

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.001

· 院士论坛 ·

## CAR-NK 抗肿瘤研究的现状与发展趋势

殷书磊, 于益芝, 曹雪涛(第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)



**于益芝** 第二军医大学免疫学教研室主任, 医学免疫学国家重点实验室副主任, 教授, 博士生导师。兼任中国免疫学会副秘书长, 中国免疫学会科普专业委员会主任委员, 中国免疫学会基础免疫专业委员会副主任委员, 中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会副主任委员, 上海市免疫学会副理事长, 《中国肿瘤生物治疗杂志》常务副主编。主要从事人体免疫学应用基础以及肿瘤的免疫治疗研究。近年来在国内外发表学术论文多篇, 获国家自然科学二等奖 1 项(第三完成人)、上海市科技进步一等奖 1 项和上海市自然科学一等奖 3 项、军队科技进步一等奖 1 项和军队科技进步三等奖 1 项。目前作为负责人承担着国家自然科学基金面上项目、国家卫生部重大专项课题等科研任务。曾被评为上海市科技启明星及上海市曙光学者。E-mail: yuyz88@126.com



**曹雪涛** 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 现任中国医学科学院院长、北京协和医学院校长, 第二军医大学免疫学研究所所长暨医学免疫学国家重点实验室主任, 全球慢性病防控联盟主席, 中国免疫学会秘书长, 国家 863 计划现代医学主题专家组组长, 国家 973 计划免疫学项目首席科学家, 国务院学位评议委员会学科评议基础医学组召集人; 同时任《中国肿瘤生物治疗杂志》主编, *Cell Mol Immunol* 杂志共同主编, *J Mol Med*、*Gene Ther*、*Cancer Immunol Res* 副主编, *Cell*、*Ann Rev Immunol*、*Sci Transl Med*、*eLife* 等杂志编委。主要从事天然免疫与炎症基础研究、疾病免疫治疗应用研究。以通讯作者在 *Cell*、*Nature*、*Science* 等杂志发表 SCI 论文 200 余篇, 论文被 SCI 他引 6 000 余次; 主编和共同主编学术专著 8 部。获国家发明专利 16 项。培养的 12 名博士获评“全国百篇优秀博士学位论文”, 获得首届国家研究生教育成果特等奖(2014 年)、Nature 导师终身成就奖(2015)。E-mail: caoxt@immunol.org

**[摘要]** 作为固有免疫中重要的效应细胞, NK 细胞具有强大的抗肿瘤功能, 在肿瘤免疫治疗方面具有良好的应用前景。随着嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞(CAR-T)技术的兴起, NK 细胞的 CAR 修饰潜力也受到了关注。CAR-NK 的研发既传承了经典 CAR-T 研发的思路, 也实现了诸多基于 NK 细胞生物特点的创新和发展。外周血 NK 细胞、NK 细胞系和干细胞来源的 NK 细胞各具生物学特色, 在 CAR-NK 研发中被广泛使用。已有靶向多种血液肿瘤和实体瘤抗原的 CAR-NK 在体外实验和动物模型中取得显著效果。虽然在临床暂未有数据支持 CAR-NK 的疗效且仍存在一些瓶颈问题需要攻克, 但是 CAR-NK 有望在治疗实体瘤、简化免疫治疗等方面实现新的突破。

**[关键词]** 嵌合抗原受体; CAR-NK; NK-92; 血液肿瘤; 实体瘤; 肿瘤免疫治疗

**[中图分类号]** R730.51; R392.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)01-0001-10

## Current situation and development trend of CAR-NK anti-tumor research

YIN Shulei, YU Yizhi, CAO Xuetao (National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** Natural killer (NK) cells are innate lymphoid cells that hold tremendous potential for effective immunother-

**[基金项目]** 国家科技重大专项基金资助项目(No. 2012ZX10002006-001-004, No. 2012ZX10002014-002); 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No. 2012AA020902); 国家自然科学基金面上项目(No. 31570873)。Supported by the National Key Science and Technology Program of China (No. 2012ZX10002006-001-004, No. 2012ZX10002014-002), the National High-tech R & D Program of China (863 Program) (No. 2012AA020902), and the General Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31570873)

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160219.2157.002.html>

apy for cancer. With the rise of CAR-T technology, potential of CAR modification in NK cells has been also concerned. The research and application of CAR-NK not only inherited some ideas of classic CAR-T, but also achieved a lot of innovations and developments based on biological characteristics of NK cells. Peripheral blood NK cells, NK cells lines and NK cells derived from stem cells exert various biological characteristics and had been widely used in the researches and developments of CAR-NK. A lot of remarkable results have been obtained in the preclinical tests and animal experiments of CAR-NK targeting to hematologic and solid tumors. CAR-NK could make a novel breakthrough in treatment of solid tumor and simplification of immunotherapy, although there is no clinical data supporting the efficacy of CAR-NK till now and some bottleneck problems still need to be overcome.

[ **Key words** ] chimeric antigen receptor ( CAR ); CAR-NK; NK-92; hematologic neoplasms; solid tumor; tumor immunotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23( 1 ): 1-10. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.001 ]

近年来,嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的T细胞(CAR-T)在白血病研究中取得了重大突破<sup>[1]</sup>,为血液肿瘤患者带来了新的希望。但是伴随着对血液肿瘤显著疗效的同时,CAR-T治疗也存在着一些问题,比如脱靶效应、细胞因子风暴、插入突变等,并且对实体瘤尚未取得显著疗效。研发新的具有强大抗肿瘤作用的效应细胞具有重要的理论意义和临床应用价值。NK细胞因其特殊的识别靶细胞的机制、短暂的生理周期<sup>[2-4]</sup>、广泛的肿瘤杀伤能力等优势,被视为同样有潜力通过CAR修饰增强其抗肿瘤能力的效应细胞。NK细胞是一类对肿瘤细胞具有强力杀伤作用且MHC非依赖的淋巴细胞,其对肿瘤细胞的识别主要依赖于其表面活化性受体和抑制性受体的相互交叉调控<sup>[5]</sup>。当识别肿瘤细胞之后,NK细胞通过释放杀伤介质穿孔素和颗粒酶使靶细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>、表达膜TNF家族分子诱导靶细胞凋亡<sup>[9]</sup>和抗体依赖的细胞毒作用等多种途径杀伤肿瘤细胞<sup>[10-11]</sup>。但是由于肿瘤患者体内NK细胞数量、质量的下降和肿瘤逃逸机制的存在,其在体内的抗肿瘤功能未能得到充分发挥。通过CAR修饰NK细胞有望增强其靶向杀伤肿瘤细胞的能力并研制出具有强大抗肿瘤作用的效应细胞。目前已有大量研究针对不同的肿瘤靶点设计出相应的CAR-NK,在实验研究中取得的效果显著,并正在临床研究中验证其可行性<sup>[12]</sup>。

