

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.002

· 基础研究 ·

## 以 CRSIPR/Cas9 技术删除 CTLA-4 后 CTL 抗裸鼠结肠癌移植瘤的效果

师龙<sup>1</sup>, 耿耸松<sup>2</sup>, 蔡子琪<sup>2</sup>, 韩锦胜<sup>3</sup>, 赵咫尺<sup>4</sup>, 张伟<sup>5</sup>, 宋鸿涛<sup>6</sup>, 孟桐羽<sup>7</sup>, 蔡建辉<sup>8</sup>(1. 河北医科大学 第二医院 血管外科, 河北 石家庄 050000; 2. 浓孚雨(河北)生物医药股份有限公司, 河北 石家庄 050000; 3. 沧州中西医结合医院 胃肠腹壁疝外科, 河北 沧州 061000; 4. 锦州医科大学附属第三医院 肝胆外科, 辽宁 锦州 121000; 5. 邯郸市中心医院 普外二科, 河北 邯郸 056001; 6. 石家庄市第二医院 周围血管外科, 河北 石家庄 050000; 7. 石家庄市人民医院 妇科, 河北 石家庄 050000; 8. 河北省人民医院 普外科&肿瘤科, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的:** 探讨使用 CRSIPR/Cas9 技术删除 CTL 的免疫检查点 CTLA-4 后 CTL 的抗裸鼠结肠癌移植瘤的效果及其作用机制。**方法:** 针对 CTLA-4 设计特异性小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 并构建 sgRNA/Cas9 质粒, 使用慢病毒载体转染质粒至 CTL 获得删除 CTLA-4 的 CTL (CTLA-4 KO CTL), 并验证质粒的转染效率和 CTLA-4 的删除效率。BALB/c 裸鼠随机分为 2 组进行实验, 预防性注射 CTLA-4 KO CTL (实验组) 及 CTL (对照组), 3 d 后接种结肠癌细胞株 LS174-T, 观察成瘤率及成瘤时间。建立结肠癌移植瘤裸鼠模型, 成瘤后裸鼠随机分为 2 组, 分别给予 CTLA-4 KO CTL (实验组) 及 CTL (对照组) 进行细胞治疗, 观察移植瘤的体积、裸鼠的生存时间, 并检测移植瘤裸鼠血清中 TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  分泌水平。**结果:** 设计 sgRNA 并成功构建以慢病毒为载体的 CRSIPR/Cas9 系统, 使用构建好的 CRSIPR/Cas9 系统转染 CTL 细胞, 转染效率最高可达 (28.80 $\pm$ 0.62)%, 转染后以流式细胞术检测 CTLA-4 的删除效率, CTLA-4 KO CTL 组的 CTLA-4 表达较 CTL 组显著降低 [(0.91 $\pm$ 0.25)% vs (42.70 $\pm$ 2.72)%,  $P < 0.01$ ]。预防实验中, 实验组结肠癌移植瘤发生率明显低于对照组 (33.33% vs 100.00%,  $P < 0.01$ )。治疗实验中, 实验组肿瘤体积较对照组显著减少 [(503.0 $\pm$ 23.9) vs (911.2 $\pm$ 51.4) mm<sup>3</sup>,  $P < 0.05$ ], 实验组裸鼠相较于对照组生存时间明显延长 (中位生存期: 78 vs 42 d,  $P < 0.05$ ), 实验组裸鼠血清 TNF- $\alpha$  [(268.93 $\pm$ 17.04) vs (148.26 $\pm$ 20.07) pg/ml,  $P < 0.05$ ] 及 IFN- $\gamma$  [(315.38 $\pm$ 18.67) vs (202.92 $\pm$ 29.32) pg/ml,  $P < 0.05$ ] 的分泌水平较对照组明显增高。**结论:** 以 CRSIPR/Cas9 技术成功删除 CTL 中免疫检查点 CTLA-4 后可以显著抑制裸鼠结肠癌移植瘤的成瘤率、增强 CTL 对荷结肠癌裸鼠的抗肿瘤作用, 并明显增高荷瘤鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平。

**[关键词]** CRSIPR/Cas9; CTLA-4; CTL; 结肠癌移植瘤; 免疫治疗

**[中图分类号]** R730.51; R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0221-07

## Anti-tumor effect of CTL on colon cancer xenograft in nude mice after blocking-out CTLA-4 with CRSIPR/Cas9 technology

SHI Long<sup>1</sup>, GENG Songsong<sup>2</sup>, CAI Ziqi<sup>2</sup>, HAN Jinsheng<sup>3</sup>, ZHAO Zhilong<sup>4</sup>, ZHANG Wei<sup>5</sup>, SONG Hongtao<sup>6</sup>, MENG Tongyu<sup>7</sup>, CAI Jianhui<sup>8</sup> (1. Department of Vascular Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Non-gfuyu (Hebei) Biomedical Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 3. Department of Gastroenteroabdominal Hernia, Cangzhou Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, Hebei, China; 4. Department of Hepatobiliary Surgery, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China; 5. The Second Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei, China; 6. Department of Peripheral Vascular Disease, the Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 7. Department of Gynecology, Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 8. General Surgery & Oncology Department, the Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of CTL cells on colon cancer xenograft in nude mice after knocking out the immune check point CTLA-4 by CRISPR/Cas9 technology. **Methods:** A specific small guide RNA (sgRNA) for CTLA-4 was designed

