DOI:10.16016/j.2097-0927.202205133

靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞抗肝癌细胞的体外杀伤性研究

王 松,张炳兰,张秉强 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科

[**摘要**] **目的** 研究靶向上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)的嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T)在体外对数种肝癌细胞的杀伤效能。**方法** 采用流式细胞术检测 4 种人肝癌细胞(SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402) EpCAM 的表达情况;通过慢病毒载体构建靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞;流式细胞术检测 CAR 分子的表达情况并分析 CAR-T 的 CD3/4/8 表型;为分析杀伤效应,将效应细胞和靶细胞共培养后,收集上清液,通过乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放实验检测 LDH 释放情况,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞因子 IFN-γ 和 TNF-α 的释放情况。**结果** EpCAM 在 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 中高表达,而在 SK-hep1 中不表达。流式细胞术表明靶向 EpCAM-CAR 在慢病毒感染后的 T 细胞中表达率高达 43.21%。流式细胞术分析 CAR-T 细胞 CD3/4/8 表型,高达 95.1%的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)为 CD3 阳性,其中 $CD8^+$ T 细胞占 61.40%、$CD4^+$ T 细胞占 32.13%。LDH 释放实验提示 CAR-T 对 EpCAM 阳性人肝癌细胞 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 有更强的直接杀伤能力($P<0.01$);ELISA 实验提示 EpCAM 阳性人肝癌细胞 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 诱导 CAR-T 细胞释放更多的 IFN-γ 和 TNF-α($P<0.05$, $P<0.01$),而对于 EpCAM 阴性的 SK-hep1 肿瘤细胞,CAR-T 组与未转染 T 细胞对照组 IFN-γ 和 TNF-α 的释放量无显著差异,此外,这 2 种细胞因子水平随着 E:T 比值的增加而增加。**结论** 相对未转染的 T 细胞,在体外,EpCAM-CAR-T 细胞对 EpCAM 阳性的肝癌细胞具有更强的杀伤能力,能使其释放出更多的 LDH、IFN-γ 和 TNF-α。

[**关键词**] 上皮细胞黏附分子;嵌合抗原受体 T 细胞;CAR-T;肝癌
[**中图法分类号**] R394.3; R73-362; R735.7 [**文献标志码**] A

EpCAM-targeting CAR-T cells against hepatoma cells *in vitro*

WANG Song, ZHANG Binglan, ZHANG Bingqiang Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the killing efficacy of chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells targeting epithelial cellular adhesion molecule (EpCAM) in several hepatoma cell lines. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of EpCAM in hepatoma cells (SK-hep1, Hep-G2, HuH7 and BEL-7402). After EpCAM -targeting CAR-T cells were constructed using lentiviral vectors with CAR genes, flow cytometry was used to detect the expression of EpCAM-CAR in the obtained cells, and to analyze the CD3/4/8 phenotype of CAR-T cells without transfection of lentiviral vectors. Then the effector cells and target cells were co-cultured, and LDH release assay and ELISA were used to detect the release of LDH and major cytokines in the supernatant. **Results** EpCAM was highly expressed in Hep-G2, HuH7 and BEL-7402 cells, but not in SK-hep1 cells. Flow cytometry showed that the expression rate of EpCAM-CAR was 43.21% in CAR-T cells after lentivirus infection. Flow cytometry also indicated that up to 95.1% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were CD3 positive, of which 61.40% were $CD8^+$ T cells and 32.13% were $CD4^+$ T cells. LDH release assay revealed that the obtained CAR-T cells had stronger direct killing ability on

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81703057)
[**通信作者**] 张秉强,E-mail:zhbingqiang@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

EpCAM-positive hepatoma cell lines Hep-G2, HuH7, and BEL-7402. ELISA showed that EpCAM-positive target cells Hep-G2, HuH7, and BEL-7402 induced CAR-T cells to release more IFN-γ and TNF-α. For SK-hep1 cells with negative EpCAM expression, IFN-γ and TNF-α releases were not significantly different between the CAR-T group and the control group, and the levels of these 2 cytokines werw increased with the increase of E∶T ratio. **Conclusion** Compared with ordinary CAR-T cells, EpCAM-targeting CAR-T cells have a stronger killing effect on EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells.

