

重组人可溶性TIM-3稳转细胞株的构建及其分泌蛋白的表达

李强 陈明 黄飏 王毅刚*

(浙江理工大学, 生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要 该研究通过慢病毒感染的方式构建携带T淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3及可结晶区域[T cell immunoglobulin and mucin domain 3 and fragment of crystallizable, *TIM-3(Fc)*]目的基因的稳转细胞株并检测TIM-3(Fc)分泌蛋白的表达。设计特异性引物PCR扩增*TIM-3(Fc)*片段, 重组插入慢病毒表达载体pCD513中并鉴定阳性克隆, 无内毒素提取质粒pCD513-TIM-3(Fc)、pSPAX2和pMD2.G共转染293T细胞包装慢病毒, 再利用慢病毒感染悬浮HEK293细胞, 最后通过嘌呤霉素筛选得到稳定转染细胞株293/TIM-3。再通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)检测*TIM-3(Fc)*目的基因在转录和翻译水平上的表达, 用时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)检测细胞产生TIM-3(Fc)分泌蛋白的能力。成功构建了pCD513-TIM-3(Fc)慢病毒表达载体, qRT-PCR、WB和TRFIA检测表明, 293/TIM-3细胞株成功表达了TIM-3(Fc)分泌蛋白。成功构建了重组人可溶性TIM-3稳定转染细胞株293/TIM-3并成功表达了TIM-3(Fc)分泌蛋白, 为进一步研究可溶性TIM-3蛋白的生物学功能提供基础。

关键词 TIM-3分泌蛋白; 悬浮HEK293细胞; 稳转细胞株; 慢病毒

Construction of Recombinant Human Soluble TIM-3 Cell Line and Expression of Its Secretory Protein

LI Qiang, CHEN Ming, HUANG Biao, WANG Yigang*

(College of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tec University, Hangzhou 310018, China)

Abstract This study constructed a stable transfected cell line carrying the target gene of *TIM-3 (Fc)* by lentivirus infection and detected the expression of TIM-3 (Fc) secretory protein. Specific primers were designed for PCR amplification of *TIM-3 (Fc)* fragment, and positive clones were identified in recombinant lentivirus expression vector pCD513. Plasmid pCD513-TIM-3 (Fc), pSPAX2 and pMD2.G were co-transfected into 293T cells to package lentivirus, and lentivirus was used to infect suspension HEK293 cells. Finally, stable transfected cell line 293/Tim-3 was obtained through puromycin screening. qRT-PCR (quantitative real-time PCR) and WB (Western blot) were used to detect the expression of *TIM-3 (Fc)* target gene at the levels of transcription and translation, and TRFIA was used to detect the ability of 293/TIM-3 cells to produce TIM-3 (Fc) secretory protein. pCD513-TIM-3 (Fc) lentivirus expression vector was successfully constructed, and the detection results of qRT-PCR, WB and TRFIA indicated that the cell line 293/TIM-3 successfully expressed TIM-3 (Fc) secretory protein. The recombinant

收稿日期: 2019-12-23

接受日期: 2020-05-22

浙江省自然科学基金(批准号: LY18C070002)和浙江理工大学2018年优质课程建设项目(批准号: YZKC1822)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province of China (Grant No. LY18C070002) and the 2018 Quality Course Construction Project of Zhejiang Sci-Tech University (Grant No. YZKC1822)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5288>

human soluble TIM-3 stable transfected cell line 293/TIM-3 is constructed and TIM-3 (Fc) secretory protein expressed, which provides the foundation for further study on the biological function of soluble TIM-3 protein.

Keywords TIM-3 secretory protein; suspension HEK293 cells; stable transfected cell lines; lentivirus

TIM-3是T淋巴细胞免疫球蛋白域黏蛋白域家族(T cell immunoglobulin and mucin domain, TIM)的一员^[1]。它属于I型跨膜糖蛋白,主要由N端的IgV样结构域、高度糖基化的黏蛋白结构域、跨膜区域和胞质尾部组成,并且能够与高迁移率组蛋白(high-mobility group protein B1, HMGB1)、癌胚抗原细胞黏附分子1(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM-1)和半乳糖凝集素-9(galectin-9)等多种配体结合,起到抑制免疫应答的作用^[2-6]。尤其在肿瘤组织中, TIM-3的高度表达会促使肿瘤浸润淋巴细胞的耗竭失能,促进肿瘤的增殖和迁移^[7],患者的预后也会更差^[8]。在近几年的研究中发现,利用可溶性TIM-3蛋白阻断TIM-3信号通路能够有效控制甚至逆转TIM-3抑制免疫应答的作用^[9-10]。因此,如何快速获取高质量的可溶性TIM-3蛋白是未来研究和治疗免疫检查点分子所引起的免疫抑制中必不可少的一环。目前,原核表达系统仍然是蛋白表达的主流方式,但缺乏特定的辅助因子、分子伴侣和翻译后修饰的能力可能会导致蛋白功能丧失以及错误折叠,虽然利用哺乳动物细胞表达系统可以有效解决这些缺陷,但这种方法的低蛋白产量、高成本以及复杂的操作会限制它未来的发展^[11]。相比之下,悬浮HEK293细胞表达系统能够表达结构、功能复杂的高活性蛋白,而且操作简便、成本低,尤其适用于小规模(30 mL)生产研究所用的蛋白复合物,能够有效解决原核表达系统和哺乳动物细胞表达系统的蛋白表达问题^[12]。为了高效持久地获取可溶性TIM-3蛋白,我们采用慢病毒感染的方式构建了悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳转细胞株。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

