

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.01.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250108.0941.003\(2025-01-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250108.0941.003(2025-01-08))NK 细胞对结直肠癌细胞增殖的影响^{*}刘素兵^{1,2}, 叶子瑜^{2,3}, 梁艳芳⁴, 曾今诚^{2,3△}

(1. 东莞市石排医院检验科, 广东东莞 523330; 2. 广东医科大学东莞市医学活性分子开发与转化重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东省宪华医学研究院, 广东东莞 523808; 4. 东莞市分子免疫病理研究重点实验室/东莞市滨海湾中心医院病理科, 广东东莞 523905)

[摘要] **目的** 研究自然杀伤(NK)细胞对 4 种结直肠癌(CRC)细胞株增殖的影响, 探讨过继性 NK 细胞免疫疗法治疗 CRC 的可行性, 为 CRC 诊疗提供实验依据。**方法** 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 在体外诱导活化为 NK 细胞并扩增, 采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测 NK 细胞对 CRC 细胞株 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 增殖的影响, 统计学分析比较 NK 细胞对 CRC 细胞株的抑制率。**结果** 在不同效靶比下, NK 细胞对同一种靶细胞的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$); 在不同靶细胞数量(5×10^3 个 vs. 1×10^4 个)下, NK 细胞对靶细胞 RKO(效靶比 0.4 : 1)、HCT15(效靶比 0.4 : 1 和 0.2 : 1)、HCT116(效靶比 3.2 : 1、1.6 : 1、0.8 : 1、0.4 : 1 和 0.2 : 1)及 LoVo(效靶比 1.6 : 1、0.8 : 1、0.4 : 1、0.2 : 1 和 0.1 : 1)的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$), 其余同种细胞各效靶比不同靶细胞数量组间抑制率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在不同靶细胞数量下, NK 细胞对 4 种 CRC 细胞株最高抑制率的效靶比均为 12.8 : 1。**结论** 过继性 NK 细胞免疫疗法对 CRC 的早期干预和治疗有重要意义, 且 12.8 : 1 可能是一个安全且疗效较好的效靶比。

[关键词] NK 细胞; 结直肠癌细胞; 效靶比; 细胞增殖; 过继性细胞免疫疗法

[中图法分类号] R730.51

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2025)01-0018-06

Effect of NK cells on proliferation of colorectal cancer cells^{*}LIU Subing^{1,2}, YE Ziyu^{2,3}, LIANG Yanfang⁴, ZENG Jincheng^{2,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongguan Municipal Shipai Hospital, Dongguan, Guangdong 523330, China; 2. Dongguan Municipal Key Laboratory of Medical Bioactive Molecular Developmental and Translational Research, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Guangdong Xianhua Institute for Medical Research, Dongguan, Guangdong 523808, China; 4. Dongguan Municipal Key Laboratory of Molecular Immunopathology/Department of Pathology, Binhaiwan Central Hospital, Dongguan, Guangdong 523905, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of NK cells on the proliferation of four kinds of colorectal cancer (CRC) lines, and to explore the feasibility of adoptive NK cell immunotherapy in the treatment of CRC so as to provide an experimental basis for the diagnosis and treatment of CRC. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated by the Ficoll density gradient centrifuge method, which were in vitro induced to activate as the NK cells and amplified. The CCK-8 method was used to detect the effect of NK cells on the proliferation of CRC cell lines RKO, HCT15, HCT116 and LoVo. The inhibition rate of NK cells on CRC cell lines was statistically analyzed and compared. **Results** The inhibitory rate of NK cells against the same target cells was significantly different at different effect target ratios ($P < 0.05$). Under different number of target cells (5×10^3 vs. 1×10^4), the inhibitory rate of NK cells against RKO (effect-target ratio 0.4 : 1), HCT15 (effect-target ratio 0.4 : 1 and 0.2 : 1), HCT116 (effect-target ratio 3.2 : 1, 1.6 : 1, 0.8 : 1, 0.4 : 1 and 0.2 : 1) and LoVo (effect-target ratio 1.6 : 1, 0.8 : 1, 0.4 : 1, 0.2 : 1 and 0.1 : 1) were significantly different ($P < 0.05$), while no statistical differences were found among other groups ($P > 0.05$). The effect-target ratio corresponding to the maximum inhibitory rate of NK cells against four CRC cell lines was 12.8 : 1 under different target cell numbers. **Conclusion** Adoptive NK cell immunotherapy has an impor-

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2024A1515012831); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2021B1515140066)。△ 通信作者, E-mail: zengjc@gdmu.edu.cn.

tant significance for the early intervention and treatment of CRC, moreover 12.8 : 1 may be a safe and effective effect-target ratio.

