

靶向 MMSA-1 的 CAR-T 细胞治疗多发性骨髓瘤的抗肿瘤活性研究



童西琴¹, 梁雨星¹, 陈国鹏¹, 周芙玲^{1, 2, 3}

1. 武汉大学中南医院血液内科 (武汉 430071)
2. 武汉大学护理学院 (武汉 430071)
3. 武汉大学全生命周期健康研究中心 (武汉 430071)

【摘要】目的 构建靶向多发性骨髓瘤 (MM) 特异性抗原-1 (MMSA-1) 的嵌合抗原受体 T (CAR-T) 细胞, 并评价其对 MM 的抗肿瘤活性及初步安全性。**方法** 采用流式细胞术检测 K562、MM 细胞系 (MM.1S、U266、RPMI-8226) 及原代 MM 细胞中 MMSA-1/ZDHHC9 表达; 筛选 MMSA-1 特异性单链可变区抗体片段并构建第二代 CAR-T 细胞; 体外检测 MMSA-1 CAR-T 细胞的 CAR 阳性率、扩增能力、对 RPMI-8226 细胞的杀伤活性及经靶细胞刺激后的效应分子释放; 在小鼠 RPMI-8226 异种移植瘤模型中评价 CAR-T 体内疗效, 并结合公共数据库、血液学/生化指标及 H&E 染色进行安全性观察。**结果** MMSA-1/ZDHHC9 在 MM.1S、U266、RPMI-8226 及原代 MM 细胞中可检测到表达, K562 细胞仅显示低水平背景信号。MMSA-1 CAR-T 细胞 CAR 阳性率约 52.2%, 体外扩增良好; 在 5 : 1、3 : 1 和 1 : 1 效靶比条件下, MMSA-1 CAR-T 细胞组 RPMI-8226 细胞残留比例均显著低于普通 T 细胞组。体内实验显示其可降低肿瘤负荷并延长小鼠生存期。初步安全性观察未见明显持续性体重下降、血液学异常、肝肾功能损伤或主要脏器病理学改变。**结论** MMSA-1 CAR-T 细胞具有初步抗 MM 活性, MMSA-1 可能作为 MM CAR-T 治疗的候选补充靶点, 但其适用人群和组织安全性仍需进一步验证。

【关键词】 MMSA-1; CAR-T; 免疫治疗; 多发性骨髓瘤; 异种移植模型

【中图分类号】 R733.3; R730.51 **【文献标识码】** A

Study of the antitumor activity of MMSA-1 CAR-T cells in multiple myeloma

TONG Xiqin¹, LIANG Yuxing¹, CHEN Guopeng¹, ZHOU Fuling^{1,2,3}

1. Department of Hematology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

2. School of Nursing, Wuhan University, Wuhan 430071, China

3. Research Center for Lifespan Health, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: ZHOU Fuling, Email: zhoufuling@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To construct chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells targeting multiple myeloma-specific antigen-1 (MMSA-1) and evaluate their antitumor activity and preliminary safety in multiple myeloma (MM). **Methods** Flow cytometry was used to detect MMSA-1/ZDHHC9 expression in K562 cells, MM cell lines (MM.1S, U266, and RPMI-8226), and primary MM cells. MMSA-1-specific single-chain variable fragments were screened and used to construct second-generation CAR-T cells. CAR expression, cell expansion, cytotoxic activity

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202605113

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82370176)

通信作者: 周芙玲, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, Email: zhoufuling@whu.edu.cn

against RPMI-8226 cells, and effector molecule release after target-cell stimulation were evaluated *in vitro*. The *in vivo* efficacy of CAR-T cells was assessed in an RPMI-8226 xenograft mouse model. Preliminary safety was evaluated using public database analysis, hematological and biochemical parameters, and H&E staining. **Results** MMSA-1/ZDHHC9 expression was detectable in MM.1S, U266, RPMI-8226, and primary MM cells, whereas K562 cells showed only low-level background signals. The CAR-positive rate of MMSA-1 CAR-T cells was approximately 52.2%, and MMSA-1 CAR-T cells showed favorable expansion *in vitro*. At effector-to-target ratios of 5:1, 3:1, and 1:1, MMSA-1 CAR-T cells significantly reduced the proportions of residual RPMI-8226 cells compared with conventional T cells group. *In vivo* experiments showed that MMSA-1 CAR-T cells reduced tumor burden and prolonged survival in mice, preliminary safety observations revealed no obvious sustained body weight loss, hematological abnormalities, liver or kidney dysfunction, or pathological changes in major organs. **Conclusion** MMSA-1 CAR-T cells exhibit preliminary anti-MM activity, suggesting that MMSA-1 may serve as a candidate complementary target for CAR-T therapy in MM. However, the applicable patient population and tissue safety still require further validation.

【Keywords】MMSA-1; CAR-T; Immunotherapy; Multiple myeloma; Xenograft model

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种难以治愈的血液系统恶性肿瘤, 近年来, 自体造血干细胞移植、免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂以及单克隆抗体等治疗手段的应用, 显著改善了 MM 患者的生存结局^[1-2]。但临床上绝大多数患者在治疗后依旧会复发, 复发/难治性 MM 患者生存期显著缩短^[3-4]。因此, 亟需开发新的临床治疗策略, 以降低复发风险并延缓疾病进展。

嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 疗法作为一种新兴的抗肿瘤治疗手段, 在难治性血液系统恶性肿瘤中展现出优异的抗肿瘤活性^[5]。靶向 CD19 抗原的 CAR-T 细胞已被美国食品药品监督管理局批准用于治疗复发/难治性急性 B 淋巴细胞白血病和弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 可诱导多数患者实现长期缓解^[6-8]。此外, 靶向 CD22 的 CAR-T 细胞治疗在初治或耐药急性 B 淋巴细胞白血病中也显示出一定疗效^[9]。B 细胞成熟抗原 (B-cell maturation antigen, BCMA) 因主要表达于恶性浆细胞, 成为 MM CAR-T 治疗中备受关注的靶点。BCMA CAR-T 细胞在复发/难治性 MM 患者中表现出显著的抗肿瘤活性且毒性相对较低^[10]。此外, 针对其他 MM 相关抗原的 CAR-T 细胞也正在研究中, 包括 CD19、CD138、CD38、免疫球蛋白 κ 轻链、信号淋巴细胞活化分子 F7、整合素 $\beta 7$ 、G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D (G protein-coupled receptor class C group 5 member D, GPRC5D)、CD56、CD44v6 和 CD70

等^[5, 11-12]。然而, 已有研究报道, 部分接受 BCMA CAR-T 治疗的 MM 患者出现复发, 主要因为残留 MM 浆细胞 BCMA 低表达或阴性表达^[13-15]。GPRC5D 和 TACI 等新靶点的发现证实不同抗原在骨髓瘤细胞上的表达模式存在互补性, 可为 BCMA 靶向治疗失败的患者开展序贯治疗或联合治疗提供新的选择^[14, 16]。CD38 虽为 MM 重要治疗靶点, 但该抗原同样表达于部分正常免疫细胞与组织细胞, 靶向该分子进行干预时存在脱靶毒性风险^[17]。因此, 发掘肿瘤特异性高、与现有靶点表达互补且具备临床转化价值的全新 MM 特异性靶点, 是当前 CAR-T 细胞免疫治疗领域极具现实意义的研究重点。