## 1 CAR-NK 构建的策略和思路

构建CAR-NK的目的是通过基因编辑的手段新建一条活化NK细胞的激活通路并增强其抗肿瘤效应,且兼具靶向性。作为CAR研发的后起之秀,CAR-NK传承了CAR-T的基本结构框架和转染方式,部分研究根据NK细胞的细胞生物学特点进行调整而设计出了有一定特色的CAR。

### 1.1 CAR 结构于NK 上的传承和创新

CAR主要包括胞外抗原结合区、跨膜区和胞内信号区,这三部分决定了CAR修饰的特异性和功能性。一代CAR结构中常用TCR复合体的CD3 $\zeta$ 胞内段作为胞内信号区,后为了增加效应细胞的细胞毒性、增殖活性和延长细胞的存活时间,在原有胞内信号区的基础上串联上一个或者两个共刺激信号元件,例如CD28、OX-40和4-1BB等,从而派生出了二代和三代CAR,而引入细胞因子和共刺激配体的CAR结构被称为四代CAR<sup>[13]</sup>。因为前期CAR-T研发积累了大量的设计策略和构建方法方面的经验,CAR-NK的研发大多是对CAR-T的直接模仿和改造。

1.1.1 抗原结合区和跨膜区 抗原结合区和跨膜区在CAR-NK和CAR-T中基本相同。抗原结合区能够与肿瘤细胞表面表达的肿瘤相关抗原紧密结合,决定着CAR结构的靶向性,主要由单链可变区片段(single-chain variable fragment, scFv)组成。理想的抗原是在肿瘤细胞表面高表达而在正常细胞表面不表达或者低表达。目前已在NK原代细胞和NK细胞系上尝试了靶向CD20<sup>[14-17]</sup>,CD19<sup>[15,16,18-21]</sup>,HER2<sup>[22-25]</sup>,GD2<sup>[26]</sup>和CD138<sup>[27]</sup>等多种抗原的CAR修饰。同时广大研究者也在探索各种策略以提高肿瘤杀伤的特异性。Oberoi等<sup>[28-29]</sup>将肿瘤相关抗原EGFR配体TGF- $\alpha$ 与NK细胞内颗粒酶融合表达,在人工活化NK细胞之后,释放的GrB-TGF- $\alpha$ 融合蛋白能够靶向杀伤EGFR阳性的肿瘤细胞;在此基础上再与膜表面CAR修饰联合使用,有望进一步提高肿瘤杀伤的靶向性及杀伤活性。一般认为跨膜区对NK细胞的CAR整体结构和功能没有明显的影响。已有多种跨膜区被运用到了CAR-NK中并能将膜外信号顺利传递到胞内,如CD3 $\zeta$ 跨膜序列<sup>[14]</sup>、CD8跨膜序列和HLA-A2<sup>[30]</sup>等。但在CAR-T

研究中发现,当用 CD28 跨膜区替换 CD3 $\zeta$  跨膜区后,CAR 结构变得更加稳固,所以或许在 CAR-NK 中跨膜区也存在有尚未发现的特性。

**1.1.2 胞内信号区** 胞内信号区的结构决定着 CAR-NK 活化信号的强弱,其含有免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM),当胞外受体与其配体相互作用时,ITAM 被酪氨酸激酶磷酸化,招募 Syk 或 ZAP70,进一步磷酸化下游蛋白传递活化信号。CD3 $\zeta$  是 CAR 结构最为经典的胞内信号段,含有三个 ITAM。与 T 细胞相似,在 NK 细胞中 CD3 $\zeta$  作为 NKp30、NKp46 和 CD16 的接头蛋白传递活化信号<sup>[31]</sup>。CAR-NK 常以 CD3 $\zeta$  作为第一信号基序(一代 CAR),再连接一个共刺激分子基序(二代 CAR),例如 CD28 或 CD137(4-1BB)<sup>[32]</sup>共同组成胞内信号区。以 ErbB2 scFv 作为抗原结合区分别与 CD3 $\zeta$ 、CD28/CD3 $\zeta$  或 CD137/CD3 $\zeta$  胞内信号区融合构建 CAR-NK,并以乳腺癌细胞作为杀伤对象进行比较,结果显示含有两个信号基序的结构具有更强的杀伤能力<sup>[24]</sup>。特别是 CD28/CD3 $\zeta$  作为信号域的 CAR-NK,对 ErbB2 阳性的 MDA-MB453 细胞的杀伤率达到了 65%,证明 CAR-T 上经典的二代结构在 NK 细胞中同样能够发挥功能。除了模仿经典 CAR-T 结构之外,也有大量研究正在以 NK 细胞活化性受体的胞内段结构为基础,对 CAR 进行 NK 细胞特色化的调整和优化。如 Topfer 等<sup>[33]</sup>对胞内信号区的第一信号基序进行了替换,其使用活化性受体 NKp44 下游的 DAPI2 作为胞内信号区结合 PSCA 受体修饰 NK 细胞系 YTS;在对前列腺癌的体外杀伤实验和动物模型中发现,仅有一个 ITAM 的 DAPI2 胞内段也能够像 CD28/CD3 $\zeta$  一样提供足够的活化信号,完成分泌 IFN- $\gamma$  和细胞溶解等抗肿瘤反应,其效应甚至还稍强于 CD28/CD3 $\zeta$ 。此外,CAR-NK 研发中也尝试了不同的共刺激分子。2B4 是 NK 细胞重要的活化信号调节分子。Altwater 等<sup>[20]</sup>以 CD19 受体作为胞外区,胞内信号区分别为 2B4/CD3 $\zeta$  和 4-1BB/CD3 $\zeta$ ,检测其对白血病细胞系 REH 的效应,结果表明,两种结构在细胞因子分泌、细胞溶解和抑制肿瘤生长等方面的抗肿瘤表现接近。上述研究表明,利用 NK 细胞自身的活化元件同样可以实现 CAR 信号的传递和增强,甚至优于经典的结构。这在增强 CAR-NK 的内部稳定性和优化修饰元件等方面具有重要意义。

