

· 论著 ·

· 基础研究 ·

## 肿瘤新抗原肽诱导献血者PBMC特异反应性T细胞\*

杨颖 路丽明 李勤 郭忠慧 杨启修 张嘉敏 赵俸涌 王晨 朱自严

**【摘要】** 目的 观察异基因献血者来源PBMC (peripheral blood mononuclear cells) 是否可被来自于肿瘤患者测序来源的新抗原肽诱导为特异反应性T细胞。方法 取健康献血者新鲜外周血白膜层, 分离获得PBMC后, 粘附获得单核细胞, 同时冻存PBL (peripheral blood lymphocytes)。单核细胞以每三天加入细胞因子GM-CSF和IL-4进行细胞诱导培养, 7天后收获成熟DC (dendritic cells), 24孔铺板后分别装载16条肿瘤新抗原肽, 其中13条为本项目组前期研究所得, 5 h后加入4~10倍细胞数量已复苏的PBL共培养, 每三天加入IL-2, 对照为不加抗原肽(DC/PBL), 加入PHA (Phytohemagglutinin, 植物血凝素) PBL孔作为阳性对照; 第14天、第21天分别再行新抗原肽脉冲刺激, 第22天留取上清液用ELISA方法测量IFN- $\gamma$ 浓度, 剩余细胞用流式细胞仪分析CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞占比。结果 发现10/13中的每条多肽至少可诱导3份PBL分化为分泌IFN- $\gamma$ 反应性CD3<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞, 同步ELISA测得上清液中IFN- $\gamma$ 浓度也升高, 以上结果具有一定的相关性 (CD3<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞 $r$ 值分别为0.66、0.58,  $P < 0.05$ )。结论 我们成功地建立了用来自肿瘤患者的肿瘤新抗原肽诱导健康献血者的PBMC分化为肿瘤新抗原肽特异性的T细胞。

**【关键词】** 外周血单个核细胞 树突状细胞 肿瘤新抗原 反应性T细胞 过继免疫治疗

**【中图分类号】** R392 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587 (2022) -05-0565-09

**Specific Reactive T Cells from Allo-Blood Donors'PBMC Induced by Tumor Neoantigen Peptides** YANG Ying, LU Li-Ming, LI Qin, et al. Shanghai Blood Center, Shanghai 200051

**【Abstract】 Objective** To observe whether neoantigen peptides sequenced from tumor patients can induce allo-donor sourced PBMC to be specific reactive T cell. **Methods** PBMC were separated from healthy donors' buffy coat, then monocytes were collected using adhesion method, remaining PBL was kept frozen in -80°C. GM-CSF and IL-4 were added to induce monocytes into dendritic cells every three days. At Day 7 mature dendritic cells were harvested and plated in 24 well-plates, then these plates were loaded with 16 neoantigen peptides as one peptide in each well, 13/16 peptides were designed by our team. Five hours later PBLs recovered from -80°C were added into these plates to be co-cultured with these treated DC in ratio of 4~10 : 1. No peptide wells (DC only) were negative controls, and PBL only wells were prepared for adding PHA later as positive control. IL-2 was replenished in these plates every three days. Peptides were pulsed twice more at Day 14 and Day 21 respectively. Supernatant of each well was collected at Day 22 to measure IFN- $\gamma$  concentration using ELISA methods, remaining cells were analyzed using Flowcytometry to measure the percentages of CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>Tcells. **Results** 10 of 13 peptides can induce more than 3 kinds of PBL to proliferate into reactive CD3<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, similar increases were also found in IFN- $\gamma$  concentration ( $r=0.66, 0.58$  for CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> respectively,  $P < 0.05$ ) in supernatant by ELISA method. **Conclusions** Our research data demonstrate these neoantigen peptides sequenced from tumor patients can induce allo-blood donors'PBMC proliferate to neoantigen specific reactive T cells.

**【Key words】** Peripheral blood mononuclear cell Dendritic cells Tumor neoantigens Reactive T cell Adoptive immunotherapy

T细胞相关的细胞免疫治疗<sup>[1]</sup>目前已被证实可用于治疗实体肿瘤<sup>[2]</sup>和血液肿瘤<sup>[3]</sup>, 如CAR-T (chimeric antigen receptor-T) 治疗<sup>[4-7]</sup>、抗PD-1<sup>[8-9]</sup>等, 而利用肿瘤新抗原制备特异T细胞, 并加以回输也可缓解肿

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2022.05.004

\*本课题受中国输血协会威高重点 (No.CSBT-MWG-2020-01)、上海市卫健委面上项目 (No.202040503) 资助

作者单位: 200051 上海市血液中心输血研究所 (杨颖, 李勤, 郭忠慧, 杨启修, 张嘉敏, 赵俸涌, 王晨, 朱自严); 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所 (路丽明)

作者简介: 杨颖 (1967-), 女, 上海人, 研究员, 硕士, 主要从事输血、干细胞移植、细胞治疗方面研究, (E-mail) yangying@sbc.org.cn.

并列第一作者: 路丽明 (1976-), 女, 山东人, 教授、研究员, 主要从事肿瘤免疫治疗方面研究, (E-mail) lulunew@163.com.

