

免疫组库测序技术在细胞质量控制中的最新进展

段晓宇

湖南工业大学生命科学与化学学院, 湖南省株洲市, 412007;

摘要: 细胞治疗作为一种革命性的医学技术, 已在血液肿瘤、自身免疫疾病、慢性感染等领域展现出巨大的临床应用潜力。然而, 细胞治疗产品的质量控制仍面临诸多挑战, 如细胞表型稳定性、功能一致性、免疫原性评估等。近年来, 免疫组库测序 (Immune Repertoire Sequencing, IRS) 作为一种高通量、精确的分子测序技术, 在细胞质量控制 (Cell Quality Control, CQC) 中发挥着越来越重要的作用。本文综述了免疫组库测序技术的基本原理、关键技术、在细胞治疗质量控制中的应用进展, 并探讨其在优化细胞治疗安全性、疗效预测、个性化治疗设计等方面的前景与挑战。

关键词: 免疫组库测序技术; 细胞治疗; 质量控制

DOI: 10.69979/3029-2808.25.03.041

1 引言 (Introduction)

1.1 细胞治疗的现状与挑战

细胞治疗 (Cell Therapy) 是一种利用活细胞作为治疗手段的医学技术, 广泛应用于血液肿瘤 (如 CAR-T 疗法)、自身免疫疾病^[1] (如 Treg 细胞疗法)、组织再生 (如干细胞治疗) 等领域。然而, 细胞产品的质量控制 (QC) 成为临床转化的核心问题, 涉及细胞纯度、活性、表型稳定性、遗传安全性等多个维度。此外, 细胞的免疫原性可能导致一系列不良免疫反应, 其中包括细胞因子释放综合征 (CRS) 和 “On-target, Off-tumor” 效应^[2]。

尽管细胞疗法在疾病治疗领域取得了显著进展, 并展现出巨大的临床应用潜力, 但其商业化进程仍面临诸多挑战。直到 FDA 批准 CAR-T 疗法前后近十年的时间里, 其他细胞疗法的商业化进程才开始显著加速^[3]。其中治疗多发性骨髓瘤的 CAR-T 产品、针对白血病和淋巴瘤的其他细胞疗法也相继进入市场^[4], 并展现出良好的应用前景。同时, 受到研究者青睐的自然杀伤 (NK) 细胞疗法在坚持不懈的努力研究中取得了突破性进展^[5], 并希望获得医疗质控监管机构的准批。细胞治疗进程加速以来, 细胞疗法在不同疾病领域都取得了重大突破, 包括心血管疾病、中枢神经系统 (CNS)、神经退行性疾病、自身免疫性疾病, 以及各类罕见病^[6]。然而, 细胞疗法可能引发一系列免疫相关不良事件 (irAEs), 其中尤为重要是细胞因子释放综合征 (CRS)^[7]。CRS 是一种严重且可能致命的全身炎症失控反应, 其潜在机

制涉及 B 细胞的异常激活和 Th17 细胞促炎活性的增强, 导致免疫系统紊乱、效应细胞过度活化及大量细胞因子的释放, 进而引发强烈的免疫应答和组织损伤^[8]。因此, 如何在细胞治疗过程中有效管理 CRS 及其他 irAEs, 是临床应用中的重要挑战。虽然 CRS 发生率不是很高, 但 CRS 容易被误诊, 且一旦发生就很有可能危及生命, 所以需要 CRS 进行精准排查。通过免疫组库测序技术能够很好的评估细胞的功能和异质性, 为细胞类型鉴定、细胞状态追踪提供精确诊断, 在细胞质量控制中使用免疫组库测序技术会大大地减少了 irAE 和细胞增殖失控的风险, 提高细胞疗法的安全性和有效性^[7-8]。因此, 开发精准高效的细胞质量检测方法用于评估细胞疗法的安全性和有效性是细胞疗法的重要趋势, 也是众多细胞产品进入市场的先行条件, 因此细胞治疗的安全性评估尤为关键

1.2 免疫组库测序技术概述 (Immune Repertoire Sequencing Technologies)

