

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.008

## 环状核酸适配体-药物偶联物联合 CAR19-T/NK 细胞增强对急性淋巴细胞白血病细胞的杀伤作用

孔令启<sup>1</sup>, 姜含笑<sup>2</sup>, 贾子璐<sup>2</sup>, 庄博<sup>1</sup>(1. 济宁市第一人民医院 小儿外科, 山东 济宁 272001; 2. 济宁医学院 临床医学院, 山东 济宁 272067)

**[摘要]** **目的:** 探究环状核酸适配体-药物偶联物(ApDC)联合抗 CD19 嵌合抗原受体 T/NK(CAR19-T/NK)细胞对 Nalm6 白血病细胞杀伤效果的增强作用。**方法:** 用数据库分析寻找白血病细胞的标志物蛋白酪氨酸激酶 7(PTK7), 设计合成靶向 PTK7 的核酸适配体 sgc8, 进一步合成两种 ApDC: 核酸适配体偶联吉西他滨(sgc8-GEM)和环状核酸适配体偶联吉西他滨(C-sgc8-GEM), 琼脂糖凝胶电泳分析其稳定性。用 CD19-CAR 过表达慢病毒转染人外周血 T/NK 细胞构建 CAR19-T 和 CAR19-NK 细胞, 流式细胞术检测 sgc8 与 Nalm6 细胞的结合力, CCK-8 法和流式细胞术检测 sgc8-GEM、C-sgc8-GEM, 以及其分别与 CAR19-T 和 CAR19-NK 细胞联合应用对 Nalm6 细胞的杀伤能力。**结果:** PTK7 mRNA 在白血病细胞中呈高表达( $P < 0.01$ ); C-sgc8-GEM 比 sgc8-GEM 稳定性更高, 与 GEM 比较, sgc8-GEM 更能有效杀伤 Nalm6 细胞( $P < 0.001$ ); C-sgc8-GEM 或 sgc8-GEM 分别与 CAR19-T/NK 细胞联合应用比单独用 C-sgc8-GEM、sgc8-GEM、CAR19-T/NK 细胞对 Nalm6 细胞的毒性均更强( $P < 0.001$ )。**结论:** 成功建立环状 ApDC 与 CAR19-T/NK 细胞联合应用法, 通过双靶点有效提高了对 Nalm6 细胞的毒性, 为急性淋巴细胞白血病提供了新的治疗思路。

**[关键词]** 核酸适配体; 环状核酸适配体-药物偶联物; CAR19-T/NK 细胞; 免疫疗法; Nalm6 细胞

**[中图分类号]** R733.71; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 03-0288-08

## Circular nucleic acid aptamer-drug conjugates combined with CAR19-T/NK cells enhance cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia cells

KONG Lingqi<sup>1</sup>, JIANG Hanxiao<sup>2</sup>, JIA Zilu<sup>2</sup>, ZHUANG Bo<sup>1</sup>(1. Department of Pediatric Surgery, Jining First People's Hospital, Jining 272001, Shandong, China; 2. Clinical Medical College, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the enhanced cytotoxic effect of circular nucleic acid aptamer-drug conjugates (ApDC) combined with anti-CD19 chimeric antigen receptor T/NK (CAR19-T/NK) cells on Nalm6 leukemia cells. **Methods:** Database analysis was used to identify the marker protein tyrosine kinase 7 (PTK7) in leukemia cells. An aptamer targeting PTK7, sgc8, was designed and synthesized. Subsequently, two ApDCs were prepared: nucleic acid aptamer-conjugated gemcitabine (sgc8-GEM) and circular nucleic acid aptamer-conjugated gemcitabine (C-sgc8-GEM). Their stability was analyzed using agarose gel electrophoresis. Human peripheral blood T/NK cells were transfected with CD19-CAR overexpression lentivirus to construct CAR19-T and CAR19-NK cells. The binding affinity of sgc8 to Nalm6 cells was detected using flow cytometry. The cytotoxicity of sgc8-GEM, C-sgc8-GEM, and their combination with CAR19-T or CAR19-NK cells against Nalm6 cells was evaluated using CCK-8 assay and flow cytometry. **Results:** PTK7 mRNA was highly expressed in leukemia cells ( $P < 0.01$ ). C-sgc8-GEM exhibited higher stability than sgc8-GEM, and sgc8-GEM exhibited more effective cytotoxicity against Nalm6 cells compared to GEM alone ( $P < 0.001$ ). The combination of C-sgc8-GEM or sgc8-GEM with CAR19-T/NK cells showed significantly stronger cytotoxicity against Nalm6 cells than C-sgc8-GEM, sgc8-GEM, or CAR19-T/NK cells alone ( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The circular ApDCs combined with CAR19-T/NK cells were successfully developed. This dual-targeting strategy effectively increased the cytotoxicity against Nalm6 cells, providing a new treatment approach for acute lymphoblastic leukemia.

**[Key words]** nucleic acid aptamer; circular nucleic acid aptamer-drug conjugate (ApDC); CAR19-T/NK cell; immunotherapy; Nalm6 cell

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(3): 288-295. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.008]

