

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.002

· 基础研究 ·

## 异位表达血红蛋白亚基增强 CAR-T 细胞在缺氧条件下的体外肿瘤细胞杀伤作用

杨建勋<sup>1,2</sup>, 郑瑞<sup>3</sup>, 梁思辛<sup>3</sup>, 潘杰<sup>4</sup>, 李琰龙<sup>5</sup>, 翟晨曦<sup>5</sup>, 赵晓娟<sup>2</sup>, 王鹏举<sup>3</sup>, 董昊<sup>4</sup>, 阎博<sup>2</sup>, 孙志宏<sup>1</sup>, 杨安钢<sup>3</sup>(1. 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 空军军医大学 基础医学院 免疫学教研室, 陕西 西安 710032; 4. 空军军医大学 西京医院 妇产科, 陕西 西安 710032; 5. 新乡医学院 医学技术学院, 河南 新乡 453003)

**[摘要]** **目的:** 探讨异位表达血红蛋白亚基(HBA/HBB)对缺氧条件下嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)功能障碍的改善作用及其对肿瘤细胞的杀伤效应。**方法:** 全基因合成技术合成靶向HER2的CAR序列, 构建共表达HBA或HBB的CAR慢病毒载体, 包装慢病毒后感染人原代T淋巴细胞, 制备异位表达HBA/HBB的CAR-T细胞, 命名为HBA CAR-T和HBB CAR-T。采用缺氧探针检测小鼠实体瘤缺氧状态。通过流式细胞术检测瘤内CAR-T细胞占比、异位表达血红蛋白亚基的CAR-T细胞阳性率及CAR-T细胞的活性氧、凋亡水平。WB法检测HBA CAR-T和HBB CAR-T内相关血红蛋白亚基表达情况, 采用细胞计数板计数检测细胞增殖水平, 通过萤光素酶报告基因法检测CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力, qPCR检测CAR-T细胞中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达水平, 利用MitoXpress Intra试剂盒检测CAR-T细胞内氧气含量。**结果:** 不同细胞构建的实体瘤模型均存在明显缺氧情况, 且CAR-T细胞浸润水平与缺氧程度呈显著负相关( $P < 0.0001$ )。HBA CAR-T与HBB CAR-T构建成功(阳性率  $> 60%$ ), 相应血红蛋白亚基可稳定表达。缺氧环境下HBA CAR-T和HBB CAR-T的ROS水平、凋亡水平显著下降, 增殖、对肿瘤细胞的体外杀伤能力显著强于传统CAR-T细胞(均  $P < 0.05$ )。HBA CAR-T与HBB CAR-T内HIF-1 $\alpha$ 表达降低(均  $P < 0.001$ ), 且缺氧程度显著降低(均  $P < 0.001$ )。**结论:** 异位表达血红蛋白亚基可改善缺氧条件下CAR-T细胞功能障碍并增强其对肿瘤细胞的体外杀伤作用。

**[关键词]** 实体瘤; 缺氧微环境; 嵌合抗原受体T细胞; 血红蛋白

**[中图分类号]** R392, R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 03-0233-10

## Ectopic expression of hemoglobin subunits enhances the *in vitro* cytotoxicity of CAR-T cells against tumor cells under hypoxic conditions

YANG Jianxun<sup>1,2</sup>, ZHENG Rui<sup>3</sup>, LIANG Sixin<sup>3</sup>, PAN Jie<sup>4</sup>, LI Yanlong<sup>5</sup>, ZHAI Chenxi<sup>5</sup>, ZHAO Xiaojuan<sup>2</sup>, WANG Pengju<sup>3</sup>, DONG Hao<sup>4</sup>, YAN Bo<sup>2</sup>, SUN Zhihong<sup>1</sup>, YANG Angang<sup>3</sup>(1. College of Life Science, Yanan University, Yanan 716000, Shaanxi, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 3. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 4. Department of Gynaecology, Xijing Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 5. College of Medical Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether ectopic expression of hemoglobin subunits (HBA/HBB) improves chimeric antigen receptor T cell (CAR-T cell) function and enhances cytotoxicity against tumor cells under hypoxic conditions. **Methods:** The CAR sequence targeting HER2 was synthesized by full gene synthesis technology, and the CAR lentiviral vectors co-expressing HBA or HBB were constructed. After packaging the lentivirus, human primary T lymphocytes were infected to prepare HBA CAR-T and HBB CAR-T. Hypoxia in mouse solid tumors was detected by hypoxia probes. The proportion of CAR-T cells in the tumor, the percentage of CAR-T cells expressing hemoglobin, and the levels of reactive oxygen species and apoptosis of CAR-T cells under different conditions were detected by flow cytometry. The expression of related hemoglobin subunits in CAR-T cells was detected by WB assay. The proliferation level of cells was detected by hemocytometer, the cytotoxicity of CAR-T cells against tumor cells was detected by

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82503710); 消化系统肿瘤整合防治全国重点实验室课题(CBSKL2022ZZ04, 2025GTEP012); 陕西省重点项目(2025SYS-SYSZD-030)

**[作者简介]** 杨建勋, 男, 硕士生

**[通信作者]** 杨安钢, 孙志宏(扫码获取作者通信方式)



luciferase reporter assay, the expression level of HIF-1 $\alpha$  in CAR-T cells was detected by qPCR, the oxygen content in T cells was detected by MitoXpress Intra kit. **Results:** The solid tumor models constructed from different cell lines all exhibited significant hypoxia, and the infiltration level of CAR-T cells was significantly negatively correlated with the degree of hypoxia ( $P < 0.0001$ ). HBA CAR-T and HBB CAR-T were successfully constructed (positive rate  $> 60\%$ ), and the corresponding hemoglobin subunits were stably expressed. Under hypoxic conditions, the ROS level and apoptosis level of HBA CAR-T and HBB CAR-T significantly decreased, and their proliferation and cytotoxicity against tumor cells were significantly stronger than those of conventional CAR-T cells (all  $P < 0.05$ ). HBA CAR-T and HBB CAR-T showed decreased HIF-1 $\alpha$  expression (all  $P < 0.001$ ), and their level of hypoxia significantly decreased (all  $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The ectopic expression of hemoglobin can reverse the functional impairment of CAR-T cells under hypoxic conditions and enhance their cytotoxicity against tumor cells *in vitro*.

