

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.002

· 基础研究 ·

表达 PD-1 shRNA 增强靶向 CD19 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力

林伟, 朱晶晶[△], 刘秀盈, 王建勋(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102400)

[摘要] **目的:** 设计和构建表达 PD-1 shRNA 的靶向 CD19 CAR-T 细胞并验证其体外肿瘤细胞杀伤能力。**方法:** 设计并构建表达 PD-1 shRNA 的 CD19 CAR 分子基因, 将其包装成逆转录病毒载体, 通过 qPCR 法检测病毒载体拷贝数。将慢病毒转导人原代 T 细胞, 获得三种 CAR-T 细胞, 分别为 RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞。采用 qPCR 法检测三种 CAR-T 细胞中 PD-1 mRNA 的表达水平, 流式细胞术检测三种 CAR-T 细胞中 PD-1 表达水平, 萤光素酶报告基因实验、流式细胞术检测在不同效靶比时 CAR-T 细胞对 CD19 阳性靶细胞(人淋巴瘤 daudi 细胞)的杀伤功能。**结果:** RNAU6-CD19 CAR、PD-1 shRNA1-CD19 CAR、PD-1 shRNA2-CD19 CAR 三种 CAR 分子成功包装成逆转录病毒载体, 病毒载体拷贝数均高于 1×10^7 拷贝/mL, 转导人原代 T 细胞获得 CAR-T 细胞, RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞转导效率分别为 43.1%、55.1%、41.7%。与 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞相比, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞中 PD-1 mRNA 表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$)、细胞表面 PD-1 表达水平更低(均 $P < 0.01$)、体外对 daudi 细胞的杀伤率更高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 成功构建表达 PD-1 shRNA 的靶向 CD19 CAR-T 细胞, 其对 CD19 阳性靶细胞的杀伤率显著提高, PD-1 mRNA 及其翻译产物 PD-1 的表达减少, CAR-T 细胞的耗竭减缓。

[关键词] CD19; PD-1; 嵌合抗原受体; T 细胞; RNA 干扰**[中图分类号]** R730.51; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)07-0655-07

Expression of PD-1 shRNA enhances the killing ability of CD19-targeting CAR-T cells on tumor cells

LIN Wei, ZHU Jingjing[△], LIU Xiuying, WANG Jianxun (School of Life Sciences, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102400, China)

[Abstract] **Objective:** To design and construct CD19-targeting CAR-T cells expressing PD-1 shRNA and validate their anti-tumor function *in vitro*. **Methods:** The authors designed and constructed CD19 CAR molecule gene expressing PD-1 shRNA, and packaged them into retroviral vector using packaging cells. The viral vector copy number was detected by qPCR, and then human primary T cells were transduced to obtain CAR-T cells, which were divided into three groups: RNAU6-CD19 CAR-T, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T, and PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T cells. qPCR was applied to detect the expression levels of PD-1 mRNA in three groups of CAR-T cells. Flow cytometry was used to detect the expression level of PD-1 on CAR-T cells in three groups. The luciferase reporter gene method and flow cytometry were used to detect the killing function of CAR-T cells against target cells (human lymphoma daudi cells) at different efficacy to target ratios. **Results:** Three groups of CAR molecules, namely RNAU6-CD19 CAR, PD-1 shRNA1-CD19 CAR and PD-1 shRNA2-CD19 CAR, were successfully packaged into retroviral vector, in which all retroviral vector copy numbers were higher than 1×10^7 copies/mL. CAR-T cells were obtained by transducing human primary T cells. The CAR-T transduction efficiencies of RNAU6-CD19 CAR-T, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T and PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T cells were 43.1%, 55.1%, and 41.7% respectively. Compared with RNAU6-CD19 CAR-T cells, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T and PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T cells showed a significant decrease in the expression level of PD-1 mRNA (all $P < 0.01$), lower expression level of PD-1 on cell surface s (all $P < 0.01$), and higher killing efficiency against CD19 positive target cells (daudi cells) *in vitro* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Successful construction of CD19-targeting CAR-T cells expressing PD-1 shRNA can improve the killing efficiency against CD19 positive target cells, reduce the expressions of PD-1 mRNA and its translation product PD-1, and slow down the depletion of CAR-T cells.

