

分类号\_\_\_\_\_  
学校代码 10488

学号 202118703033  
密级\_\_\_\_\_

武汉大学

硕士学位论文

全日制学术学位

靶向 CD19 的 CAR 外泌体抗 B 细胞淋  
巴瘤的研究

学位申请人：方兰兰

学科专业：生物学

指导教师：顾潮江

答辩日期：2024 年 5 月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Master in Engineering**

**CD19-targeting chimeric antigen  
receptor-exosome for the therapy of  
B-lineage lymphoma**

**Master Candidate:**

**Lanlan Fang**

---

**Major:**

**Biology**

---

**Supervisor:**

**Chaojiang GU**

---

**Wuhan University of Science and Technology**

**Wuhan, Hubei 430081, China**

**May, 2024**

## 摘要

**研究目的：**构建绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）和荧光素酶（luciferase, Luc）双标记的 EB 病毒（Epstein-Barrvirus, EBV）感染的人 B 淋巴瘤细胞系（B lymphoblastoid cell lines, B-LCL）应用于肿瘤模型，接着探究装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素的外泌体体外和体内抗肿瘤活性，进一步修饰外泌体制备 CAR-T 细胞。开发安全有效的免疫治疗方法。

**研究方法：**（1）利用慢病毒构建含 Luc、GFP 双标签的 B-LCL-GL 细胞系，稀释成 3 种浓度接种至 NPG ((NOD)/Prkdc<sup>scid</sup>/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup>) 小鼠皮下或尾静脉内，建立皮下移植瘤模型与血行性转移瘤模型并成像分析，同时记录小鼠生存情况。

（2）修饰 293F 细胞，提取装载 CD19 CAR、颗粒酶、穿孔素的 CD19/G+P 外泌体，并在体内和体外水平探究其抗肿瘤效果。（3）修饰 293F 细胞提取靶向 T 细胞的外泌体，构建外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统，并探究其 CAR-T 细胞制备效果。

**研究结果：**（1）在血行性转移瘤模型和皮下移植瘤模型中均检测到肿瘤细胞在小鼠体内发出了荧光信号，相同接种剂量分别通过尾静脉和皮下接种时不影响肿瘤细胞生长，为后续体内实验肿瘤选择接种剂量和接种方式提供了依据。（2）修饰 293F 细胞获得的 CD19/G+P 外泌体，不仅对 CD19+肿瘤细胞具有良好靶向性，还可以将细胞毒性分子颗粒酶、穿孔素高效递送进入肿瘤细胞，发挥诱导细胞凋亡、抑制增殖的作用，显示了良好的抗肿瘤治疗效果。（3）修饰 293F 细胞提取的靶向 T 细胞外泌体，在外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统中 CD3+、CD4+、CD8+ T 细胞中均可以表达 CD19 CAR，且靶向 CD8 T 细胞外泌体高靶向性和 CD8+T 细胞高占比显示了 CD3+T 细胞中 CAR 高表达。（4）提取的靶向 CD8+ T 细胞外泌体，在外泌体 mRNA 靶向递送系统中 L7Ae 与 mRNA 上 box 结合提高 mRNA 稳定性，显著提升 T 细胞表面 CAR 表达，进而延长了其在血液中的半衰期。（5）提取的靶向 CD8+ T 细胞外泌体，在外泌体 mRNA 靶向递送系统中第 5 天 CD3+、CD8+的 CAR-T 细胞达到 59.5%、94.3%。

**研究结论：**装载 CD19 CAR、颗粒酶、穿孔素的外泌体在体内和体外均能特异性杀伤肿瘤，靶向 T 细胞外泌体利用外泌体 mRNA 靶向递送系统可以高效制

备在体内具有特异性杀伤作用的 CAR-T 细胞, 为免疫治疗的研究奠定新的台阶。

**关键词:** B 细胞淋巴瘤; 外泌体; 外泌体靶向系统; 外泌体 mRNA 靶向递送系统; 嵌合抗原受体

## Abstract

**Objective:** To establish a green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) double-labeled Epstein-Barr virus (EBV) infected B lymphoblastoid cell line (B-LCL) to be applied in mouse models. Then, the antitumor activity of exosomes loaded with CD19 CAR, granzyme and perforin was investigated in vitro and in vivo. Furthermore, we prepared CAR T cells by incubation of PBMC with exosomes, with the goal of developing safe and effective immunotherapies.

**Method:**(1) The lentiviral method was used to establish a green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) double-labeled Epstein-Barr virus (EBV) infected B lymphoblastoid cell line (B-LCL), Subcutaneous xenograft and hematogenous metastasis models were established by subcutaneous or intravenous injection of B-LCL-GL cells at three concentrations into NPG mice for in vivo bioluminescence imaging.(2) 293F cells were modified to produce CD19/G+P exosomes loaded with CD19 CAR, granzyme and perforin, and their anti-tumor effects were studied both in vivo and in vitro.(3) Modified 293F cells were used to produce T cell-targeting exosomes, constructing an exosome targeting system and an exosome mRNA targeting delivery system.

**Results:**(1) In the hematogenous metastasis models and the subcutaneous xenograft models tumor-related bioluminescence signals all were detected. There was no difference in tumor proliferation when the same inoculation dose of BLCL-GL cells was administered via intravenous and subcutaneous. This provides a basis for selecting the appropriate dose and method of inoculation in vivo. (2) We transfected 293F cells to obtain CD19/G+P exosomes, which have strong targeting abilities for CD19+ tumor cells and efficiently deliver cytotoxic molecules granzyme and perforin into tumor cells. This induces apoptosis and inhibits proliferation, demonstrating a promising anti-tumor therapeutic effect.(3) We modified 293F cells to obtain exosomes that target T cells. In both the exosome targeting system and exosome mRNA targeting delivery system, CD19 CAR was expressed in CD3+, CD4+ and

CD8<sup>+</sup> T cells. The high targeting efficiency of CD8<sup>+</sup> T cell-targeting exosomes and the high proportion of CD8<sup>+</sup>T cells indicated a high expression of CAR in CD3<sup>+</sup>T cells.(4) In the exosome mRNA targeting delivery system , the L7Ae protein of the CD8<sup>+</sup> T cell-targeting exosomes improved mRNA load by binding to the box region, resulting in a significant enhancement of CAR expression on the T cell surface and prolonging its half-life in the blood.(5) Further confirmation showed that the CD8<sup>+</sup> T cell-targeting exosomes in the exosome mRNA targeting delivery system resulted in 59.5% and 94.3% of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CAR-T cells, respectively, on the 5th day.

**Conclusion:** The use of CD19/G+P exosomes, which contain granzyme, perforin, and CD19 CAR, has shown to be effective in killing tumors both *in vivo* and *in vitro*. Additionally, the use of exosomes to deliver mRNA to CD8<sup>+</sup> T cells has proven to be an effective method for preparing CAR-T cells, which have anti-tumor activities *in vivo*. This research opens up new possibilities for future immunotherapy studies.

**Key words:** B-cell lymphoma; exosomes; exosome targeting system; exosome mRNA targeting delivery system; chimeric antigen receptor

# 目 录

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 第一章 绪论.....                             | 1  |
| 1.1 引言.....                             | 1  |
| 1.2 免疫治疗靶点选择.....                       | 1  |
| 1.3 CAR-T 细胞免疫治疗.....                   | 2  |
| 1.4 外泌体.....                            | 4  |
| 1.5 工程化外泌体.....                         | 5  |
| 1.6 外泌体靶向.....                          | 6  |
| 1.7 研究意义.....                           | 6  |
| 1.8 研究内容和技术路线.....                      | 7  |
| 第二章 靶向 CD19 的 CAR 外泌体抗 B 细胞淋巴瘤.....     | 10 |
| 2.1 引言.....                             | 10 |
| 2.2 材料与方法.....                          | 11 |
| 2.2.1 实验耗材.....                         | 11 |
| 2.2.2 实验试剂.....                         | 11 |
| 2.2.3 实验仪器.....                         | 13 |
| 2.2.4 实验抗体.....                         | 14 |
| 2.2.5 菌种、细胞、动物.....                     | 14 |
| 2.2.6 细胞培养.....                         | 15 |
| 2.2.7 PLV-Luc-GFP 慢病毒载体构建及慢病毒包装.....    | 15 |
| 2.2.8 GFP 与 Luc 双标记靶细胞的构建.....          | 15 |
| 2.2.9 肿瘤模型构建.....                       | 16 |
| 2.2.10 超速离心法提取 293F 细胞衍生的外泌体及其表征验证..... | 16 |
| 2.2.11 CD19/G+P 外泌体制备及细胞毒性检测.....       | 18 |
| 2.2.12 统计分析.....                        | 20 |
| 2.3 结果.....                             | 21 |
| 2.3.1 PLV-Luc-GFP 慢病毒载体构建及慢病毒包装.....    | 21 |
| 2.3.2 构建 GFP 与 Luc 双标记的靶细胞.....         | 21 |
| 2.3.3 血行性转移瘤模型的建立.....                  | 22 |
| 2.3.4 皮下移植瘤模型的建立.....                   | 23 |
| 2.3.5 皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型对比分析.....         | 24 |
| 2.3.6 293F 外泌体表征验证.....                 | 25 |
| 2.3.7 CD19/G+P 外泌体细胞毒性原理.....           | 26 |
| 2.3.8 CD19/G+P 外泌体制备.....               | 27 |
| 2.3.9 CD19/G+P 外泌体细胞毒性.....             | 28 |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4 讨论.....                                                      | 30 |
| 第三章 外泌体靶向制备 CAR-T 细胞 .....                                       | 32 |
| 3.1 引言.....                                                      | 32 |
| 3.2 材料与方法.....                                                   | 32 |
| 3.2.1 实验耗材.....                                                  | 32 |
| 3.2.2 实验试剂.....                                                  | 32 |
| 3.2.3 实验仪器.....                                                  | 32 |
| 3.2.4 实验抗体.....                                                  | 32 |
| 3.2.5 菌种、细胞、动物.....                                              | 33 |
| 3.2.6 细胞培养.....                                                  | 33 |
| 3.2.7 外泌体靶向系统.....                                               | 33 |
| 3.2.8 外泌体 mRNA 靶向递送系统 .....                                      | 33 |
| 3.2.9 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统对比实验.....                           | 34 |
| 3.2.10 外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞 .....                          | 34 |
| 3.2.11 统计分析.....                                                 | 35 |
| 3.3 结果.....                                                      | 35 |
| 3.3.1 外泌体靶向系统.....                                               | 35 |
| 3.3.2 CD19 CAR 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞<br>对比分析 .....        | 37 |
| 3.3.3 外泌体 mRNA 靶向递送系统设计 .....                                    | 37 |
| 3.3.4 构建外泌体 mRNA 靶向递送系统.....                                     | 38 |
| 3.3.5 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、<br>CD8+T 细胞对比分析 ..... | 40 |
| 3.3.6 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统比较分析.....                           | 40 |
| 3.3.7 统计分析外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统.....                           | 43 |
| 3.3.8 外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞 .....                           | 44 |
| 3.4 讨论.....                                                      | 45 |
| 第四章 结论与展望 .....                                                  | 47 |
| 4.1 总结.....                                                      | 47 |
| 4.2 主要创新点.....                                                   | 47 |
| 4.3 展望.....                                                      | 48 |
| 参考文献.....                                                        | 49 |



# 第一章 绪论

## 1.1 引言

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康,已成为目前导致死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。恶性肿瘤分为血液系统恶性肿瘤和实体器官恶性肿瘤。世界卫生组织依据细胞系来源将血液类恶性肿瘤分为髓系肿瘤、淋巴系肿瘤、组织细胞肿瘤及肥大细胞肿瘤四大类<sup>[2]</sup>。淋巴瘤主要包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,B 细胞淋巴瘤几乎占所有淋巴瘤病例的 95%<sup>[3]</sup>。B 细胞淋巴瘤患者的特征通常是淋巴结肿大、结外疾病或两者兼有,并有可能累及多器官<sup>[3]</sup>,B 细胞淋巴瘤的研究为患者提供了更多的治疗选择和可能性,具有重要意义<sup>[4]</sup>。

目前 B 细胞淋巴瘤的治疗方法包括手术、化疗、放疗和免疫治疗<sup>[5]</sup>。尽管放疗、化疗和手术等治疗方式在控制和治疗 B 细胞恶性肿瘤方面取得了一些成功,但仍面临多重复杂困境,例如缺乏特异性治疗及个体化治疗手段、治疗不良反应较多、肿瘤异质性和肿瘤耐药等<sup>[6]</sup>。免疫疗法是一种相对较新的癌症治疗方法,具有高度精确和个性化的潜力,并且比其他类型的癌症疗法更有效<sup>[5]</sup>。如今,免疫疗法广泛用于治疗 B 细胞淋巴瘤,包括抗原特异性单克隆抗体(例如抗 CD20),免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors, ICIs)和嵌合抗原受体 T 细胞<sup>[5]</sup>。嵌合抗原受体 T 细胞(Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T)疗法的药物为淋巴瘤治疗带来了新的希望<sup>[7,8]</sup>。

## 1.2 免疫治疗靶点选择

CD22 是一种唾液酸结合黏附分子,在大多数 B 细胞恶性肿瘤中高度表达,且仅在 B 细胞上表达<sup>[9,10]</sup>。CD19 是 95 kD 的穿膜糖蛋白,它属于免疫球蛋白超家族,表达于 B 细胞表面蛋白的跨膜蛋白,在 B 细胞的活化、增殖以及内部  $\text{Ca}^{2+}$  的转运中发挥着重要作用<sup>[11,12]</sup>,在 B 细胞调节应答中起核心作用<sup>[13,14]</sup>。CD19 作为治疗 B 细胞淋巴瘤的一个标志性的靶点<sup>[13]</sup>,在大部分恶性 B 细胞、前 B 细胞、正常 B 细胞中都有表达<sup>[13]</sup>,在 B 细胞相关疾病的诊断和治疗中具有重要意义。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<sup>[15]</sup>。使用基因修饰的 CD19 特异性嵌合抗原受体 T 细胞(CD19 CAR-T 细胞)治疗已被报道为 CD19 阳性 B 细胞谱系恶性血液病的突破性治疗方法<sup>[16]</sup>。近年来,多款抗 CD19 CAR-T 细胞产品陆续获批上市,它对 B 细胞恶性淋巴瘤的疗效显著,特别是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤,完全缓解率可达 54%<sup>[17]</sup>。

### 1.3 CAR-T 细胞免疫治疗

CAR-T 细胞疗法具有精确的靶向性和显著的疗效，已迅速成为强大而创新的癌症治疗方式<sup>[18,19]</sup>。CAR-T 细胞疗法彻底改变了血液系统恶性肿瘤的治疗，近年来取得了前所未有的效果，特别是在复发/难治性 B 细胞急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤中<sup>[20]</sup>。2020 年，美国食品药品监督管理局批准了抗 CD20 单克隆抗体利妥昔单抗，随后开启了 B 细胞非霍奇金淋巴瘤治疗的新时代<sup>[21]</sup>。

CAR-T 细胞是一种经过基因工程改造表达抗原特异性非 MHC 限制性受体 (CAR) 的 T 细胞<sup>[22,23]</sup>，能够识别和攻击肿瘤细胞表面特定的抗原。CAR 的基本结构包含胞外抗原结合区、跨膜区和胞内信号结构域<sup>[24,25]</sup>。胞外抗原结合区的单链可变片段 (single-chain variable fragment, scFv) 特异性识别抗原，跨膜域确保 CAR 受体能够稳定地嵌入 T 细胞膜上，胞内信号结构域(CD3  $\zeta$ )向 T 淋巴细胞提供激活信号<sup>[26]</sup>。第一代 CAR 由融合到跨膜区域的 scFv 和内源性 T 细胞受体 (TCR) 的 CD3 $\zeta$  分子的胞内结构域组成，scFv 识别并结合到细胞表面表位并确定靶标特异性，胞内结构域在 CAR 接触后，转导信号并激活免疫细胞攻击靶细胞。由于扩增和持久性失败，第一代 CAR-T 细胞在临床试验中几乎没有疗效<sup>[27-29]</sup>。第二代 CAR 包括一个共刺激结构域如 CD28 或 4-1BB，位于跨膜域和 CD3 信号传导结构域之间。三代 CAR 包含两种或两种以上的共刺激分子，例如 CD28 和 4-1BB，与跨膜域和 CD3 信号传导结构域共同组成，相比于一代和二代 CAR 具有更强的抗肿瘤效应、更持久的治疗效果和更好的安全性<sup>[30]</sup>。第四代 CAR-T 细胞能够产生可诱导的细胞因子(例如，白细胞介素-12)增强 T 细胞功能，用 T 细胞重新定位以启动抗原无限制的细胞因子诱导的杀伤作用<sup>[30]</sup>。第五代 CAR 基于二代结构，包含了一个截短的细胞质 IL-2 受体  $\beta$  链结构域，具有转录因子 STAT3 结合位点，增强了 T 细胞的增值、存活以及抗肿瘤效果。

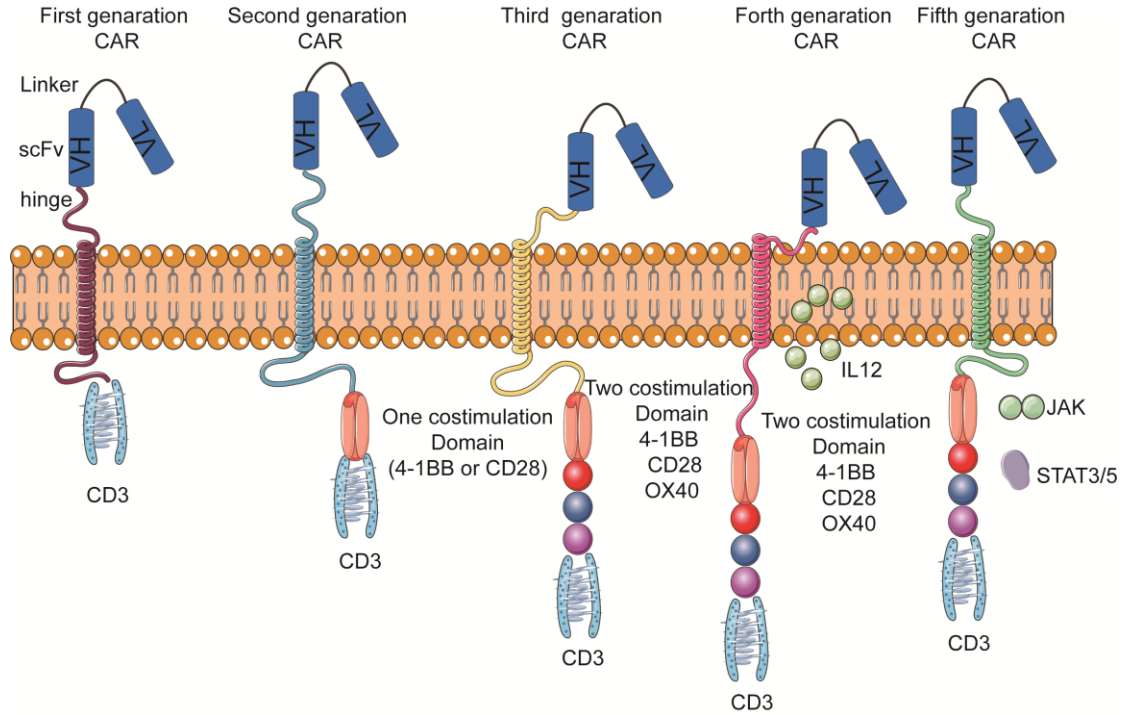


图 1.1 嵌合抗原受体的结构发展

图 1.1 Structural Development of Chimeric Antigen Receptors

由抗 CD19 抗体的 VH 和 VL 创建的 scFv 连接到 CD28 或 CD8 的跨膜序列，然后连接 CD3  $\zeta$  链和 CD28 或 CD137 的细胞内信号结构域<sup>[31]</sup>。CAR 同时赋予来自 scFv 的结合域和单个跨膜蛋白中的连接信号域，从而激活载体转导的 T 细胞 (CAR-T)<sup>[31]</sup>。在 CAR-T 细胞疗法中，CAR-T 细胞使 T 细胞通过单链可变片段识别域结合靶细胞表面抗原，介导主要组织相容性复合物限制性逃逸，使细胞毒性 T 细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 重定向到表达该抗原的靶细胞<sup>[28]</sup>，从而杀伤靶细胞肿瘤，实现精准治疗。结合后，CTL 和靶标之间形成非经典免疫突触，通过穿孔素和颗粒酶轴、Fas 和 Fas 配体轴和细胞因子介导其抗肿瘤作用<sup>[32]</sup>。其中，穿孔素和颗粒酶的溶细胞脱颗粒作用起主要杀伤作用，细胞因子的调节和 FasL 的诱导凋亡作用协同杀伤<sup>[32,33]</sup>。在颗粒酶依赖性途径中，穿孔素能够形成孔道，使颗粒酶能够进入靶细胞内部，促进半胱天冬酶的致死蛋白酶家族的活化<sup>[34]</sup>，诱导半胱天冬酶依赖性细胞凋亡<sup>[34]</sup>。CTL 细胞表面 FasL 诱导的靶细胞表面死亡受体 Fas 的交联，交联 Fas 迅速诱导细胞内“致死信号复合物” (death-inducing signaling complex, DISC) 的组装，进而激活半胱天冬酶-3 导致细胞死亡<sup>[35]</sup>。活化的 CAR-T 细胞产生的细胞因子可诱导肿瘤基质表达干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 受体，驱动抗原非依赖性基质破坏介导肿瘤细胞杀伤<sup>[32]</sup>。穿孔素、颗粒酶、细胞因子和 FasL 等因素共同参与了对癌细胞的杀伤作用，从而实现治疗效果。

## 1.4 外泌体

外泌体在疾病发生发展及治疗中发挥重要的作用<sup>[36,37]</sup>。自从 1981 年外泌体的概念被首次提出，外泌体便一直是多种领域的研究热点<sup>[38]</sup>。20 世纪 80 年代，在绵羊的红细胞中首次发现细胞外囊泡<sup>[39,40]</sup>。1996 年，RAPOSO 等在 B 淋巴细胞中观测到了外泌体的存在，并发现这些外泌体中含有 MHC II 类分子，并且具有多种重要的生物学活性，包括刺激 T 细胞增殖、抑制肿瘤生长等<sup>[41-43]</sup>。2013 年的诺贝尔生理或医学奖获得者：美国科学家 James E. Rothman 和 Randy W. Schekman，德国科学家 Thomas C. Südhof，他们发现了细胞内部囊泡(外泌体等)运输调控机制而获得了该奖项，这一突破性发现对于深入了解细胞内部运输机制、细胞间通讯以及疾病发生机制具有重要意义，为相关领域的研究和应用开辟了新的方向，成为近些年来生物医学领域研究的热点<sup>[44,45]</sup>。

外泌体是一类直径在 40~200nm 之间的小囊泡，由细胞分泌而出。这些小囊泡包含有脂质、核酸和蛋白质等生物分子。在电子显微镜下观察，外泌体通常呈现为球状或杯状的亚细胞囊泡状颗粒<sup>[46,47]</sup>，图 1.2。外泌体生成包括：内陷、多泡体(multivesicular bodies, MVB)形成和分泌<sup>[48,49]</sup>。首先分泌细胞的细胞膜发生内吞作用，内陷形成胞内小泡(Intraluminal Vesicle, ILV)，形成早期内体 (Early Endosome)，进一步发展为多泡小体向细胞膜移动，途中接收 RNA 及细胞质蛋白质并内部酸化发育形成晚期内体 (Late Endosome)。晚期外泌体中的微粒体膜再向内“出芽”形成 MVB，多泡体与细胞膜发生融合，其内部形态和大小均一的囊泡通过胞吐作用被释放到细胞外，形成 40~200nm 的外泌体<sup>[41]</sup>。MVB 中的腔内小囊泡也可以与溶酶体 (Lysosome) 融合降解<sup>[36]</sup>。