MM 特异性抗原-1 (multiple myeloma specific antigen-1, MMSA-1) 是本课题组前期采用重组表达克隆血清学抗原鉴定技术结合生物信息学分析发现的 MM 相关抗原^[18]。既往研究显示, MM 患者骨髓来源单个核细胞中 MMSA-1 表达水平高于对照人群, 复发/难治患者高于初诊患者, 且其高表达与不良预后独立相关^[19]。MMSA-1 在原代骨髓瘤细胞和 MM 细胞系中亦呈较高表达; MMSA-1 联合 DKK1 疫苗可增强细胞毒作用、延长生存并减轻骨破坏^[20]。基于此, 本研究构建 MMSA-1 CAR-T 细胞并评价其体内外抗骨髓瘤活性, 为 MM CAR-T 治疗提供候选补充靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: Ficoll-Paque 分离液购自天津灏

洋华海生物科技有限公司; CTS™ AIM V™ 无血清培养基、RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清和免疫细胞血清替代物 (ICSR) 购自美国 Gibco 公司; 抗人 CD3、CD28 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司; 重组人白细胞介素-2 (IL-2) 购自美国 MedChemExpress 公司; 聚凝胺 (polybrene) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ZDHHC9 多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗和 PE 标记 F(ab')₂ 山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Invitrogen 公司; Alexa Fluor 647 标记的山羊抗小鼠 IgG F(ab')₂ 片段特异性抗体购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司; FITC 标记抗人 CD3 抗体、佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (PMA)、离子霉素、布雷菲德菌素 A、流式固定破膜试剂、抗人颗粒酶 B、穿孔素和 IL-2 抗体、人 IL-2 和干扰素- γ (IFN- γ) ELISA 试剂盒, 以及小鼠 IL-6、IFN- γ 、IL-2、IL-3、IL-10 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) ELISA 试剂盒购自美国 BioLegend 公司; Mlu I 和 BamH I 限制性内切酶购自美国 New England Biolabs 公司。

主要仪器: FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 小动物活体成像 IVIS Spectrum 系统购自美国 PerkinElmer 公司; TEK-VET3 兽用全自动三分群血液分析仪购自江西特康科技有限公司; BS-240 Vet 全自动兽用生化分析仪购自深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司; ECLIPSE Ci 显微镜购自日本 Nikon 公司; Panoramic SCAN II 数字切片扫描仪购自济南丹吉尔电子有限公司。

1.2 骨髓样本及外周血收集

本研究收集武汉大学中南医院 MM 患者骨髓样本及健康供者外周血样本。所有患者均依据世界卫生组织相关诊断标准, 并参照美国国家综合癌症网络指南确诊为 MM。样本采集均在研究对象签署书面知情同意后书后进行。本研究符合《赫尔辛基宣言》相关原则, 并经武汉大学中南医院伦理委员会审批 (批号: 临研伦 [2023033])。

骨髓样本经 Ficoll-Paque 密度梯度离心分离骨髓单个核细胞 (原代 MM 细胞), 用于流式检测。用于制备 CAR-T 细胞的 T 细胞来源于健康供者外周血单个核细胞, 经抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体刺激活化后用于慢病毒转导和体外扩增。

1.3 细胞来源与培养

人源慢性髓系白血病细胞系 K562, 人源 MM 细胞系 MM.1S、U266、RPMI-8226 和人胚肾细胞 293T 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。K562、MM.1S、U266 和 RPMI-8226 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。293T 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4 流式细胞术检测 MMSA-1 表达及 CAR 阳性率

MMSA-1 相关基因为 ZDHHC9, 本研究采用抗 ZDHHC9 多克隆抗体检测细胞 MMSA-1/ZDHHC9 表达。分别取 5×10^5 个 K562、MM.1S、U266、RPMI-8226 细胞或原代 MM 细胞, 加入 ZDHHC9 多克隆抗体孵育。洗涤后加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗进行避光孵育。洗涤并重悬后行流式细胞术检测, 采用 FlowJo 软件分析。MMSA-1/ZDHHC9 表达水平以相对平均荧光强度 (MFI) 及阳性细胞比例表示。

CAR 阳性率采用 Alexa Fluor 647 标记的山羊抗小鼠 IgG F(ab')₂ 片段特异性抗体检测。该抗体识别 CAR 中的抗体来源单链可变区片段 (scFv), 用于评估 CAR 在 T 细胞表面的表达。染色后行流式细胞术检测, 并采用 FlowJo 软件分析。

1.5 MMSA-1 scFv 及 CAR 质粒构建

基于前期研究已提示 MMSA-1 可作为 MM 免疫治疗相关抗原^[20], 本研究进一步构建靶向 MMSA-1 的 CAR-T 细胞。抗 MMSA-1 抗体可变区序列分析、MMSA-1 scFv 候选序列设计及相关质粒合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。不同重链可变区和轻链可变区经 G4S linker 连接后形成 MMSA-1 scFv 候选克隆, 并经细胞水平结合筛选, 最终选择 VL2-G4S-VH4 作为 CAR 结构中的抗原识别结构域。将 VL2-G4S-VH4 scFv 与 CD8 α 信号肽连接后, 经 Mlu I 和 BamH I 双酶切插入 pHR 慢病毒载体。该 CAR 结构包括 MMSA-1 scFv、CD8 铰链区/跨膜区、4-1BB 共刺激结构域和 CD3 ζ 信号结构域。连接产物经测序验证正确后, 获得 pHR-MMSA-1 CAR 质粒。将 pHR-MMSA-1 CAR 质粒与本实验室保存的慢病毒包装辅助质粒 psPAX2 和 pMD2.G 共同转染 293T 细胞, 收集病毒上清并浓缩后用于后续 T 细胞转导实验。

1.6 T 细胞活化、慢病毒转导及 CAR-T 细胞扩增

将健康供者外周血单个核细胞重悬于 CTS™ AIM V™ 无血清培养基中, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$ 。加入 5% ICSR、50 ng/mL CD3、CD28 单克隆抗体活化 T 淋巴细胞, 培养 48 h。收集细胞并调整至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 按感染复数 5 加入浓缩慢病毒, 同时加入 200 U/mL IL-2 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺。孵育 6~8 h 后更换新鲜培养基并补充 200 U/mL IL-2, 此后每 2~3 d 补液并维持细胞密度约 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。扩增 10~12 d 后用于实验, 未转导的健康供者原代 T 细胞作为对照。

1.7 CAR-T 细胞体外细胞毒性实验

根据 MMSA-1 表达检测结果, RPMI-8226 细胞作为 MMSA-1 阳性靶细胞, K562 细胞作为 MMSA-1 低表达/背景信号对照细胞。将 RPMI-8226 细胞和 K562 细胞按 1:1 比例混合作为靶细胞, 并接种于 96 孔板中。随后分别按 1:1、3:1 和 5:1 的效靶比加入 MMSA-1 CAR-T 细胞或未转导 T 细胞, 共培养 24 h。

