

# 下调 Nrf2 及 TrxR 表达对慢性髓性白血病细胞增殖的影响及机制探讨

潘飞 许莲蓉 王宏伟 朱孟霞 刘艳 覃艳红 陈秀花 任方刚

**【摘要】** 目的 研究核因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 及硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 基因表达对慢性髓性白血病 (CML) 细胞增殖的影响并初步探讨其作用机制。方法 根据 siRNA 序列设计原则, 设计并合成四条针对 Nrf2 的小分子干扰 RNA (siRNA) 及一条阴性对照 siRNA, 并构建慢病毒载体, 转染 CML 细胞系 K562 细胞, 以未转染的细胞作为空白对照; 应用激光共聚焦显微镜观察转染效果, 流式细胞术检测转染效率; 实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 的抑制效应; CCK-8 法检测细胞增殖抑制率; 膜联蛋白 A5 (Annexin V-PE)/碘化丙锭 (PI) 双染法流式细胞术检测细胞凋亡率, 激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡状态。结果 慢病毒转染效率达 65%, 实时荧光定量 PCR 检测显示明显抑制 Nrf2 表达的细胞克隆为 K562-C3, 其 Nrf2 相对表达水平 ( $1.003 \pm 0.093$ ) 高于对照组 ( $0.344 \pm 0.032$ ); TrxR 相对表达水平 ( $1.090 \pm 0.549$ ) 高于对照组 ( $0.395 \pm 0.029$ ), 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $< 0.001$ ); CCK-8 法检测显示转染 Nrf2 特异 siRNA 24、48、72 h 细胞的 K562-C3 细胞增殖抑制率分别为 ( $4.74 \pm 0.39$ )%、( $6.13 \pm 1.78$ )% 和 ( $25.36 \pm 3.77$ )%; 转染 72 h 的 K562-C3 细胞凋亡率 (29.9%) 与对照组 (7.9%) 比较明显提高; 激光共聚焦显微镜显示 Annexin V-PE 标记阳性细胞出现核固缩、核碎裂及凋亡小体形成等凋亡特征。结论 在细胞水平上, Nrf2 特异的 siRNA 转染 K562 细胞可抑制 Nrf2 表达并引起下游调控的抗氧化酶如 TrxR 表达下调, 抑制 K562 细胞增殖, 促进细胞凋亡。

**【关键词】** K562 细胞; NF-E2 相关因子 2; 硫氧还蛋白还原酶; RNA 干扰; 细胞凋亡

**Effect of Nrf2 and TrxR on proliferation of chronic myeloid leukemia cell and its mechanism** PAN Fei, XU Lian-rong, WANG Hong-wei, ZHU Meng-xia, LIU Yan, TAN Yan-hong, CHEN Xiu-hua, REN Fang-gang. Department of Hematology, 2nd Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China  
Corresponding author: XU Lian-rong, Email: xulianrong@sohu.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) and thioredoxin reductase (TrxR) gene on proliferation of chronic myeloid leukemia (CML) line cells and its mechanism. **Methods** Four interfering sequences of Nrf2 and one negative control sequence were designed and synthesised based on the principle of target sequence of siRNA, then constructed lentivirus vectors, which were transfected into K562 cell lines. The transfection effect was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM) and flow cytometer (FCM); The depressing effect of siRNA was analyzed by real-time PCR. The cell proliferation inhibiting rate was measured with CCK-8 assay, the apoptotic rate by Annexin V-PE/PI with FCM and the apoptotic morphology of cells by LSCM. **Results** The transfection efficiency of lentivirus was 65%. One cell line K562-C3 which significantly inhibited Nrf2 mRNA was obtained by real-time PCR, Nrf2 relative quantitation (RQ) expressions were  $1.003 \pm 0.093$  and  $0.344 \pm 0.032$  in the control group and K562-C3 respectively; TrxR expression also decreased with RQ as  $1.090 \pm 0.549$  and  $0.395 \pm 0.029$  respectively. The cellular proliferation inhibition rates of K562-C3 were ( $4.74 \pm 0.39$ )%, ( $6.13 \pm 1.78$ )% and ( $25.36 \pm 3.77$ )%, respectively at 24, 48 and 72 h. The apoptotic rate induced by K562-C3 (29.9%) at 72 hours was obviously higher than in the control group (7.9%). The Annexin V-PE positive K562-C3 cells presented the following apoptotic characteristics, such as karyopyknosis, nuclear fragmentation and apoptotic bodies observed by LSCM. **Conclusion** Nrf2 specific siRNA could repress its expression at the cellular level and down-regulate the expression of its downstream antioxidant enzyme, such as TrxR, which lead to increased apoptotic rate and decreased cell proliferation.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.06.015

