

全血来源 NK 细胞分离纯化技术体系的初步构建

曹腾宇^{1,2} 林华雨² 张璇之^{1,2} 段翠密² 刘羿² 薛晓楠² 孙莉萍² 于洋^{1,2}

(1. 解放军医学院, 北京 100853; 2. 中国人民解放军总医院第一医学中心 输血医学科, 北京 100853)

摘要:目的 探索全血为同种异体 CAR NK 细胞疗法与激活 NK 细胞回输疗法提供 NK 原料细胞的可行性, 初步构建全血来源 NK 细胞分离纯化技术体系。方法 分别采用手工分离和机器分离从 400 mL 全血中富集全部外周血单个核细胞(PBMCs), 比较 2 种方式的红细胞损耗率、PBMCs 细胞数量、NK 细胞纯度, 分别采用 3 种分离富集方法(免疫磁珠阴性选择法、血小板裂解液培养扩增法、PERCOLL 密度梯度分离法)从 PBMCs 中分选 NK 细胞, 比较 3 种分离富集方法的 NK 细胞纯度与得率、NK 细胞的活性、肿瘤杀伤能力。结果 从全血中富集 PBMCs, NK 细胞占淋巴细胞群的比例手工分离法高于机器分离法[(13.16±5.16)% vs (8.56±3.92)%, $P < 0.05$], PBMCs 细胞数量手工分离法低于机器分离法[(4.09±1.80)×10⁸ vs (6.49±2.16)×10⁸, $P < 0.05$], 红细胞损耗率 2 种方法无差异($P > 0.05$)。采用免疫磁珠阴性选择法从手工分离的 PBMCs 中分离富集的 NK 细胞纯度为(96.77±2.31)%, 得率为(56.27±10.47)%, NK 细胞肿瘤增殖抑制率为(38.67±14.05)%, 肿瘤杀伤率为(19.90±8.05)%。采用血小板裂解液培养扩增法从手工分离的 PBMCs 中分离富集的 NK 细胞在 d7 时纯度最高, 为(54.84±15.80)%, 细胞扩增倍数在 d7 可达 16.92±6.28, NK 细胞体外肿瘤杀伤率为(15.83±5.5)% , 肿瘤增殖抑制率为(44.33±13.5)%, 上述 2 种方法的 NK 细胞毒性及活性无差异($P > 0.05$)。采用 PERCOLL 密度梯度分离法分离富集的 NK 细胞纯度为(15.83±5.82)%, 得率为(14±6.25)%, 显著低于另 2 种方法。结论 通过手工分离从全血中提取 PBMCs, 采用免疫磁珠阴性选择法分离富集的 NK 细胞具备为 CAR-NK 细胞疗法提供 NK 细胞原料的潜力, 采用血小板裂解液条件培养基法分离富集的 NK 细胞具备为大量 NK 细胞激活回输疗法提供 NK 细胞的潜力。

关键词: NK 细胞; 全血; 分离纯化; 细胞免疫治疗

中图分类号: R457.1 R331.1⁺42 文献标识码: A

文章编号: 1004-549X(2025)2-0181-09

DOI: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2025.02.004

Construction of a system for isolation and purification of NK cells from whole blood donations

CAO Tengyu^{1,2}, LIN Huayu², ZHANG Xuanzhi^{1,2}, DUAN Cuimi², LIU Yi², XUE Xiaonan², SUN Liping², YU Yang^{1,2}.

1. Medical School of Chinese PLA; 2. Department of Transfusion Medicine, The First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.

Joint-first authors; CAO Tengyu, LIN Huayu

Co-corresponding authors; YU Yang, Email: yuyangpla301@163.com; SUN Liping, Email: sunlp2012@sina.com

Abstract: Objective To explore the feasibility of using whole blood as a source of NK cells for allogeneic CAR NK cell therapy and activated NK cell reinfusion therapy, and initially construct a technical system for the separation and purification of NK cells from whole blood. **Methods** All peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were enriched from 400 mL of whole blood by manual separation and machine separation, respectively. The erythrocyte loss rate, PBMCs number, NK cell purity of the two methods were compared. NK cells were sorted from PBMCs by three separation and enrichment methods as immunomagnetic bead negative selection method, platelet lysate culture expansion and PERCOLL density gradient separation method, and the purity and yield of NK cells, the activity of NK cells and the tumor-killing ability of the three separation and enrichment methods were compared. **Results** The proportion of NK cells in the lymphocyte population was higher in the manual separation method than in the machine separation method[(13.16±5.16)% vs (8.56±3.92)%, $P < 0.05$]; the number PBMCs was lower in the manual separation method than in the machine separation method[(4.09±1.80)×10⁸ vs (6.49±2.16)×10⁸, $P < 0.05$], and there was no difference in the red blood cell loss between the two methods ($P > 0.05$). The purity of NK cells isolated and enriched from PBMCs by manual separation method using immunomagnetic was (96.77±2.31)%; the yield was (56.27±10.47)%; the inhibition of tumor proliferation was (38.67±14.05)%;

and the tumor killing rate was (19.90±8.05)%. The purity of NK cells isolated and enriched from PBMCs by manual separation method using platelet lysis culture expansion method was the highest at day 7, which was (54.84±15.80)%; the cell expansion multiple could reach 16.92±6.28 at day 7; the in vitro tumor killing rate of NK cells was (15.83±5.5)%; the tumor inhibition rate was (44.33±13.5)%; and there was no difference in the toxicity and activity of NK cells between the two methods ($P>0.05$). The purity of NK cells isolated and enriched by PERCOLL density gradient separation method was (15.83±5.82)%, and the yield was (14±6.25)%, which was significantly lower than the other two methods. **Conclusion** PBMCs isolated from whole blood by manual separation and NK cells enriched by negative selection with immunomagnetic beads have the potential to provide NK cell materials for CAR-NK cell therapy, and NK cells enriched by platelet lysate-conditioned medium have the potential to provide NK cells for large-scale NK cell activation reinfusion therapy.

