

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.002

## 人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$ 抗体扩增及其培养和保存的条件

康宁, 崔瑛, 周建华, 刘庆丰, 崔莲仙, 巴德年, 何维\* (中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院基础学院免疫学系, 北京 100005)

[摘要] 目的: 比较人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞不同的制备方法, 摸索适于临床应用的培养和保存条件。方法: 分离人外周血单个核细胞, 分别以固相化和可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体进行刺激, 以添加小牛血清或人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液或 AIM V 无血清培养液进行培养, 采用锥虫蓝染色法检测  $\gamma\delta$  T 细胞存活率, 采用免疫荧光染色法考察  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度和亚型, 采用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 法检测  $\gamma\delta$  T 细胞对不同肿瘤细胞系的杀伤作用。结果: 添加 15% 小牛血清和添加 5% 人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液对  $\gamma\delta$  T 细胞的培养效果接近, 均优于 AIM V 无血清培养液。可溶性抗体与固相化抗体扩增外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的效果相似; 可溶性抗体扩增的  $\gamma\delta$  T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 库容完整, 同时具有 TCR V $\delta$ 1 和 V $\delta$ 2 两种亚型; 对肺癌、肝癌和卵巢癌细胞系均有体外杀伤活性。这些  $\gamma\delta$  T 细胞在含 1% 人 AB 血浆或 0.25% 人血白蛋白的生理盐水中, 4 °C 条件下保存 12 h, 细胞存活率仍达 95% 以上。结论: 可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体和含有人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液可以用于人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的体外扩增, 扩增得到的  $\gamma\delta$  T 细胞在含有血浆或白蛋白的生理盐水中稳定性较好。

[关键词]  $\gamma\delta$  T 细胞; 可溶性抗体; 培养液; 稳定性

[中图分类号] R392.11; R392.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0106-07

## Soluble anti-TCR $\gamma\delta$ stimulates expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells and its culture and storage

KANG Ning, CUI Ying, ZHOU Jian-hua, LIU Qing-feng, CUI Lian-xian, BA De-nian, HE Wei\* (Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Beijing Union Medical College, Beijing 100005, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the different protocols for amplifying human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells and establish the suitable expansion and storage conditions for clinical application. **Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells were isolated and stimulated by immobilized or soluble anti-TCR  $\gamma\delta$ , and further cultured in RPMI 1640 supplemented with newborn bovine serum, RPMI 1640 supplemented with human AB plasma, or serum free AIM V medium separately. Cell numbers and survival rates were detected by trypan blue staining; purities and phenotypes of the expanded  $\gamma\delta$  T cells were measured by immunofluorescence staining; cytotoxicities of  $\gamma\delta$  T cells against different tumor cell lines were detected by lactate dehydrogenase (LDH) method. **Results:** RPMI 1640 supplemented with 15% newborn bovine serum or 5% human AB plasma had similar effects on the proliferation of  $\gamma\delta$  T cells but better than that of AIM V serum free medium. Soluble antibody stimulated the expansion of peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells as effectively as immobilized antibody did. The expanded  $\gamma\delta$  T cells had complete T cell receptor (TCR) pool, containing TCR V $\delta$ 1 and V $\delta$ 2 subtypes, and displayed cytotoxic activities against lung cancer, hepatocellular carcinoma, and ovarian carcinoma cells *in vitro*. These  $\gamma\delta$  T cells, when suspended in normal saline supplemented with 0.25% human albumin or 1% human AB plasma, could maintain 95% survival for 12 hours at 4 °C. **Conclusion:** Human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells can be effectively expanded *in vitro* by soluble anti-TCR  $\gamma\delta$  in RPMI 1640 culture medium containing human AB plasma, and these expanded  $\gamma\delta$  T cells can be stably preserved in normal saline supplemented with plasma or albumin.

[Key words]  $\gamma\delta$  T cells; soluble antibody; culture medium; stability

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 106-112]

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(No. 2007AA021109)。Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2007AA021109)。

[作者简介] 康宁(1973-),女,天津市人,助理研究员,主要从事  $\gamma\delta$  T 细胞的培养和功能研究

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: heweiimu@public.bta.net.cn

恶性肿瘤传统的治疗手段有手术治疗、放疗和化疗。手术治疗难以彻底消除残存病灶,放疗和化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,使机体的免疫系统也受到重创。因此,采用具有杀伤肿瘤细胞能力的免疫细胞进行治疗被认为是治疗肿瘤的更理想的策略。

