



38 kD 抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞的抗结核抗原活性研究

罗微^①, 张笑冰^②, 黄永塔^①, 郝佩佩^①, 姜振民^①, 温茜^①, 周明乾^①, 马骥^{①*}

① 南方医科大学生物技术学院分子免疫学研究所, 广州 510515;

② 中国医学科学院病原生物学研究所, 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100176

* 联系人, E-mail: maryhmz@126.com

2011-12-14 收稿, 2012-04-26 接受

国家自然科学基金(30972680)和病毒基因工程国家重点实验室开放研究课题(2011KF03)资助

摘要 抗原特异 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)基因修饰 T 细胞已被应用于肿瘤、病毒感染过继免疫治疗研究, 取得了鼓舞人心的结果, 但在结核上未见报道. 本研究利用结核分枝杆菌 38 kD 抗原刺激人 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞, 通过分析刺激前后 T 细胞 TCR 互补决定区 3 (complementarity determining region 3, CDR3)谱型, 从 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞中分别筛选出 38 kD 抗原特异的 TCR V α 11, V β 8 和 V α 3, V β 8 基因家族 T 细胞, 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增获得其 α , β 链全长基因并插入逆转录病毒载体, 构建重组载体 pMX- β 8-IRES- α 11-GFP (p β 8 α 11)和 pMX- β 8-IRES- α 3-GFP (p β 8 α 3), 分别转染初始 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞, 检测其体外抗结核抗原活性. 结果显示, TCR 基因修饰的 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞均表达外源性 TCR, 不仅能特异性识别抗原, 且介导免疫效应功能, 表明结核抗原特异 TCR 基因修饰的 T 细胞具有应用于多药耐药结核患者过继细胞免疫治疗的可能.

关键词

结核分枝杆菌
38 kD 抗原
T 细胞受体
基因修饰

近年来, 随着耐药和多重耐药菌株流行, 结核杆菌与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)合并感染, 移植及免疫抑制剂使用等致免疫损害宿主增多, 全球结核病死灰复燃, 呈现卷土重来之势^[1]. 尽管抗生素的发明曾一度控制结核病的流行, 但抗生素的用药疗程长达半年乃至一年, 副作用明显, 而且越来越多的结核病患者对多种抗生素产生了耐药性. 耐药菌的产生及患者免疫力低下是导致结核病难治的根本原因, 单一调整化疗方案效果有限, 而且化疗无法解决因机体免疫力低下或缺陷引起的内源性复燃和外源性再感染^[2]. 因此, 开创新的治疗方法已成为当务之急.

在抗结核免疫反应中, 作用最关键的是特异性 T 细胞, 包括 CD4⁺ 辅助性 T 细胞 1 型(T-helper cell type 1, Th1)和 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lympho-

cyte, CTL)^[3]. 活化的 Th1 释放 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等细胞因子, 激活和趋化巨噬细胞, 提高其对胞内结核菌的杀灭和抗原递呈能力^[4]. CTL 则发挥其细胞毒作用, 特异识别和杀伤靶细胞, 暴露并清除胞内寄生的结核菌^[5]. 在潜伏感染者体内, 结核菌可局部建立有利于 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)募集和存活的环境, 抑制特异性免疫应答, 致使结核菌不能被彻底清除, 保持休眠和静止状态, 与机体免疫系统维持一种平衡^[6]. 一旦各种因素导致机体免疫力降低, 破坏了这种平衡, 潜伏感染者将发展为活动性结核患者^[7]. 而在患者体内, 特异 Th1 和 CTL 的抗结核活性非常弱, 甚至处于“无能”状态^[8].

通过输注效应 T 细胞提高患者免疫功能的过继免疫疗法, 尤其适用于免疫缺陷或低下的结核患者.

英文引用格式: Luo W, Zhang X B, Huang Y T, et al. Anti-tuberculosis activity of TCR gene-modified T cells specific for the *M. tuberculosis* 38 kD antigen (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2012, 57: 1657–1665, doi:10.1360/972011-711

国外已有学者开展结核过继细胞免疫的研究, Orme 等人^[9]将供体小鼠脾内高抗结核活性 T 细胞体外扩增后, 过继给 T 细胞缺陷型同系结核小鼠, 成功地将保护性免疫传递给受者小鼠, 使之清除体内的结核病菌. Kitsukawa 等人^[10]利用灭活的结核菌体外致敏外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL), 将其回输给多药耐药肺结核患者, 取得良好疗效. 美国 NIH 传染病研究所所长 St Georgiev^[11]提出, 过继细胞免疫疗法是一种有前景的结核病治疗策略.

将结核抗原特异 Th1 和 CTL 在体外培养, 可突破免疫调节网络限制, 获得大量扩增的免疫效应细胞, 回输体内后以最快的速度发挥抗结核效应. 但实际上, 将抗原特异 T 细胞分离并扩增至临床治疗所需数量非常困难, 对普通 T 细胞进行抗原特异 T 细胞受体基因修饰则可有效解决这一问题^[12].

目前, 将抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞应用于肿瘤、病毒感染等 T 细胞免疫相关疾病的免疫治疗研究已取得较大进展, 成为该领域的热点. Morgan 等人^[13]将携带肿瘤抗原特异 TCR 基因的重组逆转录病毒转染黑色素瘤患者 T 细胞, 再过继回输体内, 患者病情发生显著好转, 修饰的 T 细胞在体内可维持 3 个月, 有的甚至 1 年以上, 且形成记忆性 T 细胞, 验证了该方法的临床可行性.

