

# 孟德尔随机化分析免疫细胞表型 与孤独症谱系障碍的因果关联

吴志晓<sup>1</sup>, 赵红洋<sup>2</sup>

(1.山东大学医学融合与实践中心,山东 济南 250012; 2.济南市中心医院儿内科,山东 济南 250013)

**摘要:**目的 探讨免疫细胞表型与孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)之间的因果关系。方法 采用双向双样本孟德尔随机化(mendelian randomization, MR)分析,利用欧洲人群全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)的公开遗传数据,以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)作为工具变量,主要采用逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)进行因果效应分析,并辅以MR-Egger回归、加权中位数、加权模式和简单模式等方法进行验证。为控制多重比较带来的假阳性结果,采用Benjamini-Hochberg方法进行错误发现率(false discovery rate, FDR)校正。通过Cochran Q检验评估工具变量的异质性,运用MR-Egger截距分析和MR-PRESSO全局测试评估水平多效性,并采用留一法进行敏感性分析。结果 研究共纳入13 092个SNPs作为工具变量。经FDR校正后,未发现免疫细胞表型与ASD存在统计学显著关联( $P_{FDR} > 0.05$ )。然而,在未经校正的分析中,6种低P值表型仍值得讨论,具体包括:CD8<sup>+</sup>T细胞在白细胞中百分比(OR = 1.099, 95% CI: 1.039~1.163,  $P_{IVW} = 0.001$ )、CD20在IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>B细胞中的表达水平(OR = 1.064, 95% CI: 1.019~1.110,  $P_{IVW} = 0.005$ )和CD45在未成熟MDSCs中的表达水平(OR = 1.056, 95% CI: 1.021~1.093,  $P_{IVW} = 0.001$ )与ASD风险呈正相关;而CD45在HLA DR<sup>+</sup>T细胞中的表达水平(OR = 0.945, 95% CI: 0.906~0.986,  $P_{IVW} = 0.009$ )、CD14在CD33<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup>CD14dim中的表达水平(OR = 0.955, 95% CI: 0.925~0.987,  $P_{IVW} = 0.006$ )和CD25在CD4调节性T细胞中的表达水平(OR = 0.963, 95% CI: 0.939~0.989,  $P_{IVW} = 0.005$ )可能对ASD具有保护作用。所有分析均未发现显著的水平多效性或异质性,敏感性分析表明结果稳健。反向MR分析未发现ASD对以上免疫细胞表型的显著影响。结论 本研究提示特定免疫细胞表型可能与ASD发病风险存在潜在因果关系,为未来探索ASD的免疫相关生物标志物和潜在治疗靶点提供了研究方向。

**关键词:**孤独症谱系障碍;免疫细胞;免疫细胞表型;孟德尔随机化

中图分类号:R749.94

文献标志码:A

## Mendelian randomization analysis of causal associations between immune cell phenotypes and the risk of autism spectrum disorders

WU Zhixiao<sup>1</sup>, ZHAO Hongyang<sup>2</sup>

(1. Department of Medical Integration and Practice Center, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Pediatrics, Jinan Central Hospital, Jinan 250013, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the causal relationship between immune cell phenotypes and autism spectrum disorder. **Methods** The present study utilised a bidirectional two-sample mendelian randomization analysis. The present study utilised publicly available genetic data from genome-wide association studies (GWAS) in European populations. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were utilised as instrumental variables (IVs). The causal effect analysis was primarily executed using the inverse variance weighted (IVW) method, with additional validation conducted via MR-Egger regression, weighted median, weighted mode, and simple mode. In order to control for the possibility of

false positive results resulting from multiple comparisons, false discovery rate (FDR) correction was performed using the Benjamini-Hochberg method. The heterogeneity of the IVs was assessed by the Cochran  $Q$ -test, while the horizontal multiple validity was tested using the MR-Egger intercept analysis and the MR-PRESSO global test. Finally, sensitivity analyses were performed using the leave-one-out method. **Results** A total of 13,092 SNPs were included in the study as IVs. Following FDR correction ( $P_{\text{FDR}} > 0.05$ ), no statistically significant association was identified between immune cell phenotypes and ASD. Nevertheless, six low  $P$ -value phenotypes merit further discussion in the uncorrected analysis. Specifically, the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells in leukocytes (OR = 1.099, 95% CI: 1.039-1.163,  $P_{\text{IVW}} = 0.001$ ), the expression level of CD20 in IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> B cells (OR = 1.064, 95% CI: 1.019-1.110,  $P_{\text{IVW}} = 0.005$ ) and the expression level of CD45 in immature MDSCs (OR = 1.056, 95% CI: 1.021-1.093,  $P_{\text{IVW}} = 0.001$ ) may increase ASD risk. In addition, CD45 expression level in HLA DR<sup>+</sup> T cells (OR = 0.945, 95% CI: 0.906-0.986,  $P_{\text{IVW}} = 0.009$ ), CD14 expression level in CD33<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup>CD14 dim (OR = 0.955, 95% CI: 0.925-0.987,  $P_{\text{IVW}} = 0.006$ ) and CD25 expression level in CD4 regulatory T cells (OR = 0.963, 95% CI: 0.939-0.989,  $P_{\text{IVW}} = 0.005$ ) may have a protective effect against ASD. The analyses did not reveal any substantial horizontal pleiotropy or heterogeneity. Sensitivity analyses indicated robust results. Conversely, reverse MR analysis did not demonstrate a substantial impact of ASD on the aforementioned immunophenotype. **Conclusion** The present study suggests that specific immune cell phenotypes may have a potential causal relationship with the risk of ASD development, and provides a research direction for future exploration of immune-related biomarkers and potential therapeutic targets for ASD.

**Key words:** Autism spectrum disorder; Immune cell; Immune cell phenotype; Mendelian randomization

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 又称为自闭症, 是一组具有高度异质性并伴有多种共患病的神经发育障碍性疾病, 其不断上升的发病率已引起全球广泛关注。流行病学数据显示, 美国 8 岁及以下儿童 ASD 的患病率从 2018 年的 1/54<sup>[1]</sup> 升至 2020 年的 1/36<sup>[2]</sup>, 我国 6~12 岁儿童 ASD 的患病率为 0.7%, 男女比例为 4.1:1<sup>[3]</sup>。ASD 主要影响患者的大脑正常发育进程, 其典型临床特征包括社交沟通、互动能力缺陷以及刻板重复的行为模式和兴趣爱好<sup>[4]</sup>。该病致残率高, 治愈率低, 给家庭和社会都带来巨大的压力和经济负担。因此, 早期识别和预防 ASD 的危险因素至关重要。

