

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.002

· 研究快报 ·

## 人外周血 TIM3 基因敲除 T 淋巴细胞的制备及其抗肿瘤作用

王康馨, 赵阳, 苏舒, 邵洁, 魏嘉, 刘宝瑞(南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤研究所, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** **目的:** 通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术及质粒电转染技术制备 T 细胞免疫球蛋白黏液素 3 (TIM3) 基因敲除的人外周血 T 淋巴细胞, 探讨敲除 TIM3 基因后能否增强 T 细胞免疫功能及其抗肿瘤作用。 **方法:** 通过电转染法将 hTIM3 sgRNA/Cas9 双质粒共转染 EBV 阳性胃癌患者外周血 T 淋巴细胞, 电转 24 h 后流式细胞术检测转染效率并利用荧光显微镜观察; 体外培养过程中观察基因敲除后 T 细胞增殖活性, 流式细胞术验证 TIM3 基因敲除效率以及细胞表型的变化。用肿瘤抗原肽活化 T 细胞检测 TIM3 基因敲除后 T 细胞分泌细胞因子水平及体外杀伤胃癌 AGS-EBV 细胞的能力。 **结果:** 电转染法能够有效地将 hTIM3 sgRNA/Cas9 双质粒敲除体系转入人外周血 T 淋巴细胞, 其转染效率平均达  $(41.5 \pm 3.6)\%$ , 基因敲除效率波动在  $40.0\% \sim 50.0\%$  (均  $P < 0.01$ ); 经抗原活化后的基因敲除组 T 细胞的增殖活性和免疫表型未见明显变化, 表面活化分子中仅见 HLA-DR 较对照组明显提高 ( $P < 0.05$ ); TIM3 基因敲除 T 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平显著增高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 体外杀伤胃癌 AGS-EBV 细胞的能力也明显增强 (均  $P < 0.05$ )。 **结论:** 用 CRISPR-Cas9 基因编辑及质粒电转染技术制备人外周血 TIM3 基因敲除 T 淋巴细胞的方法简易可行, 在体外的扩增活化中保持 TIM3 基因水平下调并具有更高的免疫应答水平以及更强的抗肿瘤作用。这一新技术的研发为基因工程化细胞免疫治疗提供了新的思路。

**[关键词]** CRISPR-Cas9; T 细胞免疫球蛋白黏液素 3 (TIM3) 基因; T 淋巴细胞; 细胞治疗; 抗肿瘤作用

**[中图分类号]** R392.1; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0374-07

## Preparation of human peripheral blood T lymphocytes with TIM3 gene knockout and its anti-tumor efficacy

WANG Kangxin, ZHAO Yang, SU Shu, SHAO Jie, WEI Jia, LIU Baorui (The Comprehensive Cancer Center of Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University & Clinical Cancer Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare human peripheral blood T lymphocytes with TIM3 (T cell immunoglobulin and mucin-3) gene knockout by using CRISPR-Cas9 gene editing technique and plasmid electrotransfection system, and to discuss whether the knockout of TIM3 gene could enhance the immune response and anti-tumor efficacy of T cells. **Methods:** Double plasmids hTIM3 sgRNA/Cas9 were transfected into human peripheral blood T lymphocytes of EBV positive gastric cancer patients by using electrotransfection system. The transfection efficiency was examined 24 h later by flow cytometry and fluorescence microscope. The proliferation activity of the T cells after gene knockout was observed during *in vitro* culture, and the knockout efficiency and phenotypes of the modified T cells were evaluated by flow cytometry. Furthermore, tumor antigen peptide was used to activate T cells, and the level of modified T cells secreting cytokines and its cytotoxicity against gastric cancer AGS-EBV cells were evaluated. **Results:** Electrotransfection system could successfully transfect hTIM3 sgRNA/Cas9 double plasmids into human peripheral blood T lymphocytes with an average transfection efficiency of  $(41.5 \pm 3.6)\%$ , and the gene knockout efficiency fluctuated between  $40.0\%$  and  $50.0\%$  (all  $P < 0.01$ ). The proliferation of the modified T cells was not significantly changed in the TIM3 gene knockout group even after the prolonged co-culturing with tumor antigenic peptide; and for the activated molecules, only HLA-DR exhibited significant elevation as compared with control group ( $P < 0.05$ ). Remarkably, T cells with TIM3 gene knockout showed significantly elevated secretion of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), as well

**[基金项目]** 国家重点研发计划专项经费资助项目 (No.2017YFC1308900); 国家自然科学基金资助项目 (No.81702811, No.81803093); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. SBK2018040809)。Project supported by the Special Funding Project of National Key Research and Development Plans (No.2017YFC1308900), the National Natural Science Foundation of China (No.81702811, No.81803093), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. SBK2018040809)

**[作者简介]** 王康馨 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事恶性肿瘤的免疫治疗及放射治疗的研究, E-mail: wknju@163.com

**[通信作者]** 刘宝瑞 (LIU Baorui, corresponding author), 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事恶性肿瘤的靶向与个体化治疗研究, E-mail: baoruiliu@nju.edu.cn

as obviously enhanced *in vitro* cytotoxicity against gastric cancer AGS-EBV cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** It's simple and feasible of CRISPR-Cas9 gene editing technique and plasmid electrotransfection system to prepare T lymphocytes with engineered TIM3 gene knockout. The expression level of TIM3 was down-regulated in *in vitro* culture. More importantly, the modified T cells performed superior immune response and cytotoxicity, which may provide a new idea for gene engineering cell immunotherapy.

