

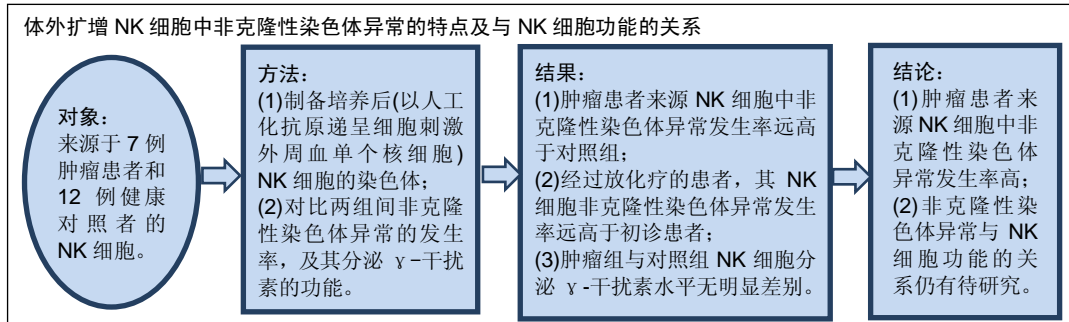
# 体外扩增NK细胞中非克隆性染色体异常的特征及意义

李玉龙, 黄洲风, 张磊, 郭成业, 程薇, 董晓燕, 朱尊民, 孙恺(河南省人民医院血液病研究所, 河南省郑州市 450002)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0645

ORCID: 0000-0001-5455-1922(李玉龙)

文章快速阅读:



李玉龙, 男, 1978 年生, 河南省郑州市人, 汉族, 2004 年郑州大学医学院毕业, 硕士, 副主任技师, 主要从事血液肿瘤遗传学研究。

通讯作者: 孙恺, 博士后, 主任医师, 河南省人民医院血液病研究所, 河南省郑州市 450002

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-06-04



文题释义:

**非克隆性染色体异常:** 是指在随机检测的 20-40 个中期分裂相中, 如果染色体异常发生率小于 4%, 则所出现异常即为非克隆性染色体异常。

**人工化抗原递呈细胞:** 通过基因工程技术, 使 K562 细胞表面表达 CD64、CD86、CD137L、截短型 CD19 和 IL-21 等抗原。NK 细胞在捕获 K562 细胞同时, 接触以上抗原, 诱发刺激信号而增殖。

摘要

**背景:** 非克隆性染色体异常在干细胞培养中较为常见且研究较多, 而在体外扩增的 NK 细胞中研究甚少。

**目的:** 探讨体外扩增 NK 细胞中非克隆性染色体异常的特征及意义。

**方法:** 分离肿瘤患者和健康志愿者外周血单个核细胞, 应用人工化抗原递呈细胞刺激 NK 细胞增殖, 流式细胞术鉴定其表型, 并测定其产生  $\gamma$ -干扰素的功能。传统 G 显带法分析 NK 细胞染色体异常。对两组 NK 细胞的非克隆性染色体异常发生率、分泌  $\gamma$ -干扰素的功能及两者相关性进行分析。

**结果与结论:** ①7 例肿瘤患者的 NK 细胞样本中, 6 例检测出非克隆性染色体异常, 而在 12 例健康志愿者中, 6 例存在非克隆性染色体异常; ②肿瘤组 481 个中期分裂相, 其中 17 个含有非克隆性染色体异常; 对照组 785 个中期分裂相, 其中 7 个含有非克隆性染色体异常[3.53%(17/481) vs. 0.89%(7/785),  $Z=-2.212$ ,  $P=0.028$ ]; ③4 例有放疗病史的患者, 其 NK 细胞中非克隆性染色体异常频率明显高于对照组( $P=0.003$ )及初诊肿瘤患者( $P=0.034$ ), 而初诊患者与对照组并无明显差别( $P=0.819$ ); ④肿瘤组分泌  $\gamma$ -干扰素的 NK 细胞比例与对照组无明显差别( $P=0.371$ )。NK 细胞产生  $\gamma$ -干扰素水平与非克隆性染色体异常发生率亦无明显相关性; ⑤实验首次探讨了以人工化抗原递呈细胞扩增的 NK 细胞中非克隆性染色体异常的特征, 并初步研究了其与 NK 细胞功能之间的关系。

**关键词:**

NK 细胞; 非克隆性染色体异常; 放疗;  $\gamma$ -干扰素

**主题词:**

杀伤细胞, 天然; 染色体; 干扰素  $\gamma$ ; 组织工程

**基金资助:**

河南省科技厅基础与前沿项目基金(142300410078), 项目名称: 自然杀伤细胞在造血干细胞移植中双重角色的研究

## The characteristics and significance of non-clonal chromosome aberrations in the *in vitro* expanded NK cells

Li Yu-long, Huang Zhou-feng, Zhang Lei, Wu Cheng-ye, Cheng Wei, Dong Xiao-yan, Zhu Zun-min, Sun Kai (Institute of Haematology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** The significance of non-clonal chromosome aberrations (NCCAs) in *in vitro* expanded stem cells has been discussed in many studies; however, it is not well documented in the expanded NK cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the characteristics and significance of NCCAs in the *in vitro* expanded NK cells.

