

· 技术与方法 ·

NK-92MI工程细胞增强HER2-CAR-CIK对卵巢癌细胞杀伤功能的研究

吴光源^{1#} 安仲姚^{1,2#} 刘小龙¹ 王海龙¹ 于阔¹ 王欣¹ 刘杨¹ 戚鹏飞¹ 范圣瑾^{3,4} 王振坤^{1,3*}⁽¹⁾哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室, 哈尔滨 150000; ⁽²⁾中科赛洱生物科技(黑龙江)有限公司技术部,哈尔滨 150000; ⁽³⁾国家卫生健康委员会细胞移植重点实验室, 哈尔滨 150000;⁽⁴⁾哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科, 哈尔滨 150000)

摘要 CAR-CIK疗法作为一种前景广阔的新策略, 其疗效却受限于传统扩增方法引发的CIK细胞功能耗竭。为此, 提高关键的CD3⁺CD56⁺细胞亚群比例并维持其功能, 成为了提升治疗效果的核心所在。该研究利用基因工程技术构建了共表达膜结合型IL-21和CD137L的NK-92MI工程细胞(IC-92), 通过联合IC-92和细胞因子(IFN- γ 、OKT3、IL-1 α 和IL-2)的优化培养体系对CIK及HER2-CAR-CIK细胞进行了扩增培养。采用流式细胞术检测效应分子表达情况; 利用Incucyte S3活细胞分析系统评估CAR-CIK细胞的HER2特异性肿瘤杀伤能力; 整合RNA测序和基于LC-MS的非靶向代谢组学, 初步探索IC-92联合细胞因子共培养策略对CIK细胞功能调控的相关机制。结果表明, 联合培养可显著提高CIK细胞的增殖活性及CD3⁺CD56⁺效应细胞比例, 且能维持CD3⁺CD56⁺细胞表面NKG2D、NKp30等激活受体表达。与对照组相比, IC-92联合细胞因子能诱导更高比例效应记忆样T细胞分化, 显著增强HER2-CAR-CIK细胞对人卵巢癌细胞系SK-OV-3的靶向杀伤能力。测序结果进一步证实, 在联合培养扩增的CIK细胞中, CD3⁺CD56⁺细胞群体的HIF-1与AMPK信号通路被显著富集, 同时其糖代谢和鞘磷脂代谢相关的差异基因在通路里显著富集。综上, 该研究成功构建了可共表达mIL-21与CD137L的IC-92工程细胞, 通过联合IC-92和细胞因子能高效诱导出CD3⁺CD56⁺高比例的CIK细胞, 并促进其向效应记忆样表型分化。功能与机制研究证实, 联合培养扩增的HER2-CAR-CIK细胞展现出显著增强的靶向杀伤能力, 其作用机制与免疫信号的激活及糖代谢与鞘磷脂代谢的重塑密切相关。

关键词 细胞因子诱导的杀伤细胞; NK-92MI; 嵌合抗原受体; 卵巢癌

Enhancement of HER2-CAR-CIK Against Ovarian Cancer Cell by the Engineered NK-92MI

WU Guangyuan^{1#}, AN Zhongyao^{1,2#}, LIU Xiaolong¹, WANG Hailong¹, YU Kuo¹, WANG Xin¹, LIU Yang¹,
QI Pengfei¹, FAN Shengjin^{3,4}, WANG Zhenkun^{1,3*}

收稿日期: 2025-06-17 接受日期: 2025-10-22

国家自然科学基金(批准号: 82101929)、黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目(批准号: LJGXCG2023-003)和哈尔滨医科大学附属第一医院杰出青年基金(批准号: 2021J02)资助的课题

#共同第一作者

*通信作者。Tel: 0451-85552454, E-mail: zhenkunwang@hrbmu.edu.cn

Received: June 17, 2025

Accepted: October 22, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82101929), the Collaborative Innovation Projects of Heilongjiang Province, China (Grant No.LJGXCG2023-003) and the Outstanding Youth Funding of the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University (Grant No.2021J02)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-451-85552454, E-mail: zhenkunwang@hrbmu.edu.cn

¹Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China;

²Technical Department, ZKCELL Biotechnology (Heilongjiang) Co., Ltd, Harbin 150000, China;

³NHC Key Laboratory of Cell Transplantation, Harbin 150000, China; ⁴Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China)

Abstract CAR-CIK therapy is a promising new strategy; however, its efficacy is limited by the functional exhaustion of CIK cells caused by traditional expansion methods. Therefore, increasing the proportion of the critical CD3⁺CD56⁺ cell subpopulation and maintaining their function is central for enhancing therapeutic outcomes. This study employed genetic engineering to generate NK-92MI cells co-expressing membrane-bound IL-21 and CD137L (hereinafter referred to as IC-92). A co-culture system combining IC-92 cells with cytokines (IFN- γ , OKT3, IL-1 α , and IL-2) was established to expand both CIK and HER2-CAR-CIK cells. Flow cytometry was used to detect the expression of effector molecules, while the Incucyte S3 live-cell analysis system was utilized to evaluate the HER2-specific tumor-killing capacity of CAR-CIK cells. Integrated RNA sequencing and LC-MS-based untargeted metabolomics were applied to preliminarily investigate the mechanisms by which the IC-92 and cytokine co-culture strategy modulates CIK cell function. The results demonstrated that the co-culture significantly enhanced the proliferative activity of CIK cells and increased the proportion of CD3⁺CD56⁺ effector cells, while maintaining the expression of activating receptors such as NKG2D and NKp30 on the cell surface. Compared to the control group, IC-92 combined with cytokines induced a higher proportion of effector memory-like T cell differentiation and markedly strengthened the killing ability of HER2-CAR-CIK cells against the human ovarian cancer cell line SK-OV-3. Sequencing results further confirmed that in the co-cultured and expanded CIK cells, the CD3⁺CD56⁺ cell population exhibited significant enrichment of the HIF-1 and AMPK signaling pathways. Additionally, differentially expressed genes associated with glycometabolism and sphingolipid metabolism showed marked enrichment in these pathways. This study successfully established IC-92 engineered cells that co-express mIL-21 and CD137L. These cells efficiently generated a high proportion of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, thereby facilitating their differentiation into an effector memory-like phenotype. The research on functions and mechanisms demonstrated that this IC-92-based system enables the expansion of highly potent HER2-CAR-CIK cells with superior tumor-killing activity, an effect attributed to enhanced immunostimulatory signaling and concurrent metabolic reprogramming of glycolytic and sphingolipid pathways.

Keywords cytokine induced killer cells; NK-92MI; chimeric antigen receptor; ovarian cancer

卵巢癌是致死率最高的妇科恶性肿瘤,全球每年新增病例逾20万例,构成重大公共卫生挑战^[1-2]。尽管手术联合铂类化疗可延长晚期患者生存期,但微转移灶清除困难及铂耐药复发仍是临床治疗的难题^[3-4]。近年来,过继细胞免疫疗法(adoptive cell transfer therapy, ACT)为实体瘤治疗提供了新方向^[5]。其中,基于细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)的CAR工程化改造策略备受关注。

CIK是以CD3⁺CD56⁺自然杀伤样T细胞为主的异质性细胞群,兼具T细胞的抗原特异性识别能力和NK细胞的非MHC限制性杀伤特性^[6-7]。相较于嵌合抗原受体修饰的T细胞(chimeric antigen receptor modified T cell, CAR-T), CAR-CIK细胞具有广谱杀瘤作用、低毒副作用的独特优势^[8-9]。此外,CIK细

胞可分泌IL-2、IFN- γ 等细胞因子,对CAR介导的特异性杀伤形成有效的补充,同时具有一定的免疫调节能力^[10-11]。然而,CAR-CIK的临床转化仍面临多重瓶颈,CIK中CD3⁺CD56⁺效应细胞亚群需要长时间诱导培养以增加其比例,而长期体外扩增可能导致细胞功能耗竭、细胞毒性下降,从而制约其临床疗效^[8,12]。因此,亟需建立新的培养策略在提升CIK细胞中CD3⁺CD56⁺ NK样T淋巴细胞亚群比例的同时,实现“激活增效”与“耗竭抑制”的精准平衡。

研究表明,IL-21可通过STAT3/STAT5信号轴显著提升CIK细胞的增殖能力与抗肿瘤效应,并能诱导CIK向干细胞样记忆表型分化并减少细胞耗竭的发生^[13]。CD137/CD137L信号通路可显著提高CIK细胞的抗肿瘤活性^[14]。此外,联合应用膜结合型IL-

21(membrane-bound interleukin 21, mIL-21)及共刺激分子配体CD137L能够诱导T细胞和NK细胞在扩增过程中维持其端粒长度,实现长期指数扩增^[15]。因此,本研究创新性构建共表达mIL-21与CD137L的NK-92MI工程细胞(IC-92),联合IFN- γ 、OKT3、IL-1 α 和IL-2等细胞因子的诱导培养体系以获得CD3⁺CD56⁺细胞占比较高的新型CIK(后称nCIK)或CAR-CIK(后称CAR-nCIK)细胞,为开发新一代CAR-CIK疗法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI 1640、DMEM、Opti-MEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DPBS、0.25%胰蛋白酶购自Gibco公司;CD3(克隆号:OKT3)、CD16[克隆号:eBioCB16(CB16)]、CD56(克隆号:CMSSB)、NKp30(克隆号:AF29-4D12)、NKp44(克隆号:44.189)、NKp46(克隆号:9E2)、NKG2D(克隆号:1D11)、TCR $\alpha\beta$ (克隆号:IP26)、CD62L(克隆号:LT-TD180)、CD45RA(克隆号:HI100)、streptavidin流式抗体购自Invitrogen公司;OKT3、IFN- γ 、IL-2等细胞因子购自江苏东抗生物医药科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞系培养 人胚肾细胞293T、人卵巢癌细胞系SK-OV-3使用含10% FBS的DMEM培养基培养。NK-92MI细胞使用淋巴细胞无血清培养基培养。细胞均培养在37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。