通信作者: 杨颖, 研究员, 硕士, 主要从事输血、干细胞移植、细胞治疗方面研究。

瘤黑色素瘤生长以及胸腺瘤等<sup>[10-12]</sup>等。而以上治疗大多数基于自体T细胞的改造和加工, 受限于肿瘤患者疾病状态, 如肿瘤患者无法耐受大量采血, 或自身免疫细胞已被肿瘤负载所耗竭<sup>[13]</sup>, 可能无法进行这种治疗。针对以上问题, 本研究使用来自于健康献血者的PBMC作为制备原料, 用肿瘤患者来源的肿瘤组织, 先制备获得肿瘤细胞, 再测序获得新抗原序列, 然后人工合成这些抗原肽, 在体外利用健康献血者的PBMC在诱导DC后装载抗原肽, 进而刺激PBMC中的PBL, 使其增殖分化为针对肿瘤新抗原特异反应性T细胞<sup>[14]</sup>, 期望以上T细胞可通过细胞毒作用而起到杀瘤效果。

### 材料与方 法

**1 实验材料与仪器** 24孔COSTAR细胞培养板(批号16218055, 美国Corning公司) 96孔COSTAR细胞培养板(批号16221601, 美国Corning公司), 75cm<sup>2</sup>培养瓶(批号30420601, 美国Corning公司), 完全培养剂含RPMI1640(批号05118006, 美国Corning公司) 90%、10% FBS(批号35081002, 美国Corning公司)、青霉素10 IU/mL、10 μg/mL链霉素, 细胞置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养; GM-CSF(批号111930、011830, 工作浓度为0.1 μg/μL, 10 μL, 美国Peprotech公司); IL-4(批号

051914、041814, 工作浓度0.1 μg/μL, 10 μL, 美国Peprotech公司); IL-2(批号091912, 工作浓度40 IU/μL, 美国Peprotech公司)。RayBio human IFN-γ ELISA kit(批号: 0506220131, 0212210131, 美国RayBiotech公司); BFA/Monensin Mixture(250×, 布雷非德菌素A/莫能霉素混合物, 联科生物, 70-CS1002), BFA(批号M2294-03, AbMole中国), Ionomycin(批号5608212, 美国Biogems公司), PHA(植物血凝素, 批号SLBZ9469, 美国Sigma公司), LPS(脂多糖, 批号L4130, 美国Sigma公司), 破膜固定剂(批号GAS003/2, 联科生物); Fc block(MTG-001, 批号10, MBL公司); DNA抽提试剂(血液基因组DNA提取试剂盒, 上海天根公司); 流式抗体见表1。5% CO<sub>2</sub>培养箱(三洋MCO-18AC, 日本松下公司); 流式细胞仪(FACSVerse, 美国BD公司; CytoFLEX, 美国贝克曼库尔特公司); 化学发光仪(SpectraMax i3X, 美国Molecular Devices)。

肿瘤抗原肽(LM1-LM11, LM13-LM14)委托上海生工合成并分装为1 mg/支, 肿瘤抗原肽NSLC、NSLC-CI、NSLC-st<sup>[12]</sup>委托南京金斯瑞公司合成并分装为1 mg/支。

**2 单个核细胞(PBMC)制备及定向诱导DC细胞** 当

表1 本实验所用流式标记抗体

厂家	特异性	荧光标记	批号	克隆号
Biolegend	抗人CD80	APC	B327069	2D10
Biolegend	抗人CD86	FITC	B300566	BU63
Biolegend	抗人CD86	PE	B350125	QA20A40
Biolegend	抗人CD86	PEcy7	B267491	IT2.2
Biolegend	抗人CD83	PE	B326916	HB15e
Biolegend	抗人CD3	FITC	B328100, B300406	UCHT1
Biolegend	抗人CD8a	APC	B349151, B321328	RPA-T8
Biolegend	抗人CD49f	PE	B274785	M5E2
Biolegend	抗人IFN-γ	PE	B341849, B271621, B336564	B27
Biolegend	抗人CD137	APC	B336657	4B4-1
Biolegend	抗人CD1a	FITC	B285168	HI149
Biolegend	抗人CD14	APC	B304396	M5E2
Biolegend	抗人CD14	PE	B287099	M5E2
Biolegend	抗人CD54	FITC	B265962	HA58
Biolegend	7-ADD		B287621	
美国BD	抗人HLA-ABC	APC	8061536	
美国BD	抗人IFN-γ	BV421	1111252	4S.B3
美国BD	抗人CD137	PE	279889	
美国BD	抗人HLA-DR	FITC	7083736	
美国BD	抗人CD1c	PE	1320635	1320635
美国BD	抗人CD56	APC	7164691	

日采集的随机健康献血者富含白细胞的白膜血,用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心分离,进行细胞计数及活力测定后,用1640重悬后加入75 cm<sup>2</sup>培养瓶,于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱静置数小时,然后用1640吹打2遍后,收集不贴壁细胞,于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜,次日冻存于-80℃冰箱作为PBL;75 cm<sup>2</sup>培养瓶中剩余贴壁细胞则加入完全细胞培养剂,并加入GM-CSF、IL-4各10 μL (0.1 μg/μL),于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养,用于诱导DC,每三天进行半量换液,并加入GM-CSF、IL-4同前,Day 5加LPS; Day 6复苏PBL备用; Day 7收集DC细胞,计数并用1640调整DC细胞为0.5×10<sup>5</sup>~1×10<sup>5</sup>/mL,接种于24孔板,每孔0.5~1 mL,共20孔,4孔留待备用PBL孔,剩余的DC用流式进行DC特征分析。如果用96孔细胞板代替24孔板,则所有试剂和细胞均用原来的1/5体系,所有孔均设置复孔,操作均与24孔板相同,不再另外赘述。

