

• 医药生物技术 •

稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 CT26 细胞系的构建及鉴定

郭雨洁¹, 段海潇¹, 程奕宁¹, 杨斌丰², 胡翰¹, 刘滨磊¹, 汪洋^{1*}

1 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068

2 武汉滨会生物科技股份有限公司, 湖北 鄂州 436000

郭雨洁, 段海潇, 程奕宁, 杨斌丰, 胡翰, 刘滨磊, 汪洋. 稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 CT26 细胞系的构建及鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 458-472.

GUO Yujie, DUAN Haixiao, CHENG Yining, YANG Binfeng, HU Han, LIU Binlei, WANG Yang. Construction and identification of a stable CT26 cell line expressing CD19-FLUC-GFP[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 458-472.

摘要: 实体瘤缺乏明确的嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)治疗靶点。因此, 通过慢病毒将已经明确的靶点分子 CD19 带入实体瘤细胞系, 研究 CD19 CAR-T 细胞对其的杀伤, 能够为 CAR-T 细胞针对实体瘤的治疗提供潜在的支撑。本研究利用三质粒慢病毒系统构建了稳定表达 CD19、萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, FLUC)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的结肠癌 CT26 细胞系 CT26-CD19-FLUC-GFP。该细胞系与 CT26 细胞系的生长活性一致。通过流式细胞术检测不同代次 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞, 证实了 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞连续传代至第 5、10、22 代后 CD19 及 GFP 的稳定表达。进一步证实, 连续传代至第 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞中的 *CD19* mRNA 及 FLUC 表达水平显著高于对照组 CT26 细胞。与 T 细胞相比, CD19 CAR-T 细胞能够显著杀伤 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞及 MC38-CD19 细胞。CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞腹腔植入小鼠体内 1 周后, 通过活体成像仪可以检测到腹腔区域的 FLUC 表达。上述结果表明, 成功构建了稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 CT26 细胞系, 且该细胞系能够被 CD19 CAR-T 细胞特异性杀伤。

关键词: CD19; 萤火虫荧光素酶; CT26 细胞; 嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T); 慢病毒

资助项目: 国家自然科学基金(32270969, 82001758)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270969, 82001758).

*Corresponding author. E-mail: wangyang@hbut.edu.cn

Received: 2023-06-27; Accepted: 2023-09-08; Published online: 2023-09-25

Construction and identification of a stable CT26 cell line expressing CD19-FLUC-GFP

GUO Yujie¹, DUAN Haixiao¹, CHENG Yining¹, YANG Binfeng², HU Han¹, LIU Binlei¹, WANG Yang^{1*}

¹ School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

² Wuhan Binhui Biopharmaceutical Co., Ltd., Ezhou 436000, Hubei, China

Abstract: Solid tumors lack well-defined targets for chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy. Therefore, introducing a known target molecule, CD19, into solid tumor cell lines via lentiviral transduction to investigate the cytotoxicity of CD19 CAR-T cells can potentially support CAR-T cell therapy against solid tumors. In this study, a stable colon cancer CT26 cell line, CT26-CD19-FLUC-GFP, expressing CD19, firefly luciferase (FLUC), and green fluorescent protein (GFP), was constructed using a triple-plasmid lentiviral system. The growth characteristics of this cell line were consistent with those of the CT26 cell line. Subsequent flow cytometry analysis confirmed stable expression of CD19 and GFP in CT26-CD19-FLUC-GFP cells after serial passaging up to the 5th, 10th, and 22nd generations. Further validation revealed significantly higher levels of *CD19* mRNA and FLUC expression in CT26-CD19-FLUC-GFP cells continuously passaged up to the 22nd generation compared to the control CT26 cells. In comparison to T cells, CD19 CAR-T cells demonstrated substantial cytotoxicity against CT26-CD19-FLUC-GFP cells and MC38-CD19 cells. One week after intraperitoneal implantation of CT26-CD19-FLUC-GFP cells into mice, FLUC expression in the peritoneal region could be detected. These results indicate the successful establishment of a stable CT26 cell line expressing CD19-FLUC-GFP, which can be specifically targeted by CD19 CAR-T cells.

Keywords: CD19; firefly luciferase (FLUC); CT26 cells; chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T); lentivirus

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤,在我国,患结肠癌后5年生存率仅有57.6%,远低于亚洲其他一些国家^[1],需要尽快制定新的策略以治疗结直肠癌^[2]。结肠癌的主要治疗手段为手术治疗、放疗和化疗^[3],但是其恶性程度高且术后易复发转移^[4]。探索结肠癌的免疫疗法成为重要治疗方向,近年来也兴起了一些靶向免疫疗法,可以精准靶向癌细胞的某个靶点,杀伤癌细胞并对正常

细胞伤害较小,而且可以避免放化疗副作用的产生,如PD-1/PD-L1靶向免疫治疗^[5]、CD19 CAR-T靶向细胞治疗^[6]。

CD19分子在B细胞成熟和分化过程中具有重要作用^[7-14]。CD19 CAR-T细胞治疗在血液系统肿瘤治疗上取得了显著的效果。由于实体瘤缺乏明确靶点,因此CAR-T细胞治疗在实体瘤的治疗上存在着挑战。

实验动物模型是恶性肿瘤研究的基础,小鼠繁殖周期短、实验成本低且操作较为简易^[15],因此,小鼠模型仍然是药物发现和新兴疗法的临床前评估重要手段^[16-17]。目前随着先进的成像模式、多种细胞系和转基因建模方法的发展,慢病毒载体已被用于多种疾病的基因治疗,慢病毒可以将目的外源基因整合进靶细胞基因组,实现靶细胞长期稳定地表达目的基因^[18-19]。如体外治疗的造血干细胞^[20-25]或 T 细胞^[26-27]的转导、体内治疗向神经系统^[28]和视网膜^[29]输送基因。生物发光成像技术实现了对荷瘤小鼠实时、连续及非侵入性观察,能够动态监控小鼠体内肿瘤细胞的生长和转移情况^[30-33]。本研究采用三质粒慢病毒系统构建稳定表达 CD19、萤火虫荧光素酶基因(firefly luciferase, *FLUC*)和绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein, *GFP*)的结肠癌细胞系,对该细胞系及 CT26 细胞系进行生长特性、功能特性研究,并对其体内成瘤及荧光素酶表达进行研究。包括结肠癌在内的实体瘤缺乏特异性标记物,使得 CAR-T 细胞难以识别和攻击肿瘤细胞,特别是与血液肿瘤相比,缺乏 CD19 或 B 细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)等明确的可以作为 CAR-T 细胞治疗靶点的表面标记物。本研究构建的稳定表达 CD19-*FLUC*-*GFP* 的 CT26 细胞系,在 CT26 细胞上加上 CD19 CAR-T 细胞靶点,为 CD19 CAR-T 细胞治疗结肠癌提供体外、体内药效学评价模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pCDH-CMV-MSLN-P2A-*FLUC*-*EF1 α* -*GFP* 载体质粒、辅助包装质粒 pMD2.G 和 pSPAX2 购自武汉森灵生物科技有限公司; HEK293T 细胞、小鼠结肠癌细胞(CT26)、小鼠结肠癌细胞