免疫系统是维持机体健康的重要防御系统, 主要包括先天免疫和适应性免疫。其中, 适应性免疫依赖 T 细胞和 B 细胞识别抗原, 并通过高度特异性的 TCR 和 BCR 介导免疫应答^[9]。由于外界抗原的多样性和突变性, 机体需要一个极其丰富的免疫受体库, 以确保能够识别并清除几乎所有可能的病原体。免疫组库指的是个体体内所有 TCR 和 BCR 的总和, 其多样性是免疫系统功能的重要决定因素^[10]。理解免疫组库的生物学基础对于免疫学研究、疾病诊断和免疫治疗具有重要意义。

1.2.1 免疫组库的生物学基础

免疫组库 (Immune Repertoire) 是机体适应性免疫系统的重要组成部分,由高度多样化的 T 细胞受体 (TCR) 和 B 细胞受体 (BCR) 组成^[10],能够识别并应对病原体、肿瘤细胞及其他外来抗原。免疫组库的形成依赖于 V(D)J 重排、体细胞超突变和克隆扩增等生物学机制,使得每个人的 TCR/BCR 库具有高度个体化的特征。

人体免疫系统通过 V(D)J 重排、体细胞超突变、克隆扩增等机制形成高度多样化的 TCR 和 BCR 库,从而识别和清除病原体或肿瘤细胞^[10-11]。不同个体的 TCR/BCR 库存在显著差异,因此免疫组库测序可用于评估个体免疫状态、预测免疫反应、监测治疗效果等。免疫组库的个体化特征决定了其在免疫应答、疾病诊断和免疫治疗中的广泛应用,随着高通量测序技术的发展,免疫组库测序已成为精准医学的重要工具,为个体化免疫评估和疾病治疗提供了新的思路^[10]。

1.2.2 免疫组库测序的优势

免疫组库测序 (IRS) 通过高通量测序 (NGS) 技术对 T 细胞受体 (TCR) 和 B 细胞受体 (BCR) 进行序列分析,揭示免疫细胞的多样性、克隆扩增情况、抗原特异性等特征^[11]。相比传统流式细胞术 (FACS)、ELISA 等方法,免疫组库测序具有更高灵敏度、更全面的信息捕获能力、可定量分析免疫细胞群体变化等优势,为细胞治疗的质量控制提供了更强有力的工具。这一技术可用于全面评估个体的免疫状态,并揭示疾病发生与 T、B 细胞克隆构成及变化之间的关联性。免疫组库测序技术强大的信息通量可大大提高抗原特异性 TCR 和 BCR 鉴别的效率和准确性,可以全面评估机体的免疫状态^[10]。

为了更好地了解细胞疗法的适用条件和治疗状况,免疫组库测序技术已被应用于人类疾病研究。科学家们已经可以使用免疫组库进行细胞分辨率与多样性分析,识别抗体或细胞受体 (BCR 或 TCR) 的亚型和亚群,实时监控免疫系统中个体细胞的多样性和动态变化^[11],在细胞产品质量控制方面,取得了飞跃进展。通过收集细胞治疗前后的免疫受体库数据,可以诊断疾病,评估机体免疫系统的健康状况,预测免疫治疗的效果和愈后复发情况。免疫组库 (Immune Repertoire, IR) 的变化会使人体的体液免疫和细胞免疫产生特异性应答^[12],通过免疫细胞对体液中的抗原进行特异性识别并结合抗原,

激活效应 T 细胞的免疫功能,最终清除侵入人体的病原体或体内突变的肿瘤细胞。本文就近年来免疫组库测序技术在细胞疗法中的应用进展作一综述。

2 细胞质量控制的传统技术

2.1 细胞形态学观察

细胞形态学检验是一门传统的细胞质量检测技术,方便快捷,实用性强。细胞形态是细胞培养好坏最直观的依据,定期监测培养细胞的形态 (包括其形状和外观) 对于确保细胞培养实验的成功至关重要^[13]。除了评估细胞的健康状况外,每次操作细胞时,结合肉眼观察和显微镜检查,可及时识别潜在污染风险,并在其扩散至实验室其他培养体系之前加以控制^[13]。然而,由于该方法技术单一,仅能观察细胞表面结构,并且镜检结果在很大程度上依赖操作者的主观判断,导致细胞形态学分析的准确性和稳定性较低,影响其在细胞质量控制中的可靠性和细胞形态学的临床诊断价值。目前有很多血细胞形态学相关技术包括光镜高分辨检测技术、荧光检测技术、流式细胞成像技术以及人工智能辅助诊断技术等已经进入研究阶段或临床应用,为血细胞形态学的研究和拓展提供了广阔的前景。

