

泊马度胺联合 CAR-T 细胞对多发性骨髓瘤细胞株 RPMI8226、U266 细胞的体外杀伤作用

王蕾 张姝婷 欧剑锋 白海

【摘要】 目的 观察 CD138-CAR-T 细胞对人多发性骨髓瘤(MM)细胞株 RPMI8226 和 U266 细胞的杀伤作用,探讨泊马度胺对 CD138-CAR-T 细胞及其杀伤作用的影响。方法 采用 CFSE/7-AAD 双标法检测 CD138-CAR-T 细胞及其联合泊马度胺对 RPMI8226、U266 细胞的杀伤活性。ELISA 法检测 CD138-CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 的变化。结果 CD138-CAR-T 细胞作用 18 h 后,对 RPMI8226、U266 细胞的杀伤活性分别为(55.2 \pm 3.9)%、(85.1 \pm 2.4)%,对照组分别为(7.0 \pm 1.5)%、(12.5 \pm 2.1)%,差异均有统计学意义(P 值均 <0.01);与 CD138-CAR-T 细胞组比较,CD138-CAR-T 细胞联合泊马度胺(2.5 μ g/ml)作用 18 h 后,对 RPMI8226、U266 细胞的杀伤活性差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。与 CD138-CAR-T 细胞组比较,CD138-CAR-T 细胞和 MM 细胞共培养组 IFN- γ 分泌水平显著增高;与共培养组比较,加入泊马度胺后能显著促进 IFN- γ 的释放,差异均有统计学意义(P 值均 <0.01)。结论 CD138-CAR-T 细胞对 MM 细胞及耐药细胞株均有明显的杀伤作用;其与 MM 细胞共培养能促进后者 IFN- γ 的分泌;泊马度胺能促进 CD138-CAR-T 细胞分泌 IFN- γ 。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 泊马度胺; T 淋巴细胞; 嵌合抗原受体

Cytotoxicity of pomalidomide combined CAR-T cell for multiple myeloma cell RPMI8226 and U266

Wang Lei, Zhang Shuting, Ou Jianfeng, Bai Hai. Department of Hematology, Center of Hematologic Diseases of Chinese PLA; Lanzhou Military Area General Hospital, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Bai Hai, Email: baihai98@tom.com

【Abstract】 **Objective** To observe the cytotoxicity of CD138-CAR-T cells on human multiple myeloma cell RPMI8226 and U266 cells and explore the impact of pomalidomide on the cytotoxicity of CD138-CAR-T on RPMI8226 and U266 cells. **Methods** The cytotoxicity of CD138-CAR-T and CD138-CAR-T combined pomalidomide on RPMI8226 and U266 was detected by CFSE/7AAD. The effector cells were co-cultured with target cells at 5:1 for 18 h, and then the supernatant were collected and used for ELISA assays. **Results** After 18 h co-culture, the cytotoxicity of CD138-CAR-T on RPMI8226 and U266 was significantly higher than control ($P<0.01$). There was no significant change on the cytotoxicity of pomalidomide combined with CD138-CAR-T on RPMI8226 and U266. The results showed that co-cultured system contributed to a markedly increased production of IFN- γ , after adding pomalidomide to the co-cultured system. It can significantly enhance the production of IFN- γ , compared with CD138-CAR-T alone. **Conclusions** CD138-CAR-T had significantly cytotoxicity on U266 and RPMI8226. Pomalidomide could promote CD138-CAR-T cells IFN- γ production.

【Key words】 Multiple myeloma; Pomalidomide; T-lymphocytes; Chimeric antigen receptors

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)仍然是一种无法治愈的恶性浆细胞肿瘤,尽管近年来患者的缓解率和总生存率有了显著的提高,但绝大多数

的患者最终仍摆脱不了疾病复发或进展^[1]。因此,迫切需要新的治疗策略来进一步延长患者的总生存和无病生存期。泊马度胺(Pomalidomide, CC-4047)是沙利度胺的衍生物,属第三代免疫调节剂。嵌合抗原受体(CAR)-T 细胞能特异性地识别、杀伤肿瘤细胞^[2]。与传统 T 淋巴细胞相比, CAR-T 细胞在识别肿瘤表面抗原的同时,无 MHC 限制^[3-4]。CD138 主要表达在肿瘤和非肿瘤性浆细胞,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.011

基金项目:国家自然科学基金(81372132)

