

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2022.04.006

转录组测序分析 NSD2 在骨髓 B 细胞发育中的作用机制

张伟¹, 王金名², 马春晓¹, 冯文心¹, 徐悦¹, 刘长伟¹, 高维强^{1,2}

(1. 上海交通大学生物医学工程学院, MED-X 研究院, 上海 200030; 2. 上海交通大学医学院, 仁济医院干细胞研究中心, 上海 200127)

【摘要】 免疫缺陷主要由免疫细胞发育、分化和功能异常导致。已有研究表明, 表观遗传调控对于免疫细胞的正常发育具有重要作用。该研究发现组蛋白甲基转移酶 NSD2 对于 B 细胞的发育起着重要的调控作用, 并且利用转录组测序找到了调节 B 细胞发育的重要通路。该研究为免疫缺陷病的治疗提供了新的治疗靶点。

【关键词】 组蛋白甲基转移酶; B 细胞; 转录组测序

【中图分类号】 Q756, R392.1, R318.04

【文献标志码】 A

文章编号: 1674-1242(2022)04-0230-08

Transcriptome Sequencing Analysis of the Role of NSD2 in Bone Marrow B Cell Development

ZHANG Wei¹, WANG Jinming², MA Chunxiao¹, FENG Wenxin¹, XU Yue¹, LIU Changwei¹, GAO Weiqiang^{1,2}

(1. MED-X Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Biomedical Engineering, Shanghai 200030, China

2. Stem Cell Research Center, Ren Ji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

【Abstract】 Primary immunodeficiency is mainly caused by abnormal development, differentiation and function of immune cells. Studies have shown that epigenetic regulation plays an important role in the development of immune cells. The study found that histone methyltransferase NSD2 plays an important role in the regulation of B cell development, and found an important pathway regulating B cell development by transcriptome sequencing. This study provides a new therapeutic target for the treatment of primary immunodeficiency diseases.

【Key words】 Histone methyltransferase; B cells; Transcriptome Sequencing

1 引言

免疫缺陷病 (Immunodeficiency Disease, IDD) 是一种由于先天遗传缺陷等因素造成的免疫系统功能障碍或后天因素导致的临床综合征^[1]。免疫缺陷病患者的免疫系统无法发挥正常功能, 临床表现为反复或持续感染, 同时常常伴随过敏

性疾病、自身免疫病、恶性肿瘤等^[2-4]。按照其发病原理, 免疫缺陷病可分为原发性免疫缺陷病 (Primary Immunodeficiency Disease, PID) 和获得性免疫缺陷病 (Acquired Immunodeficiency Disease, SIDD)^[2]。其中, 原发性免疫缺陷病由于种类繁多、异质性强, 给诊断和治疗带来了

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 上海市自然科学基金 (21JC1404100) 资助项目

作者简介: 张伟 (1998—), 男, 安徽省蚌埠市人, 硕士研究生, 从事表观遗传与疾病的发生发展研究

通信作者: 高维强, 男, 教授, 博士生导师, 电话 (Tel.): 86-21-34207854; E-mail: gao.weiqiang@sjtu.edu.cn

巨大困难^[5]。在原发性免疫缺陷病患者中,原发性B细胞缺陷病患者占比约为50%^[1]。因此,明确B细胞发育的分子机制对原发性免疫缺陷病的正确认识和治疗有着重要意义。

B细胞在骨髓中的早期发育对维持免疫系统的正常功能至关重要^[6,7]。B细胞在骨髓中的早期发育经历了前祖B细胞(pre-pro-B cell)、祖B细胞(pro-B cell)、前B细胞(pre-B cell)、未成熟B细胞(imature B cell)和成熟B细胞(mature B cell)等几个阶段^[8]。B细胞的异常发育会导致免疫缺陷^[9]。已有研究表明,免疫缺陷不仅与遗传因素有关,还与DNA甲基化和组蛋白修饰等表观遗传调控有关^[10],表观遗传调控的功能异常对免疫缺陷病的发生发展至关重要。

NSD2又称Wolf-Hirschhorn综合征候选蛋白1(Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1, WHSC1)或多发性骨髓瘤SET结构域蛋白(Multiple Myeloma SET Domain-containing Protein, MMSET)^[11],是核受体结合域NSD家族成员之一^[12]。作为表观遗传调控因子,NSD2可以催化组蛋白H3K36位点的二甲基化(H3K36me2)^[13]。已有研究表明,NSD2在血液细胞的发育中扮演着重要角色。Chen等发现,NSD2可以通过促进B细胞和滤泡树突状细胞之间的黏附作用来确保生发中心的选择性作用^[14]。Long等通过研究发现,组蛋白甲基转移酶NSD2是滤泡辅助性T细胞分化所必需的^[11]。Nguyen等探究了NSD2在小鼠B细胞Ig类别转换中的作用,发现缺失NSD2会抑制抗体类别转换重组^[15]。但是,NSD2在骨髓B细胞早期发育中的作用鲜有报道。