[Key words] NK cells; colorectal cancer cells; effect-target ratio; cell proliferation; adoptive cell immunotherapy

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床上最常见的消化道恶性肿瘤之一,其主要是源自结肠和直肠腺上皮的恶性肿瘤^[1]。据统计,2020 年全球 CRC 约有 188 万例新发病例和 92 万例死亡病例^[2]。此外,有研究推测,到 2035 年 CRC 的新发病例可能增加到近 250 万例^[3]。因此,探究安全且有效的治疗方法对 CRC 的早期干预和治疗具有十分重要的意义。自然杀伤(natural killer, NK)细胞是一种天然免疫细胞,具有较强的抗肿瘤活性^[4]。近年来,大量的研究显示 NK 细胞在抗肿瘤免疫中有极大的应用价值,是极具前景的过继性细胞免疫疗法的效应细胞^[5]。目前,过继性 NK 细胞免疫疗法已用于乳腺癌、肾细胞癌、肺癌等多种癌症的治疗^[6-7]。本研究通过检测 NK 细胞对 4 种 CRC 细胞株增殖的影响,探讨 NK 细胞回输治疗 CRC 的可行性,为 CRC 治疗策略提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

CRC 细胞株 RKO、HCT15、HCT116 和 LoVo 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;RPMI-1640 培养基、青/链霉素、胎牛血清和胰酶购自美国 Gibco 公司;MEM 培养基、McCoy's 5A 培养基和 Ham's F-12K 培养基均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;ALyS505NK-AC 无血清培养基、ALyS505NK-EX 无血清培养基和 NK Cell Induction Reagent 试剂盒(ALyS505NK-A Reagent 和 ALyS505NK-B Reagent)购自珠海贝索细胞科学技术有限公司;外周血单个核细胞分离液购自天津灏阳生物制品科技有限公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本同仁研究所;抗 CD3-FITC 抗体和抗 CD56-PE 抗体均购自美国 Biolegend 公司。酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;离心机购自长沙湘智离心机仪器有限公司;细胞培养箱购自益世科(上海)企业发展有限公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

CRC 细胞株 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 分别培养于含 1% 青/链霉素和 10% 胎牛血清的 MEM 培养基、RPMI-1640 培养基、McCoy's 5A 培养基、Ham's F-12K 培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞进行后续试验。

1.2.2 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细

胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)

采用肝素钠采血管收集人外周血后,用巴氏吸管将血液沿着管壁缓慢加入至装有单个核细胞分离液的离心管中,水平离心机升降速度调至 0,室温下 800 r/min 离心 25 min。用巴氏吸管轻轻吸出第二层白膜层(即单个核细胞层)至新的离心管中,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤细胞 2 次,并计数。

1.2.3 制备自体血浆

用巴氏吸管轻轻吸取步骤 1.2.2 中第一层血浆层,56 ℃ 加热 30 min,恢复至室温后,1 200 r/min 离心 10 min,收集上清液即为灭活自体血浆,4 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 包被抗体

T75 悬浮细胞培养瓶中加入 1 mL ALyS505NK-A Reagent 包被液和 9 mL PBS;缓慢晃动培养瓶,使液体均匀分布至培养瓶表面;室温放置 1 h 后,轻轻移除包被液,用 10 mL PBS 轻轻洗涤培养瓶 1 次。

1.2.5 诱导活化 NK 细胞

200 mL ALyS505NK-AC 培养基中加入 1 mL ALyS505NK-B Reagent,配制成 NK 细胞诱导培养基(INDM 培养基)。用 18 mL INDM 培养基和 2 mL 灭活自体血浆重悬 PBMCs,调整细胞浓度为 1.5×10^6 /mL。随后将细胞悬液轻轻加入已包被好的 T75 悬浮细胞培养瓶中,于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。在第 3 天补充 INDM 培养基,在第 5 天补充 INDM 培养基和 10% 灭活自体血浆。

