

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.012

低氘水对肺癌细胞增殖的抑制作用及其可能的机制

丛峰松^{1*}, 张亚茹¹, 王菊勇², 石中媛¹ (1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 上海中医药大学附属龙华医院 肿瘤科, 上海 200032)

[摘要] 目的: 初步探讨低氘水(deuterium-depleted water, DDW)在体内外对人肺癌细胞增殖的抑制作用及其可能机制。方法: MTT法检测DDW对肺癌A549细胞和正常人胚肺成纤维细胞HLF-1增殖的抑制作用, TUNEL法检测A549细胞凋亡情况, 流式细胞仪检测细胞周期的变化。建立BALB/c裸鼠人肺癌H460细胞移植瘤模型, 低氘水饮用60 d后观察裸鼠移植瘤的生长情况。结果: 与对照组比较, 培养10 h时体积分数为0.0025%、0.0050%和0.0105%的DDW对A549细胞增殖具有显著抑制作用($P < 0.05$), 随后抑制作用消失, 48 h后又逐渐出现抑制现象, 72 h抑制作用显著($P < 0.05$); 相同条件下不同体积分数的DDW对正常人胚肺成纤维细胞HLF-1无显著抑制作用。TUNEL染色显示, 0.005% DDW作用后A549细胞出现凋亡, 凋亡率显著高于对照组细胞($25.38 \pm 3.90\%$ vs $10.87 \pm 1.11\%$), $P < 0.05$ 。流式细胞仪检测显示, DDW作用后A549细胞S期细胞显著增加($P < 0.05$)。人肺癌细胞H460移植瘤裸鼠饮用DDW后, 能够明显提高裸鼠的生活质量, 抑瘤率达30.08%。结论: DDW对肺癌细胞增殖的抑制作用仅限于一定的剂量范围, 且具有波动性和时段性的特点; 其机制可能与诱导肺癌细胞S期阻滞和细胞凋亡有关。

[关键词] 低氘水; 肺肿瘤; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0484-06

Inhibitory effect of deuterium-depleted water on proliferation of lung carcinoma cells and the possible mechanism

CONG Feng-song¹, ZHANG Ya-ru¹, WANG Ju-yong², SHI Zhong-yuan¹ (1. College of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of deuterium-depleted water (DDW) on the proliferation of human lung carcinoma cells, and to explore the possible mechanism. **Methods:** The inhibitory effect of DDW on the proliferation of human lung carcinoma A549 cells and human embryonic lung fibroblast HLF-1 cells was examined by MTT assay; apoptosis of A549 cells was examined by TUNEL; and cell cycle was analyzed by flow cytometry. Mouse model of lung carcinoma was established by inoculating human lung carcinoma H460 cells into BALB/c nude mice, and the growth of implanted tumors was observed after DDW treatment for 60 d. **Results:** Compared with control group, A549 cells treated with 0.0025%, 0.0050% or 0.0105% DDW showed significantly decreased proliferation 10 h after treatment ($P < 0.01$). Then the inhibitory effects of DDW gradually disappeared, but appeared 48 h later again, with the inhibitory effects at 72 h being significant ($P < 0.05$). DDW at the same dosages showed no inhibition on the proliferation of HLF-1 cells ($P > 0.05$). TUNEL assay verified the apoptosis of DDW-treated A549 cells, and the apoptosis rate of DDW-treated A549 cells was significantly higher than that of control group ($45.30 \pm 4.21\%$ vs $22.25 \pm 0.30\%$, $P < 0.01$). Cells in S phase were significantly increased in DDW-treated A549 cells compared with those in the control group ($P < 0.05$). The life quality of H460 cell-inoculated nude mice treated with DDW was greatly improved, with the tumor inhibition rate being 30.08%. **Conclusion:** DDW can inhibit the proliferation of lung cancer cells within a certain range of dosage and in a fluctuating pattern; its mechanism might be associated with induction of apoptosis and cell cycle arrest in S phase of tumor cells.