本研究利用NSD2骨髓缺陷性小鼠探究了NSD2对骨髓B细胞早期发育的影响,研究发现NSD2的缺失会抑制骨髓中前祖B细胞向祖B细胞的转化,从而影响B细胞在骨髓的发育。同时本研究利用转录组测序技术探究了NSD2影响骨髓B细胞早期发育的关键分子通路。研究结果揭示了NSD2对于骨髓B细胞早期发育的重要作用,将为免疫缺陷疾病的药物研发提供重要的理论依据。

2 资料和方法

2.1 骨髓NSD2敲除小鼠的构建

本研究使用Mx1驱动的Cre(Mx1-Cre)构

建骨髓细胞敲除的小鼠模型。Mx1-Cre是一种受干扰素诱导表达的重组酶,可以特异识别并敲除LoxP标记的基因位点。本研究通过将Mx1-Cre工具鼠与LoxP标记NSD2(NSD2 F/F)的小鼠杂交两代后得到基因型为Mx1-Cre;NSD2 F/F的小鼠,同窝的NSD2 F/F小鼠作为对照组。在小鼠8周大时,使用聚肌胞苷酸(PIPC)以10 mg/kg体重进行腹腔注射,两周后处死小鼠进行后续试验。

2.2 骨髓及外周血免疫细胞提取

用脊髓脱臼法处死小鼠,取小鼠下肢股骨和胫骨,并剔除附着的肌肉及其他软组织。用剪刀剪开股骨、胫骨的两端,用装满PBS的1 ml注射器冲出骨髓,收集在10 cm皿中并用枪头反复吹吸将骨髓吹散。随后使用ACK Lysing Buffer裂解悬液中的红细胞,离心,PBS重悬后获得小鼠骨髓细胞。

利用摘眼球取血法将小鼠外周血收集到1.5 ml的离心管中,随后使用ACK Lysing Buffer裂解红细胞,离心,PBS重悬后获得小鼠外周血细胞。

2.3 流式细胞染色及检测

对于细胞表面抗原的染色,从外周血或骨髓分离细胞,与对应的抗体在冰上孵育30分钟,并用染色缓冲液(含2% FBS, 0.1% NaN₃和50 mM EDTA的PBS)洗涤。对于细胞内抗原染色,细胞在染色前用1%多聚甲醛在PBS中固定,并用冷甲醇透化。流式细胞染色的配色方案按照前人所述^[16,17]。在Beckman Cytoflex上进行流式数据采集,用FlowJo 10软件进行分析。

2.4 反转录和实时荧光定量PCR

使用RNA提取试剂盒(74106, Qiagen)从骨髓细胞中提取RNA,并利用cDNA反转录试剂盒(RR047A, Takara)进行反转录,将得到的cDNA产物用RNase free H₂O稀释20倍进行后续的荧光定量PCR实验。使用实时荧光定量PCR试剂盒(RR4210, Takara)进行定量PCR分析,每个PCR产物都通过熔解曲线分析进行质量控制,以GAPDH作为定量PCR分析的内参。

2.5 蛋白印迹实验

用含有蛋白酶抑制剂(78410, Thermo)的RIPA裂解液(89901, Thermo)将骨髓细胞裂解,离心后吸取上清液中的蛋白。使用BCA法定量蛋白浓度后,加入SDS-PAGE上样缓冲液于98℃加热套中加热10分钟,进行蛋白变性处

理。将等量的蛋白质在十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移到 PVDF 膜上。用抗体 Histone 3 (9715, Cell Signaling Technology) 作为内参, 用 NSD2 (ab75359, Abcam) 检测目的蛋白。

2.6 免疫组织化学染色

取小鼠股骨置于 4% PFA 中固定 24 h, 随后用 0.5 M 的 EDTA 脱钙两周, 之后采用标准方法进行石蜡包埋, 切片。在进行免疫组化染色前, 将载玻片置于 60℃ 烘箱烘烤 2 h, 随后利用 NSD2 (ab75359, Abcam) 抗体检测目的蛋白。

2.7 RNA-Seq 数据比对

通过 FAST - QC 对原始测序数据进行评估, 包括核苷酸质量分布、位置特异性测序质量、GC 含量、PCR 重复比例、kmer 频率等。

将过滤后测序序列 (clean data) 采用 Hisat2 算法比对到测序物种 (Taxonomy ID: 10090) 对应的参考基因组 (mm10_Ensembl) 上, 来确定测序序列在基因组上的定位情况。

2.8 RNA-Seq 表达差异分析

RPKM (Reads Per Kb per Million reads) 用于从 RNA - Seq 数据中计算基因表达。分析显著差异基因筛选的原则为: (1) $\log_2(FC) > 0.3785$ 或 $\log_2(FC) < -0.3785$; (2) $Pvalue < 0.05$ 。

