

靶向PSCA的缺氧诱导型CAR-T的 构建及体外效能研究

朱秀秀¹ 王玲² 沈俊杰¹ 陈雪娇² 钱程^{1*}

(¹浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; ²重庆精准生物产业技术研究院有限公司, 重庆 400000)

摘要 该文针对肿瘤微环境中的缺氧环境, 利用缺氧相关的启动子, 设计和制备在缺氧环境中诱导表达靶向前列腺干细胞抗原(PSCA)的嵌合抗原受体修饰的T细胞(CAR-T), 研究缺氧条件下其嵌合抗原受体(CAR)的表达及对肿瘤细胞的体外杀伤作用。研究者通过基因合成缺氧启动子(5H1P)和CAR的DNA片段, 利用酶切方法将其插入到慢病毒载体中, 然后感染T淋巴细胞。在体外用CoCl₂构建缺氧模型, 通过流式细胞术检测CoCl₂未诱导组CAR有42%的弱阳性表达, 诱导后阳性率增加到84.4%, 且荧光强度显著增加。结果表明, 诱导组比不诱导对照组抗肿瘤效果更好。综上所述, 该实验成功构建了靶向PSCA的缺氧诱导型CAR-T, 使其在缺氧的环境中效能增强, 这为CAR-T在实体瘤的治疗方面提供了新的方案。

关键词 5H1P; CoCl₂; 缺氧; PSCA; CAR-T; 抗肿瘤

Construction and *In Vitro* Potency Investigation of Hypoxia-Inducible CAR-T Targeting PSCA

Zhu Xiuxiu¹, Wang Ling², Shen Junjie¹, Chen Xuejiao², Qian Cheng^{1*}

(¹College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Chongqing Institute of Precision Medicine and Biotechnology Company Limited., Chongqing 400000, China)

Abstract Considering anoxic tumor microenvironment, we designed a hypoxia-inducible chimeric antigen receptor-modified T cells (CAR-T) targeting prostate stem cell antigen (PSCA), and tested the cytotoxicity of these cells against tumor cells *in vitro*. 5H1P and the sequences encoding the light and heavy chain variable regions of a monoclonal antibody targeting PSCA were synthesized and integrated into lentiviral vectors using restriction enzymes. Then lentivirus were infected to human T lymphocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells to preparation CAR-T cells. Taking use of CoCl₂, we emulated the hypoxia model *in vitro*. The positivity rate of PSCA-CAR expression in the T lymphocytes was detected by flow cytometry with or without CoCl₂ treatment. There was 42% weak positive subpopulation in uninduced group and increased to 84.4% after CoCl₂ induction, in which the fluorescence intensity increased significantly. Cytotoxic assay was performed to evaluate the specific cytotoxicity of the genetically modified T cells against the PSCA-positive HeLa cells, and ELISA was used to detect cytokine secretion by the cells. Results showed that induction group had better cytotoxicity than non-induced control group ($P < 0.05$), and secreted significantly higher levels of cytokines ($P < 0.01$). In conclusion,

收稿日期: 2018-12-11 接受日期: 2019-01-25

科技部重点专项(批准号: 2016YFC1303400)资助的课题

*通讯作者: Tel: 15086883400, E-mail: cqian8634@gmail.com

Received: December 11, 2018 Accepted: January 25, 2019

This work was supported by the Key Projects of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2016YFC1303400)

*Corresponding author: Tel: +86-15086883400, E-mail: cqian8634@gmail.com

网络出版时间: 2019-05-10 17:21:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1721.032.html>

we successfully constructed the hypoxia-inducible CAR-T targeting PSCA with enhanced potency in anoxic environment. It will provide a new solution for CAR-T treatment in solid tumors.

Keywords 5H1P; CoCl₂; hypoxia; PSCA; CAR-T; anti-tumor

肿瘤微环境在肿瘤发生、发展中具有关键作用, 其中酸性和缺氧是微环境中两大相互关联的物理因素。研究表明, 实体瘤中大部分细胞都处在缺氧环境中, 缺氧可改变肿瘤细胞的糖代谢途径, 产生大量乳酸, 造成肿瘤微环境中酸性的特征, 进而可以降低肿瘤细胞凋亡, 增强细胞增殖和生长, 并且帮助肿瘤细胞的迁移^[1]。缺氧诱导因子-1 α (Hif-1 α)是一种在缺氧肿瘤微环境中激活并稳定表达的转录因子, Hif-1 α 参与肿瘤的代谢、血管生成以及凋亡分化等重要事件的调节^[2]。该基因存在缺氧调控元件(HRE)具有在缺氧条件下起始基因转录应答的特性, 因此常被用于基因的缺氧诱导表达^[3-5]。

嵌合抗原受体修饰的T细胞(CAR-T)是一种新型的肿瘤免疫治疗技术, 其在血液系统肿瘤中已获得成功运用, 但受限于肿瘤微环境等抑制因素, CAR-T疗法在实体瘤中的治疗效果并不理想^[6-8]。因此, 提高CAR-T在实体瘤中的有效性和安全性是目前CAR-T应用亟待解决的难题。目前该领域相关的探索性研究包括: 针对肿瘤基质细胞靶向FAP或者构建分泌乙酰肝素酶的CAR-T; 通过抵抗或逆转PD-1免疫抑制信号通路; 同时表达细胞因子如IL-2等能增强CAR-T细胞效能的CAR结构^[7-10]。但是, 这些改造在提高有效性的同时也存在潜在的安全性问题^[11]。由于安全性是临床应用最为重要的指标之一, 针对CAR-T使用的安全性, 现有的研究包括: 构建带有双抗原的双CAR系统; 构建带有激活抑制功能的iCAR系统; 用mRNA瞬时转染表达CAR受体; 携带致死基因, 可在不良事件发生时被激活; CAR-T与药物联合使用等^[12-14]。但这些方案在CAR的稳定表达、操作的复杂性、实际效果等方面仍存在问题。

