

单细胞RNA测序在自身免疫性疾病中的研究进展

孙 帆

延安大学附属医院风湿免疫科, 陕西 延安

收稿日期: 2024年7月27日; 录用日期: 2024年8月19日; 发布日期: 2024年8月29日

摘 要

单细胞RNA测序(scRNA-seq)是一种新的大规模、高通量技术, 其允许在单个细胞的分辨率下分析整个转录组。自身免疫性疾病是确切病因和发病机制仍然未知的一组疾病, 深入研究自身免疫性疾病发病机制的细胞和分子机制, 确定新的治疗靶点, 可以通过使用单细胞转录组测序技术来实现。本文基于最近发表的体外、体内和临床研究结果, 综述了scRNA-seq在研究不同自身免疫性疾病中的应用。

关键词

单细胞RNA测序, 自身免疫性疾病, 综述

Advances in Single-Cell RNA Sequencing in Autoimmune Diseases

Fan Sun

Department of Rheumatology and Immunology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an Shaanxi

Received: Jul. 27th, 2024; accepted: Aug. 19th, 2024; published: Aug. 29th, 2024

Abstract

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a new large-scale, high-throughput technique that allows the entire transcriptome to be analyzed at the resolution of a single cell. Autoimmune diseases are a group of diseases whose exact etiology and pathogenesis are still unknown, and in-depth study of the cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease pathogenesis and identification of new therapeutic targets can be achieved through the use of single-cell transcriptome sequencing technology. Based on the results of recently published *in vitro*, *in vivo*, and clinical

studies, this article reviews the application of scRNA-seq in the study of different autoimmune diseases.

Keywords

Single-Cell RNA Sequencing, Autoimmune Diseases, Review

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)是一种新的大规模、高通量技术,其允许在单个细胞的分辨率下分析整个转录组。它已成为生命科学研究中的一种必要方法,揭示了复杂的细胞网络并提供关键基因,最终为疾病的早期诊断和临床治疗提供更多可能。自身免疫性疾病是一组疾病,与免疫系统失调、病理生理及临床方面的高度异质性有关([1], p. 1),许多自身免疫性疾病的确切病因和发病机制仍然未知。深入研究自身免疫性疾病发病机制的细胞和分子机制,确定新的治疗靶点,可以通过使用单细胞转录组测序技术来实现。本文基于最近发表的体外、体内和临床研究结果,综述了 scRNA-seq 在研究不同自身免疫性疾病中的应用。

2. 单细胞 RNA 测序技术概述

2.1. 单细胞 RNA 测序技术的兴起

在过去十年中,单细胞转录组学取得了非常大的技术突破。通过单细胞 RNA 测序,目前在单项研究中,能够实现在单细胞水平上分析超过数百万个细胞的转录组。这使我们能够在转录组水平上对每个细胞进行分类、表征和区分,从而识别及筛选关键基因,为疾病的早期诊断提供分子基础,发现潜在治疗靶点[2]。

2009 年, Tang 等人对单细胞 RNA 测序方法进行了首次概念和技术突破,对单个卵裂球和卵母细胞的转录组进行了测序[3]。这项研究带来的概念和技术为扩大细胞数量开辟了一条新途径,并首次使兼容的高通量 RNA 测序成为可能。从那时起,越来越多的改良和改进的单细胞 RNA 测序技术被开发出来,在样本采集、单细胞捕获、逆转录、cDNA 扩增、文库制备、测序和简化的生物信息学分析方面引入了必要的修改和改进。最重要的是,成本大大降低。

