

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.004

分泌PD-1抗体的EGFR-CAR-T细胞可明显抑制胃癌的进展

华海琴¹, 郑小妹¹, 吴大平¹, 李斐², 任庆¹(1. 儋州市人民医院 肿瘤内科, 海南 儋州 571700; 2. 中国药科大学 基础医学与临床药学院, 江苏省肿瘤发生与干预重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**探索分泌PD-1 scFv的CAR-T细胞对胃癌的抗癌功效。**方法:**选择EGFR作为CAR-T细胞的靶标,构建二代EGFR-CAR-T细胞(EGFR BB-z)和分泌PD-1 scFv的四代EGFR-CAR-T细胞(EGFR BB-z/E30),通过体外激活以及靶细胞长期刺激检测其抗肿瘤活性,通过胃癌移植瘤小鼠模型检测其肿瘤抑制能力。**结果:**胃癌组织及细胞均高表达EGFR(均 $P<0.01$)。通过慢病毒感染的方式成功获得EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30细胞。体外实验表明,与EGFR BB-z相比,EGFR BB-z/E30具有更长效的增殖能力及更强的肿瘤杀伤活性(均 $P<0.01$)。体内实验显示了EGFR BB-z/E30在胃癌细胞皮下移植瘤模型和胃癌人源性肿瘤异种移植瘤(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型中具有明显的肿瘤抑制能力(均 $P<0.01$),并可显著增加肿瘤部位T细胞的浸润($P<0.01$),减少EGFR BB-z/E30细胞表面PD-1的表达($P<0.01$)和高分泌IFN- γ 的水平($P<0.05$)。**结论:**分泌PD-1 scFv的EGFR-CAR-T细胞EGFR BB-z/E30可对胃癌进展产生显著的抑制作用,为胃癌治疗提供一种潜在新策略。

[关键词] 嵌合抗原受体T细胞; 实体瘤; 肿瘤免疫; PD-1

[中图分类号] R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)12-1336-09

EGFR-CAR-T cells secreting PD-1 antibody significantly suppress the progression of gastric cancer

HUA Haiqin¹, ZHENG Xiaomei¹, WU Daping¹, LI Fei², REN Qing¹(1. Department of Oncology, Danzhou People's Hospital, Danzhou 571700, Hainan, China; 2. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Jiangsu Key Laboratory of Oncology and Intervention, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-tumor effect of CAR-T cells secreting PD-1 scFv on gastric cancer. **Method:** We selected EGFR as the target of CAR-T cells and constructed second-generation EGFR-CAR-T cells (EGFR BB-z) and fourth-generation EGFR-CAR-T cells secreting PD-1 scFv (EGFR BB-z/E30). The anti-tumor activity was examined after *in vitro* activation and long-term stimulation, and its tumor suppression ability was validated through a mouse gastric cell xenograft model. **Results:** EGFR was highly expressed in gastric cancer tissues and cells (all $P<0.01$). EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 cells were successfully obtained by lentivirus infection. *In vitro* experiments showed that compared with EGFR BB-z, EGFR BB-z/E30 had longer long-term proliferation ability and stronger tumor killing activity (all $P<0.01$). *In vivo* experiments also validated that EGFR BB-z/E30 had obvious tumor inhibitory function in subcutaneous gastric tumor cell transplanted xenograft model and patient-derived tumor xenograft model (PDX) (all $P<0.01$). It also significantly increased T cell infiltration in tumor site and decreased the expression level of PD-1 ($P<0.01$ or $P<0.05$) on EGFR BB-z/E30 cell surface as well as the high secretion of IFN- γ ($P<0.05$). **Conclusion:** EGFR-CAR-T cell EGFR BB-z/E30 secreting PD-1 scFv can significantly inhibit the progression of gastric cancer and provide a potential new strategy for the treatment of gastric cancer.

[Key words] Chimeric antigen receptor T cells; solid tumors; tumor immunotherapy; PD-1

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1336-1344. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.004]

胃癌是全球癌症相关死亡数位居第3位的疾病,每年新诊断病例约100万^[1-2]。尽管手术技术和新的化疗方案有了显著进步,但晚期胃癌患者的5年生存率仍为5%~20%,中位总生存期(OS)约为10个月。因此,迫切需要研究延长患者生存时间的策略^[3]。嵌合抗原受体改造的T(CAR-T)细胞是一种颇具前途的癌症治疗策略。经典的CAR结构包括细胞外靶向肿瘤细胞的单链可变片段(scFv结构域)、短穿膜结

构域及具有细胞内T细胞信号转导功能的胞内共刺

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研资助项目(No.1801320712A2180)。

Project supported by the Scientific Research Project of Health and Family Planning Industry in Hainan Province (No. 1801320712A2180)

[作者简介] 华海琴(1983-),女,本科,主治医师,主要从事肿瘤内科的基础与临床研究,E-mail: 13518843811@163.com

[通信作者] 任庆(REN Qing, corresponding author),硕士,副主任医师,硕士生导师,主要从事肿瘤内科的基础与临床研究,E-mail: luxb17173@163.com

激域^[4-5]。临床前研究^[6-7]表明,靶向HER2的CAR-T细胞可诱导胃癌消退,这表明CAR-T细胞可作为胃癌治疗的下一代疗法。

EGFR是穿膜糖蛋白,属于ERBB受体酪氨酸激酶家族的成员^[8]。由于EGFR基因扩增和/或突变导致的EGFR过表达已在多种人类癌症中被观察到,并且与肿瘤复发、血管新生和癌症转移密切相关^[9]。在肿瘤细胞表面过度表达的EGFR的胞外结构域是一种理想的肿瘤特异性抗原,针对EGFR的治疗性单克隆抗体在多种癌症(如肺癌、头颈癌等)的治疗中发挥显著疗效^[8,10-11]。因此,EGFR可能是过继细胞免疫治疗的合适靶点。

