

# B7-H1 基因修饰的调节性 DC 对小鼠甲状腺相关性眼病的治疗作用

陈华新<sup>1\*</sup>, 邵伯棕<sup>2\*</sup>, 陈宣辰<sup>2</sup>, 周维明<sup>3</sup>, 张意<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(430070)中国湖北省武汉市,广州军区武汉总医院眼科;<sup>2</sup>(200433)中国上海市,第二军医大学研究生管理大队临床十队;<sup>3</sup>(200433)中国上海市,第二军医大学免疫学教研室  
作者简介:陈华新,男,硕士,主治医师,研究方向:眼整形与眼眶病;邵伯棕,第二军医大学研究生管理大队临床大队在读硕士研究生,研究方向:临床医学。

\* 作者陈华新和邵伯棕对本文贡献一致。

通讯作者:张意,博士,讲师,研究方向:细胞免疫学。  
zhangyikulang@sohu.com

收稿日期:2014-03-19 修回日期:2014-08-22

## Inhibition effect of B7-H1 gene-modified regulatory dendritic cells on thyroid-associated ophthalmopathy in mice

Hua-Xin Chen<sup>1\*</sup>, Bo-Zong Shao<sup>2\*</sup>, Xuan-Chen Chen<sup>2</sup>, Wei-Ming Zhou<sup>3</sup>, Yi Zhang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command of Chinese PLA, Wuhan 430070, Hubei Province, China; <sup>2</sup>The 10<sup>th</sup> Company of Graduate Management Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; <sup>3</sup>Department of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Co-first authors: Hua-Xin Chen and Bo-Zong Shao

Correspondence to: Yi Zhang, Department of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China.  
zhangyikulang@sohu.com

Received:2014-03-19 Accepted:2014-08-22

### Abstract

• AIM: To construct adenovirus vector expressing mice B7-H1 gene, transfect dendritic cells (DCs), and to study the therapeutic effect of modified DC on thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) in mice.

• METHODS: We designed and constructed B7-H1 gene adenovirus expression vector, and transfected DCs from mouse bone marrow, tested the phenotype and function of modified DCs, identified its negative regulation to immune responses. The modified DCs were infected the sicked mice. And then the immunotherapeutic effect of modified DCs to TAO were tested.

• RESULTS: B7-H1 gene adenovirus vector was constructed and transfected DCs from bone marrow. The titer of the recombinant adenovirus was  $1.8 \times 10^9$  PFU/mL. B7-H1 gene modified DCs characteristics of regulatory DCs, could inhibit positive immune responses. The

inhibition proceeding of TAO into mice infected modified DCs, was obviously prior to the control mice. The gene modified DCs, maybe become the new immunotherapy biological agent to thy TAO.

• CONCLUSION: We constructed the expression of mouse B7-H1 gene adenovirus expressed vector successfully, transfected DCs, by vector have properties of regulatory DCs, inhibiting positive immune response and the occurrence and development of thyroid eye disease. Gene modified DCs, reveal potent to the treatment of thyroid eye disease.

• KEYWORDS: B7-H1; dendritic cells; adenovirus vector; thyroid-associated ophthalmopathy; negative immunoregulation

Citation: Chen HX, Shao BZ, Chen XC, et al. Inhibition effect of B7-H1 gene-modified regulatory dendritic cells on thyroid-associated ophthalmopathy in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(10):1765-1769

### 摘要

目的:构建表达小鼠 B7-H1 基因的腺病毒载体,转染修饰树突状细胞,并研究该细胞对小鼠甲状腺相关性眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)的治疗效应。

方法:设计并构建小鼠 B7-H1 的腺病毒表达载体,转染小鼠骨髓来源的树突状细胞,检测该树突状细胞的表型和功能,鉴定其对免疫应答的负向调控能力,采用实验动物模型观察 B7-H1 基因修饰的树突状细胞在体内治疗 TAO 的效果。

结果:成功构建出具有良好 B7-H1 表达效力的腺病毒载体,病毒滴度为  $1.8 \times 10^9$  PFU/mL,转染腺病毒的小鼠骨髓来源的树突状细胞表现出调节性树突状细胞性能,能够负向抑制免疫应答;在动物模型中使用该型树突状细胞可以有效控制甲状腺眼病的发生发展。

