

· 基础研究 ·

免疫效应细胞增殖与细胞毒性功能检测3种方法的比较

徐大来^{1,2}, 司 远³, 田 蕾¹, 肖 斌¹, 何远清⁴, 朱 毅^{1,2*}

¹南京医科大学第一附属医院胰腺中心, ²普外科, 江苏 南京 210029; ³天津天锐生物科技有限公司, 天津 300000; ⁴江苏大学实验动物中心, 江苏 镇江 212000

[摘 要] 目的: 对比研究用于检测免疫效应细胞增殖与细胞毒功能的方法。方法: 分别采用CCK-8法、EdU标记法、CFSE标记法检测不同培养条件下NK92细胞增殖[组1: 100 U/mL白细胞介素(interleukin, IL)-2; 组2: 100 U/mL IL-2+10 U/mL IL-15]。用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放法、活细胞染料双标流式法、荧光素酶法检测两组NK92对K562细胞的杀伤。结果: CCK-8法检测结果提示组2增殖能力强于组1, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而EdU和CFSE标记法均提示两组间增殖能力有显著差异($P < 0.05$)。活细胞染料双标流式法与荧光素酶法均能够检测出不同效靶比下两组NK92细胞毒功能的差异($P < 0.05$), LDH释放法在低效靶比下未检测出两组细胞毒性的差异($P > 0.05$)。以双标流式法的检测值为标准参照, 荧光素酶法和LDH释放法的检测值与其呈显著相关性($r_s=0.979\ 4, P < 0.001$; $r_s=0.973\ 2, P < 0.001$)。结论: CCK-8法更侧重于检测代谢活性, EdU和CFSE标记法更适用于悬浮类免疫细胞的增殖检测。3种细胞毒功能检测具有一致性, 活细胞染料双标流式法适合检测对悬浮类靶细胞的杀伤, 荧光素酶法比LDH释放法更适用于检测对贴壁细胞的杀伤作用。

[关键词] 免疫细胞; 增殖; 细胞毒功能; 检测方法; 对比研究

[中图分类号] R392.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)03-355-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20210308

A comparative study on three detection methods of proliferation and cytotoxic function in immune effector cells

XU Dalai^{1,2}, SI Yuan³, TIAN Lei¹, XIAO Bin¹, HE Yuanqing⁴, ZHU Yi^{1,2*}

¹Pancreatic Center, ²Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ³Tianjin Tianrui Biotechnology Limited Company, Tianjin 300000; ⁴Experimental Animal Center, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to systematically compare the methods for detecting the proliferation and cytotoxic function of immune effector cells. **Methods:** CCK-8 assay, EdU labeling assay and CFSE labeling assay were used to detect the proliferation of NK92 cells *in vitro* under different culture conditions (group 1: 100 U/mL IL-2; group 2: 100 U/mL IL-2+10 U/mL IL-15), and the killing effect of NK92 on K562 cells was detected by lactate dehydrogenase (LDH) release assay, double living cell dye labeling assay and luciferase assay. The principles, characteristics and effectiveness of the various methods were compared. **Results:** The results of CCK-8 assay showed that the proliferation ability of group 2 was stronger than that of group 1, but there was no significant difference between group 2 and group 1 ($P > 0.05$), but both EdU and CFSE labeling assay showed that there were significant differences in proliferation ability between the two groups. Double living cell dye labeling flow assay and luciferase assay could detect the differences in cytotoxic function of NK92 between the two groups under different effector-target ratio ($P < 0.05$), but there was no difference in cytotoxicity between the two groups under low effector-target ratio detected by LDH release assay ($P > 0.05$). When double living cell dye labeling flow assay was as standard method, results of luciferase assay and LDH release assay were significantly correlated with the results of living cell dye labeling flow assay ($r_s < 0.979\ 4, P < 0.001$; $r_s=0.973\ 2, P < 0.001$). **Conclusion:** CCK-8 assay is more focused on the detection of metabolic activity, EdU and CFSE labeling assay are more suitable for detecting the proliferation of suspended

[基金项目] 国家自然科学基金(81672471)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhuyijssry@126.com

immune cells. The three kinds of cytotoxic function assay are consistent. Double living cell dye labeling assay is suitable for detecting the killing of suspended target cells, and luciferase assay is more suitable than LDH release method for the killing of adherent cells.

