

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.04.0315

论著

# 溶瘤单纯疱疹病毒联合 CD19 CAR-T 细胞提升弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗效果

刘纪乐<sup>1</sup>, 郭姝婧<sup>1</sup>, 孙瑞<sup>2</sup>, 赵莱含<sup>1</sup>, 安昱欣<sup>1</sup>, 张金琳<sup>1</sup>, 赵明峰<sup>3</sup>

(1. 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2. 南开大学医学院, 天津 300071; 3. 天津市第一中心医院血液科, 天津 300192)

**摘要** 目的: 探究溶瘤单纯疱疹病毒(oHSV)和 CD19 CAR-T 细胞联合治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效以及 CD19 CAR-T 细胞是否为 oHSV 的良好载体。方法: 将 oHSV 与 CD19 CAR-T 细胞共培养, 制备携带 oHSV 的 CD19 CAR-T 细胞(CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞)。通过细胞增殖实验、细胞杀伤实验以及重要指标如细胞因子、细胞亚群、耗竭表型的测定, 评估体外 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞相较于 CD19 CAR-T 细胞的抗肿瘤效果和功能。构建弥漫大 B 肿瘤细胞系小鼠模型, 比较未转导 T 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组小鼠瘤体变化和重要脏器指标, 探究 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞在体内的安全性和有效性。结果: 成功制备出 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞。体外实验发现, 与 CD19 CAR-T 细胞相比, CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞表现出更强的抗肿瘤效果( $t_{24h}=2.989, P<0.05$ ;  $t_{48h}=8.525, P<0.01$ )。联合治疗促进了干扰素(IFN)- $\gamma$  的分泌( $t=4.578, P<0.05$ ), 并降低 CD19 CAR-T 细胞表面 PD-1 的表达( $t=2.946, P<0.05$ )。在小鼠模型中, CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 只感染肿瘤, 不影响其他脏器功能, 显示出安全性。同时, CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组瘤体质量显著小于 CD19 CAR-T 细胞组( $t=6.010, P<0.01$ )。免疫组化也发现, CD19 CAR-T 细胞和 oHSV 的联合治疗促进了 CAR-T 细胞向肿瘤的浸润( $t=12.68, P<0.001$ )。结论: CD19 CAR-T 细胞可以作为 oHSV 的良好载体。CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞治疗可安全且有效提升弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗效果。

**关键词** 溶瘤单纯疱疹病毒; CD19 CAR-T 细胞; B 细胞淋巴瘤; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 肿瘤微环境

中图分类号 R733.4

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)04-0315-07

## Combination of oncolytic herpes simplex virus and CD19 CAR-T cells enhances the therapeutic effect of diffuse large B-cell lymphoma

LIU Jile<sup>1</sup>, GUO Shujing<sup>1</sup>, SUN Rui<sup>2</sup>, ZHAO Mohan<sup>1</sup>, AN Yuxin<sup>1</sup>, ZHANG Jinlin<sup>1</sup>, ZHAO Mingfeng<sup>3</sup>

(1. First Center Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract Objective:** To explore the efficacy of combined treatment with oncolytic herpes simplex virus (oHSV) and CD19 CAR-T cells in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and determine whether CD19 CAR-T cells can serve as a good carrier for oHSV.

**Methods:** CD19 CAR-T cells were co-cultured with oHSV to prepare CD19 CAR-T cells carrying oHSV (CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells). The anti-tumor effect and function of CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells were evaluated *in vitro* compared to CD19 CAR-T cells through cell proliferation assays, cytotoxicity assays, and the determination of important indicators such as cytokines, cell subsets, and exhaustion phenotypes. A mouse model of DLBCL was established to compare the tumor growth and important organ function in mice treated with non-transduced T cells, CD19 CAR-T cells, and CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells, and to investigate the safety and efficacy of CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells *in vivo*. **Results:** CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells were successfully prepared. *In vitro* experiments showed that CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells exhibited stronger anti-tumor effects compared with CD19 CAR-T cells ( $t_{24h}=2.989, P<0.05$ ;  $t_{48h}=8.525, P<0.01$ ). The combined treatment promoted the secretion of interferon(IFN)- $\gamma$  ( $t=4.578, P<0.05$ ) and reduced the expression of PD-1 on the surface of CD19 CAR-T cells ( $t=2.946, P<0.05$ ). In the mouse model, CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells showed safety by only infecting tumors but not affecting the function of other organs, demonstrating safety. Additionally, the tumor weight in the CAR-T<sup>oHSV</sup> cells group was significantly lower than that in the CD19 CAR-T cells group ( $t=6.010, P<0.01$ ). Immunohistochemistry also revealed that the combined treatment of CD19 CAR-T cells and oHSV promoted the infiltration of CAR-T cells into tumors ( $t=12.68, P<0.001$ ).

**Conclusion:** CD19 CAR-T cells can serve as a good carrier for oHSV. The treatment with CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> cells can safely and effectively enhance the therapeutic effect on diffuse large B-cell lymphoma.