尽管CAR-T细胞疗法在血液肿瘤中的疗效令人兴奋,但在实体瘤中的抗肿瘤效果未能取得同样的成功,部分原因是实体瘤的肿瘤微环境抑制了CAR-T细胞的抗肿瘤活性^[12],包括上调的抑制受体与其同源配体反应而介导的内在抑制途径^[13]。PD-1是一种抑制性受体,在癌症患者静息T细胞中不表达,但在功能耗竭的T细胞中高表达^[14]。PD-L1已被鉴定为PD-1的配体,它在抗原提呈细胞和肿瘤细胞表面表达,特别是在局部炎症细胞因子(例如I型和II型干扰素等)的刺激后会显著上调。PD-L1和PD-1的结合可能导致T细胞凋亡、功能丧失和衰竭^[15];因此,通过阻断PD-1和PD-L1的结合可以部分恢复其生物学活性^[16]。PD-1单抗pembrolizumab和nivolumab在黑色素瘤^[17]、NSCLC^[18]、RCC^[19]以及越来越多的实体瘤中取得了令人满意的治疗效果。但是,有不少患者在接受PD-1抗体治疗后并未完全反应,有些患者甚至完全没有反应,这些结果表明需要更好地了解阻断PD-1/PD-L1通路的作用途径和潜在的分子机制^[20]。动物模型研究和许多临床试验表明,阻断PD-1/PD-L1通路可能会影响肿瘤微环境中的肿瘤浸润淋巴细胞和其他免疫细胞^[21]。考虑到PD-1/PD-L1通路参与T细胞的抑制作用,本课题组推测携带PD-1抗体的CAR-T细胞可以免于受免疫抑制的影响,从而增强对实体瘤的抗肿瘤作用。

本研究检测到EGFR在很多胃癌组织中高表达,但在癌旁组织中表达有限,因此采用靶向EGFR的CAR改造T细胞,构建二代EGFR-CAR-T细胞,同时还构建了分泌PD-1 scFv的四代EGFR-CAR-T细胞以阻断PD-1/PD-L1信号通路,旨在探讨阻断PD-1/PD-L1通路是否会增强EGFR-CAR-T细胞在胃癌中的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、实验动物及临床标本

CD3/CD28激活磁珠和CD3⁺的分选磁珠购自德国Miltenyi Biotec公司,人淋巴细胞分离液(LymphoprepTM)购自Axis-Shield公司,N-乙酰基L-半胱氨酸购自美国Sigma公司,IL-2购自美国PeproTech公司,L-谷氨酰胺购自美国Gibco公司,polybrane购自中国Yeasen Biotech公司,anti-EGFR-PE、anti-CD4-PE均购自CA公司,anti-CD3-FITC、anti-Fab-FITC、anti-CD8-APC、anti-PD-1-PB450和anti-IFN- γ -FITC均购自BD公司,乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司,ELISA试剂盒购自杭州联科生物科技有限公司。

30只5~7周龄的雌性NOD/SCID小鼠(体质量23~29g),购买并饲养于海南医学院实验动物研究中心(动物合格证号:201833839;实验动物研究中心动物饲养许可证号:SYXK2016-0012)。所有实验方案均经儋州市人民医院动物护理和使用委员会批准进行(批准文号:20190930c1000120)。

选取2018年3月至2018年9月期间在儋州市人民医院32例患者手术切除的胃癌组织标本,其中男性21例、女性11例,年龄区间为32~71岁,同时选取其中3例癌旁组织标本(距肿瘤边缘>5cm处)作为对照。所有取材标本的患者以及本研究中提供新鲜外周血的健康志愿者均已签署知情同意书,并且得到儋州市人民医院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养与外周血T细胞的分离制备

采集儋州市人民医院血液科健康志愿者外周血并肝素抗凝,使用LymphoprepTM通过梯度离心分离获得外周血单个核细胞(PBMC),然后使用人T细胞亚型CD3⁺的分选磁珠通过阳性筛选富集T细胞。分离的T细胞在添加5%人AB血清、10mmol/L N-乙酰基L-半胱氨酸和300U/ml人IL-2的X-VIVO15培养基中培养。

胃癌细胞MKN28、MGC-803、MKN7和MGC-27获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。MKN28、MKN7细胞在RPMI 1640培养基中培养,MGC-803和MGC-27细胞在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)中培养,所有的肿瘤细胞培养基均补充有10%胎牛血清、2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。

1.3 胃癌细胞皮下移植瘤小鼠模型和人源胃癌组织小鼠移植瘤模型的制备

胃癌细胞皮下移植瘤造模:将密度为 5×10^6 个胃癌细胞MGC-803-Luc与基质胶混合后重悬于100 μ l PBS中,取0.1ml的细胞悬液接种至小鼠左侧腋下,观察小鼠一般情况及成瘤情况,肉眼可见移植瘤出现后用游标卡尺测量移植瘤;当移植瘤体积达到

80 mm³左右时(接种后约7 d)认为模型构建成功。

人源性胃癌组织移植瘤(patient-derived tumor xenograft, PDX)造模:将手术切除的肿瘤组织在生理盐水中漂洗后,用眼科剪剪成约为2 mm³的小块,通过手术切开小鼠左侧腋下皮肤,将肿瘤组织埋植在小鼠皮下,缝合伤口,直至肿瘤形成。待肿瘤大小长至100 mm³时认为PDX模型构建成功。

1.4 免疫组化染色检测胃癌和癌旁组织中EGFR的表达

将组织标本用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋,切成4 μm厚的切片,通过二甲苯脱蜡以及梯度乙醇脱水处理,使用5%山羊血清室温封闭1 h,之后用anti-MSLN抗体(1:100)在4℃下孵育过夜,次日使用羊抗兔二抗(1:1 000)室温避光孵育1 h,使用PBS清洗3遍,进行显微拍照。EGFR的染色强度通过Image Pro Plus 5.0计算积分吸光度(IA)来表征,IA值越大,代表EGFR阳性染色越强。

1.5 携EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30重组慢病毒感染T细胞构建二代和四代EGFR-CAR-T细胞

EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30重组慢病毒的构建由上海汉恒生物科技有限公司完成。重组慢病毒感染前48 h,在T细胞培养基中以2:1的磁珠与细胞比例加入人CD3/CD28珠,激活分离T细胞。将激活的T细胞分为3组,未感染病毒的PBS组、感染EGFR BB-z病毒组和感染EGFR BB-z/E30病毒组,之后以MOI值为8分别加入编码对应基因的慢病毒,并加入终浓度为7 μg/ml的polybrene,1 200×g离心60 min,在37℃、5%CO₂条件下孵育过夜。重组慢病毒感染5 d后,收获修饰的T细胞,分别命名为EGFR BB-z(二代)和EGFR BB-z/E30(四代),通过流式细胞仪检测感染后T细胞中CAR的表达情况。

1.6 流式细胞术检测肿瘤细胞EGFR表达、CAR-T细胞表型及其IFN-γ的分泌

EGFR检测:通过离心获得所有瘤细胞,用FACS洗涤缓冲液(1×PBS:0.5%BSA和0.03%叠氮化钠)洗涤3次,用100 μl PBS重悬细胞,加入anti-EGFR-PE的流式抗体,避光孵育30 min,用PBS洗涤3次,上机检测。

