

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00721

· 论 著 ·

Cy7. SE 标记 ICOS-Ab 荧光示踪技术评估小鼠心脏移植术后急性排斥反应

阳揭宇^{1△}, 傅宏^{1△}, 王全兴², 刘芳¹, 施晓敏¹, 郭闻渊¹, 宋少华¹, 李瑞东¹, 傅志仁¹, 丁国善^{1*}

1. 第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003
2. 第二军医大学基础部免疫学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨以 T 细胞活化表达的可诱导共刺激分子(inducible co-stimulatory molecule, ICOS)为基础的荧光示踪技术无创诊断小鼠心脏移植后急性排斥反应的可行性。**方法** 以小鼠颈部异位心脏移植为模型,分为同系移植、同种移植、同种移植+他克莫司(tacrolimus, FK506)治疗(同种移植治疗组)及同种移植治疗后停药组,分别在移植术后 1、3、5、7 d,采用荧光染料 Cy7. SE 标记抗小鼠 ICOS 抗体(Cy7. SE-ICOS-Ab)经尾静脉注入移植小鼠,用荧光实时显像仪观察移植植物荧光图像变化;同时用流式细胞仪检测各组小鼠脾脏 T 细胞表面 ICOS 表达, H-E 染色分析心脏移植植物病理改变。**结果** 同系移植及同种移植治疗组小鼠移植术后各时间点基本不显影;同种移植术后 1 d,移植植物荧光图像无明显变化,但术后 3、5、7 d 荧光逐渐增强,术后 7 d 时荧光强度最明显;同种移植治疗后停药组停药 3 d 移植植物荧光强度逐渐增强,停药 5、7 d 后强度明显增强。H-E 染色表明:各时间点同系移植及同种移植治疗组小鼠心脏移植植物无明显排斥反应;同种移植及同种移植治疗后停药组在术后(或停药后)1 d 移植植物无明显排斥反应,术后 3、5、7 d 排斥反应逐渐出现并加重。流式细胞仪检测显示:术后 1 d,各组脾脏 T 细胞表达 ICOS 水平无明显差异;同系移植及同种移植治疗组在各时间点基本不表达 ICOS,但同种移植及同种移植治疗后停药组在术后(或停药后)3、5、7 d ICOS 表达逐渐增加($P < 0.05$)。**结论** ICOS 表达强度与心脏移植后排斥反应强度有关,荧光标记的 ICOS 抗体可能有助于无创评估移植术后急性排斥反应的发生及程度。

[关键词] 心脏移植;可诱导共刺激分子;移植排斥;他克莫司;荧光抗体技术

[中图分类号] R 654.28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0721-06

Fluorescent tracer technique using ICOS-Ab marked with Cy7. SE for diagnosing acute heart graft rejection in mice

YANG Jie-yu^{1△}, FU Hong^{1△}, WANG Quan-xing², LIU Fang¹, SHI Xiao-min¹, GUO Wen-yuan¹, SONG Shao-hua¹, LI Rui-dong¹, FU Zhi-ren¹, DING Guo-shan^{1*}

1. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a non-invasive method based on fluorescent tracer technique using inducible co-stimulatory molecules(ICOS) expressed on activated T cells for diagnosing acute heart graft rejection in mice. **Methods** The cervical heterotopic heart transplantation was used as model to establish isograft, allograft, allograft plus tacrolimus treatment, and allograft with tacrolimus ceased groups. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day after transplantation, Cy7. SE-ICOS-Ab was injected into the heart transplant mice via tail veins. The real-time fluorescent imaging changes of the graft were observed by fluorescent equipment. Flow cytometry was used to examine the expression of ICOS on spleen T cells of mice in each group. H-E staining was used to observe the pathological changes of cardiac graft. **Results** There was no noticeable fluorescent imaging in the grafts at the 1st, 3rd, 5th and 7th day after transplantation in the isograft and allograft with tacrolimus treatment group. On the first day after transplantation, the fluorescent imaging of graft in the allograft group had no noticeable changes, but the fluorescent imaging gradually increased on the 3rd, 5th, and 7th day. The graft fluorescent imaging became stronger on the 3rd day after ceasing tacrolimus in the treated allograft group, and it became stronger at 5 and 7 days after ceasing tacrolimus. H-E staining found no noticeable rejection in isograft group and allograft plus tacrolimus treatment group at all time points. The allograft and allograft plus tacrolimus ceased group developed rejection on the 3rd day after transplantation, and the rejection became more serious on the 5th and 7th day. Flow cytometry showed that there were no significant differences in ICOS expression on spleen T cells on the 1st day after transplantation among the four groups ($P > 0.05$). The isograft and allograft plus tacrolimus treatment group had no ICOS expression on the T cells, and ICOS expression in the allograft and allograft with tacrolimus