**3 DC细胞装载肿瘤抗原肽并诱导淋巴细胞分化为肿瘤抗原肽特异T细胞** 在上述已分装好DC的24孔板中每孔加入一种肿瘤抗原肽10 μL (2 μg/μL)作为实验组,并设置无肽孔、单独PBL孔各4孔,分别用于基准对照组、以及备用加PHA作为阳性刺激对照组,视细胞数量,对照组复孔数可调整,一般不得少于2孔,37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育5 h,取出复苏12 h以上的PBL,调整为DC的4~10倍细胞密度,每孔加入等体积PBL,继续于37℃ CO<sub>2</sub>培养箱培养,48~72 h后加入IL-2,终浓度为20~40 IU/mL,每三天进行半量换液,并补充IL-2。Day 14加入肿瘤抗原肽,剂量同前; Day 21则用达科为无血清培养基0.5 mL重悬细胞,再加入肿瘤抗原肽,剂量同前,单独PBL孔加PHA作为阳性对照孔,37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养,16 h后加入BFA/Monensin各2 μL,或BFA (0.5 mg/mL) /Ionomycin (50 μg/mL)各2 μL,继续37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养6 h后取出,留取上清液100~200 μL/孔。

**4 肿瘤抗原肽特异T细胞反应性** 上述24孔细胞板每孔分别加入Fc block 2 μL,并各取4孔(使用单独PBL孔、无肽孔)分别用于不染、FITC、APC、PE单染,室温20 min后加入FITC-CD3/APC-CD8抗体,室温30 min,然后根据联科破膜试剂盒所示,分别进行染色固定破膜,并加入胞内染色荧光抗体PE抗IFN-γ,室温30 min后,洗涤后用于流式分析。

**5 流式细胞仪分析DC特征或T细胞反应性** 所有实验均设置无荧光标记的空白管,多色荧光标记时每一荧

光分别设置单色标记对照,必要时加上同型对照。根据不染管、单标管,调整细胞选取门和阈值,流式细胞仪(FACSVerse,美国BD公司)、至少读取10 000个细胞(Events)后记录结果;CytoFLEX至少读取5 000个细胞(Events)后记录结果。

**5.1 DC特征分析:**分几组进行流式抗体标记设置以下几种染色组合①APC-CD80、FITC-CD86、PE-CD83;②APC-HLA-I、PE-CD14、FITC-CD1a;③APC-CD123、PE-CD49f、FITC-CD86;④APC-CD56、PE-CD64、FITC-DR;组合①为必选,②~④根据DC数量,选择性选取,加入抗体孵育30 min, PBS洗涤2~3次后进行流式分析,并另取一孔进行7-ADD单独染死活细胞。

**5.2 T细胞反应性分析:**主要观察CD3<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>T细胞群占比,这些细胞代表分泌IFN-γ的反应性T细胞。

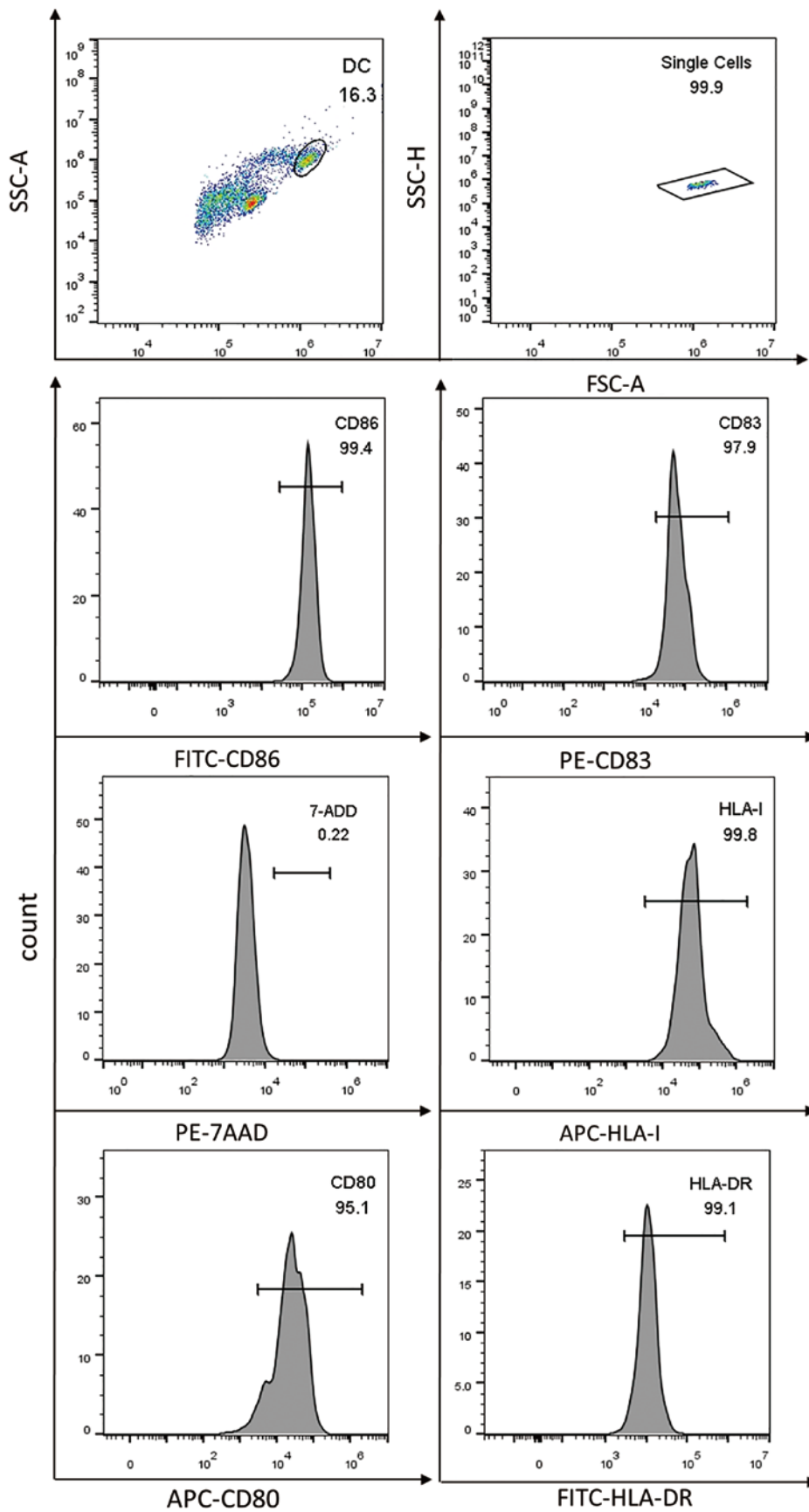
**6 ELISA法分析细胞培养板中IFN-γ含量**按照厂商说明操作,用1.3中所留取的上清液进行IFN-γ含量测定,并同步用标准品建立标准曲线,用SpectraMax i3X仪器自带软件计算得到拟合方程和拟合度,并计算出各待测样品的IFN-γ浓度。

