

脐带血单个核细胞诱导多能干细胞来源自然杀伤细胞的生物学特性

杜为^{1,2,3,5} 崔丽娟^{1,3,5} 徐迎^{1,3,5} 张华^{1,3,5} 杜宏伟^{1,3,5} 张金美^{1,3,5} 刘容志^{1,3,5} 王征宇^{3,4}
杨文玲^{1,5} 张宇^{1,3,5}

【摘要】 目的 利用脐带血单个核细胞(CBMCs)获得诱导多能干细胞(iPSCs)并进一步诱导分化为自然杀伤(NK)细胞。通过与其他来源NK细胞的比较,探讨iPSCs来源NK细胞的生物学特性。方法 获取CBMCs并使用非整合质粒电转法对其进行重编程,利用免疫荧光染色和流式细胞术鉴定获得的iPSCs的多能性因子的表达水平。将CBMCs来源iPSCs(CB-iPSCs)诱导分化为NK细胞,并利用流式细胞术对NK细胞表型进行鉴定。利用肿瘤细胞体外杀伤实验,比较CB-iPSCs来源NK(CB-iPSCs-NK)细胞、脐带血来源NK(CB-NK)细胞和外周血来源NK(PB-NK)细胞的杀伤活性。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。结果 CBMCs经过携带重编程因子的非整合质粒转染后,启动多能性基因表达,成功地获得iPSCs克隆,经扩增和筛选,最后获得了可稳定增殖的CB-iPSCs。免疫荧光染色和流式细胞术检测结果显示,获得的CB-iPSCs表达高水平的多能性标志物。然后,利用CB-iPSCs成功分化NK细胞。流式细胞术检测NK受体,包括抑制性受体CD94、细胞毒性受体CD16和Nkp46;与CB-NK和PB-NK比较,CB-iPSCs-NK中CD94(94.17%±1.80%,94.10%±1.32%比87.60%±2.10%) and CD16表达(64.53%±2.80%,92.40%±2.00%比9.23%±3.37%)较低,Nkp46表达(85.30%±2.36%,29.43%±9.08%比88.00%±3.60%)较高(*P*均<0.05)。肿瘤细胞体外杀伤实验结果显示,三种来源NK细胞对K562、MDA-MB-231细胞均具有较好的杀伤作用;但是,对Raji细胞的杀伤作用,CB-iPSCs-NK与CB-NK相似,均弱于PB-NK(*P*均<0.05)。结论 免疫表型和对不同肿瘤细胞杀伤效果的差异,提示CB-iPSCs-NK细胞具有不同的生物学特性。

【关键词】 脐带血; 诱导多能干细胞; 自然杀伤细胞; 生物学特性

Biological characteristics of natural killer cells from cord blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells Du Wei^{1,2,3,5}, Cui Lijuan^{3,5}, Xu Ying^{1,3,5}, Zhang Hua^{1,3,5}, Du Hongwei^{3,5}, Zhang Jinmei^{3,5}, Liu Rongzhi^{1,3,5}, Wang Zhengyu⁴, Yang Wenling^{1,5}, Zhang Yu^{1,3,5,1}. ¹Union Stem Cell&Gene Engineering Co., LTD, Tianjin 300384, China; ²School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China; ³Tianjin Key Laboratory of Blood Cell Therapy Technology, Tianjin 300384, China; ⁴State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020, China; ⁵National Stem Cell Product Industrialization Base, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhang Yu, Email: zhangyu@vcnabio.com

【Abstract】 Objective To obtain induced pluripotent stem cells (iPSCs) from cord blood mononuclear cells (CBMCs) and further induce them to generate natural killer (NK) cells, then to investigate the biological characteristics of CB-iPSCs-derived NK (CB-iPSCs-NK) cells and compare key traits between CB-iPSCs-NK cells and the other-derived NK cells. **Methods** CBMCs were obtained and transduced with reprogramming factors by non-integrated plasmids to generate iPSCs. The pluripotency factors expressions of CBMCs-derived iPSCs (CB-iPSCs) were determined by immunofluorescence staining and flow cytometry. CB-iPSCs were induced to generate NK cells, and phenotypes of NK cells were identified by flow cytometry. The cytotoxic effects of CB-iPSCs-NK cells, compared with cord blood derived NK (CB-NK) cells and peripheral blood derived

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2021.06.002

基金项目: 天津市科技计划创新平台专项(18PSTYJC00070); 天津市博士后择优资助计划项目(TJQYBSH2018030)

作者单位: 300384 天津, 协和干细胞基因工程有限公司¹; 300371 天津, 南开大学医学院²; 300384 天津, 天津市血液细胞治疗技术企业重点实验室³; 300020 天津, 实验血液学国家重点实验室⁴; 300384 天津, 国家干细胞产品产业化基地⁵

