

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.010

· 技术方法 ·

## 人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌杀伤活性的检测方法建立及验证

周巧<sup>1</sup>, 李美玲<sup>1</sup>, 陈志刚<sup>2</sup>, 王壮<sup>1</sup>, 尚孙玉麟<sup>1</sup>, 徐秋玲<sup>1</sup>, 朱艳萍<sup>1</sup>, 张益丽<sup>1</sup> (1. 云南精准检验有限公司 检验部, 云南 昆明 650000; 2. 赛德特生物制药有限公司 临床样品制备部, 云南 昆明 650000)

**[摘要]** **目的:** 构建绿色荧光蛋白(GFP)/萤光素酶(Luc)双荧光标记的肿瘤细胞株, 建立人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌细胞杀伤活性的检测方法, 并进行初步验证。 **方法:** 通过HLA高分辨分型筛选出HLA-A、HLA-B、HLA-C基因型别为纯合子且相应等位基因的分布频率高于2.500%的非小细胞肺癌细胞系作为细胞模型, 采用携带有GFP和Luc基因的重组慢病毒感染原始细胞株而获得GFP、Luc稳定表达的细胞系作为靶细胞。通过效应细胞与靶细胞共培养, 并优化靶细胞前处理步骤、共培养时间、效靶比等参数, 建立人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌杀伤活性的检测方法, 并进行专属性、精密度验证。 **结果:** 通过HLA高分辨分型, 成功筛选出高频等位基因HLA-A\*11:01:01 (20.893%)、HLA-B\*52:01:01 (2.991%)、HLA-C\*12:02:02 (3.139%)的非小细胞肺癌(HCC827)细胞株作为细胞模型。通过慢病毒载体成功构建GFP/Luc双荧光标记的HCC827细胞株, GFP阳性率达96%。重组慢病毒滴度为 $1.83 \times 10^7$  TU/mL。效靶比为5:1、10:1、15:1、20:1时, 各组间杀伤活性差异显著( $P < 0.05$ ), 且杀伤活性随培养时间延长显著升高( $P < 0.0001$ )。经综合评估后确认最优参数效靶比为10:1, 共培养时间为72 h。方法学验证表明, 建立的方法专属性强; 重复性变异系数为0.80%~1.86%; 精密度变异系数为1.00%~1.58%, 方差分析显示差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 说明方法重复性良好。 **结论:** 成功建立了人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌杀伤活性的检测方法并验证成功, 该方法有助于人链式激活免疫细胞制剂在细胞免疫治疗有效性评价中发挥重要作用。

**[关键词]** 人链式激活免疫细胞制剂; 非小细胞肺癌; 萤光素酶; 绿色荧光蛋白; 杀伤活性; 方法学建立; 方法学验证

**[中图分类号]** R446.6; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)08-0862-08

## Establishment and verification of a detection method for the cytotoxic activity of human cascade-primed immune cell injection against non-small cell lung cancer

ZHOU Qiao<sup>1</sup>, LI Meiling<sup>1</sup>, CHEN Zhigang<sup>2</sup>, WANG Zhuang<sup>1</sup>, SHANG Sunyulin<sup>1</sup>, XU Qiuling<sup>1</sup>, ZHU Yanping<sup>1</sup>, ZHANG Yili<sup>1</sup> (1. Inspection Department, Yunnan Precision Inspection Co., Ltd., Kunming 650000, Yunnan, China; 2. Clinical Sample Preparation Department, CYTOCRAFT Biopharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650000, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To create a luciferase (Luc) / green fluorescent protein (GFP) dual-fluorescent labeled tumor cell line and establish a detection method for the cytotoxic activity of human cascade-primed immune cell injection against non-small cell lung cancer (NSCLC), and to conduct preliminary verification. **Methods:** NSCLC lines, which possessed homozygous HLA-A, HLA-B, and HLA-C genotypes and an allelic distribution frequency higher than 2.500% were screened through high-resolution HLA typing for use as cell models. The cell line stably expressing the green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) was obtained through infecting the original cell line with a recombinant lentivirus that carries the GFP gene and Luc gene. This cell line was then used as the target cell. Through co-culturing effector cells and target cells as well as optimizing parameters including the pretreatment steps of target cells, co-culture duration, and effector-to-target proportion, a detection method for the cytotoxic activity of human cascade-primed immune cell injection against NSCLC was established. Subsequently, both the specificity and precision of this method were thoroughly verified. **Results:** Through high-resolution HLA typing, the non-small cell lung cancer cell line HCC827 harboring high-frequency alleles HLA-A11:01:01 (20.893%), HLA-B52:01:01 (2.991%), and HLA-C\*12:02:02 (3.139%) was successfully selected as the cellular model. The HCC827 cell line with GFP and Luc dual fluorescence labeling was successfully constructed using a lentiviral vector, with a 96% GFP-positive rate. The titer of the recombinant lentivirus was  $1.83 \times 10^7$  TU/mL. Significant differences in the cytotoxic activity were observed among groups with effector-to-target (E:T) ratios of 5:1, 10:1, 15:1, and 20:1 ( $P < 0.05$ ), and the cytotoxic activity

**[作者简介]** 周巧(1986—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事肿瘤免疫细胞质量控制研究

**[通信作者]** 张益丽(扫码获取作者联系方式)



increased significantly with prolonged co-culture duration ( $P < 0.0001$ ). After comprehensive evaluation, the optimal parameters were determined as an effector-to-target (E:T) ratio of 10:1 and a co-culture duration of 72 h. Methodological verification demonstrated that the established method exhibited strong specificity, with a coefficient of variation of 0.80% - 1.86% for repeatability and 1.00% - 1.58% for precision. Furthermore, no significant differences were observed *via* variance analysis ( $P > 0.05$ ), confirming good repeatability of the method. **Conclusion:** A detection method for the cytotoxic activity of human cascade-primed immune cell injection against NSCLC has been successfully established and verified. This method might help human cascade-primed immune cell injection play an important role in the effectiveness evaluation of cellular immunotherapy.

