

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.003

· 基础研究 ·

靶向CD19抗原的CAR-NK-92MI和CAR-CD19-T细胞对套细胞淋巴瘤的体外杀伤

赵松柏, 韩志超, 安钢力, 孟会敏, 杨林(苏州大学 唐仲英血液学研究中心, 江苏 苏州 215000)

[摘要] **目的:** 探讨靶向CD19抗原的CAR-NK-92MI和CAR-CD19-T细胞对套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)的体外杀伤作用。**方法:** 利用近年来在B细胞急性淋巴细胞白血病(B-lineage acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)临床试验中获得的成功嵌合抗原受体基因修饰的T(CAR-T细胞)技术, 针对MCL高表达CD19抗原的情况, 分别构建了靶向CD19抗原的CAR-CD19-T和CAR-NK-92MI细胞, 运用LDH释放法检测两者对MCL细胞的体外杀伤作用, 另外通过流式细胞术对其杀伤作用进行了验证。**结果:** 相对于对照, 无论是CAR-NK-92MI细胞还是CAR-CD19-T细胞, 都对MCL细胞具有极高的杀伤能力(均 $P < 0.01$), 都对K562-CD19细胞具有非常高的毒性(均 $P < 0.01$), 而对K562细胞基本不起作用。CAR-NK-92MI细胞组MCL细胞的死亡率比对照组高30%~40%, CAR-CD19-T细胞组MCL细胞的死亡率比对照组高40%~50%。**结论:** CAR-NK-92MI和CAR-CD19-T细胞在体外对MCL细胞具有强的特异性杀伤作用。

[关键词] 套细胞淋巴瘤; CAR-NK-92MI细胞; CAR-CD19-T细胞

[中图分类号] R733.4; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0455-07

CAR-NK-92MI and CAR-CD19-T cells targeting CD19 antigen exhibit significant *in vitro* killing activity on mantle cell lymphoma

ZHAO Songbo, HAN Zhichao, AN Gangli, MENG Huimin, YANG Lin (The Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Suzhou, 215000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vitro* cytotoxicity of the chimeric antigen receptor-modified T cells and NK-92MI cells (CAR-NK-92MI cells) and CAR-CD19-T cells against mantle cell lymphoma (MCL). **Methods:** CAR-T cell technology, successfully obtained in clinical trial of B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) treatment, was used in this study. In the case of high expression of CD19 antigen in MCL, CAR-CD19-T cells and CAR-CD19-NK-92MI cells targeting CD19 antigen were generated, respectively. Then, their cytotoxicity against MCL cell lines was detected by LDH release assay and the results were verified by flow cytometry. **Results:** Compared with control group, both CAR-NK-92MI and CAR-CD19-T cells exhibited prominent killing effect against MCL cells (all $P < 0.01$); in addition, the two CAR cells exhibited high cytotoxicity against K562-CD19 cells but not on K562 cells (all $P < 0.01$). The death rate of MCL cells from CAR-NK-92MI group was 30%-40% more than that of control group, and the death rate of MCL from CAR-CD19-T group was 40%-50% more than that of control group. **Conclusion:** Both CAR-NK-92MI and CAR-CD19-T cells exhibited potent cytotoxicity against MCL cells *in vitro*.

[Key words] mantle cell lymphoma; CAR-NK-92MI cell; CAR-CD19-T cell

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 455-461. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.003]

套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)约占非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)的6%^[1-3]。临床上MCL难以治愈,多数患者的生存期仅约4年^[4]。目前常用的一些信号通路抑制剂(如依鲁替尼)疗效不乐观,仅有1/3的患者得到缓解,有1/3的患者会出现耐药^[5]。CAR-T/NK细胞治疗技术是依据识别肿瘤表面相关抗原或特异性抗原,对T/NK细胞进行基因修饰,对肿瘤细胞进行有效杀伤的技术^[6]。CAR结构中的scFv赋予T/NK细胞选择性识别肿瘤细胞的能力^[7],CD3 ζ 的ITAM序列可以对T细胞

进行有效的激活而提高杀伤能力^[8]。第一代CAR-T细胞仅具有胞内CD3 ζ ,具有部分持续性和有限杀伤能力^[9]。第二代CAR增加了1个共刺激分子,如

[基金项目] 国家重点研发项目资助(No. 2016YFC1303403)。Project supported by the National Key Research and Development Program of China(No. 2016YFC1303403)

[作者简介] 赵松柏(1990-),男,硕士生,主要从事细胞免疫治疗研究,E-mail:18253594570@139.com

[通信作者] 杨林(YANG Lin, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事细胞免疫治疗研究,E-mail:yanglin@suda.edu.cn

