

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.011

· 技术方法 ·

## 靶向CD7抗原的嵌合共刺激受体修饰的 $\gamma\delta$ T细胞的制备方法及初步功能鉴定

汪敏<sup>1</sup>, 张萍<sup>1</sup>, 游凤涛<sup>2</sup>, 许汉英<sup>1</sup>, 杨林<sup>1,2</sup> [1. 博生吉安科细胞技术有限公司, 技术中心, 安徽 合肥 230088; 2. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 新药研究院, 江苏 苏州 215000]

**[摘要]** **目的:** 探讨构建靶向CD7抗原的嵌合共刺激受体(CCR)并制备该受体修饰的健康供者来源 $\gamma\delta$  T细胞, 以评估其对急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)的体内与体外杀伤作用。 **方法:** 构建携带CD7-DAP10-CCR的慢病毒载体, 并转导健康人外周血 $\gamma\delta$  T细胞, 制备靶向CD7抗原的CCR  $\gamma\delta$  T细胞(CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T), 所获细胞借助表达CD64、CD86和CD137L的人工抗原提呈细胞(aAPC)进行体外扩增。采用Annexin V/7-AAD方法检测CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T对T-ALL细胞(Jurkat)、CD7缺陷型Jurkat细胞(CD7<sup>-</sup> Jurkat)及异体健康人原代 $\alpha\beta$  T细胞的体外杀伤作用, 共设置了3组效靶比(E:T = 1:1、1:3和1:10), 孵育时间为18~24 h。其中, Jurkat细胞作为CD7阳性靶细胞, CD7<sup>-</sup> Jurkat作为CD7阴性靶细胞以验证杀伤特异性, 而异体健康人原代 $\alpha\beta$  T细胞则作为CD7阳性正常细胞对照, 用于评估CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞的脱靶效应。此外, 在T-ALL荷瘤免疫缺陷小鼠体内验证药效, 通过定期对荷瘤免疫缺陷小鼠进行活体成像、体质量检测及生存期观察, 评估CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞在荷瘤免疫缺陷小鼠体内的药效。 **结果:** 成功利用aAPC体外制备出CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞, 其平均扩增倍数超过10 000倍。体外杀伤实验表明, 该细胞对T-ALL细胞具有较高的杀伤能力( $P < 0.01$ ), 对Jurkat细胞具有较高的毒性( $P < 0.01$ ), 对CD7<sup>-</sup> Jurkat细胞杀伤作用有限, 而对高表达CD7的正常原代 $\alpha\beta$  T细胞基本无杀伤作用; 荷瘤免疫缺陷小鼠体内药效试验结果显示, 相对于对照PBS组, 经CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞治疗后, 荷瘤免疫缺陷小鼠的生存期显著延长( $P < 0.01$ )。 **结论:** 体外借助aAPC能成功制备CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞, 并且CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞在体外、小鼠体内均对T-ALL细胞具有较强的杀伤作用, 表明CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞具备对T-ALL的治疗潜力。

**[关键词]** 急性T淋巴细胞白血病;  $\gamma\delta$  T细胞; 人工抗原提呈细胞; CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞; 嵌合共刺激受体; Jurkat细胞; K562细胞

**[中图分类号]** R730.51; R945; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 11-1181-07

## Preparation method and preliminary functional characterization of chimeric costimulatory receptor-modified $\gamma\delta$ T cells targeting the CD7 antigen

WANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>1</sup>, YOU Fengtao<sup>2</sup>, XU Hanying<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1,2</sup> (1. Technology Center, PersonGen. Anke Cellular Therapeutics Co., Ltd, Hefei 230088, Anhui, China; 2. Innovative Drug Research Institute, PersonGen BioTherapeutics [Suzhou] Co., Ltd, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a chimeric costimulatory receptor (CCR) targeting the CD7 antigen and prepare CCR-modified  $\gamma\delta$  T cells from healthy donors for the evaluation of its *in vitro* and *in vivo* cytotoxic effects against T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells. **Methods:** Lentiviral vectors carrying CD7-DAP10-CCR were constructed and  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood of healthy individuals were transduced to prepare CCR  $\gamma\delta$  T cells targeting the CD7 antigen (CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T). The obtained cells were expanded *in vitro* using artificial antigen-presenting cells (aAPC) expressing CD64, CD86, and CD137L. The *in vitro* cytotoxic effects of CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells against T-ALL cells (Jurkat), CD7-deficient Jurkat cells (CD7<sup>-</sup> Jurkat), and healthy donor primary  $\alpha\beta$  T cells were detected using the Annexin V/7-AAD assay. The experiment was performed at three effector-to-target (E:T) ratios (1:1, 1:3, and 1:10), with Jurkat cells as CD7 positive target cells, CD7<sup>-</sup> Jurkat cells as CD7 negative target cells to verify the killing specificity, and healthy donor primary  $\alpha\beta$  T cells as CD7 positive normal control cells to evaluate the off-target effects of CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells. The incubation time was 18-24 h. Furthermore, the *in vivo* efficacy was evaluated in an immunodeficient mouse model bearing T-ALL xenografts. *In vivo* imaging of tumor-bearing immunodeficient mice was regularly conducted, their body