本文率先开展抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞抗结核免疫效应研究, 旨在探讨其应用于结核过继细胞免疫治疗的可能性, 并为其他胞内菌感染性疾病的免疫治疗研究提供新思路.

1 材料与方法

1.1 载体、细胞和试剂

HL-10 菌株和 pMX-IRES-GFP 载体由第四军医大学医学遗传学与发育生物学教研室韩骅教授惠赠; VSV-G 质粒、*E. coli* DH5 α , NIH3T3 和 GP2-293 细胞为本研究所保存; pGEM-T 载体购自美国 Promega 公司; Ficoll 淋巴细胞分离液购自上海生物制品研究所; 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、白介素-4(interleukin-4, IL-4), TNF- α 和 IL-7 均购自美国 Peprotech 公司; 38 kD 抗原由美国 ImmunoDiagnostics 公司供应; 磁珠分选柱及磁珠分选试剂均购自德国 Miltenyi Biotec 公司; RNA 提取试剂盒购自美国 Omega Bio-

Tek 公司; 第一链互补 DNA (complementary DNA, cDNA)合成试剂盒购自德国 MBI Fermentas 公司; 限制性内切酶均由日本 TAKARA 公司生产; Lipofectin 转染试剂盒由美国 Invitrogen 生命技术公司供应; 聚凝胺(polybrene, PE)和硫酸软骨素 C 购自美国 Sigma 公司; 鼠抗人 TCR V β 单抗购自美国 BD 公司; Cell Counting Kit-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司; 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供; 时间分辨荧光免疫分析(time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)杀伤检测试剂盒购自美国 PerkinElmer 公司; 测序和引物合成由上海英潍捷基贸易有限公司完成.

1.2 38 kD 抗原诱导特异性 T 细胞克隆增殖

取健康志愿者外周血 20 mL, Ficoll 淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 贴壁培养 2 h, 吸出悬浮细胞, 经尼龙毛柱法获得纯化的 T 细胞, 冻存待用. 向贴壁细胞中加入含 100 ng/mL GM-CSF, 80 ng/mL IL-4 的 10% FBS RPMI-1640 培养液, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养, 3 d 半量换液, 并补充细胞因子, 第 6 天加入 10 μ g/mL 38 kD 抗原蛋白, 20 ng/mL TNF- α , 继续培养 24 h 后收集树突状细胞(dendritic cells, DC). 复苏冻存的 T 细胞, 与上述负载 38 kD 抗原的 DC 按 10:1 的比例混合, 加入 10 ng/mL IL-7, 培养 5 d 后, 再补充新鲜制备的负载 38 kD 抗原的 DC 与上述 T 细胞共培养, 如此 5 d 为 1 个周期, 反复刺激 3 个周期.

1.3 磁珠分选 CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ T 细胞

收集刺激了 3 个周期的 T 细胞, PBS 洗 3 次, 细胞计数, 取 2×10^7 个 T 细胞, 利用 CD8 单抗免疫磁珠阳选出 CD8 $^{+}$ T 细胞, 剩下的 CD8 阴性细胞进一步通过阴选法分选出 CD4 $^{+}$ T 细胞, 再通过 CD25 单抗免疫磁珠阳选法去除 CD4 $^{+}$ T 细胞中的 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg 细胞, 流式细胞术检测细胞纯度(结果未显示).

1.4 聚合酶链式反应扩增 TCR α , β 全长基因

参照文献合成引物并通过反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)扩增 24 V β 与 32 V α 家族互补决定区 3 (complementarity determining region 3,

CDR3), 取 2 μ L PCR 产物进行 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳, GeneScan 672 软件自动分析, 收集电泳过程中的荧光素, 转换为不同位置、高度、颜色和形态的 CDR3 谱型峰图^[14]. 分析 CDR3 谱型, 筛选出刺激前呈多克隆峰型、刺激后为单峰的 TCR V α , V β 基因家族, 依据 GeneBank 报道的该基因家族 V 区序列特点设计全长基因上游引物, 依据 C 区序列设计下游引物, 扩增出 TCR α , β 链全长基因. 在 α 基因上、下游引物 5' 端引入 *Nco* I 酶切位点, 在 β 基因上、下游引物 5' 端分别引入 *Eco*R I, *Xho* I 酶切位点, 引物序列见表 1. PCR 反应体系 50 μ L, 含 cDNA 模板 1 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 5 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, Platinum Pfx DNA 聚合酶 0.4 U, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

1.5 重组逆转录病毒载体的构建

将 TCR α , β 全长基因 PCR 产物插入 pGEM-T 载体, 转化宿主菌 DH5 α , 提取质粒, DNA 测序正确后, 依次以 *Nco* I 单酶切 α 全长基因, 以 *Eco*R I, *Xho* I 双酶切 β 全长基因, 回收相应大小的片段, 先后插入 pMX- β -IRES- α -GFP 的对应位点, 连接产物转化宿主菌 HL-10, 提取质粒, 酶切鉴定.

1.6 重组病毒的制备

重组质粒与包膜蛋白质粒 VSV-G 以 3:1 的比例混合, 采用 Lipofectin 试剂盒转染 GP2-293 细胞, 操作依说明书进行. 培养 48 h 后收取培养上清, 加入聚凝胺和硫酸软骨素 C 各 200 μ g, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 10000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 以浓缩和纯化病毒. 纯化后的病毒上清转染 NIH3T3 细胞, 3 d 后倒置显微镜 (Nikon-i80, 日本) 下观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达, 流式细胞术 (FACSCalibur

流式细胞仪, BD, 美国) 检测其 GFP 表达阳性率, 并按下列公式计算病毒滴度: 病毒滴度 (GFU/mL) = NIH3T3 细胞数 $\times$ 阳性率 / 感染病毒上清量 (mL).

