

嵌合抗原受体T细胞靶向LMP1抗原治疗EB病毒阳性淋巴瘤的功能研究

何慧珍 邢妍妍 张瑜 徐颖茜 田征 邢海燕 唐克晶 饶青 王建祥 王敏

中国医学科学院北京协和医学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津市血液病细胞治疗研究重点实验室,天津 300020

通信作者:王敏,Email:wangjxm@ihcams.ac.cn

【摘要】 目的 制备一种靶向LMP1抗原的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞),研究其对EB病毒(EBV)阳性淋巴瘤的免疫治疗作用。方法 应用分子克隆技术构建二代LMP1 CAR表达质粒,通过慢病毒包装体系包装病毒后感染人T细胞,获得LMP1 CAR-T细胞,体外实验验证LMP1 CAR-T细胞对感染EBV后的LMP1阳性淋巴瘤细胞的特异性细胞毒性作用。结果 ①LMP1蛋白表达于EBV阳性的淋巴瘤细胞表面;②成功构建了二代LMP1 CAR慢病毒载体,感染人T细胞,获取LMP1 CAR-T细胞,感染效率大于80%;③LMP1 CAR-T细胞可特异性杀伤LMP1阳性淋巴瘤细胞,当效靶比按4:1共培养48 h后,LMP1 CAR-T细胞对Raji细胞的杀伤作用增强,对Ramos细胞无明显杀伤作用;④与LMP1阳性淋巴瘤细胞按1:1共培养5 h后,LMP1 CAR-T细胞处理组CD107a⁺ T细胞比例显著高于Vector-T细胞组[(13.25±2.94)%对(1.55±0.05)% $t=3.972, P=0.017$],脱颗粒效果增强;⑤与LMP1阳性淋巴瘤细胞共培养后,LMP1 CAR-T细胞组CD69⁺、CD25⁺ T细胞比例显著高于Vector-T细胞组[(7.40±0.41)%对(3.48±0.47)% $t=6.268, P=0.003$; (73.00±4.73)%对(57.67±2.60)% $t=2.842, P=0.047$],活化效应增强。⑥与LMP1阳性淋巴瘤细胞共培养后,LMP1 CAR-T细胞组细胞因子分泌增强,高于Vector-T细胞组[IFN- γ : (703±73)ng/L对(422±87)ng/L $t=2.478, P=0.068$; TNF- α : (215±35)ng/L对(125±2)ng/L $t=2.536, P=0.064$]。结论 该研究证实EBV阳性淋巴瘤细胞表面可特异表达LMP1蛋白,成功构建了LMP1 CAR慢病毒载体并感染人T细胞,成功获得LMP1 CAR-T细胞。体外实验证实:与LMP1阳性淋巴瘤细胞共培养后,LMP1 CAR-T细胞脱颗粒效果增强,活化效应增强,高效分泌细胞因子,可特异杀伤LMP1阳性淋巴瘤细胞,具有潜在的临床应用前景。

【关键词】 EB病毒; LMP1抗原; 嵌合抗原受体T细胞

基金项目:国家重点研发计划(2019YFA0110200);国家自然科学基金(81830005);中国医学科学院创新工程项目(2021-I2M-1-041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.03.008

Functional investigation of chimeric antigen receptor T cells targeting LMP1 antigen

He Huizhen, Xing Yanyan, Zhang Yu, Xu Yingxi, Tian Zheng, Xing Haiyan, Tang Kejing, Rao Qing, Wang Jianxiang, Wang Min