1.2.2 细胞因子体外扩增CIK细胞 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)并按 2×10^6 /mL接种至24孔板中,第0天使用1 000 U/mL IFN- γ 刺激PBMCs,24 h后使用20 ng/mL OKT3、50 ng/mL IL-1 α 和1 000 IU/mL IL-2刺激PBMCs,每2~3天补充含1 000 IU/mL IL-2和5% FBS的新鲜培养基,14~35天收集CIK细胞,并在第0、7、14、21、28和35天检测CIK细胞异质性群体各组分比例。

1.2.3 IC-92联合IL-2体外扩增CIK细胞 分离PBMCs并按 2×10^6 /mL接种至24孔板中,第0天添加经25 Gy剂量 γ 射线辐照的IC-92工程细胞(数量比为IC-92:PBMCs=1:4)与PBMCs共培养,并添加1 000 IU/mL IL-2。每2~3天补充含1 000 IU/mL IL-2和5% FBS的新鲜培养基,在第7、14、21、28天添加经25 Gy剂量 γ 射线辐照的IC-92工程细胞

(数量比为IC-92:PBMCs=1:4)进行二轮刺激,第14~35天收集细胞,并在第0、7、14、21天检测异质性细胞群体各组分比例。

1.2.4 IC-92联合细胞因子体外扩增nCIK细胞 分离PBMCs并按 2×10^6 /mL接种至24孔板中,第0天使用1 000 U/mL IFN- γ 刺激PBMCs,24 h后使用20 ng/mL OKT3、50 ng/mL IL-1 α 和1 000 IU/mL IL-2刺激PBMCs;7天后按照细胞数量1:4(IC-92:PBMCs)的比例与IC-92工程细胞(25Gy辐照)进行共培养,每7天为一轮,进行多轮共培养获得新型CIK细胞(nCIK)。每2~3天补充含1 000 IU/mL IL-2和5% FBS的新鲜培养基,在第0、7、14、21、28和35天检测两组CIK细胞各组分比例。

1.2.5 慢病毒载体构建、包装及感染 mIL-21与CD137L通过2A肽连接;抗人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)抗体(克隆号:4D5)、抗II型胶原蛋白抗体(克隆号:551-3)的轻链可变区与重链可变区(variable domains of the heavy, VH)通过柔性连接肽(G4S)₃连接,再与CD8铰链区、CD8跨膜区、CD28共刺激结构域及CD3 ζ 活化域串联,进一步将HER2-CAR与截短的神经生长因子受体(truncated nerve growth factor receptor, NGFRt)通过2A肽链接。mIL-21-P2A-CD137L、4D5-28z-P2A-NGFRt基因序列合成后分别构建入PCCL慢病毒载体中。

慢病毒载体质粒与gag/pol、VSV-g按质量比3:2:1的比例混合,利用PEI共转染293T细胞,分别收集培养48 h和72 h的上清,0.45 μ m滤器过滤后,加入 $5\times$ PEG-8000(5% W/V)混匀后4℃过夜,4℃、4 000 $\times$ g离心30 min。加入适量PBS重悬慢病毒沉淀,置于-80℃冰箱长期保存。

CIK细胞培养第4天,将细胞转入RetroNectin包被的96孔板中,加入病毒浓缩液,1 000 $\times$ g、32℃离心1 h,24 h后更换新鲜培养基。

1.2.6 流式细胞术检测细胞表面标志物的表达情况 取 2×10^5 个细胞,PBS洗涤后加入用100 μ L DPBS和5 μ L流式抗体,4℃避光孵育30 min,PBS洗涤两遍后用流式细胞仪进行检测。应用Protein L检测CAR表达时,先用Biotin-Protein L室温孵育30 min,PBS洗涤三遍后,再用1:1 000稀释的streptavidin-PE 4℃孵育15 min,PBS洗涤两遍后用流式细胞仪进行检测,FlowJo软件处理数据。

1.2.7 Incucyte S3活细胞分析系统检测细胞杀伤情况

按照 1×10^4 /孔在 96 孔板中接种靶细胞, 按照不同效靶比调整各组效应细胞的浓度, 按 $100 \mu\text{L}$ /孔加入到孔板中; 将孔板放入机器中, 设置拍照程序, 24 h 后杀伤完成, 使用 Incucyte 2022B Rev2 软件进行数据分析。

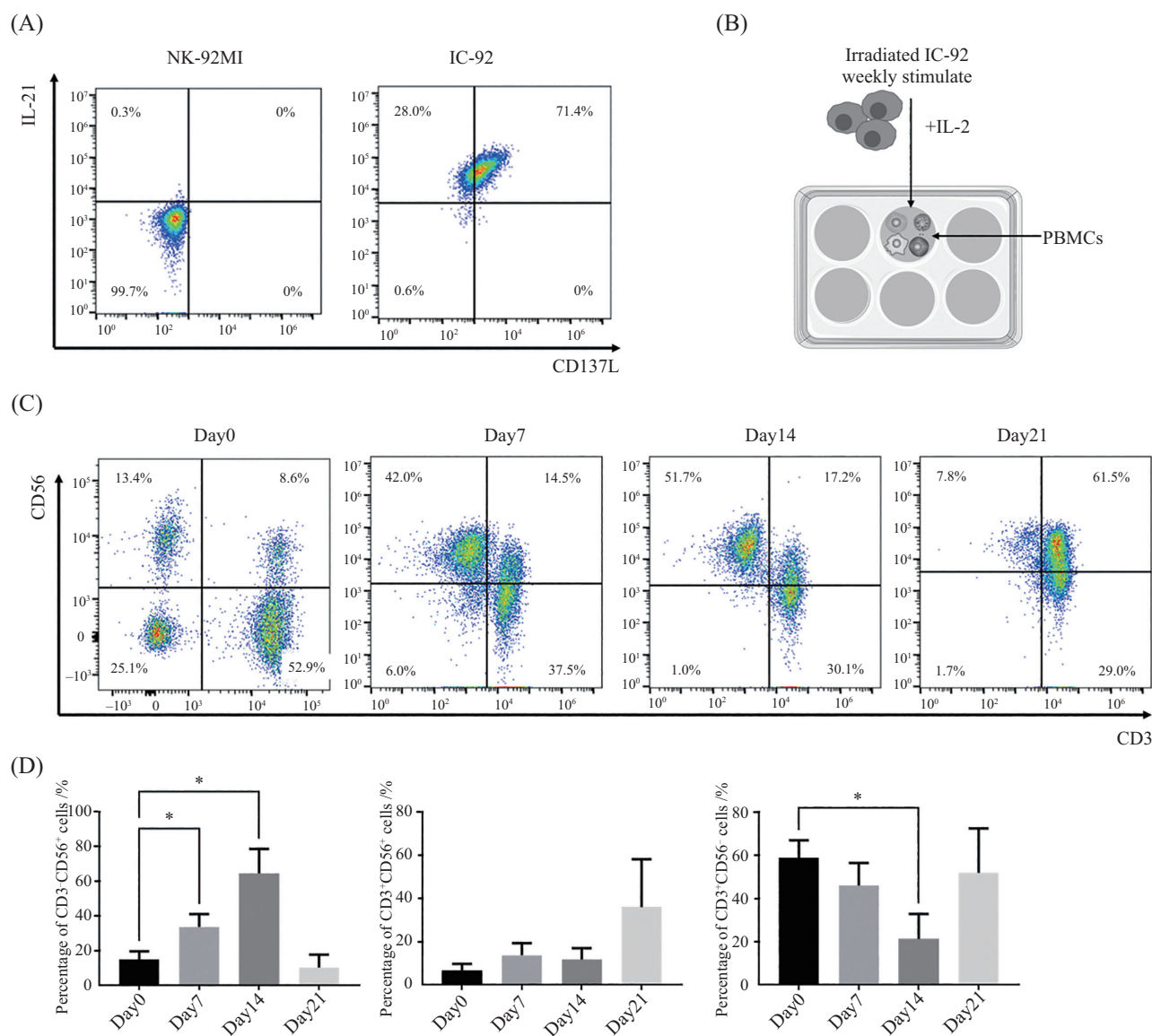
1.2.8 统计学分析 所有实验均重复 3 次及以上, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间进行 *t* 检验比较, 多组间进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 或多因素方差分析(Two-Way ANOVA)。利用 Graph-

Pad Prism 9.5.1 软件完成数据分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{ns} $P > 0.05$)。

2 结果

2.1 NK-92MI 工程细胞构建及体外与 PBMC 共培养

通过慢病毒感染和流式分选, 成功获得了 mIL-21 和 CD137L 共表达的 IC-92 (图 1A)。IC-92 经 25 Gy 剂量 γ 射线辐照后按照细胞数量 1:4 的比例与健康



A: 流式检测NK-92MI及分选后IC-92的CD137L及IL-21表达水平; B: 辐照的IC-92与健康供者PBMCs共培养示意图; C、D: 辐照的IC-92与PBMCs共培养后不同时间点CD3与CD56表达情况的代表性流式图(C)及统计图(D), $n=3$ 。* $P < 0.05$ 。

A: flow cytometry analysis of CD137L and IL-21 expression in NK-92MI cells and sorted IC-92 cells; B: schematic diagram illustrating the co-culture system of irradiated IC-92 cells with healthy donor PBMCs; C, D: representative flow cytometry plots (C) and statistical graphs (D) showing CD3 and CD56 expression at different time points after co-culture of irradiated IC-92 cells with PBMCs, $n=3$. * $P < 0.05$.

