

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.003

· 基础研究 ·

## CD3 $\zeta$ 链引入YRHQ基序可增强靶向HER2的CAR-T细胞的抗肿瘤活性

王田,张征峥,王晓峰,张紫梦,张雨晴,马翠卿,宋淑霞(河北医科大学 免疫学教研室 河北省重大疾病免疫机制及干预重点实验室,河北 石家庄 050017)

**[摘要]** **目的:**探讨在靶向HER2的CAR的CD3 $\zeta$ 链胞内区引入YRHQ基序对CAR-T细胞的特异性杀伤活性及免疫记忆形成的影响。**方法:**通过DNA合成获得包含靶向HER2的编码抗原受体H28 $\zeta$ 或H28 $\zeta$ (YRHQ)的DNA片段,通过慢病毒载体将不同CAR的DNA片段分别转导健康人外周血T细胞,制备靶向HER2的H28 $\zeta$ -CAR-T及H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T细胞。扩增过程中对不同CAR-T细胞进行计数,FCM检测CAR的表达率。将CAR-T细胞分别与HER2阳性的SKOV3、MDA-MB-453或HER2阴性的MCF-7细胞共培养,LDH释放法检测其杀伤活性,ELISA法检测IL-2、IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B的水平,WB法检测STAT3磷酸化水平及免疫检查点分子TIM-3和PD-1的表达,通过FCM检测CCR7、CD45RO的表达,分析CAR-T细胞的表型。**结果:**H28 $\zeta$ -CAR-T和H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T细胞扩增能力较好,体外培养7 d时扩增4~5倍。H28 $\zeta$ -CAR和H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR表达率分别为(33.3 $\pm$ 2.85)%和(28.30 $\pm$ 3.2)%。H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T细胞的杀伤活性较H28 $\zeta$ -CAR-T细胞更高( $P<0.05$ )。经HER2抗原刺激后,与T细胞或H28 $\zeta$ -CAR-T细胞比较,H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T细胞的STAT3磷酸化水平较H28 $\zeta$ -CAR-T细胞明显升高( $P<0.01$ );而两者间PD-1和TIM-3的表达无明显差异。未经抗原刺激的CAR-T细胞CCR7和CD45RO表达与正常T细胞比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),与SKOV3细胞共培养后,与T细胞或H28 $\zeta$ -CAR-T细胞比较,H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T细胞中T<sub>EM</sub>细胞比例明显增加、T<sub>CM</sub>细胞比例明显减少(均 $P<0.05$ )。**结论:**在CD3胞内区引入YRHQ基序可在一定程度上提高CAR-T细胞的杀伤潜力。

**[关键词]** 人表皮生长因子受体2;CAR-T细胞;YRHQ基序;STAT3;记忆性T细胞

**[中图分类号]** R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)03-0181-08

## Incorporation of the YRHQ motif into CD3 $\zeta$ chain enhances the antitumor activity of HER2-targeted CAR-T cells

WANG Tian, ZHANG Zhengzheng, WANG Xiaofeng, ZHANG Zimeng, ZHANG Yuqing, MA Cuiqing, SONG Shuxia (Department of Immunology; Key Laboratory of Immune Mechanism and Intervention for Serious Diseases in Hebei Province, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of incorporating YRHQ motif into the intracellular CD3 $\zeta$  region of chimeric antigen receptor (CAR) targeting HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) on the specific killing activity and immune memory formation of CAR-T cells. **Methods:** DNA fragments encoding the antigen receptor H28 $\zeta$  or H28 $\zeta$ (YRHQ) were obtained by DNA synthesis. H28 $\zeta$ -CAR-T and H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells targeting HER2 were developed by transducing different CAR DNA fragments into T cells from healthy human peripheral blood using lentiviral vectors. The number of different CAR-T cells was counted during amplification, and CAR expression rate was detected by FCM. The CAR-T cells were incubated with HER2 positive SKOV3, MDA-MB-453 cells or HER2 negative MCF-7 cells, respectively. Then, the killing activity of CAR-T cells was measured by LDH release assay, the levels of IL-2, IFN- $\gamma$  and GZMB were measured by ELISA, the phosphorylation level of STAT3 and the expression of immune checkpoint molecules TIM-3 and PD-1 were detected by WB, and the expression of CCR7 and CD45RO was detected by FCM. In addition, the phenotypes of CAR-T cells were analyzed. **Results:** Both H28 $\zeta$ -CAR-T and H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells had good amplification ability and expanded 4-5 folds at 7th day of culture *in vitro*. The expression rate of H28 $\zeta$ -CAR or H28 $\zeta$ (YRHQ) CAR in T cells were (33.3 $\pm$ 2.85)% and (28.30 $\pm$ 3.2)%, respectively. A higher cytotoxicity of H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells than H28 $\zeta$ -CAR-T cells was observed ( $P<0.05$ ). After HER2 antigen stimulation, the STAT3 phosphorylation level of H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells was significantly higher than that of H28 $\zeta$ -CAR-T cells ( $P<0.01$ ); however, no significant difference in the expression of PD-1 and TIM-3 was observed between two CAR-T cells. The expression of CCR7 and CD45RO in the CAR-T cells without antigen stimulation was not significantly different from that in normal T cells (both  $P>0.05$ ). After co-culture with SKOV3 tumor cells, compared with T

**[基金项目]** 河北省卫生健康委医学科资助项目(No. 20200037)

**[作者简介]** 王田(1995—),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗的研究,E-mail:304716901@qq.com

**[通信作者]** 宋淑霞,E-mail:16600549@hebm.edu.cn;马翠卿,E-mail:macuiqing@hebm.edu.cn

cells or H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells, the the proportion of T<sub>EM</sub> cells increased, while the proportion of the T<sub>CM</sub> cells decreased significantly in H28 $\zeta$ (YRHQ)-CAR-T cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The incorporation of YRHQ motif in CD3 intracellular region could improve the killing potential of CAR-T cells to some extent.

