

## · 综述 ·

## NK细胞免疫治疗恶性肿瘤的研究进展

曹腾宇<sup>1,2</sup> 孙莉萍<sup>2</sup> 于洋<sup>2</sup><sup>1</sup>解放军医学院, 北京 100853<sup>2</sup>中国人民解放军总医院第一医学中心输血医学科, 北京 100853

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2024.02.017

作者简介: 曹腾宇, 主要从事输血与免疫方面研究, (E-mail) ava\_qswcblbq@163.com。

通信作者: 于洋, 主要从事单采治疗、野战输血及智能化输血辅助决策系统研究, (E-mail) yuyangpla301@163.com。

共同通信作者: 孙莉萍, 主要从事输血医学基础研究, (E-mail) sunlp2012@sina.com。

**【摘要】** 细胞免疫治疗是针对自身免疫细胞能力低下的恶性肿瘤患者进行的一种新型补充疗法, 包括基于T细胞的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 疗法、肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 疗法, 基于NK细胞的嵌合抗原受体NK细胞 (CAR-NK) 疗法和自体细胞免疫疗法 (CIK), 还有基于其他免疫细胞如单核吞噬细胞, 包括树突状细胞和巨噬细胞的输注治疗。其中, 自然杀伤细胞 (nature killer cell, NK细胞) 作为机体天然免疫的重要细胞, 在机体抗肿瘤、抗病毒感染、免疫调节中发挥着重要作用。它可以像T细胞一样通过工程化改造后靶向治疗肿瘤, 还能够进行同种异体来源的NK细胞输注治疗, 弥补了T细胞自体来源受限和异体免疫排斥的缺点。研究证实, 输注异体NK细胞的患者不会发生严重的移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD)。NK细胞不仅扩大了用于细胞免疫治疗的细胞种类, 还为形成较低成本的细胞免疫治疗产品提供了广阔应用前景。但是目前仍存在NK细胞质量不稳定, 制备流程缺乏统一质量标准等问题, 虽有部分NK细胞免疫治疗产品已经获得了美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 或国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 的批准, 但仍然没有明确公开的NK细胞免疫治疗产品的规范生产体系。本文从NK细胞独特的免疫调节作用机制出发, 综合近年研究者利用NK细胞在恶性肿瘤治疗上应用的治疗策略和临床前研究及临床试验的最新进展, 最终落脚于NK细胞的体外扩增办法及活性功能维持的研究进展上, 表明NK细胞有望形成质量统一的细胞免疫治疗产品。

**【关键词】** NK细胞 细胞免疫治疗 异体过继输入 体外扩增 CAR-NK**【中图分类号】** **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587 (2024) 02-0267-08

**Current Trends in NK Cell Immunotherapy for Malignant Tumors** CAO Tengyu<sup>1,2</sup>, SUN Liping<sup>2</sup>, YU Yang<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, <sup>2</sup>Department of Transfusion Medicine, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853

**【Abstract】** Cellular immunotherapies, new complementary therapies for tumor patients, are aimed at malignant tumors with low ability of autoimmune cells, including T cell-based chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy, tumor infiltrating lymphocytes (TILs) therapy, NK cell-based chimeric antigen receptor NK cell (CAR-NK) therapy, and autologous cell immunotherapy (CIK), as well as infusion therapies based on other immune cells such as mononuclear phagocytes like dendritic cells and macrophages. Among them, nature killer cells (NK cells), important to the body's natural immunity, matter greatly in anti-tumor, antiviral infection and immune regulation. Like T cells, it can be engineered to target tumor treatment, and can also be transfused with allogeneic NK cells, making up for the shortcomings of limited T cell source and allogeneic immune rejection. No evidence shows that patients transfused with allogeneic NK cells may develop severe Graft Versus Host Disease (GVHD). NK cells not only expand the types of cells used in cellular immunotherapy, but also provide a broad application prospect for the formation of low-cost cellular immunotherapy products. However, there are still problems such as unstable quality of NK cells and lack of unified quality standards in the preparation process. Although some NK cell immunotherapy products have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) or the National Medical Products Administration (NMPA), there is still no clear and publicly available standardized production system for NK cell immunotherapy products. Starting from the unique immunomodulatory mechanism of NK cells, this paper summarizes the therapeutic strategies applied by researchers in the treatment of malignant tumors in recent years and the latest progress of preclinical studies and clinical trials, and finally focuses on the research progress of in vitro expansion methods and maintenance of active function of NK cells, indicating that NK cells promise to be a unified quality of cellular immunotherapy products.

