

荧光定量PCR检测c-Met CAR病毒感染T细胞的效率

黄晓辰^{1,2}, 蒯兴旺^{1,2}, 杨婷婷^{1,2}, 唐奇², 李涛³, 季国忠³, 赵薇⁴, 刘振云⁵, 陈渊⁶, 仇镇宁², 冯振卿^{1,2*}, 朱进^{2,7*}

¹南京医科大学病理学系, ²国家卫计委抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 江苏 南京 210011; ⁴南京医科大学附属南京医院病理科, 江苏 南京 210006; ⁵安徽未名细胞治疗有限公司, 安徽 合肥 238000; ⁶南京医科大学第二附属医院耳鼻喉科, 江苏 南京 210011; ⁷华东医学生物技术研究所, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的:通过设计特异性引物,应用荧光定量PCR方法检测c-Met CAR病毒感染T细胞的效率。方法:应用基因重组技术构建c-Met CAR(GFP)逆转录病毒质粒。应用病毒包装技术制备c-Met CAR病毒与c-Met CAR(GFP)病毒,感染T细胞制备c-Met CAR-T细胞与c-Met CAR-T(GFP)细胞。Western blot检测c-Met CAR和c-Met CAR(GFP)在293T细胞中表达的外源性CD3 ζ 蛋白。设计特异性引物应用荧光定量PCR检测CAR病毒对T细胞的感染效率,并与流式细胞术的检测结果进行比较。结果:构建c-Met CAR(GFP)质粒,荧光显微镜可观察到c-Met CAR(GFP)质粒在293T细胞上表达绿色荧光蛋白。c-Met CAR和c-Met CAR(GFP)病毒感染的293T细胞可表达外源性CD3 ζ 蛋白。荧光定量PCR检测c-Met CAR与c-Met CAR(GFP)的感染效率分别为(52.1 \pm 1.7)%、(55.9 \pm 2.3)%。流式细胞术检测c-Met CAR(GFP)病毒感染效率为(50.7 \pm 3.6)%,两种检测方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:通过设计特异性引物,应用荧光定量PCR方法能够特异性检测CAR病毒对T细胞的感染效率,该检测方法结果准确、安全,对CAR-T细胞的临床应用具有实用价值。

[关键词] 嵌合抗原受体;c-Met;荧光定量PCR

[中图分类号] R446

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-903-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180707

Detection of the efficiency of c-Met CAR virus infected T cells by qRT-PCR

Huang Xiaochen^{1,2}, Kuai Xingwang^{1,2}, Yang Tingting^{1,2}, Tang Qi², Li Tao³, Ji Guozhong³, Zhao Wei⁴, Liu Zhenyun⁴, Chen Yuan⁶, Qiu Zhenning², Feng Zhenqing^{1,2*}, Zhu Jin^{2,7*}

¹Department of Pathology, ²Key Laboratory of Antibody Technology, National Health and Family Planning Commission, NMU, Nanjing 211166; ³Digestive Medical Center, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011; ⁴Department of Pathology, the Affiliated Nanjing Hospital of NMU, Nanjing 210006; ⁵Sinobioway Cell Therapy Co., Ltd., Hefei 238000; ⁶Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011; ⁷Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** To detect the efficiency of c-Met CAR infection in T cells by qRT-PCR using specific primers. **Methods:** Gene recombination technology was introduced to construct c-Met CAR(GFP)retroviral plasmids. C-Met CAR and c-Met CAR(GFP) viruses were prepared by viral packaging. C-Met CAR-T cells and c-Met CAR-T(GFP)cells were prepared by infection of T cells with virus. The expression of c-Met CAR and c-Met CAR(GFP) virus infected 293T cells was tested by Western blot assay to express exogenous CD3 ζ protein. Specific primers were designed to detect the infection efficiency of T cells by qRT-PCR and compared with flow cytometry. **Results:** c-Met CAR(GFP)plasmid was constructed, and the expression of c-Met CAR(GFP)plasmid on 293T cells was observed by fluorescence microscope. The results showed that c-Met CAR and c-Met CAR(GFP) virus infected 293T cells expressed exogenous CD3 ζ protein. The infection efficiency of c-Met CAR and c-Met CAR(GFP) virus were(55.9 \pm 2.3)% and(52.1 \pm 1.7)% by qRT-PCR. The efficiency of c-Met CAR(GFP) infection was(50.7 \pm 3.6)% by flow cytometry. There was no statistical

[基金项目] 国家自然科学基金(81602119,81773268);江苏省科学技术厅重点研发专项基金(BE2016799)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujing 1968@njmu.edu.cn

difference between the two methods ($P > 0.05$). **Conclusion:** Through the design of specific primers, the qRT-PCR can detect the infection efficiency of c-Met CAR virus on T cells, which is accurate and security, and have value for the clinical application of CAR-T cell therapy.

