

NK 细胞体外杀伤活性检测方法建立与验证

刘家权

【摘要】

目的 建立自然杀伤细胞（NK 细胞）体外杀伤活性检测方法并进行验证。

方法 以慢性髓源白血病细胞 K562 为靶细胞，使用 5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯（CFDA SE）标记后，将携带 CFSE 荧光的靶细胞按照不同的效靶比与 NK 细胞共培养。使用死细胞染料碘化丙啶（PI）与早期凋亡染料 Annexin V 对共培养的细胞进行染色后，采用流式细胞仪对 CFSE 荧光筛对靶细胞圈门，同步圈门 PI 检测其死亡率与 Annexin V 检测早期凋亡率，计算杀伤率。对活细胞染料 CFDA SE 与死细胞染料 PI 及早期凋亡染料 Annexin V 使用量、检测限与定量限、准确度、重复性、再现性进行验证。

结果 经过活细胞染料 CFDA SE 用量验证后， 2×10^6 个 K562 靶细胞的 CFDA SE 最佳使用量为 0.2 μL 。PI 与 Annexin V 的最佳使用量均为 1 $\mu\text{L}/\text{Test}$ 。靶细胞死亡与早期凋亡检出限为 0.1%，定量限为 0.5%。准确度、重复性、再现性验证结果均能满足 YY/T 0588《流式细胞仪》中表面标志物检测的重复性 a) 阳性百分比 $\geq 30\%$ 时，CV 值应 $\leq 8\%$ ；或 b) 阳性百分比 $< 30\%$ 时，CV 值应 $\leq 15\%$ 的要求。 t 值与理论值符合 95% 置信水平中的统计学要求。

结论 建立的 NK 细胞体外杀伤活性检测方法符合标准化评价体系，为 NK 细胞功能检测与质量评价提供了参考依据。

【关键词】 NK 细胞； K562 细胞株； CFDA SE； PI； Annexin V； 流式细胞仪

中图分类号：Q813

文献标识码：A

文章编号：1673-713X（2025）01-0112-06

自然杀伤细胞（natural killer cell, NK 细胞）是机体重要的非特异性免疫屏障，不仅参与抗肿瘤、抗病毒感染，也跟免疫调节有关，其特点是在不受到抗原呈递的情况下，通过不同的方式杀死肿瘤细胞^[1]。通过接受 NK 治疗患者的淋巴细胞亚群分析结果表明，NK 细胞具有增强机体免疫力的功能，与恶性肿瘤的手术治疗、化疗、放疗有明显的互补性^[2]，并且可以与其他免疫细胞协同的方式发挥作用，克服肿瘤免疫逃避^[3]。据国家药品监督管理局统计，现有 36 项 NK 细胞治疗恶性肿瘤的临床试验正在进行。

随着 NK 细胞恶性肿瘤治疗研究的发展，NK 细胞的功能研究也越发重要。NK 细胞功能的评估主要分为体外杀伤活性，抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC），CD107a 脱粒，穿孔素、颗粒酶 B 等杀伤介质与炎症因子胞内合成与分泌能力。NK 细胞炎症因子与杀伤介质是 NK 细胞执行杀伤功能的工具，而不是其最终的靶细胞杀伤活性，因此研究人员认为细胞杀伤活性检测是一种更有说服力、更直接的功能检测方法^[4]。《人自然杀伤细胞》附录 C^[5]中要求对 NK 细胞的杀伤活性进行检测；《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》^[6]中也规定需要对生物学活性进行研究。在检测方法指南上，《中华人民共和国药典》2020 年版三部^[7]中没有规定相应的详细检测步骤；在《全国临床检验操作规程》（第 4 版）^[8]中规定了检测外周血淋巴细胞中的 NK 细胞杀伤活性检测方法，但是该方法只关注了整体的效应细胞与靶细胞死亡率，既未能精准地区分靶细胞也未对早期凋亡检测细胞群进行分析。另外该方法仅包括 20:1 一个效靶比，在 NK 细胞功能评价上存在很大局限性，并不能满足当前细胞新药研发领域准确评估 NK 细胞杀伤功能的需求。