**[Key words]** human cascade-primed immune cell injection; non-small cell lung cancer (NSCLC); luciferase; green fluorescent protein (GFP); cytotoxic activity; establishment of method; verification of method

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(8): 862-869. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.010]

人链式激活免疫细胞制剂系由患者自体外周血中的单个核细胞在体外经 CD3 单抗联合细胞因子 (I、II、III) 激活、扩增培养而获得的混合 T 淋巴细胞。这种经激活和诱导的免疫细胞可在患者体内对肿瘤细胞进行杀伤, 配合放化疗或单独使用抑制原发肿瘤生长, 从而延缓复发和转移、提高患者的生存质量<sup>[1]</sup>。目前, 人链式激活免疫细胞制剂在自体乳腺癌<sup>[2]</sup>、结肠癌<sup>[3]</sup>以及非小细胞肺癌<sup>[4]</sup>显示出明显疗效。有效性是细胞制剂关键质量属性的重要评价指标。现有技术中, 动物模型法是评价免疫细胞制剂有效性的金标准<sup>[5]</sup>; 体外评估的方法有放射性  $^{51}\text{Cr}$  释放法 (chromium-51 release assay)、非放射性双 (乙酰氧基甲基)-2,2':6',2"-三联吡啶-6,6"-二羧酸 [bis(acetoxymethyl)-2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylate, BATDA] 法、钙荧光素乙酰氧基甲酯 (calcein acetoxymethyl ester, Calcein-AM) 标记法、CytoTox-Glo<sup>TM</sup> (CytoTox-Glo<sup>TM</sup> Cytotoxicity Assay) 法, 酶反应比色法、流式细胞术等, 但这些方法为终点试验, 限制了效应细胞杀伤靶细胞活性的直观性、动态化观察。本研究中, 首先利用 HLA 高分辨分型筛选出肿瘤细胞系, 通过慢病毒构建表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和萤光素酶 (luciferase, Luc) 的靶细胞, 与效应细胞共培养并利用荧光显微镜及酶标仪直观、动态化、定量地检测人链式激活免疫细胞制剂对肿瘤细胞的杀伤活性<sup>[6-7]</sup>。该方法旨在实现产品的有效性评估及质量研究中的快速放行, 为细胞制剂关键质量属性的有效性评估提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂及仪器

人链式激活免疫细胞制剂 (伦理审查批件号: YJ23-003-02)、人非小细胞肺癌细胞 HCC827 由赛德特生物制药有限公司提供。人胚肾 293T 细胞、Jurkat 细胞由本实验室保存。所有细胞系均经短串联重复

序列 (short tandem repeat, STR) 分析鉴定, 均无支原体污染。所有细胞均采用推荐的培养基培养。

慢病毒包装质粒 PSPAX2 和 PMD2G 来自 BioVector NTCC Inc. (典型培养物保藏中心, 中国北京)。含有 Luc 基因的 psiCHECK-2 载体购自上海信裕生物科技有限公司。pCDH-MSCV-MCS-EF1 $\alpha$ -GFP-T2A-Puro 慢病毒载体购自 SBI 公司。感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、DNA 纯化回收试剂盒、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂、PureLink<sup>TM</sup> Expi 无内毒素大量质粒纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司。Opti-MEM 购自 Gibco 公司。限制性内切酶 *Xba* I、*Bam*H I, T4 DNA 连接酶、DNA marker 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。D-荧光素钠购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, Triton-X 100 购自 Sigma-Aldrich 公司。多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司, 流式细胞分析仪购自贝克曼库尔特生物科技 (苏州) 有限公司, 倒置荧光显微镜购自尼康, 基因扩增仪购自杭州博日科技有限公司, 凝胶成像系统购自 UVITEC 公司。

### 1.2 非小细胞肺癌肿瘤细胞株的筛选

取工作库细胞 NCI-H1975、HCC827 进行 HLA 高分辨分型 (4 位水平) 检测。首先进行肿瘤细胞系的 DNA 提取及 PCR 扩增, 完成测序文库的制备。文库经质检合格后, 根据有效浓度及目标数据量在 Illumina 测序平台进行全序列的双向测序。再将原始荧光信号经碱基识别分析转换为 FASTQ 格式的短读长序列。原始 FASTQ 文件经质量控制, 包括测序数据过滤、测序错误率分布检查  $\leq 0.1\%$ 、测序数据的平均质量值分布 Q30  $\geq 80\%$ 。符合质量标准的 clean reads 通过 BWA 工具比对到参考基因组 (b37 + decoy), 得到 BAM 格式文件后用 SAMtools 进行排序, 再用 Samblaster 标记重复序列。最后, 分别采用 HLA-I 类分型软件 (OptiType)、HLA-II 类分型软件 (HLAminer) 以及 HLA-HD 和 HLA-VBSeq 软件提取 BAM 文件中 \*HLA 基因座的测序 reads, 并进行局部重比对优化。将 reads 映射至 HLA 可变区数据库, 独

