

血必净注射液增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性的研究

朱晶晶¹ 张静¹ 王萍¹ 刘斯² 冯志乔² 石冰洁¹ 王建勋¹

¹北京中医药大学生命科学院, 北京 102400; ²天津红日药业股份有限公司, 天津 301700

通信作者: 王建勋, Email: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

【摘要】目的 探讨血必净注射液对抗 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 体外肿瘤杀伤活性的影响。**方法** 构建基于单链抗体 (scFv) 抗 CD19 靶点的 CAR 分子, 将 CAR 基因装载于逆转病毒载体质粒中, 制备逆转病毒载体, 转导健康人供体 T 细胞制备抗 CD19 CAR-T 细胞。以 CD19 阳性淋巴瘤细胞 (Raji)、Raji- 荧光素酶 (LUC) 标记细胞为靶细胞, 将未转导的 T 细胞、CD19 CAR-T 细胞分别与靶细胞按 1:2、1:4、1:8 的效靶比共孵育 12 h 后, 分别采用流式细胞术、荧光素酶报告基因检测法检测 CAR-T 细胞对靶细胞的杀伤效果。将血必净注射液按 1 g/L 及 10 g/L 浓度加入 CD19 CAR-T 细胞共培养基, 采用同样的方法检测不同浓度血必净注射液处理的 CD19 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤效率。**结果** 健康人群来源的 CD19 CAR-T 细胞经过 14 d 培养后扩增良好, 每 48 h 扩增倍数为 2~6 倍, 阳性率 70.17%, 提示 CD19 CAR-T 细胞制备成功。效靶比为 1:2、1:4、1:8 时, CD19 CAR-T 细胞对 Raji 细胞和 Raji-LUC 细胞的杀伤效率均显著高于未转导 T 细胞 [效靶比 1:2 时 Raji 细胞 (65.57±2.93)% 比 (13.17±0.69)%, Raji-LUC 细胞 (49.23±2.11)% 比 (14.04±2.68)%; 效靶比 1:4 时 Raji 细胞 (44.40±0.80)% 比 (10.06±2.44)%, Raji-LUC 细胞 (29.97±1.77)% 比 (8.60±0.71)%; 效靶比 1:8 时 Raji 细胞 (27.39±1.70)% 比 (9.05±1.13)%, Raji-LUC 细胞 (25.40±0.57)% 比 (7.09±0.44)%, 均 $P<0.001$]。在相应效靶比条件下, 经 1 g/L 和 10 g/L 血必净注射液处理的 CD19 CAR-T 细胞对 Raji 细胞和 Raji-LUC 细胞的杀伤效率均高于未经处理的 CD19 CAR-T 细胞, 其中以经 1 g/L 血必净注射液处理的 CD19 CAR-T 细胞的杀伤效率升高最为显著 [效靶比 1:2 时 Raji 细胞 (74.53±2.56)% 比 (71.91±3.25)%、(64.06±0.86)%, Raji-LUC 细胞 (57.67±0.58)% 比 (53.33±0.58)%, (49.00±2.00)%; 效靶比 1:4 时 Raji 细胞 (63.96±3.23)% 比 (50.84±5.54)%, (43.95±0.50)%, Raji-LUC 细胞 (43.33±0.58)% 比 (40.00±1.00)%、(29.67±2.08)%; 效靶比 1:8 时 Raji 细胞 (41.79±3.58)% 比 (33.79±1.15)%, (27.62±2.07)%, Raji-LUC 细胞 (36.20±0.53)% 比 (31.90±0.66)%, (23.13±1.06)%, 均 $P<0.05$]。**结论** CD19 CAR-T 细胞能有效杀伤 CD19 阳性肿瘤细胞, 血必净注射液可有效提高 CD19 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。

【关键词】 CD19; 嵌合抗原受体; 血必净注射液; T 淋巴细胞

基金项目: (18-19)北京市双一流人事处-高层次-王建勋科研团队科研经费项目 (1000041510155)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.018

Xuebijing injection enhancing CD19 CAR-T cell anti tumor killing activity Zhu Jingjing¹, Zhang Jing¹, Wang Ping¹, Liu Si², Feng Zhiqiao², Shi Bingjie¹, Wang Jianxun¹

¹School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China; ²Tianjin Chase Sun Pharmaceutical Co., Tianjin 201700, China

Corresponding author: Wang Jianxun, Email: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

