

PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞抗急性髓系白血病作用的影响

林国强^{1,2} 张彦明² 康立清³ 俞磊³ 吴德沛¹

¹苏州大学附属第一医院血液科,国家血液系统疾病临床医学研究中心,江苏省血液研究所,国家卫生健康委员会血栓与止血重点实验室 215006;²徐州医科大学附属淮安医院,淮安市第二人民医院血液科 223002;³上海优卡迪生物医药科技有限公司,上海 201203

通信作者:吴德沛,Email:wudepei@suda.edu.cn

【摘要】 目的 探讨程序性死亡受体配体 1(PD-L1)对 CLL-1 CAR-T 细胞抗急性髓系白血病(AML)作用的影响。方法 通过构建 PD-L1 表达载体、制备慢病毒、转导、单克隆筛选技术获得稳定表达 PD-L1 的 THP-1 单克隆细胞株(THP1-PDL1),然后以前期制备的 CLL-1 CAR-T 细胞为效应细胞,以 THP-1、THP1-PDL1 单克隆细胞株作为靶细胞,分别通过 LDH 检测、CBA 法、CFSE 法评价 PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞裂解功能、炎性因子释放、细胞增殖等功能的影响。结果 ①成功制备了 PD-L1 慢病毒,并筛选获得了稳定表达 PD-L1 的 THP1-PDL1 单克隆细胞株,流式细胞术及 PCR 验证成功。②PD-L1 过表达抑制了 CLL-1 CAR-T 细胞裂解 THP-1 细胞的能力;效靶比为 10:1 时,CLL-1 CAR-T 细胞对 THP1-PDL1 细胞的杀伤效率明显低于对 THP-1 细胞的杀伤效率[(15.70±9.90)% 对 (51.95±2.52)% $P < 0.05$]。③PD-L1 过表达减弱了 CLL-1 CAR-T 细胞释放细胞因子的能力[与 THP1-PDL1 细胞共培养时对与 THP-1 细胞共培养时:IFN- γ (115.66±3.13)pg/ml 对 (1708.16±26.76)pg/ml, $P < 0.05$;IL-6 (17.37±0.72)pg/ml 对 (124.92±4.26)pg/ml, $P < 0.05$;IL-10 (5.69±0.13)pg/ml 对 (124.12±3.02)pg/ml, $P < 0.05$];同时抑制了 CLL-1 CAR-T 细胞的增殖能力。结论 成功构建了表达 PD-L1 的 THP1-PDL1 单克隆细胞株,同时证实了 PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞抗 AML 的不利的影响,为通过 PD-1/PD-L1 通路调控 CLL-1 CAR-T 细胞功能提供了一定的理论基础。

【关键词】 白血病,髓系,急性; 程序性死亡受体配体 1; C 型凝集素样分子 1(CLL-1); 嵌合抗原受体 T 细胞

基金项目: 国家科技重大专项课题(2017ZX09304021);国家重点研发计划(2019YFC0840604、2017YFA0104502);江苏省医学杰出人才项目(JCRCA2016002);江苏省科教强卫工程-临床医学中心(YXZX2016002);徐州医科大学校研课题(2018KJ11)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.007

Research on the effect of PD-L1 overexpression on CLL-1 CAR-T anti-acute myeloid leukemia

Lin Guoqiang^{1,2}, Zhang Yanming², Kang Liqing³, Yu Lei³, Wu Depei¹

¹The First Affiliated Hospital of Soochow University, National Clinical Research Center for Hematologic Diseases, Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou 215006, China;²Department of Hematology, Huai'an Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College and Huai'an Second People's Hospital, Huai'an 223002, China;³Shanghai Unicar-Therapy Biomed-Pharmaceutical Technology Co.Ltd, Shanghai 201203, China
Corresponding author: Wu Depei, Email:wudepei@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of programmed death receptor ligand 1 (PD-L1) on CLL-1 CAR-T against acute myeloid leukemia (AML). **Methods** In this experiment, the PD-L1 expression vector was constructed, and then the lentivirus vector was packaged by three-plasmid packaging system. THP-1 monoclonal cell lines stably expressing PD-L1 were set up. The CLL-1 CAR-T was developed by our team, as the effector cell for co-culture with the THP-1 or THP1-PDL1 cell lines, respectively. Then, the LDH was tested using the kit, the supernatant cytokine was detected by CBA, and the CLL-1 CAR-T cell proliferation was demonstrated by flow cytometry (FCM) with CFSE labeled. **Results** ①The PD-L1 lentivirus vector was successfully constructed, and monoclonal cell lines of THP-1

