

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.003

双靶点 CD38/CD138 CAR-T 细胞的构建及其对多发性骨髓瘤细胞的体外杀伤效果

潘璐^{1,2a}, 刘航宇³, 王景鸿^{2a}, 孙大玮^{2b}, 赵松柏^{2c}, 鞠吉雨¹, 宋绚丽⁴ (1. 山东第二医科大学基础医学院 免疫学教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 山东第一医科大学附属省立医院 a. 临床医学检验部, b. 医学影像科, c. 中心实验室, 山东 济南 250021; 3. 临沂市莒南县人民医院 检验科, 山东 临沂 276600; 4. 济南市疾病预防控制中心 细菌性疾病检验所, 山东 济南 250021)

[摘要] **目的:** 构建靶向 CD38 和 CD138 分子抗原的双靶点嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞 (CD38/CD138 CAR-T 细胞), 探讨其对多发性骨髓瘤 (MM) 细胞的体外杀伤作用。 **方法:** 利用 CAR-T 细胞技术, 基于 MM 细胞高表达 CD38 和 CD138 抗原, 分别构建靶向 CD38、CD138 的 CD38 CAR-T 与 CD138 CAR-T 细胞, 以及同时靶向 CD38 与 CD138 的 CD38/CD138 CAR-T 细胞, 实验分为未处理 T、CD38 CAR-T、CD138 CAR-T 和 CD38/CD138 CAR-T 细胞组。采用流式细胞术检测 CAR-T 细胞的表型, 利用 LDH 释放法检测各种 CAR-T 细胞对 MM 细胞 RPMI8226 和 U266 的体外杀伤作用。 **结果:** 成功构建 CD38 CAR-T、CD138 CAR-T 和 CD38/CD138 CAR-T 细胞。CD38/CD138 CAR-T 细胞倾向于向记忆表型分化, 表达较高水平的增殖分子 (CD25)、激活分子 (CD27) 和较低水平的耗竭分子 (PD-1、CTLA-4、TIM-3) (均 $P < 0.001$), 而且 CD38/CD138 CAR-T 细胞不易于耗竭和衰老, 且表达较低水平的 r-H2AX、p-p53、p21 和 p16 蛋白 (均 $P < 0.01$)。在不同效靶比条件下, CD38/CD138 CAR-T 细胞较 CD38 CAR-T、CD138 CAR-T 细胞对 RPMI8226 和 U266 细胞具有更强的杀伤作用 (均 $P < 0.001$)。 **结论:** 靶向 CD38 和 CD138 治疗 MM 的 CD38/CD138 CAR-T 细胞在体外具有较优表型及较强的抗肿瘤功能。

[关键词] 多发性骨髓瘤; 嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞; CD38/CD138 CAR-T 细胞; 免疫治疗

[中图分类号] R733.3; R730.51; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 12-1186-08

Construction of CD38/CD138 dual-targeted CAR-T cell and its *in vitro* cytotoxicity against multiple myeloma cells

PAN Lu^{1,2a}, LIU Hangyu³, WANG Jinghong^{2a}, SUN Dawei^{2b}, ZHAO Songbo^{2c}, JU Jiyu¹, SONG Xuanli⁴ (1. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, Shandong, China; 2. a. Department of Clinical Laboratory Medicine; b. Department of Medical Imaging; c. Central Laboratory, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China; 3. Clinical Laboratory, Junan People's Hospital of Linyi City, Linyi 276600, Shandong, China; 4. Institute of Bacterial Disease Laboratory, Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021, Shandong, China)

[Abstract] Objective: To construct dual-targeting (CD38 and CD138) chimeric antigen receptor (CAR) gene-modified T cells (CD38/CD138 CAR-T cells) and explore their *in vitro* cytotoxicity against multiple myeloma (MM) cells. **Methods:** Based on the high expression of CD38 and CD138 antigens in MM cells, CD38 CAR-T cells and CD138 CAR-T cells targeting CD38 and CD138 respectively, and CD38/CD138 dual-targeted CAR-T cells targeting both CD38 and CD138 were constructed using CAR-T cell technology. The experimental groups included untreated T cells, CD38 CAR-T, CD138 CAR-T, and CD38/CD138 CAR-T cells. The phenotype of CAR-T cells was detected by flow cytometry. The cytotoxicity of various CAR-T cells against MM cells (RPMI8226 and U266) was assessed using the LDH release assay. **Results:** Three types of CAR-T cells, CD38 CAR-T, CD138 CAR-T, and CD38/CD138 CAR-T cells, were successfully constructed. The CD38/CD138 CAR-T cells tended to differentiate into a memory phenotype, expressing higher levels of proliferation marker (CD25), activation marker (CD27), and lower levels of exhaustion markers (PD-1, CTLA-4, TIM-3) (all $P < 0.001$). Moreover, CD38/CD138 CAR-T cells were less prone to exhaustion and senescence, and expressed lower levels of r-H2AX, p-p53, p21, and p16 proteins (all $P < 0.01$). Under different effector-to-target cell ratios, CD38/CD138 CAR-T

[基金项目] 山东省自然科学基金 (No. ZR2023QC179)

[作者简介] 潘璐 (1993—), 女, 硕士生, 主管技师, 主要从事临床检验研究。E-mail: 735959316@qq.com。

[通信作者] 鞠吉雨, E-mail: jujiyu@163.com; 宋绚丽, E-mail: 787764302@qq.com

cells exhibited stronger cytotoxic effects against RPMI8226 and U266 cells compared to CD38 CAR-T and CD138 CAR-T cells (all $P < 0.001$). **Conclusion:** CD38/CD138 CAR-T cells targeting both CD38 and CD138 demonstrate an optimal phenotype and enhanced anti-tumor activity *in vitro*, offering promising potential for immunotherapy in multiple myeloma.

