

# 靶向人类巨细胞病毒 pp65<sub>495-503</sub> 的 T 细胞受体工程化 T 细胞的构建及体外杀伤作用评价

王晨<sup>1</sup> 王斌<sup>1</sup> 沈文<sup>1</sup> 江莎莎<sup>2</sup> 钱冬萌<sup>1</sup>

(1 青岛大学基础医学院病原生物学系, 山东 青岛 266071; 2 西安交通大学附属红会医院检验科)

**[摘要]** 目的 构建靶向人类巨细胞病毒(HCMV)表位肽 pp65<sub>495-503</sub> (NLVPMVATV)的 T 细胞受体工程化 T 细胞(TCR-T 细胞),并评价其对 HCMV 感染胶质母细胞瘤(GBM)细胞的体外杀伤作用。方法 通过流式细胞术分选获得 HCMV pp65 特异性 T 细胞,克隆其 TCR 序列并构建慢病毒载体,转导 CD8<sup>+</sup> T 细胞后,在多种细胞因子刺激下扩增,制备得到 HCMV TCR-T 细胞,并通过流式细胞术检测 HCMV TCR-T 细胞中 CD8<sup>+</sup> NLVPMVATV<sup>+</sup> 细胞占比。将 U-87 MG 细胞分为 A、B 两组,A 组细胞不做任何处理,B 组细胞加入 HCMV AD169 病毒株进行感染,48 h 后收集细胞并通过 Western Blot(WB)实验检测两组细胞中 pp65 蛋白相对表达水平。将 HCMV TCR-T 细胞按照不同效应细胞:靶细胞(E:T)比例(50:1,30:1,20:1,10:1,5:1 和 1:1)分别与 A 组和 B 组靶细胞共同孵育 12 h 和 24 h,并通过乳酸脱氢酶(LDH)法检测 HCMV TCR-T 细胞对两组靶细胞的体外杀伤作用。结果 流式细胞术检测结果显示,扩增培养 13 d 的 HCMV TCR-T 细胞中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例为 86.15%,CD8<sup>+</sup> NLVPMVATV<sup>+</sup> 细胞比例为 74.65%。WB 实验结果显示,与 A 组相比,B 组细胞中 pp65 蛋白相对表达水平显著升高( $t=19.01, P<0.01$ )。LDH 法检测结果显示,在培养第 12、24 小时,不同 E:T 比例下,HCMV TCR-T 细胞对 A 组和 B 组细胞的杀伤率均有显著差异( $F=3.37\sim 112.30, P<0.05$ );与 A 组相比,各 E:T 比例下 HCMV TCR-T 细胞对 B 组细胞的杀伤率均显著升高( $F=19.54\sim 428.97, P<0.05$ )。结论 本研究成功构建了靶向 HCMV pp65<sub>495-503</sub> 的 TCR-T 细胞,该细胞对 HCMV 感染 GBM 细胞具有高效且特异性体外杀伤作用。