CAR-T细胞表型检测:阳性率检测用anti-Fab-FITC,其余表型分子使用anti-CD3-FITC、anti-CD4-PE、anti-CD8-APC和anti-PD-1-PB450抗体检测,方法同EGFR检测。

CAR-T细胞分泌IFN-γ检测:在经历表面染色后,采用固定/破膜剂处理细胞30 min,Perm/Wash溶液洗涤3次,使用anti-IFN-γ避光染色30 min,洗涤3次,上机检测。

此外,用CD3-PerCP/CD4-FITC/CD8-PE TruCOUNT

试剂盒检测经过EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30处理的小鼠的外周血T细胞的数量,根据产品说明书操作方法对CD4⁺和CD8⁺T细胞进行定量。

1.7 ELISA实验检测CAR-T细胞对肿瘤细胞中IL-2、IFN-γ和TNF-α表达的影响

取1×10⁴个靶细胞重悬于100 μl,将效靶细胞以3:1的比例在U形底96孔板中混合后孵育24 h,低速离心10 min收获上清液,并按照ELISA实验产品说明书操作步骤测定释放的靶细胞中IL-2、IFN-γ和TNF-α水平。

1.8 效靶细胞共孵育实验检测CAR-T细胞的增殖及其对肿瘤细胞的抑制能力

为了评估效应CAR-T细胞的细胞毒性及增值能力,首先将MGC-803细胞以1×10⁶个/孔铺在6孔组织培养板中并添加完全培养基,4 d后分别将效应细胞EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30以效靶比为1:40加入孔中,不添加额外的外源性细胞因子,之后每7 d收集细胞并通过流式细胞术(CD3阳性)和细胞计数定量CAR-T细胞数量。在第5次刺激之前,用5 μmol/L cell trace dilution染料预先将EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30进行染色,然后以3:1的效靶标比与MGC-803细胞共培养96 h。通过流式细胞术测量每组中效应细胞的荧光强度来表征CAR-T细胞的增殖情况。

1.9 回输CAR-T细胞检测其对小鼠移植瘤的抑制作用

成功构建胃癌细胞MGC-803-luc皮下移植瘤模型后,将PBS、EGFR BB-z和EGFR BB-z/E303组小鼠分别通过尾静脉给予100 μl的PBS、1×10⁷个的EGFR BB-z和1×10⁷个的EGFR BB-z/E30(*n*=4),之后通过Xenogen IVIS Spectrum System测量生物发光,所有测量每7 d进行1次。对表现出垂死状态的小鼠实施安乐死。同时在PDX模型成功造模后,将肿瘤大小约为100 mm³的荷瘤小鼠随机分成对照组和治疗组(*n*=5),所有小鼠通过尾静脉回输100 μl的密度为1×10⁸个/ml效应细胞,每3 d测量一次肿瘤体积。当小鼠的体质量减轻大于初始体质量的20%时或无法走动或者肿瘤在对照组中发生溃烂时被处死。

1.10 流式细胞术检测荷瘤小鼠外周血中T细胞的数目

在上述相同的动物实验中,于接种肿瘤细胞后第20天通过小鼠眼眶取血收集200 μl血液以测量体内T细胞的水平和检测CD8⁺和CD4⁺T细胞的数目。

1.11 免疫荧光实验检测移植瘤组织中EGFR的表达水平、浸润的CAR-T细胞水平

为了评估处理后的移植瘤组织中CAR-T细胞的浸润情况,将肿瘤组织冰冻切片后使用5%山羊血清室温封闭1 h,再用anti-CD3、anti-EGFR抗体(1:150)在

4℃下孵育过夜,次日使用羊抗兔及羊抗鼠荧光二抗(1:1 000)室温避光孵育1 h,使用PBS清洗3遍,进行显微拍照。定量方法同1.4,即通过Image Pro Plus 5.0计算积分IA值来表示荧光强度,IA值越大,代表荧光越强。

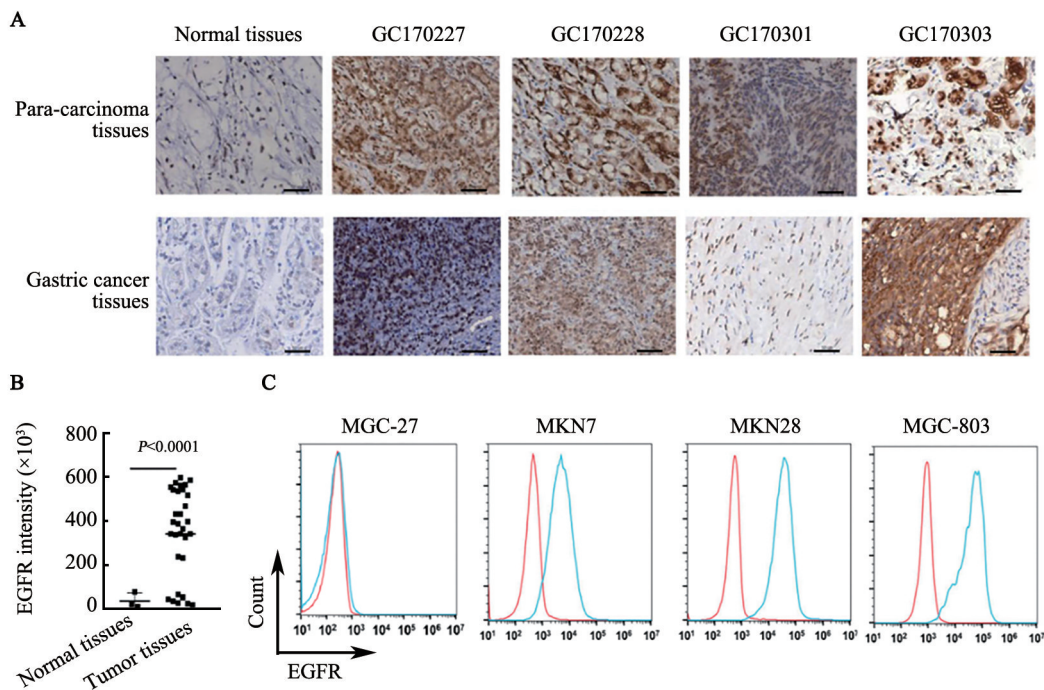
1.12 统计学处理

上述相关实验均重复3次。采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间样本均数比较采用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 胃癌组织和细胞中高表达EGFR

