

· 论著 ·

单细胞测序揭示心脏移植物中树突状细胞和 B 细胞的抗原提呈特性

朱越星 陈超 徐晔 范玉玺 郑新国 罗秋琳 汤周琦 张和栋 李腾芳 彭龙开 代贺龙

【摘要】 目的 探讨心脏移植物中树突状细胞 (DC) 和 B 细胞的抗原提呈特性。方法 将 BALB/c 小鼠的心脏移植到 C57BL/6J 小鼠腹腔内, 术后 5 d (急性排斥反应早期) 提取并流式分选心脏移植物中的 CD45⁺ 细胞, 进行单细胞 RNA 测序。以心脏移植物中的 DC 和 B 细胞的亚群为主要对象, 通过生物信息学分析和流式细胞术, 研究其在心脏移植后变化趋势、抗原提呈能力及其与 T 细胞之间的胞间通讯情况。采用基因本体 (GO) 功能富集差异分析佐证细胞亚群特异性功能和细胞亚群注释可信度。结果 生发中心样 B 细胞 (GC-L B) 是急性排斥反应期心脏移植物中增幅最大、比例高达 87% 的 B 细胞亚群, 经典 DC (cDC) 2 是心脏移植急性排斥期间唯一大量增多的 DC 亚群, 占 44%, 是心脏移植后与 T 细胞的胞间通讯中占据最高通讯强度的 DC 亚群; 单核样 DC (moDC) 与记忆性 B 细胞 (MBC) 是未心脏移植中 T 细胞输入信号的主要发出者, 而在心脏移植后急性排斥反应期中, 转变为 cDC2 与 GC-L B; 其中 MBC 与 GC-L B 分别是心脏移植前后的主要 T 细胞输入信号来源。结论 在未移植心脏和移植心脏指向 T 细胞的胞间通讯中, 与 DC 相比, B 细胞均占据更高的通讯数量和权重, 推测在心脏移植急性排斥反应早期, B 细胞的抗原提呈活动比 DC 更加活跃, 强度更大。

【关键词】 心脏移植; 抗原提呈; B 细胞; 树突状细胞; 单细胞测序; 急性排斥反应; 细胞通讯; T 细胞
【中图分类号】 R617, R392.12 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 05-0015-10

Single cell sequencing reveals the antigen presentation characteristics of dendritic cells and B cells in cardiac grafts Zhu Yuexing*, Chen Chao, Xu Ye, Fan Yuxi, Zheng Xinguo, Luo Qiulin, Tang Zhouqi, Zhang Hedong, Li Tengfang, Peng Longkai, Dai Helong.
*Medical College of Guangxi University, Nanning, 530004, China
Corresponding author: Dai Helong, Email: helong68888@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the antigen presentation characteristics of dendritic cells (DC) and B cells in cardiac grafts. **Methods** The heart of BALB/c mice was transplanted into the abdominal cavity of C57BL/6J mice. CD45⁺ cells in the heart graft were extracted and sorted by flow cytometry at postoperative 5 d, and single cell RNA sequencing was performed. Taking DC and B cell subsets in cardiac grafts as the main study cells, the changing trend, antigen presenting ability and intercellular communication with T cells after heart transplantation were analyzed by bioinformatics analysis and flow cytometry. Gene ontology (GO) function enrichment difference analysis was adopted to prove the specific function and the reliability annotation of cell subsets. **Results** Germinal center-like B cell (GC-L B) was the B

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024115

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82070776、82270796、82200849、82370761); 湖南省科技创新领军人才计划项目 (2022RC3071); 湖南省自然科学基金项目 (2023JJ40872); 中南大学高等教育教学改革项目 (2023jy110)

作者单位: 530004 南宁, 广西大学医学院 (朱越星、陈超、徐晔); 中南大学湘雅二医院肾脏移植科 湖南省器官移植临床医学研究中心 (朱越星、陈超、徐晔、范玉玺、郑新国、罗秋琳、汤周琦、张和栋、李腾芳、彭龙开、代贺龙); 中南大学基础医学院免疫系 (范玉玺、郑新国、罗秋琳)

作者简介: 朱越星 (OCRID 0009-0000-0751-4205), 硕士研究生, 研究方向为移植免疫, Email: zhuyuexing990809@163.com

通信作者: 代贺龙 (OCRID 0000-0002-0696-3081), 博士, 副研究员, 研究方向为器官移植、移植免疫, Email: helong68888@163.com

cell subset with the largest increase in quantity during the acute rejection phase, accounting for 87%. Classical DC (cDC) 2 was the only DC subset with a significant increase in quantity during acute rejection of heart transplantation, accounting for 44% of DC subset, and it occupied the highest communication intensity with T cells after heart transplantation. Mononucleated DC (moDC) and memory B cell (MBC) were the main transmitters of T cell input signals in non-transplanted hearts, whereas transformed into cDC2 and GC-L B during the acute rejection phase. Among them, MBC and GC-L B were the main sources of T cell input signals in non-transplanted hearts and heart grafts. **Conclusions** Compared with DC, B cells occupy a higher number and weight in the intercellular communication with T cells in non-transplanted hearts and heart grafts, prompting that the antigen presenting activity of B cells is more active and stronger than DC in the early stage of acute rejection of heart transplantation.

【 Key words 】 Heart transplantation; Antigen presentation; B cell; Dendritic cell; Single cell sequencing; Acute rejection; Cellular communication; T cell

心脏移植急性排斥反应是由多种细胞参与的复杂的免疫应答过程，分为抗体介导的排斥反应（antibody-mediated rejection, AMR）和 T 细胞介导的排斥反应（T cell-mediated rejection, TCMR）^[1-2]。TCMR 主要由 T 细胞介导，当 T 细胞识别抗原信息后将被激活分化为细胞毒 T 细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL），参与破坏移植组织。主要由抗原提呈细胞（antigen-presenting cell, APC）通过直接识别或间接识别的方式，将移植抗原信息提呈给 T 细胞，诱导其活化、增殖。巨噬细胞、B 细胞、树突状细胞（dendritic cell, DC）是专职 APC，其中 DC 被认为是最典型的 APC^[3]。基于 DC 在移植排斥反应中的关键作用，很多研究者利用耐受型 DC 治疗法，成功缓解了移植急性排斥反应^[4-7]。DC 从造血干细胞中分化而来，可分为经典 DC（cDC）以及浆细胞样 DC（pDC），pDC 将在骨髓中继续发育，而 cDC 则在外周继续分化^[8-9]。此外，在炎症反应中，单核细胞可以分化成单核样 DC（moDC），发挥募集炎症细胞的功能^[10]。

