

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.004

· 基础研究 ·

靶向CD33的CAR修饰的NK92细胞对CD33⁺急性髓系白血病细胞的杀伤作用

刘延众¹, 潘丽娟¹, 唐取来¹, 史江舟¹, 赵文静¹, 霍丽红¹, 顾朝江², 胡广², 刘慧宁², 张同存^{1,2} (1. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457; 2. 武汉科技大学 生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430000)

[摘要] **目的:** 根据抗CD33-scFv序列构建CD33-CAR修饰的NK92细胞, 探讨其对CD33⁺急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞的杀伤作用。**方法:** 通过基因合成以及分子克隆技术获得抗CD33-CAR片段, 然后将其构建到慢病毒载体上, 进行慢病毒包装, 将得到的慢病毒转染NK92细胞, 用流式细胞术检测细胞转染效率并通过嘌呤霉素筛选得到稳定表达抗CD33-CAR的细胞系CD33-CAR-NK92, 利用钙黄绿素释放法检测该细胞的杀伤作用, ELISA法检测细胞因子IFN- γ 分泌的变化。**结果:** 成功构建pCDH-CD33-CAR重组慢病毒质粒, 慢病毒转导后约18.7%的NK92细胞表达CD33-CAR(命名为CD33-CAR-NK92细胞), 嘌呤霉素筛选后表达CD33-CAR的NK92细胞比例约86.3%。CD33-CAR-NK92细胞对CD33⁺AML细胞MOLM-13的杀伤作用明显高于未被基因修饰的NK92细胞($P < 0.01$), 而两者对CD33⁻肿瘤细胞JURKAT的杀伤作用没有明显差异($P > 0.05$)。效靶比为2:1共培养6 h后, 经CD33-CAR修饰的NK92细胞相比未被基因修饰的NK92细胞IFN- γ 的分泌水平明显升高 $[(190.97 \pm 11.52) \text{ vs } (88.41 \pm 2.75) \text{ pg/ml}, P < 0.01]$ 。**结论:** CD33-CAR-NK92细胞能特异性识别CD33抗原并杀伤CD33⁺AML细胞, 其杀伤作用显著高于未被基因修饰的NK92细胞, 为进一步开展靶向CD33的CAR-NK92细胞治疗AML的临床转化奠定了实验基础。

[关键词] 嵌合抗原受体; CD33; NK92细胞; CD33-CAR-NK92细胞; 急性髓系白血病

[中图分类号] R733.71; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0462-07

Killing effect of NK92 cells modified with CD33-CAR on CD33⁺ acute myeloid leukemia cells

LIU Yanzhong¹, PAN Lijuan¹, TANG Qulai¹, SHI Jiangzhou¹, ZHAO Wenjing¹, HUO Lihong¹, GU Chaojiang², HU Guang², LIU Huining², ZHANG Tongcun^{1,2} (1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjing 300457, China; 2. College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To construct CD33-CAR modified NK92 cells based on CD33-scFv sequence, and to explore its killing effect on CD33⁺ AML (acute myeloid leukemia) cells. **Methods:** DNA fragment encoding CD33-CAR was synthesized by gene synthesis and molecular cloning technology and then cloned into lentiviral vector. Lentivirus were packaged and used to transfect NK92 cells. The transfection efficiency was detected by flow cytometry, and puromycin was used to screen NK92 cells stably expressing CD33-CAR (CD33-CAR-NK92). Killing effect of CD33-CAR-NK92 cells on AML cells *in vitro* was examined with calcein-AM release assays. IFN- γ secretions of NK92 cells and CD33-CAR-NK92 cells were measured by ELISA. **Results:** The pCDH-CD33-CAR lentiviral vector was successfully constructed. After lentiviral transfection, about 18.7% of NK92 cells express CD33-CAR (referred as CD33-CAR-NK92 cells). The percentage of CD33-CAR⁺ NK92 cells was about 86.3% after puromycin selection. In contrast to unmodified NK92 cells, significantly higher cytotoxic effect against CD33⁺ MOLM-13 cells was found in CD33-CAR-NK92 cells ($P < 0.01$); however, there was no significant difference in cytotoxicity against CD33⁻ JURKAT cells between NK92 cells and CD33-CAR-NK92 cells ($P > 0.05$). After co-culture at an effect-target ratio of 2:1 for 6 hours, the level of IFN- γ secreted by the CD33-CAR modified NK92 cells

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No.31401170)。Project supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China(No.31401170)

[作者简介] 刘延众(1992-),男,硕士生,主要从事白血病的细胞免疫治疗研究,E-mail:842195369@qq.com

[通信作者] 张同存(ZHANG Tongcun, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤、心血管疾病等重大疾病病理生理机制及相关药物治疗的研究,E-mail:tony@tust.edu.cn

was significantly higher than that of the unmodified ($[190.97 \pm 11.52]$ vs $[88.41 \pm 2.75]$ pg/ml, $P < 0.01$). **Conclusion:** The CD33-CAR-NK92 cells could specifically recognize CD33 antigen and kill CD33⁺ AML cells in comparison with the unmodified NK92 cells, which provides experimental basis for clinical transformation of CD33-CAR-NK92 cells in treating AML.

