

· 肝脏肿瘤 ·

DOI: 10.12449/JCH250619

靶向叶酸受体 α (FR α)的程序性细胞死亡受体1敲低型嵌合抗原受体T细胞杀伤肝癌细胞的效果分析

温军业¹, 张浚琪², 任行², 张海强³, 叶学帅²

1 河北省人民医院肝胆外科, 石家庄 050000

2 河北工程大学附属医院/临床医学院学科建设与研究生办, 河北 邯郸 056002

3 河北医科大学第二医院胃肠外科, 石家庄 050000

通信作者: 叶学帅, yexueshuai@hebeu.edu.cn (ORCID: 0009-0000-3665-3394)

摘要: 目的 探究靶向叶酸受体 α (FR α)嵌合抗原受体(CAR)的程序性细胞死亡受体1(PD-1)敲低型T细胞(si-PD-1-CAR-T)对肝癌细胞的清除能力。方法 应用生物信息学数据库TCGA分析FR α 抗原在肝癌及正常肝组织中的表达情况,以及FR α 表达与肝癌患者生存期的关系。分别将编码靶向FR α 抗原的CAR结构的mRNA及mRNA联合靶向PD-1基因的小干扰RNA(siRNA)使用电穿孔仪转入T细胞,制备FR α -CAR-T和si-PD-1-CAR-T。流式细胞术分析FR α -CAR的表达效率和PD-1的敲低效率。体外培养肝癌细胞系JHH-1和HepG2,采用流式细胞术分析FR α 在肿瘤细胞表面的表达情况,将FR α -CAR-T、si-PD-1-CAR-T及空载体转导的T细胞(Mock T)作为效应细胞,JHH-1和HepG2作为靶细胞,CCK-8法检测在不同效靶比(1:1、2.5:1、5:1、10:1、20:1)时对靶细胞的杀伤效率;采用ELISA法分别检测效应细胞与靶细胞(10:1)共培养上清中IFN- γ 和IL-2的分泌情况。计量资料符合正态分布时,两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK检验。采用Kaplan-Meier法分析比较患者生存差异。结果 TCGA数据库分析显示,FOLR1在肝癌组织中表达水平明显升高,FOLR1高表达肝癌患者的总生存期显著低于FOLR1低表达者($P=0.013$)。将mRNA转入T细胞后,FR α -CAR在CAR-T和si-PD-1-CAR-T中的表达率可达89.8%和84.7%,使用mRNA和siRNA共转染可将T细胞的PD-1下调并维持至少7天的PD-1低表达状态。FR α 抗原在JHH-1细胞中表达率为100%,而在HepG2细胞中呈阴性表达。CCK-8结果显示,si-PD-1-CAR-T对JHH-1细胞杀伤效率显著高于FR α -CAR-T细胞($P<0.05$);ELISA结果显示,FR α -CAR-T细胞与JHH-1细胞共培养时,IL-2分泌量较Mock T细胞显著增加[(1032.50 \pm 135.90) pg/mL vs (50.26 \pm 7.87) pg/mL, $P<0.001$], IFN- γ 分泌量显著增加[(1430.56 \pm 184.20) pg/mL vs (89.05 \pm 11.26) pg/mL, $P<0.001$];si-PD-1-CAR-T与JHH-1细胞共培养后,IFN- γ 和IL-2的释放水平较FR α -CAR-T均显著提高(P 值均 <0.05)。结论 FR α 是肝癌治疗的潜在靶点,敲低T细胞PD-1可显著提高FR α -CAR-T在体外的杀伤活性。

关键词: 癌, 肝细胞; 嵌合抗原受体; 叶酸盐受体1; 程序性细胞死亡受体1

基金项目: 河北省自然科学基金(H2024402005)

Efficacy of chimeric antigen receptor T-cell with programmed cell death-1 knockdown targeting folate receptor alpha in killing hepatoma cells

WEN Junye¹, ZHANG Junqi², REN Hang², ZHANG Haiqiang³, YE Xueshuai²

1. Department of Hepatobiliary Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China; 2. Office of Discipline Development and Graduate Education, The Affiliated Hospital/Clinical Medical College of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056002, China; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: YE Xueshuai, yexueshuai@hebeu.edu.cn (ORCID: 0009-0000-3665-3394)

Abstract: Objective To investigate the ability of chimeric antigen receptor T-cell with programmed cell death-1 (PD-1) knockdown (si-PD-1 CAR-T) targeting folate receptor alpha (FR α) to eliminate hepatoma cells. **Methods** The bioinformatics

