

· 综述 ·

# 多发性硬化三级淋巴结构的研究进展

刘双 马坚妹\*

(大连医科大学基础医学院解剖学教研室, 大连 116044)

**[摘要]** 多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统自身免疫性疾病,其病理变化主要包括淋巴细胞浸润、胶质细胞活化、髓鞘脱失和神经退行变等。随着 MS 进展,外周浸润的免疫细胞通过释放 C-X-C 基序趋化因子配体(CXCL)13、CXCL12 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等,诱导淋巴细胞集聚在脑脊膜或其覆盖的脑脊髓实质中,形成三级淋巴结构(TLS)。TLS 可不依赖外周免疫系统发生强烈的免疫应答,产生致病性淋巴细胞,并持续活化其周围的小胶质细胞和星形胶质细胞,通过释放促炎性细胞因子和趋化因子,导致神经炎症加剧并导致 MS 症状持续和加重,甚至产生不可逆性的神经损伤,这些均与 MS 的慢性进展密切相关。我们就 TLS 在不同类型 MS 中的发生、分布以及组织结构等方面的研究进展进行综述,为慢性进展期 MS 的治疗提供新思路。

**[关键词]** 多发性硬化;三级淋巴结构;淋巴细胞;中枢神经系统

**[中图分类号]** R741;R392 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2024.04.002

## Research progress of the tertiary lymphoid structure in multiple sclerosis

LIU Shuang, MA Jian-mei\*

(Department of Anatomy, College of Basic Medical Science, Medical Dalian University, Dalian 116044, China)

**[Abstract]** Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system(CNS), which is characterized by infiltration of immune cells, glia activation, demyelination and neurodegeneration. With the progression of MS, the peripheral infiltrated immune cells promote lymphocytes to locate in parenchyma or meninges adjacent to active lesions by secreting cytokines, such as C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 13, CXCL12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), contributing to the formation of tertiary lymphoid structure (TLS). TLS formation in the CNS can directly trigger immune reaction independent from peripheral immune system, leading to the differentiation of pathogenic lymphocytes, the activation of microglia and astrocyte, and the recruitment of additional peripheral immune cells into the CNS by secreting proinflammatory cytokines and chemokines. The immune reaction in CNS caused by TLS leads to aggravated neuroinflammation and pathological changes, even irreversible neuron damage, which is thought to be responsible the progression of MS. The formation, distribution, tissue structure, and the mechanism of formation and distribution of the TLS in MS are reviewed in this article, which may contribute to potential therapeutic approaches for chronic progressive MS.

**[Key words]** Multiple sclerosis;Tertiary lymphoid structure;Lymphocyte;Central nervous system

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)免疫介导的慢性神经炎症性脱髓鞘疾病。根据 MS 临床病程特点,主要分为复发缓解型 MS(relapsing remitting MS, RRMS)、继发进展型 MS(secondary progressive MS, SPMS)、原发进展型 MS(primary progressive MS, PPMS)和进展复发型 MS(progressive relapsing MS,

PRMS)等<sup>[1]</sup>。其中,以 RRMS 最为常见,约占 MS 的 85%,以症状的复发和缓解交替为特点,没有或仅残留轻微的 CNS 功能障碍。超过 50%的 RRMS 患者在 10~15 年后发展为 SPMS,表现为症状无明显缓解并进行性加重,出现不可逆神经损伤<sup>[1]</sup>。PPMS 和 PRMS 是 MS 的少见病程类型,分别占 MS 的 10%~15%和 5%~10%,从发病开始就表现为症状

**[收稿日期]** 2024-03-16 **[修回日期]** 2024-04-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82071555);大连医科大学交叉科研合作课题基金(JCHZ2023007)

**[作者简介]** 刘双(1992—),女(汉族),湖北省襄阳市人,在读博士研究生。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: ma\_jianmei@hotmail.com Tel: (0411)86110281



进行性加重,但在 PRMS 也有少数病例存在缓解复发过程<sup>[1]</sup>。MS 的主要病理变化是以 CNS 中淋巴细胞浸润、胶质细胞活化以及促炎性细胞因子释放为特点的神经炎症,及其导致的局灶性髓鞘脱失、胶质瘢痕形成、轴突损伤,甚至出现神经元和白质丢失引发的脑萎缩和脑室扩张等<sup>[1]</sup>。因此,遏制进展,减少复发是 MS 治疗的关键。近年来,通过尸检在进展型 MS 患者脑内发现了一种新的病理改变,即三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS),出现在超过 44.09% 的 SPMS 患者中<sup>[2~13]</sup>,在早期死亡、尚未分型的 MS 患者中也有发现<sup>[14]</sup>。并且,根据对 MS 病例和实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)的研究发现, TLS 发生与 CNS 损伤程度和疾病进展成正相关<sup>[3,6,8]</sup>,提示 TLS 是治疗 MS 的可能靶标,而近年也出现了针对 TLS 发生的药物。为更好地阐释 TLS 发生与 MS 进展的关系,我们就 TLS 在不同类型 MS 中的发生、分布、组成结构以及诊断和药物开发等方面的最新研究进展进行综述。

