

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01177

· 论 著 ·

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

马宜冬^{1△}, 王 真^{2△}, 巩睿智², 李林芳³, 吴红平³, 金华君^{3*}, 钱其军^{3*}

1. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院细胞生物学系, 苏州 215123

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院生物治疗科, 上海 200438

3. 第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 探讨靶向黏蛋白 1(mucin 1, MUC1)的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞株(CAR-T)对 MUC1 高表达肝癌细胞的特异杀伤能力。**方法** 分别构建第 1 代与第 3 代靶向 MUC1 的 CAR 基因表达框(MUC1-CAR 与 G3MUC1-CAR), 并将其装入慢病毒载体, 利用获得的重组慢病毒感染 Jurkat 细胞, 通过 CCK-8 法、ELISA 法、乳酸脱氢酶释放实验, 分别检测在 MUC1 抗原存在条件下, CAR-T 细胞的增殖、IL-2 分泌量、杀伤作用。**结果** 成功构建 2 种靶向 MUC1 嵌合抗原受体表达框的重组慢病毒 Jurkat CAR-T 细胞株。两种 Jurkat CAR-T 细胞均能特异识别 MUC1 分子, 杀伤 MUC1 高表达的肝癌细胞 QGY-7701, 而对 MUC1 低表达的正常肝细胞基本不杀伤; 第 3 代 CAR 修饰的 Jurkat T 细胞接触 MUC1 分子后, 其增殖速度、IL-2 分泌量和杀伤效率均优于第 1 代 MUC1 修饰细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 靶向 MUC1 的 Jurkat CAR-T 细胞能特异杀伤 MUC1 高表达的肝癌细胞。

[关键词] 嵌合抗原受体; 黏蛋白 1; Jurkat 细胞; 肝细胞癌**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1177-06

Specific cytotoxicity of MUC1 chimeric antigen receptor-engineered Jurkat T cells against hepatocellular carcinoma

MA Yi-dong^{1△}, WANG Zhen^{2△}, GONG Rui-zhi², LI Lin-fang³, WU Hong-ping³, JIN Hua-jun^{3*}, QIAN Qi-jun^{3*}

1. Department of Cell Biology, School of Biology and Basic Medical Sciences, Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

2. Tumor Immunology and Gene Therapy Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

3. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the specific cytotoxicity of MUC1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered Jurkat T cells against hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** The expression cassettes of both the first and the third generation MUC1-specific CAR gene (*i. e.* MUC1-CAR and G3MUC1-CAR) were constructed and cloned into lentivirus transfer plasmids, respectively. Then the obtained recombinant lentiviruses carrying the MUC1-specific CAR gene and hrGFP reporter genes were used to infect Jurkat T cells *in vitro* to establish MUC1-specific CAR-engineered Jurkat cells (*i. e.* CAR-T cells). Subsequently, the assays of CCK-8, ELISA, and LDH were used to detect the cell proliferation, IL-2 secretion and killing effect of the CAR-T cells, respectively. **Results** We successfully constructed the expression cassettes of MUC1-specific CAR gene and the corresponding recombinant lentivirus, established the MUC1-specific CAR-engineered Jurkat T cells. Both types of MUC1-specific CARs-engineered Jurkat T cells could recognize MUC1 molecule and specifically kill MUC1 over-expressed HCC cells while left normal hepatic cells almost undamaged. In addition, the cell proliferation, the secretion of IL-2

[收稿日期] 2014-04-12 **[接受日期]** 2014-08-06**[基金项目]** 艾滋病和病毒肝炎等重大传染病的防治重大专项(2013ZX10002-010-007); 上海工程技术研究中心专项课题(12DZ2251600). Supported by Grants for Major Infectious Diseases such as HIV/AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment (2013 ZX10002-010-007) and Special Project of Shanghai Engineering Technology Research Center(12DZ2251600).**[作者简介]** 马宜冬, 硕士生. E-mail: mayidong@live.cn; 王 真, 硕士. E-mail: wangzhenyangguang@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-65580677, E-mail: HJ-Jin@hotmail.com; Tel: 021-65580677, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

and killing effect of the G3MUC1-CAR-engineered Jurkat T cells was significantly superior to the MUC1-CAR-engineered counterpart ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** The MUC1-specific CAR-engineered Jurkat T cells can specifically kill MUC1 over-expressed HCC cells.

