



磁性细胞分选技术的应用与生物学评价*

洪甜¹⁾ 李静雯¹⁾ 李仁爱²⁾ 陈尔凝¹⁾ 赵璐璐¹⁾ 杜美红^{1)**}

(¹⁾北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心),北京 100094; (²⁾北京城市学院生物医药学部,北京 100094)

摘要 磁性细胞分选技术是一种利用超顺磁性纳米复合材料进行细胞分选的细胞高度特异性快速分选技术,在免疫学、干细胞学、肿瘤学和临床医学等领域应用广泛。本文综合阐述了磁性细胞分选技术的分类和应用,讨论了近几年出现的几项基于磁性细胞分选的新技术和面临的挑战。重点分析了磁性细胞分选产品生物学评价的必要性,并提出了10项与磁性细胞分选产品相关的生物学评价技术参数:得率、纯度、无菌、细胞毒性、细胞形态、活率、细胞的光散射特性、细胞的荧光抗体标记能力、细胞活化、细胞增殖,该评价技术参数的提出对磁性细胞分选规范化应用具有重要的推动作用。

关键词 磁性细胞分选,生物学评价,细胞分选技术,磁性材料,淋巴细胞

中图分类号 Q2-33, Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0009

磁性细胞分选技术首次应用于1977年, Molday等^[1]使用偶联异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)的磁珠成功分选出了人红细胞和小鼠脾脏B淋巴细胞。随后,1994年, Büsch等^[2]通过两级磁分选的方法从11例孕妇外周血样本中检测到7例(妊娠12~25周)胎儿细胞包含父系等位基因,1998年, Gomez等^[3]使用凝集素涂层的磁珠分离出了肝内皮细胞。随着磁性细胞分选技术的逐渐成熟,德国美天旎磁性细胞分选技术已经成为磁性细胞分选领域的金标准^[4]。流式细胞分选对设备要求较高、对细胞刺激较大,且只有 $10^7/h$ 的分选速度,而磁性细胞分选简单快速,分选速度可达到 $10^9/h$ ^[5]。磁性细胞分选的优势表现在它能够获得高得率、高纯度、高活率的目标细胞,且目标细胞可用于培养分析、血液回输、流式分析等,是目前试验研究和临床应用中获得单一的纯化细胞的最为重要的一项技术手段。

本文对磁性细胞分选方法现状进行综述,并对磁性分选的细胞提出了生物学评价。

1 磁性细胞分选

细胞分选是指从全血、组织或者多细胞悬液中分离纯化目标细胞。分选方法主要有两种,一种是

通过流式细胞仪对标记有特异性荧光的细胞进行分选,一种是通过免疫磁珠进行磁性分选。磁性细胞分选的主要原理是细胞通过生物活性分子连接到具有超顺磁性的磁珠上,在磁场的作用下,被磁珠标记的细胞滞留在磁场中,未被标记的细胞会流出或被吸出从而被收集,当去除磁场后,被标记的细胞可被洗脱收集,由此目标细胞和非目标细胞得以分离。

磁性细胞分选的方法主要有3种:外源性磁珠标记如磁珠表面偶联抗体、内源性磁矩如含铁元素的红细胞、磁珠通过细胞封装内化如巨噬细胞吞噬磁珠。一般所说的磁性细胞分选是指采用外源性磁珠标记的方法进行细胞分选。目前市场上应用于细胞分选的磁珠主要有两种,一种是1~50 nm的小粒径磁珠,如美天旎的50 nm磁珠;一种是100 nm~50 μm 的大粒径磁珠,如Dynabeads的1 μm 、2.8 μm 、4.5 μm 磁珠。

*北京市科学技术研究院高水平创新团队(HIT202201)和北科萌芽计划(BGS202116)资助项目。

**通讯联系人。

Tel: 010-58717271, E-mail: dumeihong@bepca.ac.cn

收稿日期: 2023-01-09, 接受日期: 2023-04-14

2 磁性细胞分选技术的分类及其应用

2.1 磁性细胞分选技术的分类

磁性细胞分选所用的磁珠一般是以氧化铁为核心，外层经过生物活性分子修饰的具有超顺磁性的纳米或微米颗粒^[6-7]。从标记方法进行分类可以分为两类：直接标记和间接标记，直接标记的生物活性分子修饰主要是单克隆抗体修饰，间接标记的生物活性分子修饰主要包括抗免疫球蛋白、抗生物素、链霉亲和素（或改性链霉亲和素）、抗荧光素修饰等。从磁珠是否可以被解离方面分为3类：只解离磁珠、同时解离磁珠和抗体，以及不可被解离。从分选方法方面分为4类：阳性细胞分选、阴性细胞分选、去除细胞分选和多级细胞分选。以下重点从分选方法分类进行阐述。

2.1.1 阳性细胞分选

阳性细胞分选是指磁珠结合目标细胞从而使其从混合物中分离出来的方法，在进行阳性细胞分选时，有直接标记和间接标记两种方法。直接标记时，磁珠标记有能够特异性识别目标细胞的抗体，磁珠上的抗体与目标细胞结合后，在磁场的作用下，目标细胞被滞留在磁场中，非目标细胞在悬液中可被丢弃或用于其他试验，当撤去磁场时，目标

细胞被洗脱收集。间接标记时，当目标细胞标记有荧光素，磁珠标记有抗荧光素，通过荧光素和抗荧光素的结合使磁珠和目标细胞结合在一起，在磁场的作用下，磁珠与目标细胞复合物被滞留，撤去磁场时目标细胞被洗脱收集。图1左为用磁性介质表面偶联抗EpCAM抗体，靶向循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）表面的EpCAM抗原对CTC进行阳性富集^[8]。

阳性细胞分选技术应用非常广泛：不仅可以有效检测外周血中的CTC^[9]，还可以有效检测外周血中的播散肿瘤细胞^[10]；用于分选人单核细胞^[11]、人心肌细胞^[12]、人血液中黑色素瘤细胞^[13]、产妇脐带血CD34+细胞^[14]等；用于从母体血液细胞中分离胎儿细胞^[15]；用于马CD14+单核细胞的富集，分选前马外周血中CD14+细胞比率为5.5%，分选后CD14+单核细胞纯度能达到98.33%，分选前外周血细胞活率为91%，分选后CD14+单核细胞活率为96.97%^[16]；用于宽吻海豚嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的分选^[17]；在辅助生殖技术方面，阳性细胞分选有助于分选DNA断裂率较低且染色体含量不平衡的精子^[18-19]；根据膜联蛋白V与磷脂酰丝氨酸结合的特性，磁珠表面包被膜联蛋白V来识别凋亡的精子，此技术可以用来分选非凋亡的精子以提高精子质量^[20-21]。

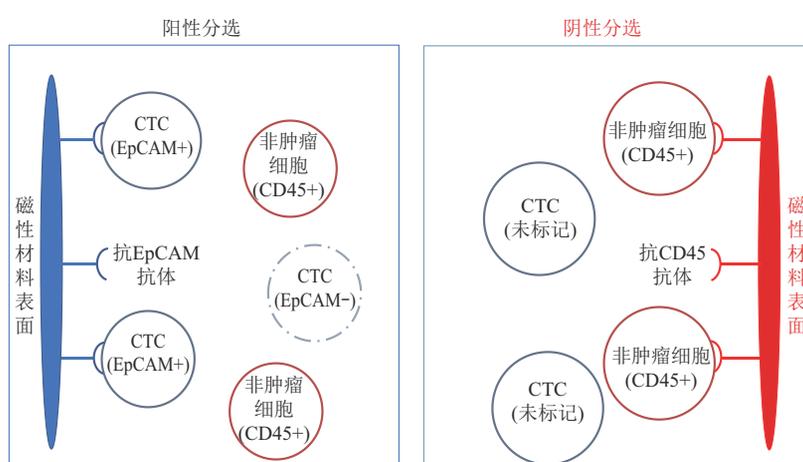


Fig. 1 Positive and negative sorting of circulating tumor cells^[8]