**Key words** oncolytic herpes simplex virus; CD19 CAR-T cells; B-cell lymphoma; diffuse large B-cell lymphoma; tumor microenvironment

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81970180)

作者简介 刘纪乐(2000-),男,硕士在读,研究方向:血液系统恶性肿瘤的细胞免疫疗法;通信作者:赵明峰, E-mail: mingfengzhao@sina.com。

嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)免疫疗法的出现,给众多难治复发血液恶性肿瘤患者带来希望。CD19 是参与 B 细胞活化与增殖的重要膜抗原之一,是 B 细胞共有的表面标志,在 B 细胞来源的肿瘤细胞表面高表达。经过 CD19 CAR-T 细胞治疗,绝大多数急性 B 淋巴细胞白血病患者可以获得临床受益<sup>[1-2]</sup>。然而,对于弥漫大 B 细胞淋巴瘤,CD19 CAR-T 细胞治疗则表现出治疗效果上的不足<sup>[3-4]</sup>。这可能与 B 细胞淋巴瘤免疫抑制肿瘤微环境有关<sup>[5]</sup>。免疫检查点上调和非炎性淋巴瘤免疫环境,使得 CD19 CAR-T 细胞无法有效浸润肿瘤,难以长期维持抗肿瘤作用,这极大地限制了 CD19CAR-T 细胞的抗肿瘤效果<sup>[6-7]</sup>。

溶瘤病毒和 CD19 CAR-T 细胞在机制上具有相辅相成的效果。溶瘤病毒通过定向感染杀伤肿瘤细胞,改变肿瘤微环境,诱导固有免疫应答和适应性免疫应答以及破坏肿瘤血供,多种机制共同作用,抑制肿瘤生长<sup>[8]</sup>。溶瘤病毒和 CD19 CAR-T 细胞的联合,或许可以更好地提升弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效,并减少复发。

同时,为了避免溶瘤病毒被中和以及应对弥漫大 B 细胞淋巴瘤多位点累及的特点,笔者采用了一种新的联合给药方式——将 CD19 CAR-T 细胞作为溶瘤单纯疱疹病毒(oHSV)的载体,携带溶瘤病毒进行联合治疗(CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞)。本研究对 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞制备的可行性、安全性以及有效性进行探究。

## 1 材料与方法

1.1 细胞系 非洲绿猴肾细胞 Vero、人胚肾细胞 HEK293 培养于含 10%胎牛血清(FBS)的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM),弥漫大 B 细胞淋巴瘤肿瘤细胞系 U2932 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。培养基购自美国 Gibco 公司。所有细胞系均购于美国模式培养物集存库(ATCC),并在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 95%湿度条件下培养。

1.2 CD19 CAR-T 细胞的制备 CD19 嵌合抗原受体包括靶向 CD19 的单链可变区 scFv、铰链区、跨膜区、人 4-1BB 和 CD3 $\zeta$  信号结构域 5 个组成部分,并将其装载到 pCDH-MSCV-MCS-EF1-T2A-Puro 载体中。三质粒系统 4  $\mu$ g 目的质粒、3  $\mu$ g 包装质粒 SPAX2 和 2  $\mu$ g 包装质粒 MD2G 用于制备 CD19 CAR-T 细胞慢病毒。HEK293T 细胞被应用于 CD19 CAR-T 细胞慢病毒的生产。采用 CD3 免疫磁珠(德国 Miltenyi 公司)从外周血单核细胞中分离出

CD3<sup>+</sup>T 细胞。使用 CD3/CD28 刺激磁珠和白细胞介素(IL)-2(美国 Thermo Fisher 公司),活化 T 细胞。将 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 活化的 T 细胞放置于 6 孔板中,加入抗 CD19 CAR 基因的慢病毒质粒和促转染试剂,感染复数为 5。在慢病毒转染 24 h 后,更换新的 VIVO 培养基;慢病毒转染 48~72 h 后,检测 CD19 CAR-T 细胞转染率。

1.3 oHSV 的制备 选择感染谱广且安全性高的 oHSV 作为 CD19 CAR-T 细胞的联用对象。为了降低病毒毒力,提高对肿瘤的定向感染,选择 HSV-1 (F 株)中的单纯疱疹病毒,使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除基因组中双拷贝 ICP34.5 和 ICP47 基因。添加 GFP 荧光序列,获得 oHSV-GFP。将 oHSV-GFP 置于不含血清的 DMEM 培养基中以感染复数 0.01 感染 Vero 细胞。2 h 后更换添加含 1% FBS 的 DMEM 培养基。48 h 后,待细胞呈现圆形不贴壁状态时,3 000 r/min、在 4℃条件下离心 10 min,收集所有离心后的上层清液,使用 0.45  $\mu$ m 的无菌滤器过滤后,纯化 oHSV。放置于-80℃冰箱进行储存,用于后续研究。

1.4 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞的制备 将 oHSV-GFP 以高感染复数与 CD19 CAR-T 细胞共培养在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 95%湿度条件 24 h。3 000 r/min, 4℃离心 3 min,获取携带 oHSV 的 CD19 CAR-T 细胞。使用流式细胞术和 qPCR 进行验证。

