

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )04-0243-06

## 转染嵌合性 T 细胞受体基因小鼠 T 淋巴细胞的体外抗肿瘤作用

杨建民<sup>1</sup>, Michael S Friedman<sup>2</sup>, 李 峤<sup>2</sup>, James J Mule<sup>2</sup>, Alfred E Chang<sup>2</sup>, Kevin T McDonagh<sup>3</sup>( 1. 第二军医大学长海医院血液内科, 上海 200433; 2. University of Michigan, Medical School, Ann Arbor MI 48109-0620, USA; 3. University of Kentucky, College of Medicine, Lexington Ky 0536-0293, USA )

[ 摘 要 ] **目的:** 研究小鼠 T 淋巴细胞在转染嵌合性 T 细胞受体基因后的体外抗肿瘤作用。**方法:** 应用重组 DNA 技术, 将 HER2 特异性嵌合性 T-细胞受体构建入逆转录病毒载体; 转入包装细胞后, 收集病毒上清, 转染小鼠 T 淋巴细胞, 转基因后的小鼠 T 淋巴细胞分别与 HER2 阳性( SK-OV-3 )或阴性( MCF-7 )的肿瘤细胞系共培养, 检测其细胞因子  $\gamma$  干扰素释放, <sup>51</sup>Cr 释放法检测 CTL 评价其抗肿瘤效应。**结果:** 所构建载体经酶切鉴定符合要求, 乒乓法转染包装细胞系 GP + E86, 检测病毒滴度为  $1.2 \times 10^6$ , Retroectin 结合离心法转染经抗 CD3/CD28 单抗活化的小鼠 T 淋巴细胞, 转染效率可达 50% 以上; 转染嵌合性 T 细胞受体基因的 T 淋巴细胞与 HER2 阳性或阴性的肿瘤细胞系共培养后可检测到 HER2 特异性的细胞因子  $\gamma$  干扰素释放, <sup>51</sup>Cr 释放法测 CTL 可见转染嵌合性 T 细胞受体基因 T 淋巴细胞对 HER2 阳性的肿瘤细胞具显著杀伤效应。**结论:** 转染嵌合性 T 细胞受体基因的小鼠 T 淋巴细胞在体外可通过细胞因子释放和 CTL 效应发挥显著的抗肿瘤作用。

[ 关键词 ] 嵌合性 T 细胞受体; 基因转染; 免疫治疗; 小鼠; T 淋巴细胞

[ 中图分类号 ] R730.59 [ 文献标识码 ] A

## Anti-tumor effects of murine T-lymphocytes harboring p185HER2 specific chimeric T-cell receptor gene

YANG Jian-min<sup>1</sup>, Michael S Friedman<sup>2</sup>, LI Qiao<sup>2</sup>, James J Mule<sup>2</sup>, Alfred E Chang<sup>2</sup>, Kevin T McDonagh<sup>3</sup>( 1. Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. University of Michigan, Medical School, Ann Arbor MI 48109-0620, USA; 3. University of Kentucky, College of Medicine, Lexington Ky 40536-0293, USA )

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of murine T-lymphocytes harboring p185HER2 specific chimeric T-cell receptor gene. **Methods:** The p185HER2 specific chimeric T-cell receptor N29 $\gamma$  or N29 $\zeta$  were introduced into retroviral vector pRET6, and the viral producer cell line was established using a Ping-Pong method. Murine spleen T-lymphocytes were transfected using an optimized protocol incorporating activation with immobilized anti-CD3/anti-CD28, followed by infection in the presence of Retroectin. Transduced murine T-lymphocytes were co-cultured with tumor cell lines overexpressing ( SK-OV-3 ) or underexpressing ( MCF-7 ) p185HER2 for assaying antigen specific cytokine release and CTL. **Results:** Endonuclease digestion showed the constructed vector was corrected. The titer of retroviral supernatant collected was  $1.2 \times 10^6$  and the retroviral transduction efficiency reached over 50% with our optimized method. Both N29 $\gamma$  and N29 $\zeta$  chimeric T-cell receptor transduced T-lymphocytes demonstrated HER2-specific antigen response as determined by release of interferon  $\gamma$  and cellular cytotoxicity assays. **Conclusion:** Our results suggest that murine T-lymphocytes harboring chimeric T-cell receptor gene had obvious antitumor effect in vitro through releasing cytokines and CTL effect.

