

EpCAM-CAR-NK细胞对EpCAM表达相关性 靶向杀伤及体内抗肿瘤效应

冀亚东^{1,2}, 李亚桐³, 高艳伟^{2*}

¹内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头

²内蒙古自治区人民医院, 内蒙古 呼和浩特

³陆军第八十一集团军医院, 河北 张家口

收稿日期: 2026年5月27日; 录用日期: 2026年6月21日; 发布日期: 2026年6月29日

摘要

目的: 探究靶向上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)的嵌合抗原受体修饰自然杀伤细胞(EpCAM-CAR-NK)对结直肠癌细胞体内外杀伤效应及其与EpCAM表达水平的关系。方法: 采用流式细胞术检测HT-29、HT-115及HT-29-OE-EpCAM-2细胞的EpCAM表达水平, 细胞计数法预测细胞增殖能力, CCK-8法评价不同效靶比下EpCAM-CAR-NK细胞和NK-92细胞的体外杀伤作用。分别建立HT-29及HT-29-OE-EpCAM-2细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为移植瘤对照组(PBS组)、NK-92组和EpCAM-CAR-NK组, 每组5只。NK-92组及EpCAM-CAR-NK组经尾静脉输注相应细胞 4.5×10^6 个/只, 隔日1次, 共3次; PBS组给予等体积无菌PBS。间隔2 d测量1次移植瘤体积, 实验终点称取瘤质量; 采用DiR荧光标记及活体成像观察效应细胞体内分布, HE染色观察主要脏器组织形态变化。结果: HT-29-OE-EpCAM-2、HT-29及HT-115细胞EpCAM阳性表达情况明显, 组间差异均有统计学意义($P < 0.001$)。HT-29-OE-EpCAM-2细胞增殖能力显著高于HT-29和HT-115细胞($P < 0.001$)。随效靶比升高, EpCAM-CAR-NK细胞对3种结直肠癌细胞的杀伤率总体升高, 且其杀伤作用强于NK-92细胞; 其中对HT-29-OE-EpCAM-2细胞杀伤作用最强, 对HT-29细胞次之, 对HT-115细胞相对较弱。体内实验显示, EpCAM-CAR-NK组显著抑制HT-29及HT-29-OE-EpCAM-2移植瘤生长; HT-29模型中, EpCAM-CAR-NK组终点肿瘤体积低于PBS组和NK-92组($P < 0.01$, $P < 0.05$); HT-29-OE-EpCAM-2模型中, EpCAM-CAR-NK组终点肿瘤体积低于PBS组及NK-92组($P < 0.001$)。两种模型中, EpCAM-CAR-NK组终点瘤质量均明显降低, 且在EpCAM高表达模型中的抑瘤效应更为突出。荧光成像显示, EpCAM-CAR-NK细胞在肿瘤部位出现明显信号富集且主要脏器HE染色后未见明显治疗相关组织损伤。结论: EpCAM-CAR-NK细胞可通过靶向识别EpCAM增强对结直肠癌细胞的杀伤作用, 并显著抑制裸鼠移植瘤生长, 其抗肿瘤效应与靶细胞EpCAM表达水平相关。EpCAM-CAR-NK细胞具有一定的肿瘤归巢能力和良好的初步安全性, 为EpCAM阳性结直肠癌的靶向细胞免疫治疗提供实验依据。

关键词

结直肠癌, 上皮细胞黏附分子, 嵌合抗原受体, 自然杀伤细胞, 移植瘤

*通讯作者。

EpCAM Expression-Associated Targeted Cytotoxicity and *in Vivo* Antitumor Effects of EpCAM-CAR-NK Cells

Yadong Ji^{1,2}, Yatong Li³, Yanwei Gao^{2*}

¹Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia

²People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot Inner Mongolia

³The Hospital of 81st Group Army PLA, Zhangjiakou Hebei

Received: May 27, 2026; accepted: June 21, 2026; published: June 29, 2026

Abstract

Objective: To investigate the *in vitro* cytotoxic activity and *in vivo* antitumor efficacy of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) targeted chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells (EpCAM-CAR-NK cells) against colorectal cancer cells, and to examine their association with EpCAM expression levels. **Methods:** EpCAM expression in HT-29, HT-115, and HT-29-OE-EpCAM-2 cells was determined by flow cytometry. Cell proliferative capacity was assessed by cell counting, and the *in vitro* cytotoxicity of EpCAM-CAR-NK cells and NK-92 cells at different effector-to-target ratios was evaluated using the Cell Counting Kit-8 assay. Subcutaneous xenograft models were established in nude mice using HT-29 and HT-29-OE-EpCAM-2 cells, respectively. Mice were randomly assigned to the xenograft control group (PBS group), NK-92 group, and EpCAM-CAR-NK group, with 5 mice per group. Mice in the NK-92 and EpCAM-CAR-NK groups received tail-vein infusions of the corresponding cells at a dose of 4.5×10^6 cells per mouse every other day for a total of 3 administrations, whereas mice in the PBS group received an equal volume of sterile PBS. Tumor volume was measured every 2 days, and tumor weight was determined at the experimental endpoint. DiR fluorescence labeling combined with *in vivo* imaging was used to assess the biodistribution of effector cells, and hematoxylin and eosin staining was performed to examine histopathological changes in major organs. **Results:** EpCAM expression differed significantly among HT-29-OE-EpCAM-2, HT-29, and HT-115 cells, with a statistically significant difference among the groups ($P < 0.001$). HT-29-OE-EpCAM-2 cells exhibited significantly greater proliferative capacity than HT-29 and HT-115 cells ($P < 0.001$). With increasing effector-to-target ratios, the cytotoxicity of EpCAM-CAR-NK cells against three types of colorectal cancer cell lines increased overall and was greater than that of NK-92 cells. The strongest cytotoxic effect was observed against HT-29-OE-EpCAM-2 cells, followed by HT-29 cells, whereas the effect against HT-115 cells was relatively weak. *In vivo*, EpCAM-CAR-NK treatment significantly inhibited tumor growth in both HT-29 and HT-29-OE-EpCAM-2 xenograft models. In the HT-29 model, endpoint tumor volume was significantly lower in the EpCAM-CAR-NK group than in the PBS group and the NK-92 group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). In the HT-29-OE-EpCAM-2 model, endpoint tumor volume was significantly lower in the EpCAM-CAR-NK group than in the PBS and NK-92 groups ($P < 0.001$). Endpoint tumor weight was also markedly reduced in the EpCAM-CAR-NK group in both models, with a more pronounced tumor-inhibitory effect in the EpCAM-high-expressing model. Fluorescence imaging demonstrated prominent accumulation of EpCAM-CAR-NK cells at tumor sites. No apparent treatment-related histopathological injury was observed in major organs after hematoxylin and eosin staining. **Conclusion:** EpCAM-CAR-NK cells enhance cytotoxicity against colorectal cancer cells through targeted recognition of EpCAM and significantly inhibit xenograft tumor growth in nude mice. Their antitumor activity is associated with EpCAM expression levels in target cells. EpCAM-CAR-NK cells exhibit tumor-homing potential and a favorable preliminary safety profile, providing experimental

