DOI:10.16016/j.2097-0927.202404042

超顺磁性氧化铁纳米颗粒标记靶向癌胚抗原的 CAR-T 细胞及体外磁共振成像研究

何坤高[1],蒋 波[2],郭牡丹[2],王桂玲[2],张 恩[2],徐豆豆[2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院放射科[1];401121 重庆,重庆市食品药品检验检测研究院[2]

[**摘要**] **目的** 采用超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)标记靶向癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T 细胞),并进行体外磁共振成像研究,为监测 CEA CAR-T 细胞的体内回输治疗提供依据。**方法** 将 ferumoxytol、肝素钠和硫酸鱼精蛋白分别以高(ferumoxytol 100 μg/mL,肝素钠 4 IU/mL,硫酸鱼精蛋白 120 μg/mL)、中(ferumoxytol 50 μg/mL,肝素钠 2 IU/mL,硫酸鱼精蛋白 60 μg/mL)、低(ferumoxytol 25 μg/mL,肝素钠 1 IU/mL,硫酸鱼精蛋白 30 μg/mL)剂量混合形成 SPIONs 复合物 FHP(ferumoxytol/heparin/protamine),然后与 CEA CAR-T 细胞共孵育进行细胞标记。CCK-8、EdU 和流式细胞术检测 FHP 对细胞的生物相容性,普鲁士蓝染色检测细胞对 FHP 的摄入情况,电感耦合等离子体-质谱法(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)定量检测细胞中 Fe 含量,流式细胞术检测 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)扫描 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞。**结果** 高、中、低剂量的 FHP 对 CEA CAR-T 细胞的活力没有明显影响,CCK-8 实验显示细胞活性均在 100%以上;EdU 实验显示各组细胞 DNA 复制活性均在 94.3%以上。普鲁士蓝染色显示 CEA CAR-T 细胞可摄取 FHP,且随 FHP 浓度的增加,摄取量增大。ICP-MS 进一步检测显示胞内 Fe 含量为(440.23±189.36)ng/mL。肿瘤细胞杀伤实验表明 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞的杀伤肿瘤细胞能力良好。MRI 扫描显示随着 FHP 浓度的增高,FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞 T2WI 信号呈明显降低趋势($P<0.01$)。**结论** SPIONs 复合物 FHP 具有良好的生物相容性并能够有效标记 CEA CAR-T 细胞,可作为 CEA CAR-T 细胞的磁标记物,为临床提供一种可行的 MRI 示踪方法。

[**关键词**] 嵌合抗原受体 T 细胞;超顺磁性氧化铁;纳米颗粒;ferumoxytol;磁共振成像
[**中图法分类号**] R392.12; R445.2; R981.9 [**文献标志码**] A

Labeling of carcinoembryonic antigen-specific CAR-T cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and *in vitro* magnetic resonance imaging

HE Kungao[1], JIANG Bo[2], GUO Mudan[2], WANG Guiling[2], ZHANG En[2], XU Doudou[2] [1]Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, 401121, China

[**Abstract**] **Objective** To use superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) to label chimeric antigen receptor (CAR) T cells targeting carcinoembryonic antigen (CEA), and perform magnetic resonance imaging (MRI) to real time trace CEA CAR-T cells *in vivo*. **Methods** Appropriate amount of ferumoxytol, heparin sodium and protamine sulfate were mixed at high (ferumoxytol 100 μg/mL, heparin sodium 4 IU/mL, protamine sulfate 120 μg/mL), medium (ferumoxytol 50 μg/mL, heparin sodium 2 IU/mL, protamine sulfate 60 μg/mL), and low (ferumoxytol 25 μg/mL, heparin sodium 1 IU/mL,

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX1078);重庆市博士后科研项目特别资助项目(2020 年);重庆市科研机构绩效激励引导专项(cstc2022jxjl120006)

[**通信作者**] 徐豆豆,E-mail:xudoudou@cqifdc.org.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

protamine sulfate 30 μg/mL) concentrations to form a SPIONs complex ferumoxytol/heparin/protamine (FHP), and then co-incubated with CEA CAR-T cells for cell labeling. The biocompatibility of FHP was detected by CCK-8 assay, EdU assay and flow cytometry. The uptake of FHP was detected by Prussian blue staining, and SPIONs content in the cells was quantitatively detected by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Flow cytometry was used to detect the lytic effect of FHP-labeled CEA CAR-T cells on tumor cells, and MRI was employed to scan FHP-labeled CEA CAR-T cells. **Results** FHP at high, medium, and low concentrations had no significant effect on the activity of CEA CAR-T cells, with cell activity above 100% determined by CCK-8 assay. DNA proliferation was above 94.3% in EdU assays. Prussian blue staining showed that CEA CAR-T cells could take FHP up, with the uptake increased with the increment of FHP concentration. ICP-MS showed that the intracellular Fe content was 440.23±189.36 ng/mL. Tumor cell killing experiment showed that FHP-labeled CEA CAR-T cells had excellent killing capability against tumor cells. MRI scans indicated that T2WI signals of FHP-labeled CEA CAR-T cells were significantly reduced with increasing FHP concentration ($P<0.01$). **Conclusion** SPIONs complex FHP shows good biocompatibility and can effectively label CEA CAR-T cells. SPIONs complex FHP can be used as a magnetic marker for CEA CAR-T cells and a feasible MRI tracer for clinical application.

