

滤白残留物来源双阴性T细胞生物学活性的实验研究

相志强^{1,2}, 吴越², 黄凯玉², 吴富强², 林菊³, 桑列勇³, 杨黎明²

1. 浙江中医药大学研究生院, 浙江 杭州 310053

2. 瑞创生物技术有限公司, 浙江 绍兴 312065

3. 绍兴市中心血站, 浙江 绍兴 312071

[摘要] **目的:**考察滤白残留物来源的双阴性T(DNT)细胞的生物学活性。**方法:**从血站收集6份400 mL全血滤白后的去白细胞过滤器,使用生理盐水对去白细胞过滤器进行反冲、浓缩获得滤白残留物。双荧光染色法对滤白残留物中的白细胞进行计数,采用抗体吸附和密度梯度离心获得滤白残留物中DNT细胞原材料。将滤白残留物来源冻存复苏和新鲜DNT细胞原材料分别进行体外培养,采用双荧光染色法、流式细胞术检测体外培养后DNT细胞扩增倍数、存活率、细胞表型、细胞分化及靶细胞杀伤率,并与全血来源DNT细胞比较。**结果:**经去白细胞过滤器反冲获得的白细胞回收率可达 $(41.9\pm 14.7)\%$ 。与全血比较,滤白残留物来源DNT细胞原材料总T细胞含量差异无统计学意义($P>0.05$),DNT细胞存活率和DNT细胞纯度降低(均 $P<0.05$)。新鲜DNT细胞体外培养17 d后,滤白残留物来源DNT细胞扩增倍数、细胞表型、细胞分化以及对靶细胞杀伤率与全血来源DNT细胞差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但DNT细胞存活率低于全血来源DNT细胞[分别为 $(86.0\pm 4.2)\%$ 和 $(92.2\pm 1.2)\%$, $P<0.05$]。与滤白残留物来源新鲜DNT细胞原材料比较,相同细胞原材料冻存3、15 d后复苏培养17 d,细胞表型、DNT细胞扩增倍数、细胞分化等相近(均 $P>0.05$),但冻存3 d复苏组细胞存活率较高[分别为 87.8% (82.0% , 89.0%)和 92.4% (91.8% , 92.8%), $P<0.05$],冻存15 d复苏组靶细胞杀伤率较高[分别为 70.9% (67.3% , 80.2%)和 91.3% (89.4% , 95.1%), $P<0.05$]。**结论:**滤白残留物来源DNT细胞与全血来源DNT细胞在扩增、纯度、细胞分化以及生物学效力等方面基本一致,且冻存复苏后细胞的生物学活性与未冻存细胞基本一致,提示滤白残留物有望作为制备现货通用型DNT细胞药物新的原材料选择。



收稿日期(Received):2025-08-14 修改返回日期(Revised):2025-10-28 接受日期(Accepted):2025-11-15 网络预发表日期(Online):2025-11-20

基金项目(Funding):绍兴市卫生健康科技计划(2023SKY096)

第一作者(First author):相志强,工程师,主要从事通用型免疫细胞治疗药物产业化工艺平台建设与研究;E-mail: xiangzq@126.com;ORCID:0009-0005-4975-1096

通信作者(Corresponding author):杨黎明,主要从事通用型药物开发及产业化研究;E-mail: lyang@wyzebiotech.com; ORCID:0009-0003-3644-9707. 桑列勇,主任技师,主要从事血液制备方法研究、临床输血服务等;E-mail: 363729994@qq.com;ORCID:0009-0005-9855-8532

[关键词] 双阴性T细胞;滤白残留物;去白细胞过滤器;细胞培养;细胞活性;细胞冻存

[中图分类号] R329.2+5 [文献标志码] A

Functional characterization of double-negative T cells isolated from leukoreduction filter residues

XIANG Zhiqiang^{1,2}, WU Yue², HUANG Kaiyu², WU Fuqiang², LIN Ju³, SANG Lieyong³, YANG Liming² (1. Graduate School, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Wyze Biotech CO., Ltd., Shaoxing 312065, Zhejiang Province, China; 3. Shaoxing Municipal Blood Center, Shaoxing 312071, Zhejiang Province, China)

Corresponding authors: YANG Liming, E-mail: lyang@wyzebiotech.com, ORCID: 0009-0003-3644-9707; SANG Lieyong, E-mail: 363729994@qq.com, ORCID: 0009-0005-9855-8532

