DOI:10.16016/j.1000-5404.202108057

慢性移植物抗宿主病患者免疫细胞亚群分选的表面标志组合策略

杜雨轩[1*],王 平[2*],葛晓军[1],王筱淇[2],洪 涛[2],王蔚浩[2],何云地[2],黄瑞昊[2],邓小娟[2],刘帅妹[1],杨世杰[2],张 曦[2]

563099 贵州 遵义,遵义医科大学第二附属医院检验科[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[2]

[**摘要**] **目的** 观测慢性移植物抗宿主病(chronic graft-versus-host disease, cGVHD)患者免疫细胞亚群分布变化规律,探讨免疫细胞表面标志物分选出的特定细胞亚群在cGVHD发病过程中对疾病发展的预测作用。**方法** 收集2020年10月至2021年7月在陆军军医大学第二附属医院血液病医学中心接受造血干细胞移植后的患者58例,根据移植后是否发生cGVHD分为cGVHD组(发生cGVHD,$n=43$)和对照组(未发生cGVHD,$n=15$),采用流式细胞术分析两组患者免疫细胞亚群比率及分布情况,募集患者原发诊断包括ALL、AML、CML、MDS、SAA和重型β地中海贫血。其中发生cGVHD的中位时间为178.5(47~1 328)d,每例患者于随访过程中发生cGVHD时或病程中随访当日留取外周血标本。**结果** cGVHD组患者外周血中调节性T细胞(regulatory T cells,Tregs)及过渡型B细胞的分布水平显著降低,$CD19^+$B淋巴细胞的分布水平较对照组显著增加;接受造血干细胞移植后发生cGVHD的患者组外周血中Tregs较接受造血干细胞移植后未发生cGVHD的患者组明显降低,中度cGVHD患者Th17细胞较轻度患者分布水平显著升高,$CD19^+$B淋巴细胞在轻度、中度患者中显著升高;比较不同cGVHD靶器官,仅累及皮肤病变的患者与仅累及肝脏的患者Tregs较对照组中显著降低,而合并皮肤及肝脏损伤患者的外周血中滤泡辅助T细胞的分布显著高于仅累及黏膜或眼睛等器官的患者。**结论** 移植后免疫细胞亚群检测是临床辅助cGVHD诊疗随访的重要参考指标。使用免疫细胞表面标志组合的特异性策略分选出的调节性T细胞、过渡型B细胞对cGVHD患者的发病及严重程度、靶器官损伤都有特异性的指示作用。

[**关键词**] 异基因造血干细胞移植;慢性移植物抗宿主病;免疫细胞亚群;调节性T细胞;过渡型B细胞;辅助滤泡T细胞

[**中图法分类号**] R392.8; R617; R733.7 [**文献标志码**] A

A combined strategy of surface markers for sorting immune cell subsets in patients with chronic graft-versus-host disease

DU Yuxuan[1], WANG Ping[2], GE Xiaojun[1], WANG Xiaoqi[2], HONG Tao[2], WANG Weihao[2], HE Yundi[2], HUANG Ruihao[2], DENG Xiaojuan[2], LIU Shuaimei[1], YANG Shijie[2], ZHANG Xi[2] [1]Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563099; [2]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, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the distribution of immune cell subsets in patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD) and investigate the predictive values of specific cell subsets sorted by

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81873424);重庆市科技创新领军人才(CSTCCXLJRC201718);重庆市科卫联合医学科研项目(2021MSXM140)