本研究的目的是建立一种稳定的用于评价 NK 细胞杀伤活性的方法并进行验证。鉴于本实验使用流式细胞仪进行靶细胞的分析检测，因此在方法验证过程中重复实验的 CV 值参考 YY/T 0588《流式细胞仪》中表面标志物检测的重复性 a) 阳性百分比 $\geq 30\%$ 时，CV 值应 $\leq 8\%$ ；或 b) 阳性百分比 $< 30\%$ 时，CV 值应 $\leq 15\%$ ^[9]的标准。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品；离心机和二氧化碳培养箱均为新加坡 ESCO 生命科学集团产品。

1.1.2 试剂 5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFDA SE）细胞增殖与示踪检测试剂盒购自碧云天生物；PI 和 Annexin V 均购自美国 Biolegend 公司；RPMI 1640 培养

作者单位：518110 深圳中检联新药检测有限责任公司，Email：17419624@qq.com

收稿日期：2024-03-26

基购自深圳市达科为生物技术股份有限公司;胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.3 细胞 K562 保存于中科院细胞库;外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)购自上海澳能生物生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及计算公式 实验分为 A、B、C、D、E、F 共 6 组,靶细胞为 K562 细胞,效应细胞为 NK 细胞。A 组: 2×10^5 个 K562 细胞用 2 mL 完全培养基(90% 1640 培养基 + 10% 胎牛血清)重悬作为阴性对照组。取 2×10^6 对数生长期的 K562 细胞, PBS 重悬, $500 \times g$ 离心 5 min, 使用 CFDA SE 标记成为 K562-CFSE 细胞。2 mL 完全培养基重悬并调整密度为 2×10^6 个/mL K562-CFSE; 分别取 100 μ L 至培养皿标记为 B~F 组, 即每组 2×10^5 个 K562-CFSE 细胞。B 组: 补充完全培养基至 2 mL 作为 CFDA 荧光对照组。C 组: 补充完全培养基至 2 mL, 孵育结束后进行 PI 与 Annexin V 染色作为靶细胞自发死亡与早期凋亡对照组。取 PBMC 诱导扩增的 NK 细胞 $500 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 使用完全培养基将 NK 细胞重悬至 4×10^6 个/mL。D~F 杀伤实验组分别按照效靶比 5:1、10:1、20:1 加入 NK 细胞, 补充完全培养基至 2 mL 后将各组细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。收获 A~F 组的细胞至流式管中, $500 \times g$, 离心 5 min 弃上清; A、B 组加 200 μ L PBS 重悬细胞; C~F 组: 各加 1 μ L PI 染液与 1 μ L Annexin V 染液, 室温避光孵育 15 min, PBS 清洗一遍, 离心 5 min 弃上清, 加 200 μ L PBS 重悬细胞上机检测。相关计算公式为: 靶细胞死亡率(%) = $(PI_{NK组} - PI_{C组}) \times 100\%$; 靶细胞早期凋亡率(%) = $(Annexin V_{NK组单阳} - Annexin V_{C组单阳}) \times 100\%$ 。

1.2.2 方法的验证

1.2.2.1 CFDA SE 用量验证 CFSE 荧光信号过强, 会导致 PI 染料的 PE 通道显现过强的阳性信号, 且这种干扰无法通过流式补偿调节去除, 因此需要对 CFDA SE 的用量进行验证。取 K562 细胞, 分为 5 个浓度组, 其分别使用 0.1、0.2、0.5、1、2 μ L 的 CFDA SE 储存液(1000 $\times$)对 2 mL 相同密度的靶细胞(1×10^6 个/mL)进行标记, 洗涤后进行上机检测。