**[基金项目]** 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目 (No.20180375)。Project supported by the Key Medical Science Research of Hebei Province (No.20180375)

**[作者简介]** 师龙 (1985-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫治疗及血管外科基础研究及临床工作, E-mail: longshi1232009@163.com

**[通信作者]** 蔡建辉 (CAI Jianhui, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤外科及生物治疗的研究, E-mail: jianhuicai2001@163.com

to construct sgRNA/Cas9 plasmid, which was then transfected into CTL using a lentiviral vector to obtain CTL cells with CTLA-4 deletion (CTLA-4 KO CTL). The transfection efficiency of the plasmid and the deletion efficiency of CTLA-4 were verified. BALB/c nude mice were randomly divided into two groups to prophylactically inoculate CTLA-4 KO CTL (experimental group) or CTL (control group); 3 days later, the animals of two groups were inoculated with colon cancer cell line LS174-T to observe the tumor formation rate and tumor formation time. After constructing colon cancer xenograft model in nude mice, the animals were randomly divided into two groups, respectively treated with CTLA-4 KO CTL (experimental group) and CTL (control group) cells to observe the tumor growth volume and survival time of mice. The serum levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in nude mice were detected. Results: sgRNA was designed and CRISPR/Cas9 system with lentivirus as vector was successfully constructed. CTL cells were transfected with the established CRISPR/Cas9 system, and the highest transfection efficiency was up to (28.80 $\pm$ 0.62)%. After transfection, the deletion efficiency of CTLA-4 was detected by Flow cytometry. The CTLA-4 expression of CTLA-4 KO CTL group was significantly lower than that of CTL group [(0.91 $\pm$ 0.25)% vs (42.70 $\pm$ 2.72)%,  $P$ <0.05]. In prophylactic assay, the formation rate of colon cancer xenografts in the experimental group was significantly lower than that in the control group (33.33% vs 100%,  $P$ <0.05). In treatment assay, the tumor volume in the experimental group was significantly inhibited compared with the control group ([503 $\pm$ 23.9] vs [911.2 $\pm$ 51.4] mm<sup>3</sup>,  $P$ <0.05), and the survival time of the experimental group was significantly prolonged (median survival time: 78 d vs 42 d,  $P$ <0.05); Moreover, the secretion levels of serum TNF- $\alpha$  ([268.93 $\pm$ 17.04] pg/ml vs [148.26 $\pm$ 20.07] pg/ml,  $P$ <0.05) and IFN- $\gamma$  (315.38 $\pm$ 18.67 pg/ml vs 202.92 $\pm$ 29.32 pg/ml,  $P$ <0.05) in the experimental group were significantly higher than those in the control group. **Conclusions:** The lentiviral vector CRISPR/Cas9 system is an effective gene editing method; its successful deletion of CTLA-4 in CTL cells can significantly inhibit the tumor formation rate of colon cancer xenografts in nude mice and enhance the anti-tumor effect of CTL on colon cancer xenografts.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; CTLA-4; CTL; colon cancer; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(3): 221-227. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.002]

近年来,随着中国居民饮食结构、生活方式的改变以及日益严重的食品安全和卫生问题,人群中罹患结肠癌的发病率及病死率都在逐步上升。结肠癌现阶段治疗手段仍以手术为主、放化疗为辅,但约有1/4结肠癌患者在诊断时已有转移,5年生生存率不足10%,绝大多数结肠癌患者在术后2年内复发<sup>[1]</sup>。随着基础实验的创新与提高,免疫治疗手段被誉为最有可能治愈肿瘤的途径。在肿瘤免疫微环境干扰的基础上联合细胞免疫治疗,可增强细胞免疫治疗的疗效,缓解患者病情,提高患者无进展生存期和总生存期。近年来,对免疫检查点的研究成为肿瘤免疫抑制微环境的热点,其中以程序性死亡受体-1(programmed cell death protein 1, PD-1)和细胞毒T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)的研究最为广泛和深入。CTLA-4主要在活化的T细胞和调节性T细胞中表达。CTLA-4与T细胞表面分子CD28同源并与CD28竞争结合B7配体。与为T细胞活化提供共刺激信号的CD28不同,CTLA-4通过与B7配体相互作用而对T细胞产生抑制性信号。由CD28和CTLA-4介导的共刺激和共抑制信号可调节T细胞介导的免疫应答<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>发现,应用CTLA-4抗体阻断CTLA-4途径后可促进CD8<sup>+</sup>T细胞增殖和细胞因子的分泌并抑制肿瘤生长。本研究旨在使用CRISPR/Cas9系统从CTL细胞中删除免疫检查点CTLA-4,观察其对裸鼠结肠癌移植瘤的影响,期望通过该方法增强CTL的肿瘤杀伤效率,为以后的临床前应用提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

采用BALB/c裸鼠,雌性,4~6周龄,体质量16~20g,购买于北京维通利华实验动物有限公司[许可证编号:SYXK(京)2017-0022]。结肠腺癌细胞株LS174-T由河北医科大学第二医院提供。GM-CSF购自华北制药,RPMI 1640培养基、DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司,CRISPR/Cas9空质粒、stb13细胞购于美国BioVector公司,GenElute™DNA提取试剂盒、GenElute™HP质粒中量制备试剂盒购自于美国SIGMA公司,HEK-293T cells购于美国GenHunter公司,pCL-VSVG、psPAX2购于美国Addgene公司,T7E1酶及缓冲液购自于NEB公司,CTLA-4-PE购自于美国San Diego公司,TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 试剂盒购自于美国Abcam公司,健康人外周血滤器取自于河北省血液中心。