2.2. 单细胞 RNA 测序技术:实验程序

scRNA-seq 的程序主要包括单细胞分离和捕获、细胞裂解、逆转录(将其 RNA 转化为 cDNA)、cDNA 扩增和文库制备[4],其中单细胞分离是 scRNA-seq 中最关键的步骤。单细胞分离和捕获是从组织中捕获高质量单个细胞的过程,从而提取精确的遗传和生化信息,并促进对独特遗传和分子机制的研究[5],最常见的单细胞分离和捕获技术包括连续稀释、荧光活化细胞分选(FACS)、磁活化细胞分选、微流控系统和激光显微切割。cDNA 文库的构建是 scRNA-seq 的核心。目前主要采用基于 PCR 的扩增、体外转录扩增(IVT)和 Phi29 聚合酶复制,其中基于 PCR 的 cDNA 扩增是目前主要的文库构建方法,包括末端拖尾和模板转换方法[6]。

2.3. 单细胞测序技术的应用

(1) 迄今为止, 单细胞 RNA 表达谱分析正迅速成为包括人类、动物和植物在内的各种研究的不可替代的方法, 能够以前所未有的方式更准确、更快速地鉴定组织中的罕见和新型关键基因。此外, 通过 mRNA 和蛋白质水平的基因表达、代谢物、细胞间通讯和空间景观的信息, 有可能解决细胞组成和功能在健康和疾病中的难题。

(2) 局限性以及挑战性: scRNA-seq 的第一步也是最具挑战性的一步是获得高质量的单细胞, 而不会导致其转录谱发生显著改变([1], p. 2)。其他局限性主要包括该方法的高成本、与生物信息学数据分析相关的挑战、解释结果的困难以及将其有意义地转化为临床成果。在使用 scRNA-seq 技术时, 捕获足够数量的 RNA 与同时获得信息保真度之间的平衡至关重要[7]。因此, 应仔细分析和解释结果, 并牢记技术的各种局限性。

3. scRNA-seq 技术在自身免疫性疾病中的应用

现已发现多种自身免疫性疾病, 包括类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)、和脊柱关节炎(Spondyloarthritis, SpA)等, 许多自身免疫性疾病的确切病因和发病机制仍然未知[8], 其主要影响结缔组织、关节、皮肤和肌肉骨骼器官。大多数自身免疫性疾病是由于免疫细胞活化和分化的异常导致的全身免疫反应, 也受到组织微环境的影响, 受影响组织内部和组织之间的相当大的异质性使疾病发展的潜在机制趋于复杂化。因此, 使用 scRNA-seq 揭示单个细胞的功能状态和确切的分子表型对于确定新的治疗靶点和关键基因的预测至关重要。

3.1. scRNA-seq 技术与类风湿性关节炎

类风湿性关节炎(RA)是临床上常见的慢性全身性自身免疫性疾病之一。类风湿性关节炎始于滑膜, 伴有反复和持续的滑膜炎, 导致关节软骨和骨骼破坏[9]。临床特征包括受累关节疼痛、肿胀和畸形, 并伴有自身抗体的产生。目前, RA 的确切病因尚不清楚, 或许与遗传易感性、环境易感因素和感染因素的综合作用有关。一些研究表明, 细胞免疫反应是类风湿性关节炎的关键因素。RA 患者的滑膜组织和滑液主要包括异常增加的免疫细胞, 如 T 细胞和免疫分子(细胞因子、自身抗体、热休克蛋白等) [10]。scRNA-seq 是一种强大的工具, 可以剖析具有复杂细胞成分的样品中的细胞异质性, 并根据独特的转录组特征表征细胞亚群。