基金项目:山西省卫生厅科技攻关计划(20100202)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二医院血液科

通信作者:许莲蓉,Email:xulianrong@sohu.com

**【Key words】** K562 cells; NF-E2 related factor 2; Thioredoxin reductase; RNA interference; Apoptosis

目前研究表明,细胞氧化还原失衡与多种疾病有关<sup>[1-3]</sup>。当细胞受到外界氧化应激等因素刺激时,核因子 NF-E2 相关因子-2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)作为抗氧化反应的转录因子被激活,导致其下游调控的抗氧化酶表达增高,可维持细胞氧化还原反应的平衡,使细胞免受氧化损伤,从而减少细胞凋亡,导致肿瘤的发生发展。本课题组前期研究发现 Nrf2 及硫氧还蛋白原酶(TrxR)在慢性髓性白血病(CML)患者骨髓细胞中高表达<sup>[4]</sup>,为进一步研究两者对 CML 细胞增殖的影响及其作用机制,我们设计了针对 Nrf2 基因的 4 条 siRNA,并构建慢病毒载体,以 CML 细胞系 K562 细胞为研究对象,观察阻断 Nrf2 基因表达后对细胞增殖和凋亡的影响,以期通过此研究为 CML 患者的基因治疗提供新的思路。

## 材料和方法

1. 主要材料:K562 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。总 RNA 提取试剂、反转录 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒及 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,引物设计及合成由上海生工生物工程技术有限公司完成,RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自四季青生物工程材料有限公司,siRNA 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,CCK-8 溶液购自武汉博士德生物工程有限公司,膜联蛋白 A5 (Annexin V-PE)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司。

2. siRNA 序列设计及合成:查找 GenBank 中人 Nrf2 基因的 mRNA 序列(NM\_006164.3),并按照 siRNA 序列设计原则从 mRNA 的 AUG 起始密码下游 75~100 碱基位置开始,寻找“AA”二连序列,并记下其 3'端的 19 个碱基序列,分析获得的序列,选择 GC 比在 0.40~0.55 之间的靶基因序列作为潜在的 siRNA 靶位点。将潜在的序列在 GenBank 用 BLAST 软件和相应的基因组数据库进行比较,排除和其他编码序列/EST 同源的序列,最后共选取 4 条 siRNA 序列及 1 条随机的阴性对照序列进行干扰试验。选取干扰效率最高的序列进行后续实验。4 条目的 siRNA 序列如下。

序列 1 正义链:5'-GCAGCAAACAAGAGATG-

GCAA-3',反义链:5'-TTGCCATCTCTTGTGTTGCTGC-3';序列 2 正义链:5'-GCACCTTATATCTCGAAGTTT-3',反义链:5'-AAACTTCGAGATATAAGGTGC-3';序列 3 正义链:5'-CCGGCATTTCCTAAACACAA-3',反义链:5'-TTGTGTTTGTAGTAAATGCCCG-3';序列 4 正义链:5'-CCCTGTTGATTTAGACGGTAT-3',反义链:5'-ATACCGTCTAAATCAACAGGG-3'。非特异对照序列:靶序列:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