[Key words] CD19; PD-1; chimeric antigen receptor; T cell; RNA interference

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(7): 655-661. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.002]

[基金项目] 北京市双一流高层次人才科研启动经费(No. 9011451310032)**[作者简介]** 林伟(1998—), 男, 硕士生, 主要从事 CAR-T 细胞的研究, E-mail: bucm_linwei@163.com; 朱晶晶(1995—), 女, 博士生, 主要从事 CAR-T 细胞的研究, E-mail: zhujj@bucm.edu.cn, [△]共同第一作者**[通信作者]** 王建勋, E-mail: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

肿瘤的嵌合抗原受体基因修饰T细胞(chimeric antigen receptor gene-modified T cell, CAR-T细胞)疗法在过去的几十年时间里迅速发展。截至发稿时,全球已有11款CAR-T细胞产品批准上市,其中美国FDA批准的有6款,中国国家药品监督管理局(NMPA)批准5款。随着越来越多的不同靶点CAR-T细胞产品相继取得成功,CAR-T细胞疗法已经成为最有前景的肿瘤治疗方法之一^[1-2]。CD19是一种免疫球蛋白超家族成员,几乎只在B细胞上表达,是B细胞信号转导的重要辅助受体,与B细胞受体协同作用,促进钙释放、分裂素激活蛋白酶的活化与促进细胞增殖,常作为B细胞的表面标志物以判断体内B细胞的水平^[3]。程序性死亡受体-1(PD-1),作为重要的免疫细胞表面抑制分子,其通过抑制炎症活动以调节免疫系统,防止自身免疫性疾病的发生;另一方面,PD-1会被一些表达PD-1配体的肿瘤细胞所利用,使T细胞发生在癌细胞影响下的程序性死亡,肿瘤杀伤能力被抑制^[4-5]。短发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA)通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)的方式实现对细胞的mRNA沉默,从而降低某些蛋白的表达水平,自FIRE等^[6]阐述了这一基因沉默现象的本质以来已二十余年,该方法已经广泛用于基因学、医学、动植物学等多种领域,成为阻断基因表达的重要手段。本研究利用PD-1 shRNA沉默CAR-T细胞中编码PD-1的基因,减少CAR-T细胞表面PD-1的表达,避免PD-1与肿瘤细胞表面的配体结合,进而减少CAR-T细胞的耗竭,达到增强CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞的目的。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

表达人源CD19及GFP-LUC报告基因的hCD19-SW620-GFP-LUC细胞由本实验室基于SW620细胞构建,该细胞在含10%FBS与1%青链霉素的DMEM培养基(美国Gibco公司)中培养,表达GFP-LUC报告基因的SKOV3-GFP-LUC细胞由本实验室基于卵巢癌SKOV3细胞构建,该细胞在含10%FBS与1%青链霉素的RPMI 1640培养基(美国Gibco公司)中培养;人淋巴瘤daudi细胞购自美国ATCC细胞库,该细胞在10%FBS与1%青链霉素的RPMI 1640培养基中培养,逆转录病毒载体包装细胞Phoenix-ECO及PG13细胞购自美国ATCC细胞库,两种细胞在含10%FBS与1%青链霉素的DMEM培养基中培养。本研究符合医学伦理学标准,经北京中医药大学医学伦理委员会批准(伦理审批号:2022-3-11)。

AIM-V培养基、胎牛血清(FBS)与青链霉素及磷

酸缓冲液(PBS)购自美国Gibco公司,Fu Gene HD转染试剂购自美国Promega公司,淋巴细胞分离液、T4连接酶、*Nru* I内切酶、*Pac* I内切酶、*Xho* I内切酶购自北京兰博利德生物技术有限公司,IL-2、CD3单克隆抗体(OKT-3)购自北京义翘神州科技股份有限公司,DH-5 α 感受态、质粒提取试剂盒、细胞总RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,SYBR Green qPCR试剂盒、胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,逆转录试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司,MYC-PE抗体购自美国R&D Systems公司,CD3-APC、PD-1-PerCP等抗体均购自美国Biolegend公司。

