

## 研究论文

## 过表达c-Jun对脐血CD19.CAR-T细胞功能影响初探

张瑶<sup>1,2</sup> 李华<sup>2</sup> 周丹<sup>3</sup> 蒙露<sup>3</sup> 刘琴<sup>3</sup> 张涛<sup>1,2\*</sup>(<sup>1</sup>西南交通大学医学院, 成都 610031; <sup>2</sup>西部战区总医院, 成都 610083; <sup>3</sup>成都医学院, 成都 610500)

**摘要** 抗原嵌合受体T细胞(chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T)疗法已显示出对血液系统恶性肿瘤的显著疗效, 但肿瘤复发问题仍未解决, 其中CAR-T细胞在体内扩增能力与活性难以维持是原因之一。前期该课题组已成功制备并获得靶向CD19的脐血CAR-T细胞。为了探讨过表达c-Jun能否有效提高脐血CAR-T细胞(umbilical cord blood (UCB)-derived T lymphocytes, CAR-CBT)扩增能力与持久性, 该研究将外源性c-Jun基因片段与CD19.CAR基因同时导入CBT细胞完成基因修饰, 制备c-Jun转录因子过表达的CAR-CBT细胞, 研究c-Jun过表达对脐血CAR-CBT细胞活性的影响。

**关键词** c-Jun; 脐带血; CAR-T细胞治疗; 疗效持久性

## The Effect of c-Jun Overexpression on the Function of Cord Blood Derived CD19.CAR-T cells

ZHANG Yao<sup>1,2</sup>, LI Hua<sup>2</sup>, ZHOU Dan<sup>3</sup>, MENG Lu<sup>3</sup>, LIU Qin<sup>3</sup>, ZHANG Tao<sup>1,2\*</sup>(<sup>1</sup>Medical College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; <sup>2</sup>Western Theater General Hospital, Chengdu 610083, China; <sup>3</sup>Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

**Abstract** Antigen chimeric receptor-T cell therapy has shown significant curative effect on hematological malignancies, but the problem of tumor recurrence has not been solved. One of the reasons is that the expansion and activity of CAR-T cells *in vivo* are difficult to maintain. In the early stage, research group has successfully prepared CD19 targeted CAR-T cells derived from cord blood (CD19.CAR-CBT cells). To explore whether overexpression of c-Jun can effectively improve the expansion and durability of CAR-CBT cells, the study will exogenous c-Jun gene fragments and CD19.CAR gene into CBT cells to complete genetic modification. Prepare CD19.CAR-CBT cells overexpressing c-Jun transcription factor to study the effect of c-Jun overexpression on the activity of cord blood CAR-CBT cells.

**Keywords** c-Jun; umbilical cord blood (UCB); CAR-T cell therapy; persistence of curative effect

CAR-T细胞治疗是一种高效的过继细胞疗法<sup>[1-2]</sup>。近年来, 关于抗原嵌合受体T细胞(chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T)疗法在治疗白血病<sup>[3-4]</sup>和淋巴瘤等B细胞恶性血液肿瘤<sup>[5]</sup>中备受瞩目。CAR-T细胞治疗是通过将外源性人工设计的CAR基因导入T细

胞, 获得表达CAR膜型蛋白的T细胞, 经体外规模化扩增后回输给患者的治疗方法<sup>[6]</sup>。CAR-T细胞通过CAR以HLA非依赖方式特异性识别并杀伤肿瘤细胞, 其治疗被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一。目前包括诺华公司CTL019在内的多个CAR-T产品被

收稿日期: 2021-05-01

接受日期: 2021-09-06

四川省科技厅应用基础研究项目(批准号: 19YYJC0242)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 17380598365, E-mail: zhangtao269@126.com

Received: May 1, 2021

Accepted: September 6, 2021

This work was supported by the Basic Research Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (Grant No.19YYJC0242)

\*Corresponding author. Tel: +86-17380598365, E-mail: zhangtao269@126.com

FDA批准上市。多项研究均证明了CAR-T细胞治疗在ALL和淋巴瘤患者中的显著疗效<sup>[7-8]</sup>。

但晚期肿瘤患者经过多轮化疗治疗后,体内的自身T细胞经过化疗损伤,往往数量低下,因此我们无法采集到足够数量的T细胞用于CAR-T细胞制备;或者T免疫细胞活性差,扩增能力弱,患者失去CAR-T治疗机会。异体CAR-T细胞是未来的解决之道。研究报告中,异体CAR-T细胞的T细胞来源大致有三类:健康成人外周血、诱导的多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)以及新生儿脐血(umbilical cord blood, UCB)。本课题组前期采用新生儿脐带血来源的T细胞,已成功制备脐血CAR-T细胞<sup>[9-10]</sup>。脐带血细胞具有更高的抗癌活性,幼稚T细胞经抗原刺激活化后可在肿瘤微环境中迅速经历效应记忆T细胞的分化<sup>[11]</sup>,这为UCB衍生的免疫疗法的应用提供了理论依据,亦正成为一种受人关注的易于获得的丰富免疫细胞来源,为无法获得自体CAR-T治疗的患者提供了新的治疗机会与希望。

