times

10⁴个,第14天细胞数为(1.24±0.22)×10⁴个,均低于PBMC组($P < 0.001$)。

2.4.4 PBMC治疗前后CD16⁺CD56⁺NK细胞变化

PBMC组患者治疗前1 mL外周血中CD16⁺CD56⁺NK细胞数量为(13.20±1.10)×10⁴个,接受PBMC治疗后第5天细胞数为(16.60±2.41)×10⁴个,第14天细胞数为(15.80±2.86)×10⁴个;对照组患者治疗前1 mL外周血中CD16⁺CD56⁺NK细胞数量为(12.90±1.56)×10⁴个,接受对照治疗后第5天细胞数为(13.00±1.82)×10⁴个,第14天细胞数为(11.30±1.74)×10⁴个。CD16⁺CD56⁺NK细胞数治疗前、治疗后第5天和第14天两组患者间均无明显差异($P > 0.05$);两组患者治疗后第5天和第14天细胞数与治疗前相比,均无明显差异($P > 0.05$,图2D)。

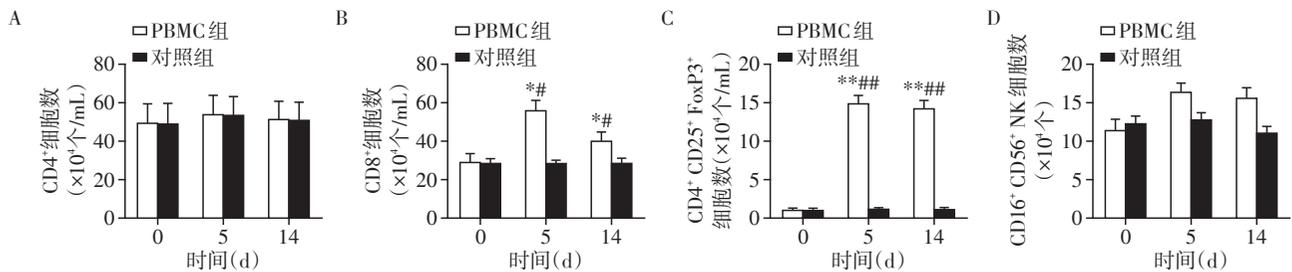
2.5 外周免疫细胞表型与ALSFRS-R评分相关性

为了评估ALSFRS-R评分和T细胞亚群变化

(CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg)之间的相关性,本文分析了PBMC组中患者在治疗前、治疗后第5天和第14天时外周血中CD8⁺T细胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数与ALSFRS-R评分间的相关性。患者在PBMC治疗后第5天和第14天时,CD8⁺T细胞数量与ALSFRS-R分呈负相关,在观察时间内,随外周血中CD8⁺T细胞数量增加,患者的ALSFRS-R分呈下降趋势;在PBMC治疗后第5天和第14天时,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数量与ALSFRS-R分呈正相关,即随外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数量增加,患者的ALSFRS-R分呈上升趋势。PBMC治疗后第5天和第14天,CD8⁺T细胞和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞与ALSFRS-R相关性有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

3 讨论

经体外扩增的自体PBMC回输治疗后短时间内



与治疗前(0 d)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$;与对照组同时间点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$ 。

图2 ALS患者PBMC组和对照组治疗前后淋巴细胞亚群变化

Figure 2 Changes of lymphocyte subsets in ALS patients before and after treatment in the PBMC group and the placebo group

