DOI:10.16016/j.2097-0927.202312100

基于颗粒酶 B 启动子的磁共振报告基因成像监测 CAR-T 细胞激活状态

倪晓英[1,2],秦 勇[1],贺小娅[1],黄 杰[1,2],张湘敏[1,2],祝慧如[1,2],胡 倩[1,2],蔡金华[1] 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室:放射科[1],儿童神经发育与认知障碍重庆市重点实验室[2]

[摘要] **目的** 利用颗粒酶 B(granzyme B,GB)启动子控制铁蛋白(ferritin heavy chain,FTH1)报告基因表达,探讨通过磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)监测嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T 细胞)激活状态的可行性。**方法** 通过 Ficoll 密度梯度离心法以及流式分选得到细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)。将 GB 启动子和 FTH1 基因连接,连同二唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside 2,GD2)嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)以慢病毒为载体转入 CTLs, 构建 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 细胞,以 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1、GD2-CAR-T 和 T 细胞为对照。CytoTox96@ 非放射性细胞毒性检测各组细胞与人神经母细胞瘤细胞(SK-N-SH)共培养后的杀伤效果,ELISA 检测共孵育因子以及 GB 分泌量,Western blot、普鲁士蓝染色、细胞 MRI 检测共培养后 FTH1 基因的表达。**结果** 成功获得 CTLs 并构建 GD2-CAR-T/pGB-FTH1、GD2-CAR-T/pCMV-FTH1、GD2-CAR-T 细胞,3 组细胞对肿瘤细胞杀伤效果、共孵育因子以及 GB 分泌量均显著高于 T 细胞组,GB 表达水平在与 SK-N-SH 细胞共培养后 1 d 最高,3 d 和 7 d 依次降低。GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组 FTH1 相对表达量以及铁含量变化趋势与 GB 表达一致,MRI 信号呈逐渐升高趋势。GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组 FTH1 相对表达量、铁含量及 MRI 信号在各时间点均无显著差异。GD2-CAR-T 和 T 细胞组无明显 FTH1 表达及聚铁效应。**结论** 基于 GB 启动子的 MRI 报告基因成像可实时反映 CAR-T 细胞的 GB 表达水平和肿瘤杀伤作用,为 CAR-T 治疗提供了一种监测细胞激活状态的可视化手段。

[关键词] 颗粒酶 B; 铁蛋白;报告基因; 磁共振成像;嵌合抗原受体 T 细胞; 二唾液酸神经节苷脂
[中图法分类号] R392.12; R445.2; R73-362 [文献标志码] A

Magnetic resonance imaging based on a granzyme B promoter-driven reporter gene expression monitors CAR-T cell activation

NI Xiaoying[1,2], QIN Yong[1], HE Xiaoya[1], HUANG Jie[1,2], ZHANG Xiangmin[1,2], ZHU Huiru[1,2], HU Qian[1,2], CAI Jinhua[1] [1]Department of Radiology, [2]Chongqing Key Laboratory of Child Neurodevelopment and Cognitive Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the feasibility of granzyme B (GB) promoter-controlled ferritin heavy chain (FTH1) reporter gene expression for monitoring the activation status of chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) by magnetic resonance imaging (MRI). **Methods** Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were screened by Ficoll density gradient centrifugation and flow sorting. The GB promoter and FTH1 gene were ligated together with disialoganglioside 2 (GD2) CAR, and lentiviral vectors were transfected into CTLs to construct GD2-CAR-T/pGB-FTH1 cells. GD2-CAR-T/pCMV-FTH1, GD2-CAR-T, and T cells served as

[基金项目] 中国博士后科学基金第 74 批面上资助(2023M740456);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0235)
[通信作者] 蔡金华,E-mail: cai_jinhua@126.com

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/)

control cells. CytoTox96@ non-radioactive cytotoxicity was used to detect the killing effect of each group of cells after co-culture with human neuroblastoma cells (SK-N-SH). ELISA was employed to detect the coincubation factor as well as the amount of GB secretion. Western blotting, Prussian blue staining and cellular MRI were applied to detect the expression of the FTH1 gene after co-culture. **Results** CTLs were successfully obtained, and then GD2-CAR-T/pGB-FTH1, GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 and GD2-CAR-T cells were constructed. The killing effect, co-incubation factor and GB secretion of the above 3 groups of cells were significantly higher than those of the T cells, and the level of GB expression was highest at day 1, and then decreased in order at day 3 and day 7 after co-culturing with SK-N-SH cells. The relative expression of FTH1 and iron content of the GD2-CAR-T/pGB-FTH1 cells showed the same trend as GB expression, and the MRI signals were gradually increased. There were no significant differences in the relative expression of FTH1, iron content and MRI signals in the GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 cells at all time points. No FTH1 expression or iron aggregation was observed in the GD2-CAR-T and T cells groups. **Conclusion** MRI based on the FTH1 reporter gene driven by the granzyme B promoter can reflect the GB expression level and tumor killing effect of CAR-T cells, which provides a potential real-time visual means to monitor the cell activation status for CAR-T therapy.

[**Key words**] granzyme B; ferritin; reporter gene; magnetic resonance imaging; chimeric antigen receptor T cells; disialoganglioside

Supported by the 74th Batch General Project of China Postdoctoral Science Foundation (2023M740456) and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0235). Corresponding author: CAI Jinhua, E-mail: cai_jinhua@126.com

嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cells,CAR-T细胞)疗法作为一种新的治疗模式,在B细胞恶性血液系统肿瘤的治疗中表现出令人惊喜的临床效果[1]。然而,在治疗实体瘤方面,目前CAR-T细胞的疗效并不理想,可能是肿瘤微环境复杂及肿瘤细胞异质性等因素导致CAR-T细胞不能持续激活[2-3]。利用影像学手段对CAR-T细胞的激活状态进行动态监测,将有助于无创、实时评估CAR-T细胞的疗效并及时调整治疗方案,同时也将促进CAR-T治疗实体瘤的研究。

颗粒酶B(granzyme B,GB)是T淋巴细胞颗粒中的一种丝氨酸蛋白酶。当CAR-T细胞结合肿瘤特异性抗原后,会释放大量GB和其它细胞因子以杀伤肿瘤细胞,因此,GB被视为免疫激活的标志物[4-5]。以GB启动子驱动磁共振(magnetic resonance, MR)报告基因表达,有望实现利用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)监测GB表达,从而间接反映CAR-T细胞的激活状态。