293T细胞、悬浮HEK293细胞及其血清培养基购自倍谱基生物科技有限公司;高糖DMEM细胞培养基购自Gibco公司;PAN血清购自PAN公司;质粒小抽试剂盒、DNA割胶回收试剂盒、动物总RNA快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;限制性核酸内切酶*Xba* I、*Eco*R I购自TaKaRa公司;

逆转录试剂盒购自TOYOBO公司;2× SYBR Green Master Mix、2× Rapid Tag Master Mix、一步法快速克隆试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司公司;质粒pCD513、pSPAX2、pMD2.G、聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)转染试剂、抗TIM-3抗体购自Superview Biotechnology公司;羊抗鼠IgG购自CST公司;10 kDa超滤管购自Millipore公司。

1.2 实验方法

1.2.1 pCD513-TIM-3(Fc)真核表达载体的构建 用TIM-3(Fc) one-step-F和TIM-3(Fc) one-step-R(表1)引物PCR扩增TIM-3(Fc)目的片段, *Xba* I和*Eco*R I双酶切pCD513质粒,回收并连接目的片段与载体,转化挑斑筛选阳性克隆,再通过PCR以及*Eco*R I单酶切进行验证,最后送往公司测序。

1.2.2 PEI包装慢病毒 取293T细胞,待其密度生长至70%时,采用三质粒包装系统进行慢病毒的包装,三种质粒比例为pCD513-TIM-3(Fc):PSPAX2:PMD2.G=4:3:1, PEI:DNA=5:1,质粒转染12 h后换液,在48 h和72 h各取1次上清,用0.45 μm的滤膜过滤病毒液后直接使用或分装好放入-80 °C保存。

1.2.3 悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳转细胞株的构建 按照 5×10^5 个/mL的密度接种悬浮HEK293细胞,待生长至 1×10^6 个/mL时将慢病毒原液与细胞混合吹打均匀,进行平角离心感染,室温800 r/min离心90 min后,收集混合液装入125 mL三角培养瓶中并补充悬浮细胞培养液至30 mL,之后将三角培养瓶放置在水平摇床上,并将水平摇床放入37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养,摇床转速为130 r/min,24 h后换液,继续培养48~96 h,期间检测荧光表达情况,待大部分细胞带有荧光时再加嘌呤霉素(3 μg/mL)传代筛选10天,后冻存细胞进行保种。

1.2.4 qRT-PCR检测TIM-3(Fc)基因的转录水平 根据TIM-3(Fc)序列设计两对qRT-PCR的引物:位于TIM-3胞外区的TIM-3(Fc) Q-PCR-F1和TIM-3(Fc) Q-PCR-R1以及位于TIM-3非胞外区的TIM-3(Fc) Q-PCR-F2和TIM-3(Fc) Q-PCR-R2(表1)。利用动物总RNA快速提取试剂盒提取对照细胞株和稳定转染细胞株的RNA再逆转录为cDNA,之后用实时荧光定量

表1 PCR扩增所用引物序列
Table 1 Sequences of primers used for PCR

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences (5'→3')	大小/bp Size /bp
TIM-3(Fc) Q-PCR-F1	5'-CAG ATA CTG GCT AAA TGG GGA T-3'	162
TIM-3(Fc) Q-PCR-R1	5'-ACC TTG GCT GGT TTG ATG AC-3'	
TIM-3(Fc) Q-PCR-F2	5'-CTG CTG CTA CTA CTT ACA AGG TC-3'	75
TIM-3(Fc) Q-PCR-R2	5'-GCA GGG CAG ATA GGC ATT CT-3'	
TIM-3(Fc) one-step-F	5'-ACC TCC ATA GAA GAT TCT AGA GCC ACC ATG GAG ACA GAC ACA -3'	1 386
TIM-3(Fc) one-step-R	5'-ATC CGA TTT AAA TTC GAA TTC TCA TTT CCC GGG AGA CAG G-3'	
TIM-3(Fc) unique-F	5'-GCC ACC ATG GAG ACA GAC ACA C-3'	1 344
TIM-3(Fc) unique-R	5'-TCA TTT CCC GGG AGA CAG GGA G-3'	