**[Key words]** CRISPR-Cas9; T cell immunoglobulin and mucin-3 (TIM3) gene; T lymphocyte; cell therapy; anti-tumor efficacy

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 374-380. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.002]

近年来,免疫治疗通过改变传统的肿瘤治疗方式,从靶向肿瘤本身转向重整机体抗肿瘤免疫系统,从而给患者带来了令人惊喜的治疗效果。免疫检查点抑制剂通过阻断 T 细胞表面负性信号的转导有效地逆转免疫耐受,防止 T 细胞功能耗竭,激活机体抗肿瘤免疫应答<sup>[1-3]</sup>。除了常见的免疫检查点分子程序性死亡蛋白-1 (programmed death protein-1, PD-1) 及其配体 (programmed death protein-legand 1, PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 以外, T 细胞免疫球蛋白黏液素 3 (T cell immunoglobulin and mucin-3, TIM3) 也被认为在肿瘤微环境的免疫调控中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。TIM3 是重要的免疫检查点蛋白之一,其表达于 CD4<sup>+</sup> Th1 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、巨噬细胞、单核细胞及 CD11b<sup>+</sup> DC 表面<sup>[6]</sup>。半乳糖素-9 (galectin-9) 是 TIM3 的主要配体,两者结合诱导 T 细胞耗竭或凋亡<sup>[7]</sup>。TIM3 过表达致使 T 细胞增殖能力及细胞因子分泌水平低下,而利用抗体阻断 TIM3/galectin-9 信号通路有助于减轻免疫抑制程度,恢复抗原特异性 T 淋巴细胞的抗肿瘤效能<sup>[8-10]</sup>。为验证 TIM3 作为肿瘤免疫治疗靶点的可行性并进一步结合肿瘤过继性细胞免疫治疗,本研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建人外周血 TIM3 基因敲除的 T 淋巴细胞,初步研究敲除 TIM3 基因后能否增强 T 细胞免疫功能及抗肿瘤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、血液标本及主要试剂

人胃癌 AGS-EBV 细胞株由南京大学附属肿瘤医院肿瘤中心实验室常规冻存。EBV 阳性胃癌 (Epstein-Barr virus - associated gastric carcinoma, EBVaGC) 患者外周血 50 ml。人外周血淋巴细胞分离液 (LTS1077)、Human IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、Human GM-CSF、LPS、IFN- $\gamma$ 、Human TNF- $\alpha$  和 Human OKT-3 单抗 (美国 PeproTech 公司), AIM-V 无血清培养基 (美国 Life 公司), 澳洲胎牛血清 (美国 Gibco 公司), Anti-human CD3 - PerCP、CD4 - APC、CD8 - PE、CD8 - APC、CD45RO - PE、CD62L - FITC、HLA - DR - PE、CD69 - PE、Ki67 - FITC、CD366 - APC、TNF -  $\alpha$  - PE 和 IFN- $\gamma$  - PE (美国 BD Pharmingen 公司), QIAGEN 去内

毒素质粒大提试剂盒 (美国 QIAGEN 公司), LB 粉末、羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE)、PI (美国 Sigma 公司), 感受态 DH5 $\alpha$  (北京天根生物科技有限公司), 质粒 pGL3-U6-hTIM3-sgRNA、pST1374-Cas9-ZF-NLS-GFP 和 VPA-1002 (德国 Lonza 公司), EBV-潜在性膜抗原 (latent membrane protein 2A, LMP2A) - A11-340 抗原肽 (上海强耀生物科技有限公司)。

