

脐血单核细胞体外高效扩增 NK 细胞方法的研究*

汪德海 郭昌龙 周越 高建恩[△] 马旭[△](国家卫生健康委员会科学技术研究所 国家人类遗传资源中心,北京 100081)

摘要:目的 建立 1 种使用脐血单核细胞(UCBMC)制备较高纯度自然杀伤(NK)细胞的体外高效扩增方法,并初步鉴定扩增后的 NK 细胞杀伤肿瘤细胞(K562)的能力。**方法** 6 人份脐血标本来自北京妇产医院,取 20 mL/份、采用密度梯度离心法分离脐血中的 UCBMC,提取后的 UCBMC 以 1×10^6 个/mL 细胞在 4 mL 含有白细胞介素(IL)-2、IL-12、IL-15 和 IL-21 的 X-VIVO15 中培养 5 d,期间于 d2 和 d3 添加等体积含上述细胞因子的新鲜培养基;800 g 离心将细胞后转入含 1 000 IU/ml IL-2 和 50 ug/mL L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐的 X-VIVO15 培养基中继续培养至 14 d,800 g 离心收获细胞。无血清 RPMI1640 重悬后通过台盼蓝染色法做细胞计数测定细胞的扩增倍数;流式细胞仪检测 NK 细胞重要表面标志物(CD56 和 CD16 等)及与杀伤功能相关的重要分子[CD158a、CD158b、CD158e/k、CD69、CD314(NKG2D)、CD94、CD335(NKp46)、CD337(NKp30)、CD62L、CD226(DNAM-1)、CD57 和 CD336(NKp44)]的表达情况;胞内染色结合流式细胞仪测定细胞杀伤重要效应分子 Perforin 和 Granzyme B 的表达情况,并以乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测扩增后的细胞对 K562 细胞的杀伤能力。**结果** 6 份 UCBMC 培养 14 d;活细胞总数从培养前的 4×10^6 个扩增至 $(3.6—5.5) \times 10^8$ 个,扩增倍数 91—137(116±13.1);CD3⁻CD56⁺ 细胞(NK 细胞)占比 85.6%—95.5%(90.2±3.4)%;培养得到的 NK 细胞表面除表达 CD56 分子外,还表达 CD16(91.2±2.6)%、CD158a(71.4±4.4)%、CD158b(52.1±2.2)%、CD158e/k(50.3±6.9)%、CD69(95.6±2.8)%、CD314(NKG2D)(94.2±1.7)%、CD94(94.1±2.1)%、CD335(NKp46)(26.6±4.1)%、CD337(NKp30)(94.6±1.5)%、CD62L(12.8±3.4)%、和 CD226(DNAM-1)(97.6±1.3)%、以及 CD57(4.2±0.9)%和 CD336(NKp44)(7.1±1)%。胞内染色结果显示;>90%扩增产物(细胞)内表达与 NK 细胞杀伤功能相关的 Perforin(86.9±2.7)%和 Granzyme B(94.1±2.9)%;体外细胞杀伤试验:扩增的细胞对 K562 在效靶比为 5:1 和 10:1 时对靶细胞(K562)具有明显的杀伤作用。**结论** 成功建立了 1 种从 UCBMC 不经纯化直接制备高纯度 NK 细胞的方法——其培养的细胞中表达了 NK 细胞重要的功能性分子,对 K562 细胞具有杀伤能力。

关键词:脐血;单核细胞;自然杀伤细胞;体外扩增;肿瘤细胞;K562;细胞毒

中图分类号:Q813.1⁺1 R392.12 R457.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2018)6-0722-05

Study on a highly efficient ex vivo expansion method for NK cells using umbilical cord blood mononuclear cells

WANG Dehai, GUO Changlong, ZHOU Yue, GAO Jianen, MA Xu. National Research Institute for Health Commission, National Human Genetic Resources Center, Beijing 100081, China. Co-corresponding authors: GAO Jianen and MA Xu

