

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.007

· 基础研究 ·

应用 CRISPR/Cas9 系统敲除 PD-1 基因对人 T 淋巴细胞增殖及分泌 IFN- γ 的影响

龚福生, 许扬梅, 刘施佳, 黄丽洁, 郑秋红(福建省肿瘤医院 福建医科大学附属肿瘤医院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨应用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统敲除 PD-1 基因对人 T 细胞增殖及分泌 IFN- γ 的影响。**方法:** 设计靶向 PD-1 基因的 sgRNA 序列, 应用 T7 RNA 聚合酶体外分别合成 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA。利用核转染技术将 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物转入激活的人 T 淋巴细胞, 测序确认基因敲除的效率。应用流式细胞术分析基因敲除后 T 淋巴细胞表型和 PD-1 的表达情况, 锥虫蓝活细胞计数法检测 T 细胞增殖活力, ELISA 检测 T 细胞分泌 IFN- γ 情况。**结果:** 体外成功合成 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA。将 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 核转染 T 淋巴细胞, 测序证实 PD-1 基因序列编辑效率为 58.3%。CRISPR/Cas9 系统成功下调 T 淋巴细胞表面 PD-1 分子的表达水平[(9.6 \pm 1.85)% vs (16.2 \pm 2.05)%, $P < 0.05$], PD-1 基因敲除不影响 T 细胞的增殖活力和细胞表型($P > 0.05$); 但 PD-1-sgRNA 组的效应 T 细胞分泌 IFN- γ 水平显著升高($P < 0.01$)。**结论:** CRISPR/Cas9 基因编辑系统成功敲除人 T 淋巴细胞 PD-1 基因, 降低 PD-1 分子表达可阻断 PD-1 / PD-L1 负性调控从而增强 T 细胞的免疫活性, 且促进效应 T 细胞分泌 IFN- γ 。

[关键词] CRISPR/Cas9 系统; T 淋巴细胞; 核转染; PD-1; 基因敲除; IFN- γ

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)06-0656-06

Effect of PD-1 knockout by CRISPR/Cas9 system on proliferation and IFN- γ secretion in human T lymphocytes

GONG Fusheng, XU Yangmei, LIU Shijia, HUANG Lijie, ZHENG QiuHong (Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Fujian Cancer Hospital & Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of PD-1 gene knockout by CRISPR/Cas9 system on the proliferation and IFN- γ secretion in human T cells. **Methods:** The sequence of sgRNA targeting PD-1 was designed. The PD-1-sgRNA and Cas9 mRNA were synthesized by T7 RNA polymerase *in vitro*, and then the mixture of PD-1-sgRNA and Cas9 mRNA was delivered into activated T cells by nucleofection. The efficiency of gene knockout was confirmed by sequencing. The phenotypes of T lymphocytes and the expression of PD-1 after gene knockout were analyzed by Flow cytometry. The proliferation of T lymphocytes was calculated by trypan blue counting. The level of IFN- γ secreted by T lymphocytes was detected by ELISA. **Results:** PD-1-sgRNA and Cas9 mRNA were successfully synthesized *in vitro* and delivered into T cells by nucleofection. Sequencing technology confirmed that the PD-1 gene sequence was edited and the editing efficiency was 58.3%. The expression of PD-1 on T lymphocyte surface was down-regulated successfully by CRISPR/Cas9 system [(9.6 \pm 1.85)% vs (16.2 \pm 2.05)%, $P < 0.05$]. The knockout of PD-1 gene did not affect the proliferation and phenotype of T lymphocytes($P < 0.05$); However, compared with the control group, the level of IFN- γ secreted by T lymphocytes in the PD-1-sgRNA group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** CRISPR/Cas9 system can successfully ablate PD-1 gene in human T lymphocytes, which could block the negative regulation of PD-1 / PD-L1 and further promote the IFN- γ secretion in T cells.

