

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.003

$\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞的体外杀伤活性

肖凌,张斌,陈虎(解放军第307医院造血干细胞移植科全军造血干细胞研究所,北京100071)

[摘要] **目的:** 建立 $\gamma\delta$ T 细胞培养体系,探讨 $\gamma\delta$ T 细胞对不同血液肿瘤细胞的杀伤活性。**方法:** 选取2016年1月至2016年4月在解放军第307医院造血干细胞移植科收治的4例B细胞淋巴瘤患者和该院5例体检健康志愿者,分别分离其外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用唑来磷酸(zoledronate, Zol)和IL-2体外扩增 $\gamma\delta$ T 细胞,采用流式细胞术检测 $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞 Jurkat、THP-1、HL-60、K562、Raji、U-937 和 RPMI-8226 的杀伤活性,比较 CIK、NK 和 $\gamma\delta$ T 三种细胞对 K562 细胞的杀伤作用,检测 $\gamma\delta$ T 细胞 IFN- γ 、TNF- α 的分泌水平及 CD107a 分子的表达水平。**结果:** 成功在体外扩增外周血 $\gamma\delta$ T 细胞; $\gamma\delta$ T 细胞对 Jurkat、THP-1、HL-60、K562、U-937 和 RPMI-8226 细胞均有明显的杀伤活性($P < 0.05$); $\gamma\delta$ T 细胞对 K562 细胞的杀伤活性与 NK 细胞无统计学差异,但明显强于 CIK 细胞($P < 0.01$);随着与 K562 细胞共孵育时间的延长, $\gamma\delta$ T 细胞分泌 IFN- γ 的水平呈现出时间依赖性增加,TNF- α 在 8 h 后逐渐增加;与 K562 细胞或 HL-60 细胞共孵育后, $\gamma\delta$ T 细胞 CD107a 分子的表达水平均显著增加($P < 0.01$)。**结论:** 体外扩增的 $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞具有较高的杀伤活性,为血液肿瘤的细胞免疫治疗提供实验依据。

[关键词] $\gamma\delta$ T 细胞;血液肿瘤细胞;细胞免疫治疗

[中图分类号] R730.3; R733

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)03-0230-07

Killing activity *in vitro* of $\gamma\delta$ T cells against human hematologic neoplasms cells

XIAO Ling, ZHANG Bin, CHEN Hu (Institute of Hematopoietic Stem Cell of PLA, Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, the 307th Hospital of PLA, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish culture system of $\gamma\delta$ T cell and to explore killing activity of the $\gamma\delta$ T cells against different human hematologic neoplasms cells. **Methods:** Four patients with lymphoma who were hospitalized in the Department of Hematopoietic Stem Cell Transplantation, the 307th Hospital of PLA and five healthy volunteers for physical examination during January to April 2016 were selected and their peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were isolated respectively. $\gamma\delta$ T cells were amplified *in vitro* with zoledronate (Zol) and IL-2, and killing activities of the $\gamma\delta$ T cells against hematologic neoplasms Jurkat, THP-1, HL-60, K562, Raji, U-937 and RPMI-8226 line cells were investigated by Flow cytometry assay. Killing effects of CIK cells, NK cells and the $\gamma\delta$ T cells on K562 cells were compared; and the expression levels of IFN- γ , TNF- α and secretion level of CD107a molecule in the $\gamma\delta$ T cells were detected. **Results:** The $\gamma\delta$ T cells were successfully amplified from peripheral blood *in vitro*. The $\gamma\delta$ T cells showed obvious killing activities against all of the Jurkat, THP-1, HL-60, K562, U-937 and RPMI-8226 cells ($P < 0.05$). There was not a statistical difference between killing activities of the $\gamma\delta$ T and NK cells against the K562 cells ($P > 0.05$), but killing activity of the $\gamma\delta$ T cells against K562 cells was higher than that of CIK cells ($P < 0.01$). With extending the co-incubation time with K562 cells, level of IFN- γ secreted by the $\gamma\delta$ T cells increased as a time-dependent manner, in addition, level of TNF- α in the $\gamma\delta$ T

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2013AA0200103);北京市科委首都特色课题基金资助项目(Z161100000516184)。Project supported by the National High Technology Research and Development Program (863 program) of China (2013AA0200103), and the Beijing Municipal Science and Technology Characteristics of the Capital Project Foundation(Z161100000516184)