evidence for targeted cellular immunotherapy in EpCAM-positive colorectal cancer.

Keywords

Colorectal Cancer, Epithelial Cell Adhesion Molecule, Chimeric Antigen Receptor, Natural Killer Cells, Xenograft

Copyright © 2026 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

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤之一[1] [2]。随着筛查技术、根治性手术、化疗及分子靶向治疗的持续发展改善了部分患者的临床结局,但晚期或转移性 CRC 仍普遍面临疾病进展、治疗耐药及长期生存获益有限等问题[1]。

免疫检查点抑制剂为 CRC 治疗带来了新突破。研究表明,微卫星高度不稳定型(MSI-H)或错配修复缺陷型(dMMR) CRC 患者可从免疫检查点阻断治疗中显著获益[3]。但绝大多数 CRC 为微卫星稳定型(MSS)或错配修复完整型(pMMR),常伴随肿瘤免疫原性不足、效应免疫细胞浸润有限及免疫抑制性肿瘤微环境显著等特征,对现有免疫检查点抑制剂的响应总体有限[4]。

自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)能够在无需预先抗原致敏的情况下识别并杀伤异常细胞,并具有较高的移植物抗宿主病风险及潜在的异体应用优势[5]。然而,实体瘤中的低氧、酸化、TGF- β 富集及基质屏障可限制 NK 细胞的浸润和效应功能。嵌合抗原受体(CAR)修饰可赋予 NK 细胞抗原特异性识别能力,从而增强其对肿瘤细胞的定向细胞毒作用,为 CRC 细胞免疫治疗提供了具有转化潜力的新策[6]。上皮细胞黏附分子(EpCAM)是一种跨膜糖蛋白,在 CRC 组织中常呈高表达,因而可作为 CAR-NK 识别肿瘤细胞的候选靶点[7]。

本研究旨在评价 EpCAM-CAR-NK 细胞对 EpCAM 阳性 CRC 细胞的体外杀伤作用并在荷瘤小鼠模型中观察其体内抑瘤效应及安全性。通过监测肿瘤生长、体重、营养状况、一般状态及组织学改变,分析 EpCAM-CAR-NK 的治疗潜能,为 CRC 免疫治疗策略的优化提供实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 细胞、实验动物及主要实验仪器及试剂

Table 1. Main experimental instruments

表 1. 主要实验仪器

| 仪器名称 | 厂家名称 |
|-------------------|----------------|
| MCO-5AC 二氧化碳细胞培养箱 | SANYO 公司 |
| HC-3018R 高速冷冻离心机 | 安徽中科中佳科学仪器有限公司 |
| ELx808 吸收光酶标仪 | Biotec 有限公司 |
| FACSCalibur 流式细胞仪 | BD 公司 |

人结直肠癌细胞 HT-29、HT-115 均购自上海中乔新舟生物科技有限公司。NK 细胞取自健康人外周血，HT-29-OE-EpCAM-2 及 EpCAM-CAR-NK 细胞均由内蒙古自治区人民医院肿瘤中心实验室制备，4~5 周龄、SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠由内蒙古大学实验动物中心提供，饲养于 SPF 级环境。主要实验仪器及试剂详见表 1 及表 2。

Table 2. Main experimental reagents

表 2. 主要实验试剂

| 试剂名称 | 厂家 |
|---------------------------|----------|
| PBS、FBS、EDTA | Gibco 公司 |
| Cell Counting Kit-8 试剂盒 | 博士德生物公司 |
| 1640、F-12K、McCoy's 5A 培养基 | Gibco 公司 |
| 抗人 CD56、抗人 IgG、抗人 CD3 | BD 公司 |

2.2. 结肠癌细胞株解冻复苏

取冻存的结肠癌细胞系(HT-29、HT-115, 及实验室自建株 HT-29-OE-EpCAM-2)迅速置于 37℃ 水浴中轻摇, 待融化后, 转入 1.5 mL 离心管, 以 1500 rpm 的转速离心 5 分钟。弃去上清液后, 加入 1 mL 新鲜完全培养基重悬细胞, 经计数后按 1×10^6 个/瓶的密度接种至 T25 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞融合度达到约 90%时, 采用 0.25%胰蛋白酶消化约 2 分钟。上述结直肠癌细胞均为贴壁生长型, 操作中需密切监测消化进程, 严防过度消化损伤细胞活性。

2.3. 流式细胞术分析

应用流式细胞技术定量分析三种结直肠癌细胞系中 EpCAM 蛋白的表达水平。针对每种细胞系, 收集 1×10^6 个细胞, 使用 CD-326-PE 特异性抗体在避光条件下孵育染色 30 分钟后将细胞重悬于 PBS 中, 上机进行流式检测与分析。

2.4. 细胞增殖实验

采用手动计数法结合生长曲线绘制来量化细胞增殖能力。将结直肠癌细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中; 连续 8 天内, 每天选取 3 个复孔, 经胰蛋白酶消化后, 在相差显微镜下利用血细胞计数板进行精确计数。以时间为横轴、细胞数量为纵轴构建生长曲线, 并以第 0 天的初始接种密度为基准对数据进行标准化处理, 以消除初始误差。