[Key words] chimeric antigen receptor(CAR); CD33; NK92 cell; CD33-CAR-NK92 cell; acute myeloid leukemia(AML)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 462-468. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.004]

CD33分子是一种穿膜糖蛋白,特异性表达于造血细胞表面^[1]。CD33在90%的急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞中有表达,虽然在髓系造血祖细胞中也有表达,但在正常造血干细胞、成熟的粒细胞和其他组织细胞不表达。有研究^[2]表明,靶向清除CD33⁺细胞后经过培养可以恢复髓系造血祖细胞的造血功能。所以,CD33成为AML特异性免疫治疗的理想靶点^[3-4]。随着CAR修饰的T细胞在治疗CD19阳性的恶性血液肿瘤上的成功运用^[5],CAR-NK细胞也受到越来越多的关注。NK细胞因其识别靶细胞的特殊机制、短暂的生理周期^[6-8]、广泛的肿瘤杀伤能力等优势,被视为同样有潜力通过CAR修饰增强其抗肿瘤能力的效应细胞。然而,有关CAR-NK细胞的临床应用鲜有报道。为了进一步增强NK细胞对CD33⁺AML细胞的杀伤、寻找治疗AML患者的有效方案,以及早日将CAR-NK细胞运用于临床治疗,本课题选用NK92细胞系,运用慢病毒感染的方法,将CD33-CAR构建到NK92细胞上,并在体外验证其对CD33⁺AML细胞的杀伤效果。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

NK92细胞系由华中科技大学附属同济医院血液科周剑锋教授馈赠,人胚肾细胞293T、人急性T细胞白血病细胞系JURKAT及人AML细胞系MOLM-13购自ATCC公司,感受态细胞DH5 α 购自TaKaRa公司。

慢病毒表达载体pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro购于Invitrogen公司,病毒包装质粒psPAX2和包膜质粒VSVG购自Addgene公司,大量质粒抽提试剂盒购于Axygen公司,胎牛血清、DMEM-Basic、MEM α 、RPMI 1640培养基及0.25% Trypsin-EDTA购于Gibco公司,7-AAD、PE Mouse Anti-Human CD33抗体购于BD Bioscience公司,Goat Anti-Mouse IgG (H+L)抗体购于Jackson Immuno Research,钙黄绿素购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,人IFN- γ ELISA试剂盒购于欣博盛生物科技有限公司。寡核苷酸引物由武汉金开瑞生物科技有限公司合成。

1.2 细胞培养

NK92细胞使用含12.5%胎牛血清、12.5%马

血清、1% Anti-Anti、200 IU/ml IL-2的MEM- α 培养基,细胞通过添加或替换新鲜培养基维持生长,换液需要300 $\times$ g离心5 min去细胞上清,然后按(2~3) $\times$ 10⁵/ml的细胞密度添加培养基,轻轻吹打均匀后放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱培养,使用时取用成团生长状态良好的细胞;293T细胞使用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基;JURKAT细胞和MOLM-13细胞使用含10%胎牛血清、1%双抗的RPMI-1640培养基。

1.3 CD33-CAR分子的设计

CD33-CAR分子的单链抗体片段来源于专利US20110206700A1,将CD33-scFv、共刺激因子CD28以及胞内信号结构域CD3 ζ 串联在一起,获得完整的可固定表达于细胞膜上的CD33-CAR片段。此外,在遵循偏爱密码子的基础上,根据氨基酸密码子的简并性,在保证氨基酸序列不变的情况下对基因序列进行改造,以增强CAR分子的表达效率。

1.4 分子重组技术构建pCDH-CD33-CAR载体

通过基因合成得到CD33-scFv序列,序列大小为801 bp,包括信号肽SP、轻链VL、连接肽Linker和重链VH等结构。再通过基因合成得到包括hinge、共刺激因子CD28及胞内信号结构域CD3 ζ 等结构的序列,序列大小为678 bp。

