



· 论 著 ·

CAR- $\gamma\delta$ T细胞生产工艺的优化研究

赵家旋¹, 王伊玄¹, 田高辉², 史江舟², 张同存^{1, 2}

1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;
2. 武汉科技大学生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430081

[摘要] 背景与目的: 近年来, 嵌合抗原受体T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞疗法在肿瘤治疗中取得突破性进展。 $\gamma\delta$ T细胞具有非主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制性识别抗原、广泛抗肿瘤活性和低移植抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 风险等特点, 因此CAR- $\gamma\delta$ T细胞疗法受到广泛关注, 成为肿瘤免疫治疗研究的重要热点之一。然而, CAR- $\gamma\delta$ T细胞制备过程中存在体外扩增效率不足、病毒转导效率低等关键问题, 严重阻碍了CAR- $\gamma\delta$ T细胞的研究和临床应用。本研究通过优化 $\gamma\delta$ T细胞的体外扩增培养条件和慢病毒转导策略, 旨在构建高效制备CAR- $\gamma\delta$ T细胞的体系。方法: 首先通过筛选多种细胞因子组合及组合中各细胞因子的浓度优化 $\gamma\delta$ T细胞的扩增方案, 通过评估细胞纯度、细胞活力、扩增倍数、细胞毒性和耗竭标志物表达水平, 筛选出 $\gamma\delta$ T细胞最佳的培养条件。随后, 通过确定转导前 $\gamma\delta$ T细胞的最优活化时间和慢病毒转导感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 进一步优化CAR- $\gamma\delta$ T细胞的转导条件。最后, 依据优化后的方案制备CAR- $\gamma\delta$ T细胞, 并利用钙黄绿素释放法和流式细胞术验证其对靶细胞的杀伤活性, 同时初步评估CAR- $\gamma\delta$ T细胞诱导GVHD的潜在风险。结果: 实验数据显示, 相较于单一白细胞介素 (interleukin, IL)-2培养组, IL-2+IL-7+IL-15联合培养方案显著提升了 $\gamma\delta$ T细胞的细胞纯度 (73.67% \pm 1.53% vs 90.69% \pm 2.00%)、细胞活力 (63.01% \pm 7.05% vs 89.00% \pm 3.61%)、扩增倍数 (876.50 \pm 238.35倍 vs 1 627.50 \pm 472.15倍) 和细胞毒性标志物CD16的表达 (4.20% \pm 1.73% vs 14.66% \pm 0.58%), 显著降低了耗竭标志物程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 的表达 (35.67% \pm 6.26% vs 21.10% \pm 6.49%)。细胞因子浓度梯度正交实验的结果表明, IL-2+IL-7+IL-15联合培养方案中IL-7和IL-15的最优细胞因子浓度为10 ng/mL。此外, 在活化96~120 h使用MOI为5~10进行病毒转导, CAR- $\gamma\delta$ T细胞具有最优的转导效率 (96 h: 12.87% \pm 4.35%; 120 h: 11.37% \pm 2.35%)。经此优化体系制备的CAR- $\gamma\delta$ T细胞对靶抗原阳性肿瘤细胞显示出特异性杀伤效应, 并且未发现CAR- $\gamma\delta$ T细胞诱导GVHD的证据。结论: IL-2+IL-7 (10 ng/mL)+IL-15 (10 ng/mL) 联合培养方案结合活化96~120 h使用MOI为5~10转导制备的CAR- $\gamma\delta$ T细胞在扩增能力、细胞纯度和转导效率等方面均显著优于传统方法。CAR- $\gamma\delta$ T细胞疗法通过天然免疫受体与CAR介导的特异性识别实现协同抗肿瘤效应, 且未观察到GVHD风险。本研究为CAR- $\gamma\delta$ T细胞疗法的临床转化提供了关键的技术支撑, 奠定了坚实的理论和实践基础。

[关键词] 嵌合抗原受体- $\gamma\delta$ T细胞; 细胞因子; 慢病毒; 生产工艺优化; 抗肿瘤活性

中图分类号: R730.51 文献标志码: A
DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.11.004

基金项目: 湖北省技术创新专项 (2019ACA168)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 不需要。

知情同意: 不需要。

引用本文: 赵家旋, 王伊玄, 田高辉, 等. CAR- $\gamma\delta$ T细胞生产工艺的优化研究 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(11): 1019-1031.

Funding: 2019 Hubei Province Technology Innovation Special Major Project (2019ACA168).

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: not required.

Informed consent: not required.

Cite this article: ZHAO J X, WANG Y X, TIAN G H, et al. A study on optimization of the CAR- $\gamma\delta$ T cell manufacturing process [J]. Chin Oncol, 2025, 35(11): 1019-1031.

A study on optimization of the CAR- $\gamma\delta$ T cell manufacturing process ZHAO Jiaxuan¹, WANG Yixuan¹, TIAN Gaohui², SHI Jiangzhou², ZHANG Tongcun^{1, 2} (1. Department of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China)

Correspondence to: ZHANG Tongcun E-mail: tony@tust.edu.cn

[**Abstract**] **Background and purpose:** In recent years, chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has achieved breakthrough progress in cancer treatment. $\gamma\delta$ T cells, with their non-major histocompatibility complex (MHC)-restricted antigen recognition, broad antitumor activity, and low risk of graft-versus-host disease (GVHD), have garnered significant interest in CAR- $\gamma\delta$ T cell therapy. However, critical challenges including suboptimal *in vitro* expansion and low viral transduction efficiency severely hinder the research and clinical application of CAR- $\gamma\delta$ T cells. This study aimed to establish an efficient platform for preparing CAR- $\gamma\delta$ T cells by optimizing the *in vitro* expansion conditions of $\gamma\delta$ T cells and refining lentiviral transduction strategies. **Methods:** We first optimized the expansion protocol for $\gamma\delta$ T cells by screening various cytokine combinations and the concentrations of individual cytokines within combination, and evaluating cell purity, viability, fold expansion, and expressions of cytotoxicity and exhaustion markers to identify the optimal culture conditions. Subsequently, the transduction conditions for CAR- $\gamma\delta$ T cells were improved by determining the optimal activation duration of $\gamma\delta$ T cells prior to gene transfer, as well as the optimal multiplicity of infection (MOI) for lentiviral transduction. Finally, CAR- $\gamma\delta$ T cells were successfully generated using the optimized protocol, and their cytotoxic activity against target cells was validated *via* calcein-release assay and flow cytometry, with a preliminary assessment of the potential risk of GVHD induction. **Results:** Experimental data demonstrated that, compared with the interleukin (IL)-2-only culture, the IL-2+IL-7+IL-15 combination significantly enhanced the expansion capacity of $\gamma\delta$ T cells (876.50 \pm 238.35-fold vs 1 627.50 \pm 472.15-fold), cell purity (73.67% \pm 1.53% vs 90.69% \pm 2.00%), and cell viability (63.01% \pm 7.05% vs 89.00% \pm 3.61%). It also increased the expression of the cytotoxicity marker CD16 (4.20% \pm 1.73% vs 14.66% \pm 0.58%) and reduced the expression of the exhaustion marker programmed death-1 (PD-1) (35.67% \pm 6.26% vs 21.10% \pm 6.49%). A cytokine concentration gradient orthogonal assay further identified 10 ng/mL IL-7 and 10 ng/mL IL-15 as the optimal concentrations within the IL-2+IL-7+IL-15 combination. Gene transduction performed 96-120 h after activation using a multiplicity of infection (MOI) of 5-10 resulted in the highest transduction efficiency for CAR- $\gamma\delta$ T cells (96 h: 12.87% \pm 4.35%; 120 h: 11.37% \pm 2.35%). CAR- $\gamma\delta$ T cells generated using the optimized system exhibited specific cytotoxic effects against tumor cells expressing the target antigen, and no evidence of GVHD induction was observed. **Conclusion:** CAR- $\gamma\delta$ T cells produced using the IL-2+IL-7 (10 ng/mL)+IL-15 (10 ng/mL) regimen combined with a 96-120 h activation period prior to transduction using a multiplicity of infection (MOI) of 5-10 significantly outperformed conventional methods in terms of expansion efficiency, cell purity, and transduction efficiency. The synergistic antitumor effects mediated by both natural immune receptors and CAR-specific recognition, along with the initial absence of GVHD risk, provide critical technical support for the clinical translation of CAR- $\gamma\delta$ T cell therapy, establishing a solid theoretical and practical foundation.

