

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.07.002

· 基础研究 ·

靶向 Siglec-6 CAR-T 细胞的体外优化及其抗急性髓系白血病的临床前评价

胡延梦子¹, 李紫涵², 管章春³, 刘丹¹, 施明¹ (1. 徐州医科大学 细胞治疗药物产业学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院 临床肿瘤中心, 江苏 徐州 221004; 3. 江苏省肿瘤生物治疗协同创新中心, 江苏 徐州 221004)

[摘要] **目的:** 构建并优化靶向唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 6 (Siglec-6) 的 CAR-T 细胞, 评价其对急性髓系白血病 (AML) 细胞的靶向杀伤作用、初步体内疗效及短期安全性, 为 Siglec-6 作为 AML 免疫治疗靶点提供实验依据。 **方法:** 设计靶向 Siglec-6 的 CAR 重组基因, 筛选 3 种人源化 scFv, 并在二代 CAR 架构下比较 4-1BB、CD28、ICOS、HVEM、TMIGD2 和 OX40 等共刺激结构域对 CAR-T 细胞功能的影响。采用慢病毒转导人原代 T 细胞制备 Siglec-6 CAR-T 细胞, 流式细胞术检测 CAR 阳性率及细胞表型。检测 U937、MV4-11 和 K562 细胞表面 Siglec-6 表达, 并构建 293T-Siglec-6 过表达 (OE) 细胞、U937-Siglec-6 敲除 (KO) 细胞及 U937-Luc/U937-Siglec-6 KO-Luc 细胞模型。采用流式杀伤实验、ELISA、实时无标记细胞分析 (RTCA) 及萤光素酶生物发光法评价 CAR-T 细胞的体外杀伤活性与靶点特异性; 建立 U937-Luc 异种移植白血病模型, 评价其体内抗肿瘤效应, 并结合体质量、活体成像、外周血 T 细胞水平、主要器官 H-E 染色、器官指数及血清生化指标进行短期安全性评估。 **结果:** 3 种候选 CAR-T 细胞中, CAR-T-1 在 CAR 表达水平、短期杀伤活性及后续构建可行性方面表现较优。不同共刺激结构域比较显示, 4-1BB-CAR-T 细胞 CAR 阳性率较稳定, 并在多种效靶比条件下表现出较强体外杀伤活性。Siglec-6 CAR-T 细胞可有效杀伤 Siglec-6 阳性 U937 和 MV4-11 细胞, 并显著促进 IFN- γ 和 TNF- α 释放 ($P < 0.0001$), 而对 Siglec-6 阴性 K562 细胞无明显杀伤作用。293T-Siglec-6 过表达模型和 U937-Siglec-6 KO 模型进一步证实, 该杀伤效应具有明确的 Siglec-6 靶点依赖性。抗原刺激后, Siglec-6 CAR-T 细胞向效应表型分化并显著活化 ($P < 0.0001$), 并伴随部分耗竭相关标志物表达水平升高 ($P < 0.01$)。体内实验显示, Siglec-6 CAR-T 治疗可降低 U937-Luc 荷瘤小鼠肿瘤负荷并延长生存期; 短期观察中, 两组小鼠体质量变化无明显差异, 主要器官 H-E 染色未见明显形态学损伤, 部分器官指数及血清生化指标存在组间差异 ($P < 0.01$)。 **结论:** Siglec-6 CAR-T 细胞可特异性杀伤 Siglec-6 阳性 AML 细胞, 并在 AML 异种移植模型中发挥初步抗白血病作用, 其机制可能与 Siglec-6 靶点依赖性识别、CAR-T 细胞活化及 IFN- γ /TNF- α 分泌水平增加有关。

[关键词] 急性髓系白血病; CAR-T 细胞; 唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 6; 4-1BB

[中图分类号] R733.71; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)07-0719-12

Optimization of Siglec-6-targeted CAR-T cells *in vitro* and preclinical assessment for the treatment of acute myeloid leukemia

Hu Yanmengzi¹, Li Zihan², Guan Zhangchun³, Liu Dan¹, Shi Ming¹ (1. School of Cell Therapy and Pharmaceutical Industry, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 2. Clinical Oncology Center, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 3. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center for Tumor Biotherapy, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To construct and optimize chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells targeting sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 6 (Siglec-6), and to evaluate their targeted cytotoxicity against acute myeloid leukemia (AML) cells, preliminary *in vivo* efficacy and short-term safety, thereby providing experimental evidence for Siglec-6 as an immunotherapeutic target for AML. **Methods:** A recombinant CAR gene targeting Siglec-6 was designed. Three humanized single-chain variable fragments (scFvs) were screened, and the effects of different co-stimulatory domains, including 4-1BB, CD28, ICOS, HVEM, TMIGD2 and OX40, on CAR-T cell function were compared within a second-generation CAR framework. Siglec-6 CAR-T cells were generated by lentiviral transduction of primary human T cells, and CAR positivity and cellular phenotypes were detected by flow cytometry. Surface expression of Siglec-6 on U937, MV4-11 and K562 cells

[基金项目] 国家自然科学基金 (82273207)

[作者简介] 胡延梦子, 女, 硕士生

[通信作者] 施明 (扫码获取作者通信方式)



was examined, and 293T-Siglec-6 overexpression (OE) cells, U937-Siglec-6 knockout (KO) cells, and U937-Luc/U937-Siglec-6 KO-Luc cell models were established. Flow cytometry-based cytotoxicity assays, ELISA, real-time cell analysis (RTCA) and luciferase bioluminescence assays were used to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity and target specificity of CAR-T cells. A U937-Luc xenograft leukemia model was established to assess *in vivo* antitumor efficacy, and short-term safety was evaluated based on body weight, bioluminescence imaging, peripheral blood T-cell levels, hematoxylin-eosin staining of major organs, organ indices and serum biochemical parameters. **Results:** Among the three candidate CAR-T cells, CAR-T-1 showed superior performance in terms of CAR expression level, short-term cytotoxic activity and feasibility for subsequent construct development. Comparison of different co-stimulatory domains showed that 4-1BB-CAR-T cells exhibited relatively stable CAR positivity and stronger *in vitro* cytotoxic activity under multiple effector-to-target ratios. Siglec-6 CAR-T cells effectively killed Siglec-6-positive U937 and MV4-11 cells and significantly promoted the release of IFN- γ and TNF- α ($P < 0.0001$), whereas no obvious cytotoxicity was observed against Siglec-6-negative K562 cells. The 293T-Siglec-6 overexpression model and U937-Siglec-6 KO model further confirmed that this cytotoxic effect was clearly dependent on Siglec-6 targeting. After antigen stimulation, Siglec-6 CAR-T cells differentiated into effector phenotypes and were significantly activated ($P < 0.0001$), accompanied by increased expression of some exhaustion-related markers ($P < 0.01$). *In vivo* experiments showed that Siglec-6 CAR-T treatment reduced tumor burden and prolonged survival in U937-Luc tumor-bearing mice. During short-term observation, no obvious difference in body weight change was observed between the two groups, and hematoxylin-eosin staining of major organs revealed no apparent morphological injury, although some organ indices and serum biochemical parameters differed between groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Siglec-6 CAR-T cells specifically killed Siglec-6-positive AML cells and exerted preliminary anti-leukemic activity in an AML xenograft model, and the underlying mechanism may be associated with the target-dependent recognition of Siglec-6, the activation of CAR-T cells and the increased secretion level of IFN- γ /TNF- α .