AMR 主要由 B 细胞参与^[11-13]。B 细胞识别并内吞 T 细胞依赖抗原（T cell-dependent antigen, TD-Ag）和 T 细胞非依赖抗原（T cell-independent antigen, TI-Ag），将其加工处理成抗原肽-主要组织相容性抗原（major histocompatibility antigen, MHC）II 类分子复合物，然后提呈给抗原特异性的辅助性 T 细胞（helper T cell, Th）识别，随后活化的 Th 通过受配体结合，为 B 细胞的增殖和分化提供共刺激信号^[14]。B 细胞的主要任务是产生抗体，但并不是生来就具有分泌抗体的能力。经过抗原刺激的初始 B 细胞（naïve B cell）大量增殖形成生发中心（germinal center, GC），GC 由内向外分为暗区、

亮区和边缘区^[15-16]。B 细胞在 GC 各个区域间游走，不断经历分裂增殖、加工重组，最终进入记忆性 B 细胞（memory B cell, MBC）和浆细胞阶段，在该阶段，B 细胞将离开 GC，参与淋巴循环^[17-18]。

心脏移植早期研究中认为急性细胞排斥反应（acute cellular rejection, ACR）是急性排斥反应发生和死亡的重要原因^[19]。近十几年以来，AMR 被提上热点，认为是与心脏移植不良预后相关的重要因素^[20-22]。依照上述学说，显然 B 细胞抗原提呈在 ACR 与 AMR 中均起到关键作用，而 DC 被认为是抗原提呈能力最强的 APC，但二者在心脏移植急性排斥反应早期抗原提呈能力及其胞间通讯强弱尚不清楚，明确其特性将有助于选择性抑制抗原提呈，缓解排斥反应。本研究利用单细胞 RNA 测序，以心脏移植 DC 和 B 细胞为主要对象，揭示其抗原提呈功能的差异性，以期对心脏移植排斥反应的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物来源

选用 8~12 周龄、体质量 20~25 g 的 BALB/c 和 C57BL/6J 雄性小鼠，购自湖南乐京达实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SYXK（湘）2022-0012。所有实验小鼠饲养在中南大学湘雅二医院无特定病原体级实验动物中心。本实验动物方案经中南大学湘雅二医院实验动物中心批准（批号：20220437），所有实验均符合相关管理标准。

1.2 构建小鼠心脏移植模型

HTx 组选用雄性 C57BL/6J 和 BALB/c 小鼠，根据参考文献 [14] 中的腹腔异位移植方法，将 BALB/c 小鼠的心脏移植到 C57BL/6J 小鼠腹腔内；鉴于小鼠同种异体心脏移植在术后 7 d 为排斥反应末期，心

脏移植植物停跳, 本研究在术后 5 d 提取移植心脏进行单细胞转录组测序和流式细胞学分析。NH 组提取未经移植健康雄性 C57BL/6J 小鼠心脏进行单细胞转录组测序和流式细胞学分析。

1.3 细胞分选及单细胞 RNA 数据收集

由于单只小鼠心脏中非实质细胞数量有限, 本研究将 3 只 BALB/c 小鼠的健康心脏 (NH 组) 和 3 只心脏移植术后小鼠的心脏移植植物 (HTx 组) 分别制作作为混合样本, 制备小鼠心脏组织单细胞混悬液后进行流式分选, 获得细胞活性达到 80% 的心脏 CD45⁺免疫细胞单细胞混悬液; 利用 10×Genomics 微流控系统采用油相液滴法包裹单个细胞并使之与带有细胞特异分子唯一标识符 (unique molecular identifiers, UMI) 的 Barcode 相结合; 最后单个细胞在液滴中裂解释放 RNA, 并反转录构建互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 文库。

1.4 质量控制与降维聚类

将 ScRNA-seq 下游数据以 matrix 文件形式读入 R (版本 v4.0.2); 创建 Seurat 对象, 下游分析流程建立在 Seurat (版本 v4.2.1) 程序包基础之上; 限定保留 UMI 数量 (nCount_RNA) >1500、线粒体基因占比 (mitoRatio) <10% 的细胞; 接着, 进行数据合并、对应锚点信息、去除批次效应; 利用 ElbowPlot 函数生成滚石图查看主成分 (PC) 数量大小对数据降维后的影响, 最终确定 PC 数为 15; 然后, 对降维的细胞数据进行聚类。

1.5 差异表达分析、细胞亚群命名

FindAllMarkers 函数用于计算鉴定各个细胞群之间的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG), 差异检验默认使用 wilcox 方法, 根据平均 log (fold change) 变化进行排序, 输出调整后的差异表达基因列表; 手动注释细胞聚类名称及其规范化基因表达评分信息, 通过统一流形逼近与投影 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 可视化细胞聚类。

1.6 差异富集分析

使用 clusterProfiler (版本 v4.2.2) 对 DEG 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释富集和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 差异通路富集分析, 其中物种参数选择 org.Mm.eg.db; GO 富集分析使用 enrichGO 函数, KEGG 富集分析使用 enrichKEGG

函数, 使用 ggplot2 (版本 v3.4.0) 对富集分析结果进行可视化绘图。

1.7 胞间交流分析

使用 CellChat (版本 v1.5.0) 计算配体受体及其辅助因子之间的相互作用来模拟分析细胞间通讯互作。接着根据表达值推测细胞互作的概率, 通过计算链路的数量或汇总通信概率来推测细胞间的聚合通信网络, 计算网络中心评分, 细胞通讯网络可视化, 单个配受体层次的细胞通讯可视化和通讯网络分析可视化。

1.8 流式细胞术

在小鼠心脏移植术后 5 d 取出心脏移植植物, 配置消化液对剪碎的心脏组织碎片进行消化 (胶原酶 1450 U/mL, DNaseI 60 U/mL, 透明质酸酶 60 U/mL), 制备单细胞悬液。用 1 μg 荧光偶联单抗 (美国 Biolegend 公司) 避光孵育染色, 该单抗针对小鼠 CD45、CD11c、MHC II、CD80、CD19、B220 等。流式细胞术采用 LSR-II 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 使用 FlowJo v.10.1 分析数据。

1.9 统计学方法

采用 RStudio (Poist, Inc. 版本 v4.3.3) 进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性排斥反应早期心脏移植植物中 GC-L B 亚群显著增加

从小鼠健康心脏 (NH 组) 和移植心脏 (HTx 组) 的 CD45⁺免疫细胞中共提取出 6 219 个 B 细胞, 其中 NH 组 4 087 个, HTx 组 2 132 个。

NH 组中有 1 721 个初始 B 细胞 (Ms4a1⁺、CD27⁻), 占 42.10%; HTx 组初始 B 细胞减少至 150 个, 仅占 7.03%。MBC (Ms4a1⁺、CD27⁺、CD38⁻) 主要存在于 NH 组, 有 2 271 个; GC-L B (Ms4a1⁺、CD27⁺、CD38⁺、Sdc1⁻) 数量在 HTx 组增加, 占 87%; HTx 组浆细胞 (Igha⁺、Jchain⁺) 为 136 个, 多于 NH 组的 93 个 (图 1A~C)。

