



· 论 著 ·

不同信号肽对嵌合抗原受体T细胞杀伤作用的影响研究

李 帆, 张琴星, 童祥文, 田高辉, 顾力行, 徐 瑶

武汉科技大学生命科学与健康学院 生物医学研究院, 湖北 武汉 430081

[摘要] **背景与目的:** 信号肽 (signal peptide, SP) 是一段存在于前体蛋白N-端的短肽链, 能够调节前体蛋白的折叠和转移, 在蛋白质的分泌过程中扮演着极其重要的角色。近年来, 靶向CD19的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) T细胞在白血病治疗中取得了重大突破, 关于CAR结构的胞内域改造方面也有诸多研究, 而对单链可变片段 (scFv) 的N端SP研究进展缓慢。探讨4种不同SP的CD19-CAR在T细胞表面表达及对CD19⁺靶细胞的杀伤作用。**方法:** 通过基因合成和分子克隆技术, 构建含4种不同SP (SP1、SP2、SP3、SP4) 的靶向CD19抗原的CAR载体, 进行慢病毒包装, 将得到的慢病毒转染T细胞, 利用流式细胞术检测细胞转染效率, 采用钙黄绿素释放法检测该细胞对靶细胞的杀伤作用, 采用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平。**结果:** 成功构建4种不同SP的重组慢病毒载体, 将4种慢病毒转导T细胞后, 结果显示, 分别有20.9%、22.6%、31.5%、38.6%的T细胞表面能够表达CD19-CAR (分别命名为SP1-CD19、SP2-CD19、SP3-CD19和SP4-CD19细胞), 进一步杀瘤实验证明, SP4-CD19细胞对CD19⁺肿瘤细胞的杀伤作用显著高于SP1-CD19、SP2-CD19和SP3-CD19细胞 ($P < 0.01$), 并且当效靶比为10:1共培养24 h后, 与SP1-CD19、SP2-CD19和SP3-CD19细胞相比, SP4-CD19细胞的IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平显著升高 ($P < 0.05$)。此外, 4种不同SP的CAR-T对CD19⁺肿瘤细胞K562的杀伤作用差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** SP4-CD19细胞的转染效率、细胞因子分泌水平及对CD19⁺肿瘤细胞的杀伤作用均显著高于SP1-CD19、SP2-CD19和SP3-CD19细胞, 该研究成果为CAR-T优化改造及其高效的临床应用奠定了科学基础。

[关键词] 信号肽; 嵌合抗原受体; 靶向CD19的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) T细胞; 体外杀瘤; 细胞因子

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.02.006

中图分类号: R730.51 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2022)02-0142-10

A study on influence of different signal peptides on anti-tumor effect of chimeric antigen receptor (CAR) T cells LI Fan, ZHANG Qinxing, TONG Xiangwen, TIAN Gaohui, GU Lixing, XU Yao (Institute of Biology and Medicine, College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China)

Correspondence to: XU Yao E-mail: xuyao0307@wust.edu.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Signal peptide (SP) is a short peptide chain at the N-terminal of precursor protein, which can regulate the folding and transfer of precursor protein and plays an important role in protein secretion. In recent years, significant breakthroughs have been made in the treatment of leukemia with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells, and many achievements have been reported in the intracellular domain modification of CAR structure, while the N-terminal SP of scFv presents less progress. The purpose of this study was to investigate the CD19-CAR expression of four different SP on the surface of T cells and their effect on the killing of CD19⁺ target cells. **Methods:** The CAR vectors containing four different SP (SP1, SP2, SP3, SP4) targeting CD19 antigen were constructed by gene synthesis and molecular cloning technology, and then packaged into lentivirus. The obtained lentivirus was transfected into T cells. The transfection efficiency of the cells was detected by flow cytometry, the killing effect of the cells on target cells was detected by calcein release assay, and the secretion levels of IFN- γ and TNF- α were detected by ELISA. **Results:** The recombinant lentiviral plasmids with four different SP were successfully constructed, and the four packaged

基金项目: 湖北省科学技术厅科技计划项目 (2019ACA168)。

通信作者: 徐 瑶 E-mail: xuyao0307@wust.edu.cn

lentiviruses were transduced into T cells. The results showed that 20.76%, 22.29%, 31.57% and 38.42% of T cells expressed CD19-CAR (named as SP1-CD19, SP2-CD19, SP3-CD19 and SP4-CD19 cells, respectively), respectively. The killing effect of SP4-CD19 on CD19⁻ tumor cells was significantly higher compared with SP1-CD19, SP2-CD19 and SP3-CD19 cells ($P < 0.01$), and the secretion levels of IFN- γ and TNF- α in SP4-CD19 cells were significantly higher than those in SP1-CD19, SP2-CD19 and SP3-CD19 cells when the effect-target ratio was 10 to 1 for 24 h ($P < 0.05$). There was no significant difference in the killing effect of CAR-T on CD19 negative cells K562 among four different SP ($P > 0.05$). **Conclusion:** The transfection efficiency and killing effect of SP4-CD19 cells on CD19⁺ tumor cells were significantly higher compared with SP1-CD19, SP2-CD19 and SP3-CD19 cells, which laid a scientific foundation for the optimization and efficient clinical application of CAR-T.

