

CD133⁺皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖与自我更新和转移能力

汪思桦, 许锐, 何诗敏, 韩建德, 陈木开
(中山大学附属第一医院皮肤科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究CD133阳性亚群在皮肤鳞状细胞癌(cSCC)的生物学特性,以探讨cSCC的肿瘤干细胞(CSC)自我更新和促进cSCC恶性行为的机制。【方法】采用流式分选皮肤鳞状细胞癌Colo-16细胞系中CD133⁺(阳性群体)和CD133⁻(阴性群体)细胞,应用四甲基偶氮唑盐检测两群细胞的增殖活性;体外成球实验检测二者自我更新能力的差异;Transwell法检测细胞浸润能力;应用Western Blot和荧光定量PCR方法检测CD44、SOX2等肿瘤干细胞特性(干性)相关基因在两群细胞中的表达情况;免疫组化了解日光性角化病、鲍温病和cSCC组织中CD133的表达情况。【结果】CD133⁺Colo-16细胞表现出了显著更强的体外增殖、自我更新和浸润能力($P<0.05$);CD133⁺细胞中干性相关基因CD44、SOX2和OCT4的蛋白表达及对应的mRNA转录水平均高于CD133⁻细胞($P<0.05$);另外,CD133在日光性角化病、鲍温病和cSCC组织中表达呈逐步上调趋势。【结论】CSC的分子标记CD133的表达与肿瘤细胞的增殖、自我更新和浸润等恶性特征相关,CD133阳性cSCC细胞具有CSC干性。cSCC的发生发展可能与表达CD133阳性的CSC有关。

关键词:皮肤鳞状细胞癌;CD133;肿瘤干细胞

中图分类号:R76 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)02-0220-07

Proliferation, Self-renewal and Metastasis Ability of CD133⁺ Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma

WANG Si-hua, XU Rui, HE Shi-min, HAN Jian-de, CHEN Mu-kai

(Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: CHEN Mu-kai, E-mail: chenmuk@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To observe the biological characteristics of CD133 positive cells derived from cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), and to investigate the mechanism of self-renewal of cancer stem cells (CSC) and the malignant behavior in cSCC. 【Methods】The flow cytometry was applied to purify CD133⁺ cells and CD133⁻ from cutaneous squamous cell carcinoma cell line Colo-16. The effects of CD133 on the cell proliferative, self renew and migratory activity of two group cells were detected by MTT assay, Sphere formation assay and Transwell assay. Western blot and quantitative fluorescent PCR were performed to investigate the expression of cancer stem cell associated gene CD44, OCT4 and SOX2 in two groups of cells. Examined the expression level of CD133 in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and cSCC by immunohistochemistry. 【Result】The CD133⁺ Colo-16 cells exhibited significantly stronger proliferation, self-renewal and metastasis ability ($P<0.05$) and present higher level protein and mRNA expression on CD44, SOX2 and OCT4 ($P<0.05$). In addition, the expression level of CD133 was dynamic rise during the continuous evolution of actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and cSCC. 【Conclusions】The expression level of CD133 may be related to the tumorigenesis of cSCC and the malignant behavior including proliferative, self renew and migratory activity, and CD133⁺ cSCC cells show the properties of cancer stem cells. The occurrence and development of cSCC may be related to the CSC, which express CD133.

Key word: cutaneous squamous cell carcinoma; CD133; cancer stem cells

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 220-226]

收稿日期: 2017-12-16

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B080701069)

作者简介: 汪思桦, 硕士研究生, E-mail: wangsixie1211@hotmail.com; 陈木开, 通信作者, 皮肤科副主任医师, 副教授, E-mail: chenmuk@mail.sysu.edu.cn