Abstract: Objective To establish a method for preparing of natural killer (NK) cells in vitro with high purity by the induction of umbilical cord blood mononuclear cells (UCBMC) with cytokine cocktail and evaluate the potential anti-tumor capability of the expanded cells. **Methods** 6 UCB samples were obtained from Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital under the term of scientific use. UCBMCs were isolated from the UCB samples by differential density centrifugation using Ficoll-Paque. The isolated UCBMCs were cultured in a serum free medium of X-VIVO 15 containing IL-2 (1 000 μ/mL), IL-12 (20 ng/mL), IL-15 (20 ng/mL), IL-21 (5 ng/mL) and 10% auto-plasma at a cell density of 1×10^6 /mL for 5 days with equal volume fresh medium addition at day 2 and day 3. Cells were harvested by centrifugation at 800 g, room temperature and re-plated in 15 mL X-VIVO 15 medium containing IL-2 (1 000 IU/mL) and phospho-ascorbic acid (50 μg/mL) for 9 days, with equal volume fresh medium addition every 3 days. After 14 days of culture, cells were harvested and the expression of NK cell immunophenotypic markers, such as CD56 and CD16, and functional molecules, such as CD158a, CD158b, CD158e/k, CD69, CD314(NKG2D), CD94, CD335(NKp46), CD337(NKp30), CD62L, CD226(DNAM-1), CD57, CD336(NKp44), Perforin and Granzyme B on or in expanded cells were analyzed by flow cytometry. In vitro cytotoxic func-

tion against tumor cell line K562 was evaluated using LDH release cytotoxic assay. **Results** Freshly isolated 6 UCBMCs were cultured for 14 days in the expansion medium supplemented with 10% auto-plasma from each UCB unit respectively. The average percentage of CD3⁻CD56⁺ subset in expanded cells was 85.6%—95.5%(90.2±3.4)% with the average of (116±4.7) fold expansion. In addition of NK phenotypic markers (CD56

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2018.07.007

* 基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1002004 和 2016YFC1000307-11);△共同通信作者:高建恩(1964.07-),男,理学博士,副研究员,主要从事固有免疫系统效应细胞的细胞生物学研究,电话:010-62154091,Email:gaojianen@nrifp.org.cn;马旭(1963.09-),男,理学博士,研究员,博士研究生导师,主要从事遗传性疾病致病基因定位、克隆与功能鉴定研究,电话:010-62173436,Email:maxu@nrifp.org.cn

and CD16), the expanded cells expressed most of the functional molecules of NK cells, such as CD158a (71.4±4.4)%, CD158b (52.1±2.2)%, CD158e/k (50.3±6.9)%, CD69 (95.6±2.8)%, CD314 (NKG2D) (94.2±1.7)%, CD94 (94.1±2.1)%, CD335 (NKp46) (26.6±4.1)%, CD337 (NKp30) (94.6±1.5)%, CD62L (12.8±3.4)%, and CD226 (DNAM-1) (97.6±1.3)% on cell surface and expressed Perforin (86.9±2.7)% and Granzyme B (94.1±2.9)% in the cell plasma. Data from LDH release assay indicated that significant cytotoxic effects were observed at E:T ratio of 5:1 and 10:1 when using human erythroleukemia cell line K562 as target cells. **Conclusion** We have established a novel method for ex vivo expansion of NK cells from umbilical cord blood mononuclear cells. The expanded NK cells expressed most of the functional markers of NK cells and present cytotoxic capability against the human erythroleukemia cell line K562.

Key words: umbilical cord blood; mononuclear cells; natural killer Cell; ex vivo expansion; tumor cells; K562; cytotoxic