1.7 TCR 基因修饰 T 细胞

取新鲜分离的 PBMC, 磁珠分选 CD4⁺ (去除 CD4⁺ CD25⁺ Tregs), CD8⁺ T 细胞, 重悬并调整密度为 1 $\times$ 10⁶ 个/mL, 按梯度感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 加入重组病毒, 同时加入含 8 μ g/mL 聚凝胺的无血清 RPMI-1640, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 补加新鲜完全培养基, 将聚凝胺稀释至 2 μ g/mL, 并加入抗人 CD3/CD28 磁珠和 100 ng/mL IL-2 诱导 TCR 基因修饰 T 细胞活化和增殖^[15], 2 d 重复 1 次. 分别于感染前、感染和活化扩增后, 使用 0.2% 台盼蓝染色 1 min, 光镜 (Nikon-i80) 观察, 计数 200 个细胞中活细胞的百分比. 转染后第 5 天, 流式细胞术检测 GFP 表达以确定最佳 MOI 值.

1.8 TCR 基因修饰 T 细胞 β 8 基因表达的检测

将重组病毒分别以最佳 MOI 感染 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞, 感染后第 5 天, 收集重组病毒感染的 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞, 与 PE 标记的鼠抗人 TCR V β 8 单抗在 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 预冷 PBS 洗 3 次, 用新鲜配制的 2% 多聚甲醛重悬固定, 流式细胞术检测 TCR β 8 基因表达阳性细胞率.

1.9 TCR 基因修饰 T 细胞的抗结核抗原活性检测

(i) 检测 TCR 基因修饰 CD4⁺ T 细胞的增殖. 按效靶比 (effector: target, $E:T$) = 7, 将 TCR 基因修饰的 CD4⁺ T 细胞和负载 38 kD 抗原的 DC 混合培养, 使用 WST-8 法 (Cell Counting Kit-8 试剂盒)^[16,17] 检测混合培养第 1, 3, 5, 7 天, CD4⁺ T 细胞的增殖状况. 实验重复 3 次. 同时设置未转染组 (未转染 T 细胞 + 38 kD 抗原冲击的 DC)、空载体组 (空载体转染 T 细胞 + 38 kD 抗原冲击的 DC)、OVA 组 (TCR 基因修饰 T 细胞 + 无关抗原 OVA 冲击的 DC) 作为对照, 以下实验对照设置同此.

(ii) 检测 TCR 基因修饰 CD8⁺ T 细胞的杀伤活性. 按 $E:T$ = 30, 将 TCR 基因修饰的 CD8⁺ T 细胞与负载 38 kD 抗原的 DC 混合培养 2 h, 依照 TRFIA 杀伤检测试剂盒说明书, 检测 CD8⁺ T 细胞对靶细胞的杀伤活性. 计算公式: 特异性杀伤率 = (待测孔荧光强

表 1 PCR 扩增 TCR α , β 全长基因引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
$\alpha 3$ 基因上游引物	CCATGGATGGAACTCTCCTGG
$\alpha 11$ 基因上游引物	CCATGGATGGCTTTGCAGAGCA
$\alpha 3$, $\alpha 11$ 基因共用下游引物	CCATGGGCTGGACCACAGCCG
$\beta 8$ 基因上游引物	GAATTCATGGACTCCTGGACC
$\beta 8$ 基因下游引物	CTCGAGTCAGAAATCCTTTCTCTT

度—自然释放孔荧光强度)/(最大释放孔荧光强度—自然释放孔荧光强度)×100%。实验重复3次。

(iii) 检测 TCR 基因修饰 T 细胞的细胞因子分泌水平。按 $E:T=7$, 将 TCR 基因修饰 T 细胞和负载 38 kD 抗原的 DC 混合培养, 18 h 收集上清, ELISA 检测 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞 IFN- γ 的分泌水平; 24 h 收集上清, ELISA 检测 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞 TNF- α , $CD4^+$ T 细胞 IL-4 和 $CD8^+$ T 细胞 GrB 的分泌水平。IFN- γ , TNF- α 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒的检测范围均为 15.6~1000 pg/mL, 敏感性 <1 pg/mL; GrB ELISA 检测试剂盒的检测范围为 0.5~20 pg/mL, 敏感性为 0.2 pg/mL。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

所有计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 检验有无组间差异, 最小显著差数法 (least significant difference, LSD) 检验比较不同处

理组间 T 细胞的增殖水平、杀伤活性及细胞因子分泌水平。采用双侧检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。所有数据采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学处理。

2 结果

2.1 TCR α, β 全长基因的获得

为筛选结核抗原特异 TCR, 我们采用结核 38 kD 抗原刺激初始 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞, 产生 38 kD 抗原特异 TCR。分析刺激前后 CDR3 谱型, 发现刺激前所有 TCR $V\alpha$, $V\beta$ 基因家族 CDR3 谱型均呈高斯分布; 38 kD 抗原刺激后大部分 TCR 家族呈偏态分布, 部分家族呈少于 8 个峰的寡峰、单峰甚至无峰型。对比刺激前后 CDR3 谱型, 发现 $CD4^+$ T 细胞中 $V\alpha11$, $V\beta8$ 基因家族和 $CD8^+$ T 细胞中 $V\alpha3$, $V\beta8$ 基因家族刺激前为正常高斯分布, 38 kD 抗原刺激后呈单克隆分布 (图 1), 设计 $V\alpha11$, $V\alpha3$, $V\beta8$ 基因家族全长引物, RT-PCR 扩增获得其全长基因, 2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, α ,