[Abstract] **Objective:** To characterize the biological properties of double-negative T (DNT) cells isolated from leukoreduction filter residues. **Methods:** Leukoreduction filters containing residues from 400 mL whole blood units ($n=6$) were collected from a blood center. Filters were back-flushed with normal saline, and the eluate was concentrated to obtain leukoreduction filter residues. Leukocytes in the residues were counted by dual-fluorescence staining. DNT cells were then isolated from the residues using antibody-mediated adsorption and density gradient centrifugation. Both cryopreserved-thawed and non-cryopreserved DNT cells derived from the residues were subjected to *in vitro* culture. Cells were assessed for expansion fold, viability, immunophenotype, differentiation status, and cytotoxicity against target cells using dual-fluorescence staining and flow cytometry, with comparisons made to DNT cells derived from whole blood. **Results:** The leukocyte recovery rate achieved through reverse flushing of the leukocyte reduction filter was $(41.9\pm 14.7)\%$. Compared to whole blood, the DNT cells starting material obtained from filter residues showed no significant difference in total T-cells content ($P>0.05$). However, the viability and purity of the resulting DNT cells starting materials were significantly lower (both $P<0.05$). After 17 days of culture, DNT cells from filter residues and whole blood showed no significant differences in expansion fold, immunophenotype, differentiation status, or cytotoxicity toward target cells (all $P>0.05$). However, the viability of DNT cells from residues was significantly lower than that of whole blood-derived DNT cells [$(86.0\pm 4.2)\%$ vs. $(92.2\pm 1.2)\%$, $P<0.05$]. After thawing (post 3 or 15 days of cryopreservation) and 17 days of culture, DNT cell starting materials from residues showed comparable immunophenotype, expansion fold, and differentiation status to their non-cryopreserved counterparts from the same source (all $P>0.05$). However, the viability of the 3-day cryopreservation recovery group [92.4% (91.8%, 92.8%) vs. 87.8% (82.0%, 89.0%)] and the cytotoxicity against target cells of the 15-day cryopreservation recovery group [91.3% (89.4%, 95.1%) vs. 70.9% (67.3%, 80.2%)] were both significantly higher than those of non-cryopreserved DNT cells (all $P<0.05$). **Conclusions:** DNT cells derived from leukoreduction filter residues exhibited highly comparable characteristics to those from whole blood in terms of expansion, purity, differentiation, and biological potency. Furthermore, their biological activity post-cryopreservation and revival remained

largely similar to non-cryopreserved cells. These findings suggest that leukoreduction filter residues represent a promising alternative source of starting material for manufacturing off-the-shelf, allogeneic DNT cell therapeutics.

[**Key words**] Double negative T cells; Leukoreduction filter residues; Leukocyte reduction filter; Cell culture; Cell activity; Cell cryopreserving

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(2): 145-153.]

[**缩略语**] 双阴性T细胞(double negative T cell, DNT细胞);分化抗原(cluster of differentiation, CD);主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC);吖啶橙(acridine orange, AO);碘化丙啶(propidium iodide, PI);藻红蛋白(phycoerythrin, PE);别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)

近年来,过继性免疫细胞疗法在血液系统恶性肿瘤及实体瘤治疗领域持续经历技术革新,已成为生物医药领域最具变革性的治疗策略之一,并驱动着全球医疗技术的重大进步。截至2025年11月,美国食品药品监督管理局和中国国家药品监督管理局已批准16款自体嵌合抗原受体T细胞产品上市。然而,此类疗法受限于患者自体细胞来源,存在因原材料质量差异导致制备失败、患者等待周期长以及生产成本高昂等局限。而通用现货型(off-the-shelf)细胞治疗药物的研发展现出显著优势和临床转化潜力。

作为一种重要的通用现货型细胞,DNT细胞因其独特的生物学特性受到业内关注。该细胞表达CD3分子,但不表达CD4、CD8和CD56分子。DNT细胞最早于1989年由斯坦福大学Strober教授团队在《自然》(*Nature*)报道,其免疫应答具有非MHC限制性^[1]。随后,加拿大多伦多大学医学院张丽教授团队在2000年进一步鉴定了该细胞群,并揭示其具有介导抗原特异性移植耐受的功能及相关机制^[2]。DNT细胞具有通用特性和良好的可拓展性^[3],在此基础上开发的系列通用现货型DNT细胞治疗药物已在多项临床试验中证实了其良好的安全性^[4-5]。DNT细胞兼具抑制移植物抗宿主病和广谱抗肿瘤的双重功能,其MHC非限制性杀伤特性以及易于规模化制备的现货型优势,使其成为治疗血液系统恶性肿瘤的一种前景广阔的新型细胞疗法^[6-7]。有研究证实了其在治疗复发难治性急性髓系白血病中

具有初步疗效^[8-9]。DNT细胞在预防复发、难治性急性髓系白血病患者异基因造血干细胞移植后复发方面也展现出可靠的有效性和安全性^[10]。此外,研究还显示DNT细胞具有预防肝移植后肿瘤复发的潜力^[11]。

当前,以DNT细胞为代表的通用现货型细胞治疗药物研发企业普遍面临一系列关键挑战,包括健康供者来源原材料(如外周全血、单采血和脐血)的合规获取、原材料质量评价体系建立、生产工艺适配性优化,以及安全性风险评价等^[12-13]。其中,开发安全可靠的细胞原材料来源是该领域亟待解决的核心问题。在中国现行的采供血体系中,经体检合格的健康献血者所捐献的全血中红细胞、血小板和血浆等主要成分被用于临床输注,而全血经滤白处理后的去白细胞过滤器通常被视为医疗废弃物,因为滤器中截留了大量可引发同种异体反应和输血相关不良反应的白细胞^[14]。既往研究证实,从这些废弃过滤器中可以回收功能性单个核细胞^[15-19]和自然杀伤细胞^[20-21]。鉴于DNT细胞是单个核细胞中的一种特定T细胞亚群,将采供血机构废弃的去白细胞过滤器通过反冲程序获得的滤白残留物开发为DNT细胞来源新途径,不仅无需额外占用宝贵的全血、单采血或脐带血细胞等医疗资源,而且大幅提升了全血的综合利用率。本文通过考察滤白残留物来源DNT细胞的细胞扩增、存活率、细胞表型、细胞分化以及体外生物学效力,希望为现货通用型DNT细胞药物研发提供可持续的原材料获取策略。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

