

粘附癌细胞的 CAR T 细胞杀伤效价 实时检测

作者

Jiaming Zhang,
Grace Yang 和 Peifang Ye
安捷伦科技（中国）有限公司

Nancy Li, Yama Abassi 和
Brandon J. Lamarche
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣地亚哥

前言

多种形式的免疫疗法利用免疫系统的出色效能和分子特异性，并引导其破坏癌细胞，从而永久改变了临床肿瘤学的格局。过继性细胞疗法（如嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞）是帮助开创这一新方式的领跑者之一。CARs 是由细胞外抗原结合结构域组成的工程蛋白，该结构域通过铰链区和跨膜结构域与驱动 T 细胞活化、增殖和靶细胞杀伤的细胞内活化结构域连接^[1]。数十年的 CAR 工程研究已清楚表明，仅仅将这些蛋白质结构域连接在一起，就像“串珠”一样，不足以产生有效的 CAR；结构域连接方式的细微差异可极大地影响其功能^[1,2]。虽然今天的第三代 CARs 相对于其前代产品已有所改进^[3]，但尚未确定普遍有效的 CAR 结构，且具有新颖或改进功能的 CARs 设计研究仍需根据具体情况进行进一步优化^[2]。

在 CAR 优化过程中，生物化学/生物物理分析可用于研究关键质量属性，如细胞外结构域^[4]的抗原亲和力或可溶性配体刺激的 CAR T 细胞的细胞因子谱^[5]。尽管这些简化方法是有用的，但在更高的生理相关性背景下，它们的结果不一定与癌细胞杀伤效力相关^[4]。为了严格比较不同的 CAR 构造子并识别不良的行为，如抗原非依赖性信号转导，普遍认为应在免疫突触的复杂环境下对 CAR 功能进行评估，并使用真正的癌细胞杀伤作为结果指标。为此，释放试验 (⁵¹Cr、LDH) 历来被用作该评估的金标准，但事实上该试验需要大量的“手动操作”时间且仅提供终点数据。在本方案中，仅需接种癌细胞，随后加入 CAR T 细胞，然后我们就可以使用 Agilent

xCELLigence RTCA eSight 连续数天监测 CAR T 细胞介导的癌细胞杀伤作用。嵌入 eSight 微孔板底部的阻抗生物传感器可以直接且客观地评估靶细胞数量、细胞大小和细胞-基底粘附强度，定量追踪靶细胞杀伤的连续过程，包括从早期（细胞-基底粘附强度降低）到晚期（杀伤）的各种事件。同时，eSight 可在明场和三个荧光通道（红、绿、蓝）中采集活细胞图像，提供杀伤过程的正交读数结果。通过结合实时阻抗监测（简单、分析灵敏度高且客观）和活细胞成像（读数的特异性）的优点，eSight 在不增加工作量的情况下为 CAR T 细胞杀伤实验提供了更丰富的信息。

实验原理

eSight 分析的核心是一个专用微电子检测微孔板。所有 96 个孔的玻璃底面都嵌入了微金电极生物传感器阵列，可连续、非侵入性地监测细胞阻抗。如图 1 下方所示，靶细胞粘附在这些生物传感器上阻碍了电流的流动，可提供细胞数量、细胞大小和细胞-基底粘附强度的高灵敏度读数。以用户定义的时间频率记录细胞阻抗信号（如每分钟、每小时一次等），并使用无单位参数细胞指数 (Cell Index) 进行记录。要注意的是，随后加入孔中的 CAR T 细胞是非粘附性的，不会影响阻抗信号。因此，对于这种异质性试验，阻抗信号仅反映靶细胞活力和行为。CAR T 细

胞诱导靶细胞发生的生化变化和细胞变化（细胞变圆、脱落、裂解）可以通过阻抗信号的进行性下降得到检测。在监测阻抗的同时，每个孔中生物传感器阵列中心的观察窗口使 eSight 能够通过明场和三个（红、绿、蓝）荧光通道中的活细胞成像追踪 CAR T 细胞杀伤效力（图 1，本研究仅使用明场和红色荧光通道）。

为了使靶细胞产生阻抗信号，并使其定位在 eSight 镜头/相机的焦平面内，它们必须与孔底部紧密接触。虽然这对于贴壁实体瘤细胞是一种自然现象，但研究非贴壁血液瘤时则可采用两种不同的策略。首先，可以使用针对不同细胞类型的特异性抗体将血液瘤细胞粘附到孔底。为此，安捷伦开发了 CD9、CD19、CD29、CD40

