·论 著·

抗 CD20 单链抗体-CD8-TCRζ 融合基因转染的 T 细胞治疗人 B 细胞淋巴瘤的实验研究

云 琳[1],张瑞萍[2],金增强[3]
(1.郑州铁路职业技术学院医学分院内科教研室,郑州 450052;2. 郑州 153 医院肿瘤科,郑州 450052;3.解放军总医院口腔科,北京 100083)

[摘要] **目的**:观察抗 CD20 单链抗体(single chain variable fragment, scFv)-CD8-TCRζ 融合基因转染的 T 淋巴细胞在体内外的抗人 B 细胞淋巴瘤作用,探讨利用 CD20 介导自体 T 淋巴细胞杀伤人 B 细胞淋巴瘤的可行性。**方法**:构建包含抗 CD20 scFv、CD8 分子和 CD3 信号转导链ζ的融合基因,将其克隆入载体 pcDNA3 中,酶切鉴定正确后电转染入人外周血 T 淋巴细胞,诱导其表达抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合蛋白。流式细胞仪检测基因修饰后人 T 淋巴细胞结合 CD20 蛋白的功能;细胞杀伤试剂盒检测基因修饰后 T 淋巴细胞体外杀伤人 B 细胞淋巴瘤 Raji 细胞的能力;并在 BALB/c 裸鼠体内观察其对人 B 细胞淋巴瘤移植瘤的抑制效应。**结果**:成功构建、转染了抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合基因,并在人 T 淋巴细胞表面成功表达;流式细胞仪和细胞杀伤试剂盒检测结果表明经基因修饰后的人 T 淋巴细胞能特异性结合 CD20 抗原,并能特异性地杀伤人 B 细胞淋巴瘤 Raji 细胞,在裸鼠体内显著地抑制人 B 细胞淋巴瘤移植瘤的生长。**结论**:抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合基因转染的 T 淋巴细胞在体内外均能杀伤人 B 细胞淋巴瘤细胞,为进一步应用人 T 淋巴细胞杀伤作用治疗人 B 细胞淋巴瘤奠定了基础。

[关键词] 抗 CD20 单链抗体-CD8-TCRζ 融合基因;T 淋巴细胞;淋巴瘤,B 细胞
[中图分类号] R 733.4 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)07-0745-05

T cells harboring anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene in treatment of human B-cell lymphomas: an experimental study

YUN Lin[1], ZHANG Rui-ping[2], JIN Zeng-qiang[3] (1. Department of Internal Medicine, Medical School, Zhengzhou Railway Vocational Technical College, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Oncology, No. 153 Hospital of PLA, Zhengzhou 450052; 3. Department of Stomatology, General Hospital of PLA, Beijing 100083)

[**ABSTRACT**] **Objective**: To observe the anti-tumor effect of T lymphocytes harboring anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene on human B lymphomas *in vitro* and *in vivo*, so as to explore the feasibility of CD20-mediated autogenous T lymphocytes in killing B-cell lymphomas. **Methods**: A fusion gene containing anti-CD20 scFv, CD8 molecule and CD3ζ chain was constructed and was cloned into pcDNA3. After confirmed by restriction endonuclease analysis, the fusion gene was used to transfect the human peripheral T lymphocytes through electroporation and expression of anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion protein was induced. The CD20 antigen-recognition ability of transfected T cells was determined by flow cytometry. The killing effect of transfected T cells on B cell lymphomas-Raji cells was tested in a cytotoxicity assay. The anti-tumor efficacy of this gene-modified T cell against the Raji tumor cell line was also evaluated in BALB/c nude mice. **Results**: We successfully constructed the anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene and expressed its protein on T cells. Flow cytometry and cytotoxicity assay demonstrated that the gene engineered T cells specifically recognized CD20 antigen and specifically inhibited B-cell lymphomas Raji cells. Furthermore, the T cells significantly inhibited the transplanted Raji cells in irradiated BALB/c nude mice. **Conclusion**: T lymphocytes transfected with anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene have antigen-specific anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*, which lays a foundation for utilizing human T lymphocytes to treat human B-cell lymphomas.