[Key words] Signal peptide; Chimeric antigen receptor; CD19-targeted chimeric antigen receptor T cells; Anti-tumor *in vitro*; Cytokines

1975年,洛克菲勒大学细胞生物学教授 Bloble等^[1]在一项研究中发现新合成的蛋白质具有内源性信号,即信号肽(signal peptide, SP),最后通过实验验证,他提出了“信号假说”,用以解答蛋白质合成后的去向问题。SP是一段存在于前体蛋白N-端的短肽链,能够调节前体蛋白的折叠和转移。研究^[2-5]表明,在原核系统中,SP附着后,外源基因能够在原核表达系统中成功表达并分泌,如芽孢杆菌、乳酸杆菌、L型细菌、大肠杆菌等。除此之外,SP还广泛应用于真核表达系统,如昆虫杆状病毒表达系统和毕赤酵母表达系统^[6-9]。由此可见,SP在蛋白质的分泌过程中扮演着极其重要的角色,通过分子生物学技术,优化SP序列对于提高外源蛋白的分泌量及活性具有重要的实际意义。

嵌合抗原受体T淋巴细胞(chimeric antigen receptor T lymphocyte, CAR-T)技术是通过分子生物学和基因工程改造技术,将靶向特异性抗原的单链抗体的轻重链可变区(single chain antibody variable fragment, scFv)序列在患者的T细胞膜表面表达,进而特异性地杀死肿瘤细胞,达到治疗癌症的目的。CAR的基础设计中包括一个肿瘤相关抗原结合区(通常来源于抗体抗原结合区域的scFv段)、一个细胞外铰链区、一个跨膜区和一个细胞内信号区^[10-11]。细胞膜外部分是从单克隆抗体中纯化的抗原靶向部分,该抗体由scFv(重链和轻链可变区的融合蛋白)组成。scFv中的SP对自身的表达尤为重要,scFv的N端SP具有三重结构,并且与分泌蛋白的SP具有相同的特征^[12-13]:疏水性 α 螺旋核心(h区),其N端侧翼为极性氨基酸残基(n区)。C端侧翼在裂

解位点(c区)的-1和-3处含有螺旋断裂的脯氨酸和甘氨酸残基,以及小的不带电荷的残基。scFv一旦与肿瘤抗原结合,它就会触发T细胞活化并导致细胞因子释放和T细胞增殖^[14]。SP能促进CAR在T细胞膜表面的表达,因此,对SP结构进行优化和选择是提高CAR表达水平的重要方法。

本研究以CD19为CAR-T治疗靶点,通过构建4种不同SP的CD19-CAR表达载体,研究4种不同来源的SP对CAR-T转染效率的影响,并验证其对CD19阳性肿瘤细胞的杀伤效果,为临床治疗急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)提供新的CAR-T治疗方案。

1 材料和方法

1.1 细胞株与主要试剂

人胚肾细胞293T、K562细胞系和NALM-6细胞系均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),K562-CD19细胞系为武汉波睿达生物科技有限公司馈赠,大肠杆菌DH5 α 感受态购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

慢病毒表达载体BRD-PTK-Kan购自武汉波睿达生物科技有限公司(自行构建并保存),慢病毒包装载体pMDLg/pRRE、pRSV-Rev和pMD2.G均购自美国Addgene公司,大量质粒抽提试剂盒购自美国Axygen公司,胎牛血清、DMEM-Basic、RPMI-1640培养基及0.25%的Trypsin-EDTA均购自美国Gibco公司,PE-Labeled Human CD19 Protein购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司,7-AAD购自美国BD Bioscience

公司, 钙黄绿素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, Human IFN- γ precoated ELISA kit (Cat:1110002) 和 Human TNF- α precoated ELISA kit (Cat:1117202) ELISA试剂盒购自深圳达科为生物科技股份有限公司。寡核苷酸引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

1.2 4种不同SP的CD19-CAR分子的设计

CD19-CAR分子的单链抗体片段来源于

GenBank: HM852952.1, 将细胞外域CD19-scFv (包含SP1序列)、跨膜区、细胞内域共刺激因子CD28、4-1BB及CD3 ζ 依次串联连接, 获得完整的CD19-CAR片段, CD19抗原的scFv可在细胞膜上稳定表达。然后通过分子克隆技术将SP2、SP3、SP4替换CD19-CAR中原有的SP1, 即可得到含不同SP的CD19-CAR分子。SP序列如表1所示。

表 1 SP的核苷酸和氨基酸序列及来源

Tab. 1 Nucleotide and amino acid sequences and sources of SP

SP	Sequence	Source
SP1	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (MALPVTALLPLALLHAARP)	Human CD8 α
SP2	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTTCTGTGCGAACTGCCCCACCCCGCCTTCTGCTAATCCCC (MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP)	Human CSF2R α
SP3	ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCATGTCATAATGTCTAGAATGGCC (MDFQVQIFSFLISAVMSRMA)	Mouse light chain Kappa-K32 precursor
SP4	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGT (MYRMQLLSICALSLALVTNS)	Human IL-2

1.3 分子重组技术构建不同SP的PTK-CD19-CAR载体

通过基因合成得到序列大小为792 bp的CD19-scFv序列, 包括SP1、VL轻链、Linker连接肽和VH重链。此外, 基因合成得到大小为804 bp的基因序列, 包括hinge、共刺激因子CD28、41BB及CD3 ζ 等结构。

通过重叠PCR技术, 将上述两段序列连接, 得到CD19-CAR片段, 然后使用引物CAR-F、CAR-R (表2), 扩增获得不含SP1的CAR片

段。用表2的引物序列分别扩增基因合成的SP2、SP3、SP4, 使其带有相同的同源臂, 然后与不含SP1的CAR片段连接即可获得含有不同SP的CD19-CAR片段。随后, 通过BamH I和EcoR I酶切, 利用亚克隆技术将其连接至慢病毒表达载体BRD-PTK-Kan。最终获得分别含4种SP的CD19-CAR目的载体, 即SP1-CD19-CAR、SP2-CD19-CAR、SP3-CD19-CAR和SP4-CD19-CAR, 用于慢病毒包装。

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SP2-forwards	GGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGCTGCTGCTGGTGACC
SP2-reverse	CTGGGTCATCTGGATGTCCGGCCTGGCGGCGTGGA
SP3-forwards	GGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGGATTTTCAGGTG
SP3--reverse	CTGGGTCATCTGGATGTCCGCCATTCTAGACATTAT
SP4-forwards	GGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGTACAGGATGCAAC
SP4-reverse	CTGGGTCATCTGGATGTCACTGTTTGTGACAAGTG
CAR-forwards	GACATCCAGATGACCCAGAC
CAR-reverse	GGGAGGGAGAGGGGCGGATCCTTAGCGAGGGGGCAGGGCC

