

· 医药生物技术 ·

人 CS1-Fc 融合蛋白的真核表达、蛋白纯化及生物学效应鉴定

陈如章, 王茜桐, 李燕晨, 高基民

温州医科大学 检验医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035

陈如章, 王茜桐, 李燕晨, 等. 人 CS1-Fc 融合蛋白的真核表达、蛋白纯化及生物学效应鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(1): 122-132.

Chen RZ, Wang XT, Li YC, et al. Eukaryotic expression, protein purification and biological effects research of human CS1-Fc fusion protein. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 122-132.

摘要: 人信号淋巴细胞激活分子 F7 (SLAMF7/CS1) 是一种细胞表面糖蛋白, 在多发性骨髓瘤细胞中高度表达。已有研究表明 CS1 是多发性骨髓瘤较为灵敏且特异的生物标志物。CAR-T 细胞免疫疗法是治疗多发性骨髓瘤的新方法, 其中 CS1 CAR-T 细胞免疫疗法针对复发性难治性多发性骨髓瘤有较好的疗效。为了检测 CS1 CAR-T 细胞上 CS1 CAR 的表达效率和探寻 CAR-T 细胞免疫疗法的辅助手段, 文中制备了一种 CS1-Fc 融合蛋白。首先利用 PCR 技术从已有质粒中扩增得到 CS1 的胞外段序列, 再通过重叠延伸 PCR 与人 IgG1-Fc 段相连。将重组片段连接至 pMH3 真核表达载体上, 经酶切鉴定和 DNA 测序后, 将重组质粒 pMH3-CS1-Fc-his 转染至中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-S)。经 G418 加压筛选和流式细胞术鉴定, 证实 CS1-Fc 融合蛋白在 CHO-S 细胞中获得了表达。利用镍柱对 CS1-Fc 融合蛋白进行纯化, 经 Western blotting 鉴定, 融合蛋白的分子量约为 70 kDa。流式细胞术和细胞计数分析结果显示, CS1-Fc 融合蛋白能有效检测 CS1 CAR 的表达效率, 证实了 CS1-Fc 融合蛋白对 CS1 CAR-T 细胞具有活化、促增殖及促分泌细胞因子的作用。本研究结果为多发性骨髓瘤细胞免疫治疗 CAR-T 细胞的体外检测和效能强化奠定了实验基础。

关键词: 人信号淋巴细胞激活分子 F7 (SLAMF7/CS1), CS1-Fc 融合蛋白, 真核表达, 嵌合抗原受体 T 细胞, 多发性骨髓瘤

Received: September 22, 2019; **Accepted:** December 5, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81573110), Science Foundation of National Health Commission of the People's Republic of China (No. WKJ-ZJ-1928), Science and Technology Major Projects of Wenzhou (No. ZJ2017014), Technology Innovation and Application Development Major Projects of Chongqing (No. cstc2019jscx-msxmX0431).

Corresponding author: Jimin Gao. Tel: +86-577-86699341; E-mail: jimingao64@yahoo.com

国家自然科学基金 (No. 81573110), 国家卫生健康委员会科研基金 (No. WKJ-ZJ-1928), 温州市重大科技专项 (No. ZJ2017014), 重庆市技术创新与应用发展专项 (No. cstc2019jscx-msxmX0431) 资助。

网络出版时间: 2019-12-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191225.1442.001.html>

Eukaryotic expression, protein purification and biological effects research of human CS1-Fc fusion protein

Ruzhang Chen, Xitong Wang, Yanchen Li, and Jimin Gao

School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: Signaling lymphocyte activation family 7 (SLAMF7/CS1) is a cell surface glycoprotein that is highly expressed in multiple myeloma cells. CS1 is a sensitive and specific biomarker for multiple myeloma. CAR-T cell immunotherapy is a new method for the treatment of multiple myeloma. CS1 CAR-T cell immunotherapy has good effect on relapsed refractory multiple myeloma. To detect the expression efficiency of CS1 CAR on CS1 CAR-T cells and to find an auxiliary means to CAR-T cell immunotherapy, we prepared a CS1-Fc fusion protein. First, the extracellular domain of CS1 was amplified from the existing plasmid by PCR and ligated with human IgG1-Fc fragment by overlap extension PCR. The recombinant fragment was ligated into pMH3 eukaryotic expression vector. After restriction enzyme digestion and DNA sequencing, the pMH3-CS1-Fc-his recombinant plasmid was successfully constructed. The recombinant plasmid was transfected into Chinese hamster ovary cell (CHO-S) by liposome. The expression of the CS1-Fc fusion protein in CHO-S cells was identified by flow cytometry after G418 pressure screening. Next, the CS1-Fc fusion protein was purified by nickel column. Western-blot analysis showed that molecular weight of the fusion protein was about 70 kDa was identified by Western blotting. The CS1-Fc fusion protein could effectively detect the expression rate of CS1 CAR and promote the activation, proliferation and cytokines secretion of the CS1 CAR-T cells. The results will lay the experimental foundation for the *in vitro* detection and potentiation of CAR-T cells in multiple myeloma treated with CS1 CAR-T cell.

Keywords: human signaling lymphocyte activation family 7 (SLAMF7/CS1), CS1-Fc fusion protein, eukaryotic expression, CAR-T, multiple myeloma

多发性骨髓瘤 (Multiple myeloma, MM) 是一种恶性浆细胞病, 其特征在于骨髓中的恶性浆细胞异常增生以及单克隆免疫球蛋白或轻链 (M 蛋白) 过度生成^[1]。在美国, 每年每 100 000 人发病约 5 例, 多发性骨髓瘤发病率约占所有血液系统恶性肿瘤的 10%^[2]。在众多的免疫疗法中, 嵌合抗原受体 T 细胞 (Chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) 免疫疗法已经发展成为一种潜在的抗癌疗法, 特别是在复发/难治性多发性骨髓瘤中, 它表现出很高的缓解率和无进展生存期的延长^[3-5]。嵌合抗原受体 (Chimeric antigen receptors, CARs) 是一种跨膜融合蛋白, 由位于胞外的抗原识别域和位于胞内的 T 细胞活化域及连接两者的铰链区三部分组成。CAR-T 细胞是经过基因修饰表达 CARs 的 T 细胞^[6]。CAR-T 细胞与单克隆抗体 (mAbs) 相同点是两者均是针对特定的细胞表面抗原。理想情况下, 它应仅在肿瘤细胞中表达而不在健康组织中表达^[7]。与单克隆抗体不同的

