

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.005

· 基础研究 ·

靶向PSCA的CAR-NK-92细胞对宫颈癌的抗瘤作用

马欢, 张贤雨, 张飞, 李锦秋, 卢秀荣, 原娜, 郝晓慧, 张志林(河北北方学院附属第一医院 放疗科, 河北 石家庄 075000)

[摘要] **目的:** 构建并验证靶向前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的NK-92细胞对宫颈癌的抗瘤活性。**方法:** 构建PSCA靶向的CAR慢病毒表达载体, 利用慢病毒感染法获得PSCA CAR-NK-92细胞。用流式细胞术及Western blotting实验检测宫颈癌细胞中PSCA的表达水平。通过体外靶细胞共孵育实验以及体内裸鼠移植瘤模型中的治疗情况, 验证PSCA CAR-NK-92细胞对宫颈癌Hela及MS751细胞杀伤能力及其裸鼠移植瘤生长的抑制能力。**结果:** 成功构建PSCA CAR-NK-92细胞, PSCA在宫颈癌细胞中高表达(均 $P < 0.01$)。体外共孵育结果显示, PSCA CAR-NK-92细胞可以以剂量依赖的方式裂解PSCA⁺的宫颈癌细胞; 体内抗肿瘤数据表明, PSCA CAR-NK-92细胞较转染空载体的NK-92细胞显著抑制宫颈癌移植瘤的生长($P < 0.01$), 并且可以有效地浸润肿瘤组织并高水平分泌TNF- α 和IFN- γ (均 $P < 0.01$)。**结论:** 靶向PSCA的CAR-NK-92细胞在体内外都显示出了良好的对PSCA⁺肿瘤细胞的杀伤能力, 有潜力成为一种针对宫颈癌的潜在治疗策略。

[关键词] 前列腺干细胞抗原; 宫颈癌; NK-92细胞; 裸鼠移植瘤; 免疫治疗

[中图分类号] R737.33; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)12-1345-06

Antitumor activity of chimeric antigen receptor NK-92 cells targeting PSCA against cervical cancer

MA Huan, ZHANG Xianyu, ZHANG Fei, LI Jinqiu, LU Xiurong, YUAN Na, HAO Xiaohui, ZHANG Zhilin (Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Shijiazhuang 075000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To construct and verify the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor (CAR) modified NK-92 cells (CAR-NK-92 cells) targeting prostate stem cell antigen (PSCA) in cervical cancer. **Methods:** Lentiviral vector expressing CAR targeting PSCA was constructed, and PSCA CAR-NK-92 cells were obtained by lentivirus transfection. The expression of PSCA in human cervical cancer cells was determined by Flow cytometry and Western blotting. The killing effect of PSCA CAR-NK-92 cells against cervical cancer cells was verified by co-incubation of effector and target cells *in vitro*, and the tumor inhibitory ability of PSCA CAR-NK-92 cells was verified with the nude mice xenograft model *in vivo*. **Results:** PSCA CAR-NK-92 cells were successfully constructed. PSCA was highly expressed in human cervical cancer Hela and MS751 cells (all $P < 0.01$). *In vitro* co-incubation results showed that PSCA CAR-NK-92 cells could lyse PSCA⁺ cervical cancer transplanted tumor in a dose-dependent manner. *In vivo* anti-tumor data showed that PSCA CAR-NK-92 cells significantly inhibited the growth of cervical cancer cells compared with NK-92 cells transfected with vehicle vectors ($P < 0.01$). In addition, PSCA CAR-NK-92 cells could effectively infiltrate tumor tissues and promote the secretion of anti-tumor cytokines TNF- α and IFN- γ (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The CAR-NK-92 targeting PSCA shows good anti-tumor effect on PSCA⁺ tumor cells both *in vitro* and *in vivo*, and has potential to be a therapeutic strategy for cervical cancer.

