

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.008

PD-L1-Ig 融合蛋白的酵母表达及其对 T 细胞的抑制作用

张 意[△], 吴 聪[△], 蒋应明, 龙 瑶, 陈国友* (第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433)

[摘要] 目的: 利用毕赤酵母表达系统表达 PD-L1-Ig 融合蛋白, 检测该融合蛋白的生物学活性。方法: 化学合成 hPD-L1-IgG4 融合基因, 构建携带该基因的酵母表达载体, 转化 GS115 酵母菌株后分泌表达融合蛋白, 亲和层析和离子交换层析法纯化, SDS-PAGE 和 Western blotting 分析鉴定。ELISA 法检测融合蛋白与受体 PD-1 的结合能力, 混合淋巴细胞反应检测融合蛋白对 T 细胞功能的抑制能力, ⁵¹Cr 稀释法检测其对 CTL 杀伤人结肠癌 SW480 细胞效应的抑制作用。结果: 成功构建酵母表达载体 pPIC9K-PD-L1-IgG4, 转化菌株分泌表达 PD-L1-IgG4 融合蛋白, 相对分子质量为 55 000, 含量为 120 μg/ml。发酵菌株, 纯化制备融合蛋白。融合蛋白与受体 PD-1 具有良好的结合能力, 能够显著抑制 T 细胞增殖、活化 ($P < 0.01$), 并抑制 CTL 对结肠癌细胞的杀伤 ($P < 0.01$)。结论: 成功制备了酵母表达 PD-L1-IgG4 融合蛋白, 该融合蛋白具有良好的生物学活性, 为深入研究其在肿瘤免疫应答中的调控效应奠定了良好基础。

[关键词] PD-L1; 融合蛋白; 酵母表达系统; PD-1; T 细胞; 结肠癌细胞

[中图分类号] R392.1; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0464-05

Expression of hPD-L1-Ig fusion protein in yeast system and its inhibitory effects on T cells

ZHANG Yi[△], WU Cong[△], JIANG Ying-ming, LONG Yao, CHEN Guo-you* (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To express hPD-L1-Ig fusion protein in the *Pichia pastoris* expression system, and to investigate the biological activity of the protein. **Methods:** The hPD-L1-IgG4 fusion gene was chemically synthesized and cloned into *Pichia* yeast expression vector. The recombinant vector was then transfected into GS115 *Pichia* yeast strain, and the fusion protein was purified by affinity chromatograph and ion exchange method before further identified by SDS-PAGE and Western blotting. The binding ability of hPD-L1-Ig fusion protein to PD-1 receptor was examined by ELISA. The inhibitory effects of hPD-L1-Ig fusion protein on T cells and on cytotoxicity of CTL against colon cancer SW480 cells were examined by MLR and ⁵¹Cr release assay, respectively. **Results:** The expression vector pPIC9K-PD-L1-IgG4 was successfully constructed, and hPD-L1-IgG4 fusion protein was secreted by GS115 *Pichia* yeast strain, with the molecular weight being about 55 000 and the concentration being 120 μg/ml. The fusion protein was purified using fermentation strain. PD-L1-Ig fusion protein had high affinity with PD-1 receptor; it also significantly inhibited the proliferation and activation of T cells ($P < 0.01$) and the cytotoxicity of CTL against colon tumor cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** The hPD-L1-IgG4 fusion protein has been successfully prepared, and it has active biological functions, which lays a foundation for further investigating its regulatory effect on tumor immune response.

[Key words] PD-L1; fusion protein; yeast expression system; PD-1; T cell; colon cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 464-468]

程序化死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 又名 B7-H1 (B7-homolog 1), 是属于共刺激分子 B7 家族的一种免疫抑制分子^[1]。PD-L1 在 APC、T、B、巨噬细胞、胎盘上均有表达, 也常见于某些恶性肿瘤细胞系, 已确认的一个配体是免疫抑制性受体程序性死亡蛋白 (programmed death 1, PD-1)。PD-L1 主要显示负性免疫调节作用: 在低水平的抗原刺激下, TCR 和 CD3 处于亚活化状态时, PD-

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (No. 2003CB515503)。Supported by the Major National Basic Research Development Program of China (No. 2003CB515503)

[作者简介] 张 意 (1976-), 男, 安徽省芜湖市人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究。E-mail: zhangyismmu@yahoo.com.cn; 吴 聪 (1983-), 女, 山东省泰安市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫和移植免疫学方面的研究, E-mail: wucong517@gmail.com

