

• 综 述

CAR-T 细胞构建技术研究进展*

张 苹¹, 翟建昭¹, 刘在栓¹, 赵旭东²综述, 武永康^{1△}审校

四川大学华西医院: 1. 实验医学科; 2. 肿瘤动物模型创制及应用研究室, 四川成都 610041

摘 要:嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(CAR-T)被认为是最有潜力的癌症治疗方法,并取得了良好的临床疗效。随着 CAR-T 大规模应用,该技术的局限性也逐渐暴露出来,如治疗效果差、疾病复发、不良反应多等。这使得制造结构更优、安全性更高、效能更佳的 CAR-T 细胞成为临床所需。了解 CAR-T 的制造过程,掌握技术进展,是构建理想的 CAR-T 细胞的关键。本文以 CAR-T 细胞构建技术为中心,着重综述嵌合抗原受体各组分的构建及基因转导技术的研究进展,并就符合药品生产质量管理规范(GMP)标准的 CAR-T 细胞产品进行描述,最后对该技术发展及推广应用进行展望。

关键词:嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法; 嵌合抗原受体; 构建; 基因转导

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.024

中图法分类号:R392

文章编号:1673-4130(2021)09-1125-05

文献标志码:A

Advances in chimeric antigen receptor T cell immunotherapy construction technology*

ZHANG Ping¹, ZHAI Jianzhao¹, LIU Zaishuan¹, ZHAO Xudong², WU Yongkang^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Tumor Animal Model

Creation and Application, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract:Chimeric antigen receptor T cell immunotherapy (CAR-T) is considered to be the most promising treatment method and has achieved good clinical efficacy. With the large-scale clinical application of CAR-T, the limitations of this technology are gradually exposed, such as poor therapeutic effect, disease recurrence and a large number of adverse reactions. This makes the manufacture of CAR-T cells with better structure, higher safety and better efficiency clinically necessary. Understanding the manufacturing process of CAR-T and mastering the technological advances is the key to construct ideal CAR-T cells. This review focuses on CAR-T cell construction technology, especially in the development of chimeric antigen receptor component construction and gene transduction technology, and describes CAR-T cell products in line with the Good Manufacturing Practices (GMP). Finally, the development, promotion and application of this technology are prospected.

Key words:chimeric antigen receptor T cell immunotherapy; chimeric antigen receptors; construction; gene transfer

嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(CAR-T)是过继性免疫治疗方法之一,通过对 T 细胞进行修饰,使 T 细胞表达靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CARs),从而特异性识别肿瘤抗原,清除癌细胞,达到临床缓解甚至是根治肿瘤的目的^[1]。CAR-T 细胞制造中, CARs 的设计和基因转导是两个重要方面,前者着重于 CARs 本身的构造,不同的 CARs 结构在诱导信号传导、发挥细胞效应等方面不同,通过 CARs 结构的优化,可以达到特异性、亲和性及毒性之间的平衡,增加抗肿瘤效应^[2]。后者强调基因转移的效率、安全

性,并与 CAR-T 的治疗成本相关。CAR-T 产品的制造昂贵、费时,并且复杂多样。完整的 CAR-T 细胞制造流程如下:首先,对患者或捐献者外周血中 T 细胞分离、富集及激活;其次,将编码目的基因的 CARs 在体外与 T 细胞进行基因转导获得 CAR-T 细胞,然后对 CAR-T 细胞进行扩增以达到临床治疗所需剂量;最后,再应用于临床治疗^[3]。

1 CARs 的基本构造及演变

CARs 这一概念在 1989 年由 GROSS 等^[4]在研究中首次提出,它是一个合成受体蛋白,由识别并结

* 基金项目:四川省科技厅项目(2020YFS0125);四川省成都市科技局项目(2019-GH02-00006-HZ、2019-YF05-00463-SN);四川大学华西医院学科卓越发展 1·3·5 工程临床研究孵化项目(2020HXFH038)。

△ 通信作者, E-mail: vipwyk@163.com。

本文引用格式:张苹,翟建昭,刘在栓,等. CAR-T 细胞构建技术研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1125-1129.

