

用于CD47靶向研究的细胞模型的构建

梅恩典¹ 沈俊杰² 陈雪娇² 钱程^{1*}

(¹浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; ²重庆精准生物产业技术研究院有限公司, 重庆 400000)

摘要 CD47是一个新的免疫检查点, 然而人源细胞广泛表达CD47, 且暂未发现CD47阴性的人源细胞, 使CD47靶向研究缺乏可靠的研究模型。该研究以中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞为基础, 制备人源CD47慢病毒, 进而感染CHO构建CHO-CD47细胞系。利用流式细胞术、反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及生物结合检测, 对CHO-CD47进行评估, 流式检测结果表明, CHO-CD47细胞表达人源CD47的阳性率为94.7%, 经冻融且10次传代后, CD47阳性率保持稳定(96.4%); RNA水平检测结果表明, CHO-CD47细胞中表达人源CD47 mRNA; 此外, 蛋白水平检测结果显示, CHO-CD47细胞可成功结合人源CD47配体信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)和信号调节蛋白 γ (signal regulatory protein γ , SIRP γ)重组蛋白。综上所述, CHO-CD47细胞模型成功构建, 可用于CD47靶向研究的结合能力验证, 为CD47靶向研究提供可靠的研究模型, 为以CD47为靶点的癌症治疗研究提供一定研究基础。

关键词 CHO-CD47; 细胞模型; CD47; CHO

Construction of Cell Model to CD47 Target Research

MEI Endian¹, SHEN Junjie², CHEN Xuejiao², QIAN Cheng^{1*}

(¹College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Chongqing Institute of Precision Medicine and Biotechnology Co., Ltd., Chongqing 400000, China)

Abstract CD47 is a new immune checkpoint. However, CD47 targeted studies lack reliable research models because CD47 widely expressed in human-derived cells and CD47-negative human-derived cells haven't been found. In this study, taking CHO (Chinese hamster ovary) cell to be a basis, human-derived CD47 lentiviral vector was prepared and CHO was infected to construct CHO-CD47 cell line. The CHO-CD47 was evaluated through flow cytometry, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and biological binding detections. The result of flow cytometry detection demonstrated that CHO-CD47 cell line expressed human-derived CD47 and the positive rate was 94.7%, which kept stable (96.4%) after freeze-thawing and passaging 10 times. The result of RNA level detection demonstrated that CHO-CD47 expressed human-derived CD47 mRNA. In addition, the result of protein level detection showed that CHO-CD47 could bind to human-derived CD47 ligands SIRP α (signal regulatory protein α) and SIRP γ (signal regulatory protein γ) recombinant protein successfully. In summary, the construction of the CHO-CD47 cell model was successful. It could be used to verify the binding ability of CD47 target studies, providing a reliable research model for CD47 targeted studies and a certain research basis for cancer therapy studies targeting CD47.

Keywords CHO-CD47; cell model; CD47; CHO

收稿日期: 2019-11-22 接受日期: 2020-06-08

科技部重点专项(批准号: 2016YFC1303400)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15086883400, E-mail: cqian8634@gmail.com

Received: November 22, 2019 Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the Key Projects of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2016YFC1303400)

*Corresponding author. Tel: +86-15086883400; E-mail: cqian8634@gmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5307>

近年来, 免疫疗法在针对癌症的治疗上取得多项突破性的进展, 如程序性死亡受体1(programmed death-ligand 1, PD-1)/程序性死亡受体配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)抑制剂的成功研制。继PD-1/PD-L1、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)之后, CD47作为一个新的免疫抑制分子映入眼帘, 通过传递“不要吃我”信号, 抑制固有免疫^[1-3]。CD47蛋白具有五次跨膜结构, 其N-端具有单个Ig V样结构域, C-端为一短的胞内结构域^[4]。CD47广泛表达于正常组织及恶性组织中, 且在多种类型的癌症中高表达, 如急性髓性淋巴细胞白血病^[5]。信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)是CD47的配体之一, 可与CD47结合, 抑制巨噬细胞的吞噬作用^[6-7]。CD47-SIRP α 机制的发现, 使得CD47成为继PD-1/PD-L1、CTLA-4之后新的免疫检查点^[8]。目前, 已有诸多团队投身于靶向CD47的抗癌药物研究。LIU团队^[9]研制靶向CD47抗体Hu5F9-G4, 并以其作为单药或与其他癌症靶向抗体联合治疗, 且已进入临床试验阶段。ADVANI等^[10]将Hu5F9联合利妥昔单抗向22例复发/难治非霍奇金淋巴瘤患者给药, 36%患者达到完全缓解。TTI-621由人源SIRP α 蛋白N-端V结构域及人免疫球蛋白G1(immunoglobulin G1, IgG1) Fc区组成, 靶向CD47分子, 且已进入临床一期研究^[11-12]。为了有效评价CD47靶向研究成果, 需要同时具有表达与不表达CD47的两种细胞模型进行对比研究; 如果有可能, 应该使用相同遗传背景的细胞。可行的做法包括, 对表达的细胞进行基因敲除或者干扰, 另外也可以在不表达的细胞上外源表达CD47分子。CD47除与SIRP α 结合抑制免疫反应外, 还参与多种信号的发生与调节, 如血小板反应蛋白1(thrombospondin-1, TSP1)信号通过CD47可在几种细胞类型中剧烈抑制环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平^[13]。因此, 为了避免敲除CD47可能对细胞的正常生理功能造成影响, 我们选择一种人源CD47表达阴性的细胞进行改造, 使其稳定表达人源CD47分子以作为一种可应用于CD47靶向药物研究的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