PCR仪检测两种细胞株的TIM-3在基因水平上的表达。

1.2.5 WB(Western blot)检测TIM-3(Fc)的蛋白表达水平 取10 kDa超滤管将已培养96 h的悬浮HEK293稳定转染细胞株的30 mL细胞上清浓缩至200~400 μ L, 之后分别对蛋白样品进行变性还原处理和非变性非还原处理, 再在10%的SDS-PAGE胶上样, 每个上样孔上样15 μ L样品, 之后调节电源至80 V 30 min, 进行蛋白浓缩, 待浓缩结束后, 将电源调节至120 V 60 min, 进行蛋白分离直至跑胶结束, 后转印到0.22 μ m的PVDF膜上, 电源调节至120 V 120 min, 转印结束后用5%脱脂奶粉封闭2 h, 抗TIM-3抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 羊抗鼠IgG孵育2 h, 超灵敏化学发光仪检测并拍照记录。

1.2.6 时间分辨免疫荧光技术检测TIM-3(Fc)蛋白的分泌情况 用0.05 mol/L、pH9.6的Na₂CO₃缓冲液稀释TIM-3包被抗体至3 μ g/mL并进行包被, 每孔加100 μ L, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 弃去包被液后用5% BSA封闭2 h, 弃去封闭液, 每孔分别加入50 μ L设置好浓度梯度的TIM-3标准蛋白品以及样品, 再加入50 μ L的销标抗体, 37 $^{\circ}$ C同时孵育90 min, 用漂洗液洗6次后每孔加入100 μ L增强液, 振荡2 min后用时间分辨免疫荧光仪检测。

1.2.7 数据统计 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示, 显著性差异分析用GraphPad Prism 7软件进行。 $P>0.05$ 为无明显差异, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著, $P<0.001$ 为差异特别显著。

2 实验结果

2.1 重组慢病毒质粒pCD513-TIM-3(Fc)的鉴定

EcoR I单酶切重组慢病毒质粒pCD513-TIM-

3(Fc)(图1A第3泳道), 得到的两条带, 大小与预期的8 276 bp和1 263 bp条带相符, 并用TIM-3(Fc) unique-F和TIM-3(Fc) unique-R(表1)对目的片段进行PCR鉴定(图1B第2、3泳道), 条带大小与预期的1 344 bp相符。送公司测序, 测序结果正确, 如图C部分测序图。

2.2 qRT-PCR检测结果

取对照细胞株和稳转细胞株的cDNA做qRT-PCR检测, 结果表明, 稳转细胞株的TIM-3胞外区的基因转录水平要明显高于对照细胞株, 而TIM-3非胞外区的基因转录水平并无显著性差异($P>0.05$)(图2), 排除了细胞本源表达TIM-3的影响, 证明稳定转染细胞株构建成功。

2.3 WB检测结果

取培养96 h的对照细胞株和稳转细胞株的上清蛋白, 用10 kDa超滤管进行浓缩, 并分别进行变性还原处理和非变性非还原处理, WB结果如图3。变性还原处理的TIM-3(Fc)蛋白大小在80~90 kDa(图3A第2、3、4泳道), 因为糖基化的缘故比预测的蛋白大小要大, 而非变性非还原处理的TIM-3(Fc)分泌蛋白大小在150~170 kDa, 约为变性还原处理蛋白的两倍(图3B第2、3、4泳道), 可以证明稳定转染细胞株表达出来的TIM-3(Fc)蛋白以二聚体的形式存在。同时WB的结果也表明, 表达的TIM-3(Fc)分泌蛋白能够与其相应抗体结合, 证明有较好的特异免疫原性。

2.4 时间分辨免疫荧光技术检测结果

将稳转细胞株从 5×10^6 个/mL开始连续培养14天, 每天进行细胞计数和锥虫蓝染色检测细胞活力, 并从第4天开始收集细胞上清, 于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存, 14天后利

