

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.009

· 技术方法 ·

基于BCMA突变体构建BCMA CAR-T细胞体外杀伤功能评价模型

张小雪^{1a}, 华静涵^{1a}, 侯睿^{1b}, 刘丹^{1c}, 施明^{1c}, 曹江² (1. 徐州医科大学 a. 第一临床医学院, b. 药学院, c. 江苏省肿瘤生物治疗研究所, 江苏 徐州 221000; 2. 徐州医科大学附属医院 血液科, 江苏 徐州 221000)

[摘要] **目的:**为解决野生型B细胞成熟抗原(BCMA)被 γ 分泌酶切割导致表达不稳定的问题,构建抵抗 γ 分泌酶切割的BCMA突变体并构建靶细胞,用于评价BCMA CAR-T细胞的杀伤功能。**方法:**将野生型BCMA的穿膜域替换为人CD8 α 穿膜域,构建抵抗 γ 分泌酶切割的BCMA突变体(BCMA-CD8 α TM),构建过表达该突变体的U266(U266^{BCMA Mut})、K562(K562^{BCMA Mut})、SKOV3(SKOV3^{BCMA Mut})和CHO(CHO^{BCMA Mut})细胞;构建装载NFAT-EGFP报告基因的BCMA CAR Jurkat细胞(BCMA-CAR-Jurkat-Reporter)与U266^{BCMA Mut}细胞共培养,采用FCM检测该细胞中EGFP表达水平以指示NFAT激活水平,荧光素酶法检测BCMA CAR-T细胞对Luciferase标记的K562^{BCMA Mut}细胞的杀伤作用,实时无标记动态细胞分析技术(RTCA)检测BCMA CAR-T细胞对SKOV3^{BCMA Mut}和CHO^{BCMA Mut}细胞的杀伤作用。**结果:**应用 γ 分泌酶抑制剂LY411575抑制 γ 分泌酶活性,显著增强野生型U266细胞表面BCMA表达水平,平均荧光强度上调10倍以上;但撤除抑制剂后BCMA表达水平逐渐降低($P<0.01$);BCMA-CD8 α TM突变体可抵抗 γ 分泌酶的切割作用,在U266细胞表面稳定表达($P>0.05$);U266细胞及过表达BCMA-CD8 α TM的U266细胞与BCMA-CAR-Jurkat-Reporter细胞共培养后都可激活Reporter系统,增强EGFP表达,但该效应在BCMA-CD8 α TM过表达的U266细胞中更显著($P<0.01$);BCMA-CD8 α TM在BCMA表达阴性的K562、SKOV3和CHO 3种靶细胞中成功过表达,且在LY411575处理下该突变体的表达水平仅有小幅度升高;荧光素酶法检测结果显示,不同靶靶比下,BCMA CAR-T细胞均可特异、高效杀伤过表达BCMA-CD8 α TM的K562细胞;RTCA结果显示,不同靶靶比下,BCMA CAR-T细胞均可有效识别、杀伤过表达BCMA-CD8 α TM的SKOV3和CHO细胞,但同等靶靶比下的Mock-T细胞无此效应。**结论:**本实验构建的BCMA-CD8 α TM突变体能够抵抗 γ 分泌酶的切割,在多种靶细胞表面稳定表达,为评价BCMA CAR-T细胞体外杀伤的有效性和特异性提供多种检测手段。

[关键词] B细胞成熟抗原; γ 分泌酶;CD8 α 穿膜域;CAR-T细胞;杀伤功能评价

[中图分类号] R730.51;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0493-08

Establishment of an *in vitro* cytotoxicity evaluation model for BCMA CAR-T cells based on BCMA mutants

ZHANG Xiaoxue^{1a}, HUA Jinghan^{1a}, HOU Rui^{1b}, LIU Dan^{1c}, SHI Ming^{1c}, CAO Jiang² (1. a. First College for Clinical Medicine, b. College of Pharmacy, c. Institute of Cancer Biotherapy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To engineer a BCMA mutant resistant to γ -secretase cleavage in order to stabilize wild-type BCMA expression after γ -secretase cleavage and to generate target cells for measuring BCMA CAR-T cell cytotoxicity. **Methods:** Our study aimed to engineer a mutant BCMA protein (BCMA-CD8 α TM) that could resist γ -secretase cleavage by replacing the transmembrane domain of the wild-type BCMA protein with the human CD8 α sequence. Four different types of cells in which this mutant gene was expressed excessively were engineered, including U266 (U266^{BCMA Mut}), K562 (K562^{BCMA Mut}), SKOV3 (SKOV3^{BCMA Mut}), and CHO (CHO^{BCMA Mut}) cells. BCMA CAR Jurkat cells, loaded with the NFAT-EGFP reporter gene (BCMA-CAR-Jurkat-Reporter), were engineered and co-cultured with U266^{BCMA Mut} cells. The expression level of EGFP was detected by FCM in order to indicate the activation level of NFAT. The cytotoxicity of BCMA CAR-T cells against Luciferase-labeled K562^{BCMA Mut} cells was detected by the luciferase assay. Additionally, real-time cell analysis (RTCA) technique was employed to detect the cytotoxicity of BCMA CAR-T cells against SKOV3^{BCMA Mut} and CHO^{BCMA Mut} cells. **Results:** Application of γ -secretase inhibitor LY411575 to inhibit γ -secretase activity significantly enhanced the expression level of BCMA on the surface of wild-type U266 cells, and the average fluorescence intensity was increased by more than 10 times. However, the expression level of BCMA gradually decreased after removal of inhibitors ($P<0.01$). BCMA-CD8 α TM mutant