本研究针对神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB),以肿瘤特异性抗原二唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside 2,GD2)为靶标,设计GD2-CAR-T细胞,并引入GB启动子驱动的MR报告基因铁蛋白(pGB-FTH1),构建诊疗一体化的CAR-T细胞,在CAR-T细胞治疗人神经母细胞瘤细胞过程中,利用铁蛋白(ferritin heavy chain,FTH1)表达产生MRI信号变化来反映CAR-T细胞的激活状态,为CAR-T细胞治疗的实时监测提供一种可视化手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 T淋巴细胞由重庆医科大学附属儿童医院健康成人志愿者捐献,经过重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准(许可证号:CHCMU-IACUC20240111010)。人神经母细胞瘤(SK-N-SH)细胞系由儿童神经发育与认知障碍重庆市重点实验室保存。

1.1.2 质粒及慢病毒 颗粒酶B启动子、FTH1报告基因、嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)慢病毒载体包装系统均由上海吉凯基因构建。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、MEM培养基购自Gibco公司;外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋公司;枸橼酸铁铵溶液(ferric ammonium citrate, FAC)购自Sigma公司;T淋巴细胞激活试剂(T Cell TransAct, Human)、T淋巴细胞培养基(TexMACS GMP Medium)均购自美天旎公司;白介素2(IL-2, Human)购自peprotech公司;流式细胞术检测所需PE-CD3、APC-CD4、FITC-CD8a、BV421-CD25、PE/Cy7-CD69、APC Isotype、FITC Isotype、BV421 Isotype和PE/Cy7 Isotype均购自Biolegend公司;细胞增殖示踪荧光探针

(CFDA SE)购自大连美仑生物技术有限公司;Ferritin Heavy Chain Rabbit pAb、GAPDH Mouse mAb (HRP)、Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)均购自正能生物技术有限公司;CytoTox96@ 非放射性细胞毒性检测试剂盒购自 Promega 公司;Human GZMB (Granzyme B) ELISA Kit 购自武汉菲恩生物科技有限公司;人 IL-2、IFN-γ ELISA 试剂盒购自欣博盛公司。

1.2 *方法*

1.2.1 慢病毒载体构建及鉴定 采用限制性内切酶消化获得线性化载体,并行 PCR 扩增制备目的基因片段,以同源重组方式将目的基因的 PCR 产物分别连接入线性化慢病毒载体中的多克隆位点中,获得 pLV/GD2-CAR-pGB-FTH1-EGFP-puro、pLV/GD2-CAR-pCMV-FTH1-EGFP-puro 和 pLV/GD2-CAR-EGFP-puro 3 种重组慢病毒载体质粒,并经测序鉴定。

1.2.2 慢病毒包装及生产 将正确克隆菌液扩大培养、抽提,获得高纯度质粒,用于下游病毒包装,后续进行慢病毒收获、浓缩、纯化及质量检测。

1.2.3 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)分离、鉴定及培养和 SK-N-SH 细胞培养 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞,加入 PE-CD3 孵育 30 min 鉴定并分选淋巴细胞,加入 APC-CD4 和 FITC-CD8a 孵育 30 min 鉴定并分选出 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 CTLs。CTLs 选用 TexMACS GMP Medium 完全培养基,SK-N-SH 细胞用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养,两种细胞培养条件均为 37 ℃,5%CO_2。

1.2.4 CTLs 的激活及检测 CTLs 中加入 CD3/CD28 激活磁珠,激活 24 h。在激活后第 1、3、7 天的 CTLs 加入 PE-CD3、APC-CD4、FITC-CD8a、BV421-CD25、PE/Cy7-CD69、APC Isotype、FITC Isotype、BV421 Isotype、PE/Cy7 Isotype 孵育 30 min 后行流式检测。培养 7 d 后行细胞增殖检测,用细胞增殖示踪荧光探针(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)实验进行淋巴细胞的增殖检测。所有流式分析以及分选数据使用 FlowJo 软件进行分析。

1.2.5 CTLs 的慢病毒感染以及感染效率检测 将激活 24 h 的 CTLs 离心收集后,以 MOI=10 计算所需慢病毒量,将细胞及慢病毒加入 24 孔板,根据说明书加入 HitransG P 助染剂,用平角转子离心机离心 1 000×*g*,1 h,随后放入培养箱继续培养。12~16 h 后离心收集细胞去掉上清液后,更换为完全培养基,隔天加入 IL-2(终浓度 300 U/mL),感染 48 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况,流式检测各组细胞的绿色荧光表达阳性率。

1.2.6 细胞毒性检测 将 3 组感染慢病毒的 CAR-T 细胞及 T 细胞分别与靶细胞 SK-N-SH 以效靶比 5∶1、1∶1、1∶5共培养 24 h,然后用非放射性细胞毒性检测试剂盒检测细胞裂解后释放的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),每组均设置 3 个复孔。细胞毒性计算公式:细胞毒性=(实验组自发释放-阴性对照组自发释放)/阳性对照组自发释放×100%。在共培养的第 24、48、72、96 h 观察各组细胞状态。

1.2.7 共孵育因子和 GB 检测 首先于 24 孔板中接种 2.5×10^5/mL 靶细胞,细胞贴壁后分别加入等量的 4 组 T 细胞,常规共培养 24 h 后收集上清,然后使用 ELISA 试剂盒检测各组 IFN-γ 和 IL-2 的浓度。分别于 SK-N-SH 细胞共培养前和共培养后的第 1、3、7 天收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测 GB 含量。

1.2.8 蛋白质印记实验检测 FTH1 表达 收集 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 和 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 各时间点细胞,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,GAPDH 一抗(1∶1 000)和 FTH1 一抗(1∶1 000)孵育并 4 ℃过夜,二抗孵育 1~2 h,最后利用 ECL 发光试剂显影。

1.2.9 普鲁士蓝染色及铁含量测定 细胞完全培养基中均加入终浓度为 0.2 mmol/L 的枸橼酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC)溶液。与 SK-N-SH 细胞共培养 24 h 后收集各组细胞,PBS 洗涤 3 次后重悬,使用普鲁士蓝(核固定法)染色试剂盒对细胞进行染色,显微镜观察各组细胞染色情况;收集与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天的各组细胞,按照铁含量测定试剂盒说明书进行铁含量测定,酶标仪检测 593 nm 处各孔光密度值。

