

外周血 T 细胞受体删除环(TRECs)定量测定 在评估骨髓移植术后免疫重建中的应用概况及进展*

武小亮, 韩娟, 王靖, 卢林纲 (农业农村部食物与营养发展研究所评价研究室, 北京 100081)

摘要:骨髓移植成功的关键在于移植后免疫系统的重建状况,特别是 T 细胞数量及功能的重建。T 细胞受体删除环(TRECs)作为胸腺近期输出 naive T 细胞含量的标志,在细胞中十分稳定,可作为评价胸腺近期的输出功能及 T 细胞免疫重建状况的指标。鉴于 TRECs 对评价骨髓移植术后免疫重建状况具有重要现实意义,该文就 TRECs 的定量检测及其在评价骨髓移植后免疫重建状况中的应用概况及进展进行综述。

关键词: T 细胞受体删除环(TRECs);骨髓移植;免疫重建

中图分类号: R457.7; R392.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2019)04-001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.001

Quantitative Determination of Peripheral Blood T Cell Receptor Rearrangement Excision Circle(TRECs) and Its Application and Progress in Evaluating Immune Reconstitution after Bone Marrow Transplantation

WU Xiao-liang, HAN Juan, WANG Jing, LU Lin-gang (Food and Nutrition Assessment Lab,
Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: The key to success of bone marrow transplantation depends on the immune reconstitution after transplantation, Especially the reconstruction of the number and function of T cells. T cell receptor rearrangement excision circle (TRECs) represent the number of naive T cell of thymus output, and are very stable in cells, which can be used as an index to evaluate the recent thymic emigrants and T cell immune reconstitution. In view of the important practical significance of TRECs in evaluating immune reconstitution after bone marrow transplantation. The article will review the quantitative detection of TRECs and its application and progress in evaluation of immune reconstitution after bone marrow transplantation.

Keyword: T cell receptor rearrangement excision circle (TRECs); bone marrow transplantation; immune reconstitution

胸腺是人体重要的中枢免疫器官,是 T 淋巴细胞生长、发育和成熟的重要场所^[1]。来自骨髓中的前 T 细胞在胸腺中发育形成 naive T 细胞,随血流运输至外周血发挥免疫作用。胸腺 naive T 细胞的输出能力,一定程度上反映了机体的免疫水平。研究表明,胸腺输出功能与年龄呈现明显的相关性,随着年龄的增长胸腺逐渐萎缩,胸腺输出功能逐渐降低,但还是能够维持最基本的输出 naive T 细胞的能力并对机体发挥免疫作用^[2-3]。除年龄增长所引起胸腺萎缩及输出功能下降外, HIV, CHB, AIDs, 白血病等病毒和疾病,临床中的化疗、放疗、骨髓移植、实体器官移植、免疫治疗,或长期接触有害化学物质如苯等,均会引起胸腺输出功能降低^[4-6]。

骨髓移植是治疗白血病、多发性淋巴瘤等恶性血液病及免疫系统疾病的有效治疗手段^[7-8]。骨髓移植后 T 细胞免疫功能的重建,部分依赖于胸腺途径所产生并输出的 naive T 细胞。目前, T 细胞

受体删除环(T-cell receptor excision circle, TRECs)是 naive T 细胞含量水平的标志^[9-11]。DOUEK 等^[12-13]于 1998 年在《Nature》上首次报道 TRECs,明确了 TRECs 的水平能够代表胸腺近期所输出的 naive T 细胞的数量,随后应用于临床研究和指标检测中, HIV 感染及 AIDs 患者常利用 TRECs 来评价胸腺功能; 2000 年开始 TRECs 被用于骨髓移植后免疫重建的分析评价。T 细胞在免疫系统调节中起核心作用^[14], T 细胞数量及功能的重建状况是移植成功的关键,同时也是移植后重点监视的重要临床指标之一。骨髓移植后免疫系统长期的缺陷,患者可能会面临由机会性感染或复发所引起的较高风险的死亡率。因此,利用合适的方法来监测 T 细胞的重建情况,及时反映机体免疫状况,为评价移植后患者免疫系统重建状况提供可靠的信息,有助于医护人员制定更加有效的治疗策略。鉴于 TRECs 是评价胸腺近期输出功能和 naive T 细胞数量的重要指标,能够反应机体免

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31802306);中国农业科学院创新工程项目(CAAS ASTIP32018IFND)。

