

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00385

## mPD-1/mPD-L1 体外分子结合模型的建立

覃晓琳<sup>1</sup>, 刘朝奇<sup>1\*</sup>, 杨凡<sup>2</sup>, 郑兰英<sup>3</sup>

1. 三峡大学分子生物学研究所, 宜昌 443002
2. 湖北省宜昌市第二人民医院放化疗科, 宜昌 443002
3. 湖北省长阳土家族自治县人民医院护理部, 长阳 443500

**[摘要]** **目的** 建立小鼠 PD-1/PD-L1(mPD-1/mPD-L1)体外分子结合模型, 为研究 PD-1/PD-L1 生物学活性及建立高通量药物筛选分子模型奠定基础。**方法** 重组质粒在原核细胞表达 mPD-1 和 mPD-L1 蛋白, 利用亲和层析及切胶方法纯化相应蛋白; 应用 ELISA 和 GST Pull-down 方法验证 mPD-1 与其配体 mPD-L1 蛋白的结合活性; 以 Alamar blue 法检测纯化 mPD-1 和 mPD-L1 蛋白混合物对混合淋巴细胞增殖的影响。**结果** SDS-PAGE 和 Western 印迹结果显示原核表达的重组蛋白与预期基本一致, 经过亲和层析和切胶、复性等方式获得了纯化的 mPD-1 和 mPD-L1 蛋白。ELISA 和 GST pull-down 结果表明, mPD-1 和 mPD-L1 蛋白具有体外结合的活性。淋巴细胞增殖试验进一步说明两蛋白的结合可一定程度上降低单独蛋白对淋巴细胞增殖的影响( $P < 0.05$ )。**结论** 利用原核细胞高效表达并纯化的 mPD-1、mPD-L1 蛋白成功建立体外 mPD-1/mPD-L1 分子结合模型, 为高通量药物初筛奠定了基础。

**[关键词]** mPD-1; mPD-L1; 分子模型; 淋巴细胞增殖

**[中图分类号]** R 392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0385-05

### Expression of mouse PD-1/PD-L1 recombinant protein in prokaryotic cells

QIN Xiao-lin<sup>1</sup>, LIU Chao-qi<sup>1\*</sup>, YANG Fan<sup>2</sup>, ZHENG Lan-ying<sup>3</sup>

1. Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China
2. Chemoradiation Department, the Second People's Hospital of Yichang, Yichang 443002, Hubei, China
3. Department of Nursing, the People's Hospital of Changyang Tujia Autonomous County, Changyang 443500, Hubei, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a molecule binding model of mouse PD-1/PD-L1 protein *in vitro*, so as to lay a foundation for studying the biological activities of the recombinant protein and to establish a high throughput drug screening model. **Methods** Prokaryotic expression plasmid pET28 a (+) /mPDL-1 and pGEX-4T-1/mPD-1 were transformed to *E. coli* BL21 (DE3), which was then induced with IPTG. The expression products were purified by fast affinity chromatography with FPLC Protein Purification Instrument or gel separation. ELISA and GST pull-down were used to detect the interaction between mPD-1 and mPD-L1. In addition, Alamar blue was used to test the role of protein mixtures in the mixed lymphocyte proliferation. **Results** SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the recombinant proteins were successfully expressed. Then purified mPD-1 and mPD-L1 protein was obtained by affinity chromatography, Gel separation and refolding, etc. ELISA and GST pull-down showed that mPD-1 and mPD-L1 protein had a specific binding activity *in vitro*. The mPD-1/mPD-L1 protein had a significantly decreased influence on the proliferation of lymphocytes( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Mouse PD-1/PD-L1 recombinant protein model has been successfully established using purified mPD-1 and mPD-L1 protein expressed prokaryotically, which lays a foundation for high-throughput drug screening.

**[Key words]** mPD-1; mPD-L1; molecular models; lymphocyte proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4):385-389]

B7 超家族成员 PD-L1 (ligand of programmed death-1, B7-H1/CD274) 属 I 型跨膜蛋白, 为协同刺激分子, 具有胞外区、跨膜区及胞质区尾部, 胞外区有一个 IgV 和一个 IgC 结构域, 通过疏水性的跨膜

**[收稿日期]** 2009-10-12 **[接受日期]** 2009-12-03

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金(2008CDB118), 三峡大学研究生科研创新基金(2009-36). Supported by Natural Science Foundation of Hubei Province(2008CDB118), and Graduate Research Innovation Foundation of Three Gorges University(2009-36).