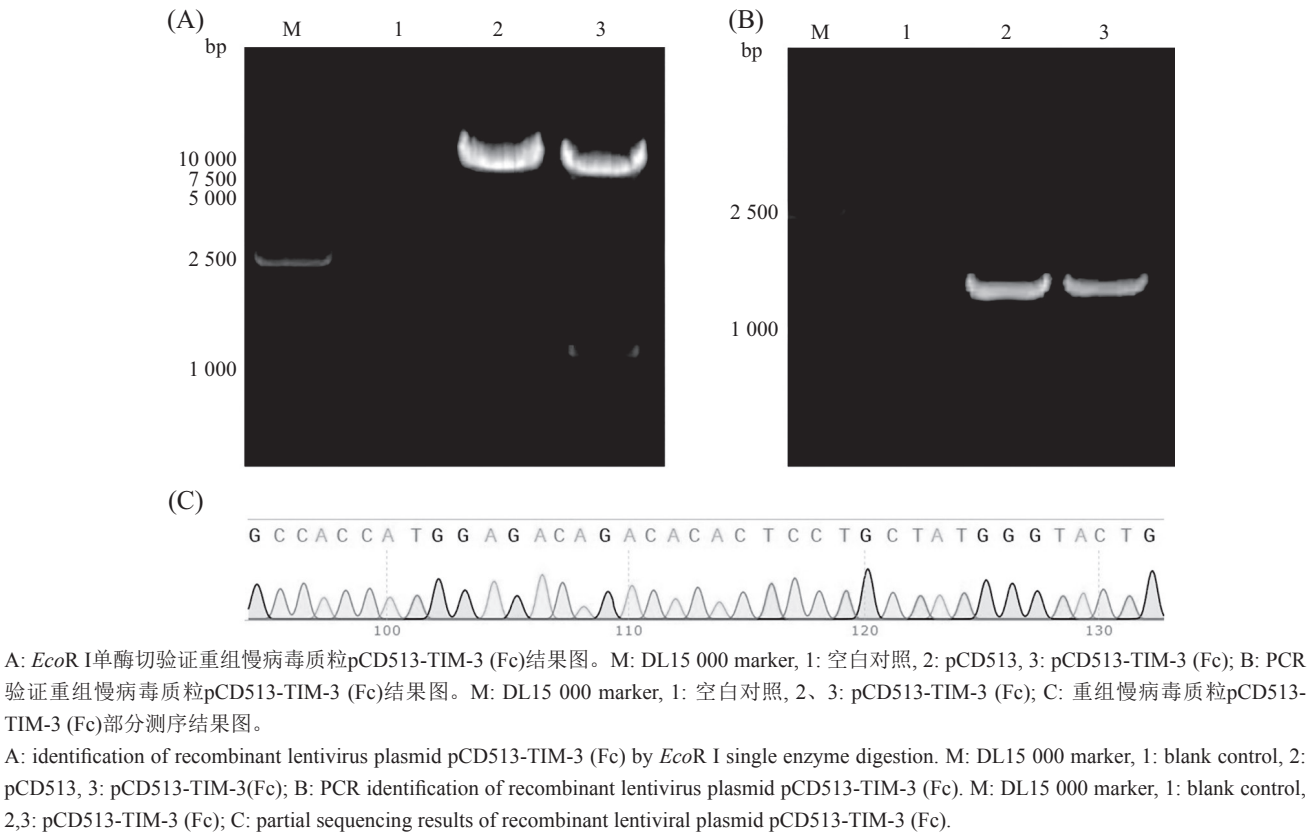
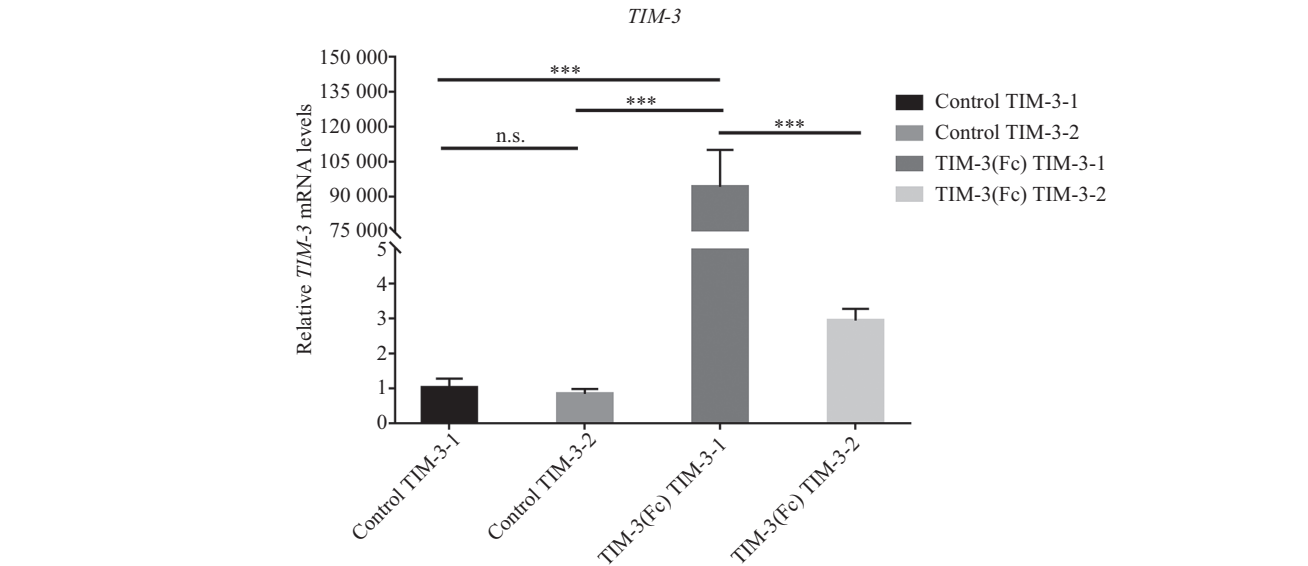


