

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.005

· 基础研究 ·

新型全人源LAG3单克隆抗体的体外抗肿瘤作用及其机制初探

张陈^{1,2a,2b}, 刘平^{2a,2c}, 于晓杰^{2a,2b}, 刘剑飞^{2a,2b}, 钦可为^{2a,2b}, 吴成林^{1,2a,2b,▲}, 周丽君^{1,2a,2b} (1. 安徽医科大学 海军临床学院, 安徽 合肥 230032; 2. 中国人民解放军总医院第六医学中心 a. 中心实验室; b. 耳鼻咽喉头颈外科医学部; c. 全科医学科, 北京 100048)

[摘要] **目的:** 构建LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞的共培养模型, 探讨新型全人源LAG3单克隆抗体(LAG3 mAb)的体外抗肿瘤作用及其可能的机制。 **方法:** 使用PHA刺激Jurkat细胞模拟TIL, 通过ELISA法检测Jurkat细胞的IL-2分泌水平来评估细胞活化程度, 通过FCM、免疫荧光法和WB法检测活化后Jurkat细胞的LAG3表达水平及肿瘤细胞(胃癌HGC-27、MGC-803细胞和NSCLC A549细胞)中LAG3配体MHC II类分子(MHC-II)的表达水平。构建活化的LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞的共培养模型, CCK-8法评估在不同效靶比时LAG3⁺Jurkat细胞杀伤肿瘤细胞的效率及抗LAG3 mAb对杀伤效率的影响, ELISA法检测共培养体系上清液中细胞因子IL-2、IL-10和TNF- α 的分泌水平。 **结果:** 2 μ g/mL PHA刺激48 h对Jurkat细胞无明显毒性($P>0.05$), 且能够活化Jurkat细胞使其分泌IL-2($P<0.01$)并诱导LAG3表达($P<0.01$), 获得活化的LAG3⁺Jurkat细胞。MGC-803和A549细胞显著表达MHC-II($P<0.01$), 但HGC-27细胞不表达($P>0.05$)。选用效靶比10:1构建LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞的共培养模型, 抗LAG3 mAb能够有效增强Jurkat细胞对两种MHC-II⁺肿瘤细胞的杀伤作用(均 $P<0.05$), 并且MHC-II⁺靶细胞组共培养上清液中细胞因子IL-2、IL-10和TNF- α 水平均显著升高(均 $P<0.01$)。 **结论:** 成功构建LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞体外共培养模型, 抗LAG3 mAb可能通过阻断LAG3/MHC-II相互作用提高LAG3⁺Jurkat细胞对肿瘤细胞MGC-803和A549的杀伤作用, 并且该作用可能与共培养体系中细胞因子IL-2、IL-10和TNF- α 分泌水平升高有关。

[关键词] 肿瘤; T细胞; Jurkat细胞; 淋巴细胞活化基因3; 全人源单克隆抗体; MHC II类分子; 细胞因子

[中图分类号] R730.51; R73-36+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0419-07

Preliminary study on the anti-tumor effect and mechanism of a novel fully human anti-LAG3 monoclonal antibody *in vitro*

ZHANG Chen^{1,2a,2b}, LIU Ping^{2a,2c}, YU Xiaojie^{2a,2b}, LIU Jianfei^{2a,2b}, QIN Kewei^{2a,2b}, WU Chenglin^{1,2a,2b,▲}, ZHOU Lijun^{1,2a,2b} (1. Naval Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China; 2. a. Central Laboratory; b. College of Otolaryngology Head and Neck Surgery; c. Department of General Practice, the Sixth Medical Center of the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective:** The co-culture model of LAG3⁺Jurkat cells and tumor cells was constructed to investigate the anti-tumor effect and mechanism of a novel fully human anti-LAG3 monoclonal antibody *in vitro*. **Methods:** Jurkat cells were stimulated with PHA to simulate TIL, and the secretion of IL-2 was detected by ELISA to evaluate the degree of Jurkat cell activation. Meanwhile, FCM, Immunofluorescence and WB assays were employed to detect the expression of LAG3 in activated Jurkat cells and MHC class II molecule (MHC-II), a LAG3 ligand, in HGC-27, MGC-803 and A549 tumor cells. The co-culture model of activated LAG3⁺Jurkat cells and tumor cells was constructed, and CCK-8 assays were employed to detect the killing efficiency of LAG3⁺Jurkat cells against tumor cells at different effector-target ratios and the effect of the anti-LAG3 antibody. The secretion levels of cytokines IL-2, IL-10 and TNF- α in supernatant of co-culture system were detected by ELISA. **Results:** After 48 h treatment, 2 μ g/mL PHA exhibited no obvious cytotoxicity to Jurkat cells ($P>0.05$), but could significantly induce IL-2 secretion ($P<0.01$) and LAG3 expression ($P<0.01$), indicating activated LAG3⁺Jurkat cells were acquired. MGC-803 and A549 cells significantly expressed MHC-II ($P<0.01$), but HGC-27 cells did not express MHC-II ($P>0.05$). The co-culture model of LAG3⁺Jurkat cells and tumor cells was constructed at a effector-target ratio of 10:1. The anti-LAG3 antibody could effectively enhance the killing efficiency of Jurkat cells against MHC-II⁺ tumor cells ($P<0.05$). Further analysis revealed that the secretion levels of cytokines IL-2, IL-10 and TNF- α were increased in the co-culture supernatant of MHC-II⁺ target cell group (all $P<0.01$). **Conclusion:** A co-culture model of LAG3⁺Jurkat cells and tumor cells was successfully

