

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.015

· 技术方法 ·

人源性 CD3 抗体诱导食蟹猴 T 淋巴细胞培养方法的建立

缪怡¹,董坚¹,角德灵²,宋倩¹,高嫦娥¹,赵恒²,孟小琴¹(1.昆明医科大学第三附属医院 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室,云南昆明 650118; 2.云南农业大学生物资源保护与利用重点实验室,云南昆明 650201)

[摘要] **目的:**在初步分析人、食蟹猴和猪 CD3 蛋白同源性的基础上,建立利用人源性 CD3 抗体诱导食蟹猴外周血 T 淋巴细胞的体外分离培养技术。**方法:**从 NCBI 查询获取人类、食蟹猴和猪 CD3 蛋白各自的氨基酸序列,并用 DNAMAN 软件进行序列比对、同源性分析和构建系统进化树。Western blotting 检测三种 T 细胞膜上 CD3 蛋白的表达水平。分离健康食蟹猴 PBMC,分为 3 组,A 组加入抗人 CD3 抗体单刺激、B 组加入 IL-2 单刺激、C 组加入抗人 CD3 抗体和 IL-2 共刺激。倒置显微镜下观察细胞生长状态并计数,绘制细胞生长曲线,锥虫蓝染色检测细胞活性,流式细胞术检测 T 细胞表面标志物 CD3、CD4、CD8 的表达。**结果:**食蟹猴、猪的 CD3 蛋白氨基酸序列与人类的同源性分别为 86.9%、65.6%,T 细胞膜上 CD3 蛋白的表达量分别为人的 79%、17%。A 组细胞不增殖;C 组细胞增殖能力、细胞活性及 CD3 表达率[(93.8±3.6)% vs (70.3±4.7)% , $P<0.01$]均显著高于 B 组,细胞生长曲线呈 S 形,符合 Logistic 生长曲线;C 组 T 细胞高表达 CD3,T 细胞纯度较高,且 CD8⁺T 细胞占比较多。**结论:**食蟹猴外周血 T 淋巴细胞膜表面能表达和人同源性很高的 CD3 蛋白,在人源性 CD3 抗体、IL-2 和 1%PHA 共刺激下能诱导食蟹猴外周血 T 淋巴细胞的增殖分化,获得生长状态良好、增殖能力强、纯度较高的 T 淋巴细胞。

[关键词] 同源性; 抗人 CD3 抗体; T 淋巴细胞; 食蟹猴; 诱导培养

[中图分类号] R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0407-07

Establishment of a method for culturing cynomolgus T lymphocytes induced by human CD3Ab

MIAO Yi¹, DONG Jian¹, JIAO Deling², SONG Qian¹, GAO Change¹, ZHAO Heng², MENG Xiaoqin¹(1. Cell Biological Medicine Integrated Engineering Laboratory of State and Regions in Yunnan Province, Third Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for *in vitro* isolation and culture of T lymphocytes from peripheral blood of cynomolgus monkeys that induced by human CD3 antibody based on the foundation of protein homology of CD3 from human, cynomolgus monkey and porcine. **Methods:** The amino acid sequences of human, cynomolgus monkeys and porcine CD3 proteins were obtained from NCBI, and the sequence, homology and phylogenetic tree were analyzed by DNAMAN software. Western blotting was used to detect the expression of CD3 protein on T cell membranes from the three species. PBMCs of healthy cynomolgus were isolated and divided into three groups: group A was stimulated with anti-human CD3Ab alone, group B was stimulated with IL-2 alone, and group C was co-stimulated with human CD3Ab and IL-2. Cell morphology and growth status were observed under inverted microscope and the cell growth curve was plotted. Cell viability was detected by trypan blue staining and the expressions of CD3, CD4 and CD8 on T cell surface were detected by flow cytometry. **Results:** The homology of the amino acid sequence of human CD3 protein to cynomolgus monkey and porcine were 86.9% and 65.6% respectively. The expression levels of CD3 protein on cynomolgus and porcine T cell membrane were 79% and 17% contrast to human, respectively. Cells of group A did not proliferate. Proliferation, viability and CD3 expression [(93.8±3.6)% vs (70.3±4.7)% , $P<0.01$] in T cells of group C were significantly higher than those in group B. Growth curve of T cells in group C showed an S-shape, which is consistent with Logistic growth curve. T cells in group C exhibited high purity and ex-