2.5. EpCAM-CAR-NK 细胞体外杀伤效应检测

选取处于对数生长期且状态优异的 HT-29、HT-115 及 HT-29-OE-EpCAM-2 细胞作为靶细胞, 制备成单细胞悬液后, 按 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板中, 每孔补充 100 μ L 完全培养基, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 以确保细胞充分贴壁。同时准备效应细胞, 将状态良好、活率 > 90%的 EpCAM-CAR-NK 细胞及未经转导 NK-92 细胞按效靶比(E:T) 0.1:1、1:1、2.5:1、5:1、10:1 和 15:1 梯度配制混合悬液。

实验设空白对照组、靶细胞对照组、NK-92 杀伤组、EpCAM-CAR-NK 杀伤组及效应细胞对照组。空白对照组仅加培养基和 CCK-8 试剂; 靶细胞对照组仅接种靶细胞; NK-92 杀伤组为靶细胞与不同效靶比的未转导 NK-92 细胞共培养; EpCAM-CAR-NK 杀伤组为靶细胞与不同效靶比的 EpCAM-CAR-NK 细胞

共培养；效应细胞对照组分别加入与各效靶比相对应数量的 NK-92 细胞或 EpCAM-CAR-NK 细胞，用于校正效应细胞自身代谢活性对检测结果的影响。每组设 5 个复孔，独立重复 3 次。

向已贴壁的靶细胞孔中加入对应比例的效应细胞，补足总体积后，共培养 24 小时。反应终止时，每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂，继续孵育 2 小时，采用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度(OD)值。以不同效靶比下各组细胞杀伤率作为观察指标，比较 EpCAM-CAR-NK 细胞与未转导 NK-92 细胞对 HT-29、HT-115 及 HT-29-OE-EpCAM-2 细胞的体外杀伤差异。

2.6. 结直肠癌移植瘤模型构建

将 HT-29 和 HT-29-OE-EpCAM-2 细胞置于含 10%胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基中，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养，并定期观察和传代。取对数生长期细胞，制备细胞悬液后按 4 \times 10⁶ 个细胞/100 μ L/只(基质胶：细胞悬液，1:1)混匀后接种于 BALB/c nude 雌鼠左侧腋窝皮下，构建结直肠癌皮下移植瘤模型。

选取 35 只 BALB/c 裸鼠，适应性喂养 5 d 后，按照随机数字表法分为移植瘤对照组(PBS 组)、NK-92 组以及 EpCAM-CAR-NK 组，共 6 个实验组，每组各 5 只小鼠。植瘤后 1 周，瘤体直径 > 0.5 cm 时表示小鼠成瘤成功。NK-92 组输注未经基因修饰的 NK-92 细胞；EpCAM-CAR-NK 组则输注靶向 EpCAM 的嵌合抗原受体修饰的 NK 细胞。NK-92 组及 EpCAM-CAR-NK 组均为尾静脉输注不同的 4.5 \times 10⁶ 个细胞，体积为 100 μ L/只。PBS 组尾静脉输注等体积的无菌 PBS 溶液。隔日给药 1 次，共给药 3 次。

2.7. 移植瘤生长及活体发光成像监测

治疗开始后每 48 h 由同一研究人员观察小鼠精神状态、活动情况，并测量肿瘤长径和短径，同步记录小鼠体重、活动、摄食及瘤周皮肤改变。输注后定期行活体成像监测。

2.8. 动物处死、组织取材与病理学检测

本研究设定给药结束后的随访期为观察窗口，并于末次给药后第 18 天作为统一实验终点，对所有存活小鼠实施安乐死。若在实验过程中动物出现肿瘤溃烂、严重运动障碍或持续性恶病质等符合人道主义终点的状况，则予以提前处死。安乐死后，完整剥离皮下瘤组织并进行称重。同时，系统性收集肿瘤组织、脾脏、肝脏、肺脏、肾脏及外周血样本。将组织置于多聚甲醛溶液中固定，后续用于石蜡包埋、苏木精-伊红(H&E)染色及免疫组化分析。

2.9. 统计学分析

所有统计分析及图表绘制均借助 GraphPad Prism 软件(9.0 版本)进行。所有功能实验，如增殖均独立重复三次生物学实验，且每次生物学重复包含三次技术重复。数据以平均值 \pm 标准差(SD)表示。两组间比较采用双尾 Student's t 检验，P < 0.05 定义为具有统计学显著性差异。各模型内终点指标采用单因素方差分析，事后比较采用 Tukey 法校正。

3. 结果

3.1. EpCAM 异质性表达

流式细胞术结果显示，低表达细胞系：HT-29-OE-EpCAM-2 (A 组：73.62%)；低表达细胞系：HT-29 (B 组：24.39%)；不表达细胞系：HT-115 (C 组：0%)，组间差异具有统计学意义(A vs B: P < 0.001; A vs C: P < 0.001; B vs C: P < 0.001)，结果提示，三种结直肠癌细胞系中 EpCAM 表达存在显著差异(见图 1)。

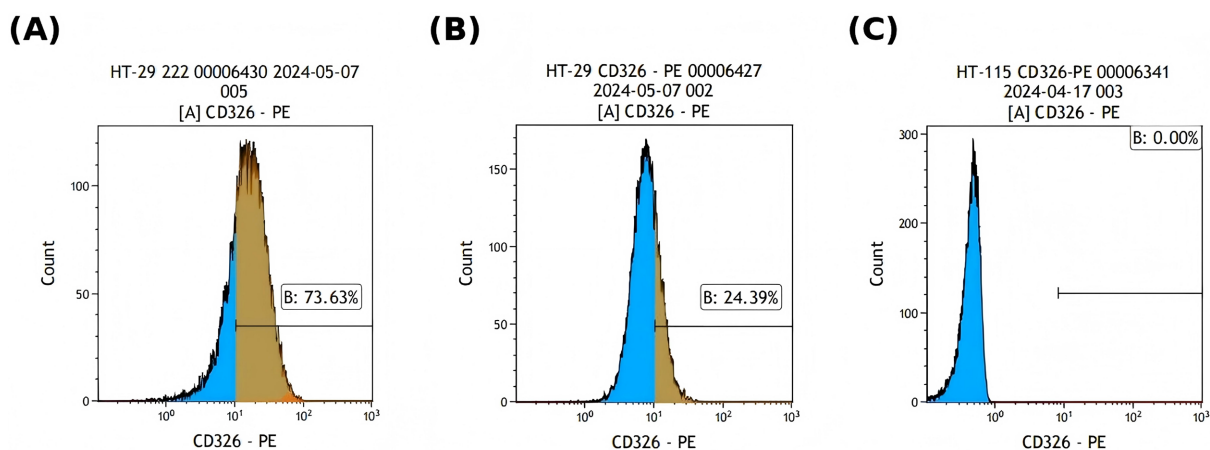


Figure 1. Flow cytometric analysis of EpCAM expression levels in three tumor cell lines