[作者简介] 肖凌(1983-),男,硕士生,主要从事造血干细胞移植和细胞免疫治疗的研究,E-mail:411068586@qq.com

[通信作者] 张斌(ZHANG Bin, corresponding author),博士,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤分子诊断新技术、分子靶向治疗研究和树突状细胞肿瘤疫苗等研究,E-mail:zb307etc@163.com;陈虎(CHEN Hu, co-corresponding author),博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事造血干细胞移植和细胞免疫治疗基础和临床研究,E-mail:chenhu217@aliyun.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170305.1505.024.html>

cells gradually increased after 8 h of the co-incubation. After co-incubation of the $\gamma\delta$ T cells with the K562 or the HL-60 cells, expression level of CD107a molecule in the $\gamma\delta$ T cells was significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** The $\gamma\delta$ T cells amplified showed higher killing activity against hematologic neoplasms cells, which could provide experimental evidence for cellular immunotherapy of hematologic neoplasms.

[**Key words**] $\gamma\delta$ T cell; hematologic neoplasms cells; cellular immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(3): 230-236. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.003]

血液肿瘤为血液恶性疾病的总称,主要包括各类白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征和恶性淋巴瘤。传统的治疗方法如造血干细胞移植、放化疗、手术等虽然延长了血液肿瘤患者的生存时间,但仍面临着复发、难治和耐药等问题。而细胞免疫治疗近年来在血液肿瘤治疗中取得进展,已成为治疗血液恶性肿瘤的重要手段^[1-2]。 $\gamma\delta$ T 细胞是表达 TCR $\gamma\delta$ 的 T 细胞亚群,在体内起抗肿瘤^[3]、抗感染^[4]、免疫监视等作用, $\gamma\delta$ T 细胞能促进未成熟 B 细胞分泌 IgA、IgM、IgG 和调节体液免疫^[5],也能活化未成熟 DC^[6],可通过分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等细胞因子和穿孔素、颗粒酶 B、Fas/FasL 途径等杀伤肿瘤细胞^[7]。 $\gamma\delta$ T 细胞虽然在体内数量较少,但在体外和体内都能在双磷酸盐(nitrogen-containing bisphosphonates, N-BPs)刺激下大量扩增,在机体抗肿瘤免疫中具有重要作用^[8]。但 $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞的杀伤作用的报道比较少见。因此本实验研究 $\gamma\delta$ T 细胞对多种血液肿瘤细胞的杀伤作用,并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要材料与试剂

急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株、急性单核细胞白血病 THP-1 细胞株、急性早幼粒细胞白血病 HL-60 细胞株、慢性髓系白血病 K562 细胞株、Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞株、组织细胞淋巴瘤 U-937 细胞株、多发性骨髓瘤 RPMI-8226 细胞株均购自协和细胞库,唑来磷酸(zoledronate, Zol)购自深圳海王制药有限公司,IL-2 购自北京双鹤药业有限公司,淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。NK 细胞体外培养试剂盒购自 Kojin 公司,抗人 TCR- $\gamma\delta$ -PE 抗体、抗人 CD3-FITC 抗体、抗人 CD107a-APC 抗体、细胞因子 CBA 检测试剂盒、Annexin V/7-AAD 凋亡检测试剂盒均购自美国 BD 公司,RPMI 1640 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Gbico 公司。

1.2 标本来源

选取解放军第 307 医院造血干细胞移植科于

2016 年 1 月至 4 月期间收治并经病理科确诊为 B 细胞淋巴瘤患者 4 例,其中男性 2 例、女性 2 例,年龄 34 ~ 67 岁,中位年龄 52 岁。另从该院体检人员中选取健康志愿者 5 例作为对照,其性别、年龄和上述患者均衡一致。本研究获解放军第 307 医院伦理委员会批准,并与患者及志愿者签署知情同意书。

1.3 $\gamma\delta$ T 细胞的体外培养与鉴定

分别抽取 5 例健康志愿者外周静脉血,用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离得到 PBMC,用 PBS 洗涤后,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中 3 h,然后将细胞悬液转移至新培养瓶中,用流式细胞仪测定细胞分型,细胞计数后调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,置于 6 孔细胞培养板中,按表 1 分组加入 Zol 和 IL-2,每 3 d 换液一次,14 d 后收集。加入抗人 TCR- $\gamma\delta$ -PE 抗体、抗人 CD3-FITC 抗体和同型对照避光孵育。锥虫蓝染色计数活细胞数和总细胞数,流式细胞仪检测 $\gamma\delta$ T 细胞的纯度。 $\gamma\delta$ T 细胞的扩增倍数计算公式:扩增倍数 = (扩增后总细胞数 \times 扩增后 $\gamma\delta$ T 细胞纯度) / (扩增前总细胞数 \times 扩增前 $\gamma\delta$ T 细胞纯度)。

