

抗 CD47 抗体联合阿糖胞苷靶向治疗 NOD/SCID 小鼠单核细胞白血病的研究

王颖超 冯磊 殷楚云 马丽娜 魏永伟 王春美 盛光耀

(郑州大学第一附属医院儿科,河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨 CD47 在急性髓细胞白血病 NOD/SCID 小鼠模型中的预后意义及靶向治疗的最佳策略。**方法** 将分选的 CD34⁺CD38⁻ 白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs) 移植入 NOD/SCID 小鼠体内,建立小鼠急性单核细胞白血病模型;抗人 CD47 单克隆抗体单独或联合阿糖胞苷治疗白血病小鼠 7~14 d,并进行疗效分析。将 LSCs 与小鼠巨噬细胞在含抗 CD47 单克隆抗体的培养液中共培养,观察 CD47 对巨噬细胞吞噬 LSCs 能力的影响。**结果** THP-1 细胞中存在 CD34⁺CD38⁻ LSCs,比例约为 0.12% ± 0.06%,将分选后的 CD34⁺CD38⁻ LSCs (比例高达 97.0% ± 1.7%) 移植入 NOD/SCID 小鼠后成功建立白血病模型。体内实验表明,阿糖胞苷(7 d)联合抗 CD47 单克隆抗体(14 d)治疗后,白血病小鼠外周血和骨髓中 CD33⁺CD45⁺ 白血病细胞下降最明显($P < 0.01$),生存时间明显长于其它各组。体外共培养 2 h 后,抗 CD47 单克隆抗体组吞噬指数(76.9% ± 12.2%)明显高于抗 CD45 单克隆抗体组(7.60% ± 2.4%, $P < 0.01$)。**结论** CD47 高表达是急性髓细胞白血病的预后不良因素。阿糖胞苷联合抗 CD47 单克隆抗体可有效杀灭普通白血病细胞和白血病干细胞,对彻底治愈急性髓细胞白血病具有重要临床意义。

[中国当代儿科杂志,2013,15(7):577-582]

[关键词] 急性髓细胞白血病;白血病干细胞;CD47;阿糖胞苷;靶向治疗;小鼠

Effectiveness of Anti-CD47 antibody and Ara-C combination targeting therapy NOD/SCID mouse of myeloid leukemia

WANG Ying-Chao, FENG Lei, YIN Chu-Yun, MA Li-Na, WEI Yong-Wei, WANG Chun-Mei, SHENG Guang-Yao. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: yingchaowang152@163.com)

Abstract: Objective To study the prognostic significance of CD47 in a NOD/SCID mouse model of acute myeloid leukemia (AML) and the best strategy for targeted therapy for this disease. **Methods** CD34⁺CD38⁻ leukemia stem cells (LSCs) were separated and transplanted into NOD/SCID mice to establish a mouse model of acute monocytic leukemia (AMoL). Anti-human CD47 antibody, alone or combined with cytosine arabinoside (Ara-C), was used to treat the mice with AMoL for 7-14 days, and therapeutic efficacy was assessed. LSCs were cultured together with mouse macrophages in culture medium containing anti-CD47 or anti-CD45 monoclonal antibody for 2 hours, to observe the phagocytic ability of macrophages to LSCs. **Results** CD34⁺CD38⁻ LSCs existed among THP-1 cells, with a content of about (0.12 ± 0.06)%, and a mouse model of AML was successfully established after the purified CD34⁺CD38⁻ LSCs (97.0% ± 1.7%) were transplanted into NOD/SCID mice. The *in vivo* experiment showed that mice with AMoL had the most significant decrease in CD33⁺CD45⁺ leukemia cells in peripheral blood and bone marrow and survived the longest after being treated with Ara-C (7 days) plus anti-CD47 monoclonal antibody (14 days) ($P < 0.01$). After 2 hours of *in vitro* culture, the phagocytic index in the culture medium containing anti-CD47 monoclonal antibody was significantly higher than in the culture medium containing anti-CD45 monoclonal antibody (76.9% ± 12.2% vs 7.60% ± 2.4%; $P < 0.05$). **Conclusions** High expression of CD47 is an adverse prognostic factor in AML. Combination therapy with anti-CD47 monoclonal antibody and Ara-C can effectively eliminate leukemia cells and LSCs, demonstrating great clinical significance in curing AML.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):577-582]