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.32170933; No. 31470897); 海军总医院创新培育基金资助项目(No.CXPY201817)

[作者简介] 张陈(1996—), 男, 硕士生, 主要从事基因工程抗体的研究, E-mail: zhangchenahmu@163.com

[通信作者] 周丽君, E-mail: hzzhoulj@126.com; 吴成林, E-mail: wclbdyxb@126.com。▲为共同通信作者

constructed *in vitro*. The anti-LAG3 antibody might increase the killing effect of Jurkat cells against MGC-803 and A549 tumor cells through blocking LAG3/MHC-II interaction, which may be related to the increased secretion levels of cytokines IL-2, IL-10 and TNF- α in the supernatant of co-culture system.

[Key words] tumor; T cell; Jurkat cell; lymphocyte-activation gene 3 (LAG3); fully human monoclonal antibody; MHC class II molecule; cytokine

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(5): 419-425. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.005]

免疫检查点抑制剂能够阻断肿瘤微环境中肿瘤细胞与TIL相互作用中的抑制性信号,恢复TIL对肿瘤细胞的免疫监视功能,促进抗肿瘤的作用,成为抗肿瘤药物研发热点^[1]。淋巴细胞活化基因3(lymphocyte-activation gene 3, LAG3)主要表达于TIL细胞表面,通过与肿瘤细胞上MHC-II类分子(MHC-II)结合,使肿瘤细胞发生免疫逃逸,成为继PD-1及CTLA-4后免疫检查点抑制剂的新兴靶点^[2-3]。至今已有30余种LAG3抑制剂进入临床试验阶段,在黑色素瘤、乳腺癌、NSCLC和胃癌等疾病中取得良好的疗效^[4-8]。前期,本课题组通过噬菌体抗体库技术筛选及工程化改造获得了一株靶向LAG3的具有高亲和力、高特异性的新型全人源IgG4单克隆抗体(mAb),能够有效阻断LAG3与其配体MHC-II的结合;在转入LAG3基因的MC38结肠癌细胞转基因小鼠模型中,该mAb单独使用及联合抗PD-1单抗均能有效抑制肿瘤生长^[9];在15例晚期实体瘤患者疗效评估中,发现该mAb的疾病控制率(disease control rate, DCR)为66.7%^[10]。为探讨其抗肿瘤作用机制,本课题组尝试构建LAG3⁺Jurkat细胞与MHC-II阳性表达的肿瘤细胞体外共培养模型,模拟体内肿瘤微环境中TIL和肿瘤细胞的相互作用,评价抗LAG3 mAb功能并对其机制进行初步探索,为其将来临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人白血病T细胞Jurkat购自北京协和细胞库,人胃癌细胞MGC-803、HGC-27和NSCLC细胞A549均由本实验室保存。抗LAG3 mAb由南京维立志博生物公司馈赠,兔抗人MHC-II、LAG3、 β -actin一抗和Alexa Fluor[®] 488、HRP标记的山羊抗兔二抗均购自美国Abcam公司,RPMI 1640液体培养基、FBS购自美国Corning公司,CCK-8细胞增殖试剂盒购自日本同仁公司,植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)购自美国Sigma公司,ECL化学发光试剂盒购自美国Millipore公司,BCA试剂盒购自北京阳光英锐生物科技有限公司,人IL-2、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4和IL-6的ELISA检测试剂盒均购自北京达科为生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

将Jurkat、HGC-27、MGC-803和A549细胞置于

含10% FBS的RPMI 1640培养基中,在37℃、5% CO₂细胞培养箱内培养,当细胞生长至70%~80%汇合时,收集细胞传代或用于后续实验。

1.3 CCK-8法检测PHA对Jurkat细胞的毒性作用

取Jurkat细胞重悬于含PHA(终质量浓度分别为1、2、3、4和5 μ g/mL)的培养基中,按 5×10^4 个/孔接种于96孔板中,分别培养48和72 h,以加入PBS(PHA溶剂)的细胞及单独培养基为对照组(Control组)和空白组。然后在各个时间点,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37℃处理2 h,通过酶标仪(Bio-Rad公司)在450 nm处测定各孔光密度(D)值,计算PHA的细胞毒性。细胞毒性= $[1 - (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.4 FCM检测LAG3和MHC-II蛋白在Jurkat细胞和肿瘤细胞表面的表达水平

收集Jurkat细胞和肿瘤细胞,用PBS洗涤2次,分别向细胞悬液加入抗LAG3(1:100)或MHC-II(1:100)、同型IgG对照(1:1 000)抗体室温下处理0.5 h后,再加入Alexa Fluor[®] 488标记的二抗(1:2 000)室温下处理25 min,重悬于300 μ L PBS中,FCM检测该两蛋白的表达水平。

