

## • 论著 •

NK 细胞培养及杀伤前列腺癌细胞效率的研究<sup>\*</sup>王丙萍<sup>1</sup> 刘彩云<sup>2</sup> 高艳伟<sup>3</sup> 高维实<sup>3</sup> 陆相吉<sup>4</sup>

(1. 内蒙古自治区人民医院肿瘤研究所, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 北京亦科诺生物科技有限公司, 北京 100176;

3. 内蒙古自治区人民医院腹部肿瘤外科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 4. 武警内蒙古自治区总队医院普外科, 内蒙古 呼和浩特 010010)

**【摘要】 目的** 建立一种高效的 NK 细胞体外扩增培养方法; 通过检测 NK 细胞杀伤 3 种前列腺癌(PCa)细胞株的效率, 鉴定其用于后期治疗 PCa 的可行性, 为应用 NK 细胞过继回输治疗 PCa 的研究奠定基础。**方法** 通过细胞因子对外周血单个核细胞(PBMCs)的诱导扩增, 培养出 NK 细胞并用流式细胞术检测 NK 细胞所占比例以及扩增倍数; 通过 CCK8 法检测 NK 细胞杀伤 3 种 PCa 细胞株 PC3、LNCaP、DU145 的效率及效靶比。**结果** NK 细胞诱导扩增成功, PBMCs 诱导扩增后, NK 细胞由最初的  $(10.97 \pm 3.28)\%$ , 扩增到占比  $(83.20 \pm 8.54)\%$  以上, 细胞总数扩增倍数为  $(251.66 \pm 19.05)$  倍, NK 细胞扩增倍数为  $(1\,940.17 \pm 402.22)$  倍。NK 细胞对 3 种靶细胞的杀伤率差异极显著 ( $P < 0.01$ ); NK 细胞对 LNCaP 的杀伤效率大于对 DU145 的杀伤效率; 对于 PC3 没有杀伤作用, 反而促进其生长。NK 细胞对 PCa 细胞株的最高杀伤效率分别为 LNCaP  $(92.03 \pm 9.95)\%$ 、DU145  $(72.40 \pm 8.30)\%$ 、PC3  $(26.69 \pm 10.56)\%$ 。**结论** 采用细胞因子诱导扩增 PBMCs 的方法能够获得纯度较高、数量足够的 NK 细胞, 为 NK 细胞的临床应用奠定基础; NK 细胞对 3 种 PCa 细胞系的杀伤率差异极显著, 为后续进行深入研究探索原因及作用机制提供了方向。

**【关键词】** NK 细胞; 诱导扩增; 前列腺癌; 细胞毒活性; 效靶比**【中图分类号】** R737.25 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.11.004

## Study on NK cell culture and killing efficiency of prostate cancer cells

WANG Bingping<sup>1</sup>, LIU Caiyun<sup>2</sup>, GAO Yanwei<sup>3</sup>, GAO Weishi<sup>3</sup>, LU Xiangji<sup>4</sup>

(1. Cancer Institute, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China;

2. Beijing Ykono Biotechnology Co., LTD., Beijing 100176, China;

3. Department of Abdominal Oncology Surgery, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China;

4. Department of General Surgery, Inner Mongolia Armed Police Hospital, Hohhot 010010, China)

**【Abstract】 Objective** To establish an efficient method of NK cell expansion and culture in vitro. The effectiveness of NK cells in killing three prostate cancer (PCa) cell lines was tested to evaluate its feasibility in the later treatment of PCa, which laid a foundation for the application of adoptive NK cell transfusion for PCa. **Methods** The NK cells were cultured by inducing and amplifying PBMCs with cytokines, and the proportion and amplification of NK cells were detected by flow cytometry. The efficiency and effect-target ratio of NK cells against three prostate cancer cell lines PC3, LNCaP and DU145 were measured by CCK8 method. **Results** The NK cells were successfully amplified. After PBMCs induction, NK cells were amplified from the initial  $10.97\% \pm 3.28\%$  to more than  $83.20\% \pm 8.54\%$ , and the total number of cells was  $(251.66 \pm 19.05)$  times. The amplification factor of NK cells was  $(1\,940.17 \pm 402.22)$ . The killing rate of NK cells to the three kinds of target cells was significantly different ( $P < 0.01$ ). The killing efficiency of NK cells against LNCaP was greater than that against DU145. It has no killing effect on PC3, but promotes its growth. The highest killing efficiency of NK cells against prostate cancer cells were LNCaP  $92.03\% \pm 9.95\%$ , DU145  $72.40\% \pm 8.30\%$  and PC3  $26.69\% \pm 10.56\%$ , respectively. **Conclusion** The proliferation of PBMCs induced by cytokines can obtain high purity and sufficient number of NK cells, which lays a foundation for the clinical application of NK cells. The killing rate of NK cells to the three prostate cancer cells was significantly different, which provided a direction for further research to explore the causes and mechanism of action.