[Key words] chimeric antigen receptors; mucin 1; Jurkat cells; hepatocellular carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1177-1182]

近年来,利用肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)开展的过继细胞治疗在黑素瘤的治疗中取得令人振奋的临床效果^[1]。然而对大部分肿瘤而言,难以获得肿瘤特异性的 TIL 细胞^[2]。理想的替代方法就是对 T 细胞进行体外遗传操作,使其具备肿瘤特异性的增殖和杀伤功能。

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)由一个 scFv 单链抗体(由抗体 V_H 区氨基酸序列和 V_L 区氨基酸序列经 Linker 连接而成),通过铰链结构与源于 TCR 复合体或者 IgE 高亲和受体的跨膜和胞内信号结构域(源自 CD3 ζ /Fc ϵ RI γ 免疫受体酪氨酸活化基序、源自 CD28/4-1BB/OX40/ICOS/DAP10/LCK 共刺激信号分子胞内结构域)连接构成^[3]。经 CAR 遗传修饰的 T 细胞(CAR-T),能够高效识别和杀伤由于 MHC 分子或抗原加工相关蛋白酶体低表达、逃逸 TCR 介导免疫反应的肿瘤细胞^[4]。至目前为止,CAR 结构已发展至 3 代,涉及肿瘤抗原包括 CD19、HER2、CEA、PSCA 等,已有 29 项 CAR-T 进入临床试验^[5],取得理想的临床疗效。因此,本研究尝试应用 CAR 修饰的 T 细胞株特异杀伤高表达黏蛋白 1(mucin 1, MUC1)的肝癌细胞,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 限制性内切酶购自 NEB 公司(New England Biolabs);细胞株 HEK-293T、QGY-7701、L02、Jurkat 及质粒 pMD. G (QJ005)、pCMVdelta8.91 (QJ001)、pLV180 为本实验保存。MUC1 单链抗体基因克隆于 HMFG2, HMFG2 V_H: AM747043, HMFG2 V_L: AF042143^[6]。载体质粒结构设计主要参考 Sadelain 等^[7]设计的嵌合抗原受体的结构。各个基因在 GenBank 中的序列号如下: CD8a hinge + TM 基因序列号为 AY039664.1, CD28 基因序列号为 XM_006712862.1, CD137 基因序列号为 U03397.1, CD3 ξ 基因序列号为 AF228312.1, 质粒载体基因交由捷瑞(Generay)公

司全基因合成。2 mol/L CaCl₂, 2 \times Hank 液由实验室自配。Cell Counting Kit-8(碧云天,产品编号 C0037),乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(碧云天,产品编号 C0017),人 IL-2 ELISA kit(上海依科赛公司,货号 EH002-96)。Human MUC-1 Allophycocyanin MAb (Clone 604804); Mouse IgG2B, Mouse IgG2B Allophycocyanin Isotype Control (同型对照)均购自 R&D 公司。Recombinant human MUC1-Fc(Sinobiological 公司,12123-H02H); Purified Mouse Anti-Human CD3 ξ (BD 公司,货号 551033)。

1.2 质粒的构建与鉴定 将全基因合成的 Anti-MUC1(V_H-V_L)-CD3 ζ -F2A-hrGFP 和 CD28-CD137-CD3 ζ -F2A-hrGFP 基因通过基础分子克隆技术装入慢病毒载体,分别构建 pLV180-MUC1-CAR-F2A-hrGFP 与 pLV180-G3MUC1-CAR-F2A-hrGFP, 以及不含 CAR 基因的对照载体 pLV180-hrGFP。