2.2 细胞活性与增殖能力的评估

细胞活性 (Cell Viability) 是评估细胞培养过程中至关重要的检测参数,是构成细胞培养、细胞毒性评估及生理学研究的基础,它被定义为样品中健康活细胞的数量占总细胞的百分比^[14]。最常用于细胞活力检测的是活体染料,如四甲基偶氮唑盐 (MTT) 微量酶反应比色法及某些细胞活力检测试剂盒都常用于细胞存活率的测定。然而,这些方法均属于终点检测技术,在实验过程中会对细胞造成不可逆的损伤。

细胞增殖是指细胞分裂引起的细胞数量增加,检测活跃细胞数量的最直接方法是活细胞计数法。目前,增殖标志物组织化学染色法和核苷酸类似物 DNA 标记法这两类特异性检测法,可用于细胞增殖能力检测^[14]。然而,这些检测技术均存在一定局限性:首先它们仅能捕捉某一时间点的细胞增殖情况,而无法反映整个时间段内的动态变化,类似于静态摄影,难以有效检测增殖缓慢的细胞 (如心肌细胞、神经元等);其次所有增殖细胞都会被无差别检测,可能引入非目标细胞的增殖信号干扰,导致信噪比低、分辨率受限。

2.3 细胞表面标志物的流式细胞术检测

流式细胞术是一种功能强大的检测技术,它能够提供细胞特性的快速、定量和准确测定,并为理解细胞群异质性提供了一种有效手段^[15]。它利用激光束照射通过检测点的细胞,细胞表面结合的荧光标记抗体会发出特定波长的荧光信号。通过测量这些荧光信号的强度,可以对细胞表面标志物进行定量分析。通过流式细胞术,研究人员可以在单细胞水平上获得关于细胞表面标志物表达的详细信息^[15]。

大多数免疫细胞均有特定的分化簇标志物(CD),可将这些细胞定义为不同的细胞群。细胞标志物又称为谱系标志物,用于定义特定的细胞群,以便在每个免疫表型分析实验中进行额外分析^[14]。除了定义免疫细胞群的谱系标志物外,还使用其他标志物来表征每个细胞群,例如活化标志物(CD69, CD25 和 CD62L)。

免疫表型分析可利用流式细胞术的独特功能,通过判断多种细胞标志物的有无来同时分析混合的免疫细胞群。除了细胞群和亚群的表征之外,免疫表型分析还可以鉴定细胞分化的状态并量化与特定细胞功能相关的表面或细胞内分子。同时流式细胞术还可用于细胞周期分析、细胞凋亡检测、细胞功能分析等多种生物学研究。

2.4 微生物污染和无菌检测的标准方法

微生物污染是细胞培养中最常见和危害最严重的问题,在体外细胞培养环境中,细菌、真菌等微生物非常容易生长,其污染可能导致细胞死亡、增殖减慢、功能改变、产量降低和毒素污染等后果,严重影响细胞培养质量和细胞产品的安全^[16]。

传统微生物污染和无菌检测包括琼脂平板培养法、显微镜镜检法、微生物测试片检测技术、薄膜过滤法、ATP 生物荧光法等,但这些技术通常耗时较长,需要专业的操作技能,且操作复杂需要大量耗材,这些因素在很大程度上限制了传统无菌检测检测方法在临床上的应用。

3 免疫组库测序技术在细胞质量控制中的创新

3.1 细胞质量评估

在快速发展的细胞疗法中,确保治疗细胞的质量和一致性对于实现最佳治疗结果至关重要。用于细胞质量评估的传统测定通常提供有限的信息,依赖于可能忽略

细胞异质性和细微表型变化的大量测量。为了应对这些挑战,免疫组库测序技术等新兴技术因其能够提供对细胞组成、表型和功能的全面分辨的能力而受到关注。

IR-SEQ 技术通过对治疗细胞中的 B 细胞和 T 细胞受体进行测序,可以提供关于这些免疫细胞的数量、多样性和分布情况的详细信息^[10]。通过分析免疫组库,可以确定细胞治疗产品中的免疫细胞的多样性和克隆性,以及免疫反应的特征,从而评估治疗细胞的免疫活性和潜在的治疗效果^[11]。这有助于确定细胞治疗产品是否具有足够的免疫活性和功能,以及是否符合质量标准。

