

一种靶向 HER2 嵌合抗原受体 CAR THP-1 细胞系的构建

陈义昭*, 刘丽华*, 朱向玲, 王卉卉, 吴旭铭, 檀学文, 方亦龙, 蒋海峰, 许振, 魏伟, 涂佳杰

摘要 目的 获得稳定转染靶向人类表皮生长因子 2 (HER2) 的嵌合抗原受体巨噬细胞 (CAR-M)。方法 构建靶向 HER2 的 CAR 慢病毒载体并感染人单核细胞白血病细胞系 (THP-1)。通过分选流式细胞仪分选出含有绿色荧光标记的 CAR THP-1 细胞并在体外继续培养。将此靶向 HER2 的 CAR THP-1 细胞与 HER2 表达阴性 (-) 及阳性 (+) 的子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 分别共培养, 通过成像流式细胞仪检测其对 HER2 表达阳性肿瘤细胞的靶向吞噬, 通过流式细胞仪检测其对 HER2 表达阳性肿瘤细胞的靶向吞噬比例。结果 CAR 慢病毒感染 THP-1 细胞效率较低; 与癌细胞共培养后, 流式细胞术及成像流式细胞术结果显示, CAR THP-1 组与空载体组相比, CAR THP-1 细胞对 HER2 阳性的 Ishikawa 细胞吞噬能力增强 ($P < 0.01$)。结论 通过构建 CAR 慢病毒载体并转染 THP-1 细胞, 成功建立了靶向 HER2 的 CAR THP-1 细胞系, 且其能通过特异性靶向吞噬 HER2 阳性 Ishikawa 细胞。

关键词 嵌合抗原受体巨噬细胞; 肿瘤细胞; 吞噬; 慢病毒

中图分类号 R 730.3; R-331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)03-0352-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.002

自 1989 年以色列学者 Eshhar^[1] 构建一代嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法 (chimeric antigen receptor t-cell immunotherapy, CAR-T) 后, 历经 30 余年的发展, CAR-T 疗法已被证明是治疗血液肿瘤的有效方法, 但同时也有大量的数据表明其对实体肿瘤的治疗缺乏有效性^[2]。巨噬细胞拥有吞噬活性, 抗原呈递能力及独特的穿透实体瘤的能力^[3]。CAR 为巨噬细胞抗肿瘤提供了新的思路: 表达 CAR 的巨噬细

胞靶向吞噬肿瘤细胞, 同时更多的肿瘤抗原呈递会进一步激活细胞毒性 T 细胞, 产生更强的抗肿瘤作用^[4]。

该实验拟构建靶向人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的 CAR 慢病毒载体, 通过转染 THP-1 细胞系, 获得靶向 HER2 的 CAR THP-1 细胞, 并在体外初步验证其对子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 靶向性和吞噬能力, 为未来嵌合抗原受体巨噬细胞 (chimeric antigen receptor macrophage immunotherapy, CAR-M) 研究提供实验基础, 可能有助于推进 CAR 技术用于实体肿瘤的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料 人源单核细胞系 THP-1 和人源子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胰蛋白酶 (货号: C0201)、青链霉素溶液 (货号: C0222) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 非必需氨基酸 (non essential amino acids, NEAA, 货号: 11140-050) 购自美国 Gibco 公司; RPMI-1640 培养基 (货号: 01-100-1 ACS) 购自上海源培生物科技股份有限公司; MEM 培养基 (货号: 01-026-1 ACS) 购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 货号: 04-001-1 ACS) 购自以色列 BI 公司; Age I 购自美国 NEB 公司; 质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司; anti-human HER2 抗体 (货号: 324405) 购自美国 BioLegend 公司; CellTracker™-Red CMTPX 荧光染料 (货号: C34552) 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒的构建 CAR 设计、基因序列合成及载体构建 根据 HER2 基因结构及四代 CAR-T 设计原则, 设计本实验 CAR 结构及序列。选择 GV208 作为载体, Age I 进行酶切, 酶切体系: 5 μ l 10 \times CutSmart Buffer2, 2 μ l 纯化的质粒 DNA, 1 μ l Age I, 加双蒸水补足 50 μ l 总体系。PCR 扩增目的基因片段, 反应体系: 1 μ g 模板, 1 μ l 上游引物, 1 μ l 下游引物, 0.5 μ l PrimeSTAR HS DNA polymerase, 4 μ l

