

论著·临床研究

程序性细胞死亡蛋白 1 配体 2 在激光共聚焦显微内镜诊断
结直肠癌中应用的初步探索

张昕恬, 陈锦南, 王奇雯, 李晓波

上海交通大学医学院附属仁济医院消化病研究所, 上海 200001

[摘要] **目的**·研究程序性细胞死亡蛋白 1 配体 2 (programmed cell death 1 ligand 2, PD-L2) 在结直肠癌组织中的表达情况与患者预后之间的关系, 探究 PD-L2 联合激光共聚焦显微内镜诊断结直肠癌的可行性。**方法**·采用免疫组织化学法检测 100 例结直肠癌患者手术切除标本 PD-L2 表达情况, 分析其表达差异和患者预后之间的关系; 采用免疫组织化学法和 Western blotting 检测 30 例早期结直肠癌和癌旁正常黏膜 PD-L2 表达情况, 分析其表达差异; 采用激光共聚焦显微内镜观察经 PD-L2 荧光抗体孵育后的离体早期结直肠癌和癌旁正常黏膜组织荧光强弱的差异。**结果**·PD-L2 低表达和高表达患者在病灶 T 分期和远处转移方面的差异具有统计学意义, 且 PD-L2 表达水平的高低与 T 分期、远处转移均呈正相关关系 ($r=0.274$, $P=0.009$; $r=0.216$, $P=0.039$); PD-L2 膜表达强弱与病灶 T 分期之间也呈正相关 ($r=0.201$, $P=0.037$)。生存分析表明, PD-L2 高表达患者的存活率显著低于 PD-L2 低表达患者 ($P=0.000$)。PD-L2 在早期结直肠癌中蛋白表达显著高于癌旁正常肠黏膜; 激光共聚焦显微内镜下, 早期结直肠癌的荧光强度高于癌旁正常黏膜。**结论**·结直肠癌中 PD-L2 高表达预示了患者的不良预后, PD-L2 联合激光共聚焦显微内镜可能有助于结直肠癌的诊断。

[关键词] 程序性细胞死亡蛋白 1 配体 2; 激光共聚焦显微内镜; 结直肠癌; 诊断

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.012 **[中图分类号]** R445.9 **[文献标志码]** A

Preliminary study on application of programmed cell death 1 ligand 2 to the diagnosis of colorectal cancer in confocal laser endomicroscopy

ZHANG Xin-tian, CHEN Jin-nan, WANG Qi-wen, LI Xiao-bo

Institute of Digestive Diseases, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200001, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the relationship between expression of programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2) in colorectal cancer and prognosis, and explore the feasibility of application of PD-L2 in confocal laser endomicroscopy in the diagnosis of colorectal cancer. **Methods**·Immunohistochemistry was used to detect the expression of PD-L2 in 100 patients with colorectal cancer. The relationship between the expression levels and the prognosis of patients was analyzed. The expressions of PD-L2 in 30 cases of early colorectal cancer and adjacent normal mucosa were detected by immunohistochemistry and Western blotting. Confocal laser endomicroscopy was used to observe the difference in fluorescence intensity between early colorectal cancer and adjacent normal mucosa after being incubated with PD-L2 fluorescent antibody. **Results**·There were statistically significant differences in T-stage and distant metastasis between the patients with low and high expression of PD-L2, and they were both positively correlated with expression of PD-L2 ($r=0.274$, $P=0.009$; $r=0.216$, $P=0.039$). There was also a positive correlation between PD-L2 membrane expression and T stage ($r=0.201$, $P=0.037$). Survival analysis showed that the survival rate of patients with high PD-L2 expression was significantly lower than that of patients with low PD-L2 expression ($P=0.000$). The protein expression of PD-L2 in early colorectal cancer was significantly higher than that in adjacent normal mucosa. Under confocal laser endomicroscopy, the fluorescence intensity of early colorectal cancer was higher than that of adjacent normal mucosa. **Conclusion**·High expression of PD-L2 in colorectal cancer predicts poor prognosis in patients. Application of PD-L2 in confocal laser endomicroscopy may contribute to the diagnosis of colorectal cancer.