是, CAR-T 细胞不仅能够杀死靶细胞, 而且它可以在患者体内持续存在, 并诱导发生针对靶抗原的持久免疫应答^[4,8]。

CS1 (CD2 subset 1) 也称为信号淋巴细胞活化家族成员 7 (Signalling lymphocytic activation molecule F7, SLAMF7), 它是一种细胞表面糖蛋白, 在多发性骨髓瘤细胞中高度表达, 自然杀伤细胞 (NK) 表达较低, 但在正常组织中不表达^[9-10]。这使其成为多发性骨髓瘤免疫治疗的理想靶点。美国希望之城医疗中心 Wang 等研究结果证实小鼠模型中 CS1 CAR-T 细胞具有有效的抗肿瘤活性。在体外试验中, 加入来那度胺可通过共刺激效应提高 CS1 CAR-T 细胞的免疫功能。在体内试验中, 来那度胺可提高 CS1 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性及持久性^[11]。在体外杀伤原发性骨髓瘤细胞实验中, MM 患者和健康人的 CS1 CAR-T 细胞表现出高效的杀伤活性。此外, 在异种移植小鼠模型中, CS1 CAR-T 细胞能显著抑制髓质和髓外

骨髓瘤。重要的是, CS1 CAR-T 细胞不仅可以特异性识别多发性骨髓瘤细胞, 同时还可以保留 CS1 低表达的免疫细胞^[12]。

Fc-融合蛋白 (Fc-fusion proteins) 是指利用基因工程技术将免疫球蛋白 (IgG、IgA 等) 的可结晶段 (Fragment crystallizable, Fc) 与某种具有生物学活性的功能蛋白分子融合而产生的新型蛋白^[13]。融合蛋白的 Fc 段可延长功能蛋白在血浆内的半衰期、提高分子的稳定性, 且可与细胞表面的 Fc 受体特异性结合, 发挥相应的生物学功能^[14]。据报道, 研究人员制备了一种癌胚抗原-Fc 融合蛋白 (CEA-Fc), 发现它可用于检测和激活 CEA CAR-T 细胞^[15]。Ag-Fc 融合蛋白亦可用于检测 CAR-T 细胞表面 CARs 表达以及用作选择性离体扩增剂。对于 CAR-T 细胞免疫疗法, 获得大规模 CAR-T 细胞 (多达 10^{11} 个细胞) 至关重要。通过用固定的 Ag-Fc 选择性激活 CAR-T 细胞, 可以诱导细胞扩增^[15]。组氨酸标签 (His-tag) 被广泛用作融合标签, 凭借此组氨酸肽段与二价金属离子 (镍、锌等) 的螯合作用, 便于用金属螯合亲和层析纯化蛋白质, 也可以用针对组氨酸肽段的抗体来检测该融合蛋白^[16]。

根据 Ag-Fc 融合蛋白和 His-tag 标签的特性, 我们计划制备一种 CS1-Fc-his 融合蛋白, 并验证它对 CS1 CAR-T 细胞的生物学效应。本研究拟通过构建表达 CS1-Fc 融合蛋白的 CHO-S 细胞获得 CS1-Fc 融合蛋白, 初步验证 CS1-Fc 融合蛋白对 CS1 CAR 的生物学效应, 为 CS1 CAR-T 细胞的检测提供有效的方法, 同时也为增强 CS1 CAR-T 细胞的效能及扩增打下基础。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the study

Name of primer	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
pMH3-F-EcoRI-CS1	TTTAACCGAAGAATTCGCCACCATGGCTGGTTCCCCAACAT	<i>EcoR</i> I
R-linker1-CS1	CCTCCTCCTGATCCTCCTCCCATGGAGGAATCTGGGTC	
F-linker1-Fc	GGAGGAGGATCAGGAGGAGGA	
pMH3-R-NotI-his	AAGATCTATGCGGCCGCT	<i>Not</i> I

Note: underlined sequences are restriction enzyme sites.

1 材料与方法

1.1 材料

pMH3 真核表达质粒和 CHO-S 细胞 (中国仓鼠卵巢细胞) 由本实验室保存; 人 CS1 DNA 片段由韩家淮实验室惠赠; 人 IgG1 Fc 片段由本实验室保存; CS1 CAR 慢病毒浓缩液由本实验室制备; *Escherichia coli* Trans5 α 感受态细胞购自上海桑尼生物技术公司; PCR 试剂、胶回收试剂盒和 DNA marker 购自 Genstar 公司; 限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 购自 NEB 公司; 质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司; TAE、氨苄青霉素 (Ampicillin) 和考马斯快速染色液购自北京索莱宝科技有限公司; 引物合成及 DNA 序列测序均由上海桑尼生物技术公司完成; Ni-NTA 柱填料购自美国 GE Healthcare 公司; Lip2000 和 G418 购自 Thermo 公司; Bio-CS1 Protein 购自 ACRO 公司; 抗人 CS1 和抗 His-tag 单克隆抗体购自 Abcam 公司; APC-SA、FITC-抗人 IgG1 Fc、PB-抗人 CD69、PB-Live/Dead 和 APC-抗人 CS1 等流式抗体购自 BioLegend 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

文中所用引物见表 1。

1.2.2 重组质粒 pMH3-CS1-linker-FC-his 的构建

将 PCR 扩增得到的 CS1 胞外端与 Fc 片段 (尾部加 His-tag) 进行重叠延伸 PCR, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对本实验室保存的重组质粒 pMH3-CD19 进行双酶切, 回收 pMH3 载体。将产物纯化得到的 CS1-linker-Fc-his 基因扩增产物与

pMH3 载体连接, 将连接后的产物转化至 Trans5 α 感受态大肠杆菌, 挑选阳性克隆, 经质粒提取获得重组质粒 pMH3-CS1-linker-Fc-his。