[**KEY WORDS**] anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene; T-lymphocytes; lymphoma, B-cell
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 745-749]

肿瘤免疫治疗就是利用机体的免疫系统清除肿瘤细胞,T 淋巴细胞在抗肿瘤免疫中发挥重要的作用[1]。然而,由于肿瘤细胞具有低免疫原性、缺乏共刺激分子及 MHC 分子的特点,以及肿瘤患者机体处于免疫抑制状态,使得产生足够数量的肿瘤特异性的 T 淋巴细胞变得非常困难;另外,由于注入体内的肿瘤特异性抗体清除较快,使得体液免疫在肿瘤治疗中的作用受到很大的限制。近年来,随着基因工程技术的发展,可以构建包含识别肿瘤相关抗原的单链抗体和 T 细胞活化基序两部分基因片段

[作者简介] 云 琳,副教授. E-mail: ylint@163.com

的载体，体外转染 T 淋巴细胞，然后再回输到患者体内，发挥细胞毒 T 细胞（CTL）的抗肿瘤作用，将抗体-抗原的高度亲和性和 CTL 的细胞杀伤机制相结合，为肿瘤的细胞免疫治疗提供了新思路[2]。

本实验拟构建抗 CD20 单链抗体（single chain variable fragment，scFv）-CD8-TCRζ 融合基因，将其克隆入载体 pcDNA3 中，电转染入人外周血 T 淋巴细胞，诱导其表达抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合蛋白，并观察其在体内外的抗 B 细胞淋巴瘤作用，为这一新的治疗策略最终应用于临床提供实验基础。

1　材料和方法

1.1　*质粒、菌株、工具酶及试剂*　pcDNA3 质粒和大肠杆菌 DH5α 为解放军总医院口腔医学研究所保存。限制性的内切酶 *Hind* Ⅲ、*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ和 PCR 反应试剂盒购自宝生物工程有限公司。质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自华舜生物工程有限公司；RT-PCR 试剂盒、pGEM-T 载体试剂盒购自 Promega 公司；TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司；Qiagen Plasmid Midi Kid 购自 Qiagen 公司；电转染试剂 Nucleofector™ 购自德国 Amaxa 公司。Lambda DNA/*Hind* Ⅲ Marker 为华美生物工程公司产品，DL2000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品。抗 CD20 scFv 由军事医学科学院生物工程研究所馈赠；FITC 标记的 CD20 蛋白由首都医科大学免疫学教研室馈赠；MACS Separators 和山羊抗大鼠 IgG-microbeads 购自 Miltenyi 公司；大鼠抗人 CD3 抗体购自深圳达科为生物技术公司；淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司。

1.2　*细胞株和动物*　人 B 细胞淋巴瘤细胞株 Raji 和小鼠的淋巴瘤细胞株 EL-4 为解放军总医院口腔医学研究所保存，分别为表达 CD20 抗原和不表达 CD20 抗原的细胞株。30 只雌性 BALB/c 裸鼠，6～8 周龄，购自军事医学科学院实验动物中心。

1.3　*载体质粒的构建和转染*

1.3.1　*淋巴细胞总 RNA 的提取、人 CD8 分子片段、CD3ζ 链胞内段的制备*　用淋巴细胞分离液常规分离人外周血单个核细胞，收集 5×10^6 个细胞按说明书抽提细胞总 RNA。根据 Genbank 上登载的人 CD8 分子片段（471～737 bp）和 CD3ζ 链胞内段（228～563 bp）cDNA 序列，分别在待克隆片段的 5′和 3′端设计一对引物，并于两条引物的 5′端分别加上相应的限制性酶切位点，委托北京晶美公司合成，用无菌水稀释成 10 pmol/L。具体引物序列如下，下划线表示酶切位点的序列。