### 1.2 构建表达靶基因的Cas9质粒并合成慢病毒载体

设计靶基因及识别靶基因的sgRNA并构建表达靶基因的Cas9质粒,合成慢病毒载体。应用<http://crispr.mit.edu/>网站,在线设计靶向CTLA-4基因的sgRNA,筛选特异性强的3条sgRNA链,引物序列CTLA4-sgRNA1: F, 5'-CACCGCCTTGGATTCAGCGGCACA-3'; R, 5'-AAACTGTGCCGCTGAAAT CCAAGGC-3'。CTLA4-sgRNA2: F, 5'-CACCGCCGGGTGACAGTGCTTCGGC-3'; R, 5'-AAACGCCGAAGCACTGTCACCCGGC-3'。CTLA4-sgRNA3: F, 5'-CACCGGTGCGGCAACCTA-CATGATG-3'; R, 5'-AAACCATCATGTAGGTTGCC-

GCACC-3'。用 ddH<sub>2</sub>O 溶解各 oligo (sgRNA) 并配制磷酸化体系。将以磷酸化退火的 oligo 用 EB 稀释 200 倍。按如下配置连接反应体系: 50 ng BsmBI digested, Cas9/sgRNA, 1 μl 稀释的 oligo, 5 μl 2×Quick DNA ligase (DNA 连接酶) Buffer, 10 μl ddH<sub>2</sub>O, 1 μl Quick DNA ligase; 并在室温连接 10 min。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞并挑选阳性克隆, 按 GenElute™ HP 质粒中量制备试剂盒说明书抽提质粒, 并行质粒凝胶电泳。7×10<sup>5</sup> 个 HEK-293T 细胞铺板, 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养过夜; 第 2 天配置如下转染体系: 1 μg sgRNA/Cas9 质粒, 750 ng psPAX2、250 ng pCL-VSVG, 20 μl 无血清培养基。转染 24 h 后, 移出培养基并更换为 RPMI 1640 完全培养基; 48 h 后收集含有慢病毒的上清液。

### 1.3 培养 CTL 细胞并使用慢病毒载体转染

结肠癌细胞株 LS174-T 培养于 RPMI 1640 培养液中, 于 37 °C 细胞培养箱中放置培养, 隔天换液, 3 d 后传代、保存。外周血取自河北省血液中心的白细胞滤器。1 500×g 离心 5 min, 收集上清, 移入含淋巴细胞分离液 15 ml 的离心管, 2 000×g 离心 15 min, 一次性吸管吸取中间白色细胞层 (单状核细胞)。重复洗涤 3 次后, 加入 1640 培养基。将单个核细胞平均分装到培养瓶中, 37 °C 培养箱中孵育 30~60 min 取出, 移除悬浮细胞和培养液 (用作 CTL 制备), 贴壁细胞即为 DC 细胞。培养至第 3 天时半量换液, 同时负载结肠癌抗原; DC 培养的第 5 天, 按每孔 1~2 ml 加入 rmTNF-α (15 ng/ml); 培养至第 6 天收集 DC。取 175 cm<sup>2</sup> 培养瓶 8 只, 分别加入 RPMI 1640 培养基 20 ml, 将悬浮的 T 细胞移入, 置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。待第 6 天 DC 疫苗回收后, 将上述 CIK 细胞平均分配至 DC 培养瓶中, 共培养于 37 °C 培养箱, DC 和 CIK 细胞比例为 1:20, 培养 3 d 获取 CTL。将 CTL 细胞接种于 6 孔板中, 用显微镜观察确认细胞生长状态良好, 取慢病毒原液, 按慢病毒与 CTL 比例 0:1、1:1、1:2.5、1:5 加入稀释后的慢病毒, 病毒稀释液替代原培养液并加入聚凝胺 (polybrene) 15 μg/ml 混匀, 放于 37 °C 培养箱孵育 24 h。使用流式仪检测转染效率, 之后加 0.75 μg/ml 的嘌呤霉素 (puromycin) 0.75 μg/ml 将没有感染的细胞杀死, 可获得 CTLA-4 KO CTL。为观察比较慢病毒转染对 T 细胞培养、扩增的影响, 分别培养未转染的 T 细胞及转染 T 细胞 12 d, 记录培养第 3、6、9、12 天的细胞数量。

### 1.4 流式细胞术检测 CTL 细胞转染效率及 CTL 细胞中 CTLA-4 的表达水平

感染 24 h 后、未加嘌呤霉素之前, 取部分 CTL 细胞按 0:1、1:1、2.5:1、5:1 病毒转染比例分为 4 组, 收集细胞, 用 0.25% 胰酶消化转染的细胞, 将细胞吹打