1.2.10 细胞 MRI 收集与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天的 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 和 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 细胞,PBS 洗涤 3 次,再用 0.5 mL PBS 重悬约 1×10^7 个细胞于 EP 管中,采用 3.0 T 临床 MR 成像仪(Philips)行 T2WI 以及 T2 mapping 扫描,获得 T2WI 和 T2 mapping 图。T2WI 扫描参数如下:TR=2 424 ms,TE=100 ms,FOV=100 mm×100 mm,体素=0.620 mm×0.600 mm,成像矩阵=160×150,信噪比=1,扫描时间为 1 min 56 s;T2 mapping 扫描参数如下:TR=2 000 ms,TE_1=13 ms,△TE=13 ms,TE_8=104 ms,FOV=150 mm×93 mm,体素=0.420 mm×0.514 mm,成像矩阵=356×181,信噪比=1,扫描时间

为 6 min 48 s。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件对获得的数据进行处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同处理组采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　重组慢病毒鉴定

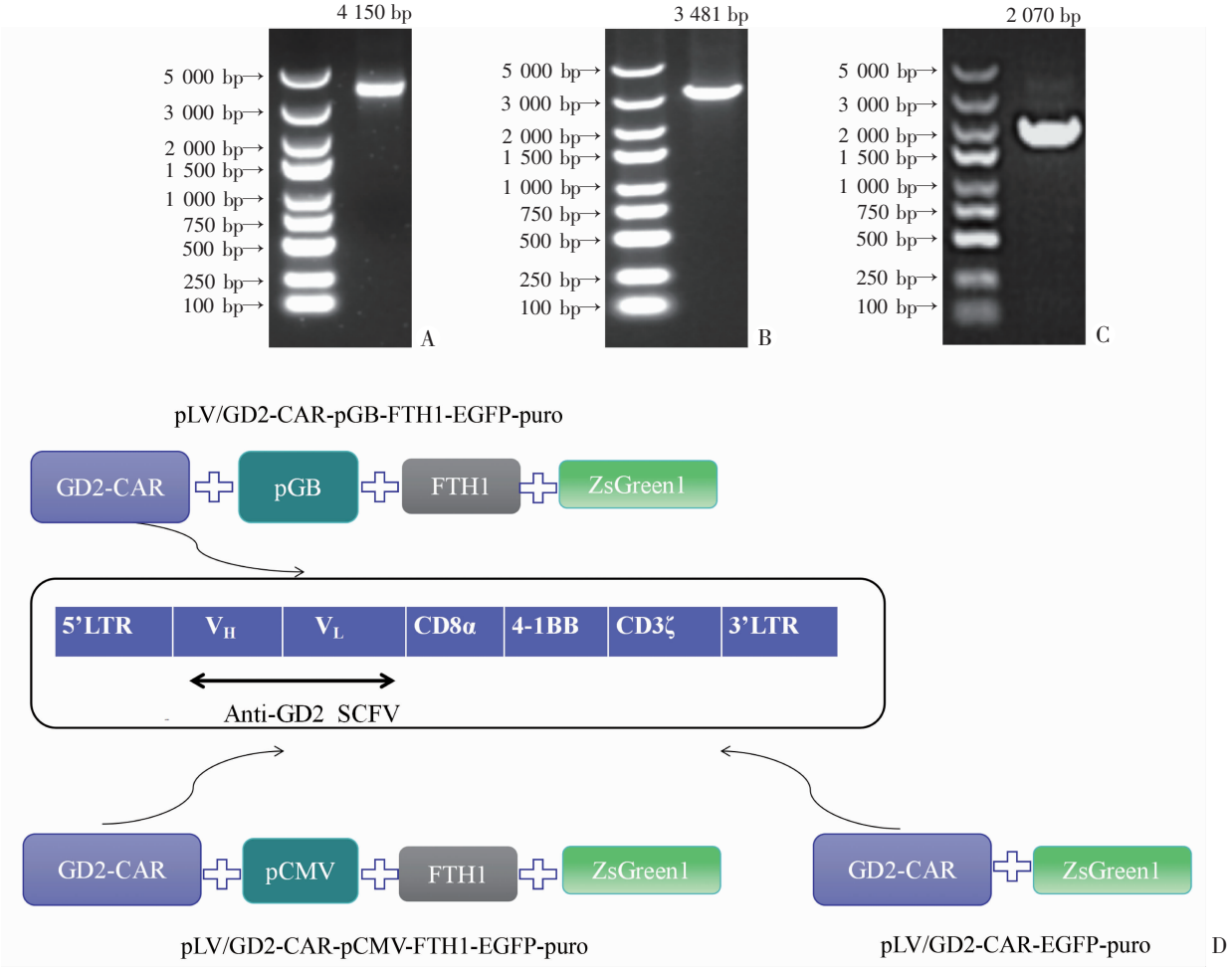
成功构建 pLV/GD2-CAR-pGB-FTH1-EGFP-puro、pLV/GD2-CAR-pCMV-FTH1-EGFP-puro 和 pLV/GD2-CAR-EGFP-puro 3 种重组慢病毒载体质粒。PCR 转化子的长度分别为 4 150、3 481、2 070 bp（图 1A～C）。CAR 区域具体设计见图 1D。

2.2　CTLs 及其激活、增殖鉴定

2.2.1　CTLs 分选鉴定　　人外周血淋巴细胞为圆形悬浮细胞。流式细胞术检测 T 淋巴细胞表面标志物 CD3,根据细胞的前向角散射光(细胞相对大小及其表面积),侧向角散射光(细胞颗粒度及细胞核相对复杂性)选出淋巴细胞区域为 88.4%(图 2A)。通过流式分选仪选择 $CD3^+$细胞群(图 2B),通过设逻辑门分析 $CD3^+$细胞群中 $CD4^+$、$CD8^+$细胞群并得到其占比(图 2D),$CD4^-CD8^-$(图 2C)为阴性对照。

