doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.06.002

不同培养基对流式细胞仪分选外周血 T 细胞的影响 *

夏碧丽[1] 邱趁丽[2] 马菊云[2] 靳燕玲[1] 秦 冉[1] 张晓燕[1△]

（1 上海市公共卫生临床中心生物治疗中心 上海 201508；2 上海市公共卫生临床中心科学研究部 上海 201508）

摘要 目的：通过探讨用于流式分选的 T 细胞体外扩增的无血清培养基，提高过继细胞的增殖能力和活性。**方法：**采用人外周血淋巴细胞分离管制备外周血单个核细胞，再用流式细胞分选仪从 6 例健康志愿者的外周血单个核细胞中分选 $CD3^+$T 细胞到 4 种常用的培养基中：X-VIVO 15、KBM 581、TexMACS GMP 和 10 % FBS/1640，观察并记录培养细胞的状态和体外增殖能力。于第 3 天，第 6 天和第 8 天，通过胎盼蓝染色后进行活细胞计数。于第 8 天用凋亡试剂盒检测扩增细胞的凋亡情况，并用流式细胞分析仪检测细胞的免疫表型。**结果：**X-VIVO 15、TexMACS GMP 和 10 % FBS/1640 作为流式细胞分选的接收液仅少量细胞碎片，而分选在 KBM 581 的细胞大量死亡，显著高于 X-VIVO 15 组（$P<0.05$）。X-VIVO 15 中扩增的细胞数量最多，增殖检测结果显示活细胞在 X-VIVO 15 中快速增殖且细胞凋亡率显著低于 KBM 581 和 TexMACS GMP（$P<0.05$）。4 种培养基扩增的细胞主要呈现效应记忆型。其中，X-VIVO 15 中效应记忆型 T 细胞比例显著高于 TexMACS GMP（$P<0.05$）。TexMACS 中效应细胞比例显著高于 10 % FBS/1640（$P<0.05$）。**结论：**X-VIVO 15 无血清培养基扩增流式分选的 T 细胞具有高增殖能力、细胞活性和记忆表型，适用于经流式分选后细胞的体外扩增。

关键词：流式细胞分选；人外周血 T 细胞；无血清培养基；过继性 T 细胞治疗

中图分类号：R331；Q813；R457.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2022)06-1007-06

Influence of Various Medium to Avidity and Proliferation of T Cells Sorted by FACS*

XIA Bi-li[1], QIU Chen-li[2], MA Ju-yun[2], JIN Yan-ling[1], QIN Ran[1], ZHANG Xiao-yan[1△]

(1 Department of Biotherapy Center, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai, 201508, China;

2 Department of Scientific Research, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai, 201508, China)

ABSTRACT Objective: To improve the proliferation and activity of adoptive T cell by screening serum-free media for in vitro expansion of flow sorting T cells. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells from six healthy volunteers were prepared by gradient centrifugation using peripheral blood lymphocyte separation tube. The $CD3^+$T cells from the peripheral blood mononuclear cells were then sorted by flow cytometry into four commonly Lymphocyte culture medium, including X-VIVO 15, KBM 581, TexMACS GMP serum-free media and RPMI 1640 with ten percent of fetal bovine serum complete medium. The status of the cultured cells and the proliferation ability of the cells in vitro was observed and recorded. On the 3rd, 6th and 8th days, viable cell counts were tested by trypan blue staining. On the 8th day, apoptosis was detected by the Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit. The immune phenotype of the expanded cells in vitro was detected by the flow cytometer. **Results:** A small amount of cell debris was observed when X-VIVO 15, TexMACS GMP and RPMI 1640 with ten percent of fetal bovine serum medium were used as the receiving medium for flow cytometry, while a large number of dead cells were observed in samples sorted in KBM 581 ($P<0.05$). The number of cells expanded in X-VIVO 15 medium is more than that of the other three media, and proliferation testing shows that live cells proliferate rapidly in X-VIVO 15 medium. Rate of apoptosis is significantly lower than that of KBM 581 and TexMACS GMP ($P<0.05$). The expanded cells mainly show effect memory type in the four different cultural environments. The rate of effect memory T cells in X-VIVO 15 medium was higher than that in TexMACS GMP($P<0.05$). The rate of terminal effector T cells in TexMACS GMP medium was higher than that in 10 % FBS/1640. **Conclusions:** Flow-sorted T cells show higher proliferation capacity, viability and memory phenotype in X-VIVO 15 media, suggesting that X-VIVO 15 media is suitable for in vitro expansion of cells after flow-sorting.