通信作者: 张宇, Email: zhangyu@vcnabio.com

NK (PB-NK) cells, were tested by killing tumor cell assay *in vitro*. One-way ANOVA was used for comparison of variables among multiple groups, and LSD-*t* test was used for comparison of variables between groups. **Results** After transfection with reprogramming factors by non-integrated plasmid, pluripotent gene expression of CBMCs were initiated, and clones of iPSCs were successfully obtained. After proliferation and selection, the stable CB-iPSCs were finally obtained. The results of immunofluorescence staining and flow cytometry showed that CB-iPSCs expressed high levels of pluripotency markers. Then, CB-iPSCs-NK cells were successfully obtained from CB-iPSCs. NK receptors including inhibitory receptor CD94, cytotoxic receptor CD16 and Nkp46 were detected by flow cytometry. Compared with CB-NK and PB-NK, CD94 expression of CB-iPSCs-NK was lower ($94.17\% \pm 1.80\%$, $94.10\% \pm 1.32\%$ vs $87.60\% \pm 2.10\%$), CD16 expression was lower ($64.53\% \pm 2.80\%$, $92.40\% \pm 2.00\%$ vs $9.23\% \pm 3.37\%$), Nkp46 expression was higher ($85.30\% \pm 2.36\%$, $29.43\% \pm 9.08\%$ vs $88.00\% \pm 3.60\%$) (All $P < 0.05$). The results of killing tumor cell assays *in vitro* showed that three kinds of NK cells had exciting cytotoxic effects to K562 and MDA-MB-231 cells. However, compared with PB-NK cells, cytotoxic effects of CB-iPSCs-NK cells and CB-NK cells to Raji cells were weaker (All $P < 0.05$). Cytotoxic effect of CB-iPSCs-NK cells to Raji cells was similar to that of CB-NK cells. **Conclusion** The differences of immunophenotypes and cytotoxic effects suggested that CB-iPSCs-NK cells have different biological characteristics for killing tumor cells.

【Key words】 Cord blood; Induced pluripotent stem cells; Natural killer cells; Biological characteristics

自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 能够杀死病毒感染细胞和肿瘤细胞, 是先天免疫系统的重要组成部分。NK 能够快速识别和杀死肿瘤细胞, 对自身健康组织具有限制性。同时, NK 缺乏 T 细胞抗原识别受体 (T-cell receptor, TCR), 不会引起移植抗宿主病^[1]。因此, 有望成为一种可以提前准备的现货型细胞治疗产品, 按需给患者使用。

扩大 NK 过继免疫疗法应用的主要障碍是稳定和均一的 NK 来源。大量稳定的 NK 产品, 才能使其成为一种具有强大抗肿瘤效果的治疗方法, 用于治疗成千上万的难治性恶性肿瘤患者。目前, NK 来源主要包括外周血 NK 扩增、脐带血 NK 扩增和 NK 系 (如 NK92 等)。外周血和脐带血 NK 扩增产生的细胞仅能满足单个患者有限的几次剂量, 耗时且价格昂贵; NK 系基因不稳定, 需要在输注之前辐照, 辐照后的细胞仅能存活 48 h, 不能达到长期的治疗效果; 所以目前亟需寻找新的 NK 来源^[2]。

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 是一种类似胚胎干细胞的多能干细胞, 可由体细胞通过强制表达相关转录因子而获得^[3]。iPSCs 有强大自我更新能力和分化潜能, 具有分化成大量功能细胞进行细胞过继性治疗的潜能^[4]。脐带血具有来源广泛、获得无侵入性、病毒污染和突变风险小等优势, 是制备 iPSCs 的优良细胞来源。脐带血制备 iPSCs 大量、稳定的产出 NK, 可作为潜在的细胞治疗产品之一^[5-6]。

不同来源 NK 虽然具有共性, 但也具有一些不

同的特性。本研究应用脐带血单个核细胞 (cord blood mononuclear cells, CBMC) 重编程为 CB-iPSCs, 进一步将 CB-iPSCs 分化为 NK, 评价其生物学特性及功能, 为进一步开发现货型细胞免疫疗法用于肿瘤治疗奠定基础。

材料与方法

一、主要试剂和材料

人脐带血由天津市脐带血造血干细胞库按照《脐带血造血干细胞库技术规范(试行)》(卫办医 2002-80 号) 制备并提供, 富含血小板白膜由天津市血液中心制备并提供。人慢性髓系白血病细胞 K562 和人淋巴瘤细胞 Raji 由中国医学科学院血液病研究所程涛教授惠赠, 人乳腺癌细胞 MDA-MB231 由南开大学李宗金教授惠赠。

pEV-SFFV/EF1/CAG-OS (OCT4-2a-SOX2) (货号 64120), pEV-SFFV/EF1/CAG-MK (MYC-2a-KLF4) (货号 64121), pEV-SFFV/EF1/CAG-B (BCL-XL) (货号 64123) (美国 Addgene 公司); mTeSRTM1 培养基 (货号 85850), mTeSRTM3D 培养基 (货号 03950), STEMdiff TMAPELTM2 培养基 (货号 05275), Gentle Cell Dissociation Reagent (货号 7174), Human Pluripotent Stem Cell Trilineage Differentiation qPCR Array (货号 7515), STEMdiffTM Trilineage Differentiation Kit (货号 5230) (美国 Stemcell 公司); 培养细胞所需因子

SCF (货号 300-07-50), EPO (货号 100-64-10), 白细胞介素 (IL)-3 (货号 200-03-10), 碱性成纤维细胞生长因子 (货号 100-18C-10), 骨形成蛋白-4 (货号 120-05ET-10), 血管内皮生长因子 (货号 100-20-10), IL-15 (货号 200-15-10), IL-7 (货号 300-19-10), Flt3-L (货号 200-07-10) (美国 Peprotech 公司); CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (货号 CA1210-500T, Solarbio 公司); 流式抗体 CD56-FITC (货号 562794), NKp46-PE (货号 557991) 和 CD94-APC (货号 559876) (美国 BD 公司); CD16-FITC (货号 Z6410070), CD56-PE (货号 Z6410020) 和 CD3-Percp (货号 A7024) (北京旷博生物公司)。

