



· 论 著 ·

没食子酸增强CAR-T细胞抗实体瘤作用的研究

孙大玮¹, 于金玉¹, 张 鑫¹, 赵松柏², 张显政³

1. 山东第一医科大学附属省立医院影像科, 山东 济南 250021;
2. 山东第一医科大学附属省立医院中心实验室, 山东 济南 250021;
3. 山东第一医科大学附属省立医院麻醉手术室, 山东 济南 250021

[摘要] 背景与目的: 没食子酸 (gallic acid, GA) 具有诱导肿瘤细胞凋亡及抑制血管生成的作用。GA除了直接攻击肿瘤细胞外, 另一个非常重要的作用是调节和增强免疫系统, 例如, GA能够改善T细胞代谢, 缓解T细胞耗竭, 有助于T细胞形成记忆表型。当前已有多款嵌合抗原受体T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞产品获批上市, 但CAR-T细胞依然存在较多缺陷, 如脱靶效应、易耗竭等。另外, 同耗竭一样, 衰老也是限制T细胞发挥功能的一大因素。本研究旨在探讨GA对CAR-T细胞体内及体外抗肿瘤作用, GA对CAR-T细胞衰老表型和记忆表型的影响, 以及GA和CAR-T细胞对肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 内免疫细胞浸润的影响。方法: 构建靶向小鼠磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican 3, GPC3) 及靶向人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth receptor 2, HER2) 的二代CAR, 构建CAR-T细胞。使用5 μg/mL GA与CAR-T细胞共培养, 采用流式细胞术检测CAR-T细胞的衰老状态和记忆表型, 衰老指标包括p53、p21、γ-H2AX和衰老相关β半乳糖苷酶 (senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal) 等, 记忆表型指标为CCR7。体外探究不同效靶比的CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。构建皮下移植瘤模型, 探究GA对CAR-T细胞抗肿瘤作用以及对TME免疫细胞浸润的影响。结果: 成功构建了人源HER2 CAR-T细胞和鼠源GPC3 CAR-T细胞, 阳性率在30%~50%之间。在此基础上, 实验结果显示, 在不同效靶比的情况下, GA可增强靶向小鼠GPC3及HER2 CAR-T细胞的体外杀伤能力 ($P < 0.001$), 延缓小鼠GPC3 CAR-T细胞的衰老 (p53, p21, γ-H2AX, $P < 0.05$; SA-β-gal, $P < 0.001$; CCR7, $P < 0.001$), 并且GA能够促进CAR-T细胞向记忆表型分化 ($P < 0.001$)。同时, GPC3 CAR-T细胞能够抑制肿瘤细胞的生长 ($P < 0.05$), 延长小鼠生存期 ($P < 0.001$), 增强CAR-T细胞 ($P < 0.001$) 和内源性免疫细胞的浸润能力 [CD4⁺ T细胞, $P < 0.05$; CD8⁺ T细胞, $P < 0.01$; 自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞, $P < 0.01$]。结论: GA可增强CAR-T细胞的体外杀伤能力, 延缓CAR-T细胞衰老表型, 促进CAR-T细胞向记忆表型分化, 增强CAR-T细胞抗肿瘤作用, 通过改善TME, 提高免疫细胞浸润能力。

[关键词] 没食子酸; 嵌合抗原受体T细胞; 抗实体瘤; 衰老; 肿瘤微环境

中图分类号: R730.51 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2025.11.005

基金项目: 无。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: SWYX:No.2025-018。

知情同意: 有。

引用本文: 孙大玮, 于金玉, 张 鑫, 等. 没食子酸增强CAR-T细胞抗实体瘤作用的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2025, 35(11): 1032-1040.

Funding: no.

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: SWYX:No.2025-018.

Informed consent: available.

Cite this article: SUN D W, YU J Y, ZHANG X, et al. A study on gallic acid enhancing the anti-solid tumor function of CAR-T cells [J]. Chin Oncol, 2025, 35(11): 1032-1040.

A study on gallic acid enhancing the anti-solid tumor function of CAR-T cells SUN Dawei¹, YU Jinyu¹, ZHANG Xin¹, ZHAO Songbo², ZHANG Xianzheng³ (1. Department of Medical Imaging, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong Province, China; 2. Central Laboratory, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong Province, China; 3. Department of Anesthesia and Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong Province, China)

Correspondence to: ZHANG Xianzheng E-mail: 13356662952@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Gallic acid (GA) induces tumor cells apoptosis and inhibits angiogenesis. Beyond directly

attacking tumor cells, another crucial aspect of GA is its ability to modulate and enhance immune system function. For example, it can improve T cell metabolism, alleviate T cell exhaustion, and promote the formation of memory T cell phenotypes. Although several chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells products have gained market approval, the technology still faces significant challenges. These limitations include off-target effects, a predisposition to T cell exhaustion and so on. Moreover, similar to exhaustion, cellular senescence is a major hindrance that impairs T cell function. This study aimed to investigate the effects of GA on the anti-tumor function of CAR-T cells both *in vitro* and *in vivo*. We further evaluated the impact of GA on CAR-T cells senescence and memory phenotypes, as well as the impact of GA and CAR-T cells on immune cell infiltration within the tumor microenvironment (TME). **Methods:** Second-generation CAR targeting mouse glypican 3 (GPC3) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) were constructed to generate CAR-T cells. CAR-T cells were co-cultured with GA at a concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$, and flow cytometry was used to assess the senescence status and memory phenotype of CAR-T cells and their killing ability against tumor cells at different effector-to-target ratios. Senescence markers included p53, p21, γ -H2AX and senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal), while CCR7 served as the memory phenotype marker. A subcutaneous tumor model was established to explore the effects of GA on the anti-tumor function of CAR-T cells and immune cell infiltration within the TME. **Results:** We successfully generated human HER2 and murine GPC3 CAR-T cells, achieving a purity of 30%-50%. GA enhanced the *in vitro* killing ability of CAR-T cells targeting mouse GPC3 and human HER2 ($P < 0.001$) at different E:T ratios, delayed the senescence of mouse GPC3 CAR-T cells (p53, p21, γ -H2AX, $P < 0.05$; SA- β -gal, $P < 0.001$; CCR7, $P < 0.001$). And GA promoted the differentiation of CAR-T cells toward a memory phenotype ($P < 0.001$). Additionally, GPC3 CAR-T cells inhibited tumor cell growth ($P < 0.05$), prolonged mouse survival ($P < 0.001$), and enhanced the infiltration capacity of CAR-cells ($P < 0.001$) and endogenous immune cells [CD4⁺ T cells, $P < 0.05$; CD8⁺ T cells, $P < 0.01$; natural killer (NK) cells, $P < 0.01$]. **Conclusion:** GA can enhance the cytotoxic activity of CAR-T cells *in vitro*, and delay the senescence of CAR-T cells. Furthermore, by modulating TME, GA improved immune cell infiltration, thereby augmenting the overall anti-tumor efficacy of CAR-T cells.

