

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.006

· 基础研究 ·

CRISPR/Cas9 介导的 PD-1 基因敲除对食蟹猴 T 细胞增殖、表型及 IFN- γ 和 IL-2 分泌的影响

缪怡¹, 董坚², 角德灵³, 高嫦娥², 张超¹ (1. 曲靖市第一人民医院 肿瘤科, 云南 曲靖 655000; 2. 昆明医科大学第三附属医院 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 云南 昆明 650118; 3. 云南农业大学 生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650201)

[摘要] **目的:** 探讨 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除食蟹猴 T 细胞 PD-1 基因对 T 细胞增殖、表型及 IFN- γ 、IL-2 分泌的影响。**方法:** 设计靶向食蟹猴 PD-1 基因的 gRNA, 构建并提取质粒, 分离食蟹猴外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 加入质粒 DNA, 用 Lonza 4D 电转仪进行细胞转染, 转染 48 h 后用流式细胞术和荧光显微镜技术检测转染效率。提取细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增及 T7E1 酶切鉴定。在人源性 CD3 抗体和 IL-2 刺激下诱导食蟹猴 T 细胞增殖并绘制细胞生长曲线, PI 染色流式细胞术检测 T 细胞的细胞周期及 CD4、CD8 表达水平, ELISA 检测 IFN- γ 、IL-2 的分泌水平。**结果:** 转染 48 h 后, 荧光显微镜下见实验组出现绿色荧光蛋白表达的细胞, 其转染效率为 (21.6 \pm 3.2)%; 实验组细胞基因组 DNA PCR 产物经 T7E1 酶切显示 3 条带, 出现目的分裂条带 (243、197 bp)。与未转染组比较, (1) 实验组 T 细胞增殖缓慢、集落形成时间延迟、细胞体积较小、折光性较弱; (2) 实验组处于 G0/G1 期的 T 细胞数显著增多 ($P < 0.05$)、G2/M 期细胞数显著减少 ($P < 0.05$); (3) 实验组 T 细胞 IFN- γ 、IL-2 的分泌水平显著升高 (均 $P < 0.05$), 但 CD4、CD8 表达水平比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论:** PD-1 基因敲除可使食蟹猴 T 细胞阻滞于 G0/G1 期从而抑制其增殖, 同时上调了 IFN- γ 、IL-2 的分泌水平。

[关键词] 程序性死亡受体 1; 食蟹猴; CRISPR/Cas9 基因编辑技术; 基因敲除; T 细胞; 增殖

[中图分类号] R730.51; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)07-0757-07

Effect of CRISPR/Cas9-mediated PD-1 gene knockout on proliferation, phenotype, IFN- γ and IL-2 secretion of T cells in Cynomolgus monkeys

MIAO Yi¹, DONG Jian², JIAO Deling³, GAO Change², ZHANG Chao¹ (1. Department of Oncology, Qujing First People's Hospital, Qujing 655000, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of Cell Therapy Technology and Translational Medicine of Yunnan Province, the Third Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China; 3. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Biological Resources, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of CRISPR/Cas9 gene editing mediated PD-1 knockdown on the proliferation, phenotype, IFN- γ and IL-2 secretion of T cells in Cynomolgus monkeys. **Methods:** gRNA targeting PD-1 gene of Cynomolgus monkey was designed, and the corresponding plasmid was constructed and extracted. peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of Cynomolgus monkeys were isolated, and plasmid DNAs were added for transfection by using Lonza 4D electrorotometer. FACS analysis and fluorescence microscopy were used to detect transfection efficiency at 48 h after transfection. Genomic DNA of T cells was extracted for PCR amplification and T7E1 digestion identification. The proliferation of T cells was induced under the stimulation of human CD3 antibody and IL-2, and the cell growth curve was drawn. PI staining flow cytometry was used to detect cell cycle and the expression levels of CD4 and CD8, and ELISA was used to detect the secretion of IFN- γ and IL-2. **Results:** At 48 h after transfection, the cells with green fluorescent protein expression in experimental group were observed under fluorescence microscopy with a transfection efficiency of (21.6 \pm 3.2)%. T7E1 enzyme digestion results showed that the PCR product of genomic DNA of cells in experimental group showed 3 bands after digestion, including the target cleavage bands (243, 197 bp). Compared with non-transfected cells, the cells in

[基金项目] 云南省科技计划重大项目资助 (No. 2016FC007); 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室资助 (No. 2015DG034)。Project supported by the Key Foundation of Science and Technology Program in Yunnan Province (No. 2016FC007), and the Key Laboratory of Cell Therapy Technology and Translational Medicine of Yunnan Province (No. 2015DG034)

[作者简介] 缪怡 (1991-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: 605223269@qq.com