**[关键词]** 胶质母细胞瘤;巨细胞病毒感染;T 淋巴细胞;受体,抗原,T 细胞;细胞和组织疗法

**[中图分类号]** R730.264;R512.99

**[文献标志码]** A

**Construction and *in vitro* cytotoxicity assessment of T cell receptor-engineered T cells targeting human cytomegalovirus pp65<sub>495-503</sub>** WANG Chen, WANG Bin, SHEN Wen, JIANG Shasha, QIAN Dongmeng (Department of Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To construct T cell receptor-engineered T (TCR-T) cells targeting human cytomegalovirus (HCMV) pp65<sub>495-503</sub>, and to evaluate their *in vitro* cytotoxicity against HCMV-infected glioblastoma (GBM) cells. **Methods** Flow cytometry sorting was used to obtain HCMV pp65 antigen-specific T cells, and HCMV-pp65-specific TCR $\alpha/\beta$  sequences were cloned and constructed into lentiviral expression vectors. Lentivirus was packaged in 293T cells and were used to transfect CD8<sup>+</sup> T cells, which were then expanded under stimulation with various cytokines. HCMV TCR-T cells were prepared, and flow cytometry was used to measure the proportion of CD8<sup>+</sup> NLVPMVATV<sup>+</sup> cells within HCMV TCR-T cells. U-87 MG cells were divided into group A (no treatment) and group B (infected with HCMV AD169 strain), and after 48 hours, Western Blot was used to measure the relative protein expression level of pp65 in both groups. HCMV TCR-T cells were co-cultured with the target cells from groups A and B at different effector-to-target (E/T) ratios (50:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, and 1:1) for 12 and 24 hours, and lactate dehydrogenase (LDH) assay was used to observe the cytotoxicity of HCMV TCR-T cells against the two groups of target cells. **Results** Flow cytometry showed that after 13 days of expansion, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells accounted for 86.15% in HCMV TCR-T cells, and CD8<sup>+</sup> NLVPMVATV<sup>+</sup> cells accounted for 74.65%. Western Blot showed that compared with group A, group B had a significant increase in the relative protein expression level of pp65 ( $t=19.01, P<0.01$ ). LDH assay showed that after co-culture for 12 and 24 hours, there were significant differences in the cytotoxicity rate of HCMV TCR-T cells against the cells in groups A and B at different E/T ratios ( $F=3.37\sim 112.30, P<0.05$ ). The cytotoxicity rate of HCMV TCR-T cells against the cells in group B was significantly increased compared with that in group A at all E/T ratios ( $F=19.54\sim 428.97, P<0.05$ ). **Conclusion** TCR-T cells targeting HCMV pp65<sub>495-503</sub> are successfully constructed in this study, and these cells exhibit efficient and specific *in vitro* cytotoxicity against HCMV-infected GBM cells.

**[KEY WORDS]** Glioblastoma; Cytomegalovirus infections; T-lymphocytes; Receptors, antigen, T-cell; Cell- and tissue-based therapy

**[收稿日期]** 2025-04-24; **[修订日期]** 2025-12-03

**[基金项目]** 青岛市自主创新重大专项任务项目(20-3-2-4-nsh)

**[通信作者]** 钱冬萌, Email: 2257683545@qq.com; 江莎莎,

Email:15844207055@163.com

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人中最具侵袭性的原发性脑恶性肿瘤,患者中位生存期

仅为 15.4 个月,5 年生存率低于 5%<sup>[1-2]</sup>。目前常规治疗手段包括手术、放疗和化疗,但均难以根治,且缺乏特异性,易损伤正常组织。近年来,免疫疗法如嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(CAR-T)、疫苗及免疫检查点阻断等在 GBM 治疗中取得一定进展,但仍受血脑屏障穿透性差、肿瘤免疫抑制微环境及抗原异质性等因素的影响,临床疗效有限<sup>[3-4]</sup>。人巨细胞病毒(HCMV)虽未被认定为致癌病毒,但其与 GBM 的恶性进展密切相关<sup>[5-6]</sup>。研究显示,HCMV 的即刻早期蛋白 1/2 和磷蛋白 65(pp65)在 GBM 肿瘤组织中特异性表达,且表达水平与肿瘤恶性程度呈正相关,与患者生存率呈负相关<sup>[7-9]</sup>。其中,pp65 是 HCMV 最主要的免疫原性蛋白之一<sup>[10-11]</sup>,其衍生的表位肽 pp65<sub>495-503</sub>(NLVPMVATV)可由 HLA-A \* 02:01 分子呈递,所形成的抗原肽-HLA 分子复合物能够被 T 细胞受体(TCR)特异性识别,从而激活 CD8<sup>+</sup> T 细胞并引发强烈的免疫应答<sup>[12-15]</sup>。因此,该表位是理想的肿瘤免疫治疗靶点。TCR 工程化 T 细胞(TCR-T)疗法通过将特异性 TCR 基因导入患者 T 细胞,使其能够识别由 HLA 分子递呈的抗原肽,从而实现了对肿瘤细胞的精准杀伤<sup>[16-18]</sup>。多项研究证实,人脑星形胶质母细胞瘤细胞 U-87 MG 细胞系为 HLA-A \* 02:01 阳性细胞系<sup>[19-20]</sup>。本研究拟构建靶向 HCMV pp65<sub>495-503</sub>的 TCR-T 细胞,并以 HCMV 感染 U-87 MG 细胞作为靶细胞评估其体外杀伤作用,为 HCMV 相关 GBM 的精准免疫治疗提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

