

应用 CRISPR/Cas9 技术构建 Raji-Luc CD19 KO 淋巴瘤细胞系

刘静静¹, 刘秀盈¹, 冯娅茹², 冯义超¹, 于梦圆¹, 王建勋^{1,3} (1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 深圳细胞谷生物医药有限公司, 广东深圳 518118; 3. 深圳北京中医药大学研究院, 广东深圳 518118)

摘要: 目的 应用 CRISPR/cas9 技术构建敲除 CD19 的 Raji-Luc 淋巴瘤细胞, 并对其免疫逃逸能力进行初步验证。方法 构建 PB-CRISPR-CD19 小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 质粒, 筛选最优的 sgRNA 序列, 用 pCAG-PBase 转座酶、PB-CD19 sgRNA 及 PB-CRISPR-Cas9 共同电转染 Raji-Luc 细胞, 采用流式分选和极限稀释法筛选得到稳定敲除的单克隆细胞株。经过基因序列检测对敲除效果进行验证; 酶标仪检测细胞系表面荧光素酶的表达情况; 以实验室前期构建的 CD19 CAR-T 和 CD38 CAR-T 作为效应细胞, 用荧光素酶化学发光法验证 Raji-Luc CD19 KO 细胞株的免疫逃逸能力。结果 电转染制备的 Raji-Luc CD19 KO 细胞转染效率较高, 筛选所得两组单克隆细胞敲除效率均达到 99% 以上, 与原始 Raji-Luc 细胞的荧光素酶表达无显著差异, 且不能激活 CD19 CAR-T 细胞对其进行杀伤。结论 成功构建了 Raji-Luc CD19 KO 淋巴瘤细胞系。

关键词: 嵌合抗原受体-T 细胞; 白细胞分化抗原 19 KO; 电转染; 淋巴瘤; Raji-Luc 细胞

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 01-010-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.01.003

Construction of Raji-Luc CD19 KO Lymphoma Cell Line Using CRISPR/Cas9 Technology

LIU Jingjing¹, LIU Xiuying¹, FENG Yaru², FENG Yichao¹, YU Mengyuan¹, WANG Jianxun^{1,3}

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Shenzhen Cell Valley Biopharmaceutical Co. Ltd, Guangdong Shenzhen 518118, China; 3. Shenzhen Research Institute, Beijing University of Chinese Medicine, Guangdong Shenzhen 518118, China)

Abstract: Objective To construct Raji-Luc lymphoma cells with CD19 knockout using CRISPR/Cas9 technology and preliminarily validate their immune escape ability. **Methods** PB-CRISPR-CD19 small guide RNA (sgRNA) plasmids was constructed, the optimal sgRNA sequence was screened, and Raji-Luc cells with pCAG-PBase, PB-CD19 sgRNA, and PB-CRISPR-Cas9 were co-transfected. Stable knockout monoclonal cell lines were screened by flow sorting and limit dilution method and the knockout effect was verified through gene sequence testing. The expression of luciferase on the surface of the cell line was detected by microplate reader, CD19 CAR-T and CD38 CAR-T previously constructed in the laboratory were used as effector cells, and the immune escape ability of Raji-Luc CD19 KO cell line was verified by universal luciferase chemiluminescence method. **Results** The transfection efficiency of Raji-Luc CD19 KO cells prepared by electro transfection was high, and the knockout efficiency of the two monoclonal cells was more than 99%. There was no significant difference in luciferase expression compared to the original Raji-Luc cells, and CD19 CAR-T cells could not be activated to kill them. **Conclusion** Successfully constructed Raji-Luc CD19 KO lymphoma cell line.

Keywords: CAR-T; CD19 KO; electro transfection; lymphoma; CRISPR/Cas9

淋巴瘤是最常见的血液肿瘤之一, 主要分为非霍奇金淋巴瘤 (non-hodgkin lymphoma, NHL) 和霍奇金淋巴瘤 (hodgkin lymphoma, HL) 两类^[1]。其中, NHL 占有所有淋巴瘤的 90%, B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-cell non-hodgkin's lymphoma, B-NHL) 的发病率是 T 细胞淋巴瘤的三倍, 在我国常见的恶

性肿瘤当中可以排在前 10 位^[2-3]。其发病率随年龄增长呈上升趋势, 致死率较高。据中国国家癌症中心和美国国家癌症研究所预估数据显示, 2022 年我国 NHL 患病人数 97 788 例, 死亡人数高达 57 929 例^[4-5]。

白细胞分化抗原 CD19 是一种表达于除浆细胞

基金项目: 北京中医药大学高层次人才科研启动经费项目 (9011451310032): 中医药调节肿瘤免疫的生物学机制研究。

作者简介: 刘静静 (1999-), 女, 硕士研究生, 主要从事 CAR-T 细胞疗法方面研究, E-mail: lj990821@163.com。

通讯作者: 王建勋 (1973-), 男, 美籍, 特聘教授, 博士生导师, 主要从事应用现代化基因与细胞治疗手段治疗血液疾病的临床转化研究, E-mail: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn。

