

可溶性人 sPD-L1 及其抗体的制备和鉴定 Preparation and Identification of Human Soluble sPD-L1 and Its Antibodies

徐丽慧^{1,2}, 迟晓云¹, 李丰耀¹, 贾仟涛¹, 查庆兵¹, 何贤辉^{1*}

XU Li-Hui^{1,2}, CHI Xiao-Yun¹, LI Feng-Yao¹, JIA Qian-Tao¹, ZHA Qing-Bing¹ and HE Xian-Hui^{1*}

1 暨南大学生命科学技术学院组织移植与免疫实验中心, 广州 510632

2 暨南大学生命科学技术学院生物工程研究所, 广州 510632

1 Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Institute of Bioengineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 通过固定化金属离子亲和层析进行柱上复性与纯化, 获得高纯度的可溶性 PD-L1 胞外域 (sPD-L1), 其纯度达 95%。纯化的 sPD-L1 经免疫印迹分析得到验证, 并具有与其受体 PD-1 的特异性结合活性; 以该抗原免疫小鼠获得高滴度的抗血清, 并以制备的 sPD-L1-HiTrap 亲和层析柱纯化获得高纯度特异性抗体, 将该抗体与另一商业化抗体结合建立了一种灵敏的双夹心 ELISA 法, 检测范围为 1ng/mL ~ 100ng/mL, 可用于分析可溶性 PD-L1 的含量。可溶性 sPD-L1 及其抗体的制备不仅可用于人体内特异性抗体和可溶性 PD-L1 的检测, 同时也为进一步研究其体内活性及其受体的性质提供了条件。

关键词 PD-L1, 原核表达, 重折叠, 亲和层析, 抗体

中图分类号 Q78; R392.12 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0106-06

Abstract This study reports the preparation and identification of soluble programmed death-1 (PD-1) ligand-1 (sPD-L1) and its antibodies of mouse origin. Immobilized metal ion affinity chromatography was used to perform on-column refolding with simultaneous purification of denatured sPD-L1, and soluble sPD-L1 with purity of 95% was obtained. The purified sPD-L1 was verified by immunoblotting using a commercial goat-anti-human PD-L1 antibody. An ELISA-based assay showed that it also had high binding activity for its cognate receptor PD-1. Furthermore, mouse anti-sPD-L1 antiserum of high titer was raised using the purified sPD-L1 as an immunogen, and the specific IgG antibodies were purified using sPD-L1-HiTrap affinity chromatography. In addition, a sensitive sandwich ELISA was established using the purified IgG antibodies together with the commercial goat antibodies. In conclusion, the preparation of soluble sPD-L1 and its antibodies provide the basis for detection of the potential anti-PD-L1 antibodies and soluble PD-L1 in humans as well as for further investigation of its *in vivo* bioactivities and characterization of its potential receptors.

Key words PD-L1, prokaryotic expression, refolding, affinity chromatography, antibody

程序死亡蛋白 1 (programmed death-1, PD-1) 是早年发现的一个与细胞凋亡相关的膜蛋白, 主要表

达于活化的 T 细胞和 B 细胞上, 近年的研究表明它除了与凋亡相关外, 主要对活化 T 细胞进行负调控,

Received: August 10, 2006; Accepted: September 26, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30572199 and 30371651).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85220679; E-mail: thehx@jnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30572199 和 30371651) 资助项目。

在维持外周耐受等过程中发挥重要作用^[1,2]。在 C57BL/6 遗传背景的小鼠上,PD-1 基因敲除后会发生狼疮样肾小球肾炎和关节炎^[3],而该基因敲除的 BALB/c 小鼠则会发生致命的自身免疫性扩张性心肌病^[4]。PD-L1(又称 B7-H1)^[5]和 PD-L2(又称 B7-DC)是 PD-1 的两个配体,属于 B7 超家族的成员^[2],与其受体 PD-1 结合传递抑制性信号,抑制 T 细胞增殖及多种细胞因子的产生^[2,5]。PD-L1 主要表达于外周组织的内皮细胞、上皮细胞以及肝细胞等实质细胞上并在一些细胞因子刺激下表达上调,同时也表达于活化的 T 细胞和 B 细胞上,但活化的单核细胞不表达 PD-L1 而表达 PD-L2^[5,6];表达于组织细胞上的 PD-L1 介导外周 T 细胞耐受^[7]。虽然大多数研究显示 PD-L1 向 T 细胞传递抑制信号,但也有研究提示 PD-L1 还可以通过非 PD-1 受体向 T 细胞传递共刺激信号,促进 T 细胞增殖^[8]。但到目前为止假定的非 PD-1 受体尚未被鉴定。此外,有研究显示,类风湿性关节炎患者体内存在抗 PD-L1 自身抗体,这种抗体似可通过与 PD-L1 结合向细胞内传递信号,与该病的发生和发展有相关性^[9]。