**[基金项目]** 济宁市重点研发计划(2024YXNS150)

**[作者简介]** 孔令启, 硕士, 主治医师

**[通信作者]** 庄博(扫码获取作者通信方式)



急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukaemia, ALL) 是分化早期的淋巴细胞恶性增生的血液疾病, 可侵入血液、骨髓及髓外组织<sup>[1]</sup>。传统疗法如化疗、放疗及造血干细胞移植虽能延长患者的生存期, 但预后仍较差<sup>[2]</sup>。近年来, 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T 细胞) 疗法为 ALL 治疗带来新希望。CAR-T 细胞疗法以特定肿瘤表面抗原如 CD19、CD20、CD22 和 BCMA 等为靶点<sup>[3]</sup>, 其中 CD19 在 ALL 等多种血液恶性肿瘤中高表达, 成为广泛应用的靶点<sup>[4]</sup>。抗 CD19 CAR-T 细胞 (CAR19-T 细胞) 疗法在复发或难治性 CD19 阳性血液恶性肿瘤中疗效显著, 完全应答率达 70%~90%<sup>[5]</sup>, 美国 FDA 已批准四种 CAR19-T 细胞产品用于此类疾病治疗<sup>[6]</sup>。尽管 CAR-T 细胞疗法效果显著, 但多达 50% 患者在 CAR19-T 细胞治疗后一年内复发<sup>[7]</sup>, 原因可能有 CAR-T 细胞持久性不足<sup>[8]</sup>、靶抗原丢失或改变<sup>[9]</sup>及免疫抑制性肿瘤微环境<sup>[10]</sup>等; 此外, CAR19-T 细胞疗法还可能诱导肿瘤细胞抗原丢失, 降低 CD19 表达密度, 逃避免疫监视<sup>[11]</sup>。

本研究提出一种新型联合治疗策略: CAR19-T 及 CAR19-NK 细胞通过 CD19 识别介导肿瘤直接杀伤<sup>[12]</sup>; 吉西他滨 (gemcitabine, GEM) 则通过引起肿瘤细胞 DNA 损伤和凋亡增强肿瘤细胞对 CAR-T/NK 细胞杀伤的敏感性<sup>[13]</sup>; 蛋白酪氨酸激酶 7 (protein tyrosine kinase 7, PTK7) 与 CD19 双靶点可协同抑制肿瘤增殖并克服抗原逃逸; 此外, GEM 诱导的免疫原性细胞死亡有望进一步增强抗原提呈与 T 细胞活化, 与 CAR 细胞形成协同抗肿瘤循环。

GEM 是脱氧胞苷类似物, 通过抑制 DNA 合成及诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>, 广泛用于胰腺癌等实体瘤治疗<sup>[15]</sup>。GEM 虽非淋巴瘤一线药物, 但在血液肿瘤中具有研究价值: 其作为 S 期特异性药物, 可有效靶向快速增殖的 ALL 细胞; 临床前研究<sup>[16]</sup>显示, GEM 能抑制 T 细胞 ALL 细胞增殖、诱导线粒体凋亡通路激活, 并与 ABT-199 等靶向药协同; 此外, GEM 在难治性淋巴瘤骨髓方案 (如 GEM/氟达拉滨/白消安方案) 中也展现出高活性且毒性可控<sup>[17]</sup>。基于 GEM 在抗白血病机制、临床前研究支持及联合治疗的潜力, 本研究选用其作为核酸适配体-药物偶联物

(aptamer-drug conjugate, ApDC)。核酸适配体是指指数富集配体系统进化 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术产生的短单链 DNA/RNA 分子, 其具有无免疫原性、易合成修饰、可位点特异性偶联荧光染料等特性<sup>[18]</sup>。因此, ApDC 可解决特异性转运、抗癌药水溶性高、亲和力弱等问题<sup>[19]</sup>, 其中环状核酸适配体稳定性更高, 兼具特异性靶点识别、细胞高效摄取及酯酶触发药物释放等特性<sup>[20]</sup>。目前, 环状 ApDC (circular ApDC, C-ApDC) 研究取得一定进展, 但其与 CAR-T 和 CAR-NK 细胞疗法的结合应用尚属空白。PTK7 是受体酪氨酸激酶家族假激酶成员, 在多种肿瘤中高表达, 对肿瘤发生发展有重要作用<sup>[21]</sup>。本研究通过 SELEX 技术筛选出能特异性结合 PTK7 的 DNA 适配体 sgc8, 构建靶向 PTK7 的 C-ApDC (C-sgc8-GEM), 探讨 C-sgc8-GEM 结合 CAR-T 和 CAR-NK 细胞疗法能否提高对 ALL 细胞的杀伤力。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂及仪器

人外周血单个核细胞 (PBMC)、HEK293T 细胞、CAR19-NK 细胞由上海儿童医学中心提供, 人 IL-2 购自北京双鹭药业股份有限公司, T4 DNA 连接酶、10 × T4 DNA 连接酶缓冲液均购自美国 NEB 公司, PBS、D-PBS、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、GEM 均购自上海生工生物技术有限公司, DAPI 和 CCK-8 试剂均购自百优泰生物技术有限公司, CPD-eF670 细胞增殖荧光染料 (后续简称 CPD670)、CTS™ AIM V™ 培养基、RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自赛默飞世尔科技 (北京) 有限公司, 琼脂糖购自上海焯森生物科技有限公司, 无血清细胞冻存液和青霉素-链霉素均购自 NCM 生物技术 (苏州) 有限公司, CD19-CAR 质粒、慢病毒包装辅助质粒 psPAX2 和 pMD2.G 均由上海儿童医学中心提供。C-sgc8-GEM 和 DNA 寡核苷酸等均由上海生工生物技术有限公司合成, 核酸适配体核酸序列见表 1。ChemiDoc MP 成像系统购自美国 Bio-Rad 公司, 流式细胞仪购自美国 BD FACS Canto Plus 公司, Tecan Infinite® 200 PRO 酶标仪购自中国上海帝肯实验器材有限公司。

表 1 核酸适配体序列 (5'-3')

核酸适配体	正向序列
sgc8-GEM-5p	GTCTAACTGCTGCGCCGCCGAAATACTGTACGGTTAGACGACCTT/iGEM/TTGGTC
sgc8-loop-GEM	GTCTAACTGCTGCGCCGCCGAAATACTGTACGGTTAGACGACCTT/iGEM/TTGGTC
sgc8-FAM	FAM-GTCTAACTGCTGCGCCGCCGAAATACTGTACGGTTAGAC

