

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0140-04

人类 NK 细胞亚群的分类及意义

郑晓东 综述, 田志刚 审阅(中国科技大学免疫学研究所, 合肥 260027)

[摘要] NK 细胞是功能异质性的群体,其亚群的分类方式至今无统一标准。根据 NK 细胞的表面标志、分泌细胞因子以及某些功能上的差异将其分为 CD56^{bright}和 CD56^{dim},NK1 和 NK2,A-NK 和 NA-NK 等不同的亚群,这些亚群之间明显存在着表型和功能的差异,对 NK 细胞的研究有重要参考意义。

[关键词] 自然杀伤细胞; 亚群; 分类

[中图分类号] R392.12 [文献标识码] A

NK 细胞是重要的天然免疫细胞,可直接杀伤肿瘤和病毒感染细胞,也可分泌细胞因子调节其他免疫细胞的功能,在机体免疫监视和早期抗感染免疫过程中起重要作用。NK 细胞是异质性细胞群体,其亚群的分类至今仍无国际公认标准。然而近年来学者们对 NK 细胞的表面标志和分泌细胞因子、黏附功能等进行深入研究,发现了许多具有特异性表型和功能的亚群,并由此将 NK 细胞进行了分类。

1 以表面标志分类

NK 细胞表达众多表面分子,如 CD56, CD16, CD57, CD161 等,但这些表面标志都不是 NK 细胞所特有的,只具有相对特异性。通常将 CD56⁺, CD16⁺, CD3⁻, TCR⁻, BCR⁻ 的淋巴样细胞认为是 NK 细胞。于是就有学者就以一种或几种表面标志来对 NK 细胞进行分类。有的学者以 CD56⁺ CD16⁺, CD56⁺ CD16⁻ 和 CD56⁻ CD16⁺ 为标志将 NK 细胞分为 3 个亚群,发现 CD56 是 NK 细胞分化的特异性标志,而 CD16 的表达量与 NK 细胞的杀伤活性密切相关^[1]。在上述研究基础上许多学者主张以 CD56 的表达密度不同,将 NK 细胞分为 CD56^{bright}和 CD56^{dim} 两群^[2,6]。CD56^{bright} NK 细胞高表达 CD56, CD94/NKG2A 和 CD62L; 低表达 CD16, KIR(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR); 表达高亲和力的 IL-2 受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)。而 CD56^{dim} NK 细胞高表达 CD16, PEN5, KIR 和 LFA-1; 低表达 CD56, CD94/NKG2A; 仅表达中亲和力的 IL-2 受体(IL-2R $\beta\gamma$)^[2,3]。CD56^{bright} NK 细胞在 IL-12, IL-15 和/或 IL-18 的作用下分泌大量的细胞因子,如 IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-10, IL-13 和 GM-CSF 等,且在 IL-2 的作用下表现出较强的增殖作用; 而 CD56^{dim} NK 细胞几乎不分泌细胞因子,且 IL-2 不能促其增殖^[4,5]。CD56^{dim} NK 细胞表现出较强的杀伤活性,而 CD56^{bright} NK 细胞杀伤活性较低且表达 c-kit 等未成熟标志(表 1),由此 Copper 等^[6]认为 CD56^{bright} NK 细胞是未成熟的 NK 细胞,而 CD56^{dim} NK 细胞则相对较成熟,即 NK 细胞发育可能经历 CD56^{bright} NK 细胞 \rightarrow CD56^{dim} NK 细胞这样一个过程。然而在以 IL-15^[7]和/或 Flt-3L^[8]为基础的体外培养体系中, CD34⁺ 造血干细胞只能发育为 CD56^{bright} CD16⁻ NK 细胞。虽然 Parrish-Novak 等^[9]研究证明

CD34⁺ 造血干细胞在 IL-21, IL-15 和 Flt-3L 的协同作用下,可以分化为 CD56⁺ CD16^{bright} NK 细胞,但这种 NK 细胞和外周血的 CD56^{dim} CD16^{bright} 细胞是否具有表型和功能的一致性还未见报道。占外周血 NK 细胞 90% 的 CD56^{dim} NK 细胞究竟从何而来? 学者们对此有不同的观点: 有的学者认为 CD56^{bright} NK 细胞和 CD56^{dim} NK 细胞是呈平行关系的亚群,可能共有一种前体细胞; 也有的学者认为两者由不同的前体细胞发育而来^[6]。

