

靶向CD138的第四代CAR-T细胞的构建及功能研究

刘宇 郑茹 谢金海 高基民*

(温州医科大学检验医学院(生命科学学院), 温州 325035)

摘要 该研究构建了靶向CD138的第四代CAR-T细胞(分泌IL-7和CCL19), 通过与靶向CD138的第二代CAR-T细胞进行生物学功能比较, 探讨第四代CAR-T细胞应用于临床的优势。使用慢病毒转染健康人外周血的T细胞制备出靶向CD138的第二代和第四代CAR-T细胞, CFSE标记法检测T细胞的增殖能力, Transwell实验检测T细胞的趋化能力, ELISA检测细胞因子分泌水平, 流式细胞术检测T细胞的CAR表达率和亚型。荧光素酶生物发光法检测CAR-T细胞对多发性骨髓瘤细胞株的体外杀伤功能; 构建人多发性骨髓瘤NCG小鼠模型, 通过生物发光成像系统监测CAR-T细胞输注后小鼠肿瘤消退情况。结果显示, 靶向CD138的第四代CAR-T细胞(CD138-BBZ-7×19)在体外的生物学功能优于第二代CAR-T细胞(CD138-BBZ), 而且在人多发性骨髓瘤动物模型中具有明显的抗肿瘤作用。

关键词 多发性骨髓瘤; 嵌合抗原受体T细胞; 慢病毒; IL-7; CCL19

Construction of the Fourth-Generation CAR-T Cells Targeting CD138 and Functional Research

LIU Yu, ZHENG Ru, XIE Jinhai, GAO Jimin*

(School of Laboratory Medicine (Life Science), Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract This study constructed a fourth-generation CAR-T cell targeting CD138 (secreting IL-7 and CCL19), and compared the biological function with the second-generation CAR-T cell targeting CD138 to explore the advantages of the fourth-generation CAR-T cell in clinical application. The second and fourth generation CAR-T cells targeting CD138 were prepared by transfecting T cells of healthy human peripheral blood with lentivirus. Then, the CFSE proliferation experiment, chemotaxis chamber, ELISA method and flow cytometry were performed to detect the cell proliferation ability, chemotaxis ability, cytokine secretion, CAR expression rate and subtype. The killing function of CAR-T cells on multiple myeloma cell lines *in vitro* was detected by luciferase bioluminescence method; an NCG mouse model of human multiple myeloma was constructed, and the tumor regression after CAR-T cells infusion was monitored by a bioluminescence imaging system. The results showed that the fourth-generation CAR-T cell targeting CD138 (CD138-BBZ-7×19) had better biological functions than the second-generation CAR-T cell (CD138-BBZ) *in vitro*, and it had obvious antitumor effect in animal models of human multiple myeloma.

Keywords multiple myeloma; CAR-T; lentivirus; IL-7; CCL19

收稿日期: 2020-04-11 接受日期: 2020-06-02

国家卫生健康委员会科研基金(批准号: WKJ-ZJ-1928)和温州市重大科技专项(批准号: ZS2017014、2018ZY001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699341, E-mail: jimingao64@163.com

Received: April 11, 2020 Accepted: June 2, 2020

This work was supported by the Science Foundation of National Health Commission of the People's Republic of China (Grant No. WKJ-ZJ-1928) and Science and Technology Major Projects of Wenzhou (Grant No. ZS2017014, 2018ZY001)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699341, E-mail: jimingao64@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5308>

过继性细胞疗法(adoptive cell transfer therapy, ACT)是肿瘤免疫治疗的新策略^[1-2], 其中CAR-T免疫治疗被认为是最具前途的过继性细胞疗法之一^[3]。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)是通过基因编辑技术改造的T细胞, 能够以非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制的方式特异性识别肿瘤抗原。嵌合抗原受体结构通常由结合肿瘤细胞表面抗原的胞外域(来源于单克隆抗体抗原结合区的scFv段)、细胞外铰链区、跨膜区和提供T细胞信号传导的胞内域(CD28、41BB等共刺激分子和CD3 ζ 信号传导区)组成^[4]。目前, 靶向CD19的CAR-T细胞在治疗急性B淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤中取得了令人瞩目的疗效^[5], CAR-T细胞治疗其他血液系统恶性肿瘤的临床试验也在不断开展中。

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是第二大常见的血液系统恶性肿瘤, 是由骨髓内单一浆细胞株异常克隆增殖形成的恶性肿瘤^[6]。虽然有自体干细胞移植、蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物和单克隆抗体等多种治疗方法, 但该病仍无法治愈且极易复发^[7-8]。靶向B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)治疗MM的CAR-T临床试验虽然取得了成功, 但是肿瘤抗原逃逸和BCMA阴性肿瘤细胞的增殖会引起复发^[9-10], 这促使我们寻找新的靶点或者联合多个靶点进行治疗^[11-12]。

CD138(syndecan-1)是跨膜硫酸乙酸肝素蛋白聚糖家族的成员, 介导细胞-细胞和细胞-基质之间的黏附作用。有研究表明, CD138分子在大于95%的MM细胞表面高度表达, 但在其他造血细胞中不表达, 可作为MM诊断治疗的主要标志物^[10,13]。目前, 靶向CD138的第二代CAR-T已经开展了临床试验^[14], 研究结果表明该疗法安全可行, 因此, CD138有望成为治疗难治性和进展型MM有吸引力的靶点。

由于多发性骨髓瘤细胞的高度异质性, 治疗后极易复发。目前应用于临床治疗的主要是第二代CAR-T, CAR-T细胞的在体内的增殖和长期存活能力有待改善。第四代CAR-T又称“TRUCK-T”(T cell re-directed for universal cytokine-mediated killing, TRUCK-T), 整合了自杀基因、细胞因子分泌或小分子开关等更加精准的调控, 进一步强化免疫应答^[15]。其中, 第四代CAR-T细胞共表达细胞因子IL-12、IL-7和趋化因子CCL19, 已被证明能够有效地增强抗肿瘤

作用和细胞的存活与迁移能力^[16-17]。本研究在靶向CD138的第二代CAR-T的基础上构建了分泌人白细胞介素-7(interleukin-7, IL-7)和CC类趋化因子19(C-C motif chemokine 19, CCL19)的第四代CAR-T细胞, 探讨其生物学功能的优势, 有望成为治疗多发性骨髓瘤的新方案。