Caki-1、786-O购于中国科学院细胞库, 293T、

CHO-K1、LOVO、A549、DLD-1、PC3、Hela、SKOV3、NK92、PLC购于ATCC; CD47 cDNA质粒、带有His标签的人SIRP α 和SIRP γ 蛋白购于Sino biological公司; 抗人CD47-APC流式抗体(克隆号: CC2C6)、APC同型对照抗体、抗His Tag流式抗体购于Biolegend公司; 限制性核酸内切酶购于Thermo Fisher Scientific公司; 琼脂糖购于Life公司; 割胶回收试剂盒、T4 DNA连接酶购于Promega公司; GelRed核酸染料购于Biotium公司; 氨苄青霉素、PEG 6000购于Sangon公司; 质粒抽提试剂盒购于OMERGA公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于BI公司; DMEM、F12培养基购于Gibico公司; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)购于Origene公司; 反转录试剂盒购于TaKaRa公司; 大肠杆菌Top10为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 以含有人源CD47全长序列的质粒载体(CD47 cDNA ORF Clone in Cloning Vector, Human)为模板, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术获取目的片段并引入*Nhe* I、*Sal* I酶切位点, 将目的片段与慢病毒载体用限制性核酸内切酶*Nhe* I和*Sal* I进行酶切, 回收酶切产物用T4连接酶于16 °C连接4 h, 转化Top10大肠杆菌感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基中培养24 h, 挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的LB液体培养基中, 置于摇床中30 °C、280 r/min过夜培养后, 抽提质粒进行酶切验证并测序, 以确定质粒是否构建成功。

1.2.2 慢病毒制备 以含10% FBS的DMEM培养基培养代数较低的293T细胞, 确保其生长状态良好后将其传代至10 cm培养皿中, 待培养皿中的细胞增殖至90%以上融合度时, 更换5.8 mL含5% FBS的DMEM培养基, 继续培养2 h。将22.5 μ g目的质粒、13 μ g包装质粒、60 μ L CaCl₂(2.5 mol/L)与一定量的无菌ddH₂O混匀至总体积为600 μ L, 并于37 °C孵育30 min以上。取600 μ L的2 \times HBS并将其逐滴加入孵育后的混合体系中, 充分混匀后置于37 °C继续孵育3 min, 再将其加入至5 mL含5% FBS的DMEM培养基中, 37 °C孵育4 min后, 倒入上述培养皿中, 轻晃混匀, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 48 h后收集上清并纯化获取人源CD47病毒液。

1.2.3 细胞制备 以含10% FBS的F12培养基培养

表1 人源CD47 RT-PCR引物序列及长度

Table 1 Primer sequence and length of human CD47 for RT-PCR

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	长度/bp Length /bp
Human CD47-F	CGG CGC TGT TGC TGG GCT CG	20
Human CD47-R	ACA GTG TCA TTA CAA AAC GTG A	22

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞, 至生长状态良好且稳定后以 1×10^5 个/孔传至24孔板中, 500 μ L体系培养数小时至其贴壁, 加入1 μ L 500 \times DEAE与人源CD47病毒液, 轻晃混匀后置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养数代, 待其达到一定细胞数后通过反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及流式细胞术检测人源CD47的表达情况。

1.2.4 流式检测技术 将细胞经扩大培养至一定细胞量, 取 5×10^5 个细胞, 用PBS清洗, 300 \times g离心5 min, 弃上清, 用100 μ L含2% FBS的PBS重悬, 加入流式抗体/同型对照抗体, 于4 $^{\circ}$ C放置30 min, 用PBS清洗, 300 \times g离心5 min, 弃上清, 用200 μ L含2% FBS的PBS重悬后转移至流式管, 上机检测阳性率。

1.2.5 RT-PCR 分别取 1×10^6 个CHO与CHO-CD47细胞, PBS清洗, 弃上清, 用Trizol法提取总RNA, 利用逆转录试剂盒获取cDNA, 设计人源CD47 RT-PCR上游引物Human CD47-F与下游引物Human CD47-R(表1), 以cDNA为模板进行PCR, 将PCR产物进行电泳测定。