图 1. 流式细胞术三种肿瘤细胞中 EpCAM 的表达水平

3.2. EpCAM 高表达促进细胞增殖

增殖曲线显示, HT-29、HT-29-OE-EpCAM-2 及 HT-115 三组细胞均于第 2~5 天进入快速增殖期, HT-29-OE-EpCAM-2 增殖最为显著, 第 5 天细胞数达 $30.76 \pm 0.15 \times 10^4$, 明显高于 HT-29 组的 $25.62 \pm 0.25 \times 10^4$ 和 HT-115 组的 $23.15 \pm 0.46 \times 10^4$ ($P < 0.001$)。第 6 天后各组增殖趋于平台期, 提示 EpCAM 过表达可增强 HT-29 细胞体外增殖能力(见图 2)。

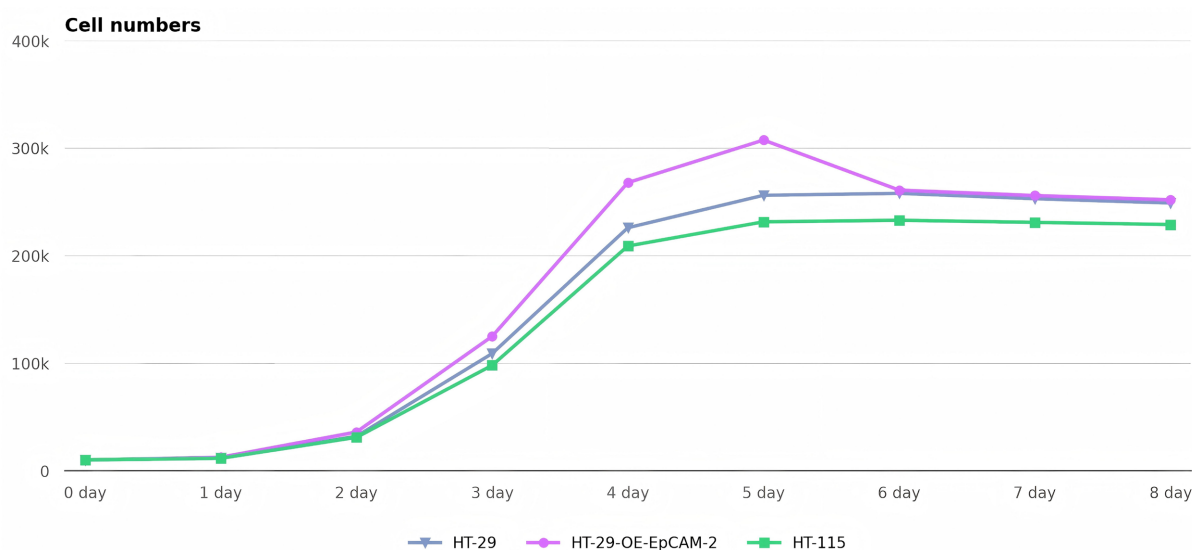


Figure 2. Cell proliferation curves (0~8 days)

图 2. 细胞增殖曲线(0~8 days)

3.3. EpCAM-CAR-NK 细胞的体外杀伤效应

CCK-8 检测结果显示, 各效靶比下, EpCAM-CAR-NK 组杀伤活性均高于 NK-92 组, 其中对 HT-29-OE-EpCAM-2 细胞的杀伤作用最强, 对 HT-29 细胞次之, 对 HT-115 细胞相对较弱。该杀伤效应强弱与靶细胞 EpCAM 表达水平基本一致。结果表明, EpCAM-CAR-NK 细胞较未修饰 NK-92 细胞具有更强的体外抗肿瘤活性, 且其杀伤效应可能与肿瘤细胞 EpCAM 表达水平相关(见图 3)。

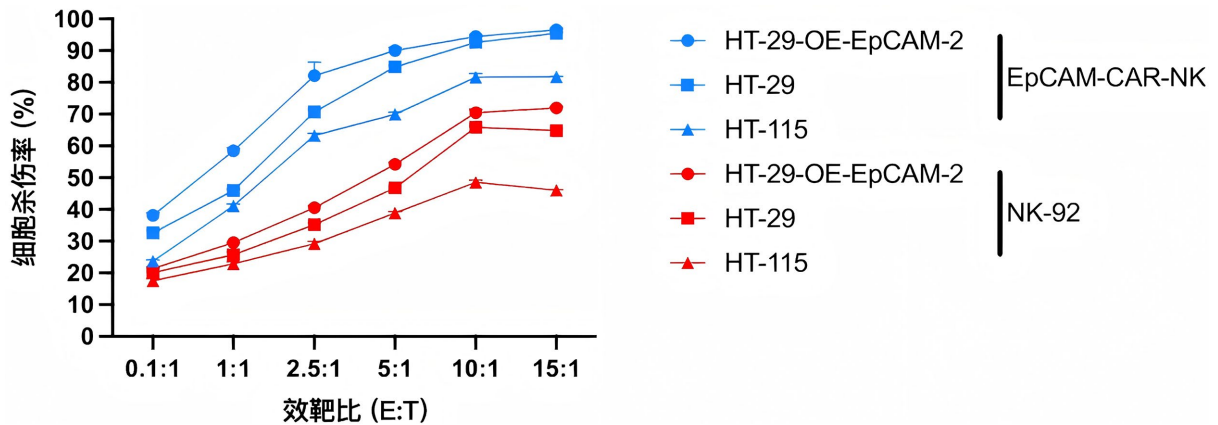
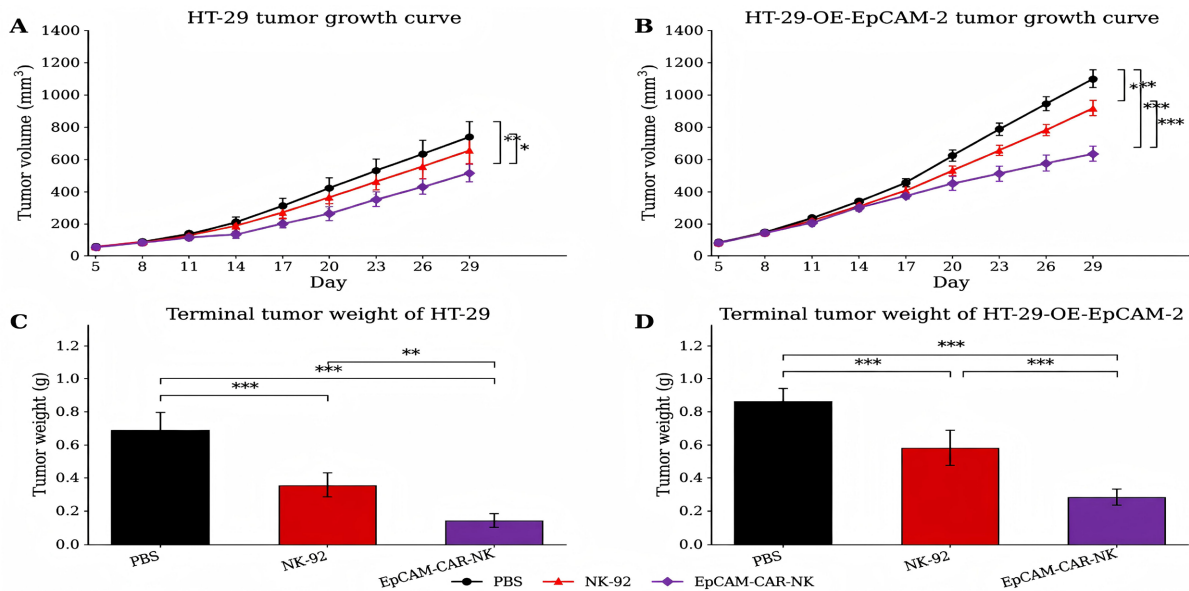


