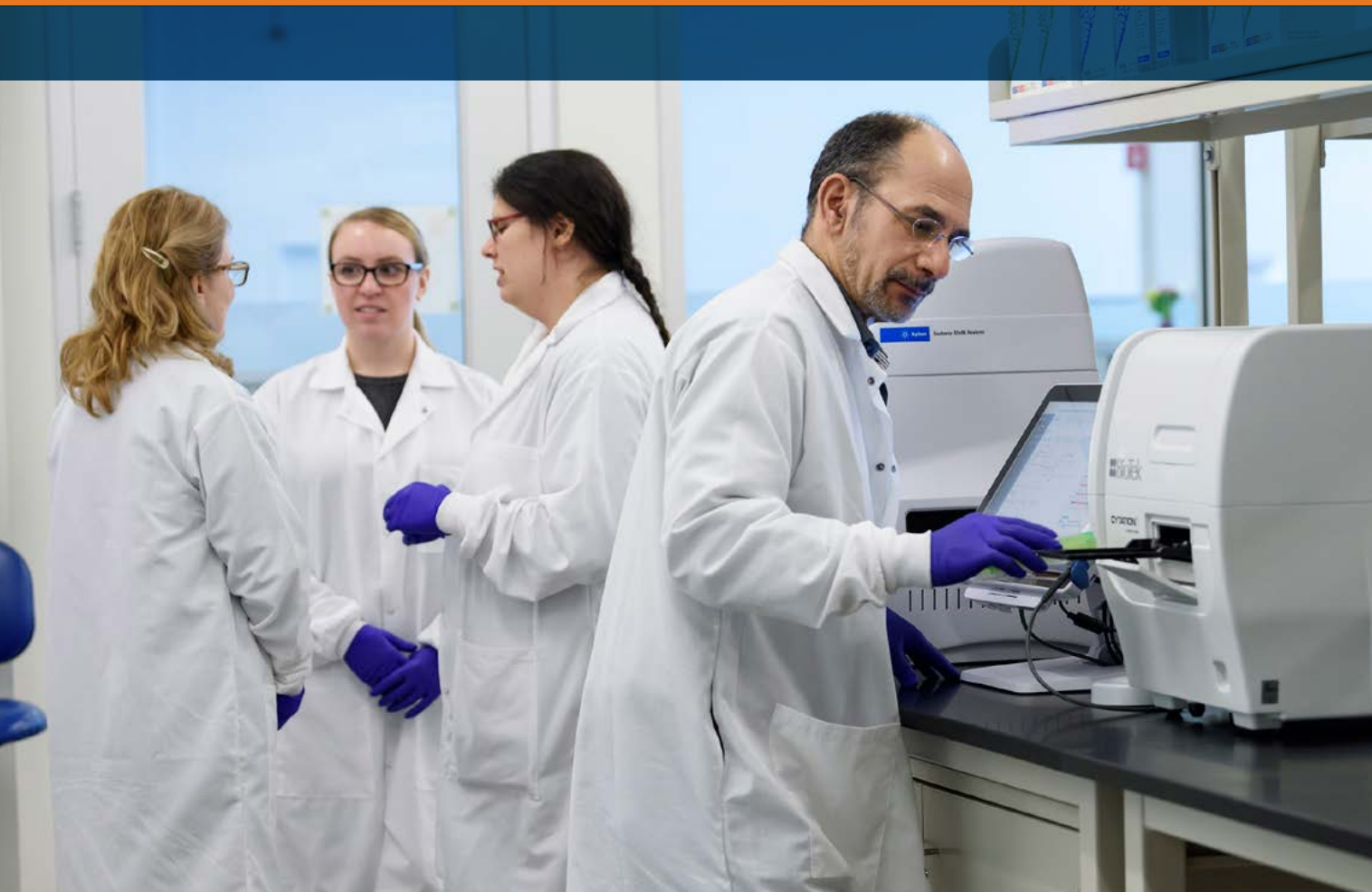


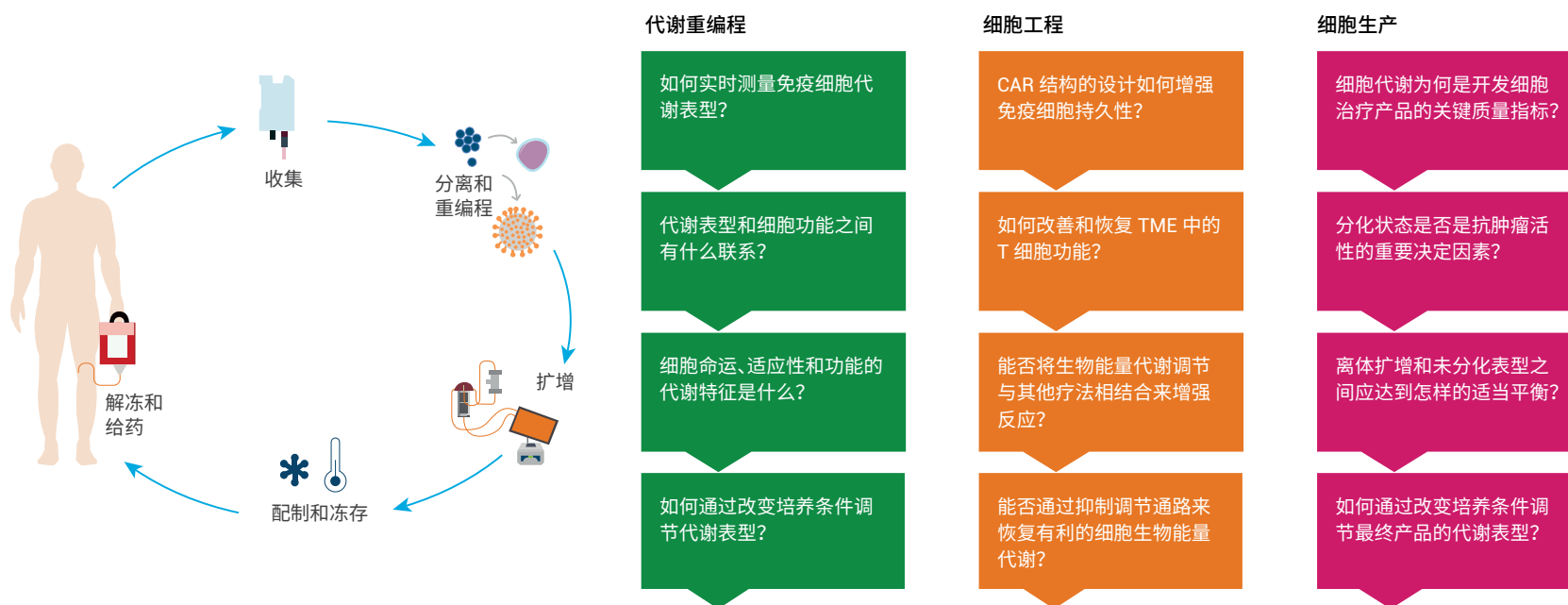
免疫细胞代谢在建立新一代 细胞疗法中的核心作用



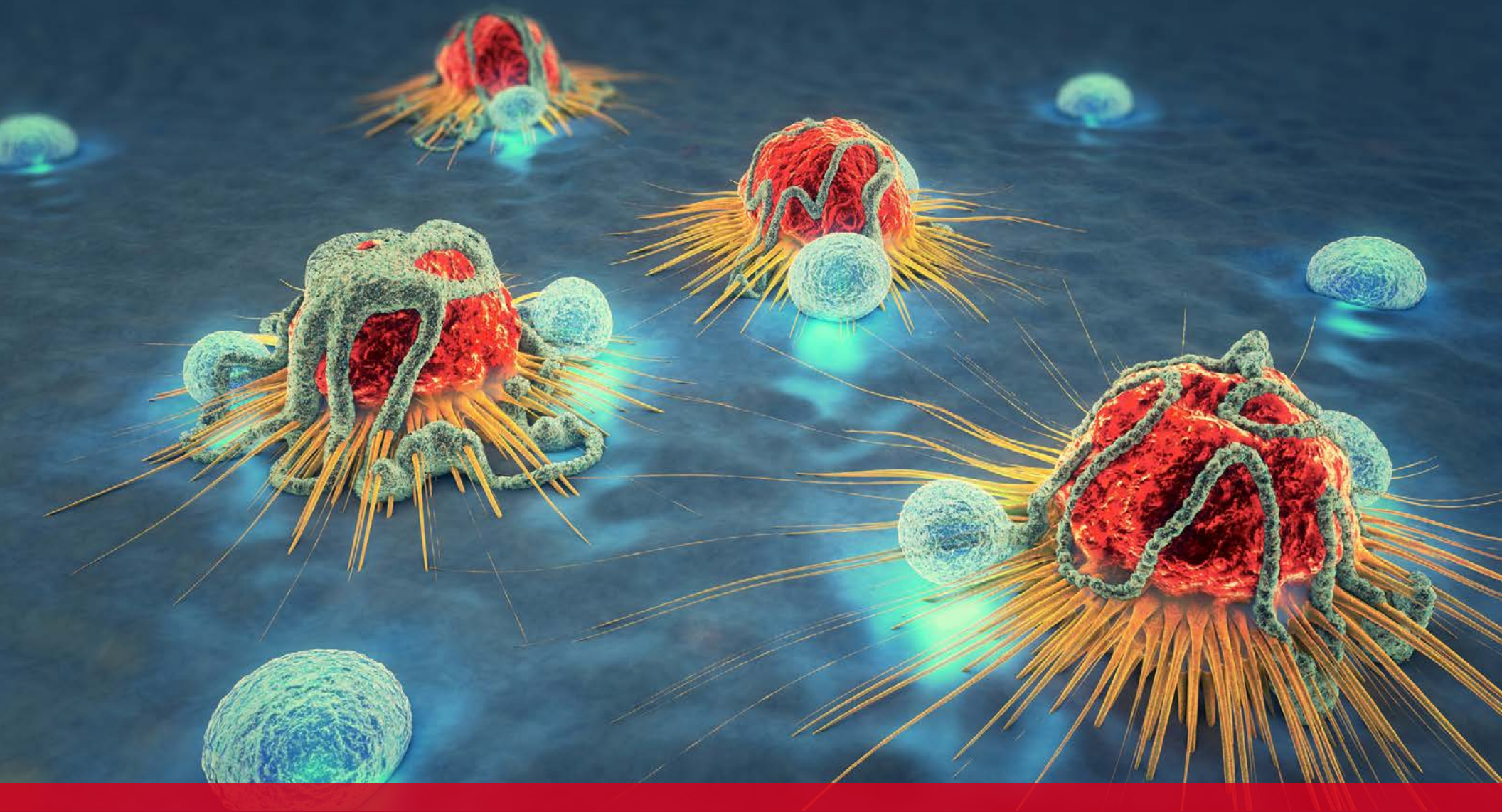
前言

免疫细胞就像哨兵，随时准备对外来抗原和癌细胞等多种触发因素作出迅速响应，精确可控地调节其功能。近期，我们对代谢平衡与免疫细胞功能之间复杂的动态联系有了更丰富的认识。这些理解让我们可以监测并控制代谢重编程方式，使其与微环境信号协同作用，并驱动和调节免疫细胞的功能、命运和适应性。

在本交互式电子书中，我们介绍了如何使用安捷伦 Seahorse XF 分析仪实时测量免疫细胞生物能量代谢。我们还引用了最近发表的文献示例，以说明免疫治疗领域的前沿研究者和机构如何应用这些工具来应对细胞工程、细胞构造子检测以及生产过程中治疗细胞效价监测方面的挑战。



索引



代谢重编程



免疫细胞适应性、命运和活化的生物能量代谢

动态的免疫细胞功能或命运与不同的代谢重编程策略之间有着复杂的联系。在初始状态下，T 细胞主要利用线粒体呼吸 (OXPHOS) 满足 ATP 需求，其 ATP 需求通常低于效应表型细胞。而效应细胞需要增加总 ATP 产生量才能满足快速增殖的要求。在这些细胞中，糖酵解贡献了总 ATP 生产中相对较大的比例，以满足加速的能量需求。