图1 循环肿瘤细胞的阳性分选和阴性分选策略^[8]

2.1.2 阴性细胞分选

阴性细胞分选是指磁珠结合非目标细胞从而使目标细胞从混合物中分离出来的方法，阴性细胞分选需要磁珠和非目标抗体混合物，该抗体混合物能够特异性识别非目标细胞。抗体混合物与磁珠的组

含有2种。a. 抗体混合物标记有生物素^[22]，磁珠标记有链霉亲和素（或者改性的链霉亲和素），生物素化的抗体混合物结合非目标细胞，磁珠上的链霉亲和素与抗体上的生物素结合，在磁场作用下，非目标细胞被滞留在磁场中，目标细胞悬浮在液体中

可被收集。b. 抗体混合物标记有小鼠抗人的IgG抗体, 磁珠标记有人抗小鼠IgG的抗体, 可以识别所有小鼠IgG亚种, 小鼠抗人的IgG抗体混合物结合非目标细胞, 磁珠上的人抗小鼠IgG的抗体与小鼠

抗人的IgG抗体结合, 在磁场作用下, 非目标细胞被滞留在磁场中, 目标细胞悬浮在液体中可被收集。表1为几种常见的淋巴细胞亚群阴性分选的抗体混合物方案。

Table 1 Several antibody mixtures for negative sorting of lymphocyte subsets

表1 几种常见的淋巴细胞亚群阴性分选的抗体混合物方案

物种	细胞类型	抗体混合物
人	T细胞	抗人CD14、CD16 (a和b)、CD19、CD36、CD56、CDw123、CD235a
	CD4+ T细胞	抗人CD8、CD14、CD16 (a和b)、CD19、CD36、CD56、CDw123、CD235a
	CD8+ T细胞	抗人CD4、CD14、CD16 (a和b)、CD19、CD36、CD56、CDw123、CD235a
	B细胞	抗人CD2、CD14、CD16 (a和b)、CD36、CD43、CD235a
	树突状细胞 (DC细胞)	抗人CD3、CD14、CD16、CD19、CD56、CD235a
	单核细胞	抗人CD3、CD7、CD16 (a和b)、CD19、CD56、CDw123、CD235a
	自然杀伤细胞 (NK细胞)	抗人CD3、CD14、CD36、HLA-II DR/DP、CDw123、CD235a
小鼠	T细胞	抗小鼠CD45R (B220)、CD11b (Mac1)、Ter-119、CD16/CD32
	CD4+ T细胞	抗小鼠CD8、CD45R (B220)、CD11b (Mac1)、Ter-119、CD16/CD32
	CD8+ T细胞	抗小鼠CD4、CD45R (B220)、CD11b (Mac1)、Ter-119、CD16/CD32
	DC细胞	抗小鼠CD2、CD3ε、CD49b、mIgM、Ter-119

阳性分选与阴性分选是细胞分选中的基本技术, 两种技术各具特点: 相较于阳性细胞分选, 阴性细胞分选的优点是能够获得更大量的目标细胞, 且目标细胞没有接触磁珠, 因而对目标细胞的损伤很小, 对于后续的功能分析和应用几乎没有任何影响, 而阴性细胞分选的缺点是得到的目标细胞会混有其他未知细胞或碎片^[23]。Bhattacharjee等^[24]通过对比阳性分选和阴性分选得到的CD14+单核细胞的活化和增殖能力时, 发现在培养6 d后, 磁珠依然附着在阳性分选得到的细胞上, 导致细胞对脂多糖的敏感性受损, 活化和增殖较差, 而阴性分选得到的细胞则没有出现该种情况。图1右为磁性介质表面偶联抗CD45抗体, 靶向非癌细胞表面的CD45抗原对CTC进行阴性富集, 对于阴性富集, 获得的癌细胞是无标签的异质性的CTC^[8]。

2.1.3 去除细胞分选

去除细胞分选是指磁珠结合某一种特定的细胞类型从而从混合物中去除该特定的细胞类型。如图2a所示, 黑色实心圆代表被磁珠结合的非目标细胞, 空心圆代表目标细胞, 在磁场的作用下, 未被标记的目标细胞被收集。有研究表明, 当磁珠附着在阳性分选的T细胞表面时, 即使在培养2周后, 大多数处于无增殖或有限增殖状态的阳性T细胞仍保持磁性, 只有在经过多次细胞分裂才能稀释进而失去磁珠的磁性^[25], 因此当目标细胞不能带有磁

性时, 更好的分选方法是选择阴性细胞分选, 或者从目标细胞组分中去除特定的非目标组分。非解离型的阳性细胞分选也可用于去除细胞群中的特定细胞。从外周血中去除CD45阳性细胞以研究肾细胞癌的循环肿瘤细胞^[26], 从外周血中去除CD24+未成熟的胸腺细胞来富集iNKT细胞^[27], 从外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中去除CD3+ T细胞以纯化NK细胞^[28], 去除红细胞中的网织红细胞^[29]。在防止移植物抗宿主病的研究过程中可以通过去除CD3+ T细胞^[30]或者活化诱导抗原的表达来去除活化的细胞^[31]。因为去除特定的细胞类型方法的去除效率不能达到百分之百, 所以仍然会混有极少量的特定细胞。在细胞治疗净化的过程中, 虽然通过去除分选不能完全去除未分化的人胚胎干细胞, 但是联用细胞毒性抗体mAb后可以达到99.1%~100%去除^[32]。

2.1.4 多级细胞分选

多级分选是指经过多次分选得到目标细胞, 当目标细胞数量较少, 或目标细胞的特异性标志物表达量低, 或需要经过多个标志物的共同表征才能标记目标细胞时就会使用到多级分选。多级分选一般会阳性分选、阴性分选、去除分选联用。先进行去除细胞分选再进行阳性细胞分选 (图2b)。为了获得PBMC中的嗜碱性粒细胞, 第一步先阴性分选去除非嗜碱性粒细胞, 第二步阳性分选得到

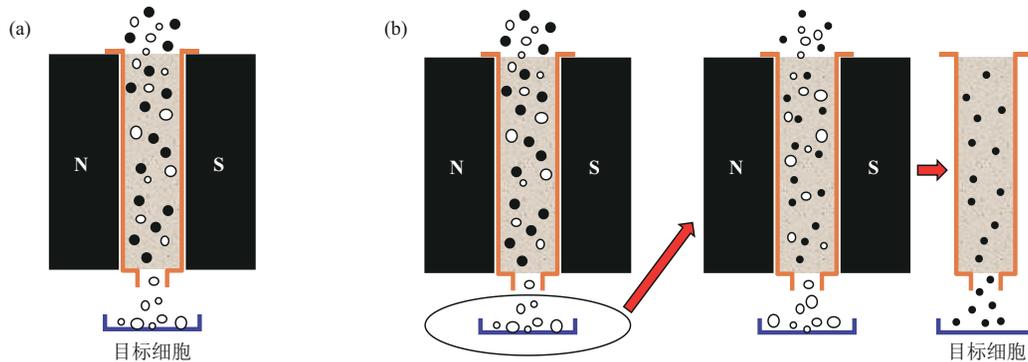


Fig. 2 Depletion and sequential cell isolation

图2 去除细胞分选和多级细胞分选策略

(a) 去除细胞分选, (b) 多级细胞分选。黑色实心圆代表磁珠标记细胞, 空心圆代表未被标记细胞。

CD123+的嗜碱性粒细胞^[33]。Werner等^[34]从外周血单个核细胞中用磁性细胞分选的方法首先分选出CD34-细胞, 再从CD34-细胞中分选出CD4+辅助性T细胞、CD8+细胞毒性T细胞、CD14+单核细胞、CD19+ B细胞、CD56+ NK细胞, 通过检测这些淋巴细胞亚群的端粒酶活性, 发现单次耐力训练可显著增加CD14+和CD34+白细胞中的端粒酶活性。为了分离胎儿有核红细胞, 第一步去除CD45+细胞, 第二步从CD45-细胞中分离出CD71+有核红细胞^[35]。从成人骨骼肌中分离静止肌肉卫星细胞^[36], 分选小鼠肝脏样本中的肝细胞、肝窦内皮细胞和枯否细胞^[37]。

