# 靶向催乳素受体的嵌合抗原受体 T 细胞制备条件的优化

徐晨宵，朱建伟，张宝红*

（上海交通大学药学院，细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

**摘要**：嵌合抗原受体（CAR）修饰的 T 细胞疗法已成为恶性肿瘤治疗领域内的研究重点，催乳素受体（PRLR）也被证明其过表达会影响乳腺癌的发生与发展，是乳腺癌治疗的潜在靶点。本研究建立了三质粒系统［p*HIV*-绿色荧光蛋白（GFP）、p*sPAX2*、p*VSVG*］包装慢病毒，并将其应用于新构建的靶向 PRLR 的 CAR 慢病毒表达载体，通过进一步优化慢病毒制备条件，测定慢病毒滴度，成功构建了靶向 PRLR 的 CAR-T 细胞。结果表明，制备慢病毒的最优条件为：PRLR-CAR ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG* 质量比为 3 ∶ 2 ∶ 1，且和转染试剂以质量比 1 ∶ 2 混合，经浓缩后滴度可达到 $1.88\times10^7$ TU/ml。以此慢病毒感染人 T 细胞，并经终浓度 0.5 μg/ml 嘌呤霉素筛选 2 d 后可得到 CD4 阳性表达率约为 55%，CD8 阳性表达率约为 35%的 CAR-T 细胞，且 PRLR-CAR 阳性表达率大于 50%。构建的新型靶向 PRLR 的 CAR-T 细胞可为乳腺癌的免疫治疗提供参考。

**关键词**：乳腺癌；催乳素受体；嵌合抗原受体；T淋巴细胞；慢病毒

**中图分类号**：R737.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)04-0491-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.010

# Optimal Preparation Conditions of Anti-PRLR Chimeric Antigen Receptor T Cells

XU Chenxiao, ZHU Jianwei, ZHANG Baohong*

(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

**ABSTRACT**: Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has become the focus of research in the field of malignant tumor treatment. Prolactin receptor (PRLR) is one of the potential targets for breast cancer treatment, and its overexpression will affect the occurrence and development of breast cancer. In this study, a three-plasmid system [p*HIV*-green fluorescent protein (GFP), p*sPAX2*, p*VSVG*] was established to package lentivirus and applied to the newly constructed CAR lentiviral expression vector targeting PRLR. By further optimizing the preparation conditions of lentivirus and measuring the titer of lentivirus, CAR-T cells targeting PRLR were constructed successfully. The results showed that when the mass ratio of PRLR-CAR∶p*sPAX2*∶p*VSVG* was 3∶2∶1, and mixed with transfection reagent at a mass ratio of 1∶2, the condition for the preparation of lentivirus was the optimality, and the titer could reach $1.88\times10^7$ TU/ml after concentration. After infecting human T cells with the lentivirus and screening with a final concentration of 0.5 μg/ml puromycin for two days, CAR-T cells were obtained with the expression positive rates of CD4 and CD8 for 55% and 35%, respectively. And the expression positive rate of PRLR-CAR could be over 50%. The constructed novel CAR-T cells targeting PRLR can provide a reference for the immunotherapy of breast cancer.

**Key Words**: breast cancer; prolactin receptor; chimeric antigen receptor; T lymphocyte; lentivirus

乳腺癌已成为全球发病率第一的恶性肿瘤。2020 年，全球新增女性恶性肿瘤患者中有近 1/4 为乳腺癌病例，在中国，女性乳腺癌新发病例数超过 41 万[1]。并且，随着生活方式、社会环境的显著变化，延迟和减少生育，肥胖和缺乏运动等多种因素均导

**收稿日期**：2021-05-17

**作者简介**：徐晨宵(1996—)，男，硕士研究生，专业方向：生物技术药物。

**通信作者**：张宝红(1975—)，女，副教授，博士生导师，从事生物技术药物的研究与开发。

E-mail：bhzhang@sjtu.edu.cn

致乳腺癌发病率持续上升[2]。

随着对乳腺癌的研究不断深入，免疫治疗展现出较好的应用前景[3]。其中，已在血液肿瘤治疗上取得显著疗效的嵌合抗原受体修饰的T细胞（chimeric antigen receptor-T cell，CAR-T）疗法也开始尝试用于乳腺癌治疗[4—5]。CAR-T技术是指通过在T细胞表面引入一段经人工改造的嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor，CAR），使T细胞的作用不再倚赖于主要组织相容性复合物（major histocompatibility complex，MHC）识别与递呈，有效解决了肿瘤细胞表面低表达MHC从而产生的免疫抑制问题[6]。虽然针对乳腺癌的CAR-T免疫治疗极具潜力，但在临床应用中仍存在很多人表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）靶向治疗抵抗的患者，同时也存在应用CAR-T疗法导致的不良事件[7]。因此，仍需开发其他治疗策略。

催乳素受体（prolactin receptor，PRLR）属于Ⅰ类造血细胞因子受体大家族，是一种跨膜糖蛋白，在正常人体组织中主要分布于乳腺细胞，仅与生育功能相关，并不产生其他特异性作用[8]。有研究证明PRLR基因全敲除小鼠可健康生长，且存活寿命和发病率均未受到影响[9]。同时，也有研究发现PRLR在乳腺癌细胞中高表达，且会影响乳腺癌的发生与发展[10]。靶向PRLR的单克隆抗体LFA102和靶向PRLR与白细胞分化抗原（cluster of differentiation，CD）3的双特异性抗体均在临床治疗乳腺癌中显示出较好的活性[11—12]。因此，PRLR十分有希望作为肿瘤相关抗原（tumor associated antigen，TAA），为CAR-T治疗乳腺癌提供了新思路。