with stable PD-L1 was set up and verified by FCM and PCR. ②The overexpression of PD-L1 inhibited CLL-1 CAR-T's ability to lyse THP-1 cells (E:F ratio 10:1); the killing efficiency of CLL-1 CAR-T on THP1-PDL1 cells was lower than that of THP-1 cells [(15.70±9.90)% vs (51.95±2.52)%, $P < 0.05$]. ③The overexpression of PD-L1 decrease the release of cytokine [THP1-PDL1 group vs THP-1 group: IFN- γ (115.66±3.13) pg/ml vs (1708.16±26.76) pg/ml, $P < 0.05$; IL-6 (17.37±0.72) pg/ml vs (124.92±4.26) pg/ml, $P < 0.05$; IL-10 (5.69±0.13) pg/ml vs (124.12±3.02) pg/ml, $P < 0.05$]. Additionally, the proliferation of CLL-1 CAR-T was also inhibited. **Conclusion** Monoclonal cell lines of THP-1 with stable PD-L1 expression were successfully constructed, and the adverse effect of PD-L1 overexpression on CLL-1 CAR-T anti-AML was confirmed, which provided a theoretical basis for the regulation of CLL-1 CAR-T through the PD-1/PD-L1 pathway.

【Key words】 Leukemia, myeloid, acute; PD-L1 overexpression; C-type lectin-like molecule 1 (CLL-1); Chimeric antigen receptor T cells

Fund program: National Science and Technology Major Project (2017ZX09304021); National Key R&D Program of China (2019YFC0840604, 2017YFA0104502); Jiangsu Medical Outstanding Talents Project (JCRCA2016002); Jiangsu Provincial Key Medical Center (YXZXA2016002); Xuzhou Medical College Project(2018KJ11)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.007

急性髓系白血病(AML)是最常见类型白血病,多发于成年人,约占急性白血病的70%^[1-4]。CAR-T细胞治疗技术作为一种新兴的过继性免疫治疗方法,在复发难治B细胞肿瘤治疗中取得了瞩目成绩。而在AML领域,进展相对缓慢。目前抗AML CAR-T细胞靶抗原主要包括CD123、CD33、叶酸受体等6类抗原^[5-6]。但CD33 CAR-T细胞等有效性、安全性有待提高。我们前期研究发现,AML患者体内存在T细胞高表达PD-1、TIM3及分泌IFN- γ 能力下降等免疫耗竭现象^[7],并且当T细胞进入骨髓环境中,耗竭比外周血中更严重^[8];并且研究显示,AML患者体内白血病细胞表面存在程序性死亡受体配体1(PD-L1)高表达现象^[9]。虽然经过基因工程改造,但理论上CAR-T细胞进入体内,尤其进入AML细胞最多的骨髓环境中也会出现免疫耗竭现象。

CLL-1抗原在多数组织及正常造血干细胞不表达,而在白血病干细胞和白血病细胞上相对特异性高表达,被认为是较有潜力的治疗AML的靶标^[10],本课题组前期制备了三代CLL-1 CAR-T细胞(CD28+OX40)。本研究在构建稳定表达PD-L1的THP-1单克隆细胞株基础上,探讨了AML细胞中过表达PD-L1对CLL-1 CAR-T细胞功能的影响,为研究PD-1/PD-L1通路对CLL-1 CAR-T细胞抗AML作用的影响提供一定的理论探索。

材料与方 法

1. 主要试剂和耗材:细胞培养液(RPMI 1640、DMEM、IMDM)、CD3/CD28磁珠、Penicillin-

streptomycin、Trypsin-EDTA均购自美国Gibco公司;无缝克隆试剂盒、SunBio Trans-EZ购于上海生博公司;Taq酶、dNTP、PrimeSTAR、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞和逆转录试剂盒购于日本TaKaRa公司;Xba I、EcoR I-HF限制性内切酶购于美国New England BioLabs公司;质粒提取试剂盒购自美国Promega公司;基因测序由美吉生物公司测定;引物由上海瑞捷生物公司合成;ABsoluteqPCR Seals、96-WELL ABgene PCR Plate、7500 Real Time PCR System购于美国Thermo公司;FACS Calibur购于美国BD公司;所有流式抗体购于美国Biolegend公司;pCMV-dR8.9、pCMV-VSV-G购自美国Addgene公司;THP-1细胞系购于美国模式培养物研究所(American Type Culture Collection, ATCC),载体PMT197购于上海世翱公司;DNA提取试剂盒购于Generay公司;ChamQ SYBR qPCR Master Mix购于Vazyme公司。