1 材料和方法

1.1 试剂

DNA胶回收试剂盒购自美国Axygen公司; 限制性内切酶和T4连接酶购自New England BioLabs公司; 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技公司; 质粒抽提试剂盒购自德国QIAGEN公司; 生物素标记的羊抗人IgG(Fab段)抗体购自美国eBioscience公司; APC偶联的链亲和素(APC-SA)、PE偶联的链亲和素(PE-SA)、PB抗人CD138和PE抗人CD3等流式抗体购自美国BioLegend公司; 细胞因子IL-7检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司; 趋化因子CCL19检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司; 聚凝胺(polybrene)购自德国Sigma公司; 聚乙酰胺(polyetherimide, PEI)购自美国Polysciences公司; 重组人IL-2购自美国Peprotech公司; 荧光素酶底物D-(-)-荧光素购自上海甄准生物技术有限公司。本实验所用的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、人AB血清和细胞培养基均购自美国Gibco公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞株、菌种及质粒

人肾上皮细胞株293T、人急性T细胞白血病细胞株Jurkat、Burkitt淋巴瘤细胞株Raji和红白血病细胞株K562购自美国菌种保藏中心(ATCC); 人多发性骨髓瘤细胞株MM1S和U266购自南京科佰生物科技有限公司; T细胞提取自健康人外周血, 均获得志愿者知情同意书以及丽水市人民医院伦理审查委员会批准。TransStbl3感受态、慢病毒载体质粒plenti-T2A-Luc-GFP和包装质粒pLP1、pLP2、pMD2G为本实验室保存; 人源的IL-7和CCL19基因序列由上海金唯智生物科技有限公司合成。

1.3 实验动物

无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)级雄性、4~6周龄的NCG(NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/Gpt)小鼠购自南京集萃药康生物科技有限公司, 动物生产许可证号为SCXK(苏)2019-0009。小鼠饲养

于温州医科大学实验动物中心的SPF级动物房内,动物饲养许可证号为SYXK(浙)2015-0009。本研究的动物实验严格按照温州医科大学医学实验动物管理委员会制定的动物伦理条例进行相关操作。

1.4 细胞培养

贴壁细胞293T培养于含10% FBS的DMEM培养基中,悬浮细胞Jurkat、Raji、K562、MM1S和U266培养于含10% FBS的RPMI-1640培养基中。T细胞在含5%人AB血清和IL-2(100 µg/mL)的AIM-V培养基中培养。

1.5 慢病毒表达载体的构建及病毒包装

CAR片段由CD138单克隆抗体的scFv段依次连接人源的CD8 α 、4-1BB和CD3 ζ 链组成,通过T4连接法将CAR片段插入*EcoR* I和*Mlu* I限制性内切酶剪切的载体plenti-T2A-Luc-GFP中,构建出第二代CAR的慢病毒表达载体plenti-EF1 α -CD138-BBZ。通过2A自剪切肽技术在CAR片段后面依次连接人源的IL-7和CCL19序列,再通过无缝克隆插入*EcoR* I和*Mlu* I限制性内切酶剪切的plenti-T2A-Luc-GFP载体中,构建出第四代CAR的慢病毒表达载体plenti-EF1 α -CD138-BBZ-7 $\times$ 19。CD138抗原序列从厦门大学生命科学学院韩家淮实验室获取,通过无缝克隆的方法插入*Sma* I和*EcoR* I限制性内切酶剪切的plenti-T2A-Luc-GFP载体中。PCR所用的引物序列见表1。

采用第三代慢病毒包装系统包装病毒:准备2个EP管,在A管中加入PBS和PEI,在B管中加入等量PBS后依次加入包装质粒pLP1、pLP2、pMD2G和目的质粒(plenti-EF1 α -CD138-BBZ或plenti-EF1 α -CD138-BBZ-7 $\times$ 19),静置5 min后将A管混合物加入B管中轻柔混匀,静置20 min形成质粒-PEI复合物。将该复合物加到密度约80%的293T细胞培养基中,37℃、5% CO₂培养箱培养48 h后收集上清,用0.45 µm滤膜过滤后通过超速离心法获得病毒浓缩液。通过

转染Jurkat细胞计算慢病毒滴度。

1.6 CAR-T细胞的制备及鉴定

利用淋巴细胞分离液Ficoll分离健康人外周血中的单个核细胞,加入 α -CD3/ α -CD28抗体包被的磁珠,分离出CD3⁺ T细胞后进行活化扩增。培养24 h后,计算T细胞的数量,在96孔细胞培养板中每孔加入2 $\times$ 10⁵个T细胞和感染复数MOI=40的病毒浓缩液(plenti-EF1 α -CD138-BBZ或plenti-EF1 α -CD138-BBZ-7 $\times$ 19),总体积200 µL,同时加入聚凝胺(1:2 000),1 200 $\times$ g离心90 min进行转染,未转染病毒的T细胞(non-CAR-T)作为阴性对照。根据细胞的生长密度,每隔2~3天传代扩大培养。

取转染第5天的T细胞,用FACS(PBS含5% FBS)洗涤后离心,弃上清。每孔加入50 µL(1:200)配置的生物素标记的羊抗人IgG(Fab段)抗体工作液,4℃避光孵育20 min;洗涤后加入50 µL(1:400)配置的APC-SA抗体工作液,4℃避光孵育20 min,用FACS洗涤2次后重悬细胞,使用流式细胞仪检测T细胞表面CAR的表达率。

1.7 CFSE标记法检测CAR-T细胞增殖能力

CAR-T细胞脱磁后离心计数,取5 $\times$ 10⁶个细胞用5 µmol CFSE重悬细胞(1 $\times$ 10⁶个细胞加100 µL CFSE),避光室温孵育10 min,然后用Buffer I洗涤3次。再次计数,于24孔板每孔铺5 $\times$ 10⁵个细胞,每组设置3个复孔,同时取部分细胞用流式检测CFSE是否标记成功。在第3天和第5天流式检测CAR-T细胞增殖情况。

1.8 Transwell实验检测T细胞迁移能力

取培养至第5天的CAR-T细胞上清备用。将non-CAR-T细胞脱磁离心,用Buffer I(PBS含5% FBS)重悬并计数。用5 µmol CFSE重悬细胞(1 $\times$ 10⁶个细胞加100 µL CFSE),避光室温孵育10 min,然后用Buffer I洗涤3次。将transwell小室放到24孔板中,在下室中加入400 µL不同的CAR-T细胞培养上清,