[Key words] prostate stem cell antigen (PSCA); cervical cancer; NK-92 cell; transplanted tumor in nude mice; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1345-1350. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.005]

宫颈癌是女性第二常见的恶性肿瘤,其发病风险高峰或平台期大约在35~55岁^[1]。宫颈癌治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移,约26%的患者在治疗后2年发生转移,预后极差,2年生存率不足10%,因此急需新的治疗方案来扭转这一局面^[2-4]。自然杀伤(nature killer, NK)-92细胞是从NK细胞淋巴瘤患者中分离出来的具有特异性、增殖活性和长期的细胞毒性,可作为肿瘤细胞治疗产品^[5-6]。研究^[7-9]

[基金项目] 河北省卫生厅科研基金资助项目(No. 20190878)。Project supported by the Research Fund of Health Department of Hebei Province (No. 20190878)

[作者简介] 马欢(1983-),男,硕士,主治医师,主要从事宫颈癌、肺癌和结直肠癌的综合治疗研究, E-mail: hermesprayer@163.com

[通信作者] 张志林(ZHANG Zhilin, corresponding author), 硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事肿瘤的综合治疗研究, E-mail: 121051706@qq.com

表明, NK-92 细胞在体外可以杀死肿瘤细胞。为提高对靶细胞的特异性和细胞毒性, 使 NK-92 细胞表达针对肿瘤细胞靶抗原的嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 是一种可行的方案^[10]。CAR 由单链抗体与 CD8 穿膜区融合而成的胞外区和共刺激信号域 (CD28, CD137 等) 及 CD3 ζ 的胞内信号转导区组成^[11]。研究^[12]表明, 用 EpCAM-CAR-NK92 细胞在结直肠癌小鼠模型中展示出有效的靶向功能和强大的肿瘤细胞清除能力, EpCAM 抗原在大部分实体瘤中高水平表达。同样, 前列腺干细胞抗原 (prostate stem cell antigen, PSCA) 作为一种细胞表面蛋白, 在大多数实体瘤中都高表达, 可作为 CAR 识别靶点^[13]。本研究通过体内外抗肿瘤实验探讨靶向 PSCA 的 CAR-NK-92 细胞对高表达 PSCA 的宫颈癌细胞的杀伤作用, 旨在提供一种有效的宫颈癌治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂及实验动物

人宫颈癌细胞系 Hela、MS751、HCC94 细胞和人成巨核细胞白血病细胞株 MEG-01 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), NK-92 细胞购自上海细胞库。所有肿瘤细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, NK-92 细胞在含 10% 人 AB 血清的 X-vivo 15 培养基中培养。

Poly-brane 购自汉恒生物科技有限公司, BX795 购自索莱宝公司, LDH 试剂盒购自碧云天公司, 抗-CD56 免疫组化抗体购自美国 Abcam 公司, 抗-PSCA、抗-TNF- α 和抗-IFN- γ 流式抗体购自美国 Biolegend 公司, 增强型 ECL 试剂盒购自万类生物科技有限公司, GAPDH 一抗、山羊抗兔二抗均购自联科生物科技有限公司, IL-2、IFN- γ 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒购自联科生物科技有限公司。

6~8 周龄、雌性 BALB/c 裸鼠 (实验动物合格证号为 No.2019006010883) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 在河北北方学院实验动物研究中心饲养, 动物实验经河北北方学院医院动物护理和使用委员会批准。

1.2 PSCA CAR 载体的构建

CD8 α 信号肽、PSCA scFv、CD8 α 穿膜区、4-1BB 胞内结构域以及 CD3 ζ 信号域序列依次连接, 克隆至慢病毒表达载体 Lenti-puro。PSCA CAR 序列与载体中的 EGFP 序列通过 T2A 连接。对照载体仅含有 EGFP 序列。

1.3 PSCA CAR-NK-92 细胞的构建

在感染前 24 h 将 NK-92 细胞铺于 6 孔板中 (密度为 1×10^5 个/孔), 将细胞与慢病毒颗粒以 MOI 为 2 的

值进行混合, 添加 8 $\mu\text{g/ml}$ 的 poly-brane 以及 8 $\mu\text{mol/L}$ 激酶抑制剂 BX795, 在 32 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $1\ 800 \times g$ 离心 60 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 h, 通过 $360 \times g$ 离心 5 min 除去转染混合物, 更换新鲜的 X-vivo 15 完全培养基。第 2 天, 以相同的条件进行再次感染, 过夜培养。第 3 天进行第 3 次感染。此后, 通过流式细胞术检测绿色荧光的发光效率来评价感染效率。

