

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.003

靶向MUC16的嵌合抗原受体修饰的NK-92细胞对卵巢癌的抗肿瘤活性

王慧峰¹, 王海琳², 范颖芳¹, 王文娣¹, 高文娟¹, 王顺英¹ (1. 甘肃省庆阳市中医医院妇产科, 甘肃 庆阳 745000; 2. 甘肃省人民医院妇产科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探索靶向MUC16的嵌合抗原受体修饰的NK-92(CARNK-92)细胞对卵巢癌的抗肿瘤活性。**方法:**通过免疫组化法及流式细胞术检测庆阳市中医医院妇产科卵巢癌外科手术15例患者的肿瘤组织及4种卵巢癌细胞系中MUC16的表达情况。通过全基因合成的方法合成MUC CAR序列并构建重组慢病毒表达载体,利用慢病毒感染的方式制备靶向MUC16的CARNK-92细胞(MUC-BBz)。通过流式细胞术检测MUC-BBz中CD107a的表达,以LDH释放法检测该工程细胞的激活及对靶细胞SKOV3的细胞毒性。建立SKOV3细胞裸鼠移植瘤模型,用来检测MUC-BBz的体内抗肿瘤活性。**结果:**卵巢癌患者肿瘤组织及人卵巢癌细胞中都高表达MUC16。通过慢病毒感染NK-92细胞成功构建MUC-BBz,其阳性率为(42.79±2.58)%。MUC-BBz可以被过表达MUC16的肿瘤细胞特异性激活,与效靶细胞共孵育后,MUC-BBz中CD107a的表达量显著升高($P<0.01$)、细胞因子IFN- γ 以及穿孔素的分泌能力明显增加(均 $P<0.01$);LDH法检测显示,随着效靶比的增加,对4种卵巢癌细胞hey、COC1、SKOV3、A2780的杀伤作用均显著提高(均 $P<0.01$)。体内移植瘤模型实验结果显示,输注MUC-BBz可以显著抑制裸鼠体内SKOV3细胞移植瘤的生长($P<0.01$)。**结论:**构建的CARNK-92细胞可以在体内外显著抑制卵巢癌细胞的增殖,为进一步评估其临床治疗能力提供重要依据。

[关键词] 卵巢癌;SKOV3细胞;嵌合抗原受体;NK-92细胞;MUC16;干扰素- γ ;CD107a;穿孔素

[中图分类号] R737.31; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0232-07

Anti-tumor activity of chimeric antigen receptor modified NK-92 cells targeting MUC16 against ovarian cancer

WANG Huifeng¹, WANG Hailin², FAN Yingfang¹, WANG Wendi¹, GAO Wenjuan¹, WANG Shunying¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Qingyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingyang 745000, Gansu, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-tumor activity of MUC16-targeted chimeric antigen receptor modified NK-92 (CARNK-92) cells against ovarian cancer. **Methods:** The expression of MUC16 in surgically resected tumor tissues of 15 patients with ovarian cancer treated in the Department of Obstetrics and Gynecology of Qingyang Hospital of Traditional Chinese Medicine and 4 ovarian tumor cell lines was detected by Immunohistochemistry and Flow cytometry. MUC CAR sequence was synthesized by gene synthesis, and its lentivirus expression vector were constructed. CARNK-92 cells targeting MUC16 (MUC-BBz) were obtained by lentivirus infection. The expression of CD107a in MUC-BBz was detected by Flow cytometry. The activation of MUC-BBz cells and its cytotoxicity against SKOV3 target cells were characterized by the release of LDH assay. The xenograft nude mouse model of SKOV3 cells was established to verify the *in vivo* anti-tumor activity of MUC-BBz cells. **Results:** MUC16 was highly expressed in ovarian cancer tissues and human ovarian cancer cells. MUC-BBz was successfully constructed by infecting NK-92 cells with lentivirus, with a positive rate of (42.79±2.58)%. MUC-BBz could be specifically activated by MUC16 over-expressing tumor cells. After co-incubation of effector cells and target cells, the expression of CD107a on MUC-BBz was upregulated significantly ($P<0.01$), and the ability of MUC-BBz secreting cytokines IFN- γ and perforin also increased (all $P<0.01$). The LDH test indicated that with the increase of effector-target ratio, the cytotoxicity of MUC-BBz against 4 ovarian cancer cells (hey, COC1, SKOV3 and A2780) also significantly enhanced. The results of transplanted tumor model showed that transfusion of MUC-BBz could significantly inhibit the growth of SKOV3 xenograft in mice ($P<0.01$). **Conclusion:** The CARNK-92 cells can significantly inhibit the growth of ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*, which provides an important basis for further evaluation of its clinical application.