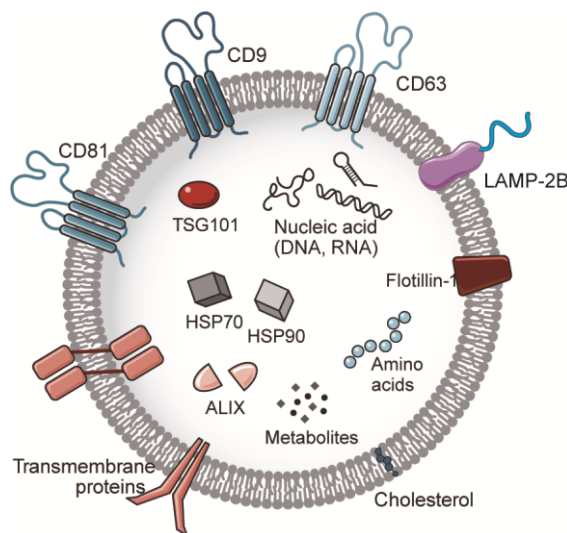


图 1.2 外泌体结构<sup>[37]</sup>

Figure 1.2 Exosome structure<sup>[35]</sup>

外泌体通过体液在体内转运,当被其他细胞吸收时,其内部多种生物分子被转运并调控受体细胞<sup>[50]</sup>。外泌体主要通过 3 种方式被细胞摄取:一是外泌体膜与受体细胞膜融合,将其内容物(蛋白质、mRNA 以及 miRNA)直接释放到靶细胞的细胞质中;二是外泌体表面的跨膜配体直接与受体细胞上的表面受体结合,激活受体细胞内的信号通路,进而影响细胞的生物学功能,如细胞内吞摄取<sup>[41,51]</sup>;三是内吞,外泌体可通过不同的内吞作用被受体细胞吸收,如胞饮作用、大胞饮作用和吞噬作用<sup>[52,53]</sup>;所有细胞类型都有非特异性摄取<sup>[53]</sup>。

通过外泌体,供体细胞可以将蛋白质、mRNA、microRNA(miRNA)和脂质等外源性物质转移到受体细胞,介导细胞间通讯。外泌体在细胞间通讯中的作用方式主要包括以下几种:外泌体表面配体与细胞表面受体特异性结合,实现信号分子的传递;外泌体与靶细胞膜结合,转移自身的膜蛋白和糖蛋白,获得新的黏附特性;外泌体与靶细胞融合,将外泌体内的分子传递到靶细胞内<sup>[50,54]</sup>。外泌体进行细胞间通讯优点有:选择性通讯实现对目标细胞的精准调控,能够在体内长时间存活,包裹信号分子保护其免受降解,可以穿过细胞膜等,对维持机体内稳态和调节各种生理过程起着重要作用。

## 1.5 工程化外泌体

工程化外泌体是指利用基因工程技术对外泌体进行改造和优化,以实现特定功能或增强其应用潜力的过程。利用基因工程技术对外泌体进行改造制备工程化外泌体,使其具有特定的功能或载体特性,为免疫治疗和抗肿瘤药物递送提供了新的思路和方法,显示出巨大的潜力和应用前景<sup>[55-57]</sup>。

来源于 CAR-T 细胞的外泌体携带 CAR、穿孔素、颗粒酶等直接攻击肿瘤细胞的效应分子<sup>[18,58]</sup>,能诱导肿瘤细胞死亡并抑制体内肿瘤生长,且未伴随明显的不良反应<sup>[59,60]</sup>,在免疫治疗中表现出极好的潜力<sup>[24,34]</sup>。CAR 分子中抗体衍生的抗原结合可变片段赋予它们特异性诱导肿瘤细胞死亡的特性<sup>[26]</sup>。穿孔素形成跨膜孔,使颗粒酶进入靶细胞触发 caspase 依赖性和非依赖性细胞死亡<sup>[26,61,62]</sup>。CAR-T 细胞来源的外泌体作为无细胞免疫疗法的优势在于,与 CAR-T 细胞相比它们不依赖于 CAR-T 细胞的寿命和分裂、稳定性好、伴随毒性(即细胞因子释放综合征发生率)的风险较低<sup>[26,63-65]</sup>。然而,制备 CAR-T 细胞衍生的外泌体需要复杂的生物工程技术 and 大量的细胞培养,限制了其在临床上的广泛应用。

1973 年,最原始的 HEK293 细胞来源于一个夭折的人类胚胎肾细胞中。将人的胚胎肾细胞中转化入人 5 型腺病毒 DNA 片段,得到的细胞即为 HEK293 细胞。HEK293 细胞因其高转染效率、易于培养和大量产生外泌体的能力,作为外泌体供体被广泛应用于各种研究<sup>[66,67]</sup>。Shabirul Haque 等使用 CD19 CAR 转导

HEK 衍生的外泌体具有选择性细胞毒性, 当外泌体与 CD19 B 细胞表面的 CD19 抗原结合介导进入细胞时, 发生促凋亡信号传导, 从而使细胞死亡<sup>[26]</sup>。

目前, 制备工程化外泌体主要包括表面修饰和功能装载两个方面。表面修饰通过对供体细胞或外泌体进行修饰, 提高外泌体的靶向性和稳定性; 功能装载是将具有治疗作用的药物和核酸等载入外泌体内部或表面, 实现对肿瘤组织的杀伤作用<sup>[68-71]</sup>。一旦外泌体进入受体细胞, 它们的内容物就被释放出来, 其中的成分可以驱动各种生物过程的变化, 包括基因表达、免疫反应和信号转导<sup>[55,72,73]</sup>。

## 1.6 外泌体靶向

外泌体的靶向是指通过改造外泌体表面的蛋白质或糖基等结构, 使其能够特异性地识别和结合特定的受体或分子, 实现对特定细胞的靶向传递, 使其内容物 mRNA 在靶细胞内部翻译表达, 从而实现精准治疗<sup>[74,75]</sup>。

外泌体具有促进 RNA 内容物细胞间转移的特性, 可以在体外进行大批量瞬时转染和功能性 RNA 修饰, 有望成为 RNA 类药物的有效载体<sup>[76,77]</sup>。外源性 mRNA 在体内易降解, 无法执行所需的功能<sup>[78,79]</sup>。L7Ae 是一种多功能 RNA 结合蛋白, 是 tRNA 成熟过程中古细菌 RNAsP 的亚基, 可以与 RNA 的 C/Dbox 识别结合, 启动小核仁核糖核蛋白复合体的形成, 对 RNA 的修饰、稳定性和翻译调控等方面发挥重要作用<sup>[80]</sup>。外泌体表面的靶标分子 CD63 是外泌体表面的跨膜蛋白, 参与外泌体的合成、定位<sup>[71]</sup>。

配体与外泌体表面表达的跨膜蛋白融合, 用编码融合蛋白的质粒转染的供体细胞分泌在其表面带有靶向配体的外泌体<sup>[48,81]</sup>, 可以增强外泌体递送的靶向性<sup>[82,83]</sup>。然而, 在外泌体的形成过程中, 肽容易被细胞内的溶酶体蛋白酶降解, 将糖基化序列(Glycosylation Motif, GNSTM)与特异性肽结合, 可以防止特异性肽被降解。人 LAMP-2B 包括一个 29 个氨基酸的信号肽、一个大的 N 端膜外结构域和一个 C 端跨膜区域, 后跟一个非常短的细胞质尾部, 是溶酶体相关膜蛋白 (lysosomal-associated membrane protein, LAMP), 主要定位于溶酶体和内体, 小部分在细胞表面<sup>[48,84]</sup>。LAMP-2B 与靶向蛋白进行基因融合, 以在外泌体上显示抗体<sup>[48]</sup>。当标签融合到 LAMP-2B 的 N 末端时, 它会暴露在外泌体表面, 当它与 LAMP-2B 的 C 末端融合时, 它会定位在外泌体内部<sup>[85]</sup>。含有伊马替尼或 BCR-ABL 融合基因短片断干扰 RNA 的白细胞介素 3-溶体相关膜蛋白 2b(interleukin-3-lysosomal associated membrane protein2b, IL3-Lamp2b)的外泌体能靶向慢性粒细胞白血病细胞并在体外和体内抑制癌细胞生长<sup>[86]</sup>。

## 1.7 研究意义

B 细胞白血病和淋巴瘤是恶性血液病中最常见的亚型, 复发难治是临床上导

致治疗失败的主要原因,近 1/3 患者因此不治而亡<sup>[87,88]</sup>。CAR-T 细胞疗法为血液系统恶性肿瘤的治疗带来了革命性的变化,近年来取得了前所未有的成绩<sup>[20,89]</sup>。目前,使用质粒或病毒载体(例如腺病毒、逆转录病毒或慢病毒)将 CAR 引入 T 细胞,其中慢病毒成为转导 T 细胞是最常见的方法<sup>[22,90]</sup>。慢病毒成本高、收率低、活性容易丧失等各方面都直接影响着 CAR-T 产品在治疗上的应用<sup>[20,91]</sup>。另外,与 CAR-T 细胞疗法相关的严重毒性也会影响其疗效,甚至可能发展为危及生命的疾病<sup>[20,92]</sup>。因此制备低成本的 CAR-T 细胞产品和寻找安全、有效的 CAR-T 细胞治疗替代疗法显得尤为重要<sup>[87,93,94]</sup>。

目前,CD19 是针对 B 细胞淋巴瘤免疫治疗最常见的靶点<sup>[95]</sup>。来源于 CAR-T 细胞的外泌体中包含穿孔素和颗粒酶等细胞毒性分子<sup>[26,45]</sup>,在免疫治疗中杀伤肿瘤表现出极好的潜力<sup>[24,96]</sup>。然而,生产 CAR-T 细胞衍生的外泌体需要复杂的生物工程技术 and 大量的细胞培养,限制了其在临床上的广泛应用。HEK293 细胞因其高转染效率、易于培养和大量产生外泌体的能力,作为外泌体供体被广泛应用于各种研究<sup>[66,77,97]</sup>。用 HEK293T 细胞转导 CD19 CAR 质粒,其外泌体(Exo-CD19 CAR)用于治疗 CD19 B 淋巴系白血病,结果显示,Exo-CD19 CAR 治疗诱导 CD19 阳性白血病 B 细胞的细胞毒性,但不诱导 CD19 阴性细胞的细胞毒性<sup>[92]</sup>。利用工程化外泌体进行免疫治疗,可以降低免疫原性,具有广阔的应用前景,为各种疾病的治疗和管理带来创新和突破<sup>[98-100]</sup>。

外源性 mRNA 在体内易降解,由于缺乏天然构象,外源性蛋白质无法执行所需的功能,所用化学药物对正常细胞具有致命性<sup>[78]</sup>。L7Ae 是一种多功能 RNA 结合蛋白,可以与 RNA 的 C/Dbox 识别结合,对 RNA 的稳定起到重要的作用<sup>[80]</sup>。外泌体表面存在有很多靶标分子(如 CD63),可以参与外泌体合成<sup>[42,60,82]</sup>。通过 L7Ae 与编码目的蛋白的 mRNA 中的 C/Dbox 相互作用很好地结合到外泌体中。天然外泌体靶向性弱,常将天然外泌体进行修饰,提高靶向性和稳定性<sup>[74]</sup>。LAMP-2B 是最广泛使用的显示靶向基序的外泌体表面蛋白。将靶向肽融合到 LAMP-2B 的 N 末端使其在外泌体表面表达<sup>[48]</sup>,可以帮助外泌体选择性递送至靶细胞<sup>[74,101]</sup>,使其内容物 mRNA 在靶细胞中翻译表达目的蛋白。利用外泌体靶向原理制备 CAR-T 细胞,可以大大降低 CAR-T 细胞免疫原性,对 CAR-T 细胞免疫治疗的临床运用具有重要意义。

## 1.8 研究内容和技术路线

外泌体免疫治疗具有低免疫原性、高效的信号传递、靶向性、生物安全性、多功能性和便捷性等优势。外泌体作为一种天然的细胞外囊泡,本身具有较低的免疫原性,不容易引起免疫排斥反应,有利于在体内稳定存在和发挥作用;外泌体内含有丰富的生物活性分子,如蛋白质、miRNA 等,可以作为信号分子传递

到目标细胞,调控目标细胞的功能和代谢,从而实现治疗效果:外泌体来源于特定细胞类型,可以携带来源细胞特异性的生物分子,具有一定的靶向性,可以选择性地作用于特定细胞或组织,减少对健康组织的影响;外泌体治疗相对于细胞治疗更为安全,因为外泌体不具备自我复制能力,避免了潜在的肿瘤形成风险;外泌体可以携带多种生物活性分子,具有多种功能,如抗炎、促进修复、抗肿瘤等,可以根据需要进行定制化设计,实现多种治疗效果;外泌体可以通过体液采集、体外培养等方式进行制备,操作简便,便于大规模生产和临床应用。受此启发,我们设计利用外泌体开发针对 B 细胞淋巴瘤的精准医疗平台,最终实现对癌细胞的“精准打击”<sup>[102,103]</sup>。

在第一份工作中,本文选择源于血液肿瘤细胞株 K562、RAJI、B-LCL 细胞进行研究,构建了绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和荧光素酶(luciferase, Luc)双标的 EBV 感染的人 B 淋巴细胞(B-LCL-GL)和 K562 细胞(K562-GL),GFP 与 Luc 双标的 RAJI 细胞株(RAJI-GL)购买于上海中桥新舟生物公司;尾静脉注射和皮下注射高、中、低 3 个浓度的 B-LCL-GL 细胞株建立肿瘤模型;并比较通过尾静脉注射和皮下注射建立的异种移植 NPG((NOD)/Prkdc<sup>scid</sup>/IL-2R<sup>null</sup>)小鼠模型的优缺点,为后续外泌体体内实验的研究奠定了基础。另外,为了避免 CAR-T 细胞免疫治疗中细胞因子释放综合征和免疫效应细胞相关神经毒性综合征等副作用,该实验运用了来源于 CAR-T 细胞的外泌体携带穿孔素、颗粒酶等直接攻击肿瘤细胞的效应分子原理<sup>[18]</sup>,以 CD19 抗原为研究靶点,将 CD19 CAR 和颗粒酶、穿孔素质粒共转染 293F 细胞制备工程化 CD19/G+P 外泌体。CD19/G+P 外泌体与 CD19 B 细胞表面的 CD19 抗原结合介导进入细胞,发生促凋亡信号传导<sup>[26]</sup>,使 CD19/G+P 外泌体对 CD19+肿瘤细胞具有选择性细胞毒性,并在体内验证了 CD19 CAR 外泌体的肿瘤杀伤作用,降低免疫原性的同时解决了外泌体产量低的问题。

在第二份工作中,为了提高外泌体的靶向受体细胞的功能,该文利用 LAMP-2B 外泌体靶向原理构建了外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统。我们将靶向肽(VCD33D-H11、Nb1、sna006a)融合到 LAMP-2B 的 N 末端构建 LAMP-2B 靶向质粒使靶向肽在外泌体表面表达<sup>[48]</sup>,使外泌体内容物选择性递送至靶细胞(CD3+T 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞)<sup>[74]</sup>。利用基因工程技术将 LAMP-2B 靶向质粒和 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞,从而获得靶向 T 细胞的外泌体(CD19 CAR 靶向外泌体),将外泌体与 PBMC 共培养,外泌体靶向递送 CD19 CAR 到 T 细胞,构建了外泌体靶向系统,并比较了在外泌体靶向系统中 3 种靶向质粒的靶向效果。另外,我们运用了 L7Ae 蛋白与 RNA 的 C/Dbox 识别结合原理,将 L7Ae 连接在外泌体跨膜蛋白 CD63 蛋白的 C 端,从而构建了 CD63-L7Ae 融合质粒,使 L7Ae 在外泌体中表达<sup>[80]</sup>;将 C/Dbox 插入到 CD19 CAR



质粒 3'-非翻译区构建 CD19 CAR-C/Dbox 质粒, 编码 CD19 CAR 的转录本可以通过 L7Ae 与 3'-UTR 中的 C/Dbox 相互作用很好地结合到外泌体中。结合 LAMP-2B 靶向质粒的靶向原理, 利用基因工程技术将 LAMP-2B 靶向质粒、CD19 CAR-C/Dbox 质粒(编码 3'UTR 中携带 C/Dbox 的 CD19 CAR mRNA 的基因)和 CD63-L7Ae 质粒共转染 293F 细胞, 从而获得靶向 T 细胞的外泌体(CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体), 将外泌体与 PBMC 共培养, 外泌体靶向递送 CD19 CAR mRNA 到 T 细胞并转录翻译, 构建了外泌体 mRNA 靶向递送系统, 并比较了在外泌体 mRNA 靶向递送系统中 3 种靶向质粒的靶向效果。此外, 为了突破 CAR-T 细胞制备瓶颈, 该文比较了外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞的能力, 并利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞, 为 CAR-T 细胞的制备提供了新的思路。

技术路线如图 1.3:

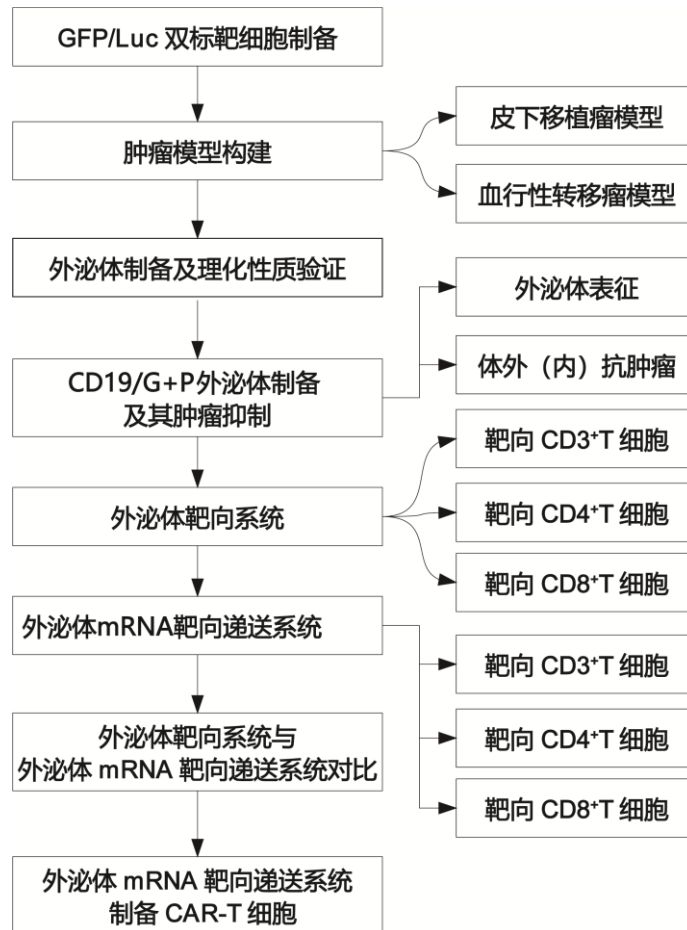


图 1.3 实验流程

Figure 1.3 Experimental Procedure

## 第二章 靶向 CD19 的 CAR 外泌体抗 B 细胞淋巴瘤

### 2.1 引言

B 细胞来源的恶性血液疾病主要包括急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤<sup>[87]</sup>。目前 CD19 靶向的 CAR-T 细胞是一种有效的治疗难治性 B 细胞淋巴瘤患者的有效方法<sup>[24,104]</sup>。CAR 免疫治疗的在临床应用面临一些主要障碍，包括 CAR-T 细胞制备、缺乏肿瘤特异性抗原、治疗相关毒性和抗原逃逸等<sup>[28]</sup>，研究者们利用外泌体的生物学特性来突破这一瓶颈。

外泌体是一种细胞外囊泡，可以在细胞之间传递信息、调节细胞功能，并参与多种生理和病理过程。外泌体内含有丰富的蛋白质、核酸、脂质等生物分子，可以通过体液循环等途径传递到受体细胞，实现细胞间的信息交流；同时，外泌体具有一定的稳定性，可以在体液中很长时间存活，有助于信息的长距离传递。因此，本课题从 CAR-T 细胞外泌体的特性及其对肿瘤细胞的杀伤作用入手，探讨工程化 CAR-T 外泌体在 B 细胞淋巴瘤免疫治疗的作用。首先，构建含 Luc、GFP 双标签的 B-LCL-GL 和 K562-GL 细胞系，接种低、中和高 3 种剂量的 B-LCL-GL 细胞至 NPG ((NOD)/Prkdc<sup>scid</sup>/IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup>) 小鼠皮下或尾静脉内，建立皮下移植瘤模型与血行性转移瘤模型并比较分析。接着，通过超速离心方法获得 293F 外泌体并分析其理化性质。随后，将颗粒酶、穿孔素和 CD19 CAR 共转导 293F 细胞制备工程化 CD19/G+P 外泌体，WB、ELISA 和纳米流式验证 CD19/G+P 外泌体理化性质。最后，流式检测 CAR 分子在受体细胞中表达情况验证 CD19/G+P 外泌体摄取情况，并通过 CCK8 检测 CD19/G+P 外泌体体外杀伤能力，动物实验检测 CD19/G+P 外泌体体内杀伤能力。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 实验耗材

表 2.1 实验耗材

Table 2.1 Experimental Consumables

| 实验耗材            | 商家                           |
|-----------------|------------------------------|
| 移液枪枪头           | Axygen 公司                    |
| EP 管、PCR 管      | Axygen 公司                    |
| 离心管             | Corning 公司                   |
| 一次性使用无菌溶药注射器    | 上海金塔医用器材有限公司                 |
| 一次性使用无菌移液管      | 广州洁特生物过滤股份有限公司               |
| 烧杯、蓝盖瓶、锥形瓶等玻璃仪器 | 四川蜀牛玻璃仪器有限公司                 |
| 芦荟乳胶手套          | 海门市扬子医疗器械有限公司                |
| 血球计数板           | 上海求精生化试剂仪器有限公司               |
| 细胞培养皿、T75 培养瓶   | Corning 公司                   |
| 细菌培养皿           | 江苏康健医疗用品有限公司                 |
| 0.22μm 滤膜       | Thermo fisher Merck Milipore |
| 125mL、500mL 摇瓶  | KIRGEN 公司                    |
| 过滤器             | Merck 公司                     |
| 96、24、6 孔板      | 康宁公司                         |

### 2.2.2 实验试剂

#### (1) 本实验所用到的试剂及生产商

表 2.2 实验试剂

Table 2.2 Experimental Reagents

| 名称                | 厂家           |
|-------------------|--------------|
| RPMI-1640 培养基     | Gibco        |
| DMEM 培养基          | Gibco        |
| 0.25%Trypsin-EDTA | Gibco        |
| PBS               | Gibco        |
| L-Glutamine       | Gibco        |
| 胎牛血清 (FBS)        | Gibco        |
| DL5000 DNA Marker | 擎科           |
| 感受态细胞 DH5α        | 擎科           |
| 氯化钠               | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 无水乙醇              | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 丙三醇 (甘油)          | 国药集团化学试剂有限公司 |
| polybrene         | 上海翌圣         |
| 胰化蛋白胨             | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 酵母提取物             | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 琼脂                | 国药集团化学试剂有限公司 |

|                                               |               |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 卡那霉素                                          | 华北制药有限公司      |
| 无血清细胞冻存液                                      | 新赛美公司         |
| 脱脂奶粉                                          | BD 公司         |
| ECL 发光液                                       | 武汉塞维尔生物科技有限公司 |
| 慢病毒滴度快速检测卡                                    | 苏州博奥龙生物公司     |
| RAPI 裂解液                                      | Servicebio    |
| 外泌体红色荧光标记染料 (PKH26)                           | 宇玫博           |
| 抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI)                             | 碧云天           |
| D-Luciferin                                   | 北京索莱宝公司       |
| 人外周血淋巴细胞分离液                                   | 天津市灏洋生物       |
| SMM293-TII 培养基                                | 奥浦迈           |
| OPM-293 CD05 Medium 培养基                       | 奥浦迈           |
| OPM-CHOPFF06                                  | 奥浦迈           |
| OpTmizer™ CTST™ T-Cell Expansion Basal Medium | Gibco         |
| OpTmizer™ CTS T-Cell Expansion Supplement     | Gibco         |
| 重组人 IL-2                                      | 同立海源生物        |
| 电泳液                                           | Servicebio    |
| 转膜液                                           | Servicebio    |
| Dynabeads human Tactivator CD3/CD28           | Gibco         |
| OPM-CHOPFF06                                  | 奥浦迈           |
| 通用型组织固定液                                      | 塞维尔           |
| HEPES                                         | Gibco         |
| Universal Benzo Nuclease 全能核酸酶                | 诺维赞           |
| MgCl <sub>2</sub>                             | 赛默飞           |
| 嘌呤霉素                                          | 碧云天           |
| 5×Loading Buffer                              | 雅酶            |
| PEI                                           | 上海复申生物科技有限公司  |