database TCGA was used to analyze the expression level of FR α antigen in liver cancer tissue and normal liver tissue and the association between FR α expression and the survival of liver cancer patients. The mRNA encoding the CAR structure targeting FR α antigen and the small interfering RNA (siRNA) targeting the PD-1 gene were transduced into T cells using an electroporator to prepare FR α -CAR-T and si-PD-1-CAR-T cells. Flow cytometry was used to analyze the expression efficiency of FR α -CAR and the knockdown efficiency of PD-1. Hepatoma cell lines JHH-1 and Hep-G2 were cultured in vitro, and flow cytometry was used to analyze the expression of FR α on the surface of tumor cells. With FR α -CAR-T, si-PD-1 CAR-T, and mock vector-transduced T cells (Mock T) used as effector cells and with JHH-1 and Hep-G2 cells as target cells, CCK-8 assay was used to measure the killing efficiency of effector cells against target cells at different effector-to-target ratios (1:1, 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1). ELISA was used to measure the secretion of interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2) in the supernatants from co-cultures of effector and target cells (10:1). The independent-samples *t* test was used for comparison of normally distributed continuous data between two groups, while a one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, and the SNK test was used for further comparison between two groups. The Kaplan-Meier method was used for comparison of survival differences. **Results** The analysis of the TCGA database showed that there was a significant increase in the expression level of FOLR1 in liver cancer tissue, and liver cancer patients with high expression of FOLR1 had a significantly shorter overall survival than those with low expression ($P=0.013$). After transduction of mRNA into T cells, the expression rate of FR α -CAR reached 89.8% in CAR-T and 84.7% in si-PD-1 CAR-T cells, and co-transfection with mRNA and siRNA could downregulate PD-1 in T cells and maintain a low expression state for at least 7 days. The expression rate of FR α antigen was 100% in JHH-1 cells, while it showed negative expression in Hep-G2 cells. CCK-8 assay showed that the killing efficiency of si-PD-1-CAR-T against JHH-1 cells was significantly higher than that against FR α -CAR-T cells ($P<0.05$). ELISA showed that compared with Mock T cells, FR α -CAR-T cells co-cultured with JHH-1 cells showed significant increases in the secretion of IL-2 (1 032.50 \pm 135.90 pg/mL vs 50.26 \pm 7.87 pg/mL, $P<0.001$) and IFN- γ (1 430.56 \pm 184.20 pg/mL vs 89.05 \pm 11.26 pg/mL, $P<0.001$), and in addition, the release levels of IFN- γ and IL-2 after co-culture of si-PD-1-CAR-T and JHH-1 cells were significantly higher than the release level of FR α -CAR-T ($P<0.05$). **Conclusion** FR α is a potential target for liver cancer treatment, and PD-1 knockdown in T cells can significantly enhance the in vitro killing activity of FR α -CAR-T cells.

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Receptors, Chimeric Antigen; Folate Receptor 1; Programmed Cell Death 1 Receptor

Research funding: Natural Science Foundation of Hebei Province (H2024402005)

肝细胞癌(HCC)是最我国常见的消化系统肿瘤之一^[1]。当前的治疗手段主要为局部和系统治疗,包括手术、经动脉放射栓塞、化疗栓塞或消融治疗、靶向免疫治疗和中医药治疗等^[2-3]。由于其起病隐匿,患者早期症状不明显,多数患者就诊时已失去手术指征。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)可通过主要组织相容性复合体非限制性途径识别并杀伤肿瘤细胞^[4],具有亲和力高、特异性强、杀伤效果显著等特点,当前国内外已有数个靶向CD19等血液系统恶性肿瘤相关抗原的CAR-T疗法获批上市^[5]。尽管实体肿瘤组织表达多种肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA),但多数TAA在正常组织中也有不同程度的表达,因此,CAR-T可以攻击表达相应TAA的正常组织细胞,造成“脱靶”效应,这极大限制CAR-T疗法的应用^[6]。叶酸 α 受体(folate receptor α , FR α)是由FOLR1基因编码的一种糖基化蛋白,在多种肿瘤组织中高表达^[7]。靶向FR α 的抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)和CAR-T疗法已在多项临床研究中得到应用^[8-9],但其

在肝癌的治疗中还尚未报道。本研究旨在探究FR α 抗原在肝癌组织中的表达情况,通过使用mRNA联合小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术制备了靶向FR α 的程序性细胞死亡受体1(programmed death 1, PD-1)沉默的CAR-T,初步研究其抗肿瘤活性,评估靶向FR α 的PD-1沉默的CAR-T疗法在肝癌治疗中的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 RPMI1640培养基、DMEM培养基、胎牛血清(FBS)及PBS缓冲液均购自美国Gibco公司;淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司;人CD8⁺T细胞分离试剂盒购自德国Miltenyi公司;人白细胞介素2(IL-2)、CD3单克隆抗体(OKT-3)、CD28单克隆抗体购自北京义翘神州科技股份有限公司;青霉素/链霉素购自北京索莱宝生物科技有限公司;抗人FOLR1-APC、抗人PD-1-FITC流式标记抗体均购自美国Biolegend公司;FITC-Labeled Human FOLR1购自北京百普赛斯生物

科技股份有限公司。Neon[®] Transfection System电穿孔仪购自美国Invitrogen公司;流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因表达及肝癌患者预后分析 从TCGA数据库下载泛癌样本与正常样本的基因表达谱及临床数据,比较FOLR1 mRNA在泛癌中的表达特点。通过单变量Cox分析和LASSO-Cox回归分析构建生存预后模型,将肝癌患者按FOLR1 mRNA表达水平分为FOLR1高表达组和FOLR1低表达组,通过Kaplan-Meier生存曲线进行分析。

