

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.002

· 基础研究 ·

体外扩增的NK细胞运载溶瘤呼肠孤病毒对结直肠癌细胞的杀伤效应

陈晓庆^{1,2,3}, 王念雪³, 龙世棋³, 廖春香^{1,2,3}, 刘金河^{1,2}, 杨薇⁴, 赵星^{1,2,3} (1. 贵州医科大学 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院 成体干细胞转化研究重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 肿瘤学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 评价体外扩增的人NK细胞能否作为呼肠孤病毒的运载细胞并探讨其临床转化应用价值。**方法:** 体外扩增人NK细胞, 用NK细胞装载呼肠孤病毒, 激光共聚焦显微镜观察呼肠孤病毒与NK细胞结合的部位。NK细胞运载呼肠孤病毒(Reo-NK)到达肿瘤细胞后, CCK-8法检测在中和抗体的存在下病毒发挥的溶瘤作用; qPCR法检测肿瘤细胞内病毒RNA的相对表达量。CCK-8法检测Reo-NK对结直肠癌KRAS基因突变型(DLD-1)和野生型(CaCo-2、HT29)细胞株的杀伤效应, ELISA双抗体夹心法检测NK细胞释放的穿孔素水平。**结果:** 呼肠孤病毒主要结合于NK细胞膜上, 在人AB型血清的存在下体外扩增的NK细胞可将呼肠孤病毒传递到肿瘤细胞, 且传递后的呼肠孤病毒仍具有显著溶瘤活性($P < 0.01$); 同时检测到肿瘤细胞内病毒RNA的表达量显著增高($P < 0.01$)。与NK组相比, Reo-NK组对KRAS基因突变型和野生型结直肠癌细胞株的细胞毒作用均显著增强($P < 0.05$), 穿孔素的释放均明显增加($P < 0.05$)。**结论:** 体外扩增的人NK细胞适合作为呼肠孤病毒的运载细胞, 且呼肠孤病毒能够增强NK细胞的细胞毒作用, 两者联合后对结直肠癌细胞可发挥更强的杀伤作用, 因而具有重要的临床转化应用价值。

[关键词] 呼肠孤病毒; 自然杀伤细胞; 运载细胞; 结直肠癌细胞

[中图分类号] R735.3; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)05-0492-08

Cytotoxic effect of *in vitro* expanded NK cell-carrying oncolytic reovirus on colorectal cancer cells

CHEN Xiaoqing^{1,2,3}, WANG Nianxue³, LONG Shiqi³, LIAO Chunxiang^{1,2,3}, LIU Jinhe^{1,2}, YANG Wei⁴, ZHAO Xing^{1,2,3} (1. Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Transformation Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4. Department of Oncology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate whether human NK cells expanded *in vitro* can be used as carrier cells of reovirus and to investigate its clinical application value. **Methods:** Expansion of human NK cells *in vitro*, and flow cytometry was used to analyse the purity of CD3⁺CD56⁺ cells. Expanded NK cells were loaded with reovirus and observed by confocal microscopy, to determining the location of reovirus on NK cells. CCK-8 assay was used to detect reovirus-induced oncolysis of expanded NK cells carrying reovirus (Reo-NK) to tumor cells in the presence of neutralizing antibodies; Real-time fluorescence quantitative PCR was used to assess the relative expression of viral RNA in tumor cells. Cytotoxicity assay were performed to detect Reo-NK cells against KRAS mutant (DLD-1) and KRAS wild type (CaCo-2, HT29) colorectal cancer cell lines, ELISA matched paired antibodies assay was performed to measure the perforin level released by NK cells. **Results:** Confocal microscopy demonstrated that NK cells retained reovirus on the surface. Expanded NK cells could delivery reovirus to tumor cells in the presence of neutralizing antibodies, and the reovirus after delivery still had significant oncolytic activity ($P < 0.01$); Corresponding qPCR result displayed that the expression of viral RNA in tumor cells significantly in-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81860542); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(No. 2017PT31042); 贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(黔教合KY字[2018]049); 贵州省应用基础研究计划重大专项(黔科合J重大字[2015]2003); 贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合SY字[2013]3010号)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81860542), the Non-Profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences(No.2017PT31042), the Science and Technology Top Talent Support Plan for Colleges and Universities in Guizhou Province (No. KY [2018] 049), the Guizhou Province's Science and Technology Major Project (Qian-J-Zhong [2015] 2003), and the Social Developmental Research Foundation of Guizhou Province (No. SY [2013] 3010)

[作者简介] 陈晓庆(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail:804216070@qq.com

[通信作者] 赵星(ZHAO Xing, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail:351497622@qq.com

creased over time ($P < 0.01$). Compared with NK group, Reo-NK group evidently enhanced the cytotoxicity on colorectal cancer cell lines with both KRAS gene mutant and wild (all $P < 0.05$), and significantly increased the release of perforin (all $P < 0.05$). **Conclusion:** *In vitro* expanded NK cells provide a convincing cell carrier for reovirus, while reovirus enhances the cytotoxicity of NK cells, and the combination of the two show a stronger killing effect on colorectal cancer cells, that has important clinical application value.