## (2) 本实验所用到的试剂盒及生厂商

表 2.3 试剂盒及生产商

Table 2.3 Kits and Manufacturers

| 试剂盒                    | 生产商        |
|------------------------|------------|
| 无内毒素质粒大提试剂盒            | 天根生化科技有限公司 |
| 质粒小提中量试剂盒              | 天根生化科技有限公司 |
| 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒        | 天根生化科技有限公司 |
| SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒       | 雅酶生物公司     |
| ClonExpress®重组试剂盒      | 诺唯赞公司      |
| PSCapture™ 外泌体流式细胞术试剂盒 | Wako       |
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒          | 碧云天        |
| 颗粒酶 ELISA 试剂盒          | 索莱宝        |
| 穿孔素 ELISA 试剂盒          | 索莱宝        |
| CC8 试剂盒                | ABclonal   |

|                     |        |
|---------------------|--------|
| EcoRI-HF 限制性内切酶     | NEB 公司 |
| BsrGI-HF 限制性内切酶     | NEB 公司 |
| 2×Phanta Master Mix | 诺唯赞公司  |

## 2.2.3 实验仪器

表 2.4 实验仪器

Table 2.4 Experimental Instruments

| 仪器名称            | 厂家                              |
|-----------------|---------------------------------|
| 恒温金属浴           | MiuLab 公司                       |
| 电动吸引器（无油式）      | 江苏鱼跃医用仪器                        |
| CO2 培养箱         | Astec 公司                        |
| Mr.Frosty™梯度降温盒 | Thermo Fisher                   |
| 激光共聚焦显微镜        | OLYMPUS 公司                      |
| 液氮保存罐           | 四川亚西机器有限公司                      |
| 凝胶成像仪           | BIO-RAD                         |
| Milli-Q 纯水仪     | Millipore 公司                    |
| 制冰机             | 杭州冰鹿公司                          |
| 高压灭菌锅           | 上海沪西仪器厂                         |
| 倒置荧光显微镜         | Olympus 公司                      |
| 流式细胞仪           | BECKMAN 公司                      |
| BD-BGC1 蓝光切胶仪   | 东林昌盛                            |
| 血球计数板           | 上海求精生化试剂仪器有限公司                  |
| 电子天平            | Artotius 公司                     |
| 超净工作台           | 广州瑞佳斯实验室设备科技                    |
| 低速离心机           | 湘仪离心机仪器有限公司                     |
| 恒温摇床            | 上海智诚                            |
| 恒温培养箱           | Astec 公司                        |
| 4 度冰箱           | 海尔                              |
| 多功能酶标仪          | Thermo 公司                       |
| 活体动物成像仪         | Spectral instruments imaging 公司 |
| 小型动物气体麻醉仪       | 深圳瑞沃德公司                         |
| 透射电子显微镜         | HITACHI                         |
| 纳米颗粒跟踪分析仪       | Particle Metrix                 |

## 2.2.4 实验抗体

表 2.5 实验抗体

Table 2.5 Experimental Antibodies

| 抗体名称                                                         | 厂家             |
|--------------------------------------------------------------|----------------|
| PE Mouse Anti-Human CD19                                     | BD Biosciences |
| CD22 Monoclonal Antibody(RFB-4), APC                         | invitrogen     |
| Anti-TSG101 antibody                                         | abcam          |
| CD81(D3N2D)Rabbit mAb                                        | CellSignaling  |
| anti-hCD63 Rabbit mAb                                        | BD Biosciences |
| 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG                                            | Servicebio     |
| PE Mouse Anti-Human CD63                                     | BD Biosciences |
| FITC anti-human CD9                                          | BioLegend      |
| APC Mouse Anti-Human CD81                                    | BD Biosciences |
| 7AAD viability staining                                      | BIOlegend      |
| GAPDH Rabbit mAb                                             | ABClonal       |
| 鼠抗 StrepII 单克隆抗体                                             | GenScript      |
| Goatanti-Mouse IgG Secondary Antibody, HRP                   | Bioswamp       |
| Anti-G4S linker(B02H1) mAb(APC)                              | PreScience     |
| APC-Cy7 CD3                                                  | BD Biosciences |
| APC antihuman CD4                                            | BIOlegend      |
| BV421 Mouse Anti-Human CD8                                   | BD Biosciences |
| CD9(D3H4P)Rabbit mAb                                         | CellSignaling  |
| THENWSHPQFEK Tag Antibody, mAb, Mouse Antibody(FITC-StrepII) | GenScript      |

## 2.2.5 菌种、细胞、动物

表 2.6 实验用菌种、细胞、动物

Table 2.6 Strains, Cells, and Animals Used in the Experiment

| 名称                                   | 来源              |
|--------------------------------------|-----------------|
| TransStbl3 Chemically Competent Cell | 全式金生物           |
| HEK293T 细胞                           | ATCC            |
| HEK293F 细胞                           | ATCC            |
| K562 细胞                              | ATCC            |
| RAJI-GL 细胞                           | 上海中桥新舟生物公司      |
| B-LCL 细胞                             | 上海恒赛生物科技有限公司    |
| PBMC                                 | 分离的健康人外周血中单个核细胞 |
| 重度联合免疫缺陷小鼠 (NPG)                     | 北京维通达生物公司       |

## 2.2.6 细胞培养

从液氮罐中取出冻存的细胞，立即置于恒温水浴锅中 37℃水浴解冻，冻融后向冻存管内加入 1 mL 已复温的完全培养基，转入装有 10 mL 已复温的完全培养基的 50 mL 离心管中，300 g 离心 5 min 弃上清。加入适量的完全培养基，混匀后转移至细胞培养瓶中，并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 二氧化碳培养箱中。B-LCL、K562、RAJI 细胞是在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养，人胚肾细胞 293T 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养，293F 细胞在 SMM293-TII 培养基与 OPM-293 CD05 Medium 培养基 1:1 混合培养液中置于摇床上悬浮培养，PBMC 细胞在 50 mL CTS OpTmizer T Cell 培养基+1.3 ml CTS Expansion+0.5 mL HEPES+0.5 mL L-谷氨酰胺（200 mM）培养液中培养。

## 2.2.7 PLV-Luc-GFP 慢病毒载体构建及慢病毒包装

（1）PLV-Luc-GFP 慢病毒载体构建：质粒 BRD-PTK-amp-CD5-GFP 经 BsrGI 和 EcoRI 双酶切，PCR 含 Luc-GFP 的质粒，0.8%琼脂凝胶电泳拍照后，切胶回收载体片段和目的 DNA 片段，用诺维赞 ClonExpress®重组试剂盒进行连接，连接产物转化 Stbl3 感受态，挑选阳性克隆扩增培养。抽提重组质粒，进行 PCR 鉴定和测序，获得含 Luc-GFP 的三代慢病毒质粒，命名为 PLV-Luc-GFP。

（2）慢病毒包装、浓缩：将包装病毒的 293T 细胞置于 10% FBS 的 DMEM 培养基中，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 进行培养。用于包装病毒的是第三代慢病毒包装系统，由目的质粒、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 等 4 种包装质粒组成。将装质粒转染 293T 细胞 72 H 后收集细胞上清，通过超速离心法浓缩慢病毒并保存于 -80℃，避免反复冻融。

（3）慢病毒载体包装效率检测：收集细胞上清时，吸取 20 μl 滴加到慢病毒滴度快速检测卡的样品窗（S）中；再加入 50 μl 缓冲液；静置 15 min 后判读结果。

（4）慢病毒转染活性鉴定：取生长良好的 293T 细胞按  $5 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 6 孔板中，添加 200 μl 浓缩后的病毒，并加入终浓度为 8 μg/μL 的 Polybrene，2~3d 后用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达。

## 2.2.8 GFP 与 Luc 双标记靶细胞的构建

（1）流式细胞术检测细胞表面 CD19、CD22 表达：取对数生长期的待测细胞于流式管中，加入 1 mL 流式 Buffer（PBS+2%FBS）室温、300 g、5 min 离心，倒掉上清液；用流式 Buffer 将细胞重悬并分为 2 份，一份添加 PE-CD19、APC-CD22 抗体 4 度避光反应 30 min 作为实验组，另一份不添加抗体作为对照

组；用流式 Buffer 重复清洗 2 遍，加入 200  $\mu$ L 流式 Buffer 重悬细胞，流式细胞仪上机检测。

(2) 慢病毒感染与细胞筛选：收集 K562 和 B-LCL 细胞接种到 6 孔板中，每 100 $\mu$ L 浓缩病毒转染  $1 \times 10^6$  个细胞，并添加终浓度为 8  $\mu$ g/ $\mu$ L 的 Polybrene，培养 4~6 h 后更换新鲜的培养基，添加 puro（嘌呤霉素）筛选 2 周后，用荧光显微镜拍照观察 GFP 的表达，体外生物发光检测 Luc 表达。

(3) 体外生物发光实验：取待测细胞重悬于 1mL 磷酸盐缓冲液（PBS）接种于 24 孔培养板，加入 100  $\mu$ L 按 D-Luciferin：缓冲液为 1：200 的比例配置生物素底物作为实验组，不添加底物的作为对照组，5min 后置于小动物活体成像系统 IVIS Spectrum 曝光成像，收集化学发光信号。

### 2.2.9 肿瘤模型构建

(1) 实验动物：4 周龄 SPF 级 NPG 小鼠，购于北京维通达生物公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0002。饲养于武汉科技大学实验动物中心 SPF 级屏障设施中，温度维持在  $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，相对湿度维持在 50%~60%，光照 12 h/12 h 正常明暗交替，小鼠自由饮水、摄食，稳定一周之后进行实验。所有动物实验均在武汉科技大学实验动物中心进行，并通过了该中心实验动物福利及伦理委员会的批准。

(2) 细胞悬液制备：收集指数生长期的 B-LCL-GL 细胞，用 PBS 清洗 2 次，300 g 离心 5 min 去上清，计数，用生理盐水重悬制备成  $5 \times 10^7$  cell/ml(高浓度)、 $1 \times 10^7$  cell/ml(中浓度)、 $0.5 \times 10^7$  cell/ml(低浓度)3 个浓度的单细胞悬液。

(3) 血行性转移瘤模型的构建：将 NPG 小鼠随机分成 3 组，分别取 100  $\mu$ L 高、中、低浓度 B-LCL-GL 细胞悬液经尾静脉注射（Intravenous, IV）于 NPG 小鼠尾静脉，每组平行 3 只（ $n=3$ ）。接种 7、14、21、28 天后分别对小鼠进行活体成像。造模 100 天后给予小鼠安乐死。

(4) 皮下移植瘤模型的构建：将 NPG 小鼠随机分成 3 组，分别取 100 $\mu$ L 高、中、低浓度 B-LCL-GL 细胞悬液经皮下注射（Subcutaneous, SC）于 NPG 小鼠右前肢，每组平行 3 只（ $n=3$ ）。接种 7、14、21、28 天后分别对小鼠进行活体成像。造模 100 天后给予小鼠安乐死。

(5) 活体成像实验：向小鼠腹腔注射 Luciferase 底物 D-Luciferin，浓度为 15 mg/mL，剂量为每只 150  $\mu$ L，3 min 后用异氟烷吸入麻醉，置入小动物成像系统 IVIS 成像。

### 2.2.10 超速离心法提取 293F 细胞衍生的外泌体及其表征验证

(1) 293F 细胞培养：将细胞按照  $0.3 \times 10^6$  cells/ml 的接种量于 125 mL 摇瓶



中的 25 ml 培养基中培养。37 °C、120 rpm、5% CO<sub>2</sub> 的摇床培养箱中培养 72 h。当细胞密度达到  $2 \times 10^6$  cells/ml，活率达到 90% 后继续培养，72 h 收集细胞上清超速离心获得 293F 外泌体。

(2) 外泌体提取：收集细胞培养上清液，在 4 °C、300 g 离心 5 min 去除细胞，3000 g 离心 10 min 去除死细胞，10000 g 离心 60 min 去除细胞碎片，0.22  $\mu$  m 滤膜过滤去除微囊泡和其他大囊泡，添加全能核酸酶和 2 M MgCl<sub>2</sub>、4 °C 过夜静置去除外源性核酸，4 °C、100000 g 离心 90 min 沉淀外泌体去除杂蛋白，用预冷 PBS 重悬，4 °C、100000 g 离心 90 min，沉淀即为所需外泌体，用 PBS 重悬并置于 -80 °C 冰箱中保存待用。透射电镜 (Transmission electron microscope, TEM) 观察外泌体的形态，纳米颗粒跟踪分析仪 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 测量外泌体粒径大小，蛋白质印迹法 (Western Blot, WB) 及磁珠捕获外泌体流式检测外泌体特异性表面标志 TSG101、CD9、CD81 和 CD63，BCA 蛋白质分析试剂盒测定外泌体蛋白质浓度<sup>[105]</sup>。

(3) TEM 观察外泌体形态：外泌体悬液用移液枪吸取 20  $\mu$  l 样本滴在碳膜铜网放置 3-5 min，将 2% 磷钨酸滴在碳支持膜铜网上放置 1-2 min，室温干燥，透射电子显微镜下观察。

(4) NTA 测量外泌体粒径：Particle Metrix 仪器自动校准合格后，将外泌体样品稀释至合适的浓度，测定外泌体的粒径大小及浓度。

(5) WB 鉴定外泌体表面标志：将样本用少量 RIPA 裂解液进行裂解，冰上静置 5 min；4 °C、12000 r/min 离心 10 min，吸上清为总蛋白抽提物；5 $\times$  Loading Buffer 和 PBS 稀释蛋白样品，在沸水浴中煮沸 10 min，制成上样液备用；10% SDS-PAGE 进行蛋白分离，并将蛋白转印至 PVDF 膜，浸入 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h；封闭结束后分别加入用 5% 脱脂奶粉稀释的一抗，4 °C 孵育过夜；加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37 °C 孵育 1 h；滴加 ECL 发光液，在凝胶成像系统中曝光成像。

采用兔抗人 TSG101 单克隆抗体 (1 : 5000)、兔抗人 CD81 单克隆抗体 (1 : 1000)、兔抗人 CD63 单克隆抗体 (1 : 1000) 作为一抗，羊抗兔 IgG (1 : 3000) 作为二抗，检测外泌体表面标志。

(6) 磁珠捕获流式鉴定外泌体表面标志：外泌体的尺寸很小 (40-200 nm)，磁珠、外泌体捕获珠和分离的外泌体使用流式细胞术可见<sup>[55]</sup>。PSCapture™ 外泌体流式细胞术试剂盒可用于细胞培养上清和体液中的细胞外囊泡定性分析。磁珠捕获细胞外囊泡后，将细胞外囊泡表面特异性结合磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 的蛋白固定在磁珠上，利用荧光标记的抗外泌体表面抗原抗体，可检测细胞外囊泡表面的标记蛋白。本实验用磁珠固定外泌体，与荧光标记抗 PE-CD63、FITC-CD9、APC-CD81 抗体结合后，通过流式细胞仪分析外

泌体表面抗原，实验步骤按照《PSCapture™ Exosome Flow Cytometry Kit》说明书进行。

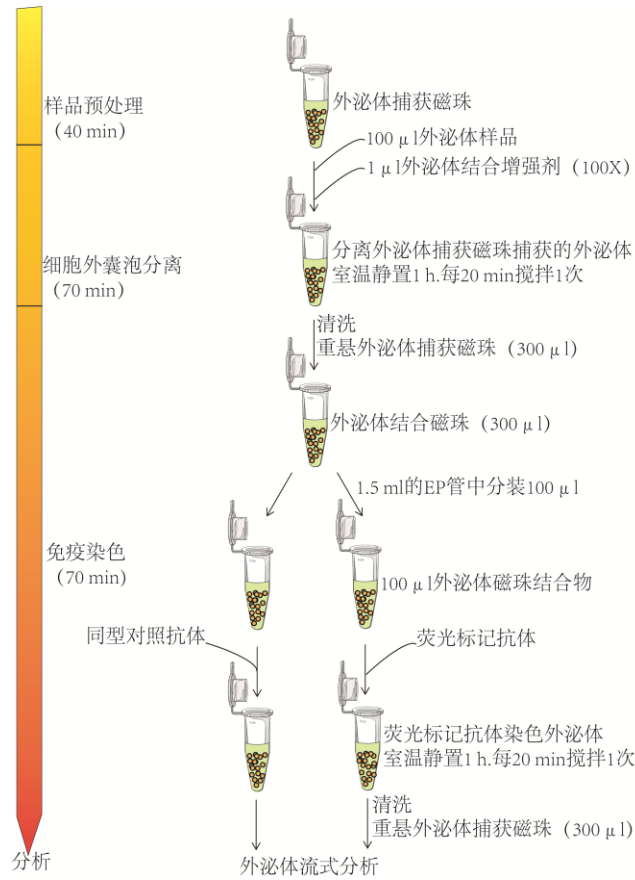


图 2.1 磁珠捕获流式鉴定外泌体操作流程

Figure 2.1 Process of magnetic bead capture flow identification of exosomes

### 2.2.11 CD19/G+P 外泌体制备及细胞毒性检测

(1) 质粒设计：如今国际上获得认可的应用于 CD19 CAR 治疗中的 CD19 单克隆抗体 scFv 克隆主要有 FMC63 和 SJ25C1<sup>[13]</sup>。选择 FMC63 作为 CD19 特异性单抗，在 VL 和 VH 结构域之间有一个 G4S 连接体，将 ScFv、StrepII、CD8 铰链区和跨膜区、ICD 和 CD3ζ 胞内区依次串联，由此构建靶向人源 CD19 的经典第二代 CAR 分子 CD19 CAR 质粒。StrepII 作为标签，CD3ζ 介导 CAR 二聚体与内源性 TCRs 结合，促进 T 细胞激活。具有 CD8α 铰链结构域和跨膜结构域的 CAR-T 细胞比 CD28 结构域的 CAR-T 细胞释放更少的 IFNγ 和 TNFα，并且对活化诱导的细胞死亡（activation induced cell death, AICD）更不敏感<sup>[94]</sup>。共刺激分子 ICD（Inducible Co-Stimulator Molecule）是一种膜上受体蛋白，是 CD28 家族的一员，提供 T 细胞的共刺激信号，促进 T 细胞的活化、增殖和分化。

已知细胞毒性 T 淋巴细胞通过释放效应分子(穿孔素和颗粒酶)来发挥其抗肿瘤

瘤活性。为了通过外泌体有效地将穿孔素或颗粒酶传递到靶细胞抑制肿瘤，本实验将穿孔素或颗粒酶融合到 CD63 的 C 端，然后亚克隆到 pcDNA3.1 (+) 载体上<sup>[71]</sup>，构建 CD63-PFRI 和 CD63-GZMB 质粒，使穿孔素或颗粒酶包裹在在外泌体内部。

(2) CD19/G+P 外泌体制备：取 25  $\mu\text{g}$  CD19 CAR、8  $\mu\text{g}$  CD63-GZMB、8  $\mu\text{g}$  CD63-PFRI 用 PEI 共转染 25 ml 293F 细胞，转染 24 h 添加 OPM-CHOPFF06 培养基（为转染体系的 1/20）和 L-Glutamine（转染体系的 1/50）。72 h 收集细胞检测细胞转染效率和收集细胞上清超离获得 CD19/G+P 外泌体。

细胞转染效率检测：取大于  $5 \times 10^5$  个转染后的细胞于流式管中作为实验组，未转染的细胞作为阴性对照；添加 FITC-StrepII 抗体 4 度避光反应 30 min，用 200  $\mu\text{L}$  流式 Buffer 重悬细胞并添加 5  $\mu\text{L}$  的 7-AAD，用流式细胞仪上机检测 293F 细胞中 StrepII 的表达。

收集转染后的细胞上清超速离心获得 CD19/G+P 外泌体，实验步骤参照 2.2.10 (2)。

(3) ELISA 检测外泌体中颗粒酶、穿孔素的含量：将 CD19/G+P 外泌体作为实验组，293F 外泌体作为对照组，使用细胞裂解液裂解提纯的外泌体，裂解后，2000 rpm 离心 20 min 以除去死细胞和杂蛋白。随后，通过 ELISA 试剂盒检测外泌体中颗粒酶和穿孔素的浓度<sup>[106]</sup>。Solarbio (Solarbio®) ELISA 试剂盒采用基于双抗体夹心法的酶联免疫吸附检测技术。将抗人颗粒酶 B 或穿孔素单克隆抗体包被在酶标板上；分别加入梯度稀释的标准品和预稀释的样本与酶标板上的包被抗体充分结合；洗板后加入生物素化抗人颗粒酶 B 或穿孔素抗体与板上包被抗体捕获的标准品和样本中的人颗粒酶 B 或穿孔素发生特异性结合；洗板后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与生物素发生高强度的非共价结合；洗板后加入显色剂底物 TMB 和终止液，在  $\lambda_{\text{max}}=450\text{nm}$  处测定吸光度 (OD)，通过标准曲线可计算出样本中人颗粒酶 B 或穿孔素的浓度。

(4) 纳米流式检测 CD19/G+P 外泌体上 CD19 CAR 的表达：取 200  $\mu\text{L}$  外泌体用流式 Buffer 稀释 10000 倍，在对应管中添加 FITC-StrepII 抗体 4 度避光孵育 30 min 作为实验组，未添加抗体作为对照组，用纳米流式细胞仪上机检测。

(5) WB 鉴定 CD19/G+P 外泌体表面蛋白：实验步骤参照 2.2.10 (5)。

兔抗人 TSG101 单克隆抗体 (1:5000)、兔抗人 CD81 单克隆抗体 (1:1000)、兔抗人 CD9 单克隆抗体 (1:1000) 和鼠抗 StrepII 单克隆抗体 (1:1000) 作为一抗，羊抗兔 IgG (1:3000)、羊抗鼠 IgG (1:1000) 作为二抗，检测 CD19/G+P 外泌体的表达蛋白。

(6) 流式检测 CD19/G+P 外泌体摄取：将 K562-GL 和 RAJI-GL 细胞以每孔  $2 \times 10^5/\text{mL}$  的浓度接种在 96 孔板中，添加 CD19/G+P 外泌体作为实验组，添加

等体积含 10%FBS 的 1640 培养基作为对照组, 每组 3 复孔, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h。收集细胞, 添加 APC-G4S 抗体 4 度避光孵育 30 min, 用 Buffer 洗 2 遍, 添加 200 μL 流式 Buffer 重悬细胞后流式细胞仪上机检测靶细胞中 CD19 CAR 表达情况。

(7) CCK8 检测外泌体毒性实验: 实验步骤: 将靶细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 每孔 50 μL 细胞悬液。添加 50 μl 外泌体/孔作为实验组, 加入等体积完全培养基作为对照组, 仅有培养液而未加细胞的孔作为空白对照组, 每组设置 3 个复孔。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养一定时间后, 分别加入 10 μL/孔 CCK8 试剂在培养箱中孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值。外泌体毒性 =  $(D(450 \text{ nm}) \text{ 实验组} - D(450 \text{ nm}) \text{ 空白对照}) / (D(450 \text{ nm}) \text{ 对照组} - D(450 \text{ nm}) \text{ 空白对照}) \times 100\%$ 。

时间对外泌体细胞毒性影响实验: 选择 RAJI-GL 细胞作为靶细胞, 用 50 μl 外泌体量进行杀伤, 培养时间设置 12 H 和 24 H。

外泌体剂量对细胞毒性影响实验: 选择 RAJI-GL 细胞作为靶细胞, 分别取 5 μl、25 μl、50 μl 外泌体量用 PBS 稀释成终体积为 50 μl 的外泌体体系, 培养时间设置 12 H。