1.2.2.2 PI 用量验证 在使用 PI 染料检测靶细胞活率时, PI 的浓度过低, 无法反映靶细胞的真实活率, PI 的浓度过高, 则可能因为 PI 的毒性造成靶细胞死亡。设置 5 个 PI 染料用量实验组, 分别取 0.2、0.5、1、2、5 μ L PI 染色, 各组设置 5 个复孔。室温避光孵育 15 min 后, 收获 K562 细胞, $500 \times g$ 离心 5 min, 用 100 μ L PBS 重悬于流式管中。上机检测。

1.2.2.3 Annexin V 用量验证 分别取 0.2、0.5、1、2、5 μ L Annexin V 染色, 其他操作方法同 1.2.2.2。

1.2.2.4 检测限与定量限验证 取 K562 靶细胞, $500 \times g$ 离心 5 min, 取 5×10^6 细胞置于二氧化碳培养箱过夜, 实

验组进行 PI、Annexin V 染色, 取 2×10^7 不染色的 K562 裸细胞作为对照组。取实验组细胞与对照组细胞按照一定的比例进行混匀上机检测, 拟定为 1~3 组, 死细胞组占混合细胞中的 0.1%、0.2%、0.5%。通过计算各组的变异系数确定其重复性; 通过 t 检验对细胞 Annexin V 荧光表达量的 t 值与细胞理论值 T 的准确性进行验证检测, 判断实验组的检测结果是否符合统计学要求, 以确定检出限与定量限。

1.2.2.5 准确度验证 取 K562 靶细胞, $500 \times g$ 离心 5 min, 取 5×10^6 个细胞作为实验组进行 PI、Annexin V 染色, 取 2×10^7 个活细胞作为对照组。取实验组细胞与对照组细胞按照一定的比例进行混匀上机检测, 拟定为 1、2 组, 死细胞组占混合细胞中的 1%、2%。通过计算各组的变异系数确定其重复性; 通过 t 检验对细胞死亡与早期凋亡荧光表达量与细胞理论值 T 的准确性进行验证检测, t 值应 $< 95\%$ 置信水平/自由度 2 时的 4.30, 判断实验组的检测结果是否符合统计学要求, 以确定准确度。

1.2.2.6 重复性验证 取一份 NK 细胞由一位检测员平行测定 3 次, 通过计算检测值变异系数确定其重复性是否符合阳性百分比 $< 30\%$ 时, CV 值应 $\leq 15\%$ 的标准。

1.2.2.7 再现性验证 取一份 NK 细胞由三位检测员每人检测 1 次, 通过计算检测值变异系数确定其再现性是否符合阳性百分比 $< 30\%$ 时, CV 值应 $\leq 15\%$ 的标准。

2 结果

2.1 CFDA SE 用量验证结果

0.1、0.2、0.5、1、2 μ L 不同浓度 CFDA SE 标记后的 K562 细胞在流式检测过程中颗粒大小与对照组均无区别, 5 个不同浓度组的 K562-CFSE 表现出来的荧光均可与未染色组进行分群区分, 且未超过 FITC 荧光检测范围。但是 0.5、1、2 μ L 三组显示出的荧光会影响 PE 通道, 因此本实验可选择 0.1、0.2 μ L 作为后续实验中 CFDA SE 的用量, 考虑本实验需要培养 4 h, 培养过程 CFSE 荧光信号减弱, 所以选择 0.2 μ L 浓度 CFDA SE 的对靶细胞进行标记(图 1)。

2.2 PI 用量验证结果

靶细胞在 5 个浓度的 PI 染色情况下都能检测出死细胞的存在, 其中 0.2、1、2、5 μ L 的 PI 浓度染色的情况下, 死细胞比例能够符合“阳性百分比 $< 30\%$ 时, CV 值应 $\leq 15\%$ ”的要求。但在 1 μ L 的 PI 浓度染色的情况下 CV 值最低, 所以在本实验使用 PI 染色的量为 1 μ L。结果见表 1 与图 2。

