

金黄色葡萄球菌致新西兰兔脓胸生物被膜模型的建立^{*}

张文淑 唐秀家 叶柳锯 王可^{*}

广西医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 广西南宁 530021

摘要 目的:建立金黄色葡萄球菌感染的新西兰兔脓胸模型,观察其胸腔内是否有生物被膜形成。方法:选取 24 只健康雄性新西兰兔按随机数字表法分为实验组和对照组,各 12 只。通过胸腔穿刺术于右侧第六肋间隙将导管置入胸腔,实验组注射剂量为 2 mL/kg 的 10^8 CFU/mL 金黄色葡萄球菌,对照组使用相同剂量的 Luria-Bertani (LB) 肉汤。建模后持续饲养并于第 4 天收集胸腔留置导管进行活菌计数和结晶紫染色。收集所有脓性絮状物的匀浆液和洗涤液用于菌落计数。切取壁层胸膜组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色,观察胸膜病理改变情况;肽核酸荧光原位杂交 (PNA-FISH) 用于观察脓性絮状物中的生物被膜形成。结果:与对照组比较,实验组患侧胸腔有脓性絮状物形成和胸膜粘连。实验组导管菌落计数显著大于对照组 ($P < 0.01$),结晶紫染色 OD 值显著高于对照组 ($P < 0.05$)。通过计算匀浆液和洗涤液的 CFU,验证了实验组胸腔内积聚了大量金黄色葡萄球菌。HE 染色结果显示,实验组胸膜明显增厚,并伴随有大量炎症细胞浸润。PNA-FISH 结果证实实验组兔子胸腔脓性絮状物中有生物被膜形成。结论:金黄色葡萄球菌致新西兰兔脓胸感染模型中,胸膜腔内存在生物被膜。

关键词 金黄色葡萄球菌; 脓胸; 导管; 生物被膜

中图分类号 R561.6 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20230316

Establishment of biofilm model of empyema in New Zealand rabbits induced by *Staphylococcus aureus* ZHANG Wen-shu, TANG Xiu-jia, YE Liu-mei, WANG Ke^{*}. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Nanning 530021, China

Corresponding author: WANG Ke, E-mail: keewang@hotmail.com

Abstract Objective: To establish a New Zealand rabbit empyema model infected by *Staphylococcus aureus*, and observe whether there is biofilm formation in the thorax. Methods: A total of 24 healthy male New Zealand rabbits were selected and divide into experimental group and control group according to the random number table method, 12 in each group. Right side sixth intercostal space thoracentesis was used to introduce a catheter into the chest cavity. *Staphylococcus aureus* (10^8 CFU/mL) was administered to the experimental group at a dose of 2 mL/kg, whereas Luria-Bertani (LB) broth was administered to the control group at the same amount. Following the creation of the model, feeding proceeded, and on the fourth day, indwelling catheters in the chest cavity were collected for counting live bacteria and crystal violet staining. For colony counts, homogenates and washes of all purulent flocs were gathered. To evaluate the pathological changes to the parietal pleura, tissue was removed and stained with hematoxylin-eosin (HE). The peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) was utilized to observe the development of a biofilm within the purulent floc. Results: In the injured thorax of the experimental group, there were purulent floc development and pleural adhesions in comparison to the control group. Both the colony count of the catheter and the absorbance value of the crystal violet staining in the experimental group were substantially greater than in the control group ($P < 0.05$). It was determined that a significant amount of *Staphylococcus aureus* had accumulated in the chest cavity of the experimental group by calculating the CFU of the homogenate and washing solutions. The results of the HE staining revealed that the pleura in the experimental group had greatly thickened along with a significant infiltration of inflammatory cells. The purulent flocs in the pleural cavity of the experimental group had biofilm formation, according to the PNA-FISH data. Conclusion: A biofilm is present in the pleural cavity in the *Staphylococcus aureus*-induced New Zealand rabbit empyema infection model.

