

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.004

## IL-12-CAR-T 细胞诱发细胞因子释放综合征小鼠模型的建立及观察

黎陈铖<sup>1</sup>, 刘细细<sup>1</sup>, 陈碧清<sup>2a</sup>, 田芳<sup>2a</sup>, 张玮光<sup>1</sup>, 杨箐<sup>1</sup>, 任江涛<sup>3</sup>, 邢芸<sup>3</sup>, 朱学军<sup>1,2b</sup> (1. 南京中医药大学附属医院 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学附属医院 江苏省中医院 a. 中心实验室, b. 血液科, 江苏 南京 210029; 3. 南京北恒生物科技有限公司, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 通过构建表达 IL-12 的小鼠 CAR-T 细胞, 探讨经尾静脉将其输注于小鼠体内建立细胞因子释放综合征(CRS)模型的方法。**方法:** 构建基于靶向鼠源 CD19 的 CAR 分子, 包装逆转录病毒载体并感染小鼠 T 细胞构建 mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T 细胞。通过构建小鼠体内胰腺癌 Panc02-CD19 细胞移植瘤模型, 检测 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞的抗肿瘤活性, ELISA 法检测两种 CAR-T 细胞 IL-12 和 IFN- $\gamma$  分泌水平; 经小鼠尾静脉输注 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞构建 CAR-T 细胞 CRS 小鼠模型, 流式细胞术检测小鼠血清中 IL-6、MCP-1、IL-1、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  等细胞因子的含量, H-E 染色法观察荷瘤小鼠肝、脾、肺和肾的病理组织学变化。**结果:** 经过培养扩增的 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞能有效分泌 IL-12, CAR 阳性率达 (56.9 $\pm$ 5.4)%; 与非靶细胞 Panc02 或靶细胞 Panc02-CD19 共培养时, 均能高分分泌 IFN- $\gamma$ 。成功构建小鼠胰腺癌 Panc02-CD19 细胞移植瘤模型, 经小鼠尾静脉注射  $1 \times 10^6$  个 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞能显著抑制移植瘤的生长, 但未能诱发严重 CRS; 输注  $2 \times 10^6$  个 mCD19/IL-12-CAR-T 细胞后, 小鼠出现体质量减轻、血清炎症因子水平升高、组织损伤, 最终导致死亡等一系列典型 CRS 表现。**结论:** 成功构建 IL-12-CAR-T 细胞诱发的小鼠 CRS 模型, 其稳定性好、重复性高, 具有广泛的应用前景。

**[关键词]** 嵌合抗原受体; 白细胞介素-12; CAR-T 细胞疗法; 细胞因子释放综合征; 胰腺癌细胞

**[中图分类号]** R730.51; R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)01-0028-07

## Establishment and observation of a mouse model of IL-12-CAR-T cell-induced cytokine release syndrome

LI Chencheng<sup>1</sup>, LIU Xixi<sup>1</sup>, CHEN Biqing<sup>2a</sup>, TIAN Fang<sup>2a</sup>, ZHANG Weiguang<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, REN Jiangtao<sup>3</sup>, XING Yun<sup>3</sup>, ZHU Xuejun<sup>1,2b</sup> (1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine & First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. a. Central Laboratory; b. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine & Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 3. Nanjing Bioheng Biotech Co., Ltd, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the method of establishing a cytokine release syndrome (CRS) model by constructing murine-oriented chimeric antigen receptor-modified T (CAR-T) cells expressing IL-12 and infusing them back into mice *via* the tail vein. **Methods:** CAR molecules targeting murine-derived CD19 were constructed, in which the retroviral vectors were packaged, and then the constructed molecules were used to infect mouse T cells to prepare mCD19-CAR-T and mCD19/IL-12-CAR-T cells. The anti-tumor activity of mCD19/IL-12-CAR-T cells was measured by constructing pancreatic cancer Panc02-CD19 cell transplanted tumor model in mice, and the levels of IL-12 and IFN- $\gamma$  secreted by two CAR-T cells were detected by ELISA; CRS model was constructed by infusing mCD19/IL-12-CAR-T cells back into the tail vein of the mice. The levels of IL-6, MCP-1, IL-1, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and other cytokines in the serum of mice were detected by flow cytometry, and the histopathological changes of liver, spleen, lung, and kidney of the mice were observed by H-E staining. **Results:** After culture expansion, mCD19/IL-12-CAR-T cells could effectively secrete IL-12, and the CAR positive rate reached (56.9 $\pm$ 5.4)%; the modified T cells could efficiently secrete IFN- $\gamma$  no matter co-cultured with non-targeted Panc02 cells or targeted Panc02-CD19 cells. A mouse pancreatic cancer Panc02-CD19 cell transplanted tumor model was successfully constructed, and the tail vein infusion of  $1 \times 10^6$  mCD19/IL-12-CAR-T cells significantly inhibited the growth of the transplanted tumor, but failed to induce severe CRS; after the infusion of  $2 \times 10^6$  mCD19/IL-12-CAR-T cells, a series of typical CRS

