

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.24.014

· 免疫学技术与方法 ·

冷冻保存对 NK 细胞活率及其肿瘤杀伤效果的影响^①

刘春香 张 怡 (天晴干细胞股份有限公司, 哈尔滨 150028)

中图分类号 R392.12 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2021)24-3010-05

[摘要] 目的:对比新鲜及冻存复苏的NK细胞的存活率及肿瘤杀伤效果,以便评价冻存的同种异体NK细胞作为即用型产品应用于临床治疗的可行性。方法:利用台盼蓝染色法对冻存前、冻存3个月复苏后及复苏后4℃存放24h时NK细胞进行存活率检测;通过ELISA方法对冻存前后NK细胞IFN- γ 表达量检测;利用流式细胞术对其表面活化性受体表达情况进行检测的同时利用RTCA S16系统检测其对A549肿瘤细胞的杀伤作用。结果:冻存复苏后细胞活率为(92.17 \pm 1.37)%,复苏后4℃保存24h后仍为(79.97 \pm 1.22)%;新鲜NK和冻存NK细胞的IFN- γ 分泌量分别为(5 967.0 \pm 517.8) pg/ml和(4 861.0 \pm 941.4) pg/ml,二者未见显著性差异($P>0.05$),同时,NK细胞冻存后受体NCR2及NKG2D较冻存前均未有明显下降;对A549细胞的杀伤作用中,效靶比(E:T)为10:1和5:1时,冻存复苏NK的杀伤效果与新鲜培养NK细胞无显著性差异,仅在高效靶比(E:T=20:1)时冻存NK杀伤作用低于新鲜NK的杀伤作用($P<0.05$)。结论:经过对比研究表明,冷冻保存的NK细胞满足临床应用所要求的活率和高效杀伤肿瘤细胞能力,可以发展成为即用型细胞药物,具有广泛的临床应用前景。

[关键词] 新鲜NK;冻存NK;细胞活率;肿瘤杀伤活性

Effects of cryopreservation on viability and tumor killing activity of NK cells

LIU Chun-Xiang, ZHANG Yi. Tianqing Stem Cell Co., Ltd., Harbin 150028, China

[Abstract] **Objective:** To compare the viability and tumor killing effect of fresh and frozen NK cells in order to evaluate the possibility of cryopreserved allogeneic NK cells for clinical treatment. **Methods:** The viability of NK cells before freezing, frozen after 3 months and stored at 4℃ for 24 h after recovery was determined by trypan blue exclusion method; IFN- γ expression of NK cells before and after freezing was detected by ELISA. NK surface activation receptors were analyzed by flow cytometry. Killing effect of fresh or thawed NK cells against A549 was revealed by RTCA S16 System Bundle. **Results:** The viability of cryopreserved cells was (92.17 \pm 1.37)% immediately after thawing and dropped to (79.97 \pm 1.22)% stored at 4℃ for 24 h after recovery, which met the criteria for clinical application. No significant difference was found ($P>0.05$) in IFN- γ secretion of fresh vs frozen NK cells (5 967.0 \pm 517.8 pg/ml vs 4 861.0 \pm 941.4 pg/ml). There was no significant difference in the expression of NK activation receptors NCR2 and NKG2D in cryopreserved and fresh NK cells; The killing activity of cryopreserved NK cells against A549 was no significant difference at E:T=10:1 and E:T=5:1 ($P>0.05$), except E:T=20:1 ($P<0.05$). **Conclusion:** Cryopreserved NK cells can achieve the clinical required viability and high efficiency to kill tumor cells, suggesting that cryopreserved NK can be developed into ready-to-use cellular drugs for clinical applications.

[Key words] Fresh NK; Cryopreserved NK; Cell viability; Tumor killing activity

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是一类重要的淋巴细胞,是人类固有免疫的首道天然防线。由于其具有对异常细胞的杀伤与清除作用,近年来在生物技术和细胞药物研究领域越来越受到重视。

NK细胞与T细胞和B细胞的区别在于,其为主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)非限制性免疫类细胞,并且不需要预先致敏即可行使其免疫识别、防疫和维稳等功能^[1]。

NK细胞发挥作用主要依靠所分泌的细胞因子及膜受体。O'SULLIVAN等^[2]发现,NK细胞对肿瘤杀伤作用依赖于所分泌产生的干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)的作用及其对肿瘤微环境中巨噬细胞的激活作用;同时,IFN- γ 可以选择性地抑制肿瘤细胞增殖、遏制肿瘤内血管的快速生成^[3]。NK细胞的膜受