糖酵解是能量产生的快速响应机制：当能量需求急剧增加，需要快速的代谢反应时，糖酵解可以快速提供所需能量。但是糖酵解速率的提升无法持续。相比之下，线粒体负责常规的能量管理，在出现入侵后使系统恢复秩序 — 它们关注的是恢复、平衡和持久性。如果免疫细胞无法恰当调节其代谢需求，就会导致无能或耗竭状态，而病原体擅长利用这些状态。在本章中，我们将参考可用于安捷伦 Seahorse XF 分析仪的一系列检测试剂盒，了解影响免疫细胞适应性、命运和活化的生物能量代谢。这些试剂盒可用于实时测量免疫细胞代谢表型。

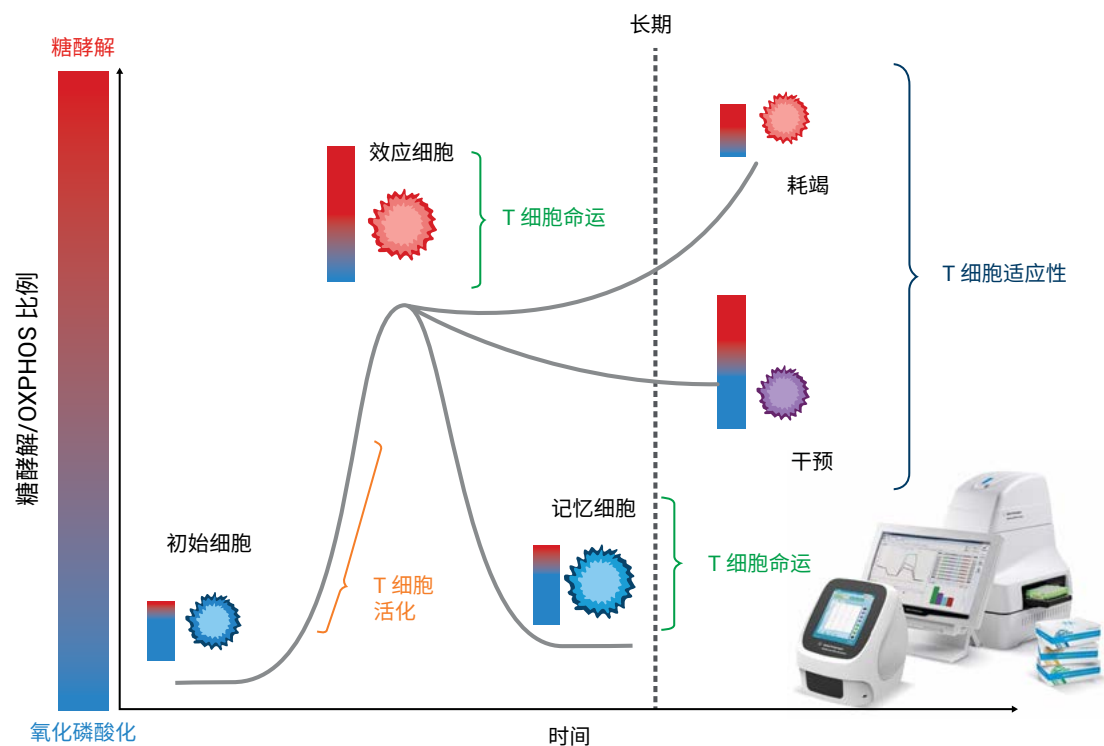


图 1：免疫细胞代谢表型的测量，展示了糖酵解/OXPHOS 比例与细胞命运、适应性和功能之间的关系

监测增殖免疫细胞的生物能量表型

安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定可在同一细胞孔中同时测量线粒体和糖酵解 ATP 的生成速率。因此，该测定提供了能量生成总量的定量标尺（总 ATP 生成速率），直接指示了不同细胞状态下的能量需求。

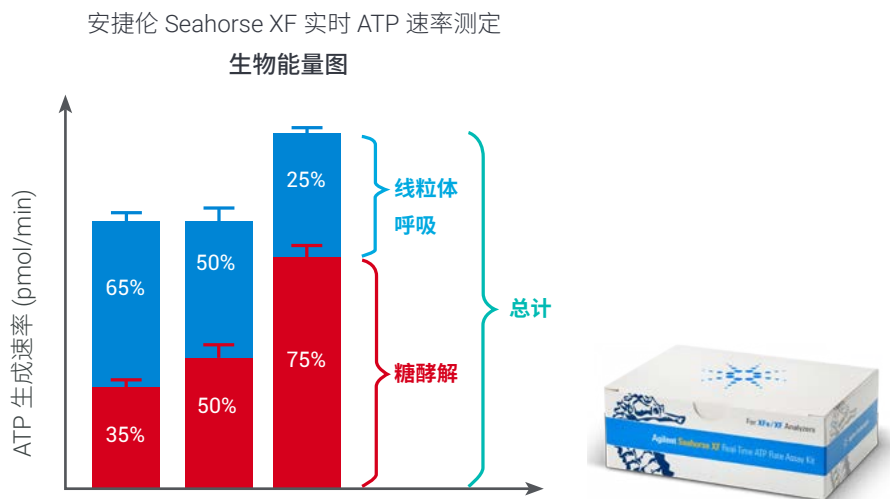


图 2：安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定图，图中显示了 ATP 生成速率

该测定提供了不同细胞群中这些通路之间相对平衡的定量标准（XF ATP 速率指数），对细胞表型和功能提供了独特见解。

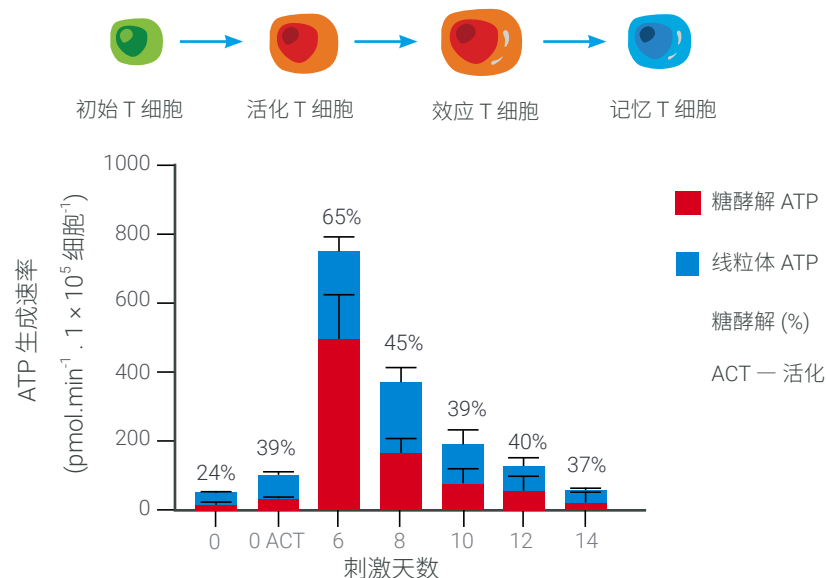


图 3：活化前后糖酵解和线粒体呼吸生成 ATP 的速率

了解有关 [安捷伦 Seahorse XF 实时 ATP 速率测定的更多信息](#)

