

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.004

· 基础研究 ·

人源 IL-15 转基因 NCG 小鼠在 CAR-NK 细胞肿瘤治疗临床前评价中的应用

马冀青^a, 刘艳芳^b, 李恒宇^a, 盛媛^a (海军军医大学附属长海医院 a. 甲乳外科; b. 病理科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 探讨人源 IL-15 转基因 NCG 小鼠 (NCG-hIL-15 鼠) 在 CAR-NK 细胞肿瘤治疗临床前评价中的作用。**方法:** 通过 qPCR 结合 WB 法检测 NCG-hIL-15 鼠骨髓及主要器官 (脾、肝、肺、肾和胰) 中的表达丰度。将人 PBMC 来源的 NK (PB-NK) 细胞回输到 NCG-hIL-15 鼠及对照 NCG 鼠, 监测 NK 细胞的体内扩增与受体鼠的体质量、生存期变化, 流式细胞术检测体内扩增 NK 细胞的活化受体与抑制受体表达差异, WB 法检测穿孔素与颗粒酶 B 的表达。MIAPaca-2 细胞原位荷瘤 NCG-hIL-15 鼠或 NCG 鼠用 anti-MUC1-CAR-NK 细胞回输治疗, 流式细胞术检测 CAR-NK 细胞在不同组鼠体内的存活情况, 小动物活体成像术检测肿瘤生长并记录荷瘤鼠生存期。**结果:** NCG-hIL-15 鼠中 PB-NK 细胞可以在 10 周内稳定增殖, 且观察期内未发生显著的移植物抗宿主反应。NCG-hIL-15 鼠中扩增 NK 细胞的 KAR 与 KIR 丰度与原始细胞相比差异较小; 与 NCG 鼠体内增殖的 NK 细胞相比, NCG-hIL-15 鼠体内扩增的 NK 细胞有更高水平的穿孔素与颗粒酶 B 表达 (均 $P < 0.05$)。CAR-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内存活比显著增加、抑瘤效果增强, 与对照组相比 NCG-hIL-15 鼠生存期显著延长 (均 $P < 0.01$)。**结论:** NCG-hIL-15 鼠模型可用于基于 NK 细胞免疫疗法的临床前实验与生物学评价。

[关键词] 人源化小鼠; CAR-NK 细胞; IL-15; 胰腺癌; MIAPaca-2 细胞; 裸鼠; 移植瘤

[中图分类号] R730.5; R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)04-0339-07

Application of human IL-15 transgenic NCG mouse in preclinical evaluation of CAR-NK cell therapy for tumor treatment

MA Jiqing^a, LIU Yanfang^b, LI Hengyu^a, SHENG Yuan^a (a. Department of Thyroid and Breast Surgery; b. Department of Pathology, Changhai Hospital Affiliated to Navy Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the application value of human IL-15 transgenic NCG mice (NCG-hIL-15 mice) in preclinical evaluation of chimeric antigen receptor modified NK (CAR-NK) cell therapy for tumor treatment. **Methods:** qPCR and WB were performed to detect the expression of human IL-15 in the bone marrow and main organs (spleen, liver, lung, kidney and pancreas) of transgenic mice. After being transfused with human PBMC-derived NK (PB-NK) cells, the NCG-hIL-15 mice and control NCG mice were continuously monitored for the *in vivo* amplification of NK cells and the changes in body weight and survival time. Flow cytometry was used to detect the differential expressions of activated receptors and inhibitory receptors in amplified NK cells. WB was used to detect the expressions of perforin and granzyme-B. NCG-hIL-15 mice or NCG mice bearing MIAPaca-2 cell transplanted tumor were treated with anti-MUC1-CAR-NK cell reinfusion; then, the CAR-NK cell survival in different groups of mice was detected by Flow cytometry, and the survival time of tumor bearing mice was recorded and tumor growth was detected by *in vivo* imaging. **Results:** The results indicated that PB-NK cells could proliferate stably within 10 weeks in NCG-hIL-15 mice without obvious graft versus host diseases (GVHD) during the observation period. The *in vivo*-expanded human NK cells maintained the original expression patterns of various surface molecules, including KARs and KIRs. Compared with the NK cells in NCG mice, the NK cells in NCG-hIL-15 mice contained significantly higher amounts of granzyme-B and perforin (all $P < 0.05$). CAR-NK cells showed significantly increased survival rate and stronger tumor-inhibitory effect in NCG-hIL-15 mice as compared with those in control NCG mice, resulting in significantly prolonged survival in NCG-hIL-15 mice (all $P < 0.01$). **Conclusion:** NCG-hIL-15 mouse model has potential application value in preclinical trial and biological evaluation of NK cell-based immunotherapy.