1.5 实时定量基因扩增荧光检测 使用细胞裂解缓冲液(TRIZOL)裂解 CD19CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞和小鼠脏器,并提取 RNA。使用 HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)逆转录 RNA 合成 cDNA。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711)对所得 cDNA 进行 qPCR 分析。oHSV 上下引物序列 gd FW:5'-TACAACCTGACCATCGCTTG-3';gd RV:5'-GCCCCAGAGACTTGTGTA-3'。根据说明书配制反应体系,循环参数:95℃预变性 30 s;95℃ 10 s、60℃ 10 s,共 40 个循环;95℃ 15 s、60℃ 60 s、95℃ 15 s 熔解曲线。GAPDH 为内参指标。

1.6 细胞增殖实验 通过 CCK8 法,将 CD19 CAR-T 细胞作为对照组,与携 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞群进行比较,评估 24 h 的细胞增殖情况。将 CD19 CAR-T 细胞和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 置于 96 孔板中。每个孔放置 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/100  $\mu$ L 培养基。培养基为含有 10%FBS 和 IL-2(250 IU/mL)的 RPMI-1640。24 h 后,向每个孔中加入 10  $\mu$ L CCK8,用波长为 450 nm 的酶谱仪测量吸光度。

1.7 细胞杀伤实验 选择高表达 CD19 的弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞系 U2932 作为靶细胞系,用于评估 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 与 CD19 CAR-T 细胞抗肿瘤效果的变化。杀伤实验分为 3 组,分别为对照组、CD19 CAR-T 细胞组以及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组。每组加入  $1 \times 10^5$  的 U2932 细胞。在 CD19 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组中,以肿瘤细胞和 CAR-T 细胞 1:1 的比例,分别加入  $1 \times 10^5$  细胞数的 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞和 CD19 CAR-T 细胞。在 24、48 h,分别对对照组、CD19 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组进行流式细胞仪计数。CD19 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组剩余肿瘤细胞的数目除以对照组肿瘤细胞数为肿瘤细胞杀伤率,用于评估实验组肿瘤清除能力的差异。

1.8 流式细胞术 用抗 FMC63 抗体标记 CAR-T 细胞,评估 CD19 嵌合抗原受体在 T 细胞的表达。使用抗 CD62L-APC 和 CD45RO-PE-Vio770 抗人单克隆抗体检测 CAR-T 细胞的分化情况。使用程序性死亡受体 1 (PD-1)-BV421、TIM3-BV510、CTLA4-BV785 人单克隆抗体评估 CD19 CAR-T 细胞耗竭情况。

1.9 细胞因子测定 杀伤试验 24 h 后,取一定体积的共培养体系,3 000 r/min,24℃,离心 3 min,获取 CD19 CAR-T 组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组共培养体系上清液。使用十二因子细胞因子试剂盒(北京指真生物公司)对 CAR-T 细胞杀伤过程中 IL-2、IL-12P70、干扰素(IFN)- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、IL-17、IL-1 $\beta$ 、IL-5、IL-8 的分泌情况进行检测。

1.10 小鼠肿瘤模型构建 使用 U2932 细胞系构建淋巴瘤小鼠异种移植模型。9 只 6~8 周龄的雄性 NSG 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,动物批号 110324241100662463,动物伦理批号为 2024SYD-WLL000127。使用简单随机分组法,将小鼠分为 3 组,每组 3 只,分别为未转导 T 细胞(UT 细胞)组、CD19 CAR-T 细胞组及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组。通过在小鼠右腹部皮下注射  $1 \times 10^6$  U2932 细胞,构建弥漫大 B 肿瘤细胞系模型。在注射肿瘤细胞后第 14 天,小鼠肿瘤体积约为 100~200 mm<sup>3</sup>,分别向 3 组小鼠尾静脉注入  $5 \times 10^6$  CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞、CD19 CAR-T 细胞和未转导 T 细胞进行治疗,每隔 72 h 记录小鼠体重和肿瘤体积。并在肿瘤体积接近伦理阈值 2 000 mm<sup>3</sup> 时,统一处死所有小鼠,结束体内实

验。取小鼠血液、肝脏、脾脏、心脏、肾脏以及肿瘤。比较不同分组小鼠瘤体和脾脏大小。取小鼠血液样本,检测血常规和肝肾功能指标。对小鼠血液、肝脏、脾脏、心脏、肾脏以及肿瘤进行 qPCR,评估病毒扩增情况。反应条件和引物序列同上文。对小鼠肝、脾和肾进行 HE 染色,评估小鼠主要脏器病理学改变。并使用抗 CD3 抗体标记小鼠肿瘤组织,使用免疫组织化学特征观察 T 细胞对肿瘤的浸润作用。

1.11 统计学处理 使用 GraphPad Prism 进行统计学分析。符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。对于不符合正态分布的数据以中位数(四分位数间距)进行统计描述,多组间差异比较采用 *Kruskal-Wallis* 检验。实验重复 3 次。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞的制备和评估 流式细胞术显示,经过 24 h oHSV 和 CD19 CAR-T 细胞共培养,(12.24 $\pm$ 3.94)%的 CD19 CAR-T 细胞显示荧光,即表示携带 OHSV(图 1A)。并通过 qPCR 进行进一步验证(图 1B)。