二、方法

1. 重编程脐血为 iPSCs (CB-iPSCs): 脐带血分离出 CBMC; 用红系培养基重悬细胞于非 TC 处理的 6 孔板中培养 CBMC, 细胞密度 5×10^6 个/mL, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱培养; 在 D6 收获 CBMC 用于重编程。利用 Neon™ 转染系统进行重编程, 转染体系组成: 100 μL 单细胞悬液, 2 μg pEV-OCT4-2a-SOX2, 1 μg pEV-MYC, 1 μg pEV-KLF4, 0.5 μg pEV-BCL-XL; 电转后样本转移至预热的含有小鼠胚胎成纤维细胞的红系培养基的培养板, 放入低氧盒中培养 ($3\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$, $92\% \text{N}_2$)。第 1 天补加 iPSCs 培养基, 第 3 天除去 3 mL 培养基, 替换为 2 mL 补充有 0.25 mmol/L 丁酸钠的 iPSCs 培养基, 第 6 天更换为补充有 0.25 mmol/L 丁酸钠的 mTeSR1 培养基, 直至单克隆出现。在显微镜下挑取单克隆集落, 将每个单克隆集落转移到含有 mTeSR1+Y 培养基 Matrigel 处理过的 24 孔中, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养, 挑取单克隆第 2 天后开始每天更换 mTeSR1 培养基, 根据单克隆生长状态培养在 4~7 d 后进行消化、传代、冻存。

2. CB-iPSCs 分化 NK (CB-iPSCs-NK): CB-iPSCs 达到 $60\% \sim 70\%$ 融合时消化。放入 mTeSR 3D+10 $\mu\text{mol/L}$ Y 培养基, 培养 3 d。CB-iPSCs 从悬浮培养转入拟胚体分化, 分化当天向 38 mL STEMdiff APEL2 培养基中加入 2 mL PFHM-II 和所需细胞因子 (BMP4 20 ng/mL、血管内皮生长因子 20 ng/mL 和 SCF 40 ng/mL), 诱导 CB-iPSCs 向造血中胚层分化。收集生长至第 4 天的 CB-iPSCs 细胞 3D 球体 (拟胚体), 以 30~50 个/mL, 接入一个新的非 TC 处理的 6 孔板中, 37°C $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱静置培养 11 d。第 5 天时每孔补加 2 mL 新鲜 APEL 分化培养基 (5 ng/mL IL-3、20 ng/mL

SCF、10 ng/mL IL-15、10 ng/mL Flt3-L 和 20 ng/mL IL-7)。将分化至 11 d 的拟胚体收集并更换成 AEL 分化培养基, 第 1 周添加 IL-3, 每周更换 AEL 分化培养基。第 4 周收获细胞进行检测和实验。对照用 CB-NK 及 PB-NK 为应用脐血及外周血单个核细胞扩增获得, 具体扩增方法参照参考文献进行^[7]。

3. 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 染色: CB-iPSCs 生长至 $60\% \sim 70\%$ 覆盖孔板的状态, 弃掉培养液用磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗 2 次, 用 3.7% 多聚甲醛固定 2 min, 用 PBS 和 TBST 各洗 2 次, 用 AP 染色 20 min, 用 PBS 洗 1 次, 在显微镜下观察结果。

4. 免疫荧光检测: CB-iPSCs 生长至 $60\% \sim 70\%$ 覆盖孔板的状态, 去除培养基用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 PBS 清洗细胞 2 次; 用 0.3% Tritonx-100 的 PBS 通透细胞 10 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次; 含 5% 羊/驴血清的 PBS 对细胞进行封闭, 室温 30 min; 将封闭液吸出, 每孔直接加入 100 μL 一抗 [TRA-1-60 单克隆抗体 (1:50), SOX2 单克隆抗体 (1:100), OCT4 单克隆抗体 (1:100), SSEA4 单克隆抗体, Nanog 单克隆抗体 (1:100), α 胎甲蛋白 (AFP3) 单克隆抗体 (1:100)、 α 平滑肌肌动蛋白 (1A4) 单克隆抗体 (1:100) 和巢蛋白 (10C2) 单克隆抗体 (1:200)], 4°C 过夜; 吸弃一抗, PBS 洗涤 3 次, 加入 100 μL 二抗 (Alexa594 羊抗鼠 IgM, Alexa594 驴抗鼠 IgG, Alexa488 驴抗兔 IgG), 室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次; 每孔 100 μL DAPI 复染细胞核, 室温孵育 15 min, 每孔 200 μL PBS 洗涤 3 次, 封片; 荧光显微镜观察。

5. iPSCs 三胚层分化能力检测: 将生长状态良好的 CB-iPSCs 传至 6 孔板中, 加入三种类型的 STEMdiff™ Trilineage 培养基, 向三种谱系分化 (内胚层、中胚层、外胚层), 其接种密度分别为 2×10^6 、 5×10^5 、 2×10^6 个细胞/孔。从第 1 天开始, 每天更换三种类型的培养基。直到第 5 天 (中胚层和内胚层谱系) 或第 7 天 (外胚层谱系) 出现, 进行特异性免疫荧光染色和基因表达分析。

6. RNA 提取、逆转录和 qPCR: 使用 TRIzol 试剂分别提取 iPSC 和 iPSC 分化的三胚层细胞的总 RNA; 使用紫外分光光度计检测 RNA 质量, $1.8 < A_{260/280} < 2.1$ 时判定 RNA 质量合格; 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA, 检验合成 cDNA 质量。以 iPSC 为对照组进行 384 孔三胚层分化的

qPCR 鉴定。反应条件为 95℃ 20 s; 95℃ 1 s, 60℃ 20 s, 循环 50 次。将 qPCR 仪器中的 Ct 数据导入 www.analog.com/zh/cn 上提供的分析工具进行分析。

7. 流式细胞术分析: 流式细胞术使用 BD FACSCalibur 进行检测, 用 FlowjoVX 0.7 软件分析结果。对分化使用两组抗体对样品进行分析, 用同型免疫球蛋白作为阴性对照。(1) CD56 管: FITC-CD16、PE-CD56 和 PerCP-CD3 抗体; (2) NKp46 管: FITC-CD56、PE-NKp46 和 APC-CD94 抗体。

