

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.002

· 基础研究 ·

IL-7的诱导表达增强靶向GPC3 CAR-T细胞的增殖及体外抗肿瘤活性

龚福生¹, 陈珊珊¹, 郑秋红², 刘沁颖¹ (1. 福建医科大学肿瘤临床医学院 福建省肿瘤医院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室, 福建 福州 350014; 2. 福建医科大学附属厦门弘爱医院 细胞治疗研究中心, 福建 厦门 361000)

[摘要] **目的:** 探讨IL-7的诱导表达对靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞(CAR-T细胞)的增殖和体外抗肿瘤活性的影响。**方法:** 通过无缝克隆将GPC3 CAR序列片段插入GV400载体的BamH I/EcoR I位置, 构建第二代CAR慢病毒载体GPC3-BBZ及GPC3-BBZ-NFAT-IL-7, 以293T细胞包装相应的慢病毒载体后, 感染人T细胞制备CAR-T细胞。实验分为未转导T细胞(NT)组、GPC3-BBZ CAR-T细胞组、GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞组。采用流式细胞术检测各组CAR-T细胞中CAR的表达水平, qPCR法检测经GPC3蛋白激活的CAR-T细胞中IL-7 mRNA的表达水平, 细胞计数法检测CAR-T细胞在GPC3抗原刺激下的增殖能力, ELISA检测CAR-T细胞在受到肿瘤细胞刺激后IL-7、IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平。应用实时细胞分析(RTCA)技术检测CAR-T细胞对人肝癌Huh-7细胞的杀伤作用。**结果:** 成功构建慢病毒载体GPC3-BBZ和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7, 制备出靶向GPC3的CAR-T细胞。经GPC3抗原激活后, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞可有效表达IL-7 mRNA ($P < 0.01$), 其表现出更强的增殖能力 ($P < 0.05$)。与GPC3-BBZ CAR-T细胞相比, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞与GPC3阳性靶细胞Huh-7细胞共培养后, 分泌更高水平的IL-7、IFN- γ 和TNF- α ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。RTCA结果显示, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞对GPC3阳性Huh-7细胞的杀伤活性显著高于GPC3-BBZ CAR-T细胞 ($P < 0.05$)。**结论:** 成功制备可诱导表达IL-7的靶向GPC3的CAR-T细胞, IL-7的诱导表达增强靶向GPC3 CAR-T细胞的免疫活性, 在体外展现出较强的肿瘤细胞杀伤能力。

[关键词] 肝细胞癌; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3; CAR-T细胞; IL-7; 诱导表达

[中图分类号] R735.7; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)10-0951-06

Inducible IL-7 expression enhances proliferation and *in vitro* antitumor activity of GPC3-specific CAR-T cells

GONG Fusheng¹, CHEN Shanshan¹, ZHENG Qiuhong², LIU Qinying¹ (1. Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. Cell Therapy Research Center, Xiamen Humanity Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Xiamen 361000, Fujian, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of induced IL-7 expression on proliferation and *in vitro* antitumor activities of glypican-3 (GPC3)-specific chimeric antigen receptor gene modified-T (CAR-T) cells. **Methods:** The GPC3 CAR sequence fragment was inserted into the BamH I/EcoR I site of the GV400 vector using seamless cloning, constructing second-generation CAR lentiviral vectors GPC3-BBZ and GPC3-BBZ-NFAT-IL-7. The lentiviruses were packaged with 293T cells and transfected into healthy human T cells to prepare CAR-T cells, which were divided into non-transduced T cell (NT) group, GPC3-BBZ CAR-T cell group and GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T cell group. The expression of CAR in CAR-T cells of each group was determined by flow cytometry. IL-7 mRNA expression level in CAR-T cells activated by GPC3 protein was determined by qPCR. The proliferation ability of CAR-T cells under GPC3 antigen stimulation was evaluated by cell counting. The secretion levels of IL-7, IFN- γ , and TNF- α by CAR-T cells after stimulation with tumor cells was determined using ELISA. The cytotoxicity of CAR-T cells against human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells was tested by real-time cell analyzer (RTCA). **Results:** Lentiviral vectors GPC3-BBZ and GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 were successfully constructed, and GPC3-specific CAR-T cells were prepared. After activation with GPC3 antigen, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T cells effectively expressed IL-7 mRNA ($P < 0.01$) and exhibited stronger proliferation capacity ($P < 0.05$). Compared with GPC3-BBZ CAR-T cells, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T cells co-cultured with GPC3-positive Huh-7 cells secreted higher levels of IL-7, IFN- γ , and TNF- α ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The RTCA results showed that the cytotoxicity of GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T cells against GPC3-positive Huh-7 cells was significantly higher than that of GPC3-BBZ