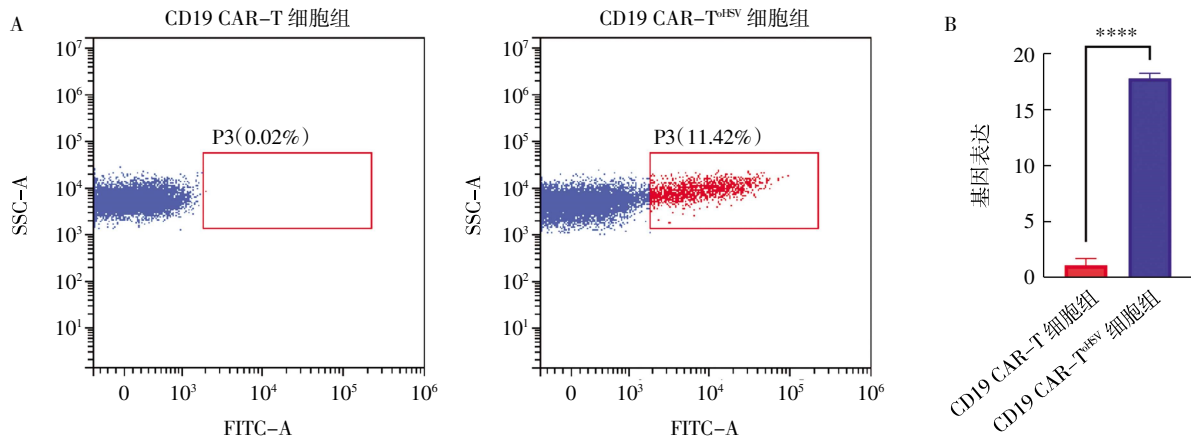
CCK8 结果显示,OHSV 对于 CD19 CAR-T 细胞的细胞活力并不会产生统计学上的影响( $t=1.08, P=0.31$ )。对细胞活化指标、细胞亚群和细胞因子测定结果进行分析,差异没有统计学意义( $t=1.11, P=0.92$ )。

2.2 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞体外细胞株抗肿瘤效果 对比 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组 24、48 h 抗肿瘤效果,发现 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组消除 CD19 阳性靶肿瘤细胞的能力明显优于 CAR-T 细胞组( $t_{24h}=2.99, P<0.05; t_{48h}=8.53, P<0.01$ ,图 2A)。

与 CD19 CAR-T 细胞组相比,CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组 IFN- $\gamma$  的分泌量显著升高( $t=4.58, P<0.05$ ,图 2B)。对于 CAR-T 细胞 T 细胞亚群,二者分化并未显示出明显差异。而在对 CD19 CAR-T 细胞耗竭表型的评估中,结果显示,与 CD19 CAR-T 细胞组相比,CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组 PD-1 表达更低( $t=2.95, P<0.05$ ,图 2C)。

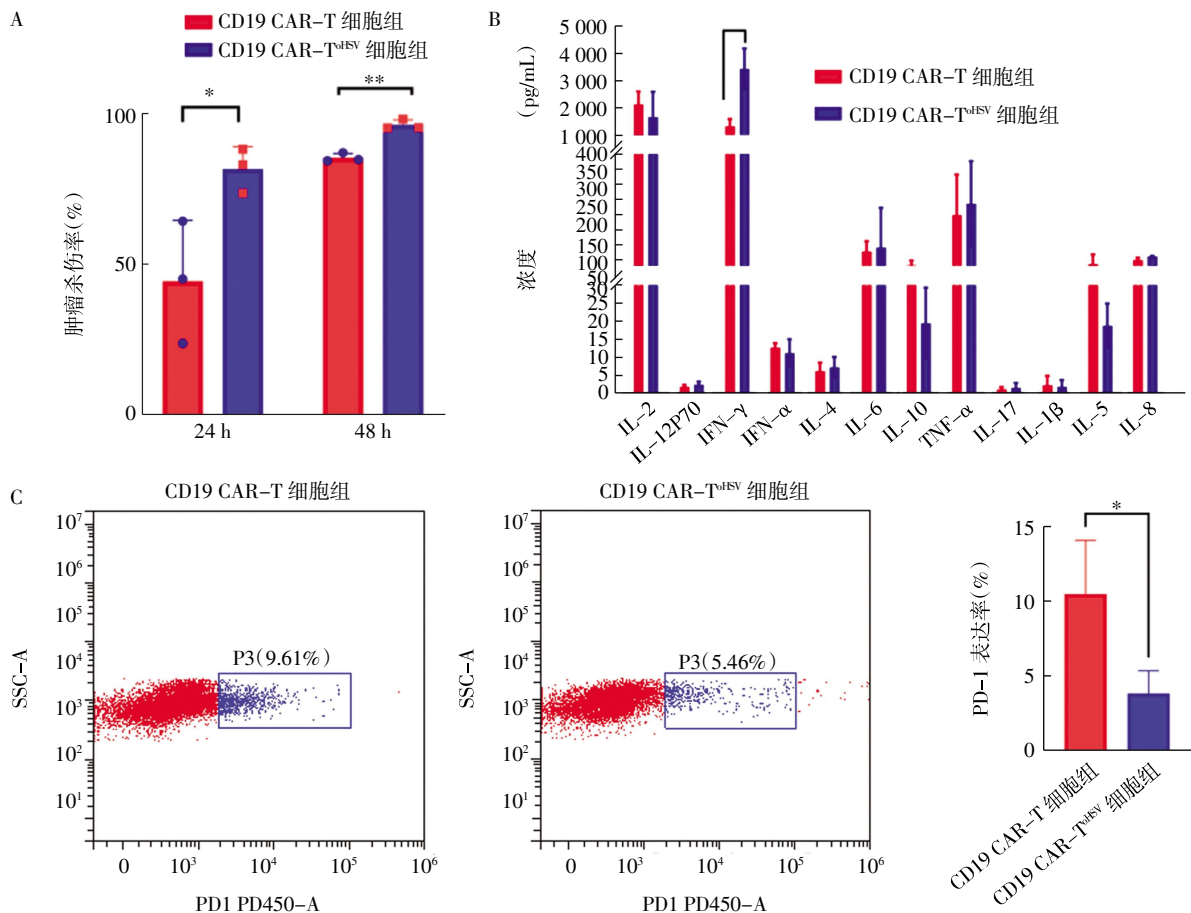
2.3 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞体内安全性和有效性的评估