**[作者简介]** 覃晓琳, 硕士生. E-mail: qinxiaolin200810@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0717-6397179, E-mail: zqliu@ctgu.edu.cn

域和一个短的、带电荷的胞内区相连<sup>[1]</sup>,是诱导活化T细胞进入凋亡的表面标志,在免疫应答中发挥重要的负性调控作用<sup>[2]</sup>。PD-1 (programmed death-1, CD279)也属于I型跨膜糖蛋白,相对分子质量约55 000,可与PD-L1 IgV样结构域相结合<sup>[3]</sup>,能够降低活化淋巴细胞的免疫功能。

PD-1/PD-L1过度表达与机体多种疾病的发生发展相关。肿瘤细胞中组成型表达的PD-L1可诱导肿瘤特异性细胞毒淋巴细胞(CTL)的凋亡,从而抑制淋巴细胞对肿瘤的免疫应答<sup>[4]</sup>;病毒感染的CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞表面高表达PD-1可引起病毒特异性CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞耗竭和功能损害,增加病毒载量,说明PD-L1/PD-1抑制途径与病毒感染过程中的免疫逃逸有关<sup>[5]</sup>。因此,PD-1/PD-L1成为抗肿瘤、抗病毒及多种疾病治疗的理想靶点<sup>[6-8]</sup>。针对PD-1/PD-L1信号途径的靶向治疗药物筛选模型的建立将大大减少寻找特异性药物所需花费的时间和精力。

本研究采用原核细胞表达并纯化小鼠PD-1胞外区(mPD-1)和小鼠PD-L1胞外区蛋白(mPD-L1),检测mPD-1/mPD-L1结合活性,尝试建立mPD-1/mPD-L1的体外结合分子模型,以利于靶向治疗药物的高通量筛选,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 菌株*E. coli* BL21(DE3)、带6×His标签的重组质粒pET28a(+)/mPD-L1、带谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签的重组质粒pGEX-4T-1/mPD-1由本研究所保存。兔源GST多克隆抗体购自eBioscience公司,鼠源His单克隆抗体、HRP标记的羊抗鼠IgG、HRP标记的羊抗兔IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其他化学试剂由Sigma等公司提供。Glutathione Sepharose 4B、GSTrap FF和蛋白纯化仪ÄKTAprime购自GE Healthcare Bioscience公司;流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司);全波长酶标测定仪(美国Thermo公司);多功能荧光酶标仪(瑞士Tecan公司)。

1.2 mPD-1蛋白的原核表达及纯化 将本实验室保存的重组质粒pGEX-4T-1/mPD-1转化至宿主菌BL21(DE3)中,挑单克隆接种于含氨苄青霉素的LB液体培养液,37℃振荡培养过夜。次日按1:25接种量分别接种于含氨苄青霉素的LB培养液中,37℃振荡培养至 $D_{600}$ 为0.60.8时,加入终浓度为1.0 mmol/L的IPTG诱导表达4 h。离心收集菌体,菌体用PBS洗涤1次,用适量PBS重悬沉淀,超声波

裂解,500×g离心10 min,取少量上清和沉淀进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果提示大部分蛋白存在于上清中,收集上清。选用5 ml柱床体积的GSTrap FF亲和层析柱和ÄKTAprime蛋白纯化仪,先以5 CV(柱体积)的平衡缓冲液(PBS, pH 7.3)过柱,然后将细菌裂解上清液以1 ml/min的速度上样,上样结束继续加入8 CV的平衡缓冲液,随后经5 CV的洗脱缓冲液(含10 mmol/L还原型谷胱甘肽,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)将融合蛋白洗脱下来并收集蛋白。取少量纯化的融合蛋白进行SDS-PAGE和蛋白印迹鉴定。