[Key words] CRISPR/Cas9 system; T lymphocyte; nuclear transfection; PD-1; gene knockout; IFN- γ

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(6): 656-661. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.007]

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. 2017J01264); 福建省科技计划资助项目(No.2018Y2003)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2017J01264), and the Science and Technology Program of Fujian Province (No.2018Y2003)

[作者简介] 龚福生(1974-), 男, 硕士, 副主任技师, 主要从事肿瘤免疫学治疗的研究, E-mail: 290923677@qq.com

[通信作者] 郑秋红(ZHENG QiuHong, corresponding author), 学士, 教授、主任医师, 研究生导师, 主要从事肿瘤的细胞免疫学研究, E-mail: zqh2858@foxmail.com

免疫治疗在肿瘤综合治疗中占有重要的地位, 使用肿瘤特异性 T 细胞的过继性细胞免疫疗法 (adoptive cell immunotherapy, ACI) 是治疗恶性肿瘤的重要策略之一。然而, 有证据^[1]表明, 肿瘤反应性 T 细胞可以通过受体传递负性调控信号, 如细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、程序性死亡受体-1 (programmed cell death protein-1, PD-1) 及其同源配体, 抑制 T 细胞的免疫活性, 是肿瘤免疫逃逸的重要原因之一。CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌的一种免疫防御系统, 该系统是以细菌降解入侵病毒 DNA 的免疫机制为基础开发出来的一种新型基因编辑技术^[2]。相较于传统的基因编辑技术, CRISPR/Cas9 具有设计简便、操作简单、编辑效率高等优点, 近年来成为基因编辑的主要工具之一, 已经被广泛应用于疾病的诊断和治疗研究^[3-5]。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除人 T 细胞中 PD-1 基因, 降低 PD-1 分子的表达以阻断 PD-1/PD-L1 负性调控, 从而增强 T 细胞的免疫活性, 为 T 细胞过继免疫治疗的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

CRISPR/Cas9 质粒 pCAG-T7 购自北京唯尚立德公司, EnGen sgRNA Synthesis Kit、HiScribe T7 ARCA mRNA Kit 和 T7 核酸内切酶 I 购自 NEB 公司, P3 Primary Cell、4D-Nucleofector X Unit 试剂盒购自 Lonza 公司, IFN- γ ELISA Kit 购自武汉博士德公司, PD-1-FITC 抗体购自 eBioscience 公司, CD3 单抗购自 Biogems 公司, rhGM-CSF、rhIL-4、IFN- γ 及 TNF- α 均购自 Peprotech 公司, GT-T551 H3 培养基购自北京宝日医生物技术有限公司。核转染仪购自广州基因有限公司, 流式细胞仪及其 T 细胞表型所用的抗体均购自 Beckman Coulter 公司。

1.2 靶向 PD-1 基因 sgRNA 的设计与体外合成

靶向 PD-1 基因的 sgRNA 的设计, 根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则, 首先应用在线工具 (<http://crispr.mit.edu>) 筛选出特异性强的 sgRNA (靶点序列: GTC TGGGCGGTGCTACAAC)。根据 sgRNA 合成试剂盒说明设计合成靶向特异性寡聚核苷酸链 (F: 5'-TTCTAATACGACTCACTATAGTCTGGGCGGTGTACAACGTGTTTGTAGAGCTAGA-3', R: 5'-AAAAGC ACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAAC GGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGC TCTAAAAC-3'), 退火延伸后用于体外合成 sgRNA。按照 EnGen sgRNA Synthesis Kit 试剂盒说明在体外利用 T7 RNA 聚合酶合成 sgRNA, 纯化的 sgRNA 经

1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定, NanoDrop 2000c 紫外分光光度计检测 sgRNA 的浓度。