造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 是治疗白血病的重要手段, HSCT 后患者的免疫重建首先出现的自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞对于治疗效果具有重要作用^[1-2]。NK 细胞是人体固有免疫系统的重要效应细胞, 是 1 群以 CD3⁻CD56⁺ 为标志的异质性细胞, 具有抗肿瘤和抗病毒的功能, 是肿瘤免疫治疗研究中的 1 种重要效应细胞^[3]。临床研究证实 NK 细胞对急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 具有杀伤作用, 同时对一些实体瘤也具有一定的杀伤作用^[4]。相比于 T 细胞, NK 细胞一般不会引发移植宿主病 (graft versus host disease, GVHD), 因而成为肿瘤过继性免疫治疗的重要候选细胞之一^[5]。有学者认为脐血中所含的幼稚 T 细胞不易引发 GVHD, 同时脐血中含有的 NK 细胞前体细胞多于成人外周血, 因此脐血被认为是制备 NK 细胞的理想来源^[6]。鉴于 NK 细胞在 HSCT 和肿瘤免疫治疗中的广阔应用前景, 以及临床对 NK 细胞的大量需求, 有必要建立 1 种简便、高效的 NK 细胞制备方法, 以满足基础和临床应用研究的需要^[7-8]。我们使用脐血单核细胞 (umbilical cord blood mononuclear cells, UCBMC), 在未经 CD3⁻CD56⁺ 细胞分离的情况下, 组合几种白细胞介素 (interleukin, IL) 细胞因子建立了 1 种不使用滋养细胞的 NK 细胞体外扩增培养方法, 并对扩增后细胞的重要功能性分子表达及其对 K562 的体外杀伤能力做初步测定, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 细胞、试剂及仪器 K562 细胞 (CCL-243, 美国 ATCC); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (10099-141), 1640 培养基 (RPMI1640) (C11875500bt) (美国 Gibco 公司); 无钙离子、镁离子磷酸缓冲液 (D-PBS) (SH30256.01, 美国 Hyclone 公司); 人淋巴细胞分离液 (比重 1.077 的 Ficoll 溶液 250mL) (LTS1077, 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司); 无血清培养基 X-VIVO 15 (04-418Q, 美国 Lonza 公司); 17 种荧光标记流式抗体包括 APC 标记抗人 CD56 (130-100-698)、抗人 CD16 (130-106-705), PerCP-Vio700 标记抗人 CD3 (130-109-465), PE 标记抗人 CD158a (KIR2DL1) (130-103-967)、抗人 CD158b (KIR2DL2/DL3) (130-099-397)、抗人 CD158e/k (KIR3DL1/DL2) (130-099-121)、抗人 CD57 (130-111-963)、抗人 CD69 (130-112-802)、抗人 CD94 (130-098-973)、抗人 CD62L (130-099-717)、抗人 CD314 (NKG2D) (130-111-723)、抗人 CD337 (NKp30) (130-112-502)、抗人 CD336 (NKp44) (130-099-684)、抗人 CD335 (NKp46) (130-112-279)、抗人

Perforin (130-096-578)、抗人-Granzyme B (130-101-353)、抗人 CD226 (DNAM-1) (130-100-461) (除抗人 CD3 外均与 NK 细胞表型和功能相关), 以及 PE 标记通用型同型抗体 REA Control (130-104-612), APC 标记通用型同型抗体 REA Control (130-104-614), PerCP-Vio700 标记的 REA Control (130-104-620) (德国 Miltenyi); 细胞因子: 重组人 IL-2 (201703027, 沈阳三生制药有限公司); 重组人 IL-12 (IL-2-H4210, 美国 AcroBiosystem 公司); 重组人 IL-15 (SJB08) 和重组人 IL-21 (SJB14) (厦门特宝公司); 细胞杀伤检测试剂盒 CytoTox 96 (G1780, 美国 Promega 公司); L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐 (2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium) (49752, 美国 Sigma 公司)。CO₂ 培养箱 (240i, 美国 ThermalFisher 公司); 离心机 (L3-5K, 湖南可成仪器设备有限公司); 光学显微镜 (BDS400, 重庆奥特光学仪器有限责任公司); 流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 BD 公司); 酶标仪 (xMark™, 美国 Biorad 公司)。

1.2 脐血来源 6 (人) 份脐血 (20 mL/份, 肝素钠抗凝) 由北京妇产医院产科 9 病区提供, 取自 2017 年 6—10 月在该区分娩的 6 名足月、顺产产妇, 年龄 26—35 (30.5±3.9) 岁, 其中初产妇 5 名、经产 (≥2 次) 妇 1 名, 采前均取得产妇本人知情同意并签署用于科研目的的《知情同意书》; 脐血采集后于 4℃ 运输保存, 并在采集 <16 h 开始实验。研究获得本所伦理委员会批准 (批件号: 2017 年第 026 号)。