OX40(CD134)、CD28、4-1BB(CD137)、CD27等^[7,10-12], 赋予CAR-T/NK细胞在体内生存与增殖的能力。有研究^[13]指出,在B细胞急性淋巴细胞白血病(B-lineage acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)的临床研究中,靶向CD19抗原的第二代CAR取得了非常可观的效果,CR高达88%。第三代CAR是2个共刺激分子串连^[14],一般是CD28和CD137分子共存。人NK细胞对体内的恶性细胞具有非常强的杀伤能力^[15],但其在免疫治疗方面还存在诸多缺陷,如在体外难以增殖^[16]。NK-92MI是NK-92转入了人IL-2 cDNA而不依赖于额外IL-2就能扩增的细胞系^[17],其体外增殖能力要优于NK和NK-92细胞。本课题分别构建了CAR-T/CAR-NK-92MI细胞,作为效应细胞,探讨其对MCL细胞的杀伤能力。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂

人套细胞淋巴瘤细胞系MAVER-1和JeKo-1、NK-92MI以及K562细胞购自ATCC。MEM- α 、RPMI1640和DMEM培养基购自Invitrogen公司, TexMACS™GMP培养基、CD3/CD28磁珠购自美天旎生物技术有限公司。Fc抗体、CD8抗体、CD3抗体和CD56抗体购自BD公司,LDH检测试剂盒购自Sigma公司。

1.2 细胞培养

NK-92MI细胞培养在含有2 mmol/L谷氨酰胺和1.5 g/L碳酸氢钠的MEM- α 培养基中,MAVER-1、JeKo-1和K562细胞培养在RPMI1640培养基中,健康人外周血T细胞培养在TexMACS™GMP培养基中,HEK293T细胞在DMEM培养基中培养。所有细胞均在含有5% CO₂、37℃饱和湿度下培养。提取的T细胞在体外激活48 h后进行转染,待细胞增殖数量足够时进行毒性实验。HEK293T细胞长至80%时进行分皿,至60%~70%汇合度时进行病毒包装。

1.3 CAR的构建

本研究构建的是第二代CAR,即将相应的CD19-scFv序列构建到慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-CopPuro上,scFv前面是信号肽,后面依次是人Fc序列、共刺激因子CD28序列和CD3 ζ 序列。

1.4 慢病毒的制备和对T/NK92-MI细胞的转染

慢病毒制备过程在本实验室以往的方法^[18]操作。NK-92MI细胞的转染过程:将NK-92MI细胞置于48孔板(1×10⁶个/孔)中,然后加入量为MOI=15的病毒,共培养6 h,去上清后进行培养,72 h后染上抗人Fc的抗体,在流式细胞分选仪上进行分选,然后进行增殖培养。CAR-T细胞的构建:将健康人外周血和

等量的PBS混匀,然后贴壁缓慢加到适量的Ficoll中,600×g离心30 min,抽取单个核细胞(多数为T细胞)置于24孔板中培养(1×10⁶个/孔)中,体系为1 ml培养基,每孔加入10 μ l抗CD3/CD28磁珠对T细胞进行激活,磁珠和T细胞的比例大约为3:1。激活48 h后将T细胞转移到48孔板中,用浓缩后的病毒上清(MOI=5)转染T细胞,每孔种1×10⁶个激活后的T细胞,终体系为100 μ l,转染15 h后去除上清,加入培养基进行培养。T细胞从激活、转染后的培养都是在TexMACS™GMP培养基中进行的,整个T细胞培养过程均加IL-2,终活性浓度为40 IU/ml。

1.5 K562-CD19稳定细胞株的构建

在NCBI上查找相应的CD19抗原序列,应用SignalP 4.1 Server软件和Uniprot软件进行处理,然后构建到pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP载体上,包装成慢病毒,对K562细胞进行转染,转染时间为6 h,体外培养3 d。构建后的K562-CD19细胞染上FITC标记的CD19抗体后在流式细胞仪上分选,直至细胞阳性率达到百分之百。

1.6 流式细胞术检测细胞的表型

收集JeKo-1、MAVER-1、K562-CD19、K562等细胞,离心弃上清,然后用pH为7.4的PBS洗一遍,转染相应的抗体。JeKo-1、MAVER-1和K562-CD19细胞转染带PE-cy5荧光的CD19抗体;转染的T细胞染带APC荧光的Fc抗体,检测阳性率;另外CAR-T细胞转染带FITC荧光的CD8抗体和带FITC荧光的CD3抗体检测表型;NK-92MI细胞转染带APC荧光的Fc抗体检测阳性率,另外转染带APC荧光的CD56抗体检测表型。所有细胞转染抗体后都是37℃孵育20~25 min,用PBS清洗后,在流式细胞仪上检测分析各细胞表面相应蛋白的表达率。实验重复3次。