Key words: Fluorescence-activated cell sorting; Human T cell; Serum-free medium; Adoptive T cell therapy

Classification (CLC): R331; Q813; R457.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2022)06-1007-06

* 基金项目：国家"十三五"科技重大专项（2017ZX10202102-006）；上海市公共卫生临床中心院内项目（KY-GW-2017-03）

作者简介：夏碧丽（1990-），女，硕士，主要研究方向：肿瘤免疫学，电话：18121157172，E-mail：gongyejishu@126.com

△ 通讯作者：张晓燕，女，博士生导师，教授，主要研究方向：粘膜感染免疫学与肿瘤学相关研究，E-mail：zhangxiaoyan@shphc.Org.cn

（收稿日期：2021-08-31 接受日期：2021-09-28）

前言

近年，细胞疗法迅速发展并成为一种新的抗癌药物[1]。T 细胞疗法是所有细胞疗法中使用最广泛的方法[2]。常用流式分选（Fluorescence-activated cell sorting, FACS）从外周血分离出高纯度的 T 细胞亚群[3,4]。FACS 可同时进行多个亚群分选，及一些罕见细胞亚群研究[5]，但分选过程中需要对目标细胞所在液流通电，对目标细胞的刺激较大[6]。为恢复细胞活性，一般接收液使用含血清完全培养基[7]，而临床应用的细胞在培养过程中，应尽量避免使用血清[8]。为优化细胞培养环境，提高 T 细胞体外扩增能力，已有研究报道不同培养基对磁性分选（magnetic-activated cell sorting，MACS）或免疫密度梯度分选的 T 细胞的影响[9-12]，但国内外尚无关于用无血清细胞培养基扩增流式分选的 $CD3^+$T 细胞的相关研究。故本研究比较 X-VIVO 15、KBM 581、TexMACS GMP 和 10 % FBS/1640 培养基在体外扩增流式细胞仪分选的 $CD3^+$T 细胞，检测细胞的体外增殖能力、扩增细胞的凋亡情况和免疫表型。根据实验结果优化细胞体外培养的培养基，为过继性 T 细胞免疫治疗提供坚实的基础。推而广之，也能为其他治疗用细胞亚群的培养及研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

外周血标本取自上海市公共卫生临床中心的健康志愿者，共 6 例，30~53 岁，平均年龄 40.2 岁。磷酸盐缓冲溶液（PBS），细胞培养用抗生素 Antibiotic Antimycotic Solution，RPMI 1640 培养基和 KBM 581 淋巴细胞无血清培养基购自美国 Corning 公司；人外周血淋巴细胞分离管购自达科为生物技术有限公司；抗人 CD3-BV421、CD4-BV650、CD8-APC-H7、CD45RO-PE-Cy7、CCR7-percp-eflour710、鼠抗人 CD3 抗体（克隆号：HIT3 ）、鼠抗人 CD28 抗体（克隆号：CD28.2）、FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 购自美国 BD Biosciences 公司；eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™670、CELLection™Pan Mouse IgG Kit (Dynabeads) 和 DynaMag™-15 磁铁购自购自美国 Invitrogen 公司；X-VIVO 15 无血清培养基购自美国 Lonza Bioscience 公司；TexMACS™GMP Medium 购自德国 Miltenyi 公司；Recombinant Human IL-2 GMP Protein、Recombinant Human IL-7 GMP Protein 和 Recombinant Human IL-15 GMP Protein 购自美国 R&D systems 公司；胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司；台盼蓝购自上海碧云天生物技术有限公司。流式分选仪（FACSAria II）和流式检测仪（LSRFortessa）购自美国 BD 公司；光学显微镜购自日本尼康仪器公司；离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；细胞拍照显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 人外周血单个核细胞（PBMC）的制备 从健康志愿者肘静脉丛采血，每人肝素锂抗凝管 10 mL 管采集 5 管，共约 40 mL。取 2 支人外周血淋巴细胞分离管 800× g 室温离心 1 min。倒入血液，升速度 3，降速度 3，800× g 室温离心 15 min。平稳取出离心管，吸取中间的白膜层到新的 50 mL 离心管中，加入 35 mL PBS，充分混匀，800× g 室温离心 6 min，吸弃上清。沉淀用 50 mL PBS 重悬，取 10 μL 细胞计数，200× g 离心 10 min 去除血小板。多余细胞用含 10% DMSO 的胎牛血清冻存，浓度为 1×10^7/mL。

1.2.2 细胞增殖检测 用 200 μL PBS 重悬 3×10^7 个 PBMC，加入抗人 CD3 抗体 15 μL，室温避光孵育 5 min，补加 800μL PBS。细胞增殖使用 eBioscience™ Cell Proliferation Dye eFluor™670 标记细胞。首先用无水的 DMSO 将染料干粉溶解为 5 mM 的储备液，用 1 mL PBS 稀释 2 μL 储备液，使其工作浓度为 10 μM。在混匀细胞的同时，加入等体积的准备好染色工作液。37 ℃避光孵育 10 min，通过添加 5 倍体积冷的含有 10 % 血清的 1640 完全培养基并在冰上孵育 5 分钟停止标记，再用完全培养基洗三遍。最后用 2 mL PBS 重悬，70 μm 滤网过滤后流式上机分选。分选结束后每天收集细胞用流式细胞仪检测。