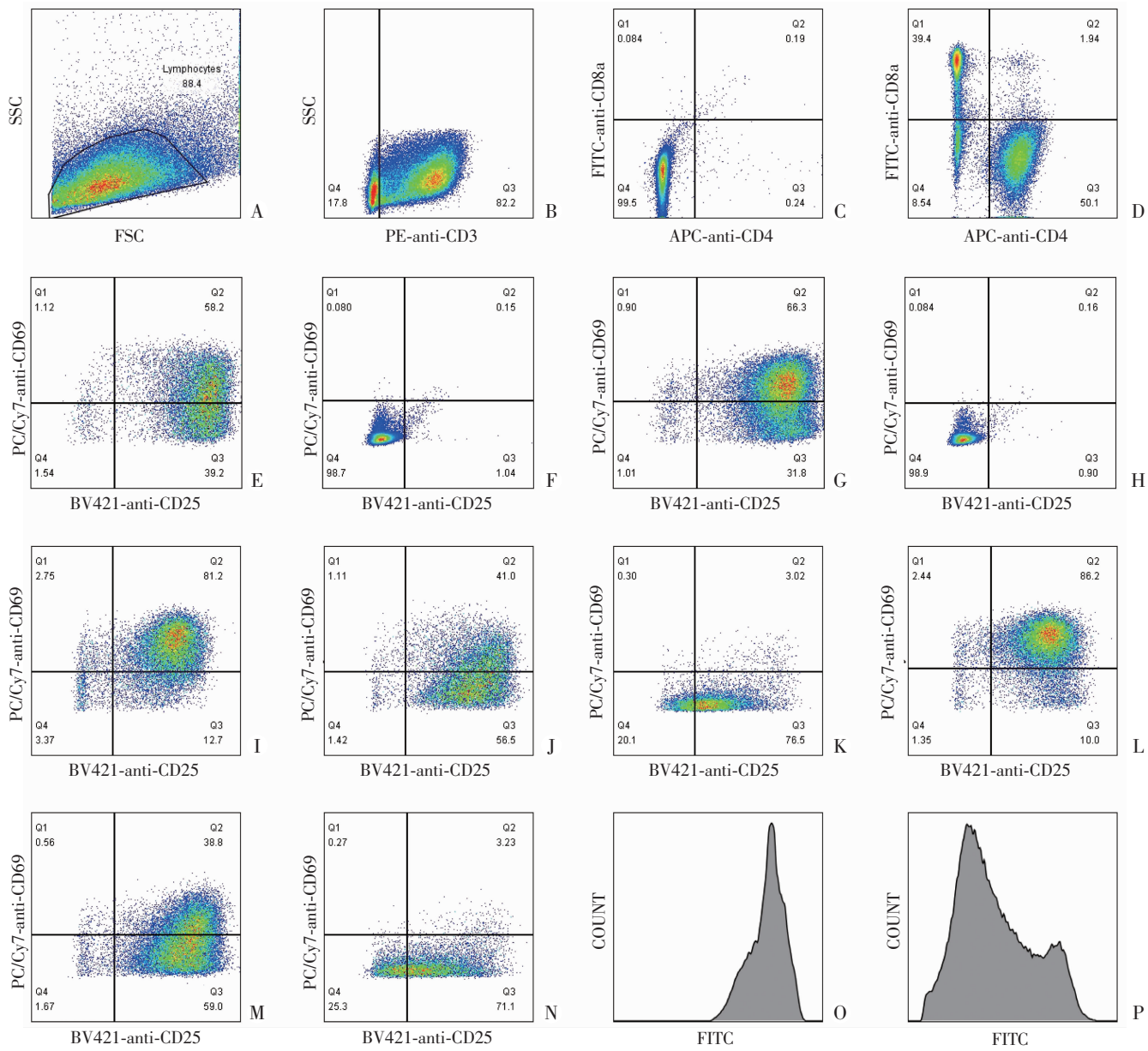
2.2.2　CTLs 激活流式检测　　淋巴细胞只有在 CD3/CD28 磁珠激活后才能刺激其增殖,维持其生存,进行感染等后续实验操作。提取后的细胞行流式分析,得到结果后行 FlowJo 软件分析,显示细胞毒性 T 淋巴细胞中 CD25、CD69 呈阳性,证明细胞激活(图 2E～H)。对细胞激活后 $CD4^+$、$CD8^+$细胞群中 $CD25^+CD69^+$细胞进行激活状态分析,发现随着激活时间的延长,$CD25^+CD69^+$细胞群占比逐渐减少(图 2I～N)。

2.2.3　CTLs 增殖检测　　细胞激活后 CFSE 染色,7 d 后流式分析结果显示,未使用 CD3/CD28 磁珠激活的细胞无增殖(图 2O),而使用 CD3/CD28 磁珠激活的细胞出现增殖(图 2P)。



A：pLV/GD2-CAR-pGB-FTH1-EGFP-puro 重组质粒酶切产物；B：pLV/GD2-CAR-pCMV-FTH1-EGFP-puro 重组质粒酶切产物；C：pLV/GD2-CAR-EGFP-puro 重组质粒酶切产物；D：3 组慢病毒设计各区域示意图

图 1　慢病毒设计以及鉴定示意图



A:T 淋巴细胞提取流式分析;B:$CD3^+$细胞分群;C:对照组 $CD4^-CD8^-$细胞分群; D:$CD4^+$、$CD8^+$细胞分群;E:$CD4^+$细胞群中 $CD25^+CD69^+$; F:对照组 $CD4^+CD25^-CD69^-$; G:$CD8^+$细胞群中 $CD25^+CD69^+$;H:对照组 $CD8^+CD25^+CD69^+$;I: 1 d $CD4^+CD25^+CD69^+$;J: 3 d $CD4^+CD25^+CD69^+$; K: 7 d $CD4^+CD25^+CD69^+$;L:1 d $CD8^+CD25^+CD69^+$; M:3 d $CD8^+CD25^+CD69^+$; N:7 d $CD8^+CD25^+CD69^+$; O、P:CFSE 实验检测阴性对照组、实验组的结果

