

靶向 HER2 的 CAR-T 细胞构建与抗肿瘤活性的体外分析

李永强^{1,2}, 姚崧源^{1,2}, 李延胜^{1,2}, 徐明恺¹, 张惠文¹, 张成刚¹

1 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016

2 中国科学院大学, 北京 100049

李永强, 姚崧源, 李延胜, 等. 靶向 HER2 的 CAR-T 细胞构建与抗肿瘤活性的体外分析. 生物工程学报, 2018, 34(5): 731–742.
Li YQ, Yao SY, Li YS, et al. Construction of HER2-specific CAR-T cells and *in vitro* analysis of their activity to suppress tumor cell growth. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 731–742.

摘要: CAR-T 细胞疗法通过靶向识别肿瘤细胞表面抗原, 特异性杀伤肿瘤细胞, 近年来已经成为肿瘤免疫疗法的研究热点。通过基因工程方法构建靶向人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 的 CAR 慢病毒表达质粒, 以磷酸钙沉淀辅助多质粒共转染 HEK293T 细胞包装, 制备 CAR 慢病毒颗粒 lenti-car, 感染人外周血单核细胞获得 HER2 靶向的 CAR-T 细胞, 并分析其对 HER2 阳性和阴性肿瘤细胞的特异性抑制效果。研究表明, 构建的 CAR-T 细胞可被 HER-2 阳性的肿瘤细胞特异性激活, 分泌大量炎症性细胞因子 IFN- γ 和 IL-2。在同样效靶比等处理条件下, 构建的 HER2 靶向 CAR-T 细胞对 HER2 阳性的人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 的生长抑制率为 $(58.47 \pm 1.72)\%$, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而对 HER2 阴性的人慢性髓原白血细胞株 K562 的生长抑制率为 $(11.74 \pm 2.37)\%$, 与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。进一步, 在 K562 细胞中转染人 HER2 表达载体使其成为 HER2 阳性, 则 HER2 靶向 CAR-T 细胞对其的生长抑制率上升为 $(30.41 \pm 7.59)\%$, 较 HER2 阴性 K562 具有明显差异 ($P < 0.05$)。研究结果表明, 构建的 HER2 靶向的第二代 CAR-T 细胞可选择性地抑制高表达 HER2 蛋白的肿瘤细胞的生长, 暗示了其对于 HER2 阳性肿瘤进行细胞免疫治疗的临床应用前景。

关键词: CAR-T 细胞, 人类表皮生长因子受体 2 (HER2), 肿瘤, 免疫治疗

Received: November 7, 2017; **Accepted:** January 4, 2018

Supported by: Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA12020225), Science & Technology Projects of Shenyang Foundation of China (Nos. Z17-7-013, F14-150-9-00), Significant Creation of New Drugs Foundation of China (No. 2012ZX09102301-013).

Corresponding author: Mingkai Xu. Tel: +86-24-83970380; Fax: +86-24-83970381; E-mail: mkxu@iae.ac.cn

中国科学院战略性先导科技专项 (A 类) (No. XDA12020225), 沈阳市科技计划项目 (Nos. Z17-7-013, F14-150-9-00), 国家科技重大专项重大新药创制项目 (No. 2012ZX09102301-013) 资助。

网络出版时间: 2018-01-31

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180131.0855.004.html>

Construction of HER2-specific CAR-T cells and *in vitro* analysis of their activity to suppress tumor cell growth

Yongqiang Li^{1,2}, Songyuan Yao^{1,2}, Yansheng Li^{1,2}, Mingkai Xu¹, Huiwen Zhang¹, and Chenggang Zhang¹

¹ Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, Liaoning, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: CAR-T cell therapy that targets surface antigens to kill tumor cells specifically has recently become another cornerstone in tumor immunotherapy. In this study, a lentiviral expression plasmid of CAR targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) was constructed by genetic engineering. The recombinant plasmid was co-transfected with other packaging plasmids into HEK293T cells by calcium phosphate precipitation to generate lenti-car, which are CAR lentiviral particles. HER2-specific CAR-T cells were obtained by transducing human peripheral blood mononuclear cells with lenti-car. Their specific inhibitory effects on HER2-positive and HER2-negative tumor cells were analyzed *in vitro*. The constructed CAR-T cells were specifically activated by HER2-expressing tumor cells as indicated by secretion of IFN- γ and IL-2. The inhibitory rate on HER2-positive SK-OV-3 cell line was $(58.47 \pm 1.72)\%$, significantly higher than that on the mock-treated control group ($P < 0.05$). The inhibitory rate on HER2-negative K562 cell lines was $(11.74 \pm 2.37)\%$, which was not significantly different from that on the control group ($P > 0.05$). Furthermore, when we transfected a HER2-expressing vector into K562, the inhibitory rate increased to $(30.41 \pm 7.59)\%$, which was higher than that on HER2-negative K562 ($P < 0.05$). Thus, the constructed second-generation HER2-specific CAR-T cells specifically suppressed growth of tumor cells overexpressing HER2 protein, suggesting that HER2-specific CAR-T cells might prove useful for immunotherapy of HER2-positive cancer.

Keywords: CAR-T cells, HER2, tumor, immunotherapy

CAR-T 细胞疗法 (Chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy) 全称为嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法, 是通过基因工程方法将识别肿瘤特异性抗原的单链抗体基因与 T 细胞信号转导区基因连接, 再通过一定途径整合到 T 细胞中而获得。CAR-T 细胞能够将抗体-抗原特异性结合能力以及 T 细胞介导的肿瘤杀伤功能结合于一体, 在不依赖于主要组织相容性复合体的情况下, 专一性地识别肿瘤特异性抗原, 将信号通过胞内信号转导区传入 T 细胞, 刺激 T 细胞增殖并杀伤肿瘤细胞^[1-4]。目前, CAR-T 细胞疗法已成为肿瘤免疫治疗领域的研究热点, 尤其以 CD19 为靶点的 CAR-T 细胞治疗淋巴细胞白血病方面疗效更为突出^[5-6]。2017 年, 美国 FDA 分别于 8 月和 10 月连续批准了诺华和吉利德旗下凯特公司的两款 CAR-T 产品应用于血液性肿瘤的临床治疗^[7-8]。

