

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.012

· 临床研究 ·

IL-7 和 IL-21 修饰的 NK-92MI 细胞对其自身及正常人外周血 T 细胞的影响

张平¹, 李亚芬², 安钢力^{1△}, 杨林^{1,2△} (1. 苏州大学医学部 唐仲英血液学研究中心, 江苏 苏州 215123; 2. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:** 研究经 IL-7 和 IL-21 修饰后的 NK-92MI 细胞的增殖和细胞毒性及其对正常人外周血中 T 细胞的影响。**方法:** 通过基因工程将 IL-7 和 IL-21 基因片段构建到电转载体上, 通过电转的方式构建了 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞。以细胞计数法和 CFSE/7-AAD 流式术分别对 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞体外增殖活性和细胞毒性进行比较。将正常人 PBMC 与 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞体外共培养后, 用流式细胞术检测 PBMC 中 T 细胞的表型变化; 同时检测正常人活化后的 T 细胞与 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞共存时相互的细胞毒性以及对肿瘤细胞的毒性比较。**结果:** 成功构建了高表达 IL-21 的 NK-92MI/IL-21 细胞和同时高表达 IL-7 和 IL-21 的 NK-92MI/IL-7&21 细胞; NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞对 Jurkat 和 K562 细胞的细胞毒性没有变化, 但是 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞相对于亲本细胞 NK-92MI 的体外增殖活性有所提高; NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞对 PBMC 中 T 细胞的活化有一定的促进作用; 活化后的 T 细胞与 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞相互之间几乎无细胞毒性; 同时, 当 T 细胞和 3 种 NK 细胞共存时, T 细胞不影响 NK 细胞对 K562 细胞的细胞毒性。**结论:** 基因工程修饰的 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞体外增殖活性有所提高, 它们对外周血 T 细胞的活化有一定的刺激和促进作用; T 细胞和 NK-92MI 细胞之间无细胞毒性, 同时活化 T 细胞的存在不影响 NK-92MI 细胞的细胞毒性。

[关键词] NK-92MI 细胞; NK-92MI/IL-21 细胞; NK-92MI/IL-7&21 细胞; 外周血单个核细胞; 细胞毒性

[中图分类号] R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0281-07

Effects of IL-7 and IL-21 modified NK-92MI cells on themselves and T cells from normal human peripheral blood

ZHANG Ping¹, LI Yafen², AN Gangli^{1△}, YANG Lin^{1,2△} (1. The Cyrus Tang Hematology Center, Medical department, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Persongen Bio Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd., Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether the proliferation and cytotoxicity of NK-92MI cells can be improved by IL-7 and IL-21 genes modification, and determine the effects of this genetically modified NK-92MI cells on T cells from normal human peripheral blood. **Methods:** IL-7 and IL-21 gene fragments were constructed into electroporation vector by genetic engineering method, and NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells were constructed by electroporation transfection. The in vitro proliferation and cytotoxicity of NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells were measured by cell count and flow cytometry assays. Then, normal human PBMCs were co-cultured with NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells in vitro respectively, and the phenotype change of T cells was measured by flow cytometry. In addition, the cytotoxicity between the activated T cells and three NK-92MI cell lines (NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells) as well as the cytotoxicity of the three NK-92MI cells on tumor cells after co-incubation with activated T cells were detected. **Results:** NK-92MI/IL-21 cell line (highly expressing IL-21) and NK-92MI/IL-7&21 cell line (highly expressing both IL-7 and IL-21) were successfully constructed. The toxicity of NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-

[基金项目] 国家重点研发计划(No.2016YFC1303403); 国家自然科学基金资助项目(No.31471283); 江苏高校血液学协同创新中心(No. XYXT2015304); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No.2016YFC1303403), the National Natural Science Foundation of China (No. 31471283), the Collaborative Innovation Center for Hematology of Jiangsu Higher Education Institutions (No. XYXT2015304), and the Priority Academic Program Fund of Jiangsu Higher Education Institutions

[作者简介] 张平(1991-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗相关研究, E-mail: 18949922412@163.com