本研究建立了一种高效制备CAR-T的方法，通过将信号肽（signal peptide，SP）、靶向PRLR的单链抗体可变区（single chain antibody fragment，scFv）（anti-PRLR-scFv）、CD8α铰链区及跨膜区（hinge & transmembrane，hinge & TM）、CD137与CD3ζ组装，建立三质粒系统，成功构建了靶向PRLR的CAR（PRLR-CAR）慢病毒表达载体，并进一步优化慢病毒制备条件，成功制备了靶向PRLR的CAR-T（PRLR-CAR-T），同时探究了PRLR-CAR-T细胞的分型，以期为乳腺癌的免疫治疗提供新思路。

## 1　仪器与试药

T100型聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Bio-Rad公司）；EPS-300型DNA凝胶电泳仪和UV-2000型GIS凝胶成像分析系统均购于上海天能科技有限公司；ECLIPSE Ti-S型倒置显微镜（日本尼康株式会社）；FACSCalibur型流式细胞仪（美国BD Biosciences公司）；Countstar BioTech型细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）。

p*HIV*-puro1.0慢病毒表达载体、p*sPAX2*与p*VSVG*慢病毒制备辅助质粒均为本实验室保存；PCR-Primerstar酶（批号R045Q）、*Xba* Ⅰ限制性内切酶（批号1634）、*Not* Ⅰ限制性内切酶（批号1623）、DNA连接酶（批号6022）和GT-T551 H3培养基（批号WK593S）均购于日本Takara公司；DNA凝胶回收试剂盒（美国Axygen公司，批号AP-GX-50）；重组人白细胞介素2（interleukin 2，IL-2）蛋白（国药集团化学试剂有限公司，批号BC40307580050）；胰蛋白胨（纯度100 %，批号LP0042B）与酵母提取物（纯度100 %，批号LP0021B）均购于英国Oxoid公司；无内毒素质粒抽提试剂盒（美国Omega公司，批号D6228-01）；PRLR-Fc-Tag重组蛋白（美国Acro Biosystems公司，批号PRP-H5251-100）；别藻蓝蛋白（allophycocyanin，APC）标记的抗人IgG Fc抗体（批号409306）、CD3单抗（批号317325）和CD28单抗（批号302903）均购于美国BioLegend公司；异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的抗CD8抗体（批号10980-MM28-F）和藻红蛋白（phycoerythrin，PE）标记的抗CD4抗体（批号10400-M001-P）均购于北京义翘神州科技股份有限公司；APC标记的抗大鼠IgG2a同型对照抗体（英国Abcam公司，批号ab253040）；淋巴细胞分离液（美国GE公司，批号17-1440-03）；DMEM培养基（批号11965092）、Opti-MEM培养基（批号31985062）、RPMI1640培养基（批号11879020）、胰蛋白酶（批号25200072）、磷酸盐缓冲液（PBS，批号10010049）和胎牛血清（FBS，批号10099141）均购于美国Gibco公司；GML-PC™慢病毒浓缩试剂盒［吉满生物科技（上海）有限公司，批号GM-040801-100］；嘌呤霉素盐酸盐［翊圣生物科技（上

海）有限公司，批号 60210ES25］；Lipofectamine™ 2000 转染试剂（Lipo，美国 Invitrogen 公司，批号 11668019）；聚凝胺（美国 Santa Cruz Biotechnology 公司，批号 sc-134220）；氯化钠为分析纯。

外周血单核细胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）来自健康成年志愿者捐赠，志愿者知情同意；人胚胎肾细胞 293（HEK293T）和 Jurkat 细胞由美国 Jecho 实验室馈赠。

## 2 方法和结果

### 2.1 三质粒系统制备慢病毒

将含有绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的 p*HIV*-puro1.0 慢病毒表达载体（p*HIV*-GFP）、p*sPAX2* 和 p*VSVG* 2 种慢病毒制备辅助质粒，按照 3 种质量比（p*HIV*-GFP ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG*=3 ∶ 2 ∶ 1、4 ∶ 1 ∶ 1 和 3 ∶ 1 ∶ 2）混合，并将上述混合物分别以质量比 1 ∶ 2 和 1 ∶ 1 与转染试剂（Lipo）混匀，作为 6 组试验组。

将 6 组试验组分别混匀于 Opti-MEM 培养基 50 μl 中，于室温孵育 20 min。将上述混合液加至 HEK293T 细胞中，4 h 后更换 DMEM 培养基。收集转染 48 h 后的细胞培养上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后，感染未经处理的 HEK293T 细胞。感染 48 h 后，用显微镜记录各组的 GFP 表达情况。并收集各组细胞约 $2\times10^5$ 个，以流式细胞术（flow cytometry，FCM）缓冲液（PBS+2% FBS）洗涤细胞 2 次，用流式细胞仪检测 HEK293T 细胞表面 GFP 的表达情况（阴性对照为在相同条件下培养 48 h，未经 GFP 慢病毒感染的 HEK293T 细胞）。