**METHODS:** Peripheral blood mononuclear cells were isolated from patients with tumors and healthy controls. Artificial antigen presenting cells were used to stimulate the proliferation of NK cells. On the 7<sup>th</sup> day of culture, the cells were collected for phenotype identification and interferon- $\gamma$  secretion test by flow cytometry and for cytogenetic analysis by the conventional G-banding technique. The difference in the frequency of NCCAs and

Li Yu-long, Master, Associate chief technician, Institute of Haematology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

Corresponding author: Sun Kai, MD, Chief physician, Institute of Haematology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

interferon- $\gamma$  secretion between the two groups and the correlation between NCCAs and interferon- $\gamma$  secretion were studied.

**RESULTS AND CONCLUSION:** NCCAs were found in 6 of 7 samples from the tumor patient group and 6 of 12 samples from the healthy controls. In the tumor patient group, 17 metaphases containing NCCAs were found out of 481 metaphases, and in the control group, 7 NCCA-containing metaphases were detected out of 785 metaphases [3.53% (17/481) vs. 0.89% (7/785),  $Z=-2.212$ ,  $P=0.028$ ]. Four patients with a history of chemoradiotherapy showed higher NCCA frequencies than those patients undergoing chemoradiotherapy ( $P=0.034$ ) and the healthy controls ( $P=0.003$ ). No difference was found between the newly diagnosed tumor patients and the healthy controls ( $P=0.819$ ). The ratios of interferon- $\gamma$  secreting NK cells in the two groups were not significantly different ( $P=0.371$ ) and the correlation between the frequency of NCCAs and the interferon- $\gamma$  secreting level was not identified. It was the first time that the characteristics of NCCAs in the artificial antigen presenting cells-expanded NK cells and the relationship between NCCAs and the NK cell function were preliminarily studied. The effect of NCCAs on the function and survival of NK cells *in vitro* and *in vivo* needs further investigations.

**Subject headings:** Killer Cells, Natural; Chromosomes; Interferon-gamma; Tissue Engineering

**Funding:** Fundamental and Frontier Project Fund of Henan Provincial Science and Technology Department, No. 142300410078

## 0 引言 Introduction

NK细胞是人体天然免疫中一种强大的效应细胞,可以在没有预先激活的条件下杀伤肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。以人工化抗原递呈细胞(artificial antigen presenting cells, aAPCs),即基因工程技术改造的K562细胞(表达CD64、CD86、CD137L、截短型CD19和IL-21等表面抗原)与NK细胞共培养的方法,已广泛应用于NK细胞的过继免疫治疗<sup>[2]</sup>。然而每次细胞分裂都伴随着一定概率的DNA突变,在快速扩增过程中修复这种损伤的困难增大,对于曾经暴露于致癌物的细胞更是如此<sup>[3]</sup>。体外培养的间充质干细胞中,经常可检测到克隆性及非克隆性染色体异常(clonal/non-clonal chromosome aberrations, CCAs/NCCAs)<sup>[4]</sup>。克隆性染色体异常是指在随机检测的20-40个中期分裂相中至少被发现2次(如果是整条染色体缺失,则至少3次)的异常。按此定义,一种克隆性染色体异常在被检测样本中的发生率需高于5%-10%<sup>[5]</sup>。而在一份样本中发生率小于4%的染色体异常即为非克隆性染色体异常<sup>[6]</sup>。对于体外扩增干细胞中所发现的克隆性染色体异常或非克隆性染色体异常对干细胞的影响已有较广泛研究<sup>[4, 7]</sup>,该类细胞是否能够发生恶性转化仍存在争议<sup>[8]</sup>。

在体外培养的NK细胞中是否存在染色体异常,以及这些异常是否影响NK细胞的功能,相关报道甚少。为此,作者对来源于肿瘤患者和健康志愿者的经人工化抗原递呈细胞扩增的NK细胞样本进行了染色体分析和分泌 $\gamma$ -干扰素功能检测,以期对此类NK细胞是否适合临床应用提供佐证。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 前瞻性队列研究。