U-87 MG 细胞系和 HEK293T 细胞系购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。HCMV AD169 病毒株由本实验室保存。蛋白提取试剂盒和总 RNA 提取试剂购自上海雅酶生物医药科技有限公司,HCMV pp65 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,HLA-A2-PE 抗体购于上海赛默飞世尔科技(中国)有限公司,人外周血单个核细胞(PBMC)购买于上海合佑生物科技有限公司,CD45-PC5.5 抗体、CD3-FITC 抗体、CD8-PE 抗体、CD8-FITC 抗体、CD4-APC 抗体购买于美国 Biolegend 公司,T-Select HLA-A \* 02:01 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-PE 抗体购自广州妙博生物技术有限公司,乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购于碧云天生物科技有限公司。

### 1.2 HCMV TCR-T 细胞的制备

利用流式细胞术从 PBMC 中分选出 CD8-FITC 和 T-Select HLA-A \* 02:01 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-PE 双阳性细胞,获得 HCMV pp65 抗原特异性 T 细胞。以其 RNA 作为模板,通过 5'-RACE PCR 扩增 TCR $\alpha$  与 TCR $\beta$  链可变区(含互补决定区 3)。对产物测序后筛选出 HCMV pp65 特异性 TCR $\alpha$ / $\beta$  序列,经 P2A 肽链连接构建 TCR $\alpha$ -P2A-TCR $\beta$  表达框,并克隆至慢病毒载体。

使用 PEI 试剂将重组慢病毒质粒转染至 HEK 293T 细胞,培养 18 h 以后将培养基更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,分别于转染后 48 h 和 72 h 收集上清液。再采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC,采用 EasySep<sup>TM</sup> Human CD8 T Cell Isolation Kit 分选出 CD8<sup>+</sup> T 细胞。CD8<sup>+</sup> T 细胞在转导前 1 d 接种于 T175 细胞培养瓶中( $1 \times 10^9$  个/L),使用含 10% AB 血清和 400 kU/L IL-2 的 X-VIVO<sup>TM</sup>-15 培养基激活。次日以慢病毒(感染复数 30)感染 CD8<sup>+</sup> T 细胞,3 d 后将培养基更换为含有 10% AB 血清、30  $\mu$ g/L IL-7、50  $\mu$ g/L IL-15、50  $\mu$ g/L IL-21 和 400 kU/L IL-2 的 X-VIVO<sup>TM</sup>-15 培养基进行扩增。13 d 后,取 20  $\mu$ L 细胞悬液,通过吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色法进行染色,而后使用 Countstar 荧光细胞分析仪检测细胞密度与活率。

### 1.3 靶细胞的制备

将 U-87 MG 细胞接种于细胞培养皿中,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基并置于培养箱(37  $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub>)内静置培养。取处于对数生长期的 U-87 MG 细胞接种于 6 孔板中( $5 \times 10^5$  个/L),分为 A 组和 B 组,每组设置 3 个复孔。在感染前使用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿处理 2 h,而后 B 组细胞加入 HCMV AD169 病毒株(感染复数 5)进行感染,A 组细胞不加入任何试剂处理,2 h 后弃去原培养基,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h 后,收集细胞用于后续实验。

### 1.4 流式细胞术检测 HCMV TCR-T 细胞表型

取扩增培养 13 d 的 HCMV TCR-T 细胞,按照各抗体说明书的推荐稀释比分别标记 CD45-PC5.5、CD3-FITC、CD8-PE、CD4-APC 抗体和 CD8-FITC、T-Select HLA-A \* 02:01 CMV pp65 Tetramer-NLVPMVATV-PE 抗体。孵育结束后,PBS 清洗并重悬细胞,使用贝克曼 CytoFLEX 流式细胞仪