为了进一步研究 PD-L1 及其受体的结构和功能特性,我们在以往构建的 PD-L1 胞外域(sPD-L1)的原核表达载体并在原核细胞中获得初步表达^[10]的基础上,通过柱上复性法获得了具有生物活性的 sPD-L1 蛋白,并制备了高特异性抗体,建立了灵敏的可溶性 sPD-L1 检测方法,这些结果为 PD-L1 的相关研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3)菌株购自 Novagen;Ni²⁺-NTA 介质购自 Invitrogen;山羊抗人 PD-L1 抗体为 R&D 公司产品;预染蛋白分子量标准为北京 TIANGEN 产品;增强化学发光试剂盒(ECL Western detection reagent)、NHS-activated HiTrap HP 预装柱购自 Amersham Biosciences 产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗小鼠 IgG 和 HRP 标记兔抗山羊 IgG 为北京中山进口分装产品(美国 Jackson ImmuneResearch);弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)和弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA)购自 Sigma 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)、咪唑、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)、邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD)、盐酸胍、尿素等均为

进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 sPD-L1 原核表达载体的构建:见前文[10]报道,将编码 PD-L1 胞外域的序列插入 pET-3c 构建 sPD-L1 的原核表达载体 pET/sPD-L1。

1.2.2 sPD-L1 在 *E. coli* 中的表达及包涵体纯化:以 pET/sPD-L1 质粒转化感受态 BL21(DE3)细菌获得工程菌,按前文[11]方法发酵工程菌、纯化包涵体。

1.2.3 sPD-L1 的柱上复性和纯化:按文献[11]方法进行并稍作改变,简述如下:包涵体以 10mL 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 6mol/L 盐酸胍、10mmol/L β-巯基乙醇及 5mmol/L 咪唑)溶解,离心除去不溶物后,上清液与 1mL Ni²⁺-NTA 介质(经同一缓冲液平衡)混合于 4℃ 振摇 16h 后,将混合物装柱,洗涤 20mL,然后以 40mL 的 8mol/L 尿素缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 8mol/L 尿素、0.5mol/L NaCl、20mmol/L 咪唑、0.1mmol/L PMSF)洗涤,然后按线性梯度降低尿素浓度至零(流速 0.5mL/min,总体积 35mL)使 sPD-L1 进行柱上复性,最后以 20、50、100、300 和 500mmol/L 的咪唑分段洗脱已复性的 sPD-L1 蛋白,分部收集洗脱峰。

1.2.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):参照 Laemmli 的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 15%,以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

1.2.5 免疫印迹分析:方法同文献[11],第一抗体为山羊抗 PD-L1 抗体(1:5000 稀释),第二抗体为 HRP-兔抗山羊 IgG(1:10000 稀释),最后以增强化学发光成像(Alpha Innotech 公司 FluorChem SP 成像系统)。

1.2.6 结合活性分析:96 孔板以每孔 100μL 5μg/mL (配于 PBS, pH 7.4)的可溶性 PD-1 (按前文方法[12]制备)于 4℃ 包被过夜,接着以 TBST 封闭孔板,洗涤后各孔加入 100μL 不同浓度的 sPD-L1 (各做 3 个复孔)于室温温育 2h,结合于板上的 sPD-L1 以山羊抗人 PD-L1 抗体(1:2000)和 HRP-兔抗山羊 IgG (1:4000)进行检测,最后以 OPD 底物溶液显色并以酶标仪测定 490nm 光吸收。

1.2.7 小鼠抗 sPD-L1 抗血清制备:6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠 3 只(购自广东省医学实验动物中心)按常规方法免疫,以酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测抗血清的效价,获得的抗血清经 *E. coli* 菌体蛋白吸附,消除与