[基金项目] 上海交通大学博士基金。Supported by the Postdoctor Foundation of Shanghai JiaoTong University

[作者简介] 丛峰松(1970-), 男, 山东省莱阳市人, 博士, 副教授。主要从事氘生物学效应方面的研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: fscong@sjtu.edu.cn

[**Key words**] deuterium-depleted water; lung neoplasms; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 484-489]

水(H_2O)由2个氢原子和1个氧原子组成,氢原子有3个核素:质量为1的氢(H),也称“气”,与氧原子元素结合生成轻水(H_2O);质量为2的重氢(D),也称氘,与氧元素结合生成重水(D_2O);质量为3的超重氢(T),也称氚,它含量极微,可忽略不计。普通水中,氘和气的比率(D/H)大约是1:6 600,即水中氘的体积分数为0.015%^[1]。通常,把氘体积分数低于0.015%的水称为低氘水(deuterium-depleted water, DDW)。

氘和氚由于质量不同导致氢的这两种稳定核素之间物理和化学性质的不同^[2-3]。在生物体内,用氘代替氢产生的核素效应早期已有论述^[4-5]。早期研究发现,饮用25%~30%重水可以提高腹水瘤存活期^[6],服用30%重水的小鼠接受⁶⁰Co辐射的致死率相对于对照组有明显减少^[7]。然而过高浓度的重水会显著减少小鼠的存活时间,甚至导致小鼠死亡^[8-9]。Gross等^[10]发现,高浓度的重水会导致有丝分裂过程的停滞。由于高浓度重水会给人体带来不良反应,限制了它在临床上的使用。

到目前为止,对低氘水研究很少。最早Somlyai等^[11]报道,低氘水可以抑制小鼠成纤维L929细胞的生长速率和引起移植瘤小鼠肿瘤组织消退。俄罗斯研究人员最近^[12-14]发现,如果把普通水中氘的体积分数减少65%,就会表现出一定的抗肿瘤特性,能抑制肿瘤生长,延长小鼠存活期。本研究拟采用体外细胞培养和裸鼠移植瘤模型观察低氘水对人肺腺癌细胞增殖的抑制作用和对移植瘤裸鼠存活的影响,探讨低氘水上述作用可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和实验动物

低氘水(体积分数为0.0025%、0.0050%、0.0105%)由上海池天超轻水生物工程有限公司提供。胎牛血清购自杭州四季清公司,MTT试剂盒购自南京凯基生物有限公司,RPMI 1640培养基购自GIBCO公司, α -MEM(含RNA和DNA)购自吉诺公司。人肺腺癌细胞株A549、H 460和人胚肺成纤维细胞HLF-1购自于中国科学院上海细胞研究所TUNEL。细胞原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。流式细胞仪(2000FCA)为美国BD公司产品。

BALB/c裸鼠,雄性,(20 ± 2)g,购自中国科学

院上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物合格证号SCXK(沪)2003-0003],饲养于上海龙华医院实验中心SPF级动物房。

1.2 细胞培养

A549细胞在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液、5% CO_2 、37℃条件下培养。HLF-1细胞培养在含10%胎牛血清的 α -MEM培养液、5% CO_2 、37℃条件下培养。DDW实验组细胞加入6 ml由低氘水(体积分数为0.0025%、0.0050%、0.0105%)配置的培养液,置37℃培养箱中培养。对照组为正常RPMI 1640培养液培养的细胞。

1.3 MTT法检测肿瘤细胞的增殖活性

利用MTT试剂盒对细胞增殖进行测定。A549细胞(1×10^4 个细胞/孔)、HLF-1细胞(5×10^3 个细胞/孔)接种96孔培养板中,每孔100 μ l,设3个复孔,分别培养2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、24、48、72 h后,每孔加入50 μ l MTT溶液继续培养4 h,吸去培养液,每孔加150 μ l DMSO,振荡10 min,选择550 nm波长,测定各孔的光密度(D)值。结果取3次实验平均值。计算DDW对细胞的增殖抑制率,抑制率(%)=(1-实验组D/对照组D)×100%。