^①本文受黑龙江省应用技术与开发计划项目(GZ18C001)资助。

作者简介:刘春香,女,硕士,助理研究员,主要从事免疫细胞改造及免疫细胞功能的研究。

通信作者及指导教师:张 怡,女,博士,高级工程师,主要从事细胞功能及临床转化研究,E-mail:neo_yi_zhang@163.com。

体主要分为抑制性受体和激活性受体两大类,这些受体通过识别自己与非己来调节及平衡细胞毒性作用。激活型受体主要为自然杀伤细胞基因2D (natural killer cell group 2D, NKG2D)和自然细胞毒性受体 (natural cytotoxicity receptors, NCR)^[4-5]。研究发现,当肿瘤患者NKG2D表达受到抑制时,NK细胞分泌IFN、激活T细胞并介导细胞毒性作用显著下降^[6]。NCR是近10年发现的NK细胞毒性特异性活化受体,包括3种异质性分子:NKp46、NKp44、NKp30,能够识别病毒硫酸乙酰肝素、凝血素、PCNA、B7等特定肿瘤抗原,其中NKp44仅表达于活化的NK细胞^[4,6]。NCR在辨识和清除靶细胞时,可单独或与其他受体一起作用,例如NK对黑色素瘤杀伤时,NCR发挥主要作用,而NCR表达低下时,NKG2D则会辅助NCR,加强对肿瘤抗原的识别^[7-8]。由于癌症患者自身NK细胞数量的减少及功能异常,使自体NK细胞扩增能力及功能受到限制,因此科学家们致力于同种异体NK细胞的安全性及有效性研究^[9-10]。KLINGEMANN等^[11]研究表明,同种异体NK细胞在多发性骨髓瘤和淋巴瘤治疗中具有很高的安全性和较好的抗肿瘤活性。HOLUBOVA等^[12]研究表明,冷冻保存的NK细胞具有较高的肿瘤杀伤活性。本研究欲在此基础上,通过对生产的新鲜NK细胞与冻存NK细胞活率、因子分泌能力及部分表面活化性受体的变化对比来确定NK细胞冻存前后的差异,同时利用A549细胞对冻存前后NK细胞进行肿瘤杀伤能力检测,为批量扩增并冷冻保存的同种异体NK细胞作为即用型产品而应用于临床提供有力支持。

1 材料与方 法

1.1 材料 淋巴细胞分离液Ficoll-Paque PLUS为GE公司产品;4-1BBL、IL-15和IL-21基因修饰的K562滋养细胞由本实验室保存;IL-2购自北京四环制药有限公司;GT-T551 H3培养基、2L细胞培养袋均为TaKaRa公司产品;T75、T175细胞培养瓶均为Nest品牌产品;15 ml、50 ml细胞离心管均为Corning公司产品;CO₂细胞培养箱、离心机、酶标仪为美国Thermo公司产品;显微镜为日本Olympus公司产品;KX-21血细胞分析仪为日本SYSMEX公司产品;流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司产品;Rabbit anti-human NKG2D IgG/FITC、Rabbit anti-human NCR2 IgG/FITC均购自北京博奥森生物科技有限公司;RTCA S16系统为ACEA公司产品;人肺癌细胞

A549由ACEA公司赠送;胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM培养基均由美国Gibco公司生产;IFN- γ ELISA试剂盒购自哈尔滨赛莱博科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 新鲜NK细胞及冻存NK细胞解冻后的活率检测 PBMCs分离:根据参考文献^[13]进行,将成人外周血2 000 r/min离心10 min后吸出血浆,56℃水浴灭活30 min,备用;血细胞用生理盐水稀释后加至装有Ficoll溶液的离心管中,2 000 r/min离心20 min密度梯度离心收集白膜层细胞并用生理盐水洗涤2次,计数备用。

NK扩增:根据参考文献^[13]进行,用30 ml GT-T551 H3培养基将 $2\times 10^7\sim 3\times 10^7$ 个PBMCs重悬后,接入T75细胞培养瓶,然后加入IL-2、K562滋养细胞及占培养基体积5%的灭活的自体血浆,其中IL-2为500 U/ml,滋养细胞为 1×10^6 个/ml,37℃、5%CO₂条件下体外共培养15 d,其中培养第7天时补加1次NK扩增滋养细胞,补加的NK扩增滋养细胞的数量为NK细胞数量的1/4,过程中进行补液,共培养15 d。