[ **Key words** ] chimeric T-cell receptor; gene transduction; immunotherapy; murine; T-lymphocytes

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13( 4 ): 243-248 ]

淋巴细胞是体内最为重要的免疫效应细胞, 在机体抗肿瘤和抗病毒免疫中均发挥着极为关键的作用<sup>[1]</sup>。早在上世纪 80 年代末, 即有人尝试以淋巴细胞作为肿瘤免疫基因治疗的靶细胞, 但由于当时对淋巴细胞本身的生物学行为认识的限制, 基因转染效率不

到 10%<sup>[2]</sup>, 应用转基因的淋巴细胞进行免疫基因治疗

[ 基金项目 ] NIH grant Ro1CA92488

[ 作者简介 ] 杨建民( 1965- ), 男, 浙江湖州人, 副教授、副主任医师, 主要从事恶性淋巴瘤、白血病诊断与治疗研究

[ 通讯作者 ] 杨建民, E-mail: yangjianmin@csc.org.cn

的疗效也不甚理想。近年随着对淋巴细胞的活化途径的进一步了解,以及淋巴细胞表面一系列与活化相关的受体分子及共刺激分子的发现,淋巴细胞的基因转染效率得以显著提高,这为应用转基因的淋巴细胞进行肿瘤的免疫基因治疗奠定了基础。

本研究将肿瘤抗原 p185HER2 特异性的单克隆抗体(N29)的 scFv 基因作为嵌合性 T 细胞受体的抗原识别区,嵌合性 T 细胞受体的信号转导肽分别为 FcR1 的  $\gamma$  链及 TCR 的  $\zeta$  链;所构建得到的逆转录病毒载体分别命名为 N29 $\gamma$  和 N29 $\zeta$ 。与肿瘤特异性 TCR 相比,该嵌合性 TCR 的最大优点就是在杀伤肿瘤细胞时可以不受 MHC 限制,这将为其实临床应用提供极大便利。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞系、单抗和培养基

GP + E86 包装细胞系、Phenix A 包装细胞系均购自美国 ATCC,各种 ELISA 单抗均购自 B. D. Pharmingen 公司,淋巴细胞分离液( $d = 1.078$ )购自 Mediatech Cellgro 公司,X-Vivo 15 淋巴细胞培养液为 Bio-Whittaker 公司产品,抗 CD3 单抗购自 Ortho Pharmaceuticals 公司,抗 CD28 单抗购自 B. D. Pharmingen 公司,Retronectin 购自 Takara Shuzo 公司。rhIL-2 由 Chiron 公司惠赠。

#### 1.2 逆转录病毒载体构建及病毒上清制备

应用磷酸钙沉淀法将含嵌合性 T 细胞受体 N29 $\gamma$ /N29 $\zeta$  的逆转录病毒载体(图 1)转入瞬时包装细胞系 Phenix A,收集其上清转染 GP + E86 包装细胞系,嘌呤霉素筛选后成为稳定产病毒包装细胞系用于本实验。用 3T3 细胞测得病毒滴度为  $1.2 \times 10^6$ 。

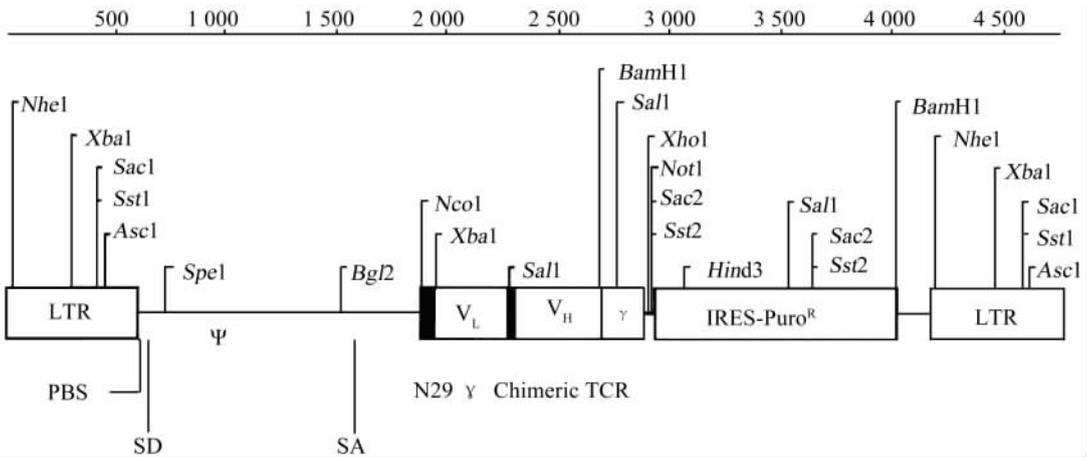


图 1 含嵌合性 T 细胞受体的逆转录病毒载体结构与酶切示意图

Fig. 1 Bicistronic N29 chimeric TCR retroviral vector

The retroviral vector backbone (pRET6) is a modified version of the moloney murine leukemia virus (MoMLV) based MFG retroviral vector. The packaging signal ( $\psi$ ), splice donor (SD), and splice acceptor (SA) sites are marked

