



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113881671 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 04

(21) 申请号 202111162804.8

(22) 申请日 2021.09.30

(71) 申请人 南京赛尔健生物技术有限公司
地址 211199 江苏省南京市江宁区兴民北路42号江宁高新园

(72) 发明人 于海涛

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

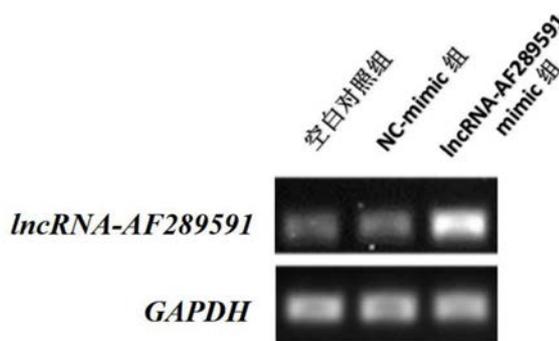
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

增强NK细胞杀伤力的基因靶标及应用

(57) 摘要

本发明公开了增强NK细胞杀伤力的基因靶标及应用。NK细胞发挥杀伤靶细胞的过程中，NK细胞受到信号触发，先通过脱颗粒过程释放Perforin、Granzyme B到达靶细胞，Perforin作用是在靶细胞膜上穿孔通道进而介导Granzyme B进入靶细胞，Granzyme B进入靶细胞后引发靶细胞的DNA断裂使靶细胞凋亡。CD107a也是NK细胞脱颗粒过程中的重要参与因子。因此，本领域技术人员通常通过检测Perforin、Granzyme B、CD107a的表达水平评价NK细胞的杀伤力强弱。本发明发现，高表达lncRNA-AF289591可以有效提高NK细胞的杀伤力。



1. 一种体外增强NK细胞杀伤力的方法,其特征在于:提高NK细胞中靶标基因的表达水平,所述靶标基因为长链非编码RNA。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述长链非编码RNA为lncRNA-AF289591。

增强NK细胞杀伤力的基因靶标及应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞免疫治疗领域,具体涉及增强NK细胞杀伤力的基因靶标及应用。

背景技术

[0002] NK细胞又称自然杀伤细胞,是机体固有免疫的组成细胞之一,主要分布于外周血和脾脏。在正常情况下,NK细胞通过识别细胞表面的人类白细胞抗原(HLA) I类分子区分“自我”与“非我”以杀伤或诱导凋亡来清除肿瘤细胞或病毒感染细胞。目前,NK细胞已被广泛用于肿瘤的过继免疫治疗中。由于NK细胞仅占外周血淋巴细胞的5%~15%,因而可以通过体外扩增以满足临床治疗的需求。实验研究已表明,体外扩增的NK细胞在肝癌、胶质母细胞瘤、白血病等多种肿瘤中均表现出良好的抗肿瘤效应。

[0003] 长链非编码RNA(lncRNA)是一类长度>200nt但不具备编码蛋白质功能的RNA,占到非编码RNA的80%。lncRNA在细胞生命中发挥重要作用,对细胞各种功能至关重要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供增强NK细胞杀伤力的基因靶标及应用。

[0005] 本发明上述目的通过如下技术方案实现:

[0006] 一种体外增强NK细胞杀伤力的方法,提高NK细胞中靶标基因的表达水平,靶标基因为长链非编码RNA。

[0007] 优选地,所述长链非编码RNA为lncRNA-AF289591。

[0008] NK细胞发挥杀伤靶细胞的过程中,NK细胞受到信号触发,先通过脱颗粒过程释放Perforin、Granzyme B到达靶细胞,Perforin作用是在靶细胞膜上穿孔通道进而介导Granzyme B进入靶细胞,Granzyme B进入靶细胞后引发靶细胞的DNA断裂使靶细胞凋亡。CD107a也是NK细胞脱颗粒过程中的重要参与因子。因此,本领域技术人员通常通过检测Perforin、Granzyme B、CD107a的表达水平评价NK细胞的杀伤力强弱。本发明具体实施例说明,高表达lncRNA-AF289591可以有效提高NK细胞的杀伤力。

[0009] 有益效果:

[0010] 本发明发现,高表达lncRNA-AF289591可以有效提高NK细胞的杀伤力。

附图说明

[0011] 图1是琼脂糖凝胶电泳测定lncRNA-AF289591表达水平。

[0012] 图2是流式法检测Perforin、Granzyme B、CD107a表达水平。

具体实施方式

[0013] 一、实验材料

[0014] 淋巴细胞分离液购自杭州联科生物技术股份有限公司,品牌为MultiSciences。IL-2购自索莱宝,人AB血清购自上海联硕生物科技有限公司,NK细胞培养基品牌为