## 1.2 CAR-NK 面临与 CAR-T 类似的转染困境

基因的稳定转染是实现效应细胞稳定表达 CAR 的前提<sup>[34]</sup>。和 T 细胞相比,NK 细胞的转染同

样存在着障碍,传统的电穿孔法和脂质体转染在 NK 细胞上效率低下,因此多数使用逆转录病毒和慢病毒载体。研究<sup>[18]</sup>报道,用电穿孔的方法转导 CD19/20-CAR 的效率不足 10%,而用慢病毒转染外周血和脐带血来源 NK 细胞的效率分别为 8% ~ 16% 和 12% ~ 73%。在另一项研究<sup>[19]</sup>中,以逆转录病毒为载体,CD19-CAR 在原代 NK 细胞中的转染效率能够达到 43% ~ 93%。研发新的载体,特别是针对 NK 细胞的特点研制出具有更高转染效率和安全性的载体是 CAR-NK 未来能在临床推广的关键。近年来,微环 DNA、裸 DNA、多聚物及分子偶连体等非病毒载体发展迅速,有望有所突破。另一主流的研究方向选择使用 NK 细胞系代替原代 NK 细胞,以弥补原代细胞扩增和转染方面的局限性。

## 2 CAR-NK 的细胞来源

理想的供 CAR 修饰的效应细胞一般需具有以下几个特点:①在体内或者体外可以实现扩增而满足过继回输的要求;②具备足够强度的肿瘤杀伤能力;③能够到达肿瘤局部;④没有或者具有易控的副作用。NK 细胞的群体具有异质性,不同群体各具优缺点,选择其中一种合适的效应细胞不仅能够最大程度地发挥 CAR 修饰的潜能,同时也有助于控制治疗成本,提高临床转化的可能性。

### 2.1 外周血来源的 NK 细胞

外周血是 NK 细胞最主要的来源,在过去十年里,已有较为有效的方法从外周血和外周血干细胞中纯化扩增足够量的 NK 细胞用于过继性免疫治疗<sup>[2, 35-39]</sup>,并逐步用于 CAR 修饰的研发中(表 1)。自体 NK 细胞和异体 NK 细胞都可以进行 CAR 修饰,但细胞特性并不相同。异体 NK 细胞供者血液存在着以 T 细胞为主的其他淋巴细胞,这些杂细胞的存在会引起移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)。因此在用于治疗之前,必须要清除 T 细胞。利用抗 CD3 磁珠能够有效降低 T 细胞数量,使 NK 细胞的比例达到 20% ~ 40%<sup>[40-41]</sup>。此外可以通过抗 CD56 的磁珠对 NK 细胞进行阳性选择,这样既能预防 GVHD 也能控制 B 细胞引发的淋巴组织增生和急性溶血性贫血等并发症,但是该方法也会损失一些在杀伤过程中起到辅助功能的非 NK 细胞<sup>[40]</sup>。异体 NK 细胞由于表面杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIRs)与患者 HLA-I 类分子并不匹配,因此不会产生抑制信号引起干扰,对 CAR 靶向的肿瘤细胞具有足够的杀伤活性。自体 CAR-NK 细胞回输

后,其抑制性受体与自体正常细胞表达的 HLA- I 类分子结合而产生抑制信号,会抑制 NK 细胞的杀伤效应。虽然肿瘤细胞丢失了经典的 HLA- I 类分子,但是非经典的 HLA- I 类分子 HLA-G、HLA-E 等的

表达,同样能够抑制 NK 细胞的活化<sup>[42]</sup>。已有研究利用靶向 KIRs 的单克隆抗体阻断了自身耐受信号的产生,且实现了完全人源化<sup>[43-44]</sup>。

表 1 CAR 修饰的外周血来源的 NK 细胞

靶点	CAR 结构	转染方法
CD19 <sup>[19]</sup>	CD8 $\alpha$ TM/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
	CD8 $\alpha$ TM/DAP10	逆转录病毒
	CD8 $\alpha$ TM/CD137/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
ErbB2(HER-2) <sup>[25]</sup>	CD28/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
CD19/GD2 <sup>[20]</sup>	CD3 $\zeta$	逆转录病毒
	2B4	逆转录病毒
	2B4/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
	CD8 TM/CD137/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
CD19 <sup>[21]</sup>	CD137/CD3 $\zeta$	mRNA 转染
NKG2D 配体 <sup>[45]</sup>	NKG2D/CD3 $\zeta$ 与 DAP10 共表达	逆转录病毒和 mRNA 转染
CD20 <sup>[17]</sup>	CD137/CD3 $\zeta$	mRNA 转染

## 2.2 NK 细胞系

除了原代细胞之外,NK 细胞有许多成熟的细胞系,包括 NK-92、NKG、YT、NK-YS、HANK-1、YTS 和 NKL 等<sup>[12]</sup>,其中 NK-92 在 CAR-NK 中研究最为广泛(表 2)。NK-92 来源于一名患有非霍奇金淋巴瘤的女性外周血,于 1992 年建立,是一株 IL-2 依赖的永生细胞系<sup>[2,46]</sup>。NK-92 具有强大的细胞毒性,高表达一系列与细胞溶解相关的分子,例如穿孔素和颗粒酶 B。NK-92 表型上表现为 CD56<sup>bright</sup>, CD2<sup>+</sup>,不表达 CD3 和 CD8,低表达 IgG、Fc $\gamma$ R III 和 CD16<sup>[47]</sup>。KHYG-1、NKL 和 YT 等其他 NK 细胞系同样表现为 CD16 阴性<sup>[34]</sup>,而 CD16 能够诱导 NK 细胞发挥抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)。通常 CD56<sup>bright</sup>表型的细胞,细胞膜上 KIRs 的表达很低<sup>[48]</sup>,NK-92 也几乎缺少该家族所有的分子<sup>[47]</sup>,故 NK 细胞上经典的抑制机制在 NK-92 上只能发挥较小的作用。NK-92 表面表达一部分活化性受体,例如 NKG2D、NKp30 和 NKp46 等自然杀伤受体<sup>[47,49]</sup>。急性淋巴白血病细胞这类表达 NKG2D 配体(MICA/B)的肿瘤细胞,对 NK-92 的杀伤作用极其敏感<sup>[50]</sup>;而不表达 MICA 或者 MICB 的细胞对 NK-92

