

混合骨髓移植后过继免疫治疗小鼠白血病**☆

王存邦, 白海, 蒯瑞, 张茜, 周进茂, 赵强, 潘耀柱

Adoptive immunotherapy for leukemia in mice after autologous bone marrow mixed with H-2 haploidentical allogeneic bone marrow transplantation

Wang Cun-bang, Bai Hai, Xi Rui, Zhang Qian, Zhou Jin-mao, Zhao Qiang, Pan Yao-zhu

Abstract

BACKGROUND: Auto hemopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT) has a high relapse rate in acute leukemia; allo-HSCT has a high incidence of transplant-related mortality. It may increase curative effect when leukemia patients are administered adoptive immunotherapy post mixed-HSCT.

OBJECTIVE: To explore the curative effect of using donor lymphocyte infusion combined with interleukin-2 (DLI+IL-2) after autologous bone marrow mixed with H-2 haploidentical allogeneic bone marrow transplantation (MBMT) in mice with leukemia.

METHODS: Leukemia models were prepared with Balb/c mice which were irradiated 3 Gy by linear accelerator and injected K562 (GFP⁺/NeoR⁺) or K562 (GFP⁺/NeoR⁻) cells 5×10^5 into caudal vein and divided into leukemia model group, irradiated leukemia model group, MBMT group, and autologous bone marrow transplantation (ABMT) group. 6 Gy irradiation was performed after 7 days; the mice were treated with ABMT or MBMT respectively. Mice of MBMT group mixed with 1/10 of H-2 haploidentical allogeneic bone marrow cells underwent IL-2 or combination of DLI treatment. Peripheral blood and bone marrow cell morphous of mice were examined; cell subsets, GFP and NeoR gene in peripheral blood, and liver, spleen homogenate cells, and NeoR gene were detected after 4 weeks.

RESULTS AND CONCLUSION: All of mice in leukemia model group died of bone marrow hematopoietic failure within 20 days; mice in irradiated leukemia model group died of hematopoietic failure within 14 days. Varying amounts of non-leukemic of mice survived for more than 28 days between ABMT group and MBMT group.

Using IL-2 treatment after MBMT and ABMT can promote long term disease free survival of mice with leukemia, and which combined with DLI can further improve long term disease free survival of mice with leukemia.

Wang CB, Bai H, Xi R, Zhang Q, Zhou JM, Zhao Q, Pan YZ. Adoptive immunotherapy for leukemia in mice after autologous bone marrow mixed with H-2 haploidentical allogeneic bone marrow transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36):6757-6761. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 急性白血病自体造血干细胞移植后复发率高, 异基因造血干细胞移植后移植相关病死率高, 混合造血干细胞移植及移植后过继免疫治疗有可能取长补短, 提高疗效。

目的: 观察自体骨髓混合 H-2 半相异体骨髓移植后供体淋巴细胞输注+白细胞介素 2 治疗对小鼠白血病的疗效。

方法: 将 Balb/c 小鼠经直线加速器照射 3 Gy 后分为白血病模型组、白血病模型照射组、混合移植组、自体骨髓移植组, 均尾静脉注射 5×10^5 K562(GFP⁺/NeoR⁺)或 K562(GFP⁺/NeoR⁻)细胞。7 d 后 6 Gy 照射, 自体骨髓移植组移植自体骨髓细胞或联合白细胞介素 2 治疗; 混合移植组移植小鼠自体骨髓细胞混合 1/10 的 H-2 半相异体骨髓细胞后应用白细胞介素 2 或联合供体淋巴细胞输注治疗。4 周后行小鼠外周血及骨髓细胞形态检查, 外周血细胞亚群、GFP 及 NeoR 基因测定, 肝、脾匀浆细胞 GFP 和 NeoR 基因测定。

