

人脐血 T/NK 细胞 KIR 分子表达的初步探讨

陈纯¹, 段连宁², 黄绍良¹, 李树浓², 魏菁³

(中山医科大学 1. 孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120; 2. 病理生理教研室, 广东 广州 510089;
3. 孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨脐血中 T 淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞上杀伤性抑制性受体(KIR)的表达特性。【方法】采用流式细胞仪检测 26 份正常分娩新生儿脐血的 T/NK 细胞表面 KIR 分子表达(CD158a, CD158b 和 CD94), 并与正常外周血比较。【结果】脐血中 T 淋巴细胞和 NK 细胞均存在 KIR 分子表达; 脐血和外周血中 T 淋巴细胞 CD158 分子表达低于 NK 细胞($P < 0.05$), 脐血 T 淋巴细胞亚群中 CD158 分子表达低于正常外周血; CD158 几乎不表达于 CD4⁺T 细胞, 主要表达于 CD8⁺T 细胞, 且以 CD158a⁺为主; 脐血中 NK 细胞 CD158 分子表达高于 T 淋巴细胞($P < 0.05$), 但明显低于外周血 NK 细胞 KIR 表达($P < 0.01$); 脐血和外周血 CD4⁺T 细胞上 CD94⁺表达无差异($P > 0.05$), 但脐血 CD8⁺T 细胞和 NK 细胞 CD94⁺表达则明显低于外周血($P < 0.01$)。【结论】脐血中 T 淋巴细胞和 NK 细胞上 KIR 表达与正常外周血存在明显差异。

关键词: 脐血; T 淋巴细胞; 杀伤细胞, 天然

中图分类号: R392.11; 446.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0067-03

The Characteristics of Killer Inhibitory Receptors Expressed on T Lymphocytes or Natural Killer Cells in Human Umbilical Cord Blood CHEN Chun¹, DUAN Lian-ning², HUANG Shao-liang¹, LI Shu-nong², WEI Jing³. (Department of Pediatrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Pathophysiology, Guangzhou 510089, China; 3. Department of Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】To study the characteristics of killer inhibitory receptors (KIRs) expressed on T lymphocytes or natural killer (NK) cells in human umbilical cord blood (UCB). 【Methods】KIRs (CD158a, CD158b and CD94) expressed on the surface of T lymphocytes or NK cells in UCB were determined by flow cytometry in 26 samples, and the results were compared with those of normal children peripheral blood (PB). 【Results】There were expressions of KIR on the surface of T and that on NK cells in UCB. The expressions of KIRs on T lymphocytes were lower than those NK cells in UCB and PB. The expressions of CD158 on the subsets of T lymphocytes in UCB were lower than that in PB ($P < 0.05$). CD158⁺ especially CD158a⁺ was almost not expressed on CD4⁺T lymphocytes, and mainly expressed on CD8⁺T lymphocytes. CD158 expression on NK cells in UCB was lower than in PB ($P < 0.05$). The expression of CD158 on NK cells in UCB was higher than that on T lymphocytes ($P < 0.05$), but significantly lower than that on NK cells in PB ($P < 0.01$). The CD94⁺ expression on CD4⁺T cells had no significant difference between UCB and PB ($P > 0.05$), but the CD94⁺ expressions on CD8⁺T and NK cells in PB were larger remarkably higher than those in UCB ($P < 0.01$). 【Conclusion】The expressions of KIRs on T lymphocytes and NK cells in UCB are different from PB.

Key words: umbilicus blood; T lymphocytes; kill cells, natural

杀伤性抑制性受体(killer inhibitory receptors, KIR)是近年来发现的细胞表面糖蛋白受体, 表达在NK细胞和一部分T细胞表面, 能特异性地与靶细胞表面HLA-I类分子结合, 抑制NK及T细胞的细胞毒活性; HLA分子与T/NK细胞表面表达的KIR在移植免疫调节中起着重要作用。已证实KIR分子识别T/NK细胞表面的HLA-C分子与骨髓移植(BMT)和外周血干细胞移植(PBSCT)中移植物抗宿主病(GVHD)和/或移植物抗白血病

(GVL)效应的发生有关^[1~3]。但目前国内外尚未见有关脐血细胞KIR特性的报道和KIR对脐血移植(UCBT)GVHD和GVL的作用研究。为此我们采用流式细胞仪检测了26例正常分娩新生儿脐血的T/NK细胞表面KIR分子表达(CD158和CD94), 以了解脐血细胞KIR的免疫学特性, 从而更好地研究KIR在脐血移植中对GVHD和/或GVL的作用。

收稿日期: 2001-09-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(010722); 广东省卫生厅基金资助(B2001029); 中国博士后科学基金资助项目(29)