合靶抗原的单链可变片段(scFv)的胞外区、铰链区、跨膜区及 CD3 ζ 链组成的胞内区 4 部分组成^[5]。根据胞内区的结构不同, CARs 分为 4 代^[6]:第 1 代 CARs 只有传导活化信号的 CD3 ζ 链或 Fc ϵ RI γ , 缺乏持久性及增殖能力;第 2 代 CARs 在第 1 代的基础上添加了共刺激分子 CD28、4-1BB、OX40、ICOS 等, 满足 T 细胞活化的 2 种信号, 是应用最广泛的 CARs;第 3 代 CARs 将共刺激分子增加到 2 个, 在研究中显示出了更强的体外激活及增殖能力^[7];第 4 代 CARs 在第 2 代基础上添加了白细胞介素-12, 增强 CAR-T 疗效的同时也避免了全身使用细胞因子带来的不良反应。

2 治疗靶点选择及优化

合理地选择和利用靶点是决定 CAR-T 疗效的关键之一。与 T 细胞受体不同, CAR-T 利用抗原与抗体、受体与配体结合的特异性, 通过 T 细胞与靶细胞接触释放颗粒酶/穿孔素破坏细胞, 不依赖主要组织相容性复合体(MHC)抗原呈递识别, 不仅可以用于下调 MHC I 类分子导致免疫逃逸的肿瘤疾病治疗, 也能够识别除蛋白质以外的糖类、脂类等靶向物质^[8]。CAR-T 治疗中, 理想的靶点应该是对肿瘤有高特异性、广泛的肿瘤覆盖范围且抗原表达稳定, 以此保证肿瘤清除的安全性和效能^[9]。

获取理想的靶点非常困难, 通过对靶点选择及 CARs 结构的优化可以增强靶点的性能^[10]:使用 2 个靶抗原构建双 CARs 或者在一个 CARs 上连接 2 个 scFv, 通过靶点的识别互补, 可以扩大靶点覆盖范围;将 CD3 和胞内共刺激分子分开构建 2 个 CARs, 或者将正常结构 CARs 联合一个抑制性 CARs[胞内区连接抑制性分子如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) 或程序性死亡受体 1 (PD-1)] 构建双 CARs, 前者仅在双靶点共同表达时完全激活, 后者通过非肿瘤细胞的结合导致正常 CARs 激活的抑制, 均可提高治疗靶点的特异性。同时, 基因突变产生的新抗原具有肿瘤特异性, 它主要以肽/HLA 复合物的形式存在, 因此, 靶向肽/HLA 复合物构建 CARs 是治疗的理想靶点。研究中, 利用亲和素、荧光素、亮氨酸拉链等标记的 scFv 制造的通用型 CAR-T, 能识别多种靶抗原, 可用于治疗高异质性实体肿瘤。

3 scFv 的合成技术及研究进展

获取针对靶抗原的 scFv 基因序列, 是构建 CARs 的重要前提。scFv 是具有抗原结合能力的免疫球蛋白分子的最小单位, 通过基因工程将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)以 VH-linker-VL 或者 VL-linker-VH 的顺序连接形成(前者使用频率更高)^[11], 并决定了 CARs 的特异性。目前, 获取 scFv 的方法很多, 并且技术成熟度较高。

1975 年研究者发展了杂交瘤技术, 通过将抗原免疫的小鼠脾脏 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 产生永生并大量扩增的单克隆抗体细胞群^[12]。现在, 杂交瘤

细胞也被用于筛选 Fab、scFv 等单克隆抗体片段。在靶向 CD19 的 CAR-T 治疗中, 多采用 FMC63 小鼠杂交瘤细胞, 通过对其总 RNA 进行抽提并反转录生成 cDNA, 并针对可变区不同序列设计引物进行 PCR 扩增, 最后对重链和轻链可变区 DNA 测序, 成功构建 scFv^[13]。由于单克隆抗体多为鼠源性, 会产生人抗鼠抗体反应^[14]。采用基因工程技术对小鼠抗体进行嵌合、人源化及去免疫改造, 可降低其免疫原性^[11]。但是, 采用杂交瘤细胞产生单克隆抗体费力且耗时, 小鼠为小型哺乳动物, 灵敏度不高, 并不能够对特异性抗原产生高亲和抗体反应, 在一定程度上限制了该技术的使用^[15]。

