

基于AO/PI荧光染色原理的杀伤细胞数量及活率检测方法学验证和细胞培养、冻存、复苏稳定性研究

储王龙¹, 朱丽萍¹, 张芬¹, 钟振忠¹, 柯晖¹, 梁晓¹, 曾秀萍¹, 刘沐芸^{2, 3*}

1. 深圳市北科生物科技有限公司, 广东 深圳 518000

2. 深圳科诺医学检验实验室, 广东 深圳 518000

3. 细胞产业关键共性技术国家工程研究中心, 广东 深圳 518000

摘要: 目的 验证基于吖啶橙(AO)/碘化丙啶(PI)荧光染色原理的自动细胞分析仪检测细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)数量及活率的可行性, 并对CIK细胞培养全过程及冻存复苏后使用前过程进行检测, 建立相应的数量及活率标准。方法 采集健康供者的外周血分离、培养CIK细胞, 取培养过程中的细胞使用AO/PI荧光染色法、应用自动细胞分析仪检测细胞数量及活率, 对结果的专属性、准确度、精密度、数量线性及范围、活率线性及范围进行验证。应用建立的方法对外周血分离后的外周血单个核细胞(PBMC)、培养过程中、冻存前及复苏后的CIK细胞数量及活率进行全过程检测。结果 专属性、准确度、精密度、数量线性及范围、活率线性及范围验证均符合预期要求。CIK细胞培养全过程活率均不低于80%, 样本平均倍增时间为(42.26±1.17)h。冻存前的CIK细胞在加入含5% DMSO的冷冻保护剂后90 min内活率稳定, 复苏后未经稀释或洗涤处理120 min内活率稳定, 复苏后经洗涤去除DMSO处理后12 h内活率稳定。结论 基于AO/PI荧光染色原理的自动细胞分析仪可以用于检测CIK细胞的数量及活率, 其结果可以用于细胞放行评价及稳定性研究。

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK); AO/PI荧光; 自动细胞分析仪; 细胞数量; 活率; 验证; 稳定性

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0377-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.019

Validation of analytical methods for CIK cells quantity and viability analysis based on AO/PI fluorescence staining principle and stability study of cell culture, cryopreservation and resuscitation

CHU Wanglong¹, ZHU Liping¹, ZHANG Fen¹, ZHONG Zhenzhong¹, KE Hui¹, LIANG Xiao¹, ZENG Xiuping¹, LIU Muyun^{2,3}

1. Shenzhen Beike Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518000, China

2. Shenzhen Kenuo Medical Laboratory, Shenzhen 518000, China

3. National Engineering Research Center of Foundational Technologies for CGT Industry, Shenzhen 518000, China

Abstract: Objective To verify the feasibility of the automatic cell analyzer based on the fluorescent staining principle of acridine orange (AO)/propyl iodide (PI) to detect the number and viability of cytokine induced killer cells (CIK), and to detect the whole process of CIK cell culture and the process from freezing resuscitation to pre-use, and establish the corresponding number and viability standards. **Methods** Peripheral blood samples collected from the healthy donors were used to induce CIK cells. The quantity and viability of the cells during culturing were evaluated using AO/PI fluorescence staining method, and the specificity, accuracy, precision, quantity linearity, viability linearity and range were validated. Furthermore, the quantity and viability of PBMC separated from peripheral blood, CIK cells during the cultivation, before freezing and after thawing were evaluated to provide a basis for the monitoring and release of CIK cells. **Results** The specificity, accuracy, precision, quantity linearity, viability linearity and range all met with the expected criteria. The viability of the entire process of the CIK cell culturing was greater than 80%, and the average population doubling time was (42.26 ± 1.17) h. Before cryopreservation, the viability of CIK cells was stable within 90 min

收稿日期: 2022-11-05

基金项目: 科诺医学细胞质量检测技术公共服务平台(S-2020-M74-500513)

第一作者: 储王龙, 男, 硕士, 研究方向为细胞工艺及质量。E-mail: wanglong@beike.cc

*通信作者: 刘沐芸, 女, 博士, 研究方向为细胞自动化生产及细胞检测。E-mail: muyun@kenuomedicallab.com

after adding cryoprotectant containing 5% DMSO. After thawing, the viability was stable within 120 min without dilution or washing treatment, and it was stable within 12 hours after washing and removing DMSO. **Conclusion** Automatic cell analyzer based on AO/PI fluorescence staining can be used to measure the number and viability of CIK cells, and the results can be used for cell release evaluation and stability study.

