

Regnase-1敲除对脐血CAR-T细胞分泌 细胞因子的影响

刘佳慧^{1,2} 冉凤萍³ 毛娟⁴ 蒙露⁵ 赵日⁶ 李华^{2*}

¹成都中医药大学基础医学院, 成都 610075; ²西部战区总医院肿瘤科, 成都 610083;

³成都京东方医院妇产科, 成都 610200; ⁴成都市第五人民医院血液科, 成都 611130;

⁵成都医学院基础医学院, 成都 610500; ⁶西南交通大学医学院, 成都 610031)

摘要 在不断改造嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞药物以增强其抗肿瘤能力的同时, 也需要关注该细胞药物激活后分泌的系列细胞因子谱。这些细胞因子可引起细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS), 而CRS与细胞药物的临床安全性密切相关。Regnase-1具有核糖核酸酶作用, 负向调控免疫应答。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功制备了Regnase-1缺陷型脐血CAR-T细胞, 发现虽然Regnase-1⁻CAR-T的杀伤能力显著比CAR-T细胞强, 但Regnase-1⁻CAR-T细胞分泌促炎因子的能力也显著增强, 提示Regnase-1⁻CAR-T细胞在安全性方面存在潜在风险。

关键词 Regnase-1; 脐血; CAR-T; 细胞因子

The Effect of *Regnase-1* Knockout on the Cytokine Secretion from Cord Blood Derived CAR-T Cells

LIU Jiahui^{1,2}, RAN Fengping³, MAO Juan⁴, MENG Lu⁵, ZHAO Ri⁶, LI Hua^{2*}

¹School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

²Department of Oncology, Western Theater General Hospital, Chengdu 610083, China; ³Department of Obstetrics and Gynecology,

Chengdu BOE Hospital, Chengdu 610200, China; ⁴Department of Hematology, Chengdu Fifth People's Hospital,

Chengdu 611130, China; ⁵Basic Medical College of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China;

⁶Medical College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract As CAR-T (chimeric antigen receptor T) cells are continually modified to enhance their anti-tumor efficacy, attention must also be paid to the cytokine profiles secreted by activated CAR-T cells. These cytokines are important factors in causing the CRS (cytokine release syndrome), which is closely related to the clinical safety of CAR-T. Regnase-1 is a ribonuclease that negatively regulates the immune response. Using CRISPR/Cas9 gene editing technology, Regnase-1-deficient CAR-T cells derived from CB (cord blood) were successfully prepared. It was found that although the specific killing ability of Regnase-1⁻CAR-T cells was significantly stronger than that of CAR-T cells, the secretion of pro-inflammatory cytokines by Regnase-1⁻CAR-T cells was also significantly increased, indicating that Regnase-1⁻CAR-T cells were potentially risky in terms of clinical safety.

Keywords Regnase-1; cord blood (CB); CAR-T; cytokine

收稿日期: 2023-09-24

接受日期: 2023-11-29

四川省科技厅应用基础研究项目(批准号: 19YYJC0242)和国家自然科学基金青年项目(批准号: 31900643)资助的课题

*通信作者。Tel: 17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

Received: September 24, 2023

Accepted: November 29, 2023

This work was supported by the Applied Basic Research Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (Grant No.19YYJC0242) and the Youth Fund of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31900643)

*Corresponding author. Tel: +86-17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞通过CAR分子的scFv单链特异性识别靶蛋白,被直接活化成为细胞毒性T细胞,发挥特异性杀伤靶细胞的作用。目前, CAR-T细胞已在血液肿瘤治疗中取得了显著疗效。截至2023年6月美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准了6款自体CAR-T细胞药物产品,其中2个产品的靶点为B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen, BCMA),其余均为CD19。但CAR-T细胞治疗其他实体瘤的疗效不佳^[1-2],于是CAR-T细胞不断被通过基因修饰或编辑技术改造升级以增强其肿瘤杀伤能力^[3],提高其疗效。但同时也观察到CAR-T细胞活化后会分泌多种细胞因子,引发细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS),甚至免疫效应细胞相关神经毒性综合征(immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS)。这些严重的毒副作用直接影响其临床安全性,因此降低其促炎能力也是值得关注的问题。

*Regnase-1*蛋白具有核糖核酸酶活性,可广泛降解多种mRNA,进而参与抑制T细胞活化^[4]等免疫应答调控。敲除*Regnase-1*可促进CAR-T记忆型细胞形成^[5]。本课题组前期利用脐血(cord blood, CB)来源的T细胞(T cells derived from cord blood),成功构建了CAR-CBT细胞^[6],并利用CRISPR/Cas9技术制备了*Regnase-1*-CAR-CBT细胞^[7]。本研究在考察*Regnase-1*-CAR-CBT细胞杀伤能力同时,重点关注了*Regnase-1*-CAR-CBT细胞活化后分泌的多种细胞因子谱的特点,以便初步评估*Regnase-1*-CAR-CBT细胞未来在临床上的有效性和安全性,为其临床应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 原代人脐血T细胞来自成都医学院第一附属医院。本研究通过成都医学院第一附属医院伦理审查委员会审批(批准号:2018CYFYH-EC-047-02),并征得健康志愿捐赠者的知情同意。含荧光素酶的Nalm-6(人B-ALL急性淋巴细胞白血病细胞)和Namalwa(人Burkitt's淋巴瘤细胞)购自中国科学院细胞库,经本实验室改造为HLA阴性细胞模式靶细胞。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640购自美国Hyclone公司。胎牛血清购自澳大利亚Bovogen Biologicals公

司。T细胞分离试剂盒(Pan T Cell Isolation Kit)购自德国Miltenyi公司。人T细胞活化剂(Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28)购自美国Gibco公司。质粒pLP1、pLP2、pLP-VSVG及pHAGE-SFFV-GFP购自美国Addgene公司。白介素7(interleukin-7, IL-7)和白介素15(interleukin-15, IL-15)均购自英国Pepertech公司。HiFi Cas9 Nuclease 3NLS购自美国Integrated DNA Technologies公司。Alexa Fluor® 700标记的小鼠抗人CD4单抗、APC/Cyanine7标记的小鼠抗人TNF- α 单抗、PE/Dazzle™ 594标记的小鼠抗人GM-CSF单抗、Brilliant Violet 785™标记的小鼠抗人IFN- γ 单抗、Brilliant Violet 510™标记的人穿孔素、PerCP标记的小鼠抗人IL-2单抗和LEGENDplex™流式多重分析试剂盒购自美国BioLegend公司。BUV395标记的标记的小鼠抗人CD8单抗、PE-Cy™7标记的小鼠抗人巨噬细胞炎性蛋白-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β)单抗、BD Horizon™ BV711标记的大鼠抗人IL-13单抗、BV650标记的大鼠抗人IL-10单抗、PE-Cy™5标记的小鼠抗人CD107a单抗和GolgiStop蛋白转运抑制剂购自美国BD公司。小鼠抗人TNF β 单抗和APC购自美国eBioscience公司。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化脐血T细胞 采用Lymphoprep淋巴细胞从人脐血中分离单个核细胞,然后按照T细胞分离试剂盒(Pan T Cell Isolation Kit)的说明书,加入15 μ L生物素标记抗体,300 \times g室温离心10 min,1 mL MACS缓冲液洗涤后加入30 μ L链霉亲和素标记磁珠,充分混匀,经MACS缓冲液洗涤后,将细胞重悬液加入已平衡的LD柱中,进行磁珠分选,收集细胞滤液,得到纯化的T细胞。利用流式细胞仪检测T细胞纯度。

