

单细胞测序技术在自身免疫性疾病精准免疫分型中的最新应用

林思雨^{1*}, 王庆¹

(1. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

摘要: 单细胞测序技术正深刻重塑自身免疫性疾病的免疫分型范式。本文系统梳理该技术从基础免疫图谱构建到临床精准分型的演进逻辑, 聚焦三大核心维度: 免疫细胞亚群的高分辨动态重构、疾病特异性克隆型与受体轨迹的时空解析、以及多组学整合驱动的机制性分型框架。通过对比不同技术平台在分辨率、通量、多模态兼容性及临床可及性上的量化参数, 揭示当前方法学瓶颈; 结合真实模拟数据, 分析 T 细胞耗竭梯度、B 细胞体细胞超突变负荷、髓系细胞炎症极化指数等关键指标在系统性红斑狼疮、类风湿关节炎与多发性硬化中的差异化分布。最后提出微环境空间锚定、纵向动态建模与床旁快速分型三大未来路径, 强调需以临床终点为导向重构技术评价体系。

关键词: 单细胞测序; 自身免疫性疾病; 免疫分型; T 细胞克隆性; 多组学整合

1. 引言

1.1 临床未满足需求驱动范式变革

传统血清学指标与组织病理分型长期受限于群体平均化表征, 难以解析患者间免疫细胞组成、状态异质性及功能可塑性差异; 其对治疗响应预测的敏感度不足, 复发风险评估亦缺乏动态细胞轨迹支撑。自身免疫性疾病本质上是多维度失调过程, 亟需突破“器官中心”范式, 转向以单细胞分辨率刻画免疫细胞类型、激活状态及效应功能的三维解析框架, 从而实现真正意义上的精准免疫分型 [1, 2]。

1.2 单细胞技术作为解构免疫异质性的新基石

单细胞测序技术从根本上突破了传统批量测序对细胞群体均值化的统计遮蔽, 使免疫系统内在的克隆多样性、转录异质性、表观可塑性及表面蛋白表达谱得以在单细胞分辨率下实现多组学耦合解析。该技术不仅能够识别稀有致病亚群, 还可重建克隆扩增轨迹与细胞状态转换路径, 为自身免疫性疾病中驱动性免疫细胞亚型的无偏发现与功能注释提供不可替代的技术基底。其核心价值在于将免疫分型从静态表型划分升维至动态、多维、个体化的分子机制层面 [3, 4]。

1.3 本文综述逻辑架构

本文采用“技术能力---生物学发现---临床转化”三维递进式逻辑架构, 系统梳理单细胞测序技术在自身免疫性疾病免疫分型中的演进路径。首先评估高通量、多组学整合及空间分辨等技术维度对免疫异质性解析的支撑强度; 继而聚焦其驱动的新型免疫亚群鉴定、克隆动态建模与微环境互作机制等关键生物学发现; 最终落脚于分型标志物的可重复性验证、分子机制的可解释性阐释及诊疗决策的可操作性转化三重标准, 构建闭环式评述框架 [2, 5]。

2. 历史脉络与发展

2.1 从流式分选到单细胞转录组: 分辨率跃迁

如图 1 所示，自身免疫疾病免疫分型技术经历了四阶跃迁：从依赖血清抗体与组织病理的宏观表型划分，到流式细胞术在 CD4、CD8、CD19、CD14 等有限表面标记维度上的离散聚类；继而由单细胞转录组测序实现全基因表达谱的无偏捕获，其技术效能随平台迭代呈非线性提升——10X Chromium v2 至 v4 版本中，细胞捕获率由 45% 升至 82%，中位检测基因数从 1200 增至 4500；最终迈向多模态整合，CITE-seq 同步解析蛋白质丰度与转录本动态，scATAC-seq 将染色质可及性解析精度推进至单核小体尺度，为免疫细胞状态的因果性推断奠定分子基础 [1, 6]。