## 1. TLS 在不同类型 MS 中的发生和分布

TLS 在生理条件下不会形成,而见于各种自身免疫性疾病、慢性炎性和肿瘤等疾病的病变部位,如炎症性肠炎的结肠固有层、系统性红斑狼疮的皮肤、类风湿性关节炎的关节滑膜、干燥综合征的唾液腺、丙型肝炎的肝脏、甲型流感病毒感染肺炎的肺组织、动脉粥样硬化斑块、结直肠癌和卵巢癌等肿瘤组织中<sup>[15~17]</sup>。2004 年, Serafini 等<sup>[2]</sup>首次在 2 名 SPMS 死亡患者脑膜中发现 TLS 的存在。2007 年, Magliozzi 等<sup>[3]</sup>再次报道约 41.4% 的 SPMS 死亡患者的脑组织存在 TLS,并首次提出 MS 的 CNS 中形成的 TLS 与疾病进展具有相关性。此后,多个研究团队对 MS 死亡患者的脑组织进行了神经病理学研究,我们按照时间顺序回顾总结了近 20 年来不同类型 MS 死亡患者 CNS 中 TLS 的发生和分布情况。如表 1 所示,在 406 例 SPMS 病例中发现 179 例患者 CNS 中存在 TLS (Bevan 等<sup>[14]</sup> 2018 年在 12 例早期死亡还未确诊分型的 MS 病例中发现 4 例患者 CNS 中存在 TLS,由于病例极少,因此未纳入统计),占比为 44.09%,而 RRMS 和 PPMS 病例中未发现 TLS 形成。由此可见, TLS 主要存在于 SPMS 中,且主要分布于邻近病灶和血管周围的脑脊膜或其覆盖下的脑脊髓实质中,提示可能与 MS 的进展密切相关。同时有研究也已证实了 CNS 的神经炎症、胶质细胞活化、髓鞘脱失和浅层皮质神经元损伤等病理改变的严重程度与 TLS 发生具有相关性<sup>[3,6,8]</sup>。因此,了解 MS 中 TLS 的组成结构、发生和分布机制以及加重 MS 进展的机制对于预测 MS 临床病程进展和探索

新的治疗靶点具有重要价值。

## 2. MS 中 TLS 的组织结构

机体各种免疫组织在功能上可以划分为初级、次级以及三级淋巴组织<sup>[16]</sup>。其中,初级淋巴组织包括胸腺和骨髓,是淋巴细胞发育和成熟的主要部位;次级淋巴组织(secondary lymphoid tissue, SLT)包括脾脏、淋巴结以及黏膜和皮肤相关淋巴组织,是抗原提呈过程和淋巴细胞动员的主要场所;三级淋巴组织,即 TLS 是各种免疫细胞在慢性炎症刺激下集聚在非淋巴组织部位的细胞簇,其结构类似于 SLT<sup>[16]</sup>。如图 1A 所示, SLT 的结构主要包括被膜、T 细胞区、B 细胞区、动脉、静脉、输入和输出淋巴管以及由成纤维网状细胞(fibroblast reticular cell, FRC)和高内皮静脉(high endothelial venule, HEV)组成的网状纤维<sup>[16]</sup>。其中如图 1B 所示, T 细胞区由密集的 T 细胞构成,分布在中央动脉周围,形成中央动脉淋巴鞘; B 细胞区主要由未受抗原刺激的 naïve B 细胞围绕少量滤泡树突状细胞(follicular dendritic cell, FDC)组成的初级淋巴滤泡构成,可在抗原刺激后发育成为次级淋巴滤泡。次级淋巴滤泡是由套区和生发中心(germinal center, GC)两个部分组成。其中,套区是由初级淋巴滤泡被成熟的 GC 挤到一端而形成的,包含 naïve B 细胞、FDC 以及记忆性 B 细胞,最外层的细胞称为边缘区; GC 主要由中心母细胞和浆细胞形成的暗区与富含中央细胞、FDC 和滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells, Tfh)的亮区。TLS 与 SLT 的次级淋巴滤泡相似,由 T 细胞区、B 细胞区、动脉、静脉和淋巴管组成<sup>[16]</sup>。其中, B 细胞区主要包括 B 细胞、浆细胞和 FDC 等; T 细胞区主要包含 Tfh,也有少量 CD4<sup>+</sup>辅助性 T (T helper, Th) 1、Th17 和 CD8<sup>+</sup>细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL);部分 TLS 也包含少量的巨噬细胞(macrophage, Mφ)、中性粒细胞、肥大细胞以及具有 FRC 功能的脑膜细胞<sup>[2~14]</sup>。除免疫细胞外, MS 患者 TLS 还检测到各种细胞因子和其他分子,如促进 TLS 发生的趋化因子[如 C-X-C 基序趋化因子配体(C-X-C motif chemokine ligand, CXCL) 13、C-C 基序趋化因子配体(C-C motif chemokine ligand, CCL) 19、CCL21、CXCL1 和 CXCL12 等]、促进 B 细胞活化增殖的 B 细胞活化因子(B cell activating factor, BAFF)、免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、干扰素-γ(interferon, IFN-γ)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素(interleukin, IL)-17 和 IL-21 等<sup>[2~15]</sup>。由于 TLS 组织结构较为松散,其内的淋巴细胞不同于 SLT 是严格按照顺序在相应的分区完成活化、增殖和分化过程。例如,自身抗原反应