随着重组 DNA 技术和抗体工程技术的发展, 1990 年, MCCAFFERTY 等^[16] 研究发现, scFv 能够作为一个功能性蛋白在噬菌体表面展示并保持其抗原结合域的活性, 以此为基础发展的噬菌体展示技术是第一个也是最广泛使用的抗体体外筛选技术^[17], 它可以产生包含数百万甚至数十亿种不同肽或蛋白质的抗体库^[18], 几乎可以筛选出任意抗原对应的特异性抗体。大多数噬菌体展示技术使用 M13 丝状噬菌体^[19], 重组抗体基因首先插入到噬菌体外壳蛋白中, 然后导入受体菌(如大肠杆菌)中增殖、成熟, 重组抗体的基因就与噬菌体外壳蛋白以融合蛋白的形式展示在了噬菌体表面, 使用靶抗原经过多轮淘选就能获取特异性抗体^[17,20]。噬菌体筛选技术不依赖于体内免疫反应, 能获得传统方法不能获取的人类抗体或者抗自身抗原的抗体, 它在细菌中增殖、培养, 速度快、成本低, 且噬菌体本身具有稳定保存的特性^[15,21], 具有很好的临床应用前景。

除了噬菌体展示技术, 核糖体展示技术^[22]、酵母表面展示技术、转基因小鼠、单个 B 细胞分离^[23] 等技术都可用于获取抗体片段。

4 基因转导技术

4.1 病毒转导 CAR-T 细胞生产过程中, 需要一种运载工具, 将 CARs 基因插入整合, 以促进或抑制某种基因的表达。病毒具有进入细胞并传递遗传信息到细胞内的能力, 在基因转导上应用广泛^[24]。目前, 最常使用的病毒载体是反转录病毒科的 γ -反转录病毒和慢病毒的复制缺陷载体系统^[25]。结构上, 所有的反转录病毒都有编码病毒结构蛋白的 gag 基因、编码病毒复制的反转录酶和整合酶的 pol 基因及编码病毒包膜糖蛋白的 env 3 种基因, 对于慢病毒, 还有 tat、rev 2 个调节基因及 vif、vpr、vpu、nef 4 个辅助基因, 负责编码对病毒复制、结合、感染和释放起重要作用的蛋白质^[26]。基因转导一般分为 4 步:(1)病毒编码蛋白被目的基因替换, 形成表达载体;(2)通过外源性补充 gag、pol、env、rev(慢病毒所需)基因, 提供合成病毒颗粒所需蛋白, 形成包装质粒;(3)表达载体、包装质粒及 env 包膜质粒共转染细胞(如 293T 细胞)进

行培养; (4) 对培养液上层细胞进行过滤并浓缩获得高滴度病毒颗粒^[27], 储存在 -80°C 稳定保存 4—9 年^[25]。病毒包装系统是不断优化的, 通过将编码基因分离构建包装质粒、自身灭活长末端重复序列、去除所有不必要的序列和辅助基因等方式, 可以避免病毒发生重组产生具有复制活性的病毒颗粒, 增加病毒载体的安全性^[28-29]。

慢病毒载体和反转录病毒载体都有很高的包装容量, 允许基因长期表达, 并且都会导致整合位点的插入突变^[30], 同时也各具特点。γ-反转录病毒载体是最早使 CD19 CARs 稳定表达的病毒载体^[31], 具有很高的基因转导效率, 并且可以使用多种稳定的包装系统, 但只转导分裂期细胞^[32]。相比之下, 慢病毒载体应用更为广泛, 它具有高效的基因转移效率和在目的基因稳定表达的特性, 可以转导非分裂期的细胞 (不包括处于 G0 期的细胞)^[33], 并且插入突变风险较反转录病毒低, 表现出更安全的整合特性, 但慢病毒缺乏广泛使用的稳定包装系统, 也存在多质粒瞬时转染带来的批间差等问题^[34], 因此, 获得慢病毒载体的方法复杂且昂贵。病毒转导的主要优势是相对容易制造、生产并且有稳定的基因整合能力。为了服从临床安全标准, 病毒载体必须证明无复制能力、低基因毒性及低免疫原性^[27]。