[Key words] immune cells; proliferation; cytotoxic function; detection methods; comparative study

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(03): 355-360, 414]

免疫治疗已经成为肿瘤综合治疗的主要手段^[1-2]。免疫治疗的手段之一,基于T细胞、NK细胞的过继性细胞免疫治疗在血液肿瘤、黑色素瘤等已取得显著进展^[3-4],在实体瘤方面,嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy)的临床应用研究也正在积极开展。过继性细胞免疫治疗的发展离不开T、NK等免疫细胞放大培养和杀伤功能的实验技术与基础研究的发展。开展过继性细胞免疫治疗的基础研究、临床应用研究和转化研究的首要前提是建立稳定、相对精准、适合免疫细胞特点的检测方法与技术平台。

免疫效应细胞增殖与细胞毒性功能的精准检测是实际工作的关键。一方面,经验显示 1 cm^3 大小的瘤块中约有 1×10^{10} 个瘤细胞,需要至少10倍于瘤细胞的免疫细胞才能保证有效的抑制和杀伤效果^[5],因此在免疫效应细胞长期稳定扩增培养的技术平台上,增殖实验不可或缺。另一方面,对于体外分离、扩增或改造的免疫效应细胞的体内应用,需要通过大量的体外细胞毒实验,准确鉴定效应细胞杀伤肿瘤靶细胞的功能。现有的体外增殖和细胞毒相关的实验方法种类繁多,准确性、经济性、可操作性不一,而且部分实验受限于实验室条件无法开展。选对适合的增殖或细胞毒实验方法,不仅可以少走弯路、事半功倍、节省有限的经费和实验资源,而且有助于建立稳定精准的技术平台和进一步推进过继性免疫治疗相关的研究。因此,鉴定免疫效应细胞增殖能力和细胞毒活性技术方法的对比研究与系统总结有重要的实用价值。

NK92细胞系由Klingemann博士的实验室分离和鉴定,来自患有NK细胞淋巴瘤的患者^[6]。相对于从志愿者体内原代分离的免疫效应细胞,NK92细胞系具有免疫效应细胞的悬浮培养特性、增殖特性和杀伤能力,是可替代原代效应细胞的稳定实验模型。因此,本研究以NK92为实验模型细胞,对比研究与系统总结目前常用的体外增殖和细胞毒相关的实验方法,旨在总结各类方法的特点与适用性的实践经验。

1 材料和方法

1.1 材料

NK92细胞系、带有荧光素酶的K562细胞系由合作单位天津天锐生物科技有限公司赠送;白细胞介素(interleukin, IL)-2(长春生物制品研究所);IL-15(Proteintech公司,美国);CCK-8试剂盒、钙黄绿素Calcein-AM(同仁化学公司,日本);EdU试剂盒(苏州US EVERBRIGHT公司);CFSE(Sigma公司,美国);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天公司);CellTracker Deep Red(Invitrogen公司,美国);ATP(北京阿拉丁公司);Triton X-100(北京索莱宝公司);荧光素钠(BioVision公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组

NK92细胞的培养方法参照ATCC的标准培养(<https://www.atcc.org/products/all/CRL-2407.aspx#culturemethod>),按照培养条件不同分为2个实验组:组1加100 U/mL IL-2,组2加100 U/mL IL-2+10 U/mL IL-15^[7]。K562培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640和DMEM中。所有细胞均在37℃、5% CO₂培养箱培养。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖

按照试剂盒说明书,将处于对数生长期的NK92细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,每个检测时间点设置5个复孔,每孔100 μL培养体系。96孔板四周加入PBS以防止板中的细胞培养液蒸发。在37℃、5% CO₂培养箱培养不同时间后,每孔分别加入10 μL CCK-8试剂,以100 μL细胞悬液+10 μL CCK-8体系进行孵育。预实验确定最佳孵育时间,即在培养箱中孵育1.5 h后使用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度值, $D(450\text{ nm})_{\text{实验组}}-D(450\text{ nm})_{\text{空白对照}}$ 的值间接反映活细胞的数量。空白对照指仅有培养液而未加细胞的孔。

1.2.3 EdU标记法检测细胞增殖

用培养基调整NK92细胞密度为 1×10^6 个/mL进行EdU标记,预实验确定加入EdU的浓度为50 μmol/L,

培养箱孵育2 h。经4%多聚甲醛固定15 min和0.5% Triton X-100通透5 min处理后,每 1×10^6 个细胞加入500 μL 现配的Click-iT反应混合物避光染色30 min后加入DAPI室温避光15 min进行核染色。使用流式细胞仪或者荧光显微镜检测与分析EdU阳性的细胞占比^[8]。

1.2.4 CFSE标记法流式检测细胞增殖

将NK92细胞用PBS洗涤1遍并重悬。 2×10^6 个/mL的NK92细胞悬液加入1 μL 5 mmol/L的CFSE储存液,配制5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min后,加入4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的5倍体积含血清的细胞培养液终止染色,5 min后离心(300 g 5 min),并用PBS洗2遍后,加入培养基继续培养。分别于CFSE标记后的不同时间点用流式细胞仪检测NK92的平均荧光强度,扩增后与扩增前的平均荧光强度比值反映细胞的扩增倍数^[7-8]。

1.2.5 Calcein-AM/CellTracker Deep Red活细胞染料双标流式法检测细胞毒功能

用培养基将靶细胞K562调整为 1×10^6 个/mL,分别加入Calcein-AM至终浓度2 $\mu\text{mol/L}$ 、CellTracker Deep Red Dye至终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min后,PBS清洗2遍后用培养基将细胞密度调整为 2×10^5 个/mL,加入96孔U型底板,每孔加入100 μL ;按照不同效靶比加入效应细胞,并定容至200 μL 。将培养板置于1 000 r/min离心1 min,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置4 h进行杀伤后,吹匀细胞,用流式细胞仪上样,注意进样相同体积数的分组样品。双阳性细胞群为剩余活的靶细胞。设置阳性对照:标记过的靶细胞不加效应细胞。效应细胞毒性(%)=(空白对照读数-实验组读数)/空白对照读数 $\times 100\%$ ^[9]。

1.2.6 LDH释放法检测细胞毒功能

根据效靶比准备实验需要的细胞数。将靶细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL,取100 μL 加入U型96孔培养板中,根据不同效靶比加入效应细胞,定容至200 μL ;靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各100 μL ,靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5% Triton X-100各100 μL ,放入培养箱中4 h。然后将96孔培养板以250 g 离心5 min,每孔吸取上清100 μL 置于平底96孔培养板中,同时加入LDH基质液100 μL ,反应5 min,每孔加入30 μL HCl(1 mol/L),在酶标仪490 nm处测定吸光度值。按下式计算效应细胞毒活性。效应细胞毒性(%)=[反应孔 $D(490 \text{ nm})$ -自然释放孔 $D(490 \text{ nm})$]/最大释放孔 $D(490 \text{ nm})$ -自然

释放孔 $D(490 \text{ nm})$] $\times 100\%$ ^[10]。

1.2.7 荧光素酶法检测细胞毒功能

将K562细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL。然后铺96孔板,每孔加靶细胞悬液100 μL ,按照不同效靶比分别加入效应细胞,空白对照不加效应细胞,并定容至200 μL 。放置培养箱4 h后。按照每孔50 μL 用量,将2 mg/mL ATP溶液与300 ng/mL荧光素钠溶液按照1:3配制发光底物混合液。取出孵育过后的96孔板,每孔加入50 μL 2% Triton X-100,吹打混匀室温静置5 min,再次吹打混匀后每孔吸出50 μL 转移到黑色96孔酶标板,并加入50 μL 发光底物混合液,吹打混匀后5 min内用活体成像仪或FLUOstar Omega多功能读板机检测荧光值。效应细胞毒性=(空白组荧光值-实验组荧光值)/空白组荧光值 $\times 100\%$ ^[11]。