【Abstract】Objective To explore the influence of Xuebijing injection on the killing activity of CD19 chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) against tumor *in vitro*. **Methods** A CAR molecule was constructed based on a single-chain antibody (scFv) to against CD19 (human originated) target, the CAR gene was packaged into a retrovirus carrier vector to prepare retrovirus vector, then the healthy human donor T cell was transduced to prepare anti-CD19 CAR-T cells. The CD19-positive lymphoma cells (Raji) and Raji-luciferase (LUC) labeled cells were used as target cells, the untransduced T cells and CD19 CAR-T cells were respectively co-incubated with target cells for 12 hours at an effector: target ratios (E/T) of 1:2, 1:4, and 1:8, then the flow cytometry and luciferase were used respectively to report the killing effect of CAR-T cells on target cells found by gene detection method. The Xuebijing injection was added to CD19 CAR-T cell co-culture medium at the concentrations of 1 g/L and 10 g/L, and the same method was used to detect the killing efficiency of CD19 CAR-T cell treated by different concentrations of Xuebijing injection on tumor cells. **Results** After 14-day incubation, the CD19 CAR-T cells donated by healthy human donors amplified well, about 2-6 times per 48 hours, with a positive rate of 70.17%, indicating successful preparation of CD19 CAR-T cells. When the E/T were 1:2, 1:4 and 1:8, the killing efficiencies of transduced CD19 CAR-T cells against Raji cells and Raji-LUC cells respectively were all significantly higher than those of non-transduced T cells [E/T 1:2: Raji cells (65.57±2.93)% vs. (13.17±0.69)%, E/T 1:4: Raji cells (44.40±0.80)% vs. (10.06±2.44)%, E/T 1:8: Raji cells (27.39±1.70)% vs. (9.05±1.13)%], Raji-LUC cells [E/T 1:2: (49.23±2.11)% vs. (14.04±2.68)%, E/T 1:4: Raji-LUC cells (29.97±1.77)% vs. (8.60±0.71)%, E/T 1:8: Raji-LUC cells (25.40±0.57)% vs. (7.09±0.44)%, all $P<0.001$]. Under the same as above mentioned E/T conditions, the killing rates of CD19 CAR-T cells treated with 1 g/L and 10 g/L Xuebijing injection to against Raji cells and Raji-LUC cells were higher than those of CD19 CAR-T cells without being treated by Xuebijing, the killing efficiency of CD19 CAR-T cells treated with 1 g/L Xuebijing injection was the most significant [E/T 1:2: Raji cells (74.53±2.56)% vs. (71.91±3.25)%, (64.06±0.86)%, Raji-LUC cells (57.67±0.58)% vs. (53.33±0.58)%, (49.00±2.00)%; E/T 1:4: Raji cells (63.96±3.23)%

vs. $(50.84 \pm 5.54)\%$, $(43.95 \pm 0.50)\%$, Raji-LUC cells $(43.33 \pm 0.58)\%$ vs. $(40.00 \pm 1.00)\%$, $(29.67 \pm 2.08)\%$; E/T 1 : 8: Raji cells $(41.79 \pm 3.58)\%$ vs. $(33.79 \pm 1.15)\%$, $(27.62 \pm 2.07)\%$, Raji-LUC cells $(36.20 \pm 0.53)\%$ vs. $(31.90 \pm 0.66)\%$, $(23.13 \pm 1.06)\%$, all $P < 0.05$]. **Conclusion** CD19 CAR-T cells can effectively kill CD19 positive tumor cells and Xuebijing injection can significantly enhance killing ability of CD19 CAR-T cells to against the tumor cells *in vitro*.

【Key words】 CD19; Chimeric antigen receptor; Xuebijing injection; T-lymphocytes

Fund program: (18-19) Beijing Double Class One Human Resource Office-High-level-Wang Jianxu's Research Team Funding Project of China (1000041510155)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.018

恶性肿瘤治愈率低、病死率高,已成为危害全球公众健康的主要原因^[1]。在中国,恶性肿瘤病死率为 168/10 万,居世界较高水平^[2]。传统治疗以化疗为主,辅助放疗,存在严重的不良反应,对传统治疗产生耐药或复发的患者预后差,亟需个性化治疗方案^[3]。嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)疗法作为细胞免疫治疗的一大手段,其对于恶性肿瘤的治疗优势日益突显,目前靶向 CD19 的 CAR-T 疗法在 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性 B 淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病的治疗中都得到应用^[4-8],但 CAR-T 治疗有明显细胞毒性,如细胞因子释放综合征(CRS)和神经毒性,给这种革命性的治疗手段带来了巨大的挑战^[9-11]。