**【Key words】** NK cells; Induced amplification; Prostate cancer; Cytotoxic activity; Effect to target ratio

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2021LHMS08060)

通讯作者: 陆相吉, E-mail: 530163695@qq.com

引用本文: 王丙萍, 刘彩云, 高艳伟, 等. NK 细胞培养及杀伤前列腺癌细胞效率的研究[J]. 西部医学, 2023, 35(11): 1577-1583. DOI: 10.3969/j.

issn.1672-3511.2023.11.004

前列腺癌(Prostate cancer, PCa)是危害老年男性健康的常见癌症之一,并且在我国呈明显的逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。细胞免疫治疗(Cell immunotherapy, CIT)是免疫治疗的一种,开始于 20 世纪 70 年代,1997 年被美国食品药品监督管理局(Food and drug administration, FDA)批准正式纳入美国药品法规接受监管, CIT 原理是将人体内的抗肿瘤免疫细胞采集后,经过体外培养扩增后回输患者,以增强人体免疫系统,从而达到抗肿瘤的目的。NK 细胞(Natural killer cell)是机体除 T 细胞之外的另一抗肿瘤利器,本身具有广谱的肿瘤杀伤能力。NK 细胞数量减少或者功能受损与各种类型癌症的进展相关。在应用 NK 细胞作为过继性免疫治疗的细胞时, NK 细胞的主要来源是外周血,但外周血单个核细胞中 NK 细胞的数量仅占 10%~15%,因此 NK 细胞的体外扩增培养十分重要。本研究建立了一种快捷、方便、高效的 NK 细胞体外扩增方法,将外周血中占比较少的 NK 细胞扩增到纯度较高、数量充足,从而为 NK 细胞的过继性免疫治疗奠定基础。通过 NK 细胞对 3 种 PCa 细胞系 LNCaP、DU145、PC3 杀伤率的研究,鉴定其用于后期治疗 PCa 的可行性,为应用 NK 细胞过继回输治疗 PCa 的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 PCa 细胞株 PC3、LNCaP、DU145 购自中国科学院上海细胞所; VIVO<sup>TM</sup>15 培养基、DMEM 高糖培养基、1640 培养基、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Gibco 公司); IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、OKT3(美国 R&D 公司); 抗人 CD16 单克隆抗体(中国北京同立海源生物科技有限公司); Ficoll 淋巴细胞分离液(中国 TBD<sup>TM</sup> 公司); 荧光标记单克隆抗体: CD3-FITC、CD56-PE、鼠抗人 IgG-FITC(美国 BD 公司); CCK8 试剂盒(中国博士德生物公司)。

1.2 实验仪器 二氧化碳培养箱及生物安全柜(Thermo, 美国); 倒置荧光显微镜(Leica, 德国); FACS-Calibur 流式细胞仪(BD, 美国); 高速离心机(Eppendorf, 德国); 超净工作台(苏州泰安空气技术有限责任公司, 中国); ELx808 吸收光酶标仪(Biotec, 美国)。

## 1.3 方法

1.3.1 PCa 细胞株的培养 PCa 细胞株 PC3 的培养液为 90% DMEM-F12 + 10% FBS; LNCaP 的培养液为 90% RPMI-1640 + 10% FBS; DU145 的培养液为 90% DMEM 高糖 + 10% FBS。从液氮罐取出需要解冻的细胞,立即放入 37 °C 水浴锅中,快速摇动,使冻存的细胞尽量在 1 min 内融化。将冻存管用酒精消毒

后迅速移入超净工作台。用移液器将细胞液移入 1.5 mL 管中, 1 500 rpm/min 离心 5 min, 弃液, 加入 1 mL 培养液轻轻悬浮细胞, 细胞计数板计数, 按细胞数  $1 \times 10^6$  个/瓶的数量接种在 T25 的培养瓶中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞培养至贴壁 90% 左右传代培养, 0.25% 胰蛋白酶消化的时间分别是 LNCaP、DU145 为 1 min, PC3 为 3 min。

1.3.2 外周血单个核细胞(PBMCs)分离 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMCs: 使用肝素钠采血管抽取静脉血 15 mL, Ficoll 与血液体积比为 1:2, 用移液管缓慢地在 Ficoll 上层加入血液; 在水平转头离心机中离心(22 °C, 800 g, 15 min, 升速 5, 降速 4); 离心结束后, 在不扰动白膜层的情况下, 用注射器吸出血浆层, 转移至 1 支 15 mL 离心管, 将血浆管置于 56 °C 水浴锅内保持 30 min, 之后置于 4 °C 冰箱内 10 min 进行冷却, 离心(1 500 g, 5 min, 22 °C, 升速 9, 降速 9)后转移上清至 1 支新的 15 mL 离心管, 保存于 4 °C 备用; 用巴氏吸管将白膜层仔细移出, 移到另 1 支 15 mL 离心管, 加入 PBS 至 15 mL, 吹打清洗, 上离心机后(22 °C, 600 g, 7 min, 升速 9, 降速 7), 弃上清液, 用 2 mL VIVO<sup>TM</sup>15 培养基重悬 PBMCs 细胞, 显微计数, 取样进行流式检测。

