

## 嵌合抗原受体修饰的 NK-92MI 细胞对 *HER2* 阳性乳腺癌细胞的杀伤

孔潇<sup>1</sup>, 秦扬<sup>2</sup>, 李甲璐<sup>1</sup>, 游凤涛<sup>3,4</sup>, 朱学军<sup>5</sup>, 袁磊<sup>6</sup>, 孟会敏<sup>1</sup>, 安钢力<sup>1</sup>, 杨林<sup>1,3</sup> (1. 苏州大学唐仲英血液学研究中心血液学协同创新中心, 江苏苏州 215123; 2. 云南省肿瘤医院泌尿外科, 云南昆明 650118; 3. 苏州市肿瘤免疫诊疗及纳米医药工程技术研究中心, 江苏苏州 215123; 4. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 江苏苏州 215123; 5. 江苏省中医院血液科, 江苏南京 210029; 6. 中国人民解放军总医院血液科, 北京 100853)

**[摘要]** **目的:** 探讨用特异性靶向 *HER2* 抗原的嵌合抗原受体(HER2-CAR)修饰的 NK-92MI 细胞对 *HER2* 阳性乳腺癌细胞的杀伤效率。**方法:** 通过 PCR 获得 *HER2*-CAR 片段, 运用常规分子克隆技术, 将其构建到慢病毒载体上, 利用包装的慢病毒颗粒对 NK-92MI 细胞进行转染; 应用流式细胞术检测细胞转染效率以及转染前后 NK-92MI 的 IFN- $\gamma$  和颗粒酶分泌差异; 使用 7-AAD 和流式细胞术体外检测 *HER2*-CAR-NK92MI 细胞对乳腺癌细胞的杀伤效率; 构建小鼠乳腺癌原位肿瘤模型进行体内细胞毒性的检测。**结果:** 用 *HER2*-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞对 *HER2* 阳性乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7 和 T47D 的杀伤效率明显高于未被基因修饰的 NK-92MI 细胞[分别为  $(62.4 \pm 1.3)\%$  vs  $(22.1 \pm 1.2)\%$  和  $(50.0 \pm 1.9)\%$  vs  $(16.9 \pm 0.6)\%$ ,  $P < 0.01$ ]; 而两者对 *HER2* 阴性的乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的杀伤效率没有明显差异[ $(13.6 \pm 1.4)\%$  vs  $(12.7 \pm 0.8)\%$ ,  $P > 0.05$ ]。同时, 经 *HER2*-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞相比未被基因修饰的 NK-92MI 细胞, IFN- $\gamma$  的分泌明显升高( $P < 0.01$ )。**结论:** 经 *HER2*-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞对 *HER2* 阳性乳腺癌细胞的杀伤效率明显提高, 且具有特异性靶向, 此为治疗乳腺癌等恶性肿瘤提供了临床依据。

**[关键词]** 乳腺癌细胞; NK-92MI 细胞; *HER2* 嵌合抗原受体(HER2-CAR)

**[中图分类号]** R739.5; R730.51; R967

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)05-0620-06

## Killing effect of NK-92MI cells modified with chimeric antigen receptor on *HER2*<sup>+</sup> breast carcinoma cell

KONG Xiao<sup>1</sup>, QIN Yang<sup>2</sup>, LI Jialu<sup>1</sup>, YOU Fengtao<sup>3,4</sup>, ZHU Xuejun<sup>5</sup>, YUAN Lei<sup>6</sup>, MENG Huimin<sup>1</sup>, AN Gangli<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1,3</sup> (1. The Cyrus Tang Hematology Center & Collaborative Innovation Center of Hematology, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Department of Urology, Cancer Hospital of Yunan Province, Kunming 650118, Yunnan, China; 3. Suzhou Cancer Immunotherapy-Diagnosis and Nanomedicine Engineering Technology Center, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 4. PersonGen Biomedicine (Suzhou) Co., Ltd, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 5. Department of Hematology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, Jiangsu, China; 6. Department of Hematology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore killing efficiency of NK-92MI cells modified with chimeric antigen receptor of specific targeting *HER2* antigen (HER2-CAR) on *HER2*<sup>+</sup> breast carcinoma cells. **Methods:** HER2-CAR fragments were obtained by PCR, then built into lentiviral vectors via molecular cloning technology and transfected into NK-92MI cells using the lentiviral particles with HER2-CAR. Flow cytometry assay was used to detect efficiency of the cell transfection and, secretion differences between IFN- $\gamma$  and granzyme in NK-92MI cells before and after the transfection. Killing efficiency of HER2-CAR-NK92MI cells on breast carcinoma cells *in vitro* was tested with 7-AAD and flow cytometry assays. Mouse model with breast tumor *in situ* was constructed and used to detect killing efficiency of the HER2-CAR-NK92MI cells *in*