结果与结论: 白血病模型组小鼠因骨髓造血功能衰竭于 20 d 内全部死亡, 白血病模型照射组小鼠因造血功能衰竭于 14 d 内全部死亡; 自体骨髓移植组、混合移植组均有多少不等小鼠无白血病存活超过 28 d, 且混合骨髓移植后及自体骨髓移植后应用白细胞介素 2 治疗可提高白血病小鼠长期无病生存率, 在此基础上联合供体淋巴细胞输注可更进一步提高白血病小鼠长期无病生存率。

关键词: 混合骨髓移植; 供体淋巴细胞输注; 白细胞介素 2; 小鼠白血病模型; 过继免疫治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.025

王存邦, 白海, 蒯瑞, 张茜, 周进茂, 赵强, 潘耀柱. 混合骨髓移植后过继免疫治疗小鼠白血病[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6757-6761. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

急性髓性白血病自体造血干细胞移植不受供者限制, 移植后造血恢复快, 并发症少, 但累积复发率为 $(52.0 \pm 5.5)\%$ ^[1-2]。异基因造血干细胞移植后复发率明显减少, 但需要 HLA 相合的供者, 且移植抗宿主病发生率达 59.6%, 移植相关病死率高^[3]。T 淋巴细胞剔除后移植物

抗宿主病的发生率降低而复发率随之增高^[4]。异基因造血干细胞移植后供体淋巴细胞输注能使复发的慢性髓系白血病缓解并持续稳定^[5-6], 说明异基因造血干细胞移植治疗效果优于自体造血干细胞移植的主要原因是因为前者能产生移植抗白血病效应, 与 T 淋巴细胞关系密切。

为克服异基因造血干细胞移植供者受限、移植相关病死率高以及自体造血干细胞移植后复发率较高的缺点, 发挥前者具有移植抗白血

Hematology Center,
General Hospital of
Lanzhou Military Area
Command of Chinese
PLA, Lanzhou
730050, Gansu
Province, China

Wang Cun-bang☆,
Doctor, Associate
chief physician,
Master's supervisor,
Hematology Center,
General Hospital of
Lanzhou Military Area
Command of Chinese
PLA, Lanzhou
730050, Gansu
Province, China
wangcunbang98@
163.com

Supported by: the
"Eleventh Five-Year"
Outstanding Talents
Foundation of the
Chinese PLA, No.
06J005*; Medical
Research Foundation
of Lanzhou Military
Area Command of
Chinese PLA, No.
LXH-2007006*

Received: 2011-01-31
Accepted: 2011-02-22

解放军兰州军区
兰州总医院全军
血液病中心, 甘肃
省兰州市
730050

王存邦☆, 男,
1966 年生, 青海
省西宁市人, 汉
族, 1989 年解放
军第四军医大学
毕业, 博士, 副主
任, 副主任医师,
硕士生导师, 主要
从事造血干细胞
移植研究。
wangcunbang98
@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)36-06757-05

收稿日期: 2011-01-31
修回日期: 2011-02-22
(20110111015/GW-L)

病效应和后者不受供者限制的优点, 作者尝试以小鼠自体骨髓细胞为主, 混合1/10的H-2半相合骨髓细胞, 实施混合骨髓移植, 并在混合骨髓移植后应用供体淋巴细胞输注联合白细胞介素2治疗, 观察可否增强移植抗白血病效应, 提高小鼠的长期存活率。为进一步提高临床混合骨髓移植的疗效提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2007-01/05在解放军兰州军区兰州总医院无菌级动物实验室完成。

材料: 命名为K562(GFP⁺/NeoR⁺)的含GFP及NeoR基因及命名为K562(GFP⁻/NeoR⁻)的不含GFP及NeoR基因的细胞株, 命名为F1(GFP⁺/NeoR⁺)的含GFP和NeoR基因的Balb/c×C57BL F1代小鼠骨髓细胞及命名为F1(GFP⁻/NeoR⁻)的不含GFP和NeoR基因的F1代小鼠骨髓细胞由解放军兰州军区兰州总医院全军血液病中心实验室保存, 8~10周龄SPF级Balb/c及Balb/c×C57BL F1代小鼠购自兰州大学动物中心, 雌雄各半, 饲养于解放军兰州军区兰州总医院动物实验科无菌级饲养室。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[7]。

