论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412238

表达靶向癌胚抗原的嵌合受体的慢病毒载体构建及初步应用

余晓玲,杨 智,彭 维,钱 程 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所)

[摘要] **目的** 构建表达靶向癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的慢病毒载体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE,研究该载体感染T淋巴细胞后嵌合抗原受体的表达以及对CEA阳性肿瘤细胞系的杀伤作用。**方法** 利用常规分子克隆技术从含靶向CEA的单链化抗体的载体上得到抗CEA抗体的编码序列,通过测序鉴定,采用酶切将基因片段插入慢病毒载体中。慢病毒载体感染T淋巴细胞后,通过非变性非还原Western blot、流式细胞术检测CEA-CAR在T淋巴细胞中的表达,体外杀伤实验检测对CEA阳性肿瘤细胞系的杀伤效果。**结果** 测序结果显示CEA-CAR的序列正确,酶切结果显示慢病毒载体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE构建正确;感染T淋巴细胞后CEA-CAR阳性表达率为62.8%;可有效杀伤CEA阳性肿瘤细胞系($P<0.01$)。**结论** 成功构建了表达靶向CEA的嵌合抗原受体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE的慢病毒载体,该嵌合抗原受体可在T细胞中正确表达,并有效杀伤CEA阳性肿瘤细胞。

[关键词] 嵌合抗原受体;肿瘤免疫治疗;CEA;慢病毒
[中图法分类号] R392-33; R392.11; R73-36 [文献标志码] A

Lentiviral vector of chimeric antigen receptor targeting carcinoembryonic antigen and its application

Yu Xiaoling, Yang Zhi, Peng Wei, Qian Cheng (Institute of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct lentiviral vector LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE carrying chimeric antigen receptor (CAR) targeting carcinoembryonic antigen (CEA), and determine its expression and cytotoxic effect on the CEA positive tumor cell lines when the vector are transfected into T cells. **Methods** The sequences coding anti-CEA antibody were obtained with standard molecular cloning techniques from the plasmid encoding antibody of CEA, and then verified by sequencing. The CEA segment was then inserted into lentiviral vector by enzyme digestion. Native Western blotting and flow cytometry were used to analyze its expression, and cytotoxic assay was employed to detect the cytotoxicity against the CEA positive tumor cell lines when the vector was infected into T cells. **Results** The sequencing result indicated that the CEA-CAR sequences were correct, and the enzyme digestion result exhibited lentiviral vector LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE was constructed correctly. When the vector was infected into T cells, the CEA-CAR$^+$ T cells were 62.8% and effectively killed the CEA positive tumor cells ($P<0.01$). **Conclusion** Lentiviral vector LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE carrying CAR targeting CEA is constructed successfully. The CAR can be expressed through the vector and efficiently kill the CEA positive tumor cells in T cells.

[**Key words**] chimeric antigen receptor; tumor immunotherapy; carcinoembryonic antigen; lentivirus

Supported by the National Natural Science for Young Scholars of China (81301959) and the Major Project of Clinical Research of Third Military Medical University (2012XLC04). Corresponding author: Qian Cheng, E-mail: cqian8634@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301959);第三军医大学临床重大研究项目(2012XLC04)
[通信作者] 钱 程,E-mail: cqian8634@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.0956.003.html (2015-04-21)

随着基因转导技术的应用,通过基因修饰技术可以使T细胞在其表面稳定地表达抗体,赋予新的抗原特异性[1]。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)由抗体(受体)结合域、铰链区和跨膜区及胞内信号域组成,胞内信号域通常为CD3ζ链或FcεRIγ,或与一种或多种共刺激分子相连,如4-1BB (CD137)、CD28、ICOS(CD278)[2-3]。肿瘤细胞表面的抗原(配体)与嵌合抗原受体的抗体(受体)结合时,通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内,胞内信号域将信号转化为活化信号,激活效应细胞,效应细胞增殖、产生细胞因子从而杀伤肿瘤细胞[4]。

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)是一种糖蛋白,相对分子质量为200×10^3,最初由Gold和Freedman报道[5],表达于上皮源性肿瘤中如结直肠癌、胃癌、肺癌、子宫颈癌、胰腺癌[6],目前广泛应用于临床辅助诊断。BW431/26是CEA特异性单克隆抗体[7-8],是制备嵌合抗原受体的理想抗体。

