

crobe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 119-124.

[23] TANGYE S G, MA C S, BRINK R, et al. The good, the bad and the ugly-TFH cells in human health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6): 412-426.

[24] 时凤敏, 周平, 陈国江, 等. 滤泡辅助性 T 细胞 (TFH) 在
· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.029

炎性肠病中的表达研究[J]. *军事医学*, 2011, 35(12): 902-904.

[25] WANG Z, WANG Z, DIAO Y, et al. Circulating follicular helper T cells in Crohn's disease (CD) and CD-associated colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 9355-9359.

(收稿日期: 2017-10-23 修回日期: 2017-12-07)

CAR-T 技术的作用机制及其在恶性淋巴瘤中的应用*

刘畅¹, 蒋婷¹, 全诗翠¹, 纪青¹综述, 邓飞^{2△}审校

(1. 遵义医学院病理学教研室, 贵州遵义 563000, 2. 南方医科大学深圳医院病理科, 广东深圳 518000)

[摘要] 近年来, 肿瘤的免疫治疗越来越受到人们的重视。在肿瘤的免疫治疗手段中, 以嵌合抗原受体 (CAR) 修饰的 T 细胞疗法为代表的肿瘤靶向免疫治疗的疗效最为肯定。嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法是近年来发展非常迅速的一种新兴的细胞免疫治疗技术, 和以往的免疫治疗手段不同, CAR-T 疗法显示出更灵敏的肿瘤特异性、更加高效的杀伤肿瘤效应及攻击持久性, 在恶性肿瘤, 特别是淋巴造血系统恶性肿瘤的治疗上具有应用潜力和发展前景。本文旨在对 CAR-T 技术的作用机制及其在恶性淋巴瘤中的临床应用做一介绍。

[关键词] 嵌合抗原受体 T 细胞疗法; 嵌合抗原受体 T 细胞疗法; 恶性淋巴瘤

[中图分类号] R733.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)09-1242-03

恶性淋巴瘤 (malignant lymphoma, ML) 是我国较为常见的恶性肿瘤之一, 约占所有恶性肿瘤的 3%~4%^[1]。目前, 大多数的 ML 尚不能治愈且复发率及病死率较高, 近年来不断涌现的新的基因治疗及靶向治疗等对 ML 的临床缓解率均有限^[2]。2013 年, 《Science》杂志总结了本年度科学界十大突破性技术, 其中肿瘤的免疫治疗高居榜首^[3]。嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法作为一种特殊的肿瘤免疫治疗方式, 以其独特的优势在恶性肿瘤, 尤其是淋巴造血系统恶性肿瘤的治疗中取得了令人瞩目的成绩。

1 CAR-T 的作用机制

1989 年, GROSS 等^[4]首次提出 CAR-T 细胞的概念, 他们发现 CAR-T 细胞具有显著地增强抗肿瘤的效能, 可以通过不依赖主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 的方式识别任何靶点, 而不仅仅是识别蛋白。从此, CAR-T 技术应运而生。近年来 CAR-T 技术已被广泛地应用于多种恶性肿瘤的临床研究当中, 其中以淋巴造血系统恶性肿瘤的效果最为显著。

1.1 CAR 的基本结构 CAR 由细胞外抗原结合区、铰链区、跨膜区和细胞内信号肽区组成。细胞外抗原结合区通常来源于单克隆抗体的单链抗体 (single-chain variable fragment, scFv), scFv 具有特异性识别并结合肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen, TAA) 的功能, 这种单链抗体不需要依赖 MHC 就可直接识别位于肿瘤细胞表面的靶抗原, 从而克服肿瘤的免疫逃逸机制^[5]。其构成是由 TAA 的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区用一条可弯曲的多肽接头连接起来; 铰链区一般为 CD8 α 、TCR β 等免疫球蛋白序列, 其具有变形和伸缩的活性, 为细胞外抗原结合区接近抗原提供条件; 胞内信号肽区通常由共刺激分子 (costimulatory molecule, CM) 和免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 组成, 负责信号传导; 跨膜区是 CD3、CD4、