实验方法:

Balb/c及F1代小鼠骨髓细胞亚群测定: 无菌处死Balb/c鼠取股骨, 用5 mL医用注射器吸取PBS反复将骨髓细胞冲洗入10 mL离心管, 肝素抗凝。并取F1(GFP⁺/NeoR⁺)和F1(GFP⁻/NeoR⁻)细胞各加于6只试管, 每管 2×10^5 个细胞, 一管为阴性本底, 另5管分别用CD3、CD4、CD8、CD16CD56、CD34单克隆抗体标记。应用流式细胞仪测定T亚群及NK细胞, CD34细胞。

制备小鼠白血病模型: 每组10只小鼠, 分组见表1。

据实验结果^[8], 将Balb/c小鼠经直线加速器照射3 Gy, 24 h后取对数生长期的K562(GFP⁺/NeoR⁺)及K562(GFP⁻/NeoR⁻)细胞(经锥虫蓝染色, 活性大于95%), 调节细胞浓度为 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。按分组尾静脉注射K562(GFP⁺/NeoR⁺)或K562(GFP⁻/NeoR⁻)细胞 5×10^6 /鼠。

骨髓移植及移植后治疗: 白血病模型制备7 d后按分组做6 Gy照射, 24 h后做骨髓移植。B1、B2、C1、C2为混合移植组, 先尾静脉输注自体骨髓细胞 1×10^7 /只。间隔1 h后B1、C1组输注F1(GFP⁻/NeoR⁻)骨髓细胞 1×10^6 /只, B2、C2组输注F1(GFP⁺/NeoR⁺)骨髓细胞 1×10^6 /只。D、E组为自体移植组, 输注自体骨髓细胞 1×10^7 /只。B1、B2组每7 d分别输F1(GFP⁻/NeoR⁻)和F1(GFP⁺/NeoR⁺)细胞1次, 并隔日腹腔注射白细胞介素2 400 U。C1、C2、D组隔日腹腔注射白细胞介素2 400 U。A组

为白血病模型组, 观察白血病对生存的影响; F组为白血病模型照射组, 观察照射对生存的影响。

表1 实验分组
Table 1 Experimental groups

Group	Injected cell	Irradiation	Autologous bone marrow transplantation	Interleukin-2
A	K562 (GFP ⁺ /NeoR ⁺)	-	-	-
B1	K562 (GFP ⁺ /NeoR ⁺)	+	-	-
B2	K562 (GFP ⁻ /NeoR ⁻)	+	-	-
C1	K562 (GFP ⁺ /NeoR ⁺)	+	-	+
C2	K562 (GFP ⁻ /NeoR ⁻)	+	-	+
D	K562 (GFP ⁺ /NeoR ⁺)	+	+	+
E	K562(GFP ⁺ /NeoR ⁺)	+	+	-
F	K562(GFP ⁺ /NeoR ⁺)	+	-	-

Group	Autologous bone marrow mixed with H-2 haploidentical allogeneic bone marrow transplantation	Donor lymphocyte infusion + interleukin-2	Interleukin-2
A	-	-	-
B1	+	+	-
B2	+	+	-
C1	+	-	+
C2	+	-	+
D	-	-	+
E	-	-	-
F	-	-	-

疗效检测:

外周血及骨髓细胞形态学检查: 观察4周后杀死存活小鼠, 取股骨, 用5 mL医用注射器吸取PBS反复将骨髓细胞冲洗入10 mL离心管, 直至股骨外观呈白色。将骨髓沉渣离心后涂片, 瑞氏-姬姆萨染色后镜检; 取尾静脉血制备血涂片, 经瑞氏染色, 油镜下分类。

外周血细胞亚群测定: 同上取尾静脉血经红细胞裂解液处理后, 加于6只试管, 每管 2×10^5 个细胞, 一管为阴性本底, 另5管分别用CD3、CD4、CD8、CD16、CD56、CD34单克隆抗体标记。应用流式细胞仪测定T亚群及NK细胞, CD34细胞。