[Key words] programmed cell death 1 ligand 2; confocal laser endomicroscopy; colorectal cancer; diagnosis

全球范围内, 结直肠癌 (colorectal cancer) 是女性第二常见的癌症, 在男性中排名第三^[1]。尽管在结直肠癌治疗方面已经取得了飞速发展, 接受外科手术和各种化学治

疗方案的晚期转移患者的生存率仍很低并且非个体化的治疗也让患者饱受各种不良反应的折磨, 承担着生理和心理上的双重压力^[2]。因此, 寻求结直肠癌的早期诊断及

[基金项目] 上海自然科学基金 (16ZR1420400) (Natural Science Foundation of Shanghai, 16ZR1420400)。

[作者简介] 张昕恬 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: zxtxxsc8@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 李晓波, 电子信箱: lixiaobo@renji.com。

更有效的个体化治疗手段仍是改善患者预后的重中之重。

近年来,为提高结直肠癌诊断的准确性出现了一些特殊的高分辨率内镜技术,包括染色内镜技术、窄带成像技术(narrow band imaging, NBI)等,但是它们最显著的缺点就是缺乏诊断特异性。激光共聚焦显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)技术是一项新兴的诊断技术,可以对胃肠道病灶进行无创、实时、体内观察,放大倍数可达1 000倍^[3],实现对胃肠道黏膜病变细胞水平,甚至是亚细胞水平的观察,达到内镜下组织病理诊断的目的^[4]。

另外,针对程序性细胞死亡蛋白1(programmed death 1, PD-1)途径的新型检查点封锁疗法在多种肿瘤中取得了前所未有的临床效果^[5-6]。T细胞上的PD-1与存在于肿瘤细胞和免疫浸润细胞上的配体PD-L1(PD-1 ligand 1)、PD-L2相互作用可以调节T细胞介导的免疫应答,并可能在人类肿瘤的免疫逃逸中发挥作用^[7]。近期有多项研究^[8-10]结果表明,PD-L1仅在小部分结直肠癌中呈现阳性表达,并且不能作为预测结直肠癌患者预后的独立预测指标。相反,PD-L2阳性肿瘤较阴性肿瘤拥有更多的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs),揭示了PD-L2与肿瘤微环境之间的功能相关性^[11]。此外,结直肠癌PD-L2表达高低与克罗恩样淋巴反应呈负相关,表明PD-L2阳性结直肠癌细胞在结直肠癌抗免疫过程中发挥着一定作用^[12]。现阶段关于PD-L2在结直肠肿瘤中表达情况的研究较少,PD-L2作为结直肠癌的生物学标志物具有良好的研究前景。

本研究着重探讨免疫检查点通路抑制蛋白PD-L2在结直肠癌和结直肠早癌中的表达情况以及激光共聚焦显微内镜联合PD-L2分子标志物在结直肠癌变诊断方面的可行性。

1 材料与方法

1.1 样本收集

收集2013年1月—12月于上海交通大学医学院附属仁济医院东院(简称仁济东院)胃肠外科行结直肠癌切除术的100例患者,这些患者术后病理石蜡标本、病史资料及随访资料齐全。所有病理标本均行免疫组织化学染色(简称免疫组化)。收集同期于仁济东院消化内镜中心行结肠镜检查的正常肠黏膜活检组织标本10例作为阴性对照。

收集2018年9月—12月于仁济东院消化内镜中心行内镜下黏膜剥离术的肠道早癌标本共50例,病灶旁正常肠黏膜组织作为阴性对照;其中30例用于免疫组化和

Western blotting, 20例用于激光共聚焦显微内镜下检测病灶PD-L2荧光强度。

所有入组病例均按照临床诊疗常规进行,患者术前均未接受任何放射或化学治疗。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 将手术切除病灶的石蜡包块以4 μm的厚度连续切片,常规脱蜡处理,5%过氧化氢孵育去除内源性过氧化氢酶,柠檬酸盐微波修复,非免疫羊血清室温封闭后滴加PD-L2抗体(1:100, Abcam),4℃孵育过夜,检测组织中PD-L2的表达含量,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染细胞核,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

