

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.005

· 基础研究 ·

CD137 单抗联合 IL-15 体外扩增 NK 细胞及其对肺癌细胞的杀伤活性

陶家龙¹, 邱玉华², 庄志祥¹, 沈丽琴¹ (1. 苏州大学附属第二医院 肿瘤科, 江苏 苏州 215004; 2. 苏州大学 免疫学教研室, 江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:**建立 CD137 单抗联合 IL-15 体外扩增 NK 细胞的方案,研究扩增后 NK 细胞对肺癌细胞的杀伤活性。**方法:**分离健康人外周血单个核细胞,经免疫磁珠阴性分选获取 CD3⁻CD56⁺ NK 细胞,将 NK 细胞分成对照组、IL-2 组、IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 + CD137 单抗 + IL-15 组进行培养,经锥虫蓝染色法计算 NK 细胞的扩增倍数,流式细胞术检测 NK 细胞的表型,LDH 酶释放法检测 NK 细胞对肺癌细胞株 A549 的杀伤活性,ELISA 法检测扩增后 NK 细胞培养液上清中 IFN- γ 的分泌量。**结果:**经磁珠分选后 NK 细胞纯度为(93.28 \pm 3.21)%。IL-2 + CD137 单抗 + IL-15 组 NK 细胞扩增倍数明显高于 IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 组及对照组[(86.20 \pm 5.00) vs (60.01 \pm 5.00)、(49.06 \pm 4.39)、(17.04 \pm 1.49)、(3.95 \pm 0.23)倍, $P < 0.01$]。IL-2 + CD137 单抗 + IL-15 组 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤效率明显高于其他各组[(93.14 \pm 3.27)% vs (83.15 \pm 4.03)%、(71.25 \pm 3.24)%、(62.27 \pm 3.01)%、(49.38 \pm 2.35)%, $P < 0.01$]。IL-2 + CD137 单抗 + IL-15 组培养液上清中的 IFN- γ 的分泌水平明显高于 IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 组及对照组[(296.25 \pm 9.79) vs (260.47 \pm 11.55)、(201.13 \pm 6.36)、(138.36 \pm 6.09)、(38.42 \pm 3.56) pg/ml, $P < 0.01$]。**结论:**CD137 单抗联合 IL-15 能高效扩增 NK 细胞,扩增的 NK 细胞高效杀伤 A549 肺癌细胞。

[关键词] NK 细胞;CD137 单抗;IL-15;IFN- γ ;肺癌细胞

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0594-05

In vitro expansion of NK cells by combination of CD137 monoclonal antibody and IL-15 and their cytotoxicity against lung cancer cells

TAO Jia-long¹, QIU Yu-hua², ZHUANG Zhi-xiang¹, SHEN Li-qin¹ (1. Department of Oncology, Second Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China; 2. Department of Immunology, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore an *in vitro* expansion method of NK cells by CD137 monoclonal antibody combination with IL-15, and to study the cytotoxicity of expanded NK cells against lung cancer cells. **Methods:** CD3⁻CD56⁺ NK cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using negative MACS, and divided into five groups: a control group, IL-2, IL-2 + CD137mAb, IL-2 + IL-15, and IL-2 + IL-15 + CD137mAb groups. The expansion, phenotype and cytotoxicity of lung cancer A549 cells and IFN- γ secretion of NK cells were evaluated by MTT, FACS, LDH, and ELISA, respectively. **Results:** The purity of NK cells increased to (93.28 \pm 3.21)% after MACS sorting. In group IL-2 + IL-15 + CD137mAb, the NK cells were expanded obviously higher than were those in IL-2 + CD137mAb, IL-2 + IL-15, IL-2 and control groups(86.20 \pm 5.00 vs 60.01 \pm 5.00, 49.06 \pm 4.39, 17.04 \pm 1.49, 3.95 \pm 0.23, $P < 0.01$). The cytotoxicity of expanded NK cells in group IL-2 + IL-15 + CD137mAb was significantly higher than that in the other groups ([93.14 \pm 3.27]% vs [83.15 \pm 4.03]%, [71.25 \pm 3.24]%, [62.27 \pm 3.01]%, [49.38 \pm 2.35]%, $P < 0.01$). In group IL-2 + IL-15 + CD137mAb, the IFN- γ level in cell supernatant was significantly higher than that in IL-2 + CD137mAb, IL-2 + IL-15, IL-2 and control groups ([296.25 \pm 9.79] vs [260.47 \pm 11.55], [201.13 \pm 6.36], [138.36 \pm 6.09], [38.42 \pm 3.56] pg/ml; $P < 0.01$). **Conclusion:** CD137 monoclonal antibody combination with IL-15 can efficiently expand NK cells with