[Key words] humanized mice; CAR-NK cell; IL-15; pancreatic cancer; MIAPaca-2 cell; nude mice; transplanted tumor

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(4): 339-345. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.04.004]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No.81972683)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81972683)

[作者简介] 马冀青 (1996-), 女, 硕士生, 主要从事乳腺癌免疫治疗研究, E-mail: explorationproject@outlook.com

[通信作者] 盛媛 (SHENG Yuan, corresponding author), 主任医师、教授, 硕士生导师, 主要从事乳腺癌的治疗研究, E-mail: sheng528yuan@163.com

人源化小鼠是肿瘤免疫研究的重要工具。研究^[1-3]表明,严重免疫缺陷小鼠体内可移植多种人源细胞或组织并维持其生存。基于此构建的人源化小鼠模型是在体内检测人源细胞和组织功能的重要研究工具。NK细胞对肿瘤细胞具有自发细胞毒活性、无须致敏作用即可杀伤靶细胞^[4],尤其是采用基因修饰技术改造的嵌合抗原受体修饰的NK(CAR-NK)细胞,因其具有靶向特异性杀伤肿瘤作用更受到学界的重视^[5-6]。研发可长期维持人NK细胞体内增殖的动物模型,对NK细胞尤其是CAR-NK细胞体内抗肿瘤效应的研究至关重要。然而,由于以IL-15为代表的细胞因子人鼠同源性较低,移植小鼠体内的NK细胞因缺乏足够的细胞因子信号,严重制约了NK细胞疗法临床前评价的开展。IL-15可促进NK细胞的存活、成熟与活化杀伤^[7-8]。本研究采用表达人IL-15的NCG(NCG-hIL-15)鼠为模型,研究人外周血来源的NK(PB-NK)细胞在体内的扩增及生物学功能变化,探讨在该模型中CAR-NK细胞的抗肿瘤效果,旨在为基于人NK细胞治疗的临床前研究与生物学功能评价提供有效的人源化小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物与主要试剂

带有Luciferase标记的胰腺癌细胞系MIA-Paca-2与anti-MUC1-CAR-NK92细胞由海军军医大学免疫学教研室惠赠,其构建方法为将anti-MUC1-ScFv(clone number: CBWJC-4196)与CD8穿膜区和CD3 ζ 、CD28ITAM组装成嵌合抗原受体片段,克隆至pLVX质粒并包被慢病毒,感染NK92细胞并分选单克隆获得。

雄性、6周龄、体质量为18~20 g的NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52}IL2R γ ^{em26Cd22}/Gpt(NCG)小鼠和NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52}IL2R γ ^{em26Cd22}IL15^{em1Cin}/Gpt(NCG-hIL-15)小鼠购自江苏集萃药康公司(品系编号:T004886);NCG-hIL-15鼠为NCG小鼠基础上使用CRISPR系统转染人源化IL-15基因构建而成。

逆转录试剂盒与qPCR试剂盒购自Vazyme, anti-hIL-15、anti-颗粒酶B、anti-穿孔素抗体购自Abcam公司, anti-CD56、anti-CD3、anti-CD45、anti-CD94、anti-NKG2D、anti-NKG2A、anti-NKp44、anti-NKp46、anti-NKp30、anti-KIR2DL2/L3、anti-KIR2DL1/S1/S3/S5、anti-KIR3DL1流式抗体购自BioLegend公司, anti-hIL-15抗体购自Abcam公司, Vetbond组织胶水购自3M公司, 淋巴细胞分离液与NK细胞分离试剂盒购自美天旎生物技术公司, HRP标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自CST公司, ELISA Kit购自R&D公司。

1.2 流式细胞术检测PB-NK细胞膜分子表达及在受体鼠PBMC中的比例

眶后取血获得的小鼠外周血,破红后使用重悬,用流式抗体在避光4℃环境中染色30 min。使用PBS洗涤后,使用NovoCyte流式细胞仪进行检测,通过标记hCD45⁺CD3⁺CD56⁺反映PB-NK细胞在受体鼠PBMC中的比例,检测NK细胞表面NKG家族成员CD94、NKG2A、NKG2D和NCR家族成员NKp30、NKp44、NKp46以及KIR家族KIR2DL2/L3、KIR2DL1/S1/S3/S5、KIR3DL1的表达。

1.3 ELISA法检测小鼠外周血中hIL-15含量

NCG-hIL15鼠($n=8$)与对照NCG鼠($n=3$)使用异氟烷麻醉后眼球取血,10 U肝素抗凝,4℃静置1 h分离血浆。采用双抗夹心ELISA检测hIL-15含量,鼠血清加至包被抗体后的96孔板37℃孵育2 h; PBST洗涤3次,加入HRP标记二抗,37℃孵育1 h; PBST洗涤3次后,加入ELISA化学发光底物,酶标仪读取各孔波长在490 nm处的光密度(D)值。根据标准曲线计算各样品中hIL-15的含量。