作者简介:武小亮(1994—),男,硕士研究生,研究方向:食物营养与健康, E-mail: 82101172218@caas.cn。

通讯作者:韩娟(1983—), E-mail: hanjuan@caas.com。

疫功能状况。本文就近年来外周血 T 细胞受体删除环(TRECs)的定量测定及其在骨髓移植后免疫重建中的应用概况及进展作一综述。

1 TRECs 形成机理 前 T 细胞由骨髓迁至胸腺,在胸腺中发育后,最终形成具有多样化 T 细胞表面抗原受体(TCR)的成熟 T 细胞被释放到外周。TCR 包括 α , β , γ 和 δ 四种,以异二聚体 $\alpha\beta$ TCR 和 $\gamma\delta$ TCR 的形式存在。胸腺中来源于骨髓的前 T 细胞的 TCR 基因处于无功能表达的胚系状态,由 V, J, (D) 和 C 区组成。不同区域的片段在重组信号序列(RSS)的识别及介导下发生随机重排,形成具有编码功能的 V-(D)-J 序列^[15]。每个功能性 TCR 基因的形成都会删除 RSS 之间的序列所形成的环状 DNA^[16-17],即 T 细胞受体删除环(T cell receptor excision circles)或信号结合 T 细胞受体删除环(sjTRECs),约 70% $\alpha\beta$ T 细胞以这种重排方式重排。外周血中的 T 细胞 95% 以上是 $\alpha\beta$ T 细胞^[18-19],TCR α 基因重排是 $\alpha\beta$ T 细胞形成的首要步骤,由于 TCR δ 和 TCR α 两个基因特殊的位置关系,因此,TCR α 基因发生重排时的首要步骤是删除 TCR δ 基因^[12,20]。TRECs 作为染色体外的环形副产物稳定地存在于细胞中,其含量不受细胞分裂的影响,但会受到细胞扩增的影响而被逐渐稀释^[16-17,21-24]。

2 TRECs 代表的含义 TRECs 的形成原理决定了只有 naive T 细胞中含有 T 细胞受体重排删除环^[17],由于其在细胞中非常稳定,不随细胞的分裂而复制,但随着细胞的扩增而逐渐被稀释,其含量始终代表了 naive T 细胞的含量。因此,TRECs 的含量可以用来表示功能性 TCR 基因形成时初始 T 细胞,即 naive T 细胞的含量^[12]。naive T 细胞能够识别环境中所有抗原并与之发生反应,其含量反应了胸腺产生和输出 T 细胞的能力,因此 TRECs 的含量可用来真实地反映胸腺近期输出 naive T 细胞的数量和胸腺近期的功能状态,进而体现机体的免疫能力状态^[12,16,18,22-24]。TRECs 自 1998 年报道以来,逐渐成为评价胸腺近期输出 naive T 细胞能力的重要指标,2000 年开始用于评价骨髓移植后免疫重建状况^[12-13]。直至今日,TRECs 依然是评价骨髓移植后免疫重建状况重要的指标之一,被广泛用于临床医学及动物实验中。

3 TRECs 的测定方法概述 TRECs 的定量方法主要有 PCR-ELISA, QC-PCR 及 RT-PCR。其中 RT-PCR 最为敏感和准确,也是目前应用最为广泛的方法。此方法首先需要构建标准品,然后将标准品质粒稀释成 7 个浓度梯度,常利用 Taqman 探针 RT-PCR 进行绝对定量检测,根据标准品 7 个浓度

的 RT-PCR 后得到的 Ct 值绘制标准曲线,进而得到待测样品中目的基因 TRECs 和内参基因 RAG2 的绝对拷贝数值;根据 RAG2 基因在细胞中稳定表达 2 个拷贝来确定待测样品的细胞数量,然后计算 TRECs 的拷贝数,在实际应用中时常以 1 000 个细胞中含有 TRECs 的拷贝数来反映 naive T 细胞的含量。计算公式为:1 000 个细胞中 TRECs 拷贝数 = $2 \times 1\,000 \times \sum \text{TRECs} / \sum \text{RAG2}$ ^[19,25-26]。另外,也可以根据样品中基因组 DNA 中目的基因 TRECs 和内参基因 RAG2 的 PCR 扩增的 Ct 值反映拷贝数,并结合标准曲线,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 求得目的基因 TRECs 相对于内参基因 RAG2 的相对表达量,即使用 RQ 值进行比较分析^[27-28]。