免疫细胞的代谢重编程

免疫细胞在微环境中的代谢重编程可以影响细胞的命运和功能。T 细胞的活化、分化和增殖会产生独特的代谢需求，以支持细胞内发生的各种过程的能量需求。

[下载海报](#)

测量免疫细胞命运（谱系）和适应性（效力）的生物能量代谢标志

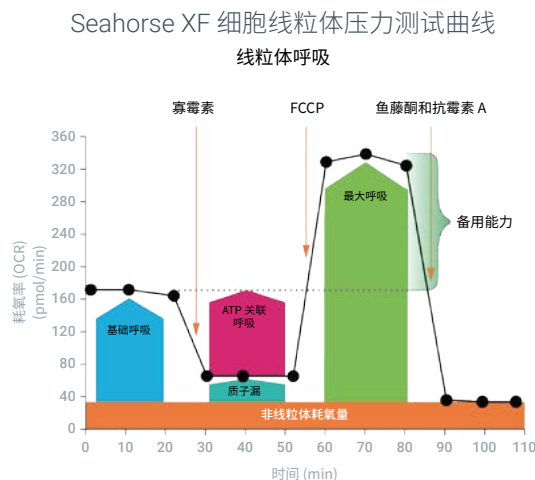


图 4：安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试曲线，显示了线粒体功能的关键参数

安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试是实时测量活细胞线粒体功能关键参数的标准方法。



参数包括基础呼吸、ATP 生成、质子漏、最大呼吸和备用呼吸能力。

了解有关 [XF 细胞线粒体压力测试试剂盒的更多信息](#)

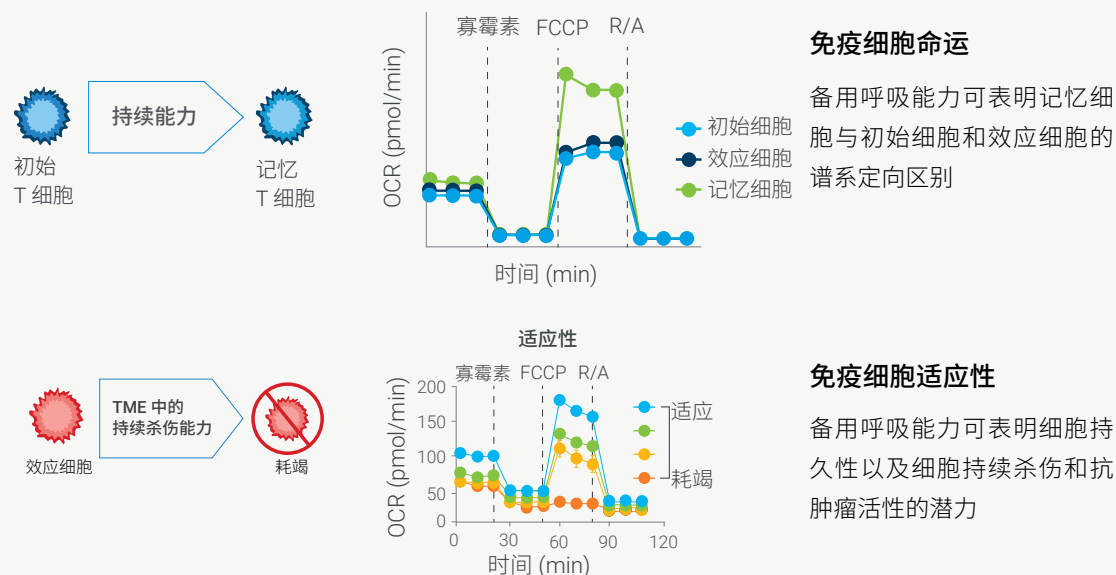


图 5：测量免疫细胞命运和适应性

备用呼吸能力 (SRC) 是经过验证的线粒体功能的可靠测量指标，且已确立为免疫细胞命运和适应性的有力指标。

可对免疫细胞命运和适应性的关键参数（包括记忆形成、肿瘤微环境中持久性和癌细胞持续杀伤力）进行定量测量和调节，从而优化免疫细胞的性能。

van der Windt, G. J., et al. Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8(+) T Cell Memory Development. *Immunity*. 2012, 36 (1), 68-78

Song, M., et al. IRE1alpha-XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity. *Nature*. 2018, 562 (7727), 423-428

了解驱动免疫细胞生物能量代谢的底物（优化细胞生长条件）

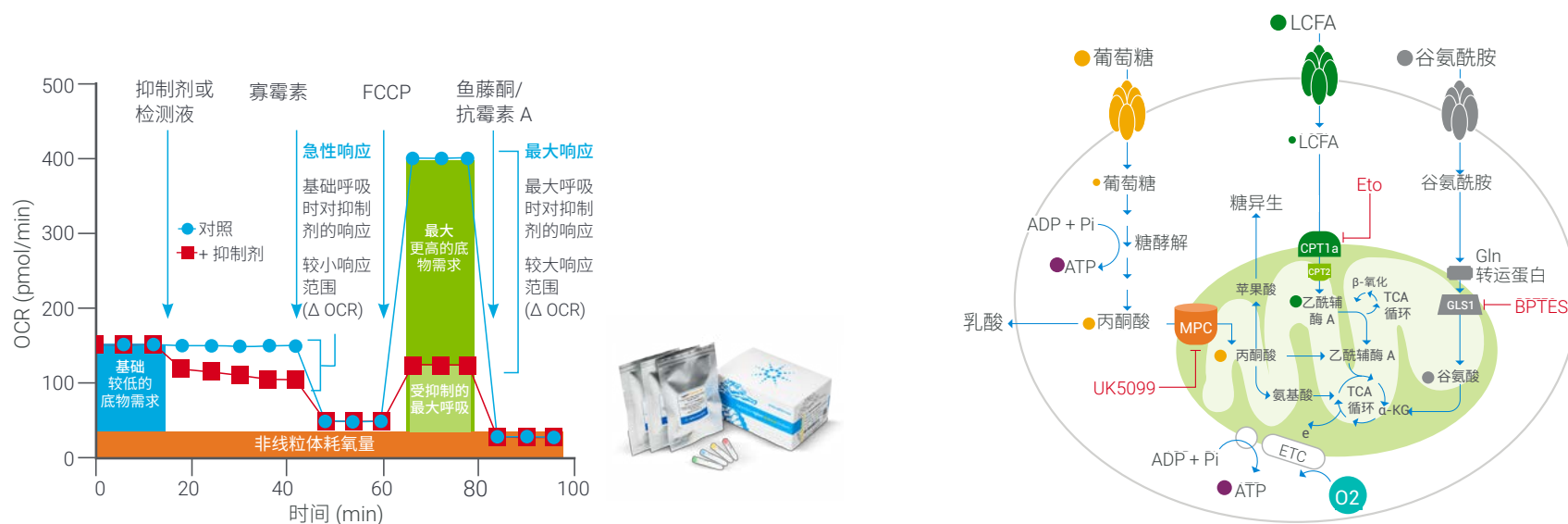


图 6：安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试曲线，显示了对底物需求至关重要的呼吸参数

安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试将底物通路特异性抑制剂和 XF 细胞线粒体压力测试相结合。测试提供的一套检测可评估三种主要线粒体底物的氧化：长链脂肪酸 (LCFA)、葡萄糖/丙酮酸和谷氨酰胺。

了解有关 [XF 底物氧化压力测试试剂盒](#) 的更多信息

细胞可通过代谢重编程发挥功能、确定命运并影响适应性。XF 底物氧化测试试剂盒可提供以下方面的关键信息：

- 哪些底物与细胞功能和表型相关
- 如何调节或调控免疫细胞命运、适应性和功能，从而优化驱动谱系定向和细胞效力的特性



“新证据表明，代谢物本身，包括特定线粒体底物的氧化，可以驱动细胞功能和表型，涉及增殖、分化以及功能障碍/疾病。”

[查看网络研讨会](#)