[**Key words**] Chimeric antigen receptor- $\gamma\delta$ T cells; Cytokines; Lentivirus; Manufacturing process optimization; Anti-tumor efficiency

嵌合抗原受体T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞通过直接识别肿瘤细胞表面抗原, 以非主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制性方式发挥细胞毒性作用, 已在血液系统肿瘤治疗中取得突破性进展^[1], 然而自体CAR-T细胞疗法面临制备周期长、个体差异大等临床转化瓶颈。近年来研究^[2-3]发现, CAR- $\gamma\delta$ T细胞通过整合CAR特异性识别与 $\gamma\delta$ T细胞受体 ($\gamma\delta$ T-cell receptor, $\gamma\delta$ TCR) 的天然免疫监视功能, 可在靶抗原缺失时, 通过识别肿瘤应激抗原维持抗肿瘤活性, 其免疫原性低于传统CAR-T细胞, 支持同种异体回输应用。临床队列研究^[4-5]证实, 肿瘤浸润 $\gamma\delta$ T细胞丰度与患者无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 及总生存期 (overall survival, OS) 显著正相关, 这为开发基于 $\gamma\delta$ T细胞的通用型细胞疗法提供了理论依据。

人外周血 $\gamma\delta$ T细胞可根据其 δ 链可变区的不同分为4个亚型, 其中V δ 2亚型占比最高, 并且是研究最为深入的一类亚型。然而, 即使

是占比最高的V δ 2亚型, 其在外周血CD3⁺淋巴细胞中也仅占1%~5%^[3], 因此建立高效体外扩增体系对于其临床应用至关重要。目前主流方案依赖唑来膦酸 (zoledronic acid, ZOL) 联合白细胞介素 (interleukin, IL)-2刺激^[6], 通过抑制外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中单核细胞异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 下游的法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 的活性, 从而使IPP在单核细胞中积累, 进而通过单核细胞间接激活 $\gamma\delta$ TCR信号通路^[2]。但是基于这种策略扩增的 $\gamma\delta$ T细胞纯度较低^[7], 输注前需要额外的 $\alpha\beta$ T细胞去除工序^[6, 8], 或使用饲养层细胞二次活化扩增^[8], 增加了制备的成本和时间。T细胞的活化和增殖需要多种信号的协同作用, 除了TCR和IL-2信号外, 其他IL-2受体家族或IL-1超家族细胞因子信号也是T细胞存活、增殖和分化的关键因素, 如IL-7^[7]、IL-15^[9-10]、IL-18^[11-12]及IL-21^[13-14]等, 这些细胞因子的协同作用对于T细胞的发育

至关重要，提示多因子组合策略可能突破现有扩增体系的技术瓶颈。

基于慢病毒的基因修饰技术在细胞治疗领域具有重要的应用价值，尤其是源自人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）-1的慢病毒载体，因其高效的转导能力和良好的临床安全性，已被证实能够实现外源基因在宿主细胞中的稳定持续表达^[15]。但 $\gamma\delta$ T细胞的转导效率普遍低于 $\alpha\beta$ T细胞^[16]，因此针对 $\gamma\delta$ T细胞的特点进行转导策略的优化具有重要意义。 $\gamma\delta$ T细胞在外周血中占比较低，通常利用PBMC进行体外诱导培养，其活化扩增过程依赖于单核细胞的间接激活作用，因此转导时 $\gamma\delta$ T细胞的活化水平、细胞纯度及转导使用的感染复数（multiplicity of infection, MOI）等均可能成为影响CAR- $\gamma\delta$ T细胞产品转导效率的因素。

本研究旨在构建标准化CAR- $\gamma\delta$ T细胞制备体系：首先通过多因子组合筛选建立高纯度扩增方案，然后进一步优化慢病毒转导参数，最终通过体外杀伤实验和异基因反应模型系统评估其功能特性和安全性。本研究旨在建立可重复的标准化技术体系，为开发通用型CAR- $\gamma\delta$ T细胞治疗产品提供关键技术支撑，对促进CAR- $\gamma\delta$ T细胞免疫治疗的临床转化具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

人原代 $\gamma\delta$ T细胞从人PBMC中诱导扩增，全血单个核细胞分离液购自天津灏洋华科生物科技有限公司，RPMI 1640培养基、DMEM培养基、Gibco CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium-L-Glutamine培养基均购自美国Thermo Fisher Scientific公司，ZOL注射液购自瑞士Novartis Pharma Schweiz AG公司，注射用重组人IL-2购自北京双鹭药业股份有限公司，重组人IL-7、重组人IL-15、重组人IL-18和重组人IL-21均购自乔默生物技术（上海）有限公司，转染增强剂聚凝胺购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司，胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司，T25、T75和T175细胞培养瓶（透气瓶）均购自康宁生命科学（吴江）有限公司，表达表皮生长因子受体Ⅲ型突变体（epidermal growth factor receptor variant Ⅲ, EGFRvⅢ）CAR和N6 CAR慢病毒的表达质粒为武汉波睿达生物科技有限公司赠予，人慢性髓系白血病细胞K562及其衍生K562-EGFRvⅢ、人神经胶质细胞瘤细胞U251、人脑胶质瘤细胞

U373、人T淋巴细胞系H9以及NL4-3 HIV-1病毒为武汉科技大学赠予。

流式抗体7-AAD活性染色溶液、FITC anti-human CD3、BV421 anti-human CD3、PE anti-human TCR V δ 2、APC anti-human CD56、PE/Cy7 anti-human NKG2D、Pacific Blue™ anti-human CD16、BV650 anti-human程序性死亡蛋白-1（programmed death-1, PD-1）、PE/Cy7 anti-human CD25、BV510 anti-human HLA-DR、BV650 anti-human CD107a、PE anti-human EGFRvⅢ、APC anti-human CD25、BV421 anti-human CD69和凋亡检测试剂盒APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD均购自美国Biolegend公司，TCR V delta 1 Monoclonal Antibody (TS8.2), APC, eBioscience™购自美国Thermo Fisher Scientific公司，THE™ NWSHPQFEK Tag Antibody [AF647]，mAb, Mouse购自南京金斯瑞生物科技有限公司，钙黄绿素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，Human γ 干扰素（interferon- γ , IFN- γ ）precoated酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）kit（Cat: 1110002）试剂盒购自上海达科为生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人原代 $\gamma\delta$ T细胞的分离活化和培养

为系统性评估多种细胞因子对 $\gamma\delta$ T细胞扩增及功能的影响，本研究采用正交实验设计以IL-7、IL-15、IL-18和IL-21为考察因子，每个因子设定2个水平（存在或缺失），最终形成16个实验组。具体分组如下：IL-2；IL-2+IL-7；IL-2+IL-15；IL-2+IL-18；IL-2+IL-21；IL-2+IL-7+IL-15；IL-2+IL-7+IL-18；IL-2+IL-7+IL-21；IL-2+IL-15+IL-18；IL-2+IL-15+IL-21；IL-2+IL-18+IL-21；IL-2+IL-7+IL-15+IL-18；IL-2+IL-7+IL-15+IL-21；IL-2+IL-7+IL-18+IL-21；IL-2+IL-15+IL-18+IL-21；IL-2+IL-7+IL-15+IL-18+IL-21。

将健康供者全血缓慢地添加到全血单个核细胞分离液上，以700 \times g的速率缓慢升降速离心20 min，抽取中间白膜层，进行单个核细胞计数。使用Gibco CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium-L-Glutamine以3 \times 10⁶个/mL的密度重悬细胞，添加ZOL注射液（4.69 μ mol/L）与对应的细胞因子，细胞因子筛选实验中各细胞因子的使用浓度见表1。72 h后补加培养基调整至培养密度1.5 \times 10⁶个/mL。

表1 细胞因子筛选实验各细胞因子的使用浓度

experiment	
Cytokine	Concentration
IL-2 ^[17-19]	1 000 U/mL
IL-7 ^[20-21]	10 ng/mL
IL-15 ^[9,22-24]	10 ng/mL
IL-18 ^[25]	10 ng/mL
IL-21 ^[26-27]	10 ng/mL

1.2.2 人原代 $\gamma\delta$ T细胞的转导

将对应活化时间的人原代 $\gamma\delta$ T细胞置于6孔板中, 采用相应的MOI添加对应慢病毒, 转导时添加聚凝胺溶液使其终浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.3 流式细胞术检测

取大于 5×10^5 个待测细胞置于流式管中, 添加1 mL流式细胞清洗液 [磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) +2% FBS], 以 $300 \times g$ 的速率离心5 min, 弃上清液, 重复1次, 添加对应待测蛋白的荧光素标记抗体, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内温育30 min, 添加1 mL流式细胞清洗液, 以 $300 \times g$ 的速率离心5 min, 弃上清液, 重复1次, 使用100 μL 流式细胞清洗液重悬细胞, 添加2 μL 7-AAD活性染色溶液, 室温温育10 min, 采用流式细胞仪检测。

1.2.4 基于钙黄绿素的细胞杀伤活性检测

将浓度为 5×10^4 个/mL并已用钙黄绿素标记的靶细胞接种到U底96孔培养板中, 每孔加入100 μL 。根据不同的效应细胞与靶细胞比例 (25 : 1、5 : 1、1 : 1), 每组分别加入100 μL 的效应细胞。设置阳性对照组 (加入裂解液) 和阴性对照组 (加入1 \times PBS)。每组设置4个重复孔。在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育3.5 h后, 将96孔板以 $500 \times g$ 的速率离心10 min, 然后吸取每孔150 μL 的上清液并转移到预先标记好的新的96孔平底板中。使用酶标仪进行扫描, 设置激发光波长为485 nm (带宽为20 nm), 发射光波长为530 nm (带宽为25 nm), 读取荧光值。根据以下公式计算各组效应细胞的细胞毒性: 特异性裂解百分比 (%) = (实验组荧光值-阴性对照组荧光值) / (阳性对照组荧光值-阴性对照组荧光值) $\times 100\%$ 。

1.2.5 基于ELISA的IFN- γ 释放浓度检测

取适量 $\gamma\delta$ T细胞 (体积100 μL) 与PBMC (体积100 μL) 置于96孔板中, 每个样品设3个复孔, 使用含10% FBS的DMEM培养基作为共培养体系。在37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中温育24 h后, 将96孔板在常温下以 $300 \times g$ 的速率离心10 min, 收集

120 μL 上清液, 按照ELISA试剂盒的说明书常温操作检测IFN- γ 的分泌水平, 在450 nm波长下检测吸光度 (D) 值, 并根据标准曲线计算各样本细胞因子的含量。

1.2.6 CD107a脱颗粒检测

取适量 $\gamma\delta$ T细胞 (体积100 μL) 与对应靶细胞 (体积100 μL) 置于96孔板中, 使用含10% FBS的DMEM培养基作为共培养体系, 每孔添加1 μL BV650 anti-human CD107a抗体, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中温育4 h后, 采用流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

