

肿瘤免疫治疗

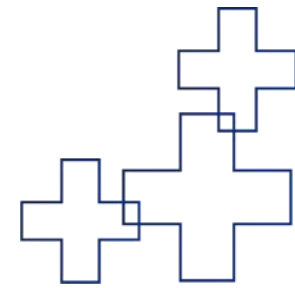
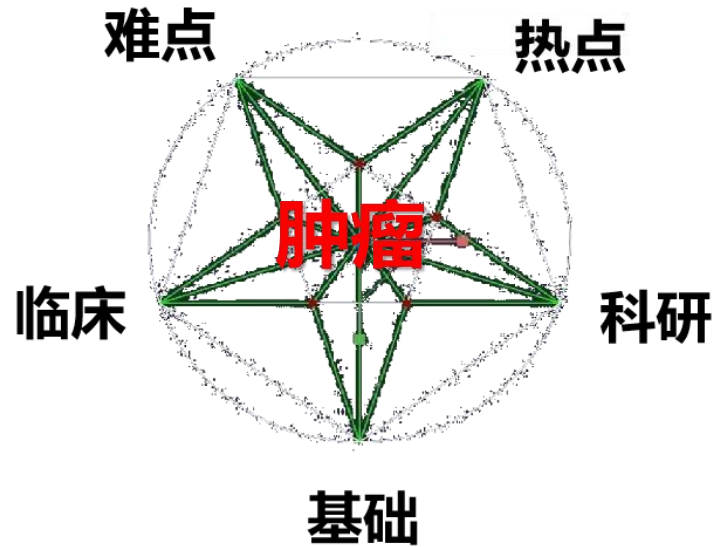
CAR-T虚拟仿真实验

课程建设团队：徐娟 陈云 张明顺 李晓曦 施冬艳 周泽伟 孙可一 张冠楠 蔡振明 杨晓帆

南京医科大学 基础医学院免疫学系

项目背景与依据

- 1 学科特点**
 - ★ **非常重要** 人体私人保镖 ~90%疾病相关 其他学科根基
 - ★ **非常困难** 抽象繁多复杂 系统交叉广泛 发展更新迅速
- 2 恶性肿瘤**
 - ★ **健康杀手** 发生因素复杂 大多机制不明 治疗方法有限
- 3 免疫治疗**
 - ★ **临床热点** 靶向免疫系统 广谱持久有效 机遇挑战并存



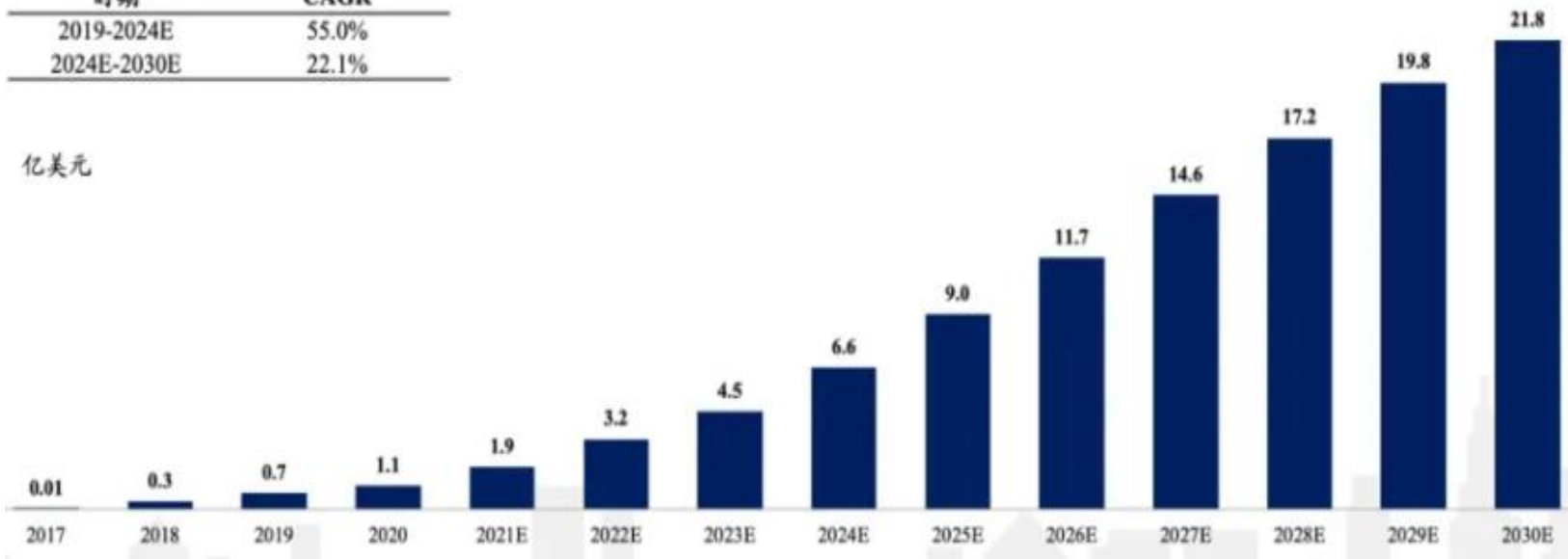
癌症领域12项颠覆性创新技术，细胞免疫治疗居首

CAR-T的优点

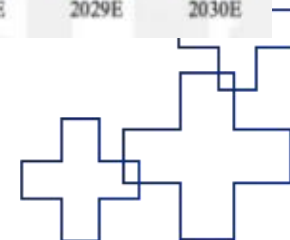
1. 精准、快速、高效、持久
2. 疗效最为肯定，有临床治愈
3. 个性化
4. 发展迅速，潜力巨大