4 TRECs 在评估移植后免疫重建中的应用 骨髓移植成功的关键取决于移植后免疫系统的重建状况。因此,临床中免疫重建状况的实时监测,尤其对早期的免疫重建的检测是一项十分重要的工作。以及对患者进行合理的干预,有效改善预后,提高长期无病生存率。而 TRECs 作为 naive T 细胞的特征性标志物,是评价早期 T 细胞重建和胸腺近期输出功能的重要指标,能够反映移植后患者的免疫功能状态。

4.1 骨髓移植后免疫重建的评价 骨髓移植是治疗恶性血液病及免疫系统疾病的有效治疗手段^[7-8],骨髓移植的成功与否很大程度上取决于免疫系统的重建能力,而 T 细胞在免疫系统调节中起核心作用^[14],因此,T 细胞的重建是整个免疫系统重建中至关重要的部分。骨髓移植后 T 细胞的重建主要依靠两个途径,一是胸腺依赖途径,即来自供体的前 T 细胞在胸腺中发育;二是非胸腺依赖途径,即供体来源的成熟 T 细胞的外周扩增^[29-30]。

骨髓移植后的 1~2 个月表型成熟的 T 细胞逐渐恢复,这主要显示了供体来源的成熟 T 细胞的外周扩增。通过检测此途径的 T 细胞恢复情况,显然存在不足之处。一方面,成熟 T 细胞的外周扩增产生的 T 细胞不足以维持足够数量的稳定 T 细胞群^[25],在淋巴细胞衰竭情况下,这种成熟 T 细胞的外周扩增具有偏向性,幼稚性 T 细胞增殖能力相比记忆性 T 细胞弱^[31],记忆性 T 细胞由于缺乏对新抗原的反应性,因此难以抵抗移植后感染性病毒等各种抗原的侵袭^[25];另一方面,不能了解依赖胸腺途径所产生并输出的 naive T 细胞的情况,忽略了患者持久的免疫重建能力和后备能力^[31]。显然,测定骨髓移植后表型成熟的 T 细胞的恢复不能真实地反映免疫重建状况。

评估骨髓移植后免疫重建状况常常利用 naive

T细胞的表型,即依赖胸腺途径发育并输出的 naive T细胞的重建能力,来说明并评估胸腺近期的输出功能情况。但仅通过借助流式细胞术检测具有初始表型的T细胞的数量来评估T细胞重建能力具有一定的局限性。因为细胞从胸腺输出后,CD45RA⁺ naive T细胞静止期较长,可自发增殖或转变成CD45RO⁺记忆或效应T细胞;某些情况下表达初始细胞表型的细胞不一定是naive T细胞,如记忆性CD8⁺T细胞同样会表达初始细胞表型^[19]。另外,naive T细胞可能来源于T细胞亚群的外周扩增、淋巴组织中T细胞的释放或是记忆或效应细胞表型的转变,这些不确定因素的存在限制了单纯利用naive T细胞的免疫表型来评估胸腺近期输出功能。目前,评价骨髓移植后患者持久的T细胞免疫重建和胸腺近期输出功能状况的公认方法是检测胸腺近期输出的naive T细胞数量^[32]。TRECs作为naive T细胞的分子标志,稳定地存在于细胞中,不随T细胞的增殖而扩增,只随T细胞的分裂而被逐渐稀释,其含量始终代表了胸腺近期输出naive T细胞的含量^[12,33]。

因此,利用外周血中TRECs的水平来反应胸腺近期输出naive T细胞的数量和胸腺近期输出功能,对骨髓移植后患者免疫重建状况的监测及预后发展具有重要意义。

4.2 TRECs作为判断移植后免疫重建的指标

国内外大量研究表明,TRECs常用于评价骨髓移植后患者胸腺近期输出功能,以反映患者真实的免疫重建状况^[19,25,28]。通过外周血TRECs的定量分析,进一步提升了对免疫重建状况的确切判断。TRECs水平受多种因素影响,包括造血干细胞移植方式、急慢性移植物抗宿主病、患者年龄、移植前的预处理条件等^[13]。骨髓移植后依赖胸腺途径的T细胞免疫重建相对较晚^[34],孙丽华等^[25]利用荧光定量PCR方法定量检测骨髓移植后患者外周血TRECs的水平,发现移植后1~6个月内TRECs水平处于较低状态,之后逐渐升高,移植后1.5年恢复至移植前水平,直到移植后2.5年才可基本恢复正常水平。骨髓移植后外周血T细胞数量恢复较快,但胸腺功能恢复相对缓慢,一般情况下,外周血T细胞数量达到正常后,胸腺功能至少需要经历6个月才能恢复^[34]。

