

一种体外扩增NK细胞的新方法

于明晓^{1,2}, 胡田田², 张 颢^{3*}, 陶艳玲^{2*}

¹济宁医学院, 山东 济宁

²济宁医学院附属医院儿科血液科, 山东 济宁

³济宁医学院附属医院血液科, 山东 济宁

收稿日期: 2022年9月16日; 录用日期: 2022年10月5日; 发布日期: 2022年10月13日

摘 要

目的: 验证一种新型、尚未报道的体外扩增原代NK细胞的方法, 同时检测其杀伤活性。方法: 采集6位健康志愿者的静脉血共6份, 分离外周血单个核细胞。自然杀伤(NK)细胞诱导培养试剂培养14天。利用流式细胞术检测NK细胞所占比例, 将K562、THP-1细胞作为靶细胞并用CFSE标记, 以效靶比2:1加入扩增后的NK细胞, 利用流式细胞术检测靶细胞凋亡。结果: 通过14天的细胞培养, 利用自然杀伤(NK)细胞诱导培养试剂培养的NK细胞扩增约300倍。NK细胞纯度达50%左右。体外杀伤实验结果显示, 扩增后的NK细胞与靶细胞共培养4 h杀伤能力可达40%以上。结论: 此种方法扩增的NK细胞其纯度较高, 但是因为缺乏其余免疫细胞提供的支撑作用, 所以最终NK细胞的扩增倍数并不理想, 但其操作简单, 花费低, 安全性高, 可靠性强。

关键词

NK细胞, 单个核细胞, 扩增, 杀伤活性

A Novel Method for Expanding NK Cells *in Vitro*

Mingxiao Yu^{1,2}, Tiantian Hu², Hao Zhang^{3*}, Yanling Tao^{2*}

¹Jining Medical University, Jining Shandong

²Department of Pediatric Hematology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

³Department of Hematology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

Received: Sep. 16th, 2022; accepted: Oct. 5th, 2022; published: Oct. 13th, 2022

Abstract

Objective: To verify to expand human NK cells *ex vivo* by using a novel and unreported method and

*通讯作者。

文章引用: 于明晓, 胡田田, 张颢, 陶艳玲. 一种体外扩增 NK 细胞的新方法[J]. 临床医学进展, 2022, 12(10): 9059-9064. DOI: 10.12677/acm.2022.12101310

to detect its killing activity. **Methods:** Mononuclear cells were isolated from 6 samples of peripheral blood from six healthy donors. Natural killer cell induction culture kit was used to culture NK cells from each sample separately for 14 days. The proportion of NK cells was detected by flow cytometry. The K562 and THP-1 cells were used as the targeting cells and the expanded NK cells were added at an effect target ratio of 2:1, and the apoptosis of AML cells was detected by flow cytometry. **Results:** After 14 days of cell culture, the number of NK cells obtained by natural killer cell induction culture kit for NK cells expanded by 300 times and the ratio of NK cells was about 50.00%. The results of cytotoxicity experiment *in vitro* showed that the killing ability of NK cells cultured could reach more than 40% when co-cultured with target cells for 4 h. **Conclusion:** New NK cell culture method using natural killer cell induction culture kit can expand NK cells efficiently and the operation is simple, low cost, high safety and reliability.