1.2.6 扩增 NK 细胞

将人重组 IL-2 加入至 ALyS505NK-EX 无血清培养基中,使 IL-2 终浓度为 1 000 IU/mL,配置成 NK 细胞扩增培养基(EXPM 培养基)。在诱导第 7 天时,将 T75 悬浮细胞培养瓶中的细胞悬液均匀转入两个细胞培养袋中,并补充 EXPM 培养基,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。并在培养第 9、11 天继续补充 EXPM 培养基。培养至第 14 天后,收集细胞悬液,650 r/min 离心 10 min。收集的细胞用于后续实验。

1.2.7 流式细胞术验证 NK 细胞含量

200 μ L PBS 重悬适量 1.2.6 中收获的细胞,分别加入 1 μ L 抗 CD3-FITC 抗体和抗 CD56-PE 抗体,室温避光孵育 30 min。PBS 洗涤和重悬细胞,采用流式细胞分析仪检测 CD3⁺CD56⁺ 细胞含量,即为 NK 细胞含量。采用 FlowJo V10 软件对流式细胞仪检测数

据进行分析。

1.2.8 CCK-8 试验检测 NK 细胞毒活性

收集处于对数生长期 CRC 细胞及培养至第 14 天的 NK 细胞。以 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 4 种 CRC 细胞为靶细胞,NK 细胞为效应细胞。将 5×10^3 和 1×10^4 个靶细胞分别接种至 96 孔板中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 12 h 后再加入效应细胞。实验组按照不同效靶比(12.8 : 1、6.4 : 1、3.2 : 1、1.6 : 1、0.8 : 1、0.4 : 1、0.2 : 1、0.1 : 1)分别加入效应细胞,同时设置相应的靶细胞孔和效应细胞孔。共同培养 24 h 后,每孔中加入 CCK-8 试剂孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度(optical density,OD)值,NK 细胞毒活性以抑制

率表示,计算公式:抑制率(%)=[1-(实验孔 OD 值-效应细胞孔 OD 值)/靶细胞孔组 OD 值] $\times 100\%$ 。

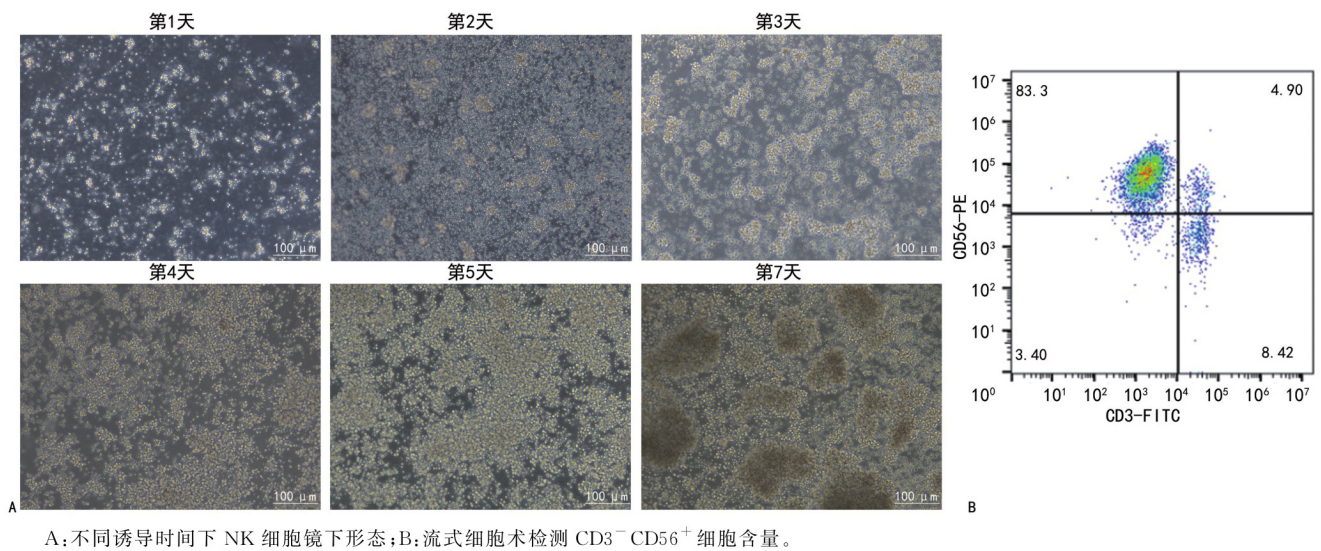
1.3 统计学处理

采用 GraphPad8.4.3 软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NK 细胞的培养与鉴定