滑膜成纤维细胞是滑膜细胞的主要成分, 在 RA 的进化中表现出异常的增殖和凋亡, 是介导关节局部炎症的关键细胞之一[11]。研究发现, RA 患者和骨关节炎患者滑膜组织中的成纤维细胞由具有不同基因表达模式的细胞亚群组成。3 个主要的纤维细胞亚群, 包括 CD34-THY1-、CD34-THY1+ 和 CD34+。位于不同的解剖区域, 发挥不同的功能, 其表达谱揭示了它们在侵袭性迁移、破骨细胞形成和免疫细胞募集等致病过程中的潜力[12], 具有独特的基因表达谱。PDPN + CD34-THY1 + 成纤维细胞亚群在 RA 中丰富, 与大量免疫细胞浸润、高疾病活动度和关节肥大有关。Cai 等研究阐明了不同状态下滑膜成纤维细胞的相似性和异质性[13]。研究发现, 类风湿性关节炎和 OA 滑膜成纤维细胞的转化过程相似, 并指出了几种信号通路在类风湿性关节炎和 OA 滑膜成纤维细胞转化中的潜在调控作用, 如 WNT 信号通路、TGF- β 信号通路、Fc γ RI 信号通路和 ERBB 信号通路, 这无疑有助于发现 RA 的潜在治疗靶点。

滑膜组织来源的巨噬细胞[14], 定义为 HBEGF + 炎性巨噬细胞, 是在 RA 滑膜组织中发现的显性 CD14+ 亚群。这些巨噬细胞产生炎性细胞因子(如 IL1 β)和生长因子(如肝素结合表皮生长因子(HBEGF)和表调蛋白), 这些因子是在常驻成纤维细胞和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的影响下形成的。它们还促进成纤维细胞的侵袭性, 从而有助于成纤维细胞介导的关节破坏。

RA 的另一个特征是自身反应性 B 细胞产生自身抗体,例如抗瓜氨酸抗体(ACPA)和类风湿因子(RF)。ACPA 和 RF 的 B 细胞转录富集本属于不同的调节通路,表明不同的分子机制驱动 RA 中 ACPA 和 RF 的产生。一部分 RA 患者可能会呈现 ACPA 和 RF 阴性,即血清阴性的 RA,主要影响较大的关节[15]。为了找到将血清阴性与阳性的类风湿性关节炎区分开来的生物标志物,进行单细胞转录组测序提示 RA 患者 CD8⁺ T 细胞的体细胞突变。这些细胞的特征是细胞毒性基因产物和与促炎信号相关的分子的表达上调,对促进慢性炎症很重要。也提示了血清阴性的 RA 患者可使用靶向 CD8⁺ T 细胞的治疗方法进行更有效的治疗[16]。

随着 scRNA-seq 技术的不断发展和完善,单组学分析已不能满足当前科学研究的需要,多组学分析或可为 RA 发病机制和靶向治疗的研究提供新的理论支持。

3.2. scRNA-seq 技术与系统性红斑狼疮

系统性红斑狼疮(SLE)是一种典型的自身免疫性疾病,可广泛影响皮肤、肾脏、关节、浆膜内膜、中枢神经系统和造血细胞。狼疮性肾炎是系统性红斑狼疮的常见且严重的表现,50%的 SLE 患者发生肾损伤。scRNA-seq 应用于狼疮性肾炎患者的肾活检样本,可以确定浸润和驻留免疫细胞以及肾实质细胞的表型,并揭示细胞之间的相互作用,从而识别新的生物标志物[17]。

Celine Berthier 等人使用 scRNA-seq 系统地分析了狼疮性肾炎肾组织中复杂的免疫细胞分布网络,揭示了病变中的 21 个活性白细胞亚群,包括多种类型的髓样细胞、T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞[18]。该研究还发现,趋化因子受体 CXCR4 和 CX3CR1 在狼疮性肾炎患者的肾组织中广泛表达,可能代表潜在的治疗靶点。根据 scRNA-seq 分析,巨噬细胞,尤其是 M2 巨噬细胞,是 LN 中表达 CD163 的主要细胞,是 sCD163 升高的潜在来源。总而言之,sCD163 可以区分活动性 LN 患者和其他 SLE 患者[19]。scRNA-seq 的使用可以为狼疮性肾炎的发病机制提供新的见解,并有助于加速发现新的治疗靶点和识别生物标志物,从而优化临床诊断和治疗。