浆细胞亚群特异性高表达 Atat1、Lax1、Ada、Ctla4, 其 GO 功能注释集中在“免疫反应激活信号通路”; 初始 B 细胞亚群特异性表达 H2-Oa、H2-Ob、CCR7, 相关 GO 功能注释集中在“抗原加工和提呈的调控”; MBC 亚群差异基因 GO 功能富集在“调节

IL-5 的产生”，代表性的基因为 *Lilrb4a*、*Nlrp3*、*Rara*；GC-LB 亚群富集在“淋巴细胞趋化性的调节”，代表性的基因为 *CXCL10*、*CCL5*、*CCR2*（图 1D）。

流式细胞术检测结果显示，心脏移植中 B 细胞比例上升 ($P < 0.01$ ，图 2A)。两组脾脏 B 细胞 ($CD19^+$) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$ ，图 2B)。

2.2 cDC2 亚群在心脏移植急性排斥反应早期增多

$CD45^+$ 免疫细胞中共提取 1 718 个 DC，其中 NH 组 817 个，HTx 组 901 个。流式细胞术结果显示，与 NH 组相比，HTx 组小鼠 DC 表现出与单细胞测序数据相似的上升趋势 ($P < 0.05$ ，图 2C)。

将 DC 注释出 4 个细胞亚型（图 3A），其中 cDC2 亚群 ($CD2^+$) 在心脏移植后增加，占 44%（图 3B）。其余 DC 亚群在移植后均呈现数量减少、占比下降。

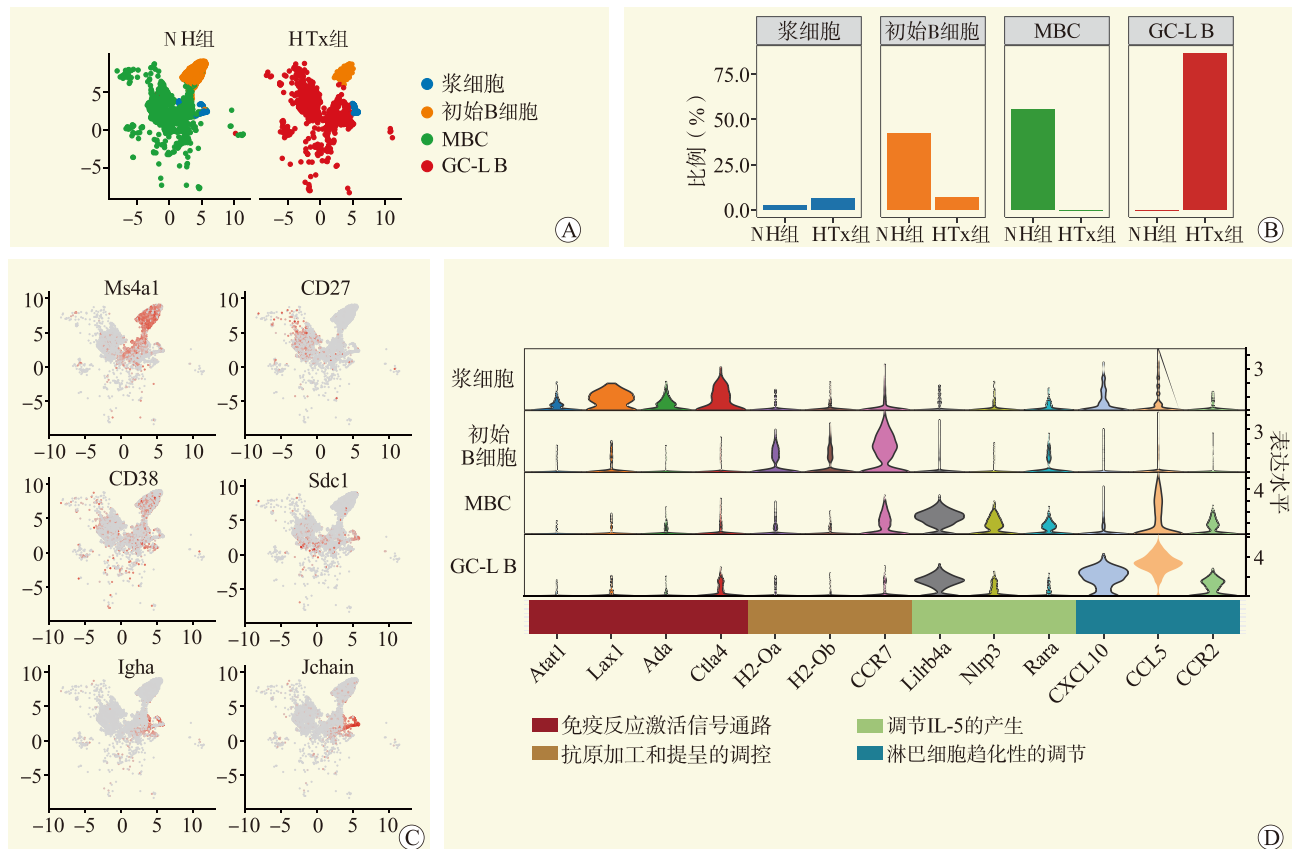
cDC2 亚群特异性表达 *Nkg7*、*CD3e*、*Zap70*、*CD28*，GO 功能富集显示其高度相关功能是“T 细胞活化”；cDC1 亚群 ($Clec9a^+$) 特异性表达与“细胞

趋化作用”相关的基因，如 *Xcr1*、*Anxa1*、*Dpp4*、*Vav3*；pDC 亚群 ($Siglech^+$) 差异性表达 *Klk1*、*Ctse*、*Cdh1*、*Plaur*，GO 功能富集注释其与“蛋白质加工”高度相关，功能富集在“白细胞-细胞黏附”的 moDC 亚群 ($Sirpa^+$ 、 $Itgam^+$ 、 $Mrc1^+$) 特异性表达 *CCR7*、*Arg2*、*Ii4i1*、*CD80*（图 3C、D）。

2.3 B 细胞在急性排斥反应早期呈现指向 T 细胞的更高权重的通讯强度

对小鼠心脏 $CD45^+$ 免疫细胞中 1 718 个 DC 和 6 219 个 B 细胞开展胞间通讯分析，通过计算与 T 细胞之间的配体受体及其他辅助因子之间相互作用的数量、频率等，模拟抗原提呈过程中的胞间交流。