1.2.2 细胞培养 本研究采用的T细胞均为脐血T细胞,因此脐血T细胞、CAR-CBT细胞和*Regnase-1*-CAR-CBT细胞在文中分别被简称为T细胞、CAR-T细胞和*Regnase-1*-CAR-T细胞。T细胞、CAR-T细胞和*Regnase-1*-CAR-T细胞均培养在含5 ng/mL IL-7、5 ng/mL IL-15、10% FBS的PRMI-1640培养液中。Nalm-6和Namalwa细胞在含10% FBS的完全RPMI-1640培养基中进行培养。

1.2.3 *Regnase-1*的敲除 将Cas9蛋白按照1:1摩尔比与*Regnase-1* gRNA混合,室温静置15 min,然后将混合液与 1×10^6 个脐血T细胞混合,进行电转。电转参数为电压560 V、脉冲20 ms。

1.2.4 CD19.CAR慢病毒转染 将Regnase-1电转组或空电转组的细胞静置30 min, 然后进行染色计数。根据细胞数加入一定感染复数的CD19.CAR慢病毒进行感染, 37 °C、5% CO₂条件下培养96 h, 流式细胞仪检测CD19.CAR阳性细胞的比例。

1.2.5 CAR-T细胞特异性杀伤模型 功能学实验均采用CAR-T细胞作为Regnase-1⁻CAR-T敲除组的对照, T细胞作为无CD19.CAR表达的空白对照组。CD19阳性的靶细胞Nalm-6和Namalwa分别以不同的效靶比(3:1、1:1、1:3)与Regnase-1⁻CAR-T细胞、CAR-T细胞、T细胞混合, 为靶共培养实验组, 同时设靶细胞单独培养组, 37 °C、5% CO₂条件下培养24 h后, 利用流式绝对计数法检测各组效应细胞和靶细胞的数量。杀伤率计算公式: 杀伤靶细胞率(%)=[(靶细胞组的靶细胞数量-共培养组中剩余的靶细胞数量)/靶细胞组的靶细胞数量]×100%。

1.2.6 流式检测CAR-T细胞杀伤时的胞内蛋白CD107a表达情况 将效应细胞Regnase-1⁻CAR-T细胞、CAR-T细胞、T细胞分别与靶细胞Nalm-6、Namalwa按1:3效靶比混合, 37 °C、5% CO₂培养24 h后取细胞悬液, 加1:1 000稀释的PE/cy5 anti-CD107a抗体孵育1 h, 加5 μL GolgiStop蛋白转运抑制剂, 于37 °C、5% CO₂孵育3 h后流式检测CD107a阳性细胞比例。

1.2.7 流式CBA(cytometric beads array)法检测CAR-T细胞杀伤时分泌的细胞因子浓度 将Regnase-1⁻CAR-T细胞、CAR-T细胞分别与Nalm-6、Namalwa按1:3效靶比混合, 37 °C、5% CO₂下孵育24 h后取细胞培养上清液, 按LEGENDplex™流式多重分析试剂盒说明书倍比稀释各细胞因子标准品和待测样本, 将25 μL上清稀释液和标准品稀释液分别加入样品孔和标准孔中, 按照试剂盒说明书进行操作: 各孔均加入25 μL混合微球, 室温静置2 h后, 加入250 μL洗液, 300 ×g室温离心5 min, 弃上清, 重复2次, 加入试剂盒自带的检测抗体室温孵育1 h, 各孔加200 μL洗液, 300 ×g室温离心5 min, 弃上清, 各孔加入藻红蛋白标记的链霉亲和素(SA-PE), 室温静置30 min, 加入200 μL洗液, 300 ×g室温离心10 min后, 各孔均加入150 μL洗液, 用流式细胞仪检测各孔样品的细胞因子浓度。

1.2.8 流式检测胞内含细胞因子的阳性细胞比例 将Regnase-1⁻CAR-T细胞、CAR-T细胞分别与Nalm-6、Namalwa按1:3效靶比混合, 24 h时取细胞悬液, 进行

流式胞内染色, 检测胞内含所测细胞因子的阳性细胞比例。

1.2.9 数据处理及统计学分析 所有实验均重复3次, 实验数据用GraphPad Prism 7.0进行统计处理, 统计结果用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分离纯化脐血T细胞

用淋巴细胞分离液从脐血中分离获得脐血T细胞, 流式检测发现其中CD3⁺T细胞比例为74%(图1A), CD3⁺CD4⁺T细胞比例为53%, CD3⁺CD8⁺T细胞比例为18%。进一步用anti-CD4/CD8磁珠分选纯化脐血T细胞, 流式检测发现, 纯化后CD3⁺T细胞比例上升至90%, CD3⁺CD4⁺T细胞占54.02%, CD3⁺CD8⁺T细胞占30.01%(图1B)。后续实验所用的脐血T细胞纯度达到90%以上。

2.2 Regnase-1敲除效率测定

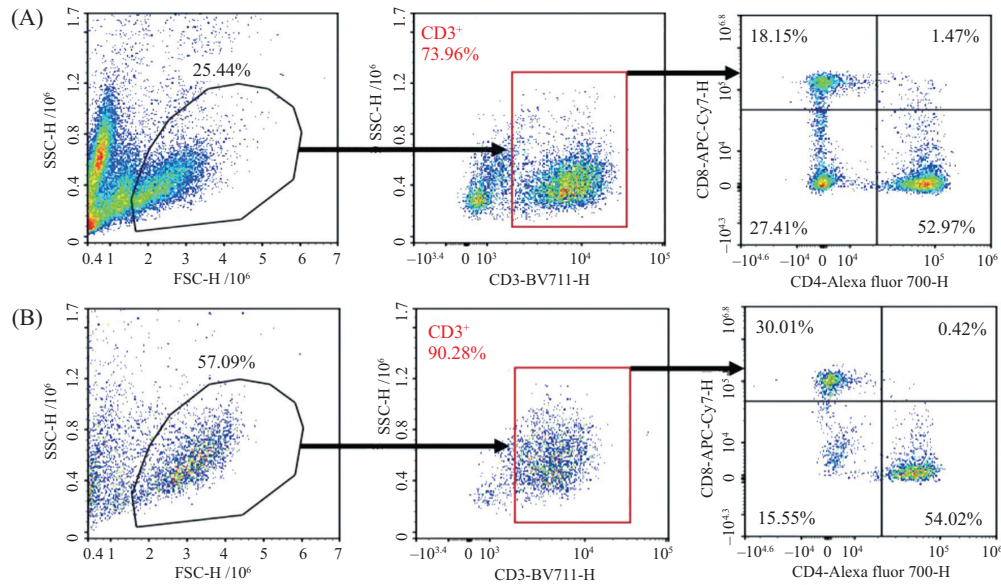
对Regnase-1敲除组细胞与未敲除对照组细胞进行测序, 通过网站(<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>)对序列进行在线TIDE(Tracking of Indels by Decomposition)分析。结果显示, Regnase-1敲除效率为34.1%(图2A), 敲除组与对照组的测序数据差异性分析结果见图2B。