免疫组化染色分析结果(图1A、B)显示,与癌旁组织相比,EGFR在人胃癌组织中高表达[(753 652.0±275.0) vs (173 562.0±116.0), $t=253.2, P<0.01, n=32$]。流式细胞术检测结果(图1C)显示,与MGC-27相比,在胃癌MKN7细胞[(78.3±2.16) vs (6.53±1.02), $t=12.56, P<0.01$]、MKN28细胞[(95.5±0.92) vs (6.53±1.02), $t=8.538, P<0.01$]及MGC-803细胞[(89.6±1.56) vs (6.53±1.02), $t=6.522, P<0.01$]中EGFR的表达水平均显著增加。因此,后续实验选择了这3种细胞作为体外实验的靶细胞,以EGFR阴性的MGC-27作为对照细胞。



A: Immunohistochemical detection of representative para-carcinoma (normal) tissues and gastric cancer tissues (×10); B: Statistical analysis of EGFR expression; C: Flow cytometry detection of EGFR expression in gastric cancer cells

图1 胃癌组织和胃癌细胞系中EGFR表达的检测

Fig.1 Detection of EGFR expression in gastric tissues and cancer cell lines

2.2 成功制备EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30两种CAR-T细胞

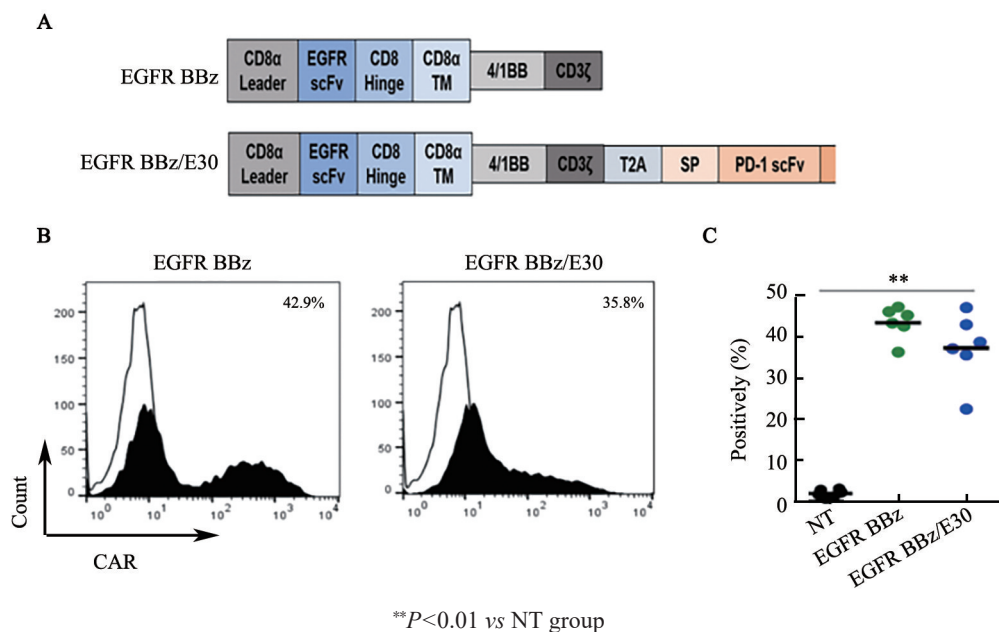
在构建靶向EGFR的二代CAR序列(EGFR BB-z)、CD3ζ介导T细胞激活和以4-1BB作为共刺激信号框架的基础上,参考文献[22]方法成功构建了可以分泌PD-1 scFv(clone 332.8H3)的四代CAR序列(EGFR BB-z/E30)(图2A)。重组慢病毒感染T细胞后,利用抗-Fab抗体通过流式细胞仪检测CAR的阳性率,发现重组慢病毒有良好的感染效果(图2B)。与未感染的T细胞(NT组)相比,构建的两种CAR-T细胞阳性率稳定在40%左右(图2C,均 $P<0.01$),表明两种CAR-T细胞被成功构建。

2.3 二代和四代CAR-T细胞呈现显著的剂量依赖性细胞毒性及细胞因子高表达

将4种肿瘤细胞MKN7、MKN28、MGC-803和MGC-27分别与制备的CAR-T细胞以3:1、1:1和1:3的效靶比共孵育,24 h后用LDH检测试剂盒检测上清中LDH释放水平来表征细胞毒性,结果(图3A)表明,随着效靶比增加,EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30对过表达EGFR的MKN28、MGC-803及MKN7细胞表现出显著的剂量依赖性细胞毒作用(均 $P<0.01$),而对EGFR阴性的MGC-27细胞则几乎没有细胞毒性。ELISA检测结果(图3B)显示,在和EGFR阳性胃癌细胞存在下,EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30中的

IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的分泌水平明显高于未转染的 T 细胞 (NT 组) (均 $P < 0.01$), 而在与 EGFR 阴性的 MGC-27 细胞共培养的 EGFR BB-z 和 EGFR BB-z/E30 中仅检测到相关细胞因子基础分泌水平; 而 EGFR BB-z 和 EGFR BB-z/E30 间的细胞毒性与细胞因子分泌水

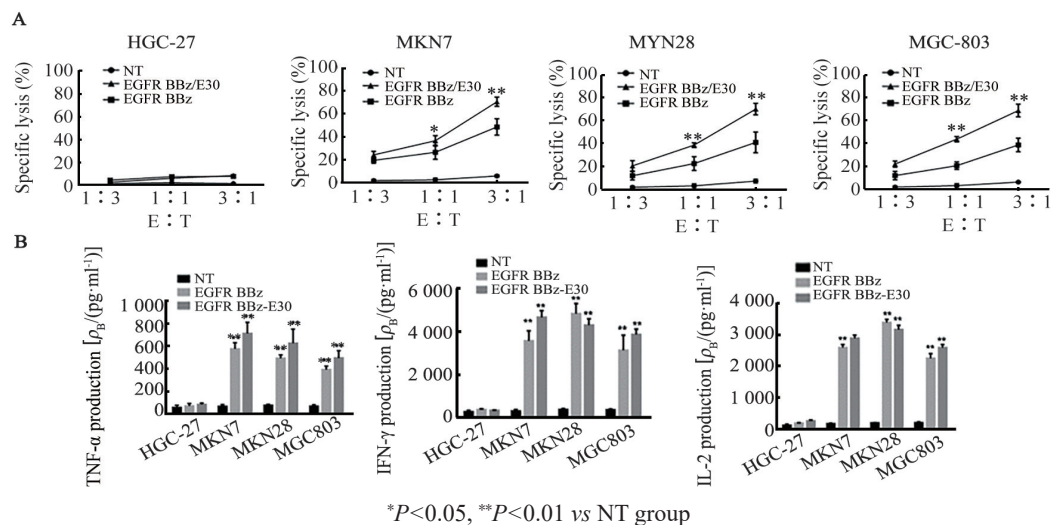
平的差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。以上结果表明, 所构建的 EGFR BB-z 和 EGFR BB-z/E30 在体外显示出明显的抗原依赖的细胞毒性及较强的细胞因子分泌功能。