**7 统计学处理**采用IBM SPSS Statistics 20进行相关统计分析,所有实验结论都经至少三次的独立实验证实。

## 结 果

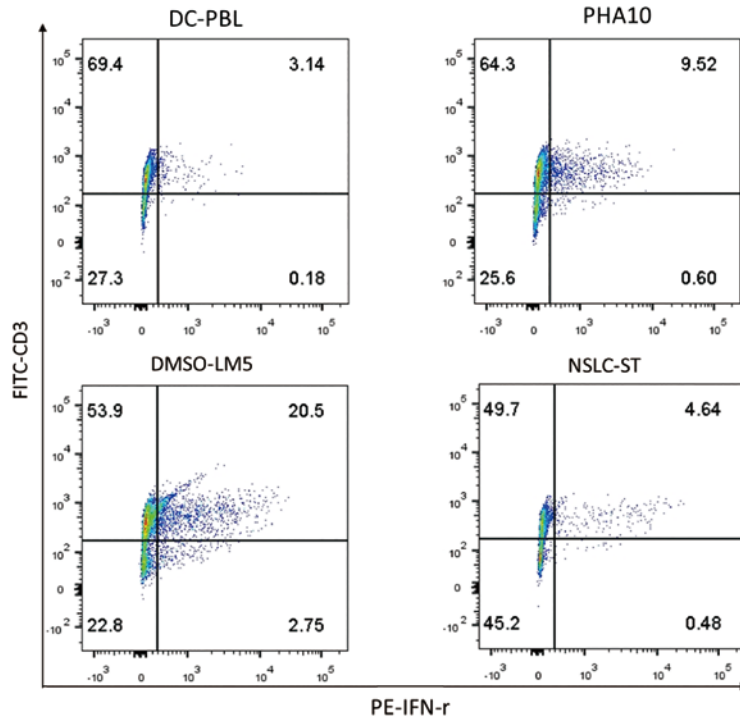
**1 DC细胞分析**可观察到本实验用PBMC诱导成熟DC,其HLA-I、HLA-DR、CD86、CD83、CD80均为高表达(图1),符合成熟DC细胞特征,DC占比不同健康个体样品具有差异,诱导率为5%~30%。除了以上标记以外,这些样品还进行了CD1a、CD3、CD14、CD16、CD49f、CD56、CD64、CD123等标记的检测,其中CD1a、CD14在不同样品中呈现出不同的阳性比例,CD49f为部分阳性,CD3、CD16、CD56、CD64、CD123基本以阴性为主。

**2 不同肿瘤抗原肽诱导的T细胞反应性**用不同肿瘤抗原肽装载DC后和PBL共培养后,我们可以观察到装载多肽LM5等多组,IFN-γ<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>的T细胞明显增多(图2 DMSO-LM5),甚至比PHA刺激阳性对照组(图2 PHA10)更明显,而显示装载多肽NSLC-ST后的分泌IFN-γ<sup>+</sup>的CD3<sup>+</sup>T细胞占比差别无明显区别。由于所有实验孔采用的起始细胞量、涉及的试剂、操作、环境均为一致的,只有装载多肽有区别,说明IFN-γ<sup>+</sup>T细胞占比不同是因加入的抗原肽不同而异。