State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Peking Union Medical University, CAMS & PUMC, Tianjin Key Laboratory of Cell Therapy for Blood Diseases, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Wang Min, Email: wangjxm@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective This study aimed to create a type of CAR-T cells that targets LMP1 antigen and study its immunotherapeutic effect on LMP1-positive hematological malignancies. **Methods** To generate LMP1 CAR-T cells, a plasmid expressing LMP1 CAR was created using molecular cloning technology, and T cells were infected with LMP1 CAR lentivirus. The effects of LMP1 CAR-T cells on specific cytotoxicity against LMP1-positive tumor cell lines infected with the EB virus had been confirmed. **Results** ① LMP1 protein expressing on EB virus-positive lymphoma cells surface was verified. ② The LMP1 CAR-expressing plasmid was created, and LMP1 CAR-T cells were obtained by infecting T cells

with a lentivirus packaging system, with an infection efficiency of more than 80%. ③LMP1 CAR-T cells have a 4:1 effect-to-target ratio in killing LMP1-positive lymphoma cells. The killing effect of LMP1 CAR-T cells on Raji cells was enhanced after 48 h of coculture, but there was no significant killing effect on Ramos, which are LMP1-negative lymphoma cells. ④After coculture with LMP1-positive lymphoma cells at a ratio of 1:1 for 5 h, the degranulation effect was enhanced. The proportion of CD107a⁺ T cells in the LMP1 CAR-T cell treatment group was significantly higher than that in the vector-T cell group [(13.25±2.94)% vs (1.55±0.05)%, $t=3.972$, $P=0.017$]. ⑤After coculture with LMP1-positive lymphoma cells, the proportion of CD69⁺ and CD25⁺ T cells in the LMP1 CAR-T cell group was significantly higher than that in vector-T cell group [(7.40±0.41)% vs (3.48±0.47)%, $t=6.268$, $P=0.003$; (73.00±4.73)% vs (57.67±2.60)%, $t=2.842$, $P=0.047$]. ⑥After coculture with LMP1-positive lymphoma cells, cytokine secretion in the LMP1 CAR-T cell group was higher than that in the vector-T cell group [interferon-gamma: (703±73) ng/L vs (422±87) ng/L, $t=2.478$, $P=0.068$; tumor necrosis factor-alpha: (215±35) ng/L vs (125±2) ng/L, $t=2.536$, $P=0.064$]. **Conclusion** In this study, we found that the LMP1 protein is only found on the surface of the EBV-positive tumor cell. Simultaneously, we created an LMP1 CAR-expressing plasmid and obtained LMP1 CAR-T cells by infecting T cells with a lentivirus packaging system. Furthermore, we demonstrated that LMP1 CAR-T cells could specifically kill LMP1-positive tumor cells in vitro. The degranulation and activation effects of LMP1 CAR-T cells were enhanced after coculture with LMP1-positive tumor cells, indicating a potential clinical application.

【Key words】 Epstein-Barr virus; LMP1 antigen; Chimeric antigen receptor T cell

Fund program: National Key R&D Program of China (2019YFA0110200); National Natural Science Foundation of China (81830005); CAMS Initiative Fund for Medical Sciences (2021-I2M-1-041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.03.008

EB病毒(EBV)是一种双链DNA病毒,属于人类疱疹病毒,人群感染率高达90%^[1],是WHO发布的I级致癌物^[2]。该病毒感染人体后,可引发EBV相关的恶性疾病^[3]。LMP1蛋白是一种六次跨膜的II型跨膜蛋白,有386个氨基酸分子^[4],是一种EBV慢性潜伏感染时特异性表达的膜抗原,在移植后淋巴瘤细胞增殖性疾病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、T/NK T细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、胃腺癌及鼻咽癌中均可表达^[5-6]。

迄今为止,针对EBV感染相关的疾病治疗方法众多,包括抗病毒药物,免疫佐剂,回输EBV特异性细胞毒性T细胞等^[7]。但这些治疗手段疗效十分有限,仍需探索新的治疗方法。嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)免疫疗法是近年来一项新兴的免疫疗法^[8]。该治疗方法通过基因重组的方式,将识别肿瘤相关抗原的单链抗体、铰链与跨膜区、胞内信号域与共刺激分子进行重组,通过慢病毒转染体系包装,感染患者自身的T细胞,获得表达抗肿瘤抗原的单链抗体的T细胞,经过大规模扩增后再回输至患者体内,可以实现靶向消除肿瘤的目的^[9]。

