

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.009

· 基础研究 ·

靶向肝癌的 GPC3-CAR-T 细胞的构建与功能鉴定

吴斯玮, 敖翔, 郭韡, 邢伟, 安天琛, 敖罗权, 胡雪婷, 李战, 徐祥 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 第一研究室, 重庆 400042)

[摘要] **目的:** 构建靶向 GPC3 阳性肝癌细胞的嵌合抗原受体修饰 T 细胞[chimeric antigen receptor-modified T cell, CAR-T cell], 并评估其对 GPC3 阳性肝癌细胞的杀伤效能。**方法:** 选择偏爱密码子技术改造基因序列, 以增强 CAR 分子表达效率, 设计靶向 GPC3 抗原的 CAR 分子基因并构建携带 GPC3-CAR 基因的慢病毒表达载体 pCDH-GPC3-CAR, 感染 T 细胞; 采用 Western blotting、流式细胞术、实时细胞监测和 ELISA 技术分别检测 GPC3-CAR 分子在 CAR-T 细胞的表达、慢病毒感染 T 细胞效率、GPC3-CAR-T 细胞对 GPC3 阳性肝癌细胞的杀伤活性和特异性。**结果:** 双酶切 pCDH-GPC3-CAR 重组慢病毒质粒可见分子质量和 GPC3-CAR 分子一致的基因片段, 成功构建 pCDH-GPC3-CAR 慢病毒质粒。约 54.38% 的 GPC3-T 细胞表达 GPC3-CAR 分子, 称为 GPC3-CAR-T 细胞。GPC3-CAR-T 细胞对 GPC3 阳性的肝癌细胞 Huh-7 比 GPC3 阴性的肝癌细胞 SK-HEP-1 具有更高效的杀伤能力[(78.96±4.76)% vs (6.87±3.15)%, $P < 0.01$]。与 GPC3 阳性 Huh-7 肝癌细胞共培养的肝癌 GPC3-CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 水平比 Mock 组高效[(21 371.4±1 808.3) vs (152.8±12.5) pg/ml, $P < 0.01$], 这可能是其高效杀伤肝癌细胞的机制之一。**结论:** 靶向肝癌的 GPC3-CAR-T 细胞具有高效分泌 IFN- γ 细胞因子并特异高效杀伤 GPC3 阳性肝癌细胞的能力, 为进一步推进 GPC3-CAR-T 临床前和临床研究奠定基础。

[关键词] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3; 嵌合抗原受体 T 细胞; 免疫治疗; 肝癌

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0748-08

Construction of GPC3-CAR-T cell targeting hepatocellular carcinoma and identification of its function

WU Siwei, AO Xiang, GUO Wei, XING Wei, AN Tianchen, AO Luoquan, HU Xueting, LI Zhan, XU Xiang (The 1st Research Laboratory, National Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] Objective: To construct chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cell (CAR-T) which targets GPC3 positive hepatoma cell, and to assess its killing efficacy to the GPC3 positive hepatoma cell. **Methods:** To enhance expression efficiency of the CAR molecule, technique for favored codon and modification of gene sequence were selected. CAR gene targeting GPC3 antigen was designed and lentiviral vector carrying GPC3-CAR gene, pCDH-GPC3-CAR, was constructed, which was transfected into T cell. Western blotting, flow cytometry, real-time cell analysis (RTCA) and ELISA assays were used respectively to detect expression of GPC3-CAR molecule in the CAR-T cell, infection efficiency of the lentivirus to T cells, killing activity and specificity of the GPC3-CAR-T cell to the GPC3 positive hepatoma cell. **Results:** The gene segment in the pCDH-GPC3-CAR recombinant lentivirus plasmid, molecular mass of which is the same as the GPC3-CAR molecule, was found in a result of double enzyme digestion, indicating that the pCDH-GPC3-CAR lentivirus plasmid was successfully constructed. About 54.38% of the GPC3-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81502434), 第三军医大学校管课题资助项目(No.2014YQN06)。Project supported by the National Natural Science Foundation (No.81502434), and the Foundation for Projects Administrated by the Third Military Medical University (No.2014YQN06)

[作者简介] 吴斯玮(1985-), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: wusw314@163.com

[通信作者] 徐祥(XU Xiang, corresponding author), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事干细胞组织再生修复、肿瘤免疫调控机制及临床新技术研发与转化研究, E-mail: xiangxu@ymail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170616.0908.002.html>

T cell expressing GPC3-CAR molecule were celled as the GPC3-CAR-T cell. Killing efficacy of the GPC3-CAR-T cell to the GPC3 positive Huh-7 hepatoma cell was higher than that to the GPC3 negative SK-HEP-1 cell ([78.96±4.76]% vs [6.87±3.15]%). IFN- γ secretion efficiency of the GPC3-CAR-T cell co-cultured with the GPC3 positive Huh-7 hepatoma cell in the CAR-T group was higher than that in the Mock group ([21 371.4±1 808.3]pg/ml vs [152.8±12.5] pg/ml), which could be one of the mechanisms of high efficacy in killing hepatoma cells. **Conclusion:** The GPC3-CAR-T cell targeting hepatoma cells might have high efficacy ability to secrete cytokine IFN- γ and specific, higher efficient ability to kill the GPC3 positive hepatoma cell, which would lay a foundation to carry further forward pre-clinical and clinical research on the GPC3-CAR-T cell.