1.5 免疫荧光法观察LAG3和MHC-II蛋白在Jurkat细胞和肿瘤细胞表面的表达

Jurkat细胞和肿瘤细胞经爬片、固定后,加入抗LAG3或MHC-II一抗(1:100)室温处理1 h后,再加入Alexa Fluor[®] 488标记的二抗(1:2 000)室温避光处理30 min,用封片剂密封,通过激光共聚焦显微镜观察。

1.6 WB法检测LAG3和MHC-II蛋白在Jurkat细胞和肿瘤细胞中的表达水平

采用RIPA裂解液裂解Jurkat细胞和肿瘤细胞,通过BCA试剂盒检测蛋白浓度,经10% SDS-PAGE、转膜、封闭后,加入抗LAG3(1:1 000)、MHC-II(1:8 000)或 β -actin(1:5 000)一抗4℃过夜孵育,加入HRP标记的二抗(1:6 000)室温处理1 h,加入ECL化学发光剂曝光显影,以 β -actin作为内参照。

1.7 CCK-8法检测LAG3⁺Jurkat细胞对肿瘤细胞的杀伤率

分别将HGC-27、MGC-803和A549肿瘤细胞制备成悬液,以 5×10^3 个/孔接种于96孔板,作为靶细胞,待其贴壁后,以不同效靶比(2.5:1、5:1、10:1、20:1或40:1)加入效应细胞LAG3⁺Jurkat或同时加入

不同剂量(0.25、0.5、1、2或4 μg/mL)抗LAG3 mAb共培养48 h,以不加处理的肿瘤细胞为对照组(Control组),以等容积培养基为空白组。使用PBS洗去悬浮的LAG3⁺Jurkat细胞,每孔加入10 μL CCK-8试剂,37℃处理2 h后,通过酶标仪测定各孔的D值,杀伤率=[1-(D_{实验组}-D_{空白组})/(D_{对照组}-D_{空白组})]×100%。

1.8 ELISA法检测抗LAG3 mAb对LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞共培养体系中相关细胞因子分泌水平的影响

在效靶比为10:1的共培养模型中,加入抗LAG3 mAb(终质量浓度为1 μg/mL)后培养48 h,收集上清液,以加入IgG的共培养体系上清为对照组、单独培养基为空白组。按ELISA试剂盒说明方法,检测上清液中IL-2、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-4和IL-6的分泌水平。

1.9 统计学处理

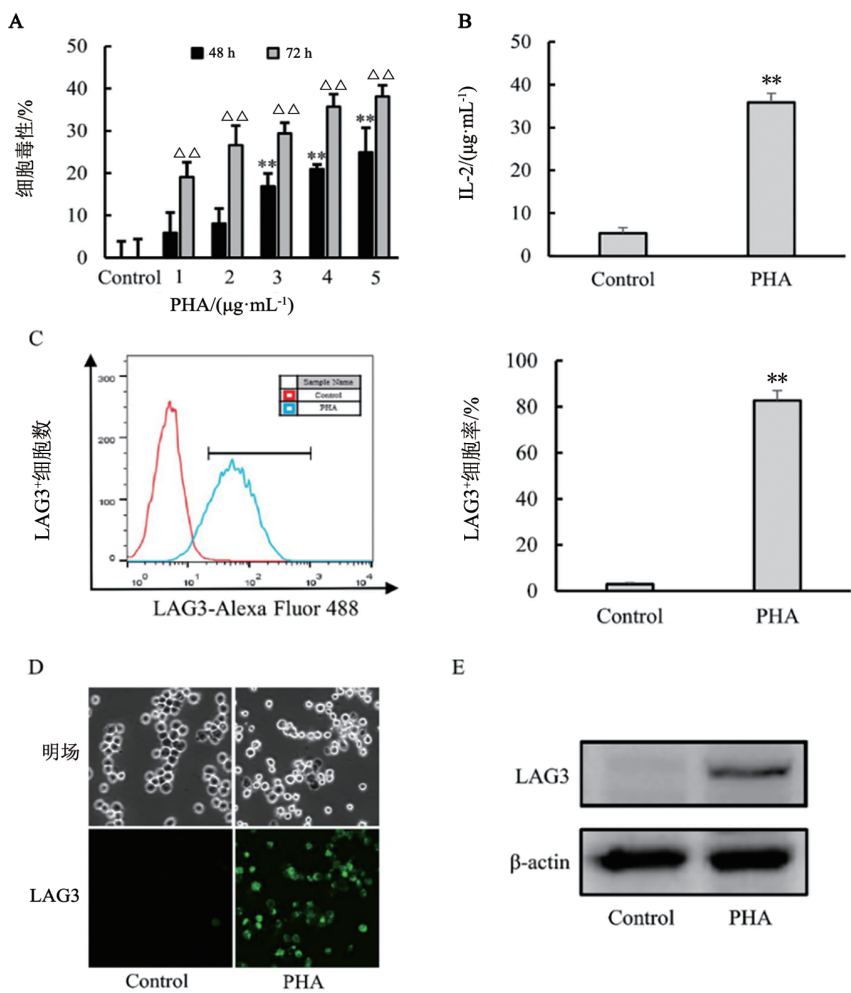
以上主要实验均独立重复3次。用SPSS26.0统

计软件分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析,以*P*<0.05或*P*<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建活化的LAG3⁺Jurkat细胞