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81972719, No. 82273207);江苏省社会发展临床前沿技术项目(No. BE2022711);徐州市医学领军人才培养项目(No. XWRCHT20210028)

[作者简介] 张小雪(1998—),女,硕士生,主要从事CAR-T细胞疗法不良反应的机制研究。E-mail: zxx9998087@163.com

[通信作者] 施明, E-mail: mingshi@xzhmu.edu.cn

could resist the cleavage of γ -secretase and expressed stably on the surface of U266 cells ($P>0.05$). U266 cells and U266 cells overexpressing BCMA-CD8 α TM were co-incubated with BCMA-CAR-Jurkat-Reporter cells, both of which could activate the Reporter system and enhance the expression of EGFP, but the effect was more significant in U266 cells overexpressing BCMA-CD8 α TM ($P<0.01$). BCMA-CD8 α TM mutants were successfully overexpressed in 3 BCMA-negative target cells, namely K562, SKOV3 and CHO cells, and the expression level of the mutant was only slightly increased under LY411575 treatment. Luciferase assay results showed that under different target-effect ratios BCMA CAR-T cells could all be specific and efficient in killing K562 cells overexpressing BCMA-CD8 α TM. RTCA results showed that under different target ratios BCMA CAR-T cells could all effectively recognize and kill SKOV3 and CHO cells overexpressing BCMA-CD8 α TM, but Mock-T cells with the same target ratio had no such effect. **Conclusion:** The BCMA-CD8 α TM mutant engineered in this study can resist γ -secretase cleavage and exhibits stable surface expression on various target cells, thus offering various methods for evaluating the efficacy and specificity of BCMA CAR-T cell cytotoxicity *in vitro*.

[Key words] B cell maturation antigen (BCMA); γ -secretase; CD8 α transmembrane domain; chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocyte (CAR-T cell); cytotoxicity evaluation

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 493-500. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.009]

靶向B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)的嵌合抗原受体修饰的T细胞(chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocyte, CAR-T细胞)在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)治疗中显示出良好的应用前景^[1-5],目前全球已有三款产品上市。作为个体化的细胞治疗药物,CAR-T细胞在完成体外制备、回输患者之前须进行质控以保证疗效和安全性^[1],因此,建立稳定可靠的CAR-T细胞体外杀伤功能检测体系对回输前的CAR-T细胞进行质量控制是保证后续治疗有效性和安全性的关键^[6-8]。通常情况下,CAR-T细胞的杀伤活性评价会选用其所针对的肿瘤细胞系作为靶细胞,但MM细胞系表面表达的野生型BCMA受 γ 分泌酶切割作用的影响表达水平不稳定,不利于准确评价BCMA CAR-T细胞对该靶细胞的识别、杀伤功能^[9-10]。本研究构建一种能够在多种细胞中稳定表达的BCMA突变体并构建四种可用于BCMA CAR-T细胞杀伤活性和特异性检测的靶细胞,以期BCMA CAR-T细胞的体外功能评价提供更多检测手段,进而为该类型CAR-T细胞治疗产品回输患者后取得良好疗效、减少不良反应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及主要试剂

人胚肾细胞293T、人多发性骨髓瘤细胞U266、人慢性髓系白血病细胞K562、人卵巢腺癌细胞SKOV3、中国仓鼠卵巢细胞CHO和人T淋巴细胞白血病细胞Jurkat均购自美国ATCC细胞库;从健康捐献者外周血中分离出原代外周血单核细胞(PBMC),所有健康捐献者捐献的PBMC均经过徐州医科大学附属医院医学伦理委员会批准(伦理批准号:XYFY-2018-KL003-01),并均签署知情同意书。BCMA-

CAR核苷酸序列(来源于专利:US10174095B2); RPMI 1640培养基(货号:11875093)、胎牛血清(FBS,货号:12483020),人T细胞纯化EasySep™ Human T Cell Isolation Kit(货号:19661)均购自STEMCELL Technologies公司,人T细胞激活磁珠Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28(货号:11132D)购自美国Gibco公司,聚乙烯亚胺(PEI,货号:TR-1003-G)购自美国Sigma公司,T细胞培养添加的细胞因子IL-2(货号:20020)、IL-7(货号:20007)、IL-15(货号:20015)均购自美国Peprotech公司,pHAGE慢病毒载体(载体编号:166467)、psPAX(载体编号:2260)、pMD2.G(载体编号:12259)来自Addgene,限制性内切酶Xba I(货号:R0145V)、EcoR I(货号:R0101V)、T4连接酶(货号:M0202V)均购自美国New England Biolabs公司,DH-5 α 感受态细胞(货号:CD201)购自北京全式金生物技术股份有限公司,质粒提取试剂盒(货号:DP103)购自北京天根生化科技有限公司,胶回收试剂盒(货号:DC301-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,anti-BCMA-PE(货号:19F2)、PE Mouse IgG2a Isotype(货号:400213)等抗体购自美国Biolegend公司,RetroNectin(货号:T100A)购自日本TaKaRa公司,HitransG P(货号:REVG005)购自上海吉凯基因科技有限公司,Polybrene(货号:TR-1003)购自德国Sigma公司,Albumin Bovine V牛血清白蛋白(BSA,货号:VIC018)、HEPES溶液(货号:VC2041)、嘌呤霉素(Puromycin,货号:VIC353)、D-荧光素(D-Luciferin,货号:VIC1550)均购自微科曼得生物工程有限公司, γ 分泌酶抑制剂LY411575(货号:53014ES05)购自上海翌圣生物科技股份有限公司。