Key words: cytokine induced killer cells (CIK); AO/PI fluorescence; automatic cell analyzer; cell quantity; viability; validation; stability

细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)是人外周血单个核细胞经多种因子诱导培养后形成的一群分别表达CD3⁺CD56⁻、CD3⁻CD56⁺、CD3⁺CD56⁺标志物的群体组成的异质性免疫细胞。Pan等^[1]研究结果表明CD3⁻CD56⁺及CD3⁺CD56⁺表型均与杀瘤活性正相关($R>0.4$)。CIK具有非主要组织相容性复合体(MHC)限制的特点,广泛用于肿瘤免疫治疗的临床试验^[2-4],当前,在ClinicalTrials.gov网站上搜索到的CIK相关临床试验多达100多个。

细胞的数量及活率属于细胞治疗产品的关键质量属性,是起始原材料质控、中间过程监控、产品放行的关键指标。因此,建立1种快速、精准的细胞数量及活率检测方法对于细胞治疗产品的生产是至关重要的,关系到临床试验的结果。同时,对培养中间过程数量及活率的监控,有利于控制细胞扩增趋势,优化工艺参数,提高产品稳定性。目前,在CIK细胞培养中用于细胞数量和活率检测的方法是经典的台盼蓝染色法^[5-8],其原理是:正常活细胞的胞膜结构完整,有选择透性,台盼蓝无法通过胞膜进入细胞,因此细胞不被染色;而丧失活性或胞膜不完整的细胞,胞膜通透性增加,台盼蓝可通过胞膜进入细胞,将细胞染成蓝色。然而,在CIK细胞培养过程中,尤其是培养早期,大多数分离方法(如密度梯度离心法),从外周血分离获得的单个核细胞中都不可避免残留有部分的红细胞。而台盼蓝染色法只能检测总细胞群的细胞数量和活率,无法区分含多种细胞的细胞群中某一种细胞的数量和活率。如使用台盼蓝染色法检测含红细胞的单个核细胞的数量和活率,就不可避免会将红细胞的数量和活率也计入其中,影响细胞数量及活率的真实结果。

随荧光染色技术的发展,近年来,使用荧光染色法检测细胞数量和活率逐渐成为主流,常见的如4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、碘化丙啶(PI)、吖啶橙(AO)、SYTOX orange等,均可以染色标记活细胞或死细胞。AO/PI荧光染色法的原理是细胞膜对能与细胞核结合的不同染料具有选择透性:AO染料可以通过完整的细胞膜,结合所有细胞的细胞核,呈现绿色荧光;PI染料则通过不完整的细胞膜,

结合死细胞的细胞核,呈现橙红色荧光。成熟的红细胞因为没有细胞核,AO/PI染料对红细胞不染色。AO与PI荧光染色细胞数量总和等于样本总细胞数量,活率则通过AO与PI分别染色细胞数量比例计算。基于AO/PI荧光只能染有核细胞的原理,相较于台盼蓝染色法,其具有更强的专属性,既能针对多种细胞的细胞群中某一类细胞,也能针对单一的细胞群,目前已经应用在多类不同细胞的活率、细胞凋亡率及数量检测,例如造血干细胞(HPC)、外周血单个核细胞(PBMC)、Jurkat细胞、胰岛细胞、肿瘤细胞、精子等^[9-14]。使用AO/PI荧光染色法,可以排除红细胞的干扰,同样是1种比较理想的准确检测培养早期及培养后的CIK细胞数量及活率的方法。

因此,基于细胞数量及活率检测方法的重要性,本研究通过验证1款应用AO/PI荧光染色原理的自动细胞分析仪(Cellometer Auto 2000, Nexcelom Bioscience, USA)检测CIK细胞的专属性、准确度、精密度、线性及范围,以获得1种方便、可靠的检测方法。在验证的基础上对CIK细胞培养全过程及细胞冻存复苏后至使用前过程进行检测,建立相应的数量及活率标准,提供可参考的稳定性研究数据,为产品的放行评价提供依据。此外,本研究也可为其其他细胞活性检测方法的验证提供参考方案。