表1 质粒构建所需引物

Table 1 Primer sequence for plasmid construction

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
CD138-F	TAG CCC CGG GGA ATT CGC CAC CAT GGC TTT ACC CGT T
CD138-R	AAG TTG GTG GCG CCG CTG CCT CTA GGG GGC AGA GCT TG
IL-7-F	GGC AGC GGC GCC ACC AAC T
CCL19-R	TGT TTA AAC ACG CGT TCA GGA GCT CCT CCT CTT CAT CTT AG
CD138 Ag-F	TCG TGA GCT AGC CCC GGG ATG AGG CGC GCG GCG CTC T
CD138 Ag-R	CAC CAC TTC CGA ATT CCT TCT TCA TGC GGT ACA GC

上室中加入CFSE标记的T细胞(2×10^5 个/100 μ L), 然后将24孔板置于培养箱培养2 h, 在荧光显微镜下拍照并计数迁移到下室的T细胞数量。

1.9 ELISA法检测细胞因子分泌水平

取培养至第3天和第5天的CAR-T细胞上清, 1 500 r/min离心10 min去除沉淀物, 根据细胞因子检测试剂盒的要求, 采用双抗体夹心法检测上清中IL-7和CCL19的浓度。底物显色后, 使用酶标仪在450 nm处读取 D 值, 根据标准曲线计算各孔相应的细胞因子浓度。

1.10 流式细胞术检测T细胞亚型和IFN- γ 分泌水平

取培养至第5天的CAR-T细胞, 用流式细胞仪检测其亚型分布情况, 具体染色方法同上。使用抗体为生物素标记的羊抗人IgG(Fab段)、PE-SA、PE-cy7抗人CD8 α 、APC抗人CD45RA、PerCP-cy5.5抗人CCR7和PB抗人CD62L。

CAR-T细胞和肿瘤细胞按效靶比1:1于37 $^{\circ}$ C培养箱共孵育10 h后加入高尔基体阻断剂(BD公司), 6 h后取细胞进行染色: 先用PE抗人CD3抗体进行胞外染色, 再按照胞内染色试剂盒的操作流程依次固定和裂解细胞, 然后加入APC抗人IFN- γ 抗体重悬细胞, 室温孵育40 min。用FACS洗涤2次后重悬细胞, 通过流式细胞仪检测T细胞的IFN- γ 分泌水平。

1.11 表达荧光素酶稳转肿瘤细胞株的构建

用本实验室保存的质粒plenti-T2A-Luc-GFP包装慢病毒, 转染人多发性骨髓瘤细胞株MM1S和U266, 96孔细胞培养板每孔铺 2×10^5 个细胞, 按1:5的比例每孔加入40 μ L病毒原液, 总体积为200 μ L。1 200 $\times$ g离心90 min进行转染。细胞培养至足够数量时, 通过流式细胞仪分选出GFP阳性的细胞株扩大培养, 获得MM1S-Luc-gfp和U266-Luc-gfp细胞。CD138阴性的K562细胞株通过转染plenti-CD138-Luc-GFP病毒, 经有限稀释法获得CD138阳性的K562细胞。

1.12 荧光素酶生物发光法体外杀伤实验

T细胞培养7天后, 按照效靶比5:1、10:1、20:1和40:1(靶细胞 1×10^4 个/孔)将效靶细胞铺于96孔V底板, 同时设置只加靶细胞与培养基的阳性对照孔和ddH $_2$ O重悬靶细胞的阴性对照孔, 每组3个复孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中培养4 h后, 在上清中加入荧光素酶的底物 D -(-)-荧光素, 避光孵育10 min, 使用酶标仪检测自发荧光值, 计算各组T细胞对肿瘤细胞的裂解

率。裂解率=(Max-V)/(Max-Min) $\times$ 100%。(Max: 阳性对照孔荧光值; Min: 阴性对照孔荧光值; V: 共孵育孔荧光值)

1.13 多发性骨髓瘤动物模型的建立

MM1S-Luc-gfp细胞离心后用PBS洗涤2遍, 再用PBS重悬计数, 将细胞浓度调成 1.5×10^7 个/mL。4~6周龄、雄性NCG小鼠随机分为2组, 每组3只, 使用一次性胰岛素注射器吸取200 μ L混匀的细胞悬液, 通过尾静脉注射 3×10^6 个肿瘤细胞到小鼠体内。注射肿瘤细胞4天后, 使用活体成像仪评估模型是否建立成功。根据成像结果判断何时输注CAR-T细胞, 输注后每隔5~7天进行活体成像, 监测小鼠体内肿瘤细胞的发光强度。

1.14 统计学方法

作图和数据的统计学分析均使用GraphPad Prism 6.0软件。所有实验均独立重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建靶向CD138的第二代和第四代CAR的慢病毒表达载体

第二代CAR的慢病毒表达载体(plenti-EF1 α -CD138-BBZ)的抗原识别片段来源于CD138单克隆抗体的单链可变区(scFv), 其后依次连接人源的CD8 α 作为铰链区和跨膜段, 4-1BB作为共刺激分子以及CD3 ζ 链作为T细胞活化基序。第四代CAR的慢病毒表达载体(plenti-EF1 α -CD138-BBZ-7 $\times$ 19)应用2A自剪切肽技术在第二代CAR的基础上通过P2A依次连接人源的IL-7和CCL19分子。质粒结构如图1所示, 经过限制性内切酶鉴定和上海桑尼生物科技有限公司测序, 结果符合预期, 表明质粒构建成功。

2.2 成功制备靶向CD138的第二代和第四代CAR-T细胞

使用上述质粒包装的慢病毒转染健康人外周血CD3 $^{+}$ 的T细胞, 制备出第二代CAR-T细胞(CD138-BBZ)和第四代CAR-T细胞(CD138-BBZ-7 $\times$ 19)。培养至第5天, 通过流式细胞术检测CAR-T细胞表面CAR的表达率, 结果如图2A所示。在多次独立实验中检测CAR的表达率, 如图2B所示, CD138-BBZ-7 $\times$ 19的CAR表达率略低于CD138-BBZ($P < 0.05$)。

