

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.008

· 基础研究 ·

FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞联合阿帕替尼增强抗胶质母细胞瘤作用及机制研究

李广文¹, 聂雯珣^{1△}, 郭建辉¹, 刘孟园¹, 任庆¹, 郭系文¹, 蔡仕宁¹, 赫振炎², 杨文利¹ (1. 遵义医科大学 基础医学院, 贵州 遵义 563006; 2. 郑州大学附属肿瘤医院 神经外科, 河南 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 构建了一种靶向成纤维细胞活化蛋白(FAP)且能分泌CTLA-4单链抗体(scFv)的CAR-T细胞,并探讨其联合血管靶向药物阿帕替尼对胶质母细胞瘤(GBM)的抗肿瘤效果及机制。**方法:** 构建FAP-CTLA-4 CAR过表达载体,转导至T细胞中制备FAP-CTLA-4 CAR-T细胞。流式细胞术检测FAP-CTLA-4 CAR-T细胞表面分子CD69表达,ELISPOT检测其分泌IFN- γ 的能力,细胞增殖实验分析FAP-CTLA-4 CAR-T细胞的增殖情况,杀伤实验分析其联合阿帕替尼处理对人脑星形胶质母细胞瘤U-87 MG细胞治疗效果的影响。建立小鼠U-87 MG细胞异种移植瘤模型。分别用FAP-CTLA-4 CAR-T细胞单独治疗或联合阿帕替尼治疗荷瘤小鼠,命名为FAP-CTLA-4 CAR-T组、阿帕替尼组和FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组,观察各组小鼠肿瘤生长情况,免疫组化、TUNEL染色与免疫荧光法检测各组肿瘤组织中Ki-67、CD31表达及细胞凋亡情况,流式细胞术分析FAP-CTLA-4 CAR-T细胞在荷瘤小鼠体内的存活状况,H-E染色和血清生化分析评估联合治疗的安全性。**结果:** 与FAP-CTLA-4 CAR-T组、阿帕替尼组相比,FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组中CAR-T细胞的活化水平显著提高,细胞增殖能力明显增强,IFN- γ 分泌细胞比例及对靶细胞的杀伤效率均提高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。在荷瘤小鼠模型中,联合治疗显著抑制肿瘤生长并延长小鼠生存时间($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),同时抑制肿瘤细胞增殖、降低微血管密度、促进肿瘤细胞凋亡,并延长CAR-T细胞在肿瘤组织中的存活时间($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且未对主要组织器官造成毒性损伤。**结论:** FAP-CTLA-4 CAR-T细胞与阿帕替尼联合应用在GBM治疗中显示出协同增效作用与良好的安全性。

[关键词] 嵌合抗原受体T细胞;成纤维细胞活化蛋白;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4;阿帕替尼;胶质母细胞瘤

[中图分类号] R739.4;R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)06-0661-09

Enhancing anti-glioblastoma efficacy of FAP-CTLA-4 CAR-T cells combined with apatinib and the underlying mechanisms

LI Guangwen¹, NIE Wenxun^{1△}, GUO Jianhui¹, LIU Mengyuan¹, REN Qing¹, GUO Xiwen¹, CAI Shining¹, HE Zhenyan², YANG Wenli¹ (1. School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, China; 2. Department of Neurosurgery, The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the anti-tumor efficacy of FAP-CTLA-4 CAR-T cells targeting fibroblast activation protein (FAP) and secreting anti-CTLA-4 single-chain antibody (scFv) combined with apatinib in the treatment of glioblastoma (GBM), and to explore the underlying mechanisms. **Methods:** A FAP-CTLA-4 CAR overexpression vector was constructed and transduced into T cells to generate FAP-CTLA-4 CAR-T cells. *In vitro* functions of CAR-T cells were evaluated by flow cytometry (CD69 expression) and ELISPOT assay (IFN- γ secretion). Proliferation assays were used to assess the proliferation capacity of FAP-CTLA-4 CAR-T cells, and cytotoxicity assays were performed to evaluate the anti-tumor effect of the combination treatment with apatinib on U-87 MG cells. A mouse U-87 MG xenograft tumor model was established, and tumor-bearing mice were assigned to the monotherapy group (FAP-CTLA-4 CAR-T or apatinib alone) and the combination therapy group (FAP-CTLA-4 CAR-T plus apatinib). Tumor growth was monitored; tumor tissue Ki-67/CD31 expression was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence; apoptosis was assessed by TUNEL staining. *In vivo* CAR-T persistence was analyzed by flow cytometry; treatment safety was assessed *via* H-E staining and serum biochemistry. **Results:** Compared with the monotherapy group, the combination therapy group showed significantly

[基金项目] 贵州省科技厅基金(ZK2024-264);贵州省科技厅基金(ZK2022-602);贵州省卫生健康委员会(gzwbkj2024-273);遵义医科大学博士(F-ZH-09);遵义医科大学创新团队(ZHTD2024-1);贵州省大学生创新创业(S202210661013);遵义医科大学珠海校区大学生创新创业(ZHCX2023034;ZHCX2023070;X202410661021;X202410661022)

[作者简介] 李广文,男,本科生;聂雯珣,本科生。△为共同第一作者

[通信作者] 杨文利,赫振炎(扫码获取作者通信方式)



increased CAR-T cell activation, enhanced proliferation capacity, a higher proportion of IFN- γ -secreting cells and superior cytotoxicity against target cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the xenograft mouse model, the combination therapy markedly suppressed tumor growth and prolonged survival ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), inhibited tumor cell proliferation and microvessel density, promoted tumor cell apoptosis, and extended the survival of CAR-T cells within tumor tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), without causing toxic damage to major organs. **Conclusion:** The combination of FAP-CTLA-4 CAR-T cells and apatinib exhibits synergistic anti-tumor effects in GBM, enhancing therapeutic efficacy while maintaining safety, and may represent a promising novel strategy for the treatment of this disease.