1 试剂与仪器

血清添加物SUPERGROW(深圳市达科为生物技术股份有限公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司);CD3单克隆抗体、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 α 、IL-2(Peprotech);RPMI 1640培养基(Gibco);AO/PI染液(Nexcelom Bioscience);标准磁珠(Nexcelom Bioscience)。

自动细胞分析仪(Cellometer Auto 2000, Nexcelom Bioscience);采血袋(四川南格尔生物科技有限公司);细胞培养瓶(Nunc);细胞培养袋(NIPRO);冻存管(Nunc);Cellometer Auto 2000细胞计数仪(Nexcelom Bioscience)。

2 方法与结果

2.1 研究方案的设计

分析方法学验证参照《国际人用药品注册技术

协调会(ICH):Q2(R1)(分析方法论证:正文和方法学)》技术指南及《中国药典》2020年版:9101分析方法验证指导原则,方案设计包含专属性、准确性、精密度、线性及范围。细胞的制备参照《药品生产质量管理规范(2010年修订)》基本要求,防止样本发生混淆、污染及交叉污染,厂房环境、设施符合细胞治疗产品生产要求,人员经过相关无菌操作及细胞培养培训,自动细胞分析仪经过安装确认(IQ)/操作验证(OQ)且每次使用前都进行标准磁珠确认,其他设备也均经过确认及定期维护。

2.2 外周血样本采集

采集6名健康志愿者外周血样本各50 mL,置于含CPDA-1抗凝剂采血袋中。样本在宝安区新桥社区健康服务中心采集并获伦理批准,所有样本采集均征求知情同意并签署知情同意书。样本采集后保存在4~10℃,6 h内送至细胞制备中心进行处理。分2批采集,第1批采集3份,用于AO/PI荧光染色计数法验证,第2批采集3份,用于CIK培养全过程数量及活率检测。

2.3 CIK细胞体外培养

CIK培养方法在Liang等^[15]培养方法基础上稍有修改,使用了血清替代物替代自体血浆。采集后的抗凝血使用Ficoll密度梯度离心法分离获得PBMC。分离前取50 ng·mL⁻¹ CD3单克隆抗体加入培养瓶中,置于37℃、5% CO₂培养箱中包被2 h。分离后的PBMC取0.5 mL用于细胞数量及活率检测,剩余细胞全部接种在包被的培养瓶中[密度(2~3)×10⁶·mL⁻¹],加入1 000 U·mL⁻¹ IFN-γ及5%血清替代物。培养1 d后加入10 ng·mL⁻¹ IL-1α、250 U·mL⁻¹ IL-2及5%血清替代物。培养3 d后补加50 mL添加150 U·mL⁻¹ IL-2、500 U·mL⁻¹ IFN-γ的培养基,培养4 d后再次补加含150 U·mL⁻¹ IL-2、500 U·mL⁻¹ IFN-γ培养基,并将细胞转至细胞培养袋中培养,使细胞密度在1×10⁶·mL⁻¹以上。之后对细胞进行补液,使细胞密度维持在1×10⁶·mL⁻¹以上。培养16 d后收集部分细胞,使用细胞冷冻保护剂[添加5%二甲基亚砜(DMSO)及5%人血清白蛋白(HSA)],按(1~2)×10⁸·mL⁻¹密度重悬冻存,冻存7 d后复苏细胞用于稳定性验证。

2.4 AO/PI荧光染色法验证

使用3份培养10 d的CIK细胞用于方法学验证。

2.4.1 专属性试验 在本验证中培养基、细胞冻存液作为空白试剂,红细胞是可能的杂质。使用

Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪分别对以上培养基及细胞冻存液进行检测,细胞数量及活率数值应为0。之后,再将细胞样本与培养基及细胞冻存液分别混合,混合后不对混合前的细胞数量及活率产生影响。

此外,还通过人工添加红细胞至CIK细胞中进行专属性试验,具体方法如下:取1份红细胞样本,先使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪明场模式计数。另取1份CIK样本20 μL与20 μL AO/PI染液混匀,使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪荧光模式计数。再将红细胞样本与CIK样本混合,取20 μL混合后细胞悬液与20 μL AO/PI染液混匀,使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪荧光模式计数,每个样本重复计数3次。红细胞不对CIK样本计数结果产生影响。

