

CAR-T 细胞免疫治疗在急性 B 淋巴细胞白血病治疗中的应用及进展

冯佳巍 李丽敏 于洪娟 周晋

摘要 复发难治型急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)的病死率居高不下,新型治疗方法的研究迫在眉睫。嵌合抗原受体 T 细胞免疫治疗(chimeric antigen receptor, CAR-T 细胞免疫治疗)近年来在肿瘤治疗方面取得了突破性进展。本文将简要介绍靶向 CD19 的 CAR-T 细胞的人工构建和临床应用,以及 CAR-T 细胞免疫治疗的前景与发展。

关键词 B-ALL CAR-T 细胞免疫治疗 临床应用

中图分类号 R551 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.007

在各种恶性肿瘤中,ALL 的治疗效果颇佳,但其中仍有一部分高危、复发难治型 ALL 的疗效及预后较差,其中约 5% 的患者长期存活可能性小,尤其伴有特殊染色体异常(如费城染色体)或起病时白细胞极高的患者^[1,2]。但对于复发难治型急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL),免疫治疗有相当的优越性。近几十年来,随着癌症相关的固有免疫生物学的进展,癌症的有效免疫治疗逐渐出现。免疫治疗的基础是机体的免疫系统反应与抗肿瘤免疫应答,目的在于增强机体免疫系统攻击肿瘤的有效性和特异性^[3]。与单克隆抗体不同,T 细胞具有直接增殖和溶解肿瘤细胞的能力。当传统治疗如化学治疗、放射治疗和靶向治疗已经不能够解决所有问题时,免疫治疗仍能为人类带来新的希望^[4]。

一、CAR 的结构与特点

1. CAR-T 细胞的起源:在白血病的免疫治疗中,最具有代表性之一当属 CAR-T 细胞免疫治疗。当前所提出的 CAR 概念是基于两项开创性研究。随着 Gross 等^[5]对 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)复合物的构建和功能越来越多的了解,Goeman 发现用抗体来替换 TCR 可变区,赋予 T 细胞特异功能将是一项可行的治疗方案^[6]。后续研究发现可通过 CD8、CD4、CD25 或 ζ 的细胞质片段来构建细胞膜嵌合蛋白。经过一系列功能完善,构建出非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)

限制性的 T 细胞,其具有半抗原特异性的靶细胞裂解功能,这种新型人工受体被人们称为第 1 代 CAR^[3]。

2. CAR-T 的组成结构:CAR 是一种人工 I 型跨膜蛋白以及跨膜结构域^[3],主要由 3 部分组成:①衍生自单克隆抗体单链可变片段的细胞外抗原结合结构域;②衍生自 CD3、CD4、CD8 或 CD28 的跨膜连接结构域;③由具有或不具有共刺激分子的 CD3 ζ 组成的细胞内信号结构域^[7]。

3. 不同代 CAR 的各自特点:第 1 代 CAR 只有 1 个 CD3 ζ 信号结构域,为 T 细胞的活化提供信号 1,有增殖效应弱和持续时间短等缺点^[8,9]。第 2 代 CAR 引入共刺激因子 CD28(具有最佳特征的共刺激分子)^[10]。它能介导产生多达 20 倍的白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)。另外还发现远离膜的 CD28 信号结构域和 ζ 链的构建体可以使信号更有效地表达,从而确定了信号排列模式。除了 CD28 共刺激域,也有 CD134/CD137(41BB)等其他共刺激域。第 2 代 CAR 可以更好的刺激细胞因子的产生和维持自身的存活。当前临床应用中最广泛的即第 2 代 CAR,尤其血液恶性肿瘤方面。第 3 代 CAR 同时含有两个刺激域,具有更有效的持久性和其他 T 细胞功能。第 4 代 CAR 在以上结构和功能中增加了响应型启动子和自杀基因来增强抗肿瘤效应。期许适时释放和终止释放细胞因子,以防产生过于严重的细胞因子释放综合征(cytokine-release syndrome, CRS),尽可能的避免机体产生多脏器功能失常综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)等不可挽回的后果。随着 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术的快速发展, CAR-T 细胞的制备正在逐渐得到改

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81430088)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科

