

Generation of $\Delta 42$ PD1-Expressing Stable Cell Line and Preliminary Research on the Function Thereof

Lin Cheng, Xian Tang*, Tingzhi Cao, Liumei Xu, Qiaoli Peng, Yun He, Hui Wang

AIDS Clinical Research Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen Guangdong
Email: chenglin252@163.com, *shannytang@qq.com

Received: Aug. 4th, 2016; accepted: Aug. 21st, 2016; published: Aug. 24th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To establish $\Delta 42$ PD1-expressing stable 293T cell line and explore the effect of $\Delta 42$ PD1 on phosphorylation of AKT, NF- κ B and Erk1/2. **Methods:** The human PD1- and $\Delta 42$ PD1-carrying eukaryotic expression plasmids were stably transfected into 293T cells respectively. Stable cell lines were screened using flow cytometry, and confirmed by RT-PCR and Western blot. The cell lines were co-cultured with PBMC to activate PD1 and $\Delta 42$ PD1, and then analyzed the phosphorylation of AKT, NF- κ B and Erk1/2 via flow cytometry. **Results:** We obtained PD1- and $\Delta 42$ PD1-stably expressing 293T cell lines by flow cytometry. The expression of genes of interest was confirmed by RT-PCR and Western blot. After co-culture with PBMC, phosphorylation of AKT but not NF- κ B or Erk1/2 in 293T cells was significantly inhibited by $\Delta 42$ PD1 or PD1. **Conclusion:** The present study found that functionally similar to PD1, $\Delta 42$ PD1 could be an important inhibitory immune-regulatory receptor.

Keywords

PD1, $\Delta 42$ PD1, Flow Cytometry, AKT

$\Delta 42$ PD1稳定表达细胞系的建立及其功能的初步研究

程林, 唐娴*, 曹廷智, 徐六妹, 彭巧丽, 何云, 王辉

*通讯作者。

深圳市第三人民医院艾滋病临床研究实验室, 广东 深圳
Email: chenglin252@163.com, shannytang@qq.com

收稿日期: 2016年8月4日; 录用日期: 2016年8月21日; 发布日期: 2016年8月24日

摘 要

目的: 建立稳定表达 $\Delta 42$ PD1的293T细胞系, 并探索其对AKT, NF- κ B和Erk1/2磷酸化的影响。**方法:** 分别将含有人PD1和 $\Delta 42$ PD1基因的真核表达质粒稳定转染293T细胞, 用流式细胞术筛选稳定细胞系, 用RT-PCR和Western blot进一步鉴定目的基因的表达。将稳定细胞系分别于PBMCs进行孵育, 以激活 $\Delta 42$ PD1和PD1, 用流式细胞术检测细胞内AKT, NF- κ B和Erk1/2的磷酸化水平。**结果:** 通过流式细胞术筛选出稳定表达PD1和 $\Delta 42$ PD1的293T细胞系, RT-PCR和Western blot确认了目的基因的表达。与PBMC混合孵育后, 293T细胞内AKT的磷酸化水平被 $\Delta 42$ PD1或PD1显著抑制, 而NF- κ B和Erk1/2的磷酸化水平没有显著变化。**结论:** 本研究发现 $\Delta 42$ PD1与PD1的功能类似, 可能是一种重要的抑制性免疫调节受体。

关键词

程序性细胞死亡受体1, Delta-42程序性细胞死亡受体1, 流式细胞术, 蛋白激酶B

1. 引言

程序性细胞死亡受体 1 (programmed cell death 1, PDCD1, PD1), 是一种重要的抑制性免疫调节受体, 可通过抑制 T 细胞和 B 细胞的活化信号, 而下调机体免疫系统活性, 进而促进自身免疫耐受和阻止自身免疫性疾病的发生[1] [2]。PD1 的异常表达与持续性感染、肿瘤、自身免疫性疾病的发生和发展密切相关, 使其成为相关疾病治疗的有效靶点[3] [4]。近年来, 以 PD1 通路为靶点的中和抗体免疫疗法在恶性肿瘤治疗中显示出显著的疗效, 成为肿瘤治疗领域的研究热点之一[5] [6]。

