

一种经 microRNA 敲低 PD-1 的新型慢病毒载体在 CAR-T 细胞中的应用

陈辉¹, 金熙¹, 张校曼¹, 高基民^{1,2}

1 温州医科大学 检验医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035

2 温州医科大学 浙江启新生物技术有限公司, 浙江 温州 325035

陈辉, 金熙, 张校曼, 等. 一种经 microRNA 敲低 PD-1 的新型慢病毒载体在 CAR-T 细胞中的应用. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1395-1404.

Chen H, Jin X, Zhang XM, et al. Construction of a novel lentiviral vector knocking down PD-1 via microRNA and its application in CAR-T cells. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1395-1404.

摘要: 本研究将 microRNA 插入 EF1 α 启动子的内含子中, 构建携带沉默 PD-1 基因的 miRNA 的新型慢病毒载体, 并将其应用于 CAR-T 细胞。通过流式细胞术检测慢病毒载体转导效率和 PD-1 沉默效率; Western blotting 检测 PD-1 蛋白表达差异; 荧光定量 PCR 检测 microRNA 相对表达情况; 荧光素酶生物发光法和流式细胞术检测 CAR-T 细胞的能力。结果显示与 U6 转录 microRNA 的载体相比较, 将 microRNA 插入到 EF1- α 内含子中的病毒载体转导效率更显著, 对 PD-1 的敲低效率均达 90% 以上, 且 Western blotting 结果验证了 PD-1 的敲低效果。另外通过荧光定量 PCR, 可显示出转导该新型慢病毒载体的 Jurkat 细胞内 microRNA 的相对表达量。荧光素酶生物发光法证实了 CAR-T 细胞针对靶细胞的特异杀伤性, 流式细胞术结果表明沉默 PD-1 的 CAR-T 细胞相较于正常 CAR-T 细胞显示出更强的特异性杀伤能力。本研究成功构建了经 microRNA 敲低 PD-1 的新型慢病毒载体并验证了其转导效率的优越性, 以及基于此载体表达的 microRNA 可高效地沉默 PD-1; 且应用此载体的 CAR-T 细胞能发挥更强的杀伤活性, 从而为后续该 CAR-T 细胞治疗表达 PD-L1 的肿瘤奠定基础。

关键词: 程序性死亡受体 1, microRNA, 新型慢病毒载体, 嵌合抗原受体 T 细胞

Received: April 9, 2020; **Accepted:** May 21, 2020

Supported by: National Health Commission Science Foundation-Major Medical and Health Science and Technology Program of Zhejiang Province (No. WKJ-ZJ-1928), Wenzhou Municipal Research Program (Nos. ZS2017014, 2018ZY001).

Corresponding author: Jimin Gao. Tel: +86-577-86699341; E-mail: jimingao64@163.com

国家卫生健康委员会科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划 (No. WKJ-ZJ-1928), 温州市重大科技专项 (Nos. ZS2017014, ZS2018ZY001) 资助。

Construction of a novel lentiviral vector knocking down PD-1 via microRNA and its application in CAR-T cells

Hui Chen¹, Xi Jin¹, Xiaoman Zhang¹, and Jimin Gao^{1,2}

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

2 Zhejiang Qixin Biotech, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: By inserting microRNAs into the intron of EF1 α promoter, we constructed a novel lentiviral vector knocking down PD-1 gene via microRNA and applied it to CAR-T cells. Lentiviral transduction efficiency and PD-1-silencing efficiency were detected by flow cytometry. PD-1 expression was detected by Western blotting. Relative expression of microRNA was measured by Q-PCR. Cytotoxicity of CAR-T cells based on this vector was tested by luciferase bioluminescence and flow cytometry. Compared with lentiviral vector with microRNA transcribed by U6 promotor, the transduction efficiency of lentiviral vector with microRNA which was inserted into the intron of EF1 α promoter was more significant, and the knockdown rate of PD-1 was more than 90%, which was validated by flow cytometry and Western blotting. And the relative expression level of microRNA in Jurkat cells transduced with this novel lentiviral vector was shown by Q-PCR. Compared with normal CAR-T cells, CAR-T cells based on this vector showed stronger cytotoxicity against PD-L1 positive Raji cells. We successfully constructed a novel lentiviral vector that knocked down PD-1 via microRNA and verified the superiority of its transduction efficiency and knockdown efficiency of PD-1. CAR-T cells based on this vector can exert a more powerful cytotoxicity, thus providing theoretical support for the subsequent treatment of PD-L1 positive tumors.

Keywords: programmed cell death protein 1, microRNA, novel lentiviral vector, CAR-T cells

CAR (Chimeric antigen receptor, 嵌合抗原受体) T 细胞疗法是利用病人自身的免疫细胞来清除癌细胞, CAR 是改造后的受体, 赋予 T 细胞非 HLA (Human leukocyte antigen, 人白细胞抗原) 依赖的方式识别肿瘤抗原的能力, 这使得经过 CAR 改造的 T 细胞相较于天然 T 细胞受体 (TCR) 能够识别更广泛的目标^[1]。CAR 由结合靶抗原的免疫球蛋白单链可变片段 (Single-chain variable fragment, scFv)、跨膜结构域和细胞内 T 细胞信号传导结构域组成。目前, CAR-T 细胞疗法在癌症免疫治疗中显示出显著的功效, 特别是在血液系统疾病的治疗中^[2-3]。

程序性死亡受体-1 (PD-1) 是一种免疫抑制性受体, 属于 CD28 家族成员的 I 型跨膜蛋白^[4], 在激活的 T 细胞、B 细胞、单核细胞和树突状细胞表面广泛表达^[5]。PD-1 与其配体 PD-L1 (细胞程序性死亡-配体 1, Programmed cell death 1 ligand 1) 结合可抑制 T 细胞的活化、增殖和细胞