[基金项目] 云南省科技计划项目重大项目资助(No.2016FC007);云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室资助(No.2015DG034)。Project supported by the Key Foundation of Science and Technology Program in Yunnan Province (No.2016FC007), and the Yunnan Key Laboratory of Cell Therapy Technology Translational Medicine (No.2015DG034)

[作者简介] 缪怡(1991-),女,硕士,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究,E-mail: 605223269@qq.com

[通信作者] 董坚(DONG Jian, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究,E-mail:dongjian18@yahoo.com

pressed high level CD3; moreover, the CD8⁺T cell took a high proportion. **Conclusion:** The membrane of T lymphocytes from peripheral blood of cynomolgus can express CD3 protein that highly homologous to human. Co-stimulation of human CD3Ab, IL-2 and 1% PHA can induce the proliferation and differentiation of T lymphocytes of cynomolgus, and obtain T lymphocytes with good growth status, high proliferation ability and high purity.

[Key words] homology; anti-human CD3Ab; T lymphocyte; cynomolgus monkey; induced culture

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 407-413. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.015]

近年来,随着细胞治疗的飞速发展,越来越多的证据表明经体外活化或基因修饰的T细胞能在体内特异性杀伤肿瘤细胞^[1-3]。如FDA已批准嵌合抗原受体T细胞疗法(CAR-T)KTE-19(商品名为Yescarta)^[4]用于既往接受二线或多线系统治疗的复发性或难治性大B细胞淋巴瘤(large B cell lymphoma, LBCL)成人患者的治疗, PD-1/PD-L1成为新的肿瘤治疗靶点而备受瞩目。目前, FDA批准了施贵宝PD-1抑制剂nivolumab(商品名为Opdivo)治疗黑色素瘤^[5-8]。但利用抗体进行治疗存在相应的问题,如价格昂贵、作用时间短、不易联合使用等。针对上述问题,黄行许等^[9]研究发现,利用一种新开发出来的基因编辑技术CRISPR/Cas9直接敲除T细胞上的*PD-1*基因阻断PD-1/PD-L1信号通路,能够上调IFN- γ 的表达并增强T细胞的细胞毒性。但这种基因修饰的T细胞能否直接应用于临床,其安全性还存在争议,相关问题亟待进一步研究。

为了选择一种理想的实验动物来探讨基因修饰的T细胞在肿瘤免疫治疗方面的安全性问题,研究^[10-12]发现食蟹猴在亲缘关系上与人类最接近,与其他动物比较,其生理、病理的研究结果,对人类疾病的医学研究有着更为重要的参考意义,目前食蟹猴已逐渐成为科学研究中使用较多的一种灵长类实验动物。虽然食蟹猴外周血T细胞具有较好的模型意义,但猴源性抗体来源困难、成本高、不易开发、难以获得。本研究拟探索建立利用人源性CD3抗体诱导食蟹猴外周血T淋巴细胞的体外分离培养技术,以期作为T细胞免疫治疗的研究和应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

猴血样本由云南英茂公司小哨实验动物基地提供。流式细胞仪(FACS Calibur)购自美国BD公司,高速离心机购自美国Thermo公司,倒置显微镜购自日本尼康公司;猴外周血淋巴细胞分离液(TBD)购自天津灏洋公司,细胞膜蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、苯甲基磺酰氟(PMSF)均购自碧云天公司,植物血凝素(PHA)购自泽浩公司,胎牛血清购自BI公司,RPMI-1640培养液(复方电解质溶液)购自百特公司,人源性CD3抗体Percp-CD3抗体、FITC-CD4抗体、PE-CD8抗体均购自BD公司。

1.2 CD3蛋白氨基酸序列分析

从NCBI查询获得人类、食蟹猴和猪CD3蛋白相应的氨基酸序列,利用DNAMAN中的Multiple和Alignment软件进行氨基酸组成分析、同源性分析和构建分子进化树。

1.3 分离健康人、食蟹猴、猪的PBMC并抽提细胞膜蛋白

无菌操作抽取健康人、食蟹猴、猪新鲜外周血各15 ml,用PBS将血液样本按1:1稀释,将稀释后的血液样本按1:1缓慢加于分离液的上层,室温下离心,400×g离心25 min,弃上层血浆,小心吸取白膜层至另一15 ml离心管中,加入10 ml PBS清洗细胞,洗涤2次,弃上清,收集细胞。