1.2.3 融合蛋白表达细胞 CS1-Fc-CHO-S 的构建及筛选

按照 Lip2000 说明书将重组质粒 pMH3-CS1-linker-Fc-his 转染至 CHO-S 细胞, 培养 24 h 后更换含遗传霉素 (G418, 浓度为 1 mg/mL)、不含其他抗生素的 DMEM/F12 培养基, 进行加压筛选, 同时用未转染的 CHO-S 作为对照, 继续培养 10–14 d。挑取单克隆至 96 孔板, 在含 G418 的 DMEM/F12 培养基继续培养。待细胞长满时, 吸取上清液作蛋白免疫点杂交 (Dot blot), 取 5 μ L 培养基上清液点于 NC 膜上, 自然风干后, 封闭, 抗 his 抗体孵育, 洗膜, 山羊抗鼠 HRP-IgG 孵育, 洗膜, 曝光。选择点杂交阳性的孔用含 G418 的 DMEM/F12 完全培养基制备细胞悬液 (10 细胞/1 mL), 按每孔 0.1 mL 细胞悬液接种 (即每孔 1 cell)。2 轮有限稀释后, 作胞内染色, 通过流式细胞分析鉴定细胞中融合蛋白的表达。

1.2.4 CS1-Fc-CHO-S 的鉴定和 CS1-Fc 融合蛋白的纯化及鉴定

96 孔板每孔铺 0.1×10^6 个细胞, 加入适量的 DMEM/F12 完全培养基, 待细胞贴壁过夜, 以 1 : 1 000 的比例加入高尔基体阻断剂, 4–6 h 后转入 V 型底 96 孔板, PB-Live/Dead 染料 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后, 固定破膜, APC 抗人 CS1 抗体 (1 : 400) 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, FACS 缓冲液清洗 2 次, 重悬后待流式细胞分析。收集细胞培养上清液, 采用 Ni-NTA 亲和层析柱对 CS1-Fc 融合蛋白进行纯化、SDS-PAGE 分析和 Western blotting 鉴定。

1.2.5 流式细胞术检测 CS1 CAR 的表达

用 Dynabeads CD3/CD28 提取健康人的 T 细胞, 将实验室制备的 CS1 CAR 慢病毒浓缩液按 1 : 1 000 的比例稀释于 X-VIVO 培养基, 4 h 后换

液, 继续培养 5 d。将细胞转入 V 型底 96 孔板, 2 500 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 3 min, 弃上清, 对照孔细胞中加入 50 μ L FACS 缓冲液配制的 Biotin-CS1 (稀释比为 1 : 400), 实验孔加入 50 μ L FACS 缓冲液配制的 CS1-Fc 融合蛋白, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min。清洗 1 次, 弃上清, 每孔加入 5 μ L FACS 缓冲液配制的抗体 (APC-抗人 CS1 和 FITC-抗人 IgG1 Fc 抗体稀释比分别为 1 : 400 和 1 : 200), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。清洗 2 次, 弃上清, 最后每孔用 200 μ L 的 FACS 缓冲液重悬混匀, 待流式细胞分析。

1.2.6 T 细胞早期活化分子 CD69 的检测

以 0.1×10^6 个 CS1 CAR-T 细胞铺 96 孔板, 每孔 100 μ L, 加入可溶 CS1-Fc (10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL) 或 BSA (10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL), 放入细胞培养箱中培养 24 h, 或将细胞铺在提前包被 CS1-Fc 的 96 孔板 (用 DPBS 将蛋白稀释至 5 μ g/mL, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜后 DPBS 清洗 2 遍, 吸干液体即可), 放入细胞培养箱中培养 24 h, 设置不加蛋白的对照组。取出细胞转入 V 型底 96 孔板, 2 500 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 3 min, 弃上清, 每孔加入 50 μ L 的 PB-抗人 CD69 抗体 (1 : 200 稀释), 4 $^{\circ}$ C 避光染色 15 min。清洗 2 次, 弃上清, 最后每孔用 200 μ L FACS 缓冲液重悬混匀, 进行流式细胞分析。

1.2.7 细胞因子 IFN- γ 的检测

以 100 μ L 含 0.1×10^6 个 CS1 CAR-T 细胞铺 96 孔板, 分别加入 CS1-Fc (100 μ g/mL) 或加入 CS1-Fc (DPBS 稀释至 5 μ g/mL, 100 μ L/孔), 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。放入细胞培养箱中培养 24 h 后, 加入高尔基体阻断剂及细胞刺激剂 (PMA+离子霉素), 培养 4 h。设置不加蛋白的对照组。取出细胞转入 V 型底 96 孔板, 2 500 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 3 min, 弃上清, PB-Live/Dead 染料 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后, 4%多聚甲醛 (PFA) 避光 4 $^{\circ}$ C 固定 20 min。1 \times BD Wash 常温避光孵育 30 min, 离心后每孔孵育 50 μ L 的 APC-抗人

IFN- γ 抗体 (1:200 稀释), 4 $^{\circ}$ C 避光染色 40 min。清洗 2 次, 弃上清, 最后每孔用 200 μ L 的 FACS 缓冲液重悬混匀, 待流式细胞分析。

1.2.8 细胞增殖实验

将含 CS1 CAR-T 细胞的 Ep 管置于磁力架上, 放置 3 min, 磁珠将吸附靠近磁力架的管壁上, 小心吸出细胞悬液。用计数板计数, 实验组用含 100 μ g/mL 融合蛋白的 X-VIVO 培养基 (对照组用不含融合蛋白的 X-VIVO 培养基) 将细胞稀释, 每孔以 100 μ L 含 0.1×10^6 个 CS1 CAR-T 细胞铺 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养。每两天在显微镜下观察细胞状态, 计数板计数, 并加入用含融合蛋白的 X-VIVO 培养基确保融合蛋白浓度为 100 μ g/mL。