[Key words] acute myeloid leukemia (AML); CAR-T cell; sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 6 (Siglec-6); 4-1BB

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(7): 719-730. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.07.002]

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是由髓系祖细胞恶性克隆性增殖引起的血液系统恶性肿瘤,起病急、进展快,多见于中老年患者。其中,复发/难治是限制AML患者长期生存的重要原因,并造成沉重医疗负担^[1-2]。目前,诱导化疗、造血干细胞移植及去甲基化/靶向药物可使部分患者获得缓解,但疗效仍受疾病异质性、耐药及移植机会有限等因素制约^[3]。CAR-T细胞治疗已在部分B细胞肿瘤中获得确切临床获益^[4],但其在AML中的应用仍受限于缺乏肿瘤选择性强且在正常造血干细胞中低表达或不表达的理想靶抗原。CD33、CD123等靶点虽被证实具备抗白血病活性,但也同样表达于正常造血干细胞,靶向治疗可能引起造血毒性损伤。此外,抗原逃逸、白血病干细胞(leukemic stem cell, LSC)残留及免疫抑制微环境亦可削弱CAR-T细胞治疗的疗效稳定性^[5-6]。因此,筛选兼具白血病相关表达特征和低造血毒性风险的替代靶点,是推动AML CAR-T细胞治疗发展的关键方向。

唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素6(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 6, Siglec-6)属于Siglec家族成员,参与唾液酸化糖链识别及免疫调节过程。已有研究^[7]显示,Siglec-6在部分AML细胞及患者原代样本中呈较高表达,而在正常造血干细胞中表达较低,提示其可能具有作为AML CAR-T治疗理想靶点的潜力。基于此,本研究自主构建并优化Siglec-6 CAR-T细胞,并对其靶点依赖性杀伤、体内抗肿瘤效应与短期安全性进行评估,为复发/难治性AML患者的免疫治疗策略优化提供重要临床前依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物与主要试剂

6~8周龄、20~25 g的12只雌性NCG(NOD-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1})小鼠购自江苏集萃药康公司[许可证号:SCXK(苏)2023-0009],饲养于无特定病原体级环境。本实验已通过徐州医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批号:202308T025)。

U937、MV4-11、K562及HEK-293T细胞均购自中国科学院细胞库/干细胞库,人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来自徐州医科大学附属医院,研究方案已获该院医学伦理委员会批准(批准号:XYFY2020-KL062-01),本研究所有实验仅使用1名供者来源的PBMC制备CAR-T细胞,受试者已签署知情同意书。

RPMI 1640、IMDM培养基购自美国VivaCell公司,DMEM培养基购自以色列Biological Industries公司,X-VIVO 15无血清培养基购自美国Lonza公司,FBS购自南京生航生物技术有限公司,重组人细胞因子IL-2、IL-7及IL-15购自美国Peprotech公司,T细胞分选与激活试剂EasySep™ Human T Cell Isolation Kit购自加拿大Stemcell公司,CD3/CD28 T细胞激活磁珠购自美国Gibco公司,流式抗体FITC-anti-CD4、APC/Cyanine 7-anti-CD8、PE/Cyanine 7-anti-PD-1、APC-anti-TIM-3、PE-anti-LAG-3、APC-anti-CD25、PE-anti-CD45RA、PE/Cyanine 7-anti-CD69及PE/Cyanine 7-anti-CD62L均购自美国Biolegend公司,Alexa Fluor 700-anti-

Siglec-6 购自德国 Miltenyi Biotec 公司, CellTracker™ Deep Red 购自上海优宁维生物科技股份有限公司, Stable-Lite™ Luciferase Assay System 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, D-荧光素底物购自徐州微科曼得生物工程有限公司, G418 购自美国 Sigma 公司, 杀稻瘟菌素购自美国 Invitrogen 公司, 嘌呤霉素、Polybrene 购自上海碧云天生物技术有限公司, 小鼠血清生化指标检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 细胞培养

U937 与 K562 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行常规培养, MV4-11 细胞采用含 10% FBS 的 IMDM 培养基进行常规培养, HEK-293T 细胞采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行常规培养。T 细胞采用含 10% FBS 的 X-VIVO 15 培养基, 并添加 IL-2 (200 U/mL)、IL-7 (5×10^{-3} μg/mL) 及 IL-15 (5×10^{-3} μg/mL)。所有细胞均置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度培养箱中培养。实验前, 所有细胞均通过短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 鉴定, 并经 PCR 检测确认无支原体污染。

1.3 流式细胞术检测肿瘤细胞 Siglec-6 抗原表达

收集对数生长期的 U937、MV4-11 及 K562 细胞各 1×10^6 个, 经 $300 \times g$ 离心 5 min 后弃上清液。用 50 μL 含 5% FBS 的 PBS 重悬细胞, 加入 Alexa Fluor 700 标记的 Siglec-6 抗体 (1:100 稀释), 室温避光处理 30 min。

PBS 洗涤 2 次后重悬, 使用流式细胞仪检测 Siglec-6 的表达丰度。

1.4 CAR 质粒构建

为筛选适用于后续研究的 Siglec-6 靶向 scFv, 本研究选取 3 条人源化 Siglec-6 scFv 序列, 按 VL-linker-VH 的排列方式构建 Siglec-6 CAR 表达质粒, 并命名为 CAR-1、CAR-2 和 CAR-3。上述 CAR 序列通过同源重组克隆至 pHAGE-EF1α 慢病毒载体, 并进一步基于优选 scFv 构建含不同共刺激结构域的 Siglec-6 CAR 质粒。

基于二代 CAR 框架, 在相同 Siglec-6 scFv、铰链区、跨膜区及 CD3ζ 胞内信号结构域基础上, 分别引入 4-1BB、诱导性 T 细胞共刺激分子 (inducible T-cell co-stimulator, ICOS)、疱疹病毒进入介导因子 (herpesvirus entry mediator, HVEM)、跨膜和免疫球蛋白结构域蛋白 2 (transmembrane and immunoglobulin domain containing 2, TMIGD2)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40) 和分化簇 28 (cluster of differentiation 28, CD28), 构建 6 种 Siglec-6 CAR 慢病毒载体。载体中 RQR8 与 Siglec-6 CAR 表达框通过 FMD-2A 肽连接, 以实现二者共表达 (图 1)。由于 CAR 结构中含有 G4S 连接肽, 故后续采用抗 G4S 连接肽抗体检测细胞表面 CAR 表达水平 (而非 RQR8)。

RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	OX40	CD3ζ	RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	HVEM	CD3ζ
RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	ICOS	CD3ζ	RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	TMIGD2	CD3ζ
RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	CD28	CD3ζ	RQR8	FMD-2A	Siglec-6 scFv	CD8	4-1BB	CD3ζ

图 1 不同共刺激结构域的 Siglec-6 CAR 结构示意图

1.5 慢病毒包装与滴度测定

利用聚乙烯亚胺转染法, 将 CAR 重组质粒与包装质粒 psPAX2、pMD2.G 共转染至 HEK-293T 细胞。转染 8 h 后更换为含 1% 丙酮酸钠、1% HEPES 及 10% FBS 的 DMEM 完全培养基。分别于 48 h 及 72 h 收集病毒上清, 经超速离心 ($84\,000 \times g$, 4 °C, 2 h) 浓缩, 重悬沉淀。

慢病毒滴度测定: 将 HEK-293T 细胞接种于 24 孔板 (1×10^5 个/孔), 24 h 后加入梯度稀释的浓缩病毒液 (0~10 μL)。感染 48 h 后收集细胞, 流式细胞术检测 CAR 阳性率, 按以下公式计算滴度 (仅选取阳性率在 10%~20% 范围内的数据, 式中病毒原液体积单位为 μL): 滴度 (TU/mL) = (感染前细胞数 × 阳性率) / (病毒原液体积 × 10^3)。

1.6 经慢病毒转导制备 Siglec-6 CAR-T 细胞

采用磁珠负向分选法从健康供者 PBMC 中分离 CD3⁺ T 细胞, 并将分离后的 T 细胞经计数后随机分配至 6 种不同共刺激结构域 Siglec-6 CAR-T 亚组和 Mock-T 组。各组细胞均按照 CD3/CD28 激活磁珠与 T 细胞 1:1 的比例进行激活培养。激活 72 h 后, 在不去除激活磁珠的条件下, 各 Siglec-6 CAR-T 亚组均按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 5 分别加入携带对应 Siglec-6 CAR 表达框的慢病毒颗粒, 介导 CAR 编码基因稳定导入 T 细胞; Mock-T 组不添加任何慢病毒, 作为未基因修饰的空白对照, 与所有 CAR-T 亚组置于完全相同的培养环境中同步操作。

将加入慢病毒当天记为转导第 0 天, Mock-T 组同步计时。转导 18 h 后, 两组细胞均更换为含细胞因子的 X-VIVO 15 完全培养基; 转导 48 h 后, 去除激活磁珠。随后每 2 d (第 4、6、8、10、12 天)