ASD 的确切病因和发病机制尚未完全阐明, 目前认为其发病是涉及遗传、环境、免疫、代谢及肠道菌群等多因素的相互作用<sup>[5]</sup>。近年来, 越来越多的证据表明, 免疫系统功能障碍可能在 ASD 的发病机制中扮演重要角色。研究发现, ASD 患者存在显著的先天免疫系统激活现象, 具体表现为外周血中单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等先天免疫细胞的数量及活化状态异常, 同时患者血液和脑脊液中促炎因子 (如 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ) 水平升高, 中枢神经系统内小胶质细胞也呈现异常活化状态<sup>[6-7]</sup>。在适应性免疫方面, ASD 患者同样表现出多方面的功能紊乱, 包括 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比例失调、辅助性 T 细胞亚群 Th1/Th2 平衡破坏、调节性 T (Treg) 细胞数量减少, 以及针对神经系统成分的自身抗体产

生增加等免疫异常特征<sup>[8-9]</sup>。然而, 目前大多数相关研究仍局限于观察性研究设计, 其结果易受混杂因素干扰和反向因果限制, 而大规模的随机对照试验往往由于可行性差、成本高及伦理问题等难以开展, 因此免疫功能失调究竟是 ASD 的致病因素还是 ASD 导致的继发改变仍有待进一步确定。

MR 将遗传变异位点作为工具变量, 由于亲本等位基因被随机分配给后代, 类似于随机对照试验中的随机分组过程<sup>[10]</sup>, 因此可以最大限度地减少观察性流行病学研究中的混杂和反向因果偏差<sup>[11]</sup>, 从而促进暴露和结果之间的因果推断。本研究使用双向、双样本 MR 方法来探讨 731 种免疫细胞表型和 ASD 遗传易感性之间的因果关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究设计方案

本研究使用双向、双样本孟德尔随机化分析来探索 731 种免疫细胞表型和 ASD 之间的因果关联, 使用在 GWAS 数据库中的 SNPs 作为工具变量, 在进行 MR 分析时需要满足 3 个假设: ①工具变量与暴露因素之间有很强的相关性; ②工具变量与混杂因素之间没有相关性; ③工具变量只能通过暴露因素影响结果, 而不能通过其他方法, 即不允许水平多效性。研究的整体设计如图 1 所示。

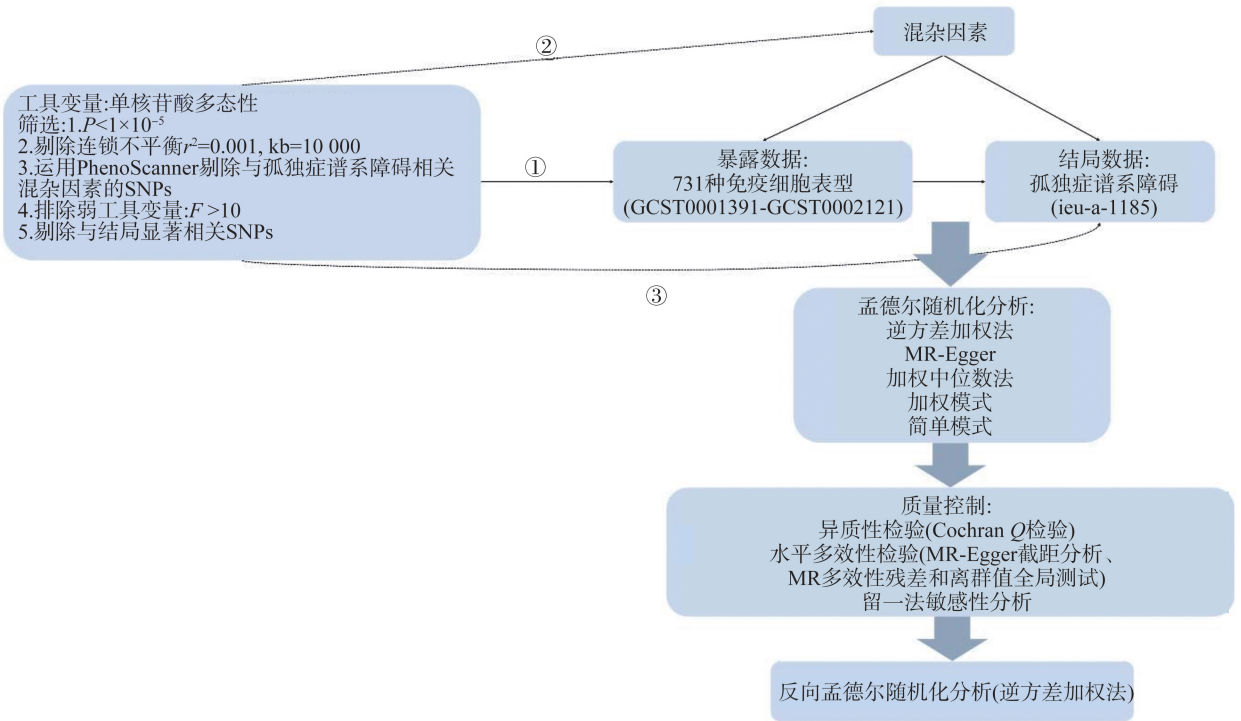


图1 孟德尔随机化核心假设及研究流程图

Figure 1 Mendelian randomization core assumptions and research flowchart

## 1.2 数据来源

### 1.2.1 样本来源

免疫细胞表型的汇总数据可在 GWAS 目录 (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) 中公开获得(注册号 GCST0001391-GCST0002121)<sup>[12]</sup>。该研究数据来源于 3 757 名欧洲人,研究者在控制混杂因素(性别、年龄)后,使用高密度阵列探索了超过 2 200 万个 SNP 基因型。这些免疫细胞表型包括 4 种类型:118 种绝对细胞(absolute cell, AC)计数、389 种反映表面抗原水平的中位荧光强度(median fluorescence intensities, MFI)、32 种形态学参数(morphological parameters, MP)和 192 种相对细胞(relative cell, RC)计数。其中 MFI、AC 和 RC 涵盖各种细胞类型,包括 B 细胞、树突状细胞、成熟期 T 细胞、单核细胞、骨髓细胞、TBNK 细胞(T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞的组合)和 Treg 细胞。相比之下,MP 只包括常规树突状细胞和 TBNK 细胞。ASD 的汇总数据可在 IEU Open GWAS 数据库(<https://gwas.mrcieu.ac.uk/>)中获取,包含 18 382 例欧洲血统的病例和 27 969 例相同血统的对照,纳入了 9 112 386 个独立的 SNPs。本研究采用的数据均来自公开数据库,所有 GWAS 数据涉及的原始研究均已取得伦理批准,