1.4 qPCR法检测小鼠PBMC和组织中hIL-15 mRNA的表达水平

密度梯度离心法分离NCG-hIL-15鼠PBMC,取相同供体来源的骨髓、脾、肝、肺、肾和胰组织。上述组织使用TRIzol法提取总RNA后,逆转录为cDNA。使用SYBR Green Taq酶进行qPCR反应,反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,59℃退火20 s,72℃延伸20 s,共循环40次;72℃延伸2 min。引物序列:人IL-15 F为CTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTG, R为TTT TTCCTCCAGTTCCTCACA;人 β -actin F为TGAGCG CAAGTACTCCGTGT, R为TCCTGCTTGCTGATCCAT。以 β -actin为内参,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算hIL-15的相对表达量。

1.5 WB法检测小鼠PBMC和组织中hIL-15蛋白的表达水平

NCG-hIL-15鼠PBMC、骨髓、脾、肝、肺、肾、胰组织使用RIPA裂解液提取总蛋白,使用BCA法定量蛋白质量浓度并调整至600 ng/ μ l。取20 μ l蛋白裂解液进行SDS-PAGE、转膜,1%的BSA封闭2 h,加入hIL-15(1:500)、 β -actin(1:2 500)一抗4℃孵育过夜。后加入HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h,使用ECL化学发光底物显影、曝光。

1.6 人NK细胞的制备与移植

来自健康献血者的浓缩白细胞使用无菌PBS稀释后,通过密度梯度离心法分离PBMC。PBMC中的NK细胞用磁珠法分离进行富集,初次富集后,将收集到的细胞继续使用磁珠法富集1~2次,至纯度

超过90%。6周龄小鼠在动物房内适应1周后进行NK细胞移植,移植前1 d小鼠行250 cGy剂量的X射线辐照,辐照后12 h从尾静脉回输 5×10^6 个PB-NK细胞。移植后每周测量小鼠体质量变化,监测小鼠生存情况;每7 d采集眶后静脉丛血,监测PB-NK细胞在小鼠PBMC中的比例及KIR与KAR的表达。

1.7 胰腺癌原位种植瘤建模与CAR-NK细胞治疗

用胰酶消化对数生长期的MUC1⁺MIAPaca-2 (luciferase knock-in)细胞进行,并用PBS重悬为 5×10^7 个/ml细胞悬液,小鼠麻醉后于剑突下1 cm处开腹,暴露并展开部分胰腺,用胰岛素注射针将50 μ l肿瘤细胞悬液注射于胰腺内,抽针同时使用Vetbond组织胶水封闭注射针孔,防止肿瘤细胞流出以免引起腹腔种植^[10]。用生理盐水湿润的棉棒将胰腺轻柔推回腹腔,使用Vetbond组织胶水粘合伤口。术后1周内口服硫酸庆大霉素预防感染,并给予甲磺酸加贝酯10 mg/(kg·d)预防胰腺炎。16 d后腹腔注射200 μ l D-luciferin(荧光素酶底物,150 μ g/ml)后,使用IVIS Kinetic小动物活体成像术(IVIS)检测肿瘤大小,选取肿瘤大小相近且无转移灶荷瘤鼠用于后续实验(NCG组 $n=6$,NCG-hIL15组 $n=8$)。

肿瘤经IVIS鉴定建模成功后,分别于第1、7、14、21天经尾静脉回输 1×10^7 个anti-MUC1-CAR-NK92细胞;并于回输前12 h行IVIS检测肿瘤生长情况,肿

瘤大小通过光子通量(Photons/s)予以反映。建模后每周取眶后静脉丛血,流式细胞术检测CAR-NK细胞的存活情况。CAR-NK细胞用MEM α 培养基(12.5%FBS+12.5%马血清+200 U/ml重组人IL-2)进行培养,输注前使用5 μ g/ml丝裂霉素C处理2 h,PBS洗涤3遍后回输。第4次治疗后不再进行干预,观察至60 d,记录小鼠生存情况。

1.8 统计学处理

使用Graphpad 9.0软件对实验数据进行统计学处理与作图。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,生存数据采用Kaplan-Meier法分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hIL-15在NCG-hIL-15鼠中高表达

qPCR和WB法检测结果显示,NCG-hIL-15鼠血清中hIL-15 mRNA的表达水平显著高于NCG鼠($t=5.028$, $P < 0.01$;图1A);hIL-15 mRNA和蛋白在NCG-hIL-15鼠PBMC、骨髓、脾、肝、肺、肾与胰组织中均有表达(图1B、1C),其中PBMC、骨髓、脾与肾中hIL-15在蛋白水平上表达丰度较高($t=7.023$ 、10.580、8.672、6.773,均 $P < 0.01$)。