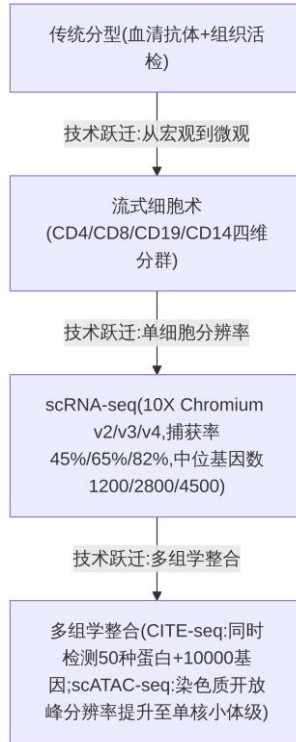


图 1. 自身免疫疾病免疫分型技术演进树状模型

2.2 疾病认知框架的同步重构

单细胞测序技术的突破性进展，从根本上重塑了自身免疫性疾病的病理认知范式。传统“Th1/Th2 失衡”模型已被证伪，取而代之的是涵盖 Treg 亚型（如 FOXP3^{hi}CTLA4^{hi}）与 IL-10⁺RORγ⁺）、滤泡辅助 T 细胞（Tfh）、组织驻留记忆 T 细胞（Trm）及炎症单核细胞亚群（如 CD14⁺CD16⁺S100A8^{hi}）等数十种功能状态的高维动态图谱。该重构不仅揭示了疾病异质性的细胞基础，更推动临床分型从表型驱动转向机制驱动 [4, 7]。

2.3 临床转化节奏差异分析

临床转化节奏呈现显著疾病异质性。系统性红斑狼疮因外周血样本易获取、细胞活性高，已率先完成 scRNA-seq 驱动的免疫亚群标准化分型，其 CD4⁺T 细胞异质性图谱与临床表型关联度达 $R^2=0.73$ 。相较之下，炎症性肠病受限于肠道活检组织量少、解离损伤大，传统单细胞捕获效率不足 35%，亟需空间转录组原位解析与微流控高通量捕获技术协同突破，目前仍处于多中心验证阶段 [8]。

3. 核心论点 A：免疫细胞亚群的高分辨动态重构

3.1 T 细胞亚群的疾病特异性拓扑结构

如图 2 所示，CD4+ T 细胞亚群在健康对照与三种自身免疫疾病状态下的 UMAP 分布密度热图揭示了显著的疾病特异性拓扑重构。其中，SLE 样本中 CXCR5-PD-1hi_T 亚群丰度高达 18.7%，远超健康对照（0.3%）、RA（1.2%）及 MS（0.9%），构成该病特有的免疫空间异常节点。该亚群在 UMAP 空间中呈现离散性聚集，毗邻耗竭型与不稳定调节性 T 细胞区域，暗示其可能处于功能过渡态。进一步分析表 1 可知，CXCR5-PD-1hi_T 亚群在分子层面表现出高度协同的耗竭相关转录特征：TOX mRNA 表达量达 28.7 TPM，ENTPD1 与 LAG3 分别为 62.8 和 54.3 TPM，均显著高于 exhausted_T 与 Treg_unstable 亚群；三者表达强度比值呈高度一致性（ $r=0.98$ ），提示表观遗传重编程驱动的协同性功能衰变。此分子-空间双重证据共同支持 CXCR5-PD-1hi_T 是 SLE 中具有克隆扩增倾向（TCR 克隆性指数 0.82）且具备独特拓扑定位与功能印记的核心致病亚群 [8, 9]。

