

靶向 Trop-2 CAR-T 细胞的制备及其体外对卵巢癌细胞杀伤作用的研究

徐亚如^{1,2}, 周 莹³, 唐 奇², 刘振云⁴, 黄晓辰^{1,2}, 杨婷婷^{1,2}, 张慧林⁵, 赵 薇^{1,2}, 蒯兴旺^{1,2}, 仇镇宁², 朱 进^{2,6*}, 冯振卿^{1,2*}

(¹南京医科大学病理学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学国家卫计委抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学第二附属医院耳鼻喉科, 江苏 南京 210011; ⁴安徽未名细胞治疗有限公司, 安徽 合肥 238000; ⁵南京医科大学附属南京妇幼保健院妇产科, 江苏 南京 210004; ⁶南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的: 制备靶向人滋养层细胞表面抗原 2(human trophoblast cell surface antigen 2, Trop-2)的嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T), 观察 Trop-2 CAR-T 细胞在体外对卵巢癌细胞增殖的影响。方法: 运用分子克隆及基因重组技术构建 Trop-2 CAR; 采用 Western blot 检测 Trop-2 CAR 在 293T 细胞中的表达; CCK-8 法检测 Trop-2 CAR-T 细胞对卵巢癌细胞增殖的影响; ELISA 检测细胞因子分泌的变化。结果: 酶切鉴定及测序分析结果表明, Trop-2 CAR 各基因片段连接正确; Western blot 检测结果显示, 该质粒能够在 293T 细胞中有效表达; CCK-8 结果显示, 制备的 Trop-2 CAR-T 细胞在体外能明显抑制表达 Trop-2 的卵巢癌细胞的增殖($P < 0.05$); ELISA 检测结果表明 Trop-2 CAR-T 细胞与表达 Trop-2 的卵巢癌细胞共培养后, 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白介素(interleukin-2, IL-2)细胞因子分泌增加($P < 0.01$)。结论: 该研究成功制备了 Trop-2 CAR-T 细胞, 可有效抑制 Trop-2 表达阳性的卵巢癌细胞的增殖。

[关键词] 嵌合抗原受体; Trop-2; 卵巢癌

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-653-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170601

Construction of Trop-2-targeted chimeric antigen receptor-modified T cells and their effects on the proliferation of ovarian cancer cells *in vitro*

Xu Yaru^{1,2}, Zhou Ying³, Tang Qi², Liu Zhengyun⁴, Huang Xiaochen^{1,2}, Yang Tingting^{1,2}, Zhang Huilin⁵, Zhao Wei^{1,2}, Kuai Xingwang^{1,2}, Qiu Zhenning², Zhu Jin^{2,6*}, Feng Zhenqing^{1,2*}

(¹Department of Pathology, NJMU, Nanjing 211166; ²Key Laboratory of Antibody Technology, National Health and Family Planning Commission, NJMU, Nanjing 211166; ³Department of Otolaryngology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ⁴Sinobioway Cell Therapy Limited Liability Company, Hefei 238000; ⁵Obstetrics and Gynecology Department, Nanjing Maternity and Child Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004; ⁶Medical Research Institute of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To produce Trop-2-targeted chimeric antigen receptor T cells(CAR-T cells) of human trophoblast cell surface antigen 2(Trop-2) and detect their effects on the proliferation of ovarian cancer cells *in vitro*. **Methods:** Molecular cloning and gene recombination technology were introduced to construct Trop-2 CAR vector. The expression of Trop-2 CAR on 293T cells was tested by Western blot. The effect of Trop-2 CAR-T cells on the proliferation of ovarian cancer cells was evaluated by CCK-8 assay. The secreting changes of cytokines by Trop-2 CAR-T cells were detected by ELISA. **Results:** The results of enzyme digestion and sequencing demonstrated that the Trop-2 CAR vector was constructed correctly. The results of Western blot showed that Trop-2 CAR was expressed on 293T cells. The results of CCK-8 verified that Trop-2 CAR-T cells prominently inhibited the growth of ovarian cancer cells with Trop-2 antigen expression ($P < 0.05$), moreover, higher levels of IFN- γ and IL-2 were detected in supernatant by ELISA ($P < 0.01$). **Conclusion:** Trop-2 CAR-T cells were prepared successfully and could inhibit the proliferation of ovarian cancer cells expressing Trop-2 antigen.