结论:成功构建了表达小鼠 B7-H1 基因的腺病毒表达载体,转染了该载体的树突状细胞具有调节性树突状细胞的性能,抑制正向免疫应答,能够有效抑制甲状腺眼病的发生发展,揭示基因修饰的树突状细胞可能成为治疗甲状腺眼病的潜在生物制剂。

关键词: B7-H1; 树突状细胞; 腺病毒; 甲状腺相关性眼病; 负向免疫调控

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.06

引用:陈华新,邵伯棕,陈宣辰,等. B7-H1 基因修饰的调节性 DC 对小鼠甲状腺相关性眼病的治疗作用. 国际眼科杂志 2014; 14(10):1765-1769

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最重要的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APC),在免疫应答中占有独特地位<sup>[1,2]</sup>。在多种DC类型中,调节性DC是具有免疫负向调控功能的DC,能够抑制免疫应答反应,不仅诱导T细胞无能,还能诱生调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)<sup>[3,4]</sup>,高表达MHC I类、II类分子,极低表达共刺激分子,并拮抗IL-12、IFN- $\gamma$ 等促进DC成熟的信号,表现出未成熟DC的表型特征。调节性DC已被广泛认为可以在器官移植和自身免疫疾病等领域发挥治疗作用<sup>[5]</sup>。程序化死亡配体1(programmed death ligand 1, B7-H1)又名PD-L1,是B7家族的一种共刺激分子,属于负向调控因子。有研究表明其可以参与DC的分化调控,和调节性DC的诱生<sup>[6]</sup>。

甲状腺相关性眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)是我国最常见的眼眶疾病,其发病机制复杂<sup>[7,8]</sup>。一般认为,TAO是一种器官特异性的自身免疫疾病,是自身免疫系统在甲状腺球蛋白等自身抗原的刺激下产生自身抗体,继而导致眼眶和其他组织广泛的炎症损伤<sup>[9,10]</sup>。我们考虑以负向刺激分子B7-H1基因修饰的DC,可能具有良好的免疫负向调控效应,有效抑制甲状腺眼病这种自身免疫疾病的发生发展,为此我们观察了B7-H1基因修饰的DC对T细胞免疫应答功能的影响和对TAO的治疗效应。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 293细胞购自ATCC。小鼠IL-2、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10的ELISA试剂盒购自RD公司。腺病毒表达载体系统AdEasy™ Adenoviral Vector System(pAdtrack-CMV、AdEasy-1、菌种BJ5183)购于Stratagene公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 B7-H1腺病毒表达载体构建** 利用RT-PCR方法从小鼠外周血单个核细胞内克隆B7-H1基因序列,将其连接入真核表达载体pcDNA3.1中保存。Not I和Hind III双酶切腺病毒穿梭质粒pAdtrack-CMV和pcDNA3.1-B7-H1后再连接,筛选鉴定表达正确的阳性克隆。

**1.2.2 腺病毒载体的包装、扩增和滴度测定** 在293细胞内对重组的B7-H1腺病毒载体进行包装扩增,采用氯仿处理-PEG/NaCl沉淀-氯仿抽提方法纯化病毒,包装出的病毒命名为Ad-B7-H1。同时构建重组腺病毒Ad-GFP。病毒滴度测定采用倍比稀释法感染293细胞测定。

**1.2.3 Ad-B7-H1转染修饰DC** 颈椎脱臼法处死Balb/c小鼠,按Weodman<sup>[11]</sup>的方法培养小鼠骨髓来源的DC,培养至第4d时,在无血清的培养基中以1:200的MOI值进行rAd-B7-H1病毒和对照rAd-GFP病毒的转染,设未经病毒转染的正常BMDC为对照。基因转导效率通过转染后GFP的表达来判定。

**1.2.4 Ad-B7-H1修饰的DC表型检测** 采用流式细胞仪检测经B7-H1修饰的DC的MHC-II类分子的表达。

**1.2.5 MLR反应** 采用<sup>3</sup>H-TdR掺入法检测Ad-B7-H1修饰的DC刺激同种异体T细胞增殖反应的能力。实验分组为:(1)B7-H1-DC组;(2)GFP-DC组;(3)Day8-DC组;(4)Day5-DC组。比较各组DC促T细胞增殖的能力,收集各组培养上清,采用ELISA方法检测IL-2、IFN- $\gamma$ 和IL-10的分泌情况。