– George W. Rogers 博士，
安捷伦科技有限公司细胞分析事业部
生物测定解决方案专家、研究科学家

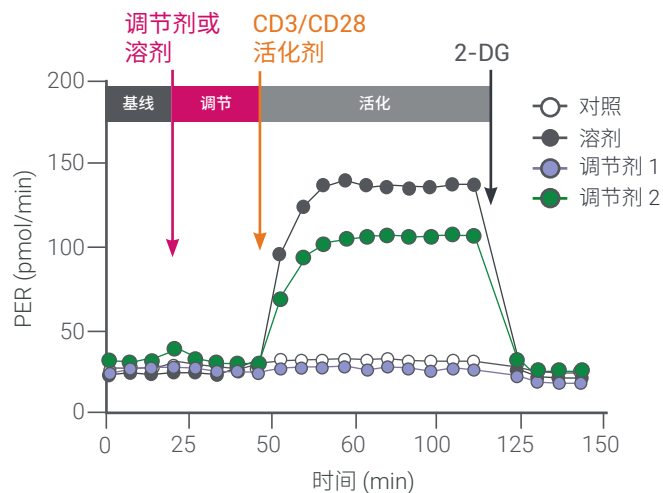


图 7: 安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定曲线, 展示了质子流出率 (PER) 用于 T 细胞活化动力学的测量

实时检测人 T 细胞活化



安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒:

优化的一站式解决方案, 可在数分钟内检测 T 细胞活化情况, 实时提供 T 细胞活化动力学的动态数据。

该试剂盒为 T 细胞生物学提供了独特的视角, 使研究人员能够定量分析活化动力学并研究 T 细胞行为的调节剂。

了解有关 [XF Hu T 细胞活化测定试剂盒的更多信息](#)

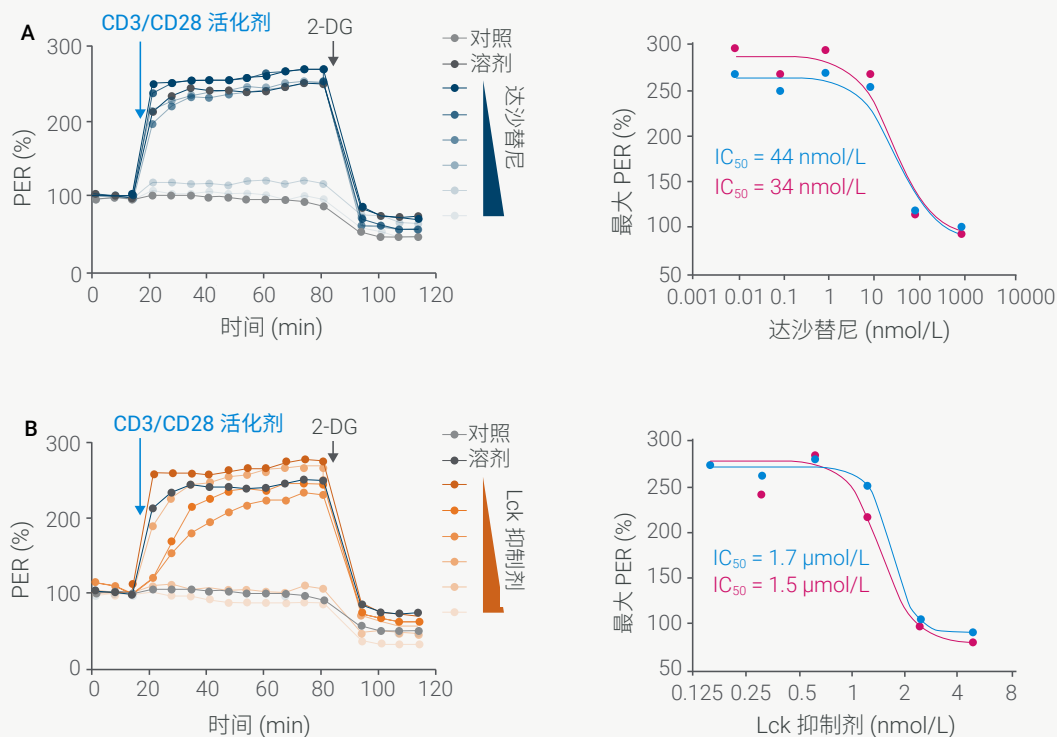


图 8: 可使用 T 细胞活化动力学数据来测量免疫调节剂有效剂量

解析 T 细胞调节剂影响

安捷伦 Seahorse XF Hu T 细胞活化测定试剂盒可深入分析不同酪氨酸激酶对 T 细胞活化的药理作用, 从而比较不同调节剂和抑制剂的效力 (图 A 和图 B 对比)。



细胞工程



调节影响免疫细胞适应性、命运和活化的生物能量代谢

嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法等工程化免疫细胞在临床上对耐药和难治性造血系统肿瘤的疗效显著。然而，工程化免疫细胞对于实体瘤的疗效有限，其原因有以下几个方面：缺乏肿瘤特异性抗原靶标、工程化免疫细胞对肿瘤的归巢和穿透不足、肿瘤微环境的免疫抑制特性以及工程化免疫细胞缺乏持久性。

细胞疗法领域正致力于利用基因工程方法来继续增加免疫细胞疗法的活化、持久性、归巢性、有效性和安全性。越来越多的证据显示，代谢平衡可能是免疫细胞功能和在肿瘤微环境中持久性的最客观决定因素，因此不受各种免疫通路利用策略和因素的影响。因此，代谢平衡可以客观地确定哪种方法可以增强免疫细胞功能，尤其是针对难治性肿瘤，并可以推动候选疗法的动物试验以及最终的临床试验。

本章中提供了一些具体示例，其中免疫细胞的基因工程和功能都取决于免疫细胞的代谢平衡。

细胞工程

CAR 结构的设计如何增强免疫细胞持久性？

如何改善和恢复 TME 中的 T 细胞功能？

能否将生物能量代谢调节与其他疗法相结合来增强反应？

能否通过抑制调节通路来恢复有利的细胞生物能量代谢？

CAR 结构设计可通过调节代谢来增强免疫细胞的持久性

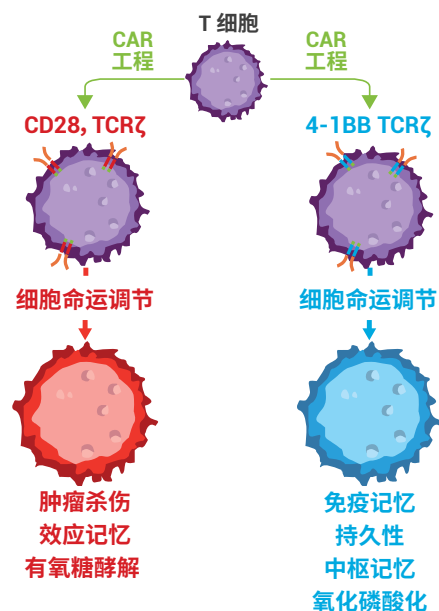


图 9: T 细胞工程和生物能量代谢可影响效应-记忆细胞功能

免疫细胞工程的目标在于生成具有某些特性和特征的细胞产物，从而改善免疫细胞功能并增强在肿瘤微环境中的持久性和存活能力。T 细胞生物能量代谢的功能调节与 T 细胞信号转导有着复杂联系，是决定细胞命运的重要决定因素。CAR 信号转导结构域的性质会决定细胞向效应或记忆表型分化。

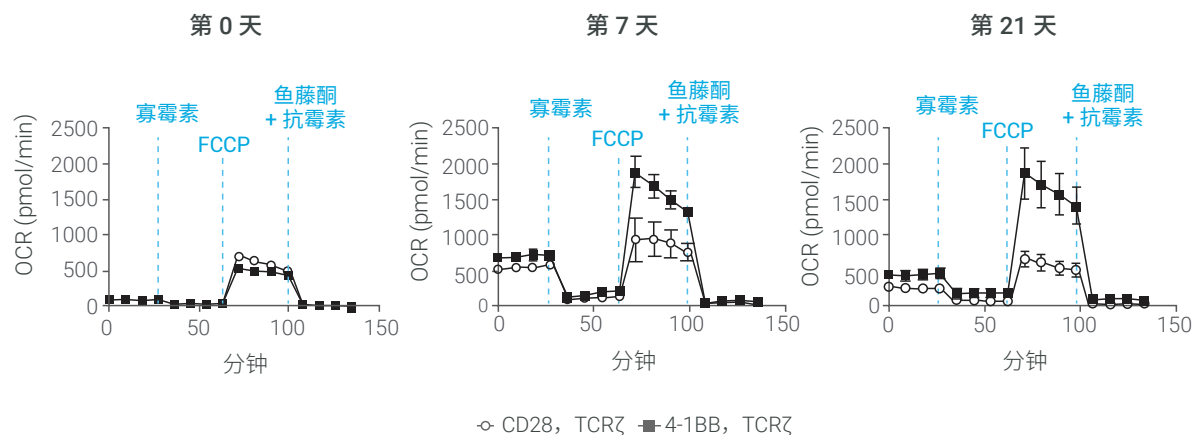


图 10: CAR-T 细胞中不同的信号共受体影响细胞代谢以驱动效应和记忆细胞功能

Kawalekar 等人通过 XF 细胞线粒体压力测试表明，CAR 信号转导结构域的选择决定了抗原刺激后 CD8 + CAR-T 细胞的生物能量代谢表型，及其体外持久性和记忆分化。在 21 天的时间内，含有 4-1BB 信号转导结构域的 CAR-T 细胞逐渐表现出更高的备用呼吸能力，最终使其体外持久性和中央记忆分化相比含有 CD28 信号转导结构域的 CAR-T 细胞有所增强。