近年香港大学的一个研究小组发现了 PD1 的一种选择性剪接转录本。与全长 PD1 编码序列相比, 该转录本框内缺失了 42 个碱基, 因此被命名为 $\Delta 42$ PD1 [7]。 $\Delta 42$ PD1 的胞外区比 PD1 缺少 14 个氨基酸, 但二者传递信号的胞内段的氨基酸序列完全相同。然而目前尚不清楚 $\Delta 42$ PD1 是否具有功能, 其胞内段是否也可以传递抑制性信号。本研究分别构建了稳定表达 $\Delta 42$ PD1 和 PD1 的 293T 细胞系, 通过与人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PMBC)混合孵育的方式活化细胞表面 $\Delta 42$ PD1 和 PD1, 发现 $\Delta 42$ PD1 与 PD1 一样, 也可以抑制细胞内 Akt 的磷酸化水平。

2. 材料和方法

2.1. 材料

真核表达质粒 pIRES-PD1、pIRES- $\Delta 42$ PD1 和载体 pIRESpuro 由香港大学陈志伟教授惠赠。293T 细胞由本实验室(深圳市第三人民医院肝病研究所艾滋病研究室)保存。胎牛血清和 DMEM 培养基均购自美国 Gibco 公司。嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司。TRIzol 试剂和转染试剂 Lipofectamine 2000 均购自美国 Invitrogen 公司。限制性核酸内切酶 EcoR I 和 EcoR V, 预染蛋白分子量标准购自 Thermo 公司。DNA 聚合酶 PrimeSTAR、DNA 分子量 Marker (DL2000)和反转录试剂盒(PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis

Kit)均购自大连 TAKARA 公司。质粒 DNA 提取纯化试剂盒购自 Promega 公司。Ficoll 溶液购自 GE 公司。PE 标记磷酸化 AKT 单抗、FITC 标记磷酸化 NF- κ B 单抗和 APC 标记磷酸化 Erk 均购自 Cell Signaling 公司, 羊抗人 PD1 多克隆抗体、PE 或 HRP 标记的驴抗羊 IgG 二抗为美国 R&D 公司产品。

2.2. 方法

2.2.1. 双酶切质粒

分别取重组真核表达质粒 pIRES-PD1、pIRES- Δ 42PD1 和载体 pIRESpuro 各 1 μ g, 在 1.5 mL 离心管中用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *EcoR* V 于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅内反应 2 h, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2.2. 稳定转染

分别取 0.8 μ g 重组质粒 pIRES-PD1 和 pIRES- Δ 42PD1, 于 24 孔板内按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书转染 293T 细胞。24 h 后将细胞转移至 25 cm² 培养瓶中培养, 培养基中加入 1 μ g \cdot mL⁻¹ 嘌呤霉素。培养 2 周后, 通过有限稀释法培养细胞单克隆。

2.2.3. 流式细胞技术

有限稀释法获得单克隆细胞后, 取 2×10^5 个细胞, 100 μ L 流式缓冲液(PBS+2% FBS+0.1% NaN₃)重悬, 加 0.5 μ g 羊抗人 PD1 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 流式缓冲液洗 3 次后, 100 μ L 流式缓冲液中加入 0.2 μ g PE 标记驴抗羊荧光二抗, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 洗涤后用流式细胞仪检测, 筛选出稳定表达目的基因细胞克隆, 分别命名为 293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1。流式细胞术以 293T 细胞作为阴性对照。

2.2.4. RT-PCR

6 孔板内接种 293T、293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1 细胞各 1×10^6 个。培养 24 h 后, 用 TRIzol 试剂裂解细胞, 按照试剂说明书提取细胞总 RNA, 取 1 μ g RNA 为模板进行逆转录合成 cDNA。取 1 μ L cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因(上游引物: 5'-ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTG-3'; 下游引物: 5'-TCAGAGGGGCCAAGAGCAGTGTC-3'), 扩增 GAPDH 内参基因(上游引物: 5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GCC-3'; 下游引物: 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3')反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 98 $^{\circ}$ C 10 s、68 $^{\circ}$ C 60 s, 扩增 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2.5. Western blot

293T、293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1 细胞各取 1×10^6 个, 加入 100 μ L 细胞裂解液, 置冰上裂解 30 min, 1200 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 转移上清至新的 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μ L 还原型(含 DTT)蛋白上样缓冲液(6 \times), 100 $^{\circ}$ C 加热 7 min, 冰上放置 2 min, 取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳和转膜。电转完成后, 将 PVDF 膜浸入 5% 脱脂奶粉中, 室温封闭 60 min; PD1 多克隆抗体(1:200 稀释), 室温孵育 60 min, PBS-T 洗涤, 用 1:2000 HRP 标记的二抗孵育 60 min, PBS-T 洗涤 10 min 3 次后用 ECL 试剂盒进行化学显影。