共培养结束后, 收集细胞并进行流式染色。采用 FITC 标记抗人 CD3 抗体 (BioLegend) 标记 T 细胞; 同时采用 ZDHHC9 多克隆一抗 (Invitrogen) 和 PE 标记 F(ab')₂ 山羊抗兔 IgG 二抗 (Invitrogen) 检测 MMSA-1/ZDHHC9 信号。染色完成后, 细胞经洗涤并固定, 采用流式细胞仪检测 FITC/FL1 和 PE/FL2 通道荧光信号, 并使用 FlowJo 软件进行分析。以 CD3 阴性靶细胞群体中 MMSA-1/ZDHHC9 阳性 RPMI-8226 细胞所占比例作为 RPMI-8226 细胞残留比例。

1.8 CAR-T 细胞效应分子及细胞因子检测

将 MMSA-1 CAR-T 细胞与 RPMI-8226 细胞按 3:1 效靶比共培养 24 h, 并加入布雷菲德菌素 A 以阻断细胞因子分泌。PMA 和离子霉素联合布雷菲德菌素 A 刺激 T 细胞作为阳性对照, 仅加入布雷菲德菌素 A 处理的细胞作为阴性对照。刺激后固定、破膜并进行胞内染色, 检测颗粒酶 B、穿孔素和 IL-2 表达。采用 FACSCalibur 流式细胞仪检测, 并使用 FlowJo 软件分析。

将 MMSA-1 CAR-T 细胞或未转导 T 细胞与 RPMI-8226 细胞按 3:1 效靶比共培养 24 h, 收集上清, 按 IL-2 和 IFN- γ ELISA 试剂盒说明书检测细胞因子水平。

1.9 体内抗肿瘤实验及安全性评价

8~12 周龄 NSG 小鼠购自南京大学模式动物研究所, 饲养于武汉大学中南医院实验动物中心无特定病原体级动物房中, 环境条件为温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%, 采用 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 自由摄取高压灭菌饲料和饮水。本研究经武汉大学中南医院实验动物福利伦理委员会审批 (批号: ZN2024083)。

每只小鼠经尾静脉注射 5×10^6 个表达荧光素酶的 RPMI-8226 细胞以建立 MM 异种移植瘤模型。通过腹腔注射 150 mg/kg D-荧光素钾盐后进行小动物活体成像。确认成瘤后, 经尾静脉输注 2×10^7 个 MMSA-1 CAR-T 细胞或未转导 T 细胞, 每组 8 只, 共 16 只。采用 IVIS Spectrum 系统监测肿瘤负荷, 并用 Living Image 软件分析。以 CAR-T 细胞输注日为第 0 天, 于治疗后第 0、3、6、9、12、21、28 和 35 天采集外周血、分离血清, ELISA 检测 IL-6、IFN- γ 、IL-2、IL-3、IL-10 和 GM-CSF。治疗后第 0、6 和 12 天检测血常规及血清生化指标, 包括白细胞计数 (WBC)、血红蛋白 (HGB)、血小板计数 (PLT)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肌酐 (Crea) 和尿素氮 (BUN)。当小鼠出现体重下降 $\geq 20\%$ 、明显活动障碍、后肢瘫痪或濒死状态时, 立即实施安乐死, 其余小鼠于实验观察期第 60 天实施安乐死。随后取心、肝、脾、肺和肾, 固定、石蜡包埋、切片并行苏木精-伊红 (H&E) 染色。

1.10 公共数据库分析

从 Human Protein Atlas (HPA, <https://www.proteinatlas.org/>)/Genotype-Tissue Expression (GTEx, <https://www.gtexportal.org/home/index.html>) 数据库提取正常组织 ZDHHC9 RNA 表达数据。从 Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库下载 GSE47552 和 GSE153380 数据: GSE47552 用于比较正常、意义未明单克隆丙种球蛋白血症 (MGUS)、冒烟型多发性骨髓瘤 (SMM) 和 MM 样本的 ZDHHC9 表达; GSE153380 用于比较原代浆细胞与 MM 浆细胞的 ZDHHC9 表达。以原代浆细胞组最高表达值为探索性阈值, 将 MM 浆细胞分为 ZDHHC9 低表达和高表达亚群。公共转录组数据反映 ZDHHC9 总转录本水平, 不能等同于 CAR-T 细胞可识别的细胞膜 MMSA-1 蛋白表达。

1.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析与绘图。符合正态分布的连续变量以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验; 不符合正态分布的连续变量以中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验; 分类变量以例数和百分比 ($n, \%$) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。细胞扩增曲线、肿瘤负荷动态变化及血清细胞因子动态变化等重复时间点数据采用双因素重复测量方差分析进行比较, 组间多重比较采用 Šidák 法校正。由于 T 细胞组小鼠在后期开始死亡, 导致部分时间点血清细胞因子动态检测数据缺失, 为避免生存偏倚和缺失数据对统计结果的影响, 本研究仅对各组小鼠均存活且样本完整的早期时间点进行组间统计分析; 小鼠开始死亡后的后续时间点仅用于趋势展示, 不纳入统计学分析。小鼠生存曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制, 组间生存差异采用 Log-rank/Mantel-Cox 检验分析。双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 MMSA-1 scFv 的构建、鉴定及筛选

对 16 种 MMSA-1 scFv 重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定, 均在约 25 kDa 处出现目标条带

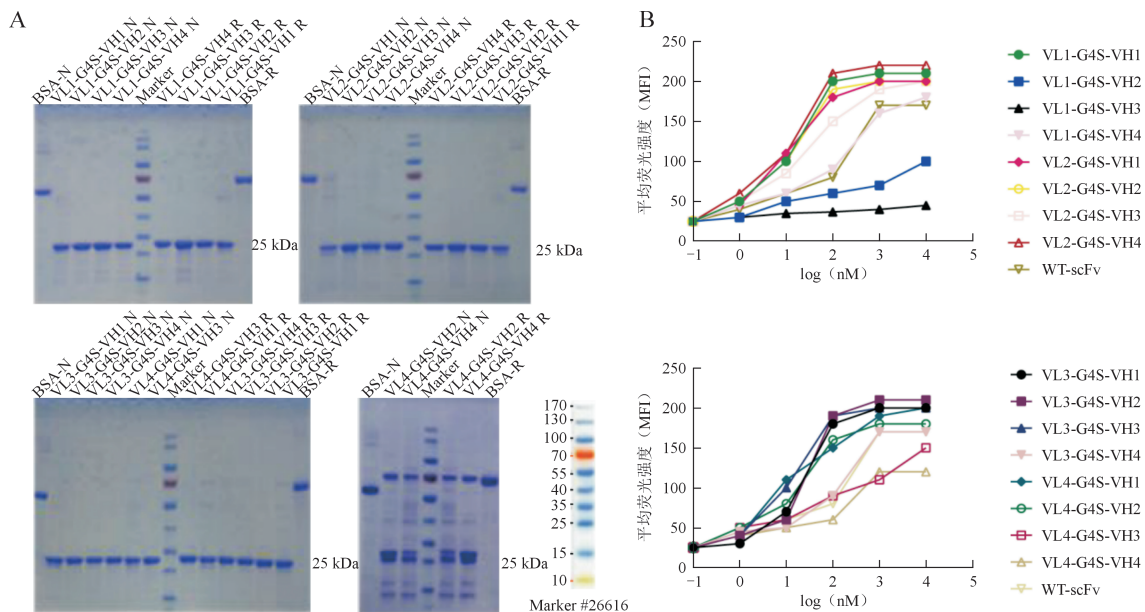


图1 抗 MMSA-1 scFv 克隆的鉴定与特征分析

Figure 1. Analysis of identification and characterization of anti-MMSA-1 scFv

注: A. 在还原性 (R) 和非还原性 (N) 条件下, SDS-PAGE 检测 16 种重组 MMSA-1 特异性 scFv 克隆的表达情况; B. 流式细胞术检测 16 种 scFv 克隆与 MM 细胞的相对结合能力; RPMI-8226 细胞作为 MMSA-1 阳性靶细胞, K562 细胞作为阴性对照细胞。