**[基金项目]** 国家生物药技术创新中心“揭榜挂帅”技术攻关项目(No.NCTIB2023XB01003); 安徽省科技重大专项项目(No.202203a07020030); 安徽省重点研究与开发计划项目(No.2023s07020010); 苏州市科技计划项目(No.SYG2024066)

**[作者简介]** 汪敏(1988—), 女, 博士, 工程师, 主要从事细胞治疗相关研究

**[通信作者]** 杨林(扫码获取作者通信方式)



weight and length of survival monitored to evaluate *in vivo* efficacy of CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells in tumor-bearing immunodeficient mice. **Results:** CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells were successfully prepared *in vitro* using aAPC, achieving an average expansion fold exceeding 10 000. *In vitro* cytotoxicity assays demonstrated that these cells exhibited significantly high killing activity against T-ALL cells and significantly high toxicity against Jurkat cells ( $P < 0.01$ ), while showing limited cytotoxicity against CD7<sup>-</sup> Jurkat cells and negligible effects on normal primary CD7-high  $\alpha\beta$  T cells. *In vivo* efficacy experiment on tumor-bearing immunodeficient mice indicated that treatment with CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells resulted in a significant prolongation of survival compared with the PBS control group. **Conclusion:** CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells can be successfully generated *in vitro* using aAPC. CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells demonstrate strong cytotoxicity against T-ALL cells both *in vitro* and *in vivo*, which suggests therapeutic potential of CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cells against T-ALL cells.

**[Key words]** T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL);  $\gamma\delta$  T cell; artificial antigen presenting cell (aAPC); CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T cell; chimeric costimulatory receptor (CCR); Jurkat cell; K562 cell

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(11): 1181-1187. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.011]

急性 T 淋巴细胞白血病 (T-lineage acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 是一种起源于未成熟 T 细胞的侵袭性血液系统恶性肿瘤, 其临床表现包括纵隔胸腺肿块和中枢神经系统脑膜浸润<sup>[1]</sup>, 预后较差<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>发现, CD34<sup>+</sup> CD7<sup>+</sup> 白血病干细胞在 T-ALL 中发挥关键作用, 使 CD7 成为潜在的治疗靶点。 $\gamma\delta$  T 细胞由  $\gamma$  链和  $\delta$  链组成, 表达一种独特的 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞受体 (TCR)<sup>[4-5]</sup>, 具有 MHC 非限制性的肿瘤杀伤能力和良好的异体应用安全性<sup>[6-7]</sup>, 被视为连接天然免疫与适应性免疫的“桥梁”<sup>[6-7]</sup>, 在肿瘤免疫治疗中展示出重要潜力<sup>[8]</sup>。NKG2D 是表达于  $\gamma\delta$  T 细胞等效淋巴细胞上的先天免疫受体, 该受体本身无信号域, 其功能依赖衔接蛋白 DAP10 传递共刺激信号<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10-11]</sup>显示, NKG2D 既可协同 TCR 激活  $\gamma\delta$  T 细胞, 也可独立介导其活化。由于健康细胞几乎不表达 NKG2D 配体<sup>[12]</sup>, 该通路可在识别肿瘤细胞时提供特异性激活信号。基于此, 本研究设计了一种靶向 CD7 的嵌合共刺激受体 (chimeric costimulatory receptor, CCR) $\gamma\delta$  T 细胞, 将 CD7 识别结构与共刺激结构共表达于  $\gamma\delta$  T 细胞, 使第一信号由 TCR 提供、第二信号由 CCR 提供, 以分离 TCR 信号和共刺激信号, 实现更精准的肿瘤特异性激活, 为克服 CAR-T 疗法的脱靶毒性与制备限制提供新的免疫治疗策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞及主要试剂

研究用 6~8 周龄、体质量 (20  $\pm$  2) g 的 NPG (NOD.CgPrkdc<sup>scid</sup>12rg<sup>tm1</sup>/Vst) 雌性重度免疫缺陷小鼠, 购自维通达 (苏州) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK (苏) 2024-0010SCXK。小鼠饲养于苏州大得生物科技有限公司, 实验动物使用许可证号为 SYXK (自苏) 2022-009, 动物实验经查士利华伦理审查委员会审批 (审批号: P202406210001)。饲养地点与伦理委员会隶属机构签署有合作协议。T-ALL 细胞 (Jurkat) 和人白血病细胞 (K562) 购自

ATCC, RPMI 1640 和 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司, 加强型 NK 细胞无血清培养基购自天津灏洋生物公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 Cellmax 公司,  $\gamma\delta$  TCR-VioBlue 抗体、 $\gamma\delta 1$  TCR-PE 抗体、 $\gamma\delta 2$  TCR-APC 抗体、CD3/CD28 磁珠、Anti-TCR $\gamma/\delta$  MicroBead Kit, human 阳选试剂盒购自美天旎生物技术有限公司, OKT3 抗体购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司, CD3-PE 抗体、CD7-APC 抗体、IgG1-APC 同型抗体、CD64-APC 抗体、CD86-APC 抗体、CD137L-APC 抗体和 7-AAD-PerCP 染料购自 BD 公司, AhCD7-APC 抗体购自爱康得公司, Annexin V/7-AAD 杀伤试剂盒购自联科生物公司, 慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 购自优宝生物公司。