采用自动细胞计数仪结合台盼蓝染色法检测细胞数量及存活率,并根据细胞生长状态补充新鲜培养基、调整细胞密度。

1.7 流式细胞术检测 CAR-T 细胞 CAR 阳性率及表型
分别于病毒感染后第 6、8、10、12 天收集 CAR-T 细胞(1×10^5 个),经 PBS 洗涤后,用 50 μ L PE 标记的抗 G4S 连接肽抗体(1:100 稀释于 2% BSA/PBS)重悬,冰上避光反应 30 min。洗涤后重悬上机,通过流式细胞术检测 CAR 分子的阳性率。流式数据分析采用 Mock-T 对照组作为模板统一圈门,并参照自然分群特征进行分析。

于感染后第 8 天收集 CAR-T 细胞(1×10^6 个)进行多色流式染色,用于检测 T 细胞分化、活化及耗竭相关表型。分化表型检测抗体包括 CD4、CD8、CD45RA 及 CD62L,根据 CD45RA 和 CD62L 的表达情况,将 T 细胞分为初始 T 细胞(naïve T cell, Tn, CD45RA⁺CD62L⁺)、中央记忆 T 细胞(central memory T cell, Tcm, CD45RA⁻CD62L⁺)、效应记忆 T 细胞(effector memory T cell, Tem, CD45RA⁻CD62L⁻)和终末分化效应记忆 T 细胞/再表达 CD45RA 的效应记忆 T 细胞(terminally differentiated effector memory T cell re-expressing CD45RA, Temra, CD45RA⁺CD62L⁻);活化表型检测抗体包括 CD4、CD8、CD25 及 CD69;耗竭相关表型检测抗体包括 CD4、CD8、PD-1、TIM-3 及 LAG-3。所有抗体按 1:100 稀释,冰上避光反应 30 min,洗涤后上机检测。

1.8 构建 Siglec-6 过表达的 HEK-293T 细胞

构建人 Siglec-6 过表达慢病毒重组质粒 pLVX-CMV-SIGLEC6-GFP-T2A-Puro,提取去内毒素质粒后,与慢病毒包装质粒 psPAX2、包膜质粒 pMD2.G 共转染 HEK-293T 细胞,于转染后 48~72 h 收集上清液,0.45 μ m 滤器过滤浓缩得到高滴度慢病毒液。向病毒液中加入 Polybrene 辅助感染 HEK-293T 细胞;感染 72 h 后更换含嘌呤霉素的完全培养基,持续筛选 10~14 d,获得 Siglec-6 过表达多克隆细胞池,命名为 293T-Siglec-6 细胞。

1.9 构建 U937-Luc、U937-Cas9 细胞

分别采用携带萤光素酶基因与 Cas9 基因的慢病毒载体感染 U937 细胞,并加入 Polybrene 辅助感染,获得 U937-Luc 细胞与 U937-Cas9 细胞。感染 72 h 后,分别采用 G418(用于 U937-Luc 细胞)和杀稻瘟菌素(用于 U937-Cas9 细胞)持续筛选 10~14 d,获得稳定多克隆细胞池。随后,采用有限稀释法进行单克隆分选,并以低浓度相应抗生素维持筛选压力。通过检测萤光素酶活性验证 U937-Luc 细胞构建情况,采用 WB 法验证 U937-Cas9 细胞中 Cas9 蛋白表达。

1.10 CRISPR/Cas9 技术构建 U937-Siglec-6 KO 及 U937-Siglec-6 KO-Luc 细胞

针对人 Siglec-6 基因 CDS 区设计 8 对 sgRNA 寡核苷酸序列(表 1),通过分子克隆技术构建 CRISPR/Cas9 基因敲除重组质粒,随后进行慢病毒包装、收集与浓缩,所获得的 Siglec-6 基因敲除慢病毒液用于感染 U937 细胞。随后,经对应抗生素药物筛选获得 Siglec-6 基因敲除的多克隆细胞池。在成功构建的 U937-Siglec-6 KO 细胞基础上,感染萤光素酶报告基因慢病毒,进一步构建稳定表达萤光素酶的 U937-Siglec-6 KO-Luc。通过流式细胞术检测细胞膜表面 Siglec-6 蛋白表达情况,验证细胞基因敲除效果,结合分子生物学检测进一步确认靶基因缺失,以筛选 Siglec-6 稳定敲除的 U937-Siglec-6 KO 及 U937-Siglec-6 KO-Luc。

表 1 靶向人 Siglec-6 基因的 sgRNA 克隆引物序列

sgRNA 引物	序列
1-F	CACCGGAATCTCCGCTCCTGAGCCA
1-R	AAACTGGCTCAGGAGCGGAGATTCC
2-F	CACCGGAGTCACTGACGGTGACAGGA
2-R	AAACTCCTGCACCGTCAGTGACTCC
3-F	CACCGTGGGCAATCTGCAGGGTACG
3-R	AAACCGTACCCTGCAGATTGCCAC
4-F	CACCGTGGTTATGGCTACTGGTTCC
4-R	AAACGGAACCAGTAGCCATAACCAC
5-F	CACCGACCATAGTACGAGGCTGGAA
5-R	AAACTTCCAGCCTCGTACTATGGTC
6-F	CACCGGGAAGGGGCTGATGTTCCAG
6-R	AAACCTGGAACATCAGCCCCTTCCC
7-F	CACCGCGACCCAGACGAAGAAGTGC
7-R	AAACGCACTTCTTCGTCTGGGTCGC
8-F	CACCGTGAGCATCAGAGATGCCCGG
8-R	AAACCCGGGCATCTCTGATGCTCAC

F:正向引物(forward);R:反向引物(reverse)。

1.11 WB 法检测 293T 及 293T-Siglec-6 细胞中 Siglec-6 蛋白表达

收集待检测细胞并提取细胞总蛋白,制备蛋白裂解液后采用 BCA 蛋白定量法测定各组蛋白样本浓度。定量完成后,每组取 20 μ g 总蛋白经 SDS-PAGE 转印至 NC 膜。5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入抗 Siglec-6 一抗(1:500)4 $^{\circ}$ C 处理过夜。次日,加入 HRP 标记二抗(1:5 000)室温处理 1 h 后,使用 ECL 化学发光液显影。

1.12 CCK-8法检测 Siglec-6 KO对U937细胞增殖能力的影响

取对数生长期的U937及U937-Siglec-6 KO细胞,制备单细胞悬液,以 3×10^5 个/孔的细胞浓度接种于96孔板中,每孔培养基体积100 μ L,每组设置6个复孔,同时设置空白培养基对照孔。分别于培养后0、24、48和72 h避光加入10 μ L/孔CCK-8溶液,继续培养1.5 h。随后,使用酶标仪检测450 nm处各孔光密度(D)值,根据检测结果比较两组细胞增殖能力差异。

1.13 实时无标记细胞分析(real-time cell analysis, RTCA)法检测 Siglec-6 CAR-T细胞对293T-Siglec-6细胞的杀伤作用

采用E-Plate 16 PET板进行RTCA检测。每孔接种293T或293T-Siglec-6靶细胞 1.5×10^4 个,培养20 h,待细胞贴壁生长稳定后,按效靶比(1:1、3:1)加入效应T细胞。通过实时监测细胞指数评估CAR-T细胞对贴壁肿瘤细胞的特异性杀伤作用。

1.14 荧光素酶生物发光法检测 Siglec-6 CAR-T细胞对U937-Luc及U937-Siglec-6 KO-Luc细胞的杀伤活性

将稳定表达荧光素酶的悬浮靶细胞与效应T细胞按不同效靶比(3:1、1:1、1:3、1:6、1:10)共培养24 h。预先采用流式细胞术检测各组CAR-T细胞的CAR阳性率,并按CAR⁺细胞绝对数调整总效应细胞数。共培养结束后,按Stable-Lite Luciferase Assay System说明书配制并加入底物,室温反应10~15 min,使用酶标仪检测化学发光值并计算特异性杀伤率。此外,为评价不同共刺激结构域Siglec-6 CAR-T细胞在重复抗原刺激条件下的持续杀伤能力,设置3轮连续共培养实验。每轮共培养24 h后检测靶细胞荧光素酶信号,并按相同效靶比重新加入新鲜U937-Luc靶细胞进入下一轮。