Keywords

NK Cells, Mononuclear Cells, Amplification, Killing Activity

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

目前许多免疫疗法都旨在增强 NK 细胞对造血系统恶性肿瘤的细胞毒性作用[1]。最先进的技术已经揭示了 NK 细胞在安全性和靶向非肿瘤效应方面的显著优势, 所以 NK 细胞被认为是 CAR 修饰 T (CAR-T) 细胞的替代物[2], 用于治疗血液系统恶性肿瘤和实体瘤。目前存在许多 NK 细胞的培养方法[3] [4] [5], 最开始的试验中, 借助免疫磁珠的方法将血液中所含有的 NK 细胞(CD3-/CD56+)单独分离出, 再使用无血清培养液(其中含自体血浆 + IL-2 又或其余细胞因子)进行扩增 NK 细胞。此种方法扩增的 NK 细胞其纯度较高, 但是因为缺乏其余免疫细胞提供的支撑作用, 所以最终 NK 细胞的扩增倍数并不理想。另外, 利用免疫磁珠对 NK 细胞提纯, 花费高, 同时需要特殊的设备仪器, 使得 NK 细胞难以在临床中应用[6]。近期, 许多研究利用单个核细胞进行扩增培养 NK 细胞, 同时将 K562 细胞用作其滋养层。但是 K562 细胞为白血病细胞的一种, 在检测 NK 细胞的杀伤活性时常用作靶细胞, 并且, K562 细胞所分泌的微囊能够导致正常的造血细胞发生恶变[7]。所以, 将 K562 细胞用作滋养层, 阻碍其临床使用的最大障碍便是安全问题, 特别是长期的安全性不能得到保证。目前研究较多的方法还包括纯细胞因子诱导法, 将 IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, IL-18 等细胞因子添加至培养扩增 NK 细胞的过程之中, 但是, 该培养方法的稳定性较差[8], 常常由于个体差异导致结果相差甚远, 达不到临床试验所要求的标准。所以如何获得高纯度和高活性的大规模临床级 NK 细胞, 成为以 NK 细胞为基础的肿瘤免疫治疗的最主要障碍[9]。在此, 我们对一种新型的、以往文献中尚未报道的原代 NK 细胞扩增和培养方法进行了验证, 探讨其扩增 NK 细胞的能力。

2. 材料和方法

2.1. 主要试剂与仪器

自然杀伤细胞诱导培养试剂(其中包括 NK 细胞无血清培养基、NK 细胞激活剂、NK 细胞活化剂达科为, 深圳), 胰蛋白酶(北京, 索莱宝), Ficoll 分离液(北京, 索莱宝)。抗人 CD3 抗体(美国 BioLegend), 抗人 CD56 抗体(美国 BioLegend), 自体血浆, PE-Annexin V/7AA 凋亡检测试剂盒(美国 BioLegend)。低

温高速离心机(Thermo 美国),水浴锅(Fisher 美国),超净工作台(中国海尔),流式细胞仪(Becton-Dickinson, USA),光学显微镜(Olympus Jpan),细胞培养箱(Thermo Germany)。

2.2. 实验对象

选取济宁医学院附属医院工作的健康志愿者 6 人,年龄为 20~26 岁(中位年龄 23 岁),其中 2 例男志愿者,4 例女志愿者,为入选的每位志愿者进行无菌采外周血 20 ml,抗凝管均为肝素钠,进行采血前每位志愿者均签署了《知情同意书》;在外周血采集之后 4 小时内开始进行试验。每位志愿者的血标本单独处理并获得一次独立的实验结果,此次研究获得本医院伦理委员会的批准(JYHL2018FZD004)。

2.3. 外周血单核细胞的分离

首先使用 75%的酒精消毒含有所需实验标本的抗凝管外部,而后将抗凝管转移到经过紫外线消毒 30 min 的超净操作台内,取 50 ml 离心管,将 10 ml 淋巴细胞分离液加至 50 ml 离心管内,50 ml 离心管倾斜约 30°,将外周血贴着管壁慢慢的加入,使外周血能够浮在淋巴细胞分离液的表面,防止加样速度过快,避免血液和淋巴分离液混合。室温下 2500 rpm,离心 15 分钟,离心结束之后,可以清楚的观察到离心管的分至 4 层:从上到下分别为血浆、白膜层(亦即单个核细胞)、淋巴细胞分离液层以及红细胞层,首先吸取最上层淡黄色透明的血浆于新的 15 ml 无菌离心管内,封口膜封口,56°C 水浴锅内灭活 30 分钟,1000 g 离心 10 分钟取上清制得热灭活的自体血浆。随后将白膜层小心的吸取到新的无菌离心管内。在无菌管内加入 PBS 将细胞洗涤 2 次,3000 rpm,5 min。