介导的细胞溶解耐受<sup>[31]</sup>。NK 细胞系体外扩增得到的细胞群体一致性更好,且 NK 细胞系并不涉及分选纯化步骤。NK-92 细胞相较原代 NK 细胞,最大的优势在于其表面的抑制性受体表达很低,抑制性受体信号的缺失使得其对多种肿瘤的杀伤能力要优于原代 NK 细胞或者经细胞因子活化的其他杀伤细胞<sup>[14,51-53]</sup>。此外,NK-92 在实体瘤治疗中也有一定的潜力。CAR-T 在实体瘤中效果不佳的重要原因是,肿瘤细胞高表达 PD-L1 与 T 细胞表面的刹车分子 PD-1 结合进而抑制了其杀伤活性<sup>[54]</sup>,NK-92 表面抑制性受体的缺失使之能够避免类似抑制信号的干扰。但是 NK-92 也存在着一些明显的缺点,例如致癌性<sup>[49]</sup>和潜在的 EB 病毒易感性等<sup>[53]</sup>。因此,作为安全考虑,NK-92 必须经过辐照后才能够使用。

## 2.3 具有分化潜能的干性细胞

除了 NK 细胞系和外周血来源的 NK 细胞之外,诱导多能干细胞、脐带血和胚胎干细胞来源的 NK 细胞同样具有供 CAR 修饰的潜力<sup>[57-60]</sup>。由这些干性细胞分化而来的 NK 细胞的表型与外周血来源的 NK 细胞较为相近<sup>[57,61-62]</sup>,且其生长能力更强,能够符合临床应用的要求<sup>[62]</sup>。Ni 等<sup>[63]</sup>使用 CD4-CAR 修饰诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC),再诱导生成的 NK 细胞同样表达 CAR

结构,这样的 NK 细胞在体外实验中能够抑制 HIV 的复制。iPSC 诱导的 NK 细胞兼具 NK-92 和外周血来源的 NK 细胞的优势,不仅能够获得大量且性状比较一致的 NK 细胞,还能正常表达 NKp44、NKp46 和 NKG2D 等活化性受体,具有很好的开发应用前景。Shah 等<sup>[64-65]</sup>通过以 K562 为基础构建的人造抗原提呈细胞与脐带血来源的 NK 细胞共培养,仅需 14 d 就能扩增出大量与外周血来源 NK 细

胞表型相近的 NK 细胞,且其纯度能够达到 95% 以上;这种脐带血诱导来的 NK 细胞在体外实验和动物模型实验中对多发性骨髓瘤具有显著的杀伤活性。可见,干性细胞诱导而来的 CAR-NK 能够行之有效地解决外周血来源 NK 细胞和 NK 细胞系所存在的一些问题,为 CAR-NK 技术的优化提供了一种新的策略。

表 2 CAR 修饰 NK-92 细胞

靶点	CAR 结构	转染方法
ErbB2(HER-2) <sup>[22]</sup>	mCD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$	双嗜性病毒
CD20 <sup>[14]</sup>	mCD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$	双嗜性病毒
CD19 <sup>[18]</sup>	CD8 $\alpha$ TM/CD3 $\zeta$	mRNA 转染
EpCAM <sup>[55]</sup>	CD8 $\alpha$ /CD28/CD3 $\zeta$	慢病毒/IL-15
HLA-A2 EBNA3C <sup>[32]</sup>	CD8 $\alpha$ TM/CD137/CD3 $\zeta$	逆转录病毒
GD2 <sup>[26]</sup>	mCD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$	双嗜性病毒
CD19/20 <sup>[15]</sup>	CD3 $\zeta$	mRNA 转染和慢病毒
HLA-2 复合体 <sup>[30]</sup>	A2 TM/CD3 $\zeta$	电穿孔
CD19/CD20 <sup>[16]</sup>	CD3 $\zeta$	慢病毒
CSI <sup>[56]</sup>	CD28 TM/CD28/CD3 $\zeta$	慢病毒
CD138 <sup>[27]</sup>	CD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$	慢病毒
ErbB2(HER-2) <sup>[23]</sup>	CD8 $\alpha$ /CD28/CD3 $\zeta$	电穿孔
ErbB2(HER-2) <sup>[24]</sup>	CD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$	慢病毒
	CD8 $\alpha$ /CD28/CD3 $\zeta$	慢病毒
	CD8 $\alpha$ /CD137/CD3 $\zeta$	慢病毒
PSCA <sup>[33]</sup>	CD28 TM/CD3 $\zeta$	慢病毒
	DAPI12 TM/CD3 $\zeta$	慢病毒

### 3 CAR-NK 的抗肿瘤效应及临床转化

#### 3.1 抗血液肿瘤效果

近年来,CAR-T 在白血病治疗研究中取得了重大突破<sup>[1]</sup>,同时也引起了人们对 NK 细胞在白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等血液肿瘤中效应的关注。CD20 和 CD19 受体修饰的 NK-92,与通过基因工程表达 CD16 而获得具有 ADCC 功能的 NK-92 细胞相比,CAR 修饰的 NK-92 细胞对慢性淋巴细胞白血病细胞的清除能力更加显著,说明 CAR 能够在 NK-92 中介导比 ADCC 更加强烈的杀伤作用<sup>[16]</sup>。Shimasaki 等<sup>[66]</sup>在近期的研究中通过电穿孔的方式成功将

CD19-BB- $\zeta$ mRNA 转染到 NK 细胞中并稳定表达,移植白血病模型的活体成像结果显示,肿瘤在回输有 CAR-NK 的小鼠中生长速度显著降低。在多发性骨髓瘤小鼠模型中,骨髓瘤细胞系表现为 CD138 阳性,带有 CD138-CAR 修饰的 NK-92 细胞较未经 CAR 修饰的 NK-92 细胞使得小鼠存活的时间更长<sup>[27]</sup>。

#### 3.2 抗实体瘤效果

除了血液肿瘤之外,NK-92 细胞同样在实体瘤研究中取得显著效果。通过 GD2、HER2、CD138 和 CSI 等肿瘤潜在靶点可以实现对实体瘤的靶向杀伤。ErbB2-CAR 修饰的 NK-92 细胞对 HER-2 阳性

的乳腺癌、卵巢癌和上皮细胞癌等肿瘤细胞系的杀伤作用明显增强,在小鼠模型中能够有效减慢肿瘤的生长<sup>[22]</sup>。GD2受体修饰能够使NK-92靶向恶性胶质瘤细胞和GD2阳性的黑素瘤和乳腺癌细胞并发挥细胞溶解作用<sup>[26]</sup>。NK细胞表面活化受体NKG2D的配体在大多数恶性肿瘤细胞中表达。因此利用NK细胞表面NKG2D的胞外区直接与CD3 $\zeta$ 结合,同时以DAP10作为第二信号分子,更大程度地增强NKG2D的表达,放大下游的活化信号,这样的设计在急性淋巴细胞白血病、前列腺癌和横纹肌肉瘤等多种恶性肿瘤细胞系中杀伤效果明显<sup>[45]</sup>。