[收稿日期] 2012-04-12 **[接受日期]** 2012-06-06

[基金项目] 上海市科委医学重点项目(09411952300). Supported by the Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (09411952300).

[作者简介] 阳揭宇, 博士生. E-mail: yjysmmu@163.com; 傅宏, 硕士, 副教授, 副主任医师. E-mail: fuhong@medmail.com.cn

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873305, E-mail: dingguoshanmail@163.com

ceased group gradually increased on the 3rd, 5th and 7th day. **Conclusion** ICOS expression intensity is associated with the degree of graft rejection. Fluorescently labeled anti-ICOS can help to assess the development and severity of acute rejection after transplantation in a non-invasive way.

[Key words] heart transplantation; inducible co-stimulatory molecules; graft rejection; tacrolimus; fluorescent antibody technique
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7): 721-726]

急性排斥反应是临床器官移植治疗术后常见的并发症^[1],及时地诊治急性排斥反应能够逆转损害从而避免移植物功能受损乃至需要二次移植^[2]。目前临床上诊断急性排斥反应一般是从临床症状^[3]、血清学^[4-5]的变化开始,但基于这些变化难以与感染^[6]、保存性损伤^[7]相鉴别,最终往往采取活组织病理检查^[8]以确诊。病理活检有出血、感染等并发症,而且对实体器官也有损伤,因此寻求一种无创诊断急性排斥反应的方法很有意义。急性排斥反应的实质就是机体免疫系统对抗外来抗原发动的免疫反应^[9],T细胞活化后介导的细胞免疫应答是其中重要的机制之一^[10]。可诱导共刺激分子(ICOS)是表达在活化的T细胞表面而在静止T细胞表面基本不表达的CD28家族分子,观察T细胞的表达情况可间接反映T细胞免疫反应强度。因此,本研究采用荧光标记物菁染料琥珀酰亚胺酯(Cy7. SE)标记抗小鼠ICOS抗体,并将其注入心脏移植小鼠体内,观察移植物的荧光显像来反映T细胞活化状态,以判断急性排斥反应的程度,并与病理活检结果进行对照,以探讨此种方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 RPMI 1640 完全培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(德国 PAA 公司);抗小鼠 ICOS 抗体(美国 eBioscience 公司);Cy7. SE 菁染料琥珀酰亚胺酯(北京泛博生物化学有限公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Fluobeam[®] 开放式实时成像系统[汇佳生物仪器(上海)有限公司];3KD 离心式过滤管(美国 Millipore 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 实验动物及分组 雄性 8~12 周龄 C57BL/6 (H-2K^b)与 BALB/C(H-2K^d)小鼠,体质量 20~25 g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,随机分成 4 组,同系移植组(isograft):C57BL/6 小鼠供体心移植到 C57BL/6 小鼠受体($n=10$);同种移植组(allograft):BALB/c 小鼠供体心脏移植到 C57BL/6 小鼠受体($n=10$);同种移植+他克莫司治疗组(allograft with tacrolimus):同种移植术后受体给予他克莫司饲服($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=10$);同种移植治疗停药组(allograft with tacrolimus ceased):同

种移植术后受体给予他克莫司饲服($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),7 d 后停用($n=10$)。受体术后保温 24 h,独笼饲养。每天目视及触摸观察移植心脏的跳动。

