论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1190-04

重组 AdPD-L1 腺病毒的构建表达及鉴定

丁涵露[1],吴雄飞[1],高闻达[2],贺伟峰[3],张晓容[3],吴 军[3] (第三军医大学西南医院:[1] 全军泌尿外科中心肾科,[3] 全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038; [2]Department of Medicine, Division of Immunology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA)

提 要: 目的 构建程序性死亡配体-1(PD-L1)重组腺病毒载体,以期用于体内实验研究。**方法** 酶切含有小鼠全长 PD-L1 cDNA 的 pcDNA3.1/PD-L1 质粒,亚克隆到穿梭质粒 pAdtrack-CMV 上,在 BJ5183 细胞内和 AdEasy-1 同源重组,筛选阳性克隆,酶切、测序鉴定正确,线性化后脂质体法转染 293 细胞进行包装、扩增,利用报告基因 EGFP 对病毒滴度进行监测,氯化铯密度梯度离心纯化病毒。PCR、Western blot 鉴定 AdPD-L1 感染 293 细胞后 PD-L1 的表达,同时进行野生型腺病毒的检测和 PD-L1 在混合淋巴细胞反应中的作用。**结果** 测序、酶切证实 PD-L1 基因重组腺病毒载体构建成功。RT-PCR、Western blot 检测 AdPD-L1 感染的 293 细胞,均有 PD-L1 的表达。无野生型腺病毒的产生,PD-L1 能显著抑制小鼠混合淋巴增殖反应。**结论** 成功构建了含小鼠 PD-L1 基因的重组腺病毒载体,这种膜结合性的 PD-L1 与其相应受体结合后,对 T 细胞可起到负性调控的作用,为下一步体内基因治疗实验奠定了基础。

关键词: PD-L1;腺病毒;基因治疗
中图法分类号: R681; R373; R392.13; R394-33 **文献标识码**: A

Construction, expression and identification of recombinant adenovirus AdPD-L1

DING Han-lu[1], WU Xiong-fei[1], GAO Wen-da[2], HE Wei-feng[3], ZHANG Xiao-rong[3], WU Jun[3] ([1]Department of Kidney, Urinary Surgery Research Center, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Medicine, Division of Immunology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA)

Abstract: Objective To construct a recombinant adenovirus encoding for Programmed Death Ligand -1 (PD-L1) for future gene therapy *in vivo*. **Methods** Full-length mouse PD-L1 cDNA linked with an internal ribosome entry site (IRES)-EGFP cassette was subcloned into pAdtrack-CMV shuttle plasmid. The product was linearized to mediate homologous recombination with AdEasy-1 vector in BJ5183 host bacteria. The positive clone was identified by restriction endonuclease digestion and further confirmed by sequencing. The recombined adenovirus DNA was transfected into 293 cells for packaging and amplification of AdPD-L1 virus, which was purified by CsCl density gradient centrifugation. The expression of PD-L1 was monitored by EGFP fluorescence in infected cells. **Results** After transfection with adenovirus DNA, infectious virus was only produced to cause cytopathic effect in the permissive cell line 293 but not in the non-permissive cell line HeLa, confirming only replication-defective but not wild type virus was generated. The specific expression of mouse PD-L1 was verified by RT-PCR and Western blotting in 293 cell after infection with AdPD-L1, but not Ad.EGFP, a similarly constructed control virus. AdPD-L1, but not Ad.EGFP, significantly inhibited mouse mixed leukocyte reaction. **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant adenovirus AdPD-L1 that suppresses T cell response *in vitro*. The virus will be useful to enforce negative co-stimulation *via* membrane-anchored PD-L1 to the unwanted T cell response in animal models of disease *in vivo*.