#### 1.3 小鼠淋巴细胞的分离与活化

C57/B6 小鼠,雄性,8~10 周龄。处死后酒精浸泡消毒。开腹取脾脏,用组织剪剪成小碎片,碾碎。细胞滤器滤过后裂解红细胞,离心洗涤后过尼龙柱去除中性粒细胞和单核细胞。所得细胞经流式细胞仪分析测定,T 淋巴细胞比例为 80%~85%。

分离后的淋巴细胞转入包被有抗 CD3 和抗 CD28 单抗(两种单抗均以  $2 \mu\text{g/ml}$  包被 24 孔板,每孔加包被液 0.5 ml,37 $^{\circ}\text{C}$  过夜。)的 24 孔板培养激活。活化后的细胞离心收集,以 X-Vivo 15 培养液加 rhIL-2 200 IU/ml 扩增培养。

#### 1.4 离心法转染淋巴细胞

收集抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体活化后的淋巴

细胞,计数后按  $5 \times 10^5/\text{ml}$  用新鲜 RV 病毒上清重悬细胞。24 孔培养板每孔加入细胞悬液 2 ml。置  $\text{CO}_2$  孵箱 10 min 后以 parafilm 密封培养板,32 $^{\circ}\text{C}$ ,1 000  $\times g$  离心 90 min,吸弃病毒上清,换含 rhIL-2 (300 IU/ml) 的 X-Vivo 15 培养液置  $\text{CO}_2$  孵箱培养。

#### 1.5 应用 Retronectin 提高淋巴细胞基因转染效率

以 Retronectin 每孔 40  $\mu\text{g}$  溶于 0.5 ml PBS 中包被非组织培养处理过的 24 孔培养平板,室温,2 h; 包被液后以 2% BSA 室温封闭 30 min。将 RV 上清以每孔 2 ml 加入 Retronectin 包被的 24 孔培养板,4 $^{\circ}\text{C}$ ,1 700  $\times g$  离心 2 h,吸弃上清,每孔加入新鲜的病毒上清 2 ml 和活化后的淋巴细胞  $1 \times 10^6$ ,32 $^{\circ}\text{C}$ ,1 000  $\times g$  离心转染 90 min。离心结束后轻轻吸弃病毒上清,每孔

加入含 rhIL-2 (300 IU/ml) 的 X-Vivo 15 2 ml, 37°C 培养 24 h 后收集淋巴细胞, 用含 rhIL-2 的 X-Vivo 15 培养液扩增转基因淋巴细胞。

### 1.6 Western blot 检测嵌合性 T 细胞受体 N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$ 表达

NP-40 裂解细胞, 15 000  $\times g$ , 4°C 离心 15 min, 收集含蛋白上清; 定量后, 每孔加待测样品 20 ~ 50  $\mu g$ , 分子量 Marker 为 Biorad 的 Kaleidoscope 每孔 10  $\mu l$ 。Biorad Tris-HCl 胶 SDS-PAGE 电泳, 电压 100 ~ 110 V, 过浓缩胶, 然后 200 V 电泳。转移至 Immobilon 膜, 4°C, TOW-BIN 缓冲液, 200 mA/h, 0.05% Tween-20、5% NFDN/TBS (pH 7.4 ~ 7.6) 缓冲液, 室温封闭 2 h 或 4°C 过夜。加一抗: 单抗浓度 1:1 000, 缓慢振荡, 4°C 过夜。洗膜。加二抗: 室温, 1 ~ 2 h。洗膜。采用 NEN HRP 检测试剂盒, 将 A、B 溶液各 5 ml 混匀后让膜浸透, 反应 1 min。曝光 X-片。