[Key words] ovarian cancer; SKOV3 cell; chimeric antigen receptor (CAR); NK-92 cell; MUC16; IFN- γ ; CD107a; Perforin

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 232-238. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.003]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81260387)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81260387)

[作者简介] 王慧峰(1976-),女,副主任医师,主要从事妇科肿瘤、内分泌与不孕不育的诊治及相关研究。E-mail:dingxianghua@163.com

[通信作者] 王海琳(WANG Hailin, corresponding author),主任医师,硕士生导师,主要从事妇科肿瘤及妇科内分泌疾病研究,E-mail:office@gsyy.cn

卵巢癌是全球发病率第六的癌症,也是女性癌症相关死亡排第七位的肿瘤^[1-2]。尽管可以实施手术和化疗等综合治疗的方法,但大多数卵巢癌患者预后较差^[3-4]。出于这个原因,迫切需要先进的方法来治疗这种疾病。供体来源的同种异体NK细胞通常用于过继癌症免疫治疗^[5]。在临床试验中,不断扩增的人NK-92细胞系已被安全地用于同种异体细胞治疗,在一些接受治疗的癌症患者中观察到了临床响应^[6-7]。与T细胞一样,NK-92细胞可以通过基因修饰表达嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR),识别肿瘤相关抗原,介导对肿瘤细胞的特异性识别和清除^[8]。此外,过继性回输CAR修饰的NK-92细胞可以克服肿瘤细胞对内源性NK细胞的耐受。黏蛋白是细胞内稳态和上皮表面保护的重要生物分子^[9]。MUC16是一种糖基化的黏蛋白,在大多数卵巢癌细胞上过度表达,是卵巢癌检测的标志物^[10]。由于该抗原仅在子宫、子宫内膜、输卵管、卵巢以及腹腔和胸腔的浆膜中低水平表达,因此MUC16是一种免疫治疗的潜在靶点^[11]。本研究首先分析了人卵巢癌组织及细胞中MUC16的表达水平。然后构建靶向MUC16的CAR NK-92细胞,并评估其在体外对卵巢癌细胞的杀伤能力以及对卵巢癌异种移植瘤体内的抗肿瘤活性,为进一步评估其临床治疗应用潜力提供依据。

1 材料与方法

1.1 组织样本、动物、细胞系及主要试剂

13例人卵巢癌组织及5例卵巢正常组织获取自庆阳市中医医院,所有患者均已签署患者知情同意书,研究方案和程序由医院伦理委员会批准。卵巢癌细胞hey、COCl、SKOV3、A2780均获取自ATCC,所有细胞用高糖DMEM培养基(额外添加10% FBS)在37℃、5%CO₂条件下培养。

Δ809和VSVG质粒获取自Addgene公司,RetroNectin购自TaKaRa公司(Otsu),polybrene购自上海汉恒生物科技有限公司,CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒购自Promega公司(美国),二氨基联苯胺染色试剂盒购自DAKO公司(美国),抗MUC16抗体购自Abcam公司(美国),FITC-MUC16及PE-CD107a抗体购自Biologend公司(美国),CD3ζ抗体购自Abcam公司(美国),APC-IFN-γ及BV421-Perforin抗体购自BD公司(美国)。6周龄左右的裸鼠购自北京生命河实验动物科技有限公司,实验动物使用合格证号[SYXK(京)2019-0007]。所有动物体内实验经过医院实验动物伦理委员会批准,批准编号:1711009。

1.2 构建MUC-CAR载体

MUC-CAR载体序列依次包含小鼠抗人MUC16 scFv片段、CD8铰链区和穿膜区,以及胞内信号域4-1BB和CD3ζ。CAR的全基因序列由金斯瑞生物科技有限公司(中国,南京)合成。然后,将DNA片段插入慢病毒载体pRRL-EGFP中,构建成pRRL-MUC-CAR-EGFP载体。MUC-CAR与EGFP之间由T2A肽连接。

1.3 包装MUC-CAR载体慢病毒

将质粒Δ809、VSVG和pRRL-MUC-CAR-EGFP导入293T细胞,制备慢病毒颗粒。分别在转染48和72 h时,在4℃、2 000×g下离心7 min收获病毒上清液。病毒上清液通过0.45 μm过滤器过滤后,在4℃、25 000×g离心2 h。弃上清,将沉淀颗粒重悬,体积为初始病毒上清液的1/100,保存在-80℃下。