立验证 HLA- I 类、HLA- II 类分型结果的一致性, 最终生成 HLA 分型报告。

### 1.3 Luc-GFP 双荧光标记靶细胞株构建

#### 1.3.1 pCDH-MSCV-MCS-Luc-EF1 $\alpha$ -GFP-T2A-Puro 慢病毒载体的构建

以 psiCHECK-2 为模板, 根据 pCDH-MSCV-MCS-EF1 $\alpha$ -GFP 载体骨架两端的酶切位点设计引物 Luc-F: 5'-TGCTAGAGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGC-3', Luc-R: 5'-TCACCAAGCAATTTGACTTTCCGCCCTTC-3' (注: 下划线 CTAGA 为 *Xba* I 酶切位点; 下划线 CCAAG 为 *Bam*H I 酶切位点) 进行 PCR 扩增 Luc 目的基因。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统分析, 选取 1 653 bp 目标片段。采用 Invitrogen DNA 纯化回收试剂盒回收目的基因片段。用 *Xba* I 和 *Bam*H I 位点分别对目的基因片段以及质粒载体进行双酶切, 再使用 T4 DNA 连接酶链接, 构建 pCDH-MSCV-MCS-Luc-EF1 $\alpha$ -GFP 重组质粒。将重组质粒转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 于含氨苄青霉素的 LB 培养基中筛选并克隆目的基因, 抽提并纯化质粒, 最终获得含 GFP、Luc 基因的高纯度慢病毒载体质粒。通过双酶切及 DNA 测序及 NCBI 亲缘性比对验证重组质粒的正确性。

#### 1.3.2 重组慢病毒液的制备

将重组质粒 pCDH-MSCV-MCS-Luc-EF1 $\alpha$ -GFP (11  $\mu$ g) 与包装质粒 psPAX2 (8.5  $\mu$ g)、pMD2G (2.8  $\mu$ g) 分别溶于 1 mL Opti-MEM 中, 制成转染液 1; 取 48  $\mu$ L Lipofectamine™ 2000 转染试剂稀释于 1 mL Opti-MEM, 制成转染液 2, 再将转染液 1 和 2 混匀, 室温静置 10~15 min, 形成 DNA-Lipofectamine 复合物后共转染汇合度为 70%~90% 的 293T 细胞, 继续培养 8~12 h, 弃去含有转染液的培养基, 再添加 20~25 mL 含有 1% 丙酮酸钠、10% FBS 的 DMEM, 37 °C 继续培养 48~72 h, 分两次收集病毒上清液<sup>[8]</sup>, 4 °C、917  $\times$  g 离心 10 min, 取上清液分装后于 -80 °C 保存备用。

#### 1.3.3 病毒滴度测定

将 Jurkat 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 共 18 孔。次日加入  $10^{-1}$  至  $10^{-5}$  倍比稀释度的病毒上清液, 其余 3 孔加入培养基作为阴性对照, 继续培养 48 h 后取样检测。取上述 6 组细胞悬液各 150  $\mu$ L, 分别加入 150  $\mu$ L 荧光素酶底物, 混匀并反应 10~15 min, 于多功能酶标仪中检测 Luc 相对光单位 (relative light unit, RLU), 以 RLU 值表示携带 Luc 报告基因的病毒感染性滴度高低。剩余细胞使用流式细胞仪检测, 绘制 FITC 通道直方图, 以阴性对照设门, 确定 FITC 阳性细胞百分比, 再根据文献[9]公式计算病毒滴度 (TU/mL): 细胞阳性率  $\times$  转导时的细胞总数  $\times$

病毒稀释倍数/病毒体积。

#### 1.3.4 Luc-GFP 双荧光标记的非小细胞肺癌细胞株的构建方法

将 HCC827 细胞接种于 6 孔培养板, 共 4 孔。培养至汇合度为 80% 后, 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 18、14、9、3 的梯度加入 Luc-GFP 慢病毒载体构建靶细胞, 37 °C 静置培养至汇合度 90%, 转入 T25 培养瓶扩大培养, 使用嘌呤霉素筛选表达 Luc 和 GFP 的 HCC827-Luc-GFP 抗性细胞, 待细胞汇合度再次达到 90% 左右时, 使用荧光显微镜观察并拍照记录荧光表达情况。采用 Imag Pro Plus 6.0 软件分析荧光照片, 筛选出阳性率大于 95% 且状态最佳的细胞, 扩增后建库。

#### 1.4 人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌细胞杀伤活性的检测方法的建立

以 Luc-GFP 标记的 HCC827 细胞作为靶细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/mL 密度接种于 96 孔板 (100  $\mu$ L/孔), 试验设置靶细胞对照组和实验组, 每组 6 个复孔。将细胞板置于培养箱中避光反应 20~24 h。实验组按效靶比 5:1、10:1、15:1、20:1 加入人链式激活免疫细胞制剂; 靶细胞对照组补加培养基至 200  $\mu$ L。所有孔混匀后共培养, 分别于 50、54、70、76 h 时间定, 使用 488 nm 激发光摄取 GFP 图像并观察杀伤情况。随后, 吸弃孔内培养基, 加入 100  $\mu$ L/孔荧光素酶底物工作液 (含 600  $\mu$ mol/L D-荧光素钠、2% Triton X-100), 水平摇床上室温混匀 10~15 min。使用多功能酶标仪化学发光检测模块 528/20 nm 检测发光信号。结合 GFP 图像与 RLU 值, 按文献[10]中公式计算杀伤率, 以代表杀伤活性。