A: Schematic diagram of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30; B: On day 5 after T cell transfection, the positive rate of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 was detected by flow cytometry; C: Statistical analysis of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 transfection efficiency

图2 两种 CAR-T 细胞构建的鉴定

Fig.2 Construction of two effector CAR-T cells



A: Cytotoxicity testing by LDH level; B: Expression of IFN- γ , IL-2, TNF- α supernatant by ELISA assay

图3 EGFR-CAR-T 细胞体外细胞毒性及细胞因子分泌水平

Fig.3 Cytotoxicity and cytokine secretion of EGFR-CAR-T cells *in vitro*

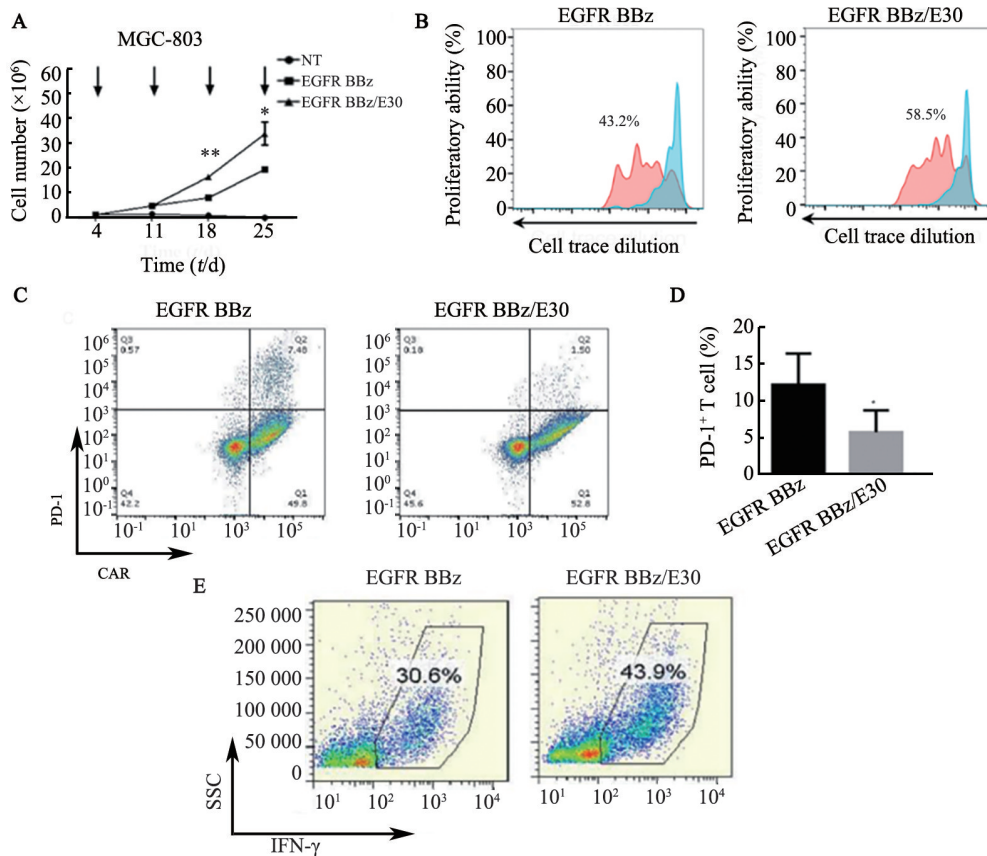
2.4 PD-1 scFv 可使四代 EGFR-CAR-T 细胞具有长效的增殖能力和较低的 PD-1 与较高的 IFN- γ 水平

为了评估分泌 PD-1 scFv 是否会在长期刺激后对 EGFR-CAR-T 细胞活性产生影响, 将 MGC-803 细

胞与效应细胞共孵育 28 d 后对 T 细胞计数, 结果 (图 4A) 显示, 在长期刺激后, EGFR BB-z/E30 较 EGFR BB-z 细胞的 T 细胞数目显著增多 ($t = 11.97, P < 0.01$)。同时, Cell Trace Dilution 染料染色结果 (图 4B) 也表明, PD-1

scFv 使得EGFR-CAR-T 细胞在体外长期刺激后增殖能力更强[(50.23±5.68)% vs (41.26±3.37)%; $t=8.263$, $P<0.01$]。流式细胞术法检测 EGFR BB-z 和 EGFR BB-z/E30 的表面PD-1 表达及细胞因子 IFN- γ 释放水平, 结果(图 4C、D)显示, 在长期刺激的过程中, EGFR BB-z/E30 表面PD-1 表达水平比 EGFR BB-z 更低($t=6.527$, $P<0.05$), 而分泌 IFN- γ 的细胞数目又显

著高于 EGFR BB-z, 反映出PD-1 scFv 可以更好地维持EGFR-CAR-T 细胞的抗肿瘤活性(图 4E, $t=3.192$, $P<0.05$)。综合以上结果表明, 分泌PD-1 scFv 可以使得四代EGFR-CAR-T 细胞在肿瘤细胞的长期刺激下依旧可以保持良好的增殖活性和较低的PD-1 表达水平与较高的 IFN- γ 分泌水平。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs EGFR BB-z/E30 group or EGFR BB-z group

A: Co-incubation of effective target cells lasting 28 d, the arrow represents the addition of fresh tumor cells, and the T cells in the system were counted every 7 d during the period, the arrow indicates adding fresh tumor cells; B: EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 after long-term stimulation with Cell Trace Dilution to test their proliferation ability; C: After incubation for 28 d, T cells were collected and the expression of PD-1 on the surface of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 was measured using flow cytometry; D: Histogram of PD-1 expression on the surface of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30; E: After incubation for 28 d, T cells were collected and flow cytometry was used to determine the expression of IFN- γ in EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 cells