3. 细胞培养:K562 细胞用含有 1% 青链霉素混合液和 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内常规培养,每 2 d 换液传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

4. siRNA 转染 K562 细胞:①实验分为三组:分别将 4 条针对 Nrf2 的 siRNA 转入 K562 细胞,相应细胞命名为 K562-C1、C2、C3、C4;②非特异 siRNA 对照(NC)组:转入非特异 siRNA;③空白组:不进行任何转染处理。实验前 1 d 给细胞换液,细胞以 4 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,培养液为含 15% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 RPMI 1640,所加培养基体积为 900 μl;稀释病毒:用吉凯转染增强液将各组病毒原液稀释为 1 × 10<sup>8</sup> TU/ml,加入 100 μl 于细胞中并混匀;把培养板放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育;8~12 h 以后观察各组细胞状态,并更换新鲜培养基培养;转染 3~4 d 后观察荧光表达情况,期间依据细胞状态换液 1~2 次。

5. 转染效率检测:病毒载体带有绿色荧光蛋白(GFP)用以检测转染效率。按照上述方法转染 72 h 后用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的转染效果。

6. 实时荧光定量 PCR 检测 Nrf2、TrxR、GAPDH 基因表达:用总 RNA 提取试剂盒提取各组 K562 细胞 RNA;取 2 μl 总 RNA,按照 PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix 试剂盒进行反转录,合成相应的 cDNA;取反转录反应液 2 μl,按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II 试剂盒操作说明,于实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7300)进行扩增,以 GAPDH 作为内参。反应条件:两步法 PCR 扩增程序:第一步:预变性 95 °C、30 s;第二步:PCR 反应 95 °C、5 s 变性,60 °C、31 s 退火延伸并检测荧光信号强度,40 个循环;生成熔解曲线:95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s,60 °C、15 s,1 个循环。每个标本重复 3 次,反应完成后用 SDS 软件进行分析,Ct 值为荧光信号强度达到阈值时所经历的循环数,比较分析各组 PCR 产物与

GAPDH 的 Ct 值之差,各基因相对表达量(relative quantitation, RQ)按公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算<sup>[5]</sup>。各基因引物序列见表 1。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{对照组}$$

7. CCK-8 法检测细胞增殖活力:各组 K562 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔培养板,培养体积为 100  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 1 d。按实验要求分别在 K562 细胞中加入终浓度为  $1 \times 10^8$  TU/ml 载有 Nrf2 特异 siRNA 序列 3(基因表达水平检测证实该序列干扰效率最高)的病毒液 10  $\mu$ l。检测转染 24、48、72 h 的 K562 细胞增殖活力,中止培养 2 h 前每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液,应用酶标仪(Bio-Rad)检测 450 nm 处的吸光度(A)值。按公式计算细胞增殖抑制率。每组实验重复 3 次。

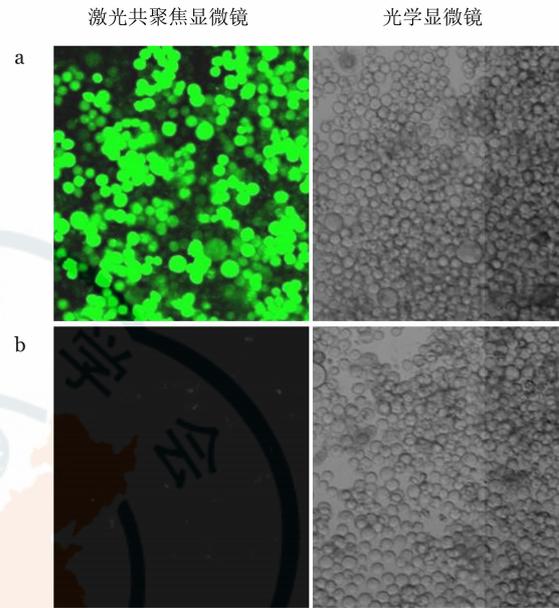
$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - A_{实验组}/A_{对照组}) \times 100\%$$