在显微镜下观察,诱导第 1 天镜下可见单个、大小均一的圆形或椭圆形细胞,第 2 天后渐渐出现聚团现象,第 7 天出现明显的细胞集落,见图 1A。采用流式细胞术分析 $\text{CD}3^-\text{CD}56^+$ 细胞含量,结果显示 NK 细胞在 PBMCs 中含量高达 83.30% ,见图 1B。



A:不同诱导时间下 NK 细胞镜下形态;B:流式细胞术检测 $\text{CD}3^-\text{CD}56^+$ 细胞含量。

图 1 NK 细胞的培养与鉴定

2.2 NK 细胞对 RKO 的影响

当靶细胞 RKO 数量为 5×10^3 个时,效靶比 12.8 : 1 和 6.4 : 1 的 NK 细胞对 RKO 的抑制率明显高于其他效靶比($P<0.05$);当靶细胞 RKO 数量为 1×10^4 个时,效靶比 12.8 : 1 和 6.4 : 1 的 NK 细胞对 RKO 的抑制率也明显高于其他效靶比($P<0.05$);效靶比为 0.4 : 1 时,RKO 数量为 5×10^3 组与 1×10^4 组中 NK 细胞对 RKO 的抑制率差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 NK 细胞对 HCT15 的影响

当靶细胞 HCT15 数量为 5×10^3 个时,效靶比 12.8 : 1、6.4 : 1 和 3.2 : 1 的 NK 细胞对 HCT15 的抑制率明显高于其他效靶比($P<0.05$);当靶细胞 HCT15 数量为 1×10^4 个时,效靶比 12.8 : 1 和 6.4 : 1 的 NK 细胞对 HCT15 的抑制率也明显高于其他效靶比($P<0.05$);效靶比为 0.4 : 1 和 0.2 : 1 时,HCT15 数量为 5×10^3 组与 1×10^4 组中 NK 细胞对靶细胞 HCT15 的抑制率差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 NK 细胞对靶细胞 RKO 的抑制率(%)

效靶比	靶细胞 RKO 数量		<i>t</i>	<i>P</i>
	5×10^3 个	1×10^4 个		
12.8 : 1	87.52 ± 1.62	82.86 ± 1.85	0.425	0.999 9
6.4 : 1	74.62 ± 4.12	59.84 ± 3.24	1.347	0.810 1
3.2 : 1	57.18 ± 6.08^a	37.87 ± 4.70^a	1.760	0.521 6
1.6 : 1	50.99 ± 7.38^a	47.72 ± 7.62^a	0.667	0.996 6
0.8 : 1	55.80 ± 2.76^a	37.41 ± 9.49^a	0.211	$>0.999\ 9$
0.4 : 1	42.98 ± 7.09^{ab}	-7.36 ± 4.10^{abcde}	4.587	0.000 5
0.2 : 1	31.59 ± 7.96^{ab}	5.74 ± 0.55^{abcde}	2.355	0.182 0
0.1 : 1	38.46 ± 1.82^{ab}	27.48 ± 4.20^{abf}	1.001	0.956 7

^a: $P<0.05$,与 12.8 : 1 比较;^b: $P<0.05$,与 6.4 : 1 比较;^c: $P<0.05$,与 3.2 : 1 比较;^d: $P<0.05$,与 1.6 : 1 比较;^e: $P<0.05$,与 0.8 : 1 比较;^f: $P<0.05$,与 0.4 : 1 比较。

2.4 NK 细胞对 HCT116 的影响

当靶细胞 HCT116 数量为 5×10^3 个时,效靶比 12.8 : 1 和 6.4 : 1 的 NK 细胞对 HCT116 的抑制率明显高于其他效靶比($P<0.05$);当靶细胞 HCT116 数量为 1×10^4 个时,效靶比 12.8 : 1 的 NK 细胞对 HCT116 的抑制率也明显高于其他效靶比($P<$