1.2 表达PD-1 shRNA的靶向CD19-CAR分子及载体的构建

本实验室此前设计出靶向CD19-CAR结构,其结构由CD19-scFv胞外抗原结合区、CD8铰链区及穿膜区、CD28共刺激域、CD3 ζ 胞内信号区依次串联而成,为经典的第二代CAR结构。在此基础上,使用Invitrogen BLOCK-iT RNAi Designer网站(<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/>)设计靶向PD-1的shRNA序列,挑选出评分高且结合序列相差200 bp以上的两条shRNA,同时设计一段不靶向任何序列的RNA序列作为对照(RNA-U6)。U6-shRNA-EF1 α 片段构建完成后使用*Sal* I酶切,先前构建的CD19-CAR质粒使用*Xho* I酶切,通过凝胶电泳回收酶切产物并使用胶回收试剂盒纯化,室温下使用T4连接酶连接3 h。转化DH5 α 感受态菌,之后接种于具有氨苄青霉素抗性的固体Luria-Bertani(LB)培养基中,37 °C恒温培养箱培养14 h,挑一定数量的单克隆菌落加入到具有氨苄抗性的液体LB培养基中,37 °C恒温摇床培养8 h后测序。确认测序结果正确后,将三种质粒载体分别命名为pMFG-U6-RNAU6-CD19-CAR、pMFG-U6-PD-1 shRNA1-CD19-CAR、pMFG-U6-PD-1 shRNA2-CD19-CAR。具体结构见图1。

1.3 逆转录病毒载体的包装及qPCR法检测拷贝数

利用Fu Gene HD转染试剂将构建完成的CAR质粒转染Phoenix-ECO细胞,48 h后收获Phoenix-ECO细胞所生产的含病毒载体上清液并转导PG13细胞,转导完成48 h后检测PG13的转导效率。使用MYC-PE对PG13细胞进行染色,以未转导的PG13细胞作为对照,通过流式细胞术检测,以PE阳性率为PG13细胞转导效率。转导效率达到后续实验要求后收获24、48、72、96 h的逆转录病毒载体上清液,按照病毒RNA提取试剂盒说明书进行操作提取RNA,再用逆

转录试剂盒将提取到的RNA逆转录为cDNA,使用SYBR Green 试剂盒采用两步法进行qPCR实验。反应条件:95 °C 2 min,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共循环40次。引物序列:JW003上游引物为GACACCAGACTAAGAACCTAGAAC,JW004下游

引物为CTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCT。利用 $10^3\sim 10^7$ 拷贝数的pMFG-U6-RNAU6-CD19-CAR质粒作出标准曲线,将样品Ct值带入标准曲线得出逆转录病毒载体拷贝数。

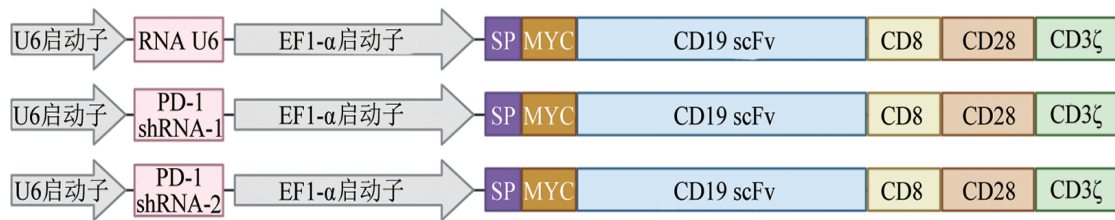


图1 质粒分子结构示意图

1.4 原代T细胞的分离

抽取健康志愿者外周血(在志愿者知情同意的情况下采集血液),使用Ficoll密度梯度离心法将其分离外周血单个核细胞(PBMC),同时使用100 U/mL的IL-2与100 ng/mL的OKT-3刺激T细胞活化与增殖,使用AIMV完全培养基(添加10%FBS与1%青链霉素)于37 °C、5%CO₂条件下进行培养,每48 h时用含有100 U/mL的IL-2的AIMV完全培养基(添加10%FBS与1%青链霉素)传代。

1.5 CAR-T细胞的制备及流式细胞术检测转导效率

使用包装细胞将三种质粒载体分别包装为逆转录病毒载体,将三种逆转录病毒载体转入培养了48 h的原代T细胞中构建三种CAR-T细胞,分别为RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T和PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T细胞。转导48 h后使用CD3-APC抗体、MYC-PE抗体染色,以未转导的T细胞作为对照,通过流式细胞术检测其表达情况,其APC、PE双阳性率即为CAR-T细胞转导效率。