没有收集新的数据,因此本研究不需要额外的伦理审批。

### 1.2.2 工具变量筛选

本研究使用 SNPs 作为工具变量来确定不同免疫细胞表型与 ASD 发病风险之间的因果关系,实施了一系列严格的措施来筛选 SNPs,具体步骤包括:①本研究参考既往免疫细胞 MR 研究的成熟方法学<sup>[13-14]</sup>,将 SNP 筛选的显著性阈值设置为  $P < 1 \times 10^{-5}$ ,旨在平衡工具变量相关性 with 数量间的权衡,在保证因果推断稳健性的同时,避免因过严筛选导致的潜在生物学信号丢失;②排除连锁不平衡的 SNPs ( $r^2 = 0.001$ , kb = 10 000),以确保工具变量的独立性<sup>[15]</sup>;③使用 PhenoScanner 工具剔除 ASD 混杂因素的相关 SNPs;④计算每个 SNP 的  $F$  值,当  $F$  值  $> 10$  时,即可排除弱工具变量的可能<sup>[16]</sup>,其中  $F$  值的计算公式如下: $F = [R^2 \times (n - k - 1)] / [k \times (1 - R^2)]$ ,  $R^2 = 2 \times (1 - EAF) \times EAF \times \beta^2$ (其中  $R$  为工具变量解释暴露的程度, $N$  是暴露因素总的样本量, $\beta$  是 SNP 对效应的暴露值,EAF 为效应等位基因频率, $k$  为工具变量个数);⑤剔除与结局显著相关( $P < 5 \times 10^{-5}$ )的 SNPs 的数据。SNP 筛选流程如图 1 所示。

### 1.3 统计学处理

采用 R 软件(版本 4.4.2)和“TwoSample MR”

“MRPRESSO”软件包进行统计分析。使用5种MR分析方法:逆方差加权法(inverse variance weighted, IVW)、MR-Egger、加权中位数法、加权模式和简单模式。其中IVW法相比于其他方法在因果推理中更为稳健,故选为估计因果效应的主要方法<sup>[17]</sup>,其余4种方法作为补充分析。当IVW分析结果的 $P < 0.05$ 且IVW和其余方法的方向一致时,表明暴露因素与结局因素之间存在因果关联。本研究结局因素为二分类变量,以比值比(odds ratio, OR)及其相应的95%置信区间(confidence interval, CI)表示暴露与结局的因果关系( $OR > 1$ 视为正相关, $OR < 1$ 视为负相关)。此外,考虑到在多重比较中增加总体I类错误的风险,采用多重检验矫正MR结果,使用Benjamini-Hochberg方法来降低错误发现率(false discovery rate, FDR),具体步骤如下:通过MR分析得到多个SNP与结局关联的 $P$ 值,排序 $P$ 值后按公式临界值 $= (i/m) \cdot q$ 确定显著性( $i$ 为秩次, $m$ 为总检验数, $q$ 为FDR阈值),找到最大满足 $P(i) \leq (i/m) \cdot q$ 的 $P$ 值,其之前的所有结果均显著<sup>[18]</sup>。质量控制方面,采用MR-Egger截距分析和MR多效性残差和离群值全局测试来评估水平多效性, $P > 0.05$ 表明不存在水平多效性<sup>[19]</sup>。此外,使用IVW和MR-Egger中的Cochran  $Q$ 检验来评估所选工具变量之间的异质性, $P > 0.05$ 表明缺乏异质性<sup>[20]</sup>。另外,还进行了留一法敏感性分析,以评估每个SNP对MR分析结果的影响<sup>[21]</sup>。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 阳性工具变量

根据上述标准筛选后得到13 092个与免疫细胞表型显著相关且相互独立的SNPs用于后续因果分析,所有SNP的 $F$ 值均 $> 10$ ,提示不存在弱工具变量偏倚。

### 2.2 MR分析

本研究采用IVW方法作为主要的MR分析手段,选取阈值 $P < 0.05$ 的阳性结果,同时结合其他4种MR方法来评估结果的稳定性,剔除OR方向与主要IVW方法不一致的结果,发现了26种与ASD遗传易感性相关的免疫细胞表型(图2),其中 $IgD^-CD38^-$ B细胞在B细胞中百分比、CD8在

初始 $CD8^+T$ 细胞中的表达水平、CCR2在 $CD62L^+$ 髓样树突状细胞中的表达水平、CD45在 $HLA DR^+T$ 细胞中的表达水平、CD14在 $CD33^+HLA DR^+CD14dim$ 中的表达水平、中央记忆型 $CD4^-CD8^-$ 双阴性T细胞在T细胞中百分比、CD45在 $CD33^+HLA DR^+CD14^-$ 中的表达水平、CD25在 $CD4$ 调节性T细胞中的表达水平、CD34在造血干细胞中的表达水平、CD39在粒细胞中的表达水平、CD127在 $CD28^+CD4^+T$ 细胞中的表达水平、CD25在活化和分泌 $CD4$ 调节性T细胞中的表达水平及 $SSC^-A$ 在 $HLA DR^+NK$ 细胞中的表达水平与ASD呈负相关( $OR$ 值均小于1); $CD8^+T$ 细胞在白细胞中百分比、CD45在未成熟MDSCs中的表达水平、CD20在 $IgD^+CD38^-B$ 细胞中的表达水平、CD8在 $CD28^+CD45RA^+CD8^+T$ 细胞中的表达水平、 $CD45RA^-CD28^-CD8^+T$ 细胞的绝对计数、CD3在 $CD39^+$ 静息状态 $CD4$ 调节性T细胞中的表达水平、CD3在 $HLA DR^+CD8^+T$ 细胞中的表达水平、 $CD28^-CD8dim$ T细胞在T细胞中百分比、 $CD28^-CD8^+T$ 细胞在 $CD8^+T$ 细胞中百分比、造血干细胞绝对计数、 $CD45RA^+CD28^-CD8^+T$ 细胞绝对计数、CD4在活化性 $CD4$ 调节性T细胞中的表达水平及CD20在 $IgD^-CD24^-B$ 细胞中的表达水平则与ASD遗传易感性正相关( $OR$ 值均大于1),可能会增加ASD的患病风险。

然而,在经过FDR校正后,所有免疫细胞表型对ASD差异没有统计学意义上的显著影响( $P_{FDR} > 0.05$ )。值得注意的是,有几种免疫表型的未调整 $P$ 值较低,仍值得讨论(图3)。具体包括, $CD8^+T$ 细胞在白细胞中百分比( $OR = 1.099$ , 95% CI: 1.039~1.163,  $P_{IVW} = 0.001$ )、CD20在 $IgD^+CD38^-B$ 细胞中的表达水平( $OR = 1.064$ , 95% CI: 1.019~1.110,  $P_{IVW} = 0.005$ )和CD45在未成熟MDSCs中的表达水平( $OR = 1.056$ , 95% CI: 1.021~1.093,  $P_{IVW} = 0.001$ )与ASD遗传易感性存在正向因果关联;相反,CD45在 $HLA DR^+T$ 细胞中的表达水平( $OR = 0.945$ , 95% CI: 0.906~0.986,  $P_{IVW} = 0.009$ )、CD14在 $CD33^+HLA DR^+CD14dim$ 中的表达水平( $OR = 0.955$ , 95% CI: 0.925~0.987,  $P_{IVW} = 0.006$ )和CD25在 $CD4$ 调节性T细胞中的表达水平( $OR = 0.963$ , 95% CI: 0.939~0.989,  $P_{IVW} = 0.005$ )可能是ASD发病的保护性因素。