## 1.2 数据库分析PTK7在白血病细胞中的表达及其与患者预后的关系

通过 GEPIA 网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), 获取 PTK7 在白血病和正常血细胞中的表达数据, 以直观的箱线图呈现, 并分析 PTK7 mRNA 表达水平与患者预后的关系。

## 1.3 细胞培养

Nalm6 细胞用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 用 5 μg/mL 抗人 CD3/CD28 抗体激活 T 细胞 (从人 PBMC 中分离) 48 h, 并在 CTS™ AIM V™ 培养基中培养, 该培养基中含 4% FBS 和 300 IU/mL 人 IL-2, 每 3~4 d 更换一次培养基。

## 1.4 CAR19-T 细胞的构建

用 CD19-CAR 质粒、psPAX2 和 pMD2.G 共转染 HEK293T 细胞以产生慢病毒颗粒。在转染后 48、72 h 收集培养基上清液, 4 °C 下以 300 × g 离心 2 h, 将病毒颗粒重悬于 PBS 中, 用 10 μg/mL 聚苯乙烯将 CD19-CAR 慢病毒感染 T 细胞。48 h 后流式细胞术检测 CD19-CAR 阳性细胞的比例, 确认 CAR19-T 细胞构建是否成功。

## 1.5 C-ApDC 的构建与稳定性分析

C-ApDC 由中国生工生物技术有限公司合成, 并进行 5'-磷酸化修饰。将线性核酸适配体与 T4 DNA 连接酶 16 °C 下孵育过夜, 使其环化, 3% 琼脂糖凝胶电泳确认其环化。为进行稳定性分析, 以 RPMI 1640 培养基为反应基质, 配制 200 μL 反应体系, 含 10% FBS, 将各核酸适配体稀释至终浓度为 10 μmol/L, 于 37 °C 分别在 0、8、16、24、32 和 40 h 每个时间点取样 20 μL。样品经 95 °C 加热 5 min 后, 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 用 ChemiDoc MP 成像系统采集凝胶图像。

## 1.6 流式细胞术检测 C-ApDC 与 Nalm6 细胞的结合能力

取对数生长期的 Nalm6 细胞 (1 × 10<sup>6</sup> 个) 在 500 μL 的结合缓冲液中与终浓度 500 nmol/L 的核酸适配体溶液混匀, 在 37 °C 下避光处理 60 min, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪进行检测分析。

## 1.7 CCK-8 法检测各组 ApDC 和 GEM 对 Nalm6 细胞的毒性作用

取对数生长期的 Nalm6 细胞, 将其密度调整为 1.5 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 以 1.5 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种 96 孔板中, 用 0、3.906 25、7.812 5、15.625、31.25、62.5、125、250 和 500 nmol/L 的 sgc8、sgc8-GEM、C-sgc8-GEM、GEM 分别处理细胞, 培养 48 h 后, 在每个孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续避光培养 30 min, 用 Tecan Infinite®

200 PRO 酶标仪检测 450 nm 处的光密度 (*D*) 值, 以 *D* 值代表细胞的增殖活力。

## 1.8 流式细胞术检测药物毒性

Nalm6 细胞作为靶细胞, 分别与 CAR19-T、CAR19-NK 两种效应细胞, 按效应细胞: 靶细胞为 1:4 的比例进行共培养, CPD670 标记 Nalm6 细胞, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 24 h 后收集细胞, DAPI 染色细胞后进行流式细胞仪检测, 对凋亡或死亡 Nalm6 细胞的百分比进行量化, 以评估效应细胞毒性。

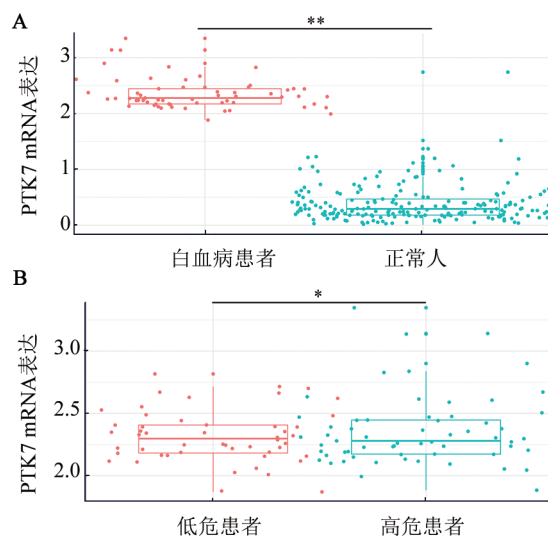
## 1.9 统计学处理

用 GraphPad Prism 9 软件对实验数据进行统计处理。符合正态分布的计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用非配对 *t* 检验, 线性关系用简单线性回归进行评估, 用 Pearson 相关检验进行相关性检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PTK7 mRNA 在白血病细胞中呈高表达且与患者预后有关联

数据库数据分析结果 (图 1) 显示, PTK7 mRNA 在白血病患者中呈高表达且与患者预后有关联 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。



A: PTK7 mRNA 在白血病患者和正常人白细胞中的表达;  
B: PTK7 mRNA 在高危和低危白血病患者白细胞中的表达。  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