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院血液科

通信作者:白海, Email: baihai98@tom.com

以及上皮细胞,已被作为MM诊断的主要标志物^[5-6]。CD138在MM细胞中的高表达,可将其作为CAR-T细胞治疗MM的靶目标。在本研究中我们观察了CD138-CAR-T细胞对体外培养的人MM细胞株RPMI8226、U266细胞的杀伤活性以及泊马度胺对CAR-T细胞的影响。

材料和方法

1. 主要试剂与仪器:实验用泊马度胺购自美国 Selleckhem 公司, RPMI 1640 培养液购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,流式细胞仪 FACSCalibur、凋亡试剂 CFSE/7-AAD、CD138 抗体购自美国 BD 公司,ELISA 试剂盒为美国 eBioscience 公司产品。酶标仪为美国 Bio Tek 公司产品。

2. 实验用细胞:CD138⁺的人MM细胞株 RPMI8226、U266 细胞购自博生吉医药科技(苏州)有限公司,CD138⁻的人肾上皮细胞系 293T 细胞由博生吉医药科技(苏州)有限公司惠赠,第二代 CAR-T 细胞及转染未携带目的基因的慢病毒空载体(CMV)-T 细胞由博生吉医药科技(苏州)有限公司构建并提供。

3. 细胞培养:CD138-CAR-T 细胞及 CMV-T 细胞均采用 Persongen 人淋巴细胞培养技术扩增培养;RPMI8226、U266 和 293T 细胞均在含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞进行实验。实验重复 3 次。

4. CFSE/7-AAD 双标法检测 CAR-T 细胞的体外杀伤活性:将靶细胞(RPMI8226、U266 和 293T 细胞)转移至离心管离心收集细胞,PBS 洗涤 2 次,以预温的 CFSE-PBS 重悬细胞(CFSE 终浓度为 1.25 μmol/L),37℃ 放置 5 min;加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液洗涤 1 次,于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中 37℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤 1 次。用培养液重悬细胞并调整密度为 5×10⁵/ml。收集并调整效应细胞(CAR-T、CMV-T 细胞)密度为 5×10⁶/ml,在 24 孔培养板中将效靶细胞按 5:1 比例混合,孵育 18 h 后加入 2 μl/ml 7-AAD,上流式细胞仪检测 CFSE⁺7-AAD⁺细胞(死亡的靶细胞)百分比。每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。

5. 泊马度胺联合 CAR-T 细胞的体外杀伤活性:实验分为 CAR-T 细胞组及联合组。联合组为向 U266、RPMI 8226 细胞中加入终浓度为 2.5 μg/ml 的

泊马度胺。CAR-T 细胞与 U266、RPMI8226 细胞按 5:1 比例混合,孵育 18 h 后上流式细胞仪检测对靶细胞的杀伤活性。每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。

6. ELISA 法测定 CAR-T 细胞上清中 IFN-γ 的表达水平:ELISA 法检测培养上清液中 IFN-γ 的分泌水平,按试剂盒说明书进行实验操作。每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次。

7. 统计学处理:采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对资料进行 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. CD138 在 RPMI 8226、U266、293T 上的表达:流式细胞术检测结果显示,CD138 在 RPMI 8226、U266 细胞阳性表达(阳性率>92%),在 293T 细胞阴性表达。

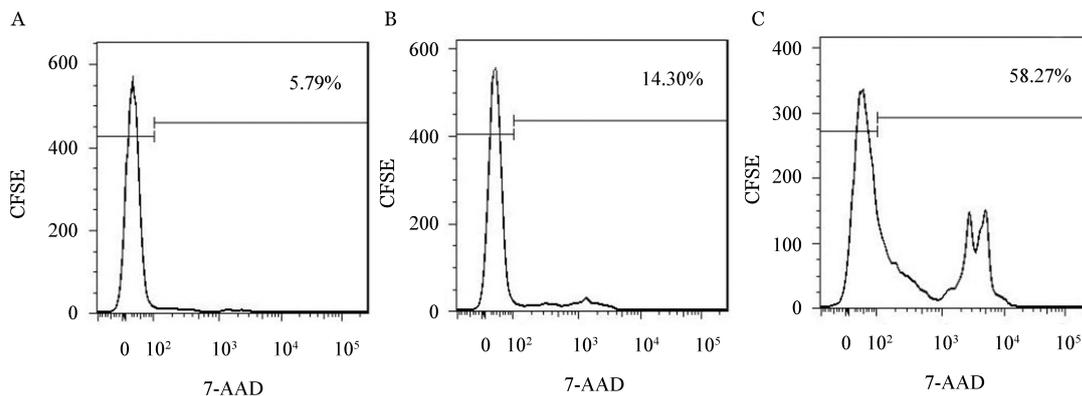
2. CD138-CAR-T 细胞的体外杀伤活性:结果显示 CD138-CAR-T 细胞对 RPMI 8226、U266 细胞的杀伤作用明显强于 CMV-T 细胞组,差异有统计学意义(*P*<0.01);CD138-CAR-T 细胞对 CD138⁺ 的 RPMI 8226、U266 细胞的杀伤作用明显强于 CD138⁻ 的 293T 细胞,差异有统计学意义(*P*<0.01)(表 1,图 1)。