以外的所有 B 细胞系、恶性 B 细胞与滤泡树突状细胞 (follicular dendritic cells, FDCs) 上的表面蛋白, 在 B 细胞成熟并最终分化为浆细胞的整个过程中都有表达^[6]。有研究表明, 大多数 B 细胞恶性肿瘤患者的癌细胞中 CD19 表达均为正常至高水平。因此, CD19 是 B 细胞恶性肿瘤中最重要的靶抗原之一, 是开发嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 对抗 NHL 和 B 细胞白血病 (B cell leukemia, BCL) 最有希望的靶点^[7]。然而, 约 60% 治疗后复发患者的癌细胞会出现 CD19 表达减少或完全丧失的现象^[8]。目前, 尽管抗 CD19 CAR-T 细胞在治疗 B 细胞恶性肿瘤方面效果显著, 但治疗后经常会出现肿瘤复发的现象, 而肿瘤复发的主要原因与抗原逃逸有关^[9-10]。因此, 需要一种能够模拟 CAR-T 治疗过程中免疫逃逸现象的细胞模型以用于相关研究。Raji 是一种非霍奇金淋巴瘤, 起源于 B 淋巴细胞, 其 CD19 和 CD38 呈双阳性表达, 常被用作靶细胞进行非霍奇金淋巴瘤的相关研究^[11]。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术, 构建了 Raji-Luc CD19 KO 细胞, 为后续探索如何解决 CAR-T 细胞疗法由于抗原免疫逃逸而产生的肿瘤复发问题构建了细胞模型, 并奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 细胞: Raji-Luc 细胞购自北京维通达生物技术有限公司, 于液氮罐中冷冻保存。

1.1.2 质粒: 电转所用的原始质粒 pCAG-PBase, PB-CRISPR-Cas9, PB-CRISPR-sgRNA 均由中国农业大学吴森教授馈赠, 于 -20℃ 冰箱中冷冻保存。

1.2 仪器与试剂 RPMI 1640 培养液, AIM-V 培养液、PBS 溶液、青霉素-链霉素溶液、限制性内切酶、T4 连接酶、琼脂、酵母提取物、胰蛋白酶、氯化钠、氨苄青霉素、DH5 α 感受态细胞、50 \times TAE 溶液、DNA marker 和琼脂糖 (北京兰博利德商贸有限公司); 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、质粒大提试剂盒和 DNA 纯化试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); FBS 胎牛血清 (北京百诺威生物科技股份有限公司); 7-AAD 抗体、PE-MYC 抗体、APC anti human CD19 抗体和 FITC anti human CD38 抗体 (深圳市达科为生物技术股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 构建 PB-CRISPR-CD19 sgRNA 质粒: 在 NCBI 网站以“CRISPR/Cas9 CD19 sgRNA”为关键词进行相关文献检索, 并通过 IDT 网站验证 off-target 以及 on-target, 按照打分由高到低的顺序, 选择合适的 sgRNA 序列, 见表 1。由擎科生物进行

引物合成, 将合成的引物片段退火形成所需的片段, 将目的片段与线性化载体 CRISPR-sgRNA-vector 在 16℃ 恒温条件下采用 T4 连接 12h, 转化至感受态大肠埃希菌后扩大培养, 提取质粒并进行浓缩。

表 1 sgRNA 片段序列表

名称	序列
CD19-sgRNA1	5'-GCTAGGTCCGAAACATTCCAC-3'
CD19-sgRNA2	5'-GTGGAATGTTTCGGACCTAGG-3'
CD19-sgRNA3	5'-GAGAGCTGAAGGACGATCGCC-3'
CD19-sgRNA4	5'-GCAGTCCTATGAGGATATGAG-3'

1.3.2 Raji-Luc 细胞的培养: 复苏 Raji-Luc 细胞, 于 37℃, 5ml/dl CO₂ 细胞培养箱中无菌培养, 每 48h 用含 10g/dl FBS 的 RPMI 培养液传代一次, 使接种密度为 5 \times 10⁵ 个/ml, 培养至对数生长期用于后续实验。

1.3.3 筛选最优 sgRNA 序列: 将 Raji-Luc 细胞分为 4 组, 每组 1 \times 10⁶ 个, 分别命名为 sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 和 sgRNA4, 300g 离心 5 min, 弃去上清, 加入无血清 RPMI 培养液重悬, 每组加入 pCAG-PBase 转座酶, PB-CRISPR-Cas9 及 PB-CD19 sgRNA 质粒各 4 μ g, 混匀后转移至电转杯中。采用伯乐电转仪, 选择 K562 模式进行电转染。电击结束将细胞置于培养箱稳定 30 min 后缓慢滴加双倍血清。电转染 48 h 后, 取适量电转后的 4 组细胞和未电转的原始 Raji-Luc 细胞, 400g 离心 5min, 去除上清, 用适量 PBS 洗涤细胞, 离心, 去除上清, 分别加入染色缓冲液重悬细胞, APC anti human CD19 流式抗体避光染色 1h。染色结束后加入 PBS 洗涤细胞, 离心后用 PBS 重悬, 用流式细胞仪检测细胞 CD19 的表达情况。