CD19 靶点多表达于如 B 细胞淋巴瘤等血液性肿瘤细胞表面, 而在其他类肿瘤如实体瘤细胞表面并不显著高表达^[9]。因此在实体瘤的免疫治疗领域, CAR-T 进展较为缓慢, 大多停留在临床实验阶段^[10-11]。人表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是表皮生长因子受体家族的第二位成员。作为一种典型的肿瘤相关抗原, HER2 的过表达对于肿瘤的发生、发展与转移起着关键性作用, 也是肿瘤分级和评估预后的重要标志之一^[12]。研究表明, HER2 在人类正常机体组织中不表达或者微量表达, 而在 30% 以上的肿瘤组织中会过量表达, 且位于细胞表面, 易被抗体识别, 可作为肿瘤特异性治疗的理想靶点^[13-14]。目前针对 HER2 开发的单克隆抗体类药物, 如曲妥珠、帕妥珠等, 已经被美国 FDA 批准上市应用于乳腺癌等实体瘤的临床治

疗, 并获得显著疗效, 这证明 HER2 作为肿瘤免疫治疗靶点的重要价值^[15]。而以 HER2 为靶点的 CAR-T 细胞免疫治疗策略, 目前仅有少量 I 期和 II 期的临床报道^[16], 尚无被 FDA 批准的产品。

本文以抗 HER2 单链抗体为靶向分子, 以第三代慢病毒为载体, 构建靶向 HER2 的第二代 CAR-T 细胞, 并分析其在体外对 HER2 阳性和阴性肿瘤细胞的特异性抑制效果, 以评估其对 HER2 阳性肿瘤进行细胞免疫治疗的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

抗 HER2 单链抗体 (anti-HER2-scFv) 表达质粒由加利福尼亚大学旧金山分校的 James Marks 教授惠赠并由本实验室保存^[12]; CD28 质粒购自 Genecopoeia 公司; CD3 ζ 质粒由美国国立儿童健康与人类发育研究所的 Allan Weissman 博士通过 Addgene 分享 (#11507)^[17]; 慢病毒表达载体 pCDH-CMV-EF1-GFP+Puro 质粒 (本文中简称为 pCDH) 购自 System Biosciences 公司; 其他慢病毒包装质粒 pMD2.G、pMDL-G/P-RRE 和 pRSV-REV 均由瑞士洛桑联邦理工学院的 Didier Trono 博士通过 Addgene 分享 (#12259、#12251、#12253)^[18]; HER2 表达质粒 perbB2-EGFP 由奥地利因斯布鲁克医科大学的 Offterdinger 博士通过 Addgene 分享 (#39321)^[19]; 外周血单核细胞采集于健康志愿者; HEK293T 细胞株、肿瘤细胞株 SK-BR-3 (人乳腺癌细胞)、SK-OV-3 (人卵巢癌细胞)、HepG2 (人肝癌细胞)、HT-29 (人结肠癌细胞)、Jurkat (人 T 淋巴细胞白血病细胞)、K562 (人慢性髓原白血病细胞) 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 实验试剂

Taq DNA 聚合酶、核酸限制性内切酶 *Nhe* I、*Not* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶和 DL2000 DNA 分子量 Marker 购自 TaKaRa 大连公司; DNA 分子量 marker 购自 Invitrogen 公司; 1640 细胞培养基、DMEM (高糖) 细胞培养基、胰蛋白酶购自 HyClone 公司; 胎牛血清购自 CAPRICORN 公司; 酵母提取物、胰蛋白胨购自 OXOID 公司; NaCl、CaCl₂ 购自 Sigma 公司; 无内毒素质粒中量试剂盒购自 AXYGEN 公司; BCA 蛋白含量检测试剂盒购自康为世纪公司; 兔抗人 HER2 多克隆抗体、羊抗兔多克隆抗体、IL-2 和抗人 CD3 抗体均为 Abcam 公司产品; 人 IFN- γ ELISA 检测试剂盒、人 IL-2 ELISA 检测试剂盒、人淋巴细胞分离液均购自达科为公司; 聚凝胺购自 Millipore 公司; MTS 购自 Promega 公司; 大肠杆菌 stb13 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 HER2 CAR 慢病毒表达载体的构建

分别以含 CD28、CD3 ζ 和 anti-HER2-scFv 的质粒为模板, 设计 PCR 引物 (表 1) 并进行 PCR 扩增。将纯化后的 PCR 扩增产物 CD28 和 CD3 ζ 稀释 100 倍后, 按照摩尔比 1 : 1 混合, 以 CD28-F、CD3 ζ -R 为引物, 再进行第二轮 PCR 扩增, 获得 PCR 产物 CD28-CD3 ζ 。然后将纯化后的 PCR 产物 CD28-CD3 ζ 用 *Not* I 和 *Bam*H I 内切酶进行双酶切, 将 PCR 产物 anti-HER2-scFv 用 *Nhe* I 和 *Not* I 内切酶进行双酶切, 将慢病毒载体质粒 pCDH 用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 内切酶进行双酶切。将上述 3 种双酶切产物按照片段 : 片段 : 载体摩尔比为 3 : 3 : 1 的比例混合, 在 T4 DNA 连接酶作用下过夜连接形成 CAR 的慢病毒表达质粒 pCDH-car, 并将连接产物全部转化大肠杆菌 stb13 感受态细胞, 用含 50 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 并将阳性克隆进行测序鉴定。

表 1 构建质粒 pCDH-car 所用的 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for plasmid pCDH-car construction

| Primer name | Primer sequence (5'-3') |
|----------------|--|
| scFv-F | TTAGCTAGCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT |
| scFv-R | TTCTGCGGCCGCACCTAGGACGGTGACCTTGGTC |
| CD28-F | AGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATC |
| CD28-R | * <u>TGCGCTCCTGCTGAACTTCACTCT</u> GGAGCGATAGGCTGCGAAGTCGCG |
| CD3 ζ -F | * <u>AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA</u> |
| CD3 ζ -R | AAGGATCCTGGCTGTTAGCGAGG |

*Underlined letters are the complementary region.