通讯作者:周晋,教授,博士生导师,电子信箱:zhoujin1111@126.com

com

善^[7,11]。

4. CAR-T靶标的选择:理想的CAR-T细胞应满足以下特点:扩增后可以满足体内和体外杀伤需求,杀死肿瘤细胞,动员肿瘤细胞,不良反应可预测和可控。一般选择肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)作为攻击靶标, TAA在肿瘤细胞中差异性过度表达,而在正常细胞中仅低水平表达或不表达。CD19存在于所有B细胞的细胞膜表面,包括正常B细胞和肿瘤细胞,在其他健康组织中不表达。是一个经过广泛验证的非TAA靶标,靶向CD19的CAR-T细胞可以特异性结合CD19表达阳性的细胞,并完成对细胞的精准杀伤。

二、CAR-T的有效性

经过十年的临床前优化, CAR-T细胞在血液系统恶性肿瘤方面的治疗效果安全,有效且稳定。CAR-T细胞免疫治疗对于复发难治型B-ALL是当前最有效的治疗方式,疗效明显优于传统治疗。2017年3月,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准CD19-CAR-T可以用于治疗复发难治型B-ALL。多家药品公司已经准备上市该新药。

1. 预处理方案与回输剂量:预处理方案尚无统一标准,回输前可无预处理、单用环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)、环磷酰胺联合氟达拉滨(fludarabine, Flu)(FC)方案、氟达拉滨联合阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)(FA)方案等可降低肿瘤负荷、降低淋巴细胞活性的方案,各种药物的使用剂量和天数均不一致。Zhang的一项Meta分析发现,未行预处理的患者6个月无进展生存期(progression-free survival, PFS)仅54%,而预处理后回输者PFS约94.7%^[12]。国外的文献报道中,使用CTX单药或FC方案较多,笔者医院近两年使用去甲基化药物(地西他滨)联合CTX取得了较好的疗效^[3]。适当的预处理有助于提高CAR-T细胞治疗的有效性和安全性。

回输剂量多为 $1 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 个数量级左右,如细胞数过少不能有效的扩增以及发挥抗肿瘤效应,细胞数过高可能引起致命的CRS反应或细胞瘀滞。CRS反应的强度与输注前体内肿瘤负荷呈相关性,不完全取决于CAR-T细胞的输注剂量。回输方式也多种多样,可一次性回输,也可分次回输。

2. CAR-T治疗后外周血象变化情况:患者输注CAR-T细胞后最直观的变化就是外周血细胞计数。多于输注后4~6天开始进入粒细胞缺乏期,9~13

天后可自行恢复,少数患者需皮下注射粒细胞集落刺激因子(human granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)协助粒细胞计数的恢复。巨核系造血也会受到影响,必要时需要输注血小板来防止重要脏器出血等风险。

3. CAR-T治疗的临床疗效观察:在MSKCC首先开展CD19-CAR-T细胞的I期临床试验,NCI和UPENN也紧随其后^[13]。他们对于复发难治型B-ALL的完全缓解(complete remission, CR)率分别是88%、67%和90%。浙江大学附属第一医院的II期临床试验CR率为94.7%^[7,14]。笔者医院当前总体反应率(overall response rate, ORR)为92.3%,CR率为88.9%。与国内外其他医疗中心的结果(70%~94%)相差不大^[3]。其中,包括异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)及自体造血干细胞移植(autologous hematopoietic stem cell transplantation, auto-HSCT)后复发的患者,应用CAR-T治疗仍能获得CR。

4. 后续治疗及疾病转归:患者行CAR-T细胞治疗后多数可达到完全缓解,但缓解期维持较短,可能与本身疾病肿瘤负荷过高,或与CAR-T细胞在体内扩增能力低下或维持时间较短有关。缓解后可尽早桥接异基因造血干细胞移植治疗,避免再次复发^[7]。笔者医院多名患者CAR-T治疗后桥接allo-HSCT,大多数患者至今仍无病存活。