[Key words] chimeric antigen receptor T cell (CAR-T cell); fibroblast activation protein (FAP); cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4); apatinib; glioblastoma (GBM)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(6): 661-669. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.008]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的中枢神经系统原发性恶性肿瘤,严重影响患者的健康和生活质量^[1-3]。探索能够进一步提高GBM临床疗效并改善患者生存质量的新策略,具有重要临床意义^[4]。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法是一种新型GBM免疫治疗策略,通过对T细胞进行基因工程改造,使其表达特异性靶向肿瘤抗原的受体,从而精准识别并清除肿瘤细胞^[5-6]。成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)作为一种II型跨膜丝氨酸蛋白酶,在GBM细胞及肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)中高表达^[7-8]。靶向FAP的CAR-T疗法在临床前研究中显示出良好的抗GBM活性及安全性,但在临床试验中,患者大多未能获得持久缓解^[9-10]。研究^[11]认为,CAR-T疗法在GBM等实体瘤中的应用面临诸多挑战,其中尤为突出的是肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中免疫细胞表面免疫抑制性受体的异常表达。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)作为关键免疫抑制性受体,通过在CAR-T细胞中表达上调,可竞争性结合B7分子,抑制CAR-T细胞功能并促进免疫逃逸^[12-13]。此外,肿瘤内部异常增生的血管结构形成物理屏障,也阻碍了CAR-T细胞浸润,减弱了该疗法长期持久的疗效。阿帕替尼(apatinib)是一种小分子酪氨酸激酶抑制剂,可以高选择性靶向血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2),目前已被应用于多种实体瘤的临床治疗^[14-15]。值得注意的是,除直接抑制肿瘤细胞外,阿帕替尼尚可改善TME中的免疫抑制状态,增强T细胞的浸润能力与抗肿瘤活性^[16-17]。总体而言,要使CAR-T细胞成为GBM的有效治疗手段,需进一步提升其对肿瘤抗原的识别特异性、增强其在肿瘤内部的存活与浸润能力并维持高效的细胞毒性。基于上述背景,本研究构建了一种靶向FAP并且能分泌CTLA-4单链抗体(single-chain antibody, scFv)的新型CAR-T细胞(FAP-CTLA-4 CAR-T),探讨其联合

阿帕替尼对治疗GBM的增效作用及相关机制,以期临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞及主要试剂、仪器

6~8周龄、体质量为 (20 ± 3) g、雌性NOD/SCID小鼠购自珠海百试通实验动物技术有限公司[实验动物许可证号:SCXK(粤)2020-0051],饲养于遵义医科大学珠海校区实验动物中心,本实验研究获得遵义医科大学伦理委员会批准,伦理批准号为ZHSC-2-(2023)036、ZHSC-1-(2023)037。所有动物实验遵循ARRIVE指南,并按照美国国立卫生研究院(NIH)《实验室动物护理和使用指南》进行。

U-87 MG细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC),293T细胞由本实验室保存。所有细胞均在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM细胞培养基中,置于含有5% CO₂、37℃的培养箱中培养。

FAP scFv编码序列源自US2009/0304718A1,CTLA-4 scFv编码序列源自CN115850475A,DMEM培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素、牛血清白蛋白、His-tag标签蛋白纯化磁珠、DNA提取试剂盒、2×Taq PCR预混液均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,阿帕替尼购自美国GLP BIO公司,人T细胞分选试剂盒、人CD3/CD28 T细胞活化扩增磁珠均购自苏州汇智和源生物技术有限公司,pCDH-CMV-MCS-EF1-Cop GFP-P2A-puro慢病毒载体、ADV-HR助感染试剂均购自山东维真生物科技有限公司,包装质粒pCMV-VSV-G和包膜质粒pCMV-dR8.9购自上海碧云天生物技术有限公司、细胞因子ELISPOT试剂盒购自瑞典Mabtech公司,藻红蛋白(PE)标记的抗CD69抗体购自美国BD公司,PKH26染色液购自杭州联科生物公司,Ki-67单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司,PE标记的抗His抗体、抗CD31抗体均购自英国Abcam公司,TUNEL原位细胞死亡检测试剂盒购自瑞士Roche公司,IL-2、T细胞扩增培养基均购自苏州伯桢生物科技有限公司。

FlexCycle2 PCR仪购自德国Analytik Jena公司,

凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司, FACS Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司, AU5800 临床化学分析仪购自美国 Beckman Coulter 公司, CTL ImmunoSpot S6 Ultimate-V 设备购自美国 Cellular Technology Limited 公司, 荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 CAR-T 细胞的制备

设计依次连接信号肽(signal peptide, sig)、FAP scFv、CD8 铰链区、CD28 跨膜域、4-1BB 共刺激域、CD3 ζ 链、P2A 和 CTLA-4 scFv(含 His-tag)的编码序列片段(图 1A), 由山东维真生物科技有限公司合成。采用无缝克隆法将片段连接至 pCDH-CMV-MCS-EF1-CoP GFP-P2A-puro 慢病毒载体, 获得 FAP-CTLA-4 CAR 重组质粒。

将重组质粒 FAP-CTLA-4 CAR、包膜质粒 pCMV-VSV-G 和包装质粒 pCMV-dR8.9 共转染 293T 细胞。转染 24 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 48 h 后收取培养上清液即病毒原液, 加入新的含胎牛血清的 DMEM 培养基, 72 h 后收取病毒原液。

抽取 10 mL 健康志愿者外周血, 用 Ficoll 密度梯度离心法分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 按照人 T 细胞分选试剂盒说明书操作, 分选出 CD3⁺ T 细胞, 用含 100 U/mL IL-2 的 T 细胞培养基培养, 加入人 CD3/CD28 T 细胞活化扩增磁珠后, 将细胞置入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。活化培养 48 h 后, 加入病毒原液及 ADV-HR 助感染试剂转导人 T 细胞, 病毒感染 3 d 后即可获得 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞。将常规培养、未感染病毒的 T 细胞命名为未转导 T 细胞(untransduced T cells, UTD), 作为对照组。

1.3 PCR 验证 FAP-CTLA-4 CAR 的导入

慢病毒转导 T 细胞后 72 h, 收集 1×10^6 个转导后的 CAR-T 细胞, 室温下 $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清后用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA; 以 5'-CGCAAA TGGGCGGTAGGCGTG-3' 和 5'-GACGTGCAATGGAATGTGAGC-3' 为 FAP-CTLA-4 CAR 的上下游引物, 配制 25 μ L PCR 反应体系: $2 \times$ Taq PCR 预混液 12.5 μ L、上下游引物各 1 μ L、模板 DNA 2 μ L、无菌无酶水 8.5 μ L; PCR 扩增程序设置为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 终延伸 10 min; 取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L $6 \times$ 上样缓冲液混匀后, 经 120 V 恒压电泳 30 min, 凝胶成像系统下观察条带。

1.4 荧光显微镜和流式细胞术测定 FAP-CTLA-4 CAR 在 T 细胞中的转导效率

慢病毒转导 T 细胞 72 h 后, 收集 1×10^6 个转导后

的 CAR-T 细胞, 接种至 24 孔板中, 于培养箱中静置 2 h 后, 荧光显微镜下观察并拍照, 记录绿色荧光细胞的分布情况, 初步判断 GFP 阳性率, 以反映 FAP-CTLA-4 CAR 在 T 细胞中的转导效率。

慢病毒转导 T 细胞 72 h 后, 收集 1×10^6 个转导后的 CAR-T 细胞, 室温下 $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清液, 用含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞, 同条件离心洗涤 2 次, Fc 封闭后用 FACS Canto II 流式细胞仪通过 FITC/GFP 通道检测荧光信号。采用 FlowJo 软件进行数据处理, 以 GFP 阳性细胞率反映 FAP-CTLA-4 CAR 在 T 细胞中的转导效率。

