

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.011

· 临床研究 ·

脐带血和乳腺癌患者外周血来源 CIK 细胞 PD-1 表达及对 MCF-7 细胞杀伤

刘力伟¹, 周敏², 刘波¹, 潘跃银³ (1. 解放军第 105 医院 生物治疗中心, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽医科大学第一附属医院 重症医学科, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽省立医院 肿瘤科, 安徽 合肥 230035)

[摘要] **目的:** 探讨脐带血和乳腺癌患者外周静脉血来源的 CIK 细胞程序性死亡分子-1 (programmed cell death-1, PD-1) 的表达及其对乳腺癌 MCF-7 细胞的杀伤作用。 **方法:** 采集 2015 年 6 月至 2015 年 12 月在解放军第 105 医院住院的健康产妇脐带血和乳腺癌患者外周静脉血各 5 例, 分离 PBMC, 体外培养、扩增 CIK 细胞。流式细胞术检测不同时间节点两种来源的 CIK 细胞 PD-1 表达情况, 分别取培养第 7、14、21、28 天的 CIK 细胞与 MCF-7 细胞共培养, 细胞计数 (CCK-8) 法测定 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率, 吖啶橙-溴化乙锭双染 (AOEB) 法观察共培养后 CIK 细胞凋亡变化, 流式细胞术检测 CIK 细胞凋亡率。 **结果:** 随着体外培养时间的延长, 脐带血和乳腺癌患者静脉血来源的 CIK 细胞 PD-1 表达率均逐渐上升, 第 14 天时脐带血组 CIK 细胞 PD-1 表达率低于乳腺癌组 [(38.42 ± 4.76)% vs (50.54 ± 3.50)% , $P < 0.05$], 至第 21 天后两组 PD-1 表达率均升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养第 7、14、21、28 天两组 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率分别为 (18.54 ± 3.54)% 和 (21.74 ± 4.27)%、(71.86 ± 16.86)% 和 (58.78 ± 24.25)%、(44.32 ± 26.87)% 和 (43.96 ± 26.04)%、(43.24 ± 24.27)% 和 (40.28 ± 23.69)% , 以培养第 14 天的脐带血来源的 CIK 细胞的杀伤活性最强 ($P < 0.05$)。分析发现, 两种来源的 CIK 细胞 PD-1 表达水平与 CIK 细胞的凋亡率呈正相关 ($r = 0.971, r = 0.900$, 均 $P < 0.01$), 与杀伤率呈负相关 ($r = -0.865, r = -0.885$, 均 $P < 0.01$)。 **结论:** 活化的 CIK 细胞表面高表达 PD-1, 脐带血较乳腺癌患者静脉血来源的 CIK 细胞表面 PD-1 水平低; 培养第 14 天的 CIK 细胞凋亡率均较低, 其杀伤能力更强。

[关键词] 脐带血; 乳腺癌; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 程序性死亡分子-1; MCF-7 细胞

[临床试验注册号] ChiCTR-ONRC-13002983

[中图分类号] R730.51; R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)01-0053-05

Expression of PD-1 in CIK cells derived from umbilical cord blood or peripheral blood from breast cancer patients and the cytotoxicity of CIKs on MCF-7 cells

LIU Liwei¹, ZOU Min², LIU Bo¹, PAN Yueyin³ (1. Center of Tumor Biotherapy, the 105th Hospital of PLA, Hefei 230031, Anhui, China; 2. Intensive Care Unit, the First Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230035, Anhui, China; 3. Department of Oncology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230033, Anhui, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expressions of programmed cell death-1 (PD-1) on cytokine-induced killer (CIK) cells derived from umbilical cord blood or peripheral blood from breast cancer patients, as well as to investigate the cytotoxicity of CIK cells on MCF-7 cells. **Methods:** Umbilical cord blood from healthy pregnant women ($n = 5$) and venous blood from breast cancer patients ($n = 5$) were collected during June 2015 to December 2015 at the 105th Hospital of PLA. The PBMC was isolated, and CIK cells were differentiated and amplified *in vitro*. The PD-1 expressions on CIK cells derived from two origins at different time points were detected by FCM; CIK cells at 7th, 14th, 21st and 28th days were used for the co-culture with MCF-7 cells, and the cytotoxicity of CIK cells on MCF-7 cells was determined by CCK-8 assay; CIK cell apoptosis after co-culture was observed by AOEB, and the apoptosis rate of CIK cells was determined by FCM. **Results:** Along with the extending of incubation time, the expressions of PD-1 on CIK cells of both groups increased