1.3.4 电转染 PB-CRISPR-CD19 sgRNA1 质粒制备 Raji-Luc CD19 KO 细胞: 取 1 \times 10⁷ 个 Raji-Luc 细胞原液量, 350g 离心 8min。弃去上清, 加入含有 sgRNA1 电转质粒的无血清 RPMI 培养液重悬。采用伯乐电转仪, 选择 K562 模式进行电转染。电击结束将细胞置于培养箱稳定 30min 后缓慢滴加双倍血清。

1.3.5 流式细胞术检测电转染效率并筛选稳定敲除的单克隆细胞株: 电转染 48h 后, 取适量电转后的 Raji-Luc CD19 KO 细胞和未电转的原始 Raji-Luc 细胞, 400g 离心 5min, 去除上清, 用适量 PBS 洗涤细胞, 离心, 去除上清, 分别加入 2g/dl FBS-PBS 染色缓冲液重悬细胞, 并向其中加入 FITC anti human CD38, APC anti human CD19 和 7-AAD 流式抗体避光染色 1h。染色结束后加入 PBS 洗涤细

胞,离心后用PBS重悬,用流式细胞仪检测细胞的转染效率,将7-AAD-CD38⁺CD19⁻的分群设为目标细胞,进行流式分选,将分选后的细胞极限稀释至2.5个/ml,在96孔板中每孔加入200 μ l筛选单克隆细胞。将96孔板中的单克隆细胞株进行扩大培养,再次取适量单克隆细胞用抗体FITC anti human CD38, APC anti human CD19染色,以未转染的Raji-Luc细胞作为阳性对照,对比检测Raji-Luc CD19 KO细胞表面CD19和CD38的表达情况,以确定筛选得到的细胞是否成功敲除表面CD19抗原。

1.3.6 细胞系表面荧光素酶表达的检测:分别取原始的Raji-Luc细胞、Raji-Luc CD19 KO细胞2号单克隆、Raji-Luc CD19 KO细胞20号单克隆各 1×10^5 个,依次梯度稀释为 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 10^2 个/ml接种于96孔白板中,每孔分别加入100 μ l Bright-LumiTM萤火虫荧光素酶检测试剂,反应5min后,选择化学发光模式,检测各组各孔细胞的相对发光光度(relative light unit, RLU)。

1.3.7 Raji-Luc CD19 KO细胞基因序列检测:扩大培养流式检测筛选出的单克隆细胞,分别取适量原始的Raji-Luc, Raji-Luc CD19 KO 2号、20号单克隆细胞提取基因组,以此为模板分别PCR扩增出CD19基因片段。引物序列为:FOR: 5'-ATGCCA CCTCCTCGCCTC-3', REV: 5'-ACCTGGTGC TCCAGGTGC-3',扩增程序为:①94 $^{\circ}$ C, 1min; ②98 $^{\circ}$ C, 10s; ③55 $^{\circ}$ C, 15s; ④68 $^{\circ}$ C, 30s/kb; ②③④30Cycles。将PCR扩增产物送至金唯智测序