1.2.3 流式细胞分选和 $CD3^+$T 细胞培养 机器清洗流程结束后，用 Accudrop beads 调节延迟时间。通过 Rainbow beads 进行仪器质控，确保仪器状态正常。选择需要分选的模式 96 well plate，调整电压和位置使液流刚好落在培养基液面上。准备 96 U 孔板，加入 4 种培养基：X-VIVO 15 无血清培养基、KBM 581 淋巴细胞无血清培养基、TexMACS™ GMP 无血清培养基和含 10 % 胎牛血清的 1640 培养基，每孔 100 μL 做为分选的接收液。流式设门选择 $CD3^+$T 细胞群分选到含细胞培养基的 96 U 孔板内，每孔 2×10^4 个细胞，三个复孔。分选结束后，细胞放置在 37 ℃，5 % CO_2 培养箱静置 1 h，弃 100 μL 上清，加入新的培养基换液，共 200 μL，并按数量比 1:1 加入 CD3/CD28 beads，体外扩增到第 8 天。4 种细胞培养基中均加入如下细胞因子：重组人 IL-2（100 IU/mL）、IL-7（25 ng/mL）、IL-15（10 ng/mL）[13]。

1.2.4 细胞形态观察和细胞计数 每天使用倒置显微镜观察细胞形态；收集培养至第 3 天、第 6 天和第 8 天的细胞，细胞悬液与 0.4%的台盼蓝染色液按 9:1 体积比混匀，加入计数板内。在显微镜下观察未染色细胞数量，3 min 内完成计数。

1.2.5 细胞凋亡检测 用 DynaMag™-15 磁铁去除磁珠，500× g 离心 5 min，弃上清，收集培养 8 天的细胞；冷 PBS 洗涤一遍；将细胞重悬于 100 μL 的 1× Bing Buffer；加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 的 PI，避光室温孵育 15 min；补加 100 μL 的 1× Binding Buffer，立刻上机检测。

1.2.6 $CD3^+$T 细胞培养产物亚群分析 收集培养 8 天的 T 细胞扩增产物，用 2 % FBS/PBS 重悬，加入相应抗体标记以区分不同的 T 细胞亚群，CD4 细胞：$CD3^+CD4^+$；CD8 细胞 $CD3^+CD8^+$；初始 T 细胞（naive T cell）：$CD3^+CD45RO^-CCR7^+$；中央记忆型 T 细胞（Central Memory T cell）：$CD3^+CD45RO^+CCR7^+$；效应记忆型 T 细胞（Effective Memory T Cell）：$CD3^+CD45RO^+CCR7^-$；效应 T 细胞（Terminal effector T cells）：$CD3^+CD45RO^-CCR7^-$。4℃避光孵育 20 min，用 PBS 洗后 200 μL PBS 重悬，流式细胞检测。

1.3 统计学分析

采用 FlowJo 10.7.1 软件处理流式数据，采用 Graphpad prism 8.2.1 软件进行统计分析。数据用均数± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，应用单因素方差分析进行均数差异比较。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术分选高纯度的 CD3⁺T 细胞

通过 FSC-W/FSC-H 和 SSC-W/SSC-H 去除黏连的细胞，再选择状态好的核心细胞。分选后 CD3⁺ 细胞比例可达 99%以上，获得高纯度 T 细胞并用 Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 有效标记细胞。见图 1。