骨髓移植后胸腺功能恢复缓慢,这可能会导致患者长期的T细胞免疫功能低下,是移植后引发感染和复发的根本原因。国内外研究表明,TRECs的水平与年龄呈现明显的负相关^[30,35-36],这可能跟胸腺随年龄增长而逐渐萎缩有关,因此,骨髓移植后年龄较小者免疫重建恢复能力会更

快^[37]。移植物抗宿主病(GVHD)是骨髓移植后常出现的并发症。研究发现,发生GVHD的患者TRECs水平较未发生GVHD的患者低,且此效应长期存在,经过免疫治疗后TRECs的含量会有所上升^[30,38],表明机体免疫状况得到了改善。利用外周血TRECs的水平证明了非清髓性移植的胸腺功能恢复较清髓性移植的快,非清髓性移植后12个月可在外周血中检测到TRECs,而清髓性移植TRECs的含量在移植后18~24个月时才能被检测到^[39]。清髓性移植对患者胸腺造成了巨大损伤,导致胸腺功能降低且恢复缓慢,保护移植前预处理条件对胸腺造成的损伤及加快移植后胸腺损伤修复,对移植后免疫系统重建具有十分重要的意义。通过定量外周血TRECs的含量,在反映患者真实免疫重建状况及胸腺功能的同时,有助于医务工作者及时了解患者近期胸腺输出功能,以判断患者免疫功能状况,为患者制定更加合理的治疗策略。

4.3 TRECs作为移植后疗效评价指标 骨髓移植后常由于免疫重建缓慢,特别是T细胞的长期缺陷,导致患者面临着由复发或感染所引起的较高风险的死亡率^[40-43]。利用合理的治疗策略加快骨髓移植后机体免疫恢复成为目前研究的热点。TRECs作为胸腺近期输出功能的评判指标,常用于对相应治疗策略疗效的评价。XU等^[28]通过定量小鼠外周血TRECs的水平,证明了骨髓移植预处理条件之前Ghrelin的管理,能够显著提高骨髓移植后小鼠胸腺输出功能的重建并促进CD4⁺T细胞的恢复。该研究提示,Ghrelin可能作为一种胸腺生长因子加快骨髓移植后免疫功能重建。HOCHBERG等^[34]对骨髓移植后6个月的患者进行了供者CD4⁺T淋巴细胞的输注,通过定量TRECs发现其水平得到了提高,证明了供者淋巴细胞输注对患者免疫重建作用的意义。锌是人体必需的微量元素之一,大剂量口服锌补充剂可以提高骨髓移植后患者CD4⁺ naive T细胞含量,TRECs定量结果显示,口服高剂量锌的患者TRECs水平明显提高,指出锌能够加快骨髓移植后患者免疫重建及胸腺功能恢复,有望在临床中应用以促进骨髓移植后患者的免疫重建^[44],同时也再次说明了TRECs在骨髓移植后用于疗效评价的重要作用。相信在未来的研究中TRECs依然会得到广泛的应用,尤其是对免疫系统重建状况的评价及相关治疗策略和药物的筛选,以更加精准地评估患者免疫系统状态和相关药物的治疗效果。

5 结语 TRECs的含量始终代表了naive T细胞的含量,且每个naive T细胞中含有两个

TRECs。通过定量检测 TRECs 的含量,来间接反映胸腺近期输出 naive T 的能力,作为判断骨髓移植后胸腺功能恢复及免疫重建状况的重要指标。但也存在一些不足之处,包括 T 细胞的凋亡和外周分裂;形成功能性 TCR 基因时 δ Rec- ϕ J α -sjTRECs 的删除方式占 70% 左右,其他删除方式可能存在影响;机体外周长期存在的 TRECs 影响对近期胸腺的输出功能的准确判断;部分 TRECs 其半衰期较长可能会对胸腺近期输出功能产生误判^[39-41]。尽管如此,目前尚未发现比 TRECs 更为可靠的指标来指示免疫系统重建和恢复状况,因此 TRECs 的定量分析依然作为判断胸腺近期输出功能的主要方法。由于该方法的准确性和稳定性,使其成为监测骨髓移植后患者免疫重建状况的可靠依据^[38]。在今后的应用及研究过程中,应该注意定量 TRECs 评价胸腺近期输出功能所存在不足之处,在力争阐明这些因素所产生的不同影响的同时,对患者近期胸腺输出功能做出更加客观和准确的判断。