1.3 T7 RNA 聚合酶法体外合成 Cas9 mRNA

Cas9 表达质粒 pCAG-T7 经 *Mfe*I 酶切线性化, 回收酶切后的线性化质粒, 经酚氯仿抽提纯化后, 溶于无核酸酶的水中作为合成模板, 利用 HiScribe T7 ARCA mRNA Kit 在体外应用 T7 RNA 聚合酶进行 Cas9 mRNA 的体外合成, 并采用 LiCl 沉淀方法进行 mRNA 纯化, 纯化后的 mRNA 经 1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定, NanoDrop 2000c 分光光度计检测 mRNA 的浓度。

1.4 T 淋巴细胞的激活与培养

抽取新鲜健康人外周全血 10 ml, 肝素抗凝后经淋巴分离液梯度离心, 获取单个核细胞, 用 RPMI 1640 培养液悬浮细胞, 离心洗涤细胞 3 次后, 将细胞接种于培养瓶中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 120 min。收集非贴壁细胞, 移入 25 cm² 培养瓶中, 用 GT-T551 H3 培养基调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/ml, 加入 IFN- γ 1 000 U/ml。第 2 天加入 CD3 抗体 50 ng/ml 和 rhIL-2 1 000 U/ml。每 3 d 补液 1 次 (加入 GT-T551 H3 培养基), 同时补加 rhIL-2 500 U/ml。

在贴壁细胞中加入含 75 ng/ml GM-CSF 和 50 ng/ml rhIL-4 的 GT-T551H3 培养基, 每 3 d 换液 1 次。第 4 天按 50 μ g/ml 加入肿瘤细胞冻融抗原, 第 5 天加入 50 ng/ml TNF- α , 第 7 天将成熟 DC 与 T 淋巴细胞共同培养获得效应 T 细胞。

1.5 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 电转入 T 淋巴细胞

取激活 3 d 后的 T 淋巴细胞 3 × 10⁶ 个, 经培养基清洗后重悬于 100 μ l 的电转缓冲液中, 加入 1 μ g sgRNA 和 2.5 μ g Cas mRNA, 在 P3 Primary Cell 试剂盒中进行电转, 电转程序 EO115, 电转后立即加入 500 μ l 预热的培养基, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 10 min 以上, 然后将细胞悬液转移到 6 孔板中继续培养扩增。激活的 T 淋巴细胞经 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 电转 72 h 后提取细胞基因组总 DNA, 根据设计好的引物进行 PCR 扩增。

1.6 PCR 扩增及 T7EN1 酶切鉴定电转后 T 细胞基因组总 DNA

抽提细胞基因组 DNA, 设计 PD-1 基因上下游引物 (F: CCCTTCCGCTCACCTCCG, R: CCAGCCTGACCCGTCATTCTAC), 对目的片段进行扩增, 预期长度 522 bp。取 100 ng 扩增产物在 NEB Buffer2 中 95 °C 变性、缓慢复性后, 用 T7EN1 37 °C 孵育 30 min, 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离。T7EN1 能够识别不完全配对的双链 DNA 并进行切割, 扩增产物以 T7EN1 酶切鉴定, 如果 CRISPR/Cas9 对靶点造成了突变, 将

能够被该酶识别,并造成双链 DNA 断裂。因此,在琼脂糖凝胶电泳中存在除 PCR 产物带之外的条带,说明退火产物能够被 T7 核酸内切酶识别并切割,表明靶点 DNA 序列可能存在突变。通过 T-A 克隆、测序进一步验证突变的存在以及突变的状态。

1.7 流式细胞术检测 T 淋巴细胞表型及 PD-1 分子的表达

将 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 电转入 T 淋巴细胞(PD-1-sgRNA),分别在电转后的第 5 天和第 10 天取样,流式检测 PD-1 分子的表达情况。在电转后的第 12 天,流式检测 T 淋巴细胞表型。取样后将细胞用 100 μl PBS 重悬,加入 PD-1、CD3、CD4、CD8 抗体各 10 μl,对照管分别加入对应的同型抗体 10 μl,室温避光孵育 30 min 后,分别加入 1 ml PBS 液重悬细胞,400×g 离心 5 min,洗涤 2 次;弃上清液,2% 多聚甲醛 400 μl 重悬细胞,进行流式检测。