(MC38)购自美国典型培养物保藏中心(American Typical Culture Collection, ATCC), pBDP-CD19 质粒、鼠源 CD19 CAR-T 细胞、MC38-CD19 细胞和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态均由本实验室提供;限制性内切酶(*Xba* I 和 *Eco*R I) 购自 NEB 公司;高保真酶(2 \times Phanta Flash Master Mix)、ClonExpress II One Step Cloning Kit (Exnase II、5 \times CE Buffer)、质粒小提试剂盒和反转录试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;LipofectamineTM 8000 转染试剂和嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride)购自碧云天生物技术有限公司;慢病毒浓缩液购自 TaKaRa 生物技术有限公司; Anti-human PE CD19 抗体购自 Biolegend;实时定量 PCR 试剂 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 购自 ToYoBo;引物合成和测序均由擎科生物科技有限公司完成。6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,购自湖北食品药品安全评价中心,饲养于湖北工业大学无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房。所有动物实验均遵守湖北工业大学科研伦理与科技安全委员会的相关规定(批准号:HBUT20200021)。

1.2 方 法

1.2.1 慢病毒载体的构建

CD19 片段从 pBDP-CD19 质粒上进行 PCR 扩增,正向引物为 5'-TGACCTCCATAGAAGATTCTAGAATGCCCCCCCCCAGGCT-3',反向引物为 5'-TCTTCCATGGTGGCGAATTCCGGTCCAGGATTCTCTTCGACATCTCCGGCTTGTTTCAG-3'。鉴定并回收 PCR 产物。将载体 pCDH-CMV-MSLN-P2A-*FLUC*-*EF1 α* -*GFP* 经过双酶切后进行胶回收,并与 CD19 扩增产物通过重组酶 Exnase II 进行重组。将重组产物转化 *E. coli*

DH5 α 感受态细菌, 涂布于含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板培养基上, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养。挑取单克隆菌落, 进行菌落 PCR 鉴定, 选取阳性克隆进行摇菌培养、质粒提取、酶切鉴定和测序比对, 并将菌液保存。

1.2.2 慢病毒包装与滴度检测

抽提 pCDH-CMV-CD19-P2A-FLUC-EF1 α -GFP 载体质粒与辅助包装质粒 pMD2.G、pSPAX2。将 HEK293T 细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种入 10 cm 的培养皿中。24 h 后, 细胞汇合度达到 80% 左右进行质粒共转染。转染后 48 h 和 72 h 收集细胞上清^[34]; 1 000 $\times g$ 离心 10 min, 将离心后的上清液转移到新的 50 mL 离心管中, 经 0.45 μm 滤膜除杂, 加入 1/3 病毒上清液体积的慢病毒浓缩液混匀后孵育过夜。次日 1 500 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 45 min, 弃上清, 加入 200 μL PBS 重悬, 获得浓缩后的病毒, 分装后保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。病毒转导前一天将 HEK293T 细胞接种于 96 孔板, 6×10^4 个/孔。转导前将孔板中培养基换成含有终浓度 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 聚凝胺(polybrene)的完全培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 30 min。通过流式细胞术检测慢病毒滴度^[35], 将慢病毒进行 10 倍梯度稀释至 1 000 倍稀释。将每管稀释后的病毒分别加入 HEK293T 细胞中, 每个梯度重复 3 孔, 阴性对照重复 3 孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 48 h 后通过流式细胞仪检测表达 GFP 的细胞比例。经流式软件处理完数据后, 计算慢病毒滴度: 转导单位(transducing unit, TU)/mL=细胞数 \times GFP 表达率 \times 稀释倍数/病毒接种体积(mL)。

1.2.3 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系的筛选

将 CT26 细胞接种于 24 孔板, 每孔细胞数 4×10^5 个, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度的细胞培养箱培养, 避光加入 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 梯度的嘌呤霉素。连续 4 d 观察细胞存活率, 第 4 天细胞完全死亡对应的最

低浓度为最低致死浓度。在 96 孔板中接种 CT26 细胞 2×10^4 个, 24 h 后细胞长至 80% 融合度时, 更换为含有 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene 的新鲜培养基, 放置在 CO_2 培养箱孵育 30 min, 取 10 μL 浓缩后的慢病毒转导至 CT26 细胞^[36]。48 h 后, 扩培至 24 孔板, 更换为含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的 10% FBS DMEM/F12 继续培养 3 d, 弃掉含有嘌呤霉素的培养基, 让剩余细胞长到合适的细胞密度。在倒置荧光显微镜下观察到细胞表达绿色荧光, 采用有限稀释法将其密度稀释至 500 个/mL, 按照 100 $\mu\text{L}/$ 孔接种入 96 孔板中, 培养期间观察单克隆生长情况, 后依次扩培至 6 孔板, 得到 6 株稳定表达 CD19-FLUC-GFP 基因的 CT26 细胞系, 通过流式细胞术和 Western blotting 筛选出 CD19 表达量最高的单克隆细胞系。

1.2.4 实时无标记细胞分析法检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系生长活性

Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪内设对照组和实验组, 将 CT26 细胞和 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞每孔各接种 2×10^4 个。使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪观察 CT26-CD19-FLUC-GFP 与 CT26 细胞的生长活性。

1.2.5 流式检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系中 CD19 及 GFP 的表达

检测连续传代至第 5、10、22 代以及冻存 1 年后复苏并连续传 10 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞的 CD19 及 GFP 的表达。收集 6 孔板内的 CT26 细胞(阴性对照)和 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞至 1.5 mL EP 管, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 使用 100 μL PBS 重悬 CT26 和 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞, 其中 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞加入 5 μL anti-human PE-CD19 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后, 加 500 μL PBS 洗涤, 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加 500 μL PBS 重悬后流式

细胞仪检测。

1.2.6 Real-time qPCR 检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系 CD19 mRNA 水平

提取 CT26 细胞和连续传至 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞的 RNA, 反转录成 cDNA, 进行 real-time qPCR 检测。50 μ L 反应体系: SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 25 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板 cDNA 5 μ L, 蒸馏水 16 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环; hCD19 正向引物 5'-CTACCTGATCTTCTGCCT-3', 反向引物 5'-ATCCTCTTCCTCTTCCTC-3'; 内参 *mGAPDH* 正向引物 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 反向引物 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。

1.2.7 多功能酶标仪检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系中 FLUC 的表达

将 CT26 细胞(阴性对照)和连续传至 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞接种于 96 孔板, 4.5×10^4 个/孔, 重复 3 孔。每孔加入 100 μ L 的 D-荧光素钾盐, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 10 min, 多功能酶标仪检测 FLUC 的相对表达量。

1.2.8 CD19 CAR-T 细胞对 CT26-CD19-FLUC-GFP 及 MC38-CD19 细胞杀伤试验

将鼠源 T 细胞和鼠源 CAR-T 细胞分别按照靶比=2:1 加入 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞和 MC38-CD19 细胞, 使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪分析鼠源 T 细胞和鼠源 CAR-T 细胞对 CT26-CD19-FLUC-GFP 及 MC38-CD19 的杀伤。

1.2.9 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系体内表达 FLUC

对 BALB/c 雌性小鼠分别腹腔植瘤 CT26 细胞和连续传代至 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞。植瘤细胞密度为 1×10^7 个/mL, 每只小鼠腹腔注射 100 μ L。植瘤 1 周后, 观察肿瘤生长

情况, 荷瘤小鼠每只腹腔注射 100 μ L D-荧光素钾盐, 10 min 后于小动物活体成像仪下观察 FLUC 的表达。

1.2.10 统计分析

用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 重组慢病毒载体 pCDH-CMV-CD19-P2A-FLUC-EF1 α -GFP 的构建

对 CD19 进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 1A 所示, 条带大小与预期一致(1 668 bp)。将 CD19 PCR 扩增产物回收并与载体质粒 pCDH-CMV-MSLN-P2A-FLUC-EF1 α -GFP 进行重组, 重组产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养。挑取单克隆菌落, 进行菌落 PCR 鉴定(图 1B)。对阳性克隆提取质粒, 进行双酶切鉴定(图 1C)。对质粒进行测序分析, 结果显示质粒构建正确。构建成功的慢病毒载体 pCDH-CMV-CD19-P2A-FLUC-EF1 α -GFP 如图 1D 所示。

