DOI:10.16016/j.1000-5404.202108060

皮肤优势型慢性移植物抗宿主病小鼠模型的构建

王蔚浩[1],杨世杰[1],杜雨轩[2],王筱淇[1],洪 涛[1],何云地[1],王 瑞[1],马 超[1],安慧慧[1],王俊洁[1],张云芳[1],高强国[3],张 曦[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院血液病医学中心,全军血液病中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1];563099 贵州 遵义,遵义医科大学第二附属医院检验科[2];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院细胞生物学教研室[3]

[摘要] **目的** 构建皮肤优势型慢性移植物抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)小鼠模型。**方法** 利用致死剂量辐照 BALB/c 小鼠,并接受来自 B10.D2 供鼠混合的骨髓细胞和脾脏细胞以构建皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型,通过小鼠临床表现、病理特征及靶器官细胞亚群评估模型构建情况。**结果** 模型小鼠的临床表现以皮肤脱毛、硬化、皮屑、结痂和由皮肤皱缩硬化引起的弓背和关节僵直为主,临床病理评分随疾病进展升高,但无明显肠道 cGVHD 表现。病理改变中皮肤出现明显胶原沉积,毛囊减少甚至消失,而其他靶器官病理改变不明显。对以上靶器官行 T 细胞亚群分析,发现 Th1 细胞、$CD4^+IL\text{-}13^+$T 细胞和 Tc1 细胞与疾病进展密切。**结论** 成功构建可用于实验研究的皮肤优势型小鼠 cGVHD 模型,病理变化主要以皮肤纤维化表现为主。

[关键词] 慢性移植物抗宿主病;皮肤;肝脏;肺脏;T 细胞

[中图法分类号] R-332; R617; R733.7 [文献标志码] A

Establishment of a mouse model of skin-dominant chronic graft-versus-host disease

WANG Weihao[1], YANG Shijie[1], DU Yuxuan[2], WANG Xiaoqi[1], HONG Tao[1], HE Yundi[1], WANG Rui[1], MA Chao[1], AN Huihui[1], WANG Junjie[1], ZHANG Yunfang[1], GAO Qiangguo[3], ZHANG Xi[1] [1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Medical Center of Hematology, PLA Center for Hematology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563099; [3]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a mouse model of skin-dominant chronic graft-versus-host disease (cGVHD). **Methods** BALB/c mice were irradiated with lethal dose and then received a mixture of bone marrow and spleen cells transplantation from B10.D2 donor mice. Then the clinical manifestations, pathological features of the mice and cell subsets of targeted organs were observed to evaluate the establishment of model. **Results** The clinical manifestations of the model mice mainly involved skin depilation, sclerosis, dandruff, scab, as well as arched back and joint stiffness due to skin shrinkage and sclerosis. The clinicopathological scores were increased with the progression of cGVHD, while the model mice showed no obvious manifestations of intestinal cGVHD. Moreover, increase of collagen deposition and decrease or even disappearance of hair follicles was observed on the histopathologic sections of skin, while other targeted organs showed no major alterations. T cell subsets analysis indicated that Th1 cells, $CD4^+IL\text{-}13^+$T cells and Tc1 cells were closely related to the disease progression. **Conclusion** The skin-dominant cGVHD mouse model is

[基金项目] 国家重点研究计划重点专项(2017YFA0105502);国家血液系统疾病临床医学研究中心 2020 年度开放课题重点项目(2020ZKZC02);军事医学基础前沿领域专项(2018YQYLY002)

[通信作者] 张 曦,E-mail:zhangxxi@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

successfully established, with skin damage and fibrosis as main pathological changes.

[**Key words**] chronic graft-versus-host disease; skin; liver; lung; T lymphocytes

Supported by the Key Special Project of National Key R&D Program (2017YFA0105502), the 2020 Open Project of National Clinical Medicine Research Center for Hematological System Diseases (2020ZKZC02), and the Special Project of Basic Frontier of Military Medicine (2018YQYLY002). Corresponding author: ZHANG Xi, E-mail: zhangxxi@sina.com

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是目前能够治愈血液肿瘤的有效方法之一,而慢性移植物抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)是HSCT后的远期及主要并发症,发生率30%~70%[1-3]。cGVHD累及全身多器官,发病机制复杂,建立动物模型以深入探索cGVHD机制及防治对策实属必要。皮肤是cGVHD最常累及的靶器官,由于对其病理机制认识局限且缺少特异性的治疗方法,临床上很难达到理想的治疗效果。cGVHD动物模型的构建相对困难,不同的表型和构建方法不尽相同。近年来虽然有cGVHD小鼠模型的改良[4-5],但针对皮肤cGVHD缺少合适可用的动物模型。为解决这一问题,对皮肤cGVHD小鼠模型的构建进行了大量尝试。但是在目前构建的模型中,急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)发病阶段及其他靶器官病变会对皮肤cGVHD的研究结果产生较大干扰[6-7]。另一方面,尽管对皮肤aGVHD已有相关研究[8-9],但还没有针对性的动物模型。本研究旨在构建皮肤优势型cGVHD小鼠模型,并有效避免aGVHD发病阶段及其他靶器官病变的显著影响,为cGVHD皮肤病变的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠,雄性,8~12周龄,购于斯贝福生物技术有限公司;SPF级B10.D2(00463)小鼠,雄性,8~12周龄,购自美国Jackson实验室,并由北京维通利华实验动物技术有限公司繁殖。小鼠饲养于陆军军医大学实验动物中心SPF级动物培养室,动物实验获得陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC2020544)。

