·生物医药前沿·

细胞因子释放综合征的2种体外检测方法比较研究

徐静怡[1,2],宇家仪[1,2],马　璟[1,2]

(1 中国医药工业研究总院,上海 201203;2 上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203)

[摘要] **目的:**对固相法及液相法2种体外细胞因子释放实验方法进行比较研究,为评价新药是否引起细胞因子释放方法学选择提供依据。**方法:**用2种不同方法与外周血单核细胞共同孵育24 h,流式细胞磁珠微阵列法检测白介素-1β(IL-1β)、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)这4种细胞因子的表达水平。**结果:**固相法中,IL-1β仅在抗CD3单克隆抗体(OKT3)的5 μg·孔$^{-1}$有显著性释放($P<0.05$);IL-6在2种抗体中均有显著性释放($P<0.05$);OKT3所有浓度及CD28超级激动剂TGN1412的5 μg·孔$^{-1}$ IL-8与TNF-α有显著性释放($P<0.05$)。液相法中,OKT3的1和5 μg·孔$^{-1}$、TGN1412的5 μg·孔$^{-1}$ IL-6有显著性释放($P<0.05$);TGN1412的5 μg·孔$^{-1}$ IL-8有显著性释放($P<0.05$);OKT3所有浓度及TGN1412的5 μg·孔$^{-1}$ TNF-α有显著性释放($P<0.05$)。**结论:**固相法更适用于T细胞受体的单克隆抗体药物,在临床前评价中其结果可信度更高;液相法操作简单,并且其模拟的环境更接近于人体,对于靶点不在T细胞上的单克隆抗体有更高的灵敏度。

[关键词] 细胞因子释放综合征;CD3单克隆抗体;CD28超级激动剂;外周血单核细胞;流式细胞磁珠微阵列法

[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)24-2256-06

Comparative study of two *in vitro* experimental methods detecting cytokine release syndrome

XU Jing-yi[1,2], YU Jia-yi[1,2], MA Jing[1,2]

(1 *China State Institute of Pharmaceutical Industry*, *Shanghai* 201203, *China*; 2 *Shanghai InnoStar Biotech Co.*, *Ltd.*, *Shanghai* 201203, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: A comparative study of two *in vitro* experimental methods detecting cytokine release was conducted for evaluating methodological choices on whether new drugs cause cytokine release. **Methods**: Peripheral blood mononuclear cells were incubated with two different methods for 24 hours, after which the expression levels of four cytokines: IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α were detected by cytometric bead assay. **Results**: In solid phase method, IL-1β was significantly released only in OKT3 at 5 μg·well^{-1} ($P<0.05$). Significant release of IL-6 was found in two antibodies ($P<0.05$). There was a significant release of IL-8 and TNF-α at all concentrations of OKT3 and 5 μg·well^{-1} of TGN1412 ($P<0.05$). While in liquid phase method, significant release of IL-6 happened in 1 and 5 μg·well^{-1} of OKT3, as well as 5 μg·well^{-1} of TGN1412 ($P<0.05$). There was a significant release of IL-8 at 5 μg·well^{-1} of TGN1412 ($P<0.05$). Significant release of TNF-α was found in all concentrations of OKT3 and 5 μg·well^{-1} of TGN1412 ($P<0.05$). **Conclusion**: The solid phase method is more suitable for T cell receptor monoclonal antibody drugs, the results of which are more reliable in preclinical evaluation. The liquid phase method is simpler to operate, and its simulated environment is closer to human body, but it has higher sensitivity for monoclonal antibodies whose target is not on T cells.

