

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.006

· 基础研究 ·

γ c 家族细胞因子对体外培养 T 细胞表型的影响

赵静静, 雷舒婷, 郑岩, 李修岭, 韩双印(郑州大学人民医院 干细胞研究中心 河南省肾脏病免疫重点实验室, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:**探讨 γ c 家族细胞因子对体外培养 T 细胞表型的影响, 为过继免疫治疗体外细胞制备提供实验依据。**方法:**采用健康人外周静脉血单个核细胞(PBMC), 应用尼龙毛柱法、CD3 磁珠阳性分选法、CD3 磁珠阴性分选法和自然沉降法等 4 种方法分选 T 细胞, 比较各种方法获取的 T 细胞纯度、回收率和细胞增殖。用 CD3/CD28 免疫磁珠激活 CD3⁺T 细胞, γ c 家族细胞因子分为 IL-2 组和 IL-7、IL-15、IL-21 混合组, 比较两组 T 细胞扩增倍数和表型的差异。**结果:**CD3 磁珠阴性分选的 T 细胞纯度显著高于尼龙毛柱分选、CD3 磁珠阳性分选、自然沉降分选[(94.06±1.07)% vs (86.74±1.06)%、(89.61±1.40)%、(88.48±1.86)%], $P<0.05$], 自然沉降分选的 T 细胞回收率显著高于其余 3 种分选法[(60.29±1.53)% vs (45.03±2.79)%、(20.15±3.41)%、(42.98±2.82)%], $P<0.05$], 综合比较效果以自然沉降法为最优选择。IL-2 组 T 细胞扩增倍数显著高于混合组[(262.6±143.2) vs (73.0±25.8)倍], $P<0.05$], 混合组的早期记忆 T 细胞占总 T 细胞的比例、 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 、 T_{em} 所占比例均显著高于 IL-2 组[(55.6±1.82)% vs (39.6±1.52)%、(16.6±1.82)% vs (9.8±1.30)%、(39.0±1.58)% vs (29.2±1.79)%], 均 $P<0.05$]**结论:**自然沉降法从 PBMC 中分选 T 细胞具有低成本、高纯度、高回收率的优势。IL-7、IL-15 和 IL-21 混合培养有利于早期记忆 T 细胞的生成, 为肿瘤过继免疫治疗的体外细胞制备提供了实验依据。

[关键词] γ c 细胞因子家族; IL-2; IL-7; IL-15; IL-21; 早期记忆 T 细胞

[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0475-05

Influence of γ -chain (γ c) family cytokines on phenotypes of T cells in *ex vivo* culture

ZHAO Jingjing, LEI Shuting, ZHENG Yan, LI Xiuling, HAN Shuangyin (Stem Cell Research Center, Key Laboratory of Kidney Disease Immunization in Henan Province, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of γ -chain (γ c) family cytokines (IL-2, IL-7, IL-15, IL-21) on T cell phenotypes in *ex vivo* culture to provide experimental evidence for *ex vivo* cell preparation in adoptive immunotherapy. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from peripheral blood of healthy volunteers; nylon column sorting, CD3⁺ magnetic beads sorting, CD3⁺ magnetic beads sorting and natural sedimentation were used to sort T cells from PBMCs. The purity, recovery rate and viability of T cells sorted by the above methods were compared. The CD3/CD28 magnetic beads-activated CD3⁺T cells were cultured in AIMV medium with IL-2 or mixed cytokines (IL-7, IL-15, IL-21). The expansion fold and phenotypes of T cells in *ex vivo* culture were detected by flow cytometry. **Results:** The purity of T cells sorted by CD3⁺ magnetic beads sorting was significantly higher than that sorted by nylon column, CD3⁺ magnetic beads sorting and natural sedimentation [(94.06±1.07)% vs [86.74±1.06]%, [89.61±1.40]%, [88.48±1.86]%, $P<0.05$]; The recovery rate of T cells sorted by natural sedimentation was significantly higher than that by other three methods [(60.29±1.53)% vs [45.03±2.79]%, [20.15±3.41]%, [42.98±2.82]%, $P<0.05$]. Comprehensively, the natural sedimentation method is the best option. The *ex vivo* expansion fold of T cells in IL-2 group was significantly higher than that in mixed group [(262.6±143.2) times vs [73.0±25.8] times, $P<0.05$]. The proportions of early memory T cells, T_{scm} + $T_{scm-like}$ and T_{em} in the mixed group were significantly higher than those in the IL-2 group [(55.6±1.82)% vs [39.6±1.52]%, [16.6±1.82)% vs [9.8±1.30]%, [39.0±1.58)% vs [29.2±1.79]%; all $P<0.05$]. **Conclusion:** Natural sedimentation sorting has advantages of low cost, high recovery and purity. Mixed cytokines of IL-7, IL-15 and IL-21 are beneficial for production of early memory T cells. This study provides an experimental data of *ex vivo* T cell preparation for cancer adoptive immunotherapy.