1.3 慢病毒包装 将 HEK-293T 细胞 4 \times 10⁶/孔的密度铺于 100 mm 培养皿中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养至 60%~80% 融合度时,换 8 mL 无血清 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养。2 h 后,用三质粒磷酸钙法包装慢病毒,具体步骤如下:在 1 个 10 mL 离心管中加慢病毒载体质粒 30 μ g, pCMVdelta8.91 (QJ001) 20 μ g, pMD. G (QJ005) 10 μ g, 2 mol/L CaCl₂ 124 μ L, 加双蒸水补全至 1 mL, 再加 1 mL 2 \times Hank, 充分混匀,室温静置 20 min, 然后逐滴加入到上述 100 mm 培养皿中,37 $^{\circ}$ C、3% CO₂ 孵箱培养,6~8 h 后,换新鲜含 10% 胎牛血清的 DMEM 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养。48 h 和 72 h 后分别收集 100 mm 培养皿中含病毒的上清液,离心去除细胞碎片,0.45 μ m 滤膜(Millipore)过滤后,将病毒上清液移入 Millipore 浓缩柱,离心 30 min,浓缩至 100~200 μ L,将浓缩的病毒液移入 EP 管,-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.4 慢病毒感染 Jurkat 细胞 将生长状态良好的

Jurkat 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中, 加无血清 RPMI 1640 培养基至 2 mL, 加入 $2 \mu\text{L}$ $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene, 加入 $100 \mu\text{L}$ 纯化病毒液, 混匀, 于 37°C 、 5% CO_2 孵箱培养, 8 h 后换成 10% FBS 的 RPMI 1640 培养, 48 h 后观察绿色荧光。

1.5 Western 印迹检测 CAR 表达 离心收集生长状态良好的经慢病毒感染的 5×10^5 个 Jurkat 细胞株, 用预冷的生理盐水清洗 2 遍, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 $160 \mu\text{L}$, 放在冰盒中于摇床上轻微摇晃, 30 min 后加 $40 \mu\text{L}$ $5 \times$ 上样 buffer, 然后在 100°C 水浴锅里煮沸 10 min, 蛋白样品保存于 -80°C 冰箱或直接使用。配制好 SDS-PAGE 蛋白胶, 点样, 跑电泳, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入稀释过的一抗, 4°C 冰箱过夜, 取出膜后, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入稀释过的二抗, 孵育 2 h, 取出膜后, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加显色剂, 最后在凝胶成像仪上拍照。

1.6 细胞增殖实验 用 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ MUC1 抗原蛋白包被 96 孔板过夜, 第 2 天, 用 PBS 洗 1 遍, 每孔加入 2 000 个 Jurkat 细胞, 补齐培养液至 $100 \mu\text{L}$, 37°C 、 5% CO_2 孵箱孵育 48 h。每孔加 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 37°C 、 5% CO_2 培养 90 min, 在 450 nm 测定光密度值 (D)。详细步骤参见 CCK-8 kit 使用说明书。

1.7 肝癌细胞 MUC1 表达水平及 IL-2 的测定 将生长状态良好的 QGY-7701 和 L02 细胞消化下来, 离心收集, 用 PBS 清洗 2 遍, 加入抗体, 室温孵育 30 min 后, 用 PBS 洗 2 次, 重悬浮, 上样, 经流式细胞仪检测肝癌细胞 MUC1 表达水平。将 5 000 个 Jurkat-CAR 和 5 000 个 QGY-7701 或 L02 细胞在 24 孔板中共培养, 48 h 后离心 2 min, 收取 $200 \mu\text{L}$ 上清, 使用人 IL-2 ELISA kit 检测 IL-2 含量, 具体步骤参见人 IL-2 ELISA kit 使用说明书。

1.8 杀伤实验 接种 $100 \mu\text{L}$ 1×10^4 /孔的靶细胞 (QGY-7701 或 L02) 到 96 孔细胞培养板中, 按不同效靶比 (E/T 值 $0.5 : 1$ 、 $1 : 1$ 、 $2 : 1$ 、 $4 : 1$ 、 $8 : 1$ 、 $16 : 1$) 加入 Jurkat-CAR 细胞, 补培养液至 $200 \mu\text{L}$, 37°C 、 5% CO_2 共培养 24 h。共培养 24 h 后, 从细胞培养箱里取出细胞培养板, 在只接种 QGY-7701 或 L02 细胞的培养孔中加入试剂盒提供的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放试剂, 加入量为原有培养液体积的 10% ($20 \mu\text{L}$)。加入 LDH 释放试剂后, 反复吹打数次混

匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育。1 h 后, 将细胞培养板用多孔板离心机 $400 \times g$ 离心 5 min。分别取各孔的上清液 $120 \mu\text{L}$, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。各孔分别加入 $60 \mu\text{L}$ LDH 检测工作液。混匀, 室温 (约 25°C) 避光孵育 30 min (可用铝箔包裹后置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动)。然后在 490 nm 处测定光密度值。详细步骤参见乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒使用说明书。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 质粒的构建与鉴定 构建了第 1 代 CAR (pLV180-MUC1-CAR-F2A-hrGFP) 和第 3 代 CAR (pLV180-G3MUC1-CAR-F2A-hrGFP) 慢病毒载体, CAR 结构简图见图 1。pLV180-G3MUC1-CAR-F2A-hrGFP、pLV180-MUC1-CAR-F2A-hrGFP、pLV180-hrGFP 质粒经 3 组酶切后经电泳鉴定正确 (图 2)。

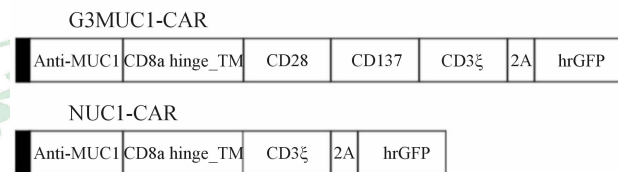


图 1 CAR 结构简图

Fig 1 Schematic structure of CAR

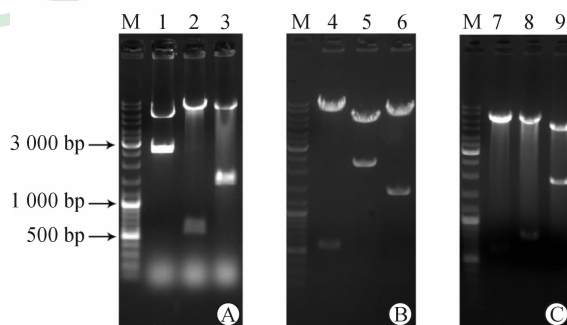


图 2 质粒电泳鉴定图

Fig 2 Electrophoresis identification of digested plasmid

A: pLV180-G3MUC1-CAR-F2A-hrGFP. 1: *Nhe* I + *Sa* II ($2\ 500 \text{ bp} + 6\ 300 \text{ bp}$), 2: *Cla* I + *Nhe* I ($560 \text{ bp} + 8\ 300 \text{ bp}$), 3: *Eco*R I + *Xba* I ($1\ 600 \text{ bp} + 7\ 200 \text{ bp}$). B: pLV180-MUC1-CAR-F2A-hrGFP. 4: *Cla* I + *Nhe* I ($560 \text{ bp} + 8\ 100 \text{ bp}$), 5: *Nhe* I + *Xho* I ($2\ 200 \text{ bp} + 6\ 300 \text{ bp}$), 6: *Eco*R I + *Xho* I ($1\ 400 \text{ bp} + 7\ 200 \text{ bp}$); C: pLV180-hrGFP. 7: *Cla* I + *Eco*R I ($560 \text{ bp} + 6\ 600 \text{ bp}$), 8: *Eco*R I + *Bam*H I ($720 \text{ bp} + 6\ 400 \text{ bp}$), 9: *Nco* I ($1\ 800 \text{ bp} + 5\ 300 \text{ bp}$). M: Marker

2.2 慢病毒包装及感染 Jurkat 细胞结果 应用三质粒磷酸钙法感染 HEK-293T 细胞, 获取携带嵌合抗原受体基因的重组慢病毒。感染 24 h 后, 在荧光显微镜下表达绿色荧光的 HEK-293T 细胞达到 80% 以上, 表明含绿色荧光基因的慢病毒载体质粒在 HEK-293T 细胞能高效地包装携带嵌合抗原受体基因的慢病毒。将得到的含慢病毒载体的上清经离心纯化后, 感染 Jurkat T 细胞, 传代培养 3 代后, 在荧光显微镜下观察表达绿色荧光的 Jurkat T 细胞达到 95% 以上(图 3), 由此可以确定包装的慢病毒滴度很高, 可以有效感染 Jurkat T 细胞株, 构建携带 CAR 的 Jurkat T 细胞株。