[Key words] glypican-3(GPC3); chimeric antigen receptor T cells (CAR-T); immunotherapy; hepatocellular carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 748-755. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.009]

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是发病率和病死率均居于恶性肿瘤的前列^[1]。我国肝癌发病率位居第3位,且呈逐年上升趋势,肝癌患者总量占全世界的40%^[2]。肝癌病程进展快,且对放疗、化疗均不敏感,其治疗仍是世界性难题。近年来,随着肿瘤免疫学和细胞生物学的迅速发展,证实肿瘤免疫在肿瘤的发生、发展和治疗中发挥重要作用,并发展出如免疫检查点抗体抑制技术和嵌合抗原受体修饰的T(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)细胞等突破性新型肿瘤免疫治疗技术,在临床治疗中显示出显著的疗效,为治愈肿瘤带来曙光^[3-6]。CAR-T技术是通过人工方法将可以特异性识别肿瘤抗原的单链抗体与可活化T细胞的受体胞内结构域“免疫受体酪氨酸活化基序”融合成重组基因,随后将重组基因高效表达于T细胞膜上的T细胞修饰技术^[7]。发展新的精准靶向肿瘤的CAR-T技术已经成为肿瘤免疫治疗领域的热点^[8-9]。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)是细胞膜表面的硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparan sulfate proteoglycan, HSPG),其在肝癌组织中高表达(阳性率高达74.8%),而在正常肝组织中几乎不表达,是一种较为理想的肿瘤治疗靶点^[10]。因此,本研究以GPC3为靶点,通过将靶向GPC3的单链抗体GC33与共刺激分子CD28、CD137和CD3 ζ 链的胞内信号结构域进行融合重组,构建抗-GPC3-CD28-CD137-CD3 ζ 的慢病毒表达载体,制备GPC3-CAR分子修饰的T细胞,鉴定CAR分子在T细胞表面的表达情况,以及其对GPC3阳性肝癌细胞的杀伤效率,为GPC3阳性肝细胞肝癌的治疗探索一条新途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

HCC细胞株Huh-7和SK-HEP-1均购于中国科学院细胞库,由本实验室冻存及培养;293FT细胞株由本实验室保存。外周血单个核细胞(PBMC)来源于健康志愿者。大肠杆菌*E. coli* TOP10菌株由本实验室保存,慢病毒表达载体pCDH-CMV-MCS-EF1 α -copGFP质粒和慢病毒包装系统的其他质粒均由本实验室保存。

寡核苷酸引物由上海闪晶公司合成。逆转录试剂盒、高保真PCR试剂盒、限制性内切酶(均为TaKaRa产品)和DNA纯化回收试剂盒均购自BioTeke公司,DNA连接试剂盒(TaKaRa产品,#6220Q)和人淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司,胎牛血清、DMEM-Basic培养基购自Gibco公司,DMEM-HG培养基购自Hyclone公司,KBM551培养基购自Corning公司,PolyJetTM转染试剂购自SignaGen公司,兔多克隆CD3 ζ 抗体购自Abcam公司,BCA蛋白含量检测试剂盒购自凯基生物公司,人IFN- γ ELISA试剂盒购自武汉华美CUSABIO公司,CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒购自Promega公司。

1.2 设计GPC3-CAR分子

选择可特异性识别GPC3的单链抗体GC33、CD8 α 铰链区、CD28的穿膜结构域,以及共刺激分子CD28、CD137和CD3 ζ 链的胞内信号结构域为模版,通过柔性连接链将这些结构串联,获得完整的可固定表达于T细胞膜上的CAR分子。此外,在遵循偏爱密码子的基础上,根据氨基酸密码子的简并性在保证氨基酸序列不变的情况下对基因序列进行改造,以增强CAR分子的表达效率。

1.3 构建GPC3-CAR慢病毒表达载体

利用PCR和分子克隆技术按上述设计将识别GPC3抗原的单链抗体GC33与共刺激分子CD28、CD137和CD3 ζ 链的胞内信号结构域进行基因重组,

随后通过人工合成和拼接技术,获得靶向GPC3抗原的GPC3-CAR基因片段,再以Xba I和BamH I限制性酶切位点为克隆位点,利用亚克隆技术将GPC3-CAR基因片段插入慢病毒表达载体pCDH-CMV-MCS-EF1 α -copGFP中,最终获得携带GPC3-CAR基因片段的慢病毒表达载体pCDH-CMV-GPC3-CAR-EF1 α -copGFP。