[基金项目] 南京军区科技创新基金资助项目 (No:15MS048)。Project supported by the Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Military Region (No. 15MS048)

[作者简介] 刘力伟 (1987 -), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事免疫细胞和干细胞研究, E-mail: 305122376@qq.com

[通信作者] 刘波 (LIU Bo, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事肝病的研究, E-mail: 18909696241@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1525.016.html>

gradually; PD-1 expression in CIK cells devived from umbilical cord blood at 14th day was lower than that devived from peripheral blood of breast cancer patients ($[38.42 \pm 4.76]\%$ vs $[50.54 \pm 3.50]\%$, $P > 0.05$), however, the expressions increased in both groups at 21st day and the difference between two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). Cytotoxicity rates of the CIK cells on the MCF-7 cell in the two groups at 7th, 14th, 21st and 28th days after co-culture were $(18.54 \pm 3.54)\%$ and $(21.74 \pm 4.27)\%$, $(71.86 \pm 16.86)\%$ and $(58.78 \pm 24.25)\%$, $(44.32 \pm 26.87)\%$ and $(43.96 \pm 26.04)\%$ as well as $(43.24 \pm 24.27)\%$ and $(40.28 \pm 23.69)\%$ respectively, and among them the cytotoxicity of the CIK cells from umbilical cord blood at 14th day of the culturing was the highest ($P < 0.05$). According to the analysis, there was a positive correlation between PD-1 expression and CIK cell apoptosis ($r = 0.971$, $r = 0.900$, all $P < 0.01$), and a negative correlation between PD-1 expression and CIK cytotoxicity rate ($r = -0.865$, $r = -0.885$, all $P < 0.01$). **Conclusion:** The activated CIK cells had high PD-1 expression, and CIK cells from patients with breast cancer had higher PD-1 expression than CIK cells from umbilical cord blood. The apoptosis rates of CIK cells at 14th day of culture were in both groups lower, and possessed higher cytotoxicities.

[**Key words**] umbilical cord blood; breast cancer; cytokine-induced killer cell; programmed cell death-1 (PD-1); MCF-7 cell

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 53-57. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.011]

程序性死亡分子 1 (programmed cell death-1, PD-1) 可在活化的 T 淋巴细胞上表达, 与配体 PDL1 结合, 对 T 淋巴细胞活化、增殖和杀伤能力都有负性影响^[1]。CIK 细胞是体外培养的由多种细胞因子活化的 NK 细胞样的 T 细胞, 在体外实验中显示其对肿瘤细胞具有不依赖 MHC II 限制的广泛杀伤作用, 但在临床应用中疗效有限^[2], 是否与其活化后 PD-1 的表达有关? 本研究通过分别采集、培养脐带血和乳腺癌患者外周静脉血中自体 CIK 细胞, 观察其在培养过程中 PD-1 表达特点与其对乳腺癌 MCF-7 细胞杀伤作用的关系, 旨在为提高临床 CIK 细胞治疗的效果提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

A 组, 脐带血 5 份, 来自 2015 年 6 月至 2015 年 12 月在解放军第 105 医院妇产科健康剖宫产足月胎儿脐带; B 组, 5 例乳腺癌患者外周静脉血, 均为同期在解放军第 105 医院住院接受 CIK 细胞移植的患者, 年龄 35 ~ 63 岁, 中位年龄 45.6 岁。临床分期均为 IV 期, 病理类型均为浸润性导管癌。所有血样本采集均告知产妇和乳腺癌患者, 并签署知情同意书, 研究方案经医院伦理委员会批准, 并在中国临床试验研究注册中心注册(临床试验注册号: ChiCTR-ONRC-13002983)。

1.2 主要试剂

淋巴细胞分离液(Ficoll)(天津灏洋生物科技发展有限公司), 完全培养基 1640(Hyclone 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), 细胞计数(CCK-8)试剂盒、