### 1.2 细胞培养

Jurkat、CD7<sup>-</sup> Jurkat 和 K562 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养, 健康人外周血  $\gamma\delta$  T 细胞和  $\alpha\beta$  T 细胞培养在加强型 NK 细胞无血清培养基中培养, HEK293T 细胞在 DMEM 培养基中培养。所有细胞均在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。

### 1.3 CD7-DAP10-CCR 的构建

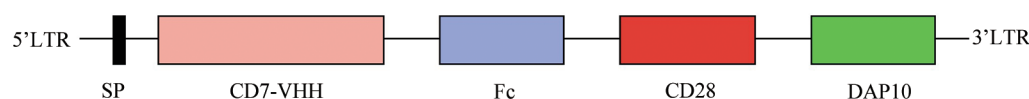
将特定的纳米抗体 CD7-VHH 序列<sup>[13]</sup>整合到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 中, 载体结构 (图 1) 依次为 GM-CSF receptor 信号肽序列—(CD7-VHH)—人 Fc 片段—DAP10-CCR 序列, 前后酶切位点依次是 Xba I 和 Not I。重组载体经 Sanger 测序平台验证正确后用于后续实验。分子克隆引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 正向引物序列为 5'-CAGATCGCC TGGAGACGCCATCCAC-3', 反向引物序列为 5'-CAACATAGTTAAGAATACCAGTCA-3'。

### 1.4 基于 K562 细胞构建 aAPC

以 K562 细胞为基础, 通过慢病毒转导及单克隆筛选, 构建稳定共表达 CD64、CD86、CD137L 和 GFP 的人工抗原提呈细胞 (artificial antigen presenting cell, aAPC), 并建立细胞库。同时, 对该细胞进行全面鉴定, 包括短串联重复序列 (short tandem repeat,

STR)分析确认其身份唯一性,以及支原体qPCR检测(包括入库检测与月度监测)确保其未受支原体污染。制备时,复苏细胞并进行体外扩增,随后使用10 Gy(Co-60源,剂量率为2.04 Gy/min)辐照处理,辐

照后的细胞在2~8℃条件下,按照每 $1 \times 10^6$ 个细胞添加1  $\mu$ g OKT3抗体的比例混匀,孵育50 min,最终经洗涤、分装后冻存备用。



LTR: long terminal repeat(长末端重复序列); SP: signal peptide(信号肽); VHH: variable heavy chain of heavy-chain antibody(骆驼源重链可变区/纳米抗体); DAP10: DNAX activation protein of 10 kDa(DNAX活化蛋白)。

图1 CD7-DAP10-CCR结构示意图

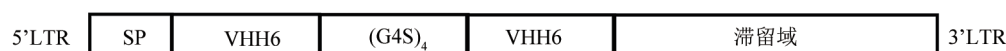
### 1.5 制备慢病毒并转导 $\gamma\delta$ T细胞

慢病毒制备过程参照本团队过往已发表的方法<sup>[14]</sup>操作。将健康人外周血与无菌PBS以1:1混合,缓慢加入装有淋巴细胞分离液的离心管中(混合物:分离液=2:1),1 200  $\times g$ 离心10 min,收集PBMC。随后,经Anti-TCR $\gamma/\delta$  MicroBeads Kit分选获得纯度 $\geq 60\%$ 的 $\gamma\delta$ T细胞。将其以 $1 \times 10^6$ 个/孔的密度接种于24孔板中,终体积为500  $\mu$ L,并按 $1 \times 10^8$ 个/mL的比例加入10  $\mu$ L抗CD3/CD28磁珠激活48 h。激活后,换用超速离心(70 000  $\times g$ , 90 min)浓缩15倍的病毒上清于培养箱(5% CO<sub>2</sub>, 37℃)中静置转导24 h(MOI=5)。转导后的细胞在IL-2(200 IU/mL)、IL-15(20 ng/mL)及IL-21(30 ng/mL)的加强型NK细胞无血清培

养基中培养22 d,期间于第0、7和14天分别加入2:1比例的aAPC进行扩增。最终收获的细胞需满足: $\gamma\delta$ T细胞数 $\geq 1 \times 10^9$ 个,细胞活率 $\geq 80\%$ ,CD7-CCR阳性率 $\geq 20\%$ 。

### 1.6 慢病毒阻断法构建CD7<sup>-</sup>Jurkat细胞模型

使用CD7阻断慢病毒(PA007CD,其结构如图2所示),转导Jurkat细胞,病毒MOI为1,转导条件为在5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中静置转导48 h,使得Jurkat细胞表达的CD7被阻断在内质网或高尔基体中无法提呈到细胞表面。转染后,继续培养细胞至状态稳定,收集细胞并与anti-human CD7-APC抗体在避光条件下孵育30 min。随后,通过APC荧光流式分选收集未染上抗体的CD7<sup>-</sup>细胞并扩增。



(G4S)<sub>4</sub>: (glycine-glycine-glycine-serine) repeat, 4 times(甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸四重复序列); ER: endoplasmic reticulum(内质网)。