**[Key words]** human epidermal growth factor receptor 2 (HER2); CAR-T cell; YRHQ motif; STAT3; memory T cell

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(3): 181-188. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.003]

近年来, CAR-T 细胞疗法在难治性急性淋巴细胞白血病治疗中取得了令人瞩目的成就<sup>[1-3]</sup>, 然而在实体瘤治疗中仍有诸多挑战<sup>[4]</sup>。CAR 的胞内信号不仅对进入实体瘤的 CAR-T 细胞活化起决定作用, 且在一定程度上可决定效应性和记忆性 CAR-T 细胞的分化, 进而影响 CAR-T 细胞的杀伤活性及持久性<sup>[5-6]</sup>。适当地修饰 CAR 信号分子以平衡 CAR-T 细胞在抗原刺激下的激活与分化, 是优化 CAR 结构的一个重要手段。HER2 是表皮生长因子受体家族的成员之一, 在乳腺癌、肺癌等多种实体瘤组织中高表达<sup>[7]</sup>, 而在正常组织中一般不表达或低表达。有研究结果<sup>[8]</sup>显示, 靶向 HER2 的 CAR-T 细胞可浸润到曲妥珠单抗无法进入的乳腺癌组织中, 并有效杀伤肿瘤细胞。YRHQ 氨基酸基序是 STAT3 的胞内结合位点<sup>[9]</sup>, STAT3 是 JAK/STAT 通路中重要的转录因子, 参与诱导 IFN- $\gamma$  等多种细胞因子的转录, 并具有抑制 Treg 细胞分化、维持 CD8<sup>+</sup>T 细胞效应功能的作用<sup>[10]</sup>。本研究以本室制备的 ScFv 为基础<sup>[11]</sup>, 制备含有 CD3 $\zeta$  和 CD28 共刺激信号的 H28 $\xi$ -CAR-T 细胞, 同时将 CD3 $\zeta$  链的羧基末端倒数第 6 至第 9 位氨基酸 LHMQ 替换为 YRHQ 基序, 制备了 H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T 细胞, 并对其抗肿瘤活性进行了评估。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、质粒及主要试剂

人胚肾细胞 HEK-293T、卵巢癌细胞 SKOV3、乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 MCF-7、慢病毒表达载体质粒 pCDH-CMV-GFP 和包装质粒 pLP-1、pLP-2、pLP-VSVG 均为本实验室保存, 人 T 淋巴细胞来自河北省中医院健康体检者。感受态 Stellar 细胞购自日本 TaKaRa 公司。

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 购自美国 NEB 公司, DNA 回收试剂盒购自北京生化天根科技有限公司, T4 DNA 连接酶、脂质体 2000 均购自美国 Thermo 公司, 人外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司, CD3 磁珠、CD28 抗体、流式抗体 PE Mouse Anti-Human CD3、APC Mouse Anti-Human CD45RO、PE Rat Anti-Human CCR7、Biotin-Protein L 及 PE Streptavidin 均购自美国 BD 公司, CD3 单克隆抗体 (OKT3) 购自德国 Miltenyi Biotec 公司, 重组人 IL-2、重组人 IL-7 均购自美国 Peprotech 公司,

LDH 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, IFN- $\gamma$ 、IL-2 ELISA 检测试剂盒均购自杭州联科生物技术有限公司, 颗粒酶 B 检测试剂盒购自美国 Proteintech 公司, 兔抗 HER2 抗体、兔抗 PD-1 抗体、兔抗 TIM-3 抗体、兔抗人 GAPDH 抗体均购自杭州华安生物公司, HRP 标记的羊抗兔二抗购自 CST 公司, 荧光二抗购自上海 Abcam 公司, H28 $\xi$ -CAR 和 H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR 全长 DNA 由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

### 1.2 慢病毒表达载体 pCDH-HER2-CAR 的构建

将 H28 $\xi$ -CAR 或 H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR 全长 DNA 序列, 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 通过常规分子生物学技术分别连接到 pCDH-CMV-GFP 载体, 获得 pCDH-H28 $\xi$ -CAR 和 pCDH-H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR 重组表达质粒。

### 1.3 慢病毒制备与病毒滴度检测

将 pCDH-H28 $\xi$ -CAR 和 pCDH-H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR 重组质粒分别与包装质粒 pLP-1、pLP-2、pLP-VSVG 按 1:1:1:1 的比例共转染 293T 细胞, 分别收集 48、72 h 的细胞培养上清, 过滤后经 20% 蔗糖密度梯度超速离心浓缩, 获得携带两种不同 HER2-CAR 的慢病毒颗粒, 分装后于 -80 °C 保存。

将 293T 细胞接种于 24 孔板 ( $3 \times 10^5$  个/孔), 培养过夜, 分别用 1、2、4  $\mu$ L 的两种慢病毒感染, 72 h 后, 经 FCM 检测 GFP 表达阳性细胞的百分率, 选取感染效率为 10%~40% 的组进行滴度计算, 计算公式: 慢病毒的滴度 (TU/mL) = 每孔细胞总数  $\times$  GFP<sup>+</sup> 细胞百分率  $\times 10^3$  / 加入的病毒体积 ( $\mu$ L)。

### 1.4 HER2-CAR-T 细胞的制备及鉴定

淋巴细胞分离液分离健康人外周血 PBMC, 经抗 CD3 免疫磁珠分选 CD3<sup>+</sup>T 细胞, FCM 检测 CD3<sup>+</sup>T 细胞纯度。采用含 5  $\mu$ g/mL 的 CD3mAb (OKT3)、0.5  $\mu$ g/mL 的 CD28mAb、10 ng/mL 的 IL-2 和 IL-7 的完全培养基活化 CD3<sup>+</sup>T 细胞, 48 h 后, 加入 MOI=50 的慢病毒和 8  $\mu$ g/mL 的病毒感染增强液, 1 000 $\times$ g 离心 1.5 h, 未感染病毒的 T 细胞作为阴性对照。离心后, 将细胞培养板常规培养 12 h 或过夜, 离心换液后继续培养。根据细胞的生长密度, 每 48 h 补充 1 次 IL-2 和 IL-7 (均补至 20 ng/mL), 每隔 2~3 d 传代扩大培养。制备的细胞分别命名为 H28 $\xi$ -CAR-T 细胞和 H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T 细胞。