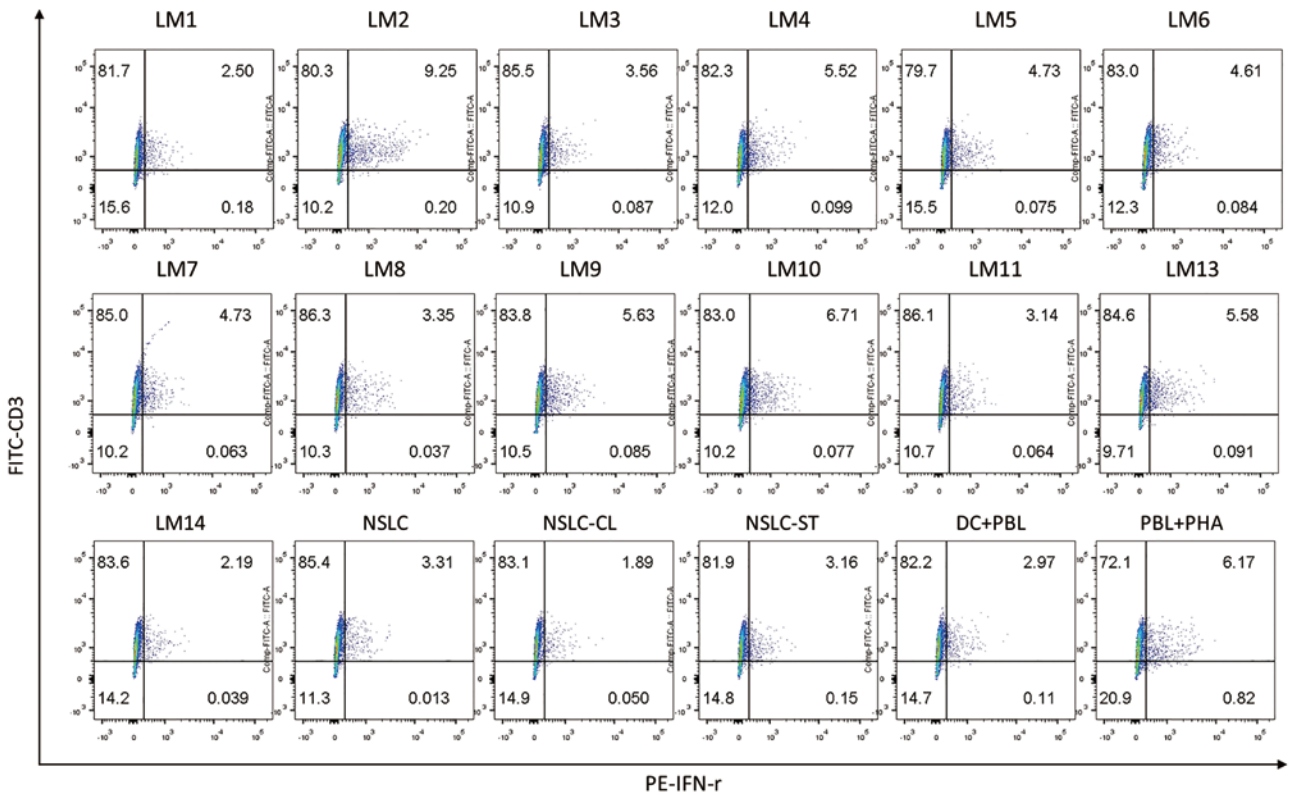
注：以上各组的阈值是根据每组中的对照而设，由于样品和不同抗体的结合能力差异，显示的阈值有所不同，如FITC-CD86和FITC-DR，虽然均为FITC标记，但FITC-DR相对较弱。

图1 献血者来源PBMC诱导培养为成熟的DC细胞



注：DC-PBL：不装载任何多肽的DC和PBL培养；PHA10：加入PHA作为刺激剂；DMSO-LM5：装载多肽LM5的DC和PBL培养；NSLC-ST：装载多肽NSLC-ST的DC和PBL培养；X轴为PE-IFN- $\gamma$ ，Y轴为FITC-CD3。可观察到LM5能引起T细胞的明显活化和应答，而ST则没有引起明显应答。CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞呈现出完全同步的类似结果，所以在此不再陈列。