2 以分泌 Th1/Th2 型细胞因子分类

公认 CD4⁺ Th(T help) 细胞可以分为 Th1 和 Th2 2 种亚群,有的学者根据这一现象研究 NK 细胞,发现 NK 细胞也存在着类似的亚群^[10-12]。Peritt 等^[10]分离外周血 CD16⁺ 或 CD56⁺ 细胞,用 IL-12 和抗 IL-4 抗体诱导出分泌 IFN- γ 的 Th1 型 NK 亚群,用 IL-4 和抗 IL-12 抗体诱导出分泌 IL-5, IL-13 的 Th2 型 NK 细胞亚群,分别命名为 NK1 和 NK2。IL-12 能促进 NK1 细胞分泌 IFN- γ , 抑制 NK2 细胞分泌 IL-5 和 IL-13; 而 IL-4 的作用正好相反。NK1 细胞高表达 FasL, 而 NK2 细胞高表达 TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 但两者对 K562 细胞杀伤和 ADCC 效应无明显差别。因此 Peritt 等^[11]认为 NK1-NK2 两者呈平行关系,即类似于典型的 Th1-Th2 型的亚群,其特点是先形成 NK0 细胞,然后分化为 NK1 和 NK2 细胞。作者实验室也作过这方面的研究,得到十分相似的结果,但许多学者对此提出不同看法。Loza 等^[12]研究了以分泌 IFN- γ 为主的 NK1 细胞和以分泌 IL-13 为主的 NK2 细胞后,发现 IL-13^{high} NK 细胞克隆的表型多为 CD56^{-/dim} CD94⁻ CD16⁻ KIR⁻ NKp46⁻ IFN- γ ⁻, 而 IFN- γ ^{high} NK 细胞克隆的表型多为 CD56^{bright} CD94⁺ CD16^{+/-} KIR⁺ NKp46⁺ IL-13⁻。同时还发现 IFN- γ ⁺ IL-13⁻ NK 细胞克隆,其表型为 CD56^{dim/-} CD94^{dim/-} CD16⁻ KIR⁻。IL-4 能促进 IL-13⁺ IFN- γ ⁻ 细胞的增殖,抑制 IFN- γ ⁺ IL-13⁻ 细胞的增殖。IL-12 能增强 IFN- γ , CD56, CD94, CD16, KIR, NKp46 的表达,抑制 IL-13 的表达; 还能促使 IL-13⁺ IFN- γ ⁻ NK 细胞转变为 IFN- γ ⁺ IL-13⁺ NK 细胞,继而转变为 IFN- γ ⁺ IL-13⁻ NK 细胞,而 IL-4 不能逆转这一过程。因此,Loza 等人认为 NK 细胞发育经历 NK2 \rightarrow

NK0→NK1 的过程。在这一过程中 IL-4 促进 NK2 增殖;IL-12 促使 NK2 向 NK1 转变,并促进 NK1 的成熟^[12](表 1)。但 IFN- γ + IL-13 + NK 细胞是否就是 NK0 细胞呢? 众多学者研究证明 CD56^{bright} NK 细胞高分泌 Th1 和 Th2 型细胞因子(IFN- γ , TNF- β 和 IL-5, IL-10, IL-13 等)^[4-5],那么 CD56^{bright} NK 细胞是

否能被分为 NK1 和 NK2 2 个亚群,或者 CD56^{bright} NK 细胞是否就是 NK0 细胞? 此外 NK 细胞是否也像 Th 细胞那样存在着极化现象,即在恶性肿瘤中处于 NK2 状态,而在某些自身免疫系统疾病中处于 NK1 状态? 这些问题还有待于进一步研究。

表 1 NK 细胞亚群的分类及特点

分类方式	表面标志		分泌细胞因子		黏附特性		
	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}	NK1	NK2	A-NK	NA-NK	
占外周血 NK 细胞的比例	约 10%	约 90%	*	*	<30%	>70%	
特异性表面标志							
CD56	+	+	+				
CD16	+/- ^a	+	+	-	+/- ^a	+ +/- ^a	
CD94/NKG2A	+	+	+	-	+	+	
KIR	+	+	+	-	+	+	
细胞因子受体							
c-kit(CD117)	+	-	*	*	*	*	
IL-2R α	+	-	*	*	+	\pm	
IL-2/15R $\beta\gamma$	+	+	*	*	+	\pm	
黏附分子							
PEN5	-	+	+	*	*	*	
CD62L	+	+	+	*	*	*	
LFA-1	+	+	+	*	*	+	
CCR7	+	+	+	*	*	*	
CXCR1	-	+	*	*	*	*	
FasL	*	*	+	+	-	+	+
TRAIL	*	*	-	+	+	*	*
分泌细胞因子							
IFN- γ	+	+	+	\pm	+	+	+
TNF- α	+	+	+	-	+	+	+
TNF- β	+	+	+	*	*	*	*
IL-2	*	*	*	*	+	+	+
IL-10	+	+	+	-	+	+	\pm
IL-13	+	+	+	-	+	+	+
GM-CSF	+	+	+	-	+	+	*
对细胞因子反应							
IL-2	促进增殖	不明显	不明显	不明显	促进增殖	不明显	
IL-4	*	*	抑制增殖	促进增殖	促进黏附	不明显	
IL-12	分泌 IFN- γ	不明显	促进成熟	促使分化	*	*	
杀伤功能							
ADCC	+	+	+	\pm	\pm	+	+
LAK	+	+	+	*	*	+	+
对 K562 的杀伤	+	+	+	\pm	\pm	+	+
体外杀瘤能力	*	*	*	*	+	+	
体内杀瘤能力	*	*	*	*	+	+	\pm
参考文献	[2 - 6]		[10 - 12]		[13-15]		

