

## CAR-T 细胞治疗产品体外效力的检测策略与技术进展

王自强,王 灿,厉高懋,段徐华,邵 泓

(上海市食品药品检验研究院/国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室/上海市创新生物物质质量检验检测中心,上海 201203)

**[摘要]** 随着嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)等细胞治疗产品的应用走向成熟,其产品质量的检测方法也日渐受到关注。体外活力是评价细胞治疗产品有效性的重要方法,体外效力测定方法也以其简单、快速的特点,在产品放行过程中被广泛采用。本文从效应细胞及靶细胞这 2 个角度对 CAR-T 等细胞治疗产品体外效力测定方法进行综述。

**[关键词]** CAR-T 细胞;效力测定;质量控制;细胞杀伤;细胞因子分泌

**[中图分类号]** R972.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1837-06

### Review of *in vitro* potency assays for CAR-T cell therapy products

WANG Zi-qiang, WANG Can, LI Gao-min, DUAN Xu-hua, SHAO Hong

(Shanghai Institute for Food and Drug Control/National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies/Shanghai Quality Inspection and Testing Center for Innovative Biological Products, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** As the use of cell therapy products such as chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) is getting matured, there has been an increasing interest in the methods used to test the quality of cell therapy products. *In vitro* viability assay is an important method for evaluating the effectiveness of cell therapy products and is also widely used in the product release process because of its simplicity and rapidity. In this paper, we review the *in vitro* potency determination methods for cell therapy products such as CAR-T from the perspective of both effector cells and target cells.

**[Key words]** CAR-T cells; potency assay; quality control; cell killing; cytokine secretion

嵌合抗原受体修饰的 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)是将由人体分离的 T 淋巴细胞通过基因工程技术,人工导入可以特异性识别靶抗原的单链抗体与可活化 T 细胞受体的胞内结构域的重组基因,从而在其细胞膜上表达相应融合蛋白的基因修饰细胞。CAR-T 以其良好的靶向性、杀伤性和持久性,在肿瘤治疗等领域取得了卓越成效<sup>[1]</sup>,数以万计的患者从中受益。

2017 年,诺华公司的 Kymriah (tisagenlecleucel)

被美国 FDA 批准用于治疗复发或难治性急性淋巴细胞白血病<sup>[2]</sup>,成为全球首个获批上市的商业化 CAR-T 产品。其后 5 年内,美国 FDA 共批准 7 款 CAR-T 产品上市,而我国国家药品监督管理局(NMPA)也在 2019 年先后批准复星凯特公司的“奕凯达”(阿基仑赛注射液)及药明巨诺公司的“倍诺达”(瑞基奥仑赛注射液)上市,标志着我国 CAR-T 产品正式开启商业化应用。

随着越来越多 CAR-T 细胞治疗产品的上市和使用,对此类新产品质量情况的关注度也日渐增高,各国药品监管机构相继出台了多项有关 CAR-T 细胞治疗产品质量控制的指导性文件<sup>[3-5]</sup>,阐述了与 CAR-T 细胞治疗产品关键质量属性有关的要求与

**[作者简介]** 王自强,男,副主任药师,研究方向:分子生物学。

E-mail: yewzq0219@126.com。

**[通讯作者]** 邵泓,女,主任药师,研究方向:药物分析。E-mail: shao-hong@sifdc.org.cn。

共识。CAR-T 细胞治疗产品是一种“活的药物”，其成分复杂、细胞类型多样、批间差异很大，难以通过简单的理化方法对其质量进行完整表征。效力试验通过定量测定 CAR-T 细胞治疗产品的相关生物功能并以此判断该产品是否具有目标治疗能力，是评价产品有效性不可或缺的手段<sup>[6]</sup>。然而，CAR-T 细胞治疗产品涉及多种作用机制，有的甚至尚不完全明确，因此实际应用中不同研究者采用的效力测定策略也不尽相同，本文综述了目前用于肿瘤治疗的 CAR-T 细胞治疗产品常用的效力测定方法及特点，以便研究者根据实际情况与需求进行选择和应用。