MV-4-11 细胞(SCSP-5031)购于中国科学院细胞库。氯化钠注射液(500 mL:4.5 g)为中国山东威高集团医用高分子制品股份有限公司产品;红细胞裂解液(B541001)为中国生工生物工程(上海)股份有限公司产品;AO/PI 染液(CS2-0106)为美国 Nexcelom Bioscience 公司产品;CD3 抗体(170-076-116)为德国 Miltenyi Biotec 公司产品;注射用人 IL-2(泉奇,国药准字:S2002004)为中国山东泉港药业有限公司产品;TheraPEAK® X-VIVO® 15 无血清造血细胞培养基(含重组转铁蛋白)(BEBP02-054Q)为瑞士 Lonza 公司产品;免疫血清替代物(A2596101)为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品;CryoStor CS5 细胞冻存液(205102)为美国 Biolife Solutions 公司产品;RosetteSep™ 人 CD4 去除抗体混合物(15662)、RosetteSep™ 人 CD8 去除抗体混合物(15663)、Lymphoprep™ 淋巴细胞分离液(07861)为加拿大 STEMCELL Technologies 公司产品;PE/Cyanine7 抗人 CD3 抗体(300316)、PE 抗人 CD4 抗体(300508)、APC 抗人 CD8a 抗体(300912)、FITC 抗人 CD3 抗体(300306)、PE 抗人 CD45RA 抗体(304108)、APC/Cyanine7 抗人 CD62L 抗体(304814)、7-AAD 细胞活力染色液(420403)、FITC Annexin V(640945)为美国 BioLegend 公司产品;用于常规细胞膜标记的 PKH26 红色荧光细胞连接子试剂盒(PKH26GL)为德国 MilliporeSigma 公司产品。

TSCD™-II 无菌接管机为日本 Terumo 公司产品;XS-900i 全自动血液分析仪为日本 Sysmex 公司产品;Cryofuge™ 16 型血站离心机、高速离心机(ST16R)均为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品;双荧光细胞计数仪(Cellometer K2)为美国 Nexcelom Bioscience 公司产品;CytoFLEX 流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品;Micro Digitcool 250 程序降温仪为法国 CryoBio System 公司产品。

1.2 滤白残留物来源、制备和计数

去白细胞过滤器(过滤 400 mL 全血/个,共 6 个)及全血(200 mL/份,共 6 份)均由绍兴市中心血站提供。取经 400 mL 全血滤白操作后的待废弃去白细胞过滤器,将 500 mL 生理盐水与过滤器

采用无菌接管方式连接并反冲,4999×g,2~6 °C 条件下离心 10 min。弃上清液,将留存的约 100 mL 残留白细胞用生理盐水重悬,悬液即为滤白残留物。

全血中白细胞数由绍兴市中心血站采用全自动血液分析仪检测。滤白残留物中的白细胞检测采用荧光染料法测定,因含有大量红细胞,计数前需要先通过红细胞裂解:取 100 μL 待检样品加 900 μL 1×红细胞裂解液,室温裂解 10 min,取 20 μL 裂解后的样品加入 20 μL AO/PI 染液,漩涡混匀后取 20 μL 样品加到计数板内,并用计数仪检测。滤白残留物中可回收的白细胞数计算公式:白细胞数=细胞浓度之和÷测量次数×样本体积。

1.3 抗体吸附法获取 DNT 细胞原材料

按照 RosetteSep™ 人 CD4/CD8 去除抗体混合物使用说明书,将去除抗体混合物加至全血和滤白残留物中,室温条件下孵育 20 min,后加至淋巴分离液之上,把“Deceleration(降速)”设置为“0”档,室温下 1200×g 密度梯度离心 20 min 获得去除 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺细胞后富含 DNT 细胞的原材料。

在部分 DNT 细胞原材料沉淀中加入 CS5 冻存液,调整细胞密度为 5×10⁶/mL,经程控降温仪梯度降温后保存于不高于-150 °C 的液氮罐中备用。

1.4 DNT 细胞原材料体外培养

采用通用型临床用 DNT 细胞制备方法^[22],对滤白残留物来源的新鲜和冻存 DNT 细胞原材料进行体外培养。首先,DNT 细胞原材料置于抗 CD3 抗体(5 μg/mL)包被的培养瓶中激活;然后使用含免疫血清替代物(培养体积的 10%)和 IL-2(250 IU/mL)的无血清培养基,并于(37±1)°C、(5.0±0.5)%二氧化碳的条件下培养,培养周期为 17 d。冻存 DNT 细胞复苏时,将 1 mL 冻存管管体置于(37±1)°C 水浴锅中左右快速移动,复苏时间为 2~3 min,复苏终点为冻存管内可见米粒大小细胞团块。