1.4 包装GPC3-CAR慢病毒

用DMEM-HG培养基培养293FT细胞,将汇合度70%~80%的培养细胞接种到10 cm培养皿中,含10%胎牛血清的DMEM-HG培养基换液。取2个1.5 ml EP管,各加入500 μ l无血清DMEM-HG培养基,将3种慢病毒包装质粒pLP1、pLP2和pLP/VSVG与慢病毒表达载体按1:1:1:1的比例混合后加入到1个EP管,另1个EP管加入PolyJet™,3种包装质粒加上慢病毒表达载体的质量与PolyJet™体积比为1:3。将2个EP管各自混匀后静置5 min,随后将装有PolyJet™的EP管中的液体缓缓加入装有质粒的EP管中,轻轻混匀后室温静置20 min。然后将此复合物加入到培养的293FT细胞中,培养16 h后弃掉上清液,加入含10%胎牛血清的DMEM-HG培养基继续培养。24 h后荧光显微镜观察绿色荧光的发光情况,48 h后收取上清液,于4 $^{\circ}$ C条件下12 000 \times g离心20 min,0.45 μ m滤器过滤后用1.5 ml EP管分装后-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

1.5 制备T细胞和GPC3-CAR慢病毒感染T细胞

取健康志愿者外周血,用Ficoll淋巴细胞分离液和密度梯度离心法分离得到PBMC。用含10%胎牛血清的KBM551培养基重悬细胞(2×10^6 个/ml),并接种于T25培养瓶内,加入IFN- γ (1 000 IU/ml),24 h后加rIL-2(300 IU/ml)和抗CD3抗体(50 ng/ml)。72 h后一半T细胞用GPC3-CAR慢病毒按8 PFU慢病毒/细胞的感染复数感染T细胞。感染后的T细胞(5×10^5 /ml)继续培养,每隔1 d加rIL-2(300 U/ml),5 d后作为GPC3-CAR慢病毒感染组。另一半T细胞则按每隔1 d加rIL-2(300 U/ml)的方法继续培养作为未感染组。

1.6 Western blotting检测GPC3-CAR分子在T细胞的表达

取GPC3-CAR慢病毒感染组和未感染组T细胞(1×10^6)到1.5 ml EP管中,2 432 \times g离心5 min后弃上清。用预冷的PBS清洗3次,离心弃上清。吸尽PBS后加入100 μ l预冷的RIPA细胞裂解液,置于冰上10 min裂解细胞后,4 $^{\circ}$ C、14 000 \times g离心10 min,取上清

液用BCA法测定蛋白浓度后,加入1/5体积的5 \times SDS上样缓冲液和1% β -巯基乙醇,经10% SDS-PAGE分离后,转移至PVDF膜,用无水乙醇封闭2 min后,加入兔抗人CD3 ζ 抗体(1:500),4 $^{\circ}$ C摇床轻晃过夜。次日用TBST洗膜5次,每次5 min。之后加入HRP标记的羊抗兔IgG(1:10 000),室温孵育2 h后再用TBST洗膜5次,每次5 min。显色试剂盒化学发光显迹后用印记显影系统采集图像。

1.7 流式细胞术鉴定GPC3-CAR分子阳性T细胞比率

将GPC3-CAR慢病毒感染组和未感染组T细胞收集到15 ml离心管中,200 \times g离心5 min后弃上清,加入1 ml PBS重悬细胞,200 \times g离心5 min后弃上清,再加入0.2 ml PBS重悬细胞(5×10^6 个/ml)后流式细胞仪检测T细胞的绿色荧光表达情况,以表达绿色荧光的T细胞为GPC3-CAR表达阳性。

1.8 实时细胞监测技术监测GPC3-CAR-T细胞对GPC3阳性肝癌细胞的杀伤效应和特异性

向无菌RTCA检测板E-plate中加入50 μ l含10%胎牛血清、45%DMEM-Basic、45%KBM551的混合培养基,放入实时细胞分析仪中,待系统检测各孔基线值之后取出RTCA检测板E-plate,加入预消化重悬的Huh-7和SK-HEP-1肿瘤细胞悬液(5×10^3 个/孔)。将E-plate室温静置30 min后再次放入仪器中,设置好实验参数,每隔15 min检测1次。待肿瘤细胞贴壁生长4 h后按处理方式的不同分为CAR-T组、Mock组与肿瘤细胞生长对照组,CAR-T组按照效靶比2:1和4:1分别加入 1×10^3 个和 2×10^4 个GPC3-CAR-T细胞,Mock组按照效靶比2:1和4:1分别加入 1×10^3 个和 2×10^4 个空载病毒感染的T细胞,肿瘤细胞生长对照组不加任何T细胞,之后用混合培养基补足到200 μ l,每组设置2个复孔。再将RTCA检测板E-plate放入仪器中继续检测。RTCA检测仪可以将贴壁细胞所产生的电阻抗信号转化为细胞指数(cell index, CI)值,根据CI值绘制出相应的生长曲线,从而间接反应贴壁细胞的增殖情况。

1.9 ELISA检测GPC3-CAR-T细胞IFN- γ 的分泌水平

将GPC3阳性的Huh-7细胞与GPC3阴性的SK-HEP-1细胞接种于12孔板(5×10^4 个/孔),待细胞贴壁后,CAR-T组按照效靶比0.5:1、1:1和2:1分别加入 2.5×10^4 、 5×10^4 和 1×10^5 个GPC3-CAR-T细胞,Mock组按照效靶比0.5:1、1:1和2:1分别加入 2.5×10^4 、 5×10^4 和 1×10^5 个空载病毒感染的T细胞,对照组只加入 2.5×10^4 、 5×10^4 和 1×10^5 个GPC3-CAR-T细胞。每组设3个复孔,共培养24 h后3 000 \times g离心10 min,收集上