Key words: Acute myeloid leukemia; Leukemia stem cell; CD47; Cytosine arabinoside; Targeted therapy; Mice

急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)占儿童急性白血病的15%~20%,除M3外,

其它各型都是难以治疗的儿童肿瘤性疾病之一^[1]。AML各亚型临床疗效不同,然而除M3外的总体生

存率在上世纪60年代低于10%^[2]。近年来,随着化疗方案的逐步改良和完善,诱导化疗结束完全缓解率已达80%以上^[3],但是5年无病生存率却只有40%~50%^[4],长期生存率依然很低,严重威胁着全世界儿童及青少年的健康和生命,而复发和耐药始终是影响最终治疗效果的重大障碍。最新研究认为,AML是一种与白血病干细胞(leukemia stem cell, LSCs)密切相关的疾病,AML的发生、发展以及治疗中耐药和缓解后复发均与LSCs有关,常规的化疗药物不能将LSCs完全清除^[5-6]。故而,阐明LSCs在AML发生、发展中的分子机制,实现基于发病机制或分子靶点的靶向疗法及协同靶向疗法,降低AML的病死率已成为当前儿科领域中的一项重要的科研课题。研究发现CD47参与调控LSCs在AML中的作用^[7],本研究旨在探索CD47在AML小鼠模型中的作用及靶向治疗效果,为彻底治愈AML寻找新的治疗策略。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器与试剂

流式细胞仪(Beckman coulter公司,美国);改良型RPMI1640培养基、优级胎牛血清(Hyclone公司,美国);单克隆抗体(eBioscience公司,美国);阿糖胞苷(Ara-C, Sigma公司,美国)。

1.2 细胞株及实验动物

人急性单核细胞白血病THP-1细胞株购于中科院上海细胞库研究所,用含20%胎牛血清和1%青、链霉素的完全培养基,置于37℃、5%CO₂的培养箱内培养。NOD/SCID小鼠,6~8周龄,雌雄不限,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,置于层流架带盖鼠盒中饲养,符合SPF标准。

1.3 THP-1细胞株LSCs(CD34⁺CD38⁻)的流式分选及白血病模型的建立

取对数生长期THP-1细胞,调整密度为10⁶个/mL,实验管加入抗CD34-PE和抗CD38-APC单克隆抗体;以IgG1-PE、IgG1-APC为同型对照,孵育染色,上机检测,确定LSCs比例后分选LSCs。40只NOD/SCID小鼠,每只接种LSCs细胞1×10⁵个(0.2 mL)。所有NOD/SCID小鼠移植前不做任何处理,对小鼠所有操作均在无菌层流室内进行。自接种后,观察小鼠一般状况,每隔一周经尾静脉取血,观察白细胞变化及成瘤情况。引颈处死濒死小鼠,对肝、脾、肺、肾、脑及病变组织等行病理组织学检查,流式细胞仪检测骨髓CD33⁺CD45⁺细胞比例。

1.4 LSCs细胞体外吞噬功能的检测

参照尹美珍等^[8]所用方法分离、培养小鼠腹腔巨噬细胞。将分选的LSCs细胞与小鼠巨噬细胞共培养2 h,分为CD47单克隆抗体(终浓度为7 μg/mL)组、CD45单抗组、IgG1单抗组和阴性对照组(培养液中不加任何抗体)。倒置荧光显微镜观察巨噬细胞的吞噬率。吞噬率=(吞噬了LSCs的吞噬细胞/100个巨噬细胞)×100%。