3.2 免疫组库在肿瘤方面的应用

随着肿瘤免疫疗法的兴起,免疫系统在肿瘤研究中的作用受到了极大的关注。免疫系统的一些组分或其变化,已被用于肿瘤预后或预测肿瘤免疫治疗的疗效。例如,肿瘤浸润淋巴细胞的存在被证明与一些癌症的良好预后直接相关^[17]。然而,尽管一些患者尽管存在高丰度的肿瘤浸润性淋巴细胞,但并不能保证有良好的疗效。肿瘤细胞具有免疫原性,能够诱导 T 淋巴细胞浸润至肿瘤组织内,形成浸润淋巴细胞(Tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)。多项研究表明,TIL 在肿瘤组织中的存在及数量与患者的生存期密切相关^[17],因此,TIL 可能作为一种潜在的肿瘤预后生物标志物。目前,免疫组库测序技术已被广泛应用于多种肿瘤类型的 TIL 研究,如结直肠癌、卵巢癌、肝癌和黑色素瘤。此外,该技术能够捕捉肿瘤发生和进展过程中免疫微环境的动态变化,并识别免疫治疗的潜在靶点,从而助力精准免疫治疗,提高抗肿瘤疗效。

因此,TCR 库被认为是一种有前景的生物标志物,对 TCR 库的研究有助于表征肿瘤细胞与宿主适应性免疫系统的相互作用,指导如何利用现有或新的治疗方法有效地调节免疫反应,以及如何更好地预测肿瘤预后。IR-SEQ 技术可用于鉴定和分析抗原特异性的 T 细胞克隆。通过测序分析,可以确定在特定抗原刺激下扩增的 T 细胞克隆,从而识别并研究参与抗原特异性免疫应答的 T 细胞群体^[10]。这有助于深入了解抗原特异性免疫应答的机制,以及相关疾病或疫苗接种的免疫保护机制。在癌症治疗中,IR-Seq 技术用于识别和分析肿瘤特异性 T 细胞受体(TCRs),这些 TCRs 能够特异性识别并攻击肿瘤细胞。通过分析肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)的 TCR 序列,研究者可以监测和评估免疫治疗的效果,

如 CAR-T 细胞治疗。同时通过分析患者的免疫组库, 可以为患者定制个性化的细胞治疗方案, 在 T 细胞受体(T

CR) 或嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞治疗中, 可以根据患者的特定免疫组库设计治疗策略。

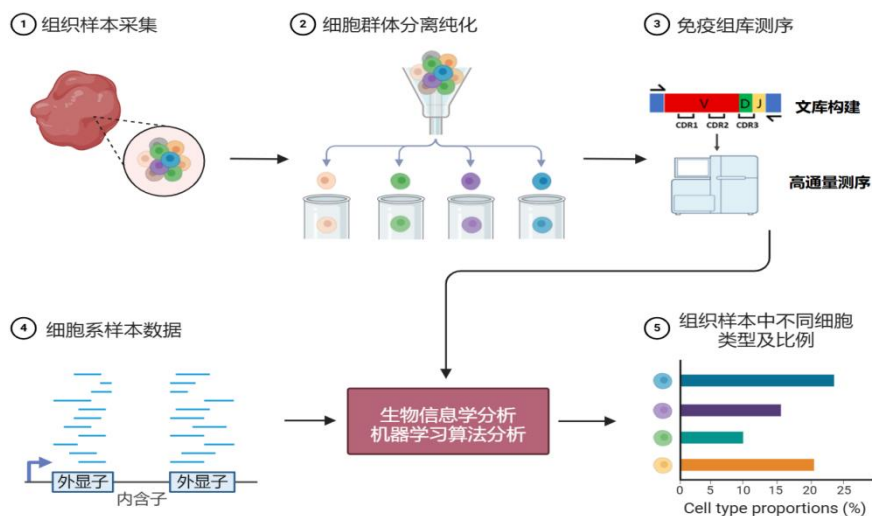


图 3-1 通过免疫组库测序技术进行组织细胞分型

3.3 免疫组库在移植和免疫重建上的应用

器官或骨髓移植过程中, 常常会引发宿主的排斥反应, 进而导致慢性移植抗宿主病的发生。T 细胞库中的交叉反应随机分布会导致同种异体反应, 因此, T 细胞恢复的延迟和 T 细胞受体多样性的限制与异体移植后感染和疾病复发的风险增加相关。IR-Seq 技术能够检测移植后的 T 细胞库, 从而识别出高风险的感染或复发人群。