本研究中,针对EBV阳性淋巴瘤靶向特异表达的LMP1抗原,我们制备了LMP1 CAR-T细胞进行研究,通过体外试验,初步验证了LMP1 CAR-T细胞抗EBV阳性淋巴瘤的作用。

材料与方法

一、主要材料

1. 细胞培养:Burkitt淋巴瘤细胞系Raji细胞为本实验室保存,人B淋巴瘤细胞系Ramos细胞购买于国家生物医学实验细胞资源库,均培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中。健康成人外周血标本取自天津市血液中心,人T细胞通过RossetteSep T细胞富集试剂、Ficoll淋巴细胞分离液富集纯化后,培养于含5%胎牛血清和50 IU IL-2的KBM581培养基中。以上细胞都培养在37℃、5%CO₂环境中。

2. 主要试剂:蛋白电泳凝胶试剂盒购于中国达科为生物工程有限公司;4%多聚甲醛购于中国碧云天公司;人IFN- γ 、TNF- α ELISA试剂盒购于德国Novus公司;APC抗人Fab抗体、PE抗人CD107a抗体、APC抗人CD3抗体、PE抗人CD19抗体、PE抗人CD69抗体、PE抗人CD25抗体购于美国Biolegend公司;PE鼠抗人IgG Fc抗体购于美国Jackson Immuno公司;抗人LMP1[H3]IgG1购于英国Absolute Antibody公司;RossetteSep T细胞富集试剂购于美国Stem Cell公司;人T细胞激活因子CD3/CD28磁珠购于美国Gibco公司;细胞因子IL-2购自美国R&D公司;DMEM、RPMI 1640培养基购于美国Gibco公司;KBM581培养基购于美国Corning公司。

二、方法

1. Western blot 验证 LMP1 抗原表达:使用蛋白电泳凝胶试剂盒配胶,取 Raji 和 Ramos 细胞各 1×10^6 于 1.5 ml EP 管中,裂解煮沸后上样,经电泳、湿转、封闭后,再孵育一抗、二抗,最后化学显影。

2. 流式细胞术标记 LMP1 抗原:使用 4% 多聚甲醛常温固定 10 min,再用抗人 LMP1 IgG1 抗体室温孵育 40 min,之后使用 PE 标记的抗人 IgG Fc 4 °C 孵育 30 min,用流式细胞仪检测 LMP1 表达。

3. 构建 LMP1 CAR 表达载体:通过中国专利库,查询得到靶向 LMP1 抗原的人源 scFv 核苷酸序列(专利号:CN 109400712 A),按照先可变区轻链后重链顺序排列,进一步优化 CAR 结构中 anti-LMP1 scFv 结构,通过分子克隆技术构建二代 LMP1 CAR 载体。

4. 慢病毒包装:LMP1 CAR 质粒、Vector (pCDH-GFP)质粒与慢病毒包装质粒 PMD2.0G、JA3、JA4 共同转染 HEK-293T 细胞,待 48 h 后收集病毒上清,将病毒超速离心浓缩后,分装冻存 -80 °C 冰箱备用。

5. LMP1 CAR 载体感染 T 细胞:浓缩后的病毒感染经 CD3/CD28 磁珠刺激活化的 T 细胞,4 d 后使用抗人 IgG F(ab')₂ 抗体标记 T 细胞表面 scFv,应用流式细胞仪检测 CAR 的表达效率。

6. CAR-T 细胞与靶细胞共培养后检测残留的肿瘤细胞:LMP1 CAR-T、Vector-T 细胞按照效靶比 4:1 和 8:1 分别与 LMP1 阳性的 Raji 细胞或 LMP1 阴性的 Ramos 细胞 37 °C、5% CO₂ 共培养 24、48 h,由于 Raji 与 Ramos 细胞稳定表达 CD19 抗原,且 CD19 抗原阳性率都高于 99%,使用流式细胞术检测靶细胞中 CD19 阳性残余细胞比例作为肿瘤细胞残余比例。