1.7 LDH释放法检测CAR-T/CAR-NK-92MI细胞对MCL细胞的体外杀伤能力

采用CytoTox 96®非放射性细胞毒性试验CBA法进行体外杀伤检测,主要检测每组LDH释放量,设4组效靶比,分别为0.25:1、0.5:1、1:1和2:1。取靶细胞4×10⁵个于24孔板中,再加入相应数量的T细胞,混匀,终体系为1.5 ml。另外设立靶细胞组(不加效应细胞)检测靶细胞LDH释放量和靶细胞完全裂解后LDH的释放总量,设立效应细胞组(不加靶细胞)和培养基组。CAR-NK-92MI细胞组培养6 h, CAR-CD19-T细胞组培养18 h后,用10×裂解液裂解靶细胞,然后每组取上清50 μ l于96孔板中,各加入50 μ l检测试剂,室温避光孵育30 min,然后加入50 μ l终止液,1 h后用酶标仪在492 nm处检测光密度(D)值。每组杀伤值按下列公式计算:杀伤效率(%)=(实验组

D 值-效应细胞自然死亡 D 值-靶细胞自然死亡率 D 值)/(靶细胞完全死亡数 D 值-靶细胞自然死亡数 D 值) $\times 100\%$ 。

为进一步验证CAR-CD19-T细胞杀伤试验的可靠性,采用课题组前期的另一种方法^[18],即取靶细胞于15 ml离心管中,PBS重悬,加微量羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxy fluorescein succinimidyl ester, CFSE)于37℃孵育10 min,后将靶细胞置于24孔板中(4×10^5 个/孔),再加入相应数量的T细胞,混匀,终体系为1.5 ml。效应细胞和靶细胞共培养18 h后,去上清,适量PBS重悬,每组加入1 μ l 7-AAD,然后在流式细胞分析仪上进行检测。CFSE阳性细胞群为靶细胞,该群中7-AAD阳性的细胞群所占比例即为靶细胞的死亡率。实验重复3次。

1.8 统计学处理

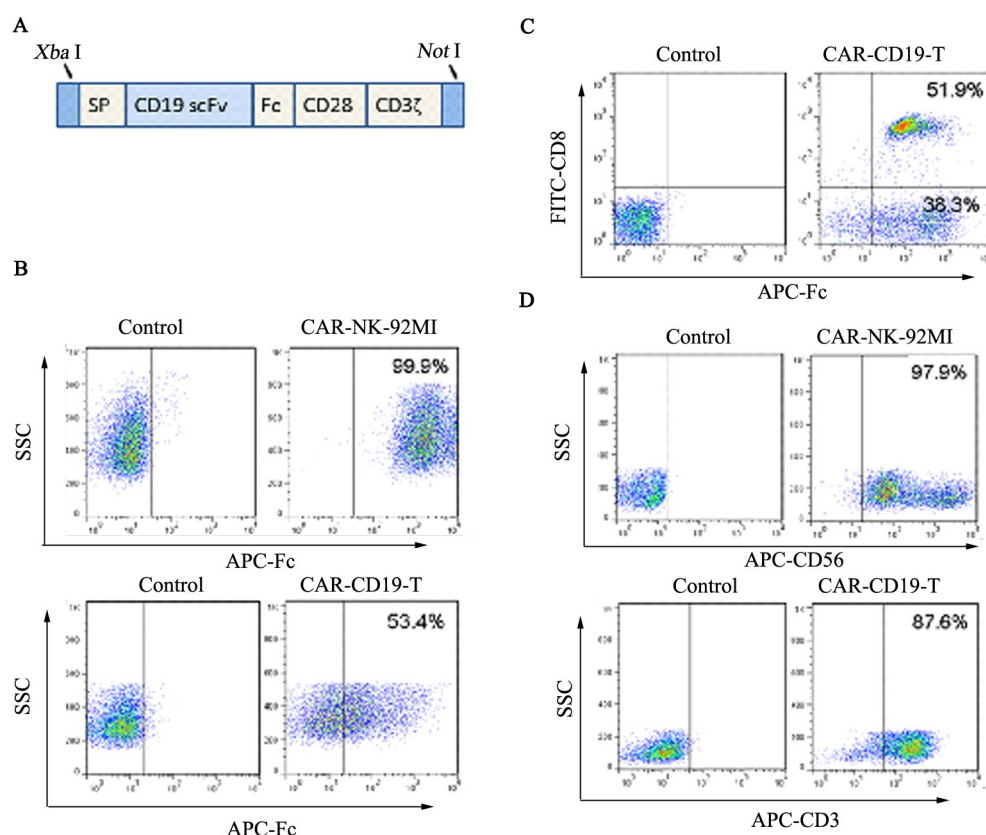
采用GraphPad Prism5 和 Social Sciences 23.0 (SPSS Inc., USA)软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间

比较用Student's t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建CAR-NK-92MI细胞和CAR-CD19-T细胞