### 1.7 ELISA 法检测 HER2 特异性细胞因子 IFN- $\gamma$ 释放

p185HER2 阴性的 MCF7 和 p185HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞系每孔各  $2 \times 10^5$  个细胞加入 24 孔培养板, 次日待肿瘤细胞贴壁后每孔分别加入转染 pRET6N29 $\gamma$ 、pRET6N29 $\zeta$  或 pRET6EGFP 的淋巴细胞每孔  $1 \times 10^6$ 。37°C、5% CO<sub>2</sub> 共培养 24 h 后取上清测定其中的细胞因子 IFN- $\gamma$  浓度。细胞因子的测定采用 ELISA 法。

### 1.8 <sup>51</sup>Cr 释放法检测 HER2 特异性 CTL

p185HER2 阴性的 MCF7 和 p185HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞系加 <sup>51</sup>Cr 后 37°C 孵育 2 h 以标记核素, 标记好的肿瘤细胞按效: 靶比 0.8:1、4:1、20:1 及 100:1 分别混合转染 pRET6N29 $\gamma$ 、pRET6N29 $\zeta$  或 pRET6EGFP 的淋巴细胞加入 U 形底的 96 孔板, 每孔 200  $\mu l$ 。37°C 共培养 6 h 后用吸附柱收集上清, 检测上清中的 cpm 值。按以下公式计算细胞杀伤率:

$$\text{细胞杀伤率} = \left[ \frac{(\text{cpm}_{\text{实验}} - \text{cpm}_{\text{本底}})}{(\text{cpm}_{\text{最大}} - \text{cpm}_{\text{本底}})} \right] \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 淋巴细胞的激活状态、离心法及 Retronectin 对淋巴细胞基因转染效率的影响

逆转录病毒载体介导的基因转染有赖于被转染的靶细胞处于细胞增殖状态。因此, 为提高淋巴细胞的基因转染效率, 本实验采用抗 CD3 和抗 CD28 单抗共同刺激淋巴细胞, 以使尽可能多的淋巴细胞进入细胞增殖周期。实验表明, 抗 CD3 和抗 CD28 单抗共同刺激 1 d 或 2 d 后, 淋巴细胞的转染效率即可达 21% ~ 25%。如在培养基中加入 huIL-2 则转染效率可提高到

40% 以上。

为了进一步提高淋巴细胞的基因转染效率, 在淋巴细胞处于最佳激活状态时, 联合采用离心法和 CH296 包被的平板进行转染, 结果淋巴细胞的基因转染效率接近 60%。

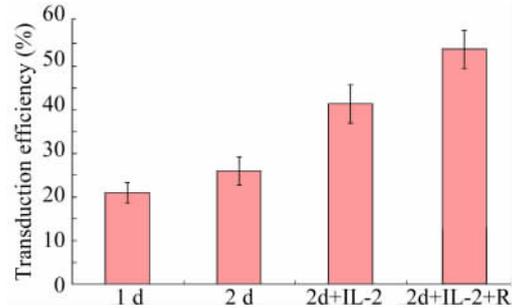


图2 淋巴细胞的激活状态、离心法及 Retronectin 对基因转染效率的影响

Fig.2 Influence of lymphocyte activation status, centrifugation, and retronectin all contributed on retroviral transduction efficiency

### 2.2 嵌合性 T 细胞受体在包装细胞和淋巴细胞中的表达

嵌合性 T 细胞受体在包装细胞系及淋巴细胞中的正确表达是其发挥抗肿瘤作用的前提, 为此本实验采用 Western blot 检测了嵌合性 T 细胞受体在包装细胞系及淋巴细胞中的表达。Western blot 结果表明, 转染 N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$  的包装细胞系及淋巴细胞中均可见相对分子质量为 37 000 和 44 000 的条带, 与按基因片段长度计算所得的嵌合性 T 细胞受体 N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$  的相对分子质量相符(图 3)。

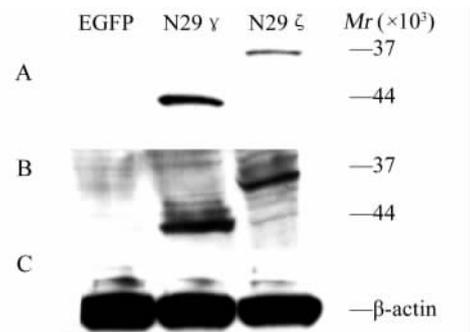


图3 Western blot 检测嵌合性 T 细胞受体 N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$  在包装细胞系和转基因淋巴细胞中的表达