1.4 TUNEL法检测A549细胞的凋亡率

收集用0.005%低氘水培养液培养48、72 h的A549细胞,以正常培养液培养A549细胞作为对照组,用DNase I反应液处理的A549细胞作为阳性对照。按照试剂盒说明处理细胞。光学显微镜观察,细胞核内出现棕色颗粒或细胞质内因核DNA溢出有棕色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。每张片子随机计数200个细胞,计算凋亡率。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

A549细胞在0.005%低氘水培养液中培养10、72 h后,胰酶消化并收集细胞。用95%乙醇固定,PBS清洗1次,离心1 000 $\times g$,5 min,弃上清。加PBS再清洗1次,弃上清。加入1 ml RNase A,37℃水浴10 min,离心1 000 $\times g$,5 min,弃上清;再加1 000 μ l PI染色,经60目尼龙网筛过滤,4℃避光20 min后,立即上机分析。

1.6 肺癌细胞移植瘤动物模型的建立及分组

将裸鼠随机分为2组,每组8只。对照组自由饮用灭菌后的正常饮用水,DDW组自由饮用0.005%低氘水。14 d后将人肺癌细胞H460的密度调至 1×10^7 /ml,以0.2 ml(含细胞 2×10^6 个)注

射于裸鼠右腋部皮下,即完成肿瘤接种。

1.7 饮用低氧水对移植瘤生长抑制的观察

裸鼠接种瘤细胞后一直观察至饮用 DDW 水第 60 天。荷瘤裸鼠生活质量的观察指标有活动量、反应力、食欲、皮肤色泽等。观察结束后,拉颈椎处死荷瘤裸鼠,剥取皮下实体瘤瘤块,剔除筋膜,用电子天平分别称重。计算各组瘤重和抑瘤率。

抑瘤率(%)=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重×100%。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件包进行数据分析,组间比较采用方差分析,两组间的差异比较采用 *q* 检验分析。

2 结果

2.1 DDW 对 A 549 细胞增殖的抑制

MTT 法检测 DDW 对 A549 细胞增殖作用结果显示:与对照组比较,DDW 组培养 10 h 时,体积分

数为 0.0025%、0.0050% 和 0.0105% 的低氧水对 A549 细胞抑制率分别为 29.61%、31.07%、30.10%,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1A, 1B, 1C)。随着时间推移,该抑制作用消失;48 h 后,抑制作用又开始出现,该作用一直维持到 72 h;与对照组比较,体积分数为 0.0025%、0.0050% 和 0.0105% 的低氧水对 A549 细胞抑制率分别为 15.89%、24.77%、13.56%,体积分数为 0.0050% 的低氧水与对照组相比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B)。

2.2 DDW 对人胚肺成纤维细胞 HLF-1 增殖无抑制

MTT 法检测 DDW 对 HLF-1 细胞增殖作用结果显示:DDW 组培养 10 h,体积分数为 0.0025%、0.0050% 和 0.0105% 的低氧水对 HLF-1 细胞的抑制率分别为 2.53%、6.82%、8.38%;培养 72 h 的抑制率分别为 4.64%、4.92%、4.23%;与对照组相比较,增殖抑制的差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

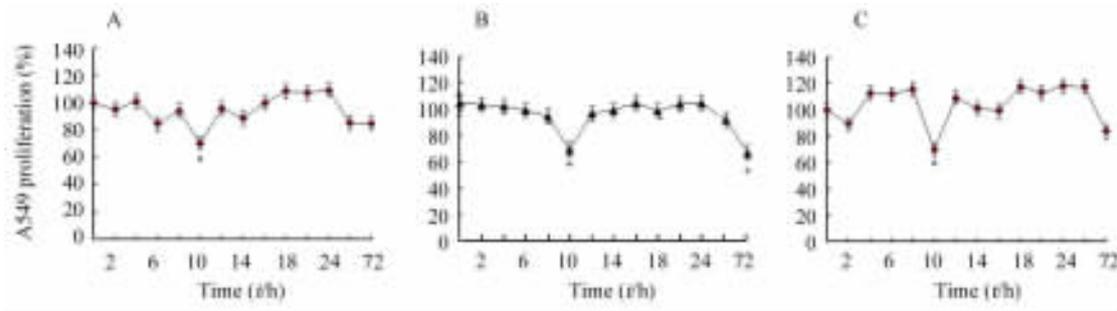


图 1 不同体积分数的低氧水对 A549 细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of different volume fractions of DDW on proliferation of A549 cells