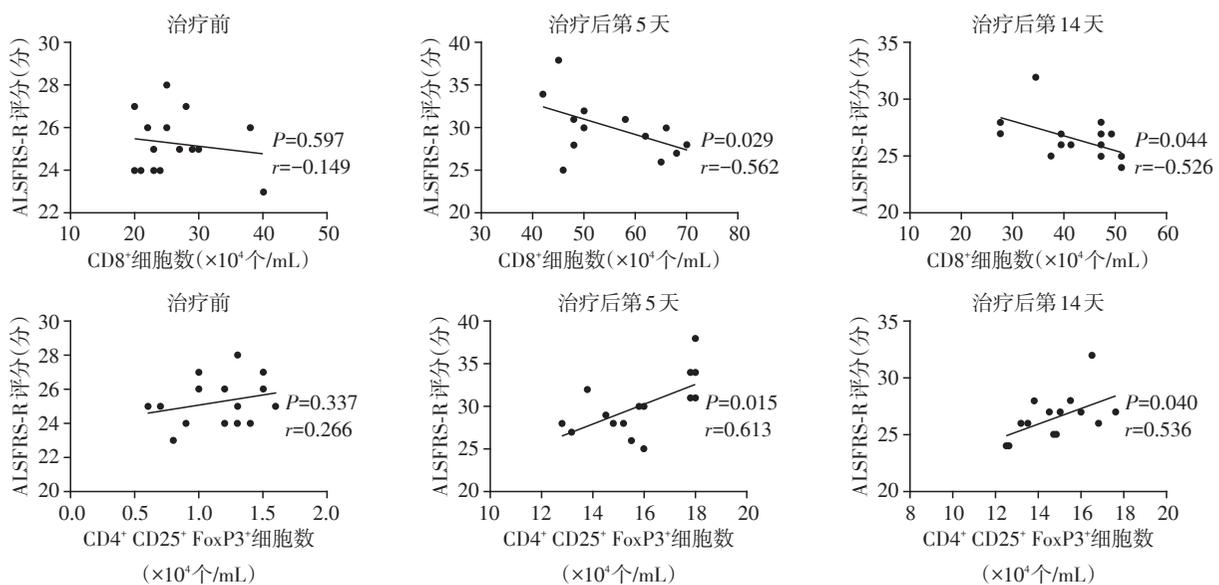


图3 PBMC组CD8⁺和CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞数与ALSFRS-R评分间的相关性

Figure 3 Correlation between CD8⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cell counts and ALSFRS-R score in the PBMC group

ALS患者临床症状有明显改善,第5天好转最明显,但大部分在2周内基本回落到治疗前情况。经PBMC治疗后ALS患者外周血中CD8⁺、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数较治疗前显著升高,治疗后第5天达到峰值;随后患者症状快速回落,治疗后第14天时,CD8⁺细胞数也明显减少但CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数仍与治疗后第5天时相仿。相关性分析显示,经PBMC治疗后CD8⁺T细胞数量与ALSFRS-R分数呈负相关,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数量与ALSFRS-R分数呈正相关。

有研究证明,患者的外周免疫系统在ALS致病过程中起重要作用^[6,16]。CD8⁺T淋巴细胞在ALS致病及病情进展中的机制尚不明确。动物研究显示,在慢进展ALS小鼠中可观察到CD8⁺T细胞浸润而在快进展小鼠中缺乏^[17]。最近有学者提出,CD8⁺T细胞在ALS患者中表现出强烈浸润,且激活的小胶质细胞和受损运动神经元中表达的MHC-I是诱导运动神经元死亡的重要原因^[18]。T淋巴细胞尤其是Treg细胞,在疾病进展的早期升高,在疾病进展快速阶段下降。此外,ALS缓慢期的Treg会增加抗炎细胞因子水平,并通过IL-4、IL-10等抑制T细胞功能^[19]。ALS患者病情的快速进展与Foxp3表达和Treg频率降低有关,恢复Treg数量和功能可能会延缓ALS疾病进展。最新研究表明,ALS患者外周血中Treg细胞明显减少,尤其在快速进展患者中,Tregs中Foxp3表达下调,Foxp3水平与发病率呈负相关;且Treg细胞数量与ALSFRS-R评分呈正相关,较低的Treg计数与较差的ALSFRS-R评分和更严重的病程相关^[20],上述结果与本研究结果一致。

最新研究表明,在ALS致病过程中,外周免疫系统(peripheral immune system, PIS)和中枢免疫系统(central immune system, CIS)之间存在交互作用。ALS患者中的CIS普遍存在炎症,小胶质细胞是CIS的固有免疫细胞,通过释放细胞因子和趋化因子等介导神经炎症,在疾病开始时表现出抗炎表型并保护运动神经元,而终末期小胶质细胞则转向促炎表型加重ALS患者运动神经元的神经退行性变;星形胶质细胞是大脑最常见的细胞,维持中枢屏障,分泌神经营养和神经保护因子,且可以控制小胶质细胞的激活、迁移和增殖。在ALS中,受损的外周淋巴细胞(T淋巴细胞、肥大细胞、单核细胞等)与胶质细胞相互作用,并释放一定水平的细胞因子和趋化因子,如IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子等。随后,先天和适应性外周免疫细胞聚集渗入中枢神

经系统,从而促进炎症。在此过程中,功能失调的中枢神经系统屏障(血脑屏障和血脊髓屏障)细胞旁通透性和渗透性增加,使周围物质和细胞能够进入中枢神经系统,为PIS和CIS“串扰”打开大门,也受到炎症环境的调节,促炎信号从CIS传播到PIS,又从PIS传播到CIS,进而促进了ALS的全身炎症环境^[21]。本研究观察到的经体外扩增的自体PBMC治疗后患者外周血淋巴细胞及临床症状变化可能与上述PIS与CIS之间的“串扰”有关,明确具体哪些机制的作用,需要进一步研究。

