

PD-1/ICOS 信号转换受体通过增强 CD19-CAR-T 细胞增殖能力提高其对 DLBCL 的杀伤活性*

加尔宝·吐尔德¹ 阿迪娜·贾库林² 闻淑娟¹

(新疆医科大学附属肿瘤医院 1. 淋巴瘤内科; 2. 乳腺放疗科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探讨共表达 PD-1/ICOS 信号转换受体通过增强靶向 CD19 的嵌合抗原受体 T 细胞(CD19-CAR-T 细胞)增殖能力提高其对弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)产生的抗肿瘤活性。方法 慢病毒感染法构建 CD19-CAR-T 细胞(bbz)以及共表达 PD-1/ICOS 信号转换受体的 CD19-CAR-T 细胞(PD-1/ICOS-bbz);流式细胞术检测长期共孵育后 T 细胞 CD69 的表达;通过细胞计数检测 CAR-T 细胞的增殖情况;LDH 法检测 CAR-T 细胞对靶细胞的细胞毒性;活体成像检测小鼠体内肿瘤细胞的生长情况;流式细胞术检测外周血中 T 细胞的比例。结果 成功构建 bbz 及 PD-1/ICOS-bbz;长期共孵育后,PD-1/ICOS-bbz 较 bbz CD69 表达水平更高,增殖能力及对靶细胞的细胞毒性均显著提高($P < 0.01$);PD-1/ICOS-bbz 可以完全清除小鼠体内的淋巴瘤细胞,且 PD-1/ICOS-bbz 较 bbz 而言可以显著延长小鼠生存期($P < 0.01$),同时 PD-1/ICOS-bbz 较 bbz 具有更强的体内增殖能力($P < 0.05$)。结论 PD-1/ICOS-bbz 较传统的二代 CAR-T 细胞具有更强的抗肿瘤活性,有望成为一种潜在的弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案。

【关键词】 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;嵌合抗原受体 T 细胞;PD-1;ICOS;免疫治疗

【中图分类号】 R733 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 10. 005

PD-1/ICOS signal conversion receptor enhances the proliferation of CD19-CAR-T cells

JIAERBAO Tuerde¹, ADINA Jiakulin², WEN Shujuan¹

(1. Department of Lymphoma Medicine, The Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Department of Breast Radiotherapy, The Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether CD19-CAR T cells co-expressing PD-1 /ICOS signal transforming receptor can induce stronger antitumor activity against diffuse large B-cell lymphoma. **Methods** CD19-CAR T cells (bbz) and CD19-CAR T cells co-expressing PD-1/ICOS signal transforming receptor (PD-1/ICOS-bbz) were constructed by lentivirus infection. The expression of CD69 on T cells after long-term co-incubation was detected by flow cytometry. The proliferation of CAR T cells was detected by cell count. LDH assay was used to detect the cytotoxicity of CAR T cells against target cells. In vivo imaging was used to detect the growth of tumor cells in mice. The proportion of T cells in peripheral blood was detected by flow cytometry. **Results** bbz and PD-1/ICOS-bbz were constructed successfully. After long-term co-incubation, CD69 expression level of PD-1/ICOS-bbz was higher than that of bbz ($P < 0.001$), and proliferation ability ($P < 0.01$) and cytotoxicity to target cells ($P < 0.01$) were also significantly improved. PD-1/ICOS-bbz can completely eliminate lymphoma cells in mice, and PD-1/ICOS-bbz can significantly prolong the survival period of mice compared with bbz ($P < 0.01$). PD-1/ICOS-bbz has a stronger in vivo proliferation ability than bbz. **Conclusion** PD-1/ICOS-bbz has stronger antitumor activity than conventional second-generation CAR T cells, and may be a promising treatment option for potential diffuse large B-cell lymphoma.

【Key words】 Diffuse large B-cell lymphoma; Chimeric antigen receptor T cells; PD-1; ICOS; Immunotherapy

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2020D01C268)

通信作者:闻淑娟,主任医师,博士后,E-Mail:ffable23@163.com

引用本文:加尔宝·吐尔德,阿迪娜·贾库林,闻淑娟.PD-1/ICOS 信号转换受体通过增强 CD19-CAR-T 细胞增殖能力提高其对 DLBCL 的杀伤活性[J].西部医学,2022,34(10):1426-1431. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 10. 005