因子的分泌, 诱导 T 细胞的凋亡, 从而负调控免疫应答^[6]。肿瘤细胞通过高表达 PD-L1 分子, 使表达 PD-1 的肿瘤抗原特异性 T 细胞凋亡, 导致肿瘤细胞逃避免疫系统的监视和杀伤^[7]。

慢病毒载体已广泛用于 RNA 分子递送或蛋白表达^[8-11]。目前研究发现, 基于慢病毒载体的小分子 RNA 转移至宿主细胞会通过各种机制导致慢病毒滴度降低^[12-13], 可能是由于病毒颗粒生产过程中 mRNA(信使 RNA)被降解导致包装失败, 或者是因病毒转导宿主细胞后的基因表达降低。因此, 在许多研究中都对慢病毒载体进行了修饰和优化, 以增强基因表达或小分子 RNA 的传递^[14-19]。

1 材料与方法

1.1 细胞株与培养基

293T 细胞株 (人肾上皮细胞系) 购自 ATCC, 用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养; 过

表达人 PD-L1 和荧光素酶的 Raji 细胞株由本实验室自行构建并保种, Jurkat 细胞株 (人急性 T 细胞白血病细胞株) 购自 ATCC, 以上两种细胞株用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。T 细胞取自健康人外周血, 用含 5% 人 AB 血清、1 ng/mL IL-2、10 μ g/mL IL-7 和 10 μ g/mL IL-15 的 X-Vivo 培养基培养。DMEM、RPMI 1640 和胎牛血清购自 Gibco 公司; X-Vivo 购自 Lonza 公司; 人 AB 血清购自 Sigma 公司; 重组人 IL2、IL7 和 IL15 购自 PRPROTECH 公司。

1.2 试剂与仪器

plenti-EF1 α -GFP (Green fluorescent protein)、plenti-EF1 α -anti-CD19 CAR 表达质粒由本实验室保存; 限制性内切酶购自 New England Bio Labs; 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司; 聚乙酰胺 (Polyetherimide, PEI) 购自 Polysciences 公司; 生物素标记的人 CD19 蛋白购自 ACRO Biosystems 公司; PE 标记的链霉亲和素、PE 标记的抗人 CD3 抗体、Brilliant Violet 421 标记的抗人 PD-L1 抗体、PB 标记的抗人 CD62L 抗体、Alexa Fluor[®] 488 标记的抗人 CD45RO 抗体、APC 标记的抗人 CD45RA 抗体和 APC 标记的抗人 PD-1 抗体均购自 BioLegend 公司。

PCR 仪、电泳装置、凝胶成像系统购自 Bio-Rad; FACS Aria II 流式细胞仪购自 BD 公司; DynaMagTM-5 磁力架、CO₂ 恒温细胞培养箱、酶标仪等购自 Thermo Fisher 公司; 超速离心机购自 Beckman Coulter 公司; 荧光显微镜、台式低速离心机、超净工作台等购自 Eppendorf 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 慢病毒表达载体构建

三条 miRNA 分别命名为 miRNA-30#backbone (miRNA-30 原始序列)、miRNA-30#PD-1#1 (靶向 PD-1 3'UTR)、miRNA-30#PD-1#61 (靶向 PD-1 蛋

白编码区), 均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 3 条 miRNA 均使用同一对引物进行扩增, F: 5'-TGCGGGCCAAGATCTTCTTCAGGTTAACCCACAC-3' 和 R: 5'-CCAGTGTGCAGATCTTCCTAAAGTAGCCCCTTG-3', 获得目的片段 Q1、Q2、Q3, 以 *Bgl* II 为酶切位点, 将 Q1、Q2、Q3 以无缝连接插入 plenti-EF1 α -GFP 质粒 EF1 α 启动子的内含子中; 以 *Bgl* II 为酶切位点, 将 Q2、Q3 以无缝连接插入 plenti-EF1 α -anti-CD19 CAR 质粒 EF1 α 启动子的内含子中。

1.3.2 慢病毒包装及其转导效率测定

将上述目的质粒分别与包装质粒 pLP1、pLP2、pMD2G 共转染 293T 细胞得到慢病毒颗粒, 设置一定比例转导 Jurkat 细胞, 并于 48 h 后通过流式细胞仪检测转导效率。

1.3.3 CAR-T 细胞的制备及扩增

采集健康人静脉血, 经 Ficoll 分离液密度梯度离心提取外周血单个核细胞, 利用抗 CD3/CD28 抗体包被的磁珠筛选 T 细胞, 并经磁珠活化 12–24 h。将上述慢病毒转导至活化的 T 细胞, 待 T 细胞扩增至一定数量时取部分细胞, 经生物素标记的 CD19 蛋白和 PE-SA 先后染色, 通过流式细胞术检测 CAR 表达率。

1.3.4 蛋白质印迹分析

细胞裂解液通过 SDS-PAGE, 然后转移至 PVDF 膜 (Bio-Rad)。抗 PD-1 抗体 (CST: 86163S)、抗 GAPDH (Beyotime) 抗体分别被用于蛋白印迹一抗和二抗。

1.3.5 实时定量 PCR

使用 TRIzol 试剂从 Jurkat 细胞中提取总 RNA。以 U6 为内参基因, 通过特异性引物将 miRNA 和 U6 逆转录为 cDNA。逆转录引物分别是 Q-PCR miRNA#1 REV、Q-PCR miRNA#61 REV, 实时荧光定量 PCR 引物如表 1 所示。相对定量法通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for quantitative PCR