本研究仍有很多不足。第一,由于临床条件限制,病例数较少,这可能导致研究结果存在较大误差及偶然现象;第二,PBMC是多种细胞混合物,主要是T细胞,本临床研究中未分特定亚型,无法标记体外扩增的PBMC细胞,输入患者体内后无法分辨检测淋巴细胞中哪些是体外培养后输入,哪些是体内产生;第三,研究中没有同时监测外周血中淋巴细胞分泌细胞因子的表达浓度;第四,现有临床研究大多来自国外报道,其研究病例多数为欧美人种,其与亚洲人种在生理、基因等特征上存在一定差异;第五,在临床试验中缺乏有效判断临床疗效的标记物。

综上所述,本研究显示,体外扩增的自体PBMC回输治疗,可以短期改善ALS患者临床症状,其外周血CD8⁺T细胞和CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞数的变化可能与临床症状改善有关。今后仍需要深入对特定免疫细胞的功能特性进行纵向研究,特别要包括疾病早期阶段患者,以更详细地探索外周先天性和适应性免疫以及整个ALS疾病过程中外周免疫与中枢神经系统免疫之间的相互作用。

[参考文献]

- [1] BURCHARDT J M, MEI X W, RANGER T, et al. Analysis of incidence of motor neuron disease in England 1998-2019: Use of three linked datasets[J]. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 2022, 23(5-6): 363-371
- [2] XU L, CHEN L, WANG S, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in urban China: a national population-based study[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(5): 520-525
- [3] LEONE M A, MANDRIOLI J, RUSSO S, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with progression and overall survival in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(2): 354
- [4] SHEEAN R K, MCKAY F C, CRETNEY E, et al. Association of regulatory T-cell expansion with progression of

- amyotrophic lateral sclerosis: a study of humans and a transgenic mouse model[J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75(6): 681-689
- [5] NISHIHARA H, SOLDATI S, MOSSU A, et al. Human CD4⁺ T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers *in vitro* [J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17(1):3
- [6] ROLFES L, SCHULTE-MECKLENBECK A, SCHREIBER S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis patients show increased peripheral and intrathecal T-cell activation [J]. *Brain Commun*, 2021, 3(3):fcab157
- [7] BRODOVITCH A, BOUCRAUT J, DELMONT E, et al. Combination of serum and CSF neurofilament-light and neuroinflammatory biomarkers to evaluate ALS [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):703
- [8] POLVERINO A, RUCCO R, STILLITANO I, et al. In amyotrophic lateral sclerosis blood cytokines are altered, but do not correlate with changes in brain topology [J]. *Brain Connect*, 2020, 10(8):411-421
- [9] MARTINEZ-MERINO L, IRIDOY M, GALBETE A, et al. Evaluation of chitotriosidase and CC-Chemokine ligand 18 as biomarkers of microglia activation in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurodegener Dis*, 2018, 18(4): 208-215
- [10] PRONTO-LABORINHO A, PINTO S, GROMICHO M, et al. Interleukin-6 and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2019, 398:50-53
- [11] TORTELLI R, ZECCA C, PICCININNI M, et al. Plasma inflammatory cytokines are elevated in ALS [J]. *Front Neurol*, 2020, 11:552295
- [12] THONHOFF J R, BEERS D R, ZHAO W, et al. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS: a phase I, first-in-human study [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2018, 5(4):e465
- [13] 吴 茗,徐 睿,刘书娜,等.卵巢癌细胞生长环境中 CD4⁺ Treg 细胞和 CD4⁺ T_H17 细胞的糖代谢特征初探 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(7):999-1005
- [14] SHAHDADFAR A, FRØNSDAL K, HAUG T, et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(9):1357-1366
- [15] 中国医药生物技术协会. 干细胞制剂制备质量管理自律规范 [J]. *中国医药生物技术*, 2016, 11(6):481-490
- [16] DUTTA K, THAMMISSETTY S S, BOUTEJ H, et al. Mitigation of ALS pathology by neuron-specific inhibition of nuclear factor kappa b signaling [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(26):5137-5154
- [17] NARDO G, TROLESE M C, DE VITO G, et al. Immune response in peripheral axons delays disease progression in SOD1^{G93A} mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):261
- [18] COQUE E, SALSAC C, ESPINOSA-CARRASCO G, et al. Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(6):2312-2317
- [19] ZHAO W, BEERS DR, LIAO B, et al. Regulatory T lymphocytes from ALS mice suppress microglia and effector T lymphocytes through different cytokine-mediated mechanisms [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48(3):418-428
- [20] RENTZOS M, EVANGELOPOULOS E, SERETI E, et al. Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation? [J]. *Acta Neurol Scand*, 2012, 125(4):260-264
- [21] WATERS S, SWANSON M E V, DIERIKS B V, et al. Blood-spinal cord barrier leakage is independent of motor neuron pathology in ALS [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1):144

[收稿日期] 2023-03-13

(本文编辑:唐 震)