

CAR-T 细胞外泌体在肿瘤治疗中的应用前景

徐恬欣, 王金菊, 党花利, 孙慧燕, 王立生

【摘要】 嵌合抗原受体 (CAR-T) 细胞疗法是一种精准的过继免疫疗法。外泌体是由细胞释放出的囊泡, 其中携带多种蛋白质、核酸和脂质等。CAR-T 细胞外泌体具有 T 细胞的肿瘤杀伤效应特性, 并具有肿瘤细胞靶向性, 在运载抗肿瘤药、携带 mRNA 和 miRNA 和递呈基因编辑元件等药物递送方面呈现出巨大优势。CAR-T 细胞衍生的外泌体为肿瘤治疗提供了一种更安全且潜在有效的手段。本文针对 CAR-T 细胞外泌体在肿瘤治疗中的研究进展及应用前景进行综述。

【关键词】 嵌合抗原受体 T 细胞; 外泌体; 免疫疗法; 肿瘤; 治疗

中图分类号: R730.51

文献标识码: A

文章编号: 1673-713X (2025) 03-0318-04

Application prospect of CAR-T cell-derived exosomes in cancer therapy

【Abstract】 Chimeric antigen receptor-T cell (CAR-T) therapy is a precise form of adoptive immunotherapy. Exosomes are vesicles released by cells, containing proteins, nucleic acids and lipids. Exosomes derived from CAR-T cells possess the characteristics of T cells, including tumor-toxicity activity and ability to target tumor cells. This makes them advantageous for drug delivery, allowing for the transportation of anti-tumor drugs, gene editing elements, as well as carrying mRNA and miRNA. Exosomes derived from CAR-T cells offer a safer and potentially more effective approach to cancer therapy. This article provides a review of the advancements and applications of exosomes derived from CAR-T cells in cancer therapy.

【Key words】 chimeric antigen receptor T cells; exosomes; immunotherapy; tumor; treatment

肿瘤治疗包括手术治疗、放疗、化疗和生物治疗等众多方式^[1]。其中以基因和细胞治疗为代表的生物治疗已经成为肿瘤治疗的最前沿领域。嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor-T cell, CAR-T) 疗法是一种通过基因工程技术对患者 T 细胞进行改造, 使其表达嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR), 从而能够特异性识别并杀伤肿瘤细胞的细胞免疫治疗方法。目前 CAR-T 已经在血液系统恶性肿瘤治疗中取得了显著的效果, 在实体肿瘤治疗中也获得较大的突破。外泌体 (exosomes, Exos) 是细胞释放的一类具有双层膜结构的微小囊泡, 直径范围在 30 ~ 150 nm^[2]。不仅包裹并运输各种生物活性分子 (如蛋白质、核酸和脂质等), 并且实现在不同细胞之间进行信息传递。免疫细胞外泌体含有细胞因子, 其表面表达各种抗原和共刺激分子, 具有多种独特的生物学特性, 在抗原提呈、免疫激活、代谢调节和肿瘤杀伤等方面发挥着重要作用^[3]。CAR-T 细胞外泌体是经过基因修饰过的工程化免疫细胞外泌体, 同时具有肿瘤靶向性和增强的生物学活性, 能够更好地识别和杀伤肿瘤细胞。因此, CAR-T 细胞衍生的外泌体提供了一种更有前景的潜在肿瘤治疗方式。本文主要针对 CAR-T 细胞来源的外泌体研究进展及在肿瘤治疗中的应用前景作一综述。

1 CAR-T 细胞疗法

CAR-T 细胞疗法是基于 CAR 的过继免疫疗法, 是通过基因工程技术, 将识别肿瘤抗原的抗体的可变区和 T 细胞的激活信号传导区域连接起来, 使 T 细胞能够特异性地识别并杀伤肿瘤细胞。利用转基因 T 淋巴细胞提供肿瘤靶向和免疫应答, CAR-T 细胞疗法目前广泛用于治疗血液系统恶性肿瘤, 如白血病、淋巴瘤等^[4]。注册临床试验的 CAR-T 细胞治疗项目已经超过 2000 项, 药物种类也超过 1000 种。全球上市的 CAR-T 共有 12 款, 其中 4 款靶向 B 细胞成熟抗原 (BCMA), 8 款靶向 CD19。目前临床研究中依然超过 38% 的临床试验集中在 CD19 和 BCMA 等既定靶点的血液系统恶性肿瘤^[5]。针对实体瘤新靶点的 CAR-T 细胞治疗目前大多都在临床试验进程中, 可能是下一个引发免疫产品爆发的机遇。