A: 0.0025% DDW; B: 0.0050% DDW; C: 0.0105% DDW; * $P < 0.05$ vs 0 h

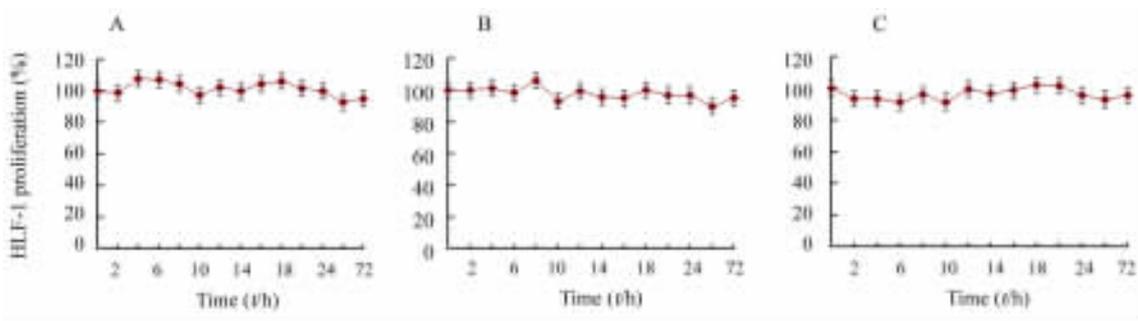


图 2 不同体积分数的低氧水对正常人 HLF-1 细胞增殖的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of different volume fractions of DDW on proliferation of normal human HLF-1 cells

A: 0.0025% DDW; B: 0.0050% DDW; C: 0.0105% DDW

2.3 DDW 对 A549 细胞凋亡的影响

TUNEL 检测显示,0.005% DDW 作用 A549 细胞 48、72 h 后,细胞出现典型的细胞凋亡特征:细胞

体积变小,细胞核内出现棕色颗粒或细胞质内因核 DNA 溢出而有棕色颗粒(图 3)。计算细胞凋亡率,对照组细胞的凋亡率为(10.87 ± 1.11)%,阳性对

照组细胞凋亡率为(46.14 ± 2.82)%, DDW 作用 48 h 的凋亡率为(31.39 ± 2.54)%, 作用 72 h 的凋亡率为(25.38 ± 3.90)%, DDW 作用后显著增加了 A549 细胞的凋亡率($P < 0.05$)。

2.4 DDW 对 A549 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示: A549 细胞在 DDW 诱导后细胞周期发生了明显变化, 与对照组比较, 主要表现为 G_0/G_1 期细胞逐渐减少, 同时 S 期细胞数增加, 而 G_2/M 期细胞数减少。DDW 作用 A549 细胞 10 h, S 期细胞数为(38.47 ± 0.29)%, 作用 72 h 后 S 期细胞数显著增加至(44.03 ± 0.35)%, 与对照组的(32.65 ± 0.78)% 相比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$; 图 4, 表 1)。