**[Key words]** solid tumors; hypoxia tumor microenvironment (TME); chimeric antigen receptor T cell (CAR-T cell); hemoglobin (Hb)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(3): 233-242. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.002]

嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T 细胞)疗法是指通过基因工程,使 T 细胞表达能够识别肿瘤相关抗原的嵌合受体,从而精准靶向并杀伤肿瘤细胞<sup>[1-2]</sup>。CAR-T 细胞疗法对血液系统恶性肿瘤的临床治疗效果显著,目前已取得了令人振奋的进展<sup>[3-4]</sup>。然而,实体瘤中肿瘤靶抗原表达的异质性, CAR-T 细胞向肿瘤部位的有效迁移和浸润不足,以及复杂的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),导致 CAR-T 细胞疗法对实体瘤疗效有限<sup>[5-6]</sup>。其中,实体瘤内普遍存在的缺氧微环境,是阻碍 CAR-T 细胞在实体瘤治疗中发挥抗肿瘤功能的核心障碍之一<sup>[7-9]</sup>。

肿瘤细胞的快速增殖常导致其生长速度超过新血管形成速度,致使肿瘤组织内部出现供血不足的区域,从而引发缺氧<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11-12]</sup>表明,实体瘤内部的氧气含量普遍较低,平均为 1.3%,显著低于正常组织的平均氧气含量(5.9%)。在实体瘤 TME 中,肿瘤浸润 T 细胞同时暴露于缺氧、持续抗原刺激及肿瘤产生的抑制性代谢物等不利因素下,易发生功能耗竭,丧失抗肿瘤活性,甚至死亡。因此,深入理解肿瘤缺氧微环境对 T 细胞功能的影响,并开发更有效的实体瘤免疫治疗策略,对推动 CAR-T 细胞在实体瘤治疗中的发展具有重要的科学意义和临床价值<sup>[13-14]</sup>。

血红蛋白是红细胞中负责运输氧气的蛋白,生理状态下存在于红细胞内,由两个  $\alpha$ -珠蛋白亚基(由 HBA 基因编码)和两个  $\beta$ -珠蛋白亚基(由 HBB 基因编码)组成四聚体,每个亚基结合一个血红素辅基<sup>[15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>报道,存在于软骨细胞中的血红蛋白在单独过表达 HBB 时能在细胞质内形成无膜的血红蛋白小体。这种血红蛋白小体作为氧气储存结构,可在组织缺氧时释放其中储存的氧气,以维持软骨细胞的存活和发育。本研究旨在构建可异位表达血红蛋白亚基的 CAR-T 细胞(HBA CAR-T 或 HBB CAR-T),以期借助血红蛋白亚基的储氧能力改善缺氧条件下 CAR-T 细胞自身的氧气供应,增强其在缺氧 TME 中

的适应性和体外抗肿瘤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物、细胞及主要试剂

24 只雌性 6 周龄 NSG 小鼠,购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司(实验动物生产许可证号: B202411270091),饲养于空军军医大学实验动物中心[实验动物使用许可证号: SYXK(陕)2024-003],采用 SPF 级独立通风笼饲养,环境控制为室温( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度( $50 \pm 10$ )%, 12 h 光照/黑暗周期,自由摄食饮水并定期消毒。本研究动物实验方案经过空军军医大学实验动物伦理委员会审批,审批号: 20210565。

稳定表达 HER2 蛋白和萤火虫萤光素酶(firefly luciferase, Fluc)的人宫颈癌 HeLa 细胞、人肺腺癌 NCI-H1975 细胞、人非小细胞肺癌 PC-9 细胞(分别命名为 HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> HeLa 细胞、HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> NCI-H1975 细胞、HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> PC-9 细胞)及人胚肾细胞(HEK-293T),生物素修饰的人 HER2 蛋白(HER2-Biotin)、pLVX-P1h2-CD28-CD3 $\zeta$  慢病毒质粒、辅助质粒 pMD2.G 和 psPAX2 由空军军医大学生物化学与分子生物学实验室构建或保存, HBA CAR 或 HBB CAR 的全基因序列由北京奥科生物技术有限责任公司合成, Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 缺氧探针检测试剂盒购自北京博蕾德生物科技有限公司, T 细胞活化磁珠购自北京百普塞斯生物科技有限公司, DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, X-VIVO15 培养液购自瑞士 Lonza 公司, 人重组 IL-2 购自上海普欣生物技术有限公司, 转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司, APC 标记的链霉亲和素、PE-Cy7 标记的抗人 Annexin V 抗体购自美国 BioLegend 公司, 人缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和 GAPDH 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 小鼠肿瘤组织解离试剂购自德国 Miltenyi

Biotec 公司, OCT 包埋剂购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, MitoXpress Intra 试剂盒购自美国 Agilent Technologies 公司, 萤火虫萤光素酶报告基因检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司, D-萤光素钾盐购自和元李记(上海)生物技术有限公司, RIPA 裂解液、无蛋白快速封闭液( $1 \times$ )购自上海雅酶公司, 兔抗 CD28 抗体购自美国 Abcam 公司, 小鼠抗 GAPDH 抗体、兔抗 HBA 多克隆抗体、兔抗 HBB 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔/小鼠 IgG 均购自武汉三鹰生物技术有限公司, RNAiso Plus RNA 提取试剂、反转录酶购自日本 TaKaRa 公司。

### 1.1.2 主要仪器

Forma II 系列三气培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, C1000/S1000 型 PCR 仪、1645052 型 Western blotting (WB) 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司, MiniChem<sup>®</sup> 化学发光成像系统购自北京森西赛智科技有限公司, 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司, BX50 型荧光显微镜、连续扫描数字切片显微镜购自日本 Olympus 公司, IVIS<sup>®</sup> Lumina Series II 小动物活体光学成像系统购自美国 PerkinElmer 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小鼠荷瘤模型构建

将  $5 \times 10^5$  个 HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> HeLa 细胞、HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> PC-9 细胞、HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> NCI-H1975 细胞用 200  $\mu$ L 生理盐水重悬后, 经皮下注射接种于 NSG 小鼠右侧背部, 建立小鼠荷瘤模型。接种后每日观察小鼠肿瘤生长情况, 当肿瘤体积达到 100~500 mm<sup>3</sup> 时, 视为造模成功。接种第 7 天经尾静脉注射  $1 \times 10^7$  个 CAR-T 细胞进行治疗, 并根据实验设计进行后续实验。

### 1.2.2 检测肿瘤组织缺氧程度

荷瘤后第 14 天, 按照 Hypoxyprobe<sup>™</sup>-1 缺氧探针检测试剂盒说明书的方法进行处理: 在麻醉处死小鼠前 60~90 min, 通过腹腔注射缺氧探针, 剂量根据体质量计算(1 只 25 g 的小鼠, 注射 1.5 mg 缺氧探针), 剖取肿瘤组织经固定包埋后连续切片, 进行免疫荧光染色。通过荧光显微镜观察并拍摄小鼠肿瘤组织切片的荧光分布, 将拍摄的图像通过 ImageJ 软件进行定量分析, 每个样本随机选取 5 个视野, 以平均荧光强度表示瘤内缺氧程度。

### 1.2.3 重组质粒构建

本实验室构建并保存的传统二代 CAR 分子 (conventional CAR, Conv. CAR) 以靶向 HER2 的人源化单链抗体 P1h2 作为抗原识别区, 连接 CD8 $\alpha$  铰链区及跨膜区段, 胞内信号传导结构域包括 CD28 和

CD3 $\zeta$ 。通过自剪切多肽 2A (T2A) 将 HBA 或 HBB 基因与上述 CAR 结构相连。将合成的完整序列经 EcoR I 和 Mlu I 酶切位点定向克隆至 pLVX-EF1 $\alpha$ -IRES-Puro 质粒中, 构建得到两种重组慢病毒质粒, 分别命名为 HBA CAR 和 HBB CAR。