2.2.6. PBMC 分离

取健康人外周血 10 mL 抗凝血加入到 50 mL 离心管中, 加入 10 mL PBS 混匀; 各取 5 mL Ficoll 溶液加入到 2 个 15 mL 离心管中, 取 10 mL 血液加入到 Ficoll 上层, 800g 离心 20 min; 吸取 PBMC 至新的离心管中, 14 mL 1640 培养基洗涤细胞 2 次; 5 mL 培养基重悬细胞, 计数后备用。

2.2.7. 信号通路磷酸化激酶检测

将 293T、293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1 细胞分别以 1:2、1:10、1:50 的比例与 PBMC 混合, 室温 15 min 后, 1000 rpm 离心 5 min, 流式细胞术检测细胞内 AKT、NF- κ B 和 Erk1/2 的磷酸化水平。

3. 结果

3.1. 稳定表达 $\Delta 42$ PD1 和 PD1 的 293T 细胞株的构建

用 *EcoRI* 和 *EcoR* V 对真核表达质粒 pIRES- $\Delta 42$ PD1 和 pIRES-PD1 进行酶切鉴定, 凝胶电泳后分别在预期的位置看到了 PD1 和 $\Delta 42$ PD1 的条带(图 1(a))。测序结果显示, pIRES-PD1 中 PD1 的序列与 Genbank(NM_005018)中的序列 100%同源, pIRES- $\Delta 42$ PD1 与 PD1 相比缺失了 42 个核苷酸。将 pIRES-PD1 和 pIRES- $\Delta 42$ PD1 分别稳定转染 293T 细胞, 有限稀释法各选出 10 个单细胞克隆, 通过流式细胞术分别筛选出相对高表达目的基因的单细胞克隆, 并分别命名为 293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1。结果如图 1(b)所示, 与 293T 阴性对照(灰色填充)相比, 细胞株 293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1(白色填充)均发生明显右移, 表明目的基因可在 293T 细胞内得到稳定表达和细胞膜定位。为进一步鉴定目的基因的表达, 我们分别提取 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞 RNA 和全细胞蛋白, 分别用 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测目的基因的表达。在内参基因 GAPDH 表达水平相当的情况下, 分别在预期的位置上检测到 $\Delta 42$ PD1 和 PD1 的条带, 而 293T 细胞在相应的位置上并无任何条带(图 1(c)和图 1(d)), 进一步明确了目的基因在 293T 细胞内得到了正确表达。