2.2 过表达 CD19-FLUC-GFP 的慢病毒包装及滴度测定

将慢病毒载体 pCDH-CMV-CD19-P2A-FLUC-EF1 α -GFP 与辅助质粒 pMD2.G、pSPAX2 共转染 HEK293T 细胞包装病毒, 转染后 24、48 和 72 h 在倒置荧光显微镜下观察到 GFP 表达(图 2A)。流式细胞仪检测转染 72 h 后 HEK293T 的 GFP 和 CD19 的表达, 经 Flowjo 软件处理得到 GFP 和 CD19 的双阳性率均高于 90% (图 2B), 根据 GFP 表达率计算慢病毒滴度(TU/mL) = $6 \times 10^4 \times 6.82\% \times 100 / 0.01 = 4.1 \times 10^7$ TU/mL (图 2C)。

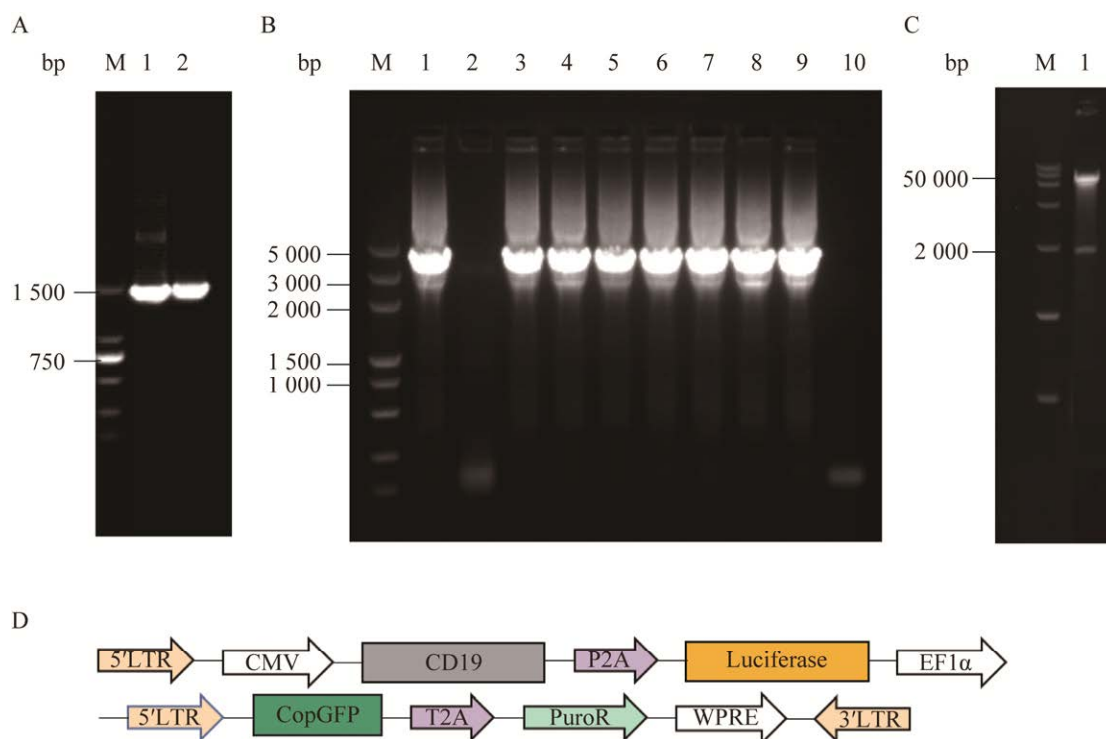


图1 慢病毒质粒构建 A: PCR 鉴定. M: 2 000 bp DNA marker; 1: *CD19* 片段; 2: *CD19*-P2A 片段. B: 菌落 PCR. M: 5000 bp DNA marker; 1-9: 单克隆菌落; 10: 阴性对照. C: 双酶切鉴定. M: 15000 bp DNA marker; 1: 双酶切片段(*Xba* I 和 *Eco*R I). D: 质粒构建示意图

Figure 1 Construction of lentivirus plasmid. A: PCR identification. Lane M: 2 000 bp DNA marker; Lane 1: *CD19* fragments; Lane 2: *CD19*-P2A fragments. B: Colony PCR. Lane M: 5000 bp DNA marker; Lane 1-9: Monoclonal colonies; Lane 10: Negative control. C: Double enzyme digestion identification. Lane M: 15000 bp DNA marker; 1: Double enzyme-digested fragments (*Xba* I and *Eco*R I). D: Schematic diagram of plasmid construction.

2.3 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系的筛选

CT26 细胞在嘌呤霉素处理的第4天, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量下观察到细胞全部死亡, 因此后续筛选的嘌呤霉素浓度确定为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3A)。过表达 CD19-FLUC-GFP 的慢病毒转导 CT26 细胞 48 h 后, 于倒置荧光显微镜下可以观察到 GFP 的表达, 证明慢病毒转导成功。经过嘌呤霉素筛选出的细胞培养 1 周后, 得到 6 株稳定表达 GFP 及 CD19 的单克隆细胞, 其中, B10、D7、

G7 单克隆细胞的 GFP 及 CD19 双阳性细胞的比例高于 95%。其中 G7 单克隆细胞的 GFP 及 CD19 双阳性细胞比例最高, 达到 99.6% (图 3B)。针对筛选到的 6 株单克隆细胞的 Western blotting 检测如图 3C 所示, 6 株单克隆细胞均能够检测到 CD19 的表达(95 kDa), 其中, G7 单克隆细胞的 CD19 相对表达量最高。挑选 G7 为后续实验的单克隆细胞系, 并于倒置荧光显微镜下观察 G7 单克隆细胞系的 GFP 表达(图 3D)。