血必净注射液是治疗全身炎症反应综合征(SIRS)的中药二类新药,主要由红花、赤芍、川芎、丹参和当归组成^[12]。研究表明,血必净注射液的多种活性成分对 T 淋巴细胞免疫功能有调节作用,可通过促进 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)凋亡、介导辅助性 T 细胞 2(Th2)向辅助性 T 细胞 1(Th1)漂移,从而平衡炎症反应,调节免疫功能紊乱^[13-15]。本研究制备 CD19 CAR-T 细胞并验证其在体外对肿瘤细胞的杀伤能力,探讨血必净注射液对 CAR-T 细胞增殖及其体外抗肿瘤活性的影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 伦理学: 本研究符合医学伦理学标准,并经北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会批准(审批号:2019-6-12)。

1.2 细胞株与主要试剂: 淋巴瘤细胞(Raji)购自美国 ATCC 细胞库, Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞购自北京维通达公司,外周血单个核细胞(PBMC)由健康志愿者提供。DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、AIMV 培养基以及胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购自北京金普来生物科技有限公司;别藻蓝蛋白荧光素(APC)-CD19、APC-CD3、FITC-CD19 抗体均购自北京 BioLegend 公司;ONE-Glo™ 荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司;血必净注射液由天津红日药业提供。

1.3 细胞培养: Raji、Raji-LUC 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养, PBMC 细胞用含 10% FBS 的 AIMV 培养基培养,培养条件均为 37 ℃、5% CO₂。

1.4 质粒构建: 合成 SP-myc-anti CD19-CD8-CD28-CD3 ζ 的碱基序列(上海生工生物), 5' 端和 3' 端分别加酶切点 Xho I、Not I, 酶切连接将 SP-myc-anti CD19-CD8-CD28-CD3 ζ 片段克隆到逆转录病毒载体 MFG 中。

1.5 逆病毒包装与滴度检测: 用包装细胞进行病毒载体制备;实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)测定病毒滴度,选取滴度最高的收获载体用来转导 T 细胞。

1.6 CD19 CAR-T 细胞制备扩增及鉴定: 采集健康志愿者外周血,用 Ficoll 密度梯度离心法分离获得 PBMC。将 PBMC 重悬于含有 10% FBS 的 AIMV 培养基中,加入 CD3 单克隆抗体(OKT3)、白细胞介素-2(IL-2),激活 T 细胞。体外培养 48 h 后进行逆病毒转导。转导 48 h 后用 PE-c-Myc 抗体标记 CAR 分子,使用流式细胞术分析测定 CAR 转导阳性率。

1.7 流式细胞术检测效应细胞对靶细胞 Raji 的杀伤效果: 用 APC-CD3 抗体、Annexin-FITC/PI 凋亡检测试剂盒进行肿瘤靶细胞凋亡效率检测。将 CD19 CAR-T 细胞与密度为 $8 \times 10^5/\text{mL}$ 的靶细胞按 1 : 2、1 : 4、1 : 8 比例共孵育 12 h 后行流式细胞术分析,用未转导 T 细胞作为对照效应细胞,APC 阴性和 FITC 阳性标记凋亡靶细胞表示效应细胞的细胞毒性。

1.8 荧光素酶报告基因检测法检测效应细胞对靶细胞 Raji-LUC 的杀伤效果: 将各组效应细胞与密度为 $8 \times 10^5/\text{mL}$ 的靶细胞按 1 : 2、1 : 4、1 : 8 的比例在 96 孔培养板中共孵育 12 h。共孵育结束后,向培养孔中加入 100 μL 荧光素酶底物,等待 3 min 完成细胞裂解,使用多功能酶标仪检测荧光强度(D)。根据下列公式计算不同效靶比水平下的细胞毒性:细胞毒性 = $[1 - (\text{实验组 D} - \text{培养基 D}) / (\text{靶细胞 D} - \text{培养基 D})] \times 100\%$ 。

1.9 血必净注射液对 CD19 CAR-T 杀伤肿瘤细胞的影响: 在 CD19 CAR-T 细胞培养体系中,分别加入 1 g/L 和 10 g/L 的血必净注射液,对照组加入相应浓度的磷酸盐缓冲液(PBS),培养 4 h 后移去上清,洗涤细胞并计数。将与血必净注射液共孵育后的

CAR-T 细胞与对照组细胞分别按 1:2、1:4、1:8 的效靶比与肿瘤细胞共孵育,检测其杀伤能力。

1.10 统计学处理:对肿瘤细胞的杀伤效率检测实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,用 GraphPad Prism 7 分析数据。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD19 CAR-T 细胞制备成功:制备靶向 CD19 的 CAR 分子,其结构为经典的二代 CAR 分子结构,将引导区、CD19 单链抗体可变区(scFv)、CD8 铰链区和跨膜区、CD28 胞内区和 CD3 ζ 胞内区依次串联(图 1)。

