

体外扩增的自然杀伤细胞特点及其杀伤活性研究

陈稳,毛菊,杨雯雯,胡世莲,程民

[中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院),安徽省老年医学研究所,肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室,合肥230001]

[摘要] **目的** 评价体外扩增的自然杀伤细胞(NK)表型、扩增倍数、杀伤活性以及安全性。**方法** 利用NK细胞体外扩增试剂盒对外周血单个核细胞进行刺激,特异性扩增NK细胞,利用流式细胞术、杀伤实验等检测扩增后NK细胞的特点及抗肿瘤活性;并检测NK细胞外源性因子污染情况等。**结果** 体外培养16~21 d后,细胞扩增500倍以上,总数可达 1×10^{10} 以上,其中 $CD3^-CD56^+$ NK细胞占90%以上,扩增后的NK细胞对Ho8910、A549、K562、HepG2及SK-MES-1细胞均有较高的杀伤活性。同时,扩增后NK细胞未检测到细菌、病毒、支原体等外源性病原体污染。**结论** NK细胞具有较高的体外杀伤活性且无外源性因子污染。

[关键词] 肿瘤;杀伤细胞,天然;体外研究;免疫活性

中图分类号:R73-36 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.04.025

The study on the characteristics and the anti-tumor effects of the natural killer cells expanded in vitro

Chen Wen, Mao Ju, Yang Wenwen, Hu Shilian, Cheng Min (The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Gerontology Institute of Anhui Province, Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Hefei 230001, China)

Corresponding author: Cheng Min, Email: chengmin@ustc.edu.cn

[Abstract] **Objective** To evaluate the phenotype, expansion fold, cytotoxic activity and safety of the natural killer cells (NK cells) expanded in vitro. **Methods** NK cells reagent kit was used to specifically induce the proliferation of NK cells from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Flow cytometry assay (FCM) and in vitro cytotoxicity assay were used to detect the phenotype and the anti-tumor activity of the expanded NK cells. Additionally, the contamination of the exogenous factors of NK cells were also detected. **Results** After 16-21 days in vitro culture, the PBMC expanded over 500 times to a total number more than 1×10^{10} , in which more than 90% of the cells are $CD3^-CD56^+$ NK cells. The expanded NK cells displayed high cytotoxicity against Ho8910, A549, K562, HepG2 and SK-MES-1 cells in vitro. Additionally, no contamination of bacteria, fungus, mycoplasma, or virus was detected in the expanded NK cells. **Conclusion** The expanded NK cells have high antitumor activity without any toxic side effects in vitro.

[Keywords] Neoplasms; Killer cells, natural; In vitro; Immunocompetence

肿瘤细胞免疫治疗技术作为一种新兴的肿瘤治疗手段,具有杀瘤识别谱广、抗癌杀伤力高、毒副作用小等特点。自然杀伤细胞(NK)通过自身表面活化性受体与肿瘤细胞表面配体之间的作用,可不受MHC分子的限制,进而识别MHC-I类分子表达下调或缺失的肿瘤细胞并发挥杀伤功能。由于NK细胞在外周血中占有较小的比例,占淋巴细胞的5%~15%,并且肿瘤患者体内NK细胞的功能存在不同程度的缺失,难以产生良好抗肿瘤效果,需要通过

体外培养增加NK细胞的数量和改善NK细胞的功能^[1-2]。因此,通过有效的体外扩增,获得足够数量、高纯度、高抗肿瘤活性并可用于临床治疗的NK细胞具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 外周血单个核细胞分离与培养试剂 本研究共收集10份健康志愿者外周血标本,50毫升/份,EDTA抗凝,无菌采集。淋巴细胞分离液

基金项目:安徽省科技攻关项目(1501041142);肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室绩效补助(2017070503B041)

作者简介:陈稳,检验技师,Email:chenwen7396@163.com

通信作者:程民,副教授,硕士生导师,Email:chengmin@ustc.edu.cn

购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, NK 细胞体外扩增试剂盒购自杭州中赢生物医疗科技有限公司, GT-T551 H3 培养基购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 重组人白细胞介素-2 购自上海华新生物高科技有限公司, 硫酸庆大霉素注射液购自福建汇天生物药业有限公司。所有健康志愿者均签署知情同意书, 研究方案经中国科学技术大学附属第一医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 细胞株及培养基 SK-MES-1 细胞、A549 细胞、HepG2 细胞、K562 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC), Ho8910 细胞购自中科院上海细胞库。RPMI 1640、DMEM 液体培养基、胎牛血清、胰蛋白酶溶液等购自 HyClone 公司。