$\gamma\delta$  T 细胞是具有以 MHC 非限制性方式直接识别多种肿瘤相关抗原、广谱抗肿瘤活性、兼具 NK、CTL 和 Th 细胞的功能特点的免疫细胞,在肿瘤免疫治疗中具有很大优势<sup>[1-2]</sup>。目前国外主要采用磷酸抗原对人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞进行扩增,得到的主要是 V $\delta$ 2 亚型的  $\gamma\delta$  T 细胞<sup>[3-5]</sup>。本课题组前期研究采用固相化 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体刺激扩增  $\gamma\delta$  T 细胞,其组分包括 V $\delta$ 1 和 V $\delta$ 2 亚型细胞,能识别肿瘤抗原、杀伤肿瘤细胞、延长荷瘤动物生存期<sup>[6-11]</sup>。然而,该方法操作繁琐,而且不能在封闭系统中大规模制备;另外,培养液中含有小牛血清,不适用于临床过继免疫治疗。为了使过继免疫治疗用  $\gamma\delta$  T 细胞更加符合临床细胞制剂制备和应用的要求,本研究采用可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞,并比较了不同培养方法和保存条件对  $\gamma\delta$  T 细胞扩增效果及稳定性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和细胞株

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离自健康志愿者外周血,血液采集符合中国医学科学院基础医学研究所伦理委员会的要求。卵巢癌细胞系 SKOV3 为北京协和医院妇科沈铿教授惠赠,肺癌细胞系 NCI-H520、肝癌细胞系 HepG2 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

### 1.2 主要试剂及仪器

Ficoll-Paque™ PREMIUM 为 Pharmacia 产品, RPMI 1640 和 AIM V 培养液为 Invitrogen 产品,国产小牛血清购自成都哈里生物工程有限公司,人 AB 血浆购自北京红十字血液中心,注射用重组人白细胞介素 2(IL-2)购自北京瑞得合通药业有限公司。纯化的抗人 TCR  $\gamma\delta$  单克隆抗体、PE 标记的抗人 CD3 及抗人 TCR  $\alpha\beta$  单克隆抗体、FITC 标记的抗人 TCR  $\gamma\delta$ 、抗人 TCR V $\delta$ 1 及抗人 TCR V $\delta$ 2 单克隆抗体均为 Immunotech 产品,PE 标记的抗人 CD314(NKG2D)单克隆抗体为 BD Pharmingen 产品, Cytotox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒为 Promega 产品。所用流式分析仪为 Becton Dickinson FACS Calibur(Becton Dickinson, USA)和 Moflo

(High-performance) cell sorter(Fort Collins, USA), 采用 FlowJo5.7.2 分析软件分析结果。

### 1.3 人外周血来源 $\gamma\delta$ T 细胞的培养

抗凝外周血以 Ficoll-Paque™ PREMIUM 分离,得到的 PBMC 以固相包被(0.25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )或可溶性(0.025~0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )抗人 TCR  $\gamma\delta$  单克隆抗体进行刺激,所用培养液为添加 IL-2(200 IU/ml)的含有 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液、含有 5% 人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液或 AIM V 无血清培养液,细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2 周,其间每 2~3 d 进行换液、传代。 $\gamma\delta$  T 细胞体外扩增效率的计算:扩增效率=(培养后细胞总数  $\times$   $\gamma\delta$  T 细胞所占比例)/(PBMC 总数  $\times$   $\gamma\delta$  T 细胞所占比例)。

### 1.4 锥虫蓝染色法检测 $\gamma\delta$ T 细胞的存活率

在 0.1 ml  $\gamma\delta$  T 细胞悬液(细胞数约为  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  个)中加入 0.1 ml 锥虫蓝染液(0.4%),充分混匀后室温静置 2~3 min,滴加于血球计数板,显微镜下分别计数外周 4 个大格中未着色的活细胞数和着蓝色的死细胞数。细胞存活率(%)=活细胞数/(活细胞数+死细胞数) $\times 100\%$ 。

### 1.5 免疫荧光染色和流式细胞术检测 $\gamma\delta$ T 细胞的纯度和表型

收集约  $1 \times 10^6$   $\gamma\delta$  T 细胞,以 PBS 洗液(含有 1% BSA 的 PBS)洗涤 2 次。以 50  $\mu\text{l}$  PBS 洗液重悬细胞,加入适量荧光标记抗体(如 FITC 标记的 anti-TCR  $\gamma\delta$ ),4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20 min。PBS 洗液洗涤 2 次,重悬于 500  $\mu\text{l}$  PBS 固定液(含有 1% 多聚甲醛的 PBS)中用于流式细胞仪分析。

### 1.6 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法检测 $\gamma\delta$ T 细胞对不同肿瘤细胞系的杀伤作用

按照试剂盒说明书进行。收集 SKOV3、NCI-H520 和 HepG2 细胞作为靶细胞,以培养 2 周的人外周血来源  $\gamma\delta$  T 细胞为效应细胞,效靶比(E:T)分别采用 5:1、10:1 和 20:1。效应细胞和靶细胞混合后置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下继续培养 6 h,收集培养上清用于 LDH 释放量的测定。杀伤率(%)=(实验孔修正值-效应细胞自发 LDH 释放孔修正值-靶细胞自发 LDH 释放孔修正值)/(靶细胞最大 LDH 释放孔修正值-靶细胞自发 LDH 释放孔修正值) $\times 100\%$ 。