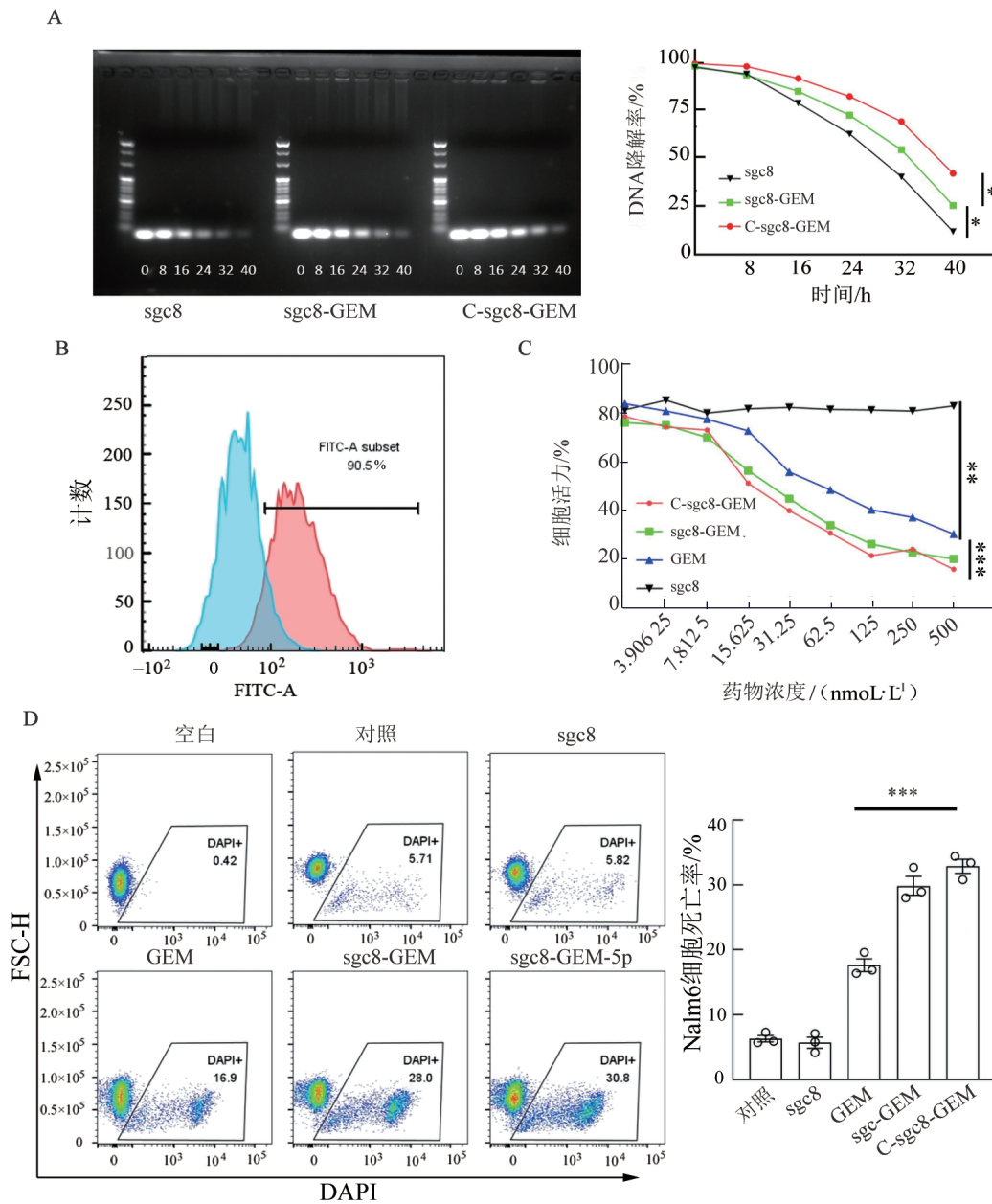
图1 白血病患者血细胞中 PTK7 mRNA 表达及与患者预后的关系

### 2.2 C-sgc8-GEM 稳定性明显增强并显著提升 GEM 对 Nalm6 细胞的靶向毒性

琼脂糖凝胶电泳分析结果 (图 2A) 显示, 40 h 后线性 sgc8 和 sgc8-GEM 明显降解, 而环化的 C-sgc8-

GEM 条带仍保持稳定, 直观反映了不同结构核酸的降解稳定性差异。进一步对 DNA 降解率进行量化分析, 重复测量方差分析 (repeated measures ANOVA) 则证实, 3 组的降解效果存在显著差异 ( $F = 10.73$ ,  $P = 0.0214$ )。上述结果与电泳分析的直观现象一

致, 共同表明环化修饰可显著提升核酸的抗降解能力, 而线性结构的核酸更易发生降解。流式细胞术检测结果 (图 2B) 显示, sgc8-FAM 与 Nalm6 细胞具有较高的结合力, 证实该适配体对目标肿瘤细胞具备良好的靶向结合能力。



A: 琼脂糖凝胶电泳分析 sgc8、sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 随时间变化的降解情况; B: 流式细胞术检测 sgc8-FAM 与 Nalm6 细胞的结合力; C: CCK-8 法检测不同 ApDC 和 GEM 对 Nalm6 细胞的毒性作用; D: 流式细胞术检测 ApDC 和 GEM 对 Nalm6 细胞的毒性。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 2 核酸适配体稳定性分析及其对 Nalm6 细胞的毒性作用

CCK-8 法检测结果显示 (图 2C), 与 sgc8 组比较, GEM、sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 组 Nalm6 细胞的细胞活率均明显下降 (均  $P < 0.01$ ); 与 GEM 组比较, sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 组 Nalm6 细胞的细胞活率均明显下降 ( $P < 0.05$ ), sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 提示环化修饰未改变

ApDC 的抗肿瘤作用。通过流式细胞术检测其抗肿瘤作用, 结果显示 (图 2D): 与 sgc8 组比较, GEM、sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 组 DAPI 阳性细胞百分率均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GEM 组比较, sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 组 DAPI 阳性细胞百分率均明显升高 ( $P < 0.001$ ); sgc8-GEM 与 C-sgc8-GEM 组间 DAPI 阳