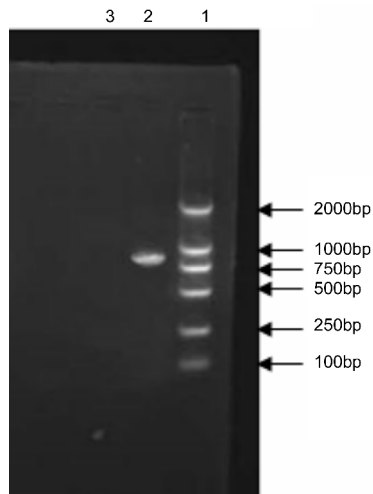


图1 B7-H1基因的琼脂糖凝胶电泳图 1: DL2000 DNA标志物; 2: B7-H1片段扩增基因; 3: 阴性对照。

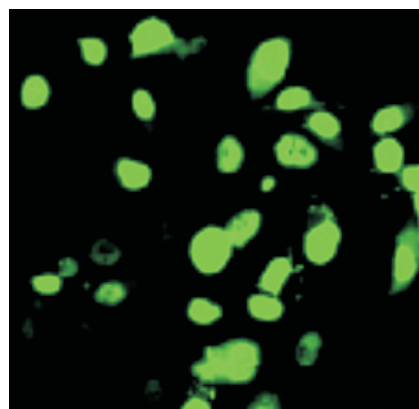


图2 DC经重组腺病毒转染后胞内绿色荧光蛋白的表达( $\times 400$ )。

**1.2.6 小鼠甲状腺眼病动物模型中观察重组腺病毒Ad-B7-H1修饰的DC对炎症反应进程的负向调控作用** 取60只Balb/c小鼠,雌雄各半,分为4组,每组15只。采用重组质粒pcDNA3.1/hTSHR多部位注射各只小鼠建立小鼠甲状腺眼病的动物模型。接下来将实验小鼠分为:生理盐水组,眼眶局部内注入0.5mL生理盐水;Ad-B7-H1修饰的DC治疗组,眼眶局部内采用基因枪注入 $4 \times 10^9$ TU重组腺病毒,分别于第7,14,21,28d分批处死动物,每组处死4只大鼠,取眼眶组织灌洗后,收集上清,用磁珠分选CD4<sup>+</sup>T细胞,4h后采用Bio-Plex悬浮芯片系统测定其中IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-10的含量。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件分析处理,组间比较用独立t检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 B7-H1基因的克隆** 用特异性引物经一步法RT-PCR扩增B7-H1基因,以10g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增条带。如图1所示,扩增片段大小约为873bp左右,与理论上的核苷酸片段大小相符。

**2.2 Ad-B7-H1重组腺病毒的制备、转染和滴度测定** 将B7-H1基因序列连接入穿梭质粒,构建重组腺病毒Ad-B7-H1,同时构建重组腺病毒Ad-GFP,重组质粒进行包装和纯化后感染DC,在培养48h后,即可有GFP的表达,并且逐渐增多。可见Ad-B7-H1和rAd-GFP的转染效率约为60%(转染阳性细胞占总细胞数60%),见图2。病毒滴度测定实验测定其滴度为 $1.8 \times 10^9$  PFU/mL。

**2.3 Ad-B7-H1 重组腺病毒转染 DC 的表型分析** FACS 分析表明经 Ad-B7-H1 重组腺病毒转染的 DC (B7-H1-DC) 和培养至第 8d 的 DC (Day8-DC) 均表达高水平的 B7-H1, 而培养至第 5d 的 DC (Day5-DC) 和经 GFP 基因转染的 DC (GFP-DC) 都表达较低水平的 B7-H1; Day8-DC 表达高水平的 CD80、CD86、CD40 和 MHC-II 分子 (Ia), 而 Day5-DC、GFP-DC 和 B7-H1-DC 都表达较低水平的 CD80、CD86、CD11c 和 MHC-II 分子 (Ia), 三组之间并无显著差异, 见图 3。

**2.4 Ad-B7-H1 重组腺病毒修饰的 DC 抑制 MLR 反应** 我们将 BALB/c 小鼠来源的 Day8-DC、Day5-DC、GFP-DC 和 B7-H1-DC 与 C57BL/6 小鼠来源的同种异基因脾脏 T 细胞作混合淋巴细胞培养。结果显示: 与 Day8-DC 相比, Day5-DC、GFP-DC 和 B7-H1-DC 与同种异基因脾脏 T 细胞的 MLR 皆明显减弱 ( $P < 0.01$ ); 与 Day5-DC 和 GFP-DC 相比, B7-H1-DC 减弱的更明显 ( $P < 0.01$ ), 而 Day5-DC 与 GFP-DC 之间则无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 见图 4。