2.4. NK 细胞的扩增和培养

将新鲜分离的 5×10^6 个单个核细胞接种至 T25 培养瓶中,培养瓶内加入 6 mL NK 细胞扩增培养基(加入 NK 细胞活化剂),600 μ l 热灭活自体血浆(所占比例为培养基体积的 10%),同时加入 12 μ l NK 细胞激活剂(每 ml 培养基 2 μ l 激活剂)。放入培养箱内(条件为 37°C,5% CO₂)进行培养。

第 3 天,显微镜下观察细胞状态,若细胞已开始形成克隆团,进行等体积补液(6 ml NK 细胞扩增培养基,600 μ l 热灭活自体血浆)。D5 天起,每两天进行 1 次取样计数,根据细胞的密度(调整 NK 细胞密度为每 ml $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ 个)决定补加 NK 细胞扩增培养基的量,此时血浆浓度可降为 5%。D7 天之后,所加培养基内的热灭活自体血浆浓度可以降低到 1%。14 天为 1 个培养周期。

2.5. 检测 NK 细胞的纯度

在第 0、5、7、11、14 天分别收集细胞于 1.5 ml EP 管内,通过流式细胞数检测 CD3、CD56 标志物。将收集的细胞进行离心、PBS 洗涤后,用 100 μ l PBS 将细胞重悬,注意操作轻柔,随后加入 3 μ l CD3、CD56 抗体,轻轻的吹打使之充分混匀,4°C 冰箱内避光孵育 30 min。进行孵育抗体时,间隔 5 分钟震荡离心管,使得细胞和抗体能够充分的接触。30 min 后,向 EP 管内加入 200 μ l PBS。而后应用流式细胞仪进行检测,收集分析 20,000 个细胞,扩增 NK 细胞的纯度等于 CD3- CD56+所占总细胞的比例。

2.6. 检测 NK 细胞的杀伤能力

将培养 14 天的 NK 细胞收集作为效应细胞,K562、THP-1 细胞作为靶细胞。首先使用荧光染料 CFSE 对靶细胞进行标记,用 1640 培养液(10% GIBCO 血清)将细胞浓度调整至 6×10^5 /mL。按照效靶比 2:1 加入相对应数量的 NK 细胞;每个孔均设置了相同的 3 个复孔,放置于 37°C,5% CO₂ 培养箱内孵育 4 小时。4 小时结束之后,细胞全部收集,离心、PBS 洗涤后,用 100 μ l Binding Buffer 重悬细胞,而后将 3 μ l Annexin V 以及 7-AAD 加至每管中,室温下避光孵育 15 分钟,孵育结束之后再向管内加入 200 μ l Binding Buffer,

准备应用流式细胞仪进行检测，同时分析数据。

3. 结果

3.1. NK 细胞生长增殖情况

在 NK 细胞体外培养过程中收集细胞，利用流式细胞术进行分析。结果表明，体外培养 14 天时 NK 细胞比例可达 $50.12\% \pm 6.05\%$ ，细胞数量由 5×10^6 个增至 $1.0 \sim 3.0 \times 10^9$ 个，扩增约 300 倍，其中第 5~11 天，NK 细胞增长速度最快。并且应用此种方法并不会导致 CD3 阳性 T 细胞的扩增，同时细胞保存着良好的生存状态。详见图 1~3。