NK细胞冻存及冻存前后存活率计算:在培养第15天时,取200 μ l NK细胞,台盼蓝染色后用血细胞计数板进行计数及计算细胞活率,染色后细胞取样计数3次;根据所测得的细胞密度进行细胞冻存,冻存液为:50%GT-T551 H3培养基,10%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),40%FBS,冻存密度为 8×10^6 个/ml。NK细胞冻存3个月后37℃水浴解冻,取 2×10^6 个细胞加入1~2 ml生理盐水,取200 μ l进行台盼蓝染色后用血细胞计数板进行计数及计算细胞存活率,染色后细胞取样计数3次;同时取 2×10^6 个细胞离心去除冻存液并利用1~2 ml生理盐水重悬4℃保存24 h后取200 μ l进行台盼蓝染色后用血细胞计数板进行计数及计算细胞存活率,染色后细胞取样计数3次。

1.2.2 ELISA方法对新鲜及冻存的NK细胞进行IFN- γ 分泌能力检测 将新鲜NK细胞用无血清GT-T551 H3培养基稀释至 1×10^6 个/ml,取2 ml接种6孔板,培养48 h后1 500 r/min离心5 min收取上清,-80℃冷冻保存;新鲜NK细胞冻存3个月后37℃水浴解冻进行计数,同样将其用无血清GT-T551 H3培养基稀释接种6孔板,培养48 h后离心收取培养上清,-80℃冷冻保存。

将 IFN- γ ELISA 检测试剂盒室温平衡 20 min 后,按照说明书加样要求进行样本加样,最终利用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的 OD 值,利用标准品绘制标准曲线,从而根据各孔对应 OD 值计算出相应浓度。

1.2.3 新鲜NK细胞与冻存NK细胞表面活化性受体表达差别分析 取培养第15天的新鲜NK细胞 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清,用 PBS 重悬计数后取 3×10^6 个/ml 制成密度为 2×10^6 个/ml 的单细胞悬液,并将其平均分成 3 管,分别加入抗体 IgG1-FITC、anti-NKG2D-FITC、anti-NCR2-FITC, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次后进行流式细胞仪检测。取冻存 3 个月的 NK 细胞进行 37 $^{\circ}$ C 水浴解冻, PBS 洗涤后制备单细胞悬液并进行流式细胞仪检测,具体方法与新鲜 NK 细胞的检测方法相同。

1.2.4 新鲜NK细胞与冻存NK细胞的肿瘤的杀伤效果对比研究 实验分组:本研究共分为 4 组,分别为靶细胞对照组及 3 个实验组,3 个实验组分别为 E:T[E:T 为效靶比,即 NK 细胞数(效应细胞, E)与肿瘤细胞数(靶细胞, T)的比例]为 20:1 组、10:1 组、5:1 组。

实验过程:肺癌细胞 A549 经胰蛋白酶消化变圆后,用含 10%FBS 的 DMEM 终止后 1 300 r/min 离心 5 min, 去除上清,用新鲜培养基稀释计数,最终稀释成 1×10^5 个/ml。向 E-Plate 16 PET 板每孔中加入 50 μ l 培养基,于 RTCA S16 系统的检测平台上检测基线,保证各孔的 Cell Index 低于 0.063; 取出 E-Plate 16 PET 并向孔中加入 100 μ l A549 细胞悬液,于 RTCA 检测平台上过夜培养。培养后的细胞分成 4 组,分别为 E:T=20:1 组、E:T=10:1 组、E:T=5:1 组及靶细胞对照组,每组 2 个平行孔。在肿瘤细胞接种约 19 h 时加入 NK 细胞。取培养第 15 天的新鲜 NK 细胞用肿瘤细胞培养基稀释细胞至 4×10^6 个/ml、 2×10^6 个/ml、 1×10^6 个/ml 后,依次加入 E:T=20:1 组、E:T=10:1 组、E:T=5:1 组对应孔中,细胞悬液量为 50 μ l,靶细胞对照组中加入 50 μ l 培养基,实时观察杀伤效果;NK 细胞冻存 3 个月后,取出于 37 $^{\circ}$ C 水浴中解冻,进行肿瘤杀伤效果检测,检测方法与新鲜 NK 细胞的肿瘤杀伤检测方法相同。杀伤率(%)=[1-(效靶细胞作用孔 Index 值-效应细胞孔 Index 值)]/靶细胞孔 Index 值 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 所有实验数据按照 $\bar{x} \pm s$ 显示,通过统计学分析软件 SPSS13.0 对数据进行独立 *t* 检验和统计学意义分析,当 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 新鲜NK细胞与冻存NK细胞存活率对比分析 本研究中,培养后的NK细胞存活率为(96.43 \pm 0.50)%,冻存NK细胞复苏后的活率可达(92.17 \pm 1.37)%,复苏后 4 $^{\circ}$ C 保存 24 h 时活率仍可达(79.97 \pm 1.22)%,虽然复苏后及复苏后 4 $^{\circ}$ C 保存 24 h 时 NK 细胞活率较冻存前有一定降低,但结果显示所冻存的 NK 细胞仍可以满足临床要求的 80% 的细胞存活率,如图 1 所示。