图1 重组慢病毒质粒pCD513-TIM-3(Fc)酶切鉴定、PCR鉴定以及测序结果

Fig.1 Digestion, PCR identification and partial sequencing results of recombinant lentivirus plasmid pCD513-TIM-3 (Fc)



n.s.: 无显著性差异, *** $P<0.001$ 。
n.s.: no significant difference, *** $P<0.001$.

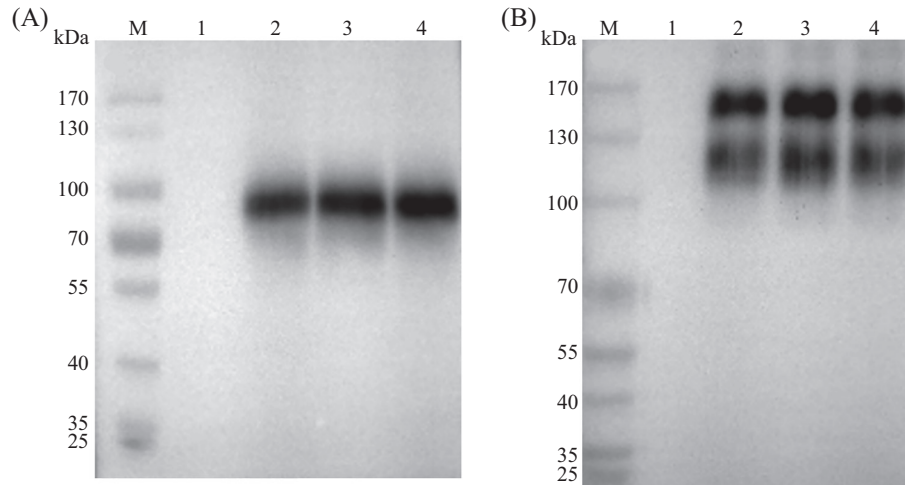
图2 TIM-3在基因水平上的表达

Fig.2 TIM-3 expression at gene level

用时间分辨免疫荧光技术检测TIM-3(Fc)蛋白表达情况(图4), 培养至12天时细胞密度可以达到 5×10^6 个/mL, TIM-3(Fc)分泌蛋白浓度可达到1 mg/L。

