

WAVE 生物反应器应用于 CIK 细胞培养

孟一鸣^a, 苏楠^a, 孙舒岚^a, 于志福^b, 李晓曦^a, 都田赵^a, 张桂荣^a(中国医科大学肿瘤医院, 辽宁省肿瘤医院暨肿瘤研究所 a. 中心实验室; b. 流行病学研究室, 辽宁 沈阳 110042)

[摘要] **目的:**探讨利用波浪(WAVE)生物反应器培养扩增肿瘤患者 CIK 细胞的效能及其对肿瘤细胞的杀伤活性。**方法:**分离 8 例肿瘤患者外周血单个核细胞,分别采用 CIK 细胞传统扩增技术(CIK 组)和 WAVE 反应器培养方案(WAVE 组),应用锥虫蓝染色并进行细胞计数,利用流式细胞术比较两组 CIK 细胞的扩增效率、活化情况及其亚群的组成变化,并以 K562 细胞为靶细胞检测扩增后 CIK 细胞的杀伤活性。**结果:**WAVE 组细胞增殖数较 CIK 组明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在第 14 天, WAVE 组 $CD3^+ CD8^+$ 、 $CD3^+ CD56^+$ 细胞亚群比例明显高于 CIK 组[(78.56 ± 2.99)% vs (74.54 ± 3.02)%], (48.33 ± 7.01)% vs (40.69 ± 6.43)%, 均 $P < 0.05$], 而 Treg 细胞比例显著降低($P < 0.05$);当效靶比为 10:1、20:1 时 WAVE 组扩增的 CIK 细胞对 K562 的杀伤率明显高于 CIK 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CIK 细胞中 $CD3^+ CD8^+ CD107a^+$ 的比例明显升高[(29.43 ± 4.97)% vs (25.19 ± 4.91)%, $P < 0.05$]。**结论:**WAVE 生物反应器扩增培养体系获得的 CIK 细胞数量多、纯度高,其中 $CD3^+ CD8^+$ 和 $CD3^+ CD56^+$ NKT 细胞比例较高,其对 K562 肿瘤细胞的杀伤效果明显高于传统培养技术获得的 CIK 细胞。

[关键词] WAVE 生物反应器;细胞因子诱导的杀伤细胞;细胞培养;体外扩增

[中图分类号] R392-33; R392.1; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)06-0670-05

WAVE bioreactors for cytokine induced killer cell culture

MENG Yiming^a, SU Nan^a, SUN Shulan^a, YU Zhifu^b, LI Xiaoxi^a, DU Tianzhao^a, ZHANG Guirong^a(a. Central Laboratory; b. Epidemiological Research Office, Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy of WAVE bioreactor in the culture and amplification of cytokine induced killer (CIK) cells and their killing activity on tumor cells. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PB-MCs) from 8 cancer patients were isolated and cultured by using traditional CIK amplification method (CIK group) and WAVE bioreactors (WAVE group) respectively. Trypan blue staining was used for cell counting, and Flow cytometry was used to compare the amplification efficiency, functionality and subtype composition between two groups; K562 cell, as the target cell, was used to detect the killing activity of amplified CIK cells of two methods. **Results:** The proliferated number of CIK cells in WAVE group was significantly higher than that of CIK group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the proportions of $CD3^+ CD8^+$ cells and $CD3^+ CD56^+$ cells in WAVE group were significantly higher than those in CIK group on Day 14 ([78.56 ± 2.99] % vs [74.54 ± 3.02] %, [48.33 ± 7.01] % vs [40.69 ± 6.43] %, all $P < 0.05$); However, the proportion of Tregs cell was significantly decreased ($P < 0.05$) in WAVE group. Moreover, it was observed that CIK cells cultured in the WAVE bioreactor group displayed a significantly higher cytotoxic capacity than that in CIK group at the E/T ratio of 10:1 and 20:1, and the proportion of $CD3^+ CD8^+ CD107a^+$ in CIK cells of WAVE group was significantly higher ([29.43 ± 4.97] % vs [25.19 ± 4.91] %, $P < 0.05$). **Conclusion:** WAVE bioreactor system could produce more CIK cells with high purity, and $CD3^+ CD8^+$ cells and $CD3^+ CD56^+$ NKT cells account higher proportion; CIK cells amplified by WAVE bioreactor exhibited higher killing effect on tumor K562 cells compared to the CIK cells amplified by traditional