1.2 BCMA-CD8 α TM突变体的设计

为解决MM细胞系表面野生型BCMA被 γ 分泌

酶切割导致表达不稳定的问题,本研究拟采用替换野生型BCMA穿膜区氨基酸的方法构建对 γ 分泌酶稳定的BCMA突变体。CD8 α 作为经典CAR结构的穿膜区,能够在不影响CAR胞外段的结构以及活化信号向胞内的传递的同时将受体稳定锚定在T细胞膜上^[11-12]。受此启发,本研究使用人CD8 α (Gene ID: 925)穿膜域(AA183-203)替换野生型BCMA(Gene ID: 608)穿膜域(AA55-77)构建对 γ 分泌酶稳定的

BCMA 突变体(BCMA-CD8 α TM)。BCMA-CD8 α TM氨基酸序列与编码核苷酸序列见表1,BCMA-CD8 α TM的氨基酸序列为SEQ ID NO. 1、3、5依次连接;编码BCMA-CD8 α TM的核苷酸序列为SEQ ID NO. 2、4、6依次连接。将编码BCMA-CD8 α TM的核苷酸序列交由上海吉凯基因医学科技股份有限公司进行全基因合成并包装过表达该突变体的慢病毒。

表1 BCMA-CD8 α TM的氨基酸及编码核苷酸序列

位置	序列(N端→C端)
BCMA 胞外段(BCMA-ECD) 氨基酸序列(SEQ ID NO. 1)	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA
BCMA 胞外段(BCMA-ECD) 核苷酸序列(SEQ ID NO. 2)	ATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCCCAAAATGAATATTTGACAGTTTGTTCAT GCTTGCATACCTTGTCAACTTCGATGTTCTTCTAATACTCCTCCTCTAACATGTCAGC GTTATTGTAATGCAAGTGTGACCAATTCAGTGAAAGGAACGAATGCG
CD8 α 穿膜区(CD8 α TM) 氨基酸序列(SEQ ID NO. 3)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
CD8 α 穿膜区(CD8 α TM) 核苷酸序列(SEQ ID NO. 4)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT ATCACCTTTACTGC
BCMA 胞内段(BCMA-ICD) 氨基酸序列(SEQ ID NO. 5)	RKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPK VDSDFHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISARZ
BCMA 胞内段(BCMA-ICD) 核苷酸序列(SEQ ID NO. 6)	AGGAAGATAAACTCTGAACCATTAAGGACGAGTTTAAAAACACAGGATCAGGTC TCCTGGGCATGGCTAACATTGACCTGGAAAAGAGCAGGACTGGTGATGAAATTATT CTTCCGAGAGGCCCTCGAGTACACGGTGGAAGAATGCACCTGTGAAGACTGCATCA AGAGCAAACCGAAGGTCGACTCTGACCATTGCTTTCCACTCCCAGCTATGGAGGA AGGCGCAACCATTTCTGTACCACGAAAACGAATGACTATTGCAAGAGCCTGCCA GCTGCTTTGAGTGCTACGGAGATAGAGAAATCAATTTCTGCTAGGTAA

1.3 慢病毒感染制备4种过表达BCMA-CD8 α TM的靶细胞系

使用过表达BCMA-CD8 α TM慢病毒以MOI=5分别感染U266、K562、SKOV3、CHO细胞,感染72 h后在培养基中添加1 μ g/mL嘌呤霉素加压筛选富集阳性细胞;加压筛选5~7 d后用anti-BCMA-PE染色,流式细胞术检测靶细胞表面BCMA的阳性率和平均荧光强度。

1.4 流式细胞术检测靶细胞表面BCMA与BCMA-CD8 α TM的表达水平

收集1 $\times$ 10⁶个待检测细胞,加入100 μ L使用2% BSA PBS稀释的anti-BCMA-PE抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C避光反应30 min,加入1 mL的PBS,吹打混匀,300 $\times$ g离心5 min,PBS清洗2遍,300 $\times$ g离心5 min,弃上清液,使用300 μ L PBS重悬过滤后上流式细胞仪检测靶细胞表面BCMA与BCMA-CD8 α TM的表达水平。使用0.5 μ mol/L LY411575预处理U266细胞24 h后撤去LY41157,流式细胞术检测第0、4、8、12、16 d时

U266细胞表面BCMA的表达水平。

使用0.5 μ mol/L LY411575处理K562^{BCMA Mut}、SKOV3^{BCMA Mut}和CHO^{BCMA Mut}细胞24 h后,与对照细胞共同用anti-BCMA-PE染色,流式细胞术检测细胞表面BCMA-CD8 α TM突变体表达水平。

1.5 BCMA-CAR慢病毒载体的构建

BCMA-CAR氨基酸序列与编码核苷酸序列见表2,将编码BCMA-CAR的核苷酸序列交由上海吉凯基因医学科技股份有限公司进行全基因合成。pHAGE慢病毒载体经Xba I和EcoR I酶切后,通过常规分子生物学技术将BCMA-CAR核苷酸序列连接到pHAGE载体,获得pHAGE-BCMA-CAR重组表达质粒。

1.6 BCMA-CAR慢病毒的包装、浓缩与滴度测定

将BCMA-CAR重组质粒与辅助质粒pMD2.G、pSPAX2共转染293T细胞,分别收集48、72 h的细胞培养上清液,经0.45 μ m滤头过滤后超速离心浓缩,获得慢病毒上清液,分装后于-80 $^{\circ}$ C保存。