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 31471283)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31471283)

**[作者简介]** 孔潇(1990-), 女, 山东曲阜人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗的临床研究, E-mail: kongxiao925818@163.com

**[通信作者]** 杨林(YANG Lin, corresponding author), E-mail: yanglin@suda.edu.cn; 安钢力(AN Gangli, co-corresponding author), E-mail: gangli\_an@suda.edu.cn

**[优先发表]**

*in vivo*. **Results:** Killing efficiencies of the NK-92MI cell modified with HER2-CAR on *HER2*<sup>+</sup> breast carcinoma MCF-7 and T47T cell lines were significantly higher than those of the NK-92MI cell that did not modified with HER2-CAR gene ( $[62.4 \pm 1.3]\%$  vs  $[22.1 \pm 1.2]\%$ ,  $[50.0 \pm 1.9]\%$  vs  $[16.9 \pm 0.6]\%$ , respectively, all  $P < 0.01$ ). However, there was no obvious difference in killing efficiency of both the modified and un-modified NK-92MI cells on *HER2*<sup>-</sup> breast carcinoma MDA-MB-468 cell ( $[13.6 \pm 1.4]\%$  vs  $[12.7 \pm 0.8]\%$ ,  $P > 0.05$ ). At the same time, amount of IFN- $\gamma$  secreted by the NK-92MI cell modified with HER2-CAR was significantly higher than that secreted by the NK-92MI cell which did not modified with HER2-CAR gene ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Killing efficiency of the NK-92MI cell modified with HER2-CAR on *HER2*<sup>+</sup> breast carcinoma cell significantly increased, and could have specific targeting property, which might provide a clinical evidence for the treatment of malignant tumor, such as breast carcinoma and so on.

[ **Key words** ] breast carcinoma cell; NK-92MI cell; HER2 chimeric antigen receptor

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 620-625. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.006 ]

HER2 受体是一个具有酪氨酸激酶活性的穿膜蛋白,是表皮生长因子受体家族的成员。研究<sup>[1-2]</sup>发现,大约有 30% 的乳腺癌患者过表达 *HER2* 基因。目前临床上广泛应用的治疗乳腺癌的药物曲妥珠单抗,被证实对高度表达 *HER2* 的乳腺癌细胞具有高效的抑制作用<sup>[3]</sup>。然而曲妥珠单抗在单独用药时仅对少于 35% 的 *HER2* 高表达的乳腺癌患者有效,对超过 5% 的患者有严重的副作用(如心功能障碍等),并且 40% 的患者在用药后会出现其他的不良反应<sup>[4]</sup>,约有 70% 的患者会产生耐药性<sup>[5]</sup>。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞在治疗 CD19 阳性的恶性血液肿瘤上的成功运用展示了这种新型肿瘤免疫治疗技术的强大效力<sup>[6-7]</sup>。然而随着研究的深入,发现 CAR-T 也有一定的副作用<sup>[8]</sup>。本文使用 NK-92MI 细胞系,运用病毒转染的方法,将 HER2-CAR 构建到 NK-92MI 细胞上,并在细胞水平以及乳腺癌原位动物模型实验中检测了其对于 *HER2* 阳性的乳腺癌细胞的杀伤效果和对肿瘤的抑制作用,旨在为将 CAR-NK 运用于临床治疗提供了实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和主要试剂