Key words: NK cells; whole blood; separation and purification; cell immunotherapy

细胞免疫治疗又称过继性细胞治疗,是通过采集患者自体或异体的免疫细胞如 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞、树突状细胞等,在体外对免疫细胞进行激活培养或工程化改造,增加其数量,提高其肿瘤靶向性,继而用于患者回输从而直接杀伤体内肿瘤或激发抗肿瘤免疫反应,纠正患者细胞免疫功能低下的状态。相对于自体免疫细胞采集,同种异体细胞免疫治疗能够克服患者自身免疫功能局限性,打破自体免疫细胞疗法的免疫细胞活性与数量难以满足患者需求的瓶颈。近年来,同种异体免疫细胞治疗难治/复发恶性肿瘤的相关研究不断获得药物临床试验许可,包括:使用同种异体诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)诱导分化形成的 NK 细胞和 T 细胞治疗头颈癌;使用同种异体 T 细胞治疗难治急性淋巴细胞白血病^[1-3];以及使用同种异体 NK 细胞治疗急性髓系白血病造血干细胞移植后复发、难治淋巴瘤以及神经母细胞瘤复发^[4-8]。相比于易引起同种异体排斥反应的 T 细胞, NK 细胞具有先天的抗瘤性和免疫特性,且不会造成严重的同种异体间移植抗宿主反应^[4-6]。已经有多项临床前研究成果证实了 NK 细胞强大的抗肿瘤能力和抗感染能力,并阐明了 NK 细胞多项免疫应答机制^[9-13]。NK 细胞疗法主要通过采集分离 NK 细胞后对其激活扩增或工程化改造后进行过继回输。目前的临床试验中, CAR NK 疗法在工程化改造前对 NK 细胞原料的需求量为 $(0.5 \sim 2) \times 10^6$, 而激活扩增后大量回输的 NK 细胞需求量则因为治疗剂量和频率不同而差异较大 $(8.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9)$, 2 者对 NK 细胞 CD3-CD56+ 比例的要求均 >90%。国内外的研究中,获得大量高纯度 NK 细胞的体外扩增技术具有多样性,部分是基于单采少量的 NK 细胞工程化或基因编辑后再进行培养扩增,部分则是在培养扩增的过程中分离富集 NK 细胞,然而尽管 NK 细胞体外分离扩增技术有了较

大的突破, NK 细胞在培养过程中活性的维持以及在体内作用时间的延长仍具有技术瓶颈,而且这些体外分离扩增技术所分离富集的 NK 细胞均没有非常统一、公开的质量标准,且这些 NK 细胞的来源也并不十分统一^[14]。

NK 细胞的来源包括 iPSCs、NK 细胞株系、脐带血和外周血^[15-16]。iPSCs 是由人成体细胞进行基因编辑后脱分化形成的多能干细胞,理论上类似胚胎干细胞,具有分化成各种成体器官和组织的再生能力,因此 iPSCs 细胞可诱导分化为 NK 细胞进行细胞免疫治疗,但是其诱导分化生产时间较长,获取不易。NK 细胞株系可以获得性质稳定的 NK 细胞,然而其致瘤风险不可避免。脐带血来源和外周血来源都可通过激活培养或者分离分选从而获得毒副作用较低和纯度较高的 NK 细胞。相较于脐带血,外周血更易获得,且能够直接进行 NK 细胞的分离与制备,最有可能成为 NK 细胞疗法主要原料来源。临床研究中的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)多来源于志愿者募捐的外周血,献血者捐献的全血中也同样含有非常丰富的免疫细胞,而这部分资源却作为医疗废弃物未被完全利用。2019 年业内专家为利用全血来源的免疫细胞资源利用达成了共识,认为全血来源的 NK 细胞具备给细胞疗法提供原料细胞的潜力,可以极大拓展 NK 细胞的来源,缩短 NK 细胞免疫治疗体外细胞培养时间,以期维持 NK 细胞的活力^[17]。为此,我们尝试构建全血来源 NK 细胞分离纯化的技术体系,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 全血来源

选取 2024 年 7—11 月 24 名献血者在解放军总医院第一医学中心输血医学科捐献的全血(400

mL/人)作为 NK 细胞来源。400 mL 全血于血袋保存袋中 4℃ 保存,保存袋中含有营养成分及抗凝成分。本实验标本为 24 份全血完成用于临床的血液成分制备后剩余的白细胞富集物,简称白膜。

1.2 试剂与仪器

外周血淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限公司,批号:LTS1077);红细胞裂解液[天根生化科技(北京)有限公司,批号:SL1071];RPMI1640 基础培养基(THERMO FISHER 公司,批号:6123055);胎牛血清(THERMO FISHER 公司,批号:2440094);抗人 CD3-FITC(批号:317306)、抗人 CD45-PECy7(批号:CD045220901)、抗人 CD56-APC Cy7(批号:318332)、抗人 CD16-APC(批号:302012)、7-AAD-Percep 凋亡抗体(批号:559763),以上流式抗体均为 BIOLEGEN 公司产品;NK 细胞磁珠分选试剂盒(MILTENYI BIOTEC 公司,批号:130-092-657);血小板裂解液(达科为生物技术股份有限公司,批号:6122012);NK 细胞试剂盒套装 2.0(北京同立海源生物科技有限公司,批号:AS-22);PERCOLL 细胞分离液(CYTIVA 公司,批号:17089101),CCK8 试剂(天津市灏洋生物制品科技有限公司,批号:SK2060);CFSE 探针(碧云天公司,批号:C1031);手动分浆夹(山东博科科学仪器有限公司,批号:0804025);CompoMat G5 全自动血液成分分离机(FRESENIUSKABI 公司);XS-900i 血常规计数仪(SYSMEX 公司);PanaCyte A8 流式细胞仪(广州竞天生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs 细胞的分离富集