1.2 时间及地点 2015年2月至2016年7月在河南省人民医院血液病研究所完成。

1.3 对象 随机选取2015年在河南省人民医院就诊的初诊及正在接受治疗的肿瘤患者共7例(表1)。7例患者均经影像学及病理学明确诊断,且无免疫系统疾病。取材时,外周血白细胞均在正常范围内。

健康志愿者12名,男11名,女1名,平均年龄32.3岁。

肿瘤组与对照组间性别比例( $P=0.123$ )及年龄比较( $P=0.944$ ),差异均无显著性意义,具有可比性。

## 1.4 方法

1.4.1 NK细胞培养 抽取外周血30 mL,采用密度梯度离心法分离单个核细胞,以 $(2-6)\times 10^8 L^{-1}$ 的浓度接种于NK细胞培养基(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),与人工化抗原递呈细胞(浙江中赢方舟生物工程股份有限公司)按1:2的比例共培养<sup>[9]</sup>。每2 d或3 d半量换液1次,每7 d按1:1的比例加入人工化抗原递呈细胞重新刺激NK细胞增殖。

1.4.2 流式细胞术鉴定NK细胞表型 在细胞第1个培养对数生长期(第7天)收集NK细胞,应用流式细胞仪检测细胞表面CD3, CD4, CD8, CD16和CD56(艾森生物杭州有限公司)分子的表达<sup>[10]</sup>。

1.4.3 流式细胞仪检测NK细胞胞浆内 $\gamma$ -干扰素水平 在培养的NK细胞样本中加入10  $\mu g/L$ 美洲商陆有丝分裂原(PMA)、1 mg/L离子霉素(ionomycin)、5 mg/L Brefeldin A,置于37  $^{\circ}C$ ,体积分数为5%CO<sub>2</sub>温箱中孵育6 h;用洗剂(含体积分数为1%胎牛血清,0.02% NaN<sub>3</sub>的PBS)清洗1次,加入CD3-APC和CD56-PE单克隆抗体,4  $^{\circ}C$ 孵育30 min;用200  $\mu L$ 固定缓冲液(含40 g/L多聚甲醛的PBS)室温固定20 min,然后用PBS清洗2遍,破膜剂(含体积分数为5%胎牛血清,0.1%皂素,0.02% NaN<sub>3</sub>的PBS)清洗1遍,加入IFN- $\gamma$ -FITC单抗,室温孵育15 min,流式细胞仪分析。

1.4.4 染色体核型分析 将NK细胞进行低渗,固定,按传统G显带方法处理,Metasystem全自动扫描系统扫描中期分裂相。每份样本分析50-100个分裂相,结果按照人类细胞遗传学国际命名体制2013进行描述。另外也对K562细胞的核型进行了分析,采用荧光原位杂交法检测K562细胞的性别染色体(K562细胞系来源于一位女性白血病患者)以排除所检测核型中存在滋养细胞的污染<sup>[11]</sup>。

1.5 主要观察指标 非克隆性染色体异常的具体形式,非克隆性染色体异常发生率及分泌 $\gamma$ -干扰素水平。

1.6 统计学分析 两组间率的比较用卡方检验的Fisher精确概率法;两样本均数的比较用 $t$ 检验,方差不齐时用秩和检验;相关性分析用Pearson检验。统计学检验水准为双侧 $P < 0.05$ 。统计学分析采用SPSS 17.0软件。

## 2 结果 Results

2.1 NK细胞的免疫表型验证 目前,CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>

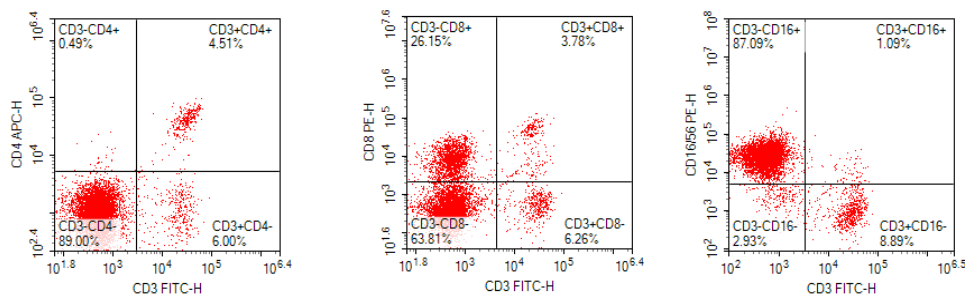


图1 NK细胞的免疫表型

Figure 1 Phenotype of expanded NK cells

图注: CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>细胞代表NK细胞。



图2 培养第7天NK细胞形态(x10)