1.3 K562 细胞培养 取 2×10⁶ 个 K562 细胞接种于 10 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 每隔 2—3 d 细胞换液。

1.4 UCBMC 分离 采用密度梯度离心法 (Ficoll-Paque)^[13]: 取新鲜抗凝脐带血 20 mL/份, 800 g 离心 5 min, 取血浆留存备用; 细胞沉淀用 20 mL 无钙、镁离子 DPBS 重悬每份脐血标本后, 将细胞悬液沿管壁小心铺在 Ficoll 分离液表面, 缓慢增加离心力, 由静止逐渐增至 800 g, 室温离心 15 min 时无制动停转; 吸取中间白雾状细胞层, 用 DPBS 缓冲液洗涤 2 次, 用 RPMI-1640 培养基悬浮, 显微镜下计数细胞。

1.5 NK 细胞的体外培养 取提取的 UCBMC 4×10⁶ 个置于 4 mL NK 细胞培养基中 (含 1 000 U/mL IL-2、20 ng/mL IL-12、20 ng/mL IL-15、5 ng/mL IL-21 和 10% 自体脐血血浆的 X-VIVO 15), 放入 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养 2 d, 加入 4 mL 上述 NK 细胞培养基继续培养 1 d, 于细胞培养液中继续添加 4 mL 上述培养基和 4 mL 无血清 X-VIVO 15 培养基再培养 2 d (此时培养了 5 d) 时, 800 g 离心 5 min 收集细胞, 并按细胞 1

$\times 10^6$ 个/mL 接种于 15 mL 只含 1 000 U/mL IL-2 单一细胞因子和添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐的 X-VIVO15 培养基中继续培养 9 d, 培养过程中每 3 d 向培养瓶中补加 1 倍量的含 1 000 U/mL IL-2 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐的培养基, 并根据需要转移至适当的大容量培养瓶中, 总共培养 14 d 时收获细胞并以台盼蓝染色法计数细胞。

1.6 NK 细胞免疫表型及重要功能性分子表达检测 流式细胞术检测: 取体外培养 14 d 的细胞, 每个反应取 10^6 个细胞, 600 g 离心 5 min 去除培养基, 将细胞重悬于 100 μL 含 1% BSA 的 PBS 中, 加入相应的荧光标记抗体, 室温孵育 20 min, 600 g 离心 5 min 去除染液后, 用含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 1 次, 将细胞重悬于 300 μL 含 1% BSA 的 PBS 中上机分析 17 种分子——Percp-Vio700 标记抗人 CD3, APC 标记抗人 CD56 和 CD16, PE 标记抗人 CD158a、CD158b、CD158e/k、CD57、CD69、CD314(NKG2D)、CD94、CD335(NKp46)、CD337(NKp30)、CD336(NKp44)、CD226(DNAM-1)、CD62L、Perforin 和 Granzyme B——的表达情况, 每种抗体反应设相应的荧光标记的通用型同型抗体 REA Control-PE、REA Control-APC、REA Control-PerCP-Vio700 为对照, 其中 Perforin 和 Granzyme B 2 种分子为胞内表达, 染色前使用 Inside Stain 试剂盒(130-090-477, 德国 Miltenyi 公司)按照说明书固定 20 min 后, 使用 PE 标记抗人 Perforin、抗人 Granzyme B 在试剂盒提供的含表面活性剂的缓冲液中破膜染色 10 min, 800 g 离心 5 min 去除染液后, 用含 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 1 次, 将细胞重悬于 300 μL 含 1% BSA 的 PBS 中上机分析 Perforin 和 Granzyme B 的表达情况。