胞, 其是否接受 MUC1 蛋白抗原刺激增殖速度没有明显差别。

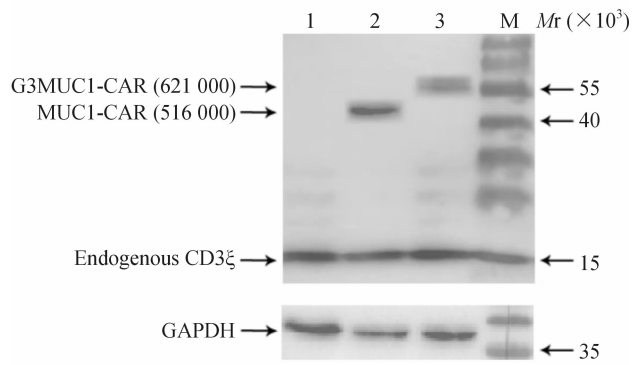


图 4 Jurkat-CAR T 细胞裂解物的免疫印迹图

Fig 4 Immunoblotting analysis of Jurkat-CAR T cell lysates M: Marker; 1: Control; 2: MUC1-CAR; 3: G3MUC1-CAR

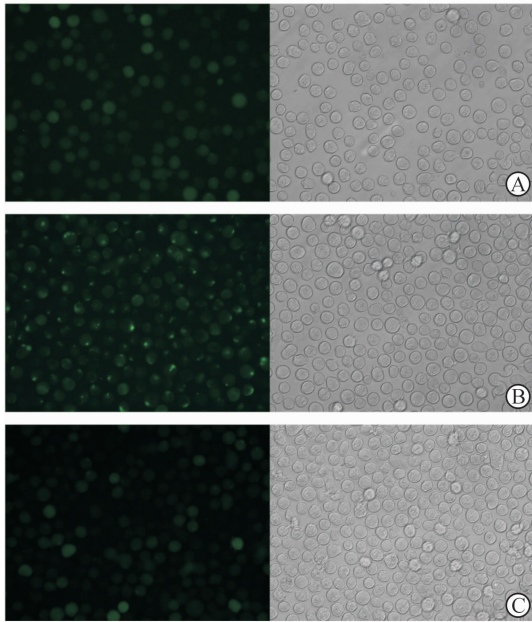


图 3 慢病毒感染 Jurkat T 细胞荧光图

Fig 3 Jurkat T cells infected by lentivirus under fluorescence microscope

A: Jurkat T cells infected by lenti-G3MUC1-CAR-F2A-hrGFP; B: Jurkat T cells infected by lenti-MUC1-CAR-F2A-hrGFP; C: Jurkat T cells infected by lenti-hrGFP. Original magnification: $\times 400$

2.3 Western 印迹检测 CAR 在 Jurkat 细胞中的表达 Western 印迹检测结果(图 4)表明: Jurkat T 细胞高表达 CAR 蛋白。

2.4 增殖实验结果 Jurkat-CAR 细胞在受到 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被 MUC1 蛋白抗原刺激 48 h 后比 Jurkat-CAR 细胞单独培养增殖速度快(图 5), 其中 Jurkat-G3MUC1-CAR 细胞快 67%, Jurkat-MUC1-CAR 细胞速度快 23%。对照组为 Jurkat-hrGFP 细

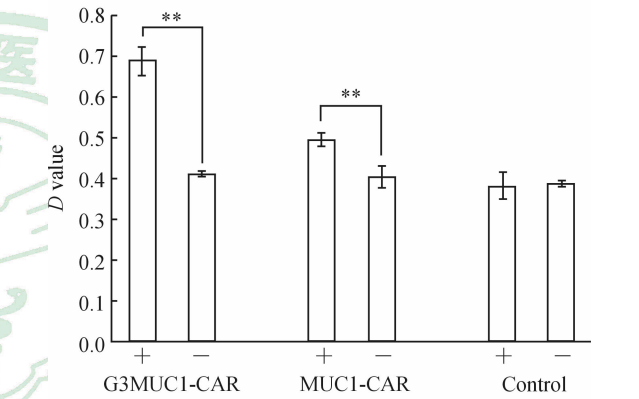


图 5 Jurkat-CAR 细胞株在 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被 MUC1 蛋白抗原刺激 48 h 后细胞增殖柱状图

Fig 5 Proliferation of Jurkat-CAR T cells 48 h after stimulation of $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ recombinant protein MUC1