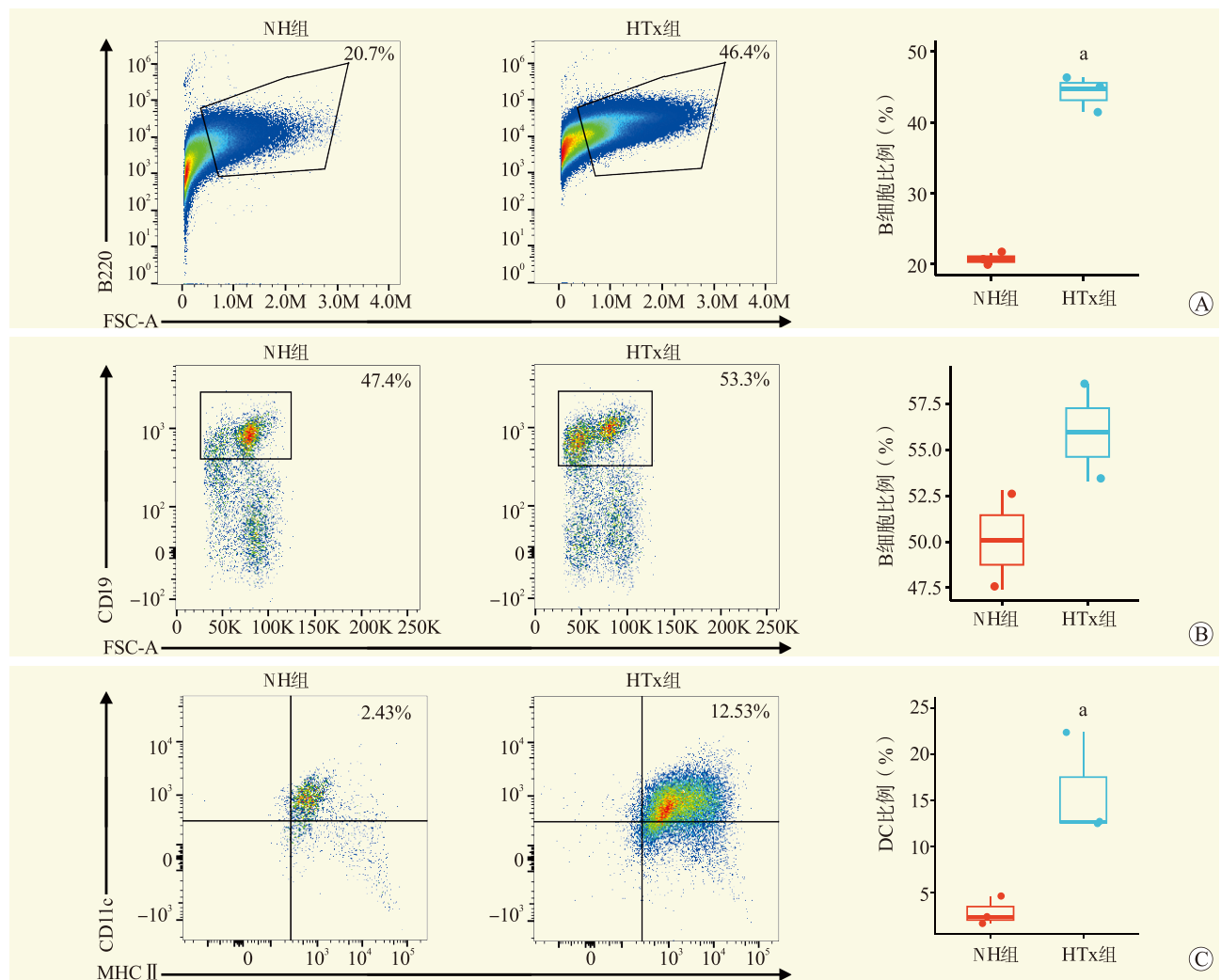
B 细胞与 T 细胞之间的通讯强度在心脏移植急性排斥反应早期从 NH 组中 MBC 亚群为主，转变为 HTx 组中 GC-LB 亚群为主（图 4A）。DC 与 T 细胞之间的通讯强度在 NH 组中以 moDC 亚群为主，在 HTx 组转变为 cDC2 亚群为主（图 4B）。



注：A 图为 4 种 B 细胞亚型可视化 UMAP 图；B 图为 NH 组和 HTx 组 4 种 B 细胞亚型数量；C 图为 Marker 基因表达散点 UMAP 图，横纵坐标代表样本点在低维空间的相对位置关系，颜色深浅代表基因平均表达量高低；D 图为代表性差异表达基因小提琴图。

图 1 小鼠未移植心脏及心脏移植中 B 细胞免疫特征

Figure 1 B cell immune characteristics in non-transplanted hearts and heart grafts of mice



注：A 图为心脏中 B 细胞流式图 ($B220^+$) 及统计分析；B 图为脾脏中 B 细胞流式图 ($CD19^+$) 及统计分析；C 图为 DC 流式图 ($MHC II^+$ 、 $CD11c^+$) 及统计分析。与 NH 组比较， $^aP < 0.05$ 。

图 2 小鼠心脏移植前后 DC、B 细胞及相应脾脏 B 细胞流式分析

Figure 2 Flow analysis of DC and B cells and corresponding spleen B cells before and after heart transplantation in mice

将 B 细胞与 DC 整合，比对二者与 T 细胞之间的通讯强度，发现在 NH 组与 HTx 组中，与 DC 相比，B 细胞均呈现出更高权重的通讯强度，NH 组中以 MBC 亚群和 moDC 亚群为主，HTx 组转变为 GC-L B 亚群和 cDC2 亚群占据更高权重（图 4 C）。