1.4 重组慢病毒载体转染NK-92细胞

对于慢病毒感染,用RetroNectin包被24孔板,4℃过夜,然后在室温下用2%BSA封闭30 min。以每孔2×10⁵个NK-92细胞接种到24孔板中,加入8 μg的polybrene和慢病毒载体(MOI=5),在32℃和1 500×g条件下离心1.5 h。过夜培养后,再次重复感染方案。本研究中将转染针对MUC16的二代嵌合抗原受体的NK-92细胞命名为MUC-BBz,将转染对照载体的NK-92细胞命名为Vehicle。扩增数天后,获取MUC-BBz和Vehicle,用流式细胞仪(FACS Canto II, Becton-Dickinson,美国)检测鉴定。

1.5 流式细胞术检测工程细胞的组成、表型分子和分泌的细胞因子

在200 μl含2%牛血清白蛋白的PBS中将1×10⁶个卵巢癌细胞分别与FITC标记的小鼠抗人MUC16抗体或同型对照抗体共同孵育,4℃避光保存30 min,孵育结束后用PBS洗涤3次,之后上机用于检测卵巢癌细胞中MUC16的表达。对于Vehicle和MUC-BBz阳性率的检测,取3×10⁵个细胞,使用PBS洗涤3遍后,使用流式细胞仪检测EGFP的表达来表示阳性率。对于Vehicle和MUC-BBz上CD107a的检测,效靶细胞共孵育后收集悬浮的MUC-BBz或Vehicle,用PE标记的CD107a抗体4℃避光孵育30 min,洗涤和检测过程同肿瘤抗原检测。对于细胞因子IFN-γ以及穿孔素的检测,收集的MUC-BBz或Vehicle使用4%多聚甲醛固定30 min,之后用Triton-X破膜30 min,添加IFN-γ以及穿孔素抗体后室温避光孵育15 min, PBS洗涤3遍,用流式细胞仪进行检测。

1.6 WB检测工程细胞中CD3ζ的表达

取5×10⁶个细胞,在1×RIPA缓冲液和1×哺乳动物蛋白酶抑制剂中冰冻裂解15 min,10 000×g离心2 min。上清液和细胞裂解产物与6×SDS样品缓冲液

混合,进行12%SDS-PAGE。将分离的蛋白质样品转移到硝酸纤维素膜上,置于含有5%脱脂牛奶的TBS缓冲液中,室温下封闭60 min。加入抗CD3 ζ 抗体在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,次日用羊抗兔二抗室温孵育1 h,使用凝胶成像仪进行成像并分析其表达水平。

1.7 LDH法检测工程细胞对卵巢癌细胞的毒性强度

将 1×10^4 个工程靶细胞与效应癌细胞以1:1、5:1、10:1、20:1的效靶比在含有15 mmol/L HEPES和5% FBS的RPMI 1640中共培养4 h,用CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒测定培养上清液中LDH的释放。根据以下公式计算细胞毒性:细胞毒性=[(实验组释放-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放)/(靶细胞最大释放-靶细胞自发释放)] $\times 100\%$ 。

1.8 免疫组化检测卵巢癌组织中MUC16的表达

人卵巢癌组织及正常组织的石蜡切片脱蜡水合后,用3% H₂O₂-甲醇溶液清除内源性过氧化物酶活性,然后用1%牛血清白蛋白在室温下封闭30 min。封闭后的切片与抗MUC16单抗(1:100)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBST洗涤后,用过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)孵育45 min。切片用二氨基联苯胺染色试剂盒显色,然后用苏木精复染。DAB免疫染色切片用奥林巴斯显微镜(OLYMPUS IX71)进行拍照分析。免疫组化评分采用二级评分法^[12]:(1)阳性细胞百分比评分:没有阳性细胞计为0分;阳性细胞百分比 $<10\%$ 记为1分;阳性细胞百分比 $10\% \sim <50\%$ 计为2分,阳性细胞百分比 $50\% \sim <80\%$ 计为3分,阳性细胞百分比 $>80\%$ 计为4分;(2)组织染色强度评分:无着色(阴性)计为0分;淡黄色(弱染色)计为

1分;棕黄色(中等着色)计为2分;棕褐色(强着色)计为3分。最终的评分为上述两种评分的乘积。

1.9 移植瘤实验检测工程细胞体内抗癌作用

每只裸鼠右侧皮下注射 3×10^6 个SKOV3细胞,当瘤生长到皮下可触及的大小(第5天)时,将裸鼠按随机数字表随机分为3组($n=5$),分别尾静脉给予PBS、Vehicle及MUC-BBz(1×10^7 细胞/只)。用数字卡尺测量移植瘤的长度和宽度,用以下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积= $1/2$ 长度 \times 宽度²。实验结束时,用100% CO₂处死裸鼠,剥离肿瘤并拍照称质量。