本研究构建了以BW431/26单克隆抗体来源的抗CEA的单链抗体为抗体结合域的嵌合抗原受体的慢病毒载体、慢病毒包装,研究该嵌合抗原受体感染人T淋巴细胞后在该细胞中的表达情况,为后续研究及治疗表达CEA抗原的实体肿瘤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌TOP10为本实验室保存,携带抗CEA单链抗体编码基因的质粒pCDNA3-scBW431/26-hFc由德国柏林Humboldt大学的Gabriele Pecher教授惠赠,DNA Marker(日本TaKaRa公司),质粒抽提试剂盒(美国Invitrogen公司),琼脂糖(上海生工生物公司),引物(南京金斯瑞公司),KOD FX酶(日本TOYOBO公司),PCR仪(美国Bio-Rad公司),限制性内切酶*Nhe* Ⅰ、*Eco*RⅤ(美国Thermo公司),离心机(美国Thermo Scientific公司),胶回收试剂盒(美国Promega公司),T4连接酶体系(美国Promega公司),5×非变性非还原蛋白上样缓冲液(上海碧云天公司),慢病毒载体LV-EF1α-Luciferase-PGK-FP635-WPRE、Lv-Nanog-2A-GFP由本实验室构建,抗CEA的单克隆抗体(英国Abcam公司),慢病毒包装细胞293T(ATCC),萤火虫荧光检测试剂盒购自Promega公司(Luciferase Assay System,E4550)。稳定表达荧光素酶(Fire-Luciferase)和红色荧光蛋白FP635的结直肠癌细胞系SW480-Luc-FP635,HT29-Luc-FP635以及稳定表达荧光素酶(Fire-Luciferase)和红色荧光蛋白FP635的肝癌细胞系HuH7-Luc-FP635由实验室构建并保存,细胞培养于含10% FBS的DMEM培养基中。

1.2 重组慢病毒载体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE的构建

1.2.1 PCR扩增目的片段抗CEA抗体 以pCDNA3-scBW431/26-hFc质粒为模板设计引物,在其5′、3′端分别加上*Nhe* Ⅰ、*Sal* Ⅰ限制性内切酶位点,CEA Up *Nhe* Ⅰ上游引物5′-AGGCTAGCATGGGATGG-AGCTGTATCAT-3′,CEA Dn *Sal* Ⅰ下游引物5′-AGGTC-GACGGTATCGATAAGCTTTG -3′,根据KOD FX说明书25 μL体系进行加样,并设置阴性对照。PCR反应条件95 ℃预变性5 min,95 ℃变性10 s,68 ℃退火15 s,72 ℃ 延伸30 s,30个循环,扩增完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。目的片段约2 000 bp,鉴定完成后,参照美国Promega公司胶回收试剂盒进行样品回收。回收后送南京金斯瑞公司测序。测序后用VectorNTI软件进行比对。

1.2.2 PCR扩增目的片段CD3-2A-GFP 以Nanog-2A-GFP质粒为模板设计引物,在其3′加上*Sal* Ⅰ限制性内切酶位点,上游引物5′-CATGCAGGCCCT-GCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGC-3′,下游引物5′-ATTGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTC-CATG-3′,根据KOD FX说明书25 μL体系进行加样,并设置阴性对照。PCR反应条件95 ℃ 预变性5 min,95 ℃ 变性10 s,68 ℃ 退火15 s,72 ℃ 延伸30 s,25个循环,扩增完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。目的片段约1 191 bp,鉴定完成后,参照美国Promega公司胶回收试剂盒进行样品回收。回收后送南京金斯瑞公司测序。测序后用VectorNTI软件进行比对。

1.2.3 PCR扩增目的片段CEA-CD3-2A-GFP 以抗CEA抗体、CD3-2A-GFP为模板,CEA Up *Nhe* Ⅰ、CEA Dn *Sal* Ⅰ为引物,根据KOD FX说明书25 μL体系进行加样,并设置阴性对照。PCR反应条件95 ℃预变性5 min,95 ℃变性10 s,68 ℃退火15 s,72 ℃延伸30 s,30个循环,扩增完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。目的片段约2 690 bp,鉴定完成后,参照美国Promega公司胶回收试剂盒进行样品回收。回收后送南京金斯瑞公司测序。测序后用VectorNTI软件进行比对。

