

实时抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 检测

作者

Peifang Ye, Grace Yang 和
Yunfei Pu
安捷伦生物（杭州）有限公司
中国杭州

Nancy Li, Ryan Raver,
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

与 T 细胞类似，自然杀伤 (NK) 细胞分泌穿孔素和颗粒酶来诱导靶细胞死亡。但是，与 T 细胞不同的是，NK 细胞不表达抗原特异性受体来指导其选择靶细胞。在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 作用中，通过外源性抗体为 NK 细胞的强大杀伤能力赋予特异性。抗体的可变区与靶细胞抗原结合，其恒定区可同时与 NK 细胞的 Fc 受体 (CD16) 结合。这样将两个细胞连接到近距离，激活 NK 细胞进行靶细胞杀伤。

由于 CD16 的通用抗体结合能力，NK 细胞可以被引导攻击几乎各种靶标，因此 ADCC 被用作对抗各种类型的癌症^[1] 和传染性疾病^[2,3] 的方法。与其他新出现的免疫疗法策略（如 CAR T 细胞）相比，ADCC 的主要优势是不需要从患者体内取出 NK 细胞并进行基因工程改造。为了使治疗性 ADCC 取得成功，研究人员开展了大量工作来确定适当的抗原靶标、提高抗体与抗原靶标的亲和性和特异性以及改善抗体恒定区与 CD16 受体的亲和性（通过氨基酸取代和糖基化工程）^[4]。作为评估这些抗体对靶细胞杀伤的体外工具，释放试验历来被看作金标准。

作为对释放试验的重大改进，本技术概述介绍了在 xCELLigence RTCA eSight 上进行实时 ADCC 检测。在 eSight 的 96 孔板中，微电极生物传感器持续追踪靶细胞暴露于效应细胞和抗体时的健康状况和行为（细胞数量、大小、细胞-基底粘附强度以及细胞间粘附）。同时，eSight 在明场和荧光（红、绿、蓝）通道中采集活细胞图像— 提供杀伤过程的正交数据。传统的释放试验涉及大量手动处理步骤，并且仅产生终点数据，而 eSight 检测只需要加入细胞和抗体，即可捕获杀伤过程的全程数据。

本研究使用曲妥珠单抗和 PBMCs 的组合作为模型系统，证明了对于 HER2 阴性和 HER2 阳性靶细胞，基于阻抗和基于成像的数据的差异。随后对曲妥珠单抗浓度进行了滴定，获得剂量-响应曲线，以便使用 EC₅₀ 值定量评估疗效。

结果与讨论

利用成像和阻抗追踪 ADCC

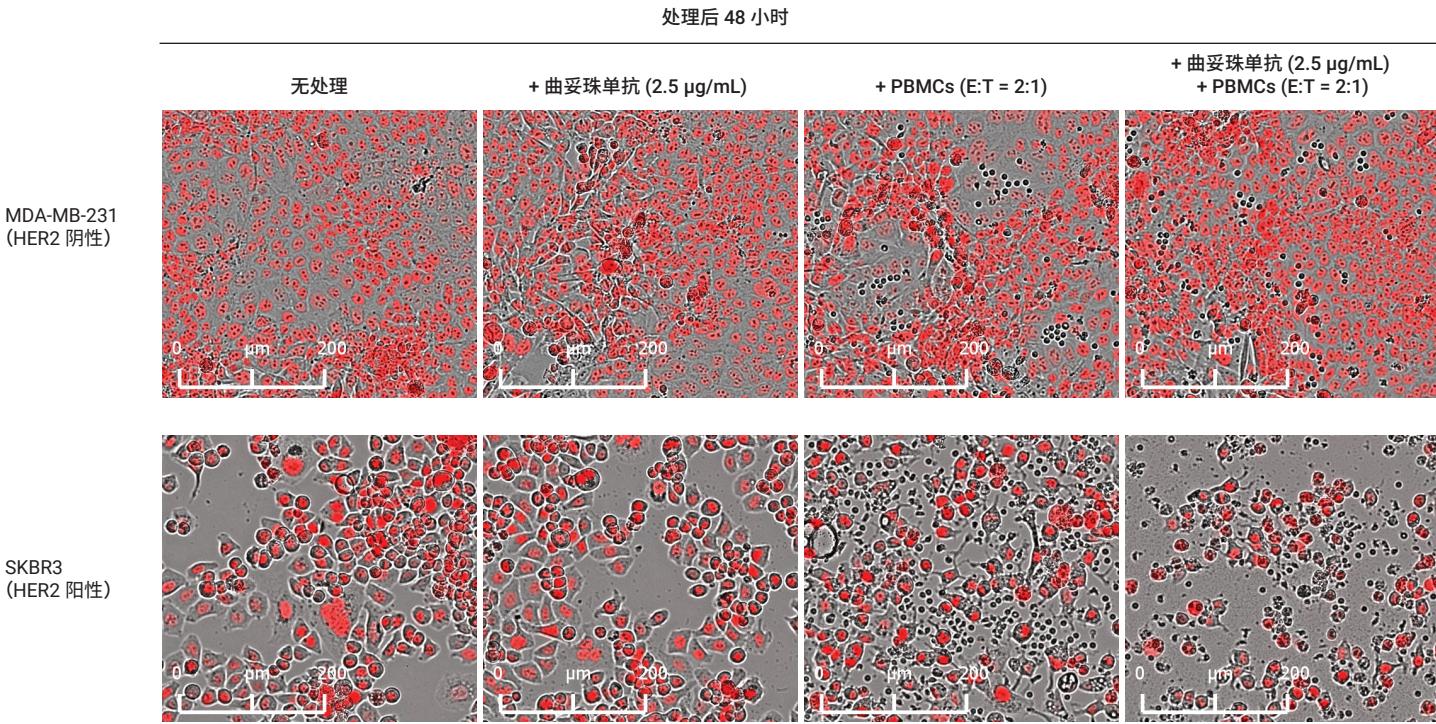
在 eSight 上进行 ADCC 检测的第一步是将 10000 个靶细胞接种到 E-Plate 孔中，使细胞粘附并增殖 20 小时，然后用曲妥珠单抗 (2.5 μg/mL)、PBMCs (E:T = 2:1) 或曲妥珠单抗 (2.5 μg/mL) + PBMCs (E:T = 2:1) 的组合处理。处理后 48 小时采集的代表性图像如图 1 所示。根据图像结果，上述处理均未能在此时间窗口内