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2019ZX09732001-020)

[作者简介] 徐静怡,女,硕士研究生,主要从事药物毒理学研究。E-mail:jingyixu1207@163.com。

[通讯作者] 马璟,女,博士,研究员,主要从事药物毒理学研究。E-mail:jingma2019@163.com。

[**Key words**] cytokine release syndrome; OKT3; TGN1412; peripheral blood mononuclear cell; cytokine bead assay

随着免疫治疗药物的不断发展,越来越多的免疫治疗药物已经上市或进入临床试验阶段,如单克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)治疗等,然而在患者获益的同时,临床不良反应也随之而来,其中细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)因其发病迅速、危害严重等特点成为临床研究及临床前研究关注的重点。CRS 是一种由细胞因子过度释放引起的免疫反应,会导致机体出现恶心、头痛、心动过速、低血压、皮疹和呼吸困难等症状。这类细胞因子多数是由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞释放。这些细胞激活了炎症级联反应,导致内皮细胞损伤进而引起机体全身炎症反应、多器官衰竭甚至死亡[1]。CD3 单克隆抗体(OKT3)在 1986 年率先被美国 FDA 批准上市,用于预防和治疗肾脏、心脏以及骨髓等实体或非实体器官移植后的排斥反应[2],当 OKT3 与靶细胞抗原结合时,趋化因子募集单核细胞、巨噬细胞、细胞毒性 T 细胞及自然杀伤细胞补体到结合区域。免疫效应细胞与结晶片段结合,以靶细胞为目标,使其被吞噬或溶解,从而导致细胞因子释放[3]。该药物体内给药过程中导致了系统性的促炎性因子[肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、白介素-2(IL-2)和 IL-6]的释放[4]。2006 年,抗 CD28 免疫球蛋白 G4(IgG4)单克隆抗体新药 TGN1412 的Ⅰ期临床试验中,发现了最严重的 CRS。6 例接受这种抗体的健康志愿者经历了全身性炎症反应,促炎细胞因子水平升高,并伴有严重的临床症状,包括呼吸衰竭、弥散性血管内凝血和多器官衰竭等[5]。TGN1412 是 CD28 单克隆抗体,与 CD28 结合后直接活化 T 细胞,促进 T 细胞增殖分化,新药临床试验(IND)注册申请拟用于白血病、类风湿关节炎的治疗。TGN1412 的食蟹猴重复给药的毒理研究中并未出现 CRS,但在进入临床试验中出现了非预期严重不良反应。该事件发生后,研究者发现导致这起不良反应发生的主要原因是临床前一般毒理试验种属选择错误,由于 TGN1412 是作用于人 CD_4^+ 记忆细胞亚群中的 CD28 受体,导致人体内细胞因子释放,但食蟹猴该亚群不表达 CD28,最终导致临床前未发现 CRS 的症状[6];另外,在首次临床试验中,采用了动物毒性试验的未见毒性反应剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)估算的临床起始剂量进行试验,但由于对新的生物制品的考虑因素不全面,导致通过 NOAEL 推算的给药剂量远超过人体可接受的剂量,该剂量可导致受体占位率超 90%,从而导致不良反应事件的发生。由于 TGN1412 在临床前毒理学试验中动物模型未表现出 CRS 风险,加之临床方案设计的错误,导致了严重的临床危害事件,因此临床前细胞因子释放的预测尤为重要[7]。

细胞因子释放检测法(cytokine release assay, CRA)是在临床前使用人源细胞进行体外检测细胞因子释放的方法,可预测生物大分子药物在体内从免疫细胞中诱导细胞因子释放的潜力[5]。目前常用的 CRA 方法包括可溶性全血刺激模型[8]、固定化抗体刺激外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)[9-10]、可溶性抗体刺激 PBMC[11-12]及预孵高密度 PBMC 模型[13]等。

本实验选择用 OKT3 及 TGN1412 作为阳性药,使用固定化抗体刺激 PBMC(以下简称固相法)和可溶性抗体刺激 PBMC(以下简称液相法)进行体外细胞因子释放实验,评价这 2 种方法的优劣。固相法是通过将抗体包被于 96 孔板上,使其固定在板底后,再与细胞共同孵育;液相法则是使抗体溶液直接与细胞共同孵育刺激。收集 2 种方法处理后细胞液的上清液,检测其 IL-6, IL-1β, IL-8, TNF-α 表达水平。

材料与方法

1 仪器

ESCO/CLM-170A-B 二氧化碳培养箱(赛默飞公司);NC－100 细胞计数仪(Chemometec 公司);ST16R 高速冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific 公司);REGAL/BSC1500-II-A 生物安全柜(赛默飞公司);Cytoflex S 流式细胞仪(贝克曼公司)。