外泌体对不同靶细胞的毒性实验: 选择 K562-GL、RAJI-GL 和 B-LCL-GL 细胞作为靶细胞, 选择 50 μl 外泌体量进行杀伤, 培养时间设置 12 H。

(8) CD19/G+P 外泌体体内实验: 人源化动物模型构建: 收集指数生长期的 GFP/Luc 双标细胞系, 用 PBS 清洗 2 次, 300 g 离心 5 min 去上清, 计数, 用生理盐水重悬制备成  $5 \times 10^7$  cell/ml 的单细胞悬液。将每只 NPG 小鼠尾静脉注射  $2 \times 10^6$  个 PBMC 构建人源化的 NPG 小鼠, 每组 3 只进行随机分组, 尾静脉注射 100 μl 的 GFP/Luc 双标细胞悬液, 7 天后尾静脉注射外泌体进行肿瘤治疗。

CD19/G+P 外泌体体内毒性实验: GFP/Luc 双标细胞系选择 B-LCL-GL 细胞, 实验组外泌体选择 CD19/G+P 外泌体进行治疗, 对照组不进行处理。尾静脉注射外泌体 5 天后对小鼠进行第一次活体成像, 并第二次注射外泌体进行治疗, 5 天后对小鼠进行第二次活体成像。

## 2.2.12 统计分析

GraphPad Prism 8 软件进行数据分析, 多组间比较采用双因素方差分析 (2 way ANOVA)。P<0.05 表示显著性差异, \*P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001; \*\*\*\* P<0.0001。

## 2.3 结果

### 2.3.1 PLV-Luc-GFP 慢病毒载体构建及慢病毒包装

利用分子克隆技术 Luc 和 GFP 依次串联构建到 3 代慢病毒载体上，可在细胞膜上稳定表达，含 Luc、GFP 双标签的质粒示意图，图 2.2A。通过 PCR 技术获得 Luc-GFP 片段，电泳结果条带大小为 2429 bp；将慢病毒表达载体 BRD-PTK-amp-CD5-GFP 通过 EcoRI 和 BsrGI 限制性内切酶进行双酶切，电泳结果条带大小为 10452 bp；将重组质粒 PCR 鉴定，电泳结果条带大小为 2429 bp；以上条带大小与预期一致，图 2.2B。表明 PLV-Luc-GFP 慢病毒表达质粒构建成功。

利用第三代慢病毒包装系统包装病毒，慢病毒载体包装效率检测结果显示，在检测窗中质控线（C）和检测线（T）均显色，说明慢病毒包装成功，图 2.2C；慢病毒转染活性鉴定结果显示，荧光显微镜下可见 293T 细胞发出绿色荧光信号，说明 293T 细胞成功表达 GFP，图 2.2D。证明具有转染活性的 PLV-Luc-GFP 慢病毒包装成功，可用于后续实验。

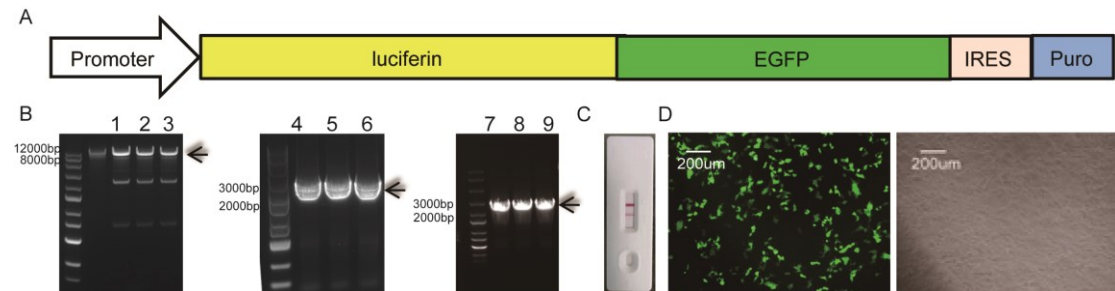


图 2.2 PLV-Luc-GFP 的构建及慢病毒包装

Figure 2.2 Construction of PLV-Luc-GFP and Lentivirus Packaging

（A）Luc-GFP 质粒结构，（B）Luc-GFP 质粒构建电泳图，（C）慢病毒滴度快速检测卡检测慢病毒载体包装效果，（D）慢病毒转染 293T 细胞，72 H 后使用荧光显微镜检测荧光强度。

注释：1-3：BRD-PTK-amp-CD5-GFP 载体双酶切片段，4-6：含有 Luc-GFP 质粒 PCR 扩增片段，7-9：含 Luc-GFP 重组慢病毒表达载体单菌落 PCR 验证条带。

### 2.3.2 构建 GFP 与 Luc 双标记的靶细胞

经过慢病毒转染、嘌呤霉素筛选，成功获得稳定表达 GFP 与 Luc 的 B-LCL、K562 细胞株，GFP 与 Luc 双标的 RAJI 细胞株购买于上海中桥新舟生物公司。流式细胞术检测结果显示 K562 为 CD19、CD22 阴性细胞系，B-LCL 和 RAJI 为



CD19、CD22 阳性细胞系，图 2.3A-B；荧光显微镜下可见 90%以上的双标细胞发出绿色荧光信号，且荧光均匀分布于整个细胞，说明双标细胞成功表达 GFP，图 2.3C；荧光素酶检测实验中 B-LCL、K562、RAJI 对照组平均发光强度分别为  $8.82\text{E}+05$  Photons/s、 $1.4\text{E}+06$  Photons/s、 $4\text{E}+06$  Photons/s，实验组的平均发光强度分别为  $2.31\text{E}+07$  Photons/s、 $2.25\text{E}+08$  Photons/s、 $1.49\text{E}+07$  Photons/s，远高于对照组，表明 B-LCL、K562、RAJI 双标细胞成功表达了高活性的 Luc，图 2.3D；上述结果表明，成功获得 GFP 与 Luc 双标记的 B-LCL-GL、K562-GL、RAJI-GL 细胞株。

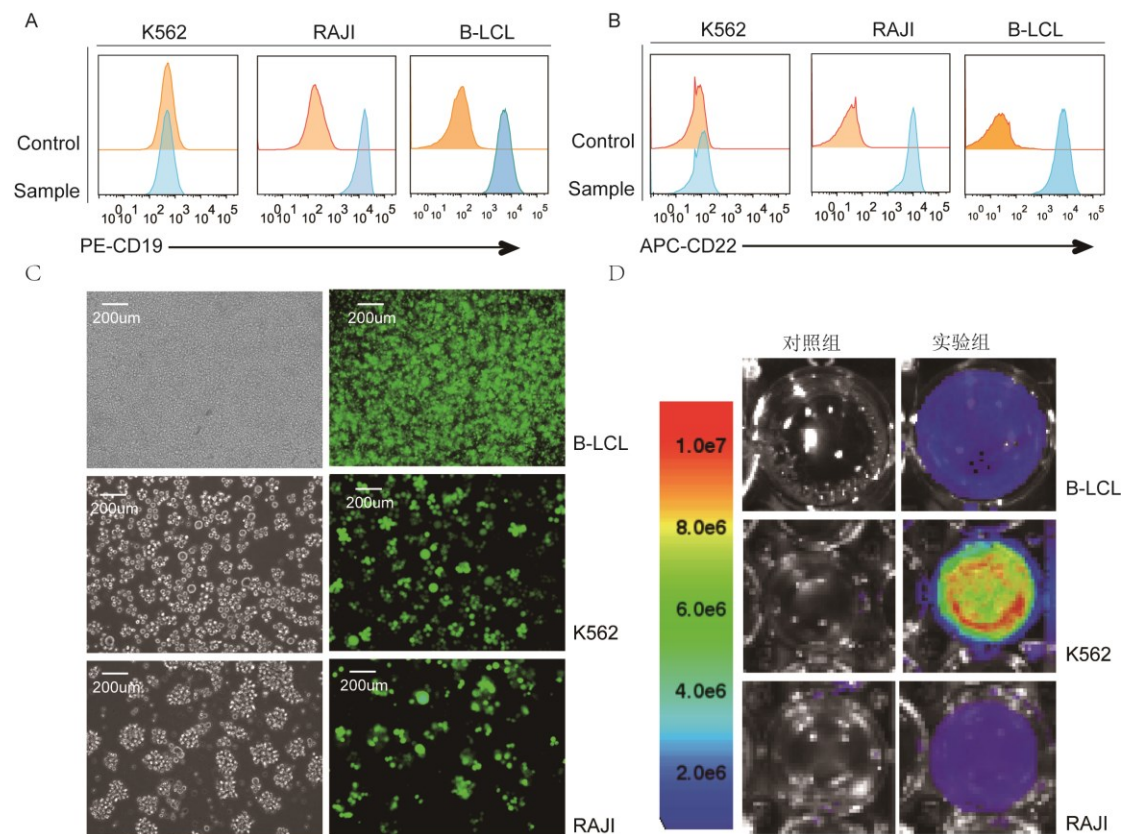


图 2.3 构建 GFP 与 Luc 双标记的细胞系

Figure 2.3 Establishment of GFP and Luc double-labeled cell lines

(A-B) 流式细胞仪检测 CD19 和 CD22 在 K562、RAJI、B-LCL 细胞表面表达，(C) 荧光显微镜检测 B-LCL、K562、RAJI 双标细胞的表达绿色荧光蛋白荧光强度，(D) 活体成像仪检测 B-LCL、K562、RAJI 双标细胞表达荧光素酶基因的荧光强度。

### 2.3.3 血行性转移瘤模型的建立

将 B-LCL-GL 细胞用生理盐水配制为  $0.5 \times 10^7$  cell/ml、 $1 \times 10^7$  cell/ml 和  $5 \times 10^7$  cell/ml 的低浓度、中浓度和高浓度的细胞悬液，经尾静脉注射到小鼠体内，分别于 7、14、21、28 d 观察肿瘤细胞在小鼠体内分布，图 2.4。28 d 时生物发光信

号比 7 d 时明显增强,表明 B-LCL-GL 细胞在 小鼠体内可成功定植并增殖;从 7 d 到 28 d 随着肿瘤移植时间的延长,早期腹腔转移,晚期肺转移随后转移到全身,说明 B-LCL-GL 细胞具备在 小鼠体内发生血行性转移<sup>[107,108]</sup>,标志着血行性转移瘤模型构建成功。

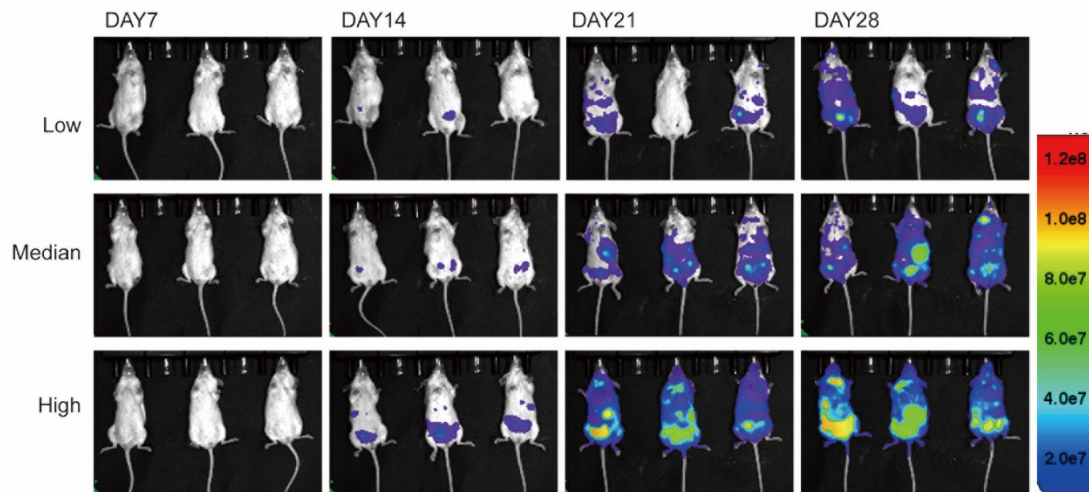


图 2.4 小鼠尾静脉注射 B-LCL-GL 细胞后体内肿瘤的生物荧光信号及定位

Figure2.4 Biofluorescent signals and tumor localization in vivo after the tail vein injection of B-LCL-GL cells into mice.

### 2.3.4 皮下移植瘤模型的建立

将 B-LCL-GL 细胞用生理盐水配制为  $0.5 \times 10^7$  cell/ml、 $1 \times 10^7$  cell/ml 和  $5 \times 10^7$  cell/ml 的低浓度、中浓度和高浓度的细胞悬液,经皮下注射到小鼠右前肢皮下,分别于 7、14、21、28 d 观察肿瘤细胞在小鼠体内分布,图 2.5。B-LCL-GL 细胞移植 7 d 时,3 组小鼠均可以检测到肿瘤细胞在小鼠皮下接种处发出了中心强、周围弱的荧光信号,体表观察具有实质性肿瘤组织块(数据未展示),说明 B-LCL-GL 细胞在小鼠体内有良好的成瘤能力,标志着皮下移植瘤模型构建成功。

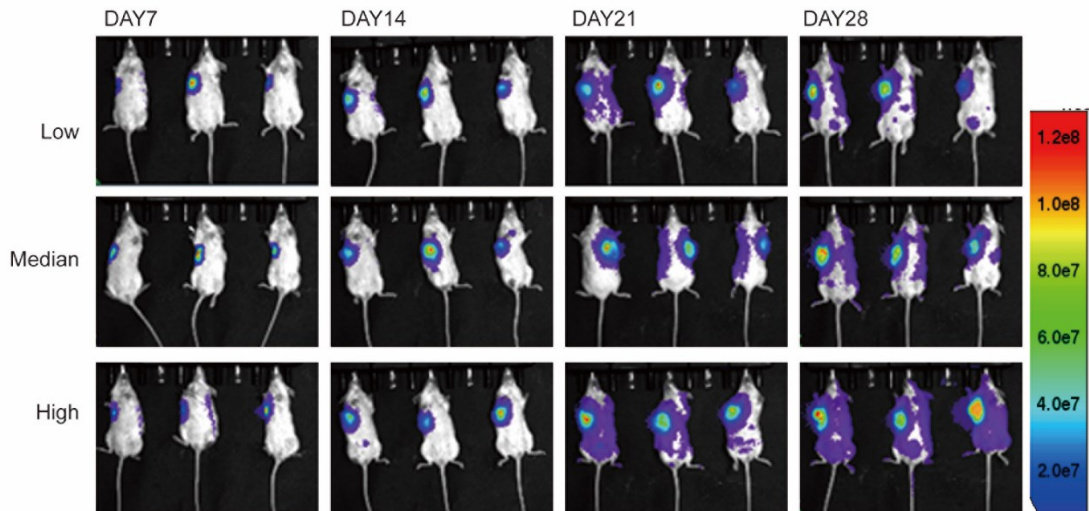


图 2.5 小鼠皮下移植肿瘤 B-LCL-GL 细胞后体内肿瘤的生物荧光信号及定位

Figure2.5 Bioluminescence signals and tumor localization in vivo after subcutaneous transplantation of tumor B-LCL-GL cells in mice

### 2.3.5 皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型对比分析

利用 LivingImage 软件定量分析皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型小鼠成像中感兴趣区域 (region of interest, ROI) 发出的光子量, 分别绘制低浓度、中浓度和高浓度组荧光强度对比分析图, 图 2.6A~C; 并对其存活情况进行分析。

低浓度组小动物成像所得数据经双因素方差分析, 尾静脉注射法与皮下注射法相比对肿瘤细胞的生长无显著性差异; 但都随时间延长而明显增大,  $P=0.021$ , 图 2.6A。低浓度尾静脉组小鼠第 52 天开始出现死亡, 第 83 天内全部死亡; 皮下注射组未见死亡; 尾静脉注射组的小鼠在接种相同细胞数量的情况下生存期更短。

中浓度组小动物成像所得数据经双因素方差分析, 尾静脉注射法与皮下注射法相比对肿瘤细胞的生长无显著差异; 但都随时间延长而明显增大,  $P=0.0081$ , 图 2.6B。中浓度尾静脉组小鼠第 70 天开始出现死亡, 第 100 天内全部死亡; 皮下注射组未见死亡; 尾静脉注射组的小鼠在接种相同细胞数量的情况下生存期更短。

高浓度组小动物成像所得数据经双因素方差分析, 尾静脉注射法与皮下注射法相比对肿瘤细胞的生长无显著差异; 但都随时间延长而明显增大,  $P=0.0038$ , 图 2.6C。高浓度尾静脉组小鼠高浓度组第 48 天开始出现死亡, 第 63 天内全部死亡; 皮下注射组实验结束时死亡 2 只; 尾静脉注射组的小鼠在接种相同细胞数量的情况下生存期更短。



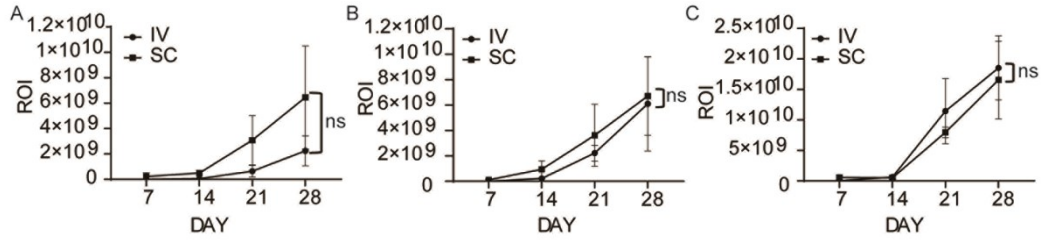


图 2.6 皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型对比分析

**Figure 2.6 Comparative Analysis of Subcutaneous Xenograft and Hematogenous Metastatic Tumor Models**

(A) 低浓度组小鼠 ROI 数据统计, (B) 中浓度组小鼠 ROI 数据统计, (C) 高浓度组小鼠 ROI 数据统计。

注:  $P < 0.05$  表示显著性差异, \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; ns  $P > 0.05$ 。

### 2.3.6 293F 外泌体表征验证

为了证实 293F 可以通过一种可行性的方法获得外泌体, 收集 293F 细胞培养上清液, 通过超速离心法获得 293F 外泌体<sup>[61]</sup>, 图 2.7A。TEM 观察显示 293F 外泌体为约 100 nm 的球形囊泡结构, 呈现经典的茶托状或类似球体被踩瘪的形状, 图 2.7B。NTA 测定 293F 外泌体主峰粒径为 125.6 nm, 与 TEM 图像显示的外泌体粒径基本一致<sup>[14]</sup>, 外泌体浓度为  $3.3E+11$  Particles/mL, 图 2.7C。WB 分析显示, 外泌体中存在典型的外泌体标记物, 如四跨膜相关蛋白(CD63 和 CD81)和细胞质蛋白 TSG101, 图 2.7D。磁珠捕获流式分析显示, 外泌体中存在典型的外泌体标记物 CD9、CD63 和 CD81, 图 2.7E。结果表明通过超速离心法提取的 293F 细胞衍生的囊泡为外泌体<sup>[61]</sup>。

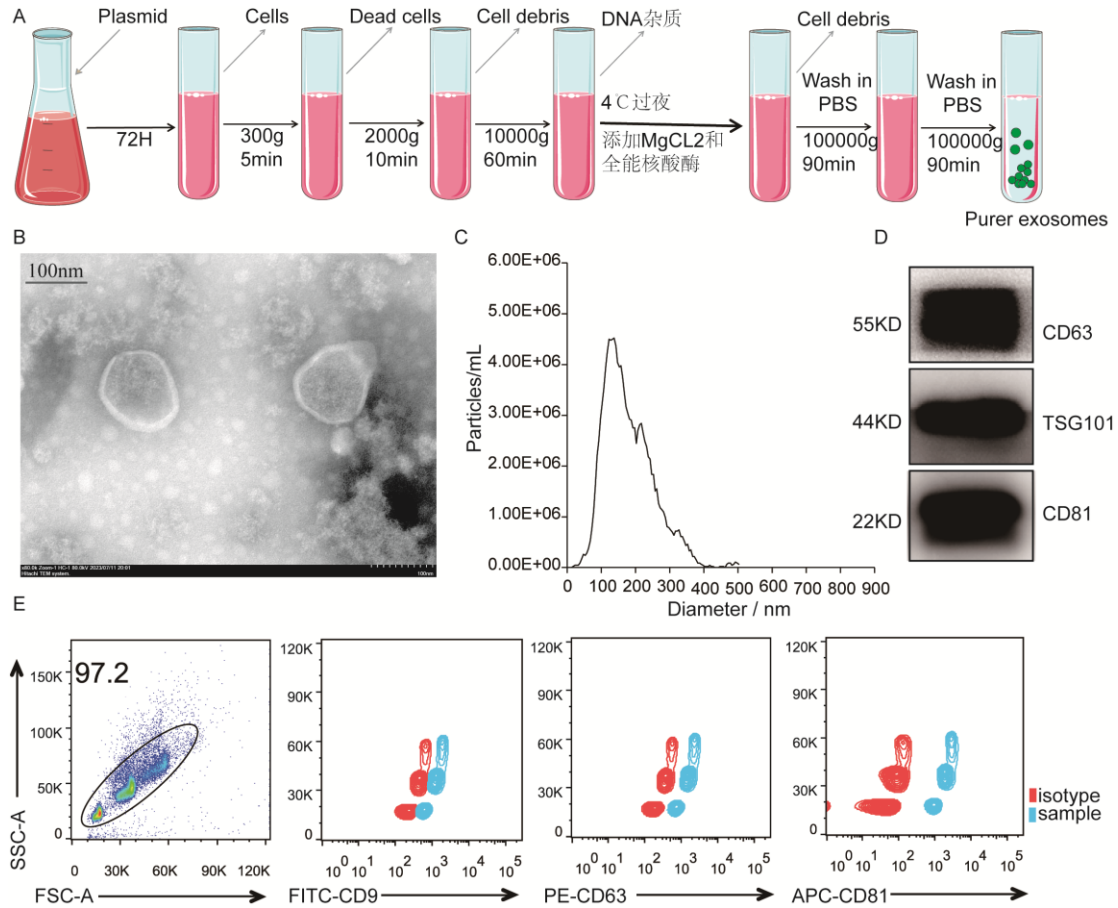


图 2.7 外泌体理化性质鉴定

Figure2.7 Identifying the Physico chemical Characteristics of Exosomes

(A) 293F 外泌体制备流程图, (B) TEM 拍照观察 293F 外泌体形态, (C) NTA 分析 293F 外泌体粒径, (D) WB 分析 293F 外泌体表面标志, (E) 磁珠捕获流式分析 293F 外泌体表面标志。

### 2.3.7 CD19/G+P 外泌体细胞毒性原理

将 CD19 特异性单抗 FMC63 融合到 CD8a 铰链和跨膜结构域以及 ICD 和 CD3 $\zeta$  的胞内结构域<sup>[109]</sup>, 构建靶向人源 CD19 的经典第二代 CAR 分子 CD19 CAR 质粒。CD19 CAR 质粒中, FMC63 的 VL 和 VH 之间用 G4S 连接, StrepII 作为标签。为了增强 293F 细胞衍生的 CD19 CAR 外泌体介导的细胞毒性, 我们将穿孔素或颗粒酶分别融合到 CD63 的 C 端; 将颗粒酶、穿孔素与 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞, 包裹异位表达的穿孔素、颗粒酶和 CD19 CAR 的外泌体由细胞分泌到上清液中, 通过超速离心法获得的工程化 CD19/G+P 外泌体介导细胞毒性<sup>[110]</sup>, 图 2.8A。颗粒酶、穿孔素质粒和 CD19 CAR 质粒结构, 图 2.8B。将 CD19scFv 氨基酸序列输入网页 SWISS-MODEL Interactive Workspace([expasy.org](http://expasy.org))同源建模法预测 CD19scFv 三级结构, 图 2.8C。CD19scFv 氨基酸序列, 图 2.8D。