诱导 HER2 阴性 MDA-MB-231 细胞的杀伤。HER2 阳性 SKBR3 细胞在曲妥珠单抗单独处理下似乎不受影响，在 PBMCs 单独处理时显示细胞质皱缩，而同时暴露于曲妥珠单抗和 PBMCs 时出现细胞质皱缩和细胞数量减少（图 1）。

尽管图 1 的照片表明存在 HER2 特异性 ADCC 活性，但此检测本质上为定性检测。为了定量比较不同细胞系和处理的 ADCC 活性，使用 eSight 软件计数红色靶细胞核数量随时间的变化。图 2A 表明，eSight 的分割 Mask（黄色轮廓）准确识别了红色靶细胞 (MDA-MB-231) 核，并正确排除了未标记的 PBMCs。这些红色细胞核数量随时间变化的曲线清楚地表明，这些 HER2 阴性细胞不断增殖，且几乎不受各种处理条件的影响（图 2B）。

用同样的基于图像的方法分析 HER2 阳性的 SKBR3 细胞获得了极为不同的结果（图 2C 和 2D）。仅曲妥珠单抗处理对 SKBR3 的生长几乎没有影响，而仅用 PBMCs 处理这些细胞时，在 70 小时时点靶细胞数量减少约 30%（图 2D）。重要的是，使用曲妥珠单抗与 PBMCs 组合与 PBMCs 单独处理相比，显著提高了杀伤效力（图 2D）。上述结果与文献所报道的曲妥珠单抗激活 ADCC 的能力依赖于靶细胞表面表达的 HER2 的结论一致^[5]。

为确认上述基于图像的分析，在 E-Plate 的相同孔中同时采集了阻抗数据。图 2E 确认了本文所考察的处理条件在 70 小时内对 MDA-MB-231 的生长均无影响。通过阻抗检测 HER2 阳性 SKBR3 细胞时（图 2F），杀伤趋势与成像中观察到的



一致（图 2D）。但是，有一个值得注意的例外。在加入 PBMCs 后，立即有一个快速而短暂的阻抗峰（图 2F，蓝色曲线）。在 PBMCs 与曲妥珠单抗一起加入时，此峰更大（粉色曲线）。为了了解出现这一现象的原因，对覆盖此阻抗峰的时间点的图像进行了分析。这些图像（此处未展示）显示了 SKBR3 细胞的细胞质表面积和阻抗信号强度之间存在非常好的相关性。这种快速的扩张-收缩循环很容易通过阻抗检测到，而使用本研究中所用的核标记方案时无法通过成像检测到：即使细胞质的表面积发生显著改变，红色细胞