病毒包装细胞 293T 及乳腺癌细胞系 MCF-7、T47D、MDA-MB-468 细胞均购于美国 ATCC, NK-92MI 细胞由博生吉医药科技(苏州)有限公司提供,病毒包装质粒  $\Delta R$ 、REV 和包膜质粒 VSV-G 由苏州大学唐仲英血液学研究中心赵昀教授惠赠,DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、0.25% 胰酶和细胞培养用青霉素-链霉素均购于 HyClone 公司, MEM- $\alpha$  培养基购于 Gibco 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 NEW ENGLAND BioLabs 公司, dNTP、Taq DNA polymerase、DNA marker 购于 Fermentas 公司,

大量质粒抽提试剂盒购于 Axygen 公司, CSFE 探针购于 Invitrogen 公司, 7-AAD 染料购于 BD Bioscience 公司; HER2-APC 抗体、鼠抗人 IFN- $\gamma$ -PE 抗体和鼠抗人 Granzyme B- Alexa Fluor 647 抗体均购于 BD Bioscience 公司

### 1.2 分子重组技术构建 HER2-CAR-pCDH

利用 PCR 和基因合成技术将识别 *HER2* 分子的单链抗体片段 HER2-ScFv( FRP-5 )、协同共刺激分子 CD28、CD137 和胞内传递信号的 CD3 $\zeta$  片段串联在一起,得到 HER2-CAR 片段。然后通过亚克隆的手段将 HER2-CAR 片段克隆到慢病毒载体上,选用的慢病毒载体为 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP(自身可表达 GFP),最终得到的目的载体记为 HER2-CAR-pCDH,用于后续慢病毒的包装。

### 1.3 慢病毒的制备及流式细胞术检测细胞转染效率

本研究中选用的是慢病毒包装系统包括  $\Delta R$ 、Rev 和 VSV-G 3 种包装质粒,选用 293T 细胞包装,293T 细胞用 10% FBS、DMEM 高糖培养基,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。当细胞的数量达到 70% 左右时,进行慢病毒包装。病毒收集后,用超速离心的方法进行浓缩,浓缩液分装后冻存在 -80 °C 冰箱。将浓缩液进行滴度检测,293T 在 24 孔板中铺板,每孔  $8 \times 10^4$  个细胞,浓缩过的病毒分别以 0.1、1、10  $\mu$ l 的梯度加到 24 孔板中,72 h 后流式细胞术检测 293T 细胞中 GFP 的阳性率,结合 293T 的细胞数,计算病毒的感染效率,从而得出每微升病毒浓缩液中的病毒颗粒数。

### 1.4 HER2-CAR-NK-92MI 细胞的构建

取  $1 \times 10^6$  个 NK-92MI 细胞,加入 HER2-CAR-pCDH 的病毒浓缩液,混匀,37 °C 孵育 4~6 h 后,转到培养皿中,72 h 后,取  $1 \times 10^6$  个转染了 HER2-CAR 的 NK-92MI 细胞,同时取未被基因修饰的 NK-

92MI 细胞作为阴性对照,用流式细胞术检测 HER2-CAR 分子在 NK-92MI 细胞表面的表达情况。

### 1.5 流式细胞术检测肿瘤细胞表面 HER2 表达

为检测 HER2-CAR 对 HER2 抗原是否有特异靶向作用,将筛选出 HER2 阳性细胞作为实验组,阴性细胞作为对照组,用 APC 荧光 HER2 抗体流式细胞术检测肿瘤细胞表面 HER2 抗原的表达情况。

### 1.6 流式细胞术检测乳腺癌细胞的死亡率

经流式细胞术筛选到的 HER2 阳性的乳腺癌细胞为 T47D、MCF-7, HER2 阴性的乳腺癌细胞为 MDA-MB-468,并将其用于体外细胞毒性试验的检测。效应细胞分别为未被基因修饰的 NK-92MI 细胞和 HER2-CAR-pCDH 病毒转染的 NK-92MI 细胞 (HER2-CAR-NK92MI)。先用稀释过的 CFSE (1:100)在 37 °C 培养箱中标记活的肿瘤细胞,30 min 后离心弃上清,分别加入效应细胞 (NK-92MI/HER2-CAR-NK92MI),效靶比为 5:1,在体外杀伤 4 h 后,加入 1 μl 7-AAD,用流式细胞仪检测 CFSE 标记的肿瘤细胞中染上 7-AAD 的比例,即肿瘤细胞的死亡率。实验重复 3 次。