时期	CAGR
2019-2024E	55.0%
2024E-2030E	22.1%

亿美元



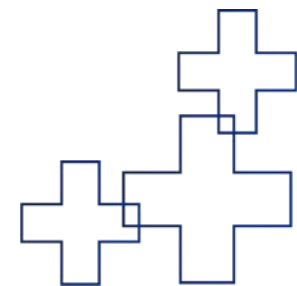
全球CAR-T细胞治疗和预测市场规模，2017-2030E
<https://mp.weixin.qq.com/s/DPLox5WYPq5ZgZ5e6AP7jw>



CAR-T的难点

1. 许多理论尚未研究透彻，既是目前面临的障碍，也是可能拓展的方向。
2. 其毒副作用是较为重要的关注点，目前临床、科研上多数是谨慎试用、联合运用。
3. 步骤复杂，周期很长，非常昂贵，成功率并不高，需要在特殊实验条件（比如P3、P4实验室）进行，普通实验室无法完成（目前CAR-T制备一般交给专业公司）。

利用虚拟仿真技术，将抽象、复杂的免疫学理论和技术具象化





项目内容与实施

1 实验对象/课时/要求

大学二年级五年制、八年制临床医学、预防、口腔医学、儿科等

实验所属课程所占课时：48学时（33+15）

实验项目所占课时：**3学时**

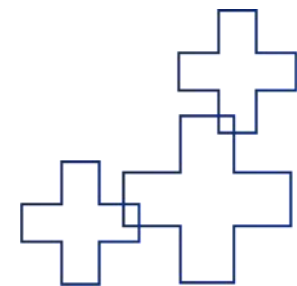
需要具备的基本知识和能力要求：

具备解剖学、组织学、细胞生物学、生物化学、生理学等相关知识。

已接受PBL课程训练，对临床有一定的感性认识。

具有自主学习、观察分析、融会贯通的能力。

具备基本计算机操作能力。



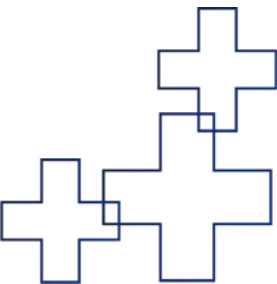


实验部分的成绩总分10分

- 3次线下实验（7分）：考勤+实验报告+期末考试包含试题
- **1次虚仿实验（3分）**：自主学习和完成项目提交实验报告成绩即可。

- 教师在超星平台发布虚仿作业，在规定时间内自主完成。
- 将成绩页另存为PDF或截图后超星平台提交实验报告。

ps：不论学习模式还是考核模式，多次重复练习后以最高分提交（**≥70分**
过关）就可以拿到本项目的3分。



CAR-T实验原理

- ◆ 肿瘤抗原免疫原性较差或表达水平很低，加上肿瘤免疫抑制、低表达或不表达抗原提呈分子 MHC- I，导致免疫细胞无法有效识别、活化和杀伤肿瘤。
- ◆ 利用抗原抗体的特异性反应，通过基因工程方法，对T细胞进行基因改造，使之表达**识别肿瘤抗原的受体**（chimeric antigen receptor, CAR）和**相关信号分子**——就像是给T细胞装上GPS，可以精准靶向肿瘤细胞