[基金项目] 辽宁省科研事业发展专项基金资助项目(No. LNZC20141101146);辽宁省博士启动基金资助项目(No. 201601412)。Project supported by the Special Fund for the Development of Scientific Research in Liaoning Province(No. LNZC20141101146), and the Doctoral Scientific Research Foundation of Liaoning province (No. 201601412)。

[作者简介] 孟一鸣(1986-),女,博士,助理研究员,主要从事肿瘤免疫调节与治疗诊断, E-mail: mengyiming@cancerhosp-ln-cmu.com

[通信作者] 张桂荣(ZHANG Guirong, corresponding author), 硕士,主任检验师,主要从事肿瘤免疫调节与治疗, E-mail: zhang.lth@163.com

culture technique.

[**Key words**] WAVE bioreactor; CIK cell; cell culture; *in vitro* amplification

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(6): 670-674. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.017]

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的主要公共卫生问题之一,占我国居民总人群死亡的第二位。手术及放疗化疗传统的肿瘤治疗手段,致力于直接杀伤肿瘤细胞,不仅难以彻底清除肿瘤细胞,还容易损伤正常细胞^[1-2]。新型分子靶向药具有研发周期长、费用高、易产生耐药且无法清除实体瘤及突变的肿瘤细胞等缺点,作为另一种新型的治疗手段,肿瘤免疫治疗位居 2013 年度世界十大科技突破之首,被评为未来医学的“第三大支柱”^[3-4]。细胞免疫治疗天然具有识别或杀伤肿瘤细胞的能力,根据肿瘤细胞的变化作出自我调整,不因肿瘤发生新的突变而失活。肿瘤体细胞免疫治疗是个体化免疫治疗的主要手段,有研究^[5]表明,肿瘤患者的外周血中存在癌细胞,是引发肿瘤复发转移导致患者死亡的重要原因之一,但其治疗效果受到效应细胞表型及数量影响较大,因此寻找提高细胞表型和数量的培养方法,在细胞免疫治疗中至关重要。新型波浪 WAVE 生物反应器采用创新的非介入搅拌理念,为细胞培养工作者提供可放大的新型自动化细胞培养平台^[6-8]。本研究利用新型 WAVE 生物反应器对肿瘤患者的 CIK 细胞进行培养,并与 WAVE 灌注培养进行比较,旨在探寻一种有效、快捷扩增,且细胞纯度较高、对肿瘤细胞有良好杀伤作用的 CIK 细胞扩增方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人白血病细胞株 K562 为本实验室保存。细胞因子 IL-2、IFN- γ 和 IL-1 α 等均购自 Peprotech 公司,流式荧光检测抗体 CD3-FITC、CD56-APC、CD4-APC、CD8-PE-cy5 等均购自 BD Biosciences 公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁制药有限公司,人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.2 传统细胞培养技术扩增 CIK 细胞

将人白血病细胞株 K562 置于 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养,每 2 d 更换培养基,培养传代至对数生长期后,作为靶细胞用于 CCK-8 试剂盒检测细胞杀伤活性。8 例采血对象均为中国医科大学肿瘤医院接受生物治疗的肿瘤患者,其中男性 3 例、女性 5 例,中位年龄 60 岁(49~80 岁)。采集肿瘤患者外周血 50 ml,采用密

度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),提取 PBMC 并转移至有培养液的培养瓶中,加入 IFN- γ 1 000 U/ml 进行诱导。将培养瓶置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,次日更换新培养液并加入 100 ng/ml anti-CD3、1 000 U/ml IL-2 和 1 ng/ml IL-1 α ,培养至第 5 天,计数细胞,并将细胞等量分为两组转移至培养袋中。其中一个培养袋采取传统的培养方式(CIK 组),另一个 Cellbag 培养袋(WAVE 组)采取 WAVE 生物反应器连续灌注系统,继续培养至第 7、14、21 天收集细胞,用于后续实验操作。