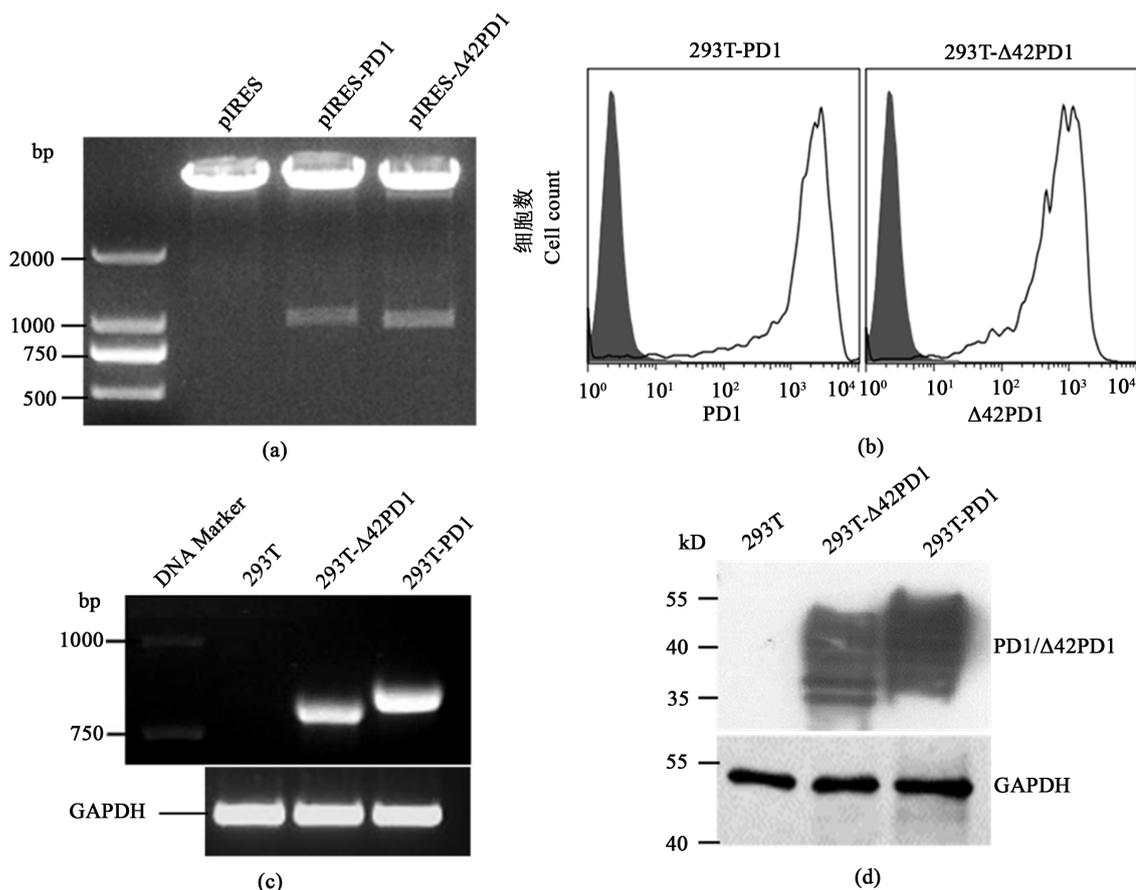


Figure 1. Generation and confirmation of 293 cell lines stably expressing human PD1 and $\Delta 42$ PD1. (a) Double digestion to validate recombinant plasmids; (b) flow cytometrical analysis of cell surface expression of PD1 and $\Delta 42$ PD1; (c) RT-PCR detection of the transcription of PD1 and $\Delta 42$ PD1; (d) western blot detection of the expression of PD1 and $\Delta 42$ PD1.

图 1. 稳定表达 $\Delta 42$ PD1 和 PD1 的 293T 细胞株的构建和鉴定。(a) 双酶切鉴定重组质粒; (b) 流式细胞术分析细胞表面 PD1 和 $\Delta 42$ PD1 的表达; (c) RT-PCR 检测 PD1 和 $\Delta 42$ PD1 的转录; (d) 免疫印迹法检测 PD1 和 $\Delta 42$ PD1 的蛋白表达。

3.2. $\Delta 42$ PD1 的活化下调 293T 细胞 AKT 的磷酸化水平

PD1 的活化可以通过其胞内段抑制 T 细胞 AKT 的磷酸化[8], $\Delta 42$ PD1 胞内段的氨基酸序列与 PD1 的完全相同[9]。为研究 $\Delta 42$ PD1 的胞内段是否具有抑制细胞 AKT 磷酸化的功能, 分别将 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞分别以 1:2、1:10、1:50 的比例与 PBMC 混合, 以激活 $\Delta 42$ PD1 和 PD1, 利用细胞大小和胞内颗粒含量的不同, 流式细胞术可以区分混合细胞中的 PBMC 和 293T 及其衍生细胞(图 2(a)), 进而分析 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞内 AKT 激酶磷酸化水平。结果发现, 293T 与 PBMC 混合后, 其细胞内 AKT 磷酸化水平并没有发生显著变化(图 2(b)), 而 293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 以 1:10 和 1:50 的比例与 PBMC 混合后, 细胞内 AKT 磷酸化水平显著下调, 而 293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞内 AKT 磷酸化水平并无显著性差异(图 2(b)和图 2(c))。

3.3. $\Delta 42$ PD1 的活化不影响 293T 细胞 Erk1/2 和 NF- κ B 的磷酸化水平

除了抑制 PI3K-AKT 信号通路外, PD1 与其配体的结合还能抑制 T 细胞 MAPK 和 NF- κ B 信号通路的激活[8] [9]。为研究 $\Delta 42$ PD1 是否具有类似的功能, 按前述的方法分别将 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞与 PBMC 混合, 以激活 $\Delta 42$ PD1 和 PD1, 用流式细胞术分析 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞内 Erk1/2 和 NF- κ B 的磷酸化水平。结果发现, 受到 PBMC 细胞刺激后, 293T、293T- $\Delta 42$ PD1 和 293T-PD1 细胞内 Erk1/2 磷酸化水平都显著上调, 且三者之间没有显著差别; 而 NF- κ B 的磷酸化水平均未发生显著变化(图 3)。