本研究采用GraphPad Prism 10.4.1及R软件 (R4.4.1) 进行统计学分析。首先, 采用Shapiro-Wilk检验对连续变量进行正态性检验, 并采用Levene检验进行方差齐性检验。连续性数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于3组及以上的比较, 若数据满足正态性和方差齐性, 采用单因素方差分析, 若数据不满足正态性或方差齐性, 则采用Kruskal-Wallis H 检验。对于2组间的比较, 若数据满足正态性和方差齐性, 采用独立样本 t 检验, 若数据不满足正态性或方差齐性, 则采用Mann-Whitney U 检验。变量间的相关性采用皮尔逊相关分析进行评估, 相关系数的显著性检验基于 t 检验。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-2+IL-7+IL-15细胞因子组合提高了 $\gamma\delta$ T细胞扩增能力和细胞毒性表型, 减少了细胞耗竭

为建立高效 $\gamma\delta$ T细胞的扩增体系, 本研究通过正交实验设计系统评估IL-7、IL-15、IL-18和IL-21对ZOL激活的PBMC中 $\gamma\delta$ T细胞扩增的影响 (图1A), 以筛选出最优的细胞因子组合。随后, 通过进一步正交实验明确各细胞因子的最适浓度。IL-2为 $\gamma\delta$ T细胞扩增的基础细胞因子^[16, 28], 本实验中使用浓度为1 000 U/mL, 不参与正交实验设计。

本研究首先参考相关文献^[9, 17-27]确定IL-7、IL-15、IL-18和IL-21的使用浓度 (表1), 并通过正交设计设置了15个实验组, 以单独添加IL-2的组作为对照。每组实验均重复3次。在培养至第14天时, 通过 $\gamma\delta$ T细胞纯度、细胞活力和细胞扩增倍数等关键指标, 将15个实验组对比排序后选取最优的3组进行后续研究。结果显示, IL-2+IL-7、IL-2+IL-15、IL-2+IL-7+IL-15 3组的细胞纯度、细胞活力和细胞扩增倍数均显著高于IL-2对照组, 也高于其他实验组 (图1B~1E, 表2)。

通过比较各组细胞组成、细胞毒性细胞比例和耗竭细胞比例等指标, 进一步评估各组细

胞因子对 $\gamma\delta$ T细胞的影响。结果显示, IL-2+IL-7组、IL-2+IL-15组和IL-2+IL-7+IL-15组中 $\alpha\beta$ T细胞比例均较对照组低, 但组间差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图1F), 提示IL-2+IL-7组、IL-2+IL-15组及IL-2+IL-7+IL-15组可能通过降低 $\alpha\beta$ T细胞的比例, 从而降低回输后移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 风险。接下来检测4组培养方案培养至第14天时 $\gamma\delta$ T细胞的细胞毒性相关标志物 (CD56、NKG2D、CD16) 和耗竭标志物 (PD-1) 的表达水平。结果显示, 4组间CD56及NKG2D的表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图1G~1H), 令人意外的是, IL-

2+IL-7+IL-15联合组的CD16⁺细胞比例最高 (IL-2: 4.20%±1.73%; IL-2+IL-7: 5.13%±1.70%; IL-2+IL-15: 7.67%±1.93%; IL-2+IL-7+IL-15: 14.66%±0.58%), PD-1⁺细胞比例最低 (IL-2: 35.67%±6.26%; IL-2+IL-7: 32.93%±9.50%; IL-2+IL-15: 34.47%±11.93%; IL-2+IL-7+IL-15: 21.10%±6.49%), 显著优于对照IL-2组 (图1I~1J)。综上所述, IL-2+IL-7+IL-15细胞因子组合可提高 $\gamma\delta$ T细胞扩增能力和细胞纯度, 并提高细胞毒性细胞比例, 降低耗竭细胞比例, 因此IL-2+IL-7+IL-15成为培养 $\gamma\delta$ T细胞最优的细胞因子组合。

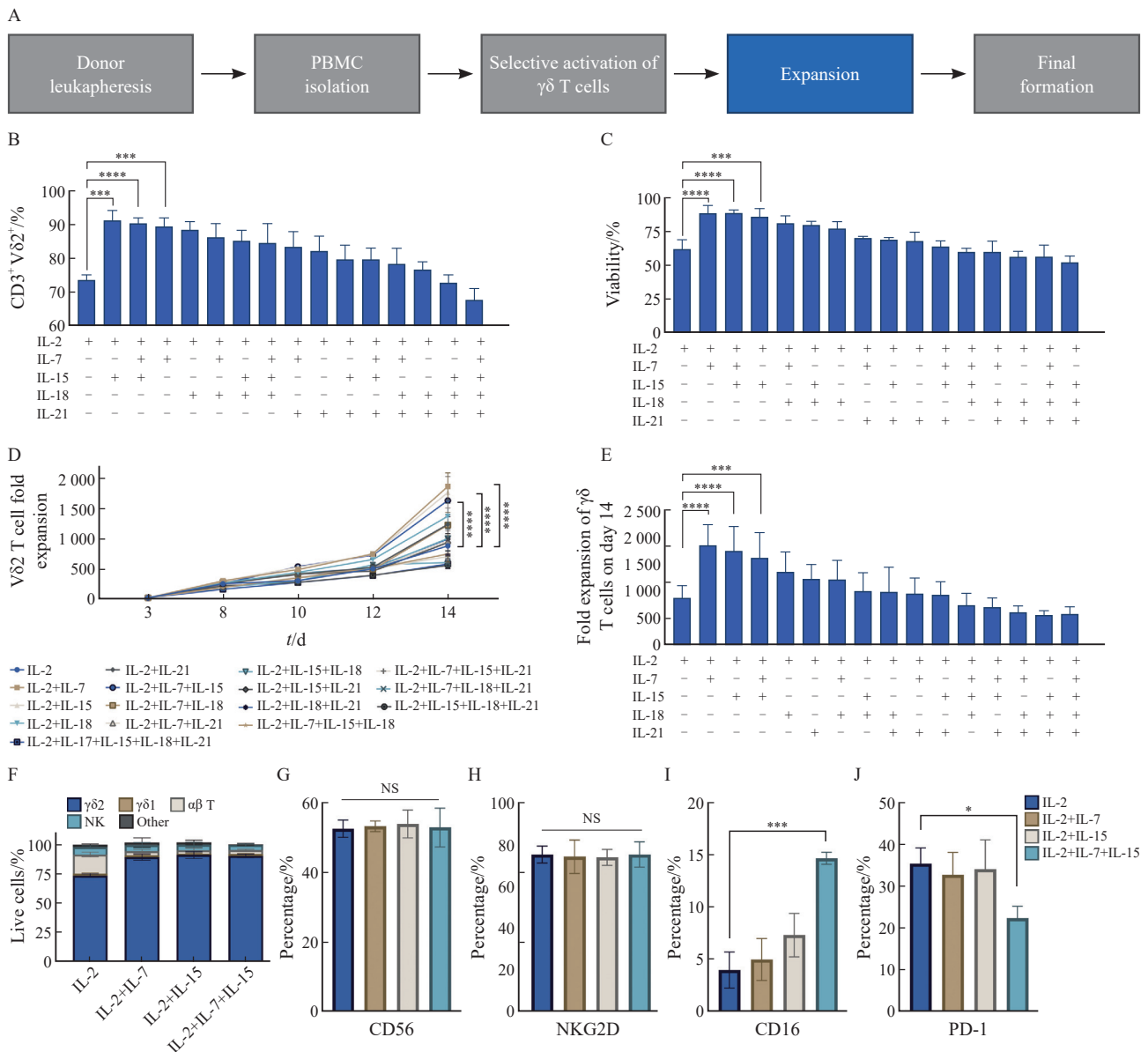


图1 IL-2+IL-7+IL-15细胞因子组合提高了 $\gamma\delta$ T细胞的扩增能力和细胞毒性表型, 减少细胞耗竭

Fig. 1 The combination of IL-2, IL-7 and IL-15 enhances the expansion capacity and cytotoxic phenotype of $\gamma\delta$ T cells while reducing exhaustion

A: Flowchart of the $\gamma\delta$ T cell production process. B: Purity of $\gamma\delta$ T cells measured by flow cytometry on day 14 ($n=3$ donors). C: Summary of 7-AAD-live cells at day 14 ($n=3$ donors). D: Fold expansion of CD3⁺V δ 2⁺ T cells from day 0 to day 14 ($n=3$ donors). E: Fold expansion of CD3⁺V δ 2⁺ T cells on day 14 ($n=3$ donors). F: Summary of flow cytometry results comparing the expansion composition on day 14 after culture with IL-2+IL-7, IL-2+IL-15, IL-2+IL-7+IL-15, or IL-2 alone ($n=3$ donors). G-J: Expression levels of cytotoxicity markers CD56 (G), NKG2D (H), CD16 (I), and the exhaustion marker PD-1 (J) on $\gamma\delta$ T cells ($n=3$ donors). Data are presented as $\bar{x}\pm s$. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$. NS: Not significant. Statistical significance was determined by ANOVA.