1.2 实验材料

胎牛血清(FBS,16140071)购自Gibco公司,1×PBS缓冲液(P1020)购自Solarbio公司,PMA(P1585)、离子霉素(I0634)购自Sigma公司,GolgiStop™(554724)购自BD公司,红细胞裂解液(R1010)购自Solarbio公司,RPMI1640培养基(c11875500BT)购自Gibco公司,抗鼠CD4-FITC(克隆:RM4-5;553046)购自BD公司,抗鼠CD8-PE-Texas Red(克隆:5H10;MCD0817)、抗鼠TCR-APC(克隆:H57-597;17-5961-82)、抗鼠IL-4-PE(克隆:11B11;12-7041-82)、抗鼠IL-17A-BV421(克隆:TC11-18H10;563354)、抗鼠IL-13-PerCP-eFluor 710(克隆:eBio13A;46-7133-82)均购自Invitrogen公司,抗鼠IFN-γ-APC/Cyanine7(克隆:XMG1.2;TC11-18H10)购自Biolegend公司,LIVE/DEAD™可固定浅绿色死细胞染色剂(L34966)购自Invitrogen公司,BD Cytofix/Cytoperm™(554714)购自BD公司。

1.3 细胞因子流式抗体染色

提取各靶器官淋巴细胞,用10% FBS的RPMI1640培养基(含有PMA 1 μg/mL以及离子霉素2 μg/mL)在37 ℃、5% CO_2的条件下培养1 h后,加入GolgiStop™(1 μL/mL)继续培养3 h。然后按照常规要求进行细胞因子染色。数据使用Flowjo 10进行分析。

1.4 临床评分标准和病理评分标准

皮肤临床评分参照GUO等[10]的方法,并根据实际情况调整如下:健康状态评0分,脱毛≤1 cm^2评1分,>1~3 cm^2评2分,>3~5 cm^2评3分,>5 cm^2~50%体表面积评4分,>50%~80%体表面积评5分,>80%体表面积评6分。皮肤除脱毛外有皮损或瘢痕评0.4分,耳朵或尾巴出现皮损或瘢痕各评0.3分。病理评分参照KAPLAN等[11]的方法。体质量评分标准为:>90%原始体质量评0分,原始体质量75%~90%评1分,<75%原始体质量评2分。弓背评分标准为:正常小鼠评0分,出现弓背但不影响活动评1分,出现弓背且影响正常活动评2分。腹泻评分标准:未出现腹泻评0分,第1次观察到腹泻评1分,连续2次及以上观察到腹泻评2分。

1.5 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,根据数据类型使用t检验、秩和检验以及方差分析。生存分析采用Kaplan-Meier曲线。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 皮肤优势型cGVHD小鼠模型的构建

以B10.D2为供鼠,BALB/c为受鼠构建小鼠皮肤优势型cGVHD模型(图1)。两小鼠品系之间主要组

织相容性复合体(MHC)相同,而次要组织相容性抗原(miHAs)不同,因此模型起病缓慢并且同临床造血干细胞移植配型有相似性。小鼠熟悉饲养环境 1 周后,移植前 1 d(-1 d)开始予抗生素饲料喂食直至实验结束,避免小鼠感染造成实验失败。模型构建当天采用致死性剂量辐照清除 BALB/c 小鼠造血系统,为骨髓移植提供条件。对辐照剂量和移植的细胞量进行初步的摸索:^{60}Co 辐照源 8.0 Gy 剂量辐照后,未移植组小鼠全部死亡,单纯骨髓移植组小鼠未恢复正常,提示辐照剂量过大。采用 7.5 Gy 辐照剂量,未移植组小鼠同样全部死亡,单纯骨髓移植组小鼠逐渐恢复正常,提示 7.5 Gy 为建模的合适剂量。移植当天(0 d)将 BALB/c 小鼠经 7.5 Gy 全身照射,8 h 后移植组小鼠接受 10×10^6/只骨髓(bone marrow)细胞(BM 组),或 10×10^6/只骨髓细胞和脾脏细胞(cGVHD 组)经尾静脉回输。关于脾脏细胞剂量的探索:cGVHD 组联合移植 18×10^6/只脾脏细胞后,较 BM 组 cGVHD 病变明显,而 12×10^6/只脾脏细胞移植后的小鼠发病程度较轻,因此,18×10^6/只脾脏细胞为诱导 cGVHD 小鼠模型的合适剂量。