1.3.1.1 手工/机器分离白膜

24 份 400 mL 全血 2 000×g 离心 10 min 后分为血浆、白膜、浓缩红细胞 3 层。12 份使用手动分浆夹(手工分离),12 份使用全自动血液离心机(机器分离)的三联白膜程序采集分离富集全血中的白膜,获得含白膜的血浆和浓缩红细胞。浓缩红细胞加入保存液制成悬浮红细胞。含有白膜的血浆 2 000×g 离心 10 min 使白膜在血袋中完全沉淀,将沉淀物即白膜转移至 50 mL 离心管中备用并测量记录白膜体积。白膜分离富集共进行 3 次,每次手工分离和机器分离各 4 份。

1.3.1.2 从白膜中使用 Ficoll 密度梯度分离法纯化 PBMCs

向 50 mL 离心管中加入 1/2 白膜体积的 FICOLL 分离液,将白膜缓慢加入 FICOLL 分离液,可

见白膜与分离液的明显分层,20℃、500×g 缓升缓降离心 20 min 后,可见离心管中分为血浆、PBMCs 和红细胞 3 层。记录红细胞体积,根据 400 mL 全血红细胞压积值计算 400 mL 全血浓缩红细胞体积,进而计算分离方法对 400 mL 全血红细胞的损耗率。吸取 PBMCs 层加入 50 mL 离心管,1×PBS 缓冲液清洗 2 遍,400×g 离心 5 min 弃上清,沉淀即为纯化后的 PBMCs。向纯化后的 PBMCs 中加入其体积 3~5 倍的红细胞裂解液,37℃ 水浴裂解 5 min,1×PBS 清洗,400×g 离心 5 min 弃上清。将 BMCs 用 20 mL 1×PBS 重悬,从中取 20 μL 在 1.5 mL EP 管中用 1×PBS 稀释 50 倍至 1 mL,再取 10 μL 加入 1 次性细胞计数板进行细胞计数,总稀释倍数为 1 000 倍。将重悬的 PBMCs 400×g 离心 5 min 弃去 PBS 上清后加入 10 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基置于悬浮皿中,37℃、5% CO₂ 培养箱备用。

1.3.2 从手工分离的 PBMCs 中分离富集 NK 细胞

取手工分离 PBMCs 细胞 3 份,每份分为 3 小份,分别采用 3 种 NK 细胞分离富集方式对 PBMCs 中的 NK 细胞进行分离富集。其中免疫磁珠阴性选择法每小份需 2×10⁷,PERCOLL 密度梯度法每小份需 2×10⁷ 个细胞,血小板裂解液培养扩增法每小份需 4×10⁶ 个细胞。

1.3.2.1 免疫磁珠阴性选择法分离富集 NK 细胞

3 份手工分离 PBMCs 每小份为 2×10⁷ 个细胞,按照试剂盒^[18-20]说明书方法加入相应量的磁珠抗体 2~8℃ 低温孵育,在免疫磁珠细胞分选器的磁场中,使用细胞分选柱和磁珠分选试剂盒对 PBMCs 细胞进行 NK 细胞的分选,使用 15 mL 离心管收集分选柱中流出的未与磁珠抗体结合的细胞,400×g 离心 5 min 弃上清,细胞沉淀即为免疫磁珠阴性选择法分离富集的 NK 细胞。将每份 NK 细胞用 1 mL 1×PBS 重悬,取 10 μL 细胞悬液加入 1 次性细胞计数板进行细胞计数。

1.3.2.2 PERCOLL 密度梯度法分离富集 NK 细胞

3 份手工分离 PBMCs 每小份为 2×10⁷ 个细胞,使用 5 mL PBS 重悬加入 15 mL 离心管中。使用不同量的 9% NaCl 溶液、去离子水和密度为 1.030 g/L 的 PERCOLL 基础液配制 3 份密度(密度梯度为 0.01 g/L)为 1.050 g/L、1.060 g/L、1.070 g/L 的 PERCOLL 工作液。将 PERCOLL 工作液(每个密度 3 mL)按密度由高到低先后缓慢铺平于 15 mL

的玻璃管内,5 mL 细胞悬液加到最上层,20℃、300×g 离心 30 min,可见不同密度 PERCOLL 液中间细胞层,取 1.050 g/L 与 1.060 g/L 之间的细胞层移入 15 mL 离心管,400×g 离心 5 min 弃上清,细胞沉淀即为 PERCOLL 密度梯度分离法分离富集的 NK 细胞。将每份 NK 细胞用 1 mL 1×PBS 重悬,取 10 μL 细胞悬液加入 1 次性细胞计数板进行细胞计数。

1.3.2.3 血小板裂解液培养扩增法扩增富集 NK 细胞

3 份手工分离富集的 PBMCs 细胞每小份为 4×10^6 个细胞,在 NK 细胞培养扩增试剂盒(使用 NK 细胞培养基及相应细胞因子对 PBMCs 进行为期 2 周的体外扩增培养)的培养基础上加入血小板裂解液(human platelet lysate, HPL)(蛋白量为 31.55 mg/mL)。对 PBMCs 中的 NK 细胞进行培养扩增,培养周期为 14 d。培养前 1 d,使用 NK 试剂盒套装中的 A 试剂、DPBS 和血小板裂解液对培养瓶进行包被 4℃ 过夜。培养周期的 d1, d3, d5, d7 添加培养体系相应量的血小板裂解液,使浓度达到 1 μg/mL 蛋白含量。3 份标本培养周期 d0 取 1×10^6 个 PBMCs 进行流式检测,培养周期 d7, d14, 各取 1 mL 加入 1.5 mL EP 管中用 1×PBS 稀释相同倍数,从 EP 管中取 10 μL 细胞悬液加入 1 次性细胞计数板进行细胞计数。