[通信作者] 安钢力(AN Gangli, corresponding author), 女, 硕士, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究, Email: gangli_an@suda.edu.cn; 杨林(YANG Lin, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗(包括 CAR-T, CAR-NK 技术)研究, E-mail: yanglin@suda.edu.cn。△共同通信作者

92MI/IL-7&21 cells on Jurkat and K562 cells showed no difference, while the proliferation of NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells was increased compared with NK-92MI cells. Furthermore, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells promoted the activation of T cells to a certain degree, and the activated T cells showed merely no cytotoxicity on NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells; Meanwhile, the activated T cells did not affect the cytotoxicity of the three NK cells (NK-92MI, NK-92MI/IL-21, and NK-92MI/IL-7&21 cells) on K562 cells under their co-existence. **Conclusion:** The in vitro proliferation of NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells were enhanced after gene modification, which could also stimulate and promote the activation of T cells from peripheral blood. The cytotoxicity assay showed that the activated T cells had no cytotoxicity on NK-92MI, NK-92MI/IL-21, and NK-92MI/IL-7&21 cells. Meanwhile, the presence of the activated T cells did not affect the cytotoxicity of NK-92MI cells.

[Key words] NK-92MI cell; NK-92MI/IL-21 cell; NK-92MI/IL-7&21 cell; PBMC; cytotoxicity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 281-287. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.012]

NK-92 细胞是从一位患有急性非霍奇金淋巴瘤的 50 岁白人男性患者的 PBMC 衍生来的一株 IL-2 依赖型 NK 细胞株^[1]。NK-92MI 细胞是通过转染得到的源自 NK-92 细胞的 IL-2 非依赖型的细胞株, 该株细胞对很多的恶性肿瘤细胞都有细胞毒性^[2]。近年来, NK 细胞在过继性细胞免疫治疗中表现出极大的应用前景^[3-5]。IL-7 主要来自骨髓和胸腺的基质细胞, 它对 B 细胞和 T 细胞的发育有着非常重要的作用。小鼠的基因敲除实验显示^[6-8], IL-7 在淋巴样细胞的存活中扮演着非常重要的作用。IL-21 主要是由 Th 细胞产生的细胞因子, 在固有免疫应答和适应性免疫应答中扮演重要角色, 可调节刺激巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞和细胞毒 T 细胞的分化、增殖和活化^[9-13]。本实验检测经 IL-7 和 IL-21 修饰后的 NK-92MI 细胞的增殖和细胞毒性是否有所提高, 同时观察其对正常人外周血中的 T 细胞有何影响, 为经基因修饰的 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞在过继性细胞免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器

NK-92MI、Jurkat 和 K562 细胞株购于 ATCC。MEM- α 培养基为 Gibco 公司产品, RPMI1640 培养基为 Thermo Scientific 公司产品, 胎牛血清(FBS)为 HyClone 公司产品, 支原体检测试剂盒为华安生物产品, CFSE 探针为 Invitrogen 公司产品, 7-AAD(7-aminoactinomycin D)为 BD Pharmingen 公司产品, 淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque 为 Pharmacia Piscataway NJ 产品, CD3、CD25、CD69、CD45RA 和 CCR7 等抗体均来自 BD Bioscience 公司。FACS Aria III 和 FACS Caliber 流式细胞仪为 BD Bioscience 公司产品, CO₂ 细胞培养箱为 Thermo 公司产品, 生物安全柜为 AIRTECH 公司产品, 凝胶成像系统为 Bio-rad 公司产品, 水平电泳槽为天能公司产品, 恒温摇床为培英公司产品, 电转仪为 LONZA 产品。

1.2 细胞培养

K562 细胞、Jurkat 细胞使用的培养基是 RP-

MI1640, 添加 10%FBS。NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞使用的培养基是 MEM- α 培养基, 添加 12.5%FBS、0.2 mmol/L 肌醇、0.02 mmol/L 叶酸和 0.01 mmol/L β -巯基乙醇。从正常人外周血中用 Ficoll 法提得 PBMC, 用 IL-2 和 2012 细胞(一种经人工改造过的 K562 细胞, 可刺激 T 细胞的活化, 使用前辐照, 不具有增殖能力)刺激 T 细胞活化。PBMC 及活化后的 T 细胞使用的培养基是 RPMI 1640, 添加 10%FBS。所有的细胞培养在 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中。