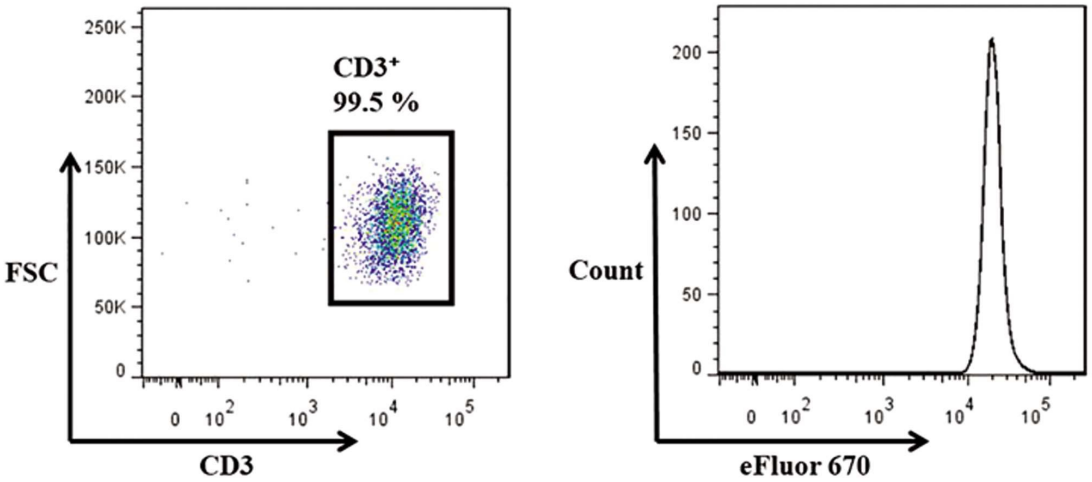

图 1 流式分选后细胞纯度检测

Fig.1 Cell purity detection after flow sorting

2.2 分选在 KBM 581 培养基中的细胞出现大量死亡

分选的细胞逐渐聚集在 96 U 孔板底部，于分选后 4 h，10 % FBS/1640 组中几乎所有的细胞都聚集在底部，其次为 TexMACS GMP 培养基和 X-VIVO 15 培养基。次日，细胞除了在 KBM 581 培养基中呈弥散状态，少见完整单独的细胞，其余可见细胞与 CD3/CD28 beads 混合聚集在底部。第 3 天，X-VIVO 15 和 10 % FBS/1640 组中可见刺激变大的细胞团，而 TexMACS GMP 培养基中 beads 覆盖细胞，细胞团较第 1 天稍大。第 6 天，在 24 孔板内 X-VIVO 15 和 10 % FBS/1640 组可见大量细胞团簇，96 U 孔板内 TexMACS GMP 组中细胞增多变大，而在 KBM 581 培养基中部分细胞聚集在底部，较多细胞碎片弥散在孔内。第 8 天，除 KBM 581 培养基外，其余培养基内细胞折光性好，形态规则，在视野中可见大量细胞团簇。流式检测分选后静置 24 小时的细胞，结果显示 KBM 581 培养基中含90 %左右的细胞碎片，显著高于 X-VIVO 15 组（$P<0.05$）。见图 2。

2.3 用 X-VIVO 15 培养基扩增的细胞具有高增殖能力和活性

T 细胞在 4 种培养基中在 CD3/CD28 beads 和相关细胞因子刺激下，扩增能力相差较大，X-VIVO 15 组中的细胞增殖最快。在第 3 天，X-VIVO 15 和 10 % FBS/1640 培养基中细胞数量相近，约 5.5×10^4，而 KBM 581 组细胞数量少于起始细胞数。第 6 天，X-VIVO 15 组中细胞数量超过 10 % FBS/1640 组，达到 $8.6\pm 1.7\times 10^5$。第 8 天，10 % FBS/1640 组细胞增殖变缓，而 3 种无血清培养基中的细胞仍呈对数增长（图 3-A）。为了更直观的对比细胞扩增速率，用 eFluor 670 标记初始细胞，并在培养后每天收集细胞，流式上机检测。X-VIVO-15 和 10 % FBS/1640 组细胞在第 2 天时已可见分裂峰。在第 3 天可见 KBM 581 组中活细胞的增殖速率与 X-VIVO 15 组相近。第 4 天，X-VIVO 15 和 KBM 581 组大部分细胞增殖到可检测最高代次数，TexMACS GMP 组的增殖速率超过 10 % FBS/1640 组。第 5 天，仅 10 % FBS/1640 可检测到低代数细胞。细胞培养至第 8 天时，在不同培养基中的细胞凋亡情况显著不同，X-VIVO 15 与 10 % FBS/1640 培养基组凋亡细胞数量较少，分别为 10.7± 1.2 % 和 7.8± 3.2 %，两组间无显著差异（$P>0.05$）。X-VIVO 15 组凋亡细胞显著少于 KBM 581 和 TexMACS GMP 组（$P<0.05$）。KBM 581 组的凋亡细胞数最多，达到 34.7± 6.9 %，其次为 TexMACS GMP 组，17.2± 2.1%（图 3-C）。

2.4 TexMACS GMP 培养基促进 T 细胞的效应表型

不同培养基中的细胞扩增产物中 CD4 细胞和 CD8 细胞的组成无显著差异。该培养体系下，细胞扩增产物中以效应记忆型 T 细胞为主。在不同培养基中，初始 T 细胞和效应记忆型 T 细胞的组成不同。10 % FBS/1640 组（90.0± 6.3 %）的效应记忆型 T 细胞高于三种无血清组（$P<0.05$），而只有极少量的初始 T 细胞（0.2± 0.3 %）。TexMACS GMP 组的初始 T 细胞（4.8± 3.2 %）高于 X-VIVO 15（$P<0.05$），效应 T 细胞（37.0± 16.2 %）显著高于 10 % FBS/1640 组（$P<0.05$），而效应记忆型 T 细胞占比最低（48.1± 5.4 %）。见图 4。