1.5 SDS-PAGE 和流式细胞术测定 CTLA-4 scFv 的分泌和结合能力

FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞培养 72 h 后, 收集上清液, 用 His-tag 标签蛋白纯化磁珠纯化 CTLA-4 scFv; 纯化产物进行 12% SDS-PAGE 以分离蛋白, 考马斯亮蓝染色 30 min, 脱色后观察分析 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞培养上清液中 CTLA-4 scFv 的含量。

另取相同的上清液, 与活化的 UTD 组细胞于 4 °C 避光共培养 90 min; 培养结束后, 用预冷流式染色缓冲液充分洗涤 2 次, 经冰上 Fc 封闭 15 min 后, 加入 PE 标记的抗 His 抗体(1:50 稀释), 使用 BD FACS Canto II 流式细胞仪完成上机检测, 以 His-tag 阳性细胞百分率为指标反映分泌型 CTLA-4 scFv 与 UTD 表面 B7 分子的结合能力。

1.6 流式细胞术检测 U-87 MG 细胞的 FAP 表达情况

将 U-87 MG 细胞接种于 6 孔板中, 当细胞汇合度达 60%~70% 时, 弃去旧培养基, 更换为含 TGF- β 1 (10 ng/mL) 的新鲜完全培养基, 诱导处理 72 h。收集细胞, 经抗人 FAP 流式抗体(1:200 稀释)染色后, 采用流式细胞仪 APC 通道检测 U-87 MG 细胞的 FAP 阳性表达率及平均荧光强度。FlowJo 软件处理数据。

1.7 流式细胞术检测 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞表面分子 CD69 表达

将 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞与 U-87 MG 细胞按效靶比(E:T) = 1:1, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱共培养 48 h。共培养结束后, 收集细胞, 用含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞, 于 4 °C、 $300 \times g$ 离心洗涤 5 min, 冰上 Fc 封闭 15 min, 加入 PE 标记的抗 CD69 抗体, 冰上避光处理 30 min, 流式细胞仪上机检测, PE 通道检测荧光信号, 以荧光阳性细胞比例反映 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞表面分子 CD69 的表达, FlowJo 软件处理数据。

1.8 ELISPOT 检测 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞 IFN- γ 分泌功能

FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞与 U-87 MG 细胞按 E:T = 1:1、 5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔酶标板中, 在 37 °C、

5% CO₂培养箱中共培养, 16 h后PBS洗涤2次, 向每孔中加入生物素化抗IFN- γ 抗体(1:500), 并在室温下避光作用2 h。随后加入链霉亲和素-碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)检测IFN- γ 特异性免疫复合物, 加入发光底物溶液显色。使用CTL ImmunoSpot S6 Ultimate-V设备计数每孔的斑点数量。

1.9 增殖和杀伤实验检测FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼对U-87 MG细胞的增殖抑制与杀伤作用

取 1×10^6 个CAR-T细胞加入4 μ L PKH26染色液, 在37℃避光处理5 min, 然后以 $300 \times g$ 离心5 min。弃去上清液, 将细胞重悬于完全培养基中。按每孔 5×10^4 个CAR-T细胞的浓度, 与等细胞数量的U-87 MG细胞接种于24孔平底培养板, 共培养120 h。收集CAR-T细胞, 通过流式细胞术检测PKH26荧光强度变化以评估FAP-CTLA-4 CAR-T细胞增殖能力。

取U-87 MG靶细胞, PKH26预染后按每孔 5×10^4 个细胞接种于24孔板。按E:T = 1:1、4:1、8:1分别加入对应数量的CAR-T细胞共培养。24 h后收集细胞, 加入7-AAD染料, 室温避光处理15 min, 流式细胞术检测PKH26和7-AAD双标记细胞百分比, 即杀伤率, 以评价CAR-T细胞对靶细胞的杀伤作用。

1.10 U-87 MG细胞异种移植瘤小鼠模型实验检测FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼的体内抗肿瘤作用

将 1×10^6 个U-87 MG细胞经皮下注射接种到小鼠左腋下, 构建异种移植瘤模型。当肿瘤体积达到100 mm³时, 视为造模成功。将荷瘤小鼠随机分组, 分别为FAP-CTLA-4 CAR-T组、阿帕替尼组和FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组。分别给予相应治疗: FAP-CTLA-4 CAR-T组经尾静脉注射 1×10^6 个FAP-CTLA-4 CAR-T细胞; 阿帕替尼组经灌胃给予阿帕替尼, 剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 持续14 d; 联合治疗组同时接受上述两种治疗。每3 d测量一次肿瘤宽度(W)以及长度(L)。按照公式肿瘤体积(V)= $W^2 \times L/2$, 计算肿瘤体积。末次测量后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出其肿瘤组织和主要器官, 保留以备后续分析。

1.11 免疫组化及TUNEL染色检测肿瘤细胞增殖与凋亡

肿瘤组织经4%多聚甲醛于4℃固定24 h后, 常规脱水、包埋, 制备4 μ m厚石蜡切片。切片经脱蜡、高温高压抗原修复3 min, 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭30 min。分别加入Ki-67单克隆抗体和抗CD31抗体(1:3 000稀释), 于湿盒4℃过夜处理。洗涤后, 分别加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(1:3 000稀释)和HRP标记的羊抗兔IgG二抗(1:3 000稀释), 室温作用1 h。加入DAB显

色, 苏木精复染细胞核, 脱水后中性树胶封片。光镜下随机选取5个高倍视野($\times 400$), 计数至少500个细胞, 以细胞核出现棕黄色颗粒为Ki-67阳性细胞, 计算Ki-67阳性细胞占总细胞数的比例即为Ki-67增殖指数; 以血管内皮细胞胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒记为CD31阳性, 计数5个高倍视野($\times 400$)的微血管数量, 取平均值作为微血管密度。使用Image-Pro Plus图像分析软件对图片进行定量分析。

对同批次石蜡切片按照TUNEL试剂盒说明书进行操作。PBS洗涤3次后, 滴加DAPI染液, 室温避光处理5 min, 复染细胞核。再次洗涤后, 在荧光显微镜下观察, 随机选取5个高倍视野($\times 400$), 计数至少500个细胞中TUNEL阳性细胞数, 按照公式“凋亡指数 = TUNEL阳性细胞数/总肿瘤细胞数 $\times 100\%$ ”计算各组凋亡指数。