Key words *Staphylococcus aureus*; Empyema; Catheter; Biofilm

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No:81760024); 广西自然科学基金面上资助项目 (No:2022GXNSFAA035646)

^{*} 通信作者:王可, E-mail: keewang@hotmail.com, 广西南宁市双拥路 6 号

脓胸是指病原菌进入到胸膜腔,出现化脓性渗出物,积聚于胸膜腔内^[1]。脓胸的主要致病菌为金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和假单胞菌属菌等^[2],其中金黄色葡萄球菌是最常见的感染微生物^[3,4],非常容易黏附于导管(如静脉导管、气管插管等)及植入设备(如起搏器、心脏瓣膜等)表层并产生生物被膜^[5]。金黄色葡萄球菌感染后胸膜腔内生物被膜形成及其对药物产生抵抗是该类疾病预后差的最为关键的因素之一^[6]。

生物被膜是指由微生物细胞自身产生的胞外基质聚合物包裹的三维立体结构^[7],除了细菌自身所释放的基质之外,源自于宿主的相关成分,如纤维蛋白等,也可以融合于生物被膜之中,共同保护细菌抵抗各类抗菌药治疗,减少机体免疫应答反应以及吞噬效应^[8,9]。本研究通过建立兔金黄色葡萄球菌感染脓胸模型,观察验证金黄色葡萄球菌感染致脓胸胸膜腔内是否有生物被膜形成。

材料与方法

实验动物 清洁级健康雄性新西兰兔 24 只,体重(2.5 ± 0.3) kg,购于广西医科大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK 桂 2014-0003;生产许可证号:SCXK 桂 2014-0002。饲养于独立的兔笼中,自由饮食,环境温度(25 ± 2)℃,相对湿度 65%,正常大气流动。实验方案经过医院伦理委员会审核,伦理审批号:NO. 2022-KY-E-(079)。

主要仪器和试剂 超净台(苏州净化);双功能气浴恒温振荡器(常州金坛良友 ZD-85);紫外分光光度计(Thermo Evolution 20);生物安全柜(苏净安泰 BSC-130011A2);多功能酶标仪(Thermo Fisher 3020);快速混匀器(江苏新康 XK80-A);生化培养箱(恒宇 SPX-300-II);常温离心机(德国赫默 Z366);超低温冰箱(Thermo 995),一次性输液用 6 号头皮针管(岳阳民康);LB 琼脂粉、LB 肉汤(北京陆桥);戊巴比妥钠(SIGMA);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(索莱宝);PNA-FISH 试剂盒(AdvanDx, MA, 美国);磷酸缓冲盐溶液(PBS)(索莱宝 0.01M pH7.2-7.4);一次性接种环(湖南比克曼);一次性涂布棒、细菌培养皿(广州洁特)。

菌液的制备 本实验所用菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923(购自上海康朗生物,货号:A0078),加入 25% 甘油的 LB 培养基中, -80°C 存储备用。生物安全柜紫外照射 30 min 后,使用一次性接种环刮取适量菌体接种到 LB 培养皿,置于 37°C 培养

18~24 h。之后挑取单个菌落,在 37°C ,220 转/min 气浴恒温振荡器中连续增殖 14~16 h。常温 3 000 转/min 离心 15 min,弃上清,PBS 洗涤 2 次。使用紫外分光光度计进行调菌,参数定为 $\text{OD}_{450} = 0.60$ (菌量是 10^9 CFU/mL),使用 LB 肉汤稀释为 10^8 CFU/mL,最终经菌落计数法确认细菌浓度。

新西兰兔脓胸模型的建立 将 24 只兔子按照随机数字表法分成对照组和实验组,各 12 只。经耳缘静脉缓慢注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉,固定在手术台上,剃毛备皮,定位第 6 肋间(距脊柱 4~5 cm)为穿刺点。碘伏消毒铺巾,沿穿刺点做一长约 2 cm 切口,直镊辅助导管(6 号头皮针管,岳阳民康)进行胸腔穿刺,检查导管是否位于胸腔中。注射器插入导管末端进行回抽,排出穿刺过程中可能进入胸腔的气体。依据 2 mL/kg 用量,经导管注入剂量为 10^8 CFU/mL 的上述菌液至实验组兔子右侧胸腔内,随后注入 2 mL PBS 溶液冲洗导管。将 6 cm 长导管全部送至胸腔内后进行穿刺切口缝合。缓慢晃动兔子,使菌液均匀分布在胸腔内,待兔子苏醒后送回兔笼继续饲养。对照组则于右侧胸腔中注入相同剂量的 LB 肉汤,其它的操作和实验组相同。

胸膜粘连评分 建模后第 4 天,经耳缘静脉注射过量戊巴比妥钠麻醉处死兔子,胸壁常规消毒铺巾后,使用高压灭菌手术器械开胸,拍照记录兔子胸腔大体观。通过胸腔积液量和胸膜粘连评分来评估脓胸的严重程度,实验结果由 2 名不知实验设计分组的实验员进行评分。按照脓胸评分量表(0~4 分)^[10]:0 = 正常胸腔;1 = 黏液稀薄的脏、壁层胸膜;2 = 胸膜剥脱很少,只有少量脓性渗出液;3 = 中度胸膜剥脱伴脓性渗出物;4 = 大量脓性渗出物。