在此基础上,为进一步提高CAR-T细胞的持久活性,LYNN等<sup>[12]</sup>于2019年12月在*Nature*上发表了一篇有关克服外周血来源的CAR-T细胞在过继回输中耗竭问题的文章。研究发现,转录因子c-Jun(典型AP-1 c-Fos-c-Jun异二聚体的一部分)可抑制健康成年人外周血T细胞的耗竭,但是否能抑制脐血T细胞活性,尚无文献报道。基于此,本研究利用基因工程技术让脐血CAR-T细胞(umbilical cord blood T lymphocytes, CBT)过表达c-Jun,拟考察过表达c-Jun可否增强UCB来源的CAR-T细胞(chimeric antigen receptor-CBT cells, CAR-CBT)增殖和杀伤作用,为今后CAR-CBT细胞治疗提供新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 新生儿脐带血T细胞由成都医学院第一附属医院健康产妇捐赠,收集和使用脐带血已通过成都医学院第一附属医院医学伦理委员会审批,批准号为2018CYFYHEC-047-02。Jurkat细胞和293FT细胞(人胚肾细胞)购自美国ATCC;含荧光素酶的Namalwa(人Burkitt's淋巴瘤细胞)购自中国科学院细胞库;质粒pLP1、pLP2、pLP-VSVG、pHAGE-SFFV-EGFP购自美国Thermo Fisher

Scientific公司;pHAGE-SFFV-CAR19重组质粒为成都医学院科研实验中心邹强教授赠送;c-Jun基因片段由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂 Prime STAR Max DNA多聚酶、限制性内切酶和in-fusion无缝连接酶均购自TaKaRa公司;Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Transfection Reagent购自Thermo Fisher Scientific公司;CD4-Microbeads与CD8-Microbeads购自MACS公司;细胞因子白细胞介素-7(interleukin-7, IL-7)、白细胞介素-15(interleukin-15, IL-15)购自Cellgenix公司;流式荧光抗体,如Brilliant Violet 711<sup>™</sup> anti-human CD3 antibody、PE/Cy7 anti-human CD4 antibody、APC anti-human CD8 antibody、Brilliant Violet 421<sup>™</sup> anti-human CD45RA antibody、PE/Cy7 anti-human CD62L antibody购自Biolegend公司;PE-Cy<sup>™</sup> 5 Anti-Human CD107a购自BD Biosciences公司;PE-Labeled Human CD19 Protein, Fc Tag购自Acrobiosystems公司;c-Jun (60A8) Rabbit mAb (Alexa Fluor 647 Conjugate)购自CST公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pHAGE-SFFV-Jun重组质粒的构建 按NCBI Nucleotide数据库c-Jun核酸序列合成c-Jun DNA片段;设计c-Jun序列上下游引物,上游引物(Fragment.FOR): 5'-GTC GAC GCC ACC ATG ACT GCA AAG ATG GAA ACG ACC-3',下游引物(Fragment.REV): 5'-TAG GGA TCC GCG GCC GCT CAA AAT GTT TGC AAC TGC TGC GT-3'。Nco I和Not I双酶切pHAGE-SFFV-CAR19,以获得线性化载体pHAGE-SFFV。随即与将PCR扩增后的c-Jun基因序列做in-fusion无缝克隆连接;最终获得重组质粒pHAGE-SFFV-Jun,通过DNA电泳和测序进行质粒鉴定。

1.2.2 病毒制备、包装与浓缩 QIAGEN无内毒素质粒提取试剂盒纯化质粒pLP1、pLP2、pLP-VSVG、pHAGE-SFFV-EGFP、pHAGE-SFFV-CAR19和pHAGE-SFFV-Jun。为确保病毒的高滴度水平,使用Opti-MEM培养基稀释质粒DNA,制备质粒DNA预混液,然后添加P3000试剂,混匀;再加入到使用Opti-MEM培养基稀释混匀的Lipofectamine 3000试剂,室温孵育10~15 min。将质粒DNA-脂质复合物转染293FT细胞完成慢病毒制备包装;在转染48 h后,采用流式细胞仪测定转染效率。滴度检测超滤管超滤浓缩病毒获取高滴度病毒浓缩液。

1.2.3 靶细胞培养 靶细胞为实验室自制保存的

*HLA*<sup>-</sup>Namalwa细胞。该细胞是在人Burkitt's淋巴瘤细胞株基础上,利用CRISPR-Cas9基因编辑技术,敲除人类白细胞抗原I(human leukocyte antigen-I, *HLA-I*)、人类白细胞抗原II(human leukocyte antigen-II, *HLA-II*)类基因而获得的。细胞以 $4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL的密度培养。

**1.2.4 T细胞的分离与纯化** 采用Ficoll密度梯度离心法分离健康捐赠者脐带血单个核细胞。将T细胞在含10 ng/mL IL-7、10 ng/mL IL-15、10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、2 mmol/L L-谷氨酰胺和50 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的X-vivo15培养基中培养。

**1.2.5 T细胞的活化** Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28抗体包被磁珠刺激活化T细胞24 h,经CD4-Microbeads、CD8-Microbeads分选后,按转导复数(multiplicity of infection, MOI)20分别加入pHAGE-SFFV-CAR19、pHAGE-SFFV-Jun慢病毒,转染96 h后流式细胞术检测CAR-CBT细胞CD19.CAR与c-Jun的阳性表达率。

