

# 鸡 *PD-1* 胞外区基因的克隆表达及其 蛋白生物学活性鉴定

李博文<sup>1,2</sup>, 孙国鹏<sup>1</sup>, 王爱国<sup>1,2</sup>, 岳 锋<sup>1</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>, 朱艳平<sup>1</sup>,  
银 梅<sup>2</sup>, 杨 媛<sup>1,2</sup>, 郭东光<sup>1</sup>, 王选年<sup>1,2\*</sup>

(1. 新乡学院 生命科学与技术系/生物技术研究中心, 河南 新乡 453003; 2. 河南科技学院 动物科学学院,  
河南 新乡 453003)

**摘要:** 为研究鸡程序性细胞死亡因子 1(PD-1)胞外区的生物学活性,根据 GenBank 中的鸡 *PD-1* 基因序列,经生物信息学比对分析,设计鸡 *PD-1* 胞外区特异性克隆引物,扩增目的基因,连接原核表达载体 pET-28a(+),构建重组表达载体 pET-28a-PD-1,转化至 Rosetta(DE3)大肠杆菌,并对 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间进行优化,对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,应用流式细胞术对所获得重组蛋白的生物学活性进行鉴定。结果显示,成功克隆了鸡 *PD-1* 胞外区基因;SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果表明,37 ℃、0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 时,PD-1 胞外区融合蛋白表达量最高,以包涵体形式存在;流式细胞术分析结果表明,PD-1 胞外区重组蛋白具有一定的生物学活性。

**关键词:** 鸡; 程序性细胞死亡因子 1; 胞外区; 克隆; 原核表达; 生物学活性

**中图分类号:** S855.3    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0112-05

## Cloning, Prokaryotic Expression and Biologic Activity Identification of Chicken *PD-1* Extracellular Region Gene

LI Bo-wen<sup>1,2</sup>, SUN Guo-peng<sup>1</sup>, WANG Ai-guo<sup>1,2</sup>, YUE Feng<sup>1</sup>, ZHANG Yan-fang<sup>1</sup>,  
ZHU Yan-ping<sup>1</sup>, YIN Mei<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>1,2</sup>, GUO Dong-guang<sup>1</sup>, WANG Xuan-nian<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Life Sciences and Technology/Biotechnology Research Center, Xinxiang University,  
Xinxiang 453003, China; 2. College of Animal Sciences, Henan Institute of Science and Technology,  
Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** In order to study the biological activity of chicken PD-1 extracellular region, the extracellular region primers were designed and the chicken *PD-1* extracellular region gene was cloned according to *PD-1* gene in GenBank by bioinformatics comparison. The purified fragment was ligated into pET-28a vector, ligated DNA was transformed in the *E. coli* strain Rosetta(DE3) after identification by sequencing. The identification of expression product by SDS-PAGE, western blot and flow cytometry after optimizing the various expression conditions such as concentration of IPTG and its action time and temperature. The result showed that the chicken *PD-1* extracellular region gene was successfully cloned. PD-1 presented as a form of inclusion bodies and its expression was highest when it was induced by addition of IPTG to a final concentration of 0.1 mmol/L for 4 h at 37 ℃. Meanwhile the result of flow cytometry showed that the recombinant protein of PD-1 extracellular region retained some biologic activity.

**Key words:** chicken; PD-1; extracellular region; clone; prokaryotic expression; biological activity

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272539)

作者简介: 李博文(1986-), 男, 河南灵宝人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物病理学与免疫学。

E-mail: libowen5943@163.com

\* 通讯作者: 王选年(1969-), 男, 河南灵宝人, 教授, 博士, 主要从事动物病理学与免疫学研究。E-mail: wangxuannian@163.com