+: Jurkat T cells co-cultured with MUC1-Fc, -: Jurkat T cells alone; * $P < 0.01$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.5 IL-2 的检测结果 流式检测表明: 肝癌细胞株 QGY-7701 高量表达 MUC1, 而正常肝细胞 L02 MUC1 表达量低。ELISA 检测 Jurkat T 细胞与 QGY-7701 共培养上清中的 IL-2 量。结果(图 6)表明: 第 3 代和第 1 代 MUC1-CAR Jurkat T 细胞与 7701 共培养分泌 IL-2 的量明显高于 MUC1-CAR T 细胞单独培养, 第 3 代 MUC1-CAR T 细胞分泌 IL-2 的量明显高于第 1 代 MUC1-CAR Jurkat T 细胞; 第 3 代和第 1 代 MUC1-CAR T 细胞与 L02 共培养分泌, 只有第 3 代 MUC1-CAR T 细胞分泌 IL-2 的量区别于第 3 代 MUC1-CAR T 细胞单独培养, 其余都无明显区别, Jurkat 分泌 IL-2 的量都停留在本体水平。

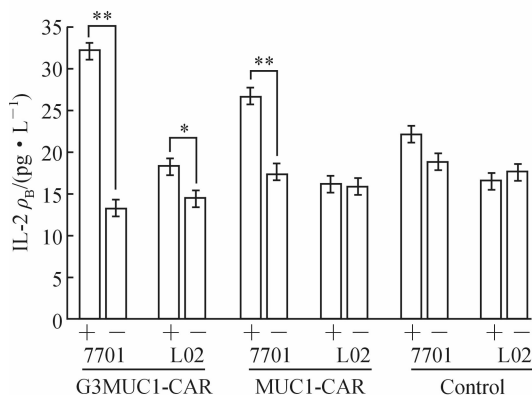


图 6 IL-2 在不同 Jurkat-CAR 细胞株中的表达量

Fig 6 ELISA results for IL-2 secretion of different Jurkat-CAR cells

+: Jurkat T cells co-cultured with QGY-7701/L02, -: Jurkat T cells alone; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.6 杀伤实验结果 结果(图 7)表明:随着 E/T 值的升高, Jurkat T 细胞杀伤 QGY-7701 细胞能力逐渐增强。其中,在 E/T = 16 时, Jurkat-G3MUC1-CAR 杀伤 QGY-7701 细胞达到 88%, Jurkat-MUC1-CAR 杀伤 QGY-7701 细胞达到 65%, 对照组杀伤 QGY-7701 细胞达到 51%, 可见经嵌合抗原受体修饰的 Jurkat T 细胞能有效杀伤 MUC1 高表达的 QGY-7701 肝癌细胞。Jurkat T 细胞对 L02 细胞的杀伤作用无显著差异, 表明 MUC1-CAR 的修饰未增强 Jurkat 细胞对 L02 的本底杀伤活性。

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见恶性肿瘤之一, 预后差、死亡率高。大多数患者发现时已处于中晚期, 丧失手术机会, 且其对化疗敏感性差, 因而亟需研发其他治疗手段应用于肝癌, 尤其是中晚期肝癌的临床治疗。MUC1 是一种大分子跨膜糖蛋白, 广泛高表达于乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌和胰腺癌等恶性肿瘤, 其胞外区主要由 20 个氨基酸 (PDTRPAPGSTAPPAHGVTS) 的核心重复序列组成, 是 MUC1 蛋白糖基化修饰位点, 且相对于正常细胞, 肿瘤细胞表面 MUC1 具有不同的糖基化结构^[8]。过表达和糖基化异常都使 MUC1 成为各种免疫治疗的理想靶点。其中, 根据 MUC1 核心重复序列设计的脂质体癌症疫苗 (L-BLP25) 能高效激活患者免疫反应, 已进入 III 期临床试验^[9]; 抗 MUC1 的抗体 Yttrium-90-labeled muHMFG 联合化疗治