**1.2.6 流式细胞术c-Jun胞内染色** 取 $1 \times 10^6$ 个细胞,用针对CD3、CD4、CD8、CD19.CAR分子的荧光标记单抗4 °C染色30 min。染色缓冲液洗涤细胞2次后,加入250  $\mu$ L BD细胞固定/通透溶液,4 °C条件下,固定通透20 min。加入c-Jun抗体进行胞内染色细胞洗涤后流式细胞分析仪检测分析。

**1.2.7 数据处理及统计学分析** 每组实验在相同条件下重复3次,所得数据采用GraphPad Prism 7.0及SPSS 20.0进行统计分析处理,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析One-Way ANOVA和t检验进行组间比较; \* $P < 0.05$ 表示存在统计学差异; \*\* $P < 0.01$ 表示统计学差异显著; \*\*\* $P < 0.001$ 表示统计学差异极显著;“ns”代表差异无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建重组慢病毒载体质粒pHAGE-SFFV-Jun及其序列鉴定

慢病毒线性质粒载体pHAGE-SFFV段由慢病毒载体pHAGE-SFFV-CAR19经Nco I和Not I双酶切后,DNA电泳,回收6 256 bp大片段而获得(图1B的泳道2)。c-Jun目的基因片段通过设计的引物,利用DNA合成的c-Jun片段为模板,PCR扩增获得(图1B的泳道8)。遂将回收的两个DNA片段pHAGE-SFFV和c-Jun利用infusion无缝连接技术,克隆重组为新载

体pHAGE-SFFV-Jun。重组后的慢病毒载体质粒转化至大肠杆菌表达,经质粒提取、酶切、电泳、琼脂糖凝胶成像初步鉴定比对目的基因片段;条带大小与预期相符(图1C)。DNA测序结果表明,所克隆的c-Jun目的基因片段与NCBI中GenBank中录入的序列完全一致(图1D),提示c-Jun基因片段成功插入pHAGE-SFFV线性质粒载体。

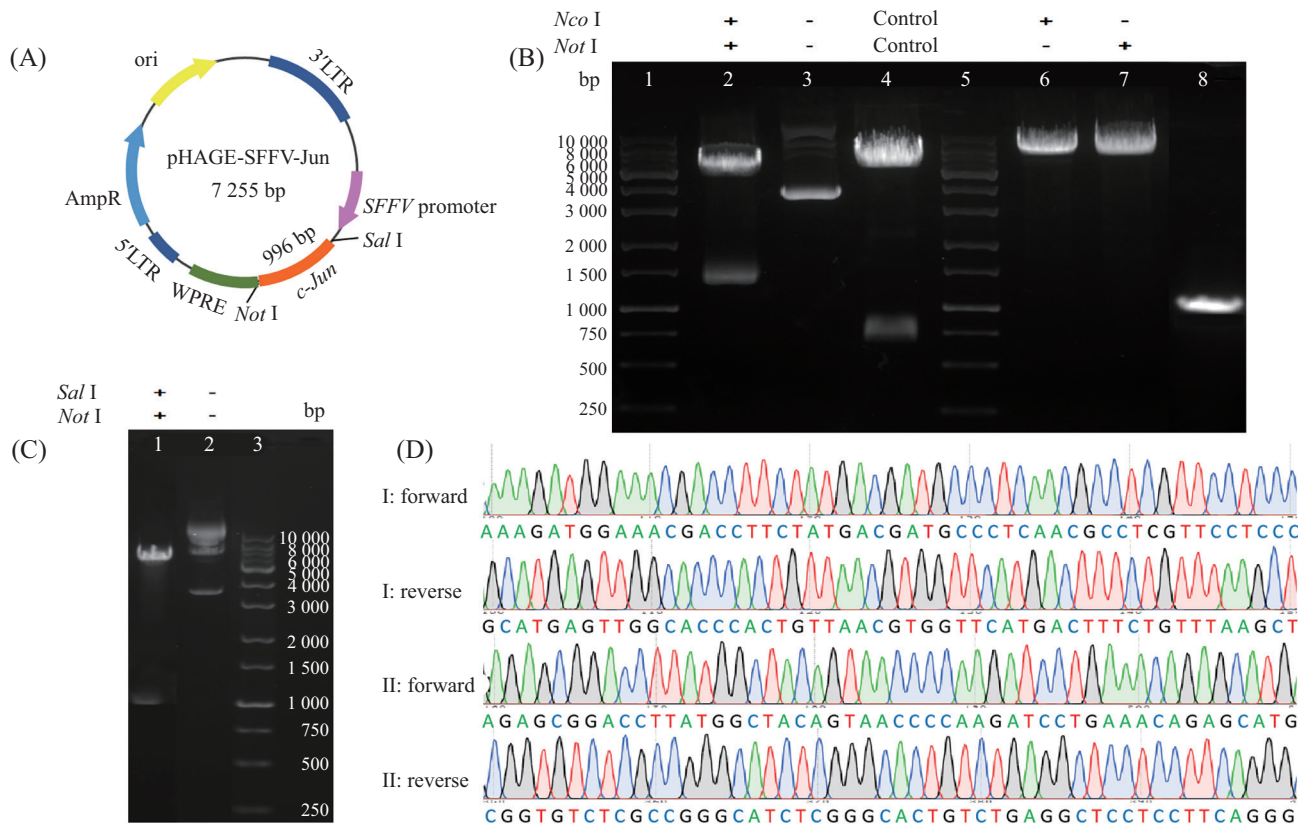
### 2.2 过表达c-Jun的CAR-CBT细胞制备促进CD19.CAR<sup>+</sup>稳定持久的表达