核的大小并未改变（数据未展示）。如果实时追踪这些形态改变确实非常重要，则只需要通过标记细胞质而不是细胞核即可实现。

PBMCs 在 SKBR3 细胞中诱导产生了快速、短暂的阻抗峰，而在 MDA-MB-231 细胞中并未出现此现象，表明这并非一种普遍现象。事实上，在类似的 ADCC 检测条件下测试其他靶细胞时，未观察到这一阻抗峰（数据未展示）。ADCC 检测中阻抗曲线的强度和形状取决于各个靶细胞系、抗体浓度以及效靶比，如下一节所述。

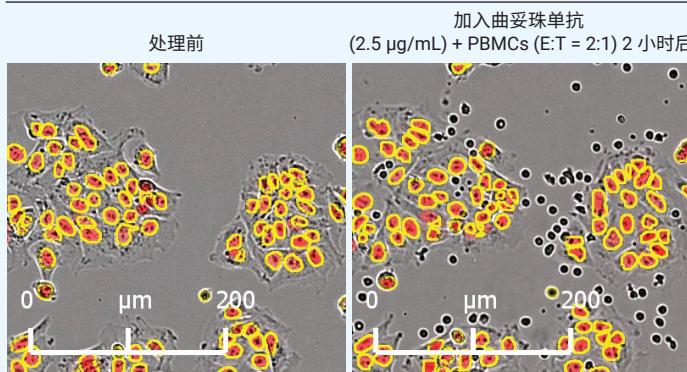
定量分析 ADCC 效力

为证明 eSight ADCC 检测适用于各种靶细胞类型，随后使用 Her2 阳性卵巢癌细胞系 SKOV3 研究了在效靶比固定为 10:1 时曲妥珠单抗浓度对杀伤效力的影响。在处理后 48 小时采集的图像定性地证明了更高的抗体浓度增加了杀伤效力（图 3A）。红色靶细胞数量随时间的变化曲线（图 3B）可轻松地转化为细胞杀伤百分比图（图 3C）。绘制这些细胞杀伤百分比曲线的曲线下面积与抗体浓度之间的关系图，可得到图 3D 中的剂量响应曲线。利用阻抗数据，绘制了同样的分析曲线，如图 3E 和 3G 所示。注意，这两种正交方法确定的 EC₅₀ 值彼此接近（成像法和阻抗法分别为 1.13 ng/mL 和 2.06 ng/mL），这是 eSight 检测所特有的。

基于图像的分析

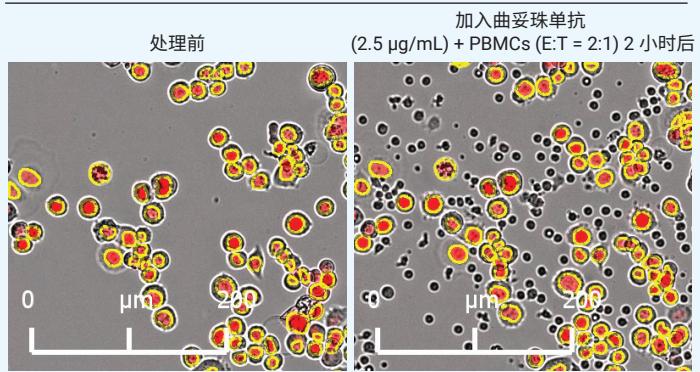
A

MDA-MB-231 (HER2 阴性)