[Key words] chimeric antigen receptor; Trop-2; ovarian cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(06):653-658]

[基金项目] 国家自然科学基金(81602119);江苏省科学技术厅重点研发专项基金(BE2016799)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhujing_1968@njmu.edu.cn; fengzhenqing@njmu.edu.com

卵巢癌致死率居女性生殖系统肿瘤之首,其早期缺乏明显症状,60%~80%患者诊断时已进展至晚期阶段,5年生存率仅20%~30%,严重危害女性生命健康^[1-2]。目前,治疗卵巢癌主要采用手术治疗为主辅以化疗的联合疗法,但是许多患者对化疗药物耐受,极大影响了临床治疗效果^[3-4]。因此迫切需要寻求新的卵巢癌治疗方法。近年来快速发展起来的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)免疫疗法,具有使T细胞获得特异性识别、进而杀伤肿瘤细胞的作用,被广泛应用于肿瘤靶向性细胞治疗的研究^[5]。目前,CAR-T技术已在血液系统肿瘤的治疗领域取得突破性进展^[6-7],但治疗实体肿瘤的报道较少,而国内外尚未见治疗人卵巢癌的研究报道。

人滋养层细胞表面抗原2(human trophoblast cell surface antigen 2, Trop-2),是一种单次跨膜的表面糖蛋白,具有促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的作用^[8-9]。研究表明Trop-2蛋白在人正常组织中不表达或低表达,在多种肿瘤中高表达,如卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌等,可作为多种恶性肿瘤靶向治疗的靶点^[10-11]。本研究拟以实验室前期筛选出的具有较高亲和力的抗Trop-2 Fab为基础,制备全人源靶向Trop-2的CAR-T细胞,观察其对卵巢癌细胞的杀伤作用,并初步探索其作用机制,为卵巢癌的靶向性细胞治疗提供技术储备。

1 材料和方法

1.1 材料

E.coli DH5- α (Clontech公司,日本),人卵巢癌细胞株 OVCAR-3、HO8910、SKOV3、A2780,人乳腺癌细胞 MCF-7,人皮肤黑色素瘤细胞 A375 和 293T 细胞,均由本实验室保存。经基因改造后的逆转录病毒质粒、CD19 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)质粒、包装质粒 RD114、peqpam3 由本实验室保存。

限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Bam*H I (NEB 公司,美国),In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech 公司,美国),Anti-Human Trop-2 (EGP-1)PE (eBioscience 公司,美国),鼠抗人 CD3 ζ 抗体 (Santa Cruz 公司,美国),293fectin[™] Transfection Reagent (Invitrogen 公司,美国),Opti-MEM 培养基 (Gibco 公司,美国),100 kDa 超滤离心管 (Millipore 公司,美国),淋巴细胞分离液 (Stem Cell 公司,美国),抗人 CD28 抗体、抗人 CD3 抗体、人干扰素 $-\gamma$ (interferon- γ , IFN- γ)

Ready-SET-Go ELISA kit、人白介素 -2(interleukin-2, IL-2) Ready-SET-Go ELISA kit (eBioscience 公司,美国),IL-2 (PeproTech 公司,美国),Cell Counting Kit-8 (Dojindo 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 Trop-2 CAR 逆转录病毒表达质粒的构建

本实验室已从噬菌体抗体库中筛选出具有较高亲和力的抗 Trop-2 Fab 抗体^[15],根据 In-Fusion PCR 原理设计引物扩增其中 V_{κ} 和 V_H 的序列,并于两者间添加辅助连接肽(Gly4Ser)₃,采用 overlap PCR 的方法完成 CAR 结构中 scFv 的拼接,命名为 SP- V_{κ} -(Gly4Ser)₃- V_H 。使用 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切逆转录病毒质粒,该逆转录病毒质粒经基因工程改造,包含人 IgG CH2CH3 以及胞内信号转导区 CD28、CD137、CD3 ζ 的基因序列。运用 In-Fusion PCR 方法将抗 Trop-2 scFv 片段与线性化的逆转录病毒质粒重组,并将该重组质粒转化 *E.coli* DH5- α ,挑取阳性克隆并测序分析,结果正确的质粒命名为 Trop-2 CAR 逆转录病毒质粒。