### 1.7 流式细胞术检测 IFN-γ 和颗粒酶的分泌

NK 细胞主要通过分泌 IFN-γ 和颗粒酶杀伤肿瘤细胞,所以本实验体外检测对比 HER2-CAR-NK-92MI 细胞和 NK-92MI 细胞系 IFN-γ 和颗粒酶的分泌情况。取 HER2-CAR-NK92MI 细胞和 NK-92MI 细胞,经固定、透化后,分别加入 PE Mouse Anti-Human IFN-γ 抗体和 Alexa Fluor 647 Mouse anti-Human Granzyme B 抗体,37 °C 孵育 30 min,利用流式细胞仪检测两者 IFN-γ 和颗粒酶的分泌是否存在差异。实验重复 3 次。

### 1.8 HER2-CAR-NK92MI 细胞对乳腺癌原位种植瘤的体内杀伤实验

10 只 6 周龄 SCID 雌性小鼠,购于上海灵畅生物科技有限公司,动物许可证号为 SCXK(沪)2013-0018,合格证编号为 2013001812782,SPF 级饲养。原位注射 2 × 10<sup>5</sup> 个 HER2 阳性的乳腺癌细胞 MCF-7,12 d 成瘤(成瘤率 100%),并将小鼠按数字表法随机分为 2 组,每组 5 只,分别注射 10 Gy 辐照过的 5 × 10<sup>5</sup> 个 HER2-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞和未被修饰的 NK-92MI 细胞,每隔 7 d 检测小鼠肿瘤的大小,根据公式  $V = ab^2/2$  计算肿瘤的体积(a 代表长径,b 代表短径)并绘制肿瘤生长曲线。当小鼠肿瘤长到 1 500 mm<sup>3</sup> 时,对小鼠采取安乐死。

### 1.9 统计学处理

本文所得结果应用 GraphPad Prism 6 软件进行

统计分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异性采用 *t* 检验分析,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 HER2-CAR-pCDH 重组质粒

利用 PCR 方法构建 HER2-CAR 片段(图 1A),分子构建成功后,将分子构建到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 上,酶切位点是 Xba I 和 Not I(图 1B)。

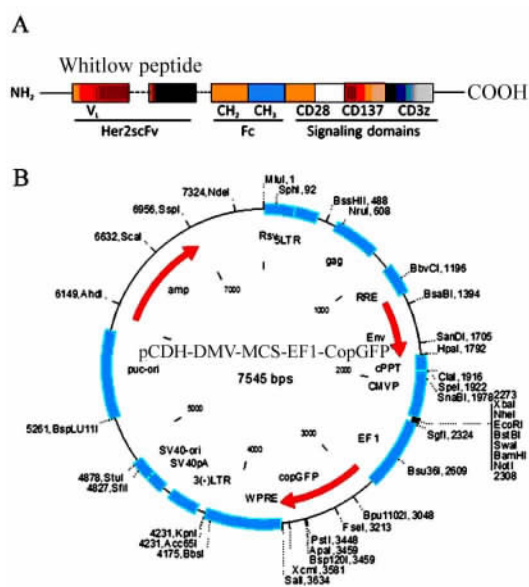


图 1 HER2-CAR-pCDH 重组质粒的构建  
Fig. 1 Construction of HER2-CAR-pCDH

A: The construction of HER2-CAR;

B: The construction of HER2-CAR-pCDH

### 2.2 成功制备慢病毒

生物智能导航仪拍摄慢病毒包装时 GFP 的表达情况(图 2A)和 0.1、1、10 μl 浓缩过的病毒液转染 293T 的转染效率(图 2B)。通过滴度检测,可以初步测定病毒浓缩液的病毒颗粒数为 8 × 10<sup>8</sup> 个/ml。由此可以得出,慢病毒包装及浓缩效果良好,可以用于下一步实验。