取感染72 h的T细胞于流式管中,分别加入生物素标记的L-蛋白及PE-Streptavidin,室温避光处理45 min,通过FCM检测T细胞表面CAR的表达率。在感染的第1、3、5及第7天,分别对CAR-T细胞进行计数。

### 1.5 细胞免疫荧光技术鉴定靶细胞表面HER2抗原的表达

取培养至对数生长期的SKOV3、MDA-MB-453和MCF-7细胞,置于加入了玻片的24孔细胞培养板,待玻片上的细胞汇合度约80%时,吸出上清液,PBS洗3次,经4%多聚甲醛固定、山羊血清封闭、兔抗人HER2一抗及抗兔荧光二抗分别处理后,荧光显微镜下观察HER2的表达。

### 1.6 LDH释放法检测HER2-CAR-T细胞体外杀伤效果

取处于对数生长期的SKOV3、MDA-MB-453和MCF-7细胞,分别置于96孔板中( $10^4$ 个/孔),培养4 h待细胞贴壁后,分别按1:1、5:1、10:1、20:1的效靶比,将培养8 d、静息2 d的CAR-T细胞与靶细胞混合,并设置培养基、效应细胞及靶细胞自发释放、靶细胞最大释放不同对照,每组均设3个复孔,继续培养16 h后按LDH试剂盒说明检测培养上清的光密度( $D$ )值,并计算细胞毒活性。细胞毒活性=(实验组 $D$ 值-效应细胞自发组 $D$ 值-靶细胞自发组 $D$ 值)/(靶细胞最大组 $D$ 值-靶细胞自发组 $D$ 值) $\times 100\%$ 。

### 1.7 ELISA法检测细胞因子分泌水平

同上以5:1的效靶比,将CAR-T细胞分别与SKOV3、MDA-MB-453和MCF-7细胞共培养24 h,离心收集上清液,ELISA法检测IL-2、IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B的水平。

### 1.8 WB法检测CAR-T细胞STAT3磷酸化水平及PD-1和TIM-3的表达

将SKOV3细胞接种于24孔板( $2\times 10^4$ 个/孔),细胞贴壁后,加入丝裂霉素C( $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ),继续培养4 h。然后按5:1的效靶比,加入培养8 d、静息2 d的CAR-T细胞继续培养4 h,收集各组上清液中悬浮的T细胞,提取总蛋白。经SDS-PAGE,将蛋白质转移至PVDF膜后,分别加入兔抗人STAT3(1:500)、pSTAT3(1:500)、PD-1(1:1 000)、TIM-3(1:1 000)或GAPDH(1:8 000)一抗,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。TBST洗膜后,加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000),室温下处理1 h。TBST洗膜后,滴加ECL显色液显影,采用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

### 1.9 FCM检测HER2-CAR-T细胞亚型

同1.8按5:1的效靶比,将T细胞与丝裂霉素C处理的SKOV3细胞共培养24 h,收集各组悬浮的T细胞置于流式管中。分别加入抗人APC-CD45RO、

抗人PE-CCR7抗体,4 $^\circ\text{C}$ 避光处理45 min,洗涤、重悬细胞,上FCM检测初始T细胞( $T_N$ )CCR7 $^+$ CD45RO $^-$ 、效应T细胞( $T_{\text{EFF}}$ )CCR7 $^+$ CD45RO $^-$ 、中央记忆T细胞( $T_{\text{CM}}$ )CCR7 $^+$ CD45RO $^+$ 及效应记忆T细胞( $T_{\text{EM}}$ )CCR7 $^+$ CD45RO $^+$ 等不同亚型T细胞的分布。

### 1.10 统计学处理

以上主要实验均重复3次。采用SPSS16统计软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布且方差齐的计量资料采用单因素方差分析进行比较,不符合方差分析的计量资料采用秩和检验的方法,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功制备携带靶向HER2的CAR的慢病毒

成功合成了两个CAR的全长DNA,即H28 $\xi$ -CAR和H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR(图1A)。其中H28 $\xi$ -CAR胞内信号包括CD28的穿膜和胞内段的68个氨基酸(第151~218, GenBank: BC112085.1)以及CD3 $\zeta$ 链胞内段112个氨基酸(第52~163, GenBank: J04132.1)。H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR的CD3 $\zeta$ 胞内段羧基末端倒数第6~9个氨基酸由LHMQ替换成YRHQ,其他与H28 $\xi$ -CAR相同。将H28 $\xi$ -CAR和H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR分别经EcoR I和BamH I双酶切后,与经同样酶切的pCDH-CMV-GFP载体链接,获得pCDH-H28 $\xi$ -CAR和pCDH-H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR重组质粒。

FCM检测慢病毒感染293T细胞48 h后的感染效率(图1B),经计算,病毒滴度(TU/mL)分别为 $1.72\times 10^8$ 和 $1.65\times 10^8$ 。

### 2.2 成功制备CAR-T细胞

FCM检测结果(图2A)显示,CD3 $^+$ T细胞的纯度可达(94.3 $\pm$ 3.4)%。两种携带HER2-CAR的慢病毒以MOI=50感染活化48 h的T细胞,培养5 d后,H28 $\xi$ -CAR-T和H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞的CAR表达阳性率分别为(33.3 $\pm$ 2.85)%和(28.30 $\pm$ 3.2)% ,显著高于激活的T细胞( $P<0.01$ ,图2B)。此外,通过细胞计数观察到,两种HER2-CAR慢病毒感染T细胞后的第1、3天时,细胞增殖能力与T细胞比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),至第5和第7天时,两种HER2-CAR-T细胞增殖明显减缓( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ,图2C)。