## 1 CAR-T 细胞治疗产品杀伤肿瘤细胞的机制

效力测定方法的设计脱胎于对 CAR-T 细胞治疗产品临床机制的理解，马列等<sup>[7]</sup>对 CAR-T 细胞治疗产品杀伤肿瘤细胞机制的研究进展进行了系统的综述，主要包括：① 通过释放细胞因子实现对肿瘤细胞基质的杀伤。② 通过分泌含颗粒酶和穿孔素的细胞毒性颗粒对靶细胞形成快速、有效和特异性的杀伤。③ 通过 CAR-T 细胞治疗产品与靶细胞间形成免疫突触来启动杀伤效应。④ 通过 Fas 信号通路的激活介导 CAR-T 细胞的肿瘤细胞溶解效应。

## 2 CAR-T 细胞治疗产品效力测定的策略与方法

现有的 CAR-T 细胞治疗产品效力测定方法可归纳为两大策略，即基于效应细胞的测定策略以及基于靶细胞的测定策略。

### 2.1 基于效应细胞的测定策略

**2.1.1 细胞因子的检测** 白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 是一种主要由 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞分泌、能够维持 T 细胞在体外长期生长的细胞因子<sup>[8]</sup>。在 CAR-T 细胞治疗产品杀伤靶细胞过程中，IL-2 可诱导 T 细胞功能，明显增强 T 细胞对 CD<sub>19</sub><sup>+</sup> 肿瘤细胞的清除<sup>[9]</sup>。因此，IL-2 分泌水平对评价 CAR-T 细胞治疗产品效力具有重要意义。干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 可招募和激活细胞毒性 T 细胞，使 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞极化为 Th1 效应细胞，同时抑制对肿瘤生长起促进作用的调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 的发展和功能<sup>[10-12]</sup>，在 T 细胞对抗肿瘤的过程中起关键作用。

通过检测上述细胞因子的分泌情况来评价 CAR-T 细胞治疗产品的效力是相关产品质量控制中的常用策略。酶联免疫吸附测定技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa) 是定量测定细胞分泌蛋白质的经典方法，自 20 世纪 70 年代诞生以

来，经过长期摸索与优化，已形成一套成熟的操作体系，并可结合全自动移液系统、自动洗板机等自动化仪器平台实现高通量标准化操作，被广泛应用于各类细胞因子检测中。例如：Yu 等<sup>[13]</sup>在建立针对 MUC1 靶点的 CAR-T 细胞治疗产品过程中，采用 Elisa 技术测定包括 IL-2、IFN- $\gamma$  在内的细胞因子，并以此指标来评价所建立 CAR-T 细胞治疗产品对患者来源的膀胱癌器官的杀伤活性。Li 等<sup>[14]</sup>也依靠 Elisa 技术发现将 IL-7 和 CCR2b 插入经典的第 2 代 CAR 结构后可增加所构建的 CAR-T 中相关细胞因子的分泌，并抑制肿瘤细胞的生长。随着检测技术的发展，流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 等新型检测手段也越来越多地应用于细胞因子的测定。FCM 是一种能够对单个细胞或生物微颗粒的生物学性质进行定量分析的检测手段，具有高效、快速、精准、多参数和高通量等优点<sup>[15]</sup>。近年来，FCM 凭借其独特的细胞分析原理和强大的荧光标记技术，在 CAR-T 技术从治疗前检查、生产过程控制、终产品质量控制和放行直到上市后监测的全过程中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。然而，传统的 FCM 技术只能检测细胞内的细胞因子水平，并不能直接体现目标细胞的细胞因子实际释放量。针对这一缺陷，细胞因子微球检测技术 (cytometric bead array, CBA) 应运而生。CBA 是一种基于流式细胞检测系统的多重蛋白定量检测方法，其原理为在不同颜色或亮度的微球上，通过物理吸附或共价结合的方式结合捕获抗体并特异性识别待测抗原后，将荧光素标记的针对同一待测抗原的检测抗体作为探针，形成“三明治”夹心复合物，最后用流式细胞仪同时对微球上的分类荧光和检测抗体上的标记荧光进行检测，从而对胞内或胞外的待测抗原进行定量检测<sup>[17]</sup>。He 等<sup>[18]</sup>利用 CBA 技术测定了 CAR-T 细胞在与肿瘤细胞共培养后上清中 IL-2 及 IFN- $\gamma$  的表达水平，以此评价不同修饰 CAR-T 细胞的抗肿瘤活力。Shen 等<sup>[19]</sup>则通过 CBA 技术同时对包括 IL-6 等 6 种细胞因子风暴相关的细胞因子进行检测，分析了患者在接受 CAR-T 治疗后的不良反应情况。CBA 技术可在一次分析过程中同时进行超过 20 种不同细胞因子的检测，既解决了传统 FCM 技术无法检测细胞上清中细胞因子的局限，与 Elisa 技术相比，还极大地提升了检测通量，缩短检测时间，减少样品损耗。