将 293T 细胞接种于 24 孔板, 培养过夜, 分别加入 1、2、4 μL 慢病毒液感染, 同时加入 1 mg/mL 聚凝胺 (Polybrene) 促感染, 48 h 后, 使用重组蛋白 L (Protein L) 结合细胞表面表达的 CAR ScFv 序列, 用 FCM 检测阳性细胞百分率。

计算公式: 慢病毒滴度 (TU/mL) = 细胞数 $\times$ 阳性细胞百分率 / 病毒液体积 (μL) $\times 10^3$ 。

1.7 BCMA CAR-T 细胞的制备及鉴定

T 细胞激活 48 h 时 (BCMA CAR 病毒感染前 24 h), 使用 200 μL 终浓度为 7 $\mu\text{g/mL}$ RetroNectin 稀释液包被 24 孔细胞培养板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光处理 24 h, 吸弃 RetroNectin 稀释液, 每孔使用 300 μL 含 2% BSA 的 PBS 室温避光封闭 30 min, 吸弃上清液, 每孔使用 300 μL PBS 清洗两遍, 放置备用, 病毒感染前弃去 PBS; 使用 EasySep™ Human T Cell Isolation Kit, 按说明书步骤从人 PBMC 中纯化获

得 T 细胞; 将 Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 试剂盒中的磁珠与纯化 T 细胞 1:1 混合, 使用含 10% FBS、200 U/mL IL-2、5 ng/mL IL-15、5 ng/mL IL-7 的 X-VIVO 15 培养基共培养; 48~72 h 后, 离心收集激活后的 T 细胞, 重悬于含 25 $\times$ HitransG P 液, 10 mmol/L pH7.4 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液, 6 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene 的 T 细胞培养基中, 按 5×10^5 个/孔接种于 RetroNectin 预先包被的 24 孔细胞培养板, 按 MOI=10 加入 BCMA CAR 慢病毒浓缩液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 离心 2 h, 置于细胞培养箱中继续培养; 感染 18~20 h 后 30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $\times g$ 离心 5 min, 更换新鲜 T 细胞培养基继续培养; 感染 48 h 后使用磁力架去除激活磁珠, 将孔内细胞转移至未包被 RetroNectin 的孔板中继续培养; 感染 72 h 后, Protein L 法检测 CAR 阳性率。

表 2 BCMA CAR 的氨基酸及编码核苷酸序列

名称	序 列
BCMA-CAR 氨基酸序列 (N端→C端)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHWVRQAPGQGLEW MGATYRGHSPTYYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGAIYNGYDVLNHWGQGT TVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITCSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKLL IYYTSLNLSHGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYRKLPTWTFGQGTKEIKRTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGDCSRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRZ
BCMA-CAR 核苷酸序列 (5'→3')	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAGGTT CAGCTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCTT CTGGCGGCACCTTACGCACTACTGGATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAATGG ATGGGCGCCACCTACAGAGGCCACAGCGACACCTACTACAACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCAT CACCGCCGACAAGTCTACAAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAGAGGCGCCATCTACAACGGCTACGACGTGCTGGATAATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACAGTTTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTAGTGGTG GTGGCGGATCTGATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTG ACCATTACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAA GGCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACAGCAACCTGCACAGCGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCTC TGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACCTATTACTG CCAGCAGTACCGGAAGCTGCCCTGGACATTTGGACAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCACTA CCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGCGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTT GGGCCCCCTCTGGCTGGTACTTGCAGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCG GTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAG GACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTTCGG AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGC AGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGACTCAGCACC GCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGGTAA

1.8 构建携带 3×NFAT Response element-minIL-2P-EGFP Reporter 系统的 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 细胞

为证明改造的 BCMA 突变体胞外结构仍可被 BCMA CAR 有效识别, 在 Jurkat 细胞中构建 NFAT-GFP 报告基因系统。Jurkat 细胞是一种保留了 NFAT、JAK-STAT、TCR-CD3 等关键 T 细胞激活信号转导通路的人白血病 T 淋巴细胞系, 其广泛应用于 T 细胞激活相关信号通路的研究^[13-14]。编码 3×NFAT Response element-minIL-2P-EGFP Reporter 的核苷酸序列交由上海吉凯基因医学科技股份有限公司进行全基因合成。将合成的核苷酸序列用常规分子生物学方法克隆至 pHAGE-EF1α 载体, 构建携带 Reporter 系统的慢病毒穿梭质粒。按 MOI=5 使用携带 3×NFAT Response element-minIL-2P-EGFP Reporter 系统的慢病毒感染 Jurkat 细胞, 感染 72 h 后在培养基中添加 2 μg/mL Puromycin 加压筛选 5~7 d, 扩大培养获得 NFAT-Jurkat-Reporter 细胞株。携带 BCMA-CAR 基因的慢病毒按 MOI=10 用转导 NFAT-Jurkat-Reporter 细胞以获得 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 细胞, 感染 72 h 后 Protein L 法染色, 并使用分选流式分选获得 CAR 阳性的单克隆细胞, 经扩大培养获得 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 细胞株。

1.9 Luciferase 标记的 K562^{BCMA Mut} 细胞制备

使用常规分子生物学技术, 将 Luciferase 编码核苷酸序列克隆到 pHAGE 载体, 包装过表达 Luciferase 慢病毒, 按 MOI=10 感染 K562^{BCMA Mut} 细胞, 感染 72 h 后, 取 10⁶ 个/孔接种到 96 孔白色板中, 每孔加入 10 μL 终浓度为 3 mg/mL 的 D-Luciferin, 1 000 rpm 振荡 30 s 混匀, 25 °C 反应 5 min, 酶标仪检测 Luciferase 化学发光强度, 获得 Luciferase 标记的靶细胞(K562^{BCMA Mut}-Luc)。