病灶免疫组化结果由2位有经验的病理医师独立双盲评判。通过2个参数,即染色强度(0分表示无染色,1分表示弱染色,2分表示中度染色,3分表示强染色)和阳性肿瘤细胞百分比(0分表示无,1分表示1%~29%,2分表示30%~69%,3分表示≥70%)的得分乘积表示每块组织免疫组化的总得分。总得分0分定义为阴性,1~3分定义为弱阳性,4~6分定义为中度阳性,>6分定义为强阳性;PD-L2阴性和弱阳性归为低表达组,中度和强阳性归为高表达组。根据免疫组化结果判断PD-L2是否在细胞膜表达,并根据其在细胞膜上的染色强度分别用强、弱来表示。

1.2.2 Western blotting 蛋白裂解液(碧云天)研磨组织,BCA法(Thermo)测量蛋白浓度,加入上样缓冲液(碧云天)100℃加热8 min制作上样蛋白质。配制10% SDS-PAGE凝胶(碧云天)和电泳液(生工生物),把蛋白样品直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内后进行电泳(60 V,恒压,30 min;120 V,恒压,60 min)。配制转膜液(生工生物),使用甲醇激活后的PVDF膜(BIO-RAD)进行转膜(350 mA,恒流,60 min)。丽春红染色液(碧云天)观察转膜效果。5%脱脂牛奶(生工生物)封闭2 h,PD-L2抗体(1:1 000, Abcam)4℃孵育过夜,次日二抗(1:5 000, 康臣生物)孵育1 h后使用化学发光显色液(Thermo)检测PD-L2蛋白质含量。

1.2.3 激光共聚焦显微内镜 将组织标本放入生理盐水中漂洗去除组织表面附着的黏液,将早癌标本及病灶旁正常组织分别置入含有PD-L2荧光抗体(1:100, Invitrogen)的微量离心管,避光孵育30 min, PBS洗涤后使用激光共聚焦显微内镜(Mauna Kea Technologies, Cellvizio 100S)观察组织荧光强度差异。PBS孵育的病灶旁正常组织作为阴性对照。观察探针使用ColoFlex UHD高清探针,激

光共聚焦显微内镜拥有 240 μm \times 200 μm 的视野和 1 μm 的横向分辨率, 当探针定位在病变上时启动数据记录并在移除探针时终止, 移除探针的时机基于操作者的判断, 其间记录的视频数据都以 MKT 文件格式 (Mauna Kea Technologies Software) 存储于个人计算机。激光共聚焦显微内镜的相关操作由一位经验丰富的内镜医师独立完成, 选图由 2 位内镜医师商讨后决定。

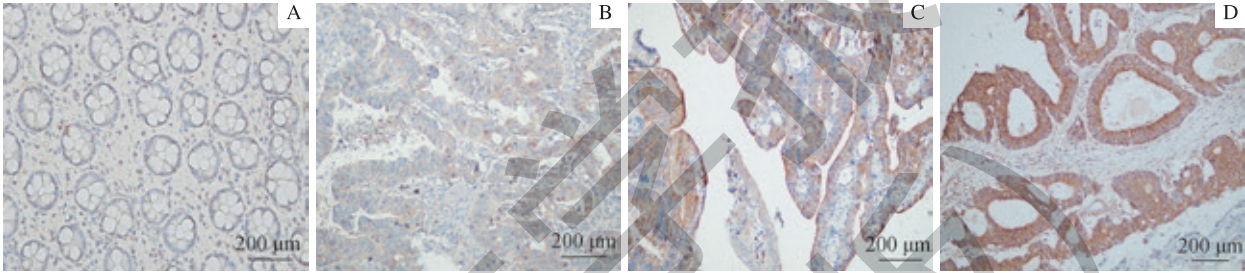
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据分析, 统计方法包括 χ^2 检验、Fisher 精确概率检验、Spearman 相关分析和生存分析。 $P < 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-L2 在结直肠癌组织中的表达与临床病理特征间的关系