2.2 自动化细胞分选

自动化细胞分选是指将细胞分选的过程机械化, 通过计算机控制实现自动细胞标记和细胞分选。全自动磁性细胞分选仪可以从全血、PBMC、骨髓和游离组织中分选出目标细胞, 通过阳性分选、阴性分选和去除分选的方式获得高得率、高纯度、高活率的目标细胞, 如T细胞、B细胞、NK细胞、DC细胞、单核细胞等免疫细胞, 以及干细胞、肿瘤细胞等。全自动磁性细胞分选仪有分选柱模式如德国美天旎公司的autoMACS Pro Separator和无柱模式如加拿大STEMCELL公司的RoboSep-S和RoboSep-16。全自动磁性细胞分选仪预设有多种常用的分选程序, 经过全自动的细胞标记和细胞分选技术, 只需手动将待分选的样本放入分选仪, 根据样本类型、目标细胞占总细胞的比率和目标细胞表面抗原表达的强弱选择合适的分选程序, 加入

合适的分选试剂, 即可在数分钟后得到目标细胞组分和不含目标细胞的组分。全自动磁性细胞分选仪可以同时处理多个样本, 如autoMACS Pro Separator可以同时分选6个样本, RoboSep-S可以同时分选4个样本, RoboSep-16可以同时分选16个样本, 分选速度可达到每秒 10^7 个细胞。

Strauss等^[38]在研究免疫抑制剂雷帕霉素促进CD4+ CD25+ FoxP3+调节性T细胞的扩增的过程中, 使用全自动磁性细胞分选仪从正常对照组($n=21$)的PBMC中分离出了CD4+ CD25+和CD4+ CD25- T细胞。Letzkus等^[39]使用全自动磁性细胞分选仪富集8种靶细胞, 包括CD14+单核细胞、CD3+ T细胞、CD4+ T细胞、CD8+ T细胞、CD15+粒细胞、CD19+ B细胞、CD56+ NK细胞, 然后对这8种细胞进行转录组分析, 这些直接从全血分离的免疫细胞亚群的转录组学信息可以整合到临床试验中。

2.3 磁性细胞分选技术的应用

磁性细胞分选在生物学和生物医学方面有着广泛的应用。磁性细胞分离人外周血中的稀有细胞可以为临床诊断提供依据, 分离并扩增特定细胞能辅助临床细胞治疗, 但这一过程的标准化应用还任重道远。尽管目前磁性细胞分选技术已经相当成熟, 但是在分选一些不太常见的细胞方面, 仍需要进行大量的方法验证才能应用于临床, 并且磁性细胞分选是一种有标记的分选, 在需要进行无标记分选时, 磁性细胞分选就出现了短板。当目标细胞的标志物为弱表达标志物或者表达于胞内时, 则需要足

够量的磁性颗粒标记兼具穿透细胞膜或核膜的功能, 而目前尚没有很好的方法来达到这一目的。因此磁性细胞分选还有有待改善的地方, 以及开发出其他分选方法进行补充。

虽然磁性细胞分选能够提高目标细胞的得率和纯度, 但当需要涉及到多个标志物才能达到分选目的的时候, 就必须按标志物在细胞中的表达强弱和表达量来进行顺序分选, 这样会延长分选时间^[40]。磁性细胞分选也可能影响目标细胞的特性, 如经过磁性细胞分选后的嗜酸性粒细胞向白三烯和血小板活化因子迁移较少或者没有迁移^[41], 细胞暴露于铁磁性基质和磁场中也会改变细胞膜完整性^[42]。

磁性细胞分选发展到今天, 已经出现了多种基于磁性细胞分选的新技术, 例如: 亲和珠介导的细胞声分离 (图 3a)^[43]; 利用梯度间距的磁性软微柱

阵列上的强力磁棘轮效应的定量磁分离仪器 (图 3b), 突破了传统的定性分离概念, 突出了其在定量分离领域的潜力^[44]; 芯片中嵌入两级磁分离的飞越式微流控芯片技术^[45]。磁珠表面的修饰材料也有了重大创新: N-(磷甲基)亚氨基二乙酸作为磁性纳米粒子表面接枝用来分选高纯度人 CD4+ T 细胞^[46]; 通过顺序连接的抗体和纳米颗粒进行磁扩增, 实现了细胞表面和细胞内标志物的标记的 100 倍放大, 能够有效分离稀有细胞亚群 (图 3c)^[47]; 用表面修饰了卷曲螺旋肽的磁珠分选转基因细胞 (图 3d)^[48]。无论是通过改变磁场来改变磁泳方式或者通过改变磁性纳米颗粒表面的修饰方法都是为了适应磁性细胞分选技术更广泛的应用场景, 使得分选的目标细胞纯度更高, 解决弱表达标志物不易被标记的难题等。表 2 总结了近 5 年比较有创新性的磁性细胞分选方法。