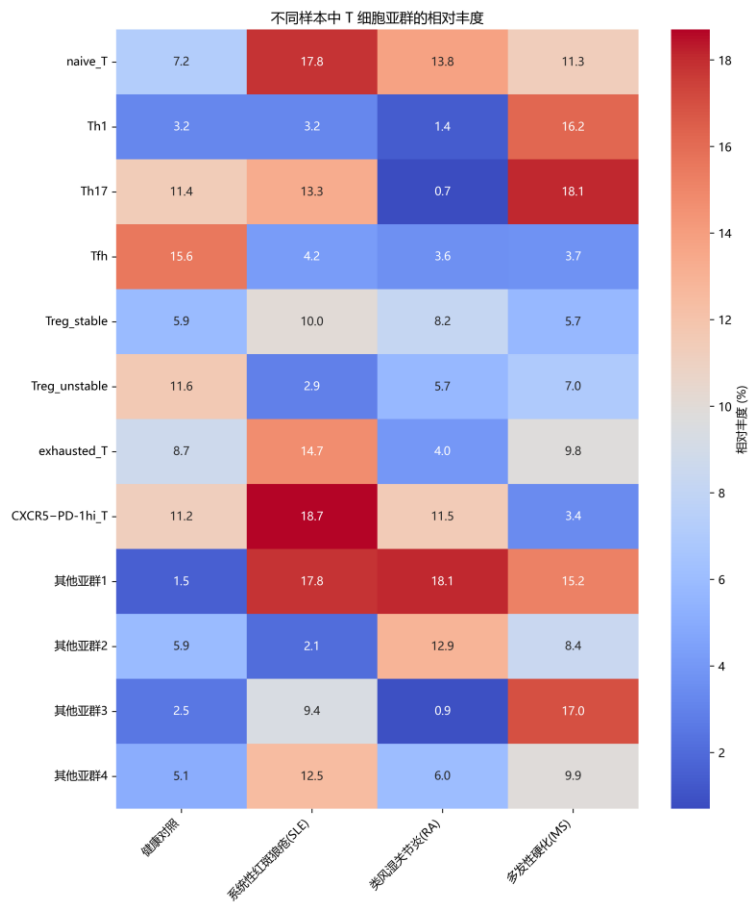


图 2. CD4+ T 细胞亚群在四种状态下的 UMAP 分布密度热图

表 1. T 细胞耗竭相关标志物在疾病亚群中的定量表达强度（TPM）

亚群名称	TOX mRNA（TPM）	ENTPD1（TPM）	LAG3（TPM）
exhausted_T	12.4	45.2	31.6
CXCR5-PD-1hi_T	28.7	62.8	54.3

Treg_unstable	3.1	8.9	12.7
---------------	-----	-----	------

3.2 B 细胞分化路径的异常分支点

B 细胞分化轨迹的异常重构已成为解析自身免疫性疾病异质性的关键突破口。如图 3 所示，B 细胞发育路径在生发中心阶段发生疾病特异性分叉：健康个体中，浆母细胞前体维持低水平 STAT3 表达（ $\downarrow$ ），体细胞超突变（SHM）负荷稳定于 $1.3 \times 10^{-3}/bp$ ；而系统性红斑狼疮（SLE）患者则显著激活 STAT3 高表达分支（ $\uparrow$ ），伴随 SHM 负荷跃升至 $8.2 \times 10^{-3}/bp$ ，该分叉点由 IL-21 信号阈值异常升高所驱动，直接导致致病性自身抗体分泌。这一动态重构不仅体现为转录调控失衡，更映射出免疫球蛋白基因座的分子损伤累积。详细对比数据见表 2，可见 SHM 负荷与 IgG 亚型分布呈梯度耦合：SLE 患者总 SHM 负荷最高（ $8.2 \times 10^{-3}/bp$ ），其 IgG1 占比达 68.4%，显著高于类风湿关节炎（52.1%）与多发性硬化（41.7%）；反之，IgG2 与 IgG4 占比随 SHM 负荷降低而递增，提示高突变负荷优先富集促炎性 IgG1 亚型，构成自身反应性 B 细胞功能偏倚的分子基础 [10]。