[**Key words**] chimeric antigen receptor T-cell; superparamagnetic iron oxide; nanoparticles; ferumoxytol; magnetic resonance imaging

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX1078), the Special Funding for Postdoctoral Research Projects of Chongqing (2020) and the Special Project of Performance Incentive and Guidance in Chongqing Scientific Research Institutes (cstc2022jxjl120006). Corresponding author: XU Doudou, E-mail: xudoudou@cqifdc.org.cn

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)T细胞疗法是通过基因改造技术,将带有特异性抗原识别结构域及T细胞激活信号的遗传物质转入T细胞,不仅能够特异性地识别T细胞,还能激活T细胞杀死肿瘤细胞。CAR-T细胞疗法首先在B细胞非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤以及急性B淋巴细胞白血病等方面得到成功应用[1-2]。从血液肿瘤的CAR-T细胞治疗中获取的经验极大地促进了针对实体肿瘤CAR-T细胞治疗的发展[3-4]。据不完全统计,全世界正在开展多项针对实体瘤,如神经母细胞瘤、胰腺癌、恶性胸膜间皮瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、卵巢癌和结肠直肠癌的CAR-T细胞治疗临床试验[5-6]。一项靶向癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)治疗结直肠癌的CAR-T临床试验显示,10例经CEA CAR-T细胞治疗的结直肠癌转移患者,在长期(28 ~ 198 d)观察中血清CEA水平均明显下降[7]。尽管如此,在CAR-T细胞治疗实体瘤的疗效评估中,了解CAR-T细胞在患者体内的生物分布仍是当前亟待解决的关键问题之一,特别是有助于阐明实体瘤CAR-T细胞治疗中产生应答和无应答的原因。

近年来,磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)因其高空间分辨率、多方位成像等优点成为理想的细胞活体示踪手段,而超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles,SPIONs)则是一种理想的细胞示踪标记物。如KIRU等[8]采用ferumoxytol(一种用于治疗慢性肾病患者缺铁性贫血的SPIONs)对靶向免疫检查点B7-H3的CAR-T细胞进行标记,利用多模态磁共振成像在小鼠体内实现了非侵袭性地监测CAR-T细胞的生物分布,为临床监测CAR-T细胞提供了新的方法。但是,由于细胞膜和SPIONs均为负电荷,直接使用ferumoxytol标记效果往往不稳定,所以常采用多聚赖氨酸、鱼精蛋白等转染剂增强标记效果[9-11]。本研究采用ferumoxytol与一定量的肝素钠和鱼精蛋白形成复合物FHP(ferumoxytol/heparin/protamine),探讨FHP对CEA CAR-T细胞标记的可行性,并进行MRI体外成像研究,以期为临床监测CEA CAR-T细胞的治疗效果提供可行方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 CEA CAR-T细胞和DLD-1、HT-29、MCF7、A549肿瘤细胞均由重庆精准生物技术有限公司无偿提供,CEA CAR-T细胞制备方法和验证结果详见文献[7, 12]。

1.1.2 主要试剂和仪器 CCK-8试剂盒、EdU-488细胞增殖检测试剂盒、Annexin V-FITC试剂盒、PBS缓冲液均购自上海碧云天生物技术股份有限公司,多聚甲醛购自天津市光复精细化工研究所,普鲁士蓝染色试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司,ferumoxytol购自美国Lek Pharmaceuticals d.d公司,硫酸鱼精蛋白注

射液购自悦博药业集团有限公司,肝素钠注射液购自成都市海通药业有限公司,Milli-Q 超纯水机购自法国 Millipore S. A. S 公司,Infinite200 PRO 酶标仪购自奥地利 TECAN 公司,FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司,IX53 显微镜购自日本 Olympus 公司,NeXION2000 ICP-MS 购自美国 PerkinElmer 公司,M7 1.0T 小动物磁共振成像仪购自以色列 Aspect 公司。

1.2 方法

1.2.1 Ferumoxytol 标记 CEA CAR-T 细胞 将 ferumoxytol、肝素钠和硫酸鱼精蛋白按一定浓度比例(25∶1∶30)混合,在无血清培养基中形成 ferumoxytol/肝素钠/硫酸鱼精蛋白复合物(FHP)。其中,高剂量组 ferumoxytol 为 100 μg/mL,肝素钠为 4 IU/mL,硫酸鱼精蛋白为 120 μg/mL;中剂量组 ferumoxytol 为 50 μg/mL,肝素钠为 2 IU/mL,硫酸鱼精蛋白为 60 μg/mL;低剂量组 ferumoxytol 为 25 μg/mL,肝素钠为 1 IU/mL,硫酸鱼精蛋白为 30 μg/mL。然后,将 FHP 与 CEA CAR-T 细胞于 5% CO_2、37 ℃共同孵育 24 h 进行细胞标记。

1.2.2 CCK-8 检测 CEA CAR-T 细胞活力 将 1×10^5 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 96 孔板内(100 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入高、中、低剂量的 FHP,对照组不加 FHP,于 5% CO_2、37 ℃孵育 24 h 后去上清,每孔加入 100 μL 新鲜完全培养基和 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 4 h 后使用酶标仪于 450 nm 波长处测定光密度值,计算细胞存活率。