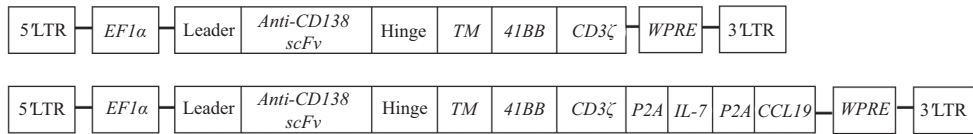
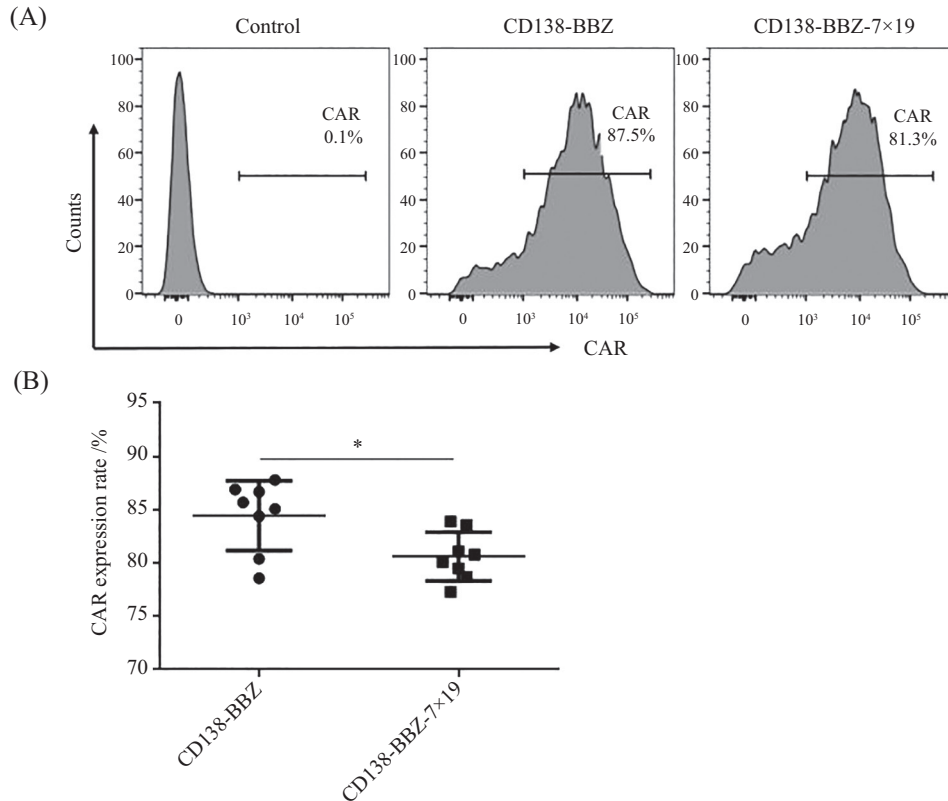


图1 慢病毒表达载体的结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of lentivirus expression vector



A: 流式细胞术检测CD138-BBZ和CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞表面CAR的表达率。B: 多次实验测得CAR表达率差异的分析($n=8$, $*P<0.05$)。
A: flow cytometry to detect the expression rate of CAR on the surface of CD138-BBZ and CD138-BBZ-7×19 CAR-T cells. B: analysis the difference of CAR expression rate measured by multiple experiments ($n=8$, $*P<0.05$).

图2 流式细胞术检测CAR-T细胞表面CAR的表达率

Fig.2 Flow cytometry to detect CAR expression rate on the surface of CAR-T cells

2.3 第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞能够分泌IL-7和CCL19且具有更高比例的低分化亚型

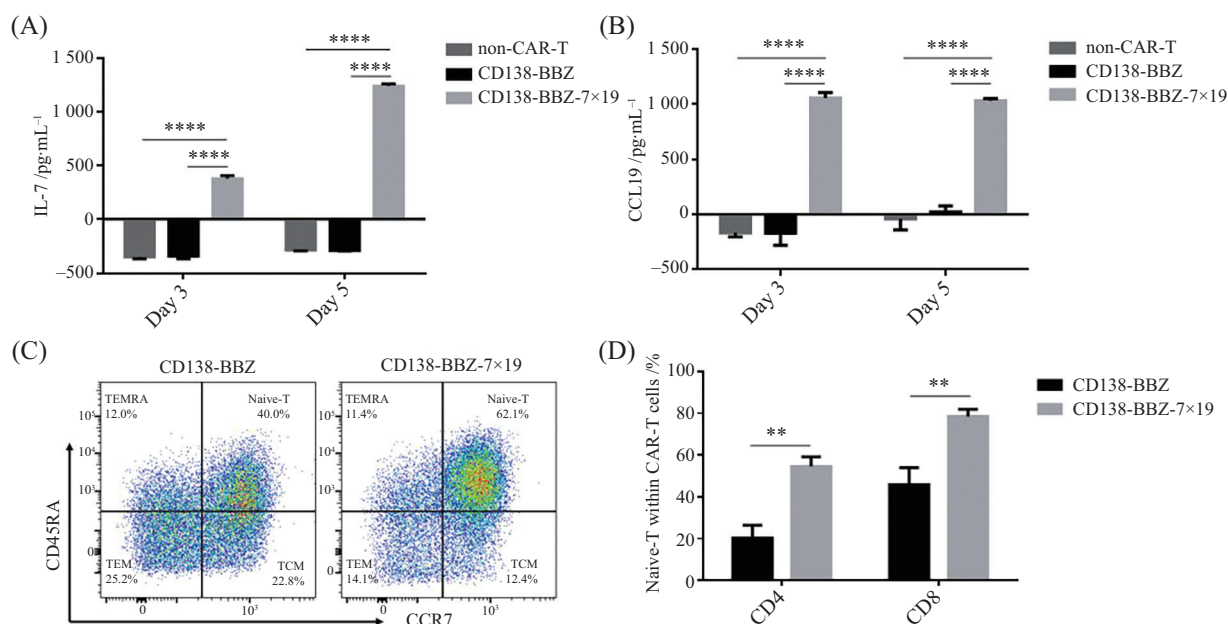
取CAR-T细胞第3天和第5天的培养上清, 使用ELISA试剂盒检测细胞因子IL-7和CCL19的分泌水平。如图3A和图3B所示, 未转染病毒的non-CAR-T细胞和第二代CD138-BBZ CAR-T细胞的上清中IL-7和CCL19含量低于相应的ELISA试剂盒检测限, 未能被检出。第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞能够分泌较高水平的IL-7和CCL19, 且IL-7的分泌量有增长趋势($P<0.0001$)。