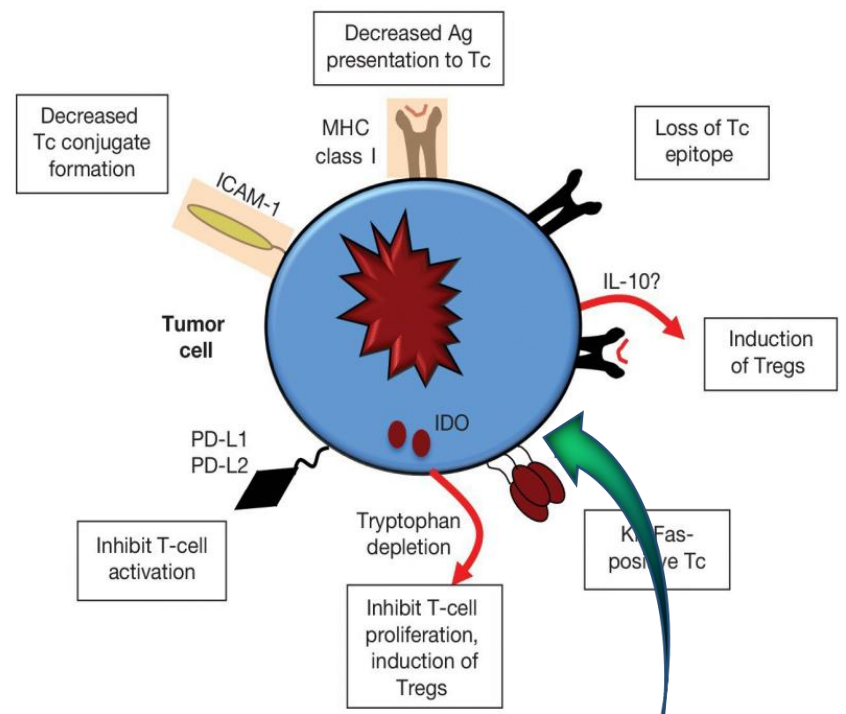
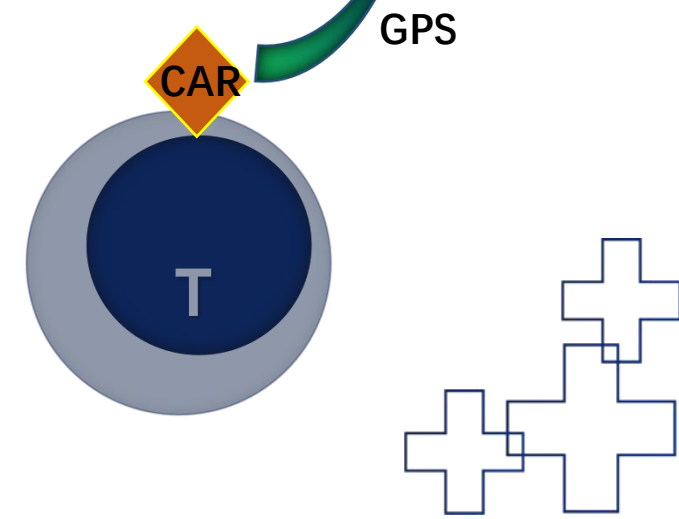
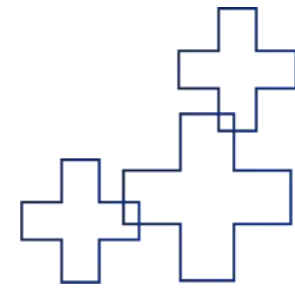
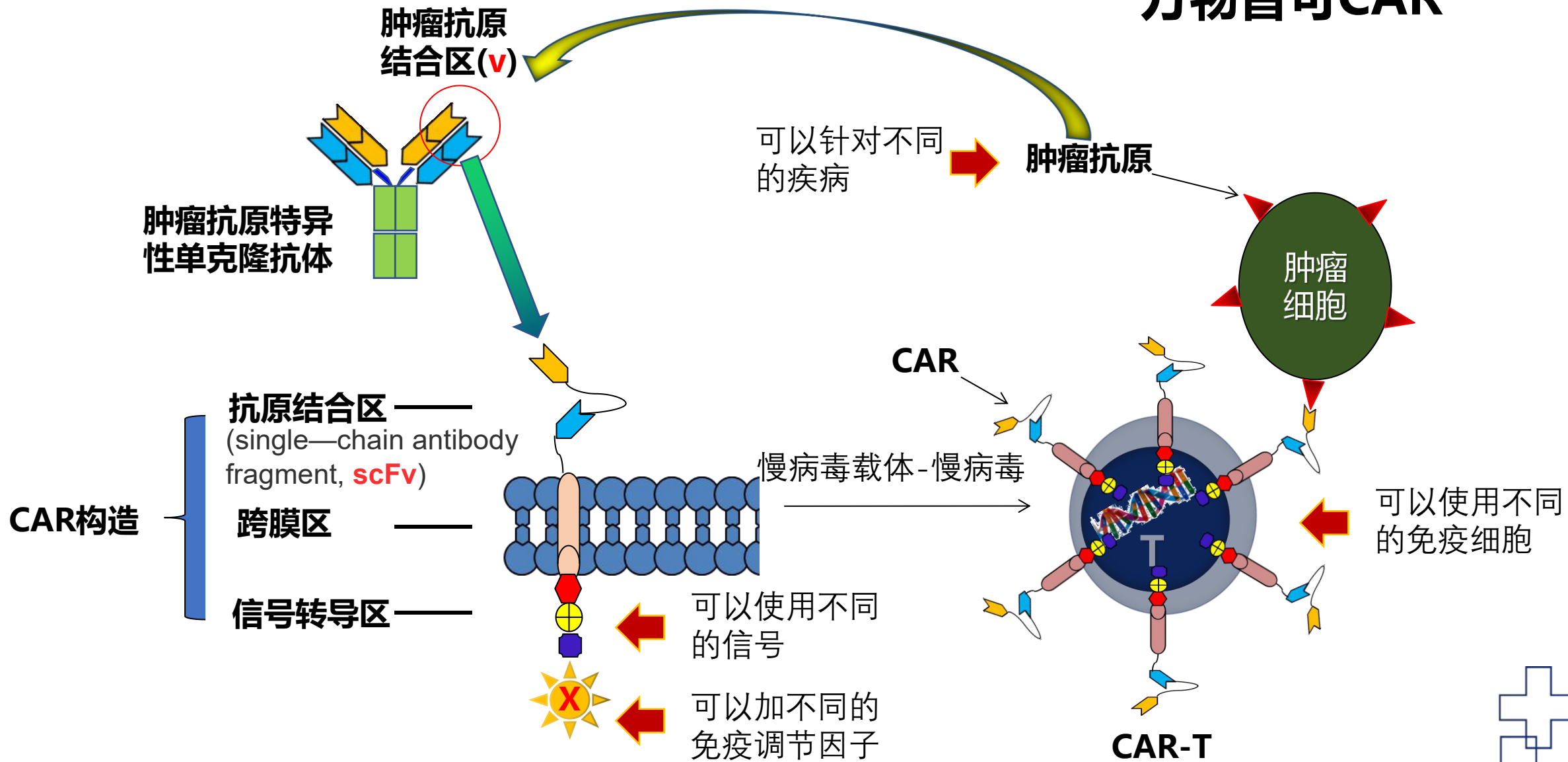