[Key words] chimeric antigen receptor; c-Met; qRT-PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):903-908]

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR) T细胞免疫治疗是近年来迅速发展的一种细胞治疗技术^[1-2]。CAR-T细胞治疗血液系统肿瘤已取得突破性进展^[3-4],针对实体瘤的治疗也处于临床研究阶段^[5],成为继手术、放疗、化疗之后新一代的肿瘤临床治疗技术^[6-7]。CAR病毒感染T细胞的效率对治疗效果有着重要的影响,因此对CAR病毒感染T细胞效率的安全检测是CAR-T细胞治疗技术从实验室研究向临床应用转化的重要控制因素之一,如何采用准确、安全、有效的方法对CAR病毒感染T细胞的效率进行检测,成为目前亟待解决的技术问题。

目前常用的检测方法为流式细胞术,主要通过单个细胞整合的病毒载体上所携带的绿色荧光蛋白进行检测;或是通过单克隆抗体对单个细胞的CAR分子胞外区进行检测^[8]。前者因绿色荧光蛋白(GFP)作为非人源蛋白具有免疫原性而不适用于临床^[9],后者因正常人体内个别免疫细胞存在相似序列而具有非特异性。因此,建立一种符合临床安全要求和高度特异性的检测技术至关重要。本文以制备的c-Met CAR-T细胞为研究对象,基于c-Met CAR序列,设计特异性引物,通过荧光定量PCR检测c-Met CAR病毒对T细胞的感染效率,并与流式细胞术的检测结果进行比较来分析该方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

经基因改造后的c-Met CAR、CD19 CAR逆转录病毒质粒^[10]、pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP质粒、包装质粒RD114、peqqam3、293T细胞由本实验室保存。

In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech公司,美国),SYBR Premix EX Taq试剂盒、RetroNectin、限制性内切酶Nco I和Xho I (TaKaRa公司,日本),PEI (Polyplus公司,法国),PEG 8000 (Biofrox公司,德国),鼠抗人CD3 ζ 抗体(Santa Cruz公司,美国),淋巴细胞分离液(Stem Cell公司,美国),细胞基因组DNA提取试剂盒(Tiangen公司,北京),DMEM培养基、Opti-MEM培养基(Gibco公司,美国),抗人CD28

抗体、抗人CD3抗体,白介素-2(IL-2, PeproTech公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 c-Met CAR(GFP)质粒的构建及鉴定

本课题组在前期研究已构建c-Met CAR。应用In-Fusion PCR原理分别设计GFP、c-Met CAR片段的扩增引物。以pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP质粒为模板扩增GFP,使用限制性内切酶Nco I、Xho I双酶切c-Met CAR质粒获得线性化逆转录病毒载体。运用In-Fusion PCR将逆转录病毒载体与扩增后的GFP片段及c-Met CAR片段进行拼接,构建c-Met CAR(GFP)质粒。将获得质粒与PEI转染试剂混合转染至293T细胞内,48 h后于荧光显微镜下观察。

1.2.2 CAR病毒的包装制备及鉴定

接种 1×10^6 个293T细胞至10 cm的细胞培养皿内,用10% FBS的DMEM完全培养基培养,待细胞汇合度达到60%左右时,用于转染包装病毒,转染前1 h更换细胞培养基。使用转染试剂PEI将c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)以及CD19 CAR质粒及包装质粒peqqam3、RD114共转染293T细胞,于转染后48 h收集病毒上清液。使用0.45 μm 滤膜过滤病毒上清,加入 $5 \times \text{PEG } 8\ 000$ 对病毒进行浓缩,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,6 000 r/min, 30 min,浓缩病毒,弃上清,使用原体积1/100的DMEM培养基重悬沉淀,获得病毒浓缩液。