[**Key words**] Gallic acid; Chimeric antigen receptor T cells; Anti-solid tumor; Senescence; Tumor microenvironment

嵌合抗原受体T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞免疫疗法在临床治疗血液系统恶性肿瘤时取得了良好效果^[1-2], 其缓解率已超过传统靶向药物^[3-5], 但在治疗实体瘤方面不尽如人意^[6-8]。造成CAR-T细胞治疗实体瘤效果不佳的原因众多, 其中主要是由于实体瘤存在复杂的肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME)^[9-11], 乏氧、低酸、高活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等TME导致免疫细胞难以浸润^[9, 12]。有研究^[13-14]表明, 清除TME中的ROS可增强靶向药的疗效。另外, CAR-T细胞在杀伤肿瘤过程中常伴随衰老现象, 有效地缓解CAR-T细胞衰老是增强CAR-T细胞抗肿瘤作用的策略之一。T细胞衰老和T细胞耗竭不同, 衰老是端粒缩短或细胞端粒应激导致的, 理论上不可逆^[15]。有研究^[16-17]表明, 通过缓解CAR-T细胞衰老, 可有效地改善CAR-T细胞表型, 调节CAR-T细胞周期, 增强CAR-T细胞抗肿瘤作用。

没食子酸 (gallic acid, GA) 是一种具有天然抗炎抗氧化功效的有机化合物, GA可通过抗炎抗氧化缓解糖尿病^[18]。另外, GA可通过清除ROS和调控谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 来改善TME, 从而发挥抗肿瘤作用^[19]。另外, GA可以通过抑制调节性T (regulatory T, Treg) 细胞及增强T细胞功能, 从而达到抗肿瘤目的^[20-21]。基于此, 本研究通过构建靶向实体瘤

的CAR-T细胞, 并在GA的刺激下, 研究CAR-T细胞的抗实体瘤效果。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

人肺癌细胞系H1299和小鼠肝癌细胞系Hepa1-6购自山东暖阳生物技术有限公司。DMEM培养基购自美国Invitrogen公司, X-VIVO 15培养基 (BE02-053Q) 购自瑞士Lonza公司, RPMI-1640培养基购自济南捷进生物技术有限公司。

抗鼠流式抗体FITC-CD45 (103107)、APC-CD3 (100205)、Pe-Cy7-CD4 (100421)、PC5.5-CD8 (100733)、PE-NK1.1 (108707) 和APC-CCR7 (120107) 均购自美国Biolegend公司; WB抗体, 以及 γ -H2AX、p21、p53、actin抗体和抗鼠二抗均购自美国ProteinTech公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自德国Merck公司, 人和鼠CD3/CD28激活磁珠、小鼠T细胞分离试剂盒均购自加拿大STEMCELL Technologies公司; 衰老相关 β 半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 试剂盒 (SG03) 购自美国Technical Manual公司。

1.2 实验动物

本研究使用5~6周龄BALB/c雌性小鼠, 购自

上海南方模式生物科技股份有限公司, 饲养于山东第一医科大学附属省立医院无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物房, 所有涉及小鼠实验均按照山东第一医科大学附属省立医院伦理要求进行。

1.3 CAR的构建

本研究构建的是二代CAR, 通过酶切酶联技术将人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 及磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican 3, GPC3) 的单链可变区片段 (single-chain variable fragment, scFv) 序列分别整合至慢病毒载体pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP上。其中, HER2 CAR序列如下: HER2 scFv-人CD8跨膜区-人41BB-人CD3z; 鼠GPC3 CAR序列如下: GPC3 scFv-鼠CD8跨膜区-鼠41BB-鼠CD3z。

1.4 T细胞获取

人T细胞的获取: 该实验通过山东第一医科大学伦理委员会审批 (伦理批号: NSFC:No.2023-268)。抽取健康志愿者外周血5~10 mL, 事先均已告知并签署知情同意书, 将同体积的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 加入抗凝外周血中混匀。在新的离心管中加入Ficoll, 然后将外周血/PBS混合物贴壁缓慢加入到Ficoll上方, 避免与Ficoll混合。以800×g离心20 min, 升速设为5 r/min, 降速保持0 r/min。吸取界面白膜层, 即得到外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。最后, 加入T cell TransAct激活试剂, 培养48 h后, 获得的细胞即为T细胞, 人T细胞培养在含有10%胎牛血清和50 U/mL IL-2的X-VIVO培养基中。

小鼠T细胞的获取: 取6~8周龄BALB/c小鼠, 实施安乐死, 摘取脾脏, 无菌环境中研磨, 使用小鼠T细胞分离试剂盒分选, 按照说明书步骤进行操作。将获取的T细胞放置在24孔板中培养, 每孔加入10 μL激活试剂, 激活48 h, 得到的即为激活的T细胞, 小鼠T细胞培养在含有10%胎牛血清、50 U/mL IL-7和100 U/mL IL-15的RPMI-1640培养基中。

1.5 CAR-T细胞的构建

将人与鼠CAR慢病毒载体交给上海吉凯生物技术有限公司, 由该公司包装成慢病毒, 冻存使用。取 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个T细胞, 按照感染系数为50进行转染, 48 h后通过流式细胞术和免疫荧光检测阳性率。同时, 使用空载体包装的对照病毒对T细