1.2.2 Trop-2 CAR 逆转录病毒的包装及表达鉴定

使用转染试剂 293fectin[™] Transfection Reagent 将 Trop-2 CAR、CD19 CAR 逆转录病毒质粒及包装质粒 peqpam3、RD114 共转染 293T 细胞,于转染后 48 h 和 72 h 收集病毒上清液。病毒上清经超滤浓缩和无菌处理,获得相应的 CAR 病毒,分装于 -80°C 冻存备用。

收集上述转染 Trop-2 CAR、CD19 CAR 逆转录病毒质粒的 293T 细胞及未做转染的 293T 细胞,经 RIPA 裂解液处理提取总蛋白,使用 Western blot 检测 CAR 结构中 CD3 ζ 分子的表达。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用牛奶封闭 2 h,鼠抗人 CD3 ζ 抗体 (1:1 000)孵育 2 h,HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000)孵育 1 h,加入 ECL 显色液后成像仪上曝光。

1.2.3 Trop-2 CAR-T 细胞的制备

抽取 10 mL 志愿者外周血,用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,将单个核细胞以 2×10^6 个/孔加入到预包被抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的 24 孔培养板中培养,次日补加 IL-2 (200 U/mL)。使用 RetroNectin 预处理非组织培养板,加入 Trop-2 CAR 病毒温育 1 h,再加入培养至第 3 天的 T 细胞。2 d 后更换含有 IL-2 (1:10 000)的完全培养基,扩大培养至细胞总数达 2×10^8 个,同样方法制备 CD19 CAR-T 细胞。

1.2.4 Trop-2 CAR-T 细胞对卵巢癌细胞增殖的影响

准备效应细胞 (E): 收集 Trop-2 CAR-T 细胞、

CD19 CAR-T 细胞和激活的 T 细胞,用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基调整细胞为 1×10^6 个/mL;靶细胞(T)准备:收获对数生长期的卵巢癌 HO8910 和 A2780 细胞株,用培养基分别调整细胞浓度为 5×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 个/mL。将效应细胞和靶细胞各取 100 μ L 混匀铺板,放入培养箱孵育约 12 h,培养板 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,以 100 μ L/孔加入 10 倍稀释的 CCK-8 溶液,培养箱内孵育 3 h,酶联免疫检测仪 (Multiskan Spectrum,Thermo Lab-systems 公司,美国)检测 450 nm 的吸光度值。细胞杀伤率=[1-(共培养孔吸光度值-E 孔吸光度值)/T 孔吸光度值] $\times 100\%$ 。

采用 CCK-8 法检测 E:T 为 20:1 时 Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 表达程度不同的卵巢癌细胞株 OVCAR-3、HO8910、A2780、SKOV3 及人乳腺癌细胞 MCF-7、人皮肤黑色素瘤细胞 A375 的杀伤作用,以 T 细胞和 CD19 CAR-T 细胞作为对照,实验方法同上。

1.2.5 Trop-2 CAR-T 细胞与靶细胞共培养后细胞因子 IFN- γ 、IL-2 分泌的变化

ELISA 检测:用包被液稀释 IFN- γ 、IL-2 抗体,以 100 μ L/孔加入不同 96 孔酶标板内,4 $^{\circ}$ C 过夜。封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。收集 E:T 为 20:1 时共培养上清液,设置 3 个复孔,加入酶标板内,4 $^{\circ}$ C 过夜。加入生物素标记的检测抗体,温育 1 h 后清洗,再加入 HRP 标记的亲合素温育 30 min,最后加入 TMB 显色,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

