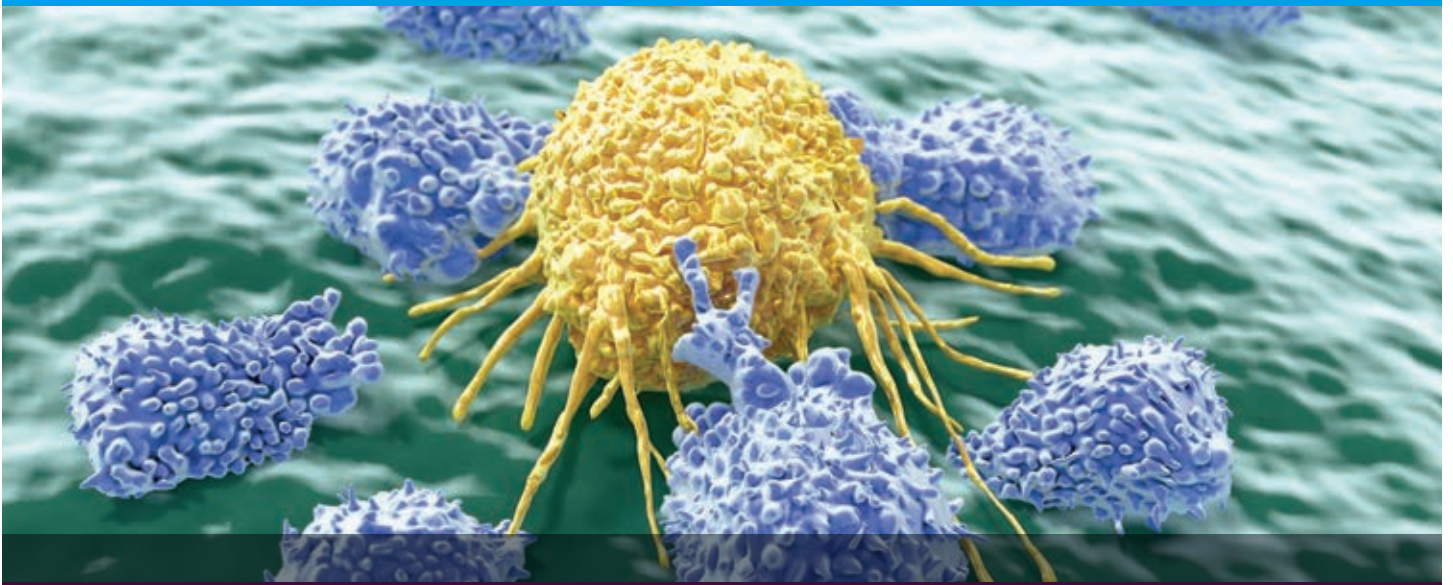


癌症免疫疗法

Agilent xCELLigence RTCA 手册



目录

什么是癌症免疫疗法?	4
通过哪些方式可以使免疫系统靶向肿瘤?	4
xCELLigence 实时细胞分析技术	6
各种癌症免疫疗法的应用	6
xCELLigence 实时细胞分析检测的工作原理	7
使用 E-Plate 测定细胞阻抗	7
实时细胞阻抗曲线说明	8
用于免疫疗法的 xCELLigence 仪器	9
抗体依赖性细胞介导的细胞杀伤 (ADCC)	11
使用 xCELLigence 研究抗体依赖性细胞介导的细胞杀伤 (ADCC)	11
参考文献	13
双特异性 T 细胞 (BiTEs) 和双特异性抗体	15
使用 xCELLigence 研究 BiTEs	15
参考文献	17
检查点抑制剂	18
使用 xCELLigence 研究检查点抑制剂	18
参考文献	20
联合疗法	21
使用 xCELLigence 研究联合疗法	21
参考文献	22
基因工程 T 细胞介导的细胞杀伤	23
使用 xCELLigence 研究基因工程 T 细胞	23
参考文献	26
巨噬细胞介导的吞噬作用	27
使用 xCELLigence 研究巨噬细胞介导的吞噬作用	27
参考文献	28
NK 细胞介导的细胞杀伤	28
使用 xCELLigence 研究 NK 细胞介导的细胞杀伤	29
参考文献	31

溶瘤病毒	32
参考文献	34
T 细胞介导的细胞杀伤	35
参考文献	37
血液瘤杀伤检测	38

什么是癌症免疫疗法？

癌症免疫疗法包括多种方法，主要通过利用和增强免疫系统的固有能力来对抗癌症。癌症免疫疗法是目前最具前景的癌症治疗方法之一。该领域的两名研究人员曾荣获 2018 年诺贝尔医学奖，且近年来已有 12 种癌症免疫疗法获得批准。

癌症免疫疗法可分为四大类：

- 细胞因子/免疫调节药物
- 单克隆抗体
- 细胞疗法
- 溶瘤病毒

尽管单克隆抗体是目前最大的一类商业化癌症免疫疗法，但细胞疗法正在迅速取得进展。这种个性化疗法需要采集癌症患者的免疫细胞，并对细胞进行工程处理（通过基因编辑或肽类/佐剂刺激）使其能识别并杀死癌细胞，然后大量培育此类工程细胞，并将其重新回输到同一患者体内。

通过哪些方式可以使免疫系统靶向肿瘤？

免疫细胞介导的肿瘤细胞杀伤过程可能涉及先天性免疫系统和适应性免疫系统（图 1），包括：

- 自然杀伤 (NK) 细胞
- 细胞毒性 T 细胞（依赖 MHC）
- B 淋巴细胞分泌的抗体
- 工程抗体，例如双特异性抗体和双特异性 T 细胞 (BiTEs)
- 靶向特定肿瘤抗原的基因工程 T 细胞（例如，CAR-T，不依赖 MHC）
- 巨噬细胞介导的吞噬作用

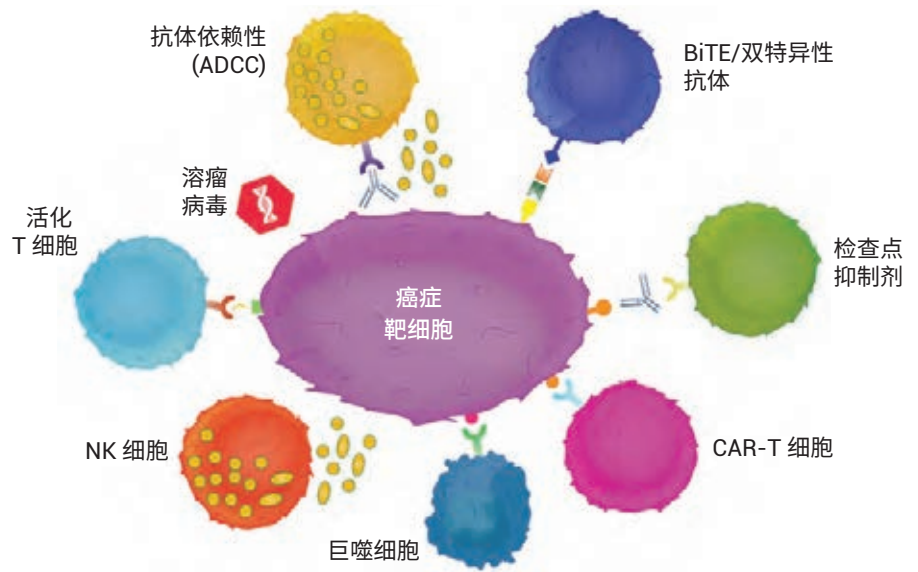


图 1. 各种类型的肿瘤靶向机制

对新型癌症免疫疗法的检测需求

癌症免疫疗法研究人员面临的巨大挑战是无法预测治疗疗效和反应。虽然已经开发出许多方法来筛选和评估免疫细胞介导的杀伤效力，但仍需要更强大的体外检测方法来准确预测治疗药物的体内行为。理想的检测方法应具备客观性、易于执行、可提供定量动力学结果并能够模拟生理相关条件。其他现有的方法（例如流式细胞仪）可以提供有关免疫细胞表型、活化和功能的额外数据。

释放试验是测定免疫细胞介导的杀伤作用最常用的一种方法。该试验中，效应细胞介导的靶细胞膜破坏使细胞质内容物渗漏到培养基中。内源性生物分子（例如乳酸脱氢酶）或先前添加的外源性标记（例如放射性同位素 ^{51}Cr ）也同样渗漏到培养基中，通过测定这些物质可以间接测定效应细胞造成的破坏。其他终点检测方法还包括基于 ELISA 的颗粒酶测定和显微镜形态分析。尽管这些检测方法提供的数据有助于从各个方面了解免疫细胞介导的杀伤作用，但需要注意的是，这些方法报告的数据通常与体内靶细胞杀伤效力并不相关。

xCELLigence 实时细胞分析技术

Agilent xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 仪器可帮助用户：

- 以极高灵敏度定量测定实时动力学
 - 以低效靶比实时测定靶细胞杀伤
- 轻松研究多种效应细胞和分子
 - 测定 CAR-T 细胞或单克隆抗体的细胞毒性作用、优化联合疗法的效价、测定脱靶效应等等
- 在无标记条件下进行实验
- 无需使用 ^{51}Cr 、萤光素酶或染料即可测定细胞毒性

各种癌症免疫疗法的应用

目前，全球已有数千台 xCELLigence 仪器投入使用，并由此在同行评审期刊中发表了超过 1800 篇 xCELLigence 相关论文。

xCELLigence RTCA 技术已广泛应用于癌症研究，其应用范围包括但不限于：

- 化合物介导的细胞毒性
- 细胞介导的细胞毒性
- T 细胞
- NK 细胞
- CAR T 细胞
- 巨噬细胞
- 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)
- 双特异性抗体
- 双特异性 T 细胞 (BiTEs)
- 检查点抑制剂联合疗法
- 肿瘤微环境（细胞间相互作用）
- 细胞粘附/伸展
- 受体活化
- 溶瘤病毒
- 自噬
- 实体瘤杀伤检测
- 血液瘤杀伤检测
- 免疫细胞活化
- 凋亡
- 炎症

xCELLigence 实时细胞分析检测的工作原理

xCELLigence RTCA 仪器使用嵌入专用微孔板 (Agilent E-Plates) 底部的微金电极生物传感器，可对细胞状态（包括细胞数量、细胞大小和细胞-基质粘附强度）进行非侵入性监测。这项技术的出色之处主要包括更高的灵敏度、无标记以及动态测定细胞活力/行为。

简单便捷的工作流程

- 接种靶细胞，添加效应细胞，开始读数
- 同时生成多种条件下的实时杀伤曲线，范围可从数秒到数天
- 在 15 秒内即可读取整个 96 孔板，并可独立运行多达 6 个微孔板，不会发生相互冲突

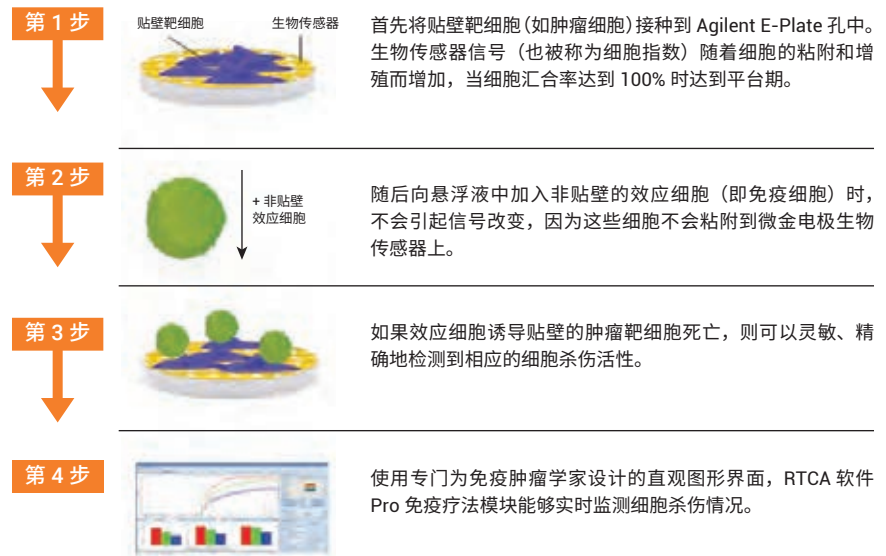


图 2. Agilent xCELLigence RTCA 检测概述

使用 E-Plate 测定细胞阻抗

安捷伦电子微孔板 (E-Plate) 每个孔中的微金电极生物传感器覆盖了约 75% 的面积。E-Plate 每个孔中的圆形生物传感器连接成串,组成交错电极阵列(图 3)。此专利设计可以同时监测大量细胞。当细胞粘附并在 E-Plate 上增殖时,生物传感器可检测细胞阻抗,从而以极高的灵敏度实时提供细胞数量、细胞大小/形态和细胞-基质粘附强度的读数。