1.3 mPD-L1蛋白的原核表达及纯化 将pET28a(+)/mPD-L1转化至宿主菌BL21(DE3)中,挑单克隆接种于含卡那霉素的LB培养液,37℃振荡培养过夜。次日按1:25接种量分别接种于含卡那霉素的LB培养液中,37℃振荡培养至 $D_{600}$ 为0.60.8时,加入终浓度为1.0 mmol/L的IPTG诱导表达4 h。离心收集菌体,菌体重悬于Buffer A中(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0),在冰浴中以超声波破碎菌体,离心后分别收集上清液和沉淀,沉淀部分(包含体)用10 ml溶液B(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 2.0 mol/L 尿素)重悬并经超声处理洗涤3次,然后再以不含Triton X-100的同一缓冲液洗涤3次,离心得沉淀部分。分别取适量上清和沉淀,进行SDS-PAGE鉴定,提示目的蛋白主要存在于沉淀中。将得到的沉淀用上样缓冲液重悬,水煮5 min,行SDS-PAGE。SDS-PAGE胶用冰冷的0.25 mol/L KCl染色510 min,切下目的蛋白,碾碎,加等体积的水,4℃放置过夜,低温离心取上清,即得到纯化的目的蛋白。重组蛋白经4℃透析(0.1 mol/L PBS含5%的甘油)36 h,每46 h换液1次进行复性。复性的蛋白分装冻存于-80℃。以SDS-PAGE和蛋白印迹电泳对样品进行分析。

1.4 ELISA法检测mPD-1/mPD-L1的结合活性 用包被液(0.01 mol/L碳酸缓冲液, pH 9.6)稀释原核表达纯化的mPD-1蛋白,以60 ng/孔(100 μl)包被ELISA板,4℃包被过夜;次日用PBS-T(0.5 ml/L Tween 20 PBS)洗涤3次后用10 g/L BSA 37℃封闭1 h;PBS-T洗涤3次后,加入10 g/L BSA稀释原核表达纯化的mPD-L1蛋白,以60 ng/孔(100 μl) 37℃反应1 h;PBS-T洗涤3次,加入抗His单克隆抗体(1:1 000),37℃反应1 h;PBS-T洗涤3次,加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:1 000),37℃反应

1 h; PBS-T 洗涤 4 次, 每孔加入 TMB 100  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min, 加 50  $\mu$ l 终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 终止反应。酶标仪测定光密度值( $D_{450}$ ), 并利用正交试验优化反应条件, 测定蛋白的结合活性。

**1.5 GST pull-down 检测 mPD-1/mPD-L1 的结合活性** 将纯化的 mPD-L1 (0.2 mg/ml) 和 mPD-1 (0.2 mg/ml) 蛋白分别按 1 : 1 的比例各 10  $\mu$ l 于 500  $\mu$ l 微离心管中混匀, 室温缓慢摇动作用 1 h, 将其混合物加入 20  $\mu$ l 的 Glutathione Sepharose 4B, 同时以单独的等量 mPD-L1 蛋白和 mPD-1 蛋白作为对照与 20  $\mu$ l 的 Glutathione Sepharose 4B 混合, 室温缓慢摇动 1 h, 用 PBS 洗涤沉淀 5 次后, 离心弃上清, 加入 1 $\times$ SDS-PAGE 加样缓冲液, 煮沸 5 min, 取上清, 按常规方法进行 12% SDS-PAGE 电泳, 产物电转至 PVDF 膜上, 5 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 His 抗体 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 5 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色。0.2 mol/L NaOH 处理上述 PVDF 膜 30 min, PBS 洗涤, 5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入 1 : 3 000 稀释的 GST-Tag 兔多克隆抗体, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 4 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色反应 3 min, 曝光, 显影。

**1.6 Alamar blue 法检测 mPD-1/mPD-L1 蛋白对混合淋巴细胞增殖的影响** 将 1 只昆明小鼠和 1 只 BALB/c 小鼠分别断髓处死, 无菌取脾, 置 75% 乙醇中浸泡 5 min, 机械分离脾细胞, 用 200 目尼龙滤膜