1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS20.0统计软件及GraphPad Prism 5进行分析。统计结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数间比较用两独立样本 t 检验。等级相关采用Spearman秩相关系数评价荧光素酶法、LDH释放法与活细胞染料双标流式法的关联。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

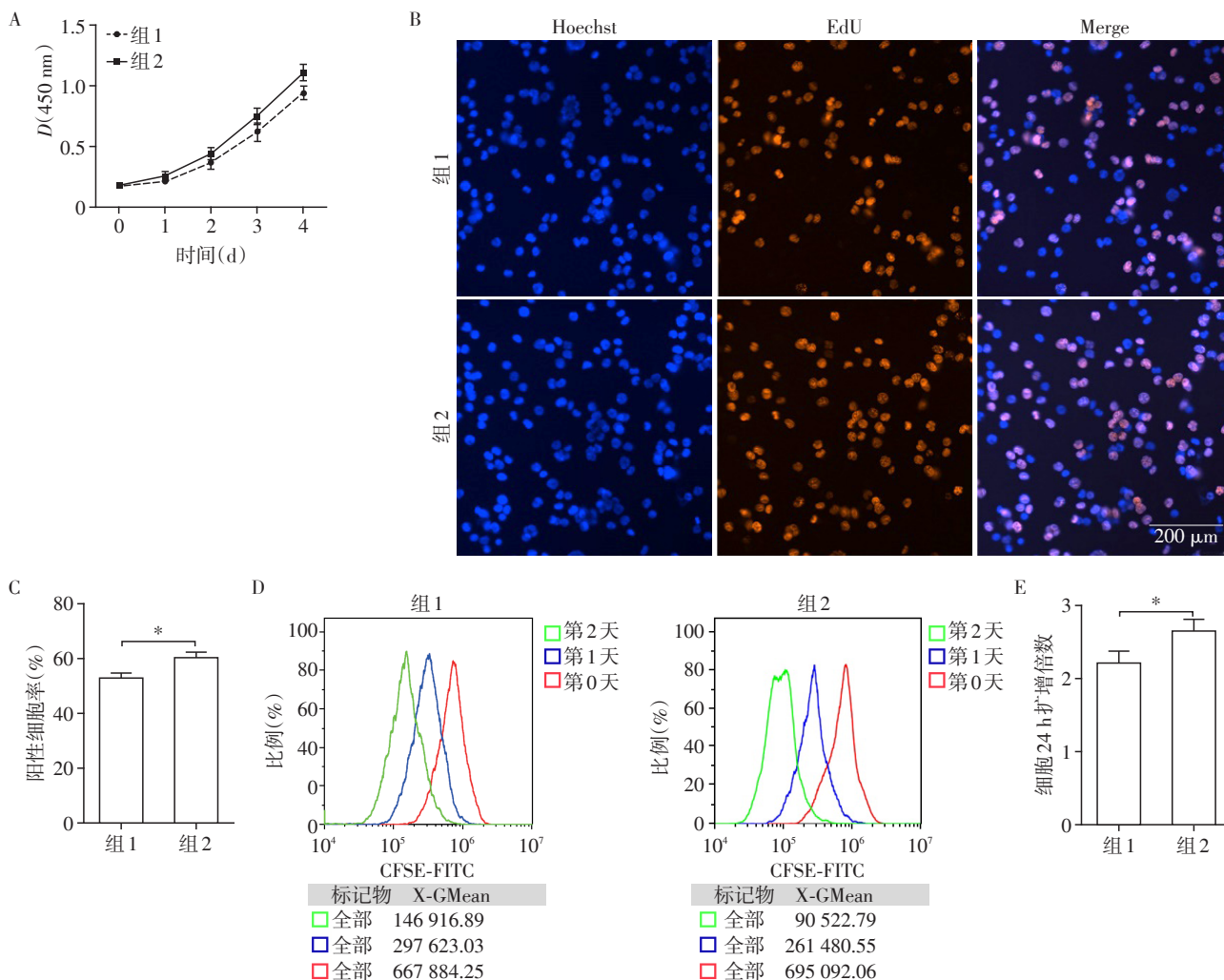
2 结 果

2.1 CCK-8法、EdU标记法与CFSE标记法检测两组NK92细胞增殖能力

CCK-8法连续4 d检测两组细胞增殖提示,组2的NK92增殖能力强于组1,但差异并无统计学意义($P > 0.05$,图1A);而EdU标记法与CFSE标记法提示,与组1相比,组2的NK92增殖能力更强且差异显著($P < 0.05$,图1B~E)。可以看出,对于悬浮免疫细胞,CCK-8法缺乏一定的灵敏度,并未检测出两组细胞间的增殖差异;而EdU和CFSE标记法则相对灵敏。

2.2 3种细胞毒性检测方法检测两组NK92细胞对K562的细胞毒性

以K562为靶细胞,组1和组2的NK92细胞为效应细胞,分别在效靶比为2.5:1、5:1和10:1下,进行4 h的共孵育。活细胞染料双标流式法能够有效检测出组1和组2效应细胞在不同效靶比下的细胞毒性差异($P < 0.05$,图2A和B)。同样,荧光素酶法也能检测出组1和组2效应细胞在不同效靶比下的细胞毒性差异($P < 0.05$,图2C、D)。图2E显示3次LDH释放实验检测两组效应细胞的细胞毒性统计



A: CCK-8法连续4 d检测两组 NK92 细胞增殖情况($n=5$); B、C: EdU 标记法检测两组 NK92 增殖情况(B)及3次重复实验的统计图(C); D、E: CFSE 标记法检测两组 NK92 细胞连续2 d 的分裂情况(D)及3次实验的统计图(E)。两组比较,* $P<0.05$ 。