2. 细胞培养:293T细胞培养于DMEM(含10%FBS)培养液中;THP-1细胞培养于RPMI 1640(含10%FBS)培养液中;人T细胞、CLL-1 CAR-T细胞培养于含5%FBS、100 IU/ml rhIL-2和与T细胞等量的CD3/CD28磁珠的淋巴细胞培养液中。

3. 载体构建、PCR扩增目的基因:在NCBI中检索获取PD-L1的基因编码序列,合成PD-L1片段a。用Xba I和EcoR I-HF酶切PMT197,回收8924 bp线性载体片段。为获得目的基因,设计1对引物,上游引物:5'-CATAGAAGATTCTAGAGCCACCAT-GAGGATATTTGCTGTCTTTATATTC-3';下游引物:5'-CATTCACAGGAATTCTTACGTCTCCTCCAA

ATGTGTATC-3'。PCR体系共50 μl: dNTP (2.5 mmol/L)各4 μl,上下游引物(10 μmol/L)各1 μl, Template 1 μl, PrimeSTAR 0.5 μl, 5×缓冲液(含Mg²⁺)10 μl, H₂O 32.5 μl。反应条件:98℃预变性3 min,后进行30个循环:98℃变性10 s,55℃退火15 s,72℃延伸60 s。30个循环结束后72℃延伸10 min,将产物于4℃保存。

取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳(15 g/L),观察是否出现相应条带。将与预计大小相符的目的条带切胶、回收、纯化。PCR上游引物:5'-CGC AAATGGGCGGTAGGCGTG-3';下游引物:5'-GCT GACTAATTGAGATGCATGCTT-3'。

4. 目的基因同源重组及转化:使用无缝克隆试剂盒通过PCR将产物a和酶切获得的线性载体以物质的量比2:1重组,获得重组PD-L1表达载体pse2353。然后取感受态细胞,取10 μl连接液加入混匀,冰浴30 min。42℃水浴热激90 s,冰浴3 min,然后每管加LB培养液900 μl,37℃摇床振荡1 h, LB琼脂平板涂菌(含表达载体相应抗生素),倒置,37℃培养16 h。挑取转化子,10 μl LB培养液重悬,取1 μl菌落PCR鉴定,证实正确后进行接种,抽提质粒,测序正确后扩菌,提质粒,保存备用。

5. 慢病毒包装:37℃、5%CO₂培养箱中培养调整293T细胞的状态,融合度大约为80%时进行转染。用三质粒系统包装病毒。取2支无菌离心管,1支向其中依次加入100 μg pse2353载体质粒、65 μg包装质粒pCMV-dR8.9、35 μg包膜质粒pCMV-VSV-G,用Opti-MEM培养基补足至5 ml。另1支向其中加入Trans-EZ溶液500 μl、Opti-MEM培养基450 μl。混匀后将Trans-EZ稀释液加入质粒管中混匀。室温孵育20 min, DNA与Trans-EZ反应,形成转染复合体。加入293T细胞培养皿培养48 h,收集上清、浓缩纯化、获得病毒颗粒,测定滴度。EP管分装,-80℃冰箱保存。

6. THP1-PDL1单克隆细胞株筛选:收集对数生长期的THP-1细胞,加入含10%FBS的RPMI 1640培养基。按照MOI=20,每孔加入1 ml慢病毒载体进行转导,嘌呤霉素浓度为0、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、5.0、10.0 μg/ml,探索合适的筛选细胞药物浓度。用筛选培养基重悬转导后的THP-1细胞,摇匀,5%CO₂、37℃培养箱中培养。每2 d更换培养基,培养6 d。收集嘌呤霉素筛选后的细胞至离心管离心。用单克隆培养基(含20%FBS的RPMI 1640

培养基)重悬,计数。细胞密度调至5个/ml,96孔板按每孔200 μl细胞悬液铺板,置于5%CO₂、37℃培养箱培养。显微镜下观察各孔细胞增殖状况,挑出单个细胞的孔并标记,扩大培养,并鉴定稳定株构建效果。

7. 流式细胞术检测THP-1表面抗原表达:每管收集约5×10⁵个细胞,1500 r/min离心3 min,重复1次;每管加入100 μl PBS重悬,再加入1 μl鼠抗PD-L1、CLL-1抗体,室温、避光孵育20 min;1500 r/min离心3 min,重复1次,加入200 μl PBS重悬,上机,分别检测THP-1、THP1-PDL1细胞表面PD-L1、CLL-1抗原表达水平。