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, cSCC)是一种来源于表皮角质形成细胞的恶性肿瘤,是第二大最常见的非色素皮肤癌^[1]。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是肿瘤中具有干细胞某些特性的一个细胞亚群,具有自我更新能力、分化潜能、高致瘤性特性^[2];近年国外有研究发现一些皮肤肿瘤包括鳞状细胞癌存在CSC并表达干细胞标记^[3-4]。有研究发现CD133,也称Prominin-1,是多种肿瘤干细胞表面特异性高表达的分子^[5];而我们前期临床研究也提示cSCC表达CSC重要分子标记CD133,并与肿瘤恶性行为特征相关,提示cSCC发生和发展与CSC有关^[6]。为进一步研究cSCC发生和发展与肿瘤干细胞特性(干性)相关性,本研究通过对人皮肤鳞状细胞癌细胞系Colo-16细胞进行CD133⁺与CD133⁻细胞群的分离纯化和体外培养,观察其增殖、自我更新和浸润等情况;了解日光性角化病、鲍温病和cSCC这演变过程中CD133在组织中表达情况,从而分析皮肤鳞状细胞癌CD133阳性亚群的体外特性以及其在肿瘤发生发展中的作用,以初步探讨cSCC的CSC自我更新和促进cSCC恶性行为的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人cSCC Colo-16细胞株购于美国模式培养物集存库(ATCC);胎牛血清、RPMI1640培养基(美国Gibco公司);人表皮生长因子(EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国PeproTech公司);Transwell小室(美国Corning公司);CD133鼠抗人单克隆抗体及CD133-PE流式抗体(德国Miltenyi公司),结晶紫、四甲基偶氮唑盐(dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、兔抗人抗体CD133、CD44、SOX2和鼠抗人抗体OCT4、 α -Tubulin一抗均购于美国Sigma公司。

1.2 细胞培养和分选

将Colo-16细胞置于体积分数为10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,并于37℃、体积分数为5%的CO₂细胞培养箱中培养。观察细胞生长情况,细胞长满至80%后进行消化传代。将Colo-16细胞重悬,调整浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,并用PE标记的兔抗人CD133单克隆抗体孵育细胞30 min,利用

流式细胞仪(美国贝克曼公司)检测其表达率为 $(34.23 \pm 0.89)\%$ 。利用流式细胞分选仪分选出荧光强度最高10%及最低10%的两群细胞。分选后重新鉴定,其中高表达群体CD133和低表达群体CD133表达率分别为 $(96.54 \pm 0.67)\%$ 和 $(5.58 \pm 0.56)\%$ 。

1.3 细胞体外增殖

将CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞接种在96孔板上(1000个细胞/孔),每组取3个复孔,常规培养基培养,隔天换液。于接种后24、48、72、96、120 h分别对各组细胞的增殖情况进行检测,每组每孔加入20 μL MTT溶液(5 g/L),继续培养4 h后吸弃孔内液体,每孔加入100 μL DMSO,混匀10 min后用酶联免疫检测仪记录490 nm的吸光度值,描绘体外生长曲线。

1.4 细胞体外成球实验

将CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞接种6孔超低吸附板(2000个细胞/孔),加入含EGF(20 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)和B27(1:50)的无血清1640/F12培养基,置于37℃、5% CO₂浓度的饱和湿度培养箱中培养,培养2周后使用倒置显微镜观察CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞的成球情况,记录其成球数。

1.5 细胞迁移实验

将无血清的RPMI1640培养基对CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞进行重悬,调整细胞浓度,加入到Transwell上室(3000个细胞/室),下室加入体积分数20%胎牛血清的RPMI1640培养基,培养18 h。甲醇固定30 min后,用(1 g/L)的结晶紫染色30 min,冲洗干燥后置于在光学显微镜下进行观察,对穿膜细胞进行计数。

1.6 蛋白免疫印迹实验

按照前期研究报道方法^[7]收集、裂解细胞,提取、测定细胞总蛋白。利用蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测CD133⁺及CD133⁻细胞群体中CD144、CD44、SOX2和OCT4蛋白表达水平。取适量蛋白质上样至常规胶电泳,转膜,封闭。一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜3遍 $\times 15 \text{ min}$,二抗室温孵育2 h,TBST洗膜3遍 $\times 15 \text{ min}$ 。化学发光显色,X线片曝光。