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是一种高度侵袭性和异质性的肿瘤,是非霍奇金淋巴瘤最常见的形式^[1-2]。随着新型靶向治疗的发展,大部分 DLBCL 患者可以治愈^[3]。然而,仍有 40%~50%的 DLBCL 患者表现为难治性或复发的特点,最终死于疾病进展^[4-5]。因此,DLBCL 的治疗还需要探寻更多的治疗手段。

靶向 CD19 的嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)已被批准用于复发难治性弥漫大 B 细胞淋巴瘤^[6]。然而,免疫抑制微环境的存在显著削弱了 CAR-T 细胞在临床应用中的疗效^[7-8]。前期研究^[9-10]发现,PD-L1 在 DLBCL 中显著高表达,是此类患者不良预后因素。阻断 PD-1/PD-L1 信号是一种有效的增强 B 细胞淋巴瘤免疫应答的手段^[11]。此外,研究^[12-13]显示,包含 ICOS 胞内结构域的 CAR 增强了 CAR-T 细胞的效应功能和体内持久性。

在本研究中,为了逆转 PD-1/PD-L1 信号对 T 细胞的抑制作用,同时基于 ICOS 胞内结构域可以增强 T 细胞的效应功能和体内持久性的特点,我们将 PD-1 受体的胞外结构域与 ICOS 受体的胞内信号域融合,并将这种嵌合受体共表达在 CD19-CAR-T 细胞中,来探索这种新型 CAR-T 细胞对 DLBCL 的抑制活性。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂、实验动物及血液样本 弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞 DB 购自武汉普诺赛生物科技有限公司。细胞培养基为 RPMI-1640+10%胎牛血清,细胞培养在 37℃,5% CO₂ 条件下。过表达 luciferase 的 DB 细胞由本实验室先前构建保存。Ficol 试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司;CD3/CD28 磁珠购自美国 Invitrogen 公司;IL-2 购自美国 Peprotech 公司;Polybrene 购自美国 sigma 公司;CFSE 试剂购自美国 Invitrogen 公司;LDH 细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;荧光素酶底物购自上海翌圣生物科技有限公司;FITC 标记的 CD19 蛋白购自北京 Acro 公司;PE 标记的抗 Myc 抗体,PE 标记的抗 CD69 抗体购自美国 Biolegend 公司;FITC 标记的抗 CD3 抗体,PE 标记的抗 CD4 抗体,APC 标记的抗 CD8 抗体购自北京义翘神州有限公司;过表达 CD19-CAR 以及过表达 PD-1/ICOS-CD19-CAR 的慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司。15 只 5 周龄大小的雌性 NCG 小鼠(体重在 23 g 左右)购自新疆医科大学,小鼠饲养 SPF 屏障环境中,所有动物实验都经过我院伦理委员会批准。志愿者招募自我院体检中心 3 例健康体检者,其中男 2 例,女 1 例,平均年龄 45 岁(年龄范围 40~49 岁),平均 BMI 为 37.6 kg/m²(BMI

范围为 35.5~38.2 kg/m²),每位志愿者抽取 20 mL 的外周血,抽血程序经过我院伦理委员会批准,志愿者签署知情同意书。

1.2 慢病毒感染法构建 bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz 按照制造商的说明,使用 Ficol 试剂从外周血中分离外周血单核细胞,然后按 3:1 的磁珠与细胞比例加入 CD3/CD28 磁珠,在室温孵育 30 min,之后将磁珠细胞混合物放入专用磁力架中静置 5 min,连同磁力架一起倾倒管中的液体,之后用完全培养基将试管中的磁珠细胞混合物按 1×10⁶/mL 重悬,培养 48 h 后,按 MOI 值为 10 分别加入过表达 CD19-CAR 以及过表达 PD-1/ICOS-CD19-CAR 的慢病毒,并额外添加 6 μg/mL 的 polybrene,在水平离心机中按 800 g 离心 90 min,之后放入培养箱中静置培养。24 h 后更换新鲜的完全培养基,并在感染 72 h 后使用流式检测 CAR-T 细胞的阳性率。

1.3 流式细胞术检测 bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz 的阳性率 分别取 3×10⁵ 个未感染的 T 细胞(Mock),bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz, PBS 清洗 3 次后使用 100 μL PBS 重悬,之后加入 5 μL PE 标记的抗 Myc 抗体以及 FITC 标记的 CD19 蛋白,4℃避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次后,使用流式细胞仪进行检测,结果使用 Flowjo V10 进行处理。