1.7 NK 细胞对肿瘤细胞系的细胞毒作用检测 使用 LDH 释放法分析所培养细胞是否具有对肿瘤细胞杀伤毒性^[9], 具体操作步骤严格按 CytoTox 96 试剂盒操作: 将体外培养后的细胞与对数期生长的 K562 细胞(1×10^5 个/mL)按效靶比 1:1、2:1、5:1 和 10:1 混合, 加入圆底 96 孔培养板中, 250 g 离心 4 min, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h, 250 g 离心 4 min 收集培养上清 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 转入新的平底 96 孔酶标板中, 加入 LDH 底物显色溶液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温孵育 30 min 后加入反应终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 酶标仪检测各孔 490 nm 的吸光度值; 同时设靶细胞的自然释放孔、靶细胞最大释放孔、培养基对照孔、效应细胞自然释放孔, 设 4 复孔/组细胞。杀伤率 = (实验组 OD 值 - 效应细胞自然释放 OD 值 - 靶细胞自然释放 OD 值) / (靶细胞最大释放 OD 值 - 靶细胞自然释放 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.8 统计学分析 采用 FlowingSoftware2.0 软件(芬兰 Turku 大学)分析荧光染色后的细胞表型和重要功能分子的表达; 根据软件计算出的每个标本中检测的分子表达的百分比, 计算“均值 \pm 标准差”, 并绘制相关的图表, 数据统计处理与图表绘制采用 GraphPad Prism 5.0 软件(美国 GraphPad Software 公司)。

2 结果

2.1 体外扩增培养的 UCBMC 显示 NK 细胞的表型及其生长的动力学特征 从 6 份脐血中提取的 UCBMC 培养 14 d 时, 细胞呈现出带有凸起的椭圆形状, 并伴有多个细胞聚集

现象(图 1), 细胞数量从 4×10^6 个增至 $[3.6-5.5(4.6 \pm 0.52)] \times 10^8$ 个, 扩增了 91-137(116 ± 13.1) 倍; 扩增后 NK 细胞(CD3⁻CD56⁺ 细胞)的比例 85.6%-95.5% (90.2 ± 3.4)%; 培养 7-14 d 时细胞增殖最快, >14 d 细胞增加数量趋缓(图 2-3)。

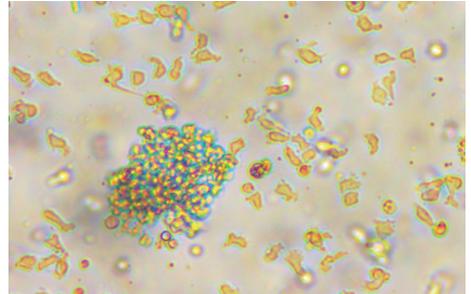


图 1 UCBMC 在体外培养 14 d 的光学显微镜观察

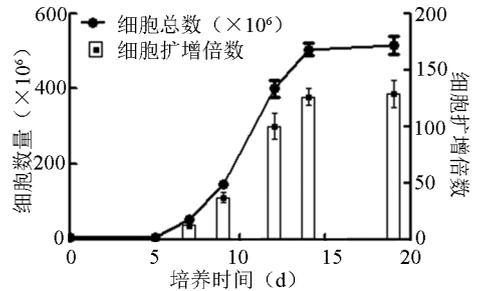


图 2 体外培养的 UCBMC 生长曲线及细胞相应的扩增倍数

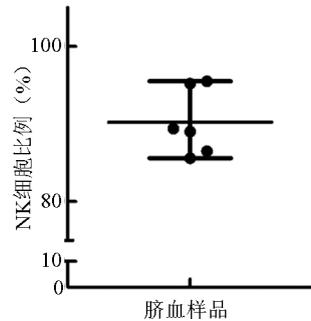


图 3 UCBMC 扩增产物中 NK(CD3⁻CD56⁺) 细胞比例

2.2 NK 细胞重要功能性分子的测定 共检测 16 种与 NK 细胞表型和功能相关的蛋白分子, 包括与 NK 细胞抑制性功能极相关的杀伤细胞免疫球蛋白样受体(the killer cell immunoglobulin-like receptor KIR) CD158a、CD158b 和 CD158e/k 及 CD94(表 1), 与 NK 细胞表面激活功能相关的 CD16、CD314(NKG2D)、CD335(NKp46)、CD336(NKp44)、CD337(NKp30)、CD69 及 CD226(DNAM-1)(表 2), 与 NK 细胞迁移有关的 CD62L 以及与 NK 杀伤有关的 Perforin 和 Granzyme B](表 3)。扩增后的 UCBMC 表达了 NK 细胞大部分重要的功能性分子(如 KIR 受体、NCR 受体及 Perforin 和 Granzyme B 等分子)。但其中 CD57 和 CD336 这 2 种表面分子表达比例非常低(表 2-3, 图 4)。