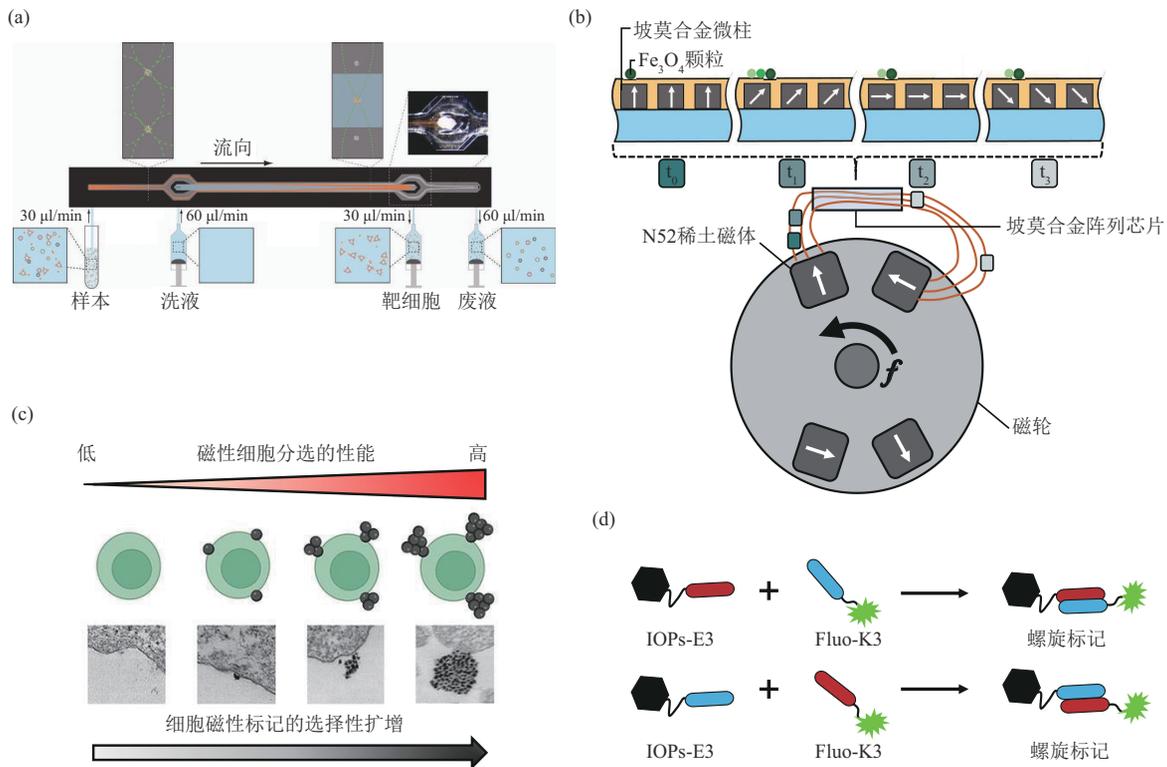


Fig. 3 Four new techniques of magnetic cell sorting

图3 4种磁性细胞分选新技术

(a) 亲和珠介导的细胞声分离技术^[43], (b) 梯度棘轮式定量磁分离技术^[44], (c) 顺序连接抗体和纳米颗粒的磁扩增技术^[47], (d) 卷曲螺旋肽修饰技术^[48]。

Table 2 Summary of innovative magnetic cell sorting methods

表2 创新的磁性细胞分选方法汇总

技术	靶细胞	解决的关键问题	技术要点	优点	参考文献
钴基带状棱镜偏转芯片	CTC	现有技术难以高分辨率分离细胞亚群，区分单细胞和细胞簇，并以无损的方式进行分离	利用钴基金属将具有不同磁负载的纳米颗粒结合的肿瘤细胞的流动流分离成10个离散流	高分辨率免疫磁分析和磁分离基于不同亚群的细胞表面蛋白质的表达来并行自动分析单个细胞和CTC簇	[49]
DynarFace芯片	CRC ¹⁾	不可逆的亲合力界面必须利用物理化学刺激来破坏循环稀有细胞的捕获力，这需要繁琐的操作，并影响细胞活力和下游分析	通过在用于液体活检的人字形芯片中设计动态和可逆免疫亲和和微界面来动态操控捕获力	累积捕获和可逆释放中等表达水平的标志物的捕获能力提升了134.81%与CRC的下游体外培养和基因分析兼容	[50]
浸润细胞的微流控亲和靶向	TIL ²⁾	TIL罕见且难以分离，纯度和回收率低 治疗性的TIL亚群靶向性差 现有分离扩增方法周期长成本高	永磁体夹在微流控装置中，平衡磁力和流体阻力	回收的TIL数量提高30倍 有效分离治疗性TIL亚群(CD39 ^{med})，增强了过继细胞疗法的效力 芯片可自行配置 降低总成本和体外培养时间	[51]
定量铁流体动力学细胞分离的微流控装置	稀有细胞	缺乏基于抗原表达的多峰分离能力 稀有细胞通常是异质性且动态变化的，使得难以同时进行抗原分析和细胞分离	在生物相容性铁磁流体中整合细胞磁电泳和抗磁电泳	分析和分离稀有细胞(如CD154+ T细胞) 每分钟30 000个细胞的速度下实现多峰稀有细胞分选和抗原分析 高灵敏度，低至1:50 000的靶向-背景细胞频率 得率96.49%，纯度98.72%	[52]
可扩展纤维制造的磁性聚合物颗粒	免疫细胞	传统的化学方法调节颗粒直径和结构的能力有限 磁性聚合物颗粒直径从纳米级连续调整到微米级能力有限	通过基于聚合物纤维的纤维内高原瑞利不稳定性通用方法生产高质量磁性复合颗粒	磁颗粒直径宽范围: 20 nm~1.25 mm 可扩展制备具有不同粒径、不同结构和不同功能的磁性聚合物复合颗粒的通用技术	[53]
磁扩增	稀有细胞	缺乏有效的弱表达标志物和胞内标志物介导的细胞分选方法	顺序连接的抗体和磁性纳米颗粒标记细胞，选择性有效地放大磁性标记	细胞表面和胞内标志物的标记能力扩增100倍 尤其适用于弱表达标志物和胞内标志物	[47]
代谢标记	罕见CTC	最常用的免疫/适配体亲和方法需要使用特异性抗体/适配体来结合CTC上的已知抗原，不能完全靶向高度异质的CTC，从而导致漏检 血液中有大量的白细胞和血浆蛋白的污染	通过胞外囊泡生成方式，产生细胞释放的遗传母细胞膜特征磁性囊泡，然后用二苯并氮杂环辛烯官能化，以靶向和分离代谢标记的罕见CTC	5个细胞的极低检测限 捕获不同类型的肿瘤细胞 高纯度富集 不依赖于抗原抗体的结合 第一例基于细胞工程策略从动物模型中获得CTC	[54]
仿生免疫磁性纳米颗粒	CTC	血液中大量的干扰白细胞非特异性结合于磁珠上，使CTC纯度低 现有的白细胞膜提取和封装技术过于繁琐	通过逐层组装技术整合磁性纳米颗粒和石墨烯纳米片，表面经白细胞膜包被，生物素化的脂质分子插入白细胞膜	1 ml血液(含20~200个CTC)中获得超过85.0%的捕获效率和高于94.4%的纯度和高于94.4%的纯度 分离的CTC中98.0%保持存活并可直接在体外培养 良好的重复性 利用石墨烯纳米片可以轻松获得白细胞膜包被的磁珠	[55]

续表2

技术	靶细胞	解决的关键问题	技术要点	优点	参考文献
基于线圈肽互补的磁性细胞分选	基因修饰的细胞	现有的转基因细胞分选成本较高或需要长时间使用要抗生素来进行筛选	细胞用螺旋线圈肽官能化或用编码螺旋线圈肽的基因转染细胞, 氧化铁颗粒用互补肽功能化	不依赖于抗原抗体的结合 胰蛋白酶处理可解离细胞	[48]

¹⁾ CRC: 循环稀有细胞 (circulating rare cell); ²⁾ TIL: 肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocyte)。

3 生物学评价

磁性细胞分选的目的是获得纯化单一的目标细胞, 需要在尽可能短的时间内完成分选过程, 并且分选出的细胞不影响后续使用。无论经过哪种磁性细胞分选方法分选得到的目标细胞, 必定需要符合一定的要求才能用于后续的分析或功能试验。

3.1 生物学评价参数

目前, 对于经磁性细胞分选得到的目标细胞的数量、活性和功能等方面没有明确统一的要求, 每个研究者都是基于各自试验的需求进行独立的研究, 这就存在着多种多样的评价指标被用于对目标细胞的评价。为了确立有效且普遍适用的评价指标, 本文查阅了多篇论著和综述后发现有许多与细胞相关的生物性能参数被提及, 通过对比分析列举如下几种重要的参数。a. 在DNA合成方面, 有研究表明, 磁分选后的24 h内细胞的DNA合成没有改变^[56]。b. 目标细胞增殖方面, 从梗阻性无精症和非梗阻性无精症人群中磁分离得到的精原干细胞 (spermatogonia stem cells, SSC) 保持增殖活力 (表3), SSC在体外增殖并保持其特征超过12代 (>6个月), 且SSC特异性标志物GFR α -1和整合素 α 6阳性的细胞数量在第8代时增加到80%以上^[57]。c. 目标细胞的功能方面, 结合磁珠不影响细胞的活性和增殖^[58]: 用磁性细胞分选法从脂肪源性间质血管部分培养细胞中分离出的CD105阳