Primer	Sequence (5'-3')
Q-PCR U6 FOR	CTCGCTTCGGCAGCACA
Q-PCR U6 REV	GGAACGCTTCACGAATTT
Q-PCR miRNA#1 FOR	ACACTCCAGCTGGGTAATATAATAGAACCA
Q-PCR miRNA#1 REV	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCCCTGTG
Q-PCR miRNA#61 FOR	ACACTCCAGCTGGGTTTAGCACGAAGCTCT
Q-PCR miRNA#61 REV	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCATCGGAG

1.3.6 流式细胞仪

以下抗体用于流式细胞仪实验：生物素化人 CD19 (ACRO Biosystems), APC 偶联抗 PD-1 (BioLegend), Brilliant Violet 421 偶联抗 PD-L1 (BioLegend), PE 偶联抗人 CD3 (BioLegend), APC-SA (BioLegend), PE-SA (BioLegend), APC 偶联抗 CD45RA (BioLegend), PB 偶联抗 CD62L (BioLegend), FITC 偶联抗 CD45RO (BioLegend)。使用 BD AriII 流式细胞仪收集细胞数据, 并使用 FlowJo 软件进行分析。

1.3.7 荧光素酶生物发光法检测 CAR-T 细胞的杀伤效能

96 孔板中每孔铺 10 000 个 PD-L1-Luc-GFP Raji 细胞, 然后以不同的效: 靶比添加 CAR-T 细胞, 使每孔的终体积为 200 μ L。另外设置两组 PD-L1-Luc-GFP Raji 细胞孔, 一个用 RPMI-1640 培养基重悬, 另一个用 ddH₂O 重悬以裂解细胞, 将其用作最大背景值 (MAX) 和最小背景值 (MIN) (每组重复 3 孔)。加入荧光素酶底物后, 用酶标仪检测自身荧光值 V。靶细胞的裂解率可通过以下公式计算: 裂解率 (%)=(MAX-V)/(MAX-MIN)×100%。

1.3.8 统计学分析

所有实验均独立重复 3 次, 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据统计分析和图表制作均采用 GraphPad prim 6.0, 差异在 *P* 时被认为具有统计学意义 (**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1)。

2 结果与分析

2.1 携带 miRNA 的新型慢病毒载体的构建及验证

我们设计了慢病毒质粒 plenti-EF1 α (miRNA-30-backbone)-GFP、plenti-EF1 α (miRNA#1)-GFP、plenti-EF1 α (miRNA # 61)-GFP, 并以由 U6 启动子转录 miRNA 的慢病毒质粒 plenti-EF1 α -GFP-U6-miRNA # 61 作为对照 (图 1A)。我们基于 miRNA-30 骨架 (miRNA-30-backbone) 设计了两种 miRNA (分别针对 PD-1 基因 3'UTR 的 miRNA-30#PD-1#1 和 CDS 区的 miRNA-30#PD-1#61), 其中 miRNA 序列经 *Bgl* II 酶切位点插入到启动子 EF1 α 的内含子中 (表 2)。将上述目的质粒经第 3 代慢病毒包装系统得到相应慢病毒颗粒并转导至 Jurkat 细胞, 通过流式细胞术检测 Jurkat 细胞中的报告基因 GFP 表达情况, 以比较在相同条件下不同慢病毒载体上目的基因的表达效率。如图 1B 所示, 经慢病毒 LV-EF1 α -GFP (阳性对照)、LV-EF1 α (miRNA-backbone)-GFP、LV-EF1 α (miRNA#1) 和 LV-EF1 α (miRNA#61)-GFP 转导的 Jurkat 细胞的 GFP 表达率显著高于经慢病毒 LV-EF1 α -GFP-U6-miRNA # 61 转导的 Jurkat 细胞。该结果表明, 相对于传统携带 miRNA 的慢病毒载体, 将 miRNA 插至 EF1 α 内含子中的慢病毒载体的转基因表达效率更高。