2.9 RNA-Seq 差异基因的 GO 分类, KEGG 和 GSEA 富集分析

基于数据库, 将分析得到的差异基因分别从生物学过程 (Biological Process, BP)、分子功能 (Molecular Function, MF) 和细胞组分 (Cellular Component, CC) 三个层面进行 GO 分类, 得到基因参与的所有 GO, 采用 Fisher 检验计算每个 GO 的显著性水平 (P-Value), 从而筛选出差异基因富集的显著性 GO。

将筛选出的差异基因基于 KEGG 数据库进行通路注释, 得到差异基因参与的所有通路, 采用 Fisher 检验计算得到通路的显著性水平 (P-Value), 从而筛选出差异基因富集的显著性通路。

利用 GSEA 4.3.2 软件对测序得到的表达文件进行 GSEA 分析, 使用的基因集 [REACTOME_SIGNALING_BY_THE_B_CELL_RECEPTOR_BCR (MM15717); IVANOVA_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL (MM667)] 来自 GSEA 官网。

2.10 统计学分析

实验所用小鼠数量根据同一模型中的预实验确定。数据采用 Graphpad Prism 6 软件以平均值 \pm SEM 表示。采用双侧 t 检验计算 p 值。显著性水平均为 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; N.S, 不显著。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。研究中的 'n' 表示生物学重复次数。

3 实验结果

3.1 NSD2 骨髓敲除小鼠模型的构建

利用聚肌胞苷酸 (PIP3) 作为诱导 Mx1-Cre 表达的诱导剂 [图 1 (a)]。同窝的 NSD2 F/F 小鼠作为对照鼠。Q-PCR 结果显示, 实验组小鼠骨髓细胞 NSD2 的 mRNA 表达水平显著下降 [图 1 (b)]。利用 WB 检测实验组与对照组小鼠骨髓细胞的 NSD2 的蛋白表达量, 实验组小鼠骨髓细胞的 NSD2 的蛋白含量显著下降 [图 1 (c)]。最后, 取小鼠股骨切片并进行 NSD2 的免疫组化染色。结果显示, 与对照组小鼠相比, 实验组小鼠骨髓切面的 NSD2 阳性细胞数量显著下降 [图 1 (d)]。以上结果证明 NSD2 骨髓敲除小鼠模型的构建成功了。

3.2 NSD2 骨髓缺失导致骨髓成熟 B 细胞与 T 细胞下降

为了探究 NSD2 对免疫细胞发育的影响, 本实验首先分析了小鼠骨髓 B 细胞、T 细胞和髓系来源抑制性细胞的比例。利用流式细胞仪检测小鼠骨髓 B 细胞和 T 细胞的含量。结果显示, 与对照组小鼠相比, 实验组小鼠骨髓成熟 T 细胞和 B 细胞的含量有下降趋势 [图 2 (a)]。除此之外, NSD2 的缺失使髓系来源抑制性细胞有上升趋势 [图 2 (b)]。

3.3 NSD2 骨髓缺失抑制 B 细胞发育

考虑到骨髓是 B 细胞发育成熟的地方, 为了进一步探究 NSD2 对 B 细胞发育的影响, 本研究随后对 B 细胞在骨髓中发育的不同阶段进行了探究。B 细胞在骨髓中的发育会经历前祖 B 细胞、祖 B 细胞、前 B 细胞、未成熟 B 细胞和成熟 B 细胞等几个阶段。本实验提取了小鼠骨髓细胞, 利用流式细胞仪检测了实验组与对照组小鼠骨髓 B 细胞各阶段的细胞比例。结果显示, 与对照组小鼠相比, 实验组小鼠前祖 B 细胞比例显著上升, 而祖 B 细胞和前 B 细胞比例则显著下降 [图 3 (a)]。此结果提示 NSD2 的