1.7 荧光定量PCR实验

利用逆转录及荧光定量PCR实验检测CD133⁺及CD133⁻细胞群体中CD144、CD44、SOX2、

OCT4基因表达水平。利用Trizol试剂(美国Invitrogen公司)提取细胞总RNA后,利用Primer Premier 5设计引物序列(表1),cDNA第一链合成采用SuperScript™ First-Strand Synthesis System试剂盒(美国Invitrogen公司),按照说明书步骤进行。荧光定量PCR应用使用SYBR Green染料法,按照SYBR Premix Ex Taq荧光定量试剂盒(Applied Biosystems)说明书进行PCR体系配制,反应体系在Light Cycler480实时PCR系统进行,采用两步法进行PCR反应。使用SDS软件自动得出的Ct值计算出相对表达量。

表1 干细胞相关基因表达的引物核苷酸序列

Table 1 Primer sequence of PCR reaction amplification

Genes	Upstream and downstream primer
CD133	5'-CCTCTGGTGGGGGTAATTCCTT-3'
	5'-AGGTGCTGTTTCATGTTCTCC-3'
CD44	5'-GTGATGGCACCCGCTATGTC-3'
	5'-AACCTCCTGAAGTGCTGCTCC-3'
OCT4	5'-ATGCATTCAAAGTGAAGTGCTGCTGC-3'
	5'-CCACCCCTTGTGTCCCAATTCCT-3'
SOX2	5'-CCTCCGGGACATGATCAG-3'
	5'-TTCTC-CCCCCTCCAGTTC-3'
GAPDH	5'-TCGTGGAAGGACTCATGACC-3'
	5'-GCAGATG-GTCGTTGGCTGA-3'

1.8 免疫组化

收集2012-2016年8月在中山大学附属第一医院经病理已确诊的蜡块标本41例,其中正常皮肤组织5例,癌前病变日光性角化病18例、原位癌鲍温病15例、皮肤鳞状细胞癌8例。组织切片后,进行CD133免疫组化染色^[8],Winyard标准判断组织染色结果。

1.9 统计学处理

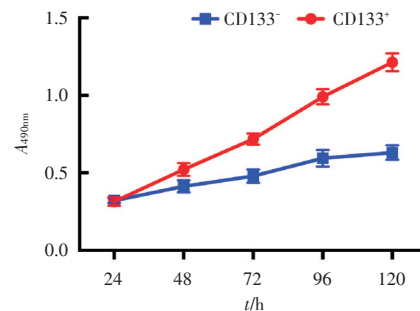
所有数据采用SPSS 16.0进行统计学分析,组间计量资料比较采用*t*检验,多组间比较采用Kruskal Wallis检验。 $P < 0.05$ 为统计学有显著差异性。

2 结果

2.1 CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞增殖能力

与CD133⁻ Colo-16细胞相比,CD133⁺ Colo-16

细胞培养48 h后的吸光度值显著增大($P < 0.05$)。观察细胞体外生长曲线,CD133⁺ Colo-16细胞较为陡峭,CD133⁻ Colo-16细胞较为平缓(图1)。



CD133⁻ vs CD133⁺, $n=3$, $t=5.40$, $P=0.03$

图1 MTT法检测两组细胞的体外增殖能力

Fig.1 Proliferation ability of two group cells was measured by MTT assay in vitro