通过融合PCR技术,将两段序列整合到一起,得到带有同源臂的CD33-CAR片段,以Xba I和Eco RI限制性酶切位点为克隆位点,利用亚克隆的方法将其克隆至慢病毒表达载体pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro上,最终获得携带CD33-CAR片段的载体,即pCDH-CD33-CAR,用于后续慢病毒包装。

1.5 慢病毒的包装、浓缩及滴度测定

利用第3代慢病毒包装系统,由包装质粒psPAX2、包膜质粒VSVG和慢病毒表达质粒组成。用PEI转染法将慢病毒系统3种质粒共转染293T包装细胞,培养72 h收集病毒上清液,通过超速离心进行浓缩。滴度测定:6孔板铺293T细胞(5 $\times$ 10⁵个/孔),按病毒量0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 2 μ l梯度加入各孔,加入终浓度为5 μ g/ml的聚凝胺(polybrene),并设置阴性对照,72 h后通过Goat Anti-Mouse IgG (H+L)抗体流式细胞术检测293T细胞转染效率并计算慢病毒滴度。每种病毒量设置2组平行孔,实验重复3次。

1.6 慢病毒转导NK92细胞构建CD33-CAR-NK92细胞

在倒置显微镜下观察NK92细胞生长情况,取 5×10^6 个生长状况良好的NK92细胞,于T25细胞培养瓶中按感染复数等于20计算需要加入慢病毒浓缩液的数量,按 $5 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度加入聚凝胺,补培养基至5 ml,混匀, 37°C 斜置孵育4 h,补培养基至10 ml继续培养。待细胞量足够时,按 $1 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度加入嘌呤霉素筛选得到阳性率较高的CD33-CAR-NK92细胞。以NK92细胞作阴性对照,每隔2 d为1个周期通过细胞计数检测CD33-CAR-NK92细胞的有效扩增能力。

1.7 流式细胞术检测慢病毒感染NK92细胞表面CD33-CAR的表达

转染72 h后,取 1×10^6 个转染后细胞作为实验组,取等数量的NK92细胞作为对照组,于流式管中 $300 \times g$ 离心5 min去上清,加1 ml PBS重悬细胞, $300 \times g$ 离心5 min去上清,重复洗2遍去上清后加入2 μl Goat Anti-Mouse IgG (H+L)抗体(稀释比例1:50)于100 μl PBS体系中重悬细胞,染色30 min后加入1 ml PBS重悬, $300 \times g$ 离心5 min去上清,重复洗3次,加2 μl 7-AAD抗体(稀释比例1:100)于0.2 ml PBS中重悬细胞,通过流式细胞术检测转染后NK92细胞表面CD33-CAR的表达水平。实验重复3次。

1.8 钙黄绿素释放法检测CD33-CAR-NK92细胞的细胞毒性

选CD33⁺人AML细胞株MOLM-13作为阳性靶细胞,CD33⁺人急性T细胞白血病细胞株JURKAT作阴性靶细胞,效应细胞分别为NK92细胞和CD33-CAR-NK92细胞。将经calcein-AM标记、浓度为 5×10^4 个/ml的靶细胞接种于U底96孔培养板(100 μl /孔)。按不同效靶比(50:1、10:1、2:1)加入各组效应细胞,体积为100 μl /孔。设置:最大释放组(加入裂解液)和自发释放组(加入PBS)。各组均设4个复孔, 37°C 、无 CO_2 孵育2.5 h,将96孔板 $500 \times g$ 离心10 min,从各孔吸取150 μl 上清对应转移到预先标记好的新96孔板中,置于酶标仪(参数设置:激发光波长485/20,发射光波长530/25)扫描读取荧光值。根据以下公式计算各组效应细胞的细胞毒性:特异性裂解百分率(%)=(实验组荧光值-自发释放组荧光值)/(最大释放组荧光值-自发释放组荧光值) $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.9 ELISA法检测CD33-CAR-NK92细胞内IFN- γ 的分泌水平

取3组NK92细胞、3组CD33-CAR-NK92细胞接种于24孔板(1×10^6 个/孔)中,依照效靶比为2:1,空白组不加入靶细胞,阴性靶细胞组加入 5×10^5 个

CD33⁺的JURKAT细胞,阳性靶细胞组加入 5×10^5 个CD33⁺的MOLM-13细胞,共培养6 h后取500 μl 细胞上清液, $300 \times g$ 离心10 min后收集上清液,用ELISA试剂盒检测IFN- γ 水平。将100 μl 收集的各组上清液加入到相应孔中,之后按试剂盒说明书操作,测量波长450 nm处的光密度(D)值,并根据标准曲线计算各样本的IFN- γ (pg/ml)水平。实验重复3次。