Jurkat细胞经PHA刺激后,CCK-8法检测结果(图1A)显示,在用2 μg/mL以上PHA处理48 h以上时,PHA对Jurkat细胞产生细胞毒性作用(*P*<0.01),因此选取对Jurkat细胞无明显细胞毒性作用的2 μg/mL刺激48 h进行诱导。ELISA法检测结果(图1B)显示,PHA组中Jurkat细胞分泌IL-2的水平显著高于Control组(*P*<0.01),表明PHA成功活化Jurkat细胞。FCM检测结果(图1C)显示,与Control组相比,PHA诱导组Jurkat细胞LAG3表达显著升高(*P*<0.01)。免疫荧光法和WB法检测也获得类似的结果(图1D、E)。结果表明,成功构建LAG3⁺Jurkat细胞,可用于后续实验。



与Control组(48 h)比较,***P*<0.01;与Control组(72 h)比较,△△*P*<0.01

A:CCK-8法检测PHA对Jurkat细胞的毒性作用;B:ELISA法检测PHA对Jurkat细胞IL-2分泌水平的影响;C:FCM检测PHA对Jurkat细胞LAG3蛋白表达的影响;D:免疫荧光法观察PHA对Jurkat细胞LAG3蛋白表达的影响(×200);

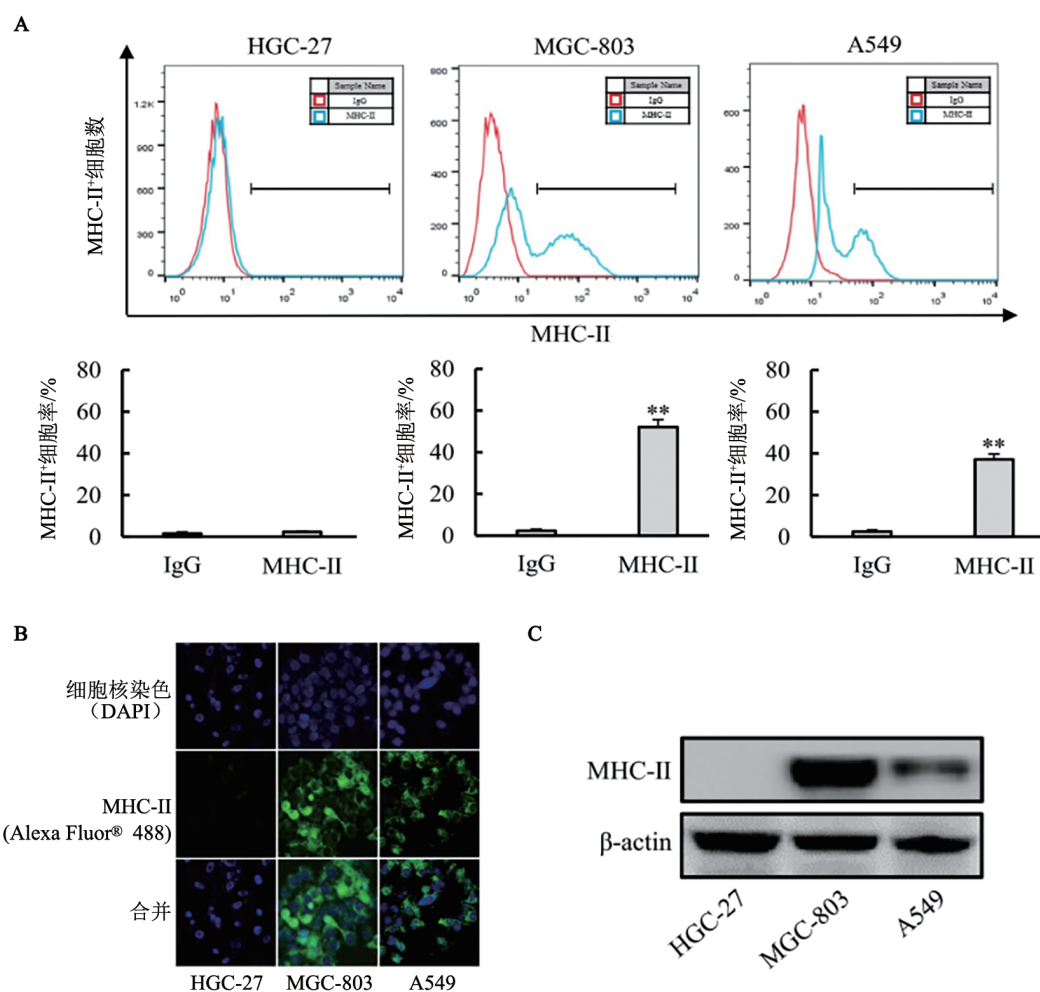
E:WB法检测PHA对Jurkat细胞LAG3蛋白表达的影响

图1 活化的LAG3⁺Jurkat细胞的构建

2.2 MGC-803和A549细胞中MHC-II呈阳性表达

FCM法检测结果(图2A)显示,在MGC-803和A549细胞表面MHC-II蛋白阳性表达率分别为 $(52.09 \pm 3.52)\%$ 和 $(37.21 \pm 2.52)\%$,均显著高于IgG组(均 $P < 0.01$);而在HGC-27细胞表面MHC-II蛋白表