1.2.2 细胞系的培养 人肝癌细胞系JHH-1和HepG2均购自美国模式培养物集存库(ATCC),两种细胞系均培养于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,在37℃、5%CO₂条件下培养。

1.2.3 CAR-mRNA的制备 本研究靶向FR α 抗原采用包含一个共刺激因子的第二代CAR结构,命名为FR α -CAR,其结构示意图如图1所示。其中,FR α 特异性scFv(克隆号:MOv19)、CD8铰链及跨膜区、CD28共刺激因子和CD3 ζ 按图示结构串联,编码CAR结构的基因经密码子优化后交由TriLink公司全基因合成。将上述基因克隆到DNA体外转录载体并获得5'加帽和poly(A)尾的CAR-mRNA,保存于-80℃冰箱备用。

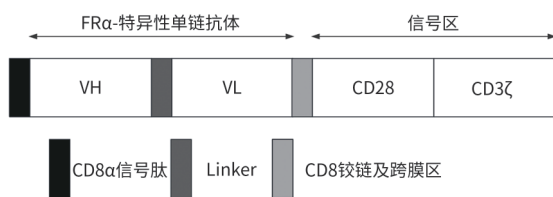


图1 FR α -CAR的结构示意图

Figure 1 The structure diagram of FR α -CAR

1.2.4 靶向PD-1的siRNA设计和合成 PD-1 siRNA及其阴性对照siRNA(NC siRNA)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,PD-1 siRNA序列如下:正义链5'-AUUAUAAUAAUAGAACCAC-3',反义链5'-GGUUCUAUUAUAAUAAUUA-3'。

1.2.5 FR α -CAR-T和si-PD-1-CAR-T的制备 使用淋巴细胞分离液密度梯度离心,分离外周血单个核细胞(PBMC),在添加10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺和100 IU/mL重组人IL-2的RPMI 1640培养基中培养,37℃、5%CO₂条件下孵育2 h,使单核细胞贴壁。使用人CD8⁺T细胞磁珠分离试剂盒,从非贴壁细胞中分离收获CD8⁺T细胞,并在培养基中加入1 μ g/mL的CD3/CD28单克隆抗体、300 U/mL IL-2激活48 h。使用电穿孔缓冲液R(Neon Transfection System Kits)以每100 μ L中 2×10^6 个细胞的体系混匀细胞。在电转体系中分别加入10 μ g的FR α -CAR mRNA和5 μ L 10 μ mol/L的对照

siRNA或10 μ g的FR α -CAR mRNA和5 μ L 10 μ mol/L的PD-1 siRNA以制备FR α -CAR-T和si-PD-1-CAR-T,使用程序24(1 600 V, 10 ms, 3个脉冲)下电击。Mock T在电转体系中仅加入5 μ L 10 μ mol/L的对照siRNA,电穿孔完成后立即将细胞转移至预热的1 mL不含IL-2的完全培养基中继续培养。

1.2.6 流式细胞术 人肝癌细胞系JHH-1和HepG2使用抗人FOLR1-APC抗体孵育后进行表面FR α 抗原表达分析。T细胞转染后第4天,每 10^6 个细胞使用FITC-Labeled Human FOLR1标记后进行表面FR α -CAR表达分析,使用抗人PD-1-FITC持续检测T细胞表面PD-1的表达情况。

1.2.7 体外杀伤实验 使用CCK-8试剂盒测定CAR-T的细胞毒性,靶细胞(JHH-1和HepG2)以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于96孔板,培养贴壁后将效应细胞(FR α -CAR-T、si-PD-1-CAR-T、Mock T)按不同效靶比(1:1、2.5:1、5:1、10:1、20:1)依次加入,每组设置3个复孔,共培养24 h。使用PBS清洗未贴壁细胞后每孔加入含10 μ L CCK-8的相应完全培养基继续培养4 h,使用酶标仪在450 nm波长处测OD值,按照如下公式计算靶细胞裂解百分比:杀伤效率=[1-(实验组OD值-空白孔OD值)/(对照组OD值-空白孔OD值)] $\times 100\%$ 。

1.2.8 ELISA检测共培养上清中IFN- γ 和IL-2的水平 将靶细胞(JHH-1和HepG2)以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于96孔板,培养贴壁后将效应细胞(FR α -CAR-T、si-PD-1-CAR-T、Mock T)按10:1效靶比加入,共培养24 h。收集共培养上清后使用人IFN- γ 、IL-2 ELISA检测试剂盒测定IFN- γ 、IL-2水平。