取 2×10^7 个细胞,用冰浴预冷的PBS洗涤(4℃、600×g离心5 min),弃上清,再次离心1 min,尽量吸尽残留液体,加入膜蛋白抽提试剂A(确保临用前添加了1 mmol/L PMSF)1 ml,充分悬浮细胞,冰浴放置10~15 min。将上述样品在液氮和室温依次反复冻融2~3次,取少量溶液于镜下观察细胞破裂达70%以上即可。4℃、700×g离心10 min,吸取上清至一新的EP管,4℃、14 000×g离心30 min,尽量吸尽上清,加入膜蛋白抽提试剂B 200 μ l,最高速剧烈涡旋5秒重悬沉淀,冰浴5~10 min,重复涡旋和冰浴1~2次,4℃、14 000×g离心5 min,吸取上清转移至另一EP管中,紫外分光光度法测定蛋白含量,-80℃保存待用。

1.4 Western blotting检测健康人、食蟹猴、猪PBMC膜蛋白中CD3的表达

将提取的细胞膜蛋白经SDS-PAGE、转膜后,室温封闭120 min,加入1:1 000稀释的人源CD3抗体,4℃封闭过夜,洗膜后加二抗稀释液室温孵育2 h,洗膜3次,加入曝光液进行显影,拍照,PVDF膜避光保存。采用Image-ProPlus软件分析条带灰度,进行半定量比较分析,并且均采用自身灰度值校正,以目的蛋白的条带灰度与内参Na-K ATPase的灰度比值表示蛋白的表达水平。

1.5 食蟹猴T细胞的诱导培养

经Ficoll密度梯度离心法分离获得食蟹猴PBMC,分为3组,每组均加入1%PHA 2 μ l/ml, A组用人源CD3抗体(终浓度100 ng/ml)10 μ l/ml单刺激, B组用IL-2(终浓度1 000 U/ml)10 μ l/ml单刺激,

C组用人源CD3抗体(终浓度100 ng/ml)10 μl/ml和IL-2(终浓度1 000 U/ml)10 μl/ml共刺激。对照组采用等量的人PBMC,加入相同浓度的人源CD3抗体和IL-2共刺激,于培养第4、7、10、13、16、19、22、25、28天计数细胞,每组计数3次,计算均值。以培养时间为横轴(*t*/d),细胞总数为纵轴,绘制T细胞的生长曲线,观察细胞生长周期。

1.6 锥虫蓝染色检测食蟹猴T细胞的活率

每组分别于培养第1、7、14、21、28天取10 μl细胞原液和10 μl 0.4%锥虫蓝溶液混匀,染色3 min,倒置显微镜下观察着色细胞数,计算细胞总数和检测细胞活率。细胞活率=未染色的细胞数/观察的细胞总数×100%

1.7 流式细胞术检测食蟹猴T细胞表面分子标志的表达

于培养第14天离心收集细胞,PBS清洗后,取1×10⁶

个细胞分别加入Percp标记的CD3抗体,FITC标记的CD4抗体和PE标记的CD4抗体各5 μl,混匀后,室温避光孵育30 min,用流式细胞仪检测各分子的表达。

1.8 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用*t*检验,以*P*<0.05或*P*<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食蟹猴T细胞膜上CD3蛋白的氨基酸序列与人类同源性最高

将查询获得的所有氨基酸序列运用DNAMAN软件进行序列比对,分析结果(图1、表1)显示,人类CD3蛋白的氨基酸序列与食蟹猴、猪的同源性分别为86.9%、65.6%。