1.10 荧光素酶法检测 BCMA CAR-T 细胞对 K562 BCMA Mut-Luc 细胞的杀伤活性

将 K562^{BCMA Mut}-Luc 细胞按 10⁴ 个/孔接种到 96 孔白色板中, 以 E:T=0.15:1、0.3:1、1:1、3:1、6:1 的效靶比加入 BCMA CAR-T 细胞, 置于细胞培养箱中分别共培养 0、24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL 终浓度为 3 mg/mL 的 D-Luciferin, 1 000 rpm 振荡 30 s 混匀, 25 °C 反应 5 min, 酶标仪读取各孔剩余靶细胞化学发光值, 以对应时间点 Mock T 细胞共培养组化学发光强度计算对应时间点 CAR-T 细胞共培养组靶细胞的存活率。

计算公式: CAR-T 杀伤时靶细胞的存活率=对应时间点 CAR-T 细胞共培养组化学发光强度/对应时间点 Mock T 细胞共培养组化学发光强度×100%。

1.11 实时无标记动态细胞分析技术(RTCA)检测 BCMA CAR-T 细胞对 SKOV3^{BCMA Mut}, CHO^{BCMA Mut} 细胞的杀伤活性

将 SKOV3^{BCMA Mut} 细胞, CHO^{BCMA Mut} 细胞按 10⁴/孔

分别接种至 RTCA 细胞培养板中, 培养 18 h 记录生长信号曲线, 按效靶比 1:1、3:1、5:1 向 SKOV3^{BCMA Mut} 细胞均匀加入 BCMA CAR-T 细胞, 按效靶比 3:1、5:1、10:1 向 SKOV3^{BCMA Mut} 细胞加入 BCMA CAR-T 细胞, 继续培养 72 h, 记录杀伤效应信号曲线。

1.12 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 软件进行分析处理, 其他数据应用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析(ANOVA), 并采用 Tukey 法对各组均值的差异进行两两成对检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BCMA-CD8α TM 突变体在 U266 细胞中稳定表达

由于野生型 BCMA 受 γ 分泌酶切割作用影响, U266 细胞表面的 BCMA 表达水平较低且不稳定(图 1A)。实验结果表明, 使用 L411575 可逆转 γ 分泌酶对 BCMA 的切割, U266 细胞表面 BCMA 平均荧光强度上调 10 倍以上(*P*<0.01), 但撤除抑制剂后 BCMA 表达水平逐渐降低(图 1B)。本研究将野生型 BCMA 穿膜域替换为人 CD8α 穿膜域构建 BCMA-CD8α TM 突变体(图 1A)并获得过表达该突变体的 U266^{BCMA Mut} 细胞系, 该突变体可抵抗 γ 分泌酶的切割作用在细胞膜表面稳定表达(图 1C)。

2.3 构建过表达 BCMA-CD8α TM 突变体的 K562、SKOV3、CHO 细胞

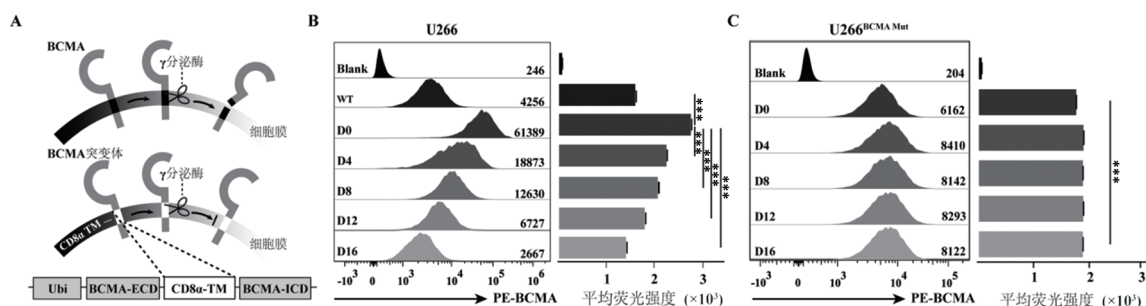
为了验证 BCMA CAR-T 细胞对靶细胞杀伤的靶点依赖性, 在 3 种本底 BCMA 表达阴性的细胞中过表达 BCMA-CD8α TM 突变体获得了 K562^{BCMA Mut}、SKOV3^{BCMA Mut} 和 CHO^{BCMA Mut} 细胞系, 流式细胞术检测 BCMA-CD8α TM 突变体在该 3 种细胞表面的表达情况显示该 3 种靶细胞均构建成功; 使用 LY411575 处理这 3 种靶细胞后, 其 BCMA-CD8α TM 突变体表达水平仅有小幅度升高, 提示 BCMA-CD8α TM 突变体能够在这 3 种靶细胞表面稳定表达并抵抗 γ 分泌酶的切割作用(图 3)。

2.2 BCMA-CD8α TM 突变体显著激活 BCMA CAR 信号转导

由于对野生型 BCMA 穿膜域的突变有可能造成 BCMA 胞外段构象变化进而影响 BCMA CAR 的识别以及下游相关信号通路的激活。为了验证 BCMA-CD8α TM 突变体仍能被 BCMA CAR 识别并激活 T 细胞活化相关信号通路, 本研究在研究 T 细胞信号活化常用的工具细胞 Jurkat 中构建了 NFAT-GFP 报告基