此外,IFN 家族参与针对病毒感染的先天性和适应性免疫反应。一般认为,过度激活的 IFN-I 信号在 SLE 的发病机制中起着重要作用,已被作为相关药物开发的重要治疗靶点[20]。scRNA-seq 的相关研究表明 IFN 信号通路的激活启动 IFN 刺激基因(ISG)的转录,从而刺激下游基因的转录和翻译。ISGs 的表达水平与 SLE 的疾病活动度密切相关,对判断疾病严重程度具有重要价值。

3.3. scRNA-seq 技术与强直性脊柱炎

目前诊断上倾向于将脊柱关节炎(Spondyloarthritis, SpA)分为两类:外周 SpA (主要累及四肢,与银屑病、炎症性肠病或既往感染有关)和中轴 SpA (主要累及脊柱,如强直性脊柱炎)。强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种病因不明、具有致残性、以骶髂关节和脊柱附着点炎症为主要症状的疾病,多见于男性,发病年龄趋于年轻化[21]。

一项强直性脊柱炎患者外周单核细胞的 RNA-seq 和 ATAC-seq 分析表明[22]:参与 AS 进展的致病基因 NFκB 起源于 CD8⁺ T 细胞。研究结果揭示了 NFκB 异常调节 FOS、JUN 和 JUNB 并驱动 AS 进展的可能机制,从 AS 的单细胞角度提供了新的视角。同期研究也表明强直性脊柱炎患者的 NK 细胞亚群改变和细胞毒性分子水平降低[23]。

近年来,随着生物信息学技术的发展,许多疾病相关的全基因组测序成为研究热点。尽管相关研究连续发表,目前临床中仍缺乏用于早期诊断和治疗 AS 的生物标志物,因此继续探索 AS 相关的重要靶点十分必要。基于外周血单细胞测序技术针对 HLA-B27 与 AS 强相关性研究、以及 AS 患者在 NK 细胞中的差异表达基因的生物信息学分析有助于更深入的了解 AS 疾病机制,为早期诊断和临床治疗提供更多

可能。

3.4. scRNA-seq 技术与其他常见自身免疫性疾病

3.4.1. scRNA-seq 技术与系统性硬化症

系统性硬化症是一种无法治愈的慢性孤儿病,其特征是皮肤和内脏器官(包括心脏,肾脏和肺)的炎症,血管变化,自身免疫和纤维化[24]。间质性肺病(ILD)是 SSc 的常见并发症(在高达 80%的患者中)。利用 SSc-ILD 肺和皮肤组织的 scRNA-seq 技术的研究可能会为以前未知的细胞亚群提供有价值的见解,如在 2016 年的一项 scRNA-seq 研究中[25],证明了少突胶质细胞确实是系统性硬化症的一个异质细胞群。这些细胞亚群驱动 SSc 的发病机制并确定新的治疗靶点。

除少突胶质细胞外,scRNA-seq 还用于分析小胶质细胞,揭示了小胶质细胞发育过程中的多样性([26], p. 1)。小胶质细胞作为大脑独特的常驻免疫细胞,在维持人类中枢神经系统的发育和稳态中起着关键作用。研究表明([26], p. 2),选择性表达趋化因子 CCL4 的小胶质细胞亚群可能是 MS 病变中 CCL4 升高的主要来源。这些独特的小胶质细胞可用作生物标志物或治疗靶点。

3.4.2. scRNA-seq 技术与干燥综合征

干燥综合征(sjogren syndrome, SS)是一种外分泌腺的自身免疫性疾病,其特征是唾液腺和泪腺广泛淋巴细胞浸润导致的口腔和眼部干燥[27]。大约 30~40%的患者会出现累及肾脏、肺和神经系统的全身表现[28]。该疾病具有很强的异质性,这限制了对致病机制的全面理解,并使新治疗靶点的发现变得复杂。Hong 等人[29]鉴定出两个 CD4+ T 细胞亚群,一个高表达的细胞毒性基因被命名为 CD4 CTLs 细胞毒性 T 淋巴细胞,另一个高表达的 T 细胞受体(TCR)可变基因被命名为 CD4 TRAV13-2+ T 细胞,其中 CD4 CTLs 的特异性扩增可能参与 SS 的发病机制,其耗竭可能是一种很有前途的治疗策略。