[基金项目] 苏州市科技基金项目资助 (No. 510307)。Project supported by the Science and Technology Foundation of Suzhou (No. 510307)

[作者简介] 陶家龙(1983-),江苏省苏州市人,本科,主治医师,主要从事肿瘤内科治疗的基础和临床研究。E-mail: tj200@qq.com

[通信作者] 沈丽琴(SHEN Li-qin, corresponding author), E-mail: liqin1231@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20121210.1717.004.html>

an effective cytotoxicity on lung cancer A549 cells.

[**Key words**] natural killer cell; CD137mAb; IL-15; IFN- γ ; lung cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 594-598]

自然杀伤(nature killer, NK)细胞具有广谱抗肿瘤细胞作用,是抗肿瘤免疫的第一道防线^[1-3]。NK 细胞对敏感靶细胞的杀伤功能不受靶细胞是否表达人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的影响,从而弥补了细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)只能识别 MHC I 类抗原阳性的靶细胞而无法杀伤 MHC I 类阴性细胞的缺陷。NK 细胞还是连接固有免疫和获得性免疫的重要环节, NK 细胞在造血干细胞/骨髓移植的辅助治疗及肿瘤过继细胞免疫治疗方面极具临床应用前景^[4-6]。然而, NK 细胞在体内的数量较少,如何获得足够数量的 NK 细胞成为其临床应用的关键问题。CD137/CD137L 是近年新发现的 TNFR/TNF 超家族的新成员, CD137 与其配体结合后介导的共刺激信号,可促进 T 细胞和 NK 细胞增殖、细胞因子的分泌等。许多体外研究^[7-9]均显示, IL-15 对促进 NK 细胞的成熟、活化、增殖及细胞毒活性有重要作用。本实验通过抗人 CD137 单抗和 IL-15 体外联合扩增人外周血来源的 NK 细胞,以期优化 NK 细胞体外扩增的效率和提高其肿瘤杀伤活性,为 NK 细胞在临床应用提供有效的选择。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

IL-2 购自北京瑞德合通药业有限公司, IL-15、CD137 单抗为 Biolegend 公司产品, 新生牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司, RPMI 1640 培养基购于美国 Gibco 公司, 24、96 孔板购于德国 Greiner Bio-one 公司, NK 细胞分选试剂盒(NK cell isolation Kjt II, 包括荧光标记抗体、磁珠)及 miniMACS 磁珠分选系统、分离柱(Ms Column)均购自德国 Miltenyi Biotec 公司。流式细胞仪为美国 Coulter 公司产品, 恒温离心机为德国 Sorvall-Legend 公司产品, CO₂ 孵育箱购于美国 Themofom 公司, Cyto-Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity 试剂盒购于美国 Promega 公司, 人干扰素- γ 定量试剂盒购自上海森熊科技实业有限公司。肺癌细胞株 A549 由本实验室常规传代培养。

1.2 外周血 PBMC 的分离和纯化

取 10 名健康志愿者外周血 20 ml, 肝素抗凝, 用 PBS 等体积稀释后, 2 500 \times g 离心 30 min 后, 吸取

中间白膜层, 加入等体积 PBS 液中, 1 500 \times g 离心 10 min, 倒掉上清。由此分离得到单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 再用 PBS 洗涤一次。

