

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01165

· 论 著 ·

人源重组 ICOSIg 对鼠不成熟树突状细胞的生物学作用

徐劲松¹, 吴 豫¹, 沈 茜², 唐古生^{2*}

1. 解放军 94 医院呼吸科, 南昌 330002
2. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析人源可诱导共刺激分子(ICOS)可溶性融合蛋白(ICOSIg)与鼠源不成熟树突状细胞(DCs)是否发生特异性结合及其一般生物学特性。**方法** 通过流式细胞术结合特异性抗体检测了解 ICOSIg 与不成熟 DCs 的结合作用;以 Annexin V/PI 双染色、活细胞染料 CFSE 和 CCK-8 研究 ICOSIg 对 DCs 的细胞毒性作用;以 [³H] 掺入法研究 ICOSIg 对于混合淋巴细胞反应的阻断作用。**结果** ICOSIg 可结合小鼠 DCs 表面的 ICOSL, ICOSIg 不引起 DCs 早期和晚期凋亡, 不影响 DCs 细胞的增殖, 可以抑制不同基因小鼠脾细胞的混合淋巴细胞反应。**结论** 本实验室构建的体外表达的 ICOSIg 具有较强的生物学活性, 对鼠 DCs 无明显的生物学毒性作用, 首次从实验角度证实人源 ICOSIg 可以特异性结合小鼠不成熟 DCs 表面配体 ICOSL, 可以用于进一步探讨 ICOSL/ICOS 共刺激通路的免疫作用。

[关键词] 可诱导共刺激分子; 树突细胞; 重组融合蛋白质类; 抑制

[中图分类号] R 392.111 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1165-06

Biological effect of human-derived recombinant ICOSIg on mouse immature dendritic cells

XU Jin-song¹, WU Yu¹, SHEN Qian², TANG Gu-sheng^{2*}

1. Department of Respiratory Diseases, No. 94 Hospital of PLA, Nanchang 330002, Jiangxi, China
2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze whether human-derived ICOSIg can bind specifically to ICOSL on mouse immature dendritic cells(DCs) and to explore its biological functions. **Methods** The binding of ICOSIg to immature DCs was observed by FCM. The cytotoxic effect of ICOSIg on DCs was examined by Annexin V/PI, CFSE staining, and CCK-8 kit. [³H] thymine incorporation was used to analyze the blocking effect ICOSIg on mixed lymphocyte reaction (MLR). **Results** Human-derived soluble fusion protein ICOSIg could bind to ICOSL on mouse bone marrow-derived immature DCs and inhibited the MLR, but it neither induced early or late apoptosis of DCs nor affected their proliferation. **Conclusion** Human-derived ICOSIg constructed in this study has a potent biological function; it has no toxic effect against mouse immature DCs. It is demonstrated that human-derived ICOSIg can sepecifically bind to ICOSL on mouse immature DCs.

[Key words] inducible costimulator; dendritic cells; recombinant fusion proteins; inhibition

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1165-1170]

前期, 我们已成功构建了人源可诱导共刺激分子(ICOS)胞膜外区和人 IgG1 蛋白恒定区 Fc 段的融合蛋白 ICOSIg 的真核表达体系, 筛选出稳定高表达 ICOSIg 的 CHO 细胞株, 并获得大量可溶性 ICOSIg 融合蛋白^[1]。为进一步研究 ICOS/ICOSL 通路在机体免疫中的重要作用、利用 ICOSIg 深入探

讨 ICOS/ICOSL 通路本身的功能状况及干预该通路对自身免疫性疾病和器官移植排斥的影响, 首先需要对该蛋白的各种生物学特性进行深入探讨。人 ICOS 及其配体的序列和结构与小鼠相似, 近期利用计算机模拟技术研究表明, 人体内 ICOS/ICOSL 配受体的结合部位与小鼠也非常相似^[2], 但人源 ICOS

[收稿日期] 2011-09-08 **[接受日期]** 2011-10-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81102249), 中国人民解放军南京军区 2010 年医学课题(10MA057), 江西省卫生厅 2011 年度科技计划项目(20112058)。Supported by National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81102249), Medical Project of PLA Nanjing Military Area Command 2010 (10MA057), and Science and Technology Projects of Health Department of Jiangxi Province 2011 (20112058).