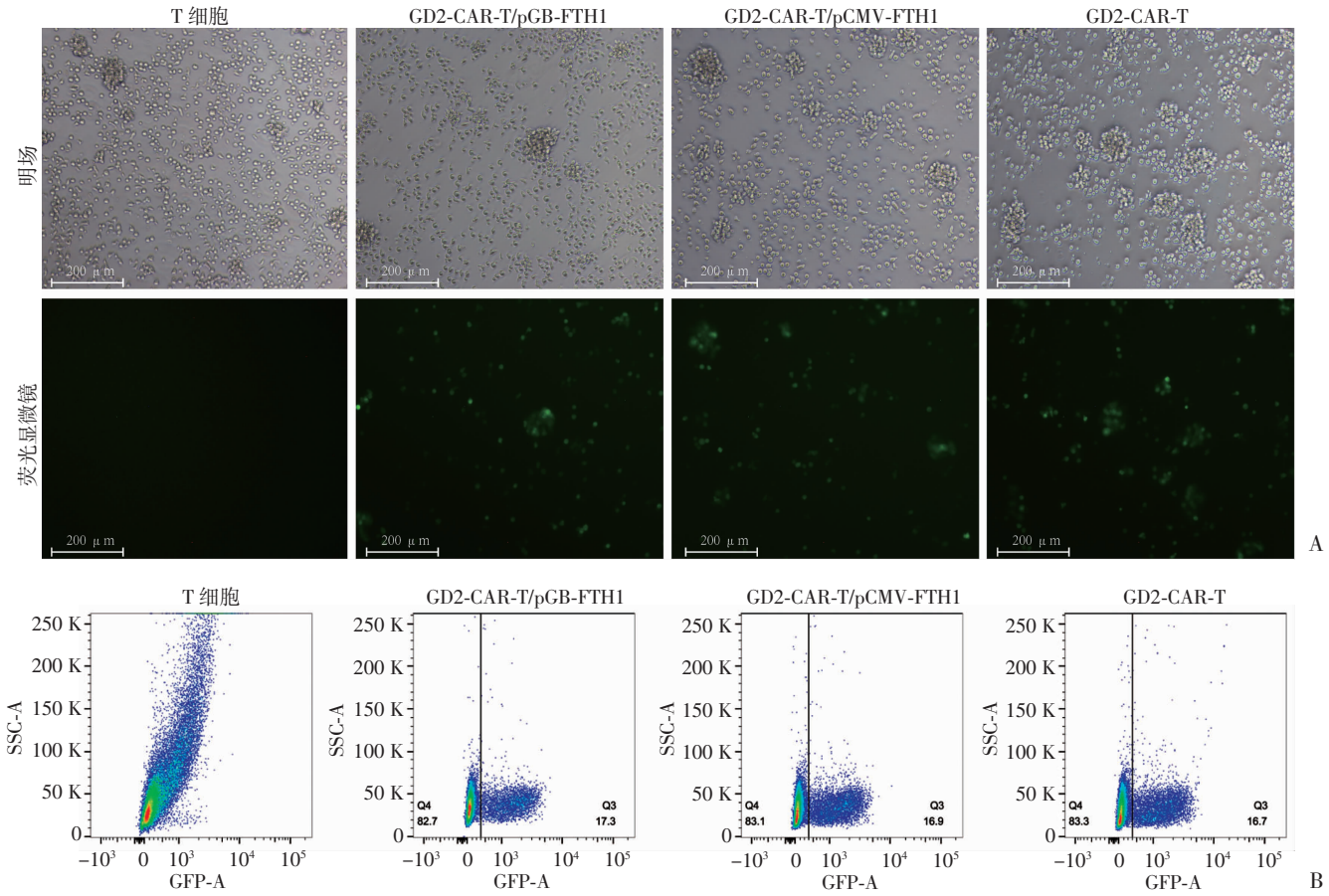
图 2 流式细胞术鉴定 CTLs 及其激活和增殖

2.3 CAR-T 构建及鉴定

3 组慢病毒感染 CTLs 48 h 后,通过荧光显微镜拍摄,如图 3A 所示,T 细胞组作为空白对照,未见明显绿色荧光蛋白表达,其余 3 组均可见绿色荧光蛋白表达。流式分析仪检测绿色荧光蛋白(eGFP)表达阳性细胞,测得 GD2-CAR-T/pGB-FTH1、GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 和 GD2-CAR-T 3 组的感染效率分为 17.3%、16.9%、16.7%(图 3B)。

2.4 CAR-T 对 SK-N-SH 细胞的体外杀伤效果

2.4.1 CytoTox96@ 非放射性细胞毒性检测 将各组细胞与 SK-N-SH 细胞共培养 96 h 后,显微镜观察,T 细胞组 SK-N-SH 细胞增殖快且几乎没有死亡,GD2-CAR-T/pGB-FTH1、GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 和 GD2-CAR-T 组 SK-N-SH 细胞几乎全部死亡(图 4A)。LDH 结果显示,各组细胞按照效靶比 5∶1、1∶1、1∶5的 24 h 杀伤效率结果显示如图 4B。



A:T 细胞以及慢病毒感染 3 组 CAR-T 细胞 48 h 后各组绿色荧光表达情况;B:流式分析仪检测 4 组绿色荧光蛋白表达阳性细胞

图 3 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达以及流式分析绿色荧光蛋白表达阳性率

2.4.2 共培养因子检测 ELISA 结果显示,各组细胞与 SK-N-SH 细胞共培养 24 h 后,上清液中 IL-2 和 INF-γ 在 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组、GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组和 GD2-CAR-T 组均分别显著高于 T 细胞组($P<0.01$,图 4C、D)。各组细胞在与 SK-N-SH 细胞共培养前第 1、3、7 天 GB 分泌量均低于与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天的 GB 分泌量($P<0.05$,图 4E)。