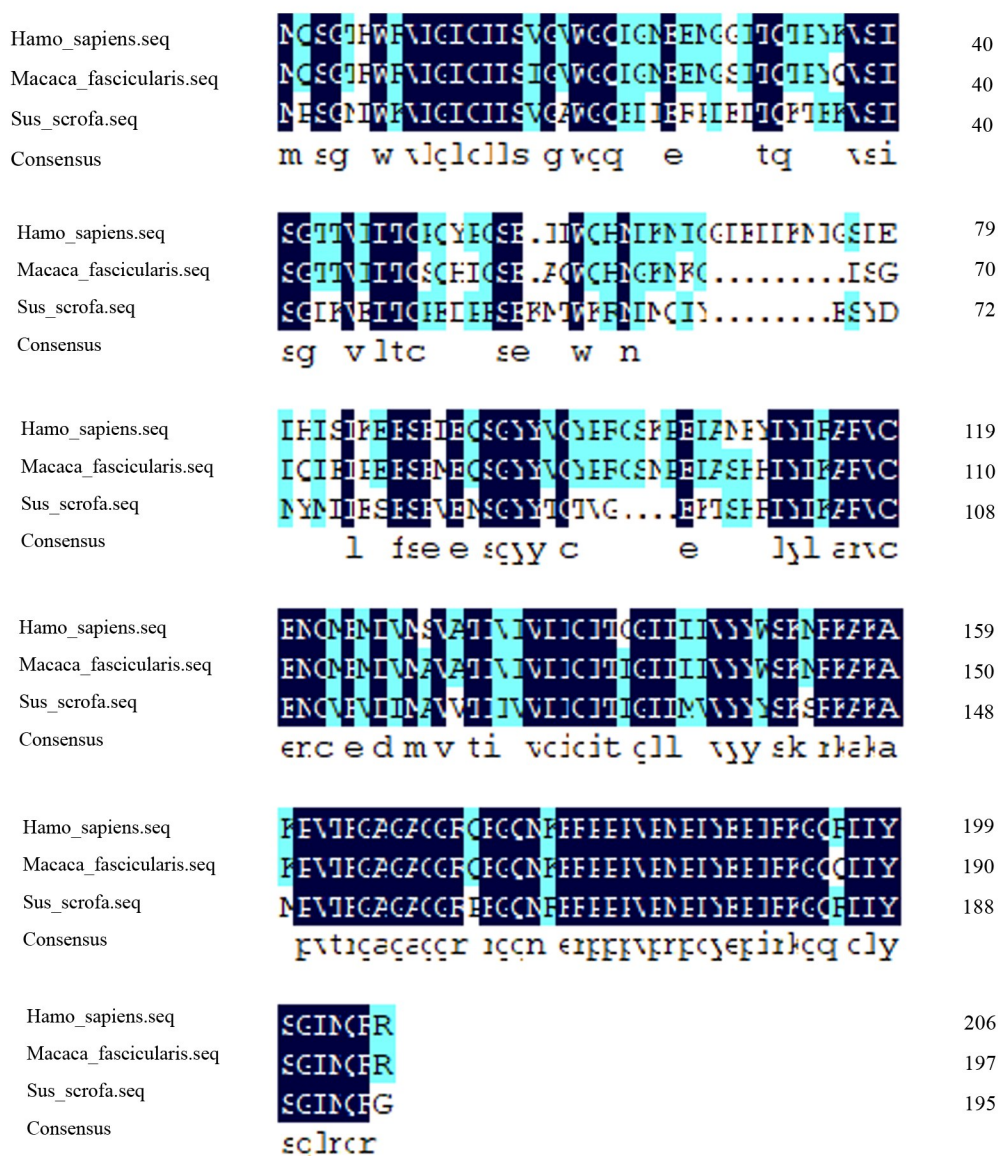


图1 人、食蟹猴和猪T细胞膜上CD3蛋白氨基酸序列的比对

Fig.1 Alignment results of amino acid sequence of CD3 protein on T cytomembrane from human, cynomolgus monkey and porcine

表1 人与食蟹猴、猪T细胞膜上CD3蛋白的氨基酸序列同源性比对(%)

Tab.1 Comparison of amino acid sequence homology of CD3 protein on T cell membrane from human, cynomolgus monkey and porcine (%)

Species	Homo sapiens	Cynomolgus	Sus scrofa
Homo sapiens	100		
Cynomolgus	86.9	100	
Sus scrofa	65.6	64.4	100

人类与食蟹猴、猪基于CD3蛋白氨基酸序列的系统进化树分析结果(图2)显示,在进化上人类与食蟹猴存在较近的亲缘关系,猪次之。

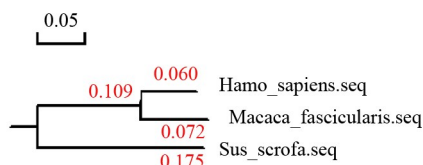


图2 基于CD3蛋白氨基酸序列构建的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on CD3 protein amino acid sequence

2.2 食蟹猴T细胞膜表面CD3蛋白表达较高

Western blotting 检测结果(图3)显示,3种细胞膜CD3蛋白的蛋白区带都位于相对分子质量25 000处,内参照Na-K ATPase反应条带位于相对分子质量110 000处,与预期结果相同,且人的条带较粗、着色深,食蟹猴的次之,猪的最弱。半定量分析结果显示:食蟹猴、猪T细胞膜上CD3蛋白的表达量分别为人的79%、17%。食蟹猴外周血T淋巴细胞膜表面能表达和人同源性很高的CD3蛋白。