表 1 UCBMC 扩增产物中与 NK 细胞抑制性功能

| | 相关分子的检测 (n=6, %) | | |
|--------|----------------------------|----------------------|------------------------|
| | CD94CD158a (KIR2DL1) | CD158b (KIR2DL2/DL3) | CD158e/k (KIR3DL1/DL2) |
| 阳性细胞比例 | 94.1 \pm 2.171.4 \pm 4 | 52.1 \pm 2.2 | 50.3 \pm 6.9 |

表 2 UCBMC 扩增产物中与 NK 细胞激活功能相关分子的检测

(n=6, %)

| | CD16 | CD69 | CD314 (NKG2D) | CD337 (NKp30) | CD336 (NKp44) | CD335 (NKp46) | CD226 (DNAM-1) |
|--------|----------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 阳性细胞比例 | 91.2±2.6 | 95.6±2.8 | 94.2±1.7 | 94.6±1.5 | 7.1±1 | 26.6±4.1 | 97.6±1.3 |

表 3 UCBMC 扩增产物中 NK 细胞标志物及与杀伤、迁移功能相关分子的检测 (n=6, %)

| | CD56 | Perforin | Granzyme B | CD57 | CD62L |
|--------|----------|----------|------------|---------|----------|
| 阳性细胞比例 | 90.2±3.4 | 86.9±2.7 | 94.1±2.9 | 4.2±0.9 | 12.8±3.4 |