2.3.1 体内 CAR-T<sup>oHSV</sup> 安全性 截止到统一处死所有小鼠时,3 组中无 1 只提前死亡。HE 染色后镜下显示并未发现 UT 细胞组、CAR-T 细胞组和 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组小鼠主要脏器具有明显形态学差异(图



注:A:流式细胞分析结果;B:qPCR 结果;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞;SSC-A:侧向散射-a;oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒;\*\*\*\* $P<0.0001$

图 1 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞制备  
Fig.1 Preparation of CD19 CAR T<sup>oHSV</sup> cells



注:A:24 和 48 h CD19 CAR-T 细胞和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞抗肿瘤效果的差异;B:获取杀伤 24 h 后共培养体系上清液,十二因子试剂盒对 CAR-T 细胞和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞杀伤过程中细胞因子的分泌情况的检测结果;C:杀伤肿瘤细胞后,CAR-T 细胞 PD-1 表达情况;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞;oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒;PD-1:程序性死亡受体 1; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

图 2 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞的体外评估  
Fig.2 In vitro evaluation of CD19 CAR T<sup>oHSV</sup> cells

3A)。不同组小鼠脾脏长度未见明显差异( $F_{脾脏}=0.93, P>0.05$ ,图 3B)。各组小鼠血常规和肝肾功能的检测结果表明,输注 CD19 CAR-T 细胞或 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞并不会加重小鼠的造血和主要脏器

负担(表 1、2)。同时,对小鼠血液、肝脏、脾脏、心脏、肾脏以及肿瘤进行 qPCR,仅在肿瘤内发现溶瘤病毒的扩增(图 3C)。

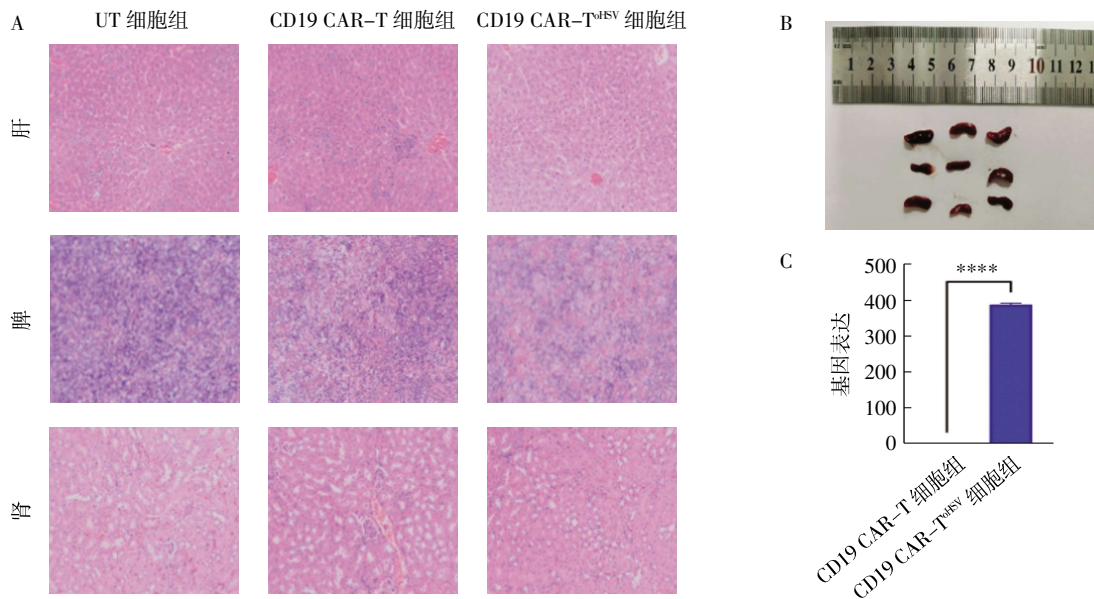
2.3.2 体内 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞有效性 结果显

表 1 不同组小鼠血常规指标测定结果( $\bar{x}\pm s$ )Tab.1 Measurement results of blood routine indicators in different groups of mice( $\bar{x}\pm s$ )