[作者简介] 徐劲松, 硕士, 主管技师。E-mail: wuyu_1972@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873612, E-mail: drake824@yahoo.com.cn

和小鼠 ICOSL 是否确实可以发生结合并产生后续的生物功能有待进一步证实。

1 材料和方法

1.1 实验动物 8~10 周龄的 C57BL/6 小鼠(H-2^b)和 BALB/c 小鼠(H-2^d),体质量 20~22 g,平均(20.7±0.8) g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。所有实验小鼠均在第二军医大学实验动物中心 SPF 清洁级环境中饲养。

1.2 实验材料 可溶性 ICOSIg 融合蛋白为本实验在前期工作中制备,并经过除内毒素处理^[1];对照蛋白 IgG1 购自 Sigma 公司;培养树突状细胞(DCs)所使用的塑料耗材均采用一次性除内毒素成品,购于国外 Corning 公司或国内圣纳堡公司;重组鼠粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(rmGM-CSF)、重组鼠白介素-4(rmIL-4)、鼠 CD16/32 抗体购自 R&D 公司;各种荧光标记流式抗体购自 eBioscience 公司;活细胞染料 CFSE 购自日本同仁化学研究所。CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.3 小鼠骨髓 DCs 制备 DCs 培养及纯化步骤详见文献[3],简述如下:无菌操作取 C57BL/6 (H-2^b)小鼠骨髓细胞,用 Tris-NH₄Cl 溶去红细胞,RPMI 1640 培养液洗 2 次后,溶于含 rmGM-CSF (10 ng/ml)、rmIL-4 (1 ng/ml)和 10% FCS 的 RPMI 1640 完全培养液,37℃ 含 5% CO₂ 孵箱内培养。第 2~3 天吸去培养液及悬浮细胞,重新加入含 rmGM-CSF 和 rmIL-4 的新鲜培养液,第 5 天即获得不成熟 DCs,上流式细胞仪检测 CD11c⁺ 细胞比例在 80% 以上。

1.4 人源重组 ICOSIg 与小鼠骨髓 DCs ICOSL 结合能力的鉴定 5×10⁵ DCs 细胞重悬于 100 μl 结合缓冲液中,先用 10 μg/ml 鼠 CD16/32 抗体,4℃ 封闭 30 min,PBS 洗涤 1 次后,再重悬于 100 μl 结合缓冲液中,分别进行以下操作:(1)先与 60 μg/ml ICOSIg 作用 30 min,再与荧光标记抗人 IgG1 抗体避光作用 30 min,上流式细胞仪检测;(2)将不同浓度的 ICOSIg 蛋白、PE 标记的足量抗鼠 ICOSL 抗体与 DCs 共孵育 30 min,上流式细胞仪检测;(3)先用足量 ICOSIg 蛋白(60 μg/ml)与 DCs 共孵育 30 min,再与 PE 标记的抗鼠 ICOSL 抗体孵育 30 min,上流式细胞仪检测。采用流式细胞仪检测时,均以 CD11c⁺ DCs 设门,门内计数细胞通常大于 5 000,用 CellQuest 软件进行分析。

1.5 ICOSIg 对小鼠淋巴细胞增殖的抑制作用 无菌条件下取 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠脾脏,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。C57BL/6 来源的单个核细胞先用丝裂霉素 C(mytomycin C) 80 μg/ml 处理 30 min,充分洗涤后,取 3×10⁵ 单个核细胞与 BALB/c 小鼠来源单个核细胞 6×10⁵ 共培养于 U 形 96 孔板,各处理组均设 3 个复孔,培养体系 200 μl,37℃、5% CO₂ 条件下培养 3 d,最后 16 h 加入 3.7×10⁴ Bq[³H]-TdR。用多头细胞收集器收集细胞至玻璃纤维膜上,将膜置于 40℃ 孵箱烘干,烘干后取各孔已收集了细胞的滤纸置于专用 24 孔板中,加入 500 μl 液体闪烁液,密封后用(液闪测定仪测定每分钟放射计数(cpm))。