研究表明, 中央记忆性T细胞(central memory T cell, TCM, $CD45RA^-CCR7^+$)和其他分化程度

较低的T细胞亚群, 例如初始样T细胞(Naive-T, $CD45RA^+CCR7^+$)对T细胞在体内的扩增、存活和持久性至关重要。如图3C所示, 通过流式细胞术检测了两代CAR-T细胞培养过程中亚型的变化, 发现分泌IL-7的第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞具有更高比例的Naive-T细胞亚群。进一步分析 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的亚型, 如图3D所示, Naive-T细胞所占比例具有明显差异($P<0.01$)。

2.4 第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞具有更强的体外增殖和趋化能力

通过CFSE法检测CAR-T细胞标记后第3天和第5天的增殖情况, 标记的第1天经流式检测表明细胞



A: ELISA法检测第3天和第5天T细胞培养上清中IL-7的含量。B: ELISA法检测第3天和第5天T细胞培养上清中CCL19的含量。C: 流式细胞术检测CAR-T细胞亚型。D: CD4⁺和CD8⁺ T细胞亚群中Naive-T细胞的比例。** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

A: detection of IL-7 in T cell culture supernatant on day 3 and day 5 by ELISA. B: detection of CCL19 in T cell culture supernatant on day 3 and day 5 by ELISA. C: detection of CAR-T cell subtypes by flow cytometry. D: proportion of Naive-T cells in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

图3 CAR-T细胞IL-7和CCL19的分泌水平及亚型的比较

Fig.3 Comparison of IL-7 and CCL19 secretion levels and subtypes of CAR-T cells

全部标记成功,且两组细胞表面CFSE染色强度基本一致(图4A)。随着培养天数的增加第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞的平均荧光强度明显低于第二代CD138-BBZ CAR-T细胞,说明CAR-T细胞分泌的IL-7可以促进自身的增殖(图4B)。

在transwell实验中,将non-CAR-T细胞标记上荧光染料CFSE,通过荧光显微镜观察上清中的CCL19对T细胞的趋化能力。如图4C和图4D所示,加入第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞培养上清的小室中迁移到下室的non-CAR-T细胞比第二代CD138-BBZ CAR-T细胞上清组数量多,说明CAR-T细胞分泌的趋化因子CCL19能促进T细胞的迁移($P<0.01$)。

2.5 第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞能够特异杀伤CD138阳性肿瘤细胞

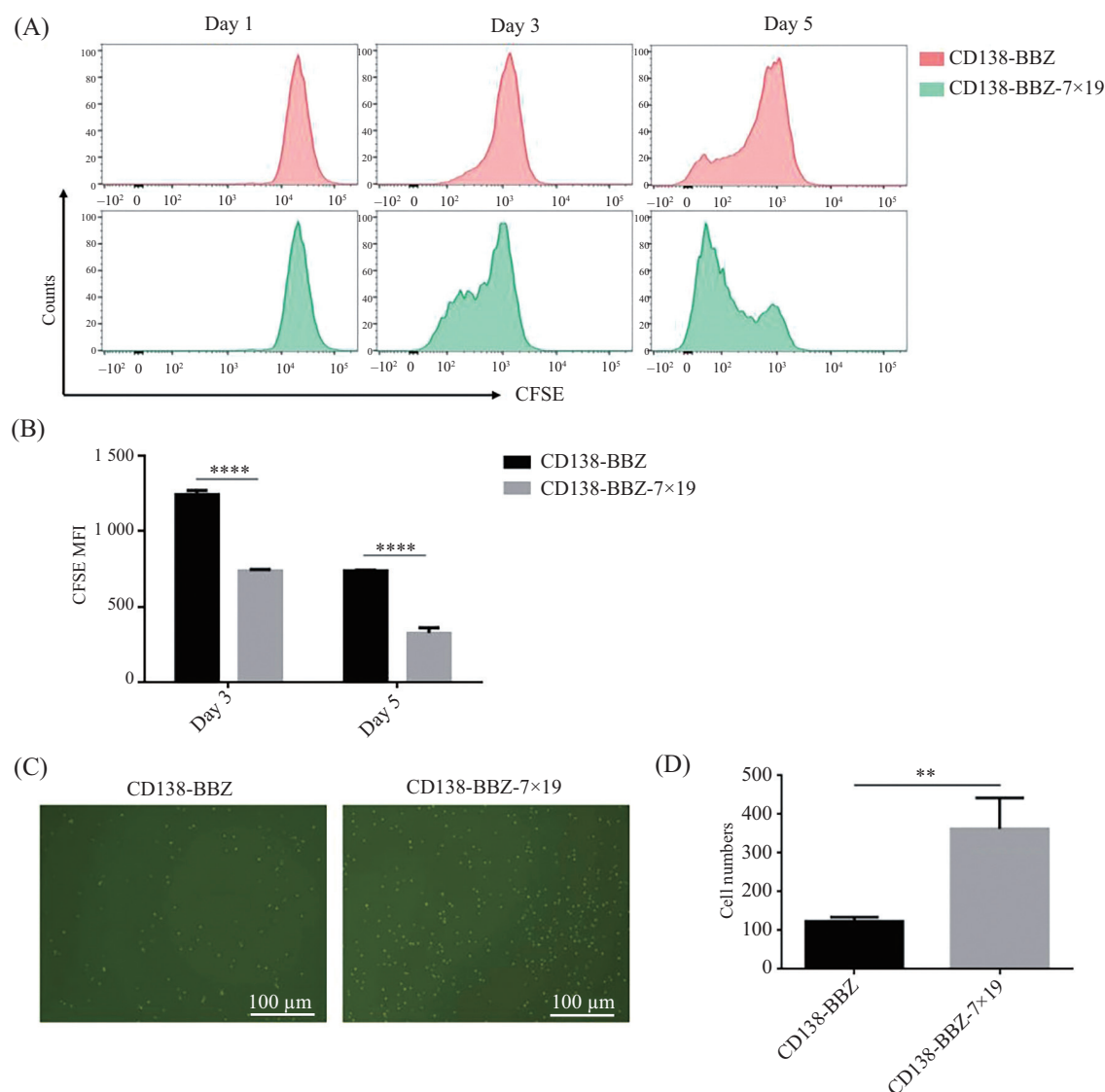
通过流式细胞术检测4种肿瘤细胞表面CD138的表达情况,如图5A所示,人多发性骨髓瘤细胞株MM1S和U266都高表达CD138,CD138阴性的K562细胞株转染病毒后能够中等程度表达CD138,人Burkitt淋巴瘤细胞株Raji不表达CD138。