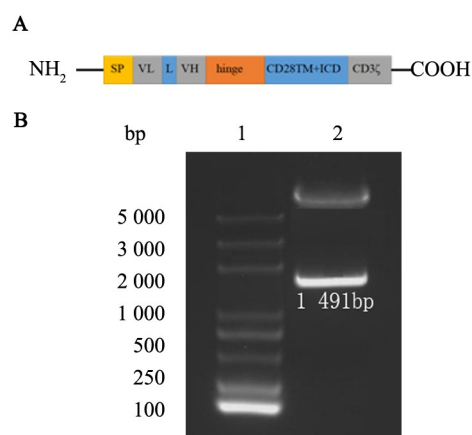
1.10 统计学处理

采用GraphPad Prism 5统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建pCDH-CD33-CAR重组质粒

利用基因合成和分子克隆技术成功构建抗CD33-CAR片段(图1A),将抗CD33-CAR分子亚克隆到慢病毒载体pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro上。*Xba*I/*Eco*RI双酶切鉴定结果(图1B)显示,重组质粒酶切后可见一条1 491 bp的基因片段,大小与CD33-CAR片段相一致。同时,CD33-CAR片段基因序列测序结果证实,CD33-CAR片段基因序列和插入的阅读框与设计完全相符,证明成功构建pCDH-CD33-CAR慢病毒表达质粒。



1: Marker; 2: pCDH-CD33-CAR recombinant lentiviral plasmid

A: Structure diagram of CD33-CAR [signal peptide (63 bp), scFv consisting of VH-linker-VL(738 bp), CD8a hinge region (135 bp), CD28TM+ICD(204 bp) and CD3 ζ chain(339 bp)]

B: Identification results of the pCDH-CD33-CAR recombinant plasmid detected by restriction endonuclease

图1 pCDH-CD33-CAR重组慢病毒表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of pCDH-CD33-CAR recombinant lentiviral plasmid

2.2 成功制备慢病毒

流式细胞术检测结果(图2)所示,用0.031 2、

0.062 5、0.125、0.25、0.5 μ l 浓缩过的病毒液转染 293T 细胞的转染效率分别为 18.7%、31.0%、53.2%、74.2%、89.3%，通过公式计算得出病毒浓缩液的滴度为