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(No. 2022J01427); 福建省肿瘤医院院内项目(No. 2021YN14)

[作者简介] 龚福生(1974—), 男, 硕士, 主任技师, 主要从事肿瘤免疫细胞治疗研究。E-mail: 290923677@qq.com

[通信作者] 刘沁颖, E-mail: liuqinyingbio@163.com; 郑秋红, E-mail: zqh2858@foxmail.com

CAR-T cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** GPC3-specific CAR-T cells with inducible IL-7 expression were successfully prepared, which exhibited immune activity and tumor cell killing capacity *in vitro*.

[Key words] hepatocellular carcinoma (HCC); glypican-3 (GPC3); chimeric antigen receptor gene modified-T (CAR-T) cell; IL-7; inducible expression

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(10): 951-956. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.10.002]

嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞(chimeric antigen receptor gene modified-T lymphocyte, CAR-T细胞)疗法是一种能够精准、快速、高效,且有可能治愈癌症的新型肿瘤免疫治疗方法,在肿瘤治疗领域取得了巨大的成功,已经彻底改变了白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的治疗方式^[1]。IL-7是一种多功能细胞因子,在调节免疫系统的稳态中起着至关重要的作用,其参与T细胞和B细胞的发育、增殖和分化,对幼稚T细胞的分化和存活及记忆T细胞的产生和维持至关重要。鉴于强大的生物学功能,IL-7被认为有潜力广泛应用于抗肿瘤免疫治疗领域^[2],对CAR-T细胞疗法具有重要意义。研究^[3]表明,IL-7/IL-7R信号与自身免疫和慢性炎症疾病有关。为能够充分发挥IL-7对CAR-T细胞的免疫调节作用,同时避免其全身应用引起的可能的不良反应,本研究以肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的生物标志物磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)为靶点构建CAR-T细胞,并应用活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)启动系统调控IL-7的表达。NFAT启动系统是CAR-T细胞在经过抗原刺激并激活后,才启动下游基因的表达^[4]。本研究进一步探讨诱导表达的IL-7对靶向GPC3 CAR-T细胞的增殖及体外抗肿瘤活性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂及仪器

人肝癌细胞Huh-7和SK-Hep-1由本实验室保存,在含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养和传代,每3d换液1次。

慢病毒表达载体GV400购自上海吉凯公司,CD3单抗购自Biogems公司,GT-T551 H3培养基和RetroNectin购自北京宝日医生物技术公司,X-VIVO 15培养基购自瑞士Lonza公司,IFN- γ 及TNF- α 均购自Peprotech公司,GPC3-PE试剂购自ACRO Biosystems公司,鼠抗人CD3 ζ 抗体购自BD公司, β -actin抗体购自Boster生物技术公司,PE标记的重组人GPC3蛋白购自Sino Biological公司,RT Master Mix for qPCR II购自MCE公司,GoTaq[®] qPCR Master Mix试剂盒购自Promega公司,IFN- γ 和TNF- α ELISA试剂盒购自Sino Biological公司,IL-7 ELISA试剂盒和PE标记抗人GPC3抗体购自Abcam公司,流式细胞仪购自

Beckman Coulter公司,实时细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)所用的xCELLigence实时细胞分析仪和细胞检测板E-plate 16检测板均购自美国Agilent公司。