1.3 统计学方法 所有实验至少进行了3次独立的实验操作,应用GraphPadPrism9.0对数据进行统计学分析。采用Shapiro-Wilk法对计量资料进行正态分布检验,资料符合正态分布时以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用成组t检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK检验。采用Kaplan-Meier法比较患者生存差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOLR1基因表达分析 首先探讨FOLR1基因在泛癌尤其是肝癌中的表达情况。通过对TCGA数据库中泛癌及正常组织的分析,FOLR1 mRNA在正常组织中几乎不表达,而在卵巢癌、胆管癌、宫颈癌、睾丸癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、食管癌、膀胱癌等肿瘤组织中表达丰度显著升高(图2),提示FR α 抗原在多种肿瘤组织中表达上调,是肿瘤治疗的潜在靶点。

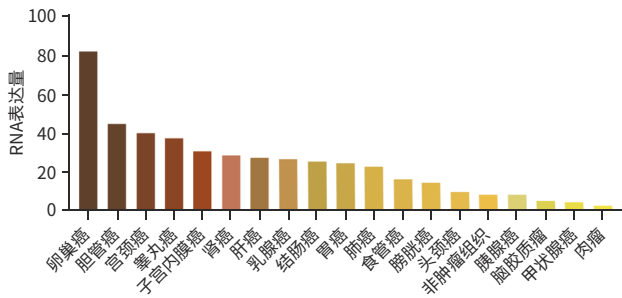


图2 FOLR1在不同肿瘤组织中的表达水平

Figure 2 The expression level of FOLR1 in different tumor tissues

2.2 FOLR1表达与患者预后分析 基于TCGA数据库中362例肝癌患者的FOLR1 mRNA表达和预后情况,分析FOLR1基因表达与肝癌患者总生存期的关系,结果显示,FOLR1高表达肝癌患者的总生存期显著低于FOLR1表达低者($P=0.013$)(图3)。

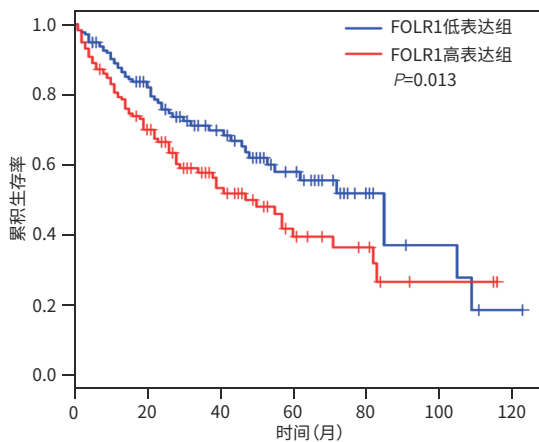
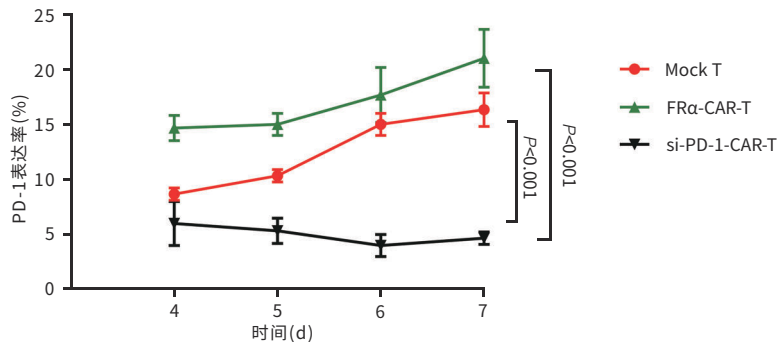
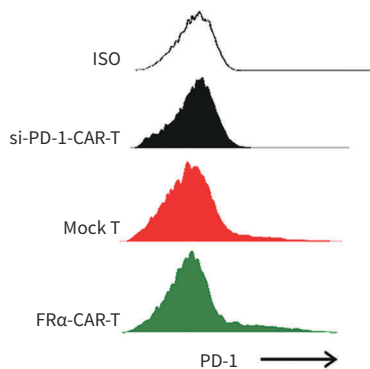


图3 FOLR1基因表达与肝癌患者总生存期的关系

Figure 3 The correlation analysis of FOLR1 gene expression with overall survival of hepatocellular carcinoma patients



注:ISO,同型对照抗体。

图5 流式细胞术检测PD-1在T细胞中表达效率及持续时间

Figure 5 FACS was applied to detect the expression efficiency and duration time of PD-1 in three types of cells

2.3 FR α -CAR-T和si-PD-1-CAR-T细胞的制备 本研究采用电穿孔法将编码CAR结构(图1)的mRNA和siRNA递送转染T细胞,电转后5天,流式细胞术结果显示,T细胞表面FR α -CAR表达率分别为89.8%和84.7%(图4)。随着培养时间延长,Mock T和FR α -CAR-T的PD-1表达水平逐渐上调,而使用siRNA可以显著下调PD-1的表达并维持至少7天的PD-1低表达(图5)。

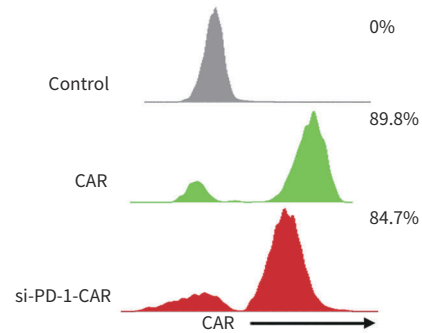


图4 流式细胞术检测CAR在T细胞中表达效率

Figure 4 FACS was applied to detect the expression efficiency of CAR in three types of cells