2023-02-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31900616); 安徽省教育厅科学研究项目 (编号: YJS20210292)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 陈义昭, 男, 硕士研究生;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

涂佳杰, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

dNTP 10 μ l 5 \times PS Buffer 加双蒸水补足 50 μ l 总体系。扩增条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,循环 30 次。将扩增的目的基因片段与载体进行交换,将 10 μ l 交换产物转入 100 μ l 感受态细胞中,冰上放置 30 min,42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,冰水浴孵育 2 min。加入 500 μ l LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 摇床震荡 1 h。取适量菌液涂布于平板上,恒温培养箱过夜。然后将制备好的过表达载体接种至 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡过夜,用质粒抽提试剂盒制备质粒。

1.2.2 慢病毒包装 转染前一天将 HEK 293 T 细胞 2×10^6 个/ml 的密度接种于 10 mm 培养皿中,培养过夜,使转染时细胞汇合度为 70% ~ 80%,并在转染前 1 h 更换培养基为无抗生素 DMEM。将 20 μ l Lipofectamine 3 000 与 500 μ l Opti-MEM 培养基加入 EP 管中混匀静置 5 min;再将 10 μ g 目的质粒,7.5 μ g psPAX2 质粒、3.5 μ g pMD2. G 与 500 μ l Opti-MEM 培养基加入另一 EP 管中,再加入 20 μ l LP3000,混匀;将这两种溶液混合吹匀后,室温孵育 15 ~ 20 min,将孵育好的混合液体分别加入 HEK 293T 细胞中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,而后收集上清液,3 000 r/min 离心 10 min,用 0.45 μ m 孔径的滤头过滤去除细胞碎片,并使用超离法进行浓缩后测定滴度备用。

1.2.3 慢病毒转染 THP-1 及其纯化 THP-1 培养于 RPMI-1640 培养基中,补充 10% FBS 及 1% 的青链霉素,当细胞密度长至 80% 左右时开始后续实验。以 1×10^5 个/ml 的密度将 THP-1 细胞接种于 24 孔板内,按 MOI = 30 及相应病毒滴度加入病毒,培养 12 h 后更换为完全培养基继续培养 48 h。后于荧光显微镜下观察 GFP 蛋白表达情况。待细胞生长至一定规模,在无菌洁净的环境中,通过流式细胞分选仪分选荧光阳性细胞,继续培养后于荧光显微镜下观察。

1.2.4 分选 HER2 阳性(+)及阴性(-) Ishikawa 细胞 Ishikawa 细胞培养于 MEM 培养基中,补充 5% FBS、1% 的青链霉素和 1% NEAA 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养,当细胞密度长至 80% 左右时开始后续实验。将 Ishikawa 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化制备成细胞悬液,再用 PBS 洗涤细胞 2 次后加入 100 μ l PBS 重悬,在 4 $^{\circ}$ C 条件下用抗人 HER2 抗体孵育 30 min,PBS 洗涤后,用含 3% FBS 的 PBS 重悬细胞,通过流式细胞分选仪分选出 HER2 阳性及阴性的 Ishikawa 细胞。

1.2.5 转染后的 THP-1 与 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 共培养 将分选出的 HER2 阳性及阴性 Ishikawa 细胞用 PBS 洗涤细胞 2 次后,用含 CMTPIX 荧光探针的染色工作液重悬,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30 min 后离心收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次后用 500 μ l 不含 FBS 的 MEM 重悬。将构建成功的 CAR THP-1 和 CMTPIX 标记的 HER2 阴性及阳性 Ishikawa 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 湿润环境中分组按 3 : 1 的比例共培养。共培养 4 h 后,收集培养基并用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞于 EP 管中,1 200 r/min 离心 5 min 后用 PBS 重悬,通过流式细胞术与成像流式细胞术检测吞噬情况。