1.5 流式细胞术表征 DNT 细胞

采用抗 CD3、CD4、CD8 抗体检测 DNT 细胞表型,采用抗 CD45RA、CD62L 抗体检测细胞分化^[23]。将待检测的 DNT 细胞培养液混匀,按每管细胞数(0.5~1)×10⁶分配至各标记管;每管补足 3 mL PBS,415×g 离心 5 min,弃上清液后重复洗涤一

次;混匀后室温避光孵育 10 min;孵育结束后洗涤,最后用 300 μ L PBS 重悬细胞,使用流式细胞仪收集 10 000 个 CD3⁺细胞,分析 DNT 细胞表型及细胞分化情况。

1.6 双荧光染色法测定 DNT 细胞数和存活率

取不少于 20 μ L 的待检样本,使用 PBS 稀释十倍。取 15 μ L 稀释后样本与 15 μ L AO/PI 染液漩涡混合,吸取混合液 20 μ L 加入计数板,静置 3~5 s 后使用双荧光细胞计数仪检测。DNT 细胞总数=细胞浓度之和 $\div$ 测量次数 $\times$ 样本体积 $\times$ 总 T 细胞含量 $\times$ DNT 细胞纯度;DNT 细胞存活率=细胞存活率之和 $\div$ 测量次数;DNT 细胞扩增倍数=培养后 DNT 细胞数 $\div$ 初始接种 DNT 细胞数。

1.7 流式细胞术检测 DNT 细胞对靶细胞的杀伤率

将 PKH26 荧光染料标记的 MV-4-11 细胞(靶细胞)与 DNT 细胞(效应细胞)按照效靶比 4:1 在 (37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、(5 $\pm$ 0.5)%二氧化碳的条件下共孵育 2 h,收集细胞,200 $\times$ g 室温离心 5 min,洗涤后加入凋亡检测试剂 Annexin V,染色后上机检测,计算靶细胞杀伤率;靶细胞杀伤率(%)=[Annexin V⁺_{效应细胞}(%)—Annexin V⁺_{靶细胞}(%)] $\div$ [100—Annexin V⁺_{靶细胞}(%)] $\times$ 100%^[24]。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.2.3 软件进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 检验对连续变量进行正态性检验,符合正态分布的变量以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;不符合正态分布、存在样本量不均衡及总量有限情况的变量,以中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示。两组间比较时,若数据满足正态性和方差齐性,采用独立样本 t 检验;若正态分布但方差不齐,则采用 Welch's t 检验。若数据不符合正态分布,或样本量过小,难以可靠评估参数检验的前提假设,采用 Mann-Whitney U 检验。多组比较时,本研究中因样本量小无法可靠评估,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,当整体检验显著时,使用 Dunn's 检验进行事后两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白细胞回收效果

滤白前 400 mL 全血中白细胞数为 (26.1 $\pm$ 2.8) $\times 10^8$,滤白残留物中可回收的白细胞数为

(10.8 $\pm$ 3.3) $\times 10^8$,经去白细胞过滤器反冲获得的白细胞回收率可达 (41.9 $\pm$ 14.7)%。

2.2 DNT 细胞原材料细胞表型和存活率

与全血比较,滤白残留物来源 DNT 细胞原材料总 T 细胞含量差异无统计学意义 ($P>0.05$),DNT 细胞存活率和 DNT 细胞纯度均降低 (均 $P<0.05$),见表 1。结果表明,通过抗体吸附法分别从滤白残留物和全血中获取的 DNT 细胞在关键指标上总体数值相当。

表 1 不同来源 DNT 细胞原材料的细胞表型和细胞存活率检测结果比较

Table 1 Comparison of phenotype and viability of unstimulated DNT cells starting materials from different sources

(% , $\bar{x}\pm s$, $n=6$)			
DNT 细胞来源	总 T 细胞含量*	DNT 细胞纯度#	DNT 细胞存活率
全血	7.5 $\pm$ 3.6	99.6 $\pm$ 0.3	96.6 $\pm$ 0.5
滤白残留物	6.1 $\pm$ 2.0	93.3 $\pm$ 4.1	95.0 $\pm$ 0.7
检验值	0.83	3.75	4.60
P 值	>0.05	<0.05	<0.01

*CD3⁺细胞在目标淋巴细胞中占比;#CD3⁺CD4⁻CD8⁻细胞在 CD3⁺ T 细胞中占比。DNT 细胞:双阴性 T 细胞。

2.3 体外扩增后 DNT 细胞生物学活性检测结果

经体外培养 17 d 后,滤白残留物与全血来源 DNT 细胞在总 T 细胞含量、DNT 细胞纯度、DNT 细胞扩增倍数以及对靶细胞杀伤率差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$),但 DNT 细胞存活率滤白残留物低于全血 ($P<0.05$),见表 2。在细胞分化方面,DNT 细胞中干细胞记忆 T 细胞占比和中枢记忆 T 细胞占比滤白残留物均有高于全血的趋势,效应记忆 T 细胞占比滤白残留物有低于全血的趋势,效应 T 细胞占比两组相近 (均 $P>0.05$),见表 2。DNT 细胞原材料的干性细胞 (干细胞记忆 T 细胞+中枢记忆 T 细胞) 占比 43.7% 较全血来源 21.4% 更高 ($P<0.05$)。上述结果提示,滤白残留物与全血来源 DNT 细胞在体外扩增后扩增倍数、细胞存活率、总 T 细胞含量、DNT 细胞纯度以及靶细胞杀伤率相近,但滤白残留物来源 DNT 细胞后续在体内持续扩增能力上可能优于全血来源。