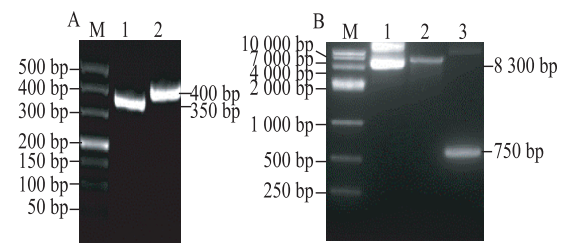
1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Trop-2 CAR 逆转录病毒表达质粒的构建及鉴定

以抗 Trop-2 Fab 为模板,扩增获得抗 Trop-2 抗体的 V κ 和 V H 序列,进行 1%琼脂糖核酸凝胶电泳鉴定,结果显示在 350 bp 和 400 bp 左右有目的条带(图 1A),运用 overlap PCR 完成 scFv 的构建,核酸电泳结果提示 750 bp 有目的条带(图 1B 泳道 3),核酸凝胶电泳结果与预期一致。运用 In-Fusion PCR 将 scFv 连接至经 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切后的逆转录病毒载体中。将重组质粒转化 *E.coli* DH5- α ,挑取阳性克隆并送测序,测序结果与设计序列一致。

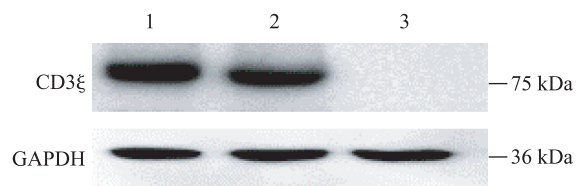


A: 抗 Trop-2 Fab V κ 、V H 扩增产物。M:DL500 DNA Marker;1: V κ ;2:V H 。B:Trop-2 CAR 逆转录病毒表达质粒各组分的鉴定。M: DL10000 DNA Marker ;1:V κ 、V H 、(Gly4Ser)3 与线性化逆转录病毒载体的重组产物;2:逆转录病毒质粒经 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切后的回收产物;3:V κ 、V H 与 (Gly4Ser)3 的连接产物。

图 1 Trop-2 CAR 逆转录病毒表达质粒的构建及鉴定
Figure 1 Construction and identification of retrovirus vector expressing Trop-2 chimeric antigen receptor

2.2 Trop-2 CAR 逆转录病毒的包装及表达鉴定

收集转染后的 293T 细胞及未做转染的 293T 细胞并提取总蛋白,使用 Western blot 检测外源性 CD3 ζ 蛋白的表达。T 细胞内源性表达的 CD3 ζ 分子量约为 22 kDa,CAR 中外源性 CD3 ζ 分子量约 75 kDa。结果表明转染 Trop-2 CAR 逆转录病毒质粒和 CD19 CAR 逆转录病毒质粒的 293T 细胞在 75 kDa 左右均有目的条带,与预期蛋白大小相符,而未转染 293T 细胞未见表达(图 2)。



1:Trop-2 CAR 逆转录病毒质粒转染的 293T 细胞;2:CD19 CAR 逆转录病毒质粒转染的 293T 细胞;3:未转染 293T 细胞。

图 2 Trop-2 CAR 在 293T 细胞中表达的验证
Figure 2 Expression identification of the Trop-2 CAR on 293T cells

2.3 Trop-2 CAR-T 细胞对卵巢癌细胞增殖的影响

选取 Trop-2 基因差异表达的人卵巢癌 HO8910 和 A2780 细胞做靶细胞,当 E:T 分别为 20:1、10:1、5:1、2:1 时,Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 阳性表达卵巢癌细胞 HO8910 的杀伤率分别为 (74.96 \pm 7.24)%、(48.71 \pm 2.47)%、(30.93 \pm 5.40)%、(16.12 \pm 5.21)%,杀伤效率明显高于 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组 ($P < 0.05$),而 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 3A)。Trop-2 CAR-T 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组对 Trop-2 阴性表达的卵巢癌 A2780 细胞的杀伤率在不同 E:T 时差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 3B)。