### 1.7 人外周血来源 $\gamma\delta$ T 细胞制剂的稳定性实验

收集培养 2 周后的  $\gamma\delta$  T 细胞,以生理盐水洗涤后,分别重悬于生理盐水、含 1% 人 AB 血浆的生理盐水、含 0.25% 人血白蛋白的生理盐水、含 50 IU/ml IL-2 和 1% 人 AB 血浆的生理盐水或含 50 IU/ml IL-

2 和 0.25% 人血白蛋白的生理盐水中, 4 °C 保存, 并于 0、2、4、6、8、10、12、24、48 h 时取细胞悬液利用锥虫蓝染色法检测细胞的存活率。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较行 *t* 检验, 多组间比较行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 不同培养液对外周血 $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增的影响

对分离的 PBMC 以固相化 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体进行刺激, 比较不同培养液对  $\gamma\delta$  T 细胞的扩增效果。

如图 1 所示, 采用含有 15% 小牛血清和 5% 人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液 (IL-2 浓度均为 200 IU/ml) 培养 1 周时,  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度分别为 16.4% 和 34.0%, 2 周时分别增加到 51.1% 和 55.0%。而使用含有 200、500 和 1 000 IU/ml IL-2 的 AIM V 培养液培养 2 周时,  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度分别为 16.9%、10.9% 和 4.3%。进一步比较含 5% 人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液和 AIM V 培养液对 6 名健康志愿者外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的培养效果, 结果显示, 培养 2 周时  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度分别达到  $(76.95 \pm 10.01)\%$  和  $(33.80 \pm 15.64)\%$ , 前者培养效果优于后者 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

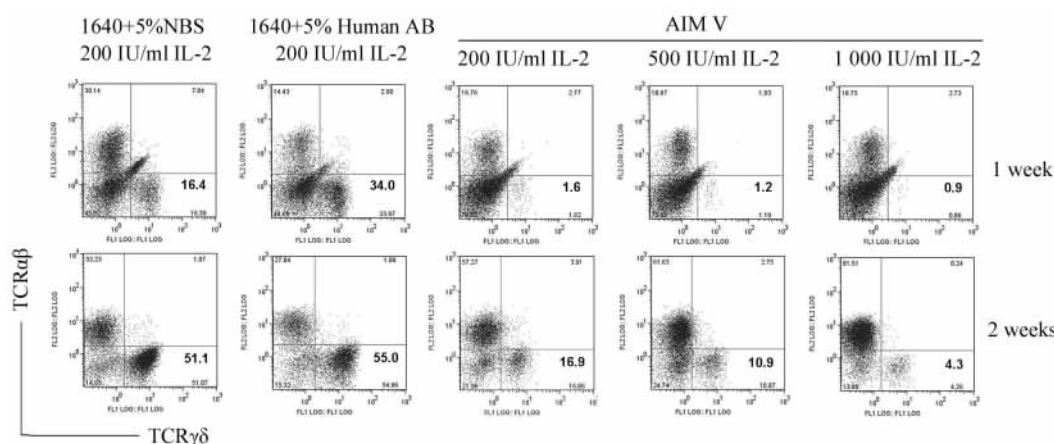


图 1 流式细胞术检测不同培养液扩增人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞所达到的纯度

Fig. 1 Purities of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells expanded in different culture media detected by flow cytometry

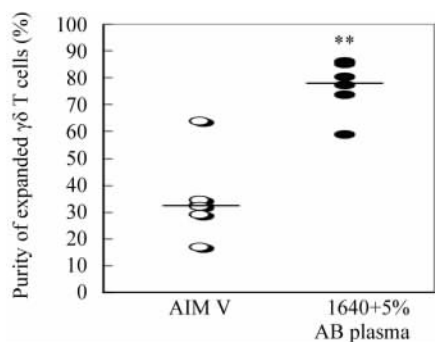


图 2 AIM V 培养液和含有人 AB 血浆的 RPMI 1640 培养液扩增  $\gamma\delta$  T 细胞所达到纯度的比较  
Fig. 2 Comparison of purities of  $\gamma\delta$  T cells expanded with AIM V medium or RPMI 1640 medium containing human AB plasma