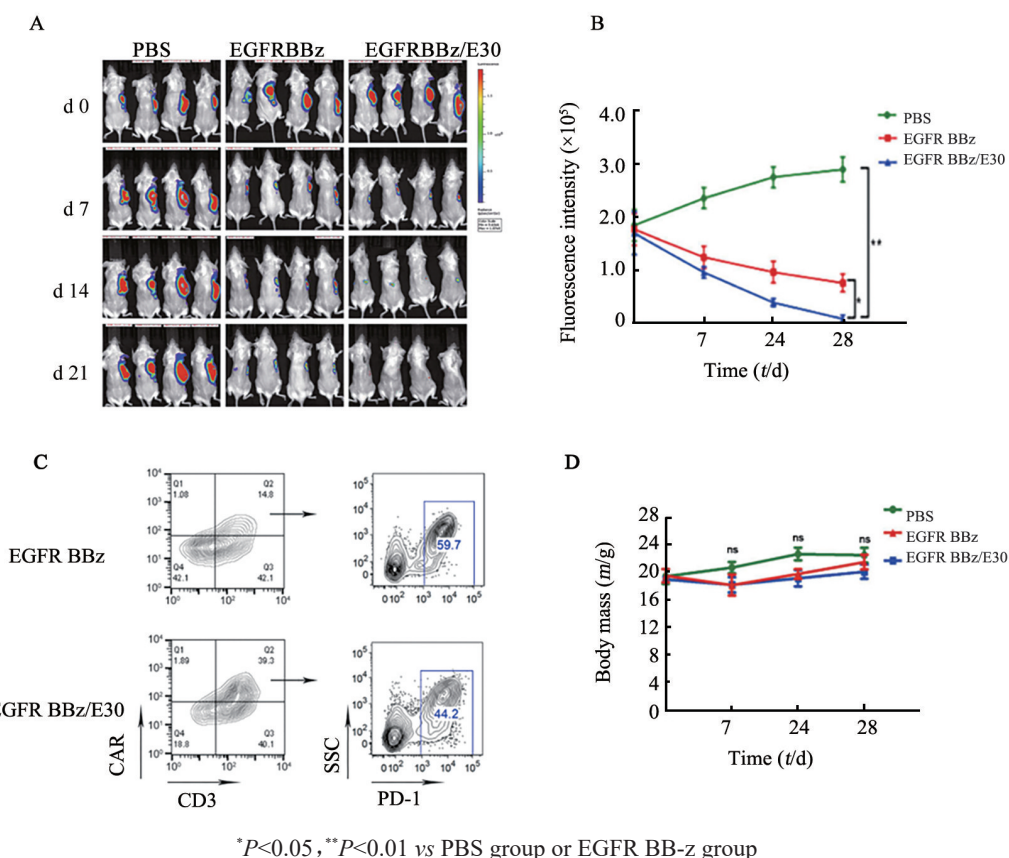
图4 体外肿瘤细胞长期刺激下EGFR-CAR-T细胞增殖能力和PD-1与IFN- γ 水平检测

Fig.4 EGFR-CAR-T cell proliferative viability and expressions of PD-1 and IFN- γ were detected after long-term stimulation *in vitro*

2.5 自分泌PD-1 scFv显著增强EGFR-CAR-T细胞在胃癌细胞皮下移植瘤模型中的抗肿瘤能力

为了进一步比较EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30的体内抗肿瘤活性, 本研究使用携带胃癌细胞皮下移植瘤的NOD/SCID小鼠进行实验, 检测活体成像移植瘤的荧光强度, 结果显示, EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30均可明显抑制肿瘤的生长(图 5A, $t=12.72$, $P<0.05$), 但EGFR BB-z/E30较EGFR BB-z肿瘤抑制得更加明显(图 5B, $t=18.33$, $P<0.01$)。流式细胞术

检测结果(图 5C)显示, EGFR BB-z/E30在肿瘤组织中浸润的数量远大于EGFR BB-z($t=32.53$, $P<0.01$), 而浸润EGFR BB-z/E30的肿瘤表面PD-1的表达水平较EGFR BB-z明显降低($t=8.175$, $P<0.05$)。此外, 在整个体内实验过程中, 小鼠体质量变化差异无统计学意义($P>0.05$, 图 5D)。皮下移植瘤实验结果表明, EGFR BB-z与EGFR BB-z/E30对胃癌移植瘤均具有明显的抑制作用, 且EGFR BB-z/E30的抗肿瘤效果更佳。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group or EGFR BB-z group
 A: *In vivo* imaging of MGC-803-Luc xenograft tumor model after treatment; B: Fluorescence intensity changed in mice xenograft model after treatment; C: Changes in the body mass of mice; D: Flow cytometry analysis on EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 infiltrating in xenograft tumor tissues, and the expression level of PD-1

图5 EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30在胃癌细胞皮下移植瘤模型中的抗肿瘤能力

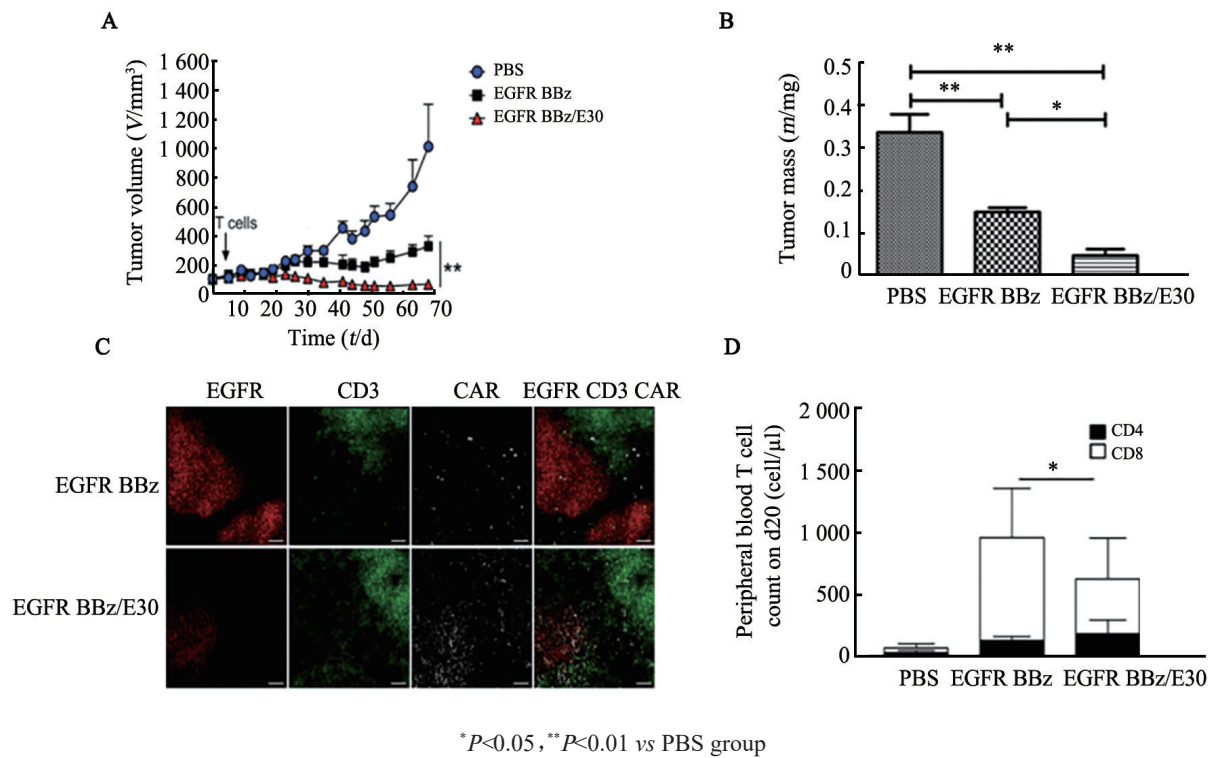
Fig.5 Anti-tumor ability of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 in a gastric cell xenograft tumor model