留置导管分析 取出留置导管,清除表面絮状物,生理盐水冲洗导管内外表面。切取一半导管置入盛有 2 mL 生理盐水的洁净离心管中,使用快速混匀器震荡 10 min 后,超声清洗 1 min,随后将该溶液稀释后均匀涂盘,培养 18~24 h 后进行活菌计数。收集另一半导管进行结晶紫染色,导管洗涤 3 次后对半剪开到 24 孔板中,用 0.1% 结晶紫染色 15 min,冲洗 3 次。待导管干燥后,用 33% 冰醋酸脱色 20 min,通过酶标仪检测 580 nm 处 OD 值。

肽核酸荧光原位杂交(PNA-FISH) 将脓性絮状物收集在盛有 10 mL PBS 溶液的试管中。洗涤 2 次后,匀浆机匀浆 3 min,收集洗涤液和匀浆液用于菌落计数。将匀浆置于载玻片上并用火焰固定,在暗视野中滴加 10 μL 金黄色葡萄球菌特异性 PNA

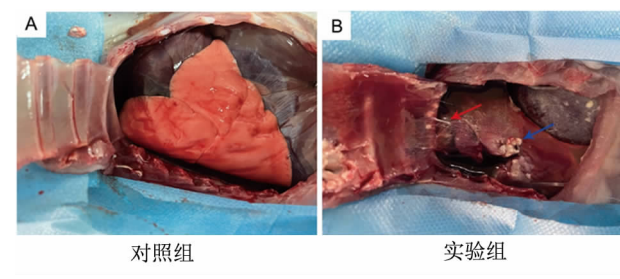
探针于玻片上进行杂交,盖上盖玻片后封胶,置于 55℃ 避光湿盒中孵育 60 min。在黑暗环境下,去除胶水和盖玻片,将载玻片浸入已预热至 55℃ 的洗涤液中 30 min。载玻片自然干燥后,加入 DAPI 染色 15 min,然后用荧光显微镜观察载玻片。从每张 PNA-FISH 载玻片中随机选取 3 个视野在 10 × 显微镜下观察生物被膜的形成情况。

组织病理学检查 取所有动物右侧壁层胸膜组织,放入到甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋后切片,行 HE 染色。每张切片随机选取 3 个视野在 10 × 显微镜下观察,测量胸膜厚度,记录平均值。

统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

脓胸模型评估 共有 24 只新西兰兔完成实验,建模后,实验组兔子精神状态较差,呼吸频率加快,摄食与饮水减少,排便正常,活动量减少,对照组未见明显异常。兔子感染金黄色葡萄球菌 4 d 后,脏层胸膜与壁层胸膜出现不同程度的胸膜粘连和纤维蛋白沉积,革兰染色发现阳性菌。对照组胸腔内无脓性分泌物,胸膜表面光滑,见图 1。

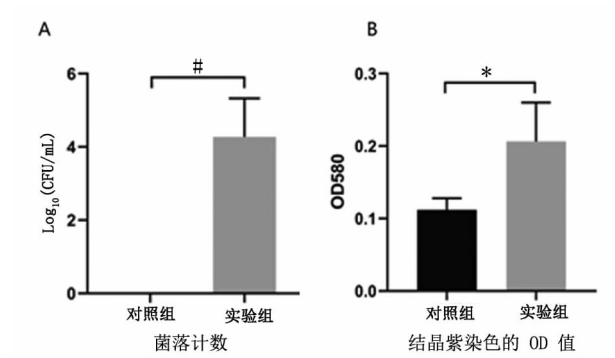


注:红色箭头指向粘连条带,蓝色箭头指向脓性絮状物
图 1 新西兰兔脓胸大体观

胸膜粘连评分及厚度 与对照组比较,实验组胸膜粘连评分及厚度均更高(*P* 均 < 0.05),见表 1。

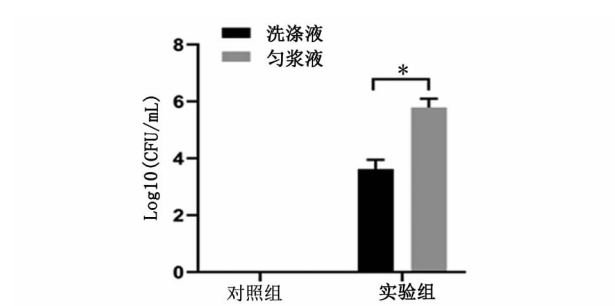
表 1 2 组兔子胸膜粘连评分及厚度比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	胸膜粘连评分(分)	胸膜厚度(mm)
实验组	2.07 ± 0.88	192.61 ± 88.29
对照组	0.40 ± 0.52	41.01 ± 7.96
<i>P</i> 值	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> < 0.001