CD8、CD28 等蛋白分子, 是 CAR 的二聚化和 T 细胞活化的关键区域^[6-7]。

1.2 CAR 的发展历程 目前 CAR 已发展到第 4 代。最初的 CAR 仅含有 ITAM, 只使用 CD3 复合体中的 ζ -链作为唯一的信号域, 这就是所谓的第 1 代 CAR。近年来, 随着研究的深入, 人们发现, 构建的这种第 1 代 CAR 对于 T 细胞的激活是不完整的, 其发挥的抗肿瘤作用有限, 于是有研究者在此基础上在胞内区的信号转导区加入 CM 如 CD28 和或 CD137^[8-9], 可以提升 T 细胞的抗肿瘤持久性和抗肿瘤活性, 因此出现了 2 代和 3 代的 CAR。有研究用第 1 代 CD19⁻ CAR 和第 2 代 CD19⁻ CAR (包含 CD28 共刺激分子) 治疗慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 和霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin lymphoma, HL)^[10], 研究表明 2 代 CAR 比 1 代 CAR 显示了更好的抗肿瘤持久性, 说明了第 2 代和第 3 代 CAR 与第 1 代 CAR 相比, 对于 T 细胞活化更加的完整, 具有更强的攻击效应^[8-11]。但第 3 代 CAR 是否优于第 2 代 CAR, 仍需要进一步验证, 目前进行临床研究的均为 2 代 CAR。

第 4 代 CAR 又称 TRUCKs (fourth-generation CAR T-cells redirected for universal cytokine killing), 结构与前 3 代不同的是其引入了炎症介质 (如 IL-12) 和共刺激配体, 这样能够提升这些改造过的 T 细胞的扩增活性和寿命从而引起更为广泛的抗肿瘤效应^[11-12]。并且, 只要肿瘤细胞表面存在靶抗原, 第 4 代 CAR 就可以充分地降低肿瘤负荷, 在无需预处理的情况下就可以产生抗肿瘤作用, 同时这样也可以使患者免受预处理治疗时发生不良反应^[13]。

1.3 CAR-T 技术的作用原理 CAR-T 技术是利用基因工程技术将 TAA 的特异性识别和 T 淋巴细胞的细胞毒活性相结合, 通过一定途径将编码 CAR 的基因转染到 T 淋巴细胞内, 使这种经基因修饰过的 T 细胞表达特异性的 CAR, 然后在体外扩增、纯化此 T 细胞, 这种 T 细胞就可以通过非 MHC 限制

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160300)。 作者简介: 刘畅 (1992-), 在读硕士, 主要从事淋巴瘤病理研究。 △ 通信作者, E-mail: mdproffeideng@hotmail.com。

的方式识别肿瘤细胞表面的特定抗原,特异性靶向杀伤肿瘤细胞,从而达到治疗肿瘤的目的^[6-7]。

2 CAR-T 技术在 ML 中的应用

ML 是较为常见的恶性肿瘤之一,约占所有恶性肿瘤的 3%~4%,占我国各种恶性肿瘤发病的第 11 位^[1]。按照病理组织学的不同可分为 HL 和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma,NHL)。目前,ML 的传统治疗是以化疗为主,放疗为辅,但是治愈率和临床缓解率均较低,复发和难治常常是导致治疗失败的主要原因。异基因造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation,HSCT)作为挽救和根治 ML 的一个方案,而实际骨髓移植之后长期生存患者也仅占 2/3^[14]。CAR-T 技术作为一种新兴的过继免疫治疗,具有抗肿瘤作用的同时却不会产生骨髓抑制等不良反应且患者耐受性较好。

研究表明,大多数的 NHL 和 B 淋巴细胞白血病均表达 CD19 抗原,因此,建立针对 CD19 抗原的 CAR-T 细胞靶向治疗显示出良好的应用前景,且该类 CAR-T 细胞在临床试验当中取得了令人振奋的疗效^[15-16]。可以说,到目前为止在 CAR-T 技术上,最著名的研究是用 CD19⁺ CAR-T 细胞对 CD19⁺ B 细胞恶性肿瘤患者的治疗。早在 2010 年,来自美国国立癌症研究院(National Institutes of Health,NIH)的 KOKENBERGER 等^[17]首先采用输注抗 CD19⁺ CAR-T 细胞的方法治疗晚期滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma,FL)1 例,该患者在治疗后得到了持续的完全缓解(CR),疗效明显。鉴于此,该团队随后又于 2013 年报道了更大样本量的研究结果,同样得到了令人振奋的成果^[18]。在接受抗 CD19⁺ CAR-T 治疗的 10 例患者中,其中 1 例 CLL 患者得到了持续生物 CR,1 例 CLL 患者出现肿瘤溶解综合征,还有 1 例套细胞淋巴瘤(mantel cell lymphoma,MCL)患者得到了持续的部分缓解(PR),且该 10 例患者均没有发生移植物抗宿主反应(graft-versus-host disease,GVHD)。最近,他们又完成了后续研究,该项研究共治疗包括 9 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL),2 例惰性淋巴瘤和 4 例 CLL。在其中可被评估的 13 例患者中,有 8 例 CR(包括 4 例 DLBCL),4 例 PR,1 例病情稳定^[19]。