### 3.3 临床转化现状

CAR-NK虽然在临床前的研究中取得了多方面的进展,但是与CAR-T相比其在临床转化上的进展仍然比较局限。现已有大量临床试验开始使用CAR-T,而CAR-NK却仅有两项临床研究获批向患者开放,且暂未有相关文章发表,因此具体疗效尚不可知<sup>[12]</sup>。其中持续最长的一项研究是在St. Jude Children's Research Hospital进行的治疗急性淋巴细

胞白血病的试验(ClinicalTrials.gov;NCT00995137)。在这项研究中,供体NK细胞与能够表达IL-15和41BB配体的K562细胞(K562-mb15-41BBL)共培养,在IL-15和41BB配体刺激下能够实现NK细胞的特异性扩增,扩增的NK细胞表面再修饰CD19受体,获得CAR-NK细胞后回输到患者体内(图1)。另一项研究(ClinicalTrials.gov;NCT01974479)由新加坡国立大学医院开展,使用的CAR结构与前者相同,只是在NK细胞扩增过程中以IL-2代替IL-15。上述两项临床试验对CAR-NK的研发意义重大,一旦得到临床数据,除了能够评价治疗效果外,对CAR-NK在体内的存活扩增状况、副作用等多个方面的评估也有很高的参考价值。虽然现有强大成熟的纯化、扩增和过继回输技术,但是整个CAR-NK治疗的过程仍旧很复杂,在整个治疗团队中不仅需要临床医生,同时具备扎实的细胞生物学和基因工程技术的人才也是必不可少,CAR-NK和CAR-T在未来临床上的应用必然会对医疗基础设施和人才梯队提出新的要求。

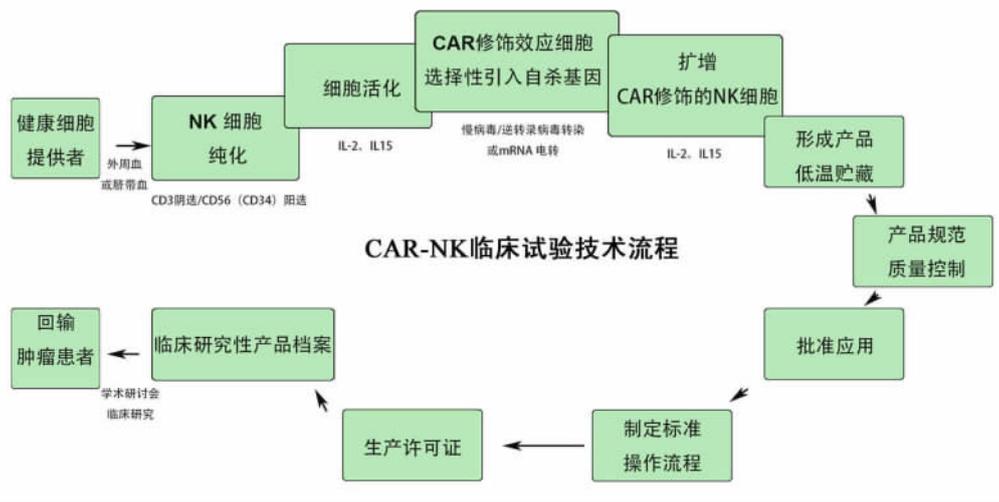


图1 CAR-NK 临床试验技术流程

## 4 CAR-NK 抗肿瘤研究和临床应用的瓶颈和对策

虽然CAR-NK在实体瘤杀伤潜力、GVHD预防等多方面表现出优于CAR-T的特点,但是其自身还是存在一些明显的缺点。同时伴随着未来临床实验的增加,必然会出现更多实际临床应用中的问题。

### 4.1 转染载体的缺陷

为了获得高效率的基因转移,CAR-NK和CAR-T相同,主要还是使用慢病毒和逆转录病毒等病毒类载体完成CAR向效应细胞中的转移。虽然病毒

载体的转移效率很高,但是却存在着一些缺陷,例如载体容量有限、致毒致癌隐患、诱导机体免疫反应等<sup>[67-68]</sup>。发掘和优化非病毒载体,提高其转染效率是解决上述问题的有效途径。

### 4.2 脱靶效应

虽然CAR-NK主要的靶向对象是和嵌合受体高度亲和的肿瘤细胞,但是部分肿瘤抗原也会在正常细胞中表达,存在被CAR-NK误伤的风险。在CD19受体修饰的T细胞治疗中,其对同样CD19阳性的B细胞具有强烈的脱靶毒性<sup>[69]</sup>。暂时未有临

床数据评估 CAR-NK 的脱靶毒性的程度,但是如果出现严重的脱靶效应,可通过剂量爬坡、引入自杀基因、嵌合多种受体等方式降低其风险。

### 4.3 细胞因子风暴

在 CAR-T 抗肿瘤效应中,大量的细胞因子在其中发挥了重要作用,但也存在着引发细胞因子风暴的隐患。虽然参与 CAR-NK 抗肿瘤效应的细胞因子种类较 CAR-T 少,但并不意味没有引起细胞因子风暴的风险。活化的 NK 细胞也会释放 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等细胞因子发挥抗肿瘤效应。CAR-NK 在识别靶细胞之后会产生强烈的活化信号,可能会引起 NK 细胞过度活化产生巨量的细胞因子而引起细胞因子风暴对机体造成伤害。可以通过剂量控制和药物辅助治疗来预防细胞因子风暴的产生。

## 5 发展趋势

在免疫系统中 NK 细胞和杀伤性 T 细胞具有很多相似之处,其抗肿瘤能力以及临床应用的潜力并不弱于 T 细胞,因此 CAR 在 NK 细胞上的应用在理论上是可行的,并也有足够的临床前研究支持这样的方案。CAR-NK 尚缺少临床上的突破,一旦得到临床数据的支持,其发展进程很可能与 CAR-T 并驾齐驱。血液肿瘤在 CAR-T 中已经获得了突破,而实体瘤中的微环境远比血液肿瘤更加复杂,逃逸机制更加多样,靶点更加繁杂,研究者们更加希望 CAR-NK 能够在实体瘤中突破研究的瓶颈,完成 CAR-T 未能完成的任务。CAR 技术的前进依赖于深入的肿瘤发生、发展机制研究和强大的基因编辑技术,研究者们正在多个方面进一步探索 CAR-NK 治疗肿瘤的可能性。