[Key words] reovirus; natural killer cell; carrier cell; colorectal cancer cell

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(5): 492-499. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.05.002]

溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)是指能够选择性感染肿瘤细胞并导致其死亡而对正常组织细胞没有损伤的一类病毒,该类病毒可通过在肿瘤细胞内大量复制增殖而直接溶瘤^[1];也可刺激机体产生特异性抗肿瘤免疫^[2],从而系统地识别和清除病灶、预防肿瘤复发及转移。目前,在全球范围内注册开展的溶瘤病毒临床试验已有100余项,其中野生型的呼肠孤病毒(reovirus)已进入III期临床实验^[3]。呼肠孤病毒广泛存在于自然环境中,绝大部分人感染后不引起任何临床症状,少部分人感染后只引起轻微的呼吸道或胃肠道症状^[4]。呼肠孤病毒可通过选择性感染及破坏RAS信号通路异常的癌变细胞来治疗神经胶质瘤、肝癌、黑色素瘤等实体肿瘤和血液恶性肿瘤,早期的临床试验已显示出其良好的安全性和耐受性,且取得了令人满意的结果^[5-7]。然而绝大部分人体内存在呼肠孤病毒的中和抗体,因此在临床应用中通过静脉给药治疗存在一定局限性。近年来,人们逐渐开发出以肿瘤特异性T淋巴细胞、DC和间充质干细胞等为运载细胞的新型给药方式,将病毒吸附在具有肿瘤趋化性的细胞上,帮助病毒越过复杂的血液环境而聚集到肿瘤部位^[8]。NK细胞作为机体的固有免疫细胞,同时具有肿瘤趋化性和肿瘤细胞杀伤能力^[9]。本课题组前期研究发现,从外周血新鲜分离的NK细胞可以运载呼肠孤病毒,但是此来源的NK细胞数量十分有限。因此,为了更好地解决呼肠孤病毒在临床应用中静脉给药时存在的抗体中和问题,本研究采用体外大量扩增的NK细胞作为运载细胞,探讨运载呼肠孤病毒的NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用,为体外扩增NK细胞的临床应用提供新思路,也为进一步研究呼肠孤病毒联合NK细胞的抗肿瘤效应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

鼠成纤维细胞株L929、人结直肠癌KRAS基因突变型细胞株DLD-1、KRAS基因野生型细胞株Ca-Co-2及HT29均购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。呼肠孤病毒(Reolysin[®])由加拿大Oncolytics Biotech公司赠予。人AB型血清为5位健康AB型血型志愿者血

清的混合物。细胞培养基RPMI 1640、DMEM、MEM均购自Hyclone公司,GT-T551无血清培养基购自TaKaRa公司,胎牛血清(FBS)购自Gibco公司,人重组IL-2购自北京四环生物公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司,TRIzol和PCR荧光定量试剂盒均购自TaKaRa公司,逆转录试剂盒均购自Thermo Fisher公司,CCK-8试剂盒购自同仁化学研究所(Dojindo),流式术检测用抗体及相关试剂购自BioLegend公司和BD公司,抗呼肠孤病毒- $\sigma 3$ 抗体购自DSHB公司,荧光二抗FITC-羊抗鼠IgG购自Jackson Immuno Research公司,DAPI购自Sigma公司,人Perforin ELISA检测试剂盒购自美国Abcam公司,实时无标记细胞分析系统(real-time cellular analyzer, RTCA)购自美国ACEA公司。

1.2 NK细胞的体外扩增及鉴定

采集健康志愿者外周血50 ml, Ficoll密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞(PBMC),用GT-T551无血清培养基调整细胞密度为 2×10^6 个/ml,并加入经辐照灭活的K562工程细胞、1%的自体血清及终浓度为1 000 IU/ml的IL-2,于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中扩增培养NK细胞,收集第14~16天的细胞备用。绘制细胞生长曲线,锥虫蓝染色计算体外扩增的NK细胞存活率,流式细胞术检测NK细胞表面CD3、CD56分子的表达情况以鉴定细胞纯度。

1.3 RTCA动态监测呼肠孤病毒的溶瘤活性

将呼肠孤病毒置于245 nm波长的紫外线下照射2 h以制备灭活病毒(UVReo)。向E-Plate16孔检测板中加入RPMI 1640培养基50 μ l测定背景阻抗值,取出检测板并按照 6×10^4 个/孔接种DLD-1细胞,于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养第15 h时加入不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的病毒稀释液(1、10 MOI),同时设置UVReo对照组和不加病毒的细胞对照组,每组3个复孔。培养箱孵育2 h后弃上清,生理盐水清洗,加入维持培养基继续培养。每隔15 min检测并记录细胞指数(cell index, CI)值,连续检测120 h,观察结果。

1.4 CCK-8法检测人AB型血清对呼肠孤病毒的中和作用

L929细胞按照 3×10^4 个/孔接种于96孔平底板,37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养过夜,次日待细胞