1.4 流式细胞术检测 PSCA CAR-NK-92 细胞中 PSCA、TNF- α 和 IFN- γ 的表达水平

将各组细胞用 PBS 洗涤 3 次, 用抗 PSCA 的流式抗体对细胞进行标记, 避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 3 次后进行流式细胞术分析。对于 TNF- α 与 IFN- γ , 先对细胞进行透膜处理, 后加入抗 TNF- α 与抗 IFN- γ 进行细胞内抗原染色, 避光孵育后用 PBS 洗涤 3 次。所有样本在 LSR II 细胞仪上进行操作, 并用 Flowjo 流式细胞分析软件进行分析。

1.5 Western blotting (WB) 检测宫颈癌细胞中 PMCA 蛋白的表达

细胞裂解液裂解宫颈癌细胞后提取总蛋白, 并进行 BCA 定量。后进行 SDS-PAGE、转膜, 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 PSCA 一抗 (1:1 000) 并孵育过夜。次日, TBST 洗涤 3 次后, 加入山羊抗兔二抗 (1:15 000) 在室温下孵育 2 h 后, 加入 ECL 发光剂对 PVDF 膜进行处理, 用 ChemiDoc™ XRS+ 成像系统进行曝光, 以 GAPDH 为内参, 分析蛋白条带的灰度值。

1.6 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放法测定 PSCA CAR-NK-92 细胞对宫颈癌细胞的杀伤作用

将密度为 1×10^4 个宫颈癌细胞 Hela、MS751、HCC94 细胞以及 MEG-01 细胞铺于 96 孔板中, 以 20:1、10:1、5:1、1:1 的效靶比将效靶细胞 (效应细胞为感染空载体或 PSCA CAR 的 NK-92 细胞) 共孵育 24 h 后, 用 LDH 测定试剂盒检测上清液中 LDH 的含量以反映细胞毒性。通过酶标仪检测波长 490 nm 处的光密度 (D) 值来确定样品中的 LDH 活性。

1.7 ELISA 法检测细胞培养上清中 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 水平

取密度为 1×10^4 的 MS751 细胞铺于 96 孔板中, 以 10:1 的效靶比将效靶细胞共孵育 24 h。收集细胞上清, 根据 ELISA 检测试剂盒的方法, 检测 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 等细胞因子的含量。

1.8 裸鼠宫颈癌细胞皮下移植瘤模型的建立、治疗及观察

将密度为 5×10^6 个 MS751 细胞注射入裸鼠腋下, 分为 Vehicle NK-92 细胞和 PSCA CAR-NK-92 细胞两个治疗组, 每组 6 只小鼠。接种后约 7 d, 待到肿瘤生长至 80 mm^3 左右时, 经尾静脉注入 1×10^7 Vehicle

NK-92细胞和PSCA CAR-NK-92细胞,7 d后再通过尾静脉给予同样数量的Vehicle NK-92细胞和PSCA CAR-NK-92细胞,每3 d测量一次移植瘤的长、宽径,按公式 $[(长 \times 宽^2)/2]$ 计算体积。在第22天时处死裸鼠,解剖出移植瘤,拍照记录肿瘤大小并称瘤质量。同时,切取部分肿瘤组织块,经石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡后,进行免疫组织化学染色和流式细胞术检测。

用0.3% H_2O_2 -甲醇溶液处理组织切片30 min, PBS洗涤,4 °C下加入CD56一抗(1:50)孵育过夜。次日使用PBS洗涤后,将切片用羊抗兔二抗(1:1 000)在室温下孵育2 h。免疫组化染色用链霉亲和素/过氧化物酶复合物和二氨基联苯胺显色,并用苏木精复染。在倒置显微镜($\times 4$)的明场下观察CAR-NK-92细胞浸润情况,对每张切片的3个不同视野进行拍照。

1.9 统计学处理

流式细胞术、WB、LDH释放法、ELISA法等实验均重复3次。采用SPSS 19.0统计软件对所有实验数据进行统计学处理。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建PSCA CAR-NK-92细胞株