1.2.9 统计学分析

数据代表至少 3 次独立实验结果。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 统计学分析使用非配对 t 检验, 数据统计学分析和图表制作均采用 Graphpad Prism 7.0, 差异在 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMH3-CS1-Fc-his 的构建及鉴定

以人 CS1 线性 DNA (全长 1 005 bp) 为模板, PCR 扩增 1-678 bp, 其中包含信号肽 (66 bp) 和胞外段 (612 bp)。再经重叠延伸 PCR 分别将人 Fc 段与 CS1 相连。CS1-linker-Fc-his 片段全长为

1 479 bp, N 端为 CS1 片段, 中间有一段 24 bp 的 linker, 之后是 693 bp 的人 Fc 段, C 端为 His 标签。CS1-linker-Fc-his 的结构示意图见图 1A。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对重组质粒 pMH3-CD19 进行双酶切, 与 CS1-linker-Fc-his 片段进行连接, 从而构建得到重组质粒 pMH3-CS1-Fc-his。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 对其进行双酶切, 可见插入的 CS1-linker-Fc-his (1 479 bp) 片段 (图 1B)。将质粒送测序, 测序结果与基因序列一致, 说明该质粒构建成功。

2.2 CS1-Fc-CHO-S 细胞株的构建及鉴定

将重组质粒 pMH3-CS1-Fc-his 通过脂质体转染至 CHO-S 细胞, 经 1 mg/mL G418 筛选 2 周后, 取上清液进行蛋白斑点杂交, 以 mGM-CSF-his 作为阳性对照, 可见转染的 CHO-S 细胞表达融合蛋白 (图 2A)。在显微镜下挑取单克隆至 96 孔板, 在含 1 mg/mL G418 的培养基中培养 2 周, 取上清液作点杂交, 筛选出表达 CS1-Fc 融合蛋白的 CHO-S 单克隆细胞 (CS1-Fc-CHO), 14 号孔信号最强 (图 2B)。将阳性细胞作第一次有限稀释, 培养 2 周后, 取上清液作点杂交, 32 号孔信号最强 (图 2C)。第 2 次有限稀释后, 可见大多数孔阳性信号均较强, C10 号孔为最强 (图 2D)。将 C10 孔的细胞扩大培养后, 进行胞内染色检测, 证实 CS1-Fc 融合蛋白表达的阳性率可达到 99.9% 以上 (图 3), 说明该细胞株构建成功。

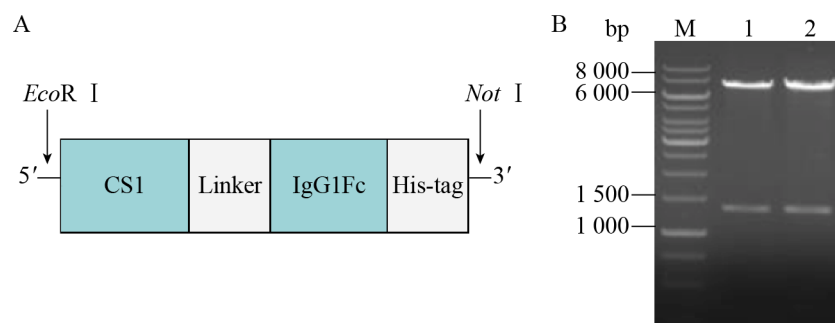


图 1 重组质粒 pMH3-CS1-linker-Fc-his 的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of recombinant plasmid pMH3-CS1-linker-Fc-his. (A) Schematic diagram of CS1-linker-Fc-his. (B) Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pMH3-CS1-linker-Fc-his. M: DNA marker; 1-2: recombinant plasmid pMH3-CS1-linker-Fc-his.

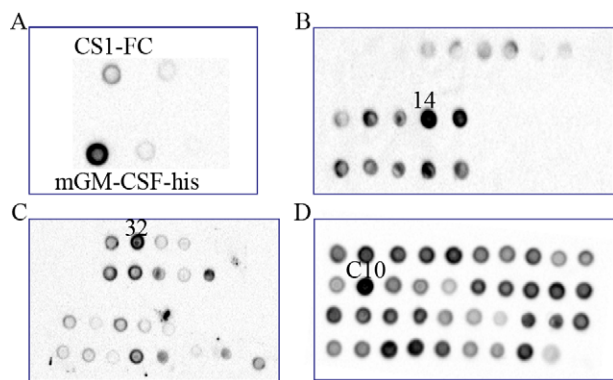


图 2 蛋白斑点杂交筛选表达 CS1-Fc 融合蛋白的 CHO-S 细胞

Fig. 2 Screening of CHO-S cells expressing CS1-Fc fusion protein by protein dot blotting.

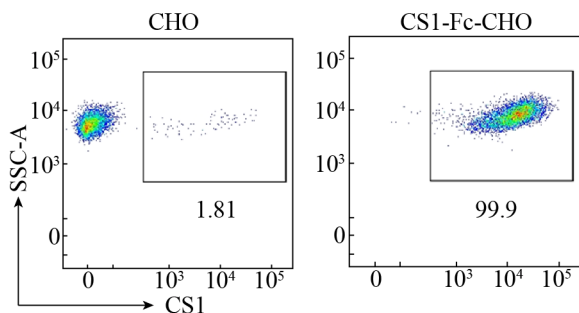


图 3 流式细胞术检测 CS1-Fc-CHO-S 细胞株的阳性表达率

Fig. 3 Expression of CS1-Fc in CHO-S cells analyzed by flow cytometry.