1.2.4 双酶切LV-EF1α-Luciferase-PGK-FP635-WPRE载体、目的片段CEA-CD3-2A-GFP 载体酶切体系为50 μL:10×Green buffer 5 μL,载体3 μL,*Nhe* Ⅰ酶1 μL,*Sal* Ⅰ酶1 μL,H_2O 40 μL;目的片段酶切体系为50 μL:10×Green buffer 5 μL,目的片段回收产物

2.5 μL,*Nhe* Ⅰ酶1 μL,*Eco*R Ⅴ酶1 μL,H_2O 39.5 μL,37 ℃水浴锅3 h。酶切完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。参照美国Promega公司胶回收试剂盒进行相应样品回收。回收后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。

1.2.5 重组慢病毒载体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE连接、转化、抽提及酶切鉴定 连接体系为10 μL:T4 DNA ligase 10×buffer 1 μL,载体片段2 μL,目的片段6 μL,T4 DNA ligase 1 μL,连接过夜。将连接产物取出5 μL加入装有感受态细菌(冰水混合状态)TOP10的1.5 mL EP管中,冰浴30 min,42 ℃水浴90 s,冰浴3 min,加入800 μL LB液体培养基,30 ℃,280 r/min振荡培养1 h;5 000 r/min离心2 min,弃上清,留200 μL吹打混匀后加入氨苄抗性的LB固体培养基上,用三角形玻璃棒涂匀,平板放入30 ℃恒温箱中培养过夜。挑取饱满的菌落于1∶1 000的氨苄LB液体培养基中,30 ℃,280 r/min,振荡培养12 h。抽提方法参照美国Invitrogen公司质粒抽提试剂盒:①取1 mL在LB培养基中培养过夜的菌液,12 000×*g*离心1 min,弃尽上清;②加250 μL buffer S1悬浮细菌沉淀,不应留有小的菌块(buffer S1中已加入Rnase);③加250 μL buffer S2温和充分上下翻转4~6次混合均匀使菌体充分裂解,直至形成透亮溶液,不超过5 min;④加350 μL buffer S3温和充分上下翻转6~8次,12 000×*g*离心10 min;⑤吸取步骤4中的上清转移到制备管(置于2 mL离心管中),12 000×*g*离心1 min,弃滤液;⑥将制备管置回离心管,加500 μL buffer W1,12 000×*g*离心1 min,弃滤液;⑦将制备管置回离心管,加700 μL buffer W2,12 000×*g*离心1 min,弃滤液,洗涤2次;⑧制备管置回离心管中,12 000×*g*离心1 min;⑨将制备管移入新的1.5 mL离心管中(试剂盒中提供),在制备膜中央加40 μL去离子水(去离子水加热至65 ℃),室温静置1 min,12 000×*g*离心1 min。抽提完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定,选取大小与重组慢病毒载体相近的质粒进行酶切鉴定,体系20 μL:10×Green buffer 2 μL,质粒0.5 μL,*Hind*Ⅲ酶1 μL,H_2O 16.5 μL,37 ℃水浴3 h,酶切完成后取出2 μL样品加入1%琼脂糖凝胶电泳上样孔中,120 V电泳30 min鉴定。

1.3 慢病毒载体的制备及感染T淋巴细胞

1.3.1 病毒包装 将293T细胞以$1\times10^5/cm^2$的密度传至1个75 cm^2的Flask中,细胞培养过夜。病毒包装前用预热的2% FBS的DMEM培养基给前1 d细胞换液,继续度培养2 h。将100 μL 2.5 mmol/L $CaCl_2$,20 μg LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE质粒,pMD2.G 10 μg、pMDLg/pRRE质粒20 μg、pRSV-Rev质粒20 μg,H_2O 680 μL混合于一个15 mL离心管中,混合均匀。向混合液中缓慢滴加入2×HBS(50 mmol/L HEPES,1.5 mmol/L Na_2HPO_4,280 mmol/L NaCl,10 mmol/L KCl,12 mmol/L sucrose),用200 μL移液器逐滴加入至$CaCl_2$混合液中,同时15 mL离心管中液体用10 mL移液器不停混匀吹打。混匀后室温下静置15 min并将混合液加入细胞。细胞转染48 h和72 h分别收集培养上清并通过PEG6000离心纯化。