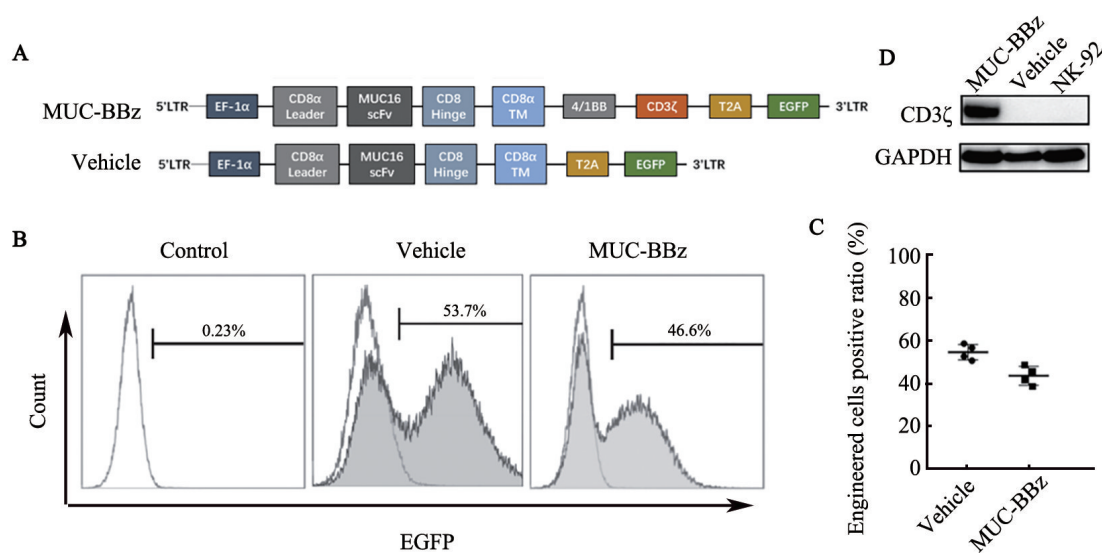
1.10 统计学处理

所有实验数据采用SPSS 19.0软件进行统计学处理。正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间样本比较采用 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MUC-BBz工程细胞

首先构建了靶向MUC16的二代嵌合抗原受体,同时构建了仅包含针对MUC16的二代嵌合抗原受体胞外区的对照载体(图1A)。分别将两种载体通过慢病毒感染的方式转染到NK-92细胞中,构建工程化细胞MUC-BBz。流式细胞术检测结果表明,Vehicle的阳性率平均为(51.66 ± 1.89)%,MUC-BBz的阳性率平均为(42.79 ± 2.58)%(图1B、C)。WB检测结果也表明,工程细胞MUC-BBz中存在CD3 ζ (图1D)。



A: Structure diagram of MUC16-specific CAR; B: Transfection efficiency of lentivirus in NK-92 cells; C: Transfection efficiency of CAR or Vehicle gene into NK-92 cells; D: Detection of CD3 ζ in engineered cells by WB