Figure 2 Morphology of NK cells on the 7<sup>th</sup> day of culture (x10)

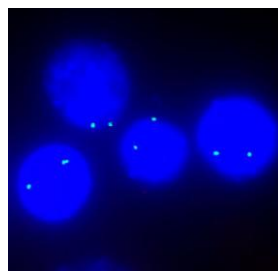


图4 K562细胞的性别染色体FISH检测结果

Figure 4 X/Y signals in the K562 cells by FISH test

图注: 所有细胞均显示两个绿色信号(代表X染色体)。

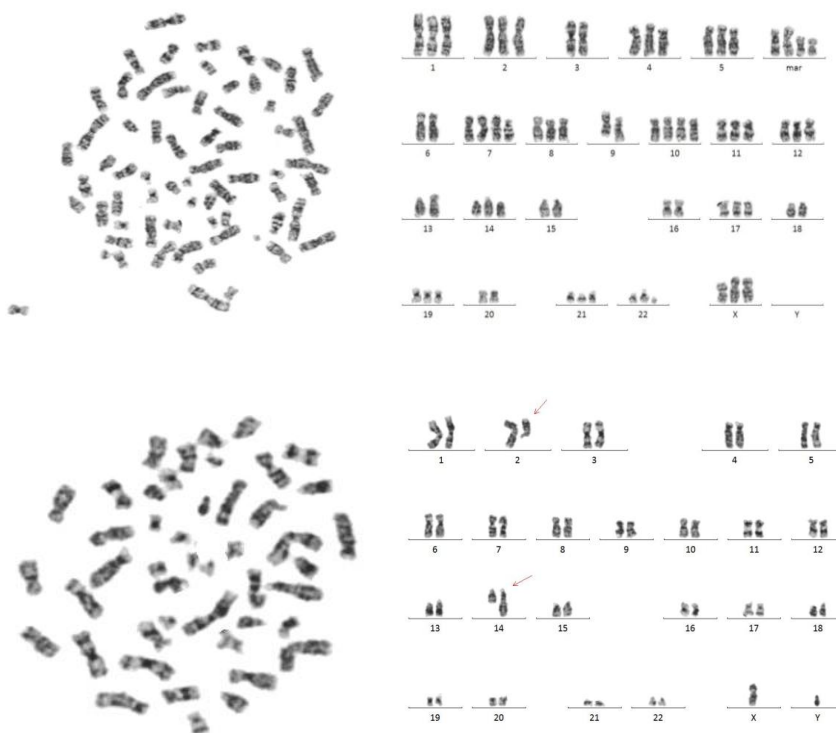


图3 K562细胞的染色体异常(姬姆萨染色, x630)

Figure 3 Chromosomal abnormalities of K562 cells (Giemsa staining, x630)

图注: K562细胞的染色体异常为复杂克隆性染色体异常, 包括1, 2, 4, 5, 7, 11, 12, 14, 17, 19, 21号染色体三体, 7p-, Xq-, t(9;22)以及4个标记染色体。

图5 P4 NK细胞样本中发现的非克隆性染色体异常: t(2;14)(q21;q32)(姬姆萨染色, x630)

Figure 5 Non-clonal chromosome aberrations [t(2;14)(q21;q32)] in the NK cell samples at passage 4 (Giemsa staining, x630)  
图注: 该异常为2号染色体长臂2区1带与14号染色体长臂3区2带之间的易位, 箭头所指为易位后的2号和14号染色体。

表1 肿瘤患者资料

Table 1 Data of patients with tumors

编号(P)	性别	年龄(岁)	诊断	治疗史
P1	男	54	肝细胞癌, TNM分期: IIIA期	7年前进行经导管动脉化疗栓塞术(TACE), 其后7年间间断接受立体适形放疗2 Gy/次, 4次/周, 总剂量30 Gy。
P2	女	72	胰腺癌, TNM分期: III期	无
P3	男	49	肝细胞癌, TNM分期: II期	无
P4	男	52	肝细胞癌, TNM分期: II期	无
P5	男	55	右肺上叶腺癌, TNM分期: IB期	培美曲塞 500 mg/m <sup>2</sup> +顺铂 75 mg/m <sup>2</sup> , 每3周重复1次(已进行2次)。
P6	男	52	右肺小细胞癌伴纵隔淋巴结转移, TNM分期: IIB期	依托泊苷 100 mg/m <sup>2</sup> 第1, 2, 3天+卡铂 200 mg/m <sup>2</sup> 第1天, 3周重复1次(已进行1次); 放疗2 Gy/次, 4次/周, 已接受剂量30 Gy。
P7	女	52	右肺小细胞癌肝转移, TNM分期: IVA期	依托泊苷 100 mg/m <sup>2</sup> 第1, 2, 3天+卡铂 200 mg/m <sup>2</sup> 第1天, 3周重复1次; 肝脏进行经导管动脉化疗栓塞术。