[Key words] multiple myeloma (MM); chimeric antigen receptor gene-modified T lymphocyte (CAR-T cell); CD38/CD138 CAR-T cell; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1186-1193. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.003]

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞恶性肿瘤, 其特征是浆细胞恶性增殖, 伴有单克隆免疫球蛋白的过量产生和终末器官的损伤^[1]。随着人们对 MM 发病机制认识的不断深入和新型治疗药物的应用, MM 患者的生存结局得到了极大的改善^[2]。但是由于耐药性的发生, 大多数 MM 患者终因为肿瘤复发而死亡。因此, 迫切需要开发新的治疗策略。近年来, 多款自体靶向 CD19 的嵌合抗原受体基因修饰 T 淋巴细胞 (chimeric antigen receptor gene-modified T lymphocyte, CAR-T 细胞) 被批准用于治疗 B 细胞恶性肿瘤^[3]。然而, CAR-T 细胞疗法目前仍存在一定局限性, 主要包括细胞因子释放综合征、脱靶等^[4]。针对因抗原丢失而引起的免疫逃逸现象, 采用多抗原靶向策略可在一定程度上有效克服这一挑战^[5]。CD38 和 CD138 是 MM 细胞表面高表达的特异性分子, 目前针对这两个分子的 MM 治疗实验研究较多; 同时基于 CD138 CAR-T 细胞已被初步证实可有效杀伤 MM 细胞的临床试验结果^[6], 本实验室分别构建了三种特异性靶向 MM 细胞的 CAR-T 细胞: CD38 CAR-T 细胞、CAR CD138-T 细胞和双靶点 CD38/CD138 CAR-T 细胞, 通过分析这三种 CAR-T 细胞的表型和对 MM 细胞的体外杀伤作用, 为临床治疗 MM 提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人 MM 细胞 RPMI8226 和 U266 购于武汉尚恩生物技术有限公司。RPMI 1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司, X-VIVO 培养基购自瑞士 Lonza 公司, CD3、CD38、CD138、CD25、CD27 和 PD-1 抗体均购自美国 BD 公司, CTLA4、TIM-3 抗体购自 Biolegend 公司, 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒购自 Sigma 公司, 人 CD3/CD28 激活磁珠购自 STEMCELL 公司, CD3 ζ 、 γ -H2AX、p16、p53 抗体购自美国 Cell signaling Technology 公司, p21、BCL-2、BCL-XL、caspase-3、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗人 IgG H&L 均购自美国 Proteintech 公司。

1.2 靶细胞的培养

RPMI8226 和 U266 细胞在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养, 待细胞抱团达到大小适合

时进行分皿。外周血 T 细胞在含有 50 U/mL IL-2 的 X-VIVO 培养基中培养。所有细胞均在含有 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 流式细胞术检测 RPMI8226 和 U266 细胞表面 CD38 和 CD138 分子的表达

取密度为 1×10^6 个 RPMI8226 和 U266 细胞, 分别与 APC 荧光标记的 CD138 抗体和 FITC 荧光标记的 CD38 抗体按照说明书比例混合, 室温避光孵育 30 min。使用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次, 以去除未结合的抗体, 随即上流式细胞仪检测。设对照组, 即未经 CD138、CD38 抗体处理的 RPMI8226 和 U266 细胞, 以分析非特异性荧光表达情况。

1.4 CAR 的构建

本研究构建的是第二代 CAR, 通过酶切酶联技术将 CD38 及 CD138 的单链可变抗体 (scFv) 序列整合至慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 上。在 scFv 序列前添加信号肽, 其后依次是人 Fc 序列、共刺激因子 CD28 和 CD3 ζ 序列, 通过 T2A 序列将 CD38 及 CD138 的 scFv 序列串联, 形成 CD38/CD138 CAR。

1.5 利用密度梯度离心法获取 T 细胞

抽取健康志愿者外周血 5~10 mL (事先均已告知并签署知情同意书), 将同体积的 PBS 加入抗凝外周血中混匀。在新的离心管中加入 Ficoll, 然后将外周血-PBS 混合物贴壁缓慢加入到 Ficoll 上方, 避免与 Ficoll 混合。以 $800 \times g$ 离心 20 min, 升速设为 5, 降速保持 0。吸取界面白膜层, 即得到外周血单个核细胞 (PBMC)。最后, 加入 T cell TransAct 激活试剂, 培养 48 h 后, 获得的细胞即为 T 细胞。