8. 流式细胞术检测细胞凋亡:收集各组细胞 2000 r/min 离心 5 min(离心半径 8 cm,下同),弃上清。用 PBS 洗涤 2 次(每次 2000 r/min 离心 5 min),收集  $(1 \sim 5) \times 10^5$  细胞;加入 500  $\mu$ l 的 Binding 缓冲液悬浮细胞;加入 1  $\mu$ l Annexin V-PE, 5  $\mu$ l PI 混匀;室温、避光反应 5 ~ 15 min;激光共聚焦显微镜观察细胞形态,流式细胞术检测凋亡率。

9. 统计学处理:采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,定量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,满足正态性及方差齐性的多组定量资料进行 One-Way ANOVA 分析,组间比较采用 LSD 检验,Nrf2 与 TrxR 表达水平的相关性用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 转染效率测定:激光共聚焦显微镜观察显示慢病毒感染 K562 细胞 72 h 后 Nrf2 特异 siRNA 和非特异 siRNA 转染的 K562 细胞均可见到 GFP 荧光分布(图 1)。流式细胞术分析显示转染效率为 65%。



a: 实验组; b: 空白组

图 1 激光共聚焦显微镜与光学显微镜观察转染 siRNA 的 K562 细胞转染效率( $\times 100$ )

2. 特异性 siRNA 转染的 K562 细胞 Nrf2 mRNA 表达水平:经 SDS 软件分析处理后,Nrf2 和 TrxR 基因的熔解曲线呈单峰分布,提示引物设计特异性良好。各组细胞中 Nrf2 和 TrxR 基因扩增曲线的  $\Delta\Delta Ct$  值及 RQ 值见表 2。荧光定量 PCR 检测结果显示,转染特异 siRNA 序列 3 的 K562 细胞(K562-C3 细胞)Nrf2 mRNA 表达明显受抑,相对表达水平较非特异 siRNA 对照组下降约 66%,且其 TrxR 表达水平也随之降低,差异有统计学意义( $P$  值均  $< 0.001$ );非特异 siRNA 对照组 K562 细胞 Nrf2 及 TrxR mRNA 表达水平与空白对照组比较差异无统计学意义( $P = 0.053, 0.429$ );将 Nrf2 和 TrxR 的表达水平进行 Pearson 相关性分析,结果表明两者具有明显的相关性( $r = 0.847, P < 0.001$ ) (表 2)。

3. Nrf2-siRNA 转染对 K562 细胞增殖的影响:Nrf2 siRNA 序列 3 转染 72 h 的 K562 细胞与空白组和非特异性 siRNA 转染组相比细胞增殖抑制率明

表 1 用于实时荧光定量 PCR 的各基因引物序列

基因名称	基因库序号	引物序列(5'→3')		产物大小(bp)
		正向	反向	
Nrf2	NM_006164.3	ACAATGAGGTTTCTTCGGCTAC	CTCTAAATCAACAGGGGCTAC	141
TrxR	NM_003330.2	TATCAGGAGGCGAGACTTCAA	GACCATCACCTTCTTGCCATA	153
GAPDH	BC004109	AGAAGGCTGGGCTCATTTG	AGGGCCATCCACAGTCTTC	258

注:Nrf2:核因子 NF-E2 相关因子 2;TrxR:硫氧还蛋白还原酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

表 2 实时荧光定量 PCR 检测各转染组 K562 细胞 Nrf2、TrxR mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Nrf2		TrxR	
	$\Delta\Delta Ct$	相对表达量	$\Delta\Delta Ct$	相对表达量
空白组	0.842 ± 0.230	0.767 ± 0.116	2.185 ± 0.105	0.860 ± 0.062
阴性对照组	0.448 ± 0.137	1.003 ± 0.093	1.964 ± 0.740	1.090 ± 0.549
K562-C1	-0.088 ± 0.143	1.455 ± 0.148	0.928 ± 0.157	2.059 ± 0.230
K562-C2	-0.561 ± 0.174	2.022 ± 0.235	1.508 ± 0.164	1.378 ± 0.161
K562-C3	1.991 ± 0.136	0.344 ± 0.032 <sup>a</sup>	3.307 ± 0.110	0.395 ± 0.029 <sup>a</sup>
K562-C4	0.643 ± 0.401	0.896 ± 0.236	2.588 ± 0.183	0.652 ± 0.081