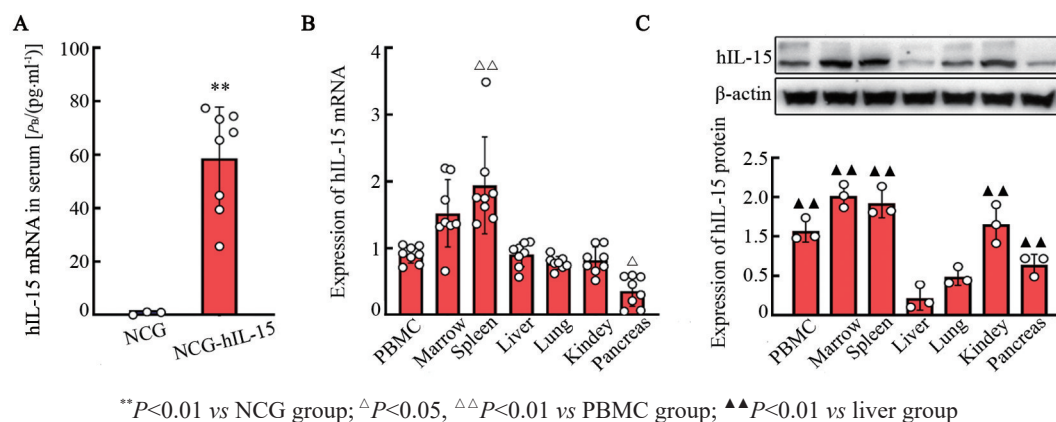


图1 hIL-15 mRNA(A, B)和蛋白(C)在NCG-hIL-15鼠血清和组织中的表达

Fig.1 mRNA (A, B) and protein (C) expressions of hIL-15 in serum and tissues of NCG-hIL-15 mice

2.2 人PB-NK细胞在NCG-hIL-15鼠体内长期存活并增殖

人PB-NK细胞经尾静脉回输NCG-hIL-15或NCG鼠体内,每周取眶后静脉丛血检测hCD45⁺CD3⁺CD56⁺细胞在PBMC中的比例,结果显示人PB-NK细胞回输NCG-hIL-15鼠后可持续存活并增殖,第2~3周受体鼠PBMC中人NK细胞比例达到峰值(15.7%~41.9%),在10周的观察期内,人NK在受体鼠PBMC中的平均比例超过10%,而PB-NK细胞