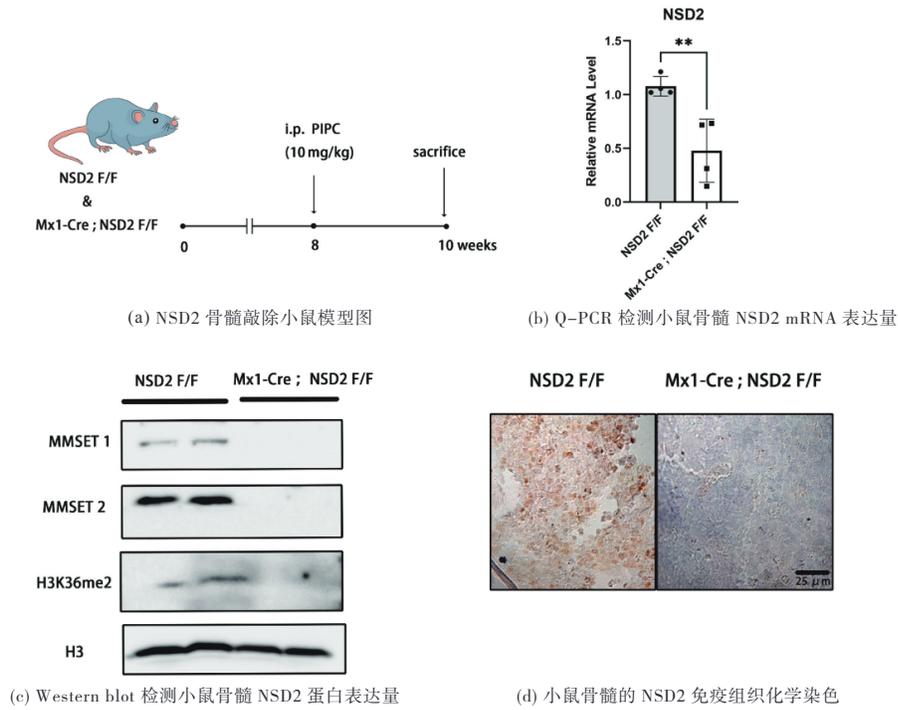


图 1 NSD2 骨髓敲除小鼠模型的构建及验证

Fig.1 Construction and verification of NSD2 bone marrow knockout mice model

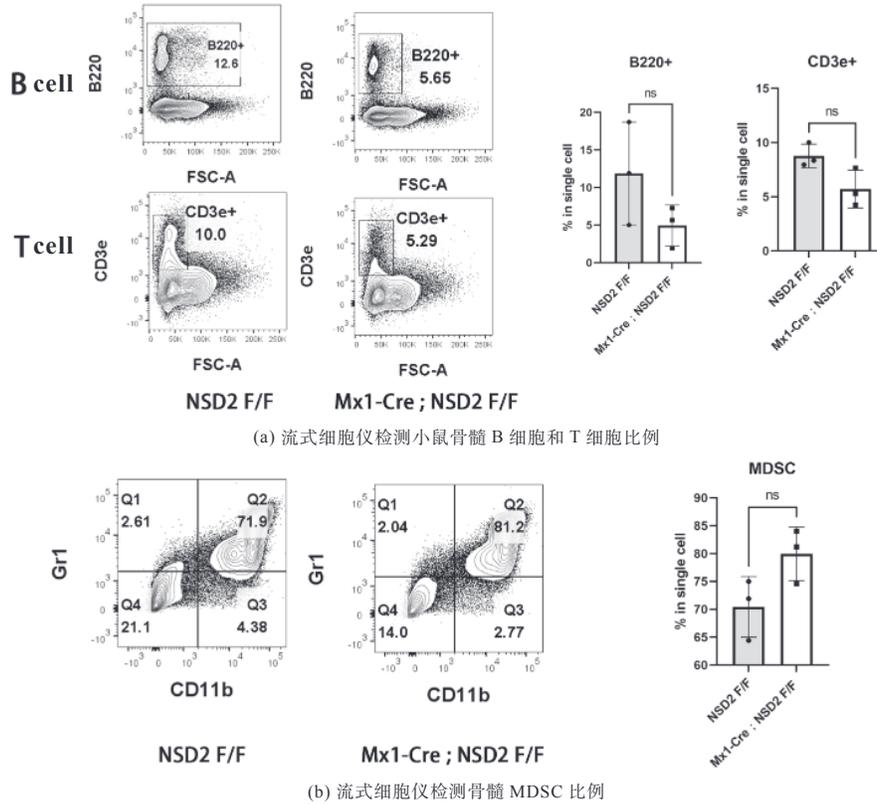


图 2 流式检测 NSD2 骨髓敲除小鼠骨髓 B 细胞与 T 细胞

Fig.2 Flow cytometry detection of bone marrow B cells and T cells in NSD2 bone marrow knockout mice