8. CB-iPSCs-NK 对肿瘤细胞的杀伤作用: 使用 CCK-8 检测试剂盒进行细胞杀伤活性的检测。取 CD3⁻CD56⁺ 的 CB-iPSCs-NK 悬液, 根据流式检测结果, 按 CD3⁻CD56⁺ 细胞的数量调整细胞密度为 1.0×10^6 个/mL, 作为效应细胞。取对数生长期的靶细胞(人慢性髓系白血病细胞 K562、人肺癌细胞 MDA-MB231 和人淋巴瘤细胞 Raji), 调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL。按照效靶比分别为 0.5:1、1:1、1.5:1、10:1 的比例进行细胞混合, 培养于 96 孔板内, 每孔总体积 200 μ L, 此为实验组。同时, 设置效应细胞孔、靶细胞孔、空白对照孔, 每组设 3 个复孔。置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养 5 h 后, 加入 CCK-8 试剂 20 μ L, 置于培养箱中继续培养 2 h 后于 450 nm 测定吸光度(A) 值。按如下计算公式: 细胞杀伤活性: 杀伤率 = [1 - (实验孔 A 值 - 效应细胞孔 A 值) / (靶细胞孔 A 值 - 空白对照孔 A 值)] \times 100%

三、统计学分析方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。细胞表面标志物检测和杀伤试验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

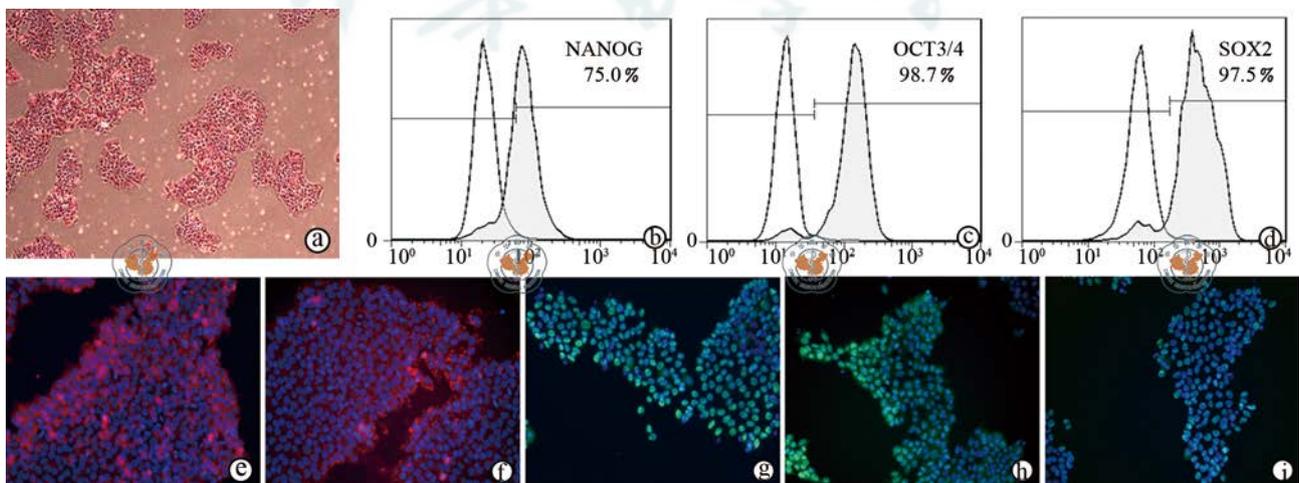
结 果

一、CB-iPSCs 多能性特征

获得的 CB-iPSCs 进行 AP 染色鉴定, 均呈红色或紫红色, 证明 CB-iPSCs 呈现出很高 AP 活性。流式分析结果显示, 多能性标志物 NANOG、OCT 4 和 SOX 2 的表达分别达到 75.0%, 98.7%, 97.5%。免疫荧光染色结果显示, CB-iPSCs 高表达多潜能性标记基因 (TRA-1-60、SSEA4、NANOG、OCT3/4 和 SOX2)。证明通过诱导性 CBMC 重编程得到的 CB-iPSCs 细胞具有多能性特征。(图 1)

二、CB-iPSCs 的分化能力

分别加入 STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit 中 3 种类型的培养基, 使 CB-iPSCs 向内胚层、中胚层、外胚层 3 种谱系分化。第 5 天中胚层和内胚层谱系细胞形成, 第 7 天外胚层谱系细胞形成, 分别进行三谱系特异性标志物免疫荧光染色。免疫荧光结果显示培养 5~7 d 的 CB-iPSCs 均高表达不同谱系特有的标志物 [内胚层为 α 甲胎蛋白 (AFP3) 单克隆抗体、中胚层为 α 平滑肌肌动蛋白 (1A4) 单克隆抗体和外胚层为巢蛋白 (10C2) 单克隆抗体] (图 2)。分别提取分化细胞的 RNA, 以 CB-iPSCs 为对照组进行 384 孔三谱系分化的 RT-PCR 鉴定。根据 Human Pluripotent Stem Cell Trilineage Differentiation qPCR Array 试剂盒, 将 384 孔板划分为 4 部分, 每部分含有 96 种不同的引物, 其中包括 81 个三胚层表达的基因 (各个谱系表达 27 个基因), 10 个 iPS 干性基因 (SOX2、NANOG、POU5F1、DNMT3B、TERT、UTF1、DPPA5、IDO1、KLF4 和 KLF17), 5 个管家基因 (GAPDH、RN18S1、ACTB、TBP 和 UBC)。结果显示经过不同培养的 CB-iPSCs 均高表达相应胚层的