1.2.3 EdU 检测 CEA CAR-T 细胞增殖 EdU(5-ethynyl-2′-deoxyuridine)是一种胸苷类似物,可以在 DNA 合成过程中替代胸苷掺入到新合成的 DNA 中。EdU 上的乙炔基能与荧光标记的小分子叠氮化物探针点击反应,使增殖细胞的 DNA 被相应的荧光探针所标记。Hoechst 荧光染料可以与活细胞的细胞核相结合,通过 EdU 和 Hoechst 双染可以辨别活细胞中有多少增殖细胞。将 1×10^5 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 96 孔板内(100 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入高、中、低剂量的 FHP,对照组不加 FHP,于 5% CO_2、37 ℃继续孵育 24 h。按照 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒操作说明,细胞离心后吸弃 50 μL 上清,加入 100 μmol/L EdU 溶液 50 μL,继续孵育 2 h。去上清,加入固定液 50 μL/孔,室温固定 15 min。吸弃固定液,洗涤。加入通透液 50 μL/孔,室温孵育 13 min。吸弃通透液,洗涤。加入点击反应液 50 μL/孔,室温避光孵育 30 min。吸弃点击反应液,洗涤。加入 1×Hoechst 33342 溶液 50 μL/孔,室温避光孵育 10 min。吸弃 1×Hoechst 33342,洗涤,然后加入 PBS 50 μL/孔。采用荧光显微镜对活细胞和正在增殖的细胞进行观察,采集图像并运用 Image J 软件进行定量计数。

1.2.4 CEA CAR-T 细胞凋亡检测 将 1×10^5 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 6 孔板内(1 000 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入高、中、低剂量的 FHP,对照组不加 FHP,于 5% CO_2、37 ℃继续孵育 24 h。按照 Annexin V-FITC 试剂盒操作说明,去上清,加入 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞,清洗后转移至离心管,离心。加 500 μL 结合缓冲液重悬细胞。每组分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶染色液,混匀,避光孵育 10 min。采用流式细胞仪进行检测,FlowJo 软件对检测结果进行分析。

1.2.5 普鲁士蓝染色(DAB 增强法)检测 CEA CAR-T 细胞内的 Fe 信号 普鲁士蓝染色(DAB 增强法)是在普鲁士蓝染色法的基础上,通过加入 DAB 增强液,使 DAB 与沉淀态的 Fe^{3+} 发生氧化还原反应形成棕色化合物,增强检测的特异性,可显示出微量铁元素。取含盖玻片的 6 孔板,将 1×10^5 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 6 孔板(1 000 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入高、中、低剂量的 FHP,对照组不加 FHP,于 5% CO_2、37 ℃继续孵育 24 h。按照普鲁士蓝染色试剂盒操作说明,去上清,加入 4% 多聚甲醛室温固定 20 min。按 1∶1配置 Perls 染色工作液,滴加至盖玻片上,然后 37 ℃孵育 20 min。用蒸馏水冲洗盖玻片,按 1∶9配置孵育工作液,滴加至盖玻片上,37 ℃孵育 20 min。用 PBS 清洗,然后按照 19∶1配置增强工作液,滴加至盖玻片上,37 ℃孵育 20 min。再次用 PBS 清洗,每次 5 s,然后滴加复染液停留 3~5 min,再用蒸馏水清洗 10 min。先经梯度乙醇脱水后用二甲苯透明,油镜下观察并记录。

1.2.6 电感耦合等离子体-质谱法(inductively coupled plasma-mass spectrometry,ICP-MS)检测 CEA CAR-T 细胞内的 Fe 含量 将 1×10^5 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 6 孔板中(1 000 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入中剂量的 FHP,于 5% CO_2、37 ℃继续孵育 24 h。细胞离心后去除上清,使用 PBS 重悬细胞,转入消解管,加入 5 mL 硝酸进行消解。消解结束后进行赶酸处理(110 ℃,2 h),待赶酸结束并降至室温后转入容量瓶定容至 10 mL,采用 ICP-MS 进行检测。

1.2.7 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞体外肿瘤细胞杀伤作用 根据参考文献[7,13-14],将 FHP(中剂量)标记与未标记的 CEA CAR-T 细胞以及未转染的 T 细胞(untransduced T cells,UTD)与特异性靶标 CEA 高表达肿瘤细胞 DLD-1、CEA 中表达肿瘤细胞 HT-29、CEA 低表达肿瘤细胞 MCF7 以及无 CEA 表达的 A549

细胞进行共孵育,分别收集处于对数生长期的上述肿瘤细胞,以 2×10^5 个/孔接种至 24 孔板中。分别收集 UTD 细胞和 CEA CAR-T 细胞,以效靶比(E∶T)12∶1向对应肿瘤细胞孔中加入相应量的 UTD 细胞和 CEA CAR-T 细胞,补加每孔培养基至 2 mL,于 5%CO_2、37 ℃孵育 6 h。共孵育完成后,将 UTD 细胞和 CEA CAR-T 细胞弃去,收集各孔肿瘤细胞,PBS 清洗后加入 500 μL PBS 重悬细胞,并向相应管中加入 7-AAD 染料,流式细胞仪检测。