0.05);效靶比 3.2 : 1、1.6 : 1、0.8 : 1、0.4 : 1 和 0.2 : 1 时,HCT116 数量为 5×10^3 组与 1×10^4 组中 NK 细胞对靶细胞 HCT116 的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 2 NK 细胞对靶细胞 HCT15 的抑制率 (%)

效靶比	靶细胞 HCT15 数量		<i>t</i>	<i>P</i>
	5×10^3 个	1×10^4 个		
12.8 : 1	91.93±0.06	92.60±0.82	0.107	>0.999 9
6.4 : 1	81.38±4.66	85.92±2.56	0.714	0.994 7
3.2 : 1	68.34±1.46	50.50±3.47 ^{ab}	2.808	0.065 4
1.6 : 1	54.56±5.17 ^{ab}	56.08±1.48 ^{ab}	0.239	>0.999 9
0.8 : 1	48.05±8.80 ^{ab}	31.28±9.37 ^{abd}	2.639	0.097 6
0.4 : 1	42.87±5.12 ^{abc}	-24.53±2.85 ^{abcde}	10.610	<0.000 1
0.2 : 1	30.91±4.84 ^{abc}	-30.06±2.80 ^{abcde}	9.597	<0.000 1
0.1 : 1	34.54±3.76 ^{abc}	18.41±2.47 ^{abcdfg}	2.539	0.122 2

^a: $P < 0.05$,与 12.8 : 1 比较;^b: $P < 0.05$,与 6.4 : 1 比较;^c: $P < 0.05$,与 3.2 : 1 比较;^d: $P < 0.05$,与 1.6 : 1 比较;^e: $P < 0.05$,与 0.8 : 1 比较;^f: $P < 0.05$,与 0.4 : 1 比较;^g: $P < 0.05$,与 0.2 : 1 比较。

表 3 NK 细胞对靶细胞 HCT116 的抑制率 (%)

效靶比	靶细胞 HCT116 数量		<i>t</i>	<i>P</i>
	5×10^3 个	1×10^4 个		
12.8 : 1	98.56±1.43	95.70±0.23	0.573	0.998 8
6.4 : 1	86.03±1.21	73.38±6.41 ^a	2.532	0.124 2
3.2 : 1	72.36±2.76 ^a	55.89±3.36 ^{ab}	3.296	0.019 1
1.6 : 1	60.58±5.18 ^{ab}	44.40±4.35 ^{ab}	3.238	0.022 2
0.8 : 1	36.88±7.13 ^{abcd}	-4.70±2.87 ^{abcd}	8.320	<0.000 1
0.4 : 1	19.74±0.69 ^{abcd}	-10.07±0.69 ^{abcd}	5.964	<0.000 1
0.2 : 1	23.76±3.35 ^{abcd}	-4.54±3.53 ^{abcd}	5.663	<0.000 1
0.1 : 1	27.76±0.89 ^{abcd}	27.53±2.48 ^{abcefg}	0.045	>0.999 9

^a: $P < 0.05$,与 12.8 : 1 比较;^b: $P < 0.05$,与 6.4 : 1 比较;^c: $P < 0.05$,与 3.2 : 1 比较;^d: $P < 0.05$,与 1.6 : 1 比较;^e: $P < 0.05$,与 0.8 : 1 比较;^f: $P < 0.05$,与 0.4 : 1 比较;^g: $P < 0.05$,与 0.2 : 1 比较。

2.5 NK 细胞对 LoVo 的影响

当靶细胞 LoVo 数量为 5×10^3 个时,效靶比 12.8 : 1、6.4 : 1 和 3.2 : 1 的 NK 细胞对 LoVo 的抑制率明显高于其他效靶比($P < 0.05$);当靶细胞 LoVo 数量为 1×10^4 个时,效靶比 12.8 : 1 的 NK 细胞对 LoVo 的抑制率也明显高于其他效靶比($P <$

0.05);效靶比 1.6 : 1、0.8 : 1、0.4 : 1、0.2 : 1 和 0.1 : 1 时,LoVo 数量 5×10^3 组与 1×10^4 组中 NK 细胞对靶细胞 LoVo 的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.6 NK 细胞对 CRC 细胞株的影响