* 未见文献报道; a 表示异质性, 即从 + 到 - 都存在

3 以黏附功能进行分类

研究发现 NK 细胞在 IL-2^[13-15] 的诱导下表现出对实体表面的黏附能力,由此有的学者将 NK 细胞分为黏附 NK(A-NK)和非黏附 NK(NA-NK)2 个亚群。A-NK 细胞的表型比较均一,主要为 CD3⁻CD56^{dim}CD16⁺IL-2R⁺,不含 CD56^{bright} 细胞。NA-NK 细胞是具有不同表型的异质性群体,CD56^{bright},CD56^{dim},CD56⁻,CD16⁺,CD16⁻均有表达。A-NK 细胞表面黏附分子 CD11abc,CD18,CD54 的表达均高于 NA-NK。在 IL-2 的作用下 A-NK 细胞表现出很强的增殖能力,且分泌 IL-1,IL-2,IL-6,TGF-β 等细胞因子的能力明显高于 NA-NK,而 IFN-γ,TNF-α 在 2 种亚群中均有表达^[13-14]。A-NK 细胞具有较高的体外杀伤活性和体内抗肿瘤的能力,但体外抗肿瘤的能力却低于 NA-NK^[15](表 1)。这可能是由于 NA-NK 细胞中含有大量的穿孔素,通过穿孔素途径表现出较强的体外抗肿瘤作用。而 A-NK 细胞由于高表达多种黏附分子和细胞因子受体,可能在体内通过抑制肿瘤细胞生长、介导肿瘤细胞凋亡,从而表现出较强的浸润和杀伤肿瘤的能力。A-NK 细胞虽然表型为 CD56^{dim},但它却能大量分泌细胞因子,具有 CD56^{bright} NK 细胞的某些特性,CD56^{dim} NK 细胞是否也存在着不同类型的亚群?这方面还未见文献报道。

4 以识别谱分类

过去认为 NK 细胞是 MHC 非限制性的,近年来发现 NK 细胞能够识别 MHC 分子,而且 MHC 分子能抑制 NK 细胞的功能。于是有的学者就以能够识别不同 MHC 分子来将 NK 细胞分群。Christiansen 等^[16]以识别 HLA-Cw α1 链的第 77 位和第 80 位氨基酸的不同来分群: NK1 识别 Asn77-Lys80 (HLA-Cw2,3,5,6); NK2 识别 Ser77-Asn80 (HLA-Cw1,3,7,8,13)。Cella 等^[17]发现识别 HLA-Bw4 分子的 NK 细胞克隆(命名为 NK3)。这几种 NK 细胞亚群对表达不同的 HLA 分子的细胞表现不同的杀伤作用。这实际上是因为 NK 细胞表达不同的 KIR 受体(CD158a,CD158b,CD158e 等),从而导致对不同的 HLA 分子的识别存在差异。

5 意义及展望

虽然 NK 细胞是异质性细胞群体,但研究证明 NK 细胞中的确存在着具有表型和功能差异的亚群。上述这些 NK 细胞亚群的特征虽然能部分解释 NK 细胞发育、分化和识别机制,但仍有许多尚未解决的问题:临床发现在孕妇蜕膜层中含有大量的细胞的表型和功能与外周血 NK 细胞有很大差异的 CD56^{bright} NK 细胞,而且外周血 CD56^{bright} NK 细胞的比例有随着年龄的增长而降低的趋势,这些是否与发育分化有关? CD56^{bright} NK 细胞的比例在某些疾病会升高,这是否与免疫失衡有关?此外还有 NK1 与 NK2 的识别杀伤机制的差异,以及 A-NK 细胞体内外抗肿瘤差异性的机理等。探清这些问题将有助于认识 NK 细胞的本质,为今后的临床应用打下基础,如对肿瘤病人输注杀伤活性高的 CD56^{dim} NK 或 A-