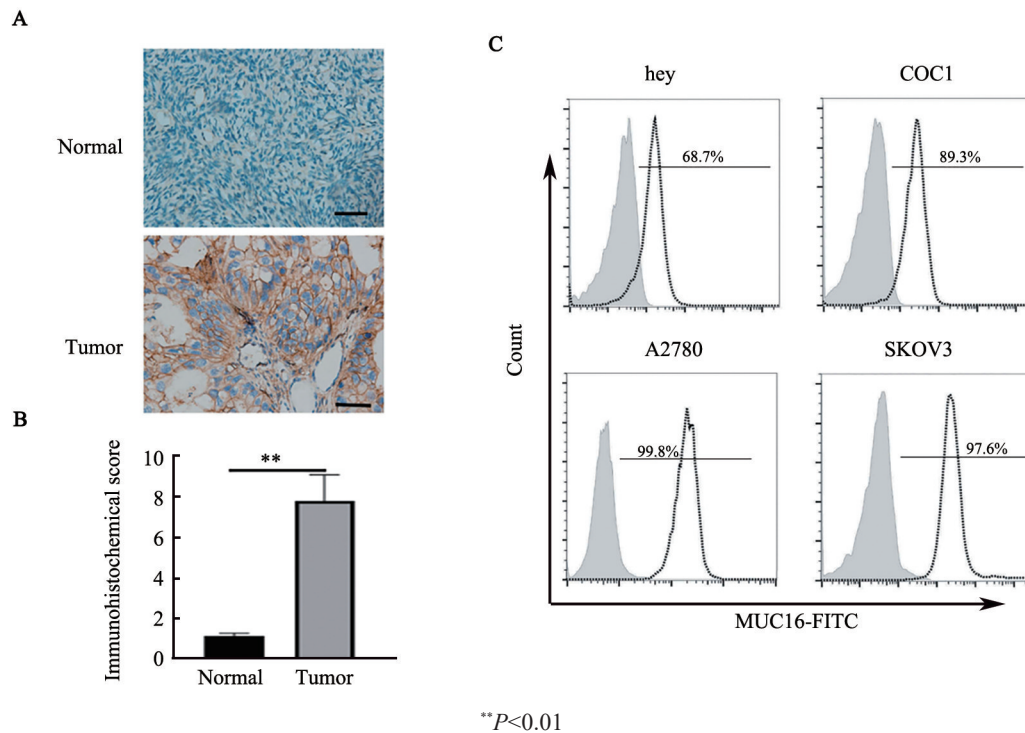
图1 MUC-BBz的构建和鉴定

Fig.1 Construction and characterization of MUC-BBz

2.2 卵巢癌组织及细胞中MUC16均呈高表达

收集13例卵巢癌患者的肿瘤组织及5例正常人卵巢组织,免疫组化法检测MUC16的表达情况,结果显示,肿瘤组织中显著高表达MUC16,而在正常组

织中MUC16表达量很低(图2A、B, $P < 0.01$)。此外,对人卵巢癌细胞中MUC16的表达情况进行了检测,流式细胞术结果表明,4种待检测的卵巢癌细胞均高表达MUC16(图2C)。



A, B: IHC analysis for tumor tissues and normal tissues (scalebar: 100 μm); C: FACS was used to test the surface expression of MUC16 protein in a series of human ovarian cell lines

图2 MUC16在卵巢癌组织和细胞系中的表达

Fig.2 MUC16 expression in ovarian cancer tissues and cell lines

2.3 MUC-BBz对卵巢癌细胞的细胞毒性

分别选取hey、COC1、SKOV3、A2780细胞作为靶细胞,以不同的效靶比将靶细胞共孵育,LDH法检测结果(图3)显示,随着效靶比的升高,效应细胞MUC-BBz对4种卵巢癌细胞的细胞毒性逐渐增强,而Vehicle只能对靶细胞产生轻微的细胞毒性。以上结果证明,MUC-BBz识别MUC16后显著增强对卵巢癌细胞的杀伤活性,并且这种杀伤功能具有剂量依赖性。

2.4 MUC-BBz细胞激活后细胞因子明显表达

选取SKOV3细胞作为靶细胞,与MUC-BBz共孵育后检测MUC-BBz表面激活表型分子CD107a及效应细胞因子IFN- γ 及穿孔素的表达情况。流式细胞术结果(图4)表明,MUC-BBz与靶细胞共孵育后,CD107a表达量较Vehicle显著升高($P < 0.01$)。MUC-BBz中的IFN- γ 及穿孔素表达量较Vehicle也显著提升(均 $P < 0.01$)。结果证明,MUC-BBz在体外可以被MUC16阳性的卵巢癌细胞充分激活,从而使其穿孔素和IFN- γ 分泌量明显增加。

2.5 MUC-BBz的体内抗肿瘤活性

用SKOV3细胞皮下接种裸鼠建立移植瘤模型,之后通过尾静脉回输MUC-BBz或Vehicle,观测肿瘤的生长状况。结果表明,MUC-BBz治疗组的裸鼠肿瘤生长较Vehicle治疗组显著缓慢(图5A, $P < 0.01$)。在第30天处死裸鼠,对肿瘤进行拍照及称质量,结果显示,MUC-BBz治疗组裸鼠肿瘤质量较Vehicle治疗组显著降低(图5B、C, $P < 0.01$)。结果证明MUC-BBz可以在体内抑制卵巢移植瘤的生长。

3 讨论

先前研究^[13]表明,携带ErbB2特异性二代CAR的NK-92细胞(CAR 5.28.z)具有持续的体外扩增能力,并且ErbB2-CAR可以触发NK-92细胞释放毒性颗粒,诱导靶细胞凋亡。CAR NK-92细胞的肿瘤细胞毒性依赖于靶抗原的识别。本研究所选择的MUC16抗原已被证明在许多人类癌症中过表达,包括乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌^[14]。虽然在子宫、子宫内膜、输卵管、卵巢以及腹腔和胸腔的浆膜中低水平表

达,但先前一项针对MUC16的CAR-T细胞的临床研究未表现出严重的不良反应^[15]。本研究通过将MUC-BBz与表达MUC16的卵巢癌细胞共孵育,结果发现MUC-BBz对高表达MUC16的hey、COC1、