2.2 CD133⁺ COLO-16细胞和CD133⁻ COLO-16细胞自我更新能力

与CD133⁻ Colo-16细胞相比,CD133⁺ Colo-16细胞形成更多且更大的克隆球,二者球体数量的差异具有统计学意义($P < 0.05$;图2)。

2.3 CD133⁺ COLO-16细胞和CD133⁻ COLO-16细胞浸润能力

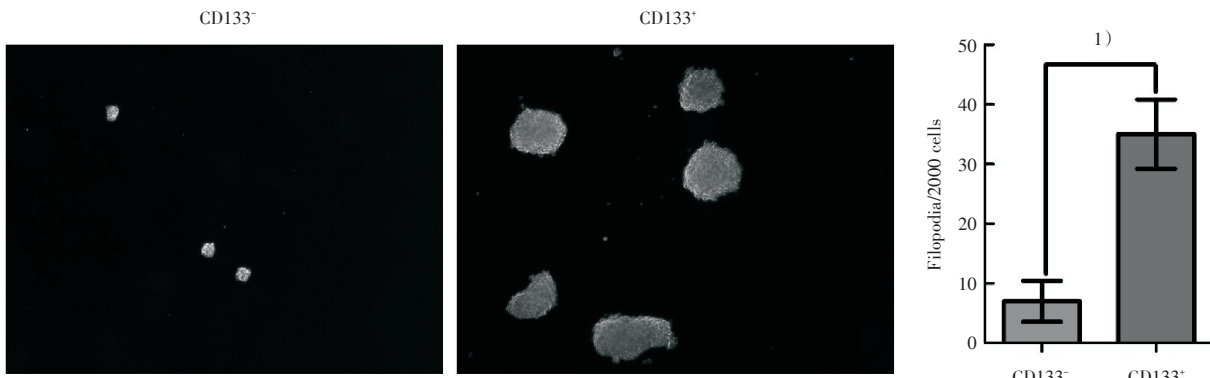
与CD133⁻ Colo-16细胞相比,CD133⁺ Colo-16细胞在18 h内的透膜细胞数量明显增多,二者数量差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

2.4 CD133⁺ Colo-16细胞和CD133⁻ Colo-16细胞干性相关基因的表达情况

应用Western Blot和荧光定量PCR方法对两群细胞上CD44、SOX2和OCT4基因的表达水平进行蛋白和mRNA水平的检测,结果显示CD133⁺ Colo-16细胞CD44、SOX2和OCT4蛋白的表达及其对应的mRNA转录水平均高于CD133⁻ Colo-16细胞(图4),二者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 CD133在日光性角化病、鲍温病和cSCC组织中的表达

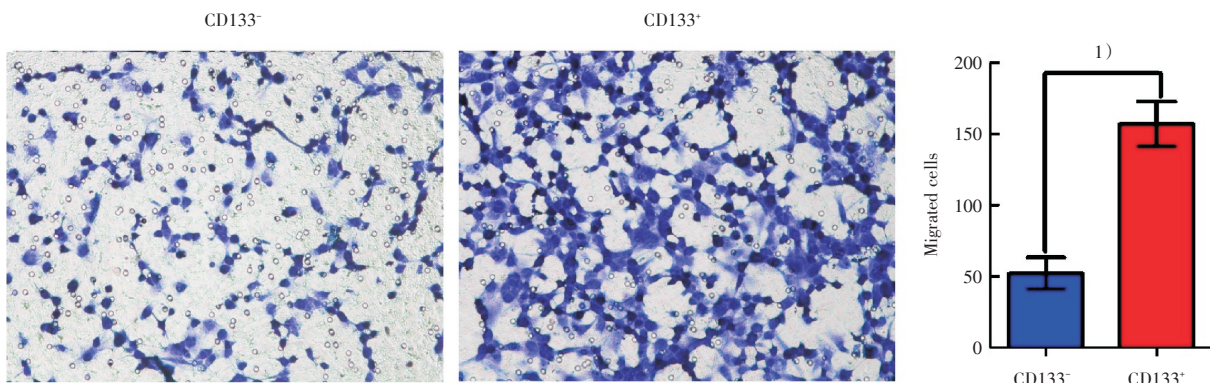
在日光性角化病、鲍温病组织中部分基底层细胞CD133呈现高表达,部分表达可呈克隆性增生样,呈向上层或真皮浅层侵袭(图5),并且在日光性角化病、鲍温病和cSCC组织中表达逐步上调(图6)。免疫组化半定量法分析显示日光性角化病、鲍温病和cSCC阳性细胞的评分计数有增高现象(表2),三组之间CD133表达计数评分的



Original magnification, ×50. CD133⁻ vs CD133⁺, n=7, t=9.14, 1)P=0.00.