表 1 CD138 嵌合抗原受体 T 细胞(CD138-CAR-T 细胞)对 RPMI8226、U266、293T 细胞的体外杀伤活性比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	U266 细胞	RPMI8226 细胞	293T 细胞
对照组	12.5±2.1	7.0±1.5	
CMV-T 细胞组	22.2±3.0	12.5±2.2	15.6±2.0
CD138-CAR-T 细胞组	85.1±2.4 ^{ab}	55.2±3.9 ^{ab}	16.9±2.0

注:对照组的结果为细胞的自然杀伤率;CMV:转染未携带目的基因的慢病毒空载体;与 CMV-T 细胞组比较,^a*P*<0.01;与 293T 细胞组比较,^b*P*<0.01;每组实验设 3 个复孔,实验重复 3 次

3. 泊马度胺联合 CD138-CAR-T 细胞对细胞体外杀伤活性和 IFN-γ 分泌水平的影响:泊马度胺联合 CD138-CAR-T 细胞组和 CD138-CAR-T 细胞组对 RPMI8226、U266 细胞的杀伤率比较,差异均无统计学意义(*P*值均>0.05)(表 2,图 2)。CD138-CAR-T 细胞 IFN-γ 分泌水平为 (23.3 ± 3.3) mg/L,CD138-CAR-T 细胞与 RPMI8226、U266 细胞共培养组 IFN-γ 分泌水平较单独的 CD138-CAR-T 细胞组



A:对照组(结果为细胞的自然杀伤率); B:转染未携带目的基因的慢病毒空载体的T细胞; C:CD138-CAR-T细胞
 图1 流式细胞术检测CD138嵌合抗原受体T细胞(CD138-CAR-T细胞)对RPMI8226细胞的体外杀伤活性

表2 泊马度胺联合CD138嵌合抗原受体T细胞(CD138-CAR-T细胞)对RPMI8226、U266细胞IFN-γ分泌水平的影响(̄x±s)

组别	U266细胞		RPMI8226细胞	
	杀伤活性(%)	IFN-γ水平(mg/L)	杀伤活性(%)	IFN-γ水平(mg/L)
CD138-CAR-T细胞组	87.5±2.3	52.7±2.6	56.2±3.8	43.4±2.7
泊马度胺联合CD138-CAR-T细胞组	86.1±2.4	70.3±2.8*	57.1±3.7	65.6±3.4*

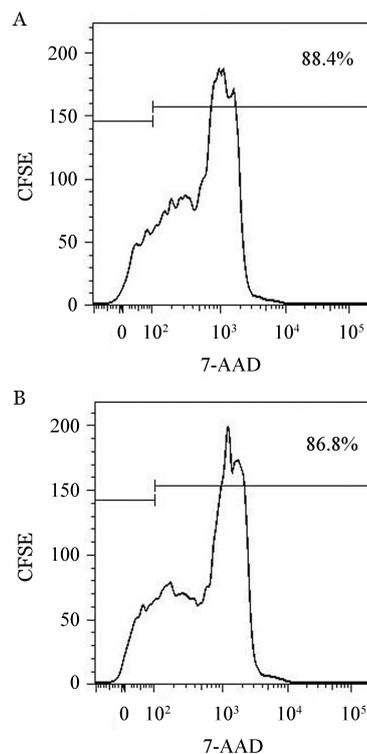
注:与CD138-CAR-T细胞组比较,*P<0.01;每组实验设3个复孔,实验重复3次