[通信作者] 董坚 (DONG Jian, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: dongjian18@yahoo.com

experimental group exhibited slow proliferation, delayed colony formation, with small volume and weak refraction; the number of T cells at G0/G1 phase of the experimental group was significantly increased ($P<0.05$), while the number of cells at G2/M phase was significantly reduced ($P<0.05$); and the secretion levels of IFN- γ and IL-2 in the cells of the experimental group increased significantly (both $P<0.05$). However, the difference in the expression levels of CD4 and CD8 was not statistically significant between the two groups (both $P>0.05$). **Conclusion:** PD-1 gene knockout can arrest T cells in Cynomolgus monkey at G0/G1 phase, thereby inhibiting its proliferation and increasing the secretion of IFN- γ and IL-2 in the meanwhile.

[Key words] programmed death receptor 1 (PD-1); Cynomolgus monkey; CRISPR/Cas9 gene editing technique; gene knockout; T lymphocyte; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(7): 757-763. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.07.006]

肿瘤免疫治疗已经成为继手术、化疗、放疗之后一种有效的疗法,如治疗复发或难治性大B细胞淋巴瘤的CAR-T细胞疗法KTE-19^[1]已获美国FDA批准。程序性死亡受体1(programmed death receptor 1,PD-1)/程序性死亡受体-配体1(programmed death receptor-ligand 1,PD-L1)已成为新的肿瘤免疫治疗靶点。许多肿瘤细胞表达PD-L1,其与T细胞中PD-1结合,引起肿瘤微环境中PD-1/PD-L1通路的持续激活,使T细胞功能被抑制而不能攻击和杀伤肿瘤细胞^[2-4],因此阻断PD-1/PD-L1通路、增强T细胞功能成为肿瘤免疫治疗的新策略^[5]。目前PD-1或PD-L1抗体在临床肿瘤免疫治疗中取得了很好的进展^[6-7]。如PD-1抑制剂纳武单抗(nivolumab)治疗黑色素瘤^[8];派姆单抗(pembrolizumab)使晚期黑色素瘤患者的生存期显著延长^[9];纳武单抗治疗后,使难治性食管癌患者的客观缓解率达17%^[10];PD-1抗体能控制24%顽固性非小细胞肺癌患者^[11]。然而这些抗体存在价格昂贵、作用时间短、不易联合使用的缺点。因此利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除T细胞的PD-1基因来阻断PD-1/PD-L1通路,可能是一种有效的治疗方式^[12-13]。基因修饰的T细胞能否直接应用于临床,其安全性尚存在争议。为阐明基因修饰的T细胞在肿瘤免疫治疗中的安全、有效性,本研究选择在亲缘关系上与人类比较接近的食蟹猴^[14],利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除食蟹猴T细胞中PD-1基因,观察PD-1基因敲除对T细胞功能的影响,以期建立利用CRISPR/Cas9靶向T细胞PD-1进行肿瘤细胞免疫治疗的

方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

食蟹猴血样本由云南英茂公司小哨实验动物基地提供。大肠杆菌菌种(Trans-5 α 感受态细胞)购自全式金公司(CD501-3),打靶质粒载体骨架pST1374和pGL3-U6购自Addgene网站,猴外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司,植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)购自泽浩公司,胎牛血清(fetal calf serum,FBS)购自BI公司,RPMI 1640培养液购自百特公司,注射用重组人IL-2购自江苏金丝利药业有限公司, Taq聚合酶、10 \times Taq Buffer、dNTPs均购自TaKaRa公司,Percep-CD3、FITC-CD4和PE-CD8抗体均购自BD公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG抗体购自Santa Cruz公司,质粒大提试剂盒购自QIAGEN公司,基因组DNA抽提试剂盒、2 000 bp DNA Marker均购自康为公司,细胞周期检测试剂盒购自碧云天公司,ELISA试剂盒购自R&D公司。

1.2 靶向食蟹猴PD-1基因的gRNA的设计和选择

从GenBank查询获得食蟹猴PD-1基因的详细序列信息NC_022283.1,根据CRISPR/Cas9靶点设计原则,利用gRNA在线设计工具(<http://crispr.mit.edu>)设计并筛选出靶向PD-1基因的sgRNA片段并进行脱靶分析,通过NCBI BLAST,从中挑选出特异性强的2条sgRNA(Sg1和Sg2)均位于第二外显子区域(图1)。