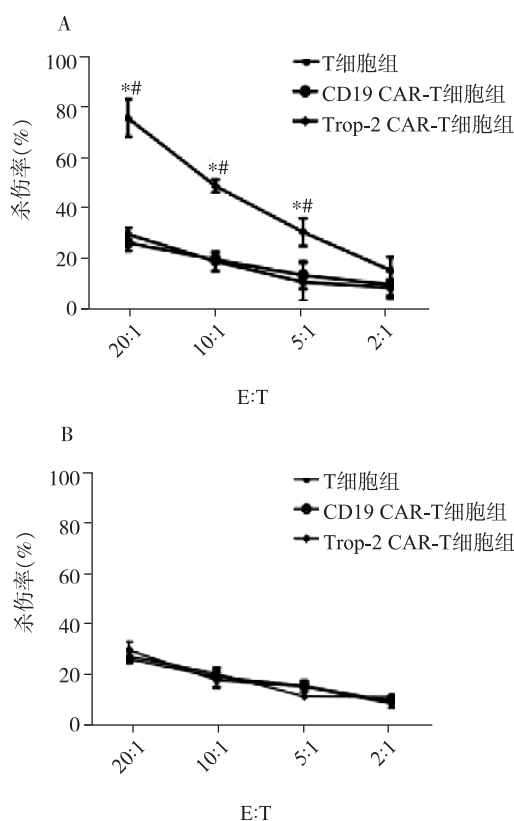


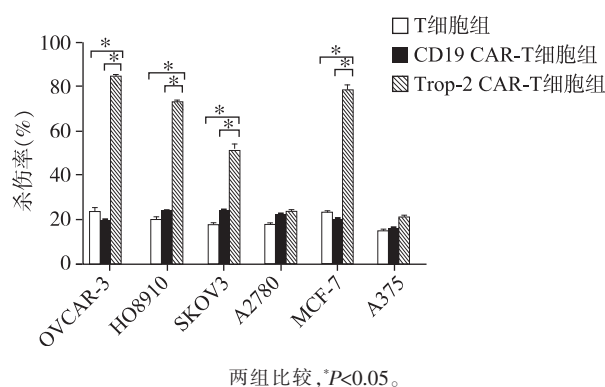
图 3 CCK-8 法检测 Trop-2 CAR-T 细胞对靶细胞杀伤作用
Figure 3 CCK-8 analysis of the cytotoxic activity of Trop-2 CAR T cells to target cells

A:不同效靶比时 Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 表达阳性的卵巢癌细胞 HO8910 的杀伤作用;B:不同效靶比时 Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 表达阴性的卵巢癌细胞 A2780 的杀伤作用。与 T 细胞组比较,* $P < 0.05$;与 CD19 CAR-T 组比较,# $P < 0.05$ 。

Trop-2 基因在人卵巢癌细胞株 OVCAR-3、HO8910 及人乳腺癌细胞 MCF-7 中有较高表达,在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中少量表达,在人卵巢癌细胞 A2780 和人皮肤黑色素瘤细胞 A375 中未见表达^[13-15]。使用 CCK-8 法检测 E:T 为 20:1 时,各组效应细胞对上述肿瘤细胞的杀伤能力(图 4)。Trop-2 CAR-T 细胞对 OVCAR-3、HO8910、SKOV3、MCF-7 的杀伤率分别为 $(83.83 \pm 1.23)\%$ 、 $(72.73 \pm 1.34)\%$ 、 $(51.63 \pm 3.67)\%$ 、 $(78.3 \pm 4.45)\%$, 杀伤效率明显高于 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组 ($P < 0.05$), 而 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组的杀伤效率差异无统计学意义 ($P > 0.05$);Trop-2 CAR-T 细胞对 A2780 和 A375 的杀伤效率分别为 $(23.53 \pm 1.10)\%$ 和 $(21.23 \pm 1.36)\%$,与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 Trop-2 CAR-T 细胞与靶细胞共培养后细胞因子 IFN- γ 、IL-2 分泌的变化