外周血GFP阳性细胞的流式细胞仪测定: 同上取尾静脉血加红细胞裂解液处理后, 调整细胞浓度至 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。流式细胞仪工作电压525 V, 激光波长475 nm, 发射波长490 nm, 获取细胞10 000个, 测定GFP阳性细胞的百分比。

外周血细胞NeoR基因测定: 取上述细胞, 应用DNA提取试剂盒提取DNA, 按文献^[9]进行PCR扩增。取10 μL扩增产物1%琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像分析系统进行成像分析。

肝、脾匀浆细胞的GFP和NeoR基因的测定: 上述实验组小鼠取肝、脾组织各100 mg, 常规方法匀浆制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 同上方法测定GFP阳性细胞的百分比及NeoR基因。

主要观察指标: ①各组小鼠外周血及骨髓细胞形态

学检查。②各组小鼠外周血细胞亚群测定。③各组小鼠GFP阳性细胞。④各组小鼠NeoR基因测定。⑤各组小鼠生存曲线分析。

统计学分析: 采用SPSS10.0软件包处理, 多组间行One-Way Anova Test; 两组间行独立 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义, $P < 0.01$ 表示差异有非常显著性意义; 并做生存曲线分析。

2 结果

2.1 移植细胞亚群测定结果 移植的自体骨髓细胞中, CD34⁺细胞占1.32%, CD3⁺细胞占26.56%, CD4⁺细胞占13.44%, CD8⁺细胞占3.09%, CD16⁺ CD56⁺细胞占7.53%。移植的F1(GFP⁺/NeoR⁺)骨髓细胞中, CD34⁺细胞占1.51%, CD3⁺细胞占61.41%, CD4⁺细胞占39.57%, CD8⁺细胞占27.61%, CD16⁺ CD56⁺细胞占9.59%; 移植的F1(GFP⁻/NeoR⁻)骨髓细胞中, CD34⁺细胞占1.49%, CD3⁺细胞占65.86%, CD4⁺细胞占40.13%, CD8⁺细胞占19.16%, CD16⁺ CD56⁺细胞占9.70%; 其中F12(GFP⁺/NeoR⁺)与F1(GFP⁻/NeoR⁻)细胞各亚群之间没有明显差别($P > 0.05$)。

2.2 各组实验小鼠存活情况 见表2, 图1。

表2 各组小鼠存活情况
Table 2 Survival condition of leukemia mice in each group

Item	A	B1	B2	C1	C2	D	E	F
Survival time (d)	< 20	> 28	> 28	> 28	> 28	> 28	> 28	< 14
Number of survival	0	6	6	4	4	3	3	0

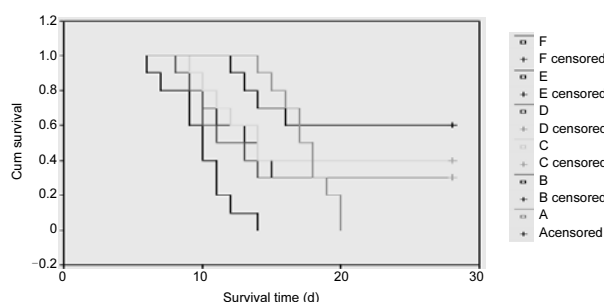


Figure 1 Survival curve of leukemia mice
图1 实验小鼠生存曲线

白血病模型组在20 d内全部死亡, 白血病模型照射组在14 d内全部死亡, D、E组各有3只小鼠存活>28 d, C1、C1组各有4只存活>28 d, B1、B2组各有6只存活>28 d。

2.3 各组小鼠标记基因存在情况 见表3。

表3 小鼠标记基因检测结果
Table 3 Marked gene detection of leukemia mice

Item	A	B1	B2	C1	C2	D	E	F
GFP (number)	+(10)	-(6)	+(6)	-(4)	+(2)	-(3)	-(3)	+(10)
NeoR (number)	+(10)	-(6)	+(6)	-(4)	+(2)	-(3)	-(3)	+(10)