\*\*  $P < 0.01$  vs AIM V

### 2.2 可溶性抗体对外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的扩增效果

分别采用不同剂量的可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体

(0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激外周血中  $\gamma\delta$  T 细胞的增殖, 培养 2 周时  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度分别为 72.0%、82.0%、76.5%、74.6%、74.9% 和 53.9%。固相化 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体 (0.025  $\mu\text{g/cm}^2$ ) 扩增同一名健康志愿者的  $\gamma\delta$  T 细胞, 2 周时纯度为 84.2% (图 3)。进一步比较不同浓度可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体对 4 名健康志愿者外周血 PBMC 中  $\gamma\delta$  T 细胞的扩增作用。结果如图 4 所示, 测试浓度范围的可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体均可刺激外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的扩增, 0.4  $\mu\text{g/ml}$  可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体对 2 名志愿者外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的刺激效果最佳 (培养 2 周时  $\gamma\delta$  T 细胞纯度分别达到 82.0% 和 67.9%), 0.1  $\mu\text{g/ml}$  可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体对另外 2 名志愿者外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的刺激效果最佳 (培养 2 周时  $\gamma\delta$  T 细胞纯度分别达到 65.4% 和 78.3%)。可溶性 (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) 和固相 (0.025  $\mu\text{g/cm}^2$ ) anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体用于外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的扩增, 2 周时扩增效率分别为  $(537.65 \pm 159.37)$  倍和  $(620.69 \pm 402.11)$

倍,无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 可溶性抗体扩增的外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的表型

采用可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体(0.4  $\mu\text{g/ml}$ )扩增  $\gamma\delta$  T 细胞,培养 2 周时 2 名志愿者  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度分别达到 83.6% 和 60.8%,其中 V $\delta$  1 细胞分别为 9.1% 和 20.6%,V $\delta$  2 细胞分别为 76.2% 和 40.3%,扩增的  $\gamma\delta$  T 细胞均表达与杀伤相关的受体 NKG-2D(图 5)。

### 2.4 可溶性抗体扩增的外周血 $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

采用可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体(0.4  $\mu\text{g/ml}$ )扩增的  $\gamma\delta$  T 细胞,对肺癌细胞系(NCI-H520)、肝癌细胞系(HepG2)和卵巢癌细胞系(SKOV3)进行杀伤。2 名志愿者外周血来源  $\gamma\delta$  T 细胞在效靶比为 5:1、10:1 和 20:1 时,对 NCI-H520 的杀伤效率分别为 24%、18%、29% 和 1%、12%、27%;对 HepG2 的杀伤效率分别为 37%、48%、67% 和 35%、30%、30%;对 SKOV3 的杀伤效率分别为 37%、52%、80% 和 39%、39%、77%(图 6)。

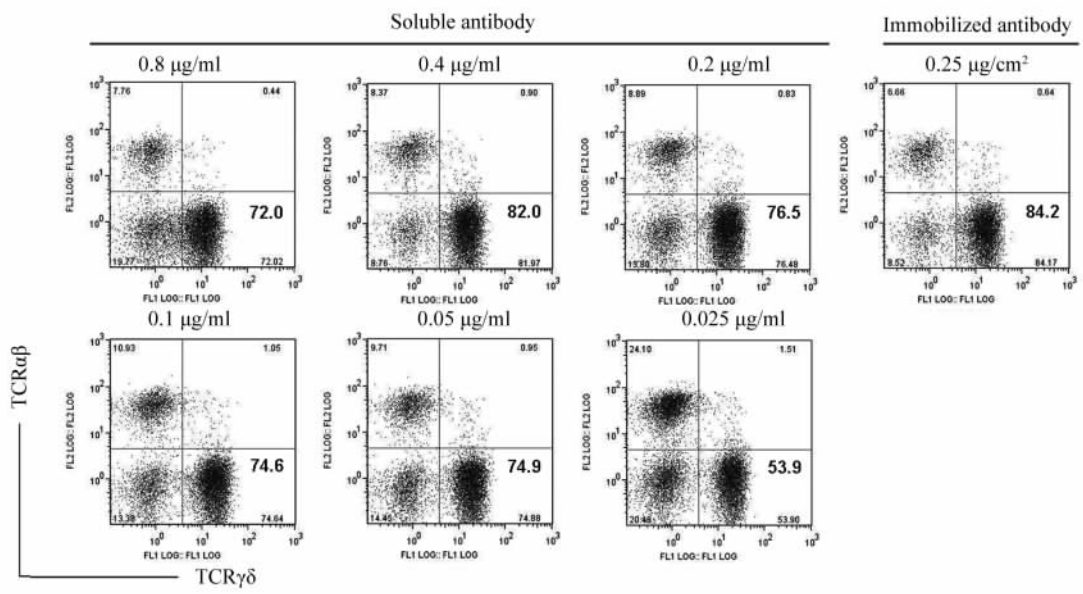


图 3 固相化和可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增  $\gamma\delta$  T 细胞纯度的比较