1.4 流式细胞术检测长期共孵育后 T 细胞中 CD69 的表达情况 分别取 2×10⁶ 个 bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz,按照试剂盒的说明用 CFSE 染料进行标记,之后按照效靶比为 2:1 与 DB 细胞共孵育,每隔 7 d 加入新鲜的 DB 细胞,共添加 3 次,在共孵育 35 d 后,取 20 μL 细胞悬液, PBS 清洗 3 次后使用 100 μL PBS 重悬,之后加入 5 μL PE 标记的抗 CD69 抗体,4℃避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次后,使用流式细胞仪进行检测,结果使用 Flowjo V10 进行处理。

1.5 流式细胞术检测长期共孵育后 T 细胞的增殖情况 按照 1.4 的共孵育方法,每隔 7 d 取 50 μL 细胞悬液,利用 T 细胞标记 CFSE 的特性,使用流式细胞仪对 CFSE+ 的细胞进行计数,以此来统计 T 细胞的增殖情况。

1.6 LDH 释放法检测 bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz 对靶细胞的细胞毒性 按照 1.4 的共孵育方法,在共孵育结束后,取 2×10⁶ 个细胞混合物,按照 3:1 的磁珠与细胞比例加入 CD3/CD28 磁珠,在室温孵育 30 min,之后将磁珠细胞混合物放入专用磁力架中静置 5 min,连同磁力架一起倾倒管中的液体,得到 T 细胞。再按照效靶比为 2:1 与 DB 细胞共孵育 24 h,期间不添加任何细胞因子,之后按照制造商的说明使用 LDH 细

胞毒性检测试剂盒检测对靶细胞的细胞毒性。计算公式为:细胞毒性或死亡率(%)=(处理样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-样品对照孔吸光度)×100。

1.7 体内移植瘤模型检测 PD-1/ICOS-bbz 的体内抗肿瘤活性 取 5×10⁶ 个 DB-luciferase 细胞,重悬于 200 μL PBS 中,通过尾静脉回输至 NCG 小鼠体内,接种 7 d 后,所有小鼠均成功长出肿瘤,将 15 只小鼠分为 3 组(Mock 组,bbz 组及 PD-1/ICOS-bbz 组,每组 5 只小鼠),通过尾静脉分别回输 1×10⁷ 个效应细胞,在接种肿瘤细胞后第 14 d 腹腔注射 1 mg/kg 的 luciferase 底物,并通过活体成像仪对体内的肿瘤细胞进行成像。之后密切监控小鼠的死亡情况。

1.8 流式细胞术检测小鼠外周血中 T 细胞的比例 通过眼眶采血取 50 μL 小鼠外周血,使用 350 μL 红细胞裂解液室温裂解 3 min,之后加入 1 mL PBS 混匀,

清洗 3 次后,加入 FITC 标记的抗 CD3 抗体,PE 标记的抗 CD4 抗体,APC 标记的抗 CD8 抗体,4℃ 避光孵育 30 min,PBS 清洗 3 次后,使用流式细胞仪进行检测,结果使用 Flowjo V10 进行处理。

1.9 统计学分析 所有实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计学处理。计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间样本比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染法构建 bbz 以及 PD-1/ICOS-bbz 流式细胞术检测 bbz 及 PD-1/ICOS-bbz 的阳性率,结果显示,bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 中 CD19-CAR 的阳性率分别为 31.1% 和 36.3% (见图 1A),而只有 PD-1/ICOS-bbz 中表达 PD-1/ICOS 嵌合受体,阳性率为 42.2%,见图 1B)。