2.2 miRNA 介导的 PD-1 基因敲低效率

我们通过植物血凝素 (PHA) 活化刺激 Jurkat 细胞, 使其高表达 PD-1, 再通过转导上述不同慢

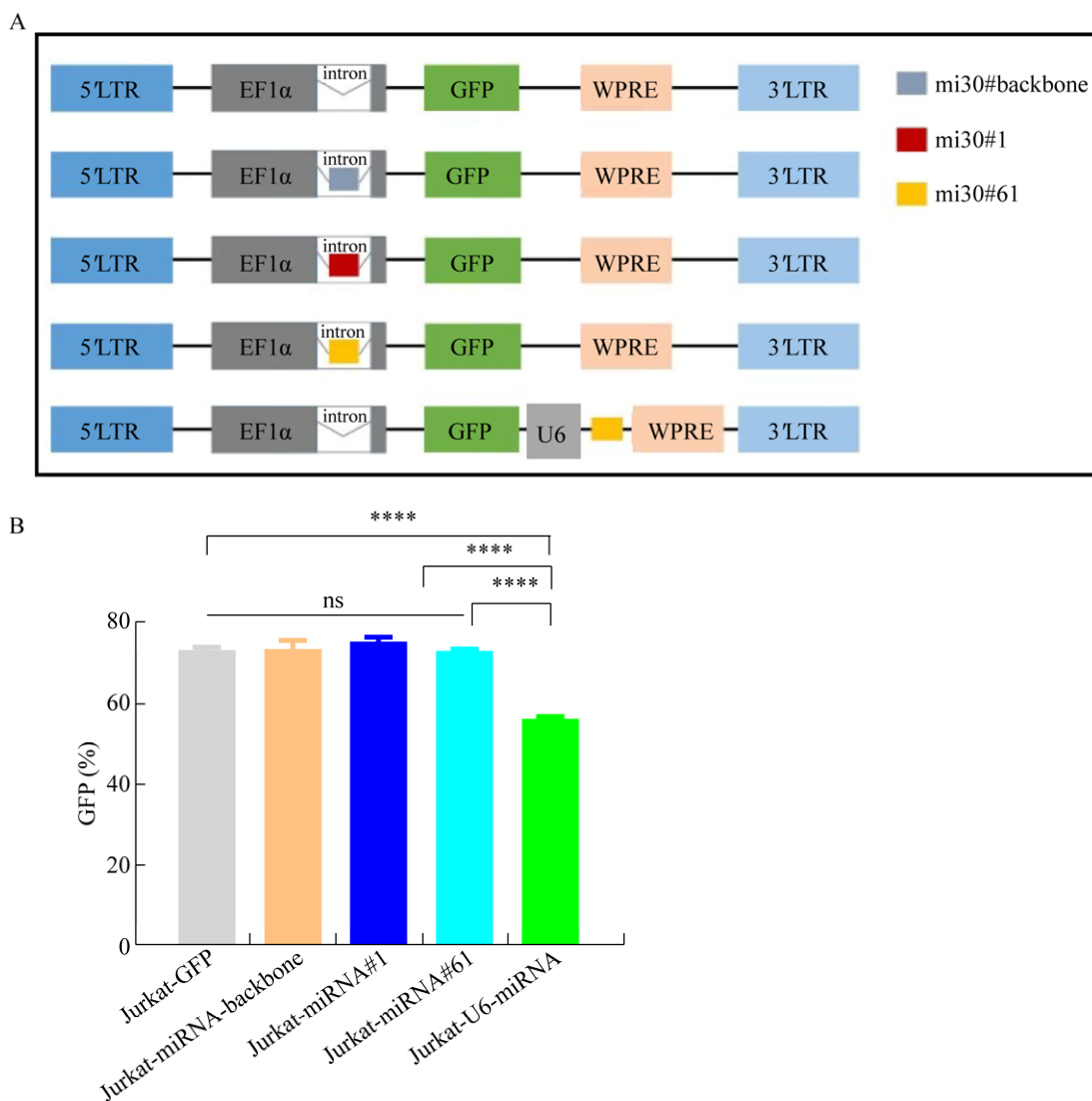


图 1 携带 miRNA 的新型慢病毒载体的构建及其目的基因表达效率的验证

Fig. 1 Construction of a novel lentiviral vector carrying miRNA and the verification of the target gene expression rate. (A) Schematic of the lentiviral vectors, miRNA-30#backbone, miRNA-30#1 and miRNA-30#61 were inserted into the intron respectively. GFP: reporter gene. U6: promoter for miRNA. EF1 α : promoter for transgene. (B) Quantification of GFP expressing through different lentiviral vectors was detected by flow cytometry. Data shown were $\bar{x} \pm s$ from triplicates. Bars: *s*. **** $P < 0.0001$ by One-Way ANOVA.

表 2 miRNA 序列

Table 2 Sequences of miRNAs

miRNA	Sequence (5'-3')
miRNA-30-backbone	TCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTAAAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGGGA GACGTGATTACCGTCTCTTGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTACTTTAGGA
miRNA-30#PD-1#1	TCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTAAAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCC CTGTGGTTCTATTATATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATATAATAGAACCACAGGGA TGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTACTTTAGGA
miRNA-30#PD-1#61	TCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTAAAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAAT CGGAGAGCTTCGTGCTAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTAGCACGAAGCTCTCCGATG TGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTACTTTAGGA

病毒以评估不同新型慢病毒载体中 miRNA 介导的 PD-1 敲除效率。图 2A 表明, 成功转导病毒的 GFP⁺ 细胞群中, LV-EF1 α (miRNA#1)-GFP 和 LV-EF1 α (miRNA#61)-GFP 转导的 Jurkat 细胞表面几乎未检测到 PD-1。如图 2B 所示, 与不靶向其他基因的 miRNA 骨架相比, miRNA#1 和 miRNA#61 介导的 PD-1 沉默效率均超过了 90%,

具有显著的统计学差异。

接下来, 我们通过荧光定量 PCR 检测了转导新型慢病毒载体后的 Jurkat 细胞中 miRNA 的相对表达量以验证 miRNA 是否由慢病毒载体递送。以 LV-EF1 α -GFP 转导的 Jurkat 细胞作为对照, LV-EF1 α (miRNA#1)-GFP 和 LV-EF1 α (miRNA#61)-GFP 转导的 Jurkat 细胞中, miRNA # 1 和 miRNA # 61 分