2.3 CD19.CAR阳性细胞比例

空电转组T细胞和电转组Regnase-1⁻T细胞分别感染慢病毒CD19.CAR, 37 °C、5% CO₂孵育96 h后检测CAR分子的表达率, 结果显示: 空电转组的CAR-T细胞纯度为65.67%, 电转组的Regnase-1⁻CAR-T细胞纯度为65.09%(图3), 与以往我们实验证实的结果Regnase-1的敲除不影响CAR的表达^[7]一致。

2.4 Regnase-1敲除对CAR-T细胞特异性杀伤能力的影响

将表达CD19的Nalm-6和Namalwa靶细胞分别与Regnase-1⁻CAR-T、CAR-T、T细胞按不同的效靶比(3:1、1:1和1:3)混合, 孵育24 h后用流式绝对计数法检测各孔剩余的靶细胞, 计算杀伤率。结果显示: 在效靶比为1:3时, 靶细胞Nalm-6杀伤组中Regnase-1⁻CAR-T细胞杀伤率为(79.7±0.9)%, 显著高于CAR-T细胞组[(64.7±5.4)%, $P<0.05$, 图4A]; 在相同效靶比下, 靶细胞Namalwa组中Regnase-1⁻CAR-T细胞的杀伤率(25.0±2.6)%, 也显著高于CAR-T细胞

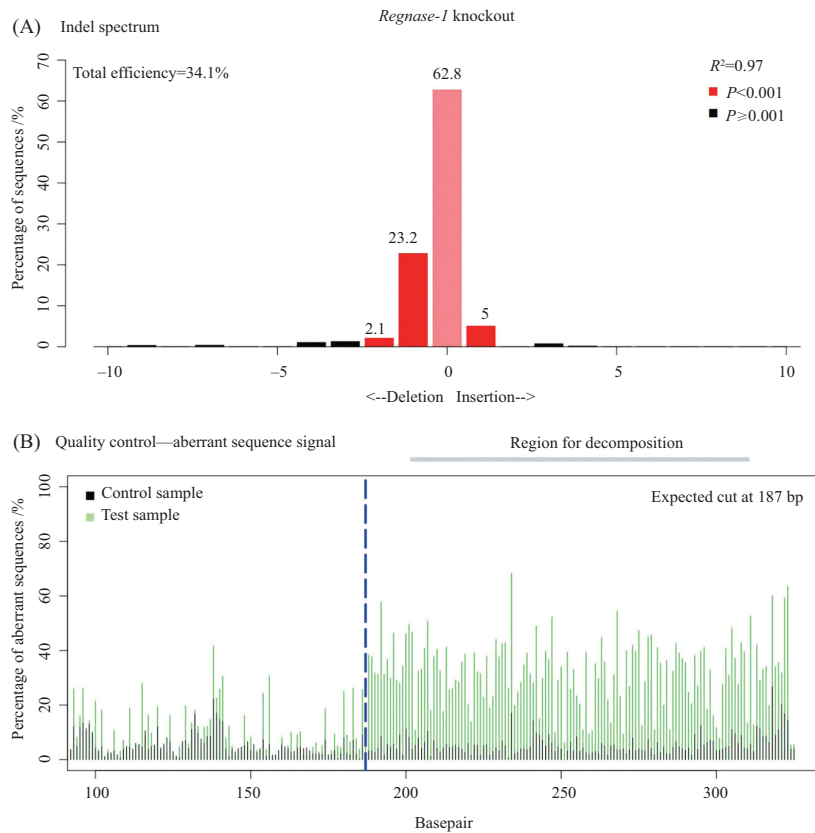


A: 经淋巴细胞分离液分离的脐血T细胞各亚群比例情况。B: 经抗CD4/CD8磁珠分选的人脐血T细胞各亚群比例情况。

A: the proportions of cell subsets in cord blood T cells isolated by lymphocyte separation medium. B: the proportions of cell subsets in cord blood T cells purified by anti-CD4/CD8 beads.

图1 脐血T细胞各亚群比例

Fig.1 The proportions of cell subsets in T cells isolated from cord blood



A: *Regnase-1* 敲除的T细胞与对照T细胞的插入-删除频谱。B: 检测样本*Regnase-1* 敲除T细胞对比对照样本T细胞的非正常序列信号。蓝色虚线指示CRISPR/Cas9切割位点。

A: insertion-deletion spectrum (indel spectrum) of *Regnase-1* knockout T cells and T cells. B: aberrant sequence signals of test sample (*Regnase-1* knockout T cells) and control sample (T cells). The blue dotted line indicates the CRISPR/Cas9 cleavage site.

图2 CRISPR-Cas9基因编辑技术的*Regnase-1*基因敲除效率

Fig.2 The efficacy of *Regnase-1* knockout by CRISPR-Cas9 genome editing

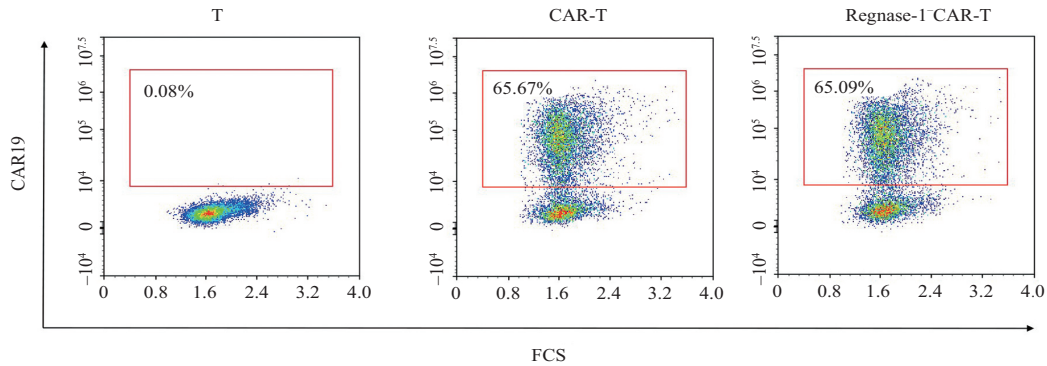
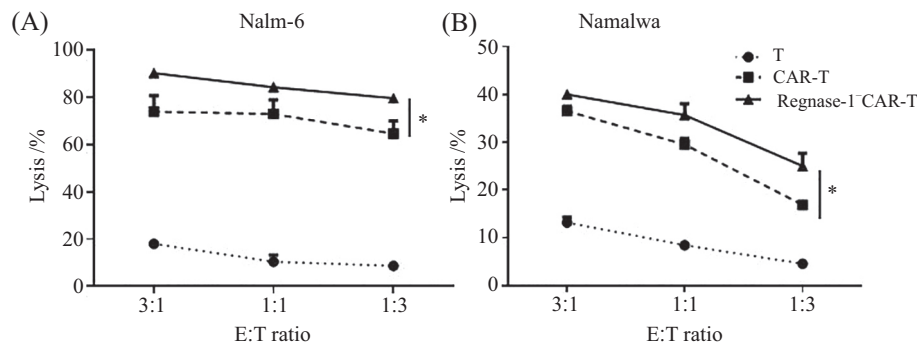