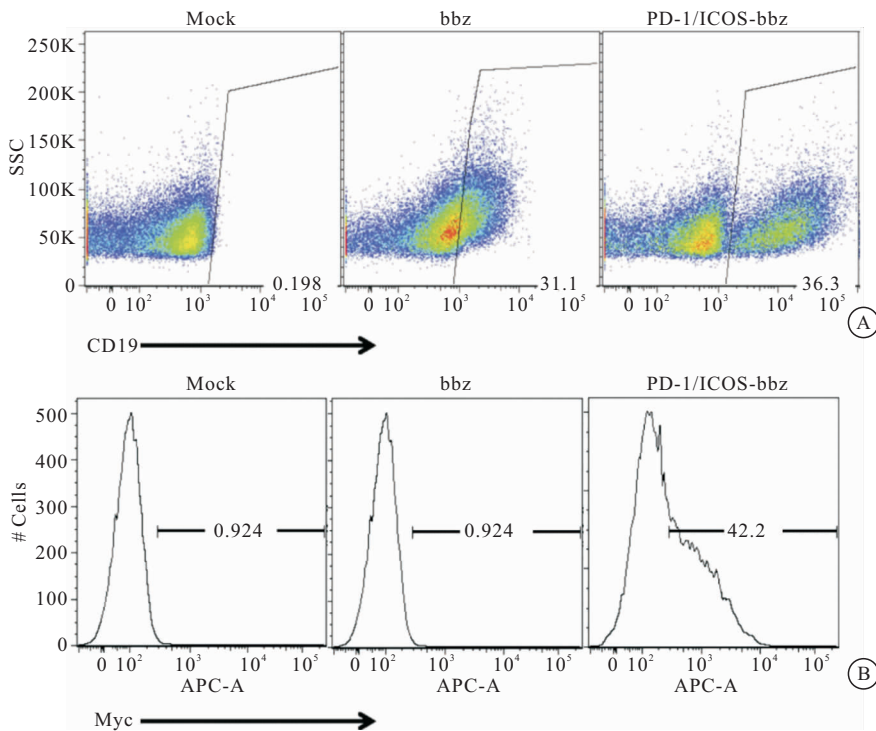


图 1 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 的表征

Figure 1 Characterization of bbz and PD-1/ICOS-bbz

注:A. 通过结合 CD19 蛋白证实 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 的 CAR 表达阳性率;B. 通过检测 Myc 的表达来确定 PD-1/ICOS 嵌合受体的阳性率

2.2 长期共孵育后 PD-1/ICOS-bbz 的激活水平更高 在经过 35 d 的体外共孵育后,流式细胞术检测 T 细胞表面激活 marker 的表达情况,结果表明,PD-1/ICOS-bbz 较 bbz CD69 的表达水平显著提高 (*P*<0.001),见图 2。

2.3 长期共孵育后 PD-1/ICOS-bbz 的增殖能力和细胞毒性水平更高 细胞增殖结果显示,在长期共孵育过程中 PD-1/ICOS-bbz 较 bbz 增殖能力显著提高

(*P*<0.01)(见图 3A)。此外,共孵育结束后取 T 细胞与 DB 细胞共孵育,结果表明,PD-1/ICOS-bbz 较 bbz 对靶细胞的细胞毒性更高 (*P*<0.01),见图 3B。

2.4 PD-1/ICOS-bbz 显著清除小鼠体内的淋巴瘤细胞 使用小鼠移植瘤模型评估 PD-1/ICOS-bbz 体内抗肿瘤活性,活体成像结果显示,在第 14 d 时 PD-1/ICOS-bbz 治疗组体内肿瘤被完全清除,而 bbz 组仍有存活部分肿瘤细胞(见图 4A)。生存结果显示,bbz 治

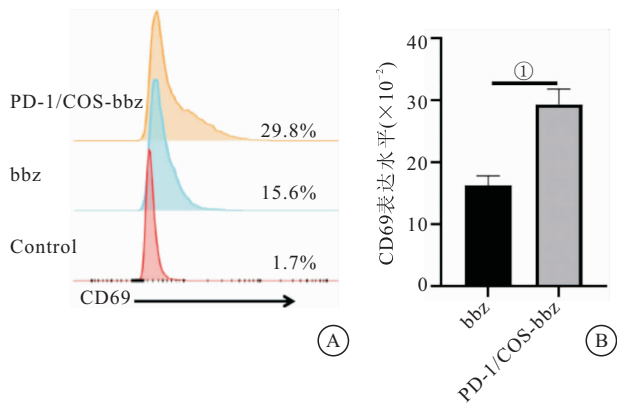


图 2 长期共孵育后 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 的激活

Figure 2 Activation of bbz and PD-1/ICOS-bbz after long-term co-incubation

注: A. 流式检测 CD69 的表达水平; B. 图 A 的统计学分析结果。与 bbz 比较, ① $P < 0.001$

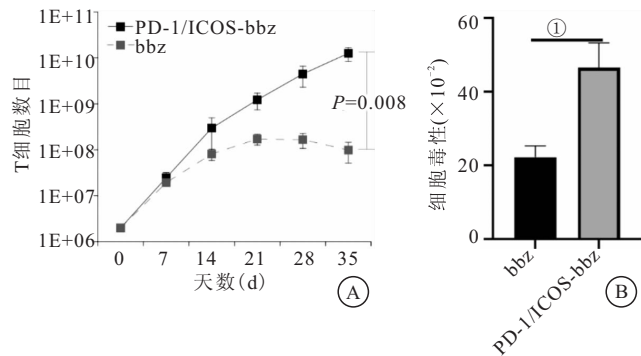


图 3 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 长期共孵育后的增殖和细胞毒性

Figure 3 Proliferation and cytotoxicity of bbz and PD-1/ICOS-bbz after long-term co-incubation