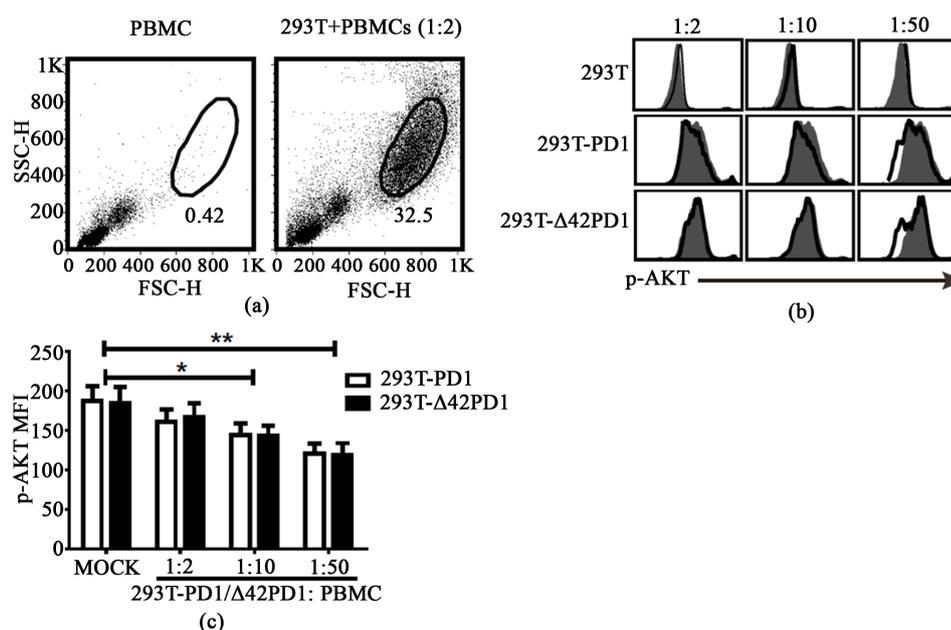


Figure 2. Flow cytometrical analysis of effect of $\Delta 42$ PD1 activation on AKT phosphorylation in 293T cells. (a) Representative dot plot of the flow cytometry gating strategy, selection by FSC and SSC, for 293T and 293T derived cells while mixed with PBMC; (b) 293T and 293T derived cells were either untreated (■) or co-cultured with PMBCs (□) at indicated ratios, followed by flow cytometrical analysis of intracellular level of p-Akt; (c) summary of MFI of p-Akt in human PD1- and $\Delta 42$ PD1-expressing 293T cells following either untreated (MOCK) or co-cultured with PBMCs at various ratios. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2. 流式细胞术分析 $\Delta 42$ PD1 的活化对 293T 细胞 AKT 磷酸化水平的影响。(a) 流式细胞术画门策略, 通过 FSC 和 SSC 从混合细胞中选出 293T 及其衍生细胞; (b) 293T 及其衍生细胞本身(灰色填充)或与 PBMC 按图示的比例共培养(无填充)后, 流式细胞术分析细胞内 p-Akt 水平; (c) 与 PBMC 共培养后, 稳定表达 PD1 或 $\Delta 42$ PD1 的 293T 细胞内 p-Akt 的平均荧光强度的汇总。蛋白表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

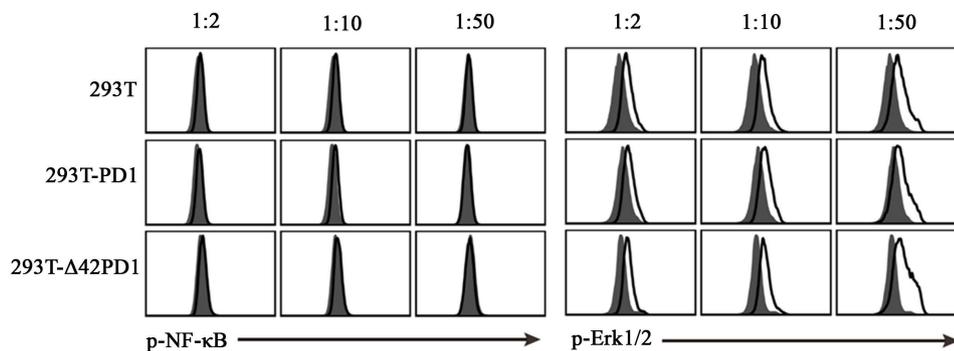


Figure 3. Flow cytometrical analysis of effect of 42PD1 activation on Erk1/2 and NF- κ B phosphorylation in 293T cells
图 3. 流式细胞术分析 Δ 42PD1 的活化对 293T 细胞 Erk1/2 和 NF- κ B 磷酸化水平的影响