1.3 Cy7. SE 标记抗小鼠 ICOS 抗体(Cy7. SE-ICOS-Ab) 以 Cy7. SE 1 mg 溶解于 500 μl PBS 溶液,加入到装有 500 μg 抗小鼠 ICOS 抗体的 5 ml 玻璃瓶中,加 PBS 至 1 ml,以锡箔纸包裹,常温置于 TS-型脱色摇床 120 次/min 过夜,将混合液移至 3KD 离心式过滤管,1 500 $\times g$ 离心 5 min,小鼠 ICOS 抗体的相对分子质量为 40 000~50 000,而 Cy7. SE 的相对分子质量为 818.01,因此离心管内胆管留下的为结合物,而过剩的 Cy7. SE 则过滤至外套管。将内胆管遗留物移至 15 ml BD 管内,加 PBS 至 5 ml 避光保存。将心脏移植成功的 4 组小鼠在术后(停药组为停药后)1、3、5、7 d 行 Cy7. SE-ICOS-Ab 注射后荧光显像示踪小鼠移植心脏急性排斥反应,每只小鼠尾静脉注射 Cy7. SE-ICOS-Ab 溶液 0.2 ml,5 min 后 Fluobeam[®] 开放式实时成像系统摄取图像。

1.4 脾脏单个核细胞悬液的制备 部分受体 C57BL/6 小鼠荧光显像检测后在 1、3、5、7 d 时断颈处死,取脾脏,加入 PBS,置于 100 目无菌碾磨钢网上,反复碾磨,过滤 2 次,500 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,加入 Tris-NH₄Cl 缓冲液破红,静置 5 min,500 $\times g$ 离心 5 min,PBS 缓冲液重悬,500 $\times g$ 离心 5 min,弃上清,调整细胞密度为 10⁷ 个/ml,于 96 孔培养板上培养。每组受体小鼠各个时间点所取单个核细胞悬液设 5 个复孔,400 μl /孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中备用。

1.5 流式细胞仪检测 ICOS 表达水平 每个复孔单独取脾脏 T 细胞 1 $\times 10^6$,加入抗小鼠 ICOS 抗体 10 μg ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,1 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清,重复洗涤 1 次,上流式细胞仪检测 ICOS。

1.6 H-E 染色分析 部分受体 C57BL/6 小鼠荧光显像检测后在 1、3、5、7 d 时断颈处死,取移植心脏切片后 H-E 染色做病理检查。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 术后小鼠 Cy7. SE-ICOS-Ab 荧光显像结果

同系移植组尾静脉注入移植小鼠 Cy7. SE-ICOS-Ab 后,荧光实时显像仪显示在术后 1、3、5、7 d 移植物荧光图像无明显变化;同种移植后 1 d,移植小鼠尾静脉注射 Cy7. SE-ICOS-Ab 后,荧光实时显像仪显示的移植物荧光图像不明显,但在术后 3、5、7 d,移植物荧光显像逐渐增强,移植 7 d 后荧光图像非常明显;在同种移植+他克莫司治疗 1、3、5、7 d 后,荧光实时显像仪显示的移植物荧光图像也无明显变化,但在停药 3 d 后移植物荧光图像开始逐渐增强,停药 5、7 d 后明显增强(图 1)。