[Key words] γ -chain (γ c) family cytokine; IL-2; IL-7; IL-15; IL-21; early memory T cell

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 475-479. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.006]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81372405, No.81772670)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81372405, No.81772670)

[作者简介] 赵静静(1991-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗基础研究, E-mail: jingjingzhao1991@126.com

[通信作者] 韩双印(HAN Shuangyin, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础和临床研究, E-mail: hansyzzu@163.com

近年来以基因修饰T细胞为代表的过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)快速发展,其中嵌合抗原受体修饰T细胞(chimeric antigen receptor engineered T cells, CAR-T)在恶性血液肿瘤中显示出惊人的治疗效果^[1]。理想的CAR-T细胞不仅能够直接杀伤肿瘤细胞,还可作为稳定的记忆T细胞持续存在于患者体内以防止癌症复发^[2-3]。T细胞的分离、激活和扩增方法以及细胞因子对培养细胞表型的影响与CAR-T治疗效果密切相关。有研究^[4]表明,与IL-2相比, γ c家族其他细胞因子(如IL-7、IL-15、IL-21)可诱导生成低分化表型T细胞,杀伤性强、持久性好、抗肿瘤效果佳。本研究观察 γ c家族细胞因子对体外培养T细胞的影响,旨在为制备良好抗肿瘤作用的T细胞提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Ficoll淋巴细胞分离液(索莱宝生物科技有限公司),尼龙毛(美国Polysciences公司),CD3磁珠(洛阳惠尔纳米科技有限公司),1640培养基、胎牛血清、PBS缓冲液(美国Hyclone公司),AIMV培养基、CD3/CD28免疫磁珠(Gibco公司),细胞因子IL-2、IL-7、IL-15、IL-21(美国PEPROTECH公司),CD3-FITC、CD45RA-APC、CCR7-PerCP-cy5.5、CD95-PE鼠抗人抗体及其同型阴性对照、Human CD3 T Cell Isolation Kit(美国Biolegend公司),CFDA SE细胞增殖与示踪检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。MidiMACS分选器、MS分选柱(德国美天旎公司),FACS-Canto II流式细胞仪(美国BD公司),倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 外周血单个核细胞(PBMC)分离和CD3⁺T细胞分选

健康人外周血由5名健康志愿者提供。采集40 ml外周血于肝素抗凝管, Ficoll密度梯度法提取PBMC,取适量细胞上机检测CD3⁺T细胞含量,余细胞均分成4等份,分别采用尼龙毛柱法、CD3磁珠阳性分选法、CD3磁珠阴性分选法和自然沉降法分选T细胞,0.4%锥虫蓝染色,计数比较4种分选方法的回收率和细胞活性,用流式细胞术分析纯度。

尼龙毛柱法:1.5 g尼龙毛置入20 ml玻璃注射器,PBS平衡注射器,高压灭菌。1640培养基平衡柱子,加入5 ml细胞悬液(2×10^6 /ml),37℃培养箱中孵育1 h。加入含5%胎牛血清的培养基洗脱柱子,收集流出液,即为CD3⁺T细胞。

CD3磁珠阳性分选法:取20 μ l预先洗涤的CD3磁珠加入100 μ l PBMC悬液(1×10^8 /ml)中,4℃孵育

20 min,MS分选柱置于MidiMACS分选器,加入待分选细胞悬液,500 μ l PBS洗脱3次。取下分选柱,PBS缓冲液冲洗柱子,收集CD3⁺T细胞。

CD3磁珠阴性分选法:将10 μ l生物素标记的单克隆抗人CD14/CD15/CD16/CD19/CD36/CD56/CD123/CD235混合抗体加入100 μ l PBMC悬液(1×10^8 /ml)中,冰上孵育15 min,加入10 μ l亲和素标记的磁珠,冰上孵育15 min,MS柱磁性分选,收集从分选柱中流出的CD3⁺T淋巴细胞。