表 1 健康人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增分组

Tab.1 Grouping of multiplication *in vitro* of $\gamma\delta$ T cell from peripheral blood of healthy individual

Group	1	2	3	4	5	6
Zol[$c_B / (\mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]	1	2	5	5	0	0
IL-2[$z / (\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1})$]	400	400	400	1 000	400	1 000

1.4 流式细胞术检测 $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞的杀伤活性

分别以 Jurkat、THP-1、HL-60、K562、Raji、U-937、RPMI-8226 细胞和健康志愿者自体 PBMC 为靶细胞,用荧光染料 CFSE 标记后备用,同时收集 $\gamma\delta$ T 细胞作为效应细胞。按效靶比 10:1 和 20:1 分别加入效应细胞和靶细胞至 96 孔板,每组设置 3 个平行孔,混匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。用 PBS 洗 2 次,用结合缓冲液重悬细胞,再加入

7-AAD 抗体在常温避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测。细胞杀伤率计算公式:细胞杀伤率(%) = [实验组 (CFSE⁺ 7-AAD⁺/CFSE⁺) - 对照组 (CFSE⁺ 7-AAD⁺/CFSE⁺)] × 100% 。

以 K562、HL-60 细胞为靶细胞,按 10:1 混合效应细胞和靶细胞,每组设置 3 个平行孔,分为 2 组,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,分别于 4 h 和 20 h 后进行 7-AAD 染色,上流式检测。

1.5 流式细胞术检测 γδ T、CIK 和 NK 细胞的杀伤活性

分别抽取 4 例淋巴瘤患者外周血,按 1.3 步骤操作获得的细胞悬液平均分成 3 组。第 1 组加入 Zol 和 IL-2,体外扩增 γδT 细胞;第 2 组加入 IFN-γ (1 667 IU/ml)、CD3mAb (50 ng/ml)和 IL-2 (500 IU/ml),体外扩增 CIK 细胞;第 3 组采用 NK 细胞体外培养试剂盒^[9]进行体外扩增 NK 细胞。以 K562 细胞为靶细胞,收集 γδ T、CIK 和 NK 细胞作为效应细胞,按 5:1、10:1 和 20:1 混合靶细胞和效应细胞于 96 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。用 7-AAD 染色后上流式检测。细胞杀伤率计算公式同方法 1.4。

1.6 流式细胞术检测 γδT 细胞 CD107a 分子的表达水平

收集 K562、HL-60 和 γδT 细胞,调整 γδT 细胞的密度为 5 × 10⁶ 个/ml, K562 和 HL-60 细胞的密度为 5 × 10⁵ 个/ml,设置 3 组:Control 组加入 γδT 细胞悬液和含 10 % FBS 的 RPMI 1640 培养基各 100 μl;HL-60 细胞组加入 γδT 细胞悬液和 HL-60 细胞悬液各 100 μl;K562 细胞组加入 γδT 细胞悬液和 K562 细胞悬液各 100 μl, 分别混匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h,加入抗人 TCR-γδ-PE 抗体、抗人 CD107a-APC 抗体和同型对照抗体避光孵育后上流式检测。

1.7 流式细胞术检测 γδT 细胞分泌 IFN-γ 和

TNF-α 的水平

收集 K562 和 γδT 细胞,调整 K562 细胞密度为 5 × 10⁵ 个/ml,每孔加入 100 μl K562 细胞悬液,按 10:1 加入 γδT 细胞和 K562 细胞至 24 孔板,用培养基调整每孔总液量至 1 ml,每组设置 3 个平行孔,混匀后置于 37 ℃、5 % CO₂ 培养箱中分别孵育 4、8、16、24、36 和 48 h。孵育结束后离心,将上清液分装后置于 -20 ℃ 冰箱中冻存备用。按说明书梯度稀释细胞因子标准品和空白对照。将待测上清液从 -20 ℃ 冰箱中取出,取 50 μl 置于流式管中,加入 50 μl 捕获微球(2 种捕获微球混合)和 50 μl 混合 PE 检测试剂,室温避光 2 h,加入冲洗缓冲液 1 ml,低速离心 5 min,弃上清,加入冲洗缓冲液 300 μl 后上流式检测。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外成功扩增健康人外周血 γδT 细胞