汇合度为70%~80%时,将培养基更换为含有不同体积分数人AB型血清(0%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%)的MEM培养基,向实验组加入10 MOI 呼肠孤病毒,同时设置对照组和空白组,每组3个复孔。培养箱中孵育2 h后弃上清,生理盐水洗一次,加入维持培养基继续培养24、48、72 h,按照CCK-8试剂盒说明书加样并检测样本的光密度(D)值,根据公式计算出细胞存活率。细胞存活率=(实验孔 D 值-空白孔 D 值)/(对照孔 D 值-空白孔 D 值) \times 100%。通过检测不同体积分数人AB型血清对L929细胞的保护作用,从而确定中和实验的最适AB型血清体积分数,用同样的方法验证该体积分数的AB型血清对呼肠孤病毒感染DLD-1细胞的阻断效果,并将该AB型血清用于后续NK细胞传递实验。实验重复3次。

1.5 激光共聚焦显微镜观察体外扩增的NK细胞装载呼肠孤病毒

将NK细胞与10 MOI呼肠孤病毒在37℃、5% CO₂的恒温培养箱中孵育2 h, PBS洗去未结合的病毒,吸取适量细胞悬液滴于载玻片上,置于37℃温箱干燥2 h, 4%多聚甲醛室温固定20 min, 冷PBST(含0.05% Triton-X-100)洗3次,用10%山羊血清37℃封闭30 min,加入抗呼肠孤病毒- σ 3抗体(1:80)4℃孵育过夜,次日弃去一抗并加入FITC-羊抗鼠IgG(1:30)室温避光染色1 h,再用DAPI(2.5 μ g/ml)复染细胞核5~10 min,滴加抗荧光衰减封片剂封片,Olympus FV3000激光共聚焦显微镜采集图像。

1.6 中和抗体存在下的呼肠孤病毒传递实验

结直肠癌DLD-1细胞分别接种于96及6孔板中,将体外扩增的NK细胞与10 MOI呼肠孤病毒在培养箱中孵育2 h,生理盐水洗去未结合的病毒,按照1:1效靶比将NK细胞与DLD-1细胞在含有15% AB型血清的培养基中共孵育2 h,吸弃培养上清,生理盐水洗去悬浮的NK细胞,向贴壁生长的DLD-1细胞加入维持培养基继续培养24、48、72 h,用CCK-8法检测NK细胞传递呼肠孤病毒后肿瘤细胞的死亡率[细胞死亡率=1-(实验孔 D 值-空白孔 D 值)/(对照孔 D 值-空白孔 D 值) \times 100%];qPCR法检测肿瘤细胞内病毒RNA的相对表达量:用TRIzol法提取DLD-1细胞的总RNA,定量后用逆转录试剂盒合成cDNA,随后根据qPCR试剂说明书加样并用Bio-Rad荧光定量PCR仪进行扩增,扩增条件为95℃ 30 s、95℃ 5 s、60℃ 45 s(40个循环)。引物序列:T3D上游引物为5'-TGATTTCCACTTCTGCTGCTT-3',下游引物为5'-TCCTGTTCA-CGATTCCATCAGAT-3'; β -actin上游引物为5'-GCCGGGACCTGACTGACTAC-3',下游引物为5'-TTCTCCTTAATGTCACGCACGAT-

3'。目的基因(T3D)相对于内参基因(β -actin)的表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,实验重复3次。

1.7 CCK-8法检测Reo-NK对结直肠癌细胞的杀伤作用

以10 MOI呼肠孤病毒预处理或未处理的NK细胞作为效应细胞,结直肠癌细胞(DLD-1、CaCo-2及HT29)为靶细胞,按照1:1的效靶比于培养箱孵育4~6 h,同时设置效应细胞组、靶细胞组和空白对照组,每组3个复孔。CCK-8法检测NK细胞毒活性,以杀伤率(%)表示。NK细胞杀伤率=[1-(效靶细胞作用孔 D 值-效应细胞孔 D 值)/靶细胞孔 D 值] \times 100%。实验重复3次。

1.8 ELISA双抗体夹心法检测细胞培养上清中的穿孔素含量

收集NK及Reo-NK单独存在、NK及Reo-NK分别杀伤DLD-1细胞6 h后的细胞培养上清液,根据ELISA试剂盒说明书进行抗体孵育、洗涤、显色及终止反应等操作,用酶标仪在450 nm处测定各孔 D 值。设标准品浓度为横坐标, D 值为纵坐标,计算机回归拟合生成标准曲线,将待测样本的 D 值代入则计算出相应的穿孔素含量。

1.9 统计学处理

使用GraphPad Prism 5.01软件进行数据统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较采用配对 t 检验,不同处理组间样本差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NK细胞的增殖及纯度鉴定

人外周血50 ml可分离获得PBMC(1.74 ± 1.56) \times 10⁷个,通过14 d的细胞诱导培养,收集得到(9.07 ± 3.38) \times 10⁹个NK细胞,绘制出细胞生长曲线(图1A),流式细胞术检测细胞纯度为(89.03 ± 3.90)%(图1B)。