表 2 扩增后 NK 细胞中非克隆性染色体异常情况

Table 2 Non-clonal chromosome aberrations in the *in vitro* expanded NK cells

编号	扩增第 7 天 NK 细胞非克隆性染色体异常情况		N/T		
	肿瘤组	对照组	肿瘤组	对照组	
1	t(2;6)(q31;p24) t(X;4)(q23;p16),der(15) t(5;15)(p13;p11),t(9;13)(p24;q31) t(4;15)(q24;q?),del(21)(q11q21) add(2)(q?)	add(9)(q34) t(5;6)(q35;p22)	5/50	2/100	
2	der(7)	t(7;9)(p10;q34)	1/100	1/100	
3	No	No	0/60	0/52	
4	t(2;14)(q21;q32)	t(6;12)(p22;p11)	1/57	1/62	
5	t(3;5)(p11;q35) add(9)(p24) der(15;17)(q10;q10)	der(13)	3/100	1/50	
6	t(1;16)(p31;p11) der(1) add(11)(p15)	No	3/64	0/71	
7	t(2;3)(p25;p13) add(2)(q?) der(4)	t(5;11)(q12;q23)	4/50	1/58	
8		No		0/55	
9		No		0/52	
10		add(2)(q37)		1/60	
11		No		0/55	
12		No		0/70	
总计			17/481(3.53%)	7/785(0.89%)	P=0.028

表注: N/T: N 代表含有非克隆性染色体异常的分裂相, T 代表共分析的分裂相数目。

被认为是 NK 细胞的表面标志。在培养的第 7 天, 80.5%–91.2% 的细胞呈现 CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 表型(图 1), 人工抗原递呈细胞成功刺激了 NK 细胞的增殖(图 2)。

2.2 肿瘤组和对照组 NK 细胞中检出非克隆性染色体异常人数及非克隆性染色体异常发生频率比较 人工化抗原递呈细胞的核型为复杂的克隆性染色体异常(图 3), 而所有 NK 细胞样本中均未检测到克隆性染色体异常。FISH 检测人工化抗原递呈细胞性别染色体为两个绿色 X 信号(图 4), 表示 K562 细胞来自女性, 因此异常的男性核型不可能源自人工化抗原递呈细胞污染。

在 7 例肿瘤患者的 NK 细胞样本中, 6 例检测出非克隆性染色体异常(图 5), 而在 12 例健康志愿者中, 6 例检出非克隆性染色体异常, 两者相比差异无显著性意义(85.71% vs. 50%, P=0.173)。

在肿瘤组中, 共分析 481 个中期分裂相, 发现含有非克隆性染色体异常的分裂相 17 个; 在健康组中, 共分析 785 个中期分裂相, 发现含非克隆性染色体异常的分裂相 7 个, 两者相比差异有显著性意义[3.53%(17/481) vs. 0.89%(7/785), Z=-2.212, P=0.028]。

2.3 有/无放化疗史的个体 NK 细胞中非克隆性染色体异常的频率比较 4 例有放化疗病史的患者, 264 个中期分裂相中发现含有非克隆性染色体异常的分裂相 15 个, 明显高于对照组 [5.68%(15/264) vs. 0.89%(7/785), Z=-2.991, P=0.003] 及初诊肿瘤患者 [5.68%(15/264) vs. 0.92%(2/217), Z=-2.121, P=0.034], 而初诊肿瘤患者与对照组

非克隆性染色体异常的频率差异无显著性意义[0.92%(2/217) vs. 0.89%(7/785), Z=-0.229, P=0.819], 见表 2。

2.4 肿瘤组与对照组 NK 细胞  $\gamma$ -干扰素表达水平比较 培养后肿瘤组与对照组 NK 细胞表达  $\gamma$ -干扰素水平差异无显著性意义[(28.41±3.54)% vs. (31.88±7.50)%, F=0.846, P=0.371], 接受过放化疗的患者与对照组以及初诊肿瘤患者相比, 差异亦无显著性意义[(26.4±3.21)% vs. (31.88±7.50)%, F=2.847, P=0.114; (26.4±3.21)% vs. (32.1±5.63)%, F=2.135, P=0.204]。

