

# 青蒿琥酯调控Th17/Treg平衡抑制慢性移植物抗宿主病的实验研究

陈晓梅 翁建宇 赖沛龙 王玉连 黄欣

耿素霞 郭礼妍 黄恬 曾令基 杜欣

广东省人民医院血液科、广东省医学科学院、广东省老年医学研究所,广州 500800

通信作者:杜欣,Email:miyadu@hotmail.com

**【摘要】** 目的 探讨青蒿琥酯抗慢性移植物抗宿主病(cGVHD)的作用及可能机制。方法 将B10D2小鼠的骨髓细胞和脾脏细胞混合悬液通过尾静脉输入近交系雌性BALB/c小鼠体内建立cGVHD模型,分别予青蒿琥酯(实验组)和丙酮腹腔(对照组)注射治疗。观察两组小鼠的cGVHD临床表现、生存时间和组织病理学改变;应用流式细胞术分析小鼠外周血和脾脏Th17和Treg细胞比例;免疫磁珠分选BALB/c小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞,分别予丙酮和青蒿琥酯进行干预72 h,流式细胞术分析两组Th17/Treg细胞比例。结果 ①实验组小鼠cGVHD临床症状较对照组明显减轻,生存时间延长[(55.71±6.99)d对(46.57±7.83)d,  $\chi^2 = 5.457, P = 0.020$ ]。②实验组小鼠皮肤及肺脏cGVHD病理损伤较轻。③与对照组比较,实验组小鼠外周血、脾脏Th17细胞比例均降低[(0.58±0.19)%对(1.51±0.18)% ,  $t = 7.233, P < 0.001$ ; (0.71±0.18)%对(1.48±0.38)% ,  $t = 3.653, P = 0.011$ ], Treg细胞比例增高[(8.40±0.23)%对(4.45±0.04)% ,  $t = 15.680, P < 0.001$ ; (10.48±0.48)%对(6.62±0.24)% ,  $t = 6.590, P = 0.003$ ], Th17/Treg细胞比值均下降(0.09±0.03对0.34±0.05,  $t = 7.621, P = 0.002$ ; 0.06±0.02对0.19±0.03,  $t = 6.993, P = 0.002$ )。④体外培养小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞,青蒿琥酯干预组较对照组Th17细胞比例减低[(0.82±0.37)%对(3.39±1.22)% ,  $t = 4.044, P = 0.007$ ], Treg细胞比例明显增高[(34.63±1.29)%对(14.28±1.69)% ,  $t = 19.119, P < 0.001$ ], Th17/Treg细胞比值下降(0.24±0.09对0.02±0.01,  $t = 4.780, P = 0.003$ )。结论 青蒿琥酯可通过减少Th17细胞及增加Treg细胞,恢复Th17/Treg平衡,减轻cGVHD的临床与病理学损伤,从而发挥抗cGVHD作用。

**【关键词】** 青蒿琥酯; Th17细胞; 调节性T细胞; Th17/Treg平衡; 慢性移植物抗宿主病

**基金项目:** 国家自然科学基金(81370665、81671585、81500102); 广东省科技计划(2014B020212009、2015B020227003)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.012

## Artesunate attenuate chronic graft-versus-host disease by regulating Th17/Treg balance

Chen Xiaomei, Weng Jianyu, Lai Peilong, Wang Yulian, Huang Xin, Geng Suxia, Guo Liyan, Huang Tian, Zeng Lingji, Du Xin

Department of Hematology, Guangdong General Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Geriatrics Institute, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Du Xin, Email: miyadu@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of artesunate treatment on chronic graft-versus-host disease (cGVHD). **Methods** Recipient BALB/c mice received  $8 \times 10^6$  bone marrow cells with  $8 \times 10^6$  spleen cells from B10D2 mice. Artesunate solubilized in acetone was injected intraperitoneally every day at the dose of 1 mg/kg at Day 28 after BMT. The clinical scores, survival and histopathological damage were analyzed. The frequency of Th17 and Tregs in PB and spleens from the mice were evaluated by flow cytometry. In addition, CD4<sup>+</sup> T cells from the spleens of mice were cultured in vitro, then stimulated with artesunate, the frequency of Th17 and Tregs in these splenocytes were evaluated by flow cytometry. **Results** Artesunate administration diminished clinical and histopathological damage, and improved the survival of cGVHD mice[(46.57±7.83)% vs (55.71±6.99)% ,  $\chi^2 = 5.457, P = 0.020$ ]; Artesunate contributed to Tregs development [(4.45±0.04)% vs (8.40±0.23)% ,  $t = 15.679, P < 0.001$ ; (6.62±0.24)% vs (10.48±0.48)% ,  $t = 6.587, P = 0.003$ ] while decreased Th17 cells [(1.51±0.18)% vs (0.58±0.19)% ,  $t = 7.233, P <$