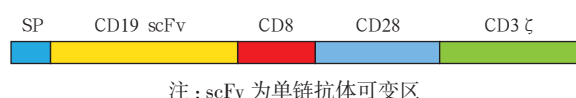
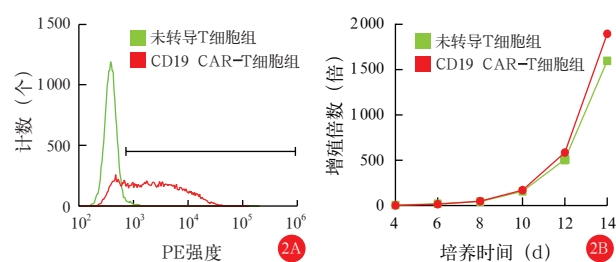


图 1 CD19 嵌合抗原受体(CAR)分子设计示意图

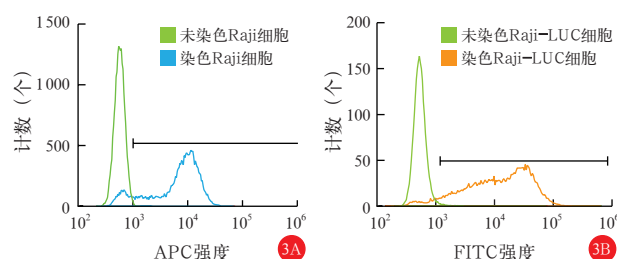
将上述分子包装成逆转录病毒,转染 T 细胞。为验证体外条件下 CD19 CAR-T 细胞是否制备成功,在转导 48 h 后对 CAR 转导效率进行分析。结果显示,未转导 T 细胞组的 T 细胞表面 CAR 分子表达阳性率极低,而 CD19 CAR-T 细胞表面的 CAR 分子表达阳性率达 70.17% (图 2A)。为验证制备的 CAR-T 细胞能否在体外正常增殖,连续记录 14 d 其增殖情况,结果显示,每 48 h 扩增倍数为 2~6 倍,CD19 CAR-T 细胞能够在体外长期增殖(图 2B)。



注: CAR-T 为嵌合抗原受体 T 细胞

图 2 流式细胞仪检测转染 48 h 后 CD19 CAR-T 细胞 CAR 分子表达率(2A)及 CD19 CAR-T 细胞体外增殖情况(2B)

2.2 Raji、Raji-LUC 细胞 CD19 表达阳性率(图 3):为验证 CAR-T 细胞对 CD19 阳性肿瘤细胞的杀伤能力,选择高表达 CD19 淋巴瘤细胞 Raji 细胞及带有 Luciferase 基因的 Raji-LUC 细胞进行验证,检测靶细胞 CD19 表达阳性率。结果显示, Raji 细胞的 CD19 表达阳性率为 96.67%, Raji-LUC 细胞的 CD19 表达阳性率为 96.35%。



注: Raji 为淋巴瘤细胞, Raji-LUC 为 Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞, APC 为别藻蓝蛋白荧光素, FITC 为异硫氰酸荧光素

图 3 靶细胞 Raji(3A)及 Raji-LUC(3B)的 CD19 表达阳性率

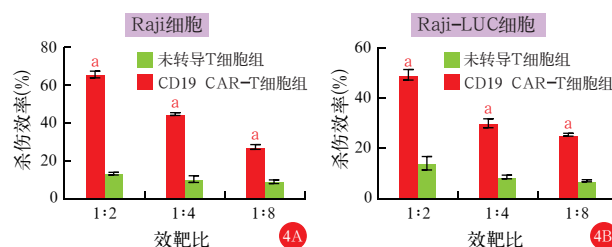
2.3 CD19 CAR-T 细胞对 Raji、Raji-LUC 细胞的杀伤效果(表 1; 图 4):按 1:2、1:4、1:8 的效靶比,将未转导的 T 细胞、CD19 CAR-T 细胞分别与靶细胞 Raji 和 Raji-LUC 共孵育 12 h,之后分别采用流式细胞术和荧光素酶检测系统检测对靶细胞的杀伤效率。流式细胞术和荧光素酶检测系统检测结果均显示,各效靶比水平下 CD19 CAR-T 细胞的杀伤效率均显著高于未转导 T 细胞 ($P < 0.001$)。同时,杀伤效率与 CAR-T 细胞和靶细胞的比例有关。