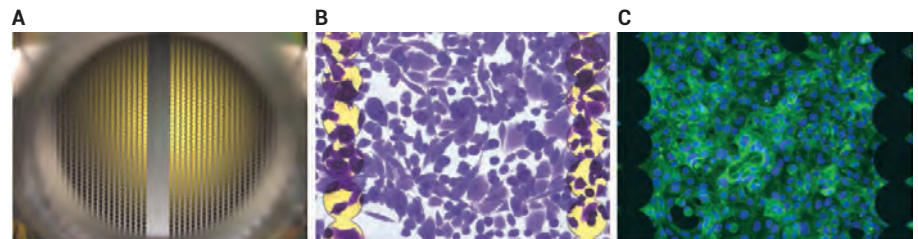


图 3. Agilent E-Plate 中用于测定细胞阻抗的生物传感器。(A) E-Plate 中单个孔的照片。尽管在微金电极生物传感器的表面上也可以看到细胞,但孔中间的区域有利于显微成像。(B) 复式显微镜下观察到的用结晶紫染色的人体细胞。(C) 免疫荧光显微图像

实时细胞阻抗曲线说明

使用细胞指数 (Cell Index, CI) 这一无单位参数来表示贴壁细胞引起的阻抗，其中：

$$CI = \frac{(\text{时间点 } n \text{ 时的阻抗}) - (\text{无细胞的阻抗})}{(\text{阻抗常数})}$$

图 4 展示了在凋亡实验的整个过程中实时阻抗曲线的示例：

1. **由于细胞粘附而快速增加**：将细胞加入孔后的最初几个小时，细胞粘附和伸展使阻抗迅速增加
2. **由于细胞增殖而缓慢增加**：如果细胞在最初的粘附阶段后生长至亚汇合 (subconfluent)，将开始增殖并导致 CI 平缓稳定地增加
3. **细胞生长至汇合而保持平稳**：当细胞增殖至汇合后，CI 值趋于平稳，表明细胞与电极的接触表面积不再变化
4. **加入凋亡诱导剂**：此时加入凋亡诱导剂会使 CI 降低至零。这是细胞变圆后从孔底脱落的结果。虽然这一通用示例涉及在细胞汇合点加入凋亡诱导剂，但基于阻抗的检测方法非常灵活，可以在各种细胞密度下检测多种现象
5. **因细胞死亡/脱落而降低**

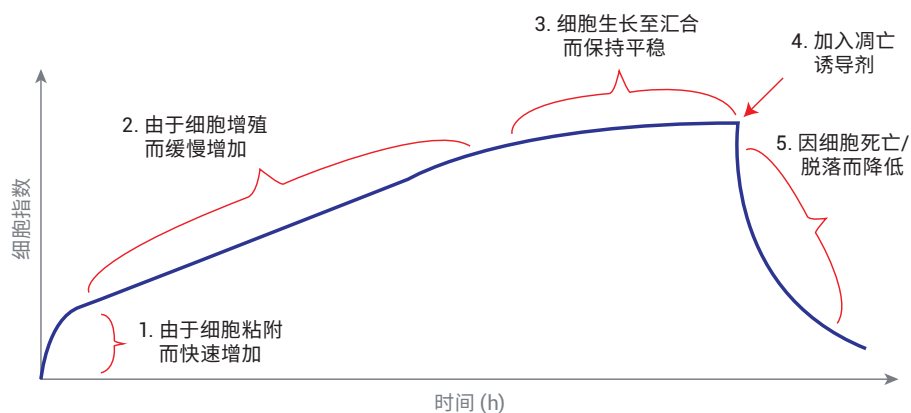


图 4. 用于细胞凋亡分析的通用实时阻抗曲线。阻抗曲线的各个阶段及其所引起的细胞行为都通过文字进行了说明

用于免疫疗法的 xCELLigence 仪器

为了控制 RTCA 检测的温度、湿度和大气成分，xCELLigence 仪器安装在标准培养箱或低氧室内（图 5）。仪器通过电缆连接到培养箱外的分析工作站。易于使用的软件可实现对仪器的实时控制和监测，并具有实时数据显示和分析功能。

在七款 xCELLigence RTCA 仪器中，最适合免疫疗法分析的仪器有双重用途 (DP)、单板位 (SP)、多板位 (MP) 和高通量 (HT) 型号（表 1）。虽然这几款仪器均以相同的方式通过细胞阻抗监测细胞数量、细胞大小和细胞-基质粘附强度，但微孔板配置和通量各不相同。DP 型号采用可作为电子 Boyden 小室的专用微孔板，具有定量监测细胞侵袭和迁移的额外功能。最后，尽管 HT 型号可以作为独立的仪器运行，但一个工作站可以连接四台此款型号的仪器，提供总共 1536 孔的通量。HT 仪器还可以与自动化液体处理器集成，最大程度提高通量。



图 5. Agilent xCELLigence RTCA eSight 仪器及其工作站分别位于培养箱的内部和外部

表 1. Agilent xCELLigence RTCA 仪器概述



免疫疗法应用	双重用途 (DP)	单板位 (SP)	多板位 (MP)	高通量 (HT)	eSight
可用于血液瘤和实体瘤靶细胞					
细胞介导的细胞毒性	✓	✓	✓	✓	✓
ADCC	✓	✓	✓	✓	✓
检查点抑制剂	✓	✓	✓	✓	✓
联合疗法	✓	✓	✓	✓	✓
抗体-药物偶联物	✓	✓	✓	✓	✓
免疫细胞活化	✓	✓	✓	✓	✓
细胞侵袭和迁移	✓				
活细胞成像					✓
性能指标					
规格	3 × 16 孔	1 × 96 孔	6 × 96 孔	1 × 384 孔	3 × 96 孔用于阻抗监测 5 × 96 孔用于成像
最大通量	48 孔	96 孔	576 孔	最多 4 × 384 孔 (总计 1536 孔)	288 孔用于阻抗监测 最多 480 孔用于成像

抗体依赖性细胞介导的细胞杀伤 (ADCC)

尽管人们通常将免疫系统的先天性免疫和适应性免疫描述为相互独立的分支，但它们常常通过协同作用提供保护，抵抗疾病。遇到病原体时，先天免疫系统的细胞通常会释放细胞因子，这些细胞因子与适应性免疫系统的成分相互作用，使其扩增并活化。许多参与先天性免疫反应的细胞（包括 NK 细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞）也会表达 CD16 (Fc 受体)，CD16 是 IgG 等免疫球蛋白的低亲和性受体。通过 CD16 与免疫球蛋白的结合，先天免疫细胞可以靶向结合了免疫球蛋白的靶细胞，并触发靶细胞的破坏。这种预防机制称为抗体依赖性细胞介导的细胞杀伤 (ADCC)，是多种单克隆抗体疗法的基础。

使用 xCELLigence 研究抗体依赖性细胞介导的细胞杀伤 (ADCC)

如图 6 和图 7 所示，科学家已使用 xCELLigence 平台来测定来自血液的单个核细胞 (MNCs) 在存在和不存在曲妥珠单抗（也称为赫赛汀）的情况下对不同乳腺癌细胞系的杀伤能力。曲妥珠单抗通过肿瘤细胞的抗原 (HER2) 对其进行识别，从而实现了对肿瘤细胞的特异性杀伤。

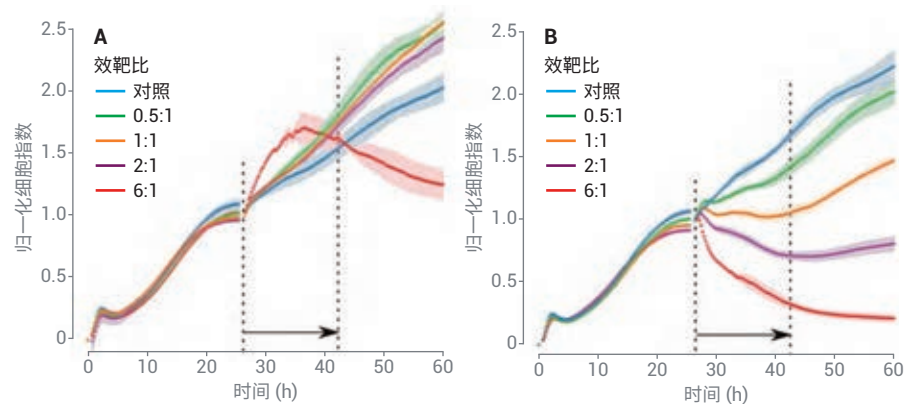


图 6. 在存在曲妥珠单抗的情况下，CI 值随着效靶比 (E:T) 的增加而相应降低。将 BT474 Clone-5 细胞维持培养 26 小时，然后分别用无细胞的培养基（对照）和含有从人血液中分离的单个核细胞 (MNCs) 的培养基对其进行处理 (A)。除加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗外，使用上述相同方式处理细胞 (B)。CI 值已根据加入时的数值进行了归一化。蓝色代表不含 MNCs (对照) 时的生长情况，而绿色、橙色、紫色和红色代表分别以 0.5:1、1:1、2:1 和 6:1 的效靶比加入 MNCs 时的生长情况。垂直虚线表示处理后 16 小时的时间窗口，用于确定 AUC 值。以 15 分钟为间隔绘制归一化 CI 值与时间的关系图，数值为三次重复分析的平均值 (含标准偏差)。此图经授权转载自: Understanding Key Assay Parameters that Affect Measurements of Trastuzumab-Mediated ADCC Against Her2 Positive Breast Cancer Cells. Kute, T. et al. *Oncoimmunology*. 2012 Sep 1, 1(6), 810–821^[15]

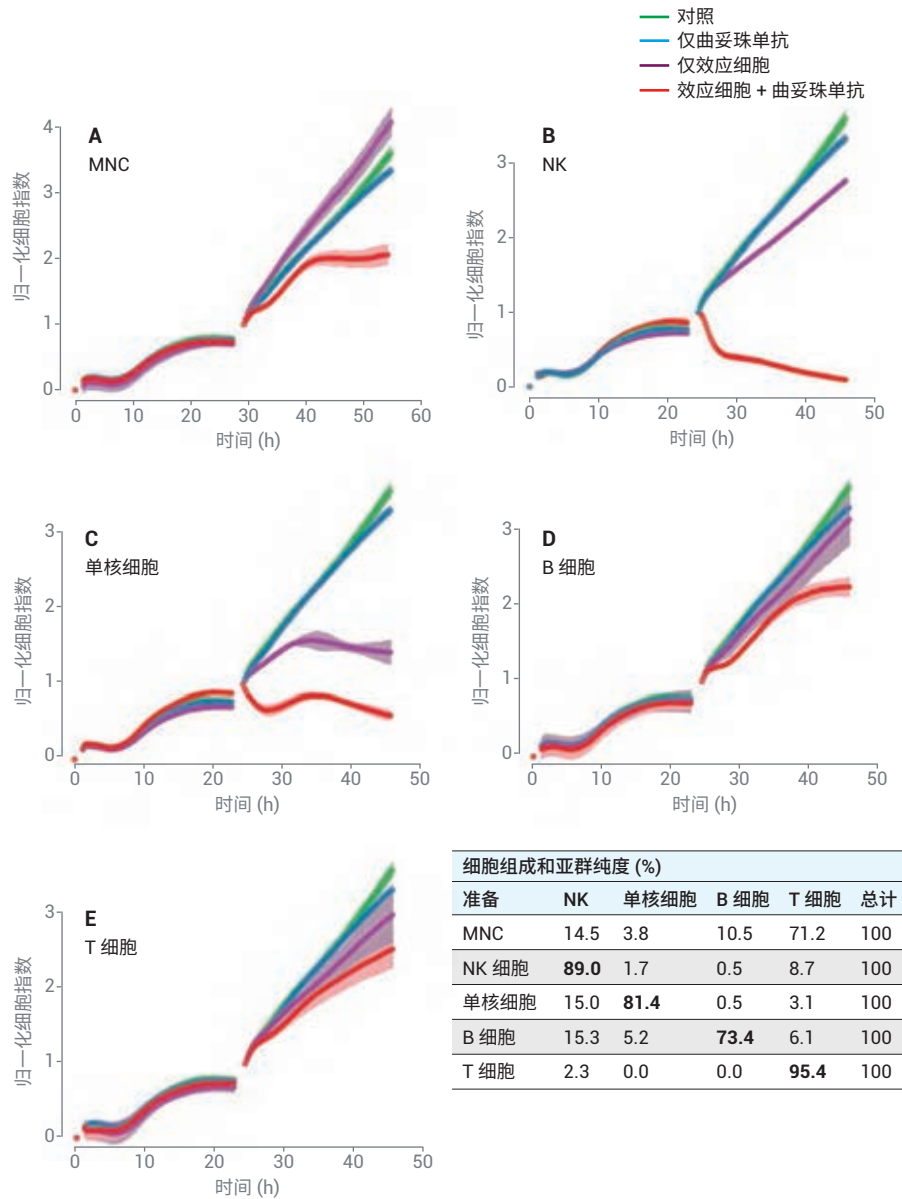


图 7. 自然杀伤细胞在单个核细胞亚群中表现出最强的 ADCC 活性。直接检测 MNCs 的 ADCC 杀伤作用 (A) 或分成亚群后进行检测: (B) NK 细胞、(C) 单核细胞、(D) B 细胞、(E) T 细胞。绿线表示对照, 蓝线表示仅加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗, 紫线表示以 6:1 的效靶比加入 MNCs 或亚群, 红线表示以 6:1 的效靶比加入 MNCs 或亚群, 且同时含有 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗。表中列出了流式细胞仪检测结果, 展示了纯化细胞和 MNCs 中各免疫亚型的分布。此图经授权转载自: Understanding Key Assay Parameters that Affect Measurements of Trastuzumab-Mediated ADCC Against Her2 Positive Breast Cancer Cells. Kute, T. et al. *Oncoimmunology*. 2012 Sep 1, 1(6), 810–821^[15]