### 2.3 SKOV3和MDA-MB-453细胞膜表面表达HER2抗原

细胞免疫荧光染色结果(图3)显示,SKOV3、MDA-MB-453细胞膜可见HER2表达,而MCF-7细胞未见HER2表达。结果表明,SKOV3、MDA-MB-453为HER2阳性细胞,MCF-7为HER2阴性细胞。



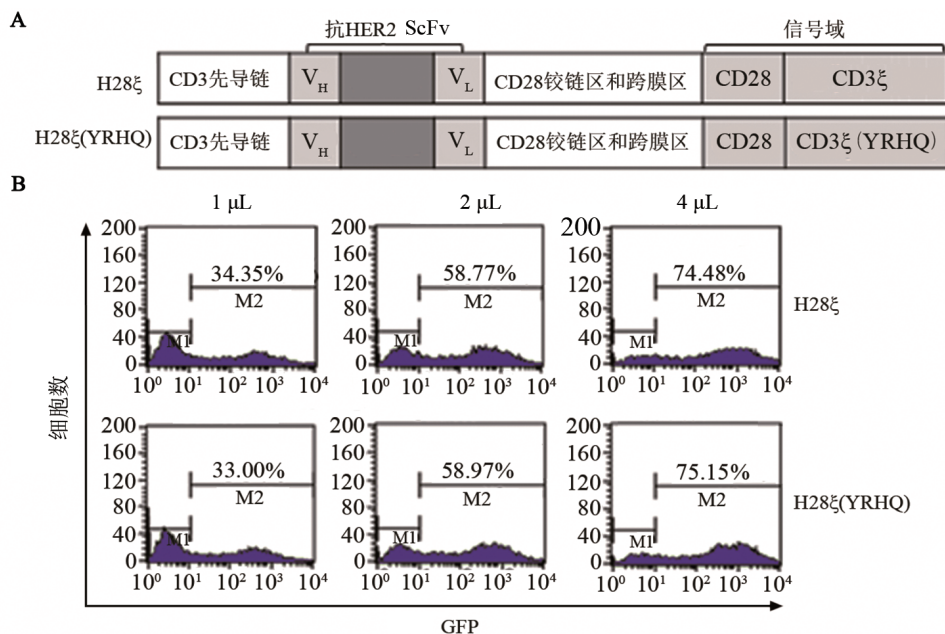
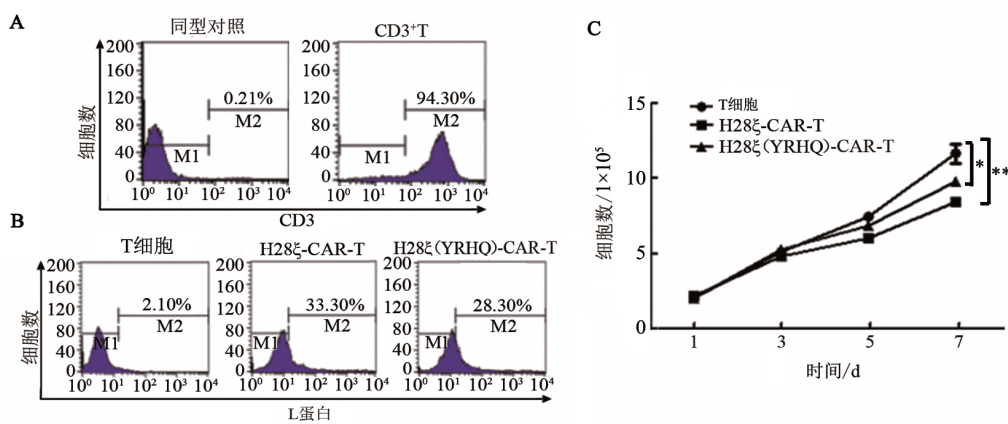


图1 靶向HER2的CAR设计(A)及慢病毒滴度测定(B)



与T细胞比较, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01

A: CD3<sup>+</sup> T细胞的纯度检测; B: CAR的表达率检测; C: CAR-T细胞的增殖水平

图2 CAR-T细胞中H28ξ-CAR和H28ξ(YRHQ)-CAR的表达及增殖能力

#### 2.4 引入YRHQ基序可增强CAR-T细胞对癌细胞的特异性杀伤活性

LDH释放法结果(图4)显示,随着效靶比的增加, H28ξ-CAR-T和H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞对SKOV3、MDA-MB-453细胞的杀伤作用逐渐增强(*P*<0.05或*P*<0.01),当20:1的HER2-CAR-T细胞与癌细胞共培养时,可杀伤40%以上的HER2<sup>+</sup> SKOV3或MDA-MB-453细胞,但对HER2<sup>-</sup> MCF-7细胞的杀伤作用较弱,而T细胞未见明显的细胞毒作用。在同一效靶比的情况下, H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞肿瘤特异性杀伤活性显著高于H28ξ-CAR-T细胞(均*P*<0.05)。结果表明,引入YRHQ基序可增强CAR-T细胞对HER-2<sup>+</sup>细胞的特异性杀伤活性。

#### 2.5 引入YRHQ基序可促进CAR-T细胞IL-2、IFN-γ和颗粒酶B的释放

ELISA检测结果(图5)显示,与SKOV3和MDA-MB-453细胞共培养后, H28ξ-CAR-T与H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞均可释放高水平的IL-2、IFN-γ和颗粒酶B,与T细胞比较差异均有统计学意义(均*P*<0.01)。其中, H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞释放的IL-2、IFN-γ和颗粒酶B水平显著高于H28ξ-CAR-T细胞(均*P*<0.01)。结果表明,引入YRHQ基序可促进CAR-T细胞IL-2、IFN-γ和颗粒酶B的释放。