1.2 慢病毒载体的构建及病毒包装

GPC3 CAR由靶向GPC3的GC33单克隆抗体的单链可变区与人CD8 α (铰链区和穿膜段)、4-1BB和CD3 ζ 组成,通过2A自剪切肽与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因连接。DNA序列由上海吉凯基因科技有限公司全基因合成,通过无缝克隆将GPC3 CAR序列片段插入GV400载体的BamH I/EcoR I位置,构建第二代CAR慢病毒载体GPC3-BBZ,经测序验证后,将重组质粒和病毒包装辅助质粒共转染293T细胞,进行慢病毒包装。收集转染后48 h上清液,超速离心,-80℃保存。GPC3-BBZ-NFAT-IL-7是在GPC3-BBZ的基础上,连接NFAT-IL-7序列,其中NFAT响应启动子包含6个NFAT结合基序的重复序列,连接一个最小的IL-2启动子。

1.3 CAR-T细胞的制备、阳性率检测和分组

利用淋巴细胞分离液Ficoll提取健康自愿者外周血单个核细胞(伦理审批号:K2022-088-01),用抗CD3单克隆抗体(OKT3)和RetroNectin刺激人T细胞过夜。然后,加入GPC3-BBZ CAR、GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR慢病毒感染48 h后,CAR-T细胞在X-VIVO 15培养基中继续培养。将感染后CAR-T细胞分别命名为GPC3-BBZ CAR-T细胞和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞。使用PE标记人GPC3蛋白,通过流式细胞术检测T细胞表面CAR的阳性率。实验分为未转导T细胞(NT)组、GPC3-BBZ CAR-T细胞组和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞组。

1.4 流式细胞术检测Huh-7和SK-Hep-1细胞GPC3蛋白的表达水平

分别取 1×10^6 个Huh-7和SK-Hep-1细胞,在室温下 $500 \times g$ 离心5 min,弃上清。用含2%胎牛血清的100 μ L PBS重悬细胞,加入5 μ L PE标记抗人GPC3抗体,4℃下作用30 min,PBS洗涤2次,300 μ L PBS重悬后,上流式细胞仪检测细胞中GPC3蛋白水平。

1.5 qPCR法检测各组CAR-T细胞中IL-7 mRNA的表达水平

用GPC3蛋白(5 μ g/mL)刺激NT、GPC3-BBZ

CAR-T 细胞和 GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T 细胞, 24 h 后使用 TRIzol 按说明书方法抽提细胞中总 RNA, 经紫外分光光度计定量检测 RNA 浓度后, 使用 RT Master Mix for qPCR II 逆转录试剂盒将抽提获得的 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂盒进行 qPCR 检测。引物序列: IL-7 上游引物为 5'-TTGGACTTCCTCCCC TGATCC-3', 下游引物为 5'-TCGATGCTGACCATTA GAACAC-3'; β -actin 为内参照, 上游引物为 5'-CAT GTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游引物为 5'-CTC CTTAATGTCACGCACGAT-3'。反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 IL-7 mRNA 的相对表达量。

1.6 ELISA 法检测各组 CAR-T 细胞中 IL-7、IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平

以 Huh-7 细胞或 SK-Hep-1 细胞为靶细胞, 将 CAR-T 细胞与靶细胞按 1:1 的效靶比共培养 24 h 后, 收集培养上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书方法, 检测各组细胞培养上清液中 IL-7、IFN- γ 及 TNF- α 的含量。

1.7 细胞计数法检测各组 CAR-T 细胞在抗原刺激下的增殖能力

用 5 μ g/mL GPC3 蛋白包被 96 孔板过夜, 第 2 天用 PBS 洗 1 遍, 每孔加入 1×10^4 个 CAR-T 细胞(无添加细胞因子), 每组设置 3 个复孔, 并于第 3、6、9、12 d 在倒置显微镜下观察 CAR-T 细胞的增殖情况, 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, 计算各组细胞的扩增倍数。