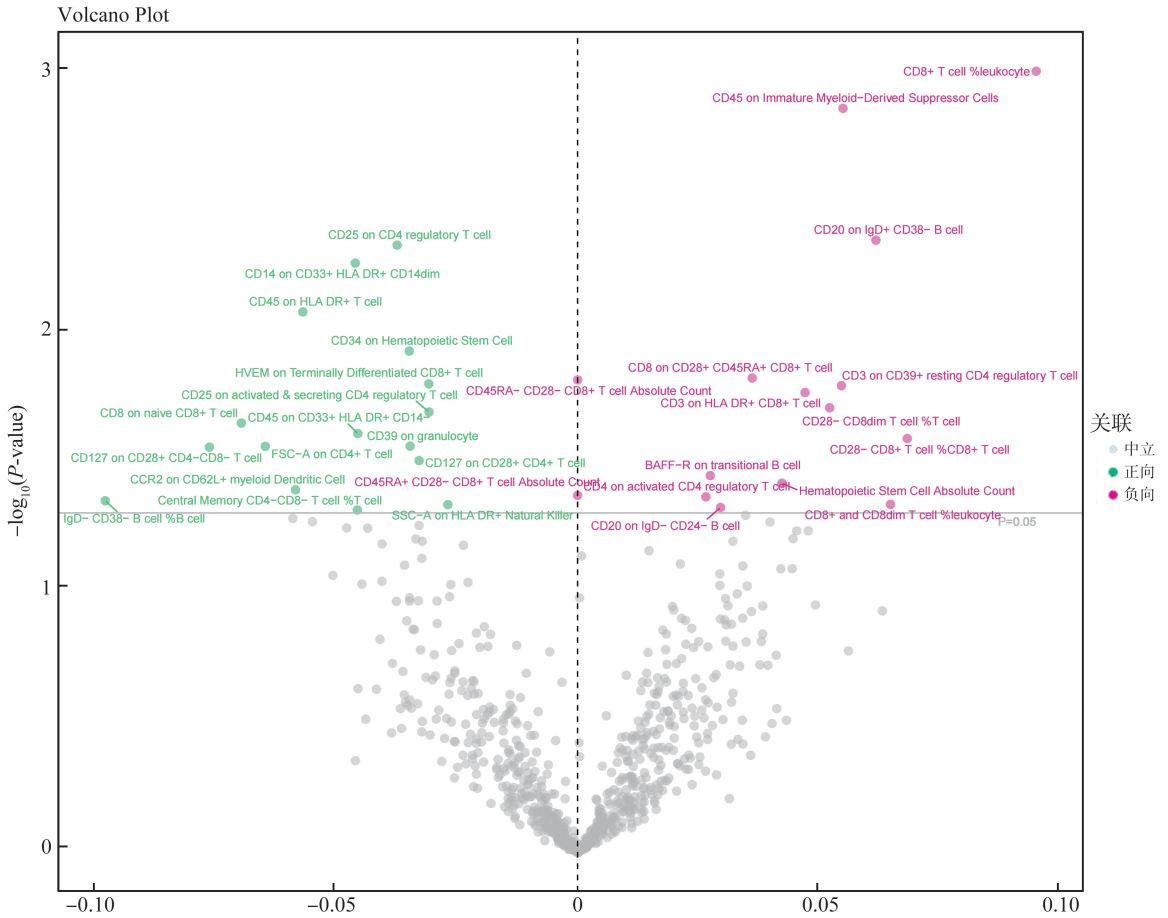


图2 免疫细胞表型与孤独症谱系障碍因果效应火山图  
Figure 2 Volcano plot of causal effects of immune cell phenotype and autism spectrum disorders

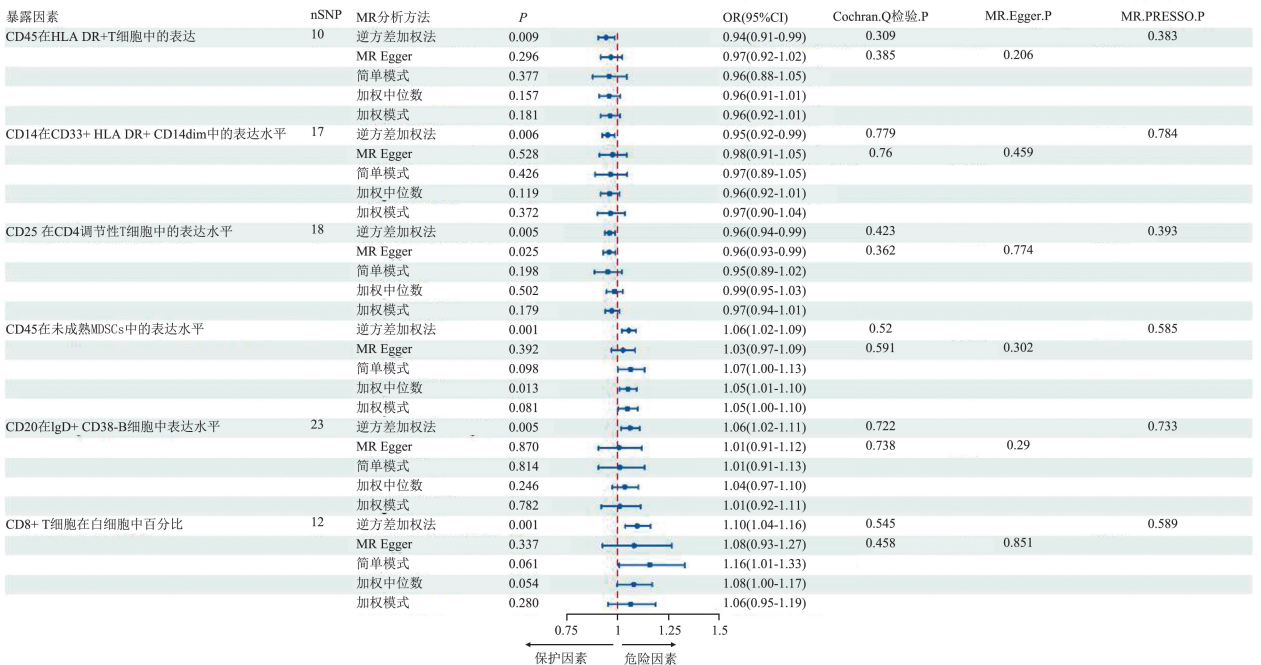


图3 6种免疫细胞表型与孤独症谱系障碍因果关系森林图  
Figure 3 Forest plot of the causal relationship between 6 immune cell phenotypes and autism spectrum disorders

