

# 骨髓增生异常综合征疾病进展及急性髓系白血病的免疫变化

陈丹桂<sup>1</sup>, 许佩佩<sup>2</sup>, 郭丹<sup>1</sup>, 陈兵<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学鼓楼临床医学院血液科, 江苏 南京 210008; <sup>2</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院血液科, 江苏 南京 210008

**[摘要]** 骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组克隆性造血干细胞疾病,其主要表现为不同程度的外周血细胞减少,骨髓无效和病态造血,并高风险向急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化。其发病机制逐渐清晰:免疫系统失衡尤其是细胞免疫缺陷,导致异常克隆的清除受阻,异常前体细胞免疫逃逸,同时各种分泌细胞因子促进骨髓细胞过早凋亡。文章就近年来有关MDS疾病进展及AML患者免疫机制中的主要以自然杀伤细胞、淋巴细胞、树突状细胞、髓源性抑制细胞等方面的研究进展进行综述,以便优化对MDS疾病进展的监控。

**[关键词]** 骨髓增生异常综合征;急性髓系白血病;免疫机制

**[中图分类号]** R733.71

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)06-848-05

doi:10.7655/NYDXBNS20180627

## The immunologic change of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia

Chen Dangui<sup>1</sup>, Xu Peipei<sup>2</sup>, Guo Dan<sup>1</sup>, Chen Bing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of hematology, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of NMU, Nanjing 210008; <sup>2</sup>Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

**[Abstract]** Myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of myeloid stem cell clonal disorders, characterized by a various degree decrease of peripheral blood cells, ineffective and pathological bone marrow hematopoiesis. There is large variability in the risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). The pathogenesis of the disease become clear gradually: the imbalance of the immune system, especially cellular immune defects, lead to the abnormal cloning clear blocked, abnormal precursor cells immune escape, while a variety of secretion cytokines promote apoptosis of bone marrow cells early. In this article, the changes of natural killer cells, lymphocyte, dendritic cells and marrow-derived suppressor cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia are reviewed in recent years in order to optimize the monitoring MDS progress.

**[Key words]** myelodysplastic syndrome; acute myeloid leukemia; immunological mechanism

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06):848-852]

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一组克隆性造血干细胞疾病,其主要表现为不同程度的外周血细胞减少,骨髓无效或病态造血,并高风险向急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化。MDS起病与发展过程非常复杂,是一个多步骤过程,包括染色体异常、癌基因与抑癌基因异常、骨髓造血干细胞、祖细胞体外

生长分化异常、单克隆性造血、造血细胞凋亡增多以及免疫学异常<sup>[1]</sup>。目前主要得出的发病机制:复杂因素(遗传或其他)等造成造血干细胞分子遗传变异,产生异常前体细胞,导致过度增殖,分化受阻,成熟障碍等;免疫系统失衡尤其是细胞免疫的缺陷,导致异常克隆的清除受阻,异常前体细胞免疫逃逸,同时各种分泌细胞因子促进骨髓细胞过早凋亡<sup>[2]</sup>。随着研究的深入,对MDS疾病进展及AML的免疫机制的不断认识,为新的治疗方法提供了可靠基础,本文就近几年来关于MDS疾病进展及AML免疫机制中自然杀伤细胞、淋巴细胞、树突状细胞、

**[基金项目]** 江苏省六大高峰人才C类(2015-WSN-075)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenbing2004@126.com

髓源性抑制细胞等方面研究进展作一综述。

## 1 自然杀伤细胞(natural killer,NK)异常

NK细胞的杀伤活性无主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制,不依赖抗体,是机体免疫系统的重要组成部分,具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调控作用。健康者、MDS患者、AML患者中NK细胞逐渐减少,AML患者及MDS患者中的抑制性受体(CD158a)、活化性受体(NKG2D)、穿孔素、颗粒酶 $\beta$ 均较健康组减少<sup>[3]</sup>,其中高危MDS患者较低危患者中NKG2D减少,降低了细胞毒性功能且与疾病进展有关<sup>[3-5]</sup>。Hejazi等<sup>[6]</sup>报道大多数NK细胞缺陷是由于NK细胞功能降低或是分化障碍,导致不成熟的NK细胞占多数或是NK细胞缺乏,对肿瘤细胞杀伤能力降低。在MDS患者中,NK细胞对不同的自体或异体靶向肿瘤的反应缺失,使肿瘤发生免疫逃逸<sup>[4-5,7]</sup>。另外发现MDS患者外周血中NK细胞数量随着年龄增长保持稳定,而老年MDS患者中CD56<sup>+</sup> NK细胞数量显著减少,可能导致免疫系统的衰老<sup>[8]</sup>。这与之前报道不成熟NK细胞增多矛盾,可能与年龄相关,需大样本进一步证实。另外,原始细胞增多预示高风险向AML转化且也与NK细胞功能缺损相关<sup>[9]</sup>。表明NK细胞功能下降或数量减少提示疾病进展。