1.1.3 荧光抗体等 Anti-CD16 (FITC)、anti-CD8 (PE)、anti-CD3 (PerCP-Cy5.5)、anti-CD56 (APC) 抗体、同种型抗体购自 BD 公司, Mouse IgG 购自 Biotest 公司, PBS 磷酸盐缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.4 细胞毒活性检测试剂 CellTrace Far Red 试剂盒购自 Invitrogen 公司, TritonX-100 购自 Sigma 公司。

1.1.5 外源性因子检测试剂 硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、精氨酸支原体肉汤培养基、支原体琼脂培养基、支原体半流体培养基购自中国食品药品检定研究院, 人类免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒检测试剂盒等购自达安基因股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离与扩增 采用密度梯度离心法分离获取外周血单个核细胞, 使用 30 mL NK 细胞培养液 (GT-T551 H3 培养基 + 200 IU/mL IL-2 + 1.0% 自体血浆 + 80 u/mL 庆大霉素) 重悬细胞沉淀, 加入试剂 A1, 置于 75 cm² 培养瓶中, 37 °C、5.0% CO₂、饱和湿度培养, 期间添加培养液。第 8 天, 向细胞培养液中加入试剂 A2, 继续培养, 期间根据细胞生长情况添加 NK 细胞培养液。

1.2.2 细胞表型检测 将待检测细胞重悬为单细胞悬液, 1 × 10⁶ 个/管, 每管加入 0.1 μg/μL mIgG 溶液 2.0 μL, 室温 15 min; 加入 CD3、CD56 等荧光抗体, 4 °C, 避光标记 30 min; 加入 1 × PBS 溶液洗涤细胞 (3500 r/min, 4 °C, 5 min), 弃上清; 使用 300 μL

1 × PBS 溶液重悬细胞, 上机检测。

1.2.3 细胞毒活性检测 使用红色荧光染料标记靶细胞, 37 °C, 避光孵育 20 min, 洗涤细胞 3 次 (3000 r/min, 25 °C, 10 min), 调整细胞浓度为 1 × 10⁵/mL, 在无菌 FACs 管中加入标记的靶细胞, 每管加 100 μL。根据效应细胞与靶细胞的比例调整效应细胞 (NK 细胞) 的浓度, 并向各管中加入 NK 细胞悬液, 100 微升/孔。每个实验设置 4 个重复。37 °C, 5.0% 二氧化碳, 培养 4 h。FACs 仪检测靶细胞的荧光强度, 区分荧光阳性/阴性的靶细胞。计算杀伤活性。

1.2.4 外源性因子检测 参照 2015 年版《中国药典》, 检测培养 21 d 后 NK 细胞及培养上清中细菌、病毒、支原体等。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。观测资料均为计量数据, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较为成组 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。使用 ORIGIN 7.5 软件绘图并解析。

2 结果

2.1 体外扩增的 NK 细胞生长情况 将分离得到的外周血单个核细胞分别接种至 NK 细胞培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 培养, 根据细胞生长情况补充 NK 细胞培养液, 期间进行细胞计数, 绘制生长曲线。结果表明, NK 细胞呈悬浮状态生长, 有成团细胞, 细胞状态及折光性好 (图 1A), 台盼兰染色着色细胞小于 10%, 接种 7 d 后 NK 细胞出现快速增殖, 培养至 21 d 左右细胞增殖速度减慢, 扩增倍数在 500 倍以上, 总数超过 1 × 10¹⁰ 个 (图 1B), 细胞数量可以满足临床输注要求。

2.2 体外扩增的 NK 细胞表型及细胞毒活性 利用流式细胞术检测体外培养不同时间后 NK 细胞表面 CD3 及 CD56 等分子的表达情况, 随着培养天数的增加, CD3⁻CD56⁺ NK 细胞比例不断升高, 21 d 后, CD3⁻CD56⁺ NK 细胞占有细胞的 90% 以上 (93.2% ± 2.30%) (图 2A, 图 2C)。杀伤实验结果如图 2B 所示, 培养 21 d 后 NK 细胞对 SK-MES-1、A549、HepG2、K562 及 Ho8910 等细胞均有不同程度的杀伤活性, 在效/靶比为 50:1 时, NK 细胞对 A549 细胞、K562 细胞和 Ho8910 细胞的杀伤效率在 60% 以上; 对 HepG2 细胞和 SK-MES-1 细胞的杀伤效率在 45% 以上。