Trop-2 CAR-T 细胞与卵巢癌细胞 OVCAR-3、



两组比较,* $P < 0.05$ 。

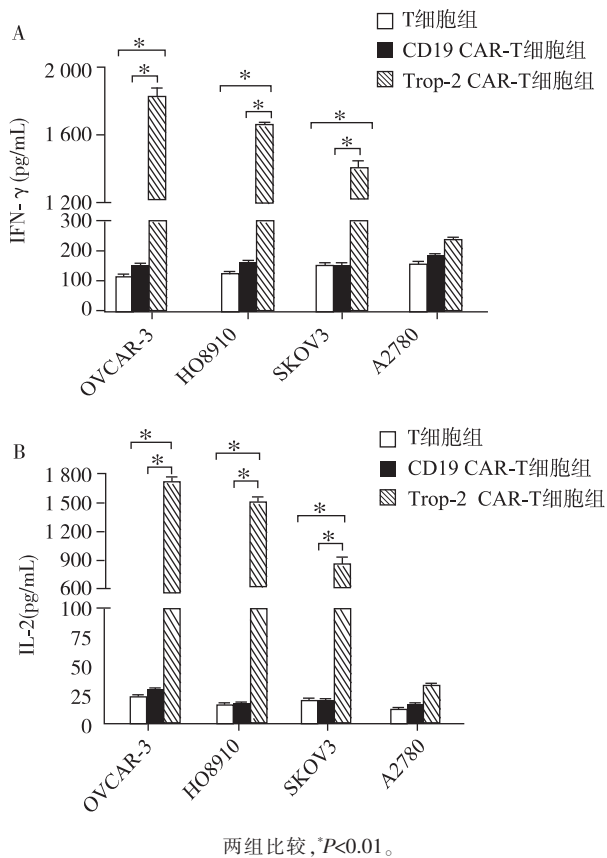
图 4 CCK-8 法检测 Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 表达不同的靶细胞的杀伤作用

Figure 4 CCK-8 analysis of the cytotoxic activity of Trop-2 CAR-T cells to target cells with different Trop-2 expression

HO8910、SKOV3、A2780 共培养 48 h 后,采用 ELISA 检测培养上清中 IFN- γ 和 IL-2 的分泌情况(图 5)。结果表明,Trop-2 CAR-T 细胞与 Trop-2 表达阳性卵巢癌细胞 OVCAR-3、HO8910、SKOV3 共培养时,培养上清中 IFN- γ 含量分别为: $(1\ 813.0 \pm 100.5)$ 、 $(1\ 655.2 \pm 22.3)$ 、 $(1\ 404.7 \pm 69.0)$ pg/mL;IL-2 含量分别为: $(1\ 707.9 \pm 113.3)$ 、 $(1\ 511.2 \pm 131.3)$ 、 (842.0 ± 173.5) pg/mL,与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组相比,Trop-2 CAR-T 细胞组共培养上清中 IFN- γ 和 IL-2 分泌量显著增加 ($P < 0.01$),而 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Trop-2 CAR-T 细胞与 Trop-2 表达阴性的卵巢癌细胞 A2780 共培养,上清中 IFN- γ 含量为 (234.2 ± 14.8) pg/mL,IL-2 含量为 (31.7 ± 3.4) pg/mL,与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

自 1989 年提出 CAR 概念以来,CAR 技术不断得到改进和发展^[12]。目前,CAR 以胞内信号转导区的不同经历了 3 代演变过程:第 1 代 CAR 胞内区仅含 CD3 ζ 或 FcR γ ,因缺乏共刺激信号分子,T 细胞不能获得有效激活,临床治疗效果受到很大限制。因此第 2 代 CAR 在第 1 代 CAR 的基础上增加了 1 种协同共刺激因子,如 CD28、CD137 等,显著提高了 T 细胞的持续增殖活性;第 3 代 CAR 则引入 2 种以上的协同共刺激分子胞内结构域,拥有更强的信号传递功能,能够更有效地延长 T 细胞在体内的存活时间和增强 T 细胞的杀瘤作用^[13]。近年来,CAR-T 技术在血液系统恶性肿瘤治疗领域取得了令人瞩目的突破,Maude 等^[14]用 CD19 CAR-T 细胞治疗 30 例患