除了逆转录病毒科, 腺病毒相关病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒也用于基因转导。腺病毒相关病毒可以转导分裂期和非分裂期细胞, 在转导剂量下, 一般没有致病性或细胞毒性, 其低基因整合率降低了插入突变的风险, 最大的缺点是包装容量小 ($<5\text{ kb}$); 腺病毒也能转导分裂期和非分裂期细胞, 插入突变风险小, 包装容量大 (最高达 30 kb), 但存在辅助病毒的污染问题及在第 1 代载体系统中产生先天免疫反应等问题^[35]; 单纯疱疹病毒是一个大容量载体 ($\geq 30\text{ kb}$), 具有多个外源性基因插入位点, 具有高效的基因转导效率, 但在脑部等组织中转基因不能长期表达, 并且存在载体靶向困难等问题^[36]。

4.2 非病毒转导 转座子是一种自然、可移动的遗传因子, 能够改变自身在基因组中的位置, 以一种非病毒的方法修改细胞基因组^[37]。转座子由转座酶基因的 DNA 片段及两侧包含转座酶结合位点的反向末端重复序列 (TIRs) 两部分组成, 转座酶与 TIRs 结合, 可切断转座子并改变其原有位置。CAR-T 治疗中, 以睡美人转座子系统和 PiggyBac 转座子系统应用最为广泛。以基于质粒的睡美人转座子系统进行基因转导为例, 首先在 TIRs 之间引入 CARs 目的基因, 将其转入宿主基因组, 然后将含目的基因的转座子传递到细胞, 通过转座酶与转座子的 TIRs 连接, 催化转座子的切除与随后的基因整合, 从而转导目的基因^[38]。与病毒载体相比, 转座子对基因的负载能力更强, 操作步骤相对简单, 在临床试验中也表现出良好

的转导效率, 且转座子是无病毒的不连续的 DNA 片段, 作为核酸载体, 它的免疫原性可忽略不计, 也不具有致病性, 但具有相对安全的整合特性, 不需进行昂贵的生物安全检测, 可以降低 CAR-T 治疗成本^[39]。但是, 由于转座子可随机插入转基因, 带来了临床安全和效率问题, 天然转座子允许转导的基因重复改变基因位置, 增加了质量控制难度^[40]。

mRNA 介导的基因转导技术提供了一个基于细胞质的表达系统, 它突破了人们认为 mRNA 稳定性差, 无法作为治疗分子的固有思维。mRNA 具有高效的转导效率, 能够转导静止或缓慢增殖的细胞, 体外转录的 mRNA 可通过电穿孔或内吞等方式进入细胞, 不需进入细胞核调节其功能, 因此, mRNA 不能整合到基因组中, 插入突变的可能性非常低。但是, mRNA 由于本身具有不稳定和存活时间相对较短的特性, 会导致编码的蛋白质相对短暂的表达^[41]。

5 符合药品生产质量管理规范 (GMP) 标准的 CAR-T 细胞产品制造

CAR-T 细胞制造的失败率在 $2\% \sim 14\%$ ^[42], 主要是由于患者 T 细胞数量少、单核细胞/粒细胞等对白细胞分离产物的污染及难以获得足量的 CAR-T 细胞进行治疗等问题造成。作为细胞免疫疗法中的一种, CAR-T 细胞的生产必须符合 GMP, 并且进行完整详尽的质量控制以保证其治疗的安全性及有效性。在获取 T 细胞时, 选取合适时间点采集患者 T 细胞 (如化疗前)、使用健康捐献者外周血构建通用型 CAR-T 来优化 T 细胞产量^[43]; 在 T 细胞富集过程中, 通过去除潜在的抑制细胞群 (如单核细胞和粒细胞) 及选取特定的 T 细胞亚群, 提升标本纯度以达到最佳的细胞终产量; 在 T 细胞增殖中, 选取封闭、自动化仪器进行 T 细胞扩增^[44], 避免污染的同时也保证了细胞质量。CAR-T 细胞必须经过产品鉴别、纯度、生存能力、效力等方面的测试, 包括对表达目的基因细胞系的细胞毒性检测及纯度检测, 以及在产品冷冻前进行存活率检测等^[42]。

6 总结及展望

构建效能强、安全性高的 CAR-T 细胞是 CAR-T 精准高效治疗的基础, 选取最优的靶点, 构建效能最佳的 CARs 结构, 获取最符合特定疾病治疗所需的 T 细胞, 进行安全高效的基因转导及充分的细胞扩增, 并且在制造全程进行质量控制, 是 CAR-T 作为药物治疗疾病的关键环节。虽然 CAR-T 价格高昂、自动化程度不高, 很难将 CAR-T 应用于更广泛的治疗人群, 但随着研究进展, 结构缺陷及技术短板等方面的难题逐渐解决, 无疑会有更多安全、高效的 CAR-T 细胞产生并应用于临床, CAR-T 细胞治疗的潜力是值得期待的。