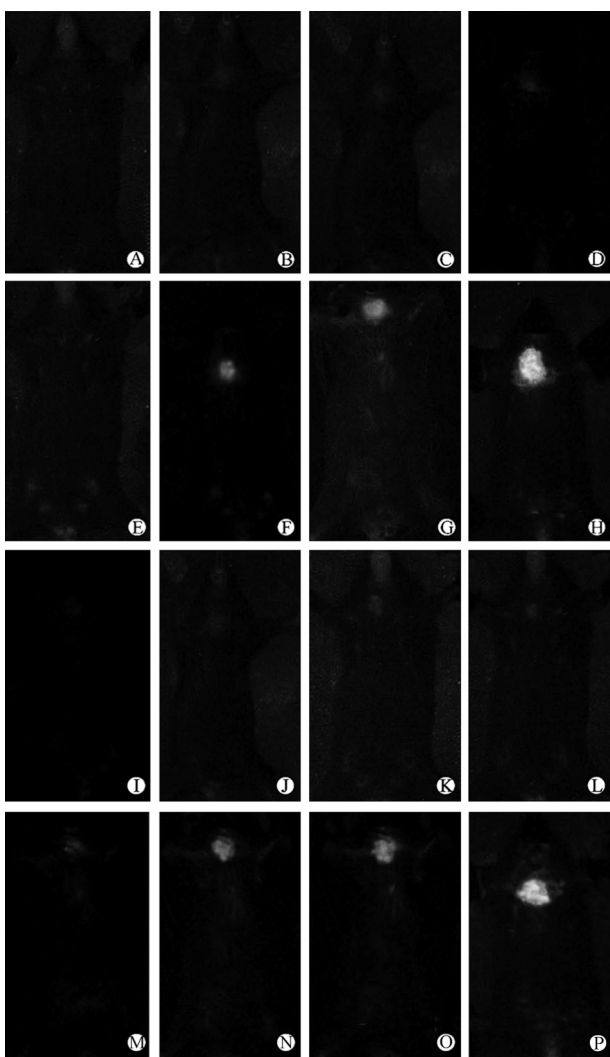


图 1 移植后不同组小鼠不同时间移植心脏荧光显像

Fig 1 Fluorescent imaging of cardiac graft at different time points after transplantation in different groups

A-D: Isograft; E-G: Allograft; I-L: Allograft plus tacrolimus; M-P: Allograft with tacrolimus ceased. A, E, I: 1 d after transplantation; B, F, J: 3 d after transplantation; C, G, K: 5 d after transplantation; D, H, L: 7 d after transplantation; M-P: 1 d, 3 d, 5 d, 7 d after tacrolimus ceased, respectively

2.2 术后小鼠移植心脏 H-E 染色结果 同系移植组在术后 1、3、5、7 d 时移植心脏无排斥反应;同种移植组在术后 1 d 无排斥反应,术后 3、5、7 d 移植心脏排斥反应逐渐加重;同种移植治疗组术后 1、3、5、7 d 无排斥反应;同种移植停药组停药后 1 d 未显示排斥反应,但停药后 3、5、7 d 移植心脏排斥反应逐渐加重(图 2)。

2.3 移植小鼠术后脾脏 T 细胞表面 ICOS 流式细胞仪检测结果(图 3)显示:术后 1 d 时脾脏 T 细胞表面 ICOS 在 4 个组别基本不表达且表达没有明显区别;而在术后 3、5、7 d,脾脏 T 细胞表面 ICOS 在 4 个组别的表达有区别($P < 0.05$),同种移植和同种移植停药组脾脏 T 细胞表面 ICOS 表达高于同系移植和同种移植治疗组,同系移植和同种移植治疗组脾脏 T 细胞表面基本不表达 ICOS,而同种移植组及同种移植停药组随着时间的增加脾脏 T 细胞表面表达 ICOS 增强。

3 讨论

器官移植是大多数终末期脏器功能衰竭疾病的唯一有效治疗方法^[11-13],移植术后的排斥反应严重影响患者的生存质量。急性排斥反应常发生于术后 1 周至 6 个月内,过去急性排斥反应发生率可高达 50%以上,由于新免疫抑制剂的使用,其发生率逐渐下降,但依然是影响术后移植物功能的主要因素^[14-15]。急性排斥反应发生时其症状有时难以与感染、保存性损伤相鉴别,准确及时诊断急性排斥反应十分重要。金标准是移植物活组织病理检查,此方法快捷准确,但其并发症也为临床医生所担心。有报道采用 PET/CT 或围手术期监测外周血 CD4⁺T 淋巴细胞 ATP 值的动态变化^[16]来进行无创诊断急性排斥反应及判断抗排斥治疗效果,但由于方法的一些局限性^[17-18]并未得到临床普遍的应用,免疫学、细胞或血清学也只能为诊断急性排斥反应提供参考。因此,寻找一种有效的无创诊断急性排斥反应的方法非常有意义。

排斥反应的本质是受体内免疫系统识别外来抗原引起的一系列免疫应答^[19],进而引起对移植物的结构和功能的损害。T 淋巴细胞激活介导的特异性免疫应答贯穿始终^[20],T 细胞活化、增殖以及在移植物局部浸润、集结是移植排斥反应发生、发展的关键。MHC 错配的组织器官进入机体后,供者器官内的抗原提呈细胞(主要为 DC)将抗原肽/MHC II 复合物^[21]提呈给受者 T 细胞尤其是 CD8⁺T 细胞(也包括 CD4⁺T 细胞)直接识别和活化,介导急性排斥反应的产生。T 淋巴细胞的活化需要双信号刺激:一是抗原肽/MHC II 分子与 CD3/TCR 的结合,