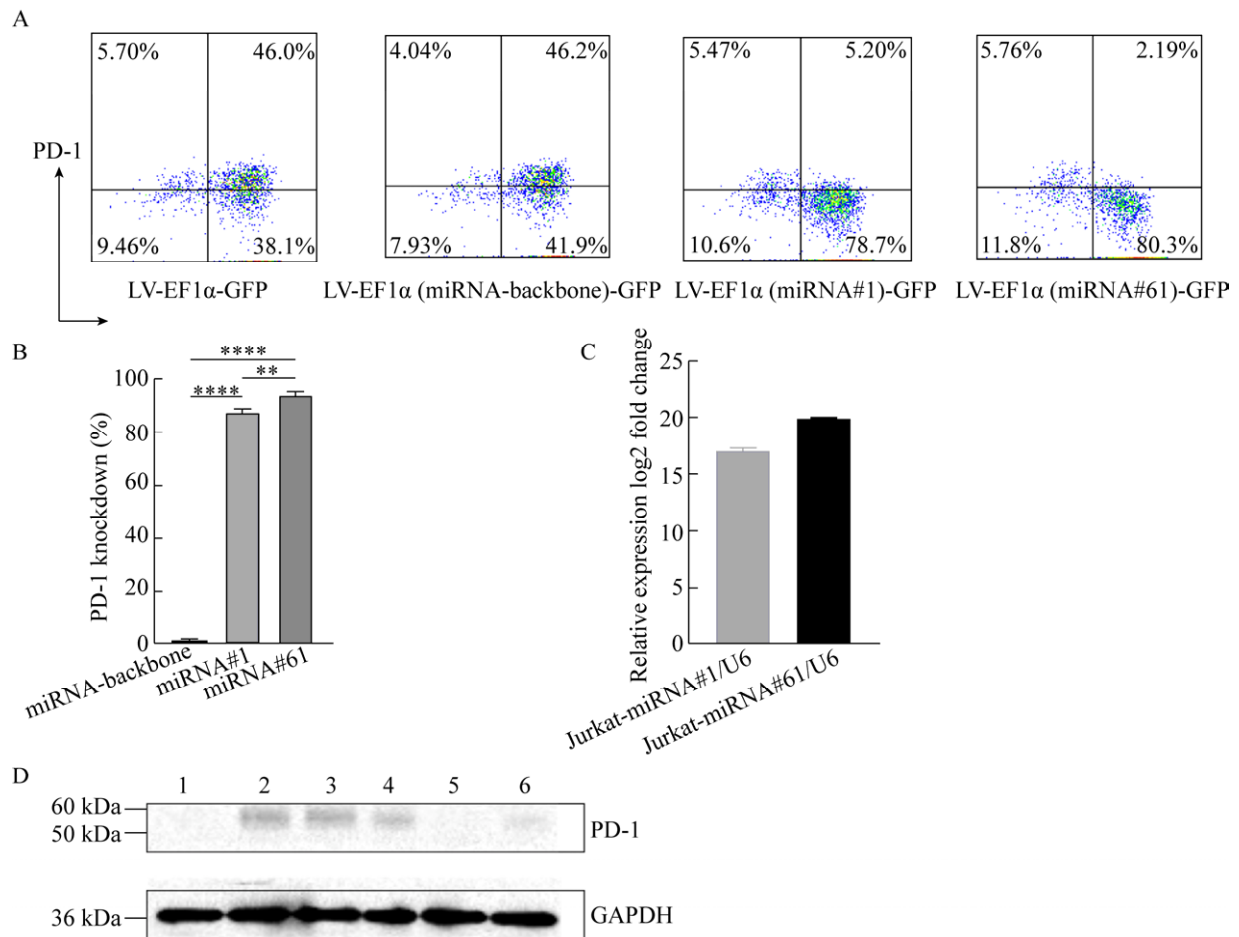


图 2 miRNAs 介导的 PD-1 基因沉默的验证

Fig. 2 Efficiency of PD-1 knockdown mediated by miRNAs. (A) Expression of PD-1 on transduced Jurkat cells was detected by flow cytometry after stimulation with PHA for 48 h. Data shown were representative of three independent experiments. (B) Knockdown rates of PD-1 via miRNA#1 or miRNA#61. Data were $\bar{x} \pm s$ from triplicates. Bars, SD. (C) The relative expression levels of miRNA#1 or miRNA#61 in Jurkat cells transduced with LV-EF1 α (miRNA#1)-GFP or LV-EF1 α (miRNA#61)-GFP were evaluated by Q-PCR, respectively. Jurkat cells transduced with LV-EF1 α -GFP as negative control. SnRNA U6 was used for internal control. Data were $\bar{x} \pm s$ from triplicates. Bars: *s*. (D). Expression of PD-1 in Jurkat cells transduced with different lentivirus particles was detected by Western blotting. 1: Jurkat cells (negative control); 2: Jurkat cells stimulated by PHA (positive control); 3: Jurkat cells transduced with LV-GFP (stimulated by PHA); 4: Jurkat cells transduced with LV-EF1 α (miRNA-30-backbone)-GFP (stimulated by PHA); 5: Jurkat cells transduced with LV-EF1 α (miRNA-30#PD-1#1)-GFP (stimulated by PHA); 6: Jurkat cells transduced with LV-EF1 α (miRNA-30#PD-1#61)-GFP (stimulated by PHA). GAPDH: internal control. Data shown were representative of three independent experiments.

别显示出较高的表达水平 (图 2C)。另外, 通过 Western blotting 验证了 LV-EF1 α (miRNA#1)-GFP 和 LV-EF1 α (miRNA#61)-GFP 转导的 Jurkat 细胞中 PD-1 的表达明显减少 (图 2D)。

2.3 经 miRNA 敲低 PD-1 的新型 CAR 慢病毒载体构建

我们构建了第 2 代 CAR 慢病毒载体, 其中包含识别 CD19 的嵌合抗原受体、CD8 跨膜区、人 CD28 的细胞内信号传导域和 CD3 ζ T 细胞信号传

导域, 其中 miRNA#1 和 miRNA#61 分别插入 EF1 α 的内含子中 (图 3A)。将基于此载体的慢病毒颗粒转导至人原代 T 细胞以构建 CAR-T 细胞。如图 3B 所示, 3 种 T 细胞表面的 CAR 阳性率分别为 88.6%、80.0% 和 73.8%, 显示成功构建 anti-CD19 CAR-T 细胞。此外, 我们将 3 种不同的 CAR-T 细胞分别与高表达 CD19 的 Raji 细胞以效靶比为 1:1、5:1 和 10:1 共培养 4 h, 结果显示 Raji 细胞被 3 种 CAR-T 特异杀伤 (图 3C)。