(图 1-A)。流式细胞术比较其与 RPMI-8226 和 K562 细胞的结合信号。根据预实验 MMSA-1/ZDHHC9 表达检测结果, RPMI-8226 作为阳性靶细胞, K562 作为低表达/背景信号对照。不同 scFv 的结合信号存在差异, 其中 VL2-G4S-VH4 与 RPMI-8226 细胞结合较强、在 K562 细胞上的背景结合较低, 故选为 CAR 抗原识别结构域 (图 1-B)。

2.2 靶向 MMSA-1 CAR-T 的构建与扩增

本研究设计并构建了靶向 MMSA-1 的第二代 CAR 慢病毒载体, 该 CAR 结构包括胞外抗 MMSA-1 scFv、CD8 铰链/跨膜区、4-1BB 共刺激结构域以及 CD3 ζ 信号转导结构域 (图 2-A 和 2-B)。随后, 将 pHR-MMSA-1-CAR 载体包装为慢病毒, 并转导人外周血来源 T 淋巴细胞, 制备 MMSA-1 CAR-T 细胞。慢病毒转导 48 h 后, 采用流式细胞术检测 CAR 表达。结果显示, MMSA-1 CAR 阳性 T 细胞比例为 52.2%, 提示 MMSA-1 CAR-T 细胞制备成功 (图 2-C)。为评估 MMSA-1 CAR-T 细胞的体外扩增能力, 本研究比较了普通 T 细胞与 MMSA-1 CAR-T 细胞在培养过程中的扩增动态。结果显示, 普通 T 细胞在体外培养期间呈低水平扩增, 而 MMSA-1 CAR-T 细胞培养 8~10 d 后扩增速度明显加快, 扩增倍数持续升高, MMSA-1 CAR-T 细胞的体外扩增能力显著高于普通 T 细胞 (图 2-D)。

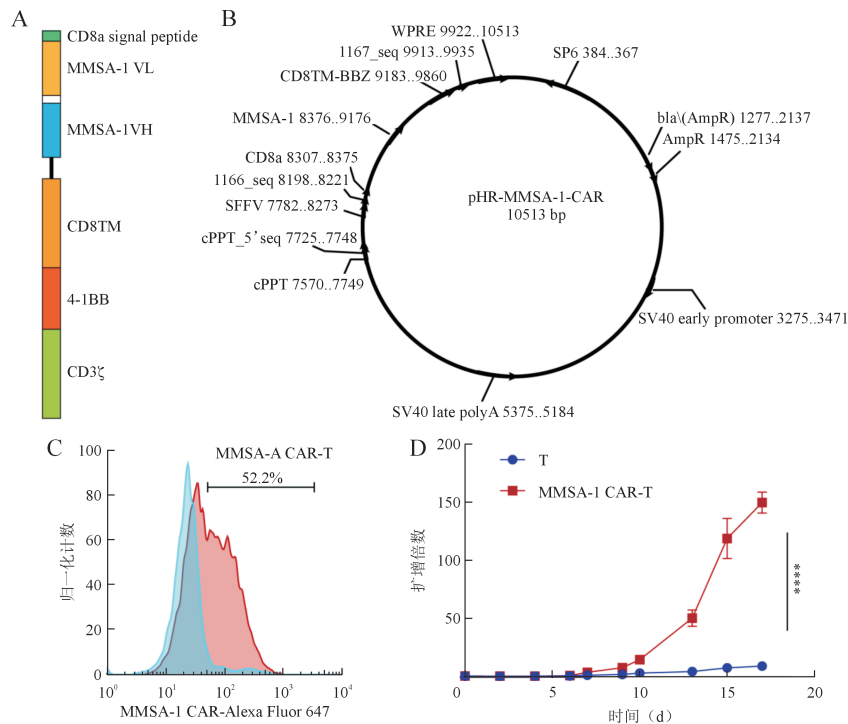


图2 MMSA-1 CAR-T细胞的制备与扩增

Figure 2. Generation and expansion of MMSA-1 CAR-T cells

注：A. 抗MMSA-1 CAR结构示意图；B. pHR-MMSA-1-CAR慢病毒质粒结构示意图；C. 流式细胞术检测慢病毒转导48 h后T细胞中MMSA-1 CAR表达情况；D. MMSA-1 CAR-T细胞和普通T细胞体外培养扩增曲线；**** $P<0.0001$ 。

2.3 MMSA-1 在MM细胞及原代患者样本中的表达特征

为明确MMSA-1 CAR-T细胞的潜在靶向基础，采用流式细胞术检测K562细胞、MM细胞系及原代MM细胞中MMSA-1表达水平。结果显示，MMSA-1在MM.1S、U266、RPMI-8226等MM细胞系及原代MM细胞中均可检测到表达，其中U266、RPMI-8226及原代MM细胞表现出较高相对MFI；而K562细胞仅显示低水平背景信号（图3-A）。上述结果提示，MMSA-1在多种MM细胞模型及原代MM样本中具有阳性表达特征，为后续MMSA-1 CAR-T细胞靶向杀伤实验提供了基础。

16例原代MM骨髓样本的MMSA-1相对MFI中位数为11.67（7.42，76.46），阳性率中位数为48.0%（38.2%，99.2%），患者间表达差异较大（附件图1）。以相对MFI中位数为探索性切点分组后，高表达组中复发患者和R-ISS III期患者比例较高，乳酸脱氢酶及 $\beta 2$ -微球蛋白水平亦较高（附件表1）。

从HPA/GTEX数据库提取正常组织ZDHHC9 RNA

表达数据，结果显示其在多种组织中可检测到表达，其中造血/淋巴组织表达相对较低，骨骼肌和大脑皮质等组织表达相对较高；从GSE47552提取的数据表明，正常、MGUS、SMM和MM样本中均可检测到ZDHHC9表达；GSE153380数据显示，部分MM浆细胞呈ZDHHC9高表达（附件图2）。

2.4 MMSA-1 CAR-T细胞体外杀伤活性及效应功能

将K562和RPMI-8226细胞按1:1混合作为靶细胞，与MMSA-1 CAR-T细胞或普通T细胞按1:1、3:1和5:1效靶比共培养24 h。流式细胞术结果显示，与普通T细胞组相比，MMSA-1 CAR-T细胞组中MMSA-1/ZDHHC9阳性RPMI-8226细胞的残留比例明显降低，提示MMSA-1 CAR-T细胞可相对选择性地清除RPMI-8226细胞（图3-B）。