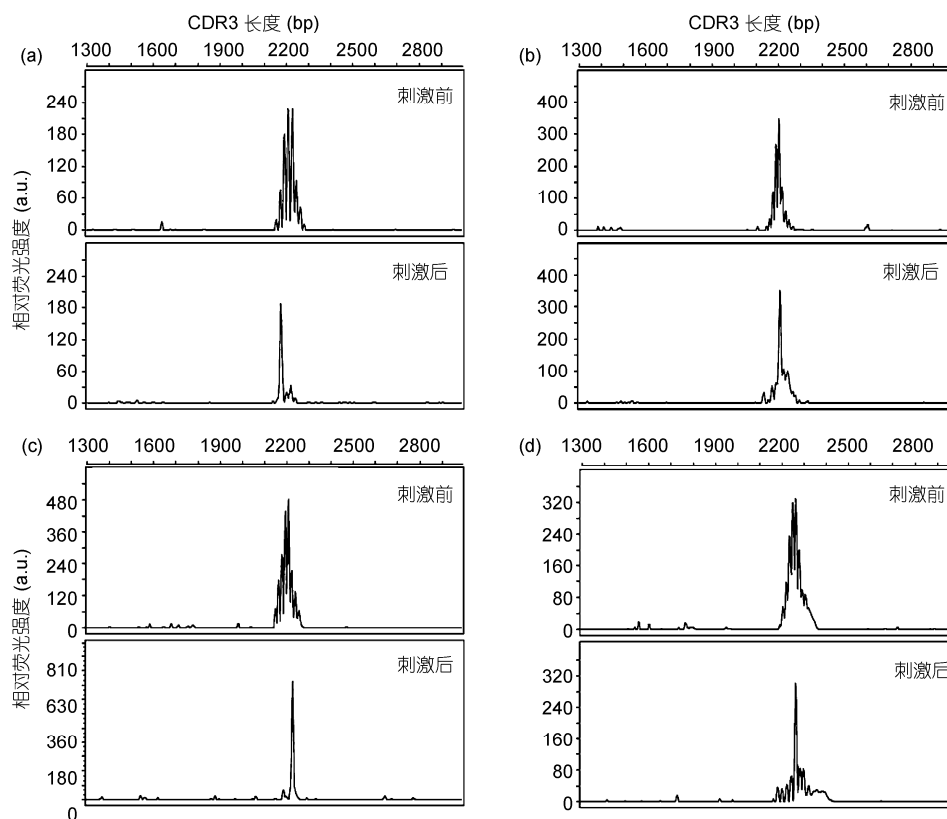


图 1 结核 38 kD 抗原刺激后呈单克隆分布的 TCR $V\alpha$, $V\beta$ 家族 CDR3 谱型峰图

(a) $CD4^+$ T 细胞 TCR $V\beta8$ 家族; (b) $CD4^+$ T 细胞 TCR $V\alpha11$ 家族; (c) $CD8^+$ T 细胞 TCR $V\beta8$ 家族; (d) $CD8^+$ T 细胞 TCR $V\alpha3$ 家族

β 全长基因 PCR 产物分别在相应位置显示清晰条带。测序结果表明, $\alpha 11$, $\alpha 3$, $\beta 8$ 全长基因 V 区和 C 区序列均与 GeneBank 报道相符, CDR3 区序列符合 TCR CDR3 序列特征。

2.2 重组载体的构建

将 $CD4^+$ T 细胞的 TCR $\alpha 11$ 和 $\beta 8$ 基因, $CD8^+$ T 细胞的 TCR $\alpha 3$ 和 $\beta 8$ 基因分别插入 pMX-IRES-GFP, 构建重组逆转录病毒载体 pMX- $\beta 8$ -IRES- $\alpha 11$ -GFP (p $\beta 8\alpha 11$), pMX- $\beta 8$ -IRES- $\alpha 3$ -GFP (p $\beta 8\alpha 3$), 酶切鉴定证实基因片段插入正确。重组病毒经包装、浓缩、纯化后, 感染 NIH3T3 细胞, 流式细胞术检测 GFP 的表达, 通过公式计算得到 p $\beta 8\alpha 11$ 与 p $\beta 8\alpha 3$ 重组病毒滴度, 分别为 9.2×10^6 和 7.8×10^6 GFU/mL。

2.3 重组病毒感染 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞

台盼蓝染色计数活细胞百分比, 感染前 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞活细胞得率分别为 95%, 91%; 感染和活化扩增后活细胞得率分别为 97%, 93%。按 MOI=1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 分别将重组逆转录病毒 p $\beta 8\alpha 11$ 和 p $\beta 8\alpha 3$ 感染初始 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞, 流式细胞术结果显示: MOI=11 时, p $\beta 8\alpha 11$ 感染的 $CD4^+$ T 细胞 GFP 表达阳性率最高, 感染第 5 天达 23.69%; MOI=13 时, p $\beta 8\alpha 3$ 感染的 $CD8^+$ T 细胞 GFP 表达阳性

率最高, 感染第 5 天达 19.12% (图 2)。

2.4 TCR 基因修饰 T 细胞 $\beta 8$ 表达的检测

将 p $\beta 8\alpha 11$ 以 MOI=11 感染初始 $CD4^+$ T 细胞, p $\beta 8\alpha 3$ 以 MOI=13 感染初始 $CD8^+$ T 细胞, 培养 6 d 后流式细胞术检测, 结果表明, $CD4^+$ T 细胞 $\beta 8$ 表达阳性率达 46.83%, $CD8^+$ T 细胞 $\beta 8$ 表达阳性率达 39.91%, 显著高于未转染的 $CD4^+$ T 细胞 (8.9%) 和 $CD8^+$ T 细胞 (6.1%), 表明修饰后 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞表面均成功表达外源性 TCR 基因 (图 3)。

