嵌合抗原受体 T 细胞体外肿瘤杀伤的流式检测

Analyzing Cytotoxicity Capacity of Chimeric Antigen Receptor T-cell *in vitro* by Flow Cytometry

张晓卿, 杨选明*

生命科学技术学院, 上海交通大学, 闵行, 上海

*通讯作者邮箱:xuanmingyang@sjtu.edu.cn

引用格式: 张晓卿, 杨选明. (2019). 嵌合抗原受体 T 细胞体外肿瘤杀伤的流式检测. *Bio-101* e1010316. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010316.

How to cite: Zhang, X. Q. and Yang, X. M. (2019). Analyzing Cytotoxicity Capacity of Chimeric Antigen Receptor T-cell *in vitro* by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010316. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010316. (in Chinese)

摘要: 嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T), 是通过基因工程手段进行修饰的 T 细胞。胞外区含有不受 MHC 限制的单链可变区 (scFv), 可特异识别抗原 (如 CD20 等); 胞内区含有共刺激结构域 (CD28, 4-1BB 等) 和第一信号激活结构域 (CD3 ζ), 进行信号传递 (Eshhar 等, 1993; Sadelain 等, 2013)。CD20 CAR-T 可特异的识别并杀伤表达 CD20 的人 B 淋巴瘤细胞系 Raji (Kowolik 等, 2006)。在体外, CD20 CAR-T 与靶细胞 Raji 以不同比例共培养 24 小时, 使用不同抗体分别标记 CAR-T 细胞和靶细胞, 通过流式细胞技术确定 CD20 CAR-T 杀伤功能。

关键词: CAR-T, 靶细胞, 流式细胞技术, T 细胞杀伤

材料与试剂

1. 96 孔板 (U 型) (Jet Biofil, catalog number: 011096)
2. Falcon 细胞流式管 (BD, catalog number: 352054)
3. 离心管 (Jet Biofil, catalog number: CFT011550)
4. Raji 细胞 (ATCC® CCL-86™)
5. 抗体:
APC-anti-human CD19 (BioLegend, catalog number: 302212)
FITC-anti-human CD3 (BioLegend, catalog number: 317306)

6. 胎牛血清 (FBS) (Gibco, catalog number: 10270)
7. RPMI 1640 培养基 (Hyclone, catalog number: SH30809.01)
8. Penicillin/streptomycin (Hyclone, catalog number: SV30010)
9. 台盼蓝 (Trypan Blue) (Sigma-Aldrich, catalog number: T8154)
10. β -巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol) (Amresco, catalog number: 0482)
11. NaCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900058-500g)
12. KCl (Sigma-Aldrich, catalog number: V900068-500g)
13. Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, catalog number: V900060-500g)
14. KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, catalog number: V900041-500g)
15. Na_3N (Amresco, catalog number: 0639-250g)
16. IL-2 (北京四环生物制药有限公司, catalog number: 国药准字 S10970018)
17. L-Glutamine (200 mM)
18. 10 $\times$ PBS (1 L, pH = 7.3) (见溶液配方)
19. FACS buffer (1 L) (见溶液配方)
20. T 细胞培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (Beckman Coulter, model: Cytoflex S)
2. 电动吸引器 (斯曼峰, model: YX930D)
3. 移液器 (Eppendorf)
4. 正置光学显微镜 (Olympus, model: IX2-SLP)
5. 离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
6. 医用低温保存箱 (海尔, model: DW-25L262/BD-226W)
7. 振荡混匀机 (kylin-bell)
8. 生物安全柜 (LabGard, model: Class II/Labconco)
9. 天平 (Sartorius, model: BSA124S)
10. 高压灭菌锅 (上海博迅实业有限公司, model: YXQ-LS-100S11)