2 试剂

TGN1412(Creative Biolabs 公司,批号:TAB-064LC);RPMI-1640 培养液(Solarbio 公司,批号:31800);1×PBS 缓冲液(Solarbio 公司,批号:P1020);胎牛血清(Gibico 公司);人全血单核细胞分离液(达科为生物技术股份有限公司,批号:712109);抗

人 T 细胞 CD3 鼠单抗(OKT3,批号:16-0037-85);流式细胞磁珠微阵列法试剂盒(Biolegend 公司,批号:740722)。

3 实验用细胞

人新鲜全血取自实验室健康志愿者。

4 细胞分离与培养

取 3 mL 全血单核细胞分离液于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 正常人外周血,2 675 r·min^{-1}离心 15 min,离心管中液体分为 4 层。第 1 层为血浆层,第 2 层为环状乳白色单核细胞层,第 3 层为透明分离液层,第 4 层为红细胞层。小心吸取第 2 层于新的 15 mL 离心管中,加入 12 mL PBS,混匀,1 503 r·min^{-1}离心 15 min,弃上清,再加入 10 mL PBS 重悬细胞沉淀,1 503 r·min^{-1}离心 15 min,弃上清。加入 2 mL 含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞沉淀,即可获得原代人 PBMC。

5 固相法及液相法刺激细胞因子释放

固相法中,OKT3 及 TGN1412 使用 PBS 进行稀释,使其终浓度为 0.1,0.2,1 mg·mL^{-1},每孔中加入 5 μL 稀释后的抗体溶液,使其最终每孔药物含量分别为 0.5,1,5 μg,每个浓度设置 3 个复孔,避光,4 ℃无菌环境过夜;液相法中,2 种药物稀释后终浓度为 10,20,100 μg·mL^{-1},每孔中加入 50 μL 稀释后的抗体溶液,使其最终每孔药物含量分别为 0.5,1,5 μg,每个浓度设置 3 个复孔。将分离的 PBMC 密度调整至 1 × 10^6 个·mL^{-1},每孔中加入 150 μL,37 ℃,5% CO_2,孵育 24 h。孵育结束后,离心收集上清液于 EP 管中,用于下一步检测。

6 流式细胞磁珠微阵列法

收集各组上清后,使用流式细胞磁珠微阵列法试剂盒严格按照操作说明检测各组别的 IL-1β,IL-6,IL-8 和 TNF-α。

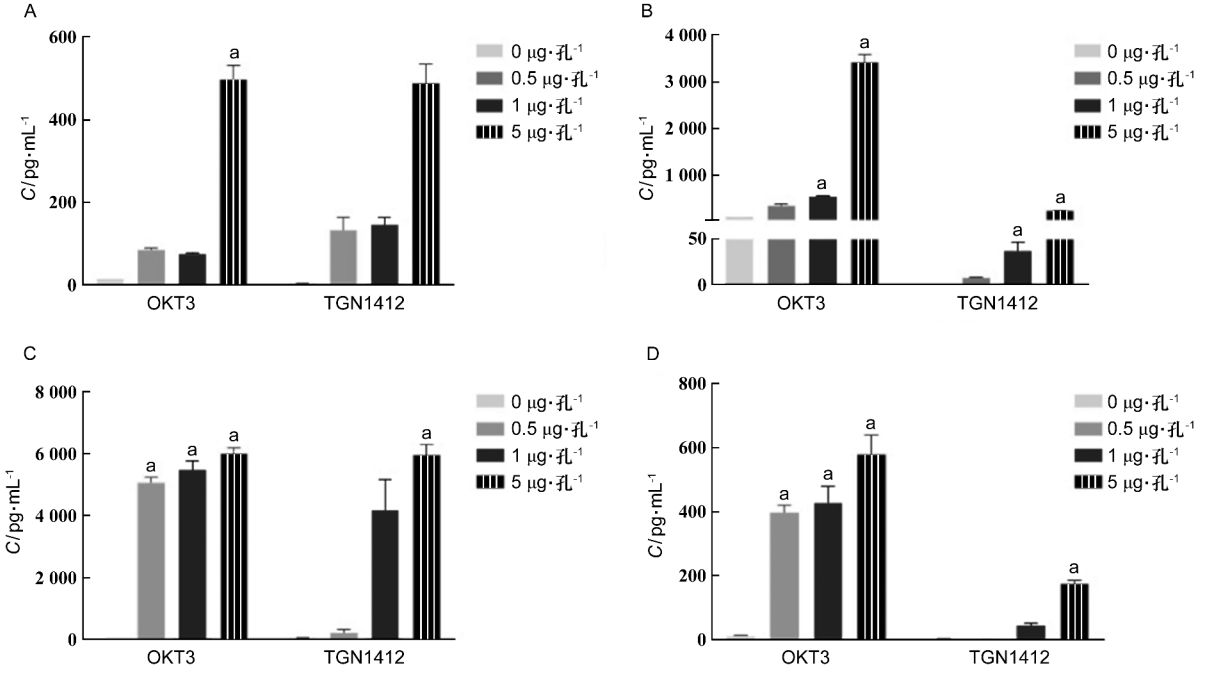
7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 统计软件包(Version 10.0)进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey 检验,检验水准(α)为 0.05。