2.3 Annexin V 用量验证结果

靶细胞在 5 个浓度的 Annexin V 染色情况下都能检测出细胞的早期凋亡, 其中 0.5、1、2 μ L 的 Annexin V 染色, 早期凋亡比例能够符合“阳性百分比 $< 30\%$ 时, CV 值应 $\leq 15\%$ ”的要求。但在 1 μ L 的 Annexin V 浓度染色的情况下 CV 值最低, 所以在本实验使用 Annexin V 染色的量为 1 μ L。结果见表 2 与图 3。

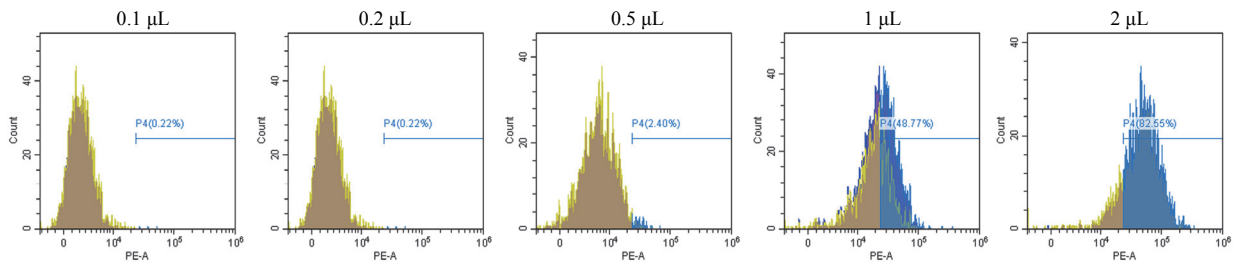


图 1 CFDA SE 不同用量的验证结果

表 1 PI 用量验证结果 (%)

	0.2 μL	0.5 μL	1 μL	2 μL	5 μL
第一次检测	0.73	0.56	0.56	0.83	1.00
第二次检测	0.96	0.12	0.50	0.62	0.98
第三次检测	0.80	0.07	0.47	0.93	0.91
第四次检测	0.70	0.37	0.52	0.80	1.14
第五次检测	0.74	0.06	0.56	0.90	0.93
$\bar{x}$	0.79	0.24	0.52	0.82	0.99
S	0.10	0.22	0.04	0.12	0.09
CV	13.21	93.54	7.47	14.87	9.11

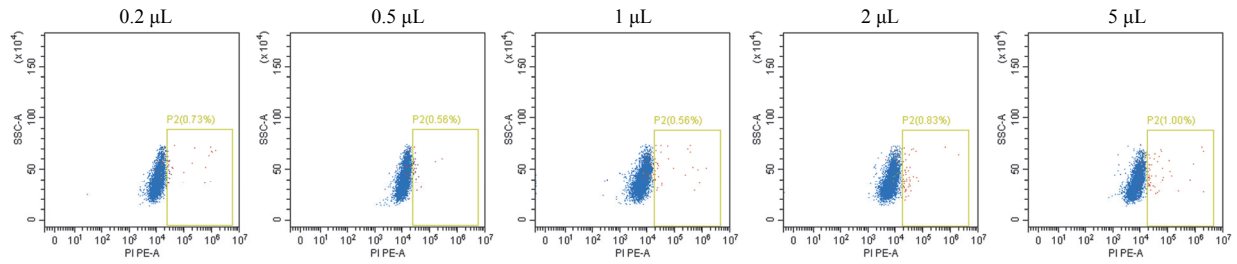


图 2 PI 用量验证结果

表 2 Annexin V 用量验证结果 (%)

	0.2 μL	0.5 μL	1 μL	2 μL	5 μL
第一次检测	0.69	1.10	1.51	1.53	0.85
第二次检测	0.46	0.94	1.53	1.57	1.02
第三次检测	0.45	1.22	1.54	1.73	0.97
第四次检测	0.67	0.92	1.59	1.50	1.24
第五次检测	0.48	1.03	1.45	1.37	0.74
$\bar{x}$	0.55	1.04	1.52	1.54	0.96
S	0.12	0.12	0.05	0.13	0.19
CV	21.70	11.80	3.33	8.44	19.58