### 5.1 靶点的发现和选择

胞外结合域是 CAR 的核心部件,决定着效应细胞的特异性。暂时未能发现一种绝对只在肿瘤细胞上表达的特异性抗原,任何一种会在正常细胞上表达的抗原都存在一定的安全隐患。肿瘤细胞往往并不单单只高表达一种肿瘤相关抗原,因此可以设计多种抗原受体复合的 CAR 结构,从而识别肿瘤相关抗原组合,提高杀伤的特异性或多能性。此外,由于肿瘤细胞基因的不稳定性,往往会出现靶标丢失的异形肿瘤细胞而逃逸 CAR 的识别。肿瘤细胞周围的基质细胞在肿瘤发生发展中起着关键性的作用,且基因表达稳定,故有研究<sup>[70]</sup>选择这类基质细胞作为杀伤对象从而间接地对肿瘤产生影响,以应对肿瘤细胞基因的不稳定突变。

### 5.2 基于 NK 细胞的特点而深化 NK 细胞的改造

正常 NK 细胞表达的杀伤抑制性受体往往会被肿瘤细胞利用而发生各种逃逸现象。抑制性受体贫乏的 NK-92 细胞具有更加优越的肿瘤杀伤能力,但是永生细胞株存在潜在的安全隐患。因此设想是否可以改造原代 NK 细胞,删除或者减少抑制性受体而免受肿瘤细胞的干扰,一部分研究者正致力于此类 NK 细胞的研发。

### 5.3 研发具有记忆性的 CAR-NK 发挥其免疫监视作用

恶性肿瘤多存在复发率高的问题,机体缺乏一种有效的免疫监视机制预防残留肿瘤细胞的复发,如果能将 NK 细胞改造成具有免疫记忆功能的效应细胞,其抗肿瘤效应可能会更持久<sup>[71]</sup>。故可以通过设计创造能够在体内持久稳定存在并对特定肿瘤细胞具有记忆性的 CAR-NK 细胞,遏制恶性肿瘤的复发。

### 5.4 CAR-NK 治疗的简化

CAR-T 治疗一般以自身 T 细胞为基础,经过基因改造扩增之后成为可以应用的效应细胞。从获得患者 T 细胞到最终得到治疗所需数量的 CAR-T 细胞之间涉及到很多技术步骤,人力、物力消耗巨大且周期较长。但是使用 CAR-NK,尤其是 NK-92 等易扩增易改造的异体效应细胞,能够增强治疗的通用性和简易性,同时可以弥补晚期肿瘤患者自身免疫细胞弱化的缺点。根据肿瘤的类型直接扩增相关靶点的 CAR-NK,快速投入治疗,能够大大缩减治疗周期和治疗成本,有望改变传统免疫治疗繁杂的模式,使其成为药品一样现成的易得的治疗方式,即“off-the-shelf”的概念。

## 6 小结

人类对抗恶性肿瘤的历史已经有数百年之久,在这过程中诞生了许多为广大患者带来希望的疗法,而 CAR 技术正是在这个时代冉冉升起的抗癌新星。CAR-T 在血液肿瘤中的成功,使我们坚信肿瘤并不是坚不可摧的,也使我们发现仍旧是我们自身的免疫细胞才是对抗肿瘤的最有利武器。NK 细胞优秀的抗肿瘤血统,极有可能在 CAR 修饰的武装下为肿瘤治疗带来新的突破。CAR-NK 只有解决来自 NK 细胞本身和 CAR 结构两方面存在的问题,能够在抗肿瘤的道路上走得更远。

## [参考文献]

- [1] PEGRAM H J, SMITH E L, RAFIQ S, et al. CAR therapy for hematological cancers: can success seen in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia be applied to other hematological

- malignancies? [ J ]. *Immunotherapy*, 2015, 7( 5 ): 545-561. DOI: 10.2217/imt.15.6.
- [ 2 ] MILLER J S, SOIGNIER Y, PANOSKALTSIS-MORTARI A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer [ J ]. *Blood*, 2005, 105( 8 ): 3051-3057. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2974.
- [ 3 ] RUBNITZ J E, INABA H, RIBEIRO R C, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia [ J ]. *J Clin Oncol*, 2010, 28( 6 ): 955-959. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.4590.
- [ 4 ] CURTI A, RUGGERI L, D'ADDIO A, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients [ J ]. *Blood*, 2011, 118( 12 ): 3273-3279. DOI: 10.1182/blood-2011-01-329508.
- [ 5 ] 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. DOI: 10.1126/science.1198687.
- [ 6 ] BRADLEY M, ZEYTUN A, RAFI-JANAJREH A, et al. Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas<sup>+</sup> and Fas<sup>-</sup> tumor cells [ J ]. *Blood*, 1998, 92( 11 ): 4248-5425. PMID: 9834230.
- [ 7 ] SCREPANTI V, WALLIN R P, LJUNGGREN H G, et al. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells [ J ]. *J Immunol*, 2001, 167( 4 ): 2068-2073. PMID: 11489989.
- [ 8 ] KAYAGAKI N, YAMAGUCHI N, NAKAYAMA M, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells [ J ]. *J Immunol*, 1999, 163( 4 ): 1906-1913. PMID: 10438925.
- [ 9 ] JONCKER N T, SHIFRIN N, DELEBECQUE F, et al. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment [ J ]. *J Exp Med*, 2010, 207( 10 ): 2065-2072. DOI: 10.1084/jem.20100570.
- [ 10 ] KARRE K. Immunology. A perfect mismatch [ J ]. *Science*, 2002, 295 ( 5562 ): 2029-2031. DOI: 10.1126/science.1070538.
- [ 11 ] CAMPBELL K S, HASEGAWA J. Natural killer cell biology: an update and future directions [ J ]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132( 3 ): 536-544. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.07.006.
- [ 12 ] GLIENKE W, ESSER R, PRIESNER C, et al. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells [ J ]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 21. DOI: 10.3389/fphar.2015.00021.
- [ 13 ] DOTTI G, GOTTSCHALK S, SAVOLDO B, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells [ J ]. *Immunol Rev*, 2014, 257( 1 ): 107-126. DOI: 10.1111/imr.12131.
- [ 14 ] MULLER T, UHEREK C, MAKI G, et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57( 3 ): 411-423. DOI: 10.1007/s00262-007-0383-3.
- [ 15 ] BOISSEL L, BETANCUR M, LU W, et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens [ J ]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53( 5 ): 958-965. DOI: 10.3109/10428194.2011.634048.
- [ 16 ] BOISSEL L, BETANCUR-BOISSEL M, LU W, et al. Retargeting NK-92 cells by means of CD19<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity [ J ]. *Oncoimmunology*, 2013, 2( 10 ): e26527. DOI: 10.4161/onci.26527.
- [ 17 ] CHU Y, HOCHBERG J, YAHR A, et al. Targeting CD20<sup>+</sup> aggressive B-cell non-hodgkin lymphoma by anti-CD20 CAR mRNA-modified expanded natural killer cells in vitro and in NSG mice [ J ]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3( 4 ): 333-344. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0114.
- [ 18 ] BOISSEL L, BETANCUR M, WELS W S, et al. Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells [ J ]. *Leuk Res*, 2009, 33( 9 ): 1255-1259. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.11.024.
- [ 19 ] IMAI C, IWAMOTO S, CAMPANA D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells [ J ]. *Blood*, 2005, 106( 1 ): 376-383. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4797.
- [ 20 ] ALTVATER B, LANDMEIER S, PSCHERER S, et al. 2B4 ( CD244 ) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15( 15 ): 4857-4866. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2810.
- [ 21 ] LI L, LIU L N, FELLER S, et al. Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17( 3 ): 147-154. DOI: 10.1038/cgt.2009.61.
- [ 22 ] UHEREK C, TONN T, UHEREK B, et al. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction [ J ]. *Blood*, 2002, 100( 4 ): 1265-1273. PMID: 12149207.
- [ 23 ] LIU H, YANG B, SUN T, et al. Specific growth inhibition of ErbB2 expressing human breast cancer cells by genetically modified NK92 cells [ J ]. *Oncol Rep*, 2015, 33( 1 ): 95-102. DOI: 10.3892/or.2014.3548.
- [ 24 ] SCHONFELD K, SAHM C, ZHANG C, et al. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor [ J ]. *Mol Ther*, 2015, 23( 2 ): 330-338. DOI: 10.1038/mt.2014.219.
- [ 25 ] KRUSCHINSKI A, MOOSMANN A, POSCHKE I, et al. Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105( 45 ): 17481-17486. DOI: 10.1073/pnas.0804788105.
- [ 26 ] ESSER R, MULLER T, STEFES D, et al. NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16( 3 ): 569-581. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01343.x.