自然沉降法:5 ml细胞培养基重悬 1×10^7 个PBMC加入培养瓶,置于37℃、5%CO₂培养箱静置2 h,收集悬浮细胞。

1.3 T细胞的激活与扩增

CD3/CD28磁珠与自然沉降法分选所得T细胞混合(磁珠:细胞比为1:1),调整细胞密度为 5×10^6 /ml。实验分为IL-2组和混合细胞因子组(以下简称混合组),IL-2组加入IL-2(300 IU/ml),混合组加入IL-7、IL-15、IL-21(均为25 ng/ml),AIM-V培养基培养2周。定期观察T细胞的形态和培养基颜色,每周0.4%锥虫蓝染色计数2次。

1.4 流式细胞术检测T细胞表型

分别取培养至第7天和第14天细胞(各 5×10^6 个细胞),加入鼠抗人CD45RA-APC、CCR7-PerCP-cy5.5和CD95-PE抗体各10 μ l,室温下避光孵育20 min,PBS洗涤,400 $\times$ g离心5 min,弃上清。500 μ l PBS重悬细胞,上机检测。每个标本用同型抗体作阴性对照。

1.5 流式细胞术检测 γ c细胞因子对细胞增殖的影响

收集培养至第5天的T淋巴细胞于15 ml离心管,加入1 ml羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA SE)细胞标记液悬浮细胞,37℃孵育10 min,再加入10 ml完全培养基混匀,400 $\times$ g离心去上清。加入10 ml培养基重悬,取 5×10^6 个细胞上流式细胞仪检测,余细胞继续培养,于培养第10天再次上机检测。

1.6 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间均数差异比较用两独立样本 t 检验,多组间比较采用ANOVA检验,Modfit软件分析细胞周期和DNA倍率。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

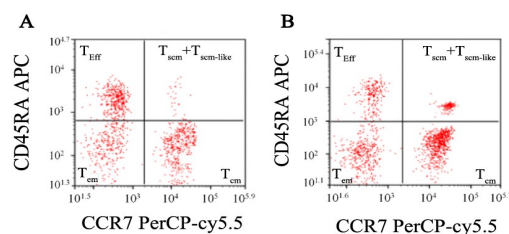
2.1 自然分选法分选T细胞的效果最优

流式细胞术检测结果显示:(1)尼龙毛柱法、CD3磁珠阳性分选法、CD3磁珠阴性分选法和自然沉降

法的T细胞纯度依次为 $(86.74 \pm 1.06)\%$ 、 $(89.61 \pm 1.40)\%$ 、 $(94.06 \pm 1.07)\%$ 和 $(88.48 \pm 1.86)\%$,均高于PBMC中T淋巴细胞的 $(60.73 \pm 0.70)\%$ ($t=77.94$, 38.03, 53.65, 29.81; 均 $P<0.05$),以CD3磁珠阴性分选的T细胞纯度明显高于其余3种方法($t=9.23$, 4.74, 4.55; 均 $P<0.05$),自然沉降法与CD3磁珠阳性分选法和尼龙毛柱法相比差异不明显($t=1.08$, 1.80; 均 $P>0.05$); (2) 4组T细胞回收率依次为 $(45.03 \pm 2.79)\%$ 、 $(20.15 \pm 3.41)\%$ 、 $(42.98 \pm 2.82)\%$ 和 $(60.29 \pm 1.53)\%$,自然沉降法显著高于余3种方法($t=2.75$, 3.79, 2.90; 均 $P<0.05$); (3) 经锥虫蓝染色计数后,4种方法所得T细胞活性分别为 $(97.21 \pm 0.82)\%$ 、 $(97.99 \pm 1.11)\%$ 、 $(97.25 \pm 1.07)\%$ 和 $(98.61 \pm 1.10)\%$,差异无统计学意义($P>0.05$)。综合比较4种分选方法的T细胞纯度、回收率和细胞活性,自然沉降法为最优选择。