滤过细胞。经 PBS 洗涤 2 次, 4 $^{\circ}$ C、500 $\times$ g 离心 5 min, 加入 RPMI 1640 培养液将细胞密度调整至 1 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml $\times$ 10<sup>6</sup>/ml, 接种于 96 孔细胞培养板, 100  $\mu$ l/孔, 分成 2 组: 一组中加入纯化的 mPD1 (2  $\mu$ g/孔) 和 mPD-L1 (2  $\mu$ g/孔) 蛋白的混合物, 另一组加入单独纯化的 mPD-L1 蛋白 (2  $\mu$ g/孔), 以未加蛋白的淋巴细胞作为阴性对照, 每个样品孔设置 3 个复孔。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 20 h 后, 向各孔中加入 10  $\mu$ l Alamar blue, 在培养箱中继续培养 24 h, 通过多功能荧光酶标仪在以 530 nm 为激发波长, 以 590 nm 发射波长下测定各孔荧光值, 检测纯化的重组蛋白对混合淋巴细胞增殖的影响。按如下公式计算增殖率: 脾细胞增殖率 (%) = (实验组平均  $D$  值 - 阴性对照组平均  $D$  值) / 阴性对照组平均  $D$  值  $\times$  100%。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行多因素多水平  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 mPD-1 和 mPD-L1 蛋白的原核表达、鉴定、纯化** SDS-PAGE 鉴定结果 (图 1A、1B): pET28a (+)/mPD-L1 重组质粒表达的蛋白相对分子质量约 30 000, pGEX-4T-1/mPD-1 重组质粒表达的蛋白相对分子质量约 42 000, 表达的蛋白相对分子质量与预期相对分子质量大小基本类似, 而阴性对照 (诱导前的菌液) 未见明显条带。结果表明重组质粒能正确表达相应的蛋白。蛋白印迹结果 (图 1C、1D) 表明 2 种蛋白能特异性与相应抗体结合。

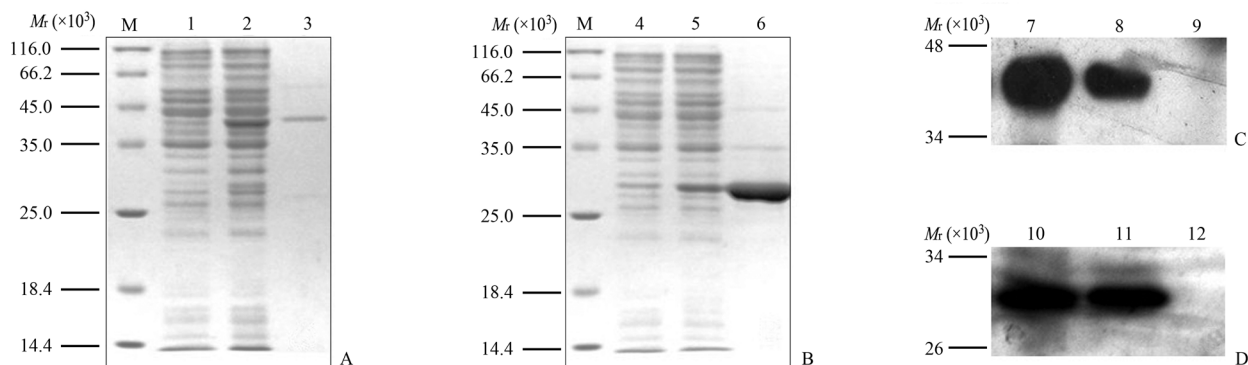


图 1 SDS-PAGE(A,B)和蛋白印迹(C,D)分析重组蛋白的原核表达及纯化

Fig 1 Analysis of expression and purification of recombinant protein by SDS-PAGE(A,B) and Western blotting analysis(C,D)

M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/mPD-1, before IPTG induction; 2: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/mPD-1 induced by IPTG after 4 h; 3: Purified mPD-1 protein; 4: *E. coli* BL21/pET28a(+)/mPD-L1, before IPTG induction; 5: *E. coli* BL21/pET28a(+)/mPD-L1, induced by IPTG after 4 h; 6: Purified mPD-L1 protein; 7: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/mPD-1, induced by IPTG after 4 h; 8: Purified mPD-1 protein; 9: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/mPD-1, before IPTG induction; 10: *E. coli* BL21/pET28a(+)/mPD-L1, induced by IPTG after 4 h; 11: Purified mPD-L1 protein; 12: *E. coli* BL21/pET28a(+)/mPD-L1, before IPTG induction

2.2 ELISA 法检测 mPD-1/mPD-L1 结合活性 通过正交试验获得的优化条件是: 包被的 mPD-1 浓度为 1 μg/孔, mPD-L1 蛋白为 500 ng/孔, His 抗体 200 ng/孔, HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体浓度为 10 ng/孔。按照以上的浓度, 用纯化的 mPD-1 蛋白包被 ELISA 板, 依次与 mPD-L1 蛋白、抗 His 单克隆抗体、HRP 标记的抗鼠 IgG 作用, 测定光密度值 ( $D_{450}$ ), 分别以未加 mPD-1 蛋白、mPD-L1 蛋白、抗 His 单克隆抗体作为 3 个阴性对照(图 2), 结果显示, 纯化的 mPD-1 蛋白与 mPD-L1 蛋白在体外具有良好的结合活性。