图1 肿瘤众多逃逸策略



CAR-T原理

万物皆可CAR



二、实验中阶段

(一) 项目简介 (自主学习) ⊕

(二) 实验目的 ⊕ 知识; 技能; 素质

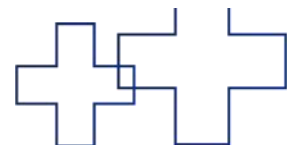
(三) Case-临床疾病 (翻转) ⊕ ▶ 选择case ⊕

(四) 实验内容 ⊕

- ▶ 要求: 实验模式 ⊕
 - 学习模式——有提示
 - 操作模式——提供操作提示
 - 考核模式——没有操作提示, 关键环节出测试题 ⊕ 分值 ⊕ 100分
- 1. 选择治疗方向 ⊕ 目前只有免疫识别
- 2. 选择临床病例 ⊕ 淋巴瘤: 了解肿瘤表面重要标志分子 (肿瘤抗原), 如CD19、CD20
- 3. CAR分子设计 ⊕
- 4. 构建scFv慢病毒表达载体 ⊕
- 5. 慢病毒载体包装 ⊕
- 6. 患者T细胞分选和感染 ⊕
- 7. CAR-T细胞功能鉴定 ⊕
- ★ 8. CAR-T回输 (拓展学习) ⊕

(五) 实验报告 ⊕

整体逻辑、科研思维训练



➤ 一、实验路径和程序

- **登录**: <http://nmuvsetsp.njmu.edu.cn/Index.aspx>
- 输入账号密码 (账号: 学号, 密码: 学号@Njyk)
- 或统一身份验证登录 (近期因申报不可用)



南京医科大学
NANJING MEDICAL UNIVERSITY

虚拟仿真实验教学共享平台

登录 | 注册

| 专业大类: 全部(84) 公共事业管理类(2) 护理学类(4) 基础医学类(14) 口腔医学类(5) 临床医学类(19)
生物医学工程类(3) 药学类(4) 医学人文学类(2) 医学影像学类(1) 预防医学类(30)

| 课程年份: 全部 2016(4) 2017(17) 2018(1) 2019(5) 2020(19) 2021(12) 2022(20) 2023(6)

| 课程搜索:

学院

请选择学院



项目名称

请输入课题名称

立即搜索

重置

LOGIN
用户登录

南京医科大学虚拟仿真实验教学共享平台

请输入账号

请输入密码

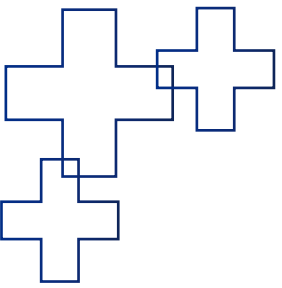
请输入验证码



立即登录

取消

统一身份验证登录



- 登陆成功后搜索项目“肿瘤免疫治疗”
- 点击项目进入

| 专业大类: **全部(84)** 公共事业管理类(2) 护理学类(4) 基础医学类(14) 口腔医学类(5) 临床医学类(19)
生物医学工程类(3) 药学类(4) 医学人文学类(2) 医学影像学类(1) 预防医学类(30)

| 课程年份: **全部** 2016(4) 2017(17) 2018(1) 2019(5) 2020(19) 2021(12) 2022(20) 2023(6)