表 1 不同类型 MS 患者 TLS 的发生与分布  
Table 1 The formation and distribution of the TLS in MS

年份 year	不同类型 MS 患者 TLS 发生病例数 numbers of the TLS cases in MS					TLS 的分布 distribution of the TLS in MS	
	对照组 control	急性 MS acute MS	RRMS	SPMS	PPMS		
2004 <sup>[2]</sup>	病例总数 MS cases	1	0	1	3	2	软脑膜血管周围 around blood vessels in cerebral leptomeninges
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	2	0	
2007 <sup>[3,4]</sup>	病例总数 MS cases	5	0	0	42	10	脑膜内;邻近软脑膜下的病灶;邻近脑干、额叶、颞叶、顶叶和扣带回内的病灶 within meninges; lesions adjacent to subpial, brainstem, frontal, temporal, parietal lobes and cingulate gyrus
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	20	0	
2009 <sup>[5]</sup>	病例总数 MS cases	28	9	5	35	13	脑膜内 within meninge
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	15	0	
2010 <sup>[6,7]</sup>	病例总数 MS cases	17	0	0	46	0	脑膜内;邻近软脑膜下的病灶 within meninges; lesion adjacent to subpial
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	28	0	
2011 <sup>[8]</sup>	病例总数 MS cases	0	0	0	123	0	邻近软脑膜下的病灶;邻近扣带回、岛叶、颞叶和额叶内的病灶 lesions adjacent to subpial, deep cerebral sulci-cingulate, insula, temporal and frontal gyri
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	49	0	
2013 <sup>[9]</sup>	病例总数 MS cases	0	0	0	44	0	皮质血管周围;邻近脑膜和 WML around perivascular in cortex; adjacent to meninges and WML
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	26	0	
2015 <sup>[10]</sup>	病例总数 MS cases	11	0	0	27	0	前额叶脑膜内 within forebrain meninges
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	12	0	
2016 <sup>[11]</sup>	病例总数 MS cases	0	0	0	15	0	脑膜内 within meninges
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	5	0	
2018 <sup>[14]</sup>	病例总数 MS cases	11	12	0	27	0	邻近软脑脊膜下 GML GML adjacent to subpial
	TLS 病例数 TLS cases	0	4	0	0	0	
2019 <sup>[12]</sup>	病例总数 MS cases	13	0	0	22	11	邻近脑和脊髓内的病灶 lesion adjacent to brain and spinal cord
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	11	0	
2020 <sup>[13]</sup>	病例总数 MS cases	5	0	0	22	0	脊膜内 within spinal cord meninges
	TLS 病例数 TLS cases	0	0	0	11	0	

对照组. 无神经疾病者;急性 MS. 在发病 1 年内死亡的 MS 患者;WML. 白质损伤;GML. 灰质损伤  
Control, No neurological disease; Acute MS, MS patients who died within one year of onset; WHL, White matter lesion; GML, Grey matter lesion

B 细胞在 SLT 内无法进入滤泡,并很快死亡;而在 TLS 中可进入,并在 BAFF 和其他细胞因子的作用下完成活化、增殖、分化和抗体产生。此外,由于 TLS 缺少被膜包裹,直接暴露于抗原和炎性因子环境中,导致其内的淋巴细胞活化迅速,增殖分化为效

应细胞,产生强烈的适应性免疫反应<sup>[16]</sup>。  
**3. MS 中 TLS 的发生和分布机制**  
TLS 发生机制被认为与 SLT 发生机制类似<sup>[16,17]</sup>。SLT 发生依赖造血细胞中淋巴组织诱导细胞(lymphoid tissue inducer cells,LTi)和间充质中淋



巴组织构建细胞 (lymphoid tissue organizer cells, LTo) 及其分泌的细胞因子、趋化因子、黏附分子和存活因子等<sup>[16,17]</sup>。LTi 的关键转录因子为视黄酸受体相关孤儿受体  $\gamma$ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t, ROR $\gamma$ t) 和分化抑制因子 (inhibitor of differentiation, Id) 2, 其表达的淋巴毒素  $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 (lymphotoxin  $\alpha$ 1/ $\beta$ 2, LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2) 和 TNF 分别与 LTo 表面的淋巴毒素  $\beta$  受体 (lymphotoxin  $\beta$  receptor, LT $\beta$ R) 和肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 结合, 促进 LTo 表达黏附分子, 如血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1)、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM1)、黏膜地址素细胞黏附分子 1 和周围淋巴结地址素