8. 荧光定量PCR(qPCR)检测PD-L1表达:使用DNA提取试剂盒提取待测细胞中DNA,然后使用ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒合成cDNA,qPCR法检测THP1-PDL1和THP1细胞的PD-L1 DNA。将待测样品CT值代入标准曲线中,得到待测品种WPRE和GAPDH拷贝数。单个细胞中的PD-L1拷贝数(copies/cell)=WPRE拷贝数/GAPDH拷贝数×2。反应体系:95℃预变性5 min,95℃变性5 s,60℃退火、延伸34 s,共40个循环。WPER上游引物序列:5'-TGCACTGTGTTTGCTGACGCAA-3';下游引物序列:5'-ATGAGTTCGCCGTGGCAATA-3'。GAPDH上游引物序列:5'-GGACAGGACCAT ATTGAGGGACA-3';下游引物序列:5'-AGGAGTG AGTGGAAGACAGAATGGA-3'。

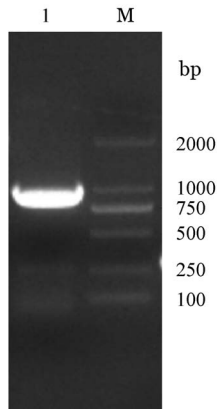
9. PD-L1过表达对CAR-T细胞裂解白血病细胞能力和CAR-T细胞增殖的影响:以CLL-1 CAR-T细胞为效应细胞,以THP1-PDL1细胞为阳性靶细胞,THP-1细胞为对照组。将上述细胞室温、1500 r/min离心5 min,PBS洗涤3次,1200 r/min离心5 min;分别用2 ml培养基(RPMI 1640+4%FBS)重悬细胞并计数;依据预实验结果,将计数好的细胞用培养基调整细胞密度,效应细胞密度为2×10⁶/ml,靶细胞密度为2×10⁵/ml(效靶比为10:1)。效靶细胞共培养16 h。取上清,采用LDH试剂盒检测CLL-1 CAR-T细胞杀伤细胞能力。同时通过CFSE染色,采用流式细胞术检测共孵育前及孵育后1、3、5 d CLL-1 CAR-T细胞的增殖能力。

10. 统计学处理:用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料数据采用均数±标准差表示,两样本均数比较采用t检验,非正态总体资料采用Wilcoxon秩和检验。P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 目的基因扩增及载体构建:PCR扩增获得产物 a,电泳可见条带大小约为 911 bp,与理论值一致。然后进行切胶、凝胶回收纯化试剂盒回收基因片段(图1)。