CD8 sense：5′-G GG ATC C CTG AGC AAC TCC ATC AT（*Bam*H Ⅰ）；CD8 antisense：5′-T GA ATC C GC AGT AAA GGG TGA TAA（*Hind* Ⅲ）；ζ sense：5′-T GG AAT CC A GAG TGA AGT TCA GCA GGA GCG CAG AGC CCC CCG CGT A（*Eco*R Ⅰ）；ζ antisense：5′-T CTC GAG TTA GCG AGG GGG CAG GGC CTG CAT（*Xho*Ⅰ）。

以淋巴细胞总 RNA 为模板，行 RT-PCR 反应，具体为：在 50 μl 反应体系中依次加入无菌水 32 μl、5×Reaction buffer 10 μl、dNTP（10 mmol/L each dNTP）1 μl、引物各 1 μl、25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl、总 RNA 1 μl、反转录酶 1 μl、DNA 聚合酶 1 μl。置于 PCR 反应仪中，按试剂盒说明书推荐设定反应程序。产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定，胶回收目的片段，T_4 DNA 连接酶与 pGEM-T 载体连接后送北京晶美公司测序。

1.3.2　*抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合基因的构建和 T 淋巴细胞的分离*　将抗 CD20 单链抗体和测序正确的 CD3ζ 链分别用相应的酶处理，克隆入载体 pcDNA3 中，鉴定正确后大量抽提质粒。免疫磁珠法分选人外周血 $CD3^+$ T 细胞，首先用淋巴细胞分离液分离人外周血单个核细胞，取分得的 1×10^8 个细胞，1 400 r/min 离心 5 min，去上清，用 1 ml 培养基重悬细胞，加入大鼠抗人 CD3 抗体，冰孵 30 min，用适量 PBS 洗一遍，悬于 450 μl 缓冲液中，加入山羊抗大鼠 IgG-microbeads 50 μl，混匀，冰孵 20 min，将细胞悬液过柱后，将分离柱移出磁场，加 1 ml 的缓冲液洗脱柱子，洗脱液即为分离的 $CD3^+$ T 细胞。

1.3.3　*融合基因的转染和转染后 $CD3^+$ T 淋巴细胞的培养*　将 5 μg 的质粒 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 与 5 μg pcDNA3 空载体分别与 5×10^6 个 T 细胞悬于 100 μl Nucleofector™ 试剂中，移入电转杯中，混匀后，置于电转仪中，选择 U-14 程序进行转染，转染后的细胞立即加入新鲜的培养基，放入 5% CO_2，37℃孵箱中培养。

1.4　*转染后 T 淋巴细胞结合 CD20 能力的测定*　分别收集 pcDNA3 空载体和 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 转染后 24 h 的 T 淋巴细胞，PBS 洗 2 遍，计数，取约 5×10^5 个细胞，分别加 FITC-CD20 蛋白，0.1 μg，4℃，放置 45 min，PBS 洗 3 遍，300 μl PBS 重悬后上流式细胞仪检测。

1.5　*细胞杀伤试剂盒检测转染后人 T 细胞体外杀*

伤人 B 细胞淋巴瘤的能力　收集转染 pcDNA3 空载体和转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 $CD3^+$ T 淋巴细胞,分别用无酚红、无血清的 RPMI 1640 培养基洗 2～3 遍后,按 40∶1、20∶1、10∶1、5∶1的比例,与相同数量的肿瘤细胞 Raji、EL-4 混合(2×10^4/孔),加入 96 孔板,分别设相同的 4 个复孔。同时设 4 个对照:靶细胞最大释放对照,靶细胞自然释放对照,效应细胞自然释放对照,培养基对照。总体积 100 μl/孔。37℃孵箱中培养 4 h,250×g 离心 5 min,吸出上清 50 μl/孔于一新的 96 孔板,加入 50 μl 的底物混合液,避光静置 30 min,加 50 μl/孔的终止液(1 mol/L 乙酸)。酶标仪读 D_{490} 值,计算杀伤效率。

$$\text{杀伤效率}(\%)=\frac{D_{490}-\text{效应细胞的自然释放}-\text{靶细胞的自然释放}}{\text{靶细胞的最大释放}-\text{靶细胞的自然释放}}$$