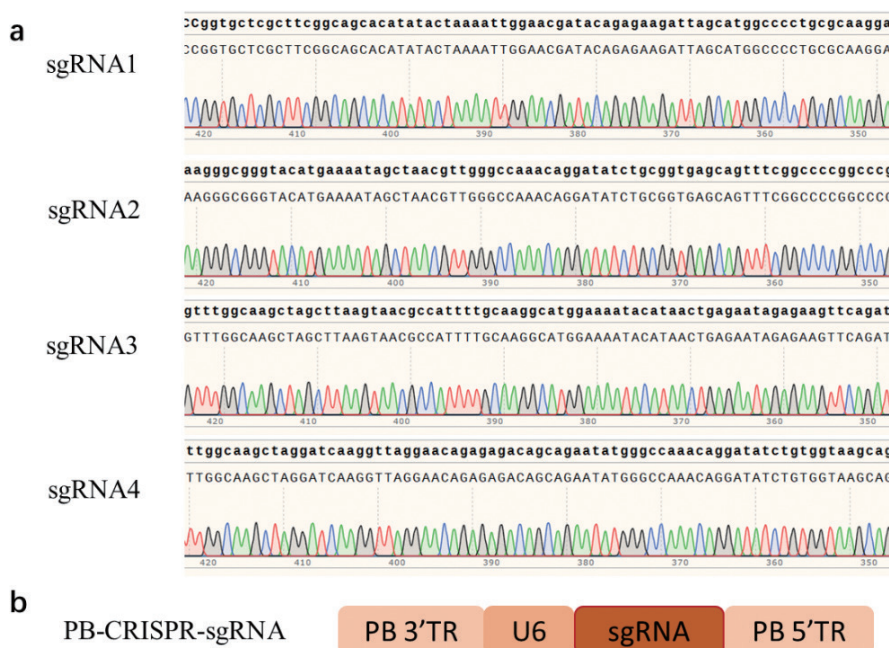
公司进行测序。

1.3.8 荧光素酶化学发光法验证CAR-T对Raji-Luc和Raji-Luc CD19 KO细胞的杀伤作用:取对数生长期的Raji-Luc和Raji-Luc CD19 KO细胞,以 8×10^5 个/ml每孔50 μ l的密度接种于96孔白板中作为靶细胞。取适量实验室前期制备的Pan-T以及CD19 CAR-T和CD38 CAR-T细胞为效应细胞^[12-13]。各分为三个实验组:靶细胞+Pan-T细胞组、靶细胞+CD19 CAR-T细胞组、靶细胞+CD38 CAR-T细胞组,每组分别设置效靶比为1:1, 1:2, 1:4和1:8,各三个复孔。取适量CAR-T和Pan-T细胞,处理至合适密度,在上述96孔板中每孔加入50 μ l CAR-T细胞或Pan-T细胞,置于37 $^{\circ}$ C, 5ml/dl CO₂细胞培养箱中共培养。培养8h后,分别在各组每孔加入100 μ l Bright-LumiTM萤火虫荧光素酶检测试剂,反应5min后,选择化学发光模式,检测各组各孔细胞的相对光单位(relative light unit, RLU),计算杀伤效率,计算公式:杀伤效率=1-(实验孔-空白孔)/(最大裂解孔-空白孔)×100%。

1.4 统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism 8统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建PB-CRISPR-CD19 sgRNA质粒 测序结果见图1a,构建所得四组PB-CRISPR-CD19 sgRNA质粒序列与预期序列一致,成功构建PB-CRISPR-CD19 sgRNA质粒,质粒构造见图1b。



a. 各组 PB-CRISPR-CD19 sgRNA 质粒测序结果; b. PB-CRISPR-CD19 sgRNA 构造示意图。

图1 PBCRISPRCD19 sgRNA 质粒构建成功

2.2 sgRNA1 序列效果最佳 流式细胞术检测结果见图2。原始 Raji-Luc 细胞 CD19 表达率为 98.52%，电转染 48h 后 sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3 和 sgRNA4 四组细胞 CD19 的表达率均低

于原始 Raji-Luc 细胞, 分别为 58.96%, 65.81%, 70.83% 和 67.78%。sgRNA1 的序列靶向性较强, 并且电转染过后细胞状态最佳。

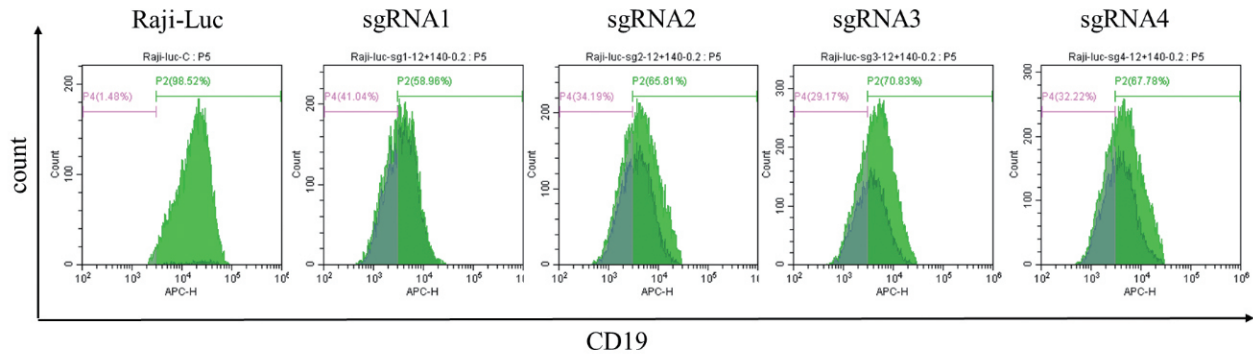
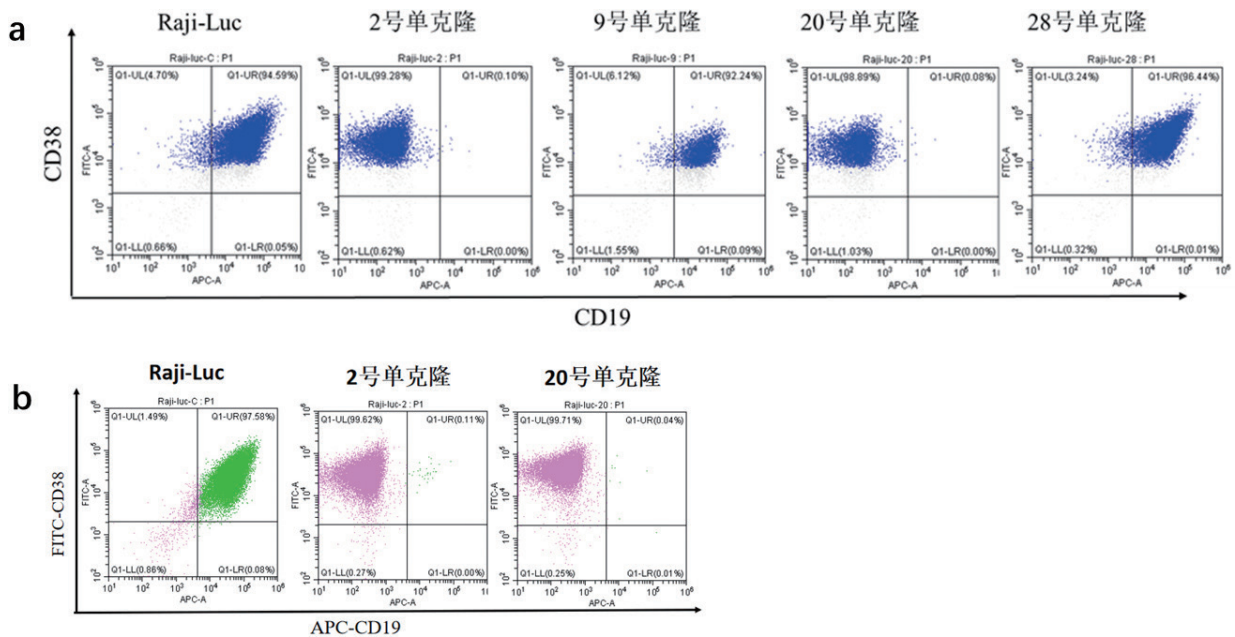