1.4 细胞培养

用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养K562细胞系、K562-CD19细胞系和NALM-6细胞系。HEK-293T细胞培养使用含10%胎牛血清的DMEM培养基,原代T细胞培养使用含1 000 U/mL IL2、1:1 000的HEPES 1M、1:1 000谷氨酰胺的TexMACS™ GMP培养基;细胞通过添加或替换新鲜培养基维持生长,换液需要300×g离心5 min去细胞上清,然后按 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL的细胞密度添加培养基,轻轻吹打均匀后置于37℃、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养。

1.5 慢病毒的包装、浓缩及滴度测定

利用第3代慢病毒包装系统,由慢病毒包装载体pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G和慢病毒表达质粒组成。用PEI转染法将慢病毒系统4种质粒共转染HEK-293T细胞,转染比例为12:10:6:5,然后37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养72 h后收集上清液,采用超速离心法进行浓缩。滴度测定:采用6孔板,每孔铺 5×10^5 个HEK-293T细胞,每孔分别加入0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μL的病毒,并加入聚凝胺(polybrene),使其浓度为5 μg/mL。并设置阴性对照,72 h后通过PE-Labeled Human CD19 Protein用流式细胞术检测HEK-293T细胞转染效率并计算慢病毒滴度。每种病毒量设置2组平行孔,实验重复3次。

1.6 慢病毒转导T细胞构建CD19-CAR-T

显微镜下观察待转染细胞生长情况,取需要数目的生长状况良好的待转细胞;于6孔板中按感染复数等于5计算需要加入慢病毒浓缩液的数量,补加Polybrene使其终浓度为5 μg/mL;37℃斜置温育4 h,最后补加培养基至正常培养浓度。

1.7 流式细胞术检测慢病毒感染T细胞表面CD19-CAR的表达

收集 $>5 \times 10^5$ 个转染待测转效或表面表达的细胞于流式管中,并选取未染色或未处理细胞作为阴性对照。向每管中加入1~2 mL流式细胞术用Buffer(PBS+2%~5%FBS,FBS维持细胞活性),300×g,离心5 min,去掉上清液,重复洗2

遍,用流式细胞术用Buffer配制好工作浓度的染色抗体,并除尽离心后的上清液,重悬细胞于配制好的抗体中,4℃避光染色30 min。加入1~2 mL流式细胞术用Buffer终止染色,300×g,5 min离心,去掉上清液,重复洗2遍,加2 μL 7-AAD抗体(稀释比例1:100)于0.2 mL流式细胞术用Buffer中重悬细胞,2~3 h之内流式细胞仪分析检测。

1.8 钙黄绿素释放法检测各种SP CD19-CAR-T的细胞毒性

以T、SP1-CD19、SP2-CD19、SP3-CD19和SP4-CD19细胞作为效应细胞,阳性靶细胞为表达CD19的NALM-6细胞系和K562-CD19细胞系,阴性靶细胞为不表达CD19的K562细胞系。将靶细胞用calcein-AM标记后,将其接种于U底96孔培养板(100 μL/孔),接种密度为 1×10^5 个/mL。将体积为100 μL/孔,不同效靶比(25:1、5:1、1:1)的效应细胞加入对应孔中,共培养体系用含5%胎牛血清的PBS。设置:阳性对照组(加入裂解液)和阴性对照组(加入PBS),各组均设4个复孔,37℃生化培养箱中温育3 h。将96孔板在常温下700×g离心10 min,将每个孔中所有的上清转移至新的平底96孔板预标记的对应的孔中。分参数设置酶标仪:激发光波长485/20,发射光波长530/25,扫描读取荧光值。各组效应细胞的细胞毒性根据以下公式计算:特异性杀伤百分率(%)=(实验组荧光值-阴性对照组荧光值)/(最大释放组荧光值-阴性对照组荧光值)×100%,实验重复3次。

1.9 ELISA法检测各种SP CD19-CAR-T内IFN-γ和TNF-α的分泌水平

取适量的靶细胞,加入 5×10^3 个K562细胞于96孔板中,作为阴性靶细胞组,阳性靶细胞组加入 5×10^3 个CD19⁺的NALM-6细胞,而空白组中不加入靶细胞,体积为100 μL。按照效应细胞比靶细胞为10:1,加入T细胞和4种SP的CD19-CAR-T(5×10^4 个/孔,体积100 μL)于对应的孔中,每个样品做3个复孔,使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基作为共培养体系。37℃生化培养箱中温育24 h后,将96孔板常温,700×g,10 min离心后收集100 μL上清液,按酶联免疫

吸附实验试剂盒的说明书常温操作检测IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平,在450 nm波长下检测吸光度(D)值,并根据标准曲线计算各样本细胞因子的含量(pg/mL)。

1.10 数据分析

本研究采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建分别含4种SP的CD19-CAR重组质粒

利用基因合成和分子克隆技术成功获得了含不同SP的CD19-CAR片段(图1A),将4种

CD19-CAR分子亚克隆至慢病毒载体BRD-PTK-Kan上。通过BamH I和EcoR I双酶切进行鉴定,CD19-CAR分子的重链VH结构含有BamH I酶切位点,则CD19-CAR分子被切成一段带SP的序列和一段大小为1 052 bp大小的序列。结果显示,含4种SP的重组质粒酶切后可见4条带SP的序列大小分别为544、547、550和541 bp,两段序列加起来的大小与携带不同SP的CD19-CAR片段一致(图1B)。此外,载体测序结果证实,4种CD19-CAR片段基因序列和插入的阅读框与设计完全相符,证明4种慢病毒表达质粒SP1-CD19-CAR、SP2-CD19-CAR、SP3-CD19-CAR和SP4-CD19-CAR构建成功。