A. 通过流式细胞术进行细胞计数; B. LDH 释放实验检测细胞毒性。与 bbz 比较, ① $P < 0.001$

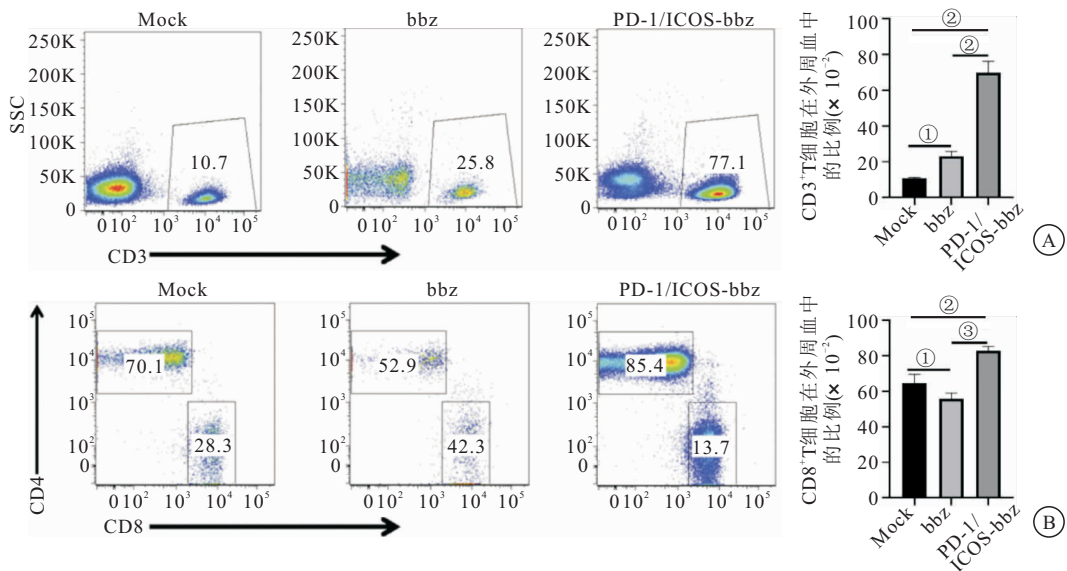


图 5 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 在体内的增殖

Figure 5 Proliferation of bbz and PD-1/ICOS-bbz in vivo

注: A. 流式检测外周血中的 $CD3^+$ T 细胞; B. 流式检测外周血中的 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的比例。与 bbz 组比较, ① $P < 0.05$; 与 PD-1/ICOS-bbz 组比较, ② $P < 0.05$; bbz 组与 PD-1/ICOS-bbz 组比较, ③ $P < 0.05$

疗组的小鼠在 43 d 时已全部死亡, 而 PD-1/ICOS-bbz 治疗组的小鼠在 70 d 时仍全部存活 ($P < 0.01$), 见图 4B。

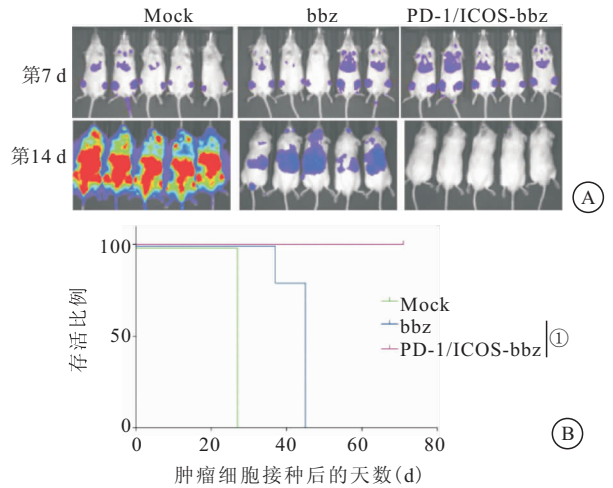


图 4 bbz 和 PD-1/ICOS-bbz 对 DB 细胞的体内抗肿瘤活性

Figure 4 Anti-tumor activity of bbz and PD-1/ICOS-bbz against DB cells in vivo

注: A. 生物发光监测肿瘤进展; B. 不同治疗组的生存曲线。与 Mock 组比较, ① $P < 0.01$

2.5 PD-1/ICOS-bbz 具有更强的体内增殖能力 流式结果显示, PD-1/ICOS-bbz 治疗组中外周血 $CD3^+$ T 细胞的数目较 bbz 组显著增多 (见图 5A), 且 PD-1/ICOS-bbz 治疗组的 T 细胞具有更多的 $CD8^+$ T 细胞的比例, 表明其肿瘤杀伤能力更强, 见图 5B。