### 2.3 异质性、多效性检验及敏感性分析

多效性分析结果显示,MR-Egger 截距分析和离群值全局测试  $P$  均 $>0.05$ (图3),表明6种免疫细胞表型都不存在水平多效性。通过IVW和MR-Egger方法中的Cochran  $Q$  检验进行异质性分析,结果显示6种免疫细胞表型均未表现出显著

的异质性( $P>0.05$ ),见图3。为进留一法结果显示在排除任一SNP后,剩余SNPs的因果效应估计值与全样本分析结果高度一致,表明本研究结果不受单个SNP的显著影响,见图4。综上所述,本研究的多效性、异质性及敏感性分析结果均支持MR结果的稳健性和可靠性。

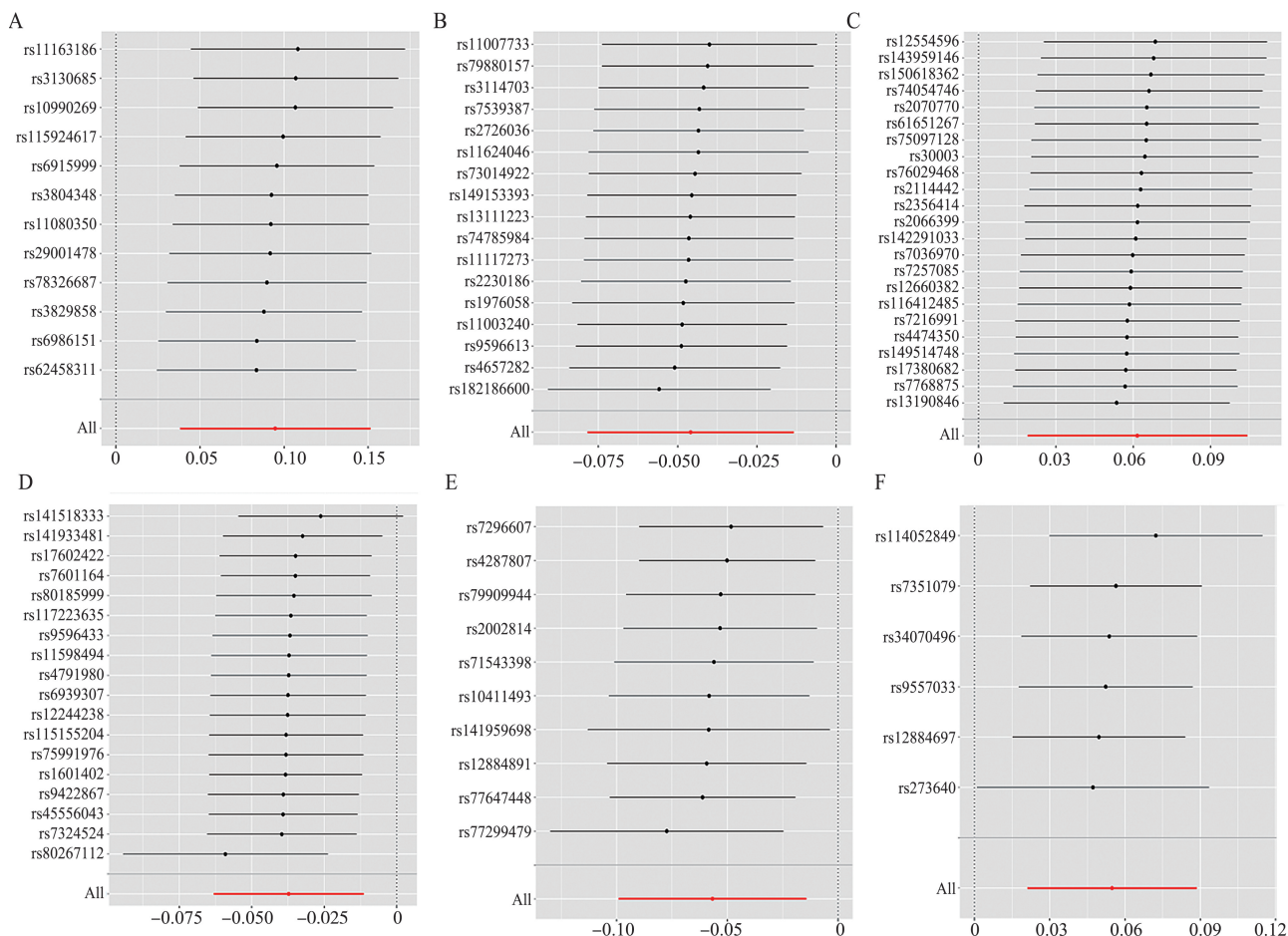


图4 免疫细胞表型对孤独症谱系障碍遗传易感性的留一法敏感性分析

A:CD8<sup>+</sup>T 细胞在白细胞中百分比对孤独症谱系障碍的影响; B:CD14 在 CD33<sup>+</sup>HLA DR<sup>+</sup>CD14dim 中的表达水平对孤独症谱系障碍的影响; C:CD20 在 IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>B 细胞中的表达水平对孤独症谱系障碍的影响; D:CD25 在 CD4 调节性 T 细胞中的表达水平对孤独症谱系障碍的影响; E:CD45 在 HLA DR<sup>+</sup>T 细胞中的表达水平对 ASD 的影响; F:CD45 在未成熟 MDSCs 中的表达水平对 ASD 的影响。

Figure 4 Sensitivity analysis of immune cell phenotypes for genetic susceptibility to autism spectrum disorder by the leave-one-out method

A: The effect of CD8<sup>+</sup> T cell %leukocyte on autism spectrum disorder; B: The effect of CD14 expression in CD33<sup>+</sup> HLA DR<sup>+</sup> CD14dim on autism spectrum disorder; C: The effect of CD20 expression in IgD<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> B cell on autism spectrum disorder; D: The effect of CD25 expression in CD4 regulatory T cell on autism spectrum disorder; E: The effect of CD45 expression in HLA DR<sup>+</sup> T cell on autism spectrum disorder; F: The effect of CD45 expression in immature myeloid-derived suppressor cells on autism spectrum disorder.