[△]张 意, 吴 聪为并列第一作者

* 通信作者 (Corresponding author)。E-mail: guoyouchen@immunol.org

1/ PD-L1 会导致 T 细胞增殖的抑制,并具有拮抗 CD28/B7-2 途径的作用^[2]。PD-1/PD-L1 相互作用还可以影响多种细胞因子的分泌,一般促进 IL-10 的分泌,而抑制 IL-2、IFN- γ 的分泌,其作用的结局依赖 TCR 和 CD28 信号的浓度^[3]。以 PD-L1 融合 Ig 的 Fc 片段制成的 PD-L1Ig 融合蛋白,较之 PD-L1,能更强烈抑制 CD4⁺ T 细胞的增殖,并显著下调 IL-2、IFN- γ 等的分泌^[4]。近年来研究^[5]显示 PD-L1 与肿瘤逃逸机制密切相关,肿瘤组织上的 PD-L1 促进效应性 T 细胞凋亡,并降低活化的效应 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤;PD-L1 还可以促进肿瘤微环境的形成,诱导 Treg,诱导肿瘤局部的免疫抑制^[6]。为了深入探索 PD-L1 对肿瘤逃逸机制的调控效应,本课题利用基因工程技术制备酵母表达的 PD-L1-IgG4 融合蛋白,并初步分析鉴定了该融合蛋白对肿瘤免疫的抑制效应。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与菌株

毕赤酵母表达质粒 pPIC9K、酵母表达菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶购自 Takara 公司,T4DNA 连接酶购自 NEB 公司,PD-1、PD-1 单抗、PD-L1 单抗、IgG4 单抗和兔抗鼠抗体购自 RD 公司。电穿孔仪为 Bio-RAD 公司产品。人结肠癌 SW480 细胞 (CEA⁺,HLA-A2.1⁺)购自 ATCC。CEA⁺/HLA-A2.1⁺ 特异性 CD8⁺ CTL 由本室制备保存。

1.2 hPD-L1-IgG4 融合基因合成与表达载体构建

hPD-L1-IgG4 融合基因委托 Invitrogen 公司合成,在 hPD-L1 基因与人 IgG4 基因之间的连接肽选择 (Gly4Ser)₃,构建 hPD-L1-L-hIgG4 融合基因,全长为 685 bp。合成的融合基因头尾两端分别带有 Xho I 和 EcoR I 酶切位点,用 Xho I 和 EcoR I 双酶切融合基因片段和 pPIC9K 载体,以 T4DNA 连接酶连接载体和融合基因,构建 pPIC9K-PD-L1-IgG4 酵母重组质粒载体。

1.3 pPIC9K-PD-L1-Ig 表达载体转化 GS115 菌株

以大量质粒提取试剂盒抽提 pPIC9K 和 pPIC9K-PD-L1-Ig 质粒 DNA,各取 10 μ g DNA 用 Sal I 酶切处理使其线性化,用电穿孔方法转化 GS115 感受态菌株。电转条件:电压 1.4 kV,电容 22 μ F,电阻 100 Ω ,时间 5 min。将转化产物涂布于缺乏组氨酸的 RDB 缺陷平板,5~6 d 后可见白色重组克隆。

1.4 酵母表达菌株的筛选与优化

挑取生长较快的酵母菌落,使用 1 mg/ml 的

G418 抗性筛选,5~7 d 后平板上长出菌落,选择长势较好的菌落进行小规模培养,甲醇诱导表达,用 Dot blotting 方法进行初步筛选;高拷贝重组子煮菌后 PCR 验证;将经上述方法筛选出的高表达酵母转化菌株进行大规模发酵培养。

1.5 hPD-L1-Ig 融合蛋白的纯化

超滤浓缩酵母培养上清,以 50% (NH₄)₂SO₄ 沉淀浓缩上清,离心 8 000 \times g 30 min,弃上清,以 20 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 缓冲液溶解沉淀。置入透析袋中,以 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液室温透析 8 h,每 4 h 换液 1 次。取透析液上 Protein A 亲和柱,平衡液为 20 mmol/L Tris-HCl、15 mmol/L NaCl (pH 8.0),洗脱液为 100 mmol/L Gly/HCl (pH 3.0) 缓冲液,1 ml/min 洗脱。将洗脱峰以 4 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液调节 pH 至 7.0。接着将洗脱峰上 Hiprep 16/10 DEAE 阴离子层析柱,20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 平衡,洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L NaCl (pH 7.0);洗脱方法:0~30% 洗脱液洗脱 30 min,30%~100% 洗脱液 10 min,5 ml/min,收集 15%~20% 洗脱液洗脱的样品。