1.6 ICOSIg 对小鼠 DCs 凋亡的影响 培养 5 d 的 DCs 以 1×10⁶/ml 密度种入 24 孔平底培养板,进行如下分组:(1)PBS 组,加入与实验组等体积的 PBS;(2)IgG 组,加入 60 μg/ml 对照 IgG;(3)ICOSIg 组,加入 60 μg/ml ICOSIg。继续培养 24 h 或 48 h。收集细胞,洗涤后加入 100 μl 结合缓冲液,参照说明书加入 FITC 标记的 Annexin V,避光反应 15 min,上机前加入 PI,采用流式细胞仪进行凋亡分析。

1.7 ICOSIg 对小鼠 DCs 增殖的影响 培养 5 d 的 DCs 以 1×10⁵/ml 密度种入 96 孔平底培养板,每孔 200 μl 体系,每组设 2 个复孔,进行如下处理:(1)ICOSIg 组,加入 60 μg/ml ICOSIg;(2)IgG 组,加入 60 μg/ml 对照 IgG;(3)PBS 组,加入等体积 PBS,作为空白对照;(4)ICOSIg-LPS 组,加入 60 μg/ml ICOSIg,同时加入终质量浓度为 100 ng/ml 的 LPS;(5)IgG-LPS 组,加入 60 μg/ml 对照 IgG,同时加 100 ng/ml 的 LPS;(6)PBS-LPS,加入等体积 PBS,同时加入 100 ng/ml 的 LPS,作为成熟 DCs 空白对照。继续培养 36 h 后,每孔加入 10 μl CCK-8 检测液,并继续培养,每隔 1 h 测光密度一次,共检测 3 次。检测时以 450 nm 作为检测波长,以 650 nm 作为参考波长。观察分析 ICOSIg 对 DCs 是否有毒性作用或促增殖作用。另将不成熟 DCs 重悬于 500 μl 含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,加入终浓度为 5 mmol/L 的 CFSE,37℃、5% CO₂ 孵育 15 min 后,充分洗涤,洗去残余的 CFSE 染料。按实验要求进行不同处理后,继续培养 48 h,收集细胞,上流式细胞仪检测其增殖情况。

1.8 统计学处理 流式细胞分析表型变化等采用多次实验重复,各次实验检测指标趋势一致,给出具有

代表意义的典型图片。对 CCK-8 及 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 掺入等实验数据采用单因素方差分析进行统计处理。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠骨髓不成熟 DCs 表面中度表达 ICOSL 首先在体外诱导培养第 5 天不成熟 DCs, 检测发现其表面 ICOSL 有中等程度表达; 用 100 ng/ml LPS 继续刺激 24 h 和 48 h 后, ICOSL 表达量

逐渐下调(图 1)。

2.2 ICOSIg 可结合不成熟 DCs 不同浓度 ICOSIg 与不成熟 DCs 细胞孵育后, 以 FITC 标记的抗人 IgG1 间接标记。结果表明, 随着 ICOSIg 浓度的升高, 流式细胞仪检测到的荧光标记细胞的比例和荧光强度也逐渐上调直至基本恒定(图 2), 表明体外真核表达的人 ICOSIg 可以结合到小鼠不成熟 DCs 表面。

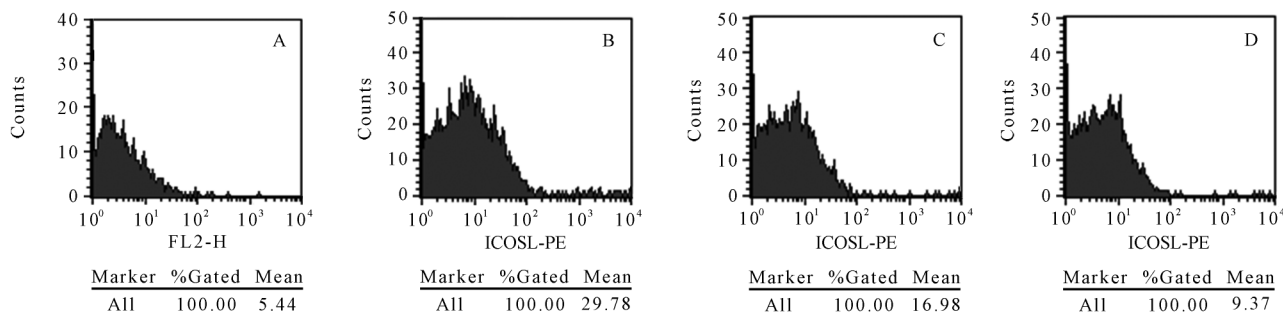


图 1 小鼠骨髓 DCs 表面 ICOSL 的表达

Fig 1 Expression of ICOSL on mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs)