1.8 锥虫蓝染色细胞计数法检测 T 淋巴细胞的增殖能力

分别在 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 电转后的第 0、3、6、9、12 天,于倒置显微镜下观察 T 淋巴细胞的生长情况,并取样经锥虫蓝染色后用 Countess 全自动细胞计数器进行细胞计数,并绘制生长曲线,计算各组细胞的扩增倍数。

1.9 ELISA 检测 T 细胞分泌 IFN-γ 情况

应用 IFN-γ ELISA Kit 检测效应 T 细胞培养液中的 IFN-γ 的含量,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

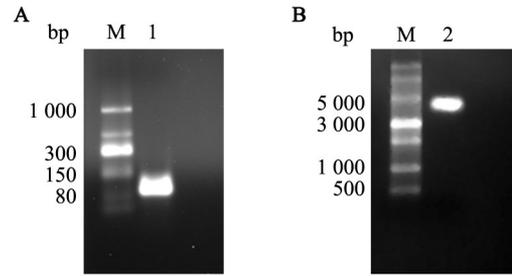
1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较用 *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 体外成功合成 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA

凝胶电泳结果(图 1)显示,PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 合成片段大小分别为 100、4 200 bp,与预期大小相符,表明体外成功合成 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA。

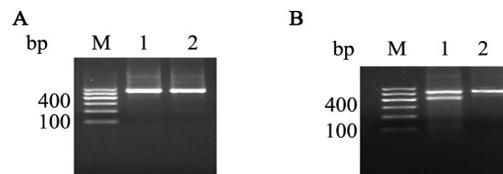


M:ssRNA Ladder; 1:PD-1-sgRNA; 2:Cas9 mRNA

图 1 PD-1-sgRNA(A)和 Cas9 mRNA(B)体外合成后的鉴定
Fig. 1 Identification of PD-1-sgRNA(A) and Cas9 mRNA(B) synthesized *in vitro*

2.2 CRISPR/Cas9 系统能定点突变 PD-1 基因

T7EN1 酶切鉴定结果(图 2)显示,PD-1 基因片段中含有不完全配对的 DNA 双链的突变位点,被 T7 核酸内切酶 I (T7EN1)切割成 2 条小片段,分别为 100 和 422 bp。将 PCR 产物经 TA 克隆并测序,证实 PD-1 基因在靶点位置序列出现编辑情况,编辑效率为 58.3% (图 3)。



M:DNA marker; 1:PD-1-sgRNA T; 2:Control T

图 2 PD-1 基因的 PCR 扩增产物(A)及其 T7EN1 酶切分析(B)
Fig. 2 Polymerase chain amplification product (A) of PD-1 gene and its T7EN1 enzyme digestion analysis (B)

```
GGCGCCCTGGCCAGTCG TCTGGGCGGTGCTACA ACT GGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTT (WT)
GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGC ACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTT (-4, 1/12)
GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACA GGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTT (-16, 3/12)
GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACA CT GGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTT (-1, 1/12)
GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACA GGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTT (-3, 1/12) (-58, 1/12)
GGCGCCCTGGCCAGTCG
```