图2 流式细胞术检测四组 sgRNA 转染细胞及 RajiLuc 细胞 CD19 的表达率

2.3 电转染 PB-CRISPR-CD19 sgRNA 质粒成功制备 Raji-Luc CD19 KO 细胞 流式细胞术鉴定结果见图 3a, 极限稀释法筛选得到的单克隆细胞株中 2 号单克隆和 20 号单克隆细胞表面 CD19 表达缺失,

而 CD38 表达正常。进行冻存复苏后, 两株单克隆细胞的 CD19 表达依旧稳定缺失, 且两组细胞电转导效率均达到 99% 以上 (即 CD19 阴性, CD38 阳性细胞), 见图 3b。



a. CD19 在各组单克隆细胞表面的表达情况; b. 冻存复苏后单克隆细胞表面 CD19 的表达情况。

图3 流式细胞术检测 Raji-Luc CD19 KO 单克隆细胞表面蛋白表达情况

2.4 Raji-Luc CD19 KO 细胞与原始 Raji-Luc 细胞的荧光素酶表达比较 经酶标仪检测结果见图4。2 号单克隆 Raji-Luc CD19 KO 细胞和 20 号单克隆 Raji-Luc CD19 KO 细胞与原始 Raji-Luc 细胞相比荧光素酶表达差异无统计学意义。

在该基因片段发生了小片段的丢失, 两个细胞株 CD19 表面抗原的表达都被成功敲除。

2.5 单克隆 Raji-Luc CD19 KO CD19 细胞表面抗原的表达敲除 测序结果见图5。Raji-Luc CD19 KO 2 号单克隆在 CD19 基因处发生了大片的碱基丢失, Raji-Luc CD19 KO 20 号单克隆细胞株的基因序列