* 同等贡献者

[**通信作者**] 葛晓军,E-mail:gxj_199421@163.com

杨世杰,E-mail:xyzysj102@163.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/)

surface markers in the development of cGVHD. **Methods** From October 2020 to July 2021, 58 patients who received hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from the Hematology Medical Center of the Second Affiliated Hospital of the Army Medical University were collected in this study. Flow cytometry was used to detect the ratio of immune cell subpopulations in the cGVHD patients (cGVHD group, $n=43$) and those without (control group, $n=15$) who received allogeneic HSCT during the same period. Primary diagnoses of the recruited patients included acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), myelodysplastic syndromes (MDS), severe aplastic anemia (SAA), and β-thalassemia major. The median time to occurrence of cGVHD was 178.5 (47~1 328) d. Peripheral blood (PB) samples were collected for each patient when cGVHD occurred during follow-up or on the day of follow-up during the course of the disease. **Results** The percentages of PB regulatory T cells (Tregs) and transitional B cells were significantly reduced in the cGVHD group ($P<0.05$), and that of $CD19^+$ B lymphocytes was higher than the control group. The percentage of Tregs differed from the cGVHD patients with different severities ($P<0.05$). The percentage of Th17-like cells in the patients with moderate cGVHD was significantly higher than patients with mild cGVHD. $CD19^+$ B lymphocytes showed higher percentage in the patients with mild and moderate cGVHD. In the comparison among different targeted organs of cGVHD, only the Tregs percentage was significantly lower in the patients with skin and liver damage than control group, while the percentage of follicular helper T cells in the patients with skin and liver damage was significantly higher than those only having mucous membrane or eye organ involvement. **Conclusion** Distribution of immune cell subsets after HSCT is an important reference marker for the diagnosis, treatment and prognosis of cGVHD. Treg cells and transitional B cells which are sorted with a special combined strategy of surface markers play specific guiding roles in the pathogenesis, severity and damage of targeted organs of cGVHD.

[**Key words**] allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; chronic graft-versus-host disease; immune cell subsets; regulatory T cells; transitional B cells; helper follicular T cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873424), the Leading Talent Project of Science and Technology Innovation of Chongqing (CSTCCXLJRC201718) and the Joint Project of Medical Scientific Research of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2021MSXM140). DU Yuxuan and WANG Ping contributed equally to the article. Corresponding authors: GE Xiaojun, E-mail: gxj_199421@163.com; YANG Shijie, E-mail: xyzysj102@163.com

异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)是现阶段治疗恶性血液系统疾病的重要手段,但移植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD)作为造血干细胞移植术后主要的并发症,其极大地降低了 allo-HSCT 患者的生存质量并影响患者长期生存[1]。按发病时间不同 GVHD 可分为急性移植物抗宿主病(acute GVHD,aGVHD)和慢性移植物抗宿主病(chronic GVHD,cGVHD),其中 cGVHD 通常指移植 100 d 后发生的远期并发症,但目前临床发现很少一部分患者在移植后早期(100 d 内)发生的 cGVHD 临床表现与 aGVHD 的临床表现同时存在,这种类型称为重叠综合征。慢性移植物抗宿主病是一种具有类似于自身免疫和其他免疫障碍临床表现的综合征,发生率 30%~70%,是严重影响 allo-HSCT 患者生存质量和长期生存的关键因素之一。

根据 cGVHD 的病理生理特征可分为 3 个阶段:组织损伤引起炎症(第 1 阶段),胸腺损伤及细胞体液免疫失调(第 2 阶段),组织纤维化(第 3 阶段)。研究证实 cGVHD 的发生与 Th1、Th2 及调节性 T 细胞等细胞亚群介导的促炎与抗炎调控机制有关[2],对免疫细胞发育过程的监测可能是诊疗和随访的一种重要手段。因此本研究收集 cGVHD 患者的外周血样本,通过对其外周血样本的检测明确特定患者免疫细胞分布的特异性。从免疫失调的角度分析,利用免疫细胞发育时分布水平的特异性变化的这一现象或将有利于辅助传统诊断方法,为 cGVHD 的发生阶段的预防、精准干预、预后提供新的参考。本研究通过对入组患者随诊时留取的外周血标本进行流式细胞术检测,明确产生 cGVHD 患者的免疫细胞是否存在分布差异性,进一步解释不同免疫细胞亚群在疾病发展中发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2020 年 10 月至 2021 年 7 月陆军军医大学