#### 2.6 引入YRHQ基序提高CAR-T细胞的STAT3磷酸化水平

按效靶比5:1,将H28ξ-CAR-T和H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞与SKOV3细胞共培养4h后, WB法检测结果(图6)显示,与T细胞组和H28ξ-CAR-T组比较, H28ξ(YRHQ)-CAR-T细胞p-STAT3蛋白水平明显升高(*P*<0.01);而该两种HER2-CAR-T细胞与SKOV3

细胞共培养 24 h 后, 细胞中TIM-3和PD-1的表达与T细胞比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$ )。结

果表明, 引入YRHQ基序可提高CAR-T细胞的STAT3磷酸化水平, 且未明显增加T细胞耗竭。

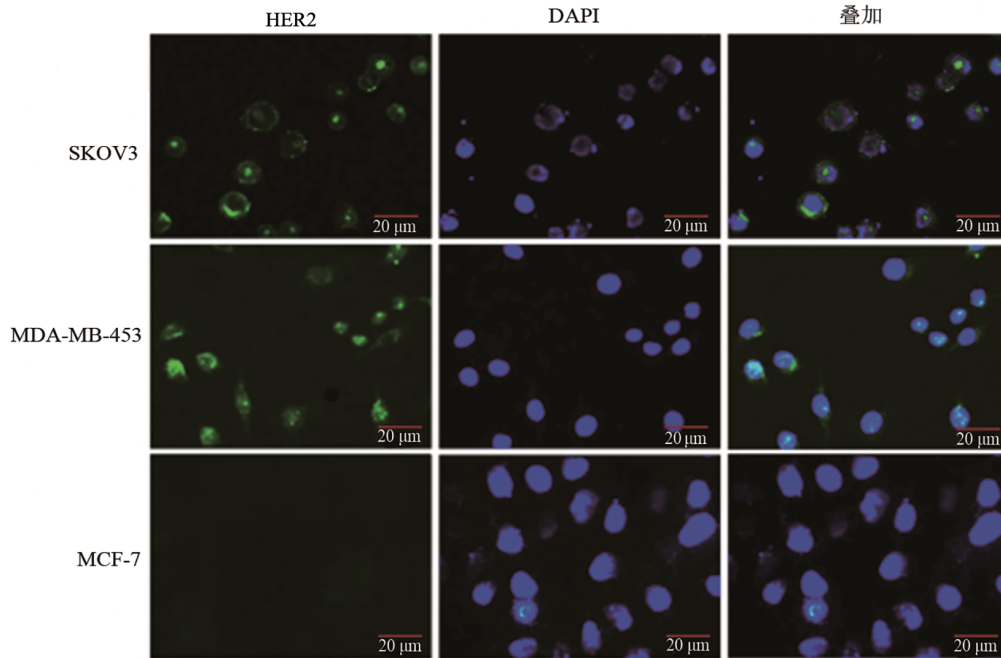
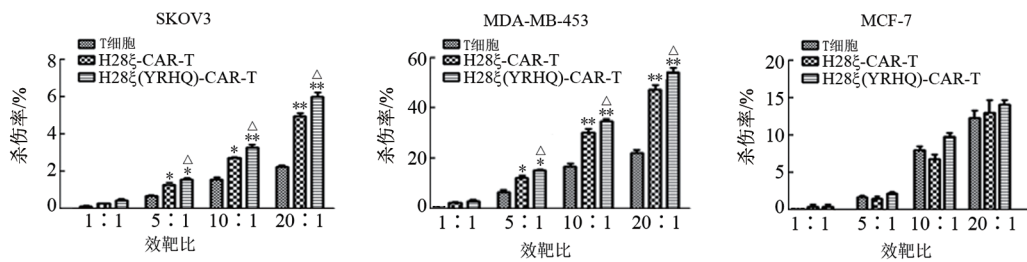
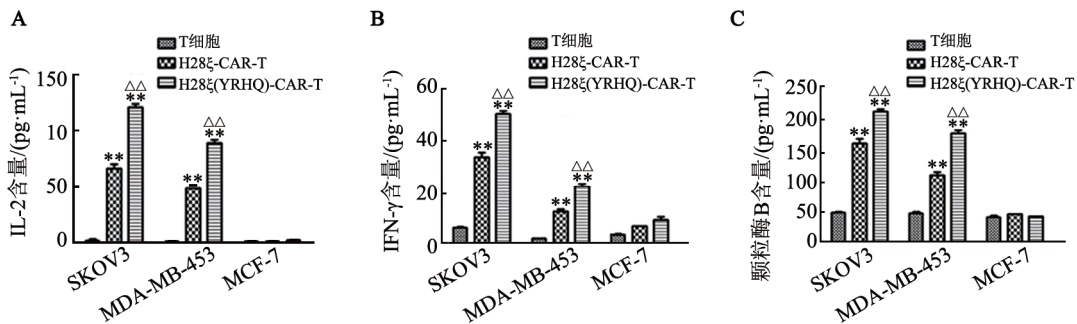


图3 HER2抗原在SKOV3和MDA-MB-453细胞膜表面阳性表达



与T细胞比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与H28 $\xi$ -CAR-T细胞比较,  $\Delta P<0.05$