培养基与冻存液的细胞数量及活率检测均为0,与细胞混合后检测,细胞浓度及活率前后差异率均在5%范围内,结果符合要求。

将红细胞样本加入CIK样本后,理论上应不对CIK计数产生影响,即红细胞与CIK细胞按1:1比例混合后样本浓度应为混合前的1/2,实际测量差异率为2.96%,结果符合要求(表1)。

表1 红细胞污染对CIK计数的影响结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of RBC contamination on CIK concentration measurement ($\bar{x}\pm s, n=3$)	
组别	计数/×10 ⁵
红细胞	8.06±0.74
CIK细胞	9.13±0.31
红细胞与CIK细胞1:1混合	4.43±0.46

2.4.2 准确度 在本验证中以台盼蓝染色人工计数法做参比,计算回收率。将3份CIK细胞样本稀释至(0.5~1.2)×10⁶·mL⁻¹,先取20 μL细胞悬液与20 μL AO/PI染液混匀,再使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪检测细胞数量和活率。检测结果与经台盼蓝染色(20 μL细胞悬液+20 μL 0.4%台盼蓝染液混匀)、使用血球计数板的人工计数结果对比。每份样品各取样计数6次,分别计算总细胞浓度、活细胞浓度、活率以及回收率(AO/PI染色计数值/台盼蓝染色计数值)。

与台盼蓝染色人工计数方法比较,AO/PI染色方法检测的CIK细胞样本总细胞数量浓度、活细胞浓度及活率的回收率均在90%~110%(表2),结果符合要求。此外,本课题组还对平均浓度为2.04×

表2 台盼蓝染色人工计数与AO/PI染色自动计数检测值比较($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 2 Comparison of manual counting with trypan blue staining and automatic counting with AO/PI staining ($\bar{x}\pm s, n=6$)

样本	总细胞浓度			活细胞浓度			活率		
	台盼蓝染色/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	AO/PI染色/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	台盼蓝染色/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	AO/PI染色/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	台盼蓝染 色/%	AO/PI染 色/%	回收率/%
A	9.49±1.24	9.74±0.56	104.24±16.16	8.56±1.24	8.09±0.54	96.09±14.48	90.13±3.37	83.10±2.13	92.24±2.52
B	8.91±0.72	8.96±0.56	101.30±12.29	8.37±0.60	7.74±0.59	93.04±11.64	94.01±1.78	86.23±2.19	91.83±1.89
C	8.74±0.74	9.30±0.24	107.00±8.62	8.02±0.75	7.70±0.40	96.69±10.23	91.70±1.49	82.74±2.28	90.26±3.45

$10^6 \text{ Beads} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、活率为74.7%的标准磁珠进行了检测,结果显示,AO/PI染色方法检测的浓度及活率的回收率也在其平均值的90%~110%。

2.4.3 精密性(重复性)试验 将3份CIK细胞样本稀释至 $(0.5\sim 1.2) \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,先取20 μL 细胞悬液与20 μL AO/PI染液混匀,再使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪检测细胞数量和活率。同一样本重复计数10次,分别计算总细胞、活细胞、活率的组内RSD值。

从总细胞浓度、活细胞浓度及活率的重复性检测结果来看,AO/PI染色方法检测的同一CIK细胞样本组内RSD均小于3.13%(表3),结果符合要求。

表3 AO/PI染色计数精密性(重复性)验证结果($n=10$)Table 3 Accuracy (repeatability) validation results of automatic counting with AO/PI staining ($n=10$)

样本	总细胞浓度		活细胞浓度		活率	
	平均值/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/ %	平均值/ ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/ %	平均值/%	RSD/ %
A	9.54	2.13	8.24	3.13	86.18	1.03
B	9.43	2.19	8.74	0.78	92.68	1.97
C	8.50	0.75	8.00	0.54	94.05	0.68