图3 *Regnase-1*敲除组与未敲除组的CAR阳性表达T细胞比例

Fig.3 The percentages of CAR positive T cells in *Regnase-1* knockout group and the unknockout control group



A: *Regnase-1* CAR-T靶向Nalm-6的特异性杀伤。B: *Regnase-1* CAR-T靶向Namalwa的特异性杀伤。n=3, *P>0.05。

A: specific cytotoxicity of *Regnase-1* CAR-T targeting Nalm-6. B: specific cytotoxicity of *Regnase-1* CAR-T targeting Namalwa. n=3, *P>0.05.

图4 *Regnase-1* CAR-T细胞的特异性细胞毒作用

Fig.4 Specific cytotoxicity of *Regnase-1* CAR-T cells

[(16.9±1.0)%, $P < 0.05$, 图4B]。两种靶细胞的数据结果一致,证实敲除 *Regnase-1*能增强脐血来源的CAR-T细胞杀伤能力,即所获得的 *Regnase-1* CAR-T细胞为增强型CAR-T细胞。

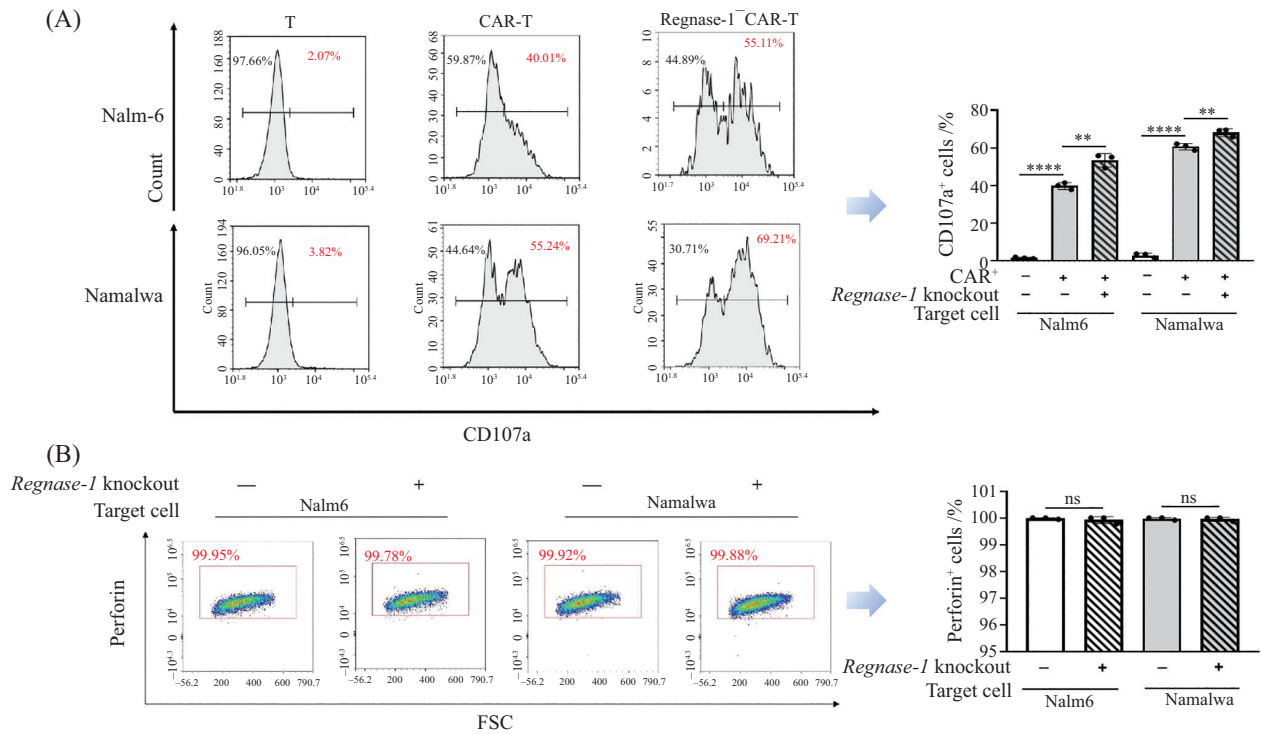
2.5 *Regnase-1*敲除对CAR-T细胞表达CD107a和穿孔素的影响

当CAR-T细胞接触靶细胞并被刺激活化后,CAR-T细胞的CD107a分子会被转运到细胞膜表面,且其会释放大量穿孔素杀伤靶细胞。因此,CAR-T细胞表面若出现CD107a,则表明该细胞正处于脱颗粒状态。CD107a阳性细胞比例高低可间接反映细胞的杀伤能力。利用1:3效靶比的T细胞特异性杀伤模型,检测表达CD107a和穿孔素的T细胞比例。结果显示,将未经*CD19.CAR*基因修饰的T细胞与CD19阳性表达的靶细胞混合后,T细胞不活化,也不表达CD107a(图5A)。将经过*CD19.CAR*基因修饰的T细胞与CD19阳性表达的靶细胞混合后,*Regnase-1*敲除组与未敲除组的CAR-T细胞几乎都能100%表达穿

孔素,两组数据无统计学差异($P > 0.05$,图5B),但是CD107a阳性CAR-T细胞比例在*Regnase-1*敲除组与未敲除组之间存在差异(图5A)。当靶细胞为Nalm6时,*Regnase-1* CAR-T组的CD107a阳性细胞比例显著高于CAR-T未敲除组[(53.4±3.6)% vs (39.8±1.8)%, $P = 0.004$ 1,图5A];当靶细胞为Namalwa时,敲除组的CD107a阳性细胞比例也显著高于CAR-T组[(68.2±2.1)% vs (60.6±1.7)%, $P = 0.008$ 4,图5A]。两者显示出一致结果,表明当遭遇靶细胞刺激时,*Regnase-1* CAR-T比CAR-T可产生更多脱颗粒状态的细胞,提示*Regnase-1*敲除可提升CAR-T细胞对靶细胞的杀伤能力。本实验结论与特异性杀伤实验(图4)结论一致,充分证实*Regnase-1* CAR-T细胞具有更强的特异性杀伤能力。

2.6 *Regnase-1*敲除对CAR-T细胞分泌细胞因子的影响

利用流式CBA法检测T细胞特异性杀伤模型中各组的多种细胞因子浓度水平,结果(表1)发现:无论



A: *Regnase-1* 敲除对CAR-T细胞表达CD107a的影响。B: *Regnase-1* 敲除对CAR-T细胞表达穿孔素的影响。n=3, ^{ns}P>0.05, **P<0.005, ****P<0.000 1。
A: effect of *Regnase-1* knockout on CD107a expression in CAR-T cells. B: effect of *Regnase-1* knockout on perforin expression in CAR-T cells. n=3, ^{ns}P>0.05, **P<0.005, ****P<0.000 1.