将上述病毒浓缩液感染293T细胞,并取未感染的293T细胞,经RIPA裂解液处理提取总蛋白,Western blot检测CAR结构中CD3 ζ 分子的表达。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用5%脱脂奶粉封闭2 h,鼠抗人CD3 ζ 抗体(1:1 000)孵育2 h,HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(1:5 000)孵育1 h,加入ECL显色液后于凝胶成像仪(Bio-Rad公司,美国)上曝光。

1.2.3 CAR-T细胞的制备

抽取10 mL志愿者外周血,用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,以 2×10^6 个/孔加入预包被抗CD3抗体和抗CD28抗体的24孔培养板中培养,次日补加IL-2(200 U/mL)。使用RetroNectin预处理

非组织培养板, 分别加入c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)与CD19 CAR病毒温育1 h, 再加入培养至第3天的T细胞。2 d后更换含有IL-2(100 U/mL)的完全培养基, 扩大培养至细胞总数达到 2×10^8 。荧光显微镜观察c-Met CAR(GFP)病毒对T细胞的感染情况。

1.2.4 CAR-T细胞的全基因组DNA抽提

使用细胞基因组DNA提取试剂盒分别提取c-Met CAR-T、c-Met CAR-T(GFP)、CD19 CAR-T细胞的全基因组DNA。病毒感染72 h后收集T细胞至1.5 mL EP管中, PBS清洗2次, 计算细胞数量。1 500 g离心5 min, 将细胞离心沉淀, 加入200 μ L缓冲液GA, 震荡至彻底悬浮; 加入20 μ L蛋白酶K; 加入200 μ L缓冲液GB, 充分颠倒混匀后70 $^{\circ}$ C放置10 min; 加入200 μ L无水乙醇, 充分震荡15 s; 将溶液加入至吸附柱CB3中, 12 000 r/min离心30 s, 倒掉废液; 向吸附柱CB3中加入500 μ L缓冲液GD, 12 000 r/min离心30 s, 倒掉废液; 加入600 μ L漂洗液, 12 000 r/min离心30 s, 倒除废液, 离心2次; 空转2次后加入洗脱液, 室温放置5 min, 12 000 r/min离心2 min, 收集离心溶液, 测定浓度并计算每 μ gDNA所含的细胞数(个/ μ g)。

1.2.5 荧光定量PCR检测病毒拷贝数

参照c-Met CAR与CD19 CAR的基因序列, 根据CAR分子scFv区段分别设计特异性引物, 扩增产物约250 bp。将目的片段连接至pMD18-T载体, 测序正确的载体提取质粒后, 根据质粒浓度(ng/ μ L)和长度计算拷贝数(copies/ μ L)。计算公式为: 拷贝数 = $6.02 \times 10^{23} \times \text{核酸浓度} \div (\text{DNA长度} \times 660)$, 拷贝数的单位为copies/mL, 核酸浓度单位为g/mL。将质粒梯度稀释至 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 copies/ μ L, 完成标准品的制备。

将样品及标准品进行荧光定量PCR检测, 在反应体系中, 加入10 μ mol/L引物各1 μ L, SYBR Premix EX Taq 12.5 μ L, DNA模板2 μ L(<100 ng), 剩余体积用ddH₂O补足, 总反应体系为25 μ L。荧光定量PCR仪上反应: 95 $^{\circ}$ C 5 min 变性, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环, 59 $^{\circ}$ C 520 nm处检测荧光值。软件分析荧光检测数据。绘制标准曲线后将样品检测结果的Ct值代入标准曲线公式, 计算出拷贝数(copies/ μ L), 除以样本浓度(μ g/ μ L), 得到每 μ gDNA所含的拷贝数(copies/ μ gDNA)。实验重复3次。

1.2.6 计算c-Met CAR-T细胞感染效率

通过荧光定量PCR技术检测整合到细胞基因组DNA中的病毒拷贝数, 由于病毒感染细胞是随机

的, 遵循Poisson分布规律, 计算病毒的感染效率。根据病毒拷贝数与细胞数的比值计算该病毒的感染效率: $P(K) = 1 - P(0)$, $P(0) = e^{-m}$, $P(K)$: 被感染细胞的百分率, $P(0)$: 未被感染细胞的百分率, e : 自然常数, m 感染重数 = 病毒拷贝数: 细胞数(copies/ μ gDNA: 个/ μ gDNA)。