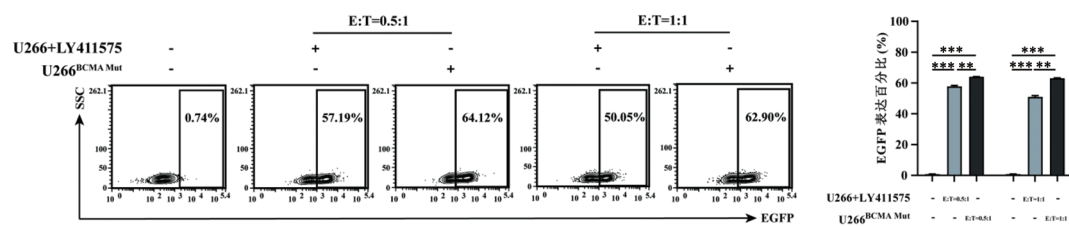
因系统,并在该 Jurkat-Reporter 细胞中装载 BCMA CAR,与 U266^{BCMA Mut} 细胞共培养,FCM 检测 GFP 表达水平研究该突变体对 CAR 胞内转导信号的激活作用。结果(图2)显示,U266^{BCMA Mut} 细胞可显著激活 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 的 NFAT 信号转导通路

($P<0.01$),其激活作用强于 LY411575 预处理的野生 U266 细胞($P<0.01$)。表明该 BCMA 突变体在细胞膜稳定表达的同时其胞外段仍然具备激活 BCMA CAR 信号转导的能力。



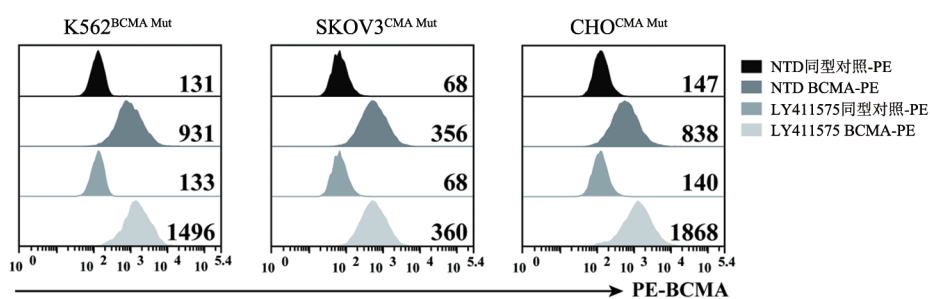
A: γ 分泌酶切割野生型 BCMA 及抵抗 γ 分泌酶切割的 BCMA-CD8 α TM 突变体结构示意图; B: 使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LY411575 处理 24 h 后撤去 LY411575, 流式细胞术检测第 0、4、8、12、16 天 (D: Day) U266 细胞表面 BCMA 的表达水平, *** $P<0.001$; C: U266^{BCMA Mut} 细胞培养第 0、4、8、12、16 天, 流式细胞术检测其表面 BCMA-CD8 α TM 突变体表达水平, *** $P<0.001$ 。

图1 BCMA-CD8 α TM 突变体在 U266 细胞中稳定表达



将 U266^{BCMA Mut} 细胞和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LY411575 处理 24 h 的 U266 细胞分别按效靶比 0.5:1 或 1:1 与 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 细胞共培养。24 h 后流式细胞术检测 BCMA-CAR-Jurkat-Reporter 细胞中 EGFP 表达水平, 比较各组平均荧光强度, 间接反映 CAR 信号活性的变化, 并进行定量分析, *** $P<0.001$ 。

图2 BCMA-CD8 α 突变体能够激活 BCMA CAR 信号转导



使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LY411575 处理 K562^{BCMA Mut}、SKOV3^{BCMA Mut} 和 CHO^{BCMA Mut} 细胞 24 h 后, 与对照细胞共同用 anti-BCMA-PE 染色, 流式细胞术检测表面 BCMA-CD8 α TM 突变体表达水平。

图3 K562^{BCMA Mut}、SKOV3^{BCMA Mut} 和 CHO^{BCMA Mut} 细胞表面 BCMA-CD8 α TM 突变体表达水平及 LY411575 的影响

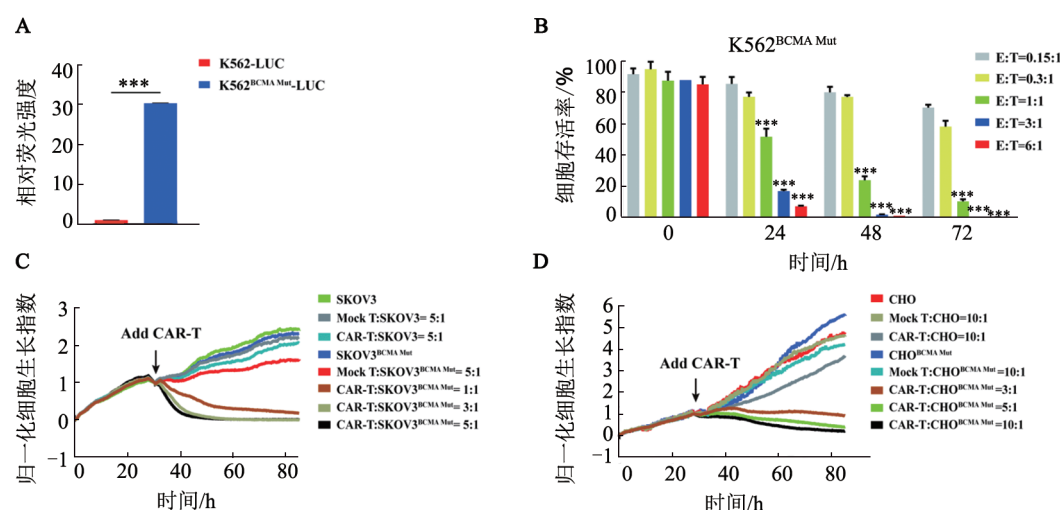
2.4 K562^{BCMA Mut}、SKOV3^{BCMA Mut} 和 CHO^{BCMA Mut} 细胞可用于评价 BCMA CAR-T 细胞的杀伤功能