0.001;  $(1.48 \pm 0.38)\%$  vs  $(0.71 \pm 0.18)\%$ ,  $t = 3.653$ ,  $P = 0.011$ ] expressions in both PB and spleens, and decreased the Th17/Treg ratio ( $0.34 \pm 0.05$  vs  $0.09 \pm 0.03$ ,  $t = 7.621$ ,  $P = 0.002$ ;  $0.19 \pm 0.03$  vs  $0.06 \pm 0.02$ ,  $t = 6.993$ ,  $P = 0.002$ ). Moreover, artesunate suppressed the Th17 cells expressions [ $(0.82 \pm 0.37)\%$  vs  $(3.39 \pm 1.22)\%$ ,  $t = 4.044$ ,  $P = 0.007$ ] and contributed to Tregs development [ $(34.63 \pm 1.29)\%$  vs  $(14.28 \pm 1.69)\%$ ,  $t = 19.119$ ,  $P < 0.001$ ], and also decreased the Th17/Treg ratio ( $0.24 \pm 0.09$  vs  $0.02 \pm 0.01$ ,  $t = 4.780$ ,  $P = 0.003$ ) *in vitro*. **Conclusions** Artesunate suppressed the Th17 cells expressions and contributed to Tregs development, which provided new sights into the development of a novel drug for cGVHD, e.g., artemisinin.

**【Key words】** Artesunate; Th17 cells; Regulatory T cells; Th17/Treg balance; Chronic graft-versus-host disease

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81370665, 81671585, 81500102); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2014B020212009, 2015B020227003)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.012

慢性移植物抗宿主病(cGVHD)是异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后非复发性死亡的主要并发症,近年来,虽然随着对cGVHD的机制研究有些进展,并涌现了一些新药或新的治疗方法,但严重cGVHD仍是allo-HSCT后的主要致残致死的原因。cGVHD主要表现为累及皮肤、肌肉骨骼、口腔、眼睛、肺脏、肝脏、心血管、神经系统等多器官病理损伤,临床表现为类似自身免疫样的综合征,以炎症和纤维化为主<sup>[1-2]</sup>。多数学者认为胸腺受损致外周T细胞选择缺陷<sup>[3]</sup>、Th17/Tc17<sup>[4]</sup>、Treg细胞缺陷<sup>[5]</sup>及B细胞紊乱<sup>[6]</sup>所致,但cGVHD确切的发病机制仍有待阐明。我们前期研究发现cGVHD患者外周血中存在Th17/Treg失衡<sup>[7]</sup>,我们通过B10D2小鼠→BALB/c小鼠建立cGVHD小鼠模型,该模型可以稳定模拟皮肤和肺部cGVHD,同样也观察到Th17/Treg失衡现象<sup>[8-9]</sup>。我们通过shRNA下调STAT3表达,可以恢复Th17/Treg平衡的紊乱,揭示STAT3是Th17/Treg分化的关键节点,是cGVHD治疗的新靶点。

近年来研究表明,青蒿素(Artesunate)及其衍生物具有免疫调节功能<sup>[10-11]</sup>,在自身免疫性疾病研究领域尤为突出。青蒿琥酯是一种青蒿素衍生物,体外被证实其具备调节JAK/STAT信号通路的作用,可以有效抑制STAT3信号通路,并展开了治疗自身免疫性相关疾病的临床研究。青蒿琥酯具有经济、高效、低毒的优势。但其在cGVHD的治疗作用及其机制迄今仍未见报道,本研究我们探究青蒿琥酯抗cGVHD的作用及可能的机制。