7. 脱颗粒效果检测:LMP1 CAR-T、Vector-T 细胞按照效靶比 1:1 分别与 LMP1 阳性的 Raji 细胞或 LMP1 阴性的 Ramos 细胞 37 °C、5% CO₂ 共培养 5 h,流式细胞术检测 T 细胞中 CD107a⁺ T 细胞比例,通过 CD107a⁺/CD3⁺ 比例反映 T 细胞激活率。

8. T 细胞活化能力检测:LMP1 CAR-T、Vector-T 细胞按照效靶比 1:1 分别与 LMP1 阳性的 Raji 细胞或 LMP1 阴性的 Ramos 细胞 37 °C、5% CO₂ 共培养 8、48 h,流式细胞术检测 T 细胞中 CD69 阳性或 CD25 阳性细胞比例,反映 T 细胞活化率。

9. 细胞因子释放检测:LMP1 CAR-T、Vector-T 细胞按照效靶比 4:1 分别与 LMP1 阳性的 Raji 细胞或 LMP1 阴性的 Ramos 细胞共培养,培养条件为

37 °C、5% CO₂,共培养 48 h 后,收集上清,使用 ELISA 试剂盒检测上清内 IFN- γ 、TNF- α 表达情况。

10. 统计学处理:采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。结果以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验分析。

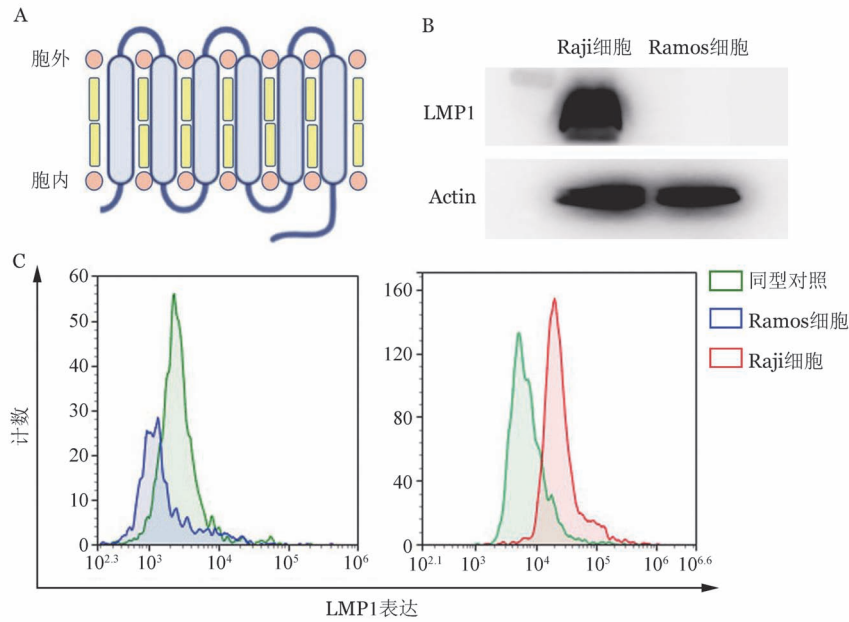
结 果

1. EBV 阳性淋巴瘤细胞特异表达 LMP1 蛋白:LMP1 抗原结构见图 1A,Western blot 及流式细胞术结果证实 EBV 阳性 Raji 细胞表达 LMP1 蛋白,而 EBV 阴性 Ramos 细胞不表达 LMP1 蛋白(图 1B、1C)。