(型号 A00-1-1102)检测,并使用 CytExpert 2.4 软件分析 HCMV TCR-T 细胞中 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>NLVPMVATV<sup>+</sup> 细胞比例。

**1.5 Western Blot(WB) 实验检测靶细胞中 pp65 蛋白相对表达水平**

取 A、B 组 U-87 MG 细胞,使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度,按照 4 : 1 比例与 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合后在 100 °C 下加热 10 min,使蛋白变性。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后转移到 PVDF 膜上,使用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,加入 pp65 抗体(1 : 1 000 稀释)和 GAPDH 抗体(1 : 10 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,然后加入 HRP 标记的二抗(1 : 10 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次后,使用 ECL 超敏发光液显影,使用 ImageJ 软件分析各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参计算 pp65 蛋白相对表达水平。

**1.6 LDH 法检测 HCMV TCR-T 细胞对靶细胞的杀伤率**

将 A、B 组细胞接种于 96 孔板中(1×10<sup>4</sup> 个/L),使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 12 h 后,按不同效应细胞 : 靶细胞(E : T)比例加入 HCMV TCR-T 细胞(效应细胞),E : T 比例分别为 50 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1、5 : 1 和 1 : 1。而后置于培养箱中培养。分别在培养第 12 和 24 小时取出各组细胞,按照 LDH 检测试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪检测 490 nm 和 600 nm 波长下各细胞孔的吸光度值,并计算在不同 E : T 比例下 HCMV TCR-T 对两组靶细胞的杀伤率。

**1.7 统计学处理**

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析,定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用双因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HCMV TCR-T 细胞的表型鉴定**

流式细胞术检测结果显示,扩增培养第 13 天的 HCMV TCR-T 细胞活率为 87%,CD3<sup>+</sup> 细胞比例为 93.66%,其中 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞比例为 1.76%,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例为 86.15%;CD8<sup>+</sup>NLVPMVATV<sup>+</sup> 细胞比例为 74.65%。

**2.2 两组靶细胞中 pp65 蛋白表达情况**

WB 实验结果显示,A 组和 B 组细胞中 pp65 蛋白相对表达水平分别为 1.00±0.01 和 2.14±0.10,与 A 组相比,B 组细胞中 pp65 蛋白相对表达水平显著升高(*t* = 19.01, *P* < 0.01)。

**2.3 HCMV TCR-T 细胞对两组靶细胞的杀伤率比较**

双因素方差分析结果显示,在培养第 12、24 小时时,E : T 比例、靶细胞组别以及 E : T 比例与靶细胞组别的交互作用对于靶细胞的杀伤率均具有显著影响(*F*<sub>E:T比例</sub> = 13.89、107.90, *F*<sub>靶细胞组别</sub> = 258.40、420.00, *F*<sub>交互</sub> = 5.72、67.96, *P* < 0.01);单独效应分析结果显示,不同 E : T 比例下,HCMV TCR-T 细胞对 A 组和 B 组细胞的杀伤率均具有显著性的差异(*F* = 3.37~112.30, *P* < 0.05);与 A 组相比,各 E : T 比例下 HCMV TCR-T 细胞对 B 组细胞的杀伤率均显著升高(*F* = 19.54~428.97, *P* < 0.05)。见表 1、2。

**3 讨 论**

GBM 是成人中最具侵袭性的原发性脑恶性肿瘤,目前常规治疗难以根治,且缺乏特异性,导致患者预后极差<sup>[1-2]</sup>。近年来,以靶向肿瘤相关抗原的免疫疗法(如 CAR-T)在 GBM 治疗中展现出巨大潜力,但也面临着靶点异质性、肿瘤免疫抑制微环境以及脱靶毒性等挑战<sup>[3-4]</sup>。研究表明,HCMV 的某些

**表 1 培养第 12 小时不同 E : T 比例下 HCMV TCR-T 对两组靶细胞的杀伤率( $\chi/\%$ , *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$ )**

分组	50 : 1	30 : 1	20 : 1	10 : 1	5 : 1	1 : 1
A 组	1.90±0.71	-1.23±0.58	0.68±0.78	-0.81±0.48	-0.55±0.55	-0.19±0.60
B 组	7.20±0.46	6.41±0.37	5.19±0.26	3.77±0.13	2.78±0.32	2.58±0.42