缺失可能会导致前祖 B 细胞向祖 B 细胞发育的过程受阻。以上结果说明 NSD2 对骨髓 B 细胞的早期发育发挥着重要作用。

同时，本研究也探究了 NSD2 缺失对骨髓巨噬细胞的影响。结果显示，NSD2 缺失使骨髓巨噬细胞数量上升 [图 3 (b)]。

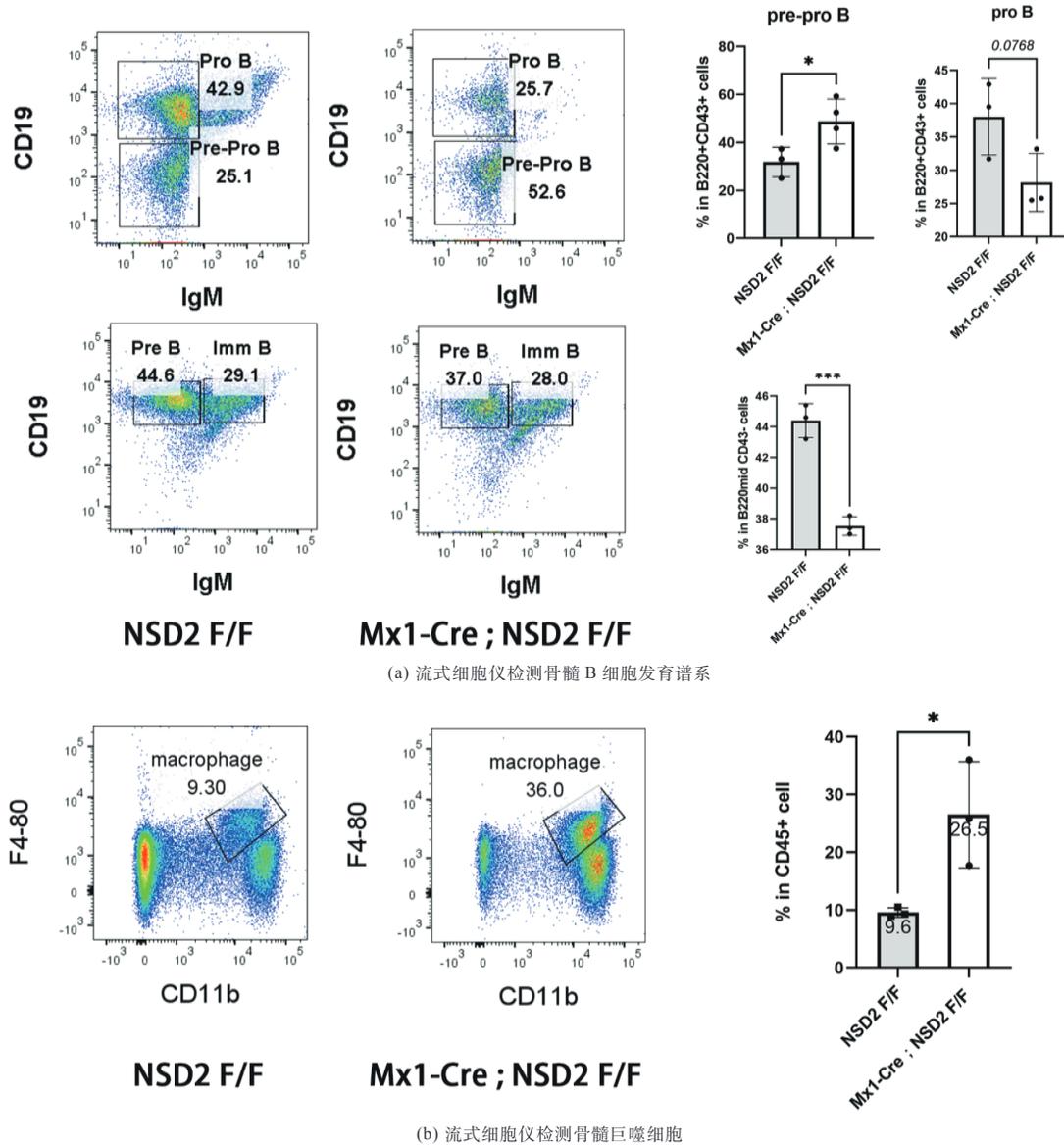


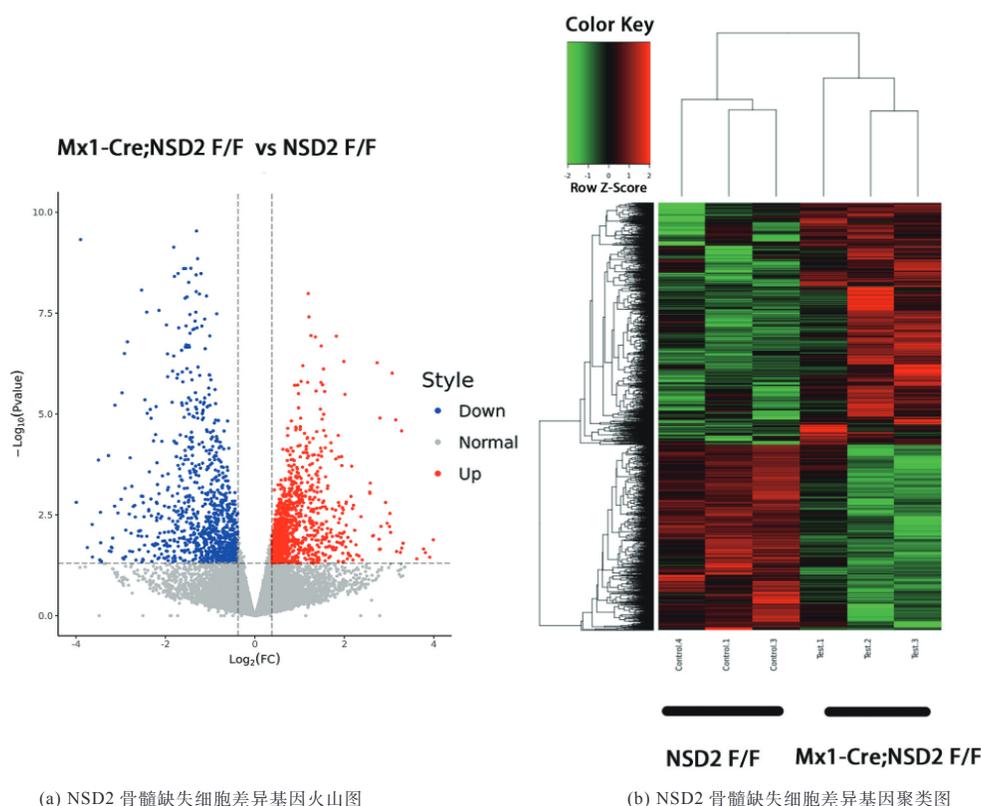
图 3 流式检测 NSD2 骨髓敲除小鼠骨髓 B 细胞发育谱

Fig.3 Flow cytometry detection of bone marrow B cell development in NSD2 bone marrow knockout mice