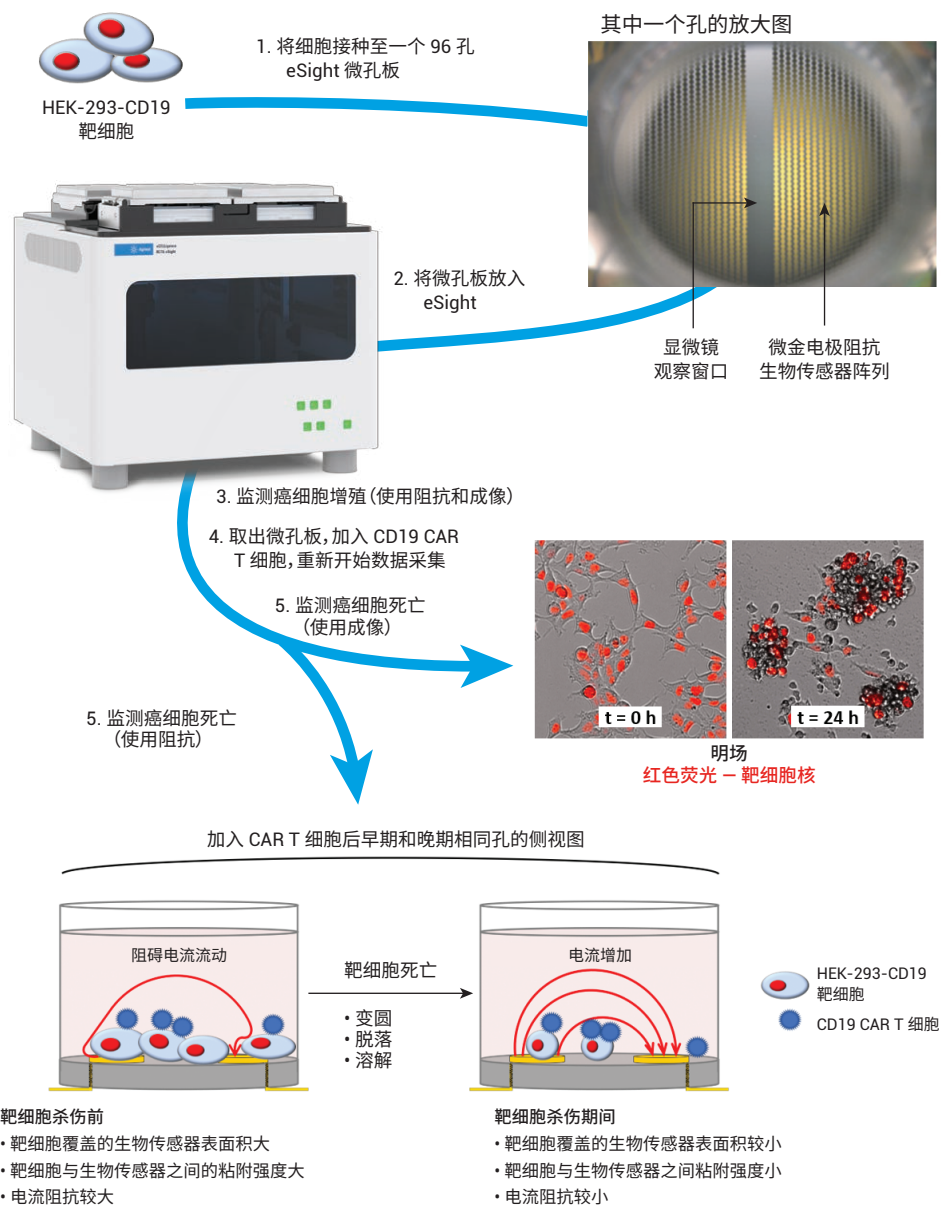


图 1. 用于进行 CAR T 细胞介导的杀伤实验的 Agilent xCELLigence RTCA eSight 工作流程

和 CD71 特异性试剂盒，这些 CD 分子均优先表达于正常 B 细胞和 B 细胞系肿瘤表面。此外，目标血液瘤抗原可以在贴壁细胞系中外源性表达，如本研究中 B 淋巴细胞蛋白 CD19 在 HEK-293 细胞中表达。

材料与amp;方法

靶细胞

将 HEK-293 细胞置于含有 10% FBS (Gibco, 货号 16050-122) 的 MEM/EBSS (HyClone, 货号 SH30024.01) 中，于 37 °C/5%CO₂ 条件下维持培养。采用慢病毒转导对这些细胞进行基因改造以表达 CD19。随后，采用 eLenti red (安捷伦科技公司, 货号 8711011) 进行转导 (感染复数为 3)，对得到的 HEK-293-CD19 细胞以及阴性对照亲代细胞系 (HEK-293) 进行基因改造，使其表达核定位红色荧光蛋白 (RFP)。感染后第 3 天至第 14 天，向生长培养基中加入 2 μg/mL 嘌呤霉素，以筛选转导子。

效应细胞

生长培养基和条件与上述靶细胞相同。使用来自健康供体的外周血单核细胞构建 CD19 特异性 CAR T 细胞。转导后 9 天，在存在 200 IU/mL IL-2 的情况下，采用 anti-CD3/anti-CD28 磁珠刺激细胞。以相同的方式制备 Mock CAR T 细胞，但需要减去转导步骤。由于本项目是与一家开发临床专用 CD19 CAR T 的公司合作开展，因此此处未披露 CAR 基因构建和后续细胞生产方案的详细信息。

通过流式细胞术表征靶细胞和效应细胞

所有流式细胞分析均采用 Agilent Novocyte Quanteon 流式细胞仪进行。采用 CD19 特异性抗体 (克隆号 H1B19, 安捷伦生物 (杭州) 有限公司, 货号 8920007) 验证 HEK-293- CD19 细胞表面的 CD19 表达。采用 CD3 特异性抗体 (克隆号 UCHT1, BioLegend, 货号 300436)、CD4 特异性抗体 (克隆号 OKT4, BioLegend, 货号 317441) 和 CD8 特异性抗体 (克隆号 SK1, 安捷伦生物 (杭州) 有限公司, 货号 8921023) 评估 T 细胞系。使用与 Fc