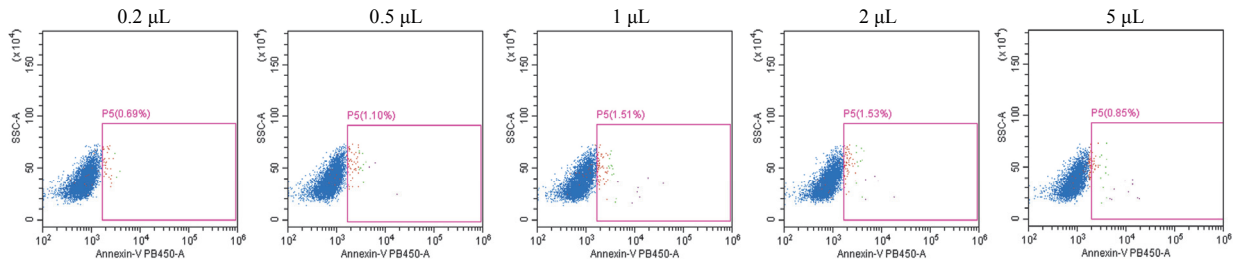


图 3 Annexin V 用量验证结果

表 3 检出限与定量限验证结果

	PI			Annexin V		
	组 1	组 2	组 3	组 1	组 2	组 3
第一次检测	0.10%	0.20%	0.53%	0.10%	0.50%	0.58%
第二次检测	0.14%	0.16%	0.50%	0.05%	0.34%	0.58%
第三次检测	0.12%	0.22%	0.52%	0.05%	0.36%	0.45%
$\bar{x}$	0.12%	0.19%	0.52%	0.07%	0.40%	0.54%
S	0.02%	0.03%	0.02%	0.03%	0.09%	0.08%
CV	16.67%	15.80%	2.96%	43.30%	21.79%	13.99%
理论值 (T)	0.10%	0.20%	0.50%	0.10%	0.20%	0.50%
t 值	1.73	0.38	1.89	2	3.97	0.85