图2 PA007CD慢病毒结构示意图

### 1.7 流式细胞术表征工程化 $\gamma\delta$ T细胞、靶细胞及aAPC表型

收集 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个待测细胞,离心弃上清,然后用pH7.4的PBS洗涤1次,与相应的荧光抗体于室温避光共孵育12 min。其中,实验使用5  $\mu$ L CD3-PE、2  $\mu$ L TCR $\gamma\delta$ -VioBlue及1  $\mu$ L AhCD7-APC对 $\gamma\delta$ T细胞及CD7-DAP10-CCR转导的 $\gamma\delta$ T细胞进行染色,并以未转导的 $\gamma\delta$ T细胞作为同型对照,通过流式细胞术检测CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>AhCD7<sup>+</sup>(CAR<sup>+</sup>)的细胞比例以评估转导效率;Jurkat和CD7-Jurkat细胞分别经2  $\mu$ L CD7-APC及其同型抗体IgG1-APC染色,以验证CD7表达缺失,从而为后续细胞毒性实验明确靶细胞性质;aAPC分别与2  $\mu$ L CD64-APC、CD86-APC及CD137L-APC单独孵育,以检测其表面分子的表达情况。所有细胞染色后,均经PBS洗涤两次,以100  $\mu$ L

PBS重悬。随后,加入2  $\mu$ L 7-AAD-PerCP于室温避光孵育3~5 min,以标记并排除死细胞。最终使用流式细胞仪检测细胞表面蛋白表达率,各实验均独立重复3次。

### 1.8 Annexin V/7-AAD染色法评估CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞对T-ALL细胞的体外细胞毒性

采用Annexin V/7-AAD双染色法评估CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞对T-ALL细胞的体外杀伤活性。实验设置了3组效靶比(E:T=1:1、1:3和1:10),分别取适量的Jurkat、CD7<sup>-</sup>Jurkat和异体健康人原代 $\alpha\beta$ T细胞。其中,Jurkat细胞作为CD7阳性靶细胞对照,CD7<sup>-</sup>Jurkat作为CD7阴性靶细胞对照以验证杀伤特异性,而异体健康人原代 $\alpha\beta$ T细胞则作为CD7阳性正常细胞对照,用于评估CAR-T细胞的脱靶效应。3种细胞经CFSE染色后以 $3 \times 10^5$ 个/孔的密度



接种于48孔板,再按不同效靶比加入转染CD7-DAP10-CCR的 $\gamma\delta$  T细胞,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中孵育18~24 h。随后,使用PBS清洗两次,将细胞沉淀与Annexin V-APC及7-AAD-PerCP常温避光共孵育12 min。最后,采用流式细胞仪检测FITC、APC与PerCP通道的荧光信号。靶细胞死亡率(即杀伤比例)定义为7-AAD<sup>+</sup> Annexin V<sup>-</sup>、7-AAD-Annexin V<sup>+</sup>及7-AAD<sup>+</sup> Annexin V<sup>+</sup>3个区域的细胞比例之和。

### 1.9 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞治疗T-ALL免疫缺陷小鼠检验体内抗肿瘤效应

在第0天通过尾静脉向每只免疫缺陷小鼠接种 $1 \times 10^6$ 个携带萤光素酶-GFP (Luci-GFP)的CCRF-CEM细胞。第3天根据小鼠体质量采用Grouping软件进行随机分组(各组平均体质量之间无统计学差异),其中5只输注 $1.2 \times 10^7$ 个CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞,另外5只输注等体积的PBS,小鼠每周进行2次进行活体成像、体质量与生存期监测,观察期为4周。伦理终点:小鼠体质量下降超过20%以及小鼠状态出现呼吸困难或者无自主活动等严重的临床症状对其进行安乐死。实验设计如图3所示。

### 1.10 统计学处理

流式细胞术及Annexin V/7-AAD双染色法检测各实验均独立重复3次,小鼠体内抗肿瘤实验则进行

1次(每组 $n=5$ )。采用GraphPad Prism 5和SPSS 23.0软件对实验数据进行统计学分析并作图,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间差异比较采用One-way ANOVA。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

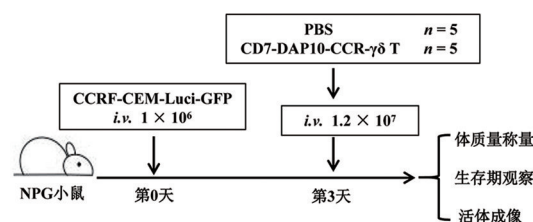
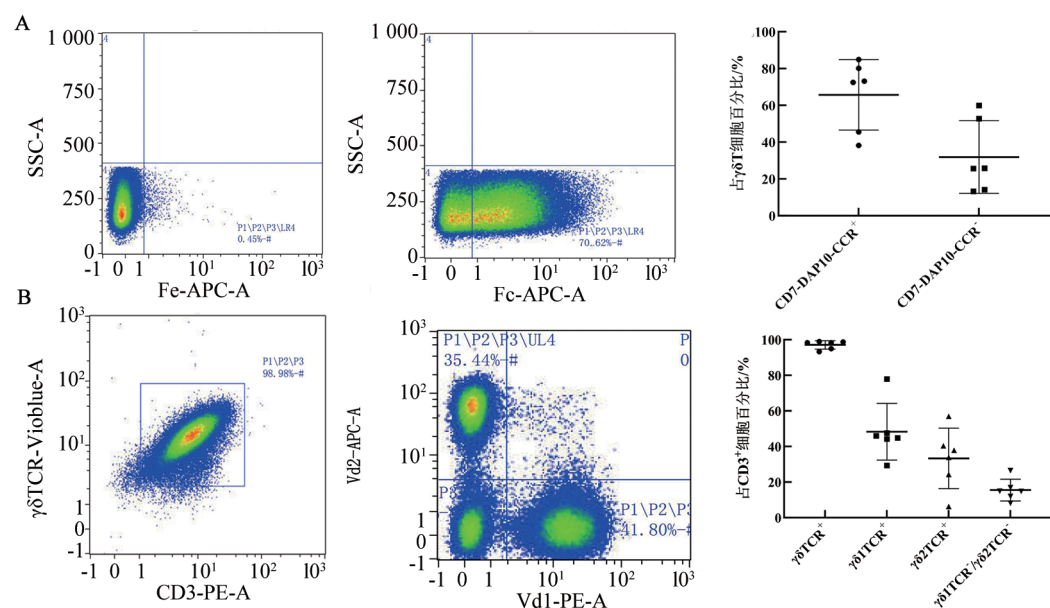