将构建成功的pHAGE-SFFV-Jun与现有的pHAGE-SFFV-CAR19分别与pLP1、pLP2、pLP-VSVG共转导293FT细胞,包装重组慢病毒。慢病毒转导健康人脐带血T细胞后培养至7日,经流式细胞仪分别对双转导组c-Jun.CAR-CBT细胞和单转导组CAR-CBT细胞进行CAR分子与c-Jun转录因子表达检测。结果显示:两组CAR<sup>+</sup>T细胞占总T细胞比例均为60%以上。单转导组中各亚群CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞中CAR表达率分别为77.7%、83.9%、62.9%;双转导组中各亚群T细胞的CAR表达率分别为63.6%、72.4%、41.4%(图2A)。JUN-CAR-CBT组的T细胞c-Jun表达率均达75%以上;各亚群CD3<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞的c-Jun表达率分别为85.1%、88.3%、75.7%(图2B)。同时表达CAR分子与c-Jun蛋白的双阳性T细胞占总T细胞比例高达60%(图2C)。这些结果显示我们通过慢病毒成功地将目的c-Jun基因与CAR基因转导至T细胞,并获得了较高转导率。培养15日后检测各组CAR分子表达情况,双转导组的CAR<sup>+</sup>T细胞比例仍维持较高比例(65.7%)(图2D)。图3结果表明随着时间推移,CD19.CAR的表达比例逐渐下降,而成功转导c-Jun基因的T细胞有助于CAR基因稳定且持久的表达。

### 2.3 过表达c-Jun可促进脐血来源的CAR-T细胞增殖能力

为观察过表达c-Jun对T细胞增殖情况的影响,我们比较了c-Jun.CAR-CBT组与CAR-CBT组增殖情况差异。结果显示:过表达c-Jun的CAR-CBT细胞组中CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T细胞数量显著高于CAR-CBT空白对照组( $P < 0.01$ )。正常脐血T细胞组(CBT)中CD4<sup>+</sup>T细胞培养到第11日后不再继续增殖,CD8<sup>+</sup>T细胞于第13日不再继续增殖(图3A和图3B)。过表达c-Jun的CAR-CBT细胞中CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值显著高于正常CAR-





A: 重组慢病毒载体质粒pHAGE-SFFV-Jun的结构示意图。B: *Nco* I和*Not* I双酶切慢病毒载体pHAGE-SFFV-CAR19后的DNA电泳图(pHAGE-SFFV-EGFP为本室保存的含*Nco* I和*Not* I酶切位点质粒,在此作为双酶切阳性对照,为泳道4。1,5为100 bp DNA ladder作Marker。2为双酶切组,6,7分别为单酶切组,3为未酶切组。8泳道为PCR扩增后996 bp的*c-Jun*目的基因片段。C: *Sal* I和*Not* I双酶切慢病毒载体pHAGE-SFFV-Jun后的DNA电泳图。D: 慢病毒载体质粒pHAGE-SFFV-Jun测序鉴定结果。

A: schematic diagram of the recombinant lentiviral vector plasmid pHAGE-SFFV-Jun. B: the DNA electrophoresis image of the lentiviral vector pHAGE-SFFV-CAR19 after double digestion with *Nco* I and *Not* I (pHAGE-SFFV-EGFP is the plasmid containing the *Nco* I and *Not* I restriction sites stored in this room, which is used here as double enzyme digestion positive control), is 4 lane. 1, 5 is 100 bp DNA ladder as Marker. 2 is the double digestion group, 6 and 7 are the single digestion group, and 3 is the non-restriction digestion group. Lane 8 is the 996 bp *c-Jun* target gene fragment after PCR amplification. C: DNA electrophoresis of lentivirus vector pHAGE-SFFV-Jun digested by *Sal* I and *Not* I. D: screenshot of the sequencing and identification results of the lentiviral vector plasmid pHAGE-SFFV-Jun.

图1 重组慢病毒载体质粒pHAGE-SFFV-Jun的构建

Fig.1 Construction of recombinant lentiviral vector plasmid pHAGE-SFFV-Jun

CBT组和CBT组。该实验结果证实过表达c-Jun可促进CAR-CBT细胞的增殖,且对CD4<sup>+</sup> T的增殖效果强于CD8<sup>+</sup> T细胞(图3C)。