导管细菌学和结晶紫染色 实验组胸膜腔内导管菌落数量明显高于对照组(*P* < 0.01)。对照组胸膜腔内导管未培养出细菌。实验组结晶紫染色 OD 值高于对照组(*P* < 0.05),见图 2。



注:与对照组比较,**P* < 0.05、#*P* < 0.01
图 2 留置导管的菌落计数和结晶紫染色结果

洗涤液和匀浆液 通过对比实验组脓性絮状物的洗涤液和匀浆的菌落计数,发现洗涤液中的细菌数显著少于匀浆液(*P* < 0.001)。对照组的菌落计数为零,见图 3。



注:与对照组比较,**P* < 0.001
图 3 脓性絮状物洗涤液和匀浆液的菌落计数结果

肽核酸荧光原位杂交 通过 PNA-FISH 方法检测金黄色葡萄球菌核糖体 RNA,进一步验证在实验组脓性絮状物中的三维立体结构。对于对照组,几乎没有脓性渗出物,见图 4A。实验组中大量细菌(绿色)被宿主细胞(蓝色)包围,显示出明亮的 PNA-FISH 信号,见图 4B。这些结构就是生物被膜。

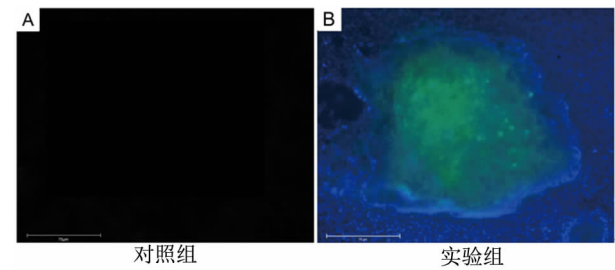


图 4 脓性絮状物 PNA-FISH 分析(10 ×)

胸膜组织病理学 与对照组比较,实验组胸膜组织显著增厚,伴随大量的炎性细胞浸润,以中性粒细胞和淋巴细胞浸润为主,见图 5。

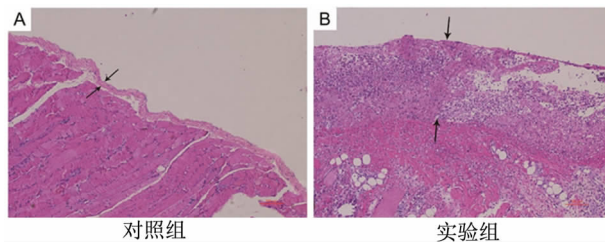


图 5 新西兰兔脓胸壁层胸膜 HE 染色图(10 ×)

讨 论

金黄色葡萄球菌属革兰阳性球菌,能产生如 α 肠毒素、杀白细胞素、休克综合征毒素、血浆凝固酶等多种毒力因子^[11],可引起机体多部位感染,如皮下软组织、肺、心内膜、骨髓、手术切口等^[12]。金葡菌生物被膜的形成是一个复杂的动态过程,分为 4 个阶段:黏附、聚集、成熟和扩散^[13]。首先,浮游细菌可逆性附着在异物表面,接着产生细胞外基质导致不可逆附着,形成细菌聚集体。随后细菌增殖、分化,形成多层细胞结构的生物被膜样三维立体结构。最后生物被膜逐渐成熟,细菌与生物被膜脱离返回浮游菌状态^[14]。生物被膜的形成成为细菌提供了有利于生存与繁殖的微环境,且生物被膜中的细菌大多对抗生素不敏感,部分抗生素不具有渗透性或延缓渗透,这使得细菌的致病性和耐药性明显增强^[15]。目前金葡菌感染的治疗方法仍然是使用高浓度或不同组合的抗生素^[16],而生物被膜相关感染为临床上的治疗带来了巨大困难^[17]。