### 1.2.4 慢病毒包装

将 HEK-293T 接种到 12 孔板中, 待细胞汇合度达到 75% 时, 按照转染试剂 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 说明书, 将目的质粒与辅助质粒 pMD2.G、psPAX2 共转染细胞。转染 48 和 72 h 后收取含病毒的上清液,  $1\ 000 \times g$  离心 5 min, 取上清液用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 获得病毒液, 分别为 Conv. CAR 慢病毒、HBA CAR 慢病毒和 HBB CAR 慢病毒。

将获得的 Conv. CAR 慢病毒、HBA CAR 慢病毒和 HBB CAR 慢病毒分别设置不同梯度, 感染 HEK-293T 细胞, 通过流式细胞术检测不同梯度病毒的感染效率, 计算病毒滴度。计算公式: 病毒滴度 (TU/mL) = (感染时细胞数  $\times$  阳性细胞比例) / 加入病毒体积, 计算时选取阳性率为 10%~30% 的病毒用量进行线性拟合计算。

### 1.2.5 Conv. CAR-T 细胞及过表达 HBA/HBB 的 CAR-T 细胞制备

密度梯度离心法分离志愿者外周血的单个核细胞, 通过磁珠分选后获得 CD3<sup>+</sup> T 细胞 [后续作为未处理 T (Untreated T) 细胞], 经抗 CD3/CD28 抗体磁珠活化 24 h 后, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 2 加入适量体积的病毒液, 通过离心辅助转导 ( $800 \times g$ , 90 min) 后培养 24 h。弃去病毒液, 更换为含有胎牛血清、青霉素-链霉素和重组人 IL-2 的 X-VIVO15 培养液进行扩增培养, 获得 Conv. CAR-T 细胞及过表达 HBA 或 HBB 的 CAR-T 细胞, 分别命名为 Conv. CAR-T、HBA CAR-T 及 HBB CAR-T。

志愿者均自愿参与本研究, 并签署知情同意书, 研究方案已获空军军医大学伦理委员会审准 (审准号: KY20214016-1)。共纳入志愿者 5 名, 其中男性 3 名、女性 2 名, 年龄 25~35 岁, 身体健康, 无恶性肿瘤、自身免疫性疾病等病史, 近 3 个月未用免疫抑制剂、未输血, 血常规正常。

### 1.2.6 流式细胞术检测 CAR-T 细胞阳性率、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平及凋亡情况

检测 CAR-T 细胞阳性率: 取制备培养 7 d 后的 CAR-T 细胞  $1 \times 10^6$  个, 用流式细胞清洗液洗涤 3 次, 加入 1  $\mu$ g 生物素化的人 HER2 蛋白, 4  $^{\circ}$ C 放置 30 min。经流式细胞清洗液洗涤 3 次, 加入 100  $\mu$ L 流式细胞清洗液和 1  $\mu$ L APC 标记的链霉亲和素, 4  $^{\circ}$ C 静置 30 min; 再次洗涤 3 次后重悬细胞, 通过流式

细胞仪检测, APC 阳性率即为 CAR-T 细胞的阳性率。

**检测 ROS 水平:**取  $1 \times 10^6$  个目标 CAR-T 细胞, 用流式细胞清洗液洗涤 3 次。将 1  $\mu$ L 碧云天 MitoSO<sup>TM</sup> Red 加入 1 mL PBS (1 $\times$ ) 中制成工作液, 取 500  $\mu$ L 工作液重悬细胞, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min (期间混匀一次), 经流式细胞清洗液清洗细胞 3 次, 加入 400  $\mu$ L 流式细胞清洗液重悬细胞, 通过流式细胞仪检测 ROS 水平, FITC 阳性率即为 ROS 水平。

**检测凋亡细胞占比情况:**取  $1 \times 10^6$  个目标 CAR-T 细胞, 用流式细胞清洗液洗涤细胞 3 次, 加入 50  $\mu$ L Annexin V Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5  $\mu$ L PC5.5 标记的 7-AAD 流式抗体及 10  $\mu$ L PE-Cy7 标记的 Annexin V 流式抗体, 置于室温下避光结合 15 min, 加入 250  $\mu$ L Annexin V Binding Buffer 重悬细胞, 通过流式细胞仪检测, PE-Cy7 和 PC5.5 双阳性率即为凋亡细胞占比。

#### 1.2.7 WB 法检测 CAR 分子、HBA、HBB 的表达水平

取  $1 \times 10^6$  个 HBA CAR-T 或 HBB CAR-T, 加入 RIPA 裂解液冰浴裂解 30 min, 12 000  $\times$  g 离心 10 min 后取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白质质量浓度, 统一蛋白上样量后, 加入 5  $\times$  SDS-PAGE 缓冲液煮沸 15 min。样品经 SDS-PAGE 分离后, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入小鼠抗 GAPDH 抗体 (1:30 000)、兔抗 CD28 抗体 (1:1 000)、兔抗 HBA/HBB 抗体 (1:3 000), 4  $^{\circ}$ C 处理过夜; 用 TBS HRPT 洗涤后分别加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:10 000)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:10 000), 置于摇床内 20  $^{\circ}$ C 反应 1 h; TBST 洗涤 3 次后在化学发光成像系统中对蛋白条带进行化学显影, 最后通过 ImageJ 分析蛋白条带灰度值。

#### 1.2.8 肿瘤组织内浸润 CAR-T 细胞数量测定

按照方法 1.2.1 构建小鼠荷瘤模型, CAR-T 细胞治疗后第 14 天, 剥离肿瘤组织, 去除周围筋膜后剪碎。加入小鼠肿瘤组织解离液, 37  $^{\circ}$ C 裂解 90 min 制备单细胞悬液, 洗涤细胞 3 次。将所得到的细胞按照方法 1.2.5 中 CAR-T 细胞阳性率的检测方法, 检测肿瘤内部 CAR-T 细胞的浸润数量。

#### 1.2.9 持续抗原刺激下 CAR-T 细胞在不同氧气条件下的增殖能力检测

取各组 CAR-T 细胞 ( $4 \times 10^5$  个细胞) 接种于预铺有  $2 \times 10^5$  个 HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> HeLa 细胞的 X-VIVO15 完全培养基中, 分别在缺氧条件 (37  $^{\circ}$ C、1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 和常氧条件 (37  $^{\circ}$ C、21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 下进行培养, 命名为缺氧组和常氧组。培养期间每 48 h 在显微镜下用血球计数板对各组细胞进行计数, 同时将上述各组 T 细

胞转移至新的预铺有 HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> HeLa 细胞的培养基中维持抗原刺激, 记录 T 细胞数量变化。

#### 1.2.10 荧光素酶报告基因实验检测 CAR-T 细胞杀伤能力

取  $1 \times 10^4$  个 HER2<sup>+</sup> Fluc<sup>+</sup> HeLa 细胞作为靶细胞铺于透明底黑色 96 孔板中, 每组设置 3 个重复, 以 Untreated T 作为阴性对照组, 按照 2:1、1:1、1:2、1:4 效靶比加入 CAR-T 细胞, 分别于常氧 (37  $^{\circ}$ C、21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 或缺氧 (37  $^{\circ}$ C、1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 条件下处理 12 h; 用 PBS 洗涤 2 次, 加入 D-荧光素钾盐底物, 通过光学成像系统检测荧光素酶相对荧光强度并计算杀伤效率。杀伤率 = (靶细胞对照荧光值 - 实验组荧光值) / 靶细胞对照荧光值  $\times$  100%