结直肠癌 PD-L2 不同染色强度见图 1。根据免疫组化总得分, PD-L2 低表达组有 51 例, 高表达组有 49 例, 2 组患者在性别、年龄、病灶部位、病灶大小、淋巴结转移和分化程度方面差异均无统计学意义; 在病灶 T 分期和远处转移方面, PD-L2 低表达组和高表达组患者的差异具有统计学意义。Spearman 等级相关分析可见, PD-L2 表达量与病灶 T 分期和远处转移之间存在正相关关系 (T 分期 $r = 0.274$, $P = 0.009$; 远处转移 $r = 0.216$, $P = 0.039$) (表 1)。



注: A. 阴性对照; B. 弱阳性; C. 中度阳性; D. 强阳性

图 1 PD-L2 在结直肠组织中的不同染色强度 (免疫组化, $\times 200$)

Fig 1 Different staining intensity of PD-L2 in colorectal tissues (immunohistochemistry, $\times 200$)

表 1 PD-L2 在结直肠癌组织中的表达与临床病理特征间的关系 [n (%)]

Tab 1 Correlation of PD-L2 expression with clinicopathological features in colorectal cancer [n (%)]

指标	总体 (N=100)	低表达组 (N=51)	高表达组 (N=49)	P 值	指标	总体 (N=100)	低表达组 (N=51)	高表达组 (N=49)	P 值
性别				0.543	肿瘤 T 分期				0.009
男	52 (52.0)	25 (49.0)	27 (55.1)		T1	3 (3.0)	3 (5.9)	0 (0)	
女	48 (48.0)	26 (51.0)	22 (44.9)		T2	13 (13.0)	11 (21.6)	2 (4.1)	
年龄				0.697	T3	51 (51.0)	24 (47.1)	27 (55.1)	
< 65 岁	47 (47.0)	23 (45.1)	24 (49.0)		T4	33 (33.0)	13 (25.5)	20 (40.8)	
≥ 65 岁	53 (53.0)	28 (54.9)	25 (51.0)		淋巴结转移				0.571
肿瘤大小				0.410	无	64 (64.0)	34 (66.7)	30 (61.2)	
< 5 cm	45 (45.0)	25 (49.0)	20 (40.8)		有	36 (36.0)	17 (33.3)	19 (38.8)	
≥ 5 cm	55 (55.0)	26 (51.0)	29 (59.2)		远处转移				0.039
肿瘤部位				0.828	无	87 (87.0)	48 (94.1)	39 (79.6)	
左半结肠 ^①	54 (54.0)	27 (52.9)	27 (55.1)		有	13 (13.0)	3 (5.9)	10 (20.4)	
右半结肠	46 (46.0)	24 (47.1)	22 (44.9)		分化程度				0.458
					高 / 中分化	70 (70.0)	34 (66.7)	36 (73.5)	
					低 / 未分化	30 (30.0)	17 (33.3)	13 (26.5)	

注: ^①包括肿瘤位于直肠和乙状结肠的病例

另外免疫组化发现, 结直肠癌组织 PD-L2 主要在细胞膜表达, 且不同 T 分期病灶的 PD-L2 膜表达情况差异有

统计学意义, PD-L2 膜表达强弱与病灶 T 分期之间正相关 ($r = 0.201$, $P = 0.037$) (表 2)。



表 2 结直肠癌组织 PD-L2 膜表达与病灶 T 分期之间的关系 [n (%)]
Tab 2 Correlation of PD-L2 expression on membrane with T stage of lesion in colorectal cancer [n (%)]

肿瘤 T 分期	PD-L2 膜表达		P 值
	强 (N=57)	弱 (N=43)	
T1	1 (1.8)	2 (4.7)	0.037
T2	3 (5.3)	10 (23.3)	
T3	32 (56.1)	19 (44.2)	
T4	21 (36.8)	12 (27.9)	