2.5 DDW 对荷瘤裸鼠生活质量的影响

模型组裸鼠活动减少, 对外界刺激反应迟钝, 每日进食量有所减少, 喜扎堆, 皮肤光泽度不佳。DDW 组裸鼠活动度可, 对外界刺激反应较敏捷, 每

日进食量可, 皮肤色泽红润, 表明 DDW 组裸鼠的生活质量优于模型组。

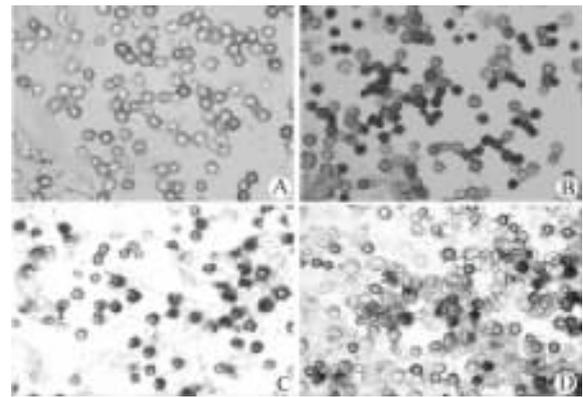


图 3 TUNEL 法检测 DDW 诱导 A549 细胞凋亡(×400)

Fig.3 DDW induced apoptosis of A549 cells as detected by TUNEL (×400)

A: Control A549 cells; B: Positive control cells; C: DDW treated for 48 h; D: DDW treated for 72 h

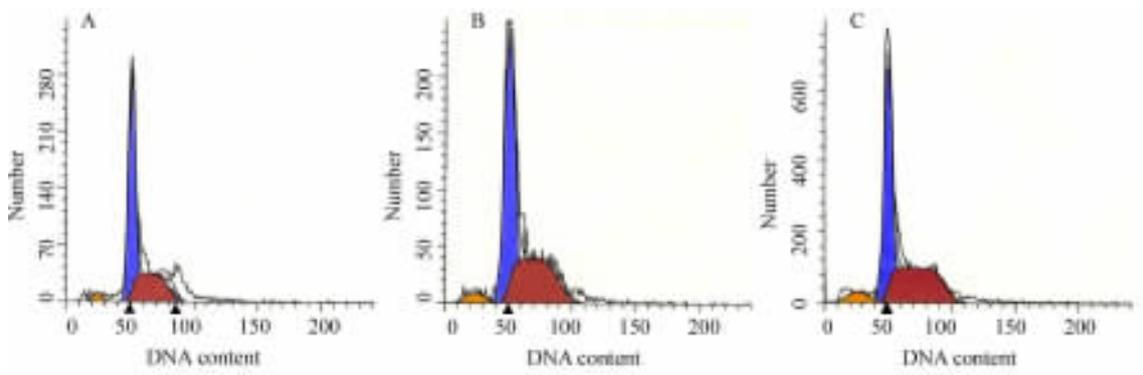


图 4 流式细胞术检测 DDW 对 A549 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of DDW on cell cycle of A549 cells by FCM

A: Control group; B: treatment for 10 h; C: 72 h

表 1 DDW 作用后 A549 细胞周期的改变($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Change of cell cycle of A549 cells after treatment with DDW ($\bar{x} \pm s$)

Time(t/h)	G_0-G_1	S	G_2-M
0	60.11 ± 2.15	32.65 ± 0.78	7.24 ± 1.37
10	58.63 ± 2.40	38.47 ± 0.29*	2.90 ± 0.08*
72	55.23 ± 1.47	44.03 ± 0.35*	0.75 ± 0.01*

* $P < 0.05$ vs 0 h

2.6 DDW 对裸鼠移植瘤的抑制作用

对照组与治疗组各 8 只裸鼠, 60 d 后处死, 剥离移植瘤体称重, 对照组平均瘤重为(10.64 ± 0.83)

g, 治疗组的平均瘤重为(7.36 ± 0.78)g, 治疗组的抑瘤率为 30.08%。结果表明, DDW 具有抑制移植瘤生长的作用。

3 讨论

肺癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 肺癌的病死率已居各种癌症死亡之首, 且以每年 0.5% 的速度在全球递增^[15]。尽管目前化疗方案不断优化组合, 但治疗效果尚欠满意, 患者生存时间也未得到明显提高^[16]。因此, 寻找能够提高治疗效果的药物和方法极为紧迫^[17]。