3×10^9 TU/ml，证明慢病毒包装及浓缩效果较好，可用于后续实验。

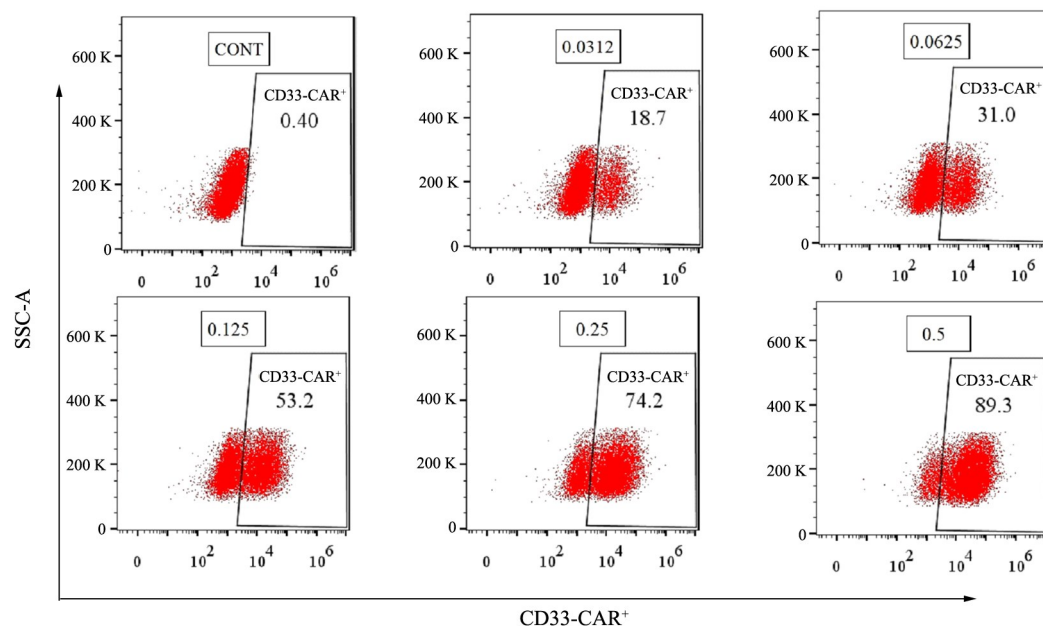


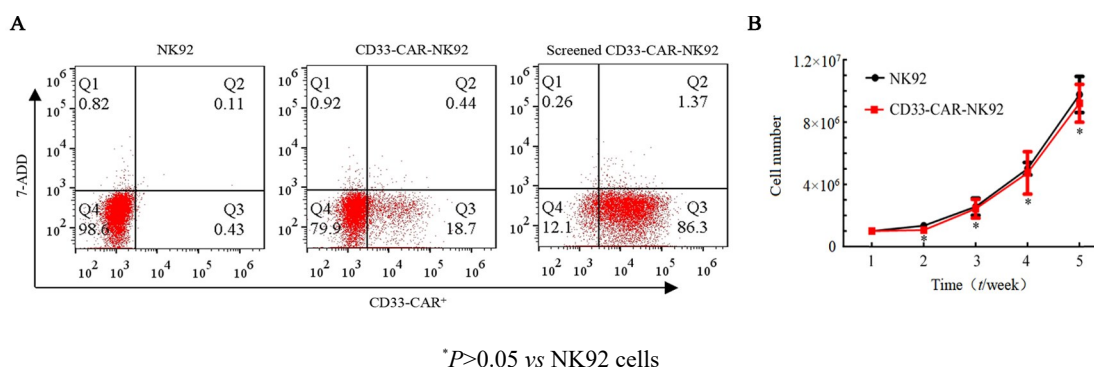
图2 293T细胞CD33-CAR分子的表达

Fig. 2 The CD33-CAR expression on 293T cells transfected by lentivirus

2.3 慢病毒转导的NK92细胞表达CD33-CAR

流式细胞术检测结果(图3A)显示,慢病毒感染组 18.7% 的 NK92 细胞表达 CD33-CAR,而对照组 NK92 细胞未见 CD33-CAR 的表达。同时,经嘌呤霉素筛选后得到阳性率达 86.3% 的 CD33-CAR-NK92

细胞。细胞增殖活性检测结果(图3B)显示,CD33-CAR-NK92 细胞的增殖活性与 NK92 细胞差异无统计学意义($t=0.205$, $P>0.05$),说明转染 CD33-CAR 不影响 NK92 细胞的有效扩增。



* $P>0.05$ vs NK92 cells

A: Expression rate of the CD33-CAR in NK92 cells detected by flow cytometry

B: Proliferation activity of NK92 cells and CD33-CAR-NK92 cells

图3 NK92细胞CD33-CAR的表达率及增殖活力

Fig. 3 Expression rate of CD33-CAR in the NK92 cells and its proliferation activity

2.4 CD33-CAR-NK92 细胞对 CD33⁺AML 细胞的杀伤效率

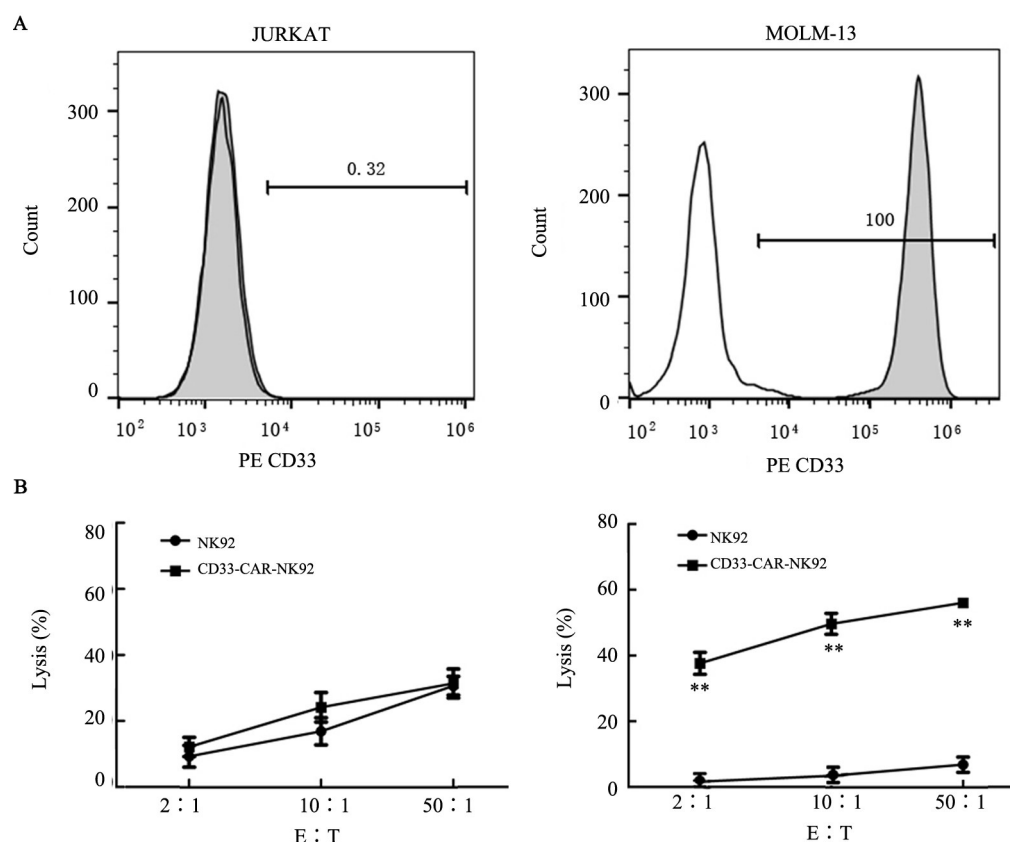
流式细胞术检测结果(图4A)显示,JURKAT 细胞不表达 CD33,作为阴性靶细胞;MOLM-13 细胞表