将所构建的CAR插入到慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-CopPuro上,前后酶切位点依次是Xba I和Not I(图1A)。将CAR包装成慢病毒后对NK-92MI和T细胞分别进行转染,CAR-NK-92MI经过分选后阳性率达到了100%,CAR-CD19-T细胞的阳性率在40%~95%(图1B)。CAR-CD19-T细胞检测结果(图1C)显示,CD8阳性细胞所占比例约为50%,CAR-CD19-T细胞表面CD3蛋白的表达率为87.6%(图1D); CAR-NK-92MI细胞表面CD56蛋白的表达率为97.9%。



A: The construction of CAR; B: Expression rate of CARs; C, D: The phenotypes of CAR-NK-92MI and CAR-T cells

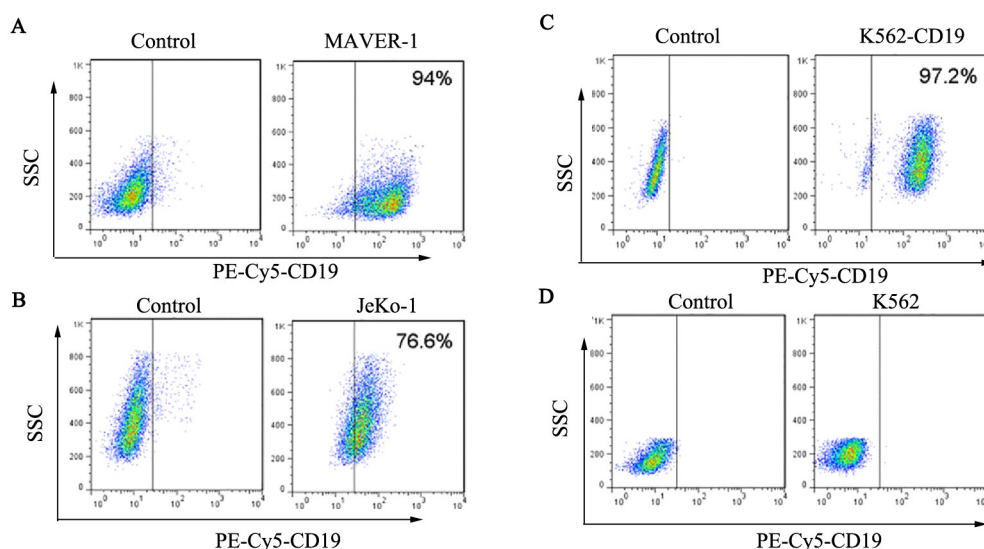
图1 CAR-NK-92MI和CAR-CD19-T细胞的构建

Fig. 1 Construction of CAR-NK-92MI and CAR-CD19-T cells

2.2 构建的靶细胞表面高表达CD19抗原

流式细胞术检测结果(图2)显示,MAVER-1的CD19抗原表达率为94%(图2A),JeKo-1的表达率为

76.6%(图2B)。相较于CD19抗原阴性的K562细胞(图2D),K562-CD19细胞株稳定表达CD19抗原(图2C)。



A: MAVER-1 cells; B: JeKo-1 cells; C: K562-CD19 cells; D: K562 cells

图2 肿瘤细胞表面CD19抗原的表达率

Fig. 2 Expression rates of CD19 antigen on the surface of tumor cells

2.3 CAR-NK-92MI 细胞对 MCL 细胞有很强的特异性杀伤能力

LDH 释放法检测结果(图3)显示, CAR-NK-92MI 对 MAVER-1 细胞的杀伤能力要明显强于 NK-92MI 组。效靶比为 0.25:1 时, CAR-NK-92MI 组 MAVER-1 细胞的死亡率是 NK-92MI 组的 2 倍; 效靶比 2:1 时, 实验组靶细胞的凋亡率比 NK-92MI 组高 30% 左右($E:T=0.25:1: t=5.54, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=4.50, P<0.01$; $E:T=1:1: t=4.86, P<0.05$; $E:T=2:1: t=4.28, P<0.01$; 图 3A)。CAR-NK-92MI 对 JeKo-1 细胞的杀伤力要明显高于 NK-92MI 组($E:T=0.25:1: t=4.98, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=4.22, P<0.01, P<0.01$; $E:T=1:1: t=6.76, P<0.01$; $E:T=2:1: t=4.23, P<0.01$; 图 3B)。CAR-NK-92MI 和 NK-92MI 细胞对 K562 细胞的杀伤力比较差异无统计学意义(图 3D); CAR-NK-92MI 细胞对靶细胞 K562-CD19 细胞的杀伤效率显著高于 NK-92MI 细胞($E:T=0.25:1: t=3.21, P<0.05$; $E:T=0.5:1: t=2.98, P<0.05$; $E:T=1:1: t=3.06, P<0.05$; $E:T=2:1: t=3.53, P<0.05$; 图 3D)。结果说明 CAR-NK-92MI 细胞对表达 CD19 抗原的 MCL 细胞具有特异性杀伤能力。