1.3 WAVE 生物反应器连续灌注培养系统扩增 CIK 细胞

在培养第 5 天,将 Cellbag 放置 WAVE 生物反应器连续灌注系统的托盘上,24 h 监控袋中培养液酸碱度、 CO_2 和氧气量,并根据监控结果全自动调节培养液体积及酸碱度、 CO_2 和氧气量,以达到细胞生长的最适条件。在培养的第 7、14、21 天收集细胞用于后续实验操作。

1.4 CIK 细胞计数及安全性检测

每隔 2 d 收集培养液,由本生物治疗研究中心完成内毒素检测;在培养结束时,将各组细胞产物进行染色,检测支原体、真菌、需氧菌或厌氧菌。用锥虫蓝染色法分别于第 7、14、21 天对两组细胞进行计数,每组样本重复计数 3 次。

1.5 流式细胞术检测各组 CIK 细胞表型

1.5.1 $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+ \text{CD}8^+$ 细胞亚群的测定 在第 1 天分离 PBMC 及第 7、14 和 21 天扩增 CIK 细胞后,每个流式管收集 1×10^6 个细胞,应用 anti-CD3-PerCP、anti-CD4-FITC、anti-CD8-APC 抗体孵育,用流式细胞仪 Cellquest 软件对 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$ 细胞表型比例进行分析。

1.5.2 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 细胞亚群的测定 操作步骤同上,收集细胞后使用 anti-CD3-PerCP、anti-CD56-PE 抗体进行染色,使用流式细胞仪分析 $\text{CD}3^+ \text{CD}56^+$ 细胞的比例。

1.5.3 Treg 细胞亚群的测定 在第 7、14、21 天,收集通过不同培养方式获得的 PBMC,离心,PBS 洗涤,每管加入 CD4-FITC、CD25-PE 与 CD127-APC 抗体,分别孵育单个核细胞 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次。分析流式结果时,以前向角和侧向角圈出单个核细胞群,再圈出 CD4 阳性细胞群,然后分别圈出

CD25⁺ CD127^{-/low} 细胞群, 得出两组 Treg 的比例。

1.6 CCK-8 法检测 CIK 细胞对白血病 K562 细胞的杀伤活性

将白血病诱导培养 14 d 的 CIK 组及 WAVE 组 CIK 细胞作为效应细胞, 人白血病细胞 K562 为靶细胞, CIK 以不同的效靶比为 5:1、10:1、20:1 和 40:1, 分别加入 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 对照组为单独效应细胞和单独靶细胞, 置 5% CO₂、37 °C 培养箱 48 h 后检测靶细胞被杀伤情况, 每孔加入 20 μl 的 CCK-8 液, 继续培养 4 h 后于 450 nm 处测定光密度 D 值。杀伤率 (%) = [1 - (ET - E)/(T - C)] × 100%, ET 为效应细胞作用于靶细胞, E 为效应细胞, T 为靶细胞, C 为空白。

1.7 流式细胞术检测 CIK 细胞中 CD107a 的含量

CD107a 是 T 细胞活化的重要标志, 与细胞脱颗粒作用密切相关。检测 CIK 细胞表达 CD107a 的含量, 将间接说明 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。将 2 组 CIK 细胞与 K562 细胞共培养 48 h 后, 收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次, 每管分别加入 10 μl 的 anti-CD3-FITC、anti-CD8-APC 和 anti-CD107a-PE 抗体, 室温避光孵育 30 min, 再次 PBS 洗涤后, 重悬于 0.5 ml 的 PBS 溶液中, 用流式细胞术检测 CD3⁺ CD8⁺ CD107a⁺ 的表达。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件和 GraphPad Prism 5 绘图软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

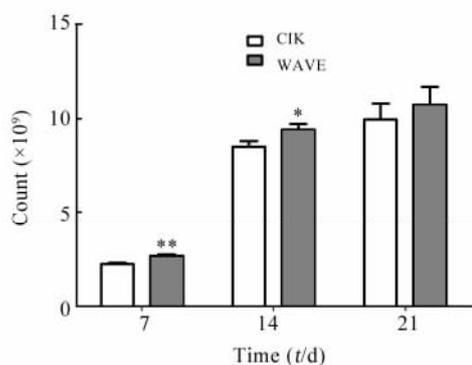
2.1 WAVE 生物反应器培养明显提高 CIK 细胞扩增数量

锥虫蓝细胞计数结果(图 1)显示, CIK 组和 WAVE 组细胞均在第 7、14 天开始大量增殖, 且随培养时间的延长而不断增殖, WAVE 组细胞扩增数较 CIK 组明显提高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.2 WAVE 生物反应器培养能提高 CD3⁺ CD8⁺ 细胞亚群比例