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.82001206); 江苏省中医院高峰学术人才培养工程(No.y2021rc42); 医学免疫学国家重点实验室开放课题(No.NKMI2021K18); 江苏省中医药科技发展计划项目(No.ZT202106); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(No. SJCX22\_0750, No.KYCX22\_1899)

**[作者简介]** 黎陈铖(1998—), 女, 硕士生, 主要从事中药药理活性的研究, E-mail: 609608203@qq.com

**[通信作者]** 朱学军, E-mail: zhuxuejun@njucm.edu.cn; 邢芸, E-mail: yun.xing@bioheng.com

manifestations such as reduced body mass, elevated serum inflammatory factor levels, tissue damage and even death were observed in the mice. **Conclusion:** The IL-12-CAR-T cell-induced CRS model in mice was successfully constructed, and it is stable and reproducible with wide application prospects.

**[Key words]** chimeric antigen receptor (CAR); IL-12; CAR-T cell therapy; cytokine release syndrome (CRS); pancreatic cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(1): 28-34. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.01.004]

CAR-T细胞疗法开辟了肿瘤免疫治疗的新领域<sup>[1-2]</sup>, 虽然CAR-T细胞临床治疗效果显著,但同时也带来许多不良反应<sup>[3]</sup>。其中,细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)是最常见的一种严重并发症<sup>[4-5]</sup>, 是由于CAR-T细胞治疗过程中活化的免疫细胞释放过量细胞因子而引起的超常免疫反应,表现为大量细胞因子短暂显著地升高,严重的CRS可危及患者生命<sup>[6-7]</sup>。建立合适的动物模型有助于探索预防或减轻CRS的有效手段。负荷肿瘤的NSG小鼠通常用作CAR-T细胞治疗的临床前模型,此外还有SCID-beige小鼠模型<sup>[8]</sup>、CD20 CAR-T细胞引起的免疫激活级联反应的恒河猴模型<sup>[9]</sup>等。但建立上述模型价格昂贵,实验成本高,不便于大规模开展相关的实验研究。IL-12是一种具有强大肿瘤抑制活性的促炎细胞因子,CAR-T细胞与IL-12的组合已被证明可增强包括白血病和卵巢癌在内的多种肿瘤小鼠模型的抗肿瘤效应<sup>[10-15]</sup>。然而,这些研究均观察到全身性IL-12的耐受性较差,主要与其诱发的CRS有关。因此,本研究尝试利用小鼠尾静脉高剂量输注mCD19/IL-12-CAR-T细胞的方式诱发CRS,以建立一种新型的CRS小鼠模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养、实验动物及主要试剂

细胞及其培养:293T细胞在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM细胞培养基中培养。小鼠胰腺癌细胞Panc02与Panc02-mCD19购自南京北恒生物科技有限公司,其在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养。

实验动物:雌性、6~8周龄C57BL/6J小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验单位使用许可证编号:SYXK(苏)2017-0069;实验动物使用许可证号:SCXK(京)2019-0010],饲养于南京中医药大学附属医院实验动物中心。本实验研究设计获得江苏省中医院伦理委员会批准(伦理批准号:2022DW-22-02)。

主要试剂:MSCV-mCD19-CAR、MSCV-mCD19-CAR-IL-12质粒与辅助质粒pCL-Eco购自上海禾午生物科技有限公司,X-tremeGENE HP DNA试剂(货号06366236001)购自瑞士Roche公司,DynaBeads CD3/CD28<sup>CTSTM</sup>(货号40203D)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,RetroNectin(货号T100A)购自日本TaKaRa公司,生物素标记的山羊抗鼠IgG(H&L)(货号

6910-250)购自美国BioVision公司,APC标记的链霉亲和素(货号554067)购自美国BD Pharmingen公司,Mouse IL-12 DuoSet ELISA Kit(货号DY419)、Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA Kit(货号DY485)购自美国R&D Systems公司,复合微球的流式细胞仪免疫测定试剂盒[*MU Inflamm Panel (13-plex) w/Vbp Multi-Analyte Flow Assay Kit*]购自美国Biolegend公司。