本研究从肿瘤自身的缺氧微环境出发, 选择包含5个重复HRE调控元件与弱启动的CMV mini Promoter联用从而构成在缺氧条件下能被激活的可调控启动子, 希望在肿瘤微环境中特异性激活下游蛋白的表达, 从而实现提高治疗安全性的同时, 保留CAR-T的有效性。前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)是一个含123个氨基酸的糖蛋白, 最初发现于前列腺癌中, 具有较高的前列腺组织特

异性, 而后期研究发现, 其广泛过表达于多种实体瘤表面, 例如胃癌、胰腺癌、膀胱癌等, 因此PSCA有望成为免疫治疗实体瘤的理想靶点^[15-17]。本实验室构建了以2B3单克隆抗体的可变区为单链抗体区、IgG4Fc为铰链区、CD28为跨膜区、CD28和4-1BB为共刺激信号的第3代CAR慢病毒载体Lv-CAG-PSCA(CAR)^[18], 并在此基础上构建缺氧调控的Lv-5H1P-PSCA(CAR)慢病毒载体, 利用体外药物构建缺氧环境, 通过Anti-PSCA CAR-T杀伤结果显示, 在CoCl₂诱导的缺氧条件下的实验组能显著诱导CAR基因的表达, 且有较强的靶细胞杀伤作用。本研究为基于肿瘤缺氧微环境调节的CAR-T应用研究提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lv-CAG-T7-GAP、Lv-CAG-PSCA(CAR)、Lv-CAG-GFP质粒由本实验室保存; 质粒抽提试剂盒(Omega)、大肠杆菌TOP10为本实验室保存; 限制性内切酶购于Thermo公司; DNA连接酶购于TaKaRa公司; 琼脂糖购于上海生工生物工程股份有限公司; 胶回收试剂盒、CellTiter-Glo One Solution Assay购于Promega公司; M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent、IgG-647、酶标仪购于Thermo公司; Complete-Mini、EDTA-free购于Roche公司; 细胞系293T、HeLa购于ATCC公司; 培养基DMEM、RPMI 1640购于Gibco公司; 胎牛血清购于BI公司; xCELLigence RTCA购于杭州艾森生物有限公司; 离心机购于Eppendorf公司; ELISA检测试剂盒购于BD公司; Protein L购于南京金斯瑞生物科技有限公司; 5H1P基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; Hif-1 α 购于Novus公司; 重组IL-2购于山东金泰生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PBKL1-5H1P系列的质粒构建 直接基因合成EcoR V-5HRE-CMVmini promoter-Nhe I共计286 bp的5H1P片段, 将合成的基因片段和慢病毒载体Lv-CAG-T7-GAP用EcoR V和Nhe I酶切, 连接, 构

成Lv-5H1P-T7-GAP载体,用*Nhe* I和*Sal* I酶切Lv-5H1P-T7-GAP、Lv-CAG-PSCA(CAR)、Lv-CAG-GFP,然后分别割胶回收目的片段,在16 °C连接5 h后,转化涂于卡纳抗性LB板上,通过挑单克隆,酶切验证后测序鉴定重组载体Lv-5H1P-PSCA(CAR)(8 325 bp)、Lv-5H1P-GFP(7 443 bp)。

1.2.2 制备慢病毒及感染T淋巴细胞 培养293T细胞,待其生长状态良好,铺一定数目于10 cm的培养皿中,培养至细胞稳定增长到融合度为85%以上时,换液并继续培养2 h。加入表达质粒20 μg,将包装质粒13 μg(RRE:REV:2G)加入到1.5 mL的离心管中,加入2.5 mol/L CaCl₂ 60 μL,补充ddH₂O至总体积为600 μL,37 °C孵育0.5 h后,将其逐滴包被至600 μL HBS中,37 °C培养箱中静置5 min后混匀加入到已温育的5.8 mL无血清的DMEM培养液中,37 °C放置5 min后加入到已换液的培养皿中,3~5 h后换成10 mL含10% FBS的DMEM培养基,48 h或72 h后收集细胞上清,纯化病毒,滴度测定。

采用CD3单克隆抗体活化人外周血来源的PBMC细胞,24 h后,按一定的感染复数(MOI)加入CAR-T病毒感染已活化的PBMC,并加入polybrene以帮助病毒感染,培养12~18 h后换液(10% RPMI 1640+IL-2+双抗),于37 °C培养箱继续培养。

1.2.3 CoCl₂的缺氧模型建立 将100 μL中含1×10⁴的HeLa细胞铺于96孔板中,同时将100 μL中含4×10⁴的PBMC细胞铺于另一个96孔板中,等贴壁细胞贴满5 h后,对它们进行CoCl₂终浓度0、100、200、300、400、500 μmol/L诱导处理24 h,按1:1的体积加入温育好的CellTiter-Glo One Solution Assay试剂,室温孵育10 min后放入酶标仪检测吸光度。

用包装好的Lv-5H1P-GFP病毒感染活化的PBMC,培养12~18 h后换液,培养至第4天铺2×10⁶细胞于6孔板中,对它们进行CoCl₂终浓度0、100、200、300 μmol/L诱导处理24 h,按照M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo公司)的说明书提取蛋白,配置10% PAGE胶100 V恒压电泳1.5~2.5 h后,300 mA恒流2 h将蛋白转于NC膜上,用5%的脱脂奶粉封闭1 h,PBST洗净剪下目的条带,于4 °C分别孵Hif-1α(1:1 000)和β-actin(1:2 000)一抗过夜。第2天用PBS洗净条带后,于室温摇床上孵育相对应的二抗1 h,PBS洗净后加显色液于仪器上拍照保存。