### 2.3 慢病毒成功转染 NK-92MI 细胞

流式细胞术检测慢病毒浓缩液对 NK-92MI 细胞的转染结果(图 3)显示,慢病毒转染效率为 23%(图 3B),可以用于下一步实验。

### 2.4 HER2-CAR-NK92MI 对乳腺癌细胞的杀伤效果显著提高

细胞杀伤实验结果(图 4)显示,HER2-CAR-

NK92MI 细胞对 HER2 阳性乳腺癌细胞的杀伤效率远高于 NK-92MI 细胞 [ MCF-7: ( 62.4 ± 1.3 )% vs ( 22.1 ± 1.2 )% 和 ( 50.0 ± 1.9 )% vs ( 16.9 ± 0.6 )% , 均  $P < 0.01$  ], 而两者对 HER2 阴性的乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的杀伤效果没有显著差异 [ ( 13.6 ± 1.4 )% vs ( 12.7 ± 0.8 )% ,  $P > 0.05$  ]。上述实验充分说明, 本研究构建的 HER2-CAR-NK92MI 细胞对 HER2 阳性乳腺癌细胞具有显著的靶向特异性。

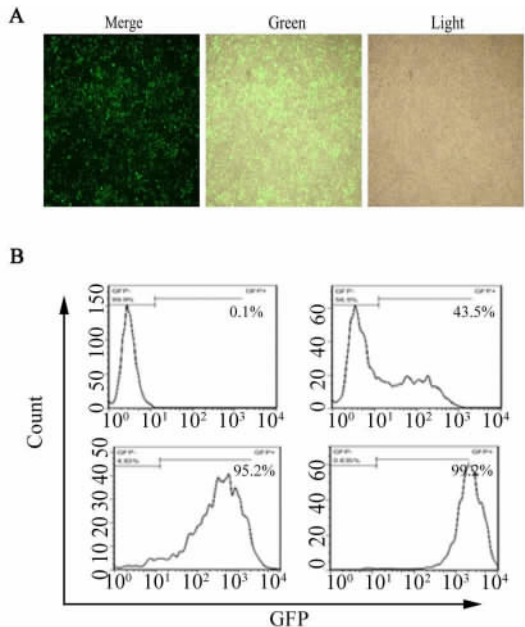


图 2 慢病毒包装及病毒滴度测定

Fig. 2 Lentivirus packaging and viral titer

A: The GFP expression of 293T cells transfected by lentivirus;  
B: The GFP positive rate of 293T cells by cell flow analysis

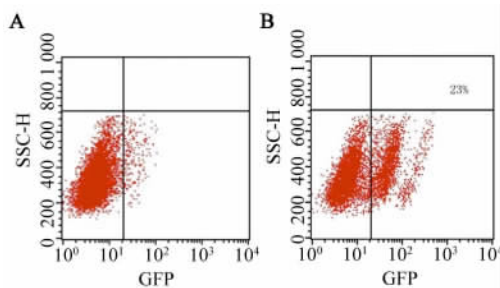


图 3 GFP 在 HER2-CAR-NK92MI 细胞中的表达

Fig. 3 GFP expression on HER2-CAR-NK92MI cells

A: NK-92MI negative control;  
B: The transfection rate of HER2-CAR- NK92MI

2.5 HER2-CAR-NK92MI 细胞 IFN- $\gamma$  分泌显著增高  
流式细胞术检测结果( 图 5 ), HER2-CAR-NK92MI 细胞 IFN- $\gamma$  的分泌比 NK-92MI 细胞显著提高(  $P <$

0.01 ), 而颗粒酶 B 的分泌没有差异(  $P < 0.01$  )。

2.6 HER2-CAR-NK92MI 对小鼠肿瘤模型有一定的抑制作用

HER2-CAR-NK92MI 细胞处理的小鼠原位种植瘤生长比 NK-92MI 细胞处理的小鼠出现延缓的趋势( 图 6 )。此外, 对小鼠各主要器官进行了组织切片病理分析, 均没有发现任何病理学改变, 显示出一定的安全性。