#### 1.2.11 MitoXpress Intra 试剂盒检测 CAR-T 细胞缺氧情况

取  $1 \times 10^6$  个经过常氧或缺氧条件处理的 CAR-T 细胞, 按照 MitoXpress Intra 试剂盒说明书的方法进行处理: 将 MitoXpress Intra 试剂以无菌水复溶后, 与经过包被固定处理的 CAR-T 细胞共培养过夜 (> 14 h), 使纳米探针通过内吞进入胞内。次日去除含探针培养基, 用预热的缓冲液洗涤细胞 2 次, 每孔加 150  $\mu$ L 测量液, 37  $^{\circ}$ C 平衡 20~30 min。随后置于荧光显微镜下观察并拍摄细胞内荧光水平, 通过 ImageJ 软件对图像的荧光信号进行定量分析, 每个样本随机选取 5 个视野, 分别读取荧光数值, 以荧光强度反映细胞内部缺氧情况。

#### 1.2.12 qPCR 法检测 HIF-1 $\alpha$ 的表达情况

取  $2 \times 10^6$  个经过常氧或缺氧条件处理的 CAR-T 细胞, RNAiso Plus 试剂提取细胞内总 RNA, 经反转录后获得 cDNA, 取 2  $\mu$ L 稀释后的 cDNA (稀释比例为 1:10) 作为模板进行 qPCR 反应。qPCR 反应程序为 95  $^{\circ}$ C、2 min; 95  $^{\circ}$ C、10 s, 60  $^{\circ}$ C、30 s, 共 40 个循环, 熔解曲线分析使用仪器默认程序。最后采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算 3 组 CAR-T 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达水平变化。(内参 GAPDH 正向引物序列为 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3'、反向引物序列为 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'; HIF-1 $\alpha$  正向引物序列为 5'-TTCCCGACTAGGCCCATTC-3'、反向引物序列为 5'-CAGGTATTCAAGGTCCCATTTC-3')。

#### 1.3 统计学处理

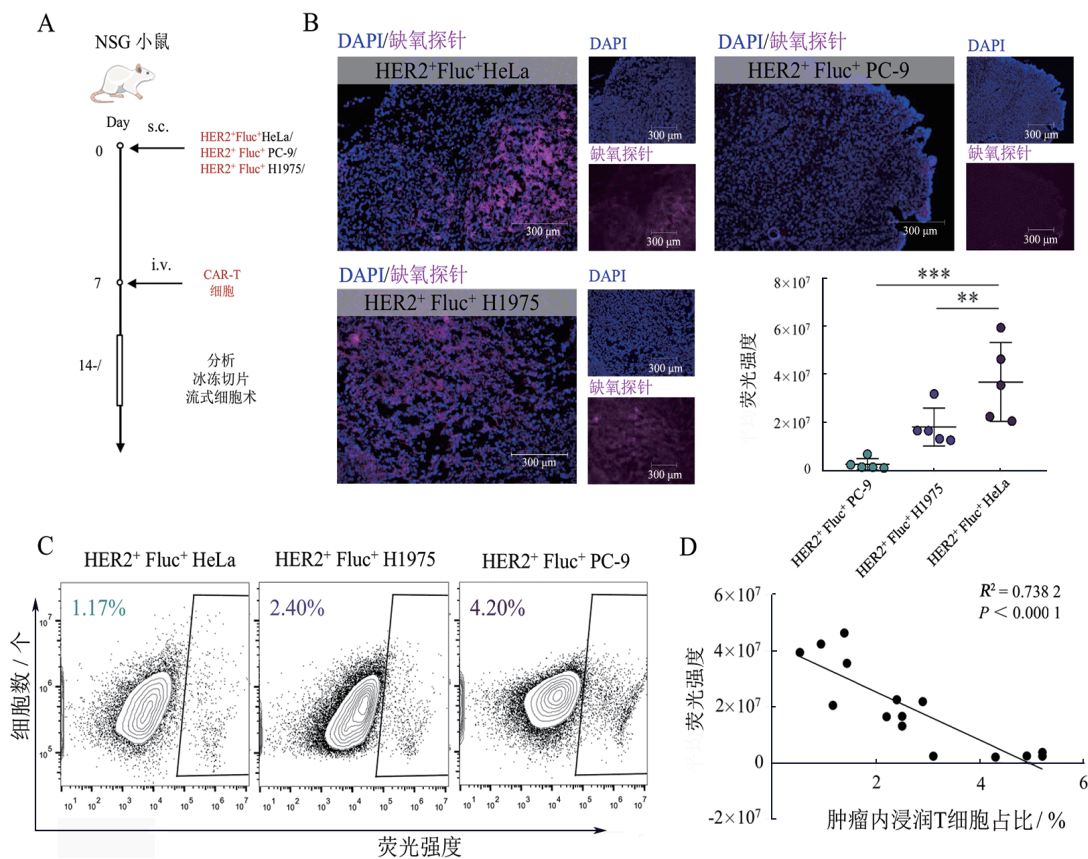
使用 SPSS 23.0 软件 (IBM, Chicago, USA) 进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行图表制作, 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 每个实验至少独立重复 3 次, 两组间差异分析采用 *t* 检验, 多组间差异分析采用 one-way/two-way ANOVA, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实体瘤缺氧微环境降低 CAR-T 细胞浸润水平

按照流程图(图 1A)成功建立小鼠皮下荷瘤模型。免疫荧光染色结果(图 1B)显示,HER2<sup>+</sup>Fluc<sup>+</sup>HeLa、HER2<sup>+</sup>Fluc<sup>+</sup>PC-9 及 HER2<sup>+</sup>Fluc<sup>+</sup>NCI-H1975 3 种细胞构建的小鼠肿瘤内部均存在缺氧区域,其中 HER2<sup>+</sup>Fluc<sup>+</sup>HeLa 细胞形成的肿瘤缺氧程度最高

( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ )。流式细胞术结果(图 1C)进一步表明,肿瘤组织缺氧程度越高,其内部浸润的 CAR-T 细胞占比越低。对缺氧程度与肿瘤组织内浸润 CAR-T 细胞占比进行统计分析显示,两者之间呈显著负相关( $R^2 = 0.7382$ ,图 1D)。上述结果证实,实体瘤内部普遍存在缺氧区域,缺氧微环境显著限制 CAR-T 细胞浸润能力,且这种抑制效应与缺氧程度呈显著负相关。



A: NSG 小鼠皮下荷瘤模型构建流程图; B: 荧光显微镜观察不同实体瘤组织的缺氧程度; C: 流式细胞术检测不同实体瘤组织内 CAR-T 细胞的占比; D: 实体瘤缺氧程度与瘤内 CAR-T 细胞浸润程度的相关性分析。\* $P < 0.01$ 、\*\* $P < 0.001$ 。