将上述 PBMC 用溶红素处理, 然后用 MACS 缓冲液洗涤 1 次, 血细胞计数板计数。将 1×10^7 个细胞重悬于 40 μ l MACS 缓冲液中, 加入 10 μ l NK 细胞生物素抗体 cocktail, 4 ~ 8 $^{\circ}$ C 孵育 10 min; 然后依次加入 30 μ l MACS 缓冲液、20 μ l 抗生物素 micro-bead, 4 ~ 8 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。再次用 MACS 缓冲液洗涤标记好的细胞, 重悬于 500 μ l MACS 缓冲液中。选用 MS 分离柱, 安放于 miniMACS 分离器磁场中。使用前先润湿分离柱, 将分离柱放置于合适的细胞收集管上面。将细胞悬液上柱, 用 3×500 μ l MACS 缓冲液洗柱, 收集细胞。纯化前后计数 PBMC, 并以 CD3、CD56 荧光标记抗体分析 NK 细胞的纯度。

1.3 CD137 单抗联合 IL-15 对 NK 细胞的体外扩增

将分离纯化后的 NK 细胞加入含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基中, 调细胞密度至 2×10^5 /ml, 在 24 孔板中加入制备的细胞悬液 1 ml。按细胞因子和单抗的不同组合分成 5 组进行培养: 对照组(不加任何因子和抗体)、IL-2(1 000 U/ml) + CD137 单抗(100 ng/ml)联合 IL-15(100 ng/ml)组、IL-2(1 000 U/ml) + CD137 单抗(100 ng/ml)组、IL-2(1 000 U/ml) + IL-15(100 ng/ml)组、IL-2(1 000 U/ml)组。每组复种 3 孔, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和温度培养箱中培养, 每 3 d 半量换液并全量补充上述细胞因子和单抗。在 0、5、10、15、20 d 通过锥虫蓝染色法计数, 动态观察细胞增殖情况。将上述细胞分别用荧光抗体 CD3-FITC、CD56-PE 标记, 用流式细胞仪检测扩增 20 d 后 NK 细胞的纯度。

1.4 LDH 酶释放法检测 CD137 单抗联合 IL-15 扩增后 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性

收集对数生长期肺癌 A549 细胞及培养第 15 天的 NK 细胞, 以 A549 细胞为靶细胞, 以 NK 细胞为效应细胞。将处于对数生长期的 A549 细胞用胰酶消化, 锥虫蓝染色法计数(活细胞数大于 95%), 调整细胞的密度, 加入 96 孔板中, 每孔 50 μ l; 按照不同效/靶比(1:1、5:1、10:1)加入效应细胞, 每孔同样为 50 μ l; 同时设立效应细胞和靶细胞自然释放孔、培养基自然释放孔、靶细胞最大释放孔, 体积校

正对照孔,每孔体积 100 μ l,且均设 3 个复孔。1 500 \times g 离心 5 min,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 4 h,在反应结束前 45 min,靶细胞最大释放孔每孔中加入 10 μ l 裂解液。反应结束后,每孔吸取 50 μ l 上清液与 50 μ l LDH 酶反应液置于另一新的 96 孔板,室温避光反应 30 min,加入反应终止液 50 μ l,酶标仪检测其 *D* 值。计算公式:杀伤活性(%)=(测定管 *D* 值 - 靶细胞自然释放管 *D* 值 - 效应细胞自然释放管 *D* 值)/(靶细胞最大释放管 *D* 值 - 靶细胞自然释放管 *D* 值) \times 100%。