形成单个细胞, 调整细胞密度约为 1×10<sup>6</sup>/100 μl, 每支流式管中加入 100 μl 细胞悬液, 按照抗体说明书加入 GFP 抗体 (CRISPR/Cas9 质粒自带 GFP 标签), 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清液, PBS 混悬, 上流式细胞仪分别检测各组的转染效率。将 CTL 细胞分为 CTL 组和 CTLA-4 KO CTL 组。调整细胞密度约为 1×10<sup>6</sup>/100 μl, 每支流式管中加入 100 μl 细胞悬液, 按照抗体说明书加入 CTLA-4-PE 抗体, 按说明书行流式细胞检测; 收集培养 CTLA-4 KO CTL 细胞, 同前过程, Flow Jo 软件分析结果。

### 1.5 T7E1 内切酶检测 sgRNA 活性

取转染后 CTL 细胞, 使用 DNA 提取试剂盒提取其 DNA, 根据 CTLA-4 靶基因设计 PCR 引物, 其引物由陕西汉兰生物科技有限公司合成, sgRNA1 (sg1) 鉴定引物序列 CTLA4-F1 F: 5'-CTTCTGTGTGTGCA-CATGTG-3', R: 5'-TCACTTCCAGTCTCATAGAAG-3'; sgRNA2 (sg2) 鉴定引物序列 CTLA4-F2 F: 5'-GC-CATGAAGGAGCATGAGTT-3', R: 5'-TACAGTCAG AATGCTATTAAGG-3'; sgRNA3 (sg3) 鉴定引物序列 CTLA4-F2 F: 5'-GCCATGAAGGAGCATGAGTT-3', R: 5'-TACAGTCAGAATGCTATTAAGG-3'。按以上引物使用 PCR 扩增出 500~600 bp 的 DNA 片段, 扩增反应条件如下: 95 °C 2 min, 95 °C 至 85 °C 按 2 °C/s 梯度程序降温, 85 °C 至 25 °C 按 0.1 °C/s 梯度程序降温; 16 °C 保存。PCR 扩增反应体系: 10× NEB #2 缓冲液 2 μl, PCR 产物 10 μl, T7E1 内切酶 0.25 μl 配制; 并 37 °C 孵育 20 min, 然后行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 (对照组为未转染 CTL 的 PCR 产物)。

### 1.6 移植瘤实验观察 CTLA-4 KO CTL 的抗瘤效果

24 只裸鼠按照随机数字表法随机分为 2 组, 每组 12 只。CTL 组裸鼠给予 1×10<sup>7</sup>/0.5 ml CTL 细胞鼠尾静脉注射作为对照组, CTLA-4 KO CTL 组裸鼠给予 1×10<sup>7</sup>/0.5 ml CTLA-4 KO CTL 细胞鼠尾静脉注射作为实验组, 3 d 后将结肠癌 LS174-T 细胞悬液注入到裸鼠右肩背部, 每只注入 0.5 ml, 观察两组裸鼠成瘤率及成瘤时间, 以检测预防效果。

接种肿瘤细胞 10 d 后用游标卡尺测量裸鼠背部移植瘤的长径 (a) 和短径 (b), 按照公式 [体积 (V)=1/2 (a×b<sup>2</sup>)] 计算肿瘤的体积。以肿瘤体积超过 50 mm<sup>3</sup> 判断为建模成功。24 只移植瘤裸鼠随机分 2 组, 每组 12 只, CTL 组裸鼠给予 1×10<sup>7</sup>/0.5 ml CTL 细胞鼠尾静脉注射作为对照组, CTLA-4 KO CTL 组裸鼠给予 1×10<sup>7</sup>/0.5 ml CTLA-4 KO CTL 细胞鼠尾静脉注射作为实验组; 每 5~7 d 测量各组移植瘤的大小, 绘制肿瘤生长曲线; 同时观察 2 组裸鼠的生存时间, 用 Kaplan-Meier 法分析裸鼠总生存期, 以检测治疗效果。

1.7 ELISA 法检测各组裸鼠血清中 TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  的分泌水平

12 只移植瘤裸鼠按照随机数字表法随机分为 2 组, 每组 6 只, CTL 组裸鼠给予  $1 \times 10^7/0.5$  ml CTL 细胞鼠尾静脉注射作为对照组, CTLA-4 KO CTL 组裸鼠给予  $1 \times 10^7/0.5$  ml CTLA-4 KO CTL 细胞鼠尾静脉注射作为实验组。两组移植瘤裸鼠注射细胞后 28 d 分别处死, 摘眼球法同时取外周血 1 ml, 放入 1.5 ml EP 管中,  $5\ 000 \times g$  离心 10 min, 得血清约 300  $\mu$ l。按 ELLSE 试剂盒说明书操作检测 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。

1.8 统计学处理

ELISA、流式细胞术等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行统计数据分析, 用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建携 CRISPR/Cas9 系统的慢病毒载体

设计 sgRNA 与 Cas9 质粒连接, 转化连接产物到感受态细胞, 挑选阳性克隆菌群(图 1A), 经质粒中抽后行凝胶电泳, sgRNA/Cas9 质粒大小为 13 131 bp 左右, 与电泳结果一致(图 1B)。随后将 CRISPR/Cas9 质