胞进行转染得到空载T细胞, 作为实验对照组。

1.6 流式细胞术

CAR-T细胞阳性率检测: 收集未处理T细胞和每组CAR-T细胞, 以未处理T细胞为阴性对照组。将T细胞移至1.5 mL离心管 (1×10^6 个/管) 中, 每管加入500 μL PBS, 以800×g离心3 min。经3次洗涤和过滤后, 采用CytoFlex流式细胞仪通过检测GFP分析CAR-T细胞的阳性率。

CAR-T细胞表型检测: 收集未处理T细胞和每组CAR-T细胞, 以未处理T细胞为阴性对照组。将T细胞移至1.5 mL离心管 (1×10^6 个/管) 中, 后加入1 μL流式抗体, 在37 °C下避光温育15 min后, 每管加入500 μL PBS, 以800×g离心3 min, 经3次洗涤和过滤后, 采用CytoFlex流式细胞仪分析CAR-T细胞的表型。

1.7 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测CAR-T细胞衰老相关蛋白表达

收集各组细胞, 用PBS清洗后, 用蛋白裂解液提取细胞的总蛋白, 采用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂测定蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液, 将样品在金属浴中100 °C煮沸10~20 min。经过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和转膜后, 在5%脱脂牛奶液中封闭1~2 h。接着, 加入稀释至1:1 000的H2AX、p21、p53和稀释至1:5 000的β-actin抗体, 4 °C下处理10~12 h。之后, 在稀释至1:5 000的HRP标记的兔抗人免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG) 中处理2 h。清洗3遍后, 使用化学发光成像系统显影, 利用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.8 CAR-T细胞对靶细胞杀伤检测

采用CBA (CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) 法对CAR-T细胞的杀伤能力进行评估。将H1299和Hepa1-6细胞分别接种于24孔板 (1×10^5 个/孔) 中, 根据设定的效靶比 (1:1和2:1), 向各孔内加入各组人或鼠源CAR-T细胞、空载T细胞以及与5 μg/mL GA温育的CAR-T细胞, 轻轻吹打、混匀。同时, 设置仅含靶细胞和仅含效应细胞的单独孔, 每孔的总体积为1 mL, 共培养12 h后收集细胞, 800×g离心3 min, 保留上清液; 弃掉靶细胞组上清液, 保留细胞, 加入裂解液处理45 min以完全释放LDH; 然后800×g离心3 min, 取上清液用于检测。从每组样本取50 μL上清液加入到96孔板中, 再加入50 μL检测试剂, 避光作用30 min后, 每孔加入

50 μL 终止液。在1 h内,使用酶标仪检测490 nm波长处的吸光度(D)值。根据公式计算细胞杀伤率:杀伤率=(实验组 D 值-效应细胞自然死亡 D 值-靶细胞自然死亡 D 值)/(靶细胞完全死亡 D 值-靶细胞自然死亡 D 值) $\times 100\%$ 。

另外,使用华东理工大学研制的智能实时监测仪(CM100- α 型)检测CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤情况。于小室中加入 1×10^5 个靶细胞/孔,5 h左右,待细胞贴壁后,加入 1×10^5 个/孔的CAR-T细胞、空载T细胞以及与5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GA温育的CAR-T细胞,实时检测,约10 h后终止检测,导出数据。

1.9 小鼠移植瘤模型的建立

本研究的动物实验获得山东第一医科大学附属省立医院研究伦理委员会的批准(伦理批号:SWYX:No.2025-018)。取5~6周龄BALB/c雌性小鼠,在5 Gy剂量下照射5 min,2 d后皮下接种,每只小鼠皮下注射 2×10^5 个Hepa1-6细胞,随机分成4组,每组7只小鼠,小鼠均在SPF级饲养环境下喂养。5 d后回输CAR-T细胞。其中,第1组回输200 μL PBS;第2组回输 1×10^6 个小鼠空载T细胞,体系为200 μL PBS;第3组回输 1×10^6 个小鼠GPC3 CAR-T细胞,体系为200 μL PBS;第4组回输 1×10^6 个小鼠GPC3 CAR-T细胞和50 μg GA,体系为200 μL PBS。每2 d测量1次小鼠肿瘤大小,肿瘤体积公式为:体积= $0.52\times$ 长 \times 宽 2 。

另外,同批处理小鼠,回输CAR-T细胞后,第5天对小鼠实施安乐死,剥离肿瘤后,使用剪刀剪碎,IV型胶原酶消化1 h。800 \times g离心3 min后,收集上清液,使用红细胞裂解液去除红细胞后,进行抗体染色,通过流式细胞术检测肿瘤内免疫细胞中CAR-T细胞、内源性T细胞及自然杀伤(natural killer, NK)细胞的比例。

1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 5.01软件对实验数据进行分析。使用Shapiro-Wilk法进行正态性检验,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表述,两组间比较采用Student's t 检验。小鼠生存曲线用Kaplan-Meier方法来处理,生存数据分析用log-rank(Mantel-COX)检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建CAR-T细胞

将靶向小鼠GPC3和HER2的CAR序列构建到慢病毒载体pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP载

体上(图1A~1B),包装成慢病毒后,感染T细胞,分别构建小鼠GPC3 CAR-T和HER2 CAR-T细胞,其中,使用空载慢病毒感染的T细胞命名为空载T细胞。使用荧光观察,发现GPC3 CAR-T和HER2 CAR-T细胞具有较强的绿色荧光(图1C),通过流式细胞术检测,结果显示,HER2 CAR-T细胞阳性率在35%~40%之间,GPC3 CAR-T细胞阳性率在20%~25%之间(图1D~1E)。

2.2 GA对CAR-T细胞体外杀伤能力影响的检测

为检测GA对CAR-T细胞能力的影响,设置空载T细胞组、CAR-T细胞组以及与浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GA共培养的CAR-T细胞,在效靶比为1:1和2:1的情况下,分别检测GPC3 CAR-T细胞对Hepa1-6以及HER2 CAR-T细胞对H1299的杀伤能力,杀伤时间为12 h。

结果显示,在不同效靶比下,GA能够增强CAR-T细胞对靶细胞的杀伤能力(效靶比为1:1, $P<0.001$;效靶比为2:1, $P<0.001$;图2A~2B)。另外,实时检测杀伤实验中,描绘肿瘤细胞生长曲线,观察到在分别加入GA+CAR-T细胞和CAR-T细胞后,加入GA组CAR-T细胞能够有效地抑制肿瘤的生长(图2C~2D)。以上实验说明GA能够增强人源和鼠源CAR-T细胞的体外杀伤能力。