2.2 γ c 细胞因子混合培养更利于早期记忆T细胞的生成

根据T细胞表型, $CD95^+CD45RA^+CCR7^+$ 为 T_n , $CD95^+CD45RA^+CCR7^+$ 为 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 之和, $CD95^+CD45RA^+CCR7^+$ 为 T_{cm} , $CD95^+CD45RA^+CCR7^+$ 为 T_{cm} , $CD95^+CD45RA^+CCR7^+$ 为 T_{eff} , 本研究数据来源于5组实验,培养至第14天T细胞表型的代表性结果见图1A(IL-2组)和图1B(混合组)。流式细胞术检测结果显示,IL-2组T细胞亚群为:0% T_n 、8% T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 、32% T_{cm} 、31% T_{cm} 、29% T_{eff} ;混合组T细胞亚群为:0% T_n 、15% T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 、40% T_{cm} 、27% T_{cm} 、18% T_{eff} 。混合组的早期记忆T细胞、 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 、 T_{cm} 所占总细胞的比例均显著高于IL-2组[(55.6 $\pm$ 1.82)% vs (39.6 $\pm$ 1.52)%, (16.6 $\pm$ 1.82)% vs (9.8 $\pm$ 1.30)%, (39.0 $\pm$ 1.58)% vs (29.2 $\pm$ 1.79)%; $t=15.119$, 6.8, 8.617; 均 $P<0.05$]。结果表明,混合组比IL-2组更利于早期记忆T细胞的生成。



A: IL-2 group; B: Mixed group

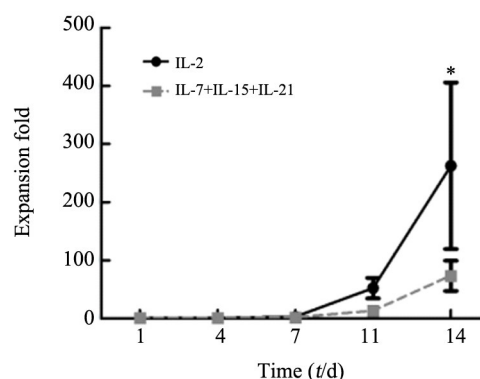
图1 培养第14天 γ c 细胞因子对T细胞表型的影响

Fig. 1 Influence of γ c family cytokines on T cell subsets observed on d 14

2.3 γ c 细胞因子混合培养T细胞扩增倍数低于IL-2

细胞计数结果(图2)显示,培养至第14天,IL-2组T细胞扩增倍数显著高于混合组(262.6 ± 143.2) vs

(73.0 ± 25.8)倍, $t=2.913$, $P<0.05$,表明在IL-2作用下,T细胞的扩增效果更好。IL-2组最高可获得 4.87×10^9 个T细胞,混合组可获得 1.09×10^9 个T细胞,所得T细胞数目均满足后续实验研究。



* $P<0.05$ vs IL-7+IL-15+IL-21 group

图2 培养第14天 γ c 细胞因子对T细胞扩增倍数的影响

Fig. 2 Influence of γ c family cytokines on T cell expansion fold observed on d 14

ModFit 软件分析细胞周期和DNA 倍数结果(图3)也表明 γ c 细胞因子对T细胞增殖的影响。培养至第5天时,IL-2组和混合组的细胞增殖没有差异(图3A),然而第10天时,混合组细胞大多增殖至第6、7代(图3B),IL-2组细胞大多增殖到8、9代(图3C)。分析增殖指数(PI)表明,IL-2组与混合组细胞增殖差异明显,IL-2能够更有效的促进T细胞的增殖,混合细胞因子可能延缓T细胞分化,使之更具有分化为早期记忆T细胞的潜力。