1.12 血清生化指标及组织病理学检测评估FAP-CTLA-4 CAR-T体内毒性

各组小鼠经不同疗法治疗后第28天, 经眼眶静脉丛采血, 室温静置30 min后, 于4℃、 $3\ 000 \times g$ 离心15 min, 分离上层血清。采用AU5800全自动临床化学分析仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平, 分别以ALT、AST水平评估小鼠肝脏功能, 以SCr、BUN水平评估小鼠肾脏功能。

采用颈椎脱臼法处死小鼠, 取出主要器官(脾、肾、心、肺、肝), 立即置于4%多聚甲醛固定液中, 4℃条件下固定24 h。固定完成后, 经常规脱水、包埋, 制备4 μ m厚石蜡切片, 对切片进行常规H-E染色, 采用光学显微镜进行观察与图像采集。

1.13 统计学处理

Graphpad Prism 9.0软件进行数据统计分析。统计数据显示为 $\bar{x} \pm s$ 。所有数据先经正态性与方差齐性检验, 其中, 两组间计量资料比较采用双侧两独立样本 t 检验; 3组及以上单因素变量资料的组间比较采用单因素方差分析; 使用Kaplan-Meier曲线描述每组小鼠的生存状态。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

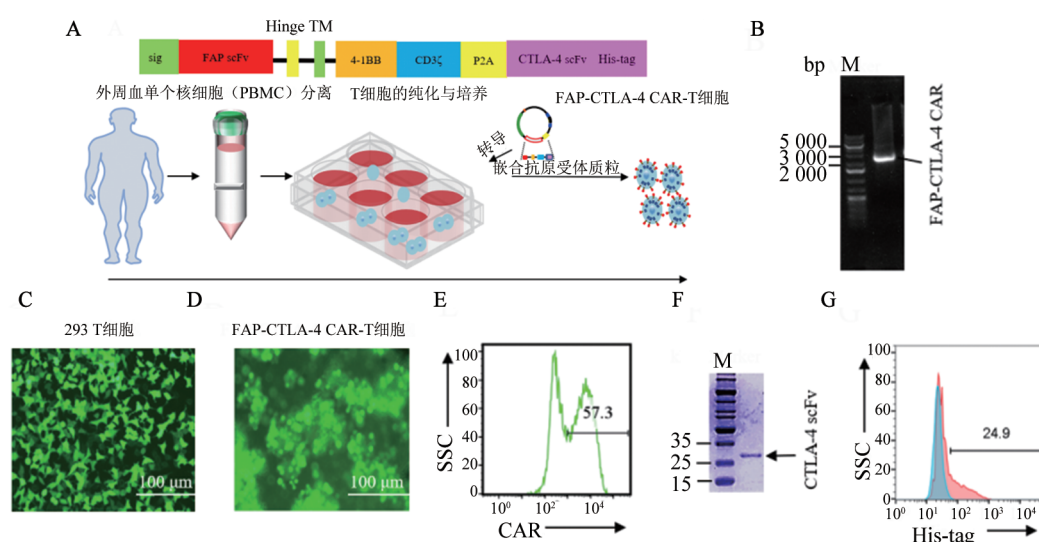
2 结果

2.1 FAP-CTLA-4 CAR-T细胞构建及鉴定

按照图1A所示流程, 成功构建靶向FAP并分泌CTLA-4 scFv的CAR-T细胞, 即FAP-CTLA-4 CAR-T。PCR验证结果(图1B)显示, FAP-CTLA-4 CAR基因成功插入FAP-CTLA-4 CAR重组质粒。重组质粒转染293T

细胞后,可获得高滴度慢病毒(图1C)。荧光显微镜下观察FAP-CTLA-4 CAR-T细胞,可见明显的GFP表达(图1D)。流式细胞术结果(图1E)显示,FAP-CTLA-4 CAR在T细胞中的转导效率大于50%。SDS-PAGE结果(图1F)显示,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞可以分泌

CTLA-4 scFv。流式细胞术检测CTLA-4 scFv的配体结合能力,结果(图1G)显示,约25%的活化T细胞表面检测到His标签信号,表明FAP-CTLA-4 CAR-T细胞分泌的CTLA-4 scFv能够与活化T细胞表面的CTLA-4配体特异性结合。



A: FAP-CTLA-4 CAR序列设计及FAP-CTLA-4 CAR-T构建过程示意图;B: PCR鉴定重组质粒中FAP-CTLA-4 CAR片段的插入情况;C: 荧光显微镜下观察转染FAP-CTLA-4 CAR重组质粒的293T细胞;D: 荧光显微镜下观察FAP-CTLA-4 CAR-T细胞;E: 流式细胞术检测FAP-CTLA-4 CAR-T细胞表面CAR的阳性率;F: SDS-PAGE检测FAP-CTLA-4 CAR-T细胞培养上清液中CTLA-4的存在情况;G: 流式细胞术检测分泌型CTLA-4 scFv与活化T细胞表面CTLA-4配体结合的情况。M: Marker。

图1 FAP-CTLA-4 CAR-T细胞构建及鉴定

2.2 FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼增强体外抗肿瘤效应

以表达FAP的U-87 MG细胞(图2A)作为靶细胞进行体外实验。流式细胞术检测各组细胞中功能性细胞分子CD69的表达,结果(图2B、C)显示,与UTD组相比,FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组细胞CD69的表达显著上调。此外,与UTD组相比,联合疗法促进FAP-CTLA-4 CAR-T细胞增殖(图2D、E)。ELISPOT分析结果(图2F、G)表明,在受到表达FAP的U-87 MG细胞刺激后,联合疗法组比UTD组、FAP-CTLA-4 CAR-T组分分泌更多的IFN- γ 。细胞毒性实验结果(图2H)表明,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞对表达FAP的U-87 MG靶细胞具有特异性杀伤作用,杀伤率显著高于UTD组($P < 0.01$);并且FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组的杀伤率进一步显著提高($P < 0.05$)。值得注意的是,这些CAR-T细胞随着E:T的升高显示出显著增强的细胞毒性。这些发现表明,联合阿帕替尼可促进FAP-CTLA-4 CAR-T细胞的活化、增殖、细胞因子的分泌及对U-87 MG靶细胞的杀伤效应。

