

冻存后脐血NK细胞的培养及CAR-NK的功能初探

张月琴^{1,2} 蒙露³ 赵日⁴ 毛娟⁵ 刘琴¹ 周丹³ 刘洋¹ 邹强^{3*}

(¹成都医学院药学院, 成都 610500; ²成都优赛诺生物科技有限公司, 成都 610200; ³成都医学院基础医学院, 成都 610500; ⁴西南交通大学医学院, 成都 610031; ⁵川北医学院, 南充 637007)

摘要 该研究优化冻存后脐血NK细胞的培养条件, 构建了靶向CD19的CAR-NK细胞, 并探究了CD19-CAR-NK对CD19⁺B细胞淋巴瘤的杀伤作用。首先将冻存的脐血单个核细胞复苏并静置18 h, 通过CD56磁珠纯化NK细胞, 使其在CBMC中的比例从13.8%提高至96.6%。然后比较使用不同细胞因子及其组合对NK细胞增殖、分化、凋亡及功能的影响, 发现IL-2和IL-15均能活化NK细胞, 但IL-2培养时NK细胞增殖优于IL-15($P<0.05$), IL-2+15下CD56dim NK亚群占比[(74.33±5.03)%]最多, 凋亡[(4.6±0.14)%]最少, 累计增殖(62.67±3.21)倍, 显著优于其他细胞因子组合($P<0.05$)。该研究使用PDK1抑制剂BX795提高CAR-19慢病毒载体对NK细胞的转导效率, 发现6 μmol/L BX795可将病毒转导效率提高3.6倍, 且在此浓度下病毒转导效率[(36.4±1.91)%]最大。最后在体外验证CD19-CAR-NK对CD19⁺肿瘤细胞的杀伤能力, 发现CD19-CAR-NK可增强NK细胞对Nalm6的杀伤作用, 但不影响NK对Nalm6-CD19KO的杀伤。综上所述, 该研究得出IL-2+15是冻存后脐血NK细胞的最佳细胞因子组合, 被CAR修饰的NK细胞能特异性识别CD19抗原并杀伤CD19⁺肿瘤细胞。

关键词 CD19; 自然杀伤细胞; 脐带血; 免疫细胞治疗

Culture of NK Cells in Umbilical Cord Blood after Cryopreservation and Preliminary Study on the Function of CAR-NK

ZHANG Yueqin^{1,2}, MENG Lu³, ZHAO Ri⁴, MAO Juan⁵, LIU Qin¹, ZHOU Dan³, LIU Yang¹, ZOU Qiang^{3*}

(¹College of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ²Chengdu Yousino Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610200, China; ³Basic Medical College of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ⁴Southwest Jiaotong University School of Medicine, Chengdu 610031, China; ⁵North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract This study was to optimize the culture conditions of cord blood NK cells after cryopreservation, construct CD19-targeting CAR-NK cells, and explore the killing effect of CD19-CAR-NK on CD19⁺B-cell lymphoma. First, the cryopreserved umbilical cord blood mononuclear cells were recovered and allowed to stand for 18 h, NK cells were purified by CD56 magnetic beads, and the proportion of NK cells in CBMC increased from 13.8% to 96.6% after purification by magnetic beads. And then the effects of different cytokines and their combinations on NK proliferation, differentiation, apoptosis and function were compared, both IL-2 and IL-15 could activate NK cells, but NK cells proliferated better when cultured with IL-2 compared with IL-15 ($P<0.05$). NK cells under IL-2+15 accounted for the largest proportion of CD56dim (74.33±5.03)%, the least apoptosis (4.6±0.14)%, and the cumulative proliferation was (62.67±3.21) times, which was significantly better than other cytokine combinations ($P<0.05$). In this study, the PDK1 inhibitor BX795 was used to improve the transduction efficiency of CAR-19

收稿日期: 2022-08-09

接受日期: 2022-09-14

*通讯作者: Tel: 18908237461, E-mail: qiangzou99@qq.com

Received: August 9, 2022 Accepted: September 14, 2022

*Corresponding author: Tel: +86-18908237461, E-mail: qiangzou99@qq.com

lentiviral vector on NK cells, 6 $\mu\text{mol/L}$ BX795 could increase the viral transduction efficiency of NK cells by 3.6 times, and the transduction efficiency (36.4 \pm 1.91)% was the highest at this concentration. Finally this study verified the killing ability of CD19-CAR-NK on CD19⁺ tumor cells *in vitro*. CD19-CAR-NK could enhance the killing effect of NK cells on Nalm6, but did not affect the killing of Nalm6-CD19KO. In conclusion, this study concluded that IL-2+15 was the best cytokine combination for umbilical cord blood NK cells after cryopreservation. NK cells modified by CAR can specifically recognize CD19 antigen and kill CD19⁺ tumor cells.

Keywords CD19; natural killer cells; cord blood; immune cell therapy

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)可使T细胞精准靶向肿瘤, 以用于治疗血液癌症, 例如: 靶向CD19的CAR-T细胞能有效缓解68%~93%的急性B淋巴细胞白血病患者^[1-2]、17%~71%的慢性淋巴细胞白血病患者^[3-4]、64%~86%的非霍奇金淋巴瘤患者的临床反应^[5-6], 并且这种症状缓解现象可能是持续存在的。目前, FDA已批准六款CAR-T细胞产品用于临床治疗。虽然CAR-T细胞具有明显的抗肿瘤活性, 但仍存在着一定的临床局限性。首先, 异体CAR-T会引起强烈的移植物抗宿主病(graft-vs-host disease, GVHD), 因此目前CAR-T大多是基于自体细胞生产的, 其生产过程复杂且成本昂贵; 其次, 部分患者经CAR-T治疗后会出现强烈的副作用, 如细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)和神经毒性^[7]。