1.5 ELISA 法检测 CD137 单抗联合 IL-15 扩增后 NK 细胞上清中 IFN- γ 的水平

取培养 15 d 的各组 NK 细胞上清液,1 500 \times g 离心 5 min,取 400 μ l 上清液备用,采用人 IFN- γ 定量 ELISA 试剂盒按照说明书进行测定。计算方法如下:以 1 000、500、250、125、62、31、16、0 pg/ml 标准品的光密度值(*D*)在半对数纸上作图(所有 *D* 值都减去空白值),画出标准曲线,再根据样品 *D* 值在该曲线图上查出相应的 IFN- γ 含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行两样本均数 *t* 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 分离纯化获得高纯度的 NK 细胞

10 名健康志愿者外周血 20 ml 用淋巴分离液经密度梯度离心法获得 $(1.85 \pm 2.21) \times 10^7$ 个 PBMC,后经免疫磁珠阴性分选法获得 CD3⁻CD56⁺ NK 细胞数为 $(2.28 \pm 1.36) \times 10^6$ 个。流式细胞仪检测 NK 细胞纯度由分选前的 $(10.21 \pm 5.11)\%$ 提高到分选后的 $(93.28 \pm 3.21)\%$ 。结果显示,PBMC 经免疫磁珠分选后可获得高纯度的 NK 细胞。

2.2 CD137 单抗联合 IL-15 明显提高 NK 细胞的扩增倍数

分离纯化后的 CD3⁻CD56⁺ NK 细胞在培养期间均通过锥虫蓝染色了解细胞存活情况,结果显示 NK 细胞的存活率达 90% 以上。培养的第 1 周内 NK 细胞增殖缓慢;第 2 周开始 NK 细胞形态发生明显变化,开始明显分裂增殖;培养至 20 d 时,细胞计数结果(图 1)显示,IL-2 + CD137 单抗联合 IL-15 组的 NK 细胞扩增 (86.20 ± 5.00) 倍,显著高于 IL-2 + CD137 单抗组的 (60.01 ± 5.00) 倍、IL-2 + IL-15 组的 (49.06 ± 4.39) 倍、IL-2 组的 (17.04 ± 1.49) 倍和对照组的 (3.95 ± 0.23) 倍(均 $P < 0.01$)。结果

显示,CD137 单抗联合 IL-15 在体外可明显提高 NK 细胞的扩增倍数。

2.3 纯化前后及 CD137 单抗联合 IL-15 扩增后 NK 细胞的纯度

流式细胞术检测结果(图 2)显示,NK 细胞纯度由分选前的 $(10.21 \pm 5.11)\%$ 提高到分选后的 $(93.28 \pm 3.21)\%$ 。体外培养扩增 20 d 的 NK 细胞,流式细胞术检测结果显示,IL-2 + CD137 单抗联合 IL-15 组、IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 组的 NK 细胞纯度分别为 $(94.21 \pm 3.25)\%$ 、 $(96.15 \pm 4.14)\%$ 、 $(95.21 \pm 4.26)\%$ 、 $(94.43 \pm 1.26)\%$ (均大于 93%),与开始培养时(0 d)NK 细胞纯度的 $(93.28 \pm 3.21)\%$ 无明显差异($P > 0.05$)。对照组 NK 细胞的纯度为 $(85.21 \pm 6.27)\%$,较其余各组及培养初始有所下降($P < 0.05$,图 2)。结果提示,纯化后可获得高纯度的 NK 细胞,CD137 单抗联合 IL-15 扩增 NK 细胞的纯度与开始培养时(纯化后)无明显差异。

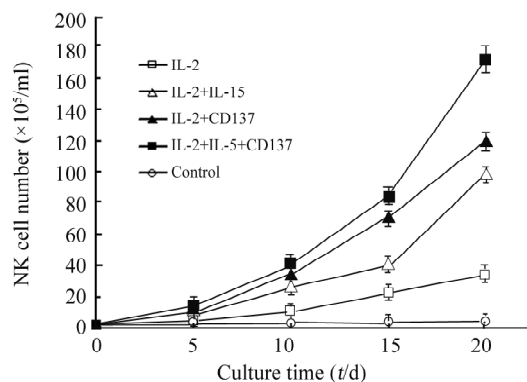


图 1 CD137 单抗联合 IL-15 促进 NK 细胞的增殖
Fig. 1 CD137 monoclonal antibody combined with IL-15 promoted proliferation of NK cells