2.5 NK 细胞中非克隆性染色体异常与  $\gamma$ -干扰素分泌水平相关性分析 肿瘤组和对照组 NK 细胞中, 非克隆性染色体异常与  $\gamma$ -干扰素表达水平均无明显相关性(r 值分别为 -0.472, -0.557, P 值分别为 0.285, 0.06)。

### 3 讨论 Discussion

一直以来, 克隆性染色体异常都是肿瘤遗传学研究的重点, 其不仅增进了研究者对血液肿瘤甚至部分实体瘤发病机制的认识, 而且促进了针对特定克隆性染色体异常的靶向性疗法的研究<sup>[12]</sup>。而非克隆性染色体异常的重要性则相对被忽视了。非克隆性染色体异常早期被用来评估特殊职业人群暴露于致癌物后发生癌症的风险<sup>[13]</sup>。肿瘤患者的外周血非克隆性染色体异常明显升高, 尤其在接受过放化疗之后, 提示非克隆性染色体异常和基因缺陷、疾病状态以及细胞的进化潜能密切相关<sup>[14]</sup>。在该研究中, 经人工化抗原递呈细胞刺激增殖的 NK 细胞, 50% 健康志愿者和

85.71%肿瘤患者可发现非克隆性染色体异常, 差异无显著性意义(85.71% vs. 50%,  $P=0.173$ ), 说明伴随细胞的快速增殖, 染色体复制, 分裂过程中的错误增加是普遍现象。肿瘤患者中共分析481个中期分裂相, 其中17个含有非克隆性染色体异常; 健康志愿者中共分析785个中期分裂相, 7个含有非克隆性染色体异常(3.53% vs. 0.89%,  $Z=-2.212$ ,  $P=0.028$ ), 说明肿瘤患者基因缺陷和基因组不稳定性明显高于正常人。通过进一步比较发现, 肿瘤患者NK细胞中增高的非克隆性染色体异常, 主要是由经历过放化疗的患者贡献的, 其发生率远高于健康对照(5.68% vs. 0.89%,  $Z=-2.991$ ,  $P=0.003$ )。而初诊患者非克隆性染色体异常的发生率与对照组比较差异无显著性意义(0.92% vs. 0.89%,  $Z=-0.229$ ,  $P=0.819$ ), 这也提示放化疗作为治疗肿瘤的手段, 同时也促使肿瘤患者的基因组异质性和进化潜能显著提高, 从而可能产生抵抗相应治疗的细胞个体<sup>[15]</sup>。

该研究发现的非克隆性染色体异常, 涉及2号染色体6次为最多, 其中5次为长臂(q), 但位点各不相同, 分别为q21、q31、q37以及2个无法确定。重复出现2次的位点包括5q35、6p22、9p24和9q34。在这些位点存在很多癌症相关基因, 如2q31的HOXD13、HOXD11、HOXD1, 其与NUP98, ETV6的融合见于多种血液髓系肿瘤。位于5q35的NPM1基因, 具有多个伙伴基因, 参与淋巴瘤、白血病、非小细胞肺癌的发生发展。位于6p22的DEK基因, 9q34的SET基因, 以及位于9p24的JAK2基因, 也都以不同的融合基因形式出现于多种血液肿瘤之中<sup>[16-21]</sup>。研究中并未发现上述热点基因参与的常见染色体异常, 如t(2;11), t(2;5), t(3;5), t(6;9)等。但是否涉及上述基因, 以及该非克隆性染色体异常对细胞有何影响尚待研究。

已经证实的是, 非克隆性染色体异常与染色体不稳定性关系密切, 以染色体不稳定性为特征的肿瘤, 升高的非克隆性染色体异常是染色体不稳定性的具体表现形式之一<sup>[22-24]</sup>。非克隆性染色体异常的升高可在人外周血中被发现, 而且通常伴随患癌概率的增高<sup>[13]</sup>。敲除了抑癌基因ATM和/或P53的多种小鼠组织细胞, 经过传代培养后, 发现其非克隆性染色体异常的发生频率均明显高于对照组, 表明肿瘤发生风险与非克隆性染色体异常发生率呈正相关<sup>[24]</sup>。Ye等<sup>[24]</sup>检测了多种代表不同阶段的肿瘤细胞系中的非克隆性染色体异常, 发现集落形成能力以及对裸鼠的致瘤能力最强的细胞系总是伴随着最高的非克隆性染色体异常发生率。