性细胞成功向软骨细胞分化^[59]; 在针对K562、Daudi、U937和HL60靶细胞系的铬释放试验中, 经磁性细胞分选得到的CD3+和CD3-免疫细胞均表现出了高度显著的免疫细胞溶解活性^[56]; 从人胚胎体中磁分离血管细胞, 经过分化培养, 有超过80%的血管细胞分化成内皮样或平滑肌样细胞^[60]; 经磁性细胞分选的细胞保持了小胶质细胞特异性 (TMEM119/Small1) 和巨噬细胞特异性 (Ccr2/CD69) 标记的表达, 保持吞噬能力, 对脂多糖刺激做出反应, 并吞噬荧光乳胶珠^[61]; 分离的人CD34+造血干细胞在免疫缺陷小鼠体内具有重新繁殖的活性^[62]。d. 目标细胞得率、纯度、活率方面, 流式细胞术和台盼蓝染色法检测表明, 磁性细胞分选法分离各类细胞的得率、纯度、活性如下: CD4+淋巴细胞平均得率为(56 \pm 15)%, 纯度为(96 \pm 3)%, 活率为(97 \pm 3)%^[43]; 人造血干细胞和祖细胞得率为(77.5 \pm 22.6)%, 纯度为(87.8 \pm 2.4)%^[62]; CD4+ CD25+ Treg细胞纯度为(91.2 \pm 6.2)%^[63]。e. 细胞的光散射特性、荧光抗体标记能力方面, Miltenyi等^[58]的研究表明, 结合了磁珠的细胞不会改变细胞的光散射和荧光参数。f. 细胞毒性方面, Di Corato等^[64]基于MTT细胞毒性试验表明, 磁珠浓度与细胞毒性正相关, 当磁珠浓度相当于16 mg/L铁浓度时, 磁珠对人口腔表皮样癌细胞毒性小于20%, 当65 mg/L时则达到40%。

Table 3 Isolation and viability of cultured spermatogonial stem cells^[57]

表3 精原干细胞的分选和活力检测^[57]

类型	人数	SSC <i>n</i> (%)	P1细胞活力 (第3天) /%		P3细胞活力 (第40天) /%	
			台盼蓝	TUNEL	台盼蓝	TUNEL
OA	18	15 (83.3)	93.98 \pm 1.05	7.31 \pm 1.78	91.91 \pm 2.20	5.14 \pm 1.68
NOA (SCOS)	11	4 (36.3)	95.15 \pm 1.09	6.11 \pm 1.89	94.10 \pm 1.69	6.03 \pm 1.53
NOA (MA)	8	4 (50.5)				
总计	37	23 (62.2)	94.56 \pm 1.07	6.71 \pm 1.83	93.00 \pm 1.94	5.58 \pm 1.60

细胞活力值为平均值 \pm SD。OA: 梗阻性无精症 (obstructive azoospermia); NOA: 非梗阻性无精症 (non-obstructive azoospermia); SCOS: 唯支持细胞综合征 (Sertoli cell only syndrome); MA: 成熟阻滞 (maturation arrest); P: 代数。

综上所述,磁性细胞分选技术分选获得的目标细胞被广泛应用于生命活动的研究,所以好的磁性细胞分选产品必须保证目标细胞的无菌、高得率、高纯度、高活率。同时,分选产品不能对细胞产生毒性,不能改变细胞形态,不能使细胞活化,不影响细胞自身的增殖功能。为了能够对目标细胞进行流式分析或者分选,分选产品和分选步骤必须不改变目标细胞的光散射特性,且分选后的目标细胞必须具有一定的荧光抗体标记能力以便对细胞进行标志物的标记。因此,对磁性细胞分选产品进行生物学评价的指标应包含:得率、纯度、无菌、细胞毒性、细胞形态、活率、细胞的光散射特性、细胞的荧光抗体标记能力、细胞活化、细胞增殖。

3.2 生物学评价参数的检测方法

对上述提出的十项参数进行检测,通过不同产品的检测结果之间的比对,磁性细胞分选厂家可以查漏补缺对自有产品进行改良,磁性细胞分选的使用者可以通过对比选择更加适合自己试验的产品。研发机构和高校科研团队可以通过这十项参数的比对发现磁性细胞分选的短板及亟待解决的问题,对新产品进行生物学评价来评估新产品的优劣。

以下列举适用于上述提出的十项生物学评价参数的检测方法。

3.2.1 得率

磁性细胞分选的得率受两方面的影响:a.分选过程中细胞的损失;b.由于细胞损伤或磁性细胞分选产品自身的因素导致的磁珠标记效率下降。只有选择最优的磁珠材料和大小,合适的抗体,最优的分选步骤才能获得较高的得率。计算目标细胞得率则可判断磁性细胞分选试剂盒的优劣。计数分选前细胞总数和分选后细胞总数,用能够特异性识别目标细胞的抗体对分选前的总细胞进行标记,采用流式细胞术检测分选前目标细胞占分选前细胞总数的比例,分选后的总细胞数占分选前目标细胞总数的比例记为目标细胞的得率。

3.2.2 纯度

磁性细胞分选的纯度受到目标细胞表面抗原与抗体结合的特异性的影响。阳性细胞分选的纯度一般高于阴性细胞分选。阳性细胞分选是直接针对目标细胞进行特异性标记,而阴性细胞分选是去除掉不需要的细胞。阴性细胞分选在抗体设计方面会受到当前对细胞群的认知的限制,有可能会去除的细胞种类不够多不够全,且特异性结合非目标细胞的结合率不可能达到100%,也就不可能100%去

除非目标细胞,所以阴性细胞分选的纯度较低。若细胞纯度太低,则无法用于后续试验,一般磁性细胞分选的纯度可达90%以上。用能够特异性识别目标细胞的抗体对分选后的总细胞进行标记,采用流式细胞术检测目标细胞占分选后总细胞数的比例记为目标细胞的纯度。流式细胞术检测表明(图4a),分选前CD19⁺B细胞数量占总淋巴细胞数量的0.068%(中),分选后CD19⁺B细胞纯度达到99.3%(右)^[65]。

3.2.3 无菌

若经磁性细胞分选出来的细胞后续需要用于继续培养,分选出来的细胞则必须无菌,磁性细胞分选试剂盒以及分选步骤均不能有细菌或真菌污染。分选步骤中发生污染与试剂盒本身无关。判断试剂盒是否合格,则只需检测试剂盒本身成分是否无菌。取适量待检试剂加入无菌微生物培养皿中,分别在营养琼脂培养基中培养2d以判断待检试剂是否含有细菌,在沙氏葡萄糖琼脂培养基中培养5~7d以判断待检试剂是否含有真菌。

3.2.4 细胞毒性

细胞毒性是指用于磁性细胞分选的材料在接触含有目标细胞的细胞群后会对细胞的生长造成影响,而不管分选出来的细胞是用于分析还是后续进一步功能试验,磁性细胞分选的材料都必须对目标细胞没有细胞毒性。将磁性分选材料按照一定的浸提比例浸没在依格尔最低限量基本培养基MEM中浸提24h,用浸提液培养小鼠成纤维细胞L929,培养24h后用MTT法或CCK-8(cell counting kit-8)法检测细胞存活率,以判断磁性分选材料对目标细胞有无细胞毒性。

3.2.5 细胞形态

磁性细胞分选是否对目标细胞造成了损伤,最直观的表现就是细胞形态发生了改变。在显微镜下观察细胞的基本形态并做记录,观察比较分选前后细胞形态的变化则可以用于判断分选试剂和分选过程是否造成了细胞损伤。如若分选出的细胞有损伤则不宜进行后续的分析 and 功能试验。图4b为倒置显微镜下观察到的结合了磁珠的CD45⁺白细胞的形态^[52]。