表2 细胞因子组合筛选实验扩增数据汇总

Tab. 2 Summary of expansion data from cytokine combination screening

Group	Expansion fold	Cell purity	Cell viability
IL-2	876.50±238.35	73.67%±1.53%	63.01%±7.05%
IL-2+IL-7	1 863.50±387.16	89.12%±3.61%	89.33%±6.03%
IL-2+IL-15	1 763.50±452.33	91.33%±3.06%	89.67%±6.11%
IL-2+IL-18	1 367.49±367.89	88.50%±2.50%	77.67%±5.51%
IL-2+IL-21	1 233.50±269.59	82.33%±4.51%	68.50%±6.56%
IL-2+IL-7+IL-15	1 627.50±472.15	90.69%±2.00%	89.00%±3.61%
IL-2+IL-7+IL-18	1 221.50±359.75	86.33%±4.04%	81.67%±5.86%
IL-2+IL-7+IL-21	955.50±292.85	83.50%±4.58%	70.67%±1.15%
IL-2+IL-15+IL-18	1 000.50±359.16	85.33%±3.06%	80.33%±3.06%
IL-2+IL-15+IL-21	932.50±254.44	79.67%±4.16%	69.50%±1.50%
IL-2+IL-18+IL-21	988.50±462.76	76.67%±2.52%	56.67%±3.51%
IL-2+IL-7+IL-15+IL-18	743.50±221.05	84.67%±5.86%	60.33%±2.52%
IL-2+IL-7+IL-15+IL-21	700.50±177.34	79.67%±3.51%	64.33%±4.04%
IL-2+IL-7+IL-18+IL-21	601.50±122.26	78.33%±4.73%	60.33%±7.51%
IL-2+IL-15+IL-18+IL-21	554.50±83.35	71.33%±4.04%	52.33%±4.51%
IL-2+IL-7+IL-15+IL-18+IL-21	578.50±132.25	67.50%±3.61%	56.67%±8.33%

2.2 IL-2+IL-7 (10 ng/mL) +IL-15 (10 ng/mL) 细胞因子浓度组合显著提高了 $\gamma\delta$ T细胞扩增能力和细胞毒性表型, 减少了细胞耗竭

为进一步确定IL-2+IL-7+IL-15细胞因子组合中的IL-7和IL-15的最佳浓度, 本研究将IL-7和IL-15分别设置为低(1 ng/mL)、中(10 ng/mL)、高(100 ng/mL) 3个浓度梯度^[10], 通过正交实验设计设置了9个细胞因子浓度组合, 每组设置3个生物学重复。将各实验组细胞培养至第14天, 通过评估 $\gamma\delta$ T细胞的细胞纯度、细胞活力、细胞扩增倍数、细胞毒性表型和耗竭表型, 最终确认最优的 $\gamma\delta$ T细胞培养条件, 具体数据见表3、4。

结果显示, 除IL-2+IL-7^{LOW}+IL-15^{LOW}实验组外, 其他8个实验组间细胞纯度和扩增倍数(图2A~2B)无显著差异, 且均高于IL-2+IL-7^{LOW}+IL-15^{LOW}实验组。细胞活力(图2C)的结果表明, IL-2+IL-7^{LOW}+IL-15^{HIGH}实验组的细胞活力显著低于IL-2+IL-7^{LOW}+IL-15^{MEDIUM}实验组, IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{HIGH}实验组的细胞活力显著低于IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{LOW}和IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{MEDIUM}, IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{HIGH}实验组的细胞活力显著低于IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{LOW}和IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{MEDIUM}实验组。综上所述, IL-15^{HIGH}实验组的细胞活力均低于IL-15^{MEDIUM}或IL-15^{LOW}实验组。

细胞毒性表型与耗竭表型(图2D~2G)的结果显示, IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{MEDIUM}和IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{MEDIUM}实验组的CD16+细胞比例和PD-1+细胞比例显著优于IL-2+IL-7^{LOW}+IL-15^{MEDIUM}、IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{LOW}和IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{LOW}实验组。

综上所述, 通过对细胞纯度、细胞活力、细胞扩增倍数、细胞毒性表型和耗竭表型的评估, 筛选出IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{MEDIUM}和IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{MEDIUM}是最优的两个 $\gamma\delta$ T细胞培养条件。为降低成本, 最终选择IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{MEDIUM}[即IL-2+IL-7(10 ng/mL)+IL-15(10 ng/mL)]作为后续 $\gamma\delta$ T细胞培养的细胞因子浓度。

2.3 活化96~120 h进行慢病毒转导的 $\gamma\delta$ T细胞具有最佳的转导效率

CAR- $\gamma\delta$ T细胞的转导效率是目前限制其临床应用的关键瓶颈之一。在未活化或细胞纯度低时进行慢病毒载体转导, $\alpha\beta$ T细胞的转导效率较低^[29-30], 而 $\gamma\delta$ T细胞的活化时间会显著影响其转导时的活化水平和细胞纯度。因此, 在确定了 $\gamma\delta$ T细胞的最优培养条件后, 通过改变 $\gamma\delta$ T细胞的活化时间来优化CAR- $\gamma\delta$ T细胞的转导效率(图3A)。

根据本课题组前期慢病毒转导 $\alpha\beta$ T细胞的经验^[31-32], 在MOI为5的条件下, 研究 $\gamma\delta$ T细胞活

表3 IL-7、IL-15细胞因子浓度筛选实验扩增数据汇总

Tab. 3 Summary of cell expansion data from IL-7 and IL-15 cytokine concentration optimization experiments

Group	Expansion fold	Cell purity	Cell viability
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{LOW}	905.67±85.81	77.73%±1.35%	75.90%±4.07%
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{MEDIUM}	1 485.80±129.48	88.73%±3.62%	89.10%±3.70%
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{HIGH}	1 502.60±159.43	89.70%±1.90%	81.97%±1.33%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{LOW}	1 451.40±176.21	88.00%±1.76%	90.47%±5.59%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{MEDIUM}	1 465.53±123.03	88.77%±4.19%	88.53%±2.80%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{HIGH}	1 535.13±142.60	87.70%±2.69%	81.27%±1.05%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{LOW}	1 579.43±136.85	87.77%±3.32%	87.47%±3.01%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{MEDIUM}	1 454.23±184.48	86.97%±1.75%	88.63%±5.74%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{HIGH}	1 496.57±139.82	83.10%±2.39%	80.30%±4.07%

表4 IL-7、IL-15细胞因子浓度筛选实验细胞毒性表型与耗竭表型数据汇总

Tab. 4 Summary of cytotoxicity and exhaustion phenotype data from IL-7 and IL-15 cytokine concentration optimization experiments

Group	CD16+	PD-1+
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{LOW}	6.57%±1.88%	30.37%±7.72%
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{MEDIUM}	12.63%±2.66%	21.67%±5.37%
IL-2+IL-7 ^{LOW} +IL-15 ^{HIGH}	15.53%±1.17%	15.50%±4.04%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{LOW}	7.35%±1.39%	20.40%±7.14%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{MEDIUM}	19.53%±4.52%	15.27%±5.08%
IL-2+IL-7 ^{MEDIUM} +IL-15 ^{HIGH}	19.77%±3.46%	17.50%±3.85%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{LOW}	10.69%±1.41%	22.93%±5.93%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{MEDIUM}	18.07%±1.36%	17.17%±3.74%
IL-2+IL-7 ^{HIGH} +IL-15 ^{HIGH}	16.93%±1.99%	14.47%±3.59%

化时间对转导效率的影响，并采用优化后的活化时间进一步探究MOI对转导效率的影响。通过这两项研究最终确定 $\gamma\delta$ T细胞最佳的慢病毒转导条件。

首先构建靶向EGFRv III的第3代CAR质粒载体（图3B），并获得对应的慢病毒。在不同的活化时间点（24~144 h）对 $\gamma\delta$ T细胞进行转导（3组生物学重复），并检测转导时 $\gamma\delta$ T细胞的细胞纯度、CD25⁺CD69⁺细胞比例（活化水平）和转导后第6天的转导效率。结果显示， $\gamma\delta$ T细胞转导效率并未随着纯度的提高而上升，而是在活化96~120 h时活化水平与转导效率均达到峰值（96 h：12.87%±4.35%；120 h：11.37%±2.35%），然后均开始逐渐下降（图3C~3D）。接下来通过计算皮尔逊相关系数来分析 $\gamma\delta$ T细胞的细胞纯度、活化水平与转导效率之间的相关性，结果显示，转导效率与转导时活化水平呈显著正相关（ $R=0.500$ ， $P=0.033$ ），转导效率与转导时细胞纯度无显著相关性

（ $R=-0.032$ ， $P=0.900$ ，图3E~3F）。

上述实验结果表明，在IL-2+IL-7（10 ng/mL）+IL-15（10 ng/mL）细胞因子组合培养下，CAR- $\gamma\delta$ T细胞转导效率最高的活化时间为96~120 h。

2.4 MOI为5~10转导的CAR- $\gamma\delta$ T细胞具有最优的转导效率和扩增水平

在确定了 $\gamma\delta$ T细胞最佳的活化时间后，我们进一步研究了慢病毒转导的MOI对 $\gamma\delta$ T细胞转导效率的影响（3组生物学重复）。根据本课题组前期慢病毒转导 $\alpha\beta$ T细胞的经验^[31-32]，设置了2、5、10和20 4个MOI，并在 $\gamma\delta$ T细胞活化96 h时进行转导，转导后第6天检测转导效率。结果显示， $\gamma\delta$ T细胞转导效率随着MOI的增加而提高，MOI为5、10和20的转导效率显著高于MOI为2的实验组（MOI=2：8.58%±1.55%；MOI=5：14.90%±2.41%；MOI=10：13.90%±2.71%；MOI=20：14.07%±2.97%，图4A~4B）。