显著增高;与共培养组比较,加入泊马度胺后能显著促进IFN-γ的释放,差异均有统计学意义(P值均<0.01)(表2)。

讨 论

MM是浆细胞的恶性肿瘤,MM细胞在骨髓内克隆性增殖。虽然近年来MM患者的疗效有所提高,但均无法实现治愈。通过基因修饰的免疫细胞(主要包括T细胞和NK细胞)表达肿瘤的相关抗原,即CAR细胞,已成为治疗血液系统恶性肿瘤非常有前景的治疗手段^[7-8]。

目前,采用CAR-T细胞治疗B细胞恶性肿瘤已取得实质性进展,特别是针对CD19分子的CAR-T细胞,现已证明了其在B细胞急性淋巴细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病的卓越疗效^[9-10]。但CD19分子在超过95%的MM患者中缺少表达^[11],寻找合适的肿瘤抗原是治疗MM的前提条件。基于CD138在骨髓瘤浆细胞表面特异性高表达,且抗CD138单克隆抗体(maytansinoid conjugates)已被证明对CD138⁺的MM细胞有较强的选择性细胞毒性作用^[12-13],且杀伤肿瘤无MHC限制性^[14]。由于第一代CAR缺乏T细胞活化所必须的双信号模式,致使不能完全活化,第三代CAR又很容易因低亲和力等



A:泊马度胺联合CD138-CAR-T细胞;B:CD138-CAR-T细胞
 图2 流式细胞术检测泊马度胺联合CD138嵌合抗原受体T细胞(CD138-CAR-T细胞)对U266细胞体外杀伤活性的影响

原因造成细胞因子风暴。况且,从美国的一些临床

试验看,第二代与第三代CAR在治疗效果上差异不大,所以本次研究选取第二代CAR作为载体。

已有研究证实泊马度胺在血液肿瘤中有明确的疗效^[15]。本实验室前期的研究显示,泊马度胺对MM细胞株RPMI8226没有作用。临床治疗中,并不是所有的患者都会对泊马度胺或者其他药物有治疗反应,耐药或治疗效果较差的情况并不少见。因此CAR-T细胞便是极为有效的治疗方法。我们的研究结果显示CAR-T细胞对U266、RPMI8226细胞有明显的杀伤效果,解决了RPMI8226细胞的耐药问题。且CD138-CAR-T细胞和肿瘤细胞共孵育可以促进IFN- γ 的分泌,均有助于体内外对肿瘤细胞的杀伤。在MM的治疗中,单独一种方案也许并不是治疗的最有效的手段,可以选取其他方案协同治疗^[16]。泊马度胺和CD138-CAR-T细胞均为治疗MM的方法。我们在实验中发现,虽然泊马度胺对CD138-CAR-T细胞的杀伤活性没有影响,但能促进CD138-CAR-T细胞分泌IFN- γ 。这是否说明在体内可发挥作用,还有待于进一步改进实验效靶比、药物作用的时间及顺序,特别是需要动物实验的验证。

综上所述,CAR-T细胞对MM细胞有非常显著的杀伤效果,不受MHC限制,对耐药的MM细胞效果也较好。这为将来更好地治疗MM提供了参考。

参考文献

- [1] Hart AJ, Jagasia MH, Kim AS, et al. Minimal residual disease in myeloma: are we there yet? [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(12):1790-1799.
- [2] Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2):215-223.
- [3] Lonial S, Mitsiades CS, Richardson PG. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1264-1277.
- [4] Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(8): 479-491.
- [5] Brown CE, Starr R, Aguilar B, et al. Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13R α 2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redirected T Cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8): 2199-2209.
- [6] Kershaw MH, Teng MW, Smyth MJ, et al. Supernatural T cells: genetic modification of T cells for cancer therapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(12): 928-940.
- [7] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733.
- [8] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-1518.
- [9] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra138.
- [10] Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5): 267-276.
- [11] Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(16): 2737-2744.
- [12] Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, et al. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 4028-4037.
- [13] Rousseau C, Ferrer L, Supiot S, et al. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B- B4) antibody in multiple myeloma patients [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(3): 679-688.
- [14] Ito F, Chang AE. Cancer immunotherapy: current status and future directions [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013, 22(4): 765-783.
- [15] Lacy MQ, McCurdy AR. Pomalidomide [J]. *Blood*, 2013, 122(14):2305-2309.
- [16] Chu J, Deng Y, Benson DM, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2014, 28(4): 917-927.

(收稿日期:2014-12-07)

(本文编辑:刘志红)