本研究结果显示, DDW 对肺癌细胞增殖有抑制作用。MTT 法检测结果显示, DDW 对 A549 细胞增

殖的抑制作用最明显是发生在细胞培养开始后的10 h时,且不同氘体积分数的DDW对A549细胞增殖均具有明显抑制作用,随后抑制作用消失,48 h后又逐渐出现抑制现象,72 h时,体积分数为0.005%的DDW对A549细胞增殖抑制的差异具有统计学意义。在同样作用条件下,DDW对正常细胞胚肺成纤维细胞HLF-1细胞的生长无显著抑制。结果提示,DDW对肺癌细胞增殖作用有一定的特点:作用剂量仅限于0.0025%~0.0105%的体积分数范围;抑制效应有波动性和时段性,10 h左右为抑制高峰,以后作用消失,至72 h时又出现第2个抑制峰。

20世纪90年代,有学者提出氘的自然丰度能引发并且维持细胞的正常增殖。研究者^[11]用体积分数0.003%低氘水培养基培养L929细胞,发现氘元素对细胞分裂是至关重要的,细胞分裂的迟滞期长于5~10 h。植物发芽实验^[18]表明,低氘水的抑制作用最明显的是在植物发芽开始后的5~6 d。10~20 d观察不到初期所见到的效果。研究者^[19]还用海藻的叶状体观察低氘水对植物细胞的影响,发现将叶状体置于含有低氘水的培养基内,在最初的30 min,对植物细胞的呼吸作用、光合作用、细胞内外膜电位以及pH变化都显示了同样的状况:植物表现出置于黑暗时的生理状态,细胞的呼吸作用变得活跃,光合作用停止,细胞内pH呈现碱性而细胞外pH则偏向于酸性;这些效应在处理后的30 min内显现,然后逐渐消失^[19]。这些特殊的实验现象与本研究观察到的DDW作用特点十分相似。事实表明,细胞分裂对氘浓度的变化很敏感,自然丰度氘的存在是细胞分裂所必需的。推测很可能在细胞(包括植物和动物)中存在着识别氘浓度变化的机制。细胞周期调控系统能识别D/H比率的变化,当这个比率达到一定的域值后,引发细胞分裂。当细胞在低氘水的细胞培养液中,低浓度的D含量,延缓细胞到达所需的D/H阈值,表现出生长抑制作用。然而,高等动植物经过几百万年的进化,体内的调节系统是很完善。氘浓度变化会引起细胞应激反应,细胞通过自身的调节机制会很快适应低氘环境。比如低氘水培养的海藻细胞质膜上的H⁺-ATPase活性化,排出H⁺,从而影响细胞的D/H比率,调节细胞的生长。

细胞凋亡是通过启动细胞自身内部死亡机制而产生的一种细胞死亡方式。许多抗肿瘤药物正是通过诱导细胞特异性的凋亡,达到治疗肿瘤的目的。本研究发现,A549细胞在DDW作用10小时后明显

被阻滞在S期,从而抑制细胞增殖。TUNEL法检测结果表明,DDW作用48 h后,A549细胞的凋亡率明显增加。提示DDW抑制A549细胞增殖作用中有凋亡机制的参与。DDW可能是通过诱导细胞S期阻滞和肿瘤细胞凋亡抑制癌细胞的恶性生长。DDW促进凋亡信号转导途径的分子机制还需进一步研究。