2. 重组载体构建:用 Xha I 和 EcoR I -HF 酶切



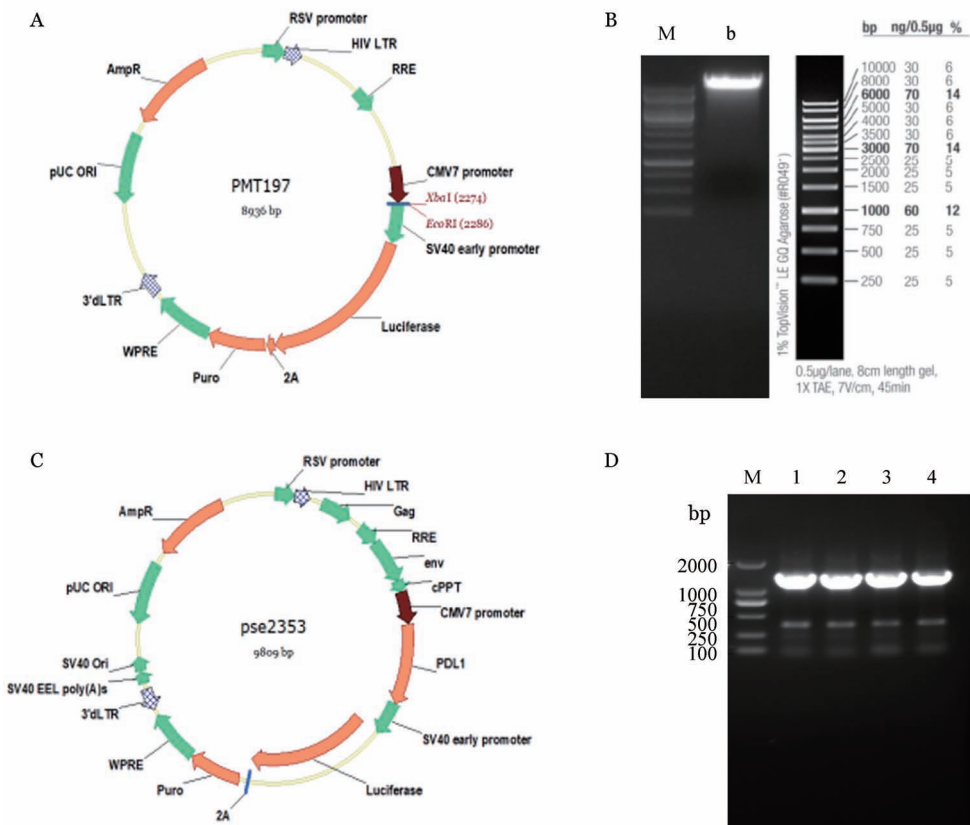
M:DNA Marker; 1:PD-L1

图1 PD-L1 PCR 片段琼脂糖凝胶电泳结果

PMT197(图2A), 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在 8924 bp 处可见条带 b,为骨架载体,与理论值相符(图2B)。将 a 和 b 重组,得到重组慢病毒载体 pse2353(图2C),然后进行转化,挑取阳性菌落,并经菌落PCR鉴定正确,得到大小为 1251 bp 条带(图2D)。取阳性菌落接种,并进行基因测序,经测序证实序列正确,提示重组的慢病毒载体质粒 pse2353 构建成功。

3. 慢病毒制备:调整好包装细胞 293T 细胞状态后,进行三质粒共转染 293T 细胞,转染后镜下动态观察细胞形态,24 h 镜下可见 293T 细胞变圆(图3)。

4. THP1-PDL1 单克隆细胞株表面 PD-L1 抗原表达:CLL-1 分子主要表达于髓系细胞,尤其在 AML 细胞上,本实验中选择了 THP-1 细胞为研究靶细胞,流式细胞术检测证实此细胞表面表达 CLL-1 抗原分子(> 85%),同时选择不表达 CLL-1 分子的 K562 细胞作为阴性对照,同时设立同型对照。经过筛选后最终获得了稳定表达 PD-L1 抗原的 THP-1 单克隆细胞株(图4)。



A:工具载体 PMT197 图谱;B:工具载体酶切后获得骨架载体的电泳条带(M:DNA Marker;b:骨架载体);C:重组慢病毒载体 pse2353 示意图;D:pse2353 转化子阳性菌落 PCR 产物电泳(M:DNA Marker;1~4 为 4 个阳性菌落)

图2 重组慢病毒载体质粒 pse2353 构建

5. THP1-PDL1 单克隆细胞株 PD-L1 DNA 表达:qPCR 法检测筛选的 THP1-PDL1 单克隆细胞株中 PD-L1 的 DNA 表达情况,结果显示与普通 THP-1 细胞相比,病毒感染后的 THP-1 单克隆细胞株的 PD-L1 的 DNA 表达明显升高(1.84±0.15 对 0.00±0.00),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

6. PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞裂解功能的影响:以 THP-1 和 THP1-PDL1 细胞为靶细胞,分别与效应细胞 CLL-1 CAR-T、Vector T 细胞共培养(效靶比为 10:1),结果发现 CLL-1 CAR-T 细胞可以有效杀伤 THP-1 细胞,当 THP-1 细胞过表达 PD-L1 后,CLL-1 CAR-T 细胞对 THP1-PDL1 单克隆

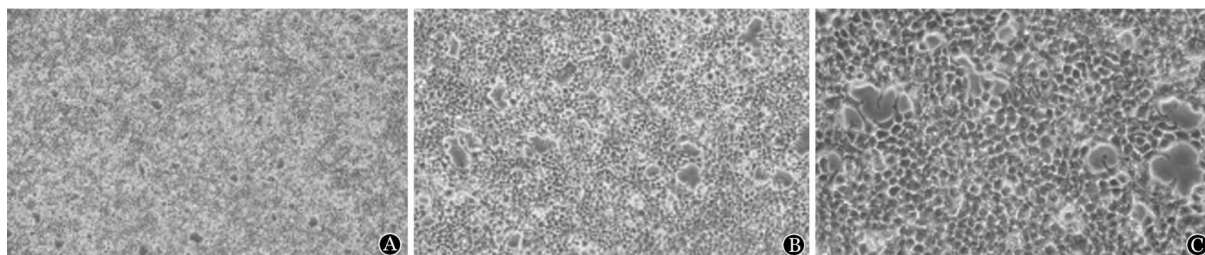


图3 psc2353 慢病毒转染 293T 细胞 24 h 镜下形态(A:×4;B:×10;C:×20)