3.2.6 活率

只有活细胞才能进行较好的抗体标记才能发挥细胞本身的功能,因此磁性细胞分选后得到的细胞必须有较高的活率。使用台盼蓝法检测分选后活细胞数目占总细胞数目的百分比则可得出细胞活率。

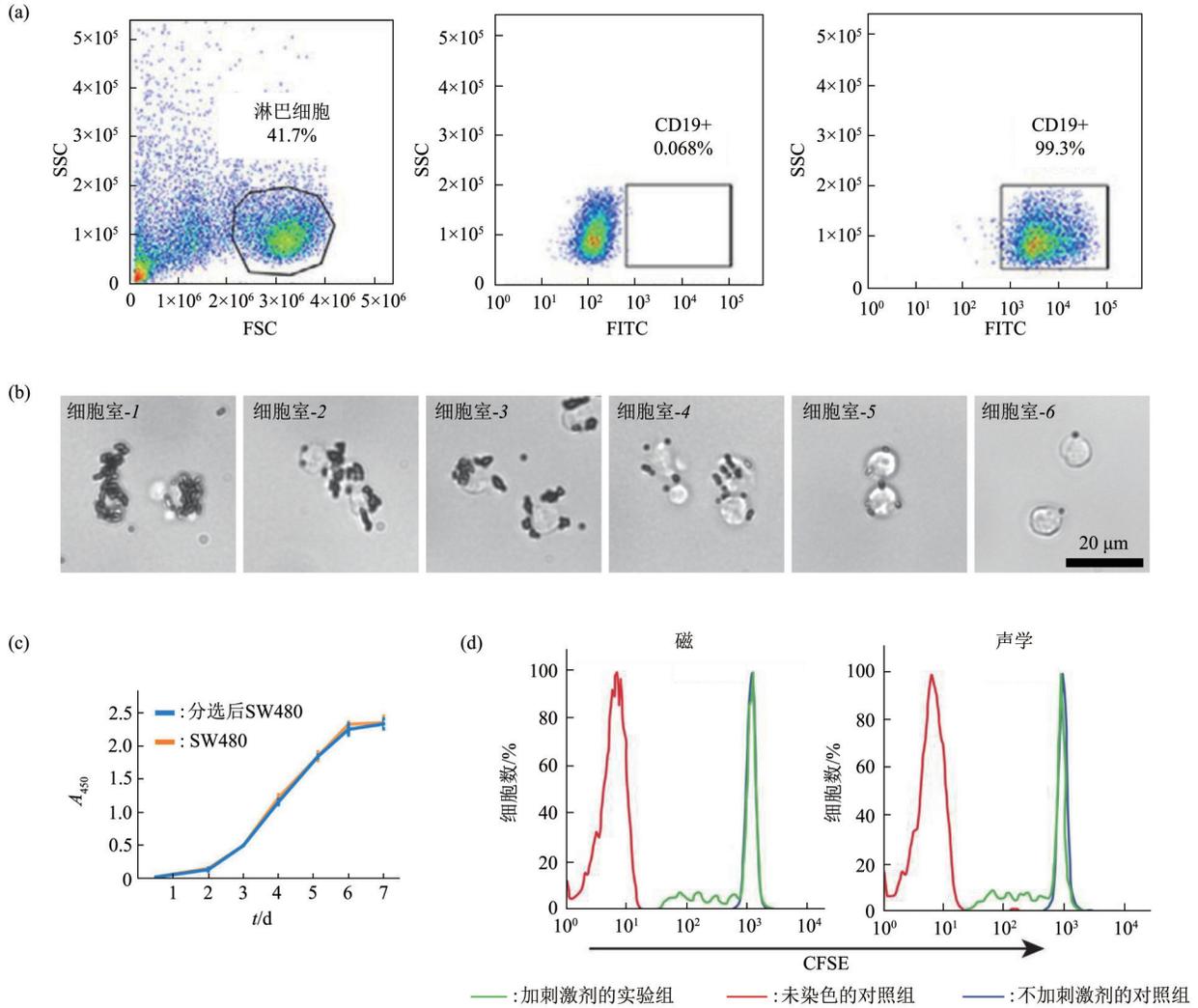


Fig. 4 Biological evaluation of magnetic cell sorting technology

图4 磁性细胞分选技术的生物学评价

(a) 流式细胞术测定从原发性干燥综合征患者外周血中磁性细胞分选的CD19+ B细胞纯度达到99.3% [65], (b) 细胞收集室中磁珠标记的CD45+白细胞的倒置显微镜明场图像 [52], (c) CCK-8法检测从磁珠上解离的SW480和对照组SW480的细胞增殖 [50], (d) CFSE法检测磁性分选和声学分选后的CD4+ T细胞的细胞增殖 [43]。FSC: 角散射光 (forward scatter), SSC: 侧向角散射光 (side scatter)。

3.2.7 细胞的光散射特性

目前细胞分选主要集中在血细胞、干细胞和肿瘤细胞, 流式细胞检测是这些细胞分析过程中常用的检测方法。而流式细胞仪检测的最基本指标包括前向角散射光 (forward scatter) 和侧向角散射光 (side scatter), 因此当分选后的目标细胞需要进行流式试验时, 则其细胞的光散射特性就不能发生改变。在流式细胞仪上用同样的电压和设门能圈出分选前和分选后的目标细胞群, 则可以证明磁性细胞分选没有改变细胞的光散射特性。

3.2.8 细胞的荧光抗体标记能力

磁性分选过程中的抗体标记会占据细胞表面一

定数量的抗原表位, 该过程中的抗体标记过少会降低分选细胞的纯度, 过多则会影响分选后的细胞进行后续分析试验时荧光抗体的标记。将经分选得到的目标细胞与不同浓度的荧光抗体共孵育, 再通过流式细胞术检测细胞表面标记的荧光抗体量即可体现细胞的荧光抗体标记能力。

3.2.9 细胞活化

分选出来的细胞一般需要保持细胞原有的活性, 需要确保细胞的表型没有被改变或激活, 因此需要检测分选后的细胞是否被活化。不同细胞有不同的活化指标, 通过流式细胞术检测分选后的细胞的活化指标即可判断经过分选的细胞是否被活化。

3.2.10 细胞增殖

分选得到的目标细胞如果要用于增殖相关试验,则分选试剂和分选步骤不能改变细胞的增殖活性。对于具有增殖活性的目标细胞只需用CCK-8法或CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)法检测其第0、1、2、3、4天的生长曲线即可判断其增殖情况。对于不能增殖的细胞如淋巴细胞则需在培养过程中添加促分裂剂和抗原物质,使细胞重新进入分裂状态,检测其0、12、24、36、48、72、96 h的生长曲线即可判断其增殖情况。使用CCK-8法检测从磁珠上解离的SW480和对照组SW480的细胞增殖表明(图4c),在7 d培养期间,解离后的SW480与对照组SW480的增殖率没有显著差异^[50]。使用CFSE法检测经磁性分选和声学分选后的CD4⁺ T细胞的细胞增殖表明(图4d),声学分选方法未对分选后的细胞的增殖产生明显差异^[43]。

4 总结与展望

磁性细胞分选技术在生命科学研究和临床研究中有着极其重要的地位。磁性细胞分选产品主要由磁珠、磁力架、分离柱或分离试管组成,不同试剂盒的组件不同,分选出的细胞也就不同。现各大生产商对各自的产品有着不同的评价标准,各有倾向,一般均为尽可能展现各自产品优点。目前由于国内外缺乏全面且一致的评价标准,磁性细胞分选产品的使用者对国外产品盲目信赖,导致国内虽然有很多厂家在生产磁性细胞分选产品,但却鲜有知名品牌,这一态势不利于中国相关试剂行业的发展。制定磁性细胞分选产品的性能检测方法有助于对各种产品进行统一检测统一评价,只有在能够有效地区分各大产品的优缺点的基础上,才能有的放矢地进行产品改造和新产品的研发,打破垄断,促进我国自主知识产权磁性细胞分选产品的产出和应用,因此亟需找出磁性细胞分选评价的关键性能指标并建立相关检测方法。