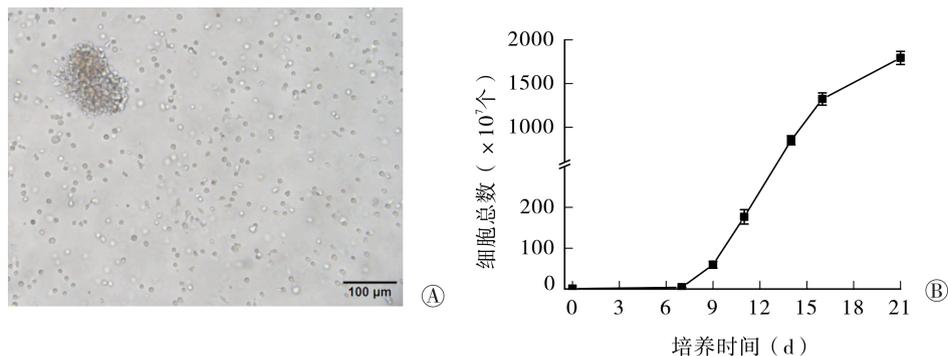


图1 体外培养的NK细胞形态及生长曲线(n=10) A示NK细胞呈悬浮状态生长,有成团细胞,细胞状态及折光性好(×100); B示台盼兰染色着色细胞小于10%,接种7d后NK细胞出现快速增殖,培养至21d左右细胞增殖速度减慢

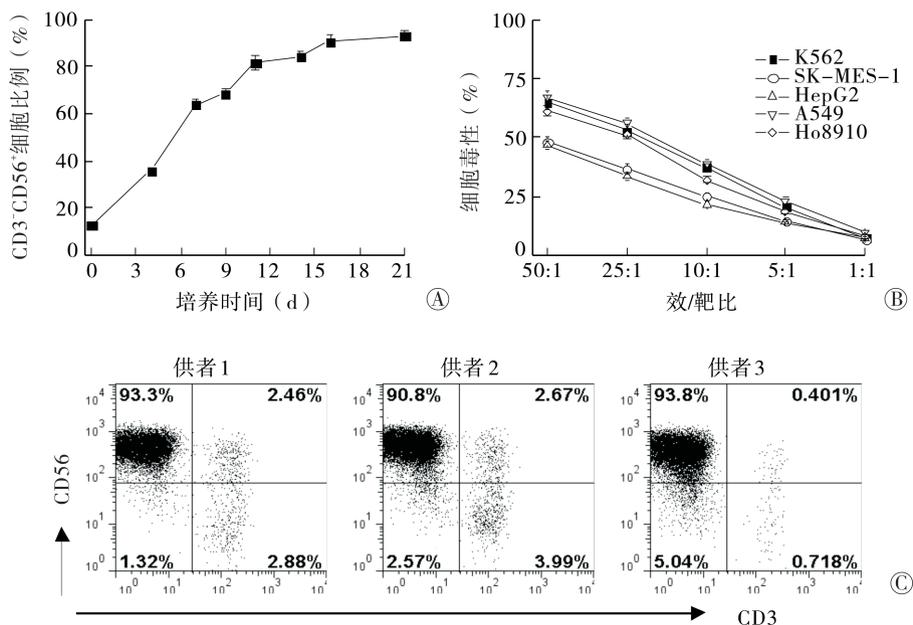


图2 体外扩增的NK细胞纯度及其细胞毒活性 A示培养不同天数NK细胞纯度变化情况; B示培养21d后NK细胞杀伤能力; C示培养21d后NK细胞比例

2.3 外源性因子检测结果

2.3.1 细菌、真菌检测 取体外扩增21d后NK细胞培养上清。经过14d培养后,胰酪大豆胨液体培养基、硫乙醇酸盐液体培养基中均无真菌或细菌生长,结果表明,NK细胞不存在细菌及真菌污染。

2.3.2 支原体检查 取体外扩增21d后NK细胞培养上清分别接种于不同支原体培养基中,21d后,各接种管中均无支原体或其他异物生长,结果表明NK细胞中不存在上述培养基所能培养的支原体污染。

2.3.3 病毒因子检测 使用乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、丙型肝炎病毒及人巨细胞病毒检测试剂盒检测培养21d后的NK细胞及其

培养上清,检测结果均为阴性。

3 讨论

人外周血NK细胞占总淋巴细胞的5%~15%,表型为CD3⁻CD56⁺,NK细胞发挥杀伤活性时无MHC限制性,亦不需要特异性抗原的刺激,在机体抗肿瘤免疫中扮演重要的角色。同时,NK细胞与机体其他多种免疫细胞相互作用,发挥免疫调节功能,调节机体的免疫状态^[3-4]。NK细胞的杀伤特性及其免疫调节功能使其成为肿瘤免疫治疗强有力的工具,自体NK细胞输注用于肿瘤临床治疗已有三十多年的历史,但临床治疗效果并不理想^[5-6]。近年来,供者来源(同种异体)的NK细胞用于肿瘤治疗已引起了人们的重视,并对多种恶性肿瘤具有较好