2.6 自分泌PD-1 scFv明显增强EGFR-CAR-T细胞在胃癌组织PDX模型中的抗肿瘤功能

本研究通过建立人胃癌小鼠PDX模型,进一步比较了EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30的抗肿瘤功能。成功建模后通过小鼠尾静脉分别注射PBS、EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30,检测结果(图6A)显示,EGFR BB-z与EGFR BB-z/E30均可显著抑制肿瘤的生长,而EGFR BB-z/E30对肿瘤的抑制率及抑瘤时间都高于EGFR BB-z(均 $P < 0.01$)。各组移植瘤体质量检测(图6B)发现,EGFR BB-z/E30较EGFR BB-z可以更加显著地抑制PDX模型中的移植瘤生长($P < 0.05$, $t = 12.76$)。免疫荧光检测结果(图6C)显示,EGFR BB-z/E30在肿瘤组织中浸润更加明显[(207.2 ± 10.28) vs (83.33 ± 2.108), $P < 0.01$]。出乎意料的是,在回输效应细胞20 d后,外周血中EGFR BB-z/E30比EGFR BB-z少(图6D, $t = 5.363$, $P < 0.05$),分析原因可能是EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30存在固有的增殖活性差异所致。结果表明,在胃癌PDX模型中EGFR BB-z/E30较EGFR BB-z的抗肿瘤效果更佳。

3 讨论

CAR-T细胞疗法已经在血液系统恶性肿瘤中取得了卓越的临床效果,目前免疫细胞治疗的主要焦点是推进CAR-T细胞用于治疗实体肿瘤^[23]。由于几种肿瘤抗原,包括EGFR、Her2、MSLN等在胃癌中广泛过表达^[24-25],因此CAR-T细胞疗法在这些恶性肿瘤中具有广泛的应用前景。然而CAR-T细胞在实体瘤中往往表现出抗肿瘤活性不佳的状态,主要的一个原因是肿瘤微环境对CAR-T细胞的抑制作用^[26]。免疫检查点,尤其是PD-1、PD-L1抗体带来的显著的临床疗效,对克服CAR-T细胞在实体瘤中的抑制状态带来希望^[27]。传统的PD-1抗体与CAR-T细胞联用已经在一些临床试验中取得了一定效果,但联合治疗由于全身给药,往往会带来一定的不良反应,同时富集至肿瘤组织的PD-1抗体数量有限,往往不能达到最佳的免疫激活功效^[28]。同时,联合治疗带来的高昂费用也让很多患者望而却步,而让CAR-T细胞自分泌PD-1抗体似乎可以解决这些问题。



A: Tumor volume data; B: Tumor mass data; C: Representative results of immunofluorescence analysis of EGFR BB-z and EGFR BB-z/E30 infiltration in tumor tissues ($\times 10$); D: The number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood

图6 EGFR BB-z和EGFR BB-z/E30在胃癌组织PDX模型中的抗肿瘤效果

Fig.6 Antitumor effect of EGFR BB-z and EGFR BB-z / E30 in gastric tumor tissue PDX model

本研究通过筛选得到了过表达EGFR的胃癌细胞,构建了靶向EGFR的二代CAR序列EGFR BB-z及可以分泌PD-1 scFv的四代CAR序列EGFR BB-z/E30,期望自分泌PD-1 scFv的EGFR-CAR-T细胞能发挥更好的抗肿瘤活性。通过一系列实验发现,EGFR BB-z及EGFR BB-z/E30都可以以抗原依赖的方式发挥细胞毒作用,而EGFR BB-z/E30在长期刺激后较EGFR BB-z拥有更强的增殖和杀伤肿瘤活性。通过建立小鼠皮下胃癌细胞移植瘤和胃癌组织PDX模型,在体内同样显示EGFR BB-z及EGFR BB-z/E30可以抑制胃癌移植瘤,并且EGFR BB-z/E30抗肿瘤效果更佳。

本课题组今后将选择一些胃癌中其他潜在的靶点,如MSLN、Her2等,拓宽这种自分泌PD-1 scFv的CAR-T细胞在胃癌治疗中的应用。然而,有研究^[29]发现,靶向单个EGFR抗原的CAR-T细胞仍然存在脱靶的风险。后续实验中可以考虑采用双受体CAR-T细胞策略,或者采用外源开关分子控制的CAR-T细胞激活,从而减少其脱靶风险^[30]。此外,由于需要转染同时编码双受体CAR和PD-1抗体的大片段基因,后续会探索通过电转法高效构建CAR-T细胞。总之,自分泌PD-1 scFv的EGFR-CAR-T细胞在胃癌中发挥了显著的抗肿瘤功能,有希望为胃癌治疗提供一种全新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] CHENG J, CAI M, SHUAI X M, et al. First-line systemic therapy for advanced gastric cancer: a systematic review and network meta-analysis [J/OL]. Ther Adv Med Oncol, 2019, 11: 1-44[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6767753/>. DOI: 10.1177/1758835919877726.
- [2] 白日兰, 杜娜雯, 崔久嵬, 等. 免疫治疗联合化疗在胃癌治疗中的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(6): 700-704. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.014.
- [3] SELIM J H, SHAHEEN S, SHEU W C, et al. Targeted and novel therapy in advanced gastric cancer[J/OL]. Exp Hematol Oncol, 2019, 8: 25[2020-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6788003/>. DOI:10.1186/s40164-019-0149-6.
- [4] HOLSTEIN S A, LUNNING M A. CAR-T cell therapy in hematologic malignancies: a voyage in progress[J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 107(1): 112-122. DOI:10.1002/cpt.1674.
- [5] SCHEPISI G, CURSANO M C, CASADEI C, et al. CAR-T cell therapy: a potential new strategy against prostate cancer[J/OL]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 258[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6794851/>. DOI: 10.1186/s40425-019-0741-7.
- [6] HAN Y L, LIU C Y, LI G H, et al. Antitumor effects and persistence of a novel HER2 CAR T cells directed to gastric cancer in preclinical models[J/OL]. Am J Cancer Res, 2018, 8(1): 106-119[2020-08-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5794725/>.
- [7] SONG Y J, TONG C, WANG Y, et al. Effective and persistent