1.6 CAR-T 细胞的构建

采用吉凯公司包装的病毒对激活的 T 细胞进行感染, 使用 CD3/CD28 磁珠激活 48 h 即可对 T 细胞进行感染。在 48 孔板中进行病毒感染, 每孔接种 1×10^5 个 T 细胞, 加入 MOI 为 20 的病毒。12 h 后, 每孔补加 200 μ L X-VIVO 15 培养基, 继续培养 24 h。随后, 浆细胞转移至 6 cm 培养皿中进行培养并进行扩增, 得到 CD38 CAR-T、CD138 CAR-T 和 CD38/CD138 CAR-T 细胞。通过绿色荧光蛋白 (GFP) 法、流式细胞术及 WB 法检测各 CAR-T 细胞的阳性率。

1.7 流式细胞术检测 CAR-T 细胞表型

收集未处理 T 细胞和各组 CAR-T 细胞, 以未处

理T细胞为阴性对照组。将T细胞移至1.5 mL离心管(1×10^6 个/管)中,后加入1 μ L的流式抗体,在37 $^{\circ}$ C下避光孵育15 min后,每管加入500 μ L PBS缓冲液,以 $800 \times g$ 离心3 min,经3次洗涤和过滤后,以CytoFlex流式细胞仪分析CAR-T细胞的表型。

1.8 WB法检测CAR-T细胞中衰老与凋亡相关蛋白的表达

收集各组细胞,用PBS清洗后,用蛋白裂解液提取细胞的总蛋白,BCA试剂测定蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液,将样品在金属浴中100 $^{\circ}$ C煮沸10~20 min。经过SDS-PAGE电泳和转膜后,在5%脱脂牛奶液中封闭1~2 h。接着,加入稀释至1:1 000的H2AX、p21、p16、p53、p-p53、BCL-2、BCL-XL、caspase-3,以及稀释至1:2 000的CD3 ζ 和稀释至1:5 000的 β -actin抗体,4 $^{\circ}$ C下处理10~12 h。之后,在稀释至1:5 000的HRP标记的兔抗人IgG中处理2 h。清洗3遍后,使用化学发光成像系统显影,利用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 LDH释放法检测CAR-T细胞对MM细胞的体外杀伤效率

采用CBA(CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay)法对CAR-T细胞的杀伤能力进行评估。将RPMI8226、U226细胞接种于24孔板(1×10^5 个/孔)中,根据设定的效靶比(1:1和2:1),向各孔内加入各组CAR-T细胞或和未处理T细胞,轻轻吹打、混匀。同时,

设置仅含靶细胞和仅含效应细胞的单独孔,每孔的总体积为1 mL,共培养18 h后收集细胞,离心后保留上清液;弃掉靶细胞组上清液,保留细胞,加入裂解液处理45 min以完全释放LDH,然后离心取上清作为母孔样本。从每组样本取50 μ L上清液加入到96孔板,再加入50 μ L检测试剂,避光作用30 min后,每孔加入50 μ L终止液。在1 h内,使用酶标仪检测490 nm波长处的光密度(D)值。根据公式计算细胞杀伤率:杀伤率=(实验组D值-效应细胞自然死亡D值-靶细胞自然死亡D值)/(靶细胞完全死亡D值-靶细胞自然死亡D值) $\times 100\%$ 。

1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism5软件对实验数据进行分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表述,两组间比较采用Student's *t*检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MM细胞表达较高水平的CD38和CD138分子

流式细胞术检测结果显示,经荧光抗体处理的RPMI8226和U266细胞表面均高表达CD138,其阳性表达率分别为95.1%和98.5%(图1A、B);RPMI8226和U266细胞表面的CD38阳性表达率分别为98.5%和14.2%(图1C、D)。结果表明,MM细胞均表达CD138和CD38分子,可作为该研究的靶细胞。