**【Key words】** NK cells Cell immunotherapy Allogeneic adoptive input In vitro amplification CAR-NK

肿瘤免疫治疗通过改善患者自身免疫系统能力来达到长期抗肿瘤效果,为经传统抗肿瘤疗法疗效不佳的患者提供了新的治疗策略和有力辅助。目前已经开展的细胞免疫治疗多集中在基因改造免疫细胞后用于靶向治疗恶性肿瘤。已有多种CAR-T获得FDA批准进入临床试验,但该疗法成本昂贵,容易引起细胞因子释放综合征和移植物抗宿主病<sup>[1, 2]</sup>,且免疫排斥强,细胞来源受限制。而NK细胞作为固有免疫细胞,通过受体进行免疫调节,能直接杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞<sup>[3]</sup>;NK细胞杀伤肿瘤的机制对特异性抗体要求小,不会引起患者免疫排斥;NK细胞进行异体回输的安全性已被证实,它的来源种类多,形成细胞产品的成本也会较低。基于此,研究者对不同来源的NK细胞使用细胞因子诱导、联合单抗和工程化改造等方法来激活NK细胞抗肿瘤活性,并将其用于临床前与肿瘤作用研究和临床试验研究。本文结合国内外近年报道,对NK细胞的杀瘤机制、活性调节策略与NK细胞用于临床试验的进展以及NK细胞来源及扩增办法研究做一综述,以期为NK细胞在治疗恶性肿瘤的应用中和NK细胞体外扩增体系的建立提供参考价值。

## 1 NK细胞免疫特性和抗肿瘤机制

### 1.1 NK细胞的生物学特性

NK细胞起源于骨髓中的共同淋巴祖细胞(common lymphoid progenitor, CLP),发育主要依赖于细胞因子和转录因子。人体外周血NK细胞以CD56为表型特征,根据CD56表达量情况分为CD56dim和CD56bright两个细胞亚群。前者占绝大部分,被视为成熟的NK细胞,可大量分泌高免疫活性细胞因子,同时表达CD16,介导抗体依赖性的细胞毒作用(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)。NK细胞受到刺激后通过激活受体和配体之间的相互作用——NK细胞受体(NK cell receptors, NKR)和靶细胞表面的配体,如人白细胞抗原分子(human leukocyte antigen, HLA)结合后,NK细胞活化释放细胞毒素,杀伤靶细胞。NKR主要包括杀伤免疫球蛋白样受体(killer immunoglobulin-like receptors, KIR)家族和杀伤凝集素样受体(NK cell group 2, NKG2)家族,KIR是一类抗体样受体,通过与HLA类分子结合来调节NK细胞的活化和抑制。KIR家族成员的表达亦存在个体差异,其中的抑制性受体和HLA类分子结合

后,可抑制NK细胞的活化<sup>[4]</sup>。因此,人类白细胞抗原(HLA)低表达的肿瘤细胞对NK细胞的杀伤更敏感。NKG2家族包括NKG2A、NKG2C、NKG2D等受体,可发挥抑制和活化NK细胞的作用。其中NKG2D表达最广泛,能够与许多肿瘤细胞和感染细胞表面的配体结合,从而激活NK细胞<sup>[5]</sup>。NK细胞表面还表达一些细胞黏附分子,促进NK细胞与其他细胞的黏附和活化<sup>[6]</sup>,如T细胞、树突状细胞和巨噬细胞,从而共同形成人体的免疫防线。

### 1.2 NK细胞和肿瘤的相互作用

NK细胞通过多种机制参与抗肿瘤免疫反应:NK细胞表面受体CD16通过ADCC效应杀伤肿瘤细胞;NK细胞可释放穿孔素、颗粒酶激活凋亡系统攻击肿瘤细胞;NK细胞能够表达死亡配体(FASL)结合靶细胞死亡受体(FAS)引起靶细胞凋亡。与激活过程需要进行抗原处理和呈递的T细胞不同,NK细胞进行免疫应答的过程无需肿瘤细胞的预先致敏,也无需特异性抗体,直接由NK细胞的活化抑制受体与靶细胞的相互作用进行控制<sup>[7-9]</sup>。NK表面KIR亚群在结合特定HLA分子时,能够阻断NK细胞识别和攻击靶细胞的作用<sup>[4]</sup>;而对不表达KIR可结合HLA分子的靶细胞,NK细胞就会被激活,从而发挥细胞毒性作用<sup>[9]</sup>。NK细胞还会在受体的调节下分泌多种细胞毒素和细胞因子,直接杀伤肿瘤细胞并诱导免疫反应。为逃避NK细胞的识别和攻击,肿瘤细胞会下调NK细胞的激活受体,因此当NK细胞暴露于患者体内肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),NK细胞功能容易失调<sup>[10]</sup>从而导致细胞毒性的减弱。肿瘤细胞还能够结合抑制性受体以及产生免疫抑制因子如TGF- $\beta$ 、IL-10、PGE2等,直接对NK细胞进行免疫抑制<sup>[10-11]</sup>。研究证明NK细胞为抑制性受体NKG2A阳性的肿瘤患者预后较差<sup>[12]</sup>。不仅如此,TME存在大量的免疫抑制性细胞,如调节性T细胞(Tregs)、肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)等,阻碍NK细胞进入肿瘤的核心。肿瘤代谢物的积累比如腺苷乳酸等,都会抑制NK细胞的杀伤能力。表1列出了NK细胞进行免疫治疗恶性肿瘤的优势和不足。目前对于肿瘤免疫逃逸的研究着眼于下面几个方面:上调激活性受体或下调抑制性受体的表达水平来增强NK细胞的杀伤活性;通过细胞因子或其他诱导颗粒使NK细胞形成记忆,增加靶向治疗肿瘤的能力;探索肿瘤细胞的免疫逃逸机制加以利用,比如神经胶质瘤等逃避NK细胞免疫和NK细胞对