1.3 统计学处理 采用 Prism 6.0 进行统计学分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组间对比采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染 THP-1 细胞 CAR 慢病毒载体感染 THP-1 细胞 48 h 后,在荧光显微镜下观察有团状绿色荧光细胞存在,这是 THP-1 经慢病毒感染聚集形成的细胞增殖簇,这表明慢病毒载体所携带的基因已经成功进入并整合到 THP-1 细胞中。通过流式分选得知两种病毒的转染效率分别为 6.6%、8.2%,见图 1,经流式分选并继续培养后再次在荧光显微镜下观察,可见明显绿色荧光,阳性率接近 100%,见图 2。且在未分选前,视野内绿色荧光细胞较少,符合流式分选得知的较低的转染效率。同时荧光显微镜下,可见 CAR 慢病毒载体与空载体转染后,各组细胞同样保持了良好的形态、透光度,视野内未见明显大片细胞死亡。

2.2 分选 HER2 阳性及阴性 Ishikawa 细胞 通过流式细胞分选仪分选出 HER2 阳性及阴性的 Ishikawa 细胞,可见在 Ishikawa 细胞系中,HER2 表达比例较高,但细胞分群不明显,为避免出现假阳性的情况,选择较为严格的阳性及阴性分选策略即以 blank 为 HER2 - Ishikawa 细胞,且尽量选择 HER2 表达高的细胞群为 HER2 + Ishikawa 细胞来分选 HER2 + 及 HER2 - Ishikawa 细胞,见图 3。

2.3 HER2 CAR THP-1 与 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 细胞共培养 流式细胞术结果表明,见图 4,空载体 THP-1 与 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 细胞共培养后,空载体 THP-1 对 HER2 - Ishikawa 细胞吞噬比例为(11.22 \pm 0.185)% 空载体 THP-1 对 HER2 + Ishikawa 细胞吞噬比例为(11.04 \pm 0.475)%。