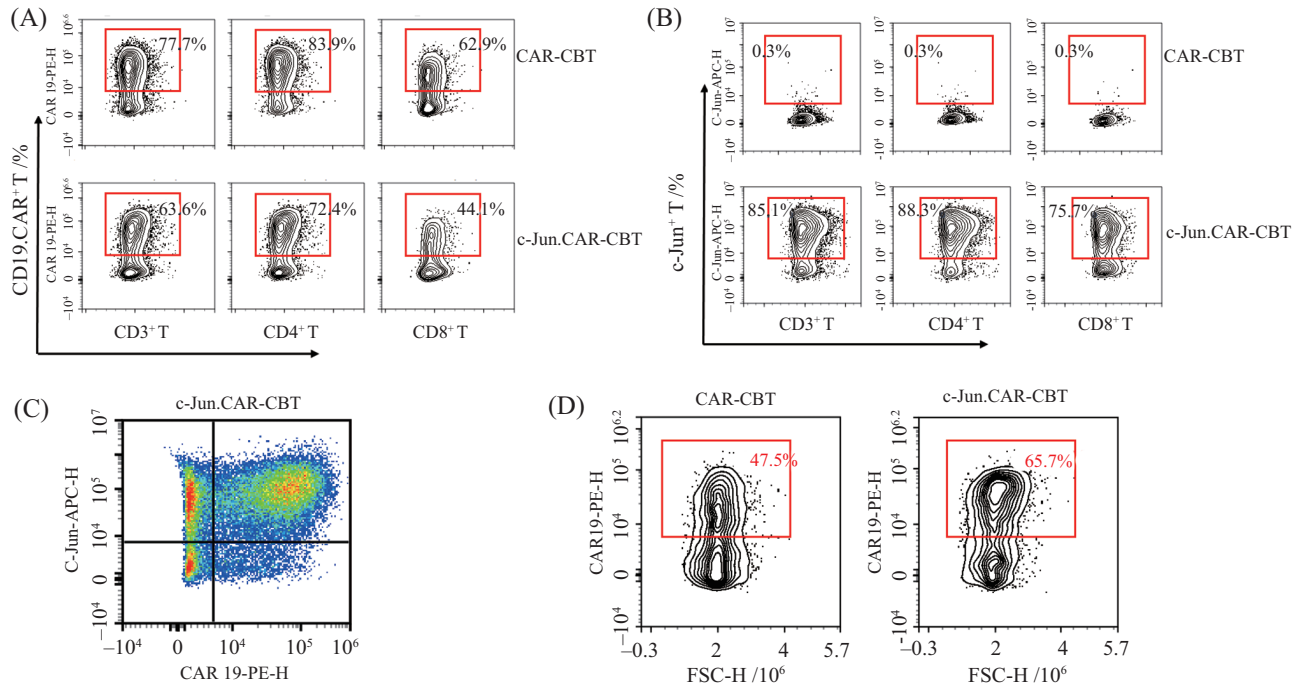
#### 2.4 过表达c-Jun促进脐血来源的CAR-T细胞杀伤靶细胞能力

含荧光素的靶细胞分别与过表达c-Jun的CAR-CBT细胞与正常CAR-CBT细胞按不同效靶比混合孵育。流式检测结果(图4)显示:在相同效靶比情况下,混合孵育4 h后时,过表达c-Jun的CAR-CBT细胞组CD107a表达均高于正常CAR-CBT组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。24 h检测靶细胞死亡比例,过表达c-Jun的CAR-CBT细胞杀伤率分别为83%、89%、

85%;正常CAR-CBT细胞杀伤率分别为67%、82%、80%,两者相差不显著。

#### 2.5 过表达c-Jun促进CAR-CBT细胞分泌炎症因子及效应T细胞形成

过表达c-Jun的CAR-CBT细胞与正常CAR-CBT细胞分别与CD19<sup>+</sup> Namalwa-DKO靶细胞和无靶点的Nalm-6-DKO细胞共培养24 h,流式检测这两组细胞杀伤靶细胞后产生的效应细胞比例情况。如图5A所示,c-Jun.CAR-CBT组产生Tem细胞比例高于CAR-CBT组,提示过表达c-Jun组T细胞具有更高的效应功能,效应细胞分化增强。IFN- $\gamma$ 、IL-2是T细胞活化后分泌的细胞因子。ELISA检测结果显示:

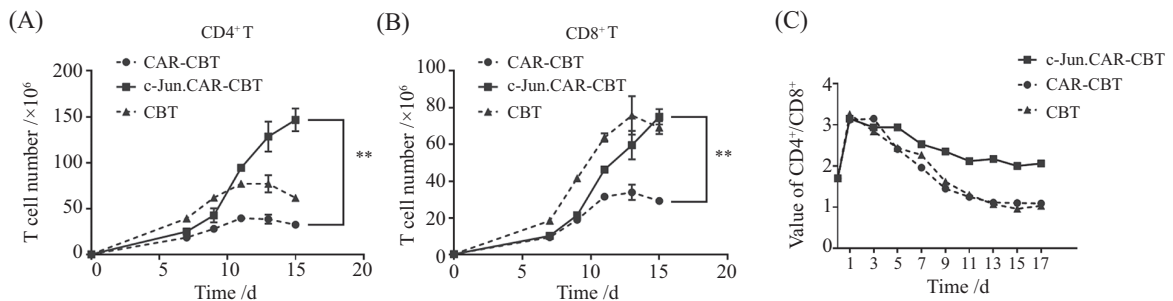


A: 转导7天后CD19.CAR<sup>+</sup> T细胞在各组CD3<sup>+</sup> T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞中的比例。B: c-Jun分子在各组CD3<sup>+</sup> T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞中的比例。C: 双转导组中双阳性细胞CD19.CAR<sup>+</sup> c-Jun<sup>+</sup> T细胞占总T细胞的比例。D: 转导第15天后, 单转导组与双转导组中CD19.CAR<sup>+</sup> T细胞占总T细胞的比例。