通过免疫细胞基因工程进行的代谢重编程可以恢复抗肿瘤功能

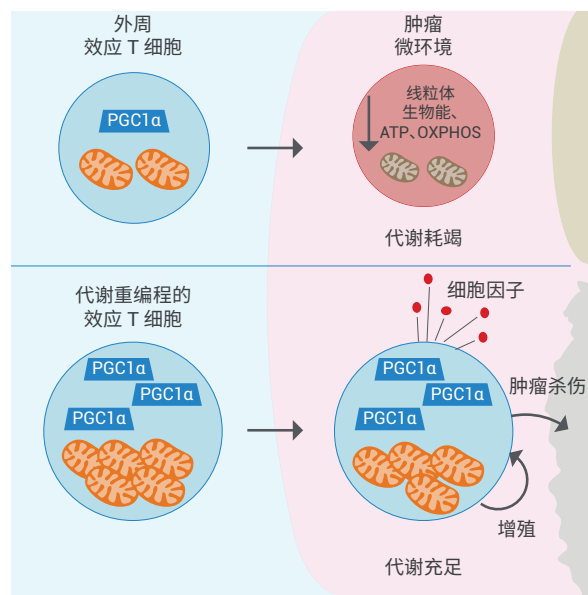


图 11：正常效应 T 细胞和重编程效应 T 细胞的代谢状态差异

肿瘤微环境 (TME) 代表一种缺氧并缺乏关键营养元素的限制性环境，会导致免疫细胞耗竭。免疫细胞的线粒体功能，特别是氧化磷酸化会受到显著影响，是免疫细胞耗竭的关键决定因素。通过过表达关键基因（例如 PGC1- α ）对免疫细胞进行代谢重编程，可恢复线粒体功能并增加线粒体量，从而逆转免疫细胞耗竭并恢复抗肿瘤功能。

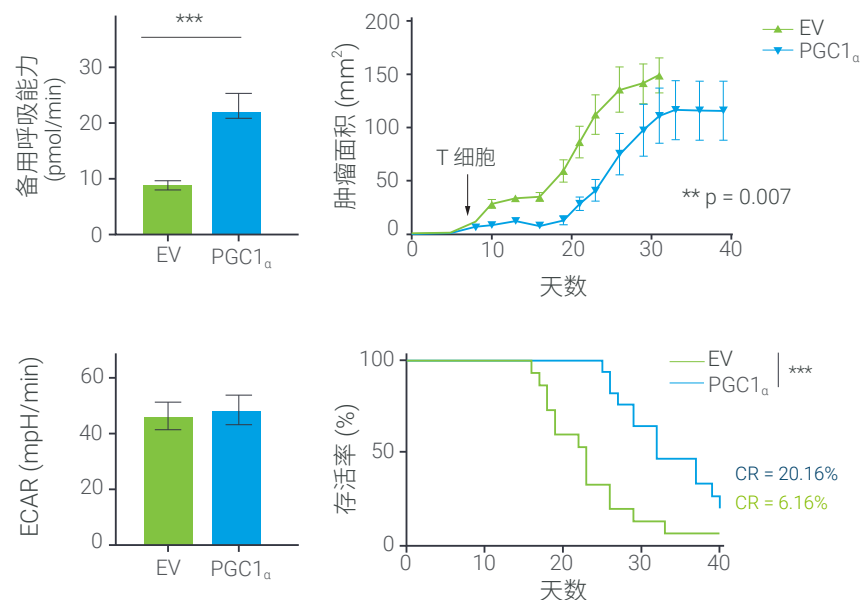
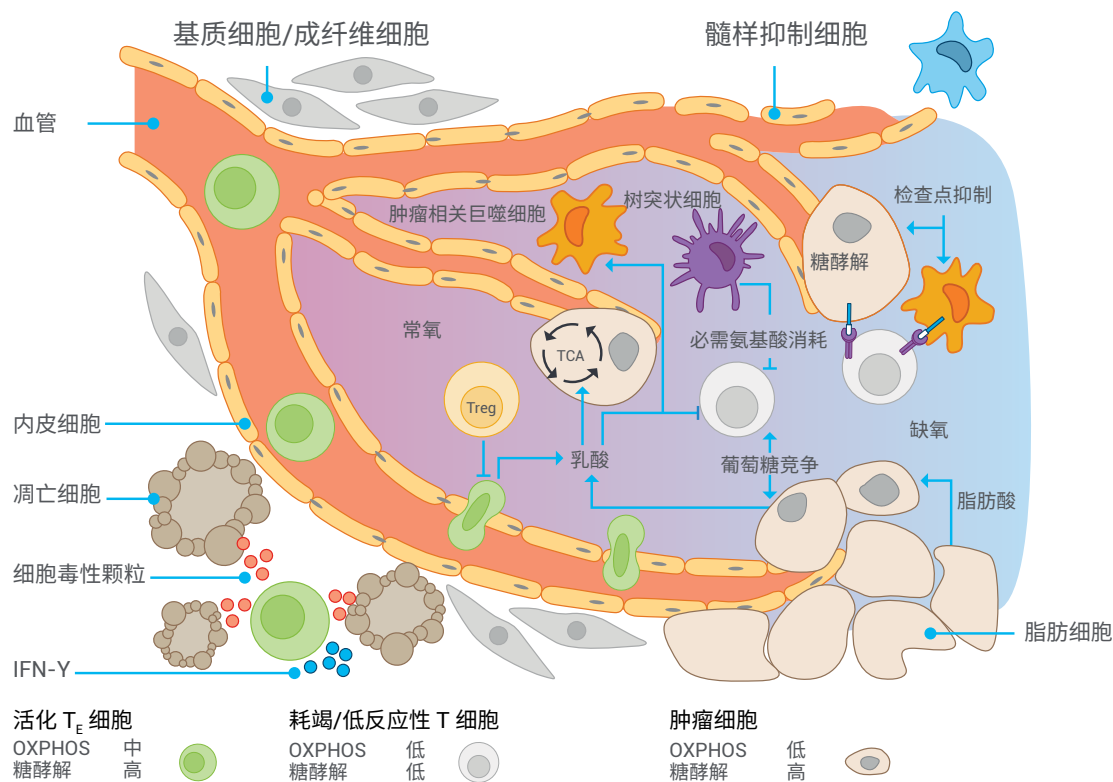


图 12：通过表达 PGC1- α 增强线粒体生物合成，使肿瘤微环境中抗肿瘤功能恢复

Sharping 等人最近使用 XF 细胞线粒体压力测试表明，编码 PGC1- α 的逆转录病毒载体转导的 OT-I T 细胞线粒体功能得到改善。备用呼吸能力增加而基础糖酵解无变化（通过细胞外酸化率 (ECAR) 测量）表明了线粒体功能的改善。T 细胞线粒体生物合成增加可改善肿瘤内 T 细胞的功能，表现为肿瘤面积的减少，使肿瘤在体动物模型的存活时间延长。

组合免疫检查点疗法可通过增强代谢适应性来改善免疫细胞功能和抗肿瘤效果



活化和分化等 T 细胞的效应反应过程对能量需求较高，肿瘤微环境会施加代谢限制，导致 T 细胞执行功能所必需的关键生物能量代谢中间体生成受限。这可能大幅降低 PD-1 阻断剂等免疫检查点疗法的有效性。通过调节关键生物能量通路的治疗干预是增强抗肿瘤反应的一种富有潜力的策略。