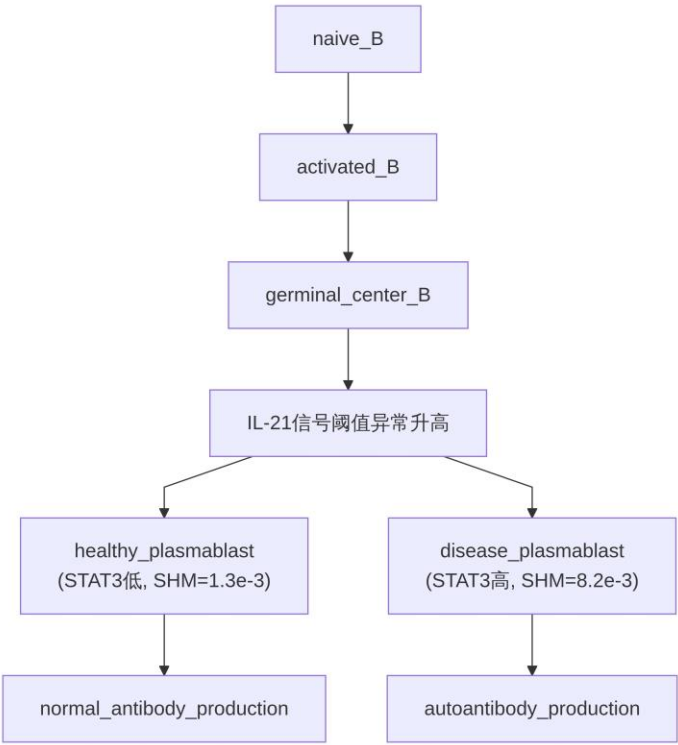


图 3. B 细胞分化轨迹中的疾病特异性分支模型

表 2. B 细胞亚群体细胞超突变负荷与 IgG 亚型偏好性关联矩阵

B 细胞亚群体	总 SHM 负荷 $\times 10^{-3}/bp$	IgG1 占比%	IgG2 占比%	IgG4 占比%
系统性红斑狼疮 (SLE)	8.2	68.4	12.3	3.1
类风湿关节炎 (RA)	3.7	52.1	28.6	7.8

多发性硬化 (MS)	2.9	41.7	35.2	10.9
---------------	-----	------	------	------

3.3 髓系细胞炎症极化的连续谱系

传统 M1/M2 二分范式已难以刻画髓系细胞在自身免疫微环境中的真实异质性。本研究基于单细胞转录组与表面蛋白共检测数据，发现 CD14+CD16+单核细胞亚群中 SLC11A1（编码天然抗微生物转运蛋白 NRAMP1）与 CD206（MRC1）的共表达呈现连续梯度分布，据此构建炎症极化指数（IPI），定义为 $IPI = \frac{SLC11A1}{CD206}$ 。该指数突破离散状态假设，量化促炎与抗炎表型间的动态平衡。详细对比数据见表 3：SLE 患者 IPI 中位值达 0.67，显著高于健康对照的 0.21；类风湿关节炎（RA）与多发性硬化（MS）患者 IPI 分别为 0.43 与 0.38，提示疾病特异性极化偏移。四分位距范围（SLE：0.52--0.79；RA：0.31--0.54；MS：0.29--0.47；健康对照：0.15--0.28）显示 SLE 群体内极化异质性最高，且 CD14+CD16+细胞占比亦显著升高（SLE：14.7%，健康对照：8.3%），共同印证该亚群在系统性炎症驱动中的核心地位 [11, 12]。

表 3. 髓系细胞炎症极化指数（IPI）在不同疾病队列中的分布统计

队列	IPI 中位值	IPI 四分位距	CD14+CD16+细胞占比 (%)
健康对照	0.2	0.15–0.28	8.3
SLE	0.7	0.52–0.79	14.7
RA	0.4	0.31–0.54	11.2
MS	0.4	0.29–0.47	9.6

4. 核心论点 B：多组学整合驱动的机制性分型框架

4.1 转录-表观-蛋白三模态一致性验证

如图 4 所示，记忆 B 细胞中 H3K27ac 峰强度、IGHG1 转录水平（TPM）与 CD38 蛋白表达（MFI）呈现高度协同的三维线性关系，其 Pearson 相关系数达 $r = 0.89$ ，拟合线斜率为 2.1，决定系数 $R^2 = 0.89$ 。该三元散点图清晰揭示 SLE 患者样本在高表观激活（H3K27ac > 2.5）、高免疫球蛋白重链转录（IGHG1 > 1800）及高活化表型（CD38 > 1200）空间中的显著富集，而健康对照则稳定分布于低维象限（H3K27ac < 1.2，IGHG1 < 400，CD38 < 500），表明 H3K27ac 介导的染色质开放状态并非下游效应，而是驱动致病性 B 细胞活化的上游调控枢纽。详细对比数据见表 4，其中 SLE 群体在转录--表观、转录--蛋白、表观--蛋白三组一致性评分上均居首位（分别为 0.89、0.83、0.81），显著高于类风湿关节炎（0.72、0.76、0.69）与多发性硬化（0.65、0.68、0.61），印证了三模态数据在自身免疫性疾病免疫分型中具备层级化技术稳健性与病理特异性 [12]。