性细胞百分率无明显变化。实验结果说明,sgc8能明显提升GEM对Nalm6细胞的靶向毒性。

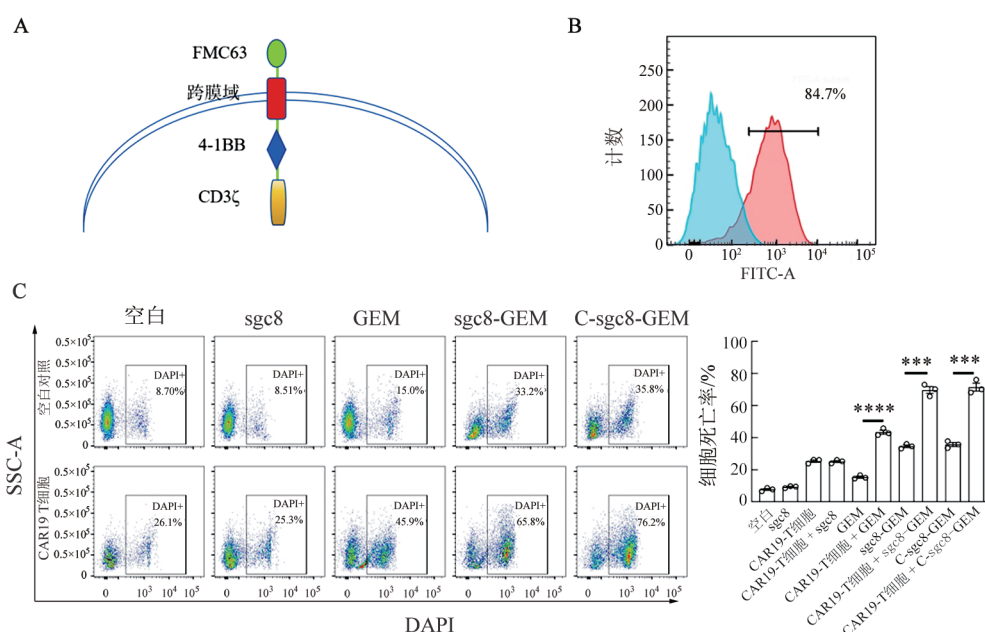
### 2.3 sgc8-GEM 或 C-sgc8-GEM 与 CAR19-T 细胞联合应用显著增强对 Nalm6 细胞的毒性

利用 4-1BB 作为共刺激分子设计了第二代 CAR19-T 细胞, CAR19 载体包括细胞外 FMC63 单链可变片段、跨膜域及人 4-1BB 和 CD3 $\zeta$  的胞浆区(图 3A)。从人 PBMC 中分离出 T 细胞, 刺激 48 h 后用 CAR19 慢病毒转导, 制备的 CAR-T 细胞的 CAR 阳性率达 80% 以上(图 3B)。流式细胞术检测结果显示(图 3C), 与单独 CAR19-T 细胞或单独药物处理比较, 药物与 CAR19-T 细胞联合后对 Nalm6 细胞的细胞毒性均显著增强(均  $P < 0.001$ ); 而空白对照组与 sgc8 处理组相比无显著差异, 表明 sgc8 本身对 Nalm6 细胞无杀伤作用; 与 CAR19-T 细胞单独作用组相比, sgc8 联合 CAR19-T 细胞亦未表现出杀伤活

性的增强效应。实验结果说明, sgc8-GEM、C-sgc8-GEM 与 CAR19-T 细胞联合应用能明显提升其对 Nalm6 的毒性作用, 而单独 sgc8 无增强作用。

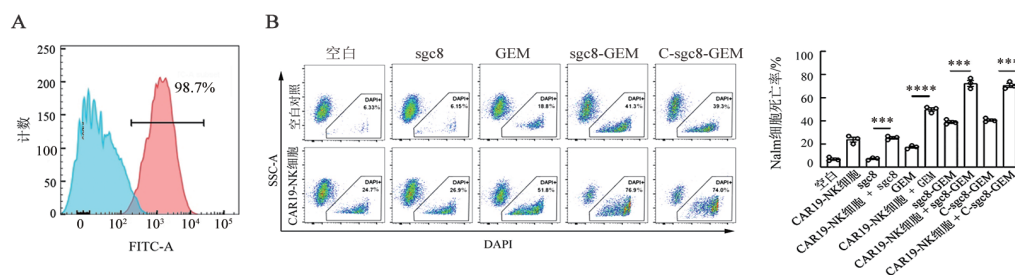
### 2.4 sgc8-GEM 或 C-sgc8-GEM 与 CAR19-NK 细胞联合显著增强对 Nalm6 细胞的毒性

CAR19-NK 通过流式细胞术进行检测, CAR19 的阳性率接近 100%(图 4A)。与 GEM、sgc8-GEM 及 C-sgc8-GEM 单独处理相比, 上述药物与 CAR19-NK 细胞联合应用均能明显增强对 Nalm6 细胞的毒性(均  $P < 0.001$ ); 与 sgc8 单独处理组比较, sgc8 联合 CAR19-NK 细胞组对 Nalm6 细胞的毒性无显著差异, 提示 sgc8 与 CAR19-NK 细胞联合应用未增强对 Nalm6 细胞的杀伤效应(图 4B)。实验结果说明, 核酸适配体偶联 GEM 与 CAR19-NK 细胞联合应用能显著增强对 Nalm6 细胞的毒性。



A: CAR19 载体结构示意图; B: CAR19-T 细胞阳性率的检测; C: C-sgc8-GEM、sgc8-GEM、GEM 单药及联合 CAR19-T 细胞杀伤 Nalm6 细胞的流式图(左)及统计分析(右)。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图3 C-ApDC 与 CAR19-T 细胞联合应用对 Nalm6 细胞的毒性