表 1 各组细胞对靶细胞 Raji 和 Raji-LUC 的杀伤效率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	不同效靶比下对 Raji 细胞杀伤效率 (%)		
		1:2	1:4	1:8
未转导 T 细胞组	3	13.17 $\pm$ 0.69	10.06 $\pm$ 2.44	9.05 $\pm$ 1.13
CD19 CAR-T 细胞组	3	65.57 $\pm$ 2.93 ^a	44.40 $\pm$ 0.80 ^a	27.39 $\pm$ 1.70 ^a

组别	样本数	不同效靶比下对 Raji-LUC 细胞杀伤效率 (%)		
		1:2	1:4	1:8
未转导 T 细胞组	3	14.04 $\pm$ 2.69	8.60 $\pm$ 0.71	7.09 $\pm$ 0.44
CD19 CAR-T 细胞组	3	49.23 $\pm$ 2.11 ^a	29.97 $\pm$ 1.77 ^a	25.40 $\pm$ 0.57 ^a

注: Raji 为淋巴瘤细胞, Raji-LUC 为 Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞, CAR-T 为嵌合抗原受体 T 细胞; 与未转导 T 细胞组比较, ^a $P < 0.001$



注: Raji 为淋巴瘤细胞, Raji-LUC 为 Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞; 与未转导 T 细胞组比较, ^a $P < 0.001$

图 4 未转导 T 细胞组和 CD19 CAR-T 细胞组对靶细胞 Raji(4A)及 Raji-LUC(4B)的杀伤作用

2.4 血必净注射液对 CAR-T 细胞增殖的影响:将 1 g/L 血必净注射液与 CD19 CAR-T 细胞共孵育 48 h,检测增殖情况,结果显示,与未用血必净注射液处理的 CD19 CAR-T 对照组相比, 1 g/L 血必净注射液处理组的增殖倍数显著升高(增殖倍数: 3.62 ± 0.12 比 2.92 ± 0.16 , $P < 0.01$)。

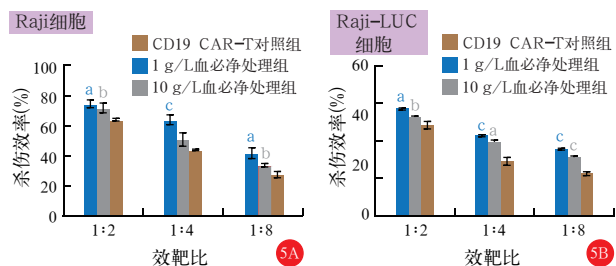
2.5 血必净注射液对 CD19 CAR-T 细胞杀伤 Raji、Raji-LUC 细胞活性的影响(表 2; 图 5): 为验证血必净注射液对 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞能力的影响, 在 CD19 CAR-T 细胞培养体系中, 分别加入 1 g/L、10 g/L 的血必净注射液, 培养 48 h 后移去上清, 洗涤细胞。将不同浓度血必净处理组细胞与对照组细胞分别按 1:2、1:4、1:8 的效靶比与 Raji 细胞、Raji-LUC 细胞共孵育 12 h, 分别采用流式细胞术、荧光素酶报告基因检测法检测血必净注射液对 CD19 CAR-T 细胞抗肿瘤活性的影响。流式细胞术检测结果显示, 1 g/L 血必净注射液在各效靶比下均可增强 CD19 CAR-T 对 Raji 细胞的杀伤能力, 而 10 g/L 血必净注射液在 1:2 和 1:8 效靶比下可增强 CD19 CAR-T 对 Raji 细胞的杀伤能力(均 $P < 0.05$); 荧光素酶检测系统检测结果显示, 1 g/L 和 10 g/L 血必净注射液均可增强 CD19 CAR-T 细胞对 Raji-LUC 细胞的杀伤能力(均 $P < 0.05$)。

表 2 各组细胞对靶细胞 Raji 和 Raji-LUC 的杀伤效率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	不同效靶比下对 Raji 细胞杀伤效率(%)		
		1:2	1:4	1:8
CD19 CAR-T 对照组	3	64.06 ± 0.86	43.95 ± 0.50	27.62 ± 2.07
1 g/L 血必净处理组	3	74.53 ± 2.56 ^a	63.96 ± 3.23 ^c	41.79 ± 3.58 ^a
10 g/L 血必净处理组	3	71.91 ± 3.25 ^b	50.84 ± 5.54	33.79 ± 1.15 ^b