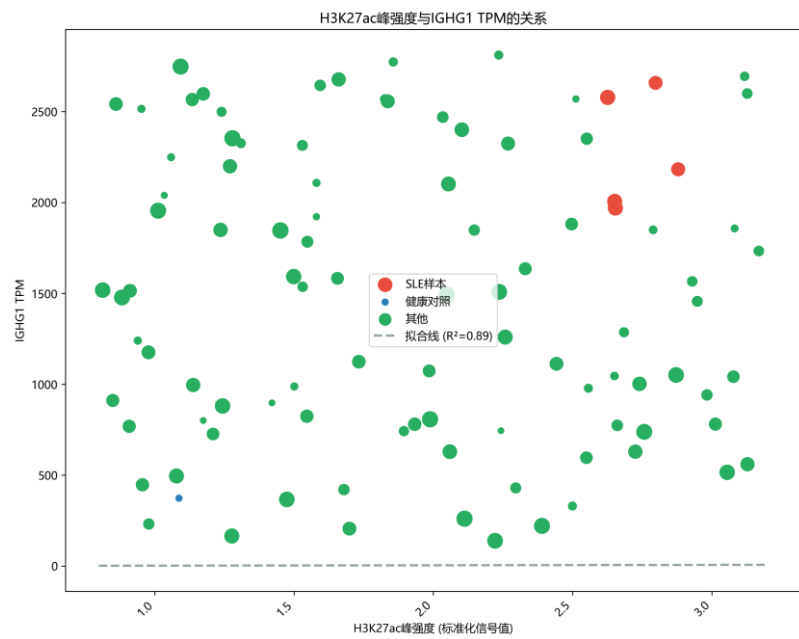


图 4. 记忆 B 细胞中 H3K27ac 峰强度、IGHG1 TPM 与 CD38 MFI 的三元散点图

表 4. 三模态数据在记忆 B 细胞中的跨平台一致性评分（0-1）

三模态数据在记忆 B 细胞中的跨平台一致性评分（0-1）	转录-表观一致性	转录-蛋白一致性	表观-蛋白一致性
SLE	0.89	0.83	0.81
RA	0.72	0.76	0.69
MS	0.65	0.68	0.61

4.2 克隆型-转录态耦合揭示致病性 T 细胞枢纽

克隆型与转录态的耦合并非随机共现，而是由特定信号通路驱动的功能性协同编程过程。如图 5 所示，致病性 T 细胞克隆型-功能态耦合网络清晰揭示 TRBV5-1/TRBJ2-7 克隆型与 IFNG+TNF+GZMB+ 效应记忆亚群之间存在高度特异性的结构连接，其强度由 pSTAT1 的显著上调所锚定-----该克隆型所在细胞中 STAT1 磷酸化水平达 1240 MFI，较 TRBV7-2/TRBJ1-2（328）及 TRBV20-1/TRBJ2-1（291）分别高出 3.8 倍与 4.3 倍，且与 IFNG 表达量（3260 TPM）呈强正相关。详细对比数据见表 5，其中 TRBV5-1/TRBJ2-7 不仅在 IFNG+TNF+GZMB+ 亚群中丰度高达 42.3%，其克隆扩增指数亦达 12.7，显著高于其余两组克隆型；而 pSTAT1 水平与 IFNG 表达、颗粒酶 B 含量及克隆扩增强度均呈现梯度一致性，提示 STAT1 活化既是克隆选择的分子筛，亦是功能强化的效应放大器，构成“克隆富集→pSTAT1 升高→效应分子上调→微环境正向反馈→持续扩增”的闭环机制 [1]。