3 讨论

CAR-T 细胞被认为是一种有效的 B 细胞淋巴瘤的治疗手段^[14]。然而, 现存的 CAR-T 细胞对复发/难治性 DLBCL 患者的疗效有限, 客观缓解率只能维持在 60% 左右^[15-16]。为了进一步提高 CAR-T 细胞对 DLBCL 疗效, 降低肿瘤微环境的影响, 我们构建了共表达信号转换受体的增强型 CAR-T 细胞。结果表明, 含有 PD-1/ICOS 信号转换受体的 CD19-CAR-T 细胞能够特异性清除表达 CD19 的 DLBCL, 有效延长小鼠的生存期。此外, 与二代的 CD19-CAR-T 细胞相比, 含有 PD-1/ICOS 信号转换受体的 CD19-CAR-T 细胞具有显著的增殖优势, 这种特性使 PD-1/ICOS-bbz 具有更强的临床应用潜力, 因为到目前为止, 大部分报道的经 CAR-T 细胞治疗失败的 DLBCL 患者, 其外周血 CAR-T 细胞扩增都令人失望^[17]。既往研究^[18]报道, 长期慢性刺激 CAR-T 细胞可导致其衰竭。而在本研究中, 体外结果显示, 在经过长期刺激后, PD-1/ICOS-bbz 较 bbz 仍具有更好的肿瘤杀伤活性。

通过回输 CAR-T 细胞可以在体内产生有效的抗肿瘤作用, 然而大多数肿瘤会采取多种策略来实现免疫逃逸。这种逃逸策略大致可以分为两类, 一种是防止 T 细胞识别的策略, 如目标抗原和主要组织相容性复合体表达下调^[19-20]; 还有就是通过限制 T 细胞持久性和效应功能的策略, 如抑制配体/受体 (如 CTLA-4、PD-1 和 LAG-3) 的表达^[21-22]。研究人员已经通过设计抑制配体阻断剂, 证明可以增强抗肿瘤免疫反应^[23]。但系统性施用这类药物往往会引起较为严重的不良反应^[24]。本研究设计的 PD-1/ICOS 信号转换受体使得回输的 CAR-T 细胞在肿瘤局部解除 PD-1/PD-L1 的抑制作用, 有效减小全身的副反应。

先前的研究表明, ICOS 共刺激受体被证明可以增强 CD8⁺T 细胞介导的抗肿瘤活性^[25]。此外, 基于 ICOS 作为共刺激信号的 CAR 受体增强了 CD8⁺T 细胞的细胞因子释放和体内持久性^[26]。本研究设计的 PD-1/ICOS 信号转换受体将肿瘤微环境中的 PD-1 信号转换为 ICOS 信号, 证明的确可以增强 CAR-T 细胞的增殖活性。

CAR-T 细胞应用于临床治疗时应该平衡疗效和毒性。然而, 由于缺乏良好的动物模型, 限制了对 PD-1/ICOS-bbz 毒性的评价^[27]。尽管如此, 我们可以在后续的研究中为 PD-1/ICOS-bbz 额外设计一些安全开关, 使其即使发生不良反应, 也可以及时采取相应手段予以控制^[28]。

4 结论

本研究证实了通过逆转肿瘤来源的抑制信号来

增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤活性的可行性。嵌合受体 (PD-1/ICOS) 与肿瘤细胞上的 PD-L1 结合, 并激活 ICOS 受体相关的下游信号级联, 增强 CAR-T 细胞的增殖能力及体内的抗肿瘤活性。该研究为 DLBCL 的治疗提供了一种潜在的方案, 有望在不远的未来进行临床研究进一步探索其治疗效果。