A: transduction for 7 days, single-transduction CD19.CAR control group CAR-CBT and double-transduction CD19.CAR and c-Jun experimental group c-Jun.CAR-CBT in each subgroup CD3<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> the proportion of CD19.CAR<sup>+</sup> cells. B: transduced c-Jun experimental group c-Jun.CAR-CBT and non-transduced blank control CAR-CBT subgroups of CD3<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells and c-Jun<sup>+</sup> cells proportion. C: the ratio of double-positive CD19.CAR<sup>+</sup> c-Jun<sup>+</sup> T cells to the total T cells in the double transduction group. D: the ratio of CD19.CAR<sup>+</sup> T cells to the total T cells in the single transduction group and the double transduction group 15 days after transduction.

图2 CAR与c-Jun阳性细胞在CAR-CBT组和c-Jun.CAR-CBT组中的比例

Fig.2 The proportion of CAR and c-Jun positive cells in CAR-CBT group and c-Jun.CAR-CBT group



A: 流式检测连续培养15天CD4<sup>+</sup> T增殖情况; B: 连续培养15天CD8<sup>+</sup> T增殖情况。C: 随时间变化, c-Jun.CAR-CBT组、CAR-CBT组与未转导病毒T细胞组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞的值; 显示过表达c-Jun对T细胞亚群CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T细胞的增殖影响。\*\* $P < 0.01$ 。

A: flow cytometric detection of CD4<sup>+</sup> T proliferation in continuous culture for 15 days; B: CD8<sup>+</sup> T proliferation in continuous culture for 15 days. C: over time, the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells between c-Jun.CAR-CBT group, CAR-CBT group and non-transduced viral T cell group; showing that over-expression of c-Jun has effect on T cell subset the proliferation of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells. \*\* $P < 0.01$ .

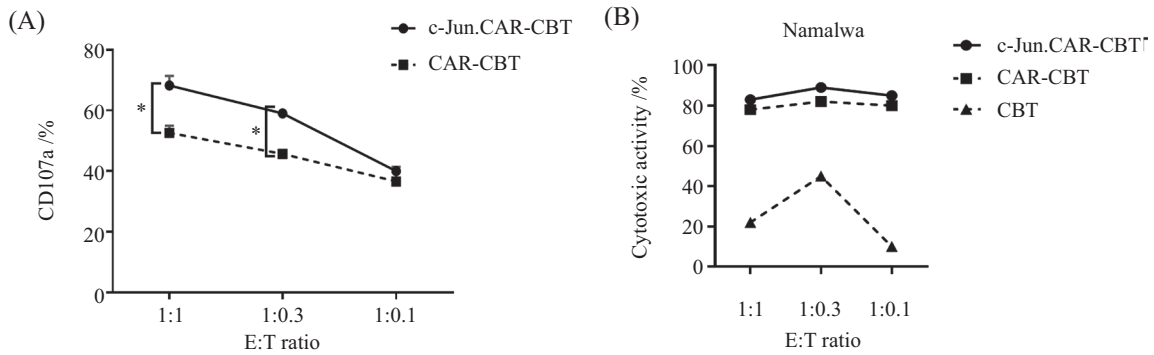
图3 过表达c-Jun对脐带血来源的CAR-T细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effect of overexpression of c-Jun on the proliferation of CAR-CBT cells

过表达组CAR-CBT细胞分泌IFN- $\gamma$ 的量在不同靶比条件下均显著高于正常CAR-CBT细胞( $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ )。各组细胞的IL-2分泌量无统计学差异(图5B)。