1.6 hPD-L1-Ig 融合蛋白的鉴定

纯化制备的 hPD-L1-Ig 融合蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定,采用 Lowery 法检测产品的蛋白浓度。

1.7 ELISA 法检测 hPD-L1-Ig 融合蛋白的受体结合能力

包被 96 孔板经倍比稀释的 hPD-L1-Ig 融合蛋白,每个浓度设 3 个复孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,封闭 2 h,洗涤,每孔加入 10 μ g 的 PD-1,室温 1 h,洗涤,加入抗 PD-1 抗体室温 1 h,洗涤,加抗鼠二抗,室温 30 min,洗涤;OPD 显色后检测 D_{490} nm 光密度值。

1.8 MLR 法检测 hPD-L1-Ig 融合蛋白抑制 T 细胞增殖活化能力

常规方法分离制备不同个体外周血单核细胞和 T 淋巴细胞,分别作为刺激细胞和效应细胞,刺激细胞经 30 Gy ⁶⁰Co 处理。96 孔细胞圆底培养板中,效应细胞与刺激细胞混合比分别为 20:1、5:1 和 1:1,加入纯化 PD-L1-Ig 蛋白,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h,加入 ³H-TdR 3.7 \times 10 Bq/孔,再培养 18 h,收集细胞,液闪计数器测定 cpm 值。

1.9 ⁵¹Cr 释放法检测 hPD-L1-Ig 融合蛋白抑制 CTL 杀伤肿瘤细胞的效应

按常规方法从人 CEA⁺/HLA-A2.1⁺ 结肠腺癌患者外周血中提取特异性 CD8⁺ CTL^[7],在 96 孔细

胞圆底培养板中加入 CTL 和 ⁵¹Cr 标记的 SW480 细胞, 效应细胞与靶细胞混合比分别为 2.5:1、5:1 和 10:1, 加入纯化 PD-L1-Ig 蛋白, 37 °C、5% CO₂ 培养 4 h, 离心培养板 200 × g、5 min, 吸出上清液, 液闪计数器测定 cpm 值。

1.10 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 hPD-L1-Ig 融合基因载体的鉴定结果

融合基因和 pPIC9K 质粒用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后行琼脂糖凝胶 DNA 电泳, 结果显示条带位置在 690 bp 左右(图 1)。

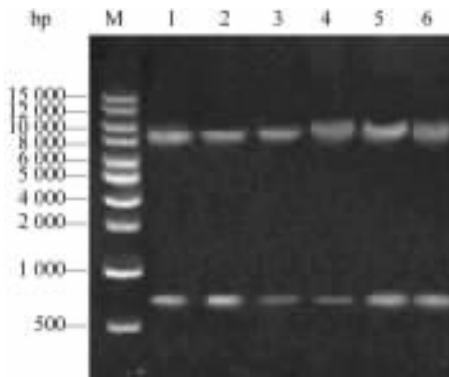


图 1 hPD-L1-Ig 融合基因的鉴定

Fig. 1 Identification of hPD-L1-Ig fusion gene

M: Marker; 1-6: hPD-L1-Ig

2.2 转化子 PCR 产物的鉴定结果

选择表达菌落, 煮菌 PCR 鉴定结果表明, 目的基因和载体经过双酶切后连接, 再转入 top10 菌, 挑取的 10 个菌株 9 个含有目的基因, 说明连接成功(图 2)。选择其中 4 个菌株进行测序, 均为正确的 pPIC9K-hPD-L1-Ig 克隆。

2.3 菌株分泌融合蛋白的鉴定结果

取筛选菌株分泌上清行 SDS-PAGE 分析, 发现其中含有融合蛋白, 其相对分子质量约为 55 000, 与预测相符; 电泳后, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 分别结合一抗(hPD-L1 单抗和人 IgG4 抗体)和 HRP 标记的二抗(兔抗鼠), 然后用化学发光试剂显影到胶片上(图 3)。经 ELISA 检测法测得融合蛋白的表达量约为 120 μg/ml。