MMSA-1 CAR-T细胞经RPMI-8226细胞刺激后，细胞内颗粒酶B、穿孔素和IL-2表达升高（图4-A）。与RPMI-8226细胞共培养24 h后，MMSA-1 CAR-T细胞组上清液中IL-2和IFN- γ 水平均显著高于普通T细胞组（图4-B）。

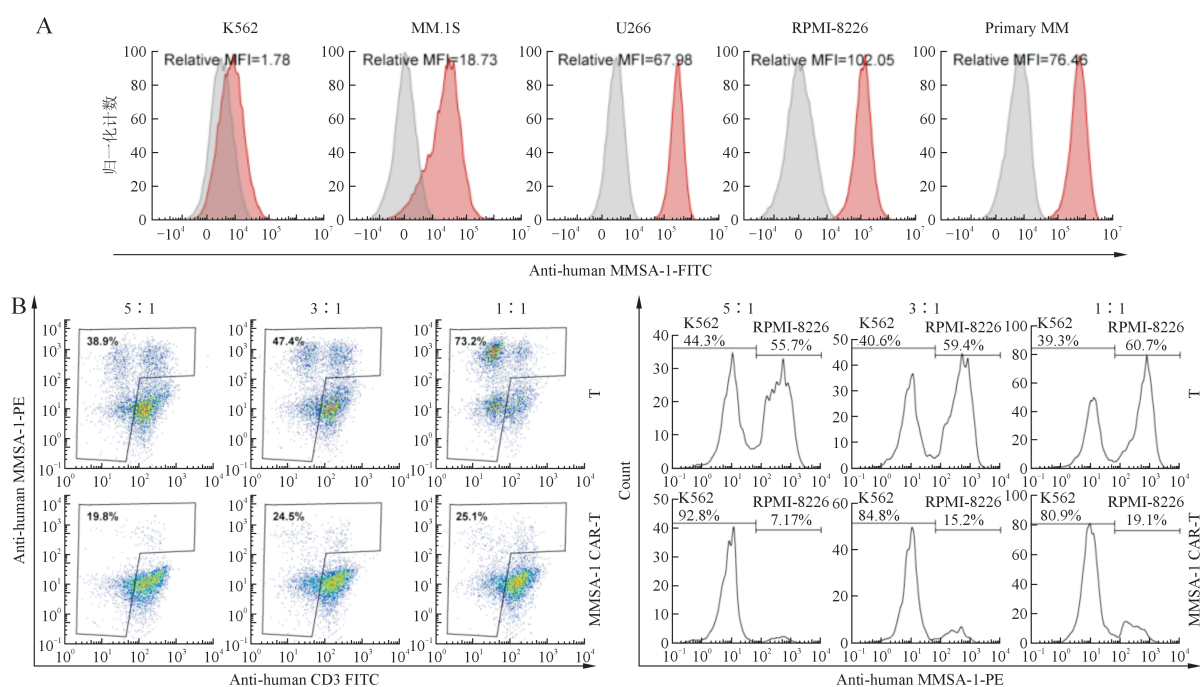


图3 MMSA-1 CAR-T细胞的体外选择性杀伤活性

Figure 3. Cytotoxic activity of MMSA-1 CAR-T cells *in vitro*

注: A. 流式细胞术检测 K562 细胞、MM 细胞系及原代 MM 细胞 MMSA-1 表达水平, 灰色峰表示同型对照染色, 红色峰表示 anti-human MMSA-1-FITC 染色; B. 流式细胞术检测不同效靶比条件下, 普通 T 细胞组和 MMSA-1 CAR-T 细胞组中 RPMI-8226 细胞残留比例。

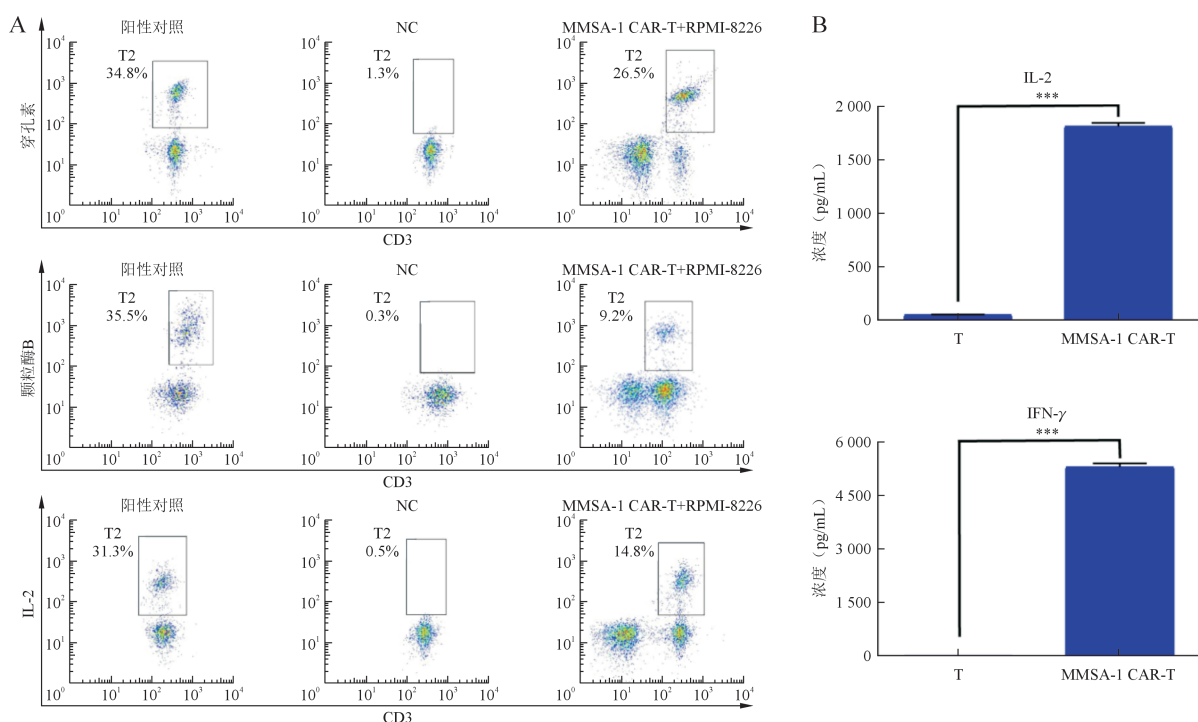


图4 MMSA-1 CAR-T细胞的体外免疫效应功能

Figure 4. Effect function of MMSA-1 CAR-T cells *in vitro*

注: A. 流式细胞术检测 MMSA-1 CAR-T 细胞经 RPMI-8226 细胞刺激后细胞内 IL-2、颗粒酶 B 和穿孔素表达水平; B. ELISA 检测 MMSA-1 CAR-T 细胞或普通 T 细胞与 MM 细胞共培养 24 h 后上清液中 IL-2 和 IFN- γ 水平; *** $P < 0.001$ 。