1.3.3 NK 细胞纯度(CD3⁻CD56⁺细胞比例)检测

3 份 PBMCs 与 3 种方式分离富集的 NK 细胞各取 1×10^6 个细胞加入流式管,用 100 μL 流式 Buffer 液(流式抗体为 CD3、CD45、CD56)重悬染色 15 min 后,buffer 液清洗,400×g 离心 5 min 弃上清,500 μL buffer 重悬,进行流式检测,记录 CD3⁻CD56⁺细胞占 CD45⁺淋巴细胞的比例。流式结果使用 Flow Jo 软件进行分析。NK 细胞得率 = NK 细胞实际分选细胞量 / NK 细胞预计分选细胞量 × 100%, NK 细胞预计分选量 = PBMCs 细胞量 × CD3⁻CD56⁺细胞比例, NK 细胞实际分选量 = 分选得到的 NK 细胞量 × CD3⁻CD56⁺细胞比例。

1.3.4 NK 细胞活性检测

3 份 PBMCs 与免疫磁珠阴性选择法及血小板裂解液培养扩增法分离富集的 NK 细胞各取 1×10^6 个细胞加入流式管,用 100 μL 流式 Buffer 液(流式抗体为 CD3、CD56、CD16)重悬染色 15 min 后,buffer 液清洗,400×g 离心 5 min 弃上清,500 μL buffer 重悬,进行流式检测,记录 CD16⁺细胞占 CD3⁻CD56⁺细胞的比例(NK 细胞活性)。流式结

果使用 Flow Jo 软件进行分析。

1.3.5 NK 细胞抑制肿瘤增殖试验

计数 HepG2 肝癌细胞与 NK 细胞,调整 2 种细胞浓度为 1×10^5 /mL 和 1×10^6 /mL。取 96 孔板加样,实验组:2 种细胞各 100 μL(效靶比 = 10:1);阴性对照组:100 μL 单纯 NK 细胞;阳性对照组:100 μL HepG2 细胞。每组设 3 个复孔,共 9 孔。培养箱共孵育 24 h 后,加入 CCK8 试剂,1~4 h 观察各孔颜色变化,96 孔板 400×g 离心 5 min,酶标仪检测各孔吸光度值。肿瘤增殖抑制率 = $[1 - (\text{实验组吸光度值} - \text{阴性对照组吸光度值}) / \text{阳性对照组吸光度值}] \times 100\%$ 。

1.3.6 NK 细胞体外杀伤肿瘤试验

计数 HepG2 肝癌细胞与 NK 细胞,HepG2 细胞使用 CFSE 染色,调整 2 种细胞浓度为 1×10^5 /mL 和 1×10^6 /mL。取 12 孔板加样,实验组:2 种细胞各 500 μL(效靶比 = 10:1),阳性对照组:500 μL HepG2 细胞。培养箱共孵育 24 h 后,胰酶消化细胞,使用 7-AAD 流式抗体对细胞进行染色,15 min 后,buffer 液清洗后 400×g 离心 5 min,500 μL buffer 液重悬,进行流式检测。CFSE 阳性细胞群为 HepG2 细胞。肿瘤杀伤率 = $(\text{实验组细胞死亡率} - \text{阳性对照组细胞自然凋亡率}) / (100 - \text{实验组细胞凋亡率}) \times 100\%$ 。

1.4 统计学分析

使用 SPSS/GRAPHPAD 软件进行数据统计,计量资料用 $\bar{X} \pm SD$ 表示,多组比较采用单因素或双因素方差分析,两两比较使用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著差异。

2 结果

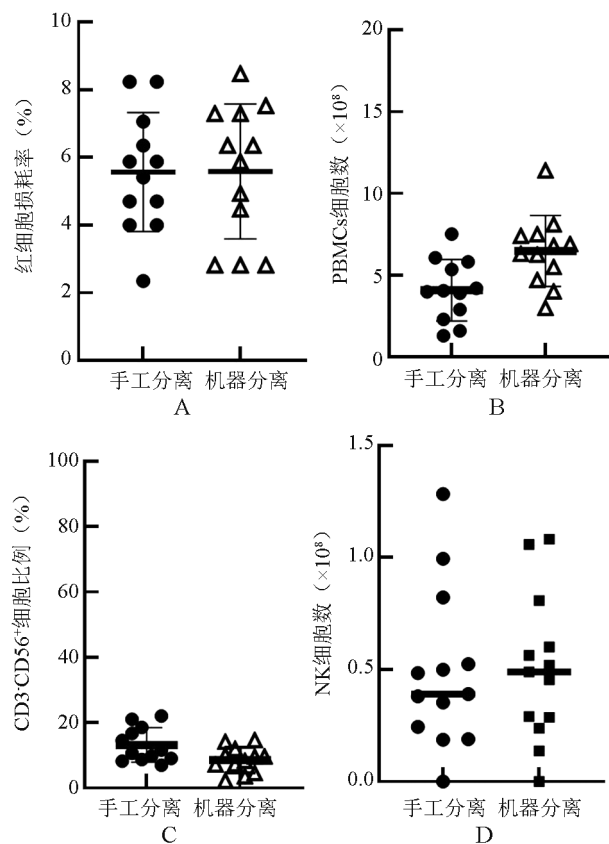
2.1 全血手工分离与机器分离 PBMCs 的效果

手工分离比机器分离的红细胞损耗率无差异(图 1A, $t = 0.03, P > 0.05$);手工分离 PBMCs 细胞的数量低于机器分离(图 1B, $t = 2.90, P < 0.05$),手工分离 PBMCs 细胞中 CD3⁻CD56⁺比例高于机器分离(图 1C, $t = 2.43, P < 0.05$),2 种分离方式的 PBMCs 中 NK 细胞的数量无差异(图 1D, $t = 0.1, P > 0.05$)。