图4 LDH释放法检测CAR-T细胞对乳腺癌细胞的特异性杀伤作用

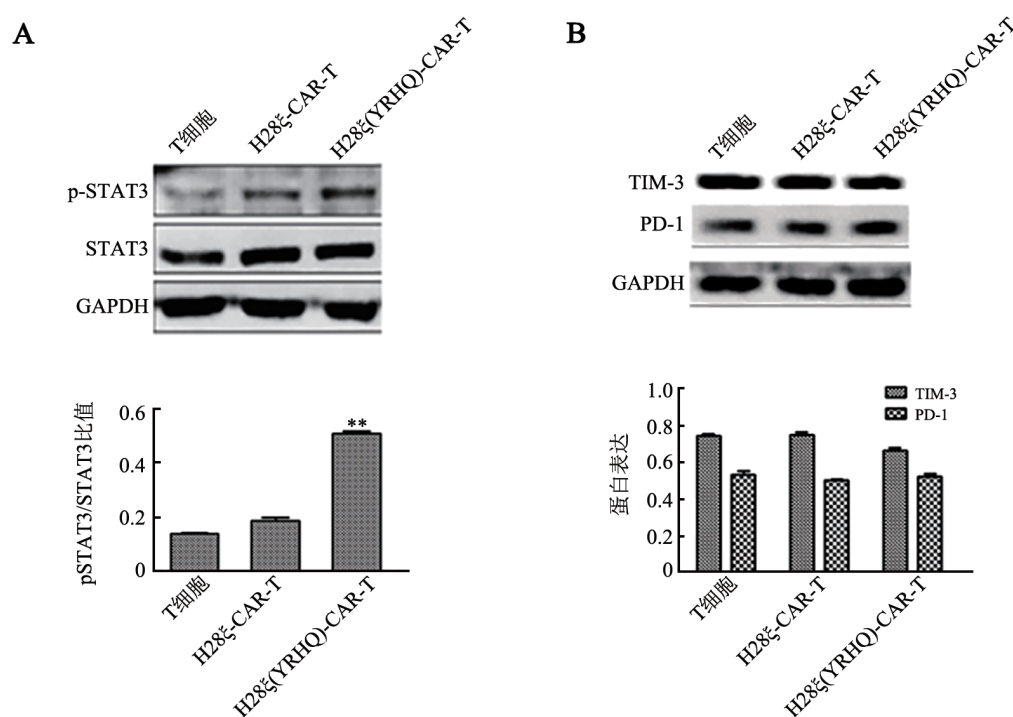


与T细胞比较, \*\* $P<0.01$ ; 与H28 $\xi$ -CAR-T细胞比较,  $\Delta\Delta P<0.01$

图5 ELISA检测CAR-T细胞分泌的IL-2、IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B水平

2.7 引入YRHQ基序促进CAR-T细胞向 $T_{EM}$ 细胞分化  
FCM检测结果(图7)显示, 培养到第10天的T细胞及两种CAR-T细胞主要为 $T_{CM}(CCR7^+CD45RO^+)$ 表型。经SKOV3细胞刺激24 h后, 包含YRHQ基序的

H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞中 $T_{EM}$ 的比例显著增加( $P<0.05$ ),  $T_{CM}$ 细胞的比例显著下降( $P<0.05$ )。结果表明, 引入YRHQ基序的H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞不仅获得了持久性特征, 同时其抗肿瘤活性也明显增强。



与T细胞或H28ξ-CAR-T细胞比较,\*\* $P < 0.01$

A: STAT3 及 p-STAT3 的表达; B: PD-1 及 TIM-3 的表达

图6 引入YRHQ基序对STAT3磷酸化水平及PD-1、TIM-3表达的影响

### 3 讨论

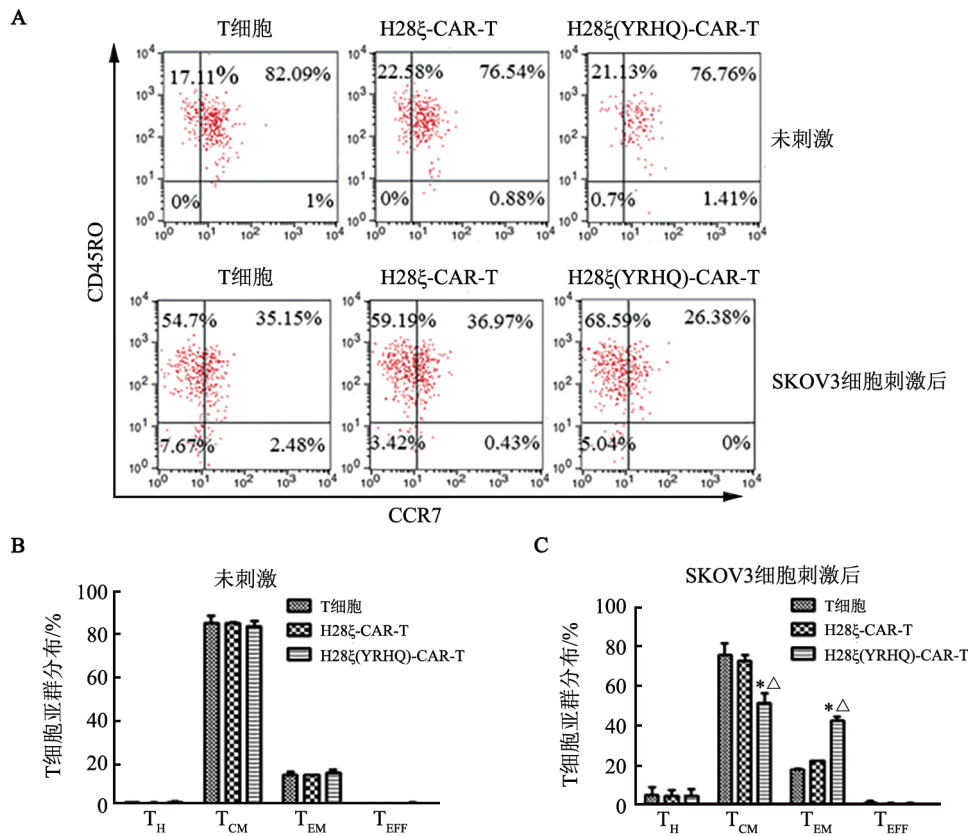
磷酸化的ZAP-70与CD3 $\zeta$ 的ITAM结合,在抗原诱导T细胞活化过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>,因此,目前在CAR的设计上主要选择CD3 $\zeta$ 链来实现胞内第1信号的转导。有研究结果<sup>[13]</sup>表明,改变CD3 $\zeta$ 链的结构可以影响CAR-T细胞的活性,如截断CD3 $\zeta$ 链胞内区结构域,保留1或2个ITAM基序,可明显降低CAR-T细胞的活化,促进免疫记忆的形成,有利于CAR-T细胞抗肿瘤活性的持久性。减少CD3 $\zeta$ 链的ITAM数量,势必会抑制NF- $\kappa$ B、NF-AT转录因子的活化。但也有研究结果<sup>[14]</sup>表明,增加胞内信号强度,上调CAR-T细胞内转录因子NF- $\kappa$ B和NFAT的活性,有利于防止CAR-T细胞的衰竭,提高其抗肿瘤的能力。降低或增强的胞内信号,可能会通过影响转录因子谱及活性来优化CAR-T细胞基因的表达,进而通过平衡相关基因的表达水平影响CAR-T细胞的分化和抗肿瘤作用。因此,CAR-T细胞功能由胞内信号的质量或类型而非仅仅是数量来控制。