### 1.2 质粒构建

依次连接CD19 ScFv、BBZ的编码序列片段,并在两端加入*Xho* I/*Eco* R I酶切位点。将片段克隆入逆转录鼠干细胞病毒(murine stem cell virus, MSCV)载体,获得MSCV-mCD19-CAR质粒,用于mCD19-CAR-T细胞的制备。T2A和IL-12的编码片段克隆入MSCV-mCD19-CAR载体,获得MSCV-mCD19-CAR-IL-12质粒,用于mCD19/IL-12-CAR-T细胞的制备。

### 1.3 逆转录病毒包装

将MSCV-mCD19-CAR、MSCV-mCD19-CAR-IL-12质粒与辅助质粒pCL-Eco通过X-tremeGENE HP DNA试剂共转染进293T细胞中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养过夜。在转染72 h后收集上清,2 000×g、4℃离心10 min,获得逆转录病毒上清液。

### 1.4 mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞的制备及鉴定

从C57BL/6J小鼠脾分离T淋巴细胞,并用DynaBeads CD3/CD28<sup>CTSTM</sup>激活1 d,在第2天将T细胞接种至带有预先用RetroNectin包被的24孔板中过夜,分别加入MSCV-mCD19-CAR病毒、MSCV-mCD19-CAR-IL-12病毒、完全培养基(阴性对照T细胞, NT),2 000×g、32℃离心2 h后,继续扩增培养。隔天更换新鲜培养基,维持细胞密度在1×10<sup>6</sup>个/mL,病毒感染3 d后,即可获得mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞。每2 d利用锥虫蓝染色法计数,根据计数结果计算CAR-T细胞的扩增倍数。加入以生物素标记的山羊抗鼠IgG为一抗,APC标记有链霉亲和素作为二抗,染色后检查CAR-T细胞的阳性率。

### 1.5 ELISA法检测mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞的IL-12和IFN-γ分泌水平

IL-12检测:收集CAR-T细胞上清液,利用Mouse IL-12 DuoSet ELISA试剂盒检测。

IFN-γ检测:以Panc02细胞或Panc02-mCD19细

胞为靶细胞, mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T、NT细胞为效应细胞, 按5:1效靶比将这两种细胞共培养24 h后, 收集培养物上清液, 利用Mouse IFN- $\gamma$  DuoSet ELISA试剂盒检测。

### 1.6 小鼠肿瘤模型的建立及观察

在小鼠左前肢腋下部位经皮下接种 $5 \times 10^5$ 个胰腺癌Panc02-mCD19细胞, 待肿瘤体积生长至 $100 \text{ mm}^3$ 时(约12 d), 将小鼠按照随机数字表法随机分为3组(6只/组), 分别向各组小鼠尾静脉注射 $1 \times 10^6$ 个NT细胞、 $1 \times 10^6$ 个mCD19-CAR-T细胞、 $1 \times 10^6$ 个mCD19/IL-12-CAR-T细胞。在输注CAR-T细胞前48 h, 腹腔注射200 mg/kg环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)预处理小鼠。之后每天均用游标卡尺分别测量, 计算小鼠肿瘤体积, 并监测小鼠的体质量的变化, 在第37天时处死所有小鼠。

### 1.7 小鼠CRS模型的建立及观察

小鼠按照随机数字表法随机分为3组, 均腹腔注射200 mg/kg CPA进行预处理, 第3天分别从尾静脉注射 $2 \times 10^6$ 个NT细胞、 $2 \times 10^6$ 个mCD19-CAR-T细胞、 $2 \times 10^6$ 个mCD19/IL-12-CAR-T细胞。每天观测小鼠日常活动、体质量减轻及存活情况。第6天通过眼眶采集血样, 并在室温下凝固30 min, 离心分离血清并储存在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。第10天脱颈椎处死小鼠, 取肝、脾、肺、肾等组织标本, 经4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、连续切片、H-E染色, 在光学显微镜下

进行病理组织学观察。

### 1.8 流式细胞术检测荷瘤小鼠血清中IL-6、MCP-1、IL-1、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等细胞因子的含量

采用基于复合微球的流式细胞仪免疫测定试剂盒检测小鼠血清中IL-6、MCP-1、IL-1、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等细胞因子的水平。

### 1.9 统计学处理

上述主要实验均独立重复3次。本研究中流式细胞术数据应用Flowjo V10、BioLegend-LEGEND plex软件进行分析处理, 其他数据应用GraphPad Prism7软件进行统计分析, 两组均数间比较采用*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 mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞的成功制备及活性鉴定