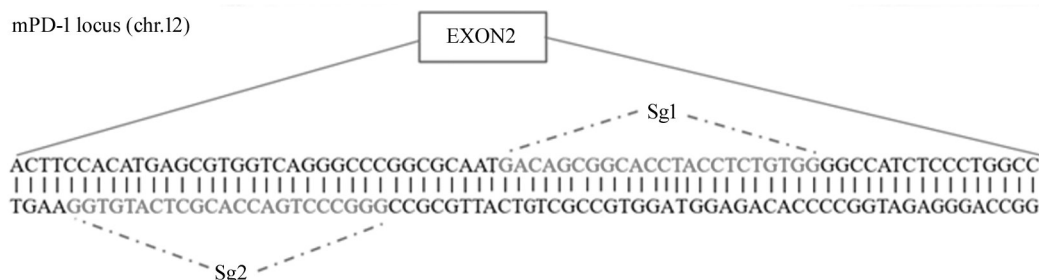


图1 靶向PD-1基因靶点位置示意图
Fig.1 Schematic diagram of targeting site on PD-1

1.3 质粒构建、提取及转染

本实验所用的 Cas9 表达载体骨架为 pST1374-Cas9-GFP, sgRNA 表达载体骨架为 pGL3-U6-sgRNA, 根据所设计的 2 条 sgRNA 序列, 添加 PGL3-U6-sgRNA 载体的 *Bsa*I 酶切黏性末端后送交昆明硕擎生物公司尤其合成。将 sgRNA 片段进行 PCR 退火, 使其碱基互补配对后形成双链短 DNA 序列, 再通过 T4 连接酶 (NEB, M0202L) 连接 (25 °C 2 h) 到载体。通过分子克隆的方法将上述连接产物转化到 Trans-5 α 感受态细胞中, 均匀涂板后置于培养箱中 37 °C 过夜培养。挑取单克隆进行菌液 PCR 验证。采用去内毒素质粒大提试剂盒提取质粒, 用于细胞转染。

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离获得食蟹猴外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 后, PBS 清洗细胞 2 遍, 250 \times g 离心 10 min, 收集细胞并调整细胞密度, 电转过程按照 Lonza 官网提供的方案完成。转染体系: 电转液 A 82 μ l、电转液 B 18 μ l、细胞数 1.5×10^6 。实验分组: 空白组 (未转染)、空质粒组 (转染 Pmax) 和实验组 (转染 Cas9+sgRNA)。将质粒 DNA 加入到转染体系中 [空质粒组: 4 μ l Pmax; 实验组: 10 μ g pST1374-Cas9-GFP+5 μ g pGL3-U6-mPD1-sg(1+2)], 混匀后的转染体系轻轻重悬细胞沉淀, 再转移至电极杯中, 切勿产生气泡。采用 4D 电转仪以 Program EH-100 进行电击, 后取 500 μ l 新鲜预热培养基 (不含抗生素) 重悬细胞, 接种于 12 孔板中培养。转染后 24 h 换液, 采用 RPMI 1640 完全培养基培养, 并加入 PHA、人源性 CD3 抗体在 IL-2 持续刺激下诱导 T 细胞增殖, 倒置显微镜下观察细胞的形态及生长状况并计数、绘制细胞生长曲线。转染后 48 h, 倒置荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白表达情况, 并进行图像采集、分析。同时收集细胞, 加入 PBS 液清洗细胞, 以 800 \times g 离心 10 min, 去除细胞碎片, 再加入 300 μ l PBS 制成 1×10^6 细胞悬液, 上流式细胞仪检测细胞的转染效率。

1.4 RT-PCR 扩增及 T7E1 酶切法鉴定转染细胞中 PD-1 突变情况

转染后第 7 天收集细胞, 提取基因组 DNA, 以该 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物序列: mPD-1 F 为 5'-GCAACCTCAATCCCTAAAGC-3', R 为 5'-TCTCTC-GCCACTGGAAATC-3'。PCR 反应体系: 上下游引物、DNA 模板各 1 μ l, ES Taq 酶 10 μ l, 加 ddH₂O 7 μ l 至总体系 20 μ l, 上 PCR 仪扩增 (95 °C 变性 3 min, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环)。将 PCR 产物进行 T7E1 酶切验证敲除情况, T7E1 酶切体系: PCR 产物 5 μ l, T7E1 缓冲液 1.1 μ l, 加 ddH₂O 4.4 μ l 至总体系 10.5 μ l, 在该反应体系中加入 0.5 μ l T7E1

酶, 37 °C 孵育 30 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。

1.5 Western blotting (WB) 检测 T 细胞中 PD-1 蛋白的表达水平

于培养第 14 天离心收集细胞, 提取 T 细胞总蛋白, 经 SDS-PAGE、转膜后, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 PD-1 抗体 (1:500), 4 °C 封闭过夜。次日洗膜后, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:2000), 室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后加入曝光液进行显影, 在光学显微镜下拍照, 以 β -actin 为内参, 分析蛋白条带的灰度值。