注: Nrf2: 核因子 NF-E2 相关因子 2; TrxR: 硫氧还蛋白还原酶; <sup>a</sup> 多组之间比较,  $P < 0.05$

显增高( $P < 0.05$ ), 而阴性对照组与空白组相比差异无统计学意义( $P = 0.676$ )(表 3)。

表 3 CCK-8 法检测各转染组不同时间段对 K562 细胞增殖抑制率(% ,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	24 h	48 h	72 h
实验组	4.74 ± 0.39	6.13 ± 1.78	25.36 ± 3.77
阴性对照组	1.82 ± 0.18	3.08 ± 1.75	6.99 ± 2.39
空白组	0	0	0

4. Nrf2 siRNA 对 K562 细胞凋亡的影响: 流式细胞术检测结果显示, K562-C3 细胞凋亡率 72 h 为 29.9%, 与空白组(5.4%)和阴性对照组(7.9%)比较明显提高, 而阴性对照组与空白组相比无明显差异。激光共聚焦显微镜发现 K562-C3 组细胞具有核固缩、核碎裂及凋亡小体形成等凋亡特征。

### 讨 论

Nrf2 是一种含有高度保守碱性亮氨酸拉链结构的蛋白, 属于 CNC (cap' n' collar) 转录因子家族成员<sup>[6]</sup>。当细胞受到氧化应激等外界因素刺激时, 可使 Nrf2 从复合物释放而转移到胞核, 调控其下游基因表达。硫氧还蛋白 (Trx)、TrxR 与还原型辅酶 II (NADPH), 构成了细胞中一组重要的氧化还原体系<sup>[7]</sup>。TrxR 可使 Trx 保持还原状态, 还原型的 Trx 结合并抑制凋亡信号调节激酶 1 (ASK1) 及随后的 JNK/p38 活化, 抑制细胞凋亡。有研究发现, Nrf2 与肺癌等实体肿瘤的发生发展有关<sup>[8-10]</sup>, 但在 CML 中的作用未见报道。本课题组前期研究发现在 CML 中 Nrf2 表达增高, 经伊马替尼治疗后其表达下降<sup>[4]</sup>, 伊马替尼治疗可使 bcr-abl 阳性的细胞减少。但有研究报道 Nrf2 的表达不会影响 bcr-abl 激酶活性<sup>[11]</sup>, 提示 CML 发生发展可能与氧化应激相关的细胞增殖有关, 因此我们就 Nrf2 对 CML 细胞是否

有促增殖作用做了进一步研究。有研究报道<sup>[12-13]</sup>在肺组织及神经细胞中发现 TrxR 是 Nrf2 调控的下游抗氧化酶的主要组成成分, 可抑制细胞凋亡, 使细胞无限增殖, 进而促进肿瘤的发生发展。但在 CML 中两者关系尚未见报道, 本研究结果显示在 K562 细胞两者表达均增高。

基因治疗已成为 CML 研究的重要方向, 慢病毒被认为是进行活体 RNAi 的最佳载体, 其具有能在靶细胞中长期表达及转染效率高等优点<sup>[14]</sup>。将合成的 siRNA 经慢病毒载体转染 K562 细胞, 探讨 CML 患者基因治疗的新途径。