2.2 PD-L2 在结直肠癌组织中的表达与患者预后的关系

结直肠癌患者术后根据相关临床指南进行规范的治疗和随访。100 例患者中共死亡 22 例，存活时间最短为 2 个月，最长为随访 68 个月时仍存活；PD-L2 高表达组患者的死亡比例显著高于低表达组 ($P=0.012$) (表 3)。生存分析表明，PD-L2 高表达患者的存活率低于 PD-L2 低表达患者，差异有统计学意义 ($P=0.000$) (图 2)。

表 3 结直肠癌 PD-L2 表达量与预后之间的关系 (n)
Tab 3 Correlation of PD-L2 expression with prognosis in colorectal cancer (n)

预后	低表达组	高表达组	P 值
存活	45	33	0.012
死亡	6	16	

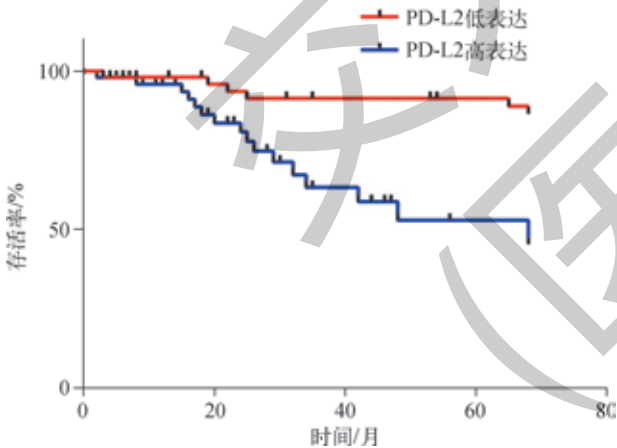
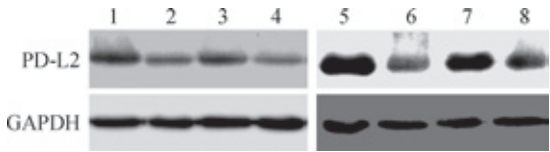


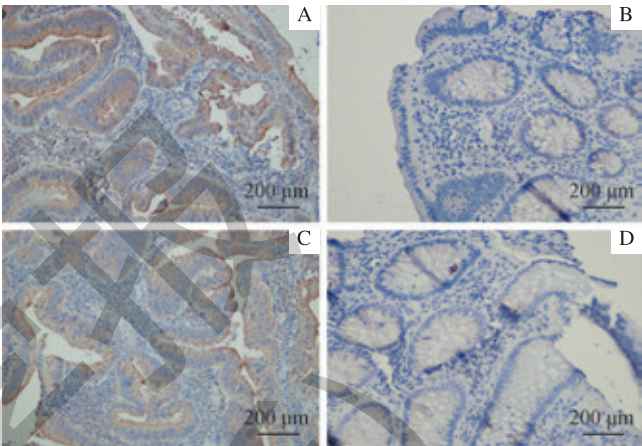
图 2 结直肠癌 PD-L2 表达量和患者预后的生存分析
Fig 2 Survival analysis of PD-L2 expression and prognosis in colorectal cancer

2.3 PD-L2 在早期结直肠癌组织中的表达情况

免疫组化和 Western blotting 的结果均表明 PD-L2 在早期结直肠癌组织中有不同程度的阳性表达，PD-L2 在早期结直肠癌病灶中的表达高于病灶旁正常肠黏膜组织，并且 PD-L2 在早期结直肠癌病灶细胞膜上也有阳性表达，表明 PD-L2 有作为内镜下早期结直肠癌诊断分子标志物的前景 (图 3，图 4)。