A: Immature DCs treated with isotype antibody; B: Immature DCs treated with PE-anti-ICOSL antibody; C, D: Immature DCs were stimulated with 100 ng/ml LPS for 24 h or 48 h before treatment with PE-anti-ICOSL antibody

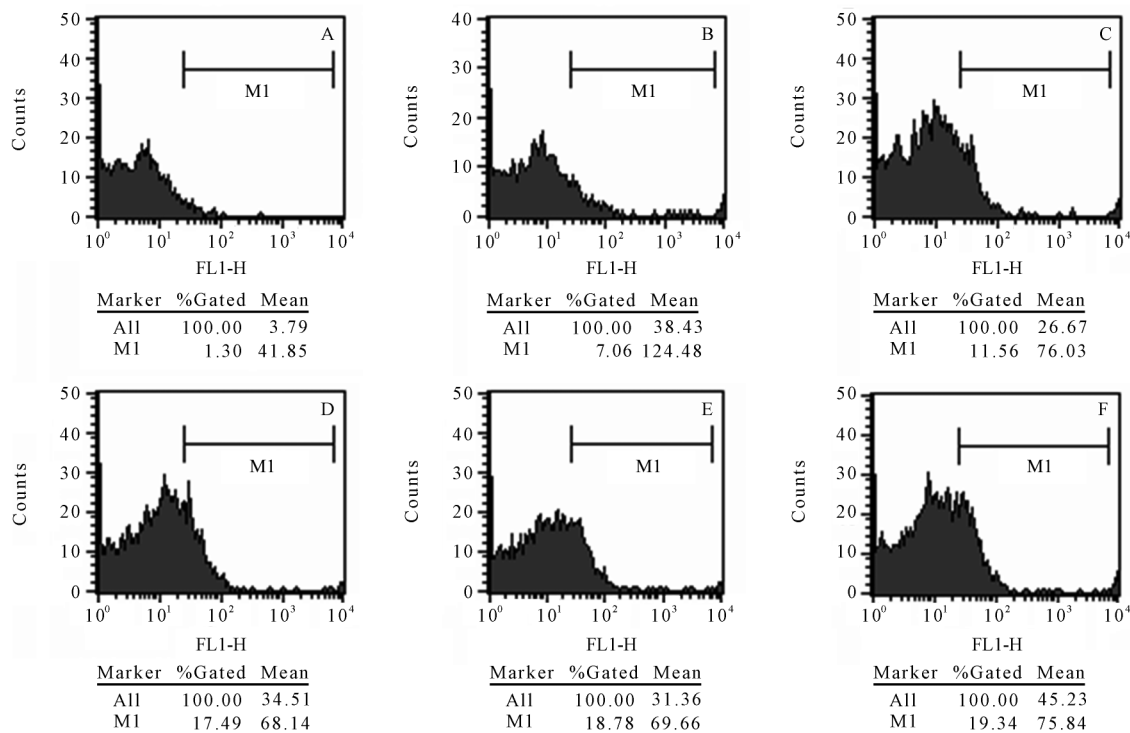


图 2 可溶性 ICOSIg 可结合到小鼠不成熟 DCs 表面

Fig 2 ICOSIg bound to mouse immature dendritic cells (DCs)

A: Blank control with isotype antibody; B-F: Immature DCs first treated with different concentration of ICOSIg (10, 20, 30, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$), then with FITC labeling anti-human IgG1 antibody

2.3 ICOSIg 可特异性结合小鼠 DCs 表面 ICOSL 用不同浓度的 ICOSIg 和 PE 标记的足量 ICOSL 抗体,同时作用体外培养 5 d 的 DCs。结果发现:随着 ICOSIg 浓度的升高,ICOSL 抗体与 DCs 的结合下调。表明 ICOSIg 与抗 ICOSL 抗体竞争结合 DCs 表面的 ICOSL(图 3A)。将 5 d 的 DCs 与足量 ICOSIg (60 $\mu\text{g/ml}$) 共孵育 30 min 后,再加入 PE-anti-ICOSL 抗体,其不能与 ICOSL 结合(图 3B)。