1.2.6 CHO-CD47结合配体蛋白 将带有His标签的配体蛋白溶于无菌ddH₂O并稀释至一定浓度, 加入4 $^{\circ}$ C预冷的含2% FBS的PBS至总体积为100 μ L, 向其中添加His流式抗体, 于4 $^{\circ}$ C孵育30 min后, 再与细胞于4 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS清洗, 4 $^{\circ}$ C、300 \times g离心5 min, 用4 $^{\circ}$ C预冷的含2% FBS的PBS重悬至流式管, 立即上机检测。

2 结果

2.1 靶细胞CD47表达检测

收集不同组织来源的细胞系, 包括人非小细胞肺癌细胞系A549、人结直肠细胞系DLD-1和LOVO、人肾透明细胞癌细胞系786-O和Caki-1、人前列腺癌细胞系PC3、人宫颈癌细胞系HeLa、人肝癌细胞系PLC、人卵巢癌细胞系SKOV3、人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞NK92、人胚肾

细胞293T, 将它们分别与可识别CD47上的SIRP α 结合位点的抗人CD47抗体共孵育^[14], 流式检测CD47的表达情况, 结果显示, 以上细胞中无CD47阴性细胞(图1A)。因此, 我们进一步尝试选择其他种属的工具细胞。CHO是一种广泛应用于生物学相关研究的工具细胞, 有学者制备了表达人源PD-L1的PD-L1/aAPC CHO-K1细胞并用于验证山奈酚和山奈酚-7-O-鼠李糖苷体外抑制PD1/PD-L1相互作用的能力^[15]。我们首先对CHO的CD47分子和人CD47分子IgV域的同源性进行比对, 结果显示, 两者IgV域同源性并不高(图1B)。将CHO细胞与抗人CD47抗体共孵育后, 流式检测结果显示, CHO的CD47确实不与抗人CD47抗体结合(图1C)。综合上述结果可知, CHO可作为阴性细胞, 诱导其表达人源CD47, 构建CHO-CD47细胞系作为阳性细胞, 建立CD47靶向研究评价模型, 具有较大的应用价值。

2.2 pL-CD47表达质粒的构建及鉴定

为了能够安全有效转导外源CD47至细胞中, 在转导载体上, 选择安全且能够稳定整合到宿主基因组的第三代自身失活型慢病毒载体。为了获得稳定、高效的基因表达效果, 我们选了CAG复合启动子, 该启动子由巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)早期增强子和鸡 β -肌动蛋白启动子组成, 克服了CMV启动子在体内可能出现表达沉默的缺点^[16]。通过设计PCR引物, 在人源CD47序列首尾两侧引入Nhe I和Sal I酶切位点, 用Nhe I和Sal I限制性核酸内切酶进行酶切后, 通过T4连接酶将其接入慢病毒表达载体中, 转化至大肠杆菌感受态细胞后经氨苄青霉素筛选获得阳性单菌落, 并将单菌落接种至含氨苄青霉素的LB液体培养基中, 于恒温摇床中30 $^{\circ}$ C、280 r/min过夜培养, 抽提质粒并通过Nhe I和Sal I限制性核酸内切酶进行酶切鉴定, 结果显示, 所抽提的质粒中包含目的条带, 其大小与理论值(974 bp)相符; 随后对其进行测序并比对序列, 结果显示, 测序结果与目的序列一致, 这表明pL-CD47表达质粒构建成功(图2)。