2.3 GA缓解CAR-T细胞衰老

衰老是影响CAR-T细胞抗肿瘤功能的因素之一,为探究GA对CAR-T细胞衰老的影响,我们检测了与GA共温育的小鼠GPC3 CAR-T细胞的衰老表型。结果显示,与GPC3 CAR-T相比,加入GA组CAR-T细胞表达较低水平的衰老相关分子p53 ($P<0.001$)、p21 ($P<0.001$)和 γ -H2AX ($P<0.001$,图3A~3B),且与GA共温育的CAR-T细胞表达较低水平的SA- β -gal ($P<0.001$,图3C~3D)和较高水平的低分化相关分子CCR7 ($P<0.001$,图3E~3F)。以上结果说明,GA可有效地缓解CAR-T细胞的衰老。另外,为探究GA缓解CAR-T细胞衰老的原因,我们使用含0.1% H_2O_2 的培养基培养CAR-T细胞,然后分别加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的GA进行处理,使用DCFH-DA染色后,采用流式细胞术检测ROS水平。结果显示,GA显著降低了CAR-T细胞ROS的释放水平,说明GA可能通过降低CAR-T细胞ROS水平,从而缓解CAR-T细胞衰老(图3G)。

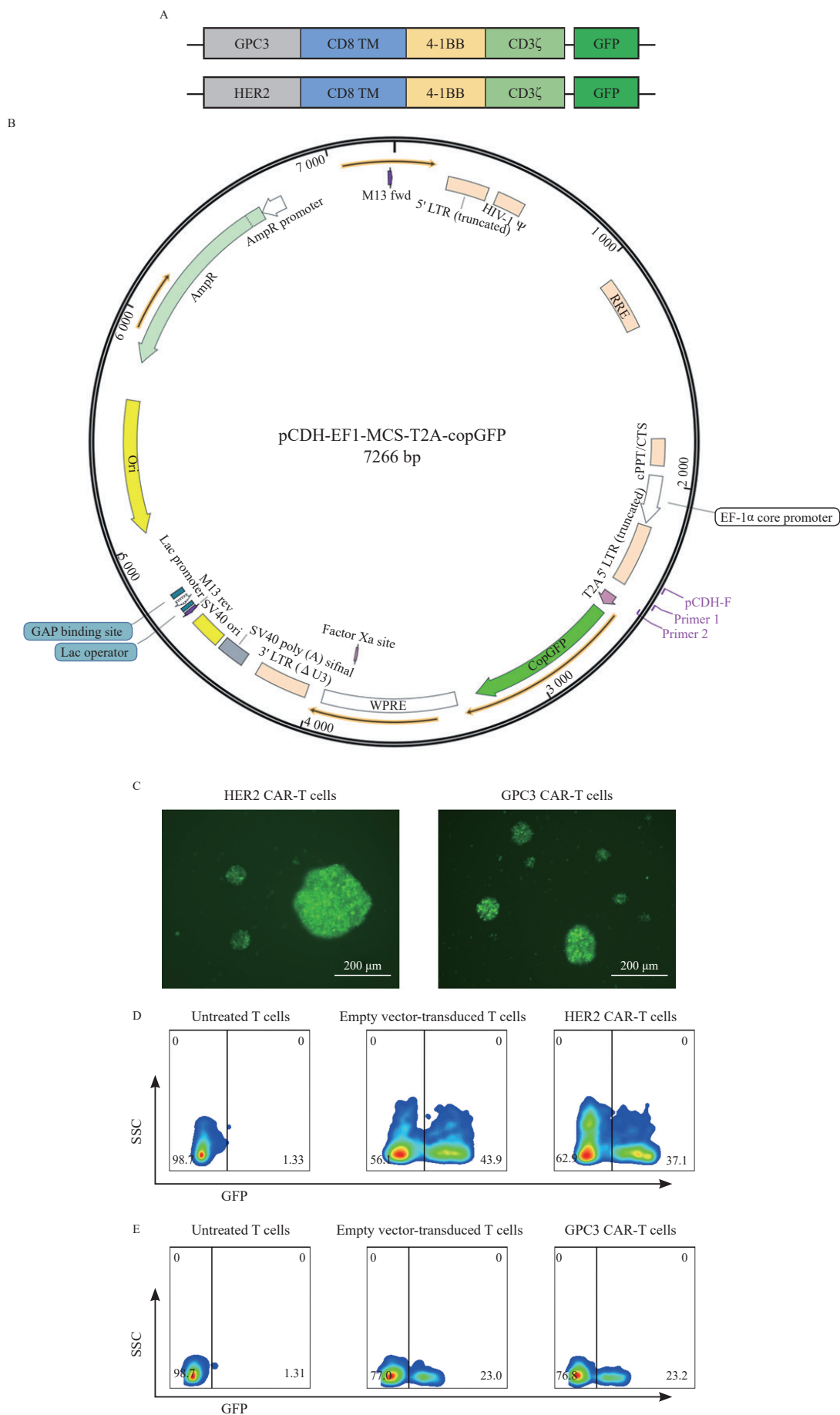


图1 CAR-T细胞构建

Fig. 1 The construction of CAR-T cell

A: The structure of GPC3 CAR and HER2 CAR; B: The lentiviral vector; C: The immunofluorescence image of CAR-T cells; D, E: The detection of positive rate by flow cytometry.