成功构建了靶向CD19的经典第二代CAR分子结构, 依次连接T2A和IL-12的编码序列片段(图1A), 以及mCD19-CAR、mCD19/IL-12-CAR分子。将上述分子包装逆转录病毒, 使用逆转录病毒转染小鼠T细胞, 得到mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞。3 d后, 通过流式细胞术采用山羊抗鼠IgG抗体检测病毒转染效率, mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞的转染效率分别为 $(65.1 \pm 7.3)\%$ 、 $(56.9 \pm 5.4)\%$ (图1B)。经过7 d扩增, 细胞增殖达200倍左右。

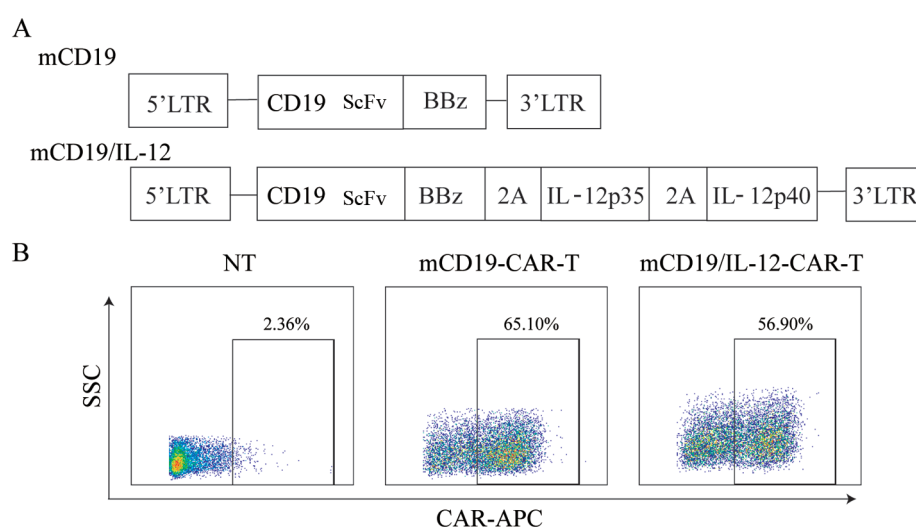
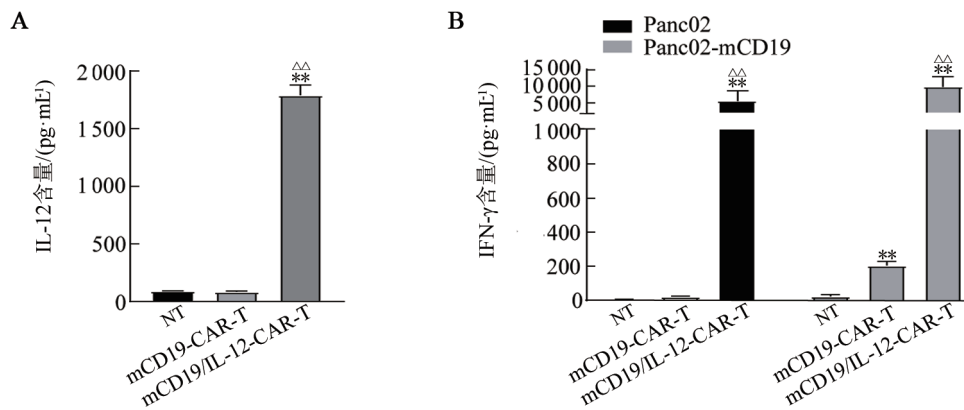


图1 CAR分子结构示意图及制备细胞中CAR-T细胞阳性率

ELISA法检测结果(图2A)显示, mCD19/IL-12-CAR-T细胞分泌IL-12的水平显著高于NT细胞和mCD19-CAR-T细胞( $P < 0.01$ )。将各组CAR-T细胞与非靶细胞Panc02共培养, 与NT组和mCD19-CAR-T组比较, mCD19/IL-12-CAR-T组细胞IFN- $\gamma$ 的

分泌水平显著升高( $P < 0.01$ ); 与靶细胞Panc02-CD19共培养后, mCD19/IL-12-CAR-T组细胞分泌IFN- $\gamma$ 水平显著升高( $P < 0.01$ , 图2B)。实验结果表明, mCD19/IL-12-CAR-T细胞大量分泌可特异性杀伤肿瘤细胞的细胞因子。



与NT组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与mCD19-CAR-T组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$