2.4 FR α -CAR-T在体外表现出对肿瘤细胞特异且高效的靶向杀伤活性 通过流式细胞术检测肝癌细胞系JHH-1和HepG2细胞表面FR α 抗原的表达,结果显示JHH-1表面FR α 表达水平为100%,而HepG2为阴性表达(图6)。因此,在接下来的CCK-8试验以及ELISA检测细胞因子分泌的试验中将JHH-1作为靶细胞,HepG2作为阴性对照组。

CCK-8试验显示,随着效靶比的提高,FR α -CAR-T对JHH-1细胞的杀伤效果逐渐增大,当效靶为20:1时,FR α -CAR-T的杀伤效率为81.00% \pm 3.64%;FR α -CAR-T对FR α 表达阴性的HepG2细胞的杀伤则未观察到显著变化($P>0.05$);而Mock T对两种肿瘤细胞的杀伤作用在各效靶比下均未观察到显著统计学差异($P>0.05$)(图7)。

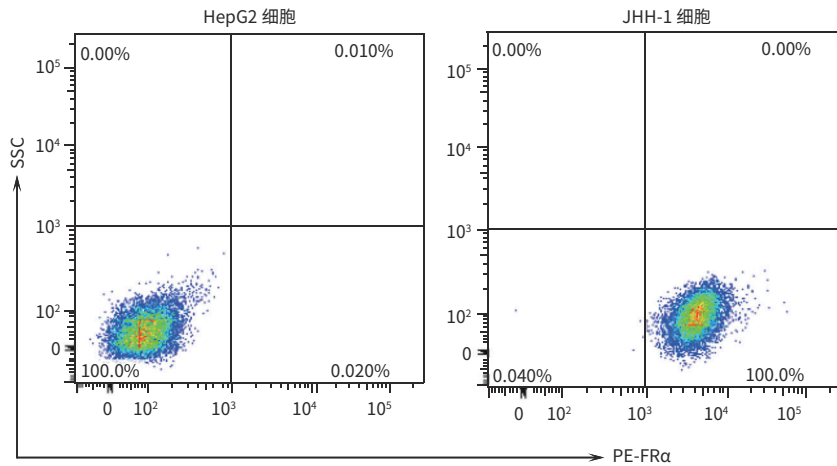
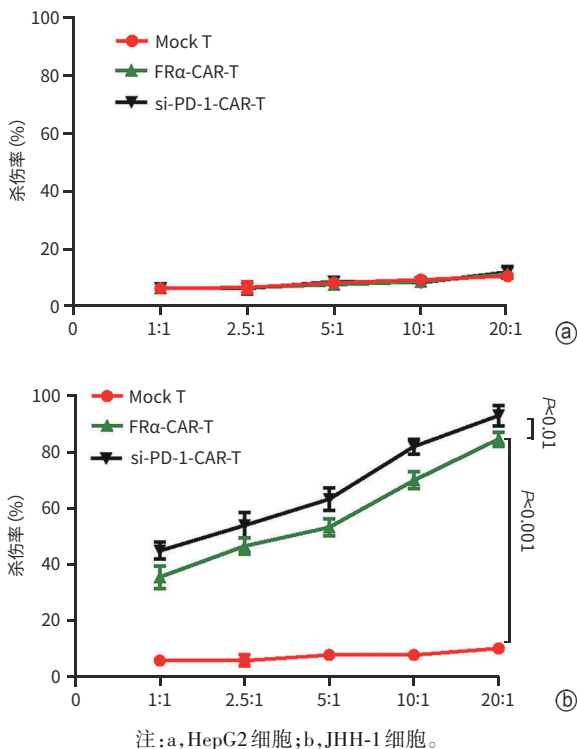


图6 HepG2和JHH-1肿瘤细胞表面FRα的表达
Figure 6 Expression of FRα on tumor cells of HepG2 and JHH-1



注:a,HepG2细胞;b,JHH-1细胞。
图7 si-PD-1-CAR-T和FRα-CAR-T对HepG2和JHH-1细胞的特异性清除率
Figure 7 The specific clearance rate of si-PD-1-CAR-T and FRα-CAR-T to HepG2 and JHH-1 cells

ELISA法检测效靶比10:1共培养液中细胞因子分泌水平,与体外杀伤实验观察到的趋势一致,FRα-CAR-T细胞与JHH-1细胞共培养时,IL-2分泌量较Mock T细胞显著增加[(1 032.50±135.90) pg/mL vs (50.26±7.87) pg/mL, $P < 0.001$];IFN-γ分泌量显著增加[(1 430.56±184.20) pg/mL vs (89.05±11.26) pg/mL, $P < 0.001$](图8)。以上结果提示,FRα-CAR-T对靶细胞的杀伤呈FRα抗原依赖和剂量依赖。