培养前健康人 PBMC 中 γδT 细胞比率为 (3.63 ± 0.75)% ,加入 Zol 和 IL-2 培养后,倒置显微镜观察(图 1)显示,随着培养时间的延长,γδT 细胞数量逐渐增多,细胞集落逐渐形成并逐渐增大,第 11 天细胞集落大且密集,细胞形态饱满且折光度较好。培养至第 14 天流式细胞仪检测 γδT 细胞表型(图 2)和锥虫蓝染色细胞增殖倍数计数结果(图 3)显示,第 2 组(Zol 2 μmmol/L、IL-2 400 IU/ml)的 γδT 细胞纯度最高,且增殖倍数最大;第 2 组增殖倍数与第 1、3 和 4 组差异无统计学意义(P > 0.05),与第 5、6 组差异有统计学意义(P < 0.05)。结果表明,健康人外周血 γδT 细胞体外成功扩增。

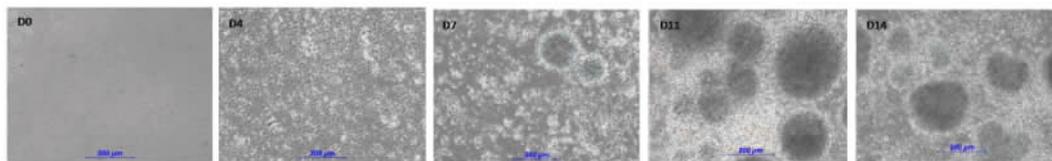


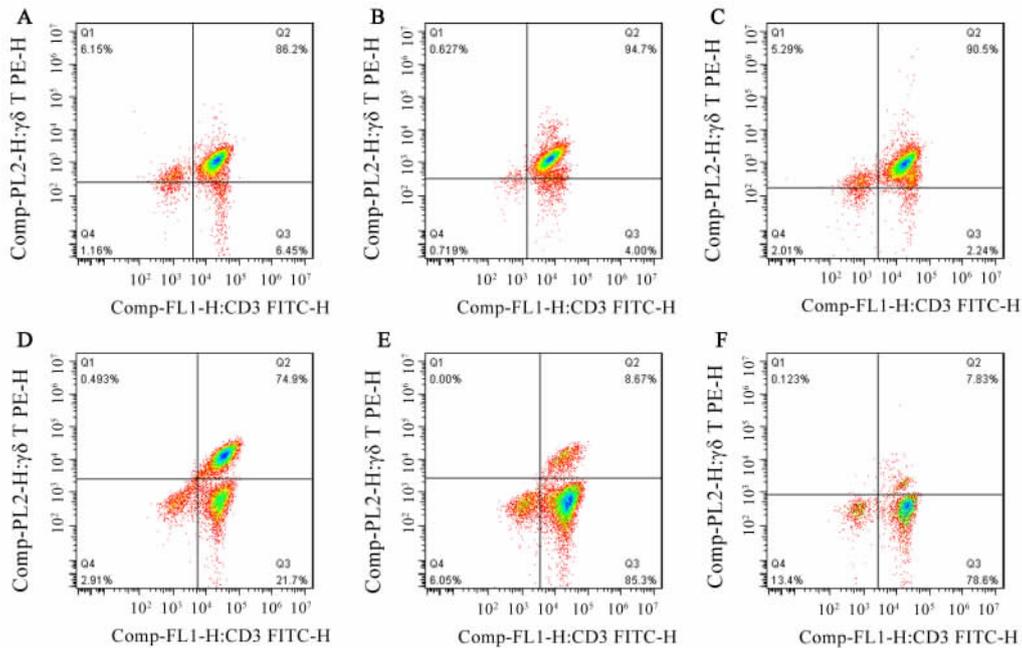
图 1 第 2 组(Zol 2 μmmol/L、IL-2 400 IU/ml)体外培养 0、4、7、11 和 14 d 对 γδT 细胞扩增的影响(×200)
Fig.1 Effects of culture *in vitro* for 0, 4, 7, 11 and 14 d on multiplication of the γδT cells in the 2nd group (Zol 2 μmmol / L, IL-2 400 IU / L)

2.2 γδT 细胞可显著杀伤多种血液肿瘤细胞

流式细胞术检测结果(图 4A)显示,效靶比为

10:1和20:1时 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤血液肿瘤细胞的杀伤率分别是:Jurkat 细胞(33.67 ± 5.29)%和(38.47 ± 5.36)%;THP-1 细胞(12.30 ± 0.87)%和(23.73 ± 2.76)%;HL-60 细胞(3.27 ± 0.92)%和(12.52 ± 3.65)%;K562 细胞(15.37 ± 1.04)%和(28.93 ± 2.10)%;Raji 细胞(5.68 ± 0.38)%和(9.68 ± 0.87)%;U-937 细胞(29.60 ± 6.43)%和(48.49 ±