1.3.2 T淋巴细胞感染 人外周血来源的单个核细胞PBMC培养在含10% FBS的RPMI1640完全培养基中,通过抗CD3单克隆抗体活化2 d后,加入20MOI的慢病毒载体,24 h后更换含有500 IU/mL的重组人IL-2的RPMI 1640完全培养基中继续培养10 d。

1.4 非变性非还原Western blot检测抗CEA抗体在T淋巴细胞中的表达

1×10^6个慢病毒载体LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE感染后的T细胞(实验组),3×10^6个未感染的T淋巴细胞(对照组),分别加入100 μL、300 μL的蛋白裂解液,冰上静置30 min,期间5~6 min振荡1次,4 ℃,12 000 r/min离心10 min,吸取上清,根据上清体积加入5×非变性非还原蛋白上样缓冲液25 μL、75 μL,两个样品分别吸出5 μL、10 μL加入10% PAGE分离胶上样孔中,电泳结束后将蛋白转移至NC膜上,转膜结束后5%脱脂牛奶封闭液封闭2 h,PBST洗涤3次,加入Goat Anti-Human IgG Fc(1∶1 000)孵育12 h,PBST洗涤3次,加入辣根过氧化物酶兔抗羊IgG抗体(1∶1 000)孵育3 h,室温显像。

1.5 流式细胞术检测抗CEA抗体在T细胞中的表达

感染病毒的T细胞培养至第14天,300×*g*离心收集细胞,用含1% FBS的PBS溶液重悬细胞并调整为1×10^6/mL。将细胞分装成5管,每管100 μL,向细胞中加入20 μL PE标记抗小鼠抗人CD4单克隆抗体(BD公司PRA-T4克隆)、Percep标记小鼠抗人CD8单克隆抗体(BD公司SK1克隆)抗体、APC标记小鼠抗人CD56单克隆抗体(BD公司B159克隆),4 ℃孵育30 min后,PBS洗涤2次,用BD公司FACS Calibur流式细胞仪进行检测。

1.6 细胞杀伤实验检测嵌合抗原受体修饰的T细胞对CEA阳性肿瘤细胞系的杀伤效果

CEA阳性的靶细胞选取稳定表达荧光素酶(Fire-Luciferase)的结直肠癌细胞系SW480、HT29,CEA阴性的靶细胞选取稳定表达荧光素酶(Fire-Luciferase)的肝癌细胞系HuH7。靶细胞以1×10^5/mL种植于96孔板

中,每孔 100 μL。效应细胞为感染 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 病毒的 T 细胞以效靶比为 1∶1的比例将效应细胞加入靶细胞中,于 37 ℃培养箱中孵育 24 h。通过 Promega 公司的 Luciferase Assay System(E4550)检测孔板中剩余细胞内 Luciferase 的表达量计算杀伤效率。

细胞杀伤效率 = 1 – 效应细胞靶细胞共培养孔荧光强度/单独靶细胞孔荧光强度 × 100%[9]

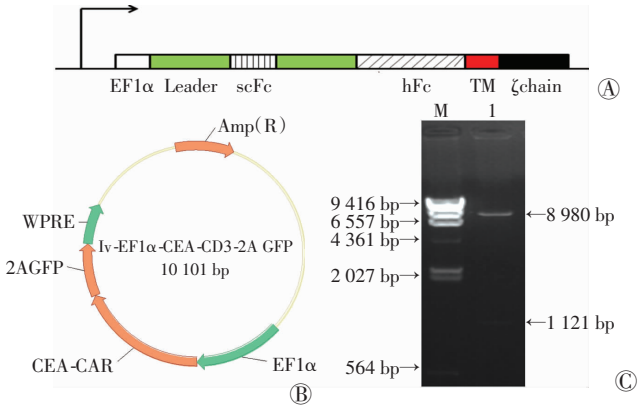
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 构建与鉴定