3 讨论

相比温和的 MACS，FACS 可识别细胞大小和颗粒度、选出需要多标记识别和低表达群细胞并获得高纯度的细胞[5,14,15]。在分选低表达群细胞或者单细胞测序时会先用 MACS 富集细胞，再用 FACS 精准分离细胞[16]。常用 X-VIVO 15、KBM 581 和 TexMACS GMP 无血清培养基扩增 T 淋巴细胞进行研究[17,18]。尽管无血清培养基对分选细胞的缓冲不如 10 % FBS/1640，但后期细胞能恢复较快的增殖，而 KBM 581 培养基对细胞的缓冲能力较差，大量细胞凋亡，到第 8 天细胞数量远低于其他培养基。我们在 KBM 581 培养基中分别加入 10 %、5 %、2 %和 1 %的 FBS，发现分选后细胞静置 4 h 时含 10 %和5% FBS 组，与 10 % FBS/1640 培养基组类似，可见形态完整的细胞聚集在

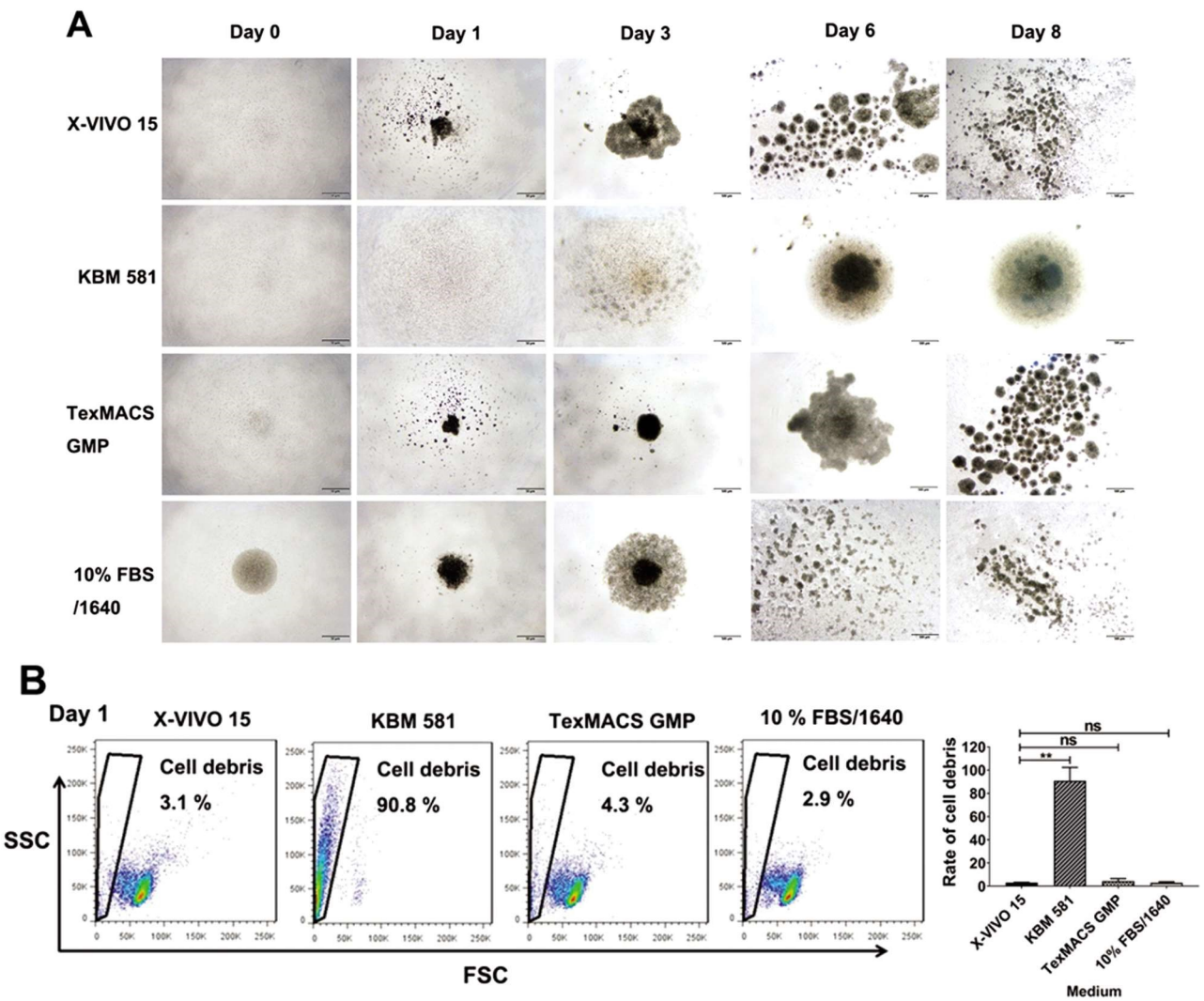

图 2 细胞在不同培养基中以及不同培养时间的状态

Fig. 2 Cell growth at different time points in different media after sorting

A) T 细胞在不同培养基以及不同时间的形态;B)流式检测分选一天后的细胞碎片

A) Morphology of in vitro human T cells in different culture media over time. B) Cell debris of in vitro human T cells in different culture media on day 1. Data were expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=6. Significant differences are denoted with an "**" above each column and represent $P<0.01$. ns, no significance.