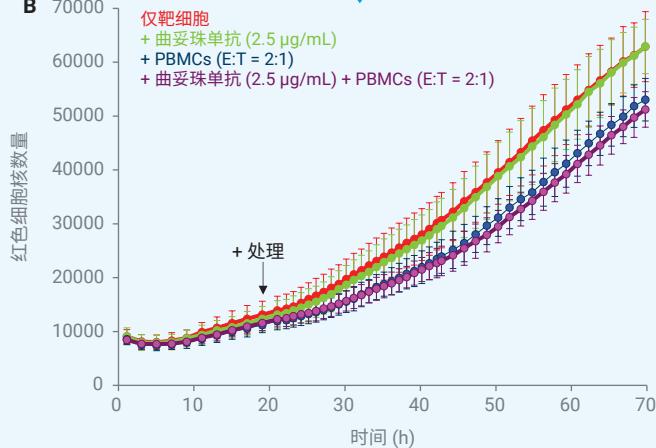


C

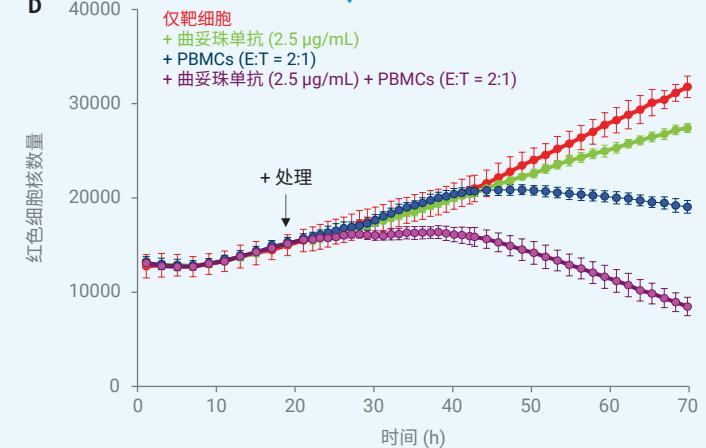
SKBR3 (HER2 阳性)



B



D



基于阻抗的分析

E

MDA-MB-231 (HER2 阴性)



F

SKBR3 (HER2 阳性)

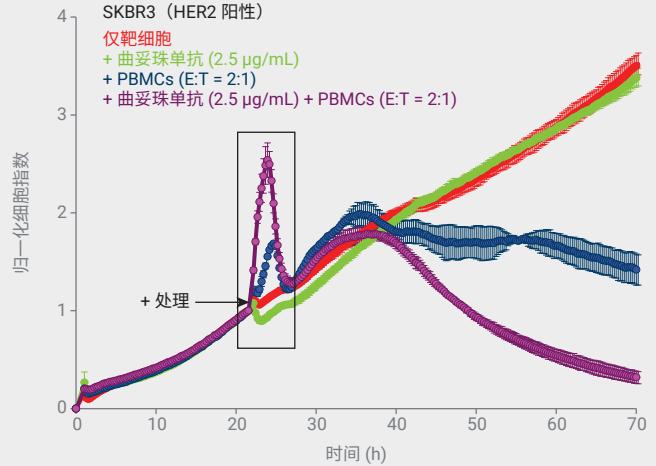


图 2. 利用成像和阻抗定量 ADCC 活性。(A) 对于 HER2 阴性 MDA-MB-231 细胞, eSight 的分割 Mask (黄色轮廓) 准确识别了红色靶细胞核, 并正确排除了未标记的 PBMCs。(B) 红色 MDA-MB-231 细胞核随时间变化的曲线。在 20 小时时点进行了不同的处理。误差线表示 3 个重复孔中得到的标准偏差。(C 和 D) 与图 A 和图 B 相似, 但采用的是 HER2 阳性 SKBR3 细胞。(E) MDA-MB-231 细胞的实时阻抗曲线。(F) SKBR3 细胞的实时阻抗曲线。黑框圈出了加入 PBMCs 或 PBMCs + 曲妥珠单抗后, 阻抗立即出现瞬时的增加。