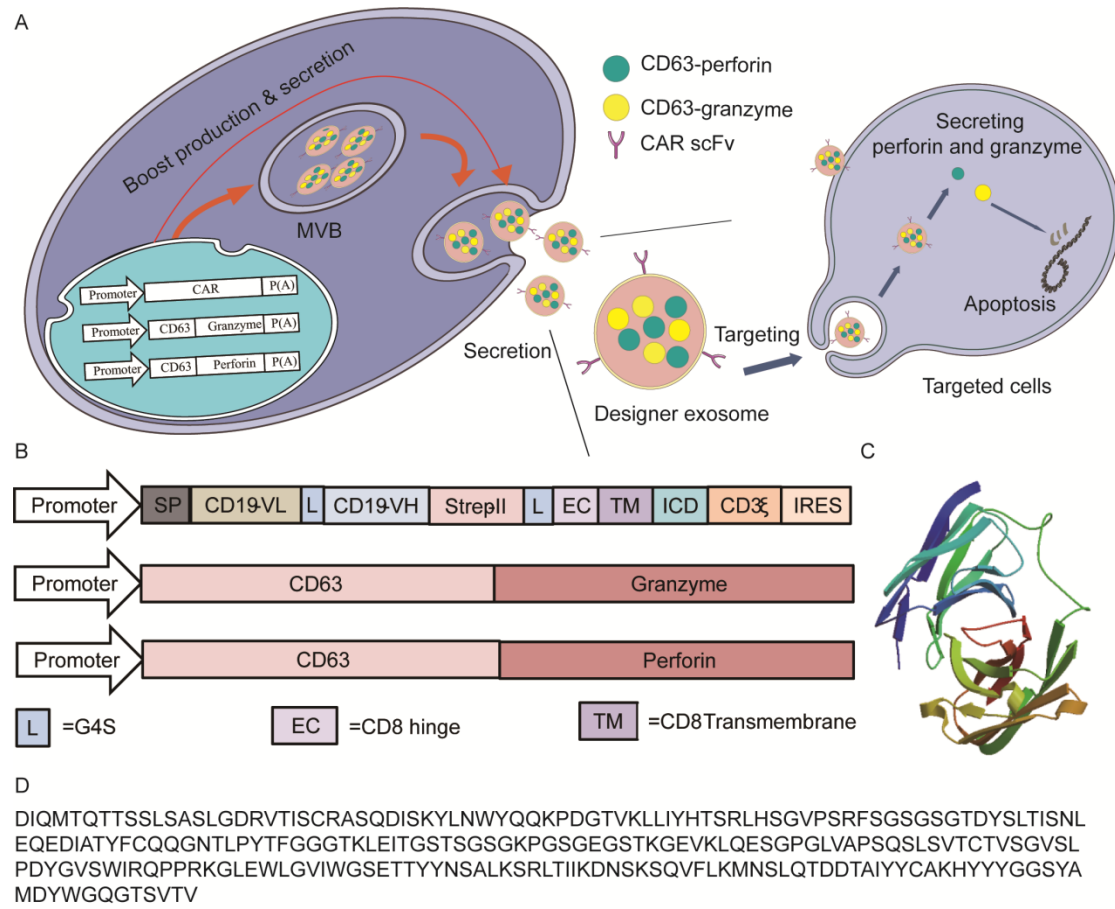


图 2.8 外泌体细胞毒性实验设计

Figure2.8 Design of the Exosome Cytotoxicity Assay

(A) CD19/G+P 外泌体细胞毒性示意图, (B) 颗粒酶、穿孔素和 CD19 CAR 质粒结构, (C) CD19scFv 同源建模法预测 CD19scFv 三级结构图, (D) CD19scFv 氨基酸序列。

### 2.3.8 CD19/G+P 外泌体制备

将穿孔素和颗粒酶与 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞, 通过超速离心法获得工程化 CD19/G+P 外泌体。流式细胞术检测 293F 细胞转染效率为 54.8%, Blank 组为未转染的 293F 细胞, CD19/G+P 组为颗粒酶、穿孔素和 CD19 CAR 共转染的 293F 细胞, 图 2.9A。表明 293F 细胞转染质粒后可以表达目的蛋白。

收集转染颗粒酶、穿孔素和 CD19 CAR 的 293F 细胞上清超速离心获得 CD19/G+P 外泌体。ELISA 测定 CD19/G+P 外泌体中穿孔素和颗粒酶的表达浓度分别为 6189 pg/mL 和 25379 pg/mL, 远高于对照 293F 外泌体, 图 2.9B; 纳米流式细胞术检测 CD19 CAR 在 CD19/G+P 外泌体中的表达效率为 45.2%, CD19/G+P 组为 StrepII 抗体孵育后的 CD19/G+P 外泌体, Blank 组为未孵育抗体的 CD19/G+P 外泌体, 图 2.9C; WB 结果表明, 提取的 CD19/G+P 在外泌体表面存在外泌体标

志性蛋白 TSG101、CD9、CD81，并且 CD19 CAR 分子成功包裹到外泌体中，图 2.9D。上述结果表明，成功制备了含穿孔素和颗粒酶和 CD19 CAR 的外泌体。

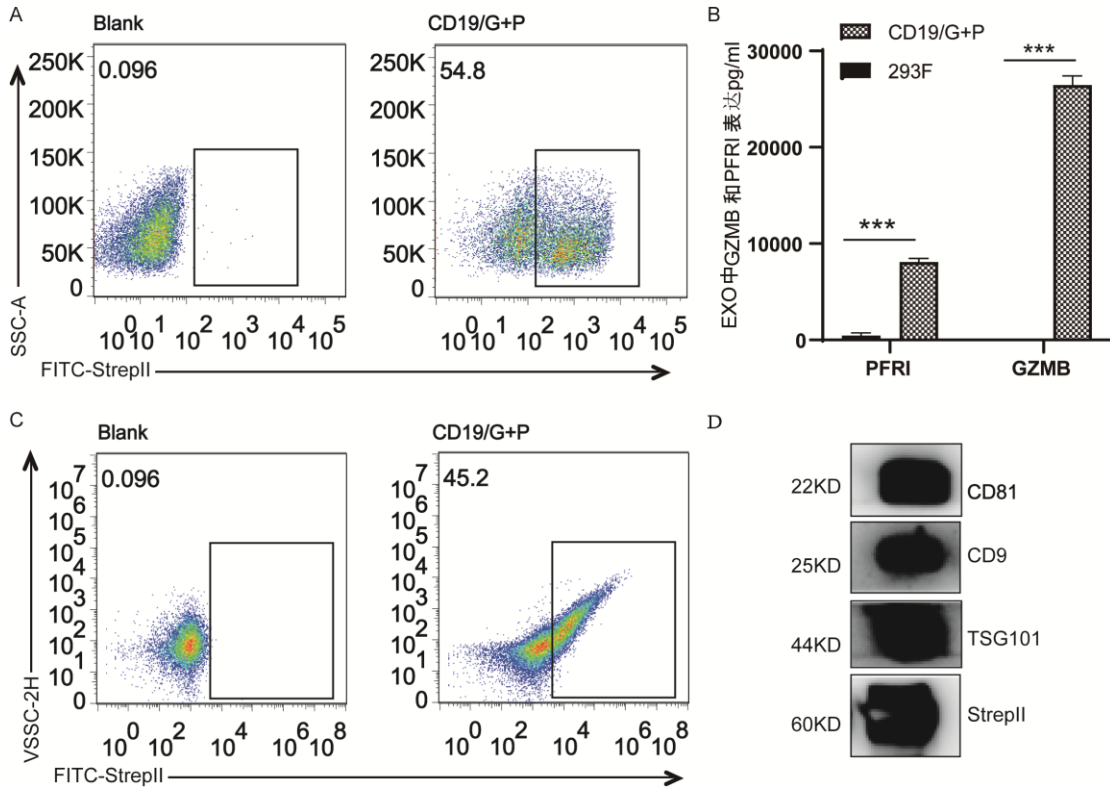


图 2.9 CD19/G+P 外泌体制备

Figure2.9 CD19/G+P Exosome Preparation

(A) 流式细胞仪检测细胞转导效率，(B) ELISA 测定 293F 和 CD19/G+P 外泌体中穿孔素和颗粒酶的表达浓度，(C) 纳米流式细胞术检测 CD19 CAR 在 CD19/G+P 外泌体中的表达效率，(D) WB 检测 CD19/G+P 外泌体表面标志性蛋白 TSG101、CD9、CD81 以及 CD19 CAR 标签蛋白 StrepII。

注释：穿孔素和颗粒酶与 CD19 CAR 的质粒共转染 293F 细胞，产生的 CD19/G+P 外泌体介导细胞毒性。P<0.05 表示显著性差异，\*P<0.05； \*\* P<0.01； \*\*\* P<0.001； \*\*\*\* P<0.0001； ns P>0.05。

### 2.3.9 CD19/G+P 外泌体细胞毒性

外泌体表面的 CAR 可通过其胞外结构域与抗原结合，达到靶向效果<sup>[14]</sup>。将 K562-GL 和 RAJI-GL 细胞分别与 CD19/G+P 外泌体共孵育，流式细胞仪分析结果显示，K562-GL 细胞显示微弱的荧光信号，CD19 CAR 在 K562-GL 细胞中不表达；RAJI-GL 细胞显示出强烈的荧光信号，CD19 CAR 在 RAJI-GL 细胞中大量表达；说明，CD19/G+P 外泌体的内容物递送具有靶向性，图 2.10A。

通过 CCK8 试剂盒检测 CD19/G+P 外泌体对 CD19 阳性肿瘤细胞具有特异性细胞毒性, 结果显示 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体在 12 H 和 24 H 对 RAJI-GL 细胞系的杀伤效率分别为 31%和 22%, 图 2.10B; 0  $\mu$ l、5  $\mu$ l、25  $\mu$ l 和 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体对 RAJI-GL 细胞系的杀伤效率分别为 0%、5%、21%和 37%, 图 2.10C; 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体对 K562-GL、RAJI-GL 和 B-LCL-GL 细胞系的杀伤效率分别为 2.4%、32%和 57%, 图 2.10D。这些结果表明, CD19/G+P 外泌体具有特异性抗 CD19 阳性肿瘤活性, 且对 RAJI-GL 的细胞毒性细胞表现为在 12 H 最好和剂量依赖性。

进一步利用人源化 NPG 小鼠异种移植瘤模型验证了 CD19/G+P 外泌体体内抗 B-LCL-GL 肿瘤活性, 利用 Living Image 软件定量分析小鼠体内荧光强度并进行统计分析。结果显示, 实验组第一周小鼠平均发光强度为 2.65E+08 Photons/s, 小鼠具有大面积的肿瘤细胞转移; 第二周小鼠平均发光强度为 9.74E+07 Photons/s, 远低于第一周, 小鼠转移的肿瘤细胞明显减少, 其中 2 只小鼠体内肿瘤完全消除; 对照组第一周小鼠平均发光强度为 2.88E+08 Photons/s, 3 只小鼠存在一定程度的肿瘤细胞转移; 第二周小鼠平均发光强度为 1.35E+09 Photons/s, 远高于第一周, 3 只小鼠肿瘤细胞的转移面积均有所增加; 与体外研究结果一致, 图 2.10E; 小动物成像所得数据经双因素方差分析无显著差异。上述结果表明 CD19/G+P 外泌体在体内和体外均具有较好的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>。

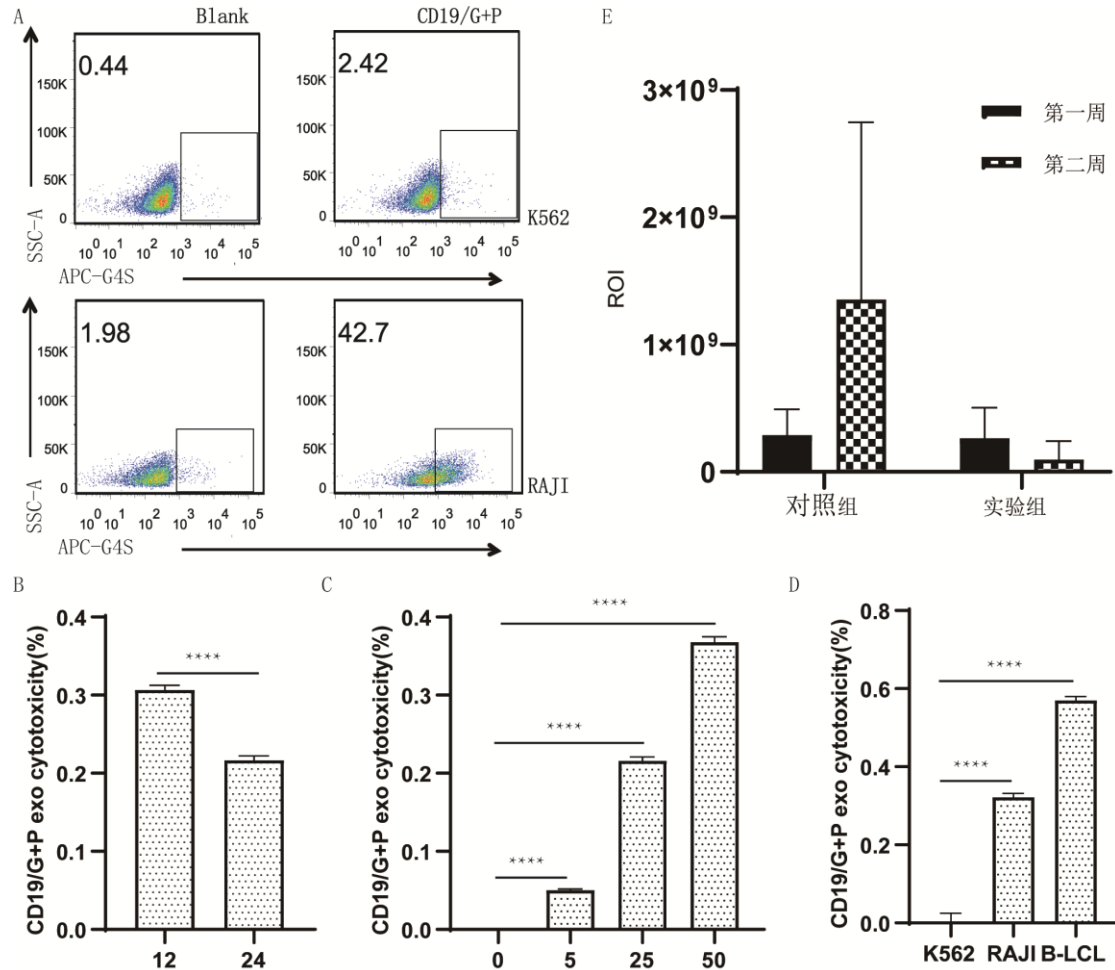


图 2.10 CD19/G+P 外泌体细胞毒性

Figure 2.10 Cytotoxicity of CD19/G+P exosomes

(A) 流式细胞仪检测 CD19/G+P 外泌体递送 CD19 CAR 情况, Blank 为对照组, CD19/G+P 为实验组, (B) CCK8 试剂盒检测 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体在 12 H 和 24 H 对 RAJI-GL 细胞的细胞毒性, (C) CCK8 试剂盒检测 0  $\mu$ l、5  $\mu$ l、25  $\mu$ l 和 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体对 RAJI-GL 细胞的细胞毒性, (D) CCK8 试剂盒检测 50  $\mu$ l 的 CD19/G+P 外泌体对 K562-GL、RAJI-GL 和 B-LCL-GL 细胞系的细胞毒性, (E) 体内实验验证 CD19/G+P 外泌体体内抗肿瘤活性。  
注:  $P < 0.05$  表示显著性差异, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns  $P > 0.05$ 。

## 2.4 讨论

为了确定构建肿瘤模型的细胞接种方式及接种剂量, 构建了绿色荧光蛋白 (GFP) 和荧光素酶 (Luc) 慢病毒载体, 制备双标的 EBV 感染的人 B 淋巴细胞, 尾静脉注射和皮下注射高、中、低 3 个浓度的 B-LCL-GL 细胞株建立肿瘤模型; 并比较尾静脉注射和皮下注射 B-LCL-GL 细胞建立的异种移植 NPG 小鼠模型的优缺点。研究发现, 成功建立了 GFP/Luc 双标细胞系, 可以同时捕获实验中微



观和宏观信息，为动物模型的建立铺设了良好的技术平台。利用该细胞株成功建立了小鼠的皮下移植瘤模型与血行性转移瘤模型，并比较皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型的特点。在两种模型中，低、中、高各剂量接种组的肿瘤均随时间而显著增大，但相同剂量细胞在两种模型中增殖信号无差异，在高剂量组中肿瘤细胞均遍布全身。两种肿瘤模型最大的差异在于模型小鼠的生存期不同，皮下模型小鼠带瘤生存周期更长，可以允许较长时间研究肿瘤发生机制和测试抗肿瘤药物。

为了降低 CAR 免疫治疗相关毒性，解决 CAR-T 细胞释放外泌体时 T 细胞收获不足的问题，首先验证了用超速离心的方法获得的 293F 外泌体的理化性质；其次，分别将颗粒酶和穿孔素连接在 CD63 蛋白的 C 端，通过基因工程和 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞，超速离心获得工程化 CD19/G+P 外泌体；并验证了颗粒酶和穿孔素通过外泌体膜蛋白 CD63 包裹到外泌体内部，CD19 CAR 质粒在 293F 细胞中转录和翻译使细胞表面上表达 CAR，细胞出芽、胞吐使外泌体表面携带 CD19 CAR。装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素的外泌体与受体细胞共培养，外泌体表面的 CAR 特异性靶向受体细胞并在受体细胞中表达；另外，我们证明了以 293F 细胞衍生的外泌体为载体，装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素后在体外和体内均具有抗肿瘤活性。

CD19/G+P 外泌体在体内抗肿瘤实验中，小动物成像所得数据经双因素方差分析无显著差异，可能原因是在小鼠人源化建模时，注射的 PBMC 在小鼠体内存活差异导致接种的肿瘤细胞在小鼠体内存活差异大。在总体趋势上，CD19/G+P 外泌体在体内具有抗肿瘤效果。

总之，将 LCLs 移植到 NPG 小鼠体内成功建立 EBV 诱发性的皮下移植瘤模型和血行性转移瘤模型，在肿瘤研究中具有重要的应用价值和广泛的推广意义。293F 细胞衍生的外泌体为载体，装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素后在体外和体内均具有抗肿瘤活性，展现了外泌体在免疫治疗上广泛的运用前景。

## 第三章 外泌体靶向制备 CAR-T 细胞

### 3.1 引言

以 CAR-T 为代表的肿瘤过继细胞免疫治疗在血液瘤治疗中具有明显的优势,然而,借助病毒进行 CAR 工程的修饰会产生安全隐患<sup>[112]</sup>,因此开发新的 T 细胞修饰方法获得 CAR-T 细胞迫在眉睫<sup>[29,109,111,113,114]</sup>。

外泌体表面有许多特征性跨膜蛋白分子,如: LAMP-2B、CD63 等,将可进行细胞表达的肿瘤靶向分子(靶向肽或抗体类等)与上述特征性蛋白进行融合构建重组质粒<sup>[98,115]</sup>,再对外泌体产生细胞进行遗传修饰<sup>[65,112]</sup>,对构建的工程化细胞培养后,收集细胞培养液获得天然修饰肿瘤靶向分子的外泌体<sup>[9,12,109,111]</sup>。本章节将靶向肽与 Lamp2b 的融合质粒分别与 CD19 CAR 共转染 293F 细胞构建外泌体靶向系统或与 CD63-L7Ae、CD19 CAR-box 共转染 293F 细胞构建外泌体 mRNA 靶向递送系统,用流式检测外泌体靶向能力并比较 3 种靶向质粒 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 的靶向效果;接着用流式评价 2 种靶向系统的优缺点,筛选出高效制备 CAR-T 细胞的外泌体 mRNA 靶向递送系统。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 实验耗材

参照表 2.1 实验耗材。

#### 3.2.2 实验试剂

(1) 本实验所用到的试剂及生产商

参照表 2.2 实验试剂。

(2) 本实验所用到的试剂盒及生厂商

参照表 2.3 试剂盒及生厂商。

#### 3.2.3 实验仪器

参照表 2.4 实验仪器。

#### 3.2.4 实验抗体

参照表 2.5 实验抗体。



### 3.2.5 菌种、细胞、动物

参照表 2.6 实验用菌种、细胞、动物。

### 3.2.6 细胞培养

PBMC 细胞在 50 mL CTS OpTmizer T Cell 培养基+1.3 ml CTS Expansion+0.5 mL HEPES+0.5 mL L-谷氨酰胺 (200 mM) 培养液中培养。B-LCL、K562、RAJI、293F 细胞培养方法参照 2.2.6 中细胞培养。

### 3.2.7 外泌体靶向系统

(1) 靶向质粒设计：将靶向肽融合到 LAMP-2B 的 N 末端使其在在外泌体表面表达<sup>[48]</sup>，可以帮助其选择性递送至靶细胞<sup>[74]</sup>。我们将靶向肽 VCD33D-H1、Nb1、sna006a 分别融合到 LAMP-2B 的 N 末端，然后亚克隆到 pcDNA3.1(+)载体上，构建靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞的 Lamp2b 靶向质粒 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b，将只有 Lamp2b 的质粒 CON-Lamp2b 作为对照靶向质粒。

(2) CD19 CAR 靶向外泌体制备：取 25  $\mu$ g CD19 CAR、8  $\mu$ g Lamp2b 靶向质粒(CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b、CON-Lamp2b)用 PEI 共转染 25 ml 293F 细胞，同时设置无靶向质粒的对照组，转染 24 h 添加 OPM-CHOPFF06 培养基（为转染体系的 1/20）和 L-Glutamine（转染体系的 1/50）。72 h 收集细胞检测细胞转染效率和收集细胞上清超离获得 CD19 CAR 靶向外泌体(CD19 CAR-CD3、CD19 CAR-CD4、CD19 CAR-CD8、CD19 CAR-CON、CD19 CAR)。

细胞转染效率检测实验步骤参照 2.2.12 (2) 中细胞转染效率检测。

收集转染后的细胞上清超速离心获得 CD19 CAR 靶向外泌体，实验步骤参照 2.2.10 (2)。

(3) CD19 CAR 靶向外泌体靶向 T 细胞实验：健康人 PBMC 细胞复苏后用 CD3/CD28 磁珠激活和 300 U 白细胞介素 (inter-leukin, IL) -2 刺激 24 h 后，收集 PBMC 细胞添加 APC-Cy7CD3、APC-CD4、BV421-CD8 抗体 4 度避光染色 30 min，洗 2 次后向  $5 \times 10^5$  个细胞中加入 200  $\mu$ l 外泌体，对照组不添加外泌体，于 48 孔板共培养一定时间后收集 PBMC 细胞，加 APC-Cy7CD3、APC-CD4、BV421-CD8 和 FITC-strepII 抗体 4 度避光染色 30 min，洗 2 次后加 7-AAD 用流式细胞仪检测 T 细胞的 CD19 CAR 表达率。此处共培养时间为 12 H。

### 3.2.8 外泌体 mRNA 靶向递送系统

(1) 质粒设计：L7Ae 蛋白能与 RNA 的 C/Dbox 识别结合，将 L7Ae 连接在外泌体跨膜蛋白 CD63 蛋白的 C 端构建 CD63-L7Ae 融合质粒，使 L7Ae 在外泌

体中表达;将 C/Dbox 插入到 CD19 CAR 质粒 3'-非翻译区构建 CD19 CAR-C/Dbox 质粒, 编码 CD19 CAR 的转录本可以通过 L7Ae 与 3'-UTR 中的 C/Dbox 相互作用很好地结合到外泌体中。

(2)CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体制备: 靶向外泌体制备: 取 12.5  $\mu\text{g}$  CD19 CAR-C/Dbox、5  $\mu\text{g}$  Lamp2b 靶向质粒(CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b)、7.5  $\mu\text{g}$  CD63-L7Ae 用 PEI 共转染 25 ml 293F 细胞, 同时设置无靶向质粒的对照组, 转染 24 h 添加 OPM-CHOPFF06 培养基(为转染体系的 1/20)和 L-Glutamine(转染体系的 1/50)。72 h 收集细胞检测细胞转染效率和收集细胞上清超离获得 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体 (CD19 CAR-C/Dbox-CD3、CD19 CAR-C/Dbox-CD4、CD19 CAR-C/Dbox-CD8、CD19 CAR-C/Dbox)。