杀伤率 =  $(1 - \text{试验组的荧光值 RLU} / \text{靶细胞对照组的荧光值 RLU}) \times 100\%$ 。

### 1.5 方法验证

#### 1.5.1 专属性<sup>[11]</sup>

设置靶细胞对照组 (HCC827 活细胞)、效应细胞对照组 (人链式激活免疫细胞)、阴性对照组 (已致死的靶细胞)、质控 (QC) 组 (活靶细胞 + 死靶细胞混合)。测定 RLU。统计各样本 RLU 的变异系数 (coefficient of variation, CV), 以靶细胞对照组为基准计算回收率。

#### 1.5.2 精密度<sup>[11]</sup>

取 3 批供试品, 每批制备 6 个重复样本进行平行试验, 以效靶比 = 10:1 共培养 72 h, 分别由两名试验员独立操作并记录结果。

### 1.6 方法应用

以 2 批人链式激活的免疫细胞为供试品, 于冻存 0、1、3、6 各月后复苏, 测定其对 HCC827-Luc-GFP 的

杀伤活性。检测复苏后(5±3)℃放置0、4 h,以及于(23±2)℃放置0、4 h后的杀伤活性。

1.7 统计学处理

采用IBM SPSS Statistics 27.0.1 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 非小细胞肺癌肿瘤细胞株的筛选

HLA-A\*11:01:01、HLA-B\*52:01:01、HLA-C\*12:02:02均为中国人群中高频基因型<sup>[12]</sup>,高分辨分型结果显示,上述等位基因在中国人群中的分布频率分别为20.893%、2.991%、3.139%(数据来源于中华骨髓数据库)。机制研究表明,人链式激活免疫细胞制剂主要效应细胞为CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞(CTL),其肿瘤杀伤作用主要依赖MHCⅠ类分子介导的途径,进而通过HLA 高分辨分型筛选出高频基因型组合的肿瘤细胞系,能有效减少无关HLA 差异带来的干扰。因此,本研究选用HCC827细胞作为靶细胞模型。

2.2 Luc-GFP 双荧光标记靶细胞株构建

2.2.1 成功制备重组慢病毒并测定滴度

PCR 扩增获得 Luc 基因片段, pCDH-MSCV-MCS-Luc-EF1 $\alpha$ -GFP 重组质粒经 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切后,1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离得到1 500~2 000 bp 的条带(图1),与 Luc 预期片段大小一致。经DNA 测序及NCBI 亲源性比对,证实插入的系列为正确的

Luc 基因。

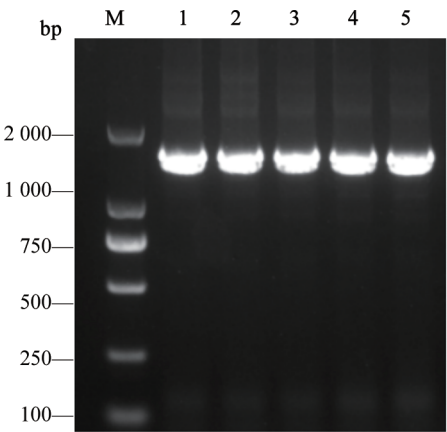
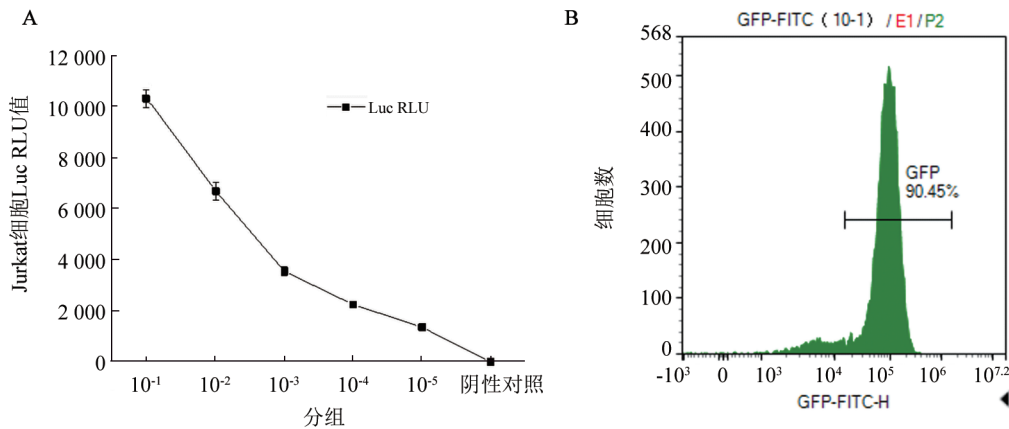


图1 琼脂糖凝胶电泳验证Luc基因PCR扩增产物

多功能酶标仪检测 Luc 基因表达强度结果(图2A)显示,随着病毒液稀释度的增加,Jurkat-Luc 的荧光信号逐渐降低,表明 Luc 基因成功转导;流式细胞术检测结果(图2B)显示,FITC通道阳性占比随着病毒液稀释度的增加逐渐减少,最高为90.45%,表明 GFP 基因成功转导。慢病毒滴度为 $1.83 \times 10^7$  TU/mL。