基金项目: 河北省省级科技计划 (225A9902D); 河北省廊坊市科技支撑计划 (2024013067)

作者单位: 130021 长春, 吉林大学护理学院康复教研室 (徐恬欣、王立生); 065201 廊坊, 河北燕达医学研究院 (王金菊、党花利、孙慧燕)

通信作者: 王立生, Email: lishengwang@jlu.edu.cn

收稿日期: 2024-12-31

CAR-T 细胞疗法的优势在于其针对性强、靶向性明显和长期的疗效。然而, CAR-T 细胞疗法也存在一定的局限性,例如免疫抑制因素、代谢能量不足和潜在的副作用等^[6]。CAR-T 治疗面临着众多挑战,包括携带 CAR 的细胞持久性差、细胞功能障碍或衰竭、疾病复发、免疫效应细胞相关神经毒性综合征、细胞因子释放综合征、对实体瘤的疗效低以及肿瘤微环境的免疫抑制等。尤其在实体肿瘤的治疗领域,因长期疗效受到肿瘤微环境等因素的限制^[7], CAR-T 细胞疗法治疗效果尚需进一步提高^[8]。CAR-T 细胞在体内的复制可以促进细胞因子的释放,这是导致细胞因子释放综合征、细胞因子风暴和脱靶效应等出现的原因^[9]。各种基因工程新策略提高实体肿瘤中 CAR-T 细胞的特异性,特别是目标靶向结合、合成生物学的亲和调节 CAR-T 细胞活性等^[10]。靶向新策略和 CAR-T 细胞代谢编程,能够提高 CAR-T 细胞代谢适应性,以增强其在体内抗肿瘤反应和存活潜力^[11],如高表达的 C-X-C 趋化因子受体 6 的特异性 T 细胞增强对胰腺癌细胞的识别,从而增加 T 细胞对胰腺癌的疗效^[12]。因此,基因工程的 CAR-T 细胞提高其肿瘤杀伤效应同时,也在改变着其外泌体的特性和功能。

2 CAR-T 细胞外泌体的生物学特性

CAR-T 细胞外泌体继承了 CAR-T 细胞的生物学特性。外泌体形成过程是细胞膜首先内陷,将一些膜表面蛋白包裹入细胞内。接下来通过与细胞内高尔基体交换蛋白质、miRNA 和其他小分子,形成晚期分选端体。最后在细胞内进化成多泡体。大多数情况下,表达 CD47 的细胞释放的外泌体与先天免疫细胞的受体信号调节蛋白 α 结合,有助于逃避免疫清除,从而延长外泌体在体内活性。CAR-T 细胞外泌体携带 CAR-T 细胞中的某些蛋白质、核酸等生物活性成分。CAR-T 细胞外泌体中的 miRNA 活性成分可通过调节靶细胞的基因表达影响其功能。同时, CAR-T 细胞外泌体也像 CAR-T 细胞一样,具有肿瘤靶向性和杀伤特性。CAR-T 细胞外泌体还能传递免疫激活信号或者携带杀伤活性生物分子到肿瘤细胞,在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。CAR-T 细胞外泌体生物特性有:①具有其来源细胞 T 细胞的生物学特性:效应 T 细胞衍生的外泌体对肿瘤细胞具有细胞毒活性,从而导致肿瘤细胞溶解^[13];②肿瘤靶向性:根据 CAR-T 不同靶点, CAR-T 细胞外泌体具有特定的靶向性,可定位到肿瘤部位,将治疗药物递送到 CAR-T 细胞无法到达的癌细胞中,成为一种有前途的无细胞免疫治疗新工具^[14];③携带工程化肿瘤抑制分子:基因修饰 CAR-T 细胞衍生外泌体可以携带工程化肿瘤抑制分子,如小 RNA 等^[15]。另外, CAR-T 细胞外泌体可以和多种癌症治疗方法联合,为癌症治疗提供更加安全有效的手段^[16]。CAR-T 细胞外泌体作为一种靶向癌症治疗的无细胞模式,在未来肿瘤治疗中具有较大发展潜力。