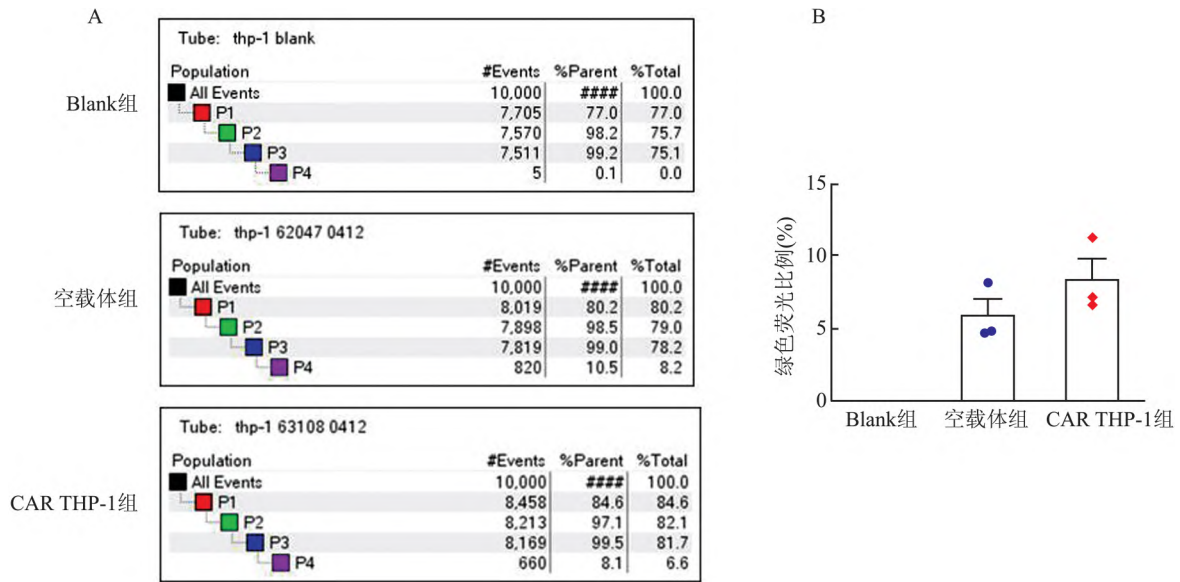


图1 流式分选荧光阳性细胞

A: 流式分选荧光阳性细胞; B: 慢病毒转染效率; P4: GFP 阳性细胞

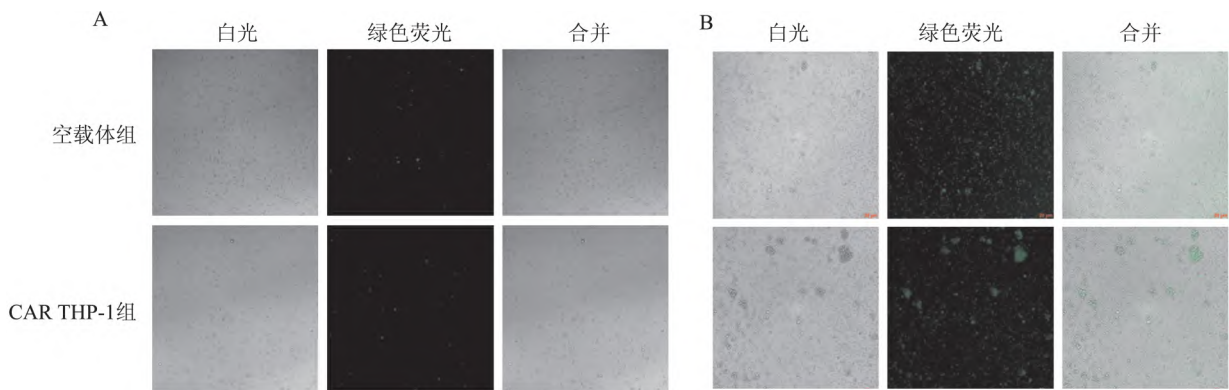


图2 荧光显微镜下观察慢病毒转染效果

A: 分选前的 THP-1 细胞; B: 分选后的 THP-1 细胞

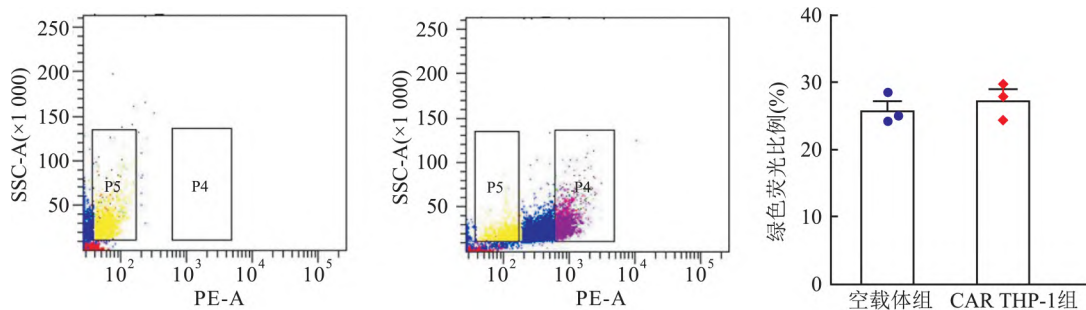


图3 流式分选 HER2 阳性及阴性 Ishikawa 细胞 (n = 3)

P4: HER2 阳性 Ishikawa 细胞; P5: HER2 阴性 Ishikawa 细胞

空载体组对 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 细胞的吞噬差异无统计学意义 ($t = 0.340, P > 0.05$)。HER2 CAR THP-1 与 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 细胞共培养后, CAR THP-1 对 HER2 - Ishikawa 细胞吞噬比例为 $(13.61 \pm 0.700) \%$, CAR THP-1 对 HER2 + 的 Ishikawa 细胞的吞噬比例为 $(22.11 \pm$