E. coli 菌体蛋白的交叉反应。

1.2.8 sPD-L1-HiTrap 亲和柱及亲和层析: 将 2mg sPD-L1 按厂家建议的方法偶联于 NHS-activated HiTrap 柱(1mL)上制备 sPD-L1-HiTrap 亲和柱,偶联反应率达 95%;将处理的抗血清按 1:10 的比例以 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0,含 0.5mol/L NaCl)稀释,然后以 1mL/min 的流速上柱,并以同一缓冲液洗涤至 280nm 光吸收回到基线,最后以 0.1mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液(pH 2.8)洗脱结合的抗体,收集于含 1/10 体积的 1mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,并以 SDS-PAGE 鉴定纯化的抗体。

1.2.9 双夹心酶联免疫吸附测定(ELISA): 96 孔板以每孔 100 μ L 2 μ g/mL(配于 PBS)山羊抗人 PD-L1 抗体于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,接着以 TBST 封闭孔板,洗涤后各孔加入 100 μ L 不同浓度的 sPD-L1(各做 2 个复孔)于室温温育 2h,结合于板上的 sPD-L1 以纯化的小鼠抗 sPD-L1 抗体(1:3000)和 HRP-山羊抗小鼠 IgG(1:10000)进行检测,然后以 OPD 底物溶液显色并以酶标仪测定 490nm 光吸收。

2 结果

2.1 sPD-L1 的复性和纯化

由于 sPD-L1 在 *E. coli* 中表达量较低,并以包涵体形式存在^[10],因此考虑从包涵体中进行复性获得 sPD-L1。该蛋白的羧基端融合了 His₆ 标签,可利用 Ni²⁺-NTA 柱上复性法^[11]进行纯化。图 1 为该蛋白的柱上复性和纯化层析图,以 300mmol/L 的咪唑将复性的 sPD-L1 从柱上洗脱,获得的可溶性产物纯度可达 95%(图 2),从 1 L 培养液所得菌体中可获得约 1mg sPD-L1 蛋白,免疫印迹分析证实该蛋白能与山羊抗人 PD-L1 抗体反应(图 3),进一步证明获得的产物为 sPD-L1 蛋白。

2.2 sPD-L1 的生物活性分析

图 4 为 sPD-L1 生物活性分析结果,说明 sPD-L1 与 PD-1 具有特异性结合活性,随前者浓度的升高,结合程度也不断提高,当 sPD-L1 浓度为 7nmol/L 时,其结合程度接近饱和,表现出典型的配体与受体的结合特征,说明复性获得的 sPD-L1 具有较强的生物活性。

2.3 sPD-L1 抗血清制备及抗体纯化

利用制备的高纯度 sPD-L1 蛋白为抗原免疫小鼠,获得了高滴度抗血清,ELISA 测定显示 3 个小鼠抗血清滴度都在 50 万以上。以 sPD-L1-HiTrap 亲和柱纯化抗体,以 0.1mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱下

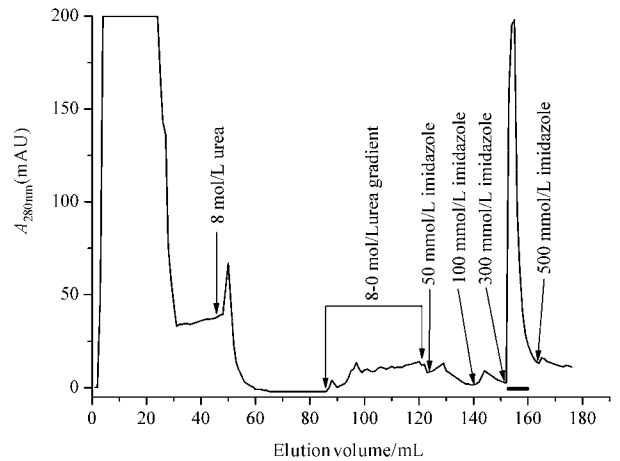


图 1 重组 sPD-L1 在 Ni²⁺-NTA 柱上复性和纯化的层析图

Fig.1 On-column refolding and purification of recombinant sPD-L1 with Ni²⁺-NTA column

The column was equilibrated with 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) containing 6mol/L guanidine hydrochloride, 15mmol/L β -mercaptoethanol and 5mmol/L imidazole. The sample dissolved in the same buffer was shaken with 1 mL of Ni²⁺-NTA resin at 4 $^{\circ}$ C for 16 h and then loaded into a column. Refolding of the denatured sample was carried out during an 8 ~ 0mol/L urea linear gradient at a flow rate of 0.5mL/min. The refolded sample was subsequently eluted with 300mmol/L imidazole. Fractions of 1mL were collected. Bar indicates the pooled fractions.