1.2.2 慢病毒颗粒的包装制备

将汇合度达到 90% 的 HEK293T 细胞传代于 10 mm 细胞培养皿中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。待细胞汇合度达到 30%–40% 时, 更换新鲜含血清培养基, 继续培养 2 h 后, 将 3 种包装质粒 pMD2.G (3.24 μg)、pMDL-G/P-RRE (4.5 μg)、pRSV-REV (2.25 μg) 和 CAR 慢病毒表达质粒 pCDH-car (11.52 μg) 或空载体对照质粒 pCDH-blank (11.52 μg) 通过磷酸钙沉淀法共转染 HEK293T 细胞, 包装 CAR 慢病毒颗粒 lenti-car 以及对照慢病毒颗粒 lenti-blank。继续培养 16 h 后, 更换新鲜培养基。24 h 后在荧光显微镜下观察 HEK293T 细胞的 GFP 表达情况, 48 h 后收集上清, 并用 0.45 μm 滤头过滤除去细胞碎片。过滤后的上清在超高速离心机中以 20 000 r/min、4 °C 离心 3 h, 收集病毒颗粒沉淀, 用无血清 1640 培养基重悬分装, 保存于 -70 °C 冰箱备用。

1.2.3 慢病毒颗粒的滴度测定

将 HEK293T 细胞以 5×10^3 cells/孔 的密度接种于 96 孔板中, 每孔含 100 μL 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜。分别吸取 40 μL 的 lenti-car 和 lenti-blank 慢病毒储液, 加入 360 μL 含终浓度 8 μg/mL 的聚凝胺的 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清)^[20]。并以此 10 倍梯度稀释。小心从上述接种

了 HEK293T 细胞的 96 孔板中吸除 90 μL 培养基上清, 随后每孔加入上述梯度稀释的病毒颗粒溶液 90 μL, 每个稀释度 3 孔重复。继续培养 24 h, 吸除干净各孔培养基, 并更换不含任何病毒颗粒的新鲜培养基, 继续培养 24 h, 在倒置荧光显微镜下观察 GFP 信号。以能观察到荧光信号的最低稀释度为止, 记录该孔中荧光细胞的个数, 并以如下公式计算慢病毒储液滴度:

$$\text{慢病毒储液滴度(TU/}\mu\text{L)} = N/9 \times 10^{(n-1)}$$

N 为能观察到荧光信号的最低稀释度孔中荧光细胞的个数, n 为稀释倍数。

1.2.4 人外周血单核细胞(PBMC)的制备及慢病毒感染制备 CAR-T 细胞

采集健康志愿者的新鲜外周血液, 以 Ficoll-hypaque (葡聚糖-泛影葡胺) 密度梯度离心法分离得到 PBMC。用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基将 PBMC 重悬, 按照 4×10^6 cells/孔 铺于 6 孔板中, 加入终浓度为 200 U/mL 的 IL-2 和终浓度为 50 ng/mL 的抗 CD3 抗体^[21], 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。培养过夜后, 观察 PBMC 状态, 向 6 孔板中分别加入 lenti-car 及 lenti-blank 慢病毒储液, 并加入终浓度为 8 μg/mL 的聚凝胺^[21], 将 6 孔板 2 500 r/min 离心 90 min, 离心后继续培养。12 h 后, 2 500 r/min 离心 6 孔板 20 min, 小心吸走 1/2 上清, 再加入等量的新鲜培养基。继续培养 48 h 后, 荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 确

定大部分 PBMC 被慢病毒感染,即为 CAR-T 细胞或对照 T 细胞。

1.2.5 HER2 阳性肿瘤细胞株筛选

将实验室冻存肿瘤细胞株 SK-BR-3 (人乳腺癌细胞)、SK-OV-3 (人卵巢癌细胞)、HepG2 (人肝癌细胞)、HT-29 (人结肠癌细胞)、Jurkat (人 T 淋巴细胞白血病细胞)、K562 (人慢性髓原白血病细胞) 进行复苏、传代培养,待细胞状态良好、汇合度达到 90% 以上时,收集细胞于 1.5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 3 min,弃上清。用预冷 PBS 洗涤 2 次,8 000 r/min 离心 3 min,弃尽上清。加入 100 μ L RIPA 细胞裂解液,反复吹打数次,12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清保存,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。以 Western blotting 检测各肿瘤细胞株的 HER2 蛋白表达量。经 10% SDS-PAGE 胶分离,转至 PVDF 膜,牛奶封闭 1 h 后,用兔抗人 HER2 抗体 (1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 3 min,再用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:2 000) 室温孵育 2 h,之后用 TBST 洗膜 3 次,每次 3 min,去离子水洗膜 2 次,每次 3 min。加入化学发光显色液后,在凝胶成像仪上曝光显色。

1.2.6 K562 HER2 阳性细胞株的构建

将 HER2 阴性肿瘤细胞株 K562 接种于 6 孔板中,以含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养 24 h 后,将培养基更换为 opti-MEM 培养基。继续培养 2 h 后,将 24 μ g 的 HER2 表达质粒 perbB2-EGFP 和 72 μ L 的转染试剂 lip2000 分别用 opti-MEM 培养基稀释至 900 μ L,室温静置 5 min 后,将质粒稀释液逐滴加入转染试剂稀释液中,小心混匀,室温静置。20 min 后,将混合液按照每孔 300 μ L 混合液的量加入含 K562 的 6 孔板中。培养 6 h 后,更换新鲜 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清)。继续培养 24 h,荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,初步判断转染效果。48 h 后,收集转染的 K562

细胞,一部分以 Western blotting 检测 HER2 表达水平,另一部分用于抗肿瘤活性检测实验。

1.2.7 HER2 CAR-T 细胞与肿瘤细胞共培养后细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 检测

将感染了 lenti-car 慢病毒的 CAR-T 细胞和感染了 lenti-blank 慢病毒的对照 T 细胞,分别以 4×10^5 cells/孔铺于 96 孔板中。将 HER2 阳性的 SK-OV-3 细胞、HER2 阴性的 K562 细胞、经转染后的 HER2 阳性 K562 细胞分别以 1×10^4 cells/孔加于各孔中。同时设置只加 T 细胞的阴性对照孔 (加与实验孔等量的不经任何病毒感染的 T 细胞)。每孔设置 3 个重复。铺板的 96 孔板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,吸取培养基上清液,以 1 500 r/min 离心 5 min 除去细胞及细胞碎片,小心吸取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书方法检测细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 的含量。

1.2.8 HER2 CAR-T 细胞体外抑制肿瘤细胞生长活性的测定

将感染了 lenti-car 慢病毒的 CAR-T 细胞和感染了 lenti-blank 慢病毒的对照 T 细胞,分别以 4×10^5 cells/孔铺于 96 孔板中。将 HER2 阳性的 SK-OV-3 细胞、HER2 阴性的 K562 细胞、经转染后的 HER2 阳性 K562 细胞分别以 1×10^4 cells/孔加于各孔中。同时设置淋巴细胞本底释放孔 (加与实验孔等量的 T 细胞),肿瘤细胞对照孔 (仅加肿瘤细胞) 及空白对照孔 (仅加含 10% 血清的 RPMI 1640)。每孔设置 3 个重复。将铺板后的 96 孔板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 72 h,之后向每孔加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTS,继续培养 4 h。培养结束后,用酶标仪以测定波长 490 nm 和参比波长 570 nm 测定各实验孔吸光度值 (OD)。并以如下公式计算生长抑制率。