三、CAR-T细胞免疫治疗的不良反应与毒性及应对

CAR-T治疗同样存在不良反应与毒性,可能与预处理药物毒性相关,也可能与CAR-T细胞自身结构、输注剂量、既往治疗和肿瘤负荷相关^[15]。

1. CRS反应:是治疗过程中最典型最致命的毒性。通常以发热、肌痛、呼吸困难甚至急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、心律失常、循环衰竭、渗漏综合征、MODS等为表现。因输注后引起机体发生一系列免疫反应,刺激体内免疫细胞合成并释放多种炎性介质及细胞因子,形成正反馈的瀑布反应而形成^[16]。其释放的细胞因子以白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)最具有代表性,其次有肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)、IL-2等^[17]。可设置预测性的生物标志物,如C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、铁蛋白(ferritin, Ferr)、IL-6血清中的浓度^[18]。依据患者症状及化验指标制定了

CRS 分级诊断标准^[19]。Ⅲ级以上的 CRS 反应需要紧急处理。通过对笔者医院 50 余例患者治疗的临床观察,IL-6 受体拮抗剂——托珠单抗可以有效的控制细胞因子风暴,且当患者治疗前肿瘤负荷较高时,可以预防性应用一次剂量^[12]。但国际上对于预防性用药的说法尚无定论,不确定是否会影响 CAR-T 细胞的抗肿瘤效应。关于是否应用类固醇类激素及预防性使用托珠单抗尚未形成定论。其他细胞因子拮抗剂如 TNF- α 拮抗剂(英夫利昔)的使用也体现出应有的临床活性。NSG 小鼠实验中验证依鲁替尼可能有拮抗 CD19 CAR-T 的 CRS 反应^[3]。在这些细胞因子拮抗剂治疗 CRS 反应过程中,可能也在一定程度上削弱抗肿瘤效应。

2. on target/off tumor 效应:由于笔者使用的是 CD19 为靶向的 CAR-T 细胞,而 CD19 存在于所有 B 细胞表面,正常 B 细胞亦表达,对靶抗原强大的杀伤同时也会造成正常组织的损伤。因此引起 B 细胞发育不全、浆细胞缺乏症,甚至继发丙种球蛋白缺乏血症。目前的解决方式仅限于静脉补充丙种球蛋白(immunoglobulin, Ig),但仅能补充 IgG^[19]。且当前研究都尽可能的使 CAR-T 细胞更长期的在体内存在,起到肿瘤免疫监视作用,这种对于正常 B 细胞杀伤效应也会持续存在。

3. 神经系统毒性:约 13%~52% 的患者中可见神经系统毒性,程度轻重不等,中枢与外周神经皆可累及。主要表现为意识模糊、谵妄、抽搐、阵挛、肢体感觉及运动障碍等,一般呈自限性^[20]。可能与预处理方案毒性相关,FC 方案后常常伴发,也常伴发严重的 CRS 反应,原因尚不清楚,有待进一步研究。美国国家癌症研究院(National Cancer Institute, NCI)认为,IL-6 受体拮抗剂托珠单抗(tocilizumab)会暂时加重神经毒性,因此他们推荐使用类固醇激素来对抗Ⅲ级以上的 CRS 反应^[3]。

大量临床报道也证实,CAR-T 细胞可透过血-脑脊液屏障进入脑脊液中^[7],尤其针对于有中枢神经系统白血病(central nervous system leukemia, CNSL)的患者,笔者医院多名患者腰椎穿刺可不止一次的发现脑脊液形态学中的 CAR-T 细胞,这类患者的神经系统毒性通常反应更重。既往接受过 CAR-T 治疗近两年,脑脊液形态学涂片仍可见 CAR-T 细胞。但并不是所有 CNSL 患者都有明显的中枢神经系统毒性。预处理前可以预防性腰椎穿刺+鞘内注药以减轻神经系统毒性。