2.3 食蟹猴外周血T细胞不同培养时期的形态

刚接种的PBMC呈悬浮状生长,圆形、体积小、数量多、折光性强。镜下观察细胞形态(图4)发现,加入细胞因子后,A组(CD3)细胞不增殖,细胞数量逐渐减少,细胞呈圆形,体积较小,折光性弱,培养第14天,细胞死亡。B组(IL-2)细胞于培养第3天形成集落,但数量较少,且随着培养天数的增加,细胞集落变化不大,培养第7天,细胞由圆形向分叶形分化,折光性较弱。C组(CD3+IL-2)细胞于培养第3天形成集落,随着培养天数的增加,细胞集落逐渐增多变大,培养第5天,彼此靠近的集落完全融合,连接成片,可进行传代培养。培养第7天,细胞由圆形向分叶形分化,细胞数量多,折光性强。

2.4 人源CD3抗体与IL-2共刺激利于食蟹猴T细胞体外存活

分别于培养第1、7、14、21、28天,采用锥虫蓝拒染法检测细胞活率(图5)。A组分别为98.0%、86.0%、第14天细胞死亡;C组细胞活率高于B组且均在98%以上,与人的T细胞活率曲线基本重合,且于培养第14天细胞活性最好。

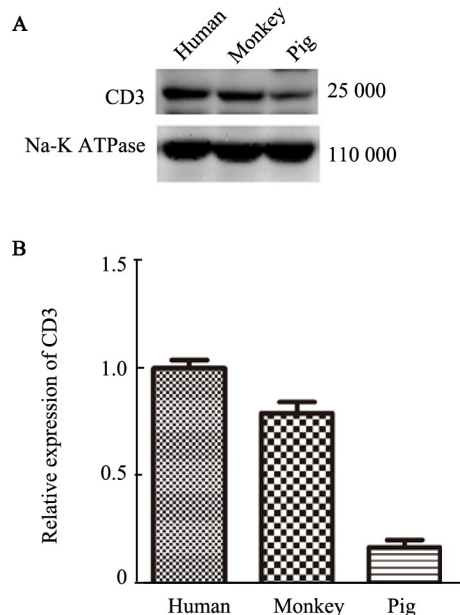
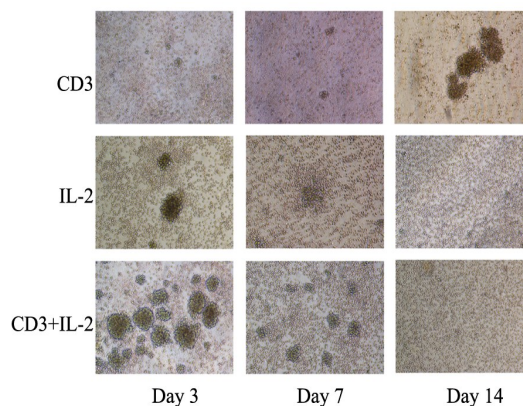


图3 食蟹猴T细胞膜表面CD3蛋白表达水平较高
Fig.3 Relatively higher expression level of CD3 protein on cynomolgus monkey T cell membrane



A: CD3 single stimulation group; B: IL-2 single stimulation group; C: CD3 + IL-2 costimulation group

图4 食蟹猴外周血T细胞不同培养条件和时间下的形态(x100)
Fig.4 Morphology of T cells in cynomolgus peripheral blood at different culture conditions and stages(x100)

2.5 人源CD3抗体与IL-2共刺激利于食蟹猴T细胞体外增殖

A组(CD3)细胞不增殖,细胞数量逐渐减少,于培养第14天死亡;B组(IL-2)细胞接种第1至10天,细胞增殖缓慢,增殖峰值在第25天,细胞数量少;C

组(CD3+IL-2)细胞生长曲线呈S形,与人T细胞生长趋势一致,符合Logistic的生长曲线。接种第1至5天,细胞增殖缓慢,之后为快速增殖期,增殖峰值在第23天,随后进入了平台期。