凋亡试剂盒(日本 Dojindo 公司), IL-2、INF- γ 、CD3 单抗、IL-1、IL-4 (Peprotech 公司), 植物血凝素(PHA)(美国 Sigma 公司), CD3-FITC/CD56-PE、PD-1-PE 鼠抗人单克隆抗体及同亚型对照抗体兔抗鼠 IgG(美国 eBioscience 公司)。

1.3 CIK 细胞的分离、纯化和培养

Ficoll 两步分离法分离出单个核细胞, 用含血清培养基调整细胞密度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 于当日加入终浓度至 1 000 U/ml 的 IFN- γ ; 第 2 天加入 100 ng/ml CD3 单抗、1 000 U/ml IL-2 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA; 每隔 1 ~ 2 d 补充完全培养液, 调整细胞密度至 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 及 IL-2 终活性浓度为 1 000 U/ml, 继续培养、传代, 锥虫蓝染色, 按照活细胞计数法[细胞数 = (细胞总数/4) \times 稀释倍数 $\times 10^4$ 个/ml] 计算细胞的增殖率。

1.4 流式术检测 CIK 细胞及 PD-1⁺ 细胞表达率

取培养第 7、14、21、28 天的 CIK 细胞, 流式细胞仪分别检测各组细胞 CD3⁺ CD56⁺ 细胞数和 PD-1 细胞阳性率。计数培养细胞, 用得到的细胞密度计算所需细胞悬液体积, 每个流式管取 2×10^5 个细胞, 每瓶细胞取两管, 分别为标记管和同型对照管, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 用 4°C 预冷的 PBS 洗 2 遍后, 用 100 μl 常温 PBS 重新悬浮细胞。标记管加入抗人 CD3-FITC、CD56-PE-CY5 各 20 μl 和 5 μl 抗人 PD-1-PE, 对照管则加入抗体对应同型对照, 室温孵育 15 min, PBS 洗 2 次后用 1 ml PBS 重新悬浮细胞, 立即上机检测。在全门 FS/SS 散点图用多点门设定淋巴门, 淋巴门的数据用 CD3/CD56 散点图通过同型对照设定十字门统计 CD3⁺ CD56⁺ 的细胞比

例(右上角第二象限), 并用矩形门设定 $CD3^+$ $CD56^+$ 细胞门, 用柱形图通过同型对射门统计 $PD-1^+$ 细胞数量。

1.5 CCK8 法检测 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率

按效靶比为 20:1, 取培养第 15 天的 CIK 细胞 $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 与靶细胞 MCF-7 细胞 $5 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ 混合加入 96 孔板中, 每组样品设 3 个复孔。将培养板置饱和湿度、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵箱内培养 24 h, CCK-8 法检测各组细胞增殖改变, 用酶联免疫检测仪(波长 450 nm)检测光密度(D)值, 计算杀伤率。计算公式: 杀伤率(%) = [靶细胞 D 值 - (效应细胞 D 值 - 实验组 D 值)] / 靶细胞 D 值 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测 CIK 细胞的凋亡率

按效靶比为 20:1, 取各组培养第 7、14、21、28 天的 CIK 细胞与 MCF-7 细胞混合加入 96 孔板中, 共培养 24 h 后收集各组 CIK 细胞, 按细胞凋亡试剂盒说明操作。流式细胞仪检测各组细胞在 480 nm 波长处的光密度(D)值; 同时取部分细胞用 AOEB 双染色以鉴定细胞的凋亡, 吡啶橙能透过细胞膜而嵌入 DNA, 使之呈现绿色, 溴化乙锭仅能透过破损的细胞膜而嵌入 DNA 使之呈橘红色, 且橘红色亮度胜过吡啶橙的绿色。