图5 *Regnase-1* 敲除对CAR-T细胞表达CD107a和穿孔素的影响
Fig.5 Effect of *Regnase-1* knockout on CD107a and perforin expression in CAR-T cells

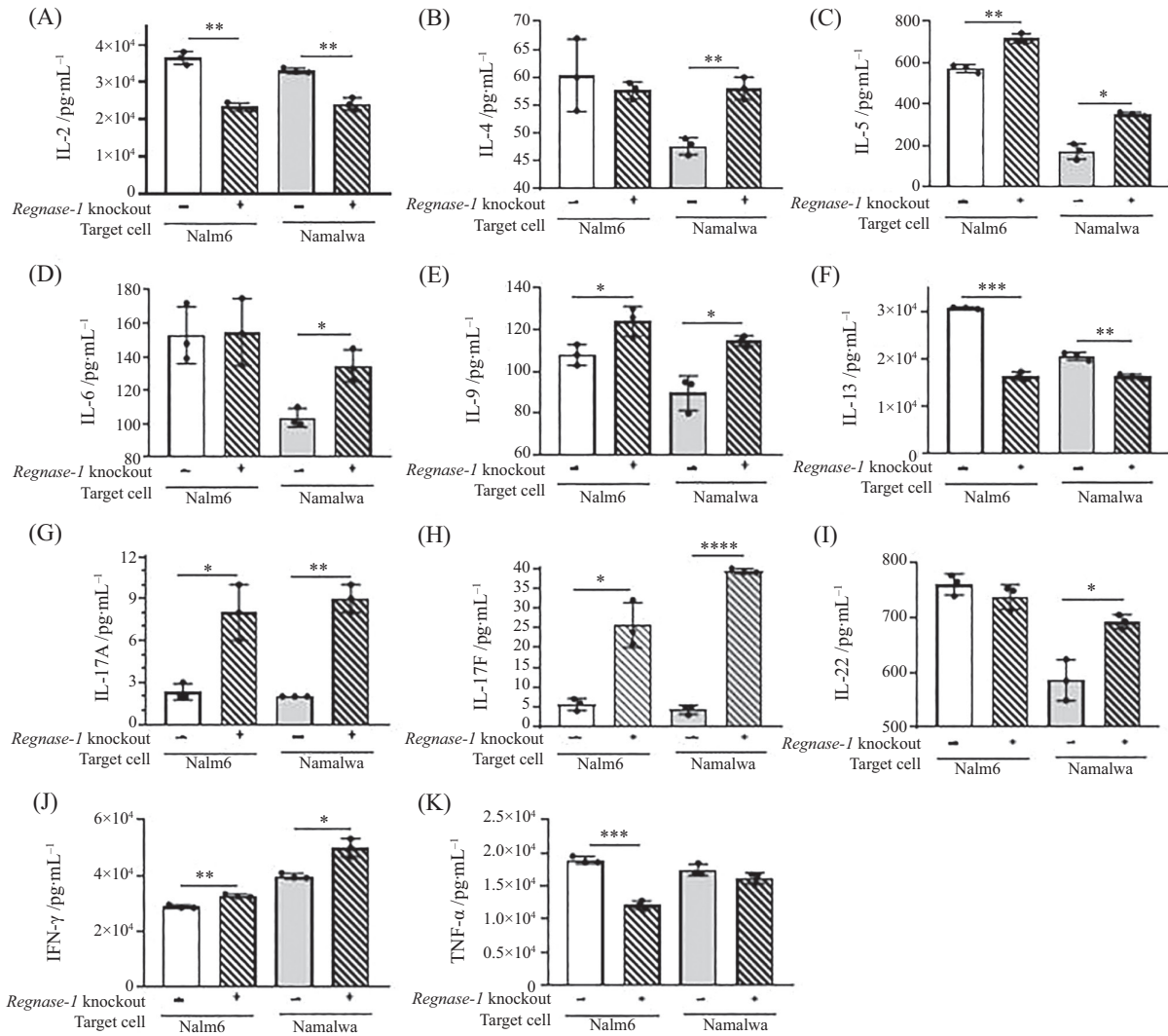
表1 *Regnase-1* 敲除对CAR-T细胞分泌细胞因子水平的影响

Table 1 Effect of *Regnase-1* knockout on cytokine profile secreted by CAR-T cells

细胞因子 Cytokines	Nalm-6			Namalwa		
	Regnase-1 ^{-/-} CAR-T组 /pg·mL ⁻¹ Regnase-1 ^{-/-} CAR-T group /pg·mL ⁻¹	CAR-T组/pg·mL ⁻¹ CAR-T group /pg·mL ⁻¹	P	Regnase-1 ^{-/-} CAR-T组 /pg·mL ⁻¹ Regnase-1 ^{-/-} CAR-T /pg·mL ⁻¹	CAR-T组/pg·mL ⁻¹ CAR-T /pg·mL ⁻¹	P
IL-2	23 377.3±1 015.8	36 487.7±1 744.2	0.001 0	24 178.3±1 694.7	33 119.0±681.6	0.005 6
IL-4	57.7±1.5	60.3±6.5	0.554 7	58.0±2.0	47.7±1.5	0.002 7
IL-5	717.0±22.7	572.3±18.7	0.001 2	351.7±9.1	172.7±37.7	0.011 0
IL-6	154.7±20.0	153.0±17.1	0.918 0	134.7±9.6	103.7±5.5	0.010 0
IL-9	124.0±7.2	108.0±5.0	0.040 2	114.7±2.5	89.7±8.4	0.027 3
IL-13	16 397.3±915.9	30 768.7±167.4	0.001 0	16 329.0±455.9	20 634.3±822.5	0.003 6
IL-17A	8.0±2.0	2.3±0.6	0.030 0	9.0±1.0	2.0±0.0	0.007 0
IL-17F	25.7±5.7	5.7±1.5	0.020 0	39.3±0.6	4.3±1.2	<0.000 1
IL-22	738.0±22.6	760.3±19.4	0.265 6	692.3±13.0	586.0±37.5	<0.000 1
IFN-γ	326 792.3±5 314.0	288 321.0±6 017.1	0.001 0	500 420.7±32 471.0	397 762.0±9 513.8	0.020 0
TNF-α	12 109.7±630.4	18 912.7±527.0	0.000 2	16 172.0±826.1	17 444.3±876.5	0.140 0