2.3 FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼增强小鼠体内抗肿瘤效应

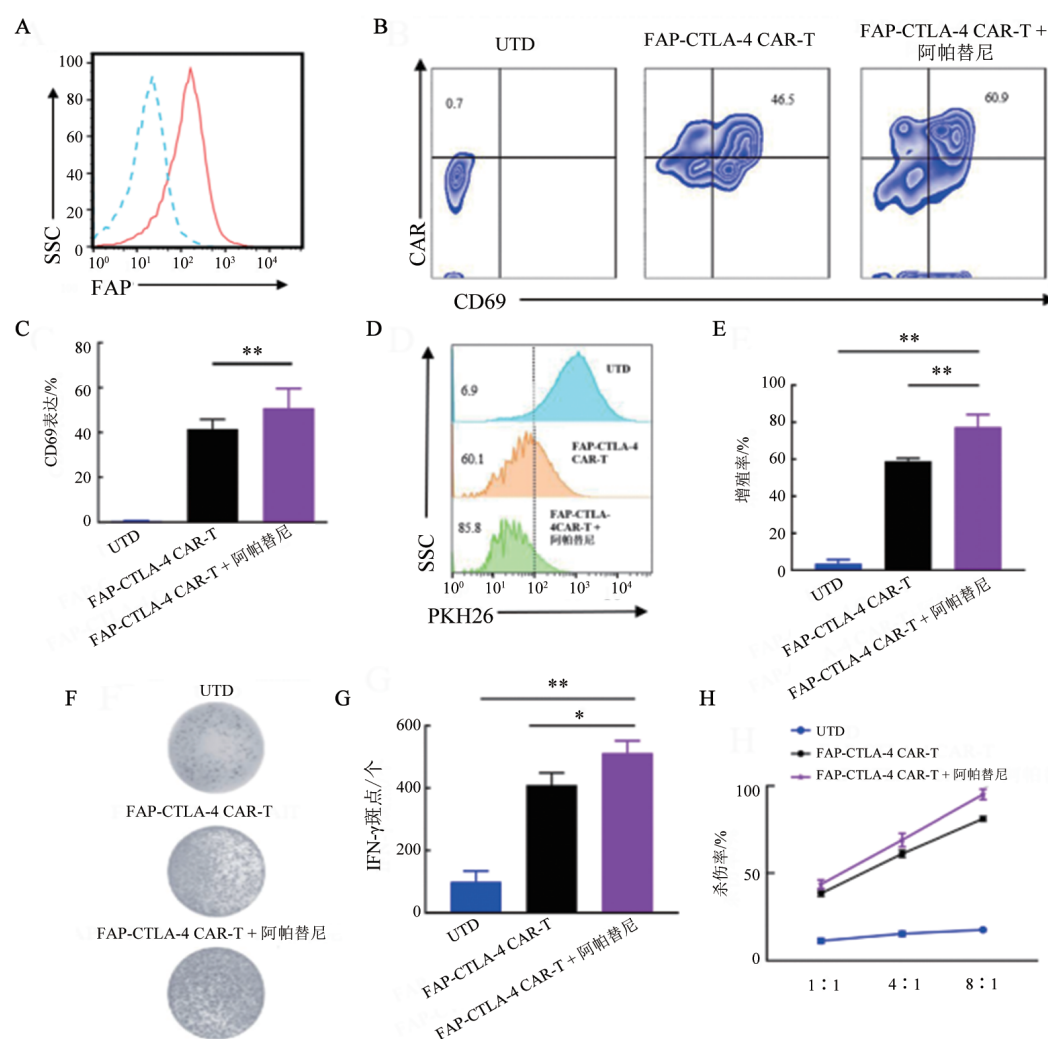
在U-87 MG细胞异种移植瘤小鼠模型中,FAP-

CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼成功抑制了肿瘤生长并延长了异种移植荷瘤小鼠的生存期,其效果优于单一疗法组。分组治疗28 d后,FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组肿瘤组织中CAR-T细胞数量仍显著高于CAR-T单独治疗组(图3B、C, $P < 0.01$)

免疫组化检测小鼠肿瘤组织中Ki-67、CD31和凋亡标记物表达情况,结果表明,FAP-CTLA-4 CAR-T组和FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组的Ki-67和CD31表达水平降低(图3D~G)。总体而言,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼通过抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡,有效抑制了小鼠体内GBM的进展。

2.4 FAP-CTLA-4 CAR-T细胞与阿帕替尼联合治疗具有良好的安全性

治疗后第28天,处死阿帕替尼组与FAP-CTLA-4 CAR-T+阿帕替尼组小鼠,取小鼠器官制作切片并进行H-E染色,结果(图4A)显示,在组织切片中未观察到明显的炎症或坏死。此外,与阿帕替尼单独治疗组相比,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼组的血清生化指标中未观察到显著差异(图4B)。这些结果提示,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼治疗在观察期内显示出良好的安全性。



A: 流式细胞术分析 U-87 MG 细胞中 FAP 的表达情况; B、C: 流式细胞术检测各组细胞表面分子 CD69 的表达 (B) 及数据统计结果 (C); D、E: 流式细胞术检测各组细胞增殖能力 (D) 及数据统计结果 (E); F、G: ELISPOT 检测各组细胞中 IFN- γ 阳性细胞数量 (F) 及数据统计结果 (G); H: CAR-T 细胞对 U-87 MG 的杀伤效率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

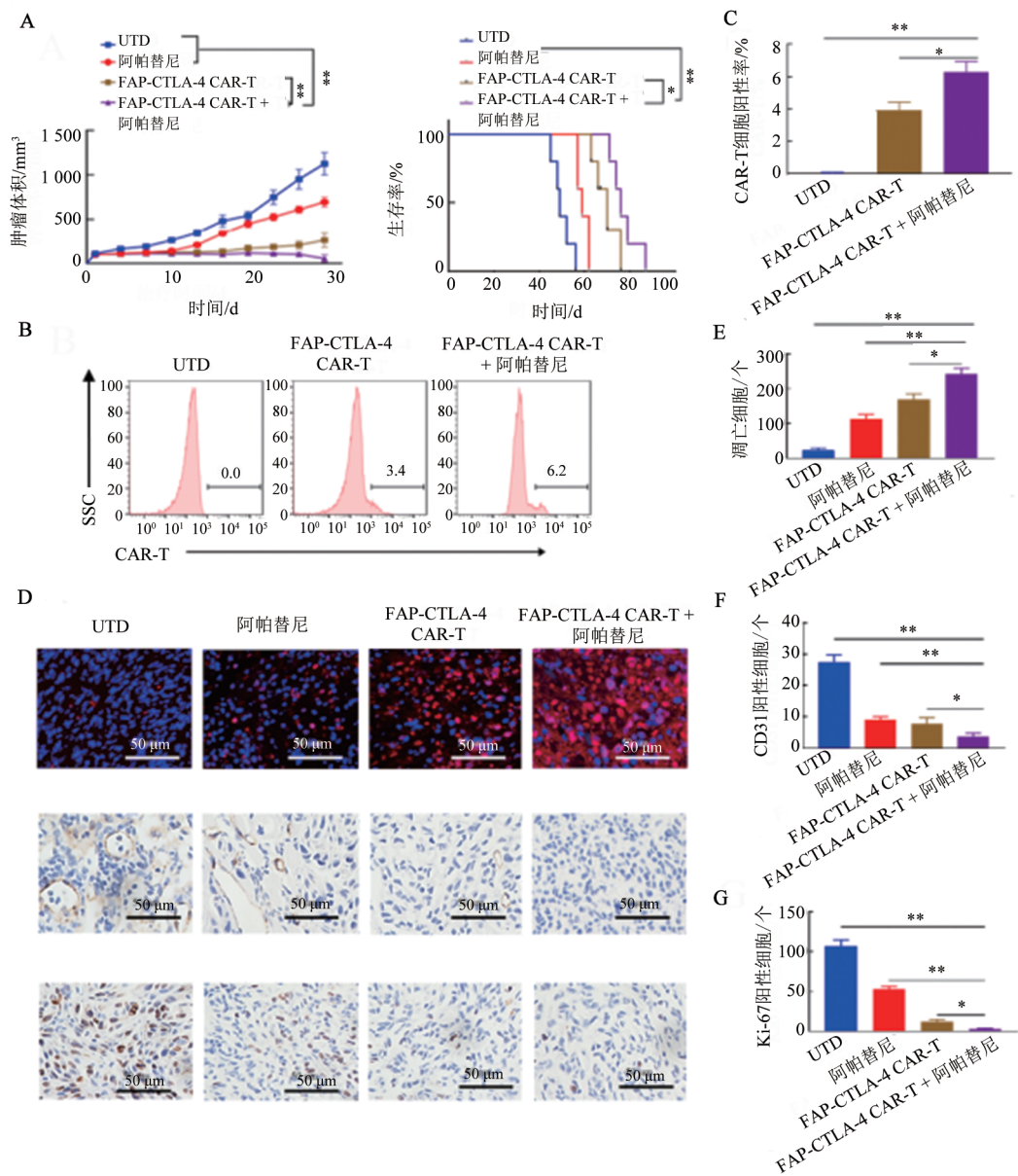
图2 阿帕替尼联合 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞增强体外抗肿瘤效应