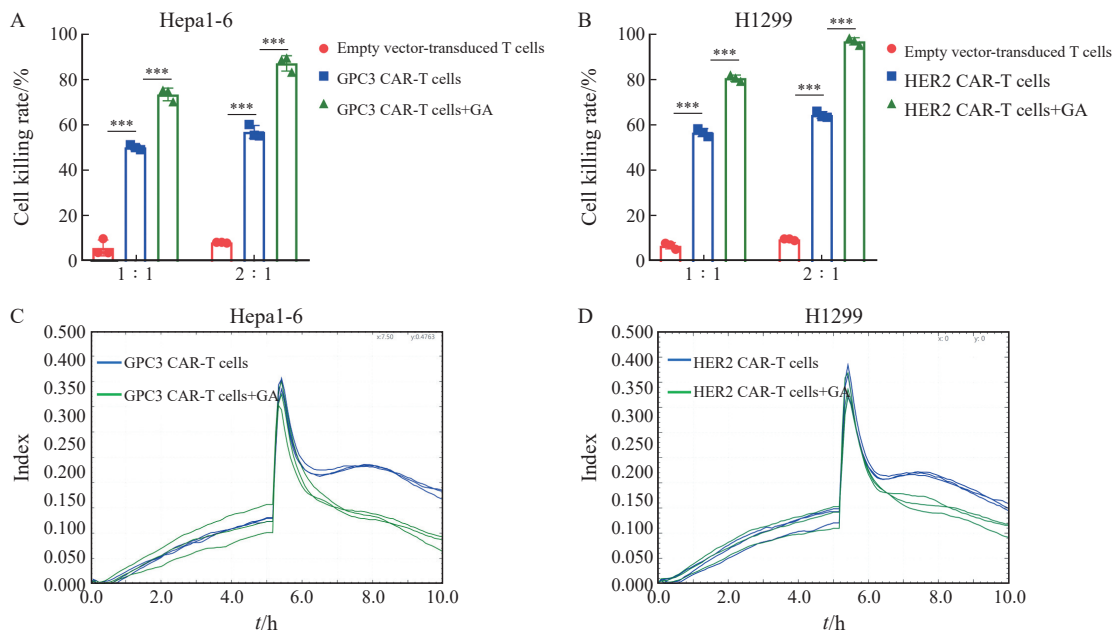


图2 LDH释放 (A、B) 和实时检测仪 (C、D) 检测GA对CAR-T细胞体外杀伤能力的影响

Fig. 2 LDH release (A, B) and real-time detection (C, D) to assess the effect of GA on the *in vitro* killing capacity of CAR-T cells

***: $P < 0.001$, compared with GPC3 CAR-T cell or HER2 CAR-T cell.

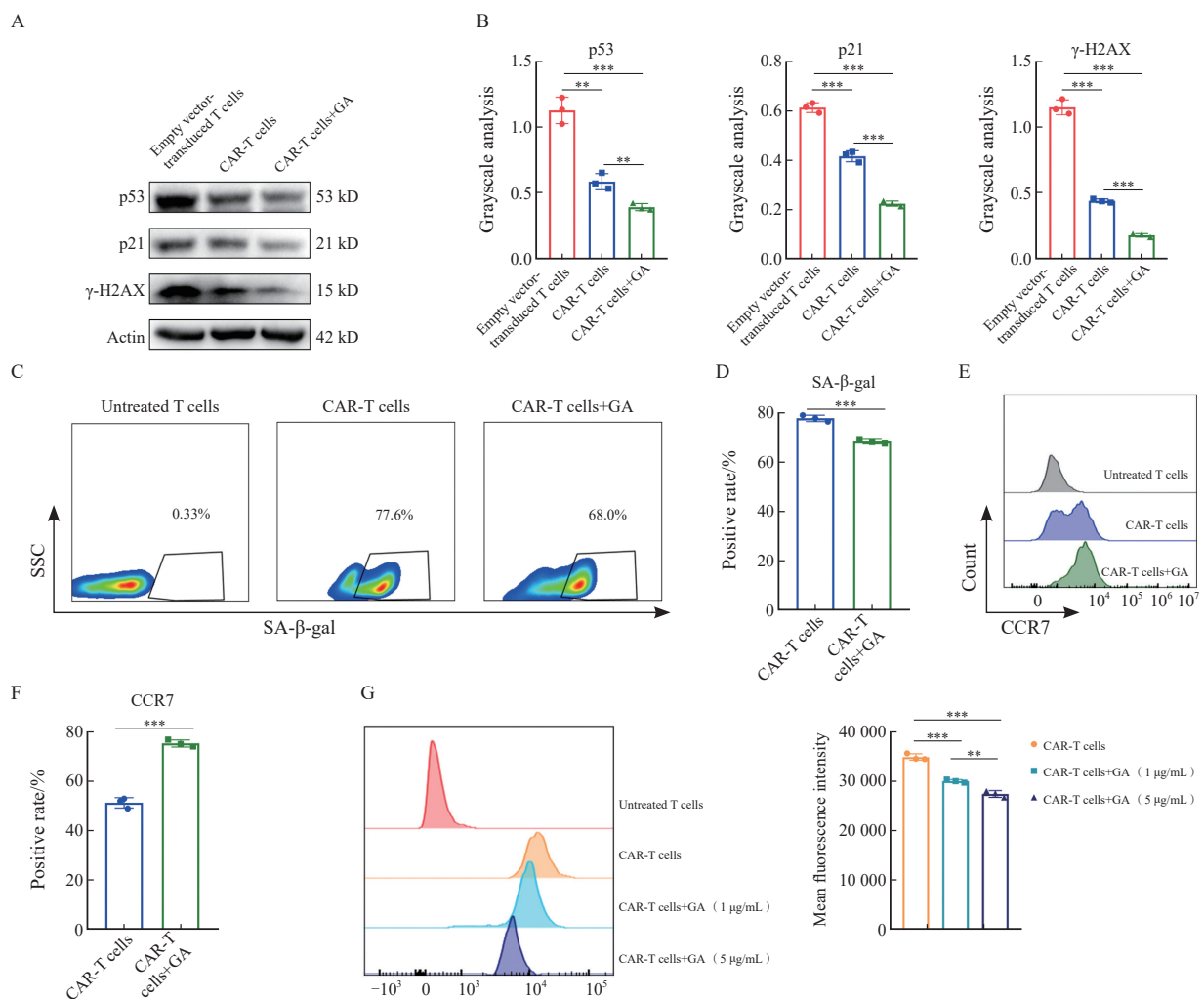


图3 WB和流式检测GA对小鼠GPC3 CAR-T细胞衰老相关分子p53、p21、 γ -H2AX (A、B)，SA- β -gal (C、D)，CCR7 (E、F)、ROS (G) 表达及释放水平的影响

Fig. 3 WB and flow cytometry were used to examine the effects of GA on the expression of senescence-related molecules (p53, p21, γ -H2AX) (A, B), SA- β -gal (C, D), CCR7 (E, F) and ROS (G) in mouse GPC3 CAR-T cells

** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$.

2.4 GA增强CAR-T细胞体内抗肿瘤功能

为了探究GA对CAR-T细胞体内抗肿瘤功能的影响, 我们构建了Hepa1-6小鼠肝癌细胞的移植瘤模型, 回输小鼠GPC3 CAR-T细胞或GA+GPC3 CAR-T细胞(图4A)。期间多次进行肿瘤测量统计, 其中PBS和空载T细胞注射组检测到15 d, 检测了7次, CAR-T回输组检测到23 d, 检测了11次, CAR-T+GA回输组检测到25 d, 检测了12次(图4B~4C)。结果显示, GA显著抑制了肿瘤的生长($P<0.01$, 图4B~4C), 并且延长了小鼠的生存期($P<0.001$, 图4D)。以上结果显示, GA可有效地增强CAR-T细胞的抗肿瘤作用。

2.5 GA提高肿瘤内免疫细胞的浸润数量

为进一步探究GA能否通过清除ROS等改善TME, 进一步增强CAR-T等免疫细胞的浸润, 我们建立了小鼠皮下移植瘤模型。回输GPC3 CAR-T细胞或GA+GPC3 CAR-T细胞后, 剥离肿瘤, 通过流式细胞术检测肿瘤内浸润的CAR-T细胞及内源性免疫细胞(T细胞和NK细胞)。结果显示, 与空载T细胞组及CAR-T细胞组相比, GA+CAR-T细胞组小鼠肿瘤内可见较高丰度的CAR-T细胞($P<0.001$)、 $CD4^+$ T细胞

($P<0.05$)、 $CD8^+$ T细胞($P<0.01$)和NK细胞($P<0.01$, 图5)。以上结果说明, GA能够改善TME, 提高CAR-T细胞和内源性免疫细胞的浸润比例。

3 讨 论

作为一种新兴的免疫疗法, CAR-T细胞疗法给广大患者带来了曙光, 尤其是针对血液系统恶性肿瘤。2017年以来, 国内外已有多款靶向CD19治疗B细胞淋巴瘤和BCMA治疗多发性骨髓瘤的CAR-T产品获批上市。靶向CD19分子治疗急性B淋巴细胞白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的完全缓解率已经超过传统靶向药物。尽管CAR-T细胞疗法在治疗血液系统恶性肿瘤方面展现出了良好的疗效, 但其在治疗实体瘤方面依旧进展缓慢。

CAR-T细胞在体外存活周期较短, 一般不超过1个月, 在体内半衰期较长, 长达数月, 有的能超过1年^[5, 22]。CAR-T细胞体内靶向肿瘤, 在抗原及免疫检查点分子配体的刺激下容易出现耗竭甚至失能, 同时也会出现衰老现象^[15]。T细胞衰老分为端粒缩短导致的自然衰老和细胞外多种应激因素导致的非端粒依赖性衰老。例如,

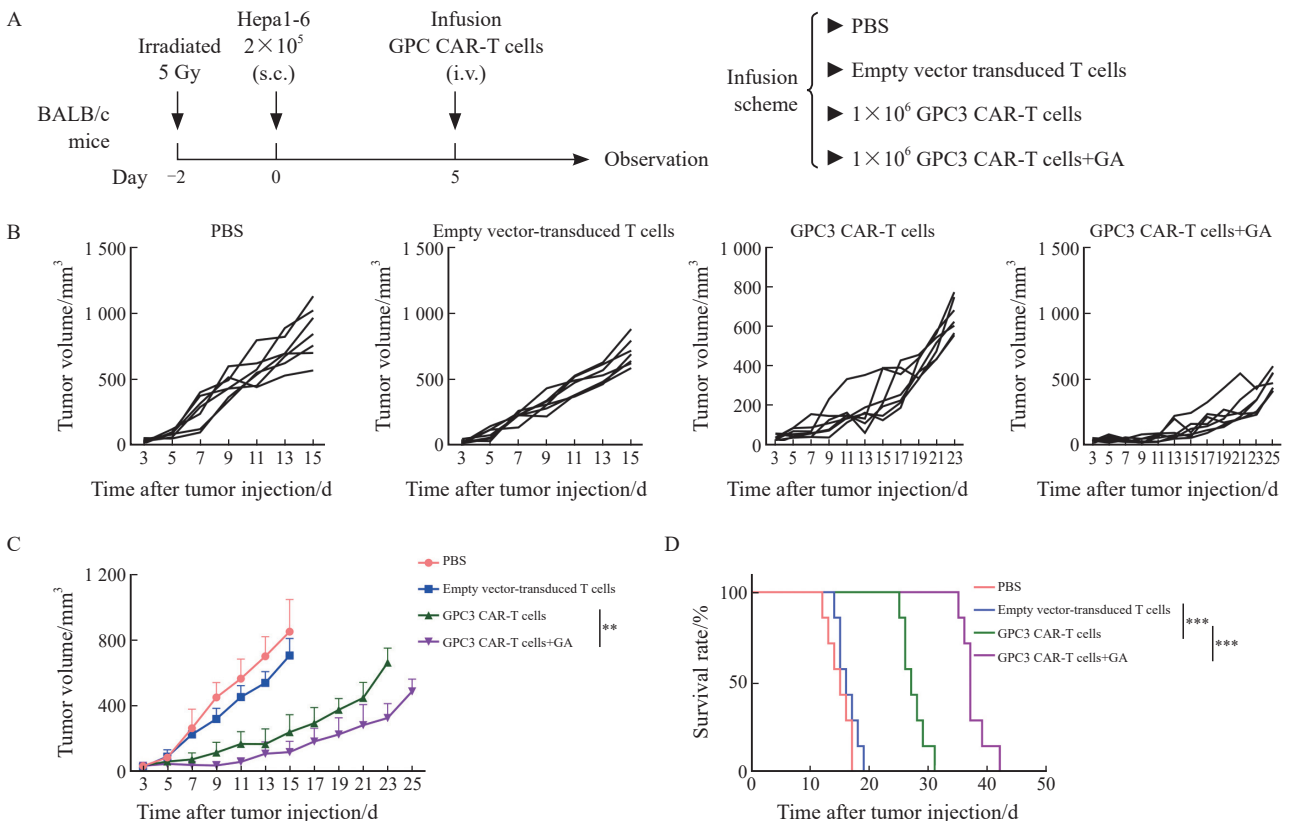


图4 GA对CAR-T细胞体内抗肿瘤作用的影响

Fig. 4 The effect of GA on the *in vivo* anti-tumor function of CAR-T cells

A: Experimental design; B, C: Tumor size was measured once every 2 d; D: Survival curve of tumor-bearing mice. **: $P<0.01$, compared with GPC3 CAR-T cell; ***: $P<0.001$, compared with GPC3 CAR-T cell.