**2.5 Ad-B7-H1 重组腺病毒修饰的 DC 对 MLR 反应中细胞因子表达的影响** B7-H1-DC 诱导的 MLR 反应体系的上清中, 代表 Th1 亚群的细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$  和代表 Th2 亚群的细胞因子 IL-4、IL-10 水平都明显降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。

**2.6 动物模型中 T 细胞分泌炎症因子减少** 按常规方法建立甲状腺眼病动物模型, 导入重组腺病毒 Ad-B7-H1 修饰的 DC, 分别于各时间点处死小鼠, 分选收集 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 采用芯片系统测定, 发现基因修饰组与生理盐水处理组的小鼠相比在第 7d 时 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 含量显著下降 ( $P < 0.05$ , 表 1); 基因修饰组与生理盐水处理组的小鼠相比在第 14d 时 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 含量显著下降 ( $P < 0.05$ , 表 1); 在第 21d 和第 28d 时检测, 也发现基因修饰组小鼠分泌的 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-10 含量较生理盐水组小鼠也分别显著下降 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

### 3 讨论

TAO 是与甲状腺功能紊乱相关的自身免疫疾病, 是当前我国成人眼眶疾病中最见得病症。因为其高发病率和损伤的不可逆性, TAO 一直是眼科学研究的一个热点。因为其发病机制非常复杂, 也缺乏有效合理的治疗手段。经过学者们的研究, 目前普遍认为参与 TAO 的自身抗原包括 TSHR、G2s 蛋白和甲状腺球蛋白等, 这些自身抗原激发机体自身反应性 T 细胞, 分泌细胞因子, 启动 Th1 和 Th2 型免疫应答诱发针对自身眼眶组织的炎症反应; 在急性发病期通常是 Th1 型反应为主, 表现为急性炎症征象; 在慢性迁延期以 Th2 型反应为主, 表现为慢性炎症反应, 甚至伴有纤维化<sup>[12,13]</sup>。种种研究显示 TAO 的发病进程表现为典型的自身炎症反应类型, 其中 T 细胞介导的 Th1 和 Th2 反应相继主导病程发展, 因而有效控制 TAO 中 T 细胞介导的炎症反应成为 TAO 生物治疗的关键<sup>[14]</sup>。

树突状细胞在免疫应答中占有独特地位, 具有双重免疫学功能: 既可以激发免疫应答; 也可以诱导免疫耐受<sup>[15]</sup>。研究表明, 髓系未成熟 DC 亚群 (immature DC subset, imDC) 由于表面缺乏刺激 T 细胞活化的黏附分子 B7、CD40、CD80、CD86 等, 具有免疫耐受性, 能诱导 T 细胞的失能 (anergy)、低反应性, 下调 Th1/Th2 型免疫反应比例, 建立“免疫偏移”状态, 并诱导调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 的产生, 而在器官移植免疫耐受的诱导和