1.3 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞系的构建

在 NCBI 中查找到 IL-7(NP-000871.1) 和 IL-21(Q9HBE4.2) 的序列, 应用 SignalP 4.1 Server 软件和 Uniprot 软件进行处理, 通过基因合成方式合成 IL-7 和 IL-21 片段(目的片段), 将合成的 IL-7 和 IL-21 基因片段分别构建到 pHULK piggyBac N-Comet GFP 载体上, 成功构建了 IL-7-pHULK piggyBac N-Comet GFP 质粒和 IL-21-pHULK piggyBac N-Comet GFP 质粒。首先将 IL-21-pHULK piggyBac N-Comet GFP 质粒通过电转的方式电转 NK-92MI 细胞, 并通过流式细胞分选仪分选得到高表达 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-21 细胞。用 IL-7-pHULK piggyBac N-Comet GFP 质粒电转 NK-92MI/IL-21 细胞, 同样利用流式分选的方式分选得到同时高表达 IL-7 和 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-7&21 细胞。然后染上相应抗体在流式细胞分选仪上分选, 直至 IL-7 和 IL-21 的阳性率达 80% 以上。采用支原体 PCR 检测试剂盒对细胞系进行支原体检测^[14], 排除支原体对实验结果的干扰。

1.4 FSE/7-AAD 流式细胞术检测 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞的细胞毒性及体外增殖

取靶细胞于离心管中, PBS 重悬, 加微量 CFSE 于 37 °C 孵育 30 min, 取靶细胞 4×10⁵ 个于 24 孔板中, 再加入相应数量的效应细胞, 混匀, 终体系为 1.5 ml。效应细胞和靶细胞共培养, 然后去除上清, 用 PBS 洗

1遍,再PBS重悬后每组加入2 μ l 7-AAD,然后在FACSCalibur机器上进行检测。CFSE阳性细胞群为靶细胞,该群里边7-AAD阳性的细胞群所占比例即为靶细胞的死亡率^[15-16]。选择了对NK-92MI敏感的K562细胞和不敏感的Jurkat细胞作为细胞毒性试验的靶细胞,取NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞作为效应细胞,效靶比(E:T)为1:1,杀伤时间为4 h(每组平行对照3组)。分别取 5×10^5 个NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞(每组细胞平行对照3组)培养,每隔24 h后计数,总共计7次。

1.5 PBMC细胞与NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞共培养后的表型分析

提取3个正常人的外周血,分别提取PBMC细胞,将提得的PBMC计数分成5组(放于24孔板中培养,所用的培养基为RPMI 1640)。第1组放 1×10^6 个PBMC,不做任何处理,作为流式分析的阴性对照(在图3中标记为PBMC);第2组放 1×10^6 个PBMC,添加IL-2和2012激活和扩增T细胞,作为流式分析的阳性对照(在图3中标记为T Cell);第3组放 1×10^6 个PBMC,再加入 1×10^5 个NK-92MI细胞共培养(在图3中标记为NK92MI);第4组放 1×10^6 个PBMC细胞,再加入 1×10^5 个NK-92MI/IL-21细胞共培养(在图3中标记为NK92MI/IL21);第5组放 1×10^6 个PBMC,再加入 1×10^5 个NK-92MI/IL-7&21细胞共培养(在图3中标记为NK92MI/IL7&21)。分别在第0、3、7、10天做流式检测,测PBMC中T细胞的表型变化情况。将每组在相同的条件下染上相应的抗体,检测的抗体分别是CD3、CD25、CD69、CD45RA和CCR7。先用CD3抗体圈出CD3阳性的T细胞,再检测CD25、CD69、CD45RA和CCR7分子在不同时间和组别的表达情况。