2.2 3 种方式分离富集的 NK 细胞中 CD3⁻CD56⁺细胞的比例

PBMCs 中 CD3⁻CD56⁺细胞比例为 $(11.35 \pm 3.69)\%$ 。免疫磁珠阴性选择法所得 NK 细胞中

CD3⁻CD56⁺细胞比例为(96.77±2.31)%,高于分离前(图2, $P < 0.05$),PERCOLL密度梯度分离法所得NK细胞中CD3⁻CD56⁺细胞比例为(15.83±5.82)%,与分离前无差异(图2, $P > 0.05$),HPL培养扩增法所得NK细胞,在培养周期d7的CD3⁻CD56⁺细胞的比例为(54.84±15.80)%,高于分离前(图2, $P < 0.05$),随着体外培养时间的延长,CD3⁻CD56⁺细胞比例反而有所下降。



注:A 2种分离方式的红细胞损耗率;B 2种分离方式所得PBMCs细胞的数量;C 2种分离方式所得PBMCs中CD3⁻CD56⁺细胞的比例;D 2种分离方式所得PBMCs中NK细胞的数量

图1 全血手工分离与机器分离PBMCs的效果

Figure 1 The difference between manual and automatic methods of PBMCs from whole blood

2.3 免疫磁珠阴性选择法与PERCOLL密度梯度分离法的细胞得率

免疫磁珠阴性选择法分离富集NK细胞得率为(56.27±10.47)%,PERCOLL密度梯度分离法分离富集NK细胞得率为(14±6.25)% (图3, $t = 6.00, P < 0.05$)。PERCOLL密度梯度分离法细胞得率低,不认为该方法分离富集得到的细胞对肿瘤增殖的抑制能力完全来源于NK细胞,因此未进行NK细胞活性测定和肿瘤抑制试验。

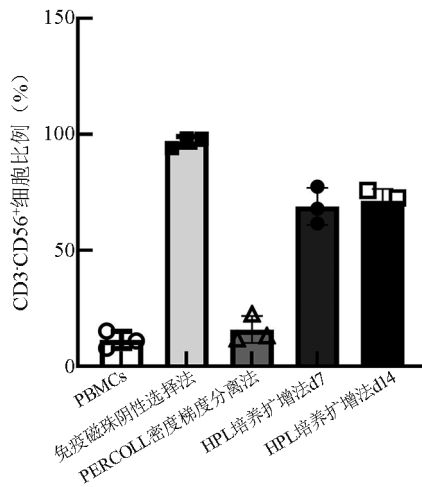


图2 3种方式分离富集的NK细胞中CD3⁻CD56⁺细胞的比例

Figure 2 The proportion of CD3⁻CD56⁺ cells of three methods for separation and enrichment of NK cells

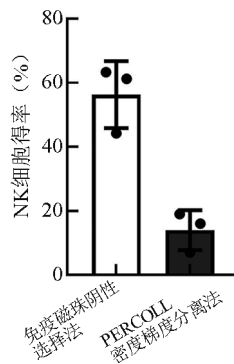


图3 免疫磁珠阴性选择法与PERCOLL密度梯度分离法的细胞得率

Figure 3 NK cell yield of immunomagnetic bead negative selection and PERCOLL method

2.4 HPL培养扩增法NK细胞扩增情况

与免疫磁珠阴性选择法和PERCOLL密度梯度分离法相比,HPL培养扩增法可以有效激活扩增NK细胞,d7细胞的扩增倍数为16.92±6.28,d14扩增倍数为55.13±33.71,d7细胞数量与初始PBMCs无差异($P > 0.05$),d14细胞数量高于初始PBMCs(图4, $P < 0.05$)。

2.5 HPL培养扩增法与免疫磁珠阴性选择法富集NK细胞的活性

HPL培养扩增法所得NK细胞活性为[d7:(68.93±8)%、d14:(71.3±5.15)%],免疫磁珠阴性选择法所得NK细胞活性为(72.86±2.81)%,与分离富集前的PBMCs中NK细胞活性(72.9±7.65)%比较均无差异(图5, $P > 0.05$)。HPL培养扩增NK细胞活性d7与d14无差异($P > 0.05$),但CD3⁻CD56⁺细胞比例d7高于d14($P < 0.05$),因此

进一步对 HPL 培养扩增 d7 及免疫磁珠阴性选择法的 NK 细胞进行了体外肿瘤抑制试验与杀伤试验。

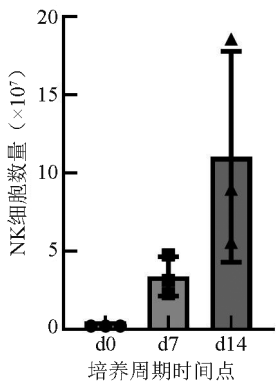


图 4 HPL 培养扩增法 NK 细胞扩增效率

Figure 4 Expansion efficiency of HPL-cultured cells

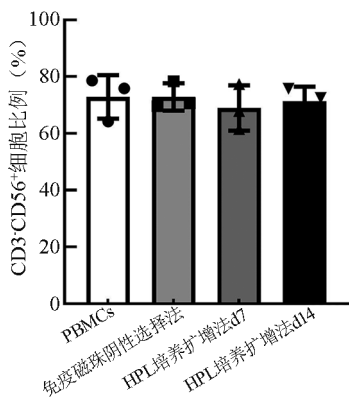


图 5 免疫磁珠阴性选择法与 HPL 培养扩增法富集 NK 细胞的活性

Figure 5 Activity of NK cells isolated by immunomagnetic bead negative selection method and expanded by HPL culture