组别	样本数	不同效靶比下对 Raji-LUC 细胞杀伤效率(%)		
		1:2	1:4	1:8
CD19 CAR-T 对照组	3	49.00 ± 2.00	29.67 ± 2.08	23.13 ± 1.06
1 g/L 血必净处理组	3	57.67 ± 0.58 ^a	43.33 ± 0.58 ^c	36.20 ± 0.53 ^c
10 g/L 血必净处理组	3	53.33 ± 0.58 ^b	40.00 ± 1.00 ^a	31.90 ± 0.66 ^c

注: Raji 为淋巴瘤细胞, Raji-LUC 为 Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞, CAR-T 为嵌合抗原受体 T 细胞; 与 CD19 CAR-T 对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.001$



注: Raji 为淋巴瘤细胞, Raji-LUC 为 Raji- 荧光素酶(LUC)标记细胞, CAR-T 为嵌合抗原受体 T 细胞; 与 CD19 CAR-T 对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.001$

图 5 血必净注射液对 CD19 CAR-T 细胞杀伤 Raji 细胞及 Raji-LUC 细胞活性的影响

3 讨论

CAR-T 细胞是经过基因工程改造以表达重组抗原受体的 T 细胞, 重组抗原受体能够识别靶细胞表面的特定抗原, 触发独立于主要组织相容性复合

体(MHC)分子的 T 细胞活化, 以激活 T 细胞发挥特异性抗肿瘤作用^[16]。随着 CAR-T 细胞疗法研究的深入, 越来越多的治疗靶点得到开发, 抗 CD19、CD22、CD123、BCMA 等靶点及其联合的双 CAR-T 的开发为恶性肿瘤的治疗提供了更多手段, 也展现出广阔的免疫治疗前景^[17]。目前, 靶向 CD19 的 CAR-T 细胞疗法成为 B 系血液恶性肿瘤领域一种革命性的免疫治疗方法^[18]。然而, 因 T 细胞本身及肿瘤微环境的性质, 其治疗过程常伴有不良反应, 其中最严重和威胁生命的不良反应是 CRS, 这一毒性限制了其应用与疗效^[19]。现有研究表明, CRS 的发病机制主要包含 2 个因素, 一是由过度激活的免疫反应和炎症反应失控, 细胞因子[如白细胞介素(IL-1、IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]过量产生导致机体抗炎和促炎机制的平衡破坏^[20]; 二是血管内皮激活、功能失调, CAR-T 细胞激活后释放炎症因子刺激内皮细胞产生更多炎症因子, 大量炎症因子形成内皮细胞激活的恶性循环, 导致功能失调^[21-22]。研究表明, 传统中药制剂含抗炎及免疫调节功能成分^[23], 采用中药制剂干预可能对 CRS 有治疗效果。

血必净注射液是传统的化腐解毒中药制剂, 有抗炎及血管内皮保护效应, 临床上广泛用于治疗 SIRS、脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)^[24], 已经被《中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)》^[25]收录。越来越多的证据显示, 血必净注射液可改善重症患者的临床结局, 降低脓毒症患者 28 d 病死率。在最近的新型冠状病毒肺炎疫情期间, 血必净注射液作为“三药三方”用于治疗 SIRS 的重型、危重型患者, 体现了中医方药的独特优势^[26-27]。研究表明, 血必净注射液有抑制细胞因子风暴和调节 Tregs 和 Th17 细胞平衡的作用, 并可介导 Th2 向 Th1 漂移^[28], 同时有降低细胞氧化应激和炎症水平的作用^[29]。血必净注射液可调节免疫功能紊乱、阻断氧化应激, 探究其对 CAR-T 细胞的作用是有意义的。

CD19 是免疫球蛋白超家族之一, 在 B 细胞整个发育成熟过程均有表达, 且在 B 细胞恶性肿瘤中呈高水平, 使 CD19 成为 CAR-T 细胞免疫疗法在 B 细胞恶性肿瘤领域常用的靶标分子^[18]。本研究成功制备了靶向 CD19 的二代 CAR-T 细胞, 并选用有代表性的 Raji 细胞验证 CAR-T 细胞功能, 证明了 CAR-T 细胞在体外杀伤肿瘤细胞的可行性和有效性。将血必净注射液加入到 CD19 CAR-T 细胞培养基孵育后, CAR-T 细胞的增殖能力、对肿瘤细胞的杀伤能力均显著增强, 证明血必净注射液的免疫功能调节