2.4 LDH 法检测显示 CAR-CD19-T 细胞对 MCL 细胞具有极强的特异性杀伤能力

经过对杀伤时间的探索, CAR-CD19-T 细胞对 MCL 杀伤时间定为 18 h。LDH 释放结果(图 4A)所示, CAR-CD19-T 细胞对 MAVER-1 的毒性要高于 T 细胞对照组, 尤其是效靶比为 0.25:1 时, CAR-T 对 MAVER-1 的杀伤效率是对照组的 5 倍($E:T=0.25:1: t=16.54, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=13.72, P<0.01$; $E:T=1:$

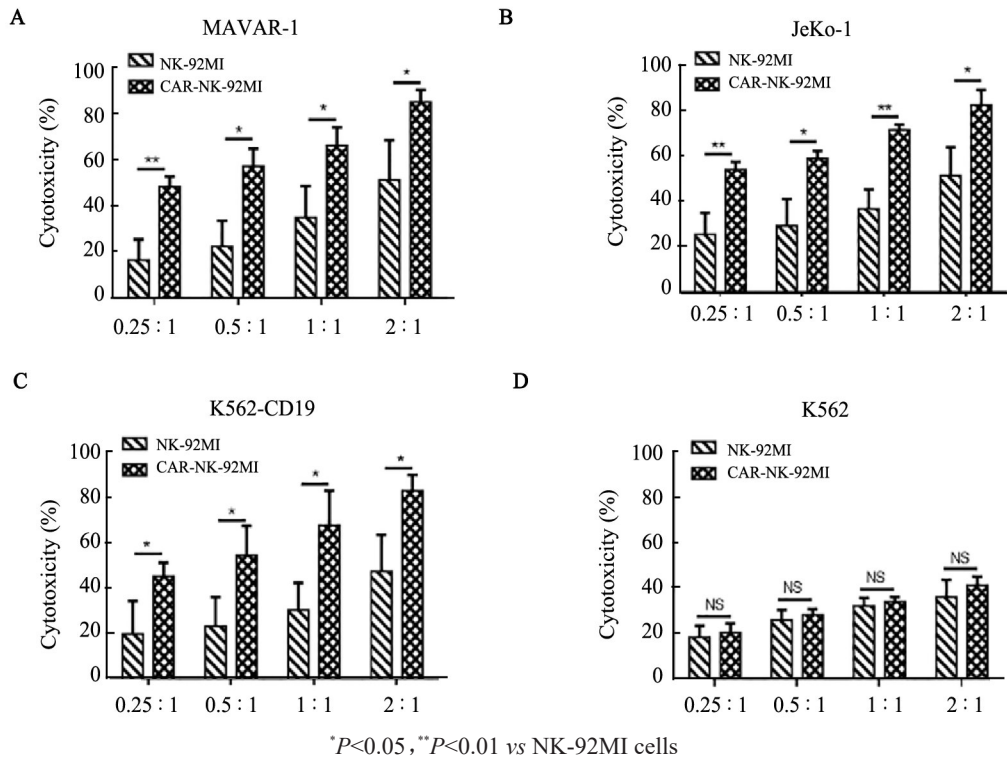
$1: t=14.57, P<0.01$; $E:T=2:1: t=7.85, P<0.01$; 图 4A)。CAR-CD19-T 细胞组 JeKo-1 的杀伤率要明显高于 T 细胞对照组, 比如效靶比为 2:1 时, CAR-CD19-T 细胞组 JeKo-1 的杀伤率高达 80%, 而 T 细胞组中 JeKo-1 细胞的杀伤效率不到 40% ($E:T=0.25:1: t=3.13, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=3.78, P<0.01$; $E:T=1:1: t=3.92, P<0.01$; $E:T=2:1: t=7.82, P<0.01$; 图 4B)。

CAR-CD19-T 细胞对 K562 细胞的毒性和对照组差异无统计学意义($P>0.05$, 图 4D), CAR-CD19-T 细胞对 K562-CD19 细胞的杀伤能力要明显高于 T 细胞对照组($E:T=0.25:1: t=8.55, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=18.0, P<0.01$; $E:T=1:1: t=6.70, P<0.01$; $E:T=2:1: t=4.69, P<0.01$; 图 4C)。结果表明, CAR-CD19-T 细胞对表达 CD19 抗原的 MCL 细胞具有特异性杀伤能力。

2.5 流式细胞术检测证实 CAR-CD19-T 细胞对 MCL 细胞具有强毒性

图 5A、5B 分别是 CAR-CD19-T 细胞对 MAVER-1 和 JeKo-1 的杀伤作用的 CFSE/7-AAD 流式细胞术测图, 上层为 T 细胞对照组, 下层为 CAR-CD19-T 细胞实验组。