Fig.3 Western blotting analysis of chimeric T-cell receptor in packaging cell line GP + E86 and transduced murine spleen T-lymphocytes

A: The packaging cell line GP + E86 retroviral vectors;  
B, C: The transduced murine spleen T-lymphocytes

### 2.3 转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞与 p185HER2 阳性的肿瘤细胞共培养后细胞表面活化标志 CD69 的表达

淋巴细胞在活化后其表面活化标志分子 CD69 的表达明显增多,因此实验采用 CD69 作为观察指标,以确定转基因的淋巴细胞在接触相应抗原后是否能激活。结果转染 N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$  的小鼠淋巴细胞与 p185HER2 阳性的肿瘤细胞 SK-OV-3 共培养后分别有 15% 和 8% 表达了 CD69,而未转基因的淋巴细胞及转染 EGFP 的淋巴细胞与 SK-OV-3 共培养后 CD69 的表达与对照组差异不显著。不同组别的淋巴细胞与 p185HER2 阴性的肿瘤细胞 MCF-7 共培养后仅见 CD69 低水平的表达(图 4)。从而说明转基因的淋巴细胞的激活是 p185HER2 肿瘤抗原特异性的。

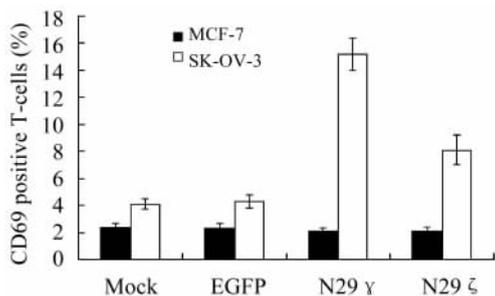


图 4 与 p185HER2 阳性的肿瘤细胞共培养后转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞表面活化标志 CD69 的表达

Fig. 4 Expression of surface activation marker CD69 on chimeric T-cell receptor modified lymphocytes after coculture with p185HER2 over-expressing ( SK-OV-3 ) and under-expressing ( MFC-7 ) tumor cell lines

### 2.4 转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞与 p185HER2 阳性的肿瘤细胞共培养后细胞因子 IFN- $\gamma$ 的释放

转染 pRET6N29 $\gamma$  的淋巴细胞与 p185HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞系共培养后可见明显的细胞因子 IFN- $\gamma$  的释放,转染 pRET6N29 $\zeta$  的淋巴细胞与 SK-OV-3 肿瘤细胞系共培养后仅见少量细胞因子释放。而未转基因的淋巴细胞及转染 EGFP 的淋巴细胞与 SK-OV-3 共培养后培养上清液中细胞因子的浓度与对照组差异不显著。不同组别的淋巴细胞与 p185HER2 阴性的肿瘤细胞 MCF-7 共培养后仅在培养上清液中检测到低浓度的细胞因子(图 5)。从而说明转基因淋巴细胞 IFN- $\gamma$  的释放是 p185HER2 肿瘤抗原特异性的。

### 2.5 $^{51}\text{Cr}$ 释放法检测转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞对 p185HER2 阳性的肿瘤细胞的杀伤效应

$^{51}\text{Cr}$  释放法是至今为止被认为最能直接反应淋巴细胞对肿瘤细胞的 CTL 杀伤效应的检测方法。本实验

以  $^{51}\text{Cr}$  标记肿瘤细胞 SK-OV-3 和 MCF-7 后,分别以 100:1、20:1、4:1 和 0.8:1 的效靶比将肿瘤细胞和转染 EGFP、N29 $\gamma$ 、N29 $\zeta$  的小鼠淋巴细胞混合培养,6 h 后测定培养上清中游离的  $^{51}\text{Cr}$  含量。结果转染 N29 $\gamma$  和 N29 $\zeta$  的淋巴细胞在效靶比为 100:1 时,对 p185HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞的杀伤比例分别达 26%、31%;当效靶比为 20:1 时杀伤比例分别达 12%、8%,均显著高于相同效靶比时转染 EGFP 组。各组淋巴细胞对 p185HER2 阴性的 MCF-7 肿瘤细胞的杀伤率无明显差异(图 6)。