Key words: programmed death ligand-1; adenovirus; gene therapy

如何在免疫反应的起始部位和效应部位抑制 T 细胞的活性是治疗狼疮性肾炎的重要策略。PD-L1 (programmed death ligand-1)是 B7 家族的一员[1],其受体 PD-1(programmed death-1)分子是免疫球蛋白超家族激活诱导的抑制性受体,PD-1 通过其胞浆区的两个酪氨酸残基与下游的信号分子作用而发挥对初次免疫应答和记忆性、效应性 T 淋巴细胞功能的负性调控[2]。我们前期的实验,发现 PD-L1-PD-1 信号系统参与了人狼疮性肾炎的发病[3],因此推测,增强 PD-L1 在狼疮性肾炎体内的表达,可能会有助于狼疮性肾炎的治疗。本实验拟构建小鼠 PD-L1 单基因表达的腺病毒穿梭载体,利用同源重组将 PD-L1 单基因融合到 V 型腺病毒

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400214)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400214)
作者简介:丁涵露(1970-),女,山东省日照市人,硕士,主治医师,主要从事狼疮性肾炎的发病机制及治疗方面的研究,发表论文 7 篇,现在大坪医院野战外科研究所肾内科。电话:(023)68757446
通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188
收稿日期:2005-03-14;**修回日期**:2005-05-04

载体基因组中，再通过脂质体转染，将构建好的重组腺病毒质粒转染 293 细胞，包装成腺病毒，筛选能产生高滴度重组腺病毒的 293 细胞，并对其进行 RT-PCR、Western blot、安全性、病毒滴度、活性等检测，以期为 BXSB 狼疮鼠体内基因治疗奠定基础。

1　材料与方法

1.1　质粒、菌株和主要试剂

含小鼠 PD-L1 全长 cDNA 的质粒 pcDNA3.1/PD-L1 由美国哈佛大学医学院的 Wenda Gao 博士惠赠。pAdtrack-CMV、AdEasy-1、菌种 BJ5183 购自 Strategene 公司。大肠杆菌 DH5 由本实验室保存。质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司，限制性内切酶及连接体系购自 Takara 公司，lipofectamin™ 2000 脂质体转染试剂盒购自 Roche 公司，DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司。蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司。大鼠抗小鼠 PD-L1 单克隆抗体购自 Ebioscience 公司，辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgG 及 DAB 显色系统购自北京中山公司。

1.2　腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV/PD-L1 的构建

Not Ⅰ和 *Hind* Ⅲ分别双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdtrack-CMV 和 pcDNA3.1/PD-L1，凝胶回收 PD-L1 片断和线性化的 pAdtrack-CMV，高效连接液连接（22 ℃，3 h），转化 DH5α 感受态细菌，在卡那霉素抗性的 LB 平板上培养过夜，挑选转化的菌落，提取质粒，*Not* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 双酶切筛选并鉴定阳性克隆，同时送检上海生物工程公司测序分析。

1.3　细菌内同源重组构建重组腺病毒质粒 AdPD-L1

小量提取 pAdtrack-CMV/PD-L1 质粒，取 1 μg 用 *Pme* Ⅰ线性化，将已转化腺病毒基因组质粒 AdEasy-1 的 BJ5183 细胞制成电感受态细胞，按照 2∶40 μl 体积比混匀后电穿孔转化（BIORAD 公司，2 500 V，200 Ω，25 μF）。转化液在 SOC 培养液中震摇孵育 1 h 后涂布于卡那霉素抗性的 LB 平板上过夜培养，挑选较小的菌落震摇后抽提质粒，琼脂糖凝胶电泳初筛重组体，再用 *Bstx* Ⅰ、*Pac* Ⅰ酶切鉴定。

1.4　重组腺病毒 AdPD-L1 的包装、扩增和纯化

Pac Ⅰ线性化 AdPD-L1，乙醇、醋酸钠沉淀，700 ml/L 乙醇漂洗后重新溶解在 20 μl 的消毒去离子水中。配制 A 液（质粒 DNA 4 μg + 无血清 DMEM 至 250 μl）和 B 液（10 μl lipofectamin™ 2000 以无血清 DMEM 稀释至 250 μl），A、B 混合，37 ℃反应 2 h。PBS 漂洗细胞后每孔加入 2 ml 无血清培养液，将混合物轻倾于培养孔中轻轻混合，继续培养 8 h 后更换完全培养基。直至 90% 以上 293 细胞出现细胞病变（cytopathic effect，CPE）。收集上清继续感染 293 细胞以扩增病毒。重组腺病毒 AdPD-L1 纯化采用氯化铯密度梯度离心法。收集后的病毒层，0.22 μm 无菌过滤后小份分装，－80 ℃保存。