2.3 CS1-Fc 融合蛋白纯化及鉴定

将收集的上清液经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤后, 进行镍柱亲和层析纯化。经 SDS-PAGE 鉴定, CS1-Fc 融合蛋白以单体 (70 kDa) 和二聚体 (140 kDa) 为主 (图 4A)。蛋白印迹 (抗 His-tag 抗体) 结果显示, CS1-Fc 融合蛋白的分子量大小为 70 kDa (图 4B), CS1-Fc 融合蛋白能与抗人 CS1 抗体发生特异性反应 (图 4C)。

2.4 CS1-Fc 融合蛋白检测 CS1 CAR 的表达

CS1-Fc 融合蛋白的 CS1 部分可以作为抗原部分与 CS1 CAR 结合, Fc 片段可以作为检测抗原被 FITC-抗人 IgG1 Fc 流式所检测, 因而可能具有检测 CS1 CAR 表达效率的能力。我们分离了外周血 PMBC, 通过 Dynabeads 分离 T 细胞。培养 24 h 后, 将制备的 CS1 CAR 慢病毒转导至 T 细胞中, 培养 5 d 后, 取部分 T 细胞, 在磁力架上将 beads 脱掉, 对 T 细胞上 CS1 CAR 的表达效率进行流式细胞分析。结果显示, CS1-Fc 融合蛋白与商品化 Biotin-CS1 的检测结果相似 (图 5), 这表明 CS1-Fc 融合蛋白具有较好地检测 CS1 CAR 表达效率的能力。

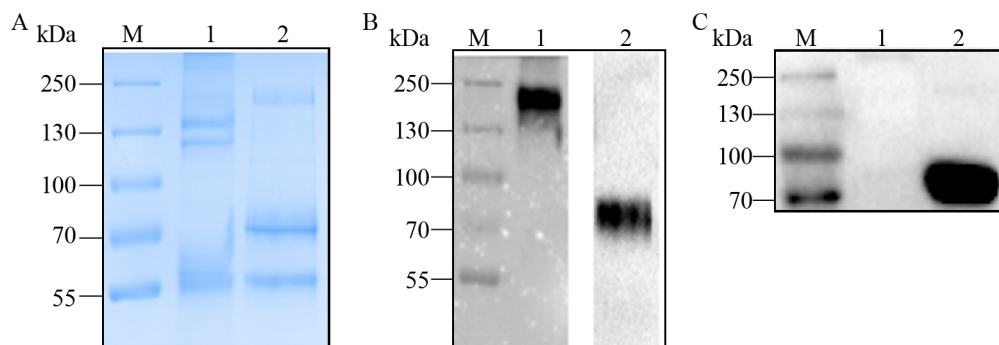


图 4 CS1-Fc 融合蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blotting 分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of CS1-Fc fusion protein. (A) The analysis of SDS-PAGE. (B) The analysis of Western blotting (anti-his tag). (C) The analysis of Western blotting (anti-human CS1). M: protein marker; 1: non-reducing CS1-Fc fusion protein; 2: reduced CS1-Fc fusion protein.

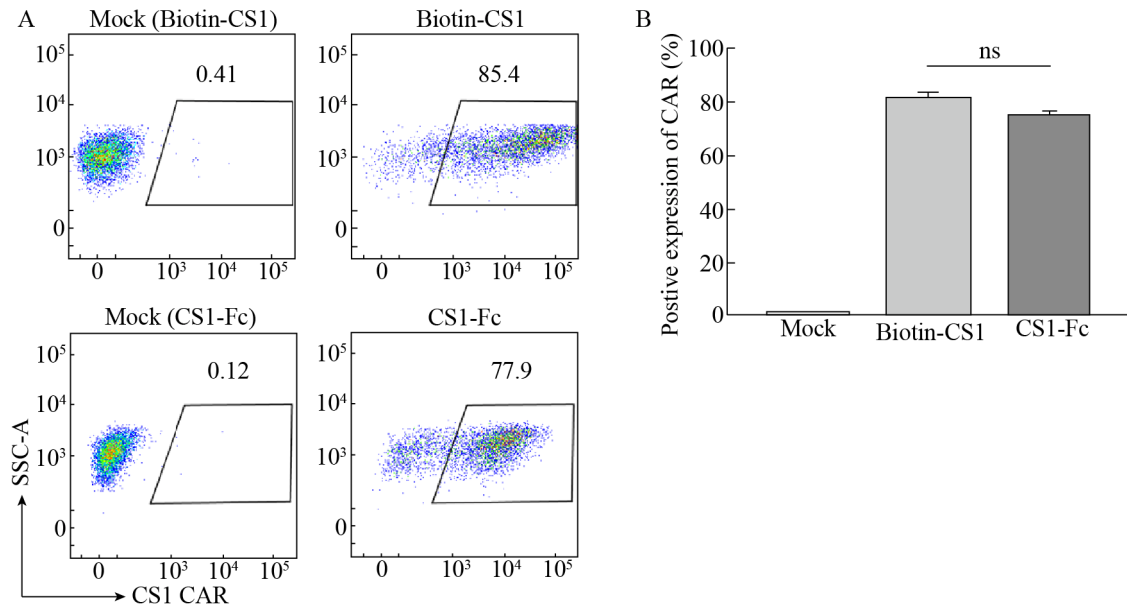


图5 CS1-Fc融合蛋白检测CS1 CAR-T细胞上CS1 CAR的表达率

Fig. 5 Detection of CS1 CAR expression rate on CS1 CAR-T cells by CS1-Fc fusion protein. (A) The analysis of flow cytometry. Mock: T cell. (B) Comparison of detection effects of Biotin-CS1 and CS1-Fc. ns: not significant.