图1 mIL21-CD137L NK-92MI工程细胞的构建

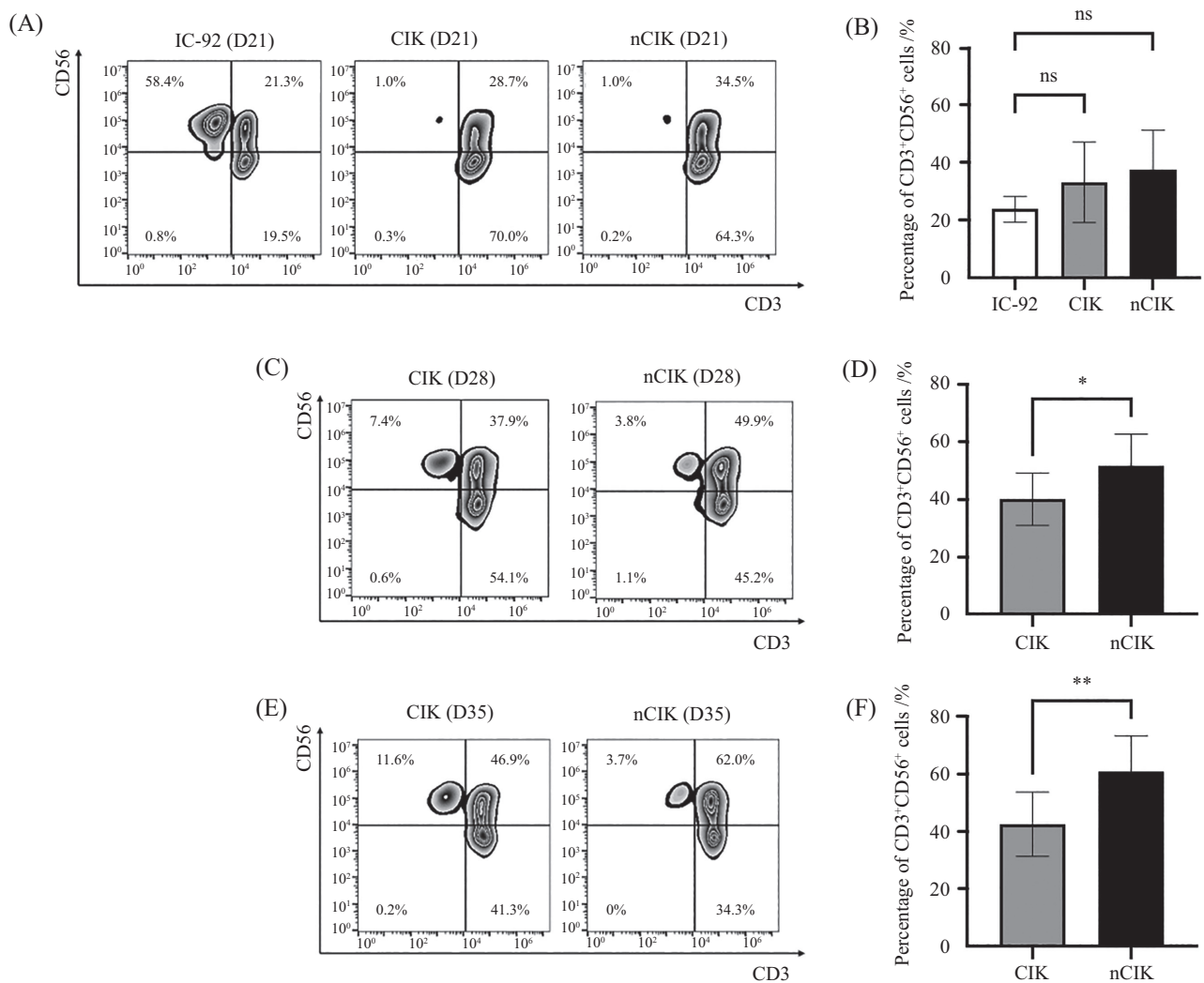
Fig.1 Construction of mIL21-CD137L NK-92MI engineered cells

供者PBMCs共培养, 每7天使用经25 Gy剂量 γ 射线辐照的IC-92细胞重复刺激(图1B)。结果显示, 培养第7和14天时, $CD3^+CD56^+$ NK细胞比例显著增加($P<0.05$)。第21天, $CD3^+CD56^+$ NK细胞样T淋巴细胞占比呈上升趋势(图1C和图1D)。上述结果表明, IC-92联合IL-2能够维持PBMCs中免疫细胞在一定时期内的存活。

2.2 IC-92联合CIK诱导细胞因子增加 $CD3^+CD56^+$ 效应细胞比例

为了进一步探究IC-92能否促进CIK中 $CD3^+CD56^+$

细胞亚群扩增, 我们分别用IC-92+IL-2(IC-92组)、IFN- γ +OKT3+IL-1 α +IL-2(CIK组)、IC-92+IFN- γ +OKT3+IL-1 α +IL-2(nCIK组)刺激PBMCs。如图2所示, 在第21天时, $CD3^+CD56^+$ 细胞亚群比例分别为(23.78 $\pm$ 4.11)% (IC-92组)、(33.19 $\pm$ 13.07)% (CIK组)、(37.65 $\pm$ 12.16)% (nCIK组), IC-92组在第21天后出现细胞活性变差、逐渐死亡的现象。CIK组及nCIK组均能扩增35天以上, 且nCIK组 $CD3^+CD56^+$ 细胞亚群比例相较于CIK组更高, 在第28天($P<0.05$)及第35天($P<0.01$) $CD3^+CD56^+$ 细胞亚群比例均有显著差异。



A: 不同培养方案第21天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例流式图; B: 不同培养方案第21天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例统计图; C: 不同培养方案第28天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例流式图; D: 不同培养方案第28天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例统计图; E: 不同培养方案第35天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例流式图; F: 不同培养方案第35天 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例统计图, $n=4$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

A: flow chart of $CD3^+CD56^+$ cell proportion in different culture schemes on day 21; B: quantitative of the proportion of $CD3^+CD56^+$ cells in different culture schemes on day 21; C: flow chart of $CD3^+CD56^+$ cell proportion in different culture schemes on day 28; D: quantitative of the proportion of $CD3^+CD56^+$ cells in different culture schemes on day 28; E: flow chart of $CD3^+CD56^+$ cell proportion in different culture schemes on day 35; F: quantitative of the proportion of $CD3^+CD56^+$ cells in different culture schemes on day 35, with $n=4$ for each measurement. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

图2 不同培养方案下的 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例

Fig.2 Proportion of $CD3^+CD56^+$ cells in different culture schemes

2.3 IC-92对CIK中细胞亚群比例及细胞增殖的影响

为了进一步探究IC-92对CIK中各细胞亚群增殖的影响,我们进一步分析了各细胞亚群随着培养时间的动态变化。结果表明,IC-92联合细胞因子可显著提高CIK细胞的整体增殖活性(图3A)。从IC-92组、CIK组和nCIK组各细胞亚群组分比例可以看出,3组中CD3⁺CD56⁺细胞亚群比例均呈升高趋势,其中nCIK组CD3⁺CD56⁺细胞亚群的比例显著高于CIK组(图3B); CIK组和nCIK组CD3⁻CD56⁺ NK细胞亚群比例处于较低水平,无统计学差异(图3C); 3组CD3⁺CD56⁻ T细胞亚群比例均整体呈下降趋势, CIK组和nCIK组无统计学差异(图3D)。在细胞增殖方面, nCIK组细胞总体扩增了(28 173.46±17 298.87)倍,且nCIK组CD3⁺CD56⁺、CD3⁻CD56⁺、CD3⁺CD56⁻增殖倍数均显著高于CIK组(图3E~图3G)。因此, IC-92联合细胞因子能够诱导T细胞向CD3⁺CD56⁺细胞亚群转化并促进其增殖。

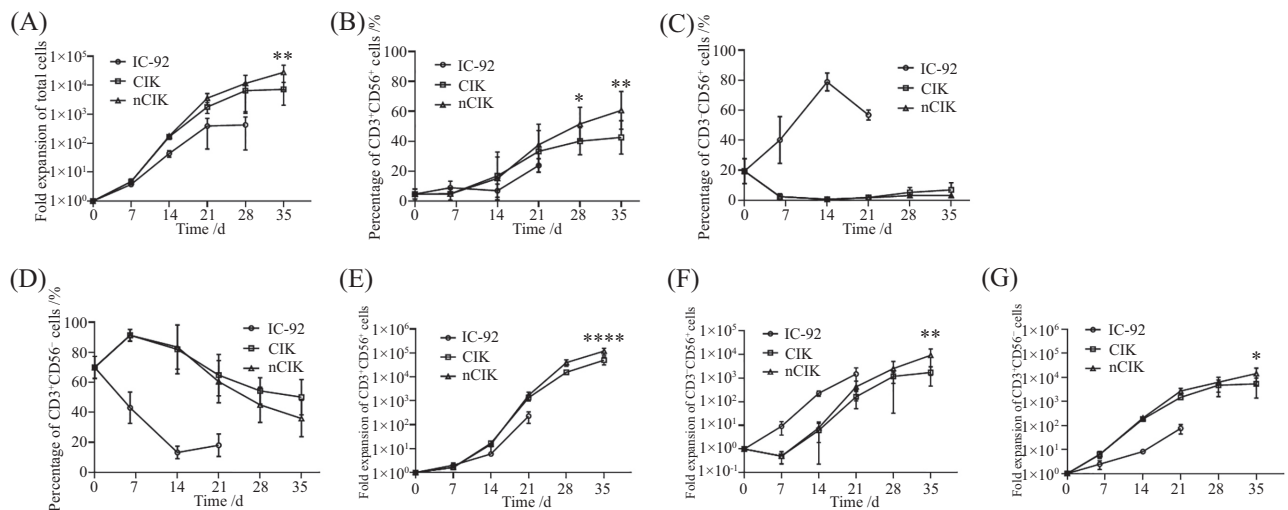
2.4 不同培养体系对CD3⁺CD56⁺细胞激活受体表达水平的影响

CD3⁺CD56⁺ NK细胞样T淋巴细胞识别和清除病原体感染细胞及肿瘤细胞、调节免疫和维持免疫稳态等过程均需要激活性受体的参与^[19]。CIK诱导分化过程中也能表达NKp30、NKp44、NKp46