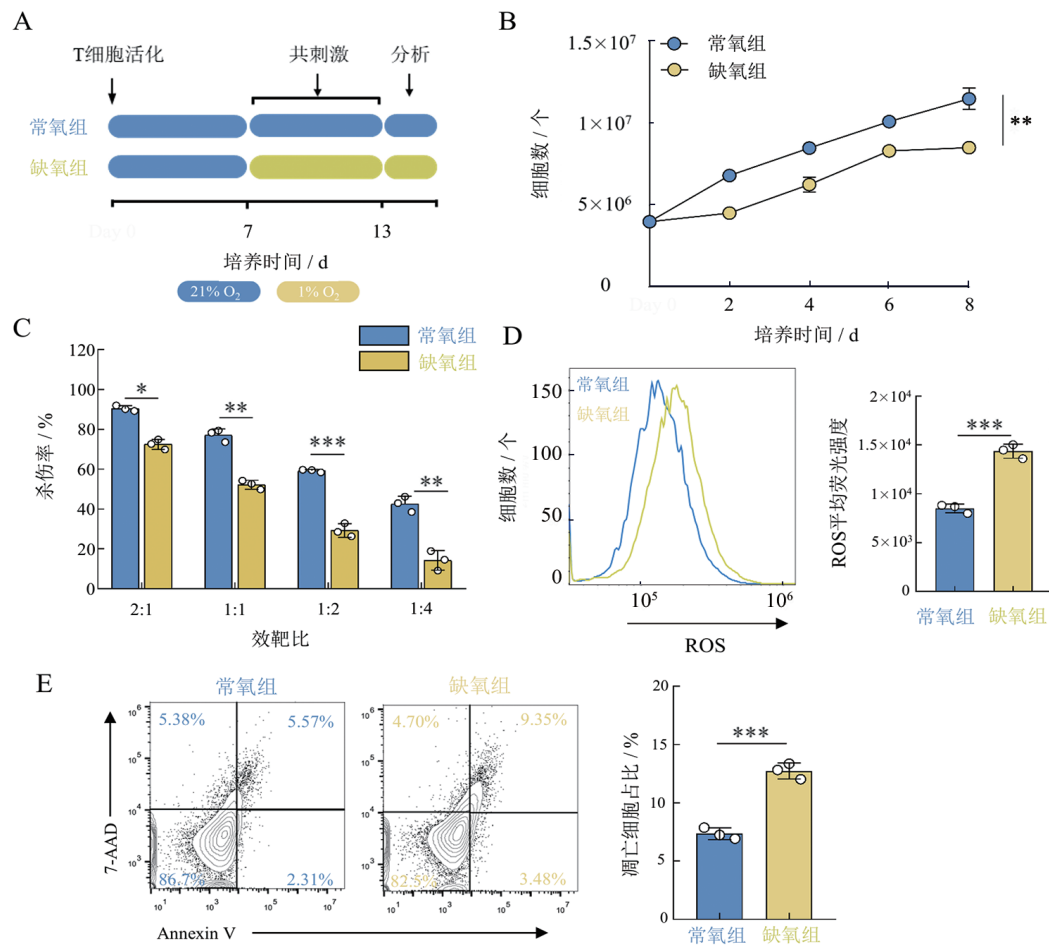
图 1 实体瘤缺氧微环境降低 CAR-T 细胞浸润水平

### 2.2 缺氧导致 CAR-T 细胞功能受损

按照(图 2A)所示对 CAR-T 细胞进行培养和处理。实验结果(图 2B)显示,与常氧组相比,缺氧组 CAR-T 细胞增殖能力显著降低( $P < 0.01$ )。萤光素酶报告基因杀伤实验结果(图 2C)显示,与常氧组相比,缺氧组 CAR-T 细胞的杀伤能力在不同靶靶比下均显著下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。流式细胞术结果(图 2D、E)进一步表明,缺氧处理后的 CAR-T 细胞内 ROS 水平及凋亡水平均显著高于常氧组(均  $P < 0.001$ )。上述结果表明,缺氧会导致 CAR-T 细胞内 ROS 水平显著升高,抑制其增殖与杀伤功能,并促进凋亡。

### 2.3 HBA/HBB CAR-T 细胞的制备及鉴定

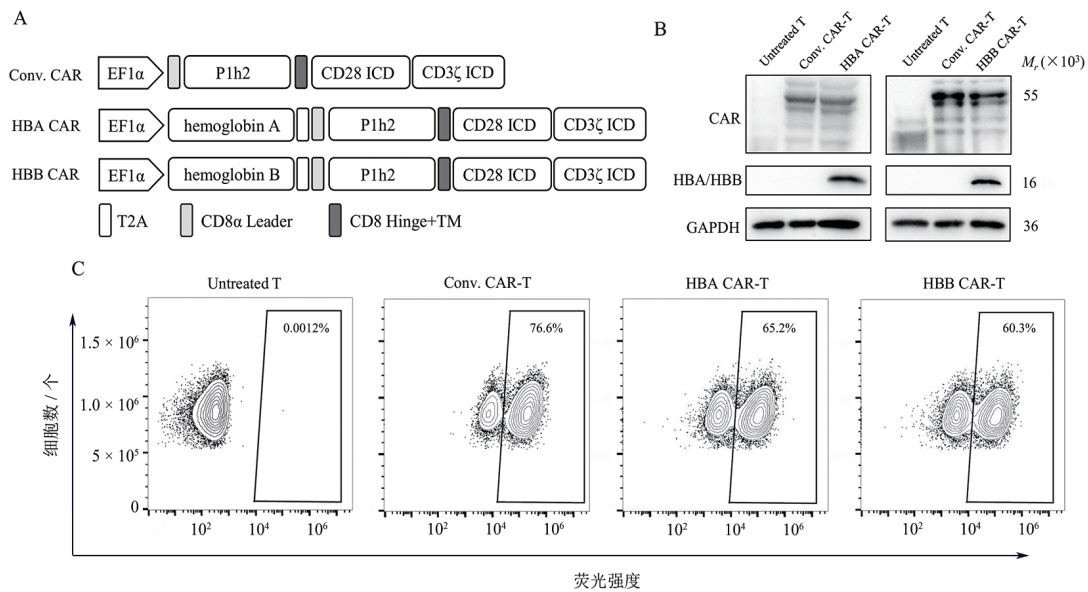
通过对本实验室构建的靶向 HER2 的序 Conv. CAR 序列进行改造(图 3A),构建可异位表达血红蛋白亚基的 HBA CAR-T 或 HBB CAR-T。利用 WB 法检测 CAR 分子及 HBA/HBB 的表达水平,通过流式细胞术检测 CAR 分子在细胞表面的表达阳性率。WB 结果(图 3B)显示, HBA 和 HBB 蛋白成功在 CAR-T 细胞中表达;流式结果(图 3C)表明 Conv. CAR-T、HBA CAR-T、HBB CAR-T 的阳性率均超过 60%。上述结果表明 HBA/HBB CAR-T 构建成功,可用于后续功能实验。



A: 常氧组与缺氧组细胞处理方法; B: 常氧组与缺氧组 CAR-T 细胞增殖曲线; C: 荧光素酶报告基因实验检测常氧组与缺氧组 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力; D: 流式细胞术检测 CAR-T 细胞内 ROS 水平; E: 流式细胞术检测 CAR-T 细胞凋亡水平。