作用可提高 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞能力。未来拟探究血必净注射液增强 CAR-T 细胞增殖及抗肿瘤活性的机制,为中药联合细胞免疫治疗提供新依据,也对提高 CAR-T 细胞免疫治疗效果意义显著。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王娅因,张琼,曹琄.恶性肿瘤患者精神症状调查及管理对策探讨[J].中国肿瘤临床与康复,2020,27(8):934-936. DOI: 10.13455/j.cnki.cjcor.2020.08.10.
- [2] 曹毛毛,陈万青.中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J].中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2019.03.246.
- [3] 曹毛毛,陈万青.中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J].中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2019.03.246.
- [4] Cao MM, Chen WQ. Epidemiology of cancer in China and the current status of prevention and control [J]. Chin J Clin Oncol, 2019, 46 (3): 145-149. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2019.03.246.
- [5] Lu YQ, Gu LH, Huang WD. Effect of Xuebijing injection on peripheral T-lymphocyte subpopulations in patients with severe trauma [J]. Chin J Traumatol, 2010, 13 (2): 72-76.
- [6] Brudno JN, Lam N, Vanasse D, et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma [J]. Nat Med, 2020, 26 (2): 270-280. DOI: 10.1038/s41591-019-0737-3.
- [7] Tu S, Huang R, Guo Z, et al. Shortening the *ex vivo* culture of CD19-specific CAR T-cells retains potent efficacy against acute lymphoblastic leukemia without CAR T-cell-related encephalopathy syndrome or severe cytokine release syndrome [J]. Am J Hematol, 2019, 94 (12): E322-E325. DOI: 10.1002/ajh.25630.
- [8] 韩笑,叶春莹,张常晓,等.人源化抗 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞治疗急性 B 淋巴细胞白血病的临床研究[J].中国实验血液学杂志,2019,27(5):1353-1359. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2019.05.001.
- [9] Han X, Ye CY, Zhang CX, et al. Clinical efficacy of humanized anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in the treatment of acute B lymphocytic leukemia [J]. J Exp Hematol, 2019, 27 (5): 1353-1359. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2019.05.001.
- [10] Wang J, Mou N, Yang Z, et al. Efficacy and safety of humanized anti-CD19-CAR-T therapy following intensive lymphodepleting chemotherapy for refractory/relapsed B acute lymphoblastic leukaemia [J]. Br J Haematol, 2020, 191 (2): 212-222. DOI: 10.1111/bjh.16623.
- [11] Gauthier J, Hirayama AV, Purushe J, et al. Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure [J]. Blood, 2020, 135 (19): 1650-1660. DOI: 10.1182/blood.2019002936.
- [12] Caimi PF, Ahmed N, Rojas P, et al. Prophylactic tocilizumab before CD3/4-1bb anti-CD19 car-T cell infusion decreases incidence of severe crs without increased risk of neurotoxicity [J]. Cytotherapy, 2020, 22 (5): S16-S17. DOI: 10.1016/j.jcyt.2020.03.483.
- [13] Jatiani SS, Aleman A, Madduri D, et al. Myeloma CAR-T CRS management with IL-1R antagonist anakinra [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2020, 20 (9): 632-636. DOI: 10.1016/j.clml.2020.04.020.
- [14] Kadauke S, Maude S, Gladney W, et al. Early administration of tocilizumab (Toci) for the prevention of grade 4 cytokine release syndrome (CRS) after CD19-directed CAR T-cell therapy (CTL019) [J]. Cytotherapy, 2019, 21 (5): e2-e3. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.04.009.
- [15] Huang H, Ji L, Song S, et al. Identification of the major constituents in Xuebijing injection by HPLC-ESI-MS [J]. Phytochem Anal, 2011, 22 (4): 330-338. DOI: 10.1002/pca.1284.
- [16] Chen X, Feng Y, Shen X, et al. Anti-sepsis protection of Xuebijing injection is mediated by differential regulation of pro- and anti-inflammatory Th17 and T regulatory cells in a murine model of polymicrobial sepsis [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 211: 358-365. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.001.
- [17] 艾宇航,姚咏明,戴新贵.不同剂量血必净对内毒素诱导调节性 T 细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(3):141-144. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.004.
- [18] Ai YH, Yao YM, Dai XG. Effect of various doses of Xuebijing injection on lipopolysaccharide-mediated apoptosis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vitro* [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2010, 17 (3): 141-144. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.004.
- [19] 高玉雷,柴艳芬,姚咏明.脓毒症免疫功能障碍机制及血必净调节效应研究进展[J].中华烧伤杂志,2013,29(2):162-165. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.02.017.
- [20] Gao YL, Chai YF, Yao YM. Advancement in the research of mechanism of immune dysfunction in sepsis and the regulatory effects of Xuebijing injection [J]. Chin J Burns, 2013, 29 (2): 162-165. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.02.017.