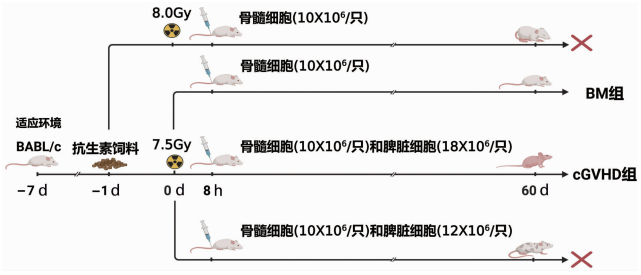
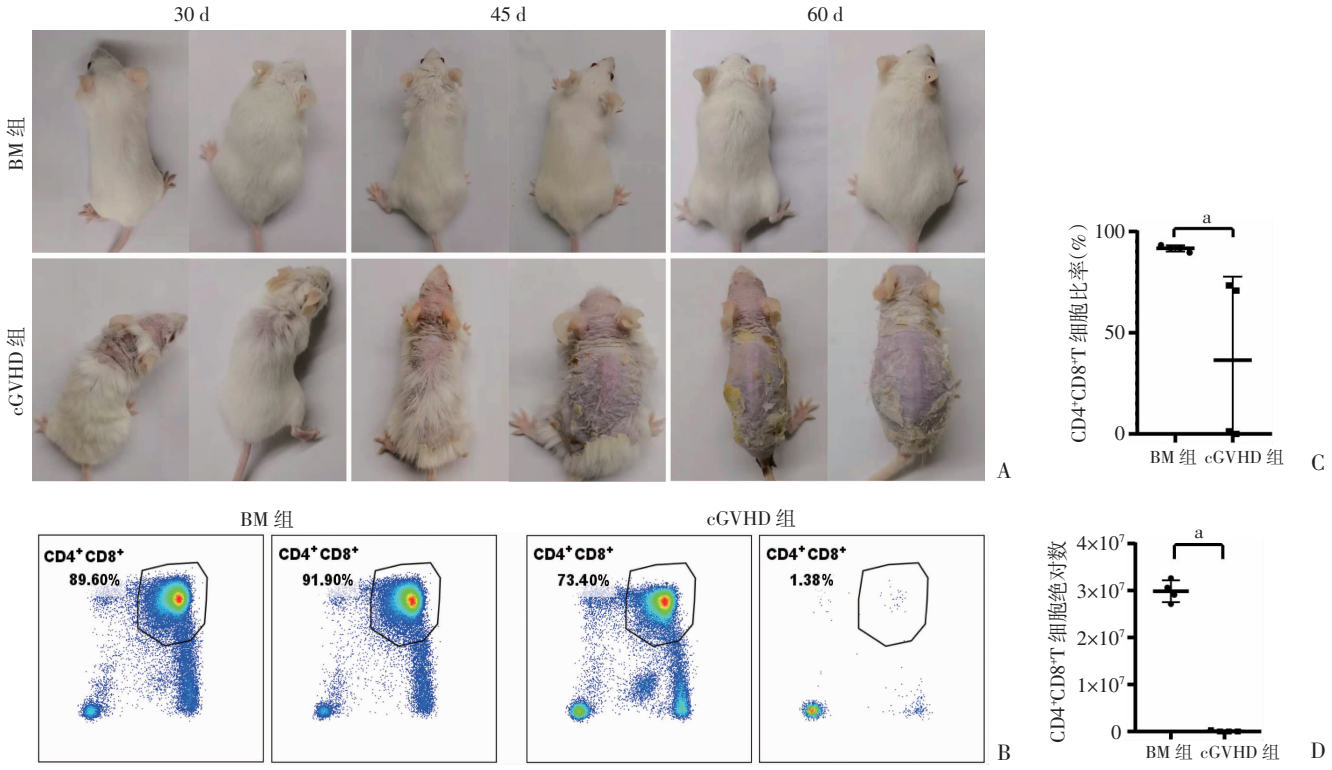


图 1　皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型构建方案

2.2　皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型发病评估

观察至移植后第 60 天,BM 组小鼠逐渐恢复至正常状态,cGVHD 组小鼠在移植后主要出现皮肤掉毛、皮屑、瘢痕、挛缩等表现,并且随时间逐渐加重(图 2A)。移植后 45 d 取胸腺的细胞,流式分析 $CD4^+CD8^+$ 双阳性细胞比率(图 2B)。相对于 BM 组,cGVHD 组小鼠胸腺中 $CD4^+CD8^+$T 细胞比率下降($P<0.05$,图 2C),尽管部分小鼠能够保留一定的 $CD4^+CD8^+$T 细胞,但是绝对数明显下降($P<0.05$,图 2D)。说明 cGVHD 组小鼠随着病情的发展,胸腺出现结构受损和功能丧失,出现 cGVHD 的发病特征。