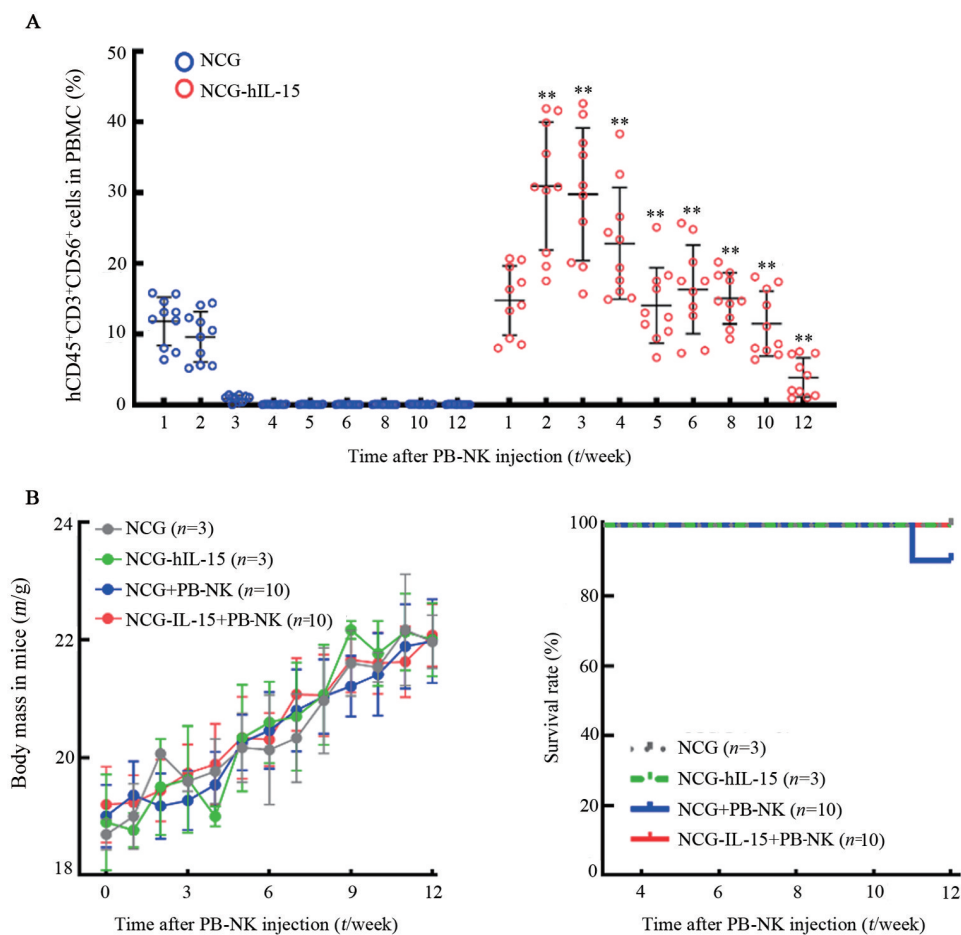
在NCG鼠体内仅能维持2周(图2A)。

检测回输人PB-NK细胞后受体鼠的体质量变化与生存情况,结果显示NCG-hIL-15鼠未发生显著的移植瘤抗宿主病(graft versus host disease, GVHD),体质量与未移植鼠及回输PB-NK细胞的NCG鼠相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图2B)。移植PB-NK细胞的NCG鼠中,1只于11周时死亡外,其余均存活至观察期结束(图2C)。实验结果提示,人PB-NK细胞在NCG-hIL-15鼠体内可持续存活并增殖,且不引起GVHD。

2.3 NCG-hIL-15 体内扩增 NK 细胞的穿孔素和颗粒酶 B 表达水平显著升高

NK 细胞在体内发挥免疫监视功能主要通过 KAR 与 KIR 的平衡实现^[11-13]。流式细胞术检测 NKG 家族、NCR 家族与 KIR 家族分子的表达模式, 结果发现 NCG-hIL-15 鼠体内扩增的 NK 细胞除 NKG2A 显著表达上调外($t=8.315, P<0.01$), 其余分子表达与 PB-NK 细胞相比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$, 图 3A)。

WB 法检测结果(图 3B)显示, NCG 鼠体内 NK 细胞的颗粒酶 B 与穿孔素表达水平显著下调($t=9.140, 8.056$, 均 $P<0.01$), 而 NCG-hIL-15 鼠体内颗粒酶 B 与穿孔素表达与原始 PB-NK 细胞相比显著上调($t=2.520, 2.782$, 均 $P<0.05$), 提示 NK 细胞在缺乏 hIL-15 的 NCG 鼠中杀伤活性受损, 而在 NCG-hIL-15 鼠体内则有良好的杀伤潜力。



** $P<0.01$ vs NCG group

A: Human PB-NK cells from healthy donors were purified with negative selection by magnetic cell-sorting. The purified NK cells were transfused into NCG ($n=10$) or NCG-hIL-15 ($n=10$) mice, hCD45⁺CD3⁺CD56⁺ cells from murine retro-orbital sinus blood were analysed by Flow cytometry; B: Mice were monitored for body mass changes every week after PB-NK transfusion; C: Mice were monitored for survival

图2 人PB-NK细胞在NCG-hIL-15鼠体内长期存活

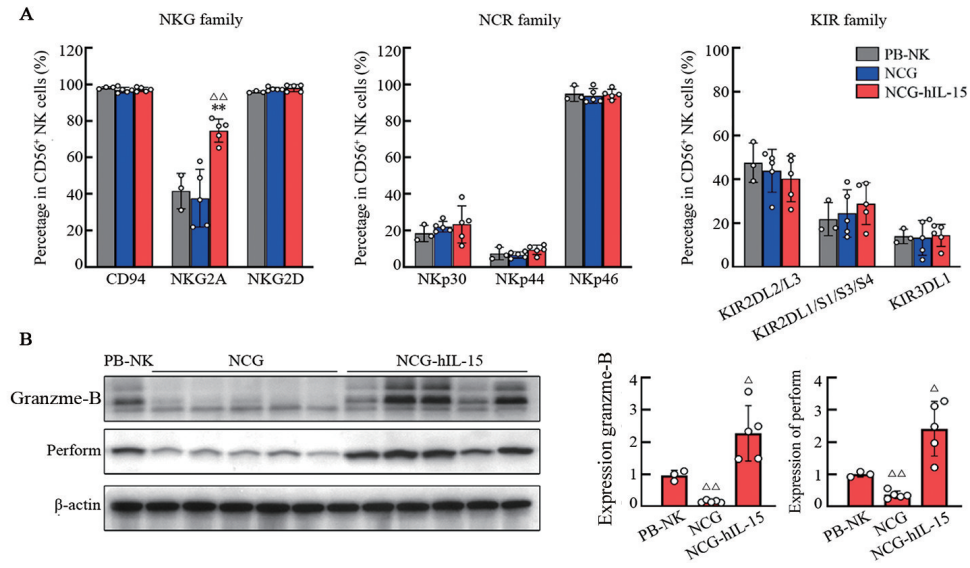
Fig.2 Long-term engraftment of human PB-NK cells in NCG-hIL-15 mice