A: 流式细胞术检测 CAR19-NK 细胞的 CAR19 阳性率; B: C-sgc8-GEM、sgc8-GEM、GEM 单药及联合 CAR19-NK 细胞杀伤 Nalm6 细胞的流式图(左)及统计分析(右)。\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图4 GEM、sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 分别与 CAR19-NK 细胞联合应用对 Nalm6 的细胞毒性作用

### 3 讨论

本研究聚焦 ALL 治疗, 用生物信息学数据分析结果发现, PTK7 在白血病细胞中呈高表达。基于此, 本研究合成了与 GEM 偶联的核酸适配体 sgc8, 并进一步合成两种 ApDC (sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM), 通过琼脂糖凝胶电泳评估了其稳定性。利用 CCK-8 法评估 sgc8-GEM、C-sgc8-GEM 及 GEM 对 Nalm6 细胞的毒性作用, 结果表明, sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 对 Nalm6 细胞的杀伤能力显著强于 GEM。最后分别构建了 CAR19-T 细胞与 CAR19-NK 细胞, 并将其与 sgc8-GEM 和 C-sgc8-GEM 联合应用。CCK-8 法检测结果显示, sgc8-GEM 或 C-sgc8-GEM 与 CAR19-T、CAR19-NK 联合使用时, 对 Nalm6 细胞的毒性均显著强于单独使用 sgc8-GEM、C-sgc8-GEM、CAR19-T、CAR19-NK 细胞。本研究构建的 C-sgc8-GEM 与 CAR19-T/NK 细胞双靶点联合应用, 能显著提升其对 Nalm6 细胞的毒性作用, 为 ALL 治疗提供了潜在的高效新策略。

核酸适配体可化学合成并修饰偶联药物成为 ApDC, ApDC 策略发展迅速, 通过核酸适配体识别癌细胞标志物递送抗癌药物<sup>[22]</sup>。与抗体-药物偶联物 (ADC) 相比, ApDC 表现出更小的体积、更强的化学稳定性、更低的免疫原性、更高的组织穿透性和更简单的工程设计等优越性能<sup>[23]</sup>。适配子凭借高特异性结合能力和低免疫毒性, 在性能上可与抗体媲美。其制备成本低、合成修饰简便, 且在极端条件下稳定性良好。这些优势使其成为医学领域的研究热点。PTK7 是一种在多种淋巴细胞白血病细胞表面广泛表达的抗原, 其表达特征与 CD19 等传统靶点形成互补<sup>[24]</sup>, 作为新兴潜在靶点在淋巴细胞白血病治疗领域展现出独特优势<sup>[25]</sup>。sgc8 核酸适配体作为具有 PTK7 靶点的血液恶性肿瘤的潜在治疗诊断剂, 其与 ALL 细胞 (CCRF-CEM 细胞) 上的 PTK7 具有高亲和力结合而被鉴定, 是有前景的特异性细胞内药物递送载体, 安全性好<sup>[26-28]</sup>, 能特异性结合 ALL 细胞表面的 PTK7 蛋白, 且稳定性高、易修饰<sup>[29-30]</sup>。

CAR-T 细胞疗法在 ALL 中初始反应率虽高, 但 CAR-T 细胞长期生存率不佳, 主要因持续抗原刺激及免疫抑制的肿瘤微环境。持续抗原刺激使 CAR-T 细胞长期处于高激活状态, 细胞内信号通路过度活化, 引发 T 细胞受体复合物及其共刺激分子表达下调, 增殖能力显著下降, 无法及时补充效应细胞数量以维持抗肿瘤效应, 致 CAR-T 细胞耗竭, 增殖、分泌细胞因子及细胞毒性功能受损, 持久性受限, 无法持续杀伤肿瘤细胞<sup>[31-32]</sup>。CAR-NK 细胞 PD-1 表达低, 免

疫抑制风险小, 但与肿瘤细胞接触时, 会通过吞噬作用摄取靶抗原, 致抗原丢失, 高抗原密度 ALL 细胞中更明显, 引发免疫逃逸与耐药性<sup>[33-34]</sup>。C-ApDC 靶向 PTK7 (独立于 CD19) 递送药物, 可弥补 CAR-T/NK 细胞因抗原丢失或耗竭导致的疗效下降。联合应用形成双靶点策略, C-ApDC 与 CAR19-T/NK 细胞相互补充, 扩大对肿瘤细胞的杀伤范围, 从多机制抑制肿瘤细胞增殖与存活, 有效降低 ALL 复发风险, 可能为患者带来更长效治疗收益。