2.3 GST pull-down 法检测 mPD-1/mPD-L1 的结合活性 mPD-L1 与 mPD-1 蛋白混合后, 加入 Glutathione Sepharose 4B, 因为含 GST 标签的 mPD-1 能与 Glutathione Sepharose 4B 特异性结合, 因此通过离心的方式使 mPD-L1/mPD-1 存在于沉淀中, 以 His 单抗为一抗经蛋白印迹可检测到一条相对分子质量约 30 000 的 mPD-L1 蛋白阳性条带, 而其他孔均为阴性。由于 Glutathione Sepharose 4B 可以

与 mPD-1 结合, 因此上述 PVDF 膜经 0.2 mol/L NaOH 处理后, 再以 GST 抗体为一抗可以测定到 2 条 mPD-1(相对分子质量约 42 000)条带, 其他均显示阴性(图 3)。结果进一步证实原核表达并纯化的 mPD-1 能与配体 mPD-L1 结合。

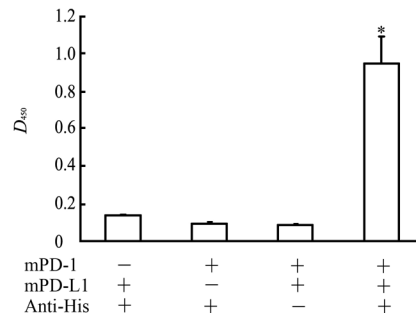


图 2 mPD-1 胞外区与 mPD-L1 胞外区蛋白结合的 ELISA 检测结果

Fig 2 Detection of interaction between extracellular domains of mPD-1 and mPD-L1 by ELISA

\*  $P < 0.05$  vs negative control.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

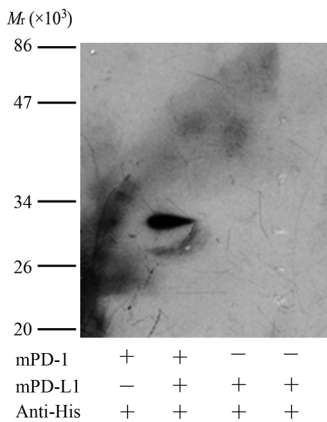
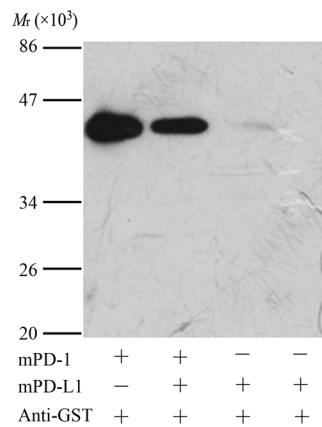


图 3 mPD-1/mPD-L1 体外结合的 GST pull-down 法检测结果

Fig 3 Detection of binding between mPD-1 and mPD-L1 by pull-down assay



2.4 Alamar blue 法检测 mPD-1、mPD-L1 蛋白对混合淋巴细胞增殖的影响 单独 mPD-L1 蛋白及 mPD1 和 mPD-L1 蛋白混合物分别作用于混合淋巴细胞, 以未加任何蛋白的淋巴细胞作为阴性对照, 培养 48 h 后应用多功能荧光酶标仪检测各孔荧光值, 反映淋巴细胞增殖活性。结果显示混合淋巴细胞加入重组蛋白 mPD-L1 后, 其增殖率明显增高, 并与细胞密度相关; 当 2 个重组蛋白混合后作用于混合淋巴细胞, 结果显示增殖率低于单独重组蛋白 mPD-L1 ( $P < 0.05$ , 图 4), 说明 mPD-1 与 mPD-L1 相互作用能拮抗单独蛋白对混合淋巴细胞增殖的影响。

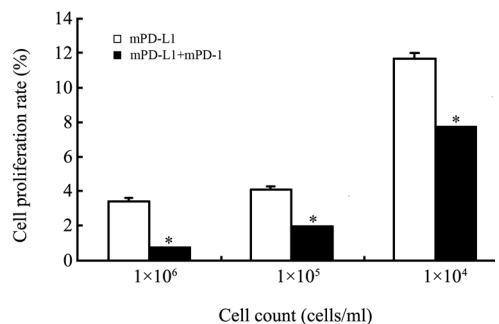


图 4 重组蛋白对混合淋巴细胞增殖的影响

Fig 4 Effect of recombinant protein on mixed lymphocyte proliferation

\*  $P < 0.05$  vs mPD-L1 group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