CAR修饰的自然杀伤细胞(natural killer, NK)或许可以减弱这些不良反应。NK细胞是先天免疫系统的重要组成部分, 无需抗原预先致敏, 反应迅速, 具有广谱抗肿瘤作用。同时脐血来源的NK细胞有以下优势: 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)匹配需求低, GVHD的发生率和严重程度较低^[8-9], 因此可作为“现货型”产品直接用于治疗疾病。与T细胞不同, NK细胞不分泌IL-1、IL-6等促发炎症的细胞因子, 引起CRS的可能性较小^[10]。人类外周血NK细胞表型为CD3⁻CD56⁺, 根据CD56的表达水平可分为2个亚群: CD56dim和CD56bright。CD56dim是成熟的毒性细胞, 有强杀伤作用, 而CD56bright则可以分泌大量细胞因子, 主要参与免疫调节^[11]。CAR-NK既可通过NK细胞表面受体杀伤肿瘤, 还可特异性杀伤表达CAR抗原的肿瘤。然而, 与造血系统的其他细胞相比, NK细胞表达病毒基因一直被认为难度较高且效率较低。研究表明, PDK1抑制剂BX795可抑制NK细胞TBK1/IKK $\alpha/\beta/\epsilon$ 抗病毒信号通路, 从而提高NK细胞的转导效率^[12]。NK细胞对冻融敏感, 目

前大多研究都是使用新鲜分离的NK细胞, 本研究通过优化冻存后脐血NK细胞的培养条件, 将CAR-19基因由慢病毒载体转导至NK细胞, 成功构建靶向CD19的CAR-NK细胞, 以Nalm6、Nalm6-CD19KO为靶细胞, 在体外开展杀伤实验以验证其特异性杀伤能力。

1 材料与方法

1.1 细胞

脐带血来自成都医学院第一附属医院, 本研究已征得捐献者的同意, 通过成都医学院第一附属医院医学伦理委员会审批, 批准号为2018CYFY-HEC-047-02。K562细胞、经改造含荧光素酶基因的Nalm6(人Burkitt's淋巴瘤细胞)购于成都飞鸥尔生物科技有限公司; 293T(人肾上皮细胞系)购于中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

Lymphoprep淋巴分离液购于加拿大STEM-CELL Technologies公司; NK细胞分选试剂盒、含CD56磁珠及Vario MACS磁珠分选系统均购于德国Macs Miltenyi公司; ACTM培养基、复苏液购于珠海贝索生物技术有限公司; RPMI-1640购于以色列BioInd公司; 细胞因子IL-1、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-27购于北京百普赛斯生物技术有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于依科赛生物技术有限公司; DMSO购于北京索莱宝科技有限公司; 凋亡试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; FITC anti-human CD16、PE anti-human CD16、Brilliant Violet711 anti-human CD3、Brilliant Violet421 anti-human CD56、APC anti-human CD19、APC/Cyanine7 anti-human CD107a和Cytometric Bead Array(CBA)试剂盒均购于美国Biolegend公司; BX795购于美国MCE公司; LV载体系统pLP1、pLP2-vsVG、pLVX-CAR-19和Lipofectamine 3000

转导试剂购于美国 Thermo Fisher Scientific公司; 质粒无内毒素大提试剂盒购于德国 Qiagen公司; 高糖 DMEM和RPMI-1640购于美国Hyclone公司; 流式细胞仪购于美国ACEA公司。

1.3 NK细胞的冻存、复苏及分选

将新鲜脐带血离心, 收集上层血浆, 而后按照 Lymphoprep说明书操作, 分离脐血中的单个核细胞(cord blood mononuclear cell, CBMC), 使用冻存液(90% DMSO+10% FBS)重悬 CBMC, 并将其置于程序性降温盒中, 4 h后将细胞转移至液氮中储存。30天后, 从液氮中取出细胞, 于37 °C水浴融化, 用 RPMI-1640洗涤一次, 最后用复苏液重悬, 并于培养箱中静置18 h, 第2天用MACS CD56磁珠分选CBMC中的NK细胞。

1.4 NK细胞的体外培养

细胞因子是由免疫细胞或非免疫细胞经刺激而合成、分泌的一类小分子蛋白, 参与调节免疫反应的各个环节, 包括淋巴细胞的发育、分化、耐受和记忆。细胞因子如IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21等参与NK细胞激活、成熟和存活^[13-14], 具体功能见表1。

1.4.1 一种细胞因子 将纯化后的NK细胞以 5×10^5 个/mL接种于24孔板培养, 每孔终体积为0.5 mL(含10% FBS的ACTM, 青、链霉素各100 U/mL), 按培养体系中的细胞因子分为9组, 每组设置3个重复: No(无细胞因子)、IL-1、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-27, IL-2浓度为1 000 U/mL, 其余细胞因子浓度为20 ng/mL, 第3天补充0.5 mL ACTM培养基同时补充各组细胞因子, 第5天时用流式细胞仪检测NK细胞增殖与CD69表达情况。

1.4.2 两种细胞因子组合 以IL-2为基础, 再加入另一种细胞因子, 按照1.4.1的培养条件分为7组: IL-2、IL-2+IL-1(简称: IL-2+1)、IL-2+IL-12(简称: IL-2+12)、IL-2+IL-15(简称: IL-2+15)、IL-2+IL-18(简称: IL-2+18)、IL-2+IL-21(简称: IL-2+21)、IL-2+IL-27(简称: IL-2+27), 每3天用流式细胞仪检测NK细胞增殖情况, 并补充相应的细胞因子和培养基。15天后, 计算NK细胞的累计增殖倍数并检测其亚群与凋亡情况。将各组NK细胞与K562细胞按1:3的比例混合(简称: 混合组), 以单独K562细胞为对照(简称: 单靶组), 4 h后检测混合组CD107a的分泌情况。由于K562细胞不表达HLA-ABC, 因此可通过流式检测HLA-ABC的表达, 并按以下公式计算NK细胞对K562的杀伤效率:

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{(\text{单靶组的HLA-ABC}^+ \text{细胞} - \text{混合组的HLA-ABC}^+ \text{细胞})}{\text{单靶组的HLA-ABC}^+ \text{细胞}} \times 100\%$$

1.5 慢病毒包装

使用Lipofectamine 3000试剂盒制备转导体系, 用P3000与pLP1、pLP2、pLP-v SVG和pLvX-CMV-CAR-19四种质粒混合后再与Lipofectamine 3000混合, 再加入适量的Opti-MEM混合, 室温孵育15~20 min, 将孵育好的混合液滴加到293T细胞中, 放入37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 48 h后收集慢病毒上清液, 用0.45 μmol/L孔径的滤头过滤慢病毒去除细胞碎片, 并用超滤管浓缩慢病毒。

1.6 制备CD19-CAR-NK细胞

将NK细胞在IL-2+15条件下培养3天, 按照不同的感染复数(multiplicity of infection, MOI), 即MOI为0、12.5、25、50与100时在NK细胞中加入CAR-19慢病毒, 制备CD19-CAR-NK细胞, 72 h后检测CAR

表1 细胞因子及其对NK细胞的功能

Table 1 Cytokines and their functions on NK cells

细胞因子 Cytokines	功能 Functions
IL-1	Synergy with IL-2 or interferon can enhance NK cell activity
IL-2	It is the most commonly used cytokine for NK expansion <i>in vitro</i> , which can activate NK cells and induce their proliferation
IL-7	CD56bright NK proliferation is promoted and cytotoxic effect is enhanced
IL-12	NK cell proliferation is promoted <i>in vitro</i> and the combination with IL-2 enhances the expansion of NK cells
IL-15	Promote NK cell differentiation, development and maintain survival <i>in vitro</i>
IL-18	It can enhance the killing activity of NK cells and activate NK cells when combined with IL-2
IL-21	It promotes the proliferation of human NK cells and regulates the expression of surface receptors
IL-27	It can prevent tissue damage induced by excessive inflammation and promote the anti-tumor effect of NK cells

的表达情况。固定MOI为50后,先加入不同浓度的BX795抑制NK细胞的抗病毒机制,30 min后再加入慢病毒,72 h后检测CAR阳性率。

1.7 CD19-CAR-NK细胞体外杀伤靶细胞

含荧光素酶的Nalm6和Nalm6-CD19KO为靶细胞,培养第15天的CAR-NK与NK细胞为效应细胞。按照不同效靶比1:9、1:3、1:1将效应细胞与靶细胞混合后共培养,终体积1 mL/孔,每组均设3个平行复孔,置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养18 h,每孔加入等体积的荧光素酶底物,振荡混匀并立即测定其发光情况。发光仪的原始数据通常以相对光单位(relative light unit, RLU)表示反应样品中光产生量的相对测试值。细胞毒性的计算方法,求出3个平行孔的平均值,按以下公式计算杀伤率:

杀伤率(%)=(1-靶细胞和效应细胞共培养孔的RLU/靶细胞孔的RLU)×100%

收集杀伤后细胞培养上清,按照CBA试剂盒说明书检测IFN- γ 、Granzyme B和Perforin的表达水平。

1.8 数据处理及统计学分析

各实验设置3组重复,采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用*t*检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功纯化NK细胞

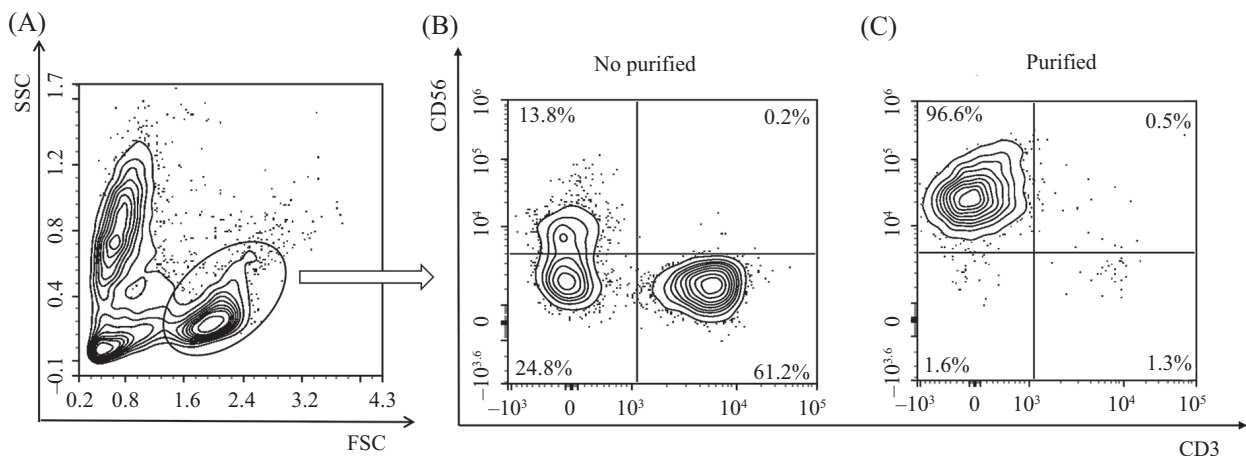
通过密度梯度离心法分离脐带血中的单个核

细胞,得到CBMC(图1A),经流式细胞仪检测显示CBMC中NK细胞(CD3⁻CD56⁺)在淋巴细胞中的比例为13.8%(图1B)。为获得较高纯度的NK细胞,通过MACS的CD56免疫磁珠分选CBMC中的NK细胞,使分选后NK细胞的比例提高至96.6%(图1C),成功纯化NK细胞。