2.4 ICOSIg 不引起 DCs 凋亡和坏死 与空白未处理对照组或 IgG1 相比,ICOSIg 不增加 DCs 的早期或晚期凋亡。图示流式细胞仪检测散点图中右下(LR)象限代表早期凋亡细胞,右上(UR)代表晚期凋亡或坏死细胞,左下(LL)代表正常存活细胞(图 4)。

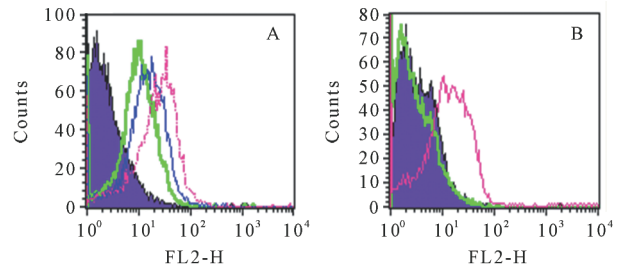


图 3 ICOSIg 可特异性结合 DCs 表面的 ICOSL

Fig 3 Specific binding of ICOSIg to ICOSL

on immature dendritic cells (DCs)

Shaded histograms in both pictures stand for fluorescence labeling-isotype antibody. A: ICOSIg binds competitively with anti-ICOSL to ICOSL on DCs. Dash line (red): only anti-ICOSL-PE. Thin line (blue): 30 $\mu\text{g/ml}$ ICOSIg + anti-ICOSL-PE. Bold line (green): 60 $\mu\text{g/ml}$ ICOSIg + anti-ICOSL-PE. B: Pretreatment with ICOSIg completely blocks the specific binding of anti-ICOSL to ICOSL on DCs. Thin line (red): 60 $\mu\text{g/ml}$ IgG + anti-ICOSL-PE. Bold line (green): 60 $\mu\text{g/ml}$ ICOSIg + anti-ICOSL-PE