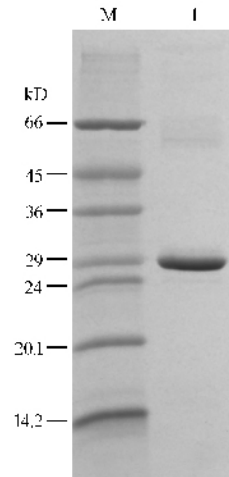


图 2 复性和纯化的 sPD-L1 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of refolded and purified sPD-L1 with SDS-PAGE M: protein MW marker; 1: refolded and purified sPD-L1 (eluted by 300 mmol/L imidazole).

一特异性结合峰(图 5),SDS-PAGE 分析显示该蛋白为由 50kD 的重链和 25kD 的轻链组成的蛋白,纯度大于 95%(图 6),计算可得抗体分子量为 150kD,说明纯化所得的抗体为 IgG。从 0.1mL 抗血清中可获得 0.2mg IgG 抗体。

2.4 双夹心 ELISA 法测定 PD-L1 浓度

利用纯化的小鼠抗 sPD-L1 抗体与商业化的山羊抗人 PD-L1 抗体进行双夹心 ELISA 测定 PD-L1 浓度。

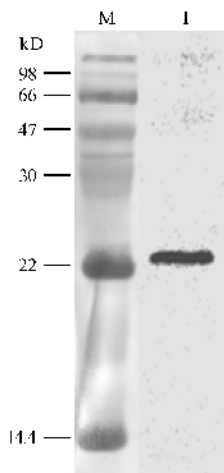


图3 复性和纯化的 sPD-L1 蛋白的免疫印迹分析

Fig.3 Immunoblotting analysis of refolded and purified sPD-L1
A commercial goat anti-hPD-L1 antibody was used ;M :prestained protein MW marker ;1 :refolded and purified sPD-L1 .

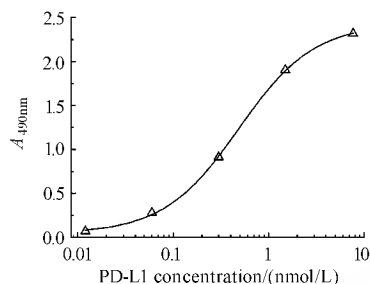


图4 sPD-L1 与受体 PD-1 的结合活性分析

Fig.4 Binding activity of sPD-L1 with its receptor PD-1
The binding activity was determined using an ELISA-based assay with soluble PD-1 protein coated on plate.

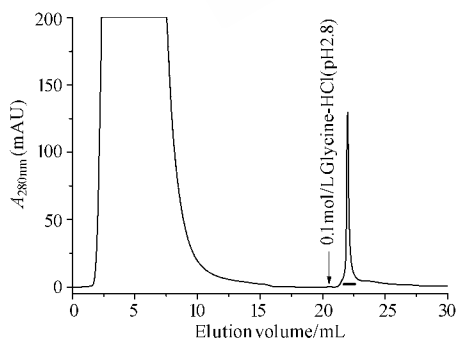


图5 小鼠抗 sPD-L1 抗体的亲和层析图

Fig.5 Chromatogram of mouse anti-sPD-L1 antibodies
The sPD-L1-HiTrap column was equilibrated with 20 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.5mol/L NaCl and the anti-serum diluted with the same buffer (1:10 ratio) was loaded onto the column. The column was washed till the absorbance back to baseline and the bound antibodies were subsequently eluted with 0.1mol/L glycine-HCl buffer (pH 2.8). The eluted peak was collected in a tube containing 1/10 volume of 1 mol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) for neutralizing the elution buffer.