2.2 成功筛选冻存后NK细胞体外培养的最佳细胞因子组合

将NK细胞在不同细胞因子中培养5天,结果显示NK细胞在IL-2组中增殖(3.17±0.25)倍,显著优于其在IL-15组中的增殖(2.43±0.25)倍($P<0.05$)(图2A),而在其他细胞因子组增殖较差。CD69是一种活化诱导分子,在静息的NK及T细胞上均不表达,在活化的NK与T细胞上表达,因此可通过检测CD69的表达情况反映NK细胞的活化状态。IL-2与IL-15均能活化NK细胞,且二者之间无显著差异($P>0.05$)(图2B)。

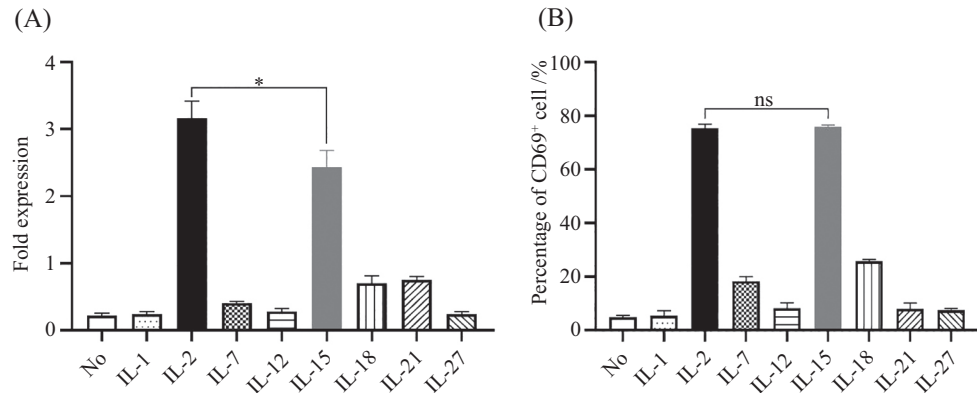
为进一步优化NK细胞的增殖条件,以IL-2为基础,联合另一种细胞因子培养NK细胞。结果显示体外培养15天后,NK细胞在IL-2+15下增殖(62.67±3.21)倍,而在IL-2+18下增殖(45.33±3.06)倍,差异显著($P<0.05$)(图3A)。同时,IL-2+15组中CD56dim NK的比例最高,为(74.33±5.03)%,而IL-2+18组中比例为(49±7.81)%差异显著($P<0.05$)(图3B)。比较各组培养条件下NK细胞的凋亡情况及其对K562细胞的杀伤作用,发现IL-2+15组NK细胞凋亡最少,为(4.6±0.14)%(图3C),CD107a分泌最多(图



A: Ficoll后的脐带血单个核细胞(CBMC); B: MACS磁珠分选前CBMC中CD3⁻CD56⁺细胞比例; C: MACS磁珠分选后CBMC中CD3⁻CD56⁺细胞比例。
A: cord blood mononuclear cell (CBMC) after Ficoll; B: CD3⁻CD56⁺ cell ratio in CBMC before MACS magnetic bead sorting; C: CD3⁻CD56⁺ cell ratio in CBMC after MACS magnetic bead sorting.

图1 MACS分选NK细胞

Fig.1 MACS sorting of NK cells



A: NK细胞的增殖倍数; B: NK细胞的CD69表达情况。n=3; *P<0.05; ns: P>0.05。

A: proliferation fold of NK cells; B: CD69 expression in NK cells. n=3; *P<0.05; ns: P>0.05.

图2 NK细胞在一种细胞因子中培养5天

Fig.2 NK cells cultured in a cytokine for five days

3D), 且各组NK细胞对K562细胞的杀伤作用差异不显著($P>0.05$)(图3E)。因此, IL-2+15为冻存后脐血NK细胞的最佳细胞因子组合。

2.3 成功构建CD19-CAR-NK细胞

按照不同MOI将CAR-19基因转导至已培养3天的NK细胞, 72 h后用流式细胞仪检测CAR-19阳性率(图4A)。结果显示, NK细胞的病毒转导效率随MOI增加而提高, 但即使在MOI为100时, NK细胞的病毒转导效率也才12%, 因此不能仅通过增加MOI来提高病毒转导效率。固定MOI为50后, 病毒转导前30 min先加入BX795抑制NK的抗病毒机制, 发现BX795可提高转导效率(图4B)。当BX795浓度为6 $\mu\text{mol/L}$ 时, 慢病毒转导效率最高, 为(36.4 \pm 1.91)%, 显著优于4 $\mu\text{mol/L}$ 时的转导效率(26.03 \pm 1.21)%($P<0.05$)。当BX795浓度超过6 $\mu\text{mol/L}$ 后, 其促进NK转导的效率降低, 说明BX795对增加NK细胞的病毒转导效率有剂量依赖性作用。比较发现, 6 $\mu\text{mol/L}$ BX795可将NK的转导效率提高3.6倍。同时, 比较BX795不同浓度下NK细胞的增殖情况, 发现9天内的增殖无差异($P>0.05$)(图4C), 这提示一定浓度范围内使用BX795对NK细胞没有直接的毒性作用。