生长抑制率 = $100\% - [(\text{实验孔} - \text{淋巴细胞本底释放孔}) / (\text{肿瘤细胞对照孔} - \text{空白对照孔})] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 HER2 CAR 慢病毒表达载体的构建

本文所构建的 HER2 靶向第二代 CAR 分子主要由 3 部分组成, 分别是含 CD3 ζ 的胞内区、含 CD28 的跨膜区以及含 anti-HER2-scFv 的胞外区 (图 1A)。本研究所设计的 CD28 的后引物 CD28-R 与 CD3 ζ 的前引物 CD3 ζ -F 有互补区 (表 1), 所以可将 CD28 和 CD3 ζ 的 PCR 产物等摩尔混合后, 用引物 CD28-F 和 CD3 ζ -R 直接 PCR 扩增出两个片段的连接产物, 即 CD28-CD3 ζ 。PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳上显示的条带大小与预期值一致 (图 1B 和 1C)。阳性克隆的 DNA 测序结果与预期一致, 表明 CAR 的慢病毒表达质粒 pCDH-car 构建正确。

2.2 慢病毒颗粒的包装制备及滴度检测

HEK293T 细胞在经过磷酸钙沉淀法共转染 40 h 后, 可在荧光倒置显微镜下观察到明显的绿色荧光信号 (图 2A), 约有 80% 的 HEK293T 细胞明显表达 GFP 蛋白。在培养 48 h 时收集上清液, 用 0.45 μ m 滤头过滤除去细胞碎片, 超高速离心收集 lenti-car 和 lenti-blank 慢病毒颗粒, 重悬并分装病毒储液。

以有限稀释法分析制备的慢病毒颗粒储液的病毒滴度。慢病毒感染后 48 h, 可在 HEK293T 细胞中观察到明显的绿色荧光信号, 且随着稀释度的增高, 荧光细胞数量逐渐降低 (图 2B)。在第 6 稀释度, lenti-car 和 lenti-blank 慢病毒感染组都可见明显可计数的荧光细胞。计算病毒滴度分别为: lenti-car 慢病毒滴度 1.67×10^5 ; lenti-blank 慢病毒滴度 3.56×10^5 。

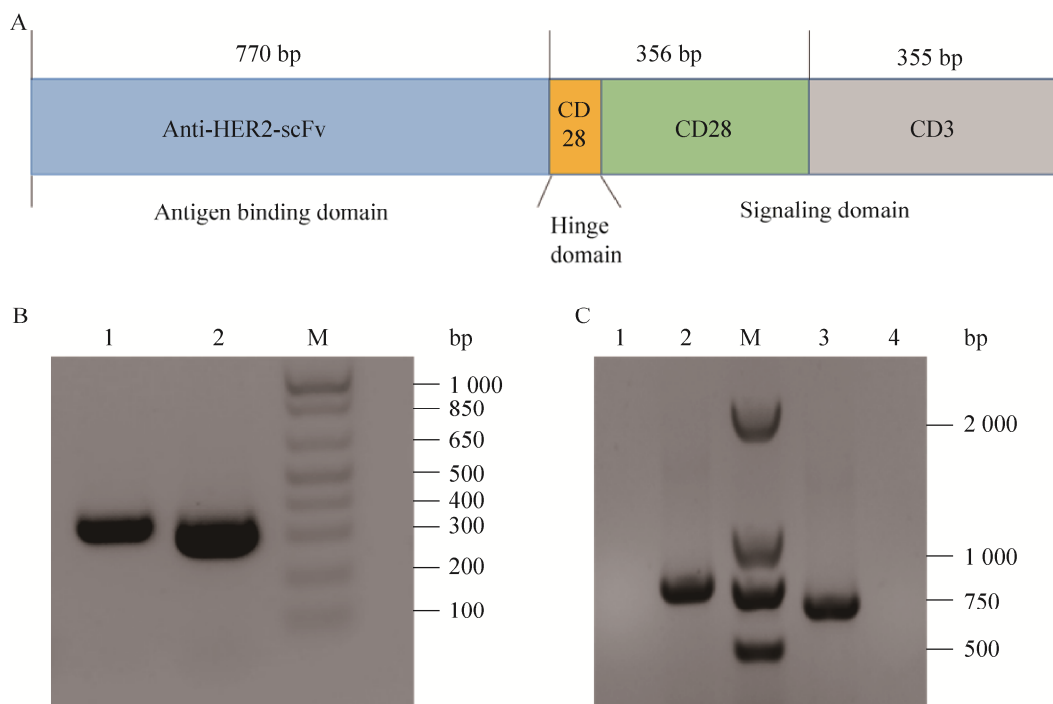


图 1 靶向 HER2 CAR 慢病毒表达载体的构建

Fig. 1 Construction of HER2-specific CAR lentivirus. (A) Schematic diagram of HER2-specific CAR. (B) CD28 and CD3 ζ PCR analyzed by agarose gel electrophoresis. 1: CD3 ζ ; 2: CD28. (C) CD28-CD3 ζ and anti-HER2-scFv PCR analyzed by agarose gel electrophoresis. 1: anti-HER2-scFv PCR without templates; 2: anti-HER2-scFv; 3: CD28-CD3 ζ ; 4: CD28-CD3 ζ PCR without templates.