本研究进一步探究过表达 BCMA-CD8 α TM 的 3 种靶细胞是否可作为工具细胞用于评估 BCMA CAR-T 细胞的杀伤活性。由于 K562 为悬浮细胞系, 无法使用 RTCA 法进行杀伤功能实验, 故本研究在构

建的 K562^{BCMA Mut} 细胞中过表达 Luciferase 标签进行标记获得 K562^{BCMA Mut}-Luc 细胞系(图 4A), 以 CAR-T 细胞杀伤后剩余细胞的 Luciferase 信号强度指示杀伤功能; 实验结果表明, 在 1:1、3:1、6:1 效靶比下, BCMA CAR-T 细胞均可特异、高效杀伤 K562^{BCMA Mut}-Luc 细胞(图 4B)。SKOV3^{BCMA Mut} 和 CHO^{BCMA Mut} 细胞均为贴壁

细胞,可以使用无标记的RTCA法全程监测BCMA CAR-T的杀伤功能;结果显示,BCMA CAR-T细胞可有效杀伤SKOV3^{BCMA Mut}和CHO^{BCMA Mut}细胞,但同等效

靶比下的Mock T细胞无此效应(图4C、D),体现出BCMA CAR-T细胞对上述靶细胞良好的杀伤功能和靶点特异性。



A: 萤光素酶法检测过表达Luciferase标签标记的K562^{BCMA Mut}细胞的化学发光水平;B: 以效靶比0.15:1、0.3:1、1:1、3:1、6:1将BCMA CAR-T细胞及相同效靶比的Mock T细胞和K562^{BCMA Mut}-Luc共孵育,在0、24、48、72 h后,萤光素酶法检测各组Luciferase化学发光水平,以对应时间点Mock T细胞共孵育组化学发光强度为参照,计算各组相对细胞活力(与0 h下对应效靶比相对细胞活力比较,*** $P < 0.001$);C: RTCA法实时监测效靶比1:1、3:1、5:1下BCMA CAR-T细胞对SKOV3^{BCMA Mut}细胞的杀伤作用;

D: RTCA法实时监测效靶比3:1、5:1、10:1下BCMA CAR-T细胞对CHO^{BCMA Mut}细胞的杀伤作用。

图4 BCMA CAR-T杀伤K562^{BCMA Mut}-Luc、SKOV3^{BCMA Mut}、CHO^{BCMA Mut}细胞

3 讨论

γ 分泌酶在多种组织细胞的细胞膜中广泛表达,在细胞信号传导、蛋白质降解以及细胞周期调节等生物学过程中发挥重要作用^[15-17]。在临床前研究中,MM靶细胞表面的BCMA受 γ 分泌酶切割作用影响表达不稳定,无法用于准确评价BCMA CAR-T杀伤功能。本研究采用将野生型BCMA穿膜区更换为CD8 α 穿膜区的方法构建了BCMA-CD8 α TM突变体,该BCMA突变体能够抵抗 γ 分泌酶的切割作用在U266细胞表面稳定表达,且该结构改造不影响BCMA CAR细胞对BCMA突变体胞外结构域的识别并激活T细胞;另外,本研究在3种非MM细胞系中过表达了该突变体,获得了K562^{BCMA Mut}-Luc、SKOV3^{BCMA Mut}和CHO^{BCMA Mut}细胞系,分别使用依赖萤光素酶标签的化学发光法和无需对细胞做任何标记,且同时对多个样本实时监测的RTCA法检测BCMA CAR-T细胞的杀伤效果。以上3种细胞系自身不表达BCMA,可作为BCMA CAR-T细胞杀伤靶点特异性的阴性对照,用于准确评价BCMA CAR-T细胞的杀伤能力和特异性。

部分临床研究^[18-19]表明,MM患者肿瘤表面表达的BCMA会被 γ 分泌酶切割,释放为胞外的可溶性

形式(sBCMA),导致肿瘤细胞表面靶标密度减少,降低BCMA CAR-T的治疗中治疗效果。同时,游离的sBCMA作为可溶性诱饵与BCMA CAR-T细胞竞争性结合,减弱了CAR-T细胞与肿瘤细胞的结合能力^[9]。亦有研究^[20]认为,部分由于 γ 分泌酶突变导致肿瘤表面BCMA表达水平极高的患者更易在接受CAR-T细胞治疗后产生严重的不良反应。由于缺乏 γ 分泌酶抑制剂与BCMA CAR-T细胞联用治疗MM的临床试验数据,MM患者 γ 分泌酶表达水平、肿瘤表面BCMA表达水平及接受BCMA CAR-T细胞治疗效果之间的关系尚不明确。但是,在BCMA CAR-T细胞回输患者之前使用稳定的评价模型对其杀伤有效性和特异性进行质量控制,是确保CAR-T细胞治疗有效性,预防CAR-T细胞进入体内后被非肿瘤靶标激活进而造成不良反应的重要保障^[21-22]。