\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

图2 缺氧导致 CAR-T 细胞功能受损



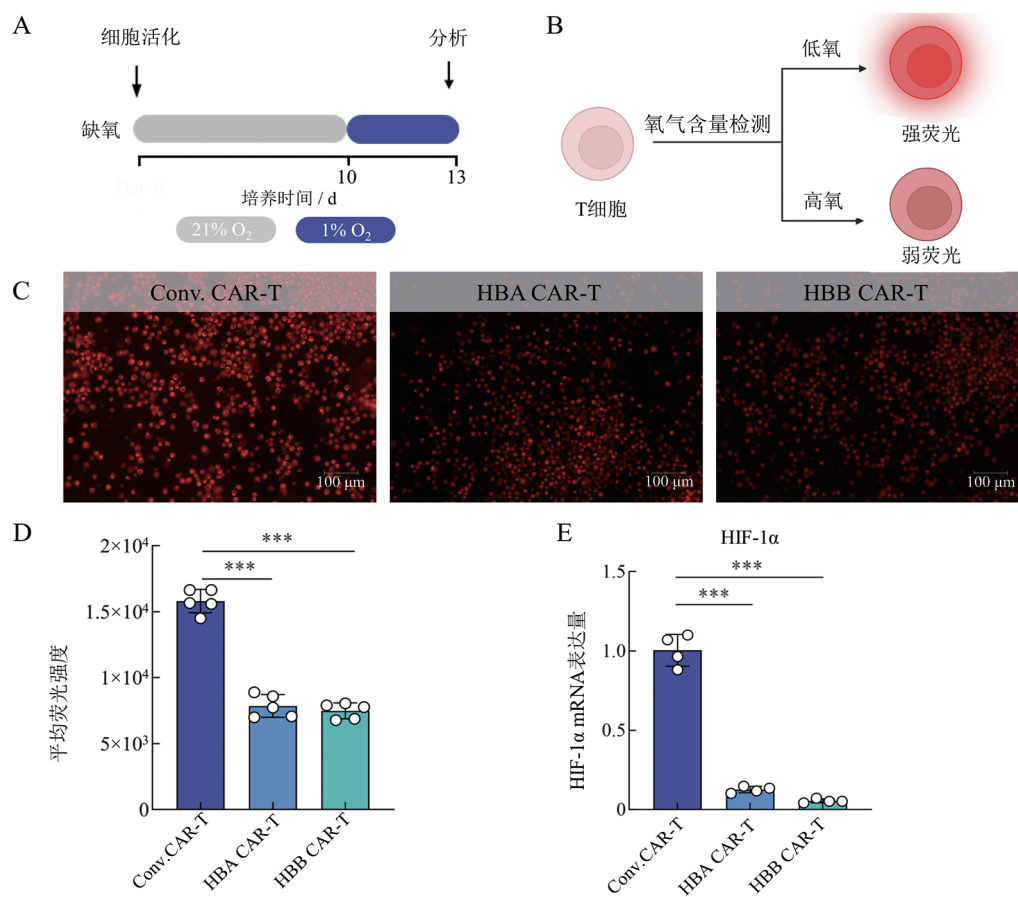
A: 可异位表达血红蛋白亚基的 CAR 基因结构示意图; B: WB 法检测 Untreated T、Conv. CAR-T、HBA CAR-T 和 HBB CAR-T 中 CAR、HBA 及 HBB 的表达情况; C: 流式细胞术检测 Untreated T、Conv. CAR-T、HBA CAR-T 和 HBB CAR-T CAR 阳性率。

图3 HBA/HBB CAR-T 的制备及鉴定

#### 2.4 异位表达血红蛋白亚基改善 CAR-T 细胞的缺氧状况并抑制 HIF-1 $\alpha$ 的表达

按照图 4A 所示对细胞进行培养和处理, 使用 MitoXpress Intra 试剂盒检测 T 细胞内氧气含量, 缺氧的细胞会发出红色荧光, 且荧光强度随缺氧程度加重而增强(图 4B)。检测结果(图 4C、D)显示, 与 Conv.

CAR-T 相比, HBA CAR-T 和 HBB CAR-T 缺氧程度显著降低(均  $P < 0.001$ )。qPCR 结果(图 4E)表明, 缺氧条件下血红蛋白亚基 CAR-T 细胞中 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平显著下调( $P < 0.001$ )。综上, 表达血红蛋白亚基可有效增强 CAR-T 细胞在缺氧条件下摄氧和储存氧气的的能力, 并显著抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达。



A: 实验设计示意图; B: 缺氧探针检测示意图; C: 荧光显微镜观察各组 CAR-T 细胞内缺氧探针的荧光强度; D: 对 C 图各组 CAR-T 细胞荧光强度的定量统计; E: qPCR 法检测 CAR-T 细胞中 HIF-1 $\alpha$  的表达水平。\*\*\* $P < 0.001$ 。

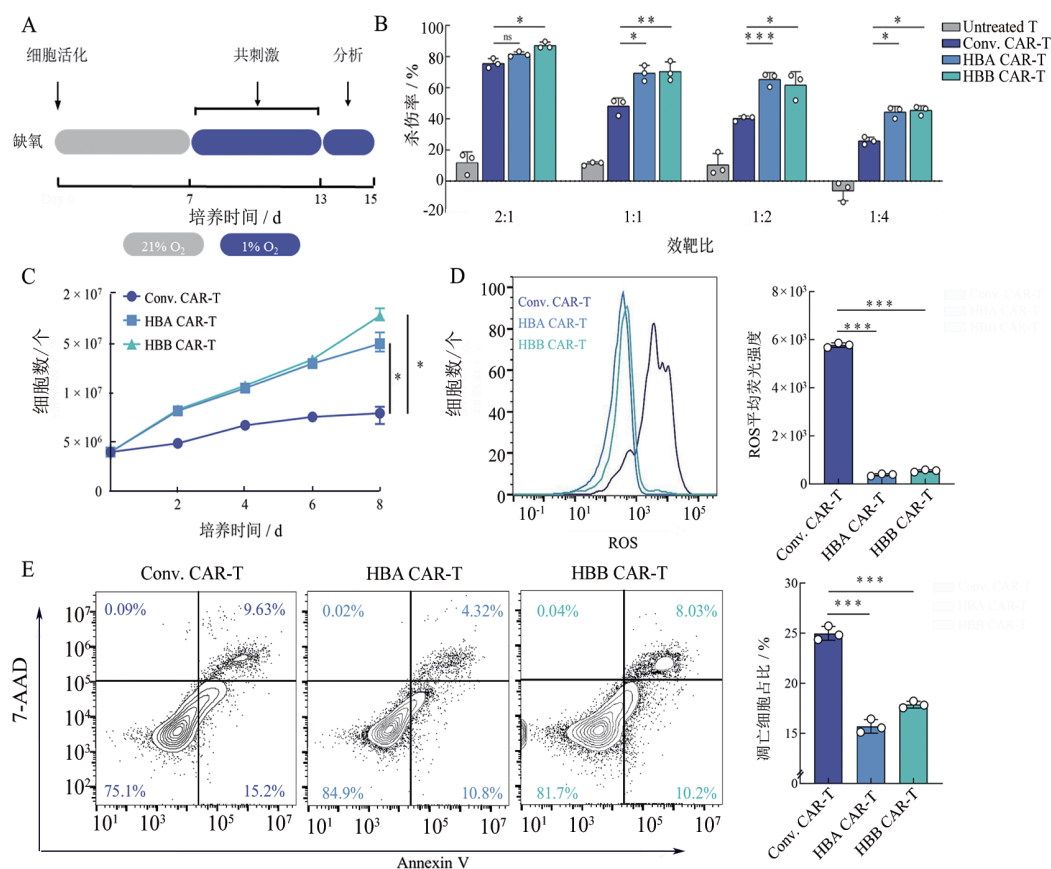
图 4 表达血红蛋白亚基改善 CAR-T 细胞的缺氧状况并抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达