图 13：肿瘤微环境：安捷伦 Seahorse XF 分析提供了有关免疫反应上游驱动因素的关键信息

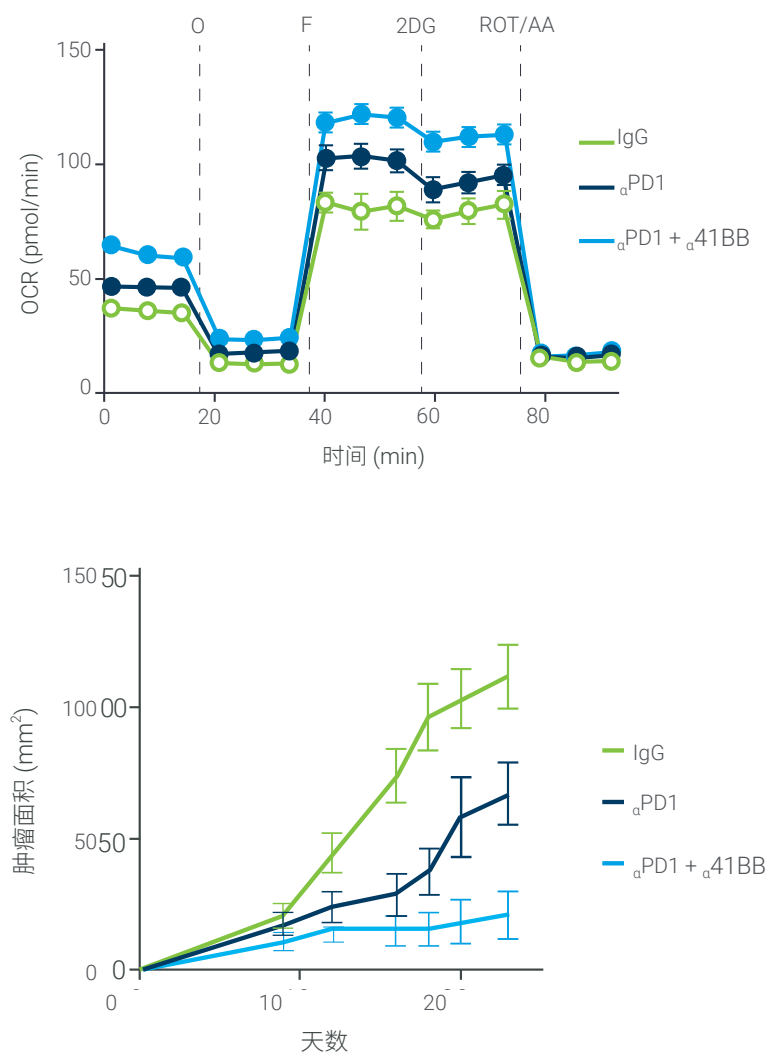


图 14: 抗 PD1 + 抗 41BB 的免疫检查点疗法可提高线粒体能力, 并增强抗肿瘤功能

Menk 等人使用 XF 细胞线粒体压力测试表明, 与使用同型对照或单独使用抗 PD-1 治疗的小鼠相比, 使用抗 PD-1 + 抗 4-1BB 联合抗体治疗的小鼠的 CD8 + T 细胞具有更高的最大呼吸。此外, 皮内接种 B16-F10 黑色素瘤细胞后, 接受联合免疫疗法的 C57/BL6 小鼠与同型对照或单独使用抗 PD-1 治疗的小鼠相比肿瘤缩小程度也更高。这些结果表明, 增强免疫细胞的线粒体能力可改善抗肿瘤反应。

Menk, A. V., et. al. 4-1BB costimulation induces T cell mitochondrial function and biogenesis enabling cancer immunotherapeutic responses. *J Exp Med.* 2018, 215 (4): 1091-1100

肿瘤微环境通过 ER 应激反应和线粒体生物能量代谢下调对 T 细胞效应功能的影响

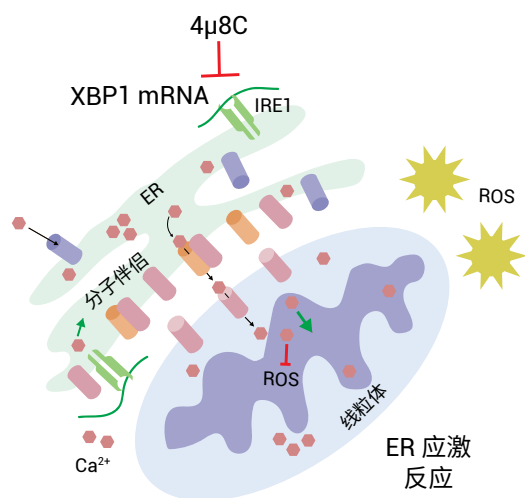


图 15: 肿瘤微环境对 T 细胞效应功能的影响

肿瘤微环境通过活化 IRE1 α -XBP-1 未折叠蛋白反应信号转导通路激活内质网 (ER) 应激反应来抑制 T 细胞效应功能。IRE1 α -XBP-1 的活化反过来限制可用的线粒体生物能量代谢关键底物 — 谷氨酰胺, 使线粒体生物能量代谢受到抑制。通过药理学抑制和基因工程下调此通路, 能恢复 T 细胞功能及其抗肿瘤活性。

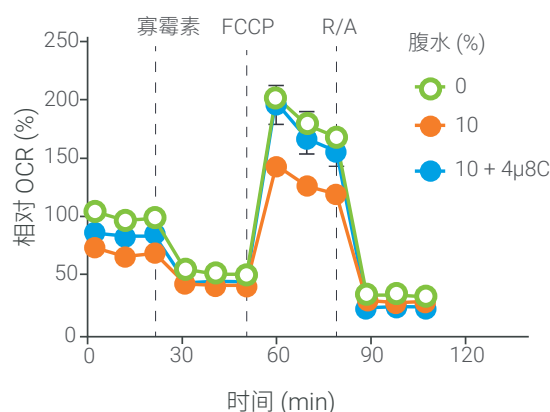
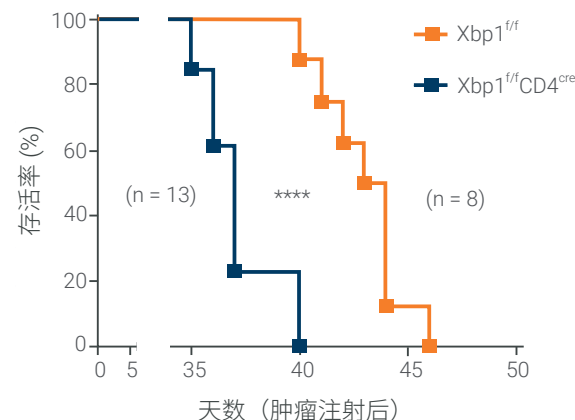
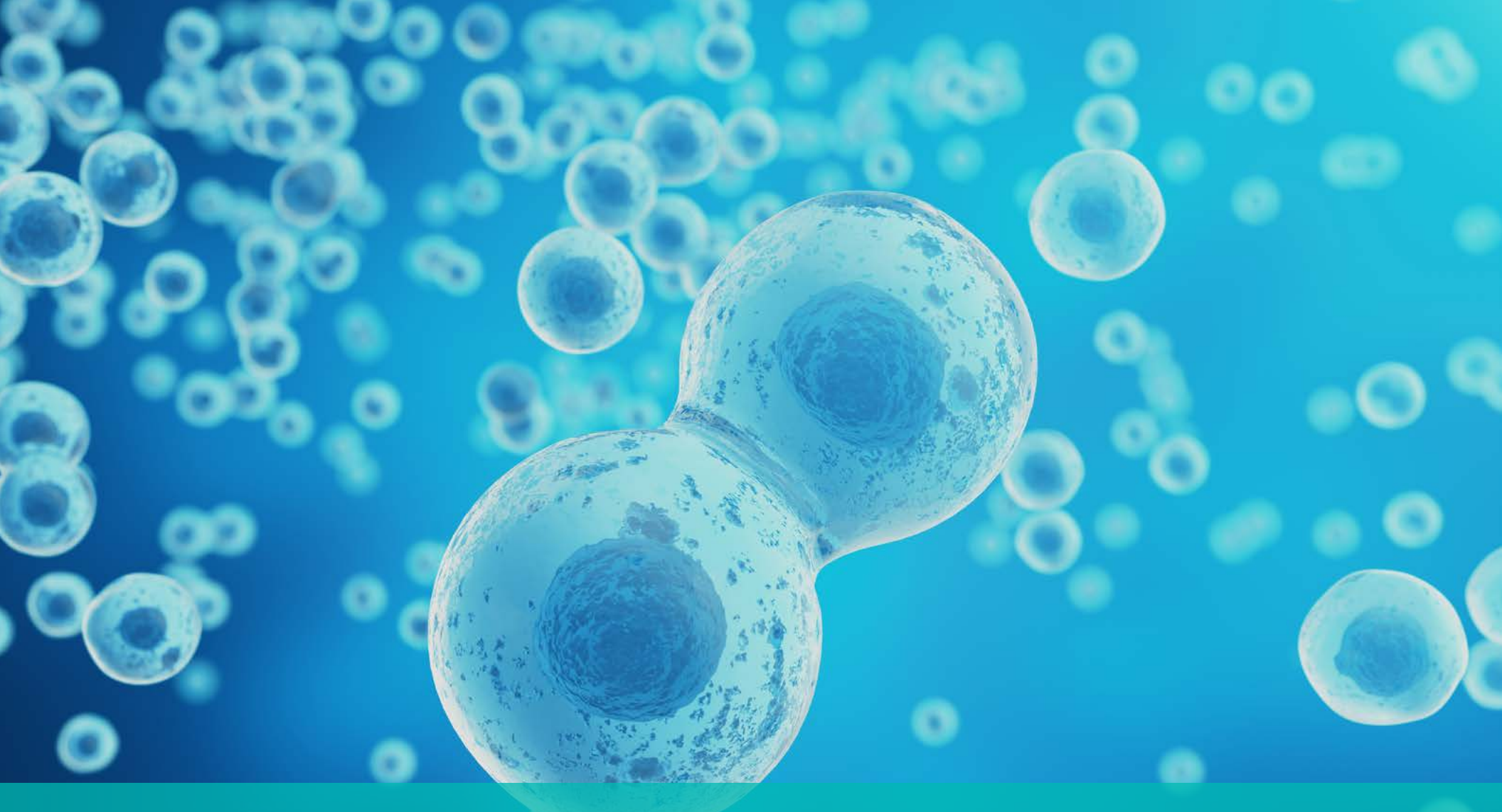


图 16: 通过靶向 T 细胞中的 IRE1 α -XBP1 信号转导来控制内质网应激反应, 从而帮助恢复代谢适应性和抗肿瘤能力



XF 细胞线粒体压力测试分析显示, CD4⁺ T 细胞接触卵巢癌患者不同浓度的恶性腹水后, 线粒体功能随剂量增加出现下降。在相同的腹水条件下, 经过 4 μ 8C (ER 应激蛋白 IRE1- α 的抑制剂) 处理可恢复线粒体功能, 表明 ER 应激反应可能会降低 T 细胞的适应性。带有卵巢癌和 XBP-1 缺陷 T 细胞的小鼠表现出更好的线粒体功能, 且 IFN- γ 分泌增加, 总体存活率更高, 表明这些恢复的 CD4⁺ T 细胞具有保护性。