平板底部,后期呈现高扩增能力(结果未显示)。KBM 581 培养基更适合用于未经流式分选的 T 细胞体外扩增。为增加分选后细胞的存活率,后期可继续探究改善培养基添加物成分,优化血清替代物成分或者比例。另外,或许可用含自体血清的培养基作为分选接收液,后期大规模扩增用无血清培养基,从而提高细胞存活率和增殖能力,也避免引入其他来源的血清,降低生物污染。

保证过继 T 细胞免疫疗法疗效需有足够数量和活性的有效 T 细胞。细胞在不同培养基中的增殖能力、培养产物的活性和功能亚群的组成各不相同。在我们研究的三种无血清淋巴细胞培养基中,X-VIVO 15 是流式分选的 $CD3^+$T 细胞体外增殖的最佳选择,细胞的增殖能力优于含血清培养基。尽管 TexMACS GMP 作为接收液,可能初始细胞恢复的较慢,经刺激分化为记忆细胞较少,增加初始 T 细胞比例,但相对记忆细胞,初始细胞在总细胞中的占比很低。而细胞寿命短的效应细胞的比例高达 30 %以上,早期研究结果亦显示 TexMACS GMP 培养基促进 T 细胞的效应表型,降低过继细胞的疗效[12]。去除分选接受液的影响,活细胞在三种无血清培养基的增殖能力均显著高于含血清组,这与先前的研究类似[10]。无血清培养基促进细胞增殖地作用可能与添加到培养基中的特定成分有关,这也使无血清培养基更安全可广泛用于免疫细胞扩增。有研究表明在无血清培养基内添加 5 %人血清可获得更高的扩增能力[9,12],说明血清替代物的成分还需继续优化。

培养基是细胞体外有效扩增的基础,我们通过流式细胞分选可获得高纯度的 $CD3^+$T 细胞,优化细胞分选和细胞体外扩增培养的培养基,提高细胞增殖能力和细胞活性,为后续流式细胞分选 T 细胞相关亚群的细胞培养和干细胞治疗制品的制备及研究提供参考[19-25]。

参 考 文 献(References)

[1] Yu JX, Upadhaya S, Tatake R, et al. Cancer cell therapies: the clinical trial landscape [J]. Nature reviews Drug discovery, 2020, 19 (9): 583-584

[2] Weber EW, Maus MV, Mackall CL. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies[J]. Cell, 2020, 181(1): 46-62