[**Key words**] epithelial cellular adhesion molecule; chimeric antigen receptor T cells; hepatocellular carcinoma

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81703057). Corresponding authors: ZHANG Bingqiang, E-mail: zhbingqiang@163.com

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占主体。HCC 是全球第六大最常见的癌症,也是癌症死亡的第四大原因[1]。由于大多数 HCC 恶性程度高,进展迅速,传统的手术、放疗、化疗等治疗手段效果较差,因此急需寻找新的治疗方法提高患者的生存期和生存质量。

近年来,过继细胞免疫治疗(adoptive cell transfer therapy, ACT)作为一种新的肿瘤免疫疗法备受关注[2]。ACT 是将大量免疫细胞在体外培养和扩增后再注入体内以使癌症消退的一种免疫疗法。ACT 通常使用具有抗肿瘤活性的天然宿主 T 细胞、基因工程化 T 细胞受体或嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰而成的 T 细胞,其中嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)能够特异性靶向清除肿瘤细胞,近年来已成为研究热点。

CAR 的结构主要由细胞外抗原结合区、铰链区、跨膜区和一个或多个细胞内信号区组成[3]。近 30 年来,CAR 已发展出 5 代,第二代在临床上应用最多,第三代到第五代目前还在研究阶段[4]。CAR-T 在临床治疗血液恶性肿瘤中取得了显著的疗效,尤其是以 CD19 为靶点的 CAR-T 研究已被大量报道[5],越来越多的学者开始进一步研究 CAR-T 治疗实体瘤,其中针对肝癌的临床前研究已取得了部分进展,目前研究 CAR-T 治疗肝癌的靶点主要聚焦在磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(Glypican-3, GPC3)[6]、黏蛋白 1(mucin-1)[7]、甲胎蛋白(alpha fetal protein, AFP)[8-9]上。

上皮细胞黏附分子(epithelial cellular adhesion molecule, EpCAM)是一种跨膜糖蛋白,在多种癌组织中高表达,如肝癌、结肠癌等[10-11],目前将 EpCAM 作为 CAR-T 治疗肝癌靶点的研究尚未见大量报道。本研究将针对 EpCAM 肿瘤抗原的第三代嵌合抗原受体基因[scFv(anti-EpCAM)-CD28-4-1BB-CD3ζ],通过慢病毒载体转染到 T 淋巴细胞获得 EpCAM-CAR-T 细胞,然后评价 CAR-T 细胞在体外抗肝癌效果。该实验为靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞治疗肝癌的体内实验及临床应用奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

编码靶向 EpCAM 的 CAR 基因的慢病毒由四川大学生物治疗国家重点实验室提供; SK-hep1 购自中国武汉普诺赛生命科技有限公司;hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 均购自中国上海抚生实业有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;X-VIVO 培养基购自美国 Lonza 公司;青-链霉素购自美国 Mediatech 公司; Ficoll 淋巴细胞分离液购自美国 Sigma-Aldrich 公司;重组人白细胞介素-2(rhIL-2)购自美国 BD 公司;抗人 CD3/抗 CD28 磁珠购自美国 Invitrogen 公司;抗人 CD3 抗体、抗人 CD8 抗体、抗人 CD4 流式实验抗体购自美国 Biolegend 公司;PE 标记的抗人 EpCAM 流式抗体购自美国 Biolegend 公司;PE 标记的山羊抗鼠 $F(ab')_2$ 流式抗体购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司; IFN-γ ELISA 试剂盒、TNF-α ELISA 试剂盒购自美国 BioLegend 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒购自中国南京建成生物研究所公司。细胞计数板购自美国 Count star 公司;孔板、培养皿、培养瓶购自美国 CORNING 公司;15、50 mL 离心管购自美国 BD 公司。摇床购自中国天呈公司,电子数字天平购自中国普力斯特公司,超纯水系统购自美国 Millipore 公司,-80 ℃超低温冰箱购自美国 Thermo 公司,生物安全柜购自美国 Thermo 公司,普通冰箱购自中国 Haier 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司,生物显微镜购自德国 Leica 公司,CO_2 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,普通离心机购自美国 Thermo Scientific 公司,超速离心机购自 Beckmann 公司,高速离心机购自美国 Thermo Scientific,恒温水浴箱购自美国 PolyScience,酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,FACSCelesta 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养

4 种人肝癌细胞 SK-hep1、hep-G2、HuH7、BEL-7402 用含 5%胎牛血清、1%青-链霉素的 DMEM 高糖完全培养基培养,当细胞生长至 80%~90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化并传代,置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,细胞均为贴壁细胞。

从外周静脉血提取出的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)用含有 2.5% AB 型人血清、100 U/mL IL-2 的 X-VIVO 完全培养基培养,置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,该种细胞为悬浮细胞。

1.3 流式细胞术检测 EpCAM 在肝癌细胞表面的表达

为了检测 EpCAM 在各肝癌细胞表面的表达情况,收集 1×10^6 个肝癌细胞,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。第 3 次洗涤后,用 200 μL PBS 缓冲液重悬细胞。在试管中加入 1 μL PE 荧光偶联 EpCAM 抗体,4 ℃避光孵育染色 30 min。孵育结束后,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,用 100 μL PBS 缓冲液重悬细胞,流式细胞术检测并分析。