2.5 CS1-Fc融合蛋白的生物学效应

为了验证CS1-Fc融合蛋白对CS1 CAR-T细胞的生物学效应,我们从细胞活化、细胞因子及增殖等方面进行了实验。

2.5.1 CS1-Fc融合蛋白对CS1 CAR-T细胞的激活作用

将BSA和CS1-Fc融合蛋白以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度与CS1 CAR-T细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下共孵育24 h后,用流式细胞术对细胞早期活化标志CD69的表达进行检测。研究结果显示,与CS1-Fc融合蛋白共孵育24 h后,CS1 CAR-T细胞表面CD69表达明显升高。与BSA组相比,差异有统计学意义($P < 0.001$) (图6)。CS1 CAR-T细胞与固相结合的CS1-Fc(包被浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)共孵育24 h后,CD69的表达率为70.7% (图7)。表明固相结合的CS1-Fc融合蛋白能更有效地激活CS1 CAR-T细胞。

2.5.2 CS1-Fc融合蛋白对CS1 CAR-T细胞的促细胞因子分泌作用

将健康人的T细胞与CS1-Fc共孵育24 h,并

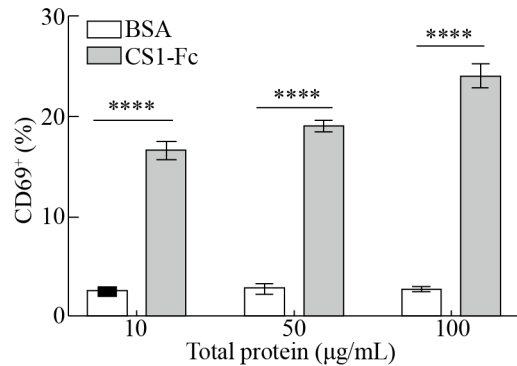


图6 CS1-Fc融合蛋白与CS1 CAR-T细胞共孵育后早期活化标志CD69的表达率

Fig. 6 Expression of early activation marker CD69 after CS1-Fc fusion protein was co-incubated with CS1 CAR-T cells. **** $P < 0.0001$.

将CS1 CAR-T细胞分别与可溶性形式的CS1-Fc(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和固相结合的CS1-Fc(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)共孵育24 h,以细胞刺激剂(PMA+离子霉素)作为对照。流式细胞分析结果显示,CS1-Fc不能促进健康人的T细胞分泌IFN- γ ,而不同形式的CS1-Fc均能特异性地促进CS1 CAR-T细胞分泌IFN- γ ,差异有统计学意义($P < 0.001$) (图8和9)。

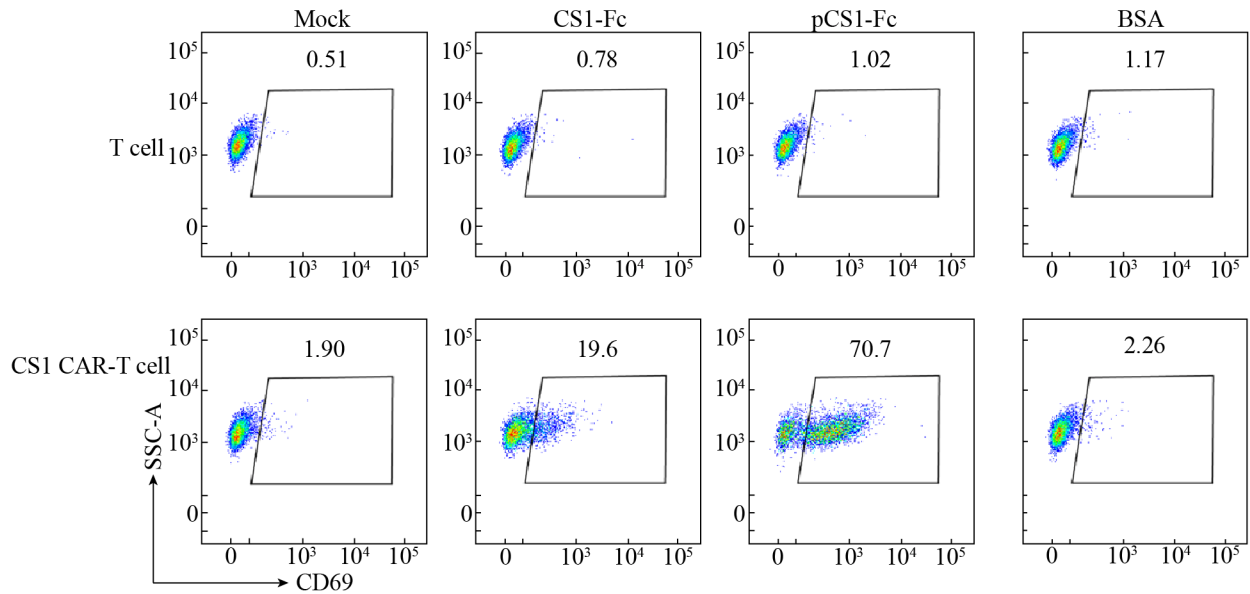


图 7 不同形式 CS1-Fc 融合蛋白与 CS1 CAR-T 细胞共孵育后早期活化标志 CD69 表达率的流式分析

Fig. 7 Flow cytometry analysis of early activation marker CD69 expression rate after co-incubation of CS1-Fc fusion protein with CS1 CAR-T cells. Mock: no protein; CS1-Fc: soluble CS1-Fc (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); pCS1-Fc: plate-bound CS1-Fc.