1.2.7 流式细胞术检测c-Met CAR(GFP)-T细胞的感染效率

荧光显微镜观察经c-Met CAR(GFP)逆转录病毒感染2 d后的T细胞, 用PBS洗涤, 计数。分别取 1×10^6 个/mL至流式检测管内, PBS洗涤后, 留100 μ L重悬细胞。上机检测, 流式细胞仪(BD FACS Calibur, 美国)检测表达GFP的T细胞比例。实验重复3次。

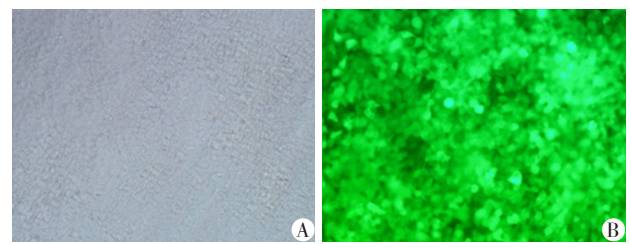
1.3 统计学方法

采用软件SPSS20.0进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK- q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 c-Met CAR(GFP)质粒构建和鉴定

构建c-Met CAR(GFP)质粒, 其结构为c-Met-scFv-CH2CH3-CD28-CD137-CD137 ζ -GFP。将质粒转染至293T细胞, 荧光显微镜下观察GFP的表达。结果显示转染48 h后, c-Met CAR(GFP)质粒可在293T细胞中表达GFP(图1)。



A: 白光下观察转染c-Met CAR(GFP)质粒的293T细胞($\times 200$);
B: 荧光通道下观察转染c-Met CAR(GFP)质粒的293T细胞($\times 200$)。

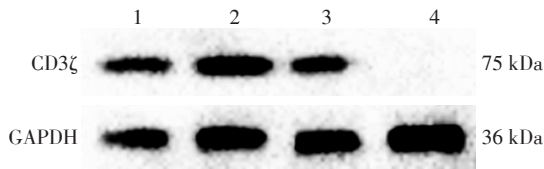
图1 荧光显微镜观察c-Met CAR(GFP)质粒在293T细胞中的表达情况

Figure 1 Detection of the c-Met CAR(GFP) plasmid expression on 293T cells by fluorescence microscope

2.2 CAR病毒的包装

收集c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)与CD19 CAR病毒感染后的293T细胞及未感染的293T细胞并提

取总蛋白,使用Western blot检测外源性CD3 ζ 蛋白的表达。CAR外源性CD3 ζ 分子量约为75 kDa。结果表明感染c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)以及CD19 CAR病毒的293T细胞在75 kDa左右均有目的条带,与预期蛋白大小相符,而未感染的293T细胞未见表达(图2)。



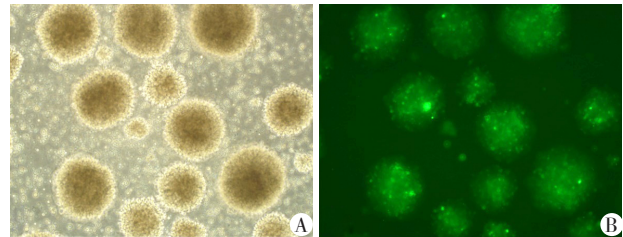
1:c-Met CAR病毒感染的293T细胞;2:c-Met CAR(GFP)病毒感染的293T细胞;3:CD19 CAR病毒感染的293T细胞;4:未感染的293T细胞。

图2 Western blot检测c-Met CAR病毒在293T细胞的表达
Figure 2 Expression of the c-Met CAR virus on 293T cells by Western blot

2.3 CAR-T细胞的制备

使用制备好的c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)与CD19 CAR病毒感染活化后的T细胞,将感染48 h后的c-Met CAR-T(GFP)细胞置于荧光显微镜下观察,