1.2.8　磁共振成像　　将 1×10^6 个/mL 的 CEA CAR-T 细胞接种至 6 孔板中(1 000 μL/孔)。实验组各孔($n=3$)加入 FHP,其中 ferumoxytol 的浓度为 2.5、5.0、10.0 和 20.0 μg/mL,于 5%CO_2、37 ℃继续孵育 24 h。去上清,用 200 μL PBS 重悬细胞后转入离心管,迅速加入预热后的 1%琼脂糖,混合均匀,待含有细胞的琼脂糖冷却凝固后进行 MRI 扫描。采用小鼠线圈,行冠面 T2WI 序列扫描,扫描参数设置为:T2WI 快速自旋回波(FSE)序列,层厚 3.0 mm,TR 3 500.0 ms,TE 68.0 ms。检测不同氧化铁浓度图像的 MR 灰度值($n=3$)。

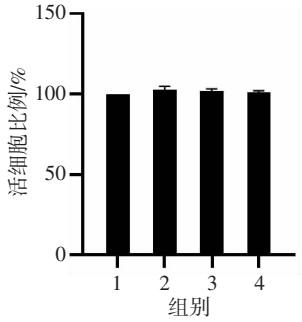
1.3　统计学分析

采用 SPSS 29.0 和 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计学分析和作图。普鲁士蓝染色、MRI 扫描结果以及 EdU 结果采用 Image J 软件进行计数;流式细胞仪测定细胞凋亡结果采用 FlowJo 软件进行分析;数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　FHP 对 CEA CAR-T 细胞活力的影响

CEA CAR-T 细胞与低、中、高剂量的 FHP(ferumoxytol 浓度分别为 25、50、100 μg/mL)共孵育 24 h 后,与对照组相比,CEA CAR-T 细胞暴露于不同浓度 FHP 的细胞活力差异均无统计学意义(图 1),细胞活力未受到影响,表明 FHP 对 CEA CAR-T 细胞具有良好的生物相容性。

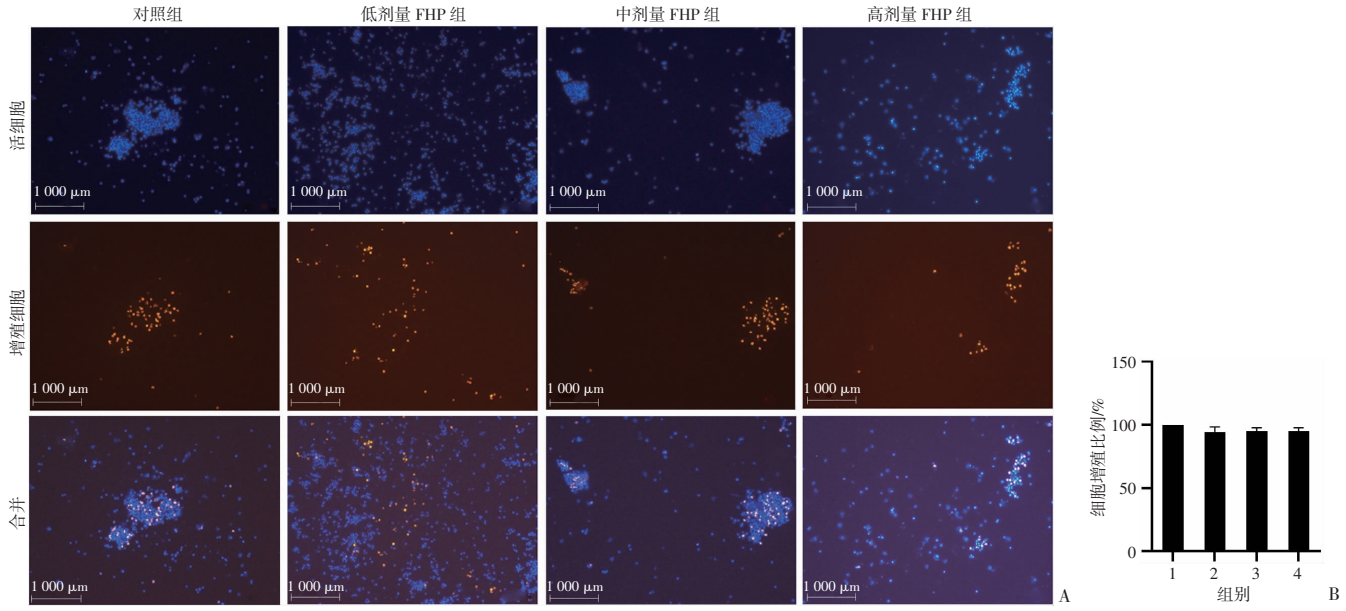


1:对照组;2:低剂量 FHP 组;3:中剂量 FHP 组;4:高剂量 FHP 组

图 1　CCK-8 检测 FHP 在体外对 CEA CAR-T 细胞活力的影响

2.2　FHP 对 CEA CAR-T 细胞增殖的影响

将 CEA CAR-T 细胞与低、中、高剂量的 FHP(ferumoxytol 浓度分别为 25、50、100 μg/mL)共孵育结果显示,不同浓度的 FHP 对 CEA CAR-T 细胞的 DNA 复制与细胞增殖没有影响(图 2),各组细胞 DNA 复制活性均在 94.3%以上。