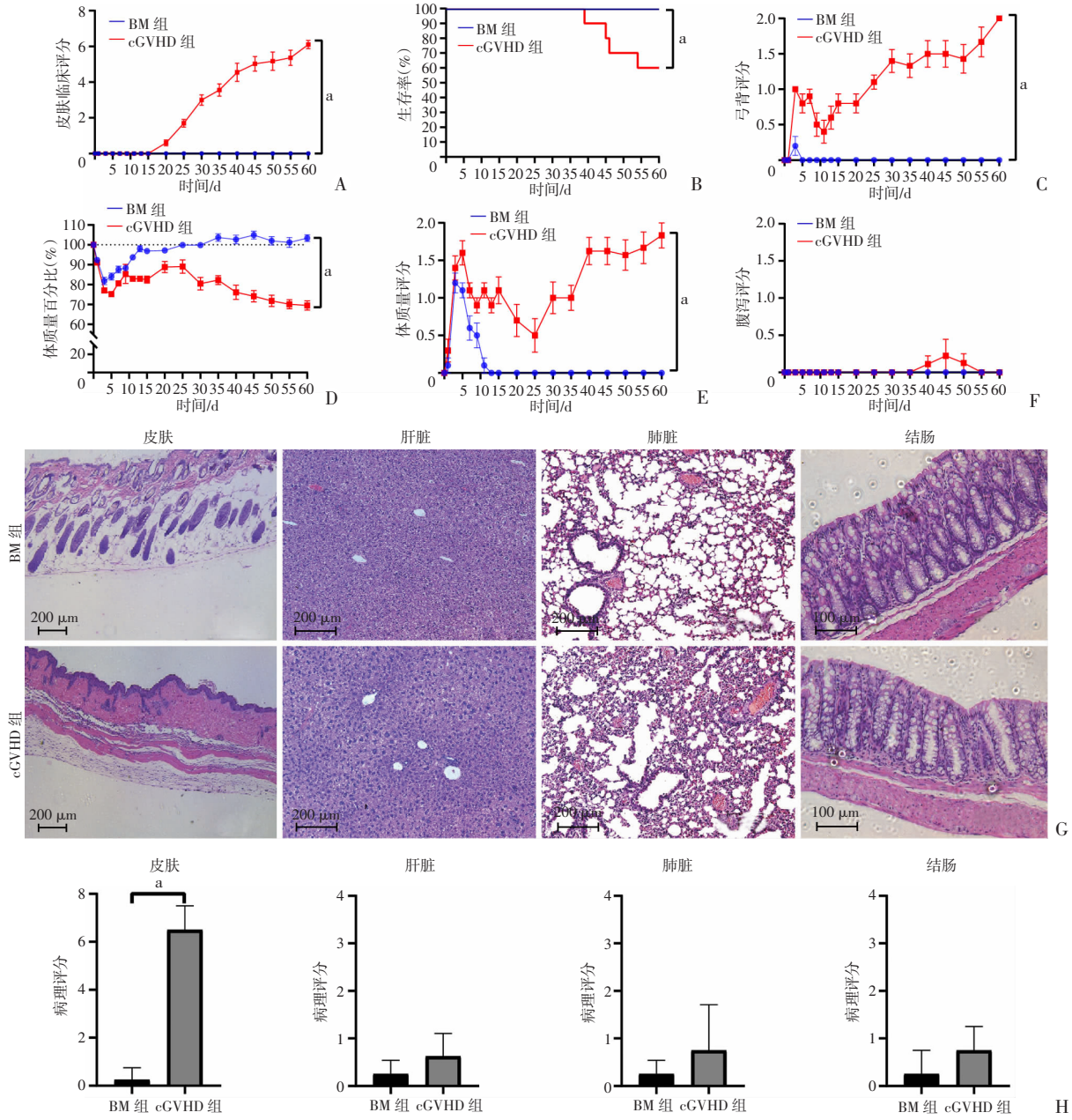


A:不同时间点移植后小鼠大体观;B:流式细胞术检测移植后 45 d 胸腺 $CD4^+CD8^+$T 细胞表达;C:移植后 45 d 胸腺 $CD4^+CD8^+$T 细胞比率统计分析;D:移植后 45 d 胸腺 $CD4^+CD8^+$T 细胞绝对数统计分析　a:$P<0.05$

图 2　皮肤优势型 cGVHD 模型发病评估

2.3　皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型基本特征

cGVHD 模型主要表现为皮肤病变。根据标准对皮肤进行临床评分,发现 cGVHD 组小鼠主要在移植后 20 d 左右开始出现皮肤病变。随病情发展,脱毛面积逐步加大并伴有皮肤硬化皱缩、脱屑,严重可伴有瘢痕生成,BM 组小鼠则完全正常(图 3A)。同时 cGVHD 组小鼠生存率下降,BM 组小鼠全部保持存活状态(图 3B)。对小鼠进行症状评分,cGVHD 组小鼠评分明显升高,系由皮肤严重皱缩引起,与皮肤病变保持一致(图 3C)。cGVHD 组小鼠体质量逐渐降低并伴有评分增高($P<0.05$);BM 组小鼠体质量在移植后初期下降,但随着时间推移体质量逐渐增加直至恢复正常水平(图 3D、E)。cGVHD 组小鼠没有表现出明显的腹泻、血便等肠道 cGVHD 表现(图 3F),表示肠道病变不明显。在病理评分方面,cGVHD 组的皮肤病变严重,与 BM 组有显著差异($P<0.05$);肝脏、肺脏和结肠病理评分在两组之间无明显差异,与临床症状表现一致(图 3G、H)。通过对该模型基本临床表现进行分析发现构建的小鼠模型皮肤为主要受累器官,而肝脏、肺脏和肠道受累较轻。



a:$P<0.05$

A:皮肤临床评分;B:生存率;C:弓背评分;D、E:小鼠体质量与原始体质量百分比及体质量评分;F:腹泻评分;G:HE 染色观察靶器官病理变化;H:各组不同靶器官病理评分