结果显示成功感染c-Met CAR(GFP)病毒的T细胞能激发出绿色荧光(图3)。

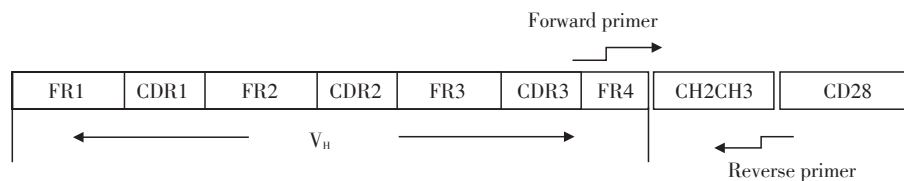


A:白光下观察感染c-Met CAR(GFP)病毒的T细胞($\times 100$);B:荧光通道下观察感染c-Met CAR(GFP)病毒的T细胞($\times 100$)。

图3 荧光显微镜观察c-Met CAR(GFP)病毒感染的T细胞
Figure 3 Detection of c-Met CAR(GFP) virus infected T cells by fluorescence microscope

2.4 CAR特异性引物的设计

针对c-Met CAR胞外结构域上的基因序列设计引物,c-Met CAR的胞外区为抗c-Met scFv,由抗c-Met Fab抗体V_H以及V_K组成,其中V_H结构由重链CDR1、2、3,以及FR1、2、3、4构成,将检测引物设计在跨越胞外区CDR3和FR4、跨膜区CH2CH3及胞内区CD28,以保证该引物的特异性(图4)。



CDR1~3为重链抗原决定簇,FR1~4为骨架区域,CH2CH3为跨膜区,CD28为胞内区。

图4 引物的设计原理

Figure 4 Principle of primer design

c-Met CAR 的上游引物为F:5'-GATAACTGGGGATTGACTACTGGGGC-3',下游引物为R:5'-TGGTGGAGCGATAGGCTGCGAA-3';CD19 CAR 的上游引物为F:5'-CTGGAGTGGCTGGGAGTAAT-3',下游引物为R:5'-GCCCCAGTAGTCCATAGCAT-3'。

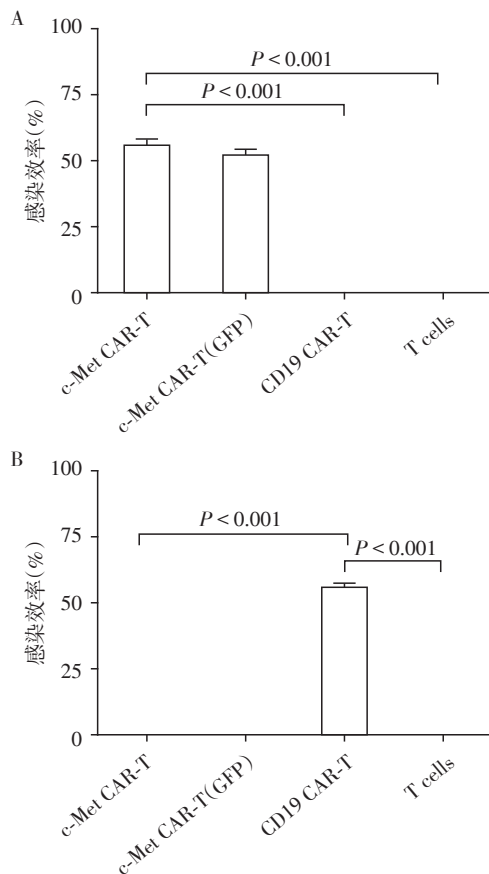
2.5 荧光定量PCR检测CAR-T细胞感染效率

分别提取c-Met CAR-T、c-Met CAR-T(GFP)、CD19 CAR-T以及未感染T细胞的基因组DNA,进行荧光定量PCR检测,将Ct值代入标准曲线得出拷贝数后计算其感染效率。检测结果表明,c-Met CAR-T细胞、c-Met CAR-T(GFP)细胞的感染效率分别为(55.9 \pm 2.3)%、(52.1 \pm 1.7)%,对照组CD19 CAR-T细胞与未感染的T细胞因无法检测出拷贝数因而无法计算病毒的感染效率(图5A)。

以同样原理设计CD19 CAR的特异性引物,对本样本再次进行检验,结果显示该引物可以检测出CD19 CAR-T细胞的病毒拷贝数,感染效率为(55.3 \pm 3.3)%,该引物无法检测c-Met CAR-T细胞以及未感染T细胞的感染效率(图5B)。