A:CEA CAR-T 细胞与不同剂量 FHP 共孵育的检测结果;B:细胞增殖定量检测结果　1:对照组;2:低剂量 FHP 组;3:中剂量 FHP 组;4:高剂量 FHP 组

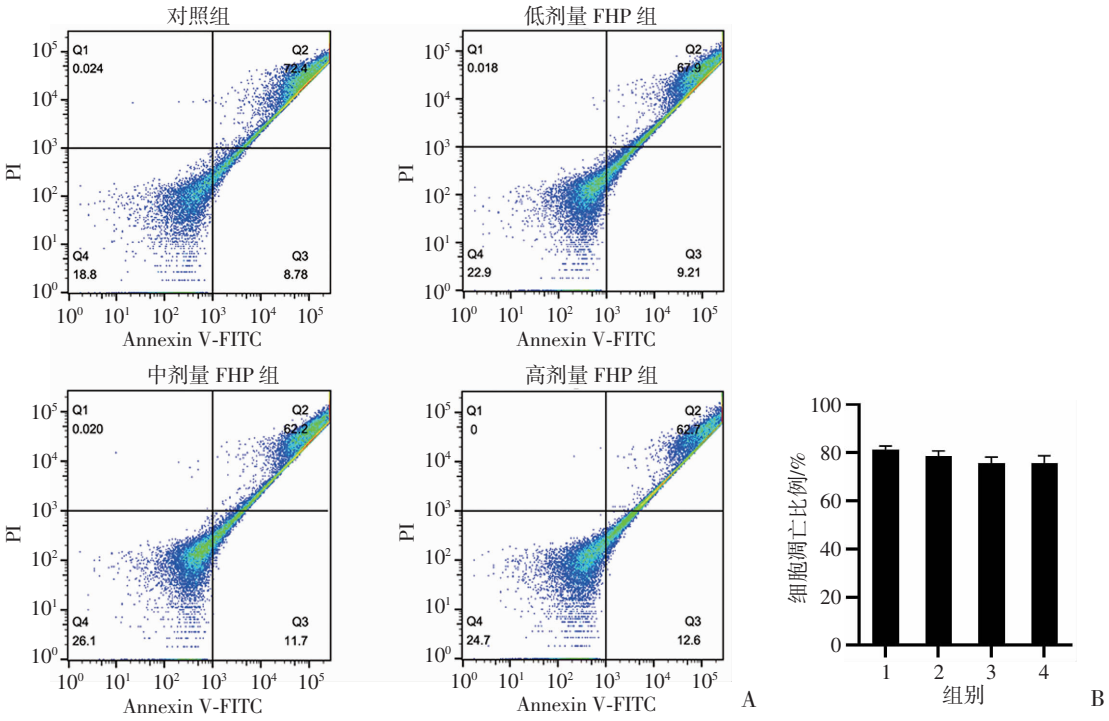
图 2　EdU 染色检测 FHP 在体外对 CEA CAR-T 细胞增殖的影响

2.3　FHP 对 CEA CAR-T 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,CEA CAR-T 细胞与低、中、高剂量的 FHP(ferumoxytol 浓度分别为 25、50、100 μg/mL)共孵育 24 h 后,与对照组相比,凋亡细胞无明显增多(图 3),表明 FHP 没有造成 CEA CAR-T 细胞的凋亡。

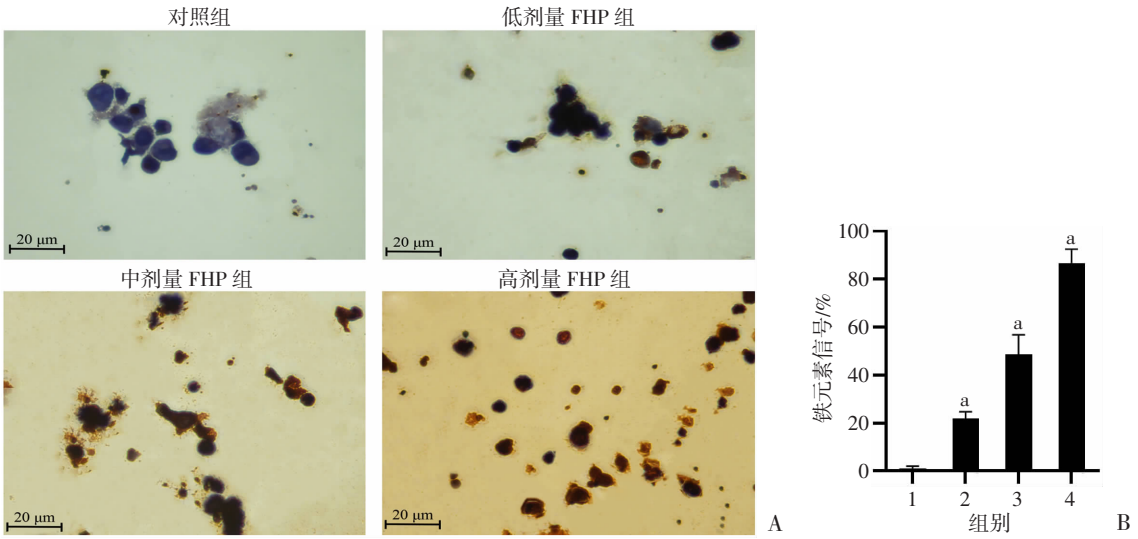
2.4　CEA CAR-T 细胞对 FHP 的摄入效果

从图 4 可以看出,对照组细胞未标记 FHP,因此未出现棕色化合物信号。而 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞均呈现出棕色化合物信号,并且该棕色化合物信号随 FHP 剂量的增加而增强(图 4),提示 FHP 进入 CEA CAR-T 细胞内。