2.2 呼肠孤病毒的溶瘤活性

RTCA实时动态监测细胞的生长情况如图2所示,在第15 h时向相应孔内分别加入呼肠孤病毒及UVReo(1、10 MOI),培养箱孵育2 h后洗去未结合的病毒,加入维持培养基继续培养观察,第26小时时各组CI值达到高峰,随后呼肠孤病毒(1 MOI)组的CI值随着时间延长逐渐降低,呼肠孤病毒(10 MOI)组的CI值则快速下降,最终接近于零。而UVReo(1 MOI)组和UVReo(10 MOI)组的细胞生长曲线与控制组相似,细胞进入平台期后CI值均无明显变化,维持时间长达100 h以上。

2.3 混合人AB型血清可有效中和呼肠孤病毒

CCK-8检测72 h时间点的结果(图3A)显示,当不存在人AB型血清时,L929细胞的增殖率为(2.06±0.09)%;随着AB型血清浓度的升高,L929细胞的增殖率也逐渐增高,当AB型血清浓度为15%时,细胞

增殖率为(97.59±3.55)%。同样,如图3B所示,在72 h时,15%的人AB型血清可有效阻断呼肠孤病毒对DLD-1细胞的溶瘤作用[(65.34±9.73)% vs (99.61±6.39)%, $P<0.01$]。

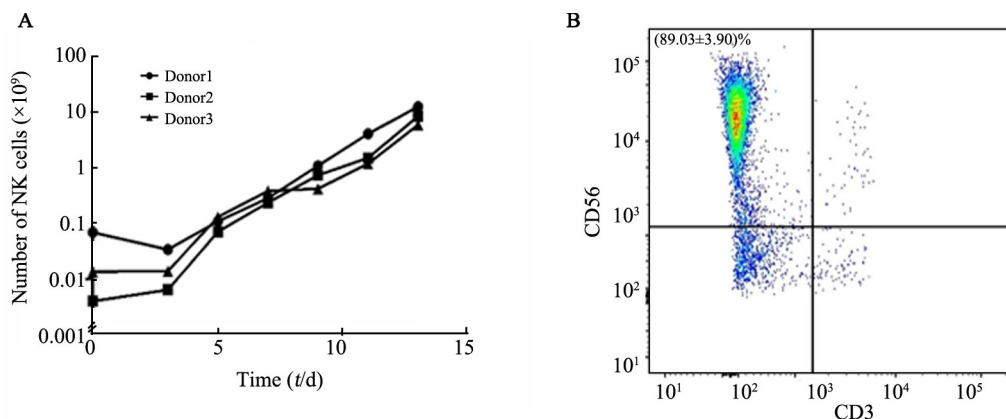


图1 NK细胞的生长曲线(A)与纯度(B)鉴定

Fig.1 Growth curve (A) and purity (B) of expanded NK cells

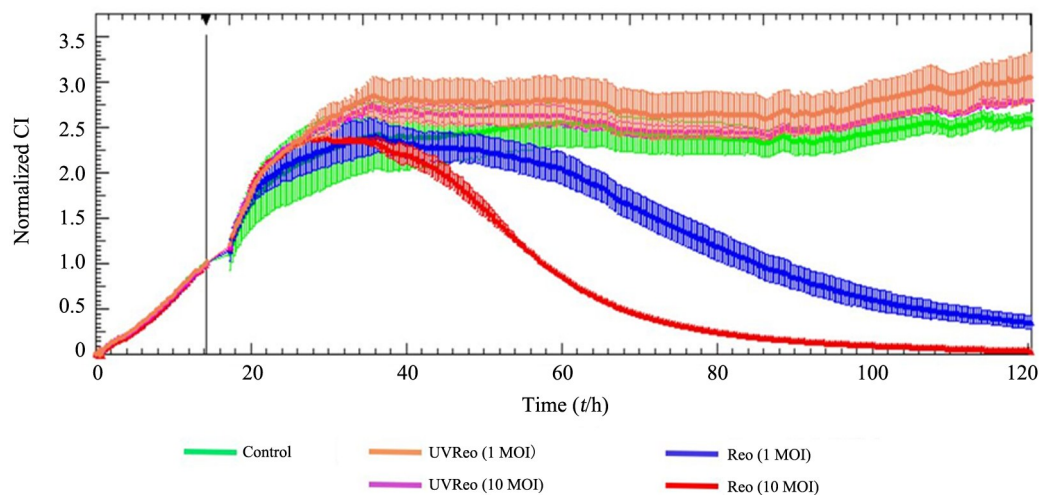
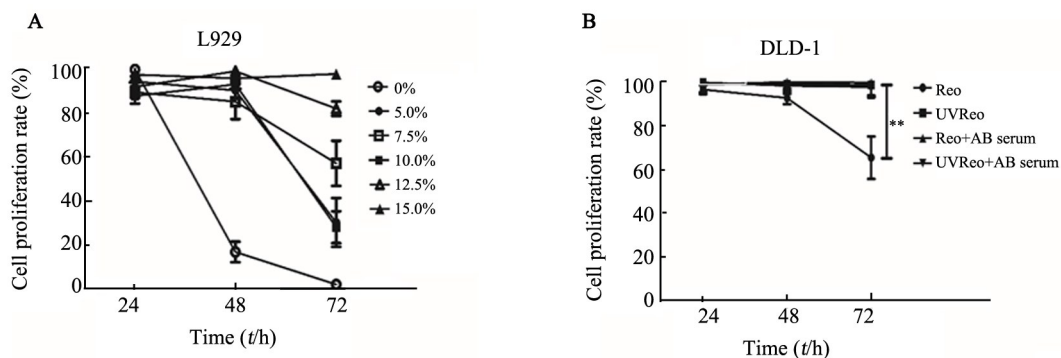