(peripheral node addressin, PNAd) 等, 以及 CCL19、CCL21 和 CXCL13 等趋化因子。LTo 中的 FRC 表达 CCL19 和 CCL21 与 FDC 表达的 CXCL13, 分别与淋巴细胞表面的 C-C 趋化因子受体 7 (C-C motif chemokine receptor 7, CCR7) 和 C-X-C 基序趋化因子受体 5 (C-X-C motif chemokine receptor 5, CXCR5) 结合, 以趋化淋巴细胞移动至 FRC 和 HEV 组成的网状纤维中, 形成 SLT 的 T 细胞区和 B 细胞区<sup>[16,17]</sup>。静息状态下, naïve B 细胞主要位于 B 细胞区的初级淋巴滤泡中, 被 FDC 提呈的抗原激活后, 迁移至 T-B 细胞交界处, 在 Tfh 的帮助下, 进行克隆增殖, 分化成中心母细胞和中心细胞<sup>[18]</sup>。FDC 释放的 CXCL13 同时与中心细胞和 Tfh 表面的 CXCR5 结合, 并与之共同向边缘区迁移聚集形成 GC 亮区。FDC 释放的

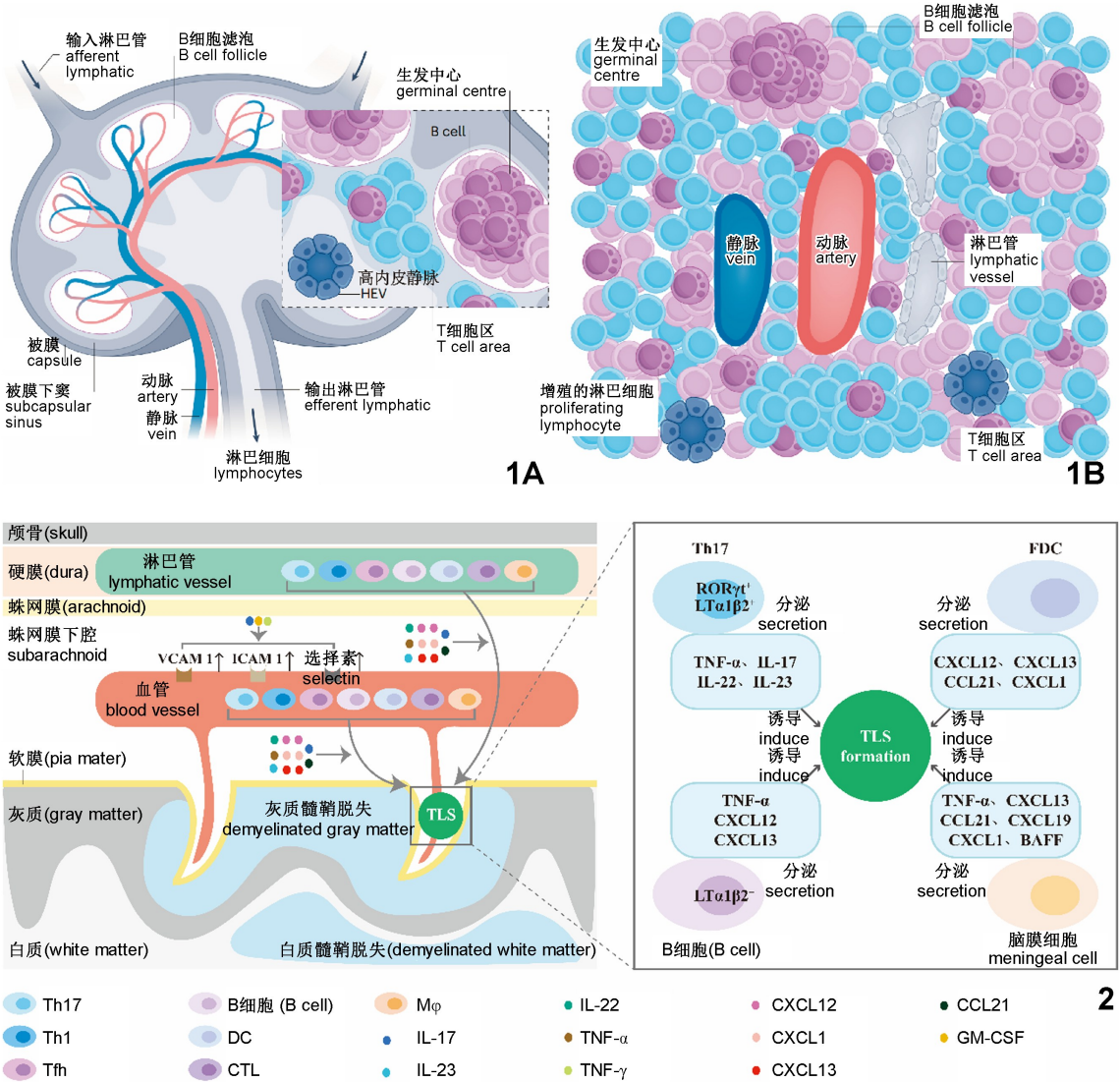


图 1 SLT 和 TLS 的组织结构差异<sup>[16]</sup>  
A. 淋巴结组织结构示意图; B. TLS 组织结构示意图  
图 2 MS 中 TLS 发生和分布机制示意图