流式细胞术检测结果, 随着时间的推移, 两种细胞扩增方案的细胞表型变化趋势相似。在第 7、14、21 天, CIK 组与 WAVE 组 CD3⁺ CD4⁺ 细胞比例无明显差异 [(15.08 ± 2.56)% vs (16.65 ± 1.92)%、(26.78 ± 3.14)% vs (26.64 ± 2.37)%、(24.18 ± 2.39)% vs (23.36 ± 5.81)%], 均 *P* > 0.05。在第 14 天, WAVE 组 CD3⁺ CD8⁺ 细胞比例明显高于 CIK 组 [(78.56 ± 2.99)% vs (74.54 ± 3.02)%], *P* < 0.05, 在第 7、21

天差异不明显 [(20.67 ± 3.01)% vs (21.46 ± 2.76)%、(63.63 ± 6.22)% vs (62.94 ± 6.81)%], 均 *P* > 0.05。



A: U937 cell; B: K562 cell

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs CIK group;

图 1 CIK 组和 WAVE 组 CIK 细胞增殖情况

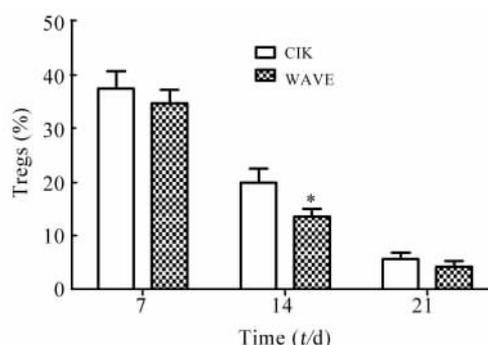
Fig. 1 Proliferation of CIK cells in CIK group and WAVE group

2.3 WAVE 生物反应器培养能提高 CD3⁺ CD56⁺ 细胞亚群比例

流式细胞术检测结果显示, 在培养的第 14 天, WAVE 组 CD3⁺ CD56⁺ 细胞亚群比例明显高于 CIK 组 [(48.33 ± 7.01)% vs (40.69 ± 6.43)%], *P* < 0.05, 而在第 7、21 天 CD3⁺ CD56⁺ 细胞亚群比例无明显差异 [(16.38 ± 6.07)% vs (14.91 ± 5.90)%、(27.75 ± 1.96)% vs (27.56 ± 2.81)%], 均 *P* > 0.05。

2.4 WAVE 生物反应器培养能降低 Treg 细胞亚群比例

流式细胞术检测结果(图 2)显示, 与 CIK 组比较, WAVE 组在第 14 天时, Treg 细胞比例显著降低 (*P* < 0.05), 而在第 7、21 天时, Treg 细胞变化不明显 (*P* > 0.05)。



* *P* < 0.05 vs CIK group

图 2 两种扩增方案 Treg 细胞亚群比例

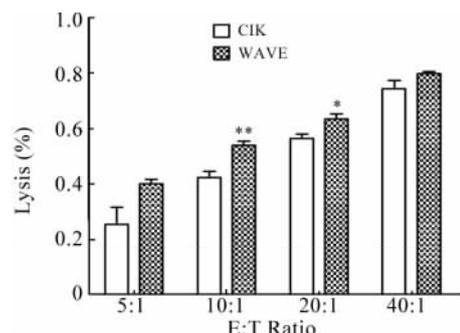
Fig. 2 Proportion of Tregs cell subsets in two groups

2.5 WAVE 生物反应器扩增能明显提高 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性

CCK-8 法检测结果(图 3)显示,两种不同 CIK 细胞扩增方法处理 14 d 后,靶比为 10:1、20:1 WAVE 组扩增的 CIK 细胞对 K562 的杀伤率明显高于 CIK 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 WAVE 生物反应器扩增的 CIK 细胞 CD3⁺CD8⁺CD107a⁺ 的比例明显升高