肿瘤细胞低反应性的关键靶点, 以期为抗肿瘤疗法提供新思路<sup>[13]</sup>。

## 2 NK细胞临床应用进展

### 2.1 NK细胞治疗策略的改进

表1 NK细胞免疫治疗恶性肿瘤的优势与不足

优点	不足
固有的自然杀伤能力, 无需激活和抗原识别。 无需个性化定制, 适用患者群体广泛。 抗肿瘤范围广, 适用多种血液系统肿瘤和实体瘤。	特异性较低, 对特定肿瘤细胞识别能力弱。 活动范围受限, 具有密度依赖性。 细胞毒性部分依赖抗体需要相应抗体才能最大程度发挥其抗肿瘤能力。
可形成记忆性NK细胞, 达到长期抗肿瘤免疫。 细胞受体激活与抑制调节, 信号通路较多, 容易被调节和改造。	肿瘤细胞可通过降低自己细胞表面的靶细胞抗原进行免疫逃逸。

#### 2.1.1 NK细胞活性调节策略

NK细胞和靶细胞发生相互作用是由受体传递信号, 从而产生级联反应调控。有研究提示, 阻断KIR受体的抑制性信号, 利用免疫抑制检查点SHP-1的缺失, 可降低免疫细胞激活的阈值, 增强NK细胞的毒性<sup>[14]</sup>。还有一些免疫检查点抑制剂如抗PD-1、抗CTLA-4抗体均可以修复NK细胞抗肿瘤效应, 阻断抑制性受体的作用, 逆转NK细胞在TME中的免疫耗竭态, 减少恶性肿瘤细胞的逃逸<sup>[11]</sup>。CD73的含量和肿瘤代谢正相关, 它的过表达会导致细胞外腺苷的失调, 使肿瘤细胞发生免疫逃逸。因此, CD73抑制剂联合抗PD-1可被用于恶性肿瘤治疗<sup>[15]</sup>。NK细胞联合特异性针对肿瘤的抗体可以增加NK细胞的靶向性, 使NK细胞的毒性完全发挥。另外, 减少NK细胞负调控抗体与NK细胞的结合也是NK细胞活力改善的新策略。研究发现, 对多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)有良好疗效的CD38单克隆抗体对抗肿瘤NK细胞有极大副作用, 减少两者联合反而能更好治疗MM<sup>[16]</sup>。T细胞来源的IL-22可促进肿瘤细胞表达CD155从而抑制NK细胞功能, 使肿瘤细胞发生肺转移<sup>[17]</sup>, 目前已有报道IL-15联合TIGHT基因可抑制黑色素瘤表达CD155, 从而减少CD155对NK细胞的活性抑制。NK细胞强大的抗肿瘤性能够杀灭循环肿瘤细胞, 有报道称NK细胞通过线粒体凋亡途径能够杀伤循环肿瘤细胞<sup>[18]</sup>, 为抗肿瘤疗法提供了新途径。另外, 刺激NK细胞释放更多肿瘤坏死因子和促炎因子, 可增强其对肿瘤细胞的毒性和趋化性。常见的 $\gamma$ 链细胞因子(IL-2、IL-15、IL-7、IL-21)均能促进NK细胞的增殖和分泌能力。通过清除患者血浆中的人类癌细胞表面抗原——MICA分子, IL-2激活的人外周血NK细胞能够恢复NKG2D介导的NK细胞对神经母细胞瘤的杀伤作用; IL-15与IL2共享NK细胞表面的信号转导通道, 均可激活和刺激NK细胞的生长和发育, 可促进NK细胞之间的信息传递和结合, 当

NK细胞互相持续接触, 细胞增殖和抗肿瘤功能会协同增加<sup>[19-21]</sup>。

#### 2.1.2 CAR-NK临床前研究及进展

NK细胞参与抗肿瘤的治疗手段不仅限于免疫检查点抑制和多种特异性抗体联合<sup>[2]</sup>, NK细胞表面的共刺激分子亦是治疗恶性肿瘤具有吸引力的靶点。基于小鼠淋巴瘤临床前模型, 研究者发现将CD19-CAR抗原和脐带血NK细胞结合, 同时使用表达编码IL-15和诱导caspase 9的基因对NK细胞进行基因修饰后, NK细胞杀伤淋巴瘤细胞的靶向性和毒性大大提高。临床前研究报道, IL-15联合诱导型蛋白开关MyD88/CD40能够增强CAR-NK细胞的抗肿瘤疗效<sup>[22]</sup>; CD33-CAR-NK和CD123-CAR-NK被用来靶向攻击急性髓系白血病细胞<sup>[23-24]</sup>, 而DLL3-CAR-NK-92则被证实了对小细胞肺癌的杀伤性<sup>[25]</sup>。另外, 将CAR-NK与其他CAR-细胞组合使用, 或许能获得惊人效果。在多种肿瘤模型中, NK细胞的胞吞作用使靶细胞抗原转移到了CAR上, 导致了CARs的持续激活和对自我NK细胞的识别, 从而降低了CAR-NK细胞对肿瘤细胞的反应性, 引起肿瘤复发, 而通过双CAR可以有效防止胞吞作用介导的肿瘤复发<sup>[26]</sup>。NK细胞泛特异性杀伤肿瘤的独特性, 提示它适合成为合成免疫治疗的细胞基底, 构建能够减毒增效的合成免疫分子<sup>[27-28]</sup>, 从而实现恶性肿瘤的精准识别。