1.4 人外周血单个核细胞的分离和提取

从重庆医科大学附属第一医院消化内科征集一位健康志愿者,取 12 mL 健康志愿者的外周静脉血入肝素抗凝管。先在 15 mL 离心管中加入 6 mL 淋巴细胞分离液,再贴壁加入 6 mL 血液,在 32 ℃、1 000×*g*、离心加减速度均为 2 的条件下离心 30 min。离心后可见其分为 4 层,将白膜层即单个核细胞层(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)吸入至 50 mL 离心管中。加入 20 mL X-VIVO 培养基清洗,300×*g* 离心 10 min 后弃上清液,加入 20 mL 红细胞裂解缓冲液,裂解 2 min 后 300×*g* 离心 5 min。离心后弃上清,加入 20 mL X-VIVO 培养基清洗,300×*g* 离心 5 min 后弃上清,并用含有抗人 CD3 /CD28 抗体磁珠的 X-VIVO 完全培养基(磁珠∶细胞=1∶1)进行活化、培养传代。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.5 靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞的制备

用含有靶向 EpCAM-CAR 基因的慢病毒转染 T 细胞,从而制备出 CAR-T 细胞。先加 1 mL 纤维连接蛋白(50 ug/mL)即 RetroNectin 于 6 孔板中,4 ℃封口过夜。弃液后用 2% BSA 溶液封闭 30 min,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。每孔加入 0.5 mL X-VIVO 培养基,然后加入含靶向 EpCAM-CAR 基因的慢病毒,1 000×*g*、32 ℃条件下离心 2 h。加入 2×10^6 个 T 淋巴细胞,300×*g* 离心 10 min。最后将 6 孔板放入培养箱进行培养,以便进行后续分析。

1.6 流式细胞术检测 T 细胞表面 CAR 的表达

为了检测 EpCAM-CAR 在 T 细胞表面的表达情况,在慢病毒转染 T 细胞 48~72 h,使用间接染色法进行荧光染色。先分别收集 1×10^6 个 CAR-T 细胞,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。第 3 次洗涤后,用 200 μL PBS 缓冲液重悬细胞。加入 4 μL 生物素偶联 $F(ab')_2$ 抗体,4 ℃下孵育 30 min。用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,弃上清液后用 200 μL PBS 缓冲液重悬细胞。加入 4 μL PE 标记链霉亲和素,4 ℃避光孵育 30 min。用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,弃上清液后用 100 μL PBS 缓冲液重悬细胞,以流式细胞术进行检测分析,未转染的普通 T 细胞作为对照组,检测 CAR-T 实验组的 CAR 表达情况。

1.7 LDH 释放实验检测 EpCAM-CAR-T 细胞杀伤能力

靶细胞 SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 经细胞培养、充分生长后被收集起来,300×*g* 离心 5 min 洗涤去除胎牛血清和培养基等,添加新鲜基础培养基于离心沉淀中,调整细胞数为 1×10^5/mL。收集效应细胞 CAR-T 和活化 T 细胞,300×*g* 离心 5 min 洗涤去除人血清和细胞因子等,添加新鲜基础培养基于离心沉淀中,调整细胞数为 2×10^5/mL。将效应细胞、靶细胞分别加 96 孔板中(200 μL/孔),效应细胞∶靶细胞=2∶1、1∶1。细胞放入 CO_2 培养箱,培养 6 h。于孵育结束前 1 h,在靶细胞最大 LDH 释放孔中加入 20 μL lysis 裂解液充分裂解细胞。孵育结束后 300×*g* 离心 5 min,转移上清液至新的 96 孔板中以备 LDH 释放实验。按照试剂说明书要求设置培养基背景孔、靶细胞自发 LDH 释放孔、效应细胞自发 LDH 释放孔、靶细胞最大 LDH 释放孔、每种实验孔均设 3 个复孔。按照说明书要求加入样本、LDH 试剂,最后加入终止液后,通过酶标仪测定吸光度值[*D*(450)]。根据公式计算效应细胞杀伤能力(溶细胞率)。

溶细胞率=(实验组 *D* 值-效应细胞自发释放孔 *D* 值-靶细胞自发释放孔 *D* 值)/(靶细胞最大释放孔 *D* 值-靶细胞自发释放孔 *D* 值)×100%

1.8 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 IFN-γ、TNF-α 的浓度

靶细胞即肝癌细胞与效应细胞即未转染的 T 细胞或 CAR-T 细胞,以不同比例(1∶5/1∶10)加入 96 孔板中,每组设 3 个复孔,放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中共培养,每孔肝癌细胞数为 1×10^4 个。20 h 后,离心收集上清液,使用 ELISA 试剂盒分别测定 IFN-γ 和 TNF-α 浓度。在酶标仪上测定各孔 450、570 nm 处的吸光度值。根据标准品浓度与 *D* 值的曲线关系,计算出 IFN-γ 和 TNF-α 的浓度。