图2 ELISA法检测mCD19-CAR-T、mCD19/IL-12-CAR-T细胞中IL-12和IFN- $\gamma$ 的分泌水平

## 2.2 输注低剂量( $1 \times 10^6$ )mCD19/IL-12-CAR-T细胞能杀伤肿瘤细胞而未诱发严重CRS

成功建立小鼠胰腺癌Panc02-CD19细胞移植瘤模型,与NT细胞和mCD19-CAR-T细胞处理组小鼠相比,mCD19/IL-12-CAR-T细胞处理组小鼠肿瘤体积明显减小( $P < 0.01$ ,图3A);小鼠体质量在CAR-T细胞输注1~2周时有下降趋势,但未出现脑炎表现,小鼠未发生死亡,且在1周左右恢复正常;mCD19/IL-12-

CAR-T细胞处理组小鼠体质量与NT细胞和mCD19-CAR-T细胞处理组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图3B)。实验结果表明,低剂量输注的mCD19/IL-12-CAR-T细胞对小鼠有一过性的毒副作用,但尚未发生严重CRS,较多分泌的细胞因子可以增强CAR-T细胞对肿瘤的抑制效果,可模拟CAR-T细胞体内杀伤移植瘤细胞。

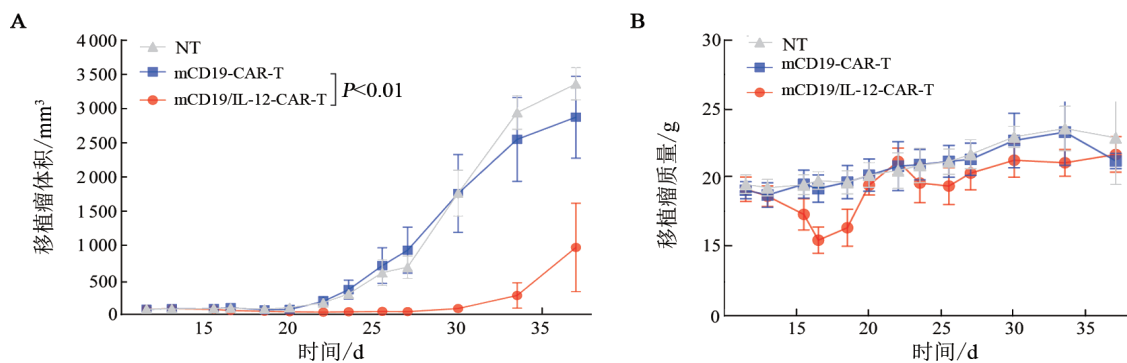


图3 mCD19/IL-12-CAR-T细胞显著抑制小鼠胰腺癌Panc02-CD19细胞移植瘤的生长

## 2.3 输注高剂量( $2 \times 10^6$ 个)mCD19/IL-12-CAR-T细胞可诱发小鼠严重CRS并致其死亡

使用200 mg/kg CPA预处理小鼠2 d后,经尾静脉输注 $2 \times 10^6$ 个CAR-T细胞,mCD19/IL-12-CAR-T组小鼠出现发抖、不适、精神萎靡和起毛现象,表现出严重的体质量减轻,最终死亡(图4A);mCD19-CAR-T组小鼠未出现体质量减轻,状态与NT组相比无明显差异,小鼠均存活。mCD19/IL-12-CAR-T组小鼠在输注第6天开始出现死亡,死亡率达80%(图4B)。

## 2.4 输注高剂量( $2 \times 10^6$ 个)mCD19/IL-12-CAR-T细胞导致小鼠血清中细胞因子含量显著升高

在CAR-T细胞输注4 d后,流式细胞术检测结果(图5)显示,与NT组和mCD19-CAR-T组相比,

mCD19/IL-12-CAR-T组小鼠血清中IFN- $\gamma$ 、MCP-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-1和IL-10含量均显著升高(均 $P < 0.01$ )。实验结果表明,输注高剂量( $2 \times 10^6$ )mCD19/IL-12-CAR-T细胞后,导致小鼠出现全身性CRS。

## 2.5 输注高剂量( $2 \times 10^6$ 个)mCD19/IL-12-CAR-T细胞致使小鼠肝、脾、肺和肾组织损伤

在CAR-T细胞输注8 d后,H-E染色结果(图6)显示,mCD19/IL-12-CAR-T组小鼠肝组织中可见弥漫性肝细胞气球样变性,胞质空泡化,多处可见坏死灶,伴淋巴细胞浸润和血管淤血;脾组织中可见大面积淤血、淋巴细胞坏死,伴大量中性粒细胞浸润;肺组织中可见弥漫性肺泡壁增厚,伴大量淋巴细胞以及中性粒细胞浸润,大量血管周围水肿;肾间质多处