1.6　转染后 T 细胞对 BALB/c 裸鼠人 B 细胞淋巴瘤移植瘤抑制效应的观察　6～8 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 30 只,^{60}Co 2 Gy 照射,每周 1 次,连续 3 周。培养肿瘤细胞 Raji 至对数生长期,胰酶消化,PBS 洗 2 遍后,用锥虫蓝染色法计算细胞活力,用预冷的 100 μl PBS 重悬 1×10^7 个活细胞,接种于每只裸鼠的背部皮下,将接种后的小鼠随机分为 3 组,空白对照组(尾静脉注射 PBS)、阴性对照组(尾静脉注射转染空质粒 pcDNA3 的 T 淋巴细胞)组和免疫治疗组(尾静脉注射转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 T 淋巴细胞),每组 10 只。分别收集转染空质粒 pcDNA3 和质粒 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 T 淋巴细胞,用 PBS 洗 2 遍后,计数,用 300 μl 的 PBS 重悬。裸鼠在接种肿瘤细胞的同时、第 2 天、第 3 天经尾静脉注射收集上述 T 淋巴细胞(2×10^7),用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,计算肿瘤的体积(用短径^2×长径/2 表示),共观察 30 d 后处死动物,取各自的肿瘤组织浸于 10%中性甲醛溶液中,制成蜡块,切片,H-E 染色后观察。

1.7　统计学处理　利用 SPSS 10.0 软件包进行数据处理。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用多组均数比较的 t 检验。

2　结　果

2.1　pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的构建和转染　从淋巴细胞总 RNA 中克隆出 CD8 分子和 CD3ζ 链片段,分别为 267 bp 和 336 bp,并将抗 CD20 的单链抗体、CD8 分子和 CD3ζ 链依次克隆入 pcDNA3 载体中,构建了 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 载体质粒,经酶切鉴定正确,并顺利转染入人 T 淋巴细胞。

2.2　转染后 T 淋巴细胞结合 CD20 抗原的能力　pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 电转染入 $CD3^+$ T 淋巴细胞后,在细胞表面成功表达抗 CD20-scFv-CD8-TCRζ 融合蛋白(图 1)。流式细胞仪检测结果表明:转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 质粒的 T 淋巴细胞结合 CD20 抗原的效率约 53%,而转染空质粒 pcDNA3 的 T 淋巴细胞几乎没有结合 CD20 蛋白的功能,结合效率 3.5%(图 2)。

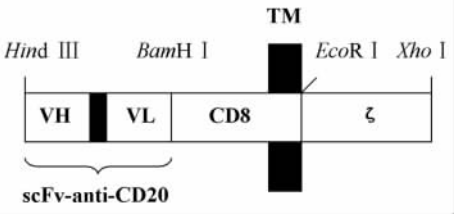

图 1　pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合基因在 T 淋巴细胞表面的表达

Fig 1　Expression of pcDNA3-anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ fusion gene on T lymphocytes

2.3　基因修饰后 T 淋巴细胞体外对肿瘤细胞的特异性杀伤功能　细胞杀伤试剂盒检测结果表明:空转染 pcDNA3 的 T 淋巴细胞和转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 T 淋巴细胞对 $CD20^-$ 的 EL-4 细胞均没有杀伤功能;转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 T 淋巴细胞对 $CD20^+$ 的 Raji 细胞有杀伤功能,且随着效应细胞/靶细胞比值的增加杀伤功能逐渐增强;而空转染 pcDNA3 的 T 淋巴细胞对 Raji 细胞却没有杀伤功能(图 3)。