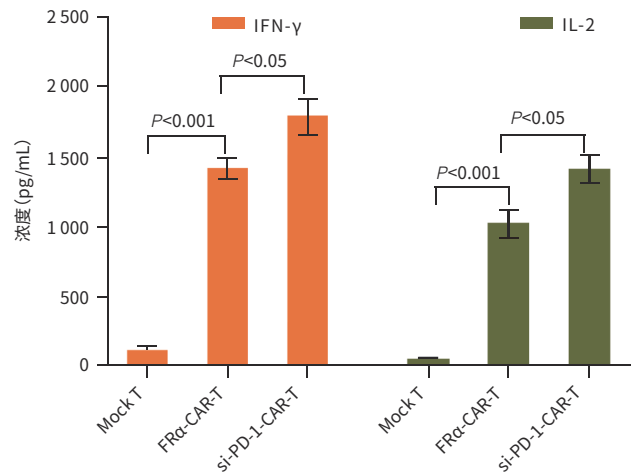


图8 si-PD-1-CAR-T和FRα-CAR-T与JHH-1细胞共培养上清中IFN-γ与IL-2含量
Figure 8 Detection of IFN-γ and IL-2 Secretion in the supernatant of si-PD-1-CAR-T and FRα-CAR-T Co-cultured with JHH-1 Cells

2.5 PD-1沉默可增强CAR-T的靶向杀伤活性 使用siRNA沉默PD-1的FRα-CAR-T细胞(si-PD-1-CAR-T)与靶细胞共培养,CCK-8试验显示,si-PD-1-CAR-T同样表现出抗原依赖和剂量依赖的杀伤作用,并且在效靶比为20:1时,其杀伤效率为92.25%±2.64%,同FRα-CAR-T相比差异有统计学意义($P < 0.05$)(图7)。

在效靶比10:1时si-PD-1-CAR-T与靶细胞共培养,其IFN-γ[(1 815.40±233.90) pg/mL vs (1 430.56±184.20) pg/mL, $P = 0.027$]和IL-2[(1 411.40±173.60) pg/mL vs (1 032.50±135.90) pg/mL, $P = 0.034$]分泌量较FRα-CAR-T均显著提升(图8),提示si-PD-1-CAR-T在细胞因子分泌和对靶细胞的清除率方面均显著提高。

3 讨论

近年来,过继细胞免疫疗法如肿瘤浸润淋巴细胞^[10]、T细胞受体改造的T细胞^[11-12]和CAR-T^[13]等被广泛应用于临床治疗恶性肿瘤。其中,靶向CD19、CD20和B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen,BCMA)的CAR-T疗法在血液系统恶性肿瘤治疗中的取得显著成效。目前,国内外已有数十个靶向CD19或BCMA靶点的CAR-T疗法上市,用于血液系统恶性肿瘤的治疗^[14]。

实体肿瘤呈团块样生长,一方面,肿瘤细胞与基质细胞、免疫细胞共同作用可形成肿瘤免疫抑制微环境^[15]。肿瘤细胞可通过PD-1/PD-L1等免疫检查点途径抑制机体自身免疫对肿瘤细胞的清除作用^[16-17]。因此,如何打破肿瘤微环境中的“免疫耐受”,对于提升免疫细胞抗肿瘤能力,具有极大的研究价值。另一方面,肿瘤细胞具有异质性^[18],使得单一抗原很难完全覆盖所有肿瘤细胞;同时,肿瘤相关抗原不仅在肿瘤细胞上表达,也在部分正常组织中表达,这意味着正常组织也可能受到CAR-T攻击,从而造成“脱靶效应”^[19]。因此,筛选合适的靶点是靶向治疗和细胞治疗的基础。当前,已有多个靶点如磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC-3)、黏蛋白1(MUC1)、CD44、自然杀伤细胞组蛋白2样配体(NKG2DL)、间皮素(MSLN)、表皮生长因子受体(EGFR)应用于HCC的临床前和临床研究^[20-22],但这些抗原在正常组织中均有不同程度的表达。所以,针对上述抗原的CAR-T疗法在应用中可能导致CAR-T细胞攻击正常组织,靶向上述靶点的CAR-T疗法在临床应用存在有一定的风险。

本研究中选择FR α 抗原是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定的细胞表面糖蛋白,在正常组织中表达水平有限,但在某些肿瘤组织中过度表达,如卵巢癌^[23]、乳腺癌(尤其是三阴性乳腺癌)^[24],使其成为CAR-T治疗的理想靶点。目前,已有针对FR α 的CAR-T疗法的临床前研究用于治疗卵巢癌、三阴性乳腺癌等实体肿瘤^[25]。从分子机制上看,FR α 可以高亲和力和地结合并介导叶酸进入肝癌细胞,参与细胞代谢、影响细胞自噬,以及DNA合成和修复。一方面,叶酸结合FR α 可通过GP130共受体介导的JAK依赖性过程诱导STAT3激活^[26]。另一方面,FR α 在小窝囊泡中内化形成内小体,内小体降解后与溶酶体融合释放FR α 和叶酸。FR α 被转移到细胞核,并直接作为转录因子发挥调节某些肿瘤相关基因表达的作用^[27]。