结果显示，含有 GFP 基因的慢病毒表达载体与 p*sPAX2*、p*VSVG* 基因翻译的蛋白成功组装为慢病毒，说明建立的三质粒系统可正常工作（图 1A）。在不同的包装条件下，所制备的慢病毒显示出不同的感染效率，根据 FCM 结果（图 1B），在 p*HIV*-GFP ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG*=3 ∶ 1 ∶ 2 的条件下，慢病毒的感染效率较低，阳性率均低于 50%，而在其他制备条件下感染阳性率均大于 60%。当 p*HIV*-GFP ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG*=3 ∶ 2 ∶ 1，且和转染试剂以 1 ∶ 2 混合时，感染阳性率最高，为 73.65%。因此，在 CAR-T 制备过程中，通过优化慢病毒制备条件可提高 CAR-T 细胞表达 CAR 的阳性率，进而提高 CAR-T 细胞的质量。

### 2.2 PRLR-CAR 慢病毒表达载体的构建

设计引物（表 1）对 PRLR 抗体轻链可变区、PRLR 抗体重链可变区以及人 CD8α、CD137、CD3ζ 的部分序列进行 PCR 试验。再经过重叠延伸 PCR 将上述片段连接（重叠延伸区段见表 1 中斜体部分），插入经 *Xba* Ⅰ和 *Not* Ⅰ（酶切位点见表 1 中下划线部分）限制性内切酶双酶切后的 p*HIV*-puro1.0 慢病毒表达载体，并运用转化的方法挑取阳性克隆，进行摇菌培养后提取 PRLR-CAR 表达载体。

PRLR-CAR 表达载体由 SP、anti-PRLR-scFv、CD8α 铰链区及跨膜区、CD137 与 CD3ζ（图 2）连接于 p*HIV*-puro1.0 慢病毒表达载体组成。通过测序及经 *Xba* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切鉴定（图 3），PRLR-CAR 慢病毒表达载体已成功构建。