粒与慢病毒载体合成, 构建 CRISPR/Cas9 系统慢病毒载体(LentiCRISPR vector2-GFP)的结构见图 2A, 所用慢病毒载体 psPAX2 结构和 pCL-VSVG 见图 2B、C。慢病毒载体转染 CTL 细胞后提取 DNA, 经 PCR 扩增, T7E1 酶内切后行电泳, 显示 3 条 sgRNA 所构建慢病毒载体均可形成突变条带(图 3), 提示 sgRNA 可对目的基因进行有效剪切且活性较好。

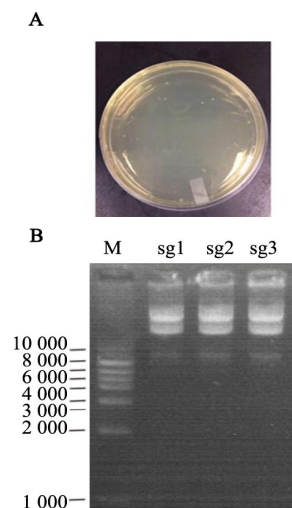


图 1 sgRNA/Cas9 质粒阳性克隆菌群(A)及凝胶电泳(B)  
Fig.1 The positive clone bacteria (A) and gel electrophoresis (B) of sgRNA/Cas9 plasmid

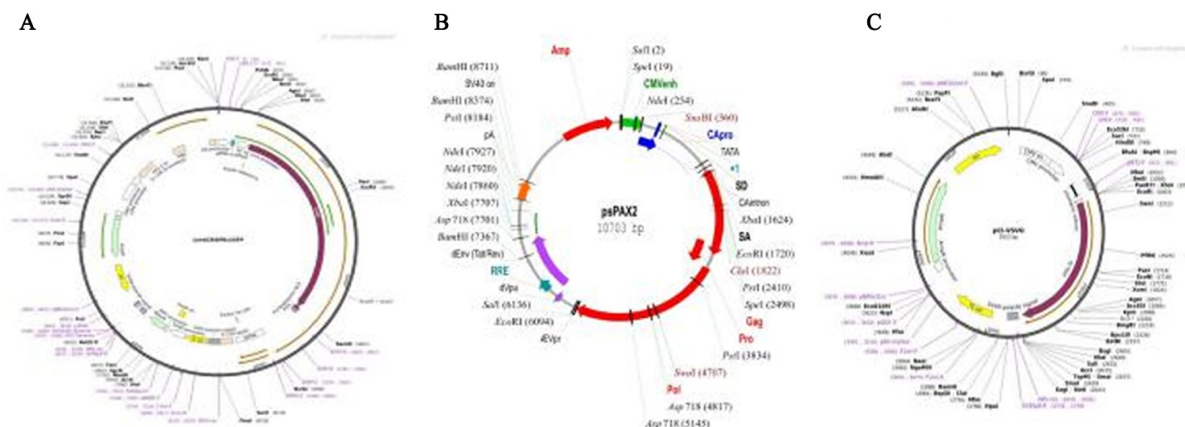


图 2 携 CRISPR/Cas9 系统的慢病毒载体(A)、慢病毒载体 psPAX2(B)和 pCL-VSVG(C)的结构  
Fig.2 The structure of lentiviral vector carrying CRISPR/Cas9 plasmid(A), lentivirus vector psPAX2(B) and pCL-VSVG (C)

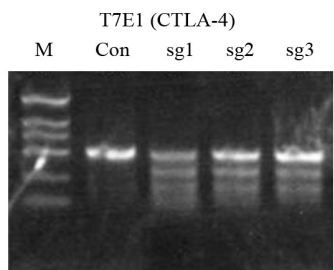


图 3 T7E1 内切酶实验显示 sg1、sg2、sg3 均可形成突变条带  
Fig.3 T7E1 endonuclease assay showed that sg1, sg2 and sg3 could form mutant bands

2.2 不同病毒滴度转染 CTL 细胞的转染效率

按 0:1、1:1、2.5:1、5:1 病毒转染比例分为 4 组, 流式细胞术检测结果(图 4)显示, 5:1 组转染效率明显高于其他各组 [(28.80 $\pm$ 0.62)% vs (1.43 $\pm$ 0.43)%、(15.43 $\pm$ 0.41)%、(15.36 $\pm$ 0.71)%], 均  $P < 0.01$ 。转染成功后, 慢病毒载体的 CRISPR/Cas9 系统所携带 GFP 标签可转染至 CTL 细胞, 在显微镜下呈绿色荧光(图 5), 显示出不同转染比例下的不同转染效率, 其中以 5:1 组转染效率最高。

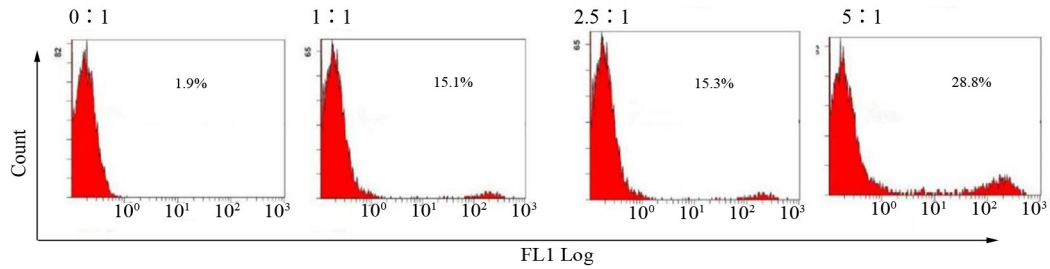


图4 5:1组慢病毒载体转染CTL的效率最高

Fig.4 Lentivirus vector/CTL ratio of 5:1 exerted the highest transfection efficiency