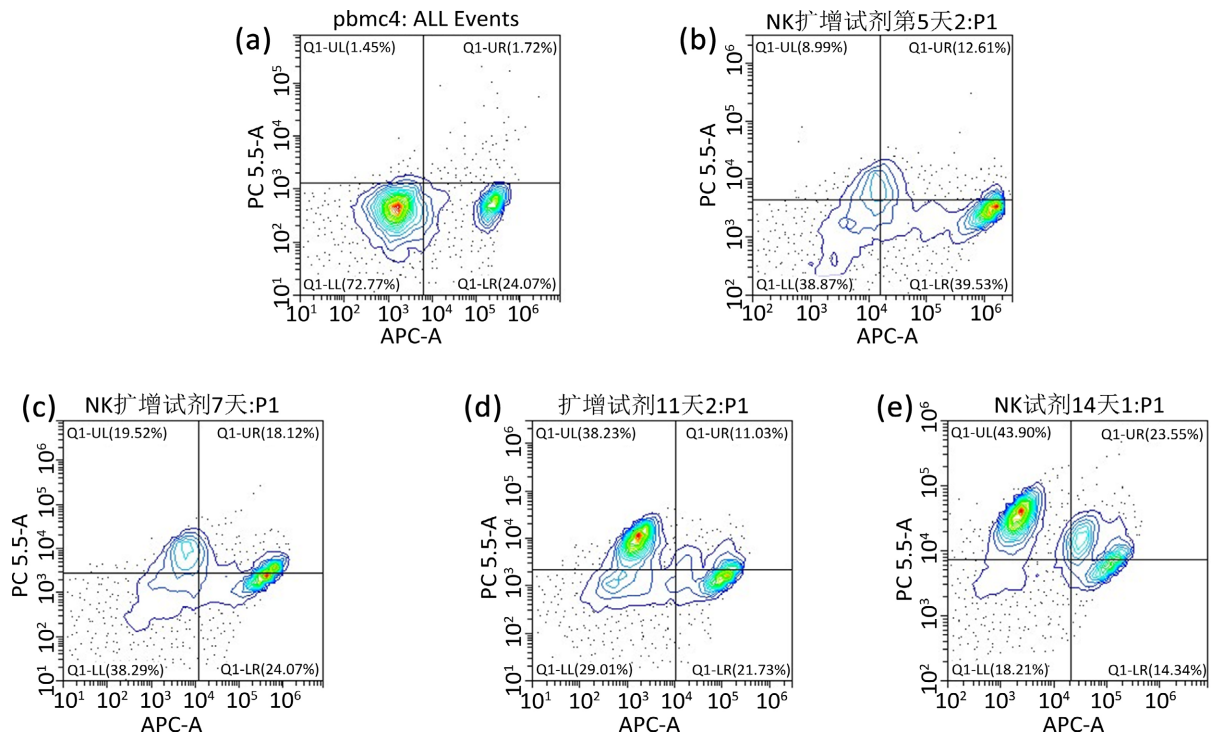


Figure 1. Changes in NK cell proportions
图 1. NK 细胞比例变化

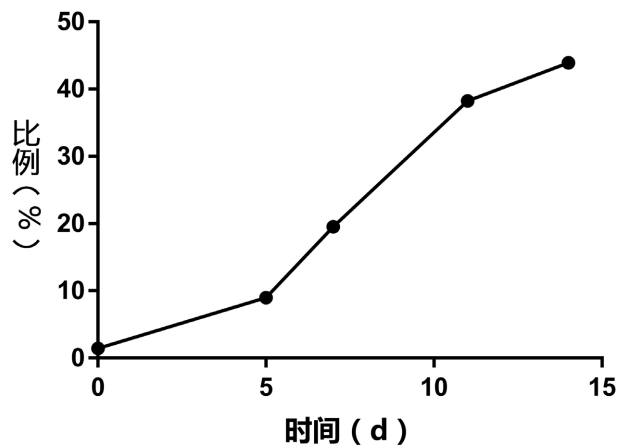


Figure 2. The proportion of NK cells changes
图 2. NK 细胞比例变化趋势

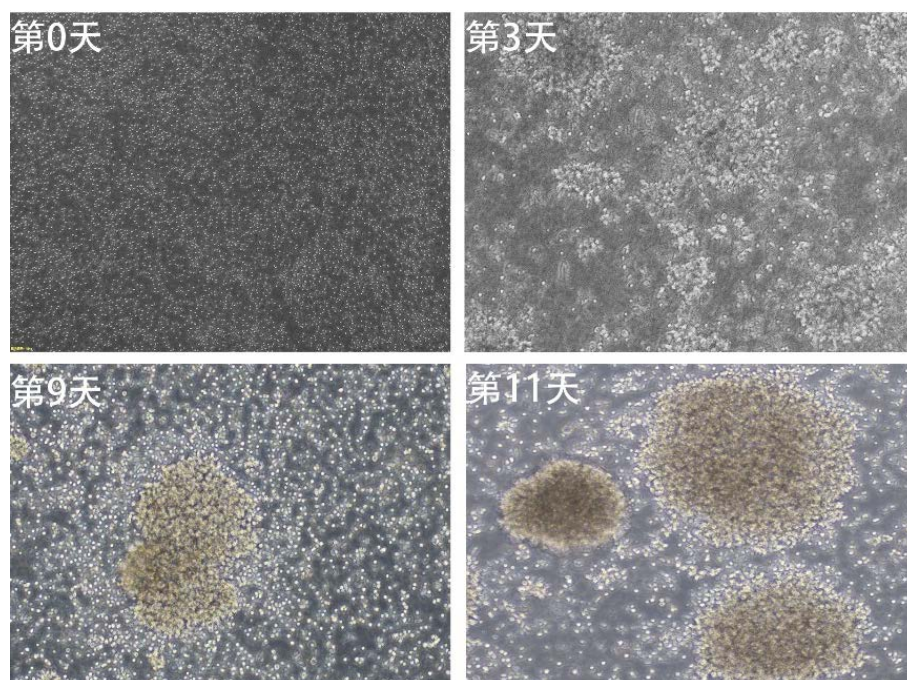


Figure 3. NK cell morphology (light microscopy 10×)
图 3. NK 细胞形态(光学显微镜 10×)

3.2. NK 细胞体外杀伤能力的检测