--:Deletions;+:Insertions;n/n:N/N:Positive colonies out of total sequenced

图 3 PD-1 基因 PCR 产物 T-A 克隆的 DNA 测序结果

Fig. 3 DNA sequencing results of T-A clone of PD-1 gene PCR product

2.3 CRISPR/Cas9 系统成功下调 T 淋巴细胞表面 PD-1 分子的表达水平

流式细胞术检测结果(图 4)显示,PD-1-sgRNA 组 T 淋巴细胞表面 PD-1 分子的表达水平在电转后的

第10天明显下调[(16.2±2.05)% vs (9.6±1.85)%], $P < 0.05$, 表明CRISPR/Cas9系统可抑制PD-1表达。

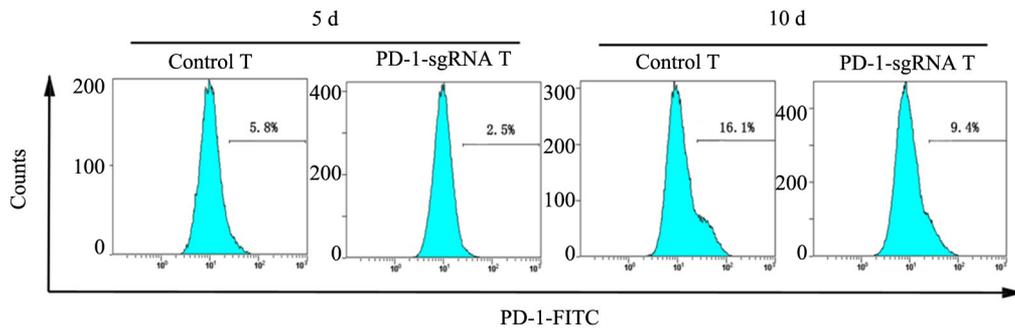


图4 CRISPR/Cas9系统对T淋巴细胞表面PD-1分子表达的影响

Fig. 4 The effect of CRISPR/Cas9 system on the expression of PD-1 on T lymphocyte surface

2.4 T淋巴细胞的增殖能力和表型不受PD-1基因敲除的影响

结果(图5)显示,PD-1基因敲除对PD-1-sgRNA组T淋巴细胞的增殖能力无明显影响($P > 0.05$)。在电转后的第12天,流式细胞术检测结果(图6)显示,PD-1基因敲除后T淋巴细胞表型也无明显影响($P > 0.05$)。表明PD-1基因的敲除不会影响T淋巴细胞的增殖能力和表型。

2.5 PD-1基因敲除后促进T淋巴细胞分泌IFN- γ

ELISA检测结果(图7)显示,与对照组比较,PD-1-sgRNA组的T淋巴细胞培养液上清中IFN- γ 的含量显著升高[(270.2±17.45) vs (387.6±13.61)pg/ml, $P < 0.01$]。表明PD-1基因的敲除能有效促进效应T淋巴细胞分泌IFN- γ 。