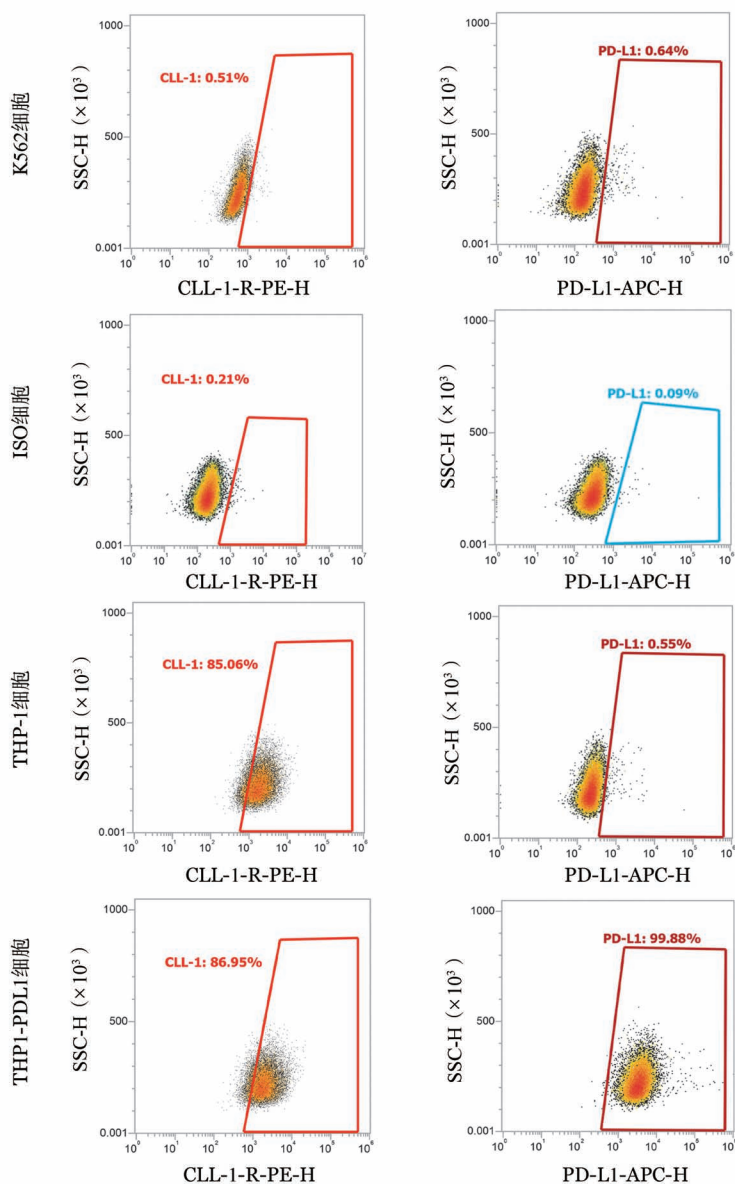


图4 THP1-PDL1 单克隆细胞株表面 PD-L1 抗原表达

细胞株的裂解能力明显下降[(15.70±9.90)%对(51.95±2.52)%],差异有统计学意义($P < 0.05$); Vector T细胞组 THP1-PDL1 细胞被裂解程度低于 THP-1 细胞,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图5)。

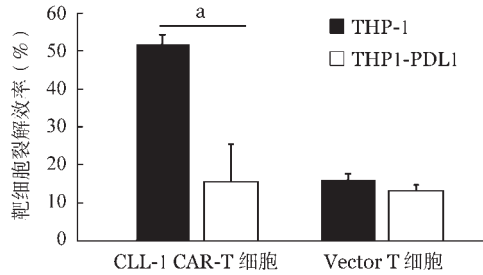


图5 PD-L1对CLL-1 CAR-T、Vector T细胞裂解靶细胞能力的影响(实验重复3次。与THP-1细胞比较,^a $P < 0.05$)

7. PD-L1 过表达对 CAR-T 细胞释放细胞因子的影响:为进一步评估当 AML 细胞与 CAR-T 细胞共培养被杀伤时,PD-L1 过表达于 AML 细胞,对 CAR-T 细胞活化释放 IL-2、IL-6、IFN- γ 、IL-10 等一系列细胞因子的影响,使用流式微球技术检测效靶比为 10:1 时共培养时释放的细胞因子。结果表明,与 THP1-PDL1 单克隆细胞株共培养的 CLL-1 CAR-T 细胞组释放的 IFN- γ 、IL-6、IL-10 较 THP-1 组明显减少,差异有统计学意义(P 值均 < 0.05)。前者 IL-2 水平较后者低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时,作为对照的 Vector T 细胞有类似趋势(表1)。