A:CEA CAR-T 细胞与不同剂量 FHP 共孵育的检测结果;B:细胞凋亡定量检测结果　1:对照组;2:低剂量 FHP 组;3:中剂量 FHP 组;4:高剂量 FHP 组

图 3　流式细胞仪检测 FHP 在体外对 CEA CAR-T 细胞凋亡的影响



A:FHP 未标记(对照组)和标记(FHP 组)的 CEA CAR-T 细胞观测结果;B:各组细胞内 Fe 信号检测结果　1:对照组;2:低剂量 FHP 组;3:中剂量 FHP 组;4:高剂量 FHP 组;a:$P<0.01$,与对照组比较

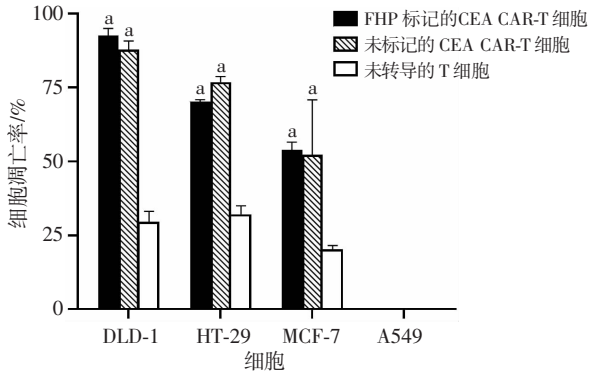
图 4　普鲁士蓝(DAB 增强)染色检测 CEA CAR-T 细胞对 FHP 的摄入及铁元素信号分析

2.5 CEA CAR-T 细胞内 Fe 含量

ICP-MS 检测结果显示,CEA CAR-T 细胞与中剂量的 FHP 共孵育后,胞内 Fe 含量为(440.23±189.36)ng/mL。

2.6 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效果

FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞对于有特异性靶标 CEA 高表达肿瘤细胞(DLD-1)、CEA 中表达肿瘤细胞(HT-29)和 CEA 低表达肿瘤细胞(MCF7)具有明显的细胞杀伤效果($P<0.01$),而对于没有 CEA 表达的 A549 细胞并无细胞杀伤效果(图 5),表明 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞具有肿瘤细胞杀伤功能。

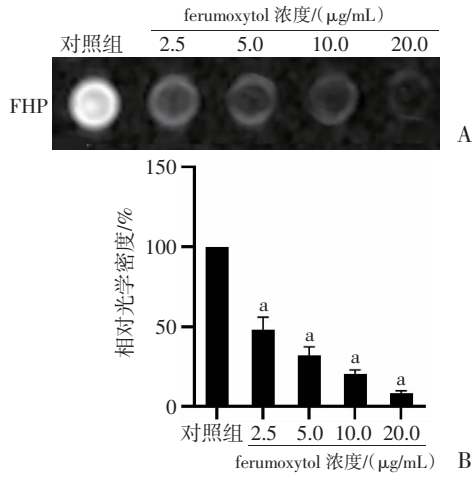


a:$P<0.01$,与未转导的 T 细胞比较

图 5 流式细胞术检测 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞在体外对肿瘤细胞的杀伤作用

2.7 FHT 标记的 CEA CAR-T 细胞成像效果

不同浓度 FHP(ferumoxytol 浓度分别为 2.5、5.0、10.0 和 20.0 μg/mL)标记的 CEA CAR-T 细胞 MRI 扫描结果显示,T2WI 序列均见信号降低(图 6A),且随着 FHP 浓度的增加,图像灰度值逐渐降低,呈低信号表达(图 6B)。



A:梯度浓度 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞 MRI 扫描图像;B:MRI 扫描图像灰度图 a:$P<0.01$,与对照组比较

图 6 不同浓度 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞 MRI 扫描结果

3 讨论

随着生物技术的不断发展,自然杀伤细胞(NK)、树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞(DC-CIK)、T 细胞受体嵌合型 T 细胞(TCR-T)和 CAR-T 细胞等免疫细胞治疗手段相继出现。其中,CAR-T 细胞疗法是该领域热门的疗法之一。目前 CAR-T 细胞疗法在临床上取得的成功主要来自血液肿瘤,但是在癌症领域中实体瘤占 90%,成为 CAR-T 细胞治疗的一大挑战。不过近年来,CAR-T 细胞治疗在实体瘤领域取得一系列进展,比如用于治疗胃腺癌和食管胃结合部腺癌的 CLDN18.2 CAR-T 细胞已在中国和美国分别获批进入临床试验。CEA CAR-T 细胞的临床试验显示其在结直肠癌转移患者中也取得初步疗效。然而,在验证和评估 CAR-T 细胞对实体瘤的疗效中,与传统疗法相比,其肿瘤体积生长抑制反应较慢,通常需要数月才能观察到明显的肿瘤体积缩小。因此,传统的实体瘤疗效评价标准(response evaluation criteria in solid tumors,RECIST)并不适用,如何快速评价实体肿瘤患者对 CAR-T 细胞治疗的响应也是目前面临的一大挑战。应对这一挑战的关键之一便是确证 CAR-T 细胞在患者体内的生物分布信息,这不仅有助于阐明实体瘤 CAR-T 细胞治疗中产生应答和无应答的因素,也有利于优化治疗方案。