### 1.2 TIM3 基因敲除的 T 淋巴细胞的制备及效率验证

基于前期 SHU 等<sup>[11-12]</sup>利用 CRISPR-Cas9 体系建立的淋巴细胞基因敲除的方法,采用 Cas9 酶以及 pGL3-U6-hTIM3-sgRNA 双质粒,以电转染的方式介导人外周血 T 淋巴细胞 TIM3 基因敲除。先获取和活化人外周血 T 淋巴细胞,通过采集 HLA 11:01 EBV 阳性胃癌患者外周血 50 ml,利用 Ficoll 密度梯度离心法分离并获取白膜层细胞,贴壁法分离淋巴细胞和单核细胞。贴壁细胞加入 20 ml 完全培养基 (AIM-V, 10% 胎牛),同时补充重组人 GM-CSF (500 U/ml) 和重组人 IL-4 (500 U/ml),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,诱导单个核细胞向 DC 分化。贴壁 1.5 h 后获得的悬浮细胞用完全培养基调整细胞密度至  $2 \times 10^6$  个/ml 培养,并加入 OKT3 单克隆抗体 (50 ng/ml) 和重组人 IL-2 (300 U/ml) 刺激细胞增殖。在淋巴细胞活化 3 d 左右,计数并调整细胞密度为  $2 \times 10^7$  样,用核穿孔仪 (Lonza II B, German) 进行质粒转染。将转染试剂 A 18  $\mu$ l 与转染试剂 B 82  $\mu$ l 混匀,实验组 (sgRNA hTIM3 T cell) 将 pGL3-U6-hTIM3-sgRNA (20  $\mu$ g) 及 pST1374-Cas9 (10  $\mu$ g) 双质粒共同加入转染试剂混合均匀后进行 T 淋巴细胞电转染,对照组 (Control T cell) 只转入 pST1374-Cas9 质粒。电转结束后,将两组细胞分别吸出至有预温培养基的 6 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后流式细胞仪检测转染效率并用荧光显微镜观察,换液并添加重组 IL-2 (100 U/ml)、IL-7 (10 ng/ml) 和 IL-15 (10 ng/ml)。电转结束后 7 d 取出部分细胞检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞表面 TIM3 基因的表达。实验重复 3 次。

### 1.3 电转染后抗原特异性 CTL 细胞的培养

电转结束后 48 h 收集两组细胞至培养瓶继续培养,贴壁细胞加入 TNF- $\alpha$  (500 U/ml)、IFN- $\gamma$  (500 U/ml) 和前列腺素 E2 (PGE2, 50 ng/ml) 诱导 DC 成熟。DC 成熟当天,加入 10  $\mu$ g/ml EBV-LMP2A 负载 DC,

37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 5 h。负载多肽后的 DC 与电转 T 细胞以 1:10 的比例混合培养,联合细胞因子 IL-2、IL-7 及 IL-15, 根据细胞生长情况 2~3 d 补充新鲜的培养基和细胞因子刺激 7 d 后,再次加入负载抗原 LMP2A 的 DC 培养 7 d。以上抗原特异性 CTL 细胞的培养可行 2~3 轮,每 7 d 为一轮诱导周期。培养第 1、7、14、21 天从培养瓶中吸取适量细胞加入 0.4% 锥虫蓝溶液,在 3 min 内用血球计数板观察并计数活细胞的比例。

#### 1.4 流式细胞术检测 T 淋巴细胞表型及细胞因子分泌水平

将细胞悬液吹匀后,调整各组细胞密度至  $2 \times 10^5$  个/管,离心弃上清后用 200  $\mu$ l pH 7.4 的 PBS 重悬,加入各种荧光抗体标记细胞,4 °C 避光染色 30 min 后加入 2 ml 洗液终止染色,离心,弃上清后用 200  $\mu$ l PBS 重悬,上流式细胞仪检测 T 细胞表型及其细胞因子水平,并用 Flowjo 软件分析检测结果。实验重复 3 次。

#### 1.5 CFSE/PI 染色流式细胞术检测 T 淋巴细胞对 AGS-EBV 细胞的体外杀伤能力

采用 CFSE/PI 标记法进行体外杀伤检测,以 EBV 阳性的胃癌细胞系 AGS-EBV 作为靶细胞,Control T 细胞与 sgRNA hTIM3 T 细胞作为效应细胞。首先,设立靶细胞数  $5 \times 10^4$  个/孔,按预定的效靶比 5:1、10:1、20:1 和 40:1 加入效应细胞,随后加入终浓度为 4 nmol/L 的 CFSE,于 37 °C 孵育 10 min,加入大容量培养基终止染色。收集转染培养后的 T 细胞,用完全培养基调整细胞密度为  $5 \times 10^6$  个/ml。按预定的效靶比加入效应细胞和 CFSE 标记的靶细胞,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 共孵育 6 h。收集细胞悬液离心并弃上清

液。将各组细胞重悬于 100  $\mu$ l PBS 中,加入终质量浓度 50  $\mu$ g/ml 的 PI,4 °C 避光孵育 15 min,加入大容量培养基终止染色。离心细胞混合物以沉淀细胞,将细胞重悬于 200  $\mu$ l PBS 中,用流式细胞仪检测和分析结果。实验重复 3 次。