达率仅为 $(2.41 \pm 0.45)\%$,与IgG组无显著差异($P > 0.05$)。免疫荧光法和WB法检测也获得类似的结果(图2B、C)。说明MHC-II在MGC-803和A549细胞中阳性呈表达,在HGC-27中几乎不表达。



与IgG组比较, ** $P < 0.01$

A: FCM检测MHC-II蛋白表达; B: 免疫荧光法观察MHC-II蛋白表达($\times 200$); C: WB法检测MHC-II蛋白表达

图2 MHC-II蛋白在HGC-27、MGC-803和A549细胞中的表达

2.3 不同效靶比的共培养模型中LAG3⁺Jurkat对肿瘤细胞的杀伤

CCK-8法检测结果(图3)显示,随着共培养模型中效靶比的增加,LAG3⁺Jurkat细胞对肿瘤细胞杀伤作用逐渐增强;在效靶比10:1时,LAG3⁺Jurkat细胞对HGC-27、MGC-803和A549细胞杀伤率分别为 $(43.56 \pm 5.09)\%$ 、 $(28.18 \pm 1.70)\%$ 和 $(15.78 \pm 3.68)\%$ 。选择效靶比10:1建立LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞共培养模型,用于后续对抗LAG3 mAb功能及机制探讨。

2.4 抗LAG3 mAb增强LAG3⁺Jurkat细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

CCK-8法检测共培养模型中mAb对肿瘤细胞的

杀伤作用,结果(图4)显示,与Control组和IgG组比较,抗LAG3 mAb剂量达到1 $\mu\text{g/mL}$ 后即可显著增强LAG3⁺Jurkat细胞对MHC-II阳性表达的MGC-803和

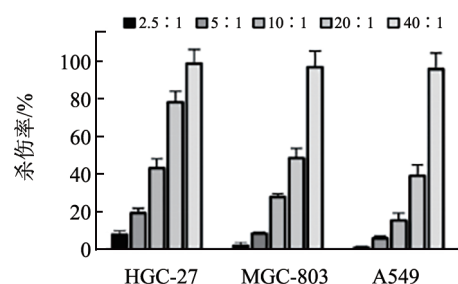


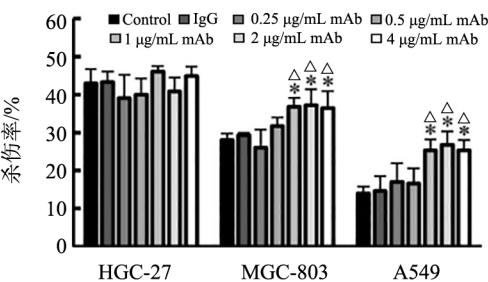
图3 LAG3⁺Jurkat细胞杀伤肿瘤细胞的效率

A549 细胞的杀伤作用(均 $P<0.05$), 但对不表达 MHC-II 的 HGC-27 细胞的杀伤作用无明显增强($P>0.05$)。结果表明, 抗 LAG3 mAb 通过阻断 LAG3 与 MHC-II 相互作用增强 LAG3⁺Jurkat 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

2.5 抗 LAG3 mAb 促进 LAG3⁺Jurkat 细胞与 MHC-II⁺ 肿瘤细胞共培养体系分泌 IL-2、IL-10 和 TNF- α

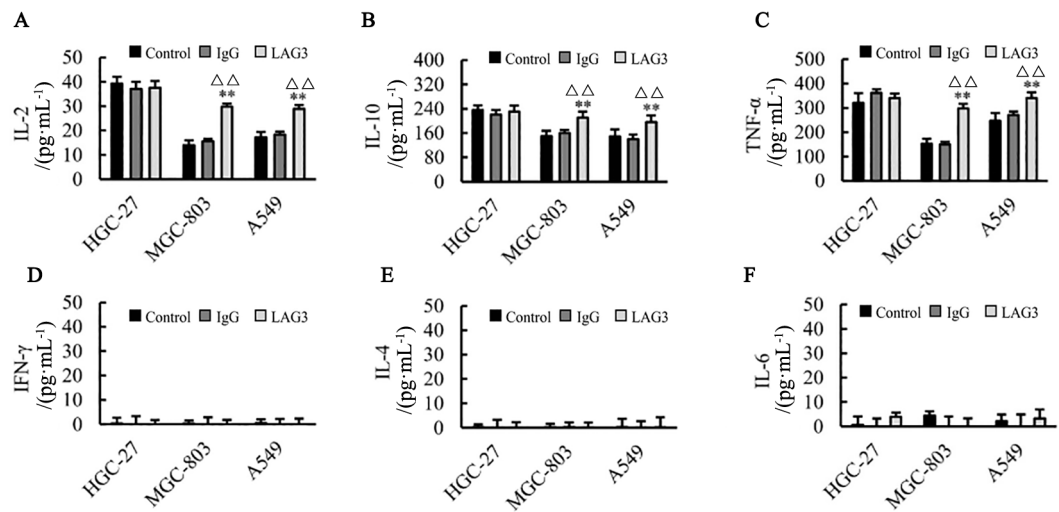
ELISA 法检测共培养体系上清液中细胞因子水平, 结果(图 5)显示, 当靶细胞是 MGC-803 或 A549 时, 与 Control 组和 IgG 组比较, 抗 LAG3 mAb 使 IL-2、IL-10 和 TNF- α 的分泌量显著升高($P<0.01$), 但对 IFN- γ 、IL-4 和 IL-6 的分泌水平无明显影响(均 $P>0.05$); 而当靶细胞是 HGC-27 时, LAG3 组与 Control 或 IgG 组的细胞因子的分泌水平均无统计学差异(均 $P>0.05$)。结果表明, 抗 LAG3 mAb 能够阻断 LAG3 与