2.5 FTH1 表达及其转铁效应

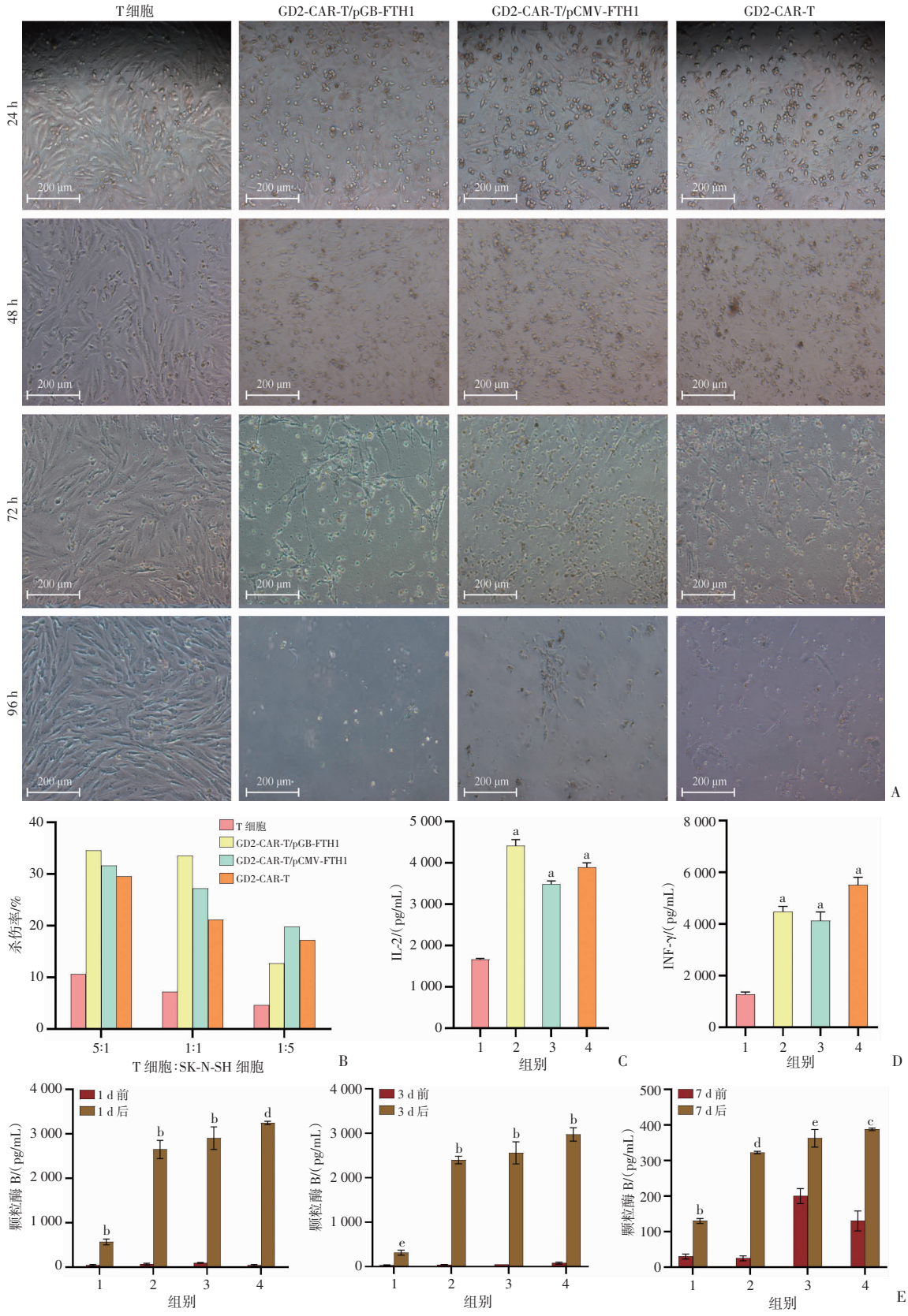
2.5.1 FTH1 表达 Westen blot 结果显示,GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组在与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天,FTH1 相对表达量呈逐渐减少趋势,各组间比较均有统计学差异($P<0.05$);GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组在与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天 FTH1 相对表达量无明显变化,各组间无统计学差异(图 5A、B)。

2.5.2 普鲁士蓝染色 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组和 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组细胞铁染色结果如图 5C,2 组细胞内可见蓝染颗粒,表明细胞内 FTH1 表达后成功引起细胞内聚铁效应。

2.5.3 细胞内铁含量检测 各组细胞与 SK-N-SH 细胞共培养后的第 1、3、7 天 3 个时间点细胞铁含量测定结果如图 5D。T 细胞组和 GD2-CAR-T 组各时间点铁含量均显著低于 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组和 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1($P<0.05$)。

2.6 细胞 MRI

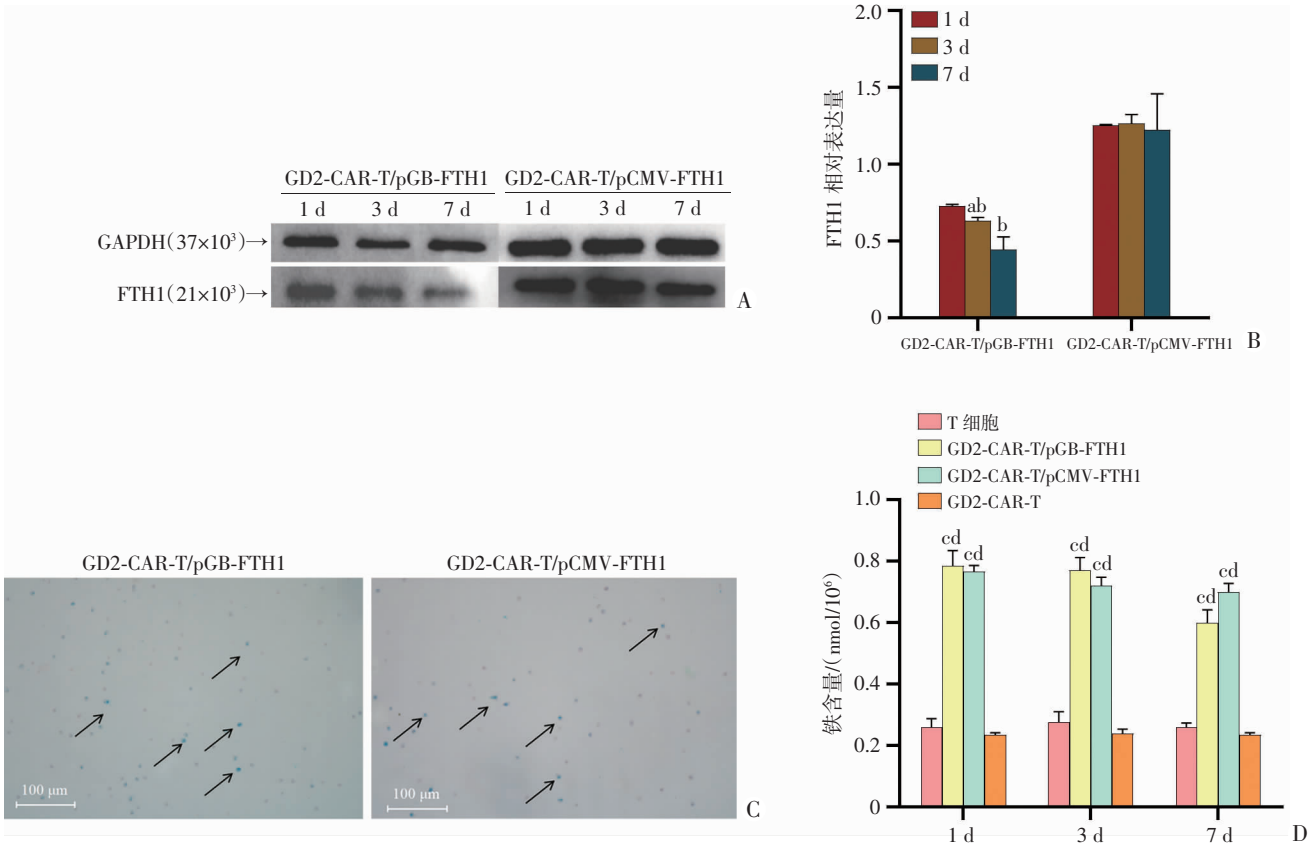
GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组细胞在与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天的 T2WI 信号逐渐升高(图 6A),而 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组细胞在第 1、3、7 天 T2 信号无明显变化(图 6A)。对 2 组细胞各时间点 T2 值进行统计分析,GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组与 SK-N-SH 细胞共培养后第 1、3、7 天 T2 值分别为(163.43±9.39)、(195.10±4.20)、(217.40±7.37),各组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组第 1、3、7 天 T2 值各组间差异无统计学意义。