1.8 RTCA 法检测 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效应

在细胞检测板 E-plate 16 孔中加入 50 μ L 培养基, RTCA 系统检测基线, 取出 E-plate 16, 在孔中加入 100 μ L 混合均匀的 Huh-7 细胞悬液, 使每孔中细胞数达 5×10^3 个。将 E-plate 16 置于超净台中室温下放置 30 min 后, 将其放到培养箱中的 RTCA 工作台(station)上进行细胞增殖的实时动态检测。过夜检测后, 按照效靶比为 2:1 的比例向各培养孔中加入 CAR-T 细胞, 同时进行实时监测, 获得实时的细胞增殖曲线。其中, 曲线横轴为时间, 纵轴为标准化细胞

指数(normalized cell index, NCI)值, NCI 值与靶细胞的活细胞数量成正比。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 统计软件对实验数据进行分析, 符合正态分布的计量数据采以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间数据比较采用 *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 肝癌 Huh-7 细胞表面高表达 GPC3 蛋白

流式细胞术检测结果(图 1)显示, 肝癌 Huh-7 细胞表面高表达 GPC3 蛋白, 而在 SK-Hep-1 细胞中几乎不表达 GPC3 蛋白, 两者差异具有统计学意义[(87.4 \pm 4.26)% vs (3.1 \pm 2.26)%, $P < 0.01$]。结果表明, Huh-7 细胞可以作为 GPC3 CAR-T 细胞的阳性靶细胞。

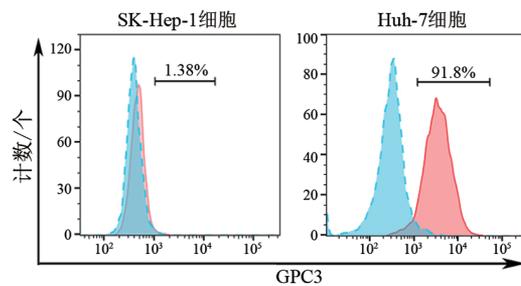
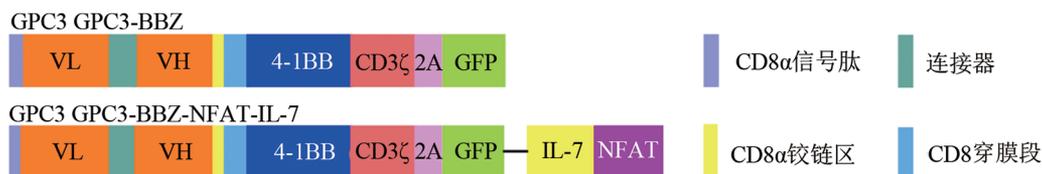


图 1 流式细胞术检测肝癌细胞中 GPC3 蛋白的表达水平

2.2 成功构建 GPC3 CAR 重组载体

构建的 GPC3-BBZ 和 GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR 分子结构如图 2 所示。GPC3-BBZ CAR 的抗原识别片段来自抗 GPC3 的抗体 GC33 的单链可变区, 其后连接人的 CD8 α 、4-1BB 和 CD3 ζ , 通过 2A 自剪切肽与 GFP 基因连接。GPC3 GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 是在 GPC3-BBZ 的基础上, 连接 NFAT 调控序列和人 IL-7 基因片段, 使 IL-7 基因可以被 GPC3 抗原诱导表达。两个重组载体构建完成后, 经 PCR 法鉴定及测序, 与设计序列比较完全一致, 说明 GPC3 CAR 重组载体构建成功。



VL:L 链可变区(variable L chain); VH:H 链可变区(variable H chain)。

图 2 GPC3-BBZ CAR 和 GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR 载体结构示意图

2.3 成功制备GPC3-BBZ CAR-T细胞和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞

流式细胞术检测结果(图3)显示, GPC3-BBZ

CAR-T和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞的转导效率分别为(46.53 ± 3.78)%和(42.13 ± 2.33)%,表明CAR分子在T细胞表面成功表达。