第二附属医院血液病医学中心接受造血干细胞移植后的患者资料,募集的患者接受造血干细胞移植的时间在2017年11月至2021年5月期间,其中发生cGVHD的中位时间为178.5(47~1 328)d,每例患者于随访过程中发生cGVHD时或病程中随访当日留取外周血标本。本研究经陆军军医大学第二附属医院伦理委员会审批批准(2017YFA02)。募集的58例患者中有43例发生cGVHD,纳入cGVHD组;15例未发生cGVHD的患者作为对照组。

cGVHD组纳入标准:按标准诊断为cGVHD的患者,无活动或进展;排除标准:出现疾病进展或复发,出现活动性感染者。对照组纳入标准:移植后100 d内基础疾病稳定,无活动性感染,没有出现临床或活检证实的cGVHD表现者。具体诊断标准参照2014年NIH提出的专家共识[3]。

1.2 方法

患者留取外周血标本,采用流式细胞仪(Navios流式细胞仪,贝克曼公司,美国)进行免疫亚群检测。以$CD45^+/SSC^+$设门,获50×10^4个细胞,获取目标群体为淋巴细胞。各个细胞亚群表面标志见表1。标记亚群的流式检测抗体均购于美国贝克曼公司,根据不同的配色方案,按照说明书进行细胞表面分子及胞内染色,抗体包括:CD45RA-FITC、CD3-ECD、CD45RO-PC-5.5、CD62L-PerCP-Cy7、CD4-AR700、CD45-A750,CD19-BV510、CD127-FITC、CD196-PE、CD4-PC-5.5、CD25PerCP-Cy7、CD183-APC、IgM-FITC、IgD-PE、CD19-ECD、CD24-PC-5.5、CD38-APC、CD27-BV510,流式FCS文件由Kaluza Analysis 2.1进行分析。

表1 目标细胞亚群表面标志分选策略

细胞亚群名称	表面标志
T淋巴细胞	$CD45^{bri+}SSC^{low/+}CD3^+CD19^-$
辅助T淋巴细胞	$CD45^+CD3^+CD4^+CD8^-$
$CD4^+$效应T细胞	$CD3^+CD4^+CD45RA^+CD45RO^-CD62L^-$
Th1样细胞	$CD45^+CD3^+CD4^+CD183^+CD196^-$
Th2样细胞	$CD45^+CD3^+CD4^+CD183^-CD196^-$
Th17样细胞	$CD45^+CD3^+CD4^+CD183^-CD196^+$
$CD4^+$调节性T细胞	$CD45^+CD3^+CD4^+CD127^{low/-}CD25^+$
B淋巴细胞	$CD45^+CD19^+$
初始B淋巴细胞Naive B	$CD19^+CD27^+IgD^+CD38^+CD24^-$
过渡型B淋巴细胞(Transitional B)	$CD19^+CD27^-CD38^{+/-}CD24^+$

1.3 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布的计量资料以$M(P_{25},P_{75})$表示,多组间两两比较采用Kruskal-Wallis单因素方差分析;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用χ^2检验。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 临床资料

共纳入患者58例,其中cGVHD组43例,男性31例,中位年龄29.0(2~54)岁,轻度15例,中度19例,重度9例;对照组15例,男性8例,中位年龄23.9(4~50)岁。两组患者的基线情况差异无统计学意义(表2)。

表2 两组患者临床资料[例(%)]