CellGro。逆转录试剂盒购自TaKaRa, lncRNA-AF289591mimic、NC-mimic及PCR扩增引物购自上海生工。

[0015] 二、实验方法

[0016] 1、NK细胞培养和鉴定

[0017] 取适量抗凝外周血,加入淋巴细胞分离液,2000rpm离心20min,吸取白膜层,生理盐水洗涤3次,去上清,加入添加有200U/mL IL-2和50mL/L人AB血清的NK细胞培养基(完全培养基),调整细胞密度为 1×10^6 /mL,接种于6孔培养板中,于5%CO₂、37℃培养箱中培养,根据生长情况及时添加培养基。用PerCP-Cy5.5标记的CD3、FITC标记的CD56与未诱导培养(0d)和培养12d的NK细胞孵育进行流式细胞术检测细胞表型。

[0018] 2、分组和转染

[0019] 取培养12d的NK细胞,制成细胞密度为 2×10^6 个/mL的细胞悬液,接种到6孔板,每孔2mL,培养24h后进行转染,分别设置lncRNA-AF289591mimic组、NC-mimic组和空白对照组,转染方式参照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行。

[0020] 3、lncRNA-AF289591含量水平检测(琼脂糖凝胶电泳法)

[0021] 收集转染后的NK细胞,洗涤,按照TRIzol试剂盒说明书提取总的RNA并测定RNA浓度。提取完成后,进行RNA浓度测定,保证A260/A280比值大于等于1.8。将获得的RNA采用逆转录试剂盒进行逆转录(TaKaRa),逆转录所得的cDNA进行PCR扩增,扩增反应完成后,配制1.5%琼脂糖凝胶,取PCR产物各5μL,加入6×loading buffer 2μL混合上样,50V电泳60min。利用图像分析系统分析各条带光密度值,拍照。PCR扩增引物序列如下。

[0022] lncRNA-AF289591正向:GTTGCCGTCCCATCAGTTGC(5'-3')

[0023] lncRNA-AF289591反向:TCACTCAAGGTCACCAGCCA(5'-3')

[0024] GAPDH正向:CATGGCACCGTCAAGGCTGA(5'-3')

[0025] GAPDH反向:GGACTCCACGACTACTCAG(5'-3')

[0026] 4、NK细胞杀伤活性检测(流式法)

[0027] 收集转染的NK细胞,PBS洗涤并重悬调整细胞密度为 1×10^7 /mL,接种于流式管中,每管0.1mL,用PE标记的穿孔素(Perforin)、PE标记的颗粒酶B(Granzyme B)、APC标记的CD107a孵育进行流式细胞术检测。

[0028] 5、统计学分析

[0029] 使用GraphPad Prism 5软件进行数据统计学分析。数据采用均数±标准差表示,两组数据间比较采用配对t检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

[0030] 三、实验结果

[0031] 1、NK细胞培养和鉴定

[0032] 流式细胞术检测结果显示,0d细胞CD3⁻CD56⁺阳性率为(10.8±3.7)%,培养12d的NK细胞CD3⁻CD56⁺阳性率高达(75.2±6.5)%,差异有统计学意义,NK细胞培养成功。

[0033] 2、琼脂糖凝胶电泳测定lncRNA-AF289591表达水平

[0034] 结果如图1所示,与空白对照组和NC-mimic组相比,lncRNA-AF289591mimic组lncRNA-AF289591表达水平显著提高,差异有统计学意义,说明高表达lncRNA-AF289591的NK细胞构建成功。

[0035] 3、流式法检测Perforin、Granzyme B、CD107a表达水平

[0036] 结果如表1和图2所示,与对照组相比,干预组Perforin、Granzyme B、CD107a的表达水平均显著上调,差异有统计学意义。

[0037] 表1 Perforin、Granzyme B、CD107a表达水平

	空白对照组	NC-mimic 组	lncRNA-AF289591 mimic 组
[0038] Perforin	36.4%	39.2%	68.9%
Granzyme B	32.0%	35.5%	64.3%
CD107a	70.1%	67.8%	85.7%

[0039] NK细胞发挥杀伤靶细胞的过程中,NK细胞受到信号触发,先通过脱颗粒过程释放Perforin、Granzyme B到达靶细胞,Perforin作用是在靶细胞膜上穿孔通道进而介导Granzyme B进入靶细胞,Granzyme B进入靶细胞后引发靶细胞的DNA断裂使靶细胞凋亡。CD107a也是NK细胞脱颗粒过程中的重要参与因子。因此,本领域技术人员通常通过检测Perforin、Granzyme B、CD107a的表达水平评价NK细胞的杀伤力强弱。据此可以说明,高表达lncRNA-AF289591可以有效提高NK细胞的杀伤力。