1.3.3 NK 细胞的诱导扩增 ①Day0 接种: 调整 PBMCs 细胞密度为 1.5 M/mL, 加入自体血清 10%, IL-2 1 000 IU/mL, IL-7 10 ng/mL, IL-15 50 ng/mL, IL-18 10 ng/mL, IL-21 50 ng/mL, OKT3 10 ng/mL, Anti-CD16 10 ng/mL, 90% VIVO<sup>TM</sup>15 培养基培养细胞, 细胞接种密度  $\leq 1.5$  M/mL, 密度过大影响 NK 生长, 放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。②Day3 补液: 细胞计数, 根据细胞数量补充培养液, 补液调节细胞的密度为 1.0 M/mL; 培养基 = 90% VIVO<sup>TM</sup>15 培养基 + 自体血浆 10% + IL-2 1 000 IU/mL, 如果细胞团较小, 或者无细胞团, 本次不计数, 不晃动培养瓶, 直接补充原体积 1/2 培养基继续培养。③Day5 补液: 细胞计数, 调整细胞密度为 1.0 M/mL, 培养基 = 90% VIVO<sup>TM</sup>15 培养基 + 自体血清 10% + IL-2 1 000 IU/mL。④Day7~Day14 补液: 每次补液调整细胞密度为 0.5~1.0 M/mL, 自体血浆 10%, 加入 IL-2 1 000 IU/mL, 培养过程中细胞密度不可超过 2.0 M/mL。⑤Day14 收获: 流式细胞仪检测结果, 合格后收获细胞。

1.3.4 流式细胞检测 免疫荧光标记法进行流式细胞分析, 取 NK 细胞 1 mL, PBS 洗涤, 1 500 rpm/min 离心 5 min, 弃液, 加入 50  $\mu$ L PBS 轻轻悬浮细胞 20  $\mu$ L CD3-FITC 和 20  $\mu$ L CD56-PE, 4 °C 避光保存 30 min。PBS 洗涤后流式细胞仪分析检测, 用异硫氰

酸(FITC)标记 IgG 作为阴性对照,根据流式细胞分析图中  $CD3^-CD56^+$  的百分比,确定 NK 细胞所占比例。

1.3.5 CCK-8 法检测杀伤效率 以 NK 细胞为效应细胞,靶细胞分别为 PCa 细胞株 LNCaP、DU145、PC3。将 3 种靶细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的数量分别接种于 96 孔板中,于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 12 h 后,轻轻吸除培养液。按效靶比 0.1:1、0.5:1、1:1、2:1、5:1、10:1、15:1、20:1 的比例分别加入效应细胞,每孔 200  $\mu\text{L}$  培养液,同时设置单独靶细胞孔和每种比例的单独效应细胞孔,每个比例 3 个复孔。共同培养 24 h 后,加入 CCK8 试剂 20  $\mu\text{L}$ /孔,放于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中,孵育 3.5 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长的 OD 值,以此方法检测 NK 细胞的细胞毒活性,公式如下:杀伤率(%)=[1-(实验组 OD 值-单独效应细胞 OD 值)/单独靶细胞组 OD 值] $\times 100\%$ 。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 19.0 进行数据统计分析,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NK 细胞的培养结果 健康人外周血分离 PB-MCs 后,经细胞因子诱导扩增 NK 细胞。第 0 天为散落的颗粒状细胞(图 1A),3~4 d 后聚集成团,出现细胞集落(图 1B),培养 10~14 d 后,细胞重新分散为单个细胞(图 1C)。经流式细胞仪鉴定  $CD3^-CD56^+$  细胞(图 1D~F),外周血中占比较少的 NK 细胞( $10.97 \pm 3.28\%$ ),扩增到占比( $83.20 \pm 8.54\%$ )以上,细胞总数扩增倍数为( $251.66 \pm 19.05$ )倍,NK 细胞扩增倍数为( $1\,940.17 \pm 402.22$ )倍,见图 1G~I。

2.2 NK 细胞毒活性的检测 以 NK 细胞为效应细胞,靶细胞分别为 PCa 细胞株 LNCaP、DU145、PC3,在不同效靶比的情况下(0.1:1、0.5:1、1:1、2:1、5:1、10:1、15:1、20:1),加入 CCK8 试剂,孵育 3.5 h 后,用酶标仪测定 450 nm 波长 OD 值的方法检测 NK 细胞的细胞毒活性(图 2)。通过公式分别计算不同效靶比下 NK 细胞对靶细胞 LNCaP、DU145、PC3 的杀伤率,结果表明(图 3),NK 细胞对靶细胞 LNCaP 在效靶比为 1:1 时杀伤率最高( $92.03 \pm 9.95\%$ ),与效靶比为 0.5:1、2:1、5:1、10:1、15:1、20:1 的实验组相比,各实验组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但与效靶比 0.1:1 实验组相比差异显著( $P < 0.05$ )(表 1~2);NK 细胞对靶细胞 DU145 在效靶比为 10:1 时杀伤率最高( $72.40 \pm 8.30\%$ ),与效靶比为 5:1 的实验组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但与其它实验组相比差异显著( $P < 0.05$ )(表 1、3);NK 细胞对靶细胞 PC3 的