SKOV3、A2780细胞的细胞毒性显著高于Vehicle,这表明MUC-BBz的确可以有效地杀伤过表达MUC16的卵巢癌细胞。

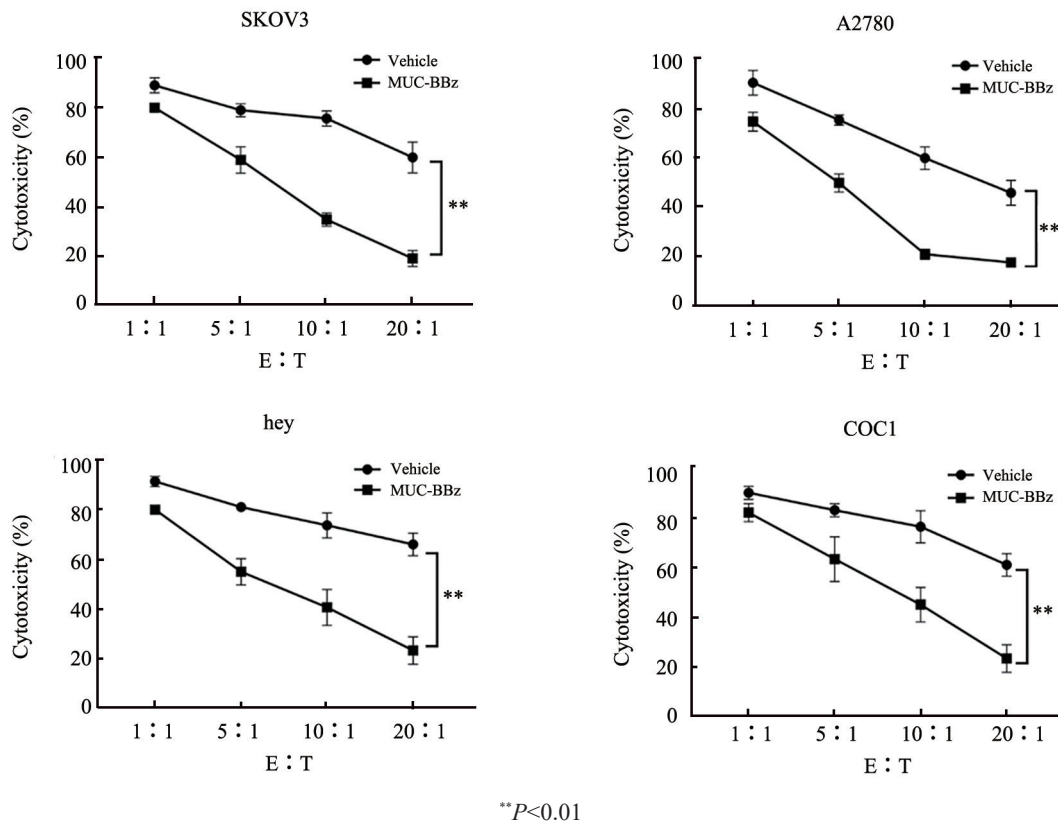
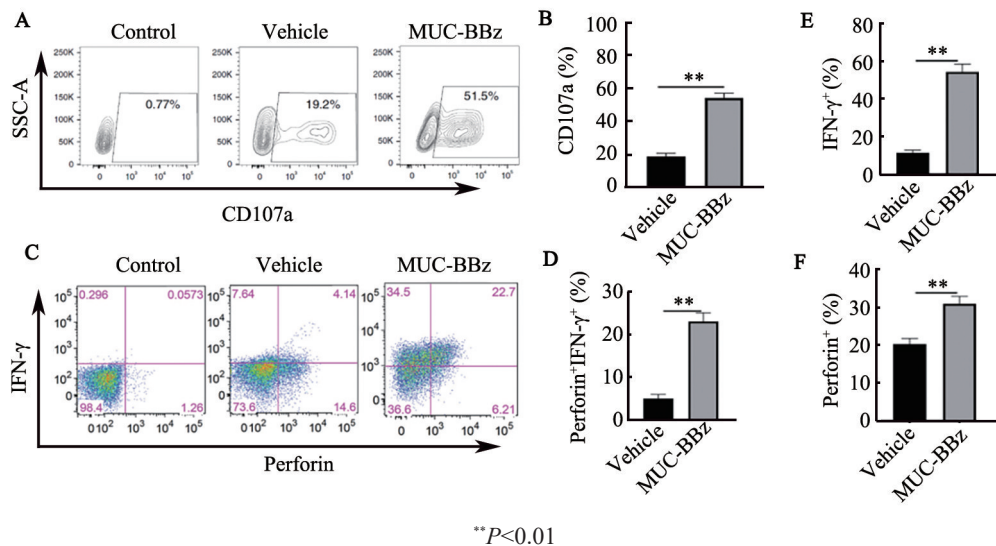