图1 3种增殖检测方法结果与统计

Figure 1 Results and statistics of three proliferation detection methods

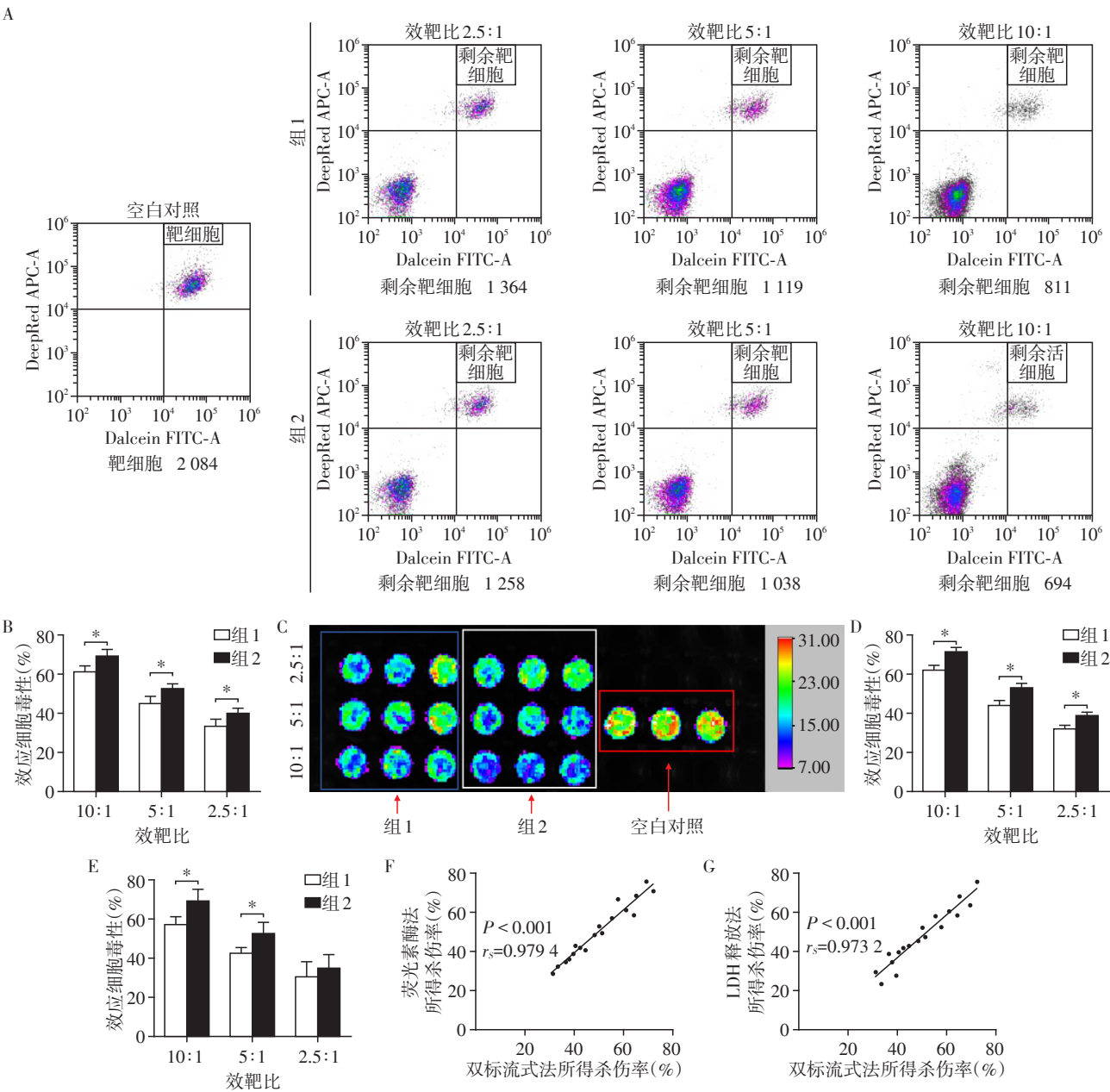
结果,在5:1与10:1效靶比下,两组效应细胞的细胞毒性差异显著($P<0.05$)。随后,为了验证3种杀伤检测方法的一致性,以双标流式法的检测值为标准参照,分别与荧光素酶法和LDH释放法的检测值进行相关性分析,图2F、G结果所示,这两种方法的检测值均与双标流式法的检测值呈显著相关性($r_s=0.979\ 4, P<0.001; r_s=0.973\ 2, P<0.001$)。但相比另外两种检测方法,LDH释放法的随机误差较大,因此并未检测出效靶比为2.5:1时两组细胞毒性的差异(图2E, $P>0.05$)。

3 讨论

免疫效应细胞的体外扩增是过继免疫治疗临床应用研究最基础的步骤。本研究通过具体实验和对文献的系统总结,比较3种常用的增殖检测方