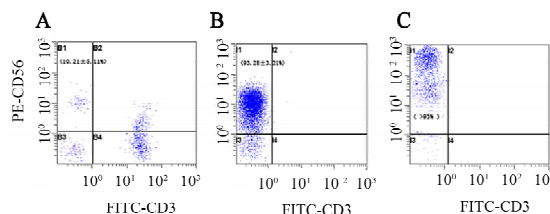


图 2 纯化前后和 CD137 单抗联合 IL-15 扩增后 NK 细胞的纯度
Fig. 2 Purity of NK cells before and after purification, or after expansion by CD137 monoclonal antibody and IL-15

A: NK cells before purification;
B: NK cells after purification;
C: NK cells after expansion

2.4 CD137 单抗联合 IL-15 体外扩增的 NK 细胞高效杀伤 A549 细胞

实验结果(图3)显示,在效靶比 1:1 时,IL-2 + CD137 单抗联合 IL-15 组、IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 组和对照组对 A549 细胞的杀伤效率分别为(47.21 ± 4.05)%、(38.21 ± 3.28)%、(27.36 ± 4.21)%、(21.35 ± 2.09)%、(16.45 ± 2.01)%;在效靶比 5:1 时各组的杀伤率分别为(79.41 ± 2.36)%、(69.01 ± 1.59)%、(51.38 ± 3.01)%、(44.16 ± 3.21)%、(30.27 ± 4.21)%;效靶比为 10:1 时各组的杀伤效率为(93.14 ± 3.27)%、(83.15 ± 4.03)%、(71.25 ± 3.24)%、(62.27 ± 3.01)%、(49.38 ± 2.35)%。结果表明,在不同效靶比下,IL-2 + CD137 单抗联合 IL-15 组杀伤率均明显高于其他各组($P < 0.01$),且随着效靶比的增加,各组 NK 细胞的杀伤率均逐步提高($P < 0.01$),CD137 单抗联合 IL-15 可明显提高体外扩增后的 NK 细胞的杀伤活性。

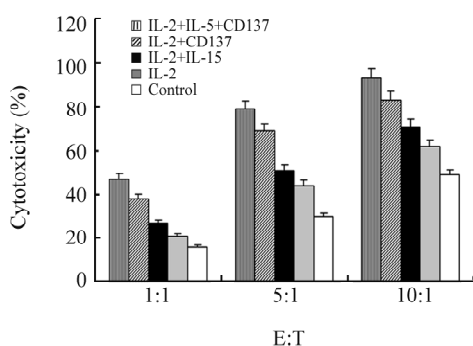


图3 CD137 单抗联合 IL-15 扩增的 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用

Fig. 3 Cytotoxicity of NK cells against A549 cells after expansion by CD137 monoclonal antibody and IL-15

2.5 CD137 单抗联合 IL-15 明显促进 NK 细胞分泌 IFN- γ

NK 细胞培养 15 d 时,IL-2 + CD137 单抗联合 IL-15 组 NK 细胞上清液中 IFN- γ 分泌水平明显高于 IL-2 + CD137 单抗组、IL-2 + IL-15 组、IL-2 组和对照组[(296.25 ± 9.79) vs (260.47 ± 11.55)、(201.13 ± 6.36)、(138.36 ± 6.09)、(38.42 ± 3.56) pg/ml, $P < 0.01$]。结果表明,CD137 单抗联合 IL-15 可明显提高扩增后的 NK 细胞 IFN- γ 的分泌量。