CD107a 是 T 细胞活化的重要标志,流式细胞检测结果(图 4)显示,与 CIK 组相比,WAVE 组中 CD3⁺CD8⁺CD107a⁺ 的表达率明显升高[(29.43 ± 4.97)% vs (25.19 ± 4.97)% , $P < 0.05$]。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CIK group

图 3 两种扩增方案的 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤活性
Fig.3 Killing effect of CIK cells against K562 cells in two groups

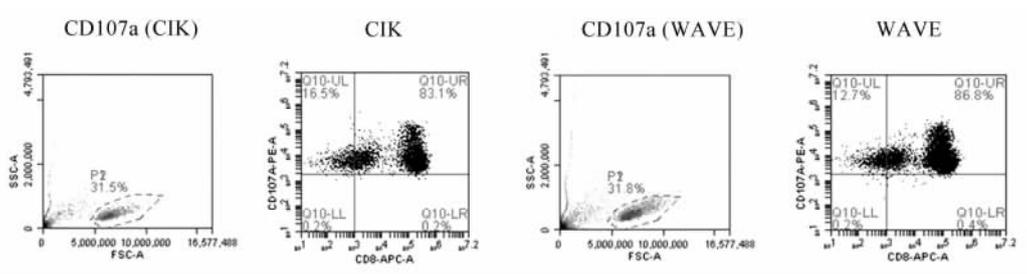


图 4 两种扩增方案 CIK 细胞中 CD107a 的比例
Fig.4 CD107a proportion in CIK cells in two groups

3 讨论

自体免疫细胞治疗技术是指从自体外周血中分离的单个核细胞经过体外激活和扩增后回输到患者体内,直接杀伤肿瘤细胞或病毒感染细胞,或调节和增强机体的免疫功能,达到治疗的目的。与传统疗法相比,细胞免疫治疗不仅可以直接杀灭肿瘤,而且能调动机体自身的免疫功能来发挥抑制肿瘤的作用,让肿瘤在其独特的肿瘤微环境中处于一种相对的平衡状态^[9-10]。回输的主要细胞类型为 CIK 细胞,CD3⁺CD56⁺ 细胞是主要的效应细胞,其中所含 CIK 细胞兼具 T 淋巴细胞的抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤等优点,在临床上具有强大的广谱抗瘤活性^[11]。

为了扩大生产,节省人工耗时,降低生产成本,提高细胞活率、功能和数量,全行业一直在寻找解决之道。新型 WAVE 生物反应器是细胞培养的理想设备^[12-14],细胞和培养液置于无菌封闭的细胞培养袋 Cellbag 中,放在特殊设计的精密摇动平台上,平台的摇动在培养液中产生波浪,提供培养物的低剪切力的充分混合和表面高效传氧,形成易于维持

1×10^7 个/ml 细胞密度的理想生长环境,改善细胞状态提高产量。

本研究比较了 WAVE 生物反应器对 CIK 细胞扩增和活化的效果,培养过程中根据细胞数目动态调节培养条件,其效应细胞可能以 CD3⁻CD56⁺ NK 细胞、CD3⁺CD56⁺ NKT 细胞、抗原特异性 CTL 细胞和 TH1 细胞为主^[15-16]。从效应细胞的表型来判断,第 14 天时 WAVE 组效应细胞以 CD3⁺CD56⁺ 细胞为主,且细胞数目明显高于 CIK 组。杀伤实验结果表明,WAVE 实验组在不同靶比条件下对 K562 细胞的杀伤效率均高于 CIK 组,证明连续灌注方式所得的 CIK 细胞有更好的抗肿瘤作用。本研究充分证明 WAVE 生物反应器可以增加 CIK 细胞增殖与活力、降低 Treg 细胞数量,并提高细胞的杀伤活性,可能是因为在培养过程中,WAVE 生物反应器对培养液、pH 值和细胞数目等的实时监控,并定期更换培养液,将培养液中的死亡细胞抽提出去,降低免疫抑制因子含量,促进抗肿瘤免疫细胞生长;同时 WAVE 生物反应器能及时调整培养液中的 pH 值,使之适合抗肿瘤免疫细胞的生长,并降低 Treg 细胞数量。但由于两种方法扩增得 CIK 细胞均为多种