- [ 27 ] JIANG H, ZHANG W, SHANG P, et al. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells [ J ]. *Mol Oncol*, 2014, 8( 2 ): 297-310. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.12.001.
- [ 28 ] OBEROI P, JABULOWSKY R A, BAHR-MAHMUD H, et al. EGFR-targeted granzyme B expressed in NK cells enhances natural cytotoxicity and mediates specific killing of tumor cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 4 ): e61267. DOI: 10.1371/journal.pone.0061267.
- [ 29 ] OBEROI P, WELS W S. Arming NK cells with enhanced antitumor activity: CARs and beyond [ J ]. *Oncoimmunology*, 2013. 2( 8 ): e25220. DOI: 10.4161/onci.25220.
- [ 30 ] ZHANG G, LIU R, ZHU X, et al. Retargeting NK-92 for anti-melanoma activity by a TCR-like single-domain antibody [ J ]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91( 10 ): 615-24. DOI: 10.1038/icb.2013.45.
- [ 31 ] VIVIER E, TOMASELLO E, BARATIN M, et al. Functions of natural killer cells [ J ]. *Nat Immunol*, 2008, 9( 5 ): 503-510. DOI: 10.1038/ni1582.
- [ 32 ] TASSEV D V, CHENG M, CHEUNG N K. Retargeting NK92 cells using an HLA-A2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19( 2 ): 84-100. DOI: 10.1038/cgt.2011.66.
- [ 33 ] TOPFER K, CARTELLIERI M, MICHEN S, et al. DAPI2-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy [ J ]. *J Immunol*, 2015, 194( 7 ): 3201-3212. DOI: 10.4049/jimmunol.1400330.
- [ 34 ] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIERE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design [ J ]. *Cancer Discov*, 2013, 3( 4 ): 388-398. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- [ 35 ] IYENGAR R, HANDGRETINGER R, BABARIN-DORNER A, et al. Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method [ J ]. *Cytotherapy*, 2003, 5( 6 ): 479-484. DOI: 10.1080/14653240310003558.
- [ 36 ] KOEHL U, ESSER R, ZIMMERMANN S, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children [ J ]. *Klin Padiatr*, 2005, 217( 6 ): 345-350. DOI: 10.1055/s-2005-872520.
- [ 37 ] SUTLU T, STELLAN B, GILLJAM M, et al. Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor [ J ]. *Cytotherapy*, 2010, 12( 8 ): 1044-1055. DOI: 10.3109/14653249.2010.504770.
- [ 38 ] LEUNG S O, GAO K, WANG G Y, et al. Surrogate target cells expressing surface anti-idiotypic antibody for the clinical evaluation of an internalizing CD22-specific antibody [ J ]. *MAbs*, 2015, 7( 1 ): 66-76. DOI: 10.4161/19420862.2014.985519.
- [ 39 ] LEUNG W. Use of NK cell activity in cure by transplant [ J ]. *Br J Haematol*, 2011, 155( 1 ): 14-29. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08823.x.
- [ 40 ] KOEPEL S A, MILLER J S, MCKENNA D H Jr. Natural killer cells: a review of manufacturing and clinical utility [ J ]. *Transfusion*, 2013, 53( 2 ): 404-410. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03724.x.
- [ 41 ] MCKENNA D H Jr, SUMSTAD D, BOSTROM N, et al. Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience [ J ]. *Transfusion*, 2007, 47( 3 ): 520-528. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.01145.x.
- [ 42 ] CAROSELLA E D, PAUL P, MOREAU P, et al. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects [ J ]. *Immunol Today*, 2000, 21( 11 ): 532-534. PMID: 11186460.
- [ 43 ] ALICI E. IPH-2101, a fully human anti-NK-cell inhibitory receptor mAb for the potential treatment of hematological cancers [ J ]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12( 6 ): 724-733. PMID: 21154164.
- [ 44 ] ROMAGNE F, ANDRE P, SPEE P, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells [ J ]. *Blood*, 2009, 114( 13 ): 2667-2677. DOI: 10.1182/blood-2009-02-206532.
- [ 45 ] CHANG Y H, CONNOLLY J, SHIMASAKI N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 6 ): 1777-1786. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3558.
- [ 46 ] 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.
- [ 47 ] SPANHOLTZ J, PREIJERS F, TORDOIR M, et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process [ J ]. *PLoS ONE*, 2011, 6( 6 ): e20740. DOI: 10.1371/journal.pone.0020740.
- [ 48 ] JENA B, MOYES J S, HULS H, et al. Driving CAR-based T-cell therapy to success [ J ]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2014, 9( 1 ): 50-56. DOI: 10.1007/s11899-013-0197-7.
- [ 49 ] MAKI G, KLINGEMANN H G, MARTINSON J A, et al. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92 [ J ]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10( 3 ): 369-383. DOI: 10.1089/152581601750288975.
- [ 50 ] ROMANSKI A, BUG G, BECKER S, et al. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia [ J ]. *Exp Hematol*, 2005, 33( 3 ): 344-352. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.11.006.
- [ 51 ] TONN T, SCHWABE D, KLINGEMANN H G, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92 [ J ]. *Cytotherapy*, 2013, 15( 12 ): 1563-1570. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017.
- [ 52 ] MACLEOD R A, NAGEL S, KAUFMANN M, et al. Multicolor-FISH analysis of a natural killer cell line (NK-92) [ J ]. *Leuk Res*, 2002, 26( 11 ): 1027-1033. PMID: 12363472.
- [ 53 ] UPHOFF C C, DENKMANN S A, STEUBE K G, et al. Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in human and other primate cell lines [ J ]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 904767. DOI: 10.1155/2010/904767.