3 讨论

目前的研究^[10-12]证实,NK 细胞是造血干细胞/

骨髓移植,以及抗肿瘤免疫治疗中非常有应用价值的效应细胞之一。在造血干细胞/骨髓移植方面,许多动物实验和临床观察均提示,异基因造血干细胞移植后,供者的异源反应性 NK 细胞可促进植入,阻止 T 细胞介导的移植排斥反应和攻击宿主白细胞,从而发挥 GVL 效应,故输注供者异源反应性 NK 细胞已成为临床移植辅助治疗的新策略。由于 NK 细胞在免疫应答中的杀伤功能不受靶细胞是否表达 MHC 的影响,从而弥补了 CTL 细胞只能识别 MHC I 类抗原阳性的靶细胞,而无法杀伤 MHC I 类阴性细胞的缺陷,NK 细胞在肿瘤治疗中作用越来越受到重视^[13-15]。然而,NK 细胞在体内的数量较少,成为制约其临床应用的瓶颈。而且现有方法扩增出的 NK 细胞对实体瘤细胞的杀伤作用非常有限;不但如此,在某些肿瘤患者体内 NK 细胞数量增多后其功能反而下降,这说明某些肿瘤患者体内的 NK 细胞可能存在功能缺陷。因此,如何增强 NK 细胞的杀伤功能是一个亟待解决的问题。

目前体外获取 NK 细胞主要有两种途径:一是采用抗 NK 细胞特异性抗体与磁珠交联的方法,在 PBMC 中分离人的 NK 细胞。二是采用体外刺激扩增的办法,从 PBMC 中扩增培养 NK 细胞。前者可快速获得 NK 细胞,但只适用于小规模 NK 制备,用于临床分析。后者则是以 PBMC 或以磁珠分离的 NK 细胞为原始材料,通过特定细胞因子的刺激,使得 NK 细胞在体外得到特异性的扩增,这种方法比较有应用前景。通过体外刺激培养可进行大规模的 NK 细胞制备,从而应用于临床^[16],但目前 NK 细胞的扩增倍数及纯度不够理想。

研究^[17]表明,共刺激分子 CD137 在 NK 细胞增殖及功能调节中发挥了极其重要的作用。人 CD137 为 TNFR 超家族成员,是相对分子质量为 30 000 的 I 型穿膜糖蛋白,表达于活化 T 细胞表面。在存在 TCR 信号条件下,CD137 信号可提供协同 CD28 的共刺激信号,维持 T 细胞的活化状态,抑制活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death,AICD)的发生。近年的研究^[18]表明,CD137 也表达在 NK 细胞的表面,并且参与了 NK 细胞的功能调节。Wilcox 等^[19]发现,激活 NK 细胞上的 CD137 分子信号,能促进 NK 细胞增殖和 IFN- γ 的分泌,并且这种激活的 NK 细胞通过和 CTL 的相互作用,增强 CTL 的杀伤活性。另一个研究小组^[20]探讨了 CD137 激活的 NK 细胞在白血病治疗中的作用,他们将转染了人 4-1BB 配体(4-1BB ligands,4-1BBL)和 IL-15 基因的 K562 细胞和人外周血共培养,富集了 NK 细胞,该 NK 细胞对多种血