Figure 3. *In vitro* cytotoxicity experiment results of EpCAM-CAR-NK cells
图 3. EpCAM-CAR-NK 细胞体外杀伤实验结果

3.4. EpCAM-CAR-NK 细胞明显的抑瘤效应

各组移植瘤模型均成功建立，随机分组后接受相应处理。治疗期间，HT-29 和 HT-29-OE-EpCAM-2 模型中 PBS 组肿瘤体积持续增大，NK-92 组肿瘤生长受到一定抑制，而 EpCAM-CAR-NK 组抑瘤作用最为明显。治疗终点时，HT-29 模型中 EpCAM-CAR-NK 组肿瘤体积显著低于 PBS 组($P < 0.01$)和 NK-92 组($P < 0.05$) (详见表 3)；HT-29-OE-EpCAM-2 模型中，EpCAM-CAR-NK 组肿瘤体积显著低于 PBS 组及 NK-92 组(均 $P < 0.001$) (详见表 4)。终点瘤质量结果与肿瘤体积变化趋势一致，EpCAM-CAR-NK 组瘤质量在两种模型中均显著低于 PBS 组及 NK-92 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结果表明，EpCAM-CAR-NK 细胞能够显著抑制结肠直肠癌移植瘤生长，且在 EpCAM 高表达模型中的抗肿瘤效应更为突出(详见图 4)。



注：*代表 $P < 0.05$ ；**代表 $P < 0.01$ ；***代表 $P < 0.001$ 。

Figure 4. Experiment results of tumor volume curves and final tumor weights
图 4. 肿瘤体积变化与终末瘤重实验结果

Table 3. Final tumor volume and weight (HT-29 xenograft model)
表 3. 终末瘤体体积及质量(HT-29 移植瘤模型)

| 组别 | 终点肿瘤体积/mm ³ | 终点瘤质量/g |
|----------------|------------------------|------------------|
| PBS 组 | 739.60 ± 91.58 | 0.69 ± 0.10 |
| NK-92 组 | 658.72 ± 92.17 | 0.35 ± 0.06*** |
| EpCAM-CAR-NK 组 | 517.18 ± 58.40**△ | 0.14 ± 0.03***△△ |
| F | 9.37 | 77.24 |
| P | 0.0035 | <0.001 |

注：数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，n = 5 只/组。各模型内终点指标采用单因素方差分析，事后比较采用 Tukey 法校正。与 PBS 组比较，*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001；与 NK-92 组比较，△P < 0.05，△△P < 0.01，△△△P < 0.001。

Table 4. Final tumor volume and weight (HT-29-OE-EpCAM-2 xenograft model)
表 4. 终末瘤体体积及质量(HT-29-OE-EpCAM-2 移植瘤模型)

| 组别 | 终点肿瘤体积/mm ³ | 终点瘤质量/g |
|----------------|------------------------|-------------------|
| PBS 组 | 1100.50 ± 51.49 | 0.86 ± 0.07 |
| NK-92 组 | 918.28 ± 45.61*** | 0.57 ± 0.10*** |
| EpCAM-CAR-NK 组 | 633.88 ± 39.76***△△△ | 0.28 ± 0.04***△△△ |
| F | 131.42 | 77.23 |
| P | <0.001 | <0.001 |

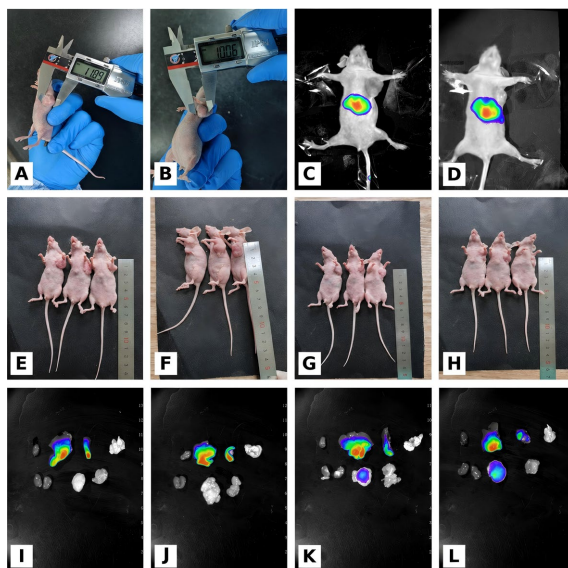
注：数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，n = 5 只/组。各模型内终点指标采用单因素方差分析，事后比较采用 Tukey 法校正。与 PBS 组比较，*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001；与 NK-92 组比较，△P < 0.05，△△P < 0.01，△△△P < 0.001。