1.15 流式杀伤法及ELISA检测 Siglec-6 CAR-T对肿瘤细胞的杀伤活性

收集对数生长期的肿瘤靶细胞,经离心后弃上清后,用适量RPMI 1640无血清培养基重悬。按每4 mL重悬液加入1 μ L CellTracker™ Deep Red荧光染料的比例进行染色,混匀后置于37 °C培养箱中培养15 min。染色完成后洗涤细胞,更换完全培养基重悬,将标记后的肿瘤靶细胞铺板。

为比较3条候选Siglec-6 CAR-T细胞的体外杀伤活性,以Siglec-6阳性U937细胞为靶细胞,将Mock-T、CAR-T-1、CAR-T-2及CAR-T-3按效靶比为1:1共培养24 h。共培养结束后收集上清液,采用ELISA试剂盒检测IFN- γ 及TNF- α 水平。在筛选获得优势CAR-T结构后,以Mock-T细胞和优化后的Siglec-6 CAR-T细胞为效应细胞,U937、MV4-11和K562细胞为靶细胞,按效靶比1:1的比例进行共培养。分别于共培养24和48 h

收集细胞,每份样本加入1 μ L计数磁珠,通过流式细胞术定量检测剩余靶细胞占比,以评估优化后的Siglec-6 CAR-T细胞对不同AML细胞的靶向杀伤作用。

1.16 U937-Luc异种移植小鼠模型构建及CAR-T细胞治疗

小鼠适应性饲养1周后,经尾静脉注射U937-Luc细胞(2×10^5 个/只)建立AML异种移植模型,将细胞接种当天记为第0天。接种次日确认小鼠状态,实验期间每日观察小鼠精神、活动及生存情况,每2 d称量小鼠体质量。于细胞接种后的第5天进行首次活体成像检测,成像前经腹腔注射D-荧光素底物(100 μ L/只)。随后采用活体成像系统检测小鼠体内荧光信号,作为基线肿瘤负荷。完成基线成像后,根据小鼠体质量将荷瘤小鼠进行随机分组,每组6只。分组完成后于当日及分组后第5天各进行1次细胞回输,CAR-T组给药剂量为 5×10^6 个CAR⁺T细胞/只;Mock-T组回输等量Mock-T细胞作为荷瘤对照组。细胞回输后,每5 d进行一次活体成像检测,以动态监测肿瘤负荷变化。

在CAR-T细胞回输后的第7、14天,每组随机选取3只存活小鼠进行外周血采集,用于检测T细胞功能及表型相关指标。所有小鼠均纳入生存分析,并采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线。当小鼠出现后肢瘫痪、濒死等预设人道终点事件时,按动物伦理要求处置并立即取材,收集小鼠外周血及主要器官组织,称重计算器官指数(器官指数=小鼠器官质量/小鼠体质量 $\times 100\%$)并完成血清生化指标检测(眼眶采血获取小鼠外周血,置于4 °C冰箱2 h后,以 $3\,000 \times g$ 离心5 min,收集小鼠血清,根据小鼠血生化试剂盒说明书进行操作及计算)。同时,将主要器官组织经4%多聚甲醛固定24~48 h,常规脱水、石蜡包埋、切片后进行H-E染色,并于光学显微镜下观察组织形态学变化。

1.17 统计学处理

除动物实验外,所有实验均独立重复3次及以上。统计图表使用GraphPad Prism 9.5绘制,生存曲线组间差异使用Log-rank (Mantel-Cox)检验。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

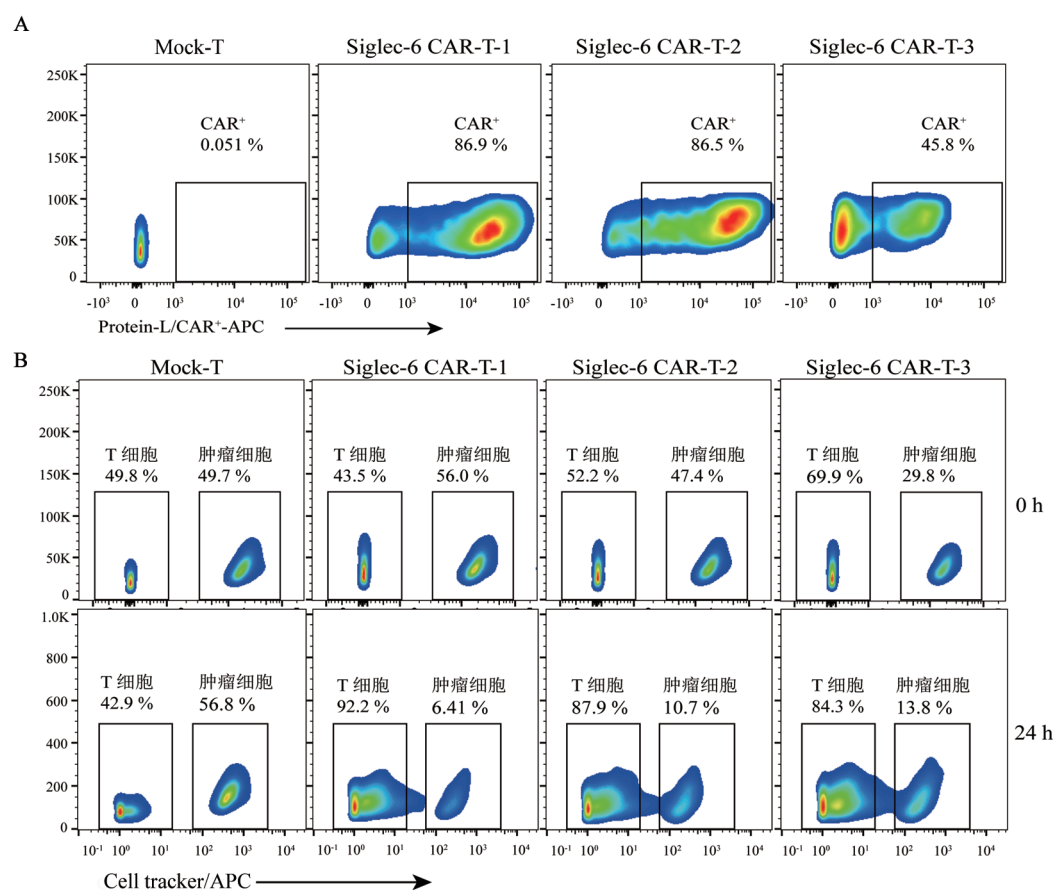
2 结果

2.1 CAR-T-1在候选Siglec-6 CAR-T中表现出较强的体外杀伤活性

流式细胞术比较3种候选CAR-T细胞的CAR表达水平,结果(图2A)显示,CAR-T-1和CAR-T-2表面的CAR阳性率相近,且均高于CAR-T-3。体外杀伤评估结果(图2B)显示,CAR-T-1组活靶细胞比例较0 h

明显降低,提示CAR-T-1具有较强的短期体外杀伤活性。鉴于CAR-T-3组CAR阳性率较低,且0 h时靶细胞比例与其他组存在一定差异,故未将其24 h靶

细胞比例直接用于与CAR-T-1和CAR-T-2杀伤幅度的比较。综上,选择CAR-T-1对应的scFv用于后续CAR结构优化。



A: Mock-T、CAR-T-1、CAR-T-2 和 CAR-T-3 细胞的 CAR 阳性率; B: 流式细胞术检测 3 种 Siglec-6 CAR-T 细胞对 Siglec-6 阳性 U937 细胞的体外杀伤作用。