### 2.4 反向 MR 分析

为探究 ASD 是否对免疫细胞表型具有反向因果效应,我们将 ASD 作为暴露,上述6种免疫细胞

表型作为结局变量,进行反向 MR 分析。结果显示 ASD 与上述6种免疫细胞表型的因果效应差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ ),见图5。

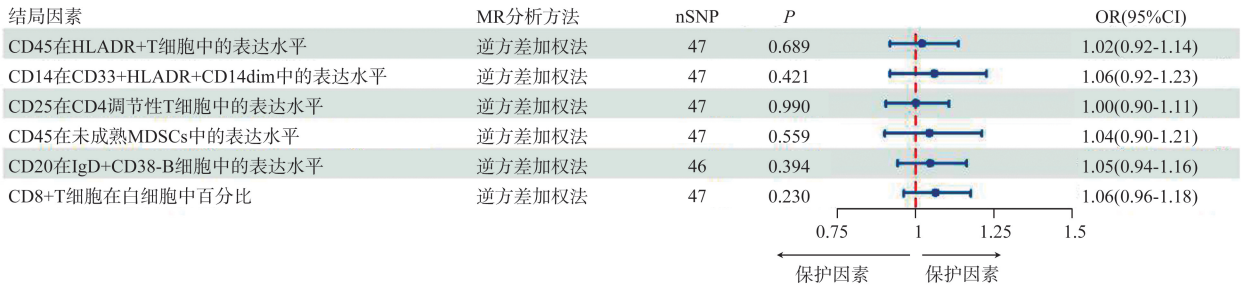


图5 孤独症谱系障碍与免疫细胞表型反向因果效应的森林图

Figure 5 Forest plot of reverse causal effects of autism spectrum disorders and immune cell phenotypes

### 3 讨论

本研究通过双向双样本 MR 分析,初步鉴定出 26 种免疫细胞表型与 ASD 之间存在潜在因果关联。其中,CD8<sup>+</sup>T 细胞在白细胞中的百分比、CD20 在 IgD<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>B 细胞中的表达水平以及 CD45 在未成熟 MDSCs 中的表达水平对 ASD 的正向因果效应显著,提示这些免疫特征可能增强 ASD 的遗传易感性。然而,经 FDR 多重检验校正后,所有暴露因素与结局的关联差异均未达到统计学显著性阈值( $P_{FDR} > 0.05$ )。这一现象可能源于多重因素的综合作用:①现有样本量与工具变量强度可能限制了检测小效应值的能力,特别是在暴露因素遗传解释度较低或存在弱工具偏倚时,因果效应估计的精度显著下降;②尽管研究严格遵循 MR 三大核心假设,但数据中广泛存在的多效性变异、人群异质性以及复杂的免疫-神经互作网络,仍可能通过稀释效应或混淆路径削弱统计效能;③针对大规模免疫细胞表型进行的多重假设检验,在 FDR 严格校正下可能过度保守,导致潜在生物学信号被过滤。因此,本研究认为在未经校正的情况下,IVW 分析中的一些低 P 值仍然有讨论的意义。

本研究发现 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平升高可能会增加 ASD 的患病风险。IVW 结果提示 CD8<sup>+</sup>T 细胞在白细胞中的百分比、CD8 在 CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞中表达水平、CD45RA<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞绝对计数、CD3 在 HLA DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞中表达水平及 CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞绝对计数会增加 ASD 的发病风险,其中 CD8<sup>+</sup>T 细胞在白细胞中的百分比的统计学效能尤为显著( $P_{IVW} = 0.001$ )。CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞是起源于骨髓并在胸腺中成熟的适应性免疫细胞<sup>[22]</sup>。在血液中释放后,成熟的初始 CD8<sup>+</sup>T 细胞寻找在抗原呈递细胞表面表达的主要组织相容性复合体 I(MHC-I)分子背景下呈递的同源抗原。遇

到抗原后,初始 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞变成效应细胞,其主要作用是通过直接和间接免疫机制介导靶细胞凋亡,称为 T 细胞介导的细胞毒性<sup>[23]</sup>。抗原清除后,大多数效应 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞受控凋亡,只有一小部分细胞作为记忆 CD8<sup>+</sup>T 细胞存活下来,提供免疫保护<sup>[24]</sup>。在 ASD 临床研究中,CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例经常被报道为正常或升高。一项西班牙的临床研究发现,ASD 患者循环中的 CD8<sup>+</sup>T 细胞百分比(21.68%)显著高于健康对照组(16.48%)<sup>[25]</sup>。动物实验也表明,BTBR 小鼠(一种广泛用于自闭症研究的动物模型)在胸腺细胞和外周血中观察到 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平的异常升高<sup>[26]</sup>。值得注意的是,ASD 患者脑组织病理学分析揭示了 CD8<sup>+</sup>T 细胞在脑脊液腔隙的浸润现象,同时还观察到星形胶质细胞泡和胶原蛋白的沉积增加,其中膜状气泡(也称为凋亡小体)是由 T 淋巴细胞释放的颗粒酶 B 或 TNF $\alpha$  等细胞毒性药物靶向的细胞产生的,提示 CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 淋巴细胞可能通过释放细胞毒性分子(如颗粒酶 B)攻击神经元或突触结构<sup>[27]</sup>。CD8<sup>+</sup>T 细胞渗透血脑屏障可能与小胶质细胞异常激活相关。研究表明,ASD 个体中枢神经系统中的小胶质细胞常呈现异常活化状态<sup>[6,28]</sup>。在这种活化状态下,小胶质细胞可以通过释放趋化因子 CCL2 和 CCL8,募集 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞穿透血脑屏障,浸润的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞则一步释放细胞毒性因子攻击神经元或突触结构<sup>[29]</sup>。基因组学研究进一步证实,CD8<sup>+</sup>T 细胞的细胞毒性通路在 ASD 中显著富集,其内在活化状态增强<sup>[30]</sup>。此外,在 ASD 个体中观察到转录因子 Runx1 和 Runx3 的表达上调,鉴于这些转录因子在胸腺 CD8<sup>+</sup>T 细胞发育和成熟过程中的关键调控作用,其表达异常可能与 ASD 中观察到的 CD8<sup>+</sup>T 细胞群改变有关<sup>[31]</sup>。还有研究表明浸润的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞还可以释放促炎因子(如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ),反过来激活小胶质细胞和星形胶质细胞,进而形成神经炎症级联反应<sup>[32]</sup>。总体而言,CD8<sup>+</sup>T 细胞可能