2.5 悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳定转染细胞株的稳定性检测

在慢病毒感染的稳转细胞株中, 绿色荧光蛋

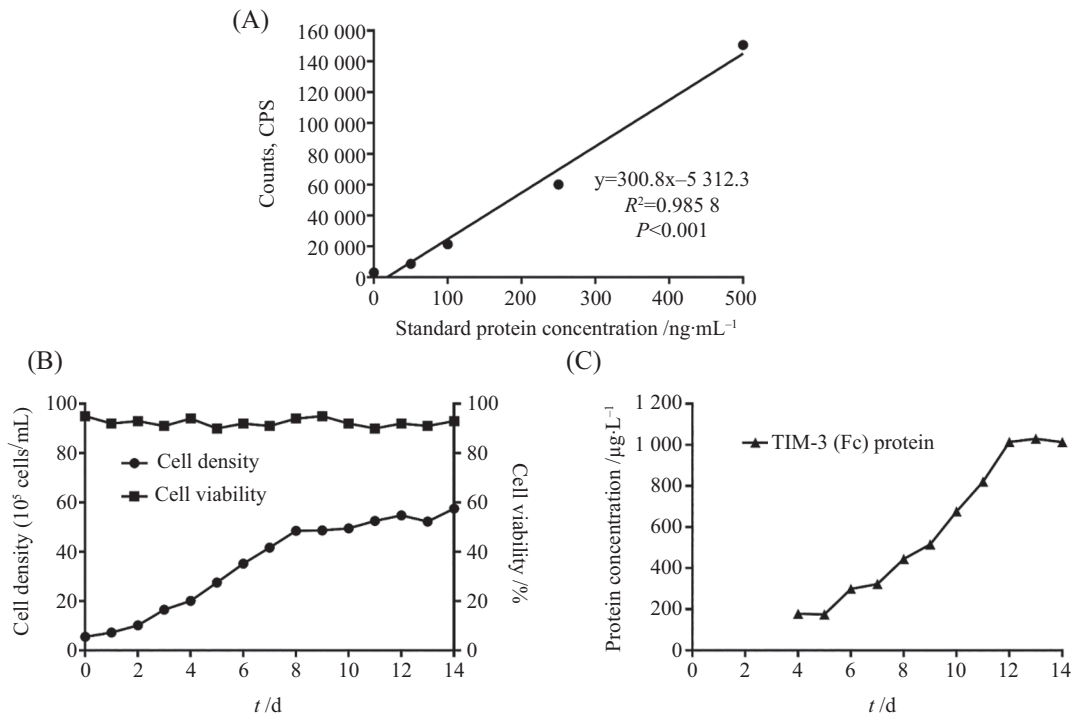


A: 变性还原处理TIM-3 (Fc)分泌蛋白。M: 蛋白marker, 1: 空白对照, 2、3、4: 稳定转染细胞株293/TIM-3细胞上清分泌蛋白平行实验组; B: 非变性非还原处理TIM-3 (Fc)分泌蛋白。M: 蛋白marker, 1: 空白对照, 2、3、4: 稳定转染细胞株293/TIM-3细胞上清分泌蛋白平行实验组。

A: denaturing and reducing TIM-3 (Fc) secretory protein. M: protein marker, 1: blank control, 2,3,4: parallel experimental group of stably transfected cell line 293/TIM-3 cell supernatant secreted protein; B: non denatured and reduced TIM-3 (Fc) secretory protein. M: protein marker, 1: blank control, 2,3,4: parallel experimental group of stably transfected cell line 293/TIM-3 cell supernatant secreted protein.

图3 WB鉴定悬浮293稳定转染细胞株上清中TIM-3(Fc)蛋白的表达

Fig.3 WB identification of TIM-3 (Fc) protein expression in the supernatant of suspension 293 stable transfected cell line



A: TIM-3蛋白标准曲线图; B: 293/TIM-3稳定转染株连续培养14天中细胞活力以及细胞密度的变化图; C: 293/TIM-3稳定转染株连续培养14天TIM-3(Fc)蛋白的表达情况图。

A: TIM-3 protein standard curve; B: cell viability and cell density of stable cell lines 293/TIM-3 cultured for 14 days; C: expression of TIM-3(Fc) protein in stable cell lines 293/TIM-3 cultured for 14 days.

图4 TIM-3蛋白标准曲线和TIM-3(Fc)稳定转染细胞株在125 mL摇瓶中连续培养时的生长状况以及TIM-3(Fc)蛋白表达情况

Fig.4 TIM-3 protein standard curve, growth status and expression of TIM-3 (Fc) protein of TIM-3 (Fc) stably transfected cell line in continuous culture in 125 mL shake flask

白和TIM-3(Fc)分泌蛋白是平行表达的, 所以可以通过观察绿色荧光来判定TIM-3(Fc)基因的稳表达情况。连续培养悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳转