1.2.4 流式细胞术检测CAR的表达 分别在病毒感染第6天和第13天检测CAR-T的阳性率,在检测的前1天对实验组加药24 h后,与其他不加药组一起检测,以不加病毒的PBMC组为对照组,分别取5×10⁵细胞,1 000 r/min离心5 min,去掉上清,加入800 μL PBS清洗1次,离心去上清,加入100 μL 1% FBS(用PBS稀释)悬浮,加入Protein L 2 μL,4 °C避光静置30 min,每10 min去晃动1次,30 min后用PBS洗1次,然后加入二抗羊抗鼠IgG-647抗体2 μL,同时加入FITC-CD3、BUV395-CD4抗体各2 μL,同上操作静置30 min,PBS清洗1次,最后用200 μL的1% FBS悬浮转移至流式管中,上机检测。

1.2.5 体外检测诱导缺氧组的杀伤效能 分别以PSCA阳性的HeLa细胞为靶细胞,将状态良好的靶细胞分别按10 000的细胞量铺于96孔的E-plate板中,每孔100 μL,培养过夜,次日用不同的方式处理CAR-T细胞,除去上清后用不含IL-2的培养基悬浮细胞,计数后按照一定的效靶比铺于靶细胞中,置培养箱培养,xCELLigence RTCA记录杀伤的情况,并计算不同组间的杀伤效率。杀伤完全后收集细胞上清,离心后取100 μL保存于-80 °C,以便后期杀伤检测。

1.2.6 Elisa检测IFN-γ和IL-2因子 按照ELISA检测试剂盒的操作步骤,用IFN-γ包被抗体包被96孔板过夜,同时用IL-2包被抗体包被新的96孔板过夜。第2天用5% FBS封闭2 h,PBST清洗,再加入相对应的标准品和样品室温孵育2 h后,加入抗体酶制剂显色,根据显色情况加2 mol/L H₂SO₄终止显色,然后于酶标仪中测定吸光度,保存数据。

1.2.7 统计学分析 实验数据采用Graphpad Prism 6统计学软件进行t检验分析,以P<0.05为差异具有统计学意义。

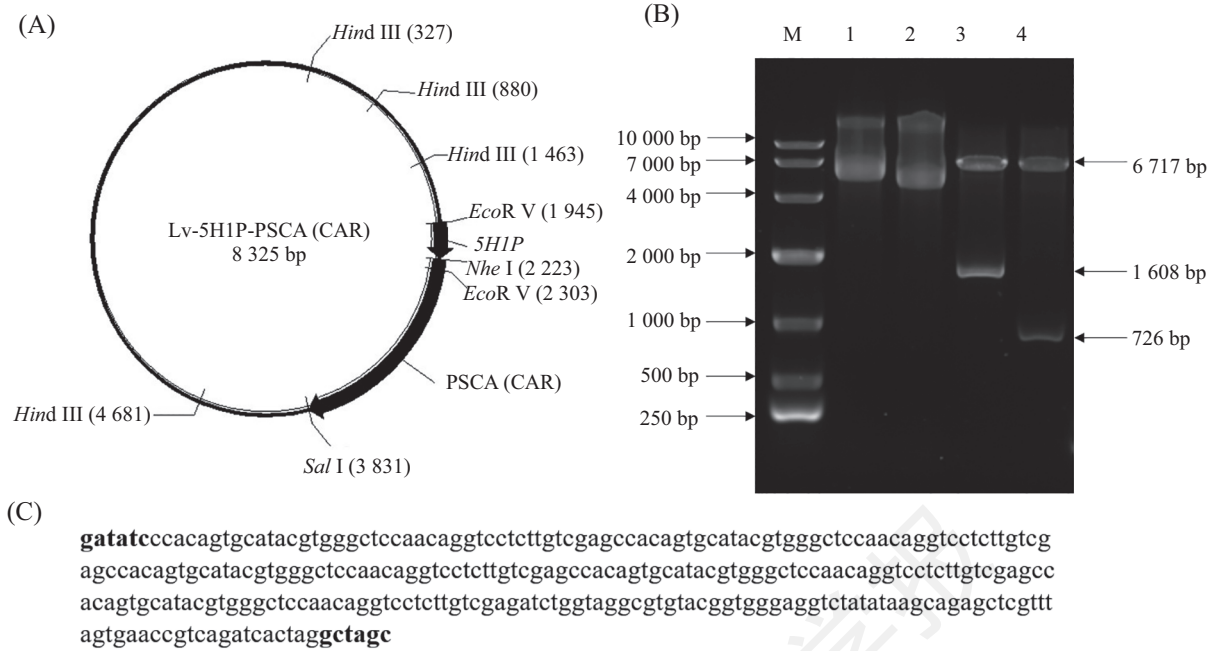
2 结果

2.1 表达载体构建与鉴定

基因合成5H1P序列后,进行酶切连接等分子克隆技术,构建Lv-5H1P-PSCA(CAR)、Lv-5H1P-GFP的表达质粒,大小分别为8 325 bp、7 443 bp,通过*Nhe* I+*Sal* I双酶切得到的CAR的基因片段为1 608 bp和GFP的基因片段为726 bp,这正好是分别插入载体中的基因片段大小。测序验证正确,成功获得克隆(图1)。

2.2 CoCl₂缺氧模型的建立

为了验证缺氧启动子的功能,我们选择目前比



A: 慢病毒载体Lv-5H1P-PSCA(CAR)结构示意图。B: 重组载体的酶切鉴定图; M: DL10000 DNA分子量标准; 1: 质粒Lv-5H1P-PSCA(CAR)(8325 bp); 2: 质粒Lv-5H1P-GFP(7443 bp); 3: *Nhe* I+*Sal* I双酶切质粒Lv-5H1P-PSCA(CAR)得6717 bp、1608 bp片段; 4: *Nhe* I+*Sal* I双酶切质粒Lv-5H1P-GFP得6717 bp、726 bp片段。C: 5H1P序列, 粗体为酶切位点序列。