标签融合的 CD19 抗原，然后使用 anti-Fc 二抗，验证 T 细胞上 CD19 特异性 CAR 的表达。

杀伤实验

杀伤实验的所有步骤均在 E-Plate VIEW 微孔板 (安捷伦科技公司, 货号 300601030) 中进行，使用与上述靶细胞相同的生长培养基和条件。采用 50 μL 培养基/孔检测背景阻抗之后，将 10000 个靶细胞 (在 100 μL 培养基中) 加入每个孔中。监测增殖 23 小时后，吸取出 50 μL 培养基，然后加入 50 μL 含 Mock CAR T 细胞或 CD19 CAR T 细胞的培养基。改变 T 细胞数量以获得不同的效靶比 (E:T): 0.06、0.12、0.25、0.5、1、2 和 4。每 15 min 检测一次阻抗，每 90 min 采集一次图像。在每个孔中，每个通道 (明场和红色荧光) 分别采集四个视野图像。暴露时间如下：红色荧光 (300 ms)、明场 (通过 eSight 软件自动优化)。当使用阻抗数据时，% 细胞杀伤 = $[1 - \text{归一化 } CI_{\text{处理组}} / \text{归一化 } CI_{\text{仅靶细胞}}] \times 100$ 。当使用来自成像数据的靶细胞计数时，% 细胞杀伤 = $[1 - \text{归一化计数}_{\text{处理组}} / \text{归一化计数}_{\text{仅靶细胞}}] \times 100$ 。

结果与讨论

表征工程效应细胞和靶细胞

采用 CD19 CAR 转导外周血单核细胞后，使用 anti-CD3/anti-CD28 磁珠刺激 T 细胞增殖 9 天，在 Agilent Novocyte Quanteon 流式细胞仪上表征最终产物。与预期的 T 细胞扩增一致，91.9% 的活

细胞为 CD3+（图 2A）。其中 19% 为 CD8+，77% 为 CD4+。使用基于 CD19 肽的检测策略（图 2B），发现约 50% 的 CD4+ 和 CD8+ 细胞表达 CAR，其可与 CD19 靶抗原结合（图 2C）。最后，约 99% 的 HEK-293-CD19 靶细胞表达预期的 CD19 靶分子（图 2D）。

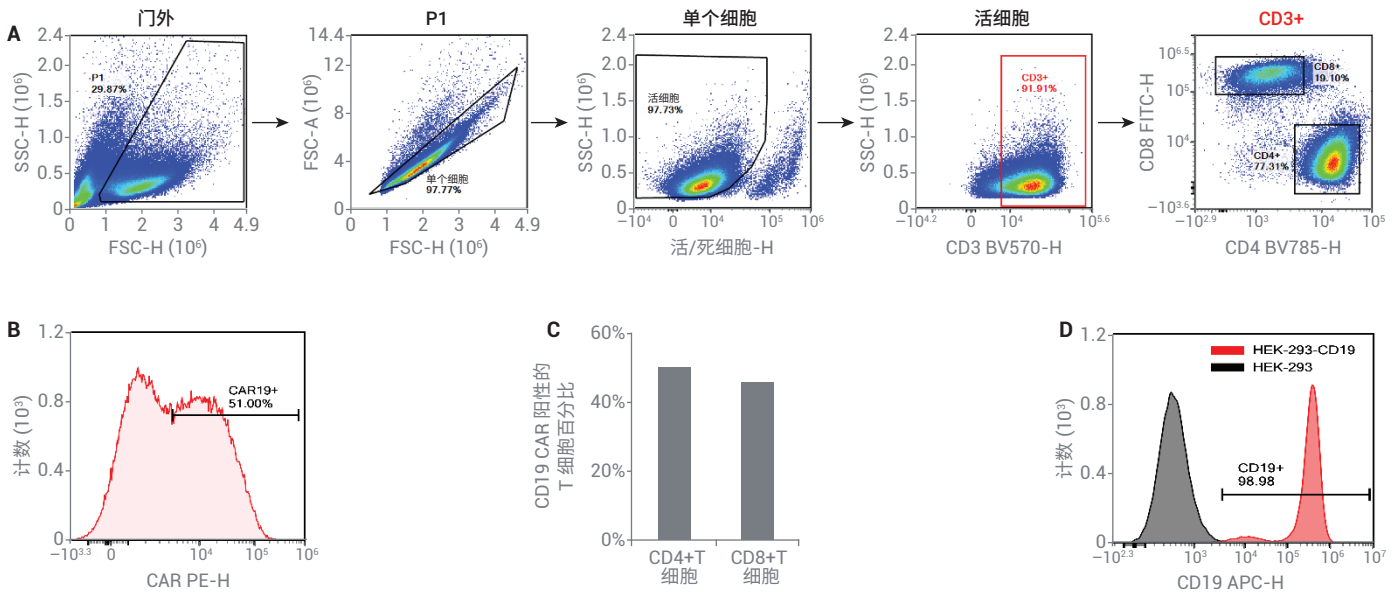


图 2. 采用 Agilent Novocyte Quanteon 流式细胞仪验证 CAR 和 CD19 的表达。(A) 转导和扩增后，最终细胞产物包含 91.9% 的 CD3+ T 细胞，其中 19% 为 CD8+，77% 为 CD4+。(B) 使用与 Fc 标签连接的 CD19 肽检测细胞的 CD19 结合活性。(C) 大约 50% 的 CD4+ 和 CD8+ 细胞表达 CD19 特异性 CAR。(D) 约 99% 的工程 HEK-293-CD19 靶细胞表面存在 CD19 蛋白

通过活细胞成像监测 CART T 细胞杀伤活性

如果不进行处理, 48 小时后, 表达 RFP 的 HEK-293-CD19 细胞增殖到汇合点 (图 3A)。然而, 暴露于 CART 细胞 48 小时后, 靶细胞数量明显减少。正如预