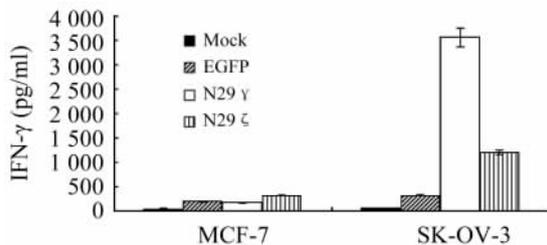


图 5 ELISA 法检测转染嵌合性 T 细胞受体的小鼠淋巴细胞与 p185HER2 阳性的 SK-OV-3 或阴性的 MCF-7 的肿瘤细胞共培养后细胞因子 IFN- $\gamma$  的释放

Fig. 5 Chimeric T-cell receptor transduced murine T-lymphocytes co-cultured with MCF-7 or SK-OV-3 tumor cells for 24 hours at an effector to target ratio of 5:1. Release of interferon- $\gamma$  was monitored by ELISA

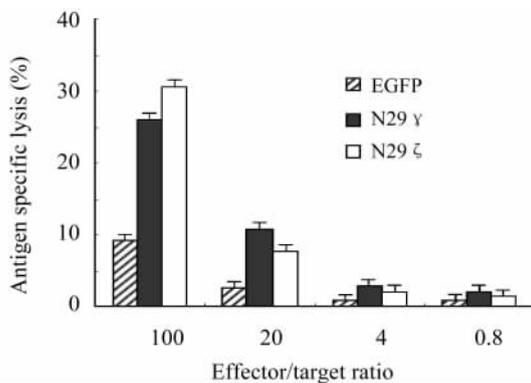


图 6  $^{51}\text{Cr}$  释放法检测转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞对 p185HER2 阳性的肿瘤细胞的杀伤效应

Fig. 6 Chimeric T-cell receptor transduced murine T-lymphocytes co-cultured with  $^{51}\text{Cr}$  labeled SK-OV-3 tumor cells. Cytotoxicity was measured after 4 hours by determining chromium release

## 3 讨论

HER2/neu 癌基因在许多恶性肿瘤细胞表面均有高表达,其中包括乳腺癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌及前列腺癌等。已有众多的研究结果证实由 HER2/neu 癌

基因表达的 p185HER2 蛋白是免疫治疗乳腺癌等恶性肿瘤的极佳靶位点。在确诊的乳腺癌中约有 20% ~ 40% 患者有 *HER2/neu* 基因的扩增或过表达。回顾性分析表明, 此类患者对联合化疗的反应差、复发率高、总体长期生存率低<sup>[3]</sup>。体外研究及动物体内实验结果证实 p185HER2 在乳腺癌的发病及临床进程中发挥重要作用, p185HER2 特异性单克隆抗体对表达 p185HER2 的肿瘤细胞系在体外生长有明显的抑制作用。目前 p185HER2 靶向的人源化的单克隆抗体 Herceptin 已成功应用于临床, 并在 HER2 阳性的乳腺癌患者取得了良好的疗效。

嵌合性 T 细胞受体是一种应用基因工程技术重组的免疫受体, 它包括细胞膜外的抗原识别区和细胞膜内的信号传导区两部分。目前最为常用的膜外的抗原识别区为单链免疫球蛋白可变区片段 (scFv), 即由多肽将单抗的重链可变区与轻链可变区相连接而成。scFv 与单抗的可变区对相应抗原具有相似的特异性和亲合性。激活细胞的信号传导肽则分别选用 T 细胞受体 (TCR) 中的  $\zeta$  链以及与其有类似作用的 FcR1 $\gamma$  链, 由此重组而成的嵌合性受体 scFv- $\zeta/\gamma$  嵌合性 T 细胞受体可像单抗一样特异性地与相应抗原结合, 然后经由信号传导肽激活相应的效应细胞。与天然的 TCR 相比, 嵌合性 T 细胞受体的最大优点是抗原结合时可不受 MHC 的限制。将嵌合性 T 细胞受体导入 T 细胞或杂交瘤细胞系中, 则所转染的细胞系即具有相应的抗原特异性, 并可让该细胞系在受到相应抗原刺激时释放细胞因子, 表现出细胞杀伤活性<sup>[4]</sup>。

以往由于基因转染效率较低, 有研究者曾尝试在 RV 载体中构建入药物抗性基因, 然后在基因转染后对转基因的淋巴细胞进行药物筛选。这一策略虽可显著提高淋巴细胞的转染效率, 但由于药物筛选使淋巴细胞的体外扩增时间明显延长, 长期的体外培养及筛选药物本身也对淋巴细胞回输体内后的归巢功能和免疫效应的发挥产生了负面影响。因此, 进一步探索新的方法, 以提高淋巴细胞的基因转染效率, 在基因治疗的实验和临床研究中具有广阔的应用前景。