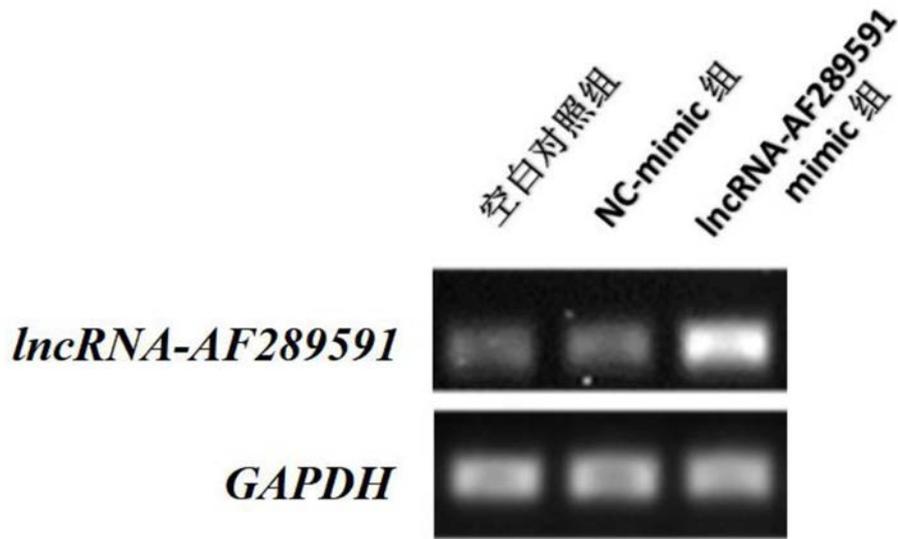


图1

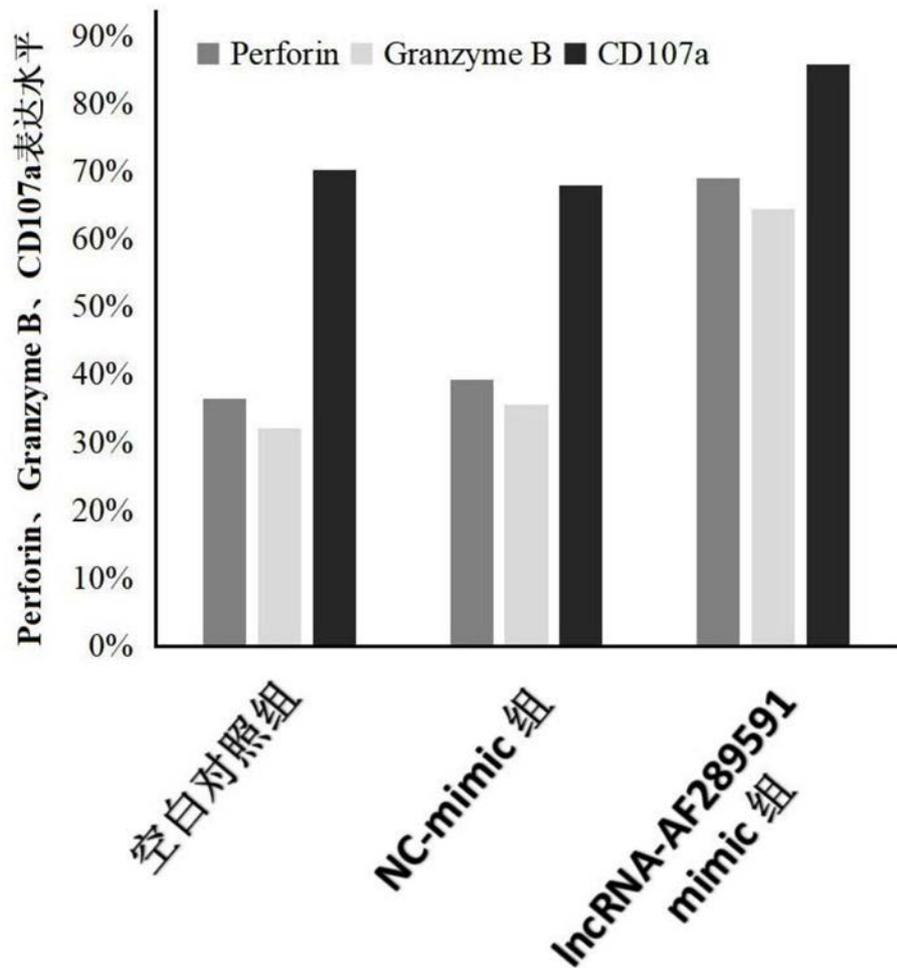


图2