3 CAR-T 细胞外泌体对肿瘤治疗作用及机制

CAR-T 细胞外泌体是一种工程化外泌体。通过工程化修饰供体细胞、直接修饰外泌体和外泌体与组织工程学材料相结合等策略可增强外泌体的功能^[17]。CAR-T 细胞衍生的外泌体携带几种细胞毒性分子,如穿孔素、颗粒酶 A 和颗粒酶 B。Yang 等^[18]发现靶向间皮素(mesothelin, MSLN)的 CAR-T 细胞外泌体表面显著表达穿孔素和颗粒酶 B,在体外实验中可直接杀伤 MSLN 阳性的三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)细胞。在体内实验中抗 MSLN 的 CAR-T 细胞外泌体处理后乳腺癌异种移植肿瘤模型小鼠的肿瘤生长明显受到抑制,肿瘤体积和重量更小,并且没有观察到任何毒性反应。Fu 等^[13]用超速离心法对携带西妥昔单抗单链抗体的 CAR-T 细胞上清液提取外泌体,结果发现 CAR-T 细胞外泌体表达显示出与 CAR-T 细胞相同水平的 CAR,但却不表达程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death protein 1, PD-1)。将 CAR-T 细胞外泌体应用于乳腺癌异种移植模型小鼠的治疗中,结果显示剂量依赖性的肿瘤生长抑制作用。CAR-T 细胞衍生的外泌体可穿过血脑屏障,并且在免疫治疗后未观察到细胞因子释放综合征。

CAR-T 细胞衍生的外泌体具有装载药物的能力。Zhu 等^[19]将靶向间皮素和程序性死亡配体-1(PD-L1)的双特异性 CAR-T 细胞衍生的外泌体与肺靶向脂质体融合,并且通过序贯靶向递送将紫杉醇(PTX)传递到肺癌小鼠的肿瘤细胞中,能够增强其抗肿瘤的作用。Zheng 等^[20]构建靶向间皮素的 MSLN-CAR,并从健康供体的外周血中提取 T 细胞并改造后得到 CAR-T 细胞,培养后收集上清液提取外泌体。通过电穿孔法将 PTX 封装到 CAR-T 细胞外泌体中,再将装载 PTX 的外泌体(PTX CAR-Exos)通过雾化吸入方式给予肺癌小鼠。结果表明 PTX CAR-Exos 对肺癌有明显的靶向细胞毒性。外泌体通过提高 PTX 的生物利用率来改变肿瘤微环境的抑制条件,具有更好的抗肿瘤效果。

外泌体可能是 CRISPR/Cas9 基因编辑的一个有前途的递呈平台^[21]。可将工程化 CAR-T 细胞衍生的外泌体应用于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术。McAndrews 等^[22]报道了一种基于工程外泌体的 CRISPR/Cas9 的非病毒递送系统。非自体外泌体通过常用的转染试剂封装 CRISPR/Cas9 质粒 DNA,并可以递送到受体癌细胞中诱导靶向基因缺失。结果证明负载 CRISPR/Cas9 的外泌体可以靶向胰腺癌细胞中突变的 Kras^{G12} 等位基因,从而抑制同基因皮下和原位胰腺癌模型的增殖和肿瘤生长。CAR-T 细胞衍生的外泌体已经成为一种有前景的肿瘤治疗措施^[23],因为其可以通过血液循环更好地渗透实体瘤的异质性微环境。CAR-T 细胞外泌体的这些独特性质意味着它们可以降低细胞因子释放综合征,同时还可以携带活性成分直接杀伤肿瘤细胞^[24]。

外泌体和药物的融合技术有电穿孔法、超声装载法、共孵育法和脂质体融合法等^[25]。细胞电穿孔法通常用于导入 DNA、miRNA 或 siRNA 等核酸。Yang 等^[26]运用纳米生

物芯片将 DNA 导入亲代细胞中, 通过其转录 mRNA, 从而使外泌体携带 mRNA, 更大地提升递送效率。外泌体与组织工程学材料相结合, 即通过具有特殊性能的材料与外泌体相结合, 如纳米材料提高外泌体功效^[27]。Qi 等^[28]开发出具有肿瘤靶向性的外泌体超顺磁性纳米粒子簇, 通过磁性纳米颗粒修饰由血液分泌的外泌体转铁蛋白受体, 基于药物负载的外泌体载体递送在外磁场下增强了癌症靶向性并抑制了肿瘤生长。未来趋势是优化药物的装载效率和提高外泌体的稳定性。CAR-T 细胞衍生的外泌体在肿瘤微环境中表现出明显的优势, 这表明工程化 CAR-T 细胞衍生的外泌体可能在实体肿瘤的治疗中展现出不可预估的潜力。