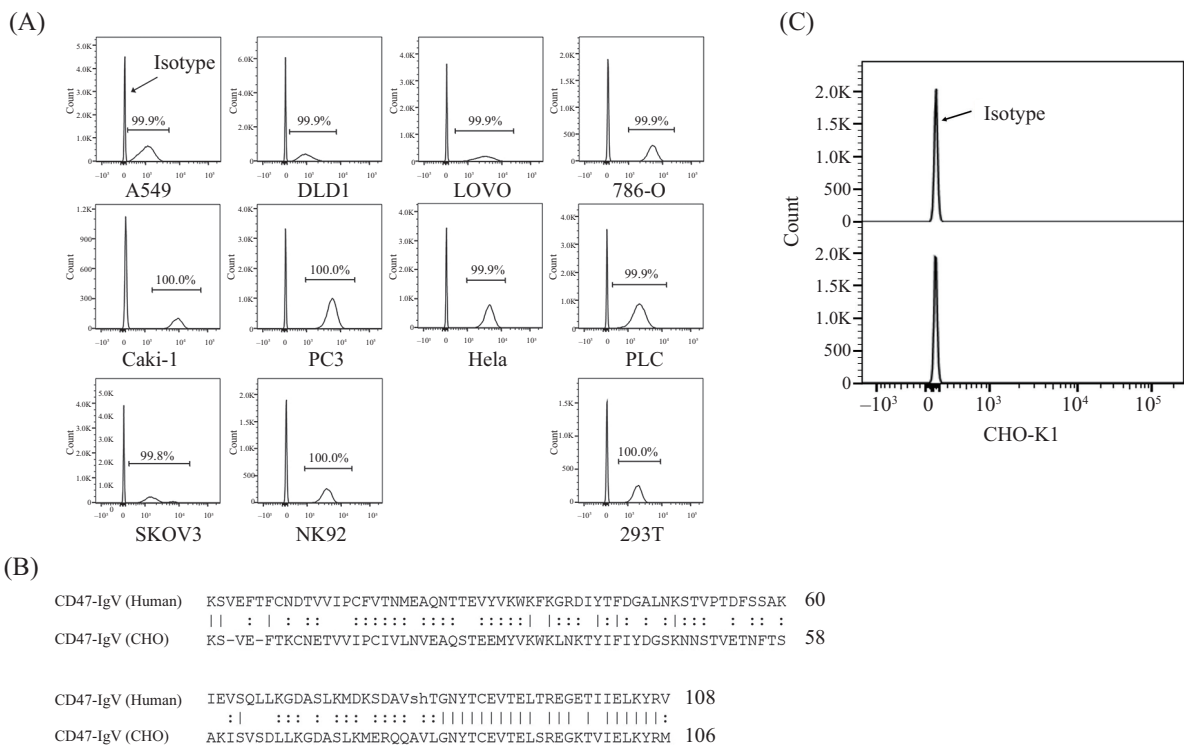
2.3 CHO-CD47细胞系构建

利用慢病毒包装系统将人源CD47表达质粒包装成慢病毒。通过人源CD47慢病毒感染CHO细胞,使其表达人源CD47。为准确检测其mRNA的表达情况,在同源性较低的核酸序列区域设计人源CD47的RT-PCR引物。待细胞增殖至一定数目后,流式检测阳性率并通过RT-PCR检测mRNA的表达情况(图3A和图3B),从分子水平对CHO-CD47进行评价。流式检测结果显示,CHO-CD47阳性率达到94.7%; RT-PCR检测结果显示,CHO无人源CD47扩增,而CHO-CD47存在人源CD47扩增片段,这表明CHO-CD47特异性表达人源CD47 mRNA,从分子水平证实CHO-CD47可成功表达人源CD47。

细胞模型评价中,表达稳定性是一项重要指标。将CHO-CD47冻存后复苏并进行长期培养,每隔2~3天进行传代,共10次传代后,再次对其进行阳性率检测,结果显示,阳性率为96.4%(图3C),前后两次流式检测结果表明,在经过冻融且多次传代后,CHO-CD47细胞阳性率处于相对稳定水平,表明CHO-CD47细胞上人源CD47稳定表达。