综上所述,磁性细胞分选技术因其应用的广泛性、分选方式的多样性和几乎对分选细胞没有影响的特性而不可替代,而一个性能良好的磁性细胞分选产品必须对其关键生物性能参数进行分析与评价。随着科技的进步与飞速发展,磁性细胞分选技术将会出现更多的新技术和新应用服务于社会服务于人类。

参 考 文 献

- [1] Molday R S, Yen S P, Rembaum A. Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. *Nature*, 1977, **268**(5619): 437-438
- [2] Büsch J, Huber P, Pflüger E, *et al.* Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. *Prenat Diagn*, 1994, **14**(12): 1129-1140
- [3] Gomez DE, Thorgeirsson UP. Lectins as tools for the purification of liver endothelial cells. *Methods Mol Med*, 1998, **9**: 319-328
- [4] Grützkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A*, 2010, **77**(7): 643-647
- [5] Plouffe B D, Murthy S K, Lewis L H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Rep Prog Phys*, 2015, **78**(1): 016601
- [6] 余靓, 刘飞, Muhammad Zubair Y, 等. 磁性纳米材料: 化学合成、功能化与生物医学应用. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 903-917
Yu L, Liu F, Muhammad Zubair Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 903-917
- [7] 唐倩倩, 吴荣谦, 樊海明, 等. 基于磁性纳米材料的肿瘤靶向治疗研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(12): 2266-2277
Tang Q Q, Wu R Q, Fan H M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(12): 2266-2277
- [8] Bankó P, Lee S Y, Nagygyörgy V, *et al.* Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1): 48
- [9] Karimi N, Oloomi M, Orafa Z. Circulating tumor cells detection in patients with early breast cancer using MACS immunomagnetic flow cytometry. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2020, **12**(3): 148-156
- [10] Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, *et al.* Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer*, 2001, **92**(4): 577-582
- [11] Luo J, Lu J, Zeng J, *et al.* Single-cell RNA analysis of chemokine expression in heterogeneous CD14(+) monocytes with lipopolysaccharide-induced bone resorption. *Exp Cell Res*, 2022, **420**(2): 113343
- [12] Schwach V, Passier R. Generation and purification of human stem cell-derived cardiomyocytes. *Differentiation*, 2016, **91**(4-5): 126-138
- [13] Siewert C, Herber M, Hunzelmann N, *et al.* Rapid enrichment and detection of melanoma cells from peripheral blood mononuclear cells by a new assay combining immunomagnetic cell sorting and immunocytochemical staining. *Recent Results Cancer Res*, 2001, **158**: 51-60
- [14] Omori A, Manabe M, Kudo K, *et al.* Influence of obstetric factors on the yield of mononuclear cells, CD34⁺ cell count and volume of

- placental/umbilical cord blood. *J Obstet Gynaecol Res*, 2010, **36**(1): 52-57
- [15] Bianchi D W, Klinger K W, Vadnais T J, *et al.* Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn*, 1996, **16**(4): 289-298
- [16] Durán M C, Willenbrock S, Carlson R, *et al.* Enhanced protocol for CD14+ cell enrichment from equine peripheral blood *via* anti-human CD14 mAb and automated magnetic activated cell sorting. *Equine Vet J*, 2013, **45**(2): 249-253
- [17] Kato M, Itou T, Nagatsuka N, *et al.* Production of monoclonal antibody specific for bottlenose dolphin neutrophils and its application to cell separation. *Dev Comp Immunol*, 2009, **33**(1): 14-17
- [18] El Fekih S, Gueganic N, Tous C, *et al.* MACS-annexin V cell sorting of semen samples with high TUNEL values decreases the concentration of cells with abnormal chromosomal content: a pilot study. *Asian J Androl*, 2022, **24**(5): 445-450
- [19] El Fekih S, Tous C, Gueganic N, *et al.* Decrease of spermatozoa with an unbalanced chromosome content after cell sorting in men carrying a structural chromosomal abnormality. *Andrology*, 2020, **8**(1): 181-190
- [20] Said T M, Agarwal A, Zborowski M, *et al.* Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*, 2008, **29**(2): 134-142
- [21] Said T M, Grunewald S, Paasch U, *et al.* Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*, 2005, **10**(6): 740-746
- [22] Ko Y, Jeong Y H, Lee J A. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded $\gamma\delta$ T cells against osteosarcoma cells. *Cells*, 2022, **11**(14): 2164
- [23] Moore D K, Motaung B, Du Plessis N, *et al.* Isolation of B-cells using Miltenyi MACS bead isolation kits. *PLoS One*, 2019, **14**(3): e0213832
- [24] Bhattacharjee J, Das B, Mishra A, *et al.* Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour. *F1000Res*, 2017, **6**: 2045
- [25] Laghmouchi A, Hoogstraten C, Falkenburg J H F, *et al.* Long-term *in vitro* persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells. *Scand J Immunol*, 2020, **92**(3): e12924
- [26] Blümke K, Bilkenroth U, Schmidt U, *et al.* Detection of circulating tumor cells from renal carcinoma patients: experiences of a two-center study. *Oncol Rep*, 2005, **14**(4): 895-899
- [27] Park J Y, Kwon J, Kim E Y, *et al.* CD24(+) cell depletion permits effective enrichment of thymic iNKT cells while preserving their subset composition. *Immune Netw*, 2019, **19**(2): e14
- [28] Farace F, Le Ridant A M, Escudier B, *et al.* Studies on NK cell purification by negative selection in human peripheral blood. *Biotherapy*, 1992, **5**(1): 11-20
- [29] Goodman S R, Hughes K M, Kakhniashvili D G, *et al.* The isolation of reticulocyte-free human red blood cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, **232**(11): 1470-1476
- [30] Ohira M, Nishida S, Matsuura T, *et al.* Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells *via* interferon- γ production. *Transplant Proc*, 2013, **45**(5): 2045-2050
- [31] Fehse B, Goldmann M, Frerik O, *et al.* Depletion of alloreactive donor T cells using immunomagnetic cell selection. *Bone Marrow Transplant*, 2000, **25**(Suppl 2): S39-S42
- [32] Schriebl K, Satiánegara G, Hwang A, *et al.* Selective removal of undifferentiated human embryonic stem cells using magnetic activated cell sorting followed by a cytotoxic antibody. *Tissue Eng Part A*, 2012, **18**(9-10): 899-909
- [33] He C, Gao S, Zhao X, *et al.* An efficient and cost-effective method for the purification of human basophils. *Cytometry A*, 2022, **101**(2): 150-158
- [34] Werner C M, Hecksteden A, Morsch A, *et al.* Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. *Eur Heart J*, 2019, **40**(1): 34-46
- [35] Yang Y H, Jee K J, Kim S K, *et al.* Prenatal genetic diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive magnetic activated cell sorting. *Yonsei Med J*, 2000, **41**(2): 258-265
- [36] Hernández-Torres F, Rodríguez-Outeiriño L, Aránega A. Isolation and culture of quiescent skeletal muscle satellite cells. *Methods Mol Biol*, 2020, **2155**: 141-150
- [37] Liu J, Huang X, Werner M, *et al.* Advanced method for isolation of mouse hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, and Kupffer cells. *Methods Mol Biol*, 2017, **1540**: 249-258
- [38] Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, *et al.* Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One*, 2009, **4**(6): e5994
- [39] Letzkus M, Luesink E, Starck-Schwartz S, *et al.* Gene expression profiling of immunomagnetically separated cells directly from stabilized whole blood for multicenter clinical trials. *Clin Transl Med*, 2014, **3**: 36
- [40] Antfolk M, Laurell T. Continuous flow microfluidic separation and processing of rare cells and bioparticles found in blood-review. *Anal Chim Acta*, 2017, **965**: 9-35
- [41] Casale T B, Erger R A, Rozell M D. Eosinophils isolated by magnetic cell sorting respond poorly to lipid chemoattractants. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1999, **83**(2): 127-131
- [42] Seidl J, Kneuchel R, Kunz-Schughart L A. Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation. *Cytometry*, 1999, **36**(2): 102-111
- [43] Lenshof A, Jamal A, Dykes J, *et al.* Efficient purification of CD4+ lymphocytes from peripheral blood progenitor cell products using affinity bead acoustophoresis. *Cytometry A*, 2014, **85**(11): 933-941
- [44] Murray C, Pao E, Tseng P, *et al.* Quantitative magnetic separation