2.2 新鲜及冻存NK细胞IFN- γ 分泌能力检测 利用无血清培养基对新鲜和复苏 NK 细胞进行培养,细胞密度均为 1×10^6 个/ml, 24 h 后利用 ELISA 方法进行 IFN- γ 分泌量检测,结果中,新鲜 NK 的 IFN- γ 分泌量为(5 967.0 \pm 517.8)pg/ml,冻存复苏的 NK 细胞的表达量为(4 861.0 \pm 941.4)pg/ml,冻存 NK 细胞 IFN- γ 分泌能力较新鲜 NK 细胞有所降低,但未见显著差异($P > 0.05$),如图 2 所示。

2.3 新鲜NK细胞与冻存NK细胞表面活化性受体表达差别 由于 NK 细胞具有表达 NCR2 和 NKG2D 的性质,并且 NK 细胞受体 NCR2 和 NKG2D 在识别、杀伤靶细胞中起重要作用,因此对冻存前后的细胞进行该功能验证,流式细胞仪分析结果,如图 3 所示,冻存复苏的 NK 细胞与新鲜的 NK 细胞相比, NCR2 未见明显变化,而 NKG2D 的表达量却有所增加,为新鲜 NK 的 1.87 倍。由此可见,冻存后 NK 细胞 NCR2 和 NKG2D 的表达未较冻存前降低。

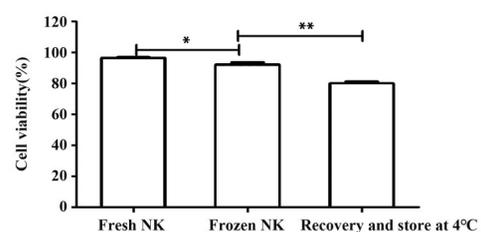


图1 冻存前后NK细胞活率对比

Fig. 1 NK cells viability before and after freezing

Note: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

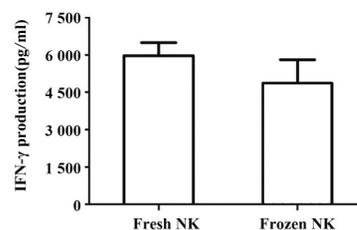


图2 新鲜及冻存NK细胞IFN- γ 分泌量

Fig. 2 IFN- γ secretion from fresh and frozen NK cells

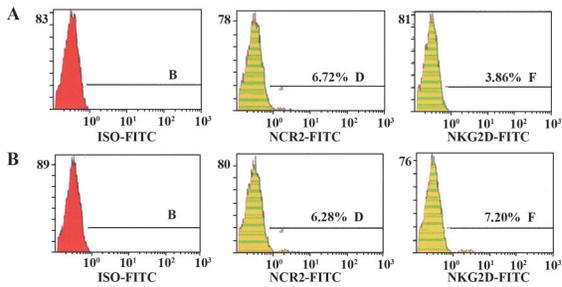


图3 新鲜NK细胞与冻存NK细胞表面活化性受体表达情况
Fig. 3 Activated receptor expression in fresh and frozen NK cells

Note: A. Fresh NK cells; B. Frozen NK cells.

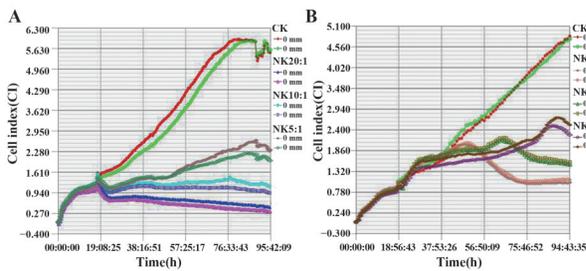


图4 NK细胞对肺癌细胞A549的实时杀肿瘤效果
Fig. 4 Real-time killing effect of NK cells on lung cancer cells A549

Note: A. Fresh NK cells; B. Frozen NK cells.