2.4 CAR-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内具有较强且持久的抗瘤作用

基于上述结果, 进一步比较了 CAR-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠与 NCG 鼠中的杀伤活性差异, 实验设计如图 4A 所示。流式细胞术检测结果(图 4B)表明, CAR-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内存活比例显著高于 NCG 鼠($t=4.374, P<0.01$)。

小动物活体成像检测结果显示, 回输 CAR-NK

细胞后, 该细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内杀伤活性明显高于对照组小鼠: 从第 2 周起肿瘤显著小于 NCG 组, 至第 3 周有 37.5% (3/8) 的荷瘤鼠肿瘤完全消退(图 4C、4D)。在 60 d 的观察期内, NCG 组小鼠全部死亡, 而 NCG-hIL-15 组有 62.5% (5/8) 小鼠存活($\chi^2=8.982, P<0.01$, 图 4E)。实验结果表明, CAR-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内可维持其杀伤活性, NCG-hIL-15 鼠模型是 CAR-NK 细胞抗肿瘤研究的重要模型。



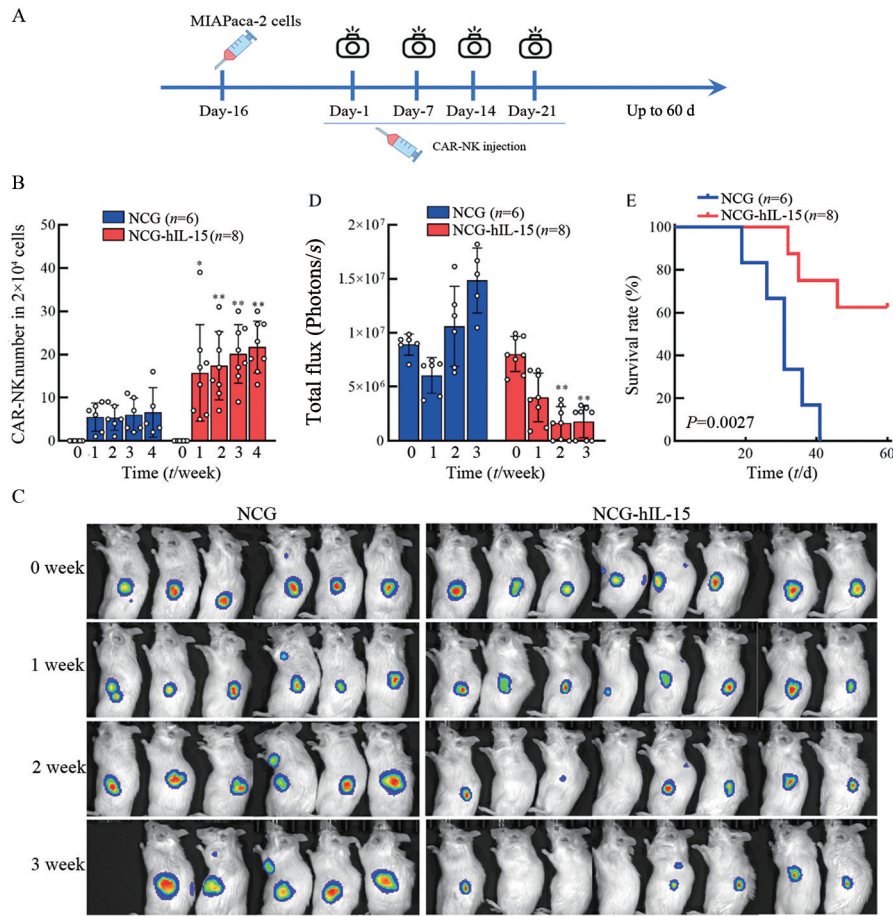
** $P < 0.01$ vs NCG group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs PB-NK group

A: Freshly isolated PB-NK cells and *in vivo*-expanded NK cells at 6th week were used for analyses of NK surface molecules, including NKG family molecules, natural cytotoxicity receptors, and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) molecules ($n=5$);

B: Expressions of granzyme-B and perforin in *in vivo* expanded NK cells were measured by WB