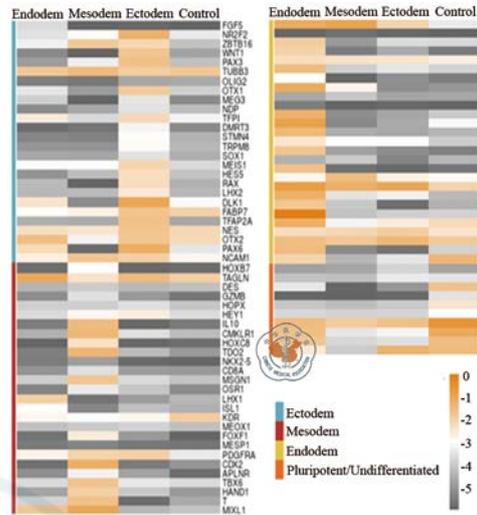
注: a 图为倒置相差显微镜下观察的 AP 染色结果 ($\times 100$); b~d 图为多能性标志物流式检测结果; e~i 图为倒置荧光显微镜下观察多能性标志物免疫荧光结果 ($\times 200$); e 图为 TRA-1-60 (红色); f 图为 SSEA4 (红色); g 图为 NANOG (绿色); h 图为 OCT3/4 (绿色); i 图为 SOX2 (绿色), DAPI (蓝色)

图 1 iPSCs 多能性标志物分析

特有标志物,证明 CB-iPSCs 具有向 3 个胚层分化的潜能(图 3)。

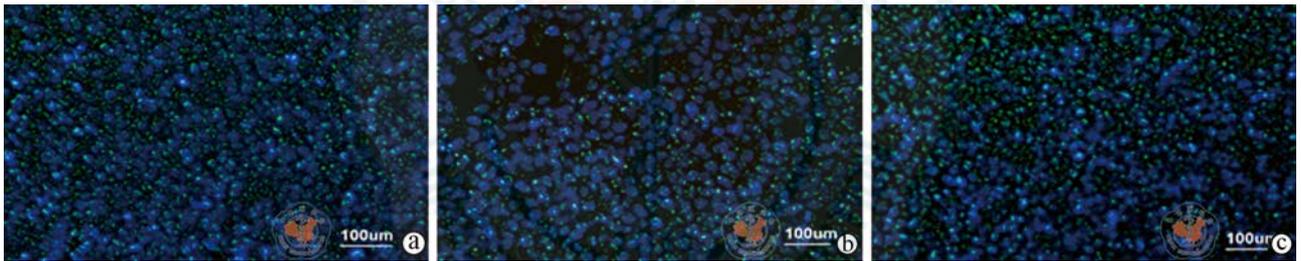
三、CB-iPSCs 分化 NK

取 60%~70% 融合的 CB-iPSCs 细胞消化,离心(第 0 天);用 mTeSR3D 培养基重悬细胞,接种到非 TC 处理 6 孔板中培养;培养第 2 天 CB-iPSCs 聚集形成的球体(拟胚体)直径可达 50~150 μm(第 2 天);培养至第 4 天拟胚体直径达到 150~250 μm(第 4 天);将 mTeSR3D 培养基更换为 APEL 培养基进入拟胚体分化阶段;培养至第 15 天,拟胚体呈现不规则球形,部分为囊泡状,球体大小差异明显(第 15 天);将 APEL 培养基更换 AEL 培养基继续培养至第 29 天,拟胚体贴壁生长形成完整集落(第 29 天);培养至第 43 天,培养基中出现大量的悬浮细胞,从形态上看,悬浮细胞小而圆,呈明亮的淋巴样细胞(第 43 天)。(图 4)



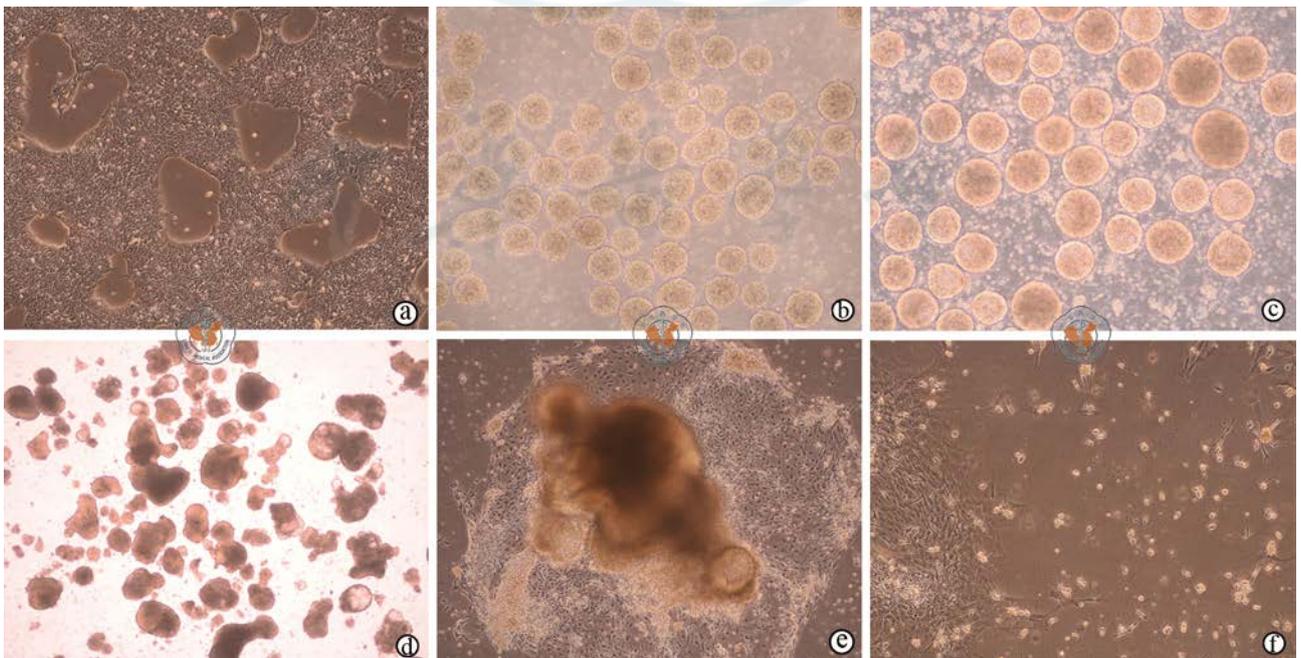
注:未分化的 iPSC 作为对照(Ectoderm 为外胚层, Mesoderm 为中胚层, Endoderm 为内胚层, Pluripotent/Undifferentiation 为未分化的 iPSC)