2. LMP1 CAR 质粒构建及 T 细胞感染:LMP1 CAR 载体示意图见图 2A。分选的健康人外周血 CD3⁺ T 细胞用抗人 CD3/CD28 磁珠刺激培养,24 h 后感染慢病毒体系包装的二代 LMP1 CAR 表达载体,从而获得 LMP1 CAR-T 细胞,通过使用 IgG Fab 抗体标记 LMP1 CAR-T 细胞表面表达的抗 LMP1 抗原的 scFv,测得 LMP1 CAR 表达载体的感染效率可达到 80%。培养 12 d 后 LMP1 CAR-T 细胞可扩增至 100 倍(图 2B)。

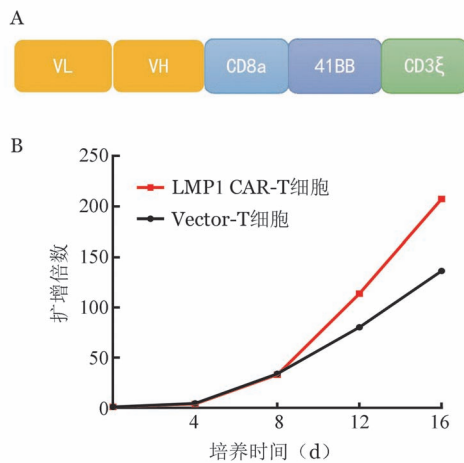
3. LMP1 CAR-T 细胞对靶细胞的特异杀伤作用:LMP1 CAR-T、Vector-T 细胞分别与 Raji 细胞或 Ramos 细胞以效靶比 4:1 和 8:1 共培养 24、48 h,流式细胞术检测共培养体系中残余靶细胞比例,以此反映 LMP1 CAR-T 细胞的杀伤能力。结果显示,与 Raji 细胞共培养 24 h,Vector-T 细胞对 Raji 细胞无明显杀伤作用,而 LMP1 CAR-T 细胞具有明显的杀伤作用。与 Raji 细胞共培养 48 h,与 Vector-T 细胞相比,LMP1 CAR-T 细胞杀伤作用更加显著。而与 Ramos 细胞共培养时,LMP1 CAR-T 细胞与 Vector-T 细胞不能有效杀伤肿瘤细胞(图 3)。结果表明,LMP1 CAR-T 细胞对 Raji 细胞具有特异性杀伤作用,而对 Ramos 细胞无杀伤作用。

4. LMP1 CAR-T 细胞脱颗粒效果:将 LMP1 CAR-T 细胞与 Raji 或 Ramos 细胞按效靶比 1:1 共培养 5 h,流式细胞术检测 CD107a⁺ T 细胞在 T 细胞中的比例。结果显示,在 Raji 细胞中,LMP1 CAR-T 细胞处理组 CD107a⁺ T 细胞比例显著高于 Vector-T 细胞组 [(13.25 \pm 2.94)% 对 (1.55 \pm 0.05)% , *t* = 3.972, *P* = 0.017];而在 Ramos 细胞中,LMP1 CAR-T 细胞组 CD107a⁺ T 细胞比例高于 Vector-T 细胞组 [(9.44 \pm 1.92)% 对 (0.97 \pm 0.18)% , *t* = 4.401, *P* = 0.046],但仍低于 LMP1 CAR-T 细胞与 Raji 细胞共培养组。提



A: LMP1 蛋白结构示意图; B: Western blot 检测 LMP1 蛋白表达; C: 流式细胞术检测 LMP1 蛋白表达
图1 LMP1 蛋白示意图及表达检测

示与特异性抗原的靶细胞共培养 5 h 后, LMP1 CAR-T 细胞显著提高 T 细胞激活率, 脱颗粒效果增强, 有利于更好地发挥抗肿瘤的效果。



A: LMP1 CAR 结构示意图; B: LMP1 CAR-T 细胞体外扩增曲线
图2 LMP1 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞) 的制备与扩增