清液, 用 ELISA 试剂盒检测 IFN- γ 水平。将 100 μ l 收集的各组上清液加入到相应孔中, 之后按试剂盒说明书操作, 测量 450 nm 波长处光密度(D)值, 并根据标准曲线计算各样本的 IFN- γ (μ l/ml)水平。

1.10 LDH 释放实验检测 GPC3-CAR-T 细胞细胞毒性

将 GPC3 阳性的 Huh-7 细胞与 GPC3 阴性的 SK-HEP-1 细胞接种于 96 孔板 (5×10^3 个/孔), 随后 CAR-T 组按照效靶比 0.5:1、1:1 和 2:1 分别加入 2.5×10^3 、 5×10^3 和 1×10^4 个 GPC3-CAR-T 细胞, Mock 组按照效靶比 0.5:1、1:1 和 2:1 分别加入 2.5×10^3 、 5×10^3 和 1×10^4 个空载病毒感染的 T 细胞。同时按照试剂说明书要求设置效应细胞自发 LDH 释放孔、靶细胞自发 LDH 释放孔、靶细胞最大 LDH 释放孔、培养基背景孔和体积校正孔, 每个实验和对照反应设 4 个复孔。250 \times g 离心 4 min。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 4 h 后 250 \times g 离心 4 min。每孔转移 50 μ l 上清液至另 1 个 96 孔板, 每孔加 50 μ l 底物缓冲液, 避光室温孵育 30 min。最后每孔加 50 μ l 终止液, 测量 490 nm 波长 D 值。根据公式计算细胞毒性[溶细胞率(%)]。溶细胞率(%)=(实验组 D 值 - 效应细胞自发释放组 D 值 - 靶细胞自发释放组 D 值)/(靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自发释放组 D 值) \times 100%。

1.11 统计学处理

统计数据使用 SPSS19.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, 以 $P > 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPC3-CAR 分子的结构

如图 1 所示, 在 GPC3 单链抗体的 VL 和 VH 之间加入 GSGG 连接柔性链, 抗体的 N 末端引入 CD8 α 的信号肽(nucleotides 1-63, GenBank NM 001768.6), GPC3 单链抗体的羧基末端直接连入 CD8 α 的铰链区(nucleotides 412-546, GenBank NM 001768.6)随后连接 CD28 的穿膜域(nucleotides 457-537, GenBank NM 006139.3), 而后面 CD8、CD137 和 CD3 ζ 的融合蛋白氨基酸序列设计与三代 CAR-T 相似, 差异在于引入偏爱密码子致基因序列不同。

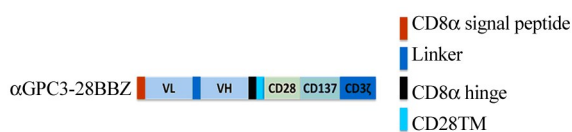
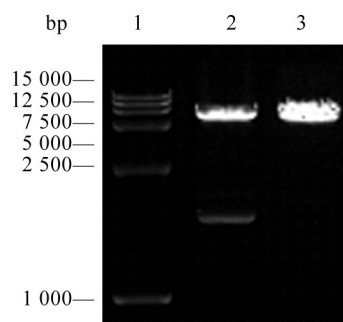


图 1 α GPC3-28BBZ 结构图

Fig. 1 Structure diagram of α GPC3-28BBZ

2.2 成功构建 GPC3-CAR 慢病毒表达载体

Xba I / *Bam* H I 双酶酶切鉴定结果(图 2)显示, 重组质粒酶切后可见一条 1 503 bp 的基因片段, 大小与 GPC3-CAR 分子相一致, 而空载质粒则无此基因片段。同时, GPC3-CAR 分子基因序列测序结果(图 3)证实, GPC3-CAR 分子基因序列和插入的阅读框与设计完全相符, 提示成功构建 pCDH-GPC3-CAR 慢病毒表达质粒。



1: Marker; 2: pCDH-GPC3-CAR recombinant lentiviral plasmid; 3: Empty pCDH plasmid

图 2 pCDH-GPC3-CAR 重组慢病毒表达质粒限制性内切酶鉴定结果

Fig. 2 Identification results of the pCDH-GPC3-CAR recombinant lentiviral expression plasmid detected by restriction endonuclease

2.3 慢病毒转染 T 细胞表达 GPC3-CAR 分子

流式细胞术检测 T 细胞中 GPC3-CAR 分子表达结果(图 4)显示, 约 54.38% GPC3-CAR 慢病毒感染的 T 细胞(GPC3-T cell)表达 GPC3-CAR 分子, 而对照组 T 细胞(T cell)未见 GPC3-CAR 分子的表达。

2.4 GPC3-CAR 分子在 CAR-T 细胞内表达

Western blotting 检测结果(图 5)显示, 在 GPC3-CAR-T 细胞中可见蛋白相对分子质量约为 16 kD 和 55 kD 蛋白带 2 条, 而对照组 T 细胞仅见 16 kD 内源性 CD3 ζ 条带, 而 GPC3-CAR 的相对分子质量为 55 kD, 提示 GPC3-CAR-T 细胞确实能表达 GPC3-CAR 分子。