PSCA CAR的结构依次为CD8 α 信号肽、PSCA scFv、CD8 α 穿膜区、4-1BB胞内结构域以及CD3 ζ 信号域(图1)。

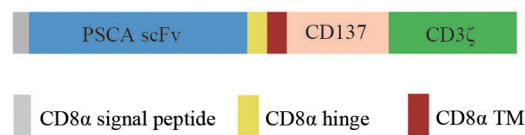


图1 PSCA CAR载体示意图

Fig.1 Schematic of the PSCA CAR carrier

流式细胞术检测结果(图2)显示,空载体转染NK-92细胞的阳性率为51.6%,PSCA CAR载体转染NK-92细胞的阳性率为41.9%($t=52.19, P < 0.05$)。结果表明,成功构建PSCA CAR-NK-92细胞株,可以用于后续的功能性实验。

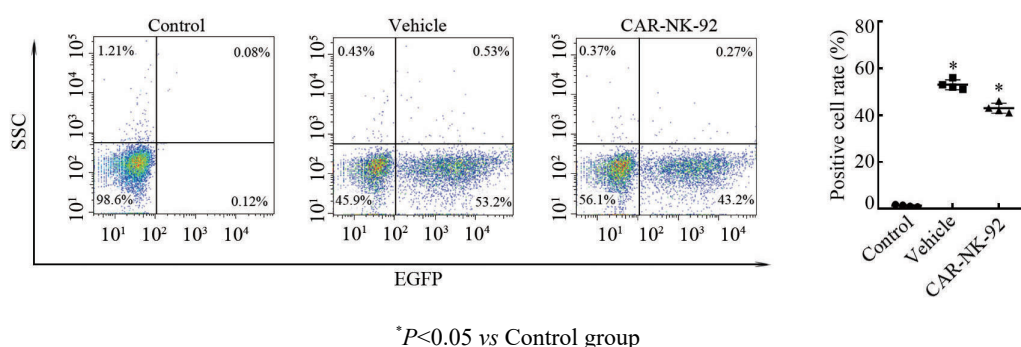


图2 流式细胞术检测工程化NK-92细胞阳性率

Fig.2 FACS was used to test positive rate of engineered NK-92 cells

2.2 PSCA在宫颈癌细胞系中的表达

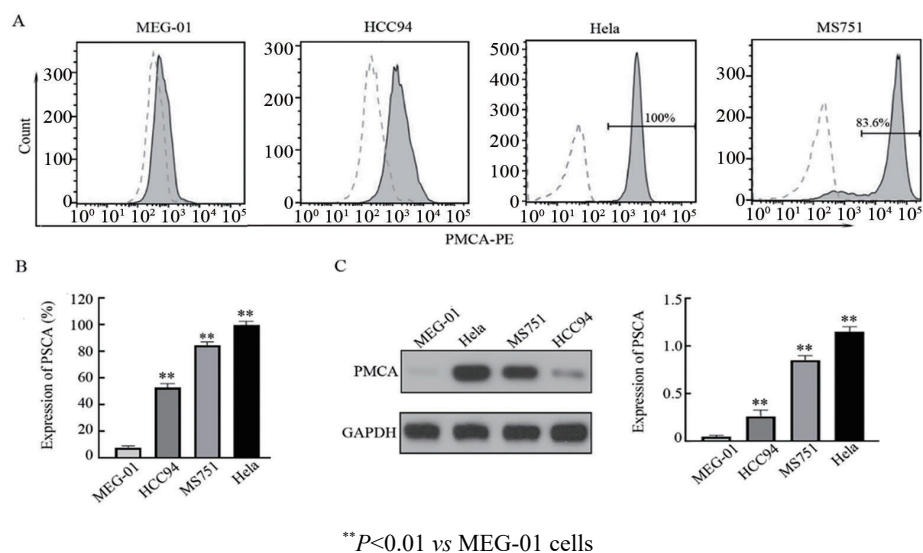
流式细胞术检测结果(图3A, B)表明,HeLa细胞及MS751细胞显著高表达PSCA($t=12.15, 23.18$, 均 $P < 0.01$),而HCC94细胞表面PSCA的表达水平相对较低($t=9.238, P < 0.01$),MEG-01细胞则不表达PSCA。WB实验结果(图3C)显示,HeLa、MS751细胞中PSCA显著高表达($t=57.22, 39.15$, 均 $P < 0.01$),而HCC94细胞中PSCA的表达水平相对较低($t=13.28, P < 0.01$),MEG-01细胞则不表达PSCA。这些结果确定了高表达PSCA的宫颈癌细胞系,后续体内实验选择MS751细胞作为靶细胞进行验证。