细胞的免疫适应性是机体抵抗感染和疾病的重要保障, 其中细胞免疫和适应性免疫相互作用, 共同维护着机体免疫平衡^[9]。对细胞免疫适应性的深入研究有助于理解免疫系统的工作机制, 为预防和治疗感染、肿瘤和自身免疫性疾病等疾病提供理论依据和临床指导。I R-Seq 技术可以帮助评估细胞治疗产品的免疫适应性。通过分析免疫组库, 可以确定细胞治疗产品中的免疫细胞是否具有对治疗环境和宿主免疫系统的适应性。这有助于确定细胞治疗产品是否能够在特定的免疫环境中存活和发挥治疗效果。

3.4 免疫组库在自身免疫性疾病方面的应用

自身免疫性疾病是由于机体对自身抗原产生免疫反应, 进而导致自身组织损伤的疾病^[18]。因此, 免疫组库测序技术能够系统性分析细胞表面功能性物质, 发现异常表达的免疫细胞, 将细胞表面功能性物质作为临床疾病诊断的标志物, 并研究细胞表面功能性标志物在自身免疫中变化机制, 可以为疾病的诊断和治疗提供科学

依据。

自身免疫性疾病患者的免疫组库中往往出现异常克隆扩增 (clonal expansion) 的 T/B 细胞, 在早期诊断方面, 免疫组库测序可以检测自身抗原特异性 TCR/B CR 克隆的扩增情况, 从而识别高风险个体^[18]。例如, 在 1 型糖尿病 (T1D) 患者中, 特定的 β 细胞抗原特异性 TCR/BCR 会在疾病早期就表现出异常扩增, 通过免疫组库测序, 可以在症状出现前预测疾病风险^[18]。此外, SLE 患者体内的 BCR 组库会表现出异常的克隆扩增, 并伴随高频突变, 这为早期检测提供了新的生物标志物。相比传统的抗体检测方法, 免疫组库测序可以更早期地捕捉免疫系统的异常变化, 有助于及早干预, 延缓疾病进展。通过 BCR 序列比对自身抗原库, 筛选致病性自身抗体, 可辅助 SLE、重症肌无力 (MG) 等疾病的诊断。

3.5 免疫组库在其他方面的应用

免疫组库测序技术还在疫苗评估、药物使用和抗体开发等医疗研究领域具有良好的应用价值。例如, 进行免疫组库测序研究可以监测感染性疾病发生过程中人体免疫力的动态变化^[19]; 在研发抗体时, 科学家通过分析血液中抗体的独特结构, 可以快速找到高效抗体, 大大缩短特异性抗体的研发时间^[19]。同时, 还可以检测患者用药后的血液样本, 了解药物是否能够激活免疫系统、具体疗效如何。而对于像红斑狼疮这类自身免疫病, 定期检查是否复发也是治疗的关键步骤。此外, 疾病复发监测是自身免疫性疾病管理的重要环节。由于此类疾病具有较高复发率, 免疫组库测序可以通过监测 TCR/BCR

克隆动态变化来预测疾病复发。例如,多发性硬化(MS)患者在复发前,脑脊液中的TCR/BCR克隆多样性下降,并出现特定克隆扩增,提示免疫系统可能处于异常活化状态^[20]。对于RA和SLE患者,治疗后恢复期BCR克隆结构的稳定性较高,而复发前BCR克隆的突变率和选择压力显著增加,因此可以作为复发预测工具,提高患者长期管理的精准度。

4 结论

细胞治疗作为一种具有里程碑意义的新型治疗方式,其产品研发正在快速发展成为新的高新领域,而在此过程中,创新的质量控制和检测技术对于提升产品的质量至关重要。然而,治疗性细胞制剂的评估标准和关键要素仍然缺乏广泛的行业共识,只有在此基础上达成统一意见,才能有效推动这一领域的进一步发展。