细胞转染效率检测实验步骤参照 2.2.11 (2) 中细胞转染效率检测。

收集转染后的细胞上清超速离心获得 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体, 实验步骤参照 2.2.10 (2)。

(3) CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体靶向 T 细胞实验: 实验步骤参照 3.2.7 (3), 此处外泌体为共培养时间为 12 H。

### 3.2.9 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统对比实验

(1) 外泌体制备: 选取 CD8-Lamp2b 利用外泌体靶向系统制备 CD19 CAR-CD8 靶向外泌体, 未添加 Lamp2b 靶向质粒的 CD19 CAR 外泌体作为对照, 实验步骤参照 3.2.7 (2)。选取 CD8-Lamp2b 利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体, 未添加 Lamp2b 靶向质粒的 CD19 CAR-C/Dbox 外泌体作为对照, 实验步骤参照 3.2.8 (2)。

(2) 外泌体靶向 T 细胞实验: 实验步骤参照 3.2.7 (3), 此处共培养时间分别为 2、5、7、9、12 天。

### 3.2.10 外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞

(1) 外泌体制备: 选择 CD8-Lamp2b 靶向质粒利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体, 实验步骤参照 3.2.8 (2)。

(2) CAR-T 细胞制备: 实验步骤参照 3.2.7 (3), 此处外泌体为 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体, 共培养时间为 5 天, 培养后的 T 细胞为 CD19 CAR-T 细胞。

(3) 体内实验: 人源化动物模型构建实验步骤参照 2.2.11 (8) 中人源化动物模型构建。

体内抗肿瘤实验: GFP/Luc 双标细胞系选择 RAJI-GL 和 B-LCL-GL 细胞, 实验组外泌体选择 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体进行治疗, 对照组不进行

处理。尾静脉注射外泌体 5 天后对小鼠进行活体成像。

### 3.2.11 统计分析

GraphPadPrism8 软件进行数据分析,多组间比较采用双因素方差分析(2 way ANOVA)。P<0.05 表示显著性差异,\*P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001; \*\*\*\* P<0.0001。

## 3.3 结果

### 3.3.1 外泌体靶向系统

我们设计一种外泌体靶向系统,将 VCD33D-H1、Nb1、sna006a 分别融合到编码溶酶体相关膜糖蛋白的 LAMP-2B 的 N 末端<sup>[103]</sup>,构建 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 靶向质粒,能够将识别的靶标分别驱动到受体细胞(CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞)的溶酶体中<sup>[85]</sup>,图 3.1。选择 293F 细胞作为宿主细胞,将靶向质粒(CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b、CON-Lamp2b)和 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞,同时设置无靶向质粒对照组,72h 后收集细胞用流式细胞术检测细胞转染效率,收集细胞上清通过超速离心获得 CD19 CAR 靶向外泌体(CD19 CAR-CD3、CD19 CAR-CD4、CD19 CAR-CD8、CD19 CAR-CON、CD19 CAR),将外泌体与激活的 PBMC 共培养 12h 检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 StrepII 的表达。

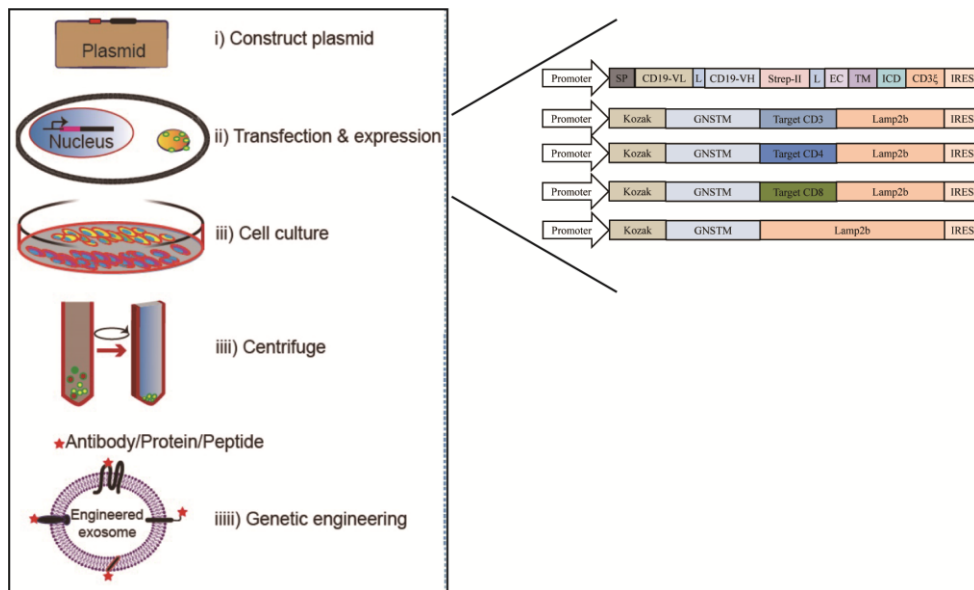


图 3.1 外泌体靶向系统<sup>[48]</sup>

Figure3.1 ExosomeTargeting Systems<sup>[48]</sup>

流式细胞术检测 CD19 CAR、CD19 CAR-CON、CD19 CAR-CD3、CD19 CAR-CD4、CD19 CAR-CD8 组细胞转染率分别为 53.8%、48.9%、13.4%、12.8%、21.8%，293F 组为未转染的 293F 细胞，CD19 CAR 组为无靶向质粒对照，CD19 CAR-CON、CD19 CAR-CD3、CD19 CAR-CD4、CD19 CAR-CD8 组分别为转染了 CON-Lamp2b、CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 靶向质粒的 293F 细胞，图 3.2A，表明 293F 细胞转染后可以表达目的蛋白。

流式细胞术检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比。结果显示，在 CD19 CAR、CD19 CAR-CON、CD19 CAR-CD3、CD19 CAR-CD4、CD19 CAR-CD8 组中，CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 3.81%、2.84%、18.3%、21.8%、43.3%，CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 组中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.2B；CD4+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 1.44%、1.43%、10.9%、96.5%、5.13%，只有 CD4-Lamp2b 组中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.2C；CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 4.08%、3.75%、27.4%、13.4%、90.6%，只有 CD8-Lamp2b 组中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.2D；PBMC 组未添加外泌体。这些数据表明，CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 3 种靶向质粒均有靶向效果，只有靶向质粒存在时才能获得阳性 CAR-T 细胞群，成功设计了 CD19 CAR 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞的外泌体靶向系统。

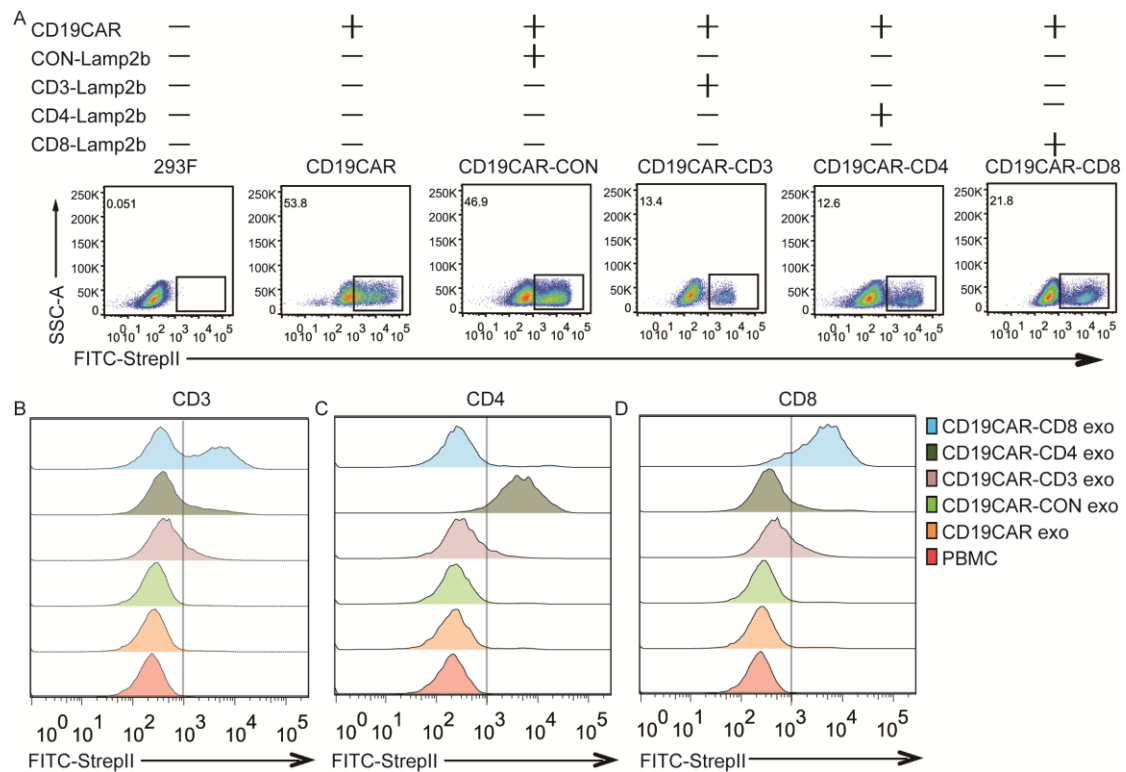


图 3.2 外泌体靶向系统

Figure3.2 Exosome Targeting System

(A) 流式检测细胞转染效率, (B-D) CD19 CAR 靶向外泌体与激活的 PBMC 共培养 12h, 流式细胞术检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞表达。

### 3.3.2 CD19 CAR 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞对比分析

利用 GraphPad Prism 8 统计分析 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比, 图 3.3。在 CD19 CAR-CD4 组中, CD4+T 细胞中 StrepII 表达最高; 在 CD19 CAR-CD8 组, CD3+T、CD8+T 细胞中 StrepII 表达最高; 在外泌体靶向系统中 CD8-Lamp2b 质粒靶向效果最好。

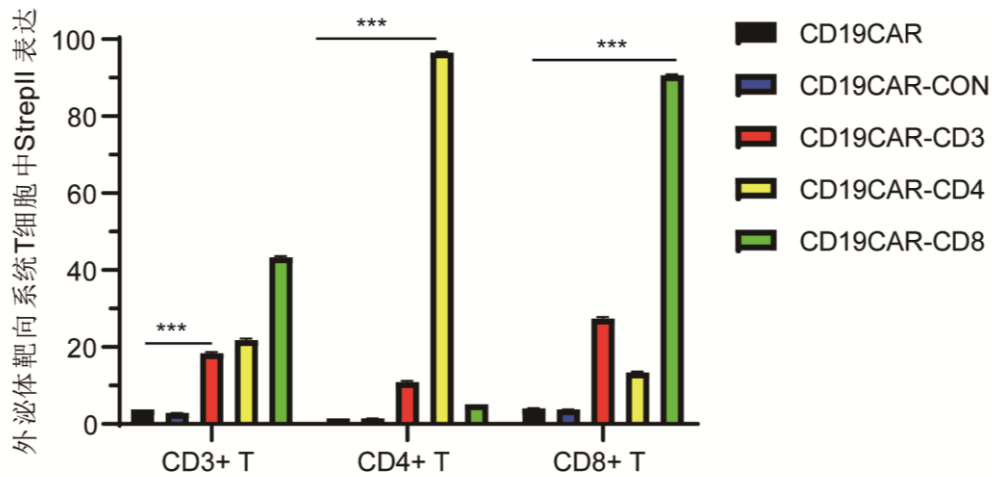


图 3.3 外泌体靶向系统靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞对比分析

Figure3.3 Compares ExosomeTargeting Systems aimed at CD3+T,CD4+T,and CD8+T cells.

注: P<0.05 表示显著性差异, \*P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001; \*\*\*\* P<0.0001; ns P>0.05。

### 3.3.3 外泌体 mRNA 靶向递送系统设计

我们设计一种 RNA 进入外泌体的活性包装系统并且帮助 RNA 递送到靶细胞的外泌体 mRNA 靶向递送系统, 图 3.4。外源性 mRNA 在体内易降解, 由于缺乏天然构象, 外源性蛋白质无法执行所需的功能<sup>[78]</sup>。古细菌核糖体蛋白 L7Ae 能结合 RNA 的 C/Dbox 结构, 帮助 RNA 的折叠和稳定, 将 L7Ae 偶联到 CD63 的 C 端, 并将 C/Dbox 插入到 CD19 CAR 质粒的 3'-非翻译区(3'-UTR)中, 通过 L7Ae 与 3'-UTR 中的 C/Dbox 相互作用, 将编码人 CD19 CAR 的 mRNA 整合到外泌体中<sup>[110]</sup>。将融合蛋白 VCD33D-H1、Nb1、sna006a 分别融合到编码溶酶体

相关膜糖蛋白的 LAMP-2B 的 N 末端<sup>[103]</sup>, 构建靶向质粒 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b, 融合蛋白功能化的外泌体能够将识别的靶标分别驱动到受体细胞 (CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞) 的溶酶体中<sup>[85]</sup>。

293F 细胞作为宿主细胞, 将编码 CARmRNA 的质粒 CD19 CAR-C/Dbox、RNA 包装质粒 CD63-L7Ae 和靶向质粒(CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b) 共转染 293F 细胞, 同时设置无靶向质粒对照组, 72H 后收集细胞用流式细胞术检测细胞转染效率, 收集细胞上清通过超速离心获得 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体 (CD19 CAR-C/Dbox-CD3、CD19 CAR-C/Dbox-CD4、CD19 CAR-C/Dbox-CD8、CD19 CAR-C/Dbox), 将 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体与激活的 PBMC 共培养 12 h 收集细胞, 通过流式细胞术检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比。

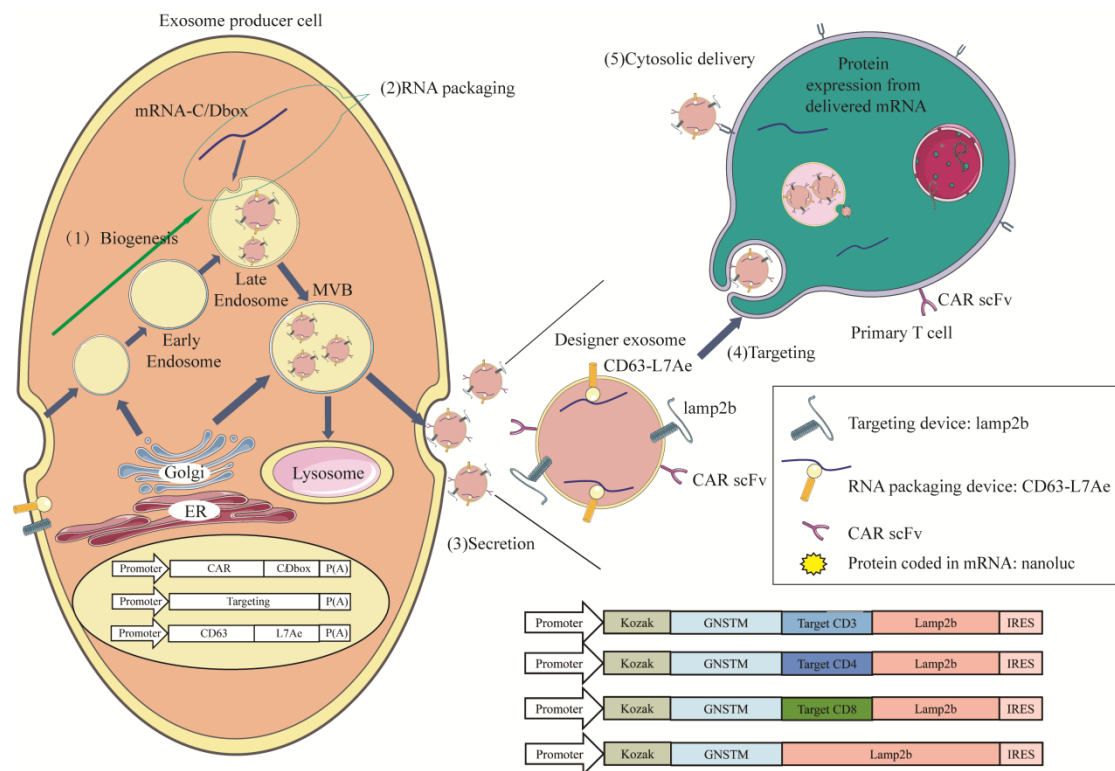


图 3.4 外泌体 mRNA 靶向递送系统

Figure3.4 Exosome mRNA Targeting Delivery System

### 3.3.4 构建外泌体 mRNA 靶向递送系统

通过流式细胞术检测 CD19 CAR-C/Dbox、CD19 CAR-C/Dbox-CD3、CD19 CAR-C/Dbox-CD4、CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组 293F 细胞转染率分别为 39.7%、46.1%、37%、40.6%，293F 组为未转染的 293F 细胞，CD19 CAR-C/Dbox 组为无靶向质粒对照，CD19 CAR-C/Dbox-CD3、CD19 CAR-C/Dbox-CD4、CD19

CAR-C/Dbox-CD8 组分别为转染了 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 靶向质粒的 293F 细胞，图 3.5A，表明 293F 细胞稳定转染后可以表达目的蛋白 CD19 CAR-C/Dbox。

流式细胞术检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比。结果显示，在 CD19 CAR-C/Dbox、CD19 CAR-C/Dbox-CD3、CD19 CAR-C/Dbox-CD4、CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中，CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 3.53%、13.3%、7.73%、47.3%，CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 组中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.5B；CD4+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 2.13%、3.85%、12.4%、5.97%，只有 CD4-Lamp2b 组中有弱阳性 CAR-T 细胞群，图 3.5C；CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 2.9%、14.7%、4.12%、93.7%，只有 CD8-Lamp2b 组中有强阳性 CAR-T 细胞群，图 3.5D；PBMC 组为未添加外泌体。这些数据表明，只有靶向质粒存在时才能获得阳性 CAR-T 细胞群，CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 均有靶向效果，成功构建了 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞的外泌体 mRNA 靶向递送系统。

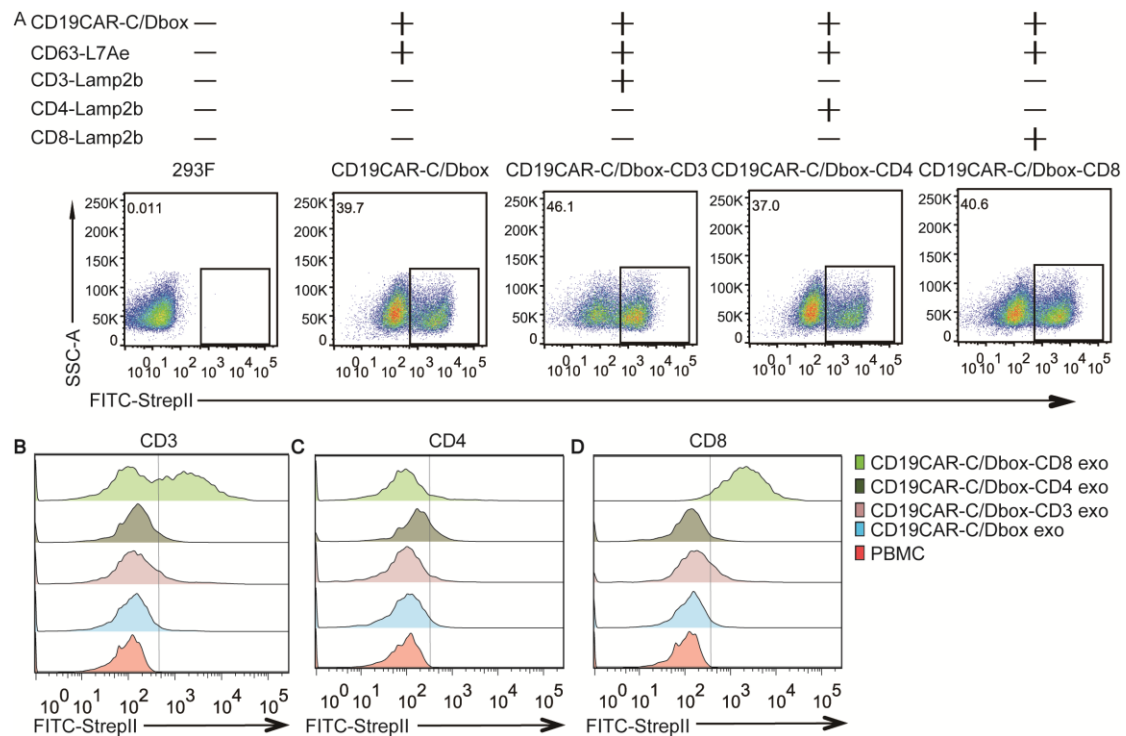


图 3.5 外泌体 mRNA 靶向递送系统

Figure3.5 Exosome mRNA Targeting Delivery System

(A) 流式检测细胞转染效率，(B-D) CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体与激活的 PBMC 共培养 12h，流式细胞术检测 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞表达。



### 3.3.5 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T

#### 细胞对比分析

利用 GraphPad Prism 8 统计分析 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比,图 3.6。在 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中,CD3+T、CD8+T 细胞中 StrepII 表达最高; 在外泌体 mRNA 靶向递送系统中 CD8-Lamp2b 质粒靶向效果最好。

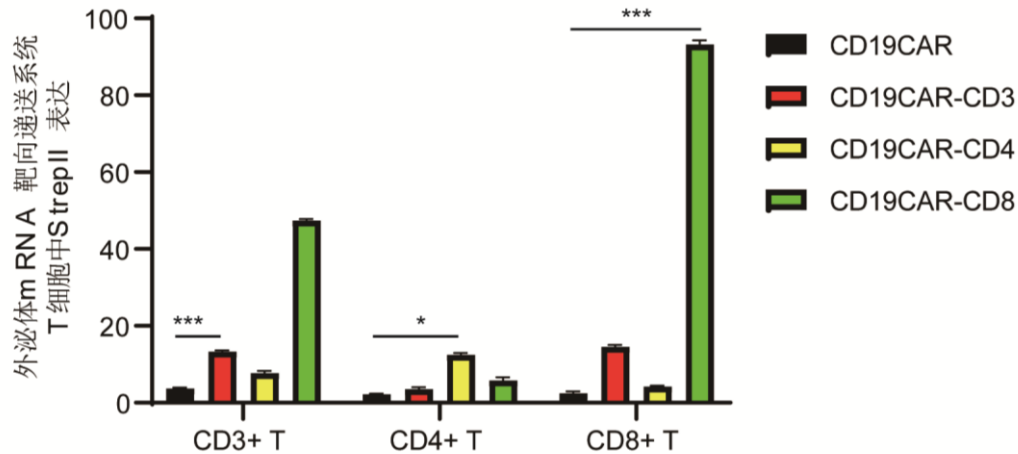


图 3.6 外泌体 mRNA 靶向递送系统靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞对比分析

Figure3.6 Comparative analysis of Exosome mRNA Targeting Delivery System for CD3+T,CD4+T,and CD8+T cells

注: P<0.05 表示显著性差异, \*P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001; \*\*\*\* P<0.0001; ns P>0.05。

### 3.3.6 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统比较分析

(1) 外泌体制备: 选取 CD8-Lamp2b 靶向质粒利用外泌体靶向系统制备 CD19 CAR-CD8 靶向外泌体, 未添加 Lamp2b 靶向质粒的 CD19 CAR 外泌体作为对照。选取 CD8-Lamp2b 靶向质粒利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体, 未添加 Lamp2b 靶向质粒的 CD19 CAR-C/Dbox 外泌体作为对照。将获得的外泌体与激活的 PBMC 共培养, 标记为 DAY1, 分别于第 2、5、7、9、12 天检测 CD3+T、CD8+T 细胞中 StrepII 的表达, 并绘制实验策略图, 图 3.7A; 质粒转导 293F 细胞 72 H 后, 通过流式细胞术检测 293F 细胞中 strep-II 的表达, 293F 组为未转染的 293F 细胞, CD19 CAR、CD19 CAR-CD8、CD19 CAR-C/Dbox、CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组细胞转染率分别为 53.2%、54.9%、38.1%、55.4%, 图 3.7B。利用外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统成功制备靶向 CD8+T 细胞的 CD19 CAR 靶向外泌体和 CD19 CAR-C/Dbox 靶向外泌体。