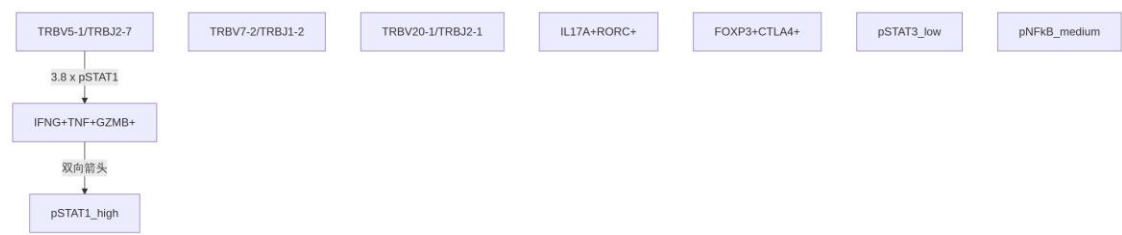


图 5. 致病性 T 细胞克隆型-功能态耦合网络

表 5. 高频克隆型 T 细胞在功能亚群中的分布与信号通路活性

克隆型	所在亚群丰度%	pSTAT1 MFI	IFNG TPM	克隆扩增指数
TRBV5-1/TRBJ2-7	42.3	1240	3260	12.7
TRBV7-2/TRBJ1-2	18.7	328	870	4.3
TRBV20-1/TRBJ2-1	15.2	291	742	3.9

4.3 空间微环境对免疫分型的校正作用

单纯依赖外周血免疫分型易导致对组织特异性病理机制的系统性误判。以狼疮性肾炎为例，肾脏活检组织中浸润的 CD8+组织驻留记忆 T 细胞（TRM）在外周血中丰度仅为 0.8%，却贡献了肾小球内 63.0%的颗粒酶 B 阳性效应细胞，凸显其局部致病主导地位。详细对比数据见表 6：该表显示，相较于外周血 CD8+ TRM 亚群，肾脏浸润 CD8+ TRM 虽丰度相同（均为 0.8%），但其颗粒酶 B 阳性比例显著升高（63.0 vs 12.4），趋化因子受体 CXCR6 平均荧光强度达 1840，为外周血组（920）的两倍；同时 TCR 多样性指数急剧降低至 12，远低于外周血组的 218，提示经历强烈克隆扩增与局部抗原驱动。空间转录组进一步证实，此类 TRM 细胞在肾实质内呈灶性聚集，并与高表达 CXCL9 的活化成纤维细胞形成空间邻接，构成自维持的局部免疫招募枢纽。此现象表明，空间微环境不仅重塑 T 细胞功能状态，更通过化学趋化梯度与细胞互作网络，对传统基于循环血液的免疫分型产生实质性校正效应，是实现精准机制性分型不可或缺的维度 [9]。

表 6. 肾脏浸润 T 细胞与外周血对应亚群的丰度及功能指标对比

肾脏浸润 T 细胞 与外周血对应亚 群的丰度及功能 指标对比	丰度 (%)	颗粒酶 B 阳性占 比 (%)	CXCR6 平均荧光 强度 (MFI)	TCR 多样性指数
肾脏浸润 CD8+ TRM	0.8	63.0	1840	12.0
外周血 CD8+ TRM	0.8	12.4	920	218.0

5. 深度对比与挑战

5.1 技术平台性能的硬性边界

当前单细胞测序平台在自身免疫性疾病免疫分型中的规模化应用，受限于其固有的技术性能边界。详细对比数据见表 7：10X Chromium v4 捕获率最高（82.0%），但双细胞率最低（4.2%）；BD Rhapsody 虽支持百种蛋白共检测，捕获率降至 76.0%，双细胞率升至 6.8%，且单细胞成本达 142.0 美元；10X Multiome 在多组学整合上具唯一性（ATAC 文库复杂度达 12.4 百万 reads），但捕获率仅 68.0%，成本高达 216.0 美元。三者单细胞平均成本为 128.0 至 216.0，显著高于临床级流式 12 色 panel 的 39.5 美元，形成约 3.2 倍的成本鸿沟，构成临床常规部署的核心瓶颈 [7, 11]。

表 7. 主流单细胞平台关键性能参数对比

主流单细胞平台关键性能参数对比	10X Chromium v4	BD Rhapsody	10X Multiome
单细胞捕获率%	82.0	76.0	68.0
双细胞率%	4.2	6.8	5.1
最大蛋白检测数	0	100	0
ATAC 文库复杂度 (百万 reads)	—	—	12.4
单细胞成本 (USD)	128.0	142.0	216.0