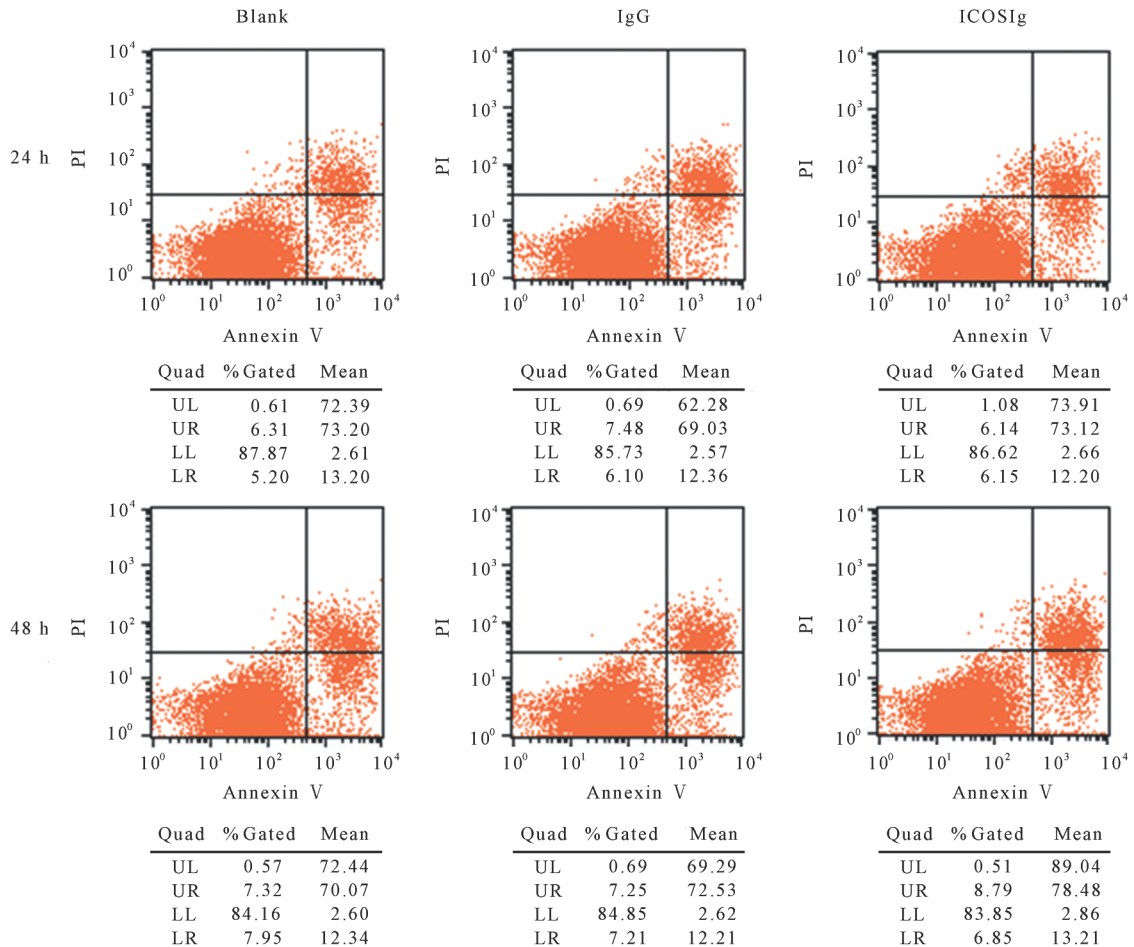


图 4 ICOSIg 不引起 DCs 凋亡

Fig 4 ICOSIg induced no apoptosis of dendritic cells (DCs)

Blank control with isotype antibody; cells were inoculated in 24-well plates after purified, and 60 $\mu\text{g/ml}$ ICOSIg, IgG or PBS were added, followed by another 24 h or 48 h cultivation before being dyed and detected for analysis of apoptosis. No difference exists among these groups at both time points

2.5 ICOSIg 不引起 DCs 增殖 我们进一步以 CCK-8 和 CFSE 检测可溶性蛋白是否对 DCs 具有毒性或促增殖作用。结果表明:(1)无 LPS 处理各不成熟 DCs 组光密度值明显高于 LPS 刺激 DCs 组。(2)无 LPS 刺激或 LPS 刺激组内对比,各处理组光密度值间没有明显差别,表明 ICOSIg 和 IgG 本身不引起 DCs 细胞的增殖,对 DCs 细胞也无明显的毒性作用(图 5A)。本实验中相同数目的不成熟 DCs,培养过程中加入 LPS 刺激后,CCK-8 检测其光密度值低于无 LPS 处理组,其原因可能是因为不成熟 DCs 在体外培养过程中,仍可部分发生增殖,DCs 数目增加。而 LPS 刺激过程中,DCs 逐渐分化成熟但不再增殖(图 5A)。为验证该可能性,我们用活细胞染料 CFSE 预染体外诱导培养 5 d 的不成熟 DCs,加或不加 100 ng/ml LPS,继续培养 48 h。发现无处理 DCs 有部分发生增殖,而 LPS 处理 DCs 无明显增殖迹象(图 5B)。

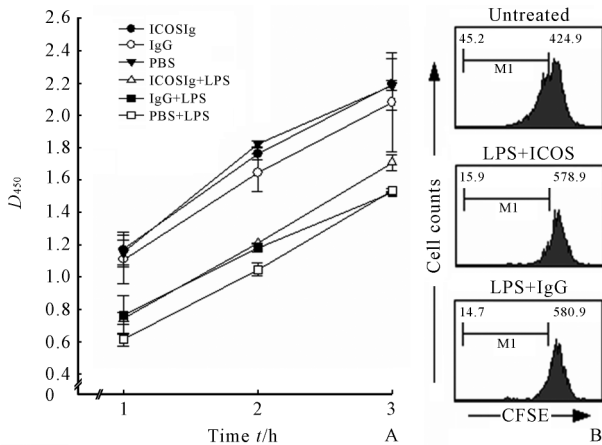


图 5 可溶性 ICOSIg 对 DCs 无促增殖和毒性作用

Fig 5 ICOSIg showed no toxicity on dendritic cells (DCs)