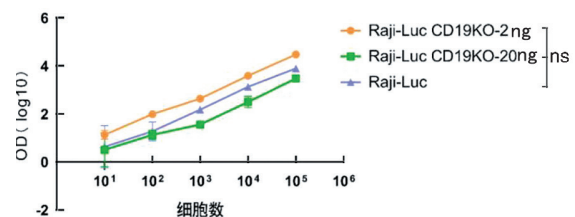


图4 Raji-Luc CD19 KO 细胞系荧光素酶检测

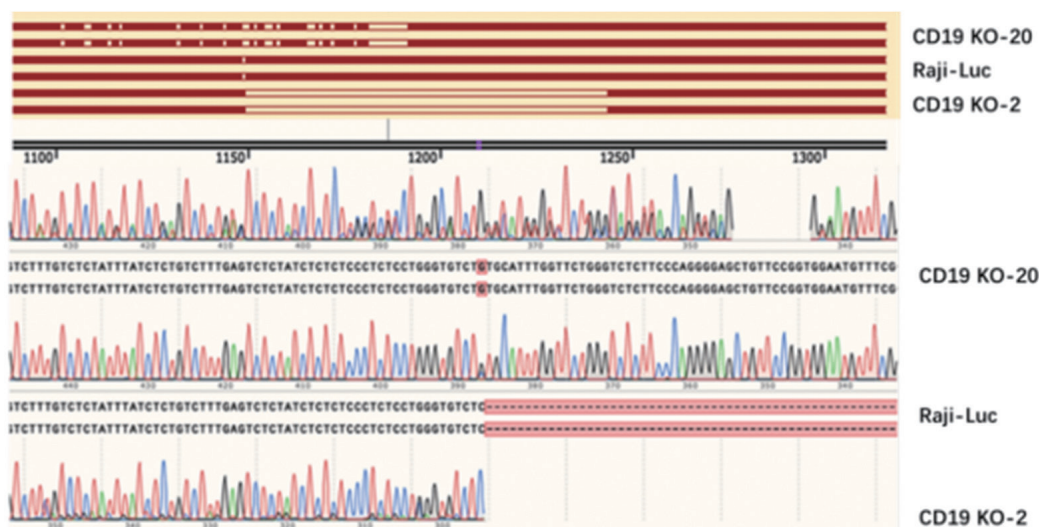
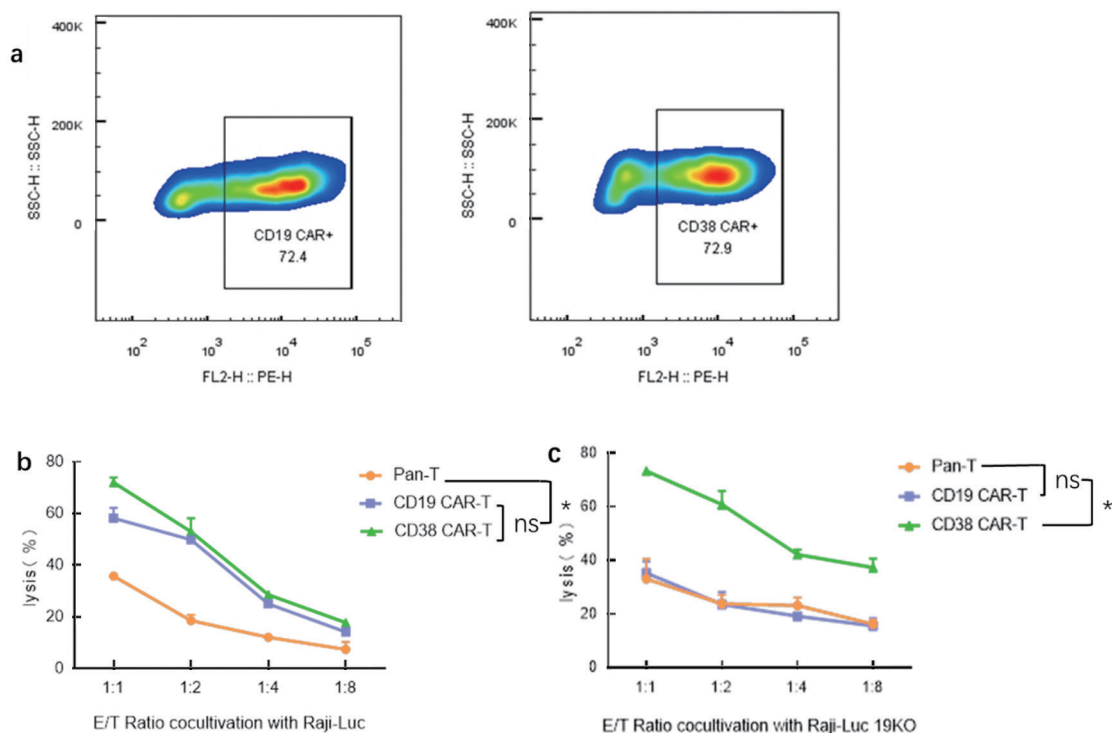


图5 原始Raji-Luc细胞与CD19 KO单克隆细胞基因序列对比图

2.6 Raji-Luc CD19 KO 细胞不能激活对应的 CAR-T 细胞 流式检测结果显示, 实验室此前构建成功的 CD19 CAR-T 和 CD38 CAR-T 细胞均出现明显细胞分群, 转导效率分别为 72.4% 和 72.9%, 见图 6a。荧光素酶测定杀伤效率实验结果显示, 当靶细胞为 Raji-Luc 细胞时, CD19 CAR-T 与 CD38 CAR-T 细胞杀伤能力相当, 且明显强于 Pan-T 细胞, 差异具

有统计学意义 ($t=3.405 \sim 3.771$, 均 $P < 0.05$), 见图 6b。当靶细胞为 Raji-Luc CD19 KO 细胞时, CD19 CAR-T 细胞与 Pan-T 细胞的杀伤能力相当, CD38 CAR-T 细胞的杀伤能力明显强于 Pan-T 细胞和 CD19 CAR-T 细胞 ($t=5.428 \sim 6.804$, 均 $P < 0.05$), 见图 6c。该结果表明敲除 CD19 的 Raji-Luc 细胞株不能激活对应的 CAR-T 细胞进行杀伤。



a. CD19 CAR-T 和 CD38 CAR-T 的转导效率; b. CAR-T 细胞对 Raji-Luc 细胞杀伤效果的检测; c. CAR-T 细胞对 Raji-Luc CD19 KO 细胞杀伤效率的检测。

图6 CAR-T 细胞对 RajiLuc 及 Raji-Luc CD19 KO 细胞的杀伤效率检测

3 讨论

CD19 属于免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 超家族的成员, 位于 16 号染色体短臂上 (16p11.2),

在调节 B 淋巴细胞选择、激活和分化的细胞表面受体的信号传导阈值中起到非常重要的作用。ENGEL 等^[14-15]人的研究表明 CD19 的缺失会使小鼠外周血

淋巴组织中B细胞的数量明显减少,B细胞对有丝分裂原的增殖反应明显降低,血清免疫球蛋白水平也显著降低。过表达CD19的小鼠在骨髓早期B细胞发育中存在明显的缺陷,有丝分裂反应增强,血清免疫球蛋白水平升高。