1.6 流式细胞术检测食蟹猴 T 细胞的细胞周期

于培养第 14 天离心收集细胞, 加入 3 ml 预冷 (4 °C) 的 PBS 重悬细胞, 洗涤 1~2 次, 弃上清, 残留约 500 μ l PBS 重悬细胞, 混匀后再逐滴加入 4.5 ml 70% 的预冷 (-20 °C) 乙醇, 4 °C 避光过夜固定。次日, 500 \times g 离心 5 min, 弃乙醇, 再加入 3 ml 预冷 PBS 重悬细胞, 洗涤 2 次, 吸净上清, 加入 500 μ l PI 染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 室温避光孵育 30 min 后, 上流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.7 流式细胞术检测食蟹猴 T 细胞表面分子标志 CD4 和 CD8 的表达水平

于培养第 14 天离心收集细胞, PBS 清洗后, 取 1×10^6 个细胞分别加入 1:100 稀释的 Percp-CD3、FITC CD4 和 PE-CD8 抗体各 5 μ l, 混匀后, 室温避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测细胞表面分子标志 CD4 和 CD8 的表达水平。

1.8 ELISA 检测食蟹猴 T 细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的分泌水平

收集各组培养 2 周后的细胞上清液, 以 1000 \times g 离心 20 min, 去除悬液中的细胞及碎片, 小心吸取上清液, 用 ELISA 检测试剂盒的方法检测 T 细胞中 IFN- γ 和 IL-2 的分泌水平。

1.9 统计学处理

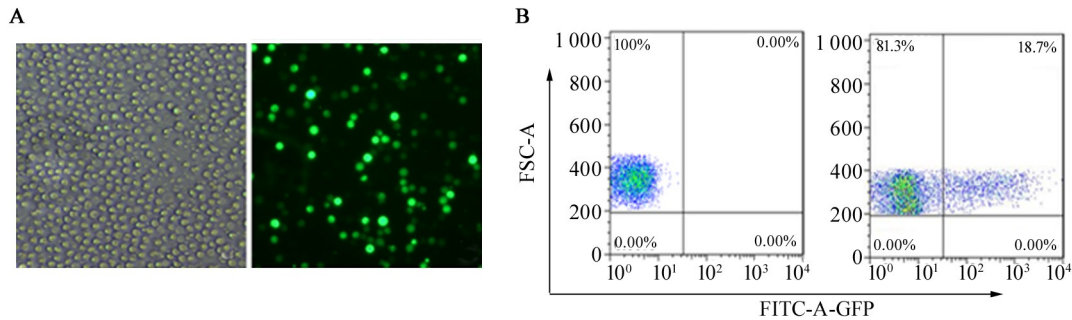
流式细胞术、WB、RT-PCR、ELISA 等实验均重复 3 次。采用 SPSS 19.0 统计学软件对实验数据进行统计分析, 用 GraphPad Prism 软件绘制细胞生长曲线。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功将靶向 PD-1-sgRNA 和 Cas9 质粒转染进食蟹猴 PBMC 细胞中

转染后 48 h 时, 倒置荧光显微镜下见实验组出现绿色荧光蛋白表达的细胞 (图 2A), 而未转染组及空载组细胞未见绿色荧光蛋白表达, 经流式细胞仪

检测其转染效率为(21.6±3.2)% (图2B)。实验结果表明,质粒有效地转染到食蟹猴PBMC细胞中。



A: The GFP expression in Cynomolgus monkey PBMCs (a: White light, b: Fluorescent light; ×200);
B: Transfection efficiency of PBMCs was measured by Flow cytometry

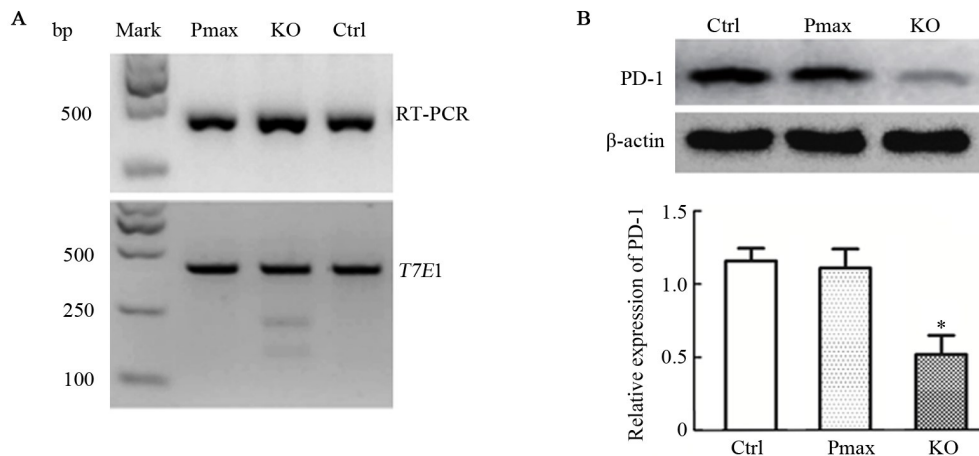
图2 转染后48 h食蟹猴PBMC中绿色荧光蛋白的表达

Fig.2 Expression of green fluorescent protein in PBMCs of Cynomolgus monkeys at 48 h after transfection