液系统肿瘤细胞株具有很强的杀伤作用。CD137 激动剂协同 IL-15 激活 NK 细胞可能是富集 NK 细胞并提高其杀伤功能的有效方法。

本实验采用经免疫磁珠阴性分选获取的高纯度 NK 细胞作为研究对象, 在 IL-2 体外扩增 NK 细胞的基础上, 联合 CD137 单抗和 IL-15 体外扩增 NK 细胞。实验结果表明, 培养至 20 d 时, IL-15 联合 CD137 单抗组的扩增效率明显高于其他各组 ($P < 0.01$), 从而明显增加了 NK 细胞的数量; 且 IL-15 联合 CD137 单抗组扩增的 NK 细胞的杀伤活性, 以及上清液中 IFN- γ 的水平均明显高于其他各组 ($P < 0.01$), 从而明显提高了 NK 细胞的质量。IFN- γ 属于 Th1 型细胞因子, 在机体免疫系统中主要介导细胞免疫而增强抗肿瘤效应。NK 细胞不仅可以通过细胞毒作用直接杀伤肿瘤细胞, 其活化后产生的效应分子 IFN- γ 可以进一步增强其他免疫细胞, 如 CIK 和 CD8⁺T 细胞的杀伤活性。Baker 等^[21]发现, 体外扩增后的 NK 细胞可产生大量 IFN- γ , 这对 NK 细胞发挥杀伤效应起着重要的调节作用。本实验中, IL-15 联合 CD137 单抗组培养 15 d 时 NK 细胞上清液分泌的 IFN- γ 明显增加, 从而有利于提高 NK 细胞的肿瘤过继免疫治疗疗效。

综上, CD137 单抗联合 IL-15 体外扩增 NK 细胞, 不仅可以获得较高的扩增倍数, 同时也提高了 NK 细胞的杀伤活性, 且操作技术方便易行, 为今后 NK 细胞的临床应用提供了新的方法。

[参 考 文 献]

- [1] Groth A, Klöss S, von Strandmann EP, et al. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance [J]. *J Innate Immun*, 2011, 3(4): 344-354.
- [2] Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(12): 1445-1459.
- [3] Carlsten M, Malmberg KJ, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated lysis of freshly isolated human tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 757-762.
- [4] 汪健, 孙自敏, 曹琳, 等. IL-2 和 IL-15 诱导扩增的脐带血 NK 细胞生物学特性研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(3): 731-735.
- [5] Grzywacz B, Miler JS, Verneris MR. Use of natural killer cells as immunotherapy for leukaemia [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008, 21(3): 467-483.
- [6] 李晓红, 马健, 吴晓雄, 等. 细胞因子联合高效扩增高纯度人外周血来源 NK 细胞并观察其细胞功能的变化 [J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(6): 404-408.
- [7] Boudreau JE, Stephenson KB, Wang F, et al. IL-15 and type I interferon are required for activation of tumoricidal NK cells by virus-infected dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2497-2506.
- [8] Wen T, Bukczynski J, Watts TH, et al. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function [J]. *J Immunol*, 2002, 168(10): 4897-4906.
- [9] Melero I, Johnston JV, Shufford WW, et al. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies [J]. *Cell Immunol*, 1998, 190(2): 167-172.
- [10] Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 557-561.
- [11] Pietra G, Manzini C, Vitale M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7): 793-801.
- [12] Luevano M, Madrigal A, Saudeumont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells *in vitro* for immunotherapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(4): 310-320.
- [13] Lee SC, Srivastava RM, López-Albaitero A, et al. Natural killer (NK): Dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity [J]. *Immunol Res*, 2011, 50(2): 248-254.
- [14] Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation [J]. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(2): 130-137.
- [15] De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2): 728-732.
- [16] Klingemann HG, Martinson J. *Ex vivo* expansion of natural killer cells for clinical applications [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 15-22.
- [17] Wilcox RA, Flis DB, Wang H, et al. Impaired infiltration of tumor-specific cytolytic T cells in the absence of interferon-gamma despite their normal maturation in lymphoid organs during CD137 monoclonal antibody therapy [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15): 4413-4418.
- [18] Marvel J, Walzer T. CD137 in NK cells [J]. *Blood*, 2010, 115(15): 2987-2988.
- [19] Vinay DS, Choi BK, Bae JS, et al. CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses [J]. *J Immunol*, 2004, 173(6): 4218-4229.
- [20] Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, et al. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2010, 115(15): 3058-3069.
- [21] Baker J, Verneris MR, Ito M, et al. Expansion of cytolytic CD8 (+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production [J]. *Blood*, 2001, 97(10): 2923-2931.

[收稿日期] 2012 - 08 - 13

[修回日期] 2012 - 10 - 23

[本文编辑] 王莹