图 3 iPSC 三胚层分化的 qPCR Array 检测结果



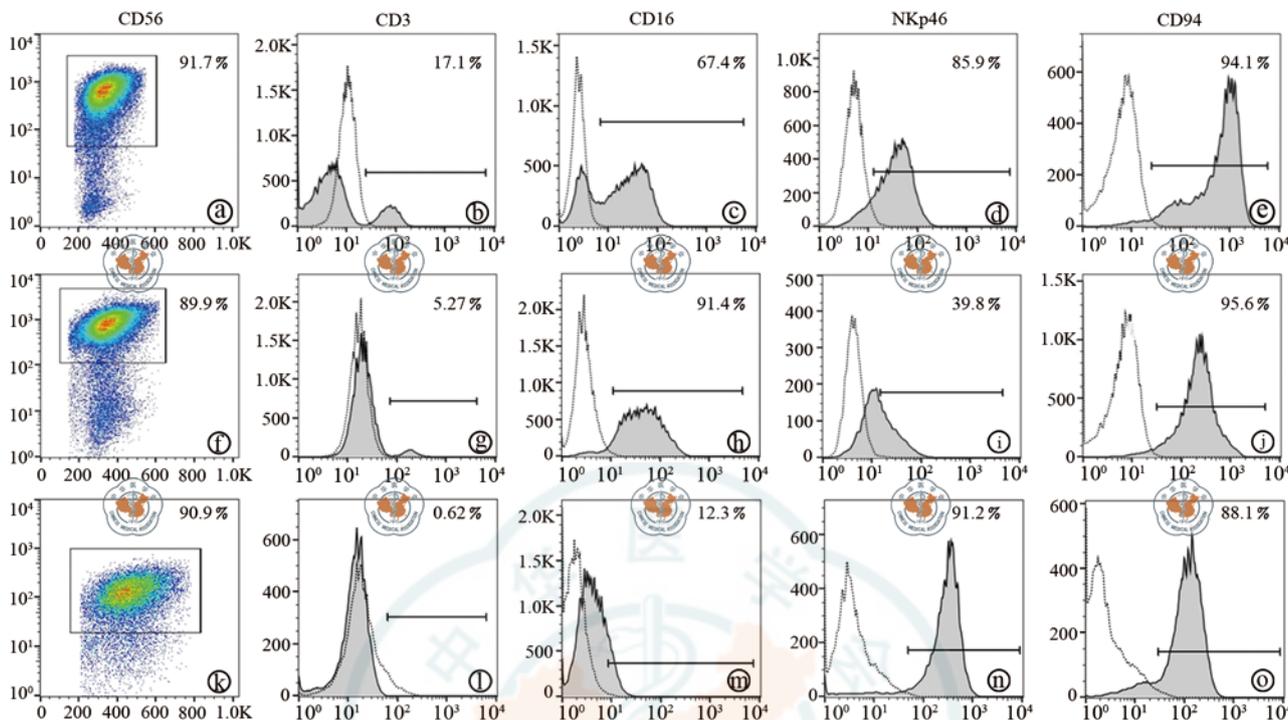
注: a 图为内胚层标志蛋白 AFP3(绿色); b 图为中胚层标志蛋白 1A4(绿色); c 图为外胚层标志蛋白 10C2(绿色), DAPI(蓝色)

图 2 倒置荧光显微镜下观察 iPSCs 三胚层分化的免疫荧光结果(×100)



注: a 图为当 CB-iPSCs 生长到 60%~70% 融合时状态良好(第 0 天); b 图为消后细胞加入 3D 培养基,培养 2d iPS 球体直径可达 50~150 μm(第 2 天); c 图为继续培养 2 d 拟胚体直径达到 150~250 μm(第 4 天); d 图为更换 APEL 培养基进入拟胚体分化,继续培养至第 15 天; e 图为更换 AEL 培养基继续培养至第 29 天; f 图为培养至第 43 天,培养基中出现大量的悬浮细胞

图 4 CB-iPSC 分化成 NK 细胞过程中不同时间点的细胞状态(×100)



注: a~e 图为 FACS 分析 CB-NK 细胞表面标志物; f~j 图为 FACS 分析 PB-NK 细胞表面标志物; k~o 图为分析 CB-iPSC-NK 细胞表面标志物(包括 CD3、CD56、CD94、Nkp46 和 CD16)

图 5 FACS 分析 3 种自然杀伤细胞的表面标志物

四、CB-iPSCs-NK 具有典型的 NK 表型

流式检测选择 T 细胞特异抗体 CD3 和功能性 NK 的表面标志,包括 CD16、Nkp46 和 CD94 (图 5)。检测结果显示,与另外两种扩增的 NK 比较,应用本研究方法制备的 CB-iPSCs-NK 群混杂的 CD3⁺ 细胞表达较低 ($P < 0.05$)。与 CB-NK 和 PB-NK 比较, CB-iPSCs-NK 低表达表面抑制性受体 CD94 ($P < 0.05$) 和细胞毒性受体 CD16 ($P < 0.05$),而高表达细胞毒性受体 Nkp46 ($P < 0.05$)。(表 1)