和NKG2D等NK细胞通常表达的激活性受体,从而具有更强的识别能力。我们通过流式细胞术检测不同培养方案获得的CD3⁺CD56⁺细胞NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D和CD16表达率。结果显示, nCIK组与CIK组的NKp30[(8.22±2.54)% vs (8.88±2.71)%]、NKp44[(5.12±2.17)% vs (4.78±1.83)%]、NKp46[(0.73±0.40)% vs (0.96±0.27)%]、NKG2D[(61.89±11.25)% vs (72.94±10.83)%]表达无显著差异(图4A~图4H)。值得注意的是, nCIK组CD16的表达率显著高于CIK组[(43.11±33.60)% vs (2.13±1.26)%](图4I和图4J)。CD16与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用相关,这一发现为后续深入探究该类细胞在免疫应答过程中的功能机制,以及开发与抗体药物联合的细胞免疫疗法提供依据。

2.5 IC-92对CIK细胞中T细胞亚型的影响

由于γδ T及NKT细胞都具有CD3⁺CD56⁺表型。我们通过流式细胞术检测CIK及nCIK细胞中的TCR类型,结果表明在CIK与nCIK中均为TCRαβ类型的NK细胞样T淋巴细胞,且大部分细胞为CD8⁺ T细胞(图5A和图5B)。进一步分析表明,两组细胞经扩增后呈现效应记忆T细胞(effector memory T cell, Tem)>效应T细胞(effector T cell, Teff)>初始T细胞(naïve T cell, Tn)>中央记忆T细胞(central memory T cell, Tcm)的分布,且nCIK组[(70.11±6.36)%]具有比CIK组[(59.41±10.06)%]

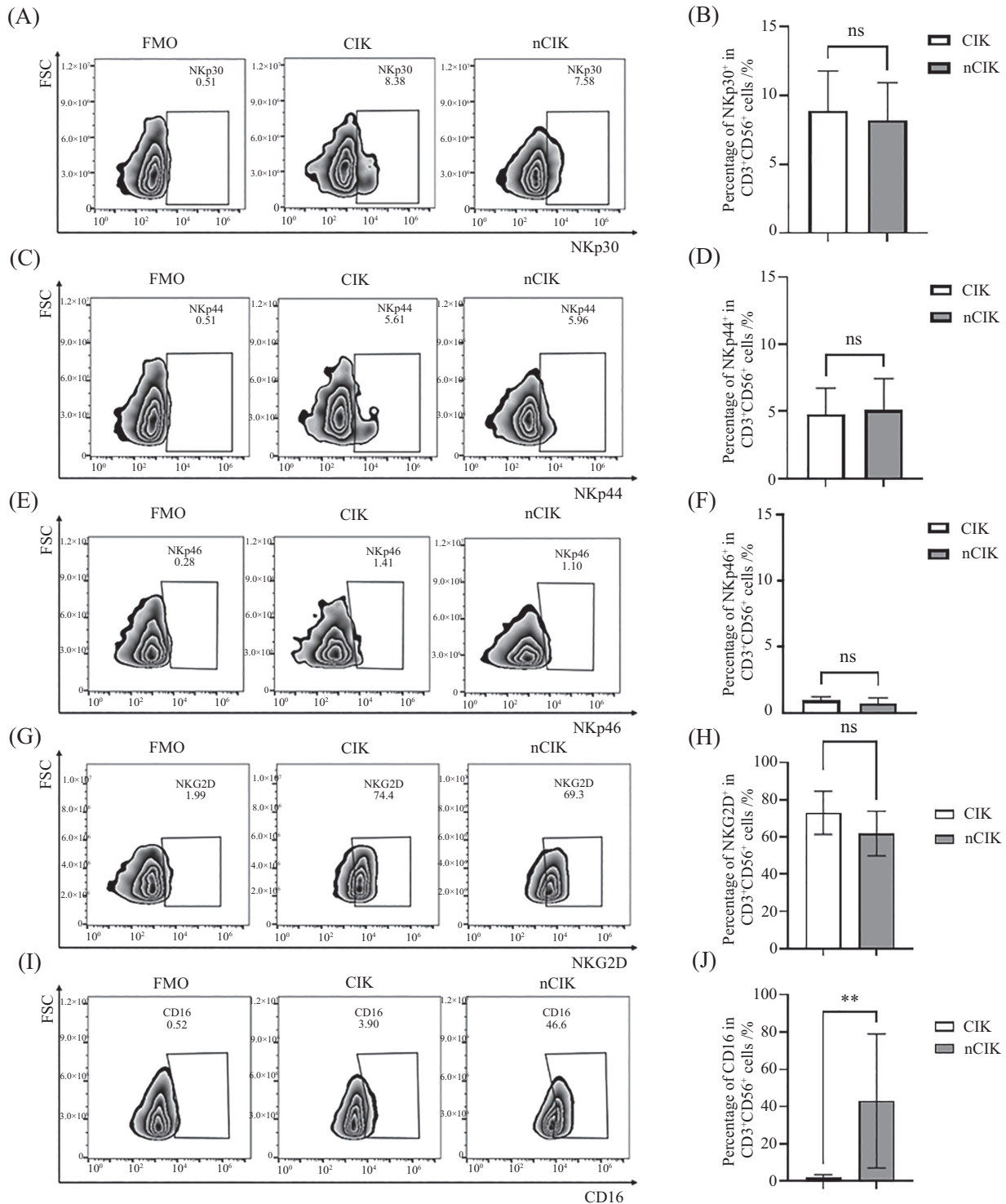


A: 3种培养体系扩增PBMCs的增殖曲线; B: CD3⁺CD56⁺细胞占比情况; C: CD3⁻CD56⁺细胞占比情况; D: CD3⁺CD56⁻细胞占比情况; E: CD3⁺CD56⁺细胞增殖曲线; F: CD3⁻CD56⁺细胞增殖曲线; G: CD3⁺CD56⁻细胞增殖曲线, $n=4$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

A: proliferation curves of PBMCs expanded in three culture conditions; B: proportions of CD3⁺CD56⁺ cells; C: proportions of CD3⁻CD56⁺ cells; D: proportions of CD3⁺CD56⁻ cells; E: proliferation curves of CD3⁺CD56⁺ cells; F: proliferation curves of CD3⁻CD56⁺ cells; G: proliferation curves of CD3⁺CD56⁻ cells, with $n=4$ for each measurement. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

图3 IC-92对CIK细胞增殖及不同细胞亚群比例的影响

Fig.3 Effects of IC-92 on the proliferation of CIK cells and the proportions of different cell subsets



A, B: 不同培养方案获得的CD3⁺CD56⁺细胞NKp30表达率代表性流式图(A)及统计图(B); C, D: NKp44表达率代表性流式图(C)及统计图(D); E, F: NKp46表达率代表性流式图(E)及统计图(F); G, H: NKG2D表达率代表性流式图(G)及统计图(H); I, J: CD16表达率代表性流式图(I)及统计图(J), $n=4$ 。* $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

A, B: representative flow cytometry plots (A) and statistical data (B) showing NKp30 expression rates in CD3⁺CD56⁺ cells obtained using different culture schemes; C, D: representative flow cytometry plots (C) and statistical data (D) of NKp44 expression rates; E, F: representative flow cytometry plots (E) and statistical data (F) of NKp46 expression rates; G, H: representative flow cytometry plots (G) and statistical data (H) of NKG2D expression rates; I, J: representative flow cytometry plots (I) and statistical data (J) of CD16 expression rates; with $n=4$ for each measurement. * $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$.