Fig. 3 Comparison of purities of  $\gamma\delta$  T cells expanded by immobilized or soluble anti-TCR $\gamma\delta$

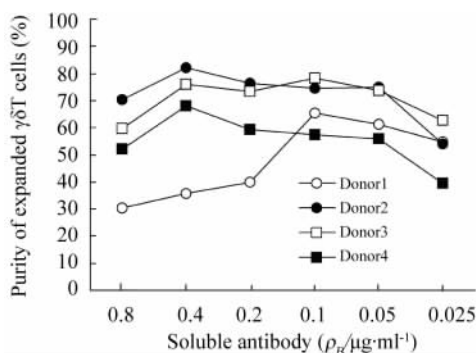


图 4 不同质量浓度可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增  $\gamma\delta$  T 细胞所达到的纯度的比较

Fig. 4 Comparison of purities of  $\gamma\delta$  T cells expanded by different concentrations of soluble anti-TCR $\gamma\delta$

### 2.5 可溶性抗体扩增的外周血 $\gamma\delta$ T 细胞制剂的稳定性

如表 1 所示,在 2~48 h 的观察范围内, $\gamma\delta$  T 细胞保存在含 0.25% 人血白蛋白的生理盐水、含 1% 人 AB 血浆的生理盐水、含 50 IU/ml IL-2 和 0.25% 人血白蛋白的生理盐水或含 50 IU/ml IL-2 和 1% 人 AB 血浆的生理盐水中,细胞存活率均明显高于生理盐水组(其中 2、4、24 和 48 h 时均为  $P < 0.01$ ,6、8、10 和 12 h 时均为  $P < 0.05$ ),12 h 时细胞存活率仍可维持 95% 以上,24 h 时也可维持在 90% 以上,且无肉眼可见的白色絮状沉淀物。这 4 种保存条件间的差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。而单纯使用生理盐水制备  $\gamma\delta$  T 细胞悬液时,细胞存活率在 4 h 时降到(89.09  $\pm$  7.11)%,且肉眼可见细胞成团后形成的白色絮状沉淀物;随时间延长,细胞存活率进一步下降,絮状沉淀物增多;至 48 h 时,细胞存活率仅为(22.15  $\pm$  17.66)%。

### 3 讨论

$\gamma\delta$  T 细胞能够以 MHC 非限制性方式识别肿瘤抗原, 通过穿孔素和颗粒酶、Fas-FasL 及 TNF- $\alpha$  等途径杀伤肿瘤细胞, 并能分泌 IFN- $\gamma$  等细胞因子, 促进其他免疫细胞的活化。因此,  $\gamma\delta$  T 细胞在肿瘤免疫细胞治疗中是一种具有优势的候选细胞<sup>[12-13]</sup>。然而,  $\gamma\delta$  T 细胞仅占人外周血 CD3<sup>+</sup> 淋巴细胞的 1% ~ 10%, 能否培养扩增出足够数量的  $\gamma\delta$  T 细胞是其可否运用于临床免疫治疗的关键。

目前国外用于过继免疫治疗的  $\gamma\delta$  T 细胞主要源于磷酸抗原的体外扩增, 该方法扩增的主要是 V $\delta$  2 亚型的细胞, 在已有的体外实验和动物体内实验中对多种肿瘤显示出明显的杀伤作用<sup>[3-5]</sup>, 在现有的临床试验中也显示出较好的治疗效果, 且不良反应轻微<sup>[14-16]</sup>。本课题组前期研究<sup>[6-7]</sup>证明, 采用固相化 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增的方法可以使  $\gamma\delta$  T 细胞得

到大量扩增, 扩增的  $\gamma\delta$  T 细胞的 TCR 库容完整, 既包括 V $\delta$  2 亚型, 也包括 V $\delta$  1 亚型的细胞。V $\delta$  1 细胞在外周血中比例较低, 主要见于组织, 是上皮来源肿瘤肿瘤浸润淋巴细胞( tumor infiltrating lymphocytes, TILs )中  $\gamma\delta$  T 细胞的主要组成部分。V $\delta$  1 细胞能够通过细胞表面的 TCR 和 NKG2D 受体识别细胞应激状态下表达的肿瘤相关抗原, 如 MHC class I chain-related molecules A and B ( MICA/B ), UL16 binding protein( ULBP1-3 ), 及前期研究中发现的新配体( human mutS homolog 2, hMSH2 )<sup>[8-9]</sup>, 且能表达上皮相关的趋化因子受体<sup>[17]</sup>。更重要的是, TIL 中分离得到的 V $\delta$  1 细胞具有显著的抗肿瘤活性<sup>[7, 10]</sup>。由此可见, V $\delta$  1 细胞在临床应用上似乎具有不可替代的作用。因此, 固相化 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增的  $\gamma\delta$  T 细胞在应用于肿瘤免疫治疗方面具有较磷酸化抗原体外扩增法更大的优势。