荧光素酶(luciferase)以荧光素(luciferin)作为底物

催化其氧化过程,反应过程中发出的荧光可在560 nm处被捕获。反应所需的ATP存在于细胞质中,故测定的自发光荧光强度与表达荧光素酶基因的活细胞数呈正相关。通过检测效靶细胞共孵育后荧光值的高低来反映T细胞对靶细胞的杀伤情况。从图5B和图5C可以看出,与non-CAR-T相比,第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞和第二代CD138-BBZ CAR-T细胞均能特异杀伤CD138阳性的肿瘤细胞MM1S、U266和CD138 K562,而对CD138阴性的Raji细胞没有显著的杀伤作用,说明表达细胞因子并不影响CAR-T细胞的杀伤功能。如图5D所示,在效靶比20:1时两种CAR-T细胞对肿瘤细胞的裂解率均大于50%($P<0.001$, $P<0.0001$)。通过胞内染色检测效靶细胞共孵育后IFN- γ 的分泌情况,两种不同CAR-T细胞的分泌水平无显著差异(图5E)。

2.6 第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞能够抑制小鼠体内多发性骨髓瘤细胞的生长

为了研究第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞在体内的抗肿瘤作用,使用MM1S-Luc-gfp细胞株构建了人多发性骨髓瘤的NCG小鼠模型。小鼠成瘤后(day 0)对照组和CAR-T组分别注射 1×10^7 个non-



A: CFSE标记第1天、第3天、第5天CAR-T细胞增殖情况。B: CAR-T细胞平均荧光强度变化。C: 荧光显微镜下拍摄迁移的T细胞。D: 迁移T细胞数量分析。** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

A: CFSE-labeled CAR-T cells proliferation on day 1, day 3, and day 5. B: changes in mean fluorescence intensity of CAR-T cells. C: photographing migrating T cells under a fluorescence microscope. D: analysis of the number of migrating T cells. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 CAR-T细胞体外增殖能力和趋化能力的比较

Fig.4 Comparison of proliferation and chemotactic ability of CAR-T cells *in vitro*

CAR-T细胞和CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞进行治疗。在输注T细胞的第4天、第14天、第21天和第28天通过生物发光成像系统监测小鼠体内荧光强度变化,如图6A和图6B所示, CAR-T组小鼠体内肿瘤细胞荧光强度明显下降,而对照组小鼠体内肿瘤细胞荧光强度呈增长趋势。实验期间同时记录小鼠的体质量变化,如图6C所示没有体质量减轻的异常情况。

3 讨论

目前CAR-T疗法已成为一种治疗多发性骨髓瘤有吸引力的方法,BCMA特异性CAR-T治疗后的

患者由抗原逃逸导致的复发仍然是一个挑战,因此,迫切需要开发其他与MM相关的肿瘤表面抗原用于CAR-T的治疗^[9]。

CD138是在恶性浆细胞上高表达的细胞表面黏附分子,可作为MM诊断治疗的主要标志物^[19]。BT062(indatuximab ravtansine)是CD138单克隆抗体与细胞毒药物DM4偶联的复合物,可特异性结合并释放细胞毒药物起到杀伤MM细胞的作用,I期临床试验表明,BT062可以降低复发和耐药型MM患者的M蛋白水平,不良反应可耐受^[20]。有研究表明,靶向CD138的CAR-T或CAR-NK能够有效杀伤多发性