#### 2.2 NK细胞的临床试验及研究进展

目前, 研究者利用NK细胞针对性治疗多种实体肿瘤, 如胃癌、结直肠癌、胰腺癌等, 正在进行临床试验<sup>[29]</sup>, 研究结果尚不完全, 但已初步显示出NK细胞的输注治疗在部分患者中能够诱导肿瘤的抑制或缩小。NK细胞进行工程化改造后治疗肿瘤的临床试验正逐步立项, 且在治疗血液恶性肿瘤上已展现了明显疗效<sup>[30]</sup>。NK细胞与免疫检查点抑制剂(如PD-1/PD-L1抗体)联合使用的疗效特别体现在耐药性肿瘤中<sup>[11]</sup>。需要指出的是, NK细胞治疗的疗效可能会因

多种因素而异，包括肿瘤类型、患者个体差异、细胞治疗产品的质量等。而且，目前的临床试验大部分仍处于早期阶段，仍需进一步的临床研究和证据来评估

其疗效。表2总结了近年NMPA、Clinical trials.gov等官方网站及本文参考文献中NK细胞在治疗恶性肿瘤的临床试验中取得的进展。

表2 NK细胞在治疗恶性肿瘤临床试验中的应用进展<sup>[30-40]</sup>

NK细胞来源	治疗肿瘤类型	疗法或细胞改造	试验进展或疗效	信息来源
自体	复发性髓母细胞瘤和室管膜瘤	联合放疗脑室内注射	验证了NK细胞局部输注的安全无毒性	[31]
自体	晚期肝癌	体外扩增后联合化疗	疾病控制率达到80%	[32]
自体	乳腺癌	体外扩增联合曲妥珠单抗	具有抗肿瘤活性	[33]
自体	非小细胞肺癌	SNK01疗法联合帕博利珠单抗	无进展生存期延长	[34]
自体	鼻咽癌	体外扩增后联合西妥昔单抗	观察到疾病稳定性	[35]
异体	复发性难治AML或急性ALL	淋巴细胞清除后输注	无进展生存期延长	[36-39]
异体	复发性卵巢癌	淋巴细胞清除后腹腔注射	尚未观察到完全缓解	[40]
异体	复发难治CD30+淋巴瘤	联合AFM13双特异性抗体	治疗耐受性极好，观察到完全缓解	Clinical trials.gov
异体	复发难治B细胞淋巴瘤	CD19-CAR-NK	可达到完全缓解	[30]
异体	霍奇金淋巴瘤	CD19-CAR-NK	尚未明确	Center for Drug Evaluation, NMPA
异体	多种复发难治血液系统恶性肿瘤	CD70/CD5-CAR-NK	临床试验 I / II 期逐步立项	Clinical trials.gov
异体	耐药性实体肿瘤	TROP2-CAR-NK	尚未明确	Center for Drug Evaluation, NMPA
异体	晚期上皮卵巢癌	间皮素-CAR-NK	尚未明确	Center for Drug Evaluation, NMPA

2.2.1 NK细胞过继免疫疗法

NK细胞过继免疫疗法包括自体回输和异体回输，已在血液系统肿瘤的治疗上取得了良好疗效。目前NK细胞自体回输多应用在复发性实体瘤或易发生转移的晚期癌症治疗，在儿童脑室膜瘤及儿童复发性成神经管瘤治疗中，研究者首次通过脑室对人体注射NK细胞，作为放疗的辅助治疗手段，其输注疗效得到了证实<sup>[31]</sup>。NK细胞自体回输治疗肝癌的临床试验正在招募受试者，事实上已经有研究报道该方法治疗晚期肝癌的疾病控制率可以达到80%<sup>[32]</sup>。对易转移的鼻咽癌、非小细胞肺癌和乳腺癌，NK细胞近两年已不仅限于单纯的回输，而多作为辅助疗法与其他药物对患者进行联合治疗<sup>[33-35]</sup>。美国FDA批准了一项阿扎胞苷、维奈托克和同种异体脐带血NK细胞（cord blood-derived nk cells, CB-NK）治疗急性髓系白血病的IB期试验。高危的急性髓系白血病（AML）和骨髓异常增殖综合征（MDS）治疗失败的主要原因是骨髓移植治疗后的复发，而异基因单倍体相同的供者记忆样NK细胞直接回输可以在一定程度上防止其复发<sup>[36-37]</sup>。NK细胞可能是异基因HSCT过程中移植对抗白血病的主要因素<sup>[38-39]</sup>，有研究提到PBMC源NK细胞经符合药品生产质量规范（good manufacture practice, GMP）的细胞因子刺激后对多发性骨髓瘤

疗效明显。近几年，异体NK细胞过继疗法正逐渐从血液肿瘤疾病过渡到实体瘤的治疗上。使用FDA批准的体外CB-NK细胞联合西妥昔单抗免疫治疗患有微小残留病的结直肠癌患者已经进入了临床试验IB期，预期可证实NK细胞异体输注的无毒性与有效性。另外，NK细胞在晚期肾细胞癌和黑色素瘤患者的输注治疗过程中也没有观察到严重的不良事件，但是抗肿瘤反应时效较短。复发难治性的卵巢癌使用异体NK细胞腹腔注射后，尚未观察到其在患者体内的成功扩增<sup>[40]</sup>。