杀伤率在除了效靶比为 0.1:1、0.5:1 的实验组外,其余各实验组的杀伤率均为负数,并且各实验组间差异显著( $P < 0.05$ )(表 1、4),说明 NK 细胞对前列腺癌 PC3 细胞株没有杀伤效果;并且随着效靶比逐步增高,其负数值越大,说明 NK 细胞对其有促进生长作用。

## 3 讨论

PCa 是目前全世界男性中最常见的恶性肿瘤之一,近年来死亡人数在持续增加<sup>[3]</sup>。在我国,PCa 发病率近年来已出现逐步升高趋势<sup>[4]</sup>,并且 PCa 发病隐匿,导致大多数发病时已处于癌症晚期<sup>[5-6]</sup>。目前对于 PCa 的治疗手段主要包括手术治疗、内分泌治疗、放疗以及化疗<sup>[7-8]</sup>。而对于晚期和转移性的 PCa 患者,雄激素剥夺治疗是其主要治疗手段,但由于其副作用严重、发生概率高,且疾病进展后,患者将失去所有现有治疗手段对生存期的收益。因此,对于这部分 PCa 患者急需开发出新的治疗手段,以提高其生活质量、延长生存期。

NK 细胞是大颗粒淋巴细胞,约占人体外周血淋巴细胞总数的 10% 左右<sup>[9]</sup>。NK 细胞参与天然免疫和适应性免疫,是先天免疫系统中最具杀伤性的细胞毒性淋巴细胞,能够介导强大的抗病毒和抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>。NK 细胞是除 T 细胞之外的机体抗肿瘤的另一重要利器,其本身具有广谱抗肿瘤的作用,同时还具有强大的间接增强 T 细胞免疫应答的作用,是 T 细胞发挥抗肿瘤功能的基础<sup>[11]</sup>。

有研究表明,NK 细胞过继性回输在晚期非小细胞肺癌的治疗中取得了令人满意的效果<sup>[12]</sup>。免疫检查点抑制剂与 NK 细胞联合应用,在治疗白血病和非小细胞肺癌患者时是安全、有效且具有生存益处的<sup>[13]</sup>。与 T 细胞相比,NK 细胞的过继性回输具有耐受性良好,神经毒性、细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome, CRS)和移植物抗宿主病(Graft-versus-host disease GVHD)等严重不良反应的发生率大大降低;同种异体 NK 细胞的回输还能避免或降低杀伤细胞免疫球蛋白样受体(Killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIRs)介导的抑制性信号,从而发挥更好的抗肿瘤作用<sup>[14-16]</sup>。

本研究建立了一种 NK 细胞体外诱导扩增的方法,将外周血中占比较少的 NK 细胞( $10.97 \pm 3.28\%$ ),扩增到占比( $83.20 \pm 8.54\%$ )以上,细胞总数扩增倍数为( $251.66 \pm 19.05$ )倍,NK 细胞扩增倍数为( $1\,940.17 \pm 402.22$ )倍。高效的 NK 细胞体外扩增方法的成功建立为 NK 细胞的过继性免疫治疗的广泛应用奠定了基础。