A: schematic diagram of the lentiviral vector Lv-5H1P-PSCA (CAR). B: restriction map of the recombinant vector; M: DL10000 DNA molecular weight standard; 1: plasmid Lv-5H1P-PSCA (CAR) (8325 bp); 2: plasmid Lv-5H1P-GFP (7443 bp); 3: *Nhe* I+*Sal* I double-digested plasmid Lv-5H1P-PSCA (CAR) to obtain 6717 bp, 1608 bp fragment; 4: *Nhe* I+*Sal* I double-digestion plasmid Lv-5H1P-GFP obtained 6717 bp, 726 bp fragment. C: 5H1P sequence, bold is the enzyme cleavage site sequence.

图1 表达载体构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of expression vector

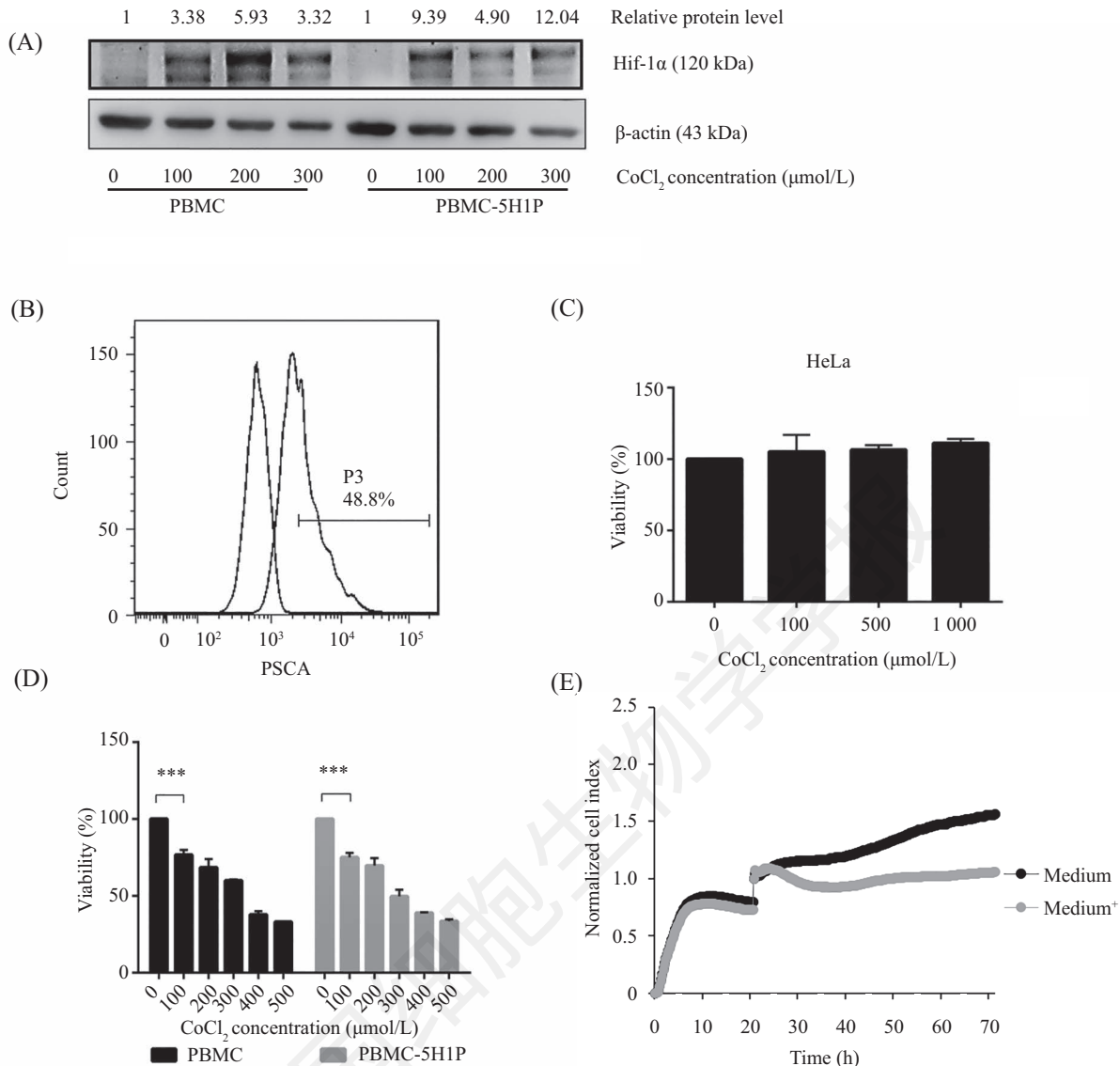
较成熟的二氯化钴(CoCl_2)缺氧诱导模型。已知Hif-1 α 的ODD区内的Pro402、Pro564在常氧条件下可被PHD(脯氨酸羟化酶)羟化, 然后与pVHL结合, 泛素化并被蛋白酶体降解。而二氯化钴(CoCl_2)中的二价钴离子会置换PHD辅助因子二价铁离子阻止Hif-1 α 被羟化, 同时能影响pVHL结合Hif-1 α ODD, 从而稳定细胞内Hif-1 α 的表达^[19-21]。通过 CoCl_2 处理后细胞中Hif-1 α 的表达显著提升, 验证了该模型构建成功(图2A)。