1.9 流式细胞术检测 T 细胞表面 CD3/4/8 的表达

CAR-T 细胞培养 10 d 后,收集 1×10^6 个细胞,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。第 3 次洗涤后,用 200 μL PBS 缓冲液重悬细胞。相继加入 1 μL APC-A750 荧光偶

联 CD3 抗体、1 μL FITC 荧光偶联 CD4 抗体和 1 μL PE 荧光偶联 CD8 抗体,4 ℃避光孵育染色 30 min。染色后,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,100 μL PBS 缓冲液重悬细胞,并以流式细胞仪检测分析。

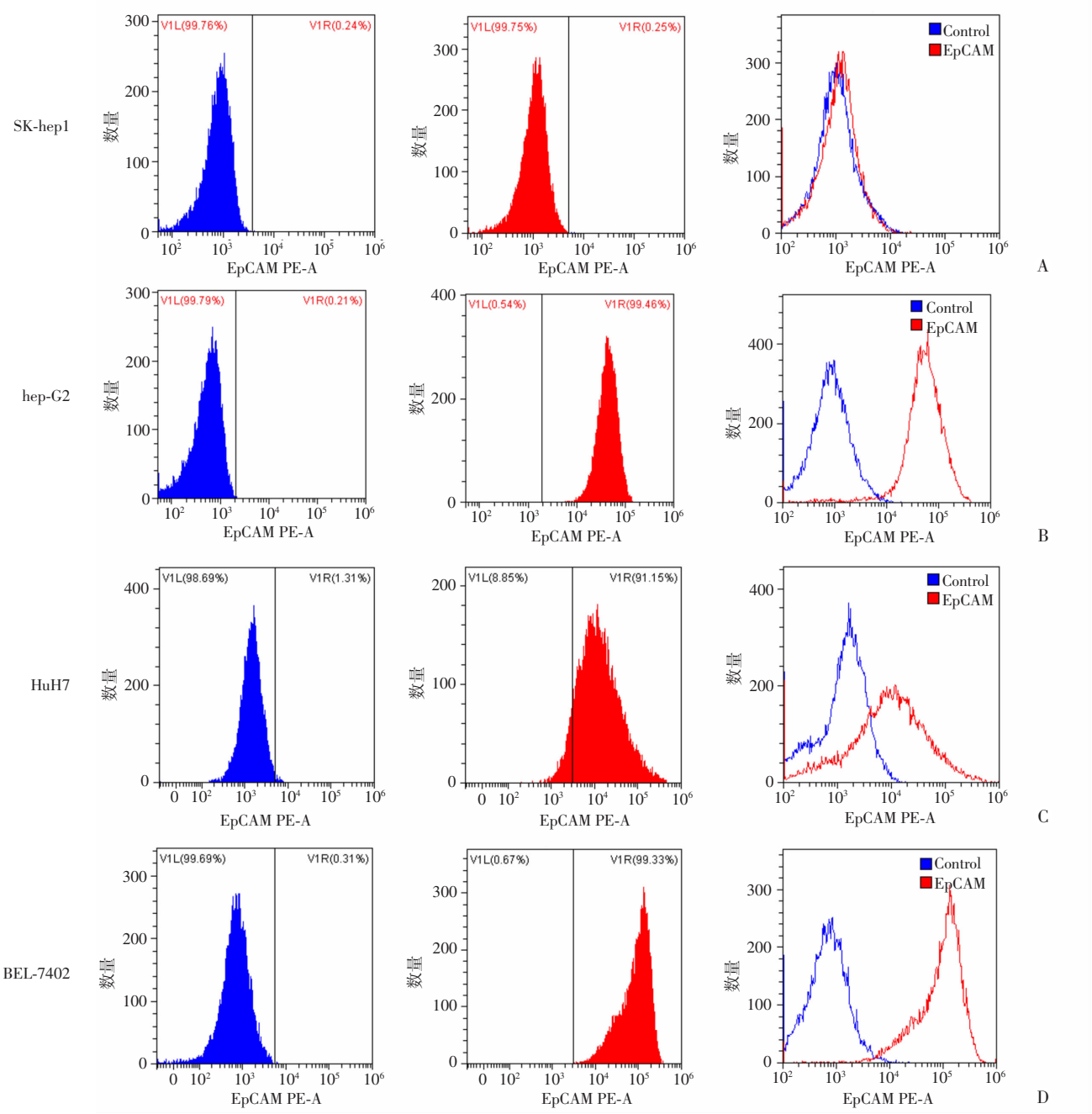
1.10 统计学分析

所有统计分析使用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行。细胞因子浓度数据、溶细胞率等定量数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用独立样本 t 检验分析两组样本的均数。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EpCAM 在人肝癌细胞系中的表达