2.6 比较荧光定量PCR法与流式细胞术所检测的感染效率

本研究制备的c-Met CAR(GFP)病毒携带有GFP标签,所以被感染的T细胞能够表达绿色荧光。利用流式细胞术检测c-Met CAR(GFP)病毒感染T细胞72 h后的感染效率,结果显示,病毒感染率为(50.7 \pm 3.6)%(图6)。荧光定量PCR法检测c-Met CAR-T(GFP)细胞的感染效率为(52.1 \pm 1.7)%,两种检测方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: c-Met CAR 感染效率; B: CD19 CAR 感染效率。

图5 荧光定量PCR检测c-Met CAR-T细胞感染效率

Figure 5 Detection of the efficiency of c-Met CAR virus infected cells by qRT-PCR

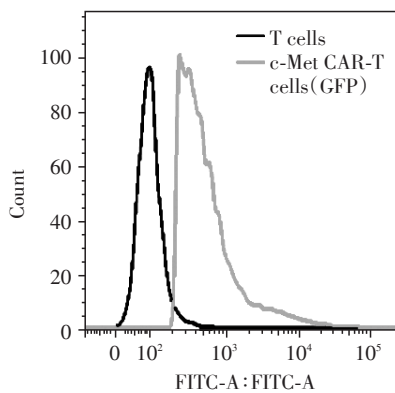


图6 流式细胞术检测c-Met CAR(GFP)病毒感染T细胞效率

Figure 6 Detection of the efficiency of c-Met CAR(GFP) virus infected T cells by flow cytometry

3 讨论

CAR-T细胞技术通过将识别肿瘤表面特异性靶点的单链抗体与细胞内活化基序以及共刺激信号分子构建在一起,再利用逆转录病毒等载体感染

T细胞,使得表达CAR的T细胞能够通过scFv靶向识别并结合肿瘤靶点,并且通过共刺激因子如CD28和CD137来提高T细胞的增殖能力以及杀伤能力进而消灭肿瘤细胞^[11]。然而,病毒对T细胞的感染效率制约着CAR-T细胞对靶细胞的结合效率和活化效率,从而影响临床治疗效果,因此如何有效、准确检测病毒感染效率,是CAR-T细胞技术临床应用的重要关键点之一。

在已有的文献报道中,常用流式细胞术检测CAR病毒感染T细胞的效率,主要通过逆转录CAR病毒载体上添加标记蛋白如GFP,从而使感染后的T细胞发出荧光,有学者分别用此方法检测GD2 CAR-T和GPC3 CAR-T细胞的感染效率^[12-13]。尽管使用细胞荧光对CAR-T细胞检测非常便捷并具有高度的敏感性,但是由于此类蛋白作为非人源蛋白,应用于人体具有免疫原性^[14],因此不利于在临床治疗上使用,并且会影响质粒的转染效果。也有采用流式细胞术检测CAR分子铰链区辅助scFv折叠的IgG CH2CH3结构^[15],但是由于其在人体内具有一定的同源性,检测的特异性欠佳。因此,选择一个更加安全、准确的检测方法对CAR-T技术应用于临床治疗尤为重要。

在病毒感染细胞的过程中,培养的细胞可能会被不同数量的病毒感染,了解病毒在培养细胞上的分布,即可了解病毒所感染细胞的比率。而受感染的细胞比率取决于每个细胞所含有的病毒拷贝平均数,由于病毒感染细胞是一种随机事件,遵循Poisson分布规律^[16], $P(n) = \frac{m^n}{n!} e^{-m}$,当计算未感染细胞的比率时, $P(0) = \frac{m^0}{0!} e^{-m} = e^{-m}$,因此病毒成功感染细胞的比率 $P(K) = 1 - P(0) = 1 - e^{-m}$ 。通过荧光定量PCR来检测其拷贝数从而可得知病毒的感染效率。

本实验以c-Met CAR-T细胞作为研究对象,由于每个抗原表位均不同,将上游引物设计于来自抗c-Met scFv可变区的CDR3区域,该部位因其空间结构的特殊性,可与抗原决定簇形成精密互补,以此区域设计的引物具有高度的特异性。同时将跨膜区CH2CH3以及胞内共刺激结构域CD28设计为下游引物,保证了该引物的特异性,因此可准确地检测出c-Met CAR病毒感染T细胞的效率。该方法同样可以对针对其他靶点的CAR进行检测。