图2 3种Siglec-6 CAR-T细胞的CAR阳性率及体外杀伤功能

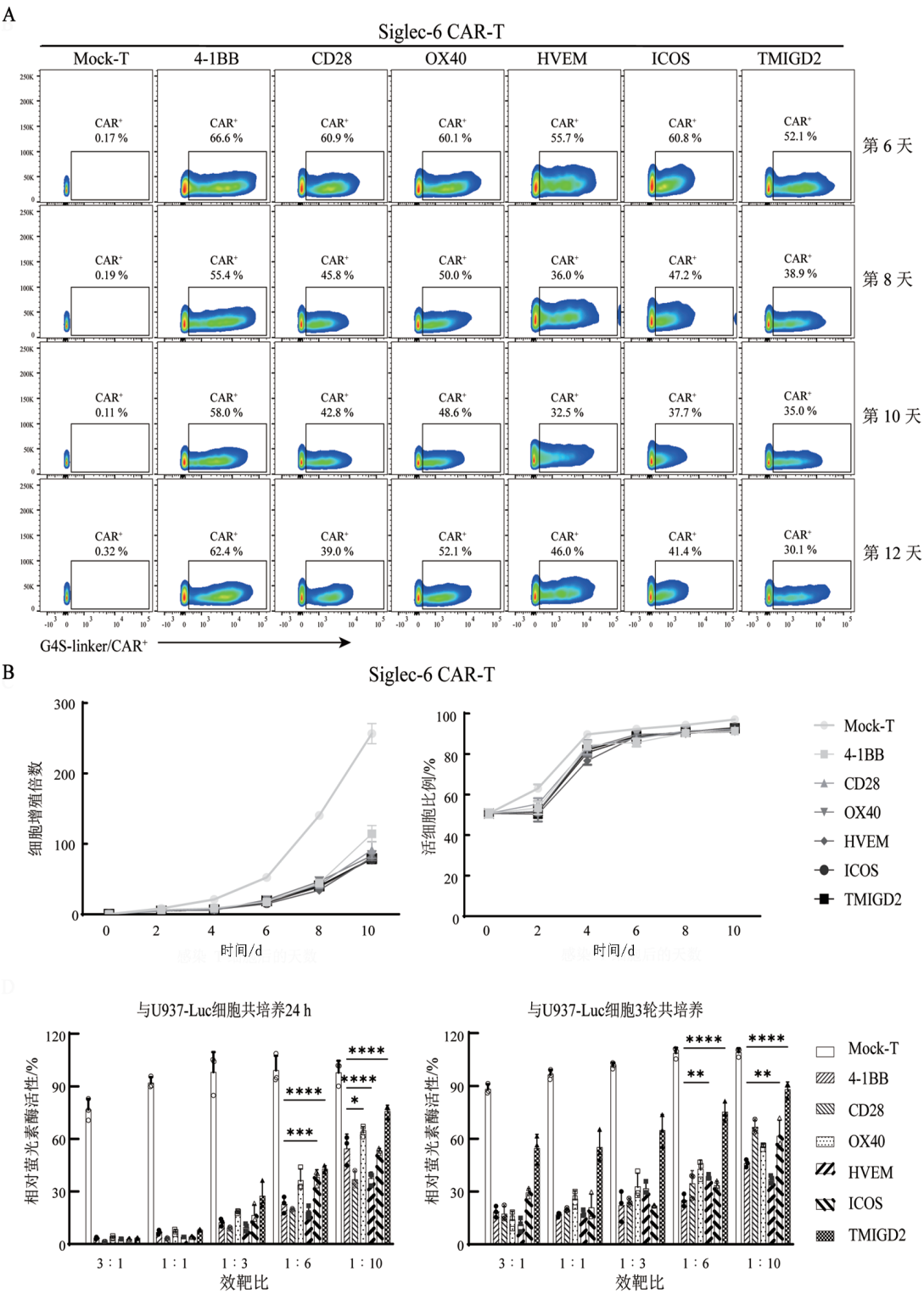
2.2 4-1BB 共刺激结构域在 CAR 阳性率稳定性及杀伤效应方面表现较好

流式细胞术检测结果(图3A)显示,与其他共刺激结构域组相比,4-1BB组在感染后第6、8、10、12天的CAR阳性率整体更为稳定。细胞增殖情况与存活率检测结果(图3B)显示,各组Siglec-6 CAR-T细胞的扩增趋势及活细胞比例变化趋势相近,组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。荧光素酶活性检测结果(图3C)显示,与Mock-T相比,各Siglec-6 CAR-T组均可杀伤U937-Luc靶细胞。不同效靶比条件下,4-1BB的杀伤效应整体高于其他组别,且差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$);且在3轮共培养条件下,上述趋势仍可观察到。综上,携带4-1BB共刺激结构域的Siglec-6 CAR-T细胞在CAR阳性率稳定性及体外杀伤效应方面表现更佳,故选用4-1BB作为共刺激分子用于后续实验。

2.3 抗原刺激促进 Siglec-6 CAR-T 细胞向效应表型

分化并显著活化

将Siglec-6 CAR-T细胞与Siglec-6阳性U937细胞共培养后,采用流式细胞术检测其表型变化($n = 3$),结果(图4A)显示,抗原刺激前后Siglec-6 CAR-T细胞的CD4⁺/CD8⁺亚群比例整体保持稳定。分化表型分析结果(图4B)显示,抗原刺激24 h后,Siglec-6 CAR-T细胞呈现向效应表型分化的趋势。活化表型分析结果(图4C)显示,与0 h相比,抗原刺激24 h后,Siglec-6 CAR-T细胞中CD25⁺CD69⁺比例明显升高,且显著高于同期Mock-T组(均 $P < 0.0001$),提示Siglec-6 CAR-T细胞经靶抗原刺激后被有效激活。同时,抗原刺激后Siglec-6 CAR-T细胞中LAG-3⁺及PD-1⁺TIM-3⁺细胞比例亦出现不同程度升高。其中,LAG-3⁺比例在CD8⁺和CD4⁺T细胞中均显著增加(均 $P < 0.0001$);PD-1⁺TIM-3⁺比例在CD8⁺T细胞中维持较高水平,在CD4⁺T细胞中于24 h显著提升($P < 0.0001$)。



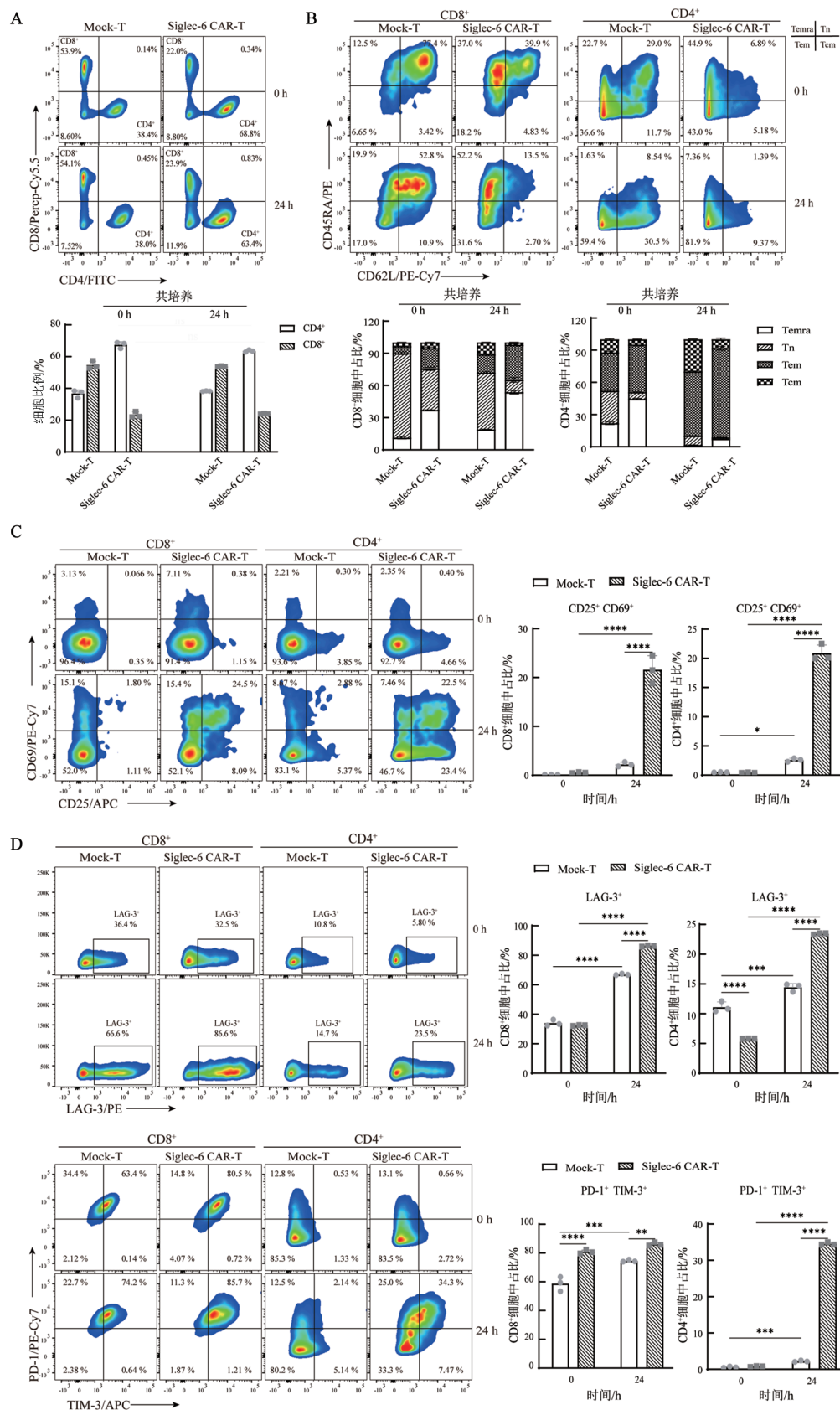
A: 流式细胞术检测感染后第 6、8、10、12 天各组 CAR 阳性率; B: 各组 Siglec-6 CAR-T 细胞在感染后 0~10 天的扩增倍数及存活率变化; C: 荧光素酶法检测不同共刺激结构域 Siglec-6 CAR-T 细胞对 Siglec-6 阳性 U937-Luc 细胞的杀伤活性。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 不同共刺激结构域 Siglec-6 CAR-T 细胞的 CAR 阳性率及其体外杀伤活性