临床特征	cGVHD组($n=43$)	对照组($n=15$)	P值
疾病类型			0.156
ALL	14(24.14)	3(5.17)	
AML	19(32.76)	7(12.07)	
CML	2(3.45)	1(1.72)	
MDS	6(10.34)	0(0.00)	
SAA	1(1.72)	2(3.45)	
重型β型地中海贫血	1(1.72)	2(3.45)	
供受者类型			0.794
有血缘关系	13(30.2)	4(26.70)	
其他	30(69.7)	11(37.30)	
是否使用ATG体外去T细胞			0.445
使用ATG	30(51.70)	12(20.70)	
未使用ATG	13(22.40)	3(5.20)	
预防性治疗方案			0.305
CSA+MMF+MTX	26(45.60)	7(12.30)	
FK506+MMF+MTX	16(28.10)	8(14.00)	
发生cGVHD的严重程度			/
轻度	15(44.10)	0(0.00)	
中度	19(59.10)	0(0.00)	
重度	9(26.50)	0(0.00)	
靶器官损伤[a]			/
肝脏损伤	14(32.56)	0(0.00)	
皮肤损伤	22(51.16)	0(0.00)	
肝脏合并皮肤损伤	3(6.98)	0(0.00)	
其他(黏膜、眼睛)	4(9.30)		

AML:急性髓系白血病;CML:慢性髓系白血病;ALL:急性淋巴细胞白血病;MDS:骨髓增生异常综合征;AA:再生障碍性贫血;SAA:重型再生障碍性贫血;ATG:抗胸腺细胞球蛋白;CSA:环孢素;MMF:吗替麦考酚脂;MTX:甲氨蝶呤;FK506:他克莫司;a:靶器官损伤中,肝脏损伤患者排除包括皮肤排异表现的患者,皮肤损伤患者排除包括肝脏排异表现的患者,其他患者同时排除包括皮肤及肝脏表现的患者

2.2 cGVHD 组与对照组中免疫细胞亚群的分布情况

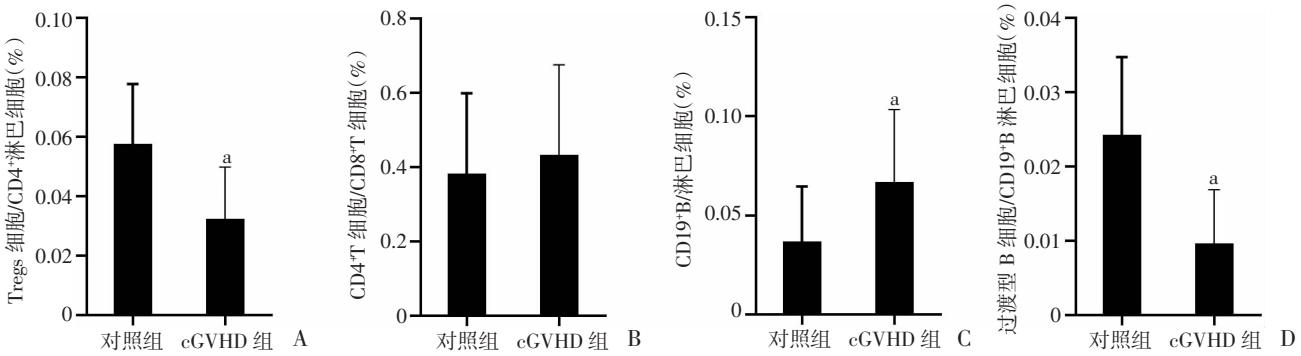
检测结果显示,与对照组(阴性患者)相比,cGVHD 组患者外周血中调节性 T 细胞(regulatory T cells,Tregs)和过渡型 B 淋巴细胞(transitional B)亚群的比例明显降低;$CD19^+$ B 细胞亚群的比例较对照组明显升高($P<0.01$,图 1A、C、D);$CD4^+/CD8^+$的细胞亚群比例差异无统计学意义($P>0.05$,图 1B)。

2.3 不同程度的 cGVHD 组患者免疫细胞亚群的检测情况

不同程度的 cGVHD 患者中,调节性 T 细胞比例相比对照组有显著性降低($P<0.05$,图 2A),中度 cGVHD 患者 Th17 样细胞亚群高于轻度及重度患者($P<0.05$,图 2B),但与对照组患者外周血中的亚群分布无显著差异;轻度和中度 cGVHD 患者 $CD19^+$ B 淋巴细胞较对照组差异有统计学意义($P<0.05$,图 2C),重度患者比明显升高,但差异无统计学意义。对照组患者过渡型 B 淋巴细胞占比水平显著高于 cGVHD 组患者,其中轻度和中度患者差异有统计学意义($P<0.05$,图 2D)。