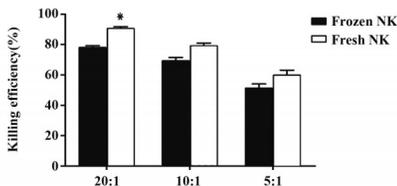


图5 96 h时NK细胞对人肺癌细胞A549的杀肿瘤效果
Fig. 5 Analysis of killing effect of NK cells on lung cancer cells A549 at 96 h

Note: *. $P < 0.05$ vs Frozen NK.

2.4 新鲜NK细胞与冻存NK细胞的肿瘤的杀伤效果对比研究 A549细胞接种量为10 000个/孔,效靶比为20:1、10:1、5:1时观察NK细胞对A549细胞的杀伤效果。结果显示,新鲜NK细胞在曲线上96 h时,效靶比为20:1、10:1、5:1的杀伤率分别为:(90.48±1.19)%、(79.16±1.79)%、(59.77±3.34)%;冻存NK细胞在曲线上96 h时,效靶比为20:1、10:1、5:1的杀伤率分别为:(78.05±1.13)%、(69.78±1.65)%、(51.21±2.86)%。E:T=20:1时,新鲜NK对A549细胞的杀伤作用显著高于冻存NK($t_{20:1}=7.593, P_{20:1}=0.0169 < 0.05$);E:T=10:1和5:1时,两组未见显著差异($t_{10:1}=3.861, P_{10:1}=0.0610 > 0.05$; $t_{5:1}=1.947, P_{5:1}=0.1909 > 0.05$),如图4、图5所示。

3 讨论

2009年5月,国家卫生监管部门制定了《自体免疫细胞(T细胞、NK细胞)治疗技术管理规范(征求意见稿)》,规范明确列出了回输时细胞应符合的最低临床标准,包括细胞数量和存活率等指标,其中要求回输时的细胞存活率应大于等于80%。本研究冻存的NK细胞复苏后活率可达(92.17±1.37)%,复苏后4℃保存24 h后活率仍可达(79.97±1.22)%,说明所冻存的NK细胞可以满足临床要求的细胞存活率。

NK细胞活性受体膜上两大类受体调控,抑制性受体和激活性受体,其中天然细胞毒性受体(NCR)和NKG2家族的NKG2D均为激活性受体^[14]。自体NK回输时,KIR可以识别自体细胞,抑制NK细胞的激活,而异体NK回输时抑制作用较弱,因此异体NK细胞的活化性受体对治疗起重要作用^[15]。本研究中,冻存复苏的NK细胞与新鲜的NK细胞相比,冻存后NK细胞NCR2和NKG2D的表达未较冻存前降低,说明冻存复苏过程不会影响NK细胞表面相关活化型受体的表达。

NK细胞具有广谱的肿瘤杀伤效果,杀伤机制包括:FasL与Fas相作用、穿孔素/颗粒酶作用、借助表面CD16与肿瘤特异性IgG发生的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、肿瘤凋亡相关因子(TNF- α 、IFN- γ)的分泌作用^[15-17]。DOMOGALA等^[18]研究发现冻存的脐血CD34阳性细胞分化成NK细胞的能力未受冻存影响,HOLUBOVA等^[19]的临床前研究表明,冻存复苏的NK细胞再iL-2激活后能表达NK细胞活化受体NKp44、NKG2D和CD25并对血液肿瘤细胞系K562具有细胞毒性作用。本研究则从人肺癌细胞系A549入手进行创新性研究,本研究发现,NK细胞在冻存后IFN- γ 分泌能力较新鲜NK细胞有所降低,但未见显著差异($P > 0.05$),说明冻存不会对IFN分泌功能产生明显影响,同时,NK细胞的肿瘤的杀伤研究发现,E:T=10:1和5:1时,新鲜与冻存复苏NK对A549细胞的杀伤作用未见显著差异(均为 $P > 0.05$);同时对新鲜和冻存NK细胞在E:T=20:1,E:T=10:1和E:T=5:1这三种效靶比下的杀伤效果进行整体差异性分析,杀伤效果未见显著性差异($P > 0.05$),因此证明冻存复苏的NK细胞对人肺癌细胞A549杀伤效能与新鲜NK接近。本研究也发现,当E:T=20:1时,新鲜NK对A549细胞的杀伤作用高于冻存NK,具有显著性差异($P < 0.05$),这可