4. 其他毒性:(1)噬血性淋巴组织细胞增多症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH):可能与 CRS 平行发生,患者表现为骨髓可见噬血现象、外周血细胞计数降低、高热、凝血功能障碍。HLH 的发生与基因易感性相关,继发性 HLH 应用托珠单抗或类固醇激素可达到良好控制。继发凝血功能障碍体现为纤维蛋白原降低,可通过输注同型血浆或直接输入纤维蛋白原纠正凝血异常。(2)过敏反应:与鼠源性 scFV 片段相关,人源化的 FV 可减少这种反应。有些过敏反应仅表现为输注后早期发热,与输液反应重叠,难以鉴别。很少出现严重的过敏反应如过敏性休克等危及生命现象。(3)肿瘤溶解综合征:仅在少数患者发生。CAR-T 细胞识别肿瘤细胞表面抗原后,形成激活的 CAR-T 细胞,释放细胞因子并开始自我增殖,启动机体免疫应答,释放颗粒酶与穿孔素攻击肿瘤细胞。肿瘤溶解综合征可能与患者输注前自身肿瘤负荷过高有关,需密切观察尿酸及乳酸脱氢酶水平,预防急性肾小管堵塞引起急性肾衰竭,甚至不可逆的损伤。

5. 对于 CAR-T 后临床状态的应对:首先明确不良反应的起因,如预处理相关毒性可考虑调整预处理用药方案。探索不同预处理方案后粒细胞缺乏期的长短有无差异,尽可能缩短粒缺期,以防发生感染。由于体内 B 细胞受到攻击,患者自身免疫尚未完全恢复,感染不易控制。

患者肿瘤负荷与 CRS 反应的严重程度有一定相关性,减低肿瘤负荷或许可相应减轻 CRS 反应。CRS 反应发生时要积极应对,一般发生在输注 CAR-T 细胞后中位数 4 天,平均 4.8 天。患者体温应控制于 39℃ 以下,避免高温对于脑及其他组织的损伤。密切关注生命体征,必要时予高级生命支持治疗^[21]。

四、CAR-T 治疗的挑战

目前 CAR-T 治疗虽然看起来前景光明,但仍然存着一些问题限制了其广泛的临床应用。

1. 严重不良反应的控制:CAR-T 细胞回输最显著的不良反应是 CRS 反应,对于发热、低血压状态予积极对症支持治疗。粒细胞缺乏期应注意预防感染,警惕肿瘤溶解综合征,加强抗感染、补液、水化及碱化,防止感染的发生、肾小管酸中毒甚至急性肾衰竭。如果能较好的预见各种不良反应,保障支持治疗,患者可以安全度过危险期。

2. 治疗无效及复发:(1)输注无效:虽然 CD19 在所有 B 细胞表面都有表达,但治疗过程中仍有输注

无效的病例。笔者医院 1 例高危 B - ALL 患儿,经标准诱导治疗后复发,接受 CAR - T 细胞免疫治疗后未进入粒细胞缺乏阶段,骨髓及外周血均未检测到 CAR - T 细胞的扩增,无显著的细胞因子释放峰。不除外该患者同时存在 CD19 克隆阴性的肿瘤细胞,且此类型肿瘤细胞在体内占优势,因此更多有效的治疗靶标有待于进一步探索。国外有报道改善受体共刺激以增强抗肿瘤效应。(2) 输注后早期复发:尽管 CAR - T 细胞免疫治疗的有效率在 90% 左右。但缓解后早期复发仍然是需要面临的一项影响远期预后的重要因素。部分患者出现 CD19 阴性克隆的复发,可能源于发病时 CD19 阴性表达的肿瘤细胞不占优势,受到 CD19 阳性表达肿瘤细胞的抑制,但 CAR - T 细胞清理了 CD19 阳性表达的肿瘤细胞后,使其他白血病细胞失去抑制而迅速扩增所致^[22]。如众多学者提出,CAR - T 后尽早桥接 HSCT,且目前单倍体移植应用广泛,患者供体缺乏将不再是阻碍,这可能是改善远期预后的最佳手段。(3) CD19 突变:在某些既往检查 CD19 阳性表达的患者中,经 CAR - T 细胞免疫治疗后复发,再次检测 CD19 仍为阳性,但抗 CD19 抗体无法识别,CAR - T 细胞也无法识别并攻击。但来自 CHOP/UPenn 等的研究已经报道,是源于治疗过程中损害了抗原表位,造成 CD19 突变,并非 CD19 阴性复发。当前有临床中心在研制双表 CAR,即 CD19 与 CD20 或其他抗原共同表达,这样的制备过程可能会带来转染效率的下降,但在临床疗效观察中,似乎可以捕捉部分“漏网之鱼”。还需大量临床前试验确定新型 CAR 的安全性及有效性。