**表 2 培养第 24 小时不同 E : T 比例下 HCMV TCR-T 对两组靶细胞的杀伤率( $\chi/\%$ , *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$ )**

分组	50 : 1	30 : 1	20 : 1	10 : 1	5 : 1	1 : 1
A 组	2.31±4.70	0.05±0.98	-4.08±1.19	-5.33±0.40	-4.41±0.34	-1.58±0.25
B 组	55.60±4.42	15.01±1.78	7.64±1.41	7.76±1.03	3.40±0.62	2.14±0.25

抗原(如 pp65)在 GBM 组织中特异性表达,且与肿瘤恶性程度呈正相关<sup>[7-9]</sup>,为开发靶向病毒相关抗原的免疫疗法提供了新思路。其中,pp65<sub>495-503</sub> 表位肽(NLVPMVATV)是理想的免疫治疗靶点,关键在于它可被 HLA-A \* 02:01 分子呈递,并被 TCR 识别,从而启动 CD8<sup>+</sup> T 细胞介导的免疫应答<sup>[12-13,21]</sup>。

TCR-T 细胞疗法能够识别由 MHC 分子递呈的细胞内抗原,在靶向病毒抗原方面相较于 CAR-T 更具优势<sup>[16,22-23]</sup>。因此,本文通过构建靶向 HCMV pp65<sub>495-503</sub> 的 TCR-T 细胞(HCMV TCR-T 细胞),旨在评估其体外特异性杀伤 HCMV 感染 GBM 细胞的效果,为 HCMV 相关 GBM 的免疫治疗提供实验依据。既往研究证实,U-87 MG 细胞系为 HLA-A \* 02:01 阳性细胞系<sup>[19-20]</sup>。本研究利用 HCMV AD169 病毒株感染 U-87 MG 细胞构建了用于评价 HCMV TCR-T 细胞体外杀伤功能的实验体系。WB 实验结果显示,HCMV 感染能有效诱导 U-87 MG 细胞表达 pp65 蛋白,与 COBBS 等<sup>[7]</sup> 研究结果一致,表明 HCMV AD169 病毒株感染 U-87 MG 细胞能够在体外模拟 HCMV 相关 GBM 的抗原表达特征,可以作为评价 HCMV TCR-T 细胞体外杀伤功能的靶细胞。

在效应细胞方面,本研究通过将编码 HCMV pp65 特异性 TCR $\alpha/\beta$  的基因序列克隆至慢病毒表达载体,在 HEK293T 细胞中包装并收集病毒;随后,用该病毒感染 CD8<sup>+</sup> T 细胞,并在 IL-2、IL-7、IL-15 和 IL-21 等细胞因子刺激下进行体外扩增。检测结果显示,上述制备得到的 HCMV TCR-T 细胞活率良好(87%),且其中 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 细胞比例为 86.15%,HCMV pp65 抗原特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞占比高达 74.65%。CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 细胞代表细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL),较高的 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 细胞比例意味着上述制备的 HCMV TCR-T 细胞具有较强的肿瘤杀伤能力;而其中较高比例的 HCMV pp65 抗原特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞则保证了 HCMV TCR-T 细胞具备较强的靶向识别潜能,其制备效率与 SCHUB 等<sup>[18]</sup> 报道的巨细胞病毒特异性 TCR-T 细胞研究结果相当,表明本研究采用的 TCR 序列筛选和慢病毒转导体系是高效且可靠的。

LDH 实验结果显示,在培养第 12 小时,HCMV TCR-T 细胞对 HCMV 感染 U-87 MG 细胞表现出显著的特异性杀伤效果;而在培养第 24 小时,HCMV TCR-T 细胞对 HCMV 感染 U-87 MG 细胞的特异性杀伤效果进一步提高,E:T 比例为