2.4 CAR促进NK特异性杀伤CD19⁺肿瘤细胞

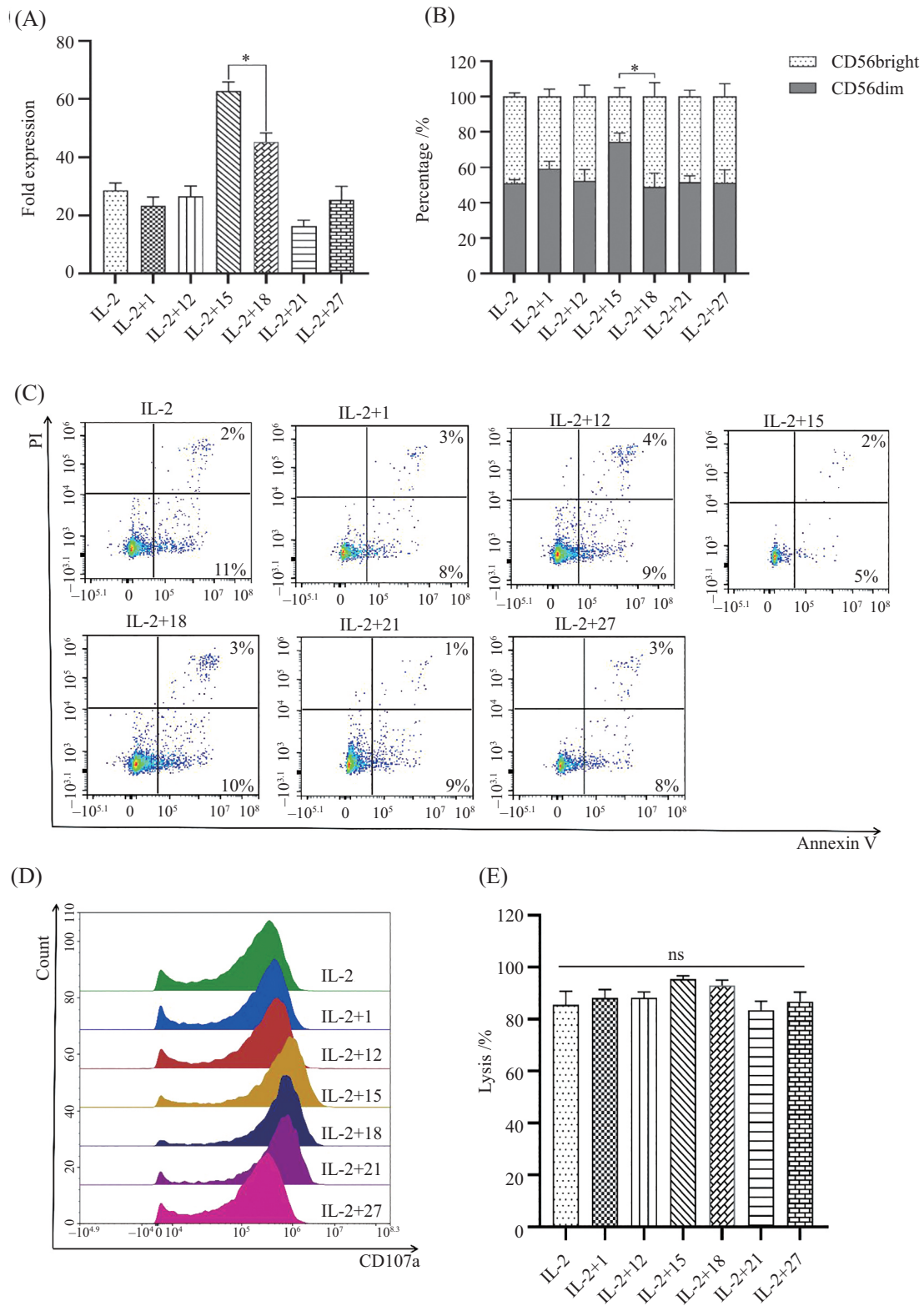
为验证CAR-NK能否特异性杀伤CD19⁺的肿瘤细胞, 通过CRISPR/Cas9将Nalm6的CD19基因敲除, 并将CD19⁻细胞纯化, 得到Nalm6-CD19KO细胞(图5A)。在1:9、1:3、1:1的效靶比下, CAR-NK对Nalm6的杀伤率分别为: (55.67 \pm 4.04)%、(73.67 \pm 5.03)%、(91.33 \pm 4.04)%, 而NK对Nalm6的

杀伤率分别为: (43.67 \pm 4.04)%、(55.00 \pm 4.36)%、(58.67 \pm 6.43)%, CAR-NK对Nalm6的杀伤显著优于NK($P<0.05$); 在1:9、1:3、1:1的效靶比下, CAR-NK对Nalm6-CD19KO的杀伤率分别为: (56.67 \pm 4.16)%、(72.33 \pm 5.86)%、(82.00 \pm 8.19)%, NK对Nalm6-CD19KO的杀伤率分别为: (52.33 \pm 3.21)%、(71.33 \pm 4.16)%、(78.00 \pm 3.00)%, 差异不显著($P>0.05$)(图5B)。收集杀伤后细胞培养上清, 采用CBA检测IFN- γ 、Granzyme B和Perforin的释放情况, CAR-NK分泌IFN- γ 、Granzyme B、Perforin的量均显著高于NK细胞($P<0.05$)(图5C)。

3 讨论

B细胞淋巴瘤是恶性淋巴瘤中最常见的亚型, 每年都有大量患者由于其复发性和难以治愈性不治而亡^[15-16]。CD19是B细胞淋巴瘤的标志抗原, 在大部分恶性B细胞、前B细胞、正常B细胞及滤泡状DC中都有可能表达。因此, CD19是治疗B细胞恶性肿瘤的理想靶标^[17]。