结　果

1 固相法

与对照组比较,2 种因子在上清液中的表达均随着剂量的升高而增加。其中仅 OKT3 的 5 μg·孔$^{-1}$的 IL-1β 有显著释放($P < 0.05$);OKT3 及 TGN1412 的 1 和 5 μg·孔$^{-1}$的 IL-6 有显著释放($P < 0.05$);OKT3 所有浓度的 IL-8 均有显著释放($P < 0.05$),而 TGN1412 仅 5 μg·孔$^{-1}$有显著释放($P < 0.05$);OKT3 所有浓度的 TNF-α 均有显著释放($P < 0.05$),而 TGN1412 仅 0.5 μg·孔$^{-1}$有显著释放($P < 0.05$)。

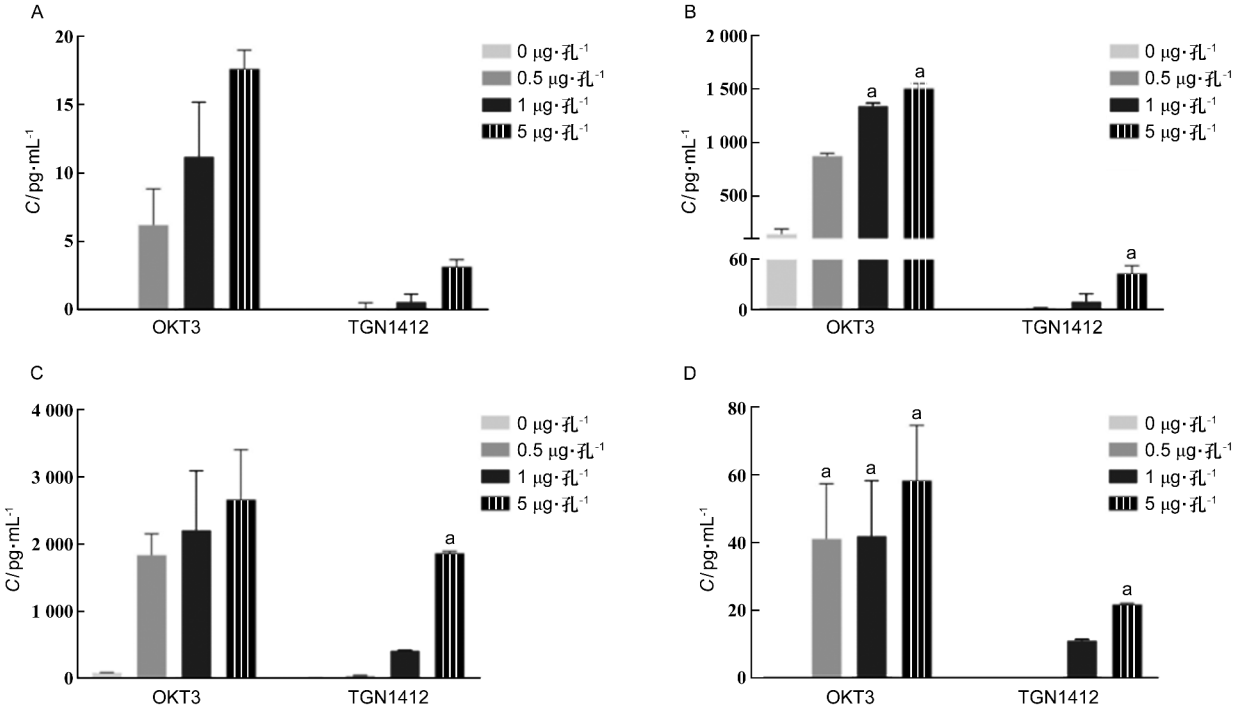


A:固相法 IL-1β 表达水平;B:固相法 IL-6 表达水平;C:固相法 IL-8 表达水平;D:固相法 TNF-α 表达水平;a:$P < 0.05$

图 1　固相法中 IL-6,IL-1β,IL-8 和 TNF-α 4 种因子的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2 液相法

与对照组相比,4 种因子在上清液中的表达均随着剂量的升高而增加。IL-1β 未见显著释放;OKT3 的 1 及 5 μg·孔$^{-1}$、TGN1412 的 5 μg·孔$^{-1}$的 IL-6 有显著释放($P<0.05$);OKT3 的 IL-8 均有升高,但未见显著释放;TGN1412 的 5 μg·孔$^{-1}$的 IL-8 有显著释放($P<0.05$);OKT3 的 TNF-α 均有显著释放($P<0.05$),而 TGN1412 的仅 5 μg·孔$^{-1}$有显著释放($P<0.05$),见图 2。



A:液相法 IL-1β 表达水平;B:液相法 IL-6 表达水平;C:液相法 IL-8 表达水平;D:液相法 TNF-α 表达水平;a:$P<0.05$