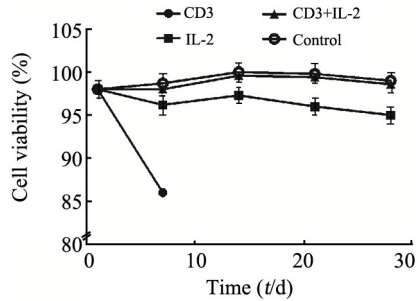


图5 人源CD3抗体与IL-2共刺激利于食蟹猴T细胞体外存活
Fig.5 Human CD3 antibody and IL-2 co-stimulation was beneficial to the survive of cynomolgus monkey T cells

2.6 人源CD3抗体与IL-2共刺激促进食蟹猴T细胞表达典型T细胞表面标志

流式细胞仪检测结果(图7)显示CD3的表达率,C组(CD3+IL-2)细胞显著高于未刺激组[(93.8±3.6)% vs (69.8±5.3)% , $P<0.01$],而B组(IL-2)与未刺激组之

间无明显差异[(70.3±4.7)% vs (69.8±5.3)% , $P>0.05$]. CD4、CD8的表达率,B组(IL-2)分别为(32.7±4.1)%、(59.5±3.8)%。CD4、CD8的表达率,C组(CD3+IL-2)分别为(25.7±4.3)%、(66.2±2.7)%。CD3+IL-2共刺激培养所得T细胞高表达CD3, T细胞纯度较高,且CD8⁺T细胞所占比例较多。

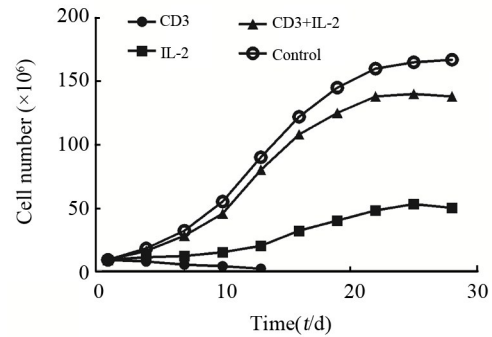
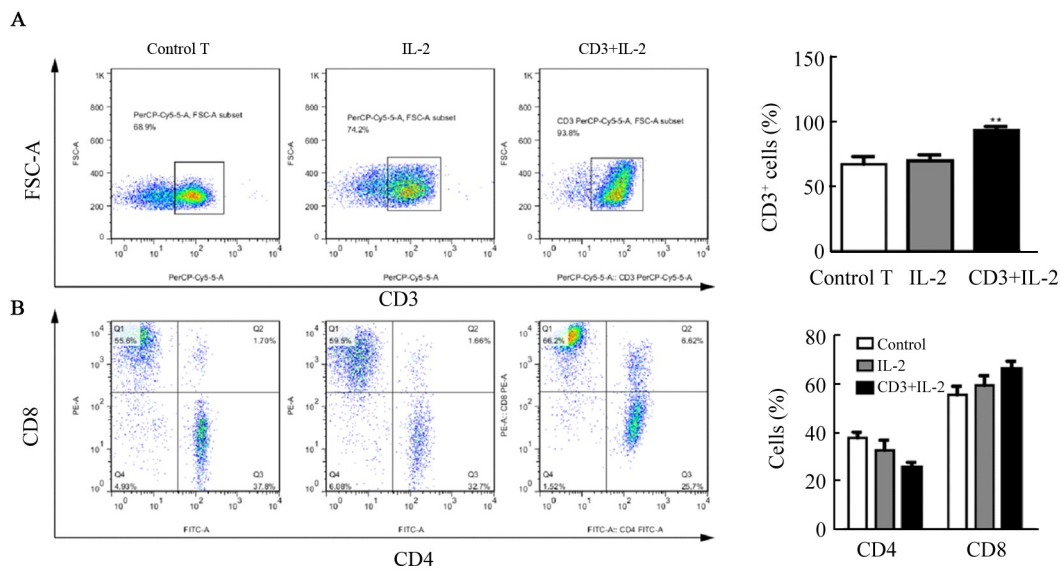


图6 人源CD3抗体与IL-2共刺激利于食蟹猴T细胞体外增殖
Fig.6 Human CD3 antibody and IL-2 co-stimulation was beneficial to the proliferation of cynomolgus monkey T cells



** $P<0.01$ vs Control group

图7 人源CD3抗体与IL-2共刺激诱导食蟹猴T细胞高表达CD3和CD8分子
Fig.7 Cynomolgus monkey T cells induced by human CD3 antibody and IL-2 co-stimulation expressed high levels of CD3 and CD8