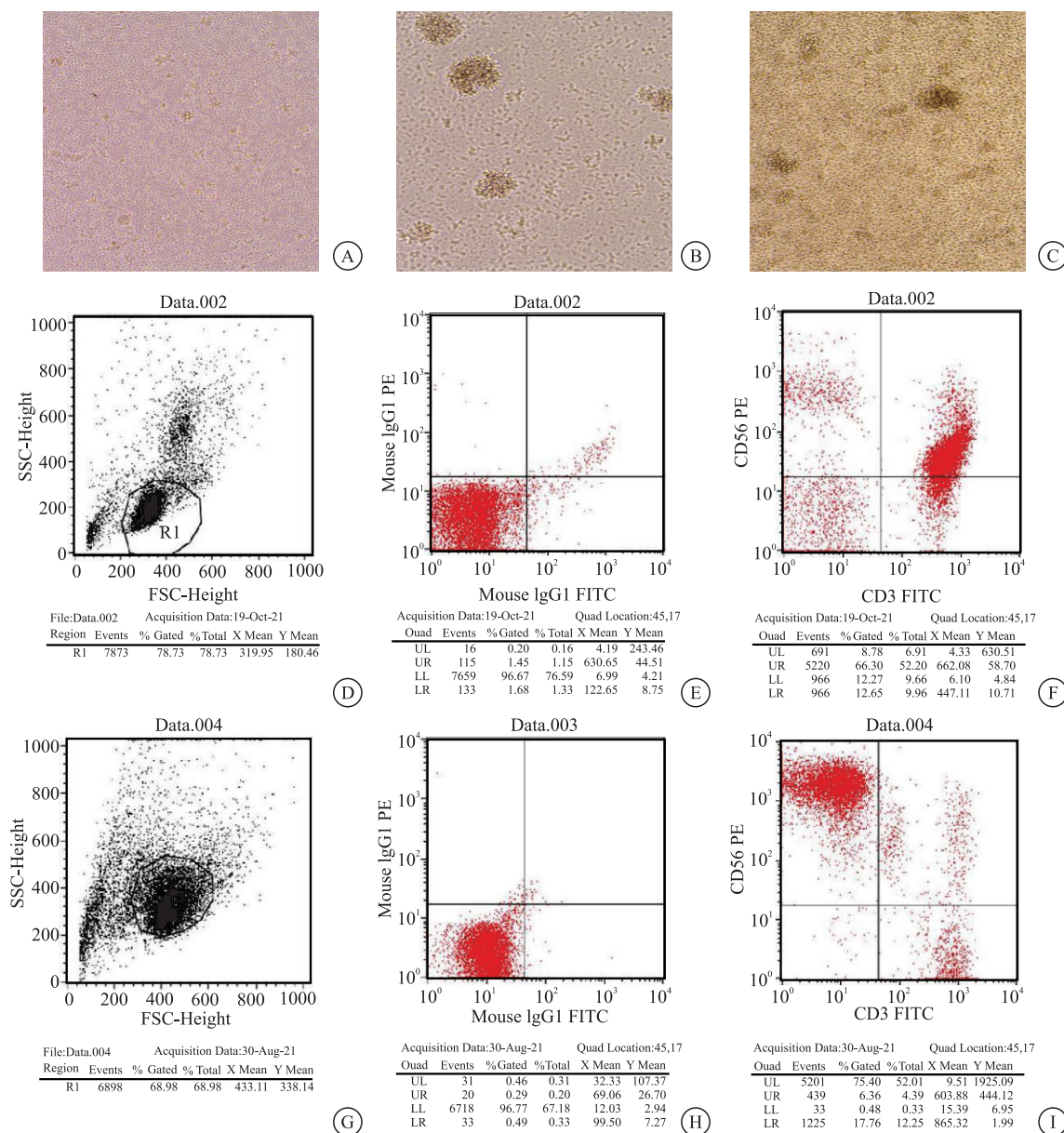


图 1 NK 细胞的培养结果

Figure 1 Results of NK cell culture

注: A. 健康人外周血分离 PBMCs (50×); B. NK 细胞扩增 3~4 d 后聚集成团 (50×); C. NK 细胞扩增 10~14 d (50×); D. 检测 PBMCs 中 NK 细胞比例时选定的细胞群; E. PBMCs 中 NK 细胞比例鉴定时的阴性对照鼠抗人 IgG-FITC; F. PBMCs 中 NK 细胞比例鉴定 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (CD3-FITC, CD56-PE); G. 检测扩增培养后 NK 细胞比例时选定的细胞群; H. 扩增培养后 NK 细胞比例鉴定时的阴性对照鼠抗人 IgG-FITC; I. 扩增培养后 NK 细胞比例鉴定 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (CD3-FITC, CD56-PE)。

LNCap 细胞系保留了 PCa 肿瘤细胞学及其早期分化功能的特征, 代表着早期雄激素依赖性的 PCa 的显著特征。LNCap 细胞倾向分泌总前列腺特异性抗原(tPSA), 而升高的 tPSA 提示为雄激素依赖性和早期肿瘤<sup>[17]</sup>。DU145 细胞系分化程度低, 为雄激素非依赖的 PCa 细胞, 具有强大的转移潜能, 缺乏内源性的雄激素受体的表达<sup>[18]</sup>。DU145 以分泌游离前列腺特异性抗原(fPSA)为主, 而升高的 fPSA 应警惕雄激素非依赖性肿瘤的存在<sup>[19]</sup>。PC3 细胞系分化程度低, 为雄激素非依赖性 PCa 细胞, 不含有内源性的雄激素

受体, 具有中等强度的转移潜能, 被广泛用于雄激素抵抗型的 PCa 的研究<sup>[20]</sup>。本研究结果显示效应细胞 NK 细胞对 3 种靶细胞的杀伤率差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 杀伤效率为由高到低分别为 LNCaP 细胞、DU145 细胞、PC3 细胞; 并且对于 PC3 细胞, 随着效靶比的增高, 不但没有杀伤作用, 反而促进其生长(杀伤效率为负数)。本研究通过对以往研究资料的梳理, 发现在生物学特性方面<sup>[18]</sup>, PC3 细胞、DU145 细胞是激素抵抗性前列腺癌(Castration resistant Prostate Cancer, CRPC), 而 LNCaP 细胞是激素敏感性前