1.5　重组腺病毒 AdPD-L1 转染 293 细胞后 RT-PCR 鉴定

Trizol 试剂提取重组腺病毒感染 293 细胞和未感染 293 细胞的 RNA 取 1 μg 细胞总 RNA 进行逆转录反应，总反应体积为 20 μl，37 ℃反应 1 h，95 ℃ 5min，灭活逆转录酶。PCR 扩增 PD-L1 片断的引物为：P1：5′-GAGGAATTCACCATGAAGATA-3′；P2：5′-CATCAGATCTATGTGAGTCCTGTT-3′，扩增长度为 293 bp；以 β-actin 作为内参照，正义序列：5′-TCCCTCAAGATTGTCAGGAA-3′，反义序列：3′-AGATCCACAACGGATACATT-5′，扩增长度为 390 bp。PCR 扩增条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 1 min，51 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，35 个循环，72 ℃末轮循环 10 min。

1.6　重组腺病毒 AdPD-L1 转染 293 细胞后 Western blot 鉴定

RIPA 提取 AdPD-L1 感染 293 细胞和未感染 293 细胞的总蛋白，Bradford 法定量蛋白，变性后行 SDS-PAGE 电泳，半干法（BIORAD）转膜，条件为 0.25 mA/cm^2 恒流，30 min。大鼠抗小鼠 PD-L1 单抗、HRP 标记的抗大鼠 IgG 先后杂交反应后 DAB 显色。

1.7　重组腺病毒 AdPD-L1 的病毒滴度测定

根据文献[4]以 CPE 法进行测定以下式计算所测样本病毒颗粒的滴度：

腺病毒滴度 = 稀释倍数 × 稀释度$^{(\text{CPE阳性细胞孔数}-4)/8}$

1.8　野生型病毒的检测

Hela 细胞和 293 细胞分别接种于两个 24 孔培养板中，培养 24 h 后弃培养基，加入感染复数（multiplicity of infection，MOI）分别为 100、200 和 400 的重组腺病毒转染 293 细胞上清，100 μl/孔，以培养液做空白对照，将细胞置于细胞培养箱中培养，每 15 分钟轻轻摇动 1 次，使均匀接触所有细胞，加入 2 ml 5% FCS-DMEM 细胞培养液继续培养。每天在倒置显微镜下与对照组对比观察细胞形态变化及生长情况，直到第 4 天。

1.9　PD-L1 在混合淋巴细胞培养反应（mixed lymphocyte reaction，MLR）中的作用

通过检测 PD-L1 在 MLR 中的作用，测定 AdEasy-PD-L1 转染 293 细胞后的培养液上清中 PD-L1 的生物学活性（MTT 法），参照文献[5]并加以改进进行。实验分组：阴性对照组：10% FCS 的 DMEM；阳性对照组：10% FCS 的 DMEM + BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠的脾脏淋巴细胞各 5×10^5/0.1 ml；PD-L1 组：分 20、60 μl 两个剂量组，其余同阳性对照组。操作步骤：无菌取 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠脾脏磨碎，220 目尼龙网过滤，用 Tris-NH_4Cl 缓冲液溶解红细胞，然后用 DMEM 培养液洗 3 次，用台盼蓝拒染试验检测细胞活性率在 95% 以上。BALB/c 小鼠脾细胞经 25 mg/L 丝裂霉素 C 37 ℃处理 30 min，洗涤 3 次作刺激细胞。取上述分离的 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠的脾脏淋巴细胞，加至 96 孔细胞培养板，于 37 ℃ 5% CO_2 孵育 4 d，孵育结束前 6 h 加入 5 mg/ml 的 MTT，继续培养 4 h，然后离心，甩去上清，加入溶解液（100% 二甲亚砜），150 μl/孔，轻轻震荡，待 MTT 结晶完全溶解，立即在 HTS700 型酶标仪读取 570 nm 处光密度值[*D*(570)]，以反映 MLR 培养体系中淋巴细胞的数量。结果以 3 孔均值表示。抑制率（%）= 1 －[实验组 *D*(570)值 － 阴性对照组 *D*(570)值]/[阳性对照组 *D*(570)值 － 阴性对照组 *D*(570)值] × 100%。

1.10　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 *t* 检验及方差分析。

2　结果

2.1　pcDNA3.1-PD-L1 质粒和 pAdtrack 质粒的酶切鉴定

将 pcDNA3.1-PD-L1 质粒和 pAdtrack 质粒用 *Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，分别得到 PD-L1 基因 873 bp 片段和 pAdtrack 片段 9.2 kb。