靶细胞为Nalm6还是Namalwa, *Regnase-1* 敲除均可显著降低CAR-T细胞分泌的IL-2(图6A)和Th2型细胞因子IL-13水平(图6F), 同时显著提高了CAR-T细胞分

泌的促炎因子IL-5(图6C)、IL-9(图6E)、IL-17A(图6G)、IL-17F(图6H)和IFN-γ(图6J)水平。关于各组的IL-4、IL-6和IL-22分泌水平差异, 仅当靶细胞为Na-



A: IL-2; B: IL-4; C: IL-5; D: IL-6; E: IL-9; F: IL-13; G: IL-17A; H: IL-17F; I: IL-22; J: IFN- γ ; K: TNF- α . $n=3$, 数据以均值 \pm 标准差表示, * $P<0.05$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: IL-2; B: IL-4; C: IL-5; D: IL-6; E: IL-9; F: IL-13; G: IL-17A; H: IL-17F; I: IL-22; J: IFN- γ ; K: TNF- α . $n=3$, data are expressed as the $\bar{x}\pm s$, * $P<0.05$, ** $P<0.005$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图6 *Regnase-1*敲除对CAR-T细胞分泌细胞因子的影响

Fig.6 Effect of *Regnase-1* knockout on cytokine secretion by CAR-T

malwa时,敲除组有显著升高(IL-4:图6B;IL-6:图6D;IL-22:图6I);当靶细胞为Nalm6时,Regnase-1⁻CAR-T组与CAR-T组相比无显著性差异($P>0.05$)。关于TNF- α 的分泌水平,仅当靶细胞为Nalm6时Regnase-1⁻CAR-T敲除组相比CAR-T对照组有显著下降(图6K),当靶细胞为Namalwa时,敲除组略有下降趋势,但与对照组相比,TNF- α 浓度差异并不显著(图6K)。总体来看,Regnase-1⁻CAR-T细胞在杀伤靶细胞时,所分泌的细胞因子的促炎作用更强。

2.7 *Regnase-1*敲除对促炎因子阳性的CAR-T细胞比例的影响

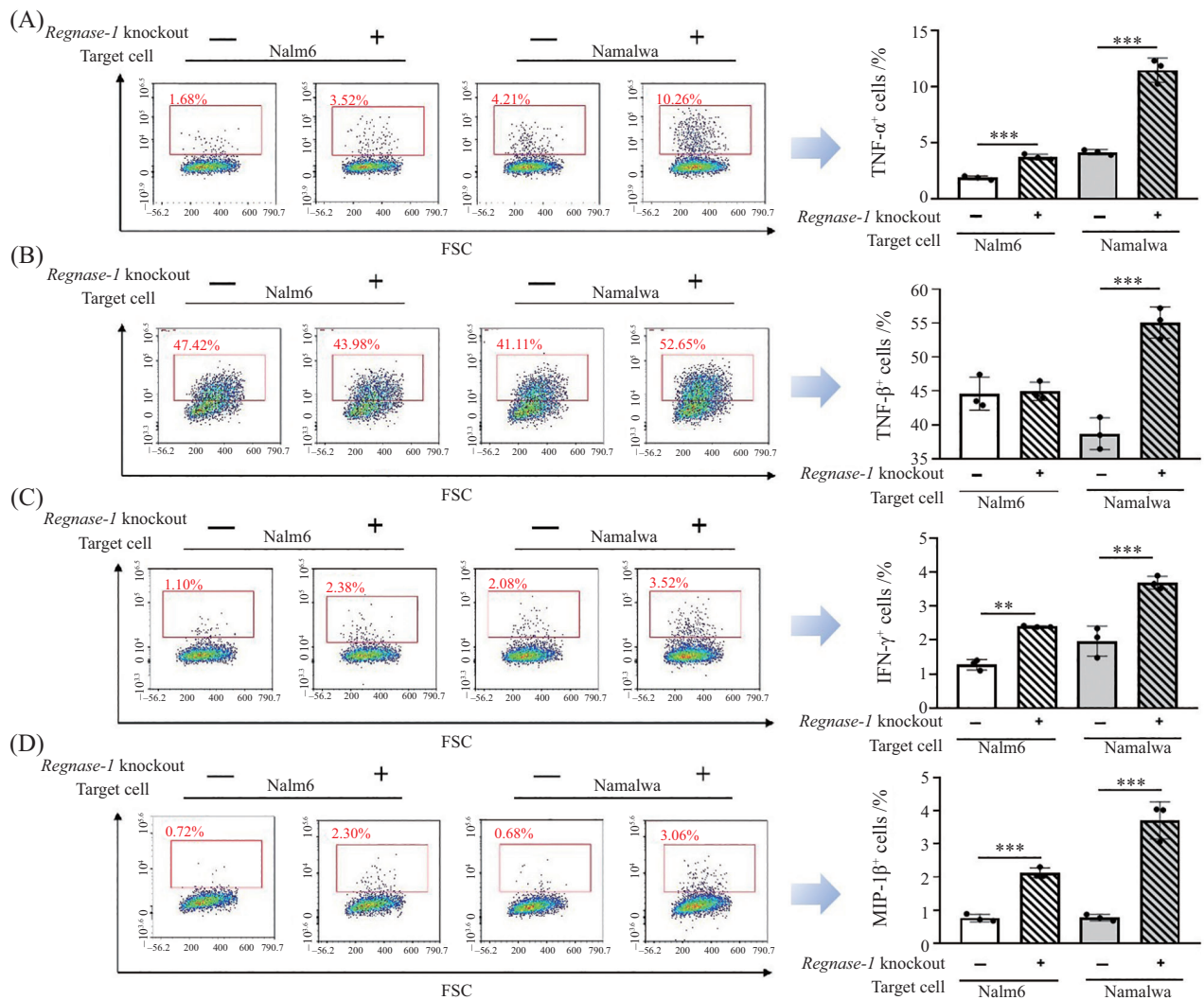
在T细胞特异性杀伤模型中,利用流式细胞术

检测效靶比为1:3时各组效应细胞中表达促炎因子TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ 和MIP-1 β 的阳性细胞比例。结果如表2所示:Regnase-1⁻CAR-T细胞无论受靶细胞Nalm6还是靶细胞Namalwa刺激后,胞内含TNF- α (图7A)、IFN- γ (图7C)和趋化因子MIP-1 β (图7D)的阳性细胞比例均显著高于对照组CAR-T细胞($P<0.005$)。当靶细胞为Namalwa时,Regnase-1⁻敲除组的TNF- β 阳性细胞比例显著比对照组高($P=0.001$,表2,图7B);但当靶细胞为Nalm6时,Regnase-1⁻敲除组的TNF- β 阳性细胞比例与CAR-T对照组无显著性差异($P=0.8502$,表2,图7B)。总体来看,Regnase-1⁻敲除可增加表达促炎因子的阳性细胞比例。