近年来,抗CD19 CAR-T细胞在治疗复发或难治性急性B淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)方面取得了快速而持久的显著疗效^[16]。目前有700多项相关临床试验在ClinicalTrials.gov中注册,其中41%针对CD19。PAN等^[17-18]人指出,在现有抗CD19 CAR-T细胞的治疗过程中有相当大比例的患者由于CD19抗原的逃逸或表达下调,复发率显著增加。RUELLA等^[19]人在临床研究当中发现,一例B-ALL患者在接受抗CD19 CAR-T细胞注入19天后病情得到了完全缓解,但在治疗后第261天出现病情复发并最终死亡,该患者复发后的白血病细胞均异常表达抗CD19 CAR,无法检测到CD19的表达。

抗原逃逸现象的出现,迫使我们去探究如何使CAR-T细胞在肿瘤细胞抗原丢失后仍然对其具有杀伤作用或是寻找更加合适的替代靶点^[20]。ZHAO等^[21]人开发了一种新型CD19/CD22/CD3三特异性抗体,用于克服肿瘤免疫逃逸对CAR-T的限制。DAI等^[22]人为了解决CD19抗原丢失而造成肿瘤复发的情况,设计了一种靶向CD19和CD22的双特异性CAR-T细胞用于治疗成人B-ALL。然而,在上述的研究当中,实验者均采用对比单抗原CAR-T与多抗原CAR-T对同一肿瘤细胞的杀伤情况来验证CAR-T对于肿瘤的体外治疗情况,并未通过产生CD19抗原丢失的肿瘤细胞来进行直接验证,本研究所构建的Raji-Luc CD19 KO细胞正是为此类研究提供了可以直接验证的模型支持,为后续研究者进行补充实验提供了研究对象。

CRISPR/Cas9是继ZFN,TALENs等基因编辑技术推出后的第三代基因编辑技术,在基因敲入、基因敲除、碱基突变等方面更加快速高效和便捷。近年来,CRISPR/Cas9技术也被应用于构建各种细胞系以满足不同领域的研究,解决了很多在过去的科研过程中无法克服的困难^[23]。黄小琴等^[24]人通过CRISPR/Cas9系统构建了敲除AMPK α 1的A549和H460肺癌细胞的细胞株,为后续研究AMPK α 1对于肺癌的促癌机制提供了细胞模型。尽管CRISPR/Cas9在肿瘤治疗研究方面显示出光明的前景,但它依赖DSB刺激基因编辑过程可能会破坏其安全性,其基因敲除的随机性可能会产生新的基因型,其中一些可能会产生潜在致病后果^[25]。

在本研究中,筛选最适的sgRNA弥补了CRISPR/Cas9质粒敲除效率不一致的缺点,通过筛选单克隆以及基因测序解决了敲除随机性的问题。并且在敲除CD19后仍不影响细胞原始荧光素酶基因的表达,这为后续在动物实验中对肿瘤进行长期观察提供了检验手段。

参考文献:

- [1] ZHAO Huayan, LI Shenglei, WANG Guannan, et al. Study of the mechanism by which dinaciclib induces apoptosis and cell cycle arrest of lymphoma Raji cells through a CDK1-involved pathway[J]. Cancer Medicine, 2019, 8(9): 4348-4358.
- [2] MOLETI M L, TESTI A M, FOÀ R. Treatment of relapsed/refractory paediatric aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. British Journal of Haematology, 2020, 189(5): 826-843.
- [3] LIU Yingyue, ZHOU Xiangxiang, WANG Xin. Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma: challenges and opportunities[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2021, 14(1): 125.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2023, 73(1): 17-48.
- [5] XIA Changfa, DONG Xuesi, LI He, et al. Cancer statistics in china and united states, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chinese Medical Journal(Engl), 2022, 135(5): 584-590.
- [6] ZINZANI P L, MINOTTI G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2022, 148(1): 177-190.
- [7] KANG C H, KIM Y, LEE H K, et al. Identification of potent CD19 scFv for CAR T cells through scFv screening with NK/T-Cell line[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(23): 9163.
- [8] SPIEGEL J Y, PATEL S, MUFFLY L, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial [J]. Nature Medicine, 2021, 27(8): 1419-1431.
- [9] ZHANG Xiaomin, ZHU Lingling, ZHANG Hui, et al. CAR-T cell therapy in hematological malignancies: current opportunities and challenges[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 927153.
- [10] MAJZNER R G, MACKALL C L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy[J]. Cancer Discovery, 2018, 8(10): 1219-1226.
- [11] ZHENG Chanli, XIAO Yu, LI Yangqiu, et al. Knockdown of long non-coding RNA PVT1 inhibits the proliferation of Raji cells through cell cycle regulation[J]. Oncology Letters, 2019, 18(2): 1225-1234.
- [12] 朱晶晶, 张静, 王萍, 等. 血必净注射液增强抗CD19 CAR-T细胞肿瘤杀伤活性的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28(2): 209-213.