## 对象与方法

1. 实验动物: 供鼠为10~12周龄雌性B10D2(Hc1 H2d H2-T18c)小鼠,购自美国Jackson实验室;

受鼠为8~10周龄雌性近交系野生型BALB/c(H2d)小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。供受鼠均饲养于中山大学北校区SPF级实验动物中心。本实验所用动物均符合广东省人民医院动物伦理审查标准。

2. 仪器和试剂: 抗小鼠CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-APC及同型阴性对照、胞内因子刺激剂、CD3单抗、CD28单抗、IL-2、固定破膜剂和破膜剂缓冲液均购自美国eBioscience公司; 抗小鼠IL-17-APC-CY7购自美国Biolegend公司; 小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞分选试剂盒购自德国Miltenyi公司; 青蒿琥酯购自美国Sigma公司。

3. cGVHD模型的建立及青蒿琥酯治疗过程: BALB/c小鼠于移植前1周开始添加抗生素(红霉素250 ml/L, 庆大霉素32万U/L)的灭菌水进行肠道准备,持续至移植后2周。移植当日,受鼠接受直线加速器(瑞典医科达Precise 151337)700 cGy单次全身照射预处理,照射后尾静脉注射 $8 \times 10^6$ 供鼠脾脏细胞和 $8 \times 10^6$ 骨髓细胞混合悬液,移植后26~28 d建成cGVHD模型。将cGVHD模型小鼠随机分为对照组(移植后第28天开始给予丙酮0.2 ml每日1次腹腔注射)和实验组(移植后第28天开始青蒿琥酯 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,连续用药至研究终点),每组7只。研究终点: 濒死状态(体重低于14 g)或观察终点(移植后第62天)。

4. 标本采集: 在研究终点进行标本采集,摘眼球法取小鼠眶后静脉血0.8~1.0 ml, EDTA抗凝; 采血后断颈处死各组小鼠,取小鼠脾脏,脾脏置于200目尼龙滤网研磨制备成脾细胞悬液。

5. 靶器官病理形态学观察: 将两组小鼠皮肤、肺脏、肝脏、胃肠道和脾脏等组织样本以甲醛固定,乙醇梯度脱水后常规Hemapun865塑料包埋、切片

(厚度5 μm),瑞氏-吉姆萨染色,光学显微镜下观察。

6. 免疫磁珠分选CD4<sup>+</sup>T细胞及体外培养:取正常BALB/c小鼠脾脏单个核细胞,免疫磁珠分选缓冲液调整细胞密度为 $2 \times 10^8$ /ml,按CD4<sup>+</sup>T细胞分选试剂盒说明书分选CD4<sup>+</sup>T细胞,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液重悬至 $1 \times 10^6$ 细胞/ml,铺板培养,分为两组:对照组及实验组,加入CD3(5 μg/ml),CD28(2 μg/ml),IL-2(40 μg/ml)置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养3 d收集细胞。

7. 流式细胞术检测Th17、Treg细胞:取100 μl外周血或制备好的脾脏单个核细胞悬液或培养后的细胞,根据操作说明先进行细胞表面CD4-FITC和CD25-APC染色,破膜后进行胞内Foxp3-PE染色,洗涤后重悬细胞,上流式细胞仪检测Treg细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>)比例。另取100 μl外周血或制备好的脾脏单个核细胞悬液或培养后的细胞,加入RPMI 1640培养液400 μl及刺激剂1 μl,5 h后根据操作说明先进行细胞表面CD4-FITC染色,破膜后进行胞内IL-17 APC-CY7染色,洗涤后重悬细胞,上流式细胞仪检测Th17细胞(CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>)比例。

8. 统计学处理:采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。实验所得数据采用均数±标准差表示,方差齐性检验采用Levene,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,小鼠生存时间采用Kaplan-Meier分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 青蒿琥酯对小鼠cGVHD临床症状和生存的影响:对照组小鼠出现体重持续减轻,尾巴、爪部及双耳脱皮、结痂、溃疡和硬化等症状持续加重,并出现苔藓样变或硬皮样变,颈背部脱毛,并出现气促、弓背、运动功能障碍,而实验组小鼠体重逐渐恢复,颈背部脱毛趋于稳定,尾巴、爪部及双耳脱皮、结痂、溃疡和硬化等症状好转(图1);至观察终点(移植后62 d),对照组小鼠全部死亡,实验组小鼠存活