| 课程搜索: 学院 项目名称

校级实验资源 院级实验资源

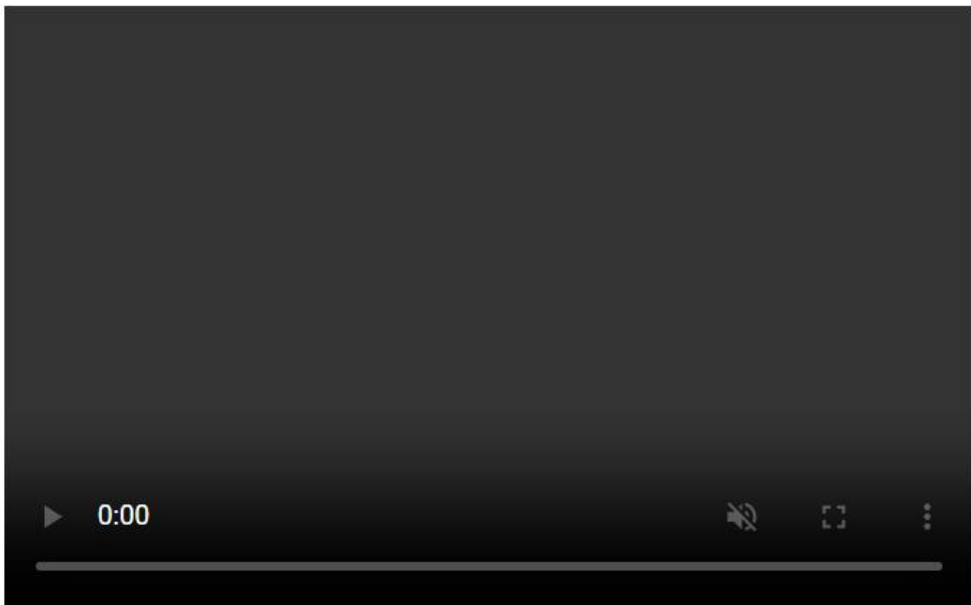
南京医科大学
NANJING MEDICAL UNIVERSITY

肿瘤免疫治疗CAR-T虚拟仿真实验

临床 基础 科研 难点 热点 肿瘤免疫 GPS T

肿瘤免疫治疗的虚拟仿真实验...
基础医学类 990 525

➤ 浏览教学引导视频、实验介绍、实验必读、预习等，尤其是**教学引导视频和预习内容**，对于顺利完成实验帮助很大



肿瘤免疫治疗的虚拟仿真实验——从基础到临床

学院：基础医学院

所属学科：基础医学类

专业门类：基础医学

项目申报人：徐娟

课程年份：2021

课时数：3

课程唯一编号：202106

实验简介：

CAR-T是目前临床与科研上应用和研究最广泛的肿瘤免疫治疗方法之一，其发展迅速、潜力巨大，但同时也具有如步骤复杂、周期很长、非常昂贵、成功率不高、有毒副作用等限制，因此尤其适合虚拟仿真实验。本项目从临床案例入手，完整呈现CAR-T的自主设计、制备及功能，沟通免疫学基础理论与临床疾病和科研探究，帮助学习者了解免疫治疗的基本原理和流程，提高知识的综合运用能力，培养初步的临床思维、批判...[查看更多](#)

▶ 实验简介视频

▶ 教学引导视频

我要做实验

返回

☰ 实验介绍

实验必读

预习

自测

评论



南京医科大学
NANJING MEDICAL UNIVERSITY

实验教学目标

实验原理

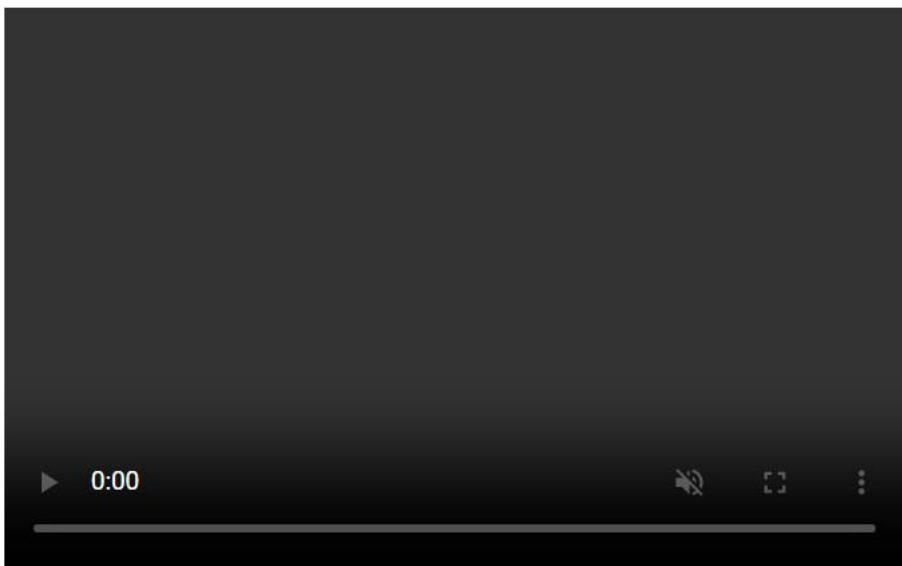
实验教学过程与实验方法

实验步骤

实验结果与结论



➤ 点击“我要做实验”进入项目



▶ 实验简介视频

教学引导视频

肿瘤免疫治疗的虚拟仿真实验——从基础到临床

学院：基础医学院

所属学科：基础医学类

专业门类：基础医学

项目申报人：徐娟


课程年份：2021

课时数：3

课程唯一编号：202106

实验简介：

CAR-T是目前临床与科研上应用和研究最广泛的肿瘤免疫治疗方法之一，其发展迅速、潜力巨大，但同时也具有如步骤复杂、周期很长、非常昂贵、成功率不高、有毒副作用等限制，因此尤其适合虚拟仿真实验。本项目从临床案例入手，完整呈现CAR-T的自主设计、制备及功能，沟通免疫学基础理论与临床疾病和科研探究，帮助学习者了解免疫治疗的基本原理和流程，提高知识的综合运用能力，培养初步的临床思维、批判...[查看更多](#)