2.3 PSCA CAR-NK-92细胞可体外杀伤肿瘤细胞

选择HeLa、MS751、HCC94细胞及MEG-01细胞作

为靶细胞验证PSCA CAR-NK-92细胞的体外细胞毒作用。效靶细胞以不同的效靶比共孵育后,以靶细胞的存活情况表征细胞毒性,结果表明,PSCA CAR-NK-92细胞对靶细胞为PSCA阳性的宫颈癌细胞具有特异性的细胞毒性,且存在剂量依赖性($t=18.78, 67.26, 59.82$, 均 $P < 0.01$),而对于PSCA阴性的宫颈癌细胞,PSCA CAR-NK-92细胞的细胞毒性在任何剂量下都与对照组NK-92细胞比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图4A)。

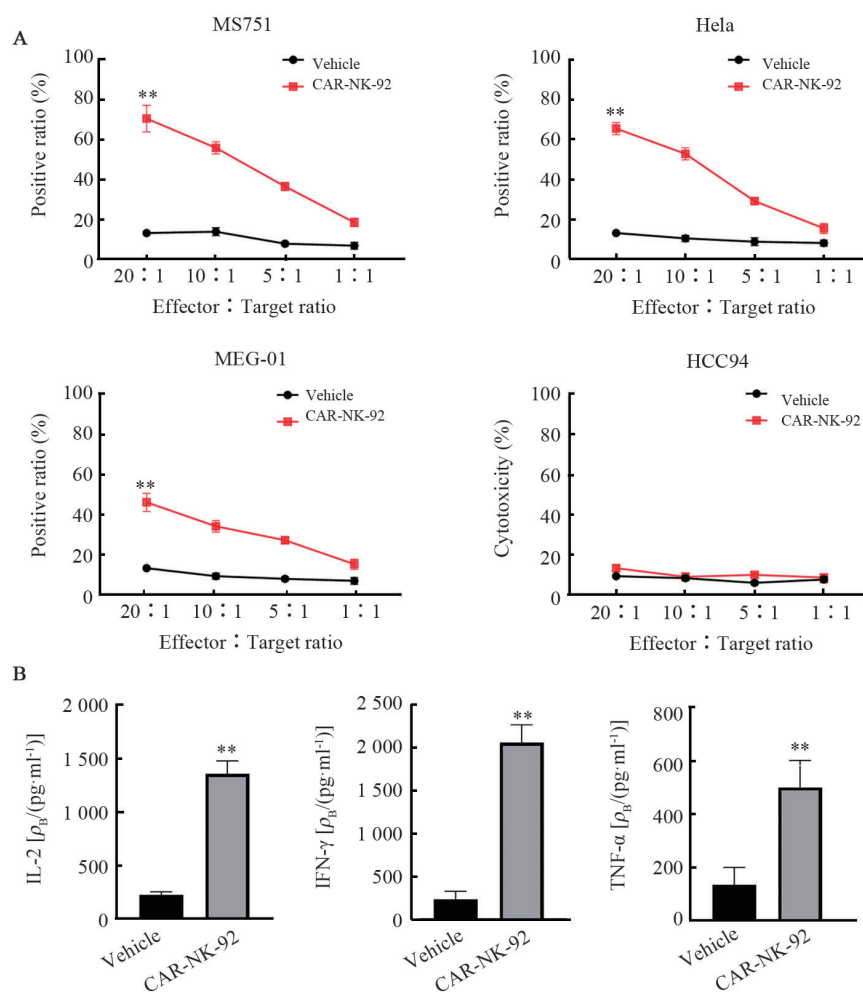
此外,选择MS751细胞作为靶细胞,验证了PSCA CAR-NK-92细胞的细胞因子分泌能力。结果显示,相较于Vehicle NK-92细胞,PSCA CAR-NK-92细胞分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的能力显著提升($t=182.60, 133.70, 37.53$, 均 $P < 0.01$;图4B)。