4 CAR-T 细胞外泌体的生产和制备

CAR-T 细胞的大规模生产是批量生产外泌体的重要组成部分。鉴于外泌体发挥作用不同于细胞的配型, 开发同种异体 CAR-T 细胞策略可以降低 CAR-T 细胞的生产成本, 为大规模生产 CAR-T 细胞外泌体提供来源细胞。通过大规模培养携带细胞内刺激域的 CAR-T 细胞, 收集和纯化外泌体, 可以获得表面具有完整 CAR 嵌合物的 CAR-T 细胞外泌体^[29]。除了 CAR-T 细胞大规模制备外, 外泌体的制备纯化也是影响 CAR-T 细胞外泌体应用的核心环节。目前提取外泌体的方法有: ①切向流超滤法: 外泌体的尺寸通常在 30~150 nm 之间, 通过使用不同截留分子量的超滤膜, 可以对外泌体进行选择分离。切向流超滤法能够有效地分离出外泌体, 是目前 cGMP 级大规模制备外泌体的最有可能的策略^[29]。与传统过滤方法相比, 它更加现代化和自动化。②生物层析技术: 利用外泌体的分子量和电荷特性, 可以通过离子交换和分子筛等层析策略, 实现外泌体的精细分离。③聚合物沉淀和离心法: 聚合物沉淀法是目前大多数外泌体分离试剂盒采用的方法。聚乙二醇等聚合剂能够帮助蛋白质和囊泡聚集沉淀。通过低速离心, 可以收集到被聚乙二醇包裹的外泌体, 这种方法因其简便和经济而被广泛应用。另外, 超速离心法基于密度、大小和形状, 可以有效分离出外泌体。但超速离心法可能会导致外泌体结构发生破坏^[30]。④免疫磁珠法: 免疫磁珠分离外泌体主要是基于抗原与抗体的特异性结合和磁珠电荷特性。磁珠表面包被有针对外泌体表面特定标志物(如 CD63、CD9 等蛋白)的单克隆抗体, 外泌体表面的标志物会与磁珠上的抗体特异性结合, 通过施加外部磁场和富集成磁珠-外泌体复合物, 从而实现外泌体的富集与纯化, 获得纯度较高的外泌体。尽管各种免疫细胞特异的标志物和活性分子可以用于 CAR-T 细胞外泌体活性的鉴定, 但 CAR-T 细胞外泌体的标准研究还亟待完善。

5 展望

CAR-T 细胞外泌体具有 T 细胞的肿瘤杀伤效应特性, 并具有肿瘤细胞靶向性, 能通过血脑屏障和渗透入肿瘤组织等优势。因此, 在肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。尽管目前 CAR-T 细胞外泌体治疗肿瘤还局限于动物模型的研究,