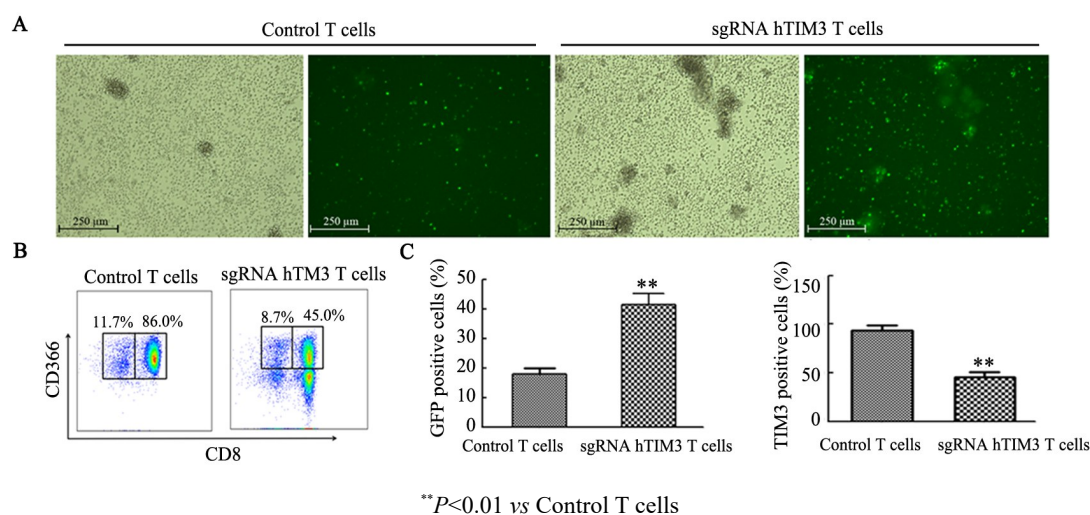
#### 1.6 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5.0 统计学软件进行数据处理。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功制备 TIM3 基因敲除的人外周血 T 淋巴细胞

用 pGL3-U6-hTIM3-sgRNA 以及 pST1374-Cas9-ZF-NLS-GFP 两种质粒电转 24 h 后,取出部分细胞,光镜下观察细胞呈明显集落生长扩增的趋势,并且在荧光显微镜下集落扩增的细胞团可见绿色荧光蛋白的表达(图 1A)。进一步验证 TIM3 基因转染及敲除效率(图 1B、C),EBV 阳性胃癌患者外周血淋巴细胞双质粒共转染效率平均达到  $(41.5 \pm 3.6)\%$ ,与对照质粒电转染组比较差异具有统计学意义( $t=9.8, P < 0.01$ )。在培养的第 7 天取出部分 Control T 组细胞,CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 TIM3 表达比例分别为 11.7%、86.0%,而 sgRNA hTIM3 T 组细胞 TIM3 表达水平的增高幅度均小于对照组,且以 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 TIM3 基因下调最为显著,其表达比例仅为 45.0%。统计结果显示,CD8<sup>+</sup>T 细胞 TIM3 基因敲除效率波动在 40.0%~50.0%,与对照组 T 细胞比较差异有统计学意义( $t=10.9, P < 0.01$ )。



A: Morphology of lymphocytes observed under light microscope and fluorescence microscope after TIM3 gene knockout; B: TIM3 gene knockout cells examined by flow cytometry; C: Statistical diagram of lymphocyte transfection efficiency and TIM3 gene knockout efficiency in CD8<sup>+</sup>T cells

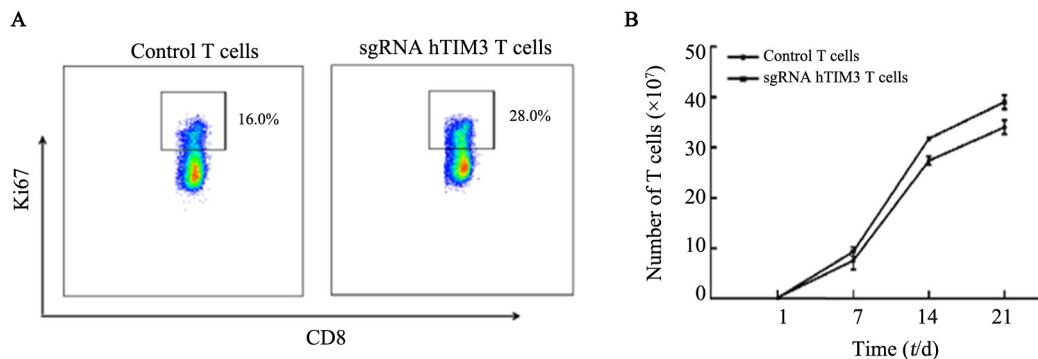
图 1 TIM3 基因敲除后淋巴细胞形态及基因转染敲除效率比较

Fig.1 Comparison of lymphocyte morphology and gene transfection/knockout efficiency after TIM3 gene knockout

## 2.2 TIM3 基因敲除对人 T 细胞的增殖活性及免疫表型无明显影响

用 EBV-LMP2-A11-340 抗原肽负载抗原提呈细胞诱导 CTL 的方法来活化细胞以备后续抗肿瘤免疫功能的研究。培养过程中发现细胞的增殖活力逐渐恢复, 可见细胞呈明显集落生长现象, 计数结果发现细胞数量逐级递增, 培养至 10 d 以后数量级可达  $1 \times 10^8$  个以上。而不同时间点计数两组细胞数显示, sgRNA hTIM3 T 组细胞较 Control T 组细胞数目略有增多。流式细胞术检测细胞内 Ki67 含量显示, sgRNA hTIM3 T 组细胞增殖活性较 Control T 组增强, 但差异尚无统计学意义 ( $t=4.3, P>0.05$ ; 图 2A、B)。随后对两组 T 淋巴细胞亚群、记忆型细胞的比