白血病模型组和白血病模型照射组濒死小鼠外周血中均检测到GFP及NeoR基因的存在。B2组中有6只小鼠均检测到了F1(GFP⁺/NeoR⁺)细胞, C2组中有2只小鼠检测到了F1(GFP⁺/NeoR⁺)细胞。

2.4 小鼠T细胞亚群及NK细胞检测 见表4。

表4 各组小鼠T细胞亚群及NK细胞检测结果
Table 4 T cell subsets and NK cells detection in leukemia mice (x±s, %)

Cell subsets	A	B1	B2	C1
CD3	25.78±1.44 ^a	63.56±2.33	69.35±3.76	59.87±2.75
CD4	12.62±1.11 ^a	42.12±1.91	45.99±2.19	38.02±1.87
CD8	3.01±0.21 ^a	20.77±1.02	21.32±1.15	25.99±1.82
CD16CD56	1.01±0.02 ^a	11.87±1.04	12.65±1.12	10.32±1.12
Cell subsets	C2	D	E	F
CD3	77.53±3.67	48.11±1.47	48.32±1.75	0.37±0.02 ^a
CD4	37.11±1.34	33.78±1.29	28.81±1.23	0.07±0.02 ^a
CD8	21.67±1.63	8.77±1.45	14.75±1.44	0.07±0.02 ^a
CD16CD56	9.77±0.89	7.11±0.45	6.23±0.64	0.81±0.02 ^a

^a $P < 0.01$, vs. other groups

白血病模型组和白血病模型照射组濒死小鼠外周血T细胞亚群及NK细胞均极低, 与其他组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。其他各组存活小鼠外周血T细胞亚群及NK细胞已恢复至正常, 各组之间, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.5 各组小鼠骨髓及外周血细胞形态学检查结果 白血病模型组濒死小鼠外周血及骨髓见11%~64%不等的原始、幼稚细胞。白血病模型照射组濒死小鼠外周血及骨髓细胞稀少, 主要为淋巴细胞。其余各组中存活的小鼠外周血及骨髓细胞形态正常。

2.6 各组小鼠肝、脾检查结果 白血病模型组、白血病模型照射组濒死小鼠肝、脾组织匀浆细胞中检测到GFP⁺细胞, 并扩增到特异性的NeoR基因。其他组存活小鼠肝、脾组织匀浆细胞中未检测到GFP⁺细胞, 亦未扩增到特异性的NeoR基因。

3 讨论

为了克服异基因造血干细胞移植供体受限、并发症重, 自体造血干细胞移植缺乏移植抗白血病效应而致复发率高的缺点, 发挥前者具有移植抗白血病效应, 后者不受供者限制的优点, 作者进行了混合骨髓移植后

供体淋巴细胞输注+白细胞介素2过继免疫治疗小鼠白血病的实验研究。在此之前, 作者已经制备获得含标记基因的Balb/c小鼠白血病模型及Balb/c×C57BL F1代骨髓细胞, 为MBMT后相关指标的检测, 提供了快捷、方便的条件^[8]。并且F1(GFP⁺/NeoR⁺)及F1(GFP⁻/NeoR⁻)骨髓细胞中, 主要为T细胞, 还包括CD34⁺细胞和NK细胞, 各实验组移植的F1(GFP⁺/NeoR⁺)及F1(GFP⁻/NeoR⁻)骨髓细胞之间没有统计学差异($P > 0.05$), 为实验中各项检测指标的一致性创造了条件。