(下转第99页)

- [15] 欧英霞, 杨盼, 龙玲, 等. 多囊卵巢综合征患者血清 IMA, HIF1 α , Vaspin, IGF-1 水平与性激素、糖脂代谢及胰岛素抵抗的关系研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(14): 2773-2777.
- OU Yingxia, YANG Pan, LONG Ling, et al. Relationship between serum IMA, HIF1 α , Vaspin, IGF-1 levels and sex hormone, glucose and lipid metabolism, insulin resistance in patients with lycystic ovary syndrome [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2021, 21(14): 2773-2777.
- [16] 吴慧, 韩文龙, 柏蕾, 等. 胎膜早破产妇产血清 SFRP5, TIMP-1 和 HMGB1 水平与并发组织学绒毛膜羊膜炎的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(5): 112-117, 158.
- WU Hui, HAN Wenlong, BAI Lei, et al. Correlation of serum SFRP5, TIMP-1 and HMGB1 levels with histological chorioamnitis in pregnant women with premature rupture of membranes [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(5): 112-117, 158.
- [17] KIMBER-TROJNAR Ž, PATRO-MAŁYSZA J, TROJNAR M, et al. Umbilical cord SFRP5 levels of term newborns in relation to normal and excessive gestational weight gain [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 595.
- [18] 陈凤玲, 王春燕, 孙东华, 等. 不同糖耐量孕妇血浆分泌型卷曲相关蛋白 5 水平对妊娠期糖尿病的预测价值 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(24): 6046-6048.
- CHEN Fengling, WANG Chunyan, SUN Donghua, et al. Prediction value of plasma secreted crimp-associated protein 5 in gestational diabetes mellitus in pregnant women with different glucose tolerance [J]. Maternal & Child Health Care of China, 2018, 33(24): 6046-6048.
- [19] LIU Lingbin, CHEN Xiaodong, ZHOU Xiangyu, et al. The Wnt antagonist and secreted frizzled-related protein 5: implications on lipid metabolism, inflammation, and type 2 diabetes mellitus [J]. Bioscience Reports, 2018, 38(4): BSR20180011.
- [20] 李晓蕾, 齐晓玲, 徐礼五, 等. 2 型糖尿病患者血清 sFRP5 水平与糖脂代谢、骨代谢及骨密度的关系 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2021, 56(5): 666-670.
- LI Xiaolei, QI Xiaoling, XU Liwu, et al. Correlation analysis of serum sFRP5 level with glucose and lipid metabolism, bone metabolism and bone mineral density in patients with T2DM [J]. Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2021, 56(5): 666-670.
- [21] FARR J N, DIMITRI P. The impact of fat and obesity on bone microarchitecture and strength in children [J]. Calcified Tissue International, 2017, 100(5): 500-513.
- 收稿日期: 2023-06-16
修回日期: 2023-08-25

(上接第 15 页)

- ZHU Jingjing, ZHANG Jing, WANG Ping, et al. Xuebijing injection enhancing CD19 CAR-T cell anti tumor killing activity [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine in Intensive and Critical Care, 2021, 28(2): 209-213.
- [13] LI Xiaorui, FENG Yaru, SHANG Fengqin, et al. Characterization of the therapeutic effects of novel chimeric antigen receptor T cells targeting CD38 on multiple myeloma [J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 703087.
- [14] ENGEL P, ZHOU L J, ORD D C, et al. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule [J]. Immunity, 1995, 3(1): 39-50.
- [15] GLOBERSON LEVIN A, RIVIÈRE I, ESHHAR Z, et al. CAR T cells: Building on the CD19 paradigm [J]. European Journal of Immunology, 2021, 51(9): 2151-2163.
- [16] LI Xinchun, DING Ying, ZI Mengting, et al. CD19, from bench to bedside [J]. Immunology Letters, 2017, 183: 86-95.
- [17] PAN J, YANG J F, DENG B P, et al. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients [J]. Leukemia, 2017, 31(12): 2587-2593.
- [18] LU Junru, JIANG Guan. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies [J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 194.
- [19] RUELLA M, XU Jun, BARRETT D M, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell [J]. Nature Medicine, 2018, 24(10): 1499-1503.
- [20] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies [J]. Blood cancer J, 2021, 11(4): 69.
- [21] ZHAO Lijun, LI Shuhong, WEI Xiaoyi, et al. A novel CD19/CD22/CD3 trispecific antibody enhances therapeutic efficacy and overcomes immune escape against B-ALL [J]. Blood, 2022, 140(16): 1790-1802.
- [22] DAI Hanren, WU Zhiqiang, JIA Hejin, 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]. Journal of Hematology & Oncology, 2020, 13(1): 30.
- [23] 吴永彬, 李凌. CRISPR/Cas 系统在新型冠状病毒肺炎快速诊断中的应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 1-5.
- WU Yongbin, LI Ling. Application of CRISPR/Cas systems in the rapid diagnosis of coronavirus disease 2019 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 1-5.
- [24] 黄小琴, 涂名进, 余华军, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建肺癌细胞系获得 AMPK α 1 基因敲除的稳定细胞株 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(1): 107-111.
- HUANG Xiaoqin, TU Mingjin, YU Huajun, et al. Application of CRISPR/Cas 9 system to construct lung cancer cell lines to obtain stable cell lines with AMPK α 1 knockdown [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(1): 107-111.
- [25] CHENG Hao, ZHANG Feng, DING Yang. CRISPR/Cas9 delivery system engineering for genome editing in therapeutic applications [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1649.
- 收稿日期: 2023-09-04
修回日期: 2023-10-12