我要做实验

返回





进入项目后

➤ 学习项目简介、项目原理、拓展实验、参考文献等。

可以重点学习简介中“**3.项目原理-3.2.2 CAR分子的结构**”，里面有详细的各代CAR分子设计

ps：由于经费、实验时长等原因，本项目简化了很多常规实验方法和操作，如果感兴趣，可在**拓展实验**里了解相关实验。

还有相关实验细胞株及小鼠模型介绍



二、实验过程注意事项

(一) 选择一种模式进入实验 (首先用“**学习模式**”反复训练, 熟悉后再用“**考核模式**”检验学习效果、得出实验成绩)

学习模式可以选择右上角“**固定**”和“**标签**”按钮, 可帮助快速找到视野和要做的实验及实验器材、目标提示等。

操作过程中使用移液器等器材**不要着急, 等它反应, 拖快了容易死机。**

拖放器材试剂等要大致放到指定位置才行, 不然放不住

如果杀毒软件、网站拦截等干扰, 就需要关掉

(二) 进入具体实验——（可对照着PPT一步步操作）

1. 选择治疗方向：目前只能选择**⑥免疫细胞识别**，其他暂未完成。
2. 选择临床病例：只有**06淋巴瘤**，其他暂未完成。学习病例，了解病例相关指标

第一部分：CAR-T的设计和慢病毒载体构建

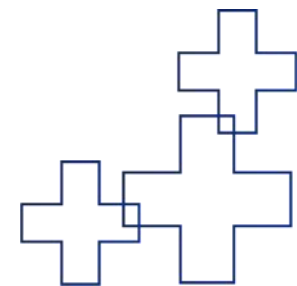
3. CAR设计：CAR分子包含三个部分，抗原结合区、跨膜区和信号转导区

这里涉及到对CAR分的设计原理、基本组成构造等背景知识的理解。

可以根据自己学习的基础知识去设计。

理论上可以随意组合设计，但是只有符合要求的设计最终可以在细胞表面表达CAR分子并可以被荧光试剂检测到，从而完成实验，**不正确的设计由于表达失败、无法检测或效果不佳实验中途失败**。可以在学习模式尝试多种组合。

针对本项目，**正确的组合只有8种**。

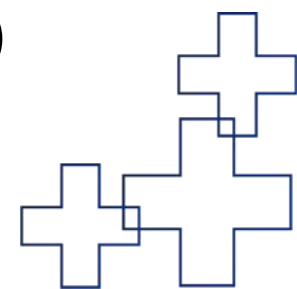


3.1 选择CAR受体的基因，即抗原结合区基因，也就是肿瘤抗原的特异性单抗V区基因（包含VH+VL），本项目针对的是淋巴瘤，所以需要知道淋巴瘤的表面分子抗原有哪些（比如案例中阳性的分子CD19和CD20）。可以单选CD19VH+VL，或者同时选择2个，但是**抗-CD19VH+VL需要放在前面**。这是目前临床上治疗淋巴瘤最常用的CAR设计，同时也是为了避免程序设计过于复杂增加费用一个措施，方便后面用**CD19-FITC荧光蛋白检测表达的CAR分子（抗-CD19 V区）**

3.2 选择CAR信号分子基因：本项目将跨膜区和信号转导区混在一起简化，其中**跨膜区**没做其他设计，只有一个选择是**CD8a**，项目简介里有文献中提供的有各种选择，包括CD8a。**信号转导区**，包含 1) **共刺激域分子**（教材中学习的是**CD28**，简介里提供的还有**4-1BB**可以选择）和 2) **信号转导结构域**（哪个分子传递TCR抗原识别信号——**CD3ζ**）