9.49)%;RPMI-8226 细胞(14.87 ± 2.25)%和(20.40 ± 4.68)%。其中 Raji 细胞(10:1组)和 HL-60 细胞(10:1组)与 PBMC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其余均有显著的统计学差异 ($P < 0.05$)。结果说明, $\gamma\delta$ T 细胞对 Jurkat、THP-1、HL-60、K562、U-937 和 RPMI-8226 细胞均有较强的杀伤作用,但对 Raji 细胞的杀伤作用较弱。



A: Group 1 (Zol 1 $\mu\text{mmol/L}$,IL-2 400 IU/ml); B: Group 2 (Zol 2 $\mu\text{mmol/L}$,IL-2 400 IU/ml);
C: Group 3 (Zol 5 $\mu\text{mmol/L}$,IL-2 400 IU/ml); D: Group 4 (Zol 5 $\mu\text{mmol/L}$,IL-2 1 000 IU/ml);
E: Group 5 (IL-2 400 IU/ml); F: Group 6 (IL-2 1 000 IU/ml)

图2 不同浓度 Zol 和 IL-2 体外培养扩增 14 d 对 $\gamma\delta$ T 细胞表型的影响

Fig.2 Effects of culture *in vitro* with different concentration of Zol and IL-2 for 14 d on phenotype of the $\gamma\delta$ T cell

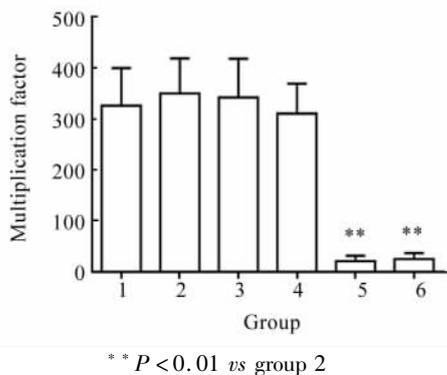


图3 不同扩增方法体外培养 14 d 后 $\gamma\delta$ T 细胞的扩增倍数
Fig.3 Amplification folds of the $\gamma\delta$ T cell after different methods of multiplication *in vitro* for 14 d

孵育时间为 4 h 和 20 h 时, $\gamma\delta$ T 细胞对 HL-60

细胞的杀伤率分别为(11.56 ± 3.54)%和(33.01 ± 5.95)%; $\gamma\delta$ T 细胞对 K562 细胞的杀伤率分别为(27.55 ± 3.25)%和(56.55 ± 10.17)%,差异均有显著的统计学意义 ($P < 0.01$),结果(图 4B)提示,随着孵育时间的延长, $\gamma\delta$ T 细胞对 K562 细胞和 HL-60 细胞的杀伤活性也明显增强。

2.3 $\gamma\delta$ T 细胞对 K562 细胞的杀伤活性明显强于 CIK 细胞

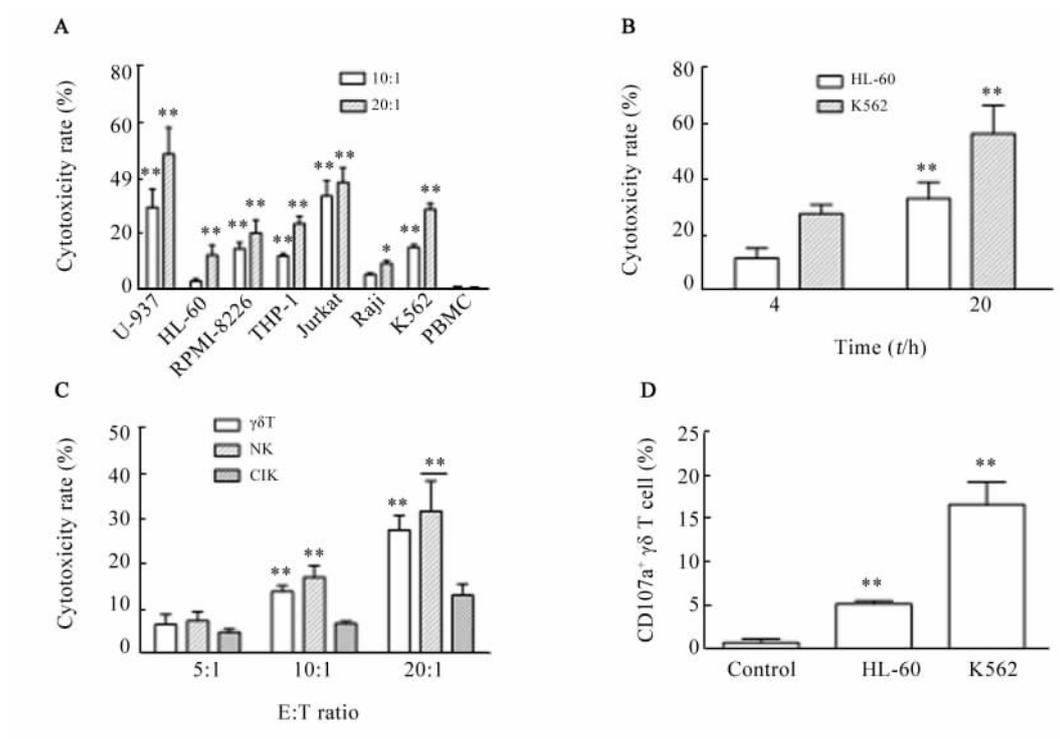
4 位淋巴瘤患者 PBMC 体外培养 14 d 后, $\gamma\delta$ T 细胞($\text{CD3}^+ \gamma\delta^+$)的比率为(89.95 ± 2.30)%, NK 细胞($\text{CD3}^- \text{CD56}^+$)的比率为(74.80 ± 6.23)%, CIK 细胞($\text{CD3}^+ \text{CD56}^+$)的比率为(51.73 ± 10.73)%,结果提示,4 例 B 细胞淋巴瘤患者均成功在体外扩增出 $\gamma\delta$ T、NK 和 CIK 细胞。为了对比 $\gamma\delta$ T、NK 和 CIK 细胞的体外杀伤活性,选择 K562 细