2.4.4 细胞浓度线性及范围 取其中1份CIK细胞样本,采用连续梯度稀释法,按初始浓度约为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为原液进行倍比稀释,分别稀释至浓度为 5.0×10^6 、 2.5×10^6 、 1.25×10^6 、 6.25×10^5 、 3.125×10^5 、 $1.5625 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,取20 μL 稀释的细胞悬液与20 μL AO/PI染液混匀,使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪检测细胞数量,每个浓度检测3次,对理论结果与实际测量值进行线性分析。线性回归方程为 $Y=1.002 X-147360$, $R^2=0.9963$,根据线性方程得出该方法检测的细胞浓度范围为 $(0.22\sim 9.49) \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.5 细胞活率线性及范围 本研究采用死活细胞掺比法。取其中1份CIK细胞样本,作为原液一

分为二,一半体积采用沸水加热3 min处理为全死细胞,一半不处理为正常细胞。取正常细胞与全死细胞分别按3:1、1:1、1:3不同比例混合获得75%、50%、25%活率样本,取20 μL 全死、全活及混合的细胞悬液与20 μL AO/PI染液混匀,使用Cellometer Auto 2000自动细胞分析仪检测细胞活率,每个比例检测3次,对理论结果与实际测量值进行线性分析。线性回归方程为 $Y=1.005 X-0.4086$, $R^2=0.9989$,除全死细胞样本外其他浓度RSD值均小于10%,根据线性方程得出该方法检测的活率范围为24.81%~98.12%。

2.5 CIK细胞培养全过程数量及活率测定

取分离后PBMC、培养4、7、10、14、16 d的CIK细胞分别检测细胞数量及活率,计算不同时间段的细胞倍增时间(PDT):

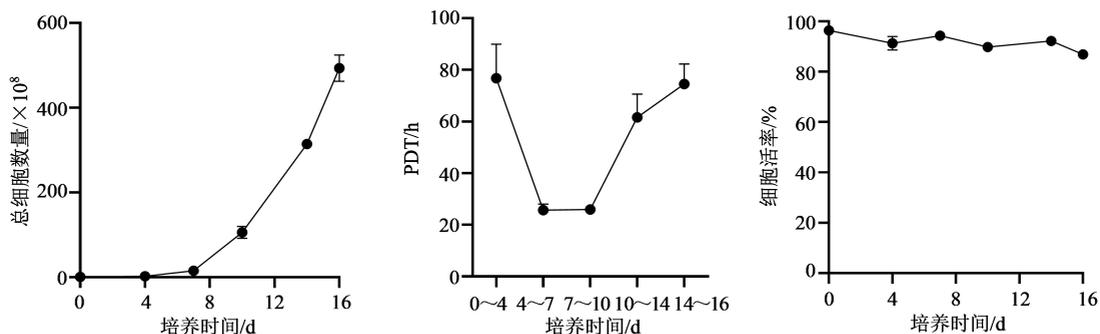
$$\text{PDT} = (\Delta T \times \lg^2) / (\lg N_t - \lg N_0)$$

ΔT 为细胞扩增时长; N_t 为扩增后的总细胞数量; N_0 为扩增前的总细胞数量

如图1所示,通过对全过程数量检测,计算出3份样本不同时间段的PDT,可以看出,CIK细胞在培养前4 d增长缓慢,之后进入快速增长期,4~10 d PDT最短,10 d后PDT又逐渐延长,3份样本平均PDT为 $(42.26 \pm 1.17) \text{ h}$ 。3份样本分离后PBMC活率均值达到 $(96.37 \pm 0.75) \%$;培养过程中活率稳定,均值为 $(91.88 \pm 2.21) \%$;最终收集细胞平均活率有一定降低,但均在85%以上,均值为 $(86.90 \pm 1.13) \%$ 。