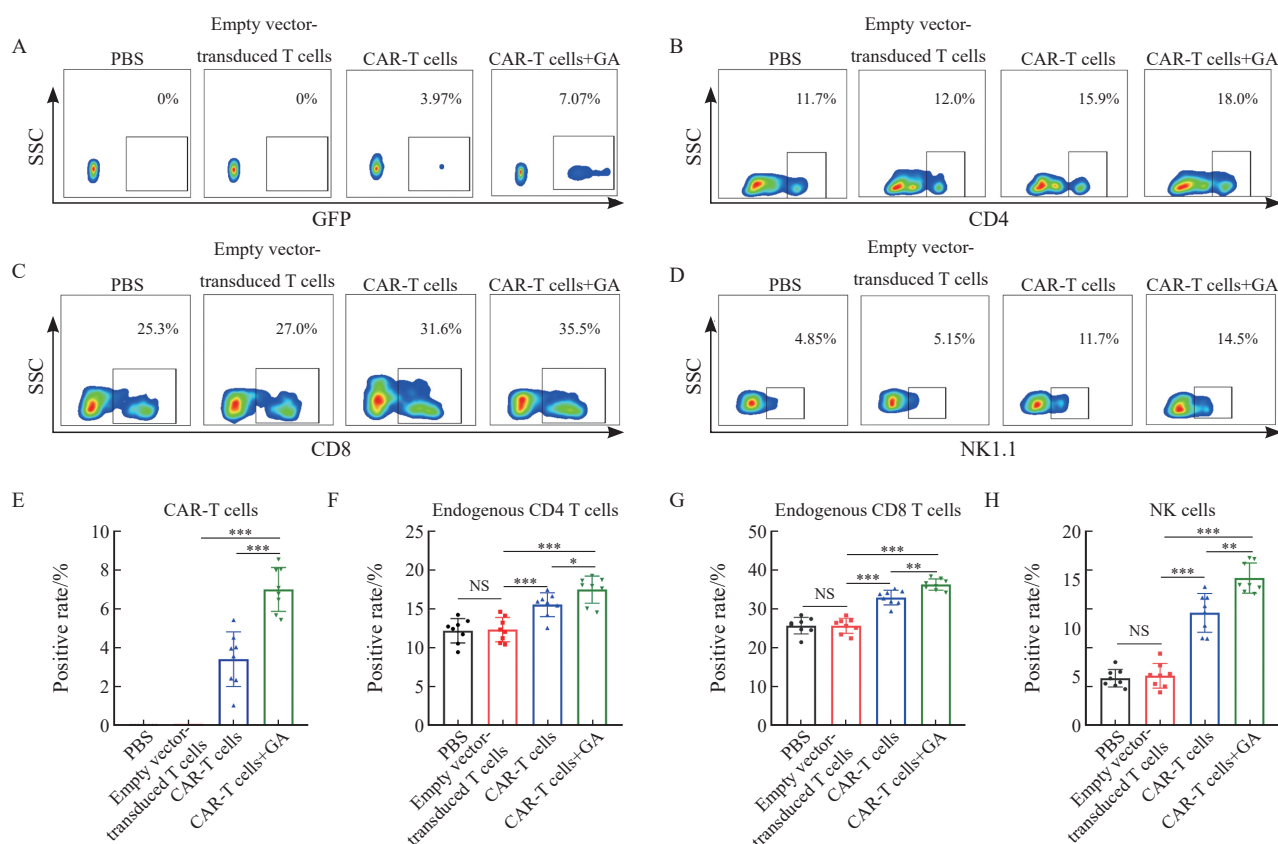


图5 流式细胞术检测GA对TME中CAR-T细胞 (A、E)、CD4⁺ T细胞 (B、F)、CD8⁺ T细胞 (C、G) 和NK细胞 (D、H) 浸润比例的影响

Fig. 5 Flow cytometry analysis of the effects of GA on the infiltration ratios of CAR-T cells (A, E), CD4⁺ T cells (B, F), CD8⁺ T cells (C, G), and NK cells (D, H) in the TME

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. NS: No significance.

CD4辅助T细胞和CD8杀伤T细胞在Treg细胞的刺激下，通过代谢紊乱促进DNA损伤，从而导致衰老^[23]。与耗竭和失能不同，T细胞衰老理论上不可逆转，因此衰老是限制T细胞发挥作用的重要因素之一^[15]。

依赖天然的抗炎和抗氧化功效，GA在治疗各种慢性疾病和肿瘤性疾病中发挥了重要作用^[18-21]。GA可通过清除ROS，包括超氧阴离子自由基和羟基自由基等调控细胞增殖和分化，另外GA可清除TME中的ROS和调控GSH，改善TME，为靶向药物治疗肿瘤奠定了基础。基于此，我们设想通过GA改善TME，增强CAR-T细胞的抗肿瘤功效。有研究^[24-26]表明，GA不但能通过改善TME，增强CAR-T细胞的浸润能力，同时能够提高内源性免疫T细胞和NK细胞的浸润数量，极大地强化CAR-T细胞的抗肿瘤作用，抑制肿瘤细胞的生长。令人振奋的是，本研究显示，与GA共温育的CAR-T细胞衰老相关分子p53、p21和 γ -H2AX的表达水平下降，且SA- β -gal释放水平降低，说明GA能够缓解甚至抑制CAR-T细胞的衰老。

本研究存在一定的局限性。首先，未能详

尽阐述GA缓解CAR-T细胞衰老的机制，且未在小鼠体内验证人源CAR-T细胞的抗肿瘤能力；其次，关于GA对CAR-T细胞其他表型如耗竭等的影响，未进行分析，没有对比GA对CAR-T细胞衰老和耗竭的影响。后期研究可详尽阐述GA对CAR-T细胞耗竭的影响，以及GA增强CAR-T细胞抗肿瘤作用的具体机制，如衰老、耗竭或记忆表型等。