本实验设置了不同细胞数量的靶细胞组,比较了 NK 细胞对不同 CRC 细胞的抑制率。结果表明,当靶细胞数量为 5×10^3 时,NK 细胞对靶细胞 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 达到最高抑制率的效靶比均为 12.8 : 1,且各种细胞间抑制率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 2A;当靶细胞数量为 1×10^4 时,NK 细胞对靶细胞 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 达到最高抑制率的效靶比也均为 12.8 : 1,且各种细胞间抑制率比较差异也均无统计学意义($P > 0.05$)。而随着效靶比的下降,NK 细胞对 4 种靶细胞的抑制率均有不同程度的下降。当靶细胞数量为 1×10^4 时,NK 细胞对靶细胞 RKO 的抑制率在效靶比为 0.4 : 1 时为负数,此时 NK 细胞对 RKO 无抑制作用;NK 细胞对靶细胞 HCT15 的抑制率在效靶比为 0.4 : 1 和 0.2 : 1 时为负数,说明此时 NK 细胞对 HCT15 无抑制作用;NK 细胞对靶细胞 HCT116 的抑制率在效靶比为 0.8 : 1、0.4 : 1 和 0.2 : 1 时为负数,表明此时 NK 细胞对 HCT116 无抑制作用,见图 2B。

表 4 NK 细胞对靶细胞 LoVo 的抑制率 (%)

效靶比	靶细胞 LoVo 数量		<i>t</i>	<i>P</i>
	5×10^3 个	1×10^4 个		
12.8 : 1	95.13±2.34	96.25±2.17	0.320	>0.999 9
6.4 : 1	90.71±1.26	86.27±0.36 ^a	1.263	0.857 0
3.2 : 1	82.74±2.19	73.48±1.47 ^{ab}	2.634	0.098 5
1.6 : 1	71.00±4.88 ^{ab}	53.59±1.95 ^{abc}	4.951	0.000 2
0.8 : 1	55.18±4.69 ^{abcd}	23.27±0.39 ^{abcd}	9.077	<0.000 1
0.4 : 1	46.04±0.91 ^{abcd}	16.27±1.24 ^{abcd}	8.466	<0.000 1
0.2 : 1	44.49±2.82 ^{abcd}	12.10±3.45 ^{abcde}	9.212	<0.000 1
0.1 : 1	50.15±2.58 ^{abcd}	33.53±1.24 ^{abcdef}	4.727	0.000 4

^a: $P < 0.05$,与 12.8 : 1 比较;^b: $P < 0.05$,与 6.4 : 1 比较;^c: $P < 0.05$,与 3.2 : 1 比较;^d: $P < 0.05$,与 1.6 : 1 比较;^e: $P < 0.05$,与 0.8 : 1 比较;^f: $P < 0.05$,与 0.4 : 1 比较。