2.5 GPC3-CAR-T 细胞有效抑制 GPC3 阳性的 Huh-7 细胞的生长

实时细胞生长监测结果显示, GPC3-CAR-T 细胞对 GPC3 阳性肝癌 Huh-7 细胞生长具有很强的抑制能力, 且其抑制效率随 GPC3-CAR-T 细胞量的增加而增加, GPC3-CAR-T 细胞与 GPC3 阳性 Huh-7 肝癌细胞效靶比为 4:1 的细胞生长抑制率高于效靶比为 2:1 的细胞(图 6A)。但是, 在检测的效靶比范围内, GPC3-CAR-T 细胞对 GPC3 阴性肝癌 SK-HEP-1 细胞

生长均无明显的抑制效应(图 6B)。提示 GPC3-CAR-T 细胞对肝癌细胞杀伤效应依赖 GPC3 分子的表达,具有特异性。而空载病毒感染的 Mock 组无论

是与哪种肝癌细胞共培养,也无论效靶比高低,对肝癌细胞均没有生长抑制效应。

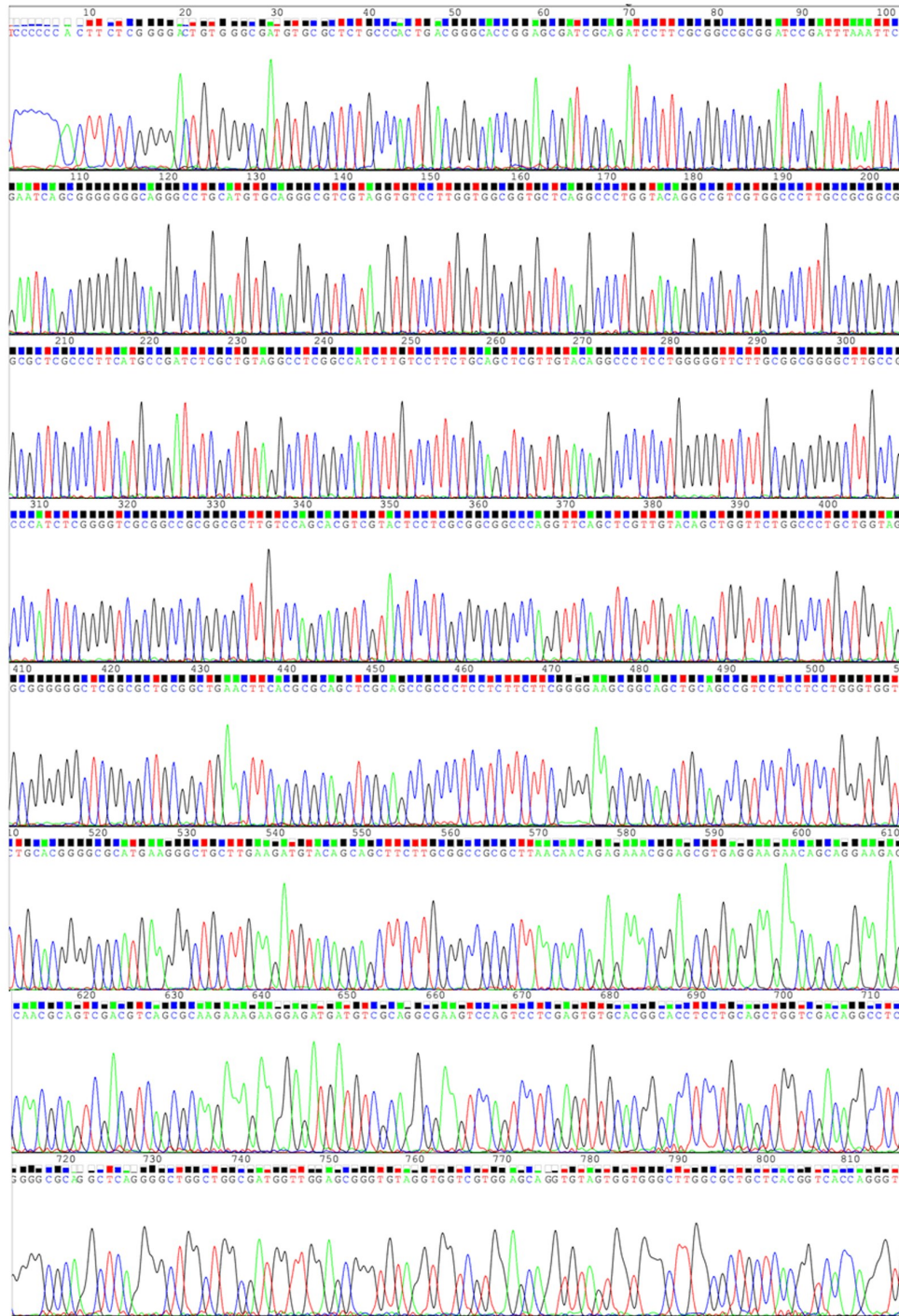


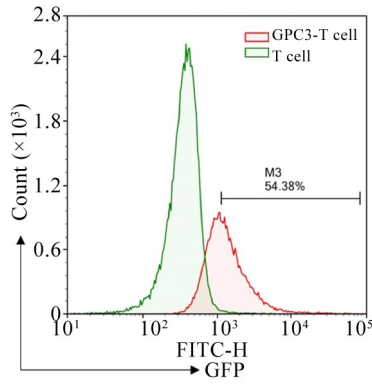
图3 目的基因测序结果

Fig.3 Results of sequencing the gene of interest

由于乳酸脱氢酶(LDH)在胞质内含量丰富,但正常时并不能通过细胞膜,在细胞受损或死亡时才释放到细胞外,此时培养基中 LDH 的活性与死亡细

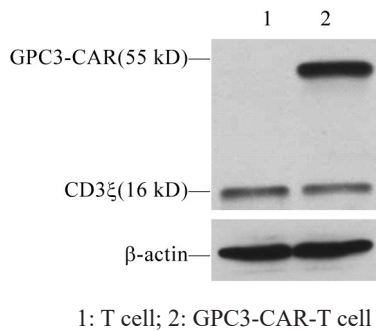
胞数量成正比。LDH 释放实验结果(图 7)显示,在效靶比为 2:1 时, GPC3-CAR-T 细胞与 GPC3 阳性 Huh-7 细胞共培养时有大量的 LDH 释放,表明 GPC3-CAR-

T 细胞对 Huh-7 细胞有强大的直接杀伤能力[(78.96±4.76)% vs (6.87±3.15)%, $P < 0.01$], 而对 GPC3 阴性的 SK-HEP-1 肝癌细胞则几乎没有杀伤作用。而空载病毒感染的 Mock 组则对两种肝癌细胞几乎都没有杀伤作用[(8.70±2.49)% vs (9.11±2.34)%, $P > 0.05$]。



M3: the T cells with GPC3-CAR positive