### 3 讨论

本研究构建了过表达转录因子c-Jun的脐血CAR-T细胞, 并考察了过表达c-Jun对CAR-CBT细胞生物学活性的影响。研究发现: 转导c-Jun基因后的

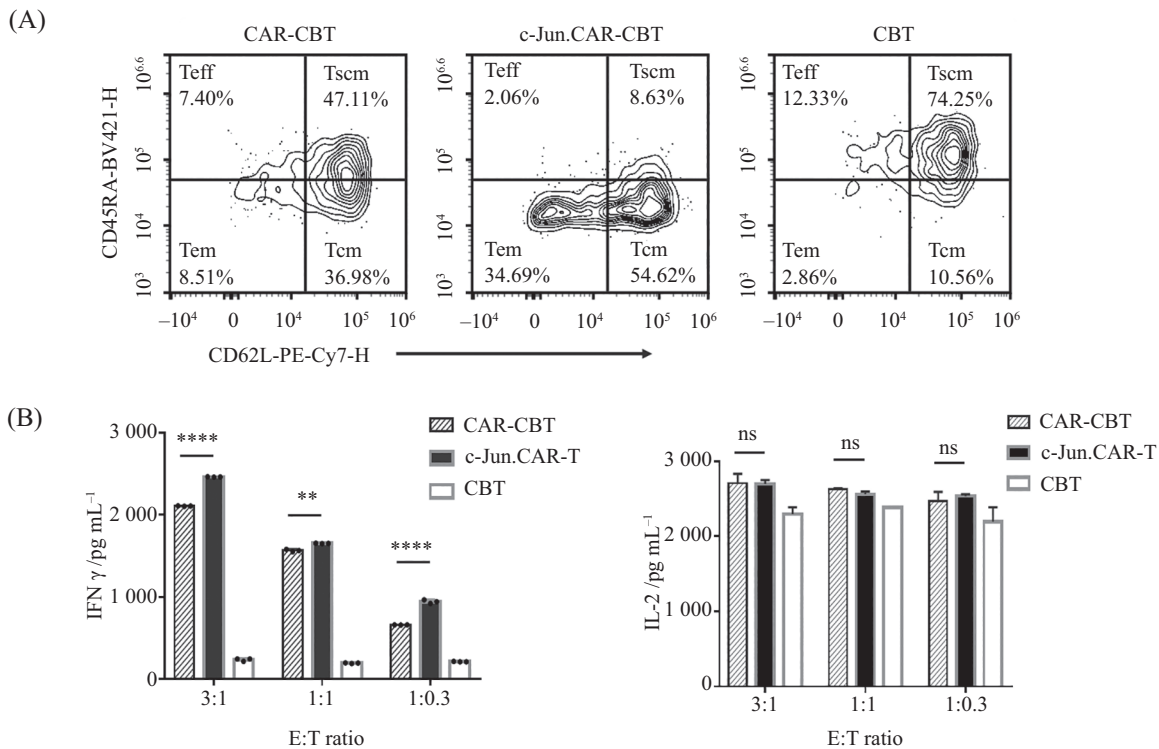


A: 各组效应细胞与靶细胞孵育4 h时的CD107a表达情况; B: 各组CAR-CBT细胞与靶细胞共孵育24 h后的靶细胞死亡率。\**P*<0.05。

A: expression of CD107a on Jun-CAR-CBT cells in co-culture with target cells with different effector-target ratios; B: cytotoxicity of Jun-CAR-CBT cells with different effector-target ratio. \**P*<0.05.

图4 c-Jun.CAR-CBT细胞对靶细胞CD19<sup>+</sup>Namalwa-DKO特异性杀伤效应

Fig.4 Cytotoxicity of c-Jun.CAR-CBT cells on target cells CD19<sup>+</sup>Namalwa-DKO



A: CAR-CBT、c-Jun.CAR-CBT及CBT各组TSCM表达情况。B: c-Jun.CAR-CBT与CAR-CBT组炎症因子分泌情况; c-Jun.CAR-CBT组分泌的IFN-γ显著高于CAR-CBT组, IL-2的分泌未见明显差异。\*\**P*<0.01, \*\*\*\**P*<0.000 1, ns表示没有显著性差异。

A: TSCM expression in each group of CD19.CAR-CBT, c-Jun.CAR-CBT and CBT. B: the secretion of inflammatory factors in c-Jun.CAR-CBT and CD19.CAR-CBT groups; IFN-γ secreted by c-Jun.CAR-CBT group was significantly higher than that in CD19.CAR-CBT group. There was no significant difference in IL-2 secretion. \*\**P*<0.01, \*\*\*\**P*<0.000 1, ns means no significant difference.

图5 过表达c-Jun促进CAR-CBT细胞分泌细胞因子及效应T细胞形成

Fig.5 Overexpression of c-Jun promotes CAR-CBT cell secretion cytokines and effect T cell formation

CAR-CBT细胞, 过表达c-Jun, 可增强脐带血来源的CD19.CAR-T细胞长期增殖能力, 特别是CD4<sup>+</sup> T细胞; 且具有更高效应功能, 分泌更多IFN-γ等细胞因子, 增强控制靶细胞生长的能力, 更好地发挥抗肿瘤作用。

MACKALL研究团队<sup>[12]</sup>发现, 过表达c-Jun的外周血CAR-T细胞显著抵抗T细胞耗竭; 过表达的T细胞增殖能力显著提高、T细胞终末分化减弱、IFN-γ和IL-2表达水平显著增加、抗肿瘤效能得到提升。无论是长期扩增还是可调节信号诱导的T细胞衰竭,



c-Jun的过表达都可有效缓解其耗竭进程。脐血与外周血不同,脐血富含造血干细胞。脐血T细胞的细胞特性与外周血T细胞不同。过表达c-Jun对脐血CAR-CBT细胞的影响是否与外周血CAR-T细胞的作用一致,尚未文献报道。本研究在脐血CAR-CBT细胞中过表达c-Jun,发现过表达c-Jun的CAR-CBT细胞表达CD19.CAR分子更稳定持久,细胞增殖也明显提高,且CD4<sup>+</sup> T细胞增殖明显强于CD8<sup>+</sup> T细胞; T细胞分化阶段终末期,过表达c-Jun使T细胞具有更高效应性增强CAR-CBT细胞抗肿瘤作用。我们的研究结果显示,在脐血CAR-CBT细胞中过表达c-Jun更有利于CD4<sup>+</sup> T细胞的增殖,且具有更高的效靶比杀伤活性。每个脐带血单位的有核细胞数量有限,在脐血的CAR-CBT细胞中过表达c-Jun可有效减少脐血用量的需求。