图4 不同培养方案获得的CD3⁺CD56⁺细胞不同活化受体的表达率

Fig.4 Expression of different activated receptors in CD3⁺CD56⁺ cells obtained by different culture conditions

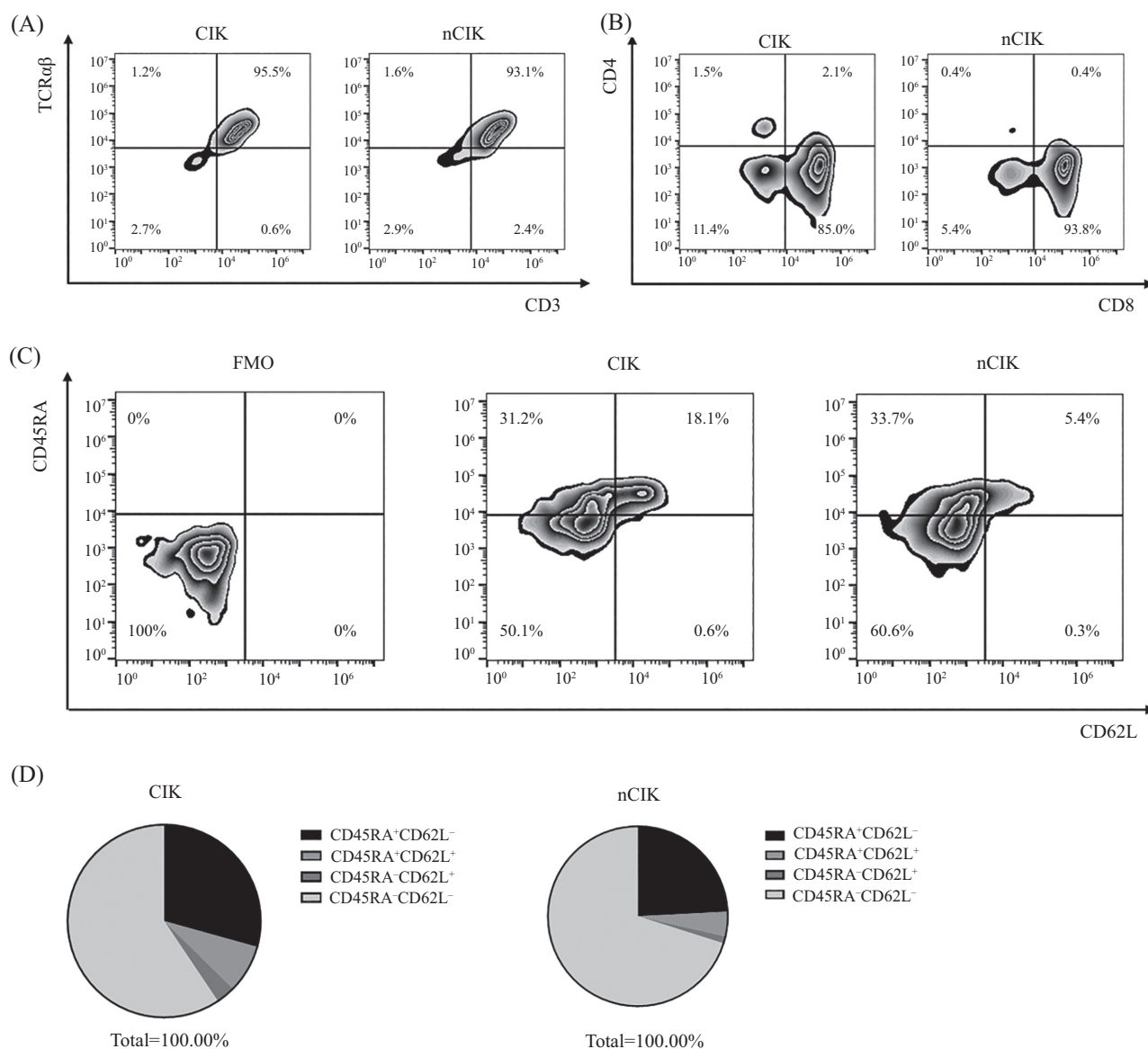


图5 不同培养方案获得的CD3⁺CD56⁺ T细胞类型

Fig.5 Types of CD3⁺CD56⁺ T cells obtained from different culture schemes

更高比例的Tem(图5C和图5D)。

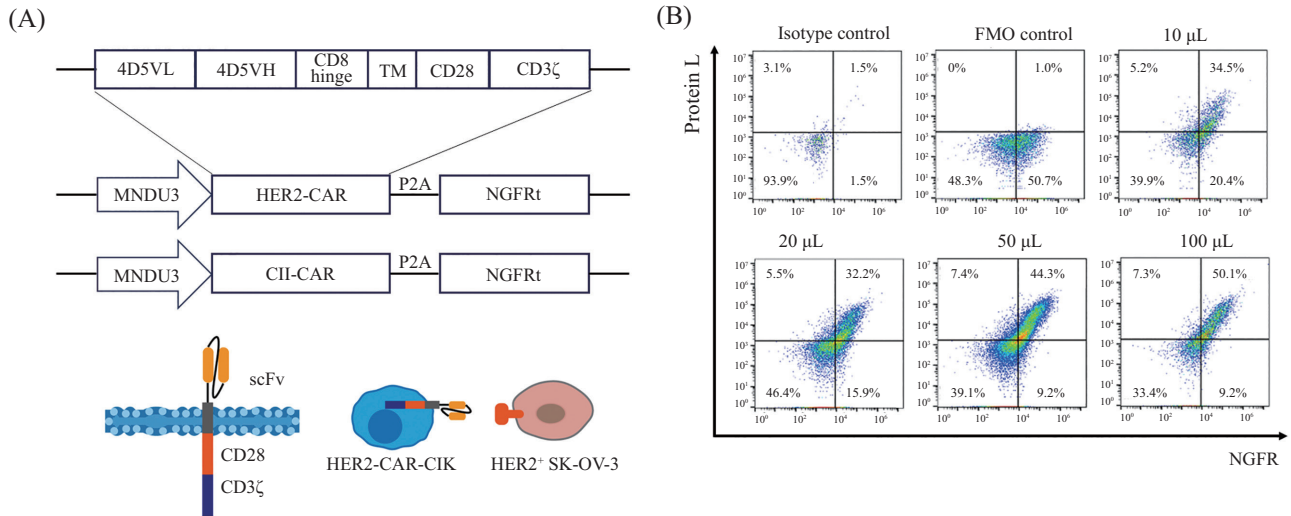
2.6 HER2-CAR载体的构建

HER2是一种跨膜酪氨酸激酶受体,在多种类型的癌症(包括乳腺癌、卵巢癌和胃癌)中异常表达^[16-17]。如图6A所示,以CII-CAR作为对照,我们构建了携带NGFRt标签的HER2-CAR慢病毒载体。经病毒包装、浓缩后,梯度感染T细胞,96 h后使用Protein L及抗NGFR抗体检测感染效率,结果表明Protein L及抗NGFR抗体均能标记CAR表达细胞

(图6B)。

2.7 HER2-CAR载体的靶向功能验证

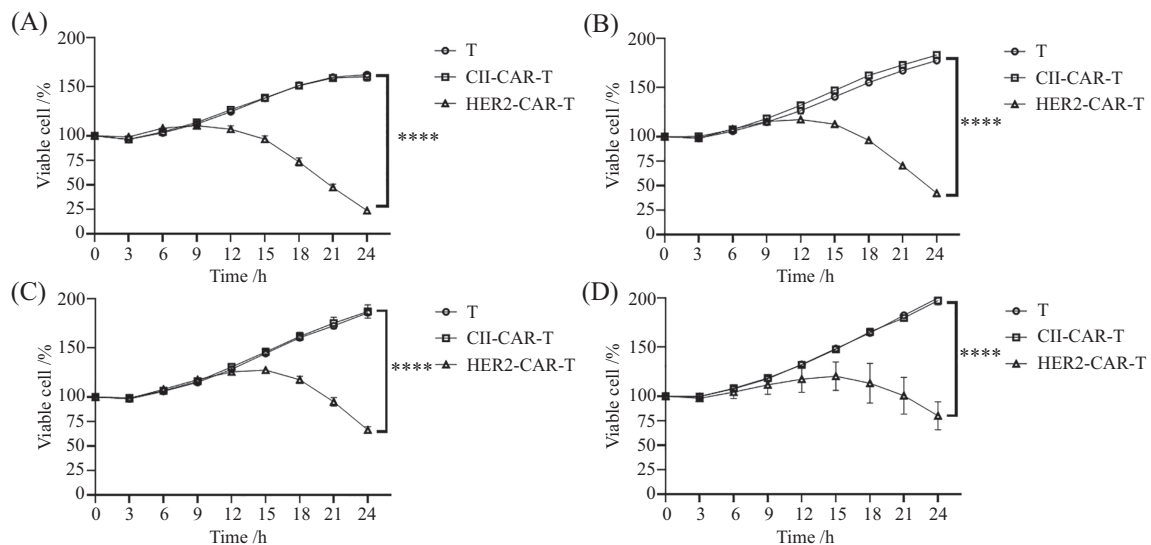
为了验证HER2-CAR感染T细胞后能否赋予T细胞靶向杀伤功能,我们分别使用CII-CAR、HER2-CAR慢病毒感染细胞因子激活的T细胞,并且按不同效靶比与SK-OV-3-GFP共培养,利用活细胞实时分析系统测定24 h杀伤效率。结果表明,HER2-CAR-T对HER2阳性的SK-OV-3肿瘤细胞的整体杀伤能力均显著高于CII-CAR-T细胞和未转导T细胞($P<0.0001$)(图7)。



A: HER2-CAR及CII-CAR载体的构建及结构示意图; B: HER2-CAR慢病毒感染96 h后, 流式检测Protein L及NGFR抗体标记的CAR表达细胞比例。
A: construction of HER2-CAR and CII-CAR vector and their schematic structures; B: analysis of CAR expression by Protein L and NGFR antibody staining via flow cytometry, 96 h post HER2-CAR lentiviral transduction.

图6 HER2-CAR载体的构建及慢病毒包装

Fig.6 Construction of HER2-CAR vectors and lentiviral packaging



Incucyte S3实时活细胞分析系统连续24 h监测T细胞、HER2-CAR-T细胞和CII-CAR-T细胞在效靶比=10:1(A)、效靶比=5:1(B)、效靶比=2.5:1(C)、效靶比=1.25:1(D)下对SK-OV-3细胞的杀伤作用, $n=3$. **** $P<0.0001$.