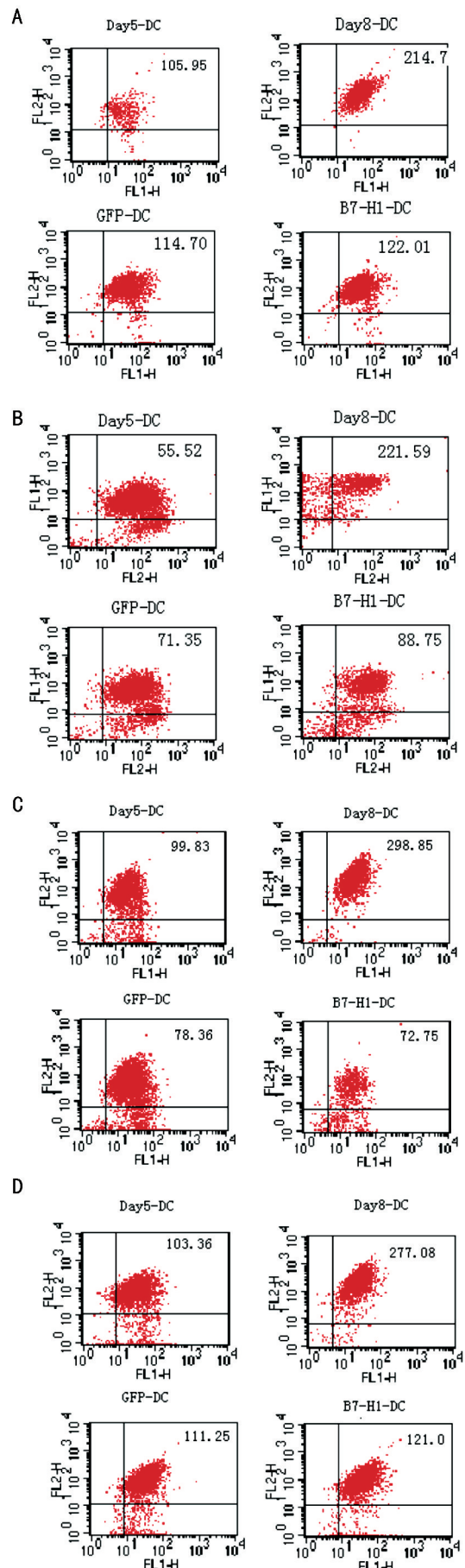


图 3 各实验组 DC 的表型分析 A: 流式细胞仪检测各组 DC 细胞表面的 CD80 分子; B: 流式细胞仪检测各组 DC 细胞表面的 CD86 分子; C: 流式细胞仪检测各组 DC 细胞表面的 CD40 分子; D: 流式细胞仪检测各组 DC 细胞表面的 Ia 分子。

表1 不同时间点甲状腺眼病模型中T细胞炎性细胞因子分泌情况 (n=4,  $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

指标	分组	时间			
		7d	14d	21d	28d
IL-2	修饰DC组	29.54±14.23	44.4±18.16	47.25±16.82	43.71±12.32
	生理盐水组	122.28±22.17 <sup>a</sup>	156.37±26.43 <sup>a</sup>	166.21±25.82 <sup>a</sup>	152.24±18.29 <sup>a</sup>
IFN- $\gamma$	修饰DC组	4.56±2.72	5.69±3.22	4.87±1.89	2.98±1.32
	生理盐水组	22.32±9.21 <sup>a</sup>	25.56±11.36 <sup>a</sup>	27.78±11.52 <sup>a</sup>	19.94±8.44 <sup>a</sup>
IL-10	修饰DC组	3.25±2.23	4.42±2.92	4.96±2.12	4.59±1.57
	生理盐水组	7.52±3.26 <sup>a</sup>	15.78±4.81 <sup>a</sup>	18.53±5.66 <sup>a</sup>	22.29±6.45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 修饰DC组。

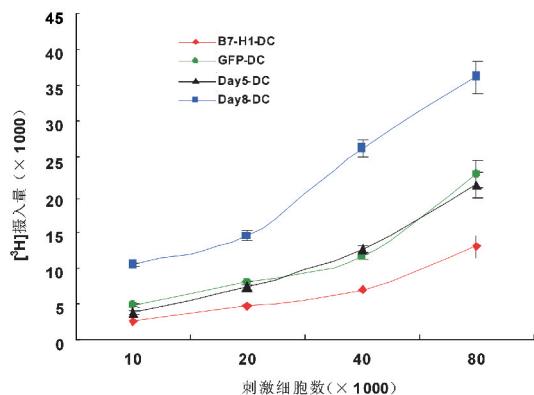


图4 各组DC刺激的同种异基因T细胞增殖。

自身免疫疾病的治疗中具有光明前景<sup>[16]</sup>。调节性DC是具有免疫负向调控功能的DC亚群,其多以免疫抑制因子(IL-10、TGF- $\beta$ 、皮质类固醇)诱导产生<sup>[17,18]</sup>。随着免疫抑制分子对DC的调控研究的深入,目前已经有很多研究证实将免疫抑制基因如CTLA-4、TGF- $\beta$ 、IL-10、B7-H1等导入DC可以有效抑制DC成熟,进而抑制T细胞功能<sup>[19]</sup>。而进行基因修饰的主要工具有腺病毒载体、慢病毒载体等,其中腺病毒载体是最常用的基因修饰工具,可以有效负载免疫抑制基因导入DC中,进而调控DC功能<sup>[20]</sup>。