参考文献

1. Wächter, S. *et al.* Individualised Multimodal Treatment Strategies for Anaplastic and Poorly Differentiated Thyroid Cancer. *J. Clin. Med.* **2018** May 15, 7(5)
2. Freedman, J. D. *et al.* Oncolytic Adenovirus Expressing Bispecific Antibody Targets T-Cell Cytotoxicity in Cancer Biopsies. *EMBO Mol Med.* **2017** Aug, 9(8), 1067–1087
3. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **2017** Apr 15, 77(8), 2052–2063
4. Ueda, O. *et al.* Entire CD3 ϵ , δ , and γ Humanized Mouse to Evaluate Human CD3–Mediated Therapeutics. *Sci. Rep.* **2017** Apr 3, 7, 45839
5. Tóth, G. *et al.* Quantitating ADCC Against Adherent Cells: Impedance-Based Detection is Superior to Release, Membrane Permeability, or Caspase Activation Assays in Resolving Antibody Dose Response. *G Cytometry A.* **2017** Oct, 91(10), 1021–1029
6. Serwotka-Suszczak, A. M. *et al.* A Conjugate Based on Anti-HER2 DiAffibody and Auristatin E Targets HER2-Positive Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2017** Feb 14, 18(2)
7. Schiller, C. B. *et al.* CD19-Specific Triplebody SPM-1 Engages NK and $\gamma\delta$ T Cells for Rapid and Efficient Lysis of Malignant B-Lymphoid Cells. *Oncotarget* **2016** Dec 13, 7(50), 83392–83408
8. Rocca Y. S. *et al.* Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. *Front. Immunol.* **2016** Oct 10, 7, 413
9. Seidel, U. J. *et al.* Reduction of Minimal Residual Disease in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia by an Fc-optimized CD19 Antibody. *Mol. Ther.* **2016** Sep, 24(9), 1634–43
10. Schmittnaegel, M. *et al.* A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2016** Sep, 15(9), 2130–42
11. Gilabert-Oriola, R. *et al.* Combinatorial Approach to Increase Efficacy of Cetuximab, Panitumumab and Trastuzumab by Dianthin Conjugation and Co-application of SO1861. *Biochem. Pharmacol.* **2015** Oct 1, 97(3), 247–55
12. Seidel, U. J. *et al.* $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Front. Immunol.* **2014** Dec 2, 5, 618
13. Schanzer, J. M. *et al.* A Novel Glycoengineered Bispecific Antibody Format For Targeted Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Insulin-Like Growth Factor Receptor Type I (IGF-1R) Demonstrating Unique Molecular Properties. *J. Biol. Chem.* **2014** Jul 4, 289(27), 18693–706
14. Croasdale, R. *et al.* Development of Tetravalent IgG1 Dual Targeting IGF-1R-EGFR Antibodies with Potent Tumor Inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012** Oct 15, 526(2), 206–18

15. Kute, T. *et al.* Understanding Key Assay Parameters that Affect Measurements of Trastuzumab-Mediated ADCC Against Her2 Positive Breast Cancer Cells. *Oncoimmunology* **2012** Sep 1, *1*(6), 810–821
16. Yamashita-Kashima, Y. *et al.* Pertuzumab in Combination with Trastuzumab Shows Significantly Enhanced Antitumor Activity in HER2-Positive Human Gastric Cancer Xenograft Models. *Clin. Cancer Res.* **2011** Aug 1, *17*(15), 5060–70
17. Ha, S. *et al.* Isolation and Characterization of IgG1 with Asymmetrical Fc Glycosylation. *Glycobiology* 2011 Aug, *21*(8), 1087–96
18. Kute, T. *et al.* Breast Tumor Cells Isolated from In Vitro Resistance to Trastuzumab Remain Sensitive to Trastuzumab Anti-Tumor Effects In Vivo and to ADCC Killing. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009** Nov, *58*(11), 1887–96

ADCC — 被检测的贴壁靶细胞

MCF-7、A431、BT-474、NCI-N87、SKOV3、PC8、PC9、PC11、PC12、PC13、HD9、HD10、HD11、H322、MCF-7-CD19tm、Colo38 和 MDA-MB435

信息来源

Agilent xCELLigence 应用简报： 自然杀伤细胞活性和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性的实时无标记检测

双特异性 T 细胞 (BiTEs) 和双特异性抗体

虽然某些表达 CD16 抗体受体的免疫细胞会减轻 ADCC 技术的疗效，但并非所有细胞都是如此。特别是细胞毒性 T 细胞和辅助性 T 淋巴细胞均不表达 CD16，因此与相应抗体共同作用时，并不会发挥免疫杀伤作用。为了克服这种局限性，增强适应性免疫系统对肿瘤细胞的杀伤能力，双特异性抗体应运而生。它能 (1) 结合肿瘤细胞表面上的特异性抗原，同时 (2) 通过 CD3 受体与 T 细胞结合，从而激活细胞毒性 T 细胞和辅助性 T 细胞。这种方法的优点是绕过了 MHC 介导的 T 细胞活化，并且可能靶向肿瘤细胞表面表达的任何抗原。尽管已经有非常多的双特异性抗体得到研究，但 BiTEs 具有更好的应用前景。FDA 将靶向 B 细胞恶性肿瘤细胞上 CD19 抗原的 BiTEs 评价为“突破性疗法”。

使用 xCELLigence 研究 BiTEs

图 8 展示了利用 xCELLigence RTCA 表征 BiTEs 的示例，其中使用 PBMCs 来杀伤贴壁 PC3 前列腺癌细胞。在存在靶向 EpCAM 受体（在 PC3 细胞等大多数上皮来源的癌细胞表面均有表达）的 BiTE 的情况下进行此项研究。

数据表明，在没有 BiTE 的情况下，PBMCs 在本实验测试的任何效靶比下均未显示出细胞杀伤活性。在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-EpCAM/CD3 BiTE 和各种效靶比下，CI 值呈剂量依赖性下降，表明 PBMCs 对 PC3s 有杀伤作用。在 PBMC:PC3 为 10:1 时，EpCAM/CD3 BiTE 诱导的杀伤作用呈剂量依赖性增强。尽管在较低的 BiTE 浓度下也会刺激对 PC3 细胞的杀伤，但杀伤作用会有所延迟。归一化 CI 值可以轻松换算为细胞杀伤百分比。数据清楚地表明，当使用的效应细胞较少时，细胞杀伤效率差异显著。

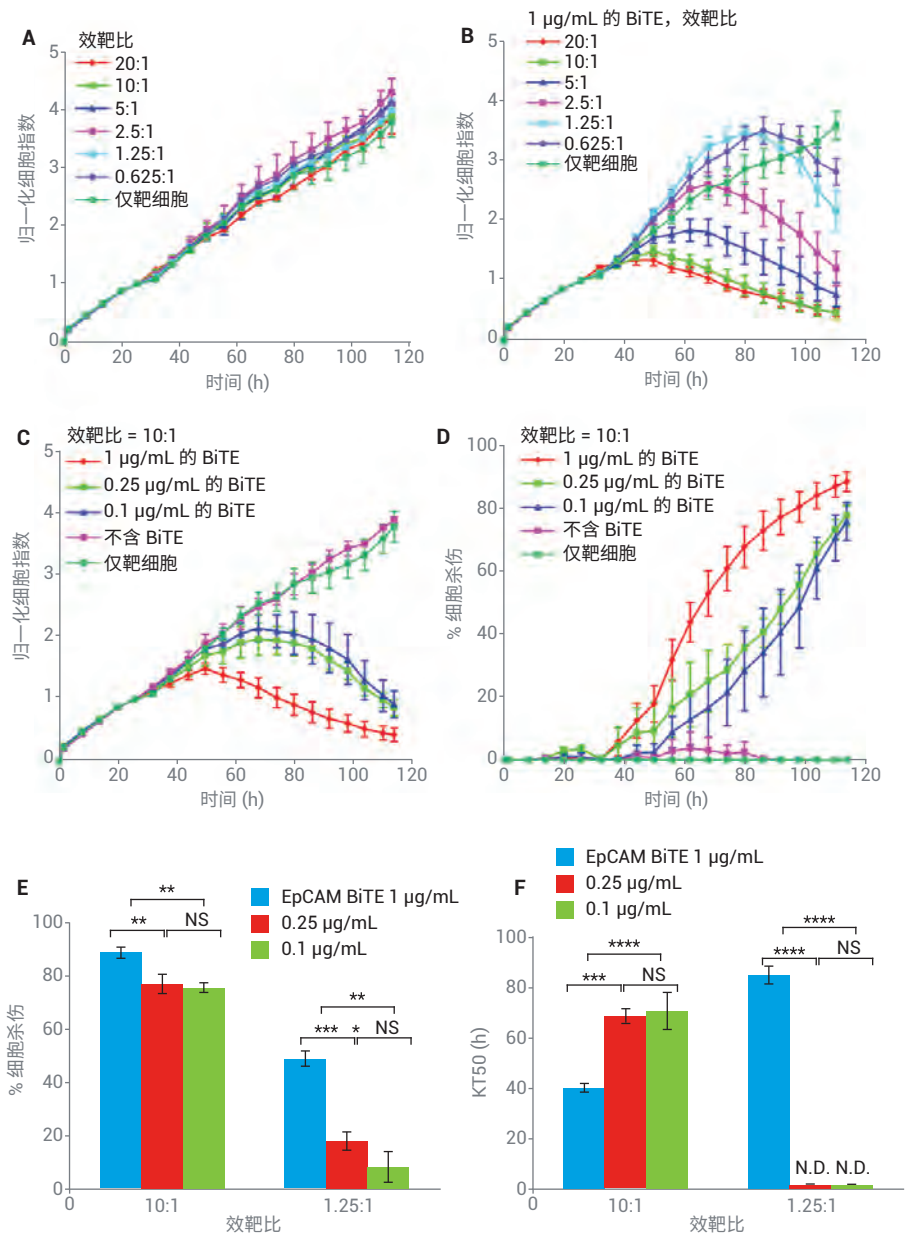


图 8. 对 BiTE 介导的细胞毒性作用进行阻抗评估。(A) 在不存在 BiTE 的情况下，加入不同效靶比的 PBMCs 与 PC3 靶细胞共同孵育得到的归一化 CI 曲线。(B) 与 (A) 相同的效靶比，但使用了 1 µg/mL anti-EpCAM/CD3 BiTE。(C) 效靶比为 10:1 时，不同 BiTE 浓度下的靶细胞的动态杀伤。(D) 与 (C) 相同的结果，以细胞杀伤百分比来显示。(E) 效靶比为 10:1 和 1.25:1 时，不同浓度 BiTE 对细胞杀伤百分比的影响。(F) 比较由 (E) 中结果得到的 KT50。通过单因素方差分析进行显著性分析。(*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; NS = 不显著; N.D.= 未检出)。此图经授权转载自 Cerignoli, F. et al. *In vitro Immunotherapy Potency Assays Using Real-Time Cell Analysis. PLOS ONE* 2018, 13(3), e0193498

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件，地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

参考文献

1. Meng, W. *et al.* Targeting Human Cytomegalovirus-Infected Cells by Redirecting T Cells Using an Anti-CD3/Anti-gB Bispecific Antibody. *Antimicrob Agents Chemother.* **2017** Oct 16. pii: AAC.01719–17
2. Freedman, J. D. *et al.* Oncolytic Adenovirus Expressing Bispecific Antibody Targets T-Cell Cytotoxicity In Cancer Biopsies. *EMBO Mol. Med.* **2017** Aug, 9(8), 1067–1087
3. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **2017** Apr 15, 77(8), 2052–2063
4. Schmittnaegel, M. *et al.* A New Class of Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules to Redirect CD8 T Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2016** Sep, 15(9), 2130–42
5. Schmittnaegel, M. *et al.* Committing Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cells to Eliminate Tumor Cells by Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules. *Cancer Immunol. Res.* **2015** Jul, 3(7), 764–76
6. Schmittnaegel, M. *et al.* Committing Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cells to Eliminate Tumor Cells by Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules. *Cancer Immunol. Res.* **2015** Jul, 3(7), 764–76
7. Seidel, U. J. *et al.* $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity with CD19 Antibodies Assessed by an Impedance-Based Label-Free Real-Time Cytotoxicity Assay. *Front. Immunol.* **2014** Dec 2, 5, 618
8. Schanzer, J. M. *et al.* A Novel Glycoengineered Bispecific Antibody Format for Targeted Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Insulin-Like Growth Factor Receptor Type I (IGF-1R) Demonstrating Unique Molecular Properties. *J. Biol. Chem.* **2014** Jul 4, 289(27), 18693–706
9. Oberg, H. H. *et al.* Novel Bispecific Antibodies Increase $\gamma\delta$ T-cell Cytotoxicity Against Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* **2014** Mar 1, 74(5), 1349–60