1.5 白血病小鼠体内单克隆抗体治疗

取40只荷瘤小鼠依据腹腔注射药物不同随机分为5个组,每组8只,具体药物使用情况如下:(1)生理盐水(对照)×14 d;(2)抗IgG1抗体100 μg×14 d;(3)抗CD47抗体100 μg×14 d^[9];(4)Ara-C 100 mg·m⁻²×7 d;(5)Ara-C 100 mg·m⁻²×7 d+抗CD47抗体100 μg×14 d。开始治疗后,每日观察小鼠一般情况变化。比较不同种类治疗药物组及治疗前后各指标的变化。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析;计数资料以率表示,组间比较采用卡方检验;采用K-M法进行生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗CD47单抗对THP-1细胞株LSCs被吞噬情况的影响

流式细胞术结果显示在白血病THP-1细胞株中存在CD34⁺CD38⁻的LSCs,比例为0.12%±0.06%;细胞分选后采用流式细胞仪检测显示CD34⁺CD38⁻LSCs纯度高达97.0%±1.7%。见图1。体外共培养试验后,普通光镜下可发现抗CD47组存在多种不同吞噬状态的细胞,而抗CD45或IgG1单抗组未见明显吞噬现象,3组间吞噬指数差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 小鼠腹腔巨噬细胞对人THP-1细胞株LSCs的吞噬率($\bar{x} \pm s, \%$)

抗体类型	吞噬率
阴性对照	3.0 ± 1.3
抗IgG1	2.8 ± 1.2
抗CD45	7.6 ± 2.4
抗CD47	76.9 ± 12.2 ^a
F值	332.162
P值	< 0.001

a:与阴性对照组、抗IgG1组和抗CD45组相比, $P < 0.01$

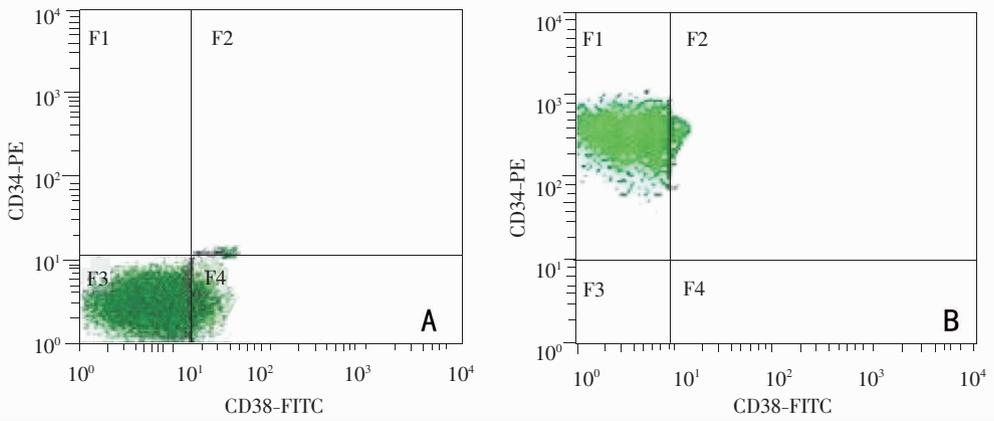


图1 流式细胞仪分选前与分选后检测结果 A:流式分选前 THP-1 细胞中 LSCs 的含量为(0.12 ± 0.06)% ;B:流式分选后 LSCs 的纯度高达(97.0 ± 1.7)% 。

2.2 THP-1 细胞株 LSCs 白血病模型的建立

接种 LSCs 后 4 ~ 6 周,40 只小鼠均出现了不同程度的白血病细胞浸润。病理组织学检查提示部分小鼠肝、脾、肺、肾、肌肉等组织受到累及;部分小鼠出现腹水,呈血性,涂片可见大量瘤细胞;骨髓涂片白血病细胞比例高达 59%,过氧化物酶染色阳性;骨髓细胞中 CD33、CD45 的表达增高。