2.4 冻存复苏后滤白残留物来源 DNT 细胞原材料生物学活性检测结果

滤白残留物来源 DNT 细胞原材料冻存 3、15 d 后复苏培养细胞的起始存活率差异无统计学意

表2 不同来源DNT细胞体外扩增后细胞生物学活性比较

Table 2 Biological characteristics of DNT cells from different sources after *in vitro* expansion

[$\bar{x} \pm s$ 或 $M(Q_1, Q_3)$, $n=6$]					
DNT细胞来源	总T细胞含量 ^a (%)	DNT细胞纯度 ^b (%)	DNT细胞存活率(%)	DNT细胞扩增倍数	靶细胞杀伤率(%)
全血	96.6±2.3	95.2(91.9, 97.6)	92.2±1.2	18 202(15 116, 32 655)	69.1±8.1
滤白残留物	94.7±3.5	95.8(91.0, 97.4)	86.0±4.2	14 535(6653, 25 004)	71.8±8.0
检验值	1.16	16.00	3.51	12.00	0.58
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05
DNT细胞来源	干细胞记忆T细胞占比(%)	中枢记忆T细胞占比(%)	效应记忆T细胞占比(%)	效应T细胞占比(%)	
全血	14.6(8.0, 19.6)	9.7(2.0, 10.2)	39.4(38.5, 59.0)	31.3(31.0, 36.7)	
滤白残留物	28.0(20.2, 33.0)	16.3(13.3, 22.1)	19.8(17.1, 37.7)	31.6(19.2, 36.0)	
检验值	3.00	2.00	3.00	8.00	
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

^aCD3⁺细胞在目标淋巴细胞中占比; ^bCD3⁺CD4⁺CD8⁺细胞在CD3⁺T细胞中占比。DNT细胞:双阴性T细胞。

义[分别为(88.6±2.2)%和(83.1±5.1)%, $P>0.05$]。体外培养17 d后,冻存复苏组与新鲜培养组总T细胞含量、DNT细胞纯度和DNT细胞扩增倍数差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);冻存3 d复苏组的DNT细胞存活率高于新鲜培养组($P<0.05$);冻存15 d复苏组DNT细胞对靶细胞杀伤率高于新鲜培养组($P<0.01$)。在细胞分化方面,冻存复苏组与新鲜培养组体外培养后干细胞记忆T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞和效应T细胞占比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表3。上述结果提示,滤白残留物来源冻存复苏与新鲜DNT细胞原材料有相同的生物学活性,冻存复苏的DNT细胞原材料甚至有更优的趋势,如对靶细

胞杀伤率。

3 讨论

目前,采供血单位将全血滤白后富含大量免疫细胞的去白细胞过滤器作为医疗废弃物处理。然而,滤白残留物实际上是一种稳定、可扩展且无须招募额外供者的免疫细胞来源。在现有完善的献血者知情同意和匿名化体系保障下,系统地开发并利用滤白残留物,将其用于细胞治疗药物的产业化生产,可以充分利用血液资源,具有重要的资源价值和实践意义。针对当下自体细胞疗法因患者T细胞质量差、成本高昂及可及性低等局限,本研究依托滤白残留物所构建的现

表3 滤白残留物来源DNT细胞原材料冻存复苏与新鲜培养后细胞生物学活性比较

Table 3 Biological characteristics of cryopreserved-thawed vs. non-cryopreserved DNT cells from leukoreduction filter residues after *in vitro* culture

[$M(Q_1, Q_3)$]						
组别	<i>n</i>	总T细胞含量 ^a (%)	DNT细胞纯度 ^b (%)	DNT细胞存活率(%)	DNT细胞扩增倍数	靶细胞杀伤率(%)
新鲜培养组	6	95.4(91.4, 97.4)	95.8(91.0, 97.4)	87.8(82.0, 89.0)	14 535(6653, 25 004)	70.9(67.3, 80.2)
冻存3 d复苏组	3	97.2(93.8, 98.1)	96.0(95.7, 96.2)	92.4(91.8, 92.8)*	31 313(21 868, 33 620)	85.2(79.3, 85.4)
冻存15 d复苏组	3	95.8(90.4, 96.0)	97.2(95.1, 97.5)	90.0(88.6, 92.8)	19 824(6339, 71 300)	91.3(89.4, 95.1)**
检验值	—	1.31	0.44	7.05	2.90	14.78
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.01
组别	<i>n</i>	干细胞记忆T细胞占比(%)	中枢记忆T细胞占比(%)	效应记忆T细胞占比(%)	效应T细胞占比(%)	
新鲜培养组	6	28.0(20.2, 33.0)	16.3(13.3, 22.1)	19.8(17.1, 37.7)	31.6(19.2, 36.0)	
冻存3 d复苏组	3	22.4(4.6, 28.3)	28.4(9.3, 28.6)	28.5(27.9, 61.7)	14.6(5.3, 40.3)	
冻存15 d复苏组	3	8.7(8.3, 13.9)	20.0(19.2, 26.3)	54.4(48.1, 54.9)	16.3(11.0, 18.8)	
检验值	—	3.31	0.67	2.89	3.08	
<i>P</i> 值	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