图2 不同滴度呼肠孤病毒的溶瘤活性

Fig.2 Oncolytic activity of reovirus with different titers



** $P<0.01$

A: Neutralizing effect of different concentrations of human AB serum on reovirus;

B: Neutralizing effect of 15% human AB serum on reovirus

图3 人AB型血清对呼肠孤病毒的中和作用($n=3$)

Fig.3 Neutralizing effect of human AB serum on reovirus($n=3$)

2.4 体外扩增的NK细胞装载呼肠孤病毒
通过激光共聚焦显微镜观察到Reo-NK组中颗

粒状黄绿色荧光主要分布于NK细胞的胞膜上,而NK对照组未见黄绿色荧光颗粒(图4)。

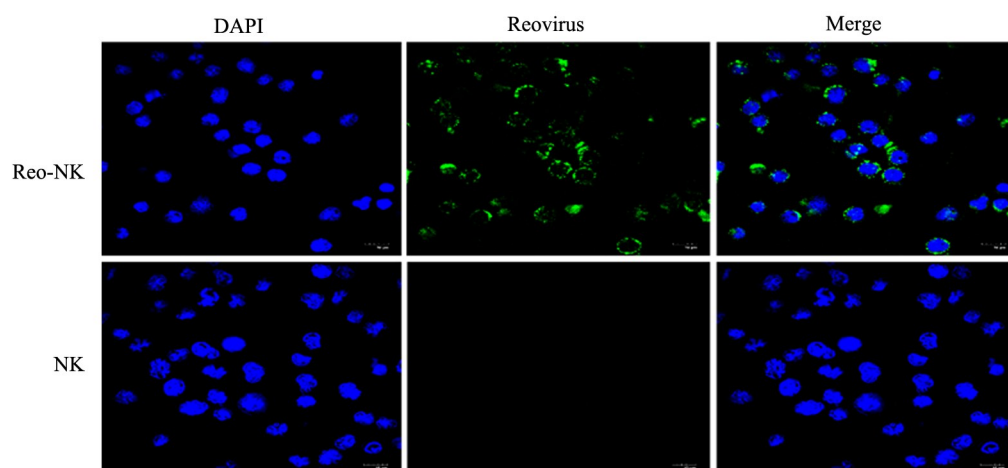


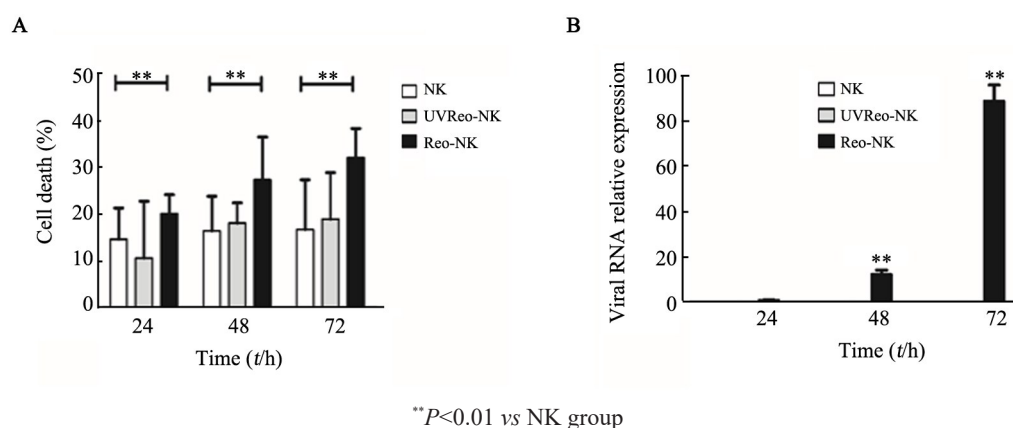
图4 激光共聚焦显微镜观察装载呼肠孤病毒的NK细胞($\times 1\ 000$;比例尺=10 μm)

Fig.4 Confocal microscopy detected of NK cells loaded with reovirus ($\times 1\ 000$;Scale bar =10 μm)

2.5 NK细胞可在中和抗体的存在下将呼肠孤病毒传递到DLD-1细胞

CCK-8法检测结果(图5A)显示,72 h时Reo-NK组的DLD-1细胞死亡率明显高于NK组[(32.12 \pm

6.21)% vs (16.76 \pm 10.61)%, $P < 0.01$]。同时,qPCR结果(图5B)显示,随着时间延长,Reo-NK组在DLD-1细胞内检测到的病毒RNA相对表达量逐渐增高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