于 NK 细胞体外培养第 14 天,检测体外杀伤能力。通过流式细胞仪分析可以得出在效靶比为 2:1 时,对 K562、THP-1 细胞株的杀伤效率均超过 40%,且对 K562 细胞的杀伤作用优于 THP-1,并且发挥作用迅速,能够在 4 小时之内发挥杀伤作用。详见图 4。

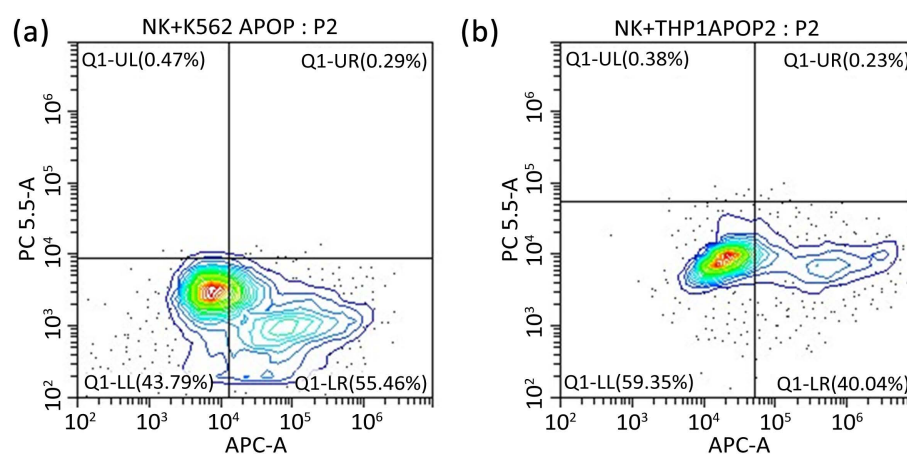


Figure 4. The killing ability of amplified NK cells to target cells
图 4. 扩增后的 NK 细胞对靶细胞的杀伤能力

4. 讨论

本次研究应用的是一种新的、临床级别的细胞培养液,但是以往文献中尚未对该方法进行报道,此方法操作较为简单,并且花费少,只需要将外周血单个核细胞分离出来,调整至适合的细胞浓度后便可