通过释放细胞毒性因子及促炎因子参与神经炎症,进而影响 ASD 的发病,未来仍需结合大规模队列研究,精准免疫分型,明确其作为生物标志物或治疗靶点的转化价值。

本研究还发现 CD20 在  $IgD^+CD38^-$  B 细胞的表达水平与 ASD 呈正相关,可能会增加 ASD 遗传易感性。CD20 是 B 淋巴细胞表面特异性表达的跨膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,在 B 细胞的发育、活化及功能调控中发挥关键作用。当 CD20 功能异常或表达失调时,可能通过调控钙信号、增殖与凋亡平衡,导致 B 细胞成熟异常<sup>[33]</sup>。B 淋巴细胞与 ASD 之间的关联存在一定争议性。既往研究<sup>[34-35]</sup>认为循环 B 细胞分泌的自身抗体水平失调可能与 ASD 病理过程相关;Connolly 等<sup>[34]</sup>研究发现,ASD 患者血清中检测到多种针对神经特异性靶点的自身抗体,包括髓鞘碱性蛋白(MBP)、脑源性神经营养因子(BDNF)和神经丝蛋白(NF)等。Piras 等<sup>[35]</sup>研究发现,循环抗脑自身抗体的水平与 ASD 核心症状(如社交障碍和重复刻板行为)的严重程度呈显著正相关,提示其可能作为 ASD 生物学标志物的潜在价值。然而,Heuer 等<sup>[36]</sup>研究发现,尽管 ASD 患儿外周血中 IgM 和 IgG 总水平显著降低,但记忆 B 细胞( $CD27^+$  B 细胞)数量未见明显差异。这一发现表明 ASD 个体免疫球蛋白的减少不单由 B 细胞功能障碍引起,而是多种免疫细胞参与的结果。此外,有荟萃分析显示 ASD 患者与健康对照组之间的 B 细胞计数差异无显著统计学意义<sup>[37]</sup>,进一步支持 B 细胞数量变化可能并非 ASD 的主要免疫特征。Nadeem 等<sup>[38]</sup>研究揭示了 B 细胞除参与体液免疫反应外,还可通过分泌细胞因子调节免疫微环境。与健康对照组相比,ASD 患者 B 细胞分泌炎症因子(如 IL-6、TNF- $\alpha$ )表达显著升高,而抗炎因子(如 IL-10)水平降低。这种细胞因子分泌谱的偏移可能通过血脑屏障影响神经炎症进程,提示 B 细胞可能通过免疫调节功能失衡参与 ASD 的病理生理机制。未来研究需进一步结合大规模人群队列和实验模型来进一步阐明 B 淋巴细胞的特定亚型与 ASD 之间的复杂联系。

髓系来源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)的概念最早于 2007 年被正式定义<sup>[39]</sup>。这类细胞主要由未成熟的髓系祖细胞以及巨噬细胞、树突状细胞和粒细胞的前体细胞组成,构成了一类具有免疫抑制功能的异质性细胞群体。在癌症、感染和慢性炎症等多种病理状态下,MDSCs 受到刺激产生和积累,通过多种机制抑制 T 细胞及

其他免疫细胞的功能,从而维持免疫平衡并防止过度免疫反应<sup>[40]</sup>。CD45 是一种受体型蛋白酪氨酸磷酸酶,在调节 T 细胞和 B 细胞抗原受体的激活过程中起着关键作用。CD45 可以通过 JAK/STAT3 通路调控 MDSCs 分化。STAT3 是驱动 MDSCs 分化的核心转录因子,IL-6、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子通过激活 JAK/STAT3 通路,诱导髓系前体细胞向 MDSCs 分化。研究发现,CD45 可通过去磷酸化 JAK 激酶的抑制性酪氨酸残基,增强 JAK/STAT3 信号通路的持续性激活,从而促进 STAT3 靶基因(如 ARG1、iNOS)的表达,推动 MDSCs 的免疫抑制表型形成<sup>[41-42]</sup>。沙特阿拉伯的一项研究显示,与普通人群相比,ASD 儿童的  $CD45^+GM^-CSF^+$ 、 $CD45^+IFN-\gamma^+$ 、 $CD45^+IL-6^+$ 、 $CD45^+IL-9^+$ 、 $CD45^+T-bet^+$  和  $CD45^+pStat3^+$  细胞数量显著增加<sup>[43]</sup>。本研究发现,CD45 在未成熟 MDSCs 中的表达水平是 ASD 的一个危险因素,可能与免疫抑制功能相关。

综上所述,本研究揭示了  $CD8^+$  T 细胞、CD20 在  $IgD^+CD38^-$  B 细胞中的表达水平以及 CD45 在未成熟 MDSCs 中的表达水平与 ASD 遗传易感性增加之间的相关性。这些发现不仅强调了上述免疫细胞表型在 ASD 发病机制中的重要作用,还为神经发育障碍的病因学研究提供了新的视角。更重要的是,这些免疫特征可能成为潜在的治疗靶点,为开发基于免疫表型调控的 ASD 及相关疾病治疗策略奠定了基础。例如开发靶向  $CD8^+$  T 细胞穿孔素/颗粒酶通路的抑制剂,利用 CD20 单抗(如利妥昔单抗)调节 B 细胞-T 细胞交互网络,或使用小分子药物(如 JAK1/2 抑制剂)调控 CD45 介导的 MDSCs 分化通路,从而重塑免疫稳态。然而,免疫疗法的实施需审慎评估其风险-获益比,例如长期免疫抑制可能增加机会性感染风险,而靶向治疗需平衡其对肿瘤免疫监视的潜在干扰。因此,未来需通过类器官模型、非人灵长类动物实验及阶梯式临床试验系统性评估治疗安全性与有效性,最终推动 ASD 免疫干预策略从基础研究向临床实践转化。

然而,本研究仍存在一些局限性需要说明:①受限于 GWAS 数据以欧洲人群为主的现状,工具变量的筛选及因果效应估计均基于欧洲血统人群的遗传特征。由于不同种族在免疫相关基因位点的等位基因频率、环境暴露及表观遗传调控机制上差异有统计学意义,研究结论在亚洲等非欧人群中的适用性可能受限。因此,未来亟需在跨种族队列中开展多中心验证研究,并建立种族特异性遗传风险评分以

提高临床转化潜力;②尽管本研究采用了高度相关的工具变量并进行了多重敏感性分析以最大程度地减少混杂因素的影响,但完全排除所有潜在混杂因素的可能性较低。未来需要通过更深入的生物学机制研究以及更大规模的队列研究来进一步验证和拓展本研究结果。