期, 该杀伤反应具有剂量依赖性, 最高的 E:T 比可导致最显著的杀伤。随着 E:T 比增加, 未标记/灰色 CART T 细胞在视野中变得更加突出, 这些 T 细胞的聚集 (活化特征) 进一步趋于稳定。请注意, 在晚期时间点, 这些 T 细胞团簇中包含大量红色靶

细胞, 由于它们显示变圆/脱落和细胞质收缩, 似乎正在经历凋亡。最后, 当使用 4:1 的固定 E:T 比重复实验时, 可明显观察到杀伤反应的时间依赖性 (图 3B)。

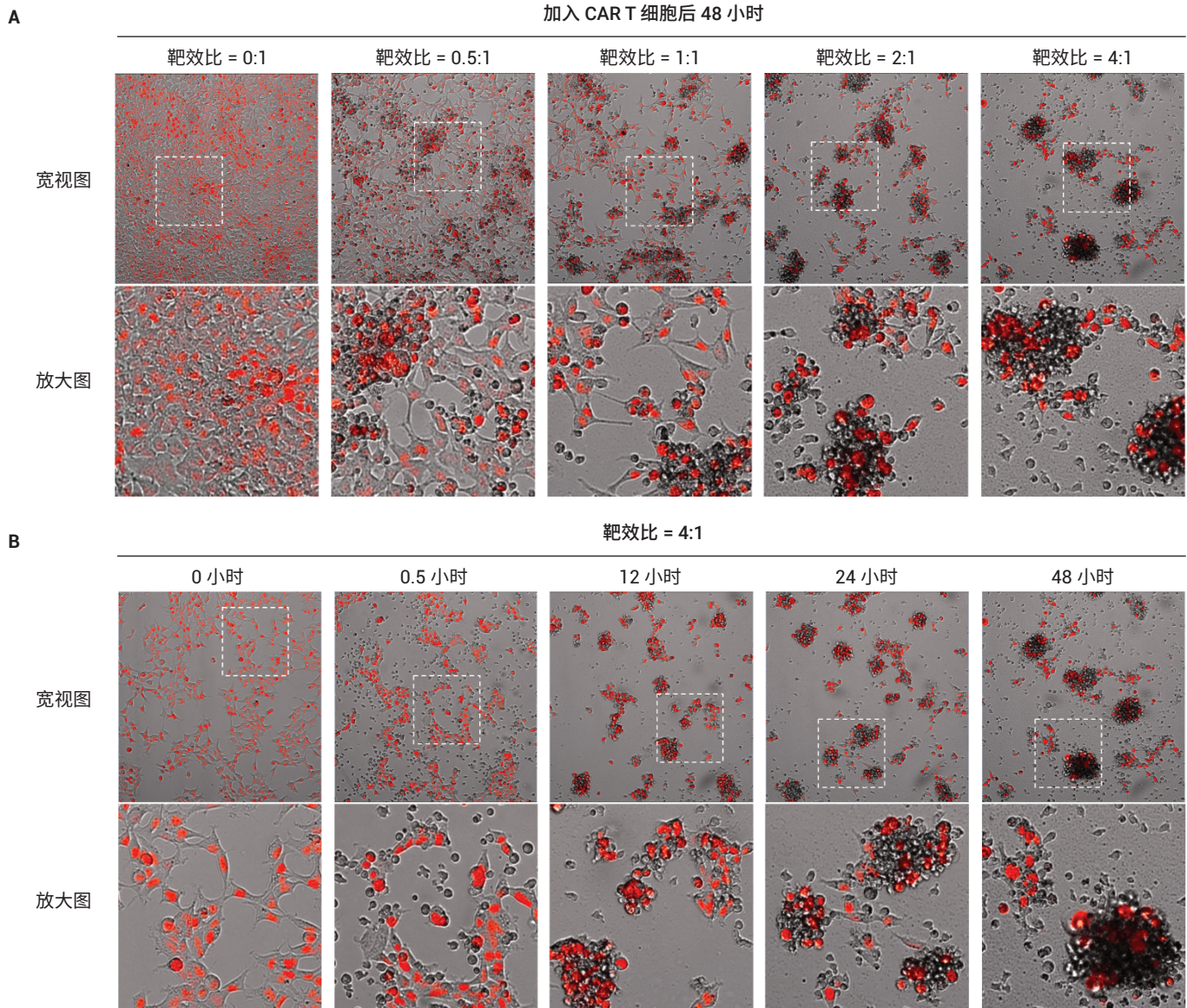


图 3. CD19 CAR T 细胞杀伤表达 RFP 的 HEK-293-CD19 细胞。(A) 加入 CART T 细胞 48 小时后, 不同 E:T 比下的杀伤效果比较。上图中的白色方框对应下图中的放大区域。未标记的 CART T 细胞为灰色。(B) E:T 比为 4:1 时, 不同时间点的杀伤效果比较