3.5. EpCAM-CAR-NK 细胞趋化归巢效果

采用 DiR 荧光染料标记 NK 细胞和 EpCAM-CAR-NK 细胞，通过活体成像系统观察细胞在裸鼠体内的分布(见图 5)。输注后 24 小时，不论是 NK 细胞组还是 EpCAM-CAR-NK 组，荧光信号强度均集中于肝脏和脾脏部位；治疗第 14 天，回输 EpCAM-CAR-NK 细胞组的肿瘤大小明显小于回输 NK 细胞组；处死后，取出裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏(上：左→右)、肾脏、肿瘤、肌肉组织(下：左→右)，进行荧光成像，发现回输 NK 细胞组的 NK 细胞主要集中于裸鼠的肝脏和脾脏组织，而回输 EpCAM-CAR-NK 组的细胞则在肿瘤部位有明显的荧光信号，表明 EpCAM 过表达促进了 CAR-NK 细胞向肿瘤部位的趋化归巢。

3.6. EpCAM-CAR-NK 细胞未出现显著肝肾功能毒性

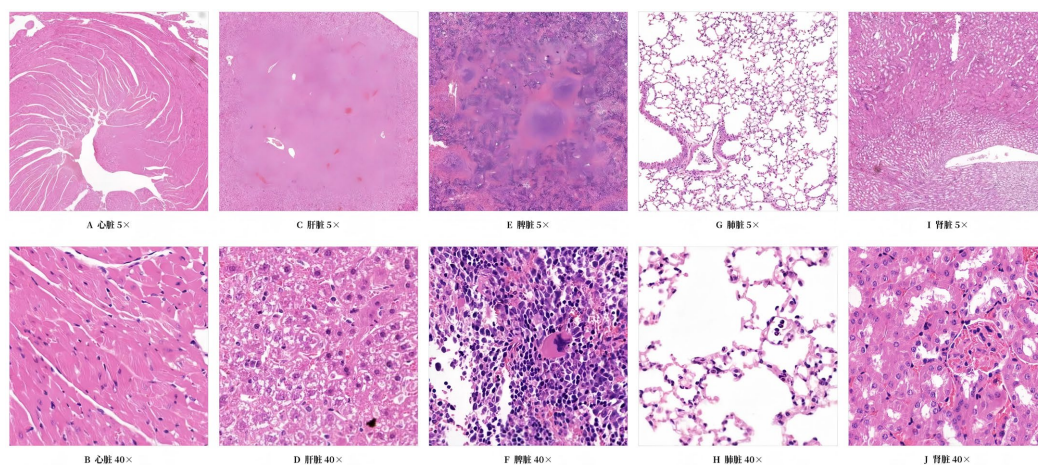
实验终点时，取各组裸鼠心、肝、脾、肺、肾组织进行 HE 染色，由病理专家双盲阅片(见图 6)。心脏：心肌细胞形态正常，未见炎症浸润或坏死。肝脏：肝小叶结构完整，肝细胞排列整齐，未见明显变性、坏死或炎症细胞浸润。脾脏：白髓、红髓结构清晰，无异常改变。肺脏：肺泡结构完整，无间质性肺炎或炎性渗出。肾脏：肾小球、肾小管结构正常，未见肾小管坏死或间质炎症。综上所述，EpCAM-CAR-NK 细胞在动物模型中未观察到显著的肝肾功能毒性及其他脏器损伤，显示出良好的安全性。



注: (A) 建模后第 14 天, HT-29 细胞系肿瘤体积达到约 100 mm^3 ; (B) 建模后第 14 天, HT-29-OE-EpCAM-2 细胞系肿瘤体积达到约 100 mm^3 ; (C) DiR 荧光染料标记的 NK 细胞输注 24 小时后, 裸鼠活体成像; (D) DiR 荧光染料标记的 EpCAM-CAR-NK 细胞输注 24 小时后, 裸鼠活体成像; (E) 回输 NK 细胞 14 天后, HT-29 细胞系建模裸鼠的肿瘤形态大小; (F) 回输 NK 细胞 14 天后, HT-29-OE-EpCAM-2 细胞系建模裸鼠的肿瘤形态大小; (G) 回输 EpCAM-CAR-NK 细胞 14 天后, HT-29 细胞系建模裸鼠的肿瘤形态大小; (H) 回输 EpCAM-CAR-NK 细胞 14 天后, HT-29-OE-EpCAM-2 细胞系建模裸鼠的肿瘤形态大小; (I) 回输 NK 细胞 14 天后, HT-29 细胞系建模裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏(上: 左→右)、肾脏、肿瘤、肌肉组织(下: 左→右)的荧光成像; (J) 回输 NK 细胞 14 天后, HT-29-OE-EpCAM-2 细胞系建模裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏(上: 左→右)、肾脏、肿瘤、肌肉组织(下: 左→右)的荧光成像; (K) 回输 EpCAM-CAR-NK 细胞 14 天后, HT-29 细胞系建模裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏(上: 左→右)、肾脏、肿瘤、肌肉组织(下: 左→右)的荧光成像; (L) 回输 EpCAM-CAR-NK 细胞 14 天后, HT-29-OE-EpCAM-2 细胞系建模裸鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏(上: 左→右)、肾脏、肿瘤、肌肉组织(下: 左→右)的荧光成像。

Figure 5. Animal fluorescence imaging experiment results

图 5. 动物荧光成像实验结果



注: (A) 心脏组织石蜡切片 HE 染色(5×); (B) 心脏组织石蜡切片 HE 染色(40×); (C) 肝脏组织石蜡切片 H&E 染色(5×); (D) 肝脏组织石蜡切片 HE 染色(40×); (E) 脾脏组织石蜡切片 HE 染色(5×); (F) 脾脏组织石蜡切片 HE 染色(40×); (G) 肺脏组织石蜡切片 HE 染色(5×); (H) 肺脏组织石蜡切片 HE 染色(40×); (I) 肾脏组织石蜡切片 HE 染色(5×); (J) 肾脏组织石蜡切片 HE 染色(40×)。