2.4 Siglec-6 CAR-T 细胞对 Siglec-6 阳性 AML 细胞表现出靶点依赖性杀伤

流式细胞术检测不同白血病细胞表面的抗原表达丰度结果(图 5A)显示, U937 细胞 Siglec-6 荧光信号明显增强, MV4-11 细胞可见较弱荧光信号, 而

K562 细胞未见明显荧光信号, 提示 3 种细胞表面 Siglec-6 表达水平存在差异。将 Siglec-6 CAR-T 细胞分别与上述 3 种靶细胞按效靶比为 1:1 共培养, 流式细胞术检测结果(图 5B)显示, 与 Mock-T 组相比, Siglec-6 CAR-T 细胞在共培养 24 h 及 48 h 后均可显



A: CD4⁺与CD8⁺ T细胞亚群比例变化; B: T细胞分化表型(Tn、Tem、Tem、Temra)分布情况; C: CD4⁺与CD8⁺ T细胞中活化标志物(CD25⁺CD69⁺)表达水平; D: CD4⁺与CD8⁺ T细胞中耗竭/持续抗原刺激相关标志物(LAG-3⁺及PD-1⁺TIM-3⁺)的表达分析。

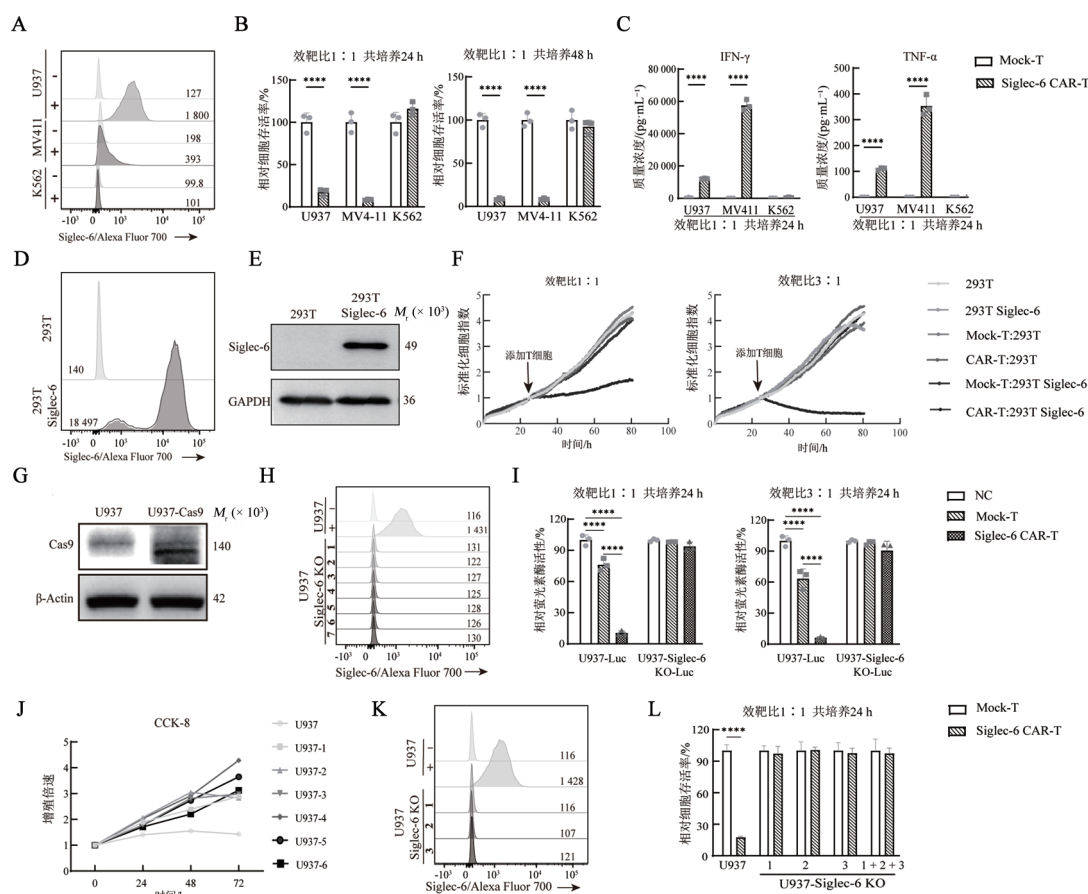
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 Siglec-6 CAR-T细胞在抗原刺激前后的表型变化特征

著降低 Siglec-6 阳性 U937 和 MV4-11 细胞的相对存活率(均 $P < 0.0001$),而对 Siglec-6 阴性 K562 细胞未见明显杀伤作用($P > 0.05$)。ELISA 检测结果(图 5C)显示, Siglec-6 CAR-T 细胞与 U937 或 MV4-11 细胞共培养后,上清液中 IFN- γ 及 TNF- α 的释放水平显著升高($P < 0.0001$);与 K562 细胞共培养后,两组细胞因子水平差异无统计学意义。

为进一步分析 Siglec-6 表达水平与 CAR-T 细胞杀伤效应之间的关系,本研究构建了 293T-Siglec-6 过表达细胞,并采用流式细胞术、WB 及 RTCA 实验进行验证。流式细胞术(图 5D)和 WB 检测结果(图 5E)显示, 293T-Siglec-6 细胞中 Siglec-6 表达明显升高。

RTCA 分析(图 5F)显示,在效靶比为 1:1 及 3:1 的条件下, Siglec-6 CAR-T 细胞均能特异性裂解 293T-Siglec-6 细胞,而对野生型 293T 细胞无明显影响。在 Siglec-6 敲除模型中, U937-Siglec-6 KO 细胞表面 Siglec-6 表达明显降低,提示 Siglec-6 敲除模型构建成功(图 5G,H)。萤光素酶生物发光法检测结果(图 5I)显示, Siglec-6 CAR-T 细胞对 U937-Siglec-6 KO-Luc 细胞的杀伤效应明显减弱或消失。进一步采用 U937-Siglec-6 KO 单克隆细胞验证亦观察到 Siglec-6 表达缺失(图 5J,K)及 CAR-T 细胞杀伤作用消失(图 5L)。上述结果表明, Siglec-6 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤具有明确的 Siglec-6 靶点依赖性。