图2 成球实验检测两组细胞的体外自我更新能力

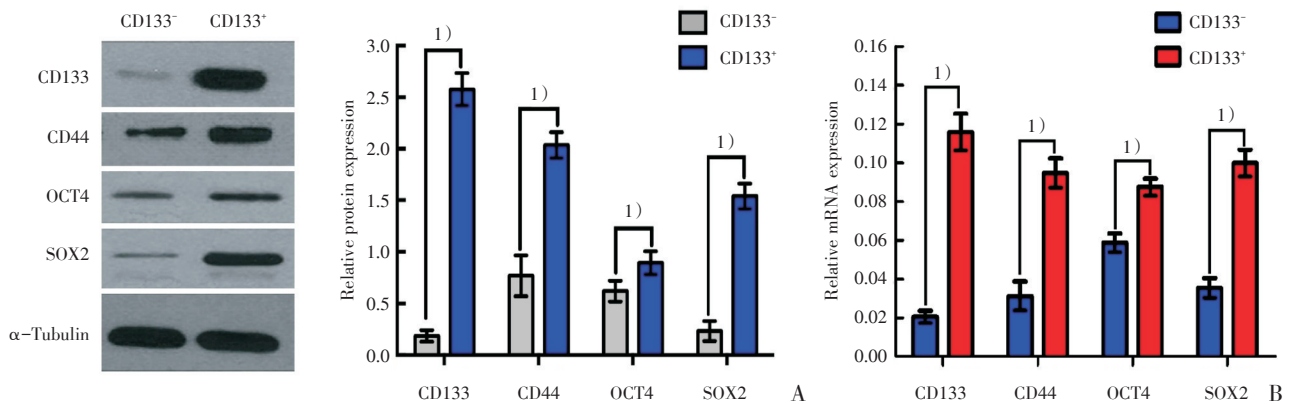
Fig.2 Self renew ability of two group cells was measured by sphere formation assay in vitro



Original magnification, ×200. CD133⁻ vs CD133⁺, n=7, t=9.14, 1)P=0.00.

图3 Transwell 实验检测 2 组细胞的体外浸润能力

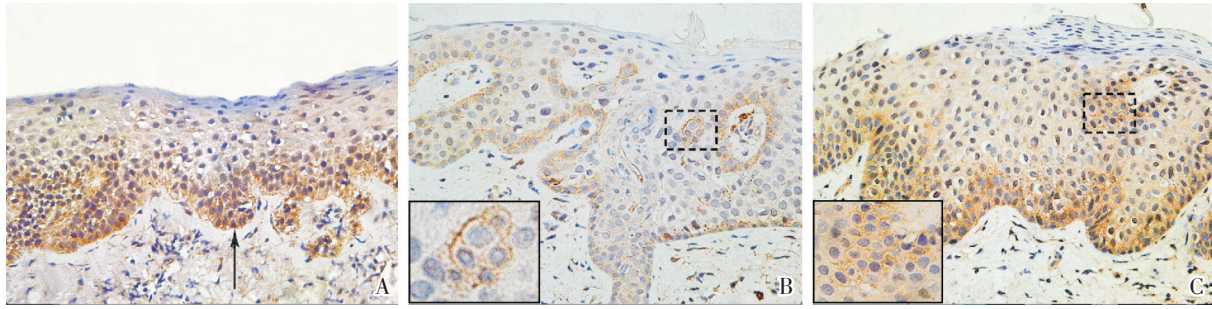
Fig.3 Migrated ability of two group cells was measured by Transwell assay in vitro



A: The protein expression of CD133, CD44, OCT4, and SOX2 in CD133⁻ group and CD133⁺ group, 1)P<0.01; B: The mRNA expression of CD133, CD44, OCT4, and SOX2 in CD133⁻ group and CD133⁺ group, 1)P<0.05.