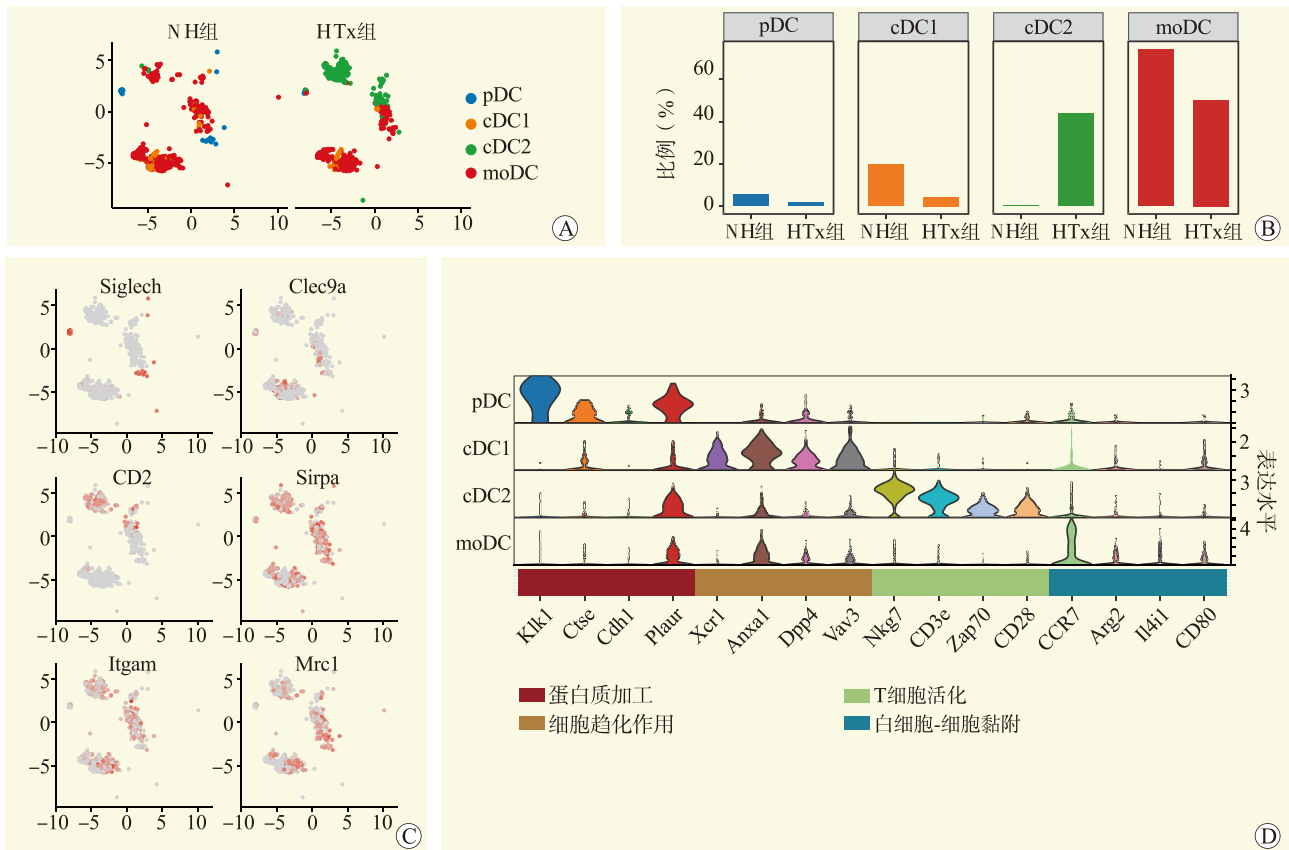
2.4 MBC 亚群是心脏移植前 CXCL 信号通路中主要的信号发送者

在 NH 组中，T 细胞的主要输入信号为 CXCL 信号通路，在输出信号模块热图中，CXCL 信号通路强度最高的是 MBC 亚群（图 5 A）。与 moDC 亚群和 cDC1 亚群相比，从 MBC 亚群指向 T 细胞的 CXCL 相关信号占到主要部分（图 5 B）。MBC 亚群是

CXCL 信号主要的信号发送者，T 细胞是 CXCL 信号的接收者（图 5 C）。在 NH 组的 CXCL 信号通路中，贡献最大的受配体对是 CXCL16-CXCR6（图 5 D），该受配体对中相关基因表现为 CXCL16 在 MBC 亚群和 moDC 亚群高表达，而 T 细胞则高表达受体 CXCR6（图 5 E）。

2.5 GC-L B 亚群是急性排斥反应早期 CXCL 信号通路中主要的信号发送者

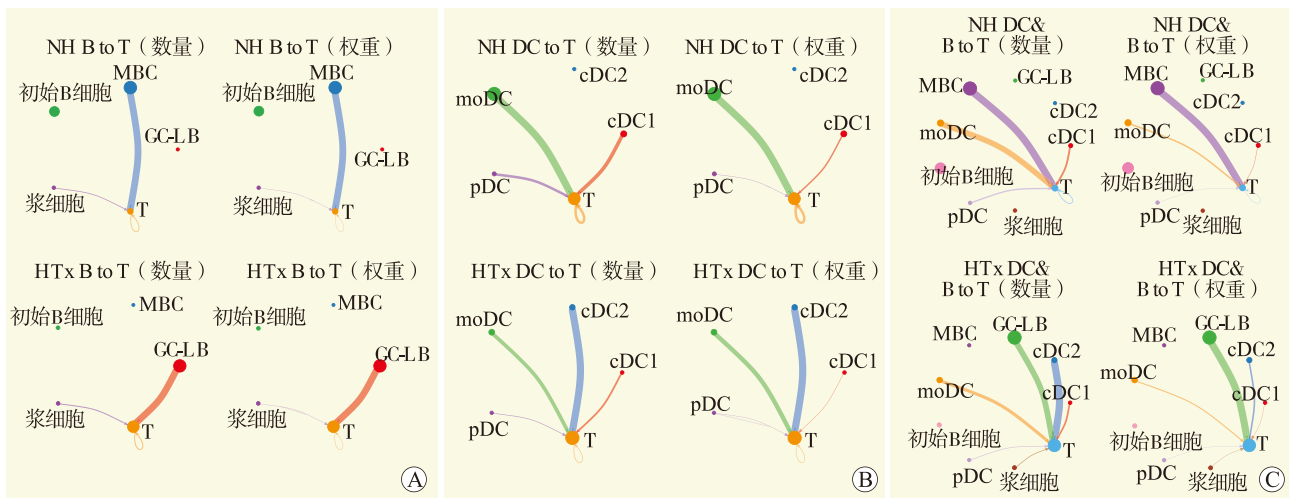
在心脏移植急性排斥反应早期，T 细胞输入信号相关性强度最突出的是 CXCL 信号通路，在输出信号模块热图中，CXCL 信号通路强度最高的是 GC-L B 亚群（图 6 A）。与浆细胞、moDC、cDC2、cDC1 亚群相比，从 GC-L B 亚群指向 T 细胞的 CXCL



注：A 图为 4 种 DC 亚型可视化 UMAP 图；B 图为 4 种 DC 亚型数量；C 图为 Marker 基因表达散点 UMAP 图，纵横坐标代表样本点在低维空间的相对位置关系，颜色深浅代表基因平均表达量高低；D 图为代表性差异表达基因小提琴图。

图 3 小鼠未移植心脏及心脏移植中 DC 免疫特征

Figure 3 DC immune characteristics in non-transplanted hearts and heart grafts of mice