图2 装载肿瘤抗原肽的DC刺激PBL诱导为分泌IFN- $\gamma$ 的T细胞

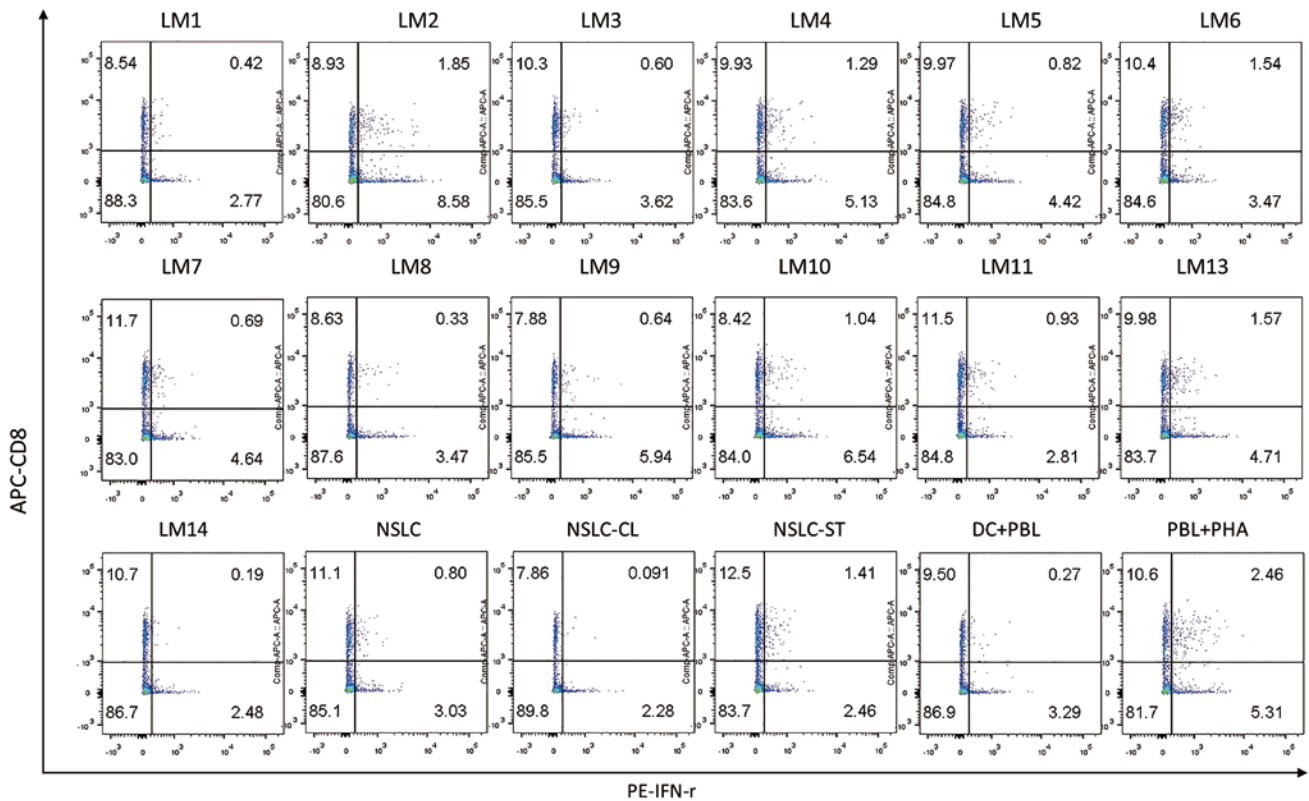


注：一般情况下，特异性T细胞反应克隆占比很低，而根据文献<sup>[15]</sup>提出的分泌效应细胞因子的比例大于无关多肽的2倍即视为具有反应性，或者是和无肽对照组进行比较<sup>[11]</sup>，本实验中最小反应性多肽-CL为1.89%，甚至低于DC无肽组2.97%，因此我们选择以DC+PBL作为基准线进行比较，可观察到大于5.94%的多肽有LM2、LM10、PHA，而LM9，LM4，M13则略小于5.94%。

图3a FITC-CD3\PE-IFN- $\gamma$ 染色后T细胞群

3 上清液IFN- $\gamma$ 的ELISA结果和CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞比较 利用上清液进行IFN- $\gamma$ 的ELISA分析,测定浓度列于表2,和流式细胞分析结

果进行比较并作了相关分析,图3a、3b是流式结果的截图,具体细胞占比也一并列于表2。



注:多肽的排列、对照品排列均同图3a, Y轴为CD8, X轴为IFN- $\gamma$ , 每组右上象限为CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞比例, 同样可观察到NSLC-CL组最低, DC-无肽组为0.27%, 大于2倍DC组的有LM2、LM13、LM6, LM14, LM10, LM11等。

图3b APC-CD8/PE-IFN- $\gamma$ 染色后的T细胞群

表2 A8样品的IFN- $\gamma$  ELISA测定浓度与IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T细胞比值的比较和相关系数

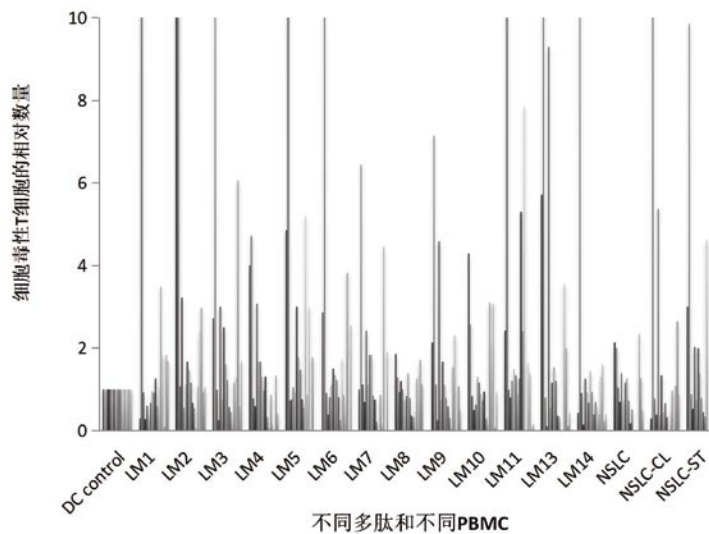
标本-多肽	IFN- $\gamma$ 浓度 (pg/mL)	CD3 <sup>+</sup> T细胞 (%)	CD8 <sup>+</sup> T细胞 (%)
A8-LM1	80.925	2.50	0.42
A8-LM2	164.599	9.25	1.85
A8-LM3	118.138	3.56	0.60
A8-LM4	132.941	5.52	1.29
A8-LM5	58.942	4.73	0.82
A8-LM6	70.072	4.61	1.54
A8-LM7	63.668	4.73	0.69
A8-LM8	40.423	3.35	0.33
A8-LM9	50.47	5.63	0.64
A8-LM10	100.896	6.71	1.04
A8-LM11	33.939	3.14	0.93
A8-LM13	96.711	5.58	1.57
A8-LM14	80.166	2.19	0.19
A8-NSLC	43.844	3.31	0.80
A8-CL	53.523	1.89	0.09
A8-ST	82.596	3.16	1.41
A8-DC*	73.822	2.97	0.27
A8- PHA+PBL**	118.138	6.17	2.46
r		0.66 <sup>Δ</sup>	0.58 <sup>ΔΔ</sup>

\*不加多肽的DC和PBL共孵育, 视为基准对照组; \*\*PBL加入PHA, 可直接刺激活化T细胞, 视为阳性;  $\Delta p=0.0031$ ;  $\Delta \Delta p=0.0124$ ; r: 相关系数。