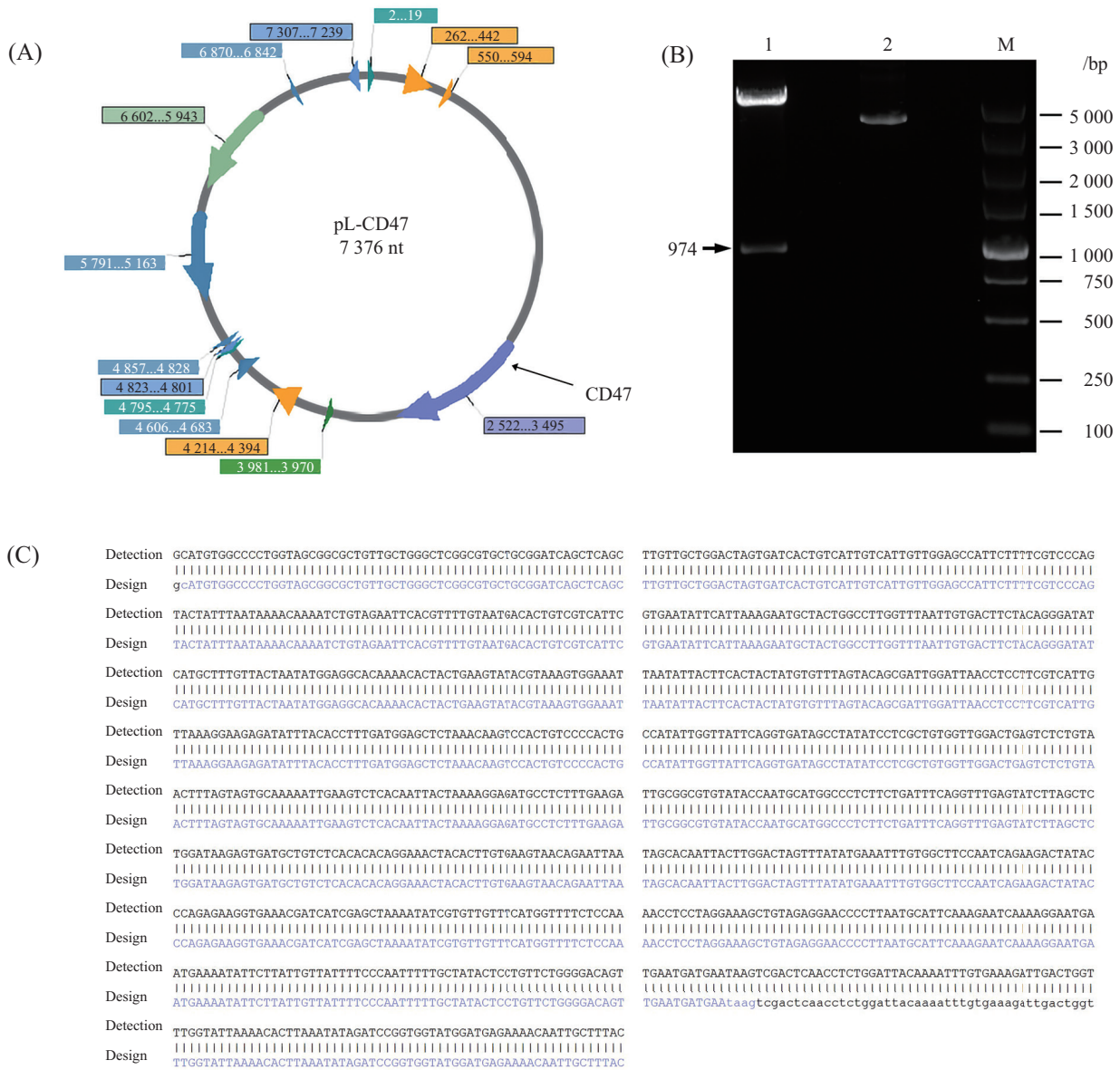
2.4 生物学结合验证

SIRP α 是CD47的配体,可与CD47结合并激活信号通路。为了在蛋白水平对CHO-CD47进行评价,通过检测CD47的天然配体SIRP α 能否与CHO-CD47结合来验证CHO-CD47的生物学功能。将溶解的人SIRP α -His Tag重组蛋白与His流式抗体于4 °C共孵育,使His流式抗体与人SIRP α -His Tag重组蛋白上的His结合,随后与293T细胞于4 °C共孵育,流式检测His阳性率并以此判断CD47与配体的结合情况,结果显示,His呈阳性,表明人SIRP α -His Tag重组蛋白可与293T上的CD47正常结合(图4A)。考虑到人源CD47与CHO的CD47存在同源性,为明确人SIRP α -His Tag重组蛋白是否存在结合CHO上CD47分子的情况及能否与CHO-CD47上人源CD47结合,将CHO、CHO-CD47分别与标记了His流式抗体的人SIRP α -His Tag重组蛋白于4 °C共孵育,流式检测His阳性率,结果表明,CHO不与人SIRP α -His Tag重组蛋白结合,CHO-CD47结合人SIRP α -His Tag重组蛋白且阳性率为52.4%(图4B),表明CHO-CD47可与SIRP α 发生特异性结合。



A: 人源细胞系上人源CD47的检测; B: CHO细胞系CD47与人源CD47 IgV域同源性对比; C: CHO-K1细胞CD47结合抗人CD47抗体能力检测。
A: detection of human-derived CD47 in human cell lines; B: comparison of IgV domain homology between CHO cell line CD47 and human-derived CD47; C: detection of combination between CD47 of CHO-K1 cell and anti-human CD47 antibody.

图1 CD47表达检测及同源性对比
Fig.1 CD47 expression detection and homology comparison



A: pL-CD47表达质粒结构示意图; B: pL-CD47表达质粒酶切鉴定电泳图, 1: *Nhe*I及*Sal*I双酶切pL-CD47表达质粒, 2: pL-CD47表达质粒, M: DL5 000 DNA分子量标准; C: pL-CD47表达质粒序列比对。
 A: schematic diagram of pL-CD47 expression plasmid; B: electrophoresis pattern of pL-CD47 expression plasmid digestion identification, 1: double digestion of pL-CD47 expression plasmid with *Nhe*I and *Sal*I, 2: pL-CD47 expression plasmid, M: DL5 000 DNA marker; C: sequencing alignment of pL-CD47 expression plasmid.