淋巴细胞亚群的混合体,故暂无法确定是何种细胞亚群。

相比传统培养方式,WAVE 培养方式使细胞密度提高,培养袋数量从 5 个减少为 1 个,简化操作流程,降低劳动力成本,提高生产效率。本实验获得的结果不仅说明 WAVE 生物反应器可以节省培养和收集过程中所消耗的人力,而且还减少了抛弃型耗材的成本,对于大量生产 CIK 细胞具有极其重要的作用,最终得到 $(10.72 \pm 3.69) \times 10^9$ 个 CIK 细胞,WAVE 生物反应器避免清洗和灭菌,操作简单,可用于不同细胞的快速轮换,避免交叉污染。同时,生物反应器培养的细胞无细菌或真菌污染,内毒素含量低,完全符合回输标准,为大规模生产临床应用型 CIK 细胞提供重要技术。

[参 考 文 献]

- [1] CHIOREAN L, BARTOS A, PELAU D, et al. Neuroendocrine tumor of gallbladder with liver and retroperitoneal metastases and a good response to the chemotherapeutical treatment[J]. *J Med Ultrason*, 2015, 42(2): 271-276. DOI:10.1007/s10396-014-0585-1.
- [2] GÜL M, ISLAMOGLU N, KAYNAR M, et al. Ileo-cavernosal fistula after radiotherapy: a case report and review of the literature [J]. *Urol J*, 2015, 12(5): 2377-2378.
- [3] Palumbo G A, Scisciani C, Pediconi N, et al. IL-6 inhibits HBV transcription by targeting the epigenetic control of the nuclear ecdDNA minichromosome[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142599[2017-03-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651563/>. DOI:10.1371/journal.pone.0142599.
- [4] ROMAGNOLI G G, ZELANTE B B, TONIOLO P A, et al. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets[J/OL]. *Front Immunol*, 2015, 5:692[2017-03-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298225/>. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00692.
- [5] FALKENBURG J H, JEDEMA I. Allo-reactive T cells for the treatment of hematological malignancies[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(10): 1894-1903. DOI:10.1016/j.molonc.2015.10.014.
- [6] MIKOLA M, SETO J, AMANULLAH A. Evaluation of a novel wave bioreactor cellbag for aerobic yeast cultivation[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2007, 30(4): 231-241. DOI: 10.1007/s00449-007-0119-y.
- [7] 李惠华,姚德恒,徐剑,等. 波浪式 WAVE 生物反应器悬浮培养枇杷细胞生产熊果酸的研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(9):1693-1698.
- [8] DONIA M, LARSEN S M, MET O, et al. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating lymphocyte manufacturing with use of the wave bioreactor[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(8): 1117-1120. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.02.004.
- [9] WEBER J, ATKINS M, HWU P, et al. White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1664-1673. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2272.
- [10] STEINMAN R M, COHN Z A. Pillars article: identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. morphology, quantitation, tissue distribution [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1): 5-25. DOI:10.1084/jem.137.5.1142.
- [11] AI Y Q, CAI K, HU J H, et al. The clinical effects of dendritic cell vaccines combined with cytokine-induced killer cells intraperitoneal injected on patients with malignant ascites[J/OL]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11): 4272[2017-03-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276200/>.
- [12] SOMERVILLE R P, DEVILLIER L, PARKHURST M R, et al. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE? bioreactor[J/OL]. *J Transl Med*, 2012, 10: 69[2017-03-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3402993/>. DOI:10.1186/1479-5876-10-69.
- [13] 杨建军,隋礼丽. WAVETM 生物反应器灌注培养生产种子细胞的开发和应用[J]. *生物工程学报*, 2012, 28(3): 358-367.
- [14] PHELAN M C. Techniques for mammalian cell tissue culture[J/OL]. *Curr Protoc Cytom*, 2006, 3: 3B[2017-03-07]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142956>. DOI:10.1002/0471142956.cya03bs36.
- [15] DUNN G P, OLD L J, SCHREIBER R D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting[J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 137-148. DOI:10.1016/j.immuni.2004.07.017.
- [16] DONIA M, LARSEN S M, MTE O, et al. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating lymphocyte manufacturing with use of the wave bioreactor[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(8): 1117-1120. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.02.004.

[收稿日期] 2017 - 02 - 17

[修回日期] 2017 - 03 - 13

[本文编辑] 王映红

欢迎访问《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 www.biother.org