实验结束后,取出兔子胸腔内导管,本研究发现导管周围有大量脓性絮状物,将其与导管分离并收集。通过导管菌落计数,证实了胸腔腔内积聚了大量金黄色葡萄球菌。导管结晶紫染色表明细菌可以定植于导管表面生长。许多研究表明,留置导管与植入物表面会定植大量细菌^[18],与本研究的結果一致。脓性絮状物 PNA-FISH 结果显示,胸膜表面有生物被膜形成。以上结果共同表明,本研究成功建立了金黄色葡萄球菌致新西兰兔脓胸生物被膜模型。

在先前关于脓胸的研究中,很少有研究证实胸腔腔内有生物被膜的形成^[19],对生物被膜相关感染的发病机制及治疗方法的认知存在严重不足。在脓胸治疗中,引流联合抗生素一直是标准治疗方案^[20],但生物被膜的形成可显著降低抗生素的治疗效果^[21],常用的抗生素种类不能穿透生物被膜杀灭

细菌^[22]。因此,一旦感染的胸腔腔内有生物被膜形成时,就会导致胸腔腔慢性复发脓肿感染,大大增加医疗负担^[23]。此外,留置导管上的生物被膜形成会使临床脓胸引流管的管理更加困难。

本研究通过构建金黄色葡萄球菌感染致胸腔腔脓胸新西兰兔模型,证实了金黄色葡萄球菌胸腔腔感染可导致生物被膜的形成,该模型的成功建立为进一步研究金黄色葡萄球菌在胸腔环境中的生长特性、耐药机制及其相应的诊疗策略提供了实验基础。将有助于对金黄色葡萄球菌相关生物被膜进行深入研究,为进一步阐明金葡菌生物被膜在胸腔的病理生理学机制并探索更好的治疗方法打下坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 Bobbio A, Bouam S, Frenkiel J, et al. Epidemiology and prognostic factors of pleural empyema [J]. *Thorax*, 2021, 76(11):1117-1123.
- 2 Liese JG, Schoen C, van der Linden M, et al. Changes in the incidence and bacterial aetiology of paediatric parapneumonic pleural effusions/empyema in Germany, 2010-2017: a nationwide surveillance study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(7):857-864.
- 3 Chen Z, Cheng H, Cai Z, et al. Identification of microbiome etiology associated with drug resistance in pleural empyema [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:637018.
- 4 Hassan M, Cargill T, Harriss E, et al. The microbiology of pleural infection in adults: a systematic review [J]. *Eur Respir J*, 2019, 54(3):1900542.
- 5 Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures [J]. *Periodontol*, 2011, 55(1):87-103.
- 6 Roy R, Tiwari M, Donelli G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action [J]. *Virulence*, 2018, 9(1):522-554.
- 7 Otto M. Staphylococcal Biofilms [J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(4):10.
- 8 Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65(2):127-145.
- 9 Blackman LD, Qu Y, Cass P, et al. Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents [J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(3):1587-1616.
- 10 Zhu Z, Hawthorne ML, Guo Y, et al. Tissue plasminogen activator combined with human recombinant deoxyribonuclease is effective therapy for empyema in a rabbit model [J]. *Chest*, 2006, 129(6):1577-1583.
- 11 Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, et al. Staphylococcus aureus infections: epidemiology pathophysiology clinical manifestations and management [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3):603-661.
- 12 Lowy FD. Staphylococcus aureus infections [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(8):520-532.

- 13 Chessa D, Ganau G, Spiga L, et al. Staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis virulence strains as causative agents of persistent infections in breast implants [J]. PLoS one, 2016, 11(1): e0146668.
- 14 Ming D, Wang D, Cao F, et al. Kaempferol inhibits the primary attachment phase of biofilm formation in staphylococcus aureus [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2263.
- 15 Frassinetti S, Falleni A, Del Carratore R. Effect of itraconazole on Staphylococcus aureus biofilm and extracellular vesicles formation [J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104267.
- 16 代兆华, 郭萌, 贾玉凤, 等. 胸腺肽 $\alpha 1$ 联合利奈唑胺提高耐甲氧西林金黄色葡萄球菌呼吸机相关性肺炎患者治疗效果和免疫功能[J]. 内科急危重症杂志, 2021, 27(6): 480-483, 500.
- 17 Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure regulation and treatment strategies [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2020, 84(3): e00026-19.
- 18 Mese B, Bozoglan O, Elveren S, et al. Efficacy of linezolid teicoplanin and vancomycin in prevention of an experimental polytetrafluoroethyl-

- ene graft infection model caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 909-914.
- 19 Psallidas I, Corcoran JP, Rahman NM. Management of parapneumonic effusions and empyema [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2014, 35(6): 715-722.
- 20 Ferreiro L, Porcel JM, Bielsa S, et al. Management of pleural infections [J]. Expert Rev Respir Med, 2018, 12(6): 521-535.
- 21 Zhang F, Wang B, Liu S, et al. Bacillus subtilis revives conventional antibiotics against staphylococcus aureus osteomyelitis [J]. Microb Cell Fact, 2021, 20(1): 102.
- 22 Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, et al. Prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(12): 1499-1516.
- 23 McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in Staphylococcus aureus [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 1.