1.6 qPCR法检测CAR-T细胞中PD-1 mRNA沉默效率

转导7~14 d,在三种CAR-T细胞中分别取 5×10^6 个活细胞,使用RNA提取试剂盒按说明书进行操作以提取RNA,再逆转录为cDNA,使用SYBR Green试剂盒采用两步法进行qPCR实验。PCR反应条件:95 °C 2 min,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共循环40次。引物序列:PD-1上游引物序列为CCAGGATGGTTC TTAGACTCCC,下游引物序列为TTTAGCACG AAGCTCTCCGAT; β -actin上游引物序列为ACC AACTGGGACGACATGGAGAAA,下游引物序列为TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA。以 β -actin作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PD-1 mRNA的相对表达量。

1.7 流式细胞术检测CAR-T细胞PD-1表达水平

取一定数量的CAR-T细胞, $3\ 000\times g$ 离心5 min,弃

上清液,用PBS洗涤一遍,使用PD-1-PerCP抗体室温避光染色45 min,PBS洗涤一遍, $3\ 000\times g$ 离心5 min并弃上清液,以含10%的PBS重悬,上流式细胞仪检测CAR-T细胞PD-1表达水平。

1.8 荧光素酶报告基因实验检测效应细胞的杀伤活性

将三种CAR-T细胞或未转导的T细胞与靶细胞以 4×10^4 个/mL密度按1:1、1:2、1:4、1:8效靶比在不透光的96孔板中共培养8 h,以只有靶细胞的孔为最大孔,以只有培养基的孔为空白孔。共培养完成后,每孔中加入100 μ L荧光素酶底物,室温中避光反应3 min,酶标仪检测其各孔的光密度(D)值。按照公式“细胞杀伤效率= $1-(\text{实验组}D\text{值}-\text{空白孔}D\text{值})/(\text{靶细胞组}D\text{值}-\text{空白孔}D\text{值})\times 100\%$ ”计算细胞的杀伤效率。

1.9 流式细胞术检测效应细胞对daudi细胞的杀伤率

将三种CAR-T细胞或未转导的T细胞与daudi细胞以 4×10^4 个/mL密度按1:1、1:2、1:4、1:8效靶比在96孔板中共培养8 h,使用CD3-APC抗体、Annexin V-FITC染色,通过流式细胞仪检测CAR-T细胞对靶细胞的杀伤效率。依据公式“细胞杀伤率= $(\text{实验组APC阴性中的FITC阳性率}-\text{单培养靶细胞的FITC阳性率})\times 100\%$ ”计算细胞杀伤率。

1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 7软件进行统计,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差ANOVA分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

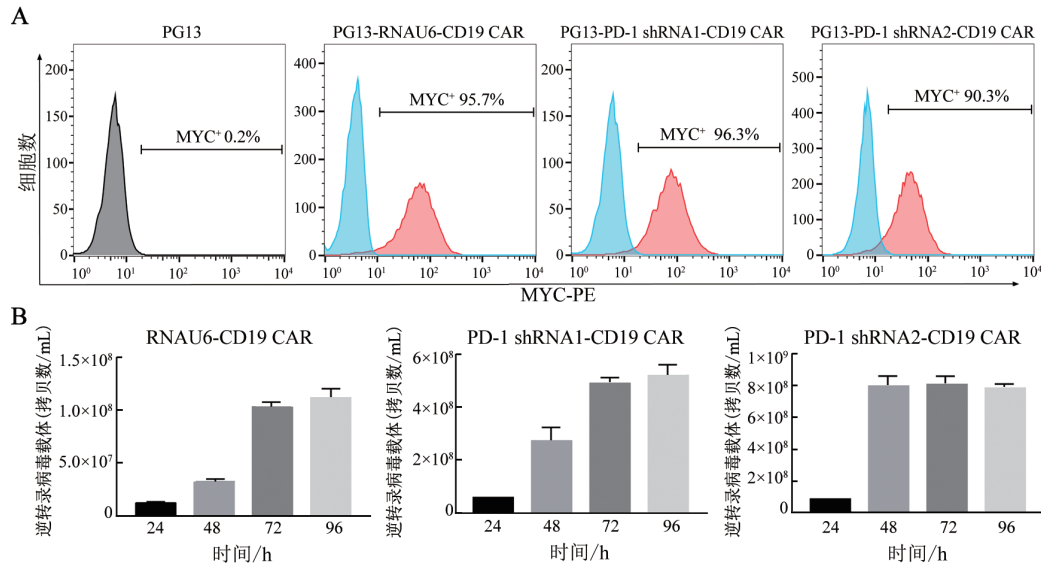
2.1 三种CAR质粒成功包装为逆转录病毒载体

pMFG-U6-RNAU6-CD19-CAR、pMFG-U6-PD-1 shRNA1-CD19-CAR、pMFG-U6-PD-1 shRNA2-CD19-CAR三种质粒通过Phoenix-ECO、PG13包装细胞进行包装以生产逆转录病毒载体。流式细胞术检测结果显