图4 两组细胞干性相关基因蛋白和 mRNA 的表达情况

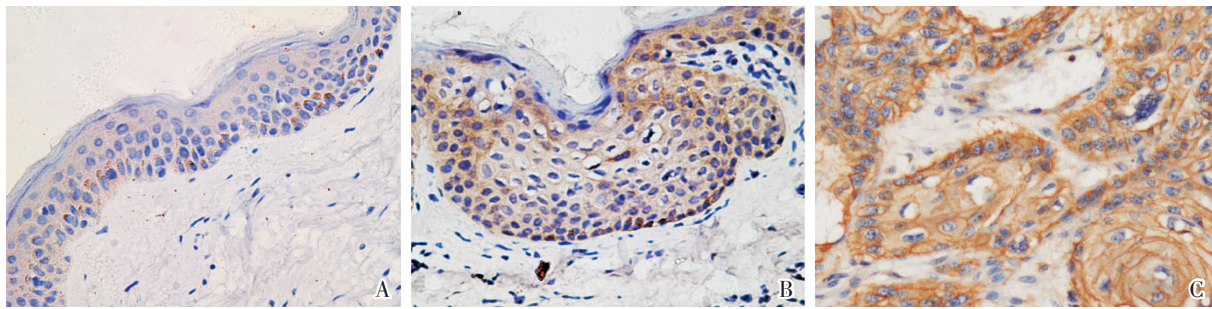
Fig.4 The protein and mRNA expression level of cancer stem cell associated gene CD44, OCT4, and SOX2 in two groups of cells



A: The high expression of CD133 can be seen in atypical hyperplasia cells that close to the basal layer of actinic keratosis, original magnification $\times 400$. B&C: In Bowen's disease, except which is close to the basal layer showed high expression, high expression of CD133 cells can be showed polar upward differentiation and cluster formation, original magnification, $\times 400$.

图5 CD133在日光性角化病及鲍温病组织中的表达

Fig.5 The expression level of CD133 in the tissue of actinic keratosis and Bowen's disease



A: Actinic keratosis; B: Bowen's disease; C: cSCC; Original magnification, $\times 400$

图6 免疫组化检测 CD133在日光性角化病、鲍温病、皮肤鳞状细胞癌组织中的表达情况

Fig.6 The expression level of CD133 was measured by immunohistochemistry in the tissue of Actinic keratosis, Bowen's disease and cSCC

表2 日光性角化病、鲍温病、cSCC组织中CD133表达人工计数分析结果

Table 2 Results of artificial enumeration of CD133 expression in Actinic keratosis, Bowen's disease and cSCC tissue [n(%)]

Diagnosis	Group (grade)				Total	Average rank
	-(0-1)	+(2-3)	++(4-5)	+++ (6-7)		
Actinic keratosis	4(22.2)	14(77.8)	0	0	18	14.56
Bowen's disease	0	9(60.0)	5(33.3)	1(6.7)	15	25.13
cSCC	0	4(50.0)	2(25.0)	2(25.0)	8	27.75

$H=13.458, P=0.001$

结果在诊断类别间不同,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前随着我国社会老龄化程度的增加,cSCC

的发病率呈现逐年递增的趋势。手术、放化疗仍然是针对cSCC主要治疗方式,但对于侵袭性、晚期cSCC患者改善预后、提高生存率仍然受限^[9]。因此,寻找cSCC发生和进展相关的关键调控因子对早期监测和治疗侵袭性的cSCC具有重要的意义,但目前这一领域仍缺乏实质的进展。