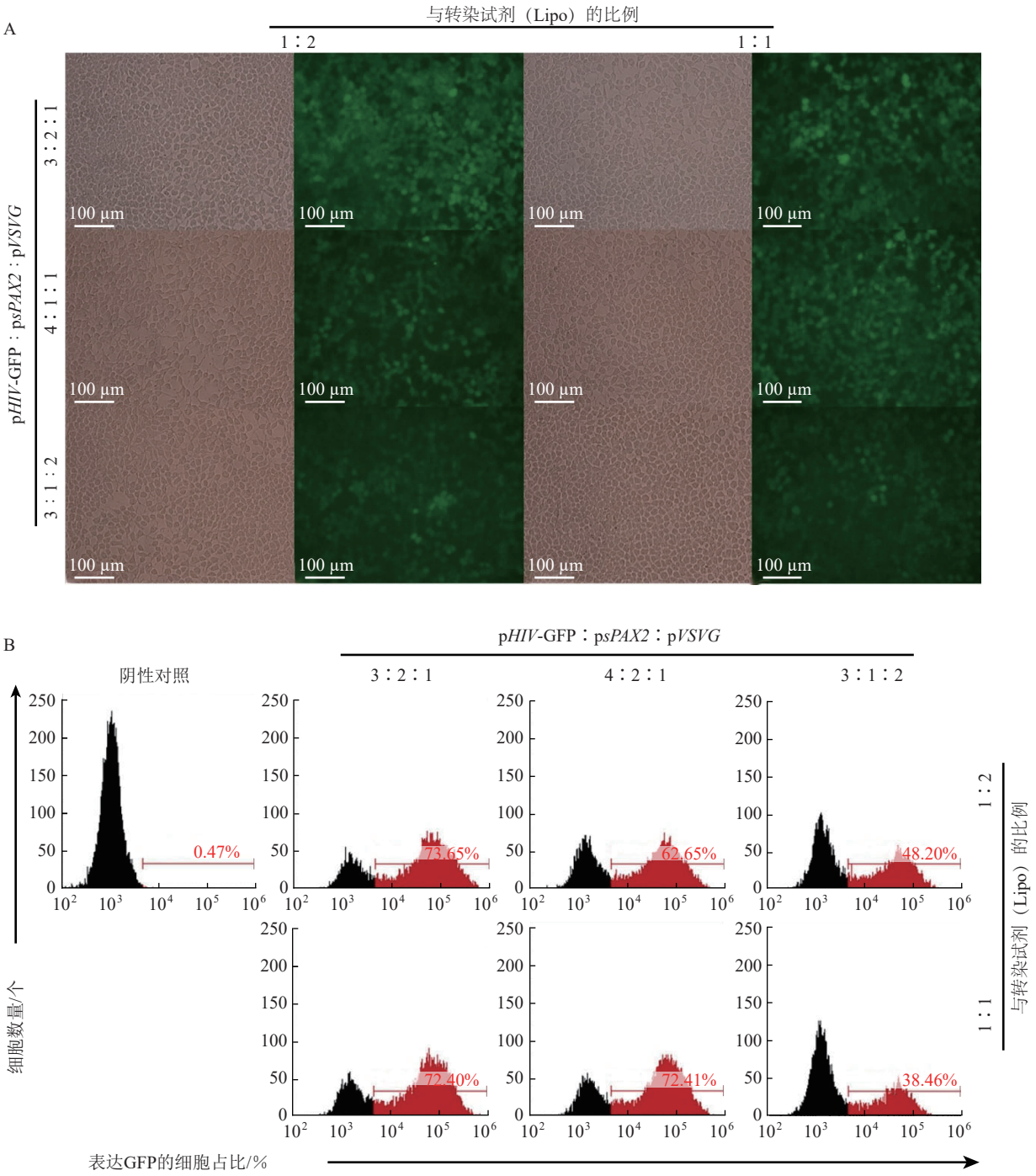
### 2.3 PRLR-CAR 慢病毒制备条件的优化

采用上述三质粒系统制备慢病毒，并以不同质量比（PRLR-CAR ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG*=3 ∶ 2 ∶ 1、4 ∶ 1 ∶ 1、1 ∶ 1 ∶ 1、3 ∶ 1 ∶ 2）混匀，并将上述混合物分别以质量比 1 ∶ 2、1 ∶ 1.5、1 ∶ 1 与

**表 1 PCR 扩增引物**

Tab.1 PCR Amplification Primers

| 基因名称 | 引物序列（5′→3′） |
|---|---|
| *GMCSFSPF* | *CCAAGCTAGCCAATTCTAGAGCCACCATGCTTCTCCTGGT* |
| *GMCSFSPR* | *GACTGGGTCAGCACGATGTCTGGGATCAGGAGGAATGCTG* |
| *PRVLF* | *CAGCATTCCTCCTGATCCCAGACATCGTGCTGACCCAGTC* |
| *PRVLR* | *CGCCAGATCCGGGCTTGCCG*GATCCAGAGGTGGAGCCCCGCTTGATCTCCAGCTTTG |
| *PRVHF* | *CGGCAAGCCCGGATCTGGCG*AGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAG |
| *PRVHR* | *TTGCGGCCGCGGAGCTCACT*GTCACAGAGG |
| *CD841BBCD3F* | *AGTGAGCTCCGCGGCCGCAA*CCACGACGCC |
| *CD841BBCD3R* | *AGGGGCGGATCCGCGGCCGCTTAGCGAGGGGGCAGGGCCT* |




A：显微镜观察 GFP 的表达，B：FCM 检测 GFP 的表达

**图 1　三质粒系统制备慢病毒的条件探究**

Fig.1　The Construction Conditions of Lentivirus by Three-plasmid System

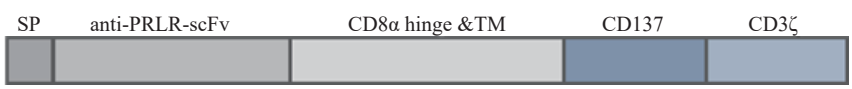
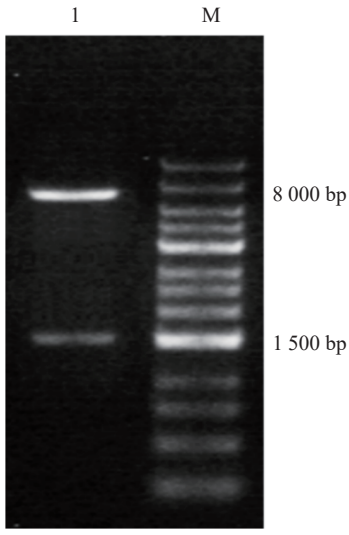



**图 2　PRLR-CAR 结构示意图**

Fig.2　Schematic Image of PRLR-CAR




1 – 经酶切的载体；M – Marker

**图 3 PRLR-CAR 表达载体的 DNA 电泳图**

Fig.3 DNA Electrophoresis Image of PRLR-CAR Expression Vector

转染试剂（Lipo）混匀，作为 12 组试验组。

将上述 12 组分别混匀于 Opti-MEM 培养基 50 μl 中，于室温孵育 20 min。将上述混合液加至 HEK293T 细胞中，4 h 后更换 DMEM 培养基。收集转染 48 h 后的细胞培养上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后，进一步感染 HEK293T 细胞，感染 48 h 后，用 FCM 缓冲液洗涤细胞。随后，加入 PRLR-Fc-Tag 重组蛋白，于 4 ℃孵育 30 min，并用 FCM 缓冲液洗涤细胞 2 次。再加入 APC 标记的抗人 IgG Fc 抗体，于 4 ℃孵育 30 min，并以 FCM 缓冲液洗涤细胞 2 次。用流式细胞仪检测 HEK293T 细胞表面 PRLR-CAR 的表达情况（阴性对照为在相同条件下培养 48 h、孵育流式抗体，且未经 PRLR-CAR 慢病毒感染的 HEK293T 细胞）。

结果见图 4，当 PRLR-CAR ∶ p*sPAX2* ∶ p*VSVG*=3 ∶ 2 ∶ 1，且与转染试剂以 1 ∶ 2 的比例混合时，慢病毒感染效率最高，阳性率为 41.91%。