- [ 54 ] RADZIEWICZ H, IBEGBU C C, FERNANDEZ M L, et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression [ J ]. *J Virol*, 2007, 81( 6 ): 2545-2553. DOI: 10.1128/JVI.02021-06.
- [ 55 ] SAHM C, SCHONFELD K, WELS W S. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61( 9 ): 1451-1461. DOI: 10.1007/s00262-012-1212-x.
- [ 56 ] CHU J, DENG Y, BENSON D M, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor ( CAR )-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma [ J ]. *Leukemia*, 2014, 28( 4 ): 917-927. DOI: 10.1038/leu.2013.279.
- [ 57 ] WOLL P S, GRZYWACZ B, TIAN X, et al. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity [ J ]. *Blood*, 2009, 113( 24 ): 6094-6101. DOI: 10.1182/blood-2008-06-165225.
- [ 58 ] NI Z, KNORR D A, CLOUSER C L, et al. Human pluripotent stem cells produce natural killer cells that mediate anti-HIV-1 activity by utilizing diverse cellular mechanisms [ J ]. *J Virol*, 2011, 85( 1 ): 43-50. DOI: 10.1128/JVI.01774-10.
- [ 59 ] NI Z, KNORR D A, KAUFMAN D S. Hematopoietic and natural killer cell development from human pluripotent stem cells [ J ]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1029: 33-41. DOI: 10.1007/978-1-62703-478-4\_3.
- [ 60 ] EGUIZABAL C, ZENARRUZABEITIA O, MONGE J, et al. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cell-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective [ J ]. *Front Immunol*, 2014, 5: 439. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00439.
- [ 61 ] WOLL P S, MARTIN C H, MILLER J S, et al. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity [ J ]. *J Immunol*, 2005, 175( 8 ): 5095-5103. PMID: 16210613.
- [ 62 ] KNORR D A, 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. DOI: 10.5966/sctm.2012-0084.
- [ 63 ] NI Z, KNORR D A, BENDZICK L, et al. Expression of chimeric receptor CD4zeta by natural killer cells derived from human pluripotent stem cells improves in vitro activity but does not enhance suppression of HIV infection in vivo [ J ]. *Stem Cells*, 2014, 32( 4 ): 1021-1031. DOI: 10.1002/stem.1611.
- [ 64 ] SHAH N, MARTIN-ANTONIO B, YANG H, et al. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 10 ): e76781. DOI: 10.1371/journal.pone.0076781.
- [ 65 ] DENMAN C J, SENYUKOV V V, SOMANCHI S S, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells [ J ]. *PLoS ONE*, 2012, 7( 1 ): e30264. DOI: 10.1371/journal.pone.0030264.
- [ 66 ] SHIMASAKI N, FUJISAKI H, CHO D, et al. A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies [ J ]. *Cytotherapy*, 2012, 14( 7 ): 830-840. DOI: 10.3109/14653249.2012.671519.
- [ 67 ] WANG G P, GARRIGUE A, CIUFFI A, et al. DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36( 9 ): e49. DOI: 10.1093/nar/gkn125.
- [ 68 ] HU W S, PATHAK V K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy [ J ]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52( 4 ): 493-511. PMID: 11121508.
- [ 69 ] DAVILA M L, KLOSS C C, GUNSET G, et al. CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 4 ): e61338. DOI: 10.1371/journal.pone.0061338.
- [ 70 ] KAKARLA S, CHOW K K, MATA M, et al. Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma [ J ]. *Mol Ther*, 2013, 21( 8 ): 1611-1620. DOI: 10.1038/mt.2013.110.
- [ 71 ] KARO J M, SUN J C. Novel molecular mechanism for generating NK-cell fitness and memory [ J ]. *Eur J Immunol*, 2015, 45( 7 ): 1906-1915. DOI: 10.1002/eji.201445339.
- [ 收稿日期 ] 2016-02-10 [ 修回日期 ] 2016-02-18  
[ 本文编辑 ] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》，文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方，均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、时刻必须使用阿拉伯数字，如 20 世纪 90 年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等；年份不能用简称，“1998 年”不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字，如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求：5 万至 10 万应写成 5 万~10 万，不能写成 5~10 万； $3 \times 10^9$  至  $5 \times 10^9$  应写成  $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ，或  $(3 \sim 5) \times 10^9$ ，不能写成  $3 \sim 5 \times 10^9$ ；60% 至 70% 不能写成 60~70%，应写成 60%~70%； $25.5 \pm 0.5$  mg 应写成  $(25.5 \pm 0.5)$  mg。(5) 带单位的量值相乘时，每个数值后单位不能省略，如 4 mm × 2 mm × 3 mm，不能写成 4 × 2 × 3 mm 或  $4 \times 2 \times 3$  mm<sup>3</sup>。(本刊编辑部)