50:1 时杀伤效果最为明显。上述结果提示 HCMV TCR-T 细胞对靶细胞的杀伤作用具有明确的效靶比(E:T 比例)依赖性和时间依赖性。这一现象与 CTL 经典的杀伤机制相符,即更多的效应细胞和更长的作用时间能导致更加充分的靶细胞裂解<sup>[24-25]</sup>。这种剂量与时间依赖模式与 WILLS 等<sup>[11]</sup> 关于 pp65 特异性 CTL 反应的研究结论一致,证明了本模型中 HCMV TCR-T 细胞功能的可靠性。值得注意的是,本研究所采用的 TCR 能够精准地识别由 HLA-A \* 02:01 递呈的 pp65<sub>495-503</sub> 表位,这与 REISER 等<sup>[13]</sup> 从结构生物学层面上证实该肽段与 HLA-A \* 02:01 具有高亲和力的发现相互支持,从功能层面印证了该靶点复合物的有效性。

本研究首次构建并且验证了靶向 pp65<sub>495-503</sub> 的 TCR-T 细胞对 HCMV 感染 U-87 MG 细胞的体外特异性杀伤作用,为 HCMV 相关 GBM 的治疗提供了一种极具潜力的新策略。然而,本研究亦存在局限性。首先,实验仅在体外对 HCMV TCR-T 细胞进行靶细胞杀伤作用评价,不能完全模拟 GBM 患者体内复杂的肿瘤微环境。该环境中的免疫抑制细胞(如肿瘤相关巨噬细胞、调节性 T 细胞)和免疫抑制因子可能会影响 HCMV TCR-T 细胞的浸润与功能持久性<sup>[26]</sup>。其次,本研究使用的体外细胞模型属于 HCMV 急性感染模型,而 HCMV 在 GBM 患者体内可能处于潜伏感染状态,抗原表达水平比较低<sup>[27]</sup>,HCMV TCR-T 细胞对 HCMV 潜伏感染细胞的清除能力有待进一步评估。未来的研究需要在 GBM 动物模型中验证 HCMV TCR-T 细胞的体内抗肿瘤活性及安全性。此外,为解决个体化 TCR-T 疗法成本高、制备周期长的问题,需要进一步开发通用型 TCR-T 或者通过 CRISPR 等基因编辑技术优化 TCR 表达<sup>[28]</sup>,以推动其临床转化。

综上所述,本研究首先成功构建了靶向 HCMV pp65<sub>495-503</sub> 的 TCR-T 细胞,而且该细胞对 HCMV 感染 GBM 细胞具有高效且特异性体外杀伤作用。本研究有望为 HCMV 相关 GBM 的过继性免疫治疗提供新的思路和坚实的实验基础。尽管其临床转化仍面临挑战,但随着对肿瘤微环境相互作用机制的深入理解及细胞制备技术的不断革新,TCR-T 疗法有望成为 HCMV 相关 GBM 的重要治疗手段。