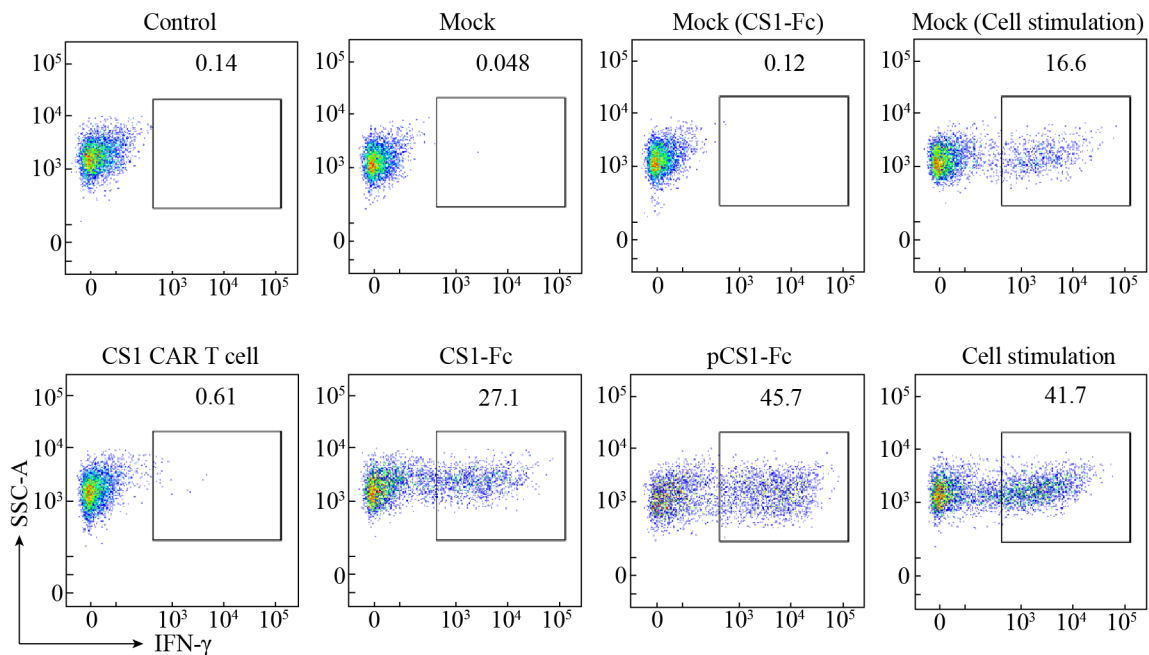


图 8 不同形式 CS1-Fc 融合蛋白与 CS1 CAR-T 细胞共孵育后细胞因子 IFN- γ 表达率的流式分析

Fig. 8 Flow cytometry analysis of cytokine IFN- γ expression rate after co-incubation of CS1-Fc fusion protein with CS1 CAR-T cells. Mock: T cell; CS1-Fc: soluble CS1-Fc; pCS1-Fc: plate-bound CS1-Fc; cell stimulation: PMA+Ionomycin.

2.5.3 CS1-Fc 融合蛋白对 CS1 CAR-T 细胞的增殖作用

将 CS1 CAR-T 细胞与 CS1-Fc 共孵育, 同时设置未加蛋白组为对照, 每两天计数并加入培养基和蛋白, 使蛋白浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 共孵育 7 d。结果显示, 加入 CS1-Fc 融合蛋白的 CS1 CAR-T 细胞数目明显增加, 与未加蛋白组相比, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$) (图 10)。

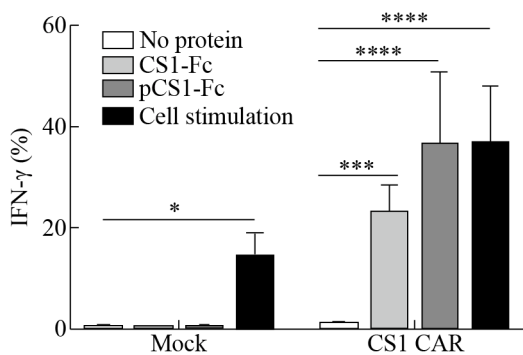


图 9 不同形式 CS1-Fc 融合蛋白与 CS1 CAR-T 细胞共孵育后细胞因子 IFN- γ 表达率的统计分析

Fig. 9 Statistical analysis of expression rate of cytokine IFN- γ after co-incubation of CS1-Fc fusion protein with CS1 CAR-T cells. Mock: T cell; CS1-Fc: soluble CS1-Fc; pCS1-Fc: plate-bound CS1-Fc; cell stimulation: PMA+ Ionomycin. * $P < 0.1$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

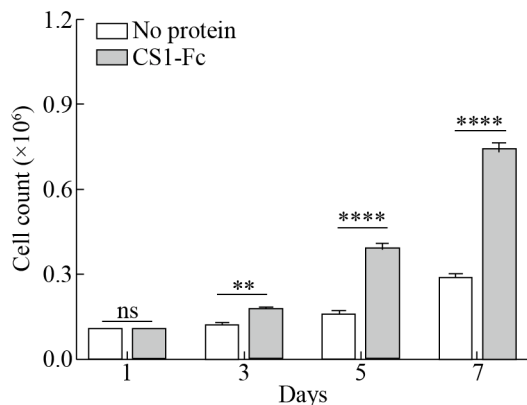


图 10 CS1-Fc 融合蛋白与 CS1 CAR-T 细胞共孵育后细胞数目的统计分析

Fig. 10 Statistical analysis of cell number after CS1-Fc fusion protein co-incubation with CS1 CAR-T cells. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant.

3 讨论

CAR-T 细胞是经过基因修饰表达 CARs 的 T 细胞^[6]。CARs 是模块化的, 其中每个功能结构域都允许部分替代, 具有很强的通用性。例如, 多种靶抗原结合部分, 包括单链抗体 (scFv) 和纳米抗体, 可以充当 CARs 的配体结合结构域。与天然的 T 细胞受体 (TCR) 复合物不同的是, CARs 可以识别抗原而不需要经过主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的提呈, 使 CARs 能够结合更广泛的抗原, 包括可溶性抗原^[17]。靶向不同抗原的 CAR-T 细胞具有结合这些可溶性抗原的能力, 并产生生物学效应^[18-20]。德国维尔茨堡大学 Gogishvili 等研究证实在体外试验中, CS1 CAR-T 细胞对于未经治疗的、难治复发型患者的多发性骨髓瘤 (MM) 细胞都表现出快速细胞溶解作用。此外, 在小鼠活体试验中, CS1 CAR-T 细胞对骨髓内外 MM 细胞均具有抑制活性^[12]。

我们制备的 CS1-Fc 融合蛋白由 CS1 的胞外区和人 IgG1 的 Fc 段组成。结果显示 CS1-Fc 融合蛋白能特异性结合 CS1 抗体, 同时也能结合 CS1 CAR。我们通过 CS1-Fc 融合蛋白与 CS1 CAR T 细胞孵育, 再利用 FITC-抗人 IgG1Fc 抗体检测 CS1 CAR-T 细胞上 CS1 CAR 的表达, 检测效果与商品化的 Biotin-CS1 相差无几, 且 CS1-Fc 融合蛋白中的 Fc 段可延长半衰期, 不容易变质, 而商品化的 Biotin-CS1 价格昂贵, 容易变质。我们提供的这种检测 CS1 CAR 表达的手段, 能够在体外培养阶段检测 CS1 CAR 的表达。