综上所述，本研究发现GA能够缓解CAR-T细胞衰老，增强CAR-T细胞抗肿瘤作用，为临床上CAR-T细胞疗法用于治疗实体瘤提供了重要的参考依据，也为未来的研究奠定了坚实的基础。

第一作者:

孙大玮 (ORCID: 0009-0003-4030-4658), 学士, 主管技师。

通信作者:

张显政 (ORCID: 0009-0001-7389-5934), 博士, 副教授, E-mail: 13356662952@163.com。

作者贡献声明:

孙大玮: 构思和设计实验, 负责大部分实验过程, 分析数据, 撰写文章; 于金玉: 进行部分流式实验; 张

鑫: 构建CAR载体; 赵松柏: 提供经费, 负责部分流式实验和分析, 以及部分动物实验; 张显政: 指导课题及实验的完成, 修改文章。

[参 考 文 献]

- [1] PARK J H, RIVIÈRE I, GONEN M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia [J] . *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 449–459.
- [2] SCHUSTER S J, BISHOP M R, TAM C S, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma [J] . *N Engl J Med*, 2019, 380(1): 45–56.
- [3] FRAIETTA J A, LACEY S F, ORLANDO E J, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia [J] . *Nat Med*, 2018, 24(5): 563–571.
- [4] 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): 1509–1518.
- [5] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J] . *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507–1517.
- [6] ZHAO Y, CHEN J Q, ANDREATTA M, et al. IL-10-expressing CAR T cells resist dysfunction and mediate durable clearance of solid tumors and metastases [J] . *Nat Biotechnol*, 2024, 42(11): 1693–1704.
- [7] XIAO Z B, TODD L, HUANG L, et al. Desmoplastic stroma restricts T cell extravasation and mediates immune exclusion and immunosuppression in solid tumors [J] . *bioRxiv*, 2023.
- [8] ALBELDA S M. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn [J] . *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(1): 47–66.
- [9] KHOSRAVI G R, MOSTAFAVI S, BASTAN S, et al. Immunologic tumor microenvironment modulators for turning cold tumors hot [J] . *Cancer Commun*, 2024, 44(5): 521–553.
- [10] LU Y, ZHENG J R, LIN P, et al. Tumor microenvironment-derived exosomes: a double-edged sword for advanced T cell-based immunotherapy [J] . *ACS Nano*, 2024, 18(40): 27230–27260.
- [11] ZHOU L Y, YI M. Editorial: Harnessing tumor microenvironment for gynecologic cancer therapy [J] . *Front Immunol*, 2024, 15: 1407128.
- [12] GANJALIKHANI-HAKEMI M, YANIKKAYA DEMIREL G, HE X, et al. Editorial: immunologic tumor microenvironment modulators for turning “cold” tumors to “hot” tumors [J] . *Front Immunol*, 2024, 15: 1425136.
- [13] YAO L, ZHU X, SHAN Y Y, et al. Recent progress in anti-tumor nanodrugs based on tumor microenvironment redox regulation [J] . *Small*, 2024, 20(25): e2310018.
- [14] ROSENQUIST R, DAVI F, GHIA P. The microenvironment in lymphomas: dissecting the complex crosstalk between tumor cells and ‘by-stander’ cells [J] . *Semin Cancer Biol*, 2014, 24: 1–2.
- [15] KASAKOVSKI D, XU L, LI Y Q. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies [J] . *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 91.
- [16] TOWERS R, TROMBELLO L, FUSENIG M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells obstruct AML-targeting CD8⁺ clonal effector and CAR T-cell function while promoting a senescence-associated phenotype [J] . *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 73(1): 8.
- [17] ALEKSANDROVA K, LEISE J, PRIESNER C, et al. Functionality and cell senescence of CD4/CD8-selected CD20 CAR T cells manufactured using the automated CliniMACS prodigy[®] platform [J] . *Transfus Med Hemother*, 2019, 46(1): 47–54.
- [18] WONG T S, MOHAMED TAP F, HASHIM Z, et al. Dual actions of gallic acid and andrographolide trigger AdipoR1 to stimulate insulin secretion in a streptozotocin-induced diabetes rat model [J] . *J Tradit Complement Med*, 2023, 13(1): 11–19.
- [19] BARAN C P, ZEIGLER M M, TRIDANDAPANI S, et al. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes [J] . *Curr Pharm Des*, 2004, 10(8): 855–866.
- [20] DENG B L, YANG B L, CHEN J Q, et al. Gallic acid induces T-helper-1-like T(reg) cells and strengthens immune checkpoint blockade efficacy [J] . *J Immunother Cancer*, 2022, 10(7): e004037.
- [21] HUANG Q Q, JIANG X Y, WANG B X, et al. Gallic acid enhances GVL effects of T cells without exacerbating GVHD after haematopoietic stem cell transplantation [J] . *Br J Haematol*, 2025, 206(1): 120–132.
- [22] GARDNER R A, FINNEY O, ANNESLEY C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults [J] . *Blood*, 2017, 129(25): 3322–3331.
- [23] CRISTOFALO V J, LORENZINI A, ALLEN R G, et al. Replicative senescence: a critical review [J] . *Mech Ageing Dev*, 2004, 125(10/11): 827–848.
- [24] MA M, LI X, ZHONG M, et al. Galloylated toll-like receptor 7/8 agonist nanovaccine for enhanced tumor antigen delivery in personalized immunotherapy [J] . *ACS Nano*, 2025, 19(12): 11900–11912.
- [25] DEDOUSSIS G V, KALIORA A C, ANDRIKOPOULOS N K. Effect of phenols on natural killer (NK) cell-mediated death in the K562 human leukemic cell line [J] . *Cell Biol Int*, 2005, 29(11): 884–889.
- [26] NEO S Y, SIEW Y Y, YE W H C, et al. Effects of *Leea indica* leaf extracts and its phytoconstituents on natural killer cell-mediated cytotoxicity in human ovarian cancer [J] . *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 79.

(收稿日期: 2025-07-18 修回日期: 2025-10-30)

(责任编辑: 李广涛)