作者声明:王晨、王斌、江莎莎、钱冬萌参与了研究设计;王晨、江莎莎、沈文、钱冬萌参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] VAN DEN BENT M J, GEURTS M, FRENCH P J, et al. Primary brain tumours in adults [J]. *Lancet*, 2023, 402 (10412):1564-1579.
- [2] HERTLER C, FELSBURG J, GRAMATZKI D, et al. Long-term survival with IDH wildtype glioblastoma: First results from the ETERNITY Brain Tumor Funders' Collaborative Consortium (EORTC 1419)[J]. *Eur J Cancer*, 2023,189:112913.
- [3] SALVATO I, MARCHINI A. Immunotherapeutic strategies for the treatment of glioblastoma: Current challenges and future perspectives[J]. *Cancers (Basel)*, 2024,16(7):1276.
- [4] FAWZY M, ELTAYEBI H M, SAMIR A. Exploring neural stem cell therapies as innovative treatments for glioblastoma [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2025,45(1):108.
- [5] EL BABA R, PASQUEREAU S, HAIDAR AHMAD S, et al. EZH2-Myc driven glioblastoma elicited by cytomegalovirus infection of human astrocytes[J]. *Oncogene*, 2023,42(24):2031-2045.
- [6] MERCADO N B, REAL J N, KAISERMAN J, et al. Clinical implications of cytomegalovirus in glioblastoma progression and therapy[J]. *NPJ Precis Oncol*, 2024,8(1):213.
- [7] COBBS C S, HARKINS L, SAMANTA M, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma[J]. *Cancer Res*, 2002,62(12):3347-3350.
- [8] WEN L, ZHAO F, QIU Y, et al. Human cytomegalovirus DNA and immediate early protein 1/2 are highly associated with glioma and prognosis[J]. *Protein Cell*, 2020,11(7):525-533.
- [9] MALEKI F, SADIGH Z A, SADEGHI F, et al. Human cytomegalovirus infection in Iranian glioma patients correlates with aging and tumor aggressiveness[J]. *J Med Virol*, 2020,92(8):1266-1276.
- [10] JIANG S S, ZHANG X J, ZHAO H P, et al. Optimized multi-epitope neoantigen human cytomegalovirus vaccine based on adenovirus vectors elicits potent antiviral immunity [J]. *Front Immunol*, 2025,16:1658220.
- [11] WILLS M R, CARMICHAEL A J, MYNARD K, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: Frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL[J]. *J Virol*, 1996,70(11):7569-7579.
- [12] WEEKES M P, WILLS M R, MYNARD K, et al. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion *in vivo* [J]. *J Virol*, 1999,73(3):2099-2108.
- [13] REISER J B, LEGOUX F, MACHILLOT P, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a public CMV-specific TCR in complex with its cognate antigen[J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009,65(Pt 11):1157-1161.
- [14] BEWARDER M, HELD G, THURNER L, et al. Characterization of an HLA-restricted and human cytomegalovirus-specific antibody repertoire with therapeutic potential[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020,69(8):1535-1548.
- [15] WAGNER E K, QERQEZ A N, STEVENS C A, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell receptor engineered for high affinity and soluble expression using mammalian cell display[J]. *J Biol Chem*, 2019,294(15):5790-5804.
- [16] ROSENBERG S A, RESTIFO N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2015,348(6230):62-68.
- [17] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018,359(6382):1361-1365.
- [18] SCHUB A, SCHUSTER I G, HAMMERSCHMIDT W, et al. CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy[J]. *J Immunol*, 2009,183(10):6819-6830.
- [19] WU A H, HALL W A, LOW W C. Identification of HLA A\*0201 glioblastoma multiforme cell lines for immunotherapy by PCR-SSP and DNA sequencing[J]. *J Neurooncol*, 2004,66(1-2):1-8.
- [20] ZENG X, NONG W X, ZOU X Q, et al. Prediction and identification of HLA-A\*0201-restricted epitopes from cancer testis antigen CT23 [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 20239(3):2293299.
- [21] GONZALEZ-GALARZA F F, MCCABE A, SANTOS E J M D, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: Gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020,48(D1):D783-D788.
- [22] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer [J]. *Science*, 2020,367(6481):eaba7365.
- [23] WANG V, SAVOLDO B, GUIMARAES J A, et al. Alloreactive-free CAR-VST therapy: A step forward in long-term tumor control in viral context [J]. *Front Immunol*, 2025,15:1527648.
- [24] SANCHEZ E E, TELLO-LAFOZ M, GUO A J, et al. Apoptotic contraction drives target cell release by cytotoxic T cells [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(9):1434-1442.
- [25] WEIGELIN B, DEN BOER A T, WAGENA E, et al. Cytotoxic T cells are able to efficiently eliminate cancer cells by additive cytotoxicity [J]. *Nat Commun*, 2021,12(1):5217.
- [26] QUAIL D F, JOYCE J A. The microenvironmental landscape of brain tumors [J]. *Cancer Cell*, 2017,31(3):326-341.
- [27] DIRCK A, DIGGINS N, PEREZ W, et al. HCMV promotes viral reactivation through the coordinated regulation of Notch signaling by UL8 and miR-UL36 [J]. *mBio*, 2026, 17(3):e0337725.
- [28] QASIM W, ZHAN H, SAMARASINGHE S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2017,9(374):eaaj2013.