1.7 统计学处理

用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞诱导后 CIK 细胞的增殖倍数及其表型变化

相同诱导条件下, 发现两组细胞在体外均可大

量增殖, 诱导 7 d 后, 光镜下可见细胞集落明显增多, 形态呈不规则形, 在第 21 天时达到增殖高峰, 脐带血组与乳腺癌血组的 CIK 细胞的扩增倍数差异无统计学意义[(680.6 ± 75.8)倍 vs (668.4 ± 51.0)倍, $t = 0.808$, $P > 0.05$]。诱导第 14 天时, 脐带血组和乳腺癌血组 CIK 细胞 $CD3^+$ $CD56^+$ 双阳性率差异无统计学意义[(44.0 ± 10.72)% vs (42.1 ± 8.31)% , $t = 1.92$, $P > 0.05$](图 1)。

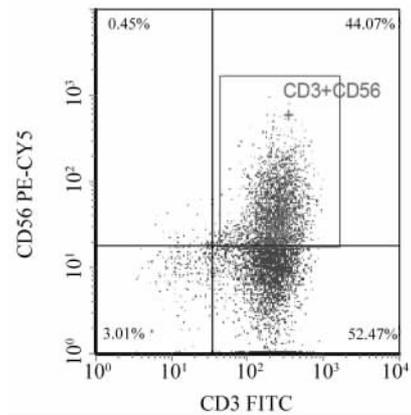


图 1 脐带血和乳腺癌静脉血 CIK 细胞的表型

Fig. 1 Phenotypes of CIK cells derived from umbilical cord blood or peripheral blood from breast cancer patients

2.2 两组 CIK 细胞不同时间 PD-1 的表达变化

流式细胞术检测结果(表 1)显示, 随培养时间的增加, CIK 细胞的 PD-1 的表达率逐渐升高。培养第 14 天的脐带血 CIK 细胞 PD-1 表达率低于乳腺癌静脉血来源的 CIK 细胞($t = 5.92$, $P < 0.05$), 培养至第 21 天后两组 PD-1 的表达率差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 不同培养时间两组 CIK 细胞 PD-1 的表达(%)

Tab. 1 Expressions of PD-1 in CIK cells of both groups at different culture time points (%)

Group	7 d	14 d	21 d	28 d
Umbilical cord blood	$15.32 \pm 2.35^*$	$38.42 \pm 4.76^*$	69.74 ± 9.54	73.06 ± 4.68
Blood of breast cancer	19.22 ± 2.38	50.54 ± 3.50	74.50 ± 7.09	73.36 ± 3.11
t	4.093	5.924	1.277	0.201
P	0.015	0.004	0.271	0.850

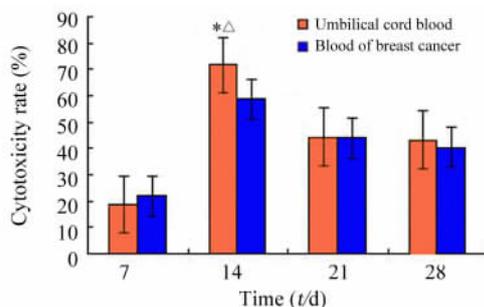
* $P < 0.05$ vs blood of breast cancer

2.3 两组 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率

CCK-8 法结果(图 2)显示, 培养第 7、14、21、28 天 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率分别为 (18.54 ± 3.54)% 和 (21.74 ± 4.27)%、($71.86 \pm$

16.86)% 和 (58.78 ± 24.25)%、(44.32 ± 26.87)% 和 (43.96 ± 26.04)%、(43.24 ± 24.27)% 和 (40.28 ± 23.69)%, 结果表明培养第 14 天脐带血来源的 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率明显高

于乳腺癌患者静脉血来源的 CIK 细胞 ($P < 0.05$); 组内相比, 培养第 14 天的 CIK 细胞杀伤率亦高于其他时间点 ($P < 0.05$)。



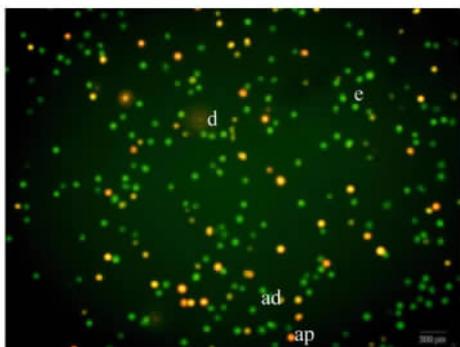
* $P < 0.05$ vs blood of breast cancer;
[△] $P < 0.05$ vs other time points