采用流式细胞术检测 4 种人肝癌细胞表面 EpCAM 抗原的表达。SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 细胞中 EpCAM 的表达率分别为 0.25%(几乎不表达)、99.46%、91.15%和 99.33%(图 1)。



A~D:分别为 SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 肝癌细胞

图 1 流式细胞术检测 4 种人肝癌细胞系表面 EpCAM 抗原的表达

2.2 转染后 T 细胞表面 CAR 的表达

采用编码靶向 EpCAM-CAR 的慢病毒转染 T 细胞来构建 CAR-T 细胞。慢病毒转染 T 细胞 48~72 h 后,流式细胞术检测转染效率,其中 Control 组代表未转染的 T 细胞组,CAR-T 组为慢病毒转染的 T 细胞组。结果显示,高达 43.21%的 T 细胞表面表达了 CAR 分子(图 2,M2 值),表明成功构建了稳定高表达的靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞。

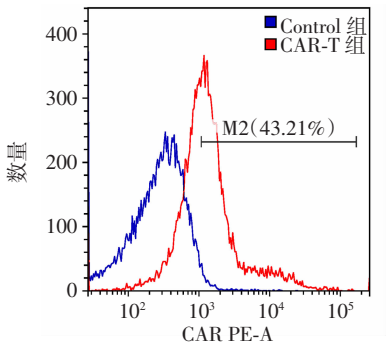


图 2 流式细胞术检测 T 细胞表面 CAR 的表达

2.3 CAR-T 细胞的体外杀伤能力

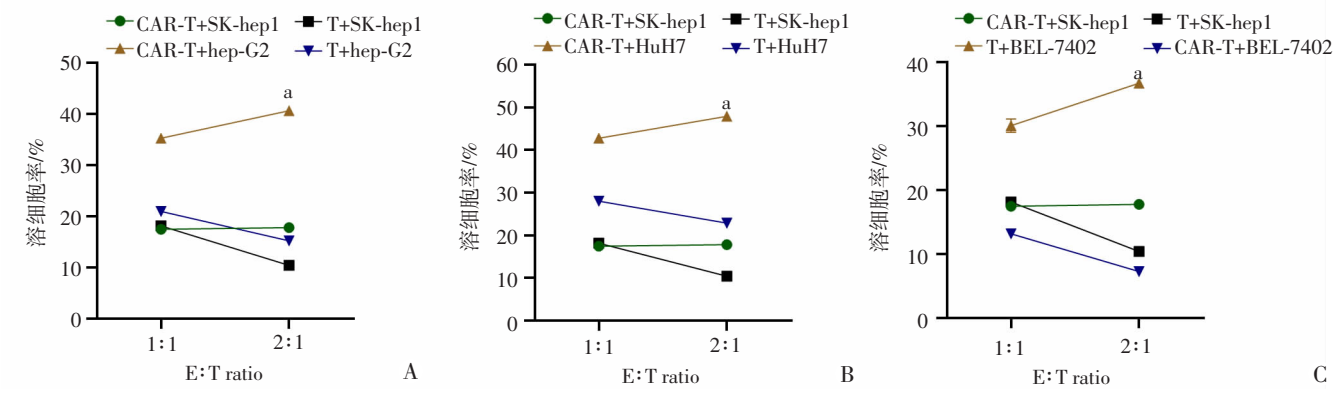
乳酸脱氢酶(LDH)在胞质内含量丰富,正常时并不能通过细胞膜,在细胞受损或死亡时才释放到细胞外,此时培养基中 LDH 的活性与受损或死亡细胞数量成正比。LDH 释放实验结果显示:以未转染 T 细胞与 SK-hep1 肝癌细胞共培养组为对照组,与对照组相比,在效靶比(E:T)为 2:1时,EpCAM-CAR-T 细胞分别与 3 种 EpCAM 阳性细胞即 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 肝癌细胞共培养时有更多量的 LDH 释放($P<0.01$,图 3)。

T 细胞要发挥抗肿瘤作用,除了与靶细胞特异性结合直接杀伤靶细胞外,还同时释放大量的细胞因子,如 IFN-γ、TNF-α 等,最终扩大和增强免疫应答。本课题通过检测共培养的细胞因子浓度水平,能侧面印证 CAR-T 细胞对肝癌细胞的杀伤能力。