图 2 液相法中 IL-6,IL-1β,IL-8 和 TNF-α 4 种因子的表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

讨 论

本实验选择这 2 种药物作为阳性药的原因如下:① OKT3 是最早在临床上有报道会导致细胞因子释放发生的药物,其作用靶点在 T 细胞上,导致 T 细胞激活,进而使细胞因子释放,因此选择 OKT3 作为方法研究的阳性药之一。② TGN1412 作用于 T 细胞的 CD28 靶点,导致 T 细胞激活,从而导致大量细胞因子释放,因此将该药作为评价 CRS 发生的阳性药之一。

2006 年 TGN1412 的严重不良反应事件说明临床前预测 CRS 的局限性。该事件发生后,许多研究者对体外细胞因子释放的实验进行了优化与比较。Vessillier 等[9]首次使用了固定化抗体刺激 PBMC 的方法,该研究表明,相比于传统的可溶性抗体直接与细胞接触刺激,将抗体包被于 96 孔板中,使其固定在板底,TGN1412 更容易与细胞结合。同时,Findlay 等[8]和 Wolf 等[10]的研究也将可溶性全血刺激模型、固相法、液相法进行比较,结果发现全血刺激的细胞因子释放水平较低。故本实验选择对固相法及液相法进行比较。

体外 CRA 的方法选择需要考虑药物作用机制,目前有研究者认为引起 CRS 有以下 4 种方式[10]:① 可溶性抗体通过抗原决定簇(complementarity determining regions,CRDS)直接结合至效应细胞表面的同源受体上,直接激发效应细胞释放大量细胞因子。② 可溶性抗体与效应细胞表面同源受体结合,并与已存在的抗 IgG 抗体交叉结合,引起效应细胞激活并释放细胞因子。③ 可溶性抗体微弱地结合于效应细胞表面,通过 Fc 与邻近非效应细胞表面 FcR 结合,引起效应细胞表面抗原聚集,刺激效应细胞释放细胞因子。④ 可溶性抗体结合至效应细胞,通过 Fc 与邻近的非效应细胞表面 FcR 交叉结合,激活非效应细胞(含有 FcR 的细胞)释放大量细胞