图 4 流式细胞技术检测 T 细胞 GPC3-CAR 分子阳性表达效率

Fig. 4 Expression rate of the GPC3-CAR molecule in the T cells detected by Flow cytometry assay

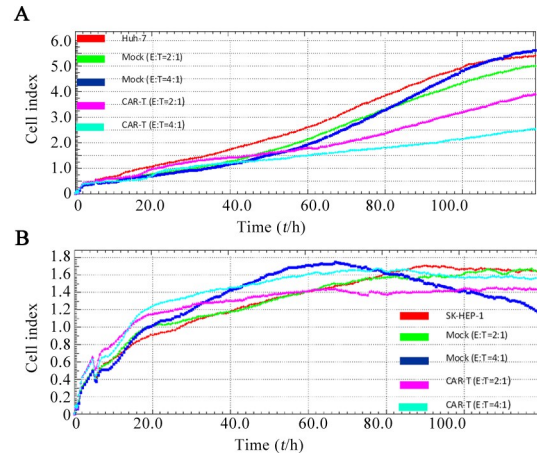


1: T cell; 2: GPC3-CAR-T cell
图 5 Western blotting 验证 GPC3-CAR 分子在 GPC3-CAR-T 细胞内表达

Fig. 5 Expression of the GPC3-CAR molecule in the CAR-T cells verified by Western blotting assay

2.6 ELISA 检测 GPC3-CAR-T 细胞 IFN- γ 的分泌水平
在 ELISA 检测细胞因子释放实验中, 与 GPC3 阳性 Huh-7 细胞共培养, 效靶比为 4:1 时, GPC3-CAR-T 细胞组 CAR-T 细胞比空载慢病毒感染的 Mock 组产生更多的 IFN- γ [(2 1371.4±1 808.3) vs (152.8±12.5) pg/ml, $P < 0.01$] (图 8A)。然而, 当这两组 T 细胞与 GPC3 的 SK-HEP-1 细胞共培养时, IFN- γ 的分泌量仅轻微增加[(153.9±13.2) vs (150.6±21.9) pg/ml, $P > 0.05$] (图 8B)。而 GPC3-CAR-T 细胞单独培养的 control 组的 IFN- γ 水平则几乎检测不到。由此提示, GPC3-

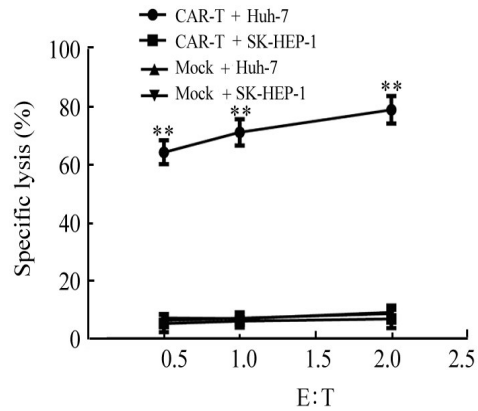
CAR-T 细胞受 GPC3 抗原刺激后能高效活化, 并大量分泌增强其杀瘤能力的 IFN- γ 。



A: Hepatocellular carcinoma GPC3 positive Huh-7 cells;
B: Hepatocellular carcinoma GPC3negative SK-HEP-1 cells