2.4 不同靶器官损伤的 cGVHD 组患者免疫细胞亚群检测情况

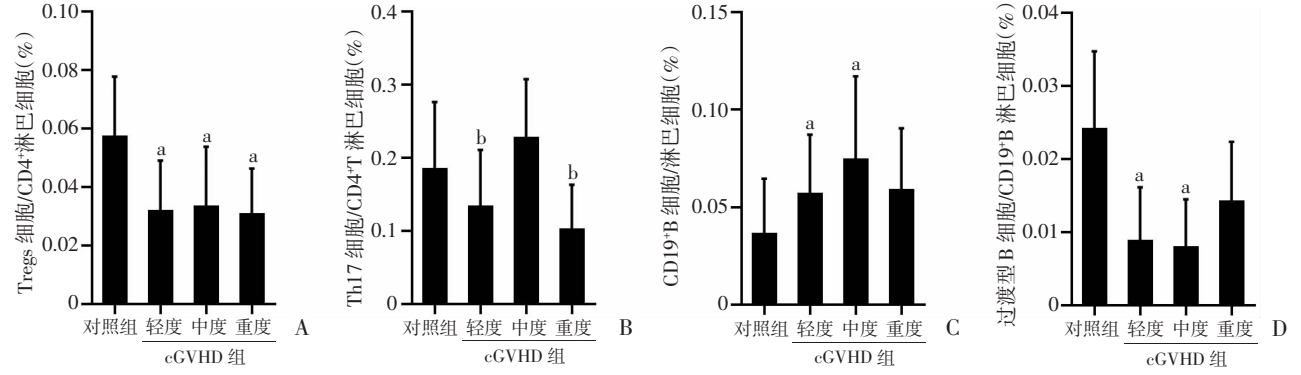
统计 cGVHD 组患者常累及的靶器官结果显示,仅皮肤排异 14 例,仅肝脏损伤 22 例,同时表现出皮肤及肝脏排异的患者 3 例,排异表现包括眼睛、黏膜及消化道但不包括皮肤及肝脏的患者 4 例。分析后发现,仅表现肝脏排异或皮肤排异表现的患者 Tregs 及过渡型 B 淋巴细胞亚群无显著差异,对照组中 Tregs 及过渡型 B 淋巴细胞显著高于 cGVHD 组($P<0.05$,图 3A、C)。皮肤合并肝脏排异的 cGVHD 患者辅助滤泡 T 细胞水平显著高于 cGVHD 累及其他靶器官的患者($P<0.05$,图 3B);过渡型 B 淋巴细胞亚群水平则显著低于对照组患者($P<0.05$,图 3C)。