图3 荷瘤小鼠体内试验设计示意图

## 2 结果

### 2.1 成功构建CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞

转染后流式细胞术检测结果(图4A)显示, $\gamma\delta$  T细胞中CD7-DAP10-CCR的阳性率为30%~90%( $n=6$ )。CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞表型鉴定检测结果(图4B)显示, $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>淋巴细胞比例为 $(97.08 \pm 2.35)\%$ 。其中, $\gamma\delta 1$  TCR<sup>+</sup>亚群所占比例为 $(48.28 \pm 15.92)\%$ , $\gamma\delta 2$  TCR<sup>+</sup>亚群所占比例为 $(33.28 \pm 16.97)\%$ , $\gamma\delta 1$  TCR<sup>-</sup>/ $\gamma\delta 2$  TCR<sup>-</sup>亚群所占比例为 $(15.51 \pm 6.15)\%$ 。



A: CD7-DAP10-CCR 阳性率( $n=6$ ); B: CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞表型百分比( $n=6$ )。

图4 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞的构建

### 2.2 aAPC细胞表面的CD64、CD86、CD137L及GFP呈高表达

流式细胞术检测结果(图5)显示,aAPC表面的CD64、CD86、CD137L及GFP的阳性率分别为

99.99%、97.38%、99.97%与93.65%。

### 2.3 CD7<sup>-</sup> Jurkat细胞表面CD7抗原表达显著降低

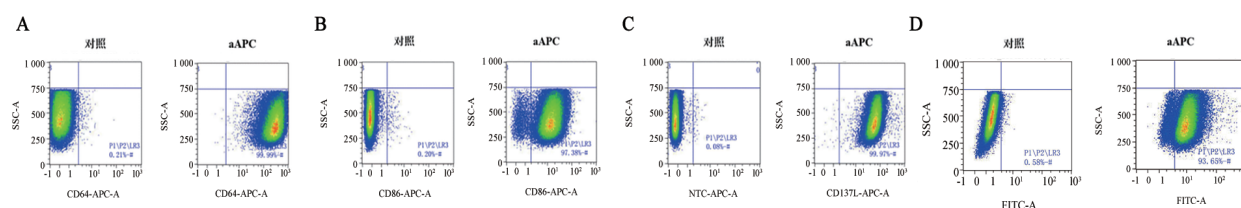
流式细胞术检测结果(图6)显示,在正常(未经处理)的Jurkat细胞中,CD7抗原表达率高达98.55%;

经单克隆化筛选后,CD7<sup>-</sup> Jurkat细胞表面CD7抗原表达率为0.01%,基本不表达。

## 2.4 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞在体外可实现高倍扩增

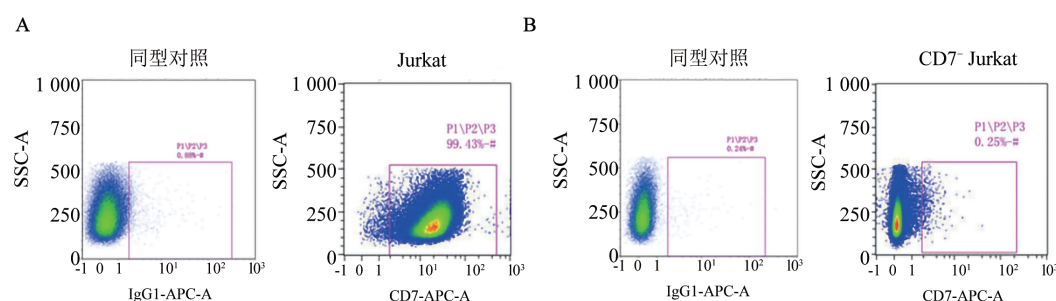
总 $\gamma\delta$  T细胞、 $\gamma\delta 1$  TCR<sup>+</sup>、 $\gamma\delta 2$  TCR<sup>+</sup>及 $\gamma\delta 1$  TCR<sup>-</sup>/ $\gamma\delta 2$