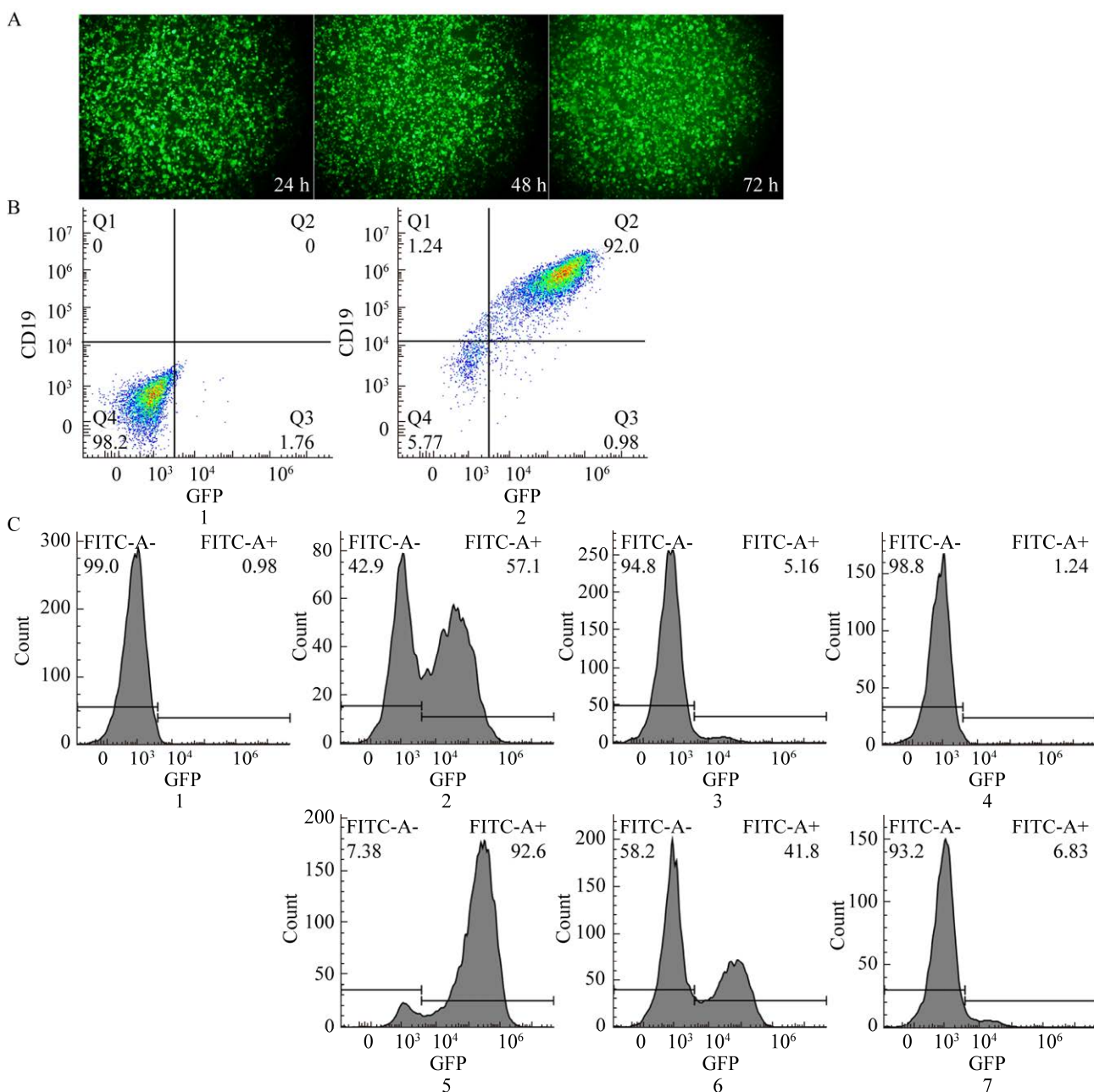
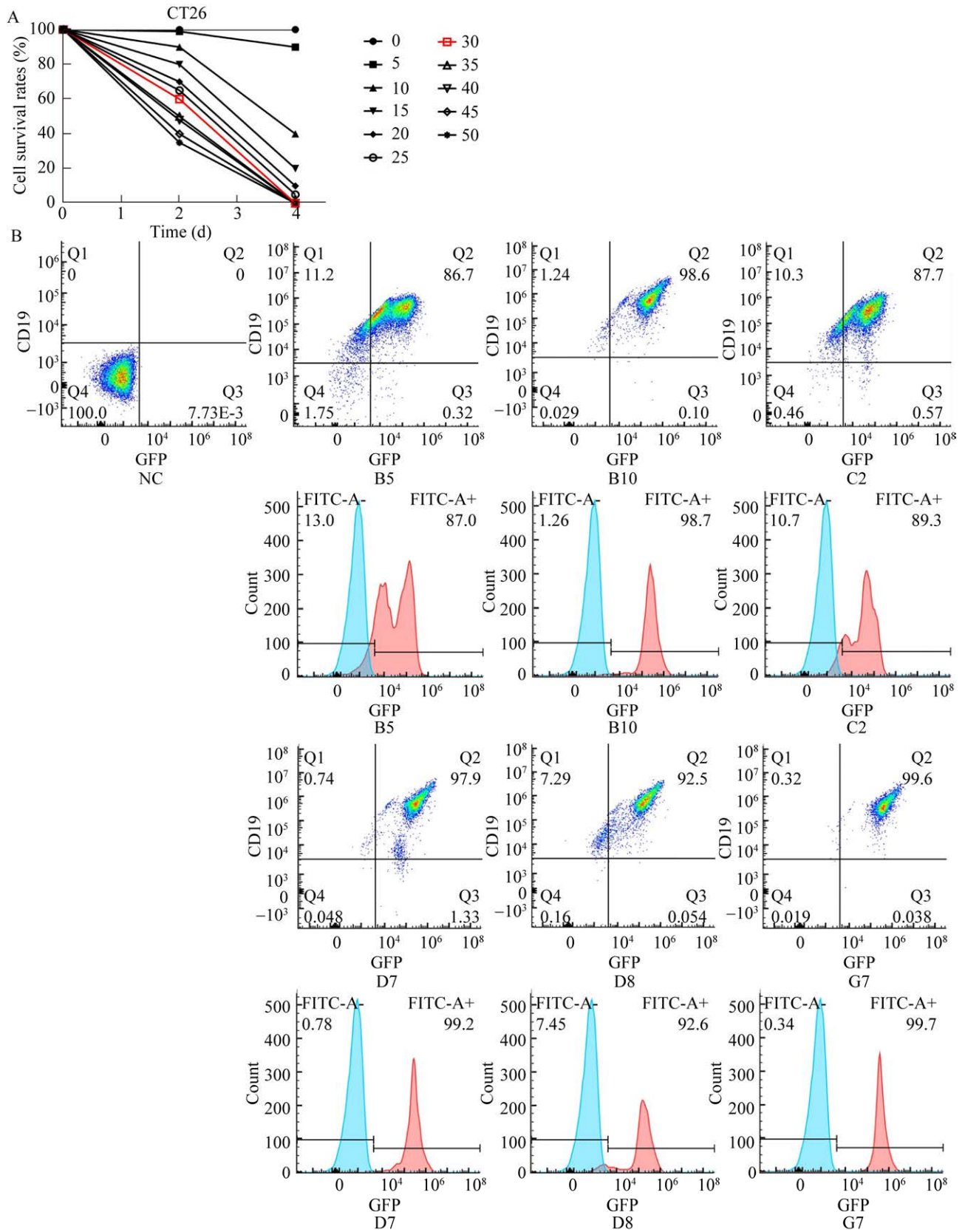


图2 慢病毒包装及滴度检测 A: 在转染后的24、48和72 h, 使用荧光显微镜(10倍放大)检测293T细胞中GFP表达。B: 通过流式细胞术检测293T细胞上的CD19和GFP表达。1: 对照组293T细胞; 2: 转染后72 h的293T细胞。C: 通过流式细胞术检测不同稀释梯度下的慢病毒的GFP表达。1: 293T细胞; 2-4: 浓缩前分别稀释了10、100和1000倍的病毒GFP表达; 5-7: 浓缩后分别稀释了10、100和1000倍的病毒GFP表达

Figure 2 Packaging and titer detection of lentivirus. A: Detecting GFP expression on 293T cells using a fluorescence microscope (10 \times) at 24 h, 48 h, and 72 h post transfection. B: Detecting CD19 and GFP expression on 293T cells by flow cytometry. 1: Control 293T cells; 2: 293T cells at 72 h post transfection. C: GFP expression detection of lentivirus under different dilution gradients by flow cytometry. 1: 293T cells; 2-4: GFP expression of virus before concentration, which diluted 10 \times , 100 \times , 1 000 \times ; 5-7: GFP expression of virus after concentration, which diluted 10 \times , 100 \times , 1 000 \times .