BiTE 和双特异性抗体介导的免疫细胞杀伤 — 被检测的贴壁靶细胞

PC3 前列腺癌细胞、Panc89、Colo357、PancTu-1、PDAC、Colo38、MDA-MB435 和 HBV 转染的 HuH7-S

信息来源

- **网络研讨会录像：**双特异性抗体构造子介导效应细胞对 HBV 感染的靶细胞的免疫治疗重定向，Felix Bohne 博士（德国环境健康研究中心）
- **Agilent xCELLigence 应用简报：**T 细胞进行的肿瘤细胞杀伤：使用实时细胞分析、流式细胞仪和多重免疫分析对 CD19-BiTE 的效应进行定量

检查点抑制剂

使用 xCELLigence 研究检查点抑制剂

检查点抑制剂通过破坏抑制免疫细胞活化的信号转导通路，使免疫效应细胞更积极地攻击癌细胞。无论是新型检查点靶标的机制验证，还是比较两种不同检查点调节抗体构造子的相对有效性，xCELLigence RTCA 仪器都能帮助您在最具生理相关性的条件下有效找到问题的答案。

研究表明，癌细胞表面的 PDL1 与活化的细胞毒性 T 细胞上表达的 PD1 结合可以保护癌细胞。这种相互作用导致细胞毒性活性下降，干扰素等细胞因子的产生减少。PDL1/PD1 阻断抗体作为一种治疗方法，可以恢复细胞毒性 T 细胞活性和干扰素产生，从而抑制肿瘤生长。

图 9 展示了使用 xCELLigence RTCA 监测在外周血单个核细胞 (PBMCs) 杀伤前列腺癌 PC3 细胞的过程中，anti-PD-1 抗体所产生的影响。将 PC3 靶细胞接种在 E-Plate 中，使其粘附并增殖。将冷冻的 PBMCs 解冻，与葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 超级抗原共同孵育使其激活，然后在存在或不存在 anti-PD-1 抗体的情况下添加到 PC3 细胞中。效靶比为 5:1。如图 10A 所示，PBMCs 本身具备适度杀伤 PC3 细胞的能力（蓝色迹线），但在存在 anti-PD-1 抗体（橙色迹线）的情况下，其杀伤作用更为显著。利用 xCELLigence RTCA 软件可将原始数据轻松转换为细胞杀伤百分比（图 10B），有助于阐明检查点抑制剂的影响：靶细胞杀伤更快实现，细胞杀伤率得以提升，以及总体细胞杀伤程度增加。

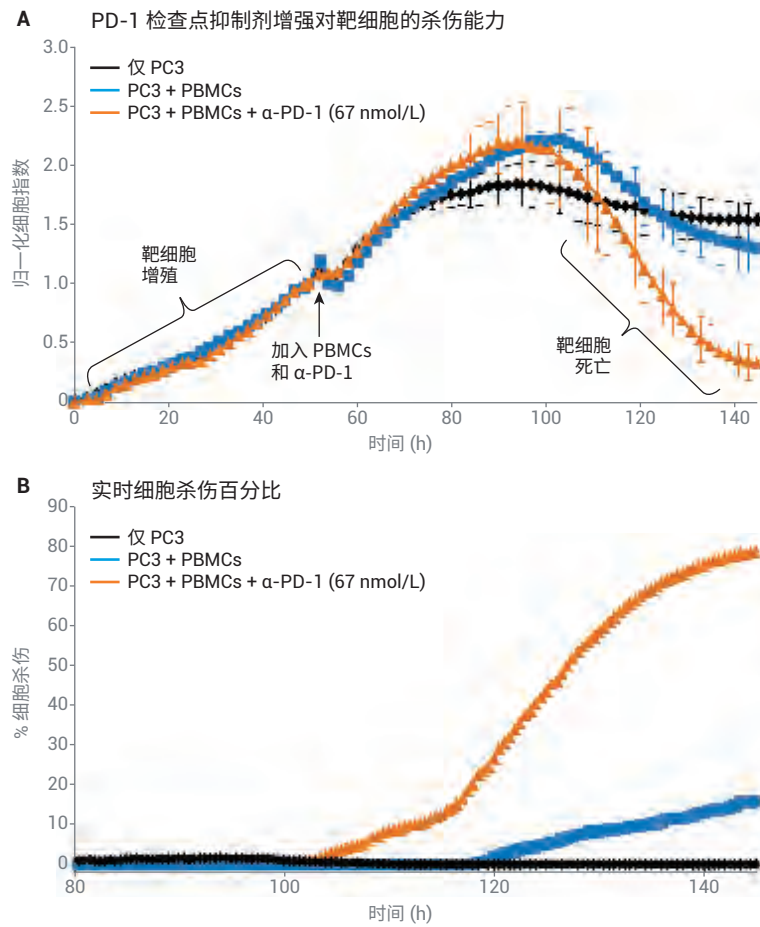


图 9. 使用 Agilent xCELLigence 监测在 PBMCs 杀伤前列腺癌 PC3 细胞的过程中, anti-PD-1 抗体所产生的影响。在 Agilent E-Plate 上培养 PC3 细胞。在存在或不存在检查点抑制剂 anti-PD-1 抗体的情况下加入 PBMC 效应细胞。监测阻抗, 并计算效应细胞的时间依赖性细胞杀伤活性

参考文献

1. Ruan, Q. Z. *et al.* Rational Combinations of in Vivo Cancer Antigen Priming And Adoptive T-Cell Therapy Mobilize Immune And Clinical Responses in Terminal Cancers. *Cancer Immunol.Immunother.* **2018** Jun, 67(6), 907–915
2. Guedan, S. *et al.* Enhancing CAR T Cell Persistence Through ICOS and 4-1BB Costimulation. *JCI insight* **2018** Jan 11, 3(1)
3. Gato-Cañas, M. *et al.* PDL1 Signals Through Conserved Sequence Motifs to Overcome interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* **2017** Aug 22, 20(8), 1818–1829
4. Morisada, M. *et al.* Dose-Dependent Enhancement of T-Lymphocyte Priming and CTL Lysis Following Ionizing Radiation in an Engineered Model of Oral Cancer. *Oral Oncol.* **2017** Aug, 71, 87–94
5. Antonios, J. P. *et al.* Immunosuppressive Tumor-infiltrating Myeloid Cells Mediate Adaptive Immune Resistance Via a PD-1/PD-L1 Mechanism in Glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **2017** Jun 1, 19(6), 796–807
6. Soto-Pantoja, D. R. *et al.* Unfolded Protein Response Signaling Impacts Macrophage Polarity to Modulate Breast Cancer Cell Clearance and Melanoma Immune Checkpoint Therapy Responsiveness. *Oncotarget* **2017** Aug 3, 8(46), 80545–80559
7. Delconte, R. D. *et al.* CIS Is a Potent Checkpoint in NK Cell-Mediated Tumor Immunity. *Nat. Immunol.* **2016** Jul, 17(7), 816–24
8. Antonios, J. P. *et al.* PD-1 Blockade Enhances The Vaccination-induced Immune Response in Glioma. *JCI insight* **2016** Jul 7, 1(10). pii, e87059
9. Hong, S. *et al.* Upregulation of PD-L1 by EML4-ALK Fusion Protein Mediates the Immune Escape in ALK Positive NSCLC, Implication for Optional Anti-PD-1/PD-L1 Immune Therapy for ALK-TKIs Sensitive and Resistant NSCLC Patients. *Oncoimmunology* **2015** Dec 21, 5(3), e1094598

联合疗法

传统小分子肿瘤药典正在迅速补充检查点抑制剂等生物制剂。不久还将纳入 CAR-T 细胞等细胞疗法。随着药典的不断扩增，将有可能通过联合不同疗法以提高对癌细胞的杀伤能力。如果检测平台可以在生理相关条件下保持高灵敏度，且获得的体外数据可预测体内行为，那么将有利于联合疗法的优化。其他理想性能还包括简单的工作流程和高通量形式，以支持联合疗法的不同设置，以便同时进行分析。xCELLigence RTCA 满足了上述所有需求。

使用 xCELLigence 研究联合疗法

图 10 展示了使用 xCELLigence RTCA 监测 PD-1 和 CTLA-4 检查点抑制剂组合在 PBMCs 杀伤前列腺癌 PC3 细胞过程中的影响。在本实验中，将 PC3 靶细胞接种在 E-Plate 中，使其粘附并增殖。将冷冻的 PBMCs 解冻，与葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 超级抗原共同孵育使其激活，然后在存在或不存在 38 nmol/L anti-PD-1 抗体和两种不同浓度 anti-CTLA-4 抗体的情况下将 PBMCs 添加到 PC3 细胞中。效靶比为 5:1。PBMCs 的杀伤作用在不同供体间存在巨大差异，对于此特定批次的细胞，添加 38 nmol/L anti-PD-1 不会增强对靶细胞的杀伤作用。但是，同时加入 anti-CTLA-4 和 anti-PD-1 时，对靶细胞的杀伤作用呈剂量依赖性增强（绿色和粉色迹线）。

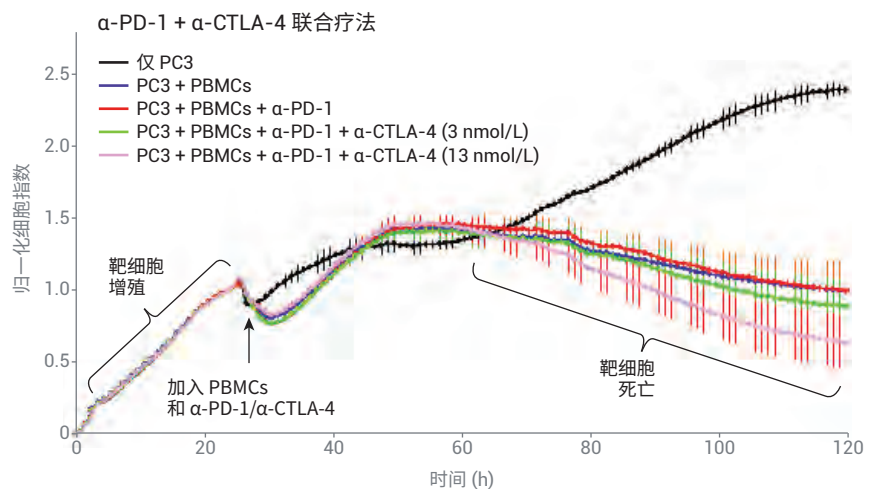


图 10. anti-PD-1 和 anti-CTLA-4 抗体联合疗法。Agilent xCELLigence RTCA 仪器可在无标记/修饰的情况下高灵敏度地分析癌细胞杀伤作用，能够在比其他体外技术更接近人体生理学的条件下研究效应细胞和靶细胞。通过对联合疗法诱导的靶细胞杀伤进行连续监测，这款仪器还省去了费时费力的终点测定，可以同时多种不同的条件下轻松获得细胞杀伤数据

参考文献

1. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-Cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **2017** Apr 15, 77(8), 2052–2063
2. Deben, C. *et al.* The MDM2-Inhibitor Nutlin-3 Synergizes with Cisplatin to Induce p53 Dependent Tumor Cell Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer. **2015** Sep 8, 6(26), 22666–79
3. Kasukabe, T. *et al.* Cotylenin A and Arsenic Trioxide Cooperatively Suppress Cell Proliferation and Cell Invasion Activity in Human Breast Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2015** Feb, 46(2), 841–8
4. Chang, H. Y. *et al.* Combination Therapy Targeting Ectopic ATP Synthase and 26S Proteasome Induces ER Stress in Breast Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2014** Nov 27, 5, e1540
5. von Mallinck-rodt, B. *et al.* Dianthin-EGF is an Effective Tumor Targeted Toxin in Combination with Saponins in a Xenograft Model for Colon Carcinoma. *Future Oncol.* **2014** Nov, 10(14), 2161–75
6. Tsamis, K. I. *et al.* Combination Treatment for Glioblastoma Cells with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand and Oncolytic Adenovirus Delta-24. *Cancer Invest.* **2013** Nov, 31(9), 630–8

基因工程 T 细胞介导的细胞杀伤

使用 xCELLigence 研究基因工程 T 细胞

经基因工程改造的 T 细胞能表达肿瘤抗原特异性 T 细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。CAR 由与肿瘤特异性抗体衍生胞外结构域与胞内信号转导结构域组成。研究基因修饰 T 细胞的主要目的是避免与非自体疗法相关的免疫耐受问题，并产生可有效靶向肿瘤且无需在人体内重新激活的 T 细胞。从近几年的可靠临床数据来看，此方法确实行之有效。(研究示例请参阅 *Clin. Transl. Immunology* **2014**, 3(5), e16)。

在图 11 中，使用 xCELLigence RTCA 在体外评估 NKG2D CAR-T 细胞对三阴性乳腺癌细胞 (TNBCs) 的抗肿瘤活性。结果表明，经 4-1BB 或 CD27 共刺激的 NKG2D CAR-T 细胞对 NKG2DL (+) MDA-MB-468 和 MDA-MB-436 细胞的细胞毒性具有时间依赖性和效靶比依赖性。作为阴性对照的未转导 T 细胞未能抑制这些细胞的生长。