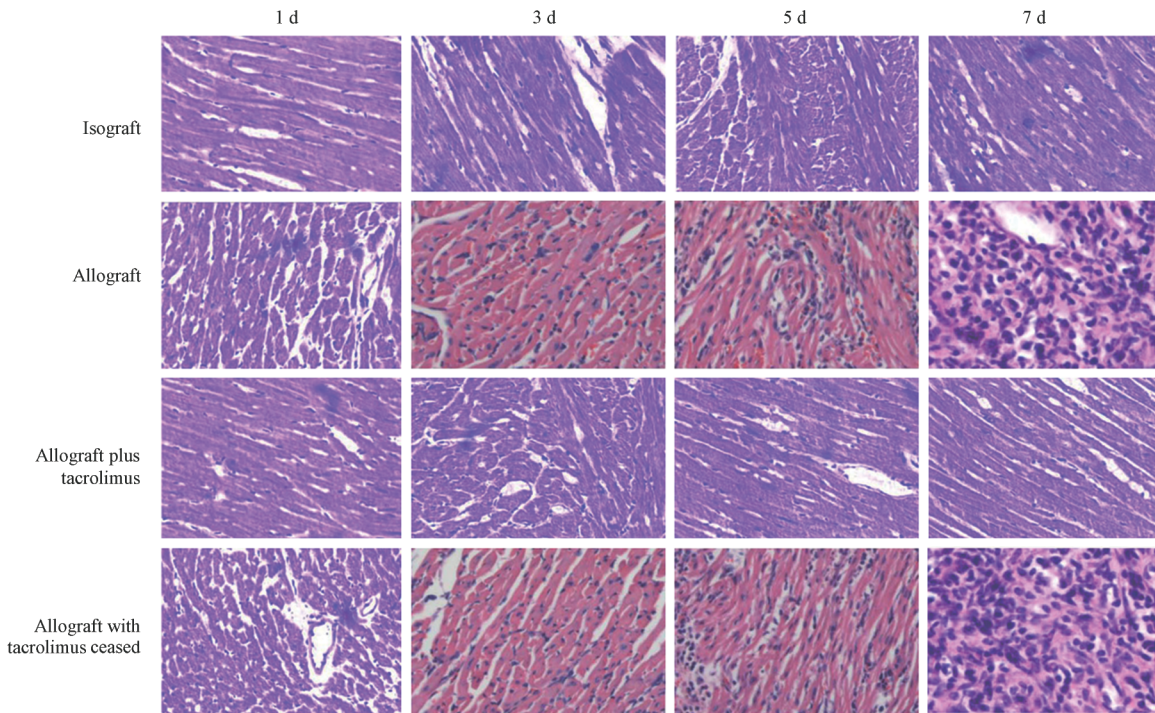


图 2 各组小鼠移植后(或停药后)不同时间移植心脏的 H-E 染色结果

Fig 2 H-E staining of transplanted hearts in mice at different time points after transplantation