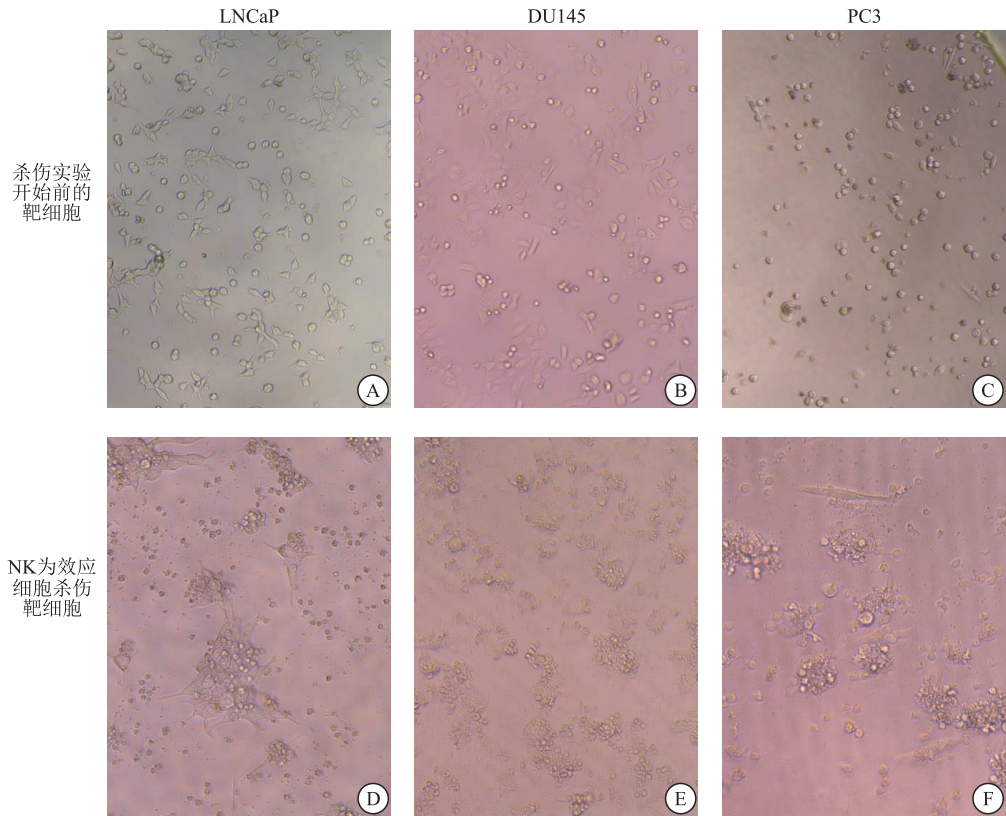


图 2 效应细胞 NK 对靶细胞 LNCaP、DU145、PC3 在效靶比为 10:1 时的杀伤图

Figure 2 Killing of effector cells NK on target cells LNCaP, DU145 and PC3 at an effect-target ratio of 10:1

注: A. 杀伤前的 LNCaP 细胞(50×); B. 杀伤前的 DU145 细胞(50×); C. 杀伤前的 PC3 细胞(50×); D. NK 细胞与 LNCaP 细胞共培养 24 h 后(50×); E. NK 细胞与 DU145 细胞共培养 24 h 后(50×); F. NK 细胞与 PC3 细胞共培养 24 h 后(50×)。由于 A、B、C 为不同靶细胞, 所用培养液不同, 因而背景颜色不同。

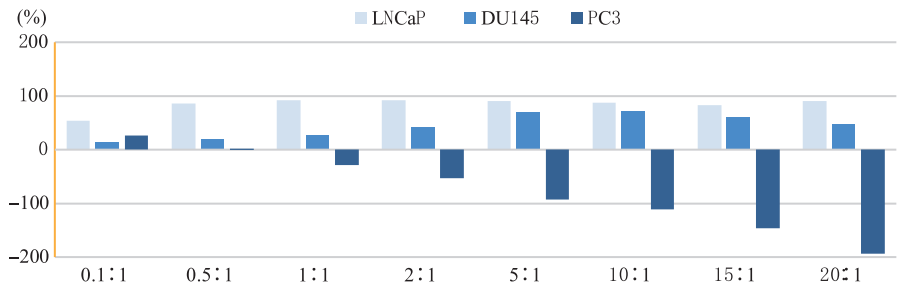


图 3 NK 细胞对靶细胞 LNCaP、DU145、PC3 的杀伤率

Figure 3 Killing rate of NK cells kill target cells LNCaP, DU145 and PC3

表 1 NK 细胞对靶细胞 LNCaP、DU145、PC3 的杀伤率( $\bar{x} \pm s$ , %)

Table 1 Killing rate of NK cells kill target cells LNCaP, DU145 and PC3

| 项目    | 0.1:1       | 0.5:1      | 1:1         | 2:1          | 5:1         | 10:1          | 15:1          | 20:1          |
|-------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| LNCaP | 53.37±4.07  | 85.94±9.50 | 92.03±9.95  | 91.37±6.06   | 90.91±5.23  | 87.27±3.85    | 83.60±2.55    | 90.15±7.94    |
| DU145 | 14.69±5.68  | 19.59±4.60 | 27.83±4.25  | 41.57±7.25   | 70.63±0.40  | 72.40±8.30    | 60.76±7.68    | 48.26±6.28    |
| PC3   | 26.69±10.56 | 0.99±9.25  | -29.25±9.66 | -53.28±13.13 | -92.50±6.43 | -110.99±11.06 | -145.79±14.08 | -193.74±12.53 |