基于细胞因子的检测能很好地衡量 T 细胞在识别抗原后的激活情况，但并非所有被激活的细胞

都能分泌细胞因子,也不是所有产生细胞因子的细胞均具有细胞毒性<sup>[20-22]</sup>,因此该类方法只能评价 T 细胞的部分功能,存在一定局限性。

**2.1.2 细胞增殖能力的检测** T 细胞的增殖也可从一定程度上代表其产品效力。细胞增殖的检测方法繁多,根据其原理主要可分为代谢活性检测、DNA 合成检测等<sup>[23]</sup>。

代谢活性检测是通过添加外源化合物,并利用细胞代谢过程中必需的酶反应过程,使化合物在酶的作用下产生颜色变化,随后通过酶标仪等仪器对颜色变化程度进行定量测定从而反映细胞增殖情况的检测策略。根据外源化合物的不同,常见的检测方法包括噻唑蓝法(MTT)、内盐法(MTS)、四唑单钠盐法(WST-1)以及 CCK-8 试剂盒法等,在 T 淋巴细胞增殖测定中获得广泛应用<sup>[24-26]</sup>。

DNA 合成检测是将经过标记的可追踪碱基掺入细胞的 DNA 合成代谢过程,并通过这些标记碱基来识别新增殖的细胞,进而体现细胞的增殖情况。Sun 等<sup>[27]</sup>通过流式细胞术及 5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶(EdU)掺入联用的方式建立了 T 细胞体内增殖检测方法;Li 等<sup>[28]</sup>采用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)结合法检测 T 细胞增殖,以此评价 MiR-150-5p 这一 miRNA 对严重再生障碍性贫血模型小鼠 T 细胞的激活作用。除此之外,用氚(<sup>3</sup>H)标记胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)也可用作追踪碱基,但因试剂中带有放射性元素,故应用范围较窄。

有研究认为,T 细胞的增殖并不与其杀伤靶细胞的能力直接相关,也不能直接代表其临床效果,以 T 细胞增殖作为细胞治疗产品效力测定指标的价值还需要进一步验证<sup>[29]</sup>。但作为一种操作相对简单的检测方法,细胞增殖仍在研发和生产过程中被经常用于考察产品的质量稳定性<sup>[30]</sup>。

**2.1.3 效应细胞活化标志物的检测** T 细胞被激活后,其表面蛋白表达会发生巨大的改变,活化 T 细胞的标志蛋白包括 CD69, CD25, CD71, HLA-DR 和 CD107 等。CD69 是一种膜结合的 II 型 C 型蛋白受体,可在 T 淋巴细胞激活后迅速表达于细胞膜表面,是一种被广泛采用的淋巴细胞激活表面标志物<sup>[31]</sup>。Wong 等<sup>[32]</sup>利用流式细胞术对其开发的基于 B 细胞激活因子(BAFF)配体的 CAR-T 表面的 CD69 表达情况进行检测,证明该 CAR-T 在治疗 B 细胞癌症时可最大限度地减少抗原逃逸的可能性。与之类似的 CD25, CD71 以及 HLA-DR 等虽然在激

活的 T 淋巴细胞表面表达的时间及表达量均有不同,但都可作为标志物来评价激活水平<sup>[33]</sup>。CD107 是 T 细胞表面的溶细胞颗粒(cytolytic granule)相关的膜蛋白,其暴露水平与 T 细胞的脱颗粒程度直接相关。脱颗粒是激活后的 T 细胞与靶细胞接触后释放一系列细胞毒颗粒物质的过程,是 T 细胞杀伤靶细胞的最主要途径。但是这些细胞毒性颗粒往往含量较低,很难进行直接准确的检测,因此,通过以 CD107 作为标志物间接检测 T 细胞脱颗粒程度被认为是一种更好的选择<sup>[34]</sup>。Caforio 等<sup>[35]</sup>通过流式细胞术证明,在基因修饰的 NK 细胞与 T 细胞中,CD107a 的表达水平与颗粒酶素 B 具有相同的趋势,并可以通过 CD107a 的上调来评价相应效应细胞的细胞毒性效力。