PD-1、PD-L1 蛋白的结构研究发现,PD-L1 分子与受体 PD-1 主要是通过其胞外区 IgV 结构域相互作用,对机体免疫系统进行负向调节。正常情况下,这种负向调节参与诱导和维持外周组织的免疫耐受,导致外周自身反应性 T 细胞的凋亡,对防止组织的炎性过度反应以及自身免疫性疾病的发生具有积极作用<sup>[9]</sup>。研究发现 PD-L1 的免疫耐受与肿瘤细胞逃避免疫监视以及病毒的慢性感染及其他多种疾病密切相关<sup>[2-5]</sup>。干扰 PD-1/PD-L1 信号途径已成为目前治疗肿瘤、自身免疫性疾病以及感染免疫耐受等疾病的新方法<sup>[9-11]</sup>。体外分子结合模型的建立将为筛选针对 PD-1/PD-L1 信号通路的药物提供帮助。

本研究通过原核细胞表达获得了 mPD-1、mPD-L1 胞外区蛋白,通过 SDS-PAGE 检测发现,表达的 GST-mPD-1 融合蛋白主要存在于上清中,所以选择用 GSTrap FF 亲和层析柱对蛋白进行纯化。而 His-mPD-L1 蛋白主要以包涵体的形式存在,故选用切胶回收的方式对蛋白进行纯化,并通过含 5% 甘油的 PBS 进行透析复性。经 SDS-PAGE 和蛋白印迹检测显示,表达的蛋白质相对分子质量与预期基本一致。

进一步采用 ELISA 结合试验和 GST pull-down 方法检测 His-mPD-L1 与受体 GST-mPD-1 在体外的结合活性,结果发现两者能够特异性结合,具有良好的结合活性。将纯化的 mPD-L1 蛋白与 mPD-1 蛋白混合,作用于混合淋巴细胞,发现两蛋白混合后对淋巴细胞的增殖活性影响明显低于 mPD-L1 蛋白单独作用活性,说明 mPD-L1 和 mPD-1 蛋白的结合,拮抗了 mPD-L1 的活性。同时也提示原核表达的 mPD-L1 蛋白能够与真核细胞表面相应的受体结合,发挥生物学活性。

综上所述,采用原核细胞表达并纯化的 mPD-L1、mPD-1 蛋白具有良好的结合活性及生物学活性,成功建立的 mPD-1/mPD-L1 体外结合分子模型有利于进一步的高通量药物初筛选,为后续研究奠

定了基础。

### [参考文献]

- [1] Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. *Nat Med*, 1999, 5: 1365-1369.
- [2] Plege A, Borns K, Baars W, Schwinzer R. Suppression of human T-cell activation and expansion of regulatory T cells by pig cells overexpressing PD-ligands[J]. *Transplantation*, 2009, 87: 975-982.
- [3] Wang S, Bajorath J, Flies D B, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction[J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 1083-1091.
- [4] Gao Q, Wang X Y, Qiu S J, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 971-979.
- [5] Keir M E, Francisco L M, Sharpe A H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 309-314.
- [6] Parekh V V, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, et al. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182: 2816-2826.
- [7] Lee J, Zhuang Y, Wei X, Shang F, Wang J, Zhang Y, et al. Contributions of PD-1/PD-L1 pathway to interactions of myeloid DCs with T cells in atherosclerosis[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2009, 46: 169-176.
- [8] 王春燕,张连生,田发青,黄睿. PD-L1 阻断对慢性髓系白血病源性树突状细胞的功能影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16: 1146-1149.
- [9] Reynoso E D, Elpek K G, Francisco L, Bronson R, Bellemare-Pelletier A, Sharpe A H, et al. Intestinal tolerance is converted to autoimmune enteritis upon PD-1 ligand blockade[J]. *J Immunol*, 2009, 182: 2102-2112.
- [10] Nikolova M, Lelievre J D, Carriere M, Bensussan A, Lévy Y. Regulatory T cells differentially modulate the maturation and apoptosis of human CD8<sup>+</sup> T-cell subsets[J]. *Blood*, 2009, 113: 4556-4565.
- [11] 贺宇飞,张桂梅,王小红,张慧,袁野,李东,等. PD-1 胞外段 cDNA 在真核细胞的表达与其功能鉴定[J]. *生物工程学报*, 2004, 20: 699-703.

[本文编辑] 贾泽军