程序性细胞死亡因子 1(programmed cell death 1, PD-1)最早在 T 细胞杂交瘤细胞凋亡调节研究中发现,是免疫球蛋白超家族成员之一。其单体型为 I 型跨膜类蛋白,由胞外区、跨膜区、胞内区构成。当 T 细胞受到一些激活因素刺激后,PD-1 能够被诱导表达在 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞,自然杀伤性 T 细胞, B 细胞,单核细胞及树突状细胞等表面<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>表明,PD-1 是 T 细胞表面的一种抑制受体,通过其胞外部分与相应配体(PD-L1/PD-L2)结合传导抑制信号,参与调节 T 细胞的抑制信号,对 T 细胞的激活、耐受和免疫介导的组织损伤起到平衡性的调节作用。由于 PD-1 及其配体(特别是 PD-L1)能够在中枢免疫和外周免疫反应中传递免疫耐受和免疫抑制信号,控制着细胞因子和抗体的产生、细胞毒性 T 细胞(CTL)的增殖活化及对自身抗原的耐受<sup>[5]</sup>,阻断 PD-1 : PD-L1 结合可以使免疫抑制时 T 细胞功能障碍或衰竭的 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能恢复<sup>[6-7]</sup>。因此,PD-1 及其配体近年来在慢性持续性病毒感染<sup>[8-11]</sup>、免疫耐受性疾病<sup>[12]</sup>、肿瘤<sup>[13-14]</sup>等免疫抑制性疾病研究中成为关注的热点,研究者以期寻求能够阻断或逆转免疫抑制的方法。

大量研究<sup>[15-19]</sup>表明,人类某些免疫抑制和持续性感染疾病会激活机体内 PD-1 与其配体介导的免疫抑制信号的传导,抑制抗原特异性 T 细胞和 B 细胞的功能,对 T 细胞的增殖、细胞因子的分泌及杀伤能力都有抑制作用,阻断该通路后可恢复 T 细胞的大部分功能。而在家禽的免疫抑制和持续性感染疾病如鸡传染性贫血病毒(CIAV)、马立克病病毒(MDV)、传染性法氏囊病病毒(IBDV)、网状内皮增生症病毒(REV)、禽白血病毒(ALV)等方面,相关研究报道较少。为此,本研究拟通过原核表达,以期获得具有良好生物活性和免疫原性的鸡 T 细胞表面抑制受体 PD-1 胞外区重组蛋白,为进一步研究 PD-1 的生物学功能、制备其胞外区单克隆抗体、探究阻断 PD-1 : PD-L1 通路及进一步恢复鸡免疫抑制性疾病诱导 T 细胞免疫抑制反应奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及酶 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、Rosetta(DE3)工程菌、pET-28a(+)表达载体由河南科技学院病毒研究所提供;RNase Inhibitor, M-MLV, dNTPs, pMD18-T simple vector systems, T4 DNA 连接酶,核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I, *rTaq*

DNA 聚合酶, DNA Marker DL2000 及 DL15000 均为 TaKaRa 公司产品。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖凝胶电泳 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒为 TIANGEN 公司产品; TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品; ProteinPure-Ni-NTA Resin 为北京全式金公司产品; HRP 标记的羊抗鼠二抗、AEC 显色试剂盒为北京中杉金桥生物公司产品; 卡那霉素、DAB、EB、脱脂奶粉、甘氨酸为北京鼎国生物技术有限公司产品; 酵母提取物、胰蛋白胨、过硫酸铵、IPTG 为北京鼎国生物技术有限公司产品; 琼脂糖、N,N-甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、TEMED、考马斯亮蓝 R-250、SDS、2-巯基乙醇、EDTA、透析袋、溴酚蓝、DTT、PVDF 膜购自北京鼎国生物技术有限公司; FBS 购自浙江天杭生物科技有限公司; 无水乙醇、甲醇、乙酸、NaCl、NaOH 等均为国产分析纯。

2 $\times$ SDS 凝胶上样 Buffer(10 mL): 2.0 mL 0.5 mol/L Tris-HCl(pH 值 6.8)、2.0 mL 20% SDS( $w/v$ )、1.0 mL  $\beta$ -巯基乙醇、0.5 mL 0.1% 溴酚蓝、2.0 mL 甘油、2.5 mL 双蒸水混匀, 4 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2 方法