**2.1.4 免疫突触质量的检测** T 淋巴细胞通过与靶细胞形成免疫突触(immunological synapse, IS)并向细胞间隙分泌颗粒酶和疏水性蛋白穿孔素而诱导细胞凋亡<sup>[36]</sup>。通过 IS 质量的检测,可在较短时间内(<24 h)对细胞治疗产品的生物学效力作出评价<sup>[37]</sup>。

从方法学上来说,IS 质量的检测可分为活细胞 IS 检测和固定细胞 IS 检测。活细胞 IS 检测可以评估一段时期内检测对象 IS 质量的动态变化过程。常用的活细胞 IS 检测方法是借助玻璃支撑的平面脂质双层系统或垂直细胞配对(vertical cell pairing, VCP)系统,定量测定 F-actin(IS 重组和稳定所需的细胞骨架结构分子)的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)、肿瘤抗原的聚集(CAR 信号转导的启动器)、细胞颗粒(lytic granules, LG)的极化、关键信号分子的分布(如 pZeta 链, CAR 分子微团后的一个关键信号分子)等指标来实现的<sup>[38]</sup>。对于固定细胞 IS 的检测,则可基于原代人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)设计构建针对特定靶点的 CAR-T 细胞,随后将其置于含有相应靶点脂质双层系统中激活,并在特定的时间点进行细胞固定后进行上述指标的测定。Liu 等<sup>[39]</sup>和 Xiong 等<sup>[40]</sup>通过脂质双层系统和 VCP 系统测量的 IS 质量与 2 种不同的 CAR-T 和 CAR-NK 细胞的 CAR 细胞疗效呈正相关,即 F-actin 的 MFI 越高、肿瘤抗原聚集越明显、LG 及关键信号分子极化越强则说明其 IS 的质量越好。

## 2.2 基于靶细胞的测定策略

对靶细胞被杀伤的情况进行考察是评价细胞治

疗产品效力的最直接方法。在 T 细胞与靶细胞相互作用时,被杀伤的靶细胞往往会表达或分泌细胞表面蛋白受体 Fas 的配体 (Fas ligand, FasL), 这会诱导激活 T 细胞发生死亡<sup>[41]</sup>。因此,在细胞治疗产品效力测定时,所选择的细胞杀伤检测方法必须能够区分 T 细胞与靶细胞。常见的靶细胞杀伤测定方法有铬同位素法、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放法、荧光素酶法、流式细胞法等。

**2.2.1 铬同位素法** 测定细胞杀伤的首选方案是对失去膜完整性的目标细胞进行定量检测。50 多年前, Brunner 等<sup>[42]</sup> 首次利用铬同位素 (<sup>51</sup>Cr) 实现了免疫细胞介导的细胞杀伤检测,该方法也成为细胞毒性测定的金标准。该方法采用 <sup>51</sup>Cr 标记靶细胞,并与效应细胞共同培养。在效应细胞介导的杀伤过程中,靶细胞失去膜完整性并将 <sup>51</sup>Cr 释放到培养基中。通过伽马闪烁计数器即可测定培养基中的 <sup>51</sup>Cr 含量且该数值与被杀伤的靶细胞数量成正比。铬同位素法是最经典和认可度最高的细胞杀伤测定方法,但由于需要使用放射性同位素及专门的测定仪器和操作资质,该方法难以大范围推广。

**2.2.2 LDH 释放法** LDH 释放法是一种铬同位素法的非放射性替代检测方法。LDH 是活细胞胞浆内含酶之一,正常情况下 LDH 不能透过细胞膜,当靶细胞受到杀伤后,LDH 释放到细胞外,可通过检测 LDH 的释放量来定量受损细胞<sup>[43]</sup>。在目前的生产和实践中,实验人员通常使用基于 LDH 释放法的商品化试剂盒对细胞治疗产品的靶细胞杀伤效力进行测定<sup>[44-46]</sup>,与铬释放法相比,LDH 释放法大大减少了操作难度和环境要求。但是该方法具有较高的检测背景,信噪比较低<sup>[47]</sup>。另外,细胞密度过大,过于剧烈的实验操作等因素均可能导致 LDH 的自发释放,进而影响实验结果的稳定性。