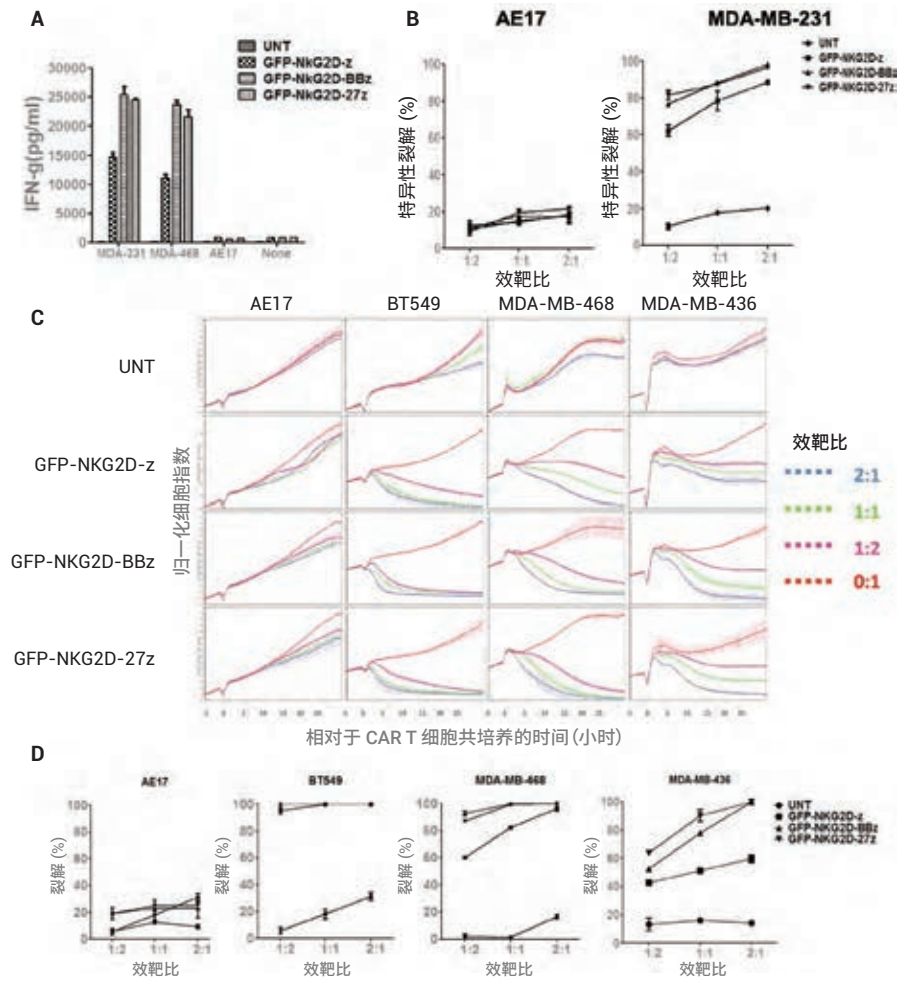


图 11. NKG2D CAR T 细胞在体外识别人 TNBC 细胞。(C) 与 UNT 或 NKG2D CAR T 细胞在不同效靶比下孵育 24 小时的靶细胞 (AE17、BT549、MDA-MB-436 和 MDA-MB-468) 的归一化 CI 图。单独接种时, 靶细胞粘附在微孔板上并增殖, 使 CI 读数增加 (红线)。将 T 细胞添加到靶细胞中后, NKG2D CAR-T 细胞使靶细胞死亡, CI 值逐渐下降。Y 轴为 RTCA 软件实时生成并显示的归一化 CI。X 轴为以小时为单位的细胞培养和培养时间。绘制 CI 的平均值 \pm 标准偏差。(D) 通过 Agilent xCELLigence 免疫疗法软件将 CI 图转换为杀伤百分比。此图经授权转载自: Hali, Y. *et al.* Control of Triple-Negative Breast Cancer Using *Ex Vivo* Self-Enriched, Costimulated NKG2D CAR T Cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2018, 11, 92^[1]

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本, 请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件, 地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

癌细胞群内的异质性抗原表达可能使其无法对 CAR-T 细胞疗法产生完全反应。表达目标抗原的癌细胞被杀死，而未表达目标抗原的细胞将继续不受阻碍地增殖。为了最大程度减少这种现象（称为抗原/肿瘤逃逸），因此靶向多种肿瘤细胞抗原的方法受到越来越多的关注。

图 12 比较了不同的情况，其中靶向 HER2 和 IL13Ra2 抗原的 CARs 在不同的 T 细胞中得到表达 (CARpool)：在同一 T 细胞中表达为不同的蛋白 (biCAR)；或在 T 细胞中表达为单个融合蛋白 (TanCAR)。当与胶质母细胞瘤靶细胞孵育时，这些 CAR T 产品均表现出不同的杀伤力和动力学 (图 13)。通过连续监测阻抗，很容易监测到在连续杀伤过程中出现的这些细微差别，但使用传统的终点检测法时无法检测到这些变化。

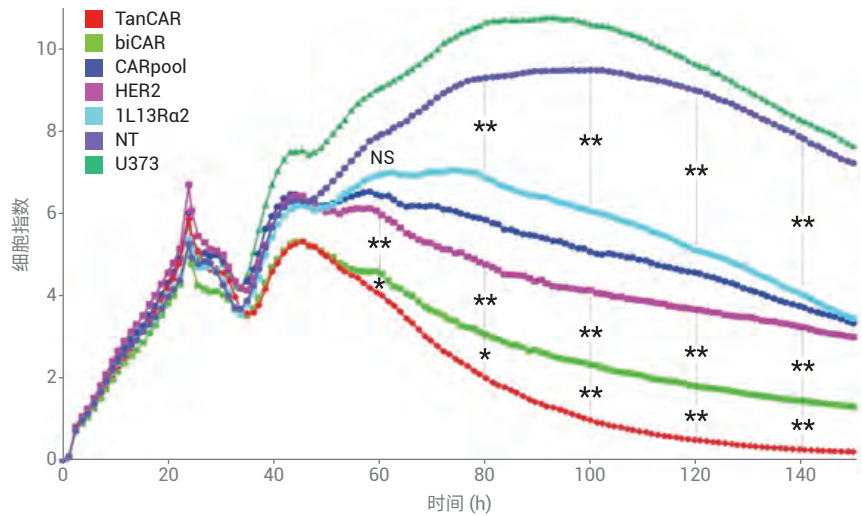


图 12. 使用 Agilent xCELLigence 监测 CAR-T 细胞单独靶向或同时靶向 HER2 和 IL13Ra2 抗原时对抗胶质母细胞瘤细胞系 U373 的杀伤能力。在图例中：U373 = 只有靶细胞系；NT = 用未转染的 T 细胞（不表达 CAR）处理的靶细胞；IL13Ra2 = 用 T 细胞处理的靶细胞，其中 T 细胞表达靶向 IL13Ra2 的单一 CAR；Her2 = 用 T 细胞处理的靶细胞，其中 T 细胞表达靶向 Her2 的单一 CAR；有关 CARpool、biCAR 和 TanCAR 的说明，请参阅正文

经授权转载自 *J. Clin. Invest.*, from "Tandem CAR T Cells Targeting HER2 and IL13Ra2 Mitigate Tumor Antigen Escape," Hegde, M. et al. 2016 Aug 1, 126, 8, 3036–52, 2019; 许可通过 Copyright Clearance Center, Inc. 传达。

参考文献

1. Hali, Y. *et al.* Control of Triple-Negative Breast Cancer Using Ex Vivo Self-Enriched, Costimulated NKG2D CAR T Cells. *J. Hematol. Oncol.* **2018** Jul 6, *11*(1), 92
2. Watanabe, K. *et al.* Pancreatic Cancer Therapy With Combined Mesothelin-Redirected Chimeric Antigen Receptor T Cells and Cytokine-Armed Oncolytic Adenoviruses. *JCI insight* **2018**, *3*(7), e99573
3. Jin, J. *et al.* Enhanced Clinicalscale Manufacturing of TCR Transduced T Cells Using Closed Culture System Modules. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 13
4. Guedan, S. *et al.* Enhancing CAR T Cell Persistence Through ICOS and 4-1BB Costimulation. *JCI insight* **2018** Jan 11, *3*(1)
5. Xu, J. Y. *et al.* Mesothelin-Targeting Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells by PiggyBac Transposon System Suppress The Growth of Bile Duct Carcinoma. *Tumour Biol.* **2017** Apr, *39*(4), 1010428317695949
6. Schirmer, D. *et al.* Transgenic Antigen-Specific, HLA-A*02, 01-Allo-Restricted Cytotoxic T Cells Recognize Tumor-Associated Target Antigen STEAP1 with High Specificity. *Oncoimmunology* **2016** Apr 25, *5*(6), e1175795
7. Hegde, M. *et al.* Tandem CAR T Cells Targeting HER2 and IL13Ra2 Mitigate Tumor Antigen Escape. *J. Clin. invest.* **2016** Aug 1, *126*(8), 3036–52
8. Magee, M. S. *et al.* GUCY2C-Directed CAR-T Cells Oppose Colorectal Cancer Metastases Without Autoimmunity. *Oncoimmunology* **2016** Sep 2, *5*(10), e1227897
9. Hillerdal, V. *et al.* Avidity Characterization of Genetically Engineered T-Cells With Novel and Established Approaches. *BMC Immunol.* **2016** Jul 13, *17*(1), 23
10. Everson, R. G. *et al.* Efficacy of Systemic Adoptive Transfer Immunotherapy Targeting NY-ESO-1 for Glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **2016** Mar, *18*(3), 368–78.
11. Davenport, A. J. *et al.* CAR-T Cells inflict Sequential Killing of Multiple Tumor Target Cells. *Cancer Immunol. Res.* **2015** May, *3*(5), 483–94
12. June, C. H. Serial Killers and Mass Murderers, Engineered T Cells Are Up to the Task. *Cancer Immunol. Res.* **2015** May, *3*(5), 470–2
13. Nguyen S.T. *et al.* Targeting Specificity of Dendritic Cells On Breast Cancer Stem Cells, In Vitro and In Vivo Evaluations. *Onco Targets Ther.* **2015** Jan 30, *8*, 323–34
14. Peper, J. K. *et al.* An Impedance-Based Cytotoxicity Assay For Real-Time and Label-Free Assessment of T-Cell-Mediated Killing of Adherent Cells. *J. Immunol. Methods* **2014** Mar, *405*, 192–8
15. Lengagne, R. *et al.* T Cells Contribute to Tumor Progression by Favoring Pro-Tumoral Properties of intra-Tumoral Myeloid Cells in A Mouse Model For Spontaneous Melanoma. *PLoS One* **2011**, *6*(5), e20235
16. Erskine, C. L. *et al.* Determining Optimal Cytotoxic Activity of Human Her2neu Specific CD8 T Cells by Comparing the Cr51 Release Assay to the xCELLigence System. *J. Vis. Exp.* **2012** Aug 8, (66), e3683
17. Henle, A. M. *et al.* Enzymatic Discovery of a HER-2/neu Epitope that Generates Cross-Reactive T Cells. *J. Immunol.* **2013** Jan 1, *190*(1), 479–88
18. Soto-Pantoja, D. R. *et al.* CD47 in the Tumor Microenvironment Limits Cooperation Between Antitumor T-Cell Immunity and Radiotherapy. *Cancer Res.* **2014** Dec 1, *74*(23), 6771–83
19. Chou, J. *et al.* Pigenetic Modulation to Enable Antigen-Specific T-Cell Therapy of Colorectal Cancer. *J. Immunother.* **2012** Feb-Mar, *35*(2), 131–41

基因工程 T 细胞介导的细胞杀伤 — 被检测的贴壁靶细胞

A375、SW480、MC57、MC57-HER2、U-251MG 和 13-06-MG

信息来源

网络研讨会录像：新一代 CAR-T 细胞：基因编辑新技术以及实时活细胞分析技术的快速评估，Mark C Johnson (Precision Biosciences) 和 Cynthia Bamdad (Minerva Biotechnologies)

巨噬细胞介导的吞噬作用

巨噬细胞是先天免疫中极为重要的效应细胞。根据组织微环境的不同，肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 可以分化为细胞毒性 (M1) 或促肿瘤 (M2) 两种不同的状态。

通常 IFN- γ 可单独或与微生物产物协同诱导产生细胞毒性 M1 巨噬细胞，而 IL-4、IL-13、IL-10、IL-21、TGF β 、免疫复合物或糖皮质激素则诱导产生 M2 促肿瘤巨噬细胞。

使用 xCELLigence 研究巨噬细胞介导的吞噬作用

近期研究表明，分泌性糖蛋白血小板反应蛋白-1 (TSP1) 是先天性抗肿瘤免疫的正向调节剂，可以增加 M1 巨噬细胞的募集并刺激活性氧 (ROS) 介导的肿瘤细胞杀伤作用 (图 13)。这些结论的得出在一定程度上利用了 xCELLigence RTCA，通过其进行阻抗监测可以评估 TSP1 对与 MDA-MB-231 乳腺癌靶细胞共培养的巨噬细胞/单核细胞活性的影响。细胞杀伤百分比数据清晰表明，在存在 TSP1 的情况下，分化的 U937 人单核细胞 (A) 和活化的 ANA-1 小鼠巨噬细胞 (B) 对肿瘤的杀伤活性均得到增强。