**2.4** PRLR-CAR 慢病毒浓缩与滴度的测定

根据“**2.3**”项下最优的慢病毒制备比例转染 HEK293T 细胞。收集转染 48、72 h 后的细胞培养上清，经 0.45 μm 滤膜过滤后，加入慢病毒浓缩试剂并混匀，于 4 ℃静置过夜后，离心（4 000×*g*）30 min，用 GT-T551 H3 培养基溶解 PRLR-CAR 慢病毒沉淀，于 –80 ℃冰箱冻存。

取 24 孔板，每孔加入 Jurkat 细胞约 $0.4\times10^6$ 个，将浓缩后的慢病毒按不同体积 100、10、1、0.1 μl 与终浓度为 8 μg/ml 的聚凝胺混匀后，加至上述 Jurkat 细胞中（终体积为 500 μl），于 32 ℃离心（1 000×*g*）90 min。感染 48 h 后，用 FCM 缓冲液洗涤细胞。按“**2.3**”项下方法检测 Jurakt 细胞表面 PRLR-CAR 的表达情况（以在相同条件下培养 48 h、孵育流式抗体，且未经 PRLR-CAR 慢病毒感染的 Jurakt 细胞作为阴性对照）。按下式计算慢病毒滴度。

$$X=(P\times N\times 1\,000)/V$$

式中，$X$ 为慢病毒滴度 /TU·ml$^{-1}$，$P$ 为慢病毒感染细胞的阳性率 /%，$N$ 为慢病毒加入时细胞数目 / 个，$V$ 为慢病毒的加入体积 /μl。

FCM 检测结果（图 5）显示，本研究使用的慢病毒滴度（$V$=10 μl）$X$=46.96% ×$4\times10^5\times1\,000/10=1.88\times10^7$ TU/ml。

**2.5** PRLR-CAR-T 细胞的构建与鉴定

在二级生物安全实验室（BSL-2）中，分离健康志愿者血液中的 PBMC，于 –80 ℃冻存，方法参见 Ficoll-Paque PLUS 说明书。根据前期优化的 PBMC 活化条件，于 24 孔板中加入 CD3 单抗和 CD28 单抗各 1 μg，于 4 ℃包被过夜。将解冻的 PBMC 细胞（每孔约 $1\times10^6$ 个）加入上述 24 孔板中，以含 10% FBS 和 300 μg/ml IL-2 的 GT-T551 H3 培养基培养。激活 36 h 后，每孔加入 T 细胞（约 $0.2\times10^6$ 个）与感染复数为 10 的 CAR-PRLR 慢病毒浓缩液，并加入终浓度为 8 μg/ml 的聚凝胺，于 32 ℃离心（1 000×*g*）90 min。感染 12 h 后，更换新鲜培养基。感染 2 d 后，更换含有嘌呤霉素 0.5 μg/ml 的 GT-T551 H3 培养基，控制细胞密度为每毫升（0.5 ～ 1）$\times10^6$ 个。感染 4 d 后，更换新鲜 GT-T551 H3 培养基。感染 8 d 后，收集 CAR-T 细胞，以 FITC 标记的抗 CD8 抗体、PE 标记的抗 CD4 抗体和 PRLR-Fc-Tag 重组蛋白与 APC 标记的抗人 IgG Fc 抗体或同型对照抗体孵育，用 FCM 缓冲液洗涤细胞 2 次，用