A: Death rate of DLD-1 cells was measured by CCK-8 assay; B: RNA relative expression level of reovirus was detected by qPCR

图5 NK细胞在中和抗体的存在下传递呼肠孤病毒到DLD-1细胞($n=3$)

Fig.5 NK cells deliver reovirus to DLD-1 cells in the presence of neutralizing antibodies ($n=3$)

2.6 呼肠孤病毒增强NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用

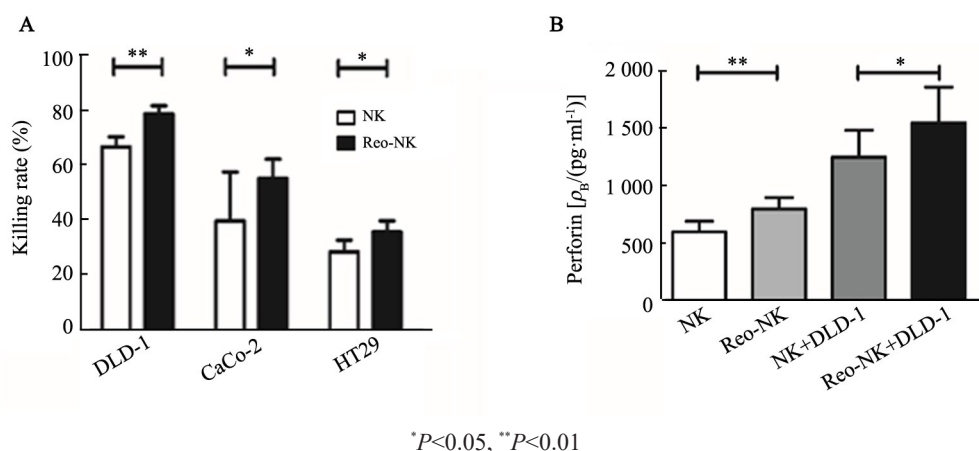
CCK-8法检测结果(图6A)显示,与NK细胞相比,Reo-NK细胞对KRAS基因突变型结直肠癌细胞株DLD-1的杀伤率明显升高[(79.38 \pm 2.90)% vs (67.29 \pm 3.64)%, $P < 0.01$],同样,Reo-NK细胞对KRAS基因野生型结直肠癌细胞株CaCo-2和HT29均表现出增强的杀伤效应($P < 0.05$)。ELISA检测结果显示(图6B),与NK组相比,Reo-NK组的穿孔素释放水平显著增高($P < 0.01$)。

3 讨论

结直肠癌是严重危及人类健康的常见恶性肿瘤之一^[10],其发病率和病死率在中国居高不下,传统的治疗包括手术、放疗、化疗以及靶向药物治疗等,然而这些方法对转移性结直肠癌患者疗效有限。溶瘤病毒作为肿瘤免疫治疗的新策略已成为当前的研究热点,有望通过直接溶瘤、调控肿瘤免疫耐受微环境以及激活机体的抗肿瘤免疫等方式来治疗转移性结直肠癌。临床研究^[11]发现,在肝转移的结直肠癌患者

接受手术前进行静脉注射呼肠孤病毒治疗, 粒细胞、血小板以及PBMC可在体内中和抗体存在的情况下, 将呼肠孤病毒传递到肿瘤部位发挥溶瘤作用。

因此, 为提高呼肠孤病毒的靶向性, 解决病毒在临床应用通过静脉给药时可能存在的抗体中和问题, 为其选择合适的运载细胞显得尤为重要。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Cytotoxicity assay of Reo-NK cells against colorectal cancer cells; E:T=1:1;

B: The level of perforin in supernatant was determined by ELISA

图6 呼肠孤病毒增强NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用($n=3$)

Fig.6 Reovirus enhances the cytotoxic effect of NK cells on colorectal cancer cells($n=3$)

文献^[12-13]报道LAK细胞和DC可作为呼肠孤病毒的细胞载体, 但是它们不具备直接攻击肿瘤细胞的能力或对肿瘤细胞的杀伤能力较弱, 且体外扩增DC较为困难。也有研究^[14]发现, 人单核细胞可将呼肠孤病毒与中和抗体形成的免疫复合物运送到黑色素瘤细胞, 且运送去有复制能力的呼肠孤病毒能导致大量的黑色素瘤细胞死亡。本课题组的前期研究^[15]结果证实, CIK细胞能在中和抗体的存在下将呼肠孤病毒传递给肿瘤细胞, 进而发挥病毒的溶瘤作用, 但是CIK细胞本身对肿瘤细胞的杀伤能力并不强, 效靶比高达20:1才有显著的杀伤效应。本研究发现, 在中和抗体的存在下, 体外扩增的NK细胞可将呼肠孤病毒传递到肿瘤细胞, 且传递后的呼肠孤病毒能够在肿瘤细胞内不断复制增殖, 导致肿瘤细胞溶破; 同时通过qPCR检测到肿瘤细胞内病毒的RNA表达量在不断升高, 说明NK细胞作为呼肠孤病毒的运载细胞可以保护呼肠孤病毒免受AB型血清中所含抗体的中和作用, 且传递后的呼肠孤病毒仍然具有溶瘤效应。同时, 体外扩增的NK细胞作为效应细胞也可直接攻击肿瘤细胞。本研究结果显示, NK细胞以1:1的效靶比即可对结直肠癌细胞发挥较强的杀伤作用。此外, 本课题组也将在体内实验中进一步验证NK细胞的肿瘤趋化性能否将呼肠孤病毒靶向运送到肿瘤部位, 以减少病毒被机体内其他组织或细胞吸附或被中和抗体中和而造成的丢失, 帮助呼肠孤病毒尽可能地聚集到肿瘤部位进而发挥溶瘤作用。