3 讨论

T淋巴细胞是重要的免疫细胞,成熟的T细胞经血流分布至外周免疫器官的胸腺依赖区定居,并可经淋巴管、外周血和组织液等进行再循环,在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的免疫作用。沈锋等^[13]用

IFN- γ 、TNF- α 诱导肝癌细胞并与T细胞共同培养,辅以CD28单抗共刺激,诱导产生的TS-CTL具有较高肝癌杀伤活性及特异性。GUCKEL等^[14]在T细胞中加入由B7.1(CD80)基因转染胸腺癌和卵巢癌细胞制备而成的肿瘤疫苗,再加入IL-12促进T细胞的增殖,增加T细胞的免疫活性,回输入人体后取得了一定的

疗效。由于T细胞在肿瘤免疫治疗中发挥着重要作用,本研究对人和食蟹猴、猪T细胞膜表面CD3蛋白同源性进行了初步分析,发现就T细胞膜上CD3蛋白氨基酸序列而言,食蟹猴与人类的同源性较高,其CD3蛋白的表达量约为人的79%,而猪的仅为人的17%,这为开展人类疾病模型及T细胞功能研究对理想实验动物的选择提供了依据。食蟹猴生物学特性与人类极其相似,用它建立的T细胞模型更能揭示人类疾病的发生发展规律,同时为治疗药物的疗效检验和安全性评估提供可靠的保证。

然而,猴源性抗体难以获得,不易开发。本研究建立了利用人源性CD3抗体诱导食蟹猴外周血T淋巴细胞的体外分离培养技术,首先采用Ficoll密度梯度离心法分离获得食蟹猴PBMC, PBMC包括淋巴细胞(T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞和DC。根据细胞生长的不同特性,DC刺激因子为GM-CSF、IL-4^[15-17], B细胞刺激因子为IL-4、IgM抗体等^[18], NK细胞刺激因子为IL-2、IL-15等^[19]。GILLIS等^[20]用含IL-2的培养基长期培养,优先刺激NK细胞和T细胞族。加入植物凝集素(PHA)和IL-2可以刺激T细胞分裂,IL-2又称为T细胞生长因子,可维持T细胞在体外长期生长并建立T细胞克隆^[21-22]。本研究在分离获得的食蟹猴PBMC中加入人源CD3抗体、IL-2,再加入1%PHA 2 μl/ml于37℃,5%CO₂温箱中培养,培养第3天开始形成大量T细胞集落,培养第5天,彼此靠近的集落完全融合,连接成片,可进行传代培养。培养第7天,细胞由圆形向分叶形分化,细胞数量多,折光性强。证明在人源CD3抗体、IL-2和1%PHA共刺激下能诱导食蟹猴外周血T淋巴细胞的增殖分化,获得生长状态良好、增殖能力强的T淋巴细胞。

为了解食蟹猴外周血T淋巴细胞的生长特点,本研究绘制了生长曲线,结果提示体外诱导培养的食蟹猴外周血T淋巴细胞生长曲线呈S形,其生长周期为28 d,与人的T细胞体外生长周期一致,其生长速度会随着体外培养时间的增加而减慢,其部分的增殖性会逐渐丧失。

T细胞表面可表达多种免疫分子,对于T细胞的鉴定一般采用检测细胞表面分子标志物的方法,CD3代表总T细胞,它可表达于所有成熟T细胞表面。根据CD4和CD8分子表达,可将成熟T细胞分为CD4⁺CD8⁻或CD4⁺CD8⁺细胞;CD4代表T辅助细胞(Th),CD8代表T抑制细胞(Ts),CD4和CD8是区分成熟T细胞亚群的主要表面标志。本研究通过流式细胞术鉴定T细胞的表面分子标志物,结果提示,在诱导得到的食蟹猴T细胞纯度较高,且CD8⁺T细胞占比较