接下来，进一步研究了慢病毒转导MOI

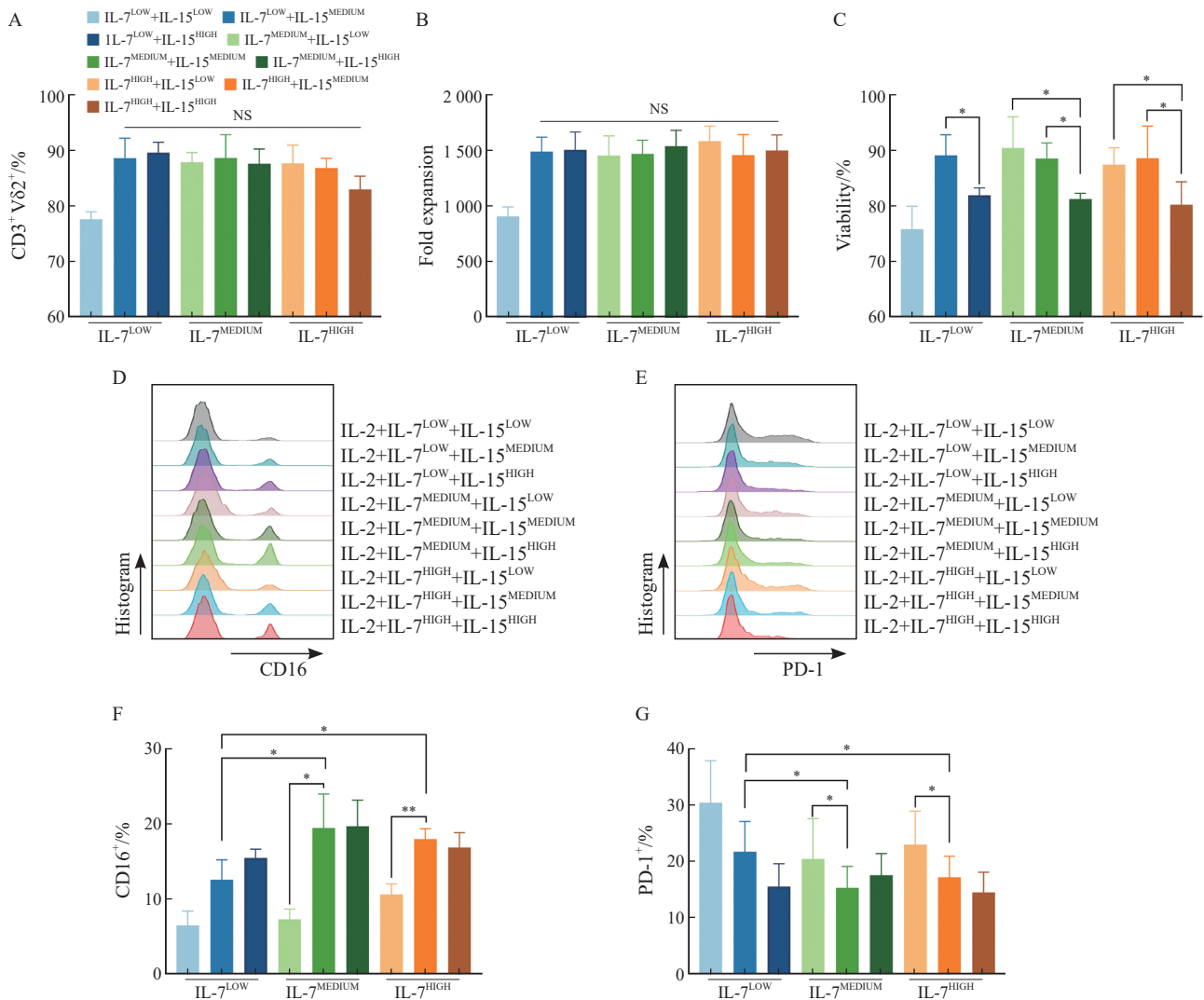


图2 IL-2+IL-7 (10 ng/mL) +IL-15 (10 ng/mL) 细胞因子浓度组合显著提高 $\gamma\delta$ T细胞的扩增能力和细胞毒性表型, 减少细胞耗竭

Fig. 2 The concentration combination of IL-2+IL-7 (10 ng/mL)+IL-15 (10 ng/mL) significantly enhances the expansion capacity and cytotoxic phenotype of $\gamma\delta$ T cells while reducing exhaustion

A: Purity of $\gamma\delta$ T cells measured by flow cytometry on day 14 ($n=3$ donors). B: Fold expansion of $CD3^+V\delta 2^+$ T cells on day 14 ($n=3$ donors). C: Summary of 7-AAD- live cells at day 14 ($n=3$ donors). D, E: Representative flow cytometry plots of $CD16^+$ and $PD-1^+$ $\gamma\delta$ T cells on day 14. F, G: Expression levels of cytotoxicity markers $CD16^+$ and exhaustion marker $PD-1^+$ $\gamma\delta$ T cells on day 14. Data are presented as $\bar{x}\pm s$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. NS: Not significant. Statistical significance was as determined by ANOVA (A,B) or Student's t -test (C, F, G).

对 $\gamma\delta$ T细胞纯度、扩增倍数及细胞活力的影响。结果显示, 4组细胞培养至第14天时, MOI为2、5和10 3组间的 $\gamma\delta$ T细胞纯度、扩增倍数及细胞活力无显著差别。MOI为20的实验组细胞纯度 (MOI=2: $82.50\%\pm 7.71\%$; MOI=5: $84.60\%\pm 3.10\%$; MOI=10: $83.57\%\pm 5.85\%$; MOI=20: $63.53\%\pm 6.28\%$) 和活力 (MOI=2: $85.23\%\pm 2.74\%$; MOI=5: $85.03\%\pm 4.27\%$; MOI=10: $86.27\%\pm 5.16\%$; MOI=20: $73.80\%\pm 8.74\%$, 图4C、4E) 显著低于其他3组。MOI为20的实验组扩增倍数 ($1\ 124.70\pm 154.39$) 较其他组 (MOI=2: $1\ 501.95\pm 271.42$; MOI=5: $1\ 460.97\pm 174.36$; MOI=10: $1\ 445.53\pm 195.50$) 低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$, 图4D)。

综上所述, 使用IL-2+IL-7 (10 ng/mL) +IL-15 (10 ng/mL) 细胞因子组合培养、活化时间为96~120 h的条件下, $\gamma\delta$ T细胞最优的慢病毒转导MOI为5~10。

2.5 基于优化条件培养的CAR- $\gamma\delta$ T细胞表现出增强的细胞毒性且未发现GVHD的证据

通过上述研究改进了 $\gamma\delta$ T细胞的扩增和转导实验方案, 为评估优化后培养体系的可行性, 针对由此产生的CAR- $\gamma\delta$ T细胞开展了细胞毒性及GVHD风险的初步评估。

CD25作为T细胞活化标志物在T细胞激活后表达, 活化的T细胞通过脱颗粒杀伤靶细胞。我们首先检测了EGFRv III- $\gamma\delta$ T与K562-EGFRv III靶细胞采用1:1的效靶比共温育24 h后的活化及脱颗粒标志物。结果显示, 未转导的 $\gamma\delta$ T细胞在单

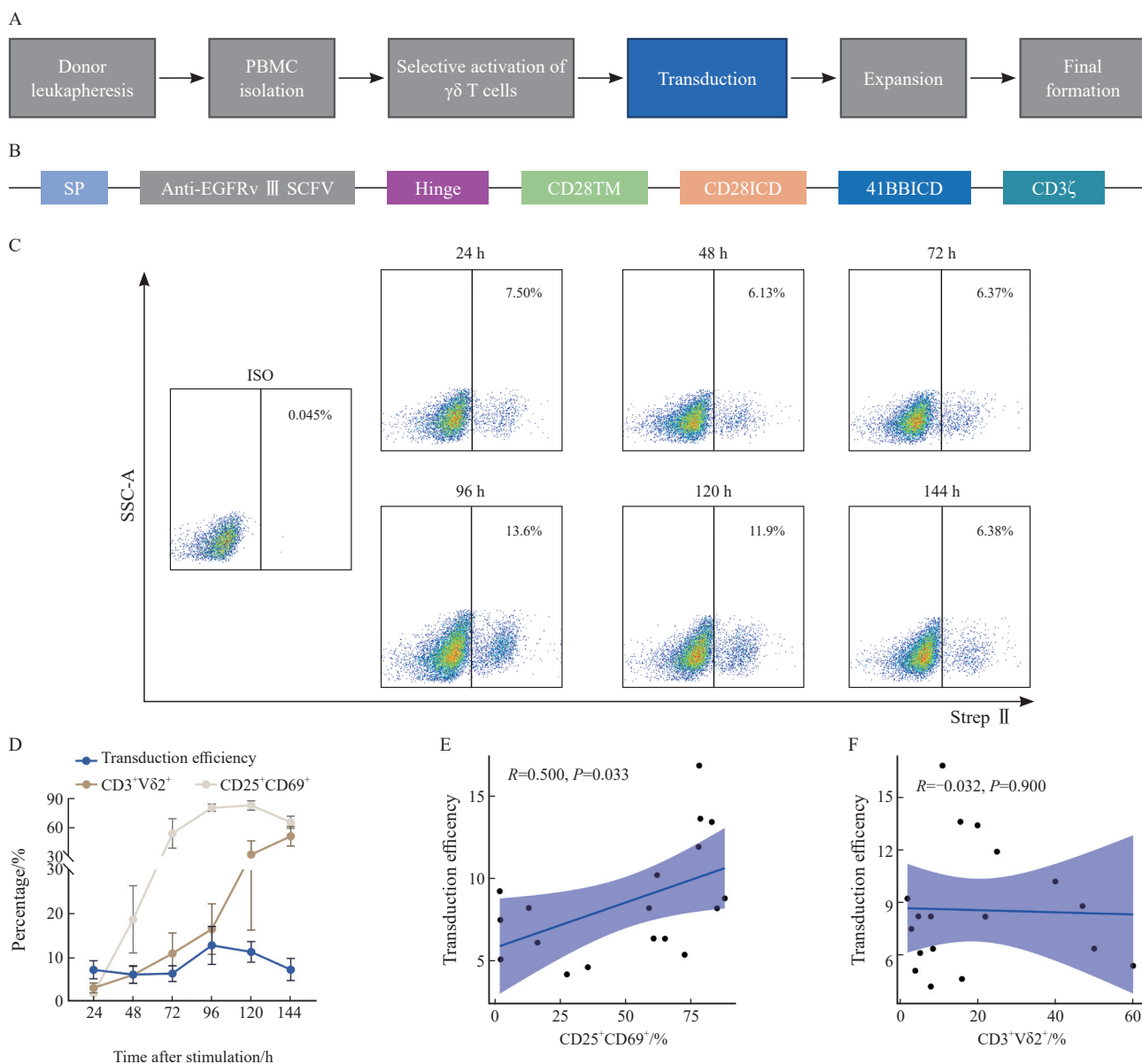


图3 活化96~120 h进行慢病毒转导的γδ T细胞具有最佳的转导效率

Fig. 3 γδ T cells activated for 96-120 h exhibit the optimal lentiviral transduction efficiency