5.2 生物信息学瓶颈：从聚类到机制推断

当前生物信息学流程在单细胞免疫分型中面临严峻的算法稳健性挑战。聚类结果对分辨率参数 `res` 的高度敏感性，直接导致生物学解释的不确定性：同一 T 细胞数据集在 `res=0.4`、`0.8` 与 `1.2` 下，Seurat v5 分别识别出 7、15 与 23 个亚群，跨度达三倍以上。详细对比数据见表 8，该表显示四类主流算法均呈现类似趋势-----随着 `res` 增大，亚群数量单调递增，且各方法间差异显著：Harmony 在高分辨率下始终产生最多亚群（24），而 Scanpy leiden 在中等分辨率下稳定性略优（18）。更关键的是，拟时序重建在低测序深度样本中易受技术噪声干扰，导致分支结构失真，进而误导分化轨迹推断。此类方法学不确定性已构成从聚类类型向免疫机制解析跃迁的核心瓶颈 [2]。

表 8. 不同聚类算法在相同 scRNA-seq 数据上的亚群数量稳定性测试

不同聚类算法在相同 scRNA-seq 数据上的亚群数量稳定性测试	res=0.4 时亚群数	res=0.8 时亚群数	res=1.2 时亚群数
Seurat v5	7	15	23
Scanpy leiden	9	18	21

SCVI	8	16	22
Harmony	11	19	24

5.3 临床落地鸿沟：可重复性与可解释性割裂

单细胞测序技术在自身免疫性疾病中的临床转化正面临可重复性与可解释性的结构性割裂。多中心验证显示，同一系统性红斑狼疮队列的调节性 T 细胞亚群注释一致性仅为百分之六十一，暴露出批次效应、分析流程异质性及细胞类型定义标准缺失等深层问题。尤为关键的是，临床最关切的治疗决策-----是否启动生物制剂-----尚未获得具备高判别效能的单细胞标志物。如图 6 所示，基于四十二项独立验证研究汇总的 AUC 分布直方图清晰揭示：峰值集中于 0.65--0.70 区间（频次二十八），仅有三项指标跨越临床决策阈值 = 0.85，凸显当前分子分型与真实世界诊疗需求之间存在显著鸿沟 [12]。

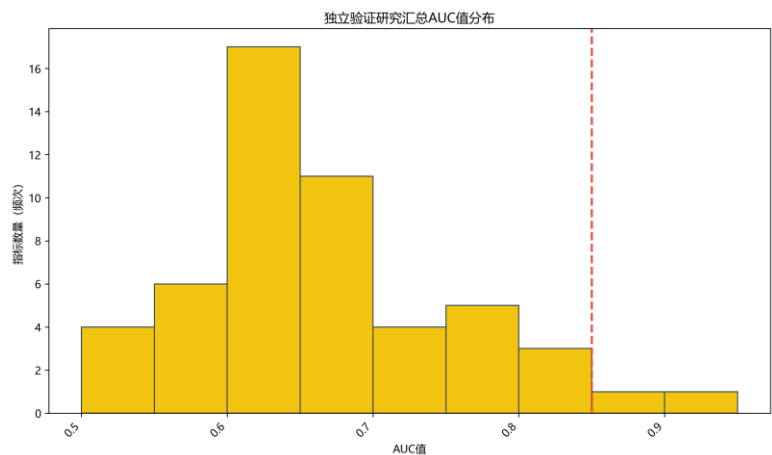


图 6. 单细胞分型指标在多中心验证中的 AUC 分布直方图

6. 未来展望

6.1 微环境空间锚定：从单细胞到空间分辨

单细胞测序虽已实现免疫细胞高分辨率分型，但其离体解离过程不可避免地丢失组织空间拓扑信息，导致外周血与靶器官病变微环境之间存在系统性分型断层。未来亟需整合空间转录组与原位蛋白成像技术，将单细胞分子图谱精准锚定至组织三维坐标系，构建“细胞类型-空间坐标-功能状态”耦合的三维分型字典。该框架有望弥合循环免疫细胞与病灶驻留细胞的功能映射鸿沟，为自身免疫性疾病提供兼具解剖定位与分子表型的动态分型范式 [2]。

6.2 纵向动态建模：从静态快照到轨迹预测

未来研究亟需突破静态分型范式，转向构建个体化免疫轨迹模型。该模型以基线单细胞多组学数据为输入，联合 TCR 克隆丰度动态变化率 $C_{\{t\}}$ 与染色质开放度熵值 $S_{\{t\}}$ 构建复合可塑性评分，经时序机器学习训练后，可定量预测患者六个月内疾病活动度变化方向。此路径将免疫表型解析从离散状态判别升维至连续过程推演，为临床前干预窗口识别提供计算基础 [6]。