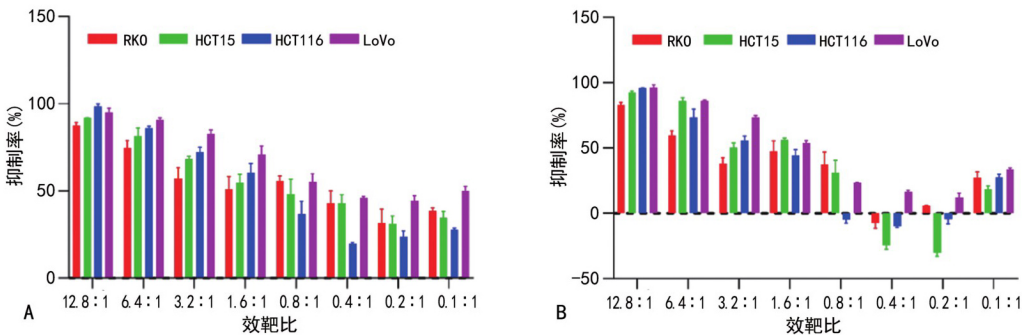


图 2 NK 细胞对 CRC 细胞株增殖的影响

3 讨 论

NK 细胞是一类起源于骨髓祖细胞的效应性先天淋巴样细胞^[8-13],主要存在于肝脏、骨髓和血液中,约占外周淋巴细胞总数的 10%。NK 细胞是固有免疫反应的关键成员之一,能够通过分泌细胞因子和介导细胞毒作用促进机体抗感染或抗肿瘤等免疫反应。相对于 T 细胞而言,NK 细胞不会引起移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD),能明显降低细胞因子释放综合征和免疫效应细胞相关神经毒性综合征的毒性,这为其靶向癌细胞的免疫疗法奠定了基础^[14-16]。随着对 NK 细胞的认识不断深入,研究者已经设计出多种利用 NK 细胞的治疗策略,目前正处于从基础研究到临床试验的不同阶段^[17]。在当前的过继性 NK 细胞免疫疗法中,NK 细胞主要的组织来源包括外周血、脐带血、造血干/祖细胞和诱导多能干细胞^[14]。此外,已有研究证实 NK 细胞具有 CD3⁻CD56⁺的免疫表型^[18-19]。因此,本研究采用 Ficoll 密度梯度离心法分离健康人外周血中 PBMCs,并在体外活化扩增 NK 细胞,采用流式细胞术对 NK 细胞的免疫表型 CD3⁻CD56⁺进行鉴定,发现经诱导外周血中 NK 细胞含量高达 83.30%。本研究结果说明,采用 NK 细胞诱导试剂盒体外活化诱导和扩增 NK 细胞,可以制备大量高纯度的 NK 细胞,为临床应用 NK 细胞奠定了良好的基础。

过继性细胞免疫疗法是一种很有前景的靶向癌细胞的免疫治疗模式,通过将具有肿瘤杀伤能力的经体外扩增活化的工程化免疫细胞转移到癌症患者体内,有效地激发机体抗肿瘤免疫反应^[20-22]。细胞毒性实验结果表明,靶细胞数量为 5×10^3 和 1×10^4 时,NK 细胞对靶细胞 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 达到最高抑制率的效靶比均为 12.8 : 1;随着效靶比的下降,NK 细胞对 CRC 细胞株的抑制率出现了不同程度的下降。该结果提示采用过继性 NK 细胞免疫疗法治疗 CRC 时,12.8 : 1 可能是一个既安全且效果最佳的效靶比。

LoVo 细胞来源于一名罹患 Dukes C 型结肠腺癌的男性左锁骨上区肿瘤转移灶,属于未分化结直肠腺癌细胞株,恶性程度较高,发展速度较快,容易出现远处转移^[23]。HCT15 细胞来源于一名罹患 Dukes C 型 CRC 的男性^[24]。RKO 细胞是一种上皮样低分化结肠癌细胞株^[25]。HCT116 细胞来源于罹患结肠癌的成年男性,也属于低分化 CRC 细胞株。本研究结果显示 NK 细胞对未分化细胞株 LoVo 的最高抑制率在靶细胞数量为 5×10^3 和 1×10^4 时均高于 90%;而 NK 细胞对低分化细胞株 HCT116 的最高抑制率在

靶细胞数量为 5×10^3 和 1×10^4 时分别为 $(98.56 \pm 1.43)\%$ 和 $(95.70 \pm 0.23)\%$,在 4 种 CRC 细胞株中抑制率相对较高,提示 NK 细胞对分化程度较低的 CRC 细胞株的抑制效果较好。此外,NK 细胞对 4 种 CRC 细胞株的最高抑制率在靶细胞数量为 5×10^3 和 1×10^4 时均高于 80%,提示 NK 细胞对多数 CRC 有较好的抑制效果,说明过继性 NK 细胞免疫疗法在治疗 CRC 方面具有可行性。

本实验采用 CCK-8 法检测了 NK 细胞对 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 4 种 CRC 细胞株增殖的影响,结果表明 NK 细胞对 4 种 CRC 细胞株 RKO、HCT15、HCT116、LoVo 达到最高抑制率相应的效靶比均为 12.8 : 1,且抑制率不受靶细胞数量的影响,提示应用过继性 NK 细胞免疫疗法治疗 CRC 时,12.8 : 1 可能是一个安全且效果较好的效靶比。

目前,过继性 NK 细胞免疫疗法已被视为一种有效的肿瘤治疗方法。本研究结果为过继性 NK 细胞免疫疗法治疗 CRC 的临床研究提供理论基础。但本研究主要针对体外细胞实验,后续仍需进行体内实验,进一步探究过继性 NK 细胞免疫疗法在 CRC 患者中的反应性。