图 6 RTCA 检测 GPC3-CAR-T 细胞对肝癌细胞生长的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of the GPC3-CAR-T cells on the hepatocellular carcinoma cells detected by RTCA



** $P < 0.01$ vs Mock+Huh-7

图 7 LDH 释放试验检测 GPC3-CAR-T 细胞对肝癌细胞的溶细胞作用

Fig. 7 Cytolytic effect of the GPC3-CAR-T cell on the hepatocellular carcinoma cells detected by LDH release assay

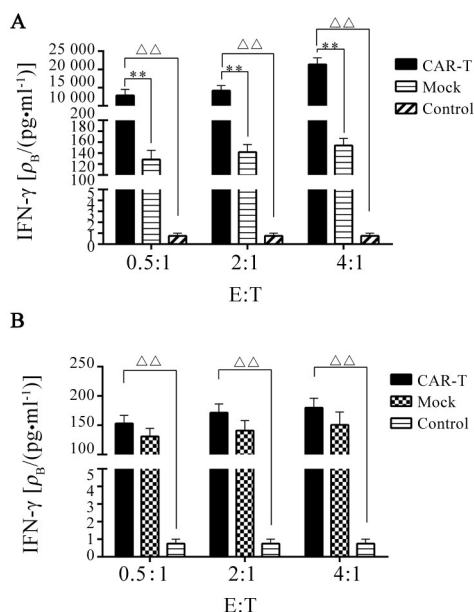
3 讨论

近几年来, 恶性肿瘤发病率逐年上升, 尽管传统肿瘤治疗方案也获得了巨大的发展, 如手术及放、化疗等, 但是这些治疗方案仍无法治愈肿瘤。因此, 探索有效治疗肿瘤的新模式和新技术仍有重要的科学意义。随着免疫学及分子生物学技术的飞速发展,

肿瘤免疫治疗领域也有了快速进展,2013年肿瘤免疫治疗被《科学》杂志评为十大突破之一^[3],进而极大地推动了肿瘤免疫治疗新技术的研发进程。肿瘤免疫治疗从最早应用增加抗肿瘤活性的细胞因子如IFN- γ 、IL-2到后来的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)以及淋巴细胞因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK)等,尽管这些治疗方案均在临床得到应用,但这些肿瘤免疫治疗方案的临床效果依然不能令人满意,这与肿瘤发生发展过程中的局部免疫抑制、免疫耐受等有关^[11-12]。因而,临床迫切需要一种可以绕开免疫抑制微环境的新型肿瘤免疫治疗方法。

受MHC限制,具有自我活化和自我增殖的能力,故而具有高效的杀伤肿瘤细胞的能力。其中,针对CD19这种在超过80%的非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的患者中高表达的B细胞肿瘤抗原的CAR-T是目前临床上研究最多且疗效最好的CAR-T技术。Sloan-Kettering 纪念医院^[13]用靶向CD19的CAR-T细胞治疗16例难治复发的急性淋巴细胞白血病(B-ALL)患者,其中14例患者完全缓解(CR),CR率达到88%。在一项使用针对CD19特异性的第二代CAR-T治疗1例晚期滤泡淋巴瘤的临床试验^[14]中,观察到患者在治疗后第36周骨髓中仍检测不到CD19⁺细胞,患者获得明显缓解持续超过32周。这些研究采用的是在scFv和CD3 ζ 链胞内结构域融合形成嵌合受体的基础上,加入CD28共刺激分子的第二代CAR-T细胞,使得第二代CAR-T细胞比第一代提高T细胞增殖性,延长T细胞存活时间并提高其细胞毒性^[8]。然而,相对血液病肿瘤,实体瘤的局部免疫微环境处于较强的免疫抑制状态,造成CAR-T细胞的疗效较弱。因此增强CAR-T细胞抗免疫抑制能力是靶向实体瘤CAR-T细胞治疗急需解决的关键,所以本研究以第三代CAR-T细胞为模版,在第二代CAR-T细胞的基础上,另外增加一个共刺激分子CD137(4-1BB)^[15],使第三代CAR-T细胞不需要外源性B7共刺激分子的参与即可产生IL-2,促进细胞增殖,其体内扩增能力和产生细胞因子的能力更强^[16]。

HCC是一种恶性程度很高的肿瘤,目前正在努力寻找治疗这种肿瘤的新方法。迄今已有多种抗GPC3的单克隆抗体,这些抗体可以特异地识别细胞和组织中的GPC3,从而抑制肝癌细胞的增殖或诱导其凋亡^[17-19]。但是基因敲除和siRNA的实验结果表明,GPC3并不是肝癌细胞的致死基因。现有研究^[20]也表明,GPC3靶向抗体并不能完全消除肿瘤,因此单独的抗体治疗尚不足以有效治愈HCC。目前,应用CAR-T细胞治疗HCC的研究相对较少。Gao等^[21]制备的第一代及第三代靶向GPC3的CAR-T细胞在体外能有效地杀伤抗原阳性的HCC细胞,其第三代CAR-T细胞可显著延长肝癌负荷小鼠的存活时间。本研究采用的CAR和Gao等研究中的第三代CAR的区别是选择偏爱密码子技术,对GPC3-CAR分子进行重新设计,在氨基酸序列不变的情况下,通过改变碱基序列,最大化增强GPC3-CAR分子在T细胞的表达,并增强T细胞的自我活化能力。实验结果证实这种GPC3-CAR-T细胞有较高GPC3-CAR分子的表达。另外,本研究获得的CAR-T细胞在与GPC3阳性