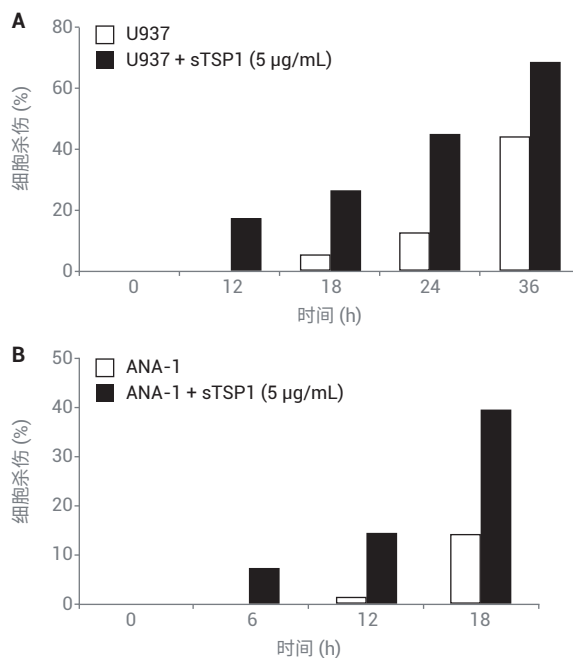


图 13. 分泌性糖蛋白 TSP1 可增强巨噬细胞/单核细胞介导的肿瘤杀伤活性。将 MDA-MB-231 乳腺癌靶细胞接种至 Agilent E-Plate 中，孵育 24 小时。然后，在存在或不存在可溶性 TSP1 的情况下加入分化的 U937 人单核细胞 (A) 和活化的 ANA-1 小鼠巨噬细胞 (B)。此图片摘自: *Cancer Res.* **2008**, 68(17), 7090–9^[4]。请注意，该出版物中描述的 RT-CES 是安捷伦的第一代 RTCA 系统，现已更名为 Agilent xCELLigence RTCA

经美国癌症研究协会授权转载: Martin-Manso G, *et al.* Thrombospondin 1 Promotes Tumor Macrophage Recruitment and Enhances Tumor Cell Cytotoxicity of Differentiated U937 cells. *Cancer Res.* **2008** Sep 1, 68(17), 7090–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0643

参考文献

1. Hoefert, S. *et al.* Altered Macrophagic THP-1 Cell Phagocytosis and Migration in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). *Clin. Oral Investig.* **2016** Jun, 20(5), 1043–54
2. Shi Y, *et al.* Trastuzumab Triggers Phagocytic Killing of High HER2 Cancer Cells In Vitro and In Vivo b Interaction with Fcy Receptors on Macrophages. *J. Immunol.* **2015** May 1, 194(9), 4379–86
3. Cook KL, *et al.* Hydroxychloroquine Inhibits Autophagy to Potentiate Antiestrogen Responsiveness in ER+ Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014** Jun 15, 20(12), 3222–32
4. Martin-Manso G, *et al.* Thrombospondin 1 Promotes Tumor Macrophage Recruitment and Enhances Tumor Cell Cytotoxicity of Differentiated U937 cells. *Cancer Res.* **2008** Sep 1, 68(17), 7090–9

巨噬细胞介导的吞噬作用 — 被检测的贴壁靶细胞

MDA-MB-231、MDA-MB-435 和 MCF-7

NK 细胞介导的细胞杀伤

NK 细胞是一种细胞毒性淋巴细胞，主要通过识别和破坏受病毒感染的细胞，在先天免疫系统中起着关键作用。NK 细胞能够表达多种激活性受体和抑制性受体，二者通过协同作用可区分正常细胞与感染或病变细胞。一旦它们与靶细胞结合，NK 细胞被激活并分泌膜通透蛋白（穿孔素）和蛋白酶（颗粒酶），通过凋亡或渗透裂解作用共同导致靶细胞死亡。NK 细胞还会参与一种特殊的细胞杀伤作用，被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在 ADCC 中，NK 细胞的 CD16 低亲和性 IgG 受体使其能够识别需要破坏的抗体包被的受感染细胞。NK 细胞用于识别和破坏感染细胞的机制对于杀伤癌细胞同样至关重要。与必须先通过抗原呈递细胞激活才能识别肿瘤的 T 细胞不同，NK 细胞可以在体内和体外自发杀伤某些类型的肿瘤细胞，无需进行免疫或预活化处理。与病毒感染的细胞相似，肿瘤细胞也可能下调其 MHC-1 表达。NK 细胞可识别这种表达水平的变化，并通过穿孔素/颗粒酶介导的裂解作用摧毁此类癌细胞。由于 NK 细胞的这种能力，人们正在研究其在免疫疗法中的用途。

使用 xCELLigence 研究 NK 细胞介导的细胞杀伤

图 14 展示了在具有生理相关性的低效靶比下，使用 xCELLigence RTCA 在体外测定 NK 细胞对肿瘤靶细胞的杀伤作用。结果表明，WEE1 激酶的小分子抑制剂 AZD1775 能够提高肿瘤细胞对 NK 细胞杀伤作用的敏感性。

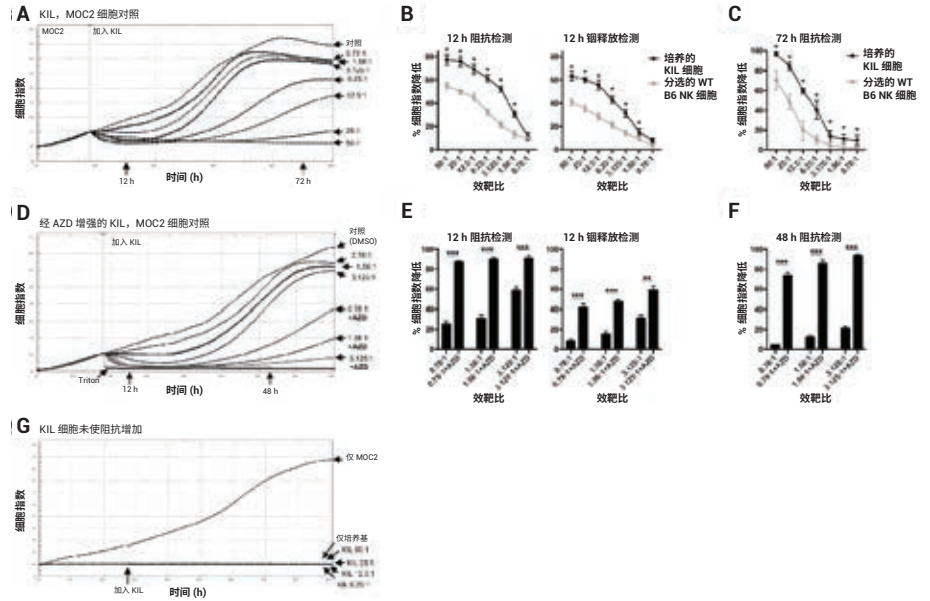


图 14. 在低效靶比下，KIL 对靶细胞的杀伤作用在 WEE1 激酶抑制后得到增强。(A) 以递增的效靶比加入 KIL 后，使用实时阻抗分析测定 MOC2 口腔癌细胞 CI 的下降。18 小时处的垂直线表示加入 KIL 的时间。对照细胞仅暴露于 KIL 培养基。(B) 左图为加入 KIL (黑线) 或分选的 WT B6 NK 细胞 (灰线) 12 小时后 CI 下降的百分比。作为比较，右图为标准的 12 小时放射性化合物释放试验，使用 KIL (黑线) 或分选的 WT B6 NK 细胞 (灰线) 导致铯释放。(C) 加入 KIL (黑线) 或分选的 WT B6 NK 细胞 (灰线) 72 小时后 CI 下降的百分比。B 和 C 中的 * 表示与分选的 WT B6 NK 细胞相比，KIL 细胞的杀伤作用得到明显增强。(D) 存在 AZD1775 (250 nmol/L) 或 DMSO (等效体积) 的情况下，以低效靶比加入 KIL 后 MOC2 的 CI 下降值。当存在 AZD1775 时，在实验开始时将 MOC2 细胞接种到药物中。在某些孔中加入 Triton 后，可以最大程度降低 CI 值。右边显示了在 MOC2 中加入 KIL 48 小时后 CI 下降的百分比。(E) 左图为存在 (AZD1775 250 nmol/L) 或不存在 (等效体积 DMSO) WEE1 激酶抑制的情况下，以所示效靶比加入 KIL 12 小时后 MOC2 细胞的 CI 下降百分比。作为比较，右图为标准的 12 小时后放射性化合物释放试验在同样条件下获得的结果。(F) 加入 KIL 48 小时后 MOC2 细胞 CI 下降的百分比。(G) 只含 MOC2 细胞 (5×10^3 细胞/孔)、只含培养基和只含 KIL 细胞 (最高效靶比相当于 50:1, 2.5×10^5 KIL/孔) 时的阻抗分析对比。所示结果代表 3 次具有相似结果的独立实验 (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$)。此图经授权转载自: Friedman, J. et al. Inhibition of WEE1 Kinase and Cell Cycle Checkpoint Activation Sensitizes Head and Neck Cancers to Natural Killer Cell Therapies. *J. Immunother. Cancer.* **2018**, 6, 59

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件，地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

在图 15 中，使用 xCELLigence RTCA 实时定量测定 NK 细胞的细胞杀伤活性。将贴壁乳腺癌 MCF7 细胞在 E-Plate 孔底进行培养后，以不同的效靶比 (E:T) 加入 NK-92 细胞。数据清晰表明 NK-92 细胞介导的 MCF7 细胞杀伤呈剂量和时间依赖性。xCELLigence 系统的实时阻抗监测具有足够高的灵敏度，即使在低效靶比下也能检测到靶细胞杀伤作用。使用下方的简单公式可轻松计算细胞杀伤百分比，以便于绘图：

$$\text{细胞杀伤百分比} = \frac{(\text{细胞指数}_{\text{无效应细胞}} - \text{细胞指数}_{\text{效应细胞}})}{\text{细胞指数}_{\text{无效应细胞}}} \times 100$$

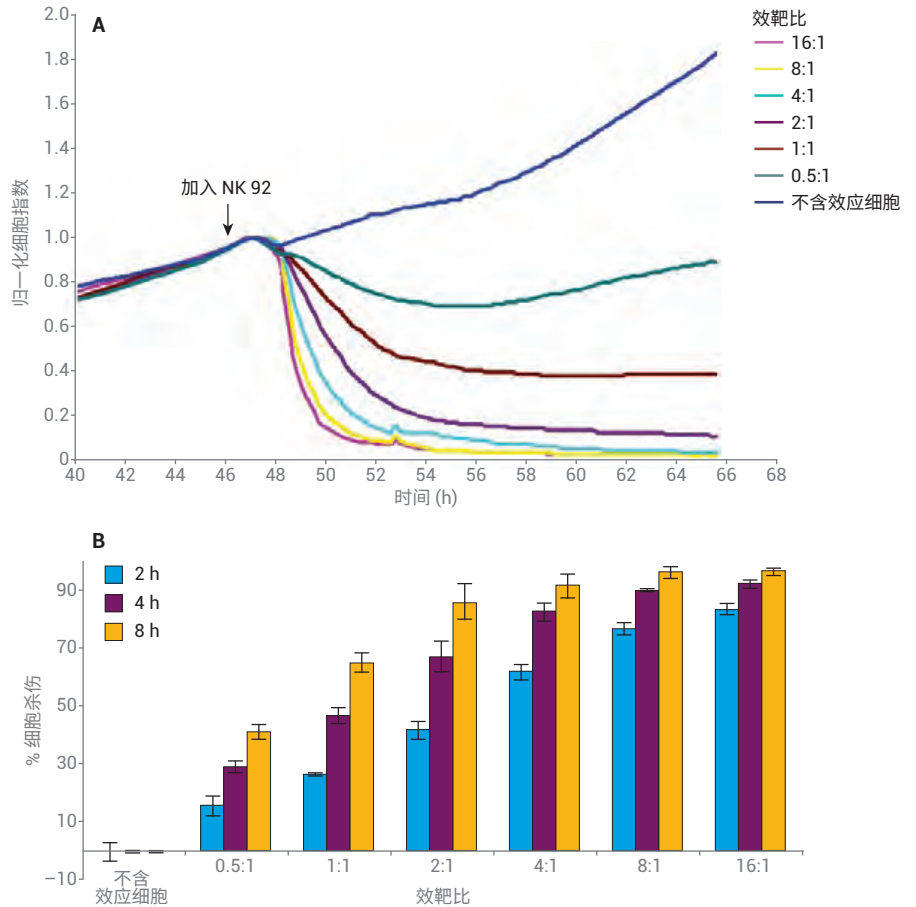


图 15. 实时监测 NK-92 细胞介导的 MCF7 乳腺癌细胞杀伤。在 Agilent E-Plate 的多个孔中培养贴壁 MCF7 靶细胞。将不同数量的 NK-92 细胞添加到每个孔中，并在之后约 20 小时内连续监测阻抗 (A)。按照上述公式计算不同效靶比 (B) 下 NK-92 细胞的时间依赖性细胞杀伤活性。图片摘自安捷伦应用简报《无标记检测 NK 细胞介导的细胞杀伤》