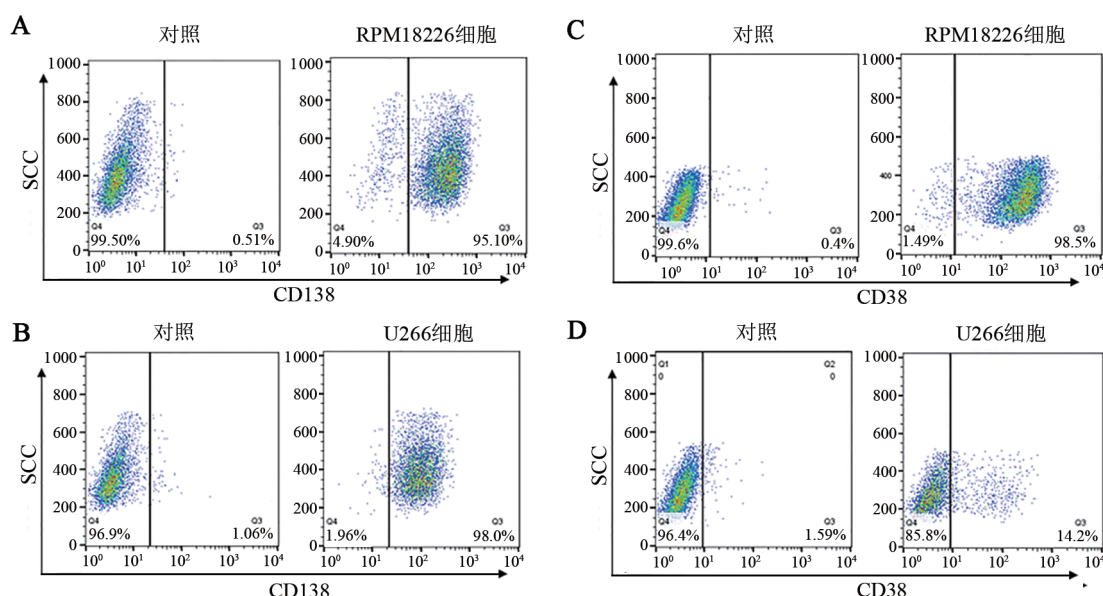


图1 流式细胞术检测RPMI8226细胞(A、C)和U266细胞(B、D)表面CD138和CD38分子的表达

2.2 成功构建高表达CD138和CD38的CAR-T细胞

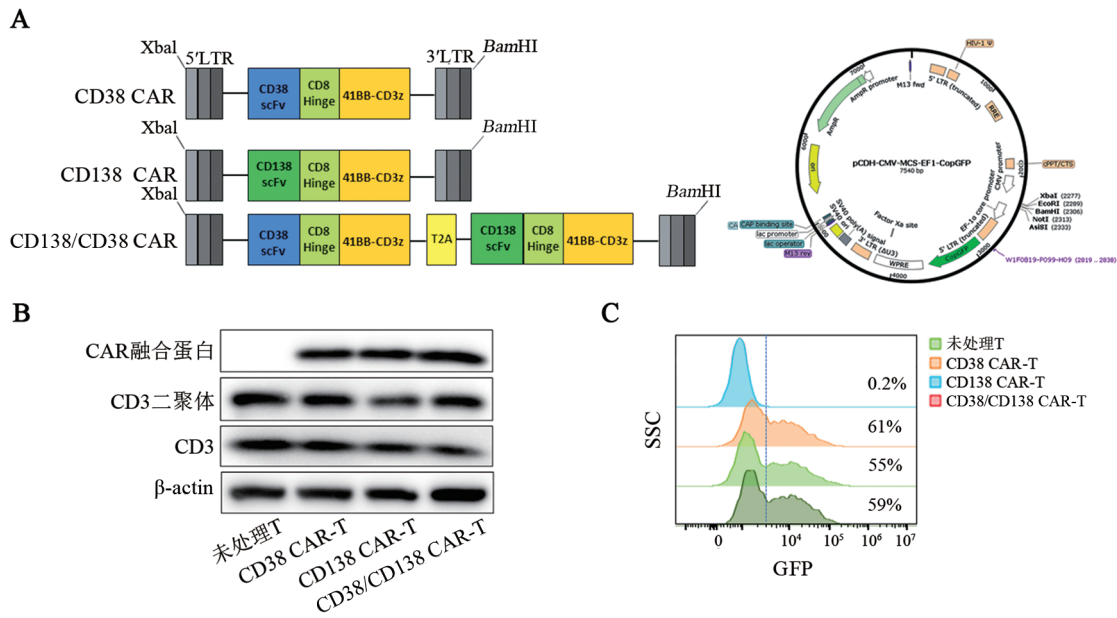
利用CD3/CD28激活磁珠对T细胞进行激活,成功构建了靶向CD138及CD38分子的CAR(图2A);通过慢病毒感染,获得表达CD138、CD38、CD138/

CD38分子的3组CAR-T细胞。WB法检测结果(图2B)显示,各组CAR-T细胞均表达CAR融合蛋白(70 kD左右),说明构建CAR-T细胞成功。流式细胞术检测结果(图2C)显示,3组CAR-T细胞阳性率

均在 50% 以上。结果表明, 成功构建高表达 CD138 及 CD38 分子的 3 组 CAR-T 细胞, 可以进行后续实验。

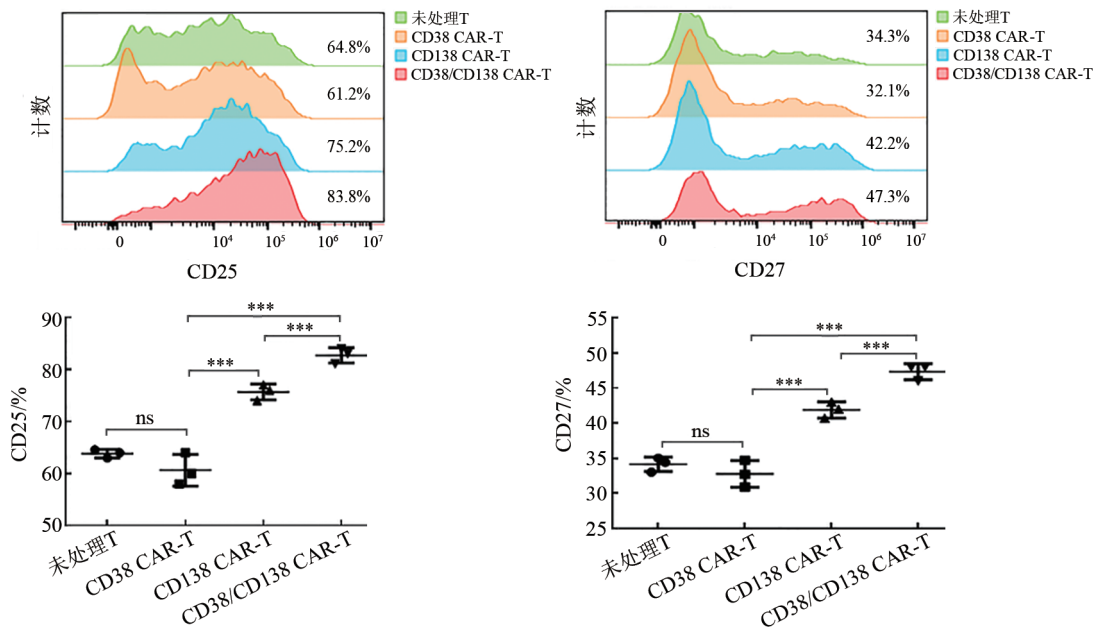
2.3 CD38/CD138 CAR-T 细胞表达较高水平激活分子 CAR-T 细胞的激活水平往往与 CAR-T 细胞功能呈正相关关系。CD25 是 IL-2 受体链, CD27 属于 T 细