NK细胞无需抗原预先致敏, 可直接杀伤某些肿瘤细胞和病毒感染的细胞^[16], 其通常含有大量穿孔素(perforin)和颗粒酶B(granzyme B)。当NK细胞遇到靶细胞时, 可分泌穿孔素破坏细胞膜、随后释放颗粒酶发挥溶解杀伤作用^[17]; 另外, 活化的NK细胞还可以通过分泌TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子发挥抗菌和抗肿瘤作用, 这些细胞因子可以直接作用于靶细胞, 也可以通过激活其他种类的免疫细胞来攻击靶细胞^[18]。已有大量的临床试验^[19]将自体或异体来源的NK细胞用于黑色素瘤和白血病等多种肿瘤的治疗。研究^[20]发现, 呼肠孤病毒可在体外活化PBMC中的NK细胞, 通过促进NK细胞脱颗粒和释放更多的IFN- γ 来增强其对急性髓细胞性白血病细胞的杀伤作用。也有临床研究^[21]表明, 呼肠孤病毒可在体内上调转移性结直肠癌患者外周血中NK细胞活化分子CD69的表达, 从而增强机体的抗肿瘤免疫应答。本课题组的前期研究^[22]结果发现, 从外周血新鲜分离的NK细胞经呼肠孤病毒活化后, 在体内体外均对肿瘤细胞发挥较强的细胞毒作用。但是新鲜分离的NK细胞仅占外周血淋巴细胞的5%~15%^[23], 因此, 体外获得大量高纯度、高质量的NK细胞显得尤为重要。本研究通过激光共聚焦显微镜观察到体外扩增的NK细胞装载的呼肠孤病毒主要结合于细胞表面, 病毒装载后并不显著影响NK细胞的存活和功能; 相反, 呼肠孤病毒可直接活化NK细胞, 诱导其释放更多的穿孔素, 从而增强对结直肠癌细胞的细胞毒作用。

此外,本研究还发现Reo-NK细胞对KRAS基因突变型(DLD-1)和KRAS基因野生型(CaCo-2、HT29)的结直肠癌细胞均能发挥增强的杀伤作用。呼肠孤病毒选择性感染并破坏肿瘤细胞的分子机制与RAS信号通路的活化有着密切的关系,在RAS信号通路持续活化的肿瘤细胞中,呼肠孤病毒可以在细胞内不断复制,最终导致肿瘤细胞溶破并释放病毒,释放出的病毒继续感染周围的肿瘤细胞产生级联放大效应^[24]。大约40%~45%的结直肠癌患者存在KRAS基因突变,而呼肠孤病毒可选择性溶破KRAS基因突变的结直肠癌细胞^[25-26]。对于KRAS基因野生的结直肠癌细胞,呼肠孤病毒也可通过增强NK细胞的肿瘤杀伤能力从而发挥更强的抗肿瘤效应。因此,无论是KRAS基因突变还是野生型的结直肠癌患者,都能够从呼肠孤病毒联合NK细胞的治疗中获益。

综上所述,体外扩增的NK细胞适合作为呼肠孤病毒的运载细胞,在中和抗体的阻断下NK细胞可将呼肠孤病毒传递到肿瘤细胞继而发挥病毒的溶瘤作用,且呼肠孤病毒可进一步活化NK细胞,增强其对结直肠癌细胞的杀伤效应。本研究初步探讨了体外扩增的NK细胞运载呼肠孤病毒杀伤结直肠癌细胞的协同增效作用,为研究结直肠癌的联合治疗提供新的方法,具有重要的临床转化应用价值。