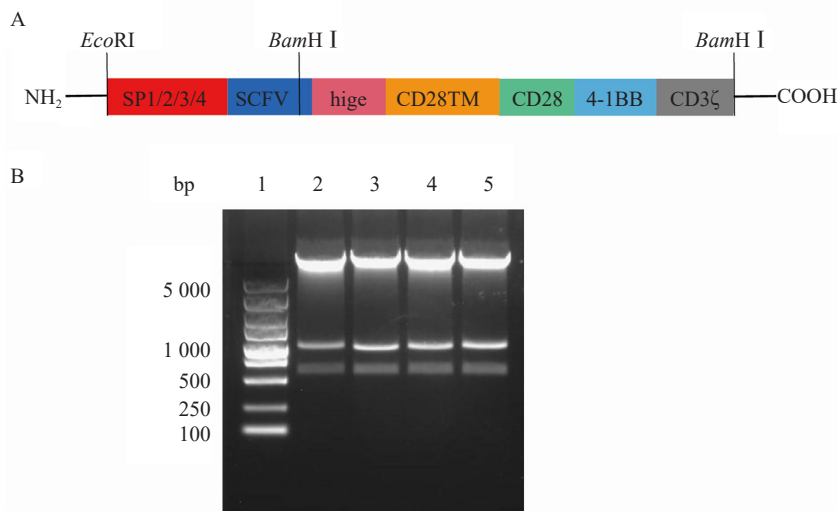


图1 含4种不同SP慢病毒表达载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant lentiviral plasmid containing four different SP

A: Structure diagram of CD19-CAR [SP (SP1: 63 bp, SP2: 66 bp, SP3: 69 bp, SP4: 60 bp), scFv consisting of VH-linker-VL (729 bp), CD8a hinge region (135 bp), CD28TM (81 bp), CD28chain (123 bp), 4-1BBchain (126 bp) and CD3 ζ chain(339 bp)]; B: Identification results of the four PTK-CD19-CAR recombinant plasmid detected by restriction endonuclease, respectively. 1: Marker; 2-5: Four PTK-CD19-CAR recombinant lentiviral plasmids.

2.2 成功制备4种慢病毒载体

流式细胞术检测结果显示,用浓缩的4种病毒液分别以0.1、0.2、0.4、0.8和1.6 μL 的体积转染HEK-293T细胞,以病毒添加量为0.4 μL 时计算对应的4种慢病毒(SP1、SP2、SP3和SP4)的滴度。结果显示,SP4 [(2.80 \pm 0.10) $\times 10^8$ TU/mL]慢病毒的滴度显著高于SP1 [(1.40 \pm 0.09) $\times 10^8$ TU/mL]、SP2 [(1.70 \pm 0.11) $\times 10^8$ TU/mL]、SP3 [(2.10 \pm 0.19) $\times 10^8$ TU/mL] ($P < 0.01$, 图

2A),证明4种慢病毒包装成功,可用于后续实验。此外,如图2B所示,病毒添加量为0.4 μL 时对应的4种慢病毒(SP1、SP2、SP3和SP4)的转染效率分别为11.3%、13.1%、16.6%和23.5%。

2.3 4种不同SP的CD19-CAR在T细胞中的表达差异分析

通过流式细胞术检测不同SP对CAR-T转染效率的影响,结果如图3所示,转染效率随着时间的延长呈现先上升后下降的趋势,且SP4-CD19组显著高于SP1-CD19、SP2-CD19和SP3-CD19组

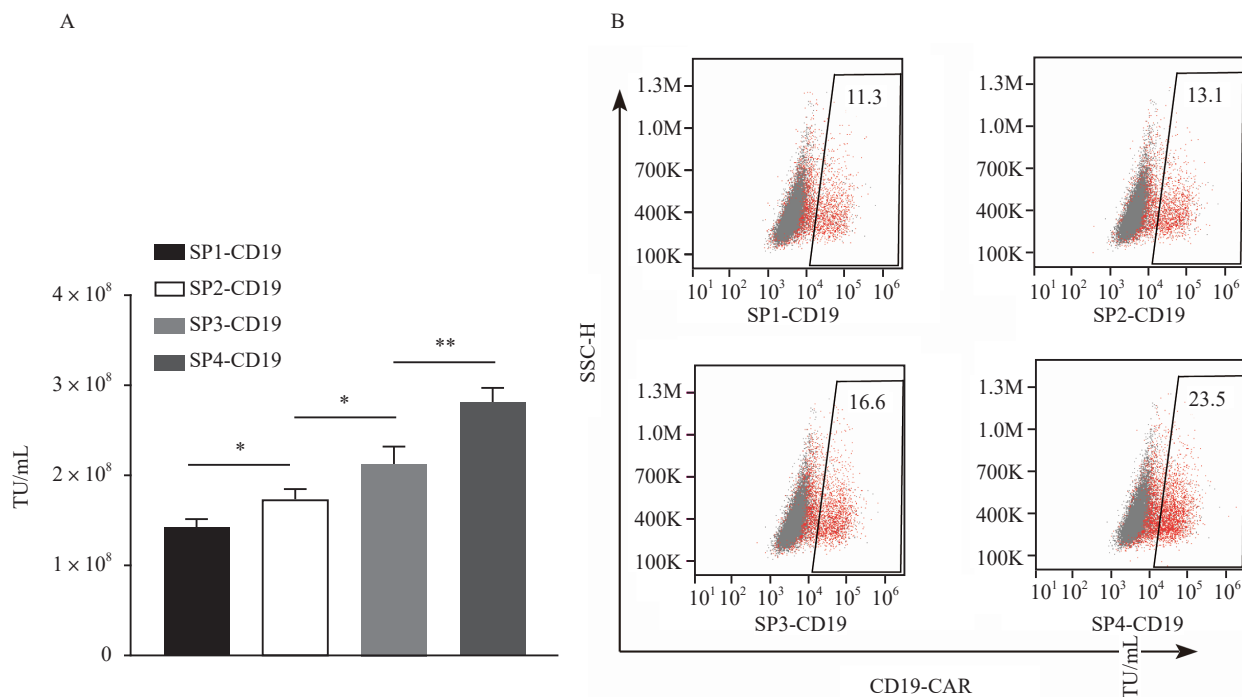


图2 4种慢病毒的成功制备

Fig. 2 Successful preparation of four lentiviruses

A: Activity titers of four lentiviruses. B: The four CD19-CAR expression on HEK-293T cells transfected by lentivirus, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