能是NK细胞冻存复苏后部分冻存NK细胞死亡造成其对A549杀伤作用降低。在高效靶比的情况下,累积体现出来,该结果提示,未来在利用冻存复苏的NK细胞进行高效靶比临床肿瘤治疗时,可通过适当增加NK细胞数量,以达到更好的体内与相应新鲜NK细胞近似的肿瘤杀伤效果。本研究首次采用人肺癌细胞A549作为效应细胞,报道了冻存复苏的NK细胞与新鲜培养NK细胞的区别,结果将为冻存的同种异体NK细胞作为即用型产品进行患者治疗提供有力支持。

参考文献:

- [1] ARTIS D, SPITS H. The biology of innate lymphoid cells[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 293-301. DOI: 10.1038/nature14189.
- [2] O'SULLIVAN T, SADDAWI-KONEFKA R, VERMI W, *et al.* Cancer immunoeediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(10): 1869-1882. DOI: 10.1084/jem.20112738.
- [3] STREET S E, CRETNEY E, SMYTH M J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 192-197. DOI: 10.1182/blood.V97.1.192.
- [4] MORVAN M G, LANIER L L. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 16(1): 7-19. DOI: 10.1038/nrc.2015.5.
- [5] SHEN Y, LU C, TIAN W, *et al.* Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4): 1285-1290. DOI: 10.3892/ijo.2011.1315.
- [6] MORETTA A, BIASSONI R, BOTTINO C, *et al.* Natural cytotoxicity receptor that trigger the human NK mediated cytotoxicity [J]. *Immunol Today*, 2000, 21(5): 228-234. DOI: 10.1016/S0167-5699(00)01596-6.
- [7] FARAG S S, FEHNIGER T A, RUGGERI L, *et al.* Natural killer cell receptors: New biology and insights into the graft-versus-leukemia effect [J]. *Blood*, 2002, 100(6): 1935-1947. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0350.
- [8] FARAG S S, FEHNIGER T A, BECKNELL B, *et al.* New directions in natural killer cell-based immunotherapy of human cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(2): 237-250. DOI: 10.1517/14712598.3.2.237.
- [9] 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.
- [10] VELUCHAMY J P, NINA K, VAN D V H J, *et al.* The rise of allogeneic natural killer cells as a platform for cancer immunotherapy: Recent innovations and future developments [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(5): 631-650. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00631.
- [11] KLINGEMANN H, GRODMAN C, CUTLER E, *et al.* Autologous stem cell transplant recipients tolerate haploidentical related-donor natural killer cell enriched infusions [J]. *Transfusion*, 2013, 53(2): 412-418. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03764.x.
- [12] HOLUBOVA M, MIKLIKOVA M, LEBA M, *et al.* Cryopreserved NK cells in the treatment of haematological malignancies: Preclinical study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12): 2561-2567. DOI: 10.1007/s00432-016-2247-8.
- [13] 刘春香, 张怡, 芦慧颖. NK细胞的高效扩增及其对体外肿瘤模型的杀伤效果研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(8): 1186-1190. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2017.08.013.
- [14] 唐甜, 饶巍. 自然杀伤细胞抗肿瘤免疫治疗研究进展——从实验室到临床[J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(1): 44-52. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.01.A007.
- [15] LIM O, MI Y J, YU K H, *et al.* Present and future of allogeneic natural killer cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(6): 286-293. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00286.
- [16] CHESTER C, FRITSCH K, KOHRT H E. Natural killer cell immunomodulation: Targeting activating, inhibitory, and costimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(12): 601-609. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00601.
- [17] XU L, SHEN M, CHEN X, *et al.* Adipocytes affect castration-resistant prostate cancer cells to develop the resistance to cytotoxic action of NK cells with alterations of PD-L1/NKG2D ligand levels in tumor cells [J]. *Prostate*, 2018, 78(5): 353-364. DOI: 10.1002/pros.23479.
- [18] DOMOGALA A, MADRIGAL J A, SAUDEMONT A. Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34(+) cells [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(6): 754-759. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.02.008.
- [19] HOLUBOVA M, MIKLIKOVA M, LEBA M, *et al.* Cryopreserved NK cells in the treatment of haematological malignancies: Preclinical study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(12): 2561-2567. DOI: 10.1007/s00432-016-2247-8.

[收稿 2020-06-18 修回 2020-12-01]

(编辑 苗磊)