3.4 NSD2 骨髓缺失细胞差异基因的筛选

前面的结果表明，NSD2 缺失会使骨髓中 B 细胞的发育受阻，为了分析 NSD2 在骨髓 B 细胞发育过程中的作用机制，本研究提取了小鼠骨髓细胞 mRNA 进行转录组测序分析，并在转录组分析中对差异表达基因进行总结。通过 DEseq 软件筛选出样本中表达明显差异的基因，筛选标准按照经验选

择 $|\text{Fold Change}| > 1.3$ 并且 $p \leq 0.05$ 。结果显示，NSD2 骨髓缺失实验组与对照组的差异基因共有 18 407 个，其中表达升高的基因有 1 285 个，表达下降的基因有 987 个 [图 4 (a)]。本研究进一步对获得的差异基因进行聚类分析，利用热图进行可视化 [图 4 (b)]。聚类热图显示，实验组与对照组样品相关性较好。



(a) NSD2 骨髓缺失细胞差异基因火山图

(b) NSD2 骨髓缺失细胞差异基因聚类图

图4 NSD2 骨髓缺失细胞差异基因的筛选

Fig.4 Screening of differentially expressed genes in NSD2 bone marrow-deficient cells

3.5 GO 功能富集分析结果

为了进一步分析 NSD2 在骨髓 B 细胞发育过程中的作用机制, 探究 NSD2 在骨髓 B 细胞发育过程中参与的生物过程, 本研究运用 GO 功能富集分析, 使用 clusterProfiler 软件进行差异基因的 GO 富集分析。GO 是描述基因功能的综合性数据库, 可分为生物过程 (Biological Process, BP)、细胞组成 (Cellular Component, CC) 和分子功能 (Molecular Function, MF) 三个部分, 可以揭示基因及其表达产物可能的生物学功能^[18]。分析结果显示, 显著富集的 GO 项目共有 444 项, 其中, 生物过程 348 项, 细胞组成 63 项, 分子功能 33 项。在分析结果中, 本研究选择了以上三个方面中每个方面都最显著的前 15 个项目, 包括初始免疫反应、免疫系统反应、B 细胞受体信号通路、受体结合和免疫球蛋白复合物循环等过程 [图 5 (a)、(b)、(c)]。这说明 NSD2 可能调控上述生物学功能, 从而参与骨髓 B 细胞的早期发育。

3.6 KEGG 富集分析结果

为了进一步了解 NSD2 参与 B 细胞发育的生物学功能, 本研究还进行了 KEGG 通路富集分析。KEGG 是整合了基因组、化学和系统功能信息的综合性数据库^[19]。分析结果显示, 在骨髓细胞中敲除 NSD2 后差异表达基因显著富集的代谢过程有造血细胞谱系、B 细胞受体信号通路、NOD 样受体信号通路等 [图 6 (a)]。

考虑到造血细胞谱系和 B 细胞受体信号通路在富集到的 KEGG 通路中处于显著的位置, 本研究随后对该通路富集到的信号分子进行 GSEA 分析, 结果显示造血细胞谱系和 B 细胞受体信号通路在 NSD2 敲除小鼠中下调 [图 6 (b)]。