表 1 3 种 NK 细胞表面标志物比例 (% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	CD3	CD16	Nkp46	CD94
CB-NK	17.03 ± 0.80	64.53 ± 2.80	85.30 ± 2.36	94.17 ± 1.80
PB-NK	4.32 ± 0.83 ^a	92.40 ± 2.00 ^a	29.43 ± 9.08 ^a	94.10 ± 1.32
CB-iPSC-NK	0.67 ± 0.26 ^{ab}	9.23 ± 3.37 ^{ab}	88.00 ± 3.60 ^{ab}	87.60 ± 2.10 ^{ab}
F 值	472.28	695.90	97.45	13.65
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.006

注: 与 CB-NK 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PB-NK 组比较, ^b $P < 0.05$; n 为实验重复次数

五、CB-iPSCs-NK 对肿瘤细胞的杀伤作用

检测了 3 种 NK 对 K562、MDA-MB-231 和 Raji 的杀伤活性。结果显示, CB-iPSCs-NK、PB-NK 和 CB-NK 对 K562 和 MDA-MB-231 均具有较好的

杀伤作用,各组之间的杀伤活性差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。对于 Raji 的杀伤作用,与 PB-NK 比较, CB-iPSCs-NK 和 CB-NK 均较弱 (P 均 < 0.05); CB-iPSCs-NK 与 CB-NK 两组之间的差异无统计学意义 (P 均 > 0.05 , 表 2~4)。

表 2 三种 NK 细胞不同效 / 靶比对 k562 细胞的杀伤比例 (% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	0.5 : 1	1 : 1	5 : 1	10 : 1
CB-NK	0.45 ± 0.05	0.68 ± 0.12	0.95 ± 0.04	0.98 ± 0.01
PB-NK	0.54 ± 0.01	0.82 ± 0.06	0.97 ± 0.02	0.99 ± 0.01
CB-iPSC-NK	0.47 ± 0.07	0.74 ± 0.06	0.96 ± 0.02	0.98 ± 0.01
F 值	2.98	1.94	0.68	0.89
P 值	0.13	0.22	0.54	0.46

注: n 为实验重复次数

表 3 三种 NK 细胞不同效 / 靶比对 MDA-MB231 细胞的杀伤比例 (% , $\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	0.5 : 1	1 : 1	5 : 1	10 : 1
CB-NK	0.14 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.77 ± 0.08	0.90 ± 0.06
PB-NK	0.23 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.86 ± 0.03	0.95 ± 0.02
CB-iPSC-NK	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.81 ± 0.07	0.92 ± 0.07
F 值	4.55	2.05	1.67	0.60
P 值	0.06	0.21	0.26	0.59

注: n 为实验重复次数

表4 3种NK细胞不同效/靶比对Raji细胞的杀伤比例(% , $x \pm s$, $n = 3$)

分组	0.5:1	1:1	5:1	10:1
CB-NK	0.05±0.03	0.14±0.03	0.21±0.03	0.26±0.03
PB-NK	0.19±0.03 ^a	0.33±0.05 ^a	0.64±0.05 ^a	0.79±0.04 ^a
CB-iPSC-NK	0.04±0.02 ^b	0.11±0.03 ^b	0.16±0.02 ^b	0.19±0.03 ^b
<i>F</i> 值	32.08	35.95	169.38	338.70
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与CB-NK组比较,^a $P < 0.05$;与PB-NK组比较,^b $P < 0.05$; n 为实验重复次数

讨 论

NK通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)非依赖方式识别病变细胞,不需提前免疫致敏,可在几十分钟内杀伤恶性细胞。NK的激活依赖于活化和抑制性受体信号的平衡结果^[8-10]。活化的NK细胞通过直接和间接的方式杀伤病变细胞:当NK与靶细胞接触并形成免疫突触时,NK释放穿孔素和颗粒酶,直接作用于靶细胞;同时通过表面的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)与靶细胞TRAIL受体结合诱导细胞凋亡^[11]。另外,NK通过分泌干扰素等细胞因子调节天然和获得性免疫细胞,从而间接杀伤病变细胞^[12]。基于NK的MHC非限制性、泛特异性识别和杀伤靶细胞及快速应答的特点,其在肿瘤免疫治疗的应用上被寄予越来越多的关注和期待。

目前,NK来源主要包括NK系、外周血和脐带血NK扩增。近年来,利用细胞工程的策略,从多能干细胞中获得组织细胞也已经成为NK的重要来源^[13]。另外,在CAR-T细胞疗法取得临床成功之后,研究者把研究的重点集中到探索CAR-NK产品的疗效^[14]。然而,由于在细胞分离、转导和扩增过程中所面临的挑战,原代NK并不是产生CAR产品的理想细胞。因此,目前CAR-NK的临床试验也主要集中在多能干细胞来源的产品上^[15]。

有报道表明,仅 $(1 \sim 3) \times 10^6$ 个未分化的iPSCs分化制备NK,后续应用aAPC细胞扩增,能够产生足够治疗患者的NK^[16]。在本研究中,选择应用CBMC重编程为iPSCs。脐带血具有来源广泛、获得无侵入性、病毒污染和突变风险小等优势;同时,脐带血库中存有大量人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)分型明确的脐带血可以作为来源。本研究对CBMC重编程获得的CB-iPSCs