A: Flowchart of the γδ T cell production process. B: Schematic illustration of the EGFRvIII CAR construct. C: Representative flow cytometry plots of Strep II-labeled CAR⁺ cells 6 d after transduction. D: Summary of transduction efficiency, CD25⁺CD69⁺ percentage, and CD3⁺Vδ2⁺ percentage of γδ T cells at different activation time points (n=3 donors). E: Correlation between transduction efficiency and CD25⁺CD69⁺ percentage. F: Correlation between transduction efficiency and CD3⁺Vδ2⁺ percentage in γδ T cells. Bars represent $\bar{x} \pm s$.

独培养或与K562-EGFRvIII共培养时，CD25与CD107a的表达水平均无显著差异；而EGFRvIII-γδ T细胞与K562-EGFRvIII共培养后，CD25与CD107a表达水平较未转导组均显著上调（图5A~5B、5D~5E），证实CAR信号通路特异性增强了γδ T细胞的活化水平和细胞毒性功能。进一步通过钙黄绿素标记的细胞杀伤实验评估其靶向杀伤能力，结果显示，γδ T细胞的天然细胞毒性显著高于αβ T细胞，且EGFRvIII-γδ T细胞对EGFRvIII阳性细胞系（K562-EGFRvIII、U251、U373）的杀伤效率较未转导γδ T细胞显著提升，但对EGFRvIII阴性的K562细胞杀伤活性差异无统计学意义（图5F），表明CAR介导的杀伤具

有严格的抗原依赖性。同时，HLA-DR（参与抗原呈递的MHC-II类分子）在转导组与未转导组间的表达水平无显著差异（图5A、5C），提示CAR基因修饰未影响γδ T细胞的内源性抗原呈递功能。

γδ T细胞通过非MHC限制性方式识别抗原，理论上GVHD风险较低。然而，基于PBMC来源的γδ T细胞终产物中仍残留少量αβ T细胞（图1F），可能介导同种异体反应。为系统评估CAR-γδ T细胞的GVHD风险，本研究将供体1来源的EGFRvIII-CAR-γδ T细胞及EGFRvIII-CAR-αβ T细胞（阳性对照）分别与异源供体（供体2/供体3）或同源供体（供体1）的PBMC共培养，

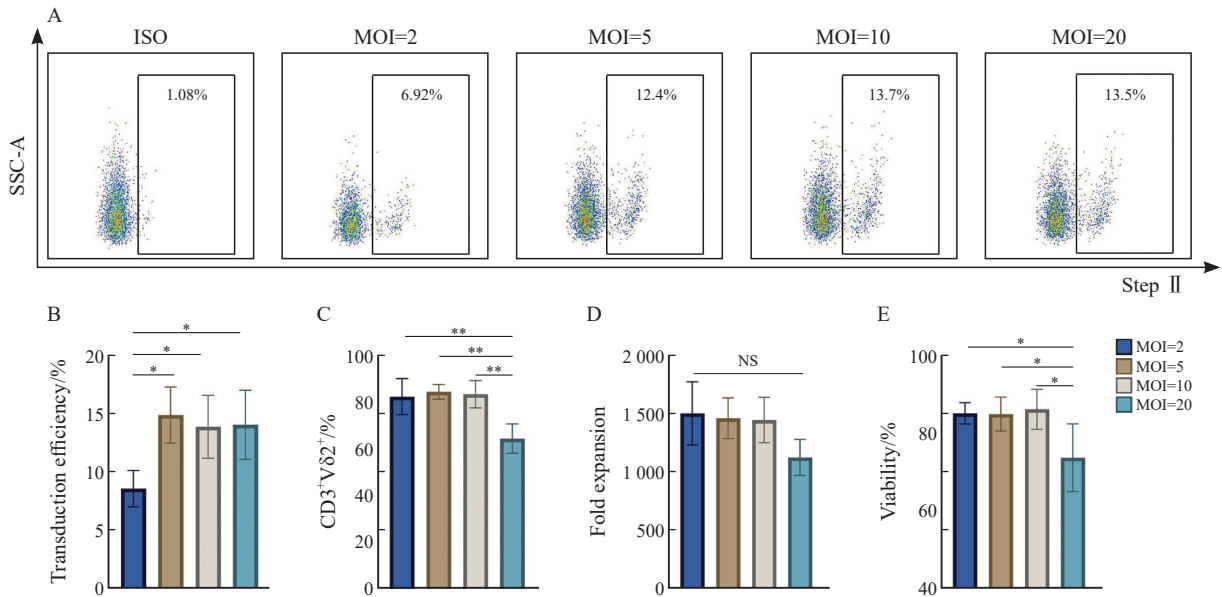


图4 MOI为5~10转导的CAR- $\gamma\delta$ T细胞具有最优的转导效率与扩增水平

Fig. 4 CAR- $\gamma\delta$ T cells transduced at MOI 5-10 exhibit optimal transduction efficiency and expansion capacity

A: Representative flow cytometry plots showing Strep II-labeled CAR⁺ T cells 6 d after transduction. B: Quantification of transduction efficiency at varying MOIs ($n=3$ donors). C-E: Summary of purity, fold expansion and viability of EGFRv III- $\gamma\delta$ T cells on day 14. Data are presented as $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. NS: Not significant.

通过ELISA检测上清液中IFN- γ (GVHD关键效应因子)的分泌水平。结果显示,与未共培养组相比,供体1 EGFRv III- $\gamma\delta$ T细胞与供体2/供体3 PBMC共培养后,IFN- γ 释放量无显著变化;而供体1 EGFRv III- $\alpha\beta$ T细胞与供体2/供体3 PBMC共培养后IFN- γ 分泌量显著提升(图5G)。两组细胞与同源供体1 PBMC共培养时,EGFRv III- $\gamma\delta$ T与EGFRv III- $\alpha\beta$ T细胞的IFN- γ 释放量均与未共培养组无显著差异(图5H)。上述结果表明,优化培养体系获得的EGFRv III- $\gamma\delta$ T细胞初步未检测到显著的异源反应性,支持其同种异体应用潜力。

为验证该优化方案对于其他靶点的适用性,我们使用抗gp120的第3代CAR (N6 CAR)慢病毒对 $\gamma\delta$ T细胞进行转导,研究其在HIV感染疾病中的应用潜力。结果表明,活化96~120 h时采用MOI为5~10进行慢病毒转导, $\gamma\delta$ T细胞的转导效率为 $6.33\% \pm 1.20\%$ (图5I~5J),并且N6- $\gamma\delta$ T细胞对HIV-1 (NL4-3)感染的H9细胞相比未转导的 $\gamma\delta$ T细胞,细胞毒性显著提升(效应细胞与靶细胞比例为25:1时: $11.23\% \pm 2.15\%$ vs $28.93\% \pm 3.27\%$)(图5K)。上述结果证实,采用IL-2+IL-7 (10 ng/mL)+IL-15 (10 ng/mL)细胞因子组合进行扩增,并结合96~120 h活化及MOI为5~10的转导策略,可制备出高活性、高抗原特异性且初步评估无GVHD风险的CAR- $\gamma\delta$ T细胞,其工艺兼容多靶点CAR设计,为临床生产提供了可靠依据。

3 讨 论

CAR-T细胞疗法通过不依赖TCR的方式特异性识别肿瘤表面抗原并介导肿瘤细胞杀伤,在血液系统恶性肿瘤治疗中已取得显著疗效^[3]。然而,CAR-T细胞疗法因高度依赖于患者自体来源T细胞、制备工艺复杂且成本高昂,限制了其应用和普及。 $\gamma\delta$ T细胞作为低免疫原性免疫细胞^[3],凭借其非经典T细胞特性(如非MHC限制性识别)和固有免疫杀伤功能,成为替代传统CAR-T细胞的潜在候选。CAR- $\gamma\delta$ T细胞免疫疗法有望成为更安全且普适性更强的免疫治疗方案。

为获取满足临床需求的高质量CAR- $\gamma\delta$ T细胞,本研究通过优化扩增体系和慢病毒转导条件改善CAR- $\gamma\delta$ T细胞的制备方案。采用上述优化条件制备的CAR- $\gamma\delta$ T细胞可有效地杀伤多种EGFRv III阳性肿瘤细胞系,且其抗肿瘤活性显著优于未转导的 $\gamma\delta$ T细胞。初步的实验数据中,未观察到CAR- $\gamma\delta$ T细胞诱发GVHD的相关迹象,提示其具有潜在的同种异体应用安全性。

CAR- $\gamma\delta$ T细胞的扩增是决定其临床应用的关键参数之一。作为培养基的组成部分,细胞因子在调控T细胞的增殖、分化、存活和功能等方面发挥核心作用。本研究结果显示,IL-2+IL-7、IL-2+IL-15和IL-2+IL-7+IL-15 3组均可显著提高 $\gamma\delta$ T细胞的纯度、活力及扩增倍数,其中IL-2+IL-7+IL-15组相较于IL-2对照组,细胞毒性标志物CD16⁺细胞比例更高,耗竭标志物PD-1⁺细胞比