本研究基于超顺磁性氧化铁纳米颗粒(SPIONs),以 CEA CAR-T 细胞为研究对象,验证了磁标记 CAR-T 细胞并进行 MRI 成像示踪的可行性。Ferumoxytol 是一种用于治疗贫血患者的静脉注射型纳米氧化铁颗粒,具有良好的生物相容性和安全性,2009 年获得美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)的上市批准。由于 ferumoxytol 优良的磁性能、催化活性以及免疫活性,目前不仅在贫血、癌症、感染性疾病、再生医学以及磁刺激神经调节等新的领域获得认可与研究,也在各种生物医学诊断(如细胞标记)中获得了广泛应用[15-20]。但是,由于电荷相斥等多种原因,直接使用 ferumoxytol 标记细胞的效果并不十分理想。NEJADNIK 等[21]基于 ferumoxytol 开发了一种干细胞标记方法,将 ferumoxytol 与含蛋白的培养基共孵育,培养基中的蛋白在 ferumoxytol 纳米颗粒周围形成蛋白冠,以增加纳米颗粒的流体动力学直径,并通过吞噬作用促进干细胞对 ferumoxytol 的摄取,从而增强 MRI 信号。尽管基于细胞对 SPIONs 内吞进行标记是当前的主流方法,但是 SPIONs 在胞内的积累对细胞是否产生影响需要全面评估和避免。为此,YAN

等[22]开发了一种新的不经内吞,而是将 SPIONs 包裹于细胞外基质的标记方法,即通过在间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)制备过程中添加 ferumoxytol,使其包裹于 MSCs 细胞球的细胞外基质,减少了 ferumoxytol 进入细胞,同时也不需要使用转染试剂。在该研究中,ferumoxytol 标记的 MSCs 细胞球在体内外均表现出良好的生物安全性和 T2-MRI 效果,表明此类技术在 MSCs 移植后 MRI 示踪中具有应用潜力。

为迅速开发可适用于临床的 CAR-T 细胞体内外示踪方法,本研究采用临床获批的 ferumoxytol 与肝素钠和鱼精蛋白制成复合物 FHP 进行细胞标记,取得了良好效果。细胞活力和增殖实验显示 FHP 标记 CAR-T 细胞具有良好的生物相容性,无需担心 FHP 在 CAR-T 细胞内蓄积对细胞活力等产生不利影响。同时,对 FHP 标记的 CEA CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞作用的验证,表明 FHP 不会影响 CEA CAR-T 细胞的活性,为进一步研究 FHP 标记 CAR-T 细胞的示踪奠定了基础。T 细胞为悬浮细胞,吞噬作用没有贴壁细胞强,使用传统的普鲁士蓝伊红法染色对于细胞内 Fe 的信号并不敏感。因此,本研究采用普鲁士蓝染色(DAB 增强法)检测 CAR-T 细胞对 FHP 的摄入情况,其原理在于细胞中的 Fe^{3+} 与亚铁氰化钾形成不溶解的蓝色亚铁氰化铁沉淀,进而加入 DAB 与亚铁氰化铁沉淀发生氧化还原反应,形成棕色化合物,可显示出胞内微量铁元素。普鲁士蓝染色结果显示 CAR-T 细胞可以摄入 FHP,并且与 FHP 剂量呈正相关。ICP-MS 是以电感耦合等离子体作为离子源,以质谱进行检测的无机多元素分析技术,广泛应用于痕量、微量元素的定量检测。本研究采用 ICP-MS 进一步证明 CAR-T 细胞可以摄入 FHP,且 Fe 含量达到(440.23±189.36)ng/mL。最后,本研究采用小动物磁共振成像仪检测了不同浓度 FHP 标记的 CAR-T 细胞成像效果,为使用 FHP 标记 CAR-T 细胞并通过 MRI 进行体内示踪提供了实验依据。

本研究使用临床已经获批、安全可靠的 ferumoxytol、肝素钠和鱼精蛋白制备了 FHP 复合物,体外标记 CEA CAR-T 细胞并对标记方法进行一系列评估,确认 FHP 具有良好的生物相容性,适用于 CAR-T 细胞的示踪检测,为今后使用类似造影剂体外标记 CAR-T 细胞并使用 MR 影像进行实时体内追踪提供了新的思路。下一步计划采用重度联合免疫缺陷小鼠,通过异种移植结直肠癌肿瘤细胞构建荷瘤小鼠模型,注射 FHP 标记 CAR-T 细胞并进行 MRI 扫描,结合肿瘤组织以及肝、肾等脏器的病理染色检测,在动物体内验证 FHP 标记 CAR-T 细胞的示踪效果,为未来在临床上采用此类 SPIONs 标记 CAR-T 细胞进行体内示踪提供依据。

参考文献:

[1] TURTLE C J, RIDDELL S R, MALONEY D G. CD19-Targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies[J]. Clin Pharmacol Ther, 2016, 100(3): 252-258. DOI: 10.1002/cpt.392.