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤, 常规疗法包括手术切除、化疗、靶向治疗和放疗。近年来, 免疫治疗已成为 GBM 研究的热点, 新型免疫治疗策略在临床前和临床研究中日益受到关注。CAR-T 细胞疗法是一种新型的免疫治疗策略, CAR 的结构通常包含胞外抗原识别区、跨膜区、铰链区和胞内信号转导区^[18]。在 CAR-T 的发展过程中, 初代 CAR 仅包含 CD3 ζ 域, 虽可介导肿瘤细胞识别, 但因缺乏协同刺激分子, CAR-T 细胞活化、增殖及细胞因子分泌能力不足, 无法在体内维持抗肿瘤效应。优化后的 CAR 于胞内区引入 CD28 或 4-1BB 共刺激分子, 胞外 CAR 识别肿瘤抗原后, 信号得以传递放大, 可驱动 CAR-T 细胞持续增殖并释放细胞因子, 大幅提升其抗肿瘤能力^[19]。研究认为 4-1BB 作为共刺激分子, 相较于 CD28 激活效应更温和, 安全性更优^[20]。本研究设计了一个同时包含胞外 FAP 受体

(抗 FAP scFv 识别区) 和 4-1BB 胞内共刺激分子的新型 CAR, 实验结果表明, 采用该策略构建的 FAP-CTLA-4 CAR-T 细胞具备良好的安全性。与天然 T 细胞相比, 该工程化 T 细胞具有非 MHC 依赖的作用模式。目前, 仍需根据胶质瘤抗原特性, 持续优化 CAR-T 细胞的 CAR 结构设计方法。

FAP 是一种 II 型跨膜蛋白, 大量研究^[21]表明其在肿瘤细胞的生长、侵袭、迁移和免疫抑制中起重要作用。在胃癌异种移植模型中, 抑制 FAP 表达可逆转免疫抑制性肿瘤微环境, 增强肿瘤对免疫检查点分子抑制剂的敏感性^[22]。靶向 FAP 的 CAR-T 细胞疗法近来已被用于 GBM 研究, 但由于对肿瘤组织的浸润不足、持久性和增殖性差, CAR-T 细胞疗法的抗肿瘤疗效有限。此外, CAR-T 细胞的细胞毒性被免疫抑制性肿瘤微环境削弱。CAR-T 细胞自身分泌免疫检查点分子阻断抗体或联合免疫检查点分子抑制剂联合用于肿瘤治疗可以显著改善 CAR-T 细胞的增殖和功能。

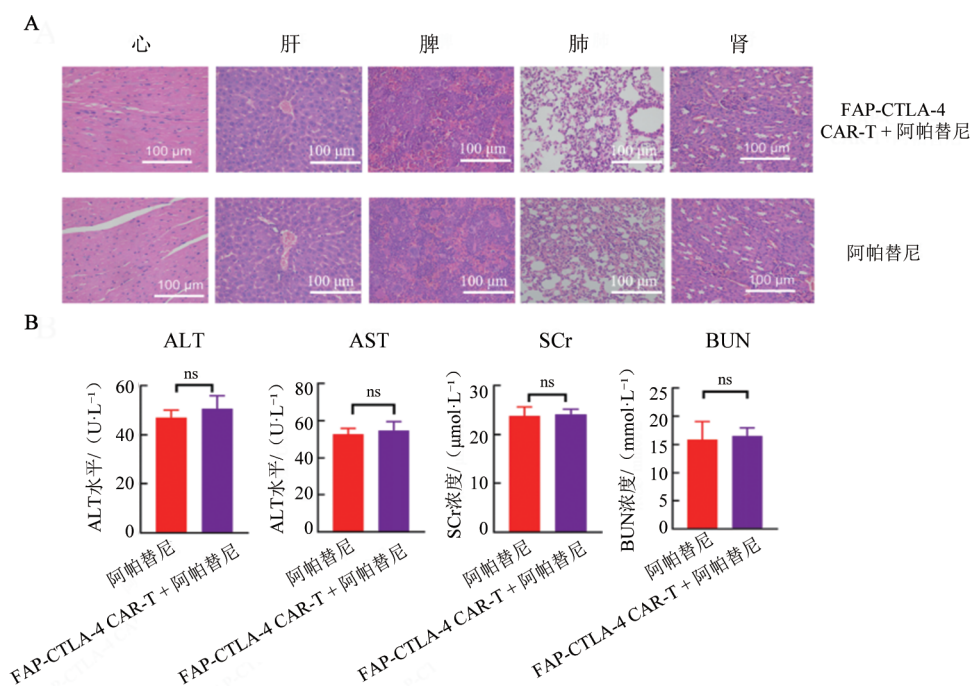


A: 各组小鼠肿瘤生长曲线(左)及生存曲线(右);B、C:流式细胞术检测各组小鼠肿瘤组织中CAR-T细胞的存活情况(B)及定量统计(C);D:各组小鼠肿瘤组织切片的TUNEL染色(凋亡,第一行)、CD31免疫组化染色(微血管,第二行)和Ki-67免疫组化染色(增殖,第三行);E~G:各组小鼠肿瘤组织切片中凋亡细胞(E)、微血管密度(F)及增殖细胞(G)的定量分析,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图3 阿帕替尼联合FAP-CTLA-4 CAR-T细胞抑制小鼠体内GBM生长、延长生存期并改善肿瘤微环境