Incucyte S3 real-time live-cell analysis system continuously monitored for 24 h the killing effect of T cells, HER2-CAR-T cells, and CII-CAR-T cells on SK-OV-3 at effector-to-target ratios of 10:1 (A) 5:1 (B), 2.5:1 (C) and 1.25:1 (D), $n=4$. **** $P<0.0001$.

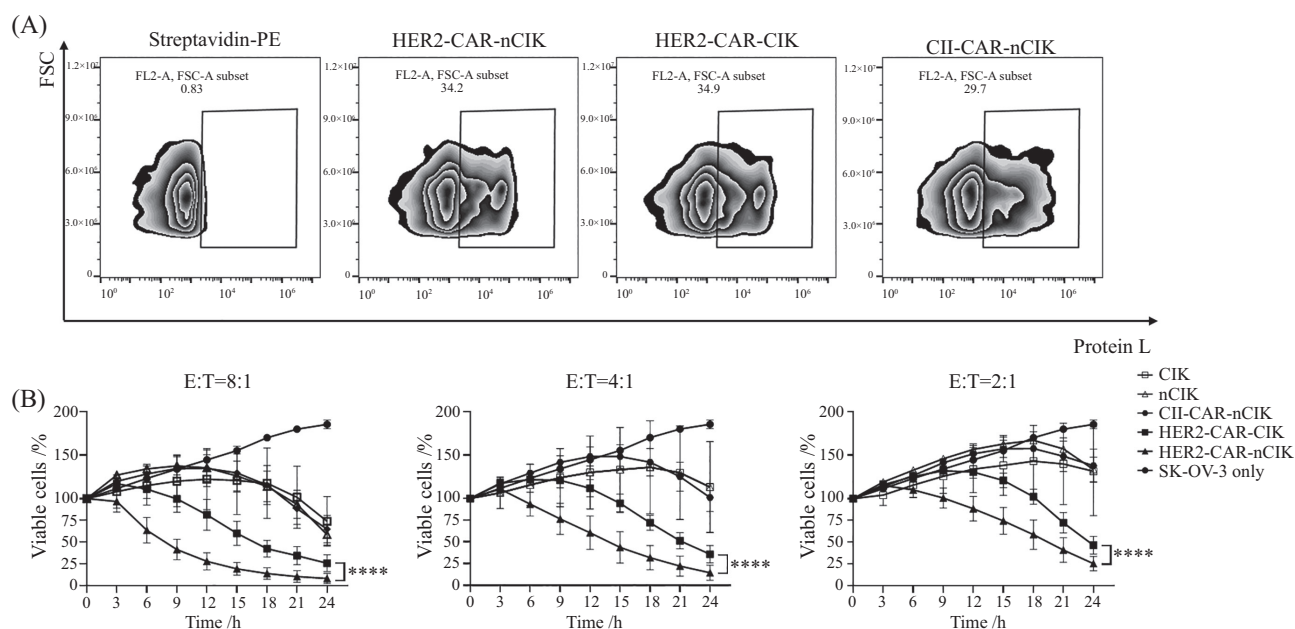
图7 HER2-CAR-T不同效靶比对SK-OV-3细胞的杀伤功能检测

Fig.7 Cytotoxic function assay of HER2-CAR-T cells against SK-OV-3 cells at different E/T (effector-to-target) ratios

2.8 HER2-CAR-nCIK对SK-OV-3肿瘤细胞的杀伤功能检测

进一步, 我们构建并培养了CIK、nCIK、HER2-CAR-CIK、HER2-CAR-nCIK及CII-CAR-nCIK。应用Protein L检测CAR表达效率, 结果显示, 各组CAR转染效率接近, 均在30%左右(图8A)。应用活细胞分析系

统检测各组细胞在8:1、4:1和2:1效靶比条件下对SK-OV-3的杀伤功能。结果表明, CIK、nCIK及CII-CAR nCIK对SK-OV-3杀伤能力较弱。HER2-CAR-CIK及HER2-CAR-nCIK具有靶向杀伤能力, 且在相同效靶比条件下, HER2-CAR-nCIK组对SK-OV-3肿瘤细胞的杀伤效率显著高于HER2-CAR-CIK组(图8B)。



A: HER2-CAR及CII-CAR转染效率(96 h); B: Incucyte S3实时活细胞分析系统连续24 h监测共培养第28天CIK、HER2-CAR-CIK、nCIK、CII-CAR-nCIK和HER2-CAR-nCIK在不同靶比下对SK-OV-3细胞的杀伤作用, $n=4$ 。**** $P<0.0001$ 。

A: transfection efficiency of HER2-CAR and CII-CAR (96 h); B: Incucyte S3 real-time live-cell analysis system continuously monitored for 24 h the killing effect of CIK, HER2-CAR-CIK, nCIK, CII-CAR-nCIK, and HER2-CAR-nCIK on SK-OV-3 at different effector-to-target ratios on day 28 of co-culture, $n=4$ 。**** $P<0.0001$ 。

图8 CIK、HER2-CAR-CIK、nCIK、CII-CAR-nCIK和HER2-CAR-nCIK对SK-OV-3细胞的杀伤效率

Fig.8 The killing efficiency of SK-OV-3 cells by CIK, HER2-CAR-CIK, nCIK, CII-CAR-nCIK and HER2-CAR-nCIK

2.9 CIK与nCIK转录水平差异分析

为进一步探究IC-92工程细胞对CIK细胞功能的影响,我们从nCIK细胞与CIK细胞中分离CD3⁺CD56⁺细胞进行RNA-seq。主成分分析结果表明,不同培养方式并未导致CD3⁺CD56⁺细胞出现显著离散,而不同供者之间的细胞差异更为明显(图9A)。与CIK组相比, nCIK来源的CD3⁺CD56⁺细胞中整合素 $\alpha 1$ 、*CD131*(又称*CSF2RB*)和*CD11c*(又称*ITGAX*)等基因表达显著上调(图9B和图9C)。研究表明,整合素 $\alpha 1$ 、*CD131*、*CD11c*基因表达的上调与T细胞活化以及多种免疫调节途径密切相关^[18-19]。进一步的GSEA分析表明,在nCIK来源的NK样T淋巴细胞中有多条免疫相关信号通路被显著富集,主要包括: T细胞分化、细胞因子产生、Toll样受体4(TLR4)信号通路、免疫细胞活化及细胞表面受体信号通路(图9D)。此外, KEGG富集分析发现, IC-92工程细胞还影响了CD3⁺CD56⁺细胞的代谢相关通路(图9E和图9F)。

2.10 CIK与nCIK代谢分析

为了进一步探究CIK与nCIK来源的CD3⁺CD56⁺细胞在代谢相关通路上的差异,我们采用LC-MS非靶向代谢组学技术进行分析。结果表明, CIK与nCIK来

源的CD3⁺CD56⁺细胞在糖代谢和鞘磷脂代谢方面存在显著差异(图10)。鞘磷脂代谢的增强已被证实能够影响淋巴细胞的成熟分化及其功能。与CIK来源的CD3⁺CD56⁺细胞相比, nCIK来源的细胞中缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)信号通路显著富集。HIF-1作为免疫细胞的关键调节因子,在先天性和适应性免疫系统中发挥重要作用,能够通过促进糖酵解和代谢重编程来调控T细胞的增殖、活化及抗肿瘤免疫应答^[20-21]。此外, KEGG分析结果显示,上调的差异基因显著富集于AMPK信号通路,其对nCIK细胞的代谢和功能也具有重要意义,它通过代谢重编程影响细胞活化、分化方向以及效应功能^[22]。这些代谢差异有望提升HER2-CAR-nCIK在实体肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的细胞活性及杀伤功能。

3 讨论

过继细胞免疫疗法(ACT)通过体外改造、扩增并回输功能性免疫细胞,在恶性肿瘤治疗中展现出巨大潜力^[23-24]。作为ACT中发展最迅速的疗法之一, CAR-T在恶性血液瘤的治疗中取得了突破性的进