2.2.2 Luc-GFP 双荧光标记的非小细胞肺癌细胞株结果

选择生长状态良好的贴壁HCC827细胞(图3A),感染 Luc/GFP 双荧光标记慢病毒后获得HCC827-Luc-GFP 靶细胞,荧光显微镜下可见HCC827-Luc-GFP 靶细胞表达 GFP 蛋白(图3B)。Imag Pro Plus 6.0 分析结果显示,HCC827-Luc-GFP 细胞GFP 蛋白表达阳性率为96%。



A: 酶标仪检测 Jurkat 细胞代表 Luc 基因表达强度的 RLU 值;B: 流式细胞术检测 Jurkat 细胞 GFP 蛋白表达水平。

图2 重组慢病毒滴度测定

2.3 人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌细胞杀伤活性的检测方法建立的结果

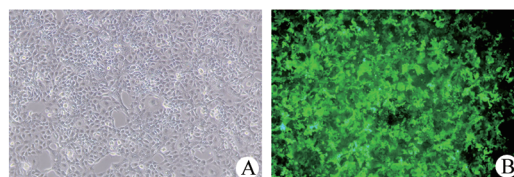
为直观、可视化、动态地反映杀伤程度及获取杀伤活性数据,由于靶细胞被杀伤后,胞内 GFP 及释放

的萤光素酶需一定时间降解,为了增加实验的准确性,本研究设定了至少 50 h 的共培养时间;考虑到实验组与对照组共培养时间始终一致,因此认为效应细胞及靶细胞在此之间的增值效应是等效的,默认

细胞的增值不影响结果判读。为了显示不同效靶比的杀伤活性,本研究设定效靶比为5:1、10:1、15:1和20:1,共培养50 h进行杀伤活性检测,并采用488 nm激发光采集GFP荧光图像(图4),结合多功能酶标仪读取的数值计算杀伤活性的结果显示,5:1与10:1组间杀伤活性差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),10:1与15:1组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。此外,5:1、10:1、15:1和20:1四组间杀伤活性差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图4),表明效靶比升高可显著提升杀伤效果,后续实验以10:1作为杀伤活性检测的效靶比。

为了显示效应细胞杀伤活性的增高趋势,本研究设定低效靶比5:1、10:1,共培养50、54、70和76 h时检测杀伤活性,以488 nm激发光摄取GFP荧光图像(图5A~J),效靶比5:1、10:1组杀伤活性随时间升高( $P < 0.000 1$ )(图5)。

本研究为人链式激活的免疫细胞对靶细胞HCC827-Luc-GFP的杀伤活性检测,通过对关键参数效靶比、共培养时间的优化表明,效靶比为(10~20):1,共培养时间为50~76 h时,杀伤活性 $\geq 70\%$ 、细胞活率 $\geq 85\%$ ,符合人链式激活的免疫细胞制剂标准。经评估后,确定效靶比为10:1、共培养72 h为标准操作条件。



A:贴壁生长的HCC827细胞;B:倒置荧光显微镜观察HCC827-Luc-GFP细胞中GFP基因表达。

图3 HCC827-Luc-GFP靶细胞构建及GFP表达检测( $\times 10$ )

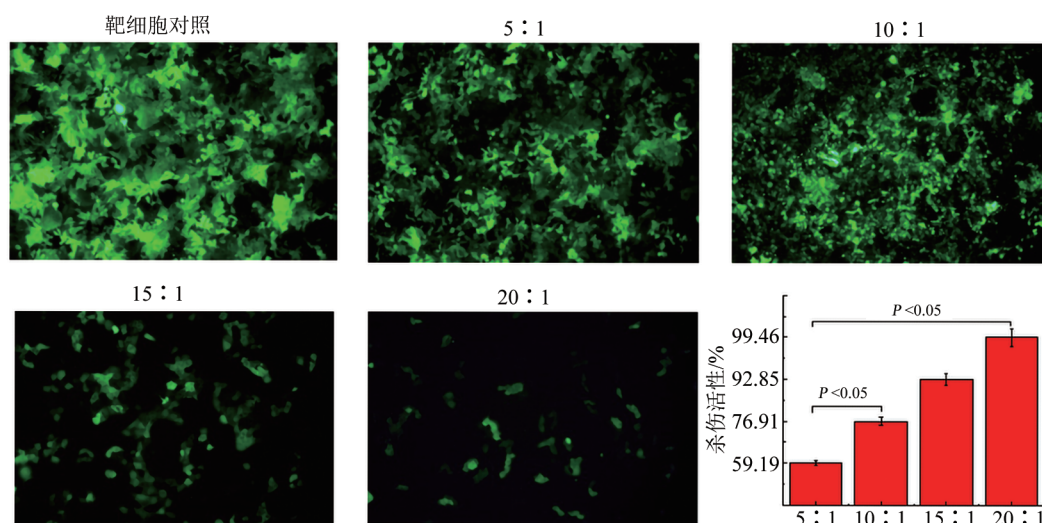


图4 不同效靶比下人链式激活免疫细胞对HCC827-Luc-GFP细胞的杀伤活性( $\times 10$ )

## 2.4 方法验证结果

### 2.4.1 专属性结果

专属性验证结果(表1)显示,阴性对照组、效应细胞对照组平均RLU分别为10、3;靶细胞对照组平均RLU为1 944;靶细胞对照组复孔RLU的 $CV < 15\%$ ;质控组1、质控组2复孔RLU的 $CV < 15\%$ ,与靶细胞对照组相比,回收率分别为94.39%、97.07%。说明本方法专属性强,共培养体系不受靶细胞与效应细胞的干扰。