## 2 淋巴细胞异常

### 2.1 B淋巴细胞异常

B淋巴细胞能产生抗体介导体液免疫应答,活化的B淋巴细胞还可提呈可溶性抗原,启动T淋巴细胞,从而激活细胞免疫功能。GATA序列结合的转录因子2(GATA-2)突变的MDS患者与其他MDS患者相比,B淋巴细胞包括外周血及骨髓中B祖细胞减少<sup>[10]</sup>。年龄 $<55$ 岁MDS患者中B祖细胞差异不明显,而老年患者中B祖细胞明显减少<sup>[11]</sup>。另外,健康者、低危MDS患者及高危MDS患者中B细胞逐渐减少<sup>[12]</sup>。而低中危患者中B祖细胞越低,预后越差,且发现B祖细胞减少是独立预后因素,对MDS预后具有重要的免疫监视作用<sup>[13]</sup>。在MDS患者中,随着疾病进展,B祖细胞减少,而B细胞生成减少,使得体液免疫缺陷,从而使得细胞免疫受损,使肿瘤细胞逃避免疫监视,疾病进展。

### 2.2 T淋巴细胞异常

T淋巴细胞是免疫系统最重要的免疫细胞,其主要分2种亚群:辅助性T细胞(T helper cell,

Th)、细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell,CTL)。Th细胞至少分4个亚群:调节性T细胞(T regulatory cell, Treg)、辅助性T细胞1(Th1)、辅助性T细胞2(Th2)、辅助性T细胞17(Th17)。Treg细胞抑制T细胞增殖和活化及免疫功能,且不具有MHC限制性,在自身免疫病、肿瘤免疫监视中均发挥重要作用<sup>[14-16]</sup>。Th1细胞主要提高细胞免疫,具有抗感染及抗病毒作用<sup>[17]</sup>;Th2细胞诱导和促进B淋巴细胞介导的体液免疫应答<sup>[18]</sup>;Th17细胞主要是介导炎症反应,在细胞外的病原体感染、肿瘤、及自身免疫组织损伤等疾病过程中发挥作用<sup>[19-20]</sup>。Foxp3、T-bet、GATA-3、RoR $\gamma$ t分别为Treg、Th1、Th2、Th17等细胞的特异性转录因子<sup>[21]</sup>。

#### 2.2.1 Th细胞(Treg、Th1、Th2、Th17)

低危MDS、高危MDS、AML患者中Treg细胞逐渐增多<sup>[22]</sup>。另外,外周血中Treg细胞在MDS高危组比例升高,且Treg细胞在高危组比例升高同时与疾病进展相关<sup>[23-25]</sup>。MDS患者及AML患者中Treg细胞逐渐升高,免疫系统受到抑制,增加肿瘤细胞逃避机体免疫监视,使疾病进展。MDS患者外周血中T-bet、GATA-3表达与健康组相比无显著差异,ROR $\gamma$ t表达则高于健康组;将MDS进一步分组分析发现,高危MDS和AML患者中GATA-3、Foxp3调控的Th2、Treg细胞比例逐渐增多,机体免疫耐受导致幼稚细胞异常克隆从而抑制正常造血,引起骨髓造血衰竭,疾病进展<sup>[21]</sup>。低危MDS较高危MDS患者及健康组中Th17细胞增多,高危MDS患者较低危MDS患者中Th17细胞凋亡增多;低危组Th17/Treg比例较高危组高,且与骨髓凋亡增加相关<sup>[26]</sup>。在AML患者中,Th17细胞较健康组增多,Th1细胞较健康组减少,且Th17细胞升高、Th1细胞降低提示预后不良<sup>[27-28]</sup>。对于AML患者中Th1、Th17升高或降低仍有争议,可能与AML患者易合并严重感染所致炎症反应增加有关,AML患者免疫机制需进一步研究证实。低危MDS患者中炎症反应激活,而高危MDS患者免疫环境处于抑制状态,可能导致逃避免疫监视。