参考文献

- [1] JHAWAR S R, THANDONI A, BOMMAREDDY P K, et al. Oncolytic viruses-natural and genetically engineered cancer immunotherapies[J/OL]. *Front Oncol*, 2017, 7: 202[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5600978/>. DOI: 10.3389/fonc.2017.00202.
- [2] MARELLI G, HOWELLS A, LEMOINE N R, et al. Oncolytic viral therapy and the immune system: A double-edged sword against cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 866[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932159/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00866.
- [3] GONG J, SACHDEV E, MITA A C, et al. Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity [J]. *World J Methodol*, 2016, 6(1): 25-42. DOI: 10.5662/wjm.v6.i1.25.
- [4] BOURHILL T, MORI Y, RANCOURT D E, et al. Going (Reo)Viral: factors promoting successful reoviral oncolytic infection[J/OL]. *Viruses*, 2018, 10(8): E421[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116061/>. DOI:10.3390/v10080421.
- [5] SAMSON A, SCOTT K J, TAGGART D, et al. Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(422): eaam7577[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6276984/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aam7577.
- [6] SAMSON A, BENTHAM M J, SCOTT K, et al. Oncolytic reovirus as a combined antiviral and anti-tumour agent for the treatment of liver cancer [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 562-573. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312009.
- [7] MAHALINGAM D, FOUNTZILAS C, MOSELEY J, et al. A phase II study of REOLYSIN® (pelareorep) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(4): 697-703. DOI: 10.1007/s00280-017-3260-6.
- [8] 何志旭, 赵星. 溶瘤病毒抗肿瘤临床试验的回顾与展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(2): 119-124. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2014.02.001.
- [9] WALZER T, VIVIER E. G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(10): 486-492. DOI:10.1016/j.it.2011.05.002.
- [10] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- [11] ADAIR R A, ROULSTONE V, SCOTT K J, et al. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patients[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(138): 138ra77[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893925/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003578.
- [12] JENNINGS V A, ILETT E J, SCOTT K J, et al. Lymphokine-activated killer and dendritic cell carriage enhances oncolytic reovirus therapy for ovarian cancer by overcoming antibody neutralization in ascites [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(5): 1091-1101. DOI: 10.1002/ijc.28450.
- [13] ILETT E J, BARCENA M, ERRINGTON-MAIS F, et al. Internalization of oncolytic reovirus by human dendritic cell carriers protects the virus from neutralization [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2767-2776. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3266.
- [14] BERKELEY R A, STEELE L P, MULDER A A, et al. Antibody-neutralized reovirus is effective in oncolytic virotherapy[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(10): 1161-1173. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0309.
- [15] ZHAO X, OUYANG W W, CHESTER C, et al. Cytokine-induced killer cell delivery enhances the antitumor activity of oncolytic reovirus[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184816[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5602626/>. DOI:10.1371/journal.pone.0184816.
- [16] JUNG I H, KIM D H, YOO D K, et al. In vivo study of natural killer (NK) cell cytotoxicity against cholangiocarcinoma in a nude mouse model[J]. *In Vivo*, 2018, 32(4): 771-781. DOI:10.21873/invivo.11307.
- [17] CHESTER C, FRITSCH K, KOHRT H E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 601[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4667030/>. DOI:10.3389/fimmu.2015.00601.
- [18] PAUL S, LAL G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1124[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601256/>. DOI:10.3389/fimmu.2017.01124.
- [19] DAHLBERG C I, SARHAN D, CHROBOK M, et al. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and

- sustain anti-tumor activity[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 6: 605 [2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663254/>. DOI:10.3389/fimmu.2015.00605.
- [20] HALL K, SCOTT K J, ROSE A, et al. Reovirus-mediated cytotoxicity and enhancement of innate immune responses against acute myeloid leukemia[J]. *Biores Open Access*, 2012, 1(1): 3-15. DOI: 10.1089/biores.2012.0205.
- [21] EL-SHERBINY Y M, HOLMES T D, WETHERILL L F, et al. Controlled infection with a therapeutic virus defines the activation kinetics of human natural killer cells in vivo[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(1): 98-107. DOI: 10.1111/cei.12562.
- [22] ZHAO X, RAJASEKARAN N, CHESTER C, et al. Natural killer cells activated by oncolytic reovirus enhance cetuximab mediated antibody dependent cellular cytotoxicity in an in vitro and in vivo model of colorectal cancer[J/OL]. *Blood*, 2015, 126(23): 3439 [2019-02-23]. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/3439>.
- [23] MERKT W, STURM P, LASITSCHKA F, et al. Peripheral blood natural killer cell percentages in granulomatosis with polyangiitis correlate with disease inactivity and stage[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 337-347. DOI: 10.1186/s13075-015-0851-7.
- [24] ZHAO X, CHESTER C, RAJASEKARAN N, et al. Strategic combinations: the future of oncolytic virotherapy with reovirus[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(5): 767-773. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-15-0695.
- [25] MAITRA R, SEETHARAM R, TESFA L, et al. Oncolytic reovirus preferentially induces apoptosis in KRAS mutant colorectal cancer cells, and synergizes with irinotecan[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(9): 2807-2819. DOI: 10.18632/oncotarget.1921.
- [26] TWIGGER K, ROULSTONE V, KYULA J, et al. Reovirus exerts potent oncolytic effects in head and neck cancer cell lines that are independent of signalling in the EGFR pathway[J/OL]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 368[2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537694/>. DOI:10.1186/1471-2407-12-368.

[收稿日期] 2019-01-19

[修回日期] 2019-03-20

[本文编辑] 黄静怡