参考文献:

- [1] JUNG S, HAN S M, KIM S M, et al. Stimulatory effect of HGF-overexpressing adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on thymus regeneration in a rat thymus involution model[J]. *Cell Biology International*, 2014, 38(10): 1106-1117.
- [2] 李彩东,陈锡莲,田鹏飞,等. 慢性乙型肝炎患者外周血调节性 T 细胞及其相关细胞因子水平检测及临床意义[J]. *实用肝脏病杂志*, 2015, 18(2): 186-188.
LI Caidong, CHEN Xilian, TIAN Pengfei, et al. Changes of peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ Treg cells and IL-18, IFN- γ and TGF- β in patients with hepatitis B [J]. *Journal of Practical Hepatology*, 2015, 18(2): 186-188.
- [3] 姚叶萍,曾跃彬,赖小丽. 慢性乙型肝炎患者外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞功能的变化[J]. *肝脏*, 2015, 20(5): 356-358.
YAO Yeping, ZENG Yaobin, LAI Xiaoli. Changes of CD8⁺ T cell function in patients with chronic hepatitis B[J]. *Chinese Hepatology*, 2015, 20(5): 356-358.
- [4] 王琛,张永乐,潘克女,等. 慢性乙型肝炎患者外周血 TRECs 与 CD45⁺ T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J]. *中国现代医生*, 2018, 56(23): 8-11.
WANG Chen, ZHANG Yongle, PAN Kenü, et al. Clinical significance of TRECs and CD45⁺ T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with chronic hepatitis B[J]. *China Modern Doctor*, 2018, 56(23): 8-11.
- [5] 李滔,李扬秋,杨力建,等. 接苯工人胸腺近期输出功能和外周血 T 细胞亚群变化[J]. *工业卫生与职业病*, 2008, 34(2): 68-71.
LI Bo, LI Yangqiu, YANG Lijian, et al. Changes of recent thymic output function and T lymphocyte subgroup in peripheral blood of benzene exposed workers[J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2008, 34(2): 68-71.
- [6] CHAUDHRY M S, VELARDI E, DUDAKOV J A, et al. Thymus: the next (re)generation[J]. *Immunological Reviews*, 2016, 271(1): 56-71.
- [7] VYAS P, APPELBAUM F R, CRADDOCK C. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia [J]. *Biology of Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(1): 8-15.
- [8] CARCIA I N. Role of hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma[J]. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2015, 15(2): 86-91.
- [9] NAYLOR K, LI Guangjin, VALLEJO A N, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(11): 7446-7452.
- [10] 李扬秋,韩素芳,杨力建,等. 重度苯中毒患者胸腺输出近期功能明显低下[J]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13(1): 114-117.
LI Yangqiu, HAN Sufang, YANG Lijian, et al. Significant decrease of recent thymic output function in patients with severe benzene intoxication[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2005, 13(1): 114-117.
- [11] LI B, LI Y Q, YANG L J, et al. Decreased T cell receptor excision DNA circles in peripheral blood mononuclear cells among benzene-exposed workers [J]. *International Journal of Immunogenetics*, 2009, 36(2): 107-111.
- [12] DOUEK D C, MCFARLAND R D, KEISER P H, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection[J]. *Nature*, 1998, 396(6712): 690-695.
- [13] DOUEK D C, VESCIO R A, BETTS M R, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution[J]. *The Lancet*, 2000, 355(9218): 1875-1881.
- [14] ROH K H, ROY K. Engineering approaches for regeneration of T lymphopoiesis[J]. *Biomaterials Research*, 2016, 20(1): 20.
- [15] 李扬秋,韩素芳,杨力建. 胸腺输出功能的评价手段-T 细胞受体重排删除环的定量分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2003, 11(6): 667-672.
LI Yangqiu, HAN Sufang, YANG Lijian. Estimate of recent thymic output function-quantification of T cell receptor rearrangement excision circles (TRECs)-review[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2003, 11(6): 667-672.
- [16] AL-HARTHI L, MARHETTTI G, STEFFENS C M, et al. Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA)