示,未转导的PG13包装细胞、PG13-RNAU6-CD19 CAR包装细胞、PG13-PD-1 shRNA1-CD19 CAR包装细胞、PG13-PD-1 shRNA2-CD19 CAR包装细胞的转导效率分别为0.2%、95.7%、96.3%、90.3%(图2A)。

qPCR法检测结果(图2B)显示,生产的RNAU6-

CD19 CAR、PD-1 shRNA1-CD19 CAR、PD-1 shRNA2-CD19 CAR三种逆转录病毒载体均大于 1×10^7 拷贝数/mL,达到转导T细胞的逆转录病毒载体拷贝数,可以进行后续实验。



A:流式细胞术检测PG13细胞的转导效率;B:qPCR法检测三种逆转录病毒载体拷贝数。

图2 逆转录病毒载体的包装及拷贝数检测

2.2 成功构建三种CAR-T细胞

使用逆转录病毒转导人原代T细胞,获得RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T三种CAR-T细胞。流式

细胞术检测结果(图3)显示,转导效率分别为43.1%、55.1%、41.7%。结果表明,细胞已成功表达目的CAR分子,可以进行后续实验。

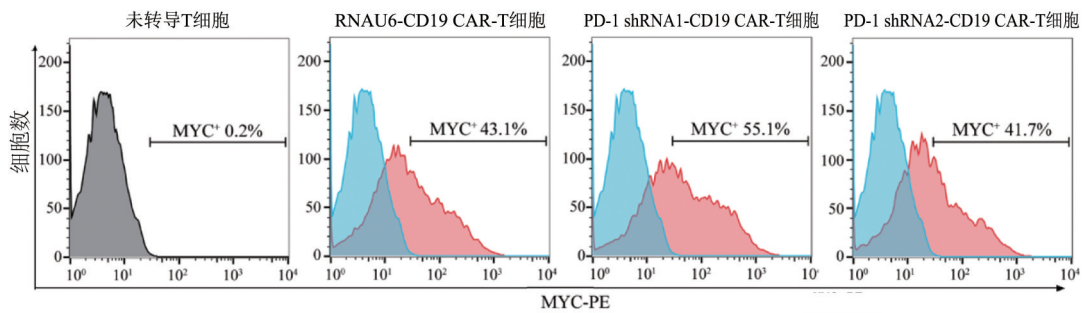


图3 流式细胞术检测CAR-T细胞逆转录病毒载体转导效率

2.3 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T细胞中PD-1 mRNA表达水平显著降低

qPCR法检测结果(图4)显示,PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T和PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T两组细胞中的PD-1 mRNA表达水平均显著低于RNAU6-CD19 CAR-T组(均 $P < 0.01$)。结果表明,设计的PD-1 shRNA1与PD-1 shRNA2序列均具有靶向性,成功干扰了CAR-T细胞PD-1 mRNA的表达。

2.4 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T细胞表面PD-1呈低表达

流式细胞术检测结果(图5)显示,与RNAU6-CD19 CAR-T细胞相比,PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T和PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T细胞表面的PD-1表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果表明,PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T和PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T细胞耗竭表型均显著降低。