在 2015 年的第 57 届美国血液学会(ASH)年会上,TURTLE 等^[20]报道了在给患者输注 CAR-T 细胞前给予氟达拉滨+环磷酰胺(FC 方案)化疗预处理的治疗。预处理的目的是清除免疫抑制细胞,从而提高 CAR-T 疗法的疗效。该研究共治疗 28 例 B 细胞 NHL 和 6 例 CLL。在 28 例 NHL 中,包括 DLBCL 18 例、FL 6 例和 MCL 4 例。在 28 例 NHL 中,其中有 12 例接受了单独的环磷酰胺(无氟达拉滨)预处理,50%有疗效[CR 1 例(DLBCL),PR 5 例(2 例 FL,2 例 DLBCL,1 例 MCL),无临床反应 6 例],CR 率为 8%;而另外接受 FC 方案的 16 例 NHL 中,其中的 12 例被评估(2 例没有被评估,2 例早期死亡),整体有效率为 67%(CR 5 例,PR 3 例),CR 率为 42%。在 6 例 CLL 中,3 例 CR,1 例 PR,2 例无反应,CR 率为 50%。在所有 CR 的患者中,在治疗后 CR 持续了 1~10 个月不等。

3 CAR-T 技术的优缺点

综上所述,CAR 的优点在于:(1)能不受 MHC 识别肿瘤抗原,不需要经过抗原提呈细胞(antigen presenting cell,APC)。(2)肿瘤表面的脂类抗原也可以作为靶点,而不再仅限于蛋白类抗原。(3)CM(如 CD28、CD137 等)能使 CAR 的免疫效应更强大、持久。

但是 CAR-T 技术也存在一定的不足之处。尽管目前研究的样本量不是很大,无法得出一个系统的结论,但是各种临床上治疗恶性肿瘤常见的不良反应它都具有。更关键的是,

CAR-T 细胞与 TAA 具有高度的亲和性,容易因识别失误而攻击正常细胞,导致误伤现象,这种现象被称为“脱靶效应”。因此需要选择特异性表达于肿瘤表面的靶抗原来避免此不良反应的发生。对于脱靶效应,可通过静脉补充免疫球蛋白(如 IgA、IgG 等)来缓解。在 2010 年,报道了结肠癌伴远处肝、肺转移的患者因为脱靶效应而造成死亡^[21],也直接促使美国重组 DNA 委员会(Reorganization of the DNA Committee in the United States,RDAC)召开会议针对性研究,要求减少输注 CAR-T 细胞的剂量,推动第 2 代与第 3 代 CAR 的运用。

另一个需要重视的不良反应就是细胞因子风暴(cytokine release syndrome,CRS)^[22],严重的 CRS 出现概率在 27%~53%,常发生于接受细胞治疗后 6~20 d。其发生机制是 T 细胞活化后,在短时间内清除肿瘤细胞的同时会产生大量的炎症介质,引发炎症反应,从而释放出大量细胞因子导致细胞因子释放综合。临床表现主要有发热、心动过速、低血压、毛细血管渗透综合性以及呼吸系统症状等。目前,对于这种细胞因子释放综合征的治疗措施可采用激素冲击和 IL-6 受体抑制剂,可以降低因 CRS 造成的死亡率。

此外,CAR-T 细胞疗法相对来说是一种“个性化”疗法,这就意味着 CAR-T 细胞制备的成本比较昂贵,预计每例患者的治疗费用至少要 30~50 万美元,这远远超出了普通家庭的承担能力,所以其临床的广泛应用将受限。

4 展 望

CAR-T 技术的出现是对淋巴造血系统恶性肿瘤治疗方法的变革,为难治性、复发性 ML 患者带来了新的希望。经过多年的临床试验研究表明,CAR-T 治疗 ML 尤其是 B 细胞淋巴瘤的疗效十分肯定,虽然已经有许多进步,但到目前为止,显著的局限性仍然存在。如不良反应 CRS,还有高昂的治疗费用,限制了其疗效和临床应用。虽然在临床广泛应用前还需要克服许多障碍,但由于 CAR-T 疗法具有良好的抑瘤活性,仍很有可能成为临床肿瘤学领域的主流。对于未来 CAR-T 技术的研究方向将包括优化生成的 CAR-T 细胞,不仅要着眼于提高其有效性,如何缩减其制造成本和时间成本也是迫切需要解决的问题。相信在不久的将来,CAR-T 技术不仅可以广泛应用于淋巴造血系统恶性肿瘤,还能为应用于其他实体瘤提供理论依据。