因子[13]。

固相法反应原理是当抗体包被于96孔板上时，其Fc区域固定在塑料表面，从而使抗体发生交联产生特定构象，最终可以模拟出体内的类似情况，使外周单核细胞中的某些特定细胞更容易与抗体结合，从而预测细胞因子释放[14]。液相法则是通过人PBMC与游离的抗体直接结合，模拟出人体血液环境中细胞与抗体结合的过程，从而预测细胞因子释放。

本实验通过对OKT3及TGN1412的体外方法实验，比较了固相法与液相法的细胞因子释放水平，从而总结出这2种方法的优缺点。OKT3组的固相法实验中，4种细胞因子均随着剂量升高而升高，且5 μg·孔$^{-1}$有显著释放；而液相法实验中只有IL-6和IL-8有显著升高。TGN1412组的固相法与液相法细胞因子均有释放，其中5 μg·孔$^{-1}$组的IL-6，IL-8，TNF-α有显著释放，但液相法中IL-6，IL-1β和TNF-α表达水平较低。

固相法与液相法各有利弊，固相法对于大部分单克隆抗体药物来说，其灵敏度更高，这可能是由于当抗体包被于孔板中后，抗体的Fc区域固定在96孔板表面，抗体本身能够交联，从而释放细胞因子。但由于该方法的特殊性，固相法也有出现假阳性的可能。而液相法是游离的抗体与PBMC结合，由于抗体交联不够充分，导致无法保证结合的抗体浓度为我们预设的抗体浓度，从而使其细胞因子释放的情况不理想。固相法更适用于作用于T细胞受体的单克隆抗体药物，在临床前评价中的结果可信度更高，可为临床试验提供参考；而液相法优势在于操作简单，并且其模拟的环境更接近于人体，对于非作用于T细胞的单克隆抗体可能会有更高的灵敏度。

巨噬细胞是一种由血液中的单核细胞穿出血管后分化而成的细胞，其在免疫调节中起着非常重要的作用[15]。在生物特异性免疫应答中，大部分胸腺依赖抗原必须经过吞噬细胞的吞噬处理才能呈递给T淋巴细胞，在此过程中巨噬细胞还会释放多种细胞因子，共同参与免疫调节[16]。最初研究者对CRS的发生机制尚不清楚，近几年随着对其深入研究，有研究者认为巨噬细胞可能是导致CRS发生的原因之一[17-18]，而巨噬细胞主要释放的炎症因子是IL-6，IL-1β，IL-8和TNF-α。因此，本实验中将这几个因子作为CRS的评价指标。IL-6是一种多功能的免疫因子，主要参与机体的免疫应答、炎症反应等过程[19]。研究显示细胞因子IL-6水平与CRS严重程度密切相关[20]，且临床上发生CRS的多数原因是IL-6的急剧升高[21]，但具体发生机制尚不完全明确，目前仅有研究者提出CRS的发生可能与细胞凋亡有关，药物与细胞膜上抗原结合后，导致细胞通过GSDME诱导产生穿孔素，使细胞内细胞因子释放，进而使细胞发生炎症反应[17]。由于IL-6的急剧升高是CRS发生时最为主要的临床指标，因此本实验选择IL-6作为主要检测指标来评判抗体药物是否存在刺激细胞因子释放的作用。由实验结果可知，固相法与液相法均呈升高趋势，且呈剂量依赖性升高，结果与Bugelski等[14]研究结果一致。

本实验选择流式细胞磁珠微阵列法作为检测细胞因子的方法，该方法可以同时检测单一液相样本中多个蛋白，检测需要标本量少、灵敏度高、重复性好、检测范围宽[22-24]。与传统的ELISA相比，流式细胞磁珠微阵列法所需要的样本体积仅为ELISA的1/6，仅需要少量的上清液就可以检测细胞因子、抗体、抗原等多个指标[25]。

综上所述，本研究通过比较2种体外细胞因子释放研究方法的优劣，为后续相关新药研发的临床前体内试验研究及临床风险控制提供参考。

[参 考 文 献]

[1] YILDIZHAN E, KAYNAR L. Cytokine release syndrome[J]. *J Oncol Sci*, 2018, 4(3): 134-141.