1.2.1 鸡 PD-1 胞外区引物的设计及合成 根据 GenBank 中鸡 PD-1 预测序列(GenBank: XM\_422723.3)设计引物扩增鸡 PD-1 胞外区序列, 扩增产物长度为 468 bp, 上、下游引物分别引入限制性内切酶酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其引物序列为: F: 5'-GGAATTCATGCACCAGGTGACCCT-3' (*EcoR* I); R: 5'-CCGCTCGAGAGTGTAGCAAAGAG-3' (*Xho* I)。

1.2.2 鸡 T 细胞总 RNA 的提取 鸡翅下静脉采血, 按照人淋巴细胞分离液说明书提取淋巴细胞, 然后按照 TRIzol LS Reagent 说明书提取总 RNA。

1.2.3 cDNA 合成 采用 20  $\mu$ L 体系, 在 PCR 反应管中分别加入 10  $\mu$ L RNA、1  $\mu$ L 随机引物、1  $\mu$ L dNTP, 65 $^{\circ}$ C 热吸附 10 min, 立即放在冰上, 加入 0.5  $\mu$ L M-MLV、0.5  $\mu$ L RNase Inhibitor、7  $\mu$ L 5 $\times$  First Strand Buffer, 混匀。反应程序: 25 $^{\circ}$ C 5 min、42 $^{\circ}$ C 60 min、70 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.4 鸡 PD-1 胞外区基因的扩增与纯化 以 cDNA 为模板, 利用设计的引物扩增目的片段, PCR 反应体系: dNTP(2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, Ex *Taq* Buffer 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, Ex *Taq* 酶 0.2  $\mu$ L, cDNA 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.8  $\mu$ L, 混匀。PCR 反应条

件:95℃预变性 5 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min 后 4℃ 保存。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用琼脂糖凝胶电泳 DNA 回收试剂盒回收目的片段并再次进行电泳检测。

#### 1.2.5 PD-1 胞外区原核表达载体的构建及鉴定

将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转化至 DH5 $\alpha$ ,经鉴定正确的克隆命名为 pMD18-T-PD-1。*EcoR* I、*Xho* I 双酶切 pMD18-T-PD-1 质粒,回收目的片段,于 16℃ 水浴中过夜连接至表达载体 pET-28a(+),命名为 pET-28a-PD-1,其连接体系为: T4 Ligation Buffer 1.0  $\mu$ L、T4 DNA 连接酶 1.0  $\mu$ L、pET-28a(+)酶切回收产物 2.0  $\mu$ L、PD-1 基因胞外区片段酶切回收产物 6.0  $\mu$ L,总体积 10.0  $\mu$ L。将上述连接产物转化至 DH5 $\alpha$  后进行菌液 PCR 鉴定。其检测方法同 1.2.4。从阳性鉴定结果的菌液中提取重组质粒,进行双酶切鉴定,其鉴定体系为:10 $\times$  H Buffer 2.0  $\mu$ L、*EcoR* I 1.0  $\mu$ L、*Xho* I 1.0  $\mu$ L、pET-28a-PD-1 5.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 11.0  $\mu$ L,总体积 20.0  $\mu$ L。混匀于 37℃ 水浴中酶切 2 h。酶切结束后进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.2.6 重组表达质粒 pET-28a-PD-1 的诱导表达及可溶性分析

分别将载体 pET-28a(+)质粒及阳性重组表达质粒 pET-28a-PD-1 转化至 Rosetta (DE3),分别挑取单菌落于 37℃ 过夜培养作为一级种子液。将上述种子液按 1:100 的比例接种于新鲜的含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中,37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时,再加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,37℃ 100 r/min 诱导表达 4 h,取 1.5 mL 菌液,12 000 r/min 离心,收集菌体沉淀,加入 200  $\mu$ L PBS 重悬,超声波破碎后,12 000 r/min 离心 1 min,保留上清。沉淀再次用 200  $\mu$ L PBS 重悬,分别向上清和沉淀中加入 2 $\times$  SDS 凝胶上样 Buffer,混匀后于沸水中煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

对 IPTG 浓度进行优化,选择 IPTG 浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L,于 37℃ 诱导 4 h,超声波破碎后,SDS-PAGE 检测最佳诱导 IPTG 浓度。在确定的最佳诱导浓度下,分别于 37℃、30℃、25℃ 诱导 3 h、4 h、5 h,超声波破碎样品后,SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达形式。