#### 2.2.2 细胞毒性T细胞(CTL)

CTL的主要功能是特异性直接杀伤靶细胞。其中I型细胞毒性T细胞(type I CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, Tc1)主要介导细胞免疫,II型细胞毒性T细胞(type II CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, Tc2)主要调节体液免疫。MDS患者较健康者中CTL增多,但细胞毒性无明显差异<sup>[29]</sup>。低危MDS患者中细胞凋亡增加与

CTL数量增多有关<sup>[30]</sup>。研究报道健康者组、低危MDS、高危MDS、AML患者中Tc1细胞逐渐减少,Tc2细胞逐渐增多,Tc1/Tc2的平衡逐渐向Tc2偏移,提示随着疾病进展,患者免疫状态不同,细胞免疫功能逐渐减退;且发现T细胞亚群细胞数量及细胞毒性逐渐下降<sup>[31]</sup>。另外高危MDS患者的CTL细胞毒性较低危MDS患者低<sup>[32]</sup>。低危组患者因为具有正性免疫或免疫调节的细胞增加,免疫抑制细胞降低而导致促炎状态、骨髓造血祖细胞凋亡增加甚至自身免疫的产生;相反高危组患者免疫抑制作用的细胞增加,而正性免疫作用的细胞功能障碍,导致机体免疫抵抗、监视和清除功能下降,导致异常克隆的祖细胞大量增殖,甚至恶变<sup>[2]</sup>。MDS随着疾病进展及AML,CTL数量减少及毒性减低,而免疫抑制性相关细胞增多,导致机体对异常细胞抵抗、清除、监视等功能下降。

### 3 树突状细胞(dendritic cells, DC)

DC是机体免疫应答的始动者,有强大的抗原处理和提呈功能,是唯一能激活初始T细胞的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),是机体特异性免疫应答的始动者。DC分为两类:浆样树突状细胞(pulsed dendritic cells, pDC)与髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDC)。pDC主要在体内发挥抗肿瘤和抗病毒作用,mDC主要在炎症和免疫耐受方面具有重要作用。进展MDS患者及AML患者中DC功能显著下降<sup>[33]</sup>。高危MDS患者中mDC较健康人组数量减少;同样,pDC较健康人组数量减少<sup>[34]</sup>。王化泉等<sup>[35]</sup>研究发现mDC数量在MDS患者中增多,提示MDS患者诱导抗肿瘤细胞免疫的抗原呈递细胞(pDC)数量不足及功能受损;而与正常造血克隆炎性损伤有关的抗原呈递细胞(mDC)却增多。AML患者多数mDC和pDC下降<sup>[36]</sup>。与正常对照组相比,AML细胞培养上清可显著抑制DC表面协同刺激分子CD80/CD86的表达,并可降低促成熟细胞因子对DC的促成熟作用,可显著诱导DC凋亡。AML患者血清抑制正常的单核细胞来源DC的分化和成熟,使正常前体细胞来源DC受抑<sup>[37]</sup>。DC数量减少或功能降低使抗原提呈作用受损,降低T淋巴细胞、CTL等对肿瘤细胞的杀伤,导致肿瘤细胞逃逸。

### 4 髓源性抑制细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSC)

MDSC是骨髓来源的一群异质性细胞,具有显著抑制免疫细胞应答的能力。MDSC不仅抑制瘤T

细胞免疫功能,还有助于疾病进展<sup>[38]</sup>。另外,MDSC可下调穿孔素、 $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )抑制NK细胞毒性,抑制DC分化成熟等抗肿瘤免疫应答<sup>[39-40]</sup>。健康者、低危、高危MDS患者中MDSC逐渐增多<sup>[41]</sup>。同样发现AML患者健康者中MDSC数量增多<sup>[42]</sup>。AML患者中MDSC是否较高危MDS患者增多有待进一步研究。随着MDS疾病进展,MDSC数量逐渐增加,AML患者MDSC数量较健康组增多,使Treg细胞扩增,DC成熟障碍,下调NK细胞毒性,清除肿瘤细胞能力降低,使肿瘤细胞逃避免疫监视。