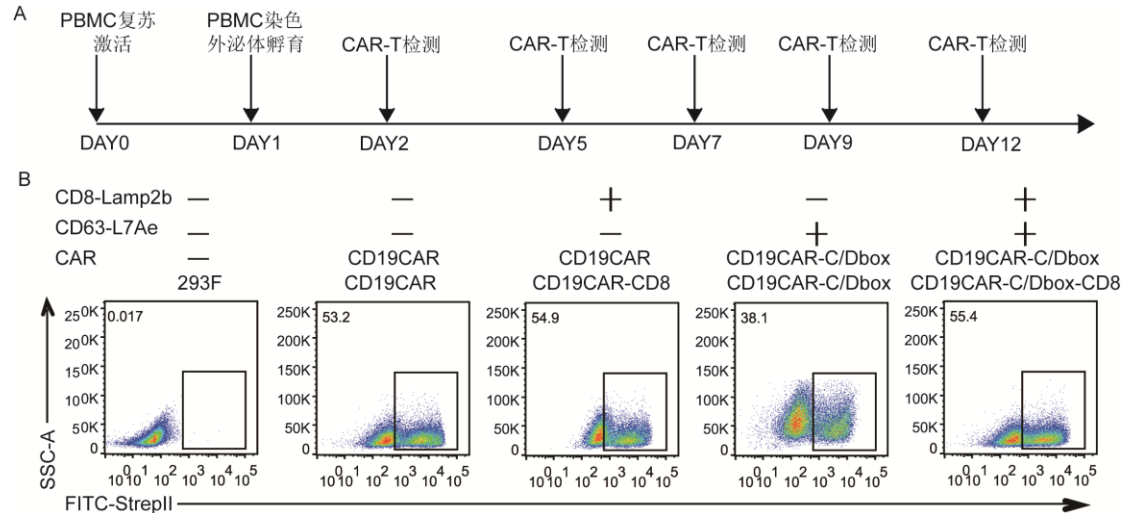


图 3.7 利用外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统制备靶向 CD8+T 细胞的外泌体

Figure3.7 Exosomes targeting CD8+T cells areprepared utilizing the Exosome Targeting System and the Exosome mRNA Targeting Delivery System

(A) 实验策略图, (B) 流式细胞术检测细胞转染效率。

(2) CD8+T 细胞中 CAR 表达: 利用 flowjo 分析第 2、5、7、9、12 天的 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比。在 CD19 CAR、CD19 CAR-CD8、CD19 CAR-C/Dbox、CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中, DAY2 时 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 5.57%、66.5%、0.22%、50.3%, 只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD8+T 中有阳性 CAR-T 细胞群, 图 3.8A; DAY5 时 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 11.5%、65.7%、0.35%、84.7%, 只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD8+T 中有阳性 CAR-T 细胞群, 图 3.8B; DAY7 时 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.26%、39.7%、0.074%、77.9%, 只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD8+T 中有阳性 CAR-T 细胞群, 图 3.8C; DAY9 时 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.45%、7.22%、0.053%、51.8%, 在 CD8-Lamp2b 存在的 CD19 CAR-CD8 和 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中只有 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组有阳性 CAR-T 细胞群, 图 3.8D; DAY12 时 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.46%、2.99%、0.48%、8.14%, CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组剩下微弱的阳性 CAR-T 细胞群, 图 3.8E; PBMC 组为未添加外泌体。这些数据表明, CD8-Lamp2b 靶向质粒存在时, 在 DAY2 时外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统均能在 CD8+T 细胞中获得阳性 CAR-T 细胞群, DAY9 时只有 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组有阳性 CAR-T 细胞群, 外泌体 mRNA 靶向递送系统使 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞保留时间更长。

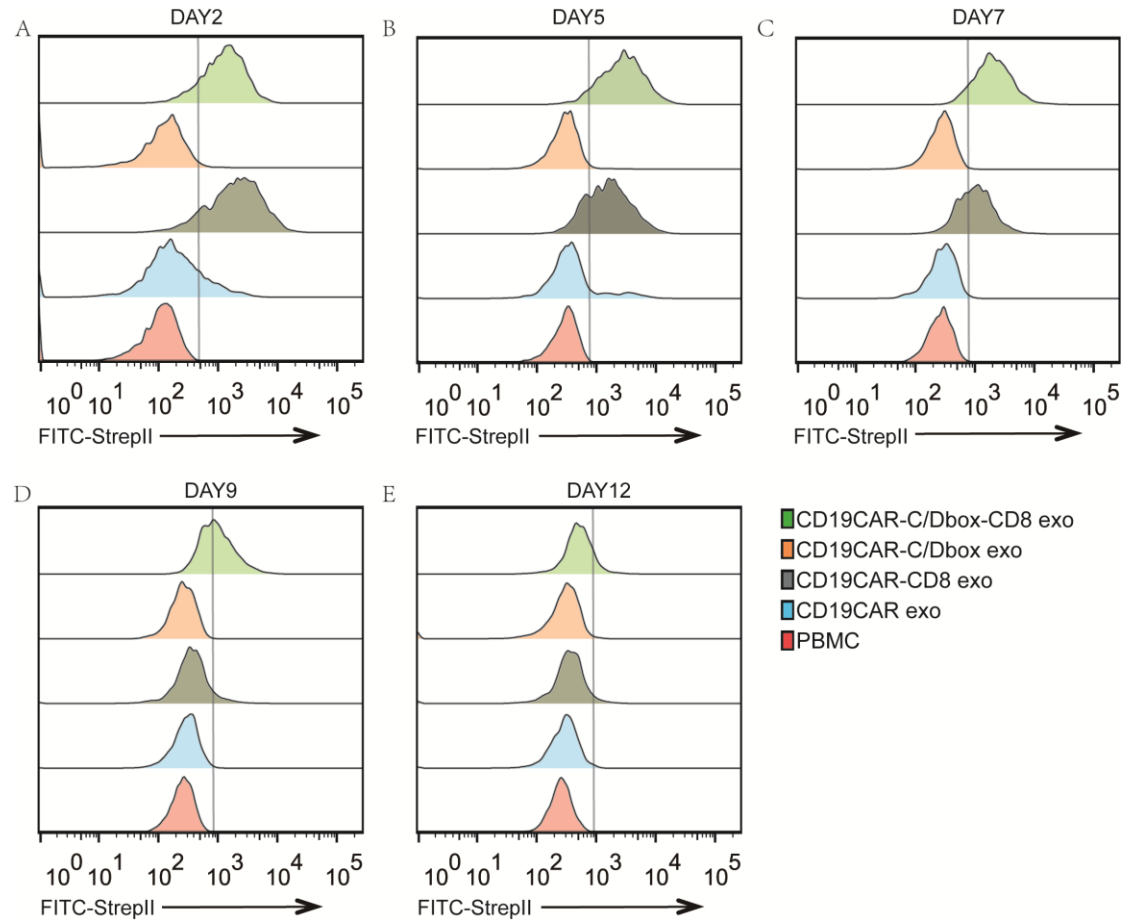


图 3.8 CD8+T 细胞中 CAR 时间梯度表达

Figure3.8 CD8+T cell CAR expression within a time-dependent

(A-E) 流式细胞术检测 2、5、7、9、12 天的 CD8+T 细胞中 CAR 表达。

(3) CD3+T 细胞中 CAR 表达：利用 flowjo 分析第 2、5、7、9、12 天的 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比。在 CD19 CAR、CD19 CAR-CD8、CD19 CAR-C/Dbox、CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中，DAY2 时 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 14.4%、43.1%、1.69%、36.2%，只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD3+T 中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.9A；DAY5 时 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 5.82%、26.6%、0.69%、37.4%，只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD3+T 中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.9B；DAY7 时 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.56%、20.3%、0.25%、35.1%，只有 CD8-Lamp2b 存在时 CD3+T 中有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.9C；DAY9 时 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.25%、2.87%、0.06%、17.18%，只有 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.9D；DAY12 时 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 0.23%、0.59%、0.17%、1.49%，所有组均没有阳性 CAR-T 细胞群，图 3.9E；PBMC 组为未添加外泌体。这些数据表明，CD8-Lamp2b 靶向质粒存在时，在 DAY2 时外泌体靶向系统和外

泌体 mRNA 靶向递送系统均能在 CD3+T 细胞中获得阳性 CAR-T 细胞群, DAY9 时只有 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组有阳性 CAR-T 细胞群, 外泌体 mRNA 靶向递送系统使 CD3+T 细胞中 CAR-T 细胞保留时间更长, 在 DAY12 时所有组均没有阳性 CAR-T 细胞群, 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统均能在 CD3+T 细胞中短暂获得阳性 CAR-T 细胞群。

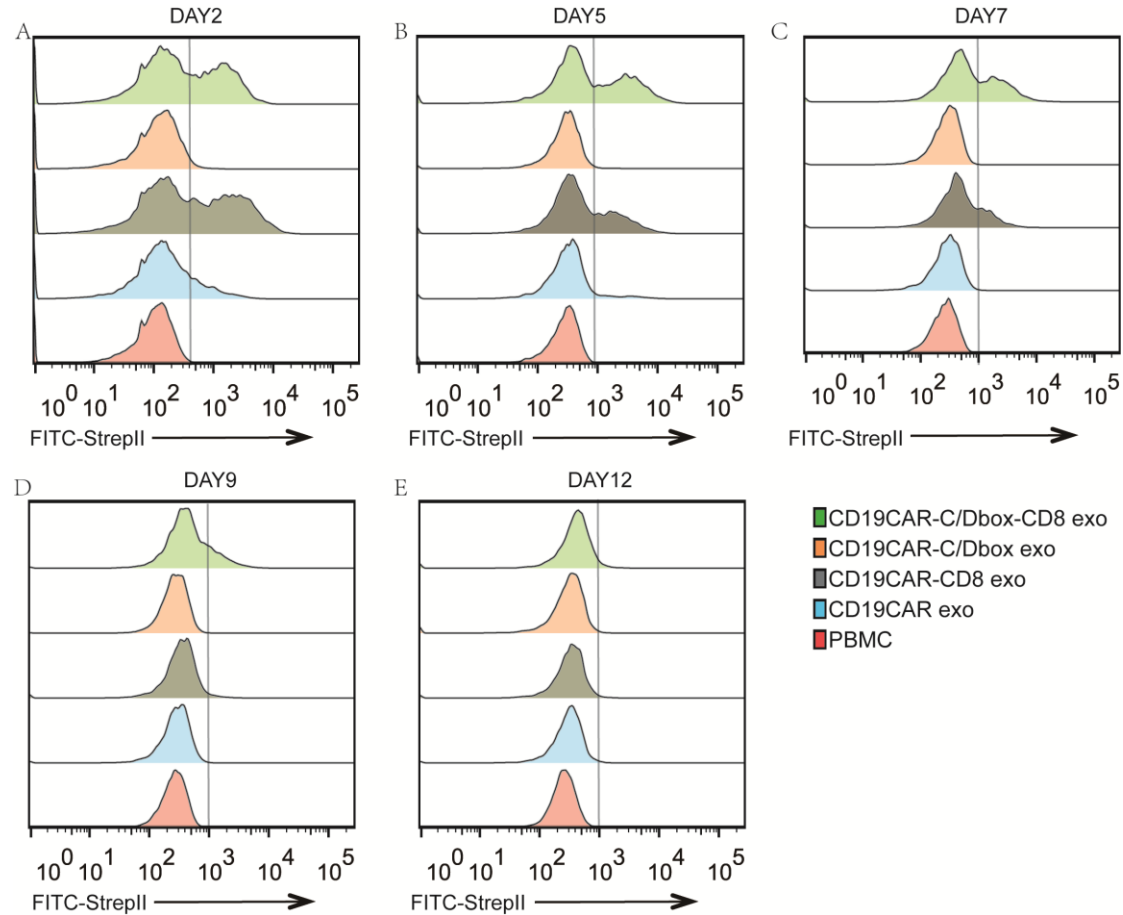


图 3.9 CD3+T 细胞中 CAR 时间梯度表达

Figure3.9 CD3+T cell CAR expression within a time-dependent

(A-E) 流式细胞术检测 2、5、7、9、12 天的 CD3+T 细胞中 CAR 表达。

### 3.3.7 统计分析外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析第 2、5、7、9、12 天的 CD3+T 细胞和 CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比, 并绘制为折线图。结果显示, 当 CD8-Lamp2b 成分存在时, DAY2 时 CD19 CAR-CD8 和 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组均能检测到 CD3+T 和 CD8+T 细胞中 StrepII 的高表达; DAY5 时 CAR-T 细胞百分比开始下降, CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组较 DAY2 时明显升高; 在 DAY12 时 CAR-T 细胞百分比的表达下降到 2%左右; 经统计学分析具有统计学意义; 图

3.10。表明外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统均可以短暂产生 CAR-T 细胞；外泌体 mRNA 靶向递送系统效率更好。

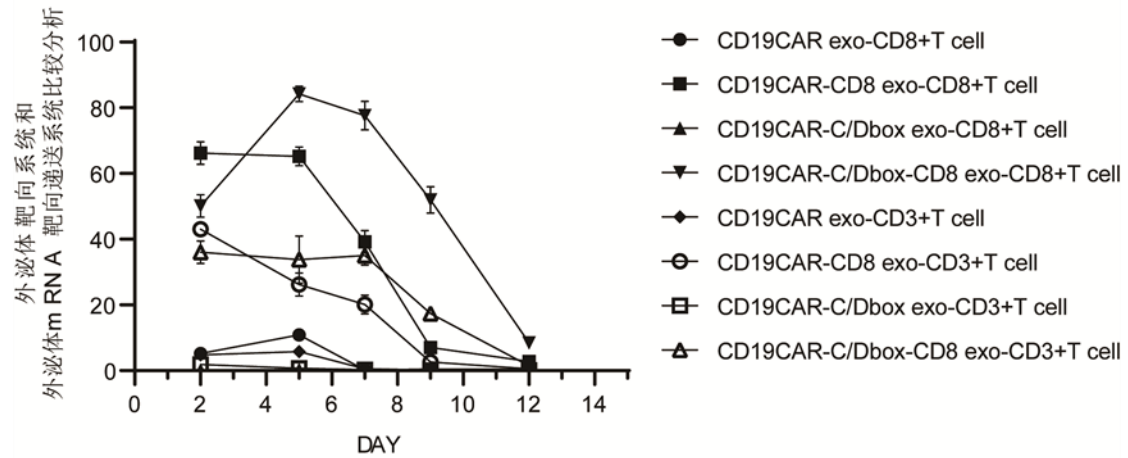


图 3.10 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统比较分析

Figure3.10 Comparative analysis of Exosome Targeting System and Exosome mRNA Targeting Delivery System

注:  $P < 0.05$  表示显著性差异, \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; ns  $P > 0.05$ 。

### 3.3.8 外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞

选取 CD8-Lamp2b 靶向质粒利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体。将 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体与激活的 PBMC 共培养标记为 DAY1, 第 5 天用流式细胞术检测 PBMC 细胞中 StrepII 的表达。流式结果显示, 在 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 组中, CD3+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞百分比分别为 59.5%、94.3%, 图 3.11A-B, control 组未添加外泌体。以上结果表明利用外泌体 mRNA 靶向递送系统成功制备了 CD19 CAR-T 细胞。

在体内实验中, DAY1 分别尾静脉注射 RAJI-GL 或 B-LCL 细胞至人源化 NPG 小鼠体内构建肿瘤模型, DAY7 尾静脉注射 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体作为治疗组, 对照组不进行处理, DAY12 小鼠活体成像, 图 3.11C。利用 Living Image 软件定量分析小鼠体内荧光强度并进行统计分析。在 B-LCL-GL 肿瘤模型中, 对照组的平均发光强度为  $5.13 \times 10^8$  Photons/s, 肿瘤细胞转移到全身; 治疗组平均发光强度仅  $1.30 \times 10^8$  Photons/s, 发光强度和肿瘤细胞转移面积明显低于对照组; 在 RAJI-GL 肿瘤模型中, 对照组的平均发光强度为  $2.60 \times 10^8$  Photons/s, 肿瘤细胞转移到全身; 治疗组平均发光强度仅  $6.52 \times 10^7$  Photons/s, 发光强度和肿瘤细胞转移面积明显低于对照组; 小动物成像所得数据经双因素方差分析无

显著差异，图 3.10D。表明 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体在体内具有较好抗 RAJI 和 B-LCL 肿瘤活性。

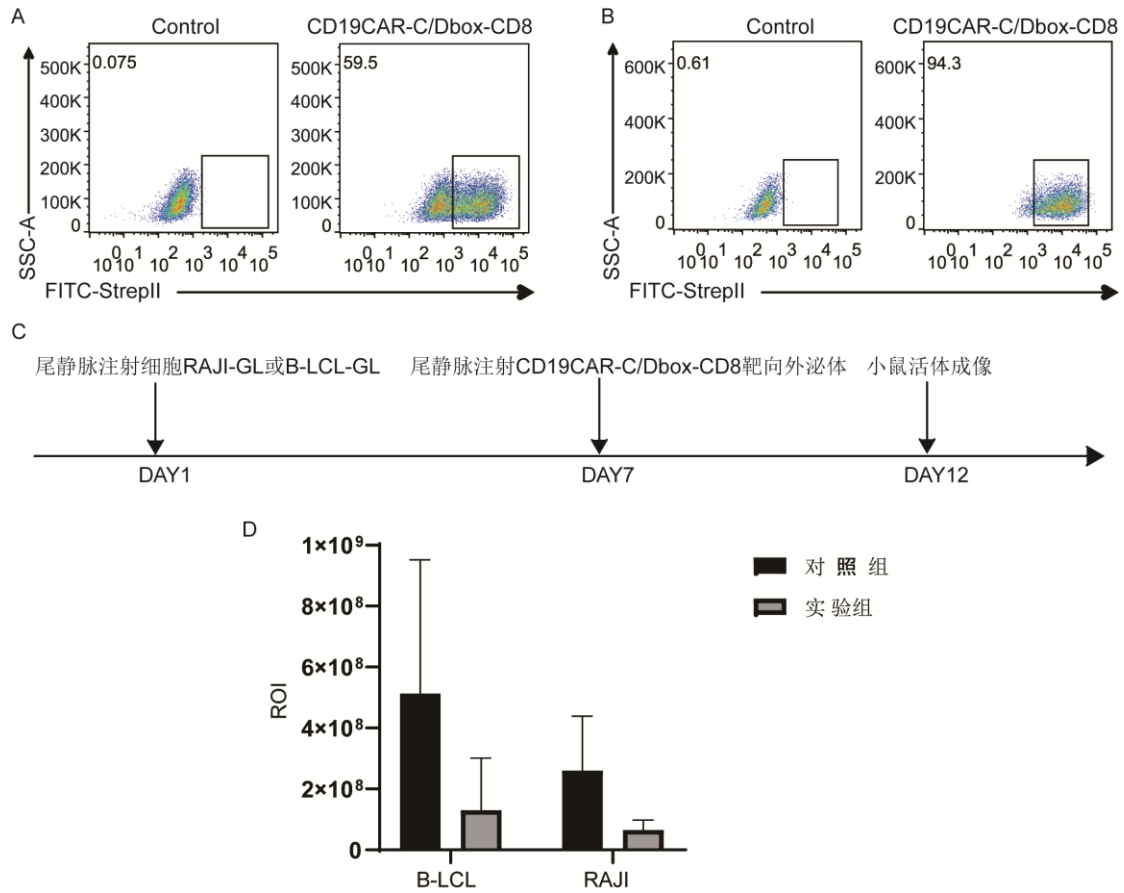


图 3.11 外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞

**Figure3.11 CAR-T cells were prepared by Exosome mRNA Targeting Delivery System s**

(A-B) 流式细胞术检测 CD3+T、CD8+T 细胞中 CAR-T 细胞表达，(C) 体内实验策略图，(D-E) 体内实验验证 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体体内抗 B-LCL-GL、RAJI-GL 肿瘤活性。

注：P<0.05 表示显著性差异，\*P<0.05； \*\* P<0.01； \*\*\* P<0.001； \*\*\*\* P<0.0001； ns P>0.05。

### 3.4 讨论

为了突破 CAR-T 细胞制备周期长、在临床治疗上安全性问题，利用 LAMP-2B 与靶向蛋白片段进行基因融合以在外泌体上显示蛋白，帮助其选择性递送至靶细胞的原理，构建了外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统，并比较 2 种靶向系统的优缺点，并且利用外泌体 mRNA 靶向递送系统高效制备了 CAR-T 细胞。将靶向蛋白融合到 LAMP-2B 的 N 末端使其在在外泌体表面表达，通过基因工程和 CD19 CAR 质粒共转染 293F 细胞使外泌体表面同时携带靶向蛋白和 CD19 CAR，再通过与 T 细胞共培养，外泌体上的靶向蛋白靶向受体细

胞并递送 CD19 CAR, 使 CD19 CAR 在受体 T 细胞中表达, 成功构建了外泌体靶向系统。L7Ae 蛋白能与 RNA 的 C/Dbox 识别结合, 将 L7Ae 连接在外泌体跨膜蛋白 CD63 蛋白的 C 端, 将 C/Dbox 插入到 CD19 CAR 质粒的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 中, 通过外泌体膜蛋白 CD63 使得融合蛋白 CD63-L7Ae 进入外泌体, 再通过 C/Dbox 与 L7Ae 的结合, 将 boxC/D RNA 带入外泌体中; 再结合 LAMP-2B 外泌体靶向原理, 使得携带 RNA 的外泌体靶向递送到受体细胞; 将携带 RNA 的靶向外泌体与 T 细胞共培养, 使 CD19 CAR 在受体 T 细胞中表达, 成功构建了外泌体 mRNA 靶向递送系统。我们成功制备了靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞的 3 种靶向质粒, 在外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统中靶向 CD8+T 细胞的靶向质粒效果最好。研究发现, 外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统均能短暂产生 CAR-T 细胞, 且在第 5 天 CAR-T 细胞百分比最高, 2 种靶向系统最大的差异在于外泌体 mRNA 靶向递送系统额外的 mRNA 靶向递送翻译机制使得 CAR-T 细胞制备效果更好, 为增强 CAR-T 细胞免疫治疗提供新的思路。

在体内抗肿瘤实验中, 小动物成像所得数据经双因素方差分析无显著差异, 可能原因是在小鼠人源化建模时, 注射的 PBMC 在小鼠体内存活差异导致接种的肿瘤细胞在小鼠体内存活差异大。在总体趋势上, 具有抗肿瘤效果。

以上结果表明, 利用 LAMP-2B 与靶向蛋白基因融合, 增强外泌体靶向的原理, 无论是外泌体靶向系统还是外泌体 mRNA 靶向递送系统, 均可以使 CD19 CAR 在受体 T 细胞中表达, 并且外泌体 mRNA 靶向递送系统可以更高效的制备 CAR-T 细胞, 为 CAR-T 细胞的制备提供了新的思路。

## 第四章 结论与展望

### 4.1 总结

靶向 CD19 的 CAR-T 细胞在治疗 B 细胞恶性肿瘤中展现出显著的疗效。根据我们的初步实验结果，可以得出以下结论：

(1) 成功构建了 GFP/Luc 双标记的 B-LCL-GL 细胞和 K562-GL 细胞，并购买了 GFP/Luc 双标记的 RAJI-GL 细胞。验证了 K562 是 CD19、CD22 双阴性细胞，RAJI 和 B-LCL 是 CD19、CD22 双阳性细胞。利用 B-LCL-GL 细胞成功建立了小鼠的皮下移植瘤模型与血行性转移瘤模型；2 种模型比较发现，建模方式不影响肿瘤生长，皮下移植瘤模型小鼠带瘤生存周期更长。

(2) 利用超速离心法成功获得 293F 细胞衍生的外泌体。将 CD63-GZMB、CD63-PFRI 重组质粒和 CD19 CAR 共转染 293F 细胞抽取 CD19/G+P 外泌体，发现 CD19/G+P 外泌体中富含颗粒酶、穿孔素和 CD19 CAR，与受体细胞共培养发现外泌体表面的 CAR 在靶向受体细胞中特异性高表达，并验证了装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素的外泌体在体外和体内均具有抗肿瘤活性。