组别	红细胞( $\times 10^{12}/L$ )	血红蛋白(g/L)	白细胞( $\times 10^9/L$ )	血小板( $\times 10^9/L$ )
UT 细胞组	5.53 $\pm$ 0.12	92.33 $\pm$ 2.08	3.56 $\pm$ 0.55	392.33 $\pm$ 33.83
CD19 CAR-T 细胞组	5.57 $\pm$ 0.85	91.67 $\pm$ 1.53	4.93 $\pm$ 0.69	507.00 $\pm$ 139.46
CD19 CAR-T <sup>oHSV</sup> 细胞组	6.23 $\pm$ 1.04	104.00 $\pm$ 15.71	5.39 $\pm$ 0.40	570.33 $\pm$ 63.17
<i>F</i>	1.25	1.71	8.72	2.98
<i>P</i>	0.35	0.26	0.02	0.13

表 2 不同组小鼠肝肾功能指标测定结果[ $M(P25, P75), \bar{x}\pm s$ ]Tab.2 Measurement results of liver and kidney function indicators in different groups of mice[ $M(P25, P75), \bar{x}\pm s$ ]

指标	UT 细胞组	CD19 CAR-T 细胞组	CD19 CAR-T <sup>oHSV</sup> 细胞组	<i>F/H</i>	<i>P</i>
总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	7.37(5.74, 8.81)	6.31(5.85, 9.06)	4.62(3.70, 14.13)	0.62	0.83
谷丙转氨酶(U/L)	14.71(4.77, 15.34)	11.46(10.34, 19.17)	14.48(9.75, 15.09)	0.09	0.99
谷草转氨酶(U/L)	60.27(59.74, 74.42)	58.62(51.61, 99.27)	86.79(66.59, 94.00)	1.69	0.51
肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )	7.95 $\pm$ 1.95	8.55 $\pm$ 1.48	8.02 $\pm$ 0.74	0.15	0.87
尿酸( $\mu\text{mol/L}$ )	45.48 $\pm$ 7.73	40.34 $\pm$ 12.13	49.37 $\pm$ 15.69	0.41	0.68
尿素(mm/L)	3.55(3.07, 3.96)	2.22(2.21, 2.79)	3.72(2.41, 5.29)	4.36	0.13

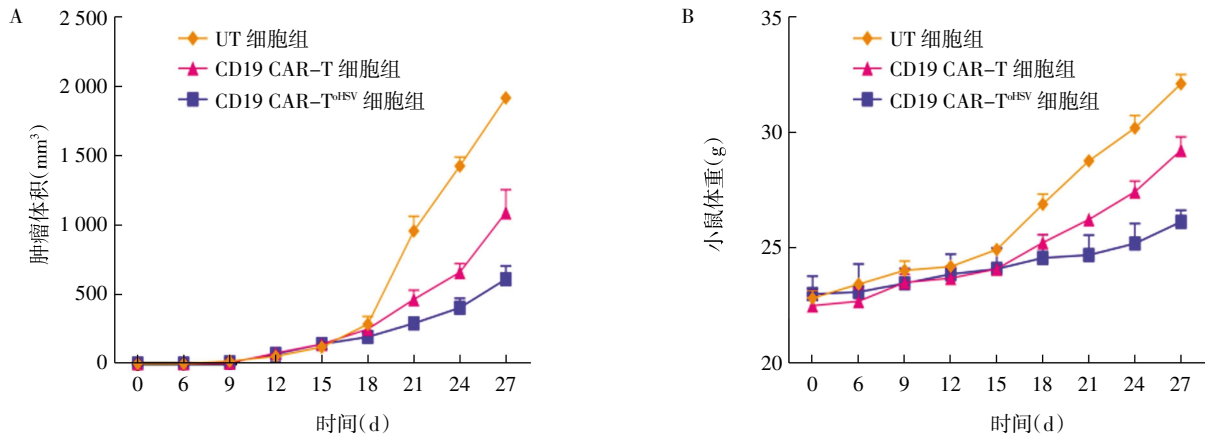


注:A:UT 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组肝、脾和肾 HE 染色;B:未转导 T 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组脾脏长度;UT 细胞:未转导 T 细胞;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞;oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒

图 3 不同组小鼠肝、脾和肾 HE 染色(20 $\times$ )和脾脏长度Fig.3 HE staining (20 $\times$ ) and spleen length of liver, spleen, and kidney in different groups of mice

示, 输注等量未转导 T 细胞的小鼠瘤体体积和体重呈现明显增加趋势, 明显快于 CD19 CAR-T 细胞组和 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组( $t_{\text{体重}}=7.14, P<0.01; t_{\text{体积}}=8.45, P<0.01$ )。CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组瘤体体积和小鼠体重增长最慢( $t_{\text{体积}}=7.13, P<0.01; t_{\text{体重}}=4.36, P<0.05$ , 图 4)。CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组瘤体重量显著