1:T 细胞组;2:GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组;3:GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组;4:GD2-CAR-T 组;a:$P<0.01$,与 T 细胞组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,d:$P<0.000\ 1$,e:$P<0.05$,与 SK-N-SH 细胞共培养前同时间段比较

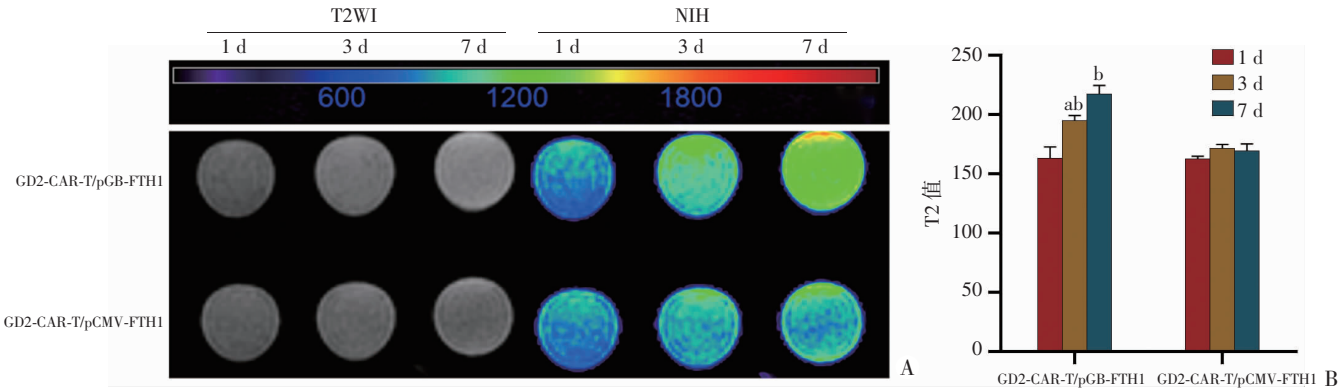
A:显微镜下各时间段 4 组细胞共培养杀伤情况;B:LDH 杀伤实验;C:IL-2 分泌情况;D:INF-γ 分泌情况;E:各组效应细胞与 SK-N-SH 细胞共培养前后颗粒酶 B 分泌情况

图 4 体外杀伤以及分泌因子情况检测



A、B: Western Blot 检测 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 以及 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组 3 个时间点 FTH1 相对表达情况及表达量　a:$P<0.05$,与同组 7 d 比较;b:$P<0.01$,与同组 1 d 比较;C:普鲁士蓝染色结果　箭头:示蓝染铁颗粒,位于细胞内;D:各组 3 个时间点细胞内铁含量检测结果　c:$P<0.01$,与同一时间点 T 细胞组比较;d:$P<0.01$,与同一时间点 GD2-CAR-T 组比较

图 5　FTH1 表达及其转铁效应



a:$P<0.05$,与同组 7 d 比较;b:$P<0,01$,与同组 1 d 比较

A:GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组以及 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组 T2WI 图(左)以及 NIH 彩图(右); B:GD2-CAR-T/pGB-FTH1 组以及 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 组 T2 值

图 6　细胞磁共振扫描

3 讨论

随着 CAR-T 细胞技术的飞速进展,对细胞免疫治疗效果的监测成为重要课题。尽管基于流式细胞术、免疫组织化学和聚合酶链式反应的分析可以检测外周血和组织样本中的 CAR-T 细胞,但这些方法存在操作复杂、有创、不能实时反映细胞状态等缺陷[6]。本研究将 GB 启动子驱动的 MRI 报告基因成像与 CAR-T 细胞疗法相结合,构建了一种诊疗一体化的 CAR-T 细胞,通过体外实验实现了利用 MRI 报告基因成像对细胞激活状态的显示,为进一步体内实验奠定了基础,有望为实体瘤的 CAR-T 细胞治疗过程提供一种实时监测免疫细胞激活状态的可视化手段。

组织特异性启动子能够调控外源基因在某些特定细胞或组织中表达,通过基因工程技术将这种启动子与报告基因相连接,可以实现报告基因的定点、定时和定量表达,从而达到利用报告基因成像实时显示特异性组织、细胞及其状态的目的[7]。GB 在 CAR-T 细胞激活时大量释放,是 CAR-T 细胞激活的一种重要生物学标志物[8]。本研究通过基因改造将 GB 启动子置于 MRI 报告基因上游并控制其表达,主要目的是利用 MRI 报告基因成像对 CAR-T 细胞的激活状态进行成像并定量分析。本研究结果显示,在 CAR-T 与 SK-N-SH 细胞共培养前,GB 的分泌量非常少,而在与 SK-N-SH 细胞共培养后,GB 分泌量显著增多,之后随着共培养时间的延长而逐渐下降,与 PATEL 等[8]的研究结果一致。GB 启动子驱动的 FTH1 表达与 GB 表达水平的变化趋势基本一致,而对照组利用广谱 CMV 启动子的报告基因在各时间点的表达无显著差异。与 CMV 启动子相比,GB 启动子驱动的报告基因表达能够真实地反映 CAR-T 细胞与 SK-N-SH 细胞共培养后激活状态的动态变化,这种差异化表达产生相应的细胞聚铁效应,从而引起不同激活状态细胞的 MRI 信号差别。