—:无相关数据。与新鲜培养组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。^aCD3⁺细胞在目标淋巴细胞中占比;^bCD3⁺CD4⁺CD8⁺细胞在CD3⁺T细胞中占比。DNT细胞:双阴性T细胞。

货通用型DNT细胞平台,通过原料源头控制和遵循《药品生产质量管理规范》规模化生产,为开发质量可控、成本降低的现货通用型细胞治疗药物奠定了基础,不仅有助于提升我国在细胞基因治疗领域的国际竞争力,也为推进可普惠的细胞治疗提供新路径。

本研究将袋装无菌生理盐水与去白细胞过滤器在普通环境下采用无菌接管的方式进行对接和反冲,生理盐水反冲的回收率和细胞存活率与采用PBS反冲效果基本一致^[17,25],降低了去白细胞过滤器的无菌处理成本。与全血来源DNT细胞比较,滤白残留物来源DNT细胞在总T细胞含量、DNT细胞纯度、扩增倍数和对靶细胞杀伤率均与全血来源DNT细胞相当,但全血和滤白残留物来源DNT细胞在细胞存活率上存在差异,可能与此次研究中样本量较少、部分样本组内标准差极低而组间标准差大等原因有关。今后将扩大样本量以平衡组间差异,并综合上述指标及体内代谢分布、疗效评估结果等进行综合评估,以得到更充分的依据。有研究证明DNT细胞对MV-4-11、OCI/AML3细胞株、原发性急性髓系白血病患者样本均具有较强的杀伤作用^[26]。本研究选取MV-4-11细胞作为DNT细胞生物学效应的靶细胞。本文资料显示,滤白残留物来源冻存复苏与直接体外DNT细胞的细胞分化以效应记忆T细胞、效应T细胞为主(50%左右),保障了DNT细胞对靶细胞的短期、直接杀伤能力。决定过继细胞免疫治疗持久杀伤靶细胞的关键是细胞产品中干细胞记忆T细胞和中枢记忆T细胞的比例,这两群细胞比例越高,细胞在体内存续时间越长^[23]。本文资料中干细胞记忆T细胞和中枢记忆T细胞比例合计可达到40%以上,与此前全血来源基于DNT细胞平台工艺的研究结果基本一致^[27],提示滤白残留物来源DNT细胞同样能在体内持续扩增,预估与现有全血来源DNT细胞在临床上的疗效相仿。

细胞产业化生产中,原材料冻存可更方便排产。有研究证实,使用适宜的冻存保护液,免疫细胞可在液氮中长期存储并维持其功能完整性,尤其是分化程度低的细胞,其在脱水、冰晶形成和氧化损伤等关键冷冻损伤环节更具耐受性^[28]。有研究证明,培养14 d后的DNT细胞冻存长达600余天后其生物学活性未见明显变化^[26]。基于

前期研究结果^[29],本研究将滤白残留物来源DNT细胞冻存在液氮中,结果显示,经过液氮冻存复苏的DNT细胞在细胞表型、细胞扩增、细胞分化方面与新鲜培养细胞保持一致,而细胞存活率和靶细胞杀伤率方面较新鲜培养细胞更优。原因可能有两:一是冻存过程中细胞产生强烈应激,分化程度低、耐受性强、内源性抗氧化系统(谷胱甘肽、超氧化物歧化酶)活性高的DNT细胞得以存活,这群细胞有更好的膜流动性,能抵抗冻融过程中的脱水损伤,可清除复苏时产生的活性氧,复苏后扩增的细胞实为经低温筛选的强耐受DNT细胞,其增殖潜力可能优于未经筛选的新鲜细胞;二是冻存过程可诱导细胞上调冷休克蛋白(如HSP70)和抗凋亡基因(如BCL-2家族),增强细胞结构稳定性,而此类保护机制在复苏后仍持续发挥作用,提升了细胞在后续培养中的应激适应能力。尽管如此,为保障产业化应用的可靠性,仍需对滤白残留物来源冻存复苏DNT细胞原材料进行系统评估,以验证其在液氮中长期储存(数月乃至数年)的稳定性。

基于上述发现及现有技术规范,企业可参照《中华人民共和国药典》相关标准,建立针对滤白残留物来源供者原材料的全面质量控制体系。滤白残留物制备和DNT细胞分离冻存过程均可能引入微生物污染,因此建议企业对滤白残留物先进行快速革兰染色鉴定,冻存期间可依据药典要求,采取为期14 d的微生物培养法进行监测,确保起始原材料的微生物安全。随着原材料冻存周期延长至30 d以上,可避免如人免疫缺陷病毒等传染性疾病的核酸检测窗口期(10~33 d)的潜在风险,同时可覆盖药典中支原体检测周期28 d的要求。建立对滤白残留物来源原材料健全的质控体系可为DNT细胞治疗药物的安全、稳定产业化提供保障。