Original magnification: $\times 200$

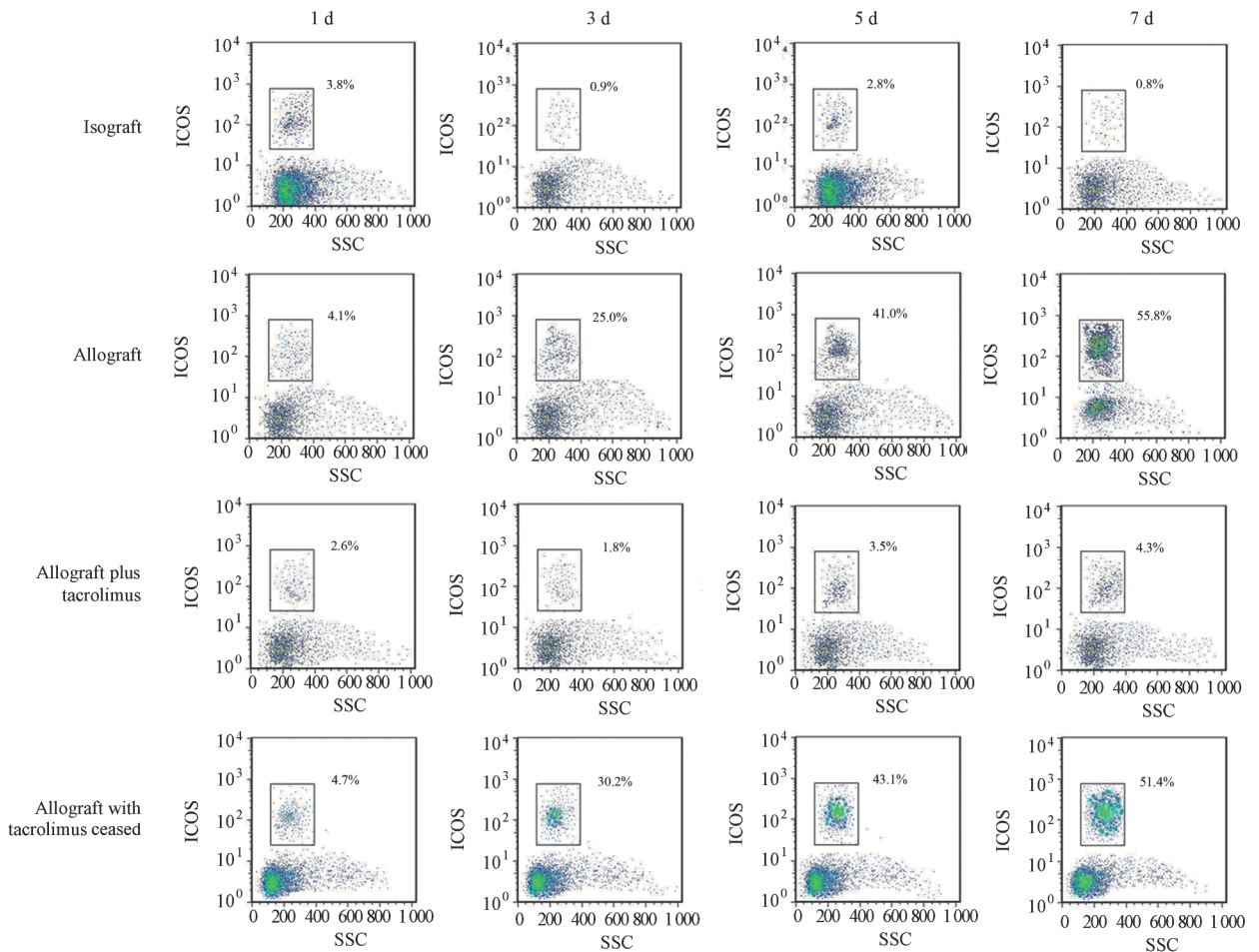


图 3 各组小鼠移植后(或停药后)不同时间脾脏 T 细胞 ICOS 的表达情况

Fig 3 Expression of ICOS on spleen T cells at different time points in transplanted mice of each group

另一个是共刺激信号,如 CD28/B7、CD40/CD40L 通路等。以往把 IL-2R、CD28、CD40L 等作为 T 细胞活化的标志。但因为这些分子组成性表达在 T 细胞表面即活化前后都表达,或又是调节性 T 细胞的标志,因此不能准确反映 T 细胞的活化情况。德国学者 Hutloff 等^[22]发现一种表达在活化后 T 细胞表面的膜分子,命名为 ICOS。ICOS 对 T 细胞的活化、分化有独特的作用,且在静止 T 细胞基本不表达而诱导性表达于活化 T 细胞表面^[23]。因此,ICOS 能更准确地反映 T 细胞活化的数量和状态。