细胞株14天, 期间每隔4天通过荧光显微镜观察细胞绿色荧光的表达情况(图5), 从图中可以看出在连续培养14天后稳转细胞株的荧光表达仍有90%

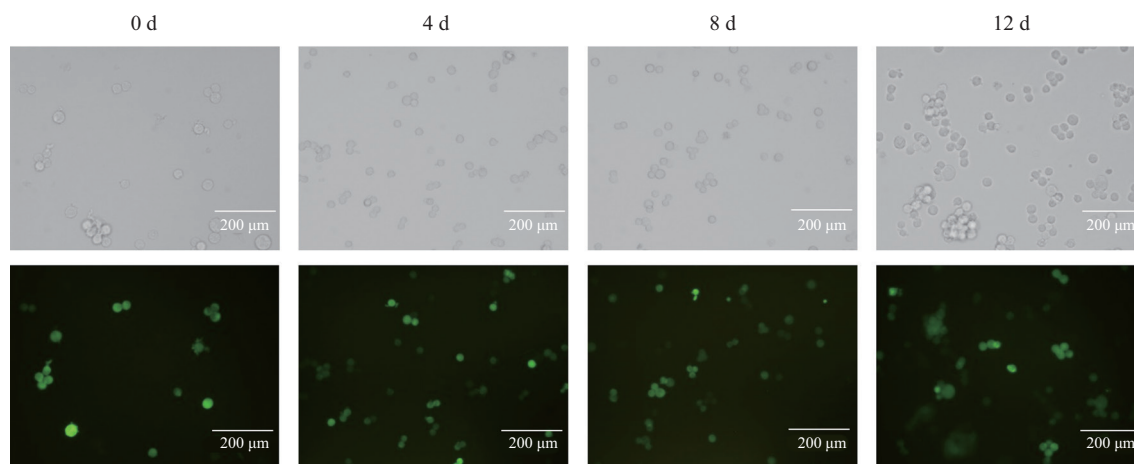


图5 TIM-3(Fc)稳转细胞株绿色荧光表达情况

Fig.5 fluorescence expression of TIM-3 (Fc) stably transfected cell line

以上, 从侧面证明了在悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳转细胞株的连续培养期间, *TIM-3(Fc)*基因能够长期稳定存在。

3 讨论

基于免疫的疗法是一种创新方法, 可增强人类对癌细胞的免疫反应, 从而消除易感癌细胞并抑制肿瘤生长。这种方法为癌症治疗提供了新的希望, 并可能使某些患者的肿瘤得到长期缓解。免疫系统的功能非常强大, 可以识别肿瘤抗原并发生消除肿瘤的抗肿瘤反应。在针对肿瘤抗原的免疫应答中, 不同免疫细胞之间的相互影响对消除肿瘤是至关重要的。然而, 肿瘤同时也具备产生抑制性配体的能力, 该抑制性配体与在肿瘤特异性免疫细胞上表达的共抑制受体(也被称为免疫检查点)结合。这种结合参与诱导负调节途径, 其限制了正常的免疫反应, 从而使肿瘤逃避或减弱了免疫反应。所以目前最新的免疫治疗方法旨在通过阻断免疫检查点来针对免疫耐受的这些机制, 以逆转功能性抑制的免疫反应, 重新激活T细胞并促进抗肿瘤免疫。

目前, 用于免疫检查点阻断的抗体药物主要有两种。一种是针对CTLA-4的阻断抗体(如: 易普利姆玛Ipilimumab), 另一种是针对PD-1的阻断抗体如: 派姆单抗(pembrolizumab)和纳武单抗(Nivolumab)。这些阻断药物都具备一定的抗肿瘤能力, 并且能实现部分病人的长期生存, 但仍会出现免疫耐受和体内毒性等问题。所以开发新型的免疫检查点阻断药物仍是现今科研的重中之重。

TIM-3是继PD-1之后新发现的一类免疫检查点分子, 主要表达于T淋巴细胞、巨噬细胞和NK细胞等免疫细胞膜表面, 在自身免疫、癌症和慢性感染期间的先天和适应性免疫反应的调节中发挥作用^[13-15]。有研究表明, 在体内免疫系统对肿瘤细胞做出反应后会释放IFN- γ 以此抑制肿瘤的生长, 但同时也会促进肿瘤细胞表面Gal-9的上调, 而Gal-9会与TH1细胞表面富集的TIM-3结合, 通过信号转导最终终止TH1相关免疫反应。而当体内免疫系统杀伤肿瘤后, 肿瘤细胞裂解所产生的HMGB1能够与树突状细胞上表达的TIM-3结合并抑制树突状细胞核酸的固有免疫, 以此抑制Toll样受体所介导的抗肿瘤反应。TIM-3虽然在不同细胞上表达的功能不尽相同, 但主要是以负调控因子的形式存在的, 起到抑制机体免疫反应的作用^[16-19]。目前对于TIM-3所引起的免疫抑制反应, 主要是通过可溶性TIM-3蛋白作为拮抗剂与TIM-3的多种配体结合, 以此阻断TIM-3信号通路达到控制的目的。有研究表明, 重组可溶性TIM-3蛋白在体外能够阻断TIM-3信号通路并显著增强T淋巴细胞和巨噬细胞的免疫活性^[9]。

本研所得到的TIM-3(Fc)分泌蛋白是将TIM-3胞外与配体结合的区域和免疫球蛋白Fc区域结合起来的融合蛋白。选用悬浮HEK293细胞作为生产TIM-3(Fc)分泌蛋白的宿主细胞相比较于贴壁细胞能够更加高效地生产分泌蛋白并节约成本, 作为真核细胞与原核表达系统相比生产的TIM-3(Fc)分泌蛋白有更高的糖基化水平, 表达的蛋白质的功能会更完善。WB的检测结果可以看出, TIM-3(Fc)分泌蛋白能够与