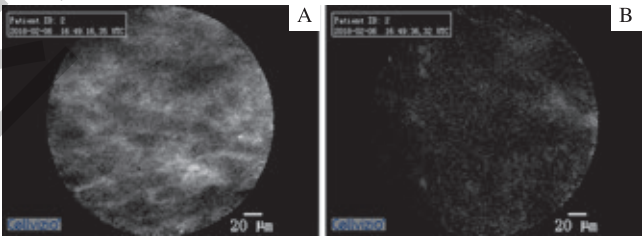
注：1、3、5、7 为早期结直肠癌组织，2、4、6、8 为对应的癌旁正常组织
图 3 Western blotting 检测早期结直肠癌和癌旁正常组织 PD-L2 蛋白水平
Fig 3 Detection of PD-L2 expression in early colorectal cancer and adjacent normal tissue by western blotting



注：A、C 为早期结直肠癌组织，B、D 为对应的癌旁正常组织
图 4 免疫组化检测早期结直肠癌和癌旁正常组织 PD-L2 蛋白表达 (×200)
Fig 4 Detection of PD-L2 expression in early colorectal cancer and adjacent normal tissue by immunohistochemistry (×200)

2.4 激光共聚焦显微内镜检测早期结直肠癌 PD-L2 表达

结果显示，早期结直肠癌 PD-L2 荧光强度明显高于病灶旁正常肠黏膜组织，说明激光共聚焦显微内镜下通过 PD-L2 荧光强度诊断早期结直肠癌是可行的 (图 5)。



注：A. 早期结直肠癌组织 + PD-L2 抗体；B. 癌旁正常组织 + PD-L2 抗体
图 5 激光共聚焦显微内镜下早期结直肠癌和癌旁正常组织
Fig 5 Images of early colorectal cancer and adjacent normal tissue under confocal laser endomicroscopy

3 讨论

PD-1 有 2 个主要的配体，PD-L1 (B7-H1/CD274) 和 PD-L2 (B7-DC) [13]。PD-L1 在 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞及非免疫细胞中表达，而 PD-L2 的表达主要局限于抗原提呈细胞 [14]。肿瘤细胞 PD-L1 的表达与肿瘤组织对抗 PD-1 封锁治疗反应性最为密切 [15]。尽管在

某些肿瘤中已经显示出作为预测性生物学标志物的显著作用,但是某些 PD-L1 阳性患者对抗 PD-1 封锁治疗反应仍不佳,而 PD-L1 阴性患者反而取得了较好的疗效,这表明 PD-1 封锁治疗效果与除 PD-L1 之外的其他 PD-1 配体(如 PD-L2)也有关^[16]。最近一项包含了 454 名结直肠癌患者的研究报道^[10]证实仅有 12% 的结直肠癌患者表达 PD-L1, PD-L1 不能作为结直肠癌患者生存的独立预测因素,并且 PD-L1 阳性仅与通过锯齿状瘤形成途径产生的肿瘤相关联,其余 80% 通过腺瘤-癌途径形成的结直肠癌可能是在没有 PD-L1 表达的情况下生成的。现阶段关于 PD-L2 的研究较少,本研究通过检测结直肠癌标本发现 PD-L2 高表达患者拥有更低的存活率;同样的,我们发现早期结直肠癌组织中 PD-L2 阳性表达高于癌旁正常黏膜组织。这些都表明,PD-L2 是潜在的结直肠癌分子标志物,在预测病灶深度和患者预后方面有重要意义。

内镜检查是结直肠癌诊断的重要手段,但是普通内镜在诊断结直肠癌方面依赖活检做出最后的组织病理学诊断,而该检测结果又往往受到组织包埋、切片、染色等多个人为操作步骤的影响^[17]。同时,对误诊病例进行的多次活检大大增加了患者的经济负担和安全风险,以及临床医师的工作负担,活检后组织纤维化也将增加日后内镜下治疗的难度^[18]。因此,内镜下实时体内组织学诊断将是未来内镜技术发展的方向。