列腺癌(Metastatic hormone-sensitive prostate cancer, mHSPC),为什么 NK 细胞对 LNCaP 的杀伤效果好,而对 PC3 细胞反而无杀伤力? 甚至促进其生长? 可能的机制是 NK 细胞对 mHSPC 杀伤效果好而对于 CRPC 杀伤效果差甚至起到反作用。PC3 与

DU145 均为低分化、雄激素非依赖的 PCa 细胞,均具有转移潜能且缺乏内源性的雄激素受体的表达,均同时表达细胞生长因子 CK5 和 CK8/18;而 PC3 与 LNCaP 均表现为上皮细胞特性、高表达 E-cadherin、不表达 Vimentin。因此,除 PC3 细胞不表达野生型 P53

表 2 NK 细胞在不同效靶比时对 LNCaP 靶细胞的杀伤率分组  
Table 2 The killing rates of NK to LNCaP target cells at different effect-targe

| LNCaP                                         | 比率    | n | 子集       |          |
|-----------------------------------------------|-------|---|----------|----------|
|                                               |       |   | 1        | 2        |
| Student-Newman-Keuls<br>事后多重比较 <sup>a,b</sup> | 0.1:1 | 6 | 53.376 7 |          |
|                                               | 15:1  | 6 |          | 83.605 0 |
|                                               | 0.5:1 | 6 |          | 85.946 7 |
|                                               | 10:1  | 6 |          | 87.271 7 |
|                                               | 20:1  | 6 |          | 90.151 7 |
|                                               | 5:1   | 6 |          | 90.911 7 |
|                                               | 2:1   | 6 |          | 91.373 3 |
|                                               | 1:1   | 6 |          | 92.030 0 |
|                                               | 显著性   |   | 1.000    | 0.323    |

表 3 NK 细胞在不同效靶比时对 DU145 靶细胞的杀伤率分组  
Table 3 The killing rates of NK to DU145 target cells at different effect-targe

| DU145                                         | 比率    | n | 子集       |          |          |          |          |
|-----------------------------------------------|-------|---|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                               |       |   | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        |
| Student-Newman-Keuls<br>事后多重比较 <sup>a,b</sup> | 0.1:1 | 6 | 14.698 3 |          |          |          |          |
|                                               | 0.5:1 | 6 | 19.598 3 |          |          |          |          |
|                                               | 1:1   | 6 |          | 27.835 0 |          |          |          |
|                                               | 2:1   | 6 |          |          | 41.571 7 |          |          |
|                                               | 20:1  | 6 |          |          | 48.263 3 |          |          |
|                                               | 15:1  | 6 |          |          |          | 60.763 3 |          |
|                                               | 5:1   | 6 |          |          |          |          | 70.638 3 |
|                                               | 10:1  | 6 |          |          |          |          | 72.408 3 |
|                                               | 显著性   |   | 0.168    | 1.000    | 0.062    | 1.000    | 0.615    |

表 4 NK 细胞在不同效靶比时对 PC3 靶细胞的杀伤率分组  
Table 4 The killing rates of NK to PC3 target cells at different effect-targe

| PC3                                           | 比率    | n | 子集         |            |            |           |           |           |         |          |
|-----------------------------------------------|-------|---|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|---------|----------|
|                                               |       |   | 1          | 2          | 3          | 4         | 5         | 6         | 7       | 8        |
| Student-Newman-Keuls<br>事后多重比较 <sup>a,b</sup> | 20:1  | 6 | -193.743 3 |            |            |           |           |           |         |          |
|                                               | 15:1  | 6 |            | -145.796 7 |            |           |           |           |         |          |
|                                               | 10:1  | 6 |            |            | -110.993 3 |           |           |           |         |          |
|                                               | 5:1   | 6 |            |            |            | -92.505 0 |           |           |         |          |
|                                               | 2:1   | 6 |            |            |            |           | -53.288 3 |           |         |          |
|                                               | 1:1   | 6 |            |            |            |           |           | -29.250 0 |         |          |
|                                               | 0.5:1 | 6 |            |            |            |           |           |           | 0.995 0 |          |
|                                               | 0.1:1 | 6 |            |            |            |           |           |           |         | 26.696 7 |
|                                               | 显著性   |   | 1.000      | 1.000      | 1.000      | 1.000     | 1.000     | 1.000     | 1.000   | 1.000    |

蛋白,而 DU145 和 LNCaP 细胞均可表达野生型 P53 蛋白外,并没有发现 PC3 细胞系与另外两株 PCa 细胞系的不同之处。然而,P53 基因是人体的抑癌基因之一,其突变会导致原有抑癌功能的丧失,同时获得新的致癌功能;有研究证明表达野生型 P53 基因的肿瘤细胞对放、化疗的敏感性强于不表达野生型 P53 基因的肿瘤细胞<sup>[21]</sup>。这说明本研究中“NK 细胞促进 PC3 细胞系生长”的结果,可能是由 PC3 细胞系不表达野生型 P53 蛋白引起的;也可能是由 PC3 细胞系的特殊性导致的,而这种“特殊性”在目前的研究资料中并没