**2.2.3 荧光素酶法** 荧光素酶法是通过基因工程手段,构建具备荧光素酶报告基因系统的靶细胞。当靶细胞被杀伤后,释放出的荧光素酶可催化外源添加的底物氧化产生生物发光,其光信号的多少即可反映靶细胞的杀伤程度。由于效应细胞不具备此系统,因此检测到的光信号可有效区分效、靶细胞,故该方法的特异性较好,同时还具有简单、快速的优点。Matta 等<sup>[48]</sup> 利用了一种新型海洋荧光素酶及其工程衍生物的高亮、稳定的特点,构建了相应的报告基因系统靶细胞,并进一步开发了一种能够快速测定靶细胞杀伤情况的检测方法。

**2.2.4 流式细胞法** 与上述检测方法均基于细胞死亡后内容物质释放的原理进行检测不同,流式细胞法借助可对死细胞进行特异性染色的染料区分死、活细胞。蔡思齐等<sup>[49]</sup> 比较并优化流式细胞术检测人 NK 细胞体外细胞毒功能的 2 种方法,证明以 7-氨基-放线菌素 D (7-AAD) 作为染料,在特异性和灵敏度上具有明显优势。此外,流式细胞术还可以通过细胞表面标志物区分异质细胞混合物中的不同细胞亚群,为调查异质目标细胞群中不同类型细胞的不同治疗敏感性提供了独特的优势<sup>[50]</sup>。而流式细胞术的缺点则在于其检测目标为单个细胞结构,对于死亡后完全裂解的细胞易发生漏检。另外,部分标记染料可能由于结合不稳定或细胞膜通透性增加而泄漏到不应被标记的邻近细胞中<sup>[51]</sup>,也进一步影响了方法的准确性。

**2.2.5 实时无标记细胞分析 (real time cell analysis, RTCA)** RTCA 是将微电极整合在细胞培养板的每个细胞生长孔底部,用以构建实时、动态、定量跟踪细胞形态的增殖分化改变的细胞阻抗检测传感技术,可以通过记录电阻抗的改变从而精确感知靶细胞被效应细胞杀伤后从原本贴壁生长状态转向脱落死亡的过程。该方法无需对靶细胞进行标记,操作简单、干扰因素较少,又因其可动态检测特点,可以提供最优检测时间以便于实验设计与优化,已在细胞治疗产品的研究领域中获得较广泛的应用。如 Fousek 等<sup>[52]</sup> 利用 RTCA 技术测定了 CD19/20/22 三重靶向 CAR-T 对各靶细胞的杀伤能力,证明三重靶向 CAR-T 的效力明显优于单靶向 CAR-T 产品。

### 3 结语

当前,我国对于细胞治疗产品和疗法的管理在一定程度上都是由卫生主管部门和药品监管部门共同管理的二元式双轨制管理模式。其中药品监管部门针对细胞治疗产品生物学活性相关的质量研究提出如下要求:原国家食品药品监督管理总局于 2017 年发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》中指出,研究者应随着研究的不断深入(如从临床前阶段进行至临床阶段)和工艺相关信息的逐渐累积,不断完善检验方法,确证性临床试验用样品的质量控制与商业化生产时的质控要求保持一致。国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)于 2022 年发布的《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》进一步建议,如果在产品具有多种作用机制或单一检测方法不能充分反映其作

用机制的情况下,可考虑采用一种以上的方法进行生物学活性检测。

细胞治疗产品是一种成分多样、生产工艺过程复杂的混合型细胞产品,必须通过效力测定试验对其生物学活性进行控制。相对于体内效力试验,体外效力试验不需要使用动物,结果观察也较为方便,具有速度快、成本低、便于操作的优点,尤其适合在产品生产过程控制及最终放行阶段使用。本文从效应细胞及靶细胞这2个角度综述了目前在研究及生产过程中常用的体外效力测定策略及相关检测方法,每种方法均有其优势与不足,应考虑靶细胞和效应细胞的特性(如原代细胞、细胞系或细胞混合物、黏附或悬浮细胞、容易或难以转染的细胞),以及需要测量的样品数量和所需的自动化水平来选择适用的检测方法。