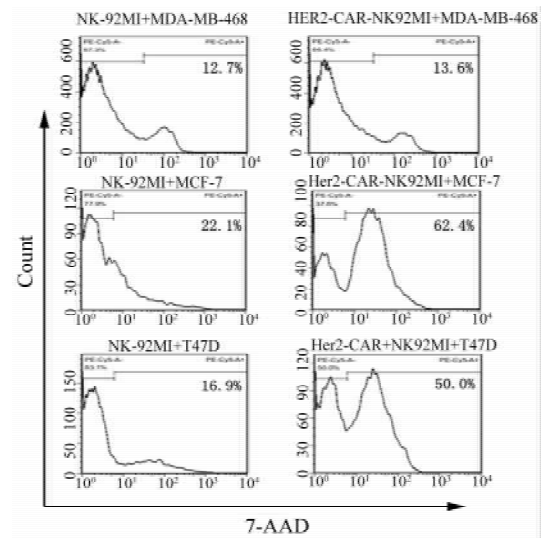


图 4 HER2-CAR-NK92MI 细胞对乳腺癌的杀伤作用  
Fig. 4 Cytotoxicity assay of HER2-CAR-NK92MI cells against breast carcinoma cells

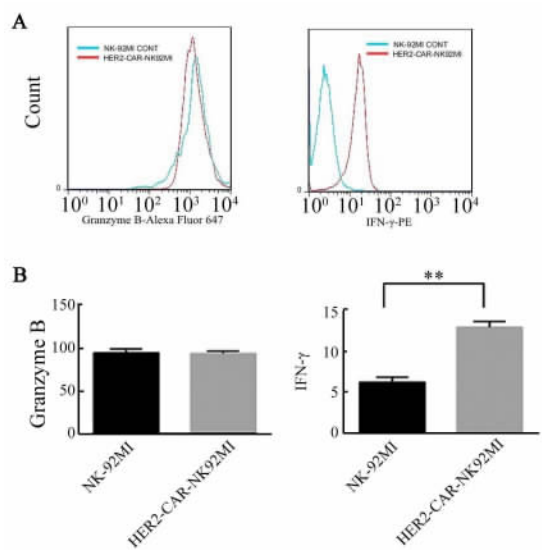


图 5 NK-92MI 和 HER2-CAR-NK92MI 细胞 IFN- $\gamma$  与颗粒酶的分泌差异

Fig. 5 The variant secretion of IFN- $\gamma$  and granzyme B between NK-92MI and HER2-CAR-NK92MI

A: Flow cytometry assay; B: Statistica analysis  
\*\*  $P < 0.01$  vs NK-92MI

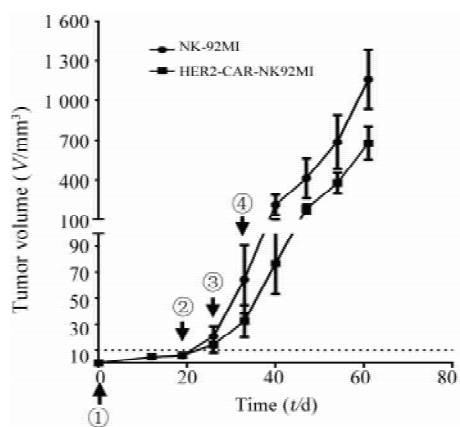


图 6 HER2-CAR-NK92MI 对小鼠乳腺癌原位肿瘤的杀伤

Fig. 6 Cytotoxicity of HER2-CAR-NK92MI against breast cancer *in vivo*

- ①: MCF-7 cells was orthotopic transplanted;  
 ②: Irradiated NK-92MI and HER2-CAR-NK92MI cells were injected intratumorally at the first time;  
 ③: Irradiated NK-92MI and HER2-CAR-NK92MI cells were injected intratumorally at the second time; ④: Irradiated NK-92MI and HER2-CAR-NK92MI cells were injected intratumorally at the last time

### 3 讨论

乳腺癌已成为危害人类健康的一大安全隐患<sup>[9]</sup>, 尽管临床上有放疗、化疗、手术疗法、靶向治疗等, 但是由于带来了一定的副作用, 使得乳腺癌仍然没有得到很好的控制。本实验通过病毒转染的方式构建了表达 HER2-CAR 的 NK-92MI 细胞, 并通过体内外实验看到了明显的靶向特异性, 证明在一定程度上, HER2 抗原特异性 CAR 对 HER2 阳性的乳腺癌细胞有较为明显的杀伤作用, 为临床治疗 HER2 阳性的乳腺癌提供了实验依据。