淋巴细胞是体内最为重要的免疫效应细胞, 从一开始就有人尝试以淋巴细胞为靶细胞进行基因转移, 但由于来源于外周血的淋巴细胞大多处于非增殖状态, 基因转染效率极低。逆转录病毒介导的基因转染要求被转染的靶细胞进入细胞增殖周期, 因而即有研究者采用 PHA 刺激处于静止状态的淋巴细胞转入增殖, 使基因转染的效率得以明显提高。但 PHA 等有丝分裂原刺激后的淋巴细胞不仅基因转染后扩增困难, 而且回输体内后其归巢功能及发挥 CTL 效应的作用大

为受损。以抗 CD3 单抗替代 PHA 等有丝分裂原, 不仅同样可使淋巴细胞转入增殖周期, 而且对转基因细胞本身功能的影响明显减小; 然而转基因细胞体外长期扩增后, 细胞凋亡明显。T 淋巴细胞表面的共刺激分子 CD28 等的发现及其在淋巴细胞活化中的应用, 使活化后的淋巴细胞的功能状态大为改观, 凋亡也明显减少。目前采用 CD3/CD28 单抗活化淋巴细胞已成为体外扩增淋巴细胞的常规方法。我们应用鼠 CD3/CD28 单抗激活淋巴细胞后行基因转染, 不仅基因转染效率分别高达 50% ~ 60%, 而且转染后的细胞在体外扩增培养可长达 1 个月以上。对转基因的淋巴细胞行流式细胞分析表明, 表达外源基因的细胞中既有 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> 的辅助 T 细胞, 也有 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的杀伤性 T 细胞。

Retronectin 是纤维连接素 (fibronectin, FN) 的人工重组蛋白片段, 由 574 个氨基酸残基组成, 相对分子量 63 000, 该片段上具有与逆转录病毒结合的区域 (肝素结合区 II) 和与细胞表面 VLA-4、VLA-5 相结合的区域。因此在利用逆转录病毒介导的基因转染体系中加入 Retronectin, 即可通过其将逆转录病毒和靶细胞连接在一起, 从而增加逆转录病毒与靶细胞接触的机会, 有效地提高逆转录病毒介导的基因转染效率。Hanenberg 等<sup>[5]</sup> 率先于 1996 年将 CH296 应用于造血细胞的基因转染, 发现 Retronectin 可显著提高逆转录病毒介导的造血细胞基因转染效率。随后的研究进一步发现, 造血细胞、淋巴细胞在经细胞因子刺激后再应用此转染技术可使基因转染效率进一步提高, 认为细胞因子刺激可使靶细胞表面的 VLA-4、VLA-5 及 RV 受体表达增加<sup>[6]</sup>。但由于受细胞表面受体表达量的限制, 一次逆转录病毒转染后细胞表面受体即被饱和, 应用同一种逆转录病毒载体重复转染时其转染效率即受到一定限制, 因此应根据各种细胞其表面受体表达规律合理设计基因转染方案。

我们通过不断地改良, 应用相应的抗 CD3、抗 CD28 单抗激活小鼠淋巴细胞, 使淋巴细胞处于最佳的活化状态, 随后采用 Retronectin 包被的培养板并结合离心转染法, 使小鼠淋巴细胞的基因转染效率稳定保持在 50% ~ 60%; 高效的基因转染使转基因的淋巴细胞无需再进一步在体外扩增及进行药物筛选; 从而使回输体内的转基因淋巴细胞能更好地发挥抗肿瘤作用。

TCR 和 Fc $\epsilon$ R1、Fc $\gamma$ R III 是表达在 T 细胞、NK 细胞及粒细胞表面的结构和功能均密切相关的受体, 这些受体与相应的配体结合后可通过激活一系列的细胞内重要的信号传导分子, 最终引起细胞因子/炎症介质的

释放、细胞溶解和细胞吞噬<sup>[7-9]</sup>。TCR 和 FcεR1 中的 ζ、γ 链中分别包含有 3 个和 1 个拷贝的免疫球蛋白酪氨酸活化区 (ITAM), 由 18 个氨基酸组成的 ITAM 中酪氨酸和亮氨酸高度保守, 而其间及末尾的氨基酸在 ζ、γ 链中有一定差异<sup>[10]</sup>。