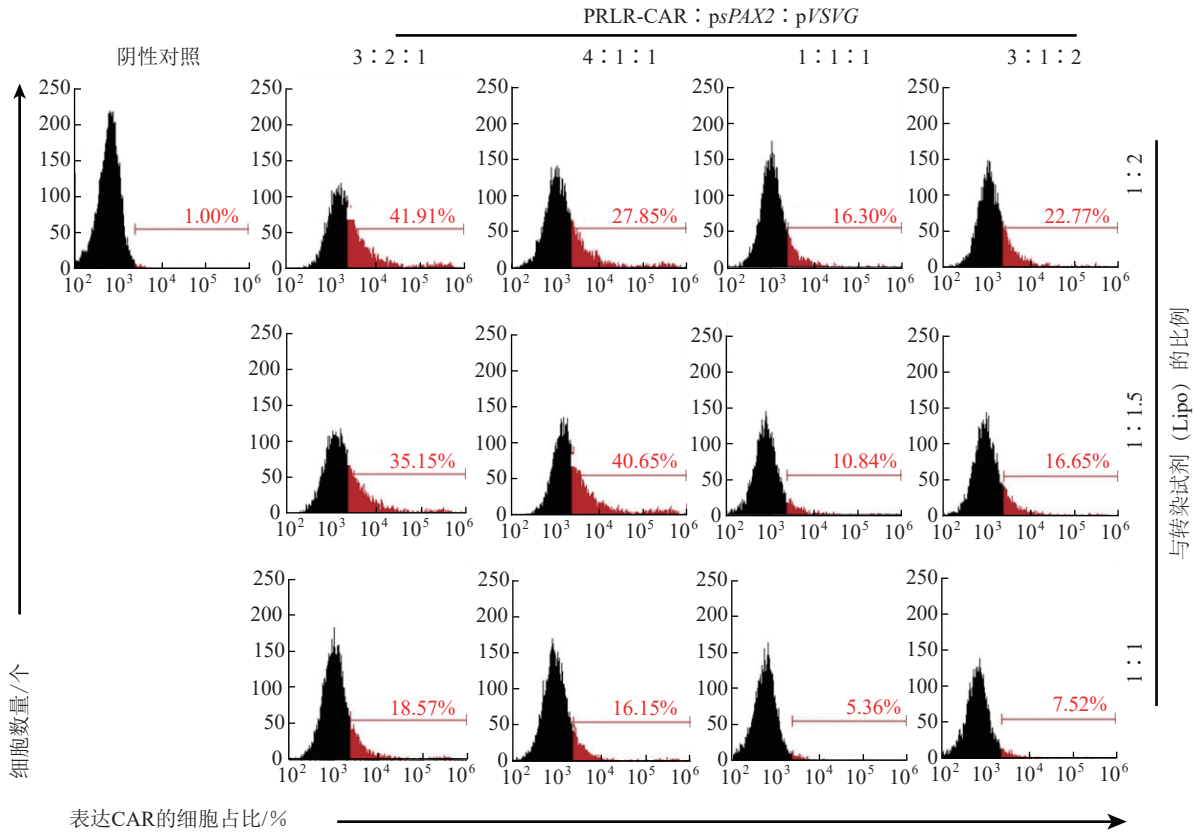



**图 4　FCM 检测 PRLR-CAR 慢病毒感染效率**

Fig.4　Infection Efficiencies of PRLR-CAR Lentivirus Determined by FCM

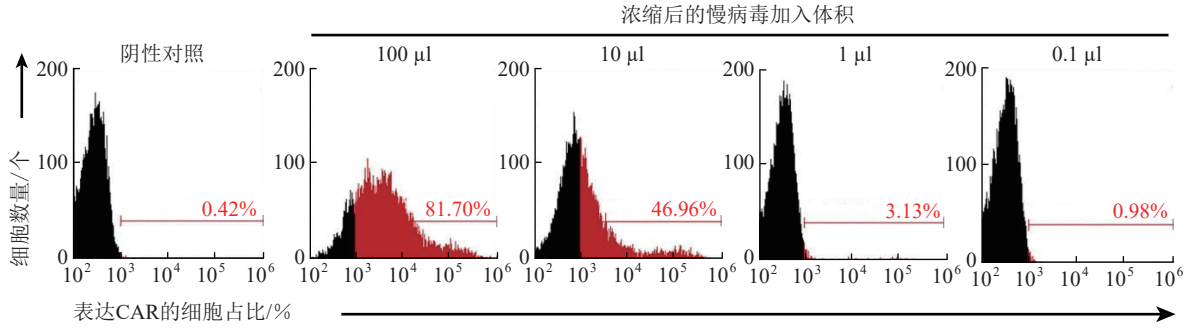



**图 5　FCM 测定 PRLR-CAR 慢病毒滴度**

Fig.5　Titer Determination Results of PRLR-CAR Lentivirus by FCM

流式细胞仪检测 T 细胞表面 CD4、CD8 和 PRLR-CAR 的表达情况。

FCM 结果显示，PBMC 经抗体激活后，CD4 阳性表达平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI）值自 3 980.37±51.78 上升至 16 955.37±61.93，CD8 阳性表达 MFI 值自 8 327.63±242.04 上升至 11 536.17±145.15（图 6A，以未经处理的 PBMC 细胞作为阴性对照），CD4 的表达显著提高，CD8 的表达略微提高，总体来看，CD4 与 CD8 阳性 T 细胞比例自约 50%上升至约 90%，可以用于下一步研究。