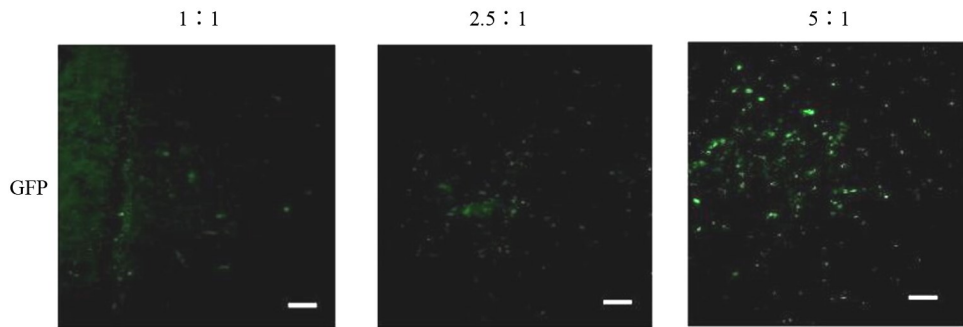
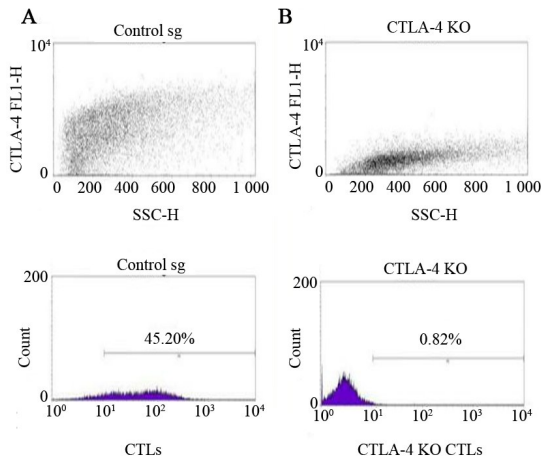


图5 荧光显微镜下转染后的T细胞为绿色荧光(×100)

Fig.5 The T cells after transfection showed green fluorescence under fluorescence-microscope(×100)

2.3 转染后CTL的CTLA-4表达水平明显降低

流式细胞术检测结果(图6)显示,在转染后第10天CTLA-4 KO CTL的CTLA-4表达水平明显低于CTL [(0.91±0.25)% vs (42.70±2.72)%, P<0.01]。



A: CTL group; B: CTLA-4 KO CTL group

图6 CTLA-4 KO CTL细胞的CTLA-4表达水平显著降低 Fig.6 The expression level of CTLA-4 in CTLA-4 KO CTL cells decreased significantly

2.4 CTLA-4 KO CTL细胞具有良好的增殖能力

培养CTLA-4 KO CTL及CTL细胞,于第3、6、9、12天可见CTLA-4 KO CTL的增殖虽受到一定影响,但仍具有良好的增殖能力,CTLA-4 KO CTL细胞数可达(1~3)×10<sup>8</sup>个/瓶,T细胞增殖曲线见图7。

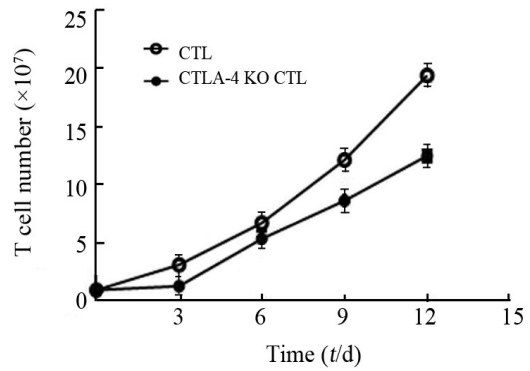


图7 CTL和CTLA-4 KO CTL细胞的增殖生长曲线

Fig.7 The proliferation curves of CTL and CTLA-4 KO CTL cells

2.5 CTLA-4 KO CTL可抑制裸鼠结肠癌移植瘤的发生率和瘤体的生长

预防实验组接种结肠癌细胞后20 d内仅有4只形成移植瘤,其发生率为33.33%。对照组第11天即有1只裸鼠形成移植瘤,于18 d全部裸鼠形成移植瘤,其移植瘤发生率为100%。

治疗实验组35 d后与CTL组相比,CTLA-4 KO CTL组处理的移植瘤裸鼠肿瘤生长被显著抑制 [(503±23.9) vs (911.2±51.4) mm<sup>3</sup>, P<0.05] (图8A)。使用Kaplan-Meier法分析荷瘤裸鼠生存期,CTLA-4 KO CTL治疗裸鼠生存期显著高于CTL组(中位生存期: 78 vs 42 d, P<0.05;图8B)。