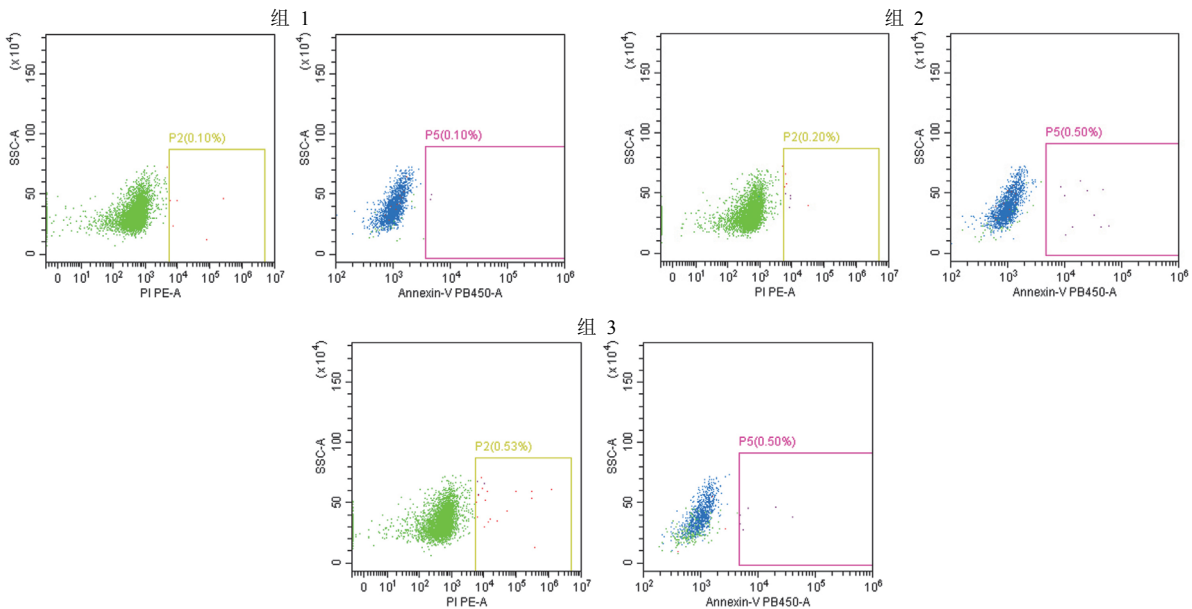


图 4 检出限与定量限验证结果（组 1：靶细胞死亡与早期凋亡理论值 0.10% 时流式图；组 2：靶细胞死亡与早期凋亡理论值 0.20% 时流式图；组 3：靶细胞死亡与早期凋亡理论值 0.50% 时流式图）

2.4 检出限与定量限验证结果

死细胞与早期凋亡表达率检测，在 0.10% 的比例下，可检测到荧光信号，但无法正确地检测出其真实表达率，可设为检出限；在 0.50% 比例时检测的荧光值符合要求，可有效检测出死细胞与早期凋亡表达率，可设为定量限。结果见表 3 与图 4。

2.5 测定方法的准确度验证结果

靶细胞在 2 个分组中均能检测到荧光值，3 次检测的 CV 值能同时满足“阳性百分比 < 30% 时，CV 值应 ≤ 15%”的标准，3 次检测结果都可达到 t 检验计算中可以达到“95% 置信水平/自由度 2”的统计学要求，实验结果可信。结果见表 4 与图 5。

2.6 重复性验证结果

重复性检测结果的 CV 值小于规定的 a) 阳性百分比 ≥ 30% 时，CV 值应 ≤ 8%；或 b) 阳性百分比 < 30% 时，CV 值应 ≤ 15% 的标准。结果见表 5 与图 6。

表 4 测定方法的准确度验证结果

	组 1		组 2	
	PI	Annexin V	PI	Annexin V
第一次检测	0.95%	1.06%	2.04%	2.09%
第二次检测	0.95%	1.04%	2.15%	2.08%
第三次检测	1.01%	1.02%	2.02%	1.92%
$\bar{x}$	0.97%	1.04%	2.07%	2.03%
S	0.03%	0.02%	0.07%	0.10%
CV	3.57%	1.92%	3.38%	4.70%
理论值 (T)	1.00%	1.00%	2.00%	2.00%
t 值	1.5	3.46	1.73	0.54

2.7 再现性验证结果

再现性结果的 CV 值小于规定的 a) 阳性百分比 ≥ 30% 时，CV 值应 ≤ 8%；或 b) 阳性百分比 < 30% 时，CV 值应 ≤ 15% 的标准。结果见表 6 和图 7。