2.6 CIK细胞冻存前及复苏后稳定性验证

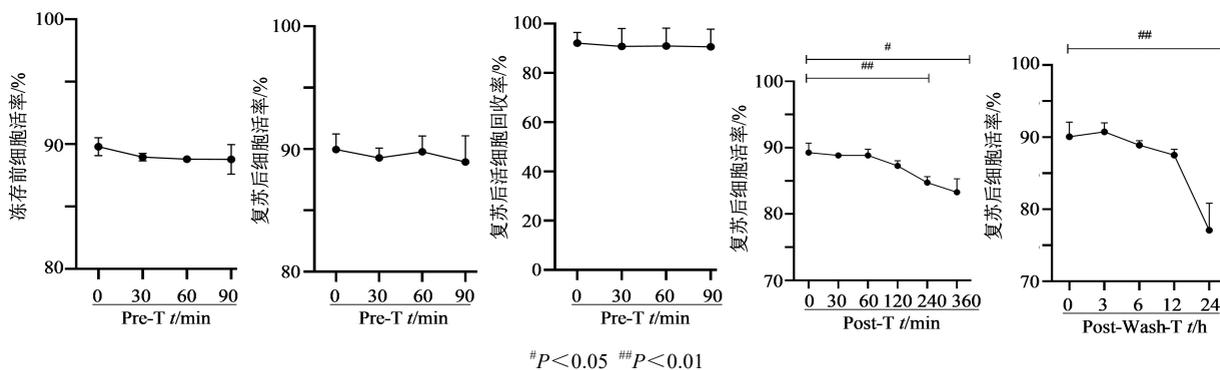
为了验证样本添加冷冻保护剂至程序降温开始的最佳保存时长,对刚添加冷冻保护剂的样本(Pre-T 0 min)、添加冷冻保护剂后4~8 $^{\circ}\text{C}$ 环境放置30、60、90 min的样本(Pre-T 30、60、90 min)进行冻存前的细胞活率检测。在程序降温后,将上述样本放入气相液氮罐($-150 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中储存7 d,再对这些样本进行复苏。检测复苏后的细胞数量及活率,计算活细胞回收率。考虑细胞复苏后存在有不洗涤和洗涤去除DMSO的2种处理方式,对刚复苏后的

图1 CIK细胞培养全过程数量、PDT及活率曲线($\bar{x}\pm s, n=3$)Fig. 1 Curve of cell number, PDT and activity rate during whole process of CIK cell culture ($\bar{x}\pm s, n=3$)

样本(Post-T 0 min)、复苏后未洗涤 15~25 °C 环境放置 30、60、120、240、360 min 的样本(Post-T 30、60、120、240、360 min)的样本、复苏后刚洗涤完成的样本(Post-Wash-T 0 h)、复苏洗涤后 4~25 °C 环境放置 3、6、12、24 h 的样本(Post-Wash-T 3、6、12、24 h)进行细胞活率检测。洗涤后的样本使用 0.9% 氯化钠注射液重悬放置。

如图 2 所示,CIK 细胞在冻存前添加冷冻保护

剂后 4~8 °C 放置 90 min 内活率稳定,Pre-T 90 min 与 Pre-T 0 min 相比,复苏后活率及活细胞回收率无显著差异。与 Post-T 0 min 比较,复苏后未经稀释或洗涤的样本 15~25 °C 放置 120 min 内活率稳定,放置 240 min 后活率显著降低($P<0.05, 0.01$);与 Post-Wash-T 0 h 比较,复苏后经洗涤去除 DMSO 处理的样本 4~25 °C 放置 12 h 内活率稳定,放置 24 h 后活率显著降低($P<0.01$)。

图2 CIK细胞在冻存前及复苏后放置不同时间的活率及活细胞回收率($\bar{x}\pm s, n=3$)Fig. 2 Viability and recovery rate of CIK cells at different times before cryopreservation and after thawing ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA) 软件进行统计学分析,组间数据比较采用双尾 t 检验。

3 讨论

细胞计数方法的标准化是细胞制剂质量控制的必要方面,保证了结果输出的准确性以及临床使用生物学效力的一致性,对于评估临床治疗效果极为重要。

台盼蓝染色是传统检测细胞数量及活率的方法,其具有简单、快速的区分死、活细胞的特点^[16]。由于台盼蓝染料无法区分红细胞及其他有核细胞,对于血液样本来源的细胞,通常需要裂解红细胞来

降低对单个核细胞的计数的干扰,会影响结果的准确性,存在一定的缺陷。Mascotti K 等^[9]对骨髓来源的 HPC 细胞对比使用 AO/PI 及台盼蓝染色方法测量细胞活率,结果表明 AO/PI 染色活率线性($R^2=0.9921$)优于台盼蓝染色线性($R^2=0.9584$)。Chan 等^[10]证实 AO/PI 染色法可以很好地从 PBMC 中去除红细胞的污染,从而精准地测量 PBMC 细胞数量。CIK 细胞是来自外周血或脐带血培养后的 1 群免疫细胞,从原理上分析,AO/PI 染料更适用于其细胞染色,本研究也证实了 AO/PI 染色法对 CIK 细胞具有很好的专属性。