($P < 0.05$) (图3A)。并且在转染效率最高的第6天检测4组慢病毒感染组的表达情况,结果显示,含4种SP的慢病毒(SP1、SP2、SP3和SP4)感染的T细胞成功表达CD19-CAR的比例分别为20.9%、22.6%、31.5%和38.6%(图3B)。此外,本研究还检测了相同时间点CD19阳性细胞的数量,结果显示,SP4-CD19组的阳性细胞数均高于其他3组(图3C),细胞增殖实验结果显示,含不同SP的CAR结构对CAR-T细胞的增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$,图3D)。

2.4 4种不同SP的CD19-CAR-T对靶细胞的杀伤效率

本研究通过流式细胞术进一步检测4种SP的CAR-T的体外杀伤效力,实验选择不表达CD19的K562细胞作为阴性靶细胞,K562-CD19细胞(CD19稳定表达细胞系)和NALM-6细胞(CD19表达阳性率为99.6%和99.5%),作为阳性靶细胞(图4A)。

细胞毒性实验结果(图4B)显示,用第6天的CAR-T杀伤靶细胞,在效靶比相同的条件下SP4-CD19细胞对K562-CD19肿瘤细胞的杀伤作用显著高于SP1-CD19、SP2-CD19、SP3-

CD19细胞和T细胞[效靶比为25:1时,分别为(36.77 ± 2.42)%、(15.15 ± 1.35)%、(18.80 ± 0.30)%、(31.58 ± 1.47)%、(9.04 ± 3.25)%、 $P < 0.01$]。同样SP4-CD19细胞对NALM-6肿瘤细胞的杀伤作用明显高于SP1-CD19、SP2-CD19、SP3-CD19和T细胞[效靶比为25:1时,分别为(23.43 ± 1.13)% vs (11.16 ± 0.48)%、(10.54 ± 2.27)%、(17.90 ± 1.53)%和(8.27 ± 2.75)%、 $P < 0.01$]。而两者对CD19-肿瘤细胞K562的杀伤作用差异无统计学意义[效靶比为25:1时,分别为(3.75 ± 0.95)% vs (3.06 ± 0.80)%、(2.42 ± 0.79)%、(4.00 ± 1.06)%和(1.92 ± 0.76)%、 $P > 0.05$]。

2.5 4种不同SP的CD19-CAR-T中IFN- γ 和TNF- α 的分泌

前期研究发现,细胞因子IFN- γ 和TNF- α 可发挥协同作用杀死肿瘤细胞,因此本研究采用ELISA技术检测细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的释放情况^[15-16]。结果显示,效靶比为10:1时,共培养24 h后,阳性靶细胞组与空白细胞组相比,T细胞IFN- γ 和TNF- α 的