现阶段备受推崇的 NBI 技术只能将早期结直肠癌与进

展期结直肠癌病变区分开来,无法进一步判断进展期结直肠癌的浸润深度;多种 NBI 下分型标准(如 NICE 分型、JNET 分型等)在诊断癌前病变、早癌病变方面的准确性和特异性也欠佳^[19]。一项大型双盲试验^[20]证明激光共聚焦显微内镜的诊断性能优于 NBI 及富士智能分光比色技术(Fuji intelligent chromo endoscopy, FICE)。本研究发现 PD-L2 在结直肠癌组织细胞膜上表达,并且膜表达的强弱与肿瘤 T 分期呈正相关,这为内镜下局部喷洒 PD-L2 荧光抗体并通过激光共聚焦显微内镜检测 PD-L2 荧光强度提供了可行依据;同时,本研究也在离体早期结直肠癌组织中进行了相应的试验,发现激光共聚焦显微内镜下早期结直肠癌组织的荧光强度明显高于癌旁正常黏膜组织。这有利于内镜医师选择最合适的肿瘤或者病变区域进行活组织检查,避免不必要的活检;此外,该结果对判断内镜黏膜下剥离术的切除范围及切除部位基底部是否有肿瘤残余具有指导意义。

随着光学技术的发展,尤其是激光共聚焦显微内镜的出现,胃肠道肿瘤的检测正从纯粹的宏观结构成像逐渐向包括分子成像等新兴的成像技术发展。本研究结果已经证实结直肠癌 PD-L2 表达高低(包括膜表达强弱)与结直肠癌 T 分期及患者的预后相关,但尚未对 PD-L2 在早期结直肠癌中的表达情况进行深入研究。因此 PD-L2 作为激光共聚焦显微内镜潜在的生物学标志物将可能有助于内镜医师做出内镜下实时组织学诊断,提高诊断信心,提高内镜下结直肠癌诊断的准确性和特异性。

参 考 文 献

- [1] O'Keefe SJ. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(12): 691-706.
- [2] Bever KM, Le DT. An expanding role for immunotherapy in colorectal cancer[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(3): 401-410.
- [3] Yarza P, Sproer C, Swiderski J, et al. Sequencing orphan species initiative (SOS): filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all species with validly published names[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2013, 36(1): 69-73.
- [4] Goetz M, Kiesslich R. Advanced imaging of the gastrointestinal tract: research vs. clinical tools[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009, 25(5): 412-21.
- [5] Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(19): 4993-4998.
- [6] Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway[J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(1): 24-33.
- [7] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [8] Song M, Chen D, Lu B, et al. PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65821.
- [9] Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, et al. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(9): 1104-1112.
- [10] Inaguma S, Lasota J, Wang Z, et al. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas[J]. *Mod Pathol*, 2017, 30(2): 278-285.
- [11] Derks S, Nason KS, Liao X, et al. Epithelial PD-L2 expression marks Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(10): 1123-1129.
- [12] Masugi Y, Nishihara R, Hamada T, et al. Tumor PDCD1LG2 (PD-L2) expression and the lymphocytic reaction to colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(11): 1046-1055.
- [13] Tan S, Zhang CW, Gao GF. Seeing is believing: anti-PD-1/PD-L1 monoclonal antibodies in action for checkpoint blockade tumor immunotherapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1: 16029.
- [14] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568-571.
- [15] Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19): 5064-5074.
- [16] Yearley JH, Gibson C, Yu N, et al. PD-L2 expression in human tumors: relevance to anti-PD-1 therapy in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12): 3158-3167.
- [17] Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, et al. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(7): 893-901.
- [18] Li WB, Zuo XL, Li CQ, et al. Diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric superficial cancerous lesions[J]. *Gut*, 2011, 60(3): 299-306.
- [19] Komeda Y, Kashida H, Sakurai T, et al. Magnifying narrow band imaging (NBI) for the diagnosis of localized colorectal lesions using the Japan NBI Expert Team (JNET) Classification[J]. *Oncology*, 2017, 93(Suppl 1): 49-54.
- [20] Buchner AM, Shahid MW, Heckman MG, et al. Comparison of probe-based confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(3): 834-842.

[收稿日期] 2019-01-04

[本文编辑] 瞿麟平