参考文献

- [1] BLANK A, ROBERTS D E, DAWSON H, et al. Tumor heterogeneity in primary colorectal cancer and corresponding metastases. Does the apple fall far from the tree? [J]. Front Med (Lausanne), 2018, 5: 234.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] XIE Y H, CHEN Y X, FANG J Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 22.
- [4] GHAZVINIAN Z, ABDOLAH S, TOKHAN-BIGLI S, et al. Contribution of natural killer cells in innate immunity against colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2023, 12: 1077053.
- [5] HU W, WANG G, HUANG D, et al. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities [J].

- Front Immunol, 2019, 10:1205.
- [6] ABEL A M, YANG C, THAKAR M S, et al. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization [J]. Front Immunol, 2018, 9:1869.
- [7] CHENG M, CHEN Y, XIAO W, et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2013, 10(3):230-252.
- [8] FREUD A G, MUNDY-BOSSE B L, YU J, et al. The broad spectrum of human natural killer cell diversity [J]. Immunity, 2017, 47(5):820-833.
- [9] MORETTA A, BOTTINO C, MINGARI M C, et al. What is a natural killer cell? [J]. Nat Immunol, 2002, 3(1):6-8.
- [10] MORETTA L, BOTTINO C, PENDE D, et al. Human natural killer cells: their origin, receptors and function [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(5):1205-1211.
- [11] MORVAN M G, LANIER L L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(1):7-19.
- [12] VIVIER E, RAULET D H, MORETTA A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells [J]. Science, 2011, 331(6013):44-49.
- [13] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells [J]. Nat Immunol, 2008, 9(5):503-510.
- [14] BERRIEN-ELLIOTT M M, JACOBS M T, FEHNIGER T A. Allogeneic natural killer cell therapy [J]. Blood, 2023, 141(8):856-868.
- [15] CHAN L Y, DASS S A, TYE G J, et al. CAR-T cells/-NK cells in cancer immunotherapy and the potential of msc to enhance its efficacy: a review [J]. Biomedicines, 2022, 10(4):804.
- [16] LIM O, JUNG M Y, HWANG Y K, et al. Present and future of allogeneic natural killer cell therapy [J]. Front Immunol, 2015, 6:286.
- [17] VIVIER E, REBUFFET L, NARNI-MANCINELLI E, et al. Natural killer cell therapies [J]. Nature, 2024, 626(8000):727-736.
- [18] TSE E, KWONG Y L. Recent advances in the diagnosis and treatment of natural killer cell malignancies [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(3):597.
- [19] CICHOCKI F, GRZYWACZ B, MILLER J S. Human NK cell development: one road or many? [J]. Front Immunol, 2019, 10:2078.
- [20] KONG J C, SA'AD M A, VIJAYAN H M, et al. Chimeric antigen receptor-natural killer cell therapy: current advancements and strategies to overcome challenges [J]. Front Immunol, 2024, 15:1384039.
- [21] 全家乐, 康彦良, 张万里, 等. 肿瘤免疫治疗中过继性细胞疗法的研究进展 [J]. 药学进展, 2021, 45(10):725-734.
- [22] 李利君, 孟庆威. 免疫检查点抑制剂联合过继性细胞疗法在实体瘤中的研究进展 [J]. 癌症, 2022, 41(4):153-159.
- [23] DREWINKO B, YANG L Y, BARLOGIE B, et al. Further biologic characteristics of a human carcino-embryonic antigen-producing colon carcinoma cell line [J]. J Natl Cancer Inst, 1978, 61(1):75-83.
- [24] CHEN T R, DOROTINSKY C S, MCGUIRE L J, et al. DLD-1 and HCT-15 cell lines derived separately from colorectal carcinomas have totally different chromosome changes but the same genetic origin [J]. Cancer Genet Cytogenet, 1995, 81(2):103-108.
- [25] BOYD D, FLORENT G, KIM P, et al. Determination of the levels of urokinase and its receptor in human colon carcinoma cell lines [J]. Cancer Res, 1988, 48(11):3112-3116.

(收稿日期:2024-03-09 修回日期:2024-09-25)

(编辑:姚 雪)