$0.751) \%$, CAR THP-1 组对 HER2 + 及 HER2 - 的 Ishikawa 细胞的吞噬差异有统计学意义 ($t = 8.283, P < 0.01$)。靶向 HER2 的 CAR THP-1 对 HER2 + 的 Ishikawa 细胞的吞噬增多。通过成像流式获得的吞噬图像显示的结果与经典流式细胞术结果一致, 见图5。这表明构建的靶向 HER2 的 CAR, 可以特异

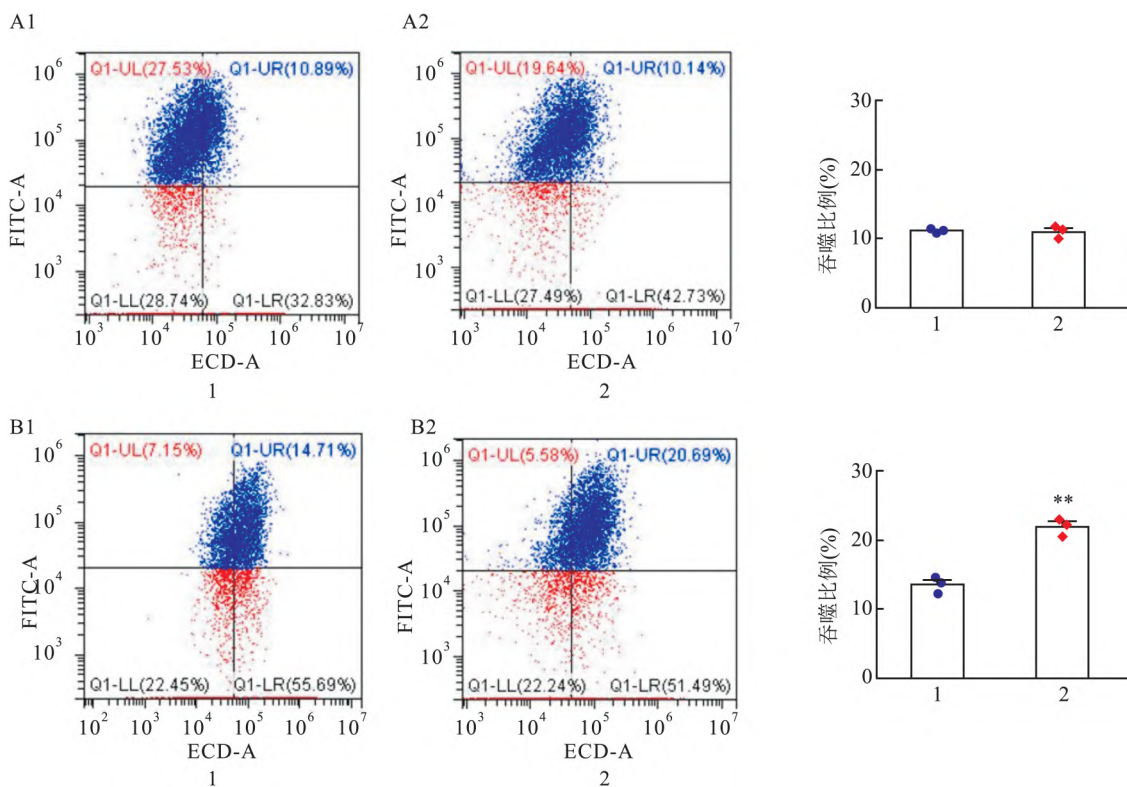


图4 流式细胞术检测吞噬情况(n=3)

A: 空载体组; B: CAR-THP-1 组; A1: 空载体与 HER2 - Ishikawa; A2: 空载体与 HER2 + Ishikawa; B1: CAR THP-1 与 HER2 - Ishikawa; B2: CAR THP-1 与 HER2 + Ishikawa; 与 CAR THP-1 与 HER2 - Ishikawa 比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