可见淤血。mCD19-CAR-T组肾小管上皮细胞、肝细胞出现少量水样变性,脾中性粒细胞增多;肺伴随淋巴细胞浸润,病变程度明显轻于mCD19/IL-12-CAR-T组,NT组未见明显病变。实验结果表明,输注高剂量

mCD19/IL-12-CAR-T细胞后,致使实验组小鼠肝、脾、肺和肾组织发生炎症细胞浸润甚至坏死、淤血等病理学改变。

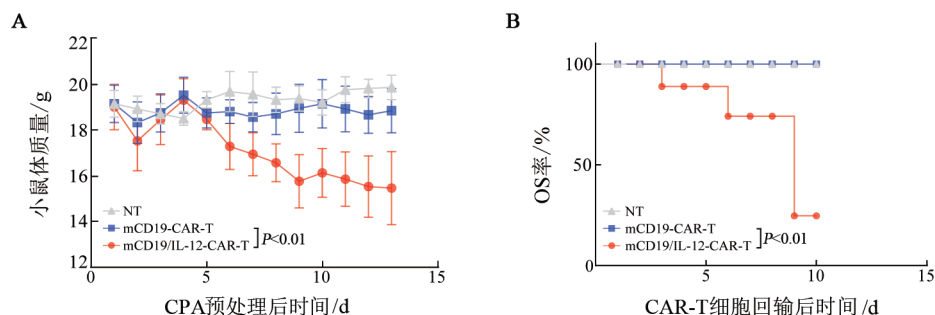


图4 高剂量mCD19/IL-12-CAR-T细胞诱发CRS的小鼠体重(A)与生存曲线(B)

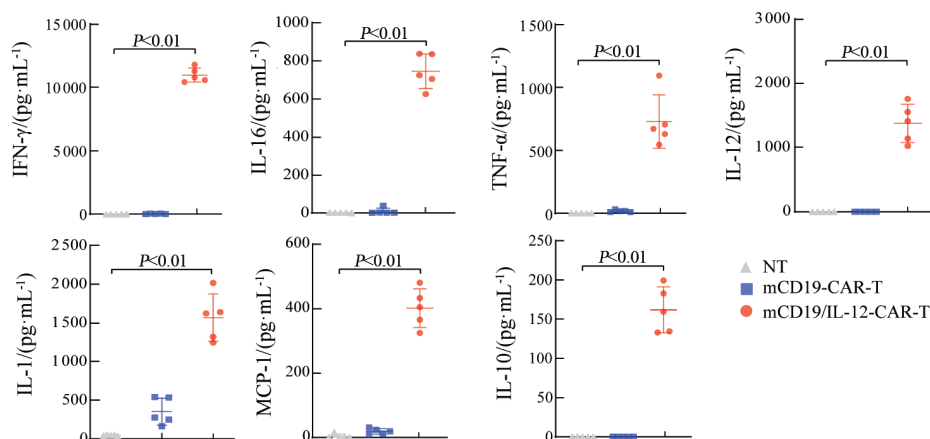


图5 输注高剂量mCD19/IL-12-CAR-T细胞后小鼠血清中细胞因子水平显著升高

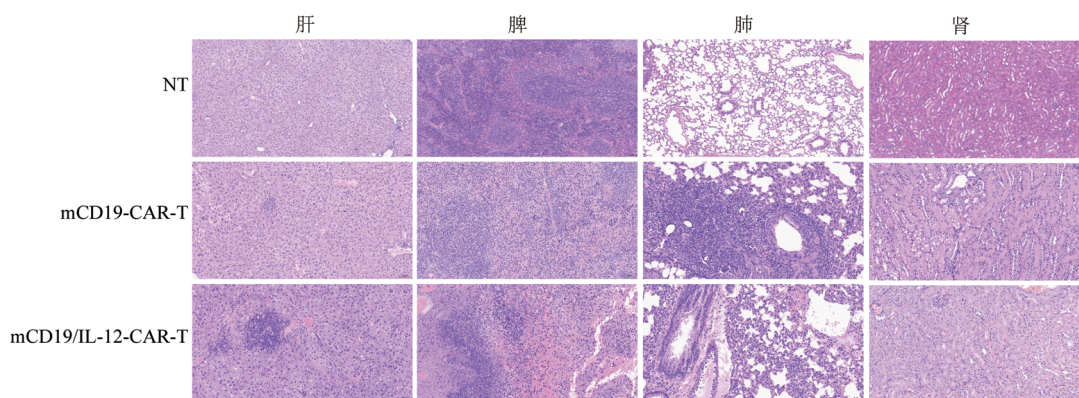


图6 输注高剂量mCD19/IL-12-CAR-T细胞后小鼠肝、脾、肺和肾病理组织学变化(H-E染色,×200)