TCR<sup>-</sup>亚群的扩增结果(图7)显示培养第0天,以 $5.0 \times 10^5$ 个细胞起始,培养至第22天, $\gamma\delta$  T细胞平均扩增倍数超过 $1.0 \times 10^4$ 倍, $\gamma\delta$  T细胞为 $(6.9 \pm 1.6) \times 10^9$ 个,CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞数为 $(4.5 \pm 1.3) \times 10^9$ 个。



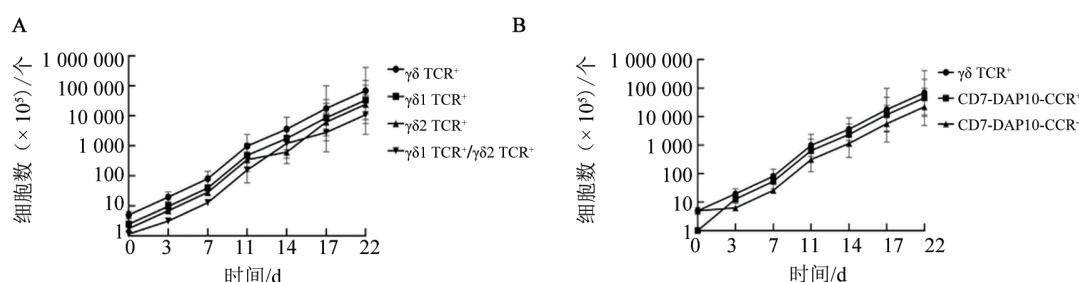
A:CD64阳性率;B:CD86阳性率;C:CD137L阳性率;D:GFP阳性率。

图5 aAPC细胞构建情况分析



A: Jurkat细胞;B: CD7 Jurkat细胞。

图6 肿瘤细胞表面CD7抗原的表达率



A:培养过程中,总 $\gamma\delta$  T、 $\gamma\delta 1$  TCR<sup>+</sup>、 $\gamma\delta 2$  TCR<sup>+</sup>和 $\gamma\delta 1$  TCR<sup>-</sup>/ $\gamma\delta 2$  TCR<sup>-</sup>细胞数统计( $n=4$ );B:培养过程中,总 $\gamma\delta$  T、CD7-DAP10-CCR<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T和CD7-DAP10-CCR<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T细胞数统计( $n=4$ )。

图7 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞的扩增

## 2.5 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞对CD7阳性T-ALL细胞具有特异性细胞毒性

Annexin V/7-AAD检测结果(图8)显示,CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞对Jurkat具有较强的杀伤作用,效靶比为1:1时杀伤效率超过80%(已达杀伤饱和)(图8A)。相比之下,其对CD7<sup>-</sup> Jurkat的杀伤效率在不同供体之间存在差异(效靶比为1:1时,杀伤效率为20%~80%,图8B),与Jurkat相比,整体显著降低,而对CD7高表达的原代 $\alpha\beta$  T细胞则几乎未观察到细胞毒性(图8C)。

## 2.6 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$ T细胞显著抑制T-ALL荷

瘤小鼠的肿瘤负荷

活体成像监测结果(图9)显示,接受CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞治疗的小鼠,其肿瘤荧光信号在第8、12和16天均显著低于对照组( $P < 0.001$ ,图9A、B)。同时,治疗有效缓解了荷瘤小鼠的体质量下降(图9C),并显著延长了其生存期( $P < 0.01$ ,图9D)。

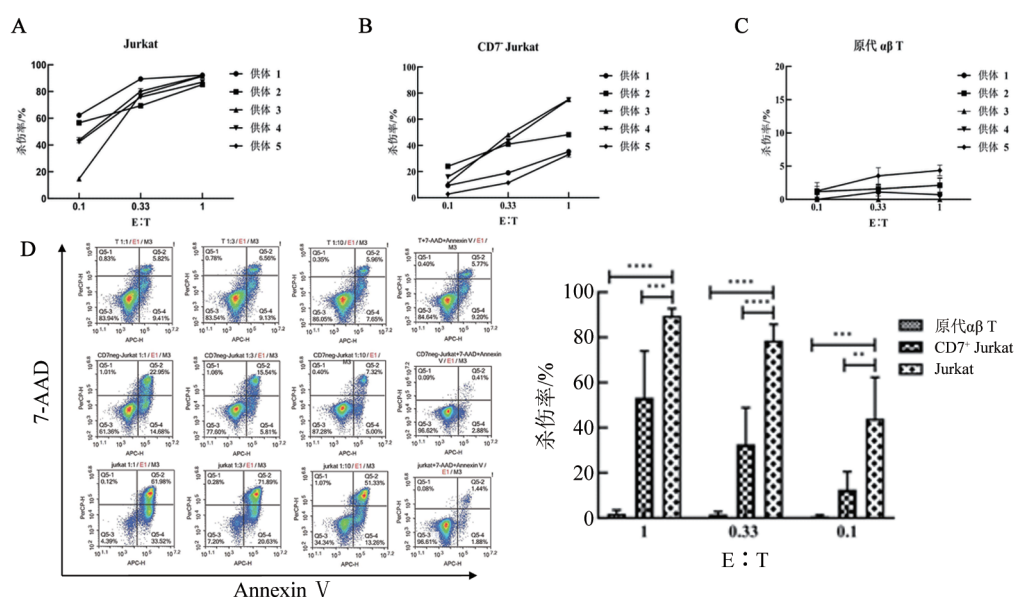
## 3 讨论

当前,自体CAR-T细胞治疗在B细胞血液淋巴系统恶性肿瘤领域已获得广泛认可,但其在T细胞恶性肿瘤领域的应用进展缓慢。一个关键障碍在于,多数T细

胞肿瘤相关抗原(如CD5抗原、CD7抗原)同样在正常的T细胞表面表达。因此,在利用患者自身T细胞制备此类靶点的自体CAR-T细胞时,面临细胞间发生“自相残杀”<sup>[2]</sup>和肿瘤细胞污染的双重挑战。