图3 NCG-hIL-15 鼠体内扩增NK细胞的功能相关分子表达

Fig.3 Expressions of function-related molecules in NK cells that *in vivo* proliferated in NCG-hIL-15 mice



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NCG group

A: The flow chart of the experiment; B: CAR-NK cell survival in peripheral blood was evaluated by Flow cytometry; C: Tumor growth in NCG ($n=6$) or NCG-hIL-15 ($n=8$) mice was evaluated using the IVIS imaging system after CAR-NK cell treatment; D: The statistical results of IVIS; E: Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method

图4 anti-MUC1-CAR-NK92 细胞在 NCG-hIL-15 鼠体内的杀伤活性

Fig.4 *In vivo* cytotoxicity of anti-MUC1-CAR-NK92 cells in NCG-hIL-15 mice

3 讨论

IL-15 是 NK 细胞发育成熟、维持生存与杀伤活性必要的细胞因子^[6,14], 人与鼠的 IL-15 同源性较低, 目前的人源化小鼠模型无法有效维持人 NK 细胞的存活与生理功能^[6]。在缺乏 hIL-15 的情况下, 造血干细胞受体鼠体内 NK 细胞亚群比例极低, 且杀伤能力严重受损^[15], 这导致目前的人源化小鼠无法作为临床前模型评价基于 NK 细胞的免疫疗法。既往研究^[16-17]表明, 给予外源性 hIL-15 支持^[8]或直接将 hIL-15 的基因敲入小鼠基因组, 有利于在移植造血干细胞后 NK 细胞的发育成熟, 使人 NK 细胞恢复杀伤活性。但在 NK 细胞疗法中, 通常回输给患者的是分化终末期的 NK 细胞或 CAR-NK92 细胞, 人源化 IL-15 小鼠模型可否用于 PB-NK 与 CAR-NK 细胞的临床前评估尚缺乏实验数据。

本研究验证了人 PB-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠中的动态增殖情况, 结果表明 PB-NK 细胞在 NCG-hIL-15 鼠外周血中可在 10 周的时间内持续扩增, 而回输至 NCG 鼠体内的 PB-NK 细胞至第 3 周基本消失; 且 NCG-hIL-15 鼠及对照组小鼠均未发生明显的 GVHD。PB-NK 细胞移植后, NCG-hIL-15 鼠扩增后的 NK 细胞基本维持了与供体相似水平的 KAR 与 KIR 表达, 体内扩增 2 周后, NCR 家族分子和 KIR 家族分子未检测出显著差异, 仅有 NKG 家族成员 NKG2A 在 NCG-hIL-15 鼠体内扩增的 NK 细胞中显著上调, 这可能是由于 NCG-hIL-15 鼠体内 hIL-15 水平 (20~70 pg/ml) 高于正常人外周血 hIL-15 浓度 (≈1 pg/ml) 的缘故^[18]。已有研究^[19-20]表明, IL-15 可以促进 NK 细胞中 NKG2A 的表达上调。本研究结果也证明了 NCG-hIL-15 鼠体内扩增 NK 细胞穿孔素与颗粒酶 B 的表达相较于原始 PB-NK 细胞有所升高, 这也可归因于 NCG-hIL-15 鼠体内有着较高的 hIL-15 表达水平。

在 CAR-NK 细胞杀伤体内肿瘤的实验中, 因为传统的免疫缺陷鼠缺乏维持 NK 细胞杀伤活性所必需的细胞因子, 往往将 CAR-NK 细胞与 IL-15、IL-2 等细胞因子共同回输才能获得好的效果^[21-23]。本研究结果也表明, anti-MUC1-CAR-NK 细胞在缺乏细胞因子的情况下并不能有效杀伤 MUC1⁺胰腺癌细胞; 但 NCG-hIL-15 鼠回输的 NK 细胞可以显著抑制肿瘤生长, 部分接受治疗的小鼠出现了肿瘤的完全消退。这些结果进一步证实了基于 NCG-hIL-15 建立的人源化小鼠是研究 NK 细胞介导的免疫反应和肿瘤免疫治疗的重要工具。

综上所述, 本研究证实了 NCG-hIL-15 鼠可在较长时间内维持移植入体内的人 PB-NK 细胞的扩增,

并可以延长 CAR-NK 细胞的体内存活时间及维持 NK 细胞的杀伤功能。该模型即可用于研究人 NK 细胞的各种免疫学特性, 也可用于荷瘤后评价 CAR-NK 细胞的杀伤活性, 是研究人 NK 细胞生物学和评价 CAR-NK 抗肿瘤效果的有效模型。

[参考文献]