Figure 6. H&E staining of major organs in nude mice

图 6. 裸鼠各组织 HE 染色

4. 讨论

CRC 作为全球范围内发病率与死亡率均居高不下的恶性疾病, 已成为公共卫生领域的重大负担[8]。尽管筛查手段、根治性手术及综合诊疗方案已取得显著进展, 但晚期或转移性 CRC 患者的临床结局依然严峻[9]。绝大多数 CRC 病例表现为 MSS 亚型, 此亚型对现行免疫检查点抑制剂应答效应较差, 因而亟需开发新型且具备主动靶向能力的治疗策略[10]。上皮细胞黏附分子(EpCAM)是一种在结直肠癌中过表达的跨膜糖蛋白, 现有证据表明其与肿瘤增殖、迁移能力及不良预后紧密相关, 使其成为极具前景的免疫治疗靶点[11][12]。

CAR-NK 的抗肿瘤活性源于靶向重定向与先天免疫杀伤程序的协同耦联。CAR 识别肿瘤相关抗原后, 可经 CD3 及 DAP12 等 NK 适配型信号域强化免疫突触形成、脱颗粒及穿孔素介导的细胞裂解, 并促进 FasL/TRAIL 相关凋亡以及 IFN- γ 、TNF- α 的释放[13]。与此同时, CAR 介导的抗原特异性识别可与 NK 细胞固有的非 MHC 限制性杀伤程序协同, 从而部分抵御靶抗原异质性[6]。然而, 持续抗原刺激、肿瘤代谢竞争以及 TGF- β 和缺氧等免疫抑制因素可共同削弱 CAR-NK 的代谢、浸润能力与效应维持[14]。因此, CAR-NK 策略的核心应由单纯强化瞬时细胞毒性, 转向兼顾持续性、代谢韧性、微环境耐受性及抗原逃逸阻断的多维工程化重塑。

鉴于此, 本研究成功对 EpCAM-CAR-NK 细胞系统评估了其对于 EpCAM 阳性 CRC 细胞的体外杀伤效能、体内抗肿瘤活性及生物安全性。研究数据显示, EpCAM-CAR-NK 细胞在体外实验中针对 HT-29 及其高表达株 HT-29-OE-EpCAM-2 展现出显著的细胞毒活性, 且该效应显著依赖于 EpCAM 的表达水平。在荷瘤小鼠模型中, EpCAM-CAR-NK 治疗不仅显著遏制了肿瘤生长, 还促进了效应细胞向肿瘤部位的趋化归巢。此外, 主要脏器的组织病理学分析尚未揭示明显的肝肾毒性或其他器官损伤。上述结果有力证实了 EpCAM-CAR-NK 作为一种潜在 CRC 免疫疗法的有效性与安全性, 并为后续优化针对 EpCAM 阳性实体瘤的 CAR-NK 策略奠定了坚实的实验基础。

本研究深入阐明了 EpCAM-CAR-NK 细胞对 EpCAM 阳性结直肠癌移植瘤的显著抑瘤效应及其多维作用机制。EpCAM 是驱动肿瘤增殖的关键调节因子, 其机制涉及蛋白酶体介导的胞内域(EpICD)裂解[13], 后者入核并与转录复合物协同, 上调 c-Myc 及细胞周期蛋白等基因表达, 进而加速细胞周期进程[14]。我们观察到 EpCAM 的高表达显著增强了 HT-29 细胞的体外增殖能力, 与既往研究关于 EpCAM 激活 Wnt/ β -catenin 及 Ras/Raf 等促增殖通路高度一致[15][16]。CAR-NK 细胞除直接细胞毒作用外, 还可能通过阻断 EpCAM 信号抑制上皮-间质转化(EMT), 降低肿瘤侵袭转移潜能[17][18]。这提示靶向 EpCAM 可能具有抑制肿瘤转移的潜在价值。这可能得益于 EpCAM 作为黏附分子促进了效应细胞与肿瘤细胞的结合, 从而强化了局部抗肿瘤免疫应答[19]。

本研究确证了 EpCAM-CAR-NK 疗法能一定程度上克服实体瘤微环境对 NK 细胞功能的抑制。经 CAR 修饰的 NK 细胞凭借增强的靶向特异性, 显著提升了对肿瘤细胞的识别与清除效率, 尤其在 EpCAM 高表达模型中表现卓越。NK 细胞在肿瘤微环境中常受低氧、抑制性细胞因子及免疫检查点(如 PD-L1)等因素制约而功能耗竭[20], 本研究结果表明 CAR 技术增强的抗原识别能力可部分抵消这些免疫抑制信号[21]。同时治疗终点时心、肝、脾、肺、肾等主要脏器的 HE 染色未见明显病理改变, 表明 EpCAM-CAR-NK 疗法在展现高效抗肿瘤生长活性的同时具备良好的安全性, 未诱发显著的移植物抗宿主病或全身炎症反应。这一特性凸显了 NK 细胞相较于 T 细胞作为 CAR 载体的先天优势。

本研究表明 EpCAM-CAR-NK 可有效抑制 EpCAM 阳性结直肠癌生长, 但其仍有较大局限性。首先, NK-92 细胞具有扩增稳定、工程化效率高等优势, 但临床输注前通常需辐照, 可能削弱体内存活、扩增及持续杀伤能力, 因此不能完全代表原代 NK、脐血 NK 或 iPSC 来源 CAR-NK [17][21]。其次, EpCAM

在 CRC 中存在显著异质性, 受 EMT、抗原内吞、表位遮蔽及可溶性 EpCAM 等因素影响, 可导致抗原逃逸[14]。同时, EpCAM 并非肿瘤特异性抗原, 其在正常胃肠道及胆胰上皮中亦存在表达, 提示有潜在脱瘤毒性[19]。本研究主要脏器 HE 未见异常仅支持短期初步耐受性, 尚不足以排除肠黏膜或延迟性损伤。此外, 细胞系和皮下移植瘤模型难以真实模拟 CRC 原位微环境及免疫抑制网络。EpCAM-CAR-NK 虽具有现货化制备、较低 GVHD 风险及天然受体辅助识别等潜在优势, 但其体内持久性、实体瘤浸润和长期安全性仍需验证。