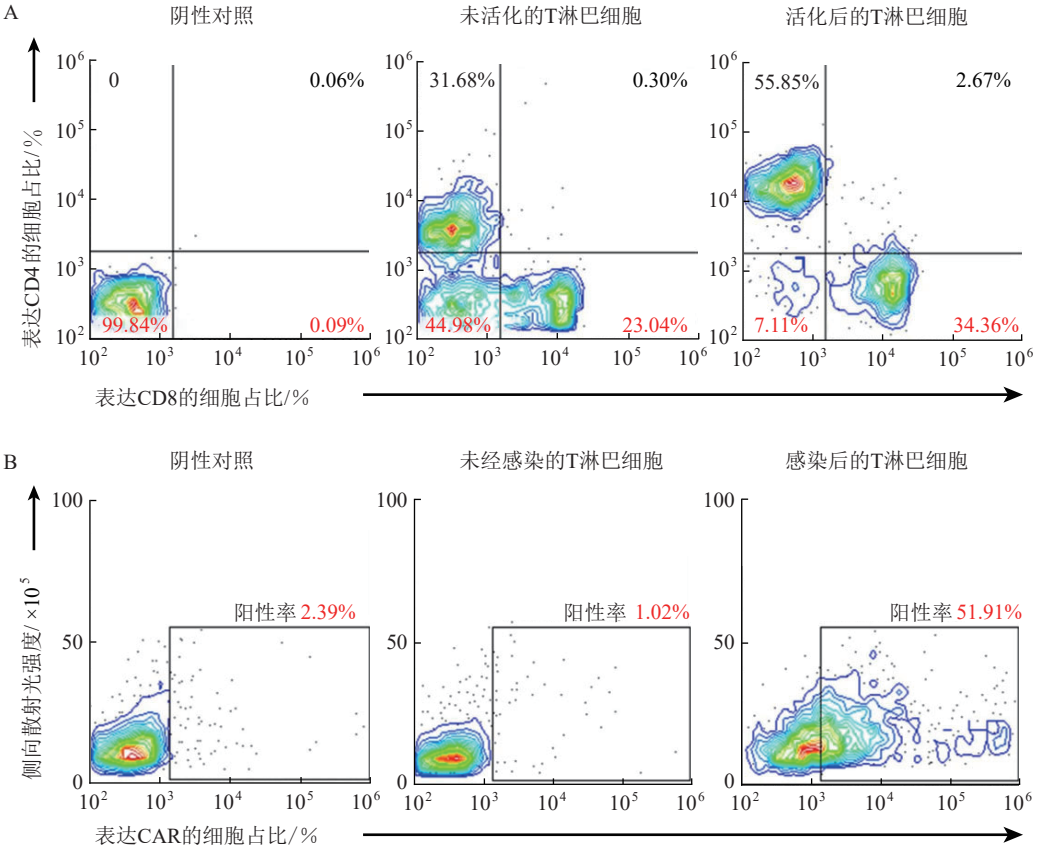
以孵育同型对照抗体的 PRLR-CAR-T 细胞和

未经感染的 T 淋巴细胞（Blank-T）作为阴性对照，结果显示 PRLR-CAR 可较高地表达于 T 细胞表面，阳性率为 51.91%（图 6B）。

## 3 讨论

乳腺癌主要根据雌激素受体（estrogen receptor，ER）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）及 HER2 这 3 种受体的基因是否过表达作为亚型分类与治疗依据。除了外科手术与放化疗之外，常用的治疗手段还包括 HER2 靶向治疗和内分泌治疗等。不同类型的治疗方法会在不同个体中因先天基因、乳腺癌表型的不同产生抗药性，从而导致治疗失败。因此需要不断开发新的治疗方法，以期在未来形成更好的乳腺癌个性化治疗方案[13]。目前，有较多研究表明 PRLR 在乳腺癌的发生与发展过程中发挥了作用，虽然 PRLR 是否参与乳腺癌的调控作用尚存在争议，但在临床前和临床研究中，已有多种靶向 PRLR 的治疗药物如单克隆抗体、抗体偶联药物和双特异性抗体等展现了很好的治疗前景，目前尚无药物被批准上市。PRLR 的优势在于其在除乳腺组织以外的其他组织上表达较少且无特异性功能，这保障了以 PRLR 作为抗原的 CAR-T 的靶向性和安全性。

在 CAR-T 的制备过程中，慢病毒技术是最常用的方法之一[14]。慢病毒可以有效提高 CAR 的表达效率，将目的基因整合至宿主基因组以实现长期表达。本研究利用三质粒系统包装慢病毒，其中，p*sPAX2* 为能表达慢病毒外壳的质粒，其表达产物可通过黏附机制使其更易穿过细胞膜；p*VSVG* 为包膜质粒，在细胞与病毒融合时发挥作用，目的基因与 p*sPAX2*、p*VSVG* 基因翻译出的蛋白经细




A：T 细胞表面 CD4 与 CD8 的表达，B：T 细胞表面 PRLR-CAR 的表达

**图 6 PRLR-CAR-T 细胞的鉴定结果**

Fig.6 Identification Results of PRLR-CAR-T Cell

胞组装为慢病毒，最终分泌至细胞膜外。本研究在探究慢病毒制备条件的过程中，发现不同质量比生产出的慢病毒具有较大的活性差异，将 PRLR-CAR：p*sPAX2*：p*VSVG*=3：2：1，且与转染试剂以 1：2 的比例混合作为慢病毒制备的最优条件，浓缩后的慢病毒可高效感染 HEK293T 细胞、Jurkat 细胞和人 T 淋巴细胞。

T 细胞是否被活化能显著影响 PRLR-CAR 的表达效率，活化 T 细胞的常用方式包括使用抗体磁珠和可溶性抗体 [15]。本研究在前期使用抗体磁珠进行活化时发现，T 细胞活化效果不稳定，且生长较慢。因此，本研究采用 CD3 单抗 1 μg 与 CD28 单抗 1 μg 激活 T 细胞，其中表达 CD4 的 T 细胞约占 55%，表达 CD8 的 T 细胞约占 35%，激活效果较稳定，T 细胞可大量增殖。

CAR-T 在乳腺癌治疗中取得的较好疗效与 CAR 在 T 细胞表面的高表达密切相关。WEI 等构建了阳性率为 30.1%～41.3% 的靶向受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase，AXL）的 CAR-T 细胞，在乳腺癌异种移植模型中显示出持久的抗肿瘤活性 [16]。ZHOU 等构建了靶向跨膜黏蛋白 1（transmembrane mucin 1，MUC1）的 CAR-T 细胞，d 10 的 CAR 表达效率约为 42.7%，单次注射该 CAR-T 可有效抑制体内乳腺肿瘤的增殖，并长期有效 [17]。TCHOU 等构建了靶向肝细胞生长因子受体（c-mesenchymal-epithelial transition factor，c-Met）的 CAR-T 细胞，在一项治疗转移性乳腺癌的 0 期临床试验中，该 CAR-T 显示出较好的安全性和有效性，6 名患者注射的 CAR-T 阳性率为 36.5%～85.8% [18]。SEITZ 等构建了靶向双唾液酸神经节苷脂（disialoganglioside，GD2）的 CAR-T 细胞，在三阴性乳腺癌细胞原位异种移植模型中展现出较好的治疗潜力，CAR 阳性率为 67%～76% [19]。HAN 等构建了靶向自然杀伤细胞表面活化性受体（natural killer group 2 member D，NKG2D）的 CAR-T 细胞，阳性率均高于 90%，可在体内较好地抑制三阴性乳腺癌的生长 [20]。