直接进行体外扩增,不需要加入有安全隐患的饲养细胞(例如经 γ 射线辐照之后的K562细胞),同时不需要加入额外的细胞因子,通过14天的培养,细胞总数可以达到约300倍的扩增,NK细胞的纯度可达50%左右。但是该方法因为缺乏其余免疫细胞提供的支撑作用,所以最终NK细胞的扩增倍数低于细胞因子方法以及饲养层细胞方法。此种方法进行NK细胞扩增时需注意以下2个问题:1)勿将2个或者3个志愿者的外周血所提取的单个核细胞进行混合培养,如此进行不仅会减缓NK细胞扩增的速度,还会影响细胞的状态。2)NK细胞是一种半贴壁半悬浮细胞,团簇状生长,若在培养过程的第3天或者第5天细胞仍未形成克隆团,又或是基本全部为悬浮细胞,那么也意味着此次的扩增可能失败。

在本研究中同时尝试了另外两种扩增NK细胞的方法,包括研究最多的饲养细胞层法,我们构建了含有K562-41-BBL-IL-15细胞饲养层,使用1640培养基(含10% Gibco血清),每两天进行换液并加入200 IU/L的IL-2,最终扩增的NK细胞比例最高也仅为7.00%左右(结果未显示在本文,NK细胞原始比例1.00%左右)。通过查阅文献[10]发现来那度胺可以增强NK细胞的活性,由于姜黄素和来那度胺同为免疫调节小分子药物,所以我们便将来那度胺、姜黄素分别加入至分离的单个核细胞培养基内进行刺激,结果相对于来那度胺而言,姜黄素刺激NK细胞的效果更为显著,培养14天NK细胞扩增的比例同样可达7.00%左右(本文未显示该结果,NK细胞原始比例1.00%左右),故姜黄素同样可以促进NK细胞的扩增,但是由于最终扩增数目不多,且纯度不高,未再深入研究。

综上所述,采用NK细胞诱导培养试剂盒扩增NK细胞的方法,虽然最终NK细胞的扩增倍数并不理想,但其操作简单,花费低,安全性高,可靠性强,可以为临床应用提供一种新的扩增方法。

基金项目

山东省自然科学基金(ZR2021MH320)。

参考文献

- [1] Shimasaki, N., Jain, A. and Campana, D. (2020) NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, **19**, 200-218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
- [2] Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., et al. (2008) Natural Killer Cell-Directed Therapies: Moving from Unexpected Results to Successful Strategies. *Nature Immunology*, **9**, 486-494. <https://doi.org/10.1038/ni1580>
- [3] Blunt, M.D. and Khakoo, S.I. (2020) Activating Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors: Detection, Function and Therapeutic Use. *International Journal of Immunogenetics*, **47**, 1-12. <https://doi.org/10.1111/iji.12461>
- [4] Becker-Hapak, M.K., Shrestha, N., McClain, E., Dee, M.J., Chaturvedi, P., Leclerc, G.M., et al. (2021) A Fusion Protein Complex That Combines IL12, IL15, and IL18 Signaling to Induce Memory-Like NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunology Research*, **9**, 1071-1087. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-1002>
- [5] Carlsten, M. and Järås, M. (2019) Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Frontiers in Immunology*, **10**, 2357. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02357>
- [6] Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., et al. (2009) Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell Therapy. *Cancer Research*, **69**, 4010-4017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>
- [7] Raimondo, S., Corrado, C., Raimondi, L., et al. (2015) Role of Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies. *BioMed Research International*, **2015**, Article ID: 821613. <https://doi.org/10.1155/2015/821613>
- [8] Romee, R., Leong, J.W. and Fehniger, T.A. (2014) Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Scientifica*, **2014**, Article ID: 205796. <https://doi.org/10.1155/2014/205796>
- [9] Hodgins, J.J., Khan, S.T., Park, M.M., et al. (2019) Killers 2.0: NK Cell Therapies at the Forefront of Cancer Control. *The Journal of Clinical Investigation*, **129**, 3499-3510. <https://doi.org/10.1172/JCI129338>
- [10] Hideshima, T., Ogiya, D., Liu, J., et al. (2021) Immunomodulatory Drugs Activate NK Cells via Both Zap-70 and Cereblon-Dependent Pathways. *Leukemia*, **35**, 177-188. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0809-x>