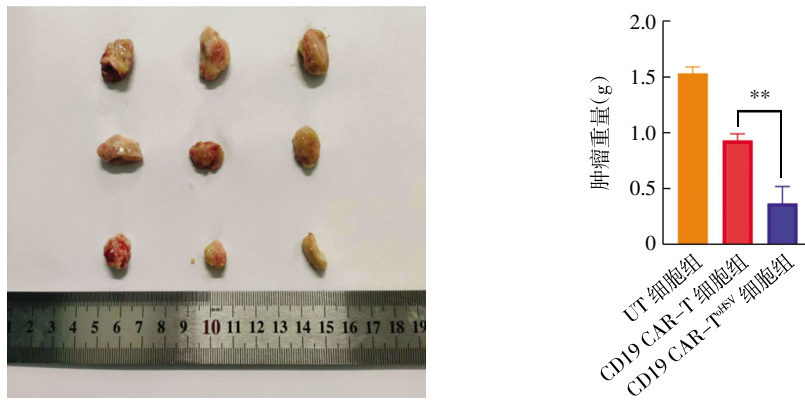
小于 CD19 CAR-T 细胞组和 UT 组, 且相较于 CD19 CAR-T 细胞组差异具有统计学意义( $t=6.01, P<0.01$ , 图 5)。与 CD19 CAR-T 细胞相比, CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组抗肿瘤效果更好。肿瘤免疫组化显示, 与 CD19 CAR-T 组和 UT 组相比, CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组小鼠瘤体切片有更多的 T 细胞( $t=12.68, P<0.001$ , 图 6)。



注:A:未转导 T 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组肿瘤体积变化;B:未转导 T 细胞组、CD19 CAR-T 细胞组及 CD19 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞组小鼠体重变化;UT 细胞:未转导 T 细胞;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞; oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒

图 4 不同组小鼠肿瘤体积和小鼠体重变化

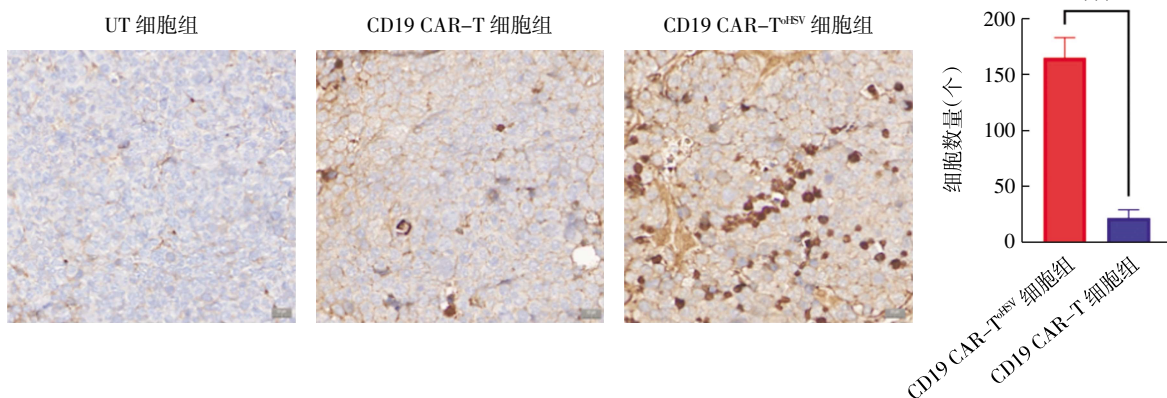
Fig.4 Changes in tumor volume and body weight of mice in different groups



注:UT 细胞:未转导 T 细胞;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞; oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒; \*\* $P < 0.01$

图 5 不同组小鼠瘤体大小和质量比较

Fig.5 Comparison of tumor size and mass in different groups of mice



注:UT 细胞:未转导 T 细胞;CAR-T 细胞:嵌合抗原受体 T 细胞; oHSV:溶瘤单纯疱疹病毒; \*\*\* $P < 0.001$

图 6 不同组小鼠瘤体 CD3 阳性 T 细胞的免疫组化结果 (20 $\times$ )

Fig.6 Immunohistochemical results of CD3 positive T cells in different groups of mouse tumors(20 $\times$ )

### 3 讨论

弥漫大 B 细胞淋巴瘤是最常见的淋巴瘤亚型,且具有全身性特点,极易累及多部位。在溶瘤病毒的临床应用中,瘤内注射和静脉给药是最常见的两种给药方式<sup>[9-10]</sup>。然而,这两种给药方式在血液肿瘤

领域均不适用。直接静脉注射溶瘤病毒往往会被体内抗体中和,难以发挥应有的抗肿瘤效果。且难以实现肿瘤处溶瘤病毒富集。瘤内注射技术要求高,且局限于单一部位。在应对多部位发生的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者以及非实体性血液肿瘤如急性淋