本研究通过优化 CAR-T 细胞制备条件，成功构建了一种新型的靶向 PRLR 的 CAR-T 细胞，且 PRLR-CAR-T 细胞 CAR 的阳性表达率超过 50%，预计其可在体内外展现出较好的生物学活性。在保障 PRLR-CAR 阳性表达率处于较高水平的基础上，未来研究可进一步优化 PRLR-CAR 结构以提升疗效 [21]，设计生产一系列特定的细胞因子重塑乳腺肿瘤微环境，使 PRLR-CAR-T 更好地识别靶抗原。同时，也可联合使用免疫检查点抑制剂等提高乳腺肿瘤细胞的免疫应答 [22]，从而提高 PRLR-CAR-T 的治疗效果。

## 参考文献：


[1] International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. [2021-03-20]. https://www. iarc. who. int/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/.

[2] RIEHI B D, KIM E, BOUZID T, *et al*. The Role of microenvironmental cues and mechanical loading milieus in breast cancer cell progression and metastasis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, **8**: 608526.

[3] ADAMS S, GATTI-MAYS M E, KALINSKY K, *et al*. Current landscape of immunotherapy in breast cancer: a review [J]. *JAMA Oncol*, 2019, **5**(8): 1205-1214.

[4] LABANIEH L, MAJZNER R G, MACKALL C L. Programming CAR-T cells to kill cancer [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, **2**(6): 377-391.

[5] DEES S, GANESAN R, SINGH S, *et al*. Emerging CAR-T cell therapy for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, **19**(12): 2409-2421.

[6] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, *et al*. CAR-T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, **359**(6382): 1361-1365.

[7] LIU X Q, ZHANG N, SHI H. Driving better and safer HER2-specific CARs for cancer therapy [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(37): 62730-62741.

[8] CHANG W P, YE Y, CLEVENGER C V. Stoichiometric structure-function analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(2): 896-905.

[9] GOFFIN V, TOURAINE P. The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: browsing new potential indications [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, **19**(9): 1229-1244.

[10] CIARA C O, SUSAN E B. Targeting prolactin receptor (PRLR) signaling in PRLR-positive breast and prostate cancer [J]. *Oncologist*, 2016, **21**(5): 523-526.

[11] DAMIANO J S, RENDAHL K G, KARIM C, *et al*. Neutralization of prolactin receptor function by monoclonal antibody LFA102, a novel potential therapeutic for the treatment of breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, **12**(3): 295-305.

[12] ZHOU Y X, ZONG H F, HAN L, *et al*. A novel bispecific antibody targeting CD3 and prolactin receptor (PRLR) against PRLR-expression breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, **39**(1): 87-100.

[13] DANIYAL A, SANTOSO I, GUNAWAN N H P, *et al*. Genetic influences in breast cancer drug resistance [J]. *Breast Cancer*, 2021, **13**: 59-85.

[14] ZHOU X Z, CUI Y, HUANG X, *et al*. Lentivirus-mediated gene transfer and expression in established human tumor antigen-specific cytotoxic T cells and primary unstimulated T cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, **14**(11): 1089-1105.

[15] RODDIE C, O'REILLY M, DIAS A P J, *et al*. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges [J]. *Cytotherapy*, 2019, **21**(3): 327-340.

[16] WEI J, SUN H Y, ZHANG A M, *et al*. A novel AXL chimeric antigen receptor endows T cells with anti-tumor effects against triple negative breast cancers [J]. *Cell Immunol*, 2018, **331**: 49-58.

[17] ZHOU R, YAZDANIFAR M, ROY L D, *et al*. CAR T cells targeting the tumor MUC1 glycoprotein reduce triple-negative breast cancer growth [J]. *Front Immunol*, 2020, **10**: 1149.

[18] TCHOU J, ZHAO Y B, LEVINE B L, *et al*. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, **5**(12): 1152-1161.

[19] SEITZ C M, SCHROEDER S, KNOPF P, *et al*. GD2-targeted chimeric antigen receptor T cells prevent metastasis formation by elimination of breast cancer stem-like cells [J]. *Oncoimmunology*, 2019, **9**(1): 1683345.

[20] HAN Y L, XIE W, SONG D G, *et al*. Control of triple-negative breast cancer using *ex vivo* self-enriched, costimulated NKG2D CAR T cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, **11**(1): 92.

[21] DRAGON A C, ZIMMERMANN K, NERRETER T, *et al*. CAR-T cells and TRUCKs that recognize an EBNA-3C-derived epitope presented on HLA-B*35 control Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferation [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, **8**(2): 736.

[22] CHEN J, LÓPEZ I F, SEO H, *et al*. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours [J]. *Nature*, 2019, **567**(7749): 530-534.