参考文献

1. Allen, C. T. *et al.* Inhibition of WEE1 Kinase and Cell Cycle Checkpoint Activation Sensitizes Head and Neck Cancers to Natural Killer Cell Therapies. *J. Immunother. Cancer* **2018** Jun 21, *6*(1), 59
2. Cerignoli *et al.* In Vitro Immunotherapy Potency Assays Using Real-Time Cell Analysis. *PLoS ONE* **2018** *13*(3), e0193498
3. Watzl *et al.* Impedance-Based Analysis of Natural Killer Cell Stimulation. *Scientific Reports* **2018** Mar 21, *8*(1), 4938
4. Gazdic, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 6294717
5. Klapdor, R. *et al.* Improved Killing of Ovarian Cancer Stem Cells by Combining a Novel Chimeric Antigen Receptor-Based Immunotherapy and Chemotherapy. *Hum. Gene Ther.* **2017** Oct, *28*(10), 886–896
6. Pantic, J. M. *et al.* The Frog Skin Host-Defense Peptide Frenatin 2.1S Enhances Recruitment, Activation and Tumoricidal Capacity of NK Cells. *Peptides* **2017** Jul, *93*, 44–50
7. Gazdic, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Protect from Acute Liver Injury by Attenuating Hepatotoxicity of Liver Natural Killer T Cells in an Inducible Nitric Oxide Synthase- and Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Manner. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2017** May 9
8. Schiller, C. B. *et al.* CD19-Specific Triplebody SPM-1 Engages NK and $\gamma\delta$ T Cells for Rapid and Efficient Lysis of Malignant B-Lymphoid Cells. *Oncotarget* **2016** Dec 13, *7*(50), 83392–83408
9. Rocca, Y. S. *et al.* Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. *Front. Immunol.* **2016** Oct 10, *7*, 413
10. Delconte, R. B. *et al.* CIS Is a Potent Checkpoint in NK Cell-Mediated Tumor Immunity. *Nat. Immunol.* **2016** Jul, *17*(7), 816–24
11. Schlegel, P. *et al.* Favorable NK Cell Activity After Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation In Stage IV Relapsed Ewing's Sarcoma Patients. **2015** Jun, *50* Suppl 2, S72–6
12. Ullrich, N. *et al.* CEACAM1-3S Drives Melanoma Cells into NK Cell-Mediated Cytolysis and Enhances Patient Survival. *Cancer Res.* **2015** May 1, *75*(9), 1897–907
13. Messaoudene, M. *et al.* Mature Cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) Natural Killer Cells Can Infiltrate Lymph Nodes Adjacent to Metastatic Melanoma. *Cancer Res.* **2014** Jan 1, *74*(1), 81–92
14. Fregni, G. *et al.* Phenotypic and Functional Characteristics of Blood Natural Killer Cells from Melanoma Patients at Different Clinical Stages. *PLoS ONE* **2013** Oct 18, *8*(10)
15. Park, K. H. *et al.* Evaluation of NK Cell Function by Flowcytometric Measurement and Impedance Based Assay Using Real-Time Cell Electronic Sensing System. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 210726
16. Perier, A. *et al.* Mutations of the von Hippel-Lindau Gene Confer Increased Susceptibility to Natural Killer Cells of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Oncogene* **2011** Jun 9, *30*(23), 2622–32
17. Fregni, G. *et al.* Unique Functional Status of Natural Killer Cells In Metastatic Stage IV Melanoma Patients and Its Modulation By Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2011** May 1, *17*(9), 2628–37

18. Moodley, K. *et al.* Real-Time Profiling of NK Cell Killing of Human Astrocytes Using xCELLigence Technology. *J. Neurosci. Methods* **2011** Sep 15, *200*(2), 173–80
19. Zhu, J. *et al.* Dynamic and Label-Free Monitoring of Natural Killer Cell Cytotoxic Activity Using Electronic Cell Sensor Arrays. *J. Immunol. Methods* **2006** Feb 20, *309*(1-2), 25–33
20. Glamann, J. *et al.* Dynamic Detection of Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity and Cell Adhesion by Electrical Impedance Measurements. *Assay Drug Dev. Technol.* **2006** Oct, *4*(5), 555–63

NK 细胞介导的细胞杀伤 — 检测的贴壁细胞系

HT1080、H460、HepG2、MCF-7、A549、HeLa、MDA-MB-231、NIH3T3、MelC、MelS、星形胶质细胞 (NT2A)、RCC6、RCC4 和间充质基质细胞 (MSCs)

信息来源

- **Agilent xCELLigence 应用简报：** 无标记检测 NK 细胞介导的细胞杀伤
- **Agilent xCELLigence 应用简报：** 自然杀伤细胞活性和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性实时无标记检测

溶瘤病毒

溶瘤病毒疗法是一种有前景的癌症治疗方法，其使用具有复制能力的病毒选择性感染癌细胞，从而引起细胞毒性并产生抗肿瘤免疫。近年来，这一疗法通过野生型 (WT) 和基因工程病毒取得了重大进展。

xCELLigence RTCA 仪器可在无标记/修饰的情况下高灵敏度地分析癌细胞杀伤作用，能够在比其他体外技术更接近人体生理学的条件下研究病毒与靶细胞之间的相互作用。通过连续监测靶细胞杀伤，这款仪器还省去了费时费力的终点测定，可以同时多种不同的条件下轻松获得细胞杀伤数据。

图 16 展示了使用 xCELLigence RTCA 监测嵌合型腺病毒 (Enadenotucirev, EnAd) 对 A549 肺癌细胞的杀伤作用。此病毒通过结合在多种癌细胞上广泛表达的 CD46 或桥粒芯蛋白来感染细胞。在效价分析中,在一定浓度范围内对 EnAd 与野生型腺病毒 Ad11p 和 Ad5 的细胞毒性 (杀伤动力学) 进行了比较。在最高浓度 (红色, 500 个病毒颗粒/细胞 (PPC)) 下, EnAd 和 Ad11p 均在感染后 36 至 48 小时内完全杀灭细胞 (细胞指数降至零)。但是,在较低病毒浓度下 (0.8–20 PPC), EnAd 的效价高于 Ad11p, 表现为更早出现细胞毒性和更快完成细胞杀伤过程。与 EnAd 和 Ad11p 相比,野生型 Ad5 对癌细胞的杀伤效率要低得多,即使在最高病毒浓度下也需要 5 天才能完全杀死癌细胞。

这些数据突显了 xCELLigence RTCA 技术能够定量捕获不同溶瘤病毒之间的效价差异。

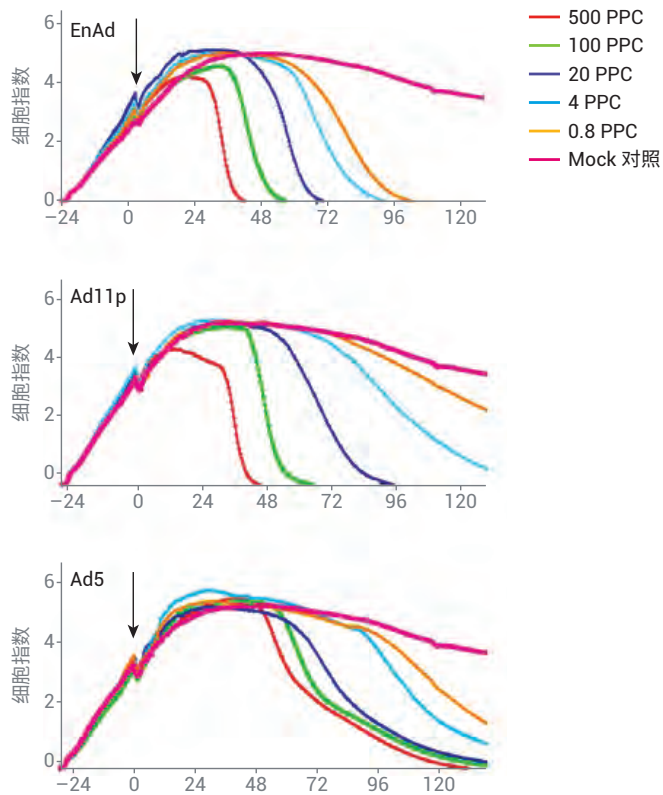


图 16. 不同腺病毒对 A549 肺癌细胞的杀伤作用。黑色箭头表示加入病毒的时间。病毒浓度以 PPC 表示。图片摘自: *Mol. Ther. Oncolytics* 2016 Dec 10, 4, 18–30^[2]

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本, 请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件, 地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA

参考文献

1. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **2017** Apr 15, 77(8), 2052–2063
2. Dyer, A. *et al.* Oncolytic Group B Adenovirus Enadenotucirev Mediates Non-Apoptotic Cell Death with Membrane Disruption and Release of Inflammatory Mediators. *Mol. Ther. Oncolytics* **2016** Dec 10, 4, 18–30
3. Ellerhoff, T. P. *et al.* Novel Epi-Virotherapeutic Treatment of Pancreatic Cancer Combining the Oral Histone Deacetylase Inhibitor Resminostat With Oncolytic Measles Vaccine Virus. *Int. J. Oncol.* **2016** Nov, 49(5), 1931–1944
4. Schneider, C. C. *et al.* Metabolic Alteration – Overcoming Therapy Resistance in Gastric Cancer Via PGK-1 Inhibition in a Combined Therapy With Standard Chemotherapeutics. *Int. J. Surg.* **2015** Oct, 22, 92–8
5. Ruf, B. *et al.* Combination of the Oral Histone Deacetylase Inhibitor Resminostat with Oncolytic Measles Vaccine Virus as a New Option for Epi-virotherapeutic Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Ther. Oncolytics* **2015** Oct 7, 2, 15019
6. Lacroix, J. *et al.* Oncolytic Effects of Parvovirus H-1 in Medulloblastoma Are Associated with Repression of Master Regulators of Early Neurogenesis. *Int. J. Cancer* **2014** Feb 1, 134(3), 703–16
7. El-Andaloussi, N. *et al.* Generation of an Adenovirus-Parvovirus Chimera with Enhanced Oncolytic Potential. *J. Virol.* **2012** Oct, 86(19), 10418–31
8. Fecker, L. F. *et al.* Efficient and Selective Tumor Cell Lysis and Induction of Apoptosis in Melanoma Cells by a Conditional Replication-Competent CD95L Adenovirus. *Exp. Dermatol.* **2010** Aug, 19(8), e56–66

T 细胞介导的细胞杀伤

通过直接寻找并破坏感染的细胞，CD8+ T 淋巴细胞在适应性免疫应答中发挥着至关重要的作用。每个 CD8+ T 细胞克隆均表达一种特殊受体（即 T 细胞受体，TCR）的独特变体，可以识别并结合靶细胞表面上由 MHC I 类 (MHC-I) 分子呈递的特异性抗原肽。利用 MCH-1 复合物识别受感染细胞或癌细胞可使 CD8+ 细胞分泌穿孔素和颗粒酶，从而导致靶细胞裂解。

肿瘤细胞的基因组通常会发生大量的突变，包括关键调节蛋白和信号转导蛋白的基因。当 MHC 分子在抗原呈递细胞的表面被切割、加工和呈递，这些突变蛋白会引起细胞免疫反应。这解释了为什么在肿瘤内部会存在 T 淋巴细胞。一些癌症疫苗通过引发适应性免疫反应的细胞“武器”，以靶向表达突变蛋白或蛋白表达水平异常的癌细胞，从而发挥 T 细胞的这种肿瘤靶向能力。

尽管在某些情况下，使用 ELISpot 或流式细胞仪等检测方法定量样品中抗原特异性 CD8+ T 细胞的数量是有用的，但通常迫切需要通过杀伤测定法评估这些细胞的功能性细胞毒性。长期以来，通过铬-51 (^{51}Cr) 释放试验测定细胞杀伤活性一直是评估 CD8+ T 细胞反应的金标准。图 17 展示了使用 ^{51}Cr 预标记表达 HER2/Neu 蛋白的 SKBR-3 乳腺癌细胞。然后将这些细胞与不同量的 CD8+ T 细胞克隆共孵育。这使 TCR 与 HER2/Neu 抗原肽特异性结合，通过检测释放到培养基中的 ^{51}Cr 含量来检测对靶细胞的杀伤作用。使用 xCELLigence RTCA 系统时，无需预标记靶细胞即可进行此项检测。RTCA 系统能够定量检测 CD8+ T 细胞对 SKBR-3 靶细胞的细胞杀伤活性随时间和加入的 CD8+ T 细胞数量的变化（图 18A）。与 ^{51}Cr 释放试验进行并列比较表明，xCELLigence RTCA 检测的灵敏度和动态范围均高于 ^{51}Cr 释放试验（图 18B）。RTCA 无需使用放射性标记并可提供动态数据（包括细胞杀伤的开始时间及肿瘤细胞的杀伤速率），因此备受青睐。