Fig. 1 Structural differences between SLT and TLS<sup>[16]</sup>  
A, Schematic diagram of lymph node tissue structure; B, Schematic diagram of TLS tissue structure  
Fig. 2 The mechanism of formation and distribution of the TLS in MS

CXCL12 与中心母细胞表面的 CXCR4 结合, 趋化中心母细胞移动至邻近 T 细胞区部位, 聚集形成 GC 暗区。中心母细胞在暗区进行体细胞超突变, 分化成产生低亲和力抗体的浆细胞<sup>[18]</sup>。随后, 这些浆细胞迁移至亮区, 在 FDC 提呈抗原的刺激和 Th 的帮助下, 分化成为能够产生高亲和力抗体的浆细胞和记忆性 B 细胞<sup>[18]</sup>。

多种细胞被认为可能充当类似 LT<sub>i</sub> 或 LT<sub>o</sub> 的角色, 促进 TLS 发生, 如图 2 所示, Th17、FDC、B 细胞和脑膜细胞等。Th17 表达 LT<sub>i</sub> 特有的分子 ROR $\gamma$ t 和 LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2, 已被证明它可以在 EAE 中通过分泌 IL-17、IL-22、IL-23 及 TNF, 与 LT $\beta$ R 和 TNFR1 受体结合, 促进 TLS 的发生<sup>[19,20]</sup>。并且, 对 Th17 浸润具有抑制作用的 IL-27 被证明同样可以抑制 TLS 的发生<sup>[21]</sup>。同时, SPMS 患者 TLS 内存在大量 IL-17<sup>+</sup> 和 ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Th17<sup>[11]</sup>。上述发现均说明 Th17 可能通过发挥类似 LT<sub>i</sub> 的功能, 参与 MS 中 TLS 的发生。FDC 可以产生 LT<sub>o</sub> 分泌的诱导 STL 发生的趋化因子, 如 CXCL12、CXCL13、CCL21 以及 CXCL1 等, 趋化大量 B 细胞聚集在 MS 的脑膜中<sup>[18]</sup>。多项研究报道, SPMS 患者的 TLS 存在 CD35<sup>+</sup> 或 CXCL13<sup>+</sup> FDC 及其分泌的相关趋化因子<sup>[2,3,6,13]</sup>。因此, FDC 被认为可能充当类似 LT<sub>o</sub> 的角色, 诱导 MS 中 TLS 的形成。B 细胞可以表达 LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2, 并且分泌与 LT<sub>i</sub> 和 LT<sub>o</sub> 诱导 SLT 发生相似的分子, 如 TNF- $\alpha$ 、CXCL12 和 CXCL13 等<sup>[22]</sup>。研究发现, SPMS 患者的 TLS 存在大量 CD20<sup>+</sup>、Ig<sup>+</sup>、Ki67<sup>+</sup>、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、CD138、胞苷脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 或 B 细胞淋巴瘤因子 6 (B cell lymphoma 6, Bcl6) B 细胞<sup>[2~14]</sup>。并且, 在将 B 细胞作为唯一抗原呈递细胞 (antigen presenting cell, APC) (IgH<sup>MOG-mem</sup> × MOG-specific TCR Tg) 启动适应性免疫应答的 EAE 小鼠模型中, 发现 TLS 的存在<sup>[23]</sup>。此外, ROR $\gamma$ t 敲除小鼠, 即无 LT<sub>i</sub> 和 Th17 存在时, 肠道固有层发现大量浸润的 B 细胞和 TLS<sup>[24]</sup>。以上发现均提示, B 细胞可能通过发挥类似 LT<sub>i</sub> 或 LT<sub>o</sub> 的功能诱导 MS 中 TLS 发生。脑膜细胞在诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-6、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和 IL-23 等促炎因子的刺激下, 同样可以分泌与 LT<sub>i</sub> 和 LT<sub>o</sub> 诱导 SLT 发生相似的因子, 如 TNF- $\alpha$ 、CXCL13、CCL21、CXCL19、CXCL1 和 BAFF 等<sup>[25,26]</sup>。此外, CNS 中浸润的其他免疫细胞, 如 T<sub>fh</sub>、Th1、CTL、M1 型的 M $\phi$  和小胶质细胞 (microglia, MG)、树突状细胞 (dendritic cell, DC)、自然杀伤细胞、中性粒细胞和肥大细胞等<sup>[2~14]</sup>, 也被报道在同种异体移植排