量化 CAR T 细胞杀伤效力

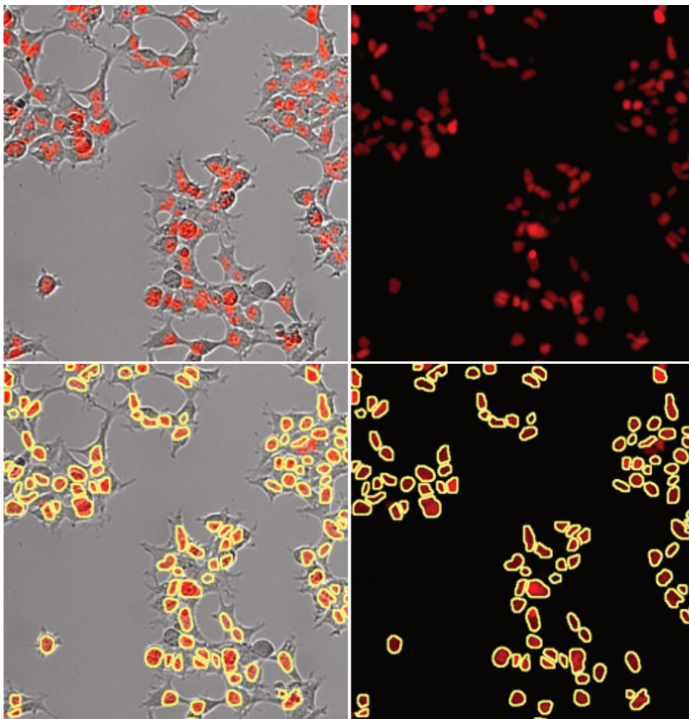
虽然上述照片明确展示了 CAR T 细胞介导的杀伤作用，但它们本质上为定性分析。为提取定量信息，采用 eSight 软件按时间对红色靶细胞核进行计数（图 4）。掩模算法可以准确界定红色靶细胞核（黄色轮廓）；既不存在假阳性，也不存在假阴性。重要的是，当加入未标记的 CAR T 细胞时（其中一些用白色箭头表示），这

些细胞将从识别掩模中相应排除（图 4，右侧）。

将红色靶细胞的数量作为时间的函数进行绘图，如图 5A 所示。请注意，该图不包括靶细胞增殖的前 18 小时；0 小时时间点对应于将 CAR T 细胞加入微孔的时间。在该时间点，每个孔含有约 15000 个靶细胞，这与已发表的 HEK-293 倍增时间为 24-34 小时以及最初接种了

10000 个靶细胞的事实一致。在不存在 CAR T 细胞的情况下，靶细胞继续增殖，直至 50 小时时间点（图 5A，黑色数据线）。当以极低的 E:T 比 (0.06:1) 加入 CAR T 细胞时，直至 30 小时时间点才观察到杀伤反应（图 5A，橙色数据线）。逐渐增加 E:T 比可使杀伤反应在更早的时间点显现，并且最终可以破坏更多靶细胞。

仅 HEK-293-CD19 靶细胞
时间 = 0 小时



HEK-293-CD19 靶细胞 + CD19 CAR T 细胞 (E:T = 1:1)
时间 = 加入 CAR T 细胞后 0.5 小时

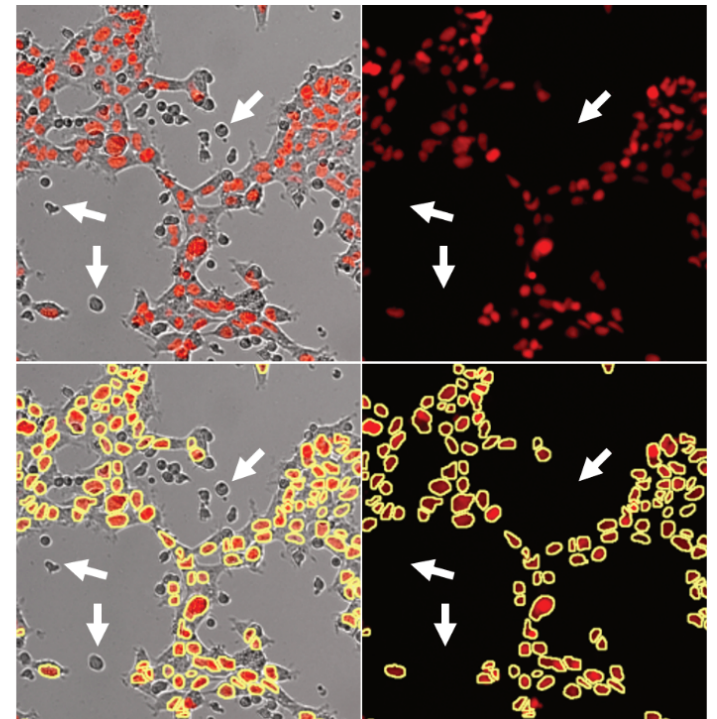


图 4. 采用 Agilent eSight 的分析掩模识别红色靶细胞核的示例。左侧的四张图仅显示靶细胞。为了突出掩模算法的准确性，采用了四种不同的形式来展示相同的孔。右侧 4 张图展示的孔与左侧相同，但比左侧晚 30 min（以 1:1 的 E:T 加入 CAR T 细胞后）。在明场图像中可见大量未标记的 CAR T 细胞；其中 3 个细胞用白色箭头突出显示。由于 CAR T 细胞无荧光，因此可从掩模中排除，不进行计数

在时间和剂量依赖性方面，使用阻抗追踪杀伤反应（图 5C）获得的细胞杀伤曲线与基于图像的曲线非常相似。两种读数之间的一个显著差异是，当 E:T = 4:1 时，阻抗响应降至零，而靶细胞数量从未降至约 5000 以下。即使在较晚的时间点，靶细胞的这种持久性也与图 3 所示的照片一致。阻抗信号同时降至零表明这些仍

然存在的靶细胞不再牢固粘附于孔底。与此一致的是，当 E:T = 4:1 时，暴露于 CAR T 细胞 48 小时后，几乎所有可见的红细胞均变圆，且似乎松散地停留于孔底（图 3）。