8. PD-L1 过表达对 CAR-T 细胞增殖的影响:为进一步评估 PD-L1 过表达对 CAR-T 细胞增殖能力的影响,通过 CFSE 对 CLL-1 CAR-T 细胞染色,然后进行流式细胞术检测,发现与 PD-L1 过表达的 THP1-PDL1 单克隆细胞株共培养的 CLL-1 CAR-T 细胞组的增殖能力低于 THP-1 组(图6)。

讨论

机体免疫在肿瘤的发生发展中有重要作用。T 细胞有效激活需要协同刺激信号,主要是由共同刺激分子提供,即抗原呈递细胞表面的 B7 家族与 T 细

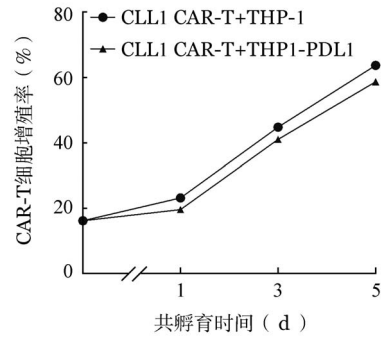


图6 PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞增殖的影响

胞表面 CD28 家族共受体分子相互作用。共刺激分子主要分激活性分子和抑制性分子两类,主要隶属于 3 个家族: B7 家族、细胞因子家族和 TNF 家族^[11]。其中 B7 家族中的 PD-L1 是近年发现的分子,正常情况下 PD-L1 主要表达于抗原呈递细胞(如树突状细胞)、B 细胞等细胞膜表面,当 T 细胞活化后分泌 IFN- γ , 可以上调细胞表面 PD-L1 的表达。其与 T 细胞表面的受体 PD-1 结合发挥作用。其中 PD-1 是 CD28 家族成员之一,是一种免疫共抑制分子,诱生性表达于活化的 T 淋巴细胞表面,与配体 PD-L1 或 PD-L2 作用,会抑制 T 细胞增殖、活化^[12], 参与免疫自稳。

研究发现,许多实体肿瘤细胞如黑色素瘤、卵巢癌等表面存在 PD-L1 高表达的情况,且其高表达能够增强肿瘤的转移能力,与预后呈负相关^[13]。但当肿瘤细胞在离体环境中时,其表面的 PD-L1 表达强度是较低的,这提示 PD-L1 的表达强度与肿瘤微环境关系密切,本实验中我们的检测结果显示 K562、THP-1 细胞株的 PD-L1 同样存在低表达;此外,肿瘤微环境中的其他细胞如肿瘤相关巨噬细胞(Tumour associated macrophages, TAM)、髓源性抑制细胞(Myeloid derived suppressor cells, MDSC)表面也会高表达 PD-L1,当活化的 T 细胞进入肿瘤微环境后,便与上述细胞表面的 PD-L1 结合,导致 T 细胞的活化、增殖等受到抑制,丧失对肿瘤细胞有效杀伤,导致肿瘤免疫逃逸^[14-17]。与实体肿瘤类似,

表1 CLL-1 CAR-T 细胞活化后释放细胞因子水平(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	CLL-1 CAR-T 细胞				Vector T 细胞			
	IFN- γ	IL-10	IL-6	IL-2	IFN- γ	IL-10	IL-6	IL-2
THP-1	1708.16±26.76	124.12±3.02	124.92±4.26	40.33±28.99	1466.59±490.50	20.06±5.27	52.45±1.81	0.13±0.06
THP1-PDL1	115.66±3.13	5.69±0.13	17.37±0.72	3.26±0.00	150.11±0.81	8.64±0.60	12.66±1.97	0.08±0.03
P 值	0.00	0.00	0.05	0.09	0.01	0.02	0.00	0.25

PD-L1 同样也存在于白血病细胞表面。有学者对 79 例 AML 患者进行了检测,发现 18% 的患者高表达 PD-L1,且可通过 IFN- γ 和 TLR (Toll-like receptors) 配体途径诱导 AML 细胞进一步增加 PD-L1 表达,其可协助 AML 细胞逃脱细胞毒性 T 细胞的杀伤^[9]。并且研究发现复发患者 PD-L1 的表达高于非复发患者,尤其是既往接受过免疫治疗者^[18]。此外,AML 患者肿瘤微环境中同样存在表达 PD-L1 的 MDSC 等免疫抑制细胞,这同样导致进入微环境的 T 细胞出现免疫耗竭,使得白血病细胞逃避 T 细胞杀伤^[19]。