目前研究表明多种肿瘤组织中存在 CSC,包括乳腺癌、脑癌、肠癌、胰腺癌、肺癌等,并证实 CSC 在肿瘤的发生发展中扮演相当重要的角色^[10-12]。不同肿瘤的 CSC 可拥有共同的细胞表面标记,如表达 CD44、SOX2、OCT4 等干细胞标记物,也可具有一些不同的特异的细胞表面抗原标记^[13]。CD133 是一种跨膜糖蛋白,具有 5 个跨膜域和 2 个细胞外糖基化环,通常在造血干细胞、内皮干细胞和多种组织干细胞中有表达^[14]。近几年,越来越多的实验研究表明 CD133 是包括脑、胰腺、肠道、肝、前列腺等多种肿瘤 CSC 的重要分子标记,并且其表达与肿瘤的自我更新、分化潜能、信号传导调控、药物耐受、复发和预后等均有相关性^[15-16]。我们前期研究也发现 cSCC 表达 CSC 的分子标记 CD133,CD133 的过度表达与病理低分化、cSCC 晚分期以及不良预后相关^[6]。

为进一步研究 cSCC 发生和发展与其 CSC 干性特征相关关系,本研究采用人 cSCC Colo-16 细胞系,通过流式细胞分选技术分选出 CD133⁺和 CD133⁻两群细胞亚群,研究比较两群细胞体外增殖、自我更新和转移能力。结果表明:MTT 法检测两组细胞增殖活性,与 CD133⁻ Colo-16 细胞相比,CD133⁺ Colo-16 细胞 48 h 后的增殖活性明显更强,提示 CD133⁺ Colo-16 细胞具有更强的增殖能力。而在成球实验中,CD133⁺ Colo-16 细胞的成球数量与成球体积也显著大于 CD133⁻ Colo-16 细胞,提示 CD133⁺ Colo-16 细胞有着更强的自我更新能力。并且在 Transwell 迁移实验的结果也显示,

CD133⁺ Colo-16 细胞浸润能力明显强于 CD133⁻ Colo-16 细胞。这些实验结果表明,CD133⁺ cSCC 细胞具有 CSC 干性特性,与肿瘤细胞的增殖、自我更新和转移等肿瘤恶性行为特征相关。

为了解 CD133⁺ Colo-16 细胞和 CD133⁻ Colo-16 细胞干性相关基因的表达情况,本研究应用 Western Blot 和荧光定量 PCR 方法对两群细胞上 CD44、SOX2 和 OCT4 基因的表达水平进行蛋白和 mRNA 水平的检测。结果显示 CD133⁺ Colo-16 细胞的 CD44、SOX2 和 OCT4 蛋白的表达及其对应的 mRNA 转录水平均高于 CD133⁻ Colo-16 细胞,这些结果进一步验证了富集到的 CD133⁺ Colo-16 细胞可同时表达其他干细胞标记物,具有干细胞特性。可为将来 cSCC 的干细胞研究提供新的载体。另外,为了进一步验证组织样本中 CD133 表达与 cSCC 发生发展的关系,我们对 cSCC 癌前病变日光性角化病、鲍温病和 cSCC 组织进行免疫组化研究,结果表明,CD133 在日光性角化病和鲍温病接近基底层非典型增生细胞中可呈高表达,在鲍温病中部分 CD133 表达细胞克隆性增生;同时发现 CD133 的表达在癌前病变逐渐发展为 cSCC 过程中逐步上调。这些现象也提示 CSC 和 cSCC 的发生发展可能有关。

总之,本研究表明应用 CD133 富集肿瘤干细胞的手段,可以为研究 CSC 在 cSCC 发生发展中的作用提供良好的基础。并对探索其关键调控因子,寻找肿瘤诊断和预后特异性标志,以及治疗新靶点方面,具有重要的意义。