#### 2.5 异位表达血红蛋白增强 CAR-T 细胞在体外缺氧环境下对肿瘤细胞的杀伤能力

按照图 5A 所示对细胞进行培养和处理。荧光素酶报告基因杀伤实验结果(图 5B)显示, 在缺氧条件下, HBA CAR-T 和 HBB CAR-T 体外杀伤细胞的能力显著强于 Conv. CAR-T( $P < 0.05$ )。此外, HBA/HBB CAR-T 细胞的增殖能力均显著高于 Conv. CAR-T 细胞(均  $P < 0.05$ , 图 5C)。流式细胞术检测结果(图 5D、E)进一步表明, 缺氧培养后 HBA CAR-T 和 HBB CAR-T 内 ROS 水平、细胞凋亡水平均显著低于 Conv. CAR-T(均  $P < 0.001$ )。实验结果表明, 异位表达血红蛋白亚基能在缺氧条件下增强 CAR-T 细胞的体外杀伤能力和增殖能力, 并降低其细胞凋亡水平及胞内 ROS 水平。

### 3 讨论

本研究旨在克服实体肿瘤缺氧微环境对 CAR-T 细胞的免疫抑制作用, 通过基因工程手段将天然的氧气载体——血红蛋白亚基(HBA 或 HBB)整合至第二代 CAR-T 细胞中, 成功构建可异位表达血红蛋白亚基的 CAR-T 细胞。实验结果表明, 在模拟实体瘤缺氧微环境的培养体系下, 血红蛋白亚基 CAR-T 细胞相较于 Conv. CAR-T 展现出诸多优势, 例如增殖与杀伤能力显著增强、胞内 ROS 水平及缺氧程度显著降低、凋亡细胞比例明显减少。上述结果验证了通过表达血红蛋白亚基可以改善缺氧条件下 CAR-T 细胞效应功能的科学假设, 为突破实体瘤缺氧障碍提供新策略。



A: 实验设计示意图; B: 不同效靶比下 Untreated T、Conv. CAR-T、HBA CAR-T 和 HBB CAR-T 对肿瘤细胞的杀伤能力; C: CAR-T 细胞增殖曲线; D: CAR-T 细胞内 ROS 水平; E: CAR-T 细胞凋亡水平。\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

图5 表达血红蛋白亚基增强 CAR-T 细胞在缺氧环境中的抗肿瘤活性

缺氧与持续抗原刺激是诱导 T 细胞耗竭的两个关键因素,短期缺氧或单纯抗原刺激均不足以迅速引发 T 细胞耗竭<sup>[17-18]</sup>。现有研究表明,尽管短期缺氧可通过上调颗粒酶 B 的表达短暂增强 T 细胞的杀伤活性<sup>[19]</sup>,但在实体瘤长期缺氧且持续抗原暴露的微环境中, T 细胞活性受损,最终呈现耗竭表型<sup>[20-22]</sup>。在这一过程中,缺氧通过调控 HIF-1 $\alpha$  等转录因子,诱导 T 细胞代谢重编程,导致线粒体功能异常、ATP 生成不足<sup>[23-24]</sup>;同时,肿瘤细胞代谢产生的大量抑制性副产物,会进一步加剧 T 细胞耗竭及凋亡<sup>[25-26]</sup>。与 T 细胞不同,肿瘤细胞能够更好地适应并利用这种免疫抑制性微环境,显著增强其耐药性,并促进免疫逃逸的发生<sup>[27-29]</sup>。

血红蛋白作为红细胞内的氧气载体,其在非红细胞中的作用机制尚不明确。有研究<sup>[16]</sup>揭示,在软骨细胞中存在大量血红蛋白  $\beta$  亚基,并在细胞质中形成无膜结构的血红蛋白小体,该结构可作为氧气“缓冲库”,在缺氧条件下释放所储存的氧气。基于此,本课题组提出假设:在 CAR-T 细胞中异位表达血红蛋白亚基,可能同样能够捕获并储存 TME 中的局部微量氧气,并在更深层的缺氧区域将其释放,从而实现细胞内氧浓度的“微调”。本研究结果验证了上述

设想。

目前改善实体肿瘤缺氧问题的策略包括局部递送氧气缓释材料和联合缺氧活性前药(hypoxia-activated prodrug, HAP)等<sup>[30]</sup>。然而,这些策略普遍存在维持时间短、缺乏特异性、高度依赖缺氧程度及潜在细胞毒性等局限,其安全性和适用性仍需进一步优化<sup>[31-32]</sup>。相较上述策略,本研究设计的 CAR-T 细胞在安全性、靶向性及持续性方面均表现出显著优势。

本研究初步证实,异位表达血红蛋白亚基的 CAR-T 细胞在缺氧环境下可有效增强其抗肿瘤反应,为后续研究提供了重要依据。基于当前成果,未来研究将从以下几个方向进一步深化和拓展:首先,本研究建立的体外缺氧模型为验证核心假设提供了初步证据,但其终究难以完全模拟高度复杂的体内肿瘤缺氧微环境。因此,在更贴近生理状态的小鼠荷瘤模型中,系统评估该策略的增殖、浸润、持久性、抗肿瘤效能及长期安全性,是推动其向临床转化的关键步骤,这也是未来工作的核心方向之一。其次,本研究已成功构建 HBA/HBB CAR-T,为系统比较两种血红蛋白亚基之间性能差异及筛选更具优势的 CAR-T 细胞提供了可靠的研究体系。此外,尽管本研究已证实血红蛋白亚基 CAR-T 细胞的诸多优势,

但其具体分子机制尚待阐明, 后续研究可聚焦于血红蛋白亚基是否通过调控 HIF-1 $\alpha$ 、Blimp-1、FOXO1 等关键转录因子, 进而影响代谢重编程、记忆亚群分化及抑制性受体的表达等。最后, 本研究为后续技术优化提供了设计思路, 例如采用缺氧响应型启动子, 以实现肿瘤缺氧微环境控制下的特异性基因表达, 对推动该策略向临床转化与安全性提升具有重要意义。

综上所述, 本研究设计的血红蛋白亚基 CAR-T 细胞在体外缺氧模型下展现出显著增强的功能活性, 为 CAR-T 细胞疗法克服实体瘤微环境缺氧问题提供了一种创新性策略。后续将进一步深入研究其作用机制、体内效能及长期安全性, 推动该策略向临床转化。