本研究在符合药品生产质量管理规范(GMP)的条件下,验证了 AO/PI 荧光染色方法对 CIK 细胞

数量及活率检测的专属性、准确度、精密性、线性及范围,其结果与经典的台盼蓝染色人工计数结果相比,差异在±10%范围内,准确度符合要求,从回收率结果可以看出,不同样本使用台盼蓝染色人工计数法检测的活细胞浓度及细胞活率数值均高于AO/PI染色法检测的数值,其中,活率差异较明显,这说明不同的染色方法对死、活细胞的区分本身存在一定差异,这与Chan等^[11]的实验对比结果一致。AO/PI荧光染色法对同一CIK细胞样本重复检测,RSD小于3.13%,细胞数量及活率线性相关系数均大于0.990,表明基于仪器自动细胞计数检测结果稳定可靠,该方法符合法规下的检测要求,有利于标准化。在验证的基础上,对CIK细胞培养全过程活率进行了检测,其活率结果均大于80%,这与文献报道^[6,17]中CIK细胞的活率标准一致,符合实验预期,进一步说明了该方法的可靠性。

细胞制剂的稳定性与细胞临床疗效直接相关,由于DMSO存在细胞毒性^[18],从加入细胞冻存保护剂至开始程序降温间隔时间被认为是影响细胞复苏后活率的关键因素之一,细胞疗法认证基金会(FACT)条款中要求此时间应被最小化及验证^[19],复苏后暴露于DMSO环境的间隔时间也会影响最终使用时的细胞活率^[20-22]。通过验证发现,加入冻存保护剂后,4~8℃环境下放置90 min内CIK细胞活率稳定,且复苏后细胞活率及活细胞回收率无显著差异。这比Gao等^[6]验证的60 min时间要长,这可能与本研究使用的DMSO浓度较低有关。CIK细胞在复苏后15~25℃放置120 min及洗涤去除DMSO后4~25℃放置12 h内,细胞活率稳定。复苏洗涤后能在较长时间内保持活率稳定,主要原因是DMSO去除后对细胞损伤小,但在洗涤过程中会有5%~10%左右的细胞损失,同时,还可能增加感染风险。本研究为在CIK细胞冻存降温前的保存条件和保存时长及冻存复苏后的保存条件和保存时长提供了一定参考。基于以上研究结果制定了CIK细胞的参考放行标准:细胞活率应≥80%;复苏后细胞回收率应≥80%,细胞活率应≥80%。

本研究还发现,当使用0.9%氯化钠注射液作为细胞的重悬介质,同时采用AO/PI染色法检测细胞数量和活率时,其荧光强度明显低于培养过程中取样检测时荧光强度,导致细胞数量结果偏低。这可能与0.9%氯化钠注射液的pH值偏酸性有关^[23],本研究中使用AO/PI染液的pH值范围是7.4~8.0,而多数商业化氯化钠注射液pH值在5.5左右^[24]。因

此,在本研究中均使用培养基作为细胞的重悬介质进行检测。

总之,本研究具备了很好的应用价值:首先,验证了一种基于自动细胞计数仪的新的检测方法,该方法借助仪器,避免了人工观察的误差,节省了人力,同时,比人工计数更加快捷,可在小于30 s的时间内完成1份样本的计数;其次,验证的方法是基于荧光染色,对于含有杂细胞的样本相较于台盼蓝染色具有更好的专属性,从风险考虑,该方法同样适用于其他类型的细胞,例如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)、自然杀伤细胞(NK)、间充质干细胞(MSC)等,这类细胞在早期分离时均可能含有红细胞干扰;另外,方法学验证方案设计规范、完整,符合ICH及《中国药典》等指南法规要求,可以为细胞计数或其他细胞活性检测方法的验证提供参考。在验证的基础上,本研究还考察了CIK细胞在储存过程中数量及活率的稳定性,确定了合理的放置时间,为同类型产品相关研究提供了依据,但稳定性研究还不够全面,需要后续在此基础上进一步评估放置时间对细胞表面标志物表达、杀瘤活性及分泌因子的影响,以建立完整的质量控制体系。