例以及活化水平等分别进行比较(图 3A), sgRNA hTIM3 T 组细胞和 Control T 组细胞相比,  $CD3^+$  T 细胞比例均保持在 80.0%~90.0%, 其中  $CD4^+$ 、 $CD8^+$  T 细胞的比例没有明显变化 ( $t=-2.2, 2.3, 均 P>0.05$ )。T 细胞表面活化的一些分子标志物如 HLA-DR 有升高 ( $t=-4.4, P<0.05$ ), 而 CD69 等分子表达水平尽管较对照组有所升高, 但差异无统计学意义 ( $t=-2.1, P>0.05$ ; 图 3B)。中央记忆型 T 细胞 ( $CD45RO^+ CD62L^+$ ) 的比例, Control T 组细胞为  $(10.4 \pm 2.3)\%$ 、sgRNA hTIM3 T 组细胞为  $(15.4 \pm 2.3)\%$ ; 而效应记忆型 T 细胞 ( $CD45RO^+ CD62L^-$ ) 的比例分别为  $(33.8 \pm 3.0)\%$ 、 $(24.1 \pm 1.2)\%$ , 两者比较差异均无统计学意义 ( $t=-2.7, 2.3, 均 P>0.05$ ; 图 3C)。



A: Lymphocyte proliferation capacity determined by flow cytometry;

B: Living cell count of lymphocytes on day 1, 7, 14, 21 with trypan blue staining

图2 TIM3 基因敲除后淋巴细胞增殖能力比较

Fig.2 Comparison of lymphocyte proliferation capacity after TIM3 gene knockout

## 2.3 TIM3 基因敲除 T 细胞的体外免疫应答及肿瘤杀伤能力增强

流式细胞术检测结果(图 4)显示, 在受到抗原肽 EBV-LMP2-A11-340 刺激时, sgRNA hTIM3 T 组细胞较 Control T 组细胞分泌  $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$  的水平有所增加, 以  $CD8^+$  T 细胞因子分泌水平升高尤为显著, 并且 sgRNA hTIM3 T 组细胞  $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$  分泌显著高于 Control T 组细胞 [ $(25.4 \pm 4.6)\%$  vs  $(7.8 \pm 3.1)\%$ ,  $t=-5.1, P<0.01$ ;  $(33.0 \pm 3.7)\%$  vs  $(19.0 \pm 1.5)\%$ ,  $t=-3.8, P<0.05$ ; 图 4A], 提示 TIM3 基因敲除有助于 T 淋巴细胞活化并产生更强的细胞免疫应答水平。CFSE/PI 体外杀伤结果显示, Control T 细胞对 AGS-EBV 细胞杀伤能力较弱, 但 sgRNA hTIM3 T 细胞由于敲除了一定比例的免疫检查点 TIM3 分子, 导致杀伤肿瘤细胞的能力显著增强(图 4B), 其中在 5:1、10:1、40:1 效靶比的情况下, sgRNA hTIM3 T 细胞对 AGS-EBV 细胞的杀伤能力较 Control T 细胞显著提高 ( $t=-8.6, -8.8, -7.2, 均 P<0.01$ ); 而在效靶比为 20:1

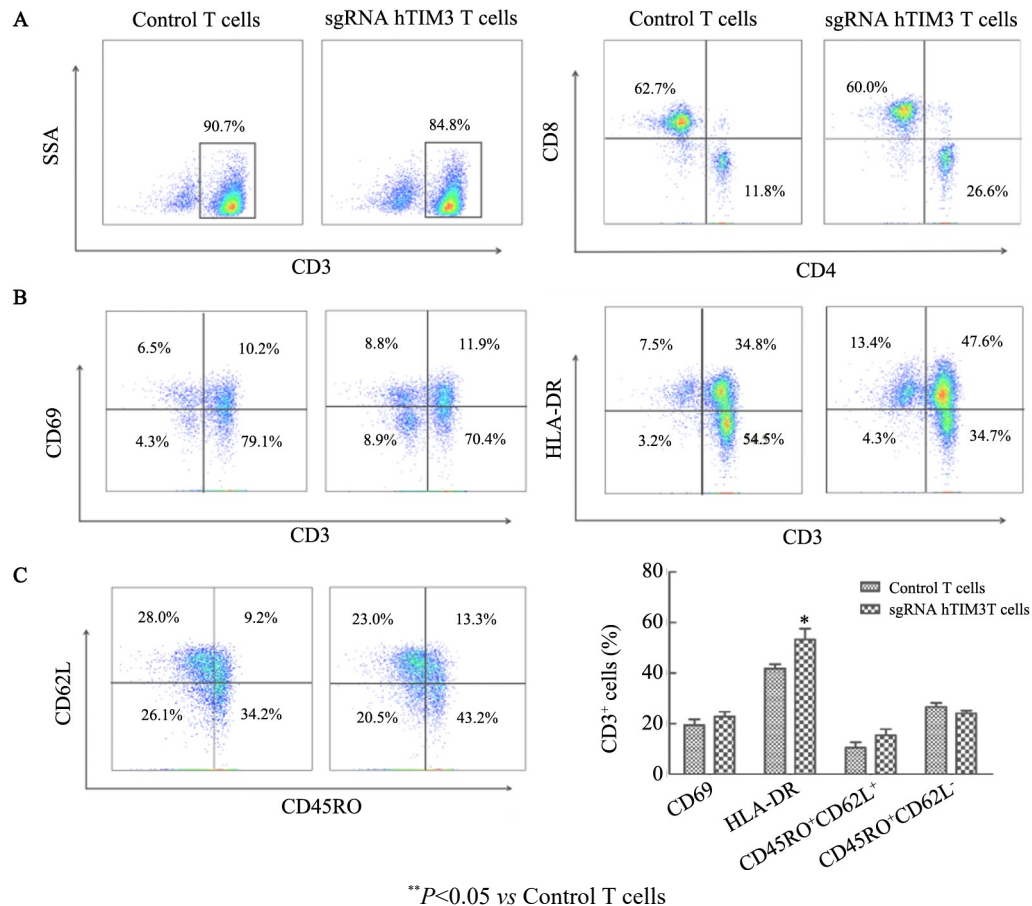
时, sgRNA hTIM3 T 细胞也显示出较好的体外杀伤优势 ( $t=-2.8, P<0.05$ )。上述实验结果证实, TIM3 基因上调可以诱导 T 细胞功能耗竭, 使其抗肿瘤能力大大减弱, 而 sgRNA hTIM3 T 细胞可以逆转对其耐受, 从而提高杀伤肿瘤细胞的能力。