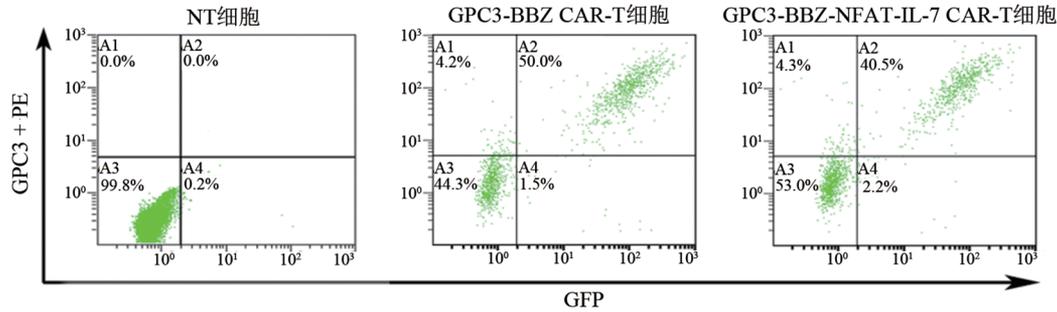


图3 流式细胞术检测CAR-T细胞CAR分子的表达率

2.4 成功诱导GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞表达IL-7 mRNA

qPCR法检测结果(图4)显示,经GPC3蛋白刺激后,与GPC3-BBZ CAR-T细胞相比, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞的IL-7 mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$);而GPC3-BBZ CAR-T细胞无论是否GPC3抗原刺激,均不表达IL-7 mRNA。结果表明, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞只有在GPC3抗原的刺激下才能表达IL-7 mRNA。

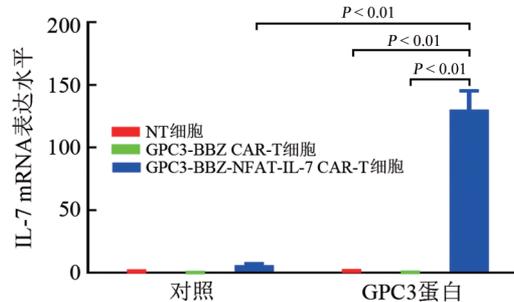


图4 qPCR法证实GPC3可刺激GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞表达IL-7 mRNA

2.5 IL-7的诱导表达增强CAR-T细胞的体外增殖能力

细胞计数法检测结果(图5)显示,在不添加细胞因子情况下, GPC3-BBZ CAR-T细胞和GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞在受到GPC3蛋白抗原刺激后显著扩增,NT组细胞扩增缓慢,并且从第6天开始, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞的增殖倍数明显高于GPC3-BBZ CAR-T细胞($P < 0.05$)。结果表明, IL-7诱导表达能显著增强CAR-T细胞体外扩增能力。

2.6 CAR-T细胞与肝癌细胞共培养液上清中IL-7、IFN- γ 及TNF- α 的分泌水平

ELISA检测结果(图6A)显示,将各组CAR-T细

胞与GPC3阳性靶细胞Huh-7细胞共培养,与GPC3-BBZ CAR-T细胞或NT细胞相比, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞分泌IL-7的水平显著升高(均 $P < 0.001$);而与GPC3阴性靶细胞SK-Hep-1共培养,3组细胞IL-7的分泌水平均无明显差异(均 $P > 0.05$)。结果表明, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞中IL-7的表达依赖于GPC3阳性靶细胞的诱导。

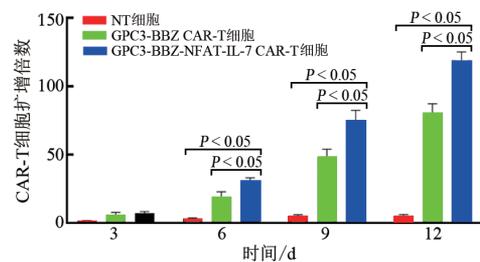
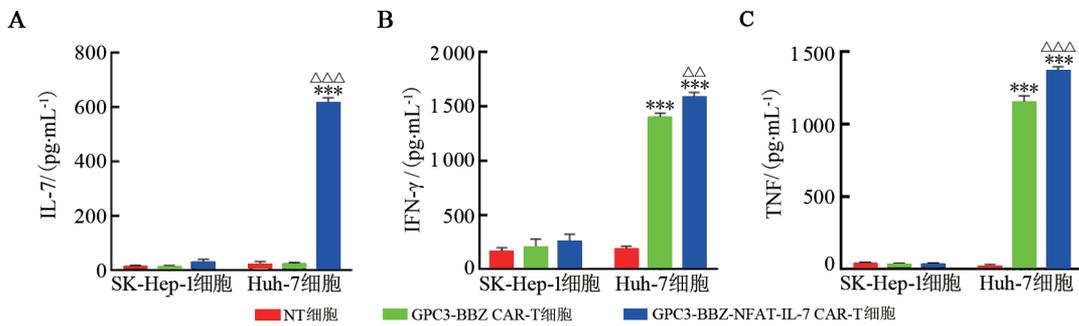