A: DCs were cultured in 96-well flat plate at a final concentration of 1×10^5 /ml in 200 μ l RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum, and 60 μ g/ml of ICOSIg or IgG1 was added in presence or absence of 100 ng/ml LPS. After 36 h of culture, 10 μ l CCK-8 was added, and the absorbance was detected at 450 nm. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. B: The five-day immature DCs were prestained with CFSE before incubating with ICOSIg or IgG in the presence of LPS or left untreated for 24 h, then cells were collected and labeled with anti-CD11c-PE antibody for FCM analysis. CD11c⁺ cells were gated and cell division was analyzed

2.6 ICOSIg 生物学活性检测 我们采用 C57/B6 和 BALB/c 小鼠来源的脾脏单个核细胞,进行混合淋巴细胞反应,检测 ICOSIg 的生物学活性。结果表明,无处理组和 IgG1 蛋白处理组 T 细胞明显增殖且两者无明显差别,而加入 ICOSIg 组 T 细胞增殖受到部分抑制(图 6)。

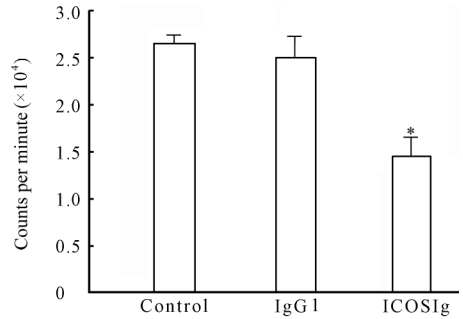


图 6 ICOSIg 部分抑制混合淋巴细胞反应

Fig 6 Mix lymphocyte reaction was partially inhibited in the presence of ICOSIg compared to IgG1

Pretreated mononuclear cells from C57/B6 and BALB/c were cocultured in 96-well U-shaped plate in the presence of 60 μ g/ml ICOSIg or IgG1. Incorporation of 3 H-TdR was used for evaluating the proliferation of T cells. * $P < 0.05$ vs IgG1 group; $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

T 细胞充分活化依赖于来自抗原特异性 T 细胞受体(TCR)与 MHC 分子的相互作用和 T 细胞表面一些共刺激分子的辅助信号。CD28/CTLA-4 - CD80/CD86 是共刺激分子家族成员配受体的典型代表,对其功能的研究最为透彻^[5]。ICOS 与 CD28 同源,属于 CD28 家族成员之一。活化的人 T 细胞中分离的 ICOS 蛋白相对分子质量约 55 000 ~ 60 000,由二硫键连接形成糖基化二聚体^[6]。小鼠的 ICOS 约 47 000 ~ 57 000,也由二硫键连接形成 N 末端糖基化二聚体,与人 ICOS 有 68% 氨基酸同源^[7-8]。ICOSL 属于 B7 家族,表达广泛,人和小鼠的 ICOSL 约有 48% 的氨基酸同源^[9-10]。主要表达在静止的 B 细胞、DCs、单核细胞和内皮细胞上;促炎因子 TNF- α 、IFN- γ 等可诱导非淋巴组织如成纤维细胞、肾小管上皮细胞等表达 ICOSL^[5,11]。

计算机模拟研究发现,人和小鼠体内 ICOS/ICOSL 配受体的结合部位 6 个氨基酸残基完全相同^[2],表明人 ICOS 和小鼠 ICOSL 之间理论上完全可以结合。我们前期已成功构建了人可溶性 ICOSIg 的真核表达系统,并在体外大量表达纯化了具有生物学功能的可溶性蛋白^[1]。为了进一步为人或小鼠来源 ICOS/ICOSL 相互结合界面的相似性提供实验证据支持,深入研究 ICOS/ICOSL 配受体间的相互作用,更透彻地了解共刺激分子之间信号传递的复杂性,我们首先体外验证人源可溶性的 ICOSIg 蛋白能否与体外诱导培养的小鼠 DCs 表面的 ICOSL 发生特异性的相互作用。