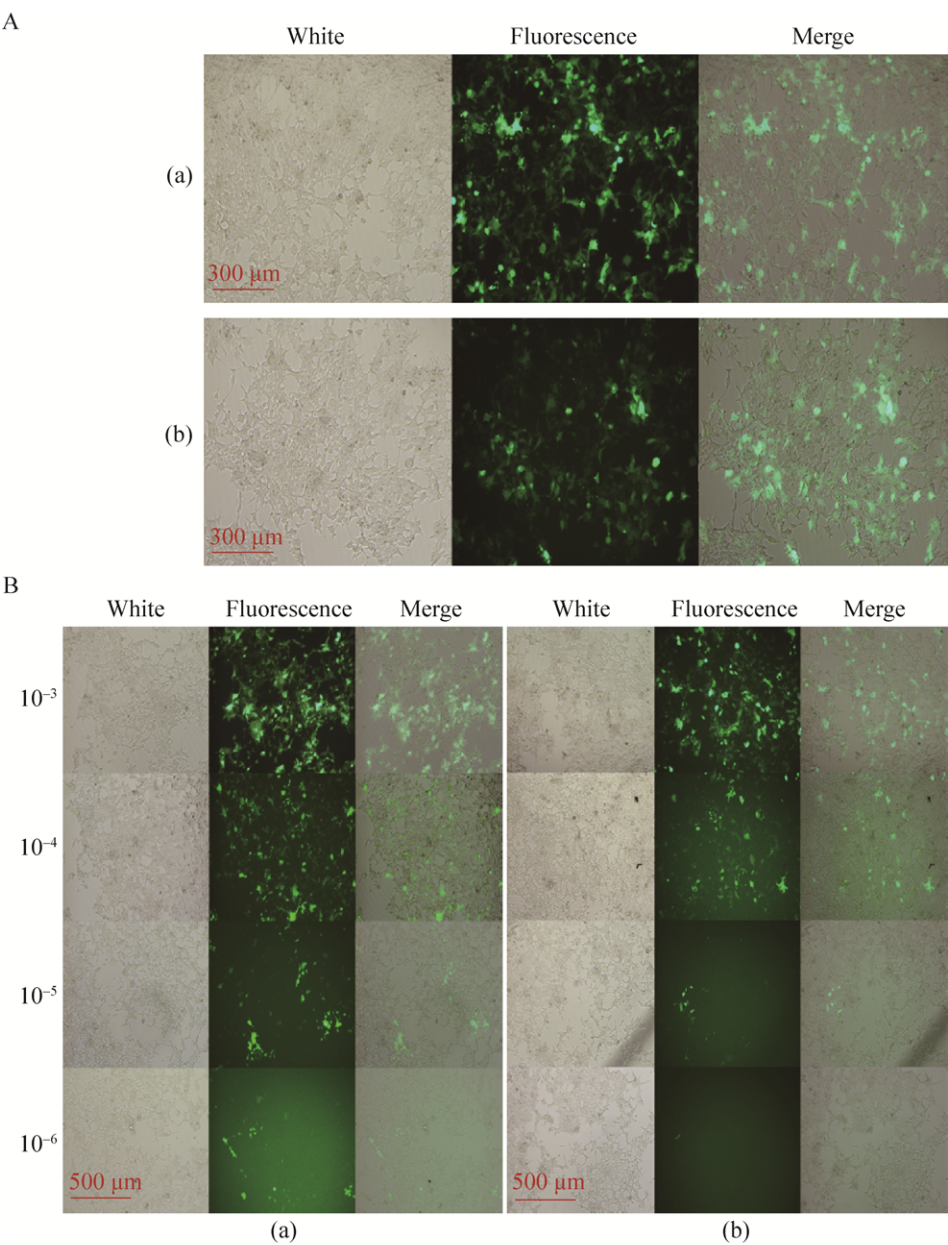


图 2 慢病毒颗粒的包装制备及滴度检测
Fig. 2 Preparation and titer determination of lentivirus. (A) Lentivirus produced by transfecting HEK293T cells. a: lenti-blank; b: lenti-car. (B) HEK293T cells infected by lentivirus with gradient dilution. a: HEK293T cells infected by lenti-blank; b: HEK293T cells infected by lenti-car.

2.3 PBMC 制备及 PBMC 的慢病毒转染

新鲜制备的人 PBMC 细胞,先以抗 CD3 抗体和 IL-2 处理培养过夜进行激活。IL-2 作为 T 细胞生长因子,有利于 T 细胞在体外长期存活,并刺激 T 细胞增殖;抗 CD3 抗体刺激 T 细胞活化,有利于后续的慢病毒转染^[18]。PBMC 激活后,加入

慢病毒进行感染。48 h 后,在荧光显微镜下可观察到成团状的绿色荧光细胞存在 (图 3),这是 PBMC 经抗 CD3 抗体及 IL-2 激活和慢病毒感染后形成的 T 细胞增殖簇,暗示慢病毒载体携带的 CAR 基因已经成功整合入 T 细胞中,并形成 CAR-T 细胞簇。

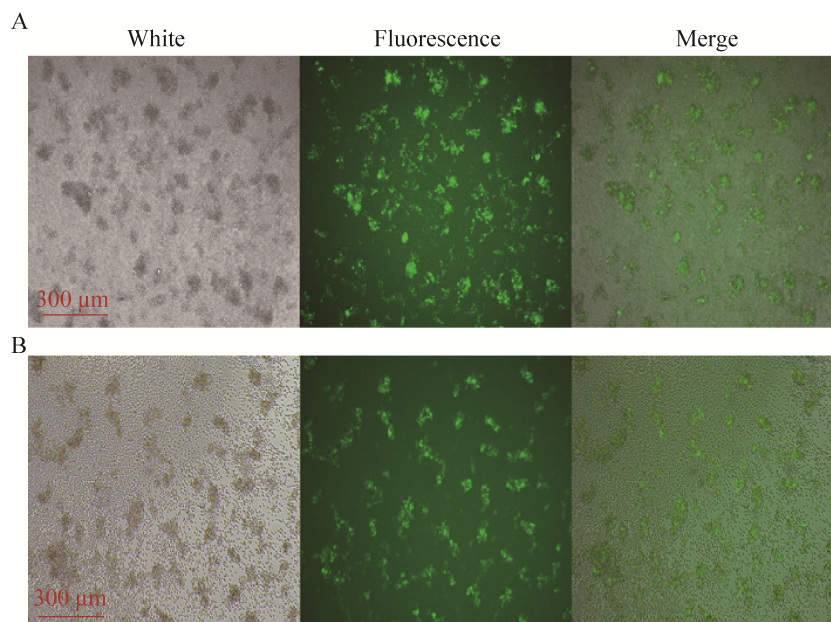


图3 慢病毒感染 PBMC

Fig. 3 PBMC infected by lentivirus. (A) PBMC infected by lenti-blank. (B) PBMC infected by lenti-car.