### 5 总结

MDS是免疫系统多步骤异常累积数量增多导致无效造血,NK细胞数量及功能降低,T细胞比例失衡,Th/Treg比值倒置,B细胞凋亡增加,DC数量及功能异常、MDSC增多等进而引起MDS疾病进展。虽然恶性克隆的免疫逃逸机制目前尚不明确,但是目前大部分研究表明低危MDS患者中免疫系统处于激活状态,造血祖细胞凋亡增加,以免疫细胞减少为主;高危MDS患者免疫环境处于抑制状态,异常细胞克隆增多,逃避免疫监视,转化为AML,对早期MDS行免疫细胞干预治疗可能成为治疗MDS的一个新的替代疗法和研究课题。

### 【参考文献】

- [1] Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 2012, 120(12):2454-2465
- [2] Kerkhoff N, Bontkes HJ, Westers TM, et al. Dendritic cells in myelodysplastic syndromes: from pathogenesis to immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2013, 5(6): 621-637
- [3] 米惠晶,付蓉,王化泉,等.骨髓增生异常综合征患者外周血自然杀伤细胞的变化及临床意义[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(10):737-741
- [4] Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer(NK)function associated with high-risk myelodysplastic syndrome(MDS)and reduced expression of activating NK receptors [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4816-4824
- [5] Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 2006, 20(3): 463-470
- [6] Hejazi M, Manser AR, Frobel J, et al. Impaired cytotoxicity associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes [J]. *Haematologica*,

- 2015,100(5):643-652
- [7] Gleason MK, Ross JA, Warlick ED, et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33<sup>+</sup> targets [J]. *Blood*,2014,123(19):3016-3026
- [8] Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, et al. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56<sup>bright</sup> NK cells [J]. *Immun Ageing*,2006,3:10
- [9] Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome (s): A perspective and review highlighting current controversies[J]. *Leuk Res*,2003,27(2):95-120
- [10] Nováková M, Žaliová M, Suková M, et al. Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of GATA-2 deficiency in childhood myelodysplastic syndrome [J]. *Haematologica*,2016,101(6):707-716
- [11] Reis-Alves SC, Traina F, Metzke K, et al. Improving the differential diagnosis between myelodysplastic syndromes and reactive peripheral cytopenias by multiparametric flowcytometry: the role of B-cell precursors [J]. *Diagn Pathol*,2015,29(10):44
- [12] Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, et al. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy [J]. *Br J Haematol*,2011,153(5):568-581
- [13] Kahn JD, Chamuleau ME, Westers TM, et al. Regulatory T cells and Progenitor B cells are independent prognostic predictors in lower risk myelodysplastic syndromes [J]. *Haematologica*,2015,100(6):e220-222
- [14] Mailloux AW, Epling-Burnette PK. Effector memory regulatory T-cell expansion marks a pivotal point of immune escape in myelodysplastic syndromes [J]. *Oncoimmunology*,2013,2(2):e22654
- [15] Beyer M, Kochanek M, Giese T, et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple myeloma [J]. *Blood*,2006,107(10):3940-3949
- [16] Wang X, Zheng J, Liu J, et al. Increased population of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients [J]. *Eur J Haematol*,2005,75(6):468-476
- [17] Liao W, Lin JX, Wang L, et al. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages [J]. *Nat Immunol*,2011,12(6):551-559
- [18] Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, et al. Protective immune mechanisms in helminth infection [J]. *Nat Rev Immunol*,2007,7(12):975-987
- [19] Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity [J]. *J Autoimmun*,2017,pii:S0896-8411(17)30803-X
- [20] Huber M, Heink S, Pagenstecher A, et al. IL-17A secretion by CD8<sup>+</sup> T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Clin Invest*,2013,123(1):247-260
- [21] Feng XM, Xu HZ, Zhang JY, et al. Expressive changes of CD4<sup>+</sup> T cell subset transcription factors in patients with aplastic anemia, myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia and their clinical significances [J]. *Exp Hematol*,2014,22(4):1038-1042
- [22] Moon HW, Kim BH, Park CM, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells in hematologic diseases [J]. *Korean J Lab Med*,2011,31(4):231-237
- [23] Kordasti SY, Ingram W, Hayden J, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS) [J]. *Blood*,2007,110(3):847-850
- [24] Hamdi W, Ogawara H, Handa H, et al. Clinical significance of regulatory T cells in patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Eur J Haematol*,2009,82(3):201-207
- [25] Perazzio AS, Oliveira JS, Figueiredo VL, et al. Increase of IRF-1 gene expression and impairment of T regulatory cells suppression activity on patients with myelodysplastic syndrome: A longitudinal one-year study [J]. *Leuk Res*,2017,55(1):6-17
- [26] Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, et al. IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome [J]. *Br J Haematol*,2009,145(1):64-72
- [27] Han Y, Ye A, Bi L, et al. Th17 cells and interleukin-17 increase with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Sci*,2014,105(8):933-942
- [28] Musuraca G, De Matteis S, Napolitano R, et al. IL-17/IL-10 double-producing T cells: new link between infections immunosuppression and acute myeloid leukemia [J]. *J Transl Med*,2015,13:229
- [29] Kook H, Zeng W, Guibin C, et al. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia [J]. *Exp Hematol*,2001,29(11):1270-1277
- [30] Pülhorn H, Herrmann M, Harms H, et al. Apoptotic cells and clonally expanded cytotoxic T cells in bone marrow trephines of patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Histopathology*,2012,61(2):200-211
- [31] Zhang JY, Xu HZ, Yin DM, et al. Changes and clinical significance of CD8<sup>+</sup> T cell subset in patients with aplastic anemia, myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia [J]. *Exp Hematol*,2013,21(1):203-208
- [32] Sand K, Theorell J, Bryceson YT, et al. Reduced potency