我们的研究表明,体外在 GM-CSF 和 IL-4 存在条件下诱导培养的小鼠骨髓来源 DCs 表面存在一定程度的 ICOSL 的表达,且其表达随着 DCs 的成熟而逐渐下调。我们首次发现人 ICOSIg 确实可以和小鼠 DCs 表面 ICOSL 发生特异性结合,且可溶性蛋白 ICOSIg 本身不引起 DCs 的凋亡、没有非特异的毒性作用和促增殖作用,可以用于后续有关 ICOS/ICOSL 通路相关功能的研究。以往研究结果表明,成熟 DCs 在无其他基质细胞存在的条件下作为终末分化细胞不再发生增殖^[4]。研究中我们也发现,LPS 刺激 DCs 成熟后细胞不再增殖,但在体外诱导培养 5 d 的 DCs 仍可发生部分增殖,这表明本实验条件下 5 d 的 DCs 的确仍处于未成熟或半成熟状态,在 LPS 等进一步刺激下可以逐渐分化成熟,从而为后续研究成熟或不成熟 DCs 的不同功能提供了实验数据支持。CD28 分子对于 T 细胞的初始活化尤为重要,而 ICOS 在 T 细胞活化后才表达,因而对于维持 T 细胞的活化状态更重要,阻断 ICOS/ICOSL 通路可影响 T 细胞的活化增殖,抑制效应 T 细胞反应^[5, 12]。本实验中所表达的 ICOSIg 蛋白可以抑制不同基因背景的小鼠脾脏细胞的混合淋巴细胞反应,与以往的研究报道一致^[12],进一步证实了我们构建表达的重组人 ICOSIg 融合蛋白的具有较好的生物活性。

因此,我们在体外真核表达的人 ICOSIg 能够和小鼠来源的 ICOSL 发生特异性结合,具有良好的生物学活性,对体外诱导培养的 DCs 无促增殖和毒性作用,不影响 DCs 的凋亡或坏死;同时本研究部分内容也为进一步证明人鼠 ICOS 的同源性以及人鼠 ICOS/ICOSL 结合界面的相似性提供了更直接的生物学的实验依据,为直接利用小鼠模型进行人源可溶性蛋白 ICOSIg 的生物学功能系列研究提供了实验支持和理论依据。

[参考文献]

[1] 张鹏,秦琴,王振猛,王健,沈茜.人 ICOS-Ig 融合蛋白的真核表达及其生物学活性[J].第二军医大学学报,2009,30:

753-756.
 Zhang P, Qin Q, Wang Z M, Wang J, Shen Q. Eukaryotic expression of human ICOS-Ig fusion protein and analysis of its biological activity[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 753-756.
 [2] Bakkour S, Sha W C. Mapping of the ICOS binding surface of murine B7h using an unbiased, cellular library of B7h mutants created by cyclical packaging rescue[J]. J Immunol Methods, 2008, 332: 151-161.
 [3] Tang G, Qin Q, Zhang P, Wang G, Liu M, Ding Q, et al. Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66: 3067-3080.
 [4] Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells[J]. Nat Immunol, 2004, 5: 1124-1133.
 [5] Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 515-548.
 [6] Beier K C, Hutloff A, Dittrich A M, Heuck C, Rauch A, Büchner K, et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS[J]. Eur J Immunol, 2000, 30: 3707-3717.
 [7] Mages H W, Hutloff A, Heuck C, Büchner K, Himmelbauer H, Oliveri F, et al. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand[J]. Eur J Immunol, 2000, 30: 1040-1047.
 [8] Katsumata Y, Harigai M, Sugiura T, Kawamoto M, Kawaguchi Y, Matsumoto Y, et al. Attenuation of experimental autoimmune myositis by blocking ICOS-ICOS ligand interaction[J]. J Immunol, 2007, 179: 3772-3779.
 [9] Hattori M, Fujiyama A, Taylor T D, Watanabe H, Yada T, Park H S, et al. The DNA sequence of human chromosome 21 [J]. Nature, 2000, 405: 311-319.
 [10] Ishikawa K, Nagase T, Suyama M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro* [J]. DNA Res, 1998, 5: 169-176.
 [11] Beatriz M, Carreno, Mary C. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 29-53.
 [12] Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady W A, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function[J]. J Immunol, 2000, 164: 4689-4696.

[本文编辑] 贾泽军