2.2.2 CAR-NK靶向治疗

被转导CD19-CAR的异体NK细胞进行靶向治疗B细胞淋巴瘤的临床试验取得了非常明确的成果<sup>[30]</sup>。而国内NMPA近年也批准了靶向CD19嵌合抗原受体基因修饰的NK细胞注射液进入临床试验，用于治疗复发和/或难治性大B细胞淋巴瘤。多项脐带血来源的异体NK细胞使用CD19-CAR进行工程化改造后，用于治疗非霍奇金淋巴瘤（NHL）的临床试验。CD70/CD5-CAR工程化IL-15转导的脐带血NK细胞在美国FDA监管下治疗复发/难治性血液系统恶性肿瘤的I/II期研究已经立项。CAR-NK用于治疗实体瘤的研究进展颇多，间皮素-CAR-NK注射液被CFDA批准用于治疗晚期上皮性卵巢癌。高级别浆液性卵巢癌患

者对常规治疗反应低下，它和一些具有耐药性的癌症如胰腺癌和间肾样腺癌，用FDA批准的TROP2-CAR-NK通过腹膜注射进行治疗，均进入了临床试验的研究。部分临床试验数据表明，CAR-NK细胞治疗在一部分患者和小鼠模型中能够产生持久的肿瘤消退和长期缓解的效果<sup>[23]</sup>。

### 3 NK细胞的来源、体外培养和扩增

#### 3.1 NK细胞的主要来源

临床前研究的原代NK细胞主要来源包括，人外周血单个核细胞（peripheral blood monocytes, PBMC）、脐带血单个核细胞、NK细胞株系，如NK92<sup>[2, 41]</sup>以及多能干细胞（iPSC）。PBMC来源的NK细胞（PB-NK）和脐带血来源的NK细胞（CB-NK）比例低，难以大量获取，需经白细胞富集后再

进一步对NK细胞进行体外的分选与扩增，但是相比于CB-NK，PB-NK的获取较为简捷、易得且成本低，尽管PB-NK纯化和利用的周期较长，细胞活性维持不易，但体外扩增体系经优化后，仍具有形成细胞免疫治疗产品的前景；NK92是最多用于临床前NK细胞杀瘤机制研究和NK细胞临床试验研究的细胞系，细胞的稳定性好，纯化程序简单，但其成本高，致癌性堪忧；iPSC技术供体细胞来源广泛，为所有类型的细胞疗法提供了潜在的通用细胞来源，包括使用NK细胞的肿瘤免疫治疗，iPSC来源的NK细胞质量均一、且易于修饰以靶向性杀伤肿瘤细胞，但所需技术复杂且价格高昂<sup>[42]</sup>。表3将多种来源的NK细胞分选扩增的办法进行了比较。

NK细胞过继免疫治疗或CAR-NK细胞治疗癌症

表3 NK细胞原料来源及分选扩增方法比较<sup>[41-45, 48]</sup>

NK细胞来源	分选、扩增与激活方法	是否形成标准质量体系	优缺点	文献信息
NK细胞株系	研究者通过给予购买的细胞株系细胞因子或免疫调节剂增强其毒性	NK92是FDA批准的第一个可进入临床试验的NK细胞株系	可无限增殖，稳定性强；成本高，但是有致癌性	<sup>[41, 45]</sup>
外周血单个核细胞	研究者采集患者，供者外周血单个核细胞或脐带血单个核细胞或使用经美国FDA批准的脐带血细胞产品进行NK细胞的分选：通过细胞表面标志分选NK细胞；对NK细胞进行刺激培养使其扩增，方法包括：细胞因子联合多抗体刺激；饲养细胞激活；添加化学药物增强其毒性	尚未明确	获得方式简单快速，易刺激培养与扩增，成本低；但是难以大量获取，获取周期长	<sup>[43, 44, 48]</sup>
脐带血扩增	研究者使用基因转化技术和其他生物技术对人成体细胞进行诱导分化使其形成NK细胞	美国FDA批准了多个脐带血来源的NK细胞体外扩增体系，但是未公开	细胞增殖性强，靶向率高；但是成本高，获取不易	
多能干细胞诱导	研究者使用基因转化技术和其他生物技术对人成体细胞进行诱导分化使其形成NK细胞	尚未明确	供者来源多，免疫原性小；但是技术复杂，操作困难，成本高	<sup>[42]</sup>

通常有自体 and 异体两种形式，输注量一般根据体表面积（body surface area, BSA）计算，在衡量患者的具体情况、疾病类型和严重程度等因素后再行个体化决定，目前的NK细胞临床试验正在探索不同癌症患者的适应性NK细胞输注剂量。NK细胞自体回输的主要来源是患者的外周血单个核细胞<sup>[43]</sup>，可最大程度避免免疫排斥反应，但由于患者免疫功能下降，NK细胞在数量、活性及功能维持上存在限制，而同种异体NK细胞能够克服这一问题，因此同种异体NK细胞的输注与改造后输注是一大研究热点。