胞共刺激分子家族, 两者常被视为 CAR-T 细胞增殖及激活的标志物^[7]。通过抗原刺激后, 流式细胞术检测结果(图 3)显示, 与 CD38 CAR-T 和 CD138 CAR-T 细胞相比, CD38/CD138 CAR-T 细胞表达较高水平的 CD25、CD27 分子(均 $P < 0.001$)。结果说明, CD25 与 CD27 双靶点更易于激活 CAR-T 细胞。



A: CAR 的结构示意图; B: WB 法检测 CAR 融合蛋白的表达; C: 流式细胞术检测 CAR-T 细胞 GFP 的表达。

图 2 成功构建 CD38 CAR-T、CD238 CAR-T、CD38/CD38 CAR-T 细胞



*** $P < 0.001$; ns: 差异无统计学意义。

图 3 流式细胞术检测 CAR-T 细胞表面激活分子 CD25(A) 和 CD27(B) 的表达

2.4 CD38/CD138 CAR-T 细胞不易于耗竭

慢病毒感染后 10 d 的 CAR-T 细胞与靶细胞共培养后, 流式细胞术检测结果(图 4)显示, CD38/CD138

CAR-T 细胞表达较低水平的 PD-1、CTLA-4 和 TIM-3 分子(均 $P < 0.001$)。结果表明, 双靶点 CD38/CD138 CAR-T 细胞在抗原刺激下更不易于耗竭。

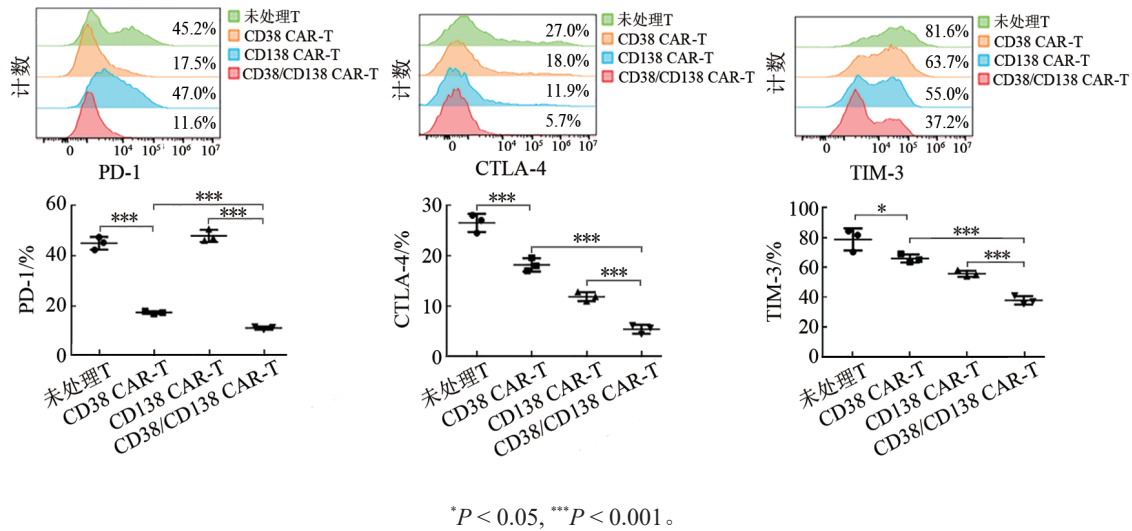
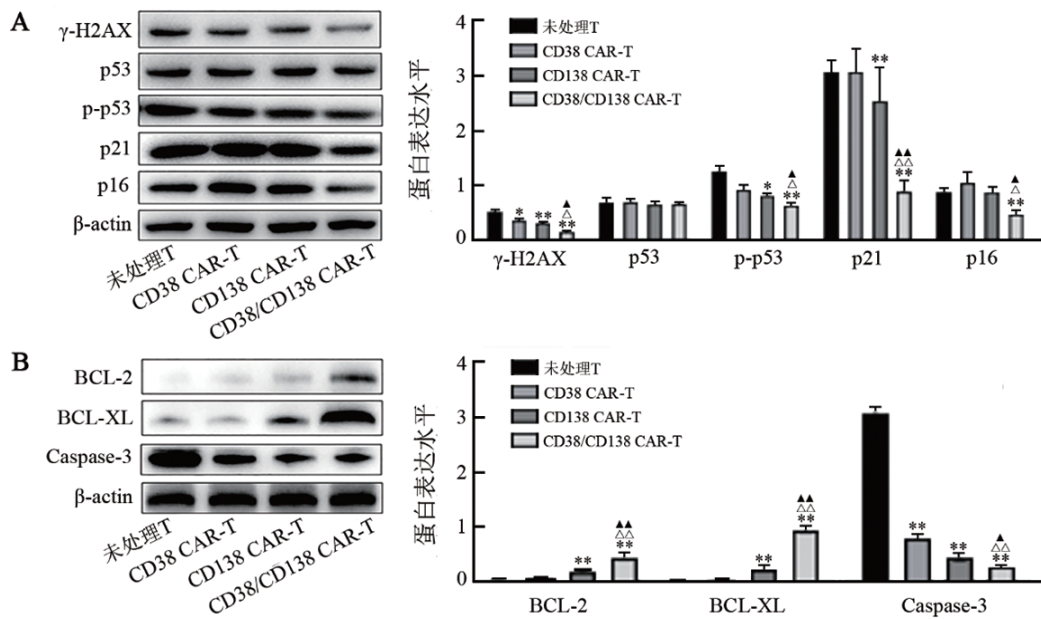