嵌合抗原受体 CAR 修饰的 T 细胞已被用于免疫治疗, 并且收到了一定的临床治疗效果<sup>[10]</sup>, 而 CAR 修饰的 NK 细胞还没有太大的进展。目前, 国际上已经出现了用 NK-92 细胞代替 NK 细胞研究 CAR 作用的先例, NK-92 细胞是 IL-2 依赖性的 NK 细胞系, 是从一位非霍奇金淋巴瘤患者体内分离建系的<sup>[11-12]</sup>。而本研究中使用的 NK-92MI 细胞系是在 NK-92 细胞系基础上改造而成, 是不依赖于 IL-2 的 NK-92 细胞系, 相比 NK-92 细胞系使用更为安全和简单方便。

CAR-T 技术目前已经较为成熟, CAR 的结构也

一直在改进, 目前分为一代、二代、三代及共表达细胞因子转基因的第四代。三代 CAR 是在二代的基础上, 在胞内信号转导区 CD28 分子的基础上, 又多了一个共刺激因子 CD137 分子, 理论上比二代 CAR 的效果更为持久, 虽然这种说法还未被证实, 但是本实验所显示的结果可以作为参考依据。

传统的转染细胞方法有慢病毒转染和电转。虽然电转染更为快捷, 但是对细胞的伤害比较大, 所以本研究选择用慢病毒转染的方法, 转染效率大约为 20% 左右, 这有可能是体外杀伤试验中杀伤效率没有达到 100% 的原因之一。当然, 通过进一步优化靶比以及作用时间, 有可能进一步提高杀伤率。从实验结果可以看出, HER2-CAR 修饰的 NK-92MI 细胞与未被基因修饰的 NK-92MI 细胞相比, 颗粒酶的表达水平没有出现差异, 但 IFN- $\gamma$  分泌增多, 这也能解释为什么在病毒转染细胞阳性率只有 20% 的情况下就可以将杀伤效果提高 30% 左右。值得一提的是, IFN- $\gamma$  分泌的增加是不依赖于肿瘤细胞的刺激就出现的, 这可能与 CAR 结构中 CD28 片段的表达有关, 因为 CD28 的激活被证实与 IFN- $\gamma$  的分泌有关<sup>[13]</sup>。

在小鼠体内实验中, 肿瘤生长出现减缓的趋势, 但相对体外实验结果来讲, 对肿瘤生长的抑制效果有限。如果能够将细胞转染阳性率进一步提高, 应该会有更为明显的体内试验效果。但是考虑到 HER2-CAR-NK-92MI 细胞回输至小鼠体内后, HER2-CAR 的表达有可能出现丢失, 因此, 最理想的解决方案是构建 HER2-CAR-NK-92MI 稳定细胞株。目前, 笔者正在进行转染和流式术分选相结合的方法, 进行稳定细胞株的构建, 期待其有更为理想的杀伤实验效果。

目前 CAR-T 细胞已经被用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和急性淋巴细胞白血病 (ALL)<sup>[14-15]</sup>, 且 T 细胞可以诱导分化成中心记忆 T 细胞, 能够在体内长期存在。这种 CAR-T 细胞的体内长期存活也是 CAR-T 在治疗 CLL 和 ALL 时出现显著疗效的主要原因。而本研究中采用的 NK-92MI 细胞是需要辐照后才可以用于体内回输, 所以在体内的存活时间并不长, 这有可能会导导致 CAR-NK-92MI 细胞的疗效不如 CAR-T 细胞, 并可能导致患者需要依赖定期的 CAR-NK-92MI 细胞回输来维持疗效。然而, CAR-T 细胞有可能出现主要由 IL-6 大量产生导致的致命的细胞因子风暴<sup>[16]</sup>, 而 CAR-NK 细胞不产生 IL-6, 因此安全性得到进一步提高。在本研究中选择使用 NK-92MI 细胞系, 主要原因如下: (1) NK-92MI 细胞体外易增

殖<sup>[17]</sup>,可以实现 GMP 规范下的大规模制备;(2) NK-92MI 的亲本细胞 NK-92 细胞已经在对抗多种恶性肿瘤的临床试验中表现出了显著的效果<sup>[18]</sup>;(3) NK-92MI 细胞无需依赖外界添加 IL-2 就可以扩增,更加便捷高效。