有呈现出来,因此需要后续进行深入研究探索其作用机制。本研究的结果为肿瘤免疫逃逸的研究提供了可作为目标的研究细胞以及研究方向,为应用 NK 细胞过继性回输治疗前列腺癌的临床应用奠定了基础。

4 结论

采用细胞因子诱导扩增 PBMCs 的方法能够获得纯度较高、数量足够的 NK 细胞,为 NK 细胞的临床应用奠定基础;NK 细胞对 3 种 PCa 细胞系的杀伤率差异极显著,为后续进行深入研究探索原因及作用机制提供了方向。

## 【参考文献】

- [1] HE H, LIANG L, HAN D, *et al.* Different Trends in the Incidence and Mortality Rates of Prostate Cancer Between China and the USA: A Joinpoint and Age-Period-Cohort Analysis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 824464.
- [2] SCHATTEN H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1095: 1-14.
- [3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [4] 李星,曾晓勇. 中国前列腺癌流行病学研究进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48(1): 98-102.
- [5] 李小升,赵玉兰,陈习田,等. 前列腺癌患者生存随访数据分析[J]. *中国病案*, 2019, 20(11): 109-112.
- [6] XU L, WANG J, GUO B, *et al.* Comparison of clinical and survival characteristics between prostate cancer patients of PSA-based screening and clinical diagnosis in China[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 428-441.
- [7] 齐涛,黄世高,高红祥,等. 放疗联合内分泌治疗晚期复发性前列腺癌[J]. *西部医学*, 2020, 32(9): 1324-1327.
- [8] 张波,莫非,许亚宏,等. 多西他赛联合内分泌治疗前列腺癌对患者无进展生存期的影响[J]. *西部医学*, 2021, 33(4): 545-548.
- [9] MAROFI F, ABDUL-RASHEED O F, RAHMAN H S, *et al.* CAR-NK cell in cancer immunotherapy; A promising frontier[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(9): 3427-3436.
- [10] HAMMER Q, RÜCKERT T, ROMAGNANI C. Natural killer cell specificity for viral infections [J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(8): 800-808.
- [11] SIVORI S, PENDE D, QUATRINI L, *et al.* NK cells and IL-Cs in tumor immunotherapy[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 80: 100870.
- [12] XIE S, WU Z, NIU L, *et al.* Preparation of highly activated natural killer cells for advanced lung cancer therapy[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 5077-5086.
- [13] TANAKA J, MILLER J S. Recent progress in and challenges in cellular therapy using NK cells for hematological malignancies [J]. *Blood Rev*, 2020, 44: 100678.
- [14] LIU S, GALAT V, GALAT Y, *et al.* NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 7.
- [15] REZVANI K. Adoptive cell therapy using engineered natural killer cells[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54(Suppl 2): 785-788.
- [16] PERERA MOLLIGODA ARACHCHIGE A S. Human NK cells: From development to effector functions[J]. *Innate Immun*, 2021, 27(3): 212-229.
- [17] KOBAYASHI T, INOUE T, KAMBA T, *et al.* Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 15615-15635.
- [18] 王妍青. 雄激素受体在前列腺癌细胞系中作用的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*. 2011, 31(3): 361-365.
- [19] 孙伟桂,甘艺平,余强国,等. 人前列腺癌 LNCap 与 DU145 细胞的性激素、VEGF、bFGF 和 PSA 等差异表达及其意义[J]. *中国男科学杂志*, 2008, 22(11): 5-8, 16.
- [20] 林艳端,申铎,胡兵. 三种常见的前列腺癌细胞系 LNCap、PC3 和 DU145 的生物学特性[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(11): 4980-4982.
- [21] HERNÁNDEZ BORRERO L J, EL-DEIRY W S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188556.

(收稿日期:2022-10-13;修回日期:2023-08-30;编辑:刘灵敏)

## (上接第 1576 页)

- [17] CANBERK S, MONTEZUMA D, INCE U, *et al.* Variants of Papillary Thyroid Carcinoma: An Algorithmic Cytomorphology-Based Approach to Cytology Specimens[J]. *Acta Cytol*, 2020, 64(4): 288-298.
- [18] KIM D W, LEE E J, KIM S H, *et al.* Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: comparison inefficacy according to nodule size[J]. *Thyroid*, 2009, 19(1): 27-31.
- [19] 平波. 细针穿刺细胞学诊断甲状腺癌价值及评价[J]. *中国实用外科杂志*, 2011, 31(5): 386-388.
- [20] JIANG H J, HSIAO P J. Clinical application of the ultrasound-guided fine needle aspiration for thyroglobulin measurement to diagnose lymph node metastasis from differentiated thyroid carcinoma-literature review [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(4): 236-243.
- [21] ZHAO H, JING W, LI W, *et al.* Risk stratification study of indeterminate thyroid nodules with a next-generation sequencing assay with residual ThinPrep® material[J]. *J Cancer*, 2020, 11(24): 7276-7282.

(收稿日期:2022-10-02;修回日期:2023-09-08;编辑:刘灵敏)