#### 3.2 NK细胞的体外培养与扩增

目前对获得大量高纯度和高细胞毒性NK细胞研究正在进行中。IL-2、IL-15、IL-18、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等对NK细胞的活化和分化有正调节作用，体外培养时加入上述细胞因子可明显提高NK的杀伤活性。CD16对NK细胞的毒性具有诱导性，且能

反复激活NK细胞的激活性受体NKG2D。研究表明，CD16靶向的单克隆抗体能够增强NK细胞的扩增及分泌能力<sup>[44]</sup>。除了NK细胞扩增过程中添加的激活剂，部分增强毒性的细胞因子与抗体，还有一些化学药物，比如将聚（磷腈）树枝状聚合物添加到来自健康志愿者或多发性骨髓瘤患者的外周血单核细胞的培养条件中，能够提高NK细胞毒性。其他方法比如辐照的肿瘤细胞、PB单核细胞或B淋巴细胞系作为饲养细胞扩增人NK细胞<sup>[43]</sup>，也能使细胞显著扩增，但是饲养细胞可能会对NK细胞的功能起到负调节作用。另外，FDA监管的NK细胞株系或脐带血一般可作为一些NK细胞临床产品的来源，NK92细胞系是FDA首个批准的NK细胞株，它可杀死虫草素致敏的癌细胞，而虫草素作为免疫调节剂也成为了增强NK细胞毒性的一种研究思路<sup>[45]</sup>。

NK细胞体外扩增的不同体系对NK细胞疗效的影

响研究也正在临床进行，研究表明单抗刺激NK细胞扩增和饲养细胞刺激NK细胞扩增的两种体系，在造血干细胞移植后白血病初发的疗效上没有明显差异，还需要更多探索。此外，研究报道了快速NK细胞产品实现通过供体单采直接分离NK细胞，将其冷冻保存后，在床边解冻输注到患者体内的可能。目前NK细胞冷冻保存的条件仍在探索，冷冻保存的NK细胞重新解冻后加入细胞因子进行刺激能够保证其部分毒性<sup>[46]</sup>。在不同来源的NK细胞和不同的研究目的下，保存条件和储存时间都有不同的限制，应当分别评估不同用法NK细胞的最优保存路径，及其保存的时间和稳定性<sup>[47]</sup>。通过优化冷冻条件，建立良好的细胞储备体系，为形成NK细胞货架式产品打好基础。

#### 4 NK细胞治疗肿瘤进行临床实践的展望

临床前研究和临床试验展示了NK细胞应用于癌症治疗的前景，其杀死肿瘤细胞的作用速度、效力、适用性为新型免疫治疗开辟了新领域。日益发展的基因转导技术及CRISPR-Cas9等基因修饰技术用于优化NK细胞在体内诱导肿瘤消退的能力<sup>[48]</sup>；同种异体NK细胞体外扩增方法的逐步优化提高了NK细胞的活性，多种靶向抗原结构联合NK细胞治疗肿瘤减少了肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[41, 49-50]</sup>；且随着NK细胞治疗肿瘤临床试验的进展，NK细胞敏感肿瘤治疗谱正逐渐形成。NK细胞体外制备工艺及其作为辅助治疗和组合治疗重要成分等方面，是未来值得关注的热点，加强NK细胞来源筛选及保持细胞质量稳定的研究将为制备简便、高效、安全、经济的NK细胞应用于临床细胞免疫治疗提供更为精准的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] BERRIEN-ELLIOTT M M, JACOBS M T, FEHNIGER T A. Allogeneic natural killer cell therapy[J]. *Blood*, 2023, 141(8): 856-868.
- [2] GOLDENSON B H, HOR P, KAUFMAN D S. iPSC-derived natural killer cell therapies - expansion and targeting[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 841107.
- [3] MERINO A, MAAKARON J, BACHANOVA V. Advances in NK cell therapy for hematologic malignancies: NK source, persistence and tumor targeting[J]. *Blood Rev*, 2023, 60: 101073.
- [4] QUATRINI L, DELLA CHIESA M, SIVORI S, et al. Human NK cells, their receptors and function[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(7): 1566-1579.
- [5] BUCKLE I, GUILLEREY C. Inhibitory receptors and immune checkpoints regulating natural killer cell responses to cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(17): 4263.
- [6] CHEN Y Y, LU D, CHUROV A, et al. Research progress on NK cell receptors and their signaling pathways[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 6437057.
- [7] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 85-100.
- [8] LIU S Z, GALAT V, GALAT Y, et al. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 7.
- [9] MUJAL A M, DELCONTE R B, SUN J C. Natural killer cells: from innate to adaptive features[J]. *Annu Rev Immunol*, 2021, 39: 417-447.
- [10] CÓZAR B, GREPPI M, CARPENTIER S, et al. Tumor-infiltrating natural killer cells[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(1): 34-44.
- [11] VALERI A, GARCÍA-ORTIZ A, CASTELLANO E, et al. Overcoming tumor resistance mechanisms in CAR-NK cell therapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 953849.
- [12] FUERTES M B, DOMAICA C I, ZWIRNER N W. Leveraging NKG2D ligands in immuno-oncology[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 713158.
- [13] SHAIM H, SHANLEY M, BASAR R, et al. Targeting the  $\alpha v$  integrin/TGF- $\beta$  axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(14): e142116.
- [14] BEN-SHMUEL A, BIBER G, SABAG B, et al. Modulation of the intracellular inhibitory checkpoint SHP-1 enhances the antitumor activity of engineered NK cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1314-1316.
- [15] NEO S Y, YANG Y, RECORD J, et al. CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(3): 1185-1198.
- [16] WU H T, ZHAO X Y. Regulation of CD38 on multiple myeloma and NK cells by monoclonal antibodies[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 1974-1988.
- [17] BRIUKHOVETSKA D, SUAREZ-GOSALVEZ J, VOIGT C, et al. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis[J]. *Immunity*, 2023, 56(1): 143-161.e111.
- [18] PAN R Q, RYAN J, PAN D, et al. Augmenting NK cell-based immunotherapy by targeting mitochondrial apoptosis[J]. *Cell*, 2022, 185(9): 1521-1538.e1518.
- [19] MA S B, CALIGIURI M A, YU J H. Harnessing IL-