我们通过流式细胞术检测发现, 以PSCA阴性的细胞系T24设门, HeLa细胞的PSCA表达率为48.8%, 认为其可以作为本次实验的阳性靶细胞(图2B)。为了排除 CoCl_2 处理对细胞活性的影响, 我们分别选取了不同浓度的 CoCl_2 处理靶细胞HeLa以及T细胞, 以期建立可诱导缺氧效应的合理药物浓度范围。HeLa细胞贴壁生长5 h后, 进行 CoCl_2 终浓度0、100、500、1000 $\mu\text{mol/L}$ 加药处理, 对T细胞则进行终浓度0、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ 加药处理, 加入药物继续培养12~24 h后观察细胞的增殖情况。24 h后

加入CellTiter-Glo One Solution Assay试剂裂解细胞, 放入酶标仪检测释放的ATP含量。结果显示, 肿瘤细胞HeLa具有较强的药物耐受性(图2C), 而T细胞随着药物浓度的增加, 其活力显著下降(图2D)。总结可得, CoCl_2 对悬浮细胞PBMC的增殖影响较大, 从蛋白水平来看100 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度足以提高Hif-1 α 的表达, 我们分别对比HeLa细胞在培养基空白组(Medium)和培养基 CoCl_2 终浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组(Medium⁺)的持续生长的增殖曲线, 发现加药处理对细胞增殖影响不大(图2E)。所以我们选择 CoCl_2 终浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 进行后面的实验。

由于体外药物模拟缺氧环境需要使用 CoCl_2 处理, 为了排除 CoCl_2 处理对T细胞的影响, 我们对比了处理组与非处理组中T细胞表型。

首先通过流式细胞术检测了非诱导、诱导以及CAG对照组中细胞CD4亚型的比例。结果显示, 诱导组与通用型CAG启动子的CAR-T细胞分型相比, CoCl_2 处理不影响CAR-T的表型分布比例(45.7% vs 46.8%)(图3A和图3B)。



A: 0、100、200、300 μ mol/L CoCl₂分别处理细胞24 h, 提取总蛋白, 检测Hif-1 α 表达; B: 靶细胞HeLa的PSCA表达; C: 0、100、500、1000 μ mol/L CoCl₂处理HeLa 24 h后的细胞增殖情况; D: 0、100、200、300、400、500 μ mol/L CoCl₂处理未转染病毒的PBMC和转染病毒的PBMC-5HIP 24 h后的细胞增殖情况; E: HeLa的增殖曲线; Medium: 培养基空白组; Medium⁺: 培养基加CoCl₂处理组。***P<0.001。

A: total protein extraction and detection of Hif-1 α expression after 24 h treatment with 0, 100, 200, 300 μ mol/L CoCl₂; B: PSCA expression of HeLa; C: cell proliferation of HeLa after 24 h treatment with 0, 100, 500, 1000 μ mol/L CoCl₂; D: cell proliferation of PBMC that were not transfected with virus and PBMC-5HIP transfected with virus after 24 h treatment with 0, 100, 200, 300, 400, 500 μ mol/L CoCl₂; E: proliferation curve of HeLa; Medium: blank medium group; Medium⁺: medium with CoCl₂ treatment group. ***P<0.001.