图4 流式细胞术检测CAR-T细胞表面PD-1(A)、CTLA-4(B)和TIM-3(C)分子的表达

2.5 CD38/CD138 CAR-T细胞不易于衰老与凋亡

3组CAR-T细胞与靶细胞共培养后, WB法检测结果显示, CD38/CD138 CAR-T细胞表达较低水平的衰老相关分子 γ -H2AX、p53、p16 和 p21 (图 5A, $P < 0.01$), 说明CD38/CD138 CAR-T细胞更不易于衰

老。在培养20 d左右时, WB法检测CAR-T细胞凋亡相关分子, 发现CD38/CD138 CAR-T细胞表达更高水平的BCL-2、BCL-XL, 表达更低水平的caspase-3 (图 5B, $P < 0.01$)。结果说明, CD38/CD138 CAR-T细胞不易于凋亡。



与未处理T细胞组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与CD38 CAR-T细胞组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与CD138 CAR-T细胞组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图5 WB法检测CAR-T细胞衰老(A)及凋亡(B)水平

2.6 CD38/CD138 CAR-T细胞体外对MM细胞具有较强的杀伤效率

将各组效应细胞分别与靶细胞以效靶比1:1与2:1共培养12 h后, 流式细胞术检测结果显示, CD38/CD138 CAR-T细胞对RPMI8226细胞体外杀

伤率显著高于其他3组细胞, 其中CD138 CAR-T细胞的杀伤效率优于CD38 CAR-T细胞 (图 6A, $P < 0.001$); CD38/CD138 CAR-T细胞对U266细胞的杀伤率显著高于其他3组细胞, 而CD138 CAR-T细胞的杀伤率约两倍于CD38 CAR-T细胞 (图 6B,