图 2 脐带血和乳腺癌静脉血 CIK 细胞对 MCF-7 细胞的杀伤率比较

Fig. 2 Comparison of the cytotoxicity rate of CIK cells on MCF-7 cells between umbilical cord blood group and blood of breast cancer group

2.4 共培养后 CIK 细胞的凋亡率

AOEB 双染色法、荧光显微镜观察结果(图 3)可见, 培养 28 d 的 CIK 细胞在与 MCF-7 细胞共培养后有明显凋亡。流式细胞术检测结果显示, 两种来源的 CIK 细胞的凋亡率分别为 (29.68 ± 3.52)% 和 (32.88 ± 5.84)%, 差异无统计学意义 ($t = 2.71, P > 0.05$)。



d: Dead cell; e: Living cell; ad: Advanced apoptotic cell; ap: Apoptotic cell

图 3 CIK 细胞与 MCF-7 细胞共培养第 28 天的凋亡图(AOEB 染色, $\times 200$)

Fig. 3 The apoptosis of CIK cells after co-culturing with MCF-7 cells at 28th day(AOEB staining, $\times 200$)

2.5 共培养后 CIK 细胞的 PD-1 表达与杀伤力、凋亡率的相关性

脐带血和乳腺癌静脉血来源的 CIK 细胞与 MCF-7 细胞共培养 24 h 后, CIK 细胞 PD-1 的表达与 CIK 细胞的凋亡率呈显著正相关 ($r = 0.971, r = 0.900$; 均 $P < 0.01$), 与杀伤率呈显著负相关 ($r = -0.865, r = -0.885$; 均 $P < 0.01$); 而 CIK 细胞的杀伤率与凋亡率呈负相关 ($r = -0.877, r = -0.869$; 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

免疫卡控点是近年来肿瘤免疫治疗研究等热点, 其中 PD-1 是关注的焦点之一。PD-1 可以在 T 细胞表面表达, 而其配体之一的 PDL1 在许多肿瘤增殖微环境中发挥负性信号的作用, 可能通过阻断 T 细胞活化第一、二信号, 阻止效应性 T 细胞活化增殖, 导致对肿瘤细胞的免疫无能, 同时还可能对辅助调节性 T 细胞发挥抑制作用^[3-4]。有研究^[5]表明, T 细胞活化可使 PD-1 表达逐步上调, 而 CIK 细胞是活化的 NK 细胞样 T 细胞, 其表面 PD-1 的表达情况并不清楚。本试验通过观察脐带血和乳腺癌患者静脉血 CIK 细胞体外增殖、凋亡和对乳腺癌 MCF-7 细胞杀伤力的试验发现, CIK 细胞表面 PD-1 的表达随培养时间的延长逐步上升, 21 d 后达到高峰。脐带血来源的 CIK 细胞 PD-1 表达稍低, 特别是在培养 14 d 之前, PD-1 的表达明显低于乳腺癌患者自体 CIK 细胞, 究其原因, 可能与脐带血中的淋巴细胞的绝对值较高, 有一定比例的幼稚细胞, 具有较强的增殖潜力, 也导致其来源的 CIK 细胞较幼稚有关^[6]。

有研究^[7-8]认为, CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤主要依赖的效应细胞是 $CD3^+/CD56^+$ 细胞。本试验表明, 随着体外 CIK 细胞培养时间的延长, $CD3^+/CD56^+$ 细胞比例逐渐升高, 培养 28 d 后达到高峰, 推测此时的 CIK 细胞应该具有最强的杀伤力。然而, 大量的研究^[9-10]表明, CIK 细胞体外杀伤能力在 14 ~ 28 d 最佳。将 CIK 细胞与 MCF-7 细胞共培养后发现, 脐带血和乳腺癌患者来源的 CIK 细胞均在培养第 14 天时显示出最强的杀伤能力, 杀伤率分别为 (71.86 ± 16.86)% 和 (58.78 ± 24.25)%, 也验证了上述结论。进一步的相关分析显示, CIK 细胞 PD-1 的表达与 CIK 细胞的凋亡率呈正相关, 而杀伤率与凋亡率之间呈负相关, 此结果表明, 培养时间较长的 CIK 细胞, 虽然 $CD3^+/CD56^+$ 细胞数量增加, 但同时 PD-1 的表达也明显增高, 导致 CIK 细胞在与靶细胞共培养时凋亡率上升、细胞杀伤力的下降, 无论脐带血还是乳腺癌患者静脉血来源的 CIK 细