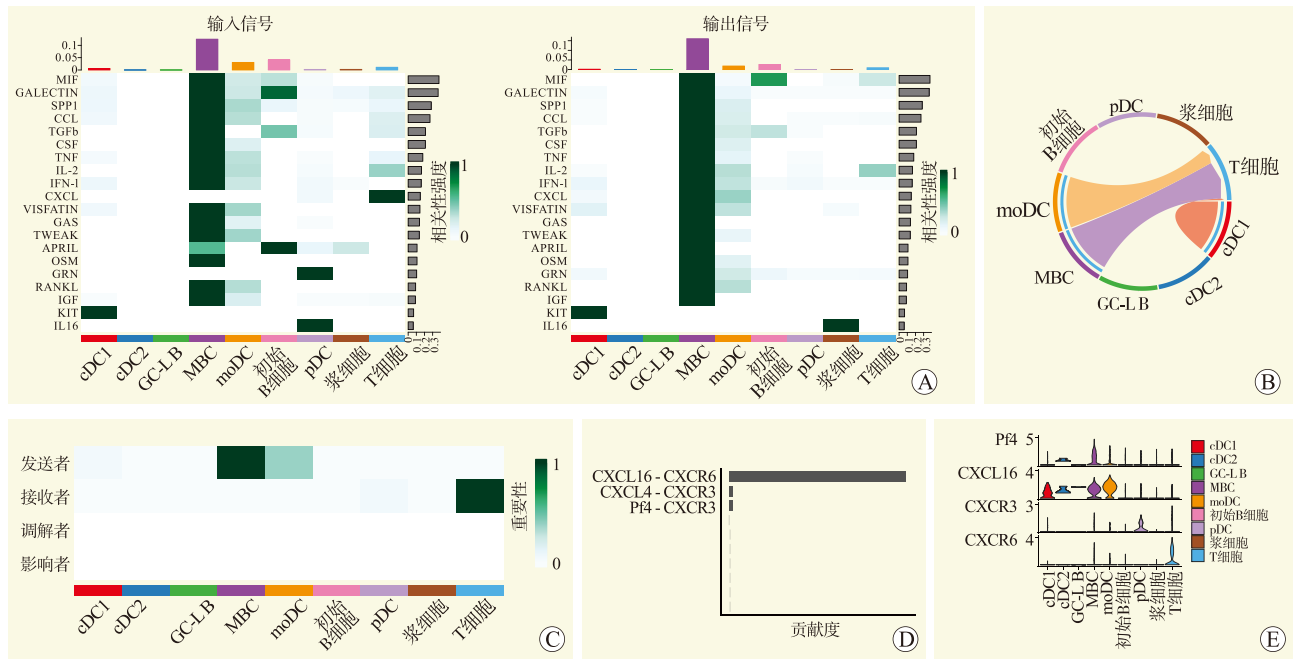
注：A 图为 B 细胞与 T 细胞之间胞间通讯的数量和权重可视化图；B 图为 DC 与 T 细胞之间胞间通讯的数量和权重可视化图；C 图为合并 DC 与 B 细胞，比对 NH 组与 HTx 组 DC、B 细胞与 T 细胞之间通讯强度的变化。

图 4 小鼠心脏 DC、B 细胞与 T 细胞胞间交流分析

Figure 4 Analysis of intercellular communication among DC, B cells and T cells in mouse hearts

相关信号占到主要部分 (图 6B)。GC-L B 亚群是 CXCL 信号主要的信号发送者，T 细胞是 CXCL 信号

的接收者，同时 cDC2 作为其中的调解者和影响者 (图 6C)。在 HTx 组的 CXCL 信号通路中，贡献最



注：A 图为 DC、B 细胞与 T 细胞输入、输出信号分析热图；B 图为 CXCL 信号通路通讯弦图（指向 T 细胞）；C 图为 CXCL 信号通路通讯角色分析热图；D 图为 CXCL 信号通路中受配体贡献度分析；E 图为 CXCL 信号通路相关基因表达水平小提琴图。

图 5 CXCL 信号通路在小鼠未移植心脏中 DC、B 细胞与 T 细胞之间的胞间通讯分析

Figure 5 Analysis of intercellular communication between DC, B cells and T cells of CXCL signaling pathway in non-transplanted mouse hearts

大的受配体对是 CXCL16-CXCR6，之后依次为 CXCL9-CXCR3 和 CXCL10-CXCR3（图 6D）。HTx 组中 CXCL 信号通路的相关基因高表达在 GC-L B、cDC2 和 moDC（图 6E）。

3 讨论

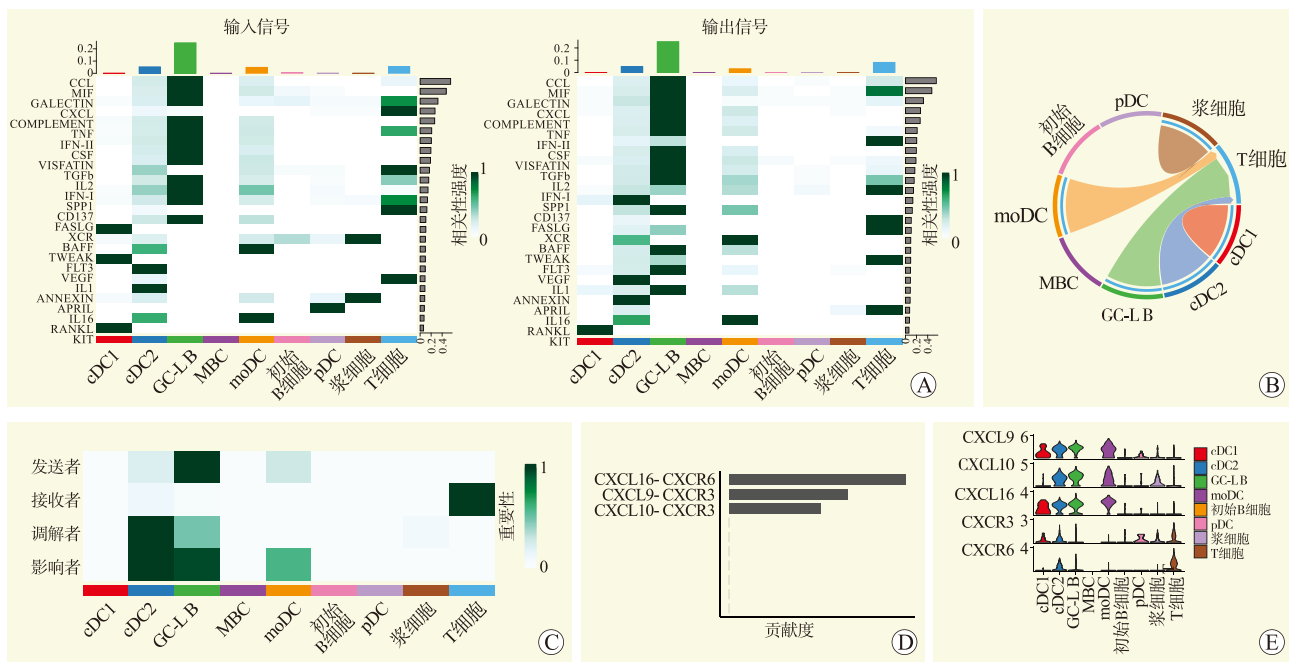
本研究收集了来自健康小鼠心脏和心脏移植急性排斥反应早期（术后 5 d）小鼠心脏移植中 6 219 个 B 细胞和 1 718 个 DC，从中命名了 4 个 B 细胞亚群和 4 个 DC 亚群^[23-28]。在 GO 差异基因功能富集分析中分别对不同细胞亚群的功能给出注释。本研究中单细胞测序数据与经典学说具有一致性^[3,8,17-18]。

初始 B 细胞经过移植抗原激活后，大量增殖形成 GC-L B，在本研究中体现在心脏移植后（HTx 组）GC-L B 数量占比增加至 80% 以上，初始 B 细胞占比减少。GC-L B 经过反复加工、重组、分化，最终达到 MBC 和浆细胞的阶段，并离开 GC，进入淋巴循环。体现在 MBC 在 HTx 组中数量急剧减少，我们对此给出猜测，在心脏移植急性排斥反应早期，接受移植抗原刺激后，MBC 快速响应免疫应答并分化，