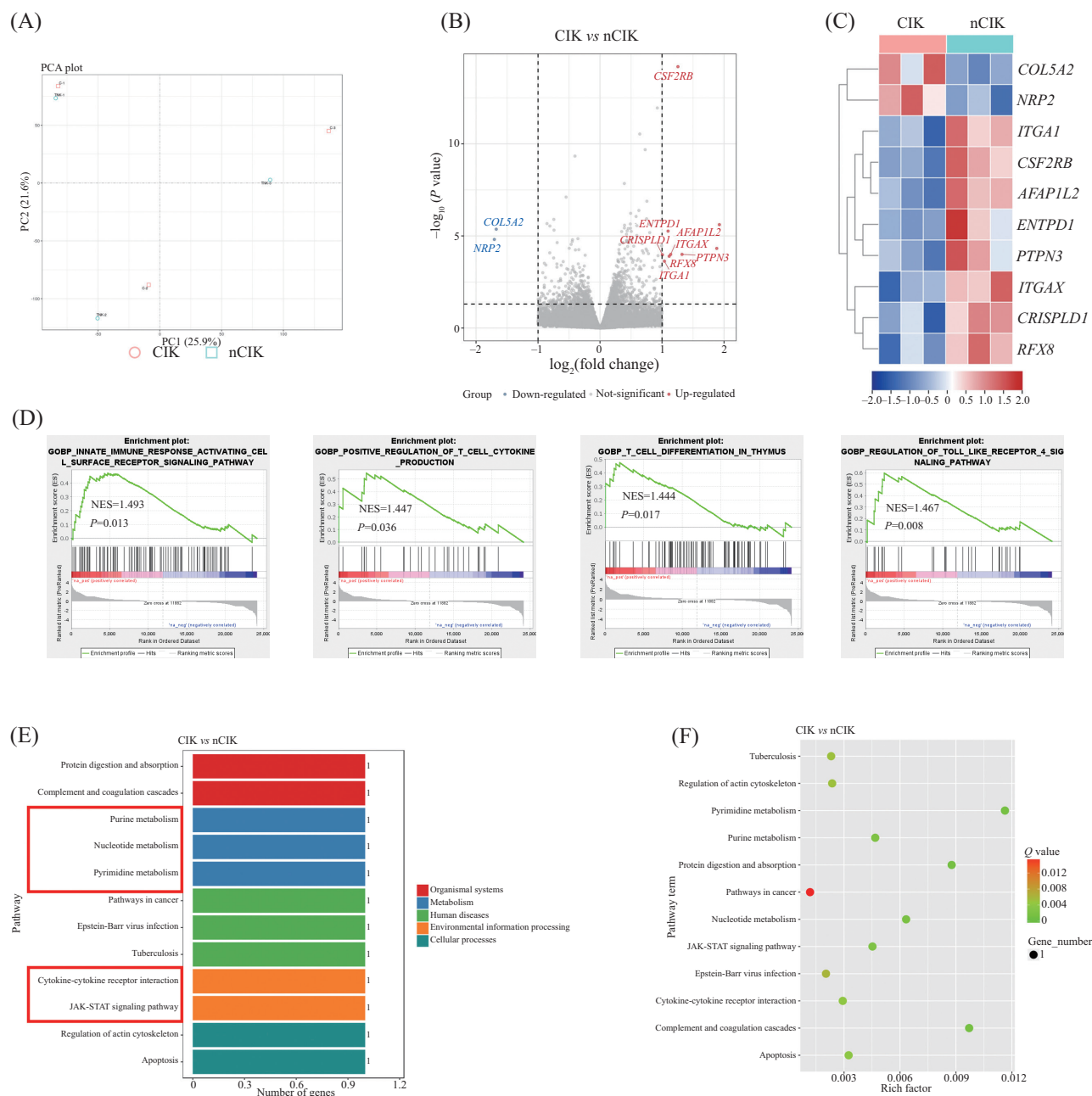
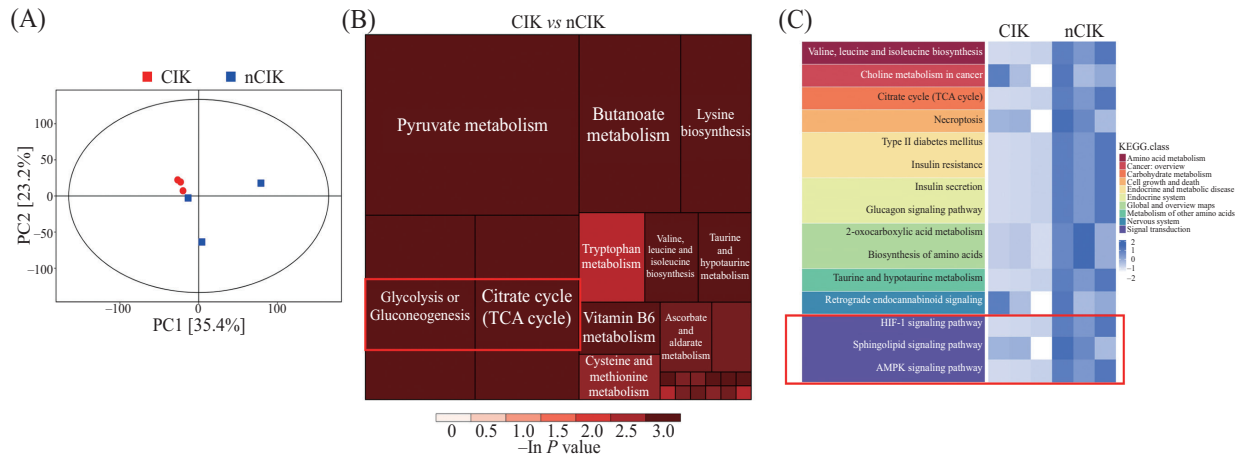


图9 CIK与nCIK RNA-seq分析
Fig.9 CIK and nCIK RNA-seq analysis

展。然而，实体肿瘤的抗原表达异质性，加之其免疫抑制性肿瘤微环境，会严重损害CAR-T细胞的功能，极大削弱CAR-T的治疗效果^[25-27]。因此，亟需建立新型替代治疗方案，以克服当前策略的局限性。

相较而言，CIK细胞是体外利用多种细胞因子联合刺激后获得的一群异质性细胞群^[28-29]。CIK细胞以CD3⁺CD56⁺ NK样T淋巴细胞为主要效应细胞，同时包含T细胞和少量的NK细胞。相比于T细胞，



A: CIK与nCIK的OPLS-DA模型得分散点图; B: CIK对nCIK的通路富集矩形树图, 红色方框代表糖酵解和三羧酸循环信号通路; C: CIK与nCIK的差异代谢物KEGG热图, 红色方框代表缺氧诱导因子信号通路、鞘磷脂代谢信号通路及AMPK等信号通路。

A: OPLS-DA model score scatter plot of CIK and nCIK; B: pathway enrichment treemap of CIK versus nCIK, the red boxes represent the glycolysis and TCA (tricarboxylic acid) cycle signaling pathways; C: KEGG heatmap of differential metabolites between CIK and nCIK, the red boxes highlight the HIF (hypoxia-inducible factor) signaling pathway, the sphingomyelin metabolism signaling pathway, and the AMPK signaling pathway.

图10 CIK与nCIK代谢组学分析

Fig.10 Metabolomics analysis of CIK and nCIK

CIK通过NKG2D等激活性受体识别肿瘤表面应激配体, 实现非MHC限制性的广谱抗肿瘤活性; 并且经CAR工程化修饰后, CAR-CIK兼具实体肿瘤精准靶向和广谱杀伤双重优势, 有望克服实体瘤异质性难题^[30-31]。然而, CIK细胞在体外扩增中易出现功能耗竭^[12]。因此, 优化CIK制备策略、对其进行工程化改造增强抗肿瘤免疫应答, 有望进一步地提升CIK疗法的有效性。

近年来, 人工构建的携带细胞因子的工程细胞被用于高活性CAR-T和CAR-NK细胞的制备^[32-33]。尤其是基于mIL-21的培养体系, 能够诱导NK细胞呈指数型扩增而不产生短期衰老的现象, 在扩增过程中mIL-21可能通过持续激活STAT3-TERT通路, 维持NK细胞端粒长度, 同时激活NK细胞氨基酸代谢和糖酵解途径并使其表现出记忆样表型^[15]。另有研究表明, IL-21可通过激活STAT3/STAT5信号通路以增加CIK细胞穿孔素、颗粒酶B、TNF- α 和IFN- γ 的表达进而增强CIK细胞的毒活性^[13]。因此, 基于mIL-21修饰的工程细胞在CAR-T及CAR-NK细胞制备中展现的积极作用, 我们推测该策略同样适用于CAR-CIK细胞。通过体外建立细胞因子与工程细胞联合培养的新体系, 可提升CAR-CIK细胞中CD3⁺CD56⁺亚群比例, 同时增强CAR-CIK细胞的杀伤功能。

在本研究中, 我们通过慢病毒感染及流式分选, 成功构建出共表达mIL21和CD137L的NK-92MI

工程细胞。在体外与PBMCs共培养实验中, IC-92联合方案可显著提高CD3⁺CD56⁺细胞亚群的比例。在第28天通过流式检测发现nCIK中CD3⁺CD56⁺细胞的比例为(51.56 $\pm$ 9.84)% ($P<0.05$), 第35天nCIK中CD3⁺CD56⁺细胞的比例为(60.66 $\pm$ 11.13)% ($P<0.01$)。

CIK细胞的核心优势在于通过表达一系列激活性受体介导广谱杀瘤作用。例如, NKG2D可以识别在病毒感染细胞和肿瘤细胞表面高表达的MICA和MICB(主要组织相容性复合体I类链相关分子)等应激诱导配体^[34]。NKp30通过识别B7-H6、病毒蛋白及应激相关分子, 在抗肿瘤、抗感染及免疫调节中发挥作用^[35]。NKp44表达于激活的NK细胞, 通过识别增殖细胞核抗原、某些病毒蛋白, 在肿瘤微环境及慢性感染中参与免疫应答^[36]。NKp46更偏向广谱病原体防御, 可直接结合流感病毒、副流感病毒等包膜病毒的病毒血凝素, 触发NK细胞杀伤感染细胞^[37]。CD16是一种低亲和力的Fc受体, 它可以与抗体的Fc段结合, 参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用^[38-39]。NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D和CD16等受体在免疫细胞识别和杀伤靶细胞的过程中发挥关键作用, 对于机体的免疫防御和免疫监视等功能有着重要意义^[40]。

在本研究中, 共培养35天后nCIK细胞扩增了(28 173.46 $\pm$ 17 298.87)倍, 并且维持了NKG2D的高水平表达, 且IC-92可促进(70.11 $\pm$ 6.36)%的nCIK细胞

向效应记忆样表型分化。兼具广谱杀伤和靶向性是CAR-CIK的一大独特优势,我们构建了靶向HER2抗原的第二代CD28-CAR结构,通过慢病毒感染获得了HER2-CAR-nCIK细胞。体外杀伤实验结果显示,在不同效靶比条件下,IC-92联合培养方案获取的HER2-CAR-nCIK均表现出显著增强的杀伤能力($P<0.0001$)。