## 3 讨论

免疫检查点疗法作为一项极具发展前景的治疗策略日益崭露头角, 常见的免疫检查点单抗 PD-1、CTLA-4 等单克隆抗体已被美国 FDA 批准用于临床恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌、霍奇金淋巴瘤、头颈部肿瘤、肾癌以及尿路上皮瘤等的治疗<sup>[13]</sup>。然而实体瘤中单用免疫检查点抑制剂的客观有效率仍然较低, 且包括结肠癌在内的一些肿瘤类型对于 PD-1、CTLA-4 阻断治疗并不敏感<sup>[14-16]</sup>。这种免疫耐受现象可能与异常的干扰素信号通路及其免疫检查点上调相关<sup>[15, 17]</sup>, 其中包括免疫检查点 TIM3 基因的过表达及其配体 Gal-9 通路的异常活化<sup>[18]</sup>。TIM3 基因上调

诱导免疫抑制的机制如下:抑制CD4<sup>+</sup>T细胞亚群Th1和Th17细胞的增殖<sup>[19]</sup>,诱导CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭或凋亡<sup>[20-21]</sup>,促进Treg和MDSC大量扩增<sup>[22]</sup>,阻碍DC活化及分化<sup>[23]</sup>。总之,TIM3分子作为共抑制受体负调控

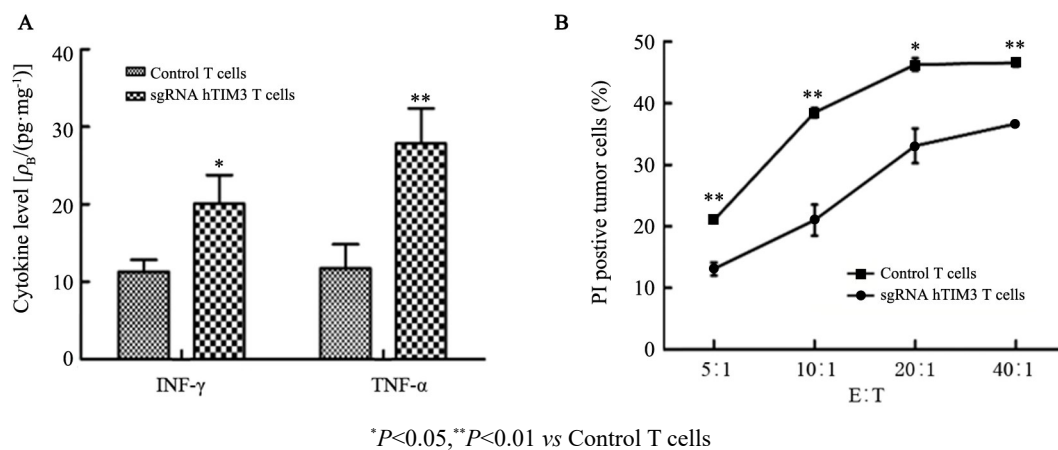
机体的抗肿瘤免疫,阻断TIM3信号或联合处理其他协同刺激信号可有效抑制肿瘤生长。因此,靶向TIM3分子可作为肿瘤免疫检查点治疗的有效途径之一。



A: Comparison of CD3, CD4 and CD8 subpopulation of the lymphocytes after TIM3 gene knockout; B: Comparison of activated molecules on cell surface after TIM3 gene knockout; C: Comparison of effector memory T cells after TIM3 gene knockout

图3 TIM3基因敲除后淋巴细胞免疫表型比较

Fig.3 Comparison of immunophenotypes on lymphocytes after TIM3 gene knockout



A: Cytokine secretion in control T cells and sgRNA hTIM3 T cells detected by flow cytometry; B: Cytotoxicity of control T cells and sgRNA hTIM3 T cells at effector target ratio of 5:1, 10:1, 20:1 and 40:1 examined by CFSE/PI double staining