进行多能干细胞特性评价,结果显示诱导形成的CB-iPSCs呈现出很高AP活性,高表达多能性标志物。同时,CB-iPSCs在不同的分化条件下,高表达相应胚层的特有标志物,证明了CBMC重编程得到的iPSCs具有向3个胚层分化的潜能。进一步,将鉴定完成的CB-iPSCs分化为NK,得到的CB-iPSCs-NK具有典型的CD3⁺CD56⁺表型。应用本研究方法, 1×10^6 CB-iPSCs形成拟胚体后,经4周分化得到 $(1.5 \sim 3) \times 10^6$ 个成熟NK(数据未在本文中展示)。如果经过aAPC的扩增可增殖2~3个数量级,完全可以产生足以治疗患者的NK。

NK识别肿瘤及病变细胞并不需要体细胞基因重排产生识别不同抗原的克隆,而是通过多种受体的表达来执行功能^[14]。在本研究选择T细胞特异抗体CD3和功能性成熟NK的表面标志,包括CD16、NKp46和CD94。CD3是一种重要的白细胞分化抗原,几乎表达于所有T细胞表面。CD3分子与TCR组成复合受体分子,是T细胞识别抗原的主要识别单位,具有稳定TCR结构和传递活化信号的作用^[17]。CD3表达过高后续体内应用时存在移植排斥的风险。应用本研究方法制备的CB-iPSCs-NK的CD3表达较低,可能有效避免移植后排斥的风险。CD16即FcγR III,属Ig超家族成员,参与抗体依赖性的细胞毒性作用。CD16对人NK作为裂解受体介导直接杀伤某些病毒感染和肿瘤细胞的过程,是依赖于抗体的紧密结合来实现的^[8]。本研究分化制备的CB-iPSCs-NK和扩增的CB-NK的CD16表达水平低于PB-NK,这与文献中的报道相一致^[2]。杀伤性受体NKp46是Ig超家族的成员,可与带有ITAM基序的转导分子相结合,诱使NK杀伤靶细胞^[18]。本研究结果显示,CB-iPSCs-NK的NKp46表达水平高于其他两种NK。CD94/NKG2是人类NK的一个抑制性受体,CD94/NKG2A能与非经典MHC-1类分子HLA-E及其呈递的抗原肽结合,传导信号而抑制NK的杀伤活性,使NK的杀伤受到控制^[19]。本研究显示,与另外两种来源的NK细胞比较,CB-iPSCs-NK的CD94表达水平显著降低。

不同来源NK对肿瘤的杀伤作用也有差异。Knorr等^[20]的研究结果显示,脐带血扩增的NK对K562的杀伤作用低于外周血扩增的NK和多能干细胞来源的NK。在他们的另一项研究中显示,外周血扩增的NK对卵巢癌细胞的杀伤作用,优于iPSCs分化来源的NK^[21]。在本研究中,将获得的3

种 NK 应用于体外肿瘤细胞杀伤实验,结果显示,3 种 NK 对 K562 和 MDA-MB-231 均具有较好的杀伤作用, PB-NK 对 Raji 的杀伤作用优于 CB-iPSCs-NK 和 CB-NK。表现出的这些差异提示不同来源 NK 具有不同生物学特性。

NK 基于其 MHC 非限制性和泛特异性的肿瘤识别特点,在肿瘤免疫治疗中展现出巨大的应用潜力。但是,不同来源的 NK 经历了不同的制备方法,使 NK 受到不同方式或是不同程度的激活,导致产生不同的治疗效果。开发 NK 免疫疗法,需要建立稳定的生产工艺,并对生产的 NK 进行相应适应症的选择。另外, NK 肿瘤靶向性的增强以及与其他疗法联合应用,都是提高 NK 肿瘤治疗效果的可行途径。

参 考 文 献

- 1 Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3):200-218.
- 2 Zeng J, Tang SY, Toh LL, et al. Generation of “Off-the-Shelf” natural killer cells from peripheral blood cell-derived induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(6):1796-1812.
- 3 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676.
- 4 Glicksman M. Induced pluripotent stem cells: the most versatile source for stem cell therapy[J]. *Clin Ther*, 2018, 40(7):1060-1065.
- 5 Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(4):434-441.
- 6 Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2):85-100.
- 7 Oberschmidt O, Morgan M, Huppert V, et al. Development of automated separation, expansion, and quality control protocols for clinical-scale manufacturing of primary human NK cells and alpharetroviral chimeric antigen receptor engineering[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2019, 30(3):102-120.
- 8 Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5):503-510.
- 9 Guilleray C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy[J]. 2016, 17(9):1025-1036.
- 10 Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(3):267-276.
- 11 Sungur CM, Murphy WJ. Positive and negative regulation by NK cells in cancer[J]. *Crit Rev Oncog*, 2014, 19(1-2):57-66.
- 12 Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:601.
- 13 Knorr DA, Kaufman DS. Pluripotent stem cell-derived natural killer cells for cancer therapy[J]. *Transl Res*, 2010, 156(3):147-154.
- 14 Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2):85-100.
- 15 Carlsten M, Childs R W. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:266. doi: 10.3389/fimmu.2015.00266.
- 16 Zhu H, Kaufman DS. An improved method to produce clinical-scale natural killer cells from human pluripotent stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2048:107-119.
- 17 Clynes RA, Desjarlais JR. Redirected t cell cytotoxicity in cancer therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70:437-450.
- 18 Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, et al. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46[J]. *J Immunol*, 2004, 173(4):2392-2401.
- 19 Diefenbach A, Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(1):37-44.
- 20 Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(4):274-283.
- 21 Hermanson DL, Bendzick L, Pribyl L, et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Natural Killer Cells for Treatment of Ovarian Cancer[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(1):93-101.

(收稿日期 :2021-03-16)

(本文编辑 :李少婷)

杜为,崔丽娟,徐迎,等.脐带血单个核细胞诱导多能干细胞来源自然杀伤细胞的生物学特性[J/CD].中华细胞与干细胞杂志(电子版),2021,11(6):329-336.