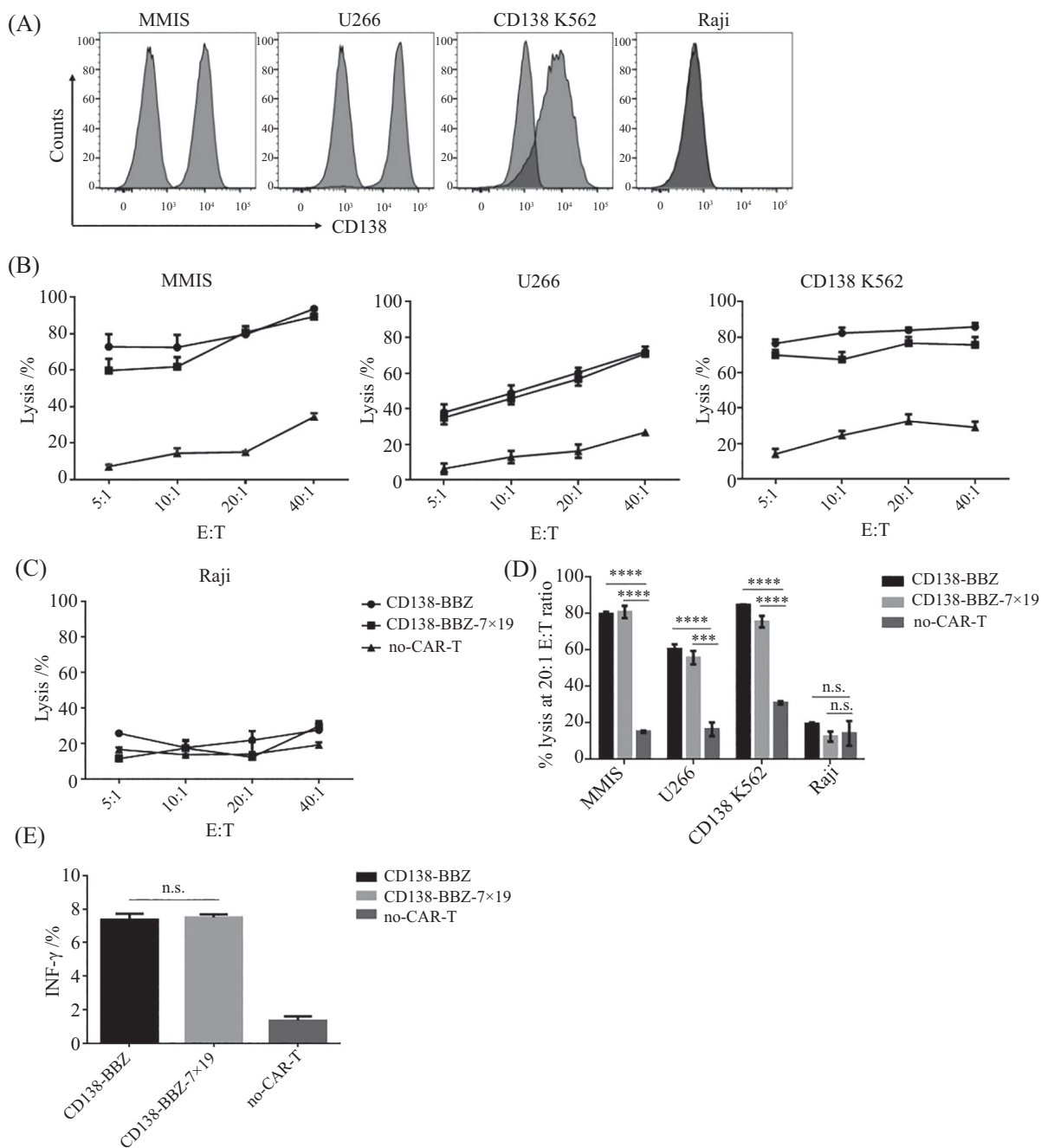
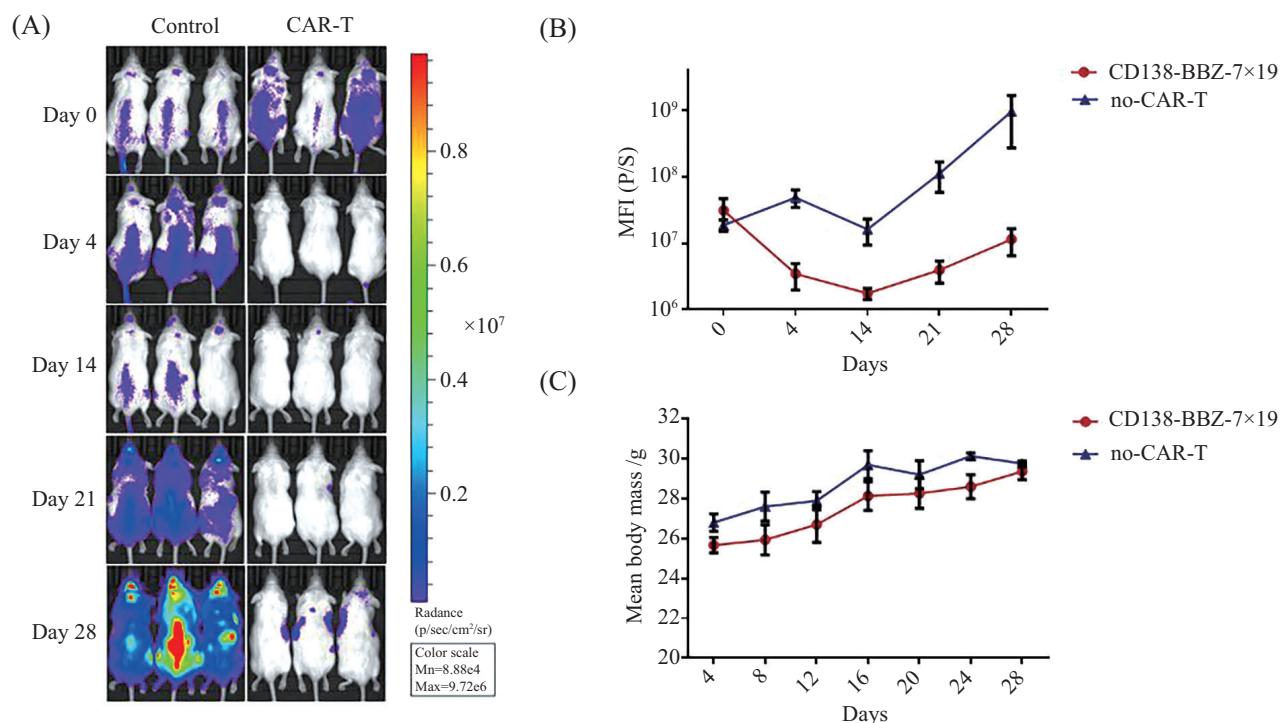


图5 CAR-T细胞对CD138阳性肿瘤细胞的裂解率和IFN- γ 分泌水平
 Fig.5 Lysis rate of CAR-T cells to CD138-positive tumor cells and IFN- γ secretion

A: flow cytometry detection of CD138 expression on tumor cell surface. B: luciferase bioluminescence method detection of the lysis rate of CAR-T cells to CD138 positive tumor cells. C: luciferase bioluminescence method detection of the lysis rate of CAR-T cells to CD138 negative tumor cells. D: the lysis rate of target cells at the 20:1 E:T ratio. E: the level of IFN- γ secreted by CAR-T cells after co-incubation with target cells. *** P <0.001, **** P <0.000 1, n.s. indicates P >0.05.

骨髓瘤细胞^[10,21], 一项对5名MM患者进行CD138特异性CAR-T治疗的临床试验也证明该疗法是安全可行的^[14]。IL-7是由非免疫基质细胞、成纤维网状细胞、DC和巨噬细胞产生的一种25 kDa的单链糖蛋

白, 对T淋巴细胞的发育、分化和增殖起关键作用^[22]。CCL19是对免疫细胞有定向趋化功能的小分子蛋白质, 能够诱导免疫细胞浸润肿瘤组织从而抑制肿瘤生长, 与其配体CCR7形成的CCL19/CCR7轴在抗肿



A: 小鼠背部生物学发光成像。每只小鼠通过尾静脉注射 3×10^6 个MM1S-Luc-gfp细胞, 第4天成瘤后(day 0)对照组和CAR-T组分别注射 1×10^7 个non-CAR-T细胞和CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞。B: 每组小鼠的平均生物学发光强度。C: 观察期内小鼠平均体质量的变化。

A: the dorsal bioluminescence imaging of mice. Each mouse was injected with 3×10^6 MM1S-Luc-gfp cells (day 0) through the tail vein, and on the 4th day after tumor formation, the control group and experimental group were injected with 1×10^7 non-CAR-T cells and CD138-BBZ-7×19 CAR-T cells, respectively. B: the average bioluminescence intensity of each group of mice. C: changes in average body mass of mice during the observation period.