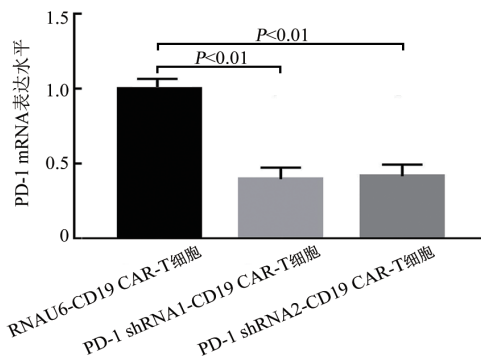
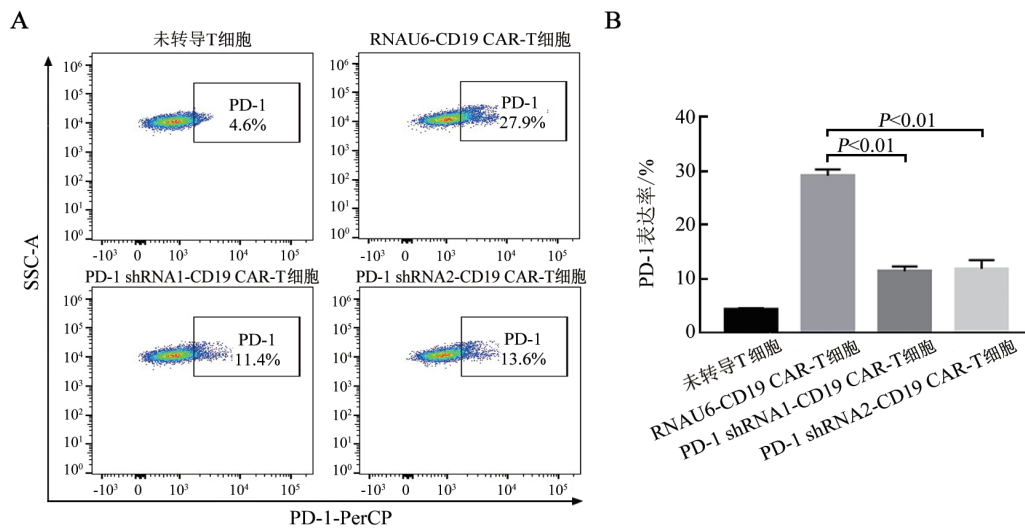


图4 qPCR法检测CAR-T细胞中PD-1 mRNA表达水平

2.5 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T细胞对CD19阴性与CD19阳性实体瘤靶细胞的杀伤率

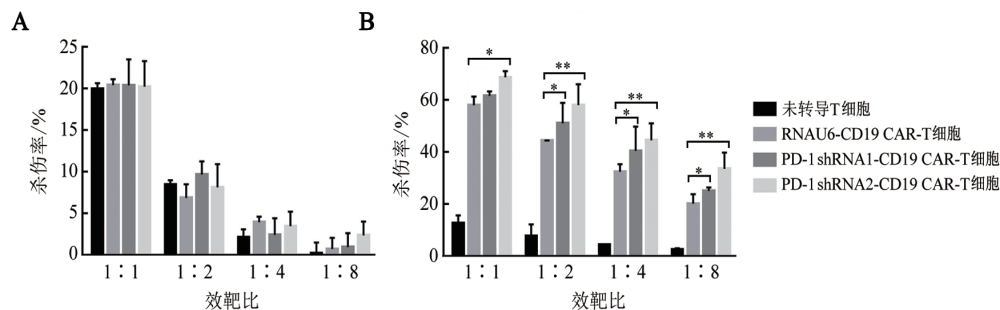
荧光素酶报告基因实验结果(图6)显示,靶细胞为CD19阴性的SKOV3-GFP-LUC细胞时,四组效应

细胞在不同效靶比之间均无明显杀伤率差异(均 $P>0.05$, 图 6A); 靶细胞为 CD19 阳性的 hCD19-SW620-GFP-LUC 细胞时, 与未转导 T 细胞相比, RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞的杀伤率均明显升高(均 $P<0.01$, 图 6B); 与 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞相比, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T 细胞杀伤率在部分效靶比下升高(均 $P<0.05$, 图 6B), PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞杀伤率明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。实验结果表明, 构建的 CAR-T 细胞在不同效靶比下对 CD19 阳性实体瘤靶细胞的杀伤率均高于未转导 T 细胞, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T 细胞与 PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞在部分效靶比下对 CD19 阳性实体瘤靶细胞的杀伤率高于 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞。



A: 流式细胞术检测 CAR-T 细胞表面 PD-1 的表达; B: PD-1 表达数据分析图。

图5 CAR-T 细胞表面 PD-1 表达水平



A: 与 CD19⁻ SKOV3-GFP-LUC 细胞共培养; B: 与 CD19⁺ hCD19-SW620-GFP-LUC 细胞共培养。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图6 荧光素酶报告基因实验检测效应细胞杀伤效率

2.6 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T 细胞对 daudi 细胞的杀伤率

流式细胞术检测结果(图7)显示,当靶细胞为

daudi 细胞时, 与未转导 T 细胞相比, RNAU6-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞杀伤率均明显升高(均 $P<0.01$); 与

RNAU6-CD19 CAR-T 细胞相比, PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T、PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞的杀伤率均明显升高(均 $P < 0.01$)。实验结果表明, 构建的 CAR-T 细胞在不同效靶比下对 CD19 阳性 daudi 靶细胞的杀伤率均高于未转导 T 细胞、PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T 细胞与 PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 细胞在不同效靶比下对 daudi 细胞的杀伤率均高于 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞。