从各组小鼠的存活情况及有关检测指标来看, A组在20 d内全部死亡。在濒死小鼠骨髓及外周血中见11%~64%不等的原、幼稚细胞, 均检测到GFP及NeoR基因, 考虑该组小鼠死于白血病所至的骨髓造血功能衰竭。F组在14 d内全部死亡, 濒死小鼠骨髓及外周血中细胞稀少, 主要为淋巴细胞, 且均检测到GFP及NeoR基因的存在, 该组小鼠可能死于照射所至的造血功能衰竭, 且在死亡时, 体内还有残留白血病存在, 说明6 Gy的照射并不能杀灭全部的肿瘤细胞。其他组小鼠均有3~6只不等的小鼠存活时间> 28 d。存活小鼠外周血T细胞亚群及NK细胞已恢复至正常, 骨髓及外周血细胞形态正常, 未见肿瘤细胞。B2组中6只存活小鼠均形成了混合嵌合体。C2组中有2只存活小鼠形成了混合嵌合体。存活小鼠肝、脾组织匀浆细胞中未检测到GFP⁺细胞, 亦未扩增到特异性的NeoR基因片段的存在。证明K562(GFP⁺/NeoR⁺)细胞在存活小鼠的骨髓、外周血、肝、脾中消失。

实验发现, 混合移植后应用供体淋巴细胞输注+白细胞介素2治疗组的疗效最佳, 其次为混合移植后应用白细胞介素2治疗组, 单纯自体移植组的疗效最低。这说明与后者相比, 前两者都可能存在不同程度移植物抗白血病效应, 而以混合移植后应用供体淋巴细胞输注+白细胞介素2治疗组移植物抗白血病效应最为明显。实验结果证明, 混合移植及移植后应用白细胞介素2治疗, 可以产生移植物抗白血病效应而使白血病小鼠的长期生存率得到提高。混合移植后应用供体淋巴细胞输注+白细胞介素2, 可以在混合移植及移植后应用白细胞介素2治疗的基础上, 使白血病小鼠的长期生存率有更明显的提高, 考虑这与供体淋巴细胞输注+白细胞介素2治疗密不可分, 即供体淋巴细胞输注+白细胞介素2可以产生更为有效的移植物抗白血病效应。

混合移植后应用白细胞介素2可以诱导、增强移植物抗白血病的确切机制尚不明了。研究提示^[10-11], 移植物抗白血病效应可能针对的是白血病特异性抗原。供者淋巴细胞与宿主白血病细胞之间的次要组织相容性抗原差异是引起免疫攻击的重要靶分子。Kloosterboer等^[12-13]认为次要组织相容性抗原特异的T细胞可以识别并溶解白血病细胞, 在供体淋巴细胞输注后诱导产生移植物抗白血病效应而无移植物抗宿主病反应中起重要的作用。供体淋

巴细胞输注这种抗白血病作用, 与输入的异体免疫活性细胞诱导的过继性免疫反应有关, 这种异源性供者淋巴细胞可以介导受者体内移植物抗白血病效应, 白细胞介素2等细胞因子可增强供体淋巴细胞输注的移植物抗白血病效应^[14]。研究表明, 白血病细胞对移植物抗白血病效应的敏感性存在很大的差别, 髓系白血病更为敏感, 而淋巴细胞白血病反应最差^[15]。不仅白血病采用过继性免疫治疗以提高长期生存率的报道逐年增多, 近年也有文献报道过继性免疫治疗晚期实体瘤取得明显疗效, 显示了供者淋巴细胞输注为主, 联合白细胞介素2等细胞因子或其他分子靶向药物治疗恶性肿瘤的良好前景^[16]。

半相合供者淋巴细胞输注抗白血病效应的机制尚未完全阐明, 可能与完全相合供者淋巴细胞输注抗白血病效应的机制相同。有研究提示, 供者淋巴细胞输注可能通过促使白血病细胞发生凋亡, 从而发挥抗白血病作用, 其中CD4⁺T细胞可能更多地引起白血病细胞的凋亡^[17]。Shi等^[18]总结了几年来相合供者淋巴细胞输注产生移植物抗白血病效应的研究成果, 认为相合供者淋巴细胞主要通过三条途径发挥移植物抗白血病效应: CD8⁺T细胞和NK细胞通过钙依赖的穿孔素途径直接溶解靶细胞; CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞能通过较缓慢的, 非钙依赖的Fas抗原途径诱导靶细胞凋亡; 细胞因子介导白血病细胞死亡或生长抑制(主要为CD4⁺细胞)。