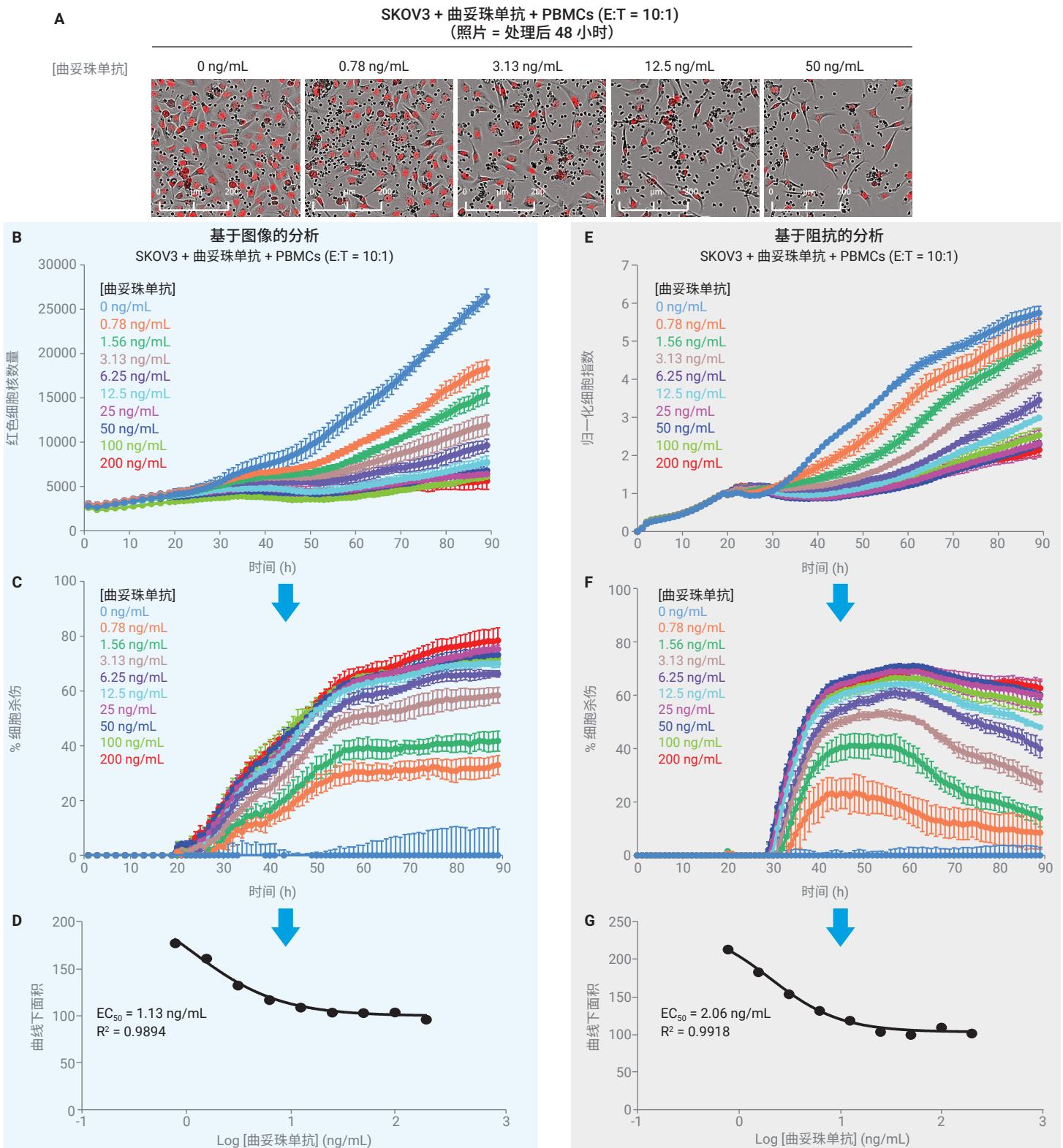


图 3. 在恒定的 PBMC 密度下滴定曲妥珠单抗的浓度。(A) 在保持 PBMC 密度恒定 (E:T = 10:1) 的情况下，增加曲妥珠单抗的浓度明显增强了对靶细胞 (SKOV3) 的杀伤程度。(B) 通过绘制红色 SKOV3 细胞核随时间变化的曲线追踪 ADCC 活性。(C) 将图 B 的数据转化为实时细胞杀伤百分比曲线。(D) 基于图 C 的细胞杀伤百分比图曲线下面积的曲妥珠单抗剂量-响应曲线。(E 到 G) 与图 B、C 和 D 类似，但使用阻抗来追踪 ADCC 活性。

结论

本文介绍的 eSight ADCC 检测最突出的特点也许是它所需的手动操作时间少。在接种靶细胞，随后加入效应细胞和抗体后，无需对微孔板进行额外的操作/处理步骤。本检测的另一个重要优点是，能够利用同一细胞群（即在同一孔中）同时采集初步分析数据（阻抗）和确认数据（成像）。本文使用的针对贴壁靶细胞研究 ADCC 的方法也可用于血液肿瘤。安捷伦开发了相应的试剂盒，这些试剂盒使用抗体将血液肿瘤细胞粘附在 E-Plate 底部（包括玻璃表面和微金电极生物传感器），使得可以通过成像和阻抗来分析这些细胞的杀伤情况。

总之，eSight 的阻抗结果可作为筛选和表征 ADCC 检测中的抗体的一种灵敏、简单、无标记的方法。eSight 的同步成像结果可用于确认阻抗结果，而无需增加运行该检测所需的手动操作时间。

参考文献

1. Nigro, C. et al. NK-Mediated Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Solid Tumors: Biological Evidence and Clinical Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2019**, 7(5), 105
2. Rieke, G. et al. Induction of NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Against SARS-CoV-2 After Natural Infection is More Potent Than After Vaccination. *J. Infect. Dis.* **2022**, Mar 22
3. Doepper, L. et al. Development of Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity Function in HIV-1 Antibodies. *Elife* **2021**, Jan 11
4. Chin, D. et al. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Through Natural Killer (NK) Cells: Unlocking NK Cells for Future Immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2022**, 23(4), 552–578
5. Kute, T. et al. Understanding Key Assay Parameters That Affect Measurements Of Trastuzumab-Mediated ADCC Against Her2 Positive Breast Cancer Cells. *Oncoimmunology* **2012**, 1(6), 810–821

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/chem/eSight

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44680.6609722222

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, 2022

2022年5月26日, 中国出版

5994-4955ZHCN