B7-H1是属于CD28家族的一种负向共刺激分子,B7-H1的表达与DC的成熟状态密切相关,未成熟DC上高表达B7-H1,成熟DC上表达则较低;而以LPS和IFN- $\gamma$ 刺激DC后,B7-H1表达量呈几十倍的增加。B7-H1与DC亚群的分化也密切相关。高表达B7-H1的imDC,可以诱导Treg细胞增殖,刺激Th细胞产生IL-10,显示出了调节性DC的一些特性<sup>[21,22]</sup>。种种研究都提示B7-H1可以调控DC向调节性DC亚群分化,有效抑制DC介导的T细胞反应,抑制T细胞介导的Th1型反应<sup>[23]</sup>。而Th1型免疫反应在TAO的发病初期起了决定性作用,如果将B7-H1基因修饰的DC导入TAO小鼠中,可能有效抑制TAO的急性期反应,抑制TAO的发生发展,对TAO的治疗开辟新的途径。

在本研究中,我们从外周血单个核细胞内克隆得到了B7-H1的基因序列,并成功构建重组腺病毒用于转染DC,结果显示经Ad-B7-H1基因修饰的DC具有未成熟DC的表型,能够抑制MLR反应中T细胞增殖,和T细胞相关炎性细胞因子分泌,体现出调节性DC的表征。体内实验也证实,导入了腺病毒修饰的DC实验组小鼠其眼眶内T细胞分泌炎性细胞因子下降,病理提示眼眶内炎症程

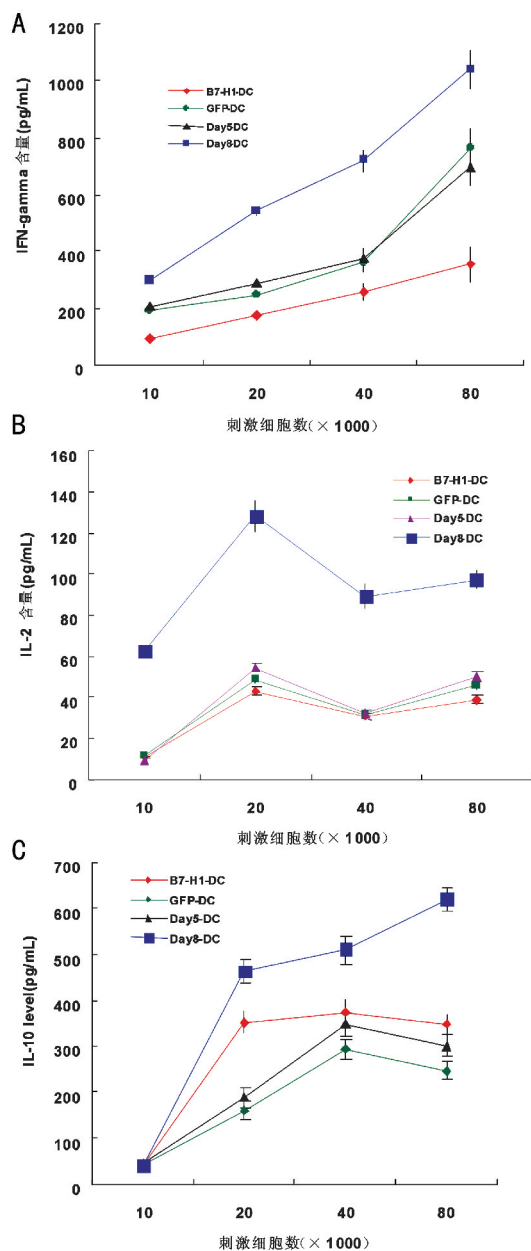


图5 各组DC刺激的MLR反应中T细胞分泌细胞因子水平 A: ELISA检测刺激细胞分泌IFN- $\gamma$ 含量; B: ELISA检测刺激细胞分泌IL-2含量; C: ELISA检测刺激细胞分泌IL-10含量。

度较低,组织损伤轻微。这些研究结果显示B7-H1基因修饰的DC在抑制TAO急性进程中可能起到重要作用,有可能成为TAO治疗的新靶点。但由于TAO发生机制非常复杂,影响因素众多,且急慢性期的免疫炎症反应类型

不同<sup>[24]</sup>,对 B7-H1 基因修饰的 DC 调控眼眶内 T 细胞炎症反应进程和相关信号转导机制仍需要进一步探索,深入研究其在 TAO 整个发病阶段的作用,探究其与其他生物靶点的协同效应,寻找 TAO 生物治疗的综合诊疗措施。