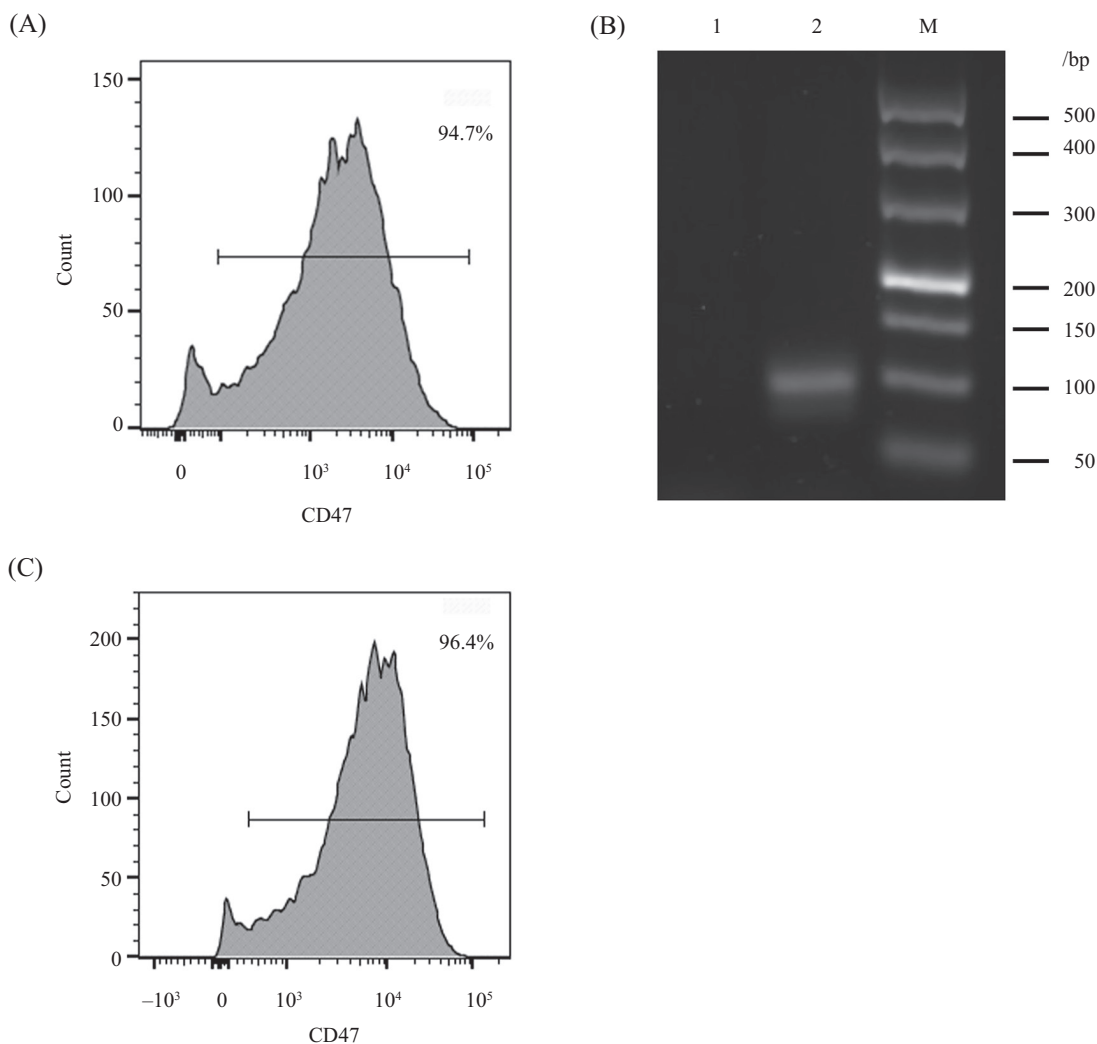
图2 pL-CD47表达质粒的构建与鉴定

Fig.2 The construction and identification of pL-CD47 expression plasmid

除了SIRP α 外, 信号调节蛋白 γ (signal regulatory protein γ , SIRP γ)也是CD47的配体之一, 可与CD47结合。为了进一步完善对CHO-CD47蛋白水平的评价, 溶解SIRP γ -His Tag重组蛋白并重复上述实验, 结果表明, 293T上的CD47可与SIRP γ -His Tag重组蛋白结合(图4C), CHO不与SIRP γ -His Tag重组蛋白结合, CHO-CD47结合SIRP γ -His Tag重组蛋白且阳性率为75.3%(图4D), 表明CHO-CD47也可与SIRP γ 发生特

异性结合。

以上结果说明, CHO-CD47表达的人源CD47可与CD47配体正常结合, 保留了人CD47的生物学活性。然而与人源CD47表达阳性率检测结果96.4%(图3C)相比, 上述结果中CHO-CD47表达的人源CD47与SIRP α /SIRP γ 的结合率偏低。由于CD47与配体的结合与抗原抗体结合相比存在一定的差异性, 故有可能造成该现象的发生。经查询文献得知,



A: 病毒感染后CHO-CD47阳性率检测; B: RT-PCR检测人源CD47表达电泳图, 1: CHO, 2: CHO-CD47, M: DL500 DNA分子量标准; C: CHO-CD47冻融并10次传代后阳性率检测。

A: detection of CHO-CD47 positive rate after virus infection; B: electrophoresis pattern of human-derived CD47 detection by RT-PCR, 1: CHO, 2: CHO-CD47, M: DL500 DNA marker; C: positive rate detection of CHO-CD47 after freeze-thawing and passaging 10 times.