法,3种检测方法因为原理上有区别而各有特点(表1)。CCK-8法侧重于细胞代谢活性,EdU标记法侧重于直接检测处于S期的细胞,而CFSE标记法则侧重于提供细胞分裂信息。如表1中拓展应用所展示的,这3种方法不仅可以检测细胞增殖而且可以反映所测样品的其他生物功能信息。如何有效选择,需要综合考量实验需求、实验室条件等多种因素。当然本文未涉及的增殖检测方法如增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)^[12]、Ki67^[13]等也都其特点和独特的适用性,如检测石蜡组织中细胞的增殖。

虽然传统的⁵¹Cr释放实验是检验细胞毒性功能的金标准^[14],但是这种方法有一些缺点,如与同位素预孵育所需的时间较长,⁵¹Cr的自发释放,特别是需要建立符合生物安全的同位素实验室,后期同位



A、B: 双标流式法检测结果: 右上象限双阳性细胞群为存活的靶细胞(A)及3次重复实验的统计图(B), 两组比较, $P < 0.05$; C、D: 荧光素酶法检测结果(C)及3次重复实验的统计图(D), 两组比较, $P < 0.05$; E: LDH释放实验3次重复实验的统计结果, 两组比较, $P < 0.05$; F、G: 以双标流式法为标准, 用Spearman秩相关系数分析荧光素酶法(F)和LDH释放法(G)与双标流式法的相关性。