#### 1.2.7 Western blot 分析

表达的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,切下需要转膜部分,使用半干转膜仪在 25 V 的电压条件下转膜 45 min。结束后

取出 PVDF 膜,TBST 洗膜 3 次,用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜;再用 TBST 洗膜 3 次,按 1:5 000 比例加入 His 标签单抗于室温反应 2 h;TBST 洗膜 3 次,按 1:5 000 的比例加入 HRP 羊抗鼠二抗于室温反应 1 h;TBST 洗膜 3 次,AEC 显色试剂盒显色,ddH<sub>2</sub>O 冲洗终止显色后观察。

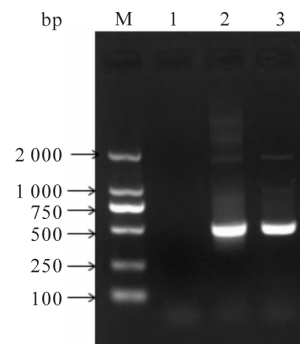
#### 1.2.8 PD-1 胞外区重组蛋白的生物学活性鉴定

以鸡 PD-1 胞外区重组蛋白为免疫原制备兔高免血清,应用流式细胞术检测 PD-1 胞外区兔多抗血清与外周血单个核细胞(PBMC)表面天然 PD-1 分子的识别和结合情况,同时以不加多抗血清为空白对照。具体方法如下:在无菌条件下分离鸡 PBMC,取 10<sup>6</sup> 个 PBMC,4℃ 1 000 r/min,离心 5 min,弃去上清;加 100  $\mu$ L PBS 悬浮,分别加入 PD-1 兔多抗血清,血清最终稀释度为 1:1 000,同时设空白对照(正常兔血清)。4℃ 结合 30 min,加入 1 mL 洗液(含 2% FBS 的 PBS),4℃、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次;加入按 1:50 倍稀释的 IgG-FITC,4℃ 结合 30 min,加入 1 mL 洗液(含 2% FBS 的 PBS),4℃、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次;加入 1 mL PBS 悬液,0.074 mm 滤网过滤,流式细胞术检测荧光信号强度,分析 PD-1 胞外区兔多抗血清与 PBMC 表面 PD-1 结合情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 PD-1 胞外区基因的 RT-PCR 扩增结果

由图 1 可见,鸡 PD-1 胞外区基因的 RT-PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,得到 1 条约为 468 bp 大小的条带,与预期目的片段大小一致。



M:DL2000 Marker; 1:阴性对照; 2-3:PD-1 胞外区的 PCR 扩增产物

图 1 PD-1 胞外区基因的 PCR 扩增结果

### 2.2 重组表达载体 pET-28a-PD-1 的双酶切鉴定

重组表达载体 pET-28a-PD-1 经双酶切鉴定,在预期位置 468 bp 处出现了目的条带。测序结果

进一步表明,目的片段正确插入到表达载体中。表明成功构建了鸡 PD-1 胞外区的重组表达载体。

### 2.3 重组表达质粒 pET-28a-PD-1 的诱导表达

分别取重组表达质粒 pET-28a-PD-1 和 pET-28a(+)空载体经 IPTG 诱导表达处理的样品以及经超声裂解处理的样品上清和沉淀同时进行 SDS-PAGE 检测,结果显示,PD-1 胞外区重组蛋白成功表达,分子量约为 20 ku(图 2)。