2只,实验组生存时间长于对照组[(55.71±6.99)d对(46.57±7.83)d, $\chi^2 = 5.457, P = 0.020$ ]。

2. 实验组和对照组cGVHD小鼠皮肤和肺脏病理改变:对照组cGVHD小鼠皮肤表皮增生、真皮层胶原沉积、周围炎症浸润、皮下脂肪变薄及毛囊减少,而实验组小鼠皮肤表皮轻度增生伴少量胶原沉积。对照组小鼠肺脏支气管/血管周围炎症浸润、肺部间质增宽,青蒿琥酯组小鼠肺脏支气管/血管周围少许炎症细胞浸润,未见肺间质增厚(图2),提示青蒿琥酯可减轻cGVHD小鼠皮肤和肺脏病理损伤。

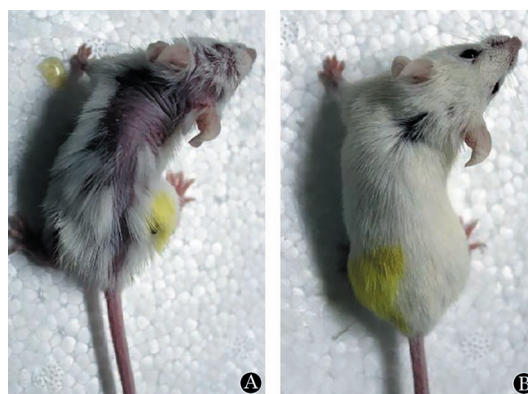
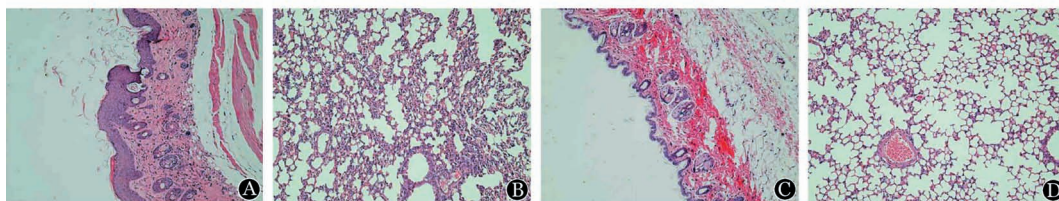


图1 对照组(A)和实验组(B)慢性GVHD小鼠临床表现

3. 流式细胞术检测实验组和对照组小鼠外周血和脾脏Th17和Treg细胞:与对照组比较,实验组小鼠外周血和脾脏Th17细胞比例均降低[(0.58±0.19)%对(1.51±0.18)% ,  $t = 7.233, P < 0.001$ ; (0.71±0.18)%对(1.48±0.38)% ,  $t = 3.653, P = 0.011$ ],Treg细胞比例增高[(8.40±0.23)%对(4.45±0.04)% ,  $t = 15.680, P < 0.001$ ; (10.48±0.48)%对(6.62±0.24)% ,  $t = 6.590, P = 0.003$ ],Th17/Treg细胞比值均下降(0.09±0.03对0.34±0.05,  $t = 7.621, P = 0.002$ ; 0.06±0.02对0.19±0.03,  $t = 6.993, P = 0.002$ ) (表1)。

4. 青蒿琥酯体外调控Th17/Treg平衡:为进一步证实青蒿琥酯对Th17/Treg平衡的调节作用,我们通过青蒿琥酯干预小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞体外培养



A:对照组皮肤;B:对照组肺;C:实验组皮肤;D:实验组肺

图2 实验组与对照组慢性GVHD小鼠皮肤、肺脏病理(HE染色,低倍)



表1 两组小鼠外周血和脾脏Th17、Treg细胞表达水平(Mean±SD)