MHC-II 相互作用, 促进共培养体系向上清液分泌 IL-2、IL-10 和 TNF- α 。



与 Control 组比较, * $P<0.05$; 与 IgG 组比较, $\Delta P<0.05$

图 4 不同剂量抗 LAG3 mAb 对 Jurkat 细胞杀伤肿瘤细胞的影响



与 Control 组比较, ** $P<0.01$; 与 IgG 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

A: ELISA 法检测 IL-2 分泌水平; B: ELISA 法检测 IL-10 分泌水平; C: ELISA 法检测 TNF- α 分泌水平;
D: ELISA 法检测 IFN- γ 分泌水平; E: ELISA 法检测 IL-4 分泌水平; F: ELISA 法检测 IL-6 分泌水平

图 5 抗 LAG3 mAb 对共培养体系上清液中细胞因子水平的影响

3 讨论

T 细胞与肿瘤细胞共培养是体外探讨免疫检查点抑制剂功能及机制的主要方法, 体外共培养能够排除肿瘤微环境中其他细胞及炎症因子干扰, 模拟肿瘤微环境中肿瘤细胞与 TIL 作用后产生的免疫逃逸过程^[11]。目前, 外周血 T 细胞与肿瘤细胞共培养是常用模型之一, 但由于血液样本需要量大、获取效率低、体外扩增相对困难, 并且可能涉及医学伦理问题, 故难以获取足够量的外周血 T 细胞。另一方面, 血液样本无法长期保存, 每次进行实验都需要采集新鲜血液样本; 而且由于获取的血液样本中外周血 T 细胞存在个体差异, 也可能导致实验结果重复性不够理想。Jurkat 细胞是一种永生化的 T 淋巴细胞

系, 具有人外周血 T 细胞生物特性, 不仅有效避免医学伦理问题, 而且实验结果也相对稳定。目前, 通过体外病毒感染或药物刺激等方式构建表达 PD-1 或 LAG3 等免疫检查点分子的 Jurkat 细胞, 已被广泛用于 PD-1 或 LAG3 等抑制剂功能及机制的研究中^[12-16]。LI 等^[17]采用 PD-1⁺Jurkat 细胞与 PD-L1⁺HepG2 肝癌细胞共培养模型探讨鼠源性抗 PD-1 mAb 的功能及机制, 发现抗 PD-1 mAb B1C4 通过恢复 Jurkat 细胞功能、促进 IL-2 和 IFN- γ 的分泌从而抑制 HepG2 细胞的增殖。BHAGWAT 等^[12]通过慢病毒感染方法获得 LAG3⁺Jurkat 与高表达 MHC-II 的 Raji 淋巴瘤细胞共培养, 加入抗 LAG3 mAb MK-4280 阻断后能够有效恢复共培养体系中 IL-2 及 TNF- α 的分泌。目前逆转录病毒或慢病毒感染方法是使 Jurkat 细胞稳定表达

LAG3蛋白的主要方法。该方法通过病毒携带LAG3基因并将其整合到Jurkat细胞基因组中,然后经过筛选获得稳定表达LAG3的Jurkat细胞,但该方法操作复杂、实验周期长,并且随着目的基因长度增加,病毒滴度下降、感染效率降低,同时实验操作必须在生物安全水平2级的实验室内进行,因而其应用受到限制^[16,18]。体外药物刺激的方法则较为简单、快速、安全,可以使活化的Jurkat细胞在一定时间内相对稳定地表达天然LAG3蛋白,更适合用于抗LAG3 mAb的功能及机制研究。通过体外药物刺激的方法也已经成功应用于PD-1/PD-L1抑制剂的研究中^[17,19]。因此,本研究尝试采用体外药物刺激方法构建活化的LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞共培养模型。因IL-2是Jurkat细胞活化的重要标志分子之一^[16-17,20],本研究使用T细胞激活剂PHA刺激Jurkat细胞后首先通过ELISA检测Jurkat细胞分泌IL-2水平,确定Jurkat细胞被成功活化,然后进一步采用FCM、免疫荧光法和WB法检测活化后细胞LAG3表达情况,结果发现Jurkat细胞经PHA活化后能够高表达LAG3,与已知文献报道一致^[21]。