本文资料中,供者之间存在遗传背景、生理状态及细胞活性的固有差异,从而导致分化结果的异质性,直接导致数据分布较为分散。同时,由于样本量小,统计结果稳健性不足。因此,本文资料仅描述了有限样本量下的观测情况,以用于进行初步趋势判断和提出假设,而非得出确凿结论。今后,将从扩大样本规模、优化实验设计和数据分析、深入探索变异来源和体内代谢情况等几个方面改进后续研究工作。

综上所述,来源于去白细胞过滤器的滤白残留物可作为一种稳定且质量可控的健康供者来源DNT细胞起始原材料,在确保不影响采供血机构正常运作的前提下,将本作为医疗废弃物处置的去白细胞过滤器进行回收、制备并冻存,实现了血液资源的有效再利用。为确保产业化应用的可靠性,仍需针对滤白残留物来源DNT细胞原材料继续开展系统研究和评估,并建立针对滤白残留物来源供者原材料的全面质量控制体系。

本文附加文件见电子版。



志谢 本研究得到绍兴市卫生健康科技计划(2023SKY096)支持

Acknowledgements This study was supported by Shaoxing Municipal Health Science and Technology Project (2023SKY096)

作者贡献 相志强、吴越、黄凯玉、吴富强、林菊、桑列勇和杨黎明参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions XIANG Zhiqiang, WU Yue, HUANG Kaiyu, WU Fuqiang, LIN Ju, SANG Lieyong and YANG Liming participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据已在论文正文及附件中完整呈现

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study are fully available within the article and supplementary materials

医学伦理 本研究通过绍兴市中心血站医学伦理审查委员会审查[绍血伦审(2023)年意见第(1)号]并符合1964年《赫尔辛基宣言》及之后的修订版或类似的伦理标准,所有献血者均已签署知情同意书

Ethical Approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of Shaoxing Central Blood Station [Shaoxing

Blood IRB (2023) No. 1], and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Written informed consent was obtained from all blood donors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] HOLOSHTITZ J, STROBER S, KONING F, et al. Isolation of CD4-CD8-mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid[J]. *Nature*, 1989, 339: 226-229.
- [2] ZHANG Z X, YANG L, YOUNG K J, et al. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression[J]. *Nat Med*, 2000, 6(7): 782-789.
- [3] 闫琼宇, 路丽明, 杨黎明. 双阴性T细胞: 通用型细胞药物研发进展与趋势[J]. *现代免疫学*, 2024, 44(6): 536-541.
YAN Qiongyu, LU Liming, YANG Liming. Research progress and trend of universal double negative T cell therapy[J]. *Current Immunology*, 2024, 44(6): 536-541. (in Chinese)
- [4] XIAO X, LEI W, JIANG H, et al. A phase 1 study of RJMty19: anti-CD19 humanized CAR-engineered allogeneic double negative T cells in adults with B-cell non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Blood*, 2023, 142: 2094.
- [5] XIAO X, LIU H, QIU X, et al. CD19-CAR-DNT cells (RJMty19) in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma: a phase 1, first-in-human study[J]. *EClinicalMedicine*, 2024, 70: 102516.
- [6] CHEN X, WANG D, ZHU X. Application of double-negative T cells in haematological malignancies: recent progress and future directions[J]. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 11.
- [7] PAN T, DING P, HUANG A, et al. Reconstitution of double-negative T cells after cord blood transplantation and its predictive value for acute graft-versus-host disease[J]. *Chin Med J*, 2024, 137(10): 1207-1217.
- [8] TANG B, LEE J B, CHENG S, et al. Allogeneic double-negative T cell therapy for relapsed acute myeloid leukemia patients post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a first-in-human phase I study [J/OL]. *Am J Hematol*, 2022, 97(7): E264-E267.
- [9] GU H, HE D, HAN X, et al. Increase of dnts correlated with clinic outcome after allogeneic DNT cells infusion in r/r AML patients[J]. *Blood*, 2023, 142: 6867.
- [10] SUN G, CHEN X, PAN T, et al. Prophylactic infusion