未来工程化 CAR-T 细胞外泌体主要应用于运载抗肿瘤药、携带 mRNA 和 miRNA 和递呈基因编辑元件等新型载体体系。CAR-T 细胞外泌体具有肿瘤靶向性纳米材料的天然优势, 与 mRNA 疫苗及基因免疫治疗等新技术结合, 将极大推进肿瘤生物治疗的发展。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [2] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [3] Zhao Y, Liu T, Zhou M. Immune-cell-derived exosomes for cancer therapy[J]. Mol Pharm, 2022, 19(9):3042-3056.
- [4] Mehrabadi AZ, Ranjbar R, Farzanehpour M, et al. Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: a scoping review[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146:112512.
- [5] Du X, Luo X, Liu L, et al. Mapping the cell therapy landscape: insights into clinical trials and regulatory advances in China[J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1):96.
- [6] Sun D, Shi X, Li S, et al. CAR-T cell therapy: A breakthrough in traditional cancer treatment strategies (review)[J]. Mol Med Rep, 2024, 29(3):47.
- [7] Chen R, Chen L, Wang C, et al. CAR-T treatment for cancer: prospects and challenges[J]. Front Oncol, 2023, 13:1288383.
- [8] Liu G, Rui W, Zhao X, et al. Enhancing CAR-T cell efficacy in solid tumors by targeting the tumor microenvironment[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5):1085-1095.
- [9] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management[J]. Blood Rev, 2019, 34:45-55.
- [10] Flugel CL, Majzner RG, Krenciute G, et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(1):49-62.
- [11] Peng JJ, Wang L, Li Z, et al. Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy[J]. Sci Immunol, 2023, 8(82):eabq3016.
- [12] Lesch S, Blumenberg V, Stoiber S, et al. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(11):1246-1260.
- [13] 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.
- [14] Gao D, Jiang L. Exosomes in cancer therapy: a novel experimental strategy[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(11):2165-2175.
- [15] Tang XJ, Sun XY, Huang KM, et al. Therapeutic potential of CAR-T cell-derived exosomes: a cell-free modality for targeted cancer therapy[J]. Oncotarget, 2015, 6(42):44179-44190.
- [16] Sani F, Shojaei S, Tabatabaei SA, et al. CAR-T cell-derived exosomes: a new perspective for cancer therapy[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1):174.
- [17] Lu Y, Mai Z, Cui L, et al. Engineering exosomes and biomaterial-assisted exosomes as therapeutic carriers for bone regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1):55.
- [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] Zhu T, Chen Z, Jiang G, et al. Sequential targeting hybrid nanovesicles composed of chimeric antigen receptor T-cell-derived exosomes and liposomes for enhanced cancer immunochemotherapy[J]. ACS Nano, 2023, 17(17):16770-16786.
- [20] Zheng W, Zhu T, Tang L, et al. Inhalable CAR-T cell-derived exosomes as paclitaxel carriers for treating lung cancer[J]. J Transl Med, 2023, 21(1):383.
- [21] Horodecka K, D  chler M. CRISPR/Cas9: Principle, applications, and delivery through extracellular vesicles[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 6072.
- [22] McAndrews KM, Xiao F, Chronopoulos A, et al. Exosome-mediated delivery of CRISPR/Cas9 for targeting of oncogenic Kras(G12D) in pancreatic cancer[J]. Life Sci Alliance, 2021, 4(9):e202000875.
- [23] 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.
- [24] Wang C, Fu W, Lei C, et al. Generation and functional characterization of CAR exosomes[J]. Methods Cell Biol, 2022, 167:123-131.
- [25] Liang Y, Duan L, Lu J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. Theranostics, 2021, 11(7):3183-3195.
- [26] Yang Z, Shi J, Xie J, et al. Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation[J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4(1):69-83.
- [27] Zhuo Z, Wang J, Luo Y, et al. Targeted extracellular vesicle delivery systems employing superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. Acta Biomater, 2021, 134:13-31.
- [28] Qi H, Liu C, Long L, et al. Blood exosomes endowed with magnetic and targeting properties for cancer therapy[J]. ACS Nano, 2016, 10(3):3323-3333.
- [29] Hu D, Yang R, Wang G, et al. Emerging strategies to overcome current CAR-T therapy dilemmas-exosomes derived from CAR-T cells[J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19:2773-2791.
- [30] Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. J Control Release, 2022, 347:533-543.

· 协会之窗 ·

中国医药生物技术协会医院药学技术专业委员会成立会议 圆满召开

2025 年 4 月 19 日,中国医药生物技术协会医院药学技术专业委员会成立会议在北京隆重举行。此次会议由中国医药生物技术协会主办,并得到了《中国医院用药评价与分析》杂志和药物治疗网的大力支持。专委会的成立旨在为全国医院药学及相关产研单位技术人员搭建一个生物技术交流平台,聚焦生物药品、药物治疗及药事管理领域的科研协作、技术创新和成果转化,促进生物技术在医院的创新应用和合理使用。

成立会议由中国医药生物技术协会行业发展与自律工作部主任李昂主持,介绍了专委会成立环节的主要议程,并向出席的嘉宾和委员们致以热烈的欢迎。随后,进行了专业委员会的选举环节,通过严谨的投票程序,选举产生了第一届委员会的委员、常务委员、副主任委员和主任委员。

当选主任委员的张相林教授发表讲话,强调专委会将以“搭建平台、服务会员、促进转化、引导发展”为宗旨,致力于构建医院药学技术交流平台,推动科研协作与成果转化,促进人才培养与科普,强化行业规范与自律,推动科研协作,促进人才培养和科普,加强行业规范与自律。在协会的领导下,专委会将积极、创新、合规地开展工作。

中国医药生物技术协会副理事长吴朝晖、王锦倩为当选的主任委员、副主任委员颁发聘书。吴朝晖副理事长致辞,首先对医院药学技术专委会的成立表示热烈的祝贺,并期望专委会在未来能围绕医药生物技术开展各项工作,推动生物技术药物在医疗机构中的规范应用。

在学术交流环节,解放军总医院赵冠人主任分享了“阿尔茨海默病—从传统到创新”的主题报告,探讨了该疾病的治疗新进展。

专委会第一届一次会议同期召开,由当选的主任委员、副主任委员分别就专委会今后工作方向做相应报告。

会议最后,张相林主委对新成立的专委会寄予厚望,希望专委会能发挥桥梁和纽带作用,推动医院药学技术的创新与发展,为提高医疗服务质量做出更大贡献。