A and B: FACS was used to test PSCA expression in cervical cancer cells; C: WB was used to test PSCA expression in cervical cancer cells

图3 宫颈癌细胞中的PSCA表达分析

Fig.3 Analysis of PSCA expression in cervical cancer cells



** $P < 0.01$ vs Vehicle group

A: Cytotoxicity of CAR-NK-92 cells to target cells in different effector/target ratios; B: The secretion level of cytokines IL-2, IFN-γ and TNF-α in MS751 cells at an E:T ratio of 10:1

图4 CAR-NK-92细胞的体外抗肿瘤活性

Fig.4 *In vitro* antitumor activity of CAR-NK-92 cells

2.4 PSCA CAR-NK-92细胞显著抑制裸鼠宫颈癌细胞移植瘤的生长

宫颈癌MS751细胞移植瘤裸鼠模型实验结果表明,与NK-92细胞比较,PSCA CAR-NK-92细胞可以显著抑制MS751细胞移植瘤在体内的生长($t=73.55$,

$P<0.01$;图5A);PSCA CAR-NK-92细胞治疗组的荷瘤裸鼠的肿瘤质量显著低于NK-92细胞治疗组($t=89.65$, $P<0.01$;图5B)。实验结果表明,PSCA CAR-NK-92细胞可以在体内显著抑制宫颈癌细胞移植瘤的生长。

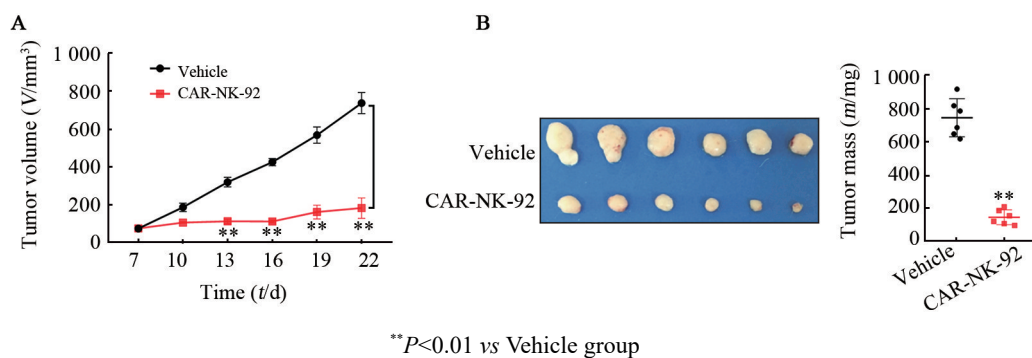


图5 PSCA CAR-NK-92细胞对裸鼠宫颈癌移植瘤生长的影响

Fig.5 Effect of PSCA CAR-NK-92 cells on the growth of cervical cancer cell transplanted xenograft in nude mice

2.5 肿瘤浸润PSCA CAR-NK-92细胞的效应功能

免疫组化染色结果(图6A)表明,肿瘤组织中PSCA CAR-NK-92细胞的浸润数目明显增多。流式细胞术检测结果(图6B)表明,分泌TNF- α 和IFN- γ 的PSCA

CAR-NK-92细胞比例明显提升($t=39.62$, $P<0.01$)。实验结果表明,PSCA CAR-NK-92细胞可以有效地浸润到肿瘤组织中,并且可以显著提高分泌TNF- α 和IFN- γ 的PSCA CAR-NK-92细胞的比例。