PCR 扩增各个目的片段回收后送测序,测序结果显示各个目的片段序列均正确,经酶切、连接等常规分子克隆技术,重组慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 已构建,其大小为 10 101 bp。*Bam*H Ⅰ酶切鉴定结果为 8 980、1 121 bp,酶切鉴定结果正确,成功获得克隆(图 1)。



A:嵌合抗原受体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 的结构示意图;B:慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 结构示意图;C:*Bam*H Ⅰ酶切鉴定重组慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE M:λ/*Hind*Ⅲ DNA 标准;1:重组慢病毒载体

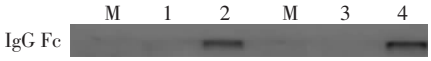
图 1 重组慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 构建与鉴定

2.2 荧光显微镜观察慢病毒载体感染 T 淋巴细胞效果

感染 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 慢病毒载体的 T 细胞,显微镜下观察细胞形态及 GFP 的表达情况,结果显示细胞成典型 T 细胞聚集生长形态,且细胞表达 GFP 荧光(图 2)。

2.3 非变性非还原 Western blot 检测抗 CEA 抗体在 T 细胞中的表达

收集慢病毒载体感染后的 T 细胞(实验组),提取蛋白,通过非变性非还原 Western blot 检测抗 CEA 抗体在 T 细胞中的表达,以未感染的 T 细胞为对照组。结果可见 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 感染后的 T 细胞表达抗 CEA 抗体,而未感染的 T 细胞不表达抗 CEA 抗体(图 3)。



M:标准;1:对照组(5 μL);2:实验组(5 μL);3:对照组(10 μL);4:实验组(10 μL)

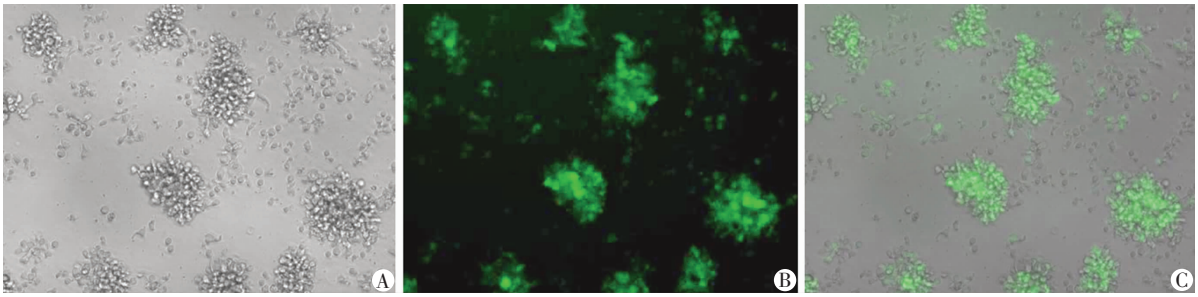
图 3 非变性非还原 Western blot 检测抗 CEA 抗体在 T 细胞中的表达

2.4 感染 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 慢病毒载体 T 细胞后抗 CEA 抗体表达率及其细胞表型

流式细胞检测结果显示,感染 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 慢病毒载体的 T 细胞培养至 14 d 后,T 细胞 GFP 表达阳性率为 62.8%;GFP^+CD4^+ T 细胞占 25.0%,GFP^+CD8^+ T 细胞占 36.8%,GFP^+CD56^+ T 细胞占 6.0%(图 4)。

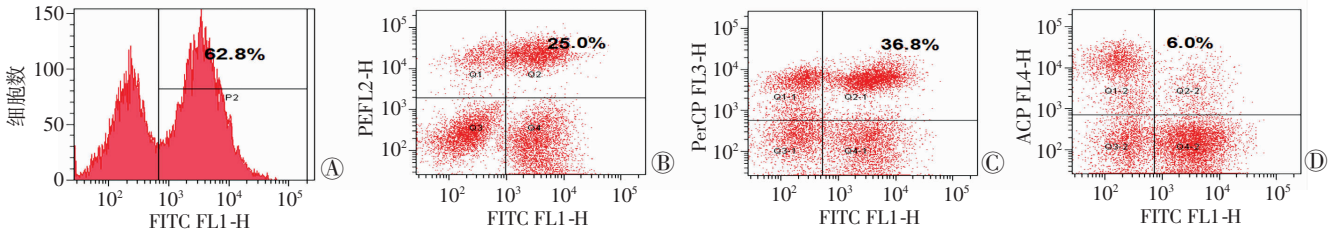
2.5 重组慢病毒载体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 感染 T 细胞后对 CEA 阳性肿瘤细胞系的杀伤效果