[2] KRUGER S, ILMER M, KOBOLD S, *et al*. Advances in cancer immunotherapy 2019—latest trends[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 268. DOI: 10.1186/s13046-019-1266-0.

[3] TOPALIAN S L, DRAKE C G, PARDOLL D M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy[J]. Cancer Cell, 2015, 27(4): 450-461. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.03.001.

[4] HOMBACH A A, RAPPL G, ABKEN H. Blocking CD30 on T cells by a dual specific CAR for CD30 and colon cancer antigens improves the CAR T cell response against $CD30^-$ tumors[J]. Mol Ther, 2019, 27(10): 1825-1835. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.06.007.

[5] RAMOS M, ESTEVA M, CABEZA E, *et al*. Relationship of diagnostic and therapeutic delay with survival in colorectal cancer: a review[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(17): 2467-2478. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.08.023.

[6] JIANG X T, XU J, LIU M F, *et al*. Adoptive $CD8^+$ T cell therapy against cancer: Challenges and opportunities[J]. Cancer Lett, 2019, 462: 23-32. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.07.017.

[7] ZHANG C C, WANG Z, YANG Z, *et al*. Phase Ⅰ escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA^+ metastatic colorectal cancers[J]. Mol Ther, 2017, 25(5): 1248-1258. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.010.

[8] KIRU L, ZLITNI A, TOUSLEY A M, *et al*. *In vivo* imaging of nanoparticle-labeled CAR T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(6): e2102363119. DOI: 10.1073/pnas.2102363119.

[9] JO J, AOKI I, TABATA Y. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells[J]. J Control Release, 2010, 142(3): 465-473. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.11.014.

[10] LIU G, YANG H, ZHANG X M, *et al*. MR imaging for the longevity of mesenchymal stem cells labeled with poly-L-lysine-Resovist complexes[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2010, 5(2): 53-58. DOI: 10.1002/cmmi.362.

[11] 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.

[12] YANG G H, KRAMER M G, FERNANDEZ-RUIZ V, *et al*. Development of endothelial-specific single inducible lentiviral vectors for genetic engineering of endothelial progenitor cells[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17166. DOI: 10.1038/srep17166.

[13] THU M S, BRYANT L H, COPPOLA T, *et al*. Self-assembling nano complexes by combining ferumoxytol, heparin and protamine for cell tracking by magnetic resonance imaging[J]. Nat Med, 2012, 18(3): 463-467. DOI: 10.1038/nm.2666.

[14] BRYANT L H Jr, KIM S J, HOBSON M, *et al*. Physicochemical characterization of ferumoxytol, heparin and protamine nano complexes for improved magnetic labeling of stem cells[J]. Nanomedicine, 2017, 13(2): 503-513. DOI: 10.1016/j.nano.2016.07.011.

[15] LONG M M, LI Y, HE H L, *et al*. The story of ferumoxytol: synthesis production, current clinical applications, and therapeutic potential[J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(6): e2302773. DOI: 10.1002/adhm.202302773.

[16] ADAMS L C, JAYAPAL P, RAMASAMY S K, *et al*. Ferumoxytol-enhanced MRI in children and young adults: state of the art[J]. AJR Am J Roentgenol, 2023, 220(4): 590-603. DOI: 10.2214/AJR.22.28453.

[17] HAMILTON B E, BARAJAS R, NESBIT G M, *et al*. Ferumoxytol-enhanced MRI is not inferior to gadolinium-enhanced MRI in detecting intracranial metastatic disease and metastasis size[J]. AJR Am J Roentgenol, 2020, 215(6): 1436-1442. DOI: 10.2214/AJR.19.22187.

[18] RASHIDI A, BARATTO L, THERUVATH A J, *et al*. Improved detection of bone metastases in children and young adults with ferumoxytol-enhanced MRI[J]. Radiol Imaging Cancer, 2023, 5(2): e220080. DOI: 10.1148/rycan.220080.

[19] ZHU A T, REEDER S B, JOHNSON K M, *et al*. Quantitative ferumoxytol-enhanced MRI in pregnancy: a feasibility study in the nonhuman primate[J]. Magn Reson Imaging, 2020, 65: 100-108. DOI: 10.1016/j.mri.2019.10.006.

[20] RAVI H, ARIAS-LORZA A M, COSTELLO J R, *et al*. Pretherapy ferumoxytol-enhanced MRI to predict response to liposomal irinotecan in metastatic breast cancer[J]. Radiol Imaging Cancer, 2023, 5(2): e220022. DOI: 10.1148/rycan.220022.

[21] NEJADNIK H, TSENG J, DALDRUP-LINK H. Magnetic resonance imaging of stem cell-macrophage interactions with ferumoxytol and ferumoxytol-derived nanoparticles[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2019, 11(4): e1552. DOI: 10.1002/wnan.1552.

[22] YAN S, HU K, ZHANG M, *et al*. Extracellular magnetic labeling of biomimetic hydrogel-induced human mesenchymal stem cell spheroids with ferumoxytol for MRI tracking[J]. Bioact Mater, 2023, 19: 418-428. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.024.

(收稿:2024-04-12;修回:2024-06-28)

(编辑 汪勤俭)