2.3 CD47 对 NOD/SCID 小鼠白血病预后作用分析

2.3.1 CD47 在正常 NOD/SCID 小鼠外周血中的表达

流式细胞仪检测结果显示:CD47 在正常 NOD/SCID 小鼠外周血单个核细胞(NPBMC)、正常骨髓单个核细胞(NMBMC)、未分选的 THP-1 (BULK THP-1)、THP-1 LSCs 中有不同的表达水平,4 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 CD47 在不同细胞类型中的表达 ($\bar{x} \pm s$;%)

细胞类型	CD47 表达值
NPBMC	14.1 ± 3.5
NMBMC	30.7 ± 1.9
BULK THP-1	56.1 ± 9.6
THP-1 LSCs	73.8 ± 12.4
F 值	106.350
P 值	0.017

注:NPBMC 为正常外周血单个核细胞;NMBMC 为正常骨髓单个核细胞;BULK THP-1 为未分选的 THP-1 细胞;THP-1 LSCs 为 THP-1 的白血病干细胞。

2.3.2 Ara-C 联合抗 CD47 单抗治疗小鼠单核细胞白血病

外周血白细胞计数结果显示抗 IgG1 单抗治疗组小鼠外周血白细胞计数持续上升,另外 3 种治疗方法外周血白细胞都呈逐渐下降,其中以 Ara-C 联

合抗 CD47 单抗组下降最为明显(图 2);对比 Ara-C 联合抗 CD47 单抗治疗前后外周血及骨髓中 CD33⁺ CD45⁺ 白血病细胞比例,发现联合治疗可有效靶向清除白血病细胞,而骨髓抑制作用较轻,对正常造血细胞影响小(图 3 ~ 4)。K-M 生存分析发现,Ara-C 联合抗 CD47 单克隆抗体生存时间明显长于其他各组($P < 0.05$)。见图 5。

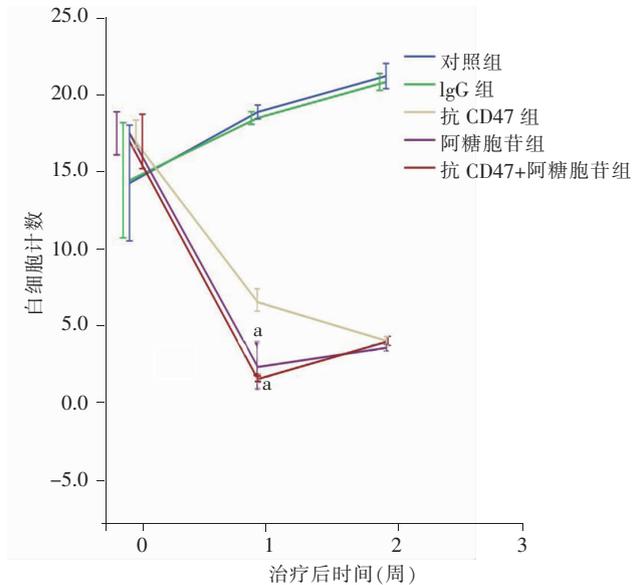


图 2 不同治疗组 AML 小鼠外周血白细胞计数 治疗前,各组间白细胞水平差异无统计学意义;治疗后 1 周,抗 CD47 + 阿糖胞苷组白细胞下降最明显;治疗后 2 周,阿糖胞苷组和抗 CD47 + 阿糖胞苷组白细胞水平差异无统计学意义。a:与其他 4 组比较, $P < 0.05$ 。