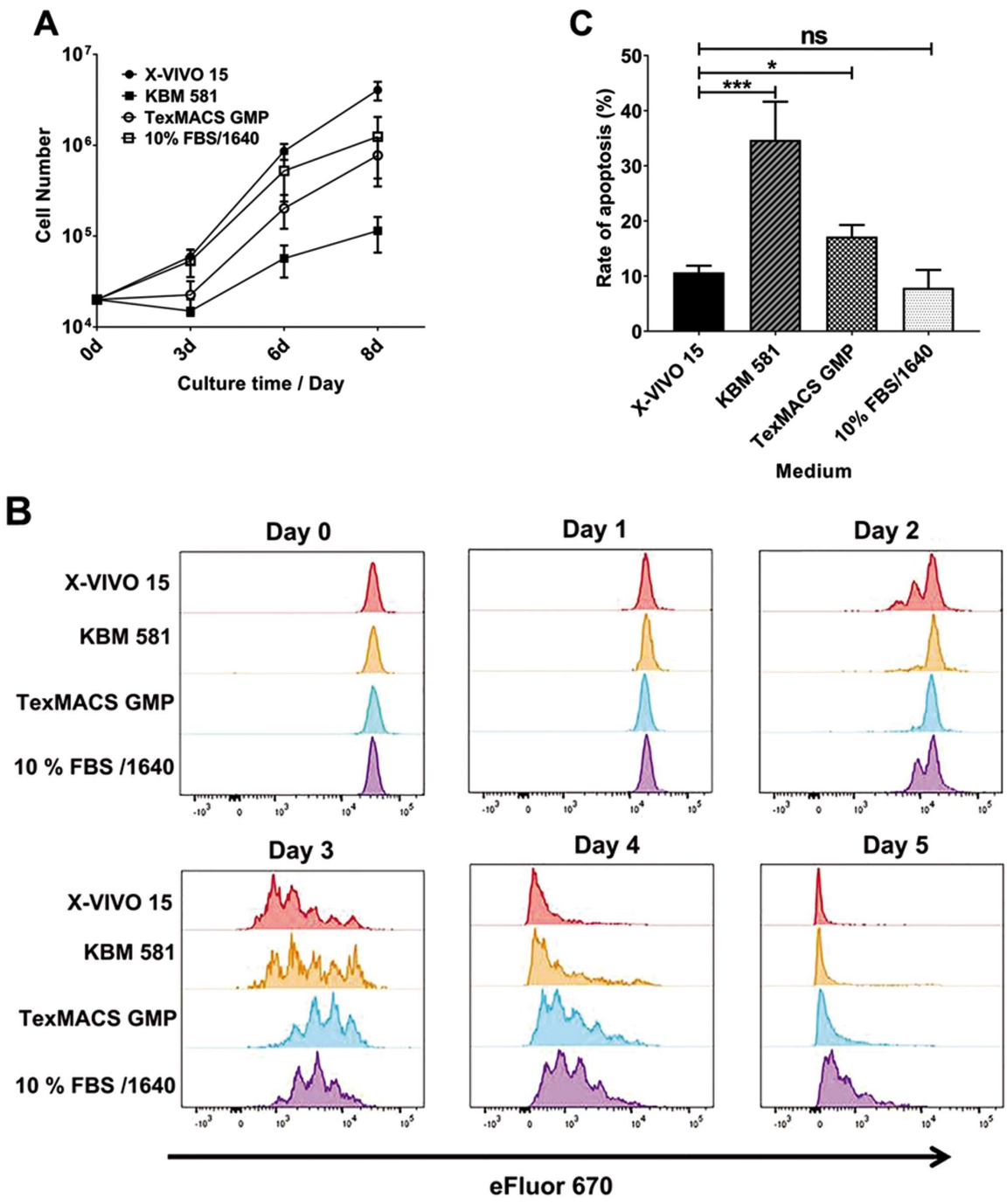

图 3 细胞在各组培养基体外扩增情况的比较

Fig. 3 Expansion of human T cells in vitro in different culture media over time

A)流式分选的 T 细胞在不同培养基的生长曲线;B)eFluor 670 检测 T 细胞在不同培养基中的增殖能力;C)不同培养基中 T 细胞凋亡的比较

A) The numbers of human T cells in the 4 media from day 0 to day 8. B) Proliferation of human T cell in vitro was assessed by eFluor 670 in different culture media over time. C) Apoptosis of human T cells was detected in the 4 medium after cell expansion day 8. Data were expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=6. Significant differences are denoted with an "*" or "***" above each column and represent $P<0.05$ or $P<0.001$. ns, no significance.

[3] Baron CS, Barve A, Muraro MJ, et al. Cell Type Purification by Single-Cell Transcriptome-Trained Sorting [J]. Cell, 2019, 179 (2): 527-542

[4] O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis [J]. Immune network, 2013, 13(2): 43-54

[5] Bacon K, Lavoie A, Rao BM, et al. Past, Present, and Future of Affinity-based Cell Separation Technologies [J]. Acta biomaterialia, 2020, 112: 29-51

[6] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications [J]. Critical reviews in biotechnology, 2017, 37(2): 163-176

[7] 刘洋,王丽婷,刘芳,等. 流式细胞分选优化经验浅谈 [J]. 科学咨询, 2018, (01): 55-56

[8] 马洁,刘彩霞,谭琴,等. 细胞产品质量控制与质量管理 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(02): 273-292

[9] Lu TL, Pugach O, Somerville R, et al. A Rapid Cell Expansion Process for Production of Engineered Autologous CAR-T Cell Therapies [J].