与CD28竞争性结合B7分子的CTLA-4免疫抑制受体能抑制T细胞的活化与增殖^[23],靶向CTLA-4在临床肿瘤治疗中取得较好的疗效。本研究构建的FAP-CTLA-4 CAR-T细胞能够分泌抗CTLA-4 scFv,并与CAR-T细胞或抗原呈递细胞表面的CTLA-4配体结合,从而阻断CTLA-4/B7负向调控信号,增强T细胞活性和功能。有研究^[24]发现,FAP可能在GBM细胞本身表达。正如预期,表达FAP-CTLA-4 CAR的T细胞有效靶向FAP阳性细胞,并在遇到抗原后传递T细胞活化信号,其活化表现为CD69表达上调、

IFN- γ 分泌增加和细胞毒性增加。外源性免疫检查点分子抑制剂联合CAR-T细胞疗法面临的主要问题是药物难以深入肿瘤内部以激活肿瘤特异性T细胞^[25]。实体肿瘤中异常的血管严重影响了CAR-T细胞在肿瘤内的浸润、存活和细胞毒性,靶向异常的血管分子靶点有望实现更好的CAR-T疗效^[26]。本研究进一步证实,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞与小分子血管靶向治疗药物阿帕替尼联用后,对U-87 MG胶质瘤细胞的杀伤作用显著增强,而且CAR-T细胞的功能也明显提升。



A: 治疗后第28天各组荷瘤小鼠心、肝、肺、脾及肾组织代表性H-E染色图像; B: 各组小鼠血清生化指标(ALT、AST、SCr、BUN)检测结果。

图4 阿帕替尼联合FAP-CTLA-4 CAR-T细胞治疗的安全性评估

阿帕替尼是靶向肿瘤VEGFR2的小分子酪氨酸激酶抑制剂,可通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡和抑制肿瘤血管生成发挥抗肿瘤作用^[27]。其目前常与替莫唑胺等化疗药物联合治疗晚期GBM患者,可延长非手术候选患者的预期寿命^[28],但该方案抗肿瘤效果有限,且长期多药化疗存在一定毒性。研究^[29]表明,低剂量阿帕替尼可缓解肿瘤缺氧、增加T细胞浸润、减少肿瘤相关巨噬细胞募集,有望提高过继免疫细胞在联合疗法中的疗效。本研究构建GBM模型,验证FAP-CTLA-4 CAR-T细胞联合阿帕替尼的体内GBM疗效。结果证实,该联合策略可延缓小鼠肿瘤进展、延长生存期,显著抑制肿瘤生长,且对主要组织器官无毒性损伤;机制上,该方案可增强GBM细胞的增殖抑制(Ki-67)与凋亡(TUNEL)诱导效应,与CAR-T细胞和阿帕替尼对肿瘤细胞的靶向杀伤作用一致。此外,过继性CAR-T细胞的长期存活能力对于恶性肿瘤的持续缓解是必要的^[30]。本研究结果显示,FAP-CTLA-4 CAR-T + 阿帕替尼组的CAR-T细胞持续存在近4周,并在荷瘤小鼠体内保持稳定。此外,FAP-CTLA-4 CAR-T细胞与阿帕替尼的联合治疗可能是一种潜在的方法,用于对抗免疫抑制性肿瘤微环境对T细胞存活的抑制作用,同时避免使用多种化疗药物以提高安全性。

在评估安全性的实验中,本研究未设置单独的FAP-CTLA-4 CAR-T治疗组。由于靶向FAP的CAR-T细胞安全性已被广泛证实^[31-32],即FAP在正常成人组织中

几乎不表达,仅在肿瘤细胞及CAF中特异性高表达,并且多项临床前研究显示FAP-CAR-T治疗无明显脱靶毒性。本研究构建的FAP-CTLA-4 CAR-T仅增加了分泌型CTLA-4 scFv模块,抗原识别特异性未发生改变,故合理推测其单药毒性无实质性升高。若未来条件允许,将增设单独的FAP-CTLA-4 CAR-T组直接验证上述安全性推断。

总之,本研究开发了一种新型的靶向FAP的CAR-T细胞,既可以选择性杀伤FAP阳性细胞,还可以合成和分泌抗CTLA-4 scFv,进一步增强免疫效应。同时,这种FAP-CTLA-4 CAR-T细胞和阿帕替尼联合疗法有利于增强FAP-CTLA-4 CAR-T细胞的增殖、细胞毒性和存活能力,并展现出良好的安全性,有望改进现有的GBM免疫治疗方案。

致谢 本研究得到遵义医科大学公共研究中心的支持,并提供实验所需设备。

利益冲突:作者声明没有利益冲突。

[参考文献]

- [1] XIA J Y, SUN Q, ZHOU D, et al. Anti-gprc5d CAR T-cell therapy as a salvage treatment in patients with progressive multiple myeloma after anti-bcma car t-cell therapy: a single-centre, single-arm, phase 2 trial[J]. *Lancet Haematol*, 2025, 12(5): e365-e375. DOI:10.1016/s2352-3026(25)00048-1.
- [2] LOUIS D N, PERRY A, WESSELING P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251. DOI:10.1093/neuonc/noab106.