图3 MUC-BBz对MUC16阳性靶细胞的特异性细胞毒作用

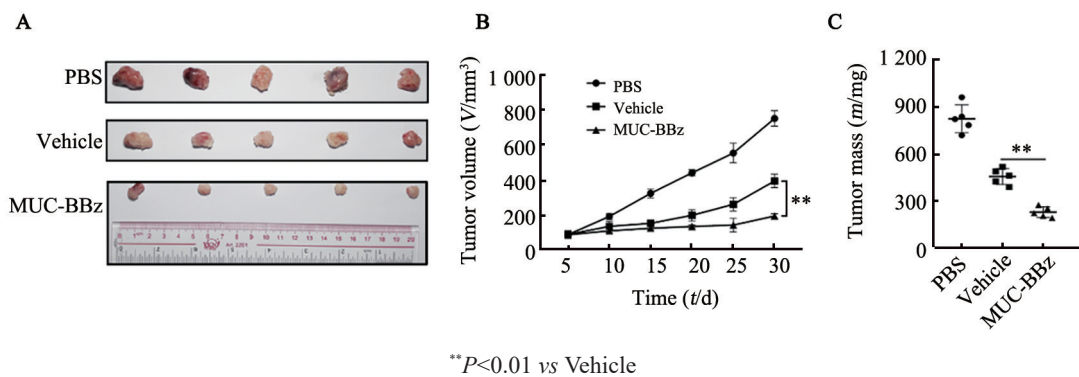
Fig.3 Specific cytotoxicity exhibited by MUC-BBz against MUC16-positive target cells



A: FACS was used to test the surface expression of CD107a; B: Quantification analysis for A; C: FACS was used to test the IFN-γ and Perforin expression; D-F: Quantification analyses for C

图4 MUC-BBz与SKOV3细胞共孵育后CD107a、IFN-γ和穿孔素水平明显增加

Fig.4 Secretion of CD107a, IFN-γ and perforin by MUC-BBz was significantly increased after co-incubation with SKOV3 cells



A: Images of tumor samples from sacrificed mice; B: The data of tumor volume; C: The data of tumor mass

图5 MUC-BBz对异种移植瘤的抗肿瘤效果

Fig.5 Antitumor efficacy of MUC-BBz against xenografts

CD19 CAR 修饰的 T 细胞在 B 细胞恶性肿瘤患者中的成功应用证明了这种方法在过继癌症免疫治疗中的潜力^[16]。然而,使用 CAR 修饰的 T 细胞治疗实体癌症仍然是一个挑战,部分原因是肿瘤微环境的免疫抑制效应^[17]。先前的一项临床前研究^[13]表明,在 CAR 介导的 NK-92 细胞激活后,其分泌促炎细胞因子,如 IFN- γ 、TNF- α 和巨噬细胞炎性蛋白-1 α ,除了直接的抗肿瘤作用以外,还可以通过激活旁观者免疫细胞来增强内源性抗肿瘤免疫,回输 NK-92/5.28.z 的小鼠经过二次接种肿瘤细胞后并不能生成肿瘤,证明其产生了持久的内源性抗肿瘤免疫活性。通过 NK 细胞治疗激活内源性抗肿瘤免疫在临床环境中可能也很重要。NK 细胞可诱导 DC 活化,清除耐受的未成熟的 DC^[18-19]。结合 NK 细胞介导的肿瘤细胞直接裂解,释放的肿瘤相关抗原可增强肿瘤微环境中的抗原提呈,激活肿瘤部位的抗肿瘤免疫反应,将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”,进而克服免疫抑制效应^[20]。癌症患者的 I 期临床试验证明,输注经过辐照的 NK-92 细胞是安全的,部分患者取得了临床响应^[21]。因此,基于 NK 细胞杀伤实体瘤的卓越功能,以及相较于 T 细胞更好的安全性,CAR-NK 细胞可能成为 CAR-T 细胞疗法的重要补充。

本研究构建了针对 MUC16 的 CAR NK-92 细胞,该工程细胞在体内外均展示了对 MUC16 阳性的卵巢癌细胞及其移植瘤具有强烈的抑制活性,同时 MUC-BBz 还展现出了抗原依赖性的激活能力,在识别肿瘤细胞表面的 MUC16 后可以促进分泌 IFN- γ 以及穿孔素,其中穿孔素可以直接介导肿瘤细胞的裂解,而 IFN- γ 则可以进一步调节抗肿瘤免疫反应。相较于 CAR-T 细胞,MUC-BBz 在体外具有持续的增殖能力,表明这种疗法可能是一种获取途径容易、成本较低的免疫细胞疗法。此外,本研究也存在一定的局限性,MUC-BBz 的体内不良反应并没有进行有效评估,需要进行后续系统性的研究。综上,本研究构