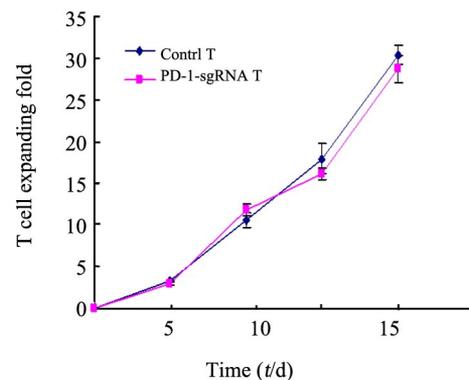


图5 PD-1基因敲除对T淋巴细胞增殖能力的影响

Fig. 5 Effect of PD-1 gene knockout on proliferation of T lymphocytes

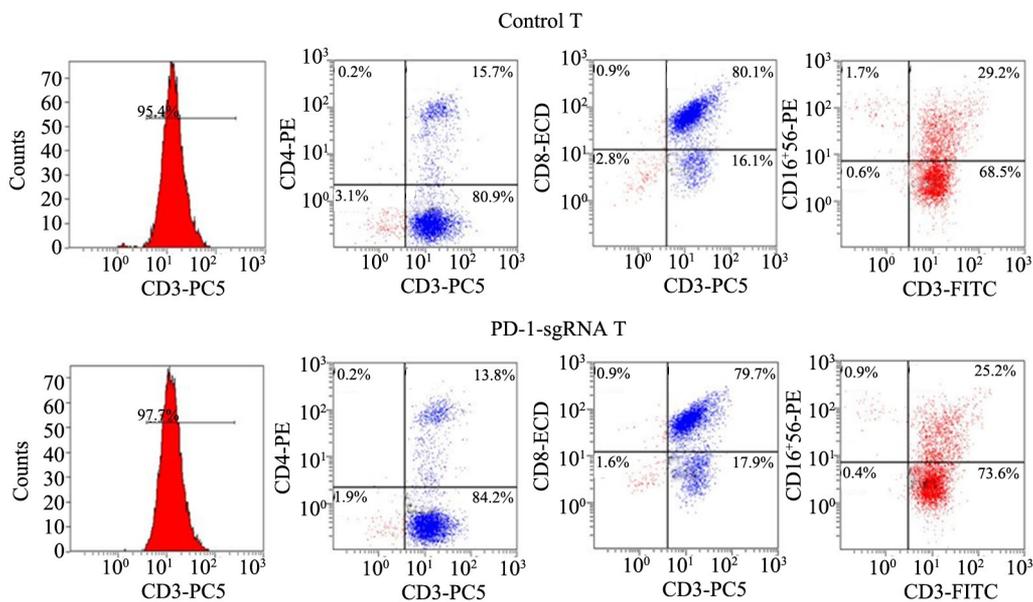
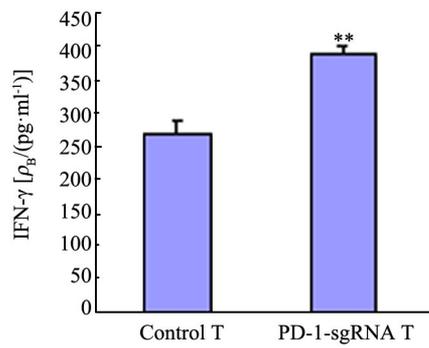


图6 PD-1基因敲除对T淋巴细胞表型的影响

Fig. 6 Effect of PD-1 gene knockout on T lymphocyte phenotype



** $P < 0.01$ vs Control group

图7 PD-1 基因敲除对 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 的影响

Fig. 7 Effect of PD-1 gene knockout on IFN- γ secretion by T lymphocytes

3 讨论

肿瘤的过继性细胞免疫治疗包括肿瘤浸润淋巴细胞和嵌合抗原受体 T 细胞治疗等, 被认为是极有前景的免疫治疗方法之一^[6]。基于 T 细胞的肿瘤免疫治疗的主要策略是提高肿瘤特异性 T 细胞的活化和抑制其负性(免疫检查点)调控作用。经过几十年的发展, 提高肿瘤特异性 T 细胞活化度的策略得到极大的发展, 而针对负性调控的免疫检查点抑制剂近几年才得到重视, 特别是以 PD-1/PD-L1 为主的信号通路抑制剂, 对几种难治性肿瘤显示有显著的抗肿瘤效应^[7]。有研究^[8]表明, 嵌合抗原受体 T 细胞也可获得与 PD-1 表达增加相关的分化和耗竭表型。因此以抑制 T 细胞负性调控的策略是 T 细胞过继免疫疗法的关键。

研究^[9]表明, 使用抗 PD-1 或 PD-L1 抗体阻断 PD-1/PD-L1 免疫抑制信号通路可以显著提高嵌合抗原受体 T 细胞的抗癌效果。但由于要求患者持续、全身用药, 导致治疗费用昂贵, 并且存在破坏免疫耐受而产生毒副作用, 限制其在临床的广泛应用。BORKNER 等^[10]应用逆转录病毒介导的 RNA 干扰来阻断 PD-1 也可达到提高肿瘤特异性 T 细胞功能的目的, 但是存在 RNA 干扰持续时间短、逆转录病毒制备复杂, 且逆转录病毒临床使用的安全性等还没有完全解决。

CRISPR/Cas9 系统的作用机制是借助 sgRNA 序列靶向识别与其碱基互补配对的靶 DNA 序列, 将 Cas9 核酸酶引导至靶位点特异地识别及切割, 在靶点位置产生双链 DNA 断裂, 触发细胞 DNA 修复, 包括非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homology directed repair, HDR) 的方式来进行修复。其中, NHEJ 介导的 DNA 修复将在靶位点产生随机插入或缺失突变。本研究首先设