2.2 成功下调食蟹猴T细胞PD-1蛋白的表达水平

RT-PCR扩增及T7E1酶切检测结果(图3)显示,转染Pmax空载及野生型T细胞基因组DNA的PCR产物经T7E1酶切后只有1条带,说明在靶位点附近无突变产生;而转染Cas9+sgRNA表达载体的T细胞基因组DNA的PCR产物经T7E1酶切后显示3条带,出现了目的分裂条带(243、197 bp),说明所构建的CRISPR/Cas9敲除系统已在食蟹猴T细胞上发生敲

除,但只是部分细胞产生了突变(图3A)。WB检测结果(图3B)显示,3组细胞均检测到分子量约34 000的蛋白表达,内参照β-actin条带位于分子量42 000处,与预期结果相符,但转染Cas9+sgRNA表达载体的T细胞PD-1蛋白的表达水平明显低于空载组及野生型的T细胞(均P<0.05)。结果表明,发生突变的食蟹猴T细胞成功下调了PD-1蛋白的表达水平。



*P<0.05 vs Ctrl T cells

A: RT-PCR amplification and T7E1 enzyme digestion analysis of T cell genomic DNA; B: PD-1 expression in T cells was detected by WB. Mark: 2 000 bp DNA marker; Pmax: Transfected empty plasmid group; KO: Transfected Cas9+sgRNA group; Ctrl: The control group

图3 T细胞PD-1基因敲除的鉴定

Fig.3 Identification of PD-1 gene knockout in T cells

2.3 PD-1敲除抑制食蟹猴T细胞的增殖

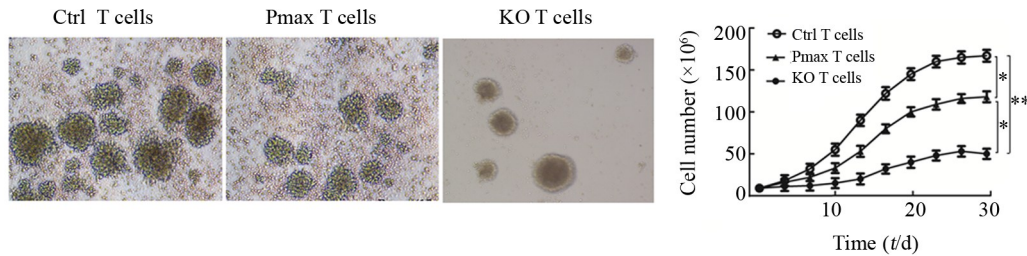
(1)细胞形态:与未转染组比较,实验组及空载组细胞体积较小、折光性较弱。实验组T细胞培养第14天开始由圆形向分叶形分化,而未转染组及空载组细胞培养第7天即由圆形向分叶形分化。

(2)细胞增殖:未转染组细胞培养第3天开始形

成大量集落,随着培养天数的增加,细胞集落逐渐增多变大,培养第5天时细胞彼此靠近的集落完全汇合、连接成片,可进行传代培养,细胞数量多,折光性强;空载组细胞培养第5天开始形成集落,随着培养天数的增加,细胞集落逐渐增多变大,培养第7天可进行传代培养,细胞数量较未转染组少;转染组细胞

集落形成时间延迟, 培养第7天才开始形成少量集落, 细胞数量少, 增殖缓慢, 培养第14天可进行传代培养。从生长曲线可以看出, 野生型细胞的生长速

度最快, 空载组次之, 实验组细胞的生长速度明显低于野生型及空载组细胞, 3 者生长曲线都呈S形, 符合 Logistic 的生长曲线(图4)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.05$