4. 讨论

人 PD1 基因位于人 2 号染色体 q37.3, 长约 10 kb, 编码一个相对分子质量约为 55 kDa 的含 288 个氨基酸的跨膜蛋白。PD1 是一种 I 型跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族 CD28/CTLA-4 家族成员, 结构上包含胞外氨基端 IgV 样结构域、跨膜区和胞内区。其 IgV 样结构域与 CTLA-4、CD28 及 ICOS 的 IgV 样结构域具有 21% - 33% 同源性。胞内区含有两个酪氨酸残基, 分别构成免疫受体酪氨酸抑制模体和免疫受体酪氨酸交换模体[10]。PD1 表达于活化的 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、NKT 细胞、B 细胞、单核细胞和树突状细胞。一旦受到其配体 PD-L1 (B7-H1) 或 PD-L2 (B7-DC) 的刺激, PD1 胞内段通过免疫受体酪氨酸交换模体的磷酸化, 招募 SHP-2, 进一步在不同类型的细胞内通过不同的机制抑制 AKT, NF- κ B 和 Erk 等信号通路的激活, 进而阻断淋巴细胞的活化和细胞因子的释放, 最终发挥免疫抑制功能[3] [10] [14]。

1999 年, 一项基于 PD1 基因敲除 C57BL/6 小鼠的研究发现, 缺失 PD1 的实验小鼠发生肾小球肾炎、关节炎、狼疮样疾病、心脏病等一系列自身免疫性疾病, 并于 5 周龄开始出现死亡, 首次揭示了 PD1 缺陷与自身免疫的关系[11], 使 PD1 逐渐成为基础免疫学、肿瘤免疫学、感染免疫学、移植免疫学等多个领域的研究热点。目前已经发现人类 PD1 基因的 30 多个单核苷酸突变, 其中多个等位基因被证实与系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、I 型糖尿病和进展型多发性硬化的发生相关[7]。多种肿瘤细胞能够通过表达 PD1 的配体抑制细胞毒性 CD8+T 细胞的功能, 从而逃逸免疫系统的杀伤。因此通过阻断 PD1 通路而增强细胞毒性 CD8+T 细胞的功能, 以治疗肿瘤的策略的可行性, 不断被不同的实验室通过不同的方法而证实[12] [13]。此外, 在慢性持续性病毒感染过程中, 病毒特异性 CD8+T 细胞因受到病毒抗原的长期刺激而高表达 PD1, 使其功能受损, 不能有效清除病毒。而阻断 PD1 通路能够使病毒特异性 CD8+T 细胞保持杀伤功能, 促进病毒的清除[14] [15]。

与 PD1 相比, Δ 42PD1 在胞外区氨基端缺少了 14 个氨基酸, 却导致其不能与 PD1 的配体(PD-L1 和 PD-L2)相互结合, 但却能刺激人 PBMC 分泌 IL-1、IL-6、TNF α 等炎症性细胞因子[7], 表明在 PBMC 中的某类细胞表面存在 Δ 42PD1 的未知配体。然而, 由于目前还未鉴定出 Δ 42PD1 的配体, 不能以纯化的配体刺激 Δ 42PD1, 进而研究其信号传导功能。为探索 Δ 42PD1 胞内区是否具有与 PD1 相同的传递抑制性信号的功能, 本研究构建了稳定表达 Δ 42PD1 和 PD1 的 293T 细胞系, 并将其与表达 Δ 42PD1 未知配体的 PBMC 细胞混合, 然后分析 Δ 42PD1 与其配体的相互结合对 293T 细胞内 PI3K-AKT、MAPK 和 NF- κ B 信号通路的影响。因 PD-L1 广泛表达免疫细胞表面, 所以在本研究以 293T-PD1 为系统阳性对照, 以 293T 为系统阴性对照。293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1 与 PBMC 混合后, NF- κ B 信号通路并没有显著被抑制, MAPK 信号通路不但没有被抑制, 反而被激活。可能是 PBMC 表面其它分子激活了 293T 细胞的 NF- κ B 和 Erk 信号通路, 导致 PD1 和 Δ 42PD1 的功能被掩盖; 也有可能是 293T 细胞与 T 细胞基因表达背景和信号通