由于NK细胞通常不攻击健康组织, 也不表达克隆重排的抗原受体, 因此其引起GVHD的能力有限。即使肿瘤细胞下调或不表达CAR抗原, NK细胞仍可被其表面受体(如NKG2D、NKp46、NKp44、NKp30、DNAM-1)激活然后杀伤肿瘤细胞, 这可能减少基于肿瘤细胞CAR抗原丢失所致的免疫逃逸^[18], 并且, 与T细胞的运输模式不同, NK细胞可在整个淋巴系统和组织中循环, 因此CAR-NK可到达CAR-T无法定位的肿瘤位置。与CAR-T相比, CAR-

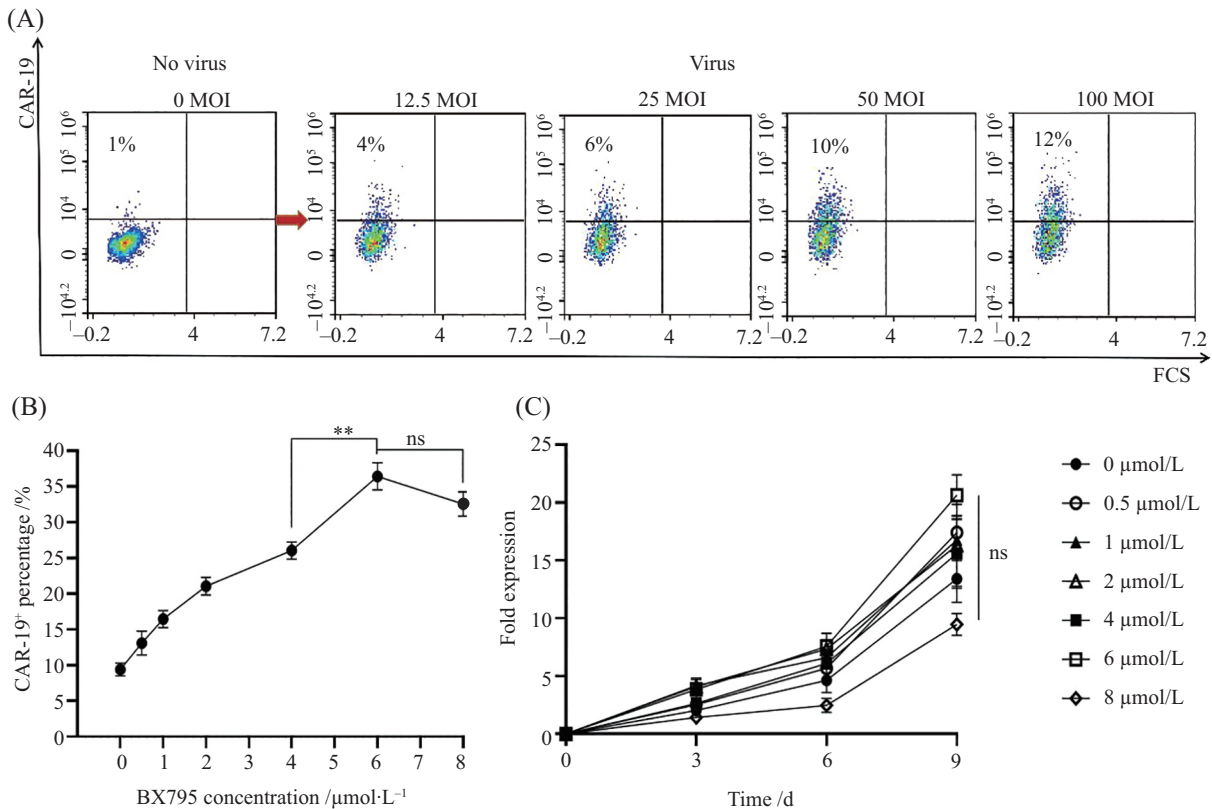


A: NK细胞的累计增殖倍数; B: NK细胞的亚群; C: NK细胞的凋亡情况; D: NK细胞杀伤K562时CD107a的分泌; E: NK细胞对K562的杀伤作用。
 n=3; *P<0.05; ns: P>0.05。

A: cumulative multiplication fold of NK cells; B: subpopulations of NK cells; C: apoptosis of NK cells; D: CD107a secretion during NK cell killing of K562; E: NK cell killing effect on K562. n=3; *P<0.05; ns: P>0.05.

图3 NK细胞在两种细胞因子中培养15天

Fig.3 NK cells were cultured in two cytokines for 15 days



A: 不同MOI时NK细胞的病毒转导效率; B: MOI为50时, 不同BX795浓度NK细胞的转导效率; C: MOI为50时, 不同BX795浓度下NK细胞的增殖情况。n=3; ** $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$ 。