疗卵巢癌, 已经进入 III 期临床试验^[10]。

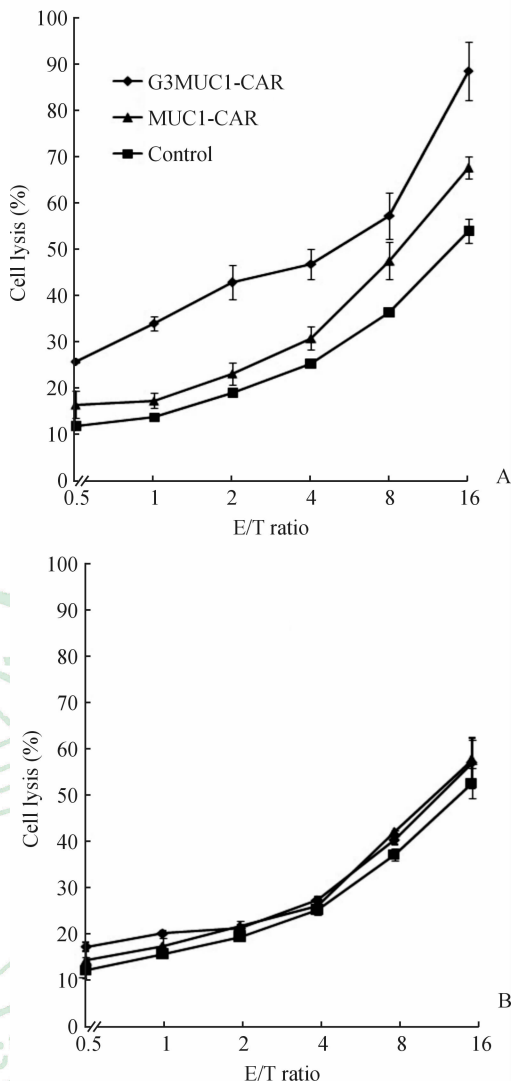


图 7 Jurkat-CAR 细胞株在不同效靶比时的杀伤效果折线图

Fig 7 QGY-7701 and L02 lysis at indicated effector/target ratios of Jurkat-CAR cells

A: QGY-7701; B: L02. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

本研究应用肿瘤过继细胞治疗策略, 将 MUC1 作为靶点用于肝癌治疗。本研究克隆了抗原决定簇位于 MUC1 蛋白异常糖基化位点的 MUC1 单链抗体 (HMFG2) 基因, 分别构建了针对 MUC1 分子的第 1 代与第 3 代 MUC1 嵌合抗原受体 (MUC1-CAR/G3MUC1-CAR), 并将其装载到慢病毒载体, 利用包装获得的重组慢病毒感染 Jurkat T 细胞, 分别构建了表达第 1 代和第 3 代 MUC1 特异性 CAR 的 Jurkat T 细胞株, 验证了该 CAR-T 细胞对肝癌细胞的杀伤功能与杀伤特异性。结果表明, 相对于对照, 两种经 MUC1 嵌合抗原受体修饰的 Jurkat T 细胞均能特异识别 MUC1 分子, 杀伤 MUC1 高表达

的肝癌细胞 QGY-7701,而对 MUC1 低表达的正常肝细胞基本不杀伤。此外,第 3 代 CAR(G3MUC1-CAR)修饰的 Jurkat T 细胞接触 MUC1 分子后,其增殖速度、IL-2 分泌量和杀伤效率均优于第 1 代 MUC1 修饰细胞 (MUC1-CAR)。本研究结果为应用 MUC1-CAR 修饰的患者原代 T 细胞用于肝癌过继性免疫细胞治疗的研究提供了实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480: 480-489.

[2] Rosenberg S A. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8: 577-585.

[3] Ramos C A, Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11: 855-873.

[4] Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3: 388-398.

[5] Ertl H C, Zaia J, Rosenberg S A, June C H, Dotti G, Kahn J, et al. Considerations for the clinical application

of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 3175-3181.

[6] Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies D M, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 4901-4909.

[7] Kloss C C, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 71-75.

[8] Bakhtiari S H, Rahbarizadeh F, Hasannia S, Ahmadvand D, Iri-Sofla F J, Rasaei M J. Anti-MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2009, 28: 85-92.

[9] Butts C, Socinski M A, Mitchell P L, Thatcher N, Havel L, Krzakowski M, et al. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 59-68.

[10] Oei A L, Moreno M, Verheijen R H, Sweep F C, Thomas C M, Massuger L F, et al. Induction of IgG antibodies to MUC1 and survival in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 1848-1853.

[本文编辑] 贾泽军