顺序一定要对！



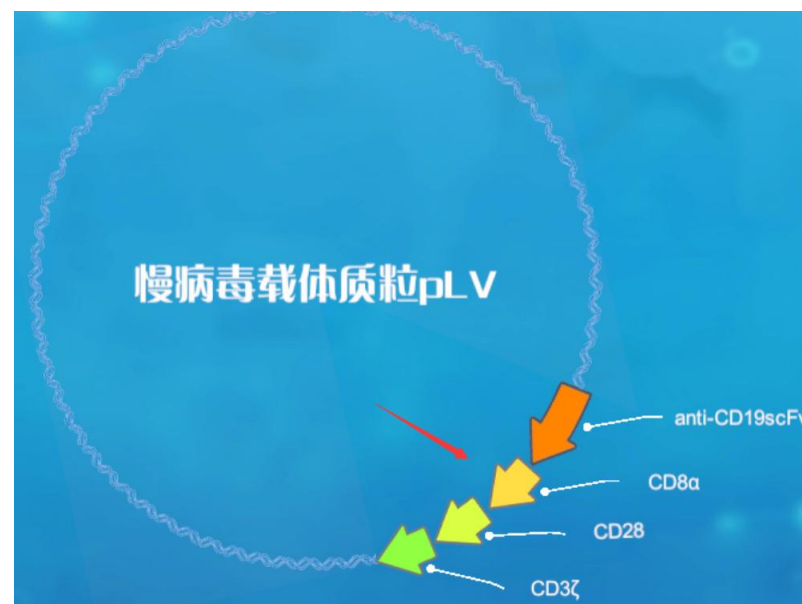
4. 构建scFv慢病毒表达载体

4.1 载体质粒酶切： 只提供了一个质粒载体示意图，需要将内切酶拖到合适的位点（多克隆位点MSC，可以插入外源目的基因）

4.2 载体质粒与目的基因连接： 根据第三步的设计得出基因连接产物（省略掉相关生物化学步骤，最后得出的就是按照你之前选择基因的顺序，最后表达的蛋白分子也是同样的顺序）



CAR设计时的基因顺序



插入载体质粒的基因顺序

第二部分：慢病毒载体包装

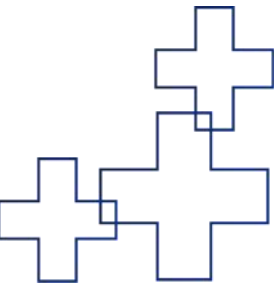
5.1观察包装细胞HEK-293T细胞：细胞密度拖动数值条在**70-80%即为良好**，这个范围自主选择即可都是正确的，并且决定你最后的转染效率。低于70%或高于80%不利于下一步转染

5.2共转染：以一个选择题省略掉了转染的繁琐步骤。只需**选择所有需要用的质粒和转染试剂**即可获得待转染混合物（质粒和转染可复习微生物及生化）。

需要用到的质粒包括：2个包装质粒pMD2.G、psPAX，慢病毒载体质粒pLV；

转染试剂：lipo3000、P3000

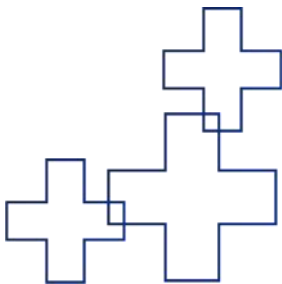
最后由包装细胞产出带有目的基因质粒的慢病毒（动画显示）



5.3 检测病毒滴度：省略掉了病毒离心浓缩等实验操作和计算，直接选择**0.5ul病毒液**，加入Jurkat细胞，孵育后取细胞，加CD19-FITC荧光蛋白，流式检测。5.1设置的细胞密度，与这里C组CAR分子表达百分比是对应的，**记住C图实验组的CAR分子表达阳性率百分比数值，后一步实验需要用到。**

如果设计的**CAR分子基因选择及连接顺序正确**，则CAR可以表达在Jurkat细胞表面，且可以**被CD19-FITC荧光蛋白识别、检测到**，实验成功，可以进行下一步。

否则实验失败，只能重头开始。ps：为避免反复失败，一定要好好学习相关内容设计正确的CAR



第三部分：分选和感染患者T细胞

6.1 磁珠分选患者T细胞：

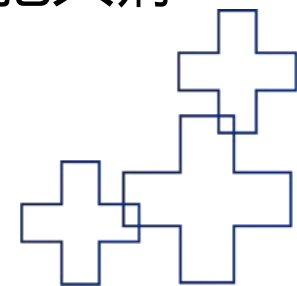
省略了PBMC的分离操作，直接提供一管患者PBMC细胞悬液

需要知道T细胞的特异性表面分子CD3，用**anti-CD3-磁珠单抗**，加入PBMC，利用磁珠分选仪则可以分选指出T细胞（分选过程用动画显示）

6.2 T细胞激活扩增：需要增加细胞数量，为后续的实验做准备。

注意：“调整细胞密度”按钮，拖动数值条到顶端**细胞密度为“ $1 \times 10^6/\text{ml}$ ”**即可（省略掉了细胞密度调节操作）

需要利用基础知识-**激活T细胞的双信号来自CD3和CD28**，用二者的单抗与T细胞共孵育（CD3/CD28双抗偶联磁珠），可以刺激T细胞激活并开始克隆增殖。

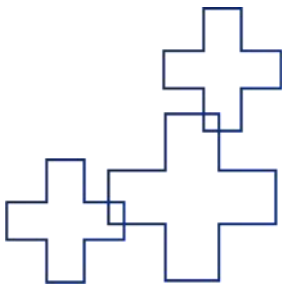


6.3 慢病毒感染患者T细胞。 “调整细胞密度” 按钮，拖动数值条到顶端细胞密度为“ $1 \times 10^6/\text{ml}$ ” 即可，加入病毒液孵育