采用“材料与方法”部分所示的简单公式，将阻抗数据和基于图像的数据转换为细胞杀伤百分比图（图 5B 和 5D）。以此

绘图时，两个数据之间的杀伤反应动力学存在明显差异。即使阻抗和成像数据均采集自完全相同的细胞群（即相同孔中的细胞），但对于给定的时间点，阻抗信号给出的细胞杀伤百分比普遍高于基于图像的结果。将两个不同的读数绘制在同一图中，更能突出二者之间的差异（图 6A-B）。这两种检测方法显示出不同

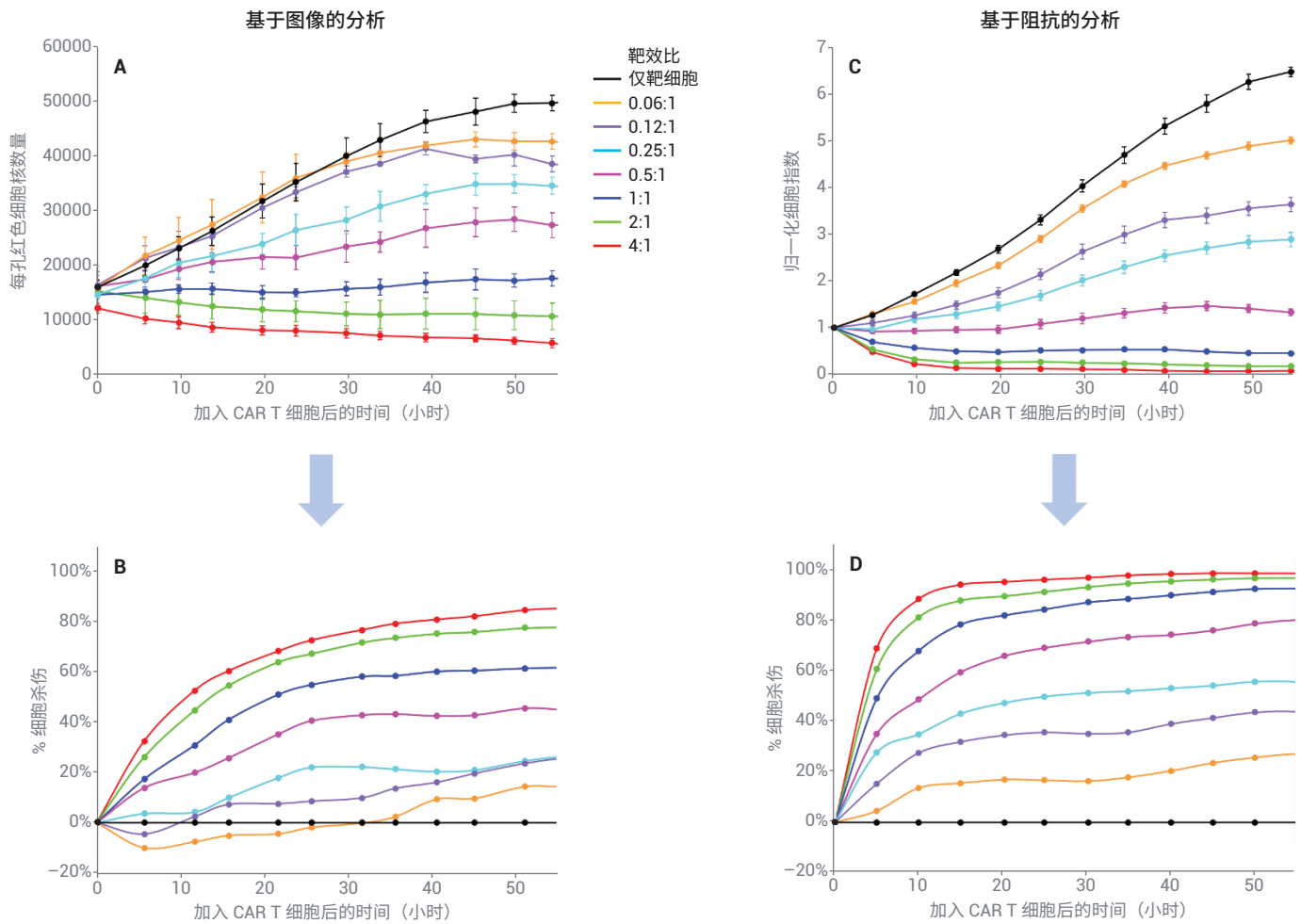


图 5. 通过成像 (A-B) 和阻抗 (C-D) 测得的 CD19 CAR T 细胞杀伤 HEK-293-CD19 的时间历程。上图为原始数据，下图为细胞杀伤百分比，按照“材料与方法”部分所述公式进行计算。实验重复进行两次；误差线代表标准偏差

的动力学，原因在于它们是从不同的角度追踪 CAR T 细胞介导的杀伤作用（图 7）。在 CAR T 细胞诱导细胞毒性的最早期阶段，HEK-293-CD19 靶细胞开始变圆，并且不太紧密地粘附在孔底，两者均可通过阻抗检测出。相比之下，本实验中使用的基于图像的追踪，在靶细胞实际裂解，导致可计数的红色点数量减少之前不会记录任何变化。

此处所述的 eSight 检测最显著的特征之一是，仅需极少的手动操作时间即可提供丰富信息。由于 E-Plate 的每个孔在整个实验期间提供连续读数，因此无需再收集终点信息。此外，每个微孔同时提供阻抗和活细胞图像两个完全独立的数据集。根据保守估计，要使用传统的终点分析方法（⁵¹Cr 释放试验）和手动显微镜观察获得与 eSight 双读数相当的结果，前者手动工作量是后者的 12 倍（表 1；注意此估算仅为 4 个时间点的粗略时间分辨率）。