通过检测 ICOS 在移植患者体内特别是移植术中的表达情况,进而反映免疫应答的活动状态,提示排斥反应程度,是值得探索的一条诊断和跟踪急性排斥反应的有效途径。荧光在临床上用于喉癌^[24]、鳞状细胞癌^[25]等疾病的早期诊断取得了非常好的效果。Cy7. SE 是性能优良的荧光标记染料,相对分子质量为 818.01,激发波长(Ex)747 nm,发射波长(Em)774 nm,其吸收在近红外区,能用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测,在活体成像领域可以代替放射性元素。Fluobeam[®]开放式实时成像系统是基于近红外成像原理,配合近红外荧光染料,提供更高的特异性和灵敏度。该成像系统广泛应用于肿瘤研究、心血管研究、药物示踪和疗效评估等方面。

本实验采用同种、同系小鼠异位心脏移植模型,于移植后不同时间将 Cy7. SE-ICOS-Ab 通过尾静脉注入小鼠体内,进行 Fluobeam[®]开放式实时成像系统移植术显像,分析排斥反应产生、发展过程中不同实验组别图像的区别,进行急性排斥的影像诊断,并以移植心脏病理检查做确诊;同时流式细胞仪检测移植小鼠体内 ICOS 的表达情况,与影像学资料相比照。结果显示:(1)在同系移植组及同种移植治疗组成像系统应用 Cy7. SE-ICOS-Ab 检测移植心脏荧光图像在术后 1、3、5、7 d 均无明显显像,而在同种移植组及同种移植停药组中随着时间的延长,移植心脏荧光显像逐渐增强;(2)各组小鼠移植心脏在术后 1、3、5、7 d 行病理检查,发现在同系移植组及同种移植治疗组移植心脏病理正常,而在同种移植组及同种移植停药组中随着时间的延长,移植心脏病理切片提示心脏损害加重,急性排斥反应程度加深;(3)在术后 1、3、5、7 d 对移植小鼠脾脏 T 细胞行流式细胞仪检测,结果显示在初始阶段脾脏 T 细胞表面基本不表达 ICOS,同种移植组及同种移植停药组

的小鼠体内 ICOS 随着时间的延长表达逐渐增强,而其他两组 ICOS 表达结果没有随时间的变化而变化。

基于以上实验结果,用 Cy7. SE 标记 ICOS 抗体示踪技术观察小鼠移植心脏的急性排斥反应,其图像中移植术荧光的强度变化与实际病理和流式细胞检测体内 ICOS 表达结果演变相符合,提示应用荧光标记 ICOS 抗体来检测急性排斥反应具有很好的指导意义,值得进一步深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 感谢汇佳公司孟庆刚博士在实验期间提供 Fluobeam[®]开放式实时成像系统!)

[参考文献]

- [1] Peddi V R, Demmy A M, Munda R, Alexander J W, First M R. Tacrolimus eliminates acute rejection as a major complication following simultaneous kidney and pancreas transplantation [J]. *Transplant Proc*, 1998, 30:509-511.
- [2] Takahashi H, Kato T, Delacruz V, Nishida S, Selvaggi G, Weppler D, et al. Analysis of acute and chronic rejection in multiple organ allografts from retransplantation and autopsy cases of multivisceral transplantation [J]. *Transplantation*, 2008, 85: 1610-1616.
- [3] De Vito Dabbs A, Hoffman L A, Iacono A T, Zullo T G, McCurry K R, Dauber J H. Are symptom reports useful for differentiating between acute rejection and pulmonary infection after lung transplantation? [J]. *Heart Lung*, 2004, 33:372-380.
- [4] Bañón-Maneus E, Kahbiri E, Marín J L, Pomar-Moya J L, Ramírez J, Climent F, et al. Increased serum creatine kinase is a reliable marker for acute transplanted heart rejection diagnosis in rats [J]. *Transpl Int*, 2007, 20:184-189.
- [5] Moench C, Uhrig A, Lohse A W, Thies J, Otto G. Differential diagnosis of cytomegalovirus infection and acute rejection by serum CC-chemokine measurement after orthotopic liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35:2084-2085.
- [6] Dohna-Schwake C, Fiedler M, Gierenz N, Gerner P, Ballauf A, Breddemann A, et al. Primary HHV 6 infection after liver transplantation with acute graft rejection and multi-organ failure: successful treatment with a 2.5-fold dose of cidofovir and reduction of immunosuppression [J]. *Pediatr Transplant*, 2011, 15: E126-E129.
- [7] Manner M, Shult W, Senninger N, Machens G, Otto G. Evaluation of preservation damage after porcine liver transplantation by assessment of hepatic microcirculation [J]. *Transplantation*, 1990, 50:940-943.
- [8] Tazelaar H D, Edwards W D. Pathology of cardiac transplantation: recipient hearts (chronic heart failure) and donor hearts (acute and chronic rejection) [J]. *Mayo Clin Proc*, 1992, 67:

- 685-696.
- [9] Oliveira J G, Monteiro M S, Teixeira J F, Osório E, Norton S M, Alves H, et al. Humoral immune response after kidney transplantation is enhanced by acute rejection and urological obstruction and is down-regulated by mycophenolate mofetil treatment[J]. *Transpl Int*, 2005, 18: 1286-1291.
- [10] Lamb L S Jr, Szafer F, Henslee-Downey P J, Walker M, King S, Godder K, et al. Characterization of acute bone marrow graft rejection in T cell-depleted, partially mismatched related donor bone marrow transplantation[J]. *Exp Hematol*, 1995, 23: 1595-1600.
- [11] Hayashi H, Shimizu K, Tani T, Takamura H, Takeshita M, Funaki K, et al. Multiple organ failure caused by end-stage liver disease successfully treated with living donor liver transplantation using perioperative percutaneous cardiopulmonary support: a case report[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37: 1101-1103.
- [12] Jacquelinet C, Burgun A, Delamarre D, Strang N, Djabbour S, Boutin B, et al. Developing the ontological foundations of a terminological system for end-stage diseases, organ failure, dialysis and transplantation[J]. *Int J Med Inform*, 2003, 70(2-3): 317-328.
- [13] Lietz K, Miller L W. Improved survival of patients with end-stage heart failure listed for heart transplantation: analysis of organ procurement and transplantation network/U. S. United Network of Organ Sharing data, 1990 to 2005[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50: 1282-1290.
- [14] Krüger T M, Strom C, Stempfle H U, Spes C H, Ziegler U, Theisen K, et al. Influence of acute cellular rejection on long-term left ventricular systolic function after orthotopic heart transplantation[J]. *Transplant Proc*, 1995, 27: 1979-1980.
- [15] Troppmann C, Gillingham K J, Benedetti E, Almond P S, Gruessner R W, Najarian J S, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis[J]. *Transplantation*, 1995, 59: 962-968.
- [16] Dong J Y, Yin H, Li R D, Ding G S, Fu Z R, Wu Y M, et al. The relationship between adenosine triphosphate within CD4⁺ T lymphocytes and acute rejection after liver transplantation[J]. *Clin Transplant*, 2011, 25: E292-E296.
- [17] Ben-Haim S, Ell P. ¹⁸F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50: 88-99.
- [18] Brepoels L, Stroobants S. PET scanning and prognosis in Hodgkin's lymphoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2008, 20: 509-516.
- [19] Utku N, Heinemann T, Milford E L. T-cell immune response cDNA 7 in allograft rejection and inflammation[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8: 401-410.
- [20] Zinkernagel R M. Major transplantation antigens in T cell-mediated immunity: a comparison of the transplantation reaction with antiviral immunity[J]. *Fed Proc*, 1978, 37: 2379-2384.
- [21] Zuniga-Pflücker J C, Jones L A, Longo D L, Kruisbeek A M. Both TCR/MHC and accessory molecule/MHC interactions are required for positive and negative selection of mature T cells in the thymus[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989, 54 (Pt 1): 153-158.
- [22] Hutloff A, Dittrich A M, Beier K C, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28[J]. *Nature*, 1999, 397: 263-266.
- [23] Coyle A J, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses[J]. *Immunity*, 2000, 13: 95-105.
- [24] Kraft M, Betz C S, Leunig A, Arens C. Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions[J]. *Head Neck*, 2011, 33: 941-948.
- [25] Kleinpenning M M, Wolberink E W, Smits T, Blokx W A, van De Kerkhof P C, van Erp P E, et al. Fluorescence diagnosis in actinic keratosis and squamous cell carcinoma[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2010, 26: 297-302.

[本文编辑] 贾泽军