- [1] DE LA ROCHERE P, GUIL-LUNA S, DECAUDIN D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology[J]. Trends Immunol, 2018, 39(9): 748-763. DOI:10.1016/j.it.2018.07.001.
- [2] SHULTZ L D, BREHM M A, GARCIA-MARTINEZ J V, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges[J/OL]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(11): 786-798[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749872/>. DOI:10.1038/nri3311.
- [3] ITO R, TAKAHASHI T, ITO M. Humanized mouse models: Application to human diseases[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(5): 3723-3728. DOI:10.1002/jcp.26045.
- [4] HODGINS J J, KHAN S T, PARK M M, et al. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control[J/OL]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3499-3510[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6715409/>. DOI:10.1172/JCI129338.
- [5] YILMAZ A, CUI H W, CALIGIURI M A, et al. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy [J/OL]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 168[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7720606/>. DOI: 10.1186/s13045-020-00998-9.
- [6] 顾炎, 曹雪涛. 肿瘤免疫与免疫治疗: 机遇与挑战[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(1): 1-10. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.01.001.
- [7] VACCA P, PIETRA G, TUMINO N, et al. Exploiting human NK cells in tumor therapy[J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 3013[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6978749/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.03013.
- [8] CANY J, VAN DER WAART A B, TORDOIR M, et al. Natural killer cells generated from cord blood hematopoietic progenitor cells efficiently target bone marrow-residing human leukemia cells in NOD/SCID/IL2Rg(null) mice[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6): e64384[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673996/>. DOI:10.1371/journal.pone.0064384.
- [9] GUO M, HAN S, LIU Y F, et al. Inhibition of allogeneic islet graft rejection by VISTA-conjugated liposome[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(3): 914-920. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.05.188.
- [10] YANG D Q, ZHANG Q, MA Y F, et al. Augmenting the therapeutic efficacy of adenosine against pancreatic cancer by switching the Akt/p21-dependent senescence to apoptosis[J/OL]. EBioMedicine, 2019, 47: 114-127[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6796568/>. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.08.068.
- [12] RUGGERI L, AVERSA F, MARTELLI M F, et al. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self[J]. Immunol Rev, 2006, 214: 202-218. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00455.x.
- [13] CRUS-MUNOZ M E, VALENZZUELA-VAZQUEZ L, et al. From

- the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(5): 955-971. DOI: 10.1002/JLB.MR0618-224RR.
- [14] LEE D A. Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells[J]. *Immunol Rev*, 2019, 290(1): 85-99. DOI:10.1111/imr.12793.
- [15] STROWIG T, CHIJOKE O, CARREGA P, et al. Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence[J/OL]. *Blood*, 2010, 116(20): 4158-4167[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993621/>. DOI: 10.1182/blood-2010-02-270678.
- [16] KATANO I, ITO R, KAWAI, et al. Improved detection of in vivo human NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity using a novel NOG-FcγR-deficient human IL-15 transgenic mouse [J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 532684[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7577188/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.532684.
- [17] MATSUDA M, ONO R, IYODA T, et al. Human NK cell development in hIL-7 and hIL-15 knockin NOD/SCID/IL2rgKO mice[J/OL]. *Life Sci Alliance*, 2019, 2(2): e201800195[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6445396/>. DOI:10.26508/lsa.201800195.
- [18] BERGAMASCHI C, BEAR J, ROSATI M, et al. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Rα in human and mouse serum[J/OL]. *Blood*, 2012, 120(1): e1-e8[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390963/>. DOI: 10.1182/blood-2011-10-384362.
- [19] LI Y, HERMANSON D L, MORIARITY B S, et al. Human iPSC-derived natural killer cells engineered with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 181-192.e5[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6084450/>. DOI:10.1016/j.stem.2018.06.002.
- [20] MUNTASELL A, OCHOA M C, CORDEIRO L, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 45: 73-81. DOI:10.1016/j.coi.2017.01.003.
- [21] ZHANG Q, ZHANG H X, DING J G, et al. Combination therapy with EpCAM-CAR-NK-92 cells and regorafenib against human colorectal cancer models[J/OL]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 4263520[2021-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6205314/>. DOI: 10.1155/2018/4263520.
- [22] KLÖB S, OBERSCHMIDT O, MORGAN M, et al. Optimization of human NK cell manufacturing: fully automated separation, improved ex vivo expansion using IL-21 with autologous feeder cells, and generation of anti-CD123-CAR-expressing effector cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(10): 897-913. DOI:10.1089/hum.2017.157.
- [23] 岳冉, 刘子洋, 郑岩, 等. 纳米载体介导的 PiggyBac 转座子制备 CAR-NK 细胞[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2): 109-114. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.02.002.
- [收稿日期] 2021-02-05 [修回日期] 2021-03-09
[本文编辑] 党瑞山