胞作为靶细胞,E:T分别为5:1、10:1和20:1,结果(图4C)显示,E:T为5:1时, $\gamma\delta$ T、NK和CIK细胞对K562细胞杀伤率分别为(6.53±2.24)%、(7.40±1.97)%和(4.83±0.71)%;E:T为10:1时, $\gamma\delta$ T、NK和CIK细胞对K562细胞的杀伤率分别为(13.85±1.29)%、(17.03±2.57)%和(6.78±0.53)%;E:T为20:1时, $\gamma\delta$ T、NK和CIK细胞对K562细胞的杀伤率分别为(27.55±3.25)%、(31.75±6.70)%和(13.05±2.51)%;E:T为5:1时,3组细胞对K562细胞的杀伤活性差异无统计学意义($P>0.05$),E:T

为10:1和20:1时,与NK细胞相比, $\gamma\delta$ T细胞对K562细胞的杀伤活性无统计学差异($P>0.05$),而与CIK细胞相比有显著统计学差异($P<0.01$)。

2.4 与K562或HL-60细胞共孵育明显增加 $\gamma\delta$ T细胞CD107a分子的表达

流式细胞术检测结果(图4D)显示,与对照组(0.80±0.45)%相比,K562细胞组(16.63±2.60)%和HL-60细胞组(5.23±0.35)% $\gamma\delta$ T细胞CD107a分子的表达水平均有显著增加($P<0.01$)。



A: Cytotoxicity of the $\gamma\delta$ T cells against tumor cells, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs PBMCs;

B: Cytotoxicity of the $\gamma\delta$ T cells against HL-60 and K562 cells after co-culture 4 or 20 h respectively. ** $P<0.01$ vs 4 h;

C: Cytotoxicity of the $\gamma\delta$ T, NK and CIK cells against K562 cells. ** $P<0.01$ vs CIK cell group

D: The expression of CD107a on the $\gamma\delta$ T cells after co-culture with HL-60 cells and K562 cells for 4 h. ** $P<0.01$ vs control group

图4 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

Fig. 4 Killing activity of the $\gamma\delta$ T cell against tumor cells

2.5 与K562细胞共孵育对 $\gamma\delta$ T细胞分泌IFN- γ 和TNF- α 水平的影响

流式细胞术检测结果显示,孵育4、8、16、24、36和48 h后, $\gamma\delta$ T细胞培养上清中IFN- γ 的质量浓度分别为(122.57±49.18)、(249.30±33.92)、(416.13±33.01)、(601.93±56.28)、(710.63±146.97)和(749.17±66.66) pg/ml。 $\gamma\delta$ T细胞培养上清中TNF- α 的质量浓度分别为(3.19±1.07)、(3.11±1.22)、(3.48±1.12)、(5.23±0.49)、(6.20±0.75)和(11.67±1.53) pg/ml。结果提示,