本研究以前期制备的c-Met CAR质粒为基础,构建c-Met CAR(GFP)质粒用以比较验证。CD19作为CAR-T细胞技术研究最多的靶点,其对血液系统

肿瘤的治疗作用已经得到广泛的验证,因此选用CD19 CAR作为本实验的对照组。分别包装c-Met CAR、c-Met CAR(GFP)以及CD19 CAR病毒并感染293T细胞,结果提示制备的CAR病毒能够感染293T细胞并能正确表达,并且由于c-Met CAR与CD19 CAR具有相同的胞内结构域,且荧光蛋白不影响目的蛋白表达位置,因此3种CAR-T细胞的CD3 ζ 分子量大小相同。荧光显微镜观察显示制备的c-Met CAR-T(GFP)细胞能产生绿色荧光。应用荧光定量PCR对c-Met CAR与c-Met CAR(GFP)病毒感染的T细胞进行检测,两种病毒对T细胞的感染效率相近,证明该检测方法可不依赖于绿色荧光蛋白的表达。使用荧光定量PCR法和流式细胞术对c-Met CAR-T(GFP)细胞的感染效率进行检测,感染效率分别为(52.1 \pm 1.7)%、(50.7 \pm 3.6)%,结果表明荧光定量PCR法检测CAR病毒感染T细胞的效率与流式细胞术的检测结果没有差别,提示荧光定量PCR法可用于检测CAR病毒感染T细胞的效率。

通过合成c-Met特异性引物分别对c-Met CAR-T、c-Met CAR-T(GFP)与阴性对照组CD19 CAR-T细胞以及空白对照组未感染的T细胞进行检测,结果表明,本文设计的c-Met CAR引物能够检测c-Met CAR-T与c-Met CAR-T(GFP)细胞的感染效率,而无法检测CD19 CAR-T与未感染的T细胞;同时针对抗CD19 CAR所设计的引物仅能检测CD19 CAR-T细胞的感染效率,验证了所设计引物的特异性。

本研究不依赖标记GFP的方法,通过设计特异性引物,应用荧光定量PCR法检测CAR病毒感染T细胞的效率。该方法还可监测CAR-T细胞在体内的分布变化,明确CAR-T细胞在体内的增殖情况,操作简便、精确、安全,有助于临床应用开展CAR-T细胞治疗。

[参考文献]

- [1] Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(2):133-146
- [2] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5):1822-1826
- [3] Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date[J]. *Blood*, 2016, 127(26):3312
- [4] Davila ML, Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(1):6-17
- [5] Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy[J]. *New Engl J Med*, 2016, 375(26):2561-2569
- [6] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6):540-549
- [7] Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(5):273
- [8] Tang X, Zhou Y, Li W, et al. T cells expressing a LMP1-specific chimeric antigen receptor mediate antitumor effects against LMP1-positive nasopharyngeal carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *J Biomed Res*, 2014, 28(6):468-475
- [9] Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects[J]. *Clin Ther*, 2002, 24(11):1720-1740
- [10] 周 炎,徐亚如,黄晓辰,等. 靶向c-Met嵌合抗原受体T细胞的制备及其对鼻咽癌细胞作用的研究[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2017, 31(2):49-54
- [11] Eyquem J, Mansillasoto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection[J]. *Nature*, 2017, 543(7643):113
- [12] Prapa M, Calder S, Spano C, et al. A novel anti-GD2/4-1BB chimeric antigen receptor triggers neuroblastoma cell killing[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28):24884-24894
- [13] Gao H, Li K, Tu H, et al. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24):6418-6428
- [14] Klein D, Bugl BW, Salmons B. Accurate estimation of transduction efficiency necessitates a multiplex real-time PCR[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6):458-463
- [15] 唐小军. LMP1靶向嵌合抗原受体T细胞对EBV相关恶性肿瘤杀伤作用的实验研究[D]. 南京:南京医科大学, 2014
- [16] Walburger DK, Afonina IA, Wydro R. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis[J]. *Mutat Res*, 2001, 432(3-4):69-78

[收稿日期] 2018-03-30