转染嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞其外源基因在细胞表面表达后, 转基因淋巴细胞首先通过嵌合性 T 细胞受体的细胞膜外部分 scFv 识别相应的特异性抗原, 然后经由信号传导肽激活淋巴细胞; 因此, 选择合适的信号传导肽对于淋巴细胞的激活程度以及淋巴细胞活化后对肿瘤靶细胞的杀伤作用尤为关键。

Brocker 等<sup>[11]</sup>将 scFv 与 TCR/CD3ζ 融合后转染 T 淋巴细胞, 结果转基因的淋巴细胞在识别相应抗原后可释放 IL-2 和 IL-3, 从而证实 ζ 链在嵌合性 T 细胞受体中可发挥其激活淋巴细胞的生理作用。Eshhar 等<sup>[12]</sup>则将 scFv 与 Fc 受体中的 γ 信号传导肽连接, 此 γ 信号传导肽是高亲合力的 IgE 受体的 FcεR1 的信号传导亚单位, 在肥大细胞和嗜碱细胞表面均有表达, 将所构建的融合基因转入 T 细胞后, 嵌合性 T 细胞受体可介导特异性的 T 细胞激活, 并释放 IL-2 及特异性地溶解靶细胞。

本实验在将 γ、ζ 链作为信号传导肽分别构建到嵌合性 T 细胞受体中, 嵌合性 T 细胞受体在包装细胞和小鼠淋巴细胞表面均得以成功表达, 表达不同结构嵌合性 T 细胞受体的淋巴细胞在受到相应肿瘤抗原刺激后均能通过细胞因子的释放及 CTL 效应对肿瘤细胞产生抑制、杀伤作用。我们将嵌合性 T 细胞受体转染人外周血淋巴细胞后也得到了类似的结果<sup>[13]</sup>。其中在细胞因子释放方面含 γ 链的嵌合性 T 细胞受体较含 ζ 链者显著增强, 而<sup>51</sup>Cr 释放法检测到的 CTL 效应两种结构较为接近, 提示 CTL 效应的产生除与细胞因子释放有关外另有其他作用机制。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, *et al.* Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report [ J ]. *N Engl J Med*, 1989, 319( 25 ): 1676-1680.

[ 2 ] Braun SE, Pan D, Aronovich EL, *et al.* Preclinical studies of lymphocyte gene therapy for mild Hunter syndrome ( mucopolysac-

charidosis type II ) [ J ]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7( 3 ): 283-290.

[ 3 ] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [ J ]. *Science*, 1987, 235( 4785 ): 177-182.

[ 4 ] Eshhar Z, Waks T, Gross G, *et al.* Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90( 2 ): 720-724.

[ 5 ] Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, *et al.* Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells [ J ]. *Nat Med*, 1996, 2( 8 ): 876-882.

[ 6 ] Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, *et al.* Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells [ J ]. *Hum Gene Ther*. 1997, 8( 18 ): 2193-2206.

[ 7 ] Scholl PR, Geha RS. Physical association between the high affinity IgG receptor ( Fc gamma RI ) and the gamma subunit of the high affinity IgE receptor ( Fc epsilon RI gamma ) [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90( 19 ): 8847-8850.

[ 8 ] Masuda M, Roos D. Association of all three types of Fc gamma R ( CD64, CD32, and CD16 ) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes [ J ]. *J Immunol*, 1993, 151( 12 ): 7188-7195.

[ 9 ] Ernst LK, Duchemin AM, Anderson CL. Association of the high affinity receptor for IgG ( Fc gamma RI ) with the gamma subunit of the IgE receptor [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90( 13 ): 6023-6027.

[ 10 ] Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif ( ITAM ) [ J ]. *J Immunol*, 1995, 155( 7 ): 3281-3285.

[ 11 ] Brocker T, Peter A, Traunecker A, *et al.* A new simplified molecular design for functional T cell receptor [ J ]. *Eur J Immunol*, 1993, 23( 7 ): 1435-1439.

[ 12 ] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin/T cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86( 24 ): 10024-10028.

[ 13 ] Yang J, Friedman MS, Reynolds CM, *et al.* Tumor antigen specific activation of primary human T-cells expressing a virally encoded chimeric T-cell receptor specific for p185HER2 [ J ]. *J Microbiol Immunol*, 2004, 2( 4 ): 272-277.

[ 收稿日期 ] 2006 - 05 - 22                      [ 修回日期 ] 2006 - 07 - 30  
[ 本文编辑 ] 王 莹