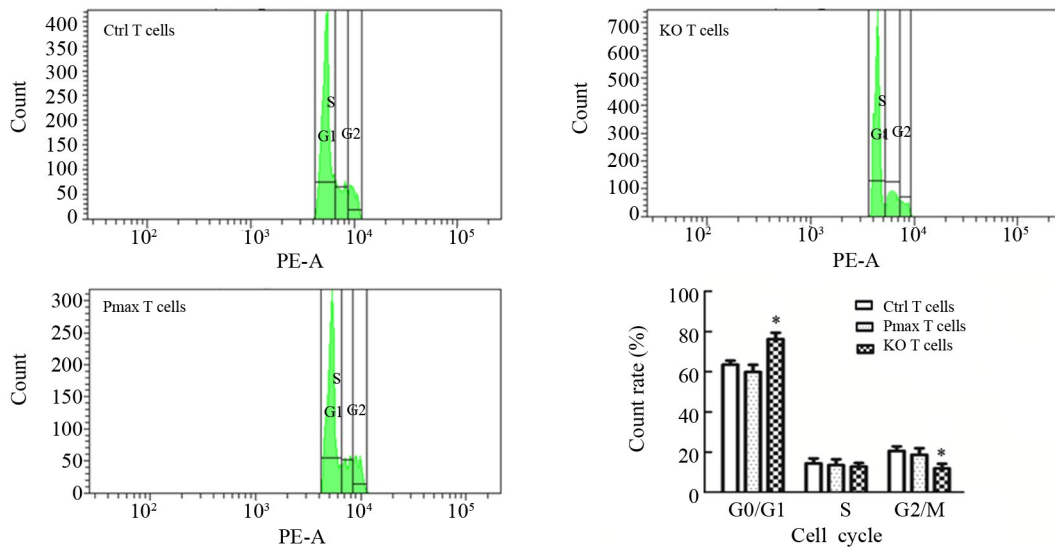
图4 PD-1 敲除对食蟹猴 T 细胞增殖的影响($\times 100$)

Fig.4 Effect of PD-1 knockout on T cell proliferation in Cynomolgus monkeys ($\times 100$)

2.4 PD-1 敲除阻滞食蟹猴T细胞于G0/G1期

流式细胞术检测结果(图5)显示, 实验组处于G0/G1期的细胞数高于未转染组($P < 0.05$), 处于G2/M期的细胞数低于未转染组($P < 0.05$); 处于S期的细胞数较未转染组无明显变化($P < 0.05$); 空载组处于

G0/G1期、S期、G2/M期的细胞数较未转染组均无明显变化(均 $P > 0.05$)。实验结果表明, PD-1 基因敲除可使食蟹猴T细胞阻滞于G0/G1期, 从而抑制细胞的增殖能力。



* $P < 0.05$ vs Ctrl or Pmax T cells

图5 PD-1 敲除阻滞食蟹猴T细胞于G0/G1期

Fig.5 PD-1 knockout arrested Cynomolgus monkey T cells at G0/G1 phase

2.5 PD-1 敲除后对食蟹猴T细胞表面分子标志CD4、CD8表达无明显影响

流式细胞术检测结果(图6)显示, 实验组细胞表面分子标志CD4、CD8阳性表达率与未转染组细胞比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结果表明, PD-1 基因敲除对食蟹猴T细胞表面分子标志CD4、CD8的表达无明显影响。

2.6 PD-1 敲除后食蟹猴T细胞中IFN- γ 、IL-2分泌水平升高

ELISA 检测结果(图7)显示, 实验T组细胞IFN- γ 、IL-2的分泌水平明显高于对照组细胞(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

T淋巴细胞在机体的抗肿瘤免疫反应中扮演着重要的角色。T淋巴细胞活化后, 其表面会表达PD-1, 它能与肿瘤细胞表面表达的PD-L1结合, 抑制T淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤^[15]。目前, 在美国FDA批准的临床试验中, 抗PD-1和PD-L1单克隆抗体在转移性结肠癌

癌、肾癌、膀胱癌、非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤等肿瘤中取得了显著疗效^[16-18]。但开发抗体需要的时间长且费用高,抗体还具有一定的副作用,可能对人体产生其他