#### 参考文献

- 1 Sato J, Fujiwara M, Kawakami T, *et al.* Fascin expression in dendritic cells and tumor epithelium in thymoma and thymic carcinoma. *Oncol Lett* 2011;2(6):1025-1032
- 2 Matsuo H, Yoshimoto N, Iijima M, *et al.* Engineered hepatitis B virus surface antigen L protein particles for *in vivo* active targeting of splenic dendritic cells. *Int J Nanomedicine* 2012;7(28):3341-3350
- 3 Dalod M. Professional Cross - Presenting CD8 $\alpha$  - Type CD141 (hi) Dendritic Cells: We Have Got You in Our Skin! *Immunity* 2012;37(1):3-5
- 4 Gros E, Novak N. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 2012;42(8):1161-1175
- 5 Lewis JS, Zaveri TD, Crooks CP 2nd, *et al.* Microparticle surface modifications targeting dendritic cells for non - activating applications. *Biomaterials* 2012;33(29):7221-7232
- 6 Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, *et al.* Interleukin-27 Priming of T Cells Controls IL-17 Production In trans via Induction of the Ligand PD-L1. *Immunity* 2012;36(6):1017-1030
- 7 Fatourehchi V. Thyroid dermopathy and acropachy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26(4):553-565
- 8 Ardley M, McCorquodale T, Laahooti H, *et al.* Eye findings and immunological markers in probands and their euthyroid relatives from a single family with multiple cases of thyroid autoimmunity. *Thyroid Res* 2012;5(1):4
- 9 Gonzales M, Fratianni C, Mamillapali C, *et al.* Immunotherapy in miscellaneous medical disorders graves ophthalmopathy, asthma, and regional painful syndrome. *Med Clin North Am* 2012; 96(3):635-654
- 10 Yin X, Latif R, Bahn R, *et al.* Genetic profiling in graves' disease: further evidence for lack of a distinct genetic contribution to graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2012;22(7):730-736
- 11 Woodman I. Dendritic cells: A hairy pathway for migration. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(8):550-551
- 12 Bartalena L. Prevention of Graves' ophthalmopathy. *Best Pract Res*

*Clin Endocrinol Metab* 2012;26(3):371-379

13 Gillespie EF, Papageorgiou KI, Fernando R, *et al.* Increased expression of TSH receptor by fibrocytes in thyroid - associated ophthalmopathy leads to chemokine production. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E740-E746

14 van Steensel L, Hooijkaas H, Paridaens D, *et al.* PDGF enhances orbital fibroblast responses to TSHR stimulating autoantibodies in Graves' ophthalmopathy patients. *J Clin Endocrinol Meta* 2012;97(6):E944-E953

15 Isakson SH, Katzman SD, Hoyer KK. Spontaneous Autoimmunity in the Absence of IL-2 Is Driven by Uncontrolled Dendritic Cells. *J Immunol* 2012;189(4):1585-1593

16 Zhan Y, Wu L. Functional regulation of monocyte-derived dendritic cells by microRNAs. *Protein Cell* 2012;3(7):497-507

17 Yi HJ, Lu GX. Adherent and non - adherent dendritic cells are equivalently qualified in GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  culture system. *Cell Immunol* 2012;277(1-2):44-48

18 Cao Y, Meng H, Qi Y *et al.* Dendritic cells of synovium in experimental model of osteoarthritis of rabbits. *Cell Physiol Biochem* 2012;30(1):23-32

19 Peng W, Ran B, Ma Y, *et al.* Dendritic cells transfected with PD-L1 recombinant adenovirus induces T cell suppression and long - term acceptance of allograft transplantation. *Cell Immunol* 2011;271(1):73-77

20 Jiang W, Chen R, Kong X, *et al.* Immunization with adenovirus LIGHT-engineered dendritic cells induces potent T cell responses and therapeutic immunity in HBV transgenic mice. *Vaccine* 2014; 32(14):2082-2092

21 Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2455-2465

22 Atsuyama - Kato A, Murata S, Isezaki M, *et al.* Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus. *Virology* 2012;45(1):94

23 Dai S, Jia R, Zhang X, *et al.* The PD-1/PD-L1 pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol* 2014;290(1):72-79

24 Bhatti MT, Dutton JJ. Thyroid eye disease: therapy in the active phase. *J Neuroophthalmol* 2014;34(2):186-197