参考文献

- [1] 李玉林.病理学[M].8 版.北京:人民卫生出版社,2013:221-222.
- [2] 姜文奇.恶性淋巴瘤诊断和治疗新进展——第十一届世界淋巴瘤大会会议综述[J].中国肿瘤临床,2011,38(18):1055-1061.
- [3] MCNUTT M. Cancer immunotherapy[J]. Science,2013,342(20):1417.
- [4] GROSS G,WAKS T,ESHAR Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1989,86(24):10024-10028.
- [5] PARK J H,BRENTJENS R J. Adoptive immunotherapy for B-cell malignancies with autologous chimeric antigen receptor modified tumor targeted T cells[J]. Discov Med,2010,9(47):277-288.
- [6] RAMOS C A,DOTTI G. Chimeric antigen receptor(CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy[J]. Expert Opin Biol Ther,2011,11(7):855-873.
- [7] 蔡亮,张凌华,杨子杰,等.嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)

- 免疫疗法:绝处逢生的利剑[J]. 自然杂志,2016,38(3):228-231.
- [8] KOWOLIK C M, TOPP M S, GONZALEZ S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(22):10995-11004.
- [9] CARPENITO C, MILONE M C, HASSAN R A, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(9):3360-3365.
- [10] SAVOLDO B, RAMOS C A, LIU E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients[J]. J Clin Invest, 2011, 121(5):1822-1826.
- [11] TILL B G, JENSEN M C, WANG J J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results[J]. Blood, 2012, 119(17):3940-3950.
- [12] CHMIELEWSKI M, KOPECKY C, HOMBACH A A, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression[J]. Cancer Res, 2011, 71(17):5697-5706.
- [13] ZHAO Z, CONDOMINES M, VAN DER STEGEN S J, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J]. Cancer Cell, 2015, 28(4):415-428.
- [14] CHMIELEWSKI M, HOMBACH A A, ABKEN H. Of CARs and TRUCKs; chimeric antigen receptor(CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma[J]. Immunol Rev, 2014, 257(1):83-90.
- [15] ADVANI A S. New immune strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia; antibodies and chimeric antigen receptors[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013, 2013(1):131-137.
- [16] ONEA A S, JAZIREHI A R. CD19 chimeric antigen receptor(CD19 CAR)-redirected adoptive T-cell immunotherapy for the treatment of relapsed or refractory B-cell non-hodgkin's Lymphomas[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(2):403-424.
- [17] KOCHENDERFER J N, WILSON W H, JANIK J E, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19[J]. Blood, 2010, 116(20):4099-4102.
- [18] KOCHENDERFER J N, DUDLEY M E, CARPENTER R O, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood, 2013, 122(25):4129-4139.
- [19] KOCHENDERFER J N, DUDLEY M E, KASSIM S H, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(6):540-549.
- [20] TURTLE C J, HANAFI L A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients[J]. J Clin Invest, 2016, 126(6):2123-2138.
- [21] PEGRAM H J, PARK J H, BRENTJENS R J. CD28z CARs and armored CARs[J]. Cancer J, 2014, 20(2):127-133.
- [22] GRUPP S A, 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.

(收稿日期:2017-11-09 修回日期:2017-12-18)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.030

脑内神经元-星形胶质细胞能量代谢偶联研究进展*

罗程,夏贞焰综述,赵永华[△]审校
(澳门科技大学中医药学院,澳门 999078)

[摘要] 脑是身体的重要器官,需要非常高的能量来完成神经功能。目前认为星形胶质细胞可以产生大量的乳酸和谷氨酸,通过在神经元和星形胶质细胞之间穿梭以调节能量代谢,使得神经元-星形细胞代谢偶联在生理和病理状态中发挥着重要作用。在本文中分别总结了神经元和星形细胞能量代谢,以及神经元-星形胶质细胞代谢偶联机制,并讨论如何操纵这些功能为改善脑损伤后神经元活动提供了一种新策略。

[关键词] 神经元;星形胶质细胞;能量代谢;偶联

[中图法分类号] R339.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)09-1244-04

脑内神经组织作为人体生理机能的主要调节器官,能够对不同刺激进行反射活动,完成神经兴奋的启动和终止。虽然脑

组织只占了人体体质量的 2% 左右,但是其能量消耗却达到了机体的 20%。葡萄糖、酮体、乳酸均可以作为脑能量的物质来