综上所述, 供体淋巴细胞输注可以产生移植物抗白血病效应, 混合移植后应用白细胞介素2可以诱导、增强移植物抗白血病效应。在本实验中不同实验组所产生的不同长期生存率, 支持了这一观点。对没有合适的HLA相合异体造血干细胞移植供者的急性髓性白血病患者而言, 实施HLA不全相合异体造血干细胞移植, 存在并发症重, 风险大, 医疗费用高及生活质量低等诸多不利因素, 而应用混合造血干细胞移植, 并在移植后应用供体淋巴细胞输注+白细胞介素2治疗, 具有相对安全, 节省费用, 具有较高的生活质量, 不失为一种较好的治疗方法。

4 参考文献

- [1] Wang HH, Feng SZ, Wang M, et al. Zhonghua Xueyexue Zazhi. 2004; 25(7):389-392.
王荷花, 冯四洲, 王 玫, 等. 急性白血病患者第一次完全缓解期自体造血干细胞移植疗效的比较[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7): 389-392.
- [2] Feng SZ, Wei JL, Zou DH, et al. Neike Jiwei Zhongzheng Zazhi. 2005; 11(3):112-115.
冯四洲, 魏嘉璘, 邹德惠, 等. 自体造血干细胞移植治疗急性白血病患者143例疗效分析[J]. 内科急危重症杂志, 2005, 11(3):112-115.
- [3] Song AX, Yang DL, Wei JL, et al. Zhongguo Shiyao Xueyexue Zazhi. 2010; 18(1):161-166.
宋阿霞, 杨栋林, 魏嘉璘, 等. 异基因造血干细胞移植治疗75例完全缓解期急性髓系白血病的疗效及预后分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(1):161-166.
- [4] Van der Straaten HJ, Fijheer R, Dekker AW, et al. Relationship between GVHD and GVL in partial T cell-depleted bone marrow transplantation. Br J Haematol 2001; 114(1):31-35.
- [5] Peled A, Hardan I, Trakhtenbrot L, et al. Immature leukemia CD34+CX2CR4+ cells from CML patient show lower integrin dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF21. Stem Cell. 2002; 20(3):259-266.

- [6] Shimoni A, Gajewski JA, Donato I, et al. Long Term follow up of recipients of CD8-depleted donor lymphocyte infusions for the treatment of chronic myelogenous leukemia relapsing after allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(10):568-575.
- [7] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [8] Wang CB, BaU H, Xirui, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu Yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(19):3550-3553.
王存邦, 白海, 惠瑞, 等. 应用含标记基因K562细胞制备的小鼠白血病模型[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(19):3550-3553.
- [9] Wang CB, Da WM, Ji MJ, et al. *Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi*. 1998;6(3):182-186.
王存邦, 达万明, 冀孟菊, 等. 细胞因子对逆转录病毒载体介导的小鼠骨髓造血干细胞基因转移效率的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 1998;6(3):182-186.
- [10] Doderio A, Camiti C, Raganato A, et al. Haploidentical stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen for the treatment of advanced hematological malignancies: post transplantation CD8-depleted donor lymphocyte infusion contribute to improve T-cell recovery. *Blood*. 2009;113(19):4771-4779.
- [11] Stem M, Ruggeri L, Mancusi A, et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor. *Blood*. 2008;112(7):2990-2995.
- [12] Kloosterboer FM, van Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, et al. Direct cloning of leukemia reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells. *Leukemia*. 2004;18(1):798-808.
- [13] Kloosterboer FM, van Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, et al. Minor histocompatibility antigen specific T cells with multiple distinct specificities can be isolated by direct cloning of IFN γ secreting T cells from patients with relapsed leukemia responding to donor lymphocyte infusion. *Leukemia*. 2005;19(1):83-90.
- [14] Gesundheit B, Shapira MY, Resnick IB, et al. Successful cell-mediated cytokine-activated immunotherapy for relapsed acute myeloid leukemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J hematol*. 2009;84(3):188-190.
- [15] Wang J, Duan LN, Junyi Jingxiu Xueyuan Xuebao. 2010;31(1):82-83.
王洁, 段连宁. 造血干细胞移植后供者淋巴细胞输注研究进展[J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(1): 82-83.
- [16] Han Y, Yu JP, Li H, et al. *Zhongguo Zhongliu Shengwu Zhiliao Zazhi*. 2010;17(1):7-12.
韩颖, 于津浦, 李慧, 等. HLA半相合外周血活化干细胞治疗晚期实体瘤的疗效[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1):7-12.
- [17] ReN Z, Luo B, Hu JB, et al. *Linchuang Xueyexue Zazhi*. 2004;17(5):277-279.
仲任, 罗斌, 胡俊斌, 等. 半相合供者淋巴细胞输注抗急性非淋巴细胞白血病的实验研究[J]. *临床血液学杂志*, 2004, 17(5):277-279.
- [18] Shi J, Tricot G, Szmania S, et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;143(5):641-653.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 全军“十一五”杰出人才基金资助项目(编号 06J005), 兰州军区医药科研基金项目(LXH-2007006)。