以上结果提示, NSD2 可能通过造血细胞谱系和 B 细胞受体信号通路这两个信号通路调节骨髓中 B 细胞的早期发育。

4 结论

目前, 有许多研究表明, 当 B 细胞在前 B 细

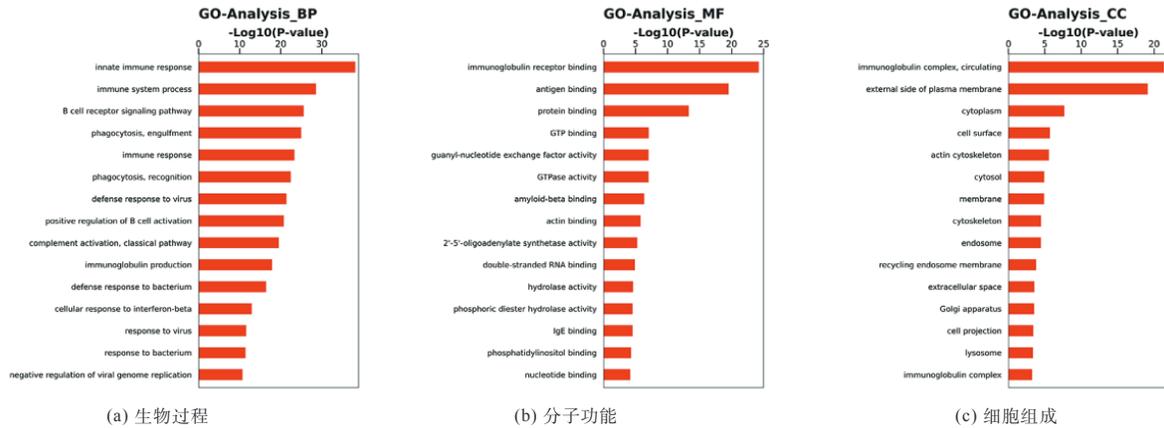


图5 GO功能富集分析

Fig.5 GO functional enrichment analysis

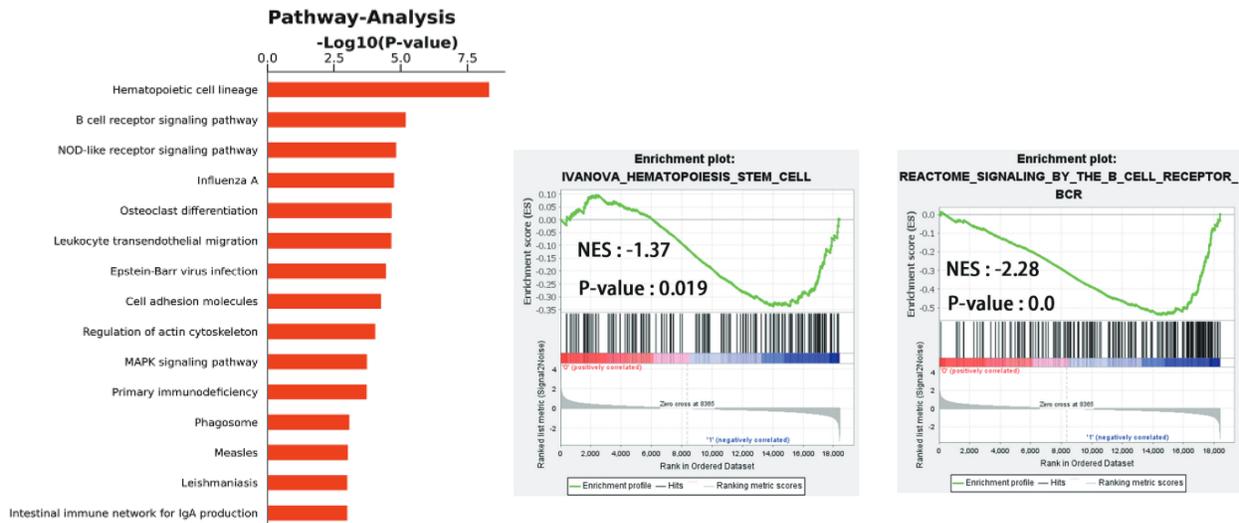


图6 差异表达基因功能分类图

Fig.6 Functional classification of differentially expressed genes

胞阶段发育受阻时,就会导致原发性免疫缺陷发生。例如,通过 pre_BCB 使细胞的信号转导受阻,从而导致成熟 B 细胞数量下降,进一步抑制免疫球蛋白合成导致原发性免疫缺陷病^[20]。与继发性免疫缺陷病患者相比,原发性免疫缺陷病患者常见于儿童^[21]。患有原发性免疫缺陷病的儿童免疫力会下降,并且容易出现反复感染,甚至危及生命^[5]。由于特定的遗传缺陷导致的免疫系统不同功能的紊乱,原发性免疫缺陷病患者的临床表现可能有很大差异^[5, 22],因此给原发性免疫缺陷病的诊断和治疗带来了巨大的挑战。现阶段,治愈原发性免疫缺陷病患者的手段主要以造血干细胞移植为主,但是找到合适的造血干细胞供源对于

患者来说较为困难。因此,亟须开发相关分子靶点药物来应对原发性免疫缺陷病。

本研究发现 NSD2 作为一个表观遗传调控因子,在骨髓 B 细胞的发育中发挥着重要的作用。本研究首先构建了骨髓 NSD2 敲除小鼠模型,在分析小鼠骨髓的免疫细胞的比例时发现,NSD2 的缺失会导致前祖 B 细胞向祖 B 细胞发育过程受阻。随后,利用转录组测序技术发现,NSD2 缺失使小鼠骨髓细胞中造血细胞谱系和 B 细胞受体信号通路下调,暗示 NSD2 可能通过以上两个通路参与 B 细胞发育过程的调控作用。