计一条能特异靶向 PD-1 基因的 sgRNA 序列, 在体外应用 RNA 合成试剂盒合成出 sgRNA, 再与 Cas9 mRNA 一同核转染人原代 T 淋巴细胞, 成功敲除人 T 细胞中 PD-1 基因, 敲除效率约 58.3%, 显著降低 T 细胞表面 PD-1 分子的表达水平。

PD-1 是 B7/CD28 协同刺激分子超家族的重要成员, 主要表达于活化的 T、B 细胞表面, 由 268 个氨基酸组成的穿膜糖蛋白, 其胞质区包含免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM) 和免疫受体酪氨酸转换基序 (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)^[11]。PD-1 与配体 (PD-L1 和 PD-L2) 结合后, 导致 ITIM 和 ITSM 中的酪氨酸残基磷酸化, 募集磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2, 进而引起下游 PI3K 蛋白激酶的去磷酸化, 抑制 mTOR、ERK2 和 AKT 等通路的活化, 最终抑制效应 T 细胞的增殖以及细胞因子 (如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2) 的分泌, 促进抗原特异性 T 细胞凋亡, 负向调控 T 细胞的免疫活性, 在维持机体免疫耐受中发挥至关重要的作用^[12]。本研究利用 DC 具有抗原加工和递呈的功能, 在体外诱导 T 细胞的激活, 使之成为效应 T 细胞, 经 DC 抗原特异性激活的效应 T 细胞可分泌功能性的细胞因子, 如 IL-2 和 IFN- γ 等, 间接调节抗肿瘤作用。迟晓云等^[13]研究发现, PD-L1 作为 PD-1 的主要配体之一, 除了表达于肿瘤细胞外, 也表达于活化的 T 细胞、DC 和巨噬细胞等, 推测活化的淋巴细胞上调表达 PD-L1, 与同时上调表达于活化的 T 淋巴细胞上的 PD-1 结合, 发挥负性调控作用, 以达到内环境稳定。本研究通过 CRISPR/Cas9 介导的 PD-1 基因敲除后活化的 T 细胞被进一步激活, 在 DC 刺激下增殖并产生更高水平的 IFN- γ 。本研究发现原代人 T 淋巴细胞经 PD-1 基因敲除后, 可以显著提高效应 T 细胞分泌 IFN- γ 的水平。

免疫细胞的基因转染一直是免疫学研究的一个难题。针对原代 T 细胞的转染, 目前主要的转染方法有腺病毒载体、逆转录病毒载体及慢病毒载体, 但是出于生物安全的担心, 有必要探索其他非病毒载体转染方法。4D-nucleofector X Unit 核转染技术综合了传统的电穿孔技术及细胞特异性的核转染液, 调整优化转染程序, 直接把外源基因导入细胞的细胞核中, 显著提高细胞的转染效率^[14]。本实验利用 4D-nucleofector X Unit 核转染技术, 成功将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物转染入 T 淋巴细胞, 有效地对 PD-1 基因进行了编辑。

利用 CRISPR-Cas9 系统进行基因编辑时, 通过慢病毒和腺病毒感染对 T 细胞的基因编辑效率较低^[15-16]。而采用质粒 DNA 转染, 对 T 细胞的毒性是其

应用的一大难题^[17]。其次, Cas9 核酸酶活性越长, 如在 DNA 转染过程中, 越有机会产生靶外效应。而使用 cas9 mRNA 或 sgRNA 的最大优点是易降解, 且不在细胞中持续, 从而限制了 Cas9 核酸酶的靶外效应。因此本实验采用 sgRNA 和 Cas9 mRNA 转染方法, 除了可以减少质粒对 T 细胞的毒性外, 还可以降低脱靶率, 这在将来的临床研究时尤其重要。