图5 细胞计数法检测IL-7表达对CAR-T细胞增殖的影响

进一步检测结果(图6B)显示, CAR-T细胞与GPC3阳性的Huh-7细胞共培养后,与GPC3-BBZ CAR-T细胞相比, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞分泌IFN- γ 和TNF- α 水平均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);而与GPC3阴性的SK-Hep-1细胞共培养后,两组CAR-T细胞IFN- γ 和TNF- α 分泌水平均无显著差异(均 $P > 0.05$)。结果表明, IL-7的诱导表达能够增强CAR-T细胞体外杀伤肿瘤细胞的能力。

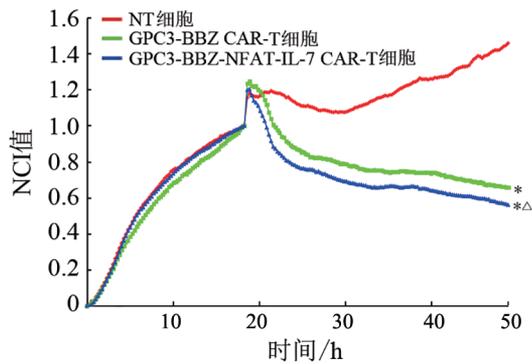
2.7 IL-7的诱导表达增强CAR-T细胞对Huh-7细胞的体外杀伤能力

RTCA法检测结果(图7)显示,与NT组和GPC3-BBZ CAR-T细胞组相比, GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞对Huh-7细胞的杀伤活性明显增强(均 $P < 0.05$)。结果表明, IL-7的诱导表达增强了CAR-T细胞对靶细胞的杀伤能力。



与NT细胞组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与GPC3-BBZ CAR-T细胞组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图6 CAR-T细胞与肝癌细胞共培养液上清中IL-7(A)、IFN- γ (B)和TNF- α (C)的分泌水平



与NT细胞组比较, * $P < 0.05$; 与GPC3-BBZ CAR-T细胞组比较, $\Delta P < 0.05$

图7 RTCA法检测CAR-T细胞对Huh-7细胞的杀伤作用

3 讨论

近年来,随着对肿瘤免疫学认识的深入,肿瘤免疫治疗相关研究取得突破性进展。其中,通过基因工程改造T淋巴细胞以获得的CAR-T细胞进行的细胞过继免疫疗法已被证明是治疗恶性肿瘤有前途的方法之一^[5]。CAR-T细胞技术是将抗体与抗原的高度特异性和T细胞对靶细胞的细胞毒性相结合的一种方法,具有高度杀伤特异性,已在血液肿瘤中显现出强劲潜力。

原发性肝癌是中国第4常见的恶性肿瘤,其中HCC是最主要的组织病理学类型,占全部肝癌的85%~90%^[6],其恶性程度高、浸润和转移性强、预后差,发病率呈逐年上升趋势。传统疗法治疗作用有限,以索拉非尼为代表的系统性治疗成为主要选择,但疗效并不理想^[7]。GPC3是一种膜结合的硫酸肝素蛋白聚糖,在一些实体肿瘤中过表达,尤其是在70%~80%的HCC中高表达,但其很少在健康成人组织中表达,在调控细胞增殖、分化和迁移中发挥重要的作用,与原发肝癌的发生、发展密切相关^[8]。由于GPC3在HCC的特异性肿瘤标志物和预后因子方面的潜在价值,目前已成为肝癌有潜力的治疗靶点。