在48 h内随着共孵育时间的延长, $\gamma\delta$ T细胞分泌IFN- γ 的水平呈时间依赖性增加,而TNF- α 自8 h后逐渐增加。

3 讨论

$\gamma\delta$ T细胞不受MHC分子以及相关抗原肽体的限制,不依赖抗原处理和呈递,能以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- α 等途径杀伤肿瘤细胞,并能分泌多种细胞因子促进其他免疫细胞的活化,对多种肿瘤细

胞均表现出显著的杀伤活性^[3, 10],因此, $\gamma\delta$ T 细胞作为肿瘤过继免疫治疗的候选细胞引起越来越多国内外学者的关注。本研究旨在验证 $\gamma\delta$ T 细胞对多种白血病细胞具有杀伤活性。体外杀伤实验发现, $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞 Jurkat、THP-1、HL-60、K562、U-937 和 RPMI-8226 均有杀伤作用,对 U-937 和 Jurkat 细胞的杀伤作用较强,但对 Raji 细胞的杀伤作用较弱。 $\gamma\delta$ T、NK 和 CIK 细胞均为对肿瘤细胞有杀伤作用的免疫细胞,本研究通过对 K562 细胞杀伤对比实验发现,采自同一患者的 $\gamma\delta$ T 细胞,利用现有的培养方法培养后对 K562 细胞的杀伤活性与 NK 细胞比较无明显差异,但较 CIK 细胞强。

$\gamma\delta$ T 细胞能通过分泌多种细胞因子来杀伤肿瘤细胞^[11]。IFN- γ 能直接抑制肿瘤生长,活化巨噬细胞和抑制血管生成,在抗肿瘤免疫中起重要作用^[12]。在肿瘤微环境中, $\gamma\delta$ T 细胞分泌的 IFN- γ 促使肿瘤细胞上调 MHC I 类分子的表达,正向调节 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤能力^[13]。TNF- α 不仅能抑制肿瘤细胞生长,也能缩短肿瘤细胞的生存时间^[5]。本实验通过检测 IFN- γ 和 TNF- α 表达水平,观察延长与 K562 细胞的共孵育时间是否能促进 $\gamma\delta$ T 细胞分泌细胞因子。结果发现,在 48 h 内随着共孵育时间的延长, $\gamma\delta$ T 细胞分泌 IFN- γ 的水平均呈时间依赖性增加,而 TNF- α 自 8 h 后逐渐增加,提示随着共孵育时间的延长, $\gamma\delta$ T 细胞杀伤 K562 细胞的能力在不断提高。CD107a 分子是细胞毒性的功能指标,CD107a 分子的表达与细胞毒活性相关^[14]。实验结果发现,与 K562 细胞或 HL-60 细胞共孵育后, $\gamma\delta$ T 细胞的 CD107a 分子的表达水平均有明显上调,提示与 K562 细胞或 HL-60 细胞共孵育后, $\gamma\delta$ T 细胞的杀伤能力明显提高。

既然 $\gamma\delta$ T 细胞能有效杀伤血液肿瘤细胞,就有可能应用 $\gamma\delta$ T 细胞进行血液肿瘤的细胞免疫治疗,但需要足够数量的较高纯度且具有较高杀伤活性的 $\gamma\delta$ T 细胞,因此,简单有效的扩增方法就显得十分重要。 $\gamma\delta$ T 细胞的来源主要有健康人和患者的 PBMC、肿瘤浸润组织的 $\gamma\delta$ T 细胞和脐血中的单核细胞。由于外周血采集方便,故 $\gamma\delta$ T 细胞的体外扩增常采用 PBMC。近来发现 N-BPs 能够在体外扩增 $\gamma\delta$ T 细胞^[8]。Zol 为第三代 N-BPs,在体内和体外都能有效扩增 $\gamma\delta$ T 细胞。而在培养过程中多次加入 Zol 可导致 $\gamma\delta$ T 细胞活性下降,甚至死亡^[15]。本研究采用 Zol 联合 IL-2 的培养方案,Zol 只在培养第一天加入,可以获得 300 倍以上、纯度高、对血液肿瘤细胞具有较强的杀伤活性的 $\gamma\delta$ T 细胞。本实验结果为