$P < 0.001$), 这可能与 U266 细胞表面 CD38 分子低表达有关(图 1D)。另外, 在对两种靶细胞杀伤中, 各组

CAR-T 细胞杀伤效率随着效靶比增加而提高, 尤其 CD38/CD138 CAR-T 细胞的杀伤率最强。

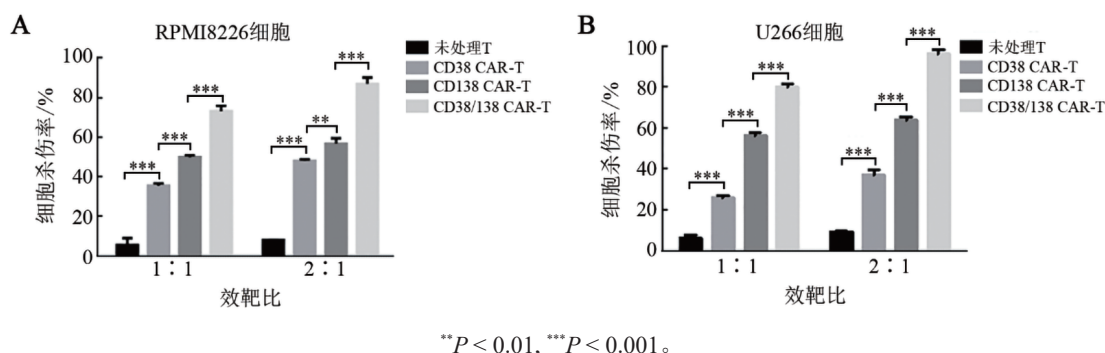


图6 CAR-T细胞体外对MM细胞RPMI8226(A)和U266(B)杀伤效率

3 讨论

MM是一种常见的血液系统恶性肿瘤,其特征是异常免疫球蛋白的释放^[8]。传统的化疗和放疗有较大的缺点,而造血干细胞移植容易引发移植物抗宿主病。尽管近年开发了一些免疫调节剂例如泊马度胺(pomalidomide),但其耐受性问题仍然是不可忽略的挑战^[9]。CAR-T细胞疗法是一种新兴的免疫疗法,大量临床试验^[10-11]表明,CAR-T细胞疗法在治疗多种血液系统肿瘤及实体瘤中具有令人瞩目的疗效。CAR-T细胞疗法最具挑战性的局限性之一是,肿瘤细胞对单抗原靶向CAR构建物的耐药性的问题,虽然针对单一靶点的CAR-T细胞在临床上取得了显著成果,但是依然有大部分患者因为肿瘤抗原丢失而出现免疫逃逸,导致肿瘤复发。例如,尽管70%~90%的复发和/或难治性急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者对靶向CD19的CAR-T细胞治疗表现出持久的反应,但最近的随访数据^[12-13]表明,治疗后期常出现疾病抵抗机制,包括30%~70%的复发性疾病患者在治疗后出现CD19抗原的下调/缺失。同样,在接受靶向B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)的CAR-T细胞治疗的MM患者中,也观察到BCMA表达下调或缺失^[14-16]。在实体瘤中也观察到类似的抗原逃逸抵抗模式。例如,一篇针对胶质母细胞瘤中IL13Ra2的CAR-T细胞治疗病例报告^[17]表明,肿瘤复发时IL13Ra2表达降低。为了降低CAR-T细胞治疗血液系统恶性肿瘤和实体瘤的复发率,许多策略现在依赖于靶向多种抗原。这些方法使用了双CAR结构或串联CAR,这是一种包含两个scFv的单个CAR结构,以便同时靶向多个目标肿瘤抗原。在临床上,这两种策略似乎都可能导致延长的持久缓解率,并且

有一些靶向CD19和CD20或CD19和CD22临床试验^[18]。

研究^[19-20]显示,CD19/CD22 CAR-T细胞疗法对成年ALL和弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)患者有很好的疗效。在实体瘤中,几种串联CAR已经在临床前模型中进行了测试,包括胶质母细胞瘤中的HER2和IL13Ra2、乳腺癌中的HER2和MUC1。在这两种情况下,与单靶点治疗相比,双靶点治疗产生了更好的抗肿瘤反应^[21]。该项研究说明了优化靶抗原选择的重要性,这不仅可以提高抗肿瘤反应,还可以减少抗原逃逸机制,以防止肿瘤复发。MM细胞中除表达BCMA和GPC5D外,还表达许多其他有吸引力的靶抗原,其中CD138、CD38和SLAMF7/CS1是最突出的,所有这些抗原均在MM细胞上高表达。虽然SLAMF7的表达可能随着肿瘤进展而略有降低,但CD38的表达在不同疾病阶段通常不受影响,CD138在难治性和进行性疾病患者的MM细胞中表达更高^[22-24],不同于BCMA等分子,CD138分子在MM生长及增殖过程中起到极其重要的作用。另有研究^[25]表明,靶向CD38分子治疗MM具有良好的治疗效果。然而,所有这些抗原也在其他组织中表达。因此,可以通过精心设计的靶向治疗来利用。这一点已经在靶向CD38的达拉单抗和依沙妥昔单抗中得到证实,该抗体在新诊断和复发/难治性MM患者中具有较好的耐受性^[26]。

本研究中,相较于单靶点CAR-T细胞,CD38/CD138 CAR-T细胞由于是双靶点,通过双共刺激分子刺激,导致CD38/CD138 CAR-T细胞表现更高的激活水平。作为T细胞的经典免疫检查点分子,PD-1、CTLA4与TIM-3严重限制T细胞的功能。研究^[27]发现,通过敲除CAR-T细胞PD-1、CTLA4或

TIM-3, CAR-T细胞的抗肿瘤功能显著提高。本研究结果显示, CD38/CD138 CAR-T细胞在抗原刺激下, 更不易于耗竭, 这与临床上靶向CD19与CD22的CD38/CD138 CAR-T细胞的表型及效果吻合^[28]。CD38/CD138 CAR-T细胞表达较低水平的 γ -H2AX等分子, 说明其衰老水平较低, 这是目前首次检测CAR-T细胞衰老的实验。CD38/CD138 CAR-T细胞同时针对双靶点CD38和CD138, 在与靶细胞作用时能够发挥更强的杀伤作用。