### [参考文献]

- [1] PATEL K K, TARIVERANMOSHABAD M, KADU S, et al. From concept to cure: the evolution of CAR-T cell therapy[J]. *Mol Ther*, 2025, 33(5): 2123-2140. DOI:10.1016/j.ymthe.2025.03.005.
- [2] KUMAR A, EMDAD L, DAS S K, et al. Recent advances and progress in immunotherapy of solid cancers[M]//*Advances in Cancer Research*. Amsterdam: Elsevier, 2024: 111-190. DOI: 10.1016/bs.acr.2024.05.004.
- [3] KHAN A N, ASIJA S, PENDHARI J, et al. CAR-T cell therapy in hematological malignancies: where are we now and where are we heading for?[J]. *Eur J Haematol*, 2024, 112(1): 6-18. DOI:10.1111/ejh.14076.
- [4] MAUS M V. A decade of CAR T cell evolution[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(3): 270-271. DOI:10.1038/s43018-022-00347-4.
- [5] DU B, QIN J L, LIN B X, et al. CAR-T therapy in solid tumors[J]. *Cancer Cell*, 2025, 43(4): 665-679. DOI: 10.1016/j.ccell.2025.03.019.
- [6] SINGHAVIRANON S, DEMPSEY J P, HAGYMASI A T, et al. Low-avidity T cells drive endogenous tumor immunity in mice and humans[J]. *Nat Immunol*, 2025, 26(2): 240-251. DOI: 10.1038/s41590-024-02044-z.
- [7] EL GHAZZI N, ITALIANO A, BAY J O, et al. Développement des CAR-T cells dans les tumeurs solides[J]. *Bull Cancer*, 2023, 110(1): 32-41. DOI:10.1016/j.bulcan.2022.12.001.
- [8] TIAN Y G, WEN C L, ZHANG Z, et al. CXCL9-modified CAR T cells improve immune cell infiltration and antitumor efficacy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(11): 2663-2675. DOI: 10.1007/s00262-022-03193-6.
- [9] CHIRIVÌ M, MAIULLARI F, MILAN M, et al. Tumor extracellular matrix stiffness promptly modulates the phenotype and gene expression of infiltrating T lymphocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5862. DOI:10.3390/ijms22115862.
- [10] KOPECKA J, SALAROGGIO I C, PEREZ-RUIZ E, et al. Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy[J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 59: 100787. DOI:10.1016/j.drug.2021.100787.
- [11] BIGOS K J, QUILES C G, LUNJ S, et al. Tumour response to hypoxia: understanding the hypoxic tumour microenvironment to improve treatment outcome in solid tumours[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1331355. DOI:10.3389/fonc.2024.1331355.
- [12] VUILLEFROY DE SILLY R, DIETRICH P Y, WALKER P R. Hypoxia and antitumor CD8<sup>+</sup> T cells: an incompatible alliance?[J]. *Onc Immunology*, 2016, 5(12): e1232236. DOI: 10.1080/2162402x.2016.1232236.
- [13] ZHANG T Q, LV Q Y, JIN W L. The cellular-centered view of hypoxia tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(5): 189137. DOI:10.1016/j.bbcan.2024.189137.
- [14] CHEN Z, HAN F F, DU Y, et al. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 70. DOI: 10.1038/s41392-023-01332-8.
- [15] BURMESTER T, HANKELN T. Function and evolution of vertebrate globins[J]. *Acta Physiol*, 2014, 211(3): 501-514. DOI: 10.1111/apha.12312.
- [16] ZHANG F, ZHANG B, WANG Y Y, et al. An extra-erythrocyte role of haemoglobin body in chondrocyte hypoxia adaption[J]. *Nature*, 2023, 622(7984): 834-841. DOI:10.1038/s41586-023-06611-6.
- [17] CUNHA P P, MINOGUE E, KRAUSE L C M, et al. Oxygen levels at the time of activation determine T cell persistence and immunotherapeutic efficacy[J]. *eLife*, 2023, 12: e84280. DOI: 10.7554/elife.84280.
- [18] SCHARPING N E, RIVADENEIRA D B, MENK A V, et al. Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(2): 205-215. DOI:10.1038/s41590-020-00834-9.
- [19] GROPPER Y, FEFERMAN T, SHALIT T, et al. Culturing CTLs under hypoxic conditions enhances their cytotoxicity and improves their anti-tumor function[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(11): 2547-2555. DOI:10.1016/j.celrep.2017.08.071.
- [20] GAO T A, CHEN Y Y. Engineering next-generation CAR-T cells: overcoming tumor hypoxia and metabolism[J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2022, 13: 193-216. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-092120-092914.
- [21] WU Q H, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 77. DOI:10.1186/s13045-022-01292-6.
- [22] LUO X J, LI A, CHI X Q, et al. Hypoxia-activated prodrug enabling synchronous chemotherapy and HIF-1 $\alpha$  downregulation for tumor treatment[J]. *Bioconjug Chem*, 2021, 32(5): 983-990. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.1c00131.
- [23] PENG J J, WANG L M, LI Z Y, et al. Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy[J]. *Sci Immunol*, 2023, 8(82): eabq3016. DOI:10.1126/sciimmunol.abq3016.
- [24] WANG K Y, YANG T Y, ZHANG Y B, et al. The opportunities and challenges for nutritional intervention in childhood cancers[J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1091067. DOI:10.3389/fnut.2023.1091067.
- [25] CHEN A X Y, YAP K M, KIM J S, et al. Rewiring endogenous genes in CAR T cells for tumour-restricted payload delivery[J]. *Nature*, 2025, 644(8075): 241-251. DOI: 10.1038/s41586-025-09212-7.
- [26] OSTROUMOV D, DUONG S, WINGERATH J, et al. Transcriptome

- profiling identifies TIGIT as a marker of T-cell exhaustion in liver cancer[J]. *Hepatology*, 2021, 73(4): 1399-1418. DOI: 10.1002/hep.31466.
- [27] MAALEJ K M, MERHI M, INCHAKALODY V P, et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 20. DOI:10.1186/s12943-023-01723-z.
- [28] LOPEZ A, REYNA D E, GITEGO N, et al. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1199. DOI:10.1038/s41467-022-28741-7.
- [29] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 69. DOI:10.1038/s41408-021-00459-7.
- [30] COLOMBANI T, EGGERMONT L J, HATFIELD S M, et al. Oxygen-generating cryogels restore T cell mediated cytotoxicity in hypoxic tumors[J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(37): 2102234. DOI: 10.1002/adfm.202102234.
- [31] WANG Z X, ZHU M L, DONG R Y, et al. TH-302-loaded nanodrug reshapes the hypoxic tumour microenvironment and enhances PD-1 blockade efficacy in gastric cancer[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 440. DOI:10.1186/s12951-023-02203-8.
- [32] BHUNIYA S, VRETTOS E I. Hypoxia-activated theragnostic prodrugs (HATPs): current state and future perspectives[J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(4): 557. DOI:10.3390/pharmaceutics16040557.

[收稿日期] 2025-09-06

[修回日期] 2026-03-15

[本文编辑] 邢一凡