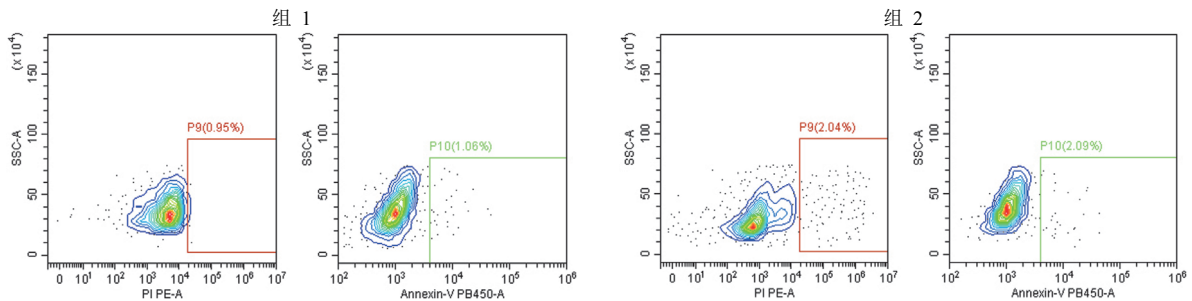


图 5 测定方法的准确度验证结果（组 1：靶细胞死亡与早期凋亡理论值 1% 时流式图；组 2：靶细胞死亡与早期凋亡理论值 2% 时流式图）

表 5 重复性验证结果（%）

	靶细胞死亡率			靶细胞早期凋亡率		
	5:1	10:1	20:1	5:1	10:1	20:1
第一次检测	17.34	33.91	60.73	30.10	12.58	2.09
第二次检测	17.70	33.43	58.96	28.49	15.76	2.41
第三次检测	16.07	31.01	62.00	31.54	12.36	2.34
$\bar{x}$	17.04	32.78	60.56	30.04	13.57	2.28
S	0.86	1.55	1.53	1.53	1.90	0.17
CV	5.03	4.74	2.52	5.08	14.02	7.38

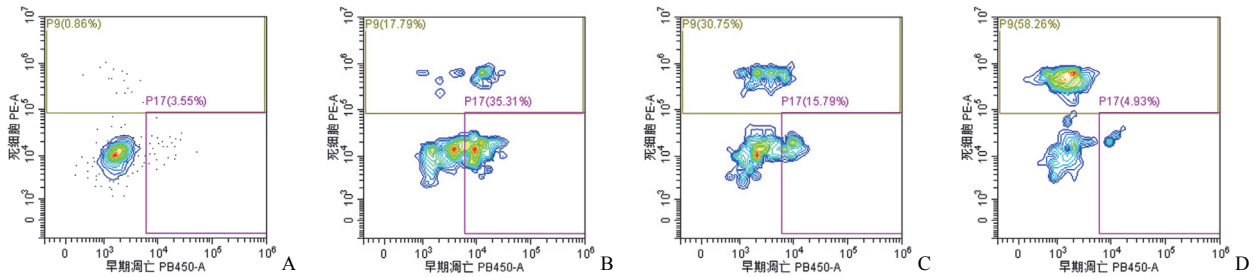


图 6 重复性验证结果（A：靶细胞自发死亡凋亡流式图；B：效靶比 5:1 杀伤流式图；C：效靶比 10:1 杀伤流式图；D：效靶比 20:1 杀伤流式图）

表 6 再现性验证结果（%）

	靶细胞死亡率			靶细胞早期凋亡率		
	5:1	10:1	20:1	5:1	10:1	20:1
第一位检测员	20.65	44.86	65.42	25.11	33.80	17.43
第二位检测员	21.46	45.63	63.83	26.16	33.72	18.52
第三位检测员	19.69	48.32	63.92	31.43	29.33	19.67
$\bar{x}$	20.60	46.27	64.39	27.57	32.28	18.54
S	0.89	1.82	0.89	3.39	2.56	1.12
CV	4.30	3.93	1.39	12.29	7.92	6.04