参考文献

[1] LEVINE B L, MISKIN J, WONNACOTT K, et al. Global

- manufacturing of CAR T Cell therapy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 4(1): 92-101.
- [2] SIEVERS N M, DÖRRIE J, SCHAFT N. Cars; beyond T cells and T cell-derived signaling domains [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3525.
- [3] LEVINE B L. Performance-enhancing drugs; design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(2): 79-84.
- [4] GROSS G, WAKS T, ESHHAR Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(24): 10024-10028.
- [5] TIMMERS M, ROEX G, WANG Y, et al. Chimeric antigen receptor-modified t cell therapy in multiple myeloma: beyond B cell maturation antigen [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1613.
- [6] ZHANG C, LIU J, ZHONG J F, et al. Engineering CAR-T cells [J]. *Biomark Res*, 2017, 5(1): 3-8.
- [7] TANG X Y, SUN Y, ZHANG A, et al. Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia; a non-randomised, open-label phase I trial protocol [J]. *BMJ Open*, 2016, 6(12): e013904.
- [8] HOLZINGER A, ABKEN H. Car T cells; a snapshot on the growing options to design a CAR [J]. *Hemasphere*, 2019, 3(1): e172.
- [9] KIM D W, CHO J Y. Recent advances in allogeneic CAR-T cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 263.
- [10] WEI J, HAN X, BO J, et al. Target selection for CAR-T therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 1-9.
- [11] SHIM H. Antibody phage display [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1053(1): 21-34.
- [12] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [13] NICHOLSON I C, LENTON K A, LITTLE D J, et al. Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma [J]. *Mol Immunol*, 1997, 34(16/17): 1157-1165.
- [14] KLIMKA A, MATTHEY B, ROOVERS R C, et al. Human anti-CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody selection using cell panning [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(2): 252-260.
- [15] AHMAD Z A, YEAP S K, ALI A M, et al. scFv antibody: principles and clinical application [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 980250.
- [16] MCCAFFERTY J, GRIFFITHS A D, WINTER G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*, 1990, 348(6301): 552-554.
- [17] MA H, O'KENNEDY R. Recombinant antibody fragment production [J]. *Methods*, 2017, 116(1): 23-33.
- [18] BASHIR S, PAESHUYSE J. Construction of antibody phage libraries and their application in veterinary immunovirology [J]. *Antibodies (Basel)*, 2020, 9(2): 21.
- [19] LEDSGAARD L, KILSTRUP M, KARATT-VELLATT A, et al. Basics of antibody phage display technology [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(6): 236.
- [20] PAROLA C, NEUMEIER D, REDDY S T. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering [J]. *Immunology*, 2018, 153(1): 31-41.
- [21] FRENZEL A, SCHIRRMANN T, HUST M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy [J]. *MAbs*, 2016, 8(7): 1177-1194.
- [22] HANES J, PLÜCKTHUN A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(10): 4937-4942.
- [23] JIN Y J, LEI C, HU D, et al. Human monoclonal antibodies as candidate therapeutics against emerging viruses [J]. *Front Med*, 2017, 11(4): 462-470.
- [24] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1529-1541.
- [25] DAI X F, MEI Y, CAI D Y, et al. Standardizing CAR-T therapy: getting it scaled up [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 239-245.
- [26] POOREBRAHIM M, SADEGHI S, FAKHR E, et al. Production of CAR T cells by GMP-grade lentiviral vectors; latest advances and future prospects [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2019, 56(6): 393-419.
- [27] MORGAN R A, BOYERINAS B. Genetic modification of T cells [J]. *Biomedicine*, 2016, 4(2): 9.
- [28] ZUFFEREY R, DULL T, MANDEL R J, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery [J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 9873-9880.
- [29] DAVID R M, DOHERTY A T. Viral vectors; the road to reducing genotoxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 155(2): 315-325.
- [30] POLETTI V, MAVILIO F. Interactions between Retroviruses and the host cell genome [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 8(1): 31-41.
- [31] BRENTJENS R J, LATOUCHE J B, SANTOS E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15 [J]. *Nat Med*, 2003, 9(3): 279-286.
- [32] VORMITTAG P, GUNN R, GHORASHIAN S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 164-181.
- [33] WANG X Y, RIVIÈRE I. Clinical manufacturing of CAR T cells; foundation of a promising therapy [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 3: 16015.
- [34] THROM R E, OUMA A A, ZHOU S, et al. Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection [J]. *Blood*, 2009, 113(21): 5104-5110.
- [35] CHEN Y H, KEISER M S, DAVIDSON B L. Viral vectors for gene transfer [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2018, 8(4): e58.