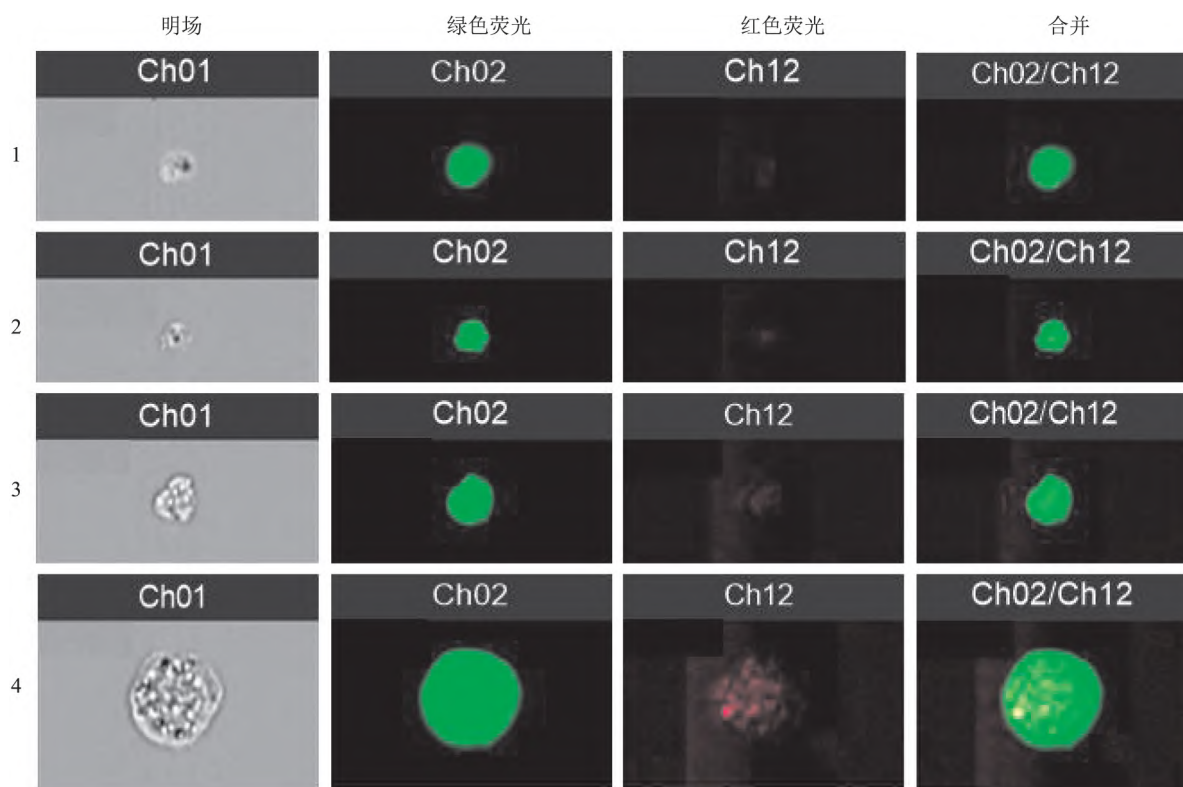


图5 成像流式细胞术观察吞噬的图像

绿色荧光: 慢病毒感染后的 THP-1 细胞; 红色荧光: 荧光染料标记的 Ishikawa 细胞; 1: 空载体与 HER2 - Ishikawa; 2: 空载体与 HER2 + Ishikawa; 3: CAR THP-1 与 HER2 - Ishikawa; 4: CAR THP-1 与 HER2 + Ishikawa

性增多 THP-1 对 HER2 + Ishikawa 细胞的吞噬。

3 讨论

HER2 是一种原癌基因,编码具有酪氨酸激酶活性的表皮生长因子,HER2 没有已知的配体,但它能够与其他表皮生长因子受体家族成员的异二聚体发出信号,从而影响这些受体的下游信号转导^[5]。HER2 激活后对于癌症发生发展的不利影响已经通过子宫内膜癌、乳腺癌和卵巢癌等癌症的 HER2 基因扩增得到证实,并已发现在这些癌症中 HER2 基因扩增导致其过表达是 HER2 激活的主要机制^[6-7]。HER2 基因在 17% ~ 33% 的肉瘤、子宫浆液性癌和一部分高级别子宫内膜样子宫内腺肿瘤中扩增,而在正常人体中,HER2 基因仅在极少数组织有表达^[8]。因此,为避免脱靶效应,HER2 是较为理想的嵌合抗原受体巨噬细胞靶点。