图 3　皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型基本特征

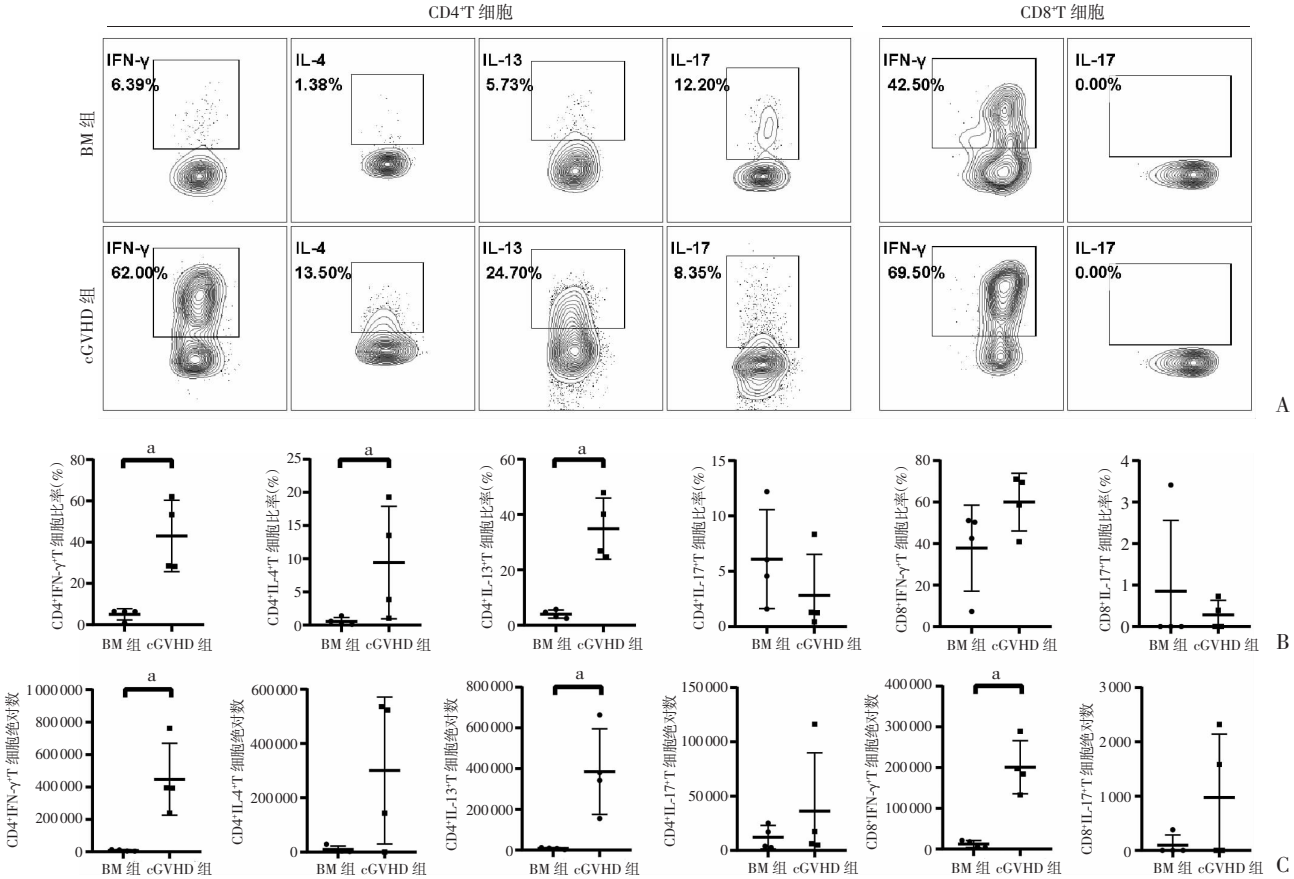
2.4　靶器官细胞亚群分析

收集小鼠靶器官的淋巴细胞,通过检测 IFN-γ、IL-4、IL-13、IL-17 分泌水平分析 Th1、Th2、Th17、Tc1 和 Tc17 细胞比率和绝对数。

2.4.1　皮肤　在 $CD4^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 和 IL-13 的细胞比率和绝对数都较 BM 组显著升高($P<0.05$),提示 Th1 细胞和 $CD4^+IL\text{-}13^+$ T 细胞在皮肤 cGVHD 发病过程中发挥主要作用;分泌 IL-17 的细胞比率和绝对数差异均无统计学意义,提示 Th17 细胞与发病关系不密切;分泌 IL-4 的细胞比率有显著增高($P<0.05$),而细胞绝对数尽管有增高的趋势但差异无统计学意义。在 $CD8^+$T 细胞中:分泌 IFN-γ 的细胞比率在两组之间差异无统计学意义,而细胞绝对数在 cGVHD 组中显著升高($P<0.05$),可能与其他细胞亚群的同步增殖活化有关,提示在皮肤 cGVHD 发病中有重要作用;分泌 IL-17 的细胞比率和绝对值两组差异均无统计学意义(图 4),因此 Tc17 细胞对皮肤 cGVHD 发病无显著影响。

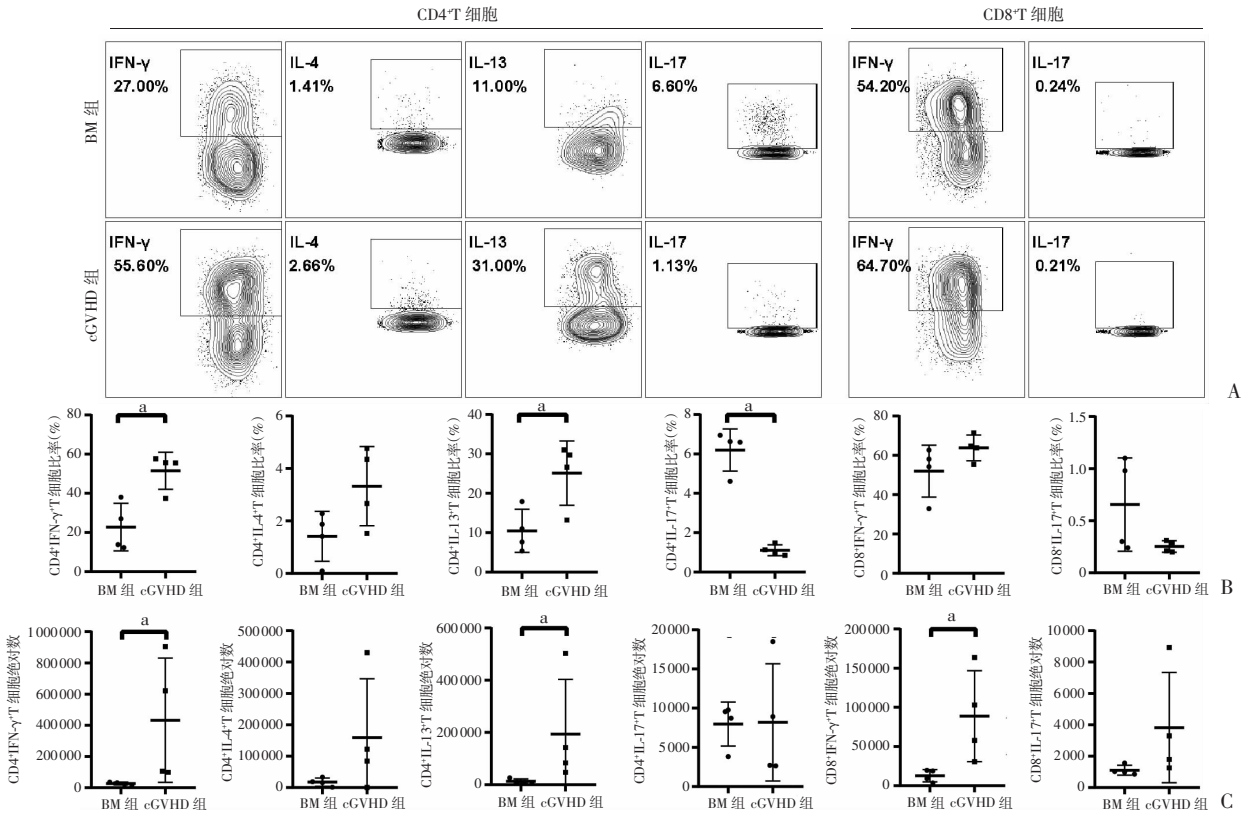
2.4.2　肝脏　在 $CD4^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 和 IL-13 的 $CD4^+$T 细胞比率和绝对数都较 BM 组明显升高($P<0.05$);两组之间分泌 IL-4 的 $CD4^+$T 细胞比率和绝对数差异均无统计学意义。在 cGVHD 组中分泌 IL-17 的 $CD4^+$T 细胞比率较 BM 组明显降低($P<0.05$),而两组绝对数差异不显著。推测在 cGVHD 组 Th17 比率的降低可能与其他细胞亚群的增殖相关,提示 Th17 在 cGVHD 的发病过程无显著增殖活化过程。在 $CD8^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 的 $CD8^+$T 细胞比率无显著变化,但绝对数明显升高($P<0.05$),可能与其他细胞亚群同步增殖活化有关;分泌 IL-17 的 $CD8^+$T 细胞在比率和绝对数上都未发现显著差异(图 5)。所以,肝脏可检测到 T 细胞浸润,并且与 Th1 细胞、$CD4^+IL\text{-}13^+$T 细胞和 Tc1 细胞关系密切。