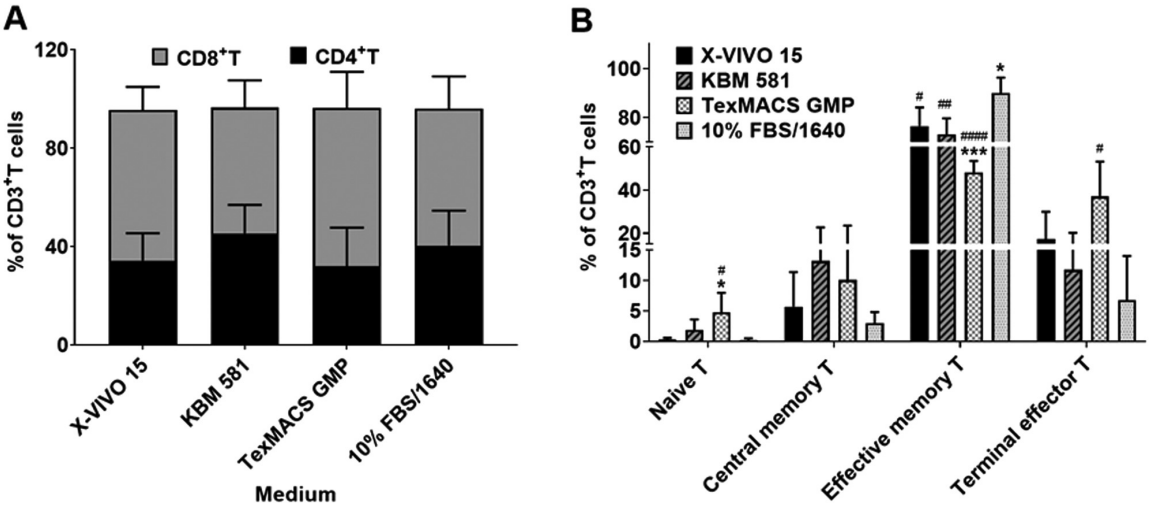

图 4 细胞在不同培养基的亚群组成

Fig. 4 Subgroup composition of T cell culture products from human peripheral blood in each group

A)不同培养基中 CD4 和 CD8 细胞的组成;B)不同培养基中细胞的免疫表型

A) Proportions of CD4+T and CD8+T cells are shown on day 8. B) Different phenotype combinations of CD3 on day 8. Compared with the X-VIVO 15 group, *; Compared with the 10 % FBS/1640 group, #. Data were expressed as $\bar{x}\pm$ SD, n=6. Significant differences are denoted with an "*" or "#"representing $P<0.05$, "##" representing $P<0.01$, "***" representing $P<0.001$, "####"representing $P<0.0001$. No logo means no significant difference.

Human gene therapy methods, 2016, 27(6): 209-218

[10] Xu H, Wang N, Cao W, et al. Influence of various medium environment to in vitro human T cell culture [J]. In vitro cellular & developmental biology Animal, 2018, 54(8): 559-566

[11] Medvec AR, Ecker C, Kong H, et al. Improved Expansion and In Vivo Function of Patient T Cells by a Serum-free Medium[J]. Molecular therapy Methods & clinical development, 2018, 8: 65-74

[12] Alnabhan R, Gaballa A, Mork LM, et al. Media evaluation for production and expansion of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells [J]. Cytotherapy, 2018, 20(7): 941-951

[13] Singh N, Perazzelli J, Grupp SA, et al. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies[J]. Science translational medicine, 2016, 8(320): ra323

[14] Pan J, Wan J. Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain [J]. Journal of immunological methods, 2020, 486: 112834

[15] Frauchiger DA, Tekari A, May RD, et al. Fluorescence-Activated Cell Sorting Is More Potent to Fish Intervertebral Disk Progenitor Cells Than Magnetic and Beads-Based Methods [J]. Tissue engineering Part C, Methods, 2019, 25(10): 571-580

[16] Wang D, Liu F, Zhu L, et al. FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages [J]. Journal of Neuroinflammation, 2020, 17(1): 257-284

[17] Velaga S, Alter C, Dringenberg U, et al. Clinical-grade regulatory T cells: Comparative analysis of large-scale expansion conditions [J]. Experimental hematology, 2017, 45: 27-35

[18] Wang X. Human T cells expansion using serum-free medium[J]. Cytotherapy, 2019, 21(5): S34

[19] Talebi M, Nozad Charoudeh H, Movassaghpour Akbari AA, et al. Acellular Wharton's Jelly, Potentials in T-Cell Subtypes Differentiation, Activation and Proliferation [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2020, 10(4): 617-622

[20] Flippe L, Bézie S, Anegon I, et al. Future prospects for CD8(+) regulatory T cells in immune tolerance [J]. Immunological reviews, 2019, 292(1): 209-224

[21] Gupta S, Su H, Agrawal S. CD8 Treg Cells Inhibit B-Cell Proliferation and Immunoglobulin Production [J]. International archives of allergy and immunology, 2020, 181(12): 947-955

[22] Fallarini S, Paoletti T, Orsi Battaglini N, et al. Invariant NKT cells increase drug-induced osteosarcoma cell death [J]. British journal of pharmacology, 2012, 167(7): 1533-1549

[23] Takeda A, Hollmén M, Dermadi D, et al. Single-Cell Survey of Human Lymphatics Unveils Marked Endothelial Cell Heterogeneity and Mechanisms of Homing for Neutrophils [J]. Immunity, 2019, 51(3): 561-572

[24] Satpathy AT, Granja JM, Yost KE, et al. Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 925-936

[25] Deng CC, Liang Y, Wu MS, et al. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2013, 45(9): 1997-2006