组别	鼠数	Th17细胞(%)		Treg细胞(%)		Th17/Treg	
		外周血	脾脏	外周血	脾脏	外周血	脾脏
对照组	7	1.51±0.18	1.48±0.38	4.45±0.04	6.62±0.24	0.34±0.05	0.19±0.03
实验组	7	0.58±0.19	0.71±0.18	8.40±0.23	10.48±0.48	0.09±0.03	0.06±0.02
统计量		7.233	3.653	15.680	6.590	7.621	6.993
P值		<0.001	0.011	<0.001	0.003	0.002	0.002

注:Treg细胞:调节性T细胞

3 d,青蒿琥酯干预组Th17细胞比例低于对照组[(0.82±0.37)%对(3.39±1.22)% , $t=4.044, P=0.007$ ](图3A),Treg细胞比例高于对照组[(34.63±1.29)%对(14.28±1.69)% , $t=19.119, P<0.001$ ](图3B),Th17/Treg细胞比值低于对照组(0.02±0.01对0.24±0.09, $t=4.780, P=0.003$ )。提示青蒿琥酯调控CD4<sup>+</sup>T细胞极化,减少Th17细胞并增加Treg细胞的分化,从而调节Th17/Treg平衡。

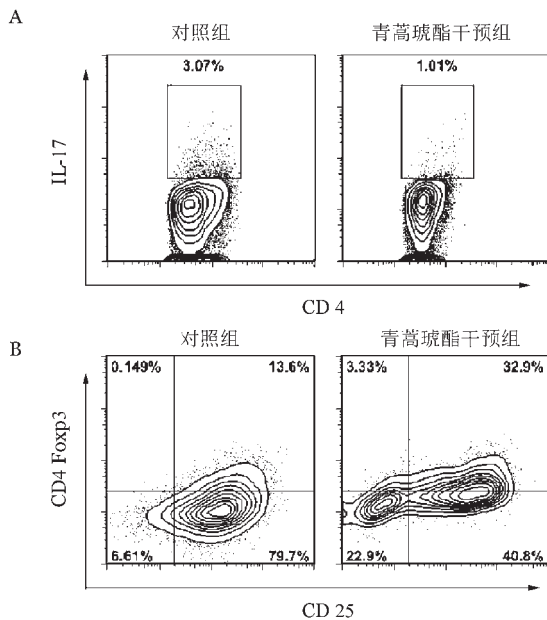


图3 青蒿琥酯抑制Th17细胞分化(A)和促进Treg细胞分化(B)

### 讨论

cGVHD是allo-HSCT后非复发性死亡的主要并发症,导致多器官、多组织慢性炎症和纤维化样病理损伤,其临床表现与系统性红斑狼疮、系统性硬化症、干燥综合征等类似,被视为一种自身免疫性疾病综合征<sup>[12-13]</sup>。尽管涌现了大量新型免疫抑制剂,但除糖皮质激素作为一线药物治疗外,其他药物疗效欠佳,难治型cGVHD的病死率仍高达50%<sup>[14]</sup>,非靶向治疗手段导致恶性肿瘤的复发、严重感染以及cGVHD病情迁延反复,严重影响患者的生存质量,且加重患者经济负担<sup>[15]</sup>。因此,探索

经济、精确的靶向治疗模式,在移植免疫研究领域具有重要的意义。

目前,有关cGVHD发病机制主要包括以下几个方面:胸腺功能的损伤<sup>[3]</sup>、Treg细胞减少或功能缺陷<sup>[5]</sup>、自身反应性效应T细胞紊乱<sup>[4]</sup>、B细胞失衡及自身免疫性抗体的产生<sup>[6,16]</sup>、巨噬细胞活化<sup>[17]</sup>等,而Th17细胞参与了cGVHD病理生理的早期炎症阶段<sup>[4,18]</sup>、慢性炎症阶段和纤维化阶段<sup>[19]</sup>全过程。Treg是专职调节效应细胞和诱导外周免疫耐受的T细胞亚群,当缺乏Treg对Th17细胞的调控作用,则可导致严重cGVHD的病理损伤<sup>[5]</sup>。我们前期研究发现cGVHD患者外周血中存在Th17/Treg失衡<sup>[7]</sup>;MSC治疗有效的cGVHD患者,Th17/Treg失衡随着病情缓解而获得纠正<sup>[20]</sup>;以往的研究中,我们也发现JAK3基因在活动期cGVHD患者中表达增高,当病情得到控制后,JAK3基因表达下降<sup>[21]</sup>。JAK/STAT信号是Th细胞极化的重要通路,STAT3是Th17/Treg极化的关键节点<sup>[22]</sup>。因此,调控JAK/STAT通路,恢复Th17/Treg平衡成为cGVHD治疗的重要靶点。