本研究证明了基于AO/PI荧光染色原理的自动细胞分析方法可以用于CIK细胞的数量及活率检测,结果稳定可靠,为CIK细胞的放行及稳定性研究提供了一种新的、快速的分析方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pan Q Z, Liu Q, Zhou Y Q, et al. CIK cell cytotoxicity is a predictive biomarker for CIK cell immunotherapy in postoperative patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(5): 825-834.
- [2] Introna M, Correnti F. Innovative clinical perspectives for CIK cells in cancer patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 358.
- [3] Meng Y M, Yu Z F, Wu Y F, et al. Cell-based immunotherapy with cytokine-induced killer (CIK) cells: From preparation and testing to clinical application [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(6): 1-9.
- [4] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, et al. Clinical trials on CIK cells: First report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2): 305-310.
- [5] Guo Z, Liu H, He X P, et al. A clinical study of cytokine-induced killer cells for the treatment of refractory lymphoma [J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(3): 531-536.

- [6] Gao X C, Mi Y J, Guo N, et al. Cytokine-induced killer cells As pharmacological tools for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 774.
- [7] Dehno M N, Li Y T, Weiher H, et al. Increase in efficacy of checkpoint inhibition by cytokine-induced-killer cells as a combination immunotherapy for renal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3078.
- [8] Bremm M, Pfeffermann L M, Cappel C, et al. Improving clinical manufacturing of IL-15 activated cytokine-induced killer (CIK) cells [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1218.
- [9] Mascotti K, McCullough J, Burger S R. HPC viability measurement: Trypan blue versus acridine orange and propidium iodide [J]. *Transfusion*, 2000, 40(6): 693-696.
- [10] Chan L L, Lavery D J, Smith T, et al. Accurate measurement of peripheral blood mononuclear cell concentration using image cytometry to eliminate RBC-induced counting error [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 388(1/2): 25-32.
- [11] Chan L L, Kuksin D, Lavery D J, et al. Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(3): 461-473.
- [12] Bank H L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, 24(4): 266-273.
- [13] Wu X, Chen Z R, Zhang G J. Detection of apoptosis of human osteosarcoma cells by AO/EB double staining [J]. *Tumor*, 2004, 24(1): 88-89.
- [14] Wang Y B, Zhao L W, Xiang Z Q, et al. Correlation analysis of the results of double fluorescence (AO/PI) staining and clinical outcomes [J]. *J Reprod Contr*, 2012, 23(2): 111-118.
- [15] Liang X, Hu X, Hu Y, et al. Recovery and functionality of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells using five different xeno-free cryoprotective solutions [J]. *Cryobiology*, 2019, 86: 25-32.
- [16] Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2015, 111: A3.B.1-A3.B.3.
- [17] Castiglia S, Adamini A, Rustichelli D, et al. Cytokines induced killer cells produced in good manufacturing practices conditions: identification of the most advantageous and safest expansion method in terms of viability, cellular growth and identity [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 237-245.
- [18] Fahy G M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology [J]. *Cryobiology*, 1986, 23(1): 1-13.
- [19] Seventh Edition NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration [S]. 2019.
- [20] Ramachandran H, Laux J, Moldovan I, et al. Optimal thawing of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for use in high-throughput human immune monitoring studies [J]. *Cells*, 2012, 1(3): 313-324.
- [21] Huang L, Song G Q, Wu Y, et al. Optimal length of time of cryopreserved umbilical cord blood infusion after thawing [J]. *Hematology*, 2014, 19(2): 73-79.
- [22] Lee Y H, Koh H, Nam E, et al. Cryopreserved cord blood mononuclear cells in DMSO are healthy for at least 6 hours after thawing [J]. *Transfus Apher Sci*, 2020, 59(1): 102603.
- [23] 王以明, 庞小峰, 张玉玉, 等. 吖啶橙受溶液pH和浓度变化的光谱研究 [J]. *应用化工*, 2009, 38(4): 509-513.
Wang Y M, Pang X F, Zhang Y Y, et al. Study on the spectra of acridine orange influencing by different concentration and pH in aqueous solution [J]. *Appl Chem Ind*, 2009, 38(4): 509-513.
- [24] Reddi B A. Why is saline so acidic (and does it really matter ?) [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(6): 747-750.

[责任编辑 兰新新]