在高通量测序快速发展的时代,免疫组库测序技术使我们能够更深入地研究肿瘤免疫细胞的个体浸润模式、异常肽的预测、HLA分型和肿瘤抗原与MHC结合亲和力的预测等。利用免疫组学技术对肿瘤抗原的预测,在临床前和临床研究中已被证明具有可靠的效果。免疫组库测序技术已经成为细胞质量控制的重要工具,能够精准评估细胞治疗产品的质量、稳定性、治疗效果,并可用于预测不良反应和复发风险。免疫组库测序在细胞质量控制领域展现出巨大潜力,但仍面临数据标准化、分析算法优化、测序深度的平衡等挑战。未来,随着单细胞测序、AI和多组学技术的进一步融合,免疫组库测序将在细胞治疗的安全性、精准性和个性化方向上发挥更大的作用,推动细胞治疗的临床转化和产业化发展。

参考文献

- [1]Raffin C, Vo L T, Bluestone J A. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives[J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20(3): 158-172.
- [2]Bauernfeind S, Salzberger B, Hitzenbichler F, et al. Association between reactogenicity and immunogenicity after vaccination with BNT162b2[J]. Vaccines, 2021, 9(10): 1089.
- [3]Mullard A. FDA approves first BCMA-targeted CAR-T cell therapy[J]. Nature reviews Drug discovery, 2021, 20(5): 332-333.
- [4]Mohanty R, Chowdhury C R, Arega S, et al. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment[J]. Oncology reports, 2019, 42(6): 2183-2195.
- [5]Bald T, Krummel M F, Smyth M J, et al. The NK cell - cancer cycle: advances and new challenges in NK cell - based immunotherapies[J]. Nature immunology, 2020, 21(8): 835-847.
- [6]Rao M, Mason C, Solomon S. Cell therapy worldwide: an incipient revolution[J]. Regenerative Medicine, 2015, 10(2): 181-191.
- [7]Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome[J]. Journal for immunotherapy of cancer, 2018, 6: 1-14.
- [8]Frey N. Cytokine release syndrome: who is at risk and how to treat[J]. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2017, 30(4): 336-340.
- [9]Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system[J]. Nature immunology, 2015, 16(4): 343-353.
- [10]Song L, Cohen D, Ouyang Z, et al. TRUST4: immune repertoire reconstruction from bulk and single-cell RNA-seq data[J]. Nature methods, 2021, 18(6): 627-630.
- [11]Liu H, Pan W, Tang C, et al. The methods and advances of adaptive immune receptors repertoire sequencing[J]. Theranostics, 2021, 11(18): 8945.
- [12]Sukumaran A, Ball B, Krieger J R, et al. Cross-kingdom infection of macrophages reveals pathogen-and immune-specific global reprogramming and adaptation[J]. MBio, 2022, 13(4): e01687-22.
- [13]Dutta R, Nambirajan A, Mittal S, et al. Cytomorphology of primary pulmonary NUT carcinoma in different cytology preparations[J]. Cancer Cytopathology, 2021, 129(1): 53-61.
- [14]Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of cell viability[J]. Current protocols in cytometry, 2013, 64(1): 9.2. 1-9.2. 26.

- [15]McKinnon K M. Flow cytometry: an overview [J]. Current protocols in immunology, 2018, 120(1): 5.1. 1-5.1. 11.
- [16]Cobo F, Cortés J L, Cabrera C, et al. Microbiological contamination in stem cell cultures[J]. Cell Biology International, 2007, 31(9): 991-995.
- [17]Brummel K, Eerkens A L, de Bruyn M, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes: from prognosis to treatment selection[J]. British Journal of Cancer, 2023, 128(3): 451-458.
- [18]Jung S M, Kim W U. Targeted immunotherapy for autoimmune disease[J]. Immune network, 2022, 22(1): e9.
- [19]胡静涵, 胡懿凡, 蒋俊锋, 等. 单细胞转录组测序技术及其在肿瘤研究中的应用进展[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(7): 800-807.
- [20]郑磊, 路佳. 单细胞测序技术及其在结直肠癌中的应用[J]. Tianjin Medical Journal, 2021, 49(8).

作者简介: 段晓宇 (2000.06.02—), 男, 汉族, 四川成都, 硕士研究生, 湖南工业大学生命科学与化学学院, 研究方向: 生物传感技术、高通量测序。

基金项目: “湖南省抗击新冠肺炎疫情应急专项: 基于多组学研究筛选与鉴定新型冠状病毒感染患者疾病转归的外周血生物学标志物, 项目编号: 2020SK3005。