2.5 TCR 基因修饰 T 细胞抗结核抗原活性的检测

(i) TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞增殖水平的检测。为鉴定 TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞能否特异性识别结核抗原并具备增殖活性, 我们采用 WST-8 法检测共培养第 1, 3, 5, 7 天 TCR 基因修饰组与各对照组 $CD4^+$ T 细胞的增殖水平。方差齐性检验后 ($P>0.05$), one-way ANOVA 分析表明, 除第 1 天外 ($P>0.05$), 第 3, 5, 7 d 各组间 T 细胞增殖水平差异均具有统计学意义 ($P<0.001$)。LSD 多重比较结果提示, 第 3, 5, 7 天 TCR 基因修饰组细胞增殖水平最高, 显著高于未转染组、空载体组和 OVA 组 ($P<0.001$), 表明 TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞具有结核抗原特异增殖活性 (图 4)。

(ii) TCR 基因修饰 $CD8^+$ T 细胞杀伤活性的检测。

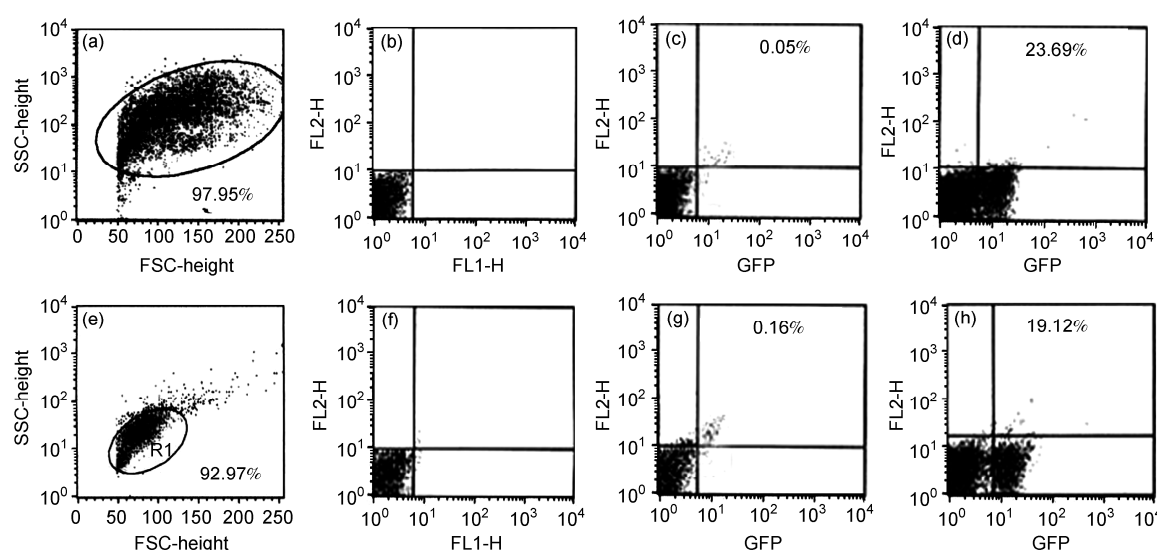


图 2 流式细胞术检测重组病毒感染 $CD4^+$, $CD8^+$ T 细胞 GFP 的表达

(a) $CD4$ 免疫磁珠阳选后侧向角/前向角散射流式图; (b) $CD4^+$ T 细胞同型对照; (c) 未转染 $CD4^+$ T 细胞; (d) TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞; (e) $CD8$ 免疫磁珠阳选后侧向角/前向角散射流式图; (f) $CD8^+$ T 细胞同型对照; (g) 未转染 $CD8^+$ T 细胞; (h) TCR 基因修饰 $CD8^+$ T 细胞

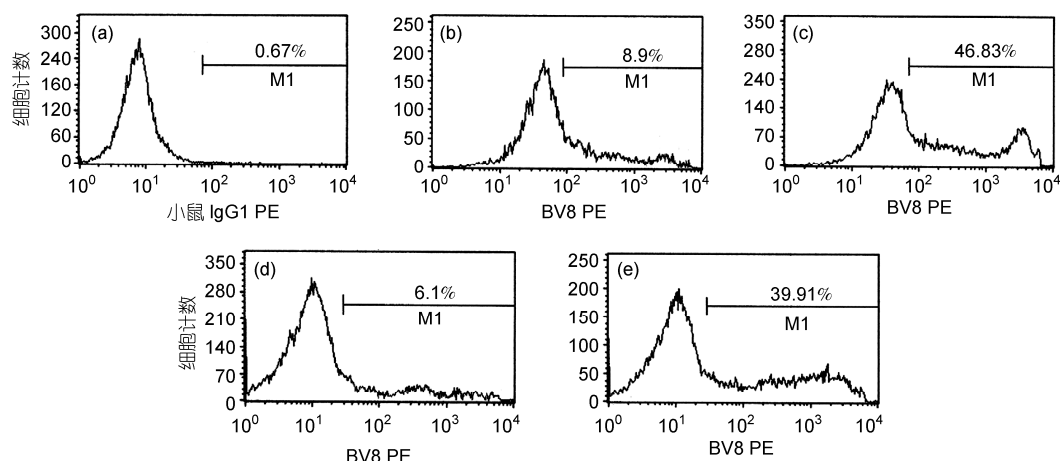


图3 流式细胞术检测 TCR 基因修饰 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞 V β 8 的表达