1.6 T细胞与NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞共存时的细胞毒性情况

首先将正常人活化后的T细胞设为效应细胞,将K562、NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞作为靶细胞进行杀伤,效靶比为1:1,杀伤时间为12 h。然后将正常人活化后的T细胞作为靶细胞,用NK-92MI细胞作为效应细胞,效靶比为1:1,杀伤时间为12 h。接下来进行了以下杀伤试验:将K562细胞设为靶细胞,T细胞与NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞设为效应细胞。第1组设NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞为效应细胞,效靶比为1:1,杀伤时间为12 h;第2组设T细胞和NK-92MI、NK-92MI/IL-21、NK-92MI/IL-7&21细胞共同作为效应细胞,效靶比为1:1,杀伤

时间为12 h。

1.7 统计学处理

用软件GraphPad Prism5和Flow_V10统计软件,每组都至少进行了3次重复试验,组间比较用Student's-*t*检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞中IL-21和IL-7高表达

根据NK-92MI/IL-21细胞的流式分析结果,染IL-21抗体(APC荧光)后测得IL-21的阳性率为95.5%;CONT表示亲本的NK-92MI细胞染IL-21抗体作为对照(图1A);根据NK-92MI/IL-7&21细胞的流式分析结果,分别染IL-7抗体(APC荧光)和IL-21抗体(APC荧光)后测得IL-7的阳性率为79.9%,IL-21的阳性率为93.6%;CONT表示亲本的NK-92MI细胞染IL-7和IL-21抗体作为对照(图1B)。

2.2 NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞较亲本细胞NK-92MI的增殖活性有所提高

选择了对NK-92MI敏感的K562细胞和不敏感的Jurkat细胞作为细胞毒性试验的靶细胞,取NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞作为效应细胞(图2A、B)。结果显示,NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞对K562细胞和Jurkat细胞的杀伤差异无统计学意义,即表明当NK-92MI细胞表达IL-21或共表达IL-7和IL-21分子时,对其细胞毒性没有影响。

NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞的体外增殖数据是用软件GraphPad Prism5处理,结果(图2C)显示,共表达IL-7和IL-21分子时能够显著性的提高NK-92MI细胞的体外增殖能力;只表达IL-21分子的NK-92MI/IL-21细胞较亲本的NK-92MI细胞也用所提高。

2.3 NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21对PBMC中T细胞的增殖和活化有刺激和促进作用

流式细胞术检测结果(图3)显示,当PBMC细胞在体外与NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞共培养时,CD25分子的表达较阴性对照PBMC和共培养NK-92MI细胞组都有了明显的提高,特别是与NK-92MI/IL-7&21细胞共培养时尤为明显。结果表明NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞对PBMC细胞中T细胞的活化有一定的刺激作用。同时,在实验过程中,可以明显观察到与NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞共培养组的PBMC较对照组有所增殖。但是在CD69、CD45RA、CCR7分子