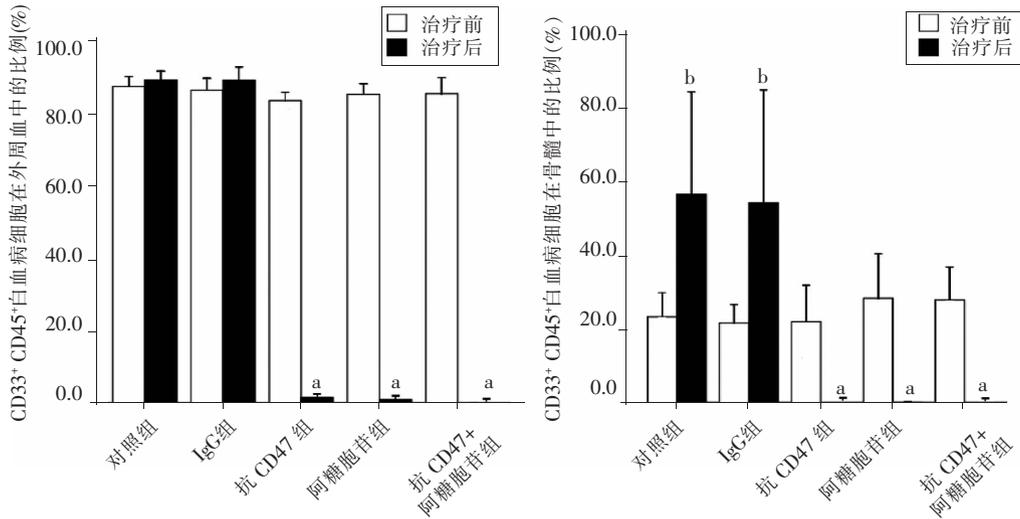


图3 不同组 AML 小鼠外周血(左图)和骨髓(右图)中 CD33⁺ CD45⁺ 白血病细胞在治疗前后比较 a:与治疗前比较, $P < 0.01$; b:与治疗前比较, $P < 0.05$ 。

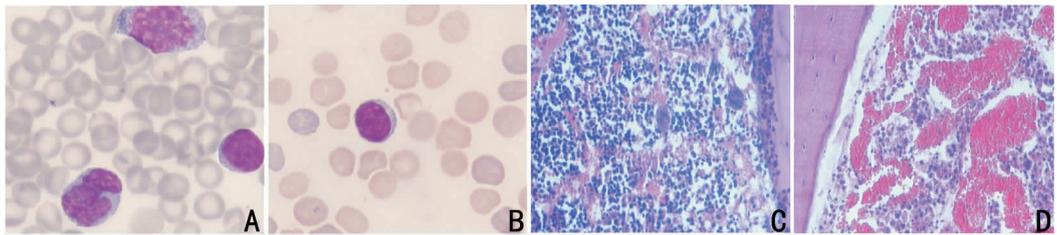


图4 Ara-C 联合抗 CD47 单抗在 AML 小鼠治疗前后外周血涂片及骨髓病理学变化(图 A 和 B 为瑞氏染色, $\times 200$; 图 C 和 D 为苏木精-伊红染色, $\times 100$) A: 治疗前外周血出现幼稚粒细胞, 形态不规则, 核仁增大, 染色质着色深; B: 治疗后外周血未见幼稚细胞, 成熟粒细胞形态规则, 核质比正常, 着色均匀; C: 治疗前骨髓中幼稚细胞形态不均, 胞浆丰富深染, 呈深紫色; D: 治疗后, 骨髓缓解, 幼稚细胞消失, 呈正常骨髓象。

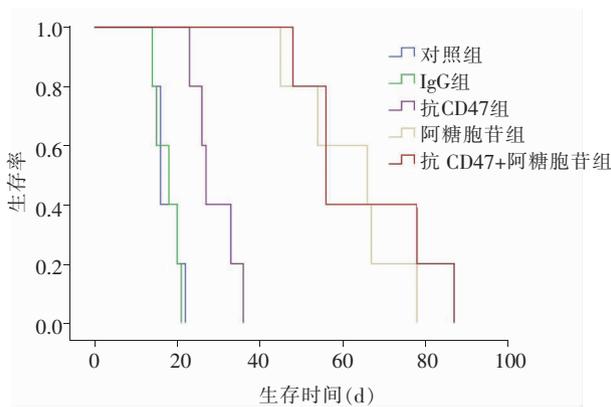


图5 不同治疗组生存分析

3 讨论

LSCs 被认为是白血病发生、发展及治疗后复发的根源。通常情况下, LSCs 处于静止状态, 对药物有抗性^[10-12]。目前使用的大多数化疗药物均针对处于

增殖期和晚期的白血病细胞, 而对处于静止期、具有高耐药特性的 LSCs 则难以完全清除, 一旦条件适合, 残留的 LSCs 又可通过增殖分化引发新的白血病。因此, 针对 LSCs 的靶向治疗, 有可能从源头上根除白血病细胞, 是治疗 AML 最有效、最根本的策略。