在免疫细胞过继疗法持续发展的今天,抗 HER2 CAR-T 细胞疗法有望成为一种新的针对 HER2 过表达癌症的新治疗方法。有研究^[9-10]证明靶向 HER2 的 CAR-T 细胞能以独立于主要组织相容复合物的方式在体内外杀死 HER2 表达阳性的胃癌细胞、皮肤黑色素瘤细胞、肉瘤细胞等。而且抗 HER2 CAR-T 细胞在乳腺癌中能突破细胞外基质成分所形成的屏障对抗对曲妥珠单抗耐药的肿瘤^[11]。除此之外,研究者们还将抗 HER2 CAR-T 细胞与其他的疗法联用,如与溶瘤病毒、免疫检查点阻断等方法联用^[12],或是构建双特异性 CAR-T 细胞^[13],都表现出抗肿瘤活性的增强。尽管这些抗 HER2 CAR-T 细胞疗法都表现出体内外的抗肿瘤能力,但部分 CAR-T 在动物实验中出现了免疫排斥反应,而且 CAR-T 上调的 IFN- γ 、IL-2、IL-4、TNF- α 等炎性因子与细胞因子释放综合征的发生相关,有产生细胞因子释放综合征的风险。在将 CAR 策略应用于 T 细胞获得成功后,有研究者尝试构建 CAR-NK 细胞来对抗癌症。并在体内外实验中证明 CAR-NK 细胞

能够杀死 HER2 阳性的胶质母细胞瘤^[14]。在 CAR-NK 疗法中,由于 NK 细胞不需要严格的白细胞匹配,能降低发生免疫排斥反应的风险,但仍有发生细胞因子释放综合征的风险。

在将 CAR 应用于 T 细胞、NK 细胞这些适应性免疫细胞后,先天性免疫细胞中的巨噬细胞因其在免疫系统和癌症微环境中的重要作用而被人们关注,并开发了一种名为 CAR-M 的细胞免疫疗法。宾夕法尼亚大学的研究者^[6]已经通过腺病毒感染,成功构建抗 HER2 CAR-M 并在体内外验证了其抗肿瘤细胞的吞噬作用。本实验通过构建一种新的 CAR 慢病毒载体,并转染 THP-1 细胞系,获得了能靶向 HER2 阳性肿瘤细胞的 CAR THP-1。可用于后续的靶向吞噬实验和探索 CAR-M 的其他相关作用及作用机制。在载体构建方面,课题组依据第四代 CAR-T 细胞疗法中 CAR 的结构,以抗 HER2 可变片段为肿瘤相关抗原结合区,CD8 为胞外铰链区,CD28 为跨膜区,CD3 ζ 为胞内活化信号设计了 CAR 序列,见图 6。目前,在与 CAR-M 相关的研究中,还没有设计专属于巨噬细胞的 CAR 结构,而在 CAR-NK 的相关研究中已经证明 CAR 结合表位的位置及其与细胞表面的距离影响对抗原的结合和细胞的激活,因此从 CAR-M 自身的结构出发,可以考虑调整 CAR 的结构,通过关联不同的结构域,探索最适合巨噬细胞的 CAR 结构来增强 CAR-M 对癌细胞的吞噬效果。另一个问题是基因转移方法,目前的 CAR-M 大都依靠病毒转染的方法进行基因转移,有产生插入突变的风险,对治疗带来不可控的影响,CRISPR/Cas9 基因组靶向系统为解决这一问题提供了一种新的可能。实验过程中,CAR 慢病毒对于 THP-1 的转染效率偏低,后期会考虑使用转染效率更高的腺病毒载体。对于 CAR-M 在体内对实体瘤的抑制作用,课题组将在后续的研究中继续探索 CAR-M 通过抗原呈递对细胞毒性 T 细胞的激活作用及对肿瘤微环境的影响。