2.4　基因修饰后 T 淋巴细胞对 BALB/c 裸鼠人 B 细胞淋巴瘤移植瘤的抑制作用　观察结果表明,免疫治疗组肿瘤生长明显被抑制,观察 30 d 后,有 3 只小鼠未成瘤,7 只成瘤;而阴性对照组和空白对照组肿瘤生长明显,20 只小鼠全部成瘤。免疫治疗组平均肿瘤体积是(112±18) mm^3,明显小于阴性对照组和空白对照组[(2 118±207),(2 200±215)] mm^3,有显著差异($P<0.01$),阴性对照组和空白对照组间无显著差异(图 4)。

2.5　各组肿瘤组织病理学观察 H-E 染色　结果表明空白对照组(图 5A)和阴性对照组(图 5B)肿瘤组织完整,无明显坏死,可见大量深染的淋巴细胞;而免疫治疗组肿瘤组织大片崩解、坏死,嗜伊红染色较多(图 5C)。

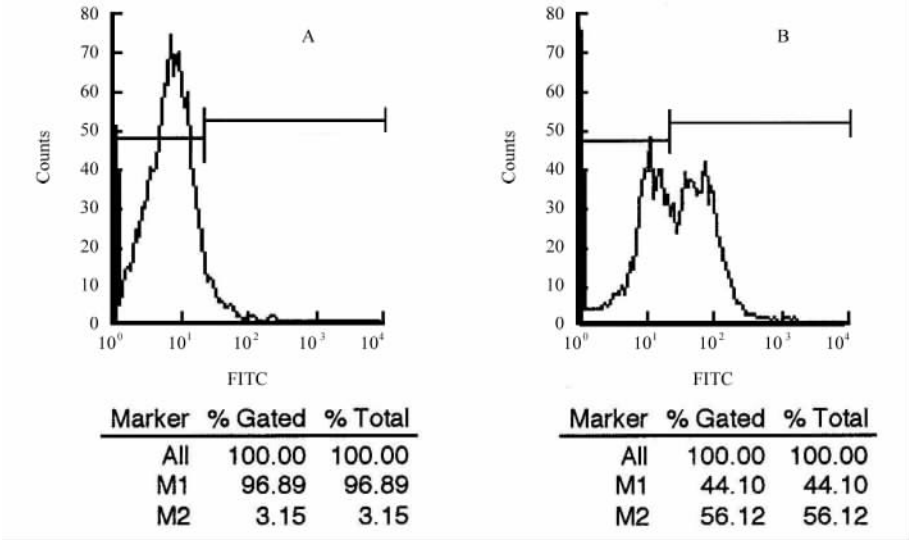

图 2　转染空载体(A)和融合基因(B)的 T 细胞结合 FITC-CD20 蛋白的功能

Fig 2　Binding capacity of T cells transfected with pcDNA3(A) and pcDNA3-anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ(B) to FITC-CD20 protein