a:$P<0.01$,与对照组比较

A:调节性 T 淋巴细胞;B:$CD4^+/CD8^+$比值;C:$CD19^+$B 淋巴细胞;D:过渡型 B 淋巴细胞

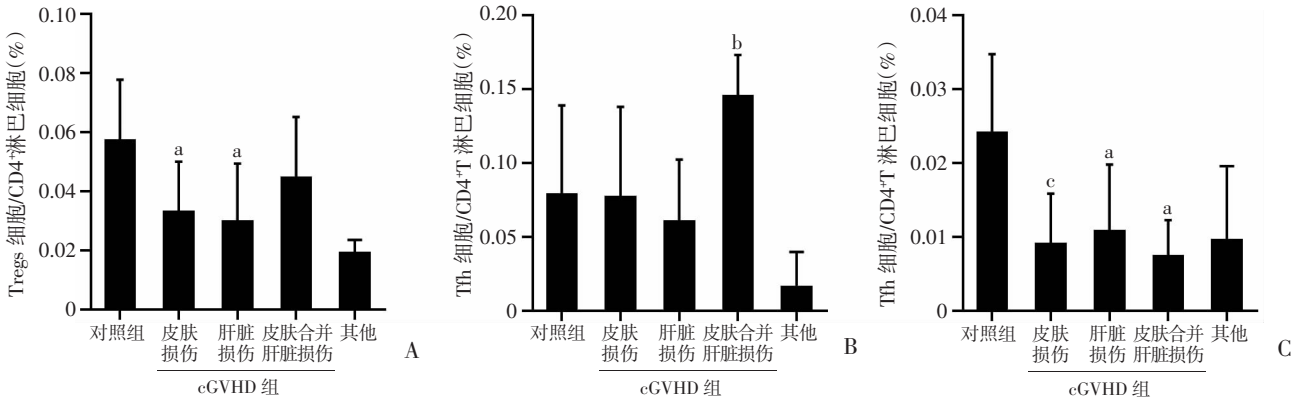
图 1 cGVHD 组与对照组外周血中细胞亚群的分布差异



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与中度比较

A:调节性 T 细胞;B:Th17 样细胞;C:$CD19^+$B 淋巴细胞;D:过渡型 B 淋巴细胞

图 2 不同严重程度的 cGVHD 组患者与对照组患者的免疫细胞亚群的分布



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与其他比较

A:调节性 T 细胞;B:滤泡辅助 T 细胞;C:过渡型 B 细胞

图 3 不同靶器官损伤的 cGVHD 组患者与对照组患者的免疫细胞亚群的分布

3 讨论

GVHD 显著影响 allo-HSCT 的成功率,同时也是非复发性死亡的常见原因[4]。急性 GVHD 发病的病理生理学机制与慢性 GVHD 有明显区别,前者有典型炎性表现包括 T 细胞浸润与破坏;而后者主要是纤维增生,为典型的自身免疫性疾病的表现,包括皮肤硬化、肝脏损伤和纤维闭塞性支气管炎等。免疫细胞亚群的变化和失衡贯穿整个 GVHD 的发病过程,研究表明在造血干细胞移植过程中使用初始 T 细胞(Naïve T 细胞)耗尽的移植物会使 cGVHD 发生率更低。同时所接受的移植物当中记忆 T 细胞(Memory T 细胞)的作用更多地体现在有助于患者移植后的免疫重建[5]。cGVHD 的发生机制已在小鼠模型上证实由供体反应性 T 细胞诱导产生[6],而在小鼠模型上通过干预 Th2 细胞极化将使 cGVHD 表现加重。在自身免疫性疾病中发现系统性硬化症中纤维化的表现与硬皮病 cGVHD 非常相似,均由浸润皮肤的 Th17 细胞介导[4]。通过对免疫细胞表面特异标志物分选后得到的免疫细胞亚群,可以体现出特定免疫细胞亚群在免疫细胞发育过程中的变化。以上提及的细胞亚群在 cGVHD 发生、发展过程中参与的环节,与本研究中观察的免疫细胞亚群结果相互印证,提示免疫细胞亚群可作为疾病的生物标志物参与疾病诊断及病情发展判断。