早期针对 LSCs 的靶向治疗主要是通过促发 LSCs 的凋亡或者抑制 LSCs 的 ABC 转运蛋白泵。上述方法缺乏特异性, 在杀伤 LSCs 的同时也损伤了肝脏星状细胞(HSCs), 且 HSCs 相比 LSCs 更易受到伤害^[13]。Ishikawa 等^[14]通过研究证明, LSCs 定居于骨髓内膜的微环境中, 受到了很好的保护, 可以免受化学治疗药物引起的细胞凋亡。因此探讨干扰维持 LSCs 生长的微环境亦成为靶向治疗白血病的重要方法^[15]。

CD47 是人抑制性受体信号调节蛋白(inhibitory receptor signal regulatory protein chain, SIRP)的胞外配体, 通过与 SIRP 结合可产生抑制性信号, 下调巨噬细胞的吞噬活性, 进而对固有免疫系统产生抑制

作用^[16],阻止供体淋巴造血细胞被受体树突细胞和巨噬细胞清除。Jaiswal等^[17]研究表明,AML及慢性髓性白血病急变期LSCs的CD47表达水平较正常的造血干/祖细胞明显增加,而其它骨髓增殖性疾病的骨髓干/祖细胞的CD47表达都未见增加。Takenaka等^[7]指出,CD47是LSCs重要的植入决定因子。此外,CD47在所有恶性实体肿瘤表面高表达,抑制其功能,可以增加巨噬细胞对肿瘤细胞的清除作用,可以作为靶向治疗的一个新靶点^[18]。因此,如果能够利用某种手段下调淋巴造血细胞CD47抗原的表达,就可以去除不正常或者有害的细胞^[19]。

本研究也发现,CD47在THP-1白血病小鼠高表达,在正常小鼠骨髓和外周血低表达。因此,CD47单克隆抗体能够特异性作用于AML患者的LSCs,对抗原性无关正常造血细胞的毒性较弱。目前在临床前期的动物模型研究中,抗CD47单克隆抗体具有特异性清除LSCs的能力^[20-21]。同样,在淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病中抗CD47单克隆抗体也有同样的效果,且未发现贫血、肝肾功能损害等并发症^[9,22]。以往研究认为,应用CD47单克隆抗体介导的对白血病细胞和其他异常造血细胞的杀伤作用与凋亡增加有关^[23],但Majeti等^[24]研究提示CD47单克隆抗体介导的LSCs破坏或清除作用与凋亡增加、抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用等机制无关,而通过阻断CD47-SIRPα的相互作用,从而增加巨噬细胞的吞噬活性^[24]。本实验的体外研究中,将分选的LSCs与小鼠腹腔巨噬细胞在含鼠抗人CD47单克隆抗体的培养基中共培养后,可明显增加巨噬细胞对LSCs的吞噬能力。人AML白血病小鼠模型建立后,分别给予腹腔注射抗CD47单克隆抗体,并以抗IgG1单克隆抗体作为对照,结果显示:抗IgG1单抗治疗组小鼠骨髓或外周血依然充满大量白血病细胞,而应用抗CD47单抗则能明显减少白血病负荷。

但是,单独应用抗CD47单克隆抗体尚有不足之处。单克隆抗体价格昂贵,长期大剂量使用部分患者经济上难以承受;而且普通白血病细胞低表达CD47,抗CD47单克隆抗体不能清除全部的白血病细胞。所以,使用化学药物治疗以及毒素配合抗体治疗,或两个不同的抗体联合治疗可以增强疗效^[22]。Ara-C是治疗白血病的经典药物,主要通过诱导增殖期肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。本研究中,我们用Ara-C联合抗CD47单克隆抗体联合治疗AML,先用Ara-C连续治疗7d,杀灭小鼠体内绝