2.4 HER2 阳性肿瘤细胞株筛选及 K562 HER2 阳性细胞株的构建

通过 Western blotting 检测 (图 4A) 可以看出, 6 株肿瘤细胞株中, 有 4 株表达 HER2 蛋白, 另外 2 株不表达, 其中 SK-OV-3 和 SK-BR-3 在 HER2 条带处显色较深, 为高表达 HER2 肿瘤细胞株, HepG2 和 HT-29 条带相对较浅, 为中等程度表达 HER2 细胞株, 而 K562 和 Jurkat 在 HER2 蛋白处没有条带, 为 HER2 阴性细胞株。借助于转染试剂 lip2000 将 HER2 表达质粒 perbB2-EGFP 转染 K562 细胞后, 荧光显微镜下可观察到大约 60% 的 K562 细胞被转染带有荧光 (图 4B); Western blotting 检测显示, 转染后的 K562 能够中等程度表达 HER2 蛋白 (图 4C)。根据以上结果, 选择 HER2 阳性的 SK-OV-3、HER2 阴性的 K562 细胞以及经 perbB2-EGFP 转染的 K562 细胞, 用于肿瘤细胞生长抑制试验。

2.5 HER2 CAR-T 细胞与肿瘤细胞共培养后细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 检测

分别将 lenti-car 慢病毒感染的 CAR-T 细胞和

lenti-blank 慢病毒感染的对照 T 细胞与不同 HER2 表达的肿瘤细胞共培养, 以 ELISA 试剂盒方法检测细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 的分泌水平 (图 5)。在不经任何病毒感染和处理的 T 细胞阴性对照组中, 上清液中细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 的含量低于相应的 ELISA 试剂盒检测限, 未能检出。如图 5A 所示, 在与 HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞共培养时, CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 的量为 $(4\,373.3 \pm 547.9)$ pg/mL, 对照 T 细胞分泌 IFN- γ 的量为 (243.1 ± 28.2) pg/mL, 两者具有显著差异 ($P < 0.05$); 与 HER2 阴性的 K562 肿瘤细胞共培养时, CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 的量为 (204.3 ± 15.5) pg/mL, 对照 T 细胞的 IFN- γ 分泌量为 (225.3 ± 24.2) pg/mL, 两者差异不显著 ($P > 0.05$); 而与表达 HER2 的 K562 共培养时, CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 的量为 $(1\,575.6 \pm 272.8)$ pg/mL, 显著高于对照 T 细胞的 IFN- γ 分泌量 (157.7 ± 28) pg/mL ($P < 0.05$)。如图 5B 所示, 在与 SK-OV-3 肿瘤细胞共培养时, CAR-T 细胞分泌 IL-2 的量为 $(1\,673.3 \pm 138.1)$ pg/mL, 对照 T 细胞分泌 IL-2 的量为 (143.3 ± 28.2) pg/mL, 两者具有显著差异 ($P < 0.05$); 与 HER2 阴性的 K562

肿瘤细胞共培养时, CAR-T 细胞分泌 IL-2 的量为 (103.3±16.5) pg/mL, 对照 T 细胞的 IL-2 分泌量为 (125.3±24.4) pg/mL, 两者差异不显著 ($P>0.05$); 而与表达 HER2 的 K562 共培养时, CAR-T 细胞分泌 IL-2 的量为 (742.3±117.4) pg/mL, 显著高于

对照 T 细胞的 IL-2 分泌量 (137.6±8.1) pg/mL ($P<0.05$)。以上结果表明, HER2 CAR-T 细胞能够被表达 HER-2 的肿瘤细胞特异性激活, 分泌炎症性细胞因子 IFN- γ 和 IL-2, 并对 HER-2 阳性的肿瘤细胞产生免疫毒性效应。

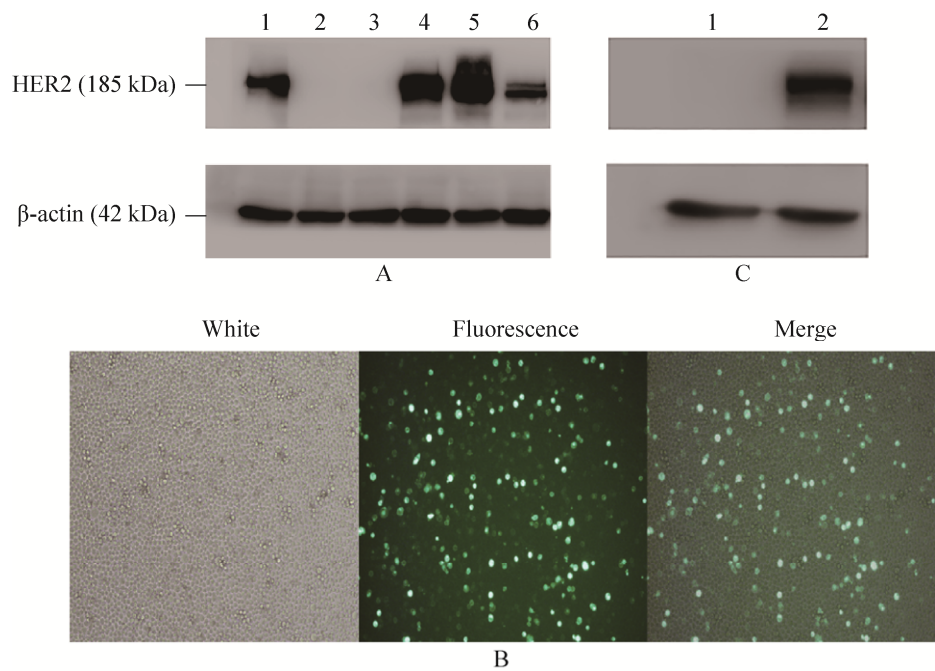


图 4 HER2 阳性肿瘤细胞株筛选及 K562 HER2 阳性细胞株的构建
Fig. 4 Selection of HER2 positive tumor cells and construction of HER2 positive K562. (A) HER2 expressing in tumor cells detected by Western blotting. 1: HT-29; 2: Jurkat; 3: K562; 4: SK-BR-3; 5: SK-OV-3; 6: HepG2. (B) K562 transfected with HER2 plasmid. (C) HER2 expressing in transfected K562. 1: untransfected K562; 2: transfected K562.

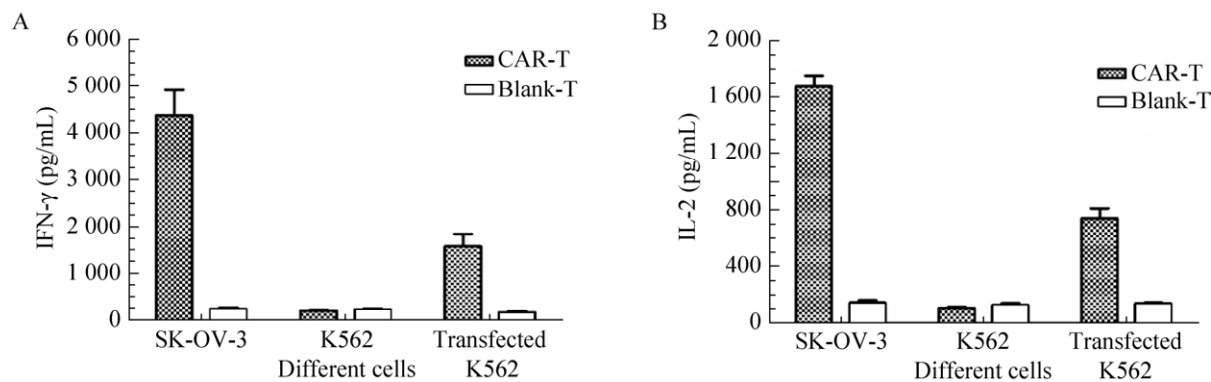


图 5 ELISA 检测 IFN- γ (A) 和 IL-2 (B)
Fig. 5 Detection of IFN- γ and IL-2 by ELISA. (A) IFN- γ . (B) IL-2.