本研究通过对TCGA数据库分析和流式细胞术检测部分肝癌细胞系发现,FR α 在肝癌组织和部分肿瘤细胞株中过表达,且其在正常组织中仅有低水平的表达。同

时,生存分析也显示,高表达FR α 的肝癌患者预后较差,提示FR α 抗原在肝癌的发生发展中可能发挥调控作用。因此,FR α 抗原可能是CAR-T疗法治疗HCC潜在的理想靶点。

CAR结构是CAR-T疗法发挥抗肿瘤作用的分子基础,本研究构建了包含结合FR α 的单链抗体、CD28共刺激因子及免疫受体酪氨酸活化基序CD3 ζ 的第二代CAR。CAR中的CD28可延长修饰后的CAR-T激活后的存留时间,并增加IL-2、IFN- γ 的分泌^[28]。当前制备CAR-T的基因递送工具主要有慢病毒载体、逆转录病毒载体、质粒DNA、mRNA以及转座子系统^[29-30],尽管各类递送工具都可实现CAR结构在T细胞中的表达,但慢病毒载体、逆转录病毒载体和转座子系统均通过将编码CAR结构的基因插入T细胞基因组以实现CAR的持续表达,存在因基因随机插入而导致的原癌基因激活等潜在的致癌风险。

当前,使用mRNA递送基因已被广泛研究,由于mRNA不需要进入细胞核且mRNA分子自身的不稳定性,通过电穿孔技术递送mRNA可以实现在T细胞中快速但非持续性地表达CAR。mRNA CAR-T的持久性上不及慢病毒或逆转录病毒载体制备的CAR-T,这在一定程度上限制了CAR-T疗效的持续性。同时,mRNA在体外具有不稳定性,制备与保存mRNA条件相对严苛,这在一定程度上增加了CAR-T制造的成本。但基于mRNA制备CAR-T细胞可能具有以下优势:首先,mRNA可以具有转染静止或慢速增殖细胞的能力,且其转导效率高^[31];其次,mRNA在翻译过程中没有基因组整合,因此不会造成基因组的随机插入^[32],进而提升CAR-T细胞的长期安全性;最后,使用mRNA制备CAR-T可以为新设计的CAR分子提供更快的调控途径来评估新CAR-T潜在肿瘤反应性,帮助快速筛选安全的靶标抗原^[33]。同时,其在体内的存留时间较短的劣势可通过多次输注CAR-T细胞来解决。