2.6 HPL 培养扩增法与免疫磁珠阴性选择法富集 NK 细胞的毒性

免疫磁珠阴性选择法富集 NK 细胞的体外肿瘤杀伤率为(19.90±8.05)%,肿瘤增殖抑制率为(38.67±14.05)%。HPL 培养扩增法富集 NK 细胞的体外肿瘤杀伤率为(15.83±5.5)%,肿瘤增殖抑制率为(44.33±13.5)%。2 种分离富集方式得到的 NK 细胞毒性无差异(图 6A、B, $t=0.72, 0.12, P>0.05$)。

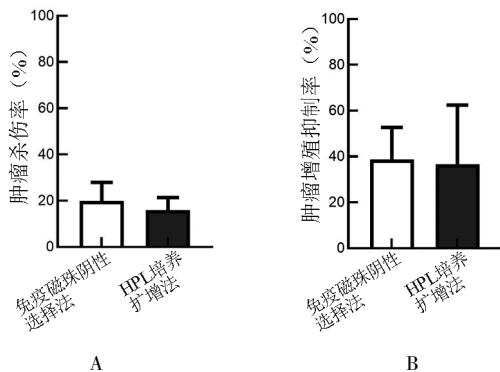
2.7 3 种 NK 细胞分离富集方式的比较

见表 1。

3 讨论

NK 细胞在肿瘤微环境中发生免疫应答的机制不断被揭示,同种异体 NK 细胞免疫疗法治疗难

治、复发恶性肿瘤的突破和进展也代表着 CAR NK 和 NK 细胞激活后的回输等 NK 细胞疗法已经成为关注的热点^[21-25]。目前已经有多个 NK 细胞扩增培养体系已经通过临床试验许可,用于肿瘤免疫治疗。然而,这些 NK 细胞的来源并不统一,其单采或分离、扩增与培养的技术体系与质量标准尚未明确公开,仅以细胞产品的形式进入临床试验。献血者捐献的全血用于临床输血时其中有大量免疫细胞资源尚未被利用,具备为同种异体 NK 细胞疗法提供大量 NK 细胞的潜能,目前已有相关研究探讨了这一细胞资源中 NK 细胞的回收率^[26]。



注: A NK 细胞肿瘤杀伤率; B NK 细胞肿瘤增殖抑制率

图 6 免疫磁珠阴性选择法与 HPL 培养扩增法富集 NK 细胞的毒性

Figure 6 NK cell toxicity of immunomagnetic bead negative selection and HPL culture expansion method

表 1 3 种 NK 细胞分离富集方式的比较

Table 1 Comparison of three methods for isolation and enrichment of NK cells

	免疫磁珠阴性选择法	PERCOLL 密度梯度分离法	HPL 培养扩增法
优势	操作简单 CD3 ⁺ CD56 ⁺ 细胞比例高	操作简单 成本低	NK 细胞得率高 数量大
局限性	成本较高 单次分选量较小	CD3 ⁺ CD56 ⁺ 细胞比例与细胞得率较低	培养时间长 CD3 ⁺ CD56 ⁺ 细胞比例较低
开发潜能	CAR NK		NK 细胞大量回输

临床上,从全血分离 PBMCs 有手工分离和机器分离 2 种方法,分别使用全自动血液成分分离机和分浆夹。全自动血液成分分离机的原理是依据透光度的不同而实现血液成分的分离,它的内参设置常用于血小板单采,其局限性在于难以针对单一种类白细胞进行单采或分离。手工分离法通过手工挤压全血离心后含有大量白细胞的白膜层,达到分离 PBMCs 的目的。在本研究中,我们使用这 2 种方法对多份 400 mL 全血中的 PBMCs 进行分离,结果显示 2 种方法的红细胞损耗率无差异 ($P>0.05$),证明 2 种方法分离 PBMCs 不会影响临床血

液成分制备。2 种方法比较, PBMCs 细胞数量手工分离低于机器分离 ($P < 0.05$), NK 细胞比例手工分离高于机器分离 ($P < 0.05$), 最终计算得到的 NK 细胞数量 2 者无差异 ($P > 0.05$)。对此我们分析了白细胞中各类细胞的密度, 发现 NK 细胞处于白细胞的中上层, 而单核细胞和中性粒细胞等位于白细胞层的中下层, 机器分离 PBMCs 时将整个白细胞层采集分离, 而手工分离 PBMCs 时因手工挤压过程通常不能完整收集白细胞层, 导致其虽然整体的量减少, 但上层 NK 细胞均被采集, 所以比例较高。鉴于 2 者在分离 NK 细胞数量上并无差异, 而 NK 细胞疗法对 NK 细胞的纯度要求较高, 于是我们选择手工分离的 PBMCs 进行 NK 细胞的分离富集。