本研究制备了含有CD28共刺激信号的第二代CAR(即H28 $\xi$ ),其中,识别抗原的ScFv来源于本实验室制备的抗人HER2单抗V区的PCR产物<sup>[11]</sup>。CD28作为T细胞的共刺激信号,可通过其下游PI3K-Akt信号通路,为CAR-T细胞提供可克服Treg细胞介导的免疫抑制性肿瘤微环境的强大信号<sup>[15]</sup>。为了进一步平衡CAR-T细

胞的胞内信号,将CD3 $\zeta$ 链C末端的4个氨基酸LHMQ替换为YRHQ,制备了H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR。YRHQ氨基酸基序是胞内STAT3的结合位点<sup>[16]</sup>。STAT3不仅作为JAK/STAT通路中重要的转录因子,活化后参与诱导IL-2、IFN- $\gamma$ 等多种细胞因子及颗粒酶B的转录,并通过调控转录调节因子Eomes、BCL-6和Blimp-1的表达,调节记忆性CD8<sup>+</sup>T细胞分化,维持CD8<sup>+</sup>T细胞效应功能与免疫记忆的平衡<sup>[17-19]</sup>。

利用携带上述CAR的慢病毒感染人外周血T细胞制备的CAR-T细胞,体外培养的前3d,CAR-T细胞与未感染慢病毒的T细胞增殖水平无明显差异,但在体外培养的第5和第7天时,CAR-T细胞的增殖能力明显减缓,说明CAR-T细胞的体外培养系统仍需要进一步改进。通过评估CAR-T细胞的效应功能,可以看出H28 $\xi$ -CAR-T和H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞均可特异性识别并有效杀伤表达HER2抗原的肿瘤细胞;引入YRHQ基序的H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞,对肿瘤细胞的特异性杀伤活性及IL-2、IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B分泌水平均高于H28 $\xi$ -CAR-T细胞。进一步观察到H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞STAT3蛋白磷酸化水平明显高于T细胞和H28 $\xi$ -CAR-T细胞,说明引入YRHQ基序可以通过调控转录因子STAT3的活性提高CAR-T细胞的活化水平。另外,H28 $\xi$ -CAR-T细胞也有一定水平的STAT3蛋白发生磷酸化,这可能是使用CD3抗体联合IL-2激活T细胞后产生的本底信号。





与T细胞比较, \* $P < 0.05$ ; 与H28 $\xi$ -CAR-T细胞比较,  $\Delta P < 0.05$   
 A: 无SKOV3细胞刺激时CAR-T细胞的表型; B: SKOV3细胞刺激时T细胞的表型

图7 FCM检测CAR-T细胞表型

PD-1、TIM-3均为T细胞耗竭的标志物。表达PD-1的CAR-T细胞与表达PD-L1的肿瘤细胞相互作用后会抑制CAR-T细胞的活化<sup>[20-22]</sup>; TIM-3阳性的CD8<sup>+</sup>T细胞存在STAT5通路受损,而阻断TIM-3途径可促进T细胞释放IFN- $\gamma$ ,增强抗肿瘤作用<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,当H28 $\xi$ -CAR-T和H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞分别与SKOV3共培养24h后,PD-1与TIM-3蛋白表达均未见明显改变,表明引入YRHQ基序后,虽然CAR-T细胞中STAT3活性水平升高,但肿瘤抗原的刺激未因CAR-T细胞活性增强而表现出耗竭状态。此外,有研究结果<sup>[24]</sup>表明,CAR-T细胞STAT3激活有利于其抵抗凋亡。当CAR-T细胞在肿瘤抗原持续刺激的情况下,YRHQ基序是否会影响CAR-T细胞的耗竭,有待在后续工作中深入研究。

本研究对两种CAR-T细胞在肿瘤细胞刺激前后的分化状态也进行了分析,结果表明,整合了YRHQ基序的CAR-T细胞能显著提高T<sub>EM</sub>(CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>)细胞亚群的比例,而T<sub>CM</sub>(CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>)细胞亚群的比例明显下降。T<sub>CM</sub>细胞组成性表达CCR7和L-选择素CD62L,与初始T细胞相似,可趋化到淋巴结,在抗原刺激后可稳定增殖,产生大量IL-2,但无细胞毒效应;而T<sub>EM</sub>细胞的特点是失去CCR7的表达,增加向

炎症部位趋化的能力,遇到抗原刺激,可快速释放IFN- $\gamma$ 和颗粒酶B等效应分子,具有保护性记忆功能<sup>[25-26]</sup>。T<sub>EM</sub>细胞比例的增加表明,整合了YRHQ基序的H28 $\xi$ (YRHQ)-CAR-T细胞在识别肿瘤抗原后可快速激活发挥细胞毒作用。YRHQ的引入是否会影响CAR-T细胞抗肿瘤活性的持久性,本课题组将在后续的研究中继续进行探索。