本研究构建双靶点CD38/CD138 CAR-T细胞相对于单靶点CAR-T细胞具有更易于激活、不易于耗竭、衰老和凋亡的优势, 在体外表现出比CD38 CAR-T和CD138 CAR-T细胞更强的杀伤MM细胞的效率。CAR-T细胞疗法和双特异性抗体在治疗MM治疗方面显示出巨大的前景, 两种疗法都已证明能够使一些患者完全缓解, 但这些反应的持续时间可能会有所不同^[29]。本研究的局限性在于未开展体内实验, 但值得肯定的是本研究成功地完成了CD38/CD138 CAR-T细胞对MM细胞的体外杀伤实验, 此为临床治疗MM提供了宝贵的参考依据, 也为未来的研究奠定了坚实的基础。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] RAJKUMAR S V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(7): 719-734. DOI: 10.1002/ajh.24402.
- [2] FACON T, KUMAR S, PLESNER T, *et al.* Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone for untreated myeloma[J/OL]. *N Engl J Med*, 2019, 380(22): 2104-2115[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10045721/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1817249.
- [3] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X Y, *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25[2024-04-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553386/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [4] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 69[2024-04-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33824268/>. DOI: 10.1038/s41408-021-00459-7.
- [5] RODDIE C, LEKAKIS LJ, MARZOLINI MAV, *et al.* Dual targeting of CD19 and CD22 with bicistronic CAR-T cells in patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2023, 141(20): 2470-2482. DOI: 10.1182/blood.2022018598.
- [6] JIANG H, ZHANG W H, SHANG P P, *et al.* Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells[J/OL]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 297-310[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5528539/>. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.12.001.
- [7] ZHAO S B, WANG C H, LU P, *et al.* Switch receptor T3/28 improves long-term persistence and antitumor efficacy of CAR-T cells[J OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(12): e003176[2024-04-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34853180/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-003176.
- [8] RAJKUMAR S V. Treatment of multiple myeloma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(8): 479-491. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.63.
- [9] DIMOPOULOS M A, RICHARDSON P, LONIAL S. Treatment options for patients with heavily pretreated relapsed and refractory multiple myeloma[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2022, 22(7): 460-473. DOI: 10.1016/j.clml.2022.01.011.
- [10] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, *et al.* Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- [11] SCHUSTER S J, BISHOP M R, TAM C S, *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(1): 45-56. DOI: 10.1056/NEJMoa1804980.
- [12] MAUDE S L, TEACHEY D T, PORTER D L, *et al.* CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2015, 125(26): 4017-4023. DOI: 10.1182/blood-2014-12-580068.
- [13] MAJZNER R G, MACKALL C L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(10): 1219-1226. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0442.
- [14] COHEN A D, GARFALL A L, STADTMAUER E A, *et al.* B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma[J/OL]. *J Clin Invest*, 2019, 129(6): 2210-2221[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6546468/>. DOI: 10.1172/JCI126397.
- [15] BRUDNO J N, MARIC I, HARTMAN S D, *et al.* T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma [J/OL]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(22): 2267-2280[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6067798/>. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.8084.
- [16] GREEN D J, PONT M, SATHER B D, *et al.* Fully human bcma targeted chimeric antigen receptor T cells administered in a defined composition demonstrate potency at low doses in advanced stage high risk multiple myeloma[J/OL]. *Blood*, 2018, 132(Supplement 1): 1011[2024-04-22]. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117729>. DOI: 10.1182/blood-2018-99-117729.
- [17] BROWN C E, ALIZADEH D, STARR R, *et al.* Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy[J/OL]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26): 2561-2569[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5390684/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1610497.
- [18] RAFIQ S, HACKETT C S, BRENTJENS R J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3): 147-167. DOI: 10.1038/s41571-019-0297-y.
- [19] HOSSAIN N, SAHAF B, ABRAMIAN M, *et al.* Phase I experience with a Bi-specific CAR targeting CD19 and CD22 in adults with B-cell malignancies[J/OL]. *Blood*, 2018, 132(Supplement 1): 490[2024-04-22]. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110142>. DOI: 10.1182/blood-2018-99-110142.

- [20] DAI H R, WU Z Q, JIA H J, *et al.* Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 30[2024-04-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245502/>. DOI: 10.1186/s13045-020-00856-8.
- [21] WILKIE S, VAN SCHALKWYK M C I, HOBBS S, *et al.* Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(5): 1059-1070. DOI: 10.1007/s10875-012-9689-9.
- [22] KAWANO Y, FUJIWARA S, WADA N, *et al.* Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide[J/OL]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 876-884[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3582943/>. DOI: 10.3892/ijo.2012.1545.
- [23] NIJHOF I S, GROEN R W, LOKHORST H M, *et al.* Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab[J]. *Leukemia*, 2015, 29(10): 2039-2049. DOI: 10.1038/leu.2015.123.
- [24] LISENKO K, SCHÖNLAND S, HEGENBART U, *et al.* Potential therapeutic targets in plasma cell disorders: a flow cytometry study [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017, 92(2): 145-152. DOI: 10.1002/cyto.b.21351.
- [25] LI H W, LI J, WU J Z, *et al.* A second-generation CD38-CAR-T cell for the treatment of multiple myeloma[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(9): 10804-10815. DOI: 10.1002/cam4.5818.
- [26] LONIAL S, DIMOPOULOS M, PALUMBO A, *et al.* Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(7): 621-631. DOI: 10.1056/NEJMoa1505654.
- [27] AGARWAL S, AZNAR M A, *et al.* Deletion of the inhibitory co-receptor CTLA-4 enhances and invigorates chimeric antigen receptor T cells[J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2388-2407. e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.09.001.
- [28] RODDIE C, LEKAKIS L J, MARZOLINI M A V, *et al.* Dual targeting of CD19 and CD22 with bicistronic CAR-T cells in patients with relapsed/refractory large B-cell lymphoma[J/OL]. *Blood*, 2023, 141(20): 2470-2482[2024-04-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10646794/>. DOI: 10.1182/blood.2022018598.
- [29] SZLASA W, DYBKO J. Current status of bispecific antibodies and CAR-T therapies in multiple myeloma[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 134: 112043[2024-11-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38733817/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112043.

[收稿日期] 2024-02-19

[修回日期] 2024-11-05

[本文编辑] 党瑞山