本研究通过体外合成方法扩增靶向 PD-1 基因的 sgRNA 和 Cas9mRNA。利用核转染技术将 PD-1-sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物转入人 T 淋巴细胞, 成功敲除人 T 淋巴细胞的 PD-1 基因, 增强细胞的免疫应答。这为阻断 PD-1/PD-L1 免疫抑制信号来达到增强效应 T 细胞的抗肿瘤活性提供了一个新的解决途径, 可以有效避免使用阻断抗体所带来的不利因素。其次, 核转染介导的内源性 PD-1 基因破坏不会影响原代 T 淋巴细胞的表型和增殖能力。这种非病毒的原代 T 细胞转染方法在临床应用上具有更加安全和操作简便的优点。

综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除人 T 细胞中 PD-1 基因, 降低 PD-1 分子的表达以阻断 PD-1/PD-L1 负性调控, 从而增强 T 细胞的免疫活性, 为 T 细胞过继免疫治疗的临床应用提供一种更加安全有效的方法。

【参 考 文 献】

- [1] HAMID O, CARVAJAL R D. Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(6): 847-861. DOI: 10.1517/14712598.2013.770836.
- [2] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J/OL]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821[2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6286148/>. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [3] DEVER D P, BAK R O, REINISCH A, et al. CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells[J/OL]. *Nature*, 2016, 539(7629): 384-389[2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5898607/>. DOI: 10.1038/nature20134
- [4] DROST J, VAN JAARSVELD R H, PONSIOEN B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells[J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43-47. DOI: 10.1038/nature14415.
- [5] YANG Y, WANG L L, BELL P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 334-338[2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786489/>. DOI: 10.1038/nbt.3469.
- [6] FORGET M A, MALU S, LIU H, et al. Activation and propagation of tumor-infiltrating lymphocytes on clinical-grade designer artificial antigen-presenting cells for adoptive immunotherapy of melanoma[J/OL]. *J Immunother*, 2014, 37(9): 448-460[2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4199393/>. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000056.
- [7] 易凡, 姜露, 关泉林. PD-1/PD-L1 抑制剂治疗胃癌的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(7): 737-741. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.014.
- [8] 赵玲娣, 韩露, 高全立. CAR-T 细胞肿瘤治疗中若干问题的思考 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(9): 859-864. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.003.
- [9] JOHN L B, DEVAUD C, DUONG C P, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20): 5636-5646. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
- [10] BORKNER L, KAISER A, VAN DE KASTEELE W, et al. RNA interference targeting programmed death receptor-1 improves immune functions of tumor-specific T cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(8): 1173-1183. DOI: 10.1007/s00262-010-0842-0.
- [11] BERGER K N, PU J J. PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD-1 gene [J]. *Gene*, 2018, 638: 20-25. DOI: 10.1016/j.gene.2017.09.050.
- [12] 郭寒菲, 於宇, 崔久嵬. 以 PD-1/PD-L1 为靶点的肺癌免疫治疗临床研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(3): 213-220. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.001.
- [13] 迟晓云, 何贤辉, 查庆兵, 等. 人外周血淋巴细胞及单核细胞表达 PD-L1 和 PD-L2 的动力学研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(5): 873-877. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4718.2006.05.010.
- [14] HULTQUIST J F, HIATT J, SCHUMANN K, et al. CRISPR-Cas9 genome engineering of primary CD4⁺ T cells for the interrogation of HIV-host factor interactions[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(1): 1-27. DOI: 10.1038/s41596-018-0069-7.
- [15] LI C, GUAN X M, DU T, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2381-2393. DOI: 10.1099/vir.0.000139.[PubMed]
- [16] WANG W M, YE C, LIU J J, et al. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115987 [2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4277423/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0115987.
- [17] MANDAL P K, FERREIRA L M, COLLINS R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 643-652[2019-01-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269831/>. DOI: 10.1016/j.stem.2014.10.004.

【收稿日期】 2019-03-06

【修回日期】 2019-05-12

【本文编辑】 王映红