国内外研究中, PBMCs 中的 NK 细胞可以通过直接分离或培养扩增的方法达到分离富集的目的。直接分离的方法包括免疫磁珠阴性选择法和 PERCOLL 密度梯度分离法 2 种, 培养扩增的方法则主要是血小板裂解液培养扩增法^[27-34]。本研究采用这 3 种方法对手工分离的 PBMCs 中的 NK 细胞进行分离富集并比较其效果。免疫磁珠阴性选择法的 NK 细胞得率约 50%, NK 细胞的纯度 > 90%, 通过少量多次的分选后可从 400 mL 全血中分到 10^8 数量级的 NK 细胞。相较于得率较低且 NK 细胞纯度并未有明显提升的 PERCOLL 密度梯度分离法, 免疫磁珠阴性选择法分离得到的 NK 细胞完全可以为 CAR NK 细胞免疫疗法提供来源一致且质量相近的 NK 细胞。HPL 培养扩增法通过 HPL 与细胞因子的共同刺激, 有效激活和扩增 PBMCs 中的 NK 细胞达到分离富集的目的。本研究结果显示, HPL 培养扩增法在培养周期 d7 时 NK 细胞纯度最高, 且该方法在激活 NK 细胞的同时刺激 NK 细胞的生长与增殖, 若对 400 mL 全血中的 NK 细胞都进行培养扩增, 其细胞数量可达到 10^9 级, 完全可满足激活 NK 细胞回输疗法的数量要求。然而随着培养时间延长, NK 细胞虽然仍在扩增, 但纯度逐渐下降(可能与停止添加 HPL 有关)。在后面的研究中, 我们会调整 HPL 的浓度梯度和添加节点, 以期提高 NK 细胞的纯度。基于目前的培养条件, 在 d7 时对 NK 细胞进行收集, 再进行磁珠少量多次分选, 可提高 NK 细胞的纯度。2 种方法分离富集的 NK 细胞活性均较好, 都能够抑制肿瘤细胞增殖并杀伤肿瘤细胞。我们通过本研究初步构建了全血来源 NK 细胞的分离纯化技术体系, 认为该来源的 NK 细胞具备成为快速分离、短时间扩增细胞免疫

治疗药物的潜能, 这不仅能够维持 NK 细胞的活性, 还降低了目前 NK 细胞疗法的成本。

在后续研究中, 我们将通过分析献血者的个体特征与分选得到 PBMCs 及 NK 细胞质量的相关性, 力求建立 1 套以献血者作为 NK 原料细胞供体的评价体系, 为更加有效利用临床用全血里的 NK 细胞资源, 推动实现 NK 细胞免疫治疗的床旁快速供应奠定基础。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor Consent

本研究已通过解放军总医院伦理委员会审批(批准号: S2024-069-02); 本研究纳入的所有献血者均已签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

曹腾宇: 主要实验操作、论文撰写; 林华雨、段翠密: 实验问题和思路指导、实验协助; 张璇之、薛晓楠: 实验协助; 刘羿: 实验协助、标本收集; 孙莉萍: 实验问题和思路指导、方案指导; 于洋: 研究思路提出、研究方案设计、论文修改。

[参考文献]

- [1] OTTAVIANO G, GEORGIADIS C, GKAZI S A, et al. Phase 1 clinical trial of CRISPR-engineered CAR19 universal T cells for treatment of children with refractory B cell leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(668): 3010-3022.
- [2] AOKI T, MOTOHASHI S. Cancer immunotherapy using allogeneic NKT cells. *Gan to kagaku ryoho* [J]. *Cancer & Chemotherapy*, 2023, 50(5): 584-588.
- [3] PAL S K, TRAN B, HAANEN J, et al. CD70-targeted allogeneic CAR T-cell therapy for advanced clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(7): 1176-1189.
- [4] AHMADVAND M, BAROUGH M S, BARKHORDAR M, et al. Phase I non-randomized clinical trial of allogeneic natural killer cells infusion in acute myeloid leukemia patients [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 1090-1100.
- [5] MARIN D, LI Y, BASAR R, et al. Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19(+) B cell tumors: A phase 1/2 trial [J]. *Nat Med*, 2024, 30(3): 772-784.
- [6] MOHSENI R, MAHDAVI SHARIF P, BEHFAR M, et al. Phase I study of safety and efficacy of allogeneic natural killer cell therapy in relapsed/refractory neuroblastomas post autologous hematopoietic stem cell transplanta-