达 CD33 且阳性率为 100%,作为阳性靶细胞。

细胞毒性实验结果(图4B)显示,阳性率约 86.3% 的 CD33-CAR-NK92 细胞对 CD33⁺肿瘤细胞 MOLM-13 的杀伤作用明显高于未被基因修饰的 NK92 细胞

[效靶比 50:1 时, $(56.00 \pm 1.32)\%$ vs $(6.83 \pm 2.30)\%$; 效靶比 10:1 时, $(49.64 \pm 3.18)\%$ vs $(3.45 \pm 0.86)\%$; 效靶比 2:1 时, $(37.63 \pm 3.34)\%$ vs $(1.60 \pm 0.58)\%$; $t=32.196, 24.299, 18.392$, 均 $P<0.01$], 而两者对 CD33⁺ 肿瘤细胞 JURKAT 的杀伤作用没有明显差异[效靶比 50:1 时, $(31.38 \pm 4.41)\%$ vs $(30.67 \pm 2.81)\%$; 效靶比 10:1

时, $(24.16 \pm 4.49)\%$ vs $(16.87 \pm 4.08)\%$; 效靶比 2:1 时, $(12.13 \pm 2.90)\%$ vs $(9.33 \pm 3.32)\%$; $t=0.235, 2.082, 1.102$, 均 $P>0.05$]。结果表明, 构建的 CD33-CAR-NK92 细胞对 CD33⁺ AML 细胞具有显著的靶向杀伤性。



A: The expression of CD33 in JURKAT and MOLM-13 cells was detected by flow cytometry

B: Detection of cytotoxicity of CD33-CAR-NK92 cells on JURKAT (left) and MOLM-13 (rite) cells by calcein-AM release assay

图4 CD33-CAR-NK92细胞对CD33⁺AML细胞的杀伤作用

Fig. 4 Killing effect of CD33-CAR-NK92 cells on CD33⁺ AML cells

2.5 CD33-CAR-NK92 细胞 IFN- γ 分泌显著增高

ELISA 检测细胞因子释放实验结果(图5)显示, 效靶比为 2:1 时, 共培养 6 h 后, NK92 细胞和 CD33-CAR-NK92 细胞中: 阴性靶细胞组较空白组 IFN- γ 分泌水平均无显著差异[NK92 细胞: (24.90 ± 1.66) vs (24.05 ± 1.44) pg/ml, CD33-CAR-NK92 细胞: (32.48 ± 2.06) vs (30.52 ± 2.47) pg/ml; $t=0.671, 1.055$, 均 $P>0.05$], 阳性靶细胞组较空白组 IFN- γ 分泌水平均显著升高[NK92 细胞: (88.41 ± 2.75) vs (24.05 ± 1.44) pg/ml, CD33-CAR-CD33 细胞: (190.97 ± 11.52) vs (30.52 ± 2.47) pg/ml; $t=35.942, 23.580$, 均 $P<0.01$], 阳性靶细胞组较阴性靶细胞组 IFN- γ 分泌水平均显著升高[NK92 细胞: (88.41 ± 2.75) vs (24.90 ± 1.66) pg/ml, CD33-