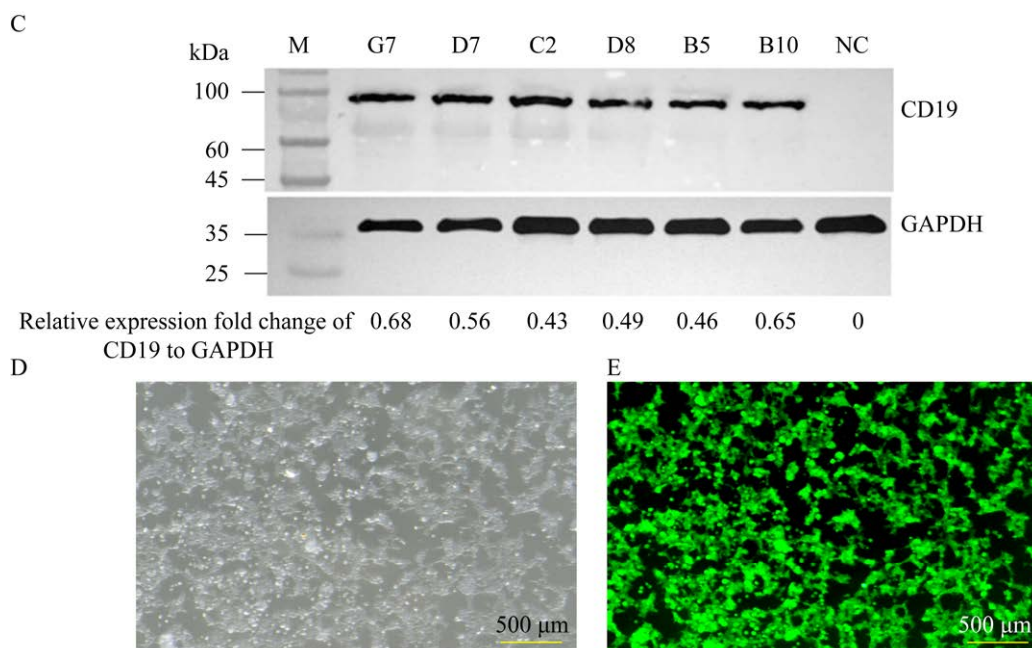


图 3 单克隆细胞系的筛选 A: CT26 细胞对于嘌呤霉素的敏感曲线. B: 用流式细胞仪检测筛选出的单克隆细胞系中 CD19 和 GFP 的表达. C: 用免疫印迹法检测筛选出的单克隆细胞系中 CD19 的表达. D: 使用显微镜在白光下(100 倍放大)观察筛选出的单克隆细胞系 G7. E: 用荧光显微镜(100 倍放大)检测筛选出的单克隆细胞系 G7 中 GFP 的表达

Figure 3 Screening of monoclonal cell lines. A: The sensitivity curve of CT26 cells to puromycin. B: Flow cytometry to detect the expression of CD19 and GFP in the screened monoclonal cell lines. C: Western blotting to detect the expression of CD19 in the screened monoclonal cell lines. D: Screened monoclonal cell line G7 observed by microscope with white light (100 \times). E: Expression of GFP in the screened monoclonal cell line G7 by fluorescence microscope (100 \times).

2.4 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系与 CT26 细胞系的生长活性监测

经 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪实时监测观察, 已筛选的稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 CT26 细胞与 CT26 细胞生长活性趋于一致(图 4)。

2.5 检测不同代次 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞 CD19 及 GFP 的表达

通过流式细胞术检测不同代次的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞 GFP 及 CD19 的表达。结果显示 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞 GFP 和 CD19 在连续传代至第 5 代(图 5A)、10 代(图 5B)、22 代(图 5C)中均有稳定表达。将 CT26-CD19-

FLUC-GFP 细胞冻存 1 年后, 复苏细胞, 连续传 10 代, 其 CD19 及 GFP 稳定表达(图 5D)。

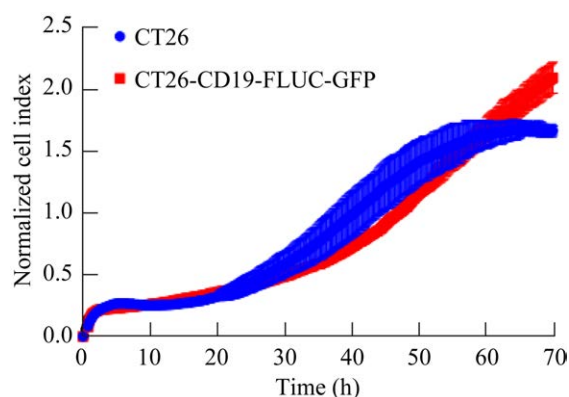


图 4 CT26-CD19-FLUC-GFP 与 CT26 细胞生长活性比较

Figure 4 Comparison of the growth activity of CT26-CD19-FLUC-GFP and CT26 cells.

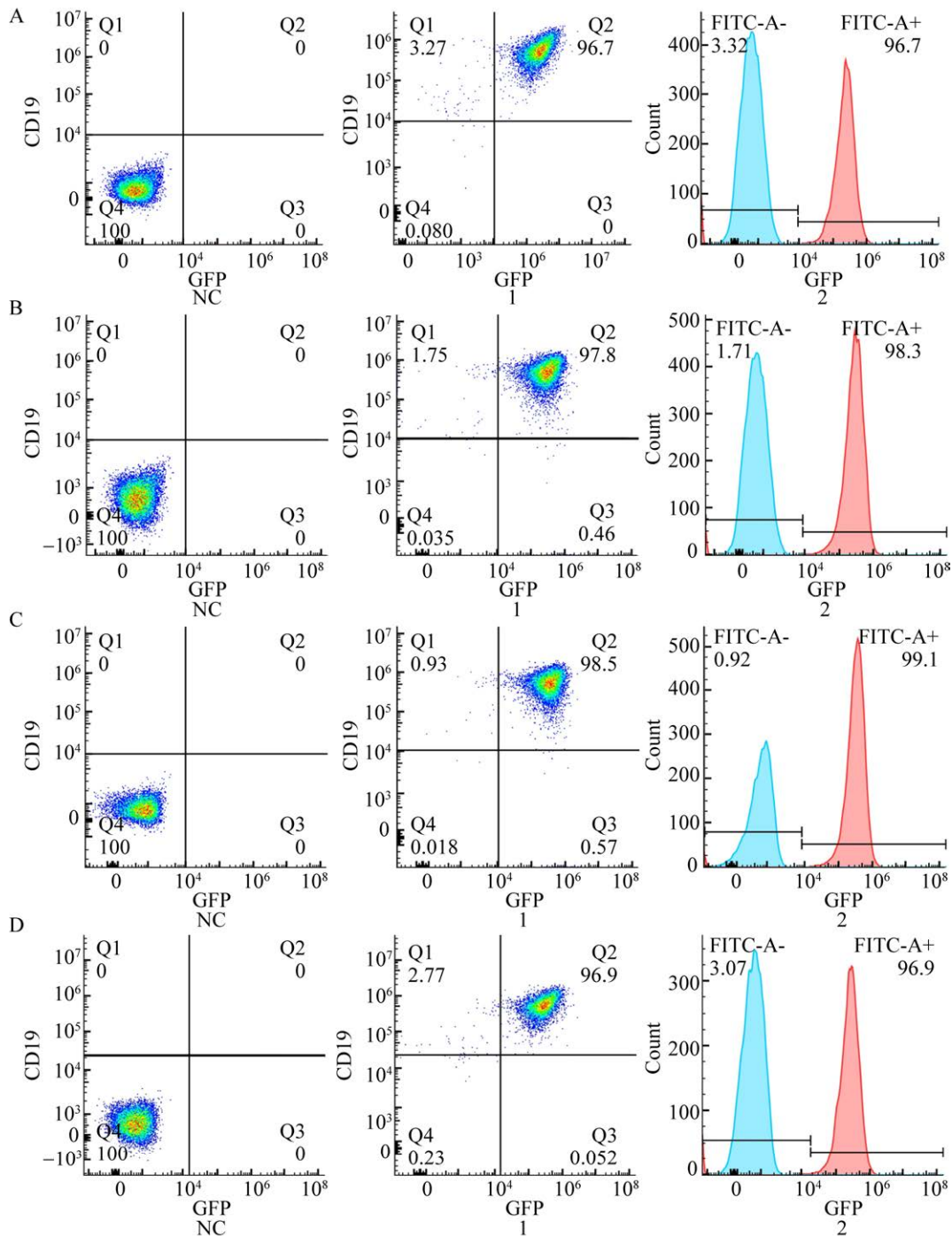


图 5 不同代次 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞的 CD19 及 GFP 表达 在连续传代 5 代(A)、10 代(B)和 22 代(C)后检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞中 CD19 和 GFP 的表达. D: 细胞冷冻保存一年后, CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞连续传代 10 代, 检测 GFP 和 CD19 的表达