作者简介: 陈纯(1967-), 女, 江苏无锡人, 博士生, 主治医师; 黄绍良, 导师, 教授, 研究方向移植免疫。

1 材料和方法

1.1 脐血和外周血标本的来源与采集

1.1.1 脐血 由本院产科提供(2001年3月—5月),产前检查无各种传染病、肝胆系统和血液系统疾病、非高危妊娠和肝炎表面抗原携带者阴性的健康产妇,足月顺产,其中男婴12例,女婴14例的脐血。胎儿娩出后立即断脐,常规消毒胎盘侧脐带,行脐静脉穿刺;抽取2 mL脐血,置于EDTA-2Na抗凝管,待测脐血细胞表型,共26份。

1.1.2 正常儿童外周血 由同期本院儿科体检的正常儿童提供,男12例,女10例,年龄3.6~9岁,平均年龄5.5岁。经外周静脉抽取2 mL外周血,置于EDTA-2Na抗凝管,待测有关免疫细胞表型,共22份。

1.2 实验方法

采用美国Becton-Dickenson公司FACScalibur流式细胞仪。所有标本均在6 h内完成标定。均采用双色和三色直接免疫荧光标记法。EDTA抗凝脐血和外周血,加相应的抗体10 μ L,摇匀,避光4 $^{\circ}$ C冰箱放置10 min。加10 g/L氯化铵裂解液2 mL,避光室温放置10 min,待红细胞完全溶解后,1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,PBS洗2次,加多聚甲醛固定液450 μ L固定,待上机检测。以流式细胞仪的配套软件(cell quest)分析样本中 1×10^4 个细胞的相应标记阳性表达率。每个样本都用FITC和PE标记同型IgG作为相应的阴性对照。双标抗体CD14PE/CD45FITC双抗作辅助设门。

所有单克隆抗体均为美国PharMingen公司产品。包括异硫氰酸(FITC)荧光标记的抗CD158a单克隆抗体、抗CD158b单克隆抗体、抗CD94单克隆抗体、抗CD56单克隆抗体;藻红蛋白(PE)荧光标记的抗CD4单克隆抗体、抗CD8单克隆抗体、抗CD16单克隆抗体;叶绿素蛋白(PerCP)荧光标记的抗CD3单克隆抗体,均为小鼠抗人IgG型抗体。

1.3 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。脐血和正常外周血组间的比较采用完全随机化设计均数的 t 检验。所有统计学分析过程应用SPSS 8.0统计学软件。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 脐血NK细胞表达

脐血和外周血的NK细胞标记CD3⁻CD16⁺CD56⁺表达几乎相同(表1),分别为18.20% \pm 7.75%和17.24% \pm 8.22%,两者无明显统计学差异($P > 0.05$)。与文献[4,5]报道的结果脐血(14% \pm 7%)和外周血(12% \pm 6%)较接近。

表1 脐血和外周血KIR在T/NK细胞表达分布

Table 1 The distribution of the expressions of KIRs on T lymphocytes and NK cells in PB and PB

Immunophenotyping of KIR on T/NK cells	CB (n = 26)	PB (n = 22)	P
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	18.20 \pm 7.75	17.24 \pm 8.22	> 0.05
CD3 ⁺ CD158a ⁺	0.24 \pm 0.15	0.83 \pm 0.71	< 0.05
CD3 ⁺ CD158b ⁺	0.39 \pm 0.10	2.24 \pm 1.36	< 0.01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD158a ⁺	0.41 \pm 0.39	0.57 \pm 0.37	> 0.05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD158b ⁺	0.10 \pm 0.03	0.27 \pm 0.21	< 0.05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD158a ⁺	2.56 \pm 2.27	3.34 \pm 2.71	> 0.05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD158b ⁺	1.31 \pm 1.05	2.24 \pm 1.74	< 0.05
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD158a ⁺	3.85 \pm 3.54	7.21 \pm 5.56	< 0.05
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD158b ⁺	2.60 \pm 0.40	7.71 \pm 0.58	< 0.01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD94 ⁺	0.78 \pm 0.67	0.73 \pm 0.41	> 0.05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD94 ⁺	2.28 \pm 1.78	8.17 \pm 6.42	< 0.01
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD94 ⁺	8.12 \pm 2.01	17.43 \pm 2.45	< 0.01

2.2 脐血T/NK细胞KIR表达

如表1所示,脐血中的T淋巴细胞和NK细胞均存在KIR分子表达。在脐血和外周血中,CD158和CD94在T细胞表达均低于NK细胞。脐血T淋巴细胞亚群中CD158a⁺和CD158b⁺表达均低于正常外周血($P < 0.05$)。与外周血分布相似,脐血细胞CD158分子几乎不表达于CD4⁺T细胞,主要表达于CD8⁺T细胞上,且以CD158⁺为主。脐血NK细胞的CD158a⁺和CD158b⁺分子表达高于T细胞($P < 0.05$),但与外周血中NK细胞相比,其表达较低($P < 0.05$)。脐血中CD8⁺T细胞和NK细胞上CD94⁺表达明显低于外周血($P < 0.05$),但CD4⁺CD94⁺表达无差异($P > 0.05$)。