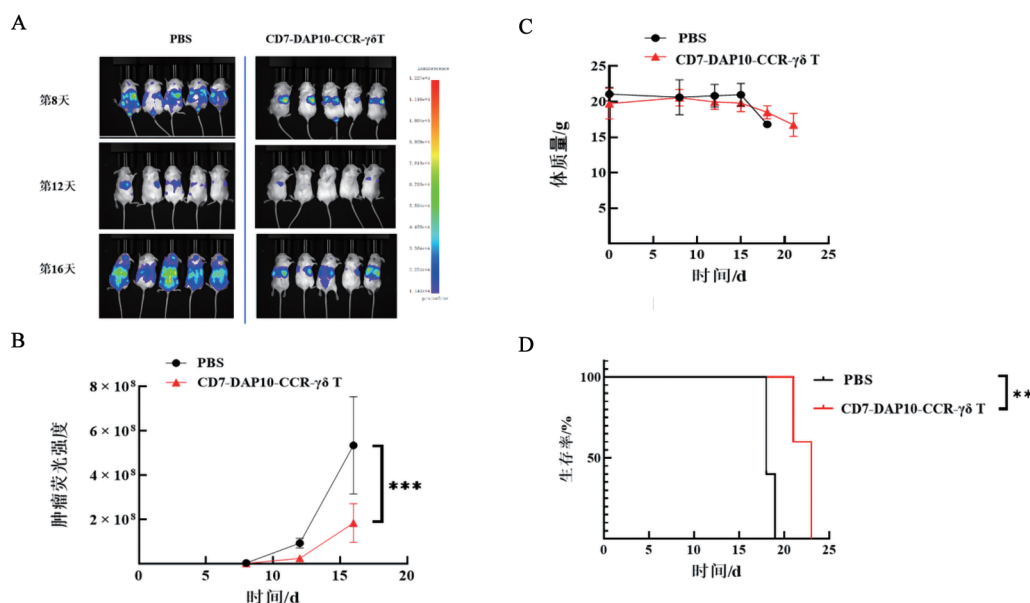
针对上述问题,本研究提出了一种基于健康供者来源 $\gamma\delta$  T细胞的现货型CAR-T细胞制备策略,从源头上规避了肿瘤细胞污染风险。与传统自体CAR- $\alpha\beta$  T细胞相比,该策略具有多重潜在优势:它不仅摆脱了对患者自身T细胞的依赖,有望缩短等待时间并降低个性化制备的成本,还规避了由CAR分子内的CD3  $\zeta$ 信号域引发的抗原非依赖性强直信号。

这种强直信号会伴随细胞增殖导致T细胞耗竭和功能衰退<sup>[1]</sup>。而 $\gamma\delta$  T细胞通过其自身的 $\gamma\delta$  TCR识别肿瘤时,可提供内源性的CD3  $\zeta$ 激活信号<sup>[11]</sup>。因此,本研究摒弃了CD3  $\zeta$ 信号,转而采用来自NKG2D信号通路的DAP10-CCR作为共刺激元件。研究<sup>[11]</sup>表明,与携带CD28或糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(glucocorticoid-induced TNFR-related protein, GITR)共刺激域的T细胞相比,DAP10-CCR能够显著提升 $\gamma\delta$  T细胞的增殖能力、促进TNF- $\alpha$ 等细胞因子分泌,并强化其细胞毒性功能,同时减轻强直信号诱导的耗竭。



A: CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞杀伤Jurkat效率; B: CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞杀伤CD7+ Jurkat效率; C: CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞杀伤原代 $\alpha\beta$  T效率; D: CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞对靶细胞的杀伤效率统计。\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

图8 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞对靶细胞的杀伤情况



A: 荷瘤小鼠活体成像; B: 荷瘤小鼠荧光强度统计; C: 荷瘤小鼠体质量统计; D: 荷瘤小鼠生存期统计。\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图9 CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞治疗T-ALL免疫缺陷小鼠情况



在作用机制方面,当CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞识别CD7阳性的肿瘤细胞时,DAP10-CCR提供的共刺激信号可与 $\gamma\delta$  TCR的内源性CD3  $\zeta$ 信号协同作用,发挥靶向抗肿瘤功效。而对于同样表达CD7的正常T细胞,由于缺乏 $\gamma\delta$  TCR的激活信号及相应的NKG2D-DAP10配体,该细胞不产生靶向杀伤,从而在机制上降低了强直信号激活与脱靶毒性风险,显示出良好的安全性。