建的 MUC-BBz 在体内外都展现出对卵巢癌的杀伤活性,该疗法可能为卵巢癌的治疗提供一种潜在的策略。

[参考文献]

- [1] ETZERODT A, MOULIN M, DOKTOR T K, et al. Tissue-resident macrophages in momentum promote metastatic spread of ovarian cancer[J]. *J Exp Med*, 2020, 217 (4): 163-168. DOI: 10.1084/jem.20191869.
- [2] PENSON R T. Platinum-sensitive ovarian cancer: Liminal advances [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21 (5):614-615.DOI:10.1016/S1470-2045(20)30178-9.
- [3] HAINES I E, GABOR MIKLOS G L. Parp inhibitors in ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (16):1573-1579.DOI:10.1056/NEJMc2000644.
- [4] O'BRIEN K M, TWOROGER S S, HARRIS H R, et al. Association of powder use in the genital area with risk of ovarian cancer[J]. *JAMA*, 2020, 323 (1):49-59.DOI:10.1001/jama.2019.20079.
- [5] MEHTA R S, RANDOLPH B, DAHER M, et al. NK cell therapy for hematologic malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2018, 107 (3):262-270. DOI:10.1007/s12185-018-2407-5.
- [6] ROMANSKI A, UHEREK C, BUG G, et al. CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20 (7): 1287-1294. DOI: 10.1111/jcmm.12810.
- [7] TANG X, YANG L, LI Z, et al. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: Safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8 (6):1083-1089. DOI: 10.1007/s11899-018-0470-x.
- [8] PINZ K G, YAKABOSKI E, JARES A, et al. Targeting T-cell malignancies using anti-CD4 CAR NK-92 cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (68):112783-112796.DOI:10.18632/oncotarget.22626.
- [9] FELDER M, KAPUR A, GONZALEZ BOSQUET J, et al. MUC16 (CA125): Tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13 (2):129-133. DOI:10.1186/1476-4598-13-129.
- [10] GUBBELS J A, BELISLE J, ONDA M, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors[J]. *Mol Cancer*,

- 2006, 5(1): 50-55. DOI:10.1186/1476-4598-5-50.
- [11] SCHNEIDER J R, SHEN X, ORLANDI C, et al. A MUC16 IgG binding activity selects for a restricted subset of IgG enriched for certain simian immunodeficiency virus epitope specificities[J]. *J Virol*, 2020, 94 (5): 69-75. DOI:10.1128/JVI.01246-19.
- [12] 何华. 如何正确地对免疫组化结果进行半定量评分[J]. *中外健康文摘·临床医师版*, 2008, 5(7): 162-162.
- [13] 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*, 2014, 3 (2):39-42. DOI:10.1002/jca.21776.
- [14] BELISLE J A, HORIBATA S, JENNIFER G A, et al. Identification of siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9 (5): 118. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.146852.
- [15] KONERU M, O'CEARBHAILL R, PENDHAKAR S, et al. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(Ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer[J]. *J Transl Med*, 2015, 13 (7): 102-110. DOI: 10.1038/mt.2014.219.
- [16] ANNEN K, ZUBAIR A, SCHWARTZ E, et al. What's in your CAR-T? Clinical insights on challenges in mononuclear cell collection for CAR-T therapy[J]. *J Clin Apher*, 2020, 73 (6): 107-110. DOI: 10.3390/cancers11010055.
- [17] ONG Z Y, MCNALLY G P. CART in energy balance and drug addiction: Current insights and mechanisms[J]. *Brain Res*, 2020, 1740 (6):146852-146858. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-18-0317.
- [18] BARROW A D, COLANNA M. Exploiting NK cell surveillance pathways for cancer therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (1):57-59. DOI:10.1007/s12185-017-2379-x.
- [19] LEE J, KANG T H, YOO W, et al. An antibody designed to improve adoptive NK-cell therapy inhibits pancreatic cancer progression in a murine model[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7 (2):219-229. DOI: 10.1186/1476-4598-9-118.
- [20] VAN ELSEN C, CIUREA S O. NK cell therapy after hematopoietic stem cell transplantation: Can we improve anti-tumor effect?[J]. *Int J Hematol*, 2018, 107 (2):151-156. DOI:10.1186/s12967-015-0460-x.
- [21] ZHU L, LI X J, KALIMUTHU S, et al. Natural killer cell (NK-92MI)-based therapy for pulmonary metastasis of anaplastic thyroid cancer in a nude mouse model[J]. *Front Immunol*, 2017, 8 (2):816-820. DOI:10.3389/fimmu.2017.00816.
- [收稿日期] 2020-11-02 [修回日期] 2021-02-05
[本文编辑] 沈志超