工艺开发和细胞生产



细胞代谢是关键的质量属性

开发稳定、安全和明确表征的细胞生产方法是所有有效细胞疗法的核心，对工程化免疫细胞而言更是如此。在整个生产过程中，必须采用分析方法来引导优化质量属性的关键策略。

在治疗细胞生产的不同阶段进行细胞代谢的测量，包括评估起始材料、转导和活化的细胞以及最终的细胞疗法产品，可以提供有关细胞代谢平衡和效力的深入定量信息。这些数据有助于做出明智决策，从而优化生产条件、工艺以及患者所用的细胞治疗产品的质量。

实质上来说，代谢调节已成为一项关键工艺指标，用于确定细胞产品是否获得适当质量属性，是否可生产制剂并上市。

细胞生产

细胞代谢为何是开发细胞治疗产品的关键质量指标？

分化状态是否是抗肿瘤活性的关键决定因素？

离体扩增和未分化表型之间应达到怎样的适当平衡？

如何通过改变培养条件调节最终产品的代谢表型？

在生产中寻求离体扩增和未分化表型之间的平衡

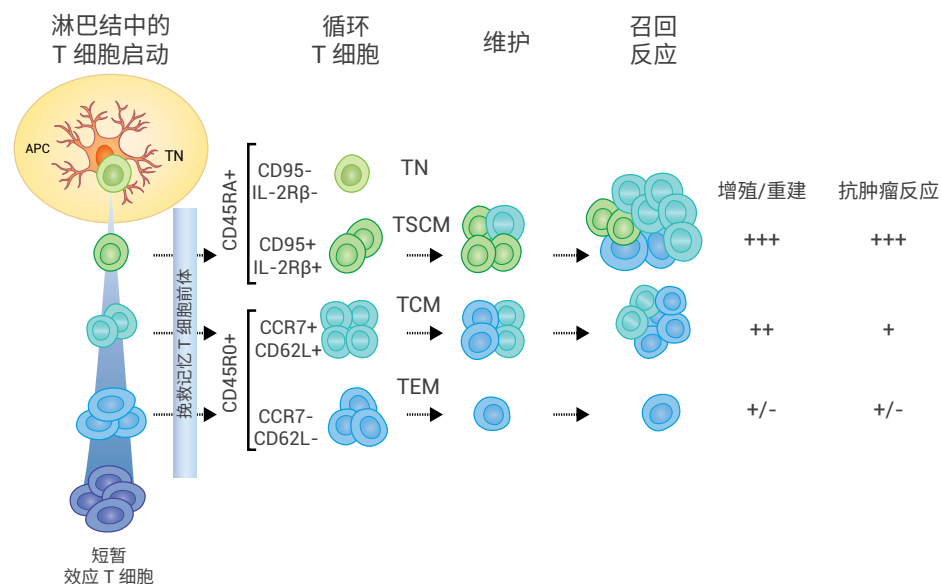


图 17: 遭遇抗原后 T 细胞分化进程及其与抗肿瘤反应的相关性

肿瘤特异性 T 淋巴细胞的过继转移对于晚期癌症患者来说是一种有效的治疗方法。最近，一些研究表明，在生产过程中选择具有特定表型的 T 细胞可以为产品提供更高的抗肿瘤效力。特别是生产了离体扩增后分化程度较低的细胞（更多“记忆或干细胞样”表型），可在重新输注后产生多种细胞，从而有助于提高效力和持久性。

具有较低分化表型的免疫细胞高度依赖线粒体的生物能量代谢。因此，可使用安捷伦 Seahorse XF 分析仪进行分析，通过高备用呼吸能力和较低的糖酵解活性来识别此类细胞。

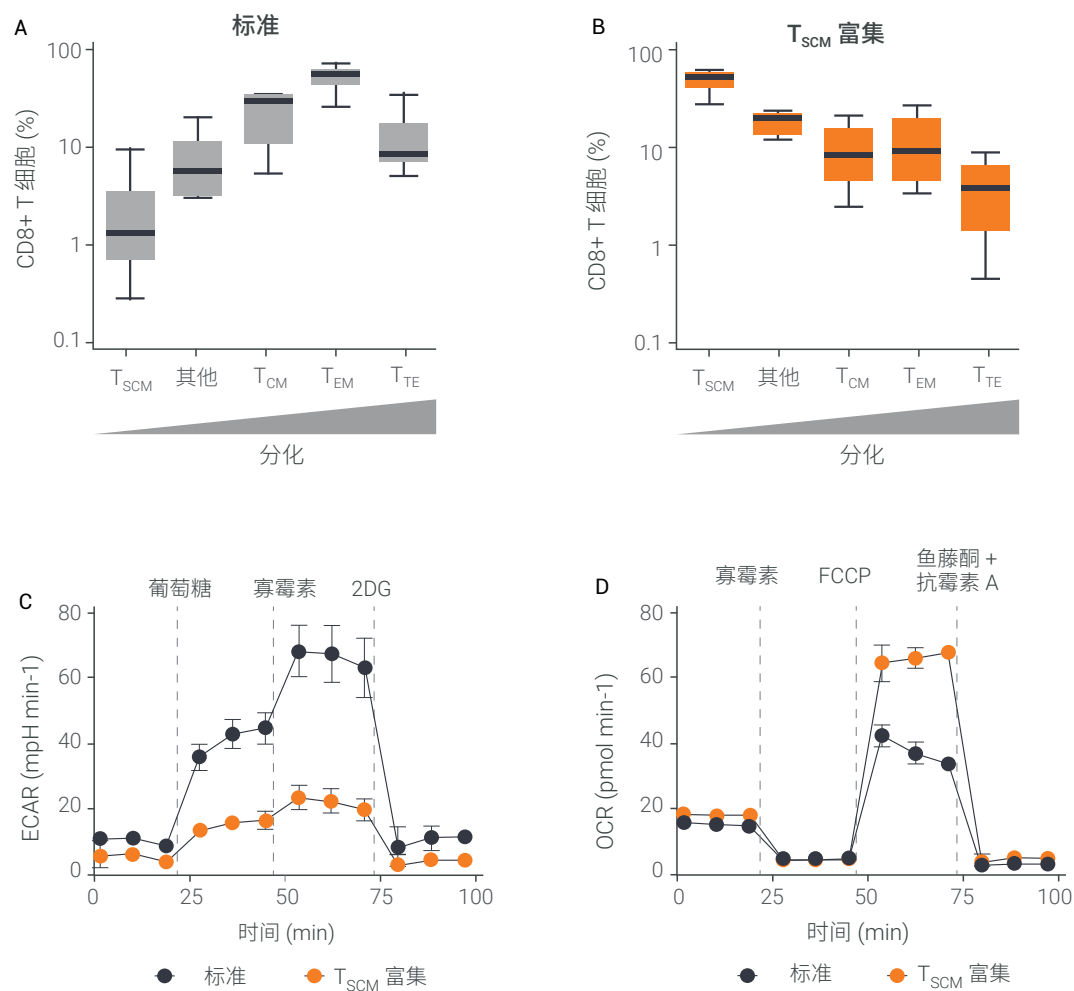


图 18：比较细胞扩增策略以及与分化和代谢适应性的关联

Sabatino 等人用外周血单核细胞 (PBMC) 产生了 CD-19 CAR-T 细胞，这些 CD-19 细胞在含有 CD-3 特异性抗体和 IL-2（标准）的条件下扩增，或使用富集的 CD3/CD28 活化初始 T 细胞，并在 IL-7、IL-21 和 GSK-3 β 抑制剂 TWS119 的情况下扩增（TSCM 富集）。

图 18 上半部分表示生产过程后每个 T 细胞亚群的百分比。图中表明，在 TSCM 生产过程后，未分化的细胞数量较高，这与糖酵解活性降低（通过 ECAR 测量）和作为记忆表型特征的线粒体备用呼吸能力 (SRC) 增加相关。总之，这些发现表明与标准细胞制备相比 TSCM 富集的 CD19-CAR 修饰型 T 细胞具有更高的代谢适应性。

Sabatino, M., et. al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood*. 2016, 128 (4): 519-28

CAR-T 分化状态是抗肿瘤活性的重要决定因素

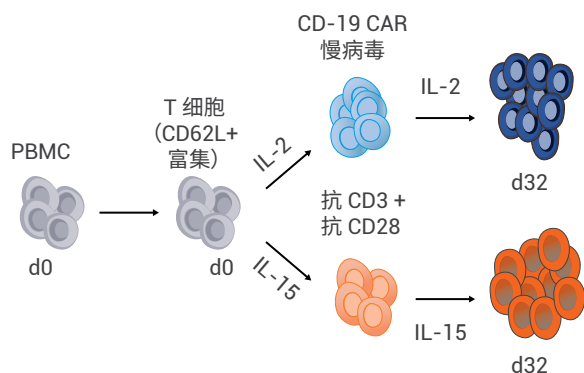


图 19：在体外扩增过程中通过调节细胞因子含量来改善 CAR-T 生产

成功生产安全有效的 CAR-T 疗法取决于许多因素，包括患者材料的质量、CAR 结构的设计、将 CAR 引入 T 细胞的模式和方法、细胞的体外扩增的培养基条件以及细胞的分化状态。已有研究表明，分化程度较低的初始和干细胞样表型对于具有出色抗肿瘤活性的稳定 CAR-T 细胞而言是理想选择。