不良反应,因此利用基因编辑技术直接敲除T细胞中的PD-1基因,同样能阻断PD-1/PD-L1信号通路、激活T细胞的功能,从而达到治疗肿瘤的目的。

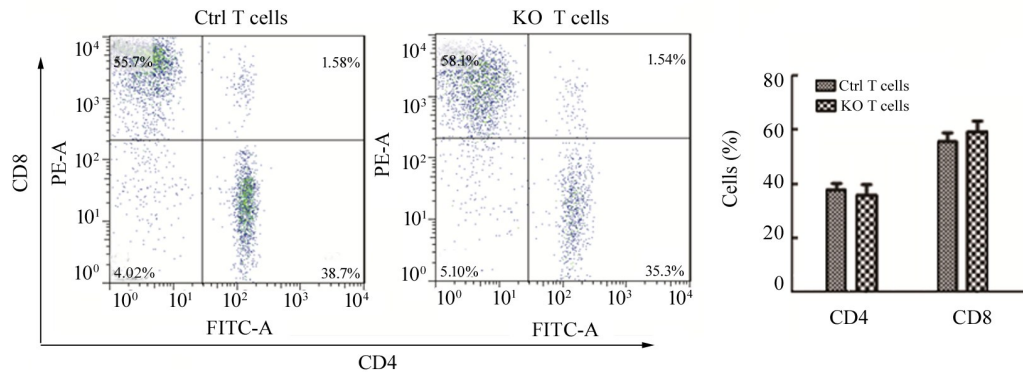


图6 PD-1敲除对食蟹猴T细胞表面分子标志CD4、CD8表达的影响

Fig.6 Effects of PD-1 knockout on the expression of surface molecular markers CD4 and CD8 on T cells in Cynomolgus monkeys

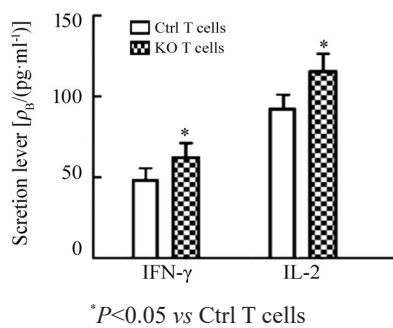


图7 PD-1敲除上调食蟹猴T细胞IFN-γ、IL-2的分泌水平
Fig.7 PD-1 knockout up-regulated the secretion of IFN-γ and IL-2 in Cynomolgus monkey T cells

传统的基因编辑技术如锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术,由于操作复杂和成本昂贵,很难应用于临床实际^[19-20]。本研究采用了一种新开发出来的基因编辑技术——CRISPR/Cas9技术,它比传统的基因编辑技术TALEN和ZEN更简单、经济,且效率高、速度快,可对靶基因多个位点同时敲除^[21-22]。为了利用CRISPR/Cas9系统在食蟹猴T细胞中高效敲除PD-1基因,首先需要构建高效特异的Cas9/sgRNA表达载体。本研究所用的Cas9表达载体骨架为pST1374-Cas9-GFP,CMV启动子启动人源性Cas9对靶序列进行切割;sgRNA表达载体骨架为pGL3-U6-sgRNA,U6启动子启动sgRNA指导Cas9的打靶特异性。本研究选取了2条特异性较好的sgRNA同时进行切割,以减少脱靶效率^[23],并成功构建了CRISPR-Cas9/sgRNA表达载体。

目前常用的细胞转染技术主要包括病毒感染和

脂质体转染。病毒感染效率比较高,但往往会刺激宿主的免疫效应,此外病毒的结合会引起不希望的变化从而改变细胞的功能。脂质体转染对于大部分原代细胞效率很低,而且有很大的细胞毒性。总之,这些转染方法都面临着免疫和整体安全的挑战。因此本研究选取了电穿孔转染法。电穿孔转染法是细胞在一个外加电场的作用下,使电流可逆地击穿细胞膜形成瞬时的水通路或膜上小孔促使DNA分子进入细胞内,它可以无毒高效地转染多种细胞,其缺点是细胞死亡率高,由于其强电场的作用,在细胞膜上打孔对细胞损伤极大。本研究采用电穿孔转染法转染食蟹猴PBMC,24h后在倒置显微镜下观察,见细胞体积变小、折光性较弱,细胞状态差,这可能与电击损伤了细胞膜有关。

本研究构建了能编码增强型绿色荧光蛋白的质粒载体,转染48h时荧光显微镜下可见实验组出现绿色荧光蛋白表达的细胞,经流式细胞术检测其平均转染效率为21.6%。收集部分细胞提取蛋白和基因组DNA,基因组DNA经RT-PCR和T7E1酶切后出现目的分裂条带(243、197bp),WB检测结果显示转染Cas9+sgRNA表达载体的T细胞PD-1蛋白的表达水平明显低于空载组及野生型的T细胞,说明所构建的CRISPR/Cas9敲除系统已在食蟹猴T细胞上成功敲除了PD-1基因。

为了探讨PD-1基因敲除对食蟹猴T细胞的影响,本实验将野生型和实验组T细胞按相同密度接种到24孔板培养,观察各孔细胞生长情况,并进行了细胞周期、细胞表型及细胞因子分泌的检测。结果发现,PD-1基因突变型T细胞集落形成时间延迟、增殖缓慢、细胞折光性较弱,从生长曲线也可以看出,野