巴细胞白血病等时,并不能满足治疗需求。因此,溶瘤病毒载体的开发是一个好的选择。将溶瘤病毒装载到载体细胞上,由载体细胞携带着溶瘤病毒定向运输到肿瘤部位,实现了全身给药,也避免了被中和的风险,能够更好地在肿瘤发生部位发挥作用。目前已经有研究人员尝试使用间充质干细胞、T 细胞以及神经干细胞作为溶瘤病毒的载体,进行运载溶瘤病毒<sup>[11-13]</sup>。而在近期的实体瘤研究领域,有研究者尝试使用 CAR-T 细胞作为载体,并取得了较好的效果<sup>[14-15]</sup>。VanSeggelen 等<sup>[16]</sup>探索了装载低剂量溶瘤病毒到 CAR-T 细胞中的可能性。研究发现,与对照组 CAR-T 细胞相比,CAR-T 细胞在装载了溶瘤病毒后,嵌合抗原受体的表达以及 CAR-T 细胞功能并没有发生明显改变。Evign 等<sup>[14]</sup>在免疫功能健全小鼠模型中进一步证实,给予携带溶瘤呼肠孤病毒或者溶瘤水疱性口炎病毒的 CAR-T 细胞,相比于对照组单一 CAR-T 细胞给药,显著提升了抗黑色素瘤和胶质瘤的效果。Zheng 等<sup>[15]</sup>研究显示,被黏液瘤病毒(MYXV)感染的 CAR-T 细胞(CAR-TMYXV 细胞)和 TCR-T 细胞(TCR-TMYXV 细胞)能够系统地将 MYXV 传递到实体瘤中,避免了免疫原性带来的影响。对于机制的探索发现,T 细胞衍生的 IFN- $\gamma$ -蛋白激酶 B 信号与 MYXV 诱导的 M-T5SKP-1-VPS34 信号发生协同作用,这种协同作用有助于对肿瘤细胞的清除<sup>[15]</sup>。

本研究基于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床特性,采用将 CD19 CAR-T 细胞作为 OHSV 载体的全新联合方式进行体内外抗肿瘤效果的验证。结果显示,CD19 CAR-T 细胞可以作为溶瘤病毒的载体,二者联合治疗显著增强对弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞系的杀伤功能。oHSV 促进了 CAR-T 细胞 IFN- $\gamma$  的分泌,降低了细胞表面 PD-1 的表达,同时促进了向肿瘤细胞的浸润。溶瘤病毒仅针对肿瘤,而不影响其他脏器,也初步验证了该联合方式的安全性。本研究为将来溶瘤病毒与 CAR-T 细胞联合治疗急性淋巴细胞白血病和急性髓系白血病等非实体肿瘤奠定基础。同时,通过不断地改良溶瘤病毒,可以使这种联合治疗在血液肿瘤领域发挥更积极地作用。

本研究仍存在不足:第一,没有在肿瘤原代细胞和患者来源肿瘤异种移植模型(PDX 模型)中对 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞的有效性和安全性进行验证。第二,未能评估 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞对肿瘤微环境的影响。第三,暂未对 CAR-T<sup>oHSV</sup> 细胞抗肿瘤的相关机制进行探索。在后续的研究中,需要对这些方面进行深入探讨。

#### 参考文献:

[1] SHAH N N, LEE D W, YATES B, et al. Long-term follow-up of

- CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults with B-ALL [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(15): 1650-1659.
- [2] QI Y, ZHAO M, HU Y, et al. Efficacy and safety of CD19-specific CAR T cell-based therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia patients with CNSL [J]. *Blood*, 2022, 139(23): 3376-3386.
- [3] ABRAMSON J S, PALOMBA M L, GORDON L I, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study [J]. *Lancet*, 2020, 396(10254): 839-852.
- [4] TESTA U, LEONE G, PELOSI E, et al. CAR-T Cell therapy in large B cell lymphoma [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2023, 15(1): e2023066.
- [5] LOCKE F L, FILOSTO S, CHOU J, et al. Impact of tumor microenvironment on efficacy of anti-CD19 CAR T cell therapy or chemotherapy and transplant in large B cell lymphoma [J]. *Nat Med*, 2024, 30(2): 507-518.
- [6] AUTIO M, LEIVONEN S K, BRÜCK O, et al. Clinical impact of immune cells and their spatial interactions in diffuse large B-cell lymphoma microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(4): 781-792.
- [7] KLINE J, GODFREY J, ANSELL S M. The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma [J]. *Blood*, 2020, 135(8): 523-533.
- [8] LAN Q, XIA S, WANG Q, et al. Development of oncolytic virotherapy: from genetic modification to combination therapy [J]. *Front Med*, 2020, 14(2): 160-184.
- [9] SAMSON A, SCOTT K J, TAGGART D, et al. Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(422): eaam7577.
- [10] LI L, LIU S, HAN D, et al. Delivery and biosafety of oncolytic virotherapy [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 475.
- [11] FARES J, AHMED A U, ULASOV I V, et al. Neural stem cell delivery of an oncolytic adenovirus in newly diagnosed malignant glioma: a first-in-human, phase 1, dose-escalation trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): 1103-1114.
- [12] QIAO J, WANG H, KOTTKE T, et al. Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(8): 604-616.
- [13] CHASTKOFKY M I, PITUCH K C, KATAGI H, et al. Mesenchymal Stem cells successfully deliver oncolytic virotherapy to diffuse intrinsic pontine glioma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(6): 1766-1777.
- [14] EVGIN L, KOTTKE T, TONNE J, et al. Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy against solid tumors in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(640): eabn2231.
- [15] ZHENG N, FANG J, XUE G, et al. Induction of tumor cell autolysis by myxoma virus-infected CAR-T and TCR-T cells to overcome primary and acquired resistance [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9): 973-985.
- [16] VANSEGGELEN H, TANTALO D G, AFSAAHI A, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells as oncolytic virus carriers [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2015, 2: 15014.

(2024-11-26 收稿)