5. 活化功能检测: 将 LMP1 CAR-T 细胞、Vector-T 细胞分别与 LMP1 阳性 Raji 细胞、LMP1 阴性 Ramos 细胞按效靶比 1:1 共培养 8 h, 检测早期活化标志 CD69⁺ T 细胞比例; 共培养 48 h, 检测晚期活化标志 CD25⁺ T 细胞比例。结果显示, LMP1 CAR-T 细胞与 Raji 细胞共培养后, CD69⁺、CD25⁺ T 细胞比

例显著高于 Vector-T 细胞组 [(7.40±0.41)% 对 (3.48±0.47)% , $t=6.268, P=0.003$; (73.00±4.73)% 对 (57.67±2.60)% , $t=2.842, P=0.047$]。与 Ramos 细胞共培养后, LMP1 CAR-T 细胞组与 Vector-T 细胞组 CD69⁺、CD25⁺ T 细胞比例差异无统计学意义 [(1.99±0.43)% 对 (1.89±0.48)% , $t=0.155, P=0.884$; (58.00±3.51)% 对 (50.00±1.00)% , $t=2.191, P=0.094$]。提示, 与特异性抗原的靶细胞共培养后, 活化的 LMP1 CAR-T 细胞比例增高。

6. 细胞因子释放检测: 将 LMP1 CAR-T 细胞、Vector-T 细胞分别与 LMP1 阳性 Raji 细胞、LMP1 阴性 Ramos 细胞按效靶比 4:1 共培养 48 h 后, ELISA 法检测细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 的表达情况。结果显示, 在 Raji 细胞共培养体系中, LMP1 CAR-T 细胞组 IFN- γ 、TNF- α 表达水平均高于 Vector-T 细胞组 [(703±73) ng/L 对 (422±87) ng/L , $t=2.478, P=0.068$; (215±35) ng/L 对 (125±2) ng/L , $t=2.536, P=0.064$] , 在 0.07 的水平上有统计学意义; 而在 Ramos 细胞共培养体系中, LMP1 CAR-T 细胞组与 Vector-T 细胞组 IFN- γ 、TNF- α 表达水平差异无统计学意义 [(220±57) ng/L 对 (169±28) ng/L , $t=0.799, P=0.469$; (82±32) ng/L 对 (55±12) ng/L , $t=0.769, P=0.485$]。反映出与 LMP1 阳性淋巴瘤细胞共培养时, LMP1 CAR-T 细胞抗肿瘤活性增强。