表2 *Regnase-1* 敲除对胞内含促炎因子CAR-T细胞比例的影响

Table 2 Effect of *Regnase-1* knockout on the percentage of CAR-T cells containing pro-inflammatory cytokines

胞内细胞因子 Intracellular cytokines	Nalm-6			Namalwa		
	Regnase-1 ⁻ CAR-T组/ Regnase-1 ⁻ CAR-T group /%	CAR-T组/ CAR-T group /%	<i>P</i>	Regnase-1 ⁻ CAR-T组/ Regnase-1 ⁻ CAR-T group /%	CAR-T组/ CAR-T group /%	<i>P</i>
TNF- α	3.74 \pm 0.25	1.87 \pm 0.18	0.000 4	11.48 \pm 1.08	4.16 \pm 0.23	0.000 3
TNF- β	44.92 \pm 1.35	44.60 \pm 2.46	0.850 2	55.11 \pm 2.31	38.67 \pm 2.35	0.001 0
IFN- γ	2.39 \pm 0.02	1.27 \pm 0.16	0.000 2	3.69 \pm 0.19	1.97 \pm 0.44	0.003 4
MIP-1 β	2.12 \pm 0.15	0.76 \pm 0.11	0.000 2	3.71 \pm 0.56	0.77 \pm 0.10	0.000 9



A: TNF- α ; B: TNF- β ; C: IFN- γ ; D: MIP-1 β . $n=3$, 数据以均值 \pm 标准差表示, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$ 。

A: TNF- α ; B: TNF- β ; C: IFN- γ ; D: MIP-1 β . $n=3$, data are expressed as the $\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$ 。

图7 *Regnase-1* 敲除对胞内含促炎因子的CAR-T细胞比例的影响

Fig.7 Effect of *Regnase-1* knockout on the percentage of CAR-T cells containing pro-inflammatory cytokines

3 讨论

本研究着重考察了敲除*Regnase-1*的脐血CAR-T细胞在发挥特异性杀伤靶细胞作用时所分泌的细胞因子的变化。*Regnase-1*是具有RNA酶活性的

CCCH锌指蛋白家族成员,通过降解某些蛋白的编码mRNA发挥转录后调控作用。研究发现*Regnase-1*参与炎性相关的细胞因子表达^[8-9]。近年来有研究发现利用CRISPR-Cas9技术敲除CD8⁺T细胞中的*Reg-*

*nase-1*可促使其活化后产生效应记忆性T细胞,有利于肿瘤治疗^[10]。随即,有研究团队制备了小鼠CAR-T细胞,并利用严重免疫缺陷NSG小鼠静脉注射自带荧光的小鼠急性B淋巴细胞白血病(B-ALL)肿瘤细胞,证实了敲除*Regnase-1*的小鼠CAR-T细胞的抗肿瘤效应更强更持久^[5]。我们随即在偏干性的人脐血T细胞上证实敲除*Regnase-1*后CAR-T细胞可产生更多的中央记忆型T细胞,可减缓CAR-T细胞耗竭并增强其杀伤能力。虽然*Regnase-1*敲除有助于提高脐血来源CAR-T细胞的临床有效性,但考虑到CAR-T细胞活化后一般会分泌众多细胞因子,这与临床常见毒副作用CRS密切相关^[11],因此本研究着重考察脐血来源*Regnase-1* CAR-T细胞的安全性。在检测*Regnase-1* CAR-T细胞杀伤靶细胞作用的同时,检测胞外细胞因子水平及胞内含促炎因子的阳性细胞比例,发现*Regnase-1*敲除不仅提高了可产生促炎因子的细胞比例,而且显著提升了其促炎细胞因子的分泌水平,这给CAR-T细胞的临床安全性带来了隐患,需要引起关注。

CRS是CAR-T细胞输注后最常见的并发症。CAR-T细胞被激活后,释放IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,可募集并激活巨噬细胞和单核细胞,巨噬细胞释放IL-1、IL-6等细胞因子,随后多种促炎因子在免疫细胞之间形成正反馈循环,引发CRS^[12-13]。CRS的临床症状主要为细胞因子过量释放导致发热、低血压、低氧血症、心动过速、肝功能损害、肾功能损害、心功能损害、凝血功能障碍等。2022年“嵌合抗原受体T细胞治疗成人急性B淋巴细胞白血病中国专家共识”中提及对CRS的分级与处理^[14]。虽然巨噬细胞在CAR-T介导的CRS中扮演了重要角色^[15-16],但启动者CAR-T最早分泌的细胞因子的种类与浓度与CRS的严重程度密切相关。IL-6是CRS治疗中最早被关注的细胞因子之一。目前临床上主要用激素和IL-6受体拮抗剂托珠单抗控制CRS^[14]。由于IL-6可促进活化的巨噬细胞极化^[17],近年有研究团队研制膜表达胞内区缺陷型IL-6受体的CAR-T细胞,此缺陷型IL-6R可中和CAR-T活化后分泌的IL-6^[18]。本研究所用的CAR-T细胞原材料并非来自以上研究所用的成年人外周血T细胞,而是新生儿脐血T细胞。脐血CAR-T细胞被靶细胞激活后的细胞因子释放情况的检测结果显示:IL-2、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 的释放浓度水平均在 10^4 pg/mL以上(图6),IL-4、IL-6、IL-9、IL-17A和IL-17F的分泌

水平相对较低(表1)。敲除*Regnase-1*后,脐血CAR-T释放的IL-6水平在Nalm6刺激组中无显著变化,浓度大约为154.7 pg/mL;在Namalwa刺激组中CAR-T分泌的IL-6水平较低,仅为100 pg/mL,显著高于对照组,但最高浓度145 pg/mL不及Nalm6刺激组平均水平。由此可见,脐血CAR-T细胞激活后主要释放的促炎因子并非IL-6,而是IFN- γ 和TNF- α 。于是,我们没有进一步检测IL-6水平,而是检测了合成IFN- γ 和TNF- α 的细胞比例。结果显示,*Regnase-1*敲除组的IFN- γ 和TNF- α 阳性细胞比例显著高于未敲除组,这与胞外细胞因子浓度水平的检测结果一致。说明敲除*Regnase-1*不仅提高了合成分泌IFN- γ 和TNF- α 的细胞比例,而且提高了胞外IFN- γ 和TNF- α 的浓度水平。