效应 T 细胞与靶细胞共培养 24 h 后通过荧光显微镜观察细胞形态,结果显示 CEA 阳性的靶细胞 SW480 和 HT29 在与效应 T 细胞共培养后出现葡萄状细胞团,该细胞团为表达绿色荧光的 T 细胞包裹表达红色荧光的靶细胞形成。而不表达 CEA 的靶细胞 HuH7 在与效应细胞共培养后无该现象出现(图 5)。通过检测荧光素酶的含量计算细胞杀伤效率后显示,嵌合抗原受体修饰的 T 细胞在效靶比 1∶1的情况下对



A:明场视野;B:荧光视野;C:荧光明场叠加视野

图 2 荧光显微镜观察慢病毒载体感染 T 淋巴细胞效果 (×100)



A:慢病毒载体感染 T 细胞后 GFP 表达阳性率;B:GFP^+ $CD4^+$ T 细胞比例;C:GFP^+ $CD8^+$ T 细胞比例;D:GFP^+ $CD56^+$ T 细胞比例

图 4 流式细胞术检测感染慢病毒载体 T 细胞后抗 CEA 抗体表达率及 T 细胞 CD4、CD8、CD56 亚型的比例

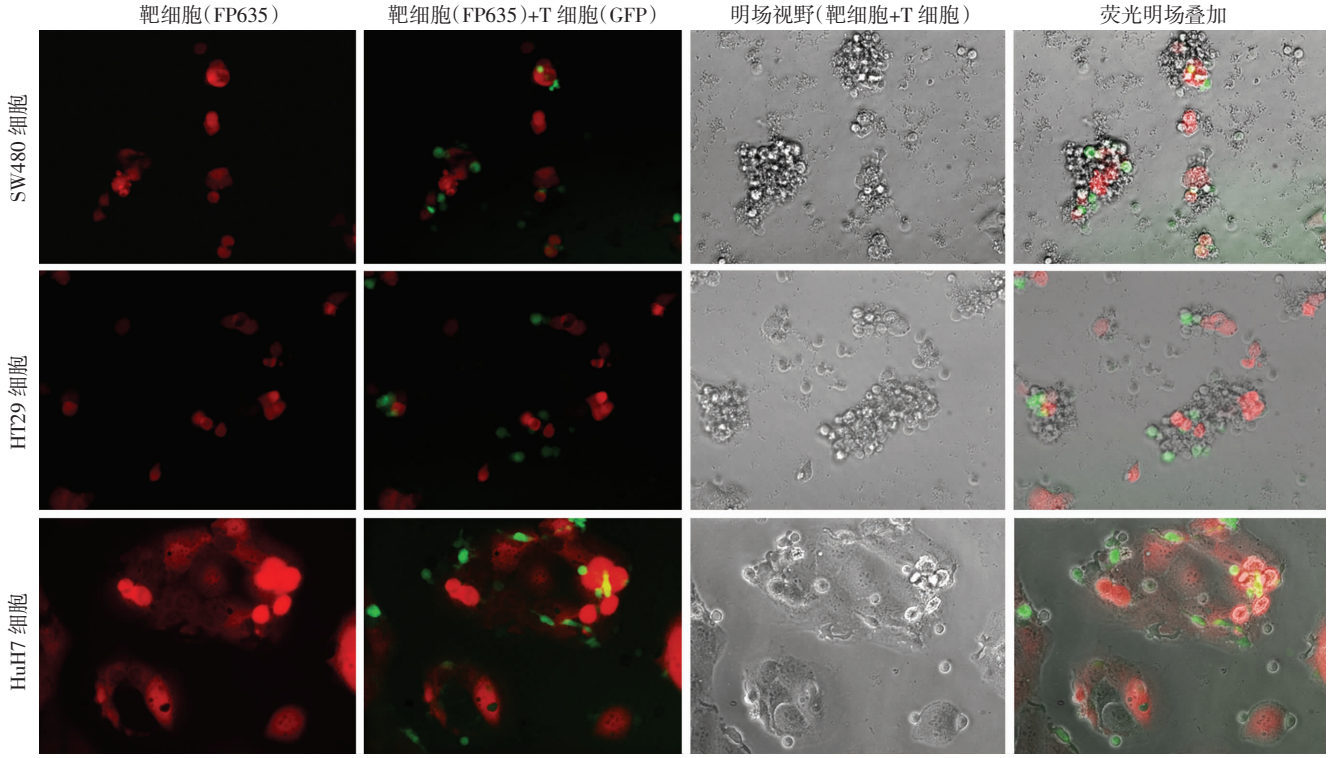


图 5 荧光显微镜观察重组慢病毒载体感染 T 细胞后对 CEA 阳性肿瘤细胞系的杀伤效果 (×100)

SW480 细胞杀伤效率为(79.53±2.47)%,对 HT29 细胞杀伤效率为(74.20±0.22)%,对 CEA 阴性细胞 HuH7 的杀伤效率为(9.20±0.99)%。结果显示嵌合抗原受体修饰的 T 细胞对 CEA 阳性的细胞具有特异性的杀伤作用($P<0.01$),而对 CEA 阴性的细胞几乎无杀伤效果。

3 讨论