### 2.4.2 精密度结果

精密度验证结果(表2)显示,2名试验员分别完成3个批次的独立重复试验,每位试验员重复性 $CV$ 为0.80%~1.86%,2名试验员间的中间精密度 $CV$ 为1.00%~1.58%, $CV$ 均 $< 5\%$ 。方差分析显示差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。表明方法重复性良好,且不受

实验人员差异影响。

### 2.5 方法应用的结果

表3显示,2个批次的人链式激活免疫细胞在冻存0、1、3、6个月复苏的活率及对靶细胞的杀伤活性经单因素方差分析,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。表4显示,2个批次人链式激活免疫细胞复苏后于 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ 存放0、4 h及 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 存放0、4 h,活率及对靶细胞的杀伤活性经双侧 $t$ 检验,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ ),提示冻存6个月内、复苏后在2~25 $^\circ\text{C}$ 存放0~4 h,人链式激活免疫细胞活率及杀伤活性均保持稳定。

## 3 讨论

人链式激活免疫细胞制剂是一种新型过继性细胞免疫细胞制剂,其效应细胞包括 $\text{CD4}^+$ Th细胞、

CD8<sup>+</sup>CTL、CIK、NK 细胞和 DC 等。所针对的实体瘤包括 20% 非 MHC 限制型及 80% 的 MHC 限制型肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。而所有这些研究均依赖于快速、有效直观的体内外杀伤活性分析方法来证明其有效性。因此, 建立快速评估免疫细胞杀伤肿瘤细胞效果的体外方法成为关键。

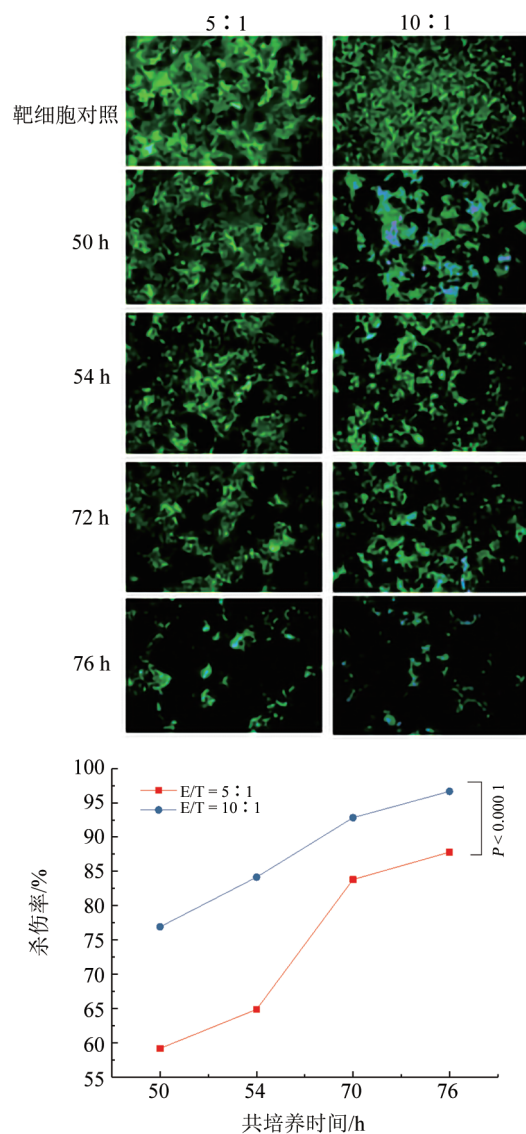


图5 不同共培养时间下人链式激活免疫细胞制剂对 HCC827-Luc-GFP 细胞的杀伤

表1 方法专属性试验结果

分组	RLU	CV/%	RE/%
阴性对照组	10 ± 2	12.89	—
效应细胞对照组	3 ± 1	15.49	—
靶细胞对照组	1 944 ± 118	6.08	—
质控组 1	1 835 ± 53	2.87	94.39
质控组 2	1887±153	8.10	97.07

表2 方法精密度(重复性、中间精密度)试验结果

分组	次数	结果	CV/%	CV/%
			(重复性)	(精密度)
批次 1	试验员 1	6 97.99 ± 0.96	0.98	1.00
	试验员 2	6 97.51 ± 1.96	1.05	
批次 2	试验员 1	6 83.44 ± 2.96	1.07	1.50
	试验员 2	6 82.84 ± 3.96	1.86	
批次 3	试验员 1	6 88.63 ± 4.96	0.80	1.58
	试验员 2	6 87.04 ± 5.96	1.60	

表3 2批人链式激活的免疫细胞制剂复苏后不同时间的杀伤活性

复苏时间	批次	活率/%	杀伤率/%
0个月	批次 1	90.2 ± 0.3	94.16 ± 0.51
	批次 2	92.9 ± 1.6	93.48 ± 1.39
1个月	批次 1	94.1 ± 0.4	98.93 ± 3.72
	批次 2	90.6 ± 0.6	97.82 ± 1.87
3个月	批次 1	91.5 ± 0.4	98.89 ± 2.53
	批次 2	93.2 ± 0.3	96.58 ± 2.29
6个月	批次 1	92.7 ± 0.4	96.44 ± 5.71
	批次 2	92.5 ± 0.7	90.43 ± 4.34