CAR-NK92 细胞: (190.97 ± 11.52) vs (32.48 ± 2.06) pg/ml; $t=34.257, 23.452$, 均 $P<0.01$]; NK92 细胞和 CD33-CAR-NK92 细胞之间: 经 CD33-CAR 修饰的 NK92 细胞相比未被基因修饰的 NK92 细胞, IFN- γ 的分泌明显升高 [(190.97 ± 11.52) vs (88.41 ± 2.75) pg/ml; $t=14.996, P<0.01$]。

3 讨论

AML 是一种常见的血液系统恶性肿瘤, 发病率高, 预后和生存率不理想。靶向治疗能特异性杀伤表达特殊抗原的白血病细胞而不伤害正常细胞, 将成为 AML 免疫治疗的新策略。有研究^[9-11]表明, 增强 NK 细胞活性可能是今后最佳的白血病治疗方案。

本实验成功构建了表达CD33-CAR分子的NK92细胞,并在体外验证出其具有靶向特异性,CD33抗原特异性CAR对CD33⁺AML细胞有较为明显的杀伤作用,为CAR-NK细胞成功运用到临床治疗提供了实验依据。

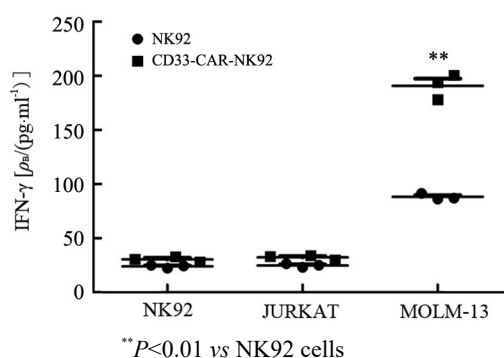


图5 NK92和CD33-CAR-NK92细胞IFN-γ的分泌差异

Fig. 5 The difference in IFN-γ secretion between NK92 cells and CD33-CAR-NK92 cells

近年来,CAR-T细胞在白血病研究中取得了重大突破^[12],而同样有潜力的CAR-NK细胞仍没有太大的进展。NK细胞因来源有限、在外周血中所占比例较低、体外扩增不稳定等多种因素限制了其自身的发展。本实验中使用的NK92细胞是IL-2依赖性的NK细胞系,是从一位非霍奇金淋巴瘤患者体内分离建成^[6,13]。作为目前唯一被FDA批准临床试验的NK细胞系,NK92细胞具有细胞毒性强,良好的临床安全性,容易规模化制备等多种优势^[14]。NK92细胞是需要辐照后才可以用于体内回输,由于其在体内存活的时间较短,也避免了长期的细胞毒性作用,减少了一定的副作用。而scFv赋予NK92细胞靶向性,增强其特异性杀伤能力。因此,CAR修饰的NK92细胞疗法有望成为新的治疗手段,为AML患者带来福音。

CAR是利用抗体对肿瘤抗原的高亲和性与T细胞或者NK细胞的杀伤机制结合来识别相关肿瘤抗原,进而杀伤肿瘤细胞。CAR主要包括胞外抗原结合区、穿膜区和胞内信号区,这3部分决定了CAR修饰的特异性和功能性。本研究中采用第二代CAR的结构,主要由单链抗体scFv、协同共刺激分子CD28和向胞内传递信号的CD3ζ组成。从细胞毒性实验中,CD33-CAR-NK92细胞对CD33⁺AML细胞的特异性杀伤性能证明以CD33-scFv序列成功构建出CD33-CAR。

基因的稳定转染是实现效应细胞稳定表达CAR的前提^[15-16]。相比于原代NK细胞,NK92细胞更容易转染和安装各种CAR^[17]。本实验运用慢病毒转染方法,转染效率在18.7%左右,通过嘌呤霉素筛选可达

到86.3%左右,得到的高阳性率CD33-CAR-NK92细胞进行细胞毒性实验。从研究结果可以看出,CD33-CAR-NK92细胞较NK92细胞对CD33⁺AML细胞杀伤效应显著增强。ELISA法检测IFN-γ分泌水平结果显示,在CD33⁺肿瘤细胞刺激下CD33-CAR-NK92细胞较NK92细胞IFN-γ分泌水平显著提高,这可能与CAR结构中CD28片段的表达有关,因为CD28的激活被证实与IFN-γ的分泌有关^[18]。IFN-γ的分泌水平显著升高表明,CD33-CAR-NK92细胞较NK92细胞特异性分泌细胞因子IFN-γ,进一步解释了杀伤效率的提高。