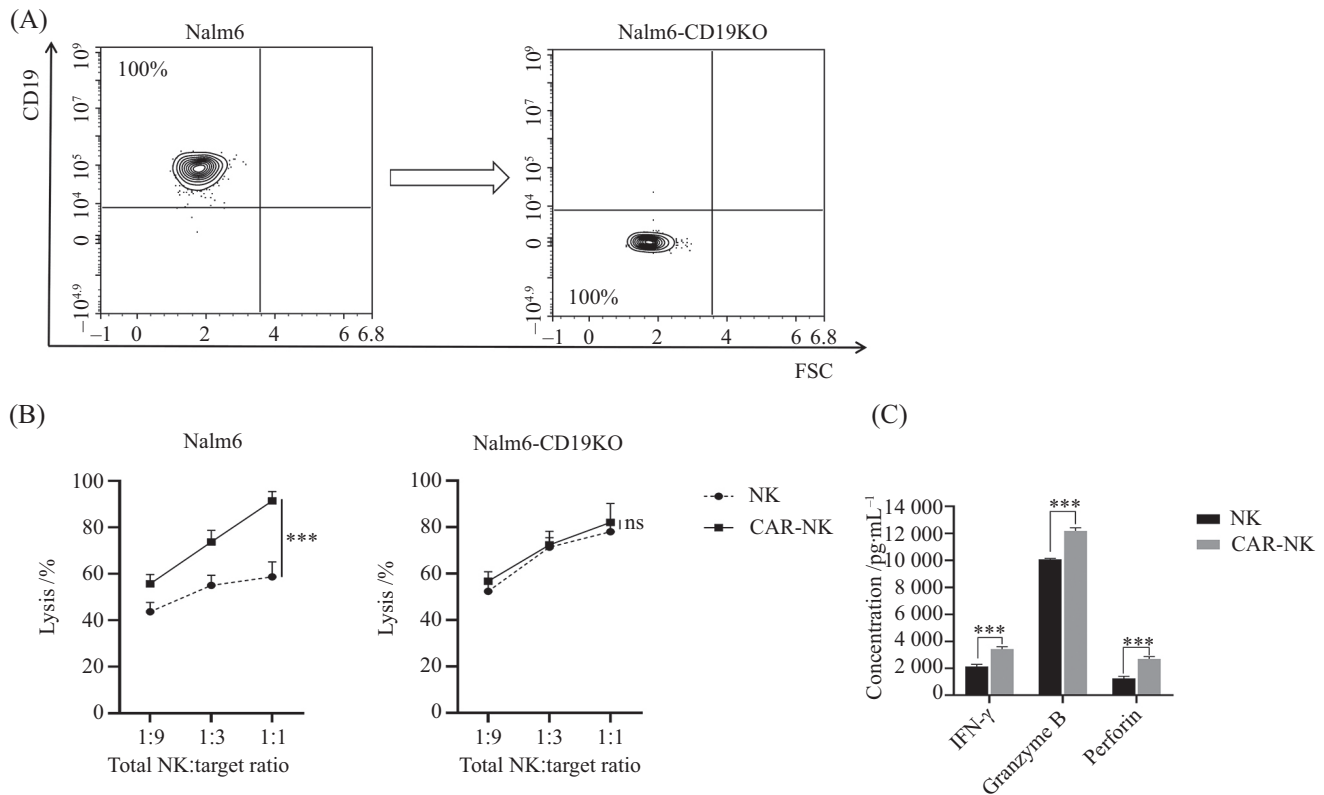
A: viral transduction efficiency of NK cells at different MOIs; B: transduction efficiencies of NK cells with different concentrations of BX795 at 50 MOI; C: proliferation of NK cells at different concentrations of BX795 at 50 MOI. n=3; ** $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$ 。

图4 CAR-19慢病毒转导NK细胞

Fig.4 NK cells transduced by CAR-19 lentivirus

NK细胞具有“货架型”产品的优点, 但仍面临着以下几个挑战: NK细胞体外扩增困难、病毒的转导效率低以及持久性差^[19]。单个供者的NK细胞数量不足以用于治疗, 因而NK细胞的体外扩增和激活非常关键^[20]。据报道, 辐照的K562-mb15-4-1BBL细胞作为饲养细胞可以促进NK细胞增殖, 但饲养细胞具有一定的成瘤性, 且回输前必须经过辐照, 这可能会降低细胞毒性。此外, 必须完全消除T细胞以防止GVHD^[21]。研究表明, NK细胞表面有许多细胞因子受体, 可通过细胞因子促进其增殖^[22]。本研究发现, 冻存后脐血NK细胞在IL-2+15下增殖(62.67±3.21)倍, CD56dim的比例最高且凋亡最少, 其余组别中NK增殖较差可能与细胞因子的浓度和添加时间有关。有研究在IL-2+15下培养新鲜CBMC 21天, NK细胞累计增殖1 000倍, 且NK细胞的毒性功能显著强于CD3⁺CD56⁺细胞^[23]。NK细胞对冻融敏感, 可通过优化冻存条件, 使复苏后的NK

细胞尽快恢复活性。此外, 还可以联合更多细胞因子增强NK细胞的功能, 如IL-12+15+18可诱导记忆型NK^[24]。就CAR-NK细胞而言, 选择合适的方法转导CAR基因是至关重要的。目前, 转导载体包括病毒载体和非病毒载体。由于NK细胞是非特异性免疫细胞, 对病毒有天然抗性, 因而病毒转导较T细胞困难^[25]。据报道, 抑制细胞内抗病毒机制可能会增加慢病毒转导NK细胞的水平^[26]。本研究使用6 μmol/L BX795抑制NK细胞的抗病毒信号, 成功将病毒转导效率提高3.6倍。mRNA转导NK细胞也被认为是一种实用和安全的转导方法。研究表明, mRNA法电穿孔24 h后受体表达水平超过80%^[27]。然而, 电穿孔法转导mRNA的CAR-NK细胞的抗肿瘤作用是短暂的, CAR的表达水平将持续不超过3天^[28]。有研究将CD19-CAR转导至脐血NK细胞, 发现7天后CAR阳性率从40%降至20%, 且在效靶比为1:1下杀伤Nalm6效率为50%^[29]。本研究构建的CD19-CAR-



A: CRISPR/Cas9敲除Nalm6的 $CD19$ 基因; B: CD19-CAR-NK增强NK细胞对Nalm6的杀伤作用但不影响对Nalm6-CD19KO的杀伤效果; C: CD19-CAR-NK杀伤时释放IFN- γ 、Granzyme B、Perforin的量均高于NK细胞。n=3; ***P<0.001; ns: P>0.05。