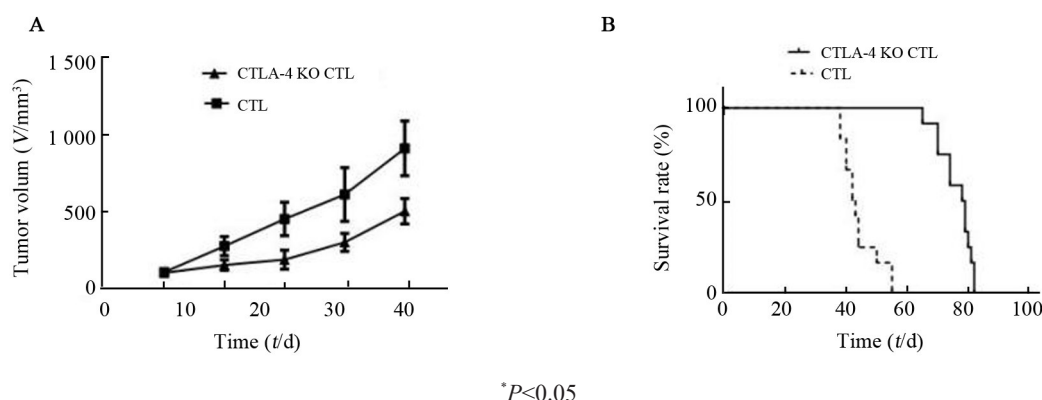


图8 CTL与CTLA-4 KO CTL组移植瘤体积(A)和荷瘤裸鼠生存期(B)的比较

Fig.8 Comparison of the xenograft volume (A) and survival time (B) of nude mice in CTL and CTLA-4 KO CTL groups

### 2.6 两组裸鼠血清中TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 的分泌水平

治疗28 d后,CTLA-4 KO CTL组裸鼠血清中TNF- $\alpha$ 的分泌量明显高于CTL组( $268.93 \pm 17.04$ ) vs ( $148.26 \pm 20.07$ ) pg/ml,  $P < 0.01$ , IFN- $\gamma$ 的分泌量也明显高于CTL组( $315.38 \pm 18.67$ ) vs ( $202.92 \pm 29.32$ ) pg/ml,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在世界范围内,结肠癌发病率和病死率均位居前列,中国近年来发病率呈持续上升趋势,位居恶性肿瘤前十位。结肠癌早期可以没有任何症状,而出现腹胀、消化不良及排便性状或习惯改变等症状往往已进展至中晚期,因此明显增加了其治疗难度。其治疗仍以外科手术及术后辅助化疗为主。近年来,免疫治疗技术的突飞猛进为肿瘤治疗带来新的希望,分子免疫学研究逐步揭示了肿瘤免疫微环境中调节细胞免疫应答的复杂机制。这些发现之一即是通过成功地抑制免疫检查点以启动抗肿瘤T细胞免疫应答,从而增强抗肿瘤效果。针对免疫检查点PD-1、CTLA-4的单克隆抗体已被美国食品药品监督管理局批准用于治疗多种实体肿瘤。研究<sup>[4-5]</sup>显示,细胞免疫治疗联合免疫检查点阻断可大幅提高效应T细胞抗肿瘤作用。但其在培养过程中,介入免疫检查点抑制剂的时间节点非常重要,若介入过早,CTLA-4或PD-1可能未呈最高表达;介入过晚,CTLA-4或PD-1表达最高峰可能已经结束。如何有效合理地使用抗体阻断在培养CTL过程中出现CTLA-4或PD-1表达的最高峰是其应用的难点。若通过基因编辑技术,将CTL细胞表达CTLA-4的基因删除,可能会从更为基础和根本的层面上解决CTLA-4的免疫抑制作用,提高CTL细胞对肿瘤的杀伤效果,同时也可减轻因持续使用CTLA-4单抗所造成的患者经济负担。

现今的主要基因编辑手段为ZFN、TALEN及CRSIPR/Cas9技术,相较于前两种基因编辑技术,

CRSIPR/Cas9具有脱靶率低、操作简易等优点,同时它还可同时编辑多个靶向基因<sup>[6]</sup>。基因编辑最为关键的一个环节是将目的基因转染细胞系。对于治疗一些难治疾病所用到的细胞,如T淋巴细胞、干细胞等,往往很难将目的基因转染至细胞。CRSIPR/Cas9技术的出现极有希望提高上述细胞的基因转染效率,其同时包含多种基因递送方法,如脂质体阳离子法(lipofactamine)法和聚乙烯亚胺(PEI)法等,但这两种方法均为瞬时转染,转染后维持时间较短<sup>[7]</sup>。本研究以提高效应细胞预防及治疗肿瘤的能力为目的,因此需要长时间维持基因删除效果,因此这两种递送系统不适合本研究。目前,由于病毒载体的高效性和特异性已在涉及基因编辑的临床试验中广泛应用,其载体类型主要包括腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和逆转录病毒等。由于腺病毒和腺相关病毒不会整合基因组,因此在细胞治疗领域应用较少。慢病毒和逆转录病毒可整合基因组,但逆转录病毒导致基因突变概率较高<sup>[8]</sup>。综合考虑以上因素,本研究使用慢病毒作为基因编辑的载体。登录全球临床试验注册官网([www.clinicaltrials](http://www.clinicaltrials))可查已登记在册的CAR-T细胞临床试验基本上都是以慢病毒为转染方式,2017年美国食品药品监督管理局已批准由慢病毒转染的CAR-T细胞应用于临床,进一步说明慢病毒转染系统的稳定性和安全性。