图3 CHO-CD47中CD47表达测定

Fig.3 The determination of CD47 expression in CHO-CD47

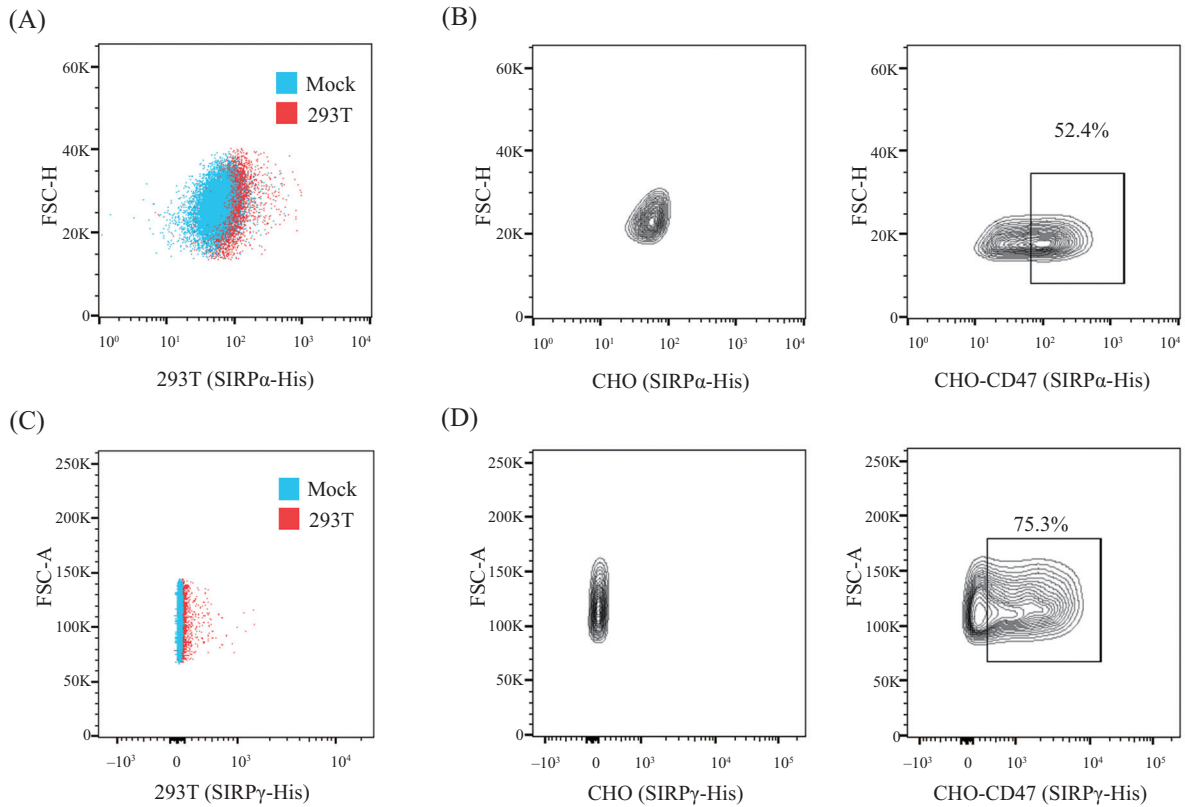
CD47与配体蛋白在结合后确实存在快速解离的现象^[17-18], 因此, 以上结果符合预期。综上所述, 用于CD47靶向研究的细胞模型构建成功。

3 讨论

细胞模型的构建是许多研究中的重要环节, 完备的细胞模型很大程度上能够推动研究的顺利进行。诸多国内外学者大多会根据自己的研究需求而建立特定的细胞模型, 来推动课题研究的进展。AMER等^[19]通过利用293细胞构建过表达Src同源性胶原蛋白D(Src homology and collagen D, ShcD)的293细胞系用于研究ShcD介导细胞运动的机制。JAMES

团队^[20]构建了由小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, *MMTV*)启动子控制的报告蛋白分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)表达载体并成功转染CHO细胞, 通过对比SEAP的产量评价了*MMTV*启动子的可行性。CHOI利用慢病毒载体将*CD19*基因导入U87, 使U87表达CD19, 成功用于评价CART.BiTEs的体外效应^[21]。

本研究选择CHO作为人源CD47阴性细胞, 通过外源表达人源CD47的方式建立用于CD47靶向研究的细胞模型。作为一种常用的工具细胞, CHO在药物评价等方面应用广泛。RAJENDRA等^[22]将CHO细胞作为表达系统, 用于评价四元载体方法作



A: SIRP α 结合人CD47的能力检测; B: CHO及CHO-CD47与SIRP α 共孵育后His阳性率检测; C: SIRP γ 结合人CD47的能力检测; D: CHO及CHO-CD47与SIRP γ 共孵育后His阳性率检测。

A: binding ability detection of SIRP α with human CD47; B: detection of His positive rate after co-incubation of SIRP α with CHO and CHO-CD47; C: binding ability detection of SIRP γ with human CD47; D: detection of His positive rate after co-incubation of SIRP γ with CHO and CHO-CD47.