多。因此,可用人源性CD3抗体来诱导食蟹猴T细胞的增殖分化,建立食蟹猴外周血T细胞的免疫治疗模型。

综上,本研究对人、食蟹猴和猪CD3蛋白同源性进行了初步分析,选择表达与人类同源性较高的T细胞膜表面CD3分子的食蟹猴T细胞,并建立了利用人源性CD3抗体和IL-2共刺激诱导食蟹猴外周血T淋巴细胞的体外分离培养技术,获得了生长状态良好、增殖能力强且与人的T细胞体外生长周期一致的较高纯度CD8⁺T淋巴细胞,为T细胞免疫治疗中T细胞模型的选择和应用提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] LABORDA E, MAZAGOVA M. Development of a chimeric antigen receptor targeting C-type lectin-like molecule-1 for human acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Res*, 2017, 18(11): 926-937. DOI: 10.3390/ijms18112259.
- [2] FISHER T S, HOOPER A T. A CD3-bispecific molecule targeting P-cadherin demonstrates T cell-mediated regression of established solid tumors in mice[J]. *Tumour Biol*, 2017, 32(5): 2071-2081. DOI: 10.1007/s00262-017-2081-0.
- [3] HOUOT R, SCHULTZ L M. T-cell-based immunotherapy: adoptive cell transfer and checkpoint inhibition[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(10): 1115-1122. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0190.
- [4] MORROW T. Novartis's Kymriah: harnessing immune system comes with worry about reining in costs[J]. *Manag Care*, 2017, 26(10): 28-30.
- [5] HAWKES E A, GRIGG A, CHONG G. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5): 234-245. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70103-8.
- [6] RIGO V, EMIONITE L, DAGA A, et al. Combined immunotherapy with anti-PDL-1/PD-1 and anti-CD4 antibodies cures syngeneic disseminated neuroblastoma[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 140-149. DOI: 10.1038/s41598-017-14417-6.
- [7] CHOWDHURY P S, CHAMOTO K, HONJO T. Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: A new era in cancer immunotherapy[J]. *J Intern Med*, 2016, 10(2): 428-435. DOI: 10.1111/joim.12708.
- [8] ELLESTAD K K, LIN J, BOON L, et al. PD-1 Controls Tonic signaling and lymphopenia-induced proliferation of T lymphocytes[J]. *Front Immunol*, 2017, 32(8): 1278-1289. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01289.
- [9] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 70(7): 402-415. DOI: 10.1038/srep20070.
- [10] VONS C, BEAUDOIN S, HELMY N, et al. First description of the surgical anatomy of the cynomolgus monkey liver[J]. *Am J Primatol*, 2009, 71(5): 400-408. DOI: 10.1002/ajp.20667.
- [11] LIU A, XIE S, SUN H, et al. Myotoxicity of gemfibzilat in cynomolgus monkey model and its relationship to pharmacokinetic properties[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(3): 287-295. DOI: 10.1016/j.taap.2008.12.015.

- [12] 单廷, 张景斌, 曲林林, 等. 人源化CD52单克隆抗体诱导食蟹猴动物模型的建立[J]. 肠外与肠内营养, 2011, 18(2): 102-105.
- [13] 沈锋, 王皓, 谢天培, 等. 肝癌特异性细胞毒T淋巴细胞的实验及临床研究[J]. 中华外科杂志, 1997, 35(2): 95-99.
- [14] GUCKEL B, MEYER G C, RUDY W, et al. Interleukin-12 requires initial CD80 mediated T-cell activation to support immune responses toward human breast and ovarian carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 1999, 6(3): 228-237. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700050.
- [15] RALPH M. Steinman. dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science[J]. *Immunity*, 2008, 19(3): 136 -139.
- [16] 钮洪艳, 王晓丽, 席雪芹. 肺癌患者与健康人体外培养 DC 细胞的比较[J]. 现代肿瘤学, 2016, 24(11): 1709-1711.
- [17] 叶双樱, 陈礼平, 武蓉珍. 体外诱导培养健康成人外周血单核细胞源树突状细胞及鉴定[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(12): 734-742.
- [18] SUN F, LADHA S S, YANG L, et al. Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis[J]. *Muscle Nerve*, 2014, 35(4): 22-31. DOI: 10.1002/mus.23951.
- [19] COLLINS S M, BAKAN C E, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC[J]. *Immunother*, 2013, 62(12): 1841-1849. DOI: 10.1007/s00262-013-1493-8.
- [20] GILLS S, WASTON J. Interleukin-2 dependent culture of cytolytic T cell lines[J]. *Immunol Rev*, 2000, 117(54): 81-109.
- [21] CONDOTTA S A, RICHER M J. The immune battlefield: The impact of inflammatory cytokines on CD8⁺ T-cell immunity[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(10): e1006618[2018-01-25]. <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006618>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006618.
- [22] 谭政, 龚非力. T 细胞功能亚群[J]. 生命科学, 2010, 22 (6) :499-505.

[收稿日期] 2017-11-29

[修回日期] 2018-02-09

[本文编辑] 黄静怡