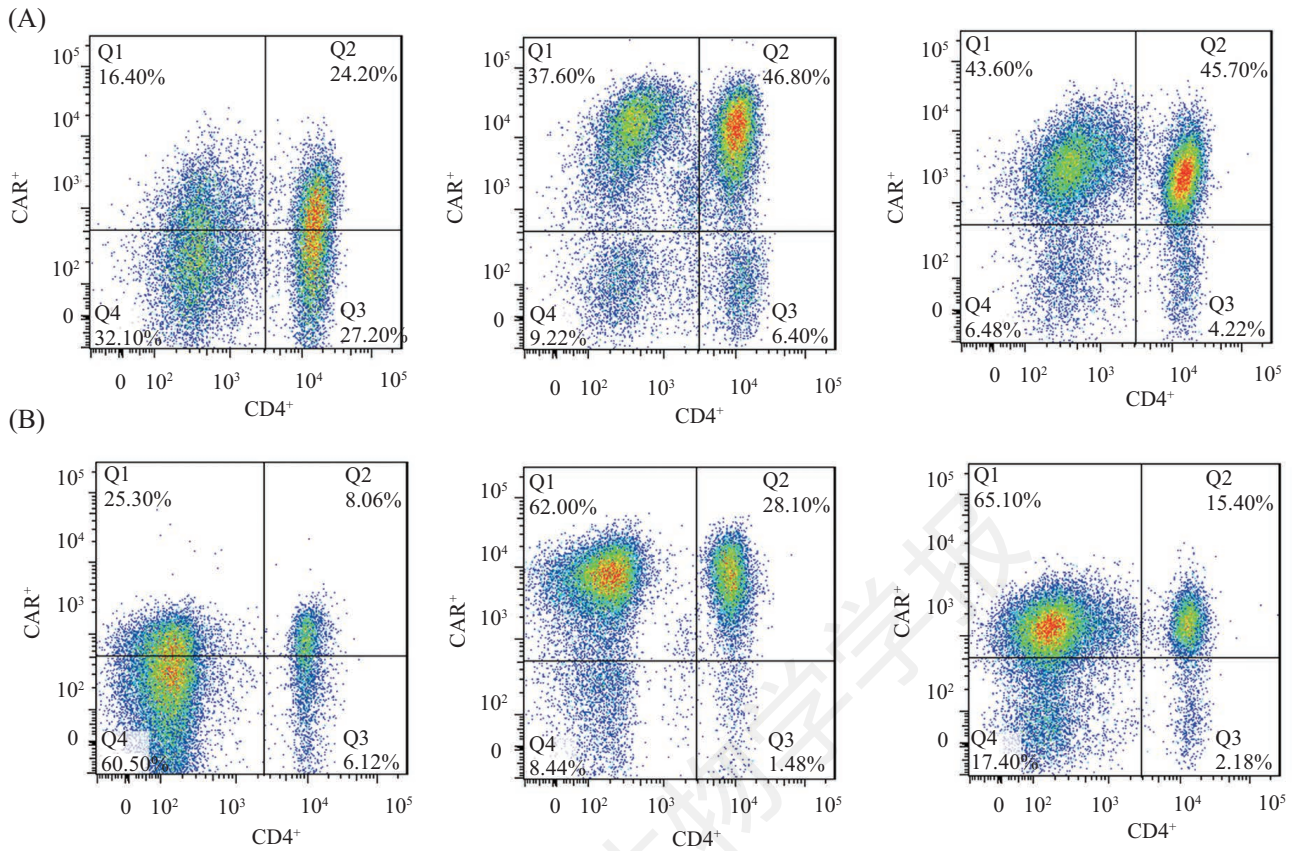
图2 CoCl₂缺氧模型的建立

Fig.2 Establishment of CoCl₂ hypoxia model

2.3 缺氧诱导CAR-T模型的细胞表达验证

使用Lv-5HIP-PSCA(CAR)、Lv-CAG-PSCA(CAR)慢病毒载体分别制备CAR-T细胞。在病毒感染后第6、13天用流式细胞术检测Lv-5HIP-PSCA(CAR)诱导、不诱导组, Lv-CAG-PSCA(CAR)阳性对照组以及不感染病毒的Control T阴性对照组中, 细胞的CAR阳性率以及细胞表型。结果显示, 第6天(d6) 5HIP-PSCA不诱导组和诱导组(CoCl₂终浓度100 μ mol/L)中CAR阳性

率分别为42.0%和84.4%, 阳性对照组CAR阳性率为90.9%; 第13天(d13)结果与第6天基本一致, 5HIP-PSCA不诱导组、诱导组和阳性对照组CAR的阳性率分别为35.1%、88.7%和88.7%。除了CAR阳性率的差别以外, 5HIP-PSCA诱导组的平均荧光强度要显著高于不诱导组(13 900 vs 802), 并且与使用含通用型CAG启动子的CAR-T细胞相比, CAR的平均荧光强度也明显提高(13 900 vs 3 640)(图4)。以上结果



A: 检测第6天CAR表达下CD4亚型的比例; 不诱导组: 5H1P-PSCA; 诱导组: 5H1P-PSCA⁺; 阳性对照组: CAG-PSCA。B: 检测第13天CAR表达下CD4亚型的比例; 不诱导组: 5H1P-PSCA; 诱导组: 5H1P-PSCA⁺; 阳性对照组: CAG-PSCA。
 A: the proportion of CD4 subtypes in the expression of CAR on D6 was detected; non-induced group: 5H1P-PSCA; induction group: 5H1P-PSCA⁺; positive control group: CAG-PSCA。B: the proportion of CD4 subtypes in the expression of CAR on D13 was detected; non-induced group: 5H1P-PSCA; induction group: 5H1P-PSCA⁺; positive control group: CAG-PSCA。

图3 流式细胞术检测CAR-T细胞的表型

Fig.3 The cell phenotype of CAR-T tested by flow cytometry

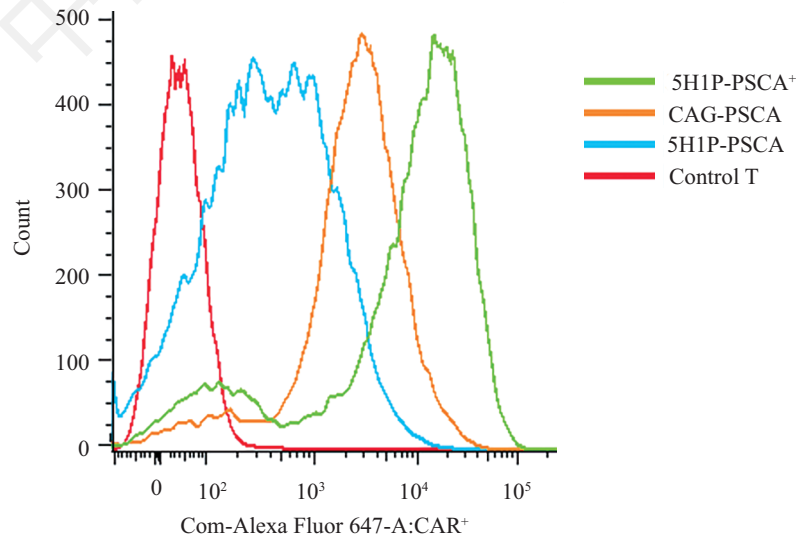
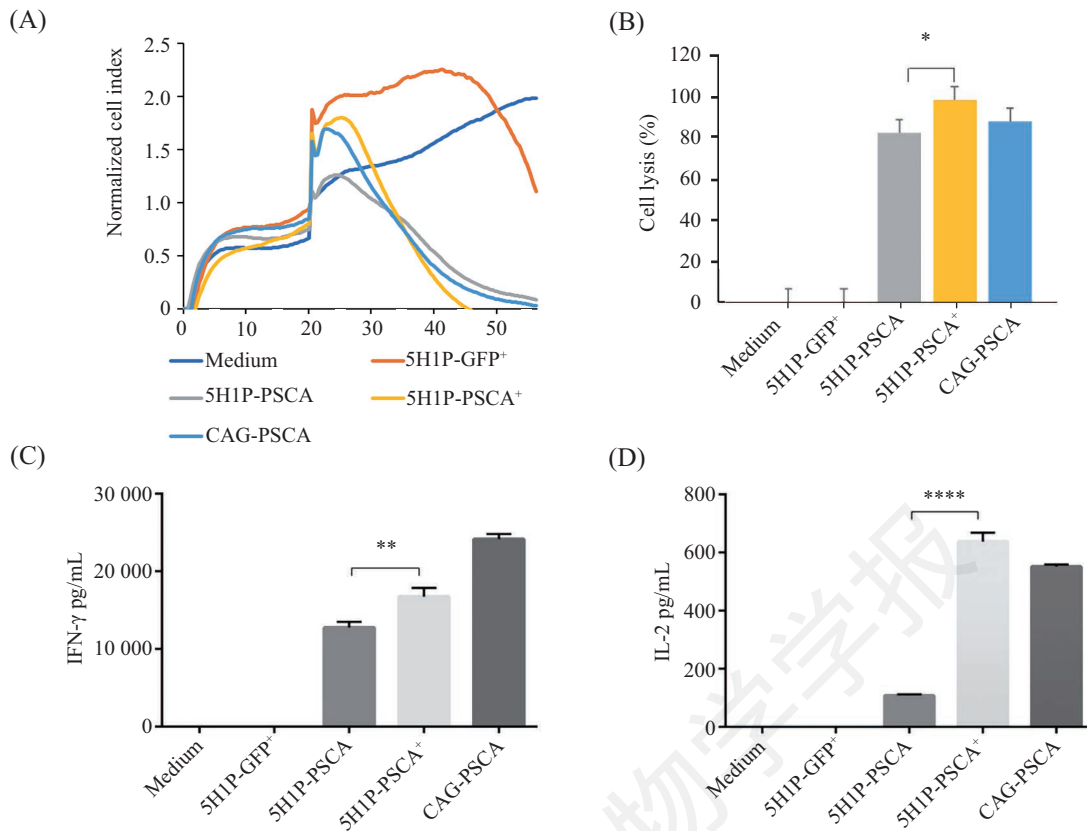