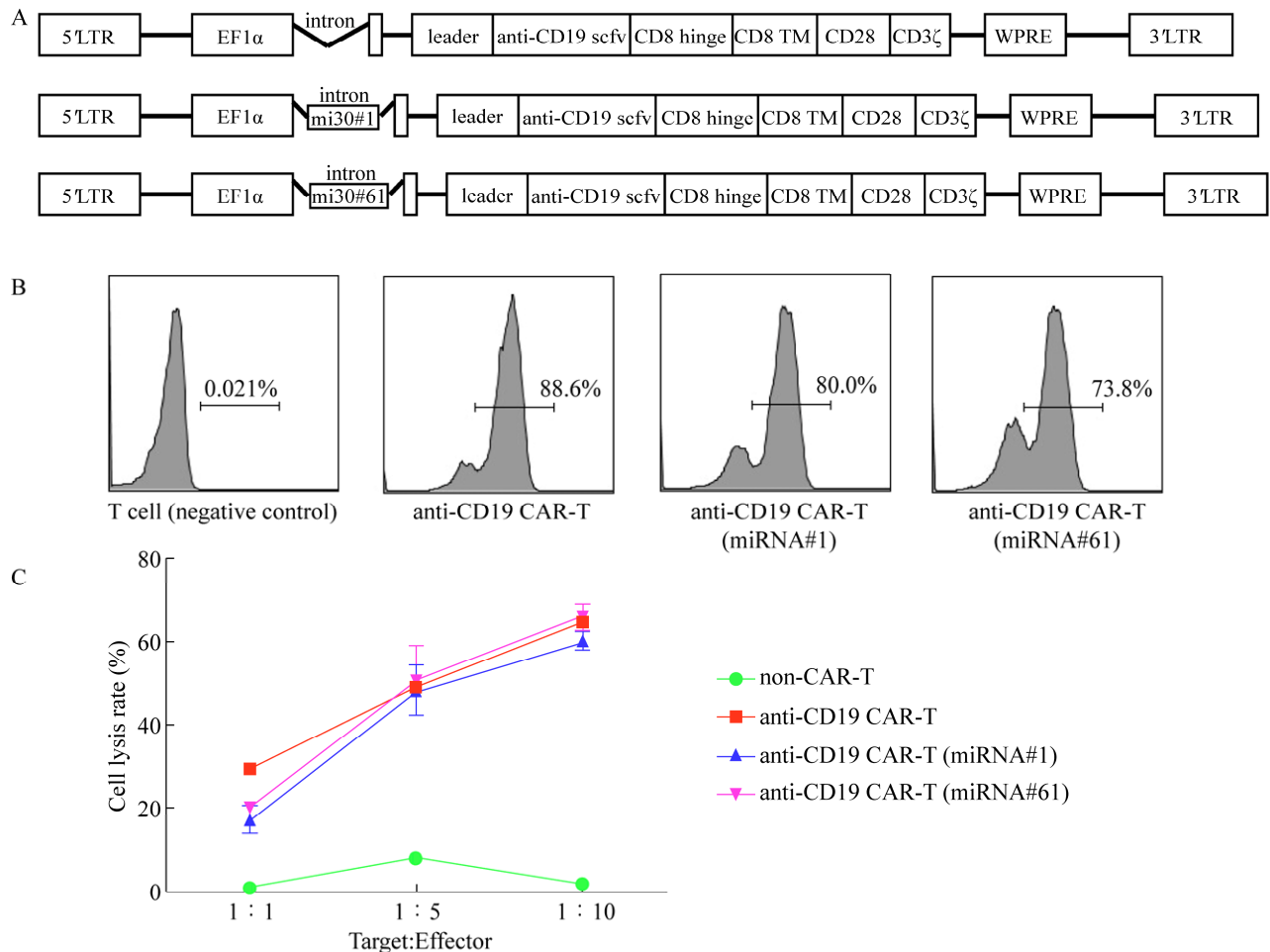


图 3 经 miRNA 敲低 PD-1 的新型 CAR 慢病毒载体构建

Fig. 3 Construction of a novel CAR lentiviral vector knocking down PD-1 via miRNA. (A) Schematic of second-generation CAR vectors, anti-CD19 scFv; leader: signal peptide; CD8 TM: CD8 transmembrane region; CD28: intracellular signaling domain of human CD28; CD3 ζ : intracellular signaling domain of CD3 zeta, miRNA30#1 and miRNA30#61 were inserted into the intron respectively. (B) CAR expression rates were detected by flow cytometry. (C) The specific cytotoxicity of CAR-T cells against tumor cells were assayed by luciferase bioluminescence. Data were $\bar{x} \pm s$ from triplicates. Bars: s .

2.4 CAR-T 细胞表面 PD-1 的敲除增强了其抗肿瘤效应

使用 CD3/CD28 抗体包被的磁珠刺激 CAR-T 细胞 48 h 后, 如图 4A 所示, 流式细胞术检测结果显示, 在携带 miRNA#1 或 miRNA#61 的 CAR-T 细胞中 PD-1 表达率明显下降, 表明 miRNA 成功地在 CAR-T 细胞中介导了 PD-1 的沉默。

为检测上述经 miRNA 敲低 PD-1 的 CAR-T 细胞的杀伤活性差异, 将 CAR-T 细胞与 PD-L1⁺ 并转有荧光素酶基因和 GFP 报告基因的 Raji 细胞以效靶比为 1:1 共培养 72 h。如图 4B 所示, 与 anti-CD19 CAR-T 细胞杀伤效率相比, 经 miRNA 敲低 PD-1 的两种 CAR-T 细胞均显示出杀伤的优越性, 其靶细胞裂解率明显提高。