的治疗效果^[7-10]。由于肿瘤患者体内 NK 细胞的数量和功能均存在一定程度的缺陷,不足以有效的发挥抗肿瘤功能,体外扩增是有效的增加 NK 细胞数量、改善 NK 细胞功能的手段,但不同的培养方法对 NK 细胞的功能和活性影响较大,使用有效的 NK 细胞体外扩增方法,获得足够数量、高纯度、高杀瘤活性的 NK 细胞,并将其用于肿瘤患者的临床治疗具有重要意义^[11-13]。

本研究利用人 NK 细胞体外扩增试剂盒对外周血单个核细胞进行刺激和培养,建立了有效的 NK 细胞扩增方法,体外培养 16~21 d 后,NK 细胞纯度(CD3⁻CD56⁺ 细胞比例)及活率均在 90% 以上,总数在 1 × 10¹⁰ 以上,可以满足肿瘤患者临床输注的需要。培养过程中所用的 NK 细胞培养液为无血清培养基,不含动物血清,可以避免异种血清来源的微生物污染。培养 21 d 后的 NK 细胞对 A549 细胞、K562 细胞和 Ho8910 细胞的杀伤活性较强,对 HepG2 细胞和 SK-MES-1 细胞也具有较强的杀伤活性。同时,体外培养 21 d 后,NK 细胞及其上清液中均未检测到细菌、真菌、支原体及病毒因子等,上述结果为 NK 细胞的临床提供了重要的依据。

综上所述,本研究所建立的 NK 细胞体外扩增方法具有细胞生长速度快、数量多、纯度高、对肿瘤细胞的杀伤力强等特点。供者来源的 50 mL 外周血分离得到的单个核细胞,经体外培养 16~21 d 后,CD3⁻CD56⁺ NK 细胞数量、纯度及活率等均可满足临床治疗的需要,NK 细胞对多种肿瘤细胞具有较强的杀伤活性,同时不存在细菌、真菌、支原体及病毒等的污染,具有很好的临床应用前景。

参考文献

[1] MONTALDO E, VACCA P, VITALE C, et al. Human innate lymphoid cells [J]. Immunol Lett, 2016, 179(1): 2-8.

[2] LEE H H, KANG H, CHO H, et al. Natural killer cells and tumor metastasis [J]. Arch Pharm Res, 2017, 40(9): 1037-1049.

[3] NAJIMA Y, YOSHIDA C, IRIYAMA N, et al. Regulatory T cell inhibition by dasatinib is associated with natural

killer cell differentiation and a favorable molecular response; the final results of the D-first study [J]. Leuk Res, 2018, 66: 66-72.

[4] CHESTER C, FRITSCH K, KOHRT H E, et al. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy [J]. Front Immunol, 2015, 6: 601.

[5] LAW T M, MOTZER R J, MAZUMDAR M, et al. Phase III randomized trial of interleukin-2 with or without lymphokine-activated killer cells in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma [J]. Cancer, 1995, 76(5): 824-832.

[6] BURNS L J, WEISDORF D J, DEFOR T E, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial [J]. Bone Marrow Transplant, 2003, 32(2): 177-186.

[7] KOLB H J, SIMOES B, SCHMID C. Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies [J]. Curr Opin Oncol, 2004, 16(2): 167-173.

[8] BIGLEY A B, SIMPSON R J. NK cells and exercise: implications for cancer immunotherapy and survivorship [J]. Discov Med, 2015, 19(107): 433-445.

[9] CHENG M, CHEN Y, XIAO W, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2013, 10(3): 230-252.

[10] RUBNITZ J E, INABA H, KANG G, et al. Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62(8): 1468-1472.

[11] CAROTTA S. Targeting NK cells for anticancer immunotherapy: clinical and preclinical approaches [J]. Front Immunol, 2016, 7: 152.

[12] CHABANNON C, MFARREJ B, GUIA S, et al. Manufacturing natural killer cells as medicinal products [J]. Front Immunol, 2016, 7: 504.

[13] GRANZIN M, WAGNER J, KÖHL U, et al. Shaping of natural killer cell antitumor activity by Ex vivo cultivation [J]. Front Immunol, 2017, 8: 458.

(收稿日期: 2017-09-20)