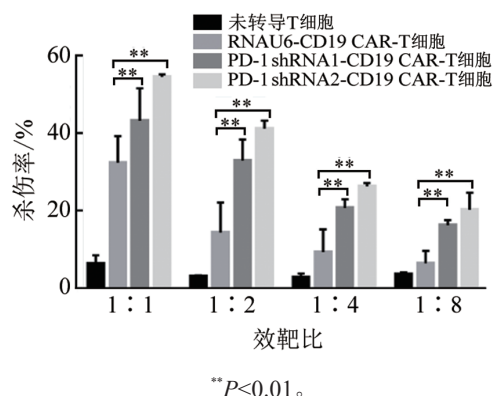


图7 流式细胞术检测效应细胞对靶细胞的杀伤率

3 讨论

近年来,越来越多的 CAR-T 细胞产品获批上市或进入临床试验,标志着细胞免疫治疗进入了新时代。2023年7月,首款国产全人源靶向 B 细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA)的 CAR-T 细胞产品——伊基奥仑赛注射液获得 NMPA 批准上市,用于治疗复发/难治性多发性骨髓瘤成人患者。截至发稿时,全球已有 11 款 CAR-T 细胞产品获批上市,其中 7 款靶向 CD19, 4 款靶向 BCMA。在 CAR-T 细胞取得令人鼓舞成绩的同时,仍存在一些问题,需要研究人员不懈努力攻克。CD19 是 CAR-T 细胞研究最为广泛的靶点^[7], 靶向 CD19 的 CAR-T 细胞已经取得了显著的疗效,但 CAR-T 细胞耗竭、抗原逃逸等问题仍需开发新的解决方案^[8-9]。目前,针对以上问题,可采用靶向免疫检查点、靶向多靶点 CAR-T 细胞、蛋白开关实现减缓 T 细胞耗竭等,实现提高抗肿瘤作用的目的^[10-12]。免疫细胞常见的免疫检查点包括 PD-1、TIM3、LAG3、CTLA-4 等。有研究结果^[13-15]显示,阻断 PD-1 可以减轻 CAR-T 细胞受 PD-L1 的抑制程度并使其杀伤功能增强,达到减缓耗竭的目的。

本研究设计并构建了表达 PD-1 shRNA 的靶向 CD19-CAR 分子,通过逆转录病毒载体进行包装后转导人原代 T 细胞,成功构建 PD-1 shRNA-CD19

CAR-T 细胞。PD-1 shRNA1-CD19 CAR-T 和 PD-1 shRNA2-CD19 CAR-T 两种 CAR-T 细胞的 PD-1 mRNA 表达水平均显著低于对照组 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞,表明 shRNA 序列靶向性强,达到了抑制 PD-1 表达的目的。两组 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T 细胞表面的 PD-1 表达相比对照组 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞有所降低,减少了 PD-1 与配体的结合,从而减少 CAR-T 细胞程序性死亡,达到了减缓 CAR-T 细胞耗竭的目的。与对照组 RNAU6-CD19 CAR-T 细胞相比,体外杀伤实验结果显示两组 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T 细胞能对 CD19 阳性的靶细胞产生更为显著的杀伤作用。实验中,两组 PD-1 shRNA-CD19 CAR-T 细胞有着不同的杀伤活性,推测这与 shRNA 阻断的 PD-1 mRNA 序列位置不同及不同靶细胞表面免疫检查点配体结合方式不同有关。

在 CAR-T 细胞疗法中,针对免疫检查点 PD-1 有多种联合策略,包括 CAR-T 细胞与 PD-1 单抗联用^[16]、自分泌 PD-1 抗体的 CAR-T 细胞^[14]、敲除 PD-1 的 CAR-T 细胞^[17]等。与 CAR-T 细胞相比,使用 shRNA 整合到 CAR 质粒中的策略与免疫检查点抑制剂联用具有更简便、成本更低的特点。与自分泌 PD-1 抗体的 CAR-T 细胞相比,分泌 PD-1 抗体蛋白的基因序列较长,将其整合进 CAR 质粒后转导、质粒递送难度较高,而 shRNA 序列较小,所以使用 shRNA 在病毒包装、CAR 质粒递送上更有优势。与 PD-1 敲除的 CAR-T 细胞相比,shRNA 策略不需要对 CAR-T 细胞再进行一次基因敲除的实验操作,且相比于基因敲除,基因沉默对细胞未知的影响较低。本研究所采用的策略可减少 T 细胞因肿瘤细胞表面的 PD-1 配体而受到的抑制,减缓 T 细胞的耗竭进程^[18]。