6.4 流式检测。 “调整细胞密度” 按钮，拖动数值条到顶端细胞密度为“ $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ ” 即可。

最后观察流式结果，C组图为患者T细胞表达CAR分的百分比，大于30%即说明CAR-T制备成功。

动画显示自己设计的CAR分子结构模拟图。进行下一步功能实验。



第四部分：CAR-T功能鉴定

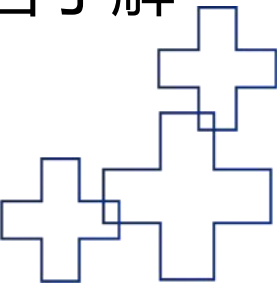
7.1 CAR-T细胞体外杀伤实验。将CAR-T加入细胞后，**动画显示CAR-T杀死肿瘤细胞株Raji细胞**，释放LDH（项目资料里有背景介绍），对照组未转染CAR分子的T细胞则不能杀死肿瘤细胞。

ELISA可检测释放的LDH水平（提示CAR-T具备杀伤功能）和细胞因子水平（提示CAR-T可以被激活并释放细胞因子，同时可监测活化水平）

7.2 CAR-T细胞体内功能实验。使用的淋巴瘤小鼠模型。对照组注射未转染CAR分子的T细胞，实验组注射CAR阳性-T细胞。

生存率观察CAR-T对于小鼠的保护作用

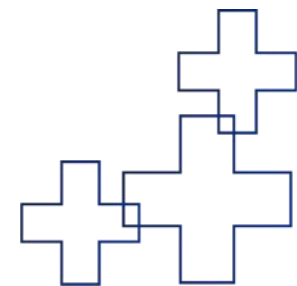
活体成像仪活体成像，观察小鼠体内肿瘤负荷变化（学习背景资料-拓展实验内容了解原理）。实验组CRA-T可以杀死肿瘤细胞延缓肿瘤扩增



第五部分：临床回输

8.1 CAR-T回输。此部分未实施。仅显示结果。背景资料可以学习各种设计的临床效果

9. 提交实验报告，查看实验完成情况。节点图红色显示做错的步骤，灰色是未做的步骤，蓝色是操作正确的步骤。鼠标移至相关节点可显示节点的内容，如果做错或没做，可以再次尝试。将**成绩页另存为PDF**或**截取成绩**



实验成绩

下面的每一个节点：

蓝色代表正确

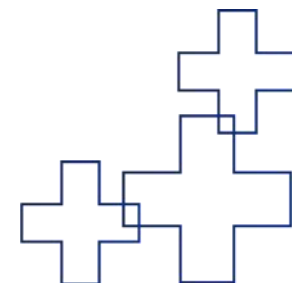
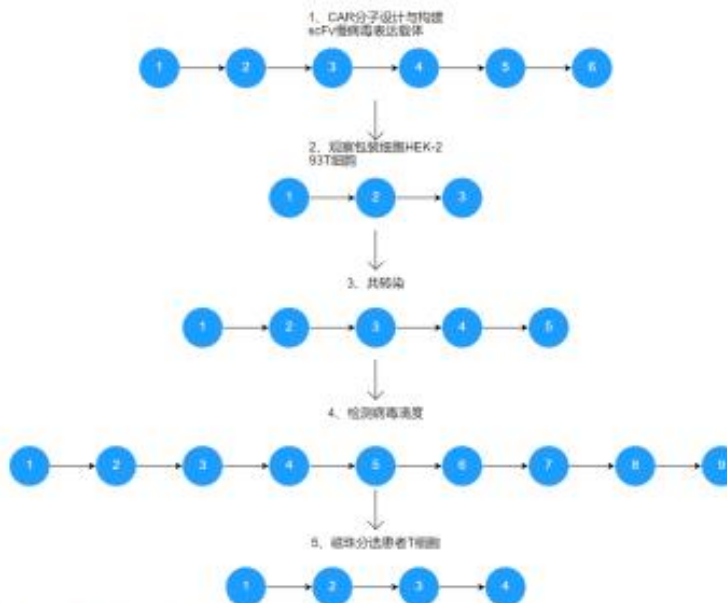
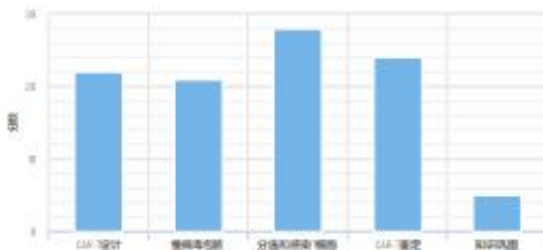
灰色代表未做

红色代表错误

移动鼠标到节点上可显示
此步操作情况

100分
优秀

名称	得分	占比	排名
CAR-T设计	100	22%	22
病毒毒包装	100	21%	21
分选和感染病毒	100	28%	28
CAR-T鉴定	100	24%	24
细胞问题	100	0%	6
			总分: 100



恭喜你完成挑战!

Thanks