作者贡献: 第一作者进行实验的设计、实施、资料收集、成文并对文章负责; 第二作者进行实验评估、文章审核; 实验实施为第三、四、五、六、七作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 以“混合骨髓移植, 供者淋巴细胞输注, 白细胞介素 2, 小鼠白血病模型, 过继免疫治疗”为关键词检索万方数据库 2001/2010 文章, 研究多为骨髓或造血干细胞移植后过继免疫治疗白血病, 关于混合骨髓移植治疗急性非淋巴细胞白血病的很少。本实验创新之处: ①选择正常免疫功能的 BALB/C 小鼠白血病模型, 理论上更接近白血病的发生和发展过程。②对白血病小鼠进行混合骨髓移植及移植后过继免疫治疗。③利用 GFP 和 NeoR 基因测定判定混合骨髓移植后过继免疫治疗的疗效优劣。



如何向 SCI 收录的优秀期刊投稿: 从审稿人意见看中国学者英语论文中出现的问题②(本刊发展部)

8、如何凸现原创性以及如何充分地写 literature review:

The topic is novel but the application proposed is not so novel.

9、对 claim, 如 A > B 的证明, verification:

There is no experimental comparison of the algorithm with previously known work, so it is impossible to judge whether the algorithm is an improvement on previous work.

10、严谨度问题:

MNQ is easier than the primitive PNQS, how to prove that.

11、格式(重视程度):

◆ In addition, the list of references is not in our style. It is close but not completely correct. I have attached a pdf file with "Instructions for Authors" which shows examples.

◆ Before submitting a revision be sure that

your material is properly prepared and formatted. If you are unsure, please consult the formatting instructions to authors that are given under the "Instructions and Forms" button in the upper right-hand corner of the screen.

12、语言问题(出现最多的问题):

有关语言的审稿人意见:

◆ It is noted that your manuscript needs careful editing by someone with expertise in technical English editing paying particular attention to English grammar, spelling, and sentence structure so that the goals and results of the study are clear to the reader.

◆ The authors must have their work reviewed by a proper translation/reviewing service before submission; only then can a proper review be performed. Most sentences contain grammatical and/or spelling mistakes or are not complete sentences.

◆ As presented, the writing is not acceptable for the journal. There are problems with sentence structure, verb tense, and clause construction.

◆ The English of your manuscript must be improved before resubmission. We strongly suggest that you obtain assistance from a colleague who is well-versed in English or whose native language is English.

◆ Please have someone competent in the English language and the subject matter of your paper go over the paper and correct it. ?

◆ the quality of English needs improving. Encouragement from reviewers:

◆ I would be very glad to re-review the paper in greater depth once it has been edited because the subject is interesting.

◆ There is continued interest in your manuscript titled "....." which you submitted to the Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials.

◆ The Submission has been greatly improved and is worthy of publication.

资料来源: blog.sina.com.cn/s/blog_5cd002ca0100fq7a.html