需要注意的是,虽然体外效力测定方法是以体内药物作用机制分析(mechanism of action, MoA)为基础开发的,但并不总是与产品的临床效果或患者存活率直接相关。因此必须与其他表征研究或检测方法相结合,共同评价产品的质量。随着CAR-T等细胞治疗技术的深入研究,除肿瘤治疗外,T细胞或特定细胞亚群也被用于治疗自身免疫性疾病、移植和免疫重建等方面的研究<sup>[53-56]</sup>。针对这些新型临床机理和应用,则必须建立相应的活力测定策略,从而约束产品质量。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李芳,曾玲. CAR-T细胞免疫疗法的原理及最新研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(23): 3648-3651.
- [2] JUNE CH, O'CONNOR RS, KAWALEKAR OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365.
- [3] European Medicines Agency. Quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [EB/OL]. (2021-06-01). <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells>.
- [4] U S Food And Administration. Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy [EB/OL]. (2021-04-21). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-human-somatic-cell-therapy-and-gene-therapy>.
- [5] European Medicines Agency. Human cell-based medicinal products [EB/OL]. (2008-05-21). <https://www.ema.europa.eu/en/human-cell-based-medicinal-products>.
- [6] BRAVERY CA, CARMEN J, FONG T, et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(1): 9-19.
- [7] 马列,孟激光,王凡,等. CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞机制研究进展[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(4): 351-354, 360.
- [8] MORGAN DA, RUSCETTI FW, GALLO R. Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows [J]. *Science*, 1976, 193(4257): 1007-1008.
- [9] MARKLEY JC, SADELAIN M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice [J]. *Blood*, 2010, 115(17): 3508-3519.
- [10] BHAT P, LEGGATT G, WATERHOUSE N, et al. Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2836.
- [11] CASTRO F, CARDOSO AP, GONÇALVES RM, et al. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 847.
- [12] DUNN GP, KOEBEL CM, SCHREIBER RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(11): 836-848.
- [13] YU L, LI ZC, MEI HB, et al. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells *in vitro* [J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(2): e1248.
- [14] LI GC, ZHANG Q, HAN ZP, et al. IL-7 and CCR2b Co-expression-mediated enhanced CAR-T survival and infiltration in solid tumors [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 734593.
- [15] ADAN A, ALIZADA G, KIRAZ Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(2): 163-176.
- [16] 李成功,梅恒,胡豫. 流式细胞术在CAR-T细胞治疗中的应用进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(1): 329-332.
- [17] 马锡慧,肖漓,石炳毅. 流式微珠阵列术在医学中的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(1): 138-141.
- [18] HE P, TAN ZQ, WEI ZH, et al. Co-expressing LRP6 with anti-CD19 CAR-T cells for improved therapeutic effect against B-ALL [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1346.
- [19] SHEN DY, SONG H, XU XJ, et al. Chimeric antigen receptor T cell therapy can be administered safely under the real-time monitoring of Th1/Th2 cytokine pattern using the cytometric bead array technology for relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia in children [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2020, 37(4): 288-299.
- [20] MALYGUINE AM, STROBL S, DUNHAM K, et al. ELISPOT assay for monitoring cytotoxic T lymphocytes (CTL) activity in cancer vaccine clinical trials [J]. *Cells*, 2012, 1(2): 111-126.
- [21] ZARITSKAYA L, SHURIN MR, SAYERS TJ, et al. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(6): 601-616.
- [22] JOHNSON LA, MORGAN RA, DUDLEY ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen [J]. *Blood*, 2009, 114(3): 535-546.
- [23] 谭亚琦,何焱玲. 细胞增殖的检测方法[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(12): 6-8.
- [24] 李艳娇,张本斯,李庄,等. 分泌 ephrinA1-caspase-3 的 T 淋巴细胞株的建立[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(8): 1097-1101.
- [25] 周京红,王韶屏,王建安. 大鼠骨髓间充质干细胞对动脉粥样硬化小鼠脾 T 淋巴细胞功能的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(3): 360-363.
- [26] 王瑾,马肖容,张王刚. CCK-8 法在淋巴细胞增殖检测中最佳实验条件的筛选[J]. 中国医药导报, 2018, 15(23): 13-16.
- [27] SUN XJ, ZHANG CP, JIN H, et al. Flow cytometric analysis of T lymphocyte proliferation *in vivo* by EdU incorporation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 41: 56-65.
- [28] LI YM, YU JF, WANG F, et al. MiR-150-5p regulate T cell activation in severe aplastic anemia by targeting Bach2 [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 384(2): 423-434.
- [29] CLAY TM, HOBEIKA AC, MOSCA PJ, et al. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of

- cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1127 - 1135.
- [30] DE WOLF C, VAN DE BOVENKAMP M, HOEFNAGEL M. Regulatory perspective on *in vitro* potency assays for human dendritic cells used in anti-tumor immunotherapy[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(11): 1289 - 1308.
- [31] CIBRIÁN D, SÁNCHEZ-MADRID F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper[J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(6): 946 - 953.
- [32] WONG DP, ROY NK, ZHANG KM, *et al.* A BAFF ligand-based CAR-T cell targeting three receptors and multiple B cell cancers[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 217.
- [33] CARUSO A, LICENZIATI S, CORULLI M, *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation[J]. *Cytometry*, 1997, 27(1): 71 - 76.
- [34] BETTS MR, BRENCHELEY JM, PRICE DA, *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8 + T cells by a flow cytometric assay for degranulation [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 281(1 - 2): 65 - 78.
- [35] CAFORIO M, SORINO C, CARUANA I, *et al.* GD2 redirected CAR T and activated NK-cell-mediated secretion of IFN $\gamma$  overcomes MYCN-dependent IDO1 inhibition, contributing to neuroblastoma cell immune escape[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(3): e001502.
- [36] 张代群, 李峰, 王淑敏, 等. scFv 亲和力对 CAR-T 细胞抗肿瘤能力的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9): 1044 - 1048, 1057.
- [37] LIU DF, BADETI S, DOTTI G, *et al.* The role of immunological synapse in predicting the efficacy of chimeric antigen receptor (CAR) immunotherapy[J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 134.
- [38] JANG JH, HUANG Y, ZHENG PL, *et al.* Imaging of cell-cell communication in a vertical orientation reveals high-resolution structure of immunological synapse and novel PD-1 dynamics [J]. *J Immunol*, 2015, 195(3): 1320 - 1330.
- [39] PULE MA, SAVOLDO B, MYERS GD, *et al.* Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1264 - 1270.
- [40] XIONG W, CHEN YH, KANG X, *et al.* Immunological synapse predicts effectiveness of chimeric antigen receptor cells[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3): 1349 - 1351.
- [41] DE AQUINO MT, MALHOTRA A, MISHRA MK, *et al.* Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer [J]. *Immunol Lett*, 2015, 166(2): 117 - 133.
- [42] BRUNNER KT, MAUEL J, CEROTTINI JC, *et al.* Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs[J]. *Immunology*, 1968, 14(2): 181 - 196.
- [43] KORZENIEWSKI C, CALLEWAERT DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 64(3): 313 - 320.
- [44] 邢孔浪, 柴芳. 治疗套细胞淋巴瘤的抗 CD19 CAR-T 细胞药物 brexucabtagene autoleucel [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(18): 1638 - 1641.
- [45] 高鹏, 李玉霞, 贾凡, 等. 抗 CD19 CAR-T 对 K562CD19 + 肿瘤细胞特异性杀伤作用的研究 [J]. 中国医药生物技术, 2018, 13(2): 145 - 150.
- [46] 吴斯玮, 敖翔, 郭韡, 等. 靶向肝癌的 GPC3-CAR-T 细胞的构建与功能鉴定 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(7): 748 - 755.
- [47] FOTAKIS G, TIMBRELL JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 160(2): 171 - 177.
- [48] MATTA H, GOPALAKRISHNAN R, CHOI S, *et al.* Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 199.
- [49] 蔡思齐, 邓志辉. 流式细胞术检测 NK 细胞的细胞毒作用的两种方法比较 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(3): 325 - 330.
- [50] JEDEMA I, VAN DER WERFF NM, BARGE RM, *et al.* New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population [J]. *Blood*, 2004, 103(7): 2677 - 2682.
- [51] HÖPPNER M, LUHM J, SCHLENKE P, *et al.* A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 267(2): 157 - 163.
- [52] FOUSEK K, WATANABE J, JOSEPH SK, *et al.* CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression [J]. *Leukemia*, 2021, 35(1): 75 - 89.
- [53] ADAIR PR, KIM YC, ZHANG AH, *et al.* Human tregs made antigen specific by gene modification: the power to treat autoimmunity and antidrug antibodies with precision [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1117.
- [54] DAWSON NAJ, LEVINGS MK. Antigen-specific regulatory T cells; are police CARs the answer? [J]. *Transl Res*, 2017, 187(9): 53 - 58.
- [55] BLUESTONE JA, TROTTEA E, XU DQ. The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(8): 1091 - 1103.
- [56] 刘千勇, GILBERT M, 李怡平. 嵌合抗原受体 T 细胞产品最新研发进展 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(19): 1759 - 1767.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2023 - 03 - 13