临床试验已经证实了靶向GPC3的CAR-T细胞具有良好的安全性和一定的有效性。本项目组前期已经开发了针对GPC3的CAR-T细胞,并在体外和体内实验中验证了它们的抗肿瘤活性。

CAR-T细胞的过继转移治疗已在血液肿瘤的患者中取得了显著成功^[9],然而,相比于血液肿瘤,CAR-T细胞对实体瘤的治疗效果仍然不佳^[10-11]。在实体瘤中,CAR-T细胞疗法遇到的主要障碍之一是肿瘤微环境的免疫抑制作用^[12]。基于对实体瘤微环境的认识,研究者们通过对CAR-T细胞进行进一步的基因修饰^[13],以改善治疗效果。这些经过改造的CAR-T细胞,进一步提升了其对实体瘤的治疗效果^[14]。

IL-7不是由T细胞本身产生的,而是主要由数量有限的非淋巴系基质细胞和上皮细胞产生的。因此,T细胞依赖于细胞外源性IL-7,并且体内IL-7的量被认为是维持外周组织中T细胞数量的主要因素,对幼稚T细胞的分化和存活以及记忆T细胞的生成和维持至关重要^[15]。由于IL-7对于T细胞的功能适应性也是必不可少的,以及对T淋巴细胞的发展、维持和增殖至关重要,其在肿瘤疫苗开发中作为佐剂的潜在作用^[16]。IL-7不仅是T、B淋巴细胞成熟分化过程中重要的细胞因子,而且还可以增强成熟T细胞的增殖及其功能,并有促进细胞毒性T淋巴细胞增殖、分化并加强其杀伤活性。虽然,细胞因子IL-7及其受体IL-7R对T细胞和小鼠中B细胞的发育、幼稚T细胞的分化和存活以及记忆T细胞的生成和维持至关重要^[3]。然而,IL-7和IL-7R的异常高或不受调节的水平也与免疫病理相关,IL-7被认为支持糖尿病和多发性硬化症等自身免疫性疾病中的异常免疫活性^[17]。

为能够充分利用IL-7的正向免疫调节功能,避免与IL-7的组成性表达相关的细胞毒性,本研究使用NFAT应答启动子来限制IL-7在由特异性肿瘤抗原识别触发的活化T细胞中的表达。在传统GPC3-BBZ CAR的构建基础上,进一步连接了NFAT-IL-7序列,成功制备了GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细

胞,其中IL-7的表达由NFAT应答启动子控制。该CAR-T细胞可被GPC3阳性的肿瘤细胞所特异性激活,并且激活的CAR-T细胞可有效表达IL-7,并进一步促进CAR-T细胞的增殖,同时也验证了GPC3-BBZ-NFAT-IL-7 CAR-T细胞只有在受到GPC3激活后才能表达IL-7因子。

IL-7作为细胞毒性T淋巴细胞和记忆T细胞的生存促进因子,与过继性细胞疗法(ACT)产生协同抗肿瘤作用^[18],对CAR-T细胞的抗肿瘤作用具有重要的临床意义。本研究在体外验证了GPC3-BBZ-NFAT6-IL-7 CAR-T细胞与GPC3阳性肝癌细胞共培养时,与传统GPC3-BBZ CAR-T细胞相比,表达更高水平功能性细胞因子IFN- γ 和TNF- α ,并且在体外对GPC3阳性的人肝癌Huh-7细胞展现出更强的杀伤活性。为CAR-T细胞在免疫抑制微环境实体瘤中浸润、存活及增殖能力不足的问题提供一种解决方案。

综上所述,本研究在传统靶向GPC3的CAR-T细胞基础上,构建了可诱导表达IL-7的CAR-T细胞,该CAR-T细胞在体外增殖能力和对靶细胞的杀伤能力均优于传统GPC3 CAR-T细胞,提示其可能有更好的抗肿瘤作用和更低的副作用。因此,本研究结果为靶向GPC3 CAR-T细胞的临床试验提供了前期研究基础。

[参考文献]