RNA-seq结果显示,nCIK来源的CD3⁺CD56⁺细胞中整合素 $\alpha 1$ 、*CD131*和*CD11c*等基因的表达显著上调,且GSEA和KEGG分析表明这些细胞在多种免疫相关信号通路及代谢过程中存在富集,包括T细胞分化、细胞因子产生及免疫细胞活化等。进一步的代谢组学分析表明,nCIK细胞中HIF-1和AMPK信号通路存在显著富集。此外,大量上调的差异表达基因显著富集于糖代谢与鞘磷脂代谢相关信号通路,这些通路可能对细胞代谢重编程、增殖、活化及抗肿瘤免疫应答产生影响。

综上,针对当前CAR-T疗法在实体瘤治疗中面临的瓶颈,CAR-CIK有望成为一种更具安全性的替代方案。CAR赋予CIK细胞特异性抗原识别能力,同时保留CIK的广谱抗癌优势,有望突破传统CIK对实体瘤异质性靶向不足的局限。本研究针对CIK的培养体系进行创新性的优化,通过建立细胞因子与新型工程细胞联合培养方案,使得HER2-CAR-nCIK保持高增殖活性的同时具备更强的抗肿瘤免疫反应,但其体内疗效及安全性仍需系统验证。综合体外数据,我们下一步拟建立人卵巢癌动物模型,通过输注HER2-CAR-nCIK,探究其能否迁移到肿瘤部位并发挥高效的抗肿瘤作用。进一步,我们拟建立IC-92工程细胞与HER2-CAR-nCIK体内联合治疗策略,利用IC-92工程细胞载体体内递送CIK细胞活化分子,充分发挥IC-92工程细胞的肿瘤杀伤与CIK活化双重功能,为开发新型CIK细胞疗法,突破免疫细胞疗法在实体瘤治疗中的障碍提供新思路。

参考文献 (References)

- [1] HONG M K, DING D C. Early diagnosis of ovarian cancer: a comprehensive review of the advances, challenges, and future directions [J]. *Diagnostics*, 2025, 15(4): 406.
- [2] HILLMANN J, MAASS N, BAUERSCHLAG D K, et al. Promising new drugs and therapeutic approaches for treatment of ovarian cancer: targeting the hallmarks of cancer [J]. *BMC Med*, 2025, 23(1): 10.
- [3] TAVARES V, MARQUES I S, MELO I G, et al. Paradigm shift: acomprehensive review of ovarian cancer management in an era of advancements [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1845.
- [4] HAVASI A, CAINAP S S, HAVASI A T, et al. Ovarian cancer-insights into platinum resistance and overcoming it [J]. *Medicina*, 2023, 59(3): 544.
- [5] INOZUME T. Adoptive cell transfer therapy for melanoma [J]. *Exp Dermatol*, 2023, 32(3): 250-5.
- [6] LI C M Y, TOMITA Y, DHAKAL B, et al. Use of cytokine-induced killer cell therapy in patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(4): e006764.
- [7] CHEN D, SHA H, HU T, et al. Cytokine-induced killer cells as a feasible adoptive immunotherapy for the treatment of lung cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 366.
- [8] ZHANG Y, SCHMIDT-WOLF I G H. Ten-year update of the international registry on cytokine-induced killer cells in cancer immunotherapy [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9291-303.
- [9] CAPPUZZELLO E, VIGOLO E, D'ACCARDIO G, et al. How can cytokine-induced killer cells overcome CAR-T cell limits [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1229540.
- [10] WANG Z, LIU Y, LI R, et al. Autologous cytokine-induced killer cell transfusion increases overall survival in advanced pancreatic cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 6.
- [11] LI C M Y, TOMITA Y, DHAKAL B, et al. Generation and assessment of cytokine-induced killer cells for the treatment of colorectal cancer liver metastases [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 73(1): 6.
- [12] ZHANG L, WANG J, WEI F, et al. Profiling the dynamic expression of checkpoint molecules on cytokine-induced killer cells from non-small-cell lung cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43604-15.
- [13] RAJBHANDARY S, ZHAO M F, ZHAO N, et al. Multiple cytotoxic factors involved in IL-21 enhanced antitumor function of CIK cells signaled through STAT-3 and STAT5b pathways [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(10): 5825-31.
- [14] ZHU B Q, JU S W, SHU Y Q. CD137 enhances cytotoxicity of CD3⁺CD56⁺ cells and their capacities to induce CD4⁺ Th1 responses [J]. *Biomed Pharmacother*, 2009, 63(7): 509-16.
- [15] YANG Y, BADETI S, TSENG H C, et al. Superior expansion and cytotoxicity of human primary NK and CAR-NK cells from various sources via enriched metabolic pathways [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 428-45.
- [16] HU L, ZHANG S, SIENKIEWICZ J, et al. HER2-CD3-Fc bispecific antibody-encoding mrna delivered by lipid nanoparticles suppresses HER2-positive tumor growth [J]. *Vaccines*, 2024, 12(7): 808.
- [17] HU X, HU H, LI D, et al. Affibody-based molecular probe ^{99m}Tc-(HE)₃ZHER2:v2 for non-invasive HER2 detection in ovarian and breast cancer xenografts [J]. *Open Med*, 2024, 19(1): 20241027.
- [18] ZHU N, YANG Y, WANG H, et al. CSF2RB is a unique biomarker and correlated with immune infiltrates in lung adenocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 822849.
- [19] HIRAHARA K, KOKUBO K, AOKI A, et al. The role of CD4⁺ resident memory T cells in local immunity in the mucosal tissue-protection versus pathology [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 616309.
- [20] TAO J H, BARBI J, PAN F. Hypoxia-inducible factors in T lym-

- phocyte differentiation and function. A review in the theme: cellular responses to hypoxia [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(9): C580-9.
- [21] PALAZON A, TYRAKIS PA, MACIAS D, et al. An HIF-1 α /VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(5): 669-83, e5.
- [22] SON J, CHO Y W, WOO Y J, et al. Metabolic reprogramming by the excessive ampk activation exacerbates antigen-specific memory CD8⁺ T cell differentiation after acute lymphocytic choriomeningitis virus infection [J]. *Immune Netw*, 2019, 19(2): e11.
- [23] DU S, YAN J, XUE Y, et al. Adoptive cell therapy for cancer treatment [J]. *Exploration*, 2023, 3(4): 20210058.
- [24] ZHANG P, ZHANG G, WAN X. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 97.
- [25] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-5.
- [26] ZHANG T, TAI Z, MIAO F, et al. Adoptive cell therapy for solid tumors beyond CAR-T: current challenges and emerging therapeutic advances [J]. *J Control Release*, 2024, 368: 372-96.
- [27] CHEN T, WANG M, CHEN Y, et al. Current challenges and therapeutic advances of CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 133.
- [28] RAMBALDI B, RIZZUTO G, RAMBALDI A, et al. Genetically modified and unmodified cellular approaches to enhance graft versus leukemia effect, without increasing graft versus host disease: the use of allogeneic cytokine-induced killer cells [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1459175.
- [29] INTRONA M, CORRENTI F. Innovative clinical perspectives for CIK cells in cancer patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 358.
- [30] DEHNO M N, LI Y, WEIHER H, et al. Increase in efficacy of checkpoint inhibition by cytokine-induced-killer cells as a combination immunotherapy for renal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3078.
- [31] MOSER L M, HEIM C, KOSCHADE S E, et al. CAR-CIK vs. CAR-T: benchmarking novel cytokine-induced killer cells as solid tumor immunotherapy in ErbB2⁺ rhabdomyosarcoma [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1485817.
- [32] DENMAN C J, SENYUKOV V V, SOMANCHI S S, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained *ex vivo* proliferation of human natural killer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30264.
- [33] KAMIYA T, CHANG Y H, CAMPANA D. Expanded and activated natural killer cells for immunotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(7): 574-81.
- [34] FERRARI DE ANDRADE L, TAY R E, PAN D, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity [J]. *Science*, 2018, 359(6383): 1537-42.
- [35] PONTARINI E, SCIACCA E, GRIGORIADOU S, et al. NKp30 receptor upregulation in salivary glands of Sjögren's syndrome characterizes ectopic lymphoid structures and is restricted by rituximab treatment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 706737.
- [36] ZECHER B F, ELLINGHAUS D, SCHLOER S, et al. *HLA-DPA1*02:01~B1*01:01* is a risk haplotype for primary sclerosing cholangitis mediating activation of NKp44⁺ NK cells [J]. *Gut*, 2024, 73(2): 325-37.
- [37] CARREIRA-SANTOS S, LÓPEZ-SEJAS N, GONZÁLEZ-SÁNCHEZ M, et al. Enhanced expression of natural cytotoxicity receptors on cytokine-induced memory-like natural killer cells correlates with effector function [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1256404.
- [38] SOLORZANO-IBARRA F, ALEJANDRE-GONZALEZ A G, ORTIZ-LAZARENO P C, et al. Cataloging circulating CD3⁺CD56⁺ NKT-like cells through a series of stimulating (NKG2D and DNAM-1) and inhibitory (PD-1, TIGIT, and Tim-3) immune checkpoint receptors in women diagnosed with precancerous cervical lesions or invasive cervical carcinoma [J]. *Immunol Lett*, 2024, 269: 106889.
- [39] AGUILAR O A, GONZALEZ-HINOJOSA M D R, ARAKAWA-HOYT J S, et al. The CD16 and CD32b Fc-gamma receptors regulate antibody-mediated responses in mouse natural killer cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 113(1): 27-40.
- [40] BARROW A D, MARTIN C J, COLONNA M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 909.