【参考文献】

- [1] GOURD E. Promising new combination therapy for non-gcb dl-bcl[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20 (5):e245
- [2] HARTERT K T, WENZL K, KRULL J E, *et al*. Targeting of inflammatory pathways with r2chop in high-risk dl-bcl[J]. *Leukemia*, 2021, 35 (2):522-533.
- [3] LE GOUILL S, GHESQUIERES H, OBERIC L, *et al*. Obinutuzumab vs rituximab for advanced dl-bcl: A pet-guided and randomized phase 3 study by lisa[J]. *Blood*, 2021, 137 (17):2307-2320.
- [4] PERRY C, BEN BAROUCH S, GOLDSCHMIDT N, *et al*. Characteristics, management and outcome of dl-bcl patients, presenting with simultaneous systemic and cns disease at diagnosis: A retrospective multicenter study[J]. *Am J Hematol*, 2019, 94 (9):992-1001.
- [5] ZHOU Z, MA D, LI P, *et al*. Sirt1 gene confers adriamycin resistance in dl-bcl via activating the pcg-1alpha mitochondrial metabolic pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (12): 11364-11385.
- [6] SERMER D, BATLEVI C, PALOMBA M L, *et al*. Outcomes in patients with dl-bcl treated with commercial car t cells compared with alternate therapies[J]. *Blood Adv*, 2020, 4 (19): 4669-4678.
- [7] JOHN L B, KERSHAW M H, DARCY P K. Blockade of pd-1 immunosuppression boosts car t-cell therapy[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (10):e26286.
- [8] ENBLAD G, KARLSSON H, LOSKOG A S. Car t-cell therapy: The role of physical barriers and immunosuppression in lymphoma[J]. *Hum Gene Ther*, 2015, 26 (8):498-505.
- [9] VARI F, ARPON D, KEANE C, *et al*. Immune evasion via pd-1/pd-l1 on nk cells and monocyte/macrophages is more prominent in hodgkin lymphoma than dl-bcl[J]. *Blood*, 2018, 131 (16):1809-1819.
- [10] 付永亮, 薛学敏, 沈贵华, 等. 伴有 MYD88 L265p 突变的弥漫大 B 细胞淋巴瘤肿瘤细胞及肿瘤微环境 PD-L1 的表达特征[J]. *中华病理学杂志*, 2021, 50 (7):751-755.
- [11] MCCORD R, BOLEN C R, KOEPPEN H, *et al*. Pd-l1 and tumor-associated macrophages in de novo dl-bcl[J]. *Blood Adv*, 2019, 3 (4):531-540.
- [12] XIAO Z, MAYER A T, NOBASHI T W, *et al*. Icos is an indicator of t-cell-mediated response to cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (14):3023-3032.
- [13] HANSON A, ELPEK K, DUONG E, *et al*. Icos agonism by jtx-2011 (vopratelimab) requires initial t cell priming and fc cross-linking for optimal t cell activation and anti-tumor immuni-

- ty in preclinical models[J]. PLoS One, 2020, 15 (9):e0239595.
- [14] WUDHIKARN K, PENNISI M, GARCIA-RECIO M, *et al.* Dlbcl patients treated with cd19 car t cells experience a high burden of organ toxicities but low nonrelapse mortality[J]. Blood Adv, 2020, 4 (13):3024-3033.
- [15] SHAH N N, AHN K W, LITOVICH C, *et al.* Is autologous transplant in relapsed dlbl patients achieving only a pet+ pr appropriate in the car t-cell era? [J]. Blood, 2021, 137 (10):1416-1423.
- [16] YANG C, XIE M, ZHANG K, *et al.* Risk of hbv reactivation post cd19-car-t cell therapy in dlbl patients with concomitant chronic hbv infection[J]. Leukemia, 2020, 34 (11):3055-3059.
- [17] Value in using car t cells for dlbl[J]. Cancer Discov, 2018, 8 (2):131-132.
- [18] SMITH SD, REDDY P, SOKOLOVA A, *et al.* Eligibility for car t-cell therapy: An analysis of selection criteria and survival outcomes in chemorefractory dlbl[J]. Am J Hematol, 2019, 94 (4):117-116.
- [19] GIL DEL ALCAZAR C R, HUH S J, EKRAM M B, *et al.* Immune escape in breast cancer during in situ to invasive carcinoma transition[J]. Cancer Discov, 2017, 7 (10):1098-1115.
- [20] MCGRANAHAN N, ROSENTHAL R, HILEY C T, *et al.* Allele-specific hla loss and immune escape in lung cancer evolution[J]. Cell, 2017, 171 (6):1259-1271. e1211.
- [21] ROSENTHAL R, CADIEUX E L, SALGADO R, *et al.* Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution[J]. Nature, 2019, 567 (7749):479-485.
- [22] LIU C, YAO Z, WANG J, *et al.* Macrophage-derived ccl5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/stat3-csn5-pd-1l pathway[J]. Cell Death Differ, 2020, 27 (6):1765-1781.
- [23] BYLICKI O, PALEIRON N, MARGERIE J, *et al.* Targeting the pd-1/pd-l1 immune checkpoint in egfr-mutated or alk-translocated non-small-cell lung cancer[J]. Target Oncol, 2017, 12 (5):563-569.
- [24] BAO R, WANG Y, LAI J, *et al.* Enhancing anti-pd-1/pd-l1 immune checkpoint inhibitory cancer therapy by cd276-targeted photodynamic ablation of tumor cells and tumor vasculature[J]. Mol Pharm, 2019, 16 (1):339-348.
- [25] LE KS, AME-THOMAS P, TARTE K, *et al.* Cxcr5 and icos expression identifies a cd8 t-cell subset with tfh features in hodgkin lymphomas[J]. Blood Adv, 2018, 2 (15):1889-1900.
- [26] GUEDAN S, POSEY JR A D, SHAW C, *et al.* Enhancing car t cell persistence through icos and 4-1bb costimulation[J]. JCI Insight, 2018, 3 (1):e96976.
- [27] FABRIZIO V A, KERNAN N A, BOULAD F, *et al.* Low toxicity and favorable overall survival in relapsed/refractory b-ll following car t cells and cd34-selected t-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplant[J]. Bone Marrow Transplant, 2020, 55 (11):2160-2169.
- [28] KULEMZIN S V, KUZNETSOVA V V, MAMONKIN M, *et al.* car t-cell therapy: Balance of efficacy and safety[J]. Mol Biol (Mosk), 2017, 51 (2):274-287.