- 15 signaling to potentiate NK cell-mediated cancer immunotherapy[J]. *Trends Immunol*,2022,43(10):833-847.
- [20] WANG X,ZHAO X Y.Transcription factors associated with IL-15 cytokine signaling during NK cell development[J]. *Front Immunol*,2021,12:610789.
- [21] BERRIEN-ELLIOTT M M,BECKER-HAPAK M,CASHE N A F,et al.Systemic IL-15 promotes allogeneic cell rejection in patients treated with natural killer cell adoptive therapy[J]. *Blood*,2022,139(8):1177-1183.
- [22] WANG X M,JASINSKI D L,MEDINA J L,et al.Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells[J]. *Blood Adv*,2020,4(9):1950-1964.
- [23] ALBINGER N,PFEIFER R,NITSCHKE M,et al.Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. *Blood Cancer J*,2022,12(4):61.
- [24] CARUSO S,DE ANGELIS B,DEL BUFALO F,et al.Safe and effective off-the-shelf immunotherapy based on CAR.CD123-NK cells for the treatment of acute myeloid leukaemia[J]. *J Hematol Oncol*,2022,15(1):163.
- [25] LIU M T,HUANG W S,GUO Y J,et al.CAR NK-92 cells targeting DLL3 kill effectively small cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. *J Leukoc Biol*,2022,112(4):901-911.
- [26] LI Y,BASAR R,WANG G H,et al.KIR-based inhibitory CARs overcome CAR-NK cell trogocytosis-mediated fratricide and tumor escape[J]. *Nat Med*,2022,28(10):2133-2144.
- [27] DEVILLIER R,CHRÉTIEN A S,PAGLIARDINI T,et al.Mechanisms of NK cell dysfunction in the tumor microenvironment and current clinical approaches to harness NK cell potential for immunotherapy[J]. *J Leukoc Biol*,2021,109(6):1071-1088.
- [28] IRVINE D J,MAUS M V,MOONEY D J,et al.The future of engineered immune cell therapies[J]. *Science*,2022,378(6622):853-858.
- [29] WRONA E,BOROWIEC M,POTEMSKI P.CAR-NK cells in the treatment of solid tumors[J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(11):5899.
- [30] LIU E L,MARIN D,BANERJEE P,et al.Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors[J]. *N Engl J Med*,2020,382(6):545-553.
- [31] KHATUA S,COOPER L J N,SANDBERG D I,et al.Phase I study of intraventricular infusions of autologous ex vivo expanded NK cells in children with recurrent medulloblastoma and ependymoma[J]. *Neuro Oncol*,2020,22(8):1214-1225.
- [32] BAE W K,LEE B C,KIM H J,et al.A phase I study of locoregional high-dose autologous natural killer cell therapy with hepatic arterial infusion chemotherapy in patients with locally advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*,2022,13:879452.
- [33] LEE S C,SHIMASAKI N,LIM J S J,et al.Phase I trial of expanded,activated autologous NK-cell infusions with trastuzumab in patients with HER2-positive cancers[J]. *Clin Cancer Res*,2020,26(17):4494-4502.
- [34] PARK H J,KIM Y M,JUNG J S,et al.Two-year efficacy of SNK01 plus pembrolizumab for non-small cell lung cancer:expanded observations from a phase I/IIa randomized controlled trial[J]. *Thorax Cancer*,2022,13(14):2050-2056.
- [35] LIM C M,LIOU A,POON M,et al.Phase I study of expanded natural killer cells in combination with cetuximab for recurrent/metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*,2022,71(9):2277-2286.
- [36] SHAPIRO R M,BIRCH G C,HU G G,et al.Expansion,persistence,and efficacy of donor memory-like NK cells infused for posttransplant relapse[J]. *J Clin Invest*,2022,132(11):e154334.
- [37] GANG M,WONG P,BERRIEN-ELLIOTT M M,et al.Memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy[J]. *Semin Hematol*,2020,57(4):185-193.
- [38] BEDNARSKI J J,ZIMMERMAN C,BERRIEN-ELLIOTT M M,et al.Donor memory-like NK cells persist and induce remissions in pediatric patients with relapsed AML after transplant[J]. *Blood*,2022,139(11):1670-1683.
- [39] AHMADVAND M,BAROUGH M S,BARKHORDAR M,et al.Phase I non-randomized clinical trial of allogeneic natural killer cells infusion in acute myeloid leukemia patients[J]. *BMC Cancer*,2023,23(1):1090.
- [40] HOOGSTAD-VAN EVERT J,BEKKERS R,OTTEVANGER N,et al.Intraperitoneal infusion of ex vivo-cultured allogeneic NK cells in recurrent ovarian carcinoma patients (a phase I study)[J]. *Medicine (Baltimore)*,2019,98(5):e14290.
- [41] HEIPERTZ E L,ZYND A E R,STAV-NORAAS T E,et al.Current perspectives on “off-the-shelf” allogeneic NK and CAR-NK cell therapies[J]. *Front Immunol*,2021,12:732135.
- [42] LUPO K B,MOON J I,CHAMBERS A M,et al.Differentiation of natural killer cells from induced pluripotent stem cells under defined,serum- and feeder-