的变化上未观察到明显的规律。

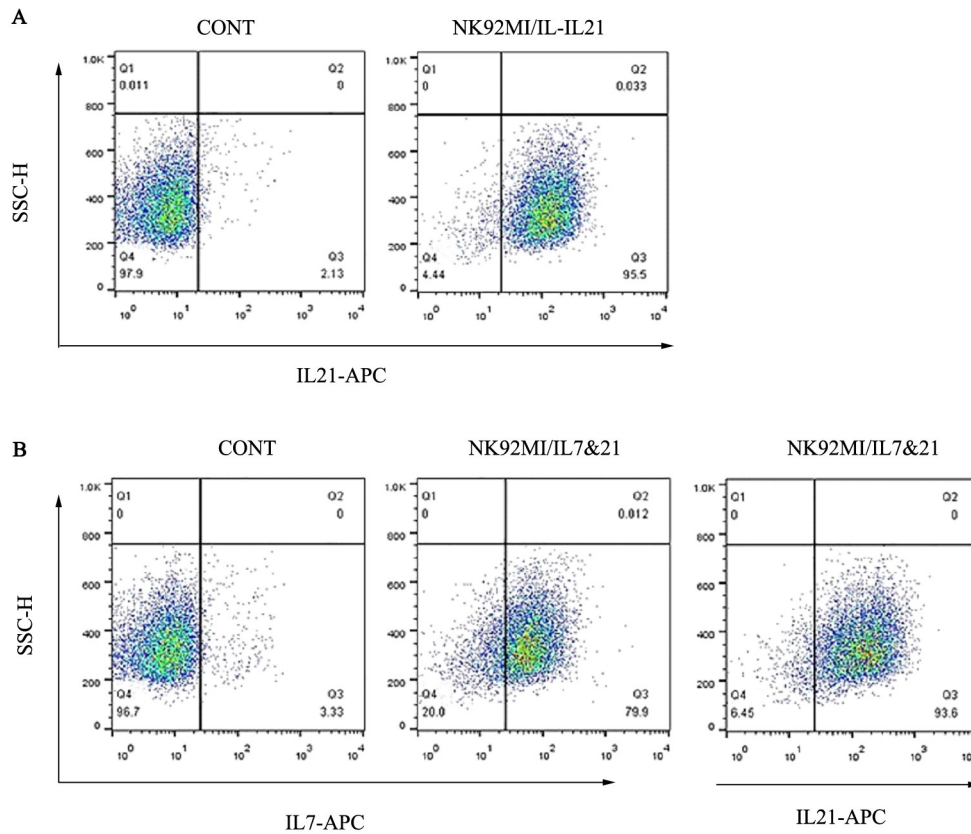
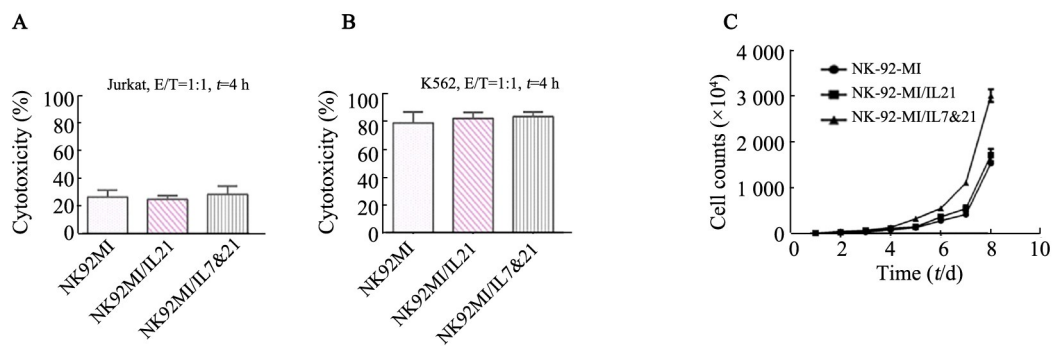


图1 NK-92MI/IL-21 和NK-92MI/IL-7&21 细胞的流式分析

Fig.1 Flow cytometry analysis of NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells



A, B: The killing on Jurkat and K562 cells by NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells under a condition of E:T=1:1 with a killing time of 4 h; C: The proliferative rate of NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells *in vitro*