## 参考文献:

- [1] Maenner MJ, Shaw KA, Bakian AV, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2018 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2021, 70(11): 1-16.
- [2] Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2020 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2023, 72(2): 1-14.
- [3] Zhou H, Xu X, Yan WL, et al. Prevalence of autism spectrum disorder in China: a nationwide multi-center population-based study among children aged 6 to 12 years [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(9): 961-971.
- [4] Battle DE. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM) [J]. *Codas*, 2013, 25(2): 191-192.
- [5] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, et al. Autism spectrum disorder [J]. *Lancet*, 2018, 392(10146): 508-520.
- [6] Xiong Y, Chen JH, Li YB. Microglia and astrocytes underlie neuroinflammation and synaptic susceptibility in autism spectrum disorder [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1125428. doi: 10.3389/fnins.2023.1125428
- [7] 王斌,付佳佳,张翠芳,等. 孕期环境危险因素与孤独症谱系障碍病因学关系的研究进展 [J]. *中国健康心理学杂志*, 2022, 30(10): 1594-1600.  
WANG Bin, FU Jiajia, ZHANG Cuifang, et al. Advances in the relationship between prenatal environmental risk factors and autism spectrum disorder [J]. *China Journal of Health Psychology*, 2022, 30(10): 1594-1600.
- [8] Ellul P, Rosenzweig M, Peyre H, et al. Regulatory T lymphocytes/Th17 lymphocytes imbalance in autism spectrum disorders: evidence from a meta-analysis [J]. *Mol Autism*, 2021, 12(1): 68. doi: 10.1186/s13229-021-00472-4
- [9] De Giacomo A, Gargano CD, Simone M, et al. B and T immunoregulation: a new insight of B regulatory lymphocytes in autism spectrum disorder [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 732611. doi: 10.3389/fnins.2021.732611
- [10] Wu Q, Liu SL, Huang XR, et al. Bidirectional Mendelian randomization study of psychiatric disorders and Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1120615. doi: 10.3389/fnagi.2023.1120615
- [11] Davey Smith G, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): R89-R98.
- [12] Orrù V, Steri M, Sidore C, et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(10): 1036-1045.
- [13] Fei YC, Yu H, Wu YL, et al. The causal relationship between immune cells and ankylosing spondylitis: a bidirectional Mendelian randomization study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1): 24. doi: 10.1186/s13075-024-03266-0
- [14] Chen JB, Yu XZ, Wu XY, et al. Causal relationships between gut microbiota, immune cell, and non-small cell lung cancer: a two-step, two-sample Mendelian randomization study [J]. *J Cancer*, 2024, 15(7): 1890-1897.
- [15] Yuan JQ, Xiong XQ, Zhang B, et al. Genetically predicted C-reactive protein mediates the association between rheumatoid arthritis and atlantoaxial subluxation [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1054206. doi: 10.3389/fendo.2022.1054206
- [16] Levin MG, Judy R, Gill D, et al. Genetics of height and risk of atrial fibrillation: a Mendelian randomization study [J]. *PLoS Med*, 2020, 17(10): e1003288. doi: 10.1371/journal.pmed.1003288
- [17] Bowden J, Davey Smith G, Haycock PC, et al. Consistent estimation in mendelian randomization with some invalid instruments using a weighted median estimator [J]. *Genet Epidemiol*, 2016, 40(4): 304-314.
- [18] Glickman ME, Rao SR, Schultz MR. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies [J]. *J Clin Epidemiol*, 2014, 67(8): 850-857.
- [19] Verbanck M, Chen CY, Neale B, et al. Detection of widespread horizontal pleiotropy in causal relationships inferred from Mendelian randomization between complex traits and diseases [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5): 693-698.
- [20] Cohen JF, Chalumeau M, Cohen R, et al. Cochran's *Q* test was useful to assess heterogeneity in likelihood ratios in studies of diagnostic accuracy [J]. *J Clin Epidemiol*, 2015, 68(3): 299-306.
- [21] Burgess S, Thompson SG. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method [J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(5): 377-389.
- [22] Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life [J]. *Immunity*, 2018, 48(2): 202-213.

- [23] Diao HT, Pipkin M. Stability and flexibility in chromatin structure and transcription underlies memory CD8 T-cell differentiation[J]. *F1000Res*, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-F1000 Faculty1278. doi: 10.12688/f1000research.18211.1
- [24] Herndler-Brandstetter D, Ishigame H, Shinnakasu R, et al. KLRG1<sup>+</sup> effector CD8<sup>+</sup> T cells lose KLRG1, differentiate into all memory T cell lineages, and convey enhanced protective immunity[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 716-729.
- [25] López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, et al. Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders[J]. *J Investig Med*, 2016, 64(7): 1179-1185.
- [26] Uddin MN, Yao YY, Manley K, et al. Development, phenotypes of immune cells in BTBR T+Itr3tf/J mice [J]. *Cell Immunol*, 2020, 358: 104223. doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104223
- [27] DiStasio MM, Nagakura I, Nadler MJ, et al. T lymphocytes and cytotoxic astrocyte blebs correlate across autism brains[J]. *Ann Neurol*, 2019, 86(6): 885-898.
- [28] 马如意, 范广祥, 陈依文, 等. 小胶质细胞调节孤独症谱系障碍的作用机制研究进展[J]. *生命科学*, 2024, 36(4): 477-486.  
MA Ruyi, FAN Guangxiang, CHEN Yiwen, et al. Advances in regulatory roles and mechanisms of microglia in autism spectrum disorders [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2024, 36(4): 477-486.
- [29] Shi ZS, Yu P, Lin WJ, et al. Microglia drive transient insult-induced brain injury by chemotactic recruitment of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes[J]. *Neuron*, 2023, 111(5): 696-710.
- [30] Gregg JP, Lit L, Baron CA, et al. Gene expression changes in children with autism[J]. *Genomics*, 2008, 91(1): 22-29.
- [31] Shin B, Hosokawa H, Romero-Wolf M, et al. Runx1 and Runx3 drive progenitor to T-lineage transcriptome conversion in mouse T cell commitment via dynamic genomic site switching [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(4): e2019655118. doi: 10.1073/pnas.2019655118
- [32] Terrabuio E, Zenaro E, Constantin G. The role of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment in ageing and neurodegenerative disorders[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1233870. doi: 10.3389/fimmu.2023.1233870
- [33] Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an “Enigma” of B-cell biology and targeted therapy[J]. *Haematologica*, 2020, 105(6): 1494-1506.
- [34] Connolly AM, Chez M, Streif EM, et al. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59(4): 354-363.
- [35] Piras IS, Haapanen L, Napolioni V, et al. Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 38: 91-99.
- [36] Heuer LS, Rose M, Ashwood P, et al. Decreased levels of total immunoglobulin in children with autism are not a result of B cell dysfunction[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 251(1/2): 94-102.
- [37] Arteaga-Henríquez G, Lugo-Marín J, Gisbert L, et al. Activation of the monocyte/macrophage system and abnormal blood levels of lymphocyte subpopulations in individuals with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14329. doi: 10.3390/ijms232214329
- [38] Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, et al. Imbalance in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines milieu in B cells of children with autism[J]. *Mol Immunol*, 2022, 141: 297-304.
- [39] Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 425; authorreply426. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037
- [40] Wu YZ, Yi M, Niu MK, et al. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 184. doi: 10.1186/s12943-022-01657-y
- [41] Kumar V, Cheng PY, Condamine T, et al. CD45 phosphatase inhibits STAT3 transcription factor activity in myeloid cells and promotes tumor-associated macrophage differentiation[J]. *Immunity*, 2016, 44(2): 303-315.
- [42] Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, et al. Involvement of CD45 cells in the development of autism spectrum disorder through dysregulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, key inflammatory cytokines, and transcription factors [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106466. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106466
- [43] Alhosaini K, Ansari MA, Nadeem A, et al. Dysregulation of ki-67 expression in T cells of children with autism spectrum disorder[J]. *Children (Basel)*, 2021, 8(2): 116. doi: 10.3390/children8020116