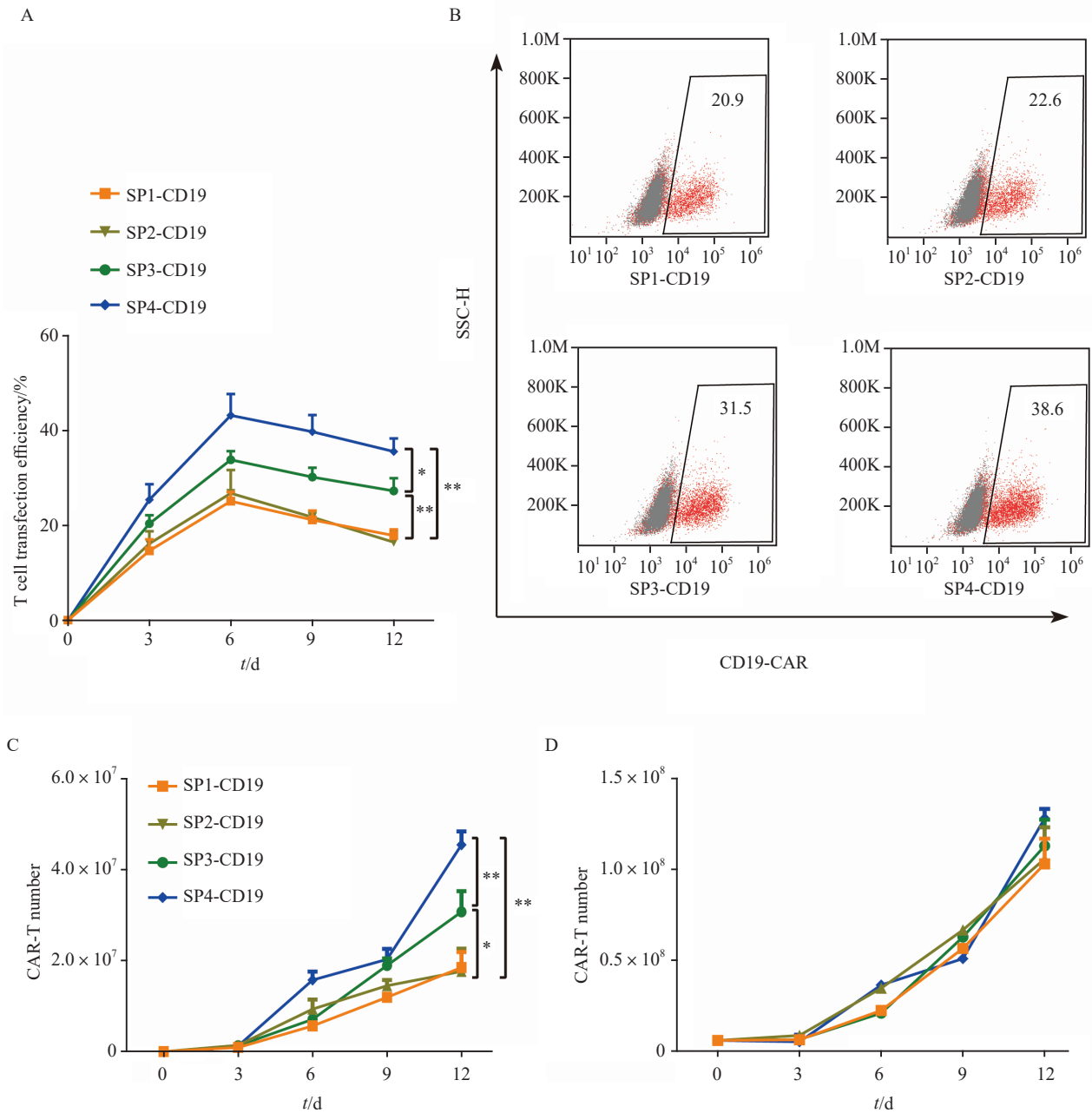


图3 4种CD19-CAR分子在T细胞中的转染效率及增殖情况

Fig. 3 Transfection and expression rate of four CD19-CAR in the T cells and its proliferation activity

A: The transfection efficiency of CAR-T with four different signaling peptides varied with days; B: Expression rate of the CD19-CAR in T cells detected by flow cytometry; C: Proliferation activity of CAR-T with four different signaling peptides; D: Proliferation activity of T cells; *: $P < 0.05$, compared with each other; **: $P < 0.01$, compared with each other.

分泌水平没有显著变化 [IFN- γ : (894.90 \pm 8.83) pg/mL vs (649.60 \pm 64.70) pg/mL, $P > 0.05$; TNF- α : (419.80 \pm 8.81) pg/mL vs (401.60 \pm 25.80) pg/mL, $P > 0.05$], 而4种不同SP的CD19-CAR-T中IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平在阳性靶细胞组中显著升高(图5)。在阳性靶细胞组中, SP4-CD19细胞IFN- γ 和TNF- α 的分泌水平比SP1-CD19、SP2-CD19、SP3-CD19细胞和T细胞

显著升高 [IFN- γ : (5 819.00 \pm 281.90) pg/mL vs (2 626.00 \pm 154.50) pg/mL、(3 089.00 \pm 173.50) pg/mL、(3 844 \pm 39.08) pg/mL、(894.90 \pm 8.83) pg/mL, $P < 0.01$; TNF- α : (5 004.00 \pm 169.50) pg/mL vs (3 014.00 \pm 85.20) pg/mL、(3 351.00 \pm 66.43) pg/mL、(3 922.00 \pm 63.38) pg/mL和(419.80 \pm 8.81) pg/mL, $P < 0.01$] 。

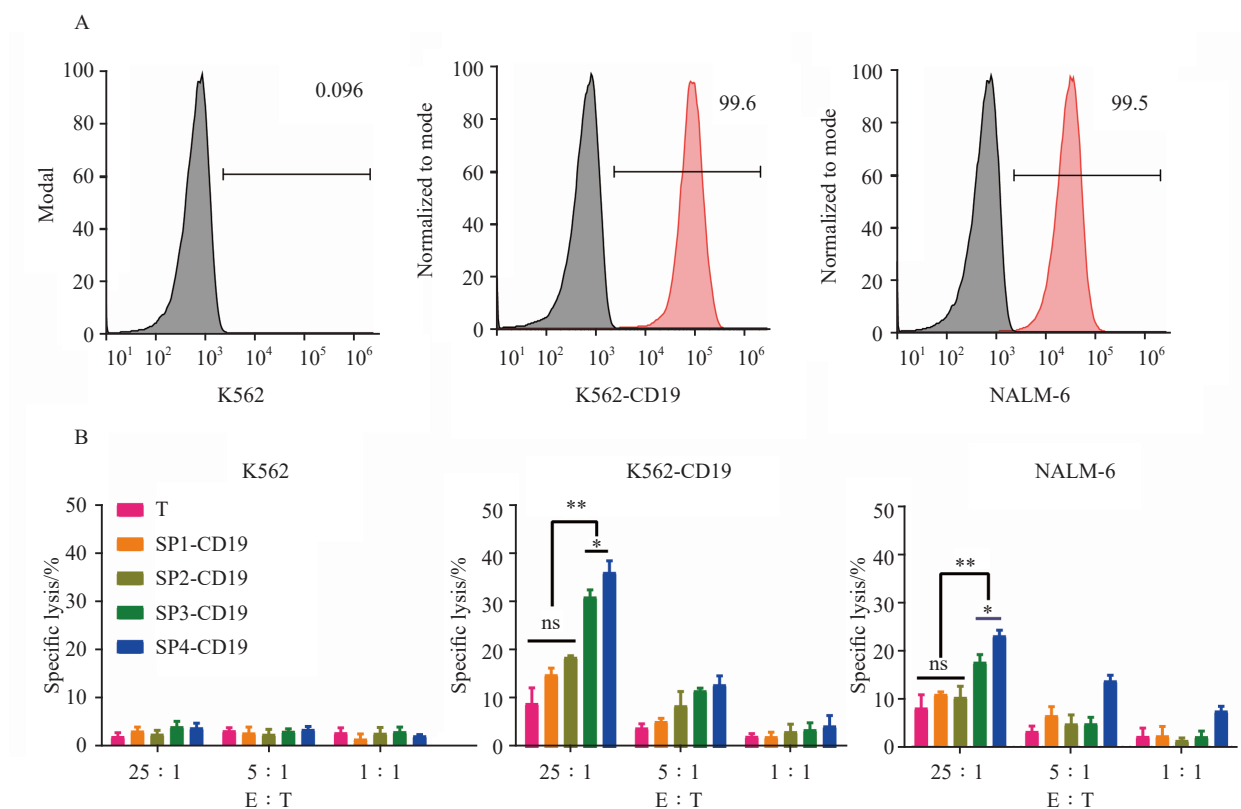


图4 4种CD19-CAR-T对CD19⁺靶细胞的杀伤效应

Fig. 4 Killing effect of four CD19-CAR-T on CD19⁺ target cells

A: The expressions of CD19 in K562, K562-CD19 and NALM-6 cells were detected by flow cytometry; B: Detection of cytotoxicity of four CD19-CAR-T on K562 (left), K562-CD19 (middle) and NALM-6 (right) cells by calcein-AM release assay; ns: No significance; **P*<0.05, compared with each other; ***P*<0.01, compared with each other.