现有研究表明, CS1 CAR-T 细胞可以在体外杀死高表达 CS1 的多发性肿瘤细胞^[12]。CAR-T 细胞的杀靶能力强弱与它的活化有密切的关系。CD69 亦称为激活诱导分子 (AIM), 是 NK 细胞信号传导基因复合体家族的成员。CD69 可作为共刺激信号促进 T 细胞进一步活化和增殖。静止的 T 淋巴细胞一般不表达 CD69, T 细胞通过 TCR

接受 CD3/TCR 复合物、佛波醇乙酯 (PMA)、植物血凝素 (PHA) 等刺激信号后, 细胞表面即合成和表达一些新的糖蛋白, 包括 CD69、IL-2 受体 CD25、转铁蛋白受体 CD71, 这些分子被称为活化标志, 其中最早表达的是 CD69^[21]。我们的研究结果显示, CS1-Fc 融合蛋白在与 CS1 CAR-T 细胞共孵育后, CS1 CAR-T 细胞上的 CD69 表达水平明显升高, 提示 CS1-Fc 融合蛋白能特异地激活 CS1 CAR-T 细胞。我们的研究还显示 CS1-Fc 融合蛋白以固相结合形式相较可溶形式的 CS1-Fc 融合蛋白能更有效地活化 CS1 CAR, 原因可能在于 IgG 对聚苯乙烯等固相具有较强的吸附力, 结合多发生在 Fc 段, 因而 CS1 部分可更好地暴露而被 CS1 CAR 所识别。

CS1 CAR-T 细胞免疫疗法的主要困难在于体内外增强 CS1 CAR-T 细胞的生存和扩增。目前, CAR-T 细胞培养是依赖于抗 CD3 抗体 (单独或与抗 CD28 抗体组合) 和细胞因子。对于 CAR-T 细胞免疫疗法来说, 如何获得大规模的 CAR-T 细胞至关重要^[22]。已有研究表明, 在适当的条件下, 活化的 T 细胞可以通过同源抗原再活化以达到扩增^[23-24]。我们的研究结果显示, CS1-Fc 融合蛋白可以在可溶形式下促进 CS1 CAR-T 细胞的增殖, 推测这种选择性增殖是由于融合蛋白的 CS1 片段被 CS1 CAR 所识别并结合, 活化了 CS1 CAR-T 细胞。

本研究首次通过质粒构建、脂质体转染和 G418 加压筛选等方法成功地构建了 CS1-Fc-CHO-S 细胞, 并运用镍柱亲和层析分离纯化制备了 CS1-Fc 融合蛋白。我们发现 CS1-Fc 融合蛋白能有效地检测 CS1 CAR-T 细胞中 CS1 CAR 的表达, 并且表现出在体外某些条件下特异性激活 CS1 CAR-T 细胞、促进增殖和细胞因子分泌的能力。CS1-Fc 融合蛋白是否可在体内作用于 CS1 CAR-T 细胞有待进一步研究的验证。

REFERENCES

- [1] Al-Hujaily EM, Oldham RAA, Hari P, et al. Development of novel immunotherapies for multiple myeloma. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1506.
- [2] Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*, 2011, 118(17): 4519-4529.
- [3] Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1122-1128.
- [4] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365.
- [5] Hudecek M, Einsele H. Myeloma CARs are rolling into the clinical arena. *Blood*, 2016, 128(13): 1667-1668.
- [6] Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood*, 2017, 130(24): 2594-2602.
- [7] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851.
- [8] Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011, 118(18): 4817-4828.
- [9] Di Bernardo A, Macor P, Guarnotta C, et al. Humoral immunotherapy of multiple myeloma: perspectives and perplexities. *Exp Opin Biol Ther*, 2010, 10(6): 863-873.
- [10] Malaer JD, Mathew PA. CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(8): 1637-1641.
- [11] Wang XL, Walter M, Urak R, et al. Lenalidomide enhances the function of CS1 chimeric antigen receptor-redirection T cells against multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(1): 106-119.

- [12] Gogishvili T, Danhof S, Prommersberger S, et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7⁺ normal lymphocytes. *Blood*, 2017, 130(26): 2838–2847.
- [13] Jafari R, Zolbanin NM, Rafatpanah H, et al. Fc-fusion proteins in therapy: an updated view. *Curr Med Chem*, 2017, 24(12): 1228–1237.
- [14] Ghose S, Hubbard B, Cramer SM. Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(4): 768–779.
- [15] Ma QZ, DeMarte L, Wang YW, et al. Carcinoembryonic antigen-immunoglobulin Fc fusion protein (CEA-Fc) for identification and activation of anti-CEA immunoglobulin-T-cell receptor-modified T cells, representative of a new class of Ig fusion proteins. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(4): 297–306.
- [16] Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, et al. Protein production and purification. *Nat Methods*, 2008, 5(2): 135–146.
- [17] Chang ZL, Lorenzini MH, Chen XM, et al. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(3): 317–324.
- [18] Irving BA, Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 1991, 64(5): 891–901.
- [19] Letourneur F, Klausner RD. T-cell and basophil activation through the cytoplasmic tail of T-cell-receptor zeta family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(20): 8905–8909.
- [20] Romeo C, Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell*, 1991, 64(5): 1037–1046.
- [21] Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1999, 21(3): 565–582.
- [22] Schwartzentruber DJ, Hom SS, Dadmarz R, et al. *In vitro* predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Clin Oncol*, 1994, 12(7): 1475–1483.
- [23] Beecham EJ, Ma QZ, Ripley R, et al. Coupling CD28 co-stimulation to immunoglobulin T-cell receptor molecules: the dynamics of T-cell proliferation and death. *J Immunother*, 2000, 23(6): 631–642.
- [24] Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*, 1998, 8(1): 89–95.

(本文责编 郝丽芳)