(a) 同型对照; (b) 未转染 $CD4^+$ T 细胞; (c) TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞; (d) 未转染 $CD8^+$ T 细胞; (e) TCR 基因修饰 $CD8^+$ T 细胞

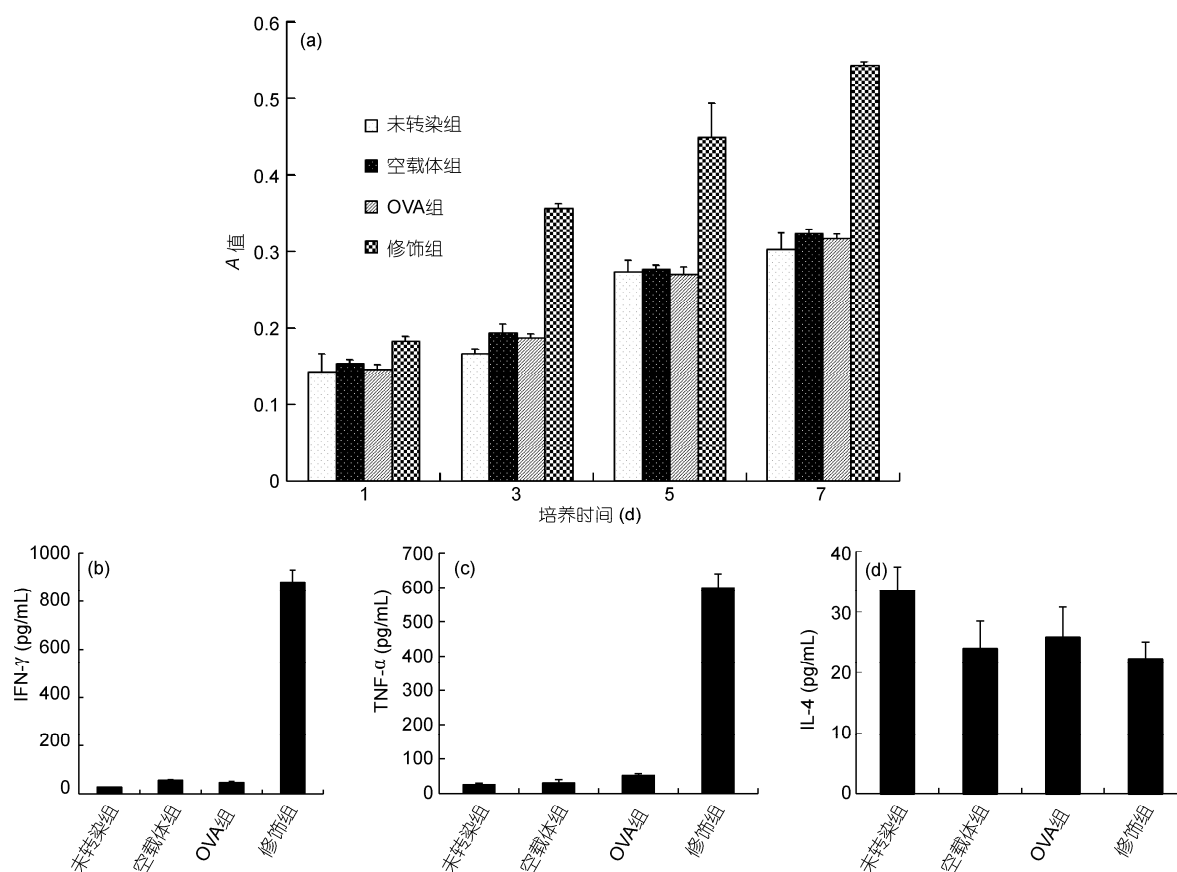


图4 TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞的增殖和细胞因子分泌

(a) 增殖活性; (b) IFN- γ 分泌水平; (c) TNF- α 分泌水平; (d) IL-4 分泌水平. 未转染组, 未转染 $CD4^+$ T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC; 空载体组, 空载体转染 $CD4^+$ T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC; OVA 组, TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞+无关抗原 OVA 冲击 DC; 修饰组, TCR 基因修饰 $CD4^+$ T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC. A 值为 OD_{450/630} 的吸光度值

为鉴定 TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞能否特异性识别结核抗原并杀伤负载结核抗原的靶细胞, 我们采用时间分辨荧光免疫分析法检测 TCR 基因修饰组与各对照组 CD8⁺T 细胞的杀伤水平. 结果表明, TCR 基因修饰组 CD8⁺T 细胞的特异性杀伤率最高, 达 89.73%, 显著高于其他各组($P<0.001$), 表明 TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞具有结核抗原特异的杀伤活性(图 5).

(iii) TCR 基因修饰 T 细胞细胞因子分泌水平的检测. ELISA 检测 TCR 基因修饰 T 细胞的细胞因子分泌水平, 结果显示, TCR 基因修饰组 CD4⁺T 细胞 IFN- γ , TNF- α 的分泌量均最高, 分别达 921.84 ± 21.38 , 601.73 ± 19.76 pg/mL, 显著高于未转染组、空载体组、OVA 组($P<0.001$); 但 TCR 基因修饰组与各对照组 IL-4 的分泌水平没有显著差异($P>0.05$), 表明 TCR 基因修饰 CD4⁺T 细胞特异性分泌 Th1 型而非 Th2 型细胞因子. TCR 基因修饰组 CD8⁺T 细胞 IFN- γ , TNF- α 和 GrB 分泌量亦最高, 分别达 451.32 ± 9.76 , 783.61 ± 19.86 , 9.27 ± 1.34 pg/mL, 显著高于其他各组($P<0.001$), 表明 TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞具有结核抗原特异性细胞因子分泌功能.