CAR-T 细胞虽然经过基因修饰,理论上与 T 细胞类似,伴随活化亦会出现 PD-1 诱生性表达,这样当 CAR-T 细胞与表达 PD-L1 的 AML 等细胞接触后可能会出现被免疫耗竭。鉴于 PD-L1 表达的不稳定,本实验构建了 THP1-PDL1 单克隆细胞株,在此基础上进一步探讨了 PD-L1 过表达对 CLL-1 CAR-T 细胞抗 THP-1 细胞作用的影响。

实验结果表明,THP1-PDL1 单克隆细胞株构建成功;CLL-1 CAR-T 细胞能有效杀伤 CLL-1 阳性的 THP-1 细胞,当 PD-L1 过表达后,CLL-1 CAR-T 细胞裂解 THP-1 细胞的能力明显下降,其分泌 IL-6、IFN- γ 等炎性细胞因子的能力也减弱,CLL-1 CAR-T 细胞的增殖能力也呈现出减弱的趋势。这提示我们 PD-L1 的过表达影响了 CAR-T 细胞抗白血病效应,PD-1/PD-L1 信号通路是一种调控 CAR-T 细胞功能的手段。

综上所述,本实验结果表明 PD-L1 影响了 CLL-1 CAR-T 细胞抗 AML 作用,PD1/PD-L1 通路是调控 CAR-T 细胞功能的一条重要途径。但这需要进一步进行相关的体内实验及临床研究进行验证。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] Chen W, Zheng R, Zuo T, et al. National cancer incidence and mortality in China, 2012 [J]. Chin J Cancer Res, 2016, 28(1):1-11. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.08.
- [3] Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project [J]. Blood, 2010, 116 (19):3724-3734. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282632.
- [4] Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies [J]. Ann Oncol, 2007, 18 Suppl 1: i3-i8. DOI: 10.1093/annonc/mdl443.
- [5] 陶中飞,王敏,王建祥. 嵌合抗原受体修饰的 T 细胞抗急性髓系白血病的研究进展 [J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(2):160-163. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.017.
- [6] Fan M, Li M, Gao L, et al. Chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy in acute myeloid leukemia [J]. J Hematol Oncol, 2017, 10 (1):151. DOI: 10.1186/s13045-017-0519-7.
- [7] Li C, Yu X, Gu C, et al. The Expression and Mechanism of Tim3 and PD-1 in Patients with Acute Myeloid Leukemia [J]. Blood, 2015, 126 (23): 4948. DOI:10.1182/blood.V126.23.4948.4948.
- [8] Jia B, Wang L, Claxton DF, et al. Bone marrow CD8 T cells express high frequency of PD-1 and exhibit reduced anti-leukemia response in newly diagnosed AML patients [J]. Blood Cancer J, 2018, 8(3):34. DOI: 10.1038/s41408-018-0069-4.
- [9] Berthon C, Driss V, Liu J, et al. In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(12):1839-1849. DOI: 10.1007/s00262-010-0909-y.
- [10] Bakker AB, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia [J]. Cancer Res, 2004, 64(22):8443-8450. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1659.
- [11] 李义,王晶,克晓燕. PD-1/PD-L1 通路在血液系统疾病中的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(6):1523-1527.
- [12] Zhu X, Lang J. The significance and therapeutic potential of PD-1 and its ligands in ovarian cancer: A systematic review [J]. Gynecol Oncol, 2016, 142 (1):184-189. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.04.002.
- [13] Pedoem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, et al. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity [J]. Clin Immunol, 2014,153(1):145-152. DOI: 10.1016/j.clim.2014.04.010.
- [14] Kumar V, Patel S, Teyganov E, et al. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment [J]. Trends Immunol, 2016, 37 (3): 208-220. DOI: 10.1016/j.it.2016.01.004.
- [15] Iwata T, Kondo Y, Kimura O, et al. PD-L1 + MDSCs are increased in HCC patients and induced by soluble factor in the tumor microenvironment [J]. Sci Rep, 2016, 6: 39296. DOI: 10.1038/srep39296.
- [16] Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected [J]. J Clin Invest, 2015, 125(9):3356-3364. DOI: 10.1172/JCI80005.
- [17] Cheng P, Eksioglu EA, Chen X, et al. S100A9-induced overexpression of PD-1/PD-L1 contributes to ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes [J]. Leukemia, 2019, 33 (8): 2034-2046. DOI: 10.1038/s41375-019-0397-9.
- [18] Chen X, Liu S, Wang L, et al. Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(5):622-627. DOI: 10.4161/cbt.7.5.5689.
- [19] Pyzer AR, Stroopinsky D, Rajabi H, et al. MUC1-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells in patients with acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2017, 129 (13):1791-1801. DOI: 10.1182/blood-2016-07-730614.

(收稿日期:2020-06-09)

(本文编辑:王叶青)