3 讨论

在本研究中, 我们以 pri-miRNA-30 骨架为基础设计了靶向 PD-1 的 miRNA, 从而介导 CAR-T 细胞 PD-1 蛋白的敲低。基于慢病毒载体, 我们将 miRNA 插入人延伸因子 1 α (EF1 α) 启动子的内含子中^[14,20], miRNA 会随着目的基因的转录而同时转录表达, 而不是加入额外的 U6 等启动子单独转录 miRNA^[21]。Cooper 等的研究表明慢病毒包装过程中 EF1 α 启动子中的内含子不会被剪接丢失^[14]。基于以上发现, 将 miRNA 插入内含子的方式是可行的。将应用此方法的慢病毒载体转导宿主细胞, 而目的基因由启动子 EF1 α 驱动。后续的结果显示, 与携带 U6 启动子转录的 miRNA 的

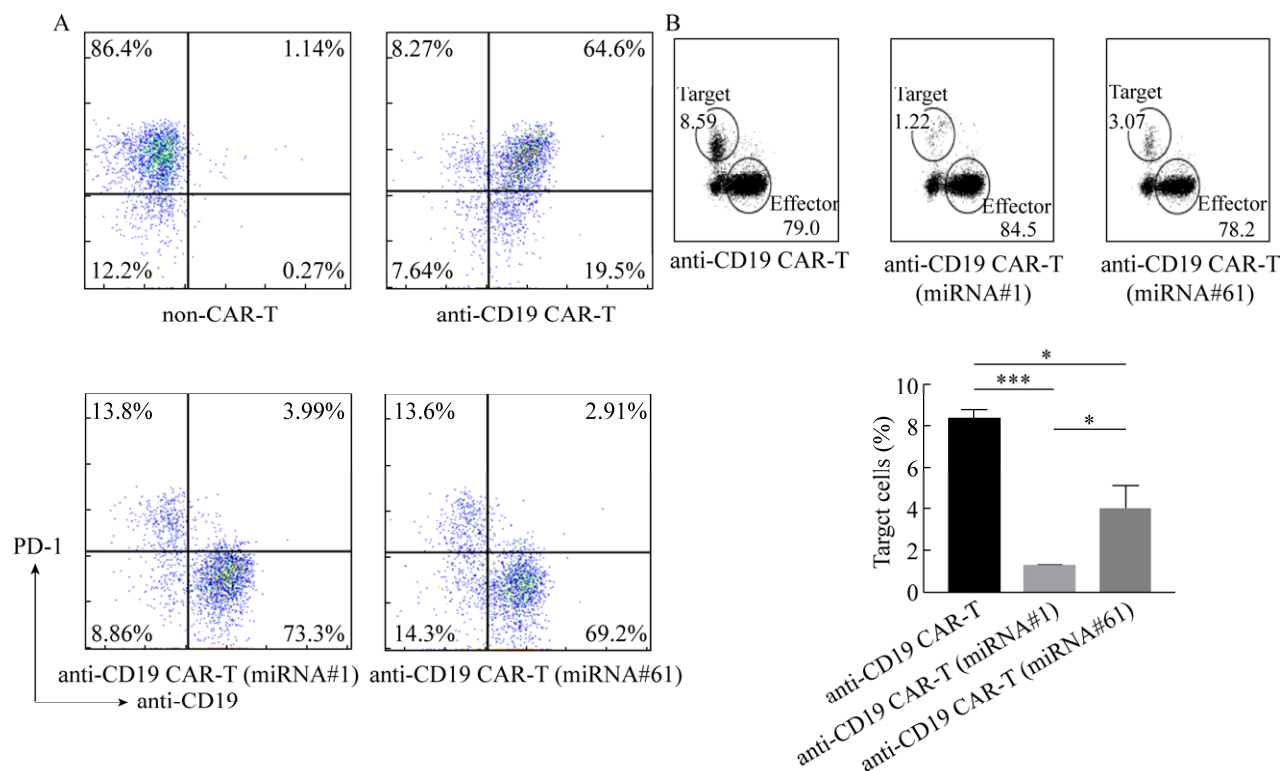


图 4 PD-1 沉默的 anti-CD19 CAR-T 细胞显示出更强的抗肿瘤活性

Fig. 4 PD-1-silencing anti-CD19 CAR T cells enhanced anti-tumor efficiency. (A) PD-1 and CAR expression on the surface of T cells were detected by flow cytometry on day 2 after re-stimulation with CD3/CD28 antibody coated beads. (B) The cytotoxicity of CAR-T cells against PD-L1⁺ Raji cells was detected by flow cytometry after co-incubation for 72 h with re-stimulation by CD3/CD28 antibody coated beads at effector-to-target ratio of 1:1. Data shown above were representative of three independent experiments. Data below were $\bar{x} \pm s$ from triplicates. Bars: *s*.

慢病毒转导的宿主细胞 (Jurkat) 相比, 将 miRNA 插入 EF1 α 内含子的慢病毒载体传递的基因表达明显更高。这种现象可能是由于此载体可以避免目的基因的 mRNA 被 RNase III^[22] 识别和切割, 因为 EF1 α 启动转录后 mRNA 会进行剪接从而其内含子和插入其中的 miRNA 会在剪接过程中被去除。因此, 目的基因的 mRNA 和 miRNA 将分别由一个启动子 EF1 α 驱动, 这为同时表达 miRNA 和 CAR 结构的 CAR-T 细胞疗法提供了更高效的方法。