近年来嵌合抗原受体修饰的免疫细胞治疗技术发展迅速,其原理是肿瘤细胞表面的抗原(配体)与嵌合抗原受体的抗体(受体)特异性结合,通过铰链区和跨膜区将信号传递至胞内,胞内信号域将信号转化为活化信号,激活效应细胞,效应细胞增殖、产生细胞因子从而杀伤肿瘤细胞[4],其具有以下优势:①特异性,抗体(受体)特异性识别抗原(配体);②安全性好,靶向杀伤肿瘤细胞;③效率高,非 MHC-Ⅰ类分子限制性[10],同时可克服肿瘤微环境造成肿瘤细胞的免疫逃逸。

目前该技术开展的临床试验主要集中应用于血液系统肿瘤的治疗,抗 CD19、CD20 CAR 修饰的 T 细胞治疗 B 系肿瘤效果显著[11]。实体肿瘤临床试验有抗叶酸嵌合抗原受体治疗卵巢癌[12],抗碳酸酐酶Ⅸ(CAⅨ)嵌合抗原受体治疗肾癌[13],抗二唾液酸神经节苷脂(GD2)嵌合抗原受体治疗经母细胞瘤[14]等。CEA 抗原是肿瘤相关抗原,广泛表达于上皮源性肿瘤中[6],对该抗原的嵌合受体修饰可广泛应用于上皮源性肿瘤的治疗。

嵌合抗原受体修饰免疫细胞治疗技术的细胞载体包括 NK 细胞和 T 细胞,由于肿瘤细胞表面 HLA Ⅰ类分子和 NK 细胞受体靶向的配体的缺失,T 细胞、NK 细胞的杀伤活性均会受到肿瘤微环境的抑制[15]。在嵌合抗原受体修饰的免疫细胞治疗技术应用中,NK 细胞在外周血淋巴细胞中含量少,转染效率不高[16],

增殖能力弱[17]；而 NK-92 细胞需要射线的照射以阻止其复制[18]，减少其成瘤风险。且嵌合抗原受体修饰的 T 细胞治疗各种肿瘤的临床试验已大量开展，技术较成熟。所以本研究将 T 细胞作为嵌合抗原受体修饰技术的细胞载体。但嵌合抗原受体修饰的 NK 细胞释放细胞因子少，毒副反应小[16]，随着 NK 细胞培养技术的提高，NK 细胞也可能作为新的细胞载体广泛应用于嵌合抗原受体修饰技术中。