TNF- α 也是CRS中常见的促炎因子之一。有临床研究使用抗TNF- α 单抗药物阿达木单抗缓解CAR-T治疗中的CRS毒性作用^[19]。脐血CAR-T细胞在敲除*Regnase-1*后,TNF- α 分泌水平在Nalm6刺激组中有显著性降低(图6K),在Namalwa刺激组中有降低趋势,但未达到显著性差别,提示*Regnase-1*敲除有助于降低脐血CAR-T分泌的TNF- α 水平。IFN- γ 是2021年研究发现的CAR-T细胞介导髓系细胞活化和诱导内源性免疫应答的关键因子^[20],2022年有报道了一份CAR-T治疗急性B细胞白血病时发生4级CRS伴嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)的病例,临床使用2018年FDA批准的IFN- γ 阻断抗体依帕伐单抗注射液后,CRS及HLH得到了有效控制^[21]。本研究发现脐血CAR-T细胞在敲除*Regnase-1*后,IFN- γ 分泌水平在Nalm6和Namalwa刺激组中均显著增高(图6J)。进一步检测被靶细胞激活的脐血CAR-T细胞中IFN- γ 和TNF- α 阳性细胞的比例,发现*Regnase-1*敲除显著提高了分泌IFN- γ 和TNF- α 的阳性细胞比例(图7A和图7C)。胞外促炎因子浓度的检测结果与分泌促炎因子的细胞比例结果一致,表明*Regnase-1*敲除不仅提升了分泌IFN- γ 和TNF- α 的细胞比例,而且提高了分泌的IFN- γ 和TNF- α 浓度水平。

仅在伯基特淋巴瘤来源的Namalwa靶细胞刺激效应细胞时,敲除组的IL-4和IL-22水平与对照组相比有显著升高。除此之外,促炎因子IL-5(图6C)、IL-9(图6E)、IL-17A(图6G)、IL-17F(图6H)水平在两种B细胞来源的靶细胞(急性淋巴细胞白血病来源的Nalm6和伯基特淋巴瘤来源的Namalwa)刺激下均显

著升高,提示 *Regnase-1* 敲除可显著提高 CAR-T 细胞分泌的 IL-5、IL-9 和 IL-17 水平。IL-13 可降低巨噬细胞活性,抑制巨噬细胞产生促炎因子和趋化因子,促进巨噬细胞极化为 M2^[22],但 *Regnase-1* 敲除的 CAR-T 细胞分泌促炎因子 IL-13 的水平在两种靶细胞的刺激下反而均显著性下降(图 6F),提示 *Regnase-1* 敲除可能降低了 CAR-T 细胞的促炎因子分泌水平。总之, *Regnase-1* 敲除虽然可增强脐血 CAR-T 细胞的杀伤能力,但同时也提高了其激活后分泌促炎因子的能力,增加了发生 CRS 的潜在风险,降低了 CAR-T 细胞药物的临床安全性。

目前研究者利用基因修饰和编辑技术不断对 CAR-T 细胞进行改造迭代,增强其抗肿瘤能力,以提升其临床有效性,但在改造时我们也应同时关注到激活的 CAR-T 细胞分泌细胞因子谱的变化,这关系到临床安全性。因此, CAR-T 细胞药物的研发应兼顾其有效性与安全性。

参考文献 (References)

- [1] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-5.
- [2] SINGH A K, MCGUIRK J P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3): e168-e78.
- [3] GHAFARI S, KHALILI N, REZAEI N. CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 269.
- [4] WEI J, LONG L, ZHENG W, et al. Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy [J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 471-6.
- [5] ZHENG W, WEI J, ZEBLEY C C, et al. Regnase-1 suppresses TCF-1⁺ precursor exhausted T-cell formation to limit CAR-T-cell responses against ALL [J]. *Blood*, 2021, 138(2): 122-35.
- [6] 蒙露, 赵日, 周丹, 等. 通用型 CD19 CAR-T 的体外构建及初步功能鉴定 [J]. *中国细胞生物学学报* (MENG L, ZHAO R, ZHOU D, et al. *In Vitro* construction and preliminary functional identification of universal CD19 CAR-T [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(2): 311-8.
- [7] 刘佳慧, 冉凤萍, 蒙露, 等. *Regnase-1* 敲除对脐血来源 CAR-T 细胞的生物学功能影响 [J]. *中国细胞生物学学报* (LIU J H, RAN F P, MENG L, et al. The effect of *Regnase-1* knockout on the function of cord blood derived CAR-T cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2023, 45(10): 1473-81.
- [8] MATSUSHITA K, TAKEUCHI O, STANDLEY D M, et al. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1185-90.
- [9] MINO T, MURAKAWA Y, FUKAO A, et al. Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms [J]. *Cell*, 161(5): 1058-73.
- [10] WEI J, LONG L, ZHENG W, et al. Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy [J]. *Nature*, 576(7787): 471-6.
- [11] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management [J]. *Blood Rev*, 34: 45-55.
- [12] 傅盈双, 李双星, 李路路, 等. CAR-T 治疗诱导细胞因子释放综合征的机制及临床前安全性评价 [J]. *药物评价研究* (FU Y S, LI S X, LI L L, et al. Mechanism and preclinical safety evaluation of cytokines release syndrome induced by CAR-T cell therapy [J]. *Drug Evaluation Research*), 2023(3): 469-77.
- [13] GUO H, QIAN L, CUI J. Focused evaluation of the roles of macrophages in chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy associated cytokine release syndrome [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 19(3): 333-42.
- [14] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组, 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会造血干细胞移植与细胞治疗学组. 嵌合抗原受体 T 细胞治疗成人急性 B 淋巴细胞白血病中国专家共识 (2022 年版) [J]. *中华血液学杂志* (Leukemia & Lymphoma Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association; Group of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, Hematological Oncology Committee of China Anti-Cancer Association. Consensus of chinese experts on chimeric antigen receptor T cell therapy for adult acute B-cell lymphoblastic leukemia (2022) [J]. *Chinese Journal of Hematology*), 2022, 43(2): 89-95.
- [15] GIAVRIDIS T, VAN DER STEGEN S J C, EYQUEM J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 731-8.
- [16] HAO Z, LI R, MENG L, et al. Macrophage, the potential key mediator in CAR-T related CRS [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9: 15.
- [17] FERNANDO M R, REYES J L, IANNUZZI J, et al. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94188.
- [18] TAN A H J, VINANICA N, CAMPANA D. Chimeric antigen receptor-T cells with cytokine neutralizing capacity [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(7): 1419-31.
- [19] CHEN Y, LI R, SHANG S, et al. Therapeutic potential of TNF- α and IL1 β blockade for CRS/ICANS in CAR-T therapy via ameliorating endothelial activation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 623610.
- [20] ALIZADEH D, WONG R A, GHOLAMIN S, et al. IFN γ is critical for CAR T cell-mediated myeloid activation and induction of endogenous immunity [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(9): 2248-65.
- [21] MCNERNEY K O, DINOFIA A M, TEACHEY D T, et al. Potential role of IFN γ inhibition in refractory cytokine release syndrome associated with CAR T-cell therapy [J]. *Blood Cancer Discov*, 2022, 3(2): 90-4.
- [22] PROTO J D, DORAN A C, GUSAROVA G, et al. Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution [J]. *Immunity*, 2018, 49(4): 666-77.e6.