2.4.3　肺脏　在 $CD4^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 和 IL-13 的 $CD4^+$T 细胞比率和绝对数都较 BM 组明显增高($P<0.05$);分泌 IL-4 的 $CD4^+$T 细胞比率和绝对数均无显著变化;分泌 IL-17 的 $CD4^+$T 细胞比率较 BM 组明显下降,但细胞绝对数差异无统计学意义。在 $CD8^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 的 $CD8^+$T 细胞比率与 BM 组差异无统计学意义,而绝对数高于 BM 组;分泌 IL-17 的 $CD8^+$T 细胞比率和绝对数两组差异无统计学意义(图 6)。因此,肺脏同样能够检测到 T 细胞浸润,主要由 Th1 细胞、$CD4^+IL\text{-}13^+$T 细胞和 Tc1 细胞参与,且与肝脏的 T 细胞浸润情况基本保持一致。



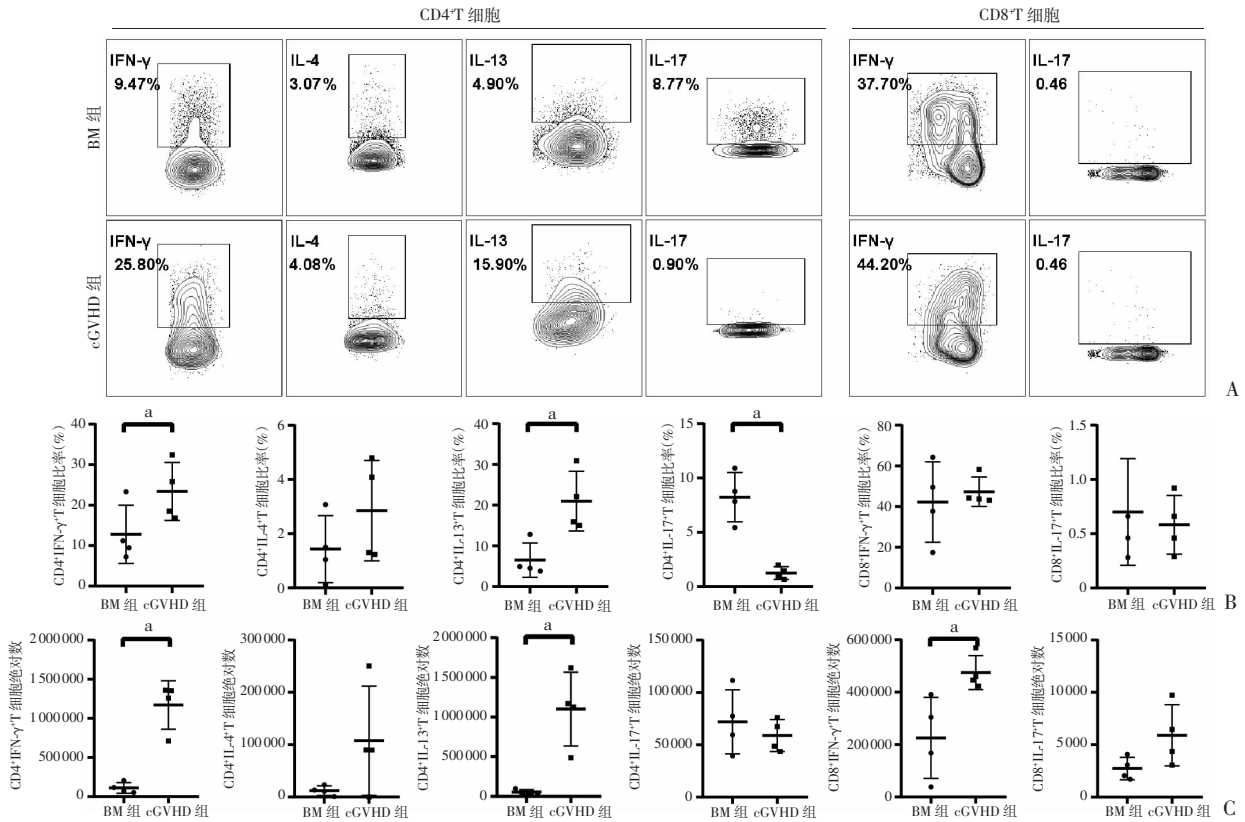
A:流式细胞术检测 T 细胞各亚群变化;B:T 细胞各亚群比率统计分析;C:T 细胞各亚群绝对数统计分析　a:$P<0.05$