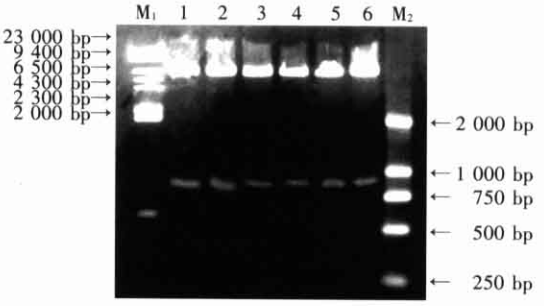
2.2　pcDNA3.1-PD-L1 质粒序列测定结果

进行 DNA 双向测序，经测序结果分析软件及同源性比较分析证实，与文献[6]报道 PD-L1 cDNA 序列一致。表明我们已

成功获得 PD-L1 cDNA。

2.3 pAdtrack-CMV-PD-L1 穿梭质粒的构建和鉴定

将 PD-L1 cDNA 用 *Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 双酶切所得 PD-L1 基因的 873 bp 片段，定向插入用同样双酶切的穿梭质粒 pAdtrack-CMV，分别提取 6 个阳性转化菌落质粒，经 *Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 酶切鉴定，均得到 9.2 kb 和 873 bp 两个片段，证明插入片段正确(图 1)，将阳性质粒命名为 pAdtrack-CMV-PD-L1。经测序证明，与文献报道的 PD-L1 cDNA 序列一致，表明构建成功。



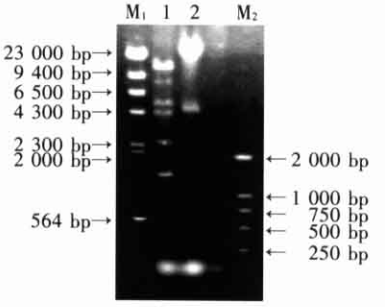
M_1, M_2: DNA marker; 1 – 6: pAdtrack-PD-L1

图 1 *Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ 酶切鉴定 pAdtrack-PD-L1

Fig 1 Restriction enzyme digestion of pAdtrack-PD-L1

2.4 PD-L1 重组腺病毒基因组质粒的构建和鉴定

构建成功的 pAdtrack-CMV-PD-L1 质粒经 *Pme* Ⅰ线性化后，电转入 BJ5138-AD-1 细菌中，与其内的 AdEasy-1 进行同源重组。*Bstx* Ⅰ酶切后分别可见 12、8.1、5.2、4.25、2.4、1.4 kb 电泳带 6 条，经 *Pac* Ⅰ酶切后，可见 4.5 kb 和 23 kb 的电泳带各 1 条(图 2)，证明同源重组成功。重组后得到最终所需要的腺病毒重组质粒将其命名为 AdEasy-PD-L1。



M_1, M_2: DNA marker; 1: AdEasy-PD-L1 + *Bstx* Ⅰ; 2: pAdEasy-PD-L1 + *Pac* Ⅰ

图 2 *Bstx* Ⅰ、*Pac* Ⅰ酶切鉴定 AdEasy-PD-L_1

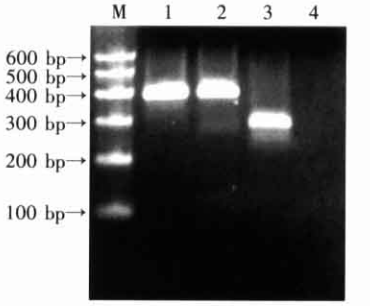
Fig 2 Restriction enzyme digestion of AdEasy-PD-L_1

2.5 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒感染 293 细胞的鉴定

2.5.1 观察 293 包装细胞的病变情况 脂质体包裹 AdEasy-PD-L1 同源重组腺病毒基因组质粒转染 293 包装细胞 1 ~ 2 d 后，光镜下观察到空斑形成，细胞变圆、肿胀、脱壁，细胞核变大等病变。

2.5.2 增强型绿色荧光(EGFP)的表达情况 荧光显微镜下观察，在绿色荧光激发通道 EGEP 受激发，表达 EGFP 基因的细胞发出明亮的绿色荧光。重组腺病毒感染的 293 细胞和 pAdΦ-EGFP 感染的 293 细胞，在培养 1 ~ 2 d 后有 EGFP 表达，并且逐渐增多。