A: U937、MV4-11 及 K562 细胞表面 Siglec-6 抗原表达水平; B: 流式细胞术检测 Siglec-6 CAR-T 细胞对 U937、MV4-11 和 K562 细胞的杀伤作用; C: ELISA 法检测(效靶比为 1:1)效应细胞与肿瘤细胞共培养 24 h 上清液中 IFN- γ 及 TNF- α 的释放水平; D、E: 293T-Siglec-6 过表达细胞中 Siglec-6 表达验证; F: RTCA 法检测 Siglec-6 CAR-T 细胞对 293T-Siglec-6 细胞的杀伤作用; G、H: U937-Cas9 细胞及 U937-Siglec-6 KO 多克隆细胞构建验证; I: 萤光素酶生物发光法检测 Siglec-6 CAR-T 细胞对 U937-Luc 及 U937-Siglec-6 KO-Luc 细胞的杀伤作用; J、K: U937-Siglec-6 KO 单克隆细胞筛选及 Siglec-6 表达验证(U937-1~U937-6 为 U937-Siglec-6 KO 单克隆细胞); L: Siglec-6 CAR-T 细胞对野生型 U937 及 U937-Siglec-6 KO 单克隆细胞的杀伤作用。**** $P < 0.0001$ 。

图 5 Siglec-6 CAR-T 细胞的体外特异性杀伤活性及靶点依赖性验证

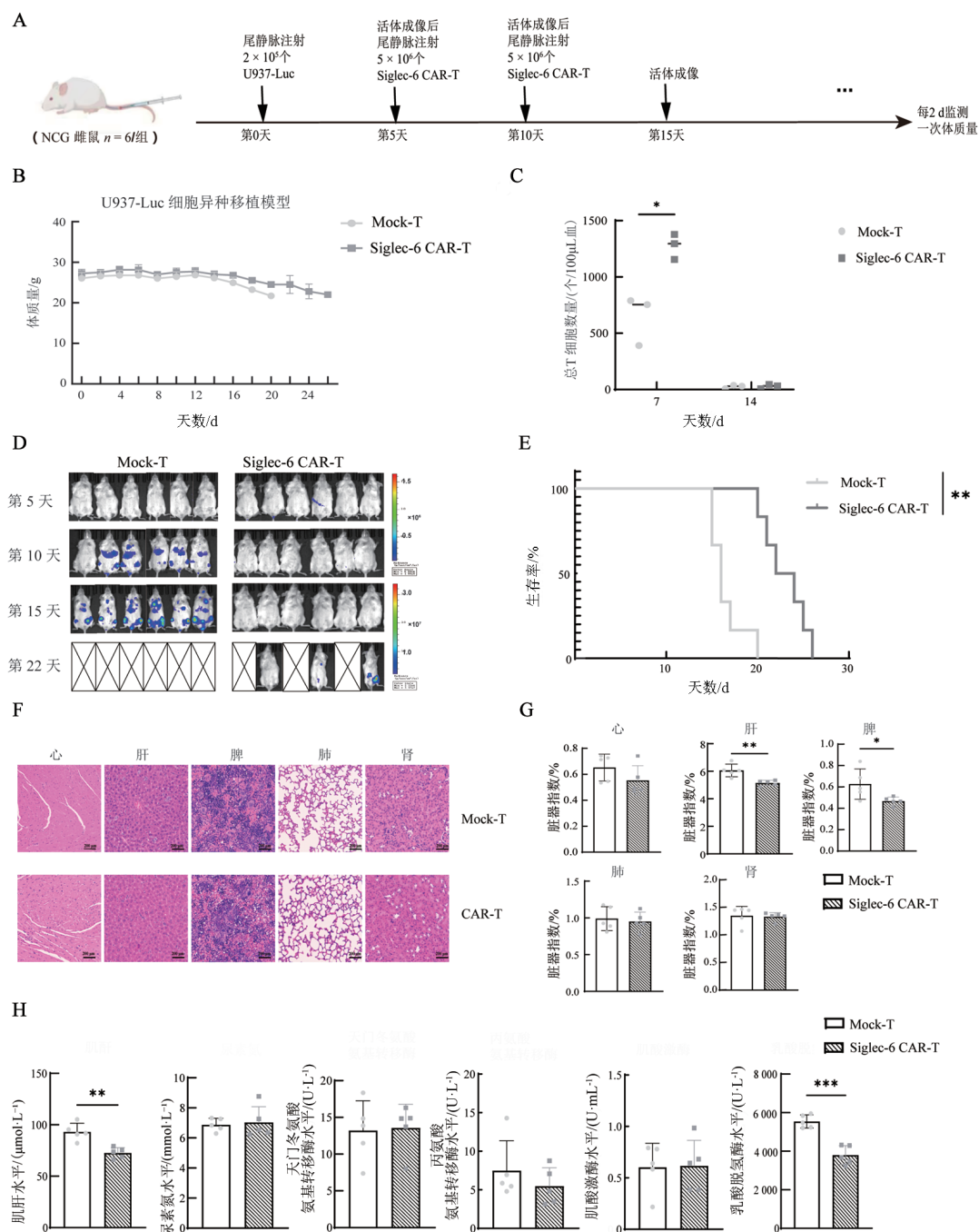
2.5 Siglec-6 CAR-T 细胞的体内抗肿瘤活性及短期安全性

利用 NCG 小鼠构建 U937-Luc 异种移植瘤模型, 并按实验方案进行 Mock-T 或 Siglec-6 CAR-T 细胞回

输治疗(图 6A)。小鼠体质量监测结果(图 6B)显示, Mock-T 组与 Siglec-6 CAR-T 组小鼠的体质量变化趋势相近, 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。流式细胞术检测结果(图 6C)显示, 治疗后第 7 天, Siglec-6

CAR-T组小鼠外周血中总T细胞数量高于Mock-T组($P < 0.05$);治疗后第14天,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。活体生物发光成像(图6D)显示,Mock-T组小鼠体内生物发光信号随时间延长逐渐增强,而Siglec-6 CAR-T组小鼠生物发光信号整体低于Mock-T组,提示其体内肿瘤负荷较低。Kaplan-Meier生存分析(图6E)显示,Siglec-6 CAR-T组小鼠生存期较Mock-T组显著延长($P < 0.01$)。短期安全

性评估方面,H-E染色结果(图6F)显示,两组小鼠心、肝、脾、肺、肾组织未见明显形态学损伤。器官指数分析(图6G)显示,Siglec-6 CAR-T组肝、脾的器官指数显著低于Mock-T组,其余器官指数未见显著差异。血清生化指标检测结果(图6H)显示,Siglec-6 CAR-T组小鼠的肌酐和乳酸脱氢酶水平显著低于Mock-T组,尿素氮、ALT、AST及肌酸激酶水平两组间差异无统计学意义。



A: U937-Luc 异种移植模型构建及 CAR-T 细胞治疗流程示意图; B: 小鼠体质量变化; C: 小鼠外周血 T 细胞数量; D: 活体生物发光成像检测小鼠体内肿瘤负荷; E: Kaplan-Meier 生存曲线; F: 小鼠主要器官 H-E 染色; G: 小鼠主要器官指数; H: 小鼠血清生化指标检测。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图6 Siglec-6 CAR-T 细胞的体内抗肿瘤疗效及安全性评价

3 讨论

AML具有高度异质性,复发/难治患者目前仍缺乏安全且持久有效的根治方案。CAR-T细胞治疗虽在B细胞恶性肿瘤中已取得显著进展,但其在AML领域中的应用仍存在诸多瓶颈,包括理想靶抗原缺乏、正常造血毒性风险及肿瘤抗原异质性等,极大限制了其临床推广。本研究围绕Siglec-6这一潜在的AML治疗靶点,构建并优化靶向Siglec-6的CAR-T细胞,评价其体外抗白血病活性、靶点特异性及初步体内疗效和短期安全性。研究结果证实,Siglec-6 CAR-T细胞可高效杀伤Siglec-6阳性AML细胞,在U937-Luc异种移植小鼠模型中可有效降低肿瘤负荷、延长荷瘤小鼠生存期,表明Siglec-6具备成为AML细胞治疗优质靶点的深入研究价值。本研究首先比较了3种候选人源化Siglec-6 scFv对应的CAR-T细胞表面表达水平及体外抗肿瘤杀伤功能,筛选出综合性能较好的CAR-T-1 scFv序列用于后续CAR结构优化。