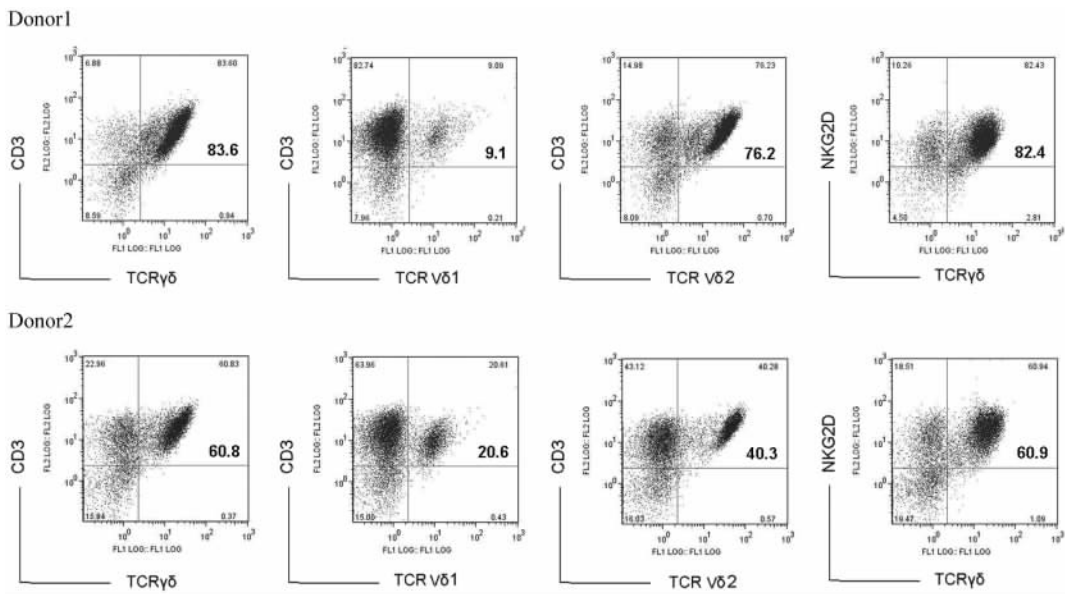


图 5 流式细胞术检测可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体扩增得到的人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞的表型

Fig. 5 Phenotypes of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells expanded by soluble anti-TCR  $\gamma\delta$  detected by flow cytometry

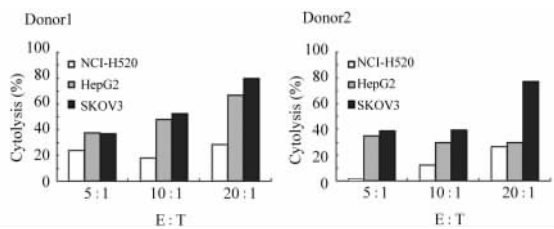


图 6 可溶性 anti-TCR  $\gamma\delta$  抗体扩增的人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

Fig. 6 Cytotoxicities of human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells expanded by soluble anti-TCR  $\gamma\delta$  against tumor cells

尽管如此, 固相化抗体扩增法在培养临床过继免疫治疗用  $\gamma\delta$  T 细胞的实际应用中存在不足之处, 即抗体的包被和细胞的传代过程较复杂, 造成污染的概率相对较大, 对培养操作人员的技术要求较高。本研究中采用可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体进行扩增, 结果显示可溶性抗体能够达到固相化抗体的扩增效果, 扩增的 T 细胞同时保持了 TCR V $\delta$  1 和 TCR V $\delta$  2 两种表型, 均表达 NKG2D, 并能够有效杀伤肺癌、肝癌和卵巢癌细胞, 具有明显的生物学活性。该

方法免除了抗体包被的过程,使细胞能够在培养瓶或培养袋等封闭系统中进行培养,细胞的培养传代过程简单,污染概率减少,更适于大规模的培养。

研究表明,临床治疗用细胞采用小牛血清进行培养,残留的牛血清蛋白成分进入人体可以刺激人体产生抗体,进行多次细胞治疗后导致一些不良反应的产生,如出现 Arthus 样反应(包括发热、体位性低血压、头痛、肌痛、关节痛、胸闷、倦怠、乏力、寒战等临床表现)<sup>[18]</sup>。目前,可以替代小牛血清用于细胞培养的有自体血清或血浆、正常人 AB 血清或血浆<sup>[19]</sup>。肿瘤患者血清中可能含有具有抑制细胞生长的药物成分或抑制性细胞因子,而正常人 AB 血