目前,JAK1/JAK2信号通路相关抑制剂主要有Ruxolitinib、Momelotinib、Baricitinib等,其可通过抑制T细胞增殖,减少细胞因子分泌,抑制APC活性,促进Treg分化达到抗GVHD作用<sup>[23]</sup>。临床上,Ruxolitinib越来越多地被应用于难治GVHD的治疗<sup>[24-25]</sup>,并获得一定的疗效,但其存在对造血系统的抑制作用、使用周期不确定性、远期疗效如何及价格昂贵等问题。探索高效、低毒、经济的新的STAT3抑制剂为临床迫切的需要。

1972年,中国科研人员首次从黄花蒿中分离提取了一种治疗疟疾有效的有效成分,将其命名为青蒿素,青蒿素衍生物是保留青蒿素分子骨架的基础上,引入或去掉一些会影响青蒿素抗疟活性的基团,大多数青蒿素衍生物具有比青蒿素更高的活性和更低的毒性,且易于制剂,水溶性增加,生物利用度高,方便应用于临床<sup>[26]</sup>。青蒿素衍生物在自身免

疫性疾病中的免疫治疗中表现出更多优势,其作用机制涉及多个JAK/STAT信号通路中免疫靶点,下调STAT3表达、抑制Th17细胞分化并促进Treg细胞生成<sup>[11,27-28]</sup>。目前,已在中国上市或由中国科研人员研发的青蒿素衍生物主要有:青蒿琥酯、双氢青蒿素(DHA)、SM934等。青蒿素衍生物主要被应用于治疗自身免疫性疾病临床研究,SM934通过抑制Th1和Th17细胞,减轻MRL/lpr狼疮小鼠的肾小球肾炎症状<sup>[28]</sup>;研究发现青蒿琥酯可通过影响体内IL-6和TGF-β的表达,调节SLE的异常免疫反应而起到治疗作用;已有临床研究证实青蒿琥酯治疗SLE可改善患者临床症状、减少激素用量、降低并发症,同时未发现明显的不良反应<sup>[29]</sup>。

本研究首次探索青蒿素衍生物——青蒿琥酯抗cGVHD作用的可能机制,研究证实,青蒿琥酯通过调控CD4<sup>+</sup>T细胞极化,抑制Th17细胞,增加Treg细胞,恢复Th17/Treg平衡,进而减轻cGVHD小鼠的临床症状、改善皮肤、肺脏的病理损伤,延长了生存了时间。综上所述,我们认为青蒿琥酯可通过调控Th细胞极化,恢复Th17/Treg平衡,从而发挥抗cGVHD的作用。