当然,本研究也存在一定的局限性。首先,由于难以获取临床患者的原代T-ALL细胞,该疗法未能在体内外模型中评估其对患者来源的效力和安全性,这是未来临床转化前必须解决的关键问题。其次,由于DAP10-CCR必须依赖TCR + CCR双信号才能完全激活,其激活强度与持久性可能弱于CD28或4-1BB等传统共刺激域,长期疗效需进一步验证。此外,不同供体来源的CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞对CD7<sup>-</sup> Jurkat细胞的杀伤效率差异显著(E:T = 1:1时,20%~80%),可能与供体筛选标准未涵盖年龄、健康状态及 $\gamma\delta$  T细胞比例与表型等参数有关,导致细胞质量不均一。尽管样本量有限( $n = 5$ ),但各供体细胞对Jurkat与CD7<sup>-</sup> Jurkat的杀伤效果均存在统计学差异(图8D,  $P < 0.01$ ),证实其对CD7表达的依赖性。后续将追溯分析现有供体参数,扩大样本量( $n \geq 10$ ),并制定更严格的供体入排标准以进一步验证该现象。

综上所述,本研究开发的CD7-DAP10-CCR- $\gamma\delta$  T细胞代表了一种颇具前景的现货型CAR- $\gamma\delta$  T细胞新策略。该方案通过巧妙的信号域设计和细胞类型选择,在保留强大抗肿瘤潜力的同时,有望克服现有CAR-T疗法中的关键瓶颈,为T细胞恶性肿瘤的治疗提供了新的可能方向。

**利益冲突申明:**本研究仅受首页所列基金资助。除此之外,没有其他任何商业或非商业机构为本研究提供资金支持。所有作者与资助机构之间不存在可能影响研究结果解读或论文撰写的特殊利益关系。作者均独立开展研究工作,保证研究的客观性和公正性。

## 【参 考 文 献】

- [1] BELVER L, FERRANDO A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 494-507. DOI: 10.1038/nrc.2016.63.
- [2] OH B L Z, SHIMASAKI N, COUSTAN-SMITH E, *et al.* Fratricide-resistant CD7-CAR T cells in T-ALL[J]. *Nat Med*, 2024, 30(12): 3687-3696. DOI: 10.1038/s41591-024-03228-8.
- [3] GERBY B, CLAPPIER E, ARMSTRONG F, *et al.* Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations[J]. *Leukemia*, 2011, 25(8): 1249-1258. DOI: 10.1038/leu.2011.93.
- [4] XU L, CHEN F, FAN W, *et al.* The role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in atherosclerosis[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1369202[2025-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40148988/>. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1369202.
- [5] BARISA M, ABATE-DAGA D, FISHER J. Editorial: Optimized gene-engineering and combination therapies to boost  $\gamma\delta$  T cell immunotherapeutic performance[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1414812[2025-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38698854/>. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1414812.
- [6] GAO Z F, BAI Y F, LIN A Q, *et al.* Gamma delta T-cell-based immune checkpoint therapy: attractive candidate for antitumor treatment[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 31[2025-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39179539/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01722-0.
- [7] LI W, ZHAO X, REN C, *et al.* The therapeutic role of  $\gamma\delta$  T cells in TNBC[J/OL]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1420107[2025-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39179539/>. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1420107.
- [8] 谈思怡, 向征, 徐艳, 等. 人 $\gamma\delta$  T细胞的抗肿瘤临床免疫治疗新进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(9): 855-863. DOI: 10.13376/j.cbls/20171115.
- [9] BILLADEAU D D, UPSHAW J L, SCHOON R A, *et al.* NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(6): 557-564. DOI: 10.1038/ni929.
- [10] NEDELLEC S, SABOURIN C, BONNEVILLE M, *et al.* NKG2D costimulates human V gamma 9V delta 2 T cell antitumor cytotoxicity through protein kinase C theta-dependent modulation of early TCR-induced calcium and transduction signals[J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 55-63. DOI: 10.4049/jimmunol.1000373.
- [11] FISHER J, SHARMA R, DON D W, *et al.* Engineering  $\gamma\delta$  T cells limits tonic signaling associated with chimeric antigen receptors[J]. *Sci Signal*, 2019, 12(598): eaax1872. DOI: 10.1126/scisignal.aax1872.
- [12] KABELITZ D, LETTAU M, JANSSEN O. Immunosurveillance by human  $\gamma\delta$  T lymphocytes: the emerging role of butyrophilins[J/OL]. *F1000Res*, 2017, 6: F1000FacultyRev-F1000Faculty782[2025-10-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28649364/>. DOI: 10.12688/f1000research.11057.1.
- [13] TANG J L, LI J L, ZHU X J, *et al.* Novel CD7-specific nanobody-based immunotoxins potentially enhanced apoptosis of CD7-positive malignant cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34070-34083. DOI: 10.18632/oncotarget.8710.
- [14] CHEN Y, YOU F T, JIANG L C, *et al.* Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- $\zeta$  or CD64-BB- $\zeta$  receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37128-37139. DOI: 10.18632/oncotarget.16201.

[收稿日期] 2025-02-08

[修回日期] 2025-10-26

[本文编辑] 陈怡宁, 黄静怡