图4 流式细胞术检测CAR的阳性率

Fig.4 The positive rate of CAR tested by flow cytometry



A: 效靶比E/T=1:1的CAR-T细胞对HeLa杀伤增殖曲线; Medium: 只加培养基; 5H1P-GFP⁺: 阴性对照加CoCl₂; 5H1P-PSCA: 不诱导组; 5H1P-PSCA⁺: 诱导组; CAG-PSCA: 阳性对照。B: 效靶比E/T=1:1的CAR-T细胞对HeLa杀伤24 h后细胞毒性。C: 杀伤48 h后检测IFN- γ 因子的释放; D: 杀伤48 h后检测IL-2因子的释放。* P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.000 1。

A: proliferation curve of CAR-T to HeLa with E/T=1:1; Medium: only medium; 5H1P-GFP⁺: negative control plus CoCl₂; 5H1P-PSCA: non-induced group; 5H1P-PSCA⁺: induction group; CAG-PSCA: positive control; B: cytotoxicity of CAR-T to HeLa for 24 h with E/T=1:1. C: detection of IFN- γ -cytokine secretion after 48 h co-culture. D: detection of IL-2-cytokine secretion after 48 h co-culture. * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.000 1.

图5 缺氧诱导型CAR-T细胞对HeLa的体外杀伤效果

Fig.5 Cytotoxicity of hypoxia-inducible CAR-T cells on HeLa

说明, 缺氧诱导型启动子在CoCl₂缺氧模型中可以被诱导激活。

2.4 缺氧诱导CAR-T细胞对HeLa的体外杀伤效果

为了明确缺氧诱导型CAR-T的杀伤作用, 我们分别设计了诱导CAR-T组和诱导GFP组, 以效靶比(E/T) 1:1进行杀伤实验。为了排除系统干扰, 我们设计了Medium组和加CoCl₂处理5H1P-GFP⁺的对照组, 结果显示, 缺氧处理对靶细胞HeLa没有明显毒性作用(图5A和图B)。对比诱导组与不诱导CAR-T组, 在处理24 h后诱导组(5H1P-PSCA⁺)杀伤效率显著高于不诱导组(5H1P-PSCA)(98.3% vs 82.2%, P <0.05)(图5B)。T细胞在杀伤过程中可以特异性释放IFN- γ 和IL-2因子, 在杀伤结束后收集上清液分别进行ELISA

检测, 结果显示, 诱导组5H1P-PSCA⁺较不诱导组5H1P-PSCA具有显著的因子释放差异(图5C和图5D), 其中IL-2的因子释放差异特别显著(P <0.000 1)。IL-2由活化T细胞产生, 能刺激T细胞的生长和分化, 促进细胞毒性T细胞(Tc)的产生, 诱导T细胞分泌IFN- γ 、TNF、CSF等细胞因子, 增强T细胞的杀伤活性^[22]。由此可知, 诱导组的CAR-T细胞对HeLa的体外杀伤效率高与不诱导组CAR-T。

3 讨论

肿瘤微环境是肿瘤天然的屏障, 也是肿瘤靶向治疗过程中需要考虑的一个重要方面。研究发现, 大部分的实体瘤微环境中存在缺氧的条件, 在该条件下Hif-1 α 表达稳定, 而Hif-1 α 可以作用于特

定的HRE调控元件, 增强基因的表达。基于现在CAR-T治疗中所面临的安全性和有效性问题, 我们选择重复的5个HRE调控元件与弱启动的CMV mini Promoter联用, 下游连接靶向Anti-PSCA CAR的结构, 从而构成在缺氧条件下能被特异性激活的调控型CAR-T。