参考文献

- [1] Allen JE, Stolle LB. Utility of sentinel node biopsy in patients with high-risk cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015, 41(2): 197-200.
- [2] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [3] Mascré G, Dekoninck S, Drogat B, et al. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance [J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 257-262.
- [4] Siegle JM, Basin A, Sastre-Perona A, et al. SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 4511-4523.
- [5] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 1997, 90(12): 5002-5012.
- [6] Xu R, Cai MY, Luo RZ, et al. The expression status and prognostic value of cancer stem cell biomarker CD133 in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *JAMA Dermatol*, 2016, 152(3): 305-311.
- [7] Liao WT, Jiang D, Yuan J, et al. HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11):

- 3569-3578.
- [8] 袁林静, 郑敏, 黄舒婷, 等. SPAG5 低表达与早期卵巢高级别浆液性癌患者预后关系[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017, 38(3): 418-426.
- Yuan LJ, Zhang M, Huang ST, et al. Relationship between SPAG5 low expression and poor prognosis of ovary: An early stage high grade serous carcinoma patients [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(3): 418-426.
- [9] Ribero S, Stucci LS, Daniels GA, et al. Drug therapy of advanced cutaneous squamous cell carcinoma: is there any evidence? [J]. *Curr Opin Oncol*, 2017, 29(2): 129-135.
- [10] Chen QY, Jiao DM, Zhu Y, et al. Identification of carcinogenic potential-associated molecular mechanisms in CD133 A549 cells based on microRNA profiles [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(1): 521-530.
- [11] Doherty MR, Smigiel JM, Junk DJ, et al. Cancer stem cell plasticity drives therapeutic resistance [J]. *Cancers (Basel)*, 2016, 8(1): 334-354.
- [12] Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, et al. Cancer stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(12): 2144-2151.
- [13] Colmont CS, Harding KG, Piguat V, et al. Human skin cancer stem cells: A tale of mice and men [J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(8): 576-580.
- [14] Li Z. CD133: A stem cell biomarker and beyond [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2013, 2(1): 17-34.
- [15] Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: Limitations, problems and challenges [J]. *J Pathol*, 2013, 229(3): 355-378.
- [16] Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: Molecule of the moment [J]. *J Pathol*, 2008, 214(1): 3-9.
- (编辑 刘清海)

(上接第 185 页 from page 185)

- [11] 吴成林, 孙启全, Xian Chang Li. 关注非 T 淋巴细胞在移植免疫中的作用 [J]. 器官移植, 2014, 5(4): 197-205.
- Wu CL, Sun QQ, Li XC. Focus on effect of non-T lymphocyte in transplantation immunity [J]. *Organ Transpl*, 2014, 04(5): 197-205.
- [12] 冯敛, 吴长有. 人外周血初始 B 细胞和记忆性 B 细胞亚群的特征和功能 [J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(3): 184-187.
- Feng L, Wu CY. Properties and functions of naive and memory B cells in human peripheral blood [J]. *Int J Immunol*, 2010, 33(3): 184-187.
- [13] Podestà MA, Cucchiari D, Ponticelli C. The diverging roles of dendritic cells in kidney allotransplantation [J]. *Transpl Rev*, 2015, 29(3): 114-120.
- [14] Schlitzer A, Ginhoux F. Organization of the mouse and human DC network [J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 26(1): 90-99.
- [15] Hudspeth K, Donadon M, Cimino M, et al. Human liver-resident CD56 (bright)/CD16 (neg) NK cells are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways [J]. *J Autoimmun*, 2016, 66(9): 40-50.
- [16] Marquardt N, Wilk E, Pokoyski C, et al. Murine CXCR3+CD27bright NK cells resemble the human CD56bright NK-cell population [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(5): 1428-1439.
- [17] Poli A, Michel T, Theresine M, et al. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset [J]. *Immunology*, 2009, 126(4): 458-465.
- [18] Tatiana M, Aurélie P, Angelica C et al. Human CD56brightNK Cells: An Update [J]. *J Immunol*, 2016, 196(7): 2923-2931.
- [19] Liu HZ, Deng W, Li JL, et al. Peripheral blood lymphocyte subset levels differ in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 77558-77564.
- (编辑 余菁)