图4 CHO-CD47结合CD47配体
Fig.4 CHO-CD47 bind to CD47 ligands

为简单有效的替代方法在双特异性抗体的瞬时表达和稳定表达上的可行性。为构建CHO-CD47细胞系,我们将目的基因接入含CAG启动子的表达载体中,通过慢病毒包装和体外感染,将人源CD47基因插入CHO细胞基因组中,这种转染方法转染效率高,且可转染分裂期和非分裂期的细胞,亦可使目的基因长期稳定表达。成功转染后,通过流式细胞术、RT-PCR等技术验证人源CD47的表达及其稳定性。为确定CHO-CD47细胞模型可用于靶向研究,将其与配体蛋白SIRP α /SIRP γ 共孵育,通过流式细胞术确定CHO-CD47可结合SIRP α 和SIRP γ 。至此,确定CHO-CD47细胞模型的成功构建。在理论应用中,通过以CHO细胞为阴性细胞,CHO-CD47为阳性细胞,两者形成单一变量对照,从而为开发靶向CD47的药物并验证其与CD47分子的结合能力提供模型。但CHO细胞作为鼠源的细胞系,与人源肿瘤细胞相比必然存在一定的差异,因此,在药物的研发过程中,仍需

以人源细胞来评价药物的药效。

综上所述,本研究以CHO细胞为基础,构建表达人源CD47分子的CHO-CD47细胞系并从RNA水平及蛋白水平对其进行评估,建立CHO-CD47细胞模型,旨在为人源CD47靶向研究提供可靠的细胞模型,为以CD47为靶点的癌症治疗研究提供一定的研究基础。

参考文献 (References)

- [1] KONG F, GAO F, LI H, et al. CD47: a potential immunotherapy target for eliminating cancer cells [J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(11): 1051-5.
- [2] RATNIKOVA N M, LEZHIN Y N, FROLOVA E I, et al. CD47 receptor as a primary target for cancer therapy [J]. Mol Biol, 2017, 51(2): 216-25.
- [3] TONG B, WANG M. CD47 is a novel potent immunotherapy target in human malignancies: current studies and future promises [J]. Futur Oncol, 2018, 14(21): 2179-88.
- [4] BROWN E J, FRAZIER W A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(3): 130-5.

- [5] WEISKOPF K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 76: 100-9.
- [6] BARCLAY A N, VAN DEN BERG T K. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 25-50.
- [7] HAYAT S M G, BIANCONI V, PIRRO M, et al. CD47: role in the immune system and application to cancer therapy [J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(1): 19-30.
- [8] MATLUNG H L, SZILAGYI K, BARCLAY N A, et al. The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer [J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 145-64.
- [9] LIU J, WANG L, ZHAO F, et al. Pre-clinical development of a humanized anti-CD47 antibody with anti-cancer therapeutic potential [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): 1-23.
- [10] ADVANI R, FLINN I, POPPLEWELL L, et al. CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(18): 1711-21.
- [11] PETROVA P S, VILLER N N, WONG M, et al. TTI-621 (SIRP α Fc): A CD47-blocking innate immune checkpoint inhibitor with broad antitumor activity and minimal erythrocyte binding [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(4): 1068-79.
- [12] ANSELL S, CHEN R W, FLINN I W, et al. A phase 1 study of TTI-621, a novel immune checkpoint inhibitor targeting CD47, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2016, 128(22): 1812.
- [13] SOTO-PANTOJA D R, KAUR S, ROBERTS D D. CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015, 50: 212-30.
- [14] LOGTENBERG M E W, JANSEN J H M, RAABEN M, et al. Glutaminyl cyclase is an enzymatic modifier of the CD47-SIRP α axis and a target for cancer immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 612-9.
- [15] KIM J H, KIM Y S, CHOI J G, et al. Kaempferol and its glycoside, kaempferol 7-O-rhamnoside, inhibit PD-1/PD-L1 interaction *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): E3239.
- [16] RAMEZANI A, HAWLEY T S, HAWLEY R G. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells [J]. *Mol Ther*, 2000, 2(5): 458-69.
- [17] NETTLESHIP J E, REN J, SCOTT D J, et al. Crystal structure of signal regulatory protein gamma (SIRP γ) in complex with an antibody Fab fragment [J]. *BMC Struct Biol*, 2013, 13: 13.
- [18] BROOKE G, HOLBROOK J D, BROWN M H, et al. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family [J]. *J Immunol*, 2004, 173(4): 2562-70.
- [19] AMER S, ALSAYEGH F, MASHAAL Z, et al. Role of TGF- β in the motility of ShcD-overexpressing 293 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2667-74.
- [20] JAMES R, ELTON J, TODD P, et al. Engineering CHO cells to overexpress a secreted reporter protein upon induction from mouse mammary tumor virus promoter [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67(2): 134-40.
- [21] CHOI B D, YU X, CASTANO A P, et al. CAR-T cells secreting BiTEs circumvent antigen escape without detectable toxicity [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9): 1049-58.
- [22] RAJENDRA Y, PEERY R B, HOUGLAND M D, et al. Transient and stable CHO expression, purification and characterization of novel hetero-dimeric bispecific IgG antibodies [J]. *Biotechnol Prog*, 2017, 33(2): 469-77.