两组比较,*P<0.01。

图 5 ELISA 检测 Trop-2 CAR-T 细胞 IFN-γ(A)和 IL-2 (B)的分泌情况

Figure 5 ELISA detection of Trop-2 CAR-T cells secreting IFN-γ (A) and IL-2 (B)

有复发或难治性急性白血病患者,其中 27 例获得了完全缓解。Kochenderfer 等^[15]用靶向 CD19 的 CAR-T 细胞单次注射后辅以化学治疗的方法治疗 15 例 CD19 阳性的晚期 B 细胞恶性肿瘤患者,其中 8 例获得完全缓解,4 例获得部分缓解。在实体瘤治疗领域,CAR-T 技术用于胰腺癌、间皮瘤等多种肿瘤治疗的研究相继展开。Brown 等^[16]用靶向 IL13Rα2 的 CAR-T 细胞治疗 1 例复发性多灶性脑胶质瘤患者,患者脑内和脊柱内的肿瘤于 CAR-T 细胞输注后均出现持续缓解。虽然目前因为肿瘤特异性抗原的缺乏、肿瘤免疫抑制微环境等因素的影响,CAR-T 细胞技术对实体瘤的治疗效果受到很大限制,但是随着 CAR-T 细胞技术的不断发展,CAR-T 细胞技术将有望成为肿瘤治疗的有效手段^[17-18]。

Trop-2 参与调节细胞间的黏附,还能通过细胞周期蛋白 D1 和细胞外调节蛋白激酶途径促进环磷酸腺苷效应元件结合蛋白、STAT1、STAT3、NF-κB、Rb 等调节肿瘤生长的下游信号分子的表达,有促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的作用^[8-9]。Trop-2 蛋白在

人正常组织中低表达或不表达,而在多种肿瘤中高表达。Trerotola 等^[11]用免疫组化方法分析了不同卵巢癌组织中 Trop-2 的表达情况,结果表明卵巢癌组织 Trop-2 表达率高达 66%,其中有 38%的卵巢癌组织表现为 Trop-2 高表达。Bignotti 等^[19]研究证实,人源化抗 Trop-2 抗体 hRS7 在体外可对 Trop-2 高表达的低分化子宫内膜样腺癌细胞产生抗体介导的细胞毒作用。Lin 等^[20]制备的人源抗 Trop-2 Fab 片段可诱导乳腺癌细胞凋亡,抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭等恶性行为。刘金荣等^[12]通过真核表达系统制备的全人源抗 Trop-2 抗体在体外对表达 Trop-2 的卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移有明显抑制作用。上述研究结果为本研究选取 Trop-2 作为靶点、制备 Trop-2 CAR-T 细胞、观察 Trop-2 CAR-T 细胞对卵巢癌细胞的体外杀伤作用提供了依据。

本研究以实验室前期筛选出的具有较高亲和力的抗 Trop-2 Fab 为基础,制备出全人源 CAR 结构胞外区 scFv,用以识别肿瘤细胞表面抗原,同时全人源的胞外区可以避免 CAR-T 细胞在体内引起 HAMA 反应的风险。本研究选用 CD28、CD137、CD3ζ 作为胞内共刺激信号转导区,制备第 3 代 CAR-T 细胞,以增强 T 细胞在体内的持续增殖能力,从而提高 T 细胞在体内的存活时间和杀瘤作用。鉴于 CD19 是研究最多的靶向性细胞治疗的靶点,其治疗血液系统恶性肿瘤的作用已得到充分验证^[6-7,14-15],且 CD19 仅在正常成熟 B 细胞、恶性 B 细胞和 B 细胞前体细胞中表达,在卵巢癌细胞中不表达^[21],因此本研究选取与 Trop-2 CAR 具有相同胞内区的 CD19 CAR 作为阴性对照,观察 Trop-2 CAR 的靶向性功能。CCK-8 杀伤实验结果显示,本研究制备的 Trop-2 CAR-T 细胞对靶细胞的杀伤作用随效靶比例的增加而增强,当效靶比例为 20:1 时,Trop-2 CAR-T 细胞对 Trop-2 高表达的卵巢癌细胞 HO8910、OVCAR-3 的杀伤效率均超过 70%,对 Trop-2 低表达的卵巢癌细胞 SKOV3 的杀伤效率达到 50%,与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组相比,杀伤效率明显提高。而 Trop-2 CAR-T 细胞对不表达 Trop-2 的肿瘤细胞的杀伤效率与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组相比无明显差别,提示本研究所制备的 Trop-2 CAR-T 细胞能够特异性识别靶细胞表面的 Trop-2 抗原,且其对靶细胞的杀伤作用与靶细胞表面 Trop-2 抗原表达量有关。在 ELISA 检测实验中,与 CD19 CAR-T 细胞组和 T 细胞组相比,Trop-2 CAR-T 细胞与 Trop-2 表达阳性肿瘤细胞的共培养