从表2中可以看到，除阳性对照外，三组中LM2、LM4、LM10、LM13也呈现出比较一致的高IFN- $\gamma$ ，而LM3、LM6组具有部分结果升高，但并没有3组线性同比例增高，可能流式分析的是封闭在细胞内的IFN- $\gamma$ ，而上清液中IFN- $\gamma$ 浓度则是在多肽刺激后前16 h内已经分泌释放到细胞外的，上清液和细胞内标志具有时间上的不同步性，反应性高的细胞分泌快，事实上实验中设置的LM3复孔也是同样的情况。IFN- $\gamma$ 浓度和IFN- $\gamma^+$ CD3 $^+$ T细胞比值相关系数达到0.66，和IFN- $\gamma^+$ CD8T细胞比值相关系数达到0.58，为中等相关，且均具有统计学显著意义，类似相关结果在其他具有细胞反应增高的多份标本中也得到证实，

说明上清液中直接测定IFN- $\gamma$ 浓度也可作为检测细胞反应性的一种实验工具。

**4 献血者PBMC对于新抗原肽的总体反应性** 本研究发现可诱导3份或3份以上PBMC产生反应性T细胞的新抗原肽包括LM2、LM3、LM4、LM5、LM6、LM7、LM9、LM10、LM11、LM13，占10/13；但不同PBMC对应具有反应性的多肽数量差异性较大，根据文献<sup>[15]</sup>，我们也采用相同的标准：具有反应性的定义是CD8 $^+$ IFN- $\gamma^+$ T细胞或CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$ T细胞数增加超过基准对照组2倍。而部分个体具有较广泛的高反应性，超过基准组10倍，其临床或医学意义需要留待进一步探讨。



注：Y轴为多肽刺激后产生CD8 $^+$ IFN $^+$ T细胞占比和不加多肽的DC对照组的倍数，X轴每一簇柱状表示一个多肽诱导一组PBMC，不加多肽的DC对照组默认为1，超过10倍的显示为10。根据参考文献<sup>[12]</sup>合成NSLC、NSLC-CL、NSLC-ST，作为多肽合成的质控指标，不纳入统计。可看到LM2、LM3、LM4、LM5、LM6、LM7、LM9、LM10、LM11、LM13可多次诱导产生高于DC对照组2倍的IFN $^+$ CD8 $^+$ T细胞比例。

**图4** 不同多肽在不同PBMC中诱导产生细胞毒性T细胞的能力比较

### 讨 论

最近的细胞免疫治疗包括肿瘤疫苗研制等为征服肿瘤提供了曙光，尤其是CAR-T等细胞治疗产品，正式获得临床试验许可，彰显了其应用价值，但目前仅限于血液系统的肿瘤<sup>[3-6]</sup>，而实体肿瘤治疗的免疫治疗手段依然需要进一步的研究<sup>[2, 10, 15]</sup>。肿瘤临床治疗领域另一个新的热点-基于免疫检查点阻断的治疗性抗体也具有明显疗效，但仅在20%的患者人群中有效<sup>[8]</sup>，且有效性也可能因突变而不同<sup>[16]</sup>，已有实验证实可通过肿瘤新抗原作为疫苗可诱导获得抗肿瘤治疗效果<sup>[10-15, 17]</sup>，而免疫检查点阻断的治疗和肿瘤新抗原诱导T细胞抗瘤等几种联合治疗目前认为可能具有

良好效果<sup>[18]</sup>，但采集自肿瘤患者的自身细胞，可能具有免疫反应能力低下、采集量有限等缺点，其有效反应株可在病程发展中不断耗竭<sup>[1, 13, 19-20]</sup>，而从健康献血者处分离获取免疫细胞具有数量众多、可重复采集、细胞兼有多多样性，可打击肿瘤的不同抗原、可预先制备储存，以利紧急使用等优点，虽然目前没有得到共识，但考虑到本研究的实验流程所制备获取的肿瘤新抗原特异性T细胞是经过抗原肽数次定向诱导活化的，不再是免疫幼稚期，因而我们认为其中具有再次被诱导分化针对未来的同种宿主的克隆株已被大幅清除了<sup>[14, 23]</sup>，所以其诱导移植物抗宿主病的能力应该相对低下；另一方面，健康献血者来源PBMC，大

部分T细胞只有经过合适的DC诱导“教育”，才可能具备针对DC诱导提呈抗原肽的T细胞克隆<sup>[14, 23-27]</sup>。

有鉴于此，我们设计了本研究，利用肿瘤患者的肿瘤组织获取单细胞，根据单细胞测序得到的序列合成新抗原肽，再用MHC多样化的众多健康献血者来源PBMC作为实验细胞，通过诱导培养成熟DC装载新抗原肽，“教育”Naïve T细胞获得识别抗原肽的能力并活化增殖成熟，从而获得抗肿瘤抗原肽的能力。我们的实验也证实了献血者的PBMC可被诱导而产生明显的活化状态，17位献血者中的13位，他们的PBMC能使用本团队获得的新抗原肽而诱导出明显的反应性T，而13种新抗原多肽中有10种至少在3份血样中可诱导得到反应性T细胞，如LM3、LM4、LM5、LM7、LM13等，可能因为健康献血员的血样具有更高杀瘤潜力。

同时我们的实验也表明ELISA法测量IFN- $\gamma$ 浓度也是可行的，在多肽刺激后16 h进行的封闭，并不影响大部分实验样本已分泌出部分IFN- $\gamma$ ，浓度已处于可测范围内，且结果和流式细胞学分析具有一定的相关性。考虑ELISA实验的简便性和实验检材的易保存特征，IFN- $\gamma$ 浓度测定有望可增加作为细胞毒性或反应性T细胞检测辅助筛选手段之一。