羊抗人 PD-L1 抗体,建立了双夹心 ELISA。结果显

示,该 ELISA 具有高度特异性,并有较好的剂量-反应关系,可以测定浓度在 1ng/mL ~ 100ng/mL 之间的 PD-L1 浓度,表明该方法具有较高的灵敏度和特异性,可用于测定可溶性 PD-L1 的浓度(图 7)。

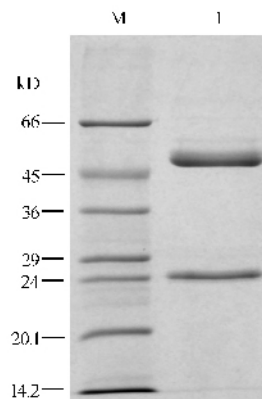


图6 纯化的小鼠抗 sPD-L1 抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified mouse anti-sPD-L1 antibodies

M :protein MW marker ;1 :purified mouse anti-sPD-L1 antibodies.

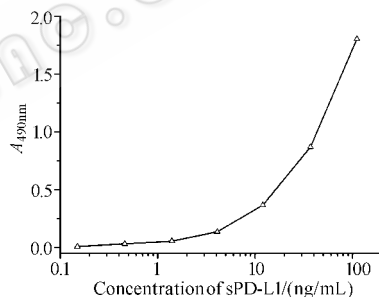


图7 双夹心 ELISA 法定量分析可溶性 sPD-L1 蛋白

Fig.7 Quantitative analysis of soluble PD-L1 with a sandwich ELISA

The assay was performed with the commercial goat anti-human sPD-L1 antibodies coated on plate and with purified mouse anti-sPD-L1 antibodies for detecting the bound sPD-L1 protein. The color was developed with o-phenylenediamine as a substrate and absorbance at 490 nm was determined.

3 讨论

PD-L1/PD-1 信号通路在维持正常生理条件下的外周组织耐受以及一些病理过程中发挥重要作用^[1,2]。在正常生理状态下,组织细胞上表达的 PD-L1 分子在下调效应 T 细胞的功能、阻止 T 细胞对组织细胞的过度反应而引起自身免疫病过程中发挥重要作用^[1],而在肿瘤病理情况下,肿瘤细胞组成性或诱导表达 PD-L1,这些表达 PD-L1 的肿瘤细胞能够诱导肿瘤特异性 T 细胞发生凋亡,因而与肿瘤细胞的免疫逃逸密切相关^[2]。此外,病毒感染也会诱导细胞表达 PD-L1^[13],影响感染病毒细胞的清除。最

近的研究发现慢性感染期病毒特异性 T 细胞上表达高水平 PD-1, 这些细胞表现出功能上的“耗竭”现象, 以特异性抗体阻断 PD-L1 信号则可恢复这些 T 细胞的功能状态^[14]。可见, 如何进一步研究 PD-L1 及其受体的生理功能以及病理状态下的作用机制, 发展以其为靶标的肿瘤和慢性病毒性疾病的辅助治疗策略, 是当前 PD-L1 研究的重点; 同时, 是否存在非 PD-1 受体也是有待解决的重要问题。我们在前文构建的 sPD-L1 原核表达载体^[10]的基础上, 通过柱上复性法^[11]获得了具有生物活性的 sPD-L1 蛋白, 并制备了纯化的抗 sPD-L1 抗体, 建立了测定可溶性 PD-L1 的高特异性高灵敏度的双夹心 ELISA 方法, 从而为进一步探索 PD-L1 的体内活性及作用机制提供了必要条件。

以往的研究已经显示, 人 sPD-L1 在 *E. coli* 中的表达水平相当低^[10], 通过优化表达条件也不能明显提高其表达率(数据略)。同时, 在 *E. coli* 中表达的 sPD-L1 主要以不溶性包涵体形式存在^[10], 因而只有通过复性才能获得可溶性产物。这里, 我们采用一种近年来常用而且有效的柱上复性法^[11]对 sPD-L1 进行复性, 并充分利用融合于羧基端的 His₆ 标签, 实现了柱上复性和亲和层析纯化一次完成, 获得的产物纯度可达 95%, 再次证明了该方法的简便有效。我们还对原来建立的方法进行了一点改进, 即将层析介质与变性蛋白混合振荡过夜, 以保证重组蛋白与介质充分结合, 并可避免将变性样品直接上柱时存在重组蛋白集中结合于柱上端导致局部浓度过高而影响复性效率的缺点, 从而使带 His₆ 标签的蛋白较均匀地与所有介质结合, 使复性更有效。此外, 在以咪唑进行洗脱时, 分段洗脱较线性梯度效果好, 可以提高洗脱样品的浓度而不影响其纯度。