A: CRISPR/Cas 9 knocks out the $CD19$ gene of Nalm6; B: CD19-CAR-NK enhances the killing of Nalm6 but does not affect the killing of Nalm6-CD19 KO; C: CD19-CAR-NK releases IFN- γ , Granzyme B, Perforin were higher than NK cells. n=3; ***P<0.001; ns: P>0.05。

图5 CD19-CAR-NK细胞体外杀伤肿瘤细胞

Fig.5 CD19-CAR-NK cells kill tumor cells *in vitro*

NK可显著增强NK对Nalm6细胞的杀伤作用, 比较CAR-NK对Nalm6与Nalm6-CD19KO细胞的杀伤效果, 发现CAR-NK对两种靶细胞的作用差别不大, 可能是CAR阳性率仅36%, 导致NK细胞自身杀伤能力强于CAR, 后续还需提高CAR阳性率, 以制备功能更强的CAR-NK细胞。

本研究优化了冻存后脐血NK的培养条件, 通过抑制NK细胞的抗病毒机制提高了慢病毒的转导效率, 成功构建了CD19-CAR-NK细胞, 其可在体外显著增强NK对CD19⁺肿瘤的杀伤作用, 且不增强NK的非特异性杀伤能力, 但仍需要在动物实验中验证CD19-CAR-NK细胞在体内的抗肿瘤能力和安全性。虽然CAR-NK细胞已被证明可有效抑制癌症, 但其长期的抗癌效果仍不明确。未来, 可在本文提供的CAR-NK细胞制备流程上进一步改造, 以制备具有更强增殖和抗肿瘤活性的CAR-NK细胞, 为更多患者提供治疗机会。

参考文献 (References)

- [1] MAUDE S L, LAETSCH T W, BUECHNER J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 439-48.
- [2] PARK J H, RIVIÈRE I, GONEN M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 449-59.
- [3] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-33.
- [4] PORTER D L, HWANG W T, FREY N V, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303): 303ra139.
- [5] NEELAPU S S, LOCKE F L, BARTLETT N L, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-44.
- [6] SCHUSTER S J, SVOBODA J, CHONG E A, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2545-54.
- [7] LEE D W, SANTOMASSO B D, LOCKE F L, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells [J]. *Biol Blood*

- Marrow Transplant, 2019, 25(4): 625-38.
- [8] BARKER J N, WAGNER J E. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 48(1): 35-43.
- [9] SHLOMCHIK W D. Graft-versus-host disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 340-52.
- [10] DALLE J H, MENEZES J, WAGNER E, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 1): 649-55.
- [11] HEIPERTZ E L, ZYNDA E R, STAV-NORAAS T E, et al. Current perspectives on "off-the-shelf" allogeneic NK and CAR-NK cell therapies [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 732135.
- [12] SUTLU T, NYSTRÖM S, GILLJAM M, et al. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(10): 1090-100.
- [13] ZWIRNER N W, DOMAICA C I. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions [J]. *Biofactors*, 2010, 36(4): 274-88.
- [14] OCHAYON D E, WAGGONER S N. The effect of unconventional cytokine combinations on NK-cell responses to viral infection [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 645850.
- [15] WANG K, WEI G, LIU D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 36.
- [16] MORGAN R A, YANG J C, KITANO M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-51.
- [17] STANCIU-HERRERA C, MORGAN C, HERRERA L. Anti-CD19 and anti-CD22 monoclonal antibodies increase the effectiveness of chemotherapy in Pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines [J]. *Leuk Res*, 2008, 32(4): 625-32.
- [18] GANG M, MARIN N D, WONG P, et al. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas [J]. *Blood*, 2020, 136(20): 2308-18.
- [19] XIA J, MINAMINO S, KUWABARA K. CAR-expressing NK cells for cancer therapy: a new hope [J]. *Biosci Trends*, 2020, 14(5): 354-9.
- [20] KLINGEMANN H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(3): 245-9.
- [21] BOISSEL L, BETANCUR M, LU W, et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(5): 958-65.
- [22] ALNABHAN R, MADRIGAL A, SAUDEMONT A. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 73-85.
- [23] TOMCHUCK S L, LEUNG W H, DALLAS M H. Enhanced cytotoxic function of natural killer and CD3⁺CD56⁺ cells in cord blood after culture [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(1): 39-49.
- [24] ROMEE R, SCHNEIDER S E, LEONG J W, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells [J]. *Blood*, 2012, 120(24): 4751-60.
- [25] OBERSCHMIDT O, MORGAN M, HUPPERT V, et al. Development of automated separation, expansion, and quality control protocols for clinical-scale manufacturing of primary human nk cells and alpharetroviral chimeric antigen receptor engineering [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2019, 30(3): 102-20.
- [26] CHOCKLEY P, PATIL S L, GOTTSCHALK S. Transient blockade of TBK1/IKKε allows efficient transduction of primary human natural killer cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped lentiviral vectors [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23(9): 787-92.
- [27] SHIMASAKI N, FUJISAKI H, CHO D, et al. A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(7): 830-40.
- [28] HUNG C F, XU X, LI L, et al. Development of anti-human mesothelin-targeted chimeric antigen receptor messenger rna-transfected peripheral blood lymphocytes for ovarian cancer therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(5): 614-25.
- [29] HERRERA L, SANTOS S, VESGA M A, et al. Adult peripheral blood and umbilical cord blood NK cells are good sources for effective CAR therapy against CD19 positive leukemic cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18729.