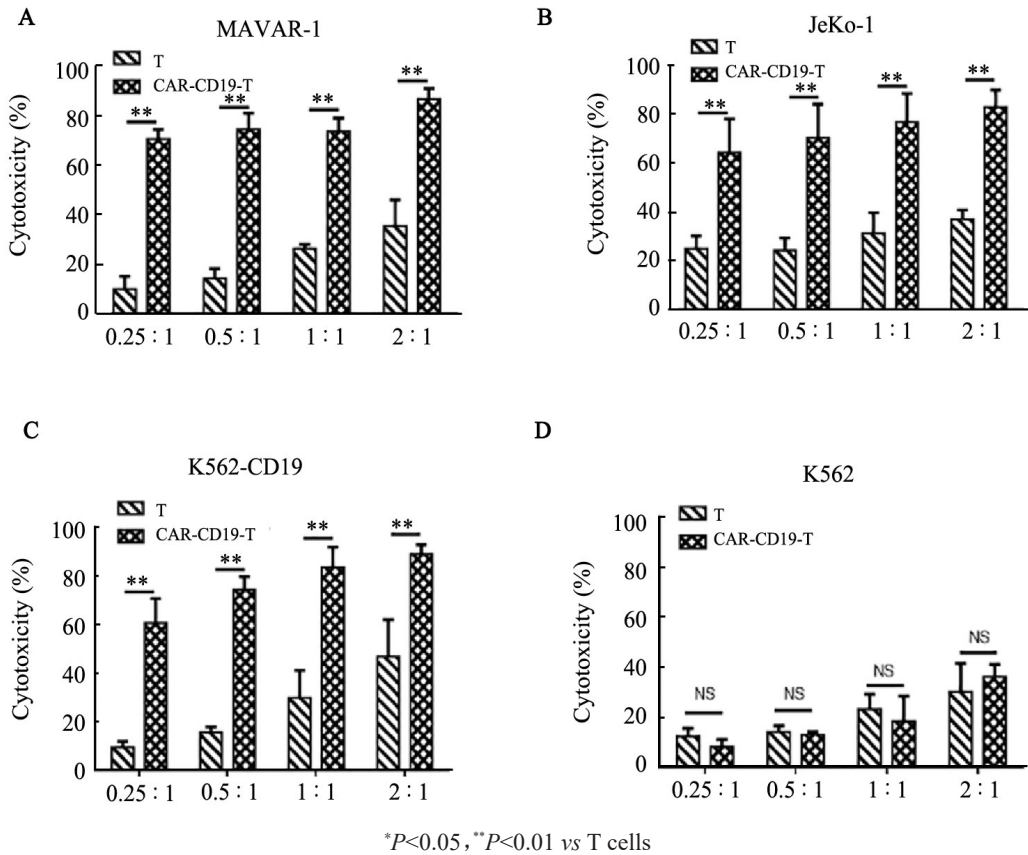
流式细胞术检测结果显示, CAR-CD19-T 细胞对 MAVER-1 的杀伤能力远远强于未作修饰的 T 细胞($E:T=0.25:1: t=106.75, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=104.93, P<0.01$; $E:T=1:1: t=13.8, P<0.01$; $E:T=2:1: t=7.3, P<0.01$; 图 5C); CAR-CD19-T 细胞同样也对 JeKo-1 具有非常强的毒性, 明显高于对照组($E:T=0.25:1: t=5.87, P<0.01$; $E:T=0.5:1: t=6.53, P<0.05$; $E:T=1:1: t=20.95, P<0.01$; $E:T=2:1: t=12.98, P<0.01$; 图 5D)。