### 3 讨论

为了更好地研究CRS发生的免疫机制,以及对肿瘤免疫治疗药物的疗效进行评估,需要建立简单、易于重复、便于大规模推广的CRS小鼠模型制备方法。目前,已报道的常用CAR-T细胞相关CRS小鼠

模型有两种,但是均稳定性较差。第一种为SCID-beige小鼠模型,通过在SCID-beige小鼠腹腔内注射 $3 \times 10^6$ 个Raji-GFP-Flu白血病细胞,肿瘤生长3周后通过生物发光成像评估肿瘤负荷,再腹腔注射 $3 \times 10^7$ 个CD19.28z CAR-T细胞,在CAR-T细胞输注2~3 d后小鼠发生CRS,其血清细胞因子升高,并最终导致

死亡<sup>[8]</sup>。在前期研究中,本课题组曾尝试建立此种模型,但是大部分小鼠接受治疗5 d后就死亡,部分小鼠因肿瘤负荷过大而死亡,且死亡时间不均一,CRS治疗观察窗较窄,不利于实验研究。此外,实验中需要大量人源CAR-T细胞,其制备费用昂贵、小鼠模型建立过程繁琐,且IFN- $\gamma$ 、IL-6等重要细胞因子及受体无法跨物种识别,限制了该模型对人体CRS反应的模拟程度。第二种为NSG小鼠模型,通过肝内注射将人脐带血造血干细胞和祖细胞移植到亚致死剂量照射的新生NSG小鼠,或者表达人类干细胞因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和IL-3的NSG-SGM3小鼠,重建淋巴造血系统,得到人源化NSG或者SGM3小鼠<sup>[16]</sup>。这种模型对人CRS模拟程度更高,但小鼠品系很难获得,国内尚未正式引进,造价昂贵,不利于实验的常规广泛开展。上述两种小鼠模型的应用目前已被多次报道,能较好地反映临床CAR-T细胞致CRS的症状。另外,也有研究利用脂多糖(LPS)诱发小鼠的CRS,但不能完全反映CAR-T细胞致CRS的病理特征和免疫学机制。现阶段尚缺乏造价低廉、稳定、能降低小鼠肿瘤负荷的CAR-T细胞致CRS模型。

本研究通过输注mCD19/IL-12-CAR-T细胞诱发小鼠CRS,建立一种新的CRS模型。研究结果发现,输注低剂量( $1 \times 10^6$ 个)mCD19/IL-12-CAR-T细胞未能诱发小鼠严重CRS,但可以抑制胰腺癌细胞移植瘤的生长,而输注高剂量( $2 \times 10^6$ 个)mCD19/IL-12-CAR-T细胞则可诱发小鼠严重CRS反应。此模型使用普通品系C57BL/6J小鼠及培养的小鼠CAR-T细胞即可建立,CRS的产生不依赖于接种的肿瘤细胞,避免了小鼠在实验期间因肿瘤生长速度的差异及负荷过重而导致的不均一死亡,CRS发生时间主要在CAR-T细胞输注后的1~6 d,小鼠表现出典型的CRS症状,如体重减轻、血清细胞因子升高等,符合临床CAR-T细胞诱发CRS的表征。本法构建的模型更稳定、制作周期短,降低了实验成本且重复性高。临床CAR-T细胞诱导的CRS主要是由于双特异性抗体或者CAR-T细胞受体与其抗原结合,促使T细胞激活或者免疫细胞溶解诱导释放IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ ,导致巨噬细胞、DC、内皮细胞及其他免疫细胞的活化,这些细胞进一步释放过量的细胞因子,引起连锁反应,形成激活炎症的循环<sup>[17]</sup>。而本研究利用IL-12的分泌域修饰CAR结构构建的mCD19/IL-12-CAR-T细胞自分泌高水平IL-12,同时IL-12通过激活STAT4信号通路诱导调控T细胞IFN- $\gamma$ 的表达<sup>[18]</sup>。mCD19/IL-12-CAR-T细胞通过高分泌IFN- $\gamma$ 实现自激活,与临床CAR-T细胞诱发CRS的分子机制一致,但与临床前

发生的CRS有一定的差异性。

目前,CRS的治疗首选使用激素治疗,抗IL-6受体拮抗剂托珠单抗联合或者不联合皮质类固醇的给药是主要的治疗方法<sup>[19]</sup>。托珠单抗干预的最佳时机尚不清楚,其是目前正在进行的临床试验亟待解决的问题<sup>[20]</sup>。本研究为CRS治疗药物的有效性、安全性评估及药物筛选提供了合适的实验动物模型。