综上所述,本研究设计并成功构建了表达 PD-1 shRNA 的靶向 CD19 CAR-T 细胞,为增强 CAR-T 细胞的肿瘤杀伤能力、减缓 CAR-T 细胞的耗竭提供了新的选择。另一方面,本研究仍存在不足,未与其他免疫检查点的靶点沉默进行比较,后续可设计实验与不同的免疫检查点如 TIM-3、TIGIT、LAG-3 等的抑制策略^[19]进行比较,从杀伤效率提升、细胞表型分析等角度综合评估免疫检查点抑制对 CAR-T 细胞功能的影响。

[参考文献]

- [1] CAPPELL K M, KOCHENDERFER J N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(6): 359-371. DOI: 10.1038/s41571-023-00754-1.
- [2] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP S A, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(3): 185-199. DOI: 10.1038/s41573-019-

- 0051-2.
- [3] SCHEUERMANN R H, RACILA E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy[J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 18(5/6): 385-397. DOI: 10.3109/10428199509059636.
- [4] LEI Q Y, WANG D, SUN K, *et al.* Resistance mechanisms of anti-PD1/PDL1 therapy in solid tumors[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 672[2024-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7385189/>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00672.
- [5] SHARPE A H, PAUKEN K E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(3): 153-167. DOI: 10.1038/nri.2017.108.
- [6] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811. DOI: 10.1038/35888.
- [7] HUANG R H, LI X P, HE Y D, *et al.* Recent advances in CAR-T cell engineering[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 86[2024-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7333410/>. DOI: 10.1186/s13045-020-00910-5.
- [8] MAALEJ K M, MERHI M, INCHAKALODY V P, *et al.* CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 20[2024-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9885707/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01723-z.
- [9] STOCK S, SCHMITT M, SELLNER L. Optimizing manufacturing protocols of chimeric antigen receptor T cells for improved anticancer immunotherapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6223[2024-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6940894/>. DOI: 10.3390/ijms20246223.
- [10] HIRSCHHORN D, BUDHU S, KRAEHENBUEHL L, *et al.* T cell immunotherapies engage neutrophils to eliminate tumor antigen escape variants[J]. *Cell*, 2023, 186(7): 1432-1447. e17. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.007.
- [11] LABANIEH L, MAJZNER R G, KLYSZ D, *et al.* Enhanced safety and efficacy of protease-regulated CAR-T cell receptors[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1745-1763.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2022.03.041.
- [12] RODDIE C, LEKAKIS L J, MARZOLINI M A V, *et al.* Dual targeting of CD19 and CD22 with bicistronic CAR-T cells in patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2023, 141(20): 2470-2482. DOI: 10.1182/blood.2022018598.
- [13] WANG Z G, LI N, FENG K C, *et al.* Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2188-2198. DOI: 10.1038/s41423-021-00749-x.
- [14] RAFIQ S, YEKU O O, JACKSON H J, *et al.* Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy *in vivo*[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 847-856. DOI: 10.1038/nbt.4195.
- [15] CHERKASSKY L, MORELLO A, VILLENA-VARGAS J, *et al.* Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3130-3144. DOI: 10.1172/JCI83092.
- [16] CHONG E A, ALANIO C, SVOBODA J, *et al.* Pembrolizumab for B-cell lymphomas relapsing after or refractory to CD19-directed CAR T-cell therapy[J]. *Blood*, 2022, 139(7): 1026-1038. DOI: 10.1182/blood.2021012634.
- [17] REN J T, LIU X J, FANG C Y, *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-2266. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300.
- [18] ZHOU J E, YU J, WANG Y Y, *et al.* ShRNA-mediated silencing of PD-1 augments the efficacy of chimeric antigen receptor T cells on subcutaneous prostate and leukemia xenograft[J/OL]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 137: 111339[2024-02-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33550044/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111339.
- [19] 徐胜, 李楠. 基因编辑背景下的肿瘤生物治疗新策略和挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(4): 275-285. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.04.001.

[收稿日期] 2024-02-27

[修回日期] 2024-05-13

[本文编辑] 党瑞山