2.5.3 RT-PCR 鉴定 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒感染的 293 细胞，RT-PCR 检测显示有 1 条 293 bp 条带，而 pAdΦ-EGFP 感染的 293 细胞的相应位置无特异条带，表明该条带系 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒感染 293 细胞后产生的 PD-L1(图 3)。

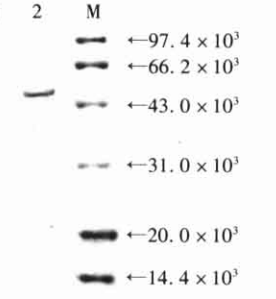


M: DNA marker; 1-2: β-actin; 3: PD-L1 mRNA; 4: No PD-L1 mRNA

图 3 RT-PCR 鉴定 AdPD-L1/AdΦ 转染的 293 细胞中 PD-L1 的表达

Fig 3 Identification of PD-L1 mRNA expression by RT-PCR

2.5.4 Western blot 法鉴定 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒感染的 293 细胞，用 Western blot 检测显示有 1 条能与抗小鼠 PD-L1 单抗特异性结合的蛋白免疫印迹条带，而 pAdΦ-EGFP 感染的 293 细胞的相应位置无特异条带，表明该蛋白条带系 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒感染 293 细胞后产生的 PD-L1(图 4)。



M: Marker; 1: No PD-L1; 2: PD-L1

图 4 Western blot 鉴定 AdPD-L1/AdΦ 转染的 293 细胞中 PD-L1 的表达

Fig 4 Expression of PD-L1 by Western blotting

2.6 重组腺病毒的纯化

大量扩增重组腺病毒并反复冻融 293 细胞 3 次，氯化铯密度梯度离心法进行纯化。第 1 次离心后，由上至下分 4 层：白色粘稠的脂质层，淡粉色的培养基层，白色边界较薄的蛋白层，乳白色的病毒层，第 2 次离心后可见清晰的两层：边界略微模糊的蛋白质层和乳白色分界清晰半透明的病毒层。

2.7 重组腺病毒滴度

实验显示，可见 60 个阳性孔(发生细胞病变率大于 50%)，故其滴度为：$10^6 \times 3^{(60-4)/8} = 2.2 \times 10^9$ PFU/ml。

2.8 野生型病毒的检测

所有样品对 Hela 细胞的生长均无明显影响，而所有的 293 细胞基本全死亡，表明无野生型病毒存在。

2.9　AdEasy-PD-L1 对小鼠混合淋巴培养反应的影响

在 BALB/c 小鼠脾脏混合淋巴细胞反应体系中，加入 20 μl 和 40 μl 感染了 AdEasy-PD-L1 的 293 细胞上清，以 pAdΦ-EGFP 转染的 293 细胞上清作为阴性对照。结果表明，加入 40 μl 感染 293 细胞上清，能显著抑制小鼠混合淋巴增殖反应，抑制率为 86%；而加入 20 μl 感染 293 细胞上清，抑制率为 20%；同样体积的空载体 pAdΦ-EGFP 转染的 293 细胞上清，则无此作用，经单因素方差分析，结果有统计学意义（表 1）。

表 1　PD-L1 对小鼠混合淋巴细胞增殖反应的抑制作用

Tab 1　The inhibitory effect of PD-L1 on the MRL

Group	D(570)	Inhibition rate(%)
Negative	0.13 ± 0.010	—
Positive	0.75 ± 0.064	—
20 μl	0.69 ± 0.071	9
40 μl	0.38 ± 0.069*	50

*：$P<0.01$，*vs* positive

3　讨论

3.1　基因转染载体的选择

目前基因治疗中应用最主要、广泛的生物病毒载体有重组逆转录病毒载体及重组腺病毒载体。重组腺病毒载体比逆转录病毒载体具有更高的感染力，宿主范围广，且既能感染处于分裂增殖期的细胞，又能感染静止期的细胞。而且缺陷型重组腺病毒载体由于不整合入细胞染色体基因组，从而具有毒性低和安全性高的优点，另外还具有病毒滴度高和装载容量大等特点[7]，已被美国 FDA 批准作为基因治疗载体应用于临床试验[8]。所以本研究选择构建重组腺病毒载体来表达我们的目的基因 PD-L1，并希望通过其高感染能力，直接将 PD-L1 表达单位导入 BXSB 狼疮鼠体内，以期达到缓解病情的作用。