尽管本研究明确展示了联合疗法的协同效果, 但其背后的分子机制仍有待深入揭示。推测该协同效应可能源于以下几个层面。首先, CAR-T/NK 细胞提供了强大且特异性的细胞毒性杀伤基础。其核心机制始于 CAR 对肿瘤表面抗原 (如 CD19) 的特异性识别与结合, 进而传递强烈的激活信号, 导致 CAR 细胞克隆性扩增并通过穿孔素/颗粒酶途径和死亡受体途径直接诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[35]</sup>。联合疗法通过多层叠加增效: 在细胞水平上, GEM 是一种核苷类似物, 通过抑制 DNA 合成 (如阻断 DNA 聚合酶活性) 及干扰 DNA 修复, 诱导肿瘤细胞发生 DNA 损伤反应, 进而触发凋亡信号通路, 包括 caspase-3/7 的激活等<sup>[36]</sup>。这使肿瘤细胞变得脆弱, 从而增强肿瘤细胞对 CAR-T/NK 细胞介导的细胞毒性作用的敏感性; 其次, 在免疫微环境层面, CAR-T/NK 细胞在杀伤过程中会释放大量细胞因子 (如 IFN- $\gamma$ ), 但同时也面临免疫抑制性微环境的挑战。而 GEM 可能通过减少髓源性抑制细胞或调节性 T 细胞等免疫抑制性细胞群体的浸润, 间接改善肿瘤微环境的免疫抑制状态, 为 CAR 细胞创造一个更有利的工作环境, 促进 CAR 细胞的存活与功能持久性<sup>[37]</sup>; 此外, PTK7 靶向与 CD19 靶向的联合可能通过交叉抗原内化或下调互补性信号通路, 进一步抑制肿瘤细胞的增殖与存活信号网络。更重要的是, 这种双靶点策略能有效克服因单一抗原 (如 CD19) 丢失而导致的免疫逃逸, 这是 CAR-T/NK 细胞治疗失败的主要原因之一; 最后, 从细胞死亡方式来看, CAR 细胞主要引发穿孔素-颗粒酶或死亡受体介导的凋亡<sup>[38]</sup>, 而 GEM 可能协同诱导免疫原性细胞死亡, 暴露钙网蛋白等吞噬信号, 增强抗原提呈与 T 细胞活化, 形成正向抗肿瘤免疫循环<sup>[39]</sup>。这不仅直接杀死肿瘤细胞, 还可能通过激活宿主自身的免疫系统 (如内源性 T 细胞), 与过继性的 CAR-T/NK 细胞产生协同效应, 实现对肿瘤的长期控制; 此外, CAR-NK 细胞还具有其独特优势: 即便肿瘤细胞通过抗原调变逃逸了 CAR 的识别, 其仍能通过固有的 NK 细胞激活受体 [如自然杀伤细胞 2D 组 (natural killer group 2D, NKG2D) 受体和自然细胞毒

性受体(natural cytotoxicity receptor, NCR)]对肿瘤细胞进行杀伤, 这为联合疗法提供了又一重保障。

本研究成功合成 C-ApDC sgc8-GEM, 通过结构优化构建 C-sgc8-GEM, 显著增强了其在体内稳定性。该 C-ApDC 以 PTK7 为特异性靶点, 可将 GEM 精准递送至 Nalm6 等 ALL 细胞, 显著减少对正常细胞的毒性。鉴于单一疗法存在局限, 本研究探索 C-ApDC 与 CAR19-T/NK 细胞联合治疗: C-ApDC 通过靶向 PTK7 独立于 CD19 的递药机制, 有效弥补了 CAR-T 细胞因抗原丢失或耗竭导致的疗效衰减, 以及 CAR-NK 细胞因抗原吞噬引发的免疫逃逸问题。这种双靶点协同策略形成了多层次抗肿瘤网络——CAR19-T/NK 细胞主导 CD19 阳性肿瘤细胞的直接清除, 而 C-ApDC 则通过 PTK7 靶向实现耐药克隆的深度杀伤。该联合方案, 为 ALL 治疗提供了创新且高效的联合策略, 展现出向临床转化的广阔前景。

#### [参考文献]

- [1] MALARD F, MOHTY M. Acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Lancet*, 2020, 395(10230): 1146-1162. DOI:10.1016/S0140-6736(19)33018-1.
- [2] BRUDNO J N, SOMERVILLE R P T, SHI V, et al. Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(10): 1112-1121. DOI: 10.1200/JCO.2015.64.5929.
- [3] CAO Y, EFETOV S K, HE M Z, et al. Updated clinical perspectives and challenges of chimeric antigen receptor-T cell therapy in colorectal cancer and invasive breast cancer[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2023, 71(1): 19. DOI:10.1007/s00005-023-00684-x.
- [4] ZHANG X M, ZHU L L, ZHANG H, et al. CAR-T cell therapy in hematological malignancies: current opportunities and challenges[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 927153. DOI:10.3389/fimmu.2022.927153.
- [5] ABBASI S, TOTMAJ M A, ABBASI M, et al. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells: novel cell therapy for hematological malignancies[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(7): 7844-7858. DOI: 10.1002/cam4.5551.
- [6] CHEN Y J, ABILA B, MOSTAFA KAMEL Y. CAR-T: what is next? [J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 663. DOI:10.3390/cancers15030663.
- [7] SOTILLO E, BARRETT D M, BLACK K L, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(12): 1282-1295. DOI:10.1158/2159-8290.CD-15-1020.
- [8] PIETROBON V, TODD L A, GOSWAMI A, et al. Improving CAR T-cell persistence[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10828. DOI: 10.3390/ijms221910828.
- [9] RAJE N, BERDEJA J, LIN Y, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(18): 1726-1737. DOI:10.1056/NEJMoa1817226.
- [10] YANG Q J, HAO J, CHI M Y, et al. Superior antitumor immunotherapy efficacy of kynureninase modified CAR-T cells through targeting kynurenine metabolism[J]. *Oncoimmunology*, 2022, 11(1): 2055703. DOI:10.1080/2162402X.2022.2055703.
- [11] SHALABI H, KRAFT I L, WANG H W, et al. Sequential loss of tumor surface antigens following chimeric antigen receptor T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Haematologica*, 2018, 103(5): e215-e218. DOI:10.3324/haematol.2017.183459.
- [12] KOCHNEVA G V, SIVOLOBOVA G F, TKACHEVA A V, et al. Combination of oncolytic virotherapy and CAR T/NK cell therapy for the treatment of cancer[J]. *Mol Biol*, 2020, 54(1): 3-16. DOI: 10.1134/S0026893320010100.
- [13] XU L, MA X, ZHANG X Z, et al. hsa\_circ\_0007919 induces LIG1 transcription by binding to FOXA1/TET1 to enhance the DNA damage response and promote gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 195. DOI: 10.1186/s12943-023-01887-8.
- [14] GUNJI M, SAWA C, AKIYAMA M, et al. Gemcitabine alters sialic acid binding of the glycocalyx and induces inflammatory cytokine production in cultured endothelial cells[J]. *Med Mol Morphol*, 2023, 56(2): 128-137. DOI:10.1007/s00795-022-00347-4.
- [15] PHAN T, NGUYEN V H, BUETTNER R, et al. Inhibition of *de novo* pyrimidine synthesis augments Gemcitabine induced growth inhibition in an immunocompetent model of pancreatic cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2240-2251. DOI:10.7150/ijbs.60473.
- [16] 赵海军, 李志峰, 周勇, 等. 吉西他滨增强 ABT-199 对费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病细胞杀伤作用的机制研究[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2018, 27(10): 581-585. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9921.2018.10.002.
- [17] RAMDIAL J, LIN R T, THALL P F, et al. High activity of the new myeloablative regimen of gemcitabine/clofarabine/busulfan for allogeneic transplant for aggressive lymphomas[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2024, 59(12): 1754-1762. DOI: 10.1038/s41409-024-02394-0.
- [18] CHEN Z H, HU L, ZHANG B T, et al. Artificial intelligence in aptamer-target binding prediction[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3605. DOI:10.3390/ijms22073605.
- [19] STEPHENS M. The emerging potential of Aptamers as therapeutic agents in infection and inflammation[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 238: 108173. DOI:10.1016/j.pharmthera.2022.108173.
- [20] JIANG Y, PAN X S, CHANG J, et al. Supramolecularly engineered circular bivalent aptamer for enhanced functional protein delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(22): 6780-6784.
- [21] XIANG W, PENG Y B, ZENG H L, et al. Targeting treatment of bladder cancer using PTK7 aptamer-gemcitabine conjugate[J]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 74. DOI:10.1186/s40824-022-00328-9.
- [22] HE J X, DUAN Q, RAN C Y, et al. Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(4): 1358-1370. DOI:10.1016/j.apsb.2023.01.017.
- [23] AGNELLO L, D' ARGENIO A, NILO R, et al. Aptamer-based strategies to boost immunotherapy in TNBC[J]. *Cancers*, 2023, 15(7): 2010. DOI:10.3390/cancers15072010.
- [24] KHOGEER H, RAHMAN H, JAIN N, et al. Early T precursor acute lymphoblastic leukaemia/lymphoma shows differential immunophenotypic characteristics including frequent CD33 expression and *in vitro* response to targeted CD33 therapy[J]. *Br J Haematol*, 2019, 186(4): 538-548. DOI:10.1111/bjh.15960.