前期通过体外结合实验^[9]发现,抗LAG3 mAb能够有效阻断LAG3与其配体MHC-II的结合,故本研究选择了表达MHC-II的肿瘤细胞MGC-803和A549及不表达MHC-II的肿瘤细胞HGC-27进行抗LAG3 mAb功能评价。分别以MGC-803、A549及HGC-27细胞为靶细胞,LAG3⁺Jurkat细胞为效应细胞,按照效靶比10:1建立体外共培养模型,并通过CCK-8法测定不同剂量抗LAG3 mAb对杀伤靶细胞的影响,结果显示,1 μg/mL抗LAG3 mAb即可显著增强LAG3⁺Jurkat细胞对MHC-II表达阳性的MGC-803和A549细胞的杀伤,但对MHC-II表达阴性的HGC-27细胞无明显影响。MIMURA等^[6]通过使用胃癌患者的PBMC建立T细胞与表达MHC-II的MKN7胃癌细胞共培养模型,发现抗LAG3 mAb H7能够增强T细胞对MKN7细胞杀伤作用。本研究结果同样显示,采用LAG3⁺Jurkat细胞建立共培养模型,LAG3 mAb通过阻断LAG3/MHC-II结合恢复Jurkat细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

细胞因子是一类低分子量的可溶性蛋白质,能够刺激肿瘤微环境中T细胞活化、增殖和分化,增强T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[22]。在PD-1、LAG3等免疫检查点抑制剂的研究中,分泌到共培养上清液中细胞因子水平的增加是免疫检查点抑制剂抗肿瘤作用的重要机制之一^[16,23-25]。MATSUZAKI等^[23]研究发现,从上皮性卵巢癌组织和腹水中分离出的TIL特异性表达LAG3,通过抗体阻断LAG3后能够明显恢复TIL的功能、促进IFN-γ、IL-6和IL-10的分泌,从而

起到抑制卵巢癌的作用。OKOYE等^[16]通过慢病毒感染方法获得LAG3⁺Jurkat细胞并建立与淋巴瘤细胞的共培养模型,发现抗LAG3 mAb能够通过阻断MHC-II/LAG3促进共培养体系中IL-2和TNF-α的分泌。为探讨新型抗LAG3 mAb的抗肿瘤作用机制,本实验通过ELISA方法检测共培养体系上清液中细胞因子水平,结果显示,在阳性表达MHC-II的MGC-803和A549共培养体系中,加入抗LAG3 mAb阻断后,共培养上清液中IL-2、IL-10和TNF-α水平显著升高,而IFN-γ、IL-4、IL-6则无明显变化,提示IL-2、IL-10和TNF-α在抗LAG3 mAb杀伤MGC-803和A549肿瘤细胞中可能发挥着重要作用。IL-2主要由活化T细胞分泌,能够促进T细胞增殖和活化,从而增强杀伤肿瘤细胞作用^[26];IL-10与IL-2共同刺激T细胞时能够显著增强后者对肿瘤细胞的杀伤作用^[27];TNF-α同样可通过增强T细胞功能而杀伤肿瘤细胞^[28]。关于细胞因子是由哪类细胞分泌和分泌增加的机制,以及是否有其他分子共同参与发挥抗肿瘤作用,还有待进一步探索。

综上,本研究构建了LAG3⁺Jurkat细胞与肿瘤细胞HGC-27、MGC-803和A549共培养模型模拟肿瘤微环境中TIL与肿瘤细胞相互作用,发现本课题组制备全人源IgG4抗LAG3 mAb通过阻断LAG3/MHC-II相互作用而恢复LAG3⁺Jurkat细胞对肿瘤细胞MGC-803和A549的杀伤作用,并且该作用可能与共培养上清液中的细胞因子IL-2、IL-10和TNF-α的水平升高有关,研究结果为抗LAG3 mAb应用于肿瘤临床治疗提供重要实验基础。同时实验结果提示,活化的Jurkat细胞与肿瘤细胞共培养模型可以有效地应用于探讨LAG3免疫抑制剂功能及机制的研究中。

[参考文献]

- [1] JOHNSON D B, NEBHAN C A, MOSLEHI J J, *et al.* Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(4): 254-267. DOI:10.1038/s41571-022-00600-w.
- [2] BALKO J M, JOHNSON D B, WANG D Y, *et al.* MHC-II expression to drive a unique pattern of adaptive resistance to antitumor immunity through receptor checkpoint engagement [J/OL]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(5_suppl): 180 [2022-04-10]. https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.5_suppl.180. DOI: 10.1200/jco.2018.36.5_suppl.180.
- [3] 陈秀秀, 于晓杰, 周丽君. LAG-3及其抑制剂在肿瘤免疫治疗中应用的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(9): 941-947. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.002.
- [4] MARUHASHI T, SUGIURA D, OKAZAKI I M, *et al.* LAG-3: from molecular functions to clinical applications[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001014 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32929051/>. DOI:10.1136/jitc-2020-001014.
- [5] JUNG E H, JANG H R, KIM S H, *et al.* Tumor LAG-3 and NY-ESO-1