五、展 望

CAR - T 治疗是肿瘤史上又一重大突破,尤其是 CD19 - CAR - T 细胞应用于 B 细胞恶性肿瘤治疗的成功经验,引发众多研究对于其他肿瘤治疗方面的探索,现已被认为是最有可能治愈肿瘤的方向^[23]。另外,CAR - T 还可应用于肿瘤外其他疾病的治疗,其中 CAR - T 结构中的自杀基因,应用于 allo - HSCT 中治疗移植抗宿主病已经取得初步成功,该疗法通过修饰 T 淋巴细胞来表达“自杀基因”,实现给细胞安置“开关”。在自身免疫系统疾病中,关于其治疗多发性硬化的动物模型已取得成功^[24]。与传统治疗相比,CAR - T 的出现是精准医学的又一大进步,相比于化疗,它毒性及脏器损伤降至最低,疗效却更好。最近研究的其他靶向的 CAR - T 细胞可以应用于其他类别的肿瘤治疗,针对髓系恶性肿瘤也有相应的 CAR - T 正

在临床试验中。相信经过更进一步的研究与发展,肿瘤将不再是难以攻克的难题,更多患者将因此受益。

参考文献

- 1 Queudeville M, Handgretinger R, Ebinger M. Immunotargeting relapsed or refractory precursor B - cell acute lymphoblastic leukemia - role of blinatumomab [J]. *Oncol Targets Ther*, 2017, 10: 3567 - 3578
- 2 Gu J, Reynolds A, Fang L, *et al*. Coexistence of iAMP21 and ETV6 - RUNX1 fusion in an adolescent with B cell acute lymphoblastic leukemia: literature review of six additional cases. [J] *Mol Cytogenet*, 2016, 9: 84
- 3 Wang ZG, Guo YL, Han WD. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment [J]. *Protein Cell*, 2017 (8): 1 - 30
- 4 Li H, Zhao YB. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(8): 573 - 589
- 5 Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin - T - cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody - type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(24): 10024 - 10028
- 6 Eshhar Z. From the mouse cage to human therapy: a personal perspective of the emergence of T - bodies/chimeric antigen receptor T cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(9): 773 - 778
- 7 Wei G, Ding L, Wang J, *et al*. Advances of CD19 - directed chimeric antigen receptor - modified T cells in refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2017, 6(1): 10
- 8 Till BG, Jensen MC, Wang J, *et al*. Adoptive immunotherapy for indolent non - Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20 - specific T cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2261 - 2271
- 9 Till BG, Jensen MC, Wang J, *et al*. CD20 - specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4 - 1BB domains: pilot clinical trial results [J]. *Blood*, 2012, 119(17): 3940 - 3950
- 10 Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, *et al*. The role of B7 - 1/B7 - 2:CD28/CTLA - 4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down - regulation of the immune response [J]. *Immunol Rev*, 1996, 153: 5 - 26
- 11 Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, *et al*. CD19 - targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy - refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra38
- 12 DeFrancesco L. CAR - T cell therapy seeks strategies to harness cytokine storm [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 604
- 13 Turtle CJ, Riddell SR, Maloney DG. CD19 - Targeted chimeric antigen receptor - modified T - cell immunotherapy for B - cell malignancies [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 100(3): 252 - 258
- 14 Hu Y, Wu Z, Luo Y, *et al*. Potent anti - leukemia activities of chimeric antigen receptor - modified T cells against CD19 in Chinese patients with relapsed/refractory acute lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3297 - 3306

(下转第 34 页)

灵敏、快速,但是局限于某些支原体的种类,两者的检测结果只有假阴性,没有假阳性。因此,在支原体检测中应该联合使用两种方法,并且延长取样前的细胞在无抗生素培养基中的培养时间,以避免假阴性,提高阳性检出率。另外经统计,中心以外实验室来源的样品支原体感染率已经达 60% 以上,严重影响研究结果的可靠性。在此强烈建议科研人员在细胞培养的过程中,使用合格制剂,严格无菌操作,预防支原体感染,并且定期采用两种不同的方法检测支原体,以保证实验结果的准确性。