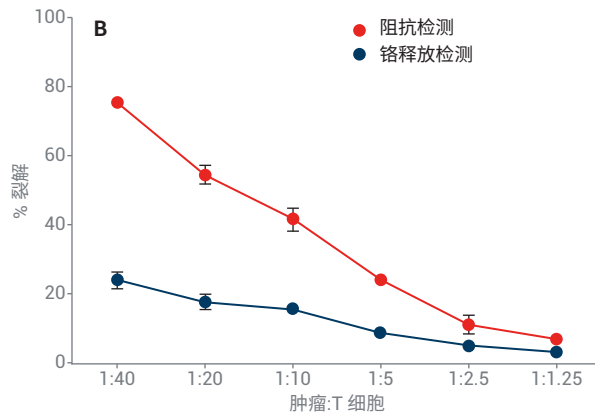
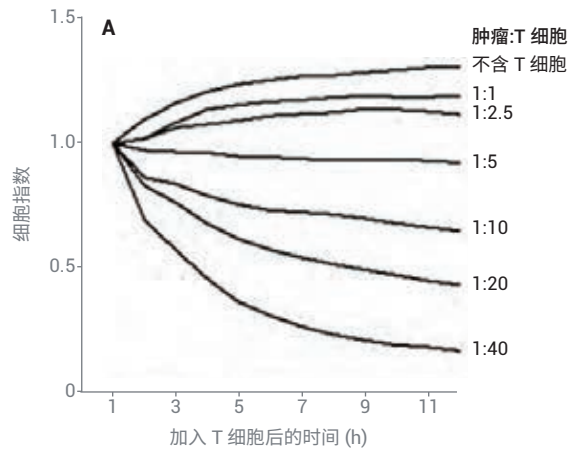


图 17. CD8+ T 细胞介导的 SKBR3 肿瘤细胞杀伤。加入 CD8+ T 细胞导致实时阻抗迹线呈剂量依赖性下降，表明 SKBR3 肿瘤细胞的数量、大小或粘附强度有所降低 (A)。绘图比较通过 Agilent xCELLigence RTCA 与标准 ^{51}Cr 释放试验测得的细胞裂解百分比，表明 RTCA 检测法的灵敏度更高 (B)。图片摘自：*J. Vis. Exp.* 2012 Aug 8, (66), e3683^[10]

参考文献

1. Morisada, M. *et al.* Dose-dependent Enhancement of T-Lymphocyte Priming and CTL Lysis Following Ionizing Radiation in an Engineered Model of Oral Cancer. *Oral Oncol.* **2017** Aug, 71, 87–94
2. Bardwell, P. D. *et al.* Potent and Conditional Redirected T Cell Killing of Tumor Cells Using Half DVD-Ig. *Protein Cell* **2017** Jun 5
3. Ueda, O. *et al.* Entire CD3 ϵ , δ , and γ Humanized Mouse to Evaluate Human CD3-Mediated Therapeutics. *Sci. Rep.* **2017** Apr 3, 7, 45839
4. Hillerdal, V. *et al.* Avidity Characterization of Genetically Engineered T-Cells with Novel and Established Approaches. *BMC Immunol.* **2016** Jul 13, 17(1), 23
5. Schirmer, D. *et al.* Transgenic Antigen-Specific, HLA-A*02, 01-Allo-Restricted Cytotoxic T Cells Recognize Tumor-Associated Target Antigen STEAP1 with High Specificity. *Oncimmunology* **2016** Apr 25, 5(6), e1175795
6. Schmittnaegel, M. *et al.* Committing Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cells to Eliminate Tumor Cells by Bifunctional Major Histocompatibility Class I Antibody Fusion Molecules. *Cancer Immunol. Res.* **2015** Jul, 3(7), 764–76
7. Soto-Pantoja, D. R. *et al.* CD47 in the Tumor Microenvironment Limits Cooperation Between Antitumor T-Cell Immunity And Radiotherapy. *Cancer Res.* **2014** Dec 1, 74(23), 6771–83
8. Pham, P. V. *et al.* A Simple In Vitro Method for Evaluating Dendritic Cell-Based Vaccinations. *Onco Targets Ther.* **2014** Aug 18, 7, 1455–64
9. Peper, J. K. *et al.* An Impedance-Based Cytotoxicity Assay for Real-Time and Label-Free Assessment of T-Cell-Mediated Killing of Adherent Cells. *J. Immunol. Methods* **2014** Mar, 405, 192–8
10. Erskine, C. L. *et al.* Determining Optimal Cytotoxic Activity of Human Her2neu Specific CD8 T Cells by Comparing the Cr51 Release Assay to the xCELLigence System. *J. Vis. Exp.* **2012** Aug 8, (66), e3683

T 细胞介导的细胞杀伤 — 被检测的贴壁靶细胞

TIII 黑色素瘤细胞、SK-BR3、HCC1419、MCF-7、BT20、15-12RM、OAW42、HLA 阴性 NCI-ADR-RES 细胞、小鼠 4T1 乳腺肿瘤细胞、BCSC (乳腺癌干细胞)、MSC (间充质干细胞)、BT20 和 HCC1419

信息来源

- **JOVE 视频操作方案:** Determining Optimal Cytotoxic Activity of Human Her2neu Specific CD8 T Cells by Comparing the Cr51 Release Assay to the xCELLigence System
- **网络研讨会录像:** 使用基于阻抗的方法测定抗原特异性细胞毒性 T 细胞的活性, Keith L. Knutson 博士 (佛罗里达疫苗与基因治疗研究所)

血液瘤杀伤检测

在过去的十年中，发表的许多同行评审研究，确立了 xCELLigence RTCA 是研究实体瘤/粘附性癌症免疫疗法的主要方法。但是，约有 10% 的癌症为血液瘤，不具有粘附性，无法通过标准阻抗检测进行直接监测。此外，由于血液瘤容易从血液中获得，不受与实体肿瘤相关的微环境复杂性/异质性的影响，因此是重要的免疫治疗靶标。为了协助推进该领域的研究，安捷伦开发了 xCELLigence RTCA 免疫疗法试剂盒，可以对血液瘤靶标进行基于阻抗的杀伤检测。共提供五种试剂盒，可将 B 细胞系或 K562 髓性白血病细胞系作为靶标。在这些检测中，需使用 anti-CD40 或 anti-CD19（用于 B 细胞）、anti-CD29 或 anti-CD71 抗体（用于 K562 细胞）以及 anti-CD9 抗体（用于 NALM6、RPMI8226 细胞）预包被 E-Plate 的孔。这样可以将这些细胞固定在孔板底部，然后再使用效应细胞、抗体和小分子等进行处理。

图 19 展示了使用 xCELLigence RTCA 免疫疗法试剂盒进行 B 细胞杀伤 (anti-CD40) 检测。抗体固定的 B 细胞会产生稳定的阻抗信号并增殖至汇合点（使阻抗信号达到平台期），而未粘附的 B 细胞的生长基本上无法检测到阻抗信号（图 18A 和图 18B）。无论孔中是否包被有 anti-CD40，使用的 NK-92 等效应细胞自身产生的信号都极小（图 18B）。向固定的 B 细胞中加入 NK-92 细胞，导致靶细胞出现剂量依赖性死亡（图 18C）。即使在低效靶比下也能轻松检测杀伤作用。该检测的灵敏度远高于传统的释放试验，在释放试验中需要使用无生理相关性的高效靶比。对于多种效应细胞类型（NK、T 和 CART）及联合疗法（CART + 检查点抑制剂），所测试的三种 B 细胞淋巴瘤细胞系（Daudi、Raji 和 Ramos）中均观察到了粘附和杀伤行为，如图 18B 和图 18C 所示。从同一供体分离的效应细胞对人源性 B 细胞的杀伤实验正在进行之中。

一个重要的问题是，通过抗体粘附对 B 细胞进行物理固定是否会影响对其的杀伤效率。为研究这一问题，对 NK-92 细胞介导的固定 Raji B 细胞（通过 xCELLigence RTCA 分析）或悬浮 Raji B 细胞（通过流式细胞术分析）杀伤进行了 4 小时平行检测。如图 18D 所示，通过两种方法观察到的杀伤趋势表现出高度相关性，细胞杀伤百分比的数值差异很小。这与大量论文的结果一致，表明 xCELLigence 能够获得与传统检测方法一致的数据。

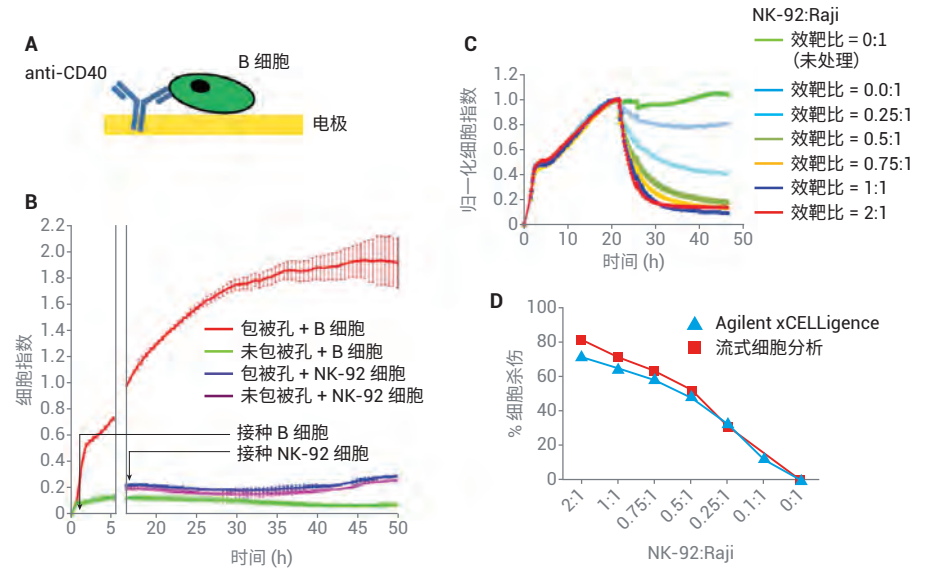


图 18. 用于监测 B 细胞杀伤的 Agilent xCELLigence 免疫疗法试剂盒。(A) 用 B 细胞特异性抗体 (anti-CD40) 预包被 Agilent E-Plates 的孔，可以使 B 细胞在传感器上增殖并被检测。(B) 对照显示 Daudi B 细胞在包被有 anti-CD40 抗体的电极上发生选择性增殖。与预期一致，无论孔中是否包被有 anti-CD40，未贴壁的 NK-92 效应细胞产生的信号都极小。误差线表示标准偏差。(C) 对 Raji B 细胞的杀伤效率取决于每个孔添加的 NK-92 细胞的数量。(D) B 细胞固定对杀伤效率的影响。用不同数量的 NK-92 细胞处理通过抗体固定的或悬浮的 Raji B 细胞。处理 4 小时后，使用 xCELLigence (对于固定细胞) 或流式细胞仪 (对于悬浮细胞) 测定细胞杀伤百分比

在血液瘤细胞杀伤的第二个示例中（图 19A 和图 19B），展示了 NK-92 细胞对 K562 细胞（使用 anti-CD29 抗体将其固定在 E-Plate 孔底部）的破坏作用。与预期一致，K562 杀伤作用随时间和效应细胞浓度的增加而增加。与 B 细胞杀伤检测相似，即使在低效靶比下也可以检测到 K562 细胞的破坏。

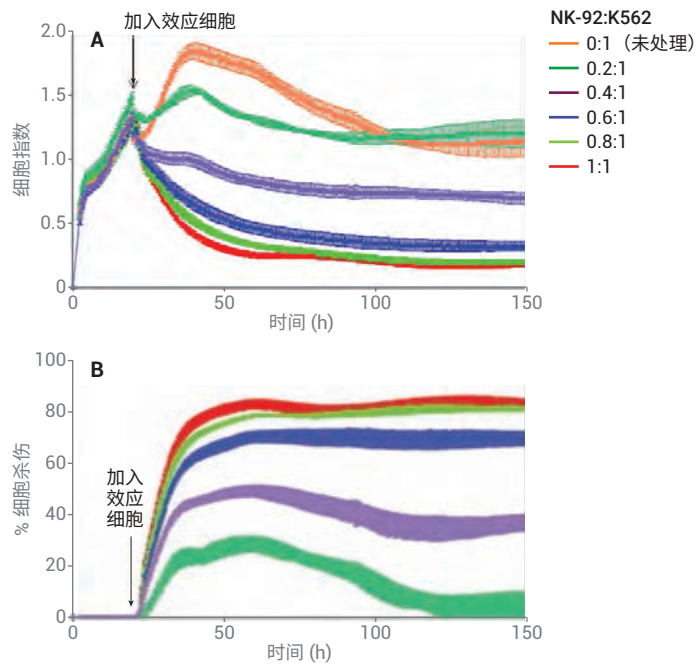


图 19. 用于监测 K562 细胞杀伤的 Agilent xCELLigence 免疫疗法试剂盒。(A) NK-92 细胞对 K562 细胞（用 anti-CD29 抗体固定在 Agilent E-Plate 孔底部）的破坏作用呈时间和剂量依赖性。(B) 将 (A) 中的数据重新绘制为细胞杀伤百分比随时间的变化。误差线表示标准偏差

本文所述的血液瘤杀伤检测已用于工业和科研实验室，以对联合疗法进行评估/优化。此外还用于开发适应性细胞疗法和工程抗体。除用于研发领域外，这些血液瘤杀伤检测还可用于已开发的免疫肿瘤疗法的功能验证/质量控制。

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年11月1日，中国出版
5994-1303ZHCN
DE.5860532407