2.5 MMSA-1 CAR-T 细胞治疗的体内抗肿瘤活性

为评估 MMSA-1 CAR-T 细胞在体内的抗肿瘤

活性, 向 NSG 小鼠尾静脉注射 RPMI-8226 细胞建立 MM 异种移植瘤模型。结果显示, 与 T 细胞组相比, MMSA-1 CAR-T 细胞可显著降低小鼠肿瘤

负荷 (图 5-A)。MMSA-1 CAR-T 细胞治疗显著增加荷瘤小鼠生存率, T 细胞组小鼠在 19 d 内全部死亡, 而 MMSA-1 CAR-T 组有 3 只小鼠分别于第 24、25 和 27 天死亡, 其余 5 只小鼠在观察终点第 60 天仍存活, 60 d 生存率为 62.5% (图 5-B)。T 细胞组小鼠血清中 IL-6、IFN- γ 、IL-2、IL-3、IL-10 和 GM-CSF 整体维持较低水平, 呈轻度波动; 相比之下, MMSA-1 CAR-T 细胞组小鼠血清早期出现不同程度升高, 其中 IFN- γ 、IL-2 及 GM-CSF 等细胞因子在 3~6 d 达到峰值, 随后逐渐下降 (图 5-C), 提示 MMSA-1 CAR-T 细胞输注后可在体内诱导早期免疫激活。上述结果初步证明 MMSA-1 CAR-T 在 RPMI-8226 异种移植瘤模型中具有体内抗肿瘤活性。

由于 T 细胞组小鼠从 14 d 开始因肿瘤进展死亡, 21 d 及以后未能获得血清样本, 后续时间点未进行组间比较, 仅用于观察 MMSA-1 CAR-T 组细胞因子水平的变化趋势。结果显示, MMSA-1 CAR-T 组细胞因子水平在 21 d 后明显回落并接近基线水平, 提示早期免疫激活后未出现持续性高水平细胞因子释放 (图 5-C)。

2.6 MMSA-1 CAR-T 治疗的体内安全性评价

为进一步评价 MMSA-1 CAR-T 治疗的体内耐受性和初步安全性, 本研究补充监测了治疗后小鼠体重变化、血常规、肝肾功能及主要脏器组织病理学改变。体重监测结果显示, 在 T 细胞组小鼠开始出现死亡前的观察窗口内, MMSA-1 CAR-T 组小鼠未出现持续性体重下降; 治疗后期, MMSA-1 CAR-T 组存活小鼠体重总体维持稳定 (图 6-A)。血常规检测显示, MMSA-1 CAR-T 组小鼠 WBC、HGB 和 PLT 水平在观察时间窗内未出现持续性异常升高或降低 (图 6-B)。进一步检测血清生化指标发现, MMSA-1 CAR-T 组小鼠 ALT、AST、Crea 和 BUN 水平未见明显异常升高 (图 6-C)。组织病理学分析显示, MMSA-1 CAR-T 组小鼠心、肝、脾、肺、肾等主要脏器 H&E 染色未见明显组织结构破坏、坏死或明显炎性细胞浸润 (图 6-D)。上述结果提示, 在本实验条件下, MMSA-1 CAR-T 治疗未观察到明显体重相关性毒性、血液学毒性、肝肾功能损伤或主要脏器病理学异常。

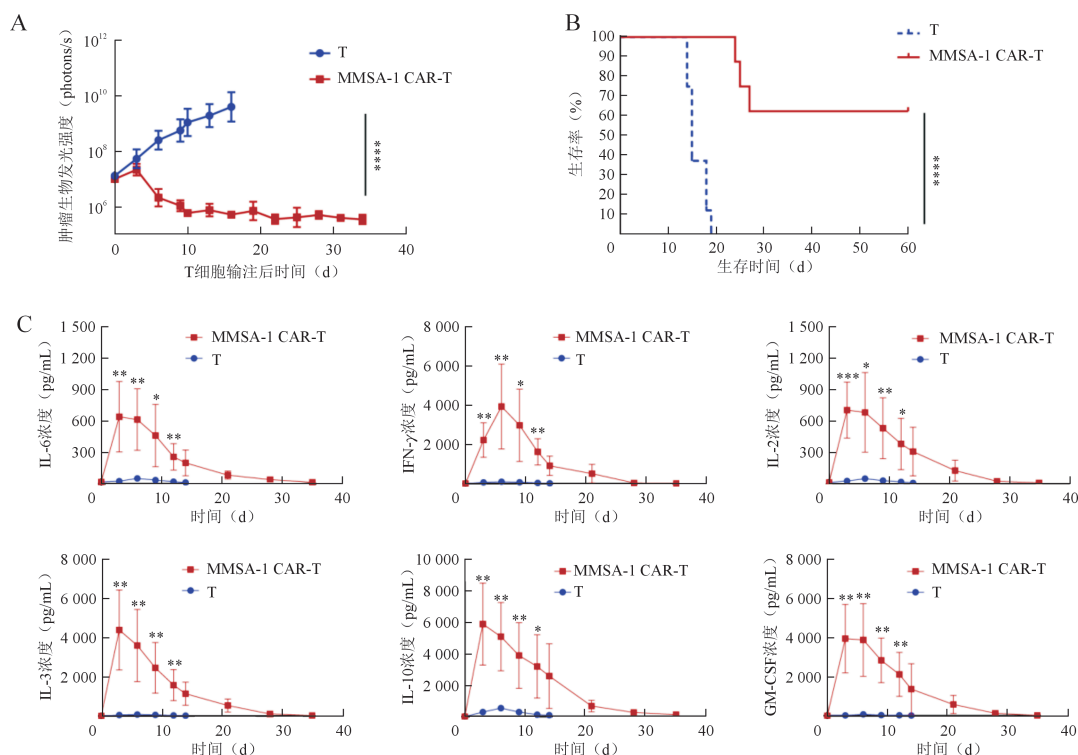


图5 MMSA-1 CAR-T 细胞的体内抗骨髓瘤作用

Figure 5. Anti-myeloma efficacy of MMSA-1 CAR-T cells *in vivo*

注: A. RPMI-8226 异种移植瘤小鼠体内肿瘤负荷动态变化; B. T 细胞组和 MMSA-1 CAR-T 细胞组荷瘤小鼠的 Kaplan-Meier 生存分析; C. T 细胞组和 MMSA-1 CAR-T 细胞组小鼠血清细胞因子水平的动态变化; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