总之,随着对免疫疗法的深入研究,越来越多的研究者关注人NK细胞系对肿瘤细胞的杀伤^[19-20]。从本实验中CD33-CAR-NK92细胞体外功能鉴定结果来看,靶向CD33的CAR-NK92细胞治疗AML的方案有望对AML的治疗将起到积极作用,但其安全性还需要进一步通过动物实验进行验证。

[参考文献]

- [1] ROBILLARD N, WUILLEME S, LODE L, et al. CD33 is expressed on plasma cells of a significant number of myeloma patients, and may represent a therapeutic target[J]. *Leukemia*, 2005, 19(11): 2021-2022. DOI: 10.1038/sj.leu.2403948.
- [2] 张珍珍, 丁倩, 汤沁, 等. 针对CD33分子的抗体偶联药物的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(01): 106-114. DOI: 10.11844/cjcb.2014.01.0236.
- [3] JURCIC J G. What happened to anti-CD33 therapy for acute myeloid leukemia?[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2012, 7(1): 65-73. DOI: 10.1007/s11899-011-0103-0.
- [4] WALTER R B, APPELBAUM F R, ESTEY E H, et al. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy[J]. *Blood*, 2012, 119(26): 6198-6208. DOI: 10.1182/blood-2011-11-325050.
- [5] BRENTJENS R J, DAVILA M L, RIVIERE I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra38[2017-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742551/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- [6] MILLER J S, SOIGNIER Y, PANOSKALTSIS-MORTARI A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer[J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3051-3057. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2974.
- [7] RUBNITZ J E, INABA H, RIBEIRO R C, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(6): 955-959. DOI: 10.1200/JCO. 2009. 24.4590.
- [8] CURTI A, RUGGERI L, D'ADDIO A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients[J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3273-3279. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329508.

- [9] 林婧祎, 张宇晶, 高锦程, 等. 急性髓系白血病免疫治疗方式及研究进展[J]. 中华全科医学, 2017, 15(10): 1763-1767. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2017.10.037.
- [10] ROMANSKI A, UHEREK C, BUG G, et al. CD19-CAR engineered NK92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(7): 1287-1294. DOI: 10.1111/jcmm.12810.
- [11] KLOESS S, EDEVALVERDEDASILVA A, OBERSCHMIDT O, et al. Triplebody mediates increased anti-leukemic reactivity of IL-2 activated donor natural killer(NK) cells and impairs viability of their CD33-expressing NK subset[J]. Front Immunol, 2017, 8(4): 1100-1109. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01100.
- [12] PEGRAM H J, SMITH E L, RAFIQ S, et al. CAR therapy for hematological cancers: can success seen in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia be applied to other hematological malignancies?[J]. Immunotherapy, 2015, 7(5): 545-561. DOI : 10.2217/imt.15.6.
- [13] GELLER M A, COOLEY S, JUDSON P L, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer[J]. Cytotherapy, 2011, 13(1): 98-107. DOI: 10.3109/14653249.2010.515582.
- [14] CHEN Y, YOU F, JIANG L, et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- ζ or CD64-BB- ζ receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody[J]. Oncotarget, 2017, 8(23): 37128-37139. DOI: 10.18632/oncotarget.16201.
- [15] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIERE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design[J]. Cancer Discov, 2013, 3(4): 388-398. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- [16] SUERTH J D, MORGAN M A, KLOESS S, et al. Efficient generation of gene-modified human natural killer cells via alpharetroviral vectors[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(1): 83-93. DOI: 10.1007/s00109-015-1327-6.
- [17] 袁园, 秦扬, 游凤涛, 等. 靶向CD19的CAR修饰的NK细胞对B细胞淋巴瘤的杀伤[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(5): 613-619. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.005.
- [18] SUNTHARALINGAM G, PERRY M R, WARD S, et al. Cytokine storm in a phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412[J]. N Engl J Med, 2006, 355(10): 1018-1028. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.
- [19] GALLARDOVERA F, DIAZ D, TAPIARODRIGUEZ M, et al. Vanadium pentoxide prevents NK-92MI cell proliferation and IFN- γ secretion through sustained JAK3 phosphorylation[J]. J Immunotoxicol, 2016, 13(1): 27-37. DOI:10.3109/1547691X.2014.996681.
- [20] PHILLIPS M, ROMEO F, BITSAKTSIS C, et al. B7H6 derived peptides trigger TNF- α dependent immunostimulatory activity of lymphocytic NK-92MI cells[J]. Biopolymers, 2016, 13(1): 27-37. DOI: 10.1002/BIP. 22879.

[收稿日期] 2017-10-22

[修回日期] 2018-02-13

[本文编辑] 党瑞山