其相应抗体特异性结合, 具有较好的免疫原性, 除此之外, 该分泌蛋白以二聚体的形式存在, 作为阻断药物在人体内的半衰期会得到延长, 控制机体免疫抑制反应的时间也会相应延长。而且在连续培养悬浮HEK293-TIM-3(Fc)稳转细胞株的过程中也可以发现该细胞活力较高, 基因也能够稳定表达。经过TRFIA的检测表明, 该细胞株在细胞密度达到 5×10^6 个/mL时, TIM-3(Fc)分泌蛋白的浓度可以达到1 mg/L, 足以用于对TIM-3蛋白的其他相关研究^[20-21]。

参考文献 (References)

- [1] FREEMAN G J, CASASNOVAS J M, UMETSU D T, et al. Tim genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235(1): 172-89.
- [2] CHIBA S, BAGHDADI M, AKIBA H, et al. Tumor-infiltrating dcs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor tim-3 and the alarmin hmgb1 [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9): 832-42.
- [3] HUANG Y H, ZHU C, KONDO Y, et al. Ceacam1 regulates tim-3-mediated tolerance and exhaustion [J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 386-90.
- [4] ZHU C, ANDERSON A C, SCHUBART A, et al. The tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates t helper type 1 immunity [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(12): 1245-52.
- [5] GONÇALVES SILVA I, RÜEGG L, GIBBS B F, et al. The immune receptor tim-3 acts as a trafficker in a tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(7): e1195535.
- [6] YASINSKA I M, SAKHNEVYCH S S, PAVLOVA L, et al. The tim-3-galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1594.
- [7] HAN G, CHEN G, SHEN B, et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 449.
- [8] GRANIER C, DARIANE C, COMBE P, et al. Tim-3 expression on tumor-infiltrating pd-1⁺cd8⁺ t cells correlates with poor clinical outcome in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(5): 1075-82.
- [9] 李葛, 王智鼎, 窦帅杰, 等. 可溶性Tim-3体外增强免疫应答的作用及机制研究[J]. *军事医学*(LI G, WANG Z D, DOU S J, et al. The effect and mechanism of soluble tim-3 on enhancing immune response *in vitro* [J]. *Military medicine*), 2017, 41(1): 33-7.
- [10] HOU N, ZOU Y, PIAO X, et al. T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule-3 (tim-3) signaling blockade improves cell-Mediated immunity against malaria [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(10): 1547-56.
- [11] ARICESCU A R, OWENS R J. Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: towards an integrative approach to structural biology [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(3): 345-56.
- [12] PORTOLANO N, WATSON PJ, FAIRALL L, et al. Recombinant protein expression for structural biology in hek 293f suspension cells: a novel and accessible approach [J]. *J Vis Exp*, 2014, (92): e51897.
- [13] FERRIS R L, LU B, KANE L P. Too much of a good thing? tim-3 and tcr signaling in t cell exhaustion [J]. *Immunol*, 2014, 193(4): 1525-30.
- [14] GALLOIS A, SILVA I, OSMAN I, et al. Reversal of natural killer cell exhaustion by tim-3 blockade [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 3(12): e946365.
- [15] DA SILVA I P, GALLOIS A, JIMENEZ-BARANDA S, et al. Reversal of nk-cell exhaustion in advanced melanoma by tim-3 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(5): 410-22.
- [16] ZHU C, ANDERSON A C, KUCHROO V K. Tim-3 and its regulatory role in immune responses [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 350: 1-15.
- [17] WU W, SHI Y, LI S, et al. Blockade of tim-3 signaling restores the virus-specific CD8⁺ T-cell response in patients with chronic hepatitis B [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(5): 1180-91.
- [18] KANAI Y, SATOH T, IGAWA K, et al. Impaired expression of tim3 on th17 and th1 cells in psoriasis [J]. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(4): 367-71.
- [19] RODRIGUEZ-MANZANET R, DEKRUYFF R, KUCHROO V K, et al. The costimulatory role of tim molecules [J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1): 259-70.
- [20] 谭玉华, 张新利. TR-FIA对低浓度HBV标志物检出的临床价值[J]. *标记免疫分析与临床*(TAN Y H, ZHANG X L. The clinical value of tr-fia in the detection of low concentration hbv markers [J]. *Marker Immunoassay and Clinic*), 2004, 11(3): 186-8.
- [21] 李美枝, 刘云霞. 时间分辨免疫荧光与ELISA法检测乙型肝炎病毒血清标志物结果的比较与分析 [J]. *中医临床研究*(LI M Z, LIU Y X. Comparison and analysis of the results of time-resolved immunofluorescence and elisa in detecting serum markers of hepatitis b virus [J]. *Clinical Research of Traditional Chinese Medicine*), 2010, 2(22): 55-6.