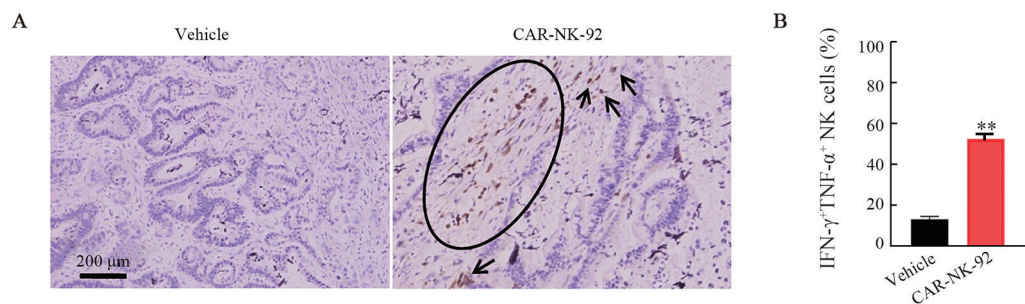


图6 裸鼠宫颈癌移植瘤组织中PSCA CAR-NK-92细胞的浸润程度

Fig.6 Infiltration of PSCA CAR-NK-92 cells in cervical cancer cell transplanted xenograft tissues in nude mice

3 讨论

临床上对复发转移性宫颈癌的治疗手段有限,患者2年生存率不足10%,因此迫切需要新的治疗策略^[4]。本研究结果表明,靶向PSCA的CAR-NK-92细胞在体内外都具有很强的特异性抗肿瘤活性,这种疗法是对CAR-T细胞疗法的一种替代选择。这些细胞具有持续和无限的增殖能力,以高效且经济的方式为患者提供“现成”的细胞治疗产品。

CAR-T细胞疗法被誉为抗肿瘤免疫疗法的重大突

破。这种方法的潜力已经在临床试验中得到证明,其中靶向CD19的CAR-T细胞对血液恶性肿瘤表现出了强大的临床效益,在很大比例的成人和儿童患者中观察到了完整和持久的疗效^[14]。当前研究的主要焦点是如何将CAR-T细胞疗法的成功延伸到实体瘤的治疗中^[15]。

PSCA是一种由123个氨基酸组成的糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定的细胞表面蛋白,在大多数实体瘤中都高表达,已经有针对PSCA的CAR-T细胞用来治疗前列腺癌和胰腺癌的临床前研究^[16],大都展现出强烈的抗肿瘤活性,然而

CAR-T细胞在治疗实体瘤的临床应用过程中的表现却不尽如人意。相较于T细胞、NK细胞具有重要的临床意义,因为它不会导致移植抗宿主疾病,因此异体NK细胞输注引起的治疗相关细胞毒性微乎其微^[17]。它们相对较短的存活期,也使得NK细胞比T淋巴细胞作为CAR的改装对象更加安全^[18]。因此,CAR修饰的NK细胞可以作为表达CAR-T细胞的一种补充治疗选择^[19]。到目前为止,对表达CAR的NK细胞在实体瘤中的临床前研究已经显示出良好的结果,目前有2项临床研究正在进行中。

本研究结果证明了靶向PSMA的CAR-NK-92细胞可以在体外特异性地杀伤宫颈癌细胞,裸鼠移植瘤模型也证明PSMA CAR-NK-92对肿瘤有很好的抑制作用,并显示出良好的肿瘤浸润能力以及在肿瘤组织中保持了良好的抗瘤活性。这些都为靶向PSCA的CAR-NK-92细胞应用于宫颈癌的临床治疗提供了很好的证据。此外,本研究还应该考虑几个限制性因素。首先,PSCA特异性CAR不识别裸鼠PSCA,在所采用的裸鼠移植瘤模型中无法评估CAR-NK-92细胞潜在的脱靶效应。其次,免疫力低下的小鼠缺乏一个功能正常的免疫系统来评估免疫微环境对CAR-NK-92细胞的抑制活性。这点可以在以后通过人源化免疫系统的小鼠模型进行评估。

综上所述,本研究成功构建了特异性靶向PSCA的CAR-NK-92细胞,并且证明其在体内外均能高效、特异地识别和杀伤PSCA阳性的宫颈癌细胞。因此,PSCA CAR-NK-92细胞有可能成为宫颈癌治疗的替代疗法。

[参 考 文 献]