4. 小结

scRNA-seq 技术的出现彻底改变了人们对生命最基本单位的理解,但 scRNA-seq 领域仍存在许多技术障碍[8]。例如,单细胞测序成本仍然很高,通量和精密度还有很大的提升空间,批量效应的问题尚未解决。然而,随着技术的进步,未来几年,scRNA-seq 领域的新兴技术将进一步融入自身免疫性疾病的研究,并将用于解决更多的生物学问题。单细胞转录组技术的运用,使各种自身免疫性疾病发生发展的细节得以发现,为发病机制、疾病诊断、药物开发等研究提供了新的视角。

参考文献

- [1] Kuret, T., Sodin-Šemrl, S., Leskošek, B. and Ferk, P. (2022) Single Cell RNA Sequencing in Autoimmune Inflammatory Rheumatic Diseases: Current Applications, Challenges and a Step toward Precision Medicine. *Frontiers in Medicine*, **8**, Article ID: 822804. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.822804>
- [2] Jovic, D., Liang, X., Zeng, H., Lin, L., Xu, F. and Luo, Y. (2022) Single-Cell RNA Sequencing Technologies and Applications: A Brief Overview. *Clinical and Translational Medicine*, **12**, e694. <https://doi.org/10.1002/ctm2.694>
- [3] Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., et al. (2009) mRNA-seq Whole-Transcriptome Analysis of a Single Cell. *Nature Methods*, **6**, 377-382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- [4] Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., et al. (2017) Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell*, **65**, 631-643.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>
- [5] Zeb, Q., Wang, C., Shafiq, S. and Liu, L. (2019) An Overview of Single-Cell Isolation Techniques. In: Barh, D. and Azevedo, V., Eds., *Single-Cell Omics*, Elsevier, Amsterdam, 101-135. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814919-5.00006-3>
- [6] Kolodziejczyk, A.A., Kim, J.K., Svensson, V., Marioni, J.C. and Teichmann, S.A. (2015) The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Molecular Cell*, **58**, 610-620. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.005>