A: MAVAR-1 cells; B: JeKo-1 cells; C: K562-CD19 cells; D:K562 cells

图3 CAR-NK-92MI细胞对靶细胞的杀伤情况

Fig. 3 The killing effect of CAR-NK-92MI cells towards target cells



A: MAVAR-1 cells; B: JeKo-1 cells; C: K562-CD19 cells; D:K562 cells

图4 CAR-CD19-T细胞对靶细胞的杀伤情况

Fig. 4 The killing effect of CAR-CD19-T cells towards target cells

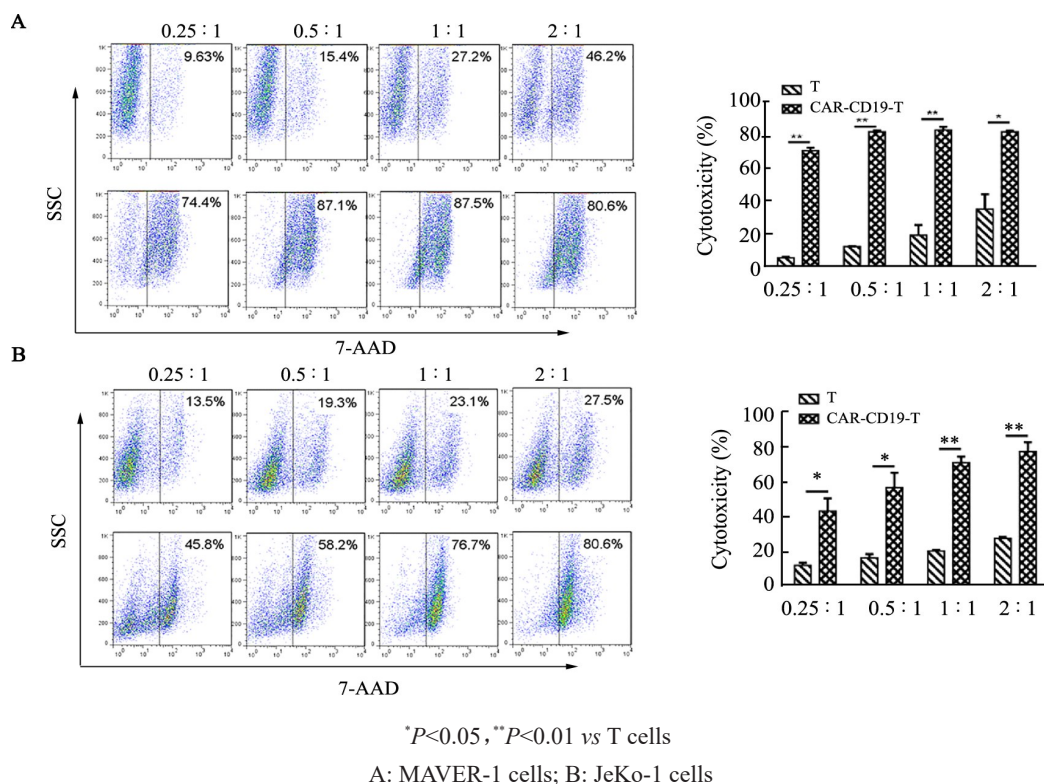


图5 流式检测 CAR-CD19-T 细胞对靶细胞的杀伤情况

Fig. 5 The killing effect of CAR- CD19-T cells toward target cells detected by flow cytometry

3 讨论

MCL 是一种 B 细胞起源的恶性血液肿瘤, 高表达 CD19 抗原^[19]。基于此, 本课题组构建了靶向 CD19 抗原的 CAR-NK-92MI 和 CAR-CD19-T 细胞, 在体外对两种 MCL 细胞系 MAVER-1 和 JeKo-1 进行杀伤验证, 结果显示两种 CAR 均对 MCL 细胞具有非常高的杀伤能力, 说明本研究的单链抗体对 CD19 抗原有着非常强的亲和力。

目前尚未见到针对同一种抗原的 CAR-NK-92MI 和 CAR-CD19-T 在研究的报道, 本研究针对 MCL 来构建两种 CAR (CAR-NK-92MI 和 CAR-CD19-T), 并且均在体外进行了杀伤实验, 其杀伤结果非常理想。MAVER-1 细胞 CD19 抗原的表达率高于 JeKo-1 细胞, 所以无论是 CAR-NK-92MI 还是 CAR-CD19-T 细胞, 在相同条件下, 基本均是前者的凋亡率高于后者。

本课题组前期的研究将 CAR-NK-92MI 的杀伤时间定位 6 h, 实验前期的条件探索显示, 杀伤时间为 8 h 时, CAR-NK-92MI 对靶细胞的杀伤效率基本不再提高。CAR-CD19-T 细胞杀伤时会释放多种毒性细胞因子, 比如穿孔素、颗粒酶等, 这些细胞因子对靶细胞的杀伤起着举足轻重的作用。前期研究还发

现, CAR-CD19-T 细胞对 MCL 细胞的杀伤时间为 24 h, 同 20 h 相比, 效靶比 2:1 和 1:1 组肿瘤细胞凋亡率不再上升, 而对照组肿瘤细胞凋亡率继续增加, 因此将杀伤时间定为 18 h 时这种情况则不再出现。

激活后的 T 细胞是 CD3 阳性的, 其中起主要杀伤作用的是 CD8⁺ T 细胞, CD4⁺ T 细胞具有辅助作用, 同 NK-92MI 细胞相比, T 细胞体外扩增相对复杂, 增殖速率慢, 但是 CAR-T 回输宿主体内不会引起 GVHD, 在体内扩增速率要高于体外, 并且持续时间久。NK-92MI 细胞体外增殖速率快, 扩增过程简单, 可以持续增殖, 但是 CAR-NK-92MI 细胞回输体内会导致一定的免疫排斥, 生存时间有限。所以 CAR-T 和 CAR-NK-92MI 各有优缺点, 本研究在体外对 CAR-NK-92MI 和 CAR-CD19-T 均进行的活性实验, 两者对 MCL 细胞都有着非常强的杀伤能力。