最终快速消耗；而浆细胞在心脏移植急性排斥反应早期数量占比均上升，这一变化可能与 AMR 有关，而供者特异性抗体（donor specific antibody, DSA）是引起 AMR 的重要原因^[29-32]。移植后供者组织抗原的出现使得 GC-L B 大量增殖，并不断发育分化为浆细胞，进而分泌 DSA，促进 AMR。

在心脏移植急性排斥反应早期接触移植抗原后，cDC2 发生大量增殖，通过 MHC II 类抗原提呈并共刺激活化初始 CD4⁺T 细胞^[33]，促进心脏移植急性排斥反应进程。在本研究中表现为 HTx 组中 cDC2 细胞增幅超过 40%，同时 cDC2 是心脏移植 DC 亚群中唯一数量增多的亚群。另一个值得关注的亚群为 moDC 亚群，其 GO 功能注释与炎症细胞募集有关，相关文献中对该类细胞的功能解释为炎症期募集^[34-36]，单细胞测序分析结果与之相匹配。且在本研究中，moDC 亚群在 HTx 组中仍然占据重要部分。

为研究心脏移植急性排斥反应期中 DC 与 B 细胞之间抗原提呈能力的差异，本研究采用胞间通讯分析二者与 T 细胞之间的交流强度模拟提呈交流过程。最终发现在心脏移植急性排斥反应早期，指向 T 细胞



注：A 图为 DC、B 细胞与 T 细胞输入、输出信号分析热图；B 图为 CXCL 信号通路通讯弦图（指向 T 细胞）；C 图为 CXCL 信号通路通讯角色分析热图；D 图 CXCL 信号通路中受配体贡献度分析；E 图为 CXCL 信号通路相关基因表达水平小提琴图。

图 6 CXCL 信号通路在小鼠心脏移植急性排斥反应早期 DC、B 细胞与 T 细胞之间的胞间通讯分析

Figure 6 Analysis of intracellular communication among DC, B cells and T cells by CXCL signaling pathway in the early stage of acute rejection of mouse heart transplantation

的聚合通信网络分析中，与 DC 各亚群相比，GC-L B 呈现更高强度的细胞互作。此外，还发现在 T 细胞的输入信号中，CXCL 信号通路在 NH 组和 HTx 组均占到重要作用，且 CXCL16-CXCR6 对在 CXCL 信号通路中贡献度最为显著，该受配体对或将成为心脏移植急性排斥反应中的关键研究方向^[37-38]。

另外，通过研究 CXCL 信号通路相关通讯内容，发现在 NH 组中 MBC 是主要的 CXCL 信号发出者，而在 HTx 组中，主要信号发出者转变为 GC-L B，并高表达 CXCL 信号通路关键基因。由此可见，在心脏移植急性排斥反应早期指向 T 细胞的胞间通讯中，与 DC 相比，B 细胞均占据更高的通讯数量和权重。同时，在小鼠心脏移植前后 DC 流式分析中，B 细胞和 DC 占比在心脏移植急性排斥反应早期均呈现显著升高。但经典学说中仍然以 DC 为抗原提呈能力最强的专职 APC，对本研究中的发现，我们猜测在心脏移植急性排斥反应早期，B 细胞与 T 细胞之间的交流不仅局限于 B 细胞将 MHC II 类分子提呈给 T 细胞，还会接收来自活化的 T 细胞亚群所分泌的细胞因子，从而达成 B 细胞进一步的增殖分化^[14]，

而后分化为浆细胞分泌 DSA，加重 AMR。B 细胞与 T 细胞之间的双向互作较 DC 更为频繁，所以在胞间通讯受配体互作分析中展现出强度更大的交流。本研究的发现也提示我们，在心脏移植急性排斥反应早期靶向抑制 B 细胞抗原提呈，可能会更有效地抑制心脏移植急性排斥反应进程。

综上所述，本研究发现在心脏移植急性排斥反应早期指向 T 细胞的胞间通讯中，与 DC 相比，B 细胞均占据更高的通讯数量和权重。其中，GC-L B 是心脏移植急性排斥反应早期与 T 细胞胞间通讯相关的关键输入信号 CXCL 信号的主要发出者。这为预防急性排斥反应早期的靶向细胞提供借鉴，提示在心脏移植急性排斥反应早期选择性抑制 B 细胞的抗原提呈，可能会更有效地抑制心脏移植急性排斥反应。但本研究以单细胞测序生物信息学分析为主要技术手段，存在一定局限。针对 CXCL 信号通路及 CXCL16-CXCR6 受配体对在心脏移植急性排斥反应早期的贡献度仍需更多生物学验证实验论证；且本研究只是小鼠单细胞测序样本的数据，有待在临床患者中进行验证。

参考文献:

- [1] HENNESSY C, LEWIK G, CROSS A, et al. Recent advances in our understanding of the allograft response[J]. *FacRev*, 2021, 10: 21. DOI: 10.12703/r/10-21.
- [2] SHORT S, LEWIK G, ISSA F. An immune atlas of T cells in transplant rejection: pathways and therapeutic opportunities[J]. *Transplantation*, 2023, 107(11): 2341-2352. DOI: 10.1097/TP.0000000000004572.
- [3] ZHUANG Q, LIU Q, DIVITO SJ, et al. Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12623. DOI: 10.1038/ncomms12623.
- [4] SUN K, FAN C, ZHANG J, et al. Prevention of alloimmune rejection using XBP1-deleted bone marrow-derived dendritic cells in heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2022, 41(12): 1660-1671. DOI: 10.1016/j.healun.2022.08.010.
- [5] YUAN S, CHEN Y, ZHANG M, et al. Overexpression of miR-223 promotes tolerogenic properties of dendritic cells involved in heart transplantation tolerance by targeting Irak1[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 676337. DOI: 10.3389/fimmu.2021.676337.
- [6] WANG B, ZHOU Q, LI T, et al. Preventing alloimmune rejection using circular RNA FSCN1-silenced dendritic cells in heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2021, 40(7): 584-594. DOI: 10.1016/j.healun.2021.03.025.
- [7] 张轶西, 宋飞玉, 郭义文, 等. Dectin-1 过表达对树突状细胞成熟的抑制作用及其对小鼠心脏移植免疫耐受的诱导作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(4): 994-1000. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20230421. ZHANG YX, SONG FY, GUO YW, et al. Inhibitory effect of Dectin-1 over-expression on maturation of dendritic cells and its induction effect on immune tolerance of heart allografts in mice[J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2023, 49(4): 994-1000. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20230421.
- [8] YIN X, CHEN S, EISENBARTH SC. Dendritic cell regulation of T helper cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2021, 39: 759-790. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101819-025146.
- [9] GUILLIAMS M, GINHOUX F, JAKUBZICK C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(8): 571-578. DOI: 10.1038/nri3712.
- [10] 冯萌, 林玮. 树突状细胞亚群及其在疾病中的作用研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(16): 2020-2025. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.16.019. FENG M, LIN W. Advances in dendritic cell subsets and their role in diseases[J]. *Chin J Immunol*, 2022, 38(16): 2020-2025. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.16.019.
- [11] HEEGER PS, HARO MC, JORDAN S. Translating Bcell immunology to the treatment of antibody-mediated allograft rejection[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2024, 20: 218-232. DOI: 10.1038/s41581-023-00791-0.
- [12] LOUIS K, MACEDO C, LEFAUCHEUR C, et al. Adaptive immune cell responses as therapeutic targets in antibody-mediated organ rejection[J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(3): 237-250. DOI: 10.1016/j.molmed.2022.01.002.
- [13] BAERT L, MAHMUDUL HM, STEGALL M, et al. B cell-mediated immune regulation and the quest for transplantation tolerance[J]. *Transplantation*, 2024, DOI: 10.1097/TP.0000000000004948[Epub ahead of print].
- [14] KWUN J, MANOOK M, PAGE E, et al. Crosstalk between T and B cells in the germinal center after transplantation[J]. *Transplantation*, 2017, 101(4): 704-712. DOI: 10.1097/TP.0000000000001588.
- [15] KENNEDY DE, OKOREEH MK, MAIENSCHNEICLINE M, et al. Novel specialized cell state and spatial compartments within the germinal center[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(6): 660-670. DOI: 10.1038/s41590-020-0660-2.
- [16] MAYER CT, GAZUMYAN A, KARA EE, et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center[J]. *Science*, 2017, 358(6360): eaao2602. DOI: 10.1126/science.aao2602.
- [17] URSCHEL S. Not just for the birds: the emerging role of B cells in transplant immunology[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2021, 40(10): 1133-1134. DOI: 10.1016/j.healun.2021.07.006.
- [18] DIJKE EI, PLATT JL, BLAIR P, et al. B cells in transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2016, 35(6): 704-710. DOI: 10.1016/j.healun.2016.01.1232.
- [19] AWAD MA, SHAH A, GRIFFITH BP. Current status and outcomes in heart transplantation: a narrative review[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2022, 23(1): 11. DOI: 10.31083/j.rcm2301011.
- [20] BOULET J, KELLEHER J, WANDERLEY MRBJ, et al. Outcomes of untreated subclinical antibody-mediated rejection after heart transplantation[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2023, 81: 48-53. DOI: 10.1016/j.pcad.2023.10.001.
- [21] CHRYSAKIS N, MAGOULIOTIS DE, SPILIOPOULOS K, et al. Heart transplantation[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(2): 558. DOI: 10.3390/jcm13020558.
- [22] HAN J, MOAYEDI Y, HENRICKSEN EJ, et al. Primary graft dysfunction is associated with development of early cardiac allograft vasculopathy, but not other immune-mediated complications, after heart transplantation[J]. *Transplantation*, 2023, 107(7): 1624-1629. DOI: 10.1097/TP.0000000000004551.
- [23] LI T, ZHANG Z, BARTOLACCI JG, et al. Graft IL-33 regulates infiltrating macrophages to protect against chronic rejection[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5397-5412. DOI: 10.1172/JCI133008.
- [24] WEISEL NM, JOACHIM SM, SMITA S, et al. Surface phenotypes of naive and memory B cells in mouse and human tissues[J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(1): 135-145.

- DOI: 10.1038/s41590-021-01078-x.
- [25] KING HW, ORBAN N, RICHES JC, et al. Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics[J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(56): eabe6291. DOI: 10.1126/sciimmunol.abe6291.
- [26] XIA J, XIE Z, NIU G, et al. Single-cell landscape and clinical outcomes of infiltrating B cells in colorectal cancer[J]. *Immunology*, 2023, 168(1): 135-151. DOI: 10.1111/imm.13568.
- [27] SATPATHY AT, WU X, ALBRING JC, et al. Re(de)fining the dendritic cell lineage[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(12): 1145-1154. DOI: 10.1038/ni.2467.
- [28] WORBS T, HAMMERSCHMIDT SI, FÖRSTER R. Dendritic cell migration in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(1): 30-48. DOI: 10.1038/nri.2016.116.
- [29] SEE SB, MANTELL BS, CLERKIN KJ, et al. Profiling non-HLA antibody responses in antibody-mediated rejection following heart transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2020, 20(9): 2571-2580. DOI: 10.1111/ajt.15871.
- [30] COUTANCE G, ZOUHRY I, LOUPY A, et al. Correlation between microvascular inflammation in endomyocardial biopsies and rejection transcripts, donor-specific antibodies and graft dysfunction in antibody-mediated rejection[J]. *Arch Cardiovasc Dis Suppl*, 2022, 14(1): 123-124. DOI: 10.1016/j.acvdsp.2021.09.277.
- [31] COSTA D, PICASCIA A, GRIMALDI V, et al. Role of HLA matching and donor specific antibody development in long-term survival, acute rejection and cardiac allograft vasculopathy[J]. *Transpl Immunol*, 2024, 83: 102011. DOI: 10.1016/j.trim.2024.102011.
- [32] 杨守国. 心脏移植术后抗体介导排斥反应研究现况与进展[J/OL]. *中华移植杂志(电子版)*, 2022, 16(5): 266-276. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-3903.2022.05.002.
- YANG SG. Current status and progress on antibody-mediated rejection in heart transplantation[J/OL]. *Chin J Transplant (Electr Edit)*, 2022, 16(5): 266-276. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-3903.2022.05.002.
- [33] ANDERSON DA 3RD, MURPHY KM, BRISEÑO CG. Development, diversity, and function of dendritic cells in mouse and human[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(11): a028613. DOI: 10.1101/cshperspect.a028613.
- [34] BOSTEELS C, NEYT K, VANHEERSWYNGHELMS M, et al. Inflammatory type 2 cDCs acquire features of cDC1s and macrophages to orchestrate immunity to respiratory virus infection[J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 1039-1056. e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.04.005.
- [35] ZHAO Y, GAO C, LIU L, et al. The development and function of human monocyte-derived dendritic cells regulated by metabolic reprogramming[J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 114(3): 212-222. DOI: 10.1093/jleuko/qiad062.
- [36] BACKER RA, PROBST HC, CLAUSEN BE. Classical DC2 subsets and monocyte-derived DC: delineating the developmental and functional relationship[J]. *Eur J Immunol*, 2023, 53(3): e2149548. DOI: 10.1002/eji.202149548.
- [37] JIANG X, SHIMAOKA T, KOJO S, et al. Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance[J]. *J Immunol*, 2005, 175(4): 2051-2055. DOI: 10.4049/jimmunol.175.4.2051.
- [38] JIANG X, SUN W, ZHU L, et al. Expression of CXCR6 on CD8⁺ T cells was up-regulated in allograft rejection[J]. *Transpl Immunol*, 2010, 22(3/4): 179-183. DOI: 10.1016/j.trim.2009.12.001.

(收稿日期: 2024-04-23)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)