图 6 CAR 的具体结构

参考文献

- [1] Kosti P, Maher J, Arnold J N. Perspectives on chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy for solid tumors [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1104.
- [2] Dolgin E. Cancer-eating immune cells kitted out with CARs [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 509–11.
- [3] Guerriero J L. Macrophages: The road less traveled, changing anticancer therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(5): 472–89.
- [4] Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(8): 947–53.
- [5] Lemmon M A, Schlessinger J, Ferguson K M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(4): a020768.
- [6] Yan M, Schwaederle M, Arguello D, et al. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37 992 patients [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(1): 157–64.
- [7] 刘虎, 吴思滢, 包楚阳, 等. 基因集富集分析探讨 HER2 基因对胃癌代谢的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2020, 55(9): 1339–42, +1349.
- [8] Diver E J, Foster R, Rueda B R, et al. The therapeutic challenge of targeting HER2 in endometrial cancer [J]. *Oncologist*, 2015, 20(9): 1058–68.
- [9] Forsberg E M V, Lindberg M F, Jespersen H, et al. HER2 CAR-T cells eradicate uveal melanoma and T-cell therapy-resistant human melanoma in IL2 transgenic NOD/SCID IL2 receptor knock-out mice [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(5): 899–904.
- [10] Song Y, Tong C, Wang Y, et al. Effective and persistent antitumor activity of HER2-directed CAR-T cells against gastric cancer cells *in vitro* and xenotransplanted tumors *in vivo* [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(10): 867–78.
- [11] Szoor A, Toth 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]. *Cancer Lett*, 2020, 484: 1–8.
- [12] Porter C E, Rosewell Shaw A, Jung Y, et al. Oncolytic adenovirus armed with bite, cytokine, and checkpoint inhibitor enables CAR T cells to control the growth of heterogeneous tumors [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(5): 1251–62.
- [13] Li P, Ynag L, Li T, et al. The third generation anti-HER2 chimeric antigen receptor mouse T cells alone or together with anti-PD1 antibody inhibits the growth of mouse breast tumor cells expressing HER2 *in vitro* and in immune competent mice [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1143.
- [14] Zhang C, Burger N C, Jennewein L, et al. ErbB2/HER2-Specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108: 5.

Construction of a chimeric antigen receptor CAR THP-1 cell line targeting HER2

Chen Yizhao, Liu Lihua, Zhu Xiangling, Wang Huihui, Wu Xuming, Tan Xuewen,
Fang Yilong, Jiang Haifeng, Xu Zhen, Wei Wei, Tu Jiajie

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract Objective To obtain chimeric antigen receptor macrophages (CAR-M) targeting HER2 stably transfected. **Methods** CAR lentivirus vector targeting HER2 was constructed and infected with human monocytic leukemia cell line (THP-1). CAR THP-1 cells with green fluorescent labeling were selected by sorting flow cytometry and continued to be cultured *in vitro*. The CAR THP-1 cells targeting HER2 were co-cultured with the endometrial cancer cell line Ishikawa with negative and positive HER2 expression, and their targeted phagocytosis of CAR-M to HER2 positive tumor cells was detected by imaging flow cytometry, and the targeted phagocytosis efficiency of CAR-M to HER2 positive tumor cells was detected by flow cytometry. **Results** CAR lentivirus infection with THP-1 cells was less efficient; After co-culture with cancer cells, flow cytometry and imaging flow cytometry showed that CAR THP-1 cells had enhanced phagocytosis of HER2 positive Ishikawa cells compared with the empty body group ($P < 0.01$). **Conclusion** In this experiment, CAR THP-1 cell line targeting HER2 was established by constructing CAR lentivirus vector and transfecting THP-1 cells, and it was proved that CAR THP-1 could phagocytize HER2 positive Ishikawa cells through specific targeting.

Key words chimeric antigen receptor macrophage; tumor; phagocytosis; lentivirus