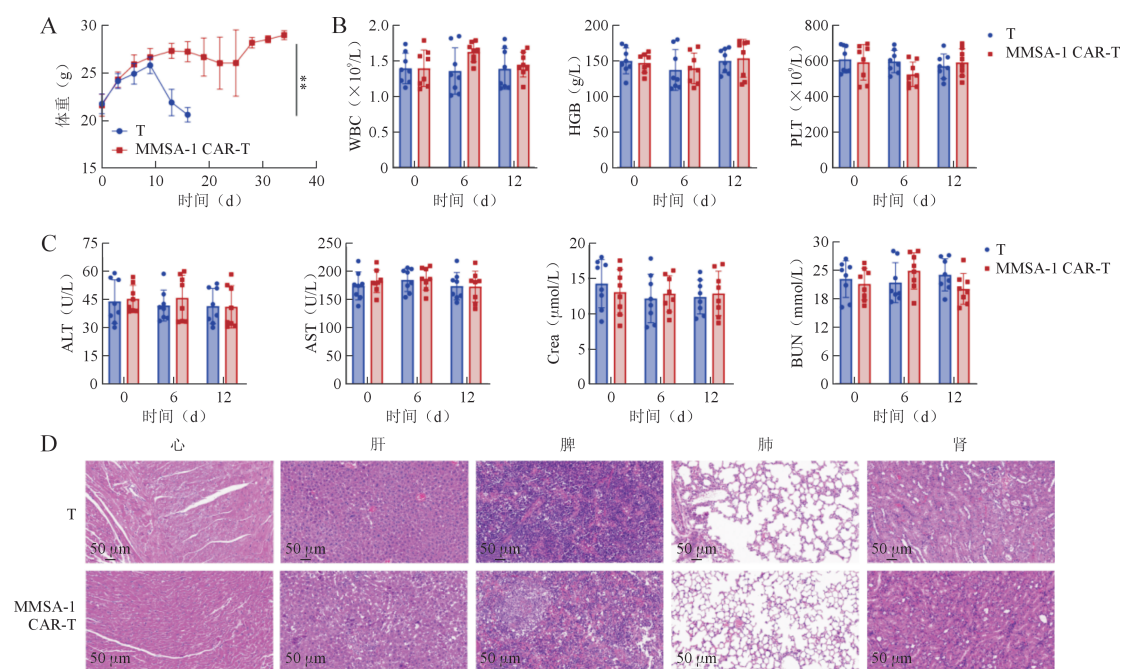


图6 MMSA-1 CAR-T治疗的初步体内安全性评价

Figure 6. Preliminary *in vivo* safety evaluation of MMSA-1 CAR-T treatment.

注：A. 普通T细胞组和MMSA-1 CAR-T组小鼠治疗后体重变化；B. 治疗后第0、6和12天血常规指标；C. 治疗后第0、6和12天肝肾功能指标；D. 两组小鼠心、肝、脾、肺、肾H&E染色代表性图像；比例尺：50 μm；** $P < 0.01$ 。

3 讨论

MM是一种难以治愈的血液系统恶性肿瘤，复发和耐药是限制患者长期生存的主要原因。近年来，CAR-T细胞治疗为复发/难治性MM提供了新的治疗策略，其中BCMA CAR-T细胞已显示出较高缓解率和明确临床价值^[21-23]。然而，部分患者治疗后仍会复发，且复发可能与靶抗原低表达、抗原丢失、肿瘤异质性及免疫逃逸有关^[5, 24]。因此，开发BCMA之外的新型MM相关抗原，对于丰富CAR-T治疗靶点、改善疗效持久性具有重要意义^[25]。目前，GPC5D、TACI、CD38等靶点均已成为MM免疫治疗的重要研究方向。已有研究显示，GPC5D靶向治疗在复发/难治性MM中具有临床活性，并且在部分既往接受BCMA靶向治疗的患者中仍可观察到治疗反应^[12]；TACI及双靶点CAR-T策略也被用于应对BCMA低表达或BCMA丢失相关复发^[16]。在这一背景下，MMSA-1作为MM相关抗原的进一步开发，可能为现有MM靶向免疫治疗体系提供新的补充，并为MMSA-1阳性患者及未来多靶点CAR-T策略提供候选抗原基础。

MMSA-1为本课题组前期发现的MM相关抗原，既往研究提示其在MM细胞和患者样本中表

达较高，并可能与疾病进展及不良预后相关^[20]。本研究中，MMSA-1在MM.1S、U266、RPMI-8226等MM细胞系及原代MM细胞中均可检测到表达，而K562细胞仅显示低水平背景信号，提示MMSA-1具有作为MM CAR-T候选靶点的表达基础。值得注意的是，不同MM细胞系和不同原代患者样本之间MMSA-1表达水平并不一致，提示该靶点表达具有一定异质性，与MM本身显著的克隆异质性相符合，提示后续临床转化过程中需要结合患者样本中的MMSA-1表达水平进行筛选。

原代样本分析显示，MMSA-1高表达组患者复发状态、R-ISS III期及乳酸脱氢酶和β2-微球蛋白升高更常见，提示MMSA-1表达可能与疾病活动度或肿瘤负荷相关。既往研究亦提示MMSA-1高表达与MM不良预后相关^[19]，但本研究样本量较小、分组阈值为探索性设定，尚不能据此将MMSA-1作为确定的预后指标或分层标准。

CAR-T靶点的正常组织表达决定潜在的靶向相关非肿瘤毒性风险。公共数据库显示，MMSA-1相关基因ZDHHC9在部分正常组织、浆细胞疾病样本及部分MM浆细胞亚群中表达，因此不能将MMSA-1简单界定为严格肿瘤特异性靶点。公共数据库反映的是总RNA水平，不能直接代表细

胞膜 MMSA-1 蛋白表达；仍需通过正常组织蛋白定位、非透膜流式检测和正常细胞杀伤实验明确其膜表面表达谱及安全性。

本研究构建的 MMSA-1 CAR-T 细胞可识别并杀伤 MMSA-1/ZDHHC9 阳性 MM 细胞，同时上调颗粒酶 B、穿孔素、IL-2 和 IFN- γ ，提示其可能通过细胞毒颗粒释放及效应性细胞因子共同发挥抗骨髓瘤作用。RPMI-8226 异种移植瘤模型中，MMSA-1 CAR-T 细胞降低肿瘤负荷并提高生存率。输注后 IFN- γ 、IL-2 和 GM-CSF 短暂升高后逐渐下降，提示早期免疫激活；但因普通 T 细胞组小鼠后期因肿瘤进展死亡，后期细胞因子数据不能用于严格的组间安全性比较。上述结果与 CAR-T 细胞抗原依赖性激活和效应分子释放的一般机制一致^[5, 25]。

本研究从体重、血液学指标、肝肾功能和主要脏器组织病理学方面进行了初步安全性观察，未见小鼠持续性体重下降、血液学异常、肾功能损伤或明显脏器病理改变。然而，异种移植瘤模型不能充分评价细胞因子释放综合征、神经毒性、迟发性损伤及长期毒性，因此本研究仅支持早期动物模型中的初步耐受性，不能据此推断临床安全性。

MMSA-1 的潜在价值主要在于补充现有 MM 靶点。MM 存在明显抗原异质性，BCMA 或 GPRC5D 靶向治疗后可发生抗原低表达、缺失或逃逸^[13-15]；TACI 及双靶点 CAR-T 策略可在一定程度上应对 BCMA 丢失^[16]。因此，若后续证实既往 BCMA/GPRC5D 靶向治疗后仍保留 MMSA-1 表达，MMSA-1 可作为候选补充靶点，并为双靶点或多靶点 CAR-T 设计提供新的抗原选择。