图4 TIM3基因敲除后淋巴细胞细胞因子分泌及肿瘤杀伤能力比较

Fig.4 Comparison of cytokine secretion and anti-tumor efficacy of T lymphocytes after TIM3 gene knockout

由于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有操作简便、成功率高、无基因及物种限制等优点, 研究者们将 CRISPR 系统创造性地应用于肿瘤研究中, 应用该技术可实现在 DNA 水平单基因或多基因敲除的目的<sup>[24]</sup>。而通过基因编辑技术敲除表达于 T 细胞上的免疫检查点分子从而逆转免疫耐受, 是抑制肿瘤很好的策略<sup>[25-26]</sup>。鉴此, 本研究团队设法通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建人外周血 TIM3 基因敲除的 T 淋巴细胞, 并通过一系列体外实验探究敲除 TIM3 基因后的 T 细胞免疫功能变化及其抗肿瘤功效。结果证实采用电转染法能够有效将 hTIM3 sgRNA/Cas9 双质粒敲除体系转入人外周血 T 淋巴细胞, 经流式细胞术检测转染效率平均达到 (41.5±3.6)%, 基因敲除效率波动在 40.0%~50.0% (均  $P<0.01$ ); 经电转质粒后的 T 淋巴细胞在体外抗原提呈细胞的持续刺激活化下, 能够保持较好的增殖活性, 数量较培养前扩增 40~50 倍, 并且能够保持 TIM3 基因表达水平下调而不影响主要免疫表型的组成。

前期本课题组围绕 EBV 阳性胃癌集中研究发现, EBVaGC 肿瘤组织中的基因表达热图显示, 肿瘤坏死因子超家族-14 (tumor necrosis factor ligand superfamily member 14, TNFSF14)、吡啶胺 2, 3 双加氧酶 1 和 2 (enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase-1/2, IDO1/IDO2)、HAVCR2 (TIM3)、CTLA-4、T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白 (T cell immunoglobulin and ITIM domain, TIGIT)、CD80 (CTLA-4 配体) 以及 PD-1 这 8 个免疫检查点基因的表达明显较高, 而这种免疫耐受环境的形成制约了抗原特异性 CTL 对 EBVaGC 细胞的杀伤能力<sup>[27]</sup>。而 HAVCR2 (TIM3) 的上调抑制机体的抗肿瘤免疫, 并且有文献<sup>[28-30]</sup>报道该基因过表达与胃癌患者的疗效及预后呈负相关。故本研究使用易引起 TIM3 基因上调的人 EBV 阳性胃癌 AGS-EBV 细胞作为靶细胞, 用 EBV-LMP2-A11-340 抗原体外诱导人 EBV 特异性 CTL 作为效应细胞, 以不同的效靶比 (5:1、10:1、20:1、40:1) 对 TIM3 基因敲除后的 T 淋巴细胞进行体外抗肿瘤功能研究, 验证是否对人外周血 T 淋巴细胞 TIM3 基因敲除有助于逆转免疫耐受, 从而提高抗原特异性 CTL 对 AGS-EBV 细胞的杀伤能力。结果发现, 经抗原活化后的 TIM3 基因敲除组 CD8<sup>+</sup>T 细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  的水平显著增高, 体外杀伤肿瘤细胞的能力也较对照组明显增强 (均  $P<0.05$ ), 提示人外周血 TIM3 基因敲除的 T 淋巴细胞具有更强的免疫应答水平以及抗肿瘤作用。然而本研究尚有一定局限性, 仅围绕 EBV 阳性胃癌这一模型进行了体外验证, 未来可以选用不同肿瘤细胞系逐一进行功能验证, 并进一步将人外周

血 TIM3 基因敲除的 T 淋巴细胞运用于动物模型评估抗肿瘤功效。CRISPR-Cas9 体系介导的人外周血 T 淋巴细胞 TIM3 基因敲除的体外功能实验证实了 TIM3 分子作为肿瘤免疫治疗靶点的可行性, 同时也为基因工程化细胞免疫治疗提供了新的思路。

(致谢: 特别感谢黄行许教授和徐琳琳博士为本研究提供 pGL3-U6-hTIM3-sgRNA、pST1374-Cas9-ZF-NLS-GFP 质粒等技术支持及为本研究中做出的贡献)