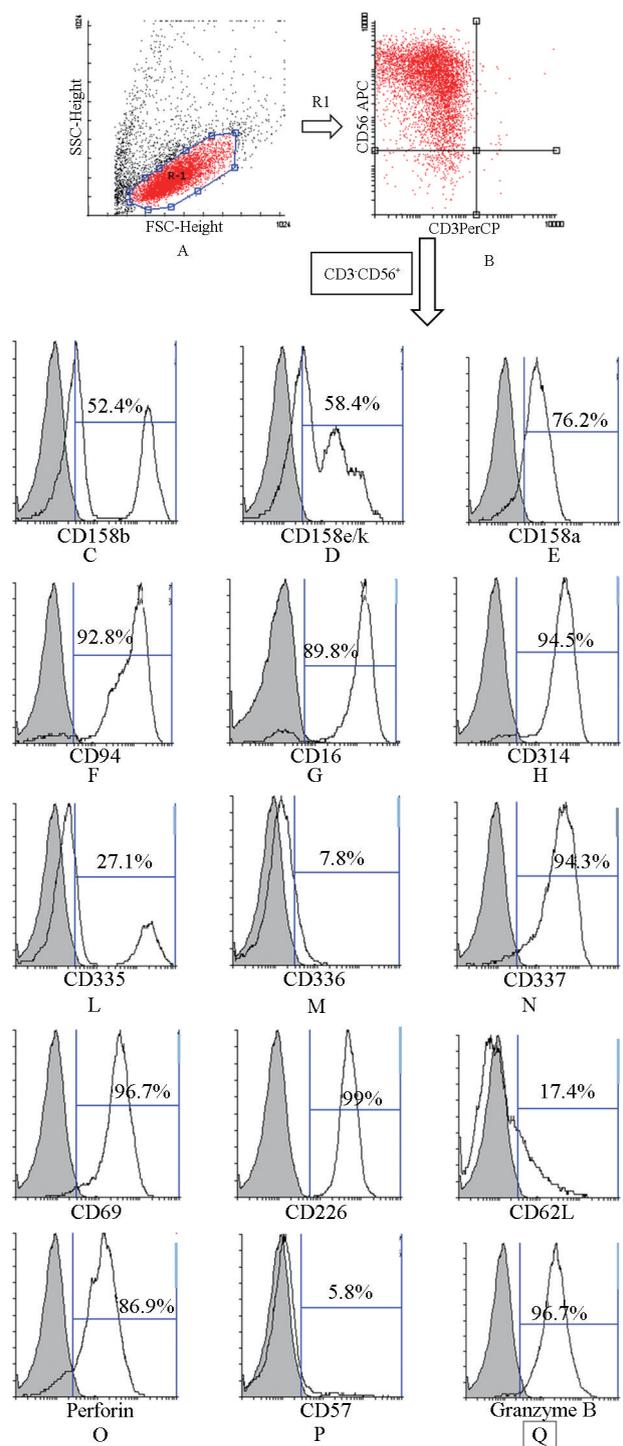


图 4 UCBMC 体外扩增培养 14 d 时的 NK 细胞重要标志物及功能性分子的表达

2.3 NK 细胞对 K562 细胞杀伤作用的测定 UCBMC 的扩增产物对靶细胞 K562 细胞在体外的杀伤功能: 在 4 个效靶比试验中, 上清中 LDH 的活性随效靶比的提高而升高, 呈剂

量依赖型; 换算成杀伤率后从效靶比为 1 : 1 的 (20.5 ± 3.1)% 上升到 10 : 1 的 (79.0 ± 7.8)% (图 4)。

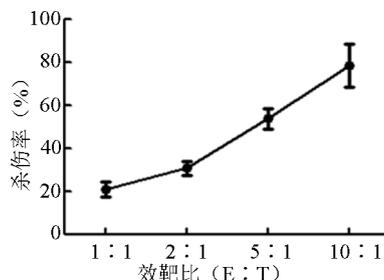


图 5 UCBMC 体外扩增的 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用随效靶比的增高而增加 (n=6)

3 讨论

近年来 NK 细胞在 HSCT 治疗肿瘤中的中的作用越来越受到重视, 以脐血库保存的脐血为起始材料制备 NK 细胞的体外扩增技术已经成为近期国内外 NK 细胞临床应用研究的热点之一^[7-8, 11-12]。Spanholtz 等^[8] 利用从脐血中分离的 CD34⁺ 细胞结合 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, flt3L)、IL-15 等 9 种细胞因子制备了高纯度的 NK 细胞, 但该 NK 细胞产物中 CD16⁺ 细胞仅占 5% 左右, 提示该 NK 细胞在发挥抗体介导的细胞毒 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 功能可能会存在问题。还有研究者使用不同形式的滋养细胞对脐血中纯化后的细胞做体外培养和扩增, 也获得了一定收率的 NK 细胞^[7, 11]。然而这些扩增 NK 细胞方法的共同特点是在细胞扩增前需要对脐血中的 NK 细胞或 CD34⁺ 细胞做分离纯化, 同时在细胞培养全程需要持续加入多种细胞因子, 细胞培养的成本较高。我们在分析比较 IL-2、IL-12、IL-15 和 IL-21 等细胞因子在 NK 细胞生长分化中的作用的基础上^[13], 摸索建立了 1 种简便、低成本的 UCBMC 体外制备 NK 细胞方法, 该法无需在扩增前对脐血中的 NK 细胞分离纯化, 而直接扩增; 同时在 NK 细胞被启动激活后, 培养 5 d 后只用含 IL-2 的培养基即可维持 NK 细胞的进一步生长, 降低了细胞培养的成本; 扩增 UCBMC 中的 NK 细胞的平均比例在 90.2% (图 3), 这种细胞扩增培养方法简化了操作步骤, 适合大规模临床级的 NK 细胞的制备。

相对于成人外周血中的 NK 细胞, 脐血中的 NK 细胞属于幼稚型 NK 细胞^[14]; 某些与 NK 细胞杀伤功能相关的分子如 Granzyme B 阳性细胞所占比例相对较低, 造成对 K562 的杀伤能力小于 PBNK 细胞^[15-16]。NK 细胞表面不同分子的表达与其功能密切相关, 表达某些分子 (如不同型别的 KIR 分子) 的异源性 NK 细胞进入受体体内后会产生负面的免疫反应, 如免疫抑制等^[17], 因此检测 NK 细胞表面的重要分子的表达不仅可以说明 NK 细胞的潜在功能, 而且可以为扩增培养 NK 细胞的临床应用提供参考。我们通过对采用上述方法制备的 UCBMC 扩增物的检测发现, 其表面表达有重要