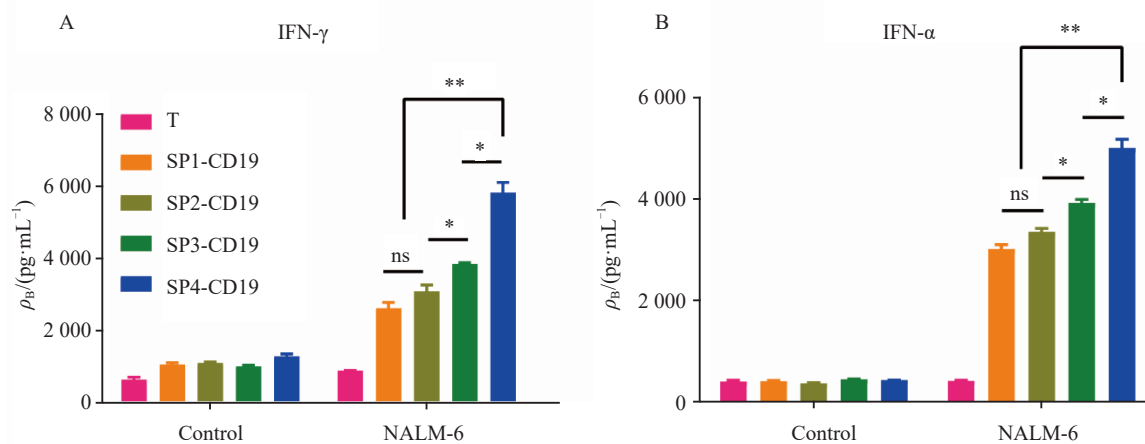


图5 4种CD19-CAR-T IFN-γ和TNF-α分泌水平

Fig. 5 The secretion levels of IFN-γ and TNF-α among four CD19-CAR T

A: IFN-γ secretion levels of four CD19-CAR T were determined by ELISA. B: TNF-α secretion levels of four CD19-CAR T were determined by ELISA; ns: No significance; **P*<0.05, compared with each other; ***P*<0.01, compared with each other.

3 讨 论

ALL是淋巴细胞在分化早期恶性增殖造成的,可侵犯骨髓、血液和髓外部位,发病率高,预后和生存率不理想^[17-18]。CAR-T免疫治疗能靶向性地杀伤具有特异性抗原的ALL细胞,而对正常细胞无杀伤作用,这将大大降低脱靶效应,为ALL的临床治疗提供新的策略。有研究^[19-20]表明,增加CAR在T细胞表面的表达可以增加CAR-T的抗肿瘤能力,这为治疗ALL提供了一个全新的方案。本实验成功构建了表达不同SP的CD19-CAR分子的T细胞,并在体外验证出其具有靶向特异性,CD19抗原CAR对CD19⁺ALL细胞有较为明显的杀伤作用,并且SP4-CD19细胞的转染效率和对CD19⁺ALL细胞的杀伤作用明显高于SP1-CD19、SP2-CD19和SP3-CD19细胞。该研究结果为CAR-T在临床转化中的优化方案提供了重要的实验依据。

近年来,靶向CD19的CAR-T在白血病的治疗中取得了重大突破^[21-22],关于CAR结构的胞内域改造方面的研究也越来越深入,而对scFv的N端SP研究较少。CAR的主要结构包括抗原结合区(包含SP)、铰链区、跨膜区和细胞内信号区^[23]。这些元件都有各自独特的功能,可以通过使用来源于各种蛋白的结构域组合,来优化CAR的结构。因此,为了增强CAR结构在T细胞表面的表达及杀伤作用,本研究主要采用由单链抗体scFv、CD28跨膜区、CD28细胞内结构域、细胞内共刺激域4-1BB和CD3 ζ 链组成的第三代CAR的结构,并在此基础上优化了抗原结合区SP结构,从而增强对靶细胞的杀伤。从细胞毒性实验结果可以看出,携带不同SP的SP-CD19 CAR-T对CD19⁺ALL细胞表现出特异性的杀伤效果,由此可以证明,不同的SP能够影响CAR在T细胞表面的表达以及对靶细胞的杀伤。

从研究结果可以看出,SP4-CD19细胞较其他SP的SP-CD19细胞对CD19⁺ALL细胞杀瘤效应显著增强。ELISA法检测IFN- γ 和TNF- α 分泌水平结果显示,在CD19⁺肿瘤细胞刺激下SP4-CD19细胞较其他SP的SP-CD19细

胞IFN- γ 和TNF- α 分泌水平显著提高。研究表明,改造SP是一种有效增加重组蛋白表达量的方式^[24],并且SP具有极强的异质性,许多SP即使在不同物种之间也具有功能上的互换性^[25]。这可能与CAR结构中的SP与SRP(信号识别颗粒)的识别有关,据推测,不同的SP对SRP表现出不同的亲和力,SRP随后决定了新生多肽链进入分泌途径的效率^[26-27]。本研究发现,SP4-CD19细胞的转染效率和对靶细胞的杀伤力较其他3个SP均显著升高,这可能与SP4结合SRP的效率有关,其中的分子机制及作用效应还有待进一步实验验证。