Figure 5 The expression of CD19 in CT26-CD19-FLUC-GFP cells of different generation. Detection of CD19 and GFP expression in CT26-CD19-FLUC-GFP cell after continuous passage for 5 generations (A), 10 generations (B), and 22 generations (C). D: After one year of cell cryopreservation, CT26-CD19-FLUC-GFP cell was continuous passed for 10 generations, the expression of GFP and CD19 was detected.

2.6 *CD19* mRNA 在 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系中高表达

分别提取连续传代至第 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞与 CT26 细胞 mRNA, 反转录成 cDNA。使用 Real-time PCR 对 *CD19* mRNA 进行检测。结果表明 *CD19* mRNA 在 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞中高表达(图 6)。

2.7 FLUC 在 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系中高表达

将 CT26 细胞、连续传代至第 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 的 D-荧光素钾盐, 使用多功能酶标仪检测 FLUC 的表达, 证实 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞大量表达 FLUC, 相较于对照细胞 CT26 有 40 000 多倍的上调表达(图 7)。

2.8 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞被 CD19 CAR-T 细胞特异性识别

将鼠源 T 细胞、鼠源 CAR-T 细胞分别与 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞和 MC38-CD19 细胞按照效靶比=2:1 共孵育, 使用 Agilent xCELLigence RTCA S16 实时无标记细胞分析仪分析鼠源 T 细胞及鼠源 CAR-T 细胞对 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞和 MC38-CD19 细胞的杀伤。结果表明, 鼠源 CAR-T 细胞对 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞和 MC38-CD19 细胞的杀伤显著高于鼠源 T 细胞对其的杀伤(图 8), 这表明 CD19 CAR-T 细胞能够特异性识别 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞以及 MC38-CD19 细胞。

2.9 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系体内功能鉴定

将 CT26 细胞和连续传代至第 22 代的 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞腹腔植瘤 1 周后, 在腹腔注射 D-荧光素钾盐, 通过小动物活体成像仪可以观察到 CT26-CD19-FLUC-GFP 植瘤组小鼠腹腔有大量 FLUC 的表达(图 9)。

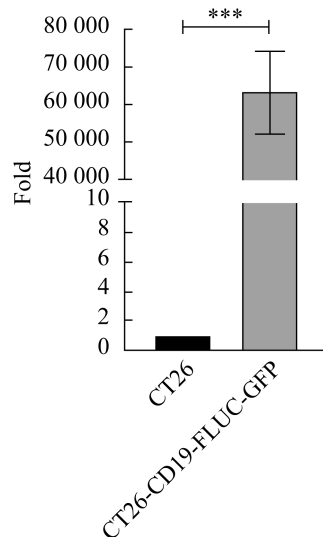


图 6 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞中 *CD19* mRNA 的表达 与 CT26 细胞系相比, CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞系中 *CD19* mRNA 显著上调表达(***: $P < 0.001$, t -检验)

Figure 6 Detection of *CD19* mRNA in CT26-CD19-FLUC-GFP monoclonal cell line. *CD19* mRNA was significantly upregulated in CT26-CD19-FLUC-GFP cell line compared with CT26 cell line (***: $P < 0.001$, t -test).

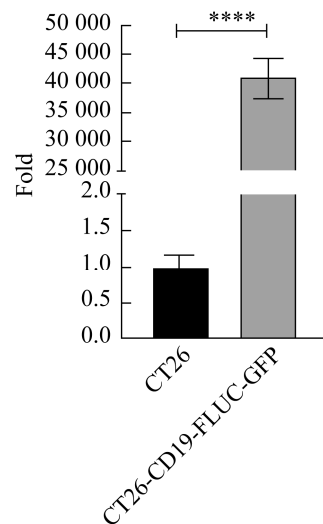


图 7 检测 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞的 FLUC 表达 与 CT26 细胞系相比, CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞系中 FLUC 的表达显著上调(****: $P < 0.0001$, t -检验)

Figure 7 Detection of FLUC expression in CT26-CD19-FLUC-GFP monoclonal cell line. FLUC expression was significantly upregulated in CT26-CD19-FLUC-GFP cell line compared with CT26 cell line (****: $P < 0.0001$, t -test).

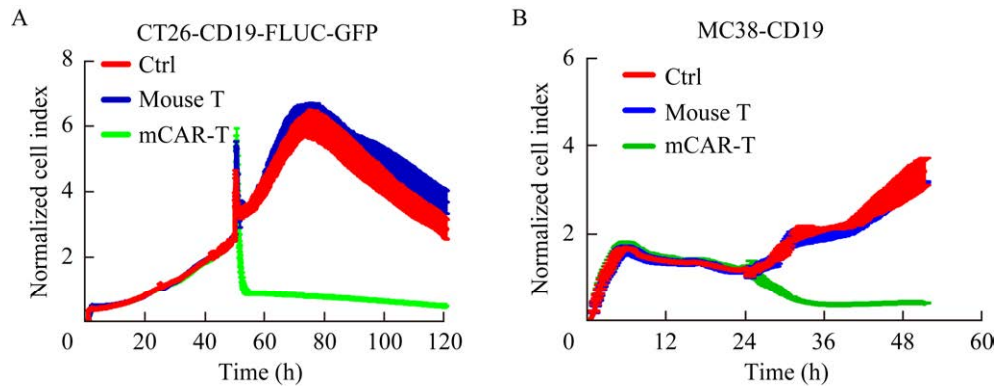


图 8 CD19-CAR-T 细胞对其靶细胞的杀伤 CD19 CAR-T 细胞对 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞(A)和 MC38-CD19 细胞(B)的杀伤作用

Figure 8 Killing of target cells by CD19 CAR-T cells. Killing of CT26-CD19-FLUC-GFP cells (A) and MC38-CD19 cells (B) by CD19 CAR-T cells.