浆是临床用血液制品,经过适当的处理可以用于细胞的培养。本研究表明,采用 RPMI 1640 添加 5% 人 AB 血浆时,所获  $\gamma\delta$  T 细胞的纯度和细胞数量均较高,可以替代小牛血清。尽管如此,正常人 AB 血浆的来源和与细胞培养相关的质量不甚稳定,同时还存在传播疾病的潜在危险性。因此,无血清培养液被认为是过继免疫治疗用细胞培养的最佳选择。AIM V 培养液是用来进行淋巴细胞培养常用的无血清培养液,然而其在  $\gamma\delta$  T 细胞培养中效果欠佳。因此,寻找适合  $\gamma\delta$  T 细胞生长的无血清培养液将是今后研究的重要内容。

表 1 不同保存条件下  $\gamma\delta$  T 细胞制剂的稳定性  
Tab. 1 Stabilities of  $\gamma\delta$  T cells preserved under different conditions

Group	Survival ( % )				
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
Normal saline	98.39 ± 0.64	92.81 ± 0.83	89.09 ± 7.11	87.14 ± 9.00	84.78 ± 10.81
0.25% albumin	99.36 ± 0.70	97.83 ± 0.39**	97.98 ± 0.51**	97.12 ± 0.72*	96.61 ± 0.67*
1% AB plasma	98.82 ± 0.96	98.57 ± 0.61**	98.92 ± 0.42**	97.52 ± 0.84*	97.62 ± 1.54*
0.25% albumin + IL-2	99.16 ± 0.38	98.70 ± 0.26**	98.18 ± 1.17**	97.81 ± 1.08**	96.87 ± 2.73*
1% AB plasma + IL-2	99.15 ± 0.53	98.76 ± 0.98**	98.26 ± 1.09**	98.37 ± 1.06**	97.69 ± 0.64*

Group	Survival ( % )			
	10 h	12 h	24 h	48 h
Normal saline	81.65 ± 14.02	76.82 ± 16.79	66.78 ± 14.52	22.15 ± 17.66
0.25% albumin	96.61 ± 0.97*	96.43 ± 0.97*	94.51 ± 0.70**	82.52 ± 2.61**
1% AB plasma	97.60 ± 1.35*	96.15 ± 1.09*	94.17 ± 1.64**	83.52 ± 2.16**
0.25% albumin + IL-2	96.77 ± 2.91*	95.55 ± 3.19*	93.59 ± 0.44**	81.31 ± 8.58**
1% AB plasma + IL-2	97.60 ± 0.70*	96.09 ± 0.61*	94.79 ± 0.59**	82.16 ± 10.27**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal saline group

细胞制剂的稳定性是关乎其临床应用的关键因素。制备的细胞如果在保存期内死亡过多,输入体内不但得不到应有的治疗效果,还会引起不良反应。单独采用生理盐水时  $\gamma\delta$  T 细胞保存期短,4 h 后细胞就会出现结团和沉淀现象。添加人血白蛋白或人 AB 血浆可能有助于维持细胞胶体渗透压,因此提高了细胞的稳定性和存活率,延长了细胞制剂的保存时间。

综上所述,采用可溶性 anti-TCR $\gamma\delta$  抗体作为刺激剂,采用人 AB 血浆替代小牛血清的培养液可以有效扩增和培养外周血  $\gamma\delta$  T 细胞,所获细胞具有良好的生物学活性,在添加人血白蛋白或人 AB 血浆

的生理盐水中可以长时间地保持较高的存活率。该培养方法和保存条件的摸索将为  $\gamma\delta$  T 细胞制剂的大规模培养和临床应用打下基础。

#### [参考文献]

- [1] Hayday AC. [  $\gamma$  ] [  $\delta$  ] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 975-1026.
- [2] Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells [ J ]. *Immunol Rev*, 2007, 215: 46-58.
- [3] Viey E, Fromont G, Escudier B, et al. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma [ J ]. *J Immunol*, 2005, 174( 3 ): 1338-1347.