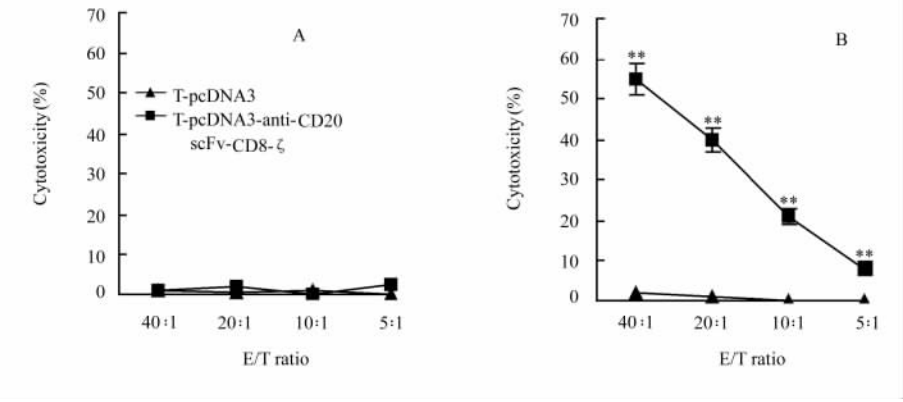

图 3　转染空载体和融合基因的 T 淋巴细胞对 EL-4(A)和 Raji(B)的细胞毒功能检测

Fig 3　Specific lysis of EL-4(A) and Raji(B) by T cells transfected with pcDNA3 and pcDNA3-anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ

$^{**}P<0.01$ *vs* T-pcDNA3；$n=4$，$\bar{x}\pm s$

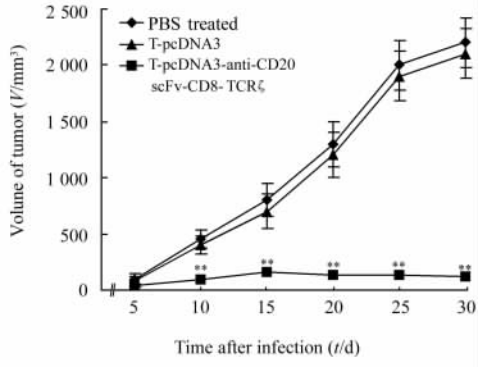

图 4　表达融合基因的 T 淋巴细胞在 BALB/c 裸鼠体内对人 B 细胞淋巴瘤的抑制作用

Fig 4　Inhibition of B-cell lymphomas growth by T cells expressing fusion gene in BALB/c nude mice

$^{**}P<0.01$ *vs* PBS or T-pcDNA3 treated group；$n=4$，$\bar{x}\pm s$

3　讨　论

非霍奇金淋巴瘤(NHL)是临床常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率位居恶性肿瘤第五位。NHL 对常规的治疗如放疗和化疗，效果好，但复发率高。再次治疗缓解率低，缓解时间短，且毒副反应大，患者不能耐受。CD20 是非糖基化的Ⅲ型跨膜蛋白，具有高度保守性，大多数 NHL 起源于 B 淋巴细胞，95% 的 B 细胞淋巴瘤患者的瘤细胞膜上有 CD20 分子表达，且表面密度很高，而且 CD20 分子在与单克隆抗体结合后，无显著内化及脱落。人 CD20 分子的上述特点，使其成为用单克隆抗体治疗 B 细胞淋巴瘤的理想靶抗原[3]。用抗 CD20 的单克隆抗体 rituximab(美罗华)治疗复发的 NHL，有效率

约 60%,但最终大部分患者仍然复发,因此,寻找一种新的免疫治疗方法和策略十分必要[4]。

近年来,随着基因工程技术和免疫学理论的发展,肿瘤特异性的 T 细胞能通过转染嵌合受体基因的方法获得,以嵌合受体基因修饰的 T 淋巴细胞能表现明显的杀伤肿瘤细胞的作用[5,6]。在体内由嵌合受体基因修饰的人的 T 淋巴细胞功能的发挥在表达 CD19 抗原的人的 Burkitt 淋巴瘤模型中首次得到证实[7]。融合基因是由能识别肿瘤抗原的部分和 T 淋巴细胞活化的信号链组成。由于 TCR 识别抗原的 α 和 β 链与免疫球蛋白的 V 区有结构上的相似性,人们用识别肿瘤抗原的 scFv 作为识别肿瘤抗原的部分[8],用 CD3 分子的 ζ 链作为信号转导链[9]。为了使 scFv 保持天然的空间构象,更有效地识别抗原,scFv 与细胞膜之间要有适当的空间,通常采用 CD8α 铰链区及跨膜区,或 IgG 的 CH2、CH3 区。本实验在以往研究的基础上,构建表达 anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ 的真核表达载体。Nucleofector™ 原代细胞转染技术是近年来发展起来的新的基因转染技术,与传统的逆转录病毒载体系统相比,具有安全性好,操作简便,转染效率高等特点。本研究利用该技术将构建的载体电转染入人原代 $CD3^+$ T 淋巴细胞,转染效率约 53%,较传统的逆转录病毒载体高。