NK 细胞以提高治疗效果;或提高体内 CD56^{bright} NK 细胞的比例,可以减小 IL-2 的用量而不影响治疗效果;利用 IL-2 体外刺激 CD56^{bright} NK 或 A-NK 细胞增殖以得到大量的 NK 细胞用于治疗。

总之,这些分类方式虽各有特点,具有某些相似点,但也明显存在着无法解释的矛盾之处,能否找到一种分类方式将上述几种分类方式统一起来: NK 细胞是否像 T 细胞那样存在着以免疫调节为主的调节性 NK 细胞亚群(类似于 Th 细胞),和以杀伤为主的功能性 NK 细胞亚群(类似于 CTL 或 Tc 细胞)? CD56^{bright} NK 细胞近似于调节性 NK 细胞亚群, NK1 和 NK2 这是这一亚群的 2 种亚型;而 CD56^{bright} NK 和 A-NK 细胞近似于功能性 NK 细胞亚群,这其中还可能还存在着亚型。

[参考文献]

- [1] Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, *et al.* Comparative studies of human FcR3-positive and -negative natural killer cells[J]. *J Immunol*, 1989, 143(10): 3183-3191.
- [2] Carson WE, Fehniger TA, Caligiuri MA. CD56^{bright} natural killer cell subsets: Characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand[J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(2): 354-60.
- [3] Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, *et al.* Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets[J]. *J Immunol*, 1998, 161(1): 400-408.
- [4] Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, *et al.* Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: Implications for the Innate Immune response[J]. *J Immunol*, 1999, 162(8): 4511-4520.
- [5] Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, *et al.* Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset[J]. *Blood*, 2001, 97(10): 3146-3151.
- [6] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA, *et al.* The biology of human natural killer-cell subsets[J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(11): 633-640.
- [7] Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells[J]. *Blood*, 1996, 87(7): 2632-2640.
- [8] Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, *et al.* Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34⁺ human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15[J]. *Blood*, 1998, 92(10): 3647-3657.
- [9] Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function[J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 57-63.
- [10] Peritt D, Robertson S, Gri G, *et al.* Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets[J]. *J Immunol*, 1998, 161(11): 5821-5824.
- [11] 梁淑娟, 张彩, 魏海明, 等. NK 细胞功能亚群“NK1 和 NK2”的初步验证[J]. *中国医学科学院学报*, 2001, 23(2): 132-136.
- [12] Loza MJ, Perussia B. Final steps of natural killer cell maturation: A model for type 1-type 2 differentiation[J]? *Nat Immunol*, 2001, 2(10): 917-924.
- [13] Vitolo D, Vujanovic NL, Rabinowich H, *et al.* Rapid IL-2-induced adherence of human natural killer cells expression of mRNA for cy-

tokines and IL-2 receptors in adherent NK cells[J]. J Immunol, 1993, 151(4): 1926-1937.

- [14] Vujanovic NL, Rabinowich H, Lee YJ, *et al.* Distinct phenotypic and functional characteristics of human natural killer cells obtained by rapid interleukin-2 induced adherence to plastic[J]. Cell Immunol, 1993, 151(1): 133-157.
- [15] Vujanovic NL, Yasumura S, Hirabayashi H, *et al.* Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues[J]. J Immunol, 1995, 154(1): 281-289.

[16] Christiansen OB, Mohapeloa HP, Steffensen R, *et al.* Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(9): 4604-4609.

[17] Cella M, Longo A, Ferrara GB, *et al.* NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80[J]. J Exp Med, 1994, 180(4): 1235-1242.

[收稿日期] 2002 - 02 - 01

[修回日期] 2002 - 04 - 01

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0143-01

端粒酶活性、C-erbB-2 的表达及对乳癌早期癌变的诊断价值

邱晓光¹, 李双兰¹, 蒲庆田², 郭丽霞¹(1. 邯郸医学高等专科学校, 河北 邯郸 056002; 2. 峰峰矿务局第一医院)

C-erbB-2 是人类乳腺癌中较常见的易激活的癌基因, 端粒酶激活是保持染色体稳定、维持肿瘤细胞生长增殖、获得永生的重要因素。其中也涉及到它们对其早期诊断及预后评价方面的研究, 但结果尚不理想, 我们应用免疫组化方法, 对乳腺囊性增生及乳腺良、恶性肿瘤分别进行了检测, 旨在探讨它们在乳腺肿瘤发生发展中的作用及意义。