(收稿日期:2022-04-01;修回日期:2022-07-20;编辑:王小菊)

(上接第 1425 页)

- [12] ZHU M, WANG L, ZHU J, *et al.* MicroRNA-330 Directs Downregulation of the GABA_BR2 in the Pathogenesis of Pancreatic Cancer Pain[J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(10):1541-1551.
- [13] 吴巧云,周科成,岳晶晶,等. 电针对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角血管生成素-1 的影响[J]. 针刺研究, 2021, 46(3):209-214.
- [14] 计忠伟,刘文龙,茹彬,等. CT 引导下经皮穿刺内脏大小神经毁损术治疗晚期胰腺癌疼痛[J]. 中国介入影像与治疗学, 2019, 16 (4):207-210.
- [15] TAKESHITA N, OE T, KISO T, *et al.* A K_{Ca}3.1 Channel Opener, ASP0819, Modulates Nociceptive Signal Processing from Peripheral Nerves in Fibromyalgia-Like Pain in Rats[J]. J Pain Res, 2021, 14:23-34.
- [16] 董甜甜,王金龄,李世刚,等. 肥大细胞在小鼠佐剂性关节炎疼痛中的作用及其机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(4):693-699.
- [17] HUANG C W, TZENG J N, CHEN Y J, *et al.* Nociceptors of dorsal root ganglion express proton-sensing G-protein-coupled receptors[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(2):195-210.
- [18] HANG L H, YANG J P, YIN W, *et al.* Activation of spinal TDAG8 and its downstream PKA signaling pathway contribute to bone cancer pain in rats[J]. Eur J Neurosci, 2012, 36(1):2107-2117.
- [19] HSIEH W S, KUNG C C, HUANG S L, *et al.* TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis[J]. Sci Rep, 2017, 7:8870.
- [20] 叶勇,林辉,汪娜,等. 基于 PI3K-Akt-mTOR 信号通路观察帕瑞昔布钠改善大鼠神经病理性疼痛的作用机制[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(12):84-88.
- [21] LUTZ B M, NIA S, XIONG M, *et al.* mTOR, a new potential target for chronic pain and opioid-induced tolerance and hyperalgesia[J]. Mol Pain, 2015, 11:32.
- [22] 吕婧,黎镇赐,马化鑫,等. 基于 PI3 K-Akt-mTOR 信号通路探讨葛根素对大鼠神经病理性疼痛的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(4):343-347.
- [23] 王皎皎,胡燃燃,张丹,等. 人参皂苷 Rg3 对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3 K-Akt/PKB 通路和血管内皮生长因子、细胞间黏附分子-1 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(1):20-25.

(收稿日期:2021-05-18;修回日期:2022-02-10;编辑:王小菊)