2.6 HER2 CAR-T 细胞体外抗肿瘤活性测定

以 lenti-car 慢病毒感染的 CAR-T 细胞和 lenti-blank 慢病毒感染的对照 T 细胞为效应细胞, 通过 MTS 方法检测对不同 HER2 表达的肿瘤细胞的生长抑制作用。结果如图 6 所示, 对于 HER2 阳性的 SK-OV-3 肿瘤细胞, CAR-T 对其生长抑制率为 $(58.47 \pm 1.72)\%$, 而对照 T 细胞的生长抑制率仅为 $(8.42 \pm 1.97)\%$, 两者具有显著差异 ($P < 0.05$); 而对于 HER2 阴性的 K562 肿瘤细胞, CAR-T 对其生长抑制率为 $(11.74 \pm 2.37)\%$, 对照 T 细胞的生长抑制率为 $(9.79 \pm 0.23)\%$, 两者无显著差异 ($P > 0.05$)。以上结果初步证明本文构建的 CAR-T 细胞对于 HER2 阳性肿瘤细胞可产生显著增强的生长抑制效果, 具有 HER2 靶向性。

为了进一步证明本文 CAR-T 的肿瘤细胞生长抑制效果是由肿瘤细胞 HER2 表达所决定的, 将 HER2 阴性的 K562 细胞转染 perbB2-EGFP 质粒, 使其表达 HER2。结果如图 6 所示, CAR-T 对表达 HER2 的 K562 细胞的生长抑制率为 $(30.41 \pm 7.59)\%$, 显著高于对不表达 HER2 的 K562 的 $(11.74 \pm 2.37)\%$ ($P < 0.05$); 对照 T 细胞对表达 HER2 的 K562 细胞的生长抑制率仅为 $(13.35 \pm 3.34)\%$, 显著低于 CAR-T 生长抑制率

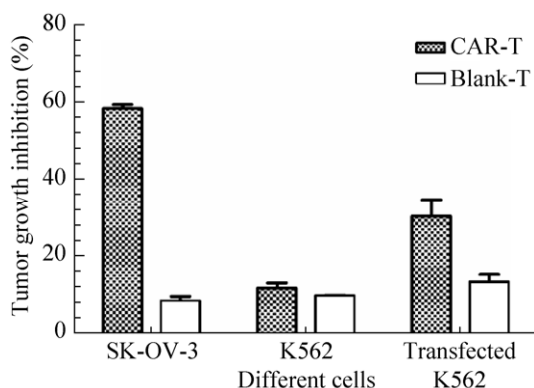


图 6 CAR-T 细胞及对照组 T 细胞抗肿瘤活性

Fig. 6 Antitumor activity of CAR-T cells and control T cells.

($P < 0.05$), 且与对照 T 细胞对不表达 HER2 的 K562 细胞的抑制率 $(9.79 \pm 0.23)\%$ 相当 ($P > 0.05$)。以上结果表明, HER2 的表达是决定 CAR-T 产生肿瘤细胞生长抑制作用的关键因素, 本文构建的 CAR-T 表现出明确的 HER2 靶向性, 并且能够产生显著的肿瘤细胞生长抑制作用, 具有进一步开发成为对 HER2 阳性肿瘤进行免疫细胞临床治疗的潜力。

3 讨论

CAR-T 细胞直接识别肿瘤表面特异性抗原, 将信号通过胞内信号转导区传入 T 细胞, 刺激 T 细胞增殖, 并分泌穿孔素、颗粒酶及细胞因子等, 发挥杀伤肿瘤细胞的作用^[3,22-23]。随着 2017 年两种 CAR-T 产品在美国获批^[7-8], 这使得 CAR-T 细胞技术在国内更加炙手可热, 也使得肿瘤免疫治疗成为世界医药界的焦点。

CAR 主要由 3 部分构成, 分别是识别肿瘤表面抗原的胞外区、连接胞内区和胞外区的铰链跨膜区以及负责传导激活 T 细胞信号的胞内信号转导区^[24], 其中胞外区主要来源于单克隆抗体的单链可变区, 跨膜区一般由二聚体膜蛋白如 CD28、CD8 等组成, 而胞内区主要由 T 细胞受体的 CD3 ζ 链组成^[25-27]。自 1989 年 CAR 概念提出以来, CAR 技术得到了不断改进与发展, 目前已经发展到第三代^[28]。3 代 CAR 的区别主要在于胞内信号转导区: 第一代 CAR 胞内信号转导区仅含有 CD3 ζ 或 FcR γ 单一信号分子, 但因缺乏共刺激因子而不能充分激活 T 细胞。第二代 CAR 胞内区在第一代 CAR 基础上增加了 1 种共刺激因子, 能显著提高 T 细胞增殖能力和抗肿瘤效应。而第三代 CAR 则引入了 2 种以上的共刺激因子, 能使 T 细胞持续增殖, 对肿瘤杀伤能力更强^[3-4,29]。第三代 CAR 相对于第二代, 更容易被肿瘤特异抗原所激活, 反应强度更大, 杀伤能力更强, 但由于其过强的

反应灵敏性,体内使用时容易造成脱靶效应,即可被非靶点的正常组织细胞所激活,并造成非靶向性的杀伤效应,产生副作用,临床治疗的风险更高,因此目前临床上应用的主要是第二代 CAR^[6,16,30]。本文构建的靶向 HER2 第二代 CAR-T 细胞,胞外区是 anti-HER2-scFv,跨膜区为 CD28,而胞内区是 CD3 ζ 和 CD28 两个刺激因子,用于靶向杀伤高表达 HER2 蛋白的肿瘤细胞。