(3) 构建了 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 分别靶向 CD3+T、CD4+T、CD8+T 细胞的 Lamp2b 靶向载体，利用 Lamp2b 靶向载体成功构建了外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统，在 2 种系统中 CD3-Lamp2b、CD4-Lamp2b、CD8-Lamp2b 均可以将外泌体内容物特异性靶向到受体细胞，且 CD8-Lamp2b 靶向效果最好。对 2 种靶向系统比较发现，2 种靶向系统均能短暂产生 CAR-T 细胞，在第 5 天达到峰值；且外泌体 mRNA 靶向递送系统靶向效果更好。筛选出可以高效制备 CAR-T 细胞的外泌体 mRNA 靶向递送系统。

### 4.2 主要创新点

CD19 靶向的 CAR-T 细胞是一种有效的治疗难治性 B 细胞淋巴瘤的方法，CAR-T 细胞制备限制了 CAR 免疫治疗的运用，也有研究用来源于 CAR-T 细胞的外泌体进行肿瘤治疗，然而，患者疾病进展、T 细胞收获不足等问题给外泌体免疫治疗的研究蒙上了阴影。本文的创新点在于：(1) 利用 293F 在无血清培养基中大量培养，生长迅速的特点生产外泌体，与 CAR-T 细胞产生外泌体相比，可以很大程度的解决外泌体的制备产量问题；(2) 修饰 293F 细胞获得的包含颗粒酶、穿孔素和 CAR 的外泌体具有良好的抗肿瘤治疗效果，制备了一种基于靶向 CD19 的 CAR 外泌体递送细胞毒性分子抗 B 细胞淋巴瘤的免疫治疗方法。(3) 修饰 293F 细胞利用外泌体 mRNA 靶向递送系统获得靶向 CD8+ T 细胞外泌体制



备 CAR-T 细胞,开发了一种新的 CAR-T 细胞制备方式,为免疫治疗的研究奠定新的台阶。

### 4.3 展望

(1) 本研究利用 293F 细胞制备装载 CD19 CAR、颗粒酶和穿孔素的外泌体在体外和体内均具有抗肿瘤活性,后期可以另外装载细胞因子如 IL-2 或化学药物,进一步提高外泌体的治疗效果及适用范围。在免疫治疗中 CD19 抗原的缺失及免疫逃逸等导致了疾病复发,从而使治疗失败。针对 B 细胞淋巴瘤的 CAR-T 细胞研究除了最常见的 CD19 外,还有 CD22 等靶点,甚至双靶点<sup>[95]</sup>。后期可以引进新靶点 CD22 作为 CD19 的联合靶点,使得 CAR-T 细胞治疗靶向性更强,进一步提高作用强度及持续时间<sup>[116]</sup>。

(2) 本研究主要构建了外泌体 mRNA 靶向递送系统,外泌体可以把 RNA 分子递送到受体细胞中发挥生物学作用。后期,可以把与 LAMP-2B 融合的靶向 CD8 基因的序列替换成靶向 BACE1、KRAS 等基因的序列,进一步提高外泌体 mRNA 靶向递送系统的适用范围。

(3) 本研究在评估 CD19/G+P 外泌体和 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体的体内抗肿瘤活性时,小动物成像所得数据经双因素方差分析无显著差异,若做重复实验能更好的反应治疗效果。本研究利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备的 CD19 CAR-C/Dbox-CD8 靶向外泌体在体外可高效制备 CAR-T 细胞,且在体内具有较好抗 CD19 阳性肿瘤活性,但在体内是否成功制备 CAR-T 细胞仍不清楚,需要进一步验证在体内实验中有 CAR-T 细胞产生和通过外泌体 mRNA 靶向递送系统制备的 CAR-T 细胞体外抗肿瘤活性。另外,在外泌体 mRNA 靶向递送系统中,CD4-Lamp2b 靶向质粒靶向效果较低,可以利用 CD4-Lamp2b 靶向质粒构建外泌体靶向系统和外泌体 mRNA 靶向递送系统比较分析,进一步揭示 CD4-Lamp2b 靶向质粒在外泌体 mRNA 靶向递送系统是否影响 CAR-T 细胞制备效果。

综上所述,本研究制备了一种基于靶向 CD19 的 CAR 外泌体递送细胞毒性分子抗 B 细胞淋巴瘤的免疫治疗方法,解决了外泌体产量低的问题。另外,我们以利用外泌体 mRNA 靶向递送系统制备 CAR-T 细胞,开发了新的 CAR-T 细胞制备方法,为免疫治疗的研究奠定新的台阶。



## 参考文献

- [1] 姚桦, 杨晓梅, 钟大妮,等.CD19 CAR-T 细胞治疗急性 B 淋巴细胞白血病的  
研究进展[J].生命科学,2022,34(6):663-675.
- [2] 董蓓蓓, 李玉淼.CAR-T 在血液类恶性肿瘤中的研究进展[J].中国生物工程  
杂志,2023,43(6):43-53.
- [3] Liu Y, Zhou X, Wang X.Targeting the tumor microenvironment in B-cell  
lymphoma: challenges and opportunities[J].J Hematol Oncol,2021,14(1):125.
- [4] 陈艳, 梁奇, 杨志武,等.外泌体在淋巴瘤中的研究进展[J].现代生物医学进  
展,2021,14(42):2797-2800.
- [5] Wang X, Waschke BC, Woolaver RA, et al.HDAC inhibitors overcome  
immunotherapy resistance in B-cell lymphoma[J].Protein  
Cell,2020,11(7):472-482.
- [6] 施明, 谢云波, 王福生.肿瘤免疫细胞治疗: 前景与挑战[J].中国肿瘤生物治  
疗杂志,31(1):1-9.
- [7] Fowler NH, Cheah CY, Gascoyne RD, et al.Role of the tumor  
microenvironment in mature B-cell lymphoid  
malignancies[J].Haematologica,2016,101(5):531-540.
- [8] Tashiro H, Sauer T, Shum T, et al.Treatment of Acute Myeloid Leukemia with  
T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Directed to C-type Lectin-like  
Molecule 1[J].Mol Ther,2017,25(9):2202-2213.
- [9] Zhang Y, Li S, Wang Y, et al.A novel and efficient CD22 CAR-T therapy  
induced a robust antitumor effect in relapsed/refractory leukemia patients when  
combined with CD19 CAR-T treatment as a sequential therapy[J].Exp  
Hematol Oncol,2022,11(1):15.
- [10] Spiegel JY, Patel S, Muffly L, et al.CAR T cells with dual targeting of CD19  
and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a  
phase 1 trial[J].Nat Med,2021,27(8):1419-1431.
- [11] 刘宇凯, 刘琦, 马聪,等.抗 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞治疗儿童急性 B 淋巴  
细胞白血病的效[J].中国医学创新,2023,20(16):43-47.
- [12] Sun Y, Su Y, Wang Y, et al.CD19 CAR-T Cells With Membrane-Bound IL-15  
for B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia After Failure of CD19 and CD22  
CAR-T Cells: Case Report[J].Front Immunol,2021,12:728962.
- [13] 袁园, 秦扬, 游凤涛,等.靶向 CD19 的 CAR 修饰的 NK 细胞对 B 细胞淋巴

- 瘤的杀伤[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(5):613-619.
- [14] Imura Y, Ando M, Kondo T, et al.CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD[J].JCI Insight,2020,5(14).
- [15] 朱晶晶, 张静, 王萍,等.血必净注射液增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性的研究[J].中国中西医结合急救杂志 2021,28(2):209-213.
- [16] Hamada M, Nishio N, Okuno Y, et al.Integration Mapping of piggyBac-Mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Analyzed by Novel Tagmentation-Assisted PCR[J].EBioMedicine,2018,34:18-26.
- [17] 单贺珍, 董石, 李晓瑞,等.金银花提取物增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性[J].中南药学,2022,20(7):1545-1549.
- [18] Yang P, Cao X, Cai H, et al.The exosomes derived from CAR-T cell efficiently target mesothelin and reduce triple-negative breast cancer growth[J].Cell Immunol,2021,360:104262.
- [19] Sterner RC, Sterner RM.CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J].Blood Cancer J,2021,11(4):69.
- [20] Zhang X, Zhu L, Zhang H, et al.CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges[J].Front Immunol,2022,13:927153.
- [21] Zhu Y, Xiao H, Yu T, et al.An immune risk score predicts survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J].Leuk Res,2023,125:107008.
- [22] Martinez M, Moon EK.CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment[J].Front Immunol,2019,10:128.
- [23] Arjomandnejad M, Kopec AL, Keeler AM.CAR-T Regulatory (CAR-Treg) Cells: Engineering and Applications[J].Biomedicines,2022,10(2).
- [24] Fu W, Lei C, Liu S, et al.CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumour effects and low toxicity[J].Nat Commun,2019,10(1):4355.
- [25] Nathan Singh NVF, Boris Engels.Antigen-independent activation enhances the efficacy of 41BB co-stimulated CD22 CAR T cells[J].Nat Med,2021,27(5):842-850.
- [26] Calvo V, Izquierdo M.T Lymphocyte and CAR-T Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Applications in Cancer Therapy[J].Cells,2022,11(5):790.
- [27] Yeku OO, Purdon TJ, Koneru M, et al.Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment[J].Sci

- Rep,2017,7(1):10541.
- [28] Pan K, Farrukh H, Chittepu VCSR, et al.CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy[J].J Exp Clin Cancer Res,2022,41(1):119.
- [29] Larson RC, Maus MV.Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J].Nat Rev Cancer,2021,21(3):145-161.
- [30] 何爱丽, 杨云, 王夏曼.CAR-T 细胞疗法在难治复发血液肿瘤中的应用与展望[J].西南医科大学学报,46(5):393-399.
- [31] Schneider D, Xiong Y, Wu D, et al.A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines[J].Journal for ImmunoTherapy of Cancer,2017,5:42.
- [32] Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, et al.Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells[J].Int J Mol Sci,2019,20(6):1283.
- [33] Jong AY, Wu CH, Li J, et al.Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells[J].J Extracell Vesicles,2017,6(1):1294368.
- [34] Cullen SP, Martin SJ.Mechanisms of granule-dependent killing[J].Cell Death Differ,2008,15(2):251-262.
- [35] Hassin D, Garber OG, Meiraz A, et al.Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable[J].Immunology,2011,133(2):190-196.
- [36] 蔡昊, 王强利, 李涵,等.间充质干细胞来源的外泌体治疗心肌梗死的研究进展[J].生理科学进展,2019,50(2):99-103.
- [37] Kalluri R, Lebleu VS.The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J].SCIENCE,2020,367(6478):1-15.
- [38] 贲新宇, 易西南.脂肪干细胞来源外泌体在周围神经损伤修复中的研究进展[J].海南医学院学报,2021,27(8):630-640.
- [39] 关梦珊, 邱玉平, 董凤英,等.干细胞源性外泌体在心血管疾病中的研究进展[J].实用医学杂志,2018,34(18):3143-3145.
- [40] Dong Gil You GTL, Seunglee Kwon,Et Al.Metabolically engineered stem cell-derived exosomes to regulate macrophage heterogeneity in rheumatoid arthritis[J].SCIENCE ADVANCES |,2021,7.
- [41] 史玉潇, 芦晓红, 卢望丁,等.外泌体的生物学性质及应用概述[J].中国医药工业杂志,2023,54(7):1008-1019.
- [42] Zhou Y, Yuan Y, Liu M, et al.Tumor-specific delivery of KRAS siRNA with

- iRGD-exosomes efficiently inhibits tumor growth[J].ExRNA,2019,1(1).
- [43] Xie X, Lian S, Zhou Y, et al.Tumor-derived exosomes can specifically prevent cancer metastatic organotropism[J].J Control Release,2021,331:404-415.
- [44] 崔永春, 祁磊, 李波,等.外泌体研究进展及潜在的转化途径[J].转化医学电子杂志,2018,5(2):1-5.
- [45] Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, et al.Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function[J].PLoS One,2008,3(10):e3377.
- [46] 任真, 吕金辉, 张丽波,等.肿瘤来源外泌体调控癌细胞转移机制的研究进展[J].同济大学学报医学版 2021, 42 (5):705-710.
- [47] Nakai W, Yoshida T, Diez D, et al.A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles[J].Sci Rep,2016,6:33935.
- [48] Liang Y, Duan L, Lu J, et al.Engineering exosomes for targeted drug delivery[J].Theranostics,2021,11(7):3183-3195.
- [49] Yang L, Peng X, Li Y, et al.Long non-coding RNA HOTAIR promotes exosome secretion by regulating RAB35 and SNAP23 in hepatocellular carcinoma[J].Mol Cancer,2019,18(1):78.
- [50] 王悦, 王树叶.弥漫大 B 细胞淋巴瘤中外泌体的研究与应用进展[J].肿瘤医学,2021,27 (21):4240-4244.
- [51] Lazaro-Ibanez E, Neuvonen M, Takatalo M, et al.Metastatic state of parent cells influences the uptake and functionality of prostate cancer cell-derived extracellular vesicles[J].J Extracell Vesicles,2017,6(1):1354645.
- [52] 曾娟, 马士淇, 张璐,等.外泌体在肺癌免疫治疗中的作用[J].肿瘤预防与治疗 2023,36(8):702-708.
- [53] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, et al.The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J].Cell Commun Signal,2021,19(1):47.
- [54] Wortzel I, Dror S, Kenific CM, et al.Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance[J].Dev Cell,2019,49(3):347-360.
- [55] 储钜航, 钱明平.外泌体在恶性肿瘤发生发展中的作用及临床应用[J].同济大学学报医学版,2022,43(5):735-741.
- [56] Muller L, Mitsuhashi M, Simms P, et al.Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets[J].Sci Rep,2016,6:20254.
- [57] Katherine D. Gray JEM, Yogindra Vedvyas,Et Al.PD1 blockade enhances

- ICAM1-directed CAR T therapeutic efficacy in advanced thyroid cancer[J].*Clinical Cancer Research*,2020,26(2):6003–6016.
- [58] Samara A, Granot G, Anbar M, et al.Using NK-Derived Exosomes to Treat Leukemia[J].*Blood*,2021,138(Supplement 1):1872-1872.
- [59] 俞丁宁, 石映红, 钱晖.CD8+T 细胞在肿瘤免疫治疗中的应用策略[J].*江苏大学学报医学版*,2022,32(6):532-536.
- [60] Wang J, Chen P, Dong Y, et al.Designer exosomes enabling tumor targeted efficient chemo/gene/photothermal therapy[J].*Biomaterials*,2021,276:121056.
- [61] Di Pace AL, Tumino N, Besi F, et al.Characterization of Human NK Cell-Derived Exosomes: Role of DNAM1 Receptor In Exosome-Mediated Cytotoxicity Against Tumor[J].*Cancers (Basel)*,2020,12(3):661.
- [62] Batista IA, Quintas ST, Melo SA.The Interplay of Exosomes and NK Cells in Cancer Biology[J].*Cancers (Basel)*,2021,13(3).
- [63] Zhang H, Xie Y, Li W, et al.CD4(+) T cell-released exosomes inhibit CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity[J].*Cell Mol Immunol*,2011,8(1):23-30.
- [64] Huai-Chia Chuang, Chen M-H, Yi-Ming Chen, et al.Induction of Interferon- $\gamma$  and Tissue Inflammation by Overexpression of Eosinophil Cationic Protein in T Cells and Exosomes[J].*Arthritis & Rheumatology*,2022,74(1):92-104.
- [65] Liu X, Xia T, Fang Y, et al.Overcoming the blood-brain barrier by using a multistage exosome delivery system to inhibit central nervous system lymphoma[J].*Nanomedicine*,2022,41:102523.
- [66] 居怡, ALI S A H, 施戈韬,等.外泌体作为药物递送载体的研究进展[J].*药学进展*,2023,47(11):804-816.
- [67] Frontiers Editorial O.Retraction: Targeting and Therapy of Glioblastoma in a Mouse Model Using Exosomes Derived From Natural Killer Cells[J].*Front Immunol*,2019,10:1770.
- [68] 赵飞, 李刚.工程化外泌体在肝癌治疗中的研究进展[J].*肝胆胰 科杂志*,2023,35(11):697-701.
- [69] Lopes D, Lopes J, Pereira-Silva M, et al.Bioengineered exosomal-membrane-camouflaged abiotic nanocarriers: neurodegenerative diseases, tissue engineering and regenerative medicine[J].*Mil Med Res*,2023,10(1):19.
- [70] Maugeri M, Nawaz M, Papadimitriou A, et al.Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells[J].*Nat*

- Commun,2019,10(1):4333.
- [71] Li B, Yang J, Wang R, et al.Delivery of vascular endothelial growth factor (VEGFC) via engineered exosomes improves lymphedema[J].Ann Transl Med,2020,8(22):1498.
- [72] Zhou Z, Pang Y, Sun W.Lymph node-tumor dual targeting exosomes: Dual-effect synergistic tumor immunotherapy[J].Chinese Science Bulletin,2022,67(22):2570-2572.
- [73] Obata Y, Kita S, Koyama Y, et al.Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release[J].JCI Insight,2018,3(8).
- [74] 张靖悦, 李云, 杨翀.外泌体靶向给药系统的研究现状[J].天津药学,2021,33(5):68-73.
- [75] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al.Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J].Nat Biotechnol,2011,29(4):341-345.
- [76] 黎力, 王越.转化医学研究领域的 super“STAR”: 外泌体相关诊疗技术现状与前景[J].第二军医大学学报,2018,39(7):697-703.
- [77] Fan Y, Zhou Y, Lu M, et al.Responsive Dual-Targeting Exosome as a Drug Carrier for Combination Cancer Immunotherapy[J].Research (Wash D C),2021,2021:9862876.
- [78] 张芮浩, 张晓勃, 袁文欢,等.外泌体的提取、贮存及其临床应用进展[J].中国生物制品学杂志,2022,35:351-355.
- [79] Dai W, Su L, Lu H, et al.Exosomes-mediated synthetic Dicer substrates delivery for intracellular Dicer imaging detection[J].Biosens Bioelectron,2020,151:111907.
- [80] 麦俊新.利用 L7Ae 蛋白构建新型靶向包裹 RNA 分子的外泌体的研究[D].广州;暨南大学,2019.
- [81] Duan L, Xu L, Xu X, et al.Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy[J].Nanoscale,2021,13(3):1387-1397.
- [82] 杜梦寒, 王敬, 华胜妮,等.适配体功能化外泌体在肿瘤靶向治疗中的应用[J].生物化学与生物物理进展,2023,50(9):2084-2092.
- [83] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al.Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J].Nat Cell Biol,2007,9(6):654-659.
- [84] Jafari D, Shajari S, Jafari R, et al.Designer Exosomes: A New Platform for

- Biotechnology Therapeutics[J].BioDrugs,2020,34(5):567-586.
- [85] Li Z, Zhou X, Gao X, et al.Fusion protein engineered exosomes for targeted degradation of specific RNAs in lysosomes: a proof-of-concept study[J].J Extracell Vesicles,2020,9(1):1816710.
- [86] 晏梓钧, 茹楠, 蔡梦溪,等.外泌体改造和修饰研究进展[J].解放军医学院学报,2019,40(12):1203-1206.
- [87] 李鹏.CD19-CART 治疗 B 细胞血液恶性肿瘤的临床前研究[D].北京;解放军医学院,2018.
- [88] Hunter BD, Rogalski M, Jacobson CA.Chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas: efficacy, toxicity, and comparative chimeric antigen receptor products[J].Expert Opin Biol Ther,2019,19(11):1157-1164.
- [89] Yu H, Huang T, Wang D, et al.Acute lymphoblastic leukemia-derived exosome inhibits cytotoxicity of natural killer cells by TGF- $\beta$  signaling pathway[J].3 Biotech,2021,11(7):313.
- [90] Watanabe N, Mo F, Mckenna MK.Impact of Manufacturing Procedures on CAR T Cell Functionality[J].Front Immunol,2022,13:876339.
- [91] Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, et al.Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy[J].Mol Ther Methods Clin Dev,2017,4:92-101.
- [92] Jogalekar MP, Rajendran RL, Khan F, et al.CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments[J].Front Immunol,2022,13:925985.
- [93] Schubert ML, Schmitt M, Wang L, et al.Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy[J].Ann Oncol,2021,32(1):34-48.
- [94] Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ.Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy[J].Nat Rev Clin Oncol,2020,17(3):147-167.
- [95] 王晋秋, 邹立群.抗 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤不良反应的研究进展[J].中国肿瘤临床,2020,47(17):912-918.
- [96] Yang JY, Tan YQ, Zhou G.T cell-derived exosomes containing cytokines induced keratinocytes apoptosis in oral lichen planus[J].Oral Dis,2022,28(3):682-690.
- [97] Zhang H, Wang L, Li C, et al.Exosome-Induced Regulation in Inflammatory Bowel Disease[J].Front Immunol,2019,10:1464.
- [98] Sadowski K, Olejarz W, Basak G.Modern Advances in CARs Therapy and

- Creating a New Approach to Future Treatment[J].*Int J Mol Sci*,2022,23(23):15006.
- [99] Haque S, Vaiselbuh SR.CD19 Chimeric Antigen Receptor-Exosome Targets CD19 Positive B-lineage Acute Lymphocytic Leukemia and Induces Cytotoxicity[J].*Cancers (Basel)*,2021,13(6):1401.
- [100] Valentine M, Li L, Zhou H, et al.Transferrin epitope-CD19-CAR-T cells effectively kill lymphoma cells in vitro and in vivo[J].*Frontiers in Bioscience*,2020,25:270-282.
- [101] Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, et al.Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery[J].*Acta Pharmacol Sin*,2017,38(6):754-763.
- [102] 丁鑫.基于聚多巴胺的多功能纳米材料的制备及其在抗肿瘤治疗中的研究[D].武汉;武汉科技大学,2023.
- [103] Si K, Dai Z, Li Z, et al.Engineered exosome-mediated messenger RNA and single-chain variable fragment delivery for human chimeric antigen receptor T-cell engineering[J].*Cytotherapy*,2023,25(6):615-624.
- [104] Barnas JL, Looney RJ, Anolik JH.B cell targeted therapies in autoimmune disease[J].*Curr Opin Immunol*,2019,61:92-99.
- [105] 封忠昕.急性髓系白血病外泌体诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞凋亡及 AMLCD8<sup>+</sup>T 细胞 TCR 特征分析[D].贵州;贵州医科大学,2021.
- [106] 樊淼.基于外泌体的免疫调节剂的构建及其用于肿瘤免疫治疗的研究[D].保定;河北大学,2022.
- [107] 王晓敏, 闫明霞, 梁琳慧,等.GFP和Luc双标技术在小鼠肿瘤模型建立中的应用[J].*实验动物与比较医学*,2010,30(1):2-7.
- [108] 韩杰, 王敬梓, 周锐,等.尾静脉注射荧光素酶标记的膀胱癌 T24 细胞动物转移模型的构建[J].*中华实验外科杂志*,2019,5(2):361-363.
- [109] Enomoto Y, Li P, Jenkins LM, et al.Cytokine-enhanced cytolytic activity of exosomes from NK Cells[J].*Cancer Gene Ther*,2022,29(6):734-749.
- [110] Kojima R, Bojar D, Rizzi G, et al.Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment[J].*Nat Commun*,2018,9(1):1305.
- [111] 龚亮.纳米抗体工程化的外泌体和NK细胞及其靶向治疗肿瘤的研究[D].无锡;江南大学,2023.
- [112] Gutierrez-Guerrero A, Cosset FL, Verhoeven E.Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for



- Research and Gene Therapy[J].Viruses,2020,12(9).
- [113] Wu CH, Li J, Li L, et al.Extracellular vesicles derived from natural killer cells use multiple cytotoxic proteins and killing mechanisms to target cancer cells[J].J Extracell Vesicles,2019,8(1):1588538.
- [114] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al.Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J].Blood,2013,121(7):1165-1174.
- [115] Mhaidly R, Verhoeyen E.Humanized Mice Are Precious Tools for Preclinical Evaluation of CAR T and CAR NK Cell Therapies[J].Cancers (Basel),2020,12(7).
- [116] 闵超.抗 CD19/CD22 嵌合抗原受体 T 细胞治疗复发难治急性 B 淋巴细胞白血病的疗效及安全性研究[D];南昌大学,2023.