收集 1997 ~ 2001 年经手术切除、病理证实的乳腺囊性增生 15 例, 年龄 25 ~ 40 岁; 乳腺纤维瘤 15 例, 年龄 18 ~ 37 岁; 癌前病变 15 例, 年龄 30 ~ 45 岁; 乳腺癌 128 例, 年龄 25 ~ 70 岁, 其中浸润性导管癌 52 例, 浸润性小叶癌 19 例, 单纯癌 14 例, 髓样癌 12 例, 实性癌 9 例, 导管内癌 7 例, 腺癌 7 例, 派杰病 2 例, 硬癌 2 例, 髓样癌伴大量淋巴细胞浸润 1 例, 黏液腺癌 2 例, 乳腺小叶原位癌 1 例, TNM 分期: I 期 19 例, II a 期 34 例, II b 期 23 例, III a 期 32 例, III b 期 14 例, IV 期 6 例。腋淋巴结阳性者 72 例, 淋巴结转移率 56.25%。

全部标本均经福尔马林固定, 石蜡包埋, 制成石蜡切片, 用与 HE 染色及组织化学测定 C-erbB-2 检测试剂盒, 其一抗为小鼠抗人 C-erbB-2 的单克隆抗体, 显色系统采用 LAB-SA (即 SP) 方法, 用不加一抗的切片作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照, DAB 染色, 苏木素复染。端粒酶检测试剂盒, 其操作及结果判断均按试剂盒说明进行。结果 C-erbB-2 阳性反应显棕黄色颗粒表达位于细胞膜上, 端粒酶阳性对照, 采用该试剂盒提供的人胚肾细胞系 293, 其 $A_{450} > 1.5$; 阴性对照: 其 $A_{450} < 0.25$; 标本检测: A_{450} -阴性对照 $A_{450} > 0.2$ 者为端粒酶表达阳性。

在 15 例乳腺囊性增生组织中, 未见端粒酶及 C-erbB-2 的表达; 而在 15 例乳腺纤维瘤中, 则有 4 例呈端粒酶阳性表达 (26.66%); 15 例癌前病变中端粒酶表达阳性者 7 例 (46.67%)。C-erbB-2 表达阳性者 5 例 (33%), 原发乳腺癌的端粒酶表达阳性率则高达 86.72%, 在原发乳腺癌中 C-erbB-2 蛋白表达与年龄、期别无关 ($P > 0.05$), 但与腋下淋巴

结转移阳性率有关。72 例腋下淋巴结阳性者, C-erbB-2 阳性率为 55.65%; 56 例阴性者, 阳性率仅 30.35%, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 而端粒酶的表达与期别及淋巴结转移均有关 ($P < 0.01$)。

在 173 例患者中, 良性增生 15 例, 其端粒酶及 C-erbB-2 蛋白表达均呈阴性, 提示二者在良性增生里均无表达。乳腺纤维腺瘤 15 例, C-erbB-2 蛋白表达均阴性, 而端粒酶表达有 4 例呈阳性, 其中 18 岁 2 例, 19 岁 1 例, 20 岁 1 例, 可能与青春期体内激素失衡有关, 具有可逆性。

本研究中, 癌前病变有 15 例, 其中端粒酶表达阳性率为 46.67%。C-erbB-2 表达阳性率为 33.33%。二者在乳腺癌前病变中的表达, 可能早于形态学变化, 是否在基因突变时就已存在表达, 值得进一步探讨。另外, 腋淋巴结阳性组织的端粒酶表达及 C-erbB-2 表达均高于阴性组, 有显著差别 ($P < 0.01$)。端粒酶的表达还与乳癌的分期有关, 临床 I 期乳腺癌的端粒酶阳性率 (63.16%) 明显低于 II 期以上 (93.87%) ($P < 0.01$)。端粒酶还与乳腺的组织学分级、体积有关。

上述资料表明, 端粒酶及 C-erbB-2 癌基因蛋白在乳腺癌细胞中均有表达, 表达率随淋巴结转移而升高。而在乳腺良性疾病中无表达, 因此可用来鉴别良、恶性肿瘤。特别值得注意的是它们在癌前病变中均有表达, 提示二者的表达有可能早于形态学变化。联检对乳癌的早期诊断具有重要的价值, 对临床乳腺癌的早期诊断具有重要的意义。要我们作更深入、更广泛的研究。

[关键词] 端粒酶; 乳腺肿瘤; C-erbB-2 癌基因

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] D

[收稿日期] 2001 - 10 - 19

[修回日期] 2002 - 02 - 20

[基金项目] 本文为河北省科委基金资助项目 (NO-012761112D)