胞都存在此现象,而且脐带血来源的 CIK 细胞在培养第 14 天的杀伤力强于乳腺癌患者静脉血来源的 CIK 细胞,可能与此时脐带血来源的 CIK 细胞 PD-1 表达较低有关,此结果与笔者前期与肝癌患者来源的 CIK 细胞比较研究^[11]结果相似。有研究^[12]表明,乳腺癌细胞表面高表达 PDL1,多因素 COX 回归分析结果显示 PDL1 是影响乳腺癌患者生存的独立因素。本试验结果表明,CIK 细胞的 PD-1 的表达与杀伤率呈负相关,此可能是影响乳腺癌患者生存的原因之一。阻断 PD-1 能提高 T 淋巴细胞分泌细胞因子的量和杀伤能力^[13],在后续的研究中笔者尝试抑制 CIK 细胞表面 PD-1 的表达,以期能进一步提高 CIK 细胞的杀伤能力。

[参 考 文 献]

- [1] RIBAS A. Tumor immunotherapy directed at PD-1[J]. N Engl J Med, 2012, 366 (26): 2517-2519. DOI: 10. 1056/NEJM1205943.
- [2] COUZIN-FRANKEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. Science, 2013, 342(6165): 1432-1433. DOI: 10. 1126/science. 342. 6165. 1432.
- [3] FRANCISCO L M, SAGE P T, SHARPE A H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J/OL]. Immunol Rev, 2010, 236: 219-242 [2016-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919275/>. DOI:10. 1111/j. 1600-065X. 2010. 00923. x.
- [4] SAKHNO L V, TIKHONOVA M A, TYRINOVA T V, et al. Cytotoxic activity of dendritic cells as a possible mechanism of negative regulation of T lymphocytes in pulmonary tuberculosis[J/OL]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 628-635 [2016-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465906/>. DOI:10. 1155/2012/628635.
- [5] BROWN J A, DORFMAN D M, MA F R, et al. Blockade of programmed death-ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production[J]. J Immunol, 2003, 170(3): 1257-1266. DOI: 10. 4049/jimmunol. 170. 3. 1257.
- [6] WEI X C, YANG D D, HAN X R, et al. Bioactivity of umbilical cord blood dendritic cells and anti-leukemia effect[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 19725-19730. PMID:26770637.
- [7] 黄建云, 邓晖, 高小华, 等. 健康人和肿瘤患者 CIK 细胞的生物学特性比较及应用[J]. 广东医学, 2011, 20(32): 2621-2624.
- [8] 扬现, 赵艳敏, 高笑天, 等. CIK 细胞不同培养时间的生物学活性[J]. 中国医药导报, 2013, 10(1): 12-14. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7210. 2013. 01. 005.
- [9] MESIANO G, TODOROVIC M, GAMMAITONI L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(6): 673-684. DOI: 10. 1517/14712598. 2012. 675323.
- [10] JIANG, J T, WU C P, LU B F. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity[J/OL]. J Transl Med, 2013, 11: 83 [2016-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617047/>. DOI:10. 1186/1479-5876-11-83.
- [11] 刘力伟, 李嘉嘉, 朱立新, 等. 脐血合并乙型肝炎病毒感染肝癌患者来源 CIK 细胞的增殖及杀伤活性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(6): 321-326. DOI: 10. 3871/j. issn: 1007-385X. 2014. 06. 016.
- [12] 区燕华, 林骏, 罗深秋. 程序性死亡因子配体 1 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2015, 36(10): 1515-1517.
- [13] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2443-2454. DOI: 10. 1056/NEJMoa1200690.

[收稿日期] 2016 - 08 - 21 [修回日期] 2016 - 11 - 24

[本文编辑] 党瑞山

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB/T 3358 - 2009《统计学词汇及符号》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)