# 纤维蛋白原在创伤性大失血救治中的研究进展\*

尚玮 汪德清

解放军总医院第一医学中心输血医学科, 北京 100853

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2024.02.018

\*本课题受“十三五”军事重大专项的子项目(No.BWS16J006)资助

作者简介: 尚玮, 主要从事临床输血风险控制研究, (E-mail) sunvary@163.com。

通信作者: 汪德清, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事临床输血风险控制研究, (E-mail) deqingw@vip.sina.com。

**【摘要】** 纤维蛋白原是机体血液循环中浓度最高的凝血蛋白质, 在创伤性大失血的救治过程中, 纤维蛋白原不仅作为主要止血成分发挥着迅速止血的作用, 越来越多的证据显示其对机体的炎症免疫的靶细胞及抗微生物感染过程均发挥着重要的调节作用, 本文拟从纤维蛋白原对急性创伤性大失血早、晚期生存率影响的角度对其多重作用进行综述, 旨在为早期足量开展纤维蛋白原替代治疗提供更多理论支持。

**【关键词】** 纤维蛋白原 血小板 创伤性大失血 创伤性内皮病 脓毒症

**【中图分类号】** R457 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587 (2024) 02-0274-08

**The Development Fibrinogen in the Treatment of Massive Traumatic Hemorrhage** SHANG Wei, WANG Deqing. Department of Transfusion Medicine, The First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853

**【Abstract】** Fibrinogen is a coagulation protein with the highest concentration in the blood circulation. During the treatment of massive traumatic hemorrhage, more and more evidence showed that fibrinogen played a key role not only as the main hemostatic component, but also as a regulator in inflammatory immunity and the anti-microbial infection. This article provides a brief overview of the multiple function of fibrinogen in the treatment of massive traumatic hemorrhage from the prospective of its influence on the early and late mortality, aiming to provide more theoretical supports to the early and sufficient fibrinogen replacement.

**【Key words】** Fibrinogen Platelet Massive traumatic hemorrhage Endotheliopathy of trauma Sepsis

全球每年约有超过490万人死于严重创伤, 到2030年该数字预计将达到840万<sup>[1-2]</sup>。过去20年来, 创伤是全球中等收入国家人群致死致残的十大主要原因

之一, 特别是40岁以下人群死亡的首要原因。已构成重要的公共卫生问题并造成巨大的经济损失。

根据Trunkey在20世纪80年代描述的经典创伤死

free conditions[J].Cytotherapy,2021,23(10):939-952.

[43] FANG F,XIE S Q,CHEN M H,et al.Advances in NK cell production[J].Cell Mol Immunol,2022,19(4):460-481.

[44] CAPUANO C,PIGHI C,BATTELLA S,et al.Harnessing CD16-mediated NK cell functions to enhance therapeutic efficacy of tumor-targeting mAbs[J].Cancers (Basel),2021,13(10):2500.

[45] PANWONG S,WATHIKTHINNAKON M,KAEWKOD T,et al.Cordycepin sensitizes cholangiocarcinoma cells to be killed by natural killer-92 (NK-92) cells[J].Molecules,2021,26(19):5973.

[46] SAULTZ J N,OTEGBEYE F.Optimizing the cryopreservation and post-thaw recovery of natural killer cells is critical for the success of off-the-shelf platforms[J].Front Immunol,2023,14:1304689.

[47] MOTALLEBNEJAD P,KANTARDJIEFF

A,CICHOCKI F,et al.Process engineering of natural killer cell-based immunotherapy[J].Trends Biotechnol,2023,41(10):1314-1326.

[48] GONG Y,KLEIN WOLTERINK R G J,WANG J X,et al.Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy[J].J Hematol Oncol,2021,14(1):73.

[49] CUTMORE L C,MARSHALL J F.Current perspectives on the use of off the shelf CAR-T/NK cells for the treatment of cancer[J].Cancers (Basel),2021,13(8):1926.

[50] AFOLABI L O,AFOLABI M O,SANI M M,et al.Exploiting the CRISPR-Cas9 gene-editing system for human cancers and immunotherapy[J].Clin Transl Immunology,2021,10(6):e1286.

(收稿日期: 2024-01-09)

(本文编辑: 马超)