ELISA 分别检测共培养细胞上清液中的细胞因子 IFN-γ 和 TNF-α,以未转染 T 细胞与肝癌细胞共培养组为对照组。结果显示:与对照组相比,3 种 EpCAM 阳性靶细胞株即 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 诱导靶向 EpCAM-CAR-T 细胞释放出更多的 IFN-γ 和 TNF-α($P<0.05$, $P<0.01$,图 4、5)。而对于 EpCAM 阴性的 SK-hep1 肿瘤细胞,EpCAM-CAR-T 实验组和对照组之间 IFN-γ 和 TNF-α 的浓度没有显著的差异。此外,细胞因子水平随着 E:T 比值的增加而增加(图 4、5)。

2.4 CAR-T 细胞的表型

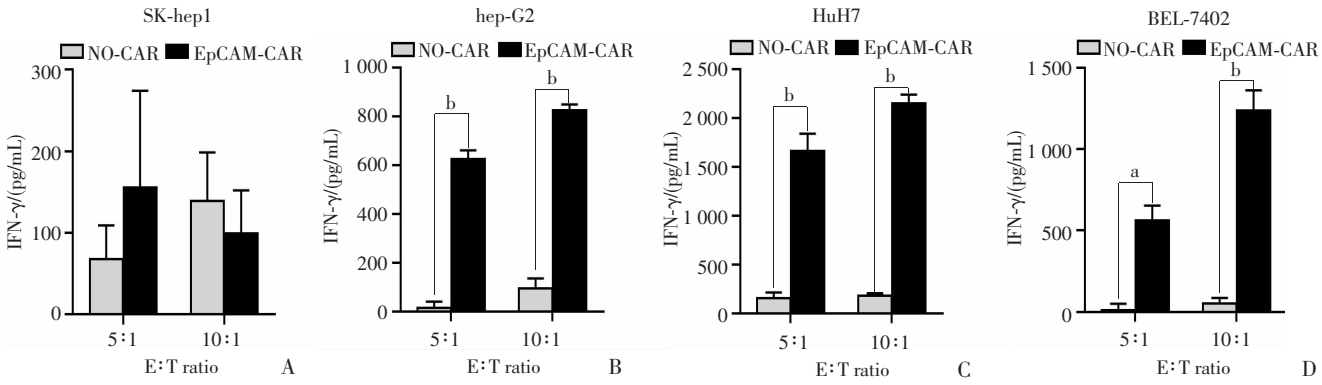
通过流式细胞仪检测激活 CAR-T 细胞的表型,高达 95.10%的 PBMCs 为 CD3 阳性,说明均是人 T 淋巴细胞,其中 $CD8^+$ T 细胞占 61.40%、$CD4^+$ T 细胞占 32.13%(图 6)。该结果表明在刺激扩增后的靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞中,$CD8^+$ 的 T 细胞明显多于 $CD4^+$ 的 T 细胞,其具有更强的杀伤能力。



SK-hep1:EpCAM 阴性肝癌细胞;a:$P<0.01$,与对照组比较

A:LDH 释放实验测定两种效应细胞与 SK-hep1、hep-G2 分别共培养后的释放情况;B:LDH 释放实验测定两种效应细胞与 SK-hep1、HuH7 分别共培养后的释放情况;C:LDH 释放实验测定两种效应细胞分别与 SK-hep1、BEL-7402 分别共培养后的释放情况

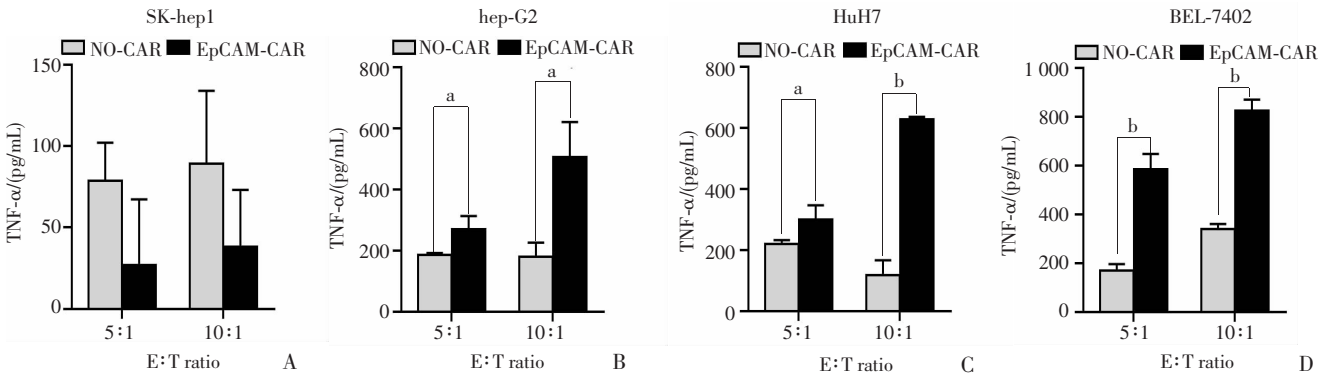
图 3 LDH 释放实验检测 CAR-T 细胞直接杀伤能力



NO-CAR:未转染的 T 细胞对照组;EpCAM-CAR:CAR-T 实验组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A~D:分别为 SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 与 2 种效应细胞分别共培养后效应细胞分泌的 IFN-γ 水平