综上所述,随着国内外科学家们对免疫疗法的深入研究,越来越多的研究者关注CAR-T对肿瘤细胞的杀伤作用^[28]。本研究制备了含不同SP的CAR-T,并通过系统的体外实验初步验证了SP对提升CAR在T细胞表面表达的影响。从本实验中CAR-T对靶细胞的体外功能鉴定结果来看,SP4-CD19细胞较其他SP的CAR-T对靶细胞的杀伤和细胞因子分泌水平显著提高。这将为ALL的临床精准治疗提供参考,但是还需要通过动物实验评估其安全性。

利益冲突声明: 所有作者均不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] BLOBEL G, DOBBERSTEIN B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma [J]. *J Cell Biol*, 1975, 67(3): 835-851.
- [2] HEGDE R S, BERNSTEIN H D. The surprising complexity of signal sequences [J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(10): 563-571.
- [3] PROMCHAI R, VISESSANGUAN W, LUXANANIL P. An efficient ABC transporter signal peptide directs heterologous protein secretion in food-grade hosts [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36(10): 154.
- [4] HUANG Q, PALMER T. Signal peptide hydrophobicity modulates interaction with the twin-arginine translocase [J]. *mBio*, 2017, 8(4): e00909-e00917.
- [5] MAHMUD H, ISMAIL A, ABDUL RAHIM R, et al. Enhanced secretion of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) by *Lactococcus lactis* using heterologous signal peptides and optimization of cultivation conditions [J]. *J Biotechnol*, 2019,

- 296: 22–31.
- [6] FERRARESE L, TRAINOTTI L, GATTOLIN S, et al. Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo-beta-1, 4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris* [J] . FEBS Lett, 1998, 422(1): 23–26.
- [7] DE PINHEIRO C G, PEDROSA M D E O, TEIXEIRA N C, et al. Optimization of canine interleukin-12 production using a baculovirus insect cell expression system [J] . BMC Res Notes, 2016, 9: 36.
- [8] DUAN G D, DING L M, WEI D S, et al. Screening endogenous signal peptides and protein folding factors to promote the secretory expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* [J] . J Biotechnol, 2019, 306: 193–202.
- [9] LIN J, NEO S H, HO S, et al. Impact of signal peptides on furin-2A mediated monoclonal antibody secretion in CHO cells [J] . Biotechnol J, 2017, 12(9): 2017, 12(9).
- [10] CHEADLE E J, GORNALL H, BALDAN V, et al. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic [J] . Immunol Rev, 2014, 257(1): 91–106.
- [11] SRIVASTAVA S, RIDDELL S R. Engineering CAR-T cells: design concepts [J] . Trends Immunol, 2015, 36(8): 494–502.
- [12] JEONG D W, LEE J H, KIM K H, et al. A food-grade expression/secretion vector for *Lactococcus lactis* that uses an alpha-galactosidase gene as a selection marker [J] . Food Microbiol, 2006, 23(5): 468–475.
- [13] MASOMIAN M, JASNI A S, RAHMAN R N Z R A, et al. Impact of signal peptide and transmembrane segments on expression and biochemical properties of a lipase from *Bacillus sphaericus* 205y [J] . J Biotechnol, 2017, 264: 51–62.
- [14] HOMBACH A, WIECZARKOWIECZ A, MARQUARDT T, et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule [J] . J Immunol, 2001, 167(11): 6123–6131.
- [15] QIN H, DONG Z Y, WANG X L, et al. CAR T cells targeting BAFF-R can overcome CD19 antigen loss in B cell malignancies [J] . Sci Transl Med, 2019, 11(511): eaaw9414.
- [16] SINGH N, FREY N V, ENGELS B, et al. Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells [J] . Nat Med, 2021, 27(5): 842–850.
- [17] COOK J, LITZOW M. Advances in supportive care for acute lymphoblastic leukemia [J] . Curr Hematol Malig Rep, 2020, 15(4): 276–293.
- [18] ROGOSIC S, GHORASHIAN S. CAR-T cell therapy in paediatric acute lymphoblastic leukaemia—past, present and future [J] . Br J Haematol, 2020, 191(4): 617–626.
- [19] FOUSEK K, WATANABE J, JOSEPH S K, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression [J] . Leukemia, 2021, 35(1): 75–89.
- [20] KOBAYASHI K, HASHIMOTO M, HONKAKOSKI P, et al. Regulation of gene expression by CAR: an update [J] . Arch Toxicol, 2015, 89(7): 1045–1055.
- [21] LIN W Y, WANG H H, CHEN Y W, et al. Gene modified CAR-T cellular therapy for hematologic malignancies [J] . Int J Mol Sci, 2020, 21(22): E8655.
- [22] HONG M H, CLUBB J D, CHEN Y Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy [J] . Cancer Cell, 2020, 38(4): 473–488.
- [23] RAFIQ S, HACKETT C S, BRENTJENS R J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy [J] . Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(3): 147–167.
- [24] KNAPPSKOG S, RAVNEBERG H, GJERDRUM C, et al. The level of synthesis and secretion of *Gussia princeps* luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide [J] . J Biotechnol, 2007, 128(4): 705–715.
- [25] LIU J, O'KANE D J, ESCHER A. Secretion of functional *Renilla reniformis* luciferase by mammalian cells [J] . Gene, 1997, 203(2): 141–148.
- [26] JANDA C Y, LI J, OUBRIDGE C, et al. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle [J] . Nature, 2010, 465(7297): 507–510.
- [27] SARAOGI I, SHAN S O. Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle [J] . Traffic, 2011, 12(5): 535–542.
- [28] LIANG Y, LIU H, LU Z M, et al. CD19 CAR-T expressing PD-1/CD28 chimeric switch receptor as a salvage therapy for DLBCL patients treated with different CD19-directed CAR T-cell therapies [J] . J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 26.

(收稿日期: 2021-10-09 修回日期: 2021-11-29)