生型细胞的生长速度明显快于实验组及空载组细胞,这可能与电穿孔损伤了细胞膜有关。对T细胞的生物特性进行检测发现,实验组T细胞处于G0/G1期的细胞数增多、处于G2/M期的细胞数减少,而细胞表面分子标志CD4、CD8的表达与野生型细胞无明显变化;细胞因子IFN- γ 、IL-2的分泌明显升高。结果说明,PD-1基因敲除可使食蟹猴T细胞阻滞于G0/G1期,抑制了其增殖,但不会影响其表面分子标志CD4、CD8的表达,同时PD-1基因敲除的T细胞还上调了IFN- γ 和IL-2的分泌水平。

综上所述,本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,通过电穿孔转染法成功敲除了食蟹猴T细胞PD-1基因,并体外验证了PD-1基因敲除对食蟹猴T细胞的影响,为后续T细胞免疫治疗研究和应用提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] MORROW T. Novartis's kymriah: harnessing immune system comes with worry about reining in costs[J]. *Manag Care*, 2017, 26(10): 28-30.
- [2] 郭寒菲, 於宇, 崔久崧. 以PD-1/PD-L1为靶点的肺癌免疫治疗临床研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(3): 213-220. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.001.
- [3] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J/OL]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704[2020-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25943068/>. DOI:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- [4] SARESELLAM, RAINONE V, AL-DAGHRI N M, et al. The PD-1/PD-L1 pathway in human pathology[J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(3): 259-267. DOI:10.2174/156652412799218903.
- [5] CHOWDHURY PS, CHAMOTO K, HONJO T. Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy[J]. *J Intern Med*, 2018, 283(2): 110-120. DOI:10.1111/joim.12708.
- [6] HAWKES E A, GRIGG A, CHONG G. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5): e234-e245[2020-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25943068/>. DOI:10.1016/S1470-2045(15)70103-8.
- [7] RIGO V, EMIONITE L, DAGA A, et al. Combined immunotherapy with anti-PDL-1/PD-1 and anti-CD4 antibodies cures syngeneic disseminated neuroblastoma[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14049[2020-01-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5656588/>. DOI: 10.1038/s41598-017-14417-6.
- [8] 张海桥, 钱璐, 林胜友. Nivolumab 一线治疗晚期恶性黑色素瘤的研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2018, 33(4): 383-386. DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2018.04.019.
- [9] ROBERT C, RIBAS A, SCHACHTER J, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20: 1239-1251. DOI:10.1016/S1470-2045(19)30388-2.
- [10] KUDO T, HAMAMOTO Y, ATO K, et al. Nivolumab treatment for oesophageal squamous-cell carcinoma: an open-label, multicentre, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18: 631-639. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30181-X.
- [11] GETTINGER S, HORN L, JACKMAN D, et al. Five-year followup of nivolumab in previously treated advanced non-small-cell lung cancer: results from the CA209-003 study[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(17): 1675-1684. DOI:10.1200/JCO.2017.77.0412.
- [12] 龚福生, 许扬梅, 刘施佳. 应用CRISPR/Cas9系统敲除PD-1基因对人T淋巴细胞增殖及分泌IFN- γ 的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(6): 656-661. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.007.
- [13] SU S, HU B, SHAO J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients[J]. *Sci Rep*, 2016, 7(7): 402-415. DOI: 10.1038/srep20070.
- [14] LIU A M, XIE S L, SUN H, et al. Myotoxicity of gemfibrozil in cynomolgus monkey model and its relationship to pharmacokinetic properties[J/OL]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(3): 287-295 [2020-01-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2650005/>. DOI:10.1016/j.taap.2008.12.015.
- [15] JOHN L B, DEVAUD C, DUONG C P, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20): 5636-5646. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
- [16] ROBERT C, SCHACHTER J, LONG G V, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(26): 2521-2532. DOI:10.1056/NEJMoa1503093.
- [17] WEBER J S, D'ANGELO S P, MINOR D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(4): 375-384. DOI:10.1016/S1470-2045(15)70076-8.
- [18] BRAHMER J, RECKAMP K L, BAAS P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135[2020-01-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681400/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1504627.
- [19] LI C, GUAN X M, DU T, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2381-2393. DOI:10.1099/vir.0.000139.
- [20] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. DOI:10.1126/science.1178817.
- [21] MUSSOLINO C, CATHOMEN T. RNA guides genome engineering [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 208-209. DOI:10.1038/nbt.2527.
- [22] HULTQUIST J F, HIATT J, SCHUMANN K, et al. CRISPR-Cas9 genome engineering of primary CD4⁺ T cells for the interrogation of HIV-host factor interactions[J/OL]. *Nat Protoc*, 2019, 14(1): 1-27 [2020-01-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6637941/>. DOI:10.1038/s41596-018-0069-7.
- [23] SHEN B, ZHANG W S, ZHANG J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399-402. DOI:10.1038/nmeth.2857.

[收稿日期] 2020-01-05

[修回日期] 2020-06-10

[本文编辑] 党瑞山