参考文献

- 1 Yu T, Wang Y, Zhang H, *et al.* Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC - 1 cells[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016,408(16): 4267 - 4273
- 2 Denecke J, Becker K, Jurgens H, *et al.* Falsification of tetrazolium dye (MTT) based cytotoxicity assay results due to mycoplasma contamination of cell cultures [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19 (2A): 1245 - 1248
- 3 Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA, Uphoff CC. False and mycoplasma - contaminated leukemia - lymphoma cell lines: time for a reappraisal[J]. *Int J Cancer*, 2017,140(5): 1209 - 1214
- 4 Kim BC, Kim SY, Kwon YD, *et al.* Mycoplasma detection and elimination are necessary for the application of stem cell from human dental apical papilla to tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Biomater Res*, 2015,19: 6
- 5 Olarerin - George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA - seq archive[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015,43(5): 2535 - 2542
- 6 Falagan - Lotsch P, Lopes TS, Ferreira N, *et al.* Performance of PCR - based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection [J]. *J Microbiol Methods*, 2015,118: 31 - 36
- 7 Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations in

- cell cultures by PCR analysis[J]. *Hum Cell*, 1999,12(4): 229 - 236
- 8 Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002,38(2): 79 - 85
- 9 Molla Kazemiha V, Bonakdar S, Amanzadeh A, *et al.* Real - time PCR assay is superior to other methods for the detection of mycoplasma contamination in the cell lines of the National Cell Bank of Iran[J]. *Cytotechnology*, 2016,68(4): 1063 - 1080
- 10 Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, *et al.* Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test[J]. *Leuk Res*, 2008,32(2): 323 - 326
- 11 Cheong KA, Agrawal SR, Lee AY. Validation of nested PCR and a selective biochemical method as alternatives for mycoplasma detection [J]. *J Basic Microbiol*, 2011,51(2): 215 - 219
- 12 Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention[J]. *Cytotechnology*, 2002,39(2): 75 - 90
- 13 Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, *et al.* Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green - based real - time polymerase chain reaction [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006,42(3 - 4): 63 - 69
- 14 Jean A, Tardy F, Allatif O, *et al.* Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172358
- 15 Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures[J]. *Nat Protoc*, 2010,5(5): 929 - 934
- 16 Lawrence B, Bashiri H, Dehghani H. Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms[J]. *Biologicals*, 2010,38(2): 218 - 223
- 17 Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 731: 93 - 103

(收稿日期:2017 - 11 - 21)

(修回日期:2017 - 11 - 27)

(上接第 24 页)

- 15 Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management [J]. *Blood*, 2016, 127 (26): 3321 - 3330
- 16 Oluwole OO, Davila ML. At The Bedside: Clinical review of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for B cell malignancies[J]. *J Leukoc Biol*, 2016,100(6): 1265 - 1272
- 17 蒋卉男. 复发难治 B 系淋巴瘤 CAR - T 治疗后细胞因子变化[J]. *实用药物与临床*, 2016,19(10): 1277 - 1280
- 18 Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, *et al.* Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T - cell therapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2016,6(6): 664 - 679
- 19 Makita S, Yoshimura K, Tobinai K. Clinical development of anti - CD19 chimeric antigen receptor T - cell therapy for B - cell non - Hodgkin lymphoma[J]. *Cancer Sci*, 2017,108(6): 1109 - 1118
- 20 Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, *et al.* Chemotherapy - re-

- fractory diffuse large B - cell lymphoma and indolent B - cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti - CD19 chimeric antigen receptor [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33 (6): 540 - 549
 - 21 Tasian SK, Gardner RA. CD19 - redirected chimeric antigen receptor - modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B - cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J]. *T - her Adv Hematol*, 2015,6(5): 228 - 241
 - 22 罗晓庆, 曾韞璟, 张诚, 等. CAR - T 细胞治疗复发/难治性急性淋巴细胞白血病的临床观察——附 3 例报告[J]. *中国输血杂志* 2016,29(10): 1096 - 1098
 - 23 姚超, 钱程. CAR - T 细胞在肿瘤治疗中的机遇与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017,24(1): 6 - 11
 - 24 Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T - cell therapy: progress and prospects[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017,28(2): 61 - 66
- (收稿日期:2017 - 09 - 13)
- (修回日期:2017 - 10 - 04)