本研究通过分析对照组和 cGVHD 组患者外周血免疫细胞亚群,结果显示 cGVHD 组 Tregs 细胞水平显著降低。Tregs 作为免疫抑制的关键亚群能够抑制效应 T 细胞活化,因胸腺受损及 T 终末分化效应记忆细胞(T_{EMRA})的发育分化致使 Tregs 数量的减少[7]。这一现象或提示移植后的患者因胸腺损伤出现 GVHD 的可能性[8]。$CD19^+$B 淋巴细胞作为参与特异性免疫反应的主体亚群细胞,在 cGVHD 组中的占比明显升高。细胞过渡型 B 细胞表达 $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ 等表面标记,被定义为众多“调节性 B 细胞(regulatory B cells,Bregs)”的一类。其同样可以通过保留 Tregs 细胞以及限制辅助性 Th1 细胞和辅助性 Th17 细胞的分化来发挥免疫抑制作用[8],在 cGVHD 组患者外周血的分布降低可能影响其作为抑制供体反应性 T 细胞而发挥作用[9]。本研究入组的病例数不多,后续研究将进一步扩大样本量,探讨上述细胞亚群作为预测移植后 cGVHD 发生的意义。从上述细胞亚群监测结果来看,目前针对 Tregs 细胞的监测已经作为临床上判断机体免疫抑制的常用指标,在免疫功能的检查中作为机体免疫抑制状态的评估指标。

本研究对比不同严重程度 cGVHD 组和对照组患者的免疫细胞亚群分布。Th17 细胞亚群是介导 cGVHD 炎症反应的重要环节,并且分泌的细胞因子 IL-17 已被验证可反映疾病的严重程度且呈正相关[10-11]。重度 cGVHD 组中 Th17 样细胞水平降低现象可能与长期服用免疫抑制剂相关。过渡型 B 淋巴细胞亚群在对照组和 cGVHD 组中也体现出显著差异。既往研究表明 cGVHD 患者的 Bregs 被 CD40 激活后生成的 IL-10 影响[12],而过渡型 B 淋巴细胞中部分有功能的 Bregs 会受到其影响出现过渡型 B 淋巴细胞亚群数量降低。同时在 cGVHD 患者常表现为淋巴细胞减少,可解释轻中度患者过渡型 B 淋巴细胞降低表现。而针对重度患者该亚群表现为分布水平高于轻中度患者,可继续扩大样本量并结合血常规表现进一步分析。

滤泡辅助 T 细胞(Tfh 细胞)作为参与 cGVHD 发生的关键亚群,因其可激活供体来源的 B 细胞分化为成熟的 B 细胞,进一步分泌相关细胞因子 IL-21 等或趋化因子 CXCR5 等参与 cGVHD,如闭塞性细支气管综合征(bronchiolitis obliterans syndrome,BOS)的发生则依赖于生发中心 B 细胞的发育而导致病变组织中

的抗原沉积[13-14]。这与本研究结果可互相印证,在涉及较多靶器官损伤且较为复杂的 cGVHD 中,如同时发生肝脏及皮肤排异患者外周血中 Tfh 细胞的分布水平要显著高于仅累计黏膜、眼睛等器官的患者。因纳入患者的原因,本研究未涉及胃肠道或肺脏排异患者。研究表明肺脏排异的患者主要的病理表现由上述机制产生损伤,结合目前严重程度评分标准,肺部病变的患者通常为中度或重度 cGVHD,可为 Tfh 作为 cGVHD 严重程度评定指标的生物标志物提供思路[15]。

cGVHD 发病机制复杂,参与的细胞亚群及其分泌相关细胞因子众多,本研究发现一些具有临床意义的特异性免疫细胞亚群并初步分析了其参与 cGVHD 发病的初步机制。考虑本研究持续时间有限,同时纳入研究的病例数较少,不同原发疾病的患者数量分布以及相关治疗个体化差异等影响导致病例异质性较大,为了保证相关实验结果的可信性,后期应扩大样本量后优化检测流程,精细筛选出与 cGVHD 相关的特异性细胞亚群,进一步为指导临床诊疗提供参考。

作者贡献声明 本文由杜雨轩、王平参与本研究的研究方案设计、样本收集、数据处理、文章撰写及修改,作者张曦、王筱淇、黄瑞昊参与本文的数据处理及修改,洪涛、王蔚浩、何云地、邓小娟、刘帅妹参与本文的修改,共同通信作者葛晓军、杨世杰参与本研究的研究方案设计及文章修改

参考文献:

[1] ZHAO L, CHEN S Q, YANG P X, *et al*. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 182. DOI: 10.1186/s13287-019-1287-9.