通过转录组测序,本研究发现在造血细胞谱系通路中,一些参与 B 细胞在骨髓发育成熟的基

因 (CD38、CD127、HLA-DR、CD19、CD22、CD25、CD20、CD21、CD23) 在 NSD2 敲除小鼠中显著低表达, 暗示 NSD2 可能通过调节这些基因影响 B 细胞的发育和成熟。本研究还发现 NSD2 敲除小鼠骨髓酪氨酸蛋白激酶 FLT3 表达显著降低, 后者可以调节造血祖细胞和树突状细胞的分化、增殖和存活^[23]。除此之外, 本研究还发现 NSD2 敲除小鼠骨髓细胞 B 细胞受体信号通路显著下调, 这可能导致 B 细胞增殖和分化成产生抗体的细胞或记忆细胞的能力下降。但是, NSD2 直接调控上述通路中的具体的靶基因还需要进一步研究。同时, 作为组蛋白 H3 第 36 号位赖氨酸二甲基转移酶, NSD2 调控上述基因的具体方式可以在以后继续深入研究。

本研究通过对 NSD2 骨髓敲除小鼠模型的分析, 并且结合转录组测序技术, 揭示了 NSD2 在骨髓 B 细胞的早期发育中发挥着重要的作用, 并且找到了 NSD2 可能调控的代谢通路, 为免疫缺陷病患者的临床检测和治疗提供了新的靶点。本研究拓宽了对表观遗传在血细胞发育过程中的作用的认知, 加深了关于表观遗传因子 NSD2 在调节 B 细胞发育过程中的分子机制的研究, 为免疫相关疾病的检测和治理提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] AMAYA-URIBE L, ROJAS M, AZIZI G, *et al.* Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review [J]. *J Autoimmun*, 2019, 99: 52-72.
- [2] SCHMIDT R E, GRIMBACHER B, WITTE T. Autoimmunity and primary immunodeficiency: two sides of the same coin? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 14(1): 7-18.
- [3] SONG J, LLEO A, YANG G X, *et al.* Common Variable Immunodeficiency and Liver Involvement [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 55(3): 340-351.
- [4] DUAN L, GRUNEBAUM E. Hematological Malignancies Associated With Primary Immunodeficiency Disorders [J]. *Clin Immunol*, 2018, 194: 46-59.
- [5] RAYMOND L S, LEIDING J, FORBES-SATTER L R. Diagnostic Modalities in Primary Immunodeficiency [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2022, 63(1): 90-98.
- [6] DOWNS-CANNER S M, MEIER J, VINCENT B G, *et al.* B Cell Function in the Tumor Microenvironment [J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 169-193.
- [7] SABATINO J J, JR., PROBSTEL A K, ZAMVIL S S. B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(12): 728-45.
- [8] PIEPER K, GRIMBACHER B, EIBEL H. B-cell biology and development [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(4): 959-71.
- [9] SLATTER M A, GENNERLY A R. Advances in the treatment of severe combined immunodeficiency [J]. *Clin Immunol*, 2022, 242: 109084.
- [10] CAMPOS-SANCHEZ E, MARTINEZ-CANO J, DEL PINO MOLINA L, *et al.* Epigenetic Deregulation in Human Primary Immunodeficiencies [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(1): 49-65.
- [11] LONG X, ZHANG L, ZHANG Y, *et al.* Histone methyltransferase Nsd2 is required for follicular helper T cell differentiation [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(1): 1-13.
- [12] TOYOKAWA G, CHO H S, MASUDA K, *et al.* Histone lysine methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in human carcinogenesis through regulation of the Wnt pathway [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(10): 887-98.
- [13] HAN X, PIAO L, XU X, *et al.* NSD2 Promotes Renal Cancer Progression Through Stimulating Akt/Erk Signaling [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 375-383.
- [14] CHEN J, LI N, YIN Y, *et al.* Methyltransferase Nsd2 Ensures Germinal Center Selection by Promoting Adhesive Interactions between B Cells and Follicular Dendritic Cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(12): 3393-404.e6.
- [15] NGUYEN H V, DONG J, PANCHAKSHARI R A, *et al.* Histone methyltransferase MMSET promotes AID-mediated DNA breaks at the donor switch region during class switch recombination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(49): E10560-E7.
- [16] LUKIN K, FIELDS S, HARTLEY J, *et al.* Early B cell factor: Regulator of B lineage specification and commitment [J]. *Semin Immunol*, 2008, 20(4): 221-7.
- [17] MAECKER H T, MCCOY J P, NUSSENBLATT R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(3): 191-200.
- [18] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25-9.
- [19] DRAGHICI S, KHATRI P, TARCA A L, *et al.* A Systems biology approach for pathway level analysis [J]. *Genome Res*, 2007, 17(10): 1537-45.
- [20] FISCHER A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(1): 23-30.
- [21] PREITE S, GOMEZ-RODRIGUEZ J, CANNONS J L, *et al.* T and B-cell signaling in activated PI3K delta syndrome: From immunodeficiency to autoimmunity [J]. *Immunol Rev*, 2019, 291(1): 154-73.
- [22] REDMOND M T, SCHERZER R, PRINCE B T. Novel Genetic Discoveries in Primary Immunodeficiency Disorders [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2022, 63(1): 55-74.
- [23] KIKUSHIGE Y, YOSHIMOTO G, MIYAMOTO T, *et al.* Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7358-67.