图6 CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞在体内的抗肿瘤活性

Fig.6 antitumor activity of CD138-BBZ-7×19 CAR-T *in vivo*

瘤中发挥重要作用^[23]。

本研究在靶向CD138的第二代CAR-T的基础上, 构建了同时分泌IL-7和CCL19的第四代CAR-T。通过与第二代CAR-T细胞进行生物学功能的比较, 发现第四代CAR-T细胞具有更强的增殖能力和趋化能力, 这与T细胞自身分泌的IL-7和CCL19密切相关, 经检测第二代CAR-T细胞分泌低水平或不分泌这两种细胞因子。有研究表明, 中央记忆性T细胞(TCM, CD45RA⁻CCR7⁺)和其他分化程度较低的T细胞亚群如初始样T细胞(Naive-T, CD45RA⁺CCR7⁺)和记忆干细胞(memory stem T cells, TSCM, CCR7⁺CD45RA⁺CD45RO⁺)对于CAR-T细胞在体内的存活和扩增至关重要^[24-25]。本研究通过流式细胞术检测了两种CAR-T细胞的亚型, 发现第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞具有更高比例的Naive-T细胞亚群。经体外杀伤实验验证, 第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞与第二代CD138-BBZ CAR-T细胞都能有效裂解CD138阳性的多发性骨髓瘤细胞, 表现出良好的特异性, 表明增加细胞因子的

表达不会影响CAR-T细胞发挥杀伤功能。进一步构建了NCG小鼠多发性骨髓瘤模型, 在体内验证了第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞能够有效地抑制多发性骨髓瘤的生长。

综上所述, 本研究表明第四代CD138-BBZ-7×19 CAR-T细胞是一种有效的治疗多发性骨髓瘤的新方案, 为其应用于临床提供了临床前研究基础。此外, 为了防止抗原逃逸和肿瘤复发, 未来有望将该CAR-T与其他靶点的CAR-T进行联合治疗或者构建双靶CAR-T治疗复发性/难治性多发性骨髓瘤, 为病人提供个性化的治疗方案。

参考文献 (References)

- GORABI A M, HAJIGHASEMI S, SATHYAPALAN T, et al. Cell transfer-based immunotherapies in cancer: a review [J]. IUBMB Life, 2020, 72(4): 790-800.
- RABINOVICH B A, RADU C G. Imaging adoptive cell transfer based cancer immunotherapy [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11(6): 672-84.
- HAN E Q, LI X L, WANG C R, et al. Chimeric antigen receptor engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and chal-

- lenges [J]. J Hematol Oncol, 2013, 6: 47.
- [4] JASPERS J E, BRENTJENS R J. Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety [J]. Pharmacol Ther, 2017, 178: 83-91.
- [5] MOHTY M, GAUTIER J, MALARD F, et al. CD19 chimeric antigen receptor-T cells in B-cell leukemia and lymphoma: current status and perspectives [J]. Leukemia, 2019, 33(12): 2767-78.
- [6] KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma [J]. Blood, 2008, 111(6): 2962-72.
- [7] MIKKILINENI L, KOCHENDERFER J N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma [J]. Blood, 2017, 130(24): 2594-602.
- [8] KUMAR S K, LEE J H, et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study [J]. Leukemia, 2012, 26(1): 149-57.
- [9] BRUDNO J N, MARIC I, HARTMAN S D, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor prognosis relapsed multiple myeloma [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(22): 2267-80.
- [10] SUN C, MAHENDRAVADA A, et al. Safety and efficacy of targeting CD138 with a chimeric antigen receptor for the treatment of multiple myeloma [J]. Oncotarget, 2019, 10(24): 2369-83.
- [11] CHEN K H, WADA M, PINZ K G, et al. A compound chimeric antigen receptor strategy for targeting multiple myeloma [J]. Leukemia, 2018, 32(2): 402-12.
- [12] YAN Z, CAO J, CHENG H, et al. A combination of humanised anti-CD19 and anti-BCMA CAR T cells in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a single-arm, phase 2 trial [J]. Lancet Haematol, 2019, 6(10): 521-9.
- [13] TIMMERS M, ROEX G, WANG Y, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cell therapy in multiple myeloma: beyond B cell maturation antigen [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1613.
- [14] GUO B, CHEN M, HAN Q, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma [J]. J Cell Immunotherapy, 2016, 2(1): 28-35.
- [15] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKs: the fourth generation of CARs [J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(8): 1145-54.
- [16] KUEBERUWA G, KALAITSIDOU M, CHEADLE E, et al. CD19 CAR T cells expressing IL-12 eradicate lymphoma in fully lymphoreplete mice through induction of host immunity [J]. Mol Ther Oncolytics, 2018, 8: 41-51.
- [17] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(4): 346-51.
- [18] MA T, SHI J, LIU H. Chimeric antigen receptor T cell targeting B cell maturation antigen immunotherapy is promising for multiple myeloma [J]. Ann Hematol, 2019, 98(4): 813-22.
- [19] PALAIOLOGOU M, DELLADETSIMA I, TINIAKOS D. CD138 (syndecan-1) expression in health and disease [J]. Histol Histopathol, 2014, 29(2): 177-89.
- [20] JAGANNATH S, HEFFNER LT, AILAWADHI S, et al. Indatuximab ravtansine (BT062) Monotherapy in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2019, 19(6): 372-80.
- [21] JIANG H, ZHANG W, SHANG P, et al. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells [J]. Mol Oncol, 2014, 8(2): 297-310.
- [22] GEISELHART L A, HUMPHRIES C A, GREGORIO T A, et al. IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation [J]. J Immunol, 2001, 166(5): 3019-27.
- [23] YAN Y, REN F, XU W, et al. CCL19 and CCR7 expression, signaling pathways, and adjuvant functions in viral infection and prevention [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7(10): 212.
- [24] XU Y, ZHANG M, RAMOS CA, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with *in vivo* expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15 [J]. Blood, 2014, 123(24): 3750-9.
- [25] HELSEN C W, HAMMILL J A, LAU V W C, et al. The chimeric TAC receptor co-opts the T cell receptor yielding robust anti-tumor activity without toxicity [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3049.