(2022-06-01 收稿 2023-03-15 修回)

(上接第 227 页)

基化试剂,可发挥抑制甲基化转移酶的作用,在磷酸化后掺入 DNA,可实现对 DNA 甲基化转移酶的抑制,继而导致 DNA 低甲基化,实现抗肿瘤作用。此外,观察组预后明显优于对照组。分析原因可能是地西他滨可有效抑制 DNA 甲基化转移酶的活性,从而引起 DNA 甲基化水平的降低,重新调控抑癌基因的表达,继而达到改善预后的目的。另外,经多因素 Logistic 回归分析发现:年龄 ≥ 60 岁、IPSS 分级为中危、未采用地西他滨治疗均是低中危 MDS 患者死亡的危险因素。即随着年龄的不断增长、病情的加重及未采用地西他滨治疗, MDS 患者的死亡风险越高。主要原因可能在于:随着年龄的不断增长,患者自然衰老,普遍存在机体循环功能以及生理储备功能的不同程度衰退,降低了药物敏感性,加之随着年龄的增长合并基础疾病的风险增加,增加临床治疗难度,最终对其预后转移造成负面影响。IPSS 分级为中危患者的病情相较于低危患者更为严重,临床治疗更为棘手,药物可发挥的作用有限,可能导致患者无法获得较佳的预后效果。而未采用地西他滨治疗的患者无法从地西他滨中获取抗肿瘤作用,不利于疾病的有效控制,导致生存周期越短^[11]。由此可见,在临床实际工作中应重点关注年龄较大及 IPSS 分级为中危的 MDS 患者,对其进行密切监测观察,并及时评估预后。针对无地西他滨治疗禁忌证的患者,可首先考虑地西他滨治疗,从而获取较为理想的效果。

参 考 文 献

- 1 赵文舒,戴敏. 骨髓增生异常综合征治疗现状[J]. 内科急危重症杂志, 2022, 28(2): 89-94.
- 2 陆敏秋,鲍立,褚彬,等. 地西他滨单药治疗中高危骨髓增生异常综合征和急性髓系白血病的疗效观察[J]. 中国全科医学, 2020, 23(35): 4443-4447.
- 3 陈园园,石锐,郭素青,等. 地西他滨治疗伴 DNA 甲基转移酶基因突变的骨髓增生异常综合征患者的疗效分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(4): 1292-1297.
- 4 马家乐,王炎,向立丽,等. 地西他滨为基础的化疗方案治疗难治性贫血伴原始细胞增多的最佳疗效及预后因素分析[J]. 中国医师杂志, 2020, 22(2): 258-262.
- 5 常春康,许峰. 骨髓增生异常综合征预后评分[J]. 天津医药, 2018, 46(8): 804-807.
- 6 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(2): 89-97.
- 7 李振波,陈丽梅,陆诚. 小剂量地西他滨治疗高危骨髓增生异常综合征的效果[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(14): 8-9.
- 8 Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia [J]. Blood, 2006, 108(2): 419-425.
- 9 Greenplate AR, Johnson DB, Roussel M, et al. Myelodysplastic Syndrome Revealed by Systems Immunology in a Melanoma Patient Undergoing Anti-PD-1 Therapy[J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(6): 474-480.
- 10 李章坤,赖应昌,李坤,等. 超长疗程国产地西他滨治疗中危骨髓增生异常综合征一例并文献复习[J]. 白血病. 淋巴瘤, 2017, 26(12): 758-760.
- 11 叶丽,任艳玲,谢丽丽,等. 小剂量地西他滨治疗较低危骨髓增生异常综合征患者疗效初步观察[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(4): 307-312.
- 12 舒华城,方腾. 地西他滨治疗低中危骨髓增生异常综合征的疗效及患者生存预后因素分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(1): 214-217.
- 13 李依,刘晓倩,郭佳丽,等. 多种血液肿瘤中 NK 细胞受体表达差异的临床意义[J]. 内科急危重症杂志, 2022, 28(3): 220-224.

(2021-11-05 收稿 2023-03-06 修回)