- [25] JIE Y M, LIU G J, FENG L N, et al. PTK7-targeting CAR T-cells for the treatment of lung cancer and other malignancies[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 665970. DOI:10.3389/fimmu.2021.665970.
- [26] WANG Y, YUAN Z Y, ZHAI L N, et al. An overview of Sgc8 aptamer as a potential theranostic agent for cancer with PTK7 oncogenic target[J]. *Sci Prog*, 2025, 108(1): 00368504251325385. DOI:10.1177/00368504251325385.
- [27] SICCO E, CERECETTO H, CALZADA V, et al. Targeted-lymphoma drug delivery system based on the Sgc8-c aptamer[J]. *Cancers*, 2023, 15(3): 922. DOI:10.3390/cancers15030922.
- [28] SICCO E, BAEZ J, IBARRA M, et al. Sgc8-c aptamer as a potential theranostic agent for hemato-oncological malignancies[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(4): 262-270. DOI: 10.1089/cbr.2019.3402.
- [29] XIAO Y, PAN T, DA W R, et al. Aptamer-drug conjugates-loaded bacteria for pancreatic cancer synergistic therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 272. DOI:10.1038/s41392-024-01973-3.
- [30] WU Y, ZHANG L Q, CUI C, et al. Enhanced targeted gene transduction: AAV2 vectors conjugated to multiple aptamers *via* reducible disulfide linkages[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(1): 2-5. DOI:10.1021/jacs.7b08518.
- [31] LIU Y, AN L N, HUANG R H, et al. Strategies to enhance CAR-T persistence[J]. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 86. DOI:10.1186/s40364-022-00434-9.
- [32] GUMBER D, WANG L D. Improving CAR-T immunotherapy: overcoming the challenges of T cell exhaustion[J]. *EBioMedicine*, 2022, 77: 103941. DOI:10.1016/j.ebiom.2022.103941.
- [33] RAMEZANI F, PANAH MEYMANDI A R, AKBARI B, et al. Outsmarting trogocytosis to boost CAR NK/T cell therapy[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 183. DOI:10.1186/s12943-023-01894-9.
- [34] KILGOUR M K, BASTIN D J, LEE S H, et al. Advancements in CAR-NK therapy: lessons to be learned from CAR-T therapy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1166038. DOI:10.3389/fimmu.2023.1166038.
- [35] PENG L, SFERRUZZA G, YANG L J, et al. CAR-T and CAR-NK as cellular cancer immunotherapy for solid tumors[J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(10): 1089-1108. DOI: 10.1038/s41423-024-01207-0.
- [36] JIANG P H, MOTOO Y, SAWABU N, et al. Effect of gemcitabine on the expression of apoptosis-related genes in human pancreatic cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(10): 1597-1602. DOI:10.3748/wjg.v12.i10.1597.
- [37] ERIKSSON E, WENTHE J, IRENAEUS S, et al. Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGF $\beta$ -1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 282. DOI:10.1186/s12967-016-1037-z.
- [38] YANG Z S, HA B J, WU Q H, et al. Expanding the horizon of CAR T cell therapy: from cancer treatment to autoimmune diseases and beyond[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1544532. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1544532.
- [39] NEMATI M, HSU C Y, NATHIYA D, et al. Gemcitabine: immunomodulatory or immunosuppressive role in the tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1536428. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1536428.

[收稿日期] 2025-08-07

[修回日期] 2025-12-05

[本文编辑] 向正华