软件

1. FlowJo

实验步骤

1. 分别收集悬浮细胞 Raji、对照 T 细胞 (未进行基因修饰原代 T 细胞)、CD20 CAR-T 细胞 (能特异识别 CD20 的嵌合抗原受体 T 细胞) 到 50 ml 离心管, 取 10 μ l 细胞, 加入 10 μ l 台盼蓝 (可根据细胞浓度进行适当稀释), 计数;
2. 500 $\times$ g 离心 5 min, 弃去上清, 新鲜 T 细胞培养基重悬细胞, 调整细胞浓度 (Raji 2×10^6 /ml, 对照 T 细胞或 CD20 CAR-T 1×10^6 /ml);
3. 按照不同的比例将 Raji (Target cells) 和对照 T 细胞、CD20 CAR-T (Effector cells) 混合于 96 孔培养板 (平底型), 总体积至 200 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱进行培养:
 E:T = 1:0.5 (1×10^5 /100 μ l CD20 CAR-T + 5×10^4 /25 μ l Raji + 75 μ l T 培养基)
 E:T = 1:1 (1×10^5 /100 μ l CD20 CAR-T + 1×10^5 /50 μ l Raji + 50 μ l T 培养基)
 E:T = 1:2 (1×10^5 /100 μ l CD20 CAR-T + 2×10^5 /100 μ l Raji);
4. 24 小时, 混匀细胞, 取 100 μ l 细胞加入 96 孔板 (U 型), 进行流式检测;
5. 加入 150 μ l FACS buffer, 500 $\times$ g 离心 3 min, 弃去上清;
6. 抗体准备 (以下为单个样品):
 50 μ l FACS buffer + 0.03 μ g FITC-anti-human CD3 + 0.0075 μ g APC-anti-human CD19;
7. 将已配制抗体加入样品中, 50 μ l/样品, 移液枪混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 25 min;
8. 加入 150 μ l FACS buffer 洗去未结合抗体, 500 $\times$ g, 离心 3 min, 弃去上清;
9. 重复步骤 8;
10. 70 μ l FACS buffer 重悬样品, 将样品置于冰上;
11. 预热流式细胞仪, 进行上样检测;
12. FlowJo 软件分析流式检测结果。

结果与分析

1. 人淋巴瘤细胞 Raji 表达 CD19, CD20 等抗原, 为了规避 CD20 CAR-T 与 anti-human CD20 竞争性结合 CD20 位点, 使用 anti-human CD19 抗体进行肿瘤特异性标记。

2. FSC-A 和 SSC-A 排除死细胞和细胞碎片，确定和收集主要细胞群 (Gate 1，收集 10,000 个数据点/样品) (图 1)。
3. 通过 CD3 (FITC-A) 和 CD19 (APC-A) 分别分析 T 细胞和 Raji 细胞。
4. 与未进行基因修饰 T 细胞相比，随着 E:T 比例降低，残留靶细胞 Raji 比例逐渐增加，但是与对照 T 细胞相比，CD20 CAR-T 仍表现出较强的杀伤能力，T cell only 和 Raji only 作为染色的对照。

图 1. CAR-T 细胞体外杀伤流式检测

注意事项

1. 对于不同肿瘤细胞的 CAR-T 杀伤实验，可根据肿瘤自身的抗原表达特点，选取不同的表面分子进行流式分析，以达到区分肿瘤细胞和 T 细胞的目的，对于选择的抗体也应进行用量滴定，保证最佳的细胞分群效果。
2. 若肿瘤细胞表达较高 FcγR 导致抗体非特异结合，应在染色体系中包含 FcγR blocker。
3. 对于某些肿瘤杀伤较慢，可延长杀伤时间至 48 小时或 72 小时。

溶液配方

1. 10× PBS (1 L, pH = 7.3)

NaCl	80 g
KCl	10 g

Na₂HPO₄ 14.4 g

KH₂PO₄ 2.4 g

使用分析天平精准称量上述试剂，加入 800 ml ddH₂O 依次进行溶解，待所有试剂完全溶解后，加入 ddH₂O 定容至 1 L，高温湿热灭菌，冷却后室温保存待用

2. FACS buffer (1 L)

10× PBS 100 ml

FBS 10 ml

Na₃N (20%) 2.5 ml

使用量筒取 100 ml 10× PBS，首先加入 800 ml ddH₂O 进行稀释，再加入 10 ml FBS 和 2.5 ml Na₃N (20%)，混合均匀，加入 ddH₂O 定容至 1 L，4 °C 备用

3. T 细胞培养基

RPMI 1640 500 ml

2-Me (1 mol/L) 27 μl

IL-2 30 IU/ml

L-Glutamine (200 mM) 6 ml

Penicillin/streptomycin 5 ml

FBS 60 ml

致谢

感谢杨选明实验室全体成员的建议和帮助。该研究受国家自然科学基金 (81671643)、科技部重点研发计划 (2016YFC1303400) 资助。

参考文献

1. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. and Schindler, D. G. (1993). [Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 720-724.
2. Kowolik, C. M., Topp, M. S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D. D., Forman, S. J., Jensen, M. C. and Cooper, L. J. (2006). [CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor](#)

- [enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells.](#) *Cancer Res* 66(22): 10995-11004.
3. Sadelain, M., Brentjens, R. and Rivière, I. (2013). [The basic principles of chimeric antigen receptor design.](#) *Cancer Discov* 3(4): 388-398.