综上所述,本研究验证了通过在CAR的胞内信号分子CD3 $\zeta$ 链整合YRHQ基序能以抗原依赖的方式为CAR-T细胞传递激活信号,此研究为通过修饰CAR胞内信号来提高CAR-T细胞的抗肿瘤能力提供了新思路。

[参考文献]

[1] LI S Q, ZHANG J S, WANG M L, *et al.* Treatment of acute lymphoblastic leukaemia with the second generation of CD19 CAR-T containing either CD28 or 4-1BB[J]. Br J Haematol, 2018, 181(3): 360-371. DOI:10.1111/bjh.15195.  
 [2] 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. DOI: 10.1038/s41591-021-01326-5.  
 [3] CAO J, WANG G, CHENG H, *et al.* Potent anti-leukemia activities of

- humanized CD19-targeted chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(7): 851-858. DOI:10.1002/ajh.25108.
- [4] 沈琦, 虞淦军. CAR-T细胞治疗肿瘤后复发的机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(12): 1411-1415. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.016.
- [5] SNOOK J P, KIM C, WILLIAMS M A. TCR signal strength controls the differentiation of CD4<sup>+</sup> effector and memory T cells[J/OL]. *Sci Immunol*, 2018, 3(25): eaas9103[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30030369/>. DOI:10.1126/sciimmunol.aas9103.
- [6] SOLOUKI S, HUANG W S, ELMORE J, *et al.* TCR signal strength and antigen affinity regulate CD8<sup>+</sup> memory T cells[J]. *J Immunol*, 2020, 205(5): 1217-1227. DOI:10.4049/jimmunol.1901167.
- [7] OH D Y, BANG Y J. HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(1): 33-48. DOI:10.1038/s41571-019-0268-3.
- [8] SZŐÖR Á, TÓTH G, ZSEBIK B, *et al.* Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies[J/OL]. *Cancer Lett*, 2020, 484: 1-8[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32289441/>. DOI:10.1016/j.canlet.2020.04.008.
- [9] KAGOYA Y, TANAKA S, GUO T X, *et al.* A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects[J/OL]. *Nat Med*, 2018, 24(3): 352-359[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839992/>. DOI:10.1038/nm.4478.
- [10] LIU B, WU H M, HUANG Q Y, *et al.* Phosphorylated STAT3 inhibited the proliferation and suppression of decidual Treg cells in unexplained recurrent spontaneous abortion[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106337[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32151956/>. DOI:10.1016/j.intimp.2020.106337.
- [11] 宋淑霞, 李妙颖, 侯志宏, 等. 抗人c-erbB2单克隆抗体的制备及其特异性鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(3): 319-321. DOI:10.3321/j.issn:1007-8738.2005.03.016.
- [12] ISAKOV N, WANGE R L, BURGESS W H, *et al.* ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity[J]. *J Exp Med*, 1995, 181(1): 375-380. DOI:10.1084/jem.181.1.375.
- [13] FEUCHT J, SUN J, EYQUEM J, *et al.* Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency[J/OL]. *Nat Med*, 2019, 25(1): 82-88[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6532069/>. DOI:10.1038/s41591-018-0290-5.
- [14] BOUCHER J C, LI G B, KOTANI H, *et al.* CD28 costimulatory domain-targeted mutations enhance chimeric antigen receptor T-cell function[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(1): 62-74. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-20-0253.
- [15] MENG X H, JING R R, QIAN L L, *et al.* Engineering cytoplasmic signaling of CD28  $\zeta$  CARs for improved therapeutic functions[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1046[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32636832/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.01046.
- [16] LI L L, XU J, QIU G H, *et al.* Epigenomic characterization of a p53-regulated 3p22.2 tumor suppressor that inhibits STAT3 phosphorylation *via* protein docking and is frequently methylated in esophageal and other carcinomas[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 61-77. DOI:10.7150/thno.20893.
- [17] ZHANG J, ROUSSEAU N, WALZER T. Eomes and T-bet, a dynamic Duo regulating NK cell differentiation[J/OL]. *Bioessays*, 2022, 44(3): e2100281[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35023197/>. DOI:10.1002/bies.202100281.
- [18] VERDEIL G, LAWRENCE T, SCHMITT-VERHULST A M, *et al.* Targeting STAT3 and STAT5 in tumor-associated immune cells to improve immunotherapy[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): E1832[2021-08-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966642/>. DOI:10.3390/cancers11121832.
- [19] RÉBÉ C, GHIRINGHELLI F. STAT3, a master regulator of anti-tumor immune response[J]. *Cancers*, 2019, 11(9): 1280. DOI:10.3390/cancers11091280.
- [20] MCGOWAN E, LIN Q M, MA G C, *et al.* PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatment of solid tumors: promises and challenges[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109625[2021-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733578/>. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109625.
- [21] HU W H, ZI Z G, JIN Y L, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3): 365-377. DOI:10.1007/s00262-018-2281-2.
- [22] 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.
- [23] TANG R H, RANGACHARI M, KUCHROO V K. Tim-3: a co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance[J/OL]. *Semin Immunol*, 2019, 42: 101302[2021-08-23]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2019.101302>. DOI:10.1016/j.smim.2019.101302.
- [24] 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. DOI:10.1038/s41591-018-0010-1.
- [25] KLEBANOFF C A, GATTINONI L, TORABI-PARIZI P, *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(27): 9571-9576. DOI:10.1073/pnas.0503726102.
- [26] BLAESCHKE F, STENGER D, KAEUFERLE T, *et al.* Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(7): 1053-1066. DOI:10.1007/s00262-018-2155-7.

[收稿日期] 2021-08-24

[修回日期] 2022-02-25

[本文编辑] 党瑞山