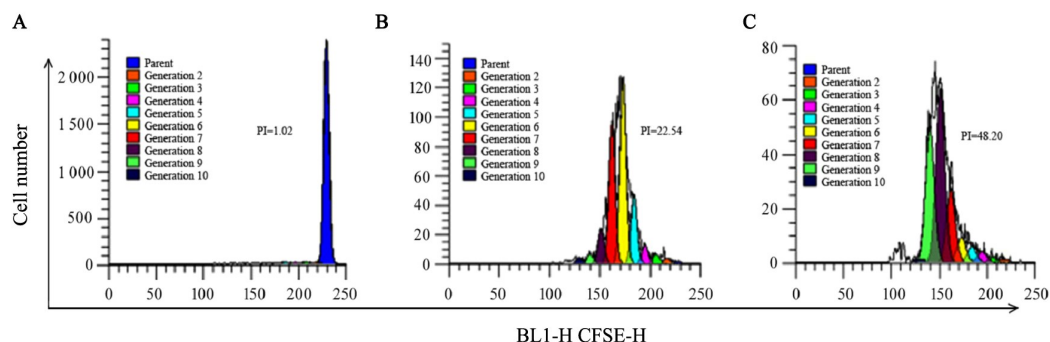
3 讨论

基因修饰T细胞的过继转移是一种非常具有前景的癌症治疗方法^[5],近年靶向CD19 CAR-T细胞在B细胞恶性血液肿瘤中取得了显著的临床疗效^[1-7]。尽管早期临床数据令人鼓舞,影响CAR-T细胞抗肿瘤活性的因素仍然需要探索和优化。当前用于过继免疫治疗的T细胞主要是终末分化的效应T细胞(T_{eff} cell, T_{eff}),但近期的研究^[8]表明, T_{eff} 可能不是过继免疫治疗的最佳细胞。低分化记忆T细胞具有良好的体内增殖能力和存活能力,不但体内杀伤作用佳,而且有记忆功能、发挥持久的抗肿瘤作用。

T细胞的体外制备,首先是分离、激活、扩增。早期的T细胞分离采用尼龙毛柱法,利用T细胞的非黏附性将其从PBMC中分选出来。CD3磁珠阳性和阴性分选法是在磁场作用下利用相应磁珠保留T细胞或弃去非T细胞。自然沉降法则是利用单核细胞贴壁、淋巴细胞悬浮的特点分选。近来研究者采用

CD3 磁珠阳性分选法分选 T 细胞, 最高纯度达 98.1%, 回收率(91.6±6.8)%; 本研究运用此方法, 最高纯度为 90.57%, 回收率仅为(20.15±3.41)%, 可能与选用国产 CD3 磁珠有关。CD3 磁珠阴性分选法所得 T 细胞纯度最高可达 95.30%, 但 2 次冰上孵育影响细

胞活性, 不利于后续研究。自然沉降法最高纯度 90.00%, 回收率为(60.29±1.53)%, 在 4 种方法中回收率最高, 且分选所得 T 细胞经 2 周培养纯度最高可达 99.92%。比较 4 种方法的分选成本、耗时、细胞活性和纯度, 自然沉降法为最优选择。



A: Culture on 5 d; B: Culture on 10 d in Mixed group; C: Culture on 10 d in IL-2 group

图3 γc 细胞因子对 T 细胞增殖的影响

Fig.3 Influence of γc family cytokines on the proliferation of T cells

细胞因子对体外 T 细胞培养扩增发挥重要作用。常见的 γc 受体细胞因子包括 IL-2、IL-7、IL-15 和 IL-21^[9], IL-2 一直被广泛用于 T 细胞体外制备。有研究者^[10]利用低浓度 IL-2 生成高比例的早期记忆 T 细胞, 但细胞扩增倍数不理想, 可能与 IL-2 通过增加调节性 T 细胞和耗竭记忆性 T 细胞产生负调控作用有关^[10]。IL-15 的 β 链介导 Jak1 和 Jac 信号通路, 促进 T 细胞增殖, 且 IL-15a 受体有助于降低 Fas 诱导的细胞凋亡和激活引起的细胞死亡^[11]。IL-21 对中央记忆型 T 细胞(T central memory cell, T_{cm})的增殖和存活起关键作用^[12]。本研究依据此原理, 在 3 个混合细胞因子作用下, 生成的早期记忆 T 细胞达 58%, 扩增倍数最高达 109 倍; 采用 IL-2 培养, 最高扩增倍数可达 487 倍, 生成的早期记忆 T 细胞最高比例为 42%。培养至第 10 天, IL-2 组的增殖指数为 48.20, 远高于混合细胞因子组的 22.54, 说明混合细胞因子可能有助于早期记忆 T 细胞的生成。 γc 家族细胞因子的使用浓度, 不同公司(Peprotech, Miltenyi, R&D 等)有所差别, 本研究为 Peprotech 公司产品, 依据文献报道采用的实验质量浓度为 25 ng/ml。

效应细胞是过继免疫治疗的主体, 直接影响抗肿瘤免疫反应。早期记忆 T 细胞被定义为 T_{cm} 、 $T_{scm-like}$ (T memory stem cell like cell)、 T_{scm} (T memory stem cell) 的总和^[10], 在抗肿瘤活性和建立免疫记忆潜能方面具有明显优势^[13], 可能会在未来的过继免疫治疗中发挥重要作用。动物研究^[14]表明, T_{cm} 比 T_{scm} 具有更长的存活时间和更强的抗肿瘤反应。 $T_{scm-like}$ 具备幼稚 T 细胞和记忆 T 细胞的双重性能, 在细胞增殖、体内存