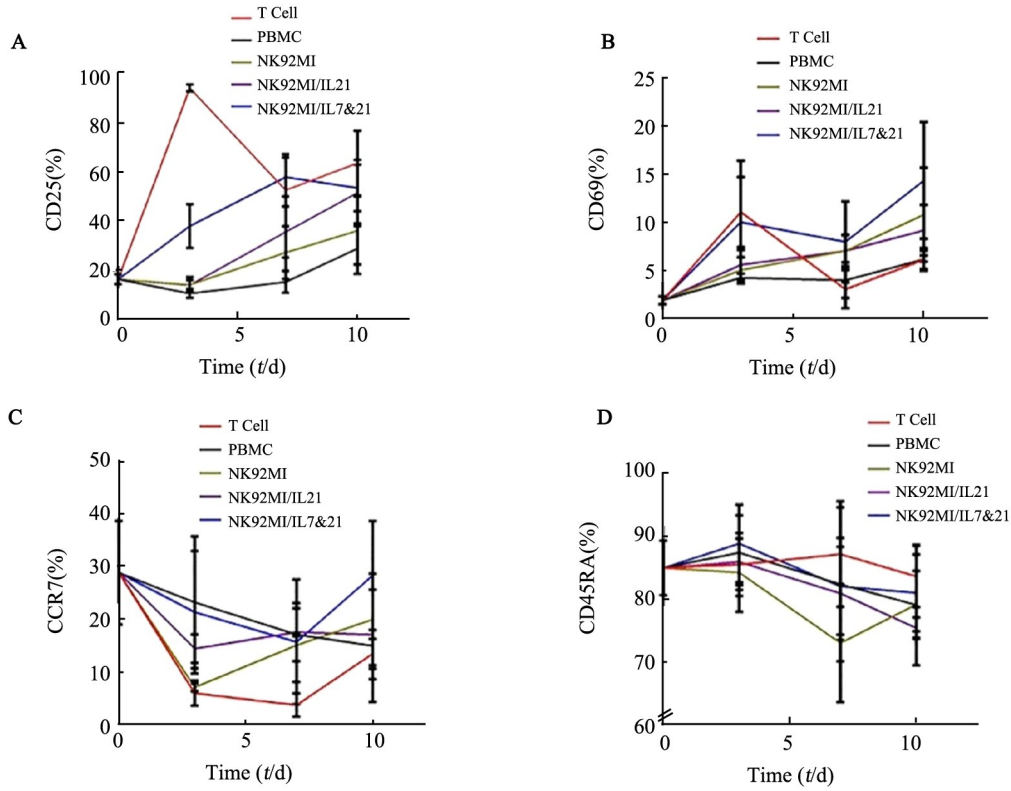
图2 NK-92MI/IL-21 和NK-92MI/IL-7&21 细胞较亲本细胞NK-92MI的增殖活性有所提高

Fig.2 The proliferation rate of NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells was higher than that of NK-92MI cells

2.4 3种NK细胞与活化后T细胞相互无细胞毒性且对肿瘤细胞的毒性也不会相互干扰

杀伤实验结果(图4)显示,正常人活化后的T细胞对K562、NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞均几乎无细胞毒性。NK-92MI细胞对正常人活化后的T细胞几乎没有细胞毒性,表明正常

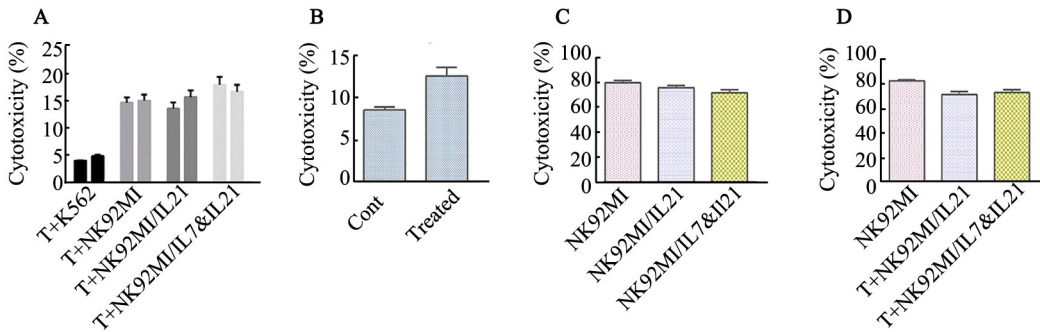
人活化后的T细胞与NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞它们相互之间几乎无细胞毒性。T细胞的存在并不影响NK-92MI、NK-92MI/IL-21和NK-92MI/IL-7&21细胞对K562细胞的细胞毒性。



A,B,C,D: The flow cytometry results of CD25,CD69,CCR7 and CD45RA molecules at different time course

图3 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 对 PBMC 中 T 细胞增殖和活化有刺激和促进作用

Fig.3 NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells could stimulate and promote the proliferation and activation of T cells from PBMC



A: Cytotoxicity of activated T cells on K562, NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells;

B: Cytotoxicity of NK-92MI cells on activated T cells;

C: Cytotoxicity of NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells on K562 cells;

D: Activated T cells and NK-92MI, NK-92MI/IL-21 and NK-92MI/IL-7&21 cells acted as effector cells to kill K562 cells