图 4　皮肤 T 细胞亚群分析



A:流式细胞术检测 T 细胞各亚群变化;B:T 细胞各亚群比率统计分析;C:T 细胞各亚群绝对数统计分析　a:$P<0.05$

图 5　肝脏 T 细胞亚群分析



A:流式细胞术检测 T 细胞各亚群变化;B:T 细胞各亚群比率统计分析;C:T 细胞各亚群绝对数统计分析　a:$P<0.05$

图 6　肺脏 T 细胞亚群分析

3 讨论

GVHD 发生于 HSCT 后,发病原因复杂,根据不同的病理生理学特征,可分为 aGVHD 和 cGVHD。其中 cGVHD 临床症状复杂,累及器官广泛,现已成为影响患者移植后长期生存的主要因素之一。在基础研究中,cGVHD 小鼠模型构建困难是目前制约研究进展的主要限制性因素。本研究致力于皮肤优势型 cGVHD 小鼠模型的构建。采用致死剂量辐照的方式清除小鼠造血干细胞,通过输注骨髓细胞和脾脏细胞模拟临床造血干细胞移植过程,并且构建皮肤优势型 cGVHD 动物模型。与 BM 组小鼠相比,cGVHD 组在临床表现上以皮肤病变为主,出现脱毛、皮屑、瘢痕等表现。胸腺作为 T 细胞发生主要场所,对于移植后小鼠免疫功能重建非常重要并影响 cGVHD 的发生[12]。分析胸腺 $CD4^+CD8^+$T 细胞,cGVHD 组在比率和绝对数方面都有明显下降,提示胸腺功能缺失及 T 细胞发生障碍。随病程延长,皮肤临床评分逐渐增高,同时生存率逐渐下降,小鼠弓背评分增高也与皮肤病变加重相关。而肠道表现两组之间差异无统计学意义,肠道 cGVHD 发病不明显。通过病理观察到,cGVHD 组皮肤受累明显,而肝脏、肺脏及肠道与 BM 组差异无统计学意义。因此在本模型中以皮肤发病为主,而其他靶器官未发生明显病变。一方面,两小鼠品系之间 MHC 相同而 miHAs 不同,决定了本模型整体发病程度相对较轻;另一方面,以皮肤为主要靶器官可能与 IL-13 在 cGVHD 组表达增高相关。早期研究中已经发现,IL-13 在皮肤疾病中具有重要作用[13-14]。

在细胞层面上分析发现,皮肤和其他靶器官均有受累,符合 cGVHD 全身性发病的特点。在 $CD4^+$T 细胞中:cGVHD 组分泌 IFN-γ 和 IL-13 的 $CD4^+$T 细胞在比率和绝对数上都有明显增高,提示 Th1 和 $CD4^+IL\text{-}13^+$T 细胞在疾病发展中具有重要意义。这与 Th1 在 cGVHD 疾病中的主导角色相符合[8,15],以及同 IL-13 与 cGVHD 关系相一致[16],可能为疾病治疗提供新的靶点。尽管有研究表明 Th2 对于 GVDH 发展比较重要[17-18],但是在实验中分泌 IL-4 的 $CD4^+$T 细胞在绝对值和比率上都没有明显差异,可能与本模型的局限性有关。IL-17 通常被认为是一种促炎细胞因子[19-20],尽管既往研究都表明 Th17 对于 cGVHD 有促进作用[21],但在实验中发现 BM 组 $CD4^+$T 细胞分泌的 IL-17 高于 cGVHD 组,但细胞绝对数计数差异无明显差异,提示本模型中 Th17 活化增殖不明显,对临床研究也有一定提示意义。在 $CD8^+$T 细胞中:分泌 IFN-γ 的 $CD8^+$T 细胞绝对数量明显增高,提示 Tc1 细胞与其他细胞同步增殖活化。尽管有研究指出 Tc17 对于 cGVHD 的发展同样有一定作用[22-23],但实验结果显示 cGVHD 组分泌 IL-17 的 $CD8^+$T 细胞比率和绝对值都极低,且不存在显著性差异。

综上,本研究构建的 cGVHD 小鼠模型主要以皮肤为靶器官。从 T 细胞亚群分析来看,$CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞都参与到疾病发展中,其中 Th1 细胞、$CD4^+IL\text{-}13^+$T 细胞和 Tc1 细胞起主要作用,而 Th2、Th17 和 Tc17 在本模型的致病作用还需进一步的确认。本模型的优势在于弱化了其他靶器官的受累,可以为皮肤优势型 cGVHD 研究提供可靠的动物模型。

参考文献:

[1] KRÖGER N. Preventing graft-versus-host disease without losing graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem-cell transplantation[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(29): 3357-3360. DOI:10.1200/jco.20.01756.

[2] 中华医学会血液学分会造血干细胞应用学组, 中国抗癌协会血液病转化委员会. 慢性移植物抗宿主病(cGVHD)诊断与治疗中国专家共识(2021 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2021,42(4):265-275.
Applied Hematopoietic Stem Cell Group of Hematology Branch of Chinese Medical Association, Hematological Diseases Transformation Committee of Chinese Anti-Cancer Society. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) (2021 edition)[J]. Chin J Hematol, 2021,42(4):265-275.