## [参考文献]

- [1] SHARPE A H. Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy[J/OL]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 5-8[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5362112/>. DOI: 10.1111/imr.12531.
- [2] MAHONEY K M, RENNERT P D, FREEMAN G J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(8): 561-584. DOI:10.1038/nrd4591.
- [3] POSTOW M A, CALLAHAN M K, WOLCHOK J D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(17): 1974-1982. DOI:10.1200/JCO.2014.59.4358.
- [4] YANG R, HUNG M C. The role of T-cell immunoglobulin mucin-3 and its ligand galectin-9 in antitumor immunity and cancer immunotherapy[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(10): 1058-1064. DOI: 10.1007/s11427-017-9176-7.
- [5] DAS M, ZHU C, KUCHROO V K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity[J/OL]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 97-111[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5512889/>. DOI: 10.1111/imr.12520.
- [6] DEKRUYFF R H, BU X, BALLESTEROS A, et al. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells[J/OL]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1918-1930[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128800/>. DOI: 10.4049/jimmunol.0903059.
- [7] ZHOU Q, MUNGER M E, VEENSTRA R G, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia[J/OL]. *Blood*, 2011, 117(17): 4501-4510[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3099570/>. DOI: 10.1182/blood-2010-10-310425.
- [8] LI Z, LIU X B, GUO R B, et al. TIM-3 plays a more important role than PD-1 in the functional impairments of cytotoxic T cells of malignant Schwannomas[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317698352. DOI: 10.1177/1010428317698352.
- [9] LI J, SHAYAN G, AVERY L, et al. Tumor-infiltrating Tim-3<sup>+</sup> T cells proliferate avidly except when PD-1 is co-expressed: evidence for intracellular cross talk[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(10): e1200778[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087305/>. DOI:10.1080/2162402X.2016.1200778.
- [10] SHAYAN G, SRIVASTAVA R, LI J, et al. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6

- (1):e1261779[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5283618/>. DOI:10.1080/2162402X.2016.1261779.
- [11] SU S, ZOU Z, CHEN F, et al. CRISPR-Cas9-mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(1): e1249558 [2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28197365/>. DOI:10.1080/2162402X.2016.1249558.
- [12] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20070[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730182/>. DOI:10.1038/srep20070.
- [13] LONG G V, ATKINSON V, LO S, et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5): 672-681. DOI:10.1016/S1470-2045(18)30139-6.
- [14] LARKIN J, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma[J / OL]. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 23-34[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698905/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030.
- [15] PITT J M, VÉTIZOU M, DAILLÈRE R, et al. Resistance mechanisms to immune-checkpoint blockade in cancer: tumor-intrinsic and-extrinsic factors[J]. *Immunity*, 2016, 44(6): 1255-1269. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.06.001.
- [16] SHARMA P, HU-LIESKOVAN S, WARGO J A, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy[J/OL]. *Cell*, 2017, 168(4): 707-723[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5391692/>. DOI:10.1016/j.cell.2017.01.017.
- [17] MINN A J, WHERRY E J. Combination cancer therapies with immune checkpoint blockade: convergence on interferon signaling[J]. *Cell*, 2016, 165(2): 272-275. DOI:10.1016/j.cell.2016.03.031.
- [18] YANG R, HUNG M C. The role of T-cell immunoglobulin mucin-3 and its ligand galectin-9 in antitumor immunity and cancer immunotherapy[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(10): 1058-1064. DOI: 10.1007/s11427-017-9176-7.
- [19] GE R T, ZENG L, MO L H, et al. Interaction of TIM4 and TIM3 induces T helper 1 cell apoptosis[J]. *Immunol Res*, 2016, 64(2): 470-475. DOI:CNKI:SUN:JCXG.0.2017-10-002.
- [20] SAKUISHI K, APETO L, SULLIVAN J M, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2187-2194. DOI: 10.1084/jem.20100643.
- [21] ZHOU Q, MUNGER M E, VEENSTRA R G, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8 T cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia[J]. *Blood*, 2011, 117(17): 4501-4510. DOI:10.1182/blood-2010-10-310425.
- [22] GUO Z, CHENG D, XIA Z, et al. Combined TIM3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer[J/OL]. *J Transl Med*, 2013, 11: 215[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853027/>. DOI:10.1186/1479-5876-11-215.
- [23] CHIBA S, BAGHDADI M, AKIBA H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1[J/OL]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9): 832-842[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622453/>. DOI:10.1038/ni.2376.
- [24] 谢一方, 王永明. 基因编辑技术的原理及其在癌症研究中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(8): 815-827. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.001.
- [25] LLOYD A, VICKERY O N, LAUGEL B. Beyond the antigen receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies[J/OL]. *Front Immunol*, 2013, 4: 221[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733021/>. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00221.
- [26] 刘宝瑞. 实体肿瘤免疫治疗的关键问题与对策[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 575-580. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.001.
- [27] 苏舒, 邹征云, 杜娟, 等. EBV阳性胃癌免疫卡控点干预治疗意义及抗肿瘤作用研究[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2018, (2)[2018-11-28]. <http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-ZLZD201802018.htm>. DOI:10.3969/j.issn.2095-5324.2018.02.014.
- [28] LIU J F, WU L, YANG L L, et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 44. DOI: 10.1186/s13046-018-0713-7.
- [29] JIE H B, SRIVASTAVA R M, ARGIRIS A, et al. Increased PD-1+ and TIM-3+ TILs during cetuximab Immunol Res, 2017, 5(5): 408-416[2018-11-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5497750/>.
- [30] WANG Y, ZHAO E, ZHANG Z, et al. Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2115-2126. DOI:10.3892/or.2018.6627.

[收稿日期] 2019-01-30

[修回日期] 2019-03-10

[本文编辑] 党瑞山