总之,恶性肿瘤已经成为危害人类健康的头号杀手,从本实验中 HER2-CAR-NK-92MI 的初步实验效果来看,可以期望 CAR-NK 技术对恶性肿瘤的治疗将起到积极作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-2/neu oncogene [ J ]. *Science*, 1987, 235( 4785 ): 177-182. DOI: 10.1126/science.3798106.
- [ 2 ] HOU J, ZHOU Z, CHEN X, et al. HER2 reduces breast cancer radiosensitivity by activating focal adhesion kinase in vitro and in vivo [ J/OL ]. *Oncotarget*, 2016, 2016: ( epub ahead of print ) [ 2016-06-08 ]. <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget>. DOI: 10.18632/oncotarget.9870.
- [ 3 ] GHAZALI N, PARKER L, SETTLE K, et al. Sustained response of HER2-positive metastatic salivary adenocarcinoma, not otherwise specified, treated with trastuzumab [ J ]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016, 122( 3 ): 292-299. DOI: 10.1016/j.oooo.2016.03.020.
- [ 4 ] VOGEL C L, COBLEIGH M A, TRIPATHY D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2002, 20( 3 ): 719-726. DOI: 10.1200/JCO.20.3.719.
- [ 5 ] SUN L, BURNETT J, GASPARYAN M, et al. Novel cancer stem cell targets during epithelial to mesenchymal transition in PTEN-deficient trastuzumab-resistant breast cancer [ J/OL ]. *Oncotarget*, 2016, 2016( Epub ahead of print ) [ 2016-06-08 ]. <http://www.impactjournals.com/oncotarget/>. DOI: 10.18632/oncotarget.9839.
- [ 6 ] KALOS M, LEVINE B L, PORTER D L, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia [ J/OL ]. *Sci Transl Med*, 2011, 3: 95ra73 [ 2016-06-08 ]. <http://stm.sciencemag.org/content/3/95/95ra73>. long. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- [ 7 ] BRENTJENS R J, DAVILA M L, RIVIERE I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia [ J ]. *Sci Transl Med*, 2013, 5( 177 ): 177ra38. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
- [ 8 ] DAVILA M L, SADELAIN M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies [ J ]. *Int J Hematol*, 2016, 104( 1 ): 6-17. DOI: 10.1007/s12185-016-2039-6.
- [ 9 ] COLLIGNON J, LOUSBERG L, SCHROEDER H, et al. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions [ J/OL ]. *Breast Cancer ( Dove Med Press )*, 2016, 8: 93-107 [ 2016-06-08 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881925/>. DOI: 10.2147/BCTT.S69488.
- [ 10 ] BHOJ V G, ARHONTOULIS D, WERTHEIM G, et al. Persistence of long-lived plasma cells and humoral immunity in individuals responding to CD19-directed CAR T cell therapy [ J ]. *Blood*, 2016, 128( 3 ): 360-370. DOI: 10.1182/blood-2016-01-694356.
- [ 11 ] KLINGEMANN H, BOISSEL L, TONEGUZZO F, et al. Natural killer cells for immunotherapy-advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells [ J/OL ]. *Front Immunol*, 2016, 7: 91 [ 2016-06-08 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789404/>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00091.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] SUNTHARALINGAM G, PERRY M R, WARD S, et al. Cytokine storm in a phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412 [ J ]. *N Engl J Med*, 2006, 355( 10 ): 1018-1028. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.
- [ 14 ] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 365( 8 ): 725-733. DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
- [ 15 ] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [ J ]. *N Engl J Med*, 2013, 368( 16 ): 1509-1518. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [ 16 ] MORGAN R A, YANG J C, KITANO M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 [ J ]. *Mol Ther*, 2010, 18( 4 ): 843-851. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
- [ 17 ] ARAI S, MEAGHER R, SWEARINGEN M, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial [ J ]. *Cytotherapy*, 2008, 10( 6 ): 625-632. DOI: 10.1080/14653240802301872.
- [ 18 ] SWIFT B E, WILLIAMS B A, KOSAKA Y, et al. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model [ J ]. *Haematologica*, 2012, 97( 7 ): 1020-1028. DOI: 10.3324/haematol.2011.054254.

[ 收稿日期 ] 2016 - 04 - 26 [ 修回日期 ] 2016 - 08 - 15

[ 本文编辑 ] 党瑞山