c-Jun转录因子与JunB和JunD同属Jun家族成员,是转录激活因子蛋白1(transcription activation factor protein 1, AP-1)复合体中研究最广泛的蛋白,在细胞生长和分化中发挥作用<sup>[13]</sup>。根据细胞类型和环境的不同,c-Jun调节基因发挥各种生理功能包括细胞增殖、分化、凋亡<sup>[14]</sup>与存活,以及肿瘤的发生发展<sup>[15]</sup>。经过近三十年的研究,我们对c-Jun的研究仍然处于一个发展阶段,其中一些特性尚未被发现。最早发现c-Jun是一种碱性亮氨酸拉链(BZIP)转录因子,可作为同源或异源二聚体与DNA结合,调节基因转录。随后发现,细胞外信号可以诱导c-Jun的翻译后修饰,导致转录活性和靶基因表达的改变<sup>[16]</sup>。c-Jun的转录活性可通过SAPK/JNK对Ser63和Ser73的磷酸化进行调控<sup>[17-18]</sup>,在T细胞发育过程中发挥作用<sup>[19]</sup>。T细胞受体(T cell receptor, TCR)激活可促进许多信号转导级联反应,通过调控细胞因子产物、细胞生存、增殖和分化来最终决定细胞命运<sup>[20]</sup>。TCR激活的早期事件是由淋巴细胞蛋白质酪氨酸激酶(Lck),对TCR/CD3复合体胞质一侧的免疫受体酪氨酸依赖性活化基序(ITAMs)的磷酸化作用<sup>[21]</sup>。CD45受体的酪氨酸磷酸酶可调节Lck和其他Src家族酪氨酸激酶的磷酸化和激活。Zeta链相关蛋白激酶-70(Zap-70)受到招募,聚集至TCR/CD3复合体处并被激活,从而启动对下游接头蛋白或骨架蛋白的招募和磷酸化<sup>[22]</sup>。SLP-76被Zap-70磷酸化后促进SLP-76招募Vav(一种鸟苷酸交换因子)、接头蛋白NCK和GADS,以及一种可诱导T细胞激酶(Itk),后激活JNK通路促进转录因子

Jun活性。该通路通过转录因子Jun促进IL-2的基因转录。

综上,过表达c-Jun可促进脐血来源的CAR-T细胞持久稳定表达CAR分子,并增强其增殖能力和靶细胞杀伤能力,以此发挥更为有效的抗肿瘤作用。

### 参考文献 (References)

- [1] SINGH A K, MCGUIRK J P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30823-X.
- [2] 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.
- [3] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-18.
- [4] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor—modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-33.
- [5] NAKAZAWA Y. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies [J]. *Rinsho Ketsueki*, 2019, 60(9): 1351-7.
- [6] SERMER D, BRENTJENS R. CAR T-cell therapy: full speed ahead [J]. *Hematol Oncol*, 2019, doi: 10.1002/hon.2591.
- [7] ABRAMSON J S. Anti-CD19 CAR T-cell therapy for B-cell Non-hodgkin lymphoma [J]. *Transfus Med Rev*, 2020, 34(1): 29-33.
- [8] YING Z, HUANG X F, XIANG X, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 947-53.
- [9] 蒙露, 赵日, 邹强, 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 Q, 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.
- [10] 郑武燕, 冉文萍, 李华, 等. 环黄芪醇联合IL-7和IL-15对人脐带血T细胞体外扩增的影响[J]. *免疫学杂志(ZHENG W Y, RAN W P, LI H, et al. Effect of cyclohydragiol combination IL-7 and IL-15 on cord blood T cells in vitro amplification [J]. Immunology Magazine)*, 2019, 35(11): 965-71.
- [11] HIWARKAR P, QASIM W, RICCIARDELLI I, et al. Cord blood T cells mediate enhanced antitumor effects compared with adult peripheral blood T cells [J]. *Blood*, 2015, 126(26): 2882-91.
- [12] LYNN R C, WEBER E W, SOTILLO E, et al. c-Jun over-expression in CAR T cells induces exhaustion resistance [J]. *Nature*, 2019, 576(7786): 293-300.
- [13] BOHMANN D, BOS T J, ADMON A, et al. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1 [J]. *Science*, 1987, 238(4832): 1386-92.
- [14] LEPPA S, BOHMANN D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis [J]. *Oncogene*, 1999, 18(45): 6158-62.
- [15] WEISS C, BOHMANN D. Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(2): 111-3.

- [16] MENG Q, XIA Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network [J]. *Protein Cell*, 2011, 2(11): 889-98.
- [17] DAVIS R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-52.
- [18] BANNISTER A J, OEHLER T, WILHELM D, et al. Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro [J]. *Oncogene*, 1995, 11(12): 2509-14.
- [19] RIERA-SANS L, BEHRENS A. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell development by the activator protein 1 transcription factor c-Jun [J]. *J Immunol*, 2007, 178(9): 5690-700.
- [20] BURBACH B J, MEDEIROS R B, MUELLER K L, et al. T-cell receptor signaling to integrins [J]. *Immunol Rev*, 2007, doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00527.x.
- [21] CHEN L, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-42.
- [22] CRONIN S J, PENNINGER J M. From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity [J]. *Immunol Rev*, 2007, doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00570.