研究<sup>[9-10]</sup>表明,使用CRSIPR/Cas9系统进行基因删除的关键节点在于设计具有可带Cas9识别切割位点的特异性sgRNA。已发表的CRSIPR/Cas9基因编辑技术文献中常采用T7E1或Surveyor这两种核酸内切酶错配法测定sgRNA的剪切活性<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>显示,T7E1法对检测CRSIPR/Cas9系统的突变准确率要高于Surveyor法,因此本研究使用T7E1法验证所设计sgRNA活性,结果显示所设计的sgRNA具有较好的剪切活性。验证CRSIPR/Cas9系统删除基因最直接的方法,就是验证删除目的基因后目的蛋白是

否继续表达。本研究中,使用流式检测转染后的CTL中CTLA-4基本不表达,表明CRSIPR/Cas9系统成功地删除了CTLA-4基因。另外,在后续的培养过程中,可以看到慢病毒转染对T细胞扩增培养有一定的影响。但经过持续培养,T细胞是可以持续扩增并具有增殖能力的,完全可以到达后续实验的要求。

有研究<sup>[13]</sup>显示,某患者一次性输注 $1 \times 10^{11}$ 数量级CAR-T细胞后,出现严重的呼吸困难等不良反应,并最终死亡,提示CAR-T细胞输注的安全性可能与输注剂量密切相关。研究中给以裸鼠输注 $1 \times 10^7$ 个CTLA-4 KO CTL细胞,裸鼠未出现过敏反应,无皮疹、腹泻、脱毛及步态改变,进食和饮水正常,无生活习性及行为的改变,表明该剂量级别的细胞输注是安全的。在预防实验中,实验组裸鼠成瘤率明显低于对照组,在治疗实验中,实验组裸鼠明显抑制了肿瘤的生长,延长了移植瘤裸鼠的生存期,且实验组裸鼠血清TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 的分泌水平明显增高。本研究以慢病毒载体构建CRSIPR/Cas9系统,删除免疫检查点CTLA-4改造CTL获得的CTLA-4 KO CTL细胞是一种安全、有效的过继性细胞免疫治疗方法。

总之,随着对免疫调节和免疫检查点的深入研究,越来越多的免疫检查点被发现,这些免疫检查点可以作为单一疗法或组合策略用于治疗结肠癌患者。这些新的免疫检查点包括但不局限于LAG-3<sup>[14]</sup>、TIM-3<sup>[15]</sup>和VISTA<sup>[16]</sup>。在以后的研究中或许可以验证这些新的免疫检查点删除后T细胞疗效的提高,以及利用CRSIPR/Cas9技术多基因靶点删除多个免疫检查点后验证其抗结肠癌作用的加强,为临床应用提供更多的理论基础和治疗选择。

## 【参考文献】

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] SALOMON B, BLUESTONE JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 225-252. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.225.
- [3] KVISTBORG P, PHILIPS D, KELDERMAN S, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8<sup>+</sup> T cell response[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(254): 254ra128. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008918.
- [4] SAWADA Y, YOSHIKAWA T, SHIMOMURA M, et al. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes[J/OL]. Int J Oncol, 2015, 46(1): 28-36[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238729/. DOI:10.3892/ijo.2014.2737.
- [5] DURAISWAMY J, KALUZA K M, FREEMAN G J, et al. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors[J/OL]. Cancer Res, 2013, 73(12): 3591-3603[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3686913/. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-4100.
- [6] THOMAS G A J, CHARLES A, GERSBACH H, et al. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(7):397-405.
- [7] STEWART M P, SHAREI A, DING X Y, et al. In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery[J]. Nature, 2016, 538(7624): 183-192. DOI:10.1038/nature19764.
- [8] KAY M A, GLORIOSO J C, NALDINI L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics[J]. Nat Med, 2001, 7(1): 33-40. DOI:10.1038/83324.
- [9] FU Y F, FODEN J A, KHAYTER C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J/OL]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 822-826[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3773023/. DOI:10.1038/nbt.2623.
- [10] VERES A, GOSIS B S, DING Q R, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing[J/OL]. Cell Stem Cell, 2014, 15(1): 27-30[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4082799/. DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.020.
- [11] 龚福生, 许扬梅, 刘施佳, 等. 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- $\gamma$ 的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(6): 656-661. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.007.
- [12] VOUILLOT L, THÉLIE A, POLLET N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases[J/OL]. G3 (Bethesda), 2015, 5(3): 407-415[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349094/. DOI: 10.1534/g3.114.015834.
- [13] MORGAN R A, YANG J C, KITANO M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2[J/OL]. Mol Ther, 2010, 18(4): 843-851[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862534/. DOI:10.1038/mt.2010.24.
- [14] TRIEBEL F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination[J]. Trends Immunol, 2003, 24(12): 619-622. DOI:10.1016/j.it.2003.10.001.
- [15] SAKUIISHI K, APETOH L, SULLIVAN J M, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity[J/OL]. J Exp Med, 2010, 207(10): 2187-2194[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947065/. DOI:10.1084/jem.20100643.
- [16] WANG L, RUBINSTEIN R, LINES J L, et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses[J/OL]. J Exp Med, 2011, 208(3): 577-592[2019-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3058578/. DOI: 10.1084/jem.20100619.

[收稿日期] 2019-12-28

[修回日期] 2020-02-15

[本文编辑] 韩丹