[3] 陈婷, 李小平, 高强国, 等. 不同方法检测急性移植物抗宿主病患者的血清标志物[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(23): 2280-2284. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907252.
CHEN T, LI X P, GAO Q G, *et al*. Different methods for detecting serum markers in patients with acute graft versus host disease[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(23): 2280-2284. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907252.

[4] HOGENES M C H, VAN DORP S, VAN KUIK J, *et al*. Modifying graft-versus-host disease in a humanized mouse model by targeting macrophages or B-cells[J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 3538963. DOI:10.1155/2019/3538963.

[5] YE Y, RICARD L, STOCKER N, *et al*. A novel mouse model of acute graft-versus-host disease based on chemotherapy conditioning and G-CSF mobilized graft[J]. Bone Marrow Transplant, 2020, 55(3): 570-577. DOI:10.1038/s41409-019-0700-4.

[6] MÜLLER A M S, MIN D, WERNIG G, *et al*. Modeling chronic graft-versus-host disease in MHC-matched mouse

strains: genetics, graft composition, and tissue targets[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2019, 25(12): 2338-2349. DOI:10.1016/j.bbmt.2019.08.001.

[7] SCHROEDER M A, DIPERSIO J F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations[J]. Dis Model Mech, 2011, 4(3): 318-333. DOI: 10.1242/dmm.006668.

[8] BOIERI M, SHAH P, JALAPOTHU D, *et al*. Rat acute GvHD is Th1 driven and characterized by predominant donor $CD4^+$ T-cell infiltration of skin and gut[J]. Exp Hematol, 2017, 50: 33-45.e3. DOI:10.1016/j.exphem.2017.02.002.

[9] MALARD F, BOSSARD C, ARBEZ J, *et al*. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) and Th17 immune response contribution in gut acute graft-versus-host-disease (GVHD)[J]. Blood, 2011, 118(21): 2968. DOI:10.1182/blood.V118.21.2968.2968.

[10] GUO L Y, LAI P L, WANG Y L, *et al*. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells prevent skin fibrosis in the cGVHD mouse model by suppressing the activation of macrophages and B cells immune response[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 106541. DOI:10.1016/j.intimp.2020.106541.

[11] KAPLAN D H, ANDERSON B E, MCNIFF J M, *et al*. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype[J]. J Immunol, 2004, 173(9): 5467-5475. DOI:10.4049/jimmunol.173.9.5467.

[12] PAN B, WANG D, LI L, *et al*. IL-22 accelerates Thymus regeneration via Stat3/mcl-1 and decreases chronic graft-versus-host disease in mice after allotransplants[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2019, 25(10): 1911-1919. DOI:10.1016/j.bbmt.2019.06.002.

[13] FURUE K, ITO T, TSUJI G, *et al*. The IL-13-OVOL1-FLG axis in atopic dermatitis[J]. Immunology, 2019, 158(4): 281-286. DOI:10.1111/imm.13120.

[14] BODOOR K, AL-QARQAZ F, HEIS L A, *et al*. IL-33/13 axis and IL-4/31 axis play distinct roles in inflammatory process and itch in psoriasis and atopic dermatitis[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2020, 13: 419-424. DOI:10.2147/ccid.s257647.

[15] ODAK I, DEPKAT-JAKOB A, BECK M, *et al*. Donor-derived IL-17A and IL-17F deficiency triggers Th1 allo-responses and increases gut leakage during acute GVHD[J]. PLoS ONE, 2020, 15(4): e0231222. DOI: 10.1371/journal.pone.0231222.

[16] MORIN F, KAVIAN N, MARUT W, *et al*. Inhibition of EGFR tyrosine kinase by erlotinib prevents sclerodermatous graft-versus-host disease in a mouse model[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(10): 2385-2393. DOI:10.1038/jid.2015.174.

[17] YEH S P, LIAO Y M, LO W J, *et al*. Kinetics of T helper subsets and associated cytokines correlate well with the clinical activity of graft-versus-host disease[J]. PLoS ONE, 2012, 7(9): e44416. DOI: 10.1371/journal.pone.0044416.

[18] TAWARA I, NIEVES E, LIU C, *et al*. Host basophils are dispensable for induction of donor T helper 2 cell differentiation and severity of experimental graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(12): 1747-1753. DOI:10.1016/j.bbmt.2011.08.013.

[19] LEE G R. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 730. DOI: 10.3390/ijms19030730.

[20] YASUDA K, TAKEUCHI Y, HIROTA K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(3): 283-297. DOI:10.1007/s00281-019-00733-8.

[21] DELENS L, EHX G, SOMJA J, *et al*. *In vitro* Th17-polarized human $CD4^+$ T cells exacerbate xenogeneic graft-versus-host disease[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2019, 25(2): 204-215. DOI:10.1016/j.bbmt.2018.10.007.

[22] GUTIÉRREZ-HOYA A, LÓPEZ-SANTIAGO R, VELA-OJEDA J, *et al*. Role of CD8 regulatory T cells versus Tc1 and Tc17 cells in the development of human graft-versus-host disease[J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 1236219. DOI: 10.1155/2017/1236219.

[23] CHASSET F, LE BUANEC H, SICRE DE FONTBRUNE F, *et al*. Evidence of Th1, Th17 and Tc17 cells in psoriasiform chronic graft-versus-host disease[J]. Exp Dermatol, 2016, 25(1): 64-65. DOI:10.1111/exd.12857.

(收稿:2021-08-10;修回:2021-09-05)

(编辑 汪勤俭)