- of cytotoxic T lymphocytes from patients with high-risk myelodysplastic syndromes [J]. *Cancer Immunol Immun*, 2016, 65(9):1135-1147
- [33] Lindblad KE, Goswami M, Hourigan CS, et al. Immunological effects of hypomethylating agents [J]. *Expert Rev Hematol*, 2017, 10(8):745-752
- [34] 刘洋, 李莉娟, 马婧花, 等. 骨髓增生异常综合征中树突状细胞的免疫异常与免疫治疗现状与前景 [J]. *临床荟萃*, 2016, 31(5):573-580
- [35] 王化泉, 邵宗鸿, 邢莉民, 等. 骨髓增生异常综合征患者外周血树突细胞数量、亚群及其表面协同刺激分子表达的研究 [J]. *中华血液杂志*, 2007, 28(7):474-477
- [36] 林海荣, 王亚哲, 王东侠, 等. 急性髓系白血病患者骨髓中树突状细胞亚群的定量分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(5):1249-1254
- [37] 王兴兵, 刘隽, 吴竞生, 等. 急性髓细胞性白血病细胞培养上清对树突细胞分化、成熟、凋亡及功能的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2007, 26(2):142-147
- [38] Eksioglu EA, Chen X, Heider KH, et al. Novel therapeutic approach to improve hematopoiesis in low risk MDS by targeting MDSCs with the Fc-engineered CD33 antibody BI 836858 [J]. *Leukemia*, 2017, 31(10):2172-2180
- [39] Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor induced T regulatory cells and T cell anergy in tumor bearing host [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2):1123-1131
- [40] Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin - cyclophosphamide chemotherapy [J]. *Cancer Immunol Immun*, 2009, 58(1):49-59
- [41] Kittang AO, Kordasti S, Sand KE, et al. Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(2):e1062208
- [42] Sun H, Li Y, Zhang ZF, et al. Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2015, 102(5):579-586

[收稿日期] 2017-06-16

## 参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度, 以及读者提供有关信息的出处, 应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料, 一般不宜列入参考文献, 可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行GB7714-2005的规定, 建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
  - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后, 用阿拉伯数字连续编序, 将序号置于方括号内, 并视具体情况把序号作为上角标, 或作为语句的组成部分。如“张××<sup>[1]</sup>研究发现……”, “李××等<sup>[2]</sup>认为……”, “模型构建参考文献[3]”。
  - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全, 著录格式为:  
主要责任者. 题名: 其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年, 引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
  - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况, 则不需重复著录, 按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。