- [7] He, J., Shen, J., Luo, W., Han, Z., Xie, F., Pang, T., *et al.* (2022) Research Progress on Application of Single-Cell TCR/BCR Sequencing Technology to the Tumor Immune Microenvironment, Autoimmune Diseases, and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 969808. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.969808>
- [8] Zhao, M., Jiang, J., Zhao, M., Chang, C., Wu, H. and Lu, Q. (2020) The Application of Single-Cell RNA Sequencing in Studies of Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **60**, 68-86. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08813-6>
- [9] Firestein, G.S. and McInnes, I.B. (2017) Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, **46**, 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
- [10] (2018) Rheumatoid Arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, **4**, Article No. 18002.
- [11] Smolen, J.S., Aletaha, D. and McInnes, I.B. (2016) Rheumatoid Arthritis. *The Lancet*, **388**, 2023-2038. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30173-8)
- [12] Mizoguchi, F., Slowikowski, K., Wei, K., *et al.* (2018) Functionally Distinct Disease-Associated Fibroblast Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Nature Communications*, **9**, Article No. 789.
- [13] Cai, S., Ming, B., Ye, C., Lin, S., Hu, P., Tang, J., *et al.* (2019) Similar Transition Processes in Synovial Fibroblasts from Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis: A Single-Cell Study. *Journal of Immunology Research*, **2019**, Article ID: 4080735. <https://doi.org/10.1155/2019/4080735>
- [14] Kuo, D., Ding, J., Cohn, I.S., Zhang, F., Wei, K., Rao, D.A., *et al.* (2019) HBEGF⁺ Macrophages in Rheumatoid Arthritis Induce Fibroblast Invasiveness. *Science Translational Medicine*, **11**, eaau8587. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau8587>
- [15] Nikiphorou, E., Sjöwall, C., Hannonen, P., Rannio, T. and Sokka, T. (2016) Long-Term Outcomes of Destructive Seronegative (Rheumatoid) Arthritis—Description of Four Clinical Cases. *BMC Musculoskeletal Disorders*, **17**, Article No. 246. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1067-y>
- [16] Kelkka, T., Savola, P., Bhattacharya, D., Huuhtanen, J., Lönnberg, T., Kankainen, M., *et al.* (2021) Corrigendum: Adult-Onset Anti-Citrullinated Peptide Antibody-Negative Destructive Rheumatoid Arthritis Is Characterized by a Disease-Specific CD8⁺ T Lymphocyte Signature. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 710831. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.710831>
- [17] Der, E., Suryawanshi, H., Morozov, P., Kustagi, M., Goilav, B., Ranabothu, S., *et al.* (2019) Author Correction: Tubular Cell and Keratinocyte Single-Cell Transcriptomics Applied to Lupus Nephritis Reveal Type I IFN and Fibrosis Relevant Pathways. *Nature Immunology*, **20**, Article No. 1556. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0529-4>
- [18] Arazi, A., Rao, D.A., Berthier, C.C., *et al.* (2019) The Immune Cell Landscape in Kidneys of Patients with Lupus Nephritis. *Nature Immunology*, **20**, 1404-1405.
- [19] Zhang, T., Li, H., Vanarsa, K., Gidley, G., Mok, C.C., Petri, M., *et al.* (2020) Association of Urine sCD163 with Proliferative Lupus Nephritis, Fibrinoid Necrosis, Cellular Crescents and Intrarenal M2 Macrophages. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article No. 671. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00671>
- [20] Nehar-Belaid, D., Hong, S., Marches, R., Chen, G., Bolisetty, M., Baisch, J., *et al.* (2020) Mapping Systemic Lupus Erythematosus Heterogeneity at the Single-Cell Level. *Nature Immunology*, **21**, 1094-1106. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0743-0>
- [21] 王晨峰, 卢旭华. 基于生物信息学分析筛选强直性脊柱炎的关键诊断标志物[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(8): 888-894.
- [22] Xu, H., Yu, H., Liu, L., Wu, H., Zhang, C., Cai, W., *et al.* (2021) Integrative Single-Cell RNA-Seq and ATAC-Seq Analysis of Peripheral Mononuclear Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 760381. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760381>
- [23] Ren, C., Li, M., Zheng, Y., Cai, B., Du, W., Zhang, H., *et al.* (2022) Single-Cell RNA-seq Reveals Altered NK Cell Subsets and Reduced Levels of Cytotoxic Molecules in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **26**, 1071-1082. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17159>
- [24] Asano, Y. (2017) Systemic Sclerosis. *The Journal of Dermatology*, **45**, 128-138. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14153>
- [25] Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., *et al.* (2016) Oligodendrocyte Heterogeneity in the Mouse Juvenile and Adult Central Nervous System. *Science*, **352**, 1326-1329. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6463>
- [26] Hammond, T.R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., *et al.* (2019) Single-Cell RNA Sequencing of Microglia Throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, **50**, 253-271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- [27] Henkin, R.I. (2018) Primary Sjögren's Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, **379**, 97.

-
- [28] Qin, B., Wang, J., Yang, Z., Yang, M., Ma, N., Huang, F., *et al.* (2014) Epidemiology of Primary Sjögren's Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **74**, 1983-1989. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205375>
- [29] Hong, X., Meng, S., Tang, D., Wang, T., Ding, L., Yu, H., *et al.* (2021) Single-Cell RNA Sequencing Reveals the Expansion of Cytotoxic CD4+ T Lymphocytes and a Landscape of Immune Cells in Primary Sjögren's Syndrome. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article ID: 594658. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594658>