- expression predict durable clinical benefits of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(5): 619-630. DOI:10.1111/1759-7714.13834.
- [6] MIMURA K, KUA L F, XIAO J F, *et al.* Combined inhibition of PD-1/PD-L1, LAG-3, and TIM-3 axes augments antitumor immunity in gastric cancer-T cell coculture models[J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(3): 611-623. DOI:10.1007/s10120-020-01151-8.
- [7] TAWBI H A, SCHADENDORF D, LIPSON E J, *et al.* Relatlimab and nivolumab *versus* nivolumab in untreated advanced melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(1): 24-34. DOI:10.1056/NEJMoa2109970.
- [8] STOVGAARD E S, KÜMLER I, LIST-JENSEN K, *et al.* Prognostic and clinicopathologic associations of LAG-3 expression in triple-negative breast cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2021, 30(1): 62-71. DOI:10.1097/pai.0000000000000954.
- [9] YU X J, HUANG X, CHEN X X, *et al.* Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody for cancer immunotherapy[J]. *mAbs*, 2019, 11(6): 1139-1148. DOI: 10.1080/19420862.2019.1629239.
- [10] SHI Y K, LUO S X, ZHOU H, *et al.* Phase I study of LBL-007, a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody in patients with advanced solid tumors[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 (15_suppl): 2523 [2022-04-10]. https://doi.org/10.1200/jco.2021.39.15_suppl.2523. DOI:10.1200/jco.2021.39.15_suppl.2523.
- [11] ALONSO-NOCELO M, ABUÍN C, LÓPEZ-LÓPEZ R, *et al.* Development and characterization of a three-dimensional co-culture model of tumor T cell infiltration[J/OL]. *Biofabrication*, 2016, 8(2): 025002 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27078888/>. DOI:10.1088/1758-5090/8/2/025002.
- [12] BHAGWAT B, CHERWINSKI H, SATHE M, *et al.* Establishment of engineered cell-based assays mediating LAG3 and PD-1 immune suppression enables potency measurement of blocking antibodies and assessment of signal transduction[J]. *J Immunol Methods*, 2018, 456: 7-14. DOI:10.1016/j.jim.2018.02.003.
- [13] SASAKI S, NISHIKAWA J, SAKAI K, *et al.* EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions [J]. *Gastric Cancer*, 2019, 22(3): 486-496. DOI: 10.1007/s10120-018-0880-4.
- [14] GESTERMANN N, SAUGY D, MARTIGNIER C, *et al.* LAG-3 and PD-1^{hi}LAG-3 inhibition promote anti-tumor immune responses in human autologous melanoma/T cell co-cultures[J/OL]. *OncoImmunology*, 2020, 9(1): 1736792 [2022-04-10]. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2020.1736792>. DOI:10.1080/2162402X.2020.1736792.
- [15] ZHOU X M, DU J F, WANG H F, *et al.* Repositioning liothyronine for cancer immunotherapy by blocking the interaction of immune checkpoint TIGIT/PVR[J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 142[2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32894141/>. DOI: 10.1186/s12964-020-00638-2.
- [16] OKOYE I S, XU L, WALKER J, *et al.* The glucocorticoids prednisone and dexamethasone differentially modulate T cell function in response to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 immune checkpoint blockade[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(8): 1423-1436. DOI:10.1007/s00262-020-02555-2.
- [17] LI Z W, LI B, LI L, *et al.* The immunostimulative effect and mechanisms of a novel mouse anti-human PD-1 monoclonal antibody on Jurkat lymphocytic cells cocultured with hepatoma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12225-12241. DOI:10.2147/OTT.S281397.
- [18] BARTELT R R, CRUZ-ORCUTT N, COLLINS M, *et al.* Comparison of T cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T cells[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5430 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19412549/>. DOI:10.1371/journal.pone.0005430.
- [19] YANG W H, CHEN P W, LI H C, *et al.* PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells *in vitro*[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(6): 2518-2525. DOI:10.1167/iops.07-1606.
- [20] KIM H R, NA B R, KWON M S, *et al.* Dynamic motile T cells highly respond to the T cell stimulation *via* PI3K-Akt and NF- κ B pathways[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59793 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555783/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0059793.
- [21] 熊镇越, 张坤明, 潘勇兵, 等. 重组人淋巴细胞活化基因-3蛋白胞外段的真核表达及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(4): 390-394. DOI:10.13200/j.cnki.cjb.003029.
- [22] YANG L, NING Q, TANG S S. Recent advances and next breakthrough in immunotherapy for cancer treatment[J/OL]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 8052212 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35340585/>. DOI:10.1155/2022/8052212.
- [23] MATSUZAKI J, GNJATIC S, MHAWECH-FAUCEGLIA P, *et al.* Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(17): 7875-7880. DOI: 10.1073/pnas.1003345107.
- [24] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (18): 4557-4566. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
- [25] SIEVILÄINEN M, SAAVALAINEN J, ADNAN-AWAD S, *et al.* IDO1 inhibition reduces immune cell exclusion through inducing cell migration while PD-1 blockage increases IL-6 and -8 secretion from T cells in head and neck cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812822 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35359980/>. DOI:10.3389/fimmu.2022.812822.
- [26] KUMAGAI-TAKEI N, NISHIMURA Y, MAEDA M, *et al.* Effect of asbestos exposure on differentiation and function of cytotoxic T lymphocytes[J/OL]. *Environ Health Prev Med*, 2020, 25(1): 59 [2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33032525/>. DOI: 10.1186/s12199-020-00900-6.
- [27] GEGINAT J, LARGHI P, PARONI M, *et al.* The light and the dark sides of interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 30: 87-93. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.003.
- [28] CERVERA-CARRASCON V, SIURALA M, SANTOS J M, *et al.* TNF α and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7 (5): e1412902[2022-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29721366/>. DOI:10.1080/2162402X.2017.1412902.

[收稿日期] 2022-02-28

[修回日期] 2022-04-28

[本文编辑] 黄静怡