表4 2批人链式激活的免疫细胞制剂复苏后不同温度放置不同时间的杀伤活性数据

复苏后 存放温 度/°C	批次	0 h		4 h	
		活率/%	杀伤率/%	活率/%	杀伤率/%
5 ± 3	批次 1	92.8 ± 1.1	97.53 ± 1.85	91.0 ± 1.4	94.66 ± 2.51
	批次 2	91.0 ± 0.7	98.82 ± 2.39	88.7 ± 0.7	97.90 ± 3.65
23 ± 2	批次 1	92.8 ± 1.1	97.53 ± 1.85	87.8 ± 0.7	98.37 ± 1.15
	批次 2	91.0 ± 0.7	98.82 ± 2.39	87.5 ± 0.6	99.90 ± 3.78

目前,检测免疫细胞杀伤活性的模型动物法周期过长,成功率较低,无法用于细胞制剂日常放行检测<sup>[14]</sup>。<sup>51</sup>Cr 放射性法存在防护要求高、对人体健康及环境的潜在危害等多种因素的限制,且仅能检测靶细胞的死亡率<sup>[15]</sup>;非放射性 BATDA 释放法<sup>[16]</sup>、Calcein-AM<sup>[17]</sup>、CytoTox-Glo 法<sup>[18]</sup>利用细胞内酶将非荧光底物转化为荧光产物,再根据荧光值读取的情况确认杀伤的活性,虽然荧光值的读取可以替代放射性的使用,但是细胞内蛋白酶活性不同,且无法排除效应细胞的自发释放而导致结果的不准确性。酶反应比色法(LDH 释放法<sup>[19]</sup>、G3PDH 法<sup>[20]</sup>、AK 法<sup>[21]</sup>)灵敏度与可重复性较低,共培养时无法区分效应细胞及靶细胞的死亡。流式细胞术基于对样本的即时

检测技术,对于免疫细胞识别并杀伤肿瘤细胞的动态过程等信息获取有限且荧光染料存在非特异性结合从而降低方法的准确性<sup>[22]</sup>。实时细胞分析(real-time cell analysis, RTCA)法基于微电极阻抗技术,在含有细胞的培养容器底部嵌入微电极,当细胞在电极表面生长、迁移、增殖或者死亡等状态发生变化时,会引起测量电极之间电流的阻抗。因此展现出特定的体系指向性,即主要适用于效应细胞非贴壁、靶细胞贴壁的共培养体系,且仪器耗材昂贵<sup>[23]</sup>。

本研究采用作用机制明确的双荧光报告基因法,通过HLA高分辨分型筛选HLA-A、B、C位点分型为纯合子且等位基因在中国人群中分布频率高于2.500%的肿瘤细胞系作为细胞模型<sup>[24]</sup>,再使用双荧光标记靶细胞。成功获得了一株稳定表达GFP、Luc的HCC827细胞。其原理为Luc在ATP、镁离子和氧气存在的条件下,能够催化萤光素氧化成氧化型的萤光素并发出波长为560 nm左右的生物荧光,该荧光可通过化学发光系统进行测定<sup>[25]</sup>。GFP在488 nm的激发光下会发出绿色荧光,其荧光的产生不需要添加额外的底物。一方面通过比较对照组与实验组GFP荧光强度,可直观甚至动态地观察杀伤情况,为质量研究提供直观可靠的辅助材料;另一方面,可加入底物溶液后通过酶标仪化学发光系统检测LucRLU,再计算出杀伤活性,提供有力的数据支持。检测方法简便,适用范围广。

本研究通过对培养体系的探索,确定人链式激活免疫细胞制剂对非小细胞肺癌细胞杀伤活性的检测方法参数为:效靶比为10:1、共培养72 h。通过专属性及方法学验证结果,表明效应细胞无自发荧光,不干扰GFP及Luc检测,只反映对靶细胞的杀伤活性。检测方法具有较高的专属性、精密度及重复性。有效解决了金标准周期长、成功率低及现有技术操作复杂、无法成像的问题。最后,本研究在有效性评价方面的应用,可筛选出冻存6个月内复苏并在2~25 °C存放4 h仍保持高活率及强细胞毒性的人链式激活免疫细胞,能够满足临床需要。

综上,本研究通过重组慢病毒感染HCC827细胞,成功构建稳定共表达Luc和GFP的靶细胞,并建立一种可评估人链式激活的免疫细胞杀伤活性的体外检测方法,该方法既可直观、可视化、动态地观察杀伤情况,又能定量获取杀伤活性数据,为质量放行检测提供参考,实现产品快速放行,亦可为其他免疫细胞治疗产品杀伤活性检测提供参考。

## 【参 考 文 献】

[1] 张益丽,王壮,周巧,等.人链式激活免疫细胞制剂的质量研究[J].中国药杂志,2025,60(5):532-538. DOI: 10.11669/

cpj.2025.05.011.