A: Stimulated with the GPC3-positive Huh-7 cells, ** $P < 0.01$ vs Mock group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Control group;

B: Stimulated with the GPC3-negative SK-HEP-1 cells, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Control group

图8 ELISA检测各实验组GPC3-CAR-T细胞IFN- γ 分泌水平

Fig. 8 Secretion levels of IFN- γ in the GPC3-CAR-T cells of various groups detected by ELISA

CAR是由胞外抗原结合区与铰链区串联形成的单链抗体片段(single-chain antibody fragment, scFv)、穿膜区和胞内信号转导区组成。将其在体外进行基因重组生成重组质粒后,在体外转染患者的T细胞,使其表达肿瘤相关抗原受体,转染并经过纯化和扩增的T细胞即为CAR-T细胞。CAR-T细胞在体内外都具有对特定肿瘤相关抗原高度的亲和性,并且不

肝癌 Huh-7 细胞共培养时,产生的 IFN- γ 水平与对照相比升高近万倍,远远高于 Gao 团队获得的千倍 IFN- γ 分泌水平。这也与 GPC3-CAR 分子在 T 细胞上高效表达和强烈激活 T 细胞有关。

本研究成功构建了靶向 GPC3 阳性 HCC 的 CAR-T 细胞。体外实验表明,其对 GPC3 阳性 HCC 细胞的杀伤作用和功能活性比对 GPC3 阴性 HCC 细胞更显著,提示靶向 GPC3 的 CAR-T 细胞对 HCC 细胞的杀伤具有较高的特异性,有向临床转化的价值。本研究获得的结果,为进一步开展靶向 GPC3 的 CAR-T 细胞治疗 HCC 的临床转化奠定实验基础。但是,该结果尚需进一步在动物模型和临床转化研究中进行验证。

[参考文献]

- [1] BERTUCCIO P, BOSETTI C, LEVI F, et al. A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe[J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(6): 1667-1674. DOI: 10.1093/annonc/mds652.
- [2] 张思维, 郑荣寿, 李霓, 等. 中国肝癌发病的趋势分析和预测[J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(7): 587-592.
- [3] MELERO I, HERVAS-STUBBS S, GLENNIE M, et al. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(2): 95-106. DOI: 10.1038/nrc2051.
- [4] O' DAY S J, HAMID O, URBA W J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4(CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies[J]. *Cancer*, 2007, 110(12): 2614-2627. DOI: 10.1002/cncr.23086.
- [5] WEBER J, THOMPSON J A, HAMID O, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5591-5598. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1024.
- [6] COUZIN-FRANKEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2013, 342: 1432-1433. DOI: 10.1126/science.342.6165.1432.
- [7] RAMOS C A, DOTTI G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11 (7): 855-873. DOI: 10.1517/14712598.2011.573476.
- [8] KALOS M, LEVINE B, PORTER D, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *SciTransl Med*, 2011, 3 (95): 1-11. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [9] PORTER D, LEVINE B, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8):725-733. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [10] WANG H L, ANATELLI F, ZHAI Q J, et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(11): 1723-1728. DOI: 10.1043/1543-2165-132.11.1723.
- [11] TOPALIAN S L, WEINER G J, PARDOLL D M. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4828-4836. DOI:10.1038/nconpnc0101.
- [12] DRAKE C G, JAFFEE E, PARDOLL D M. Mechanisms of immune evasion by tumors[J]. *Adv Immunol*, 2006, 90: 51-81. DOI: 10.1016/S0065-2776(06)90002-9.
- [13] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *SciTransl Med*, 2014, 6(224): 224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [14] KOCHENDEFFER J N, WILSON W H, JANIK J E, et al. Eradication of B lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19[J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4099-4102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931.
- [15] TILL B G, JENSEN M C, WANG J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results[J]. *Blood*, 2012, 119(17): 3940-3950. DOI: 10.1182/blood-2011-10-387969
- [16] PULE M A, STRAATHOF K C, DOTTI G, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933-941. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.04.016.
- [17] HARUYAMA Y, KATAOKA H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(1): 275-283. DOI: 10.3748/wjg.v22.i1.275.
- [18] PHUNG Y, GAO W, MAN Y G, et al. High-affinity monoclonal antibodies to cell surface tumor antigen glypican-3 generated through a combination of peptide immunization and flow cytometry screening[J]. *MAbs*, 2012, 4(5): 592-599. DOI: 10.4161/mabs.20933.
- [19] ZHU A X, GOLD P J, EL-KHOUEIRY A B, et al. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 920-928. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2616
- [20] FENG MQ, HO M. Glypican-3 antibodies: A new therapeutic target for liver cancer[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588:377-382. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.10.002.
- [21] GAO H, LI K S, TU H, et al. Development of T Cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6418-6428. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-1170.

[收稿日期] 2017-02-20

[修回日期] 2017-05-26

[本文编辑] 宋关鸿