活、细胞因子释放和抗肿瘤效果方面优势明显^[15-18]。 T_{scm} 具有持久的抗肿瘤作用、自我更新及扩增能力^[19]。本研究 γc 细胞因子混合培养生成了 18% 的 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 与 40% 的 T_{cm} , 早期记忆 T 细胞百分比为(55.6±1.82)%, 远高于 IL-2 作用下的(39.6±1.52)%; 混合培养组早期记忆 T 细胞百分比的最低值为 19% 的 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 与 37% 的 T_{cm} , 亦高于 IL-2 组的最高值 11% 的 T_{scm} 和 $T_{scm-like}$ 与 31% 的 T_{cm} 。本研究为过继免疫治疗的体外细胞制备提供了实验依据。

参考文献

- [1] SINGH N, FREY N V, GRUPP S A, et al. CAR T cell therapy in acute lymphoblastic leukemia and potential for chronic lymphocytic leukemia [J/OL]. Curr Treat Options Oncol, 2016, 17(6): 28[2017-12-05]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2F11864-016-0406-4>. DOI: 10.1007/s11864-016-0406-4.
- [2] SABATION M, HU J, SOMMARIVA M, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8⁺ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies[J]. Blood, 2016, 128(4): 519-528. DOI: 10.1182/blood-2015-11-683847.
- [3] BUSCH D H, FRASSLE S P, SOMMERMEYER D, et al. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy[J]. Semin Immunol, 2016, 28(1): 28-34. DOI: 10.1016/j.smim.2016.02.001.
- [4] YANG S, JI Y, GATTINONI L, et al. Modulating the differentiation status of ex vivo-cultured anti-tumor T cells using cytokine cocktails [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(4): 727-736. DOI: 10.1007/s00262-012-1378-2.
- [5] RESTIFO N P, DUDLEY M E, ROSENBERG S A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(4): 269-281. DOI: 10.1038/nri3191.
- [6] REN P P, LI M, LI T F, et al. Anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor-

- modified T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(14): 2113-2116. DOI:10.2174/1381612823666170316125402.
- [7] 张昂, 张斌, 陈虎. 改进 CAR-T 细胞有效性和安全性的设计策略[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(5): 461-466. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.001.
- [8] GATTINONI L, KLEBANOFF C A, PALMER D C, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1616-1626. DOI: 10.1172/JCI24480.
- [9] TESCHNER D, WENZEL G, DISTLER E, et al. In vitro stimulation and expansion of human tumour-reactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by anti-CD3/CD28/CD137 magnetic beads[J]. *Scand J Immunol*, 2011, 74(2): 155-164. DOI:10.1111/j.1365-3083.2011.02564.x.
- [10] KAARTINEN T, LUOSTARINEN A, MALINIEMI P, et al. Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19(6): 689-702. DOI:10.1016/j.jcyt.2017.03.067.
- [11] KU C C, MURAKAMI M, SAKAMOTO A, et al. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines[J]. *Science*, 2000, 288(5466): 675-678. DOI: 10.1126/science.288.5466.675.
- [12] HINRICHS C S, SPOLSKI R, PAULO S C M, et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy[J]. *Blood*, 2008, 111(11): 5326-5333. DOI: 10.1182/blood-2007-09-113050.
- [13] 王艺, 赵颖颖, 韩双印. 基于嵌合抗原受体修饰T细胞的肿瘤免疫治疗新策略[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(4): 383-390. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.001.
- [14] KLEBANOFF C A, GATTINONI L, TORABI-PARIZI P, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(27): 9571-9576. DOI: 10.1073/pnas.0503726102.
- [15] GATTINONI L, LUGLI E, JI Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties[J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1290-1297. DOI: 10.1038/nm.2446.
- [16] HINRICHS C S, BORMAN Z A, CASSARD L, et al. Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8⁺ T cells mediate superior antitumor immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(41): 17469-17474. DOI: 10.1073/pnas.0907448106.
- [17] ZHOU X, CUI Y, HUANG X, et al. Lentivirus-mediated gene transfer and expression in established human tumor antigen-specific cytotoxic T cells and primary unstimulated T cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(11): 1089-1105. DOI: 10.1089/104303403322124800.
- [18] BERGER C, JENSEN M C, LANSDORP P M, et al. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 294-305. DOI: 10.1172/JCI32103.
- [19] LUGLI E, DOMINGUEZ M H, GATTINONI L, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 594-599. DOI:10.1172/JCI66327.

[收稿日期] 2018-01-07

[修回日期] 2017-03-05

[本文编辑] 党瑞山