3 讨论

KIR是近年来发现的一种主要表达在NK和部分T细胞上的抑制性信号分子。人KIR分子属免疫球蛋白超家族成员。NK细胞表面表达有二类KIR:免疫球蛋白超家族受体(KIR2D、3D)和

CD94/NKG2。这些KIR的配体即为HLA-I类分子(HLA-A、B、C、E、G)。其中KIR2DL1(CD158a, P58.1)特异性识别HLA-C同种异型分子的Cw2, Cw4, Cw5, Cw6位点, KIR2DL2(CD158b, P58.2)则特异性识别Cw1, Cw3, Cw7, Cw8位点^[6]。KIR最早在NK细胞发现,以后才发现在部分T细胞也表达,有报道表达于33%的CD8⁺细胞,但在T细胞表达的意义并不清楚^[7]。迄今为止,尚未见有关脐血移植中KIR的作用研究。人们对脐血细胞中KIR分子的表达尚未认识。有报道表达在T细胞的KIR具有记忆T细胞表型,存在于外周血、脾脏、淋巴结、扁桃体等外周组织,而不存在于胸腺及脐血中^[8];而本实验结果提示,脐血中的T/NK细胞均存在KIR分子表达,脐血T淋巴细胞亚群中CD158a和CD158b表达均低于正常外周血。与外周血分布相同,脐血CD158分子几乎不表达于CD4⁺T细胞,主要表达于CD8⁺T细胞上,且以CD158a⁺为主。这为研究脐血移植中T/NK细胞KIR分子的作用提供了实验数据。

近年来T淋巴细胞和NK细胞的KIR表达在BMT中与GVHD和GVL的关系日益引起人们的注意。1999年12月日本学者首次报道了23例接受异基因BMT的慢性粒细胞白血病患者GVHD发生与CD158b相关^[1]。Albi等^[2]发现,在去T细胞的HLA三位点不合的同种BMT及PBSCT治疗高危白血病的临床研究中发现,移植后具有NK活性及GVL效应的TCR⁺CD3⁺CD8⁺KIR⁺的T细胞增加,且HLA-C抗原特异性58 ku的KIR分子可杀伤白血病细胞,正常人这种CTL不到5%,但在三位点不合的BMT和PBSCT后3~5个月可达40%以上,提示GVL效应可由T/NK细胞上KIR特异性地识别HLA-C分子介导。Rugger等^[3]报道60例异基因BMT,发现20例供者NK细胞KIR表型不合移植中供者的NK细胞可杀伤异基因白血病细胞,提示NK细胞上KIR分子参与的GVL效应不依赖T细胞介导的GVH途径。可见,KIR分子(CD158a和CD158b)可能是区别GVHD和GVL的不同的重要分子。

以往认为脐血移植GVHD程度轻与成熟T细胞含量低(尤其是CD8⁺亚群)有关,但近年随着UCBT病例积累发现,即使HLA全相合的血缘相关的UCBT仍有9%发生急性GVHD,1~3位点不合者的血缘相关UCBT急性GVHD达25%~

40%,而非血缘相关者急性GVHD的发生率和重度GVHD的发生更高^[9,10]。作者等^[11,12]开展了国内首例UCBT以及首例脐带血和新生儿外周血混合移植的工作,至今追踪的12例UCBT中7例发生I~II度急性GVHD,III度者2例。本文的实验结果显示,CD158b在脐血NK细胞和CD8⁺T细胞的表达明显高于CD4⁺T细胞,这可能是UCBT后GVHD发生的免疫学基础。大量临床资料显示,与BMT相比,UCBT治疗白血病和淋巴瘤复发率并不高(分别为14%和15%)^[9,10],而脐血的细胞毒作用主要由NK细胞介导而非CD8⁺T细胞介导^[5]。本实验结果中脐血与正常外周血中的NK细胞表达几乎相同,脐血NK细胞的CD158a⁺表达高于T细胞,但低于外周血中NK细胞中的表达,提示脐血中NK细胞CD158a⁺可能与UCBT后GVL有关。

研究证实CD94表达的KIR分子具有对Dauidi肿瘤细胞有强烈的溶解杀伤活性^[8]。本实验结果显示,外周血的CD8⁺T细胞和NK细胞CD94⁺表达则明显高于脐血,但CD94在脐血和外周血的CD4⁺细胞的表达无差异,提示CD4⁺CD94⁺也可能与UCBT中GVL效应有关。因此,KIR在UCBT中与GVHD和GVL发生的关系尚有待于临床病例的追踪观察和进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Tanaka J, Mori A, Ota S, *et al.* Alterations in binding activity of T cell transcription factor CD28 responsive element binding complex (CD28RC) following allogeneic bone marrow transplantation [J]. *Eur J Haematol* 2000, 64(5): 333.
- [2] Albi N, Ruggeri L, Aversa F, *et al.* Natural killer cell function and antileukemia activity of expressing NK receptor for major histocompatibility complex class I after "three-loci" HLA incompatible bone marrow transplantation [J]. *Blood* 1996, 87(9): 3993.