图 4 ELISA 实验测定共培养后细胞因子 IFN-γ 释放水平



NO-CAR:未转染的 T 细胞对照组;EpCAM-CAR:CAR-T 实验组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A~D:分别为 SK-hep1、hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 与 2 种效应细胞分别共培养后效应细胞分泌的 TNF-α 水平

图 5 ELISA 实验测定共培养后细胞因子 TNF-α 释放水平

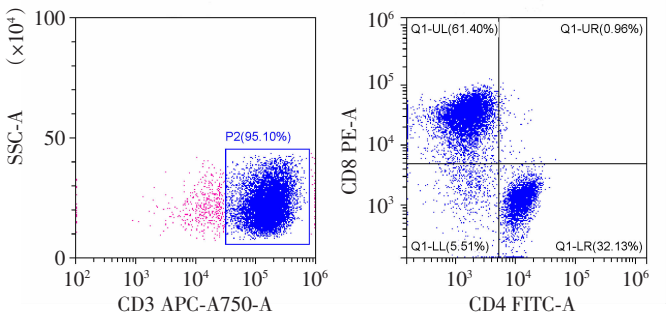


图 6 流式细胞术检测 EpCAM -CAR-T 细胞的表型

3 讨论

T 细胞是肿瘤细胞的天敌,在抗肿瘤的免疫反应中发挥重要作用。基于 CAR-T 细胞的过继细胞免疫治疗可以预防肿瘤的复发和进展[12]。CAR-T 疗法已经成为一种非常有前途的 ACT。与传统的 ACT 相比,CAR-T 治疗有以下优点:①它具有一定的抗原特异性;②CAR-T 细胞不依赖于 MHC,直接识别肿瘤细胞[13]。

目前,靶向 CD19 的 CAR -T 是临床实践中研究最广泛的,实体瘤的 CAR-T 治疗也在进一步研究中,研究的实体肿瘤靶点包括人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2,HER2)[14]、

双唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside,GD2)[15]、间皮素(mesothelin)[16]、甲胎蛋白等。

肝癌是一种恶性程度很高的实体瘤,进展快,预后差,目前 CAR-T 细胞治疗肝癌的研究相对较少,本课题选择 EpCAM 抗原作为 CAR-T 治疗肝癌靶点。既往研究表明,EpCAM 在肝癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、卵巢癌、前列腺癌等组织中过表达,而在正常组织中基本不表达。循环肿瘤细胞和播散性肿瘤细胞被确定为潜在的转移诱导细胞[17],而 EpCAM 是其标记物,此外 EpCAM 还是肿瘤干细胞的标记物。EpCAM 在化疗耐药肿瘤患者中可能升高或降低表达[18]。

3.1 4 种肝癌细胞系唯有 SK-hep1 基本不表达靶抗原 EpCAM

本研究采用流式细胞术检测了 4 种肝癌组织中 EpCAM 的表达。结果显示 EpCAM 在 hep-G2、HuH7 和 BEL-7402 中高表达,而 SK-hep1 基本不表达。靶向 EpCAM 的 CAR-T 细胞(即 EpCAM-CAR-T)能够识别肿瘤表面抗原 EpCAM,从而更有效地杀伤肿瘤细胞。

3.2 通过慢病毒转染成功制备高表达 CAR 的 CAR-T

为了实现 CAR 在 T 细胞上的稳定表达,既往研究发现重组人纤维连接蛋白(RetroNectin)可以增强慢病毒感染 T 细胞的效率。在本研究中,Retronectin 法被用来更有效地将编码 CAR 的慢病毒转染到 T 细胞中,慢病毒转染 T 细胞 48~72 h 后,用流式细胞仪检测转染效率。结果表明,CAR 在转染的 T 细胞表面的表达率高达 43.21%。

3.3 EpCAM-CAR-T 相对普通 T 细胞具备更强的杀伤能力

T 细胞是通过直接破坏靶细胞膜而将靶细胞杀伤,同时释放细胞因子增强免疫效应,所以 T 细胞杀伤靶细胞后,从靶细胞中释放出的 LDH 程度能直观地代表 T 细胞的直接杀伤能力,而从 T 细胞释放出的细胞因子的量也能一定程度上代表其杀伤能力。两种体外杀伤实验里,LDH 释放实验表明 EpCAM-CAR-T 对 EpCAM 阳性肝癌细胞比对 EpCAM 阴性肝癌细胞具有更强的直接杀伤能力,而且细胞因子释放实验表明 EpCAM-CAR-T 在肿瘤表面抗原 EpCAM 刺激下,对比普通 T 细胞,其可以释放更多量的细胞因子,包括 IFN-γ、TNF-α,激活和维持 T 细胞抗肿瘤活性,发挥更强的杀伤效应。