- of particles and cells using gradient magnetic ratcheting. *Small*, 2016, **12**(14): 1891-1899
- [45] Lin S, Zhi X, Chen D, *et al.* A flyover style microfluidic chip for highly purified magnetic cell separation. *Biosens Bioelectron*, 2019, **129**: 175-181
- [46] Rashid Z, Shokri F, Abbasi A, *et al.* Surface modification and bioconjugation of anti-CD4 monoclonal antibody to magnetic nanoparticles as a highly efficient affinity adsorbent for positive selection of peripheral blood T CD4⁺ lymphocytes. *Int J Biol Macromol*, 2020, **161**: 729-737
- [47] Wang Z, Wang H, Lin S, *et al.* Nanoparticle amplification labeling for high-performance magnetic cell sorting. *Nano Lett*, 2022, **22**(12): 4774-4783
- [48] Shen M J, Olsthoorn R C L, Zeng Y, *et al.* Magnetic-activated cell sorting using coiled-coil peptides: an alternative strategy for isolating cells with high efficiency and specificity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(10): 11621-11630
- [49] Aldridge P M, Mukhopadhyay M, Ahmed S U, *et al.* Prismatic deflection of live tumor cells and cell clusters. *ACS Nano*, 2018, **12**(12): 12692-12700
- [50] Chen X, Ding H, Zhang D, *et al.* Reversible immunoaffinity interface enables dynamic manipulation of trapping force for accumulated capture and efficient release of circulating rare cells. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, **8**(20): e2102070
- [51] Wang Z, Ahmed S, Labib M, *et al.* Efficient recovery of potent tumour-infiltrating lymphocytes through quantitative immunomagnetic cell sorting. *Nat Biomed Eng*, 2022, **6**(2): 108-117
- [52] Liu Y, Vieira R M S, Mao L. Simultaneous and multimodal antigen-binding profiling and isolation of rare cells *via* quantitative ferrohydrodynamic cell separation. *ACS Nano*, 2023, **17**(1): 94-110
- [53] Du M, Ye S, Tang J, *et al.* Scalable in-fiber manufacture of functional composite particles. *ACS Nano*, 2018, **12**(11): 11130-11138
- [54] Kang K, Zhou X, Zhang Y, *et al.* Cell-released magnetic vesicles capturing metabolic labeled rare circulating tumor cells based on bioorthogonal chemistry. *Small*, 2021, **17**(18): e2007796
- [55] Zhou X, Luo B, Kang K, *et al.* Leukocyte-repelling biomimetic immunomagnetic nanoplatform for high-performance circulating tumor cells isolation. *Small*, 2019, **15**(17): e1900558
- [56] Jacobs N, Moutschen M P, Boniver J, *et al.* Efficient immunoselection of cytolytic effectors with a magnetic cell sorter. *Res Immunol*, 1993, **144**(2): 141-150
- [57] Lim J J, Sung S Y, Kim H J, *et al.* Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell Prolif*, 2010, **43**(4): 405-417
- [58] Miltenyi S, Müller W, Weichel W, *et al.* High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 1990, **11**(2): 231-238
- [59] Ishimura D, Yamamoto N, Tajima K, *et al.* Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker. *Tohoku J Exp Med*, 2008, **216**(2): 149-156
- [60] Levenberg S, Ferreira L S, Chen-Konak L, *et al.* Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc*, 2010, **5**(6): 1115-1126
- [61] Li Q, Lan X, Han X, *et al.* Expression of Tmem119/Sall1 and Ccr2/CD69 in FACS-sorted microglia-and monocyte/macrophage-enriched cell populations after intracerebral hemorrhage. *Front Cell Neurosci*, 2018, **12**: 520
- [62] Mata M F, Hernandez D, Rologi E, *et al.* A modified CD34+ hematopoietic stem and progenitor cell isolation strategy from cryopreserved human umbilical cord blood. *Transfusion*, 2019, **59**(12): 3560-3569
- [63] Yan H, Ding C G, Tian P X, *et al.* Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4⁺ CD25⁺ Treg cells. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, **10**(12): 928-932
- [64] Di Corato R, Piacenza P, Musarò M, *et al.* Magnetic-fluorescent colloidal nanobeads: preparation and exploitation in cell separation experiments. *Macromol Biosci*, 2009, **9**(10): 952-958
- [65] Tian Q, Zhao H, Ling H, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase enhances infiltration of mononuclear cells in primary Sjögren's syndrome through interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1-mediated up-regulation of CXCL10. *Arthritis Rheumatol*, 2020, **72**(6): 1003-1012

Application and Biological Evaluation of Magnetic Cell Sorting Technology*

HONG Tian¹⁾, LI Jing-Wen¹⁾, LI Ren-Ai²⁾, CHEN Er-Ning¹⁾, ZHAO Lu-Lu¹⁾, DU Mei-Hong^{1)**}

¹⁾*Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology (Beijing Center for Physical & Chemical Analysis), Beijing 100094, China;*

²⁾*School of Biomedicine, Beijing City University, Beijing 100094, China)*

Abstract Magnetic cell sorting technology is a highly specific and rapid cell sorting technology using superparamagnetic nanocomposites for cell sorting, which is widely used in immunology, stem cytology, oncology, clinical medicine and other fields. Magnetic cell sorting technology is divided into positive isolation, negative isolation/untouched cell isolation, depletion, multi-step isolation and automated cell separation systems. In this review, we firstly give a brief introduction to the classification and application of magnetic cell sorting technology, then discuss several new techniques and challenges based on magnetic cell sorting in recent years, such as improving the sorting efficiency by improving the structure of magnetic materials and magnetic field structure. The necessity of biological evaluation of magnetic cell sorting products was emphatically analyzed. Through the biological evaluation, the advantages and disadvantages of magnetic cell sorting products can be understood, and the research and development ability could be improved. Therefore, 10 biological evaluation technical parameters related to magnetic cell sorting products were proposed: yield, purity, sterility, cytotoxicity, cell morphology, viability, light scattering characteristics of cells, fluorescent antibody labeling ability of cells, cell activation and cell proliferation. The 10 biological evaluation technical parameters play an important role in promoting the standardized application of magnetic cell sorting.

Key words magnetic cell sorting, biological evaluation, cell sorting technology, magnetic material, lymphocyte

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0009

* This work was supported by grants from High-level Innovation Team Program (HIT202201) and BFAST Budding Talent Program (BGS202116).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-58717271, E-mail: dumeihong@bcpc.a.ac.cn

Received: January 9, 2023 Accepted: April 14, 2023