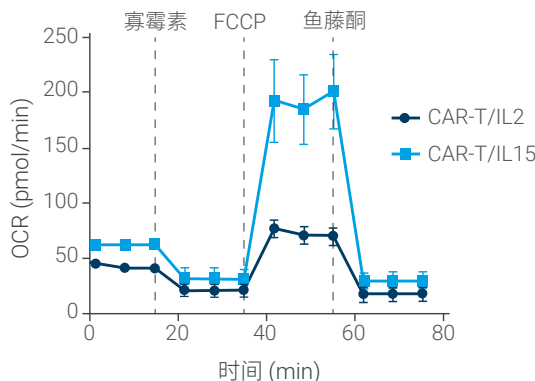
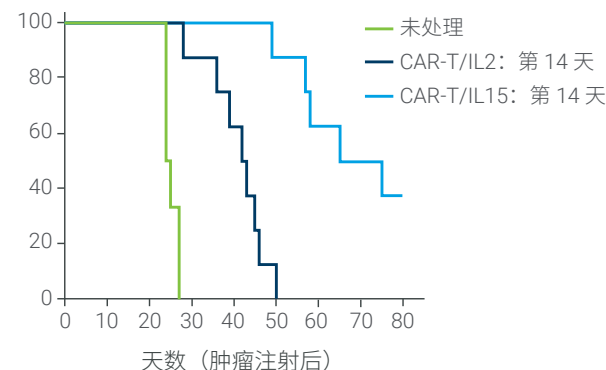


图 20：在存在 IL-15 的条件下，CAR-T 细胞的扩增可维持分化程度较低的 T 细胞表型，具有出色的抗肿瘤活性



Alizadeh 等人证明，与在存在 IL-2 情况下进行培养的细胞相比，在含有 IL-15 条件下扩增的 CAR-T 细胞保留了分化程度较低的干细胞-记忆型表型，具有更高的代谢适应性。

他们使用 XF 细胞线粒体压力测试和安捷伦 Seahorse XF 分析仪表明，在 IL-15 条件下培养的 CD19 CAR-T 细胞具有的备用呼吸能力明显高于 IL-2 条件下培养的细胞。较高的备用呼吸能力是记忆干细胞样 T 细胞的标志。他们还证明，与 IL-2 条件下培养的 CD19 CAR-T 细胞相比，IL-15 条件下培养的 CD19 CAR-T 细胞在向 NSG 小鼠的过继转移中显示出优异的抗肿瘤活性。

优化细胞疗法开发的营养和生长条件：利用生物能量参数获得抗肿瘤活性提高的免疫细胞

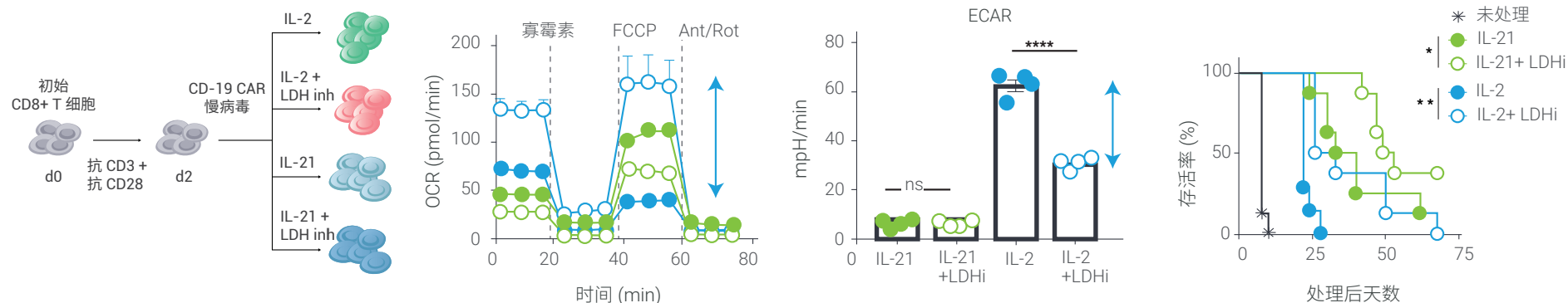


图 21：在 T 细胞扩增过程中抑制有氧糖酵解协同使用 IL-21，用于开发具有静止表型和抗肿瘤免疫力更高的产品

T 细胞生产过程中的代谢重编程可以显著影响 T 细胞分化和最终细胞产品的表型。Hermans 等人证明，IL-2 会引起高基础 ECAR 和缺乏 SRC 的能量代谢，从而促进重编程，而 IL-21 可更好地维持代谢静止状态。这种代谢静止状态具有记忆 T 细胞的低基础 ECAR 和高 SRC 特征，与再刺激时的扩增潜力相关。

LDH 抑制剂的存在可重编程 T 细胞的代谢，抑制丙酮酸转化为乳酸（有氧糖酵解），并在体外扩增过程中促进了线粒体的丙酮酸氧化。LDH 抑制增强了 IL-21 诱导的表型，其特征是低基础 ECAR 和高 SRC，在小鼠肿瘤模型中进行过继细胞转移后具有更高的体内抗肿瘤活性，并延长了动物存活期。

结论

在过去的十年中，免疫疗法已成为治疗癌症的重要方式，随着创新抗体和细胞类疗法（例如免疫检查点抑制剂和工程化免疫细胞）的引入，免疫疗法有望显著增长。免疫细胞的代谢平衡是一个关键的决定因素，与抗肿瘤有效性具有内在联系，特别是在免疫抑制性肿瘤微环境中。因此，对于理解抗肿瘤免疫反应生物学和疗法设计而言，免疫细胞关键代谢和生物能量参数的分析和优化至关重要。

安捷伦 Seahorse XF 分析仪提供灵敏的实时功能测量，可以客观定量地测定免疫细胞的代谢活性，从而在整个疗法设计和生产过程中提供有关免疫细胞关键质量属性的重要信息。

安捷伦 Seahorse XF 分析仪：

- 可结合定制的试剂盒和检测，灵敏、动态地测量免疫细胞的命运、适应性和功能
- 提供优化免疫细胞选择和工程设计的关键信息，提升细胞性能，可用于选择和设计具有优异代谢特性的工程化免疫细胞，实现出色的肿瘤杀伤功能
- 可用于优化治疗细胞生产中免疫细胞组分和生长条件



用户好评

“基础免疫学的最新数据表明，细胞包含重要的代谢重编程步骤。一般情况下，急性效应 T 细胞的代谢由糖酵解主导，而记忆细胞增殖较慢，但存活时间更长，主要利用基于脂肪酸氧化、三羧酸循环和线粒体生物合成的代谢。”



Carl June 博士
宾夕法尼亚大学
病理学和检验医学教授，
免疫学家和肿瘤学家

[下载《免疫疗法的突破》电子书](#)

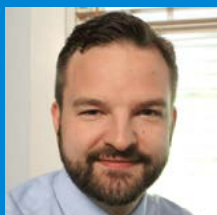
“通过整合不同的检测，我们现在可以了解用于治疗患者样本的 T 细胞的功能信息，或者对有反应和无反应的独立样本进行回顾性研究。”



Devikala Gurusamy 博士
美国国立卫生研究院
外科部门研究人员

[注册参加网络研讨会](#)

“通过改变代谢参数，我们能使免疫疗法治疗更多的患者，并提高有效性。”



Greg M. Delgoff 博士
匹兹堡大学 Hillman 肿瘤中心，
肿瘤微环境中心
免疫学助理教授

[注册参加网络研讨会](#)

“调节代谢变化可很大程度地支持 T 细胞的生长和分化，而且可以增强 T 细胞的功能。”



Roddy O'Connor 博士
宾夕法尼亚大学
病理学和检验医学系
研究助理教授

[注册参加网络研讨会](#)



其他资源

浏览免疫代谢应用网页

www.agilent.com/en/solutions/cell-analysis/cell-metabolism/immune-metabolism

了解有关快速、实时检测 T 细胞活化的更多信息

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xf-tcell-activation

查看安捷伦细胞分析网络研讨会回放页面，了解其在免疫研究中的应用

<https://www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series#13>

访问安捷伦细胞分析出版物数据库，搜索与您研究相关的出版物

www.agilent.com/search/?N=4294836537+4294656423+4294835561

T 细胞活化的药物调节

[下载海报](#)

直接测量细胞代谢以识别线粒体药物靶点

[查看应用简报](#)

安捷伦 Seahorse XF 技术：发现细胞命运、功能和适应性的驱动因素

[查看产品样本](#)

用于免疫学研究的安捷伦 Seahorse XF 活细胞代谢解决方案

[查看手册](#)



了解更多信息

www.agilent.com/en/solutions/cell-analysis/cell-metabolism/immune-metabolism

实时交流

www.agilent.com/chem/discoverXF

安捷伦客户服务中心：

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

RA44294.3665046296

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，2021

2021 年 3 月 2 日，中国出版

5994-3004ZHCN