- [36] KAY M A, GLORIOSO J C, NALDINI L. Viral vectors for gene therapy; the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics[J]. Nat Med, 2001, 7(1): 33-40.
- [37] WOODARD L E, WILSON M H. PiggyBac-ing models and new therapeutic strategies[J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(9): 525-533.
- [38] IZSVÁK Z, HACKETT P B, COOPER L J, et al. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges[J]. Bioessays, 2010, 32(9): 756-767.
- [39] MAGNANI C F, TETTAMANTI S, ALBERTI G, et al. Transposon-based CAR T cells in acute leukemias: where are we going[J]. Cells, 2020, 9(6): 1337.
- [40] PISCOPO N J, MUELLER K P, DAS A, et al. Bioengineering solutions for manufacturing challenges in CAR T cells[J]. Biotechnol J, 2018, 13(2): 1700095.
- [41] TAVERNIER G, ANDRIES O, DEMEESTER J, et al. mRNA as gene therapeutic; how to control protein expression[J]. J Control Release, 2011, 150(3): 238-247.
- [42] GEE A P. GMP CAR-T cell production[J]. Best pract res clin haematol, 2018, 31(2): 126-134.
- [43] NIE Y, LU W, CHEN D, et al. Mechanisms underlying CD19-positive ALL relapse after anti-CD19 CAR T cell therapy and associated strategies[J]. Biomark Res, 2020, 8(1): 18.
- [44] COSTARIOL E, ROTONDI M C, AMINI A, et al. Demonstrating the manufacture of human CAR-T cells in an automated stirred-tank bioreactor[J]. Biotechnol J, 2020, 15(9): e2000177.

(收稿日期: 2020-09-24 修回日期: 2020-12-30)

• 综 述 •

循环肿瘤细胞的分离与鉴定研究进展^{*}

张 佺 综述, 徐克前[△] 审核

1. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 湖南长沙 410013; 2. 中南大学湘雅三医院检验科, 湖南长沙 410013

摘 要: 循环肿瘤细胞(CTC)是由自发或诊疗操作中从实体瘤、转移灶进入外周血循环系统的肿瘤细胞, 是“液体活检”的一项重要指标, 可以为肿瘤的早期诊断、转移复发的评估提供有力帮助。但由于体液中 CTC 的数量极少, 检测 CTC 首先需要将细胞高效分离出来, 并对细胞纯度、表型进行鉴定。目前已经建立了较多分离、鉴定 CTC 的方法, 本文就 CTC 的分离与鉴定方法进行综述, 并对其未来的应用进行展望。

关键词: 循环肿瘤细胞; 分离; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.025

中图法分类号: R73

文章编号: 1673-4130(2021)09-1129-05

文献标志码: A

Research progress on isolation and identification of circulating tumor cells^{*}

ZHANG Wei, XU Keqian[△]

1. Department of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

Abstract: Circulating tumor cells (CTC) are tumor cells that enter the peripheral blood circulation system from solid tumors and metastases by spontaneous or diagnostic operation. It is an important index of "liquid biopsy", which can provide powerful help for the early diagnosis of tumors and the evaluation of metastasis and recurrence. However, as CTC is extremely rare in body fluids, it is necessary to isolate the cells efficiently and identify the purity and phenotype of the cells. At present, many methods of CTC isolation and identification have been established. This paper reviews the methods of CTC isolation and identification, and prospects its future application.

Key words: circulating tumor cells; isolation; identification

高效分离和准确鉴定循环肿瘤细胞(CTC)对肿瘤的早期诊断具有重要意义。目前, CTC 的分离方法

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(81471499); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40347)。

[△] 通信作者, E-mail: xukeqian@126.com。

本文引用格式: 张佺, 徐克前. 循环肿瘤细胞的分离与鉴定研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1129-1133.