我们也关注到实验过程中有些个体差异非常明显，如PHA刺激T细胞反应性，有的样品能分泌出高达2 000 pg/mL的IFN- $\gamma$ ，而同样条件下有的样品只分泌出100 pg/mL，健康献血员中这种受刺激后高表达细胞因子的倾向，有何实际意义尚不得知，是否和感染后容易产生细胞因子风暴有关或者具有更高的抵抗肿瘤发生能力，都需要进一步研究。

本研究希望能利用血液中心的特点——广泛而不间断的献血者来源，具备多样化HLA特征而且可以预先冻存等优势，为肿瘤的治疗提供新的资源和方法，使得健康献血员来源PBMC得到更有效的利用，先利用肿瘤组织获取肿瘤新抗原，进行肿瘤疫苗的“量身订做”，再从众多冻存预制的库存中筛选出符合不同病人的细胞资源，根据MHC匹配或部分匹配原则，制造出合适的抗瘤细胞，过继输注或局部注射给病人进行后续治疗，从而造福人类。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

（致谢：资金资助方：中国输血协会威高重点CSBT-MWG-2020-01；上海市卫健委面上项目202040503；东南大学免疫系沈传来教授给予的实验帮助）

## 参考文献

- [1] WALDMAN A D, FRITZ J M, LENARDO M J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(11): 651-668.
- [2] ROSENBERG S A. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(10): 577-585.
- [3] SOMMERMEYER D, HUDECEK M, KOSASIH P L, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo[J]. *Leukemia*, 2016, 30(2): 492-500.
- [4] ZAM W, ASSAAD A. Chimeric antigen receptor T-cells (CARs) in cancer treatment[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2022, 15(3): 532-546.
- [5] CHOW V A, SHADMAN M, GOPAL A K. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2018, 132(8): 777-781.
- [6] CERRANO M, RUELLA M, PERALES M A, et al. The advent of CAR T-cell therapy for lymphoproliferative neoplasms: integrating research into clinical practice[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 888.
- [7] PAPATHANASIOU M M, STAMATIS C, LAKELIN M, et al. Autologous CAR T-cell therapies supply chain: challenges and opportunities? [J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(10/11): 799-809.
- [8] RIZVI N A, MAZIÈRES J, PLANCHARD D, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(3): 257-265.
- [9] KURTULUS S, MADI A, ESCOBAR G, et al. Checkpoint blockade immunotherapy induces dynamic changes in PD-1-CD8+ tumor-infiltrating T cells[J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 181-194.e6.
- [10] COULIE P G, LEHMANN F, LETHÉ B, et al. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7976-7980.
- [11] CHEN F J, ZOU Z Y, DU J, et al. Neoantigen identification strategies enable personalized immunotherapy in refractory solid tumors[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(5): 2056-2070.
- [12] ANAGNOSTOU V, SMITH K N, FORDE P M, et al.



- Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Discov*,2017,7(3):264-276.
- [13] DAVIS L,TARDUNO A,LU Y C.Neoantigen-reactive T cells:the driving force behind successful melanoma immunotherapy[J]. *Cancers*,2021,13(23):6061.
- [14] BLASS E,OTT P A.Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2021,18(4):215-229.
- [15] CHEN Y,XUE S A,BEHBOUDI S,et al. Ex vivo PD-L1/PD-1 pathway blockade reverses dysfunction of circulating CEA-specific T cells in pancreatic cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*,2017,23(20):6178-6189.
- [16] RIZVI N A,HELLMANN M D,SNYDER A,et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Science*,2015,348(6230):124-128.
- [17] HUNTER N N,WALLEN H,CAO J H,et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1[J]. *N Engl J Med*,2008,358(25):2698-2703.
- [18] SHARMA P,ALLISON J P.Immune checkpoint targeting in cancer therapy:toward combination strategies with curative potential[J]. *Cell*,2015,161(2):205-214.
- [19] DUAN M,GOSWAMI S,SHI J Y,et al. Activated and exhausted MAIT cells foster disease progression and indicate poor outcome in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*,2019,25(11):3304-3316.
- [20] MCLANE L M,ABDEL-HAKEEM M S,WHERRY E J. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*,2019,37:457-495.
- [21] DEPIL S,DUCHATEAU P,GRUPP S A,et al. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells:development and challenges[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2020,19(3):185-199.
- [22] PEREZ C,GRUBER I,ARBER C.Off-the-shelf allogeneic T cell therapies for cancer:opportunities and challenges using naturally occurring “universal” donor T cells[J]. *Front Immunol*,2020,11:583716.
- [23] DAVEY M S,WILLCOX C R,BAKER A T,et al. Recasting human V $\delta$ 1 lymphocytes in an adaptive role[J]. *Trends Immunol*,2018,39(6):446-459.
- [24] CARRENO B M,MAGRINI V,BECKER-HAPAK M,et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells[J]. *Science*,2015,348(6236):803-808.
- [25] JENSEN K D C,SU X Q,SHIN S,et al.Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate:antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma[J]. *Immunity*,2008,29(1):90-100.
- [26] SIMONI Y,BECHT E,FEHLINGS M,et al. Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates[J]. *Nature*,2018,557(7706):575-579.
- [27] JHUNJHUNWALA S,HAMMER C,DELAMARRE L. Antigen presentation in cancer:insights into tumour immunogenicity and immune evasion[J]. *Nat Rev Cancer*,2021,21(5):298-312.

(收稿日期: 2022-08-15)

(本文编辑: 王慧茹)