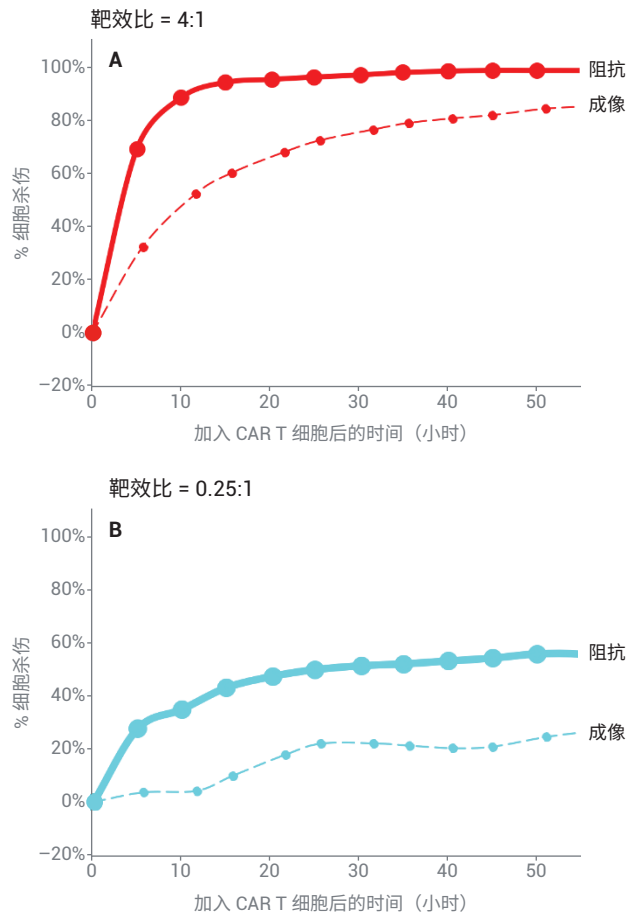


图 6. 采用阻抗或成像获得的细胞杀伤百分比比较。(A) E:T = 4:1。(B) E:T = 0.25:1

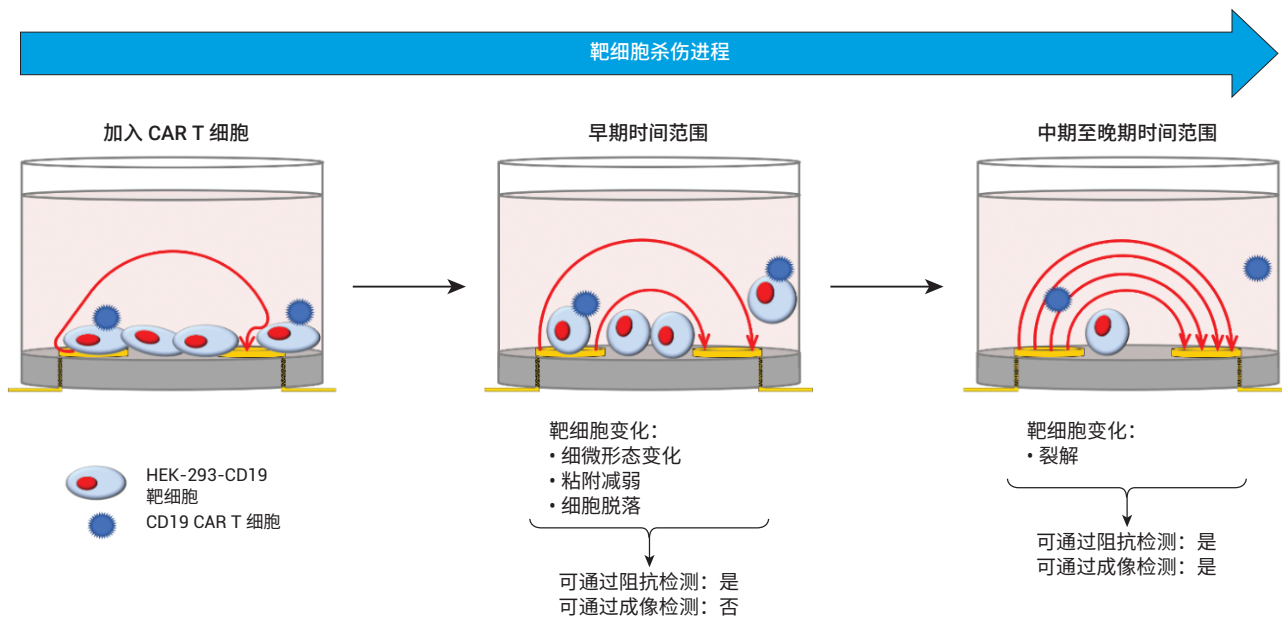


图 7. 阻抗比成像更早检测到 CAR T 细胞介导的杀伤作用的原因阐释

因此，仅需加入效应细胞，然后即可在无人值守的情况下自动连续记录数据显得极具价值。

eSight CAR T 检测的另一个显著特征是其灵敏度。由于 ^{51}Cr 会自发从靶细胞中释出，导致背景信号逐渐增加，因此必须在相对较短的时间内完成 ^{51}Cr 释放试验。这需要用到生理学不相关的高 E:T 比。相比之下，eSight 检测没有固有的时间限制。给定一个较长的测定窗口，可以在模拟体内情况的低 E:T 比下测定 CAR T 细胞杀伤活性（见图 5 中 E:T = 0.06:1）。