大部分处于增殖期的白血病细胞,随后抗CD47单克隆抗体进一步彻底清除处于静止期的LSCs,效果显著,生存率和生存时间明显延长。而且,用Ara-C联合抗CD47单克隆抗体治疗并未加重骨髓抑制,这样就可以避免联合用药所致强烈骨髓抑制,进而减少贫血、出血和感染的机会。CD47单克隆抗体应用之后,巨噬细胞对正常的HSCs未见明显的吞噬作用,这可能与正常的HSCs和巨噬细胞除了CD47-SIRPα的相互作用外,还存在着LSCs与巨噬细胞间没有的其它的保护机制,抑或是因为LSC与正常HSC相比,还存在着其它的促进巨噬细胞吞噬作用的协同因素。

综上所述,CD47在LSCs高表达,在正常的骨髓干/祖细胞表达较低,是人AML的一项不良预后因素。用Ara-C联合抗CD47单克隆抗体治疗AML,可有效靶向不同时期的白血病细胞,对清除白血病干细胞、彻底治愈AML具有重要临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] 陈静,顾龙君,汤静燕,薛慧良,潘溢,叶启东,等. AML-XH-99-M3方案治疗33例儿童急性早幼粒细胞白血病临床总结[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 329-332.
- [2] 郭晔,陈玉梅,皱尧,陈晓娟,张丽,王书春,等. 688例儿童急性白血病群体生物学特征现况调查—单中心小样本研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(10): 793-796.
- [3] Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia[J]. Blood Rev, 2011, 25(1): 39-51.
- [4] Zhai XW, Cheng FW, Lee V, Leung WK, Ng MH, Tsang KS, et al. Improved survival outcome of childhood acute myeloid leukemia with intensified chemotherapy in Chinese children[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2011, 28(4): 269-278.
- [5] Guzman ML, Rossi RM, Kamishyky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, et al. The sesquiterpene lactone Parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells[J]. Blood, 2005, 105(11): 4163-4169.
- [6] Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(26): 11008-11013.
- [7] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells[J]. Nat Immunol, 2007, 8(12): 1313-1323.
- [8] 尹美珍,李世普,袁琳,戴红莲. 小鼠腹腔巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 武汉大学学报(医学版), 2006, 27(2): 203-205.
- [9] Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Jan M, Weissman-Tsakamoto R, Zhao F, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1374-1384.
- [10] Coebergh JW, Reedijk AM, deVries E, Martos C, Jakab Z, Steliarova-Foucher E, et al. Leukaemia incidence and survival in chil-

- dren and adolescents in Europe during 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(13): 2019-2036.
- [11] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 275-284.
- [12] Felipe Rico J, Hassane DC, Guzman ML. Acute myelogenous leukemia stem cells: From Bench to Bedside[J]. *Cancer Lett*, 2012 [Epub ahead of print].
- [13] Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence[J]. *Blood*, 2006, 107(1): 358-366.
- [14] Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone marrow endosteal region[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1315-1321.
- [15] Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: Targeting the microenvironment in leukemia and other cancers[J]. *Leukemia*, 2009, 23(1): 43-52.
- [16] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6): 457-464.
- [17] Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 271-285.
- [18] Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(17): 6662-6667.
- [19] Blazar BR, Lindberg FP, Ingulli E, Panoskaltis-Mortari A, Oldenburg PA, Lizuka K, et al. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counter receptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(4): 541-549.
- [20] 王建祥. 白血病干细胞的研究现状[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(6): 361-362.
- [21] Kim D, Wang J, Willingham SB, Martin R, Wernig G, Weissman IL. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells[J]. *Leukemia*, 2012, 26(12): 2538-2545.
- [22] Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma [J]. *Cell*, 2010, 142(5): 699-713.
- [23] Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y, Otabe K, Lida S, Oheda M, et al. A bivalent single chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4): 912-918.
- [24] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KDJ, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic anti body target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell*, 2009, 138(2): 286-299.

(本文编辑:周勇)