- [1] CHAUHAN S R, BHARADWAJ M. Gearing up T-cell immunotherapy in cervical cancer[J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(2): 175-188. DOI: 10.1016/j.crrprobcancer.2018.04.001.
- [2] KAGABU M, NAGASAWA T, FUKAGAWA D, et al. Immunotherapy for uterine cervical cancer[J]. *Healthcare*, 2019, 7(3): 108. DOI: 10.3390/healthcare7030108.
- [3] RING K L, YEMELYANOVA A V, SOLIMAN P T, et al. Potential immunotherapy targets in recurrent cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2017, 145(3): 462-468. DOI:10.1016/j.ygyno.2017.02.027.
- [4] MAZA M, MELÉNDEZ M, HERRERA A, et al. Cervical cancer screening with human papillomavirus self-sampling among transgender men in El Salvador[J/OL]. *LGBT Health*, 2020, 7(4): 174-181[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7301324/>. DOI:10.1089/lgbt.2019.0202.
- [5] HODGINS J J, KHAN S T, PARK M M, et al. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3499-3510. DOI:10.1172/jci129338.
- [6] LORENZO-HERRERO S, LÓPEZ-SOTO A, SORDO-BAHAMONDE C, et al. NK cell-based immunotherapy in cancer metastasis[J]. *Cancers*, 2018, 11(1): 29. DOI:10.3390/cancers11010029.
- [7] SUCK G, ODENDAHL M, NOWAKOWSKA P, et al. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(4): 485-492. DOI:10.1007/s00262-015-1761-x.
- [8] ZHANG C C, OBEROI P, OELSNER S, et al. Chimeric antigen receptor-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for targeted elimination of cancer cells and induction of protective antitumor immunity[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 533[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5435757/>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00533.
- [9] 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.
- [10] AO X, YANG Y, LI W Q, et al. Anti-αFR CAR-engineered NK-92 cells display potent cytotoxicity against αFR-positive ovarian cancer [J/OL]. *J Immunother*, 2019, 42(8): 284-296[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6735933/>. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000286.
- [11] XU Q, HARTO H, BERAHOVICH R, et al. Generation of CAR-T cells for cancer immunotherapy[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1884: 349-360. DOI:10.1007/978-1-4939-8885-3_24.
- [12] ZHANG Q, ZHANG H X, DING J G, et al. Corrigendum to "combination therapy with EpCAM-CAR-NK-92 cells and regorafenib against human colorectal cancer models"[J/OL]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 2070562[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458869/>. DOI:10.1155/2019/2070562.
- [13] GU Z, THOMAS G, YAMASHIRO J, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2000, 19(10): 1288-1296. DOI:10.1038/sj.onc.1203426.
- [14] LABANIEH L, MAJZNER R G, MACKALL C L. Programming CAR-T cells to kill cancer[J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(6): 377-391. DOI:10.1038/s41551-018-0235-9.
- [15] GRAHAM C, HEWITSON R, PAGLIUCA A, et al. Cancer immunotherapy with CAR-T cells-behold the future[J/OL]. *Clin Med (Lond)*, 2018, 18(4): 324-328[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6334043/>. DOI:10.7861/clinmedicine.18-4-324.
- [16] MOHAMMED S, SUKUMARAN S, BAJGAIN P, et al. Improving chimeric antigen receptor-modified T cell function by reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of pancreatic cancer [J/OL]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 249-258[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363304/>. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.016.
- [17] POCKLEY A G, VAUPEL P, MULTHOFF G. NK cell-based therapeutics for lung cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20(1): 23-33. DOI:10.1080/14712598.2020.1688298.
- [18] AFOLABI L O, ADESHAKIN A O, SANI M M, et al. Genetic reprogramming for NK cell cancer immunotherapy with CRISPR/Cas9 [J/OL]. *Immunology*, 2019, 158(2): 63-69[2020-06-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6742769/>. DOI:10.1111/imm.13094.
- [19] ZHUANG X, LONG E O. Inhibition-resistant CARs for NK cell cancer immunotherapy[J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(12): 1078-1081. DOI:10.1016/j.it.2019.10.004.

[收稿日期] 2020-07-20

[修回日期] 2020-11-05

[本文编辑] 党瑞山