本文通过 Western blotting 方法,确定 SK-OV-3 和 SK-BR-3 为高表达 HER2 蛋白的肿瘤细胞株,而 HT-29 和 HepG2 为中等程度表达 HER2 蛋白细胞株,不表达 HER2 蛋白的细胞株为 K562 和 Jurkat。为得出显著结果,故选择高表达和不表达细胞株作为后续实验研究对象。根据预实验结果,SK-OV-3 相对于 SK-BR-3 更易活化,且生长速度快,更适合进行本研究的肿瘤细胞生长抑制实验,所以选择 SK-OV-3 为后续实验中 HER2 阳性靶细胞,而 K562 相对于 Jurkat 细胞体积更大,易计数,易收集,所以选择 K562 作为后续实验 HER2 阴性靶细胞。为进一步验证本文构建 CAR-T 细胞的作用靶点为 HER2,消除不同种类细胞株对 CAR-T 细胞毒性可能存在的敏感性差异,通过转染 HER2 质粒进入 K562 细胞,构建了 HER2 阳性 K562。但由于转染 K562 为瞬时转染,且转染效率不高,所以 CAR-T 细胞对 HER2 阳性 K562 杀伤作用提升程度有限,并低于 SK-OV-3,但仍显著高于 CAR-T 细胞对 HER2 阴性 K562 杀伤作用。

本文以实验室保存的抗 HER2 抗体基因为基础,构建靶向 HER 的 CAR-T 细胞,该 CAR-T 细胞可被 HER-2 阳性的肿瘤细胞所特异性激活,分泌大量炎症性细胞因子 IFN- γ 和 IL-2。其对 HER2 阳性的人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 的生长抑制率为 $(58.47 \pm 1.72)\%$,显著高于对照组 ($P < 0.05$);对 HER2 阴性的人慢性髓原白血病细胞株 K562 的生长抑制率为 $(11.74 \pm 2.37)\%$,与对照组无显著差异 ($P > 0.05$);对构建的 HER2 阳性细胞 K562 的生长

抑制率上升为 $(30.41 \pm 7.59)\%$,较 HER2 阴性 K562 具有明显差异 ($P < 0.05$)。结果表明,本文构建的 HER2 靶向的第二代 CAR-T 细胞可选择性地抑制高表达 HER2 蛋白的肿瘤细胞的生长,具有靶向、安全、有效的特点,暗示了其对 HER2 阳性肿瘤进行细胞免疫治疗的临床应用前景。但该方法仍需进一步的荷瘤动物实验模型加以验证,这也是本研究团队未来工作的重点。

致谢 诚挚感谢香港中文大学路钢教授对本研究给予的指导和在实验上提供的帮助,感谢美国国立儿童健康与人类发育研究所的 Allan Weissman 博士、瑞士洛桑联邦理工学院的 Didier Trono 博士和奥地利因斯布鲁克医科大学的 Martin Offterdinge 博士通过 Addgene 分享的质粒载体,感谢加利福尼亚大学旧金山分校的 James Marks 教授惠赠的抗 HER2 单链抗体 (anti-HER2-scFv) 表达质粒。

REFERENCES

- [1] Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(1): 26–31.
- [2] Zhu XY, Yao JX. The CAR-T technology and its application. *J Clin Hematol*, 2015, 28(3): 428–431 (in Chinese).
朱昕赞,姚军霞. CART 技术及其临床应用. *临床血液学杂志*, 2015, 28(3): 428–431.
- [3] Gill S, Maus MV, Porter DL. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Rev*, 2016, 30(3): 157–167.
- [4] Jaspers JE, Brentjens RJ. Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety. *Pharmacol Ther*, 2017, 178: 83–91.
- [5] Maher J. Clinical immunotherapy of B-cell malignancy using CD19-targeted CAR T-cells. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(1): 35–43.
- [6] Gauthier J, Yakoub-Agha I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: clinical data to date, current limitations and perspectives. *Curr Res Transl Med*, 2017, 65(3): 93–102.

- [7] FDA approval brings first gene therapy to the United States [EB/OL]. [2017-10-30]. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm>.
- [8] FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma [EB/OL]. [2017-10-30]. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm581216.htm>.
- [9] Davila ML, Brentjens RJ. CD19-Targeted CAR T cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2016, 14(10): 802–808.
- [10] Jin C, Yu D, Essand M. Prospects to improve chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Immunotherapy*, 2016, 8(12): 1355–1361.
- [11] Newick K, O'Brien S, Moon E, et al. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med*, 2017, 68(1): 139–152.
- [12] Ming-Kai X, Cheng-Gang Z. Gene expression and function study of fusion immunotoxin anti-Her-2-scFv-SEC2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 78–84.
- [13] Tuefferd M, Couturier J, Vincentsalomon A, et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS ONE*, 2007, 2(11): e1138.
- [14] Sun M, Shi H, Liu C, et al. Construction and evaluation of a novel humanized HER2-specific chimeric receptor. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3): 1–10.
- [15] Martin V, Cappuzzo F, Mazzucchelli L, et al. HER2 in solid tumors: more than 10 years under the microscope; where are we now? *Future Oncol*, 2014, 10(8): 1469–1486.
- [16] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol*, 2015, 33(15): 1688–1696.
- [17] Weissman AM, Hou D, Orloff DG, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(24): 9709–9713.
- [18] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998, 72(11): 8463–8471.
- [19] Offterdinger M, Bastiaens PI. Prolonged EGFR signaling by ERBB2-mediated sequestration at the plasma membrane. *Traffic*, 2008, 9(1): 147–155.
- [20] Zhang Y, He Q, Hu Z, et al. Long noncoding RNA LINP1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(6): 522–530.
- [21] Schmuckhenneresse M, Omer B, Shum T, et al. Comprehensive approach for identifying the T Cell subset origin of CD3 and CD28 antibody-activated chimeric antigen receptor-modified T cells. *J Immunol*, 2017, 199(1): 348–362.
- [22] Cheadle EJ, Gornall H, Baldan V, et al. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 91–106.
- [23] Ramos CA, Savoldo B, Dotti G. CD19-CAR trials. *Cancer J*, 2014, 20(2): 112–118.
- [24] Li S, Yang Z, Shen J, et al. Adoptive therapy with CAR redirected T cells for hematological malignancies. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(4): 370–378.
- [25] Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, 2013, 3(4): 388–398.
- [26] Atanackovic D, Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2016, 172(5): 685–698.
- [27] Liu X, Zhang N, Shi H. Driving better and safer HER2-specific CARs for cancer therapy. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 62730–62741.
- [28] Abate-Daga D, Davila ML. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 3: 16014–16020.
- [29] Yeku OO, Brentjens RJ. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(2): 412–418.
- [30] Drent E, Themeli M, Poels R, et al. Reducing on-target off-tumor effects of CD38-chimeric antigen receptors by affinity optimization. *Mol Ther*, 2017, 25(8): 1946–1958.

(本文责编 陈宏宇)