NK细胞作为一种终末分化期细胞, 其增殖依靠细胞因子或人工化抗原递呈细胞的刺激。一旦撤销刺激因素, NK细胞将不可避免走向凋亡<sup>[25]</sup>。因此, 体外扩增的NK细胞中虽然可发现不同比例的非克隆性染色体异常, 但其主要反映了细胞基因组本身的缺陷以及快速扩增导致的染色体复制、分配和修复方面的错误<sup>[14]</sup>。虽然干细胞体外培养能否导致细胞恶性转化的争论一直存在<sup>[8]</sup>, 但目前为止, 未发

现输注NK细胞致瘤或癌变的报道<sup>[26]</sup>。

一种核型即代表一种独特的遗传信息, 其生物学功能也必然有相应的改变。非克隆性染色体异常的发生以及不同非克隆性染色体异常的比例是否对NK细胞的功能产生影响尚不得而知。该实验检测了培养第7天NK细胞分泌 $\gamma$ -干扰素的能力, 在肿瘤组与对照组之间差异无显著性意义( $P=0.371$ ), 亦未发现肿瘤组或对照组非克隆性染色体异常的发生率和NK细胞分泌 $\gamma$ -干扰素的功能之间有显著相关性( $P$ 值分别为0.285, 0.06)。究其原因, 作者认为主要是发生非克隆性染色体异常的细胞占NK细胞的比例并不高(该实验中最高为10%), 并不能对培养后的NK细胞整体功能产生足够的影响, 目前尚无法对发生非克隆性染色体异常的细胞单独检测。由于该研究病例数目较少, 无法针对放化疗剂量、药物种类、不同肿瘤病类型以及病理分期与非克隆性染色体异常和NK细胞功能之间的关系进行分组研究。但是, 关于放化疗对NK细胞功能的影响, 报道的差异较大。区大卫等<sup>[27]</sup>报道54例鼻咽癌患者, 放疗后NK细胞杀伤K562细胞功能显著降低。而刘晓静等<sup>[28]</sup>报道28例放疗的中晚期食管癌患者, 当累积剂量达20-30 Gy和40-60 Gy时检测NK细胞功能, 发现其分泌穿孔素的能力显著增强。有报道称, 如果放疗包含了血流丰富的纵膈区域, 则患者NK细胞功能下降, 如不涉及纵膈区, NK细胞功能不受影响<sup>[29]</sup>。Ghiringhelli等<sup>[30]</sup>发现对肿瘤患者小剂量、周期性应用环磷酰胺(50 mg, 2次/d, 口服, 间隔1周, 共4周), 可特异性杀伤调节性T细胞, 降低其免疫抑制功能, 从而增强NK细胞的功能。而Koda等<sup>[31]</sup>研究了174例直肠癌患者, 发现术前化疗显著损伤了I到III期患者的NK细胞功能。因此, 放化疗对NK细胞功能到底产生何种影响与肿瘤类型、疾病分期、用药、患者自身状况等多种因素相关, 无法一概而论。

虽然研究中未证实非克隆性染色体异常对于NK细胞功能有何影响, 但是非克隆性染色体异常对细胞寿命的影响似乎是必然的。DNA损伤可以通过多条信号传导通路导致细胞凋亡。ATM、ATR蛋白可检测到诸如双链DNA断裂(double-strand breaks, DSBs)等损伤, 传递信号激活检查点激酶1, 2(checkpoint kinases, CHK)和P53。P53激活前凋亡因子如FAS、PUMA和BAX的转录, 启动凋亡程序<sup>[32]</sup>。非克隆性染色体异常的存在无疑将导致该类细胞的凋亡, 缩短NK细胞的寿命。该研究中, NK细胞中发生非克隆性染色体异常的细胞比例最高为10%, 但是考虑到人工检测的局限性, 实际发生率也许更高。况且, 放化疗通常都以DNA作为靶标, 未检测到非克隆性染色体异常细胞中存在DNA损伤的比例尚难确定。因此, 该类患者NK细胞回输后的生存时间和效能势必受到影响。

综上所述, 作者发现在应用人工化抗原递呈细胞体外扩增的NK细胞中普遍存在非克隆性染色体异常, 而具有放化疗史的肿瘤患者, 其NK细胞的非克隆性染色体异常频率显著增高, 并未发现具有较高频率非克隆性染色体异常的

NK细胞样本整体分泌 $\gamma$ -干扰素的功能与对照组有明显差别。含有非克隆性染色体异常的NK细胞功能和回输后的生存时间以及遗传学检测在NK细胞过继性免疫治疗中的意义值得进一步研究。

**作者贡献:** 实验设计为李玉龙、黄洲风, 实验实施为李玉龙、张磊、郭成业、程薇、董晓燕、孙恺, 实验评估为朱尊民、孙恺, 资料收集为李玉龙、张磊、郭成业。

**经费支持:** 该文章接受了“河南省科技厅基础与前沿项目基金(142300410078)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该研究的实施符合河南省人民医院血液病研究所的相关伦理要求。