图2 3种细胞毒性检测方法结果与分析

Figure 2 Results and analysis of three cytotoxicity detection methods

素耗材的处置,生物安全检测,可能导致的环境污染等系列问题。因此,近年来不断研发新的检测方法来替代 ^{51}Cr 释放实验方法,包括本研究选用的作为“标准”的双标流式法^[15]。比较实验表明本研究所选用的3种细胞毒性检测方法均具有较好的检测效果,且具有很高的-致性,但也各有优劣(表2)。因此,对于靶细胞为悬浮细胞的,建议首选双标流式法,贴壁靶细胞可根据实验室条件及需求选择荧

光素酶法或LDH释放法。

总之,本研究不仅在实验模型上详细对比研究了3种增殖和3种细胞毒性功能检测方法,而且在实践经验的基础上系统总结了各类方法的原理、特点、适用性和实践应用时的注意点。因此,需要依据实验室条件、实验对象与目的等多种因素,在追求稳定、精准和标准化的目标下,综合考虑后选择适合实验体系的检测方法。

表1 3种增殖检测方法的比较

Table 1 Comparison of three proliferation detection assays

方法	原理	特点及优劣	拓展应用	参考文献
CCK-8检测法	通过检测细胞代谢活性间接反映细胞数量	操作简便、经济、可连续观察细胞增殖；孔板内的培养液易挥发,无法保证最终检测体系的体积,造成随机误差	可以作为研究悬浮细胞代谢组学的基础,如在某种特定刺激下细胞整体代谢的改变	—
EdU标记法	以嘧啶类似物的形式整合入合成期的DNA双链,通过检测处于S期细胞占比	直接反映处于增殖状态的细胞,检测结果精准、可靠;悬浮细胞的EdU检测操作较贴壁细胞繁琐;荧光显微镜拍摄缺乏客观性,最佳检测仪器为流式细胞仪;直接反映细胞增殖	EdU有可能在活细胞中跟踪DNA复制和复制过程中标记细胞的命运	Cavanagh等 ^[8]
CFSE标记法	CFSE与细胞稳定结合并将荧光物质平均分配给子代	直接反映细胞的分裂情况,通过荧光衰减提示扩增;CFSE荧光仅能稳定传7~8代,不适用于长期观察细胞增殖	可区分在某种特定刺激下分裂与不分裂的细胞亚群,并跟踪不同的细胞亚群的功能,如特定标记的表达或细胞因子的产生	Terrén等 ^[9]

表2 3种细胞毒性检测实验的比较

Table 2 Comparison of three kinds of cytotoxicity detection assays

方法	原理	特点及优劣	参考文献
Calcein-AM/ CellTracker Deep Red 双标流式法	所用荧光染料为活细胞染料,被标记细胞死亡则荧光随之消失,通过检测双阳性细胞直接反映剩余靶细胞数	操作简便,靶细胞准备仅需半小时;经济、安全;双荧光染料增加实验的准确性;基于流式细胞仪的检测结果准确度高、可重复性好;不适用于对贴壁靶细胞的杀伤	Jang ^[15]
荧光素酶法	荧光素酶与底物反应依赖细胞中活性ATP,通过检测剩余靶细胞产生的荧光定量存活的细胞	操作简便,无需繁琐的准备,对贴壁和悬浮靶细胞均适用;基于活体成像仪的检测结果直观可见,具有说服力;实验的可行性依赖细胞内稳定表达荧光素酶,需提前转导	Karimi ^[11]
LDH释放法	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,通过检测LDH的释放量来定量受损细胞	操作简便,经济,对贴壁和悬浮靶细胞均适用;对设备要求低,仅需酶标仪即可;随机误差大,LDH自发释放影响实验结果的稳定性,靶细胞生长过密、离心速度过大均会导致LDH自发释放	Korzeniewski等 ^[10]