综上所述,本研究构建了一种能够抵抗 γ 分泌酶切割作用、在多种细胞中稳定表达的BCMA突变体并构建了4种可用于BCMA CAR-T细胞杀伤活性和特异性检测的靶细胞。该突变体和靶细胞的成功构建为BCMA CAR-T细胞的体外功能评价提供了多种检测手段,进而为该类型CAR-T细胞治疗产品回输患者后取得良好疗效、减少不良反应奠定基础。但是,本研究中所建立的BCMA CAR-T细胞功能评

价体系目前并未经过后续临床治疗效果的验证,这将是本课题组未来进一步研究关注的重点。

[参 考 文 献]

- [1] SUN W X, JIANG Z H, JIANG W, *et al.* Universal chimeric antigen receptor T cell therapy-the future of cell therapy: a review providing clinical evidence[J/OL]. *Cancer Treat Res Commun*, 2022, 33: 100638 [2023-12-03]. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100638>. DOI: 10.1016/j.ctarc.2022.100638.
- [2] SADEK N L, ALMEIDA COSTA B, NATH K, *et al.* CAR T-cell therapy for multiple myeloma: A clinical practice-oriented review [J]. *Clin Pharma And Therapeutics*, 2023, 114(6): 1184-1195. DOI: 10.1002/cpt.3057.
- [3] SELLNER L, FAN F L, GIESEN N, *et al.* B-cell maturation antigen-specific chimeric antigen receptor T cells for multiple myeloma: clinical experience and future perspectives[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(8): 2029-2041. DOI: 10.1002/ijc.33002.
- [4] 梅恒, 李成功, 胡豫. 嵌合抗原受体T细胞疗法在难治/复发多发性骨髓瘤中的研究进展[J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(7): 441-445. DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806.2020.07.001.
- [5] 栾春燕, 菅子莹, 程韬, 等. B细胞成熟抗原(BCMA)靶向免疫治疗多发性骨髓瘤的研究进展[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(5): 1701-1705. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2019.05.053.
- [6] ELSALLAB M, MAUS M V. Expanding access to CAR T cell therapies through local manufacturing[J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(12): 1698-1708. DOI: 10.1038/s41587-023-01981-8.
- [7] VANDGHANOONI S, ESKANDANI M, SANAAT Z, *et al.* Recent advances in the production, reprogramming, and application of CAR-T cells for treating hematological malignancies[J/OL]. *Life Sci*, 2022, 309: 121016 [2023-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36179813/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121016.
- [8] CAI Y H, PROCHAZKOVA M, JIANG C J, *et al.* Establishment and validation of in-house cryopreserved CAR/TCR-T cell flow cytometry quality control[J/OL]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 523 [2023-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34952597/>. DOI: 10.1186/s12967-021-03193-7.
- [9] PONT M J, HILL T, COLE G O, *et al.* γ -Secretase inhibition increases efficacy of BCMA-specific chimeric antigen receptor T cells in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2019, 134(19): 1585-1597. DOI: 10.1182/blood.2019000050.
- [10] MIKKILINENI L, KOCHENDERFER J N. CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 71-84. DOI: 10.1038/s41571-020-0427-6.
- [11] GACEREZ A T, ARELLANO B, SENTMAN C L. How chimeric antigen receptor design affects adoptive T cell therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(12): 2590-2598. DOI: 10.1002/jcp.25419.
- [12] LARSON R C, MAUS M V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(3): 145-161. DOI: 10.1038/s41568-020-00323-z.
- [13] KIM R, EMI M, TANABE K, *et al.* Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death[J]. *J Pathol*, 2006, 208(3): 319-326. DOI: 10.1002/path.1885.
- [14] LINK A, VOGT T K, FAVRE S, *et al.* Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(11): 1255-1265. DOI: 10.1038/ni1513.
- [15] HOU P F, ZIELONKA M, SERNEELS L, *et al.* The γ -secretase substrate proteome and its role in cell signaling regulation[J]. *Mol Cell*, 2023, 83(22): 4106-4122.e10. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.10.029.
- [16] MERILAHTI J A M, ELENIOUS K. Gamma-secretase-dependent signaling of receptor tyrosine kinases[J]. *Oncogene*, 2019, 38(2): 151-163. DOI: 10.1038/s41388-018-0465-z.
- [17] HITZENBERGER M, GÖTZ A, MENIG S, *et al.* The dynamics of γ -secretase and its substrates[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 105: 86-101. DOI: 10.1016/j.semdb.2020.04.008.
- [18] MEINL E, KRUMBHOLZ M. Endogenous soluble receptors sBCMA and sTACI: biomarker, immunoregulator and hurdle for therapy in multiple myeloma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2021, 71: 117-123. DOI: 10.1016/j.coi.2021.06.015.
- [19] 郑兰兰, 李斌. sBCMA在初诊多发性骨髓瘤患者中的表达水平及其与预后的关系[J]. *中国实验血液学杂志*, 2023, 31(4): 1108-1112. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2023.04.027.
- [20] LI D, QUE Y M, DING S N, *et al.* Anti-BCMA CAR-T cells therapy for a patient with extremely high membrane BCMA expression: a case report[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(9): e005403 [2023-12-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36137648/>. DOI: 10.1136/jitc-2022-005403.
- [21] 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]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
- [22] YANG Z H, WANG Y. Clinical development of chimeric antigen receptor-T cell therapy for hematological malignancies[J]. *Chin Med J*, 2023, 136(19): 2285-2296. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002549.

[收稿日期] 2023-12-04

[修回日期] 2024-04-24

[本文编辑] 黄静怡