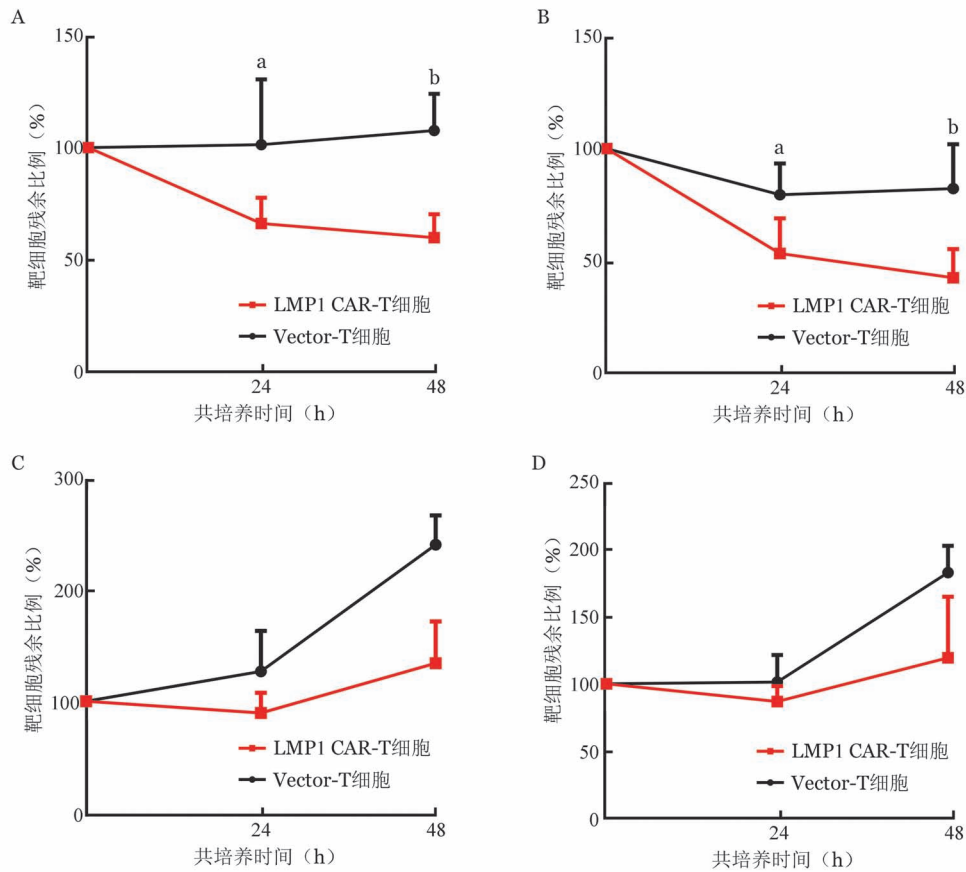
讨 论

自EBV首次通过电镜从非洲 Burkitt 淋巴瘤细胞中发现至今已经 60 余年^[10], 临床治疗上 EBV 阳性的淋巴瘤还是以化疗与放疗联合治疗为主, 联合治疗霍奇金淋巴瘤的 5 年生存率为 80% ~ 90%, 但该方式易导致严重长期毒性, 包括继发性恶性肿瘤、心肺毒性、甲状腺功能减低、不孕症等不良反应, 且对于治疗后复发的患者预后不佳^[11]。近年来, 免疫检查点抑制剂在临床上逐见成效, 如 PD-1 可有效改善患者免疫抑制的情况^[12], 体外扩增患者来源的 EBV 特异性 T 细胞再回输的治疗方式也同样有效, 特别是针对淋巴细胞增殖性疾病^[13]。然而, 这些治疗方法仍然无法满足全面、有效治疗的需求。

CAR-T 细胞免疫治疗是一种可以实现靶向抗肿瘤的治疗方式^[14]。EBV 感染人体后, 感染的 B 细胞和扁桃体上皮细胞在慢性潜伏期均可表达 EBV 相关遗传物质^[15], 此前已有针对鼻咽癌的 LMP1 CAR-T 研究^[16], 此外, 还有针对鼻咽癌的 LMP2a CAR-T^[17]、针对 EBV 感染的 gp-350 CAR-T^[18] 等研究(表 1)。这些 CAR-T 细胞都取得不错的抗肿瘤效果, 但与靶向病毒颗粒蛋白 gp350 相比, 靶向潜伏膜蛋白的 CAR-T 细胞治疗安全性更好。

基于以上研究背景, 本研究的创新之处在于将 EBV 感染后特异性表达的 LMP1 抗原作为靶点, 结合 CAR-T 靶向治疗的治疗方式, 验证靶向 EBV 阳性的淋巴瘤的治疗作用。

综上, 我们成功构建了 LMP1 CAR 表达载体,



A: 效靶比 4:1 与 Raji 细胞共培养; B: 效靶比 8:1 与 Raji 细胞共培养; C: 效靶比 4:1 与 Ramos 细胞共培养; D: 效靶比 8:1 与 Ramos 细胞共培养
图 3 LMP1 嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)特异性杀伤肿瘤细胞作用(实验重复 3 次, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01)

表 1 靶向 EB 病毒(EBV)阳性疾病的嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)治疗策略

文献来源	CAR-T 细胞类型	靶向的肿瘤类型	效果及安全性
Kieser 等 ^[16]	LMP1 CAR-T	靶向 EBV 阳性鼻咽癌	有效, 无 GVHD 发生
陈渊等 ^[17]	LMP2a CAR-T	靶向 EBV 阳性鼻咽癌	有效, 无 GVHD 发生
Slabik 等 ^[18]	gp350 CAR-T	靶向 EBV 急性感染的淋巴增殖性疾病	有效, 但 CD4 ⁺ CAR-T 细胞可发生异种 GVHD