3.2　AdPD-L1 重组腺病毒构建方法的优化

再将该质粒与腺病毒载体在包装细胞中同源重组。本实验采用的 AdEasy 腺病毒系统有以下优点[9]：①骨架载体 AdEasy-1 含有大部分的腺病毒基因组 DNA，呈超螺旋状态，免去了酶切处理的步骤；②已转化了 AdEasy 质粒的 BJ5183 细胞更方便进行细菌内同源重组，免去了在真核细胞内重组筛选复杂、费时的缺点；③利用了在细菌内高效同源重组原理，在重组病毒形成的过程中免去了连接的步骤；④载体可插入 10 000 bp 以下的片断，并可以在 1 个载体中插入多个片断进行同时表达；⑤在穿梭质粒中加入了常见的酶切位点，便于克隆；⑥整个实验操作可在 3 周内完成，而传统的腺病毒载体构建需要 3 个月的时间。

3.3　AdEasy-PD-L1 重组腺病毒的包装、鉴定方法的选择

为验证重组腺病毒中是否带有目的基因，进行了以下鉴定：①pAdtrack-PD-L1 的酶切和测序结果证实了目的基因 PD-L1 正确插入到穿梭质粒；②AdEasy-PD-L1 经 *Pac* Ⅰ酶切后，可见 4.5 kb 和 23 kb 两条带，Bstx Ⅰ酶切后分别可见 12、8.1、5.2、4.25、2.4、1.4 kb 电泳带 6 条，说明重组成功；③本实验构建病毒载体的穿梭质粒 pAdtrack-CMV 中的构建元件已插入 EGFP 表达盒，重组腺病毒转染 293 细胞后，通过荧光显微镜观察，可见 293 细胞有绿色荧光表达，并逐渐出现生长停止和空斑形成，证明 AdEasy-PD-L1 已包装入 293 细胞；④通过 RT-PCR 和 Western blot 方法证明了 AdEasy-PD-L1 转染 293 细胞后有 PD-L1 核酸和蛋白的表达。

3.4　AdEasy-PD-L1 重组腺病毒的安全性和活性检测

理论上，本研究构建的 AdEasy-PD-L1 为复制缺陷型，在非 293 类细胞中不能复制，因此对这些靶细胞毒性很小。而且在本研究中，用原代 AdEasy-PD-L1 重组腺病毒载体感染液转染非包装细胞 Hela 细胞后，对 Hela 细胞无明显影响，未检测到有感染能力的腺病毒产生，表明无野生型病毒存在，从而为基因治疗的安全性提供了保障。通过观察 AdEasy-PD-L1 对小鼠混合淋巴增殖反应的影响，证明了 AdEasy-PD-L1 是有活性的，膜结合性的 PD-L1 与其受体 PD-1 结合后，可起到增强 PD-1 功能的作用，这为下一步体内基因治疗实验奠定了基础。

参考文献：

[1] Coyle A J, Gutierrez Ramos J C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function[J]. Nat Immonol, 2001, 2(3): 203 - 209.

[2] Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, *et al*. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC[J]. J Immunol, 2002,169(10): 5538 - 5545.

[3] Hanlu Ding, Xiongfei Wu, Wenda Gao. Po-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cell and suppresses T cell cytokine synthesis[J]. Clin Immunol, 2005, 115(2): 184 - 191.

[4] Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, *et al*. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu→S alpha and sequential S mu→S gamma, S gamma→S alpha DNA recombination[J]. J Immunol, 1998, 161(10): 5217 - 5225.

[5] Ruiz P, Nassiri M, Gregorian S, *et al*. Neonatal transplantation tolerance is associated with a systemic reduction in memory cells, altered chimeric cell phenotype, and modified eicosanoid and cytokine production[J]. Transplantation, 1996, 61(7): 1198 - 1205.

[6] Dong H, Zhu G, Tamada K, *et al*. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic $CD8^+$ T lymphocytes[J]. Immunity, 2004, 20(3): 327 - 336.

[7] Seino K, Kayagaki N, Okumura K, *et al*. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand[J]. Nat Med, 1997, 3(2): 165 - 170.

[8] Efrat S, Fejer G, Brownlee M, *et al*. Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(15): 6947 - 6951.

[9] He T C, Zhou S, da Costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(3): 2509 - 2514.

（编辑　陈聪连）