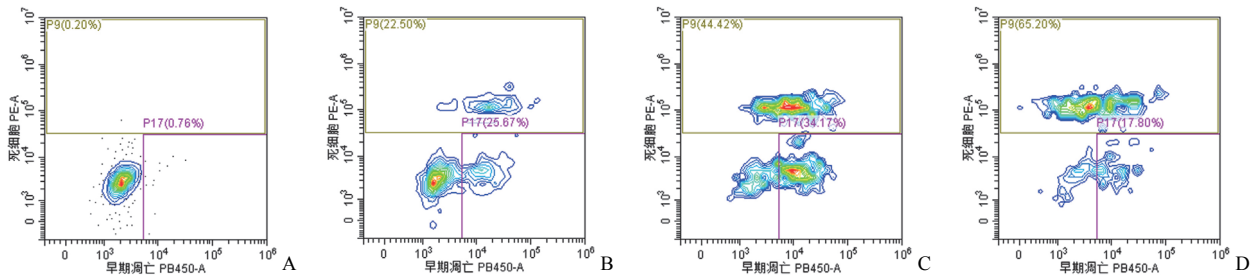


图 7 再现性验证结果（A：靶细胞自发死亡凋亡流式图；B：效靶比 5:1 杀伤流式图；C：效靶比 10:1 杀伤流式图；D：效靶比 20:1 杀伤流式图）

3 讨论

NK 细胞在肿瘤治疗中的疗效已在临床上得到确切证实,目前国内外正积极开展多项与 NK 细胞相关的临床研究项目。在以往的临床研究中,对 NK 细胞的质量检测不够全面,主要局限于微生物安全性与细胞表面标志物的检测。尽管这些检测可以确保受试者不会因细胞微生物污染而面临感染风险,且通过 NK 细胞的比例与分型可在一定程度上判断细胞质量,但仅检测这些项目是不够的。缺少对 NK 细胞功能性的研究,无法确保 NK 细胞的质量与在临床研究中的疗效。随着越来越多 NK 细胞临床研究项目的开展,国家也出台了一系列法规与标准,例如《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》等,在这些法规中对免疫细胞质量检测的要求都非常严格,都需要对细胞的生物学活性进行研究。NK 细胞体外杀伤活性作为其生物学有效性评价的重要检测内容,是其对肿瘤细胞杀伤反应的重要体现。目前国家各项法规与团体标准中只对 NK 细胞的体外杀伤活性给出了指导性的意见,尚未明确 NK 细胞体外杀伤活性的具体检测步骤。每个 NK 细胞临床研究机构都应在文献研究基础上建立自己的 NK 细胞体外杀伤活性检测方法。

本研究使用 PBMC 诱导与扩增后得到的 NK 细胞作为效应细胞,使用 K562 作为靶细胞,通过一系列的方法确定了 NK 细胞体外杀伤活性检测过程中 CFDA SE、PI、Annexin V 的用量,避免了因荧光染料干扰的问题导致实验失败;并精准地测定了反应细胞靶细胞死亡率与早期凋亡率的检测限与定量限,在 NK 细胞体外杀伤活性检测过程中可精准判断细胞死亡率与早期凋亡率。再通过准确度、重复性、再现性验证证实了本方法符合标准化的检测程序。本方法为 NK 细胞功能性检测提供了依据,可作为有关 NK 细胞的临床研究中生物学有效性评价的参照,对临床疗效的预测具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, et al. NK cell metabolism and tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2278.
- [2] Yang B, Li TT, Xiang YS, et al. Clinical efficacy evaluation of 60 cases of malignant tumor treated by NK cells[J]. *China J Mod Med*, 2015, 25(14):107-109. (in Chinese)
杨波, 李婷婷, 向永胜, 等. 60 例自然杀伤细胞治疗恶性肿瘤的临床疗效评价[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(14):107-109.
- [3] Qin Z, Chen J, Zeng J, et al. Effect of NK cell immunotherapy on immune function in patients with hepatic carcinoma: A preliminary clinical study[J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(5):323-330.
- [4] Kandarian F, Sunga GM, Arango-Saenz D, et al. A flow cytometry-based cytotoxicity assay for the assessment of human NK cell activity[J]. *J Vis Exp*, 2017, (126):56191.
- [5] Chinese Society for Cell Biology. T/CSCB 0010—2022 Human natural killer cells[S]. 2022. (in Chinese)
中国细胞生物学学会. T/CSCB 0010—2022 人自然杀伤细胞[S]. 2022.
- [6] Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration. Technical guidelines for pharmaceutical research and evaluation of immune cell therapy products (trial)[Z]. 2022-05-31. (in Chinese)
国家药品监督管理局药品审评中心. 免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)[Z]. 2022-05-31.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Volume 3, 2020. Beijing: China Medical Science Press, 2020. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2020 年版三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [8] Shang H, Wang YS, Shen ZY. National clinical laboratory procedures[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015:412. (in Chinese)
尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015:412.
- [9] China Food and Drug Administration. YY/T 0588—2017 Flow cytometer[S]. Beijing: China Standards Press, 2017. (in Chinese)
国家食品药品监督管理总局. YY/T 0588—2017 流式细胞仪[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.