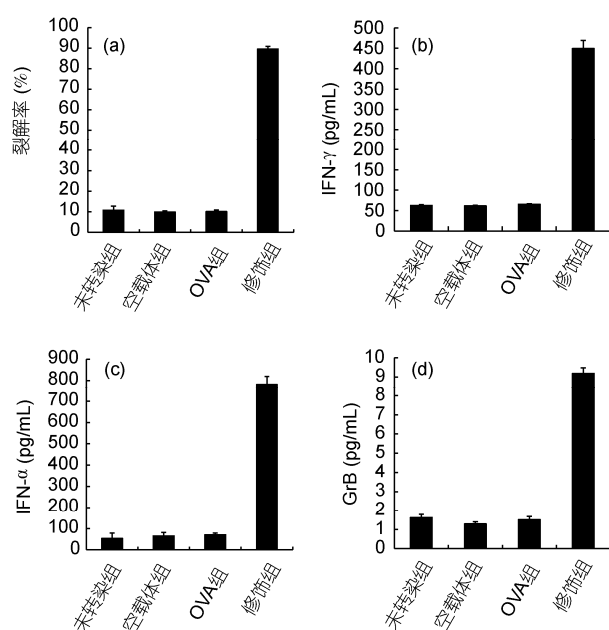


图 5 TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞的杀伤和细胞因子分泌 (a) 杀伤活性; (b) IFN- γ 分泌水平; (c) TNF- α 分泌水平; (d) GrB 分泌水平. 未转染组, 未转染 CD8⁺T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC; 空载体组, 空载体转染 CD8⁺T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC; OVA 组, TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞+无关抗原 OVA 冲击 DC; 修饰组, TCR 基因修饰 CD8⁺T 细胞+38 kD 抗原冲击 DC

3 讨论

近年来, 多药耐药和广泛耐药结核病流行形势严峻, 人们发现化疗无法解决结核病治疗的全部问题, 结核病免疫治疗再次得到了重视, 成为研究热点. 结核杆菌属胞内寄生菌, 机体抗结核免疫以细胞免疫为主, 决定细胞免疫强弱的主要是 T 细胞的数量和功能. 长期感染造成 Th1 细胞被不断消耗, 导致结核患者外周血 Th1 水平极度低下^[18]. 将结核抗原特异 Th1 和 CTL 细胞过继给免疫低下的患者, 有望在调节和平衡免疫系统的同时治愈结核. 然而分离培养结核抗原特异 Th1 和 CTL 并将其扩增至临床治疗所需数量极其困难, 将抗原特异 TCR 基因转入初始 T 细胞中, 可短期内获得大量有抗原识别特异性的 T 细胞, 该方法在肿瘤、病毒感染等疾病过继细胞免疫治疗研究中显示了良好的前景^[19], 为结核过继细胞免疫治疗提供了有希望的策略.

迄今, 抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞抗结核免疫治疗的研究未见报道. 为明确结核抗原特异 TCR 基因修饰的 T 细胞能否发挥抗结核活性, 我们将结核抗原特异的 TCR 分别转染 CD4⁺, CD8⁺T 细胞, 结果表明, TCR 基因修饰的 CD4⁺, CD8⁺T 细胞均表现出显著的结核抗原特异性增殖、杀伤和细胞因子分泌功能.

人体受到结核杆菌感染时, 以 IFN- γ 为代表的 Th1 型细胞因子介导保护性细胞免疫反应, 有利于控制感染, 而以 IL-4 为代表的 Th2 型细胞因子则介导迟发型变态反应, 不仅对自身造成免疫病理损伤, 还会加重感染^[20]. 结核抗原 38 kD 是一种参与磷酸盐代谢的脂蛋白, 对多菌种型结核菌均敏感特异, 研究表明, 该抗原可诱导较强的 Th1 型保护性细胞免疫反应^[21]. 本研究分离出 38 kD 抗原特异的 TCR, 研究其修饰 T 细胞介导的抗结核活性, 结果表明修饰后的 CD4⁺T 细胞高表达 IFN- γ 而非 IL-4, 介导 Th1 型细胞因子分泌.

既往特异 TCR 基因均来源于长期体外培养建立的 TIL 或 CTL 细胞系^[22]. 然而, 原代特异性 T 细胞的来源有限、体外培养和建系困难、且耗时长^[23]. 通过 CDR3 谱型分析可从复杂的 T 细胞群中筛选出抗原特异 TCR 家族 T 细胞, 免去体外建系的繁琐过程. 我们首次尝试采用 CDR3 谱型分析技术, 筛选对结核 38 kD 抗原特异的 TCR, 结果表明采用该方法选出的 TCR 转染 T 细胞后能高效介导抗结核免疫效应.