- antitumor activity of HER2-directed CAR T cells against gastric cancer cells in vitro and xenotransplanted tumors in vivo[J/OL]. *Protein Cell*, 2018, 9(10): 867-878[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6160382/>. DOI:10.1007/s13238-017-0384-8.
- [8] LIU S H, CHEN X F, XIE Z B, et al. EGFR monoclonal antibody panitumumab inhibits chronic proliferative cholangitis by downregulating EGFR[J/OL]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(1): 79-88 [2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6559293/>. DOI:10.3892/ijmm.2019.4190.
- [9] JIA Y J, ZHAO S, JIANG T, et al. Impact of EGFR-TKIs combined with PD-L1 antibody on the lung tissue of EGFR-driven tumor-bearing mice[J]. *Lung Cancer*, 2019, 137(11): 85-93. DOI:10.1016/j.lungcan.2019.09.016.
- [10] AL-SALEH K, EL-SHERIFY M, SAFWAT R, et al. Phase II/III randomized controlled trial of concomitant hyperfractionated radiotherapy plus cetuximab (anti-EGFR antibody) or chemotherapy in locally advanced head and neck cancer[J]. *Gulf J Oncolog*, 2019, 1(30):6-12.
- [11] MCDAID W J, GREENE M K, JOHNSTON M C, et al. Repurposing of Cetuximab in antibody-directed chemotherapy-loaded nanoparticles in EGFR therapy-resistant pancreatic tumours [J/OL]. *Nanoscale*, 2019, 11(42): 20261-20273[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6861736/>. DOI: 10.1039/c9nr07257h.
- [12] AKBARI P, HUIJBERS E J M, THEMELI M, et al. The tumor vasculature an attractive CAR-T cell target in solid tumors[J/OL]. *Angiogenesis*, 2019, 22(4): 473-475[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864117/>. DOI: 10.1007/s10456-019-09687-9.
- [13] BAGLEY S J, O'ROURKE D M. Clinical investigation of Car T cells for solid tumors: Lessons learned and future directions[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 205: 107419. DOI:10.1016/j.pharmthera.2019.107419.
- [14] MELEVEEDU K S, CHEN D, NADIMINTI K, et al. PD-1/PD-L1 expression in extramedullary lesions of acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2019: 1-4. DOI:10.1080/10428194.2019.1675880.
- [15] LIU Y T, ZUGAZAGOITIA J, AHMED F S, et al. Immune cell PD-L1 colocalizes with macrophages and is associated with outcome in PD-1 pathway blockade therapy[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(4): 970-977 [2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC024671/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-1040.
- [16] QORRAJ M, BÖTTCHER M, MOUGIAKAKOS D. PD-L1/PD-1: new kid on the “immune metabolic” block[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73364-73365[2020-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5650265/>. DOI:10.18632/oncotarget.20639.
- [17] TANG B X, YAN X Q, SHENG X N, et al. Safety and clinical activity with an anti-PD-1 antibody JS001 in advanced melanoma or urologic cancer patients[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 1-15. DOI:10.1186/s13045-018-0693-2.
- [18] JIA M H, FENG W J, KANG S Y, et al. Evaluation of the efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibody in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis[J/OL]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(3): 455-461[2020-08-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387409/>. DOI:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.06.
- [19] MIZUTANI K, HORIE K, KATO T, et al. Serum PD-1 levels measured by ELISA using Nivolumab increased in advanced RCC patients: novel approach to develop companion diagnostics for antibody therapy [J/OL]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(6): 1661-1663 [2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527537/>. DOI: 10.1007/s00432-018-2806-2.
- [20] WANG W G, CARPER K, MALONE F, et al. PD-L1/PD-1 signal deficiency promotes allogeneic immune responses and accelerates heart allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2008, 86(6): 836-844. DOI:10.1097/TP.0b013e3181861932.
- [21] MIZUNO R, SUGIURA D, SHIMIZU K, et al. PD-1 primarily targets TCR signal in the inhibition of functional T cell activation[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 630[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6455061/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.00630.
- [22] REARDON D A, GOKHALE P C, KLEIN S R, et al. Glioblastoma eradication following immune checkpoint blockade in an orthotopic, immunocompetent model[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(2): 124-135. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0151.
- [23] MARTINEZ M, MOON E K. CAR-T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 128[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6370640/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.00128.
- [24] BENLI YAVUZ B, KOÇ M, KOZACIÖÇLU S, et al. Prognostic importance of PTEN, EGFR,HER-2, and IGF-1R in gastric cancer patients treated with postoperative chemoradiation[J/OL]. *Turk J Med Sci*, 2019, 49(4): 1025-1032[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7018360/>. DOI:10.3906/sag-1802-34.
- [25] HUCL T, BRODY J R, GALLMEIER E, et al. High cancer-specific expression of mesothelin (MSLN) is attributable to an upstream enhancer containing a transcription enhancer factor dependent MCAT motif[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9055-9065. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-0474.
- [26] GIRALDO N A, SANCHEZ-SALAS R, PESKE J D, et al. The clinical role of the TME in solid cancer[J/OL]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 45-53[2020-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325164/>. DOI:10.1038/s41416-018-0327-z.
- [27] READY N E, OTT P A, HELLMANN M D, et al. Nivolumab monotherapy and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small cell lung cancer: results from the CheckMate 032 randomized cohort[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(3): 426-435. DOI:10.1016/j.jtho.2019.10.004.
- [28] LAINEZ S, TISSOT C, COTTIER M, et al. EBUS-TBNA can distinguish sarcoid-like side effect of nivolumab treatment from tumor progression in non-small cell lung cancer[J]. *Respiration*, 2017, 94(6): 518-521. DOI:10.1159/000480155.
- [29] 李津杞, 顾海慧, 杨建民, 等. 嵌合抗原受体修饰的T细胞治疗肿瘤的不良反应及相关治疗方案的研究进展[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(2): 169-173. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.019.
- [30] 魏运雄. 嵌合抗原受体基因修饰T细胞免疫疗法在肿瘤治疗中的进展与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(8): 904-909. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2019.08.012.

[收稿日期] 2020-08-15

[修回日期] 2020-11-25

[本文编辑] 阮芳铭