注: GVHD: 移植物抗宿主病

LMP1 CAR 的表达效率达到 80% 以上, 制备出 LMP1 CAR-T 细胞, 并通过将 LMP1 CAR-T 细胞与 LMP1 阳性淋巴瘤细胞共培养的方式, 证实了 LMP1 CAR-T 细胞可被特异性激活、高效分泌细胞因子, 对 LMP1 阳性淋巴瘤具有明显抗肿瘤能力, 且对 LMP1 抗原阴性淋巴瘤无明显特异杀伤能力, 表现出一定的安全性, 为未来临床治疗 EBV 阳性淋巴瘤提供新的治疗思路。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 何慧珍: 资料收集、数据分析、文章撰写; 王敏: 研究设计、文章审阅; 其他作者: 资料收集

参考文献

- [1] Münz C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(11):691-700. DOI: 10.1038/s41579-019-0249-7.
- [2] Xu H, Perez RD, Frey TR, et al. Novel replisome-associated proteins at cellular replication forks in EBV-transformed B lymphocytes[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(12):e1008228. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008228.
- [3] Farrell PJ. Epstein-Barr Virus and Cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14:29-53. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023.
- [4] Tsao SW, Tramoutanis G, Dawson CW, et al. The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(6):473-487. DOI: 10.1016/s1044579x02000901.
- [5] Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases[J]. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1:375-404. DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209.
- [6] Hui KF, Yiu S, Tam KP, et al. Viral-Targeted Strategies Against EBV-Associated Lymphoproliferative Diseases[J]. *Front Oncol*, 2019, 9:81. DOI: 10.3389/fonc.2019.00081.
- [7] Sinha D, Srihari S, Beckett K, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic antigen-specific adoptive T-cell therapy for the treatment of multiple EBV-associated malignancies[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(2):e001608. DOI: 10.1136/jitc-2020-001608.
- [8] Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3):e168-e178. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30823-X.
- [9] Wang Z, Wu Z, Liu Y, et al. New development in CAR-T cell therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):53. DOI: 10.1186/s13045-017-0423-1.
- [10] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24(1):193-209. DOI: 10.1128/CMR.00044-10.
- [11] Murray PG, Young LS. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2019, 134(7):591-596. DOI: 10.1182/blood.2019000568.
- [12] Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas[J]. *Blood*, 2018, 131(1):68-83. DOI: 10.1182/blood-2017-07-740993.
- [13] Barker JN, Doubrovina E, Sauter C, et al. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. *Blood*, 2010, 116(23):5045-5049. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281873.
- [14] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95):95ra73. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [15] Cohen JI. Epstein-Barr virus infection[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(7):481-492. DOI: 10.1056/NEJM200008173430707.
- [16] Kieser A, Sterz KR. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1)[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, 391:119-149. DOI: 10.1007/978-3-319-22834-1_4.
- [17] 陈渊, 陈仁杰, 黄晓辰, 等. 潜伏膜蛋白 2A 嵌合抗原受体-T 细胞的制备及对鼻咽癌细胞杀伤作用的研究[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 53(12):925-930. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2018.12.010.
- [18] Slabik C, Kalbarczyk M, Danisch S, et al. CAR-T Cells Targeting Epstein-Barr Virus gp350 Validated in a Humanized Mouse Model of EBV Infection and Lymphoproliferative Disease[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18:504-524. DOI: 10.1016/j.omto.2020.08.005.

(收稿日期:2021-11-22)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通知

根据中华医学会杂志社的相关规定, 当以人体为研究对象时, 作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位、地区或国家)所制订的伦理学标准并提供该委员会的批准文件复印件, 同时在正文中说明受试对象或其监护人是否知情同意。

本刊编辑部