图4 3种NK细胞与活化后T细胞相互无细胞毒性且对肿瘤细胞的毒性也不会相互干扰

Fig.4 Cytotoxicity was not found between T cells and the three NK-92MI cells, and the presence of T cells did not affect the cytotoxicity of the three NK-92MI cells on tumor cells

3 讨论

近年来, NK 细胞在过继性细胞免疫治疗中表现出良好的应用前景, NK-92 细胞是目前唯一被 FDA 批准的临床试验的 NK 细胞系, 该株细胞的细胞毒性很强、经济、off-the-shelf、容易规模化制备, 绝大多数接受治疗的患者没有对 NK-92 细胞产生排斥, 不表

达 KIRs, 处于组成型激活状态, 到目前为止表现出很好的临床安全性。NK-92MI 细胞是通过转染得到的源自 NK-92 细胞的 IL-2 非依赖型的细胞株, 在临床应用中具有更大的应用前景^[17-20]。相关研究表明, IL-7 在淋巴细胞的存活中扮演着非常重要的作用, IL-7 能够维持 CTL 和记忆 T 细胞的存活, 能够增强淋巴细胞的浸润, 从而增强抗肿瘤活性^[6-7]; IL-21 是由 IL-

21 基因编码的蛋白质,在固有免疫应答和适应性免疫应答中扮演重要角色,调节刺激巨噬细胞、NK 细胞、B 细胞和 CTL 的分化、增殖和活化^[9-13]。

本研究通过基因工程技术将外源性的 IL-7 和 IL-21 构建到 NK-92MI 细胞上,成功构建了高表达 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-21 细胞和同时高表达 IL-7 和 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-7&21 细胞。结果表明, NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞相对于亲本细胞 NK-92MI 细胞,在体外增殖能力有所提高。特别是同时表达 IL-7 和 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-7&21 细胞,体外增殖能力有了明显的提高。体外杀伤试验表明, NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞与亲本细胞 NK-92MI 细胞在体外对 Jurkat 和 K562 细胞的细胞毒性没有改变。

本研究观察了 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞与正常人的外周血 PBMC 细胞共培养时,3 种 NK 细胞对 PBMC 中 T 细胞的作用是否有差异,选取 CD3、CD25、CD69、CD45RA、CCR7 分子进行不同时间的流式检测分析。实验结果表明,作为活化 T 细胞标志分子之一的 CD25 分子^[21-22],从 CD25 分子的表型变化来看, NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞对正常人 PBMC 中 T 细胞的活化有一定的刺激和促进作用,特别是同时表达 IL-7 和 IL-21 分子的 NK-92MI/IL-7&21 细胞对 PBMC 中 T 细胞有显著性的刺激活化作用。同时,在实验过程中发现, NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞也可刺激 T 细胞的增殖, T 细胞的数目明显高于阴性对照组和 NK-92MI 细胞组,且 NK-92MI/IL-7&21 细胞的刺激效果更强。然而,在 CD69、CD45RA、CCR7 分子的表型变化中并未观察到明显的规律,这可能与本实验选取的检测时间点有一定的关系。

NK-92MI 细胞已经作为一种过继性细胞免疫治疗细胞应用于临床研究中,相关临床试验^[18-20]表明,对于癌症晚期患者注射具有较小的副作用。为了了解 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞与正常人的活化 T 细胞之间有无细胞毒性,以及它们共存时对肿瘤细胞的细胞毒性是否会相互干扰,所进行的一系列的体外杀伤实验结果表明, NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞与正常人的活化 T 细胞相互之间无细胞毒性;而且,活化 T 细胞的存在不会影响 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞对 K562 细胞的细胞毒性。

综上所述,本研究构建的 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞相对于亲本细胞 NK-92MI 细胞来说,在体外的增殖能力有所增强,尤其时 NK-92MI/IL-7&21 细胞的体外增殖能力有了明显提高。同时,

NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞在体外与正常人的 PBMC 共培养时,能够在一定程度上刺激 T 细胞的增殖和活化,同样也是 NK-92MI/IL-7&21 细胞表现的更为突出。此外,发现 NK-92MI、NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞与正常人的活化 T 细胞相互之间无细胞毒性, T 细胞与它们共存时也不会影响它们对肿瘤细胞的细胞毒性。经过人为改造的 NK-92MI/IL-21 和 NK-92MI/IL-7&21 细胞在过继性细胞免疫治疗中具有极大的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] GONG H, MAKI G, KLINGEMANN H G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells[J]. *Leukemia*, 1994, 8(4): 652-658.
- [2] TAM Y K, MAKI G, MIYAGAWA B, et al. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(8):1359-1373. DOI:10.1089/10430349950018030.
- [3] FARAG S S, CALIGIURI M A. Human natural killer cell development and biology[J]. *Blood Rev*, 2006, 20(3): 123-137. DOI: 10.1016/j.blre.2005.10.001.
- [4] JIANG H, ZHANG W, SHANG P, et al. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 297-310. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.12.001.
- [5] SUN W P, WANG F M, XIE F, et al. A novel anti-human syndecan-1 (CD138) monoclonal antibody 4B3: characterization and application [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(3): 209-214.
- [6] LIN J, ZHU Z, XIAO H, et al. The role of IL-7 in Immunity and Cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 963-967. DOI:10.21873/anticancer.11405.
- [7] SHMAROV V A, MALASHCHENKO V V, MENIAILO M E, et al. Direct effects of interleukin-7 on the function of human T cells in vitro[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2016, 27(4): 102-107. DOI: 10.1684/ecn.2016.0385.
- [8] MICHAUD A, DARDARI R, CHARRIER E, et al. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells[J]. *J Immunother*, 2010, 33(4): 382-390. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181cd872d.
- [9] GHARBI T, MAJIDI J, KAZEMI T, et al. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases[J]. *Immunobiology*, 2016, 221(2): 357-367. DOI:10.1016/j.imbio. 2015. 09.021.
- [10] LI Q, YE L J, REN H L, et al. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion[J]. *Immunobiology*, 2015, 220(7): 876-888. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.01.009.
- [11] ZHOU H Y, ZHENG Y H, HE Y, et al. Interleukin-21 plays an important role in CD8 T-cell activation and poor outcome in HIV infection[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2013, 33(3): 115-120. DOI: 10.1089/jir.2012.0099.
- [12] ETTINGER R, SIMS G P, FAIRHURST A M, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells[J]. *J Immunol*, 2005, 175(12): 7867-7879.

- [13] LEONARD W J, SPOLSK I. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(9): 688-698. DOI:10.1038/nri1688.
- [14] NIKFARJAM L, FARZANEH P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture[J]. *Cell J*, 2012, 13(4): 203-212.
- [15] LECOEUR H, FEVRIER M, GARCIA S, et al. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 253(1/2): 177-187.
- [16] CHEN D, ZOU J, ZONG Y, et al. Anti-human CD138 monoclonal antibodies and their bispecific formats: generation and characterization[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(3): 175-183. DOI: 10.3109/08923973.2016.1153110.
- [17] TONN T, SCHWABE D, KLINGEMANN H G, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92 [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(12): 1563-1570. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017.
- [18] SUCK G. Novel approaches using natural killer cells in cancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(5): 412-418. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.07.006.
- [19] SUCK G, ODENDAHL M, NOWAKOWSKA P, et al. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(4): 485-492. DOI: 10.1007/s00262-015-1761-x.
- [20] KLINGEMANN H, BOISSEL L, TONEGUZZO F. Natural killer cells for immunotherapy-advantages of the nk-92 cell line over blood NK cells[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 91. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00091.
- [21] FU K, SUN X, ZHENG W, et al. Sam68 modulates the promoter specificity of NF- κ B and mediates expression of CD25 in activated T cells[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1909. DOI: 10.1038/ncomms2916.
- [22] MORRIS J C, WALDMANN T A. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment[J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(Suppl1): i109-14.

[收稿日期] 2017-12-16

[修回日期] 2018-01-23

[本文编辑] 韩丹