[2] 陈婷, 李小平, 张诚, 等. 慢性移植物抗宿主病患者血清特异性生物标志物的临床研究[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(11):948-952. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.11.012.
CHEN T, LI X P, ZHANG C, *et al*. The clinical observation of serum specific biomarkers in patients with chronic graft-versus-host disease[J]. Chin J Hematol, 2019, 40(11):948-952. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.11.012.

[3] JAGASIA M H, GREINIX H T, ARORA M, *et al*. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-Host Disease: I the 2014 diagnosis and staging working group report[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(3):389-401.e1. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001.

[4] MACDONALD K P, HILL G R, BLAZAR B R. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies[J]. Blood, 2017, 129(1): 13-21. DOI:10.1182/blood-2016-06-686618.

[5] DEKKER L, DE KONING C, LINDEMANS C, *et al*. Reconstitution of T cell subsets following allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. Cancers, 2020, 12(7): 1974. DOI:10.3390/cancers12071974.

[6] LIN A E, REYES S, AN X Y, *et al*. Experimental modeling of acute- and chronic-GVHD by xenotransplanting human donor PBMCs or cord blood $CD34^+$ cells (HSC) into NSG mice[J]. Blood, 2018, 132(Supplement 1): 5684. DOI: 10.1182/blood-2018-99-115462.

[7] SOARES M V D, AZEVEDO R I, FERREIRA I A, *et al*. TREG and tcon dynamics after allo-HSCT: cGVHD is associated to decreased NaïVe and stem cell memory subsets with a concomitant increase in terminally differentiated T cell subsets[J]. Blood, 2016, 128(22): 2229. DOI:10.1182/blood.v128.22.2229.2229.

[8] KINSELLA S, DUDAKOV J A. When the damage is done: injury and repair in thymus function[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1745. DOI:10.3389/fimmu.2020.01745.

[8] LI X P, GAO Q G, FENG Y M, *et al*. Developing role of B cells in the pathogenesis and treatment of chronic GVHD[J]. Br J Haematol, 2019, 184(3): 323-336. DOI:10.1111/bjh.15719.

[9] SARVARIA A, BASAR R, MEHTA R S, *et al*. IL-10+ regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation[J]. Blood, 2016, 128(10): 1346-1361. DOI:10.1182/blood-2016-01-695122.

[10] CHEN X, LAI P, WANG Y, *et al*. Emerging role of C5a/C5aR IL-17A axis in cGVHD[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(7): 2148-2157.

[11] FORCADE E, PAZ K, FLYNN R, *et al*. An activated Th17-prone T cell subset involved in chronic graft-versus-host disease sensitive to pharmacological inhibition[J]. JCI Insight, 2017, 2(12): e92111. DOI:10.1172/jci.insight.92111.

[12] MARAVILLAS-MONTERO J L,ACEVEDO-OCHOA E. Human B regulatory cells: the new players in autoimmune disease[J]. Rev Invest Clin, 2017, 69(5): 243-246. DOI:10.24875/ric.17002266.

[13] VERGHESE D A, CHUN N, PAZ K, *et al*. C5aR1 regulates T follicular helper differentiation and chronic graft-versus-host disease bronchiolitis obliterans[J]. JCI Insight, 2018, 3(24): e124646. DOI: 10.1172/jci.insight.124646.

[14] BEURIER P, RICARD L, ESHAGH D, *et al*. TFH cells in systemic sclerosis[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 375. DOI:10.1186/s12967-021-03049-0.

[15] SAIDU N E B, BONINI C, DICKINSON A, *et al*. New approaches for the treatment of chronic graft-versus-host disease: current status and future directions[J]. Front Immunol, 2020, 11: 578314. DOI:10.3389/fimmu.2020.578314.

(**收稿**:2021-08-10;**修回**:2021-09-20)
(编辑 汪勤俭)