[参考文献]

[1] 温少迪,沈波.非小细胞肺癌免疫治疗作用机制及临床研究现状[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(11):1739-1746

[2] RILEY R S,JUNE C H,LANGER R,et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Drug Discov,2019,18(3):175-196

[3] GOGISHVILI T,DANHOF S,PROMMERSBERGER S A,et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7(+)normal lymphocytes[J]. Blood,2017,130(26):2838-2847

[4] ARAI S,MEAGHER R,SWEARINGEN M,et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial[J]. Cytotherapy,2008,10(6):625-632

[5] 李娜,薄常文,马文华,等.过继免疫细胞治疗对原发性肝癌患者免疫学指标的影响[J].中国现代医学杂志,2015,25(21):31-34

[6] TONN T,BECKER S,ESSER R,et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92[J]. J Hematother Stem Cell Res,2001,10(4):535-544

[7] TERRÉN I,MIKELEZ I,ODRIOZOLA I,et al. Implication of interleukin-12/15/18 and ruxolitinib in the phenotype, proliferation, and polyfunctionality of human cytokine-preactivated natural killer cells[J]. Front Immunol,2018,9:737

[8] CAVANAGH B L,WALKER T,NORAZIT A,et al. Thy-

(下转第414页)

- 学报(自然科学版),2011,31(11):1685-1687,1706
- [15] NAVAI N, DINNEY C P. Oncologic equivalence between laparoscopic/robotic and open radical cystectomy [J]. J Urol,2016,195(6):1646-1647
- [16] 戴志红,刘志宇,高玉仁,等. 免缝扎背深静脉复合体技术在腹腔镜前列腺癌根治术中的应用探讨[J]. 中国医科大学学报,2016,45(12):1086-1088,1093
- [17] 陈玢岫,徐亚文,徐啊白,等. 免结扎血管筋膜复合体技术在腹腔镜根治性前列腺切除术中的应用(附32例报告)[J]. 中国内镜杂志,2013,19(1):46-49
- [18] 朱再生,施红旗,周鹏飞,等. 保留耻骨膀胱复合体技术在腹腔镜根治性前列腺切除术中的应用[J]. 中华泌尿外科杂志,2018,39(7):515-521
- [19] 邱志军,余湘群,向军章,等. 超声刀直接烧灼法处理DVC在腹腔镜膀胱癌根治性切除术中的应用[J]. 包头医学院学报,2018,34(7):18-19
- [20] 刘 锋,王 帅,祁小龙,等. 完全腹腔镜下根治性膀胱切除及原位U形回肠新膀胱术19例报告[J]. 中华泌尿外科杂志,2015,36(4):270-275
- [收稿日期] 2020-10-23

(上接第360页)

- midine analogues for tracking DNA synthesis [J]. Molecules,2011,16(9):7980-7993
- [9] TERRÉN I, ORRANTIA A, VITALLÉ J, et al. CFSE dilution to study human T and NK cell proliferation *in vitro* [J]. Methods Enzymol,2020,631:239-255
- [10] KORZENIEWSKI C, DENIS M. Callewaert 2. an enzyme-release assay for natural cytotoxicity [J]. J Immunol Methods,1983,64(3):313-320
- [11] KARIMI M A, LEE E, BACHMANN M H, et al. Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay [J]. PLoS One,2014,9(2):e89357
- [12] SCHÖNENBERGER F, DEUTZMANN A, FERRANDO-MAY E, et al. Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells [J]. BMC Bioinformatics,2015,16(1):180
- [13] MILLER I, MIN M, YANG C, et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence [J]. Cell Rep,2018,24(5):1105-1112.e5
- [14] HOLDEN H T, OLDHAM R K, ORTALDO J R, et al. Standardization of the chromium-51 release, cell-mediated cytotoxicity assay: cryopreservation of mouse effector and target cells [J]. J Natl Cancer Inst,1977,58(3):611-622
- [15] 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
- [收稿日期] 2020-12-14