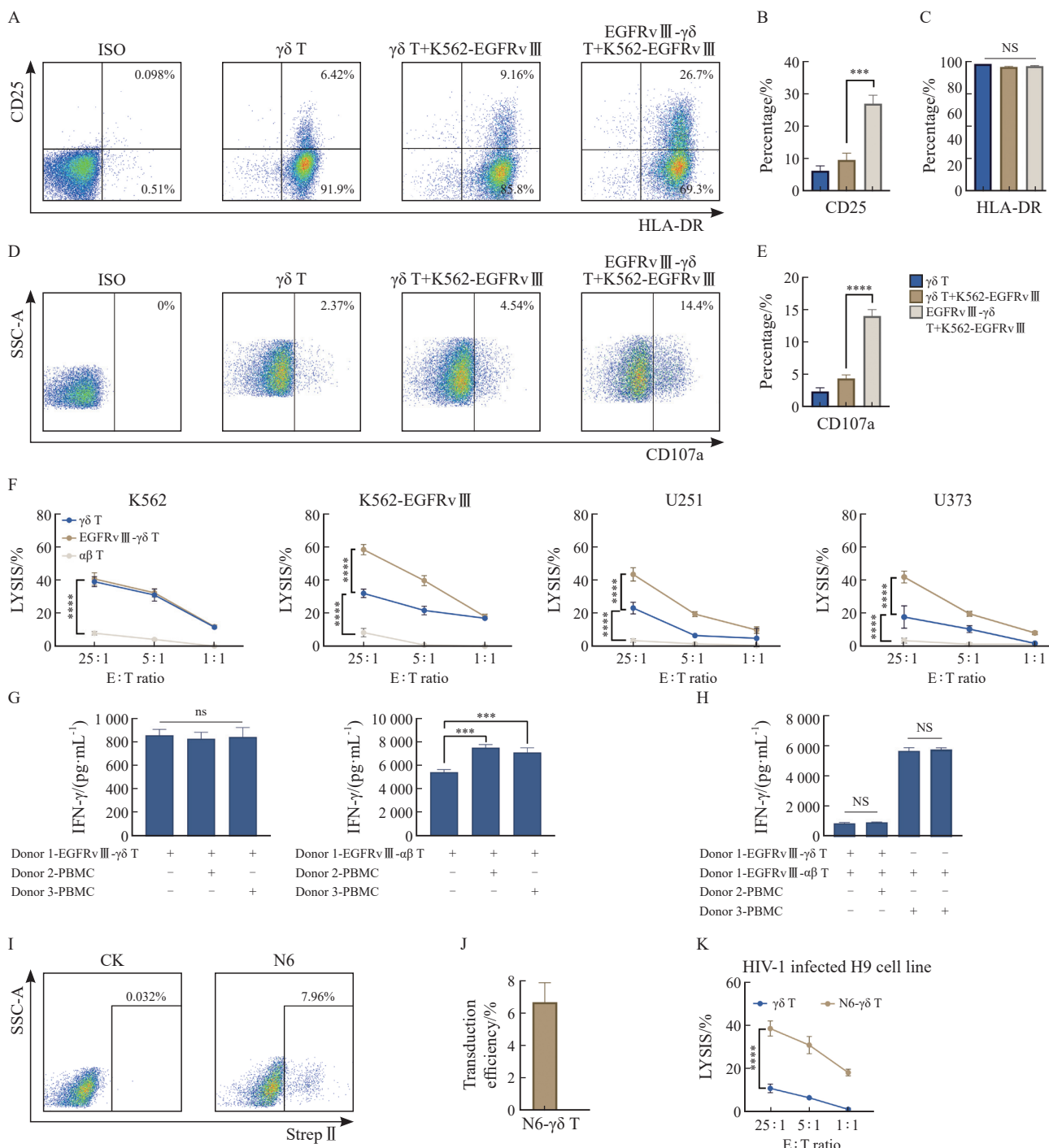


图5 基于优化条件培养的CAR- $\gamma\delta$ T细胞表现出增强的细胞毒性且未发现GVHD的证据

Fig. 5 CAR- $\gamma\delta$ T cells cultured by optimal conditions demonstrate enhanced cytotoxicity with preliminarily no evidence of GVHD

A: representative flow cytometry plots of CD25 and HLA-DR. B, C: Summarized results ($n=3$ donors) of CD25 and HLA-DR expression on $\gamma\delta$ T or CAR- $\gamma\delta$ T cells. D: Representative flow cytometry plots of CD107a. E: Summarized results ($n=3$ donors) of CD107a expression on $\gamma\delta$ T or CAR- $\gamma\delta$ T cells. F: Cytotoxic activity of CAR- $\gamma\delta$ T cells against four cell lines, as determined by calcein release assay at different E : T ratios (1 : 1, 5 : 1, 25 : 1) after 3.5 h of co-culture (one representative donor from two is shown; $n=4$ independent wells). G, H: Detection of IFN- γ in the supernatants from EGFRv III - $\gamma\delta$ T and EGFRv III - $\alpha\beta$ T cells co-cultured with other donors' PBMC and own PBMC ($n=3$ independent wells). I: Representative flow cytometry plots of Strep II-labeled CAR+ 6 days after transduction. J: Summarized results ($n=3$ donors) of Transduction efficiency of N6- $\gamma\delta$ T cells. K: The H9 cell line was infected with HIV-1 (NL4-3) and mixed with N6 CAR- $\gamma\delta$ T cells at different ratios (1 : 1, 5 : 1, 25 : 1). Direct cytotoxicity effects were detected (one representative donor from two is shown; $n=4$ independent wells). Data are presented as $\bar{x} \pm s$. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. NS: Not significant.

例更低，证明IL-7和IL-15共同使用可增强 $\gamma\delta$ T细胞的杀伤及抵抗耗竭的能力。在此基础上，本研究进一步采用正交设计对IL-7和IL-15的浓度进行了系统筛选，发现IL-2+IL-7^{MEDIUM}+IL-15^{MEDIUM}和IL-2+IL-7^{HIGH}+IL-15^{MEDIUM}浓度条件下培养的 $\gamma\delta$ T

细胞在扩增能力、效应表型和耗竭表型等方面表现最优。IL-7或IL-15在低浓度条件下，难以提高 $\gamma\delta$ T细胞的扩增能力和细胞毒性表型。令人意外的是，高浓度IL-15显著降低了细胞活力，可能引起代谢过度活跃，诱导细胞凋亡^[19, 24]。已有

研究^[33]结果显示, IL-7对 $\gamma\delta$ T细胞的发育和存活具有重要作用, IL-7缺陷小鼠胸腺 $\gamma\delta$ T细胞显著减少, 且真皮驻留 $\gamma\delta$ T细胞的存活依赖于IL-7信号^[34]。IL-15在IL-2或磷酸化抗原存在时可促进 $\gamma\delta$ T细胞增殖^[9], 并通过调控颗粒酶B表达增强细胞毒性^[19]。上述结果与本研究观察到的细胞增殖能力提升和PD-1下调等结果一致, 提示IL-7与IL-15可能通过共通的调控通路发挥协同效应。

CAR- $\gamma\delta$ T细胞的转导效率是决定其临床应用的另一关键参数。有关 $\alpha\beta$ T细胞慢病毒转导的研究^[29, 35-37]表明, 转导效率与活化时间密切相关, 在被CD3/CD28激活剂刺激24 h后, $\alpha\beta$ T细胞处于高度增殖状态且未进入分化耗竭期, 该时间转导效率最高; 但若激活48 h后再进行转导, 转导效率可能因T细胞分化程度高和耗竭水平强而下降。这表明早期转导可充分利用细胞处于活跃增殖期且未过度分化的状态。本研究发现活化96~120 h的 $\gamma\delta$ T细胞表现出最优的转导效率, 不同于使用CD3/CD28激活剂直接激活的 $\alpha\beta$ T细胞, $\gamma\delta$ T细胞通过单核细胞呈递的BTN3A活化^[38], 活化进程可能涉及更复杂的信号整合与代谢重编程, 因此需要更长时间达到最佳活化状态。值得注意的是, $\gamma\delta$ T细胞的转导效率与细胞纯度并非呈正相关性, 这与 $\alpha\beta$ T细胞研究中“高纯度T细胞群体有利于转导”的结论不同^[30], 该结果表明, $\gamma\delta$ T细胞纯度并非决定转导效率的关键因素, $\gamma\delta$ T细胞的活化时间能够影响其活化水平, 进而影响其转导效率。此外, 病毒MOI是影响转导效率的另一关键因素。MOI过低将导致 $\gamma\delta$ T细胞转导效率过低, 而MOI过高则可能引起病毒相关毒性, 影响细胞活力和功能^[39]。综合转导效率与细胞质量考量, 我们最终确定MOI为5~10作为 $\gamma\delta$ T细胞转导的最优参数。

尽管本研究通过优化扩增和转导方案改进了CAR- $\gamma\delta$ T细胞的培养工艺, 但作为可同种异体输注的“现货型”免疫细胞, CAR- $\gamma\delta$ T细胞若仅依赖手工操作生产, 仍面临生产周期长、大规模培养困难及污染风险高等挑战。因此, 提高生产的效率和稳定性仍是CAR- $\gamma\delta$ T细胞同种异体临床应用亟待解决的关键问题。未来的研究将进一步探索全封闭自动化培养设备在CAR- $\gamma\delta$ T细胞生产中的应用, 优化关键工艺参数, 并建立规模化生产体系, 以降低生产成本, 提升生产稳定性和效率, 从而加速CAR- $\gamma\delta$ T细胞疗法的临床转化和广泛应用。