尽管肿瘤细胞和正常细胞一样对氘浓度变化也表现出适应性,但很可能由于肿瘤细胞有更高的生长速率需要消耗更多的氘^[20],最终观察到DDW不仅在体外可以抑制肿瘤细胞生长,诱导肺癌细胞发生凋亡,在体内也能抑制肿瘤生长,改善移植瘤裸鼠的生活质量,这为低氘水用于肺癌的辅助治疗提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Yurtsever Y, Gat JR. Stable Isotope Hydrology (JR Gat and R Gonfiantini, Eds.) [M]. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1981, 103-142.
- [2] Collins CJA, Bowman NS (Eds): Isotope Effects in Chemical Reactions [M]. Van Nostrand Reinhold, New York, 1971.
- [3] Winberg KB. The deuterium isotope effect [J]. Chem Rev, 1955, 55: 713-43.
- [4] Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (Eds). Stable Isotopes in Ecological Research [M]. Springer, New York, 1988.
- [5] Katz JJ, Crespi HL. Isotope effects in biological systems. In: Isotope Effects in Chemical Reaction, Collins CJ and Bowman NS (eds) [M]. 286-363. New York: Van Nostrand Reinhold, 1970.
- [6] Hughes AM, Tolbert BM, Lonberg-Holm K, et al. The effect of deuterium oxide on survival of mice with ascites tumor [J]. Biochim Biophys Acta, 1958, 28(1): 58-61.
- [7] Laissue JA, Bally E, Joel DD, et al. Protection of mice from whole-body gamma radiation by deuteration of drinking water [J]. Radiat Res, 1983, 96(1): 59-64.
- [8] Katz JJ, Crespi HL, Czajka DM, et al. Course of deuteration and some physiological effects of deuterium in mice [J]. Am J Physiol, 1962, 203(5): 907-913.
- [9] Katz JJ, Crespi HL, Hasterlik RJ. Some Observations on Biological Effects of Deuterium with Special Reference to Effects on Neoplastic Processes [J]. J Nat Cancer Inst, 1957, 18(5), 641-659.
- [10] GweEross PR, Spindel W. Heavy water inhibition of cell division: an approach to mechanism [J]. Ann N Y Acad Sci, 1962, 90: 500-522.
- [11] Somlyai G, Jancsó G, Jákli G, et al. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells [J], FEBS, 1993, 317(1-2): 1-4.
- [12] Siniak IuE, Turusov VS, Grigorev AI, et al. Consideration of the deuterium-free water supply to an expedition to Mars [J]. Aviako-

- sm Ekolog Med, 2003, 37(6): 60-63.
- [13] Turusov VS, Siniak IuE, Grigor'ev AI, *et al.* Low-deuterium water effect on transplantable tumors [J]. *Vopr Onkol*, 2005, 51(1): 99-102.
- [14] Tyrysov VS, Siniak IuE, Antoshina EE, *et al.* The effect of preliminary administration of water with reduced deuterium content on the growth of transplantable tumors in mice [J]. *Vopr Onkol*, 2006, 52(1): 59-62.
- [15] Carney DN. Lung Cancer-Time to Move on from Chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346: 126-128.
- [16] Nishio K, Nakamura T, Koh Y, *et al.* Drug resistance in lung cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 1999, 11(2): 109-115.
- [17] Swisher S, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for lung cancer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2002, 11(1): 521-535.
- [18] Somlyai G. Defeating cancer ! The biological effect of deuterium depletion [M]. Raminu Valcea, Romania: Conphys, 2001.
- [19] Laskay G, Somlyai G, Jancsó G, *et al.* Reduced deuterium concentration of water stimulates O₂-uptake and electrogenic H⁺-efflux in the aquatic macrophyte elodea Canadensis [J]. *Jpn J Deuterim Sci*, 2001, 10(1):17-23.
- [20] Berdea P, Cuna S, Cazacu M, *et al.* Deuterium variation of human blood serum [J]. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Physica, Special Issue*, 2001, 256-258.
- [收稿日期] 2009-06-03 [修回日期] 2009-08-29
- [本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

转录因子 ROR γ t 对肠道和皮肤中 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞发育和功能的影响