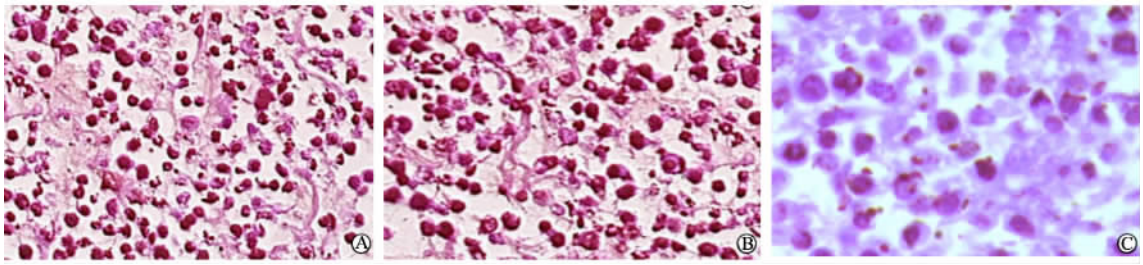

图 5　不同处理情况下裸鼠肿瘤组织的 H-E 染色

Fig 5　H-E staining of tumor tissues in different groups(×400)

A: PBS treated group; B: T-pcDNA3 treated group; C: T-pcDNA3-anti-CD20 scFv-CD8-TCRζ treated group

本研究结果表明转染 24 h 后,T 淋巴细胞对表达 CD20 抗原的人 B 细胞淋巴瘤细胞株 Raji 有特异性的识别和杀伤功能,而对于不表达 CD20 抗原的鼠淋巴瘤细胞株 EL-4 则没有杀伤功能,这表明表达融合蛋白 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 的 T 淋巴细胞的细胞杀伤功能具有 CD20 抗原特异性。经转染 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζT 淋巴细胞处理的裸鼠成瘤率明显低于肿瘤组和空白组,平均肿瘤体积也显著小于肿瘤组和空白组,这说明表达 pcDNA3-抗 CD20 scFv-CD8-TCRζ 融合蛋白的 T 淋巴细胞在小鼠体内能显著抑制肿瘤细胞的生长。本研究为人 B 细胞淋巴瘤的细胞免疫治疗奠定了基础,能否应用于临床还有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

[1] Ben-Efraim S. Cancer immunotherapy: hopes and pitfalls: a review[J]. Anticancer Res,1996,16(5B): 3235-3240.

[2] Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes[J]. Nat Rev Cancer,2003,3: 35-45.

[3] Countouriotis A, Moore TB, Sakamoto KM. Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hemotologic malignancies[J]. Stem Cells,2002, 20:215-229.

[4] Cartron G, Watier H, Golay J, et al. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy[J]. Blood, 2004, 104:2635-2642.

[5] Ho WY, Blattman JN, Dossett ML, et al. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction[J]. Cancer cell, 2003,3:431-437.

[6] Kalos M. Tumor antigen-specific T cells and cancer immunotherapy: current issues and future prospects[J]. Vaccine, 2003,21:781-786.

[7] Brentjens R, Latouche JB, Riviere I, et al. *In vivo* anti-tumor activity of genetically modified T cells is dependent on the method of *ex vivo* T cell expansion[J]. Blood, 2002, 100: 577a.

[8] Brocker T, Karjalainen K. Adoptive tumor immunity mediated by lymphocytes bearing modified antigen-specific receptors[J]. Adv Immunol, 1998,68:257-269.

[9] Letourneur F, Klausner RD. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88: 8905-8909.

[收稿日期] 2006-03-28　　**[修回日期]** 2006-06-20

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群