- [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 237 (1/2):187-197.
- [17] 李扬秋,杨力建,陈少华,等. 实时定量 PCR 检测正常人外周血 T 细胞和胸腺细胞中 sjTRECs 水平[J]. *现代临床医学生物工程杂志*, 2001, 7(6): 397-400.
- LI Yangqiu, YANG Lijian, CHEN Shaohua, et al. Detection of sjTRECs within peripheral blood T cells and thymocytes in normal individuals by real-time PCR[J]. *Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering*, 2001, 7(6): 397-400.
- [18] LANG P O, GOVIND S, DRAMÉ M, et al. Measuring the TREC ratio in dried blood spot samples; Intra- and inter-filter paper cards reproducibility[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2013, 389(1-2): 1-8.
- [19] 王坤,韩俊永,陈金烟,等. 造血干细胞移植后免疫重建早期 T 细胞受体删除环的检测分析[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(29): 4643-4649.
- WANG Kun, HAN Junyong, CHEN Jinyan, et al. Measurements of T-cell receptor excision cycles in early stage of immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2018, 22(29): 4643-4649.
- [20] SEMPOWSKI G D, GOODING M E, LIAO H X, et al. T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice[J]. *Molecular Immunology*, 2002, 38(11): 841-848.
- [21] LYNCH H E, SEMPOWSKI G D. Molecular measurement of T cell receptor excision circles[J]. *Methods Molecular Biology*, 2013, 979: 147-159.
- [22] HUG A, KORPORAL M, SCHRODER I, et al. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(1): 432-437.
- [23] 代现良,黄帅波,贺治青,等. 一种动态检测小鼠微量血中 T 细胞受体重排删除环含量的方法[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(24): 4605-4609.
- DAI Xianliang, HUANG Shuaibo, HE Zhiqing, et al. Establishment of a novel method of dynamically detection T cell receptor rearrangement excision circles content from micro-volume mouse blood[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(24): 4605-4609.
- [24] CHIARINI M, SOTTINI A, BERTOLI D, et al. Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients[J]. *Multiple Sclerosis*, 2015, 21(6): 726-734.
- [25] 孙丽华,孟庆祥,赵林俊,等. 造血干细胞移植患者动态监测胸腺输出功能的意义[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(19): 50-53.
- SUN Lihua, MENG Qingxiang, ZHAO Linjun, et al. Significance of dynamic monitoring of thymic recent output function in patients with hematopoietic stem cell transplantation[J]. *China Medical Herald*, 2013, 10(19): 50-53.
- [26] 陈广华,吴德沛,王易,等. 小鼠胸腺输出功能及免疫重建的研究方法[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2009, 29(1): 112-115.
- CHEN Guanghua, WU Depei, WANG Yi, et al. Study on the establishment of quantitative PCR and run-off PCR for evaluating thymic output and immune reconstitution[J]. *Suzhou University Journal of Medical Science*, 2009, 29(1): 112-115.
- [27] 李美珍,廖苑君,郑嘉坤,等. 异基因造血干细胞移植合并胸腺移植及 CD4⁺ DLI 后 T 细胞重建情况[J]. *广东医学*, 2016, 37(10): 1425-1428.
- LI Meizhen, LIAO Yuanjun, ZHENG Jiakun, et al. Evaluation of T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation combined with thymus transplantation and CD4⁺ DLI by real time PCR[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2016, 37(10): 1425-1428.
- [28] XU Jingxia, ZHU Junyu, TIAO Xianyu, et al. Ghrelin protects the thymic epithelium from conditioning-regimen-induced damage and promotes the restoration of CD4⁺ T cells in mice after bone marrow transplantation[J]. *Transplantation*, 2017, 101(9): e293-e300.
- [29] 符粤文. 异基因造血干细胞移植后 T 细胞免疫重建的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2007.
- FU Yuewen. The study of T cell immune reconstitution in leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[D]. Suzhou: Suzhou University, 2007.
- [30] PENG Xinguo, DONG Yan, HANG Tingting, et al. Immune reconstitution of CD4⁺ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its correlation with invasive fungal infection in patients with hematological malignancies[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, 16(8): 3137-3140.
- [31] BOURGEOIS C, KASSIOTIS G, STOCKINGER B. A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(9): 5316-5323.
- [32] HAZENBERG M D, OTTO S A, DE PAUW E S, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events[J]. *Blood*, 2002, 99(9): 3449-3453.
- [33] 王坤,金静君,杨婷,等. 荧光定量 PCR 检测 T 细胞受体删除环在亲缘与非亲缘异基因造血干细胞移植后免疫重建早期的应用[J]. *福建医药杂志*, 2017, 39(5): 139-143.