NK 功能分子标志物(图 4),如主要的 KIR 分子、NK 激活性受体及与 NK 细胞杀伤有关的胞内分子如 Granzym B 和 Perforin 等(表 1—3);CD16 的表达比例高达 89.8%(图 4-G),较之于从 CD34⁺ 细胞制备的 NK 细胞,我们制备的 NK 细胞中 CD16 的表达比例明显更高,提示采用本方法扩增培养的这些 NK 细胞更有利于肿瘤细胞的识别与清除,而这可能是我们在培养初始阶段使用 NK 细胞激活因子 IL-2、IL-12 和 IL-15 综合作用的结果^[13]。进一步测定这种 NK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用显示:随着效靶比的增高而增强,证明这种细胞具有体外杀伤 K562 的功能(图 5)。

我们对所扩增的 NK 细胞只检测了其对于 K562 细胞系的杀伤作用,未检测针对其他类型的肿瘤细胞(尤其是实体肿瘤来源的细胞系)的杀伤作用,故尚无法为下一步动物模型体内肿瘤杀伤实验提供依据,这是本研究的不足之处;另外几种细胞因子的使用剂量仍需进一步优化。下一步我们将优化 UCBMC 体外扩增培养 NK 细胞的体系,探讨该方法体系在 NK 细胞生长与激活过程中的分子机制,深入研究该扩增产物(NK 细胞)中不同细胞亚群在肿瘤杀伤与病毒清除中的作用及其分子机制,并测试扩增产物在动物模型体内对肿瘤的杀伤能力。

参 考 文 献

- [1] Somers JA, Brand A, van Hensbergen Y, et al. Double umbilical cord blood transplantation: a study of early engraftment kinetics in leukocyte subsets using HLA-specific monoclonal antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013, 19(2): 266-273.
- [2] Saliba RM, Rezvani K, Leen A, et al. General and virus-specific immune cell reconstitution after double cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(7): 1284-1290.
- [3] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 2001, 22(11): 633-640.
- [4] Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5): 329-339.
- [5] Dahlberg CIM, Sarhan D, Chrobok M, et al. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front Immunol*, 2015, 6:605. doi: 10.3389/fimmu.2015.00605.
- [6] Perez SA, Sotiropoulou PA, Gkika DG, et al. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood*, 2003, 101(9): 3444-3450.
- [7] Shah N, Martin-Antonio B, Yang H, et al. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76781. doi:10.1371/journal.pone.0076781.
- [8] Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive Cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS ONE*, 2010, 5(2): e9221. doi:10.1371/journal.pone.0009221.
- [9] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Immunol Methods*. 1983, 64(3): 313-320.
- [10] Brahmi Z, Hommel-Berrey G, Smith F, et al. NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum Immunol*, 2001, 62(8): 782-790.
- [11] Vasu S, Berg M, Davdison-Moncada J, et al. A novel method to expand large numbers of CD56+ natural killer cells from a minute fraction of selectively accessed cryopreserved cord blood for immunotherapy after transplantation. *Cytotherapy*, 2015, 17(11): 1582-1593.
- [12] 罗琦,尹洁,李杨,等.人脐带血造血干细胞体外分化为 NK 细胞的效率及功能检测. *天津医药*, 2015, 43(3): 225-228.
- [13] Alnabhan R, Madrigal A, Saudemont A, et al. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. *Cytotherapy*, 2015, 17(1): 73-85.
- [14] Gaddy J, Broxmeyer HE. Cord blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12. *J Inter Cytokine Res*, 1995, 15(6): 527-536.
- [15] Wang Y, Zheng X, Wei H, et al. High expression of NKG2A/CD94 and low expression of granzyme B are associated with reduced cord blood NK cell activity. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(5): 377-382.
- [16] Dalle JH, Wagner E, Blagdon M, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*, 2005, 57(5): 649-655.
- [17] 刘佳,孙雪冬,陆颖,等.异源反应性 NK 细胞对输血相关免疫抑制作用的初步研究. *中国输血杂志*, 2010, 23(11): 917-921. (2017-12-25 收稿, 2018-07-05 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net