2.4 融合蛋白的纯化结果

取经层析纯化的 hPD-L1-Ig 融合蛋白产品行 Western blotting 和 SDS-PAGE 分析, 结果显示融合

蛋白分子质量为 55 000, 纯度大于 90%(图 4)。Lowery 法测得纯化蛋白的质量浓度为 540 μg/ml。

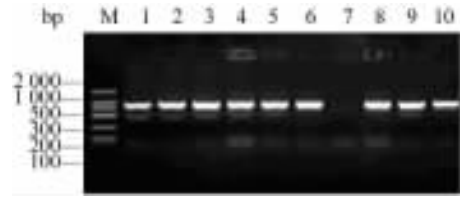


图 2 pPIC9K-hPD-L1-Ig 质粒 PCR 的鉴定结果

Fig. 2 Identification of pPIC9K-hPD-L1-Ig plasmid by PCR

M: Marker; 1-6, 8-10: pPIC9K-hPD-L1-Ig plasmid; 7: Negative plasmid

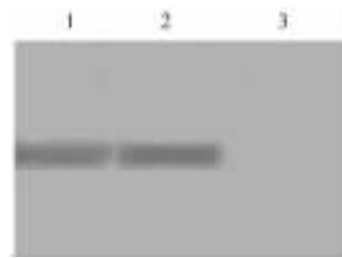


图 3 Western blotting 分析菌株上清中的 hPD-L1-Ig 融合蛋白

Fig. 3 hPD-L1-Ig fusion protein in supernatant of transformed-bacteria as detected by Western blotting

1: Anti hPD-L1; 2: Anti IgG4; 3: Negative control

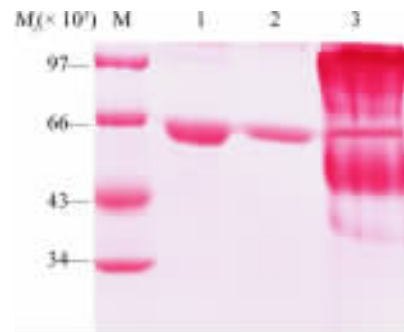


图 4 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白

Fig. 4 Purified fusion protein analyzed by SDS-PAGE

M: Marker; 1: Purified by affinity chromatograph; 2: Purified by ion chromatograph; 3: Unpurified fermentation supernatant

2.5 融合蛋白具有与 PD-1 较强的结合能力

制备的 hPD-L1-Ig 融合蛋白与 10 μg 的 PD-1 具有较强的结合活性(图 5), 未观察到阴性对照 IgG4 与 PD-1 的结合。

2.6 融合蛋白对 T 细胞增殖活化的抑制作用

采用 MLR 法测定 PD-L1-Ig 对 T 细胞的抑制功能, 采用液闪仪计数 cpm 值。结果显示融合蛋白能够显著抑制 T 细胞增殖活化(图 6, *P* < 0.01)。

2.7 融合蛋白对 CTL 杀伤肿瘤细胞的抑制作用

采用⁵¹Cr 释放法测定 PD-L1-Ig 对 CTL 杀伤肿瘤细胞的抑制效应,用液闪仪计数 cpm 值,结果表明融合蛋白能够显著抑制抗原特异性 CTL 对人结肠癌 SW480 细胞的杀伤效应(图 7),融合蛋白处理组与对照组差异有统计学意义($P < 0.01$)。

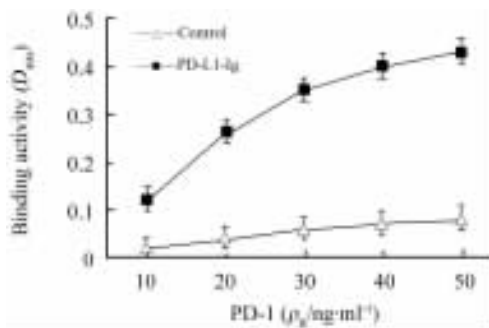


图 5 hPD-L1-Ig 融合蛋白特异性结合 PD-1 受体
Fig. 5 hPD-L1-Ig fusion protein specifically binded PD-1 receptor