综上所述,本研究报道了一种直接输注mCD19/IL-12-CAR-T细胞诱发小鼠CRS模型的构建方法,并且证实该模型的可重复性和高效性,具有广泛的应用前景。下一步课题组将进行CRS治疗药物的筛选和临床前研究的准备。

### [参考文献]

- [1] MI J Q, XU J, ZHOU J F, *et al.* CAR T-cell immunotherapy: a powerful weapon for fighting hematological B-cell malignancies[J]. *Front Med*, 2021, 15(6): 783-804. DOI:10.1007/s11684-021-0904-z.
- [2] MANIER S, INGENERE T, ESCURE G, *et al.* Current state and next-generation CAR-T cells in multiple myeloma[J]. *Blood Rev*, 2022, 54: 100929. DOI:10.1016/j.blre.2022.100929.
- [3] ZHANG X M, ZHU L L, ZHANG H, *et al.* CAR-T cell therapy in hematological malignancies: current opportunities and challenges [J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 927153[2022-08-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9226391/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.927153.
- [4] 许苗, 代兴斌, 朱学军. CAR-T免疫疗法所致细胞因子释放和神经毒性综合征的诊疗研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(6): 629-635. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.012.
- [5] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management[J]. *Blood Rev*, 2019, 34: 45-55. DOI:10.1016/j.blre.2018.11.002.
- [6] FSJGENBAUM D C, JUNE C H. Cytokine storm[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255-2273. DOI:10.1056/NEJMra2026131.
- [7] MAUDE S L, BARRETT D, TEACHEY D T, *et al.* Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies[J]. *Cancer J*, 2014, 20(2): 119-122. DOI:10.1097/PPO.000000000000035.
- [8] GIAVRIDIS T, VAN DER STEGEN S J C, EYQUEM J, *et al.* CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade[J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 731-738. DOI: 10.1038/s41591-018-0041-7.
- [9] TARASEVICIUTE A, TKACHEV V, PONCE R, *et al.* Chimeric antigen receptor T cell-mediated neurotoxicity in nonhuman Primates[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(6): 750-763. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-17-1368.
- [10] YEKU O O, PURDON T J, KONERU M, *et al.* Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10541[2022-08-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5585170/>. DOI: 10.1038/s41598-017-10940-8.
- [11] KUEBERUWA G, KALAITSIDOU M, CHEADLE E, *et al.* CD19 CAR T cells expressing IL-12 eradicate lymphoma in fully

- lymphoreplete mice through induction of host immunity[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2017, 8: 41-51. DOI:10.1016/j.omto.2017.12.003.
- [12] AGLIARDI G, LIUZZI A R, HOTBLACK A, *et al.* Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 444[2022-08-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7815781/>. DOI:10.1038/s41467-020-20599-x.
- [13] LIU Y, DI S M, SHI B Z, *et al.* Armored inducible expression of IL-12 enhances antitumor activity of glypican-3-targeted chimeric antigen receptor-engineered T cells in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunol*, 2019, 203(1): 198-207. DOI:10.4049/jimmunol.1800033.
- [14] SU E W, MOORE C J, SURIANO S, *et al.* IL-2R $\alpha$  mediates temporal regulation of IL-2 signaling and enhances immunotherapy [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(311): 311ra170[2022-08-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805116/>. DOI:10.1126/scitranslmed.aac8155.
- [15] TUGUES S, BURKHARD S H, OHS I, *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(2): 237-246. DOI:10.1038/cdd.2014.134.
- [16] NORELLI M, CAMISA B, BARBIERA G, *et al.* Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells[J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-748. DOI:10.1038/s41591-018-0036-4.
- [17] STERNER R M, SAKEMURA R, COX M J, *et al.* GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts[J]. *Blood*, 2019, 133(7): 697-709. DOI:10.1182/blood-2018-10-881722.
- [18] GOCHER A M, WORKMAN C J, VIGNALI D A A. Interferon- $\gamma$ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(3): 158-172. DOI: 10.1038/s41577-021-00566-3.
- [19] SCHUBERT M L, SCHMITT M, WANG L, *et al.* Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(1): 34-48. DOI:10.1016/j.annonc.2020.10.478.
- [20] FREY N, PORTER D. Cytokine release syndrome with chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(4): e123-e127. DOI:10.1016/j.bbmt.2018.12.756.

[收稿日期] 2022-08-16

[修回日期] 2022-12-05

[本文编辑] 党瑞山