综上所述, 本研究优化了 $\gamma\delta$ T细胞的培养

体系 [联合添加IL-2、IL-7 (10 ng/mL) 和IL-15 (10 ng/mL)] 和转导策略 (活化96~120 h采用MOI为5~10转导), 制备出高纯度、高活力、高扩增倍数和转导效率的CAR- $\gamma\delta$ T细胞, 且细胞毒性标志物CD16⁺细胞比例提高, 耗竭标志物PD-1⁺细胞比例降低, 在EGFRv III阳性肿瘤模型及HIV-1病毒感染模型中CAR- $\gamma\delta$ T细胞均表现出增强的细胞毒性。不仅如此, 初步的安全性评估中未检测到GVHD相关证据, 提示其同种异体治疗潜力。上述结果为CAR- $\gamma\delta$ T细胞的生产提供了关键工艺参数和理论依据, 为临床试验的开展奠定了坚实基础。

第一作者:

赵家旋 (ORCID: 0009-0001-8650-9451), 博士。

通信作者:

张同存 (ORCID: 0000-0001-9190-2285), 博士, 教授, E-mail: tony@tust.edu.cn。

作者贡献声明:

赵家旋: 实验方案设计, 实验操作, 实验数据分析, 数据可视化处理, 撰写及修订文章; 王伊玄, 田高辉: 实验操作, 审核及修订文章; 史江舟: 实验方案设计, 文章框架设计, 审核及修订文章; 张同存: 提出研究方向, 提供科研资金, 审核文章。

[参 考 文 献]

- [1] ISMAIL F S, GALLUS M, MEUTH S G, et al. Current and future roles of chimeric antigen receptor T-cell therapy in neurology: a review [J]. *JAMA Neurol*, 2025, 82(1): 93-103.
- [2] LV J Z, LIU Z, REN X T, et al. $\gamma\delta$ T cells, a key subset of T cell for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1562188.
- [3] HU Y, HU Q L, LI Y S, et al. $\gamma\delta$ T cells: origin and fate, subsets, diseases and immunotherapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 434.
- [4] LU Y W, XIANG Z Q, WANG W J, et al. Establishment and validation of a tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cell related prognostic gene signature in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 132: 112054.
- [5] LI W J, ZHAO X, REN C X, et al. The therapeutic role of $\gamma\delta$ T cells in TNBC [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1420107.
- [6] ROZENBAUM M, MEIR A, AHARONY Y, et al. Gamma-delta CAR-T cells show CAR-directed and independent activity against leukemia [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1347.
- [7] SUMARIA N, ROEDIGER B, NG L G, et al. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 505-518.
- [8] LANDIN A M, COX C, YU B, et al. Expansion and enrichment of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells from apheresed human product [J]. *J Vis Exp*, 2021, (175): e62622.
- [9] WANG H, WANG X L, WANG W, et al. Interleukin-15 enhanced the survival of human $\gamma\delta$ T cells by regulating the expression of Mcl-1 in neuroblastoma [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8: 139.

- [10] KHAN M W A, OTAIBI A A, SHERWANI S, et al. Optimization of methods for peripheral blood mononuclear cells isolation and expansion of human gamma delta T cells [J] . *Bioinformation*, 2021, 17(3): 460–469.
- [11] TEO H Y, SONG Y, YONG K S M, et al. IL12/18/21 preactivation enhances the antitumor efficacy of expanded $\gamma\delta$ T cells and overcomes resistance to anti-PD-L1 treatment [J] . *Cancer Immunol Res*, 2023, 11(7): 978–999.
- [12] SONG Y, TEO H Y, LIU Y H, et al. Reviving human $\gamma\delta$ T cells from apoptosis induced by IL-12/18 *via* p-JNK inhibition [J] . *J Leukoc Biol*, 2022, 112(6): 1701–1716.
- [13] TYLER C J, HOTI I, GRIFFITHS D D, et al. IL-21 conditions antigen-presenting human $\gamma\delta$ T-cells to promote IL-10 expression in naïve and memory CD4⁺ T-cells [J] . *Discov Immunol*, 2024, 3(1): kyae008.
- [14] ISHIKAWA J, SUTO A, ABE K, et al. IL-21 is required for the maintenance and pathogenesis of murine V γ 4⁺ IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells [J] . *Front Immunol*, 2023, 14: 1211620.
- [15] STITZ J. Development of HIV-1 vectors pseudotyped with envelope proteins of other retroviruses [J] . *Virology*, 2025, 602: 110300.
- [16] WANG R N, WEN Q, HE W T, et al. Optimized protocols for $\gamma\delta$ T cell expansion and lentiviral transduction [J] . *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1471–1480.
- [17] KONDO M, IZUMI T, FUJIEDA N, et al. Expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells using zoledronate [J] . *J Vis Exp*, 2011(55): 3182.
- [18] SATO K, KONDO M, SAKUTA K, et al. Impact of culture medium on the expansion of T cells for immunotherapy [J] . *Cytotherapy*, 2009, 11(7): 936–946.
- [19] AEHNLIICH P, CARNAZ SIMÕES A M, SKADBORG S K, et al. Expansion with IL-15 increases cytotoxicity of V γ 9V δ 2 T cells and is associated with higher levels of cytotoxic molecules and T-bet [J] . *Front Immunol*, 2020, 11: 1868.
- [20] YOUNAS M, HUE S, LACABARATZ C, et al. IL-7 modulates *in vitro* and *in vivo* human memory T regulatory cell functions through the CD39/ATP axis [J] . *J Immunol*, 2013, 191(6): 3161–3168.
- [21] RATHMELL J C, FARKASH E A, GAO W, et al. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naïve T cells [J] . *J Immunol*, 2001, 167(12): 6869–6876.
- [22] KING L A, JONG M D, VETH M, et al. V δ 2 T-cell engagers bivalent for V δ 2-TCR binding provide anti-tumor immunity and support robust V γ 9V δ 2 T-cell expansion [J] . *Front Oncol*, 2024, 14: 1474007.
- [23] PETERS C, HÄSLER R, WESCH D, et al. Human V δ 2 T cells are a major source of interleukin-9 [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(44): 12520–12525.
- [24] VAN ACKER H H, ANGUILE S, WILLEMEN Y, et al. Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells [J] . *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 101.
- [25] SCHILBACH K, WELKER C, KRICKEBERG N, et al. In the absence of a TCR signal IL-2/IL-12/18-stimulated $\gamma\delta$ T cells demonstrate potent anti-tumoral function through direct killing and senescence induction in cancer cells [J] . *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): 130.
- [26] THEDREZ A, HARLY C, MORICE A, et al. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy [J] . *J Immunol*, 2009, 182(6): 3423–3431.
- [27] NOVY P, HUANG X P, LEONARD W J, et al. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection [J] . *J Immunol*, 2011, 186(5): 2729–2738.
- [28] BESSER M J, SCHALLMACH E, OVIED K, et al. Modifying interleukin-2 concentrations during culture improves function of T cells for adoptive immunotherapy [J] . *Cytotherapy*, 2009, 11(2): 206–217.
- [29] GHASSEMI S, DURGIN J S, NUNEZ-CRUZ S, et al. Rapid manufacturing of non-activated potent CAR T cells [J] . *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(2): 118–128.
- [30] NOAKS E, PETICONE C, KOTSPOULOU E, et al. Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing [J] . *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 20: 675–687.
- [31] 李帆, 张琴星, 童祥文, 等. 不同信号肽对嵌合抗原受体 T 细胞杀伤作用的影响研究 [J] . *中国癌症杂志*, 2022, 32(2): 142–151.
- LI F, ZHANG Q X, TONG X W, et al. A study on influence of different signal peptides on anti-tumor effect of chimeric antigen receptor (CAR) T cells [J] . *Chin Oncol*, 2022, 32(2): 142–151.
- [32] ZHANG S K, GU C J, HUANG L F, et al. The third-generation anti-CD30 CAR T-cells specifically homing to the tumor and mediating powerful antitumor activity [J] . *Sci Rep*, 2022, 12(1): 10488.
- [33] SHITARA S, HARA T, LIANG B F, et al. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes [J] . *J Immunol*, 2013, 190(12): 6173–6179.
- [34] BACCALA R, WITHERDEN D, GONZALEZ-QUINTIAL R, et al. Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors [J] . *J Immunol*, 2005, 174(8): 4606–4612.
- [35] 田高辉, 张琴星, 史江舟, 等. 靶向CD30的CAR-T细胞慢病毒转导条件优化研究 [J] . *中国癌症杂志*, 2023, 33(7): 646–654.
- TIAN G H, ZHANG Q X, SHI J Z, et al. A study on optimized lentiviral transduction conditions in CAR-T cells targeting CD30 [J] . *Chin Oncol*, 2023, 33(7): 646–654.
- [36] CAVALIERI S, CAZZANIGA S, GEUNA M, et al. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence [J] . *Blood*, 2003, 102(2): 497–505.
- [37] LANITIS E, ROTA G, KOSTI P, et al. Optimized gene engineering of murine CAR-T cells reveals the beneficial effects of IL-15 coexpression [J] . *J Exp Med*, 2021, 218(2): e20192203.
- [38] DANNOVI S. Identifying regulators of $\gamma\delta$ T cell activity [J] . *Nat Genet*, 2023, 55(11): 1781.
- [39] LO PRESTI V, CORNEL A M, PLANTINGA M, et al. Efficient lentiviral transduction method to gene modify cord blood CD8⁺ T cells for cancer therapy applications [J] . *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 357–368.

(收稿日期: 2025-03-31 修回日期: 2025-08-21)

(责任编辑: 李广涛)