斥、类风湿性关节炎、克罗恩病、动脉粥样硬化或恶性肿瘤等疾病中, 通过分泌促炎性细胞因子, 如 TNF- $\alpha$ 、PNA $\delta$ 、IFN- $\gamma$ 、iNOS、IL-6、TGF- $\beta$ 、IL-7、BAFF 和 IL-23 等, 以及趋化因子, 如 CXCL13、CCL21、CXCL19、CXCL12、CXCL10 和 CXCL11 等, 与淋巴细胞表面的相应受体结合, 趋化淋巴细胞聚集在炎症部位, 诱导 TLS 的形成<sup>[15~17]</sup>, 但是在 MS 中尚鲜见报道。

MS 中 TLS 的分布主要定位在脑脊膜或其覆盖下的脑脊髓实质中, 这可能与脑脊膜的解剖结构和功能有关。由于 CNS 血-脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的存在, 可阻止大分子 and 炎性细胞的进入<sup>[27]</sup>, 因此, CNS 曾经被认为是免疫豁免器官, 不存在淋巴管或淋巴组织。但是, Louveau<sup>[28]</sup> 团队在 2015 年打破了这一说法, 发现了脑膜淋巴管的存在。目前, 脑膜淋巴管已经被证实是 CNS 与外周进行免疫细胞或分子交换的重要通道<sup>[29]</sup>。由于脑脊膜具有丰富的血管和淋巴管结构, 因此, 大量外周免疫细胞在脑膜中流动聚集。生理状态下, 外周循环系统中免疫细胞通过脑膜淋巴管进入脑脊液中, 与 CNS 中原驻的 MG 共同对外来抗原进行免疫监视, 之后经脑膜淋巴管回流至颈部淋巴结, 维持 CNS 稳态<sup>[29]</sup>。然而, 当 APC 在脑脊液中识别外来抗原或 CNS 自身抗原并将其呈递给淋巴细胞后<sup>[29]</sup>, 淋巴细胞活化, 经过脑膜淋巴管回流至颈部淋巴结, 分化成相应的效应细胞, 分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 等, 促进构成 BBB 的内皮细胞表达 VCAM1、ICAM1 和内皮细胞选择素等黏附分子, 破坏 BBB 的完整性<sup>[30]</sup>。外周激活的 M $\phi$ 、DC 和单核细胞等固有免疫细胞与 Th1、Th17、T<sub>fh</sub>、浆细胞和 CTL 等适应性免疫细胞, 通过破坏的 BBB 进入 CNS, 分泌促炎性细胞因子并活化 MG 和星型胶质细胞<sup>[30]</sup>。这些浸润至 CNS 的免疫细胞与活化的 MG 和星型胶质细胞通过分泌趋化因子, 进一步趋化外周免疫细胞进入 CNS<sup>[30]</sup>, 加重神经炎症。其中, Th17、FDC、B 细胞、T<sub>fh</sub>、Th1、CTL、M1 型的 M $\phi$  和 MG 等细胞, 通过发挥 LT<sub>i</sub> 或 LT<sub>o</sub> 的功能, 诱导淋巴细胞聚集在脑脊膜或其覆盖下的脑实质及脊髓中, 形成 TLS。基于上述原因, TLS 的分布主要定位在邻近脑膜淋巴管的脑脊膜或其覆盖下的脑脊髓实质。

#### 4. TLS 加重 MS 进展的机制

MS 中的 TLS 具有 SLT 的功能, 可以诱导 T 和 B 细胞成熟和分化<sup>[15]</sup>, 并且, 大多数进展型 MS 具有相对完整或修复好的 BBB<sup>[31]</sup>, TLS 中发生的适应性免疫应答可以不依赖外周淋巴系统的细胞和分子。



TLS 中的 APC, 如 FDC、DC 和 M $\phi$  等, 与周围活化的 MG 均能识别自身异常抗原并将抗原提呈给其内的 naïve T 和 B 细胞或记忆性的 T 和 B 细胞, 产生致病性 T 细胞和浆细胞。并且, 由于 TLS 表面没有被膜包绕, 邻近病灶和血管<sup>[16,17]</sup>, 这些活化的致病性 T 细胞、浆细胞、M $\phi$  和 MG 等免疫细胞更容易浸润至病灶周围, 通过释放促炎性细胞因子、趋化因子、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)、活性氮簇 (reactive nitrogen species, RNS)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 等, 导致神经炎症加剧并持续, 同时通过抗体依赖的细胞介导细胞毒作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)、补体依赖的细胞毒作用 (complement dependent cytotoxicity, CDC)、氧化应激以及线粒体损伤等<sup>[30]</sup>, 加重 MS 病理改变, 甚至导致不可逆性的神经损伤<sup>[3,6,8]</sup>, 最终使 MS 症状持续并进行性加重。这可能是针对外周免疫细胞的药物治疗效果不佳的原因之一。