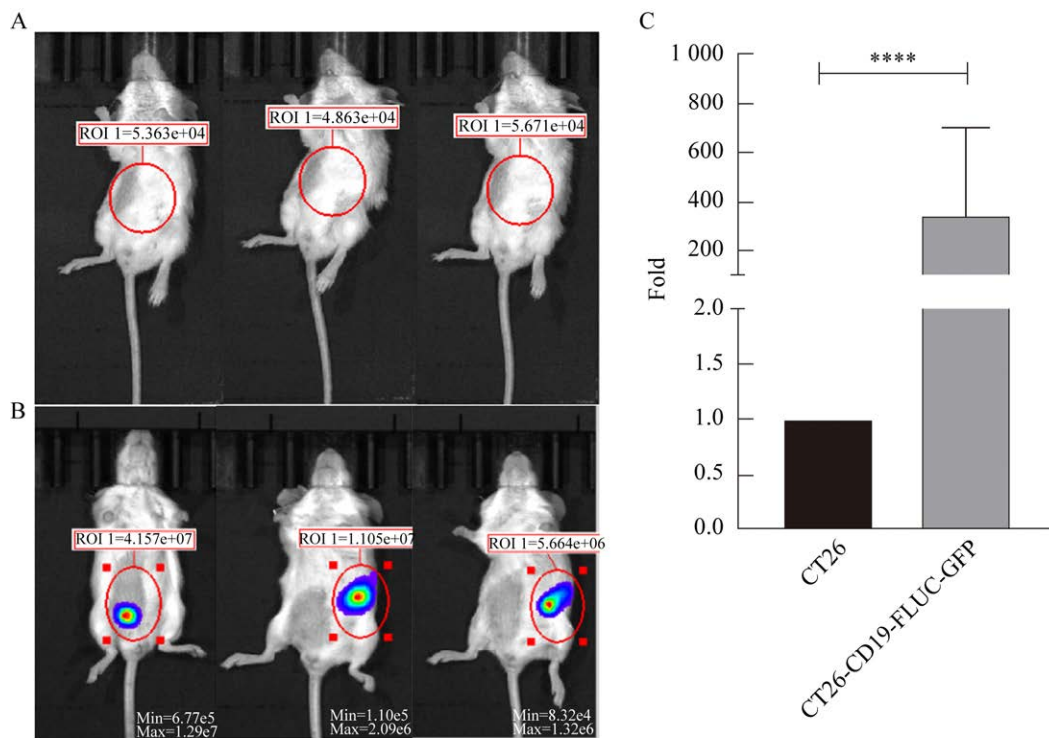


图 9 CT26-CD19-FLUC-GFP 稳转细胞系体内成瘤和 FLUC 的表达 A: 对照组小鼠腹腔内植入 CT26 细胞. B: 实验组小鼠腹腔内植入 CT26-CD19-FLUC-GFP 细胞. C: CT26-CD19-FLUC-GFP 组小鼠与 CT26 组相比, FLUC 的表达显著上调(****: $P < 0.0001$, t -检验)

Figure 9 *In vivo* tumor formation and FLUC expression. A: Control group mouse with intraperitoneal implanted CT26 cells. B: Experimental group mouse with intraperitoneal implanted CT26-CD19-FLUC-GFP cells. C: Compared to the CT26 group, the expression of FLUC is significantly upregulated in the mouse of CT26-CD19-FLUC-GFP group (****: $P < 0.0001$, t -test).

3 讨论与结论

CAR-T 细胞治疗作为一种革命性的免疫疗法,在治疗血液肿瘤方面取得了显著的成功。然而, CAR-T 细胞治疗在实体瘤治疗中面临着一个挑战,即缺乏明确的靶点。相比之下,血液肿瘤通常具有表面标记物,如 CD19、CD20 或 BCMA,可作为 CAR-T 细胞治疗的靶点。但是,实体瘤的异质性和缺乏特异性标记物使得寻找合适的靶点变得困难。CD19 抗原对 B 细胞的发育和成熟有着重要作用^[37-39]。CD19 分子是一种稳定的靶点,在大多数 B 细胞相关恶性肿瘤中广泛表达,不易发生突变或下调。这使得 CD19 分子成为一个可靠的治疗靶点,能够持续有效地识别和攻击癌细胞,减少肿瘤耐药和复发风险。CD19 靶向免疫疗法,如 CD19 CAR-T 细胞免疫疗法,在 B 细胞相关血液肿瘤以及其他类型的 CD19 阳性的恶性肿瘤(包括某些非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病等)中取得了良好的治疗效果^[40-41]。在实体瘤缺乏明确 CAR-T 治疗靶点的情况下,通过慢病毒将已经明确的靶点分子 CD19 带入实体瘤细胞系,研究 CD19 CAR-T 细胞对其的杀伤,能够为 CAR-T 细胞针对实体瘤的治疗提供潜在的支撑。本研究构建的稳定表达 CD19-FLUC-GFP 的 CT26 细胞系能够为 CD19 CAR-T 细胞治疗提供明确靶点,GFP 的表达为针对该细胞系的体外杀伤提供荧光标记信号,该细胞系在荷瘤小鼠体内 FLUC 的表达为针对该细胞系的体内杀伤提供检测基础。该细胞系为 CD19 CAR-T 细胞治疗结肠癌提供体外、体内的药效评价模型。为探索治疗结肠癌的免疫疗法、结肠癌发生进展机制和候选药物的评估方面提供支持,为肿瘤转移机制、新抗癌药物的发现等提供可靠有效的模型。

REFERENCES

- [1] ALLEMANI C, MATSUDA T, di CARLO V, HAREWOOD R, MATZ M, NIKŠIĆ M, BONAVENTURE A, VALKOV M, JOHNSON CJ, ESTÈVE J, OGUNBIYI OJ, SILVA GAE, CHEN WQ, ESER S, ENGHOLM G, STILLER CA, MONNEREAU A, WOODS RR, VISSER O, LIM GH, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries[J]. *Lancet (London, England)*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [2] XIE YM, SHI LS, HE XS, LUO YX. Gastrointestinal cancers in China, the USA, and Europe[J]. *Gastroenterology Report*, 2021, 9(2): 91-104.
- [3] JIMENEZ-RODRIGUEZ RM, QUEZADA-DIAZ F, HAMEED I, KALABIN A, PATIL S, SMITH JJ, GARCIA-AGUILAR J. Organ preservation in patients with rectal cancer treated with total neoadjuvant therapy[J]. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2021, 64(12): 1463-1470.
- [4] CADY B, STONE MD. The role of surgical resection of liver metastases in colorectal carcinoma[J]. *Seminars in Oncology*, 1991, 18(4): 399-406.
- [5] XIE W, MEDEIROS LJ, LI SY, TANG GL, FAN G, XU J. PD-1/PD-L1 pathway: atherapeutic target in CD30+ large cell lymphomas[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1587.
- [6] DENLINGER N, BOND D, JAGLOWSKI S. CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma[J]. *Current Problems in Cancer*, 2022, 46(1): 100826.
- [7] WOYACH JA, AWAN F, FLINN IW, BERDEJA JG, WILEY E, MANSOOR S, HUANG Y, LOZANSKI G, FOSTER PA, BYRD JC. A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL[J]. *Blood*, 2014, 124(24): 3553-3560.
- [8] ZALEVSKY J, LEUNG IWL, KARKI S, CHU SY, ZHUKOVSKY EA, DESJARLAIS JR, CARMICHAEL DF, LAWRENCE CE. The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates[J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3735-3743.
- [9] POE JC, MINARD-COLIN V, KOUNTIKOV EI, HAAS KM, TEDDER TF. A c-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice[J].

- Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 2012, 189(5): 2318-2325.
- [10] IMURA Y, ANDO M, KONDO T, ITO M, YOSHIMURA A. CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD[J]. JCI Insight, 2020, 5(14): e136185.
- [11] ANDERSON KC, BATES MP, SLAUGHENHOUP BL, PINKUS GS, SCHLOSSMAN SF, NADLER LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation[J]. Blood, 1984, 63(6): 1424-1433.
- [12] GINALDI L, de MARTINIS M, MATUTES E, FARAHAT N, MORILLA R, CATOVSKY D. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias[J]. Journal of Clinical Pathology, 1998, 51(5): 364-369.
- [13] OLEJNICZAK SH, STEWART CC, DONOHUE K, CZUCZMAN MS. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry[J]. Immunological Investigations, 2006, 35(1): 93-114.
- [14] SCHEUERMANN RH, RACILA E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy[J]. Leukemia & Lymphoma, 1995, 18(5/6): 385-397.
- [15] KHALED WT, LIU PT. Cancer mouse models: past, present and future[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014, 27: 54-60.
- [16] HANGAUER MJ, VISWANATHAN VS, RYAN MJ, BOLE D, EATON JK, MATOV A, GALEAS J, DHRUV HD, BERENS ME, SCHREIBER SL, McCORMICK F, McMANUS MT. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition[J]. Nature, 2017, 551(7679): 247-250.
- [17] LÖSCHER W. Animal models of seizures and epilepsy: past, present, and future role for the discovery of antiseizure drugs[J]. Neurochemical Research, 2017, 42(7): 1873-1888.
- [18] TIFFEN JC, BAILEY CG, NG C, RASKOJEJ, HOLST J. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth *in vitro* or *in vivo*[J]. Molecular Cancer, 2010, 9: 299.
- [19] NASRI M, KARIMI A, FARSANI MA. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes[J]. Cytotechnology, 2014, 66(6): 1031-1038.
- [20] CARTIER N, HACEIN-BEY-ABINA S, BARTHOLOMAE CC, VERES G, SCHMIDT M, KUTSCHERA I, VIDAUD M, ABEL U, DAL-CORTIVO L, CACCAVELLI L, MAHLAOUI N, KIERMER V, MITTELSTAEDT D, BELLESME C, LAHLOU N, LEFRÈRE F, BLANCHE S, AUDIT M, PAYEN E, LÉBOULCH P, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy[J]. Science, 2009, 326(5954): 818-823.
- [21] CAVAZZANA-CALVO M, PAYEN E, NEGRE O, WANG G, HEHIR K, FUSIL F, DOWN J, DENARO M, BRADY T, WESTERMAN K, CAVALLESCO R, GILLET-LEGRAND B, CACCAVELLI L, SGARRA R, MAOUCHE-CHRÉTIEN L, BERNAUDIN F, GIROT R, DORAZIO R, MULDER GJ, POLACK A, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia[J]. Nature, 2010, 467(7313): 318-322.
- [22] BIFFI A, MONTINI E, LORIOLI L, CESANI M, FUMAGALLI F, PLATI T, BALDOLI C, MARTINO S, CALABRIA A, CANALE S, BENEDICENTI F, VALLANTI G, BIASCO L, LEO S, KABBARA N, ZANETTI G, RIZZO WB, MEHTA NAL, CICALESE MP, CASIRAGHI M, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy[J]. Science, 2013, 341(6148): 1233158.
- [23] AIUTIA, BIASCO L, SCARAMUZZA S, FERRUA F, CICALESE MP, BARICORDI C, DIONISIO F, CALABRIA A, GIANNELLIS, CASTIELLO MC, BOSTICARDO M, EVANGELIO C, ASSANELLI A, CASIRAGHI M, Di NUNZIO S, CALLEGARO L, BENATI C, RIZZARDI P, PELLIN D, Di SERIO C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome[J]. Science (New York, NY), 2013, 341(6148): 1233151.
- [24] SESSA M, LORIOLI L, FUMAGALLI F, ACQUATI S, REDAELLI D, BALDOLI C, CANALE S, LOPEZ ID, MORENA F, CALABRIA A, FIORI R, SILVANI P, RANCOITA PMV, GABALDO M, BENEDICENTI F, ANTONIOLI G, ASSANELLI A, CICALESE MP, del CARRO U, SORA MGN, et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial[J]. Lancet (London, England), 2016, 388(10043): 476-487.
- [25] de RAVIN SS, WU XL, MOIR S, ANAYA-O'BRIEN S, KWATEMAA N, LITTEL P, THEOBALD N, CHOI U, SU L, MARQUESEN M, HILLIGOSS D, LEE J, BUCKNER CM, ZAREMBER KA, O'CONNOR G, McVICAR D, KUHNS D, THROM RE, ZHOU S,

- NOTARANGELO LD, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency[J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(335): 335ra57.
- [26] McGARRITY GJ, HOYAH G, WINEMILLER A, ANDRE K, STEIN D, BLICK G, GREENBERG RN, KINDER C, ZOLOPA A, BINDER-SCHOLL G, TEBAS P, JUNE CH, HUMEAU LM, REBELLO T. Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2013, 15(2): 78-82.
- [27] POOREBRAHIM M, SADEGHI S, FAKHR E, ABAZARI MF, POORTAHMASEBI V, KHEIROLLAHI A, ASKARI H, RAJABZADEH A, RASTEGARPANAH M, LINĒ A, CID-ARREGUI A. Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2019, 56(6): 393-419.
- [28] PALFI S, GURRUCHAGA JM, LEPETIT H, HOWARD K, RALPH GS, MASON S, GOUELLO G, DOMENECH P, BUTTERY PC, HANTRAYE P, TUCKWELL NJ, BARKER RA, MITROPHANOUS KA. Long-term follow-up of a phase I/II study of ProSavin, a lentiviral vector gene therapy for parkinson's disease[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2018, 29(3): 148-155.
- [29] CAMPOCHIARO PA, LAUER AK, SOHN EH, MIR TA, NAYLOR S, ANDERTON MC, KELLEHER M, HARROP R, ELLIS S, MITROPHANOUS KA. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study[J]. *Human Gene Therapy*, 2017, 28(1): 99-111.
- [30] ELIAS HANSEN A, FLIEDNER FP, HENRIKSEN JR, JØRGENSEN JT, CLEMMENSEN AE, BØRRESEN B, ELEMA DR, KJÆR A, LARS ANDRESEN T. Liposome accumulation in irradiated tumors display important tumor and dose dependent differences[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2018, 14(1): 27-34.
- [31] DEROOSE CM, de A, LOENING AM, CHOW PL, RAY P, CHATZIOANNOU AF, GAMBHIR SS. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging[J]. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 2007, 48(2): 295-303.
- [32] SHI Y, KUNJACHAN S, WU ZJ, GREMSE F, MOECKEL D, van ZANDVOORT M, KIESSLING F, STORM G, van NOSTRUM CF, HENNINK WE, LAMMERS T. Fluorophore labeling of core-crosslinked polymeric micelles for multimodal *in vivo* and *ex vivo* optical imaging[J]. *Nanomedicine (London, England)*, 2015, 10(7): 1111-1125.
- [33] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424.
- [34] WANG XY, McMANUS M. Lentivirus production[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2009(32): 1499.
- [35] SEGURA MM, MANGION M, GAILLET B, GARNIER A. New developments in lentiviral vector design, production and purification[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013, 13(7): 987-1011.
- [36] 敖罗权, 敖翔, 郭韡, 邢伟, 胡雪婷, 李战, 姚孟维, 吴晓凤, 徐祥. 稳定表达 CD19 的 HeLa 细胞株的构建及其作为 CD19-CAR-T 细胞的靶细胞功能鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(12): 1095-1101.
- AO LQ, AO X, GUO W, XING W, HU XT, LI Z, YAO MW, WU XF, XU X. Construction of HeLa cell line stably expressing CD19 and identification of its target cell function as CD19-CAR-T cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 36(12): 1095-1101 (in Chinese).
- [37] OTERODC, RICKERT RC. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(11): 5921-5930.
- [38] DIAMANT E, KEREN Z, MELAMED D. CD19 regulates positive selection and maturation in B lymphopoiesis: lack of CD19 imposes developmental arrest of immature B cells and consequential stimulation of receptor editing[J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3247-3254.
- [39] MILLS DM, STOLPA JC, CAMBIER JC. Modulation of MHC class II signaltransduction by CD19[M]// *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US, 2007: 139-148.
- [40] JUNE CH, O'CONNOR RS, KAWALEKAR OU, GHASSEMI S, MILONE MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365.
- [41] NEELAPU SS. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy[J]. *Hematological Oncology*, 2019, 37(suppl 1): 48-52.

(本文责编 郝丽芳)