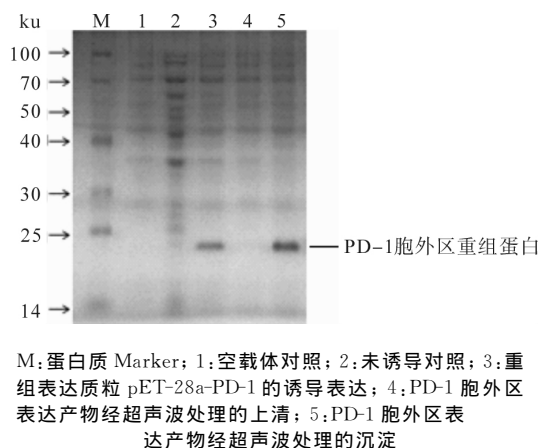


图 2 PD-1 胞外区重组蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析

### 2.4 PD-1 胞外区重组蛋白诱导条件优化及可溶性分析

将 37 °C 条件下用不同浓度 IPTG 诱导 4 h 的样品超声波处理后,经 SDS-PAGE 检测发现,IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时,pET-28a-PD-1 的表达量最高(图 3)。分别在 37 °C、30 °C、25 °C 条件下用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h、4 h、5 h,将样品超声波处理后,经 SDS-PAGE 检测发现,在 37 °C 条件下 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h,重组蛋白的表达量最高,并且以包涵体的形式表达(图 4)。

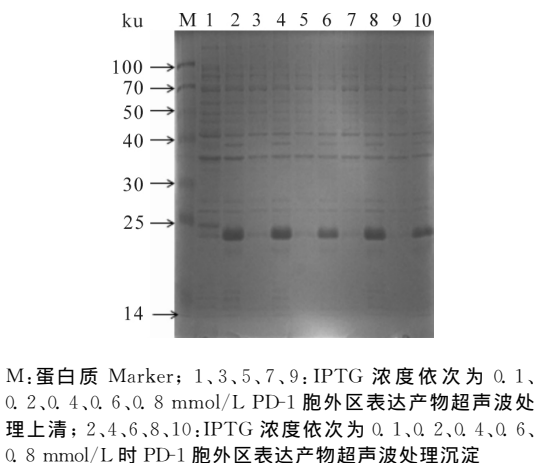


图 3 不同浓度 IPTG 对重组表达质粒 pET-28a-PD-1 的诱导结果

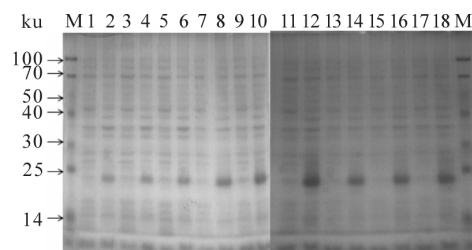


图 4 不同诱导温度和时间对重组表达质粒 pET-28a-PD-1 的诱导结果

### 2.5 PD-1 胞外区重组蛋白的 Western blot 分析

Western blot 结果显示,重组蛋白与 His 标签单抗(图 5)在 20 ku 左右出现了特异性目的条带。表明所表达的融合蛋白具有良好的反应原性。

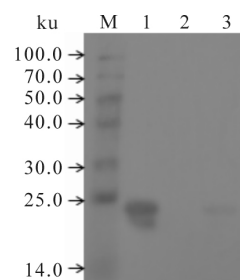


图 5 PD-1 胞外区重组蛋白和 His 标签单抗反应

### 2.6 PD-1 胞外区蛋白生物学活性鉴定结果

流式细胞术分析显示,与对照组相比,以鸡 PD-1 胞外区兔多抗血清为一抗的试验组荧光信号明显增强(阳性细胞比例为 54.4%),说明本研究制备的鸡 PD-1 胞外区重组蛋白兔多抗血清能够与 PBMC 表面具有天然构象的 PD-1 分子结合。进一步表明本研究获得的鸡 PD-1 胞外区重组蛋白具有一定的生物学活性。

## 3 结论与讨论

PD-1 是 T 细胞表面表达的一种辅助受体,这种辅助受体在一些病毒持续性感、免疫抑制疾病和肿瘤疾病时上调表达,导致 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞功能障碍或功能耗竭,从而造成免疫抑制。阻断免疫抑制受体与其配体的结合可使功能耗竭的 T 细胞功能恢复<sup>[6]</sup>。PD-1 与其配体结合后,促使 PD-1 胞内区部位募集蛋白质酪氨酸磷酸酶 SHP-2,激活胞内区酪氨酸免疫抑制基序(ITSM),引起淋巴细

胞活化通路如 BCR 和 TCR 下游效应分子的去磷酸化,导致免疫抑制,因此 PD-1 及其配体在机体的免疫调节中起着重要的负调节作用<sup>[20]</sup>。但是目前尚未见有关鸡 PD-1 胞外区基因克隆与表达的相关研究报道,也无其商业化的特异性单克隆抗体,这在一定程度上阻碍了鸡免疫抑制通路的研究。