在获得纯化的可溶性 sPD-L1 蛋白基础上, 以其为抗原免疫小鼠, 获得高滴度的抗血清, 该抗血清用无外源蛋白的 *E. coli* 菌体蛋白吸附以消除其中与细菌蛋白的交叉反应, 提高抗血清的特异性。同时我们还将 sPD-L1 蛋白偶联至活化介质制备了 sPD-L1-HiTrap 亲和柱, 以此亲和柱纯化抗血清得到具有高度特异性的小鼠抗 sPD-L1 IgG 抗体。然后将自制的抗体与商业化抗体, 建立了灵敏而特异的可溶性 PD-L1 的 ELISA 定量检测方法。该定量方法有两方面的应用, 一是用于分析 sPD-L1 的体内药物动力学, 二是用于研究潜在的可溶性 PD-L1 蛋白。我们曾发现 PD-L2 的 mRNA 存在一种可溶性剪接变异体^[15], 而 PD-L1 的 mRNA 也有不同的剪接变异

体^[16], 还存在编码可溶性 PD-L1 异构体的 mRNA 剪接变异体(未发表数据)。然而, 以此方法对活化 T 细胞培养液和人血清样品进行初步检测, 没有监测到其中有可溶性 PD-L1 存在(数据未给出), 但肿瘤患者或慢性病毒感染病人体内是否存在可检测到的可溶性 PD-L1 仍值得探索。

前述 sPD-L1-HiTrap 亲和柱除了用于纯化特异性抗体, 还可用于纯化其受体 PD-1。已知 PD-1 的 mRNA 存在多种不同的剪接变异体, 但这些变异体在蛋白质水平的表达尚不清楚^[17], 利用亲和柱可以通过富集而分析这些潜在 PD-1 的特性。此外, sPD-L1-HiTrap 亲和柱也可用于鉴定非 PD-1 受体的存在与否。非 PD-1 受体是一种假定的 PD-L1 的刺激性受体, 虽然有大量证据显示可能存在这样一种受体, 但至今尚未被鉴定^[2], 利用 sPD-L1-HiTrap 亲和柱纯化潜在的非 PD-1 受体, 结合飞行时间质谱有可能鉴定其存在与否。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol*, 2001, **22**(5): 265-268.
- [2] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**: 515-548.
- [3] Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 1999, **11**(2): 141-151.
- [4] Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, 2001, **291**(5502): 319-322.
- [5] Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 2000, **192**(7): 1027-1034.
- [6] Chi XY(迟晓云), He XH(何贤辉), Zha QK(查庆兵), et al. The kinetics of PD-L1 and PD-L2 expression on the surface of the human lymphocytes and monocytes. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志) 2006, **22**(5): 873-877.
- [7] Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*, 2006, **203**(4): 883-895.
- [8] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 1999, **5**(12): 1365-1369.
- [9] Dong H, Strome SE, Matteson EL, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J*

- [10] He XH(何贤辉), Xu LH(徐丽慧), Liu Y(刘毅), *et al.* Cloning of the cDNA of human PD-L1 gene and the expression of its extracellular domain in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, **20**(6): 659 - 663.
- [11] Xu LH(徐丽慧), Hong A(洪岸), He XH(何贤辉). On-column refolding and purification of human EGF receptor L2 domain inclusion body overexpressed in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**(4): 597 - 603.
- [12] Xu L, Liu Y, He X. Expression and purification of soluble human programmed death-1 in *Escherichia coli*. *Cell Mol Immunol*, 2006, **3**(2): 139 - 143.
- [13] Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, *et al.* PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol*, 2006 Jun 16; doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.007.
- [14] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006, **439**(7077): 682 - 687.
- [15] He XH, Liu Y, Xu LH, *et al.* Cloning and identification of two novel splice variants of human PD-L2. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36**(4): 284 - 289.
- [16] He XH, Xu LH, Liu Y. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform lacking Igy-like domain. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, **26**(4): 462 - 468.
- [17] Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, *et al.* Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol*, 2005, **235**(2): 109 - 116.