综上所述,本研究通过含有靶向 EpCAM-CAR 基因的慢病毒转染普通 T 细胞,成功构建了稳定高表达 EpCAM-CAR 的 CAR-T 细胞。在体外实验中,EpCAM-CAR-T 对 EpCAM 阳性肝癌细胞的杀伤能力强于其对 EpCAM 阴性肝癌细胞的杀伤能力,本研究为进一步开展 EpCAM-CAR-T 细胞治疗肝癌的临床研究奠定了一定的实验基础。本研究尚存在不足之处,比如进一步做体内动物实验验证 CAR-T 在动物体内抗肝癌能力。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] ROSENBERG S, RESTIFO N. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer[J]. Science, 2015, 348(6230): 62-68. DOI: 10.1126/science.aaa4967.

[3] DOMINGUEZ G. The CART gene: structure and regulation[J]. Peptides, 2006, 27(8): 1913-1918. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.01.025.

[4] 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. DOI: 10.1111/imr.12139.

[5] MAUS M V. CD19 CAR T cells for adults with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia[J]. Lancet, 2021, 398(10299): 466-467. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01289-7.

[6] SHI D H, SHI Y P, KASEB A O, *et al*. Chimeric antigen receptor-glypican-3 T-cell therapy for advanced hepatocellular carcinoma: results of phase I trials[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(15): 3979-3989. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3259.

[7] 马宜冬, 王真, 巩睿智, 等. 靶向黏蛋白 1 嵌合抗原受体修饰的 Jurkat T 细胞特异杀伤肝癌细胞[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(11): 1177-1182. DOI: 10.3724/SP.J.1008.2014.01177

MA Y D, WANG Z, GONG R Z, *et al*. Specific cytotoxicity of MUC1 chimeric antigen receptor-engineered Jurkat T cells against hepatocellular carcinoma[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2014, 35(11): 1177-1182. DOI: 10.3724/SP.J.1008.2014.01177

[8] LIU H, XU Y Y, XIANG J Y, *et al*. Targeting alpha-fetoprotein (AFP)-MHC complex with CAR T-cell therapy for liver cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(2): 478-488. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1203.

[9] SUN L H, GUO H, JIANG R Y, *et al*. Engineered cytotoxic

T lymphocytes with AFP-specific *TCR* gene for adoptive immunotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(1): 799-806. DOI: 10.1007/s13277-015-3845-9.

[10] GIRES O, PAN M, SCHINKE H, *et al*. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(3): 969-987. DOI: 10.1007/s10555-020-09898-3.

[11] ASAKURA N, NAKAMURA N, MUROI A, *et al*. Expression of cancer stem cell markers EpCAM and CD90 is correlated with anti- and pro-oncogenic EphA2 signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8652. DOI: 10.3390/ijms22168652.

[12] ZHANG R Y, ZHANG Z, LIU Z K, *et al*. Adoptive cell transfer therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Front Med, 2019, 13(1): 3-11. DOI: 10.1007/s11684-019-0684-x.

[13] BUJAK J K, PINGWARA R, NELSON M H, *et al*. Adoptive cell transfer: new perspective treatment in veterinary oncology[J]. Acta Vet Scand, 2018, 60(1): 60. DOI: 10.1186/s13028-018-0414-4.

[14] BUDI H S, AHMAD F N, ACHMAD H, *et al*. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor (CAR) for tumor immunotherapy; recent progress[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 40. DOI: 10.1186/s13287-022-02719-0.

[15] PULE M A, SAVOLDO B, MYERS G D, *et al*. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma[J]. Nat Med, 2008, 14(11): 1264-1270. DOI: 10.1038/nm.1882.

[16] TOKATLIAN T, ASUELIME G E, MOCK J Y, *et al*. Mesothelin-specific CAR-T cell therapy that incorporates an HLA-gated safety mechanism selectively kills tumor cells [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(1): e003826. DOI: 10.1136/jitc-2021-003826.

[17] GIRES O, STOECKLEIN N H. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(22): 4393-4402. DOI: 10.1007/s00018-014-1693-1.

[18] BROWN T C, SANKPAL N V, GILLANDERS W E. Functional implications of the dynamic regulation of EpCAM during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 956. DOI: 10.3390/biom11070956.

(**收稿**:2022-05-24;**修回**:2023-03-28)

(编辑 邓强庭)