本实验应用的载体 pMX-IRES-GFP 含有内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)序列,该序列可使多个基因在同一启动子驱动下分别转录并翻译为多种不同的蛋白质,但 IRES 下游基因的表达水平通常仅为上游的 50%左右^[24]。由于 β 链在 TCR 的抗原识别中贡献较大,故在构建重组载体时,我们选择将 β 链基因插入 IRES 的上游,而 α 链基因则插入其下游。由于 GFP 基因位于 α 基因下游,也在 IRES 的下游,故其表达水平理论上应低于 β 基因的表达水平,这与我们的流式结果相符,重组病毒感

染的 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞 GFP 表达阳性率(23.69%, 19.12%)均明显低于 β 8 表达阳性率(46.83%, 39.91%)。

总而言之,本研究结果提示,结核抗原特异 TCR 基因修饰 T 细胞可以特异性识别结核抗原,并具有较强的抗结核抗原活性,具有应用于结核过继细胞免疫治疗的潜能。我们下一步拟在人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)转基因结核小鼠模型上开展过继 TCR 基因修饰 T 细胞的体内抗结核作用研究,为结核过继细胞免疫治疗研究奠定基础,为其他胞内菌感染性疾病免疫治疗研究提供模式和平台。

参考文献

- 1 蔡宏,潘怡,朱玉贤,等. 结核分枝杆菌多价核酸疫苗的构建及免疫原性. 科学通报, 2002, 47: 966–971
- 2 Janin Y L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 2479–2513
- 3 Du G, Chen C Y, Shen Y, et al. TCR repertoire, clonal dominance, and pulmonary trafficking of mycobacterium-specific CD4⁺ and CD8⁺ T effector cells in immunity against tuberculosis. J Immunol, 2010, 185: 3940–3947
- 4 Millington K A, Gooding S, Hinks T S, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific cellular immune profiles suggest bacillary persistence decades after spontaneous cure in untreated tuberculosis. J Infect Dis, 2010, 202: 1685–1689
- 5 Kaufmann S H. Future vaccination strategies against tuberculosis: Thinking outside the box. Immunity, 2010, 33: 567–577
- 6 Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. Clin Immunol, 2007, 123: 50–59
- 7 Wergeland I, Assmus J, Dyrhol-Riise A M. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy. Scand J Immunol, 2011, 73: 234–242
- 8 He X Y, Xiao L, Chen H B, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29: 643–650
- 9 Orme I M, Collins F M. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by adoptive immunotherapy: Requirement for T cell-deficient recipients. J Exp Med, 1983, 158: 74–83
- 10 Kitsukawa K, Higa F, Takushi Y, et al. Adoptive immunotherapy for pulmonary tuberculosis caused by multi-resistant bacteria using autologous peripheral blood leucocytes sensitized with killed *Mycobacterium tuberculosis* bacteria. Kekkaku, 1991, 66: 563–575
- 11 St Georgiev V. Treatment and developmental therapeutics of *Mycobacterium tuberculosis* infections. Int J Antimicrob Agents, 1994, 4: 157–173
- 12 Thomas S, Stauss H J, Morris E C. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer. Immunology, 2010, 129: 170–177
- 13 Morgan R A, Dudley M E, Wunderlich J R, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science, 2006, 314: 126–129
- 14 Luo W, Ma L, Wen Q, et al. Analysis of the interindividual conservation of T cell receptor alpha- and beta-chain variable regions gene in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol, 2008, 154: 316–324
- 15 Kalamasz D, Long S A, Taniguchi R, et al. Optimization of human T-cell expansion *ex vivo* using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. J Immunother, 2004, 27: 405–418
- 16 Corrigan C J, Wang W, Meng Q, et al. T-helper cell type 2 (Th2) memory T cell-potentiating cytokine IL-25 has the potential to promote angiogenesis in asthma. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 1579–1584
- 17 Koyama M, Izutani Y, Goda A E, et al. Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 synergistically induce apoptosis. Clin Cancer Res, 2010, 16: 2320–2332
- 18 Geffner L, Yokobori N, Basile J, et al. Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra strains. Infect Immun, 2009, 77: 5025–5034
- 19 Jorritsma A, Schumacher T N, Haanen J B. Immunotherapeutic strategies: The melanoma example. Immunotherapy, 2009, 1: 679–690

- 20 van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis*, 2000, 181: 1194–1197
- 21 Zhang S L, Zhao J W, Sun Z Q, et al. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009, 89: 278–284
- 22 Rauser G, Einsele H, Sinzger C, et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*, 2004, 103: 3565–3572
- 23 Jorritsma A, Gomez-Eerland R, Dokter M, et al. Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma. *Blood*, 2007, 110: 3564–3572
- 24 Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, et al. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 2000, 1: 376–382

Anti-tuberculosis activity of TCR gene-modified T cells specific for the *M. tuberculosis* 38 kD antigen

LUO Wei¹, ZHANG XiaoBing², HUANG YongTa¹, HAO PeiPei¹, JIANG ZhenMin¹, WEN Qian¹, ZHOU MingQian¹ & MA Li¹

¹Institute of Molecular Immunology, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100176, China

Recent advances in T-cell receptor (TCR) gene modification methods have enabled researchers to design T-cells specific for target antigens, e.g., tumor-associated or viral antigens. These genetically redirected T-cells display similar anti-tumor or anti-viral activity as the cell clones from which the TCR genes were isolated. However, there is no data describing the activity of T-cells with genetically modified TCR genes specific for intracellular bacterial antigens (e.g., tuberculosis antigens). This study enriched T-cells specific for the mycobacterial 38 kD glycolipoprotein by repeated *in vitro* stimulation with antigen-pulsed dendritic cells. Magnetic beads were used to separate CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Spectratype analysis was then used to identify and characterize the third complementarily-determining regions (CDR3) of the antigen-specific human leukocyte antigen (HLA) class II- and I-restricted TCRs derived from specific CD4⁺ or CD8⁺ T-cells, respectively. Full-length TCR genes were inserted into retroviral vectors and transferred into autologous, primary CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Both redirected CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressed exogenous TCRs with the ability to recognize specific antigens and mediate effector functions. Thus, the method presented in this study generated TCR gene-modified T-cells that can treat multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections.

***M. tuberculosis* (Mtb), 38 kD antigen, T cell receptor (TCR), genetic modification**

doi: 10.1360/972011-711