综上所述,FR α 是一个很有前景的肝癌治疗靶点,使用mRNA载体制备靶向FR α 的CAR-T细胞在体外表现出高效、特异的清除FR α 阳性的肝癌细胞的能力,通过敲低PD-1在FR α -CAR-T中的表达,可进一步增强CAR-T细胞抗肿瘤能力。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 温军业、叶学帅负责课题设计,资料分析,撰写论文;张浚琪、任行、张海强参与收集数据,修改论文;温军业、张海强、叶学帅负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] GANESAN P, KULIK LM. Hepatocellular carcinoma: New developments[J]. *Clin Liver Dis*, 2023, 27(1): 85-102. DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.004.
- [3] COURI T, PILLAI A. Goals and targets for personalized therapy for HCC[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(2): 125-137. DOI: 10.1007/s12072-018-9919-1.
- [4] SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, BÖLL B, SCHELLONGOWSKI P, et al. Critical care management of chimeric antigen receptor T-cell therapy recipients[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 78-93. DOI: 10.3322/caac.21702.
- [5] DRANSART B, DEGHANI H, MOORE A. Product-safety considerations in allogeneic chimeric antigen-receptor T-cell process flows[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 78: 102797. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102797.
- [6] CARNEIRO BA, EL-DEIRY WS. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- [7] SCARANTI M, COJOCARU E, BANERJEE S, et al. Exploiting the folate receptor α in oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(6): 349-359. DOI: 10.1038/s41571-020-0339-5.
- [8] GILBERT L, OAKNIN A, MATULONIS UA, et al. Safety and efficacy of mirvetuximab soravtansine, a folate receptor alpha (FR α)-targeting antibody-drug conjugate (ADC), in combination with bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2023, 170: 241-247. DOI: 10.1016/j.ygyno.2023.01.020.
- [9] YOUNG O, NGO N, LIN L, et al. Folate receptor as a biomarker and therapeutic target in solid tumors[J]. *Curr Probl Cancer*, 2023, 47(1): 100917. DOI: 10.1016/j.currprobcancer.2022.100917.
- [10] ZHAO YS, DENG J, RAO SF, et al. Tumor infiltrating lymphocyte (TIL) therapy for solid tumor treatment: Progressions and challenges[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(17): 4160. DOI: 10.3390/cancers14174160.
- [11] HE JJ, XIONG XX, YANG H, et al. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response[J]. *Cell Res*, 2022, 32(6): 530-542. DOI: 10.1038/s41422-022-00627-9.
- [12] ZHENG NB, FANG J, XUE G, et al. Induction of tumor cell autolysis by myxoma virus-infected CAR-T and TCR-T cells to overcome primary and acquired resistance[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9): 973-985.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.08.001.
- [13] DENLINGER N, BOND D, JAGLOWSKI S. CAR T-cell therapy for B-cell lymphoma[J]. *Curr Probl Cancer*, 2022, 46(1): 100826. DOI: 10.1016/j.currprobcancer.2021.100826.
- [14] YOUNG RM, ENGEL NW, USLU U, et al. Next-generation CAR T-cell therapies[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(7): 1625-1633. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1683.
- [15] XIAO Y, YU DH. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.
- [16] JIANG XJ, WANG J, DENG XY, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 10. DOI: 10.1186/s12943-018-0928-4.
- [17] VESELY MD, ZHANG TX, CHEN LP. Resistance mechanisms to anti-PD cancer immunotherapy[J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 45-74. DOI: 10.1146/annurev-immunol-070621-030155.
- [18] LEKO V, ROSENBERG SA. Identifying and targeting human tumor antigens for T cell-based immunotherapy of solid tumors[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4): 454-472. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.07.013.
- [19] UPADHYAY R, BOIARSKY JA, PANTSULAIA G, et al. A critical role for fas-mediated off-target tumor killing in T-cell immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 599-613. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0756.
- [20] WANG HZ, YE XS, JU Y, et al. Minicircle DNA-mediated CAR T cells targeting CD44 suppressed hepatocellular carcinoma both in vitro and vivo[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3703-3716. DOI: 10.2147/OTT.S247836.
- [21] SUN L, GAO F, GAO ZH, et al. Shed antigen-induced blocking effect on CAR-T cells targeting Glypican-3 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(4): e001875. DOI: 10.1136/jitc-2020-001875.
- [22] PANG NZ, SHI JX, QIN L, et al. IL-7 and CCL19-secreting CAR-T cell therapy for tumors with positive glypican-3 or mesothelin[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 118. DOI: 10.1186/s13045-021-01128-9.
- [23] SAITO S, KOYA Y, KAJIYAMA H, et al. Folate-appended cyclodextrin carrier targets ovarian cancer cells expressing the proton-coupled folate transporter[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(5): 1794-1804. DOI: 10.1111/cas.14379.
- [24] CHEUNG A, OPZOOMER J, ILIEVA KM, et al. Anti-folate receptor alpha-directed antibody therapies restrict the growth of triple-negative breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(20): 5098-5111. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0652.
- [25] LUANGWATTANANUN P, JUNKING M, SUJJITJOON J, et al. Fourth-generation chimeric antigen receptor T cells targeting folate receptor alpha antigen expressed on breast cancer cells for adoptive T cell therapy[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2021, 186(1): 25-36. DOI: 10.1007/s10549-020-06032-3.
- [26] NAWAZ FZ, KIPREOS ET. Emerging roles for folate receptor FOLR1 in signaling and cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33(3): 159-174. DOI: 10.1016/j.tem.2021.12.003.
- [27] SHARMA A, SEOW JJW, DUTERTRE CA, et al. Onco-fetal reprogramming of endothelial cells drives immunosuppressive macrophages in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2020, 183(2): 377-394.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.040.
- [28] ROSELLI E, BOUCHER JC, LI GB, et al. 4-1BB and optimized CD28 costimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(10): e003354. DOI: 10.1136/jitc-2021-003354.
- [29] MAGNANI CF, GAIPA G, LUSSANA F, et al. Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(11): 6021-6033. DOI: 10.1172/JCI138473.
- [30] HUANG RH, LI XP, HE YD, et al. Recent advances in CAR-T cell engineering[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 86. DOI: 10.1186/s13045-020-00910-5.
- [31] BILLINGSLEY MM, SINGH N, RAVIKUMAR P, et al. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(3): 1578-1589. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b04246.
- [32] SOUNDARA RAJAN T, GUGLIANDOLO A, BRAMANTI P, et al. In vitro-transcribed mRNA chimeric antigen receptor T cell (IVT mRNA CAR T) therapy in hematologic and solid tumor management: A pre-clinical update[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6514. DOI: 10.3390/ijms21186514.
- [33] MORETTI A, PONZO M, NICOLETTE CA, et al. The past, present, and future of non-viral CAR T cells[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867013. DOI: 10.3389/fimmu.2022.867013.

收稿日期: 2024-11-04; 录用日期: 2025-01-21

本文编辑: 刘晓虹

引证本文: WEN JY, ZHANG JQ, REN H, et al. Efficacy of chimeric antigen receptor T-cell with programmed cell death-1 knockdown targeting folate receptor alpha in killing hepatoma cells[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(6): 1128-1134.

温军业, 张俊琪, 任行, 等. 靶向叶酸受体 α (FR α)的程序性细胞死亡受体1敲低型嵌合抗原受体T细胞杀伤肝癌细胞的效果分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(6): 1128-1134.