上清中 IFN- γ 和 IL-2 的分泌明显增加, 而 Trop-2 CAR-T 细胞与 Trop-2 表达阴性肿瘤细胞的共培养上清中 IFN- γ 和 IL-2 的分泌无明显差别。提示肿瘤细胞表面抗原 Trop-2 与 Trop-2 CAR-T 细胞结合后能够有效激活胞内信号转导区, 从而促进 Trop-2 CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2 细胞因子, 杀伤肿瘤细胞。

本研究制备了针对 Trop-2 的第 3 代 CAR-T 细胞, 在体外可有效杀伤 Trop-2 表达阳性的卵巢癌细胞, 其杀伤作用与分泌的细胞因子 IFN- γ 、IL-2 有关。本研究为进一步将 Trop-2 CAR-T 细胞应用于卵巢癌的临床治疗奠定了实验基础, 有望为卵巢癌的临床治疗提供新手段。

[参考文献]

- [1] Yeung TL, Leung CS, Yip KP, et al. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A review in the theme: cell and molecular processes in cancer metastasis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(7):444-456
- [2] Jeon SY, Hwang KA, Choi KC. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 158:1-8
- [3] Hansen JM, Coleman RL, Sood AK. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 56:131-143
- [4] Aravantis G, Pectasides D. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review[J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7:57
- [5] Whilding LM, Maher J. CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(10):1994-2018
- [6] Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date[J]. *Blood*, 2016, 127(26):3312-3320
- [7] Davila ML, Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(1):6-17
- [8] Cardillo TM, Govindan SV, Sharkey RM, et al. Humanized anti-Trop-2 IgG-SN-38 conjugate for effective treatment of diverse epithelial cancers: preclinical studies in human cancer xenograft models and monkeys [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10):3157-3169
- [9] Guerra E, Trerotola M, Aloisi AL, et al. The Trop-2 signalling network in cancer growth[J]. *Oncogene*, 2013, 32(12):1594-1600
- [10] Xu N, Zhang Z, Zhu J, et al. Overexpression of trophoblast cell surface antigen 2 as an independent marker for a poor prognosis and as a potential therapeutic target in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2016, 97(2):150-158
- [11] Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, et al. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth[J]. *Oncogene*, 2013, 32(2):222-233
- [12] 刘金荣, 白露月, 唐奇, 等. 全人源抗 Trop-2 IgG 的制备及对卵巢癌细胞生物特性的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(3):280-286
- [13] Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(4):388-398
- [14] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16):1507-1517
- [15] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6):540-549.
- [16] Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-Cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26):2561-2569
- [17] Gill S, Maus MV, Porter DL. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making[J]. *Blood Rev*, 2016, 30(3):157-167
- [18] An N, Tao Z, Li S, et al. Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9):10638-10649
- [19] Bignotti E, Ravaggi A, Romani C, et al. Trop-2 overexpression in poorly differentiated endometrial endometrioid carcinoma: implications for immunotherapy with hRS7, a humanized anti-trop-2 monoclonal antibody[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(9):1613-1621
- [20] Lin H, Zhang H, Wang J, et al. A novel human Fab antibody for Trop2 inhibits breast cancer growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(5):1239-1249
- [21] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17):5697-5706

[收稿日期] 2017-01-12