## 5. MS 中 TLS 的诊断

目前, MS 中 TLS 的研究较少, 至今还未形成诊断 TLS 的标准。磁共振扫描检测脑膜对比增强 (leptomeningeal contrast enhancement, LMCE) 可以确定 MS 脑膜炎症, 与 MS 中灰质体积减少、萎缩速度和持续时间成正相关, 并且, 存在 LMCE 的进展型 MS 患者更容易形成 TLS<sup>[32]</sup>, 提示 LMCE 可能成为 MS 患者 TLS 形成的诊断依据。此外, 由于 TLS 主要位于脑脊膜或邻近的脑脊髓实质中, 因此, 脑脊液中存在与 TLS 发生相关的免疫细胞和分子, 如果通过分子生物学方法对脑脊液进行检测, 有望成为另一种 TLS 的诊断方法。Magliozzi 等<sup>[33]</sup>的团队在存在 TLS 的 MS 患者的脑脊液中检测出大量与 TLS 发生相关的趋化因子, 如 CXCL13 和 CXCL10, 以及细胞因子, 如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-10 等, 进一步验证了这种诊断方法的可行性。目前, 关于 MS 中 TLS 的研究尚需进一步推进, 寻找更好的诊断方法。

## 6. MS 中针对 TLS 治疗的药物开发

目前有多种药物已经应用于 MS 临床治疗中, 有靶向免疫细胞和降低神经炎症的, 还有发挥神经保护作用以及促进髓鞘再生的药物等<sup>[34]</sup>。然而, 大多数药物仅在 RRMS 的治疗中有效, 针对进展型 MS 的临床治疗只有 Ocrelizumab<sup>[35]</sup>和 Siponimod<sup>[36]</sup>被批准。然而, Ocrelizumab 虽然可以结合 B 细胞表面 CD20 的单克隆抗体, 通过 ADCC 和 CDC 消耗外周 B 细胞, 但是无法通过 BBB, 不能消耗 CNS 中的 B 细胞<sup>[35]</sup>。因此, 在 RRMS、SPMS 和 PPMS 的治疗中可以缓解症状, 但是无法有效延缓疾病进展和抑

制 TLS 发生, 说明仅靶向外周免疫细胞的治疗药物是不够的, 还需将重点放在消耗 CNS 中的免疫细胞, 比如阻止 TLS 发生。Siponimod 是一种免疫调节剂药物, 可以通过 BBB, 通过降低淋巴细胞表达鞘氨醇 1 磷酸酯受体 (sphingosine 1 phosphate receptor, S1PR), 抑制表达 CCR7 的 T 和 B 细胞离开 SLT 和 TLS, 即抑制淋巴细胞向病灶迁移, 以减轻因神经炎症而导致的髓鞘脱失<sup>[36]</sup>。并且, 有报道证明, Siponimod 可降低 EAE 模型中 TLS 的发生, 明显延缓进展<sup>[37]</sup>。Evobrutinib 是一种布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 抑制剂, 已进入 RRMS 的 III 期临床试验<sup>[38]</sup>, 可以通过 BBB, 抑制 B 细胞、M $\phi$ 、MG 和星形胶质细胞表面的 BTK 信号通路, 降低 B 细胞活化和增殖及其释放细胞因子水平, 抑制 M $\phi$  和 MG 向 M1 型分化<sup>[39]</sup>。在 RRMS 的 II 期临床实验中, Evobrutinib 被发现可以减少 LMCE 病灶, 减轻脑膜炎症<sup>[40]</sup>, 提示其可能具有抑制 MS 中 TLS 发生的潜能。Siponimod 和 Evobrutinib 的基础研究和临床研究提示, 开发具有 BBB 渗透性, 抑制多种免疫细胞以及抑制 TLS 发生的药物在未来 MS 治疗中具有更好的前景。

## 7. 总结与展望

TLS 由于具有类似 SLT 的结构和功能, 可不依赖外周淋巴系统, 在 CNS 产生致病性 T 和 B 淋巴细胞, 并持续活化 MG 和星形胶质细胞, 通过释放促炎性细胞因子和趋化因子, 导致神经炎症的加剧和 MS 症状的持续与进展, 是 MS 慢性进展期的关键病理改变。因此, 明确 TLS 的诊断方法以及开发针对 TLS 的药物对 MS 预后判定和治疗非常重要。目前, MS 中 TLS 的相关研究还较少, 调控 MS 中 TLS 发生的分子机制尚未阐明, 这可能是未来需要深入研究的问题。

## 参 考 文 献

- [1] Kuhlmann T, Moccia M, Coetzee T, et al. Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(1): 78-88.
- [2] Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis [J]. *Brain Pathol*, 2004, 14(2): 164-174.
- [3] Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology [J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 4): 1089-1104.
- [4] Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(12): 2899-2912.
- [5] Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 5): 1175-1189.
- [6] Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, et al. A Gradient of neuronal

- loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(4): 477-493.
- [7] Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, et al. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69(7): 677-693.
- [8] Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2755-2771.
- [9] Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, et al. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72(1): 29-41.
- [10] Howell OW, Schulz-Trieglaff EK, Carassiti D, et al. Extensive grey matter pathology in the cerebellum in multiple sclerosis is linked to inflammation in the subarachnoid space [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41(6): 798-813.
- [11] Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, et al. ROR $\gamma$ t expression and lymphoid neogenesis in the brain of patients with secondary progressive multiple sclerosis [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2016, 75(9): 877-888.
- [12] Bell L, Lenhart A, Rosenwald A, et al. Lymphoid aggregates in the CNS of progressive multiple sclerosis patients lack regulatory T cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3090.
- [13] Realì C, Magliozzi R, Roncaroli F, et al. B cell rich meningeal inflammation associates with increased spinal cord pathology in multiple sclerosis [J]. *Brain Pathol*, 2020, 30(4): 779-793.
- [14] Bevan RJ, Evans R, Griffiths L, et al. Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2018, 84(6): 829-842.
- [15] Kee R, Naughton M, McDonnell GV, et al. A review of compartmentalised inflammation and tertiary lymphoid structures in the pathophysiology of multiple sclerosis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(10): 2604.
- [16] Sato Y, Silina K, van den Broek M, et al. The roles of tertiary lymphoid structures in chronic diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(8): 525-537.
- [17] Schumacher TN, Thommen DS. Tertiary lymphoid structures in Cancer [J]. *Science*, 2022, 375(6576): eabf9419.
- [18] Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers [J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 413-442.
- [19] Barone F, Nayar S, Campos J, et al. IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015, 112(35): 11024-11029.
- [20] Schropp V, Rohde J, Rovituso DM, et al. Contribution of LT $\alpha$  and TH17 cells to B cell aggregate formation in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 111.
- [21] Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1372-1379.
- [22] Vanderkerken M, Baptista AP, De Giovanni M, et al. ILC3s control splenic cDC homeostasis via lymphotoxin signaling [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(5): e20190835.
- [23] Molnár N, Schulze-Toppoff U, Weber MS, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(13): 2921-2937.
- [24] Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR $\gamma$ t and LT $\alpha$  cells [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(1): 125-134.
- [25] Pikor NB, Astarita JL, Summers-Deluca L, et al. Integration of Th17- and lymphotoxin-derived signals initiates meningeal-resident stromal cell remodeling to propagate Neuroinflammation [J]. *Immunity*, 2015, 43(6): 1160-1173.
- [26] Wieseler-Frank J, Jekich BM, Mahoney JH, et al. A novel immune-to-CNS communication pathway: cells of the meninges surrounding the spinal cord CSF space produce proinflammatory cytokines in response to an inflammatory stimulus [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(5): 711-718.
- [27] Cui ZhJ, Liu F, Zhao KB, et al. Brain barrier structure of APPSWE Tg2576 mice [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2018, 49(5): 571-578. (in Chinese)  
崔占军, 刘芳, 赵凯冰, 等. APPSWE Tg2576 小鼠脑屏障结构 [J]. *解剖学报*, 2018, 49(5): 571-578.
- [28] Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels [J]. *Nature*, 2015, 523(7560): 337-341.
- [29] Da Mesquita S, Papadopoulos Z, Dykstra T, et al. Meningeal lymphatics affect microglia responses and anti-A $\beta$  immunotherapy [J]. *Nature*, 2021, 593(7858): 255-260.
- [30] Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The immune response in multiple sclerosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 121-139.
- [31] Leech S, Kirk J, Plumb J, and McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007, 33(1): 86-98.
- [32] Zivadinov R, Ramasamy DP, Vaneckova M, et al. Leptomeningeal contrast enhancement is associated with progression of cortical atrophy in MS: a retrospective, pilot, observational longitudinal study [J]. *Mult Scler*, 2017, 23(10): 1336-1345.
- [33] Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R, et al. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2018, 83(4): 739-755.
- [34] DeLuca J, Chiaravalloti ND, Sandroff BM. Treatment and management of cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(6): 319-332.
- [35] Hauser SL, Bar-Or A, Weber MS, et al. Association of higher ocrelizumab exposure with reduced disability progression in multiple sclerosis [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2023, 10(2): e200094.
- [36] Starke L, Millward JM, Prinz C, et al. First in vivo fluorine-19 magnetic resonance imaging of the multiple sclerosis drug Siponimod [J]. *Theranostics*, 2023, 13(4): 1217-1234.
- [37] Brand RM, Diddens J, Friedrich V, et al. Siponimod inhibits the formation of meningeal ectopic lymphoid tissue in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2021, 9(1): e1117.
- [38] Montalban X, Arnold DL, Weber MS, et al. Placebo-controlled trial of an oral BTK inhibitor in multiple sclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(25): 2406-2417.
- [39] Dolgin E. BTK blockers make headway in multiple sclerosis [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 3-5.
- [40] Bhargava P, Kim S, Reyes AA, et al. Imaging meningeal inflammation in CNS autoimmunity identifies a therapeutic role for BTK inhibition [J]. *Brain*, 2021, 144(5): 1396-1408.