NK 细胞存在不同的功能亚群虽然已知人和小鼠的肠道、皮肤中有 NK 细胞存在,但其具体的细胞亚群及相应功能特征尚未可知。为探讨这一问题,论文作者首先通过组织免疫荧光确认在人和小鼠的肠道固有层和皮肤的真皮层中存在 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞,通过表型分析证明该淋巴细胞不是 T、B 淋巴细胞,而是表达多种 NK 细胞表面受体的 NK 细胞群;进一步功能检测发现,真皮中的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞与肠道中的该细胞群不同;真皮中 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞的表面分子表达与常规 NK 细胞类似,但是在功能方面具有未成熟 NK 细胞的特点,即较弱的分泌细胞因子和杀伤效应以及较强的增殖活性;而肠道中的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞表达 CD127,但在功能方面既没有成熟 NK 细胞的效应功能又没有未成熟 NK 细胞较高的增殖活性。为了进一步研究肠道中的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞,该研究仔细分析其表型特征,发现定居于肠道隐窝小结中的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞与淋巴组织诱导 (LTi) 细胞类似,表达 CD127 和 c-Kit,基因芯片检测发现该细胞亚群表达多种 LTi 细胞表达的基因,诸如 DR5、TNFR1、DR3、TRANCE、LIGHT、OX40L、CD30L、4-1BBL 及 CCR7 等。已知 LTi 细胞的发育依赖于 ROR γ t。存在于此隐窝集结部位的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞也表达 ROR γ t,并且 NKp46⁺ ROR γ t⁺ 细胞在整个隐窝小结淋巴细胞中占 (14 ± 4)%。根据 ROR γ t 表达与否,作者发现肠道中的 NKp46⁺ CD3⁻ 细胞可分为两个亚群,一个为 NKp46⁺ CD3⁻ NK1.1⁺ CD127⁺ 的未成熟的 NK 细胞亚群,另一个为高分泌 IL-22 的 NKp46⁺ CD3⁻ NK1.1^{lo} ROR γ t⁺ 的细胞亚群。

以往研究证明 IL-22 能够维持肠道黏膜层的结构和稳定性,在预防感染抵御病原体入侵方面发挥重要作用,但是其具体细胞来源尚不清楚。该研究不仅发现并鉴定出 NK 细胞的一个新亚群,而且提供了肠道 IL-22 的主要细胞来源,同时在表型分析、基因鉴定及功能研究等多个方面证明该细胞亚群与 NKp46⁺ ROR γ t⁺ 的 LTi 细胞之间存在密切的关系。

在同期和 2008 年 12 月份的 *Immunity* 上还分别有两篇类似的文章,分别确认了具有特异性分泌 IL-22 的 NKp46⁺ ROR γ t⁺ 细胞,并且表明在无菌级小鼠体内此类细胞的绝对和相对数量都明显降低,只有少量的 IL-22 产生;加入 IL-22 抗体或 NK1.1 抗体或敲除 ROR γ t,具有维持上皮微环境稳定和修复功能的 Reg III β 和 Reg III γ 表达均明显降低,但将正常的微生物菌丛移植到无菌级小鼠体内后,NKp46⁺ ROR γ t⁺ 细胞会恢复到正常水平,并且 Reg III β 和 Reg III γ 表达也恢复到正常值。因此共生的微生物菌丛促进产生 IL-22 的此类细胞的分化,从而维持了黏膜微环境的稳定。

2009 年 2 月份发表于 *Nature* 上一篇文章也报道了在扁桃体和派氏淋巴集结部位的黏膜相关的淋巴组织 (MALT) 中存在能分泌 IL-22、IL-26 和 LIF 的 NKp44⁺ 的 NK 细胞亚型,并命名为 NK-22 细胞。通过分泌的因子、刺激上皮细胞增殖、分泌 IL-10、表达促有丝分裂和抗凋亡分子的检测,发现在细菌感染小鼠的 MALT 中也有 NK-22 细胞亚群存在。因此认为,NK-22 细胞亚群在抑制炎症和维持黏膜内环境稳定方面起着重要的作用。

这些研究都提示在肠黏膜组织中存在以分泌 IL-22 为主要特征的 NK 细胞亚群,该细胞能强烈抑制炎症发生,维持黏膜内环境的稳定,为进一步研究 NK 细胞在肠道感染免疫中的作用及其发育提供了重要线索。

[高强国 摘译,韩岩梅 审阅. *Luci C, Reynders A, Ivanov II, et al. Nat Immunol*, 2009, 10(1): 75-82]