- [21] Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. Lancet Oncol, 2020, 21 (3): e168-e178. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30823-X.
- [22] Fousek K, Watanabe J, Joseph SK, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression [J]. Leukemia, 2021, 35 (1): 75-89. DOI: 10.1038/s41375-020-0792-2.
- [23] Yamada S, Kaneko MK, Sayama Y, et al. Development of novel mouse monoclonal antibodies against human CD19 [J]. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2020, 39 (2): 45-50. DOI: 10.1089/mab.2020.0003.
- [24] Wei J, Liu Y, Wang C, et al. The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5 (1): 134. DOI: 10.1038/s41392-020-00256-x.
- [25] Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer Discov, 2016, 6 (6): 664-679. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0040.
- [26] Pabst T, Joncourt R, Shumolov E, et al. Analysis of IL-6 serum levels and CAR T cell-specific digital PCR in the context of cytokine release syndrome [J]. Exp Hematol, 2020, 88: 7-14.e3. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.07.003.
- [27] Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy [J]. Biomark Res, 2018, 6: 4. DOI: 10.1186/s40364-018-0116-0.
- [28] 韩磊,向云霞,徐磊.中药抗炎与免疫药理[J].新疆中医药,2011,29(4):112-114. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3931.2011.04.064.
- [29] Han L, Xiang YX, Xu L. Anti inflammatory and immunopharmacology of traditional Chinese medicine [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 2011, 29 (4): 112-114. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3931.2011.04.064.
- [30] 李志军,李银平.从“卫气营血”辨证到“三证三法”看脓毒症的诊治思辨[J].中华危重病急救医学,2019,31(2):135-138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.02.002.
- [31] Li ZJ, Li YP. Distinguishing the "Wei Qi Ying Xue" syndrome differentiation from the "three certificates and three methods" to the diagnosis of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2019, 31 (2): 135-138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.02.002.
- [32] 中国医师协会急诊医师分会,中国研究型医院学会休克与脓毒症专业委员会.中国脓毒症/脓毒性休克急诊诊疗指南(2018)[J].感染、炎症、修复,2019,20(1):3-22. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8521.2019.01.001.
- [33] Emergency Physicians Branch of Chinese Medical Doctor Association, Shock and Sepsis Committee of Chinese Society of Research Hospitals. Chinese guidelines for emergency treatment of sepsis/septic shock (2018) [J]. Infect Inflamm Repair, 2019, 20 (1): 3-22. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8521.2019.01.001.
- [34] 文隆,周志国,姜迪让,等.血必净注射液对重型新型冠状病毒肺炎患者炎症指标及病情转归的疗效观察[J].中华危重病急救医学,2020,32(4):426-429. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200406-00386.
- [35] Wen L, Zhou ZG, Jiang DX, et al. Effect of Xuebijing injection on inflammatory markers and disease outcome of coronavirus disease 2019 [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (4): 426-429. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200406-00386.
- [36] 郭程程,焦华琛,李运伦.中医“扶正祛邪”治则在“三药三方”治疗新冠肺炎中体现[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):159-163. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2020.10.038.
- [37] Guo CC, Jiao HC, Li YL. Novel coronavirus pneumonia is the embodiment of "three drugs and three sides" in treating new crown pneumonia [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2020, 22 (10): 159-163. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2020.10.038.
- [38] 戴新贵,姚咏明,艾宇航,等.血必净促进内毒素/脂多糖刺激调节性 T 淋巴细胞凋亡并介导辅助性 T 淋巴细胞漂移的作用[J].中华烧伤杂志,2009,25(2):106-110. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2009.02.011.
- [39] Dai XG, Yao YM, Ai YH, et al. The enhancing effect of "Xuebijing injection" on lipopolysaccharide-induced apoptosis of regulatory T cells and mediation of polarization of helper T cells [J]. Chin J Burns, 2009, 25 (2): 106-110. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2009.02.011.
- [40] 张万里,余兴蓉,田昕,等.血必净对百草枯诱导肾近曲小管上皮细胞-2 氧化应激和炎症水平的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2019,26(2):143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.02.003.
- [41] Zhang WL, She XR, Tian X, et al. Effect of Xuebijing on paraquat-induced cell oxidative stress and inflammation level in human renal proximal convoluted tubular epithelial cell-2 [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2019, 26 (2): 143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.02.003.

(收稿日期:2020-11-03)