为了验证 CAR-NK-92MI 和 CAR-CD19-T 细胞针对 CD19 抗原的特异性, 本实验对 K562 细胞和 K562-CD19 细胞同时做了杀伤实验。对于 K562 细胞, CAR-T/NK92MI 组靶细胞凋亡率和对照组没有显著差异, 而 CAR-T/NK-92MI 对 K562-CD19 细胞的杀伤非常明显, 说明了本实验构建的 CAR-T/NK-92MI 细胞对 CD19 抗原具有特异性。同时为了验证 CAR-T 细胞对 MCL 细胞的毒性, 采用 CFSE/7-AAD

的流式细胞术检测方式进行了验证,杀伤趋势和LDH释放检测方式一样,足以说明CAR-CD19-T细胞对MCL细胞具有非常强的杀伤能力。本研究的一个遗憾是没有进行体内试验,不过本研究成功地进行了CAR-T/NK-92MI对MCL的体外杀伤试验,为临床上治疗MCL提供了很好的参考依据。

[参 考 文 献]

- [1] O'CONNOR O A. Mantle cell lymphoma: identifying novel molecular targets in growth and survival pathways[J/OL]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007, 2007: 270-276[2017-12-05]. <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2007/1/270.long>. DOI: 10.1182/asheducation-2007.1.270.
- [2] DREYLING M, HIDDEMANN W. Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma[J/OL]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009, 2009: 542-551[2017-12-05]. <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2009/1/542.long>. DOI: 10.1093/annonc/mdn193.
- [3] JARES P, COLOMER D, CAMPO E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(10): 750-762. DOI: 10.1038/nrc2230.
- [4] CHANDRAN R, GARDINER S K, SIMON M, et al. Survival trends in mantle cell lymphoma in the United States over 16 years 1992-2007[J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(8): 1488-1493. DOI: 10.3109/10428194.2012.656628.
- [5] RUELLA M, KENDERIAN S S, SHRSTOVA O, et al. The addition of the BTK inhibitor ibrutinib to anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CART19) improves responses against mantle cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(11): 2684-2696. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1527. DOI: 110.1158/1078-0432.CCR-15-1527.
- [6] ESHHAR Z, WAKS T, BENDAVID A, et al. Functional expression of chimeric receptor genes in human T-cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 248(1/2): 67-76. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00343-4.
- [7] HEGDE M, CORDER A, CHOW K K, et al. Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred T-cells in glioblastoma[J]. Mol Ther, 2013, 21(11): 2087-2101. DOI: 10.1038/mt.2013.185.
- [8] IRVING B A, WEISS A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways[J]. Cell, 1991, 64(65): 891-901. DOI: 10.1016/0092-8674.
- [9] BROCKER T, KARJALAINEN K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are sufficient to prime resting T lymphocytes[J]. J Exp Med, 1995, 181(5): 1653-1659. DOI: 10.1084/jem.181.5.1653.
- [10] URBANSKA K, LANITIS E, POUSSIN M, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1844-1852. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [11] TAMADA K, GENG D, SAKODA Y, et al. Redirecting gene-modified T-cells toward various cancer types using tagged antibodies[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(23): 6436-6445. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449.
- [12] GRADA Z, HEGDE M, BYRD T, et al. TanCAR: a novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy[J/OL]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2: e105[2017-12-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731887/>. DOI: 10.1038/mtna.2013.32.
- [13] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. Sci Transl Med, 2016, 6(224): 224ra25[2017-12-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684949/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [14] LEE D W, BARRETT D M, MACKALL C, et al. The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(10): 2780-2790. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1920.
- [15] VIVIER E, RAULET D H, MORETTA A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells[J]. Science, 2011, 331(6013): 44-49. DOI: 10.1126/science.1198687.
- [16] TONN T, BECKER S, ESSER R, et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(4): 535-544. DOI: 10.1089/15258160152509145.
- [17] FAVORS S E, CURD L M, GREGG R K. Use of the antiinflammatory cytokine interleukin-11 to reverse HIV-1 gp120 repression of a natural killer cell line[J]. Cell Immunol, 2012, 276(1/2): 1-5. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.02.011.
- [18] CHEN Y, YOU F T, YANG L, et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- ζ or CD64-BB- ζ receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody[J]. Oncotarget, 2017, 8(23): 37128-37139. DOI: 10.18632/oncotarget.16201.
- [19] BRENTJENS R J, LATOUCHE J B, SANTOS E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15[J]. Nat Med, 2003, 9(3): 279-286. DOI: 10.1038/nm827.

[收稿日期] 2018-01-16

[修回日期] 2018-03-16

[本文编辑] 党瑞山