本研究采用基因工程技术对 T 细胞进行了 2 部分改造,GD2-CAR 用于靶向和激活,FTH1 报告基因用于成像。结果发现,无论是 GD2-CAR-T/pGB-FTH1、GD2-CAR-T/pCMV-FTH1、GD2-CAR-T 3 组 CAR-T 细胞与 T 细胞组,还是 GD2-CAR-T/pGB-FTH1 和 GD2-CAR-T/pCMV-FTH1 2 组 FTH1 细胞与 GD2-CAR-T 和 T 细胞 2 个对照组,各实验组 CAR-T 细胞及对照组 T 细胞,除了在特异性靶向、免疫细胞激活能力及成像结果功能的不同,其他方面在各组细胞之间均无显著差异,说明本研究所采用细胞工程化技术的安全性和可行性。另一方面,为验证 FTH1 表达所产生的转铁效应,在体外实验部分采用了含铁的细胞培养基。之前有研究发现,高浓度的铁离子可通过芬顿效应对细胞造成损伤,导致细胞活力下降甚至死亡[9-10],出于细胞聚铁效应的安全性考虑,本研究在体外培养液中使用了 0.2 mmol/L 终浓度的 FAC。这一浓度的铁在之前肿瘤细胞[11]及间充质干细胞[12]的研究中被证实是安全的。此外,报告基因铁蛋白通过细胞膜的转铁蛋白受体将铁离子转入细胞内,是一个依赖于铁蛋白表达的主动转运过程,当 Fe^{2+} 进入细胞后,其通过氧化作用变为 Fe^{3+} 并储存于铁蛋白的铁核内,从而降低了细胞内游离铁离子的浓度,减少了对细胞的损伤[13-14]。本研究结果显示,CAR-T 细胞转铁后其抗原结合能力、细胞因子分泌功能、肿瘤细胞杀伤作用等均与对照组无显著差异,提示这一培养浓度的铁离子不仅可以满足报告基因成像所需,还能保证细胞结构和功能不受影响。

本研究虽然初步证实了利用 MRI 报告基因成像显示 CAR-T 细胞激活状态的可行性,但未进行进一步体内实验验证。与体外环境相比,体内环境更为复杂,可能影响 CAR-T 细胞的抗原靶向、结合以及激活能力;另外,体外基于报告基因的 MRI 成像需要加入外源性铁,体内在仅依赖内源性铁的情况下,转铁量能否满足成像的要求尚不可知。

总之,本研究成功构建了 GB 启动子驱动 FTH1 报告基因表达的 CAR-T 细胞成像系统,该系统可以灵敏响应 CAR-T 激活状态,当细胞激活时,GB 启动子启动报告基因表达并产生相应的聚铁效应,进而引起 MRI 信号变化。这一成像策略实现了 CAR-T 细胞激活状态的可视化,有望为 CAR-T 细胞治疗提供一种有潜力的实时、安全的动态监测手段。

参考文献:

[1] PARK J H, RIVIÈRE I, GONEN M, *et al*. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med, 2018, 378(5): 449-459. DOI: 10.1056/NEJMoa1709919.

[2] ALBELDA S M. Tumor antigen heterogeneity: the "elephant in the room" of adoptive T-cell therapy for solid tumors[J]. Cancer Immunol Res, 2020, 8(1): 2. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0801.

[3] MORELLO A, SADELAIN M, ADUSUMILLI P S. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors

[J]. Cancer Discov, 2016, 6(2): 133-146. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0583.

[4] ZHANG Y, HE S S, CHEN W, *et al*. Activatable polymeric nanoprobe for near-infrared fluorescence and photoacoustic imaging of T lymphocytes[J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(11): 5921-5927. DOI: 10.1002/anie.202015116.

[5] PRENDERGAST J A, HELGASON C D, BLEACKLEY R C. Quantitative polymerase chain reaction analysis of cytotoxic cell proteinase gene transcripts in T cells. Pattern of expression is dependent on the nature of the stimulus[J]. J Biol Chem, 1992, 267(8): 5090-5095.

[6] HU Y, HUANG J. The chimeric antigen receptor detection toolkit[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1770. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01770.

[7] ZHENG C Y, BAUM B J. Evaluation of promoters for use in tissue-specific gene delivery[J]. Methods Mol Biol, 2008, 434: 205-219. DOI: 10.1007/978-1-60327-248-3_13.

[8] PATEL M R, CHANG Y F, CHEN I Y, *et al*. Longitudinal, noninvasive imaging of T-cell effector function and proliferation in living subjects[J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10141-10149. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1843.

[9] FENG Y P, LIU Q C, ZHU J F, *et al*. Efficiency of ferritin as an MRI reporter gene in NPC cells is enhanced by iron supplementation[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 434878. DOI: 10.1155/2012/434878.

[10] KAUR D, RAJAGOPALAN S, ANDERSEN J K. Chronic expression of H-ferritin in dopaminergic midbrain neurons results in an age-related expansion of the labile iron pool and subsequent neurodegeneration: implications for Parkinson's disease[J]. Brain Res, 2009, 1297: 17-22. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.08.043.

[11] SUN J, HUANG J, BAO G C, *et al*. MRI detection of the malignant transformation of stem cells through reporter gene expression driven by a tumor-specific promoter[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 284. DOI: 10.1186/s13287-021-02359-w.

[12] HE X Y, ZHOU Y R, MU T, *et al*. Magnetic resonance imaging focused on the ferritin heavy chain 1 reporter gene detects neuronal differentiation in stem cells[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(7): 1563-1569. DOI: 10.4103/1673-5374.358608.

[13] FAN Y M, ZHANG J, CAI L L, *et al*. The effect of anti-inflammatory properties of ferritin light chain on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in murine macrophages[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(11): 2775-2783. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.06.015.

[14] ZHAO G H, AROSIO P, CHASTEEN N D. Iron (Ⅱ) and hydrogen peroxide detoxification by human H-chain ferritin. An EPR spin-trapping study[J]. Biochemistry, 2006, 45(10): 3429-3436. DOI: 10.1021/bi052443r.

(**收稿**:2023-12-19;**修回**:2024-02-28)

(编辑 邓强庭)