路活化水平的差异, 因为 PD1 抑制 NF- κ B 和 Erk 信号通路的结论主要来源于 T 细胞。与 PBMC 混合后, 293T 细胞内 AKT 磷酸化水平不变的情况下, 293T-PD1 和 293T- Δ 42PD1 细胞内 AKT 磷酸化水平显著下调, 表明 Δ 42PD1 在与其配体结合后也可以向细胞内传递抑制性信号, 可能具有重要的免疫负调控的功能。

基金项目

国家自然科学基金(31500750), 广东省自然科学基金(2016A030313030), 深圳市科技创新基金(JCYJ20140411111718169, JCYJ20150402111430650)和深圳市医药卫生三名工程资助项目。

参考文献 (References)

- [1] Fife, B.T. and Pauken, K.E. (2011) The Role of the PD-1 Pathway in Autoimmunity and Peripheral Tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1**, 677-704. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x>
- [2] Riella, L.V., Paterson, A.M., Sharpe, A.H., *et al.* (2012) Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response. *American Journal of Transplantation*, **12**, 2575-2587. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x>
- [3] Dai, S., Jia, R., Zhang, X., *et al.* (2014) The PD-1/PD-Ls Pathway and Autoimmune Diseases. *Cellular Immunology*, **290**, 72-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.006>
- [4] Pedoeem, A., Azoulay-Alfaguter, I., Strazza, M., *et al.* (2014) Programmed Death-1 Pathway in Cancer and Autoimmunity. *Clinical Immunology*, **153**, 145-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2014.04.010>
- [5] Zheng, P. and Zhou, Z. (2015) Human Cancer Immunotherapy with PD-1/PD-L1 Blockade. *Biomark Cancer*, **20**, 15-18. <http://dx.doi.org/10.4137/BIC.S29325>
- [6] Schmid-Bindert, G. and Jiang, T. (2015) First-Line Nivolumab (anti-PD-1) Monotherapy in Advanced NSCLC: The Story of Immune Checkpoint Inhibitors and “the Sorcerers Apprentice”. *Translational Lung Cancer Research*, **4**, 215-216. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.12>
- [7] Zhou, J., Cheung, A.K., Liu, H., *et al.* (2013) Potentiating Functional Antigen-Specific CD8(+) T Cell Immunity by a Novel PD1 Isoform-Based Fusion DNA Vaccine. *Molecular Therapy*, **21**, 1445-1455. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2013.63>
- [8] Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., *et al.* (2012) Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Science Signaling*, **5**, ra46. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2002796>
- [9] Karyampudi L., Lamichhane, P., Krempsi, J., *et al.* (2016) PD-1 Blunts the Function of Ovarian Tumor-Infiltrating Dendritic Cells by Inactivating NF- κ B. *Cancer Research*, **76**, 239-250. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0748>
- [10] Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., *et al.* (1999) Development of Lupus-Like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity*, **11**, 141-151. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)
- [11] Zamani, M.R., Asbagh, F.A., Massoud, A.H., *et al.* (2015) Association between a PD-1 Gene Polymorphism and Antisperm Antibody-Related Infertility in Iranian Men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **32**, 103-106. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-014-0371-4>
- [12] Fankhauser, C.D., Curioni-Fontecedro, A., Allmann, V., *et al.* (2015) Frequent PD-L1 Expression in Testicular Germ Cell Tumors. *British Journal of Cancer*, **113**, 411-413. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.244>
- [13] Ascierto, P.A. and Marincola, F.M. (2015) 2015: The Year of Anti-PD-1/PD-L1s against Melanoma and Beyond. *EBioMedicine*, **2**, 92-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.01.011>
- [14] Velu, V., Shetty, R.D., Larsson, M., *et al.* (2015) Role of PD-1 Co-Inhibitory Pathway in HIV Infection and Potential Therapeutic Options. *Retrovirology*, **12**, 182-190. <http://dx.doi.org/10.1186/s12977-015-0144-x>
- [15] Owusu Sekyere, S., Suneetha, P.V., Kraft, A.R., *et al.* (2015) A Heterogeneous Hierarchy of Co-Regulatory Receptors Regulates Exhaustion of HCV-Specific CD8 T Cells in Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Hepatology*, **62**, 31-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.008>

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>