- of allogeneic double-negative T cells as immune modulators to prevent relapse in high-risk AML patients post-allo-HSCT: a phase I trial[J]. **Exp Hematol Oncol**, 2025, 14(1): 90.
- [11] HU Z, YANG M, CHEN H, et al. Double-negative T cells: a promising avenue of adoptive cell therapy in transplant oncology[J]. **J Zhejiang Univ Sci B**, 2023, 24(5): 387-396.
- [12] 徐隆昌. 外周血来源的通用型CAR-T细胞产品研究进展和审评考虑[J]. **中国新药杂志**, 2022, 31(21): 2159-2164.
- XU Longchang. Research development and review considerations of universal CAR-T cells derived from peripheral blood[J]. **Chinese Journal of New Drugs**, 2022, 31(21): 2159-2164. (in Chinese)
- [13] 李倩倩, 郝晓芳, 黄 瑛, 等. 人诱导多能干细胞来源细胞治疗产品的临床前安全性评价研究进展[J]. **中国医药生物技术**, 2024, 19(6): 521-525.
- LI Qianqian, HAO Xiaofang, HUANG Ying, et al. Progress in preclinical safety evaluation of cell products derived from human induced pluripotent stem cells[J]. **Chinese Medicinal Biotechnology**, 2024, 19(6): 521-525. (in Chinese)
- [14] PEYTOUR Y, VILLACRECES A, CHEVALEYRE J, et al. Discarded leukoreduction filters: a new source of stem cells for research, cell engineering and therapy? [J]. **Stem Cell Res**, 2013, 11(2): 736-742.
- [15] 陈小林, 李冬妹, 徐 彬, 等. 从滤白后的白细胞滤器中回收外周血单个核细胞的可行性研究[J]. **北京医学**, 2020, 42(4): 340-343.
- CHEN Xiaolin, LI Dongmei, XU Bin, et al. The feasibility of PBMCs recovery from white cell-reduced filters after filtration[J]. **Beijing Medical Journal**, 2020, 42(4): 340-343. (in Chinese)
- [16] FERDOWSI S, ABBASI-MALATI Z, POURFATHOLLAH A A. Leukocyte reduction filters as an alternative source of peripheral blood leukocytes for research[J]. **Hematol Transfus Cell Ther**, 2021, 43(4): 494-498.
- [17] MALATI Z A, POURFATHOLLAH A A, DABBAGHI R, et al. Evaluation of a new method of leukocyte extractions from the leukoreduction filter[J]. **Indian J Hematol Blood Transfus**, 2023, 39(3): 478-486.
- [18] SOWEMIMO-COKER S O, ANDRADE F, KIM A, et al. A simple filtration system for red blood cell depletion and volume reduction in routine processing of human umbilical cord blood[J]. **Vox Sang**, 2009, 96(2): 138-145.
- [19] DIETZ A B, BULUR P A, EMERY R L, et al. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers[J]. **Transfusion**, 2006, 46(12): 2083-2089.
- [20] 李 然, 孙丽艳, 陈婷婷, 等. 白细胞滤器中的NK及T细胞回收数量及其相关因素研究[J]. **临床输血与检验**, 2024, 26(4): 451-456.
- LI Ran, SUN Liyan, CHEN Tingting, et al. Number of NK and T cells recovered from leukocyte reduction filters and its correlation factors[J]. **Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine**, 2024, 26(4): 451-456. (in Chinese)
- [21] 张庆利, 王 琳, 黄 凯, 等. 白细胞滤器中白细胞回收及其细胞生物学特点的研究进展[J]. **国际输血及血液学杂志**, 2021, 44(1): 84-88.
- ZHANG Qingli, WANG Lin, HUANG Kai, et al. Research progress on recovery of leukocytes from leukocyte filters and its cell biological characteristics [J]. **International Journal of Blood Transfusion and Hematology**, 2021, 44(1): 84-88. (in Chinese)
- [22] 杨黎明, 相志强, 吴 越, 等. 一种通用型临床用DNT细胞及其制备方法与应用: CN119101648A[P]. 2024-12-10.
- YANG Liming, XIANG Zhiqiang, WU Yue, et al. Universal dnt cell for clinical use, and preparation method therefor and use thereof: CN119101648A[P]. 2024-12-10. (in Chinese)
- [23] GOLUBOVSKAYA V, WU L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy[J]. **Cancers**, 2016, 8(3): 36.
- [24] LEE J, MINDEN M D, CHEN W C, et al. Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms[J]. **Clin Cancer Res**, 2018, 24(2): 370-382.
- [25] SASANI N, ROGHANIAN R, EMTIAZI G, et al. Design and introduction of a rational mechanical eluting system for leukocyte recovery from leukoreduction filters: a cell differential approach[J]. **Transfus Clin Biol**, 2020, 27(3): 172-178.
- [26] LEE J B, KANG H, FANG L, et al. Developing allogeneic double-negative T cells as a novel off-the-shelf adoptive cellular therapy for cancer[J]. **Clin Cancer Res**, 2019, 25(7): 2241-2253.
- [27] WANG D, WANG L, LIU S, et al. A preclinical study of allogeneic CD19 chimeric antigen receptor double-negative T cells as an off-the-shelf immunotherapy drug against B-cell malignancies[J/OL]. **Clin Transl Immunology**, 2024, 13(12): e70022.
- [28] QI K, JIA D, ZHOU S, et al. Cryopreservation of immune cells: recent progress and challenges ahead[J/OL]. **Adv Biol**, 2024, 8(12): e2400201.
- [29] 林 菊, 相志强, 杜东芬, 等. 从滤白残留物中回收单个核细胞的稳定性研究[J]. **中国输血杂志**, 2025, 38(5): 723-733.
- LIN Ju, XIANG Zhiqiang, DU Dongfen, et al. Study on the stability of PBMCs recovered from leukocyte-depleted filter residues[J]. **Chinese Journal of Blood Transfusion**, 2025, 38(5): 723-733. (in Chinese)

[本文编辑 余 方 刘丽娜]