本研究通过生物信息学比对分析,确定鸡 PD-1 的胞外区基因片段为 468 bp,利用 RT-PCR 技术成功克隆出鸡 PD-1 胞外区基因,成功构建了鸡 PD-1 胞外区原核表达载体 pET-28a-PD-1。通过优化表达条件和可溶性分析,重组蛋白在 37 °C 条件下,经 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 表达量最高,获得 20 ku 的目的蛋白,以包涵体的形式存在。以鸡 PD-1 胞外区重组蛋白兔高免血清为一抗的流式细胞术分析结果显示,本研究制备的鸡 PD-1 胞外区重组蛋白兔高免血清能够与 PBMC 表面具有天然构象的 PD-1 分子结合。进一步表明本研究获得的鸡 PD-1 胞外区重组蛋白具有一定的生物学活性。

本研究在国内首次克隆出鸡 PD-1 胞外区基因,并通过表达条件的优化成功获得具有一定生物学活性的鸡 PD-1 胞外区重组蛋白纯化产物,这为制备其特异性的单克隆抗体,阻断鸡 PD-1 : PD-L1 信号通路,进一步探索 PD-1 在禽类相关免疫抑制性疾病过程中发挥的生物学功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Keir M E, Butte M J, Freeman G J, *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
- [2] Francisco L M, Sage P T, Sharpe A H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. *Immunol Rev*, 2010, 236: 219-242.
- [3] Egen J G, Kuhns M S, Allison J P. CTLA-4: New insights into its biological function and use in tumor immunotherapy[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(7): 611-618.
- [4] Greenwald R J, Latchman Y E, Sharpe A H. Negative co-receptors on lymphocytes[J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(3): 391-396.
- [5] Jacobs J F, Idema A J, Bol K F, *et al.* Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors[J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(4): 394-402.
- [6] Barber D L, Wherry E J, Masopust D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439: 682-687.
- [7] Velu V, Titanji K, Zhu B, *et al.* Enhancing SIV-specific immunity *in vivo* by PD-1 blockade[J]. *Nature*, 2009, 458: 206-210.
- [8] Porichis F, Kwon D S, Zupkosky J, *et al.* Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade[J]. *Blood*, 2011, 118(4): 965-974.
- [9] Jiang W. Blockade of B7-H1 enhances dendritic cell-mediated T cell response and antiviral immunity in HBV transgenic mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(4): 758-766.
- [10] Raziorrouh B, Ulsenheimer A, Schraut W, *et al.* Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients with chronic infection[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(4): 1422-1431.
- [11] Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, *et al.* Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses *in vitro* via PD-L1 blockade[J]. *Vet Res*, 2011, 42(1): 103-117.
- [12] Amarnath S, Costanzo C M, Mariotti J, *et al.* Regulatory T cells and human myeloid dendritic cells promote tolerance via programmed death ligand-1[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(2): e1000302.
- [13] Karwacz K, Arce F, Bricogne C, *et al.* PD-L1 co-stimulation, ligand-induced TCR down-modulation and anti-tumor immunotherapy[J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(1): 86-88.
- [14] Hatam L J, Devoti J A, Rosenthal D W, *et al.* Immune suppression in premalignant respiratory papillomas: Enriched functional CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells and PD-1/PD-L1/L2 expression[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 1925-1935.
- [15] Parry R V, Chemnitz J M, Frauwirth K A, *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21): 9543-9553.
- [16] Blackburn S D, Shin H, Freeman G J, *et al.* Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alpha PD-L1 blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(39): 15016-15021.
- [17] Kim H K, Guan H, Zu G, *et al.* High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79(4): 686-695.
- [18] Seo S K, Seo H M, Jeong H Y, *et al.* Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response[J]. *Immunol Lett*, 2006, 102(2): 222-228.
- [19] Ding H, Wu X, Gao W. PD-L1 is expressed by human renal tubule epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis[J]. *Clin Immunol*, 2005, 115(2): 184-191.
- [20] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104(9): 3360-3365.