$\gamma\delta$ T 细胞应用于血液肿瘤细胞免疫治疗提供了实验依据。

有实验^[16]利用基因工程技术,将嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)导入 $\gamma\delta$ T 细胞,使 $\gamma\delta$ T 细胞获得识别特异性肿瘤抗原的能力,再回输给患者后使其免疫系统同时具有特异性和非特异性杀伤血液肿瘤细胞的能力。由于本研究中采用的血液肿瘤细胞种类有限,不能完全反映 $\gamma\delta$ T 细胞对其他血液肿瘤细胞的杀伤活性,也需要继续进行体内实验来验证 $\gamma\delta$ T 细胞对血液肿瘤细胞的杀伤活性。如何能够增强 $\gamma\delta$ T 细胞在体内的杀伤活性,又可同时减小 $\gamma\delta$ T 细胞分泌细胞因子所致的毒副作用,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] ARNASON J, AVIGAN D. Evolution of cellular immunotherapy: from allogeneic transplant to dendritic cell vaccination as treatment for multiple myeloma[J]. Immunotherapy, 2012, 4(10): 1043-1051. DOI:10.2217/imt.12.118.
- [2] HOCHBERG J, EL-MALLAWANY N K, CAIRO M S. Humoral and cellular immunotherapy in ALL in children, adolescents, and young adults[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014, 14 Suppl (S6-S13). DOI:10.1016/j.clml.2014.04.015.
- [3] FOWLER D W, BODMAN-SMITH M D. Harnessing the power of V δ 2 cells in cancer immunotherapy[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 180(1):1-10. DOI:10.1111/cei.12564.
- [4] HOU L, WANG T, SUN J. $\gamma\delta$ T cells in infection and autoimmunity[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(2): 887-891. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.03.038.
- [5] WU Y L, DING Y P, TANAKA Y, et al. Gammadelta T cells and their potential for immunotherapy[J/OL]. Int J Biol Sci, 2014, 10(2): 119-135 [2016-11-25]. <http://www.ijbs.com/v10p0119.htm>. DOI:10.7150/ijbs.7823.
- [6] VAN ACKER H H, ANGUILE S, VAN TENDELOO V F, et al. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy[J/OL]. Oncoimmunology, 2015, 4(8): e1021538 [2016-07-07]. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1021538>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1021538.
- [7] SILVA-SANTOS B, SERRE K, NORELL H. Gammadelta T cells in cancer[J]. Nature Rev Immunol, 2015, 15(11): 683-691. DOI:10.1038/nri3904.
- [8] VAN ACKER H H, ANGUILE S, WILLEMEN Y, et al. Bisphosphonates for cancer treatment: mechanisms of action and lessons from clinical trials[J]. Pharmacol Ther, 2016, 158:24-40. DOI:10.1016/j.pharmthera.2015.11.008.
- [9] MASUYAMA J, MURAKAMI T, IWAMOTO S, et al. Ex vivo expansion of natural killer cells from human peripheral blood mononuclear cells co-stimulated with anti-CD3 and anti-CD52 monoclonal antibodies[J]. Cytotherapy, 2016, 18(1): 80-90. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.09.011.

- [10] FISHER J P, HEUIERJANS J, YAN M, et al. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: a systematic review of clinical trials[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(1): e27572[2016-04-27]. <http://dx.doi.org/10.4161/onci.27572>. DOI: 10.4161/onci.27572.
- [11] TODARO M, MERAVIGLIA, S, CACCAMO N, et al. Combining conventional chemotherapy and $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapy to target cancer-initiating cells[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(9): e25821[2016-11-23]. <http://dx.doi.org/10.4161/onci.25821>. DOI: 10.4161/onci.25821.
- [12] TYLER C J, DOHERTY D G, MOSER B, et al. Human Vgamma9/Vdelta2 T cells: innate adaptors of the immune system[J]. *Cell Immunol*, 2015, 296(1): 10-21. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.01.008.
- [13] PAUL S, LAL G. Regulatory and effector functions of gamma-delta (gammadelta) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(5):976-985. DOI:10.1002/ijc.30109.
- [14] AKTAS E, KUCUKSEZER U C, BILGIC S, et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity[J]. *Cell Immunol*, 2009, 254(2): 149-154. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007.
- [15] ZOU C, ZHAO P, XIAO Z, et al. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 8(5): 8900-8909. DOI: 10.18632/oncotarget.13051.
- [16] MIRZAEI H R, MIRZAEI H, YUN LEE S, et al. Prospects for chimeric antigen receptor (CAR) gammadelta T cells: a potential game changer for adoptive T cell cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(2): 413-423. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.07.001.
- [收稿日期] 2016 - 12 - 06 [修回日期] 2017 - 01 - 29
- [本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心(Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR)为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构(World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于2005年7月25日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由WHO领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公共利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予WHO ICTRP全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得WHO ICTRP认证的二级注册机构输送的注册资料,并向WHO ICTRP中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国Cochrane中心、英国Cochrane中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过ChiCTR检索入口网址www.chictr.org,公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与WHO全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

(本刊编辑部)