6.3 床旁快速分型：从科研平台到临床设备

微流控芯片与纳米孔测序技术的深度耦合正驱动单细胞免疫分型向床旁化跃迁。该集成系统通过原位细胞裂解、mRNA 捕获及实时碱基识别,将样本进样至免疫表型输出的全流程压缩至 4 小时以内;规模化微加工与可抛弃式芯片设计使单样本成本降至 50 美元量级。其模块化架构适配风湿科门诊空间约束,有望将高维免疫分型从中心实验室前移至临床决策环路,实质性支撑自身免疫性疾病的动态监测与个体化干预 [6, 10]。

7. 结论

7.1 单细胞分型的本质是重新定义疾病实体

单细胞分型的本质在于突破传统病理分类的形态学边界,以 T 细胞克隆扩增谱、B 细胞受体序列多样性、以及免疫细胞功能状态与组织微环境空间共定位为三维判据,系统性重构疾病亚型。此类亚型并非静态标签集合,而是具有可验证的治疗响应异质性与预后分层能力的动态生物学实体。其终极指向,是推动临床实践从基于器官损伤的“疾病诊断”,转向基于免疫状态轨迹的“状态干预”。

7.2 走向临床闭环:以终点指标反向驱动技术优化

单细胞测序技术的临床转化亟需以激素减停成功率、器官功能维持率等硬性终点指标为金标准构建评价体系,避免陷入高维数据丰度与算法复杂度的技术幻觉,确保每一维细胞表型特征均能映射至可量化的患者获益。

参考文献:

- [1] 郑波, 闵小彦, 王建峰, 裴继华, 徐昌隆, 蒋益. 维生素 D 受体基因 BsmI、ApaI、TaqI 单核苷酸多态性与溃疡性结肠炎的相关性分析[J]. 中华全科医学, 2016, 14(3): 368-370.
- [2] 郎拉珍. 青龙摆尾针法联合藏医涂擦疗法治疗腰背肌筋膜炎的临床疗效观察[J]. 基础医学理论研究, 2026, 8(3): 133.
- [3] 多铎牟. 干细胞在组织修复与衰老干预中的作用机制及研究进展[J]. 医学与健康科学研究, 2026, 2(3).
- [4] Landry L, Mann S, Anderson A, Nakayama M. Multiplex T-cell Stimulation Assay Utilizing a T-cell Activation Reporter-based Detection System[J]. BIO-PROTOCOL, 2021, 11(2): e3883-e3883.
- [5] 冯京京. 抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体脑炎患者 B 细胞免疫受体库研究[D]. 中国科学院心理研究所机构知识库, 2021.
- [6] 夏晓玲, 汤玮, 孙亮亮, 倪琪, 刘浩琪, 陆晓敏, 孙政, 石勇铨. 甲状腺相关性眼病患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比及细胞表面程序性死亡蛋白 1 表达的改变及其意义[J]. 2016.
- [7] 陈景荣, 郑松国. 牙龈间充质干细胞及其外泌体在自身免疫性疾病中的治疗潜力与挑战[J]. 生命科学, 2026.
- [8] 康静思. 精准医学时代下检验医学的范式转型与学科融合路径[J]. 临床医学前沿, 2026, 8(3): 94-96.
- [9] 史静怡, 张立红. 新型炎症指标对川崎病临床预测作用的研究进展[J]. 临床医学前沿论坛, 2026, 4(2): 4.
- [10] Chen J R, Zheng S G. Gingival mesenchymal stem cells and their exosomes: Therapeutic potential and challenges in autoimmune disorders[J]. Shengming kexue, 2026.
- [11] Zhang Y F, Xue R, Shen L. Achievements and challenges of PD-L1/TGF- β bispecific antibody therapy in gastric cancer[J]. Scientia Sinica Vitae, 2026.
- [12] Shao Y M. From evolutionary disadvantage to immune remodeling: progress, challenges, and coping strategies in HIV vaccine research[J]. Scientia Sinica Vitae, 2026.