- tion[J]. *Sci Rep*, 2024,14(1):1-12.
- [7] MCCURDY S R. Harnessing allogeneic NK cells; improving outcomes with tailored donor lymphocyte infusion[J]. *J Clin Invest*, 2022,132(11):e160584.
- [8] BEDNARSKI J J, ZIMMERMAN C, BERRIEN-ELLIOTT M M, et al. Donor memory-like NK cells persist and induce remissions in pediatric patients with relapsed AML after transplant[J]. *Blood*, 2022,139(11):1670-1683.
- [9] LACHOTA M, VINCENTI M, WINIARSKA M, et al. Prospects for NK cell therapy of sarcoma[J]. *Cancers*, 2020,12(12):3719-3750.
- [10] BRIUKHOVETSKA D, SUAREZ-GOSALVEZ J, VOIGT C, et al. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis[J]. *Immunity*, 2023, 56(1):143-161+111.
- [11] SILVESTRE R N, EITLER J, DE AZEVEDO J T C, et al. Engineering NK-CAR 19 cells with the IL-15/IL-15R α complex improved proliferation and anti-tumor effect in vivo[J]. *Front Immunol*, 2023,9(14):1-15.
- [12] TANG F, LI J, QI L, et al. A pan-cancer single-cell panorama of human natural killer cells[J]. *Cell*, 2023, 186(19):4235-4251+4220.
- [13] SUN X, NAGAHAMA Y, SINGH S K, et al. Deletion of the mRNA endonuclease Regnase-1 promotes NK cell anti-tumor activity via OCT2-dependent transcription of *Ifng*[J]. *Immunity*, 2024,57(6):1360-1377+1313.
- [14] NAVIN I, LAM M T, PARIHAR R. Design and implementation of NK cell-based immunotherapy to overcome the solid tumor microenvironment[J]. *Cancers*, 2020,12(12):3871-3893.
- [15] FANG F, XIE S, CHEN M, et al. Advances in NK cell production[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022,19(4):460-481.
- [16] HUANG M, LIU Y, YAN Q, et al. NK cells as powerful therapeutic tool in cancer immunotherapy[J]. *Cell Oncol*, 2024,47(3):733-757.
- [17] 田亚平, 汪德清, 赵秀梅, 等. 无偿献血者免疫细胞资源库专家共识[J]. *中国输血杂志*, 2019, 32(6): 517-520.
- TIAN Y P, WANG D Q, ZHAO X M, et al. Expert consensus on immune cell resource bank of voluntary blood donors[J]. *Chin J Blood Transfusion*, 2019,32(6):517-520.
- [18] HUNENECKE S, ZIMMERMANN S Y, KLOESS S, et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion[J]. *J Immunother*, 2010,33(2):200-210.
- [19] NGUYEN-PHAM T N, YANG D H, NGUYEN T A, et al. Optimal culture conditions for the generation of natural killer cell-induced dendritic cells for cancer immunotherapy[J]. *Cell Mol Immunol*, 2012,9(1):45-53.
- [20] Torelli G F, Rozera C, Santodonato L, et al. A good manufacturing practice method to ex vivo expand natural killer cells for clinical use[J]. *Blood Transfus*, 2015,13(3):464-471.
- [21] POZNANSKI S M, SINGH K, RITCHIE T M, et al. Metabolic flexibility determines human NK cell functional fate in the tumor microenvironment[J]. *Cell Metab*, 2021,33(6):1205-1220+1205.
- [22] TONG L, JIMÉNEZ-CORTEGANA C, TAY A H M, et al. NK cells and solid tumors: Therapeutic potential and persisting obstacles[J]. *Mol Cancer*, 2022,21(1):206-224.
- [23] JIA H, YANG H, XIONG H, et al. NK cell exhaustion in the tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2023,11(14):1-8.
- [24] HE C, WANG D, SHUKLA S K, et al. Vitamin B6 competition in the tumor microenvironment hampers anti-tumor functions of NK cells[J]. *Cancer Discov*, 2024,14(1):176-193.
- [25] NEO S Y, TONG L, CHONG J, et al. Tumor-associated NK cells drive MDSC-mediated tumor immune tolerance through the IL-6/STAT3 axis[J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(747):2952-2970.
- [26] 张红, 吴昊, 姜磊, 等. 人 NK 细胞的体外扩增及其基因表达通路的研究[J]. *精准医学杂志*, 2022, 37(2): 170-174.
- ZHANG H, WU H, JIANG L, et al. In vitro amplification and gene expression pathway of human nk cells[J]. *Precision Medicine*, 2022,37(2):170-174.
- [27] PHILPOTT D N, CHEN K, ATWAL R S, et al. Ultra throughput immunomagnetic cell sorting platform[J]. *Lab Chip*, 2022,22(24):4822-4830.
- [28] LEE D Y, KIM Y, PARK J S, et al. Development of genetically engineered feeder cells for natural killer cell expansion[J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(9): 3897-3904.
- [29] KOH S K, PARK J, KIM S E, et al. Natural killer cell expansion and cytotoxicity differ depending on the culture medium used[J]. *Ann Lab Med*, 2022, 42(6): 638-649.
- [30] 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(12):1-21.

(4):435-437.

[35] 孙长杰, 王晓宁, 卢伟伟, 等. 红细胞 Kidd 血型抗原研究现状及进展[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(2): 340-343.

SUN C J, WANG X N, LU W W, et al. Research status

and progress of erythrocyte Kidd blood group antigen [J]. Chin J Experimental Diagnostics, 2020, 24(2): 340-343.

(2024-08-06 收稿, 09-28 修回, 11-24 接收)

本文编辑: 闻欣

(上接第 188 页)

[31] ZHANG C, KADU S, XIAO Y, et al. Sequential exposure to IL21 and IL15 during human natural killer cell expansion optimizes yield and function[J]. Cancer Immunol Res, 2023, 11(11): 1524-1537.

[32] INGENNERE T, SEGAIN B, COZZANI A, et al. Optimizing CAR-NK cell transduction and expansion; Leveraging cytokine modulation for enhanced performance[J]. Current Protocols, 2024, 4(11): e70040.

[33] BECKER P S, SUCK G, NOWAKOWSKA P, et al. Se-

lection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy [J]. Cancer Immunol Immun, 2016, 65(4): 477-484.

[34] FAHRNER R, GRÖGER M, SETTMACHER U, et al. Functional integration of natural killer cells in a microfluidically perfused liver on-a-chip model [J]. BMC Research Notes, 2023, 16(1): 285-293.

(2024-12-20 收稿, 2025-02-06 修回, 02-16 接收)

本文编辑: 闻欣

(上接第 213 页)

[15] CHANG H H, LIOU Y S, SUN D S. Hematopoietic stem cell mobilization[J]. Tzu Chi Med J, 2021, 34(3): 270-275.

[16] BUHLER S, AKHOUNDOVA D, JEKER B, et al. Stem Cell Mobilization with Ixazomib and G-CSF in Patients with Multiple Myeloma[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(2): 430-443.

[17] DONMEZ A, ARIK B, TOMBULOGLU M, et al. Risk factors for adverse events during collection of peripheral

blood stem cells[J]. Transfus Apher Sci, 2011, 45(1): 13-16.

[18] YANAGISAWA R, HIRAKAWA T, DOKI N, et al. Severe short-term adverse events in related bone marrow or peripheral blood stem cell donors[J]. Int J Hematol, 2023, 117(3): 421-427.

(2024-10-16 收稿, 2025-01-22 修回, 02-06 接收)

本文编辑: 李弘武