- [ 4 ] Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, *et al.* Targeting human  $\gamma$  delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 15 ): 7450-7457.
- [ 5 ] Otto M, Barfield RC, Martin WJ, *et al.* Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14. 18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11( 23 ): 8486-8491.
- [ 6 ] 牛海涛, 张素梅, 何 维. 卵巢癌患者  $\gamma\delta$  T 细胞对肿瘤细胞的细胞毒活性 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7( 2 ): 90-93.
- [ 7 ] Yu S, He W, Chen J, *et al.* Expansion and immunological study of human tumor infiltrating gamma/delta T lymphocytes *in vitro* [ J ]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 119( 1 ): 31-37.
- [ 8 ] Zhao J, Huang J, Chen H, *et al.* Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339( 1 ): 232-240.
- [ 9 ] Chen H, He X, Wang Z, *et al.* Identification of human T cell receptor gammadelta-recognized epitopes/proteins via CDR3delta peptide-based immunobiochemical strategy [ J ]. *J Biol Chem*, 2008, 283( 18 ): 12528-12537.
- [ 10 ] Chen J, Niu H, He W, *et al.* Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes [ J ]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 125( 3 ): 256-263.
- [ 11 ] Wang Z, Zhang T, Hu H, *et al.* Targeting solid tumors via T cell receptor complementarity-determining region 3delta in an engineered antibody [ J ]. *Cancer Lett*, 2008, 272( 2 ): 242-252.
- [ 12 ] Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 1 ): 5-8.
- [ 13 ] Lamb LS Jr, Lopez RD. gammadelta T cells: a new frontier for immunotherapy [ J ]? *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11( 3 ): 161-168.
- [ 14 ] Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies [ J ]. *Blood*, 2003, 102( 1 ): 200-206.
- [ 15 ] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, *et al.* Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56( 4 ): 469-476.
- [ 16 ] Saitoh A, Narita M, Watanabe N, *et al.* Anti-tumor cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells of patients with myeloma and lymphoma [ J ]. *Med Oncol*, 2008, 25( 2 ): 137-147.
- [ 17 ] Ebert LM, Meuter S, Moser B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance [ J ]. *J Immunol*, 2006, 176( 7 ): 4331-4336.
- [ 18 ] Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions [ J ]. *Blood*, 1997, 89( 3 ): 776-779.
- [ 19 ] Lamers CH, Willemsen RA, Luider BA, *et al.* Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9( 7 ): 613-623.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 02 - 04 [ 修回日期 ] 2009 - 03 - 11  
[ 本文编辑 ] 王 莹

## · 科技动态 ·

### I 型单纯疱疹病毒在潜伏期表达微 RNA 以调控病毒自身 mRNA 的表达

I 型单纯疱疹病毒 ( HSV-1 ) 全长 10. 8 kb, 其在潜伏期中, 不表达任何病毒源性的蛋白产物, 仅表达潜伏相关转录本 ( LAT )。论文作者将 8. 3Kb 的 LAT 构建入 PCDNA3. 1 载体中并将其转入 293T 细胞, 随后从其总 RNA 中分离小片段 RNA 并进行 454 测序, 共测得 225 439 个小片段 RNA 序列, 其中 144 955 个序列为细胞内微 RNA, 有 651 个微 RNA 读数可能来源于 HSV-1。根据 HSV-1 茎环结构前体序列预测, 这些读数来源于 HSV-1 的 4 个茎环结构前体, 为 6 个 HSV-1 表达的微 RNA。其中, 读数最多的为 miR-H2-3p( 265 ) 和 miR-H4-3p( 266 )。

随后, 作者在潜伏性感染 HSV-1 的小鼠三叉神经节样本中进行 454 测序, 其中测得了 164 个读数的 HSV-1 来源的小片段 RNA, 其中 miR-H2-3p 为 94 个读数, 而 miR-H4 未测得。同时, 作者还测得了 50 个读数的 miR-H6( 在 293T-LAT 样本中未测得, 因其不在构建入 PCDNA3. 1-LAT 载体中的序列中)。作者进一步在转染了 LAT 的 293T 细胞、HSV-1 感染的 Vero 细胞和潜伏性感染 HSV-1 的小鼠三叉神经节样本中, 使用 RT-PCR 法鉴定如上微 RNA 的表达, 并且获得了与 454 测序相同的结果。

关于 HSV-1 表达的 miRNA 的功能鉴定, 作者将在潜伏性感染 HSV-1 的小鼠三叉神经节样本中测得的表达较高的 miR-H2-3p 和 miR-H6 与 HSV-1 自身表达的 mRNA 进行比对, 发现 miR-H2-3p 可能作用于 HSV-1 活化起始所必需的病毒蛋白 ICP0 的 mRNA, 而 miR-H6 可能作用于 HSV-1 的病毒蛋白产物 ICP4。随后, 作者在 293T 细胞中共转 miR-H2-3p 和 ICP0 的表达质粒以及 miR-H6 和 ICP4 的表达质粒, 发现 miR-H2-3p 可以在不降低 ICP0 mRNA 表达的情况下降低 ICP0 的蛋白表达水平, 同样 miR-H6 能够在不降低 ICP4 mRNA 表达的情况下降低 ICP4 的蛋白表达水平, 进而抑制 HSV-1 的活化, 实现 HSV-1 的潜伏。

综上所述, 该研究发现 HSV-1 在潜伏状态下所表达的微 RNA, 并进一步证明其在维持 HSV-1 潜伏状态中所发挥的作用。

[ 侯 晋摘译, 陈涛涌 审阅. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, *et al.* *Nature*, 2008, 454( 7205 ): 780-783 ]