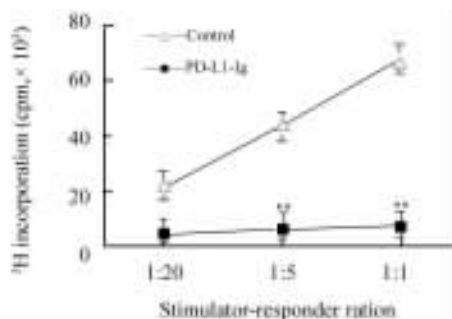


图 6 融合蛋白对 T 细胞活化的抑制作用
Fig. 6 Fusion protein inhibited activation of T cells
** $P < 0.01$ vs control

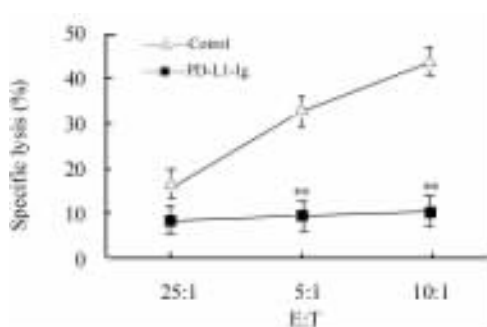


图 7 融合蛋白抑制 CTL 对 SW480 细胞的杀伤
Fig. 7 Fusion protein inhibited cytotoxicity of CTL against SW480 cells
** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

T 细胞活化及抗原特异性 T 细胞免疫应答的产生及维持需要双信号,即 MHC 肽复合物提供的特异性信号和 APC 表面共刺激分子提供的活化信号。共刺激分子对 T 细胞抗原特异性激活是必需的,并具有启动、维持以及调节活化级联反应的作用,决定了 T 细胞的活化增殖、失能、凋亡。由于控制协同刺激信号可以增强或终止免疫应答,因而受到关注。最具有代表性的共刺激分子是 B7 家族成员,PD-L1 就是其中一员,被鉴定为 PD-1 的配体。PD-L1 广泛表达于淋巴组织及非淋巴组织中,人 B7-H1 mRNA 在心肌、骨骼肌、胎盘和肺都有大量表达,在胸腺、脾、肾、肝脏也可检出,常表达于 APC 和巨噬细胞。

有研究^[8]表明,T 细胞受刺激活化 5 ~ 15 min 后,PD-L1 先与其第二未明活化受体结合,上调 T 细胞表面 CD40L 的表达,促进 T 细胞的进一步活化;24 h 后 T 细胞开始表达 PD-1,PD-L/ PD-1 途径占主导作用,介导 T 细胞的凋亡并下调细胞因子的分泌,对 T 细胞的增殖产生抑制作用。PD-L1 在癌组织上广泛表达,如肺癌、肝癌、乳腺癌以及卵巢癌等,且许多癌组织经诱导后可使 PD-L1 呈上调性表达,从而促进 T 细胞的凋亡,这可能与肿瘤的免疫逃避机制相关^[9-10]。Konishi 等^[11]用免疫组化方法检测了非小细胞肺癌手术切除标本中 PD-L1 的表达,发现在同一切片中,PD-L1 阳性区域的肿瘤浸润淋巴细胞比 PD-L1 阴性区域显著减少,证实了 PD-1 配体在抗肿瘤免疫应答中起负性调控作用。阻断 PD-1/PD-1L 的相互作用有望为肿瘤治疗提供潜在有效的方案。而肿瘤微环境的形成也与 PD-L1 密切相关,多种肿瘤细胞表达 PD-L1,并与 PD-1 结合,产生抑制性作用,抑制肿瘤抗原特异性的 CD8⁺ T 细胞功能,使用抗 PD-L1 抗体后上述抑制作用得到逆转,抗肿瘤作用得到增强,还有研究表明,PD-L1 可以诱导 T 细胞凋亡,从而进一步诱导肿瘤局部的免疫抑制,参与肿瘤微环境形成^[12-14]。

PD-1/PD-L1 通路在移植免疫中也起着重要作用。Koga 等^[15]把 C57BL/6 小鼠的心脏移植给 B6. C-H2 <bm12 > KhEg 小鼠,发现 PD-L1 在移植冠状动脉内膜的平滑肌细胞上表达,给予抗 PD-L1 单抗则促进了移植动脉病变的进展。Blazar 等^[16]发现 PD-1/PD-L1 通路通过调节 IFN- γ 的产生而下调 GVHD,从而为降低 GVHD 的致死率提供了一个新的治疗途径。在自身免疫疾病中,PD-L1 也发挥重要作用,PD-1 和 PD-L1 在 NOD 小鼠胰岛的浸润细