[2] ABRAMOWICZ D, SCHANDENE L, GOLDMAN M, *et al*. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients[J]. *Transplantation*, 1989, 47(4): 606-608.

[3] WINKLER U, JENSEN M, MANZKE O, *et al*. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD_{20} monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8)[J]. *Blood*, 1999, 94(7): 2217-2224.

[4] SUNTHARALINGAM G, PERRY MR, WARD S, *et al*. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD_{28} monoclonal antibody TGN1412[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(10): 1018-1028.

[5] FINCO D, GRIMALDI C, FORT M, *et al*. Cytokine release assays: current practices and future directions[J]. *Cytokine*, 2014, 66(2): 143-155.

[6] WOLF B, MORGAN H, KRIEG J, *et al*. A whole blood *in vitro* cytokine release assay with aqueous monoclonal antibody presentation for the prediction of therapeutic protein induced cytokine release syndrome in humans[J]. *Cytokine*, 2012, 60(3): 828-837.

[7] STEBBINGS R, FINDLAY L, EDWARDS C, *et al*. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics[J]. *J Immunol*, 2007, 179(5): 3325-3331.

[8] FINDLAY L, EASTWOOD D, STEBBINGS R, *et al*. Improved *in vitro* methods to predict the *in vivo* toxicity in man of therapeu-

tic monoclonal antibodies including TGN1412[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 352(1-2): 1-12.
[9] VESSILLIER S, EASTWOOD D, FOX B, *et al*. Cytokine release assays for the prediction of therapeutic MAb safety in first-in man trials: Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm[J]. *J Immunol Methods*, 2015, 424: 43-52.
[10] WOLF B, MORGAN H, KRIEG J, *et al*. A whole blood *in vitro* cytokine release assay with aqueous monoclonal antibody presentation for the prediction of therapeutic protein induced cytokine release syndrome in humans[J]. *Cytokine*, 2012, 60(3): 828-837.
[11] 吕明. 新型抗 CD_3 小分子抗体的设计及其功能研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2007.
[12] BRESLIN S. Cytokine-release syndrome: overview and nursing implications[J]. *Clin J Oncol Nurs*, 2007, 11(Suppl 1): S37-S42.
[13] STEBBINGS R, EASTWOOD D, POOLE S, *et al*. After TGN1412: recent developments in cytokine release assays[J]. *J Immunotoxicol*, 2013, 10(1): 75-82.
[14] BUGELSKI PJ, ACHUTHANANDAM R, CAPOCASALE RJ, *et al*. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009, 5(5): 499-521.
[15] FINDLAY L, EASTWOOD D, STEBBINGS R, *et al*. Improved *in vitro* methods to predict the *in vivo* toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 352(1-2): 1-12.
[16] 张金凤, 夏妍, 张淑云. 抗原提呈细胞的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(19): 2735-2738.
[17] 陈建, 曾莉, 何立群. 从巨噬细胞角度研究肾纤维化发病机制进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(7): 639-641.
[18] LIU YY, FANG YL, CHEN XF, *et al*. Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome[J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(43): 7969.
[19] GIAVRIDIS T, VAN DER STEGEN SJC, EYQUEM J, *et al*. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade[J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 731-738.
[20] KIM JW, KONG JS, LEE S, *et al*. Angiogenic cytokines can reflect the synovitis severity and treatment response to biologics in rheumatoid arthritis[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(5): 843-853.
[21] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm[J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(8): 959-970.
[22] FINDLAY L, EASTWOOD D, STEBBINGS R, *et al*. Improved *in vitro* methods to predict the *in vivo* toxicity in man of therapeutic monoclonal antibodies including TGN1412[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 352(1-2): 1-12.
[23] 李向阳, 华慧, 颜超, 等. 流式细胞术检测血清细胞因子常见问题与对策[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(1): 73-76.
[24] 高恩惠, 陈探, 马璟, 等. 药效动力学研究中流式细胞术方法学验证概述[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(7): 815-822.
[25] 高赟, 许沈华, 朱赤红, 等. CBA 技术检测胃肠癌患者 Th/1Th2 细胞因子表达水平的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 280-283.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2021-05-06