**知情同意问题:** 实验所用血液标本来源于肿瘤患者、健康志愿者, 对提供样本均知情同意。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经郑州大学公共卫生学院施学忠主任审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Barao I, Murphy WJ. The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9(12):727-741.
- [2] Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One.* 2012;7(1):e30264.
- [3] Hare I, Gencheva M, Evans R, et al. In Vitro Expansion of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Alters DNA Double Strand Break Repair of Etoposide Induced DNA Damage. *Stem Cells Int.* 2016;2016:8270464.
- [4] Capelli C, Pedrini O, Cassina G, et al. Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. *Haematologica.* 2014;99(6):e94-97.
- [5] Schaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, et al. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature Karger, Basel. 2013.
- [6] Heng HH, Regan SM, Liu G, et al. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs. *Mol Cytogenet.* 2016;9:15.
- [7] Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):521-531.
- [8] Barkholt L, Flory E, Jekerle V, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy.* 2013;15(7):753-759.
- [9] Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res.* 2009;69(9):4010-4017.
- [10] Pittari G, Filippini P, Gentilcore G, et al. Revving up Natural Killer Cells and Cytokine-Induced Killer Cells Against Hematological Malignancies. *Front Immunol.* 2015;6:230.
- [11] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321-334.
- [12] Bochtler T, Fröhling S, Krämer A. Role of chromosomal aberrations in clonal diversity and progression of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(6):1243-1252.
- [13] Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Cancer Res.* 2000;60(6):1619-1625.
- [14] Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(1):1-10.
- [15] Shen KC, Heng H, Wang Y, et al. ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. *Cancer Res.* 2005;65(19):8747-8753.
- [16] Mavrogenis AF, Patapis P, Papaparaskeva KT, et al. Extraskeletal myxoid chondrosarcoma of the perineum. *Orthopedics.* 2009;32(3):216.
- [17] Cho TJ, Kim OH, Choi IH, et al. A dominant mesomelic dysplasia associated with a 1.0-Mb microduplication of HOXD gene cluster at 2q31.1. *J Med Genet.* 2010;47(9):638-639.
- [18] Logan GE, Mor-Vaknin N, Braunschweig T, et al. DEK oncogene expression during normal hematopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood Cells Mol Dis.* 2015;54(1):123-131.
- [19] Ohanian M, Bueso-Ramos C, Ok CY, et al. Acute myeloid leukemia with MYC rearrangement and JAK2 V617F mutation. *Cancer Genet.* 2015;208(11):571-574.
- [20] Prokopiou C, Koumas S, Neokleous N, et al. SET-NUP214 rearrangement in isolation is insufficient to induce leukemia: a single center experience. *Leuk Lymphoma.* 2015:1-2.
- [21] Qiu SW, Wan YL, Wang M, et al. Effects of NPM1 gene expression on acute myeloid leukemia cell lines and its mechanism. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2017;38(11):940-944.
- [22] Sharpless NE, Ferguson DO, O'Hagan RC, et al. Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Mol Cell.* 2001;8(6):1187-1196.
- [23] Kulusayin Ozar MO, Orta T. The use of chromosome aberrations in predicting breast cancer risk. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24(2):217-222.
- [24] Ye CJ, Stevens JB, Liu G, et al. Genome based cell population heterogeneity promotes tumorigenicity: the evolutionary mechanism of cancer. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):288-300.
- [25] Fujisaki H, Kakuda H, Imai C, et al. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol.* 2009;145(5):606-613.
- [26] Fang F, Xiao W, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol.* 2017;31:37-54.
- [27] 区大卫, 蔡体育, 李端, 等. 干扰素在体外对放疗后鼻咽癌病人自然杀伤细胞功能的影响[J]. *中山医学院学报*, 1984, 5(2):40-44.
- [28] 刘晓静, 龚春香, 范敏其, 等. 放疗对食管癌患者血清可溶性MICA含量及外周血NK细胞功能的影响[J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(8):508-511.
- [29] McGinnes K, Florence J, Penny R. The effect of radiotherapy on the natural killer (NK)-cell activity of cancer patients. *J Clin Immunol.* 1987;7(3):210-217.
- [30] Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):641-648.
- [31] Koda K, Saito N, Oda K, et al. Natural killer cell activity and distant metastasis in rectal cancers treated surgically with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Am Coll Surg.* 2003;197(2):254-260.
- [32] Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 2013;332(2):237-248.