本研究显示, 加CoCl₂诱导不影响CAR-T的CD4表型, 且诱导后(5H1P-PSCA⁺) CAR-T 24小时的杀伤效率达到98.3%, 并且相比未诱导组有显著的IFN- γ 和IL-2因子释放($P < 0.0001$)。同时虽然在诱导后启动子的活性得到显著增强, 但是我们也发现未诱导组存在一定程度的本底表达, 这也是诱导型启动子比较常见的问题^[3,22]。我们认为具有较强本底的原因可能有两点: 一是启动子设计, 针对该问题, 可行的做法包括更换启动活性更弱的迷你启动子、减少调控元件的重复数、增强目标蛋白的降解速率等; 二是T细胞应用本身, 有研究显示, 在T细胞激活的过程, PI3K/mTOR及pSTAT3的信号转导途径均有利于增加Hif-1 α 的表达^[24-27], 从而可能造成在T细胞培养的活化过程中, 产生本底表达。结合本研究发现, 在加入诱导后CAR基因的表达显著高于使用通用型CAG强启动子的效果, 进一步提示这种现象可能与Hif-1 α 的这种正反馈调节有关。

由于缺氧条件的复杂性, 为了更全面检测细胞在缺氧条件下的增殖和T细胞的杀伤作用, 在本研究中我们创新地使用了实时无标记细胞分析技术(real-time cellular analysis, RTCA), 与传统的细胞免疫杀伤检测⁵¹Cr或¹¹¹In进行放射性标记分析方法相比, 此方法实验操作简单, 人为误差小, 且对细胞无损伤。细胞在最接近生理状态下进行检测, 每隔5 min动态记录1次细胞信息, 通过该系统我们发现, 在缺氧条件下加入CAR-T 6~8 h后其对靶细胞杀伤的效率明显提升, 24 h左右缺氧条件下的CAR-T杀伤效率高达98.3%。

综上所述, 本研究成功构建了缺氧诱导的CAR-T(5H1P-PSCA), 展示了其可在缺氧条件下被激活, 因此可以单独或者和其他策略联合使用, 以达到增强CAR-T安全性的目的。此外, 本研究获得的缺氧诱导的CAR-T在缺氧条件下表现为CAR分子的高水平表达和很强的体外杀伤能力, 也为提高实体肿瘤治疗的有效性提供可能。因此, 本研究有望为CAR-T的改造升级以及临床应用提供新的思路。

参考文献 (References)

- White KA, Grillo-Hill BK, Barber DL. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130(4): 663-9.
- Liu W, Shen SM, Zhao XY, Chen GQ. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; 3(2): 165-78.
- Harada H, Kizaka-Kondoh S, Itasaka S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, *et al.* The combination of hypoxia-response enhancers and an oxygen-dependent proteolytic motif enables real-time imaging of absolute HIF-1 activity in tumor xenografts. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360(4): 791-6.
- Huang D, Desbois A, Hou ST. A novel adenoviral vector which mediates hypoxia-inducible gene expression selectively in neurons. *Gene Ther* 2005; 12(18): 1369-76.
- Shibata T, Akiyama N, Noda M, Sasai K, Hiraoka M. Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42(4): 913-6.
- Li S, Yang Z, Shen J, Shan J, Qian C. Adoptive therapy with CAR redirected T cells for hematological malignancies. *Sci China Life Sci* 2016; 59(4): 370-8.
- Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol* 2017; 95(4): 356-63.
- Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2017; 5: 28.
- Liu X, Ranganathan R, Jiang S, Fang C, Sun J, Kim S, *et al.* A Chimeric Switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Cancer Res* 2016; 76(6): 1578-90.
- Xue S, Hu M, Iyer V, Yu J. Blocking the PD-1/PD-L1 pathway in glioma: a potential new treatment strategy. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 81.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010; 18(4): 843-51.
- Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med* 2017; 68: 139-52.
- Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med* 2013; 5(215): 215ra172.
- Minagawa K, Zhou X, Mineishi S, Di Stasi A. Seatbelts in CAR therapy: How safe are CARs? *Pharmaceuticals (Basel)* 2015; 8(2): 230-49.
- Yang X, Guo Z, Liu Y, Si T, Yu H, Li B, *et al.* Prostate stem cell antigen and cancer risk, mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014; 14(1): 31-7.
- Dannull J, Diener PA, Prikler L, Furstenberger G, Cerny T, Schmid U, *et al.* Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60(19): 5522-8.
- Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, *et al.*

- Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(4): 1735-40.
- 18 洪娟, 陈运凡, 沈俊杰, 徐艳敏, 钱程. 靶向前列腺干细胞抗原的嵌合抗原受体T细胞构建及其抗肿瘤作用. *第三军医大学学报 (Hong Juan, Chen Yunfan, Shen Junjie, Xu Yanmin, Qian Cheng. Construction of T cells expressing chimeric antigen receptor targeting prostate stem cell antigen and its anti-tumor effect in tumor-bearing mice. Chinese Journal of the third military medical university)* 2018; 40(12): 1053-9.
- 19 Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15911-6.
- 20 Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 443-7.
- 21 Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp* 2011; doi: 10.3791/2899.
- 22 Cheng LE, Öhlén C, Nelson BH, Greenberg PD. Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8⁺ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8⁺ T cells rather than promotion of cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(5): 3001-6.
- 23 Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther* 2000; 7: 493.
- 24 McNamee EN, Korn Johnson D, Homann D, Clambey ET. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol Res* 2013; 55(1/2/3): 58-70.
- 25 Phan AT, Goldrath AW. Hypoxia-inducible factors regulate T cell metabolism and function. *Mol Immunol* 2015; 68(2 Pt C): 527-35.
- 26 Tao JH, Barbi J, Pan F. Hypoxia-inducible factors in T lymphocyte differentiation and function. A review in the theme: cellular responses to hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(9): C580-9.
- 27 Nakamura H, Makino Y, Okamoto K, Poellinger L, Ohnuma K, Morimoto C, *et al.* TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *J Immuno* 2005; 174(12): 7592-9.