- [1] GOYCO VERA D, WAGHELA H, NUH M, *et al.* Approved CAR-T therapies have reproducible efficacy and safety in clinical practice [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2024, 20(1): 2378543. DOI: 10.1080/21645515.2024.2378543.
- [2] FU C X, ZHANG X Q, ZHANG X Y, *et al.* Advances in IL-7 research on tumour therapy[J/OL]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(4): 415[2024-06-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38675377/>. DOI: 10.3390/ph17040415.
- [3] BARATA J T, DURUM S K, SEDDON B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1584-1593. DOI: 10.1038/s41590-019-0479-x.
- [4] ZHANG L, KERKAR S P, YU Z Y, *et al.* Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment[J/OL]. *Mol Ther*, 2011, 19(4): 751-759[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3070103/>. DOI: 10.1038/mt.2010.313.
- [5] JAGANNATH S, LIN Y, GOLDSCHMIDT H, *et al.* KarMMa-RW: comparison of idecabtagene vicleucel with real-world outcomes in relapsed and refractory multiple myeloma[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(6): 116[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8213772/>. DOI: 10.1038/s41408-021-00507-2.
- [6] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)01200-4.
- [7] MOEK K L, FEHRMANN R S N, VAN DER VEGT B, *et al.* Glypican 3 overexpression across a broad spectrum of tumor types discovered with functional genomic mRNA profiling of a large cancer database[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(9): 1973-1981. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.05.014.
- [8] LIU J W, ZUO X L, WANG S. Diagnosis accuracy of serum glypican-3 level in patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis: a meta-analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(19): 3655-3673.
- [9] JAIN P, NASTOUPIL L, WESTIN J, *et al.* Outcomes and management of patients with mantle cell lymphoma after progression on brexucabtagene autoleucel therapy[J]. *Br J Haematol*, 2021, 192(2): e38-e42. DOI: 10.1111/bjh.17197.
- [10] KHEYROLAHZADEH K, TOHIDKIA M R, TARIGHATNIA A, *et al.* Theranostic chimeric antigen receptor (CAR)-T cells: Insight into recent trends and challenges in solid tumors[J/OL]. *Life Sci*, 2023, 328: 121917[2024-06-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37422069/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121917.
- [11] DAGAR G, GUPTA A, MASOODI T, *et al.* Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments[J/OL]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 449[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10327392/>. DOI: 10.1186/s12967-023-04292-3.
- [12] USLU U, CASTELLI S, JUNE C H. CAR T cell combination therapies to treat cancer[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(8): 1319-1325. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.07.002.
- [13] SASAKI T, SAKODA Y, ADACHI K, *et al.* Therapeutic effects of anti-GM2 CAR-T cells expressing IL-7 and CCL19 for GM2-positive solid cancer in xenograft model[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(11): 12569-12580. DOI: 10.1002/cam4.5907.
- [14] SHIN M H, OH E, KIM Y, *et al.* Recent advances in CAR-based solid tumor immunotherapy[J/OL]. *Cells*, 2023, 12(12): 1606[2024-06-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37371075/>. DOI: 10.3390/cells12121606.
- [15] PARK J H, LEE S W, CHOI D, *et al.* Harnessing the power of IL-7 to boost T cell immunity in experimental and clinical immunotherapies [J/OL]. *Immune Netw*, 2024, 24(1): e9[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10917577/>. DOI: 10.4110/in.2024.24.e9.
- [16] ZHAO Y, WEI K Y, CHI H, *et al.* IL-7: a promising adjuvant ensuring effective T cell responses and memory in combination with cancer vaccines? [J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1022808[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9650235/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1022808.
- [17] LEE L F, LOGRONIO K, TU G H, *et al.* Anti-IL-7 receptor- α reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12674-12679[2024-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412026/>. DOI: 10.1073/pnas.1203795109.
- [18] LUO H, SU J W, SUN R X, *et al.* Coexpression of IL7 and CCL21 increases efficacy of CAR-T cells in solid tumors without requiring preconditioned lymphodepletion[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(20): 5494-5505. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0777.

[收稿日期] 2024-06-28

[修回日期] 2024-08-21

[本文编辑] 党瑞山