虽然嵌合抗原受体修饰免疫细胞治疗各种肿瘤取得了令人振奋的效果，但仍存在部分问题：由于肿瘤抗原特异性有限，虽然这些抗原在肿瘤组织中表达提升，但其在正常组织中也有较弱的表达水平。因此，CAR 修饰免疫细胞杀伤肿瘤细胞的同时也会损伤正常组织，即脱靶（on-target off-tumor toxicity）效应[13,19]；修饰后的 T 细胞在识别靶细胞后将产生大量促炎因子，如 IL-2、INF-γ 等。这些因子大量聚集将带来严重的副反应，如抗 CD19 CAR 修饰的 T 细胞治疗急慢性淋巴细胞白血病观察到了肿瘤溶解综合征（TLS）和细胞因子释放风暴（CRS）[1,20]；异基因 CAR 修饰 T 细胞治疗时可能会发生移植物抗宿主病（graft versus host disease GVHD）[11,21]。这也是今后该治疗技术需要逐步改进的内容。

本研究成功构建了表达靶向 CEA 的嵌合抗原受体 LV-EF1α-CEA-2A-GFP-WPRE 的慢病毒载体，该载体导入 T 细胞后可正确表达靶向 CEA 的嵌合抗原受体。通过体外研究发现表达靶向 CEA 的嵌合抗原受体的 T 细胞可有效杀伤 CEA 阳性肿瘤细胞，为后续体内研究及临床治疗奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] Porter D L, Levine B L, Kalos M, *et al*. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. N Engl J Med, 2011, 365(8): 725 - 733.

[2] Jensen M C, Riddell S R. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells[J]. Immunol Rev, 2014, 257(1): 127 - 144.

[3] Kalos M, June C H. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology[J]. Immunity, 2013, 39(1): 49 - 60.

[4] Jena B, Dotti G, Cooper L J. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor[J]. Blood, 2010, 116(7): 1035 - 1044.

[5] Gold P, Freedman S O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system[J]. J Exp Med, 1965, 122(3): 467 - 481.

[6] Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues[J]. Semin Cancer Biol, 1999, 9(2): 67 - 81.

[7] Gussow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies[J]. Methods Enzymol, 1991, 203:99 - 121.

[8] Bruynck A, Seemann G, Bosslet K. Characterisation of a humanised bispecific monoclonal antibody for cancer therapy [J]. Br J Cancer, 1993, 67(3): 436 - 440.

[9] Thorne S H, Negrin R S, Contag C H. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. Science, 2006, 311(5768): 1780 - 1784.

[10] Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors[J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(2): 215 - 223.

[11] Turtle C J. Chimeric antigen receptor modified T cell therapy for B cell malignancies[J]. Int J Hematol, 2014, 99(2): 132 - 140.

[12] Kershaw M H, Westwood J A, Parker L L, *et al*. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6106 - 6115.

[13] Lamers C H, Sleijfer S, Vulto A G, *et al*. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(13): e20 - e22.

[14] Louis C U, Savoldo B, Dotti G, *et al*. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma[J]. Blood, 2011, 118 (23): 6050 - 6056.

[15] Kuroki M, Kuroki M, Shibaguchi H, *et al*. Strategies to endow cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells with antibody activity against carcinoembryonic antigen[J]. Tumor Biol, 2004, 25(4): 208 - 216.

[16] Klingemann H. Are natural killer cells superior CAR drivers? [J]. Oncoimmunology, 2014, 3:e28147.

[17] Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors[J]. Cancer J, 2014, 20(2): 134 - 140.

[18] Schonfeld K, Sahm C, Zhang C, *et al*. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor[J]. Mol Ther, 2015, 23(2):330 - 338.

[19] Lamers C H, Sleijfer S, van-Steenbergen S, *et al*. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity[J]. Mol Ther, 2013, 21(4): 904 - 912.

[20] Grupp S A, Kalos M, Barrett D, *et al*. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. N Engl J Med, 2013, 368(16): 1509 - 1518.

[21] Marcus A, Eshhar Z. Allogeneic chimeric antigen receptor-modified cells for adoptive cell therapy of cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2014, 14(7): 947 - 954.

（**收稿**：2014-12-25；**修回**：2015-01-21）

（编辑　汪勤俭）