与既往研究^[7]中采用小鼠来源scFv的设计不同,本研究采用人源化scFv序列,可有效降低潜在免疫原性,为后续临床转化提供基础。共刺激结构域是影响CAR-T细胞活化、增殖及长效抗肿瘤功能的核心元件。既往研究^[8-10]表明,4-1BB信号可改善T细胞线粒体功能、增强细胞抗凋亡能力、延长CAR-T细胞体内存续时间,本研究基于二代CAR架构,比较了4-1BB与CD28、ICOS、HVEM、TMIGD2、OX40不同共刺激结构域对CAR-T细胞功能的影响。结果显示,4-1BB结构域可显著提升CAR-T细胞在T细胞表面的表达稳定性,同时保持优异的体外肿瘤杀伤效应,与既往研究的认识基本一致。研究结果还提示,CD28虽可诱导较快的初始扩增,但也可能与细胞代谢压力增加及功能衰减相关^[11]。此外,CD28、ICOS及TMIGD2组的CAR阳性率随培养时间延长呈下降趋势,现有数据暂无法明确其具体机制,推测可能与持续性本底信号激活、细胞凋亡、病毒转导效率差异、CAR蛋白表达不稳定等因素相关,后续可通过Annexin V/7-AAD凋亡检测、CAR转基因拷贝数定量、CAR蛋白表达动态分析等实验深入阐释。

靶点特异性是AML CAR-T细胞治疗安全的核心问题。目前临床常用的AML靶点CD33、CD123广泛表达于白血病细胞表面^[12-13],但由于其亦在正常造血干/祖细胞上表达^[14],故靶向这些抗原可能带来骨髓抑制和造血恢复延迟等风险,限制其治疗窗口^[15-16]。已有研究^[7]表明,Siglec-6在部分AML细胞中高表达,而在正常造血干细胞中低表达或不表达,

具备潜在的安全治疗窗口。本研究体外实验显示,优化后的Siglec-6 CAR-T细胞可特异性识别并高效清除Siglec-6阳性的U937、MV4-11 AML细胞,而对Siglec-6阴性的K562细胞未见明显杀伤作用。进一步通过293T-Siglec-6过表达模型和U937-Siglec-6敲除模型验证发现,CAR-T细胞杀伤效应随靶细胞Siglec-6表达状态改变而变化,进一步支持其抗肿瘤作用具有Siglec-6抗原依赖性。

体内动物实验结果显示,Siglec-6 CAR-T细胞可有效降低U937-Luc异种移植小鼠体内的肿瘤生物发光信号,并延长荷瘤小鼠生存期,提示其在该模型中具有一定抗白血病活性。在本研究观察周期内,Siglec-6 CAR-T治疗未导致小鼠体质量明显下降,主要器官H-E染色亦未见明显形态学损伤。器官指数及部分血清生化指标的组间差异可能与肿瘤负荷变化、治疗反应或模型进展有关。然而,由于本研究未纳入正常小鼠作为对照,且NCG异种移植模型难以完整反映人正常造血系统及正常组织Siglec-6表达背景,因此现有安全性结果仅可提示短期观察中未见明显急性组织损伤,尚不足以全面评价长期用药安全性。

本研究虽取得阶段性积极成果,但仍存在诸多局限性,需在后续研究中进一步完善。其一,本研究CAR-T细胞均来源于单一供者,无法体现不同供者T细胞的个体差异对实验结果的影响;其二,体外功能验证仅依托AML细胞,缺乏足量AML患者原代肿瘤样本的临床相关性验证;其三,体内研究采用U937-Luc细胞异种移植模型,无法完全模拟患者体内复杂的骨髓免疫抑制微环境^[17];其四,研究对正常造血细胞及Siglec-6潜在表达的正常组织的毒性评估尚不全面。后续将依托AML患者原代样本、患者来源异种移植(patient-derived xenograft, PDX)模型、人源化小鼠模型,结合正常造血细胞毒性实验,系统完善Siglec-6 CAR-T细胞的抗肿瘤疗效、适用人群及安全治疗窗口评估,并进一步探索联合用药等优化治疗方案,加速其临床转化进程^[18-19]。

综上所述,本研究成功构建并优化了靶向Siglec-6的新型CAR-T细胞,筛选获得性能优异的人源化scFv联合4-1BB共刺激结构域的CAR组合。体内外实验结果提示,该CAR-T细胞对Siglec-6阳性AML细胞具有较明确的抗原依赖性杀伤活性,并在U937-Luc异种移植模型中显示出一定抗白血病作用。上述结果支持Siglec-6作为复发/难治性AML潜在治疗靶点的进一步研究价值。后续研究将重点优化临床级CAR-T细胞制备工艺,开展探索性临床试验,以期将该新型免疫治疗策略应用于临床,改善复发/难治性AML患者的不良预后。

[参考文献]

- [1] Shimony S, Stahl M, Stone R M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98(3): 502-526. DOI:10.1002/ajh.26822.
- [2] Dinardo C D, Erba H P, Freeman S D, et al. Acute myeloid leukaemia[J]. *Lancet*, 2023, 401(10393): 2073-2086. DOI:10.1016/S0140-6736(23)00108-3.
- [3] Cao S T, Wang Q X, Zhu G Q. From chemotherapy to targeted therapy: unraveling resistance in acute myeloid leukemia through genetic and non-genetic insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(9): 4005. DOI:10.3390/ijms26094005.
- [4] Locke F L, Ghobadi A, Jacobson C A, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(1): 31-42. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
- [5] Haubner S, Subklewe M, Sadelain M. Honing CAR T cells to tackle acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2025, 145(11): 1113-1125. DOI: 10.1182/blood.2024024063.
- [6] Canichella M, Molica M, Mazzone C, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in acute myeloid leukemia: state of the art and recent advances[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(1): 42. DOI: 10.3390/cancers16010042.
- [7] Jetani H, Navarro-Bailón A, Maucher M, et al. Siglec-6 is a novel target for CAR T-cell therapy in acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2021, 138(19): 1830-1842. DOI:10.1182/blood.2020009192.
- [8] Layssol-Lamour C J, Sarry J E, Braun J D, et al. Reference values for hematology, plasma biochemistry, bone marrow cytology and bone histology of NOD.Cg-prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ immunodeficient mice[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2021, 60(1): 4-17. DOI: 10.30802/aalas-jaalas-20-000020.
- [9] Menk A V, Scharping N E, Rivadeneira D B, et al. 4-1BB costimulation induces T cell mitochondrial function and biogenesis enabling cancer immunotherapeutic responses[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(4): 1091-1100. DOI:10.1084/jem.20171068.
- [10] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen S J C, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428. DOI:10.1016/j.ccell.2015.09.004.
- [11] Cook M S, King E, Flaherty K R, et al. CAR-T cells containing CD28 versus 4-1BB co-stimulatory domains show distinct metabolic profiles in patients[J]. *Cell Rep*, 2025, 44(7): 115973. DOI:10.1016/j.celrep.2025.115973.
- [12] Tambaro F P, Singh H, Jones E, et al. Autologous CD33-CAR-T cells for treatment of relapsed/refractory acute myelogenous leukemia[J]. *Leukemia*, 2021, 35(11): 3282-3286. DOI: 10.1038/s41375-021-01232-2.
- [13] Budde L, Song J Y, Kim Y, et al. Remissions of acute myeloid leukemia and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following treatment with CD123-specific CAR T cells: a first-in-human clinical trial[J]. *Blood*, 2017, 130 (Suppl 1): 811. DOI: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.811.811.
- [14] Ehninger A, Kramer M, Röhlig C, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia[J]. *Blood Cancer J*, 2014, 4(6): e218. DOI: 10.1038/bcj.2014.39.
- [15] Boucher J C, Shrestha B, Vishwasrao P, et al. Bispecific CD33/CD123 targeted chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2023, 31: 100751. DOI:10.1016/j.omto.2023.100751.
- [16] Gill S, Tasian S K, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells[J]. *Blood*, 2014, 123(15): 2343-2354. DOI:10.1182/blood-2013-09-529537.
- [17] Damiani D, Tiribelli M. Advancing chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: current limitations and emerging strategies[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(12): 1629. DOI:10.3390/ph17121629.
- [18] Yu Y Y, Peng W J. Recent progress in targeting the sialylated glycan-SIGLEC axis in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Biol Med*, 2023, 20(5):369-384. DOI:10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0046.
- [19] Vago L, Gojo I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(4): 1552-1564. DOI: 10.1172/jci129204.

[收稿日期] 2026-01-30

[修回日期] 2026-05-29

[本文编辑] 陈怡宁