#### 参考文献

- [1] Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse [J]. *Blood*, 2002, 100(2):406-414. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V100.2.406>.
- [2] MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. 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.
- [3] Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2001, 97(5):1458-1466. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1458>.
- [4] Brüggem MC, Klein I, Greinix H, et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2014, 123(2):290-299. DOI: 10.1182/blood-2013-07-514372.
- [5] Zorn E, Kim HT, Lee SJ, et al. Reduced frequency of FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2005, 106(8):2903-2911. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1257.
- [6] Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission [J]. *Blood*, 2005, 105(7):2973-2978. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3660.
- [7] Lai P, Weng J, Lu Z, et al. Gene expression profiling-based identification of CD28 and PI3K as new biomarkers for chronic graft-versus-host disease [J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(12):1019-1025. DOI: 10.1089/dna.2011.1284.
- [8] 黄欣, 翁建宇, 吴萍, 等. miHA 不合基因骨髓移植后慢性移植植物抗宿主病小鼠模型的建立 [J]. *国际输血及血液学杂志*, 2014, 37(2): 97-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2014.02.001.
- [9] Wang Y, Lai P, Chen X, et al. Attenuation of cGVHD by C5a/C5aR blockade is associated with increased frequency of Treg [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3603. DOI: 10.1038/s41598-017-03700-1.
- [10] 吴言为. 青蒿素衍生物SM934对系统性红斑狼疮的疗效及作用机制研究 [D]. 中国科学院上海药物研究所, 2016.
- [11] Li H, Zuo J, Tang W. Water-soluble artemisinin derivatives as promising therapeutic immunosuppressants of autoimmune diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017. DOI: 10.1038/cmi.2017.87.
- [12] Soiffer R. Immune modulation and chronic graft-versus-host disease [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2008, 42 Suppl 1:S66-S69. DOI: 10.1038/bmt.2008.119.
- [13] Inamoto Y, Martin PJ, Storer BE, et al. Association of severity of organ involvement with mortality and recurrent malignancy in patients with chronic graft-versus-host disease [J]. *Haematologica*, 2014, 99(10): 1618-1623. DOI: 10.3324/haematol.2014.109611.
- [14] MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. 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.
- [15] Sun YC, Chai X, Inamoto Y, et al. Impact of Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease on Quality of Life. [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(9):1687-1691. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.05.020.
- [16] Forcade E, Kim HT, Cutler C, et al. Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2489-2497. DOI: 10.1182/blood-2015-12-688895.
- [17] MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. 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.
- [18] Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, et al. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2007, 110(10):3804-3813.
- [19] 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). pii: 92111. DOI: 10.1172/jci.insight.92111.
- [20] Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45(12):1732-1740. DOI: 10.1038/

- bmt.2010.195.
- [21] 李其辉, 杜欣, 耿素霞, 等. 定量监测Janus激酶3基因变化在移植抗宿主病中的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(28): 1981-1983. DOI: 10.3760/j.issn:0376-2491.2007.28.011.
- [22] O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention [J]. Annu Rev Med, 2015, 66:311-328. DOI: 10.1146/annurev-med-051113-024537.
- [23] Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid- refractory graft- versus- host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey [J]. Leukemia, 2015, 29 (10): 2062- 2068. DOI: 10.1038/leu.2015.212.
- [24] Jagasia M, Zeiser R, Arbushites M, et al. Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GVHD: an introduction to the REACH trials[J]. Immunotherapy, 2018, 10(5):391-402. DOI: 10.2217/imt-2017-0156.
- [25] Yalniz FF, Murad MH, Lee SJ, et al. Steroid refractory chronic graft-versus-host disease: cost-effectiveness analysis [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2018, pii: S1083-8791 (18) 30121-30126. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.03.008.
- [26] 张东, 王满元, 杨岚. 青蒿素类药物新制剂研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2015(03):189-193. DOI: 10.11669/cpj.2015.03.001.
- [27] Shi C, Li H, Yang Y, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory functions of artemisinin and its derivatives [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:435713. DOI: 10.1155/2015/435713.
- [28] Hou LF, He SJ, Li X, et al. Oral administration of artemisinin analog SM934 ameliorates lupus syndromes in MRL/lpr mice by inhibiting Th1 and Th17 cell responses [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(8):2445-2455. DOI: 10.1002/art.30392.
- [29] 钟嘉熙, 刘亚敏, 刘红姣, 等. 青蒿琥酯治疗系统性红斑狼疮的安全性观察[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(6):336. DOI: 10.3321/j.issn:1003-9783.2000.06.005.

(收稿日期:2018-05-16)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学符号:按GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。例如:调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;实验设计应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡4个基本原则概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表达近似服从正态分布的定量资料,用中位数(四分位数间距)[M(Q<sub>R</sub>)]表达呈偏态分布的定量资料。用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚。用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则。用相对数时,分母不宜小于20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 $t$ 检验和单因素方差分析。对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 $\chi^2$ 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对各因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$ )时,应表述为对比组之间的差异有统计学意义,而不应表述为对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 $t$ 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 $q$ 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$ 等);在用不等式表示 $P$ 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表达方式,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出95%可信区间。

6. 样本数(病例数)小于20例的临床研究,原则上不进行统计学分析。

本刊编辑部