因为阻抗对细胞大小和细胞-基底粘附强度的变化极为敏感，因此可检测靶细胞死亡过程的最早期阶段。相比之下，这里使用的基于图像的读数可追踪靶细胞裂解 — 发生裂解的时间要晚得多。尽管存在这种差异，但通过阻抗和成像最终对 CD19 CAR T 细胞的杀伤效力获得了相似的定量评估结果。使用图 5A 和 5C 中所示的数据，绘制曲线下面积与 E:T 的关系图，得到剂量响应曲线（图 8）。计算

出的 EC_{50} （产生 50% 杀伤反应所需的 E:T 比）为 0.56（基于成像）和 0.30（基于阻抗）。这两种数据之间的一致性是由于这两种检测都是对完全相同的细胞群（即存在于同一孔中的细胞）进行的。在物理

原理上完全不同的检测技术得到的数据如此相似，提高了所得结论的可信度，表明 eSight 可以为细胞介导的杀伤实验提供初步结果和进行确认性分析。

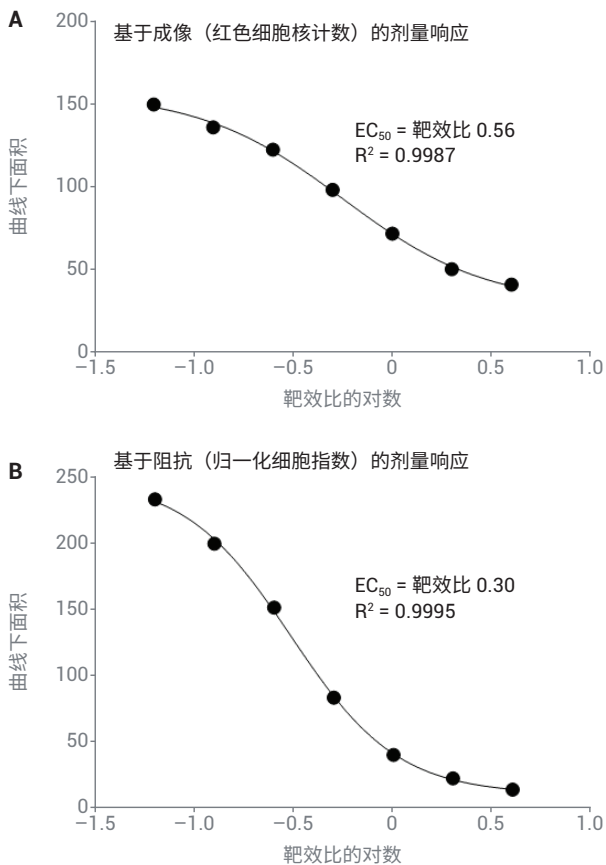


图 8. 基于成像和阻抗读数的剂量响应曲线

表 1. 连续、双读数 Agilent eSight 检测与传统 ^{51}Cr 释放试验（结合手动成像）的手动工作量比较。仅考虑单个实验条件，即 E:T = 4:1

方法	监测单个条件 (E:T = 4:1) 所需的孔数量	细胞处理步骤数量	采集时间点	手动操作步骤总数
eSight	1 (从同一孔中采集阻抗数据和图像)	2 接种靶细胞 加入效应细胞	0 (自动连续监测)	2
^{51}Cr 释放试验	2 1 个孔用于释放试验 1 个孔用于图像采集	3 接种靶细胞 加入效应细胞 终点采集	4 (12、24、36 和 48 小时)	24

除了具有两种独立的检测技术之外，还要重点注意的是阻抗读数的客观性，它直接进行报告，不需要用户进行任何处理或输入。相反，对于 eSight 以及所有其他基于成像的仪器，原始图像文件通过用户指定的算法被转换成输出数据（例如红色靶细胞核的数量），其中必须定义细胞的预期大小范围、偏心度和亮度。虽然这种方法存在的潜在问题（如用户间的差异）可以通过适当的培训和使用相同的分析参数尽量避免，但是将阻抗作为一个客观的对照参数有助于提高分析结果的可靠性。

eSight 可在三个不同的荧光通道中对细胞进行成像（本研究中未使用）。除了用不同颜色标记靶细胞和效应细胞外，第三通道还可用于追踪一般的细胞死亡或通过使用膜联蛋白 V 或 caspase 3 特异性试剂追踪特异性凋亡。

结论

xCELLigence RTCA eSight 将实时阻抗监测的简便性、分析灵敏度和客观性与活细胞成像的高特异性读数相结合，能够提供无比丰富的信息，轻松表征 CAR T 细胞杀伤效力。

参考文献

1. Bridgeman, J. S. *et al.* Building Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T Cell Therapy. *Curr. Gene Ther.* **2010**, 10(2), 77–90
2. Guedan, S. *et al.* Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2018**, 12, 145–156
3. Feins, S. *et al.* An Introduction to Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-cell Immunotherapy for Human Cancer. *Am. J. Hematol.* **2019**, 94(S1), S3–S9
4. Maus, M. V. *et al.* An MHC-Restricted Antibody-Based Chimeric Antigen Receptor Requires TCR-Like Affinity to Maintain Antigen Specificity. *Mol. Ther. Oncolytics* **2017**, 3, 1–9
5. Xue, Q. *et al.* Single-Cell Multiplexed Cytokine Profiling of CD19 CAR-T Cells Reveals a Diverse Landscape of Polyfunctional Antigen-Specific Response. *J. Immunother. Cancer* **2017**, 5(1), 85

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE.5595138889

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020年4月14日，中国出版
5994-1712ZHCN