我们在 4 条 siRNA 中筛选出 Nrf2 基因抑制效率最高的干扰序列, 与对照组相比, 其干扰 K562 细胞后 Nrf2 mRNA 表达下降约 66%, 且伴随 TrxR 基因的表达下降, 并且两者呈正相关, 下调 Nrf2 基因表达, 即可降低其下游调控基因 TrxR 的表达。我们采用 CCK-8 法及 Annexin V-PE/PI 双染法检测抑制 Nrf2 基因后对 K562 细胞增殖的影响, 结果显示干扰效率最高的序列转染的 K562 细胞 (K562-C3) 在转染 72 h 后细胞凋亡率为 29.9%, 细胞增殖抑制率为 25.36%, 且激光共聚焦显微镜观察到该组细胞出现典型的凋亡形态。提示抑制 Nrf2 基因表达, 能使其下游调控抗氧化应激的基因如 TrxR 表达降低, 从而引起细胞增殖能力下降, 达到促进细胞凋亡的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem*, 2006, 13: 1859-1876.
- [2] Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med*, 2006, 3: e420.
- [3] Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, et al. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer.

- Anticancer Res, 2003, 23:2425-2433.
- [4] 潘飞,许莲蓉,王宏伟,等. 核因子-E2 相关因子 2 在慢性粒细胞白血病的表达及其与硫氧还蛋白还原酶相关性的研究. 白血病·淋巴瘤, 2012, 21:520-523.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. Methods, 2001, 25:402-408.
- [6] Motohashi H, Katsuoka F, Engel JD, et al. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101:6379-6384.
- [7] Fujino G, Noguchi T, Takeda K, et al. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. Semin Cancer Biol, 2006, 16:427-435.
- [8] Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. J Biol Chem, 2012, 287:9873-9876.
- [9] Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR, et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer; implications for cell proliferation and therapy. Mol Cancer, 2011, 10:37.
- [10] Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. Clin Cancer Res, 2010, 16:3743-3753.
- [11] Nagai T, Kikuchi S, Ohmine K, et al. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. J Cell Biochem, 2008, 104:680-691.
- [12] Locy ML, Rogers LK, Prigge JR, et al. Thioredoxin reductase inhibition elicits Nrf2-mediated responses in Clara cells: implications for oxidant-induced lung injury. Antioxid Redox Signal, 2012, 17:1407-1416.
- [13] Tanito M, Agbaga MP, Anderson RE. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. Free Radic Biol Med, 2007, 42:1838-1850.
- [14] 丁震宇,梁后杰. 慢病毒载体介导 RNAi 的研究进展. 医学研究杂志, 2009, 38:15-19.

(收稿日期:2012-11-30)

(本文编辑:徐丽娟)

## 艾争第一·2013 血液肿瘤临床经验交流项目征文通知

为鼓励临床医师对血液肿瘤相关性疾病开展临床经验分享,提高学术水平和专业能力,《中华血液学杂志》杂志社决定自 2013 年起,在全国范围内开展“2013 血液肿瘤临床经验交流项目”学术征文活动。

### 一、征文内容

#### 1. 病例类别一:急性白血病观察病例

- 初次诊断急性髓系白血病(AML),欲行诱导治疗(第 1 个疗程)和巩固治疗的感染已得到良好控制(体温正常 3 d),肝、肾功能正常的患者
- 临床诊断及疗效资料完整

#### 2. 病例类别二:急性白血病治疗优秀分享病例

- AML 病例,诊断疑难或治疗曲折
- 符合白血病诊治原则,充分运用循证医学
- 临床疗效、安全性及随访资料完整
- 治疗成功与否不作为病例入选必需条件

### 二、征集时间及方式

1. 征稿截止时间:2013 年 8 月 31 日截止
2. 投稿方式:发送邮件至:IDA@chinadoctors.org,请标注主题词:艾争第一

### 三、奖项设置

1. 所有参与者将获得精美纪念奖 1 份;
2. 提交的论文经过《中华血液学杂志》编委会评审将有机会参与各级别学术会议交流并有机会在《中华血液学杂志》上刊登。

《中华血液学杂志》杂志社