- [3] MAO M, WU Y J, HE Q. Recent advances in targeted drug delivery for the treatment of glioblastoma[J]. *Nanoscale*, 2024, 16(18): 8689-8707. DOI:10.1039/d4nr01056f.
- [4] ZHOU Y C, SHI F X, ZHU J Y, et al. An update on the clinical trial research of immunotherapy for glioblastoma[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1582296. DOI:10.3389/fimmu.2025.1582296.
- [5] NG B D, RAJAGOPALAN A, KOUSA A I, et al. IL-18-secreting multiantigen targeting CAR T cells eliminate antigen-low myeloma in an immunocompetent mouse model[J]. *Blood*, 2024, 144(2): 171-186. DOI:10.1182/blood.2023022293.
- [6] BEGLEY S L, O'ROURKE D M, BINDER Z A. CAR T cell therapy for glioblastoma: a review of the first decade of clinical trials[J]. *Mol Ther*, 2025, 33(6): 2454-2461. DOI:10.1016/j.ymthe.2025.03.004.
- [7] LEE D, KIM D, KIM D, et al. Harnessing the potential of FAP-IL12mut TMEkine for targeted and enhanced antitumor responses[J]. *Mol Cancer Ther*, 2025, 24(2): 176-187. DOI:10.1158/1535-7163.mct-24-0125.
- [8] SERUMULA W, PILLAY V, HADEBE B, et al. Fibroblast activation protein inhibitor (FAPi)-based theranostics[J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(4): 522. DOI:10.3390/ph18040522.
- [9] SHAHVALI S, RAHIMAN N, JAAFARI M R, et al. Targeting fibroblast activation protein (FAP): advances in CAR-T cell, antibody, and vaccine in cancer immunotherapy[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13(7): 2041-2056. DOI:10.1007/s13346-023-01308-9.
- [10] WU Y Y, WU C, SHI T C, et al. FAP expression in adipose tissue macrophages promotes obesity and metabolic inflammation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(51): e2303075120. DOI:10.1073/pnas.2303075120.
- [11] WEI R Y, SONG J Q, LIU C C, et al. FAP upregulates PD-L1 expression in cancer-associated fibroblasts to exacerbate T cells dysfunction and suppress anti-tumor immunity[J]. *Cancer Lett*, 2025, 612: 217475. DOI:10.1016/j.canlet.2025.217475.
- [12] YEO E C F, BROWN M P, GARGETT T, et al. The role of cytokines and chemokines in shaping the immune microenvironment of glioblastoma: implications for immunotherapy[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 607. DOI:10.3390/cells10030607.
- [13] ZHENG L L, YANG Q, LI F F, et al. The glycosylation of immune checkpoints and their applications in oncology[J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1451. DOI:10.3390/ph15121451.
- [14] PRINZ L F, RIET T, NEUREUTHER D F, et al. An anti-CD19/CTLA-4 switch improves efficacy and selectivity of CAR T cells targeting CD80/86-upregulated DLBCL[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(2): 101421. DOI:10.1016/j.xcrm.2024.101421.
- [15] HUENE A L, SANDERS S M, MA Z W, et al. A family of unusual immunoglobulin superfamily genes in an invertebrate histocompatibility complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(40): e2207374119. DOI:10.1073/pnas.2207374119.
- [16] BEWERSDORF J P, SHALLIS R M, ZEIDAN A M. Immune checkpoint inhibition in myeloid malignancies: moving beyond the PD-1/PD-L1 and CTLA-4 pathways[J]. *Blood Rev*, 2021, 45: 100709. DOI:10.1016/j.blre.2020.100709.
- [17] XU C, BAI Y, AN Z J, et al. IL-13R α 2 humanized scFv-based CAR-T cells exhibit therapeutic activity against glioblastoma[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 443-451. DOI:10.1016/j.omto.2022.01.002.
- [18] YI E, LEE E, PARK H J, et al. A chimeric antigen receptor tailored to integrate complementary activation signals potentiates the antitumor activity of NK cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2025, 44(1): 86. DOI:10.1186/s13046-025-03351-5.
- [19] LIN S H, CHENG L, YE W, et al. Chimeric CTLA4-CD28-CD3z T cells potentiate antitumor activity against CD80/CD86 - positive B cell malignancies[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 642528. DOI:10.3389/fimmu.2021.642528.
- [20] SUN Y P, ZHOU L L, GU X Y, et al. Leveraging T cell co-stimulation for enhanced therapeutic efficacy of trispecific antibodies targeting prostate cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2025, 13(3): e010140. DOI:10.1136/jitc-2024-010140.
- [21] OSTER C, KESSLER L, BLAU T, et al. The role of fibroblast activation protein in glioblastoma and gliosarcoma: a comparison of tissue, ^{68}Ga -FAPi-46 PET data, and survival data[J]. *J Nucl Med*, 2024, 65(8): 1217-1223. DOI:10.2967/jnumed.123.267151.
- [22] WANG K W, XIE C J, DING Z, et al. PDE5A $^{+}$ cancer-associated fibroblasts enhance immune suppression in gastric cancer[J]. *Gut*, 2026, 75(3): 486-501. DOI:10.1136/gutjnl-2025-335794.
- [23] XU X Z, DENNETT P, ZHANG J B, et al. CTLA4 depletes T cell endogenous and trogocytosed B7 ligands *via* cis-endocytosis[J]. *J Exp Med*, 2023, 220(7): e20221391. DOI:10.1084/jem.20221391.
- [24] CHEN D, VARANASI S K, HARA T, et al. CTLA-4 blockade induces a microglia-Th1 cell partnership that stimulates microglia phagocytosis and anti-tumor function in glioblastoma[J]. *Immunity*, 2023, 56(9): 2086-2104.e8. DOI:10.1016/j.immuni.2023.07.015.
- [25] PENG L, SFERRUZZA G, YANG L J, et al. CAR-T and CAR-NK as cellular cancer immunotherapy for solid tumors[J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(10): 1089-1108. DOI:10.1038/s41423-024-01207-0.
- [26] GASPARETTO A, CHIARLE R. CAR-ving a path: metalloprotease-engineered CAR T cells tunnel through solid tumors[J]. *Cancer Immunol Res*, 2025, 13(11): 1698-1699. DOI:10.1158/2326-6066.cir-25-1097.
- [27] LI H S, HUANG H Y, ZHANG T, et al. Apatinib: a novel antiangiogenic drug in monotherapy or combination immunotherapy for digestive system malignancies[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 937307. DOI:10.3389/fimmu.2022.937307.
- [28] LI G L, XU X W, CUI J Q, et al. Efficacy of apatinib combined with temozolomide in the treatment of recurrent high-grade glioma: a meta-analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(3): 452. DOI:10.3892/etm.2023.12151.
- [29] YANG A F, SHENG S P, BAI Y, et al. Hydrogel/nanoparticles-mediated cooperative combination of antiangiogenesis and immunotherapy[J]. *Acta Biomater*, 2022, 153: 124-138. DOI:10.1016/j.actbio.2022.09.060.
- [30] WANG L H, ZHANG L F, DUNMALL L C, et al. The dilemmas and possible solutions for CAR-T cell therapy application in solid tumors [J]. *Cancer Lett*, 2024, 591: 216871. DOI:10.1016/j.canlet.2024.216871.
- [31] LIU X, DU Z H, ZHANG Y Y, et al. CAR-T cells generated *in vivo* for the targeted treatment of myocardial fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, 168: 115840. DOI:10.1016/j.intimp.2025.115840.
- [32] BUGHDA R, DIMOU P, D' SOUZA R R, et al. Fibroblast activation protein (FAP)-targeted CAR-T cells: launching an attack on tumor stroma[J]. *ImmunoTargets Ther*, 2021, 10: 313-323. DOI:10.2147/itt.s291767.

[收稿日期] 2026-02-09

[修回日期] 2026-04-29

[本文编辑] 邢一凡