综上所述, 本研究证实 EpCAM-CAR-NK 细胞能特异性识别并高效杀伤 EpCAM 高表达的结直肠癌细胞, 且在体内具有显著抑制肿瘤生长而无明显脏器毒性。EpCAM 表达水平与治疗获益呈正相关, 确立了其作为理想 CAR-NK 靶点的地位。尽管面临实体瘤微环境的挑战, 工程化 NK 细胞仍展现出优异的趋化归巢能力。这些发现为突破微卫星稳定型结直肠癌的免疫治疗耐药困境提供了新策略, 支持开展进一步的临床前优化研究, 以推动该疗法向临床应用转化, 最终改善晚期结直肠癌患者的预后。

声明

本研究经内蒙古自治区人民医院医学伦理委员会批准通过(伦理批准号: SC-07/02KT2024124Y)。

利益冲突

本研究所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Wagle, N.S., Star, J., Kratzer, T.B., Smith, R.A. and Jemal, A. (2026) Colorectal Cancer Statistics, 2026. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **76**, e70067. <https://doi.org/10.3322/caac.70067>
- [2] Piotrowski, M., Suska, K., Jacenik, D. and Fichna, J. (2025) Current Advances in Colorectal Cancer Treatment: A Review of Recent Clinical Trials. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **26**, 1949-1959. <https://doi.org/10.1080/14656566.2025.2608867>
- [3] Yu, G. and Gong, J. (2025) Targeting Csc-Immune Cell Crosstalk to Overcome Chemoresistance and Enhance Immunotherapy Efficacy. *Frontiers in Immunology*, **16**, Article 1620807. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1620807>
- [4] Wang, G., Liu, Z., Gong, D., Man, C. and Fan, Y. (2025) Association between Weight Loss and Survival Outcomes in Patients with Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Discover Oncology*, **16**, Article No. 2051. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-03902-4>
- [5] Rady, M., Mostafa, M., Dida, G., Sabet, F., Abou-Aisha, K. and Watzl, C. (2025) Adoptive NK Cell Therapy in AML: Progress and Challenges. *Clinical and Experimental Medicine*, **25**, Article No. 41. <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01559-5>
- [6] Peng, L., Sferruzza, G., Yang, L., Zhou, L. and Chen, S. (2024) CAR-T and CAR-NK as Cellular Cancer Immunotherapy for Solid Tumors. *Cellular & Molecular Immunology*, **21**, 1089-1108. <https://doi.org/10.1038/s41423-024-01207-0>
- [7] Lee, C., Su, Y., Panda, S.S., Chiu, C., Wu, C., Lu, T., et al. (2025) EpCAM Activates the ERK-EGR1 Signaling Axis and Promotes TNF- α -Induced the Progression of Anaplastic Thyroid Cancer. *Journal of Translational Medicine*, **24**, Article No. 214. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-07575-z>
- [8] Siegel, R.L., Giaquinto, A.N. and Jemal, A. (2024) Cancer Statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **74**, 12-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
- [9] Wang, Q., Yu, M. and Zhang, S. (2025) The Characteristics of the Tumor Immune Microenvironment in Colorectal Cancer with Different MSI Status and Current Therapeutic Strategies. *Frontiers in Immunology*, **15**, Article 1440830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1440830>
- [10] Jiang, Y., Zhao, M., Tang, W. and Zheng, X. (2024) Impacts of Systemic Treatments on Health-Related Quality of Life for Patients with Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *BMC Cancer*, **24**, Article No. 188. <https://doi.org/10.1186/s12885-024-11937-z>
- [11] Li, D., Guo, X., Yang, K., Yang, Y., Zhou, W., Huang, Y., et al. (2023) EpCAM-Targeting CAR-T Cell Immunotherapy Is Safe and Efficacious for Epithelial Tumors. *Science Advances*, **9**, eadg9721. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg9721>
- [12] Lee, C., Yu, C., Panda, S.S., Chen, K., Liang, K., Huang, W., et al. (2023) Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM)

- Regulates HGFR Signaling to Promote Colon Cancer Progression and Metastasis. *Journal of Translational Medicine*, **21**, Article No. 530. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04390-2>
- [13] Liu, P., Zhang, Q. and Liu, F. (2025) Biological Roles and Clinical Applications of EpCAM in HCC. *Discover Oncology*, **16**, Article No. 319. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02095-0>
- [14] Jiang, X., Wang, S., Liang, Q., Liu, Y. and Liu, L. (2023) Unraveling the Multifaceted Role of EpCAM in Colorectal Cancer: An Integrated Review of Its Function and Interplay with Non-Coding RNAs. *Medical Oncology*, **41**, Article No. 35. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02273-6>
- [15] Fagotto, F. and Aslemarz, A. (2020) EpCAM Cellular Functions in Adhesion and Migration, and Potential Impact on Invasion: A Critical Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1874**, Article 188436. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188436>
- [16] Chen, H., Liang, K., Lai, J., Lan, C., Liao, M., Hung, S., *et al.* (2020) EpCAM Signaling Promotes Tumor Progression and Protein Stability of PD-L1 through the EGFR Pathway. *Cancer Research*, **80**, 5035-5050. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-1264>
- [17] Yang, L., Renauer, P.A., Tang, K., Saskin, J., Zhou, L., Zou, C., *et al.* (2026) OR7A10 GPCR Engineering Boosts CAR-NK Therapy against Solid Tumours. *Nature*, **652**, 740-751. <https://doi.org/10.1038/s41586-026-10149-8>
- [18] Islam, F., Pupovac, A., Boyd, R.L. and Trounson, A.O. (2025) CAR-NK Engineering to Overcome TME Barriers. *Cells*, **15**, Article 21. <https://doi.org/10.3390/cells15010021>
- [19] Sun, Q. and Hong, S. (2025) Glycoscience in Advancing PD-1/PD-L1-Axis-Targeted Tumor Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **26**, Article 1238. <https://doi.org/10.3390/ijms26031238>
- [20] Bhattacharya, S. (2026) Therapeutic Targeting of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in Colorectal Cancer: Tumor-Intrinsic and Immune Checkpoint Signaling. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **26**, 387-393. <https://doi.org/10.1080/14712598.2026.2655971>
- [21] Zhang, F., Soleimani Samarkhazan, H., Pooraskari, Z. and Bayani, A. (2025) Beyond CAR-T: Engineered NK Cell Therapies (CAR-NK, NKCEs) in Next-Generation Cancer Immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **214**, Article 104912. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104912>