- [2] 郑书楷,桂安萍,凌飞海,等. CAPRI细胞免疫疗法辅助32例三阴性乳腺癌临床观察[J]. 广东医学院学报, 2016, 34(4): 411-413. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4057.2016.04.022.
- [3] 梁文龙,吴学琼,孟昭升. 链式激活诱导免疫细胞联合化疗对恶性实体肿瘤患者外周血T淋巴细胞亚群及肿瘤标志物的影响[J]. 山东医药, 2019, 59(22): 51-53. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2019.22.014.
- [4] 孙银萍,王福立. 级联激活的免疫细胞联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌效果观察[J]. 山东医药, 2017, 57(6): 48-50. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2017.06.016.
- [5] VATSAN R S, BROSS P F, LIU K, *et al.* Regulation of immunotherapeutic products for cancer and FDA's role in product development and clinical evaluation[J/OL]. J Immunother Cancer, 2013, 1: 5[2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24764535/>. DOI: 10.1186/2051-1426-1-5.
- [6] EUGENE-NORBERT M, CUFFEL A, RIOU G, *et al.* Development of optimized cytotoxicity assays for assessing the antitumor potential of CAR-T cells[J/OL]. J Immunol Methods, 2024, 525: 113603[2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38147898/>. DOI: 10.1016/j.jim.2023.113603.
- [7] HAYASHI R, NAKATANI H, KAWAHATA H, *et al.* Firefly luciferase-based chronological measurement of effector CD8<sup>+</sup> T-cell activity using a multi-chamber luminometer[J]. Bioanalysis, 2022, 14(22): 1413-1421. DOI: 10.4155/bio-2022-0208.
- [8] MOREIRA A S, CAVACO D G, FARIA T Q, *et al.* Advances in lentivirus purification[J/OL]. Biotechnol J, 2021, 16(1): e2000019 [2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33089626/>. DOI: 10.1002/biot.202000019.
- [9] GÖDECKE N, HAUSER H, WIRTH D. Stable expression by lentiviral transduction of cells[J]. Methods Mol Biol, 2024, 2810: 147-159. DOI: 10.1007/978-1-0716-3878-1\_10.
- [10] LUANPITPONG S, JANAN M, POOHADSUAN J, *et al.* A high-throughput, three-dimensional multiple myeloma model recapitulating tumor-stroma interactions for CAR-immune cell-mediated cytotoxicity assay[J]. Immunotargets Ther, 2025, 14: 321-338. DOI: 10.2147/ITT.S503984.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典——三部: 2025年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 775-776.
- [12] 中华骨髓库CWD表编纂组. 中国常见及确认的HLA等位基因表(CWD)2.2版本[M].
- [13] LI G X, ZHAO S S, ZHANG X G, *et al.* Comparison of the proliferation, cytotoxic activity and cytokine secretion function of cascade primed immune cells and cytokine-induced killer cells *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2629-2635. DOI: 10.3892/mmr.2015.3765.
- [14] MU P Y, ZHOU S J, LV T, *et al.* Newly developed 3D *in vitro* models to study tumor-immune interaction[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 81[2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37016422/>. DOI: 10.1186/s13046-023-02653-w.
- [15] KOUKOULIAS K, PAPAYANNI P G, JONES J, *et al.* Assessment of the cytolytic potential of a multivirus-targeted T cell therapy using a vital dye-based, flow cytometric assay[J/OL]. Front Immunol, 2023, 14: 1299512 [2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38187380/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1299512.
- [16] KIM Y, KIM I, PARK C H, *et al.* Korean mistletoe lectin enhances

- natural killer cell cytotoxicity via upregulation of perforin expression[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2018, 36(3): 175-183. DOI: 10.12932/AP-030417-0067.
- [17] JANG Y Y, CHO D, KIM S K, *et al.* An improved flow cytometry-based natural killer cytotoxicity assay involving calcein AM staining of effector cells[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2012, 42(1): 42-49.
- [18] NILES A L, MORAVEC R A, ERIC HESSELBERTH P, *et al.* A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers[J]. *Anal Biochem*, 2007, 366(2): 197-206. DOI: 10.1016/j.ab.2007.04.007.
- [19] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay[J/OL]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 2018(6): pdb.prot095497 [2025-07-24]. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>. DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
- [20] COREY M J, KINDERS R J, BROWN L G, *et al.* A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated Lysis[J]. *J Immunol Methods*, 1997, 207(1): 43-51. DOI: 10.1016/S0022-1759(97)00098-7.
- [21] OLSSON T, GULLIKSSON H, PALMEBORN M, *et al.* Leakage of adenylate kinase from stored blood cells[J]. *J Appl Biochem*, 1983, 5(6): 437-445.
- [22] ISERENTANT G, SEGUIN-DEVAUX C, ZIMMER J. Flow cytometry conjugate formation assay between natural killer cells and their target cells[J]. *Methods Cell Biol*, 2025, 193: 213-228. DOI: 10.1016/bs.mcb.2024.02.037.
- [23] STIRLING E R, SOTO-PANTOJA D R. *In vitro* cell impedance assay to examine antigen-specific T-cell-mediated melanoma cell killing to support cancer immunotherapy drug discovery[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2413: 63-68. DOI: 10.1007/978-1-0716-1896-7\_8.
- [24] KUBO T, ASANO S, SASAKI K, *et al.* Assessment of cancer cell-expressed HLA class I molecules and their immunopathological implications[J/OL]. *HLA*, 2024, 103(5): e15472[2025-07-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38699870/>. DOI: 10.1111/tan.15472.
- [25] LOMAKINA G Y, UGAROVA N N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells [J]. *Biophys Rev*, 2022, 14(4): 887-892. DOI: 10.1007/s12551-022-00978-y.
- [收稿日期] 2025-02-01 [修回日期] 2025-07-25  
[本文编辑] 黄静怡