本研究存在以下局限性：①原代患者样本量较小，MMSA-1 表达与复发状态、R-ISS 分期及疾病负荷指标的关系仅为探索性结果；②尚未在同一批原代样本中同步比较 MMSA-1 与 BCMA、GPRC5D、TACI 和 CD38 的共表达，不能确定其重叠或互补程度；③公共数据库仅反映 ZDHHC9 总 RNA 表达，不能代表细胞膜 MMSA-1 抗原表达，靶向相关非肿瘤毒性风险仍需系统验证；④ VL2-G4S-VH4 scFv 主要依据细胞结合能力筛选，尚缺乏表面等离子共振或生物膜层干涉等亲和动力学检测；⑤尚未通过 MMSA-1 敲低/敲除、过表达或抗原阻断模型严格验证杀伤效应的

抗原依赖性；⑥ RPMI-8226 异种移植瘤模型不能充分模拟 MM 骨髓微环境和患者异质性；⑦尚未系统分析 CAR-T 细胞的 CD4/CD8 比例、记忆表型、激活及耗竭标志物。后续应扩大临床样本，完善正常组织和正常细胞安全性评价，并在骨髓定植模型或患者来源异种移植模型中验证疗效和毒性。

综上，本研究构建了 MMSA-1 CAR-T 细胞，并初步证实其体内外抗 MM 活性。MMSA-1 可作为 MM CAR-T 治疗的候选补充靶点，但其患者适用范围、抗原特异性及正常组织安全性仍需进一步验证。

附件见《医学新知》官网附录 (<https://yxxz.whuznhmedj.com/futureApi/storage/appendix/202605113.pdf>)

伦理声明：冻存原代 MM 患者骨髓样本及健康人群外周血样本来源于武汉大学中南医院血液科，样本使用经武汉大学中南医院伦理委员会审批（批号：临研伦[2023033]）；动物实验经武汉大学中南医院实验动物伦理委员会审批（批号：ZN2024083）

作者贡献：实验设计与操作、数据分析、论文撰写：童西琴；样本收集、论文修改、动物实验：梁雨星、陈国鹏；课题指导、经费支持：周美玲

数据获取：本研究中使用和（或）分析的数据可联系通信作者获取
利益冲突声明：无

致谢：感谢武汉大学中南医院血液科工作人员协助收集样本

参考文献

- 1 van de Donk N, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma[J]. *Lancet*, 2021, 397(10272): 410-427.
- 2 Laubach JP, Schjesvold F, Mariz M, et al. Efficacy and safety of oral panobinostat plus subcutaneous bortezomib and oral dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma (PANORAMA 3): an open-label, randomised, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(1): 142-154.
- 3 Engelhardt M, Waldschmidt JM, Wäsch R. Proteasome inhibition: the dawn of novel therapies in multiple myeloma[J]. *Haematologica*, 2022, 107(5): 1018-1019.
- 4 Xu J, Wang BY, Yu SH, et al. Long-term remission and survival in patients with relapsed or refractory multiple myeloma after treatment with LCAR-B38M CAR T cells: 5-year follow-up of the LEGEND-2 trial[J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 23.
- 5 Swan D, Madduri D, Hocking J. CAR-T cell therapy in multiple myeloma: current status and future challenges[J]. *Blood Cancer J*, 2024, 14(1): 206.
- 6 Phely L, Hensen L, Faul C, et al. Allogeneic CD19/CD22 CAR T-cell therapy for B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *JAMA Oncol*, 2024, 10(6): 821-824.
- 7 Schubert ML, Schmitt A, Hükelhoven-Krauss A, et al. Treatment of adult ALL patients with third-generation CD19-directed CAR T

- cells: results of a pivotal trial[J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 79.
- 8 Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2022, 399(10343): 2294–2308.
- 9 Frank MJ, Baird JH, Kramer AM, et al. CD22-directed CAR T-cell therapy for large B-cell lymphomas progressing after CD19-directed CAR T-cell therapy: a dose-finding phase 1 study[J]. *Lancet*, 2024, 404(10450): 353–363.
- 10 Rodriguez-Otero P, Ailawadhi S, Arnulf B, et al. Ide-cel or standard regimens in relapsed and refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(11): 1002–1014.
- 11 Li H, Li J, Wu J, et al. A second-generation CD38-CAR-T cell for the treatment of multiple myeloma[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(9): 10804–10815.
- 12 Mailankody S, Devlin SM, Landa J, et al. GPRC5D-targeted CAR T cells for myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(13): 1196–1206.
- 13 Firestone RS, Socci ND, Shekarkhand T, et al. Antigen escape as a shared mechanism of resistance to BCMA-directed therapies in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2024, 144(4): 402–407.
- 14 Lee H, Ahn S, Maity R, et al. Mechanisms of antigen escape from BCMA- or GPRC5D-targeted immunotherapies in multiple myeloma[J]. *Nat Med*, 2023, 29(9): 2295–2306.
- 15 Samur MK, Fulciniti M, Aktas Samur A, et al. Biallelic loss of BCMA as a resistance mechanism to CAR T cell therapy in a patient with multiple myeloma[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 868.
- 16 Larson RC, Kann MC, Graham C, et al. Anti-TACI single and dual-targeting CAR T cells overcome BCMA antigen loss in multiple myeloma[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7509.
- 17 Teoh PJ, Chng WJ. CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 84.
- 18 Zhou FL, Zhang WG, Chen G, et al. Serological identification and bioinformatics analysis of immunogenic antigens in multiple myeloma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(8): 910–917.
- 19 Meng S, Lu C, Zhang W, et al. MMSA-1 expression pattern in multiple myeloma and its clinical significance[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(4): 599–609.
- 20 Lu C, Meng S, Jin Y, et al. A novel multi-epitope vaccine from MMSA-1 and DKK1 for multiple myeloma immunotherapy[J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(3): 413–426.
- 21 Munshi NC, Anderson LD, Shah N, et al. Idecabtagene vicleucel in relapsed and refractory multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8): 705–716.
- 22 Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study[J]. *Lancet*, 2021, 398(10297): 314–324.
- 23 Martin T, Usmani SZ, Berdeja JG, et al. Ciltacabtagene autoleucel, an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor T-cell therapy, for relapsed/refractory multiple myeloma: CARTITUDE-1 2-year follow-up[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(6): 1265–1274.
- 24 Hu Y, Hou J, Jiang Z, et al. Mechanisms of resistance to CAR-T cell therapy in multiple myeloma: latest updates from the 2024 ASH annual meeting[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2025, 14(1): 45.
- 25 Tan MSY, Chen Y, Smith EL. Beyond BCMA: newer immune targets in myeloma[J]. *Blood Adv*, 2024, 8(16): 4433–4446.

收稿日期: 2026 年 05 月 27 日 修回日期: 2026 年 07 月 11 日
本文编辑: 杨室淞 曹 越

引用本文: 童西琴, 梁雨星, 陈国鹏, 等. 靶向 MMSA-1 的 CAR-T 细胞治疗多发性骨髓瘤的抗肿瘤活性研究[J]. 医学新知, 2026, 36(8): 850–860. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202605113.
Tong XQ, Liang YX, Chen GP, et al. Study of the antitumor activity of MMSA-1 CAR-T cells in multiple myeloma[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2026, 36(8): 850–860. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202605113.