胞上有表达, 阻断 PD-1/B7-H1 通路, NOD 小鼠出现病情恶化^[17]。实验性脑脊髓炎的小鼠脑组织中, PD-1/PD-L1 在浸润性炎症细胞中都有表达^[18]。

PD-L1 可能通过与 T 细胞表面不同的受体相互作用, 经过不同的机制在初始和效应阶段对 T 细胞产生不同的生物学效应。鉴于 PD-L1 重要的生物学功能及潜在的临床应用价值, 本研究构建了 hPD-L1-Ig 酵母表达体系, 并制备了具有良好生物学活性的重组融合蛋白。应用毕赤酵母体系进行重组蛋白的表达制备已经成为生物工程领域关注的热点。目前采用本体系已经成功开发了多种有价值的蛋白^[19]。本课题中采用毕赤酵母表达体系, 在设计基因序列时即采用了酵母喜爱的优化密码子, 结合营养筛选和抗性筛选, 获得了高分泌表达目的蛋白的酵母菌株, 通过简便的亲和层析方法及离子交换层析, 获得了纯度大于 90% 以上的目的蛋白。

本研究中采用 ELISA 方法检测纯化蛋白与配体 PD-1 的结合能力, 结果表明 PD-L1-Ig 融合蛋白与 PD-1 具有良好的结合能力; 表现出了有效的抑制 T 细胞功能的特性, 并且融合蛋白具有显著抑制抗原特异性 CTL 杀伤 SW480 肿瘤细胞的效应, 证明本研究制备的 PD-L1-Ig 融合蛋白具有良好的抑制肿瘤免疫的生物学特性, 为进一步深入研究 PD-L1 调控肿瘤免疫应答、自身免疫疾病和移植免疫耐受奠定了良好的基础, 也为下一步制备 PD-L1 单抗、探索 PD-L1 的新配体提供了有利条件。

[参 考 文 献]

- [1] Rosignoli G, Lim CH, Bower M, *et al.* Programmed death (PD)-1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human immunodeficiency virus-1-infected individuals [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(1): 90-97.
- [2] Waisman A, Yagov N. B7-H1 and CD8⁺ Treg: the enigmatic role of B7-H1 in peripheral tolerance [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(6): 1448-1451.
- [3] Rilev JL. PD-1 signaling in primary T cells [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 114-125.
- [4] Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production [J]. *J Immunol*, 2005, 175(3): 1257-1266.
- [5] Zhang L, Gajewski TF, Kline J, *et al.* PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model [J]. *Blood*, 2009, 114(8): 1545-1552.
- [6] Parekh VV, Lalani S, Kim S, *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(5): 2816-2826.
- [7] Wu YF, Wan T, Zhou XY, *et al.* HSP70-like protein 1 fusion protein enhance induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4947-4954.
- [8] Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, *et al.* PD-L1 negatively regulates CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(3): 551-564.
- [9] Cao Q, Wang XY, Qiu SJ, *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 971-979.
- [10] Kuang DM, Zhao Q, Peng C, *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1 [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(6): 1327-1337.
- [11] Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, *et al.* B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5094-5100.
- [12] Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, *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.
- [13] Zhang C, Wu J, Xue X, *et al.* Anti-tumor immunotherapy by blockade of the PD-1/PD-L1 pathway with recombinant human PD-1-IgV [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(7): 711-719.
- [14] Fourcade J, Kudela P, Sun Z, *et al.* PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cell expansion in melanoma patients [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9): 5240-5249.
- [15] Koga N, Suzuki J, Kosuge H, *et al.* Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(11): 2057-2062.
- [16] Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltis-Mortari A, *et al.* Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism [J]. *J Immunol*, 2006, 177(3): 1272-1277.
- [17] Wang CJ, Chou FC, Chu CH, *et al.* Protective role of programmed death 1 ligand 1 (PD-L1) in nonobese diabetic mice: the paradox in transgenic models [J]. *Diabetes*, 2008, 57(7): 1861-1869.
- [18] Schreiner B, Bailey SL, Shin T, *et al.* PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE. [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(10): 2706-2717.
- [19] Watanabe T, Ikeda H, Masaki K, *et al.* Cloning and characterization of a novel phytase from wastewater treatment yeast *Hansenula fabianii* J640 and expression in *Pichia pastoris* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108(3): 225-230.

[收稿日期] 2009 - 08 - 19

[修回日期] 2009 - 09 - 20

[本文编辑] 韩 丹