本研究证实了 miRNA 介导的 PD-1 敲低效率保持在较高水平, 且不亚于 Cas9 的基因敲除^[23-24]。更重要的是, 经 miRNA 敲低 PD-1 的 CAR 慢病毒载体可直接转导 T 细胞而用于 CAR-T 免疫疗法, 而 Cas9 基因编辑方法相对繁琐^[25], 且其在加工过程中可能影响到 T 细胞的免疫活性或者产生脱靶效应, 从而造成不良影响。另外, Rafiq 等构建了一种分泌抗 PD-1 scFv 的 CAR-T 细胞, 它可以通过旁分泌和自分泌两种方式阻断免疫检查点的抑制以增强抗肿瘤功效^[26]。尽管 miRNA 沉默 PD-1 仅限于 CAR-T 细胞本身, 但其 PD-1 的敲低效率超过 90%, 而抗 PD-1 scFv 阻断 T 细胞的效率在某种程度上较低, 导致在很大程度上引起 CAR-T 细胞衰竭。

本研究结果显示, 随着 T 细胞被 CD3/CD28 抗体活化从而其表面高表达 PD-1 蛋白, 与 PD-L1 阳性的靶细胞共孵育后, Raji 细胞表面 PD-L1 与 CAR-T 细胞表面 PD-1 的结合所发挥的负调控作用, 可抑制 CAR-T 细胞的活化、增殖, 并诱导其凋亡, 而 anti-CD19 CAR-T (miRNA-30#1 或 miRNA-30#61) 细胞中 PD-1 的高效敲低可避免该负调控所引起的抑制作用, 从而介导了 CAR-T 细胞发挥更强的杀伤能力。另外, 我们可以设计靶向其他免疫检查点的 miRNA, 将其插入该种新型慢病毒载体, 如 CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)^[27]、LAG-3 (Lymphocyte-activation gene

3)^[28]、TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3)^[29]等, 从而达到沉默 CAR-T 细胞表面多种免疫检查点以进一步增强其抗肿瘤活性, 进而为 CAR-T 细胞疗法提供了一种可靠策略, 使 CAR-T 细胞免受免疫检查点的抑制并改善其生物学效应。

REFERENCES

- [1] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(6): 370–383.
- [2] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra138.
- [3] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507–1517.
- [4] Han YY, Liu DD, Li LH. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 727–742.
- [5] Payandeh Z, Khalili S, Somi MH, et al. PD-1/PD-L1-dependent immune response in colorectal cancer. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7/8): 5461–5475.
- [6] Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*, 2004, 173(2): 945–954.
- [7] Dong HD, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 2002, 8(8): 793–800.
- [8] Merlin S, Follenzi A. Transcriptional targeting and MicroRNA regulation of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 12: 223–232.
- [9] Åkerblom M, Sachdeva R, Quintino L, et al. Visualization and genetic modification of resident brain microglia using lentiviral vectors regulated by microRNA-9. *Nat Commun*, 2013, 4: 1770.

- [10] Sachdeva R, Jönsson ME, Nelander J, et al. Tracking differentiating neural progenitors in pluripotent cultures using microRNA-regulated lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11602–11607.
- [11] Gentner B, Schira G, Giustacchini A, et al. Stable knockdown of microRNA *in vivo* by lentiviral vectors. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 63–66.
- [12] Liu YP, Vink MA, Westerink JT, et al. Titers of lentiviral vectors encoding shRNAs and miRNAs are reduced by different mechanisms that require distinct repair strategies. *RNA*, 2010, 16(7): 1328–1339.
- [13] Poluri A, Sutton RE. Titers of HIV-based vectors encoding shRNAs are reduced by a dicer-dependent mechanism. *Mol Ther*, 2008, 16(2): 378–386.
- [14] Cooper AR, Lill GR, Gschwend EH, et al. Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter. *Nucl Acids Res*, 2015, 43(1): 682–690.
- [15] Fowler DK, Williams C, Gerritsen AT, et al. Improved knockdown from artificial microRNAs in an enhanced miR-155 backbone: a designer's guide to potent multi-target RNAi. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(5): e48.
- [16] Herrera-Carrillo E, Liu YP, Berkhout B. Improving miRNA delivery by optimizing miRNA expression cassettes in diverse virus vectors. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28(4): 177–190.
- [17] Hu T, Fu Q, Chen P, et al. Construction of an artificial MicroRNA expression vector for simultaneous inhibition of multiple genes in mammalian cells. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(5): 2158–2168.
- [18] Poling BC, Tsai K, Kang D, et al. A lentiviral vector bearing a reverse intron demonstrates superior expression of both proteins and microRNAs. *RNA Biol*, 2017, 14(11): 1570–1579.
- [19] Sun DQ, Melegari M, Sridhar S, et al. Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *Biotechniques*, 2006, 41(1): 59–63.
- [20] Amendola M, Passerini L, Pucci F, et al. Regulated and multiple miRNA and siRNA delivery into primary cells by a lentiviral platform. *Mol Ther*, 2009, 17(6): 1039–1052.
- [21] Nie LH, Thakur MD, Wang YM, et al. Regulation of U6 promoter activity by transcriptional interference in viral vector-based RNAi. *Genom Proteom Bioinformat*, 2010, 8(3): 170–179.
- [22] Filippov V, Solovyev V, Filippova M, et al. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, 2000, 245(1): 213–221.
- [23] Guo XL, Jiang H, Shi BZ, et al. Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1118.
- [24] Hu WH, Zi ZG, Jin YL, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3): 365–377.
- [25] Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(9): 933–941.
- [26] Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 847–856.
- [27] Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, et al. *De-novo* and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol*, 2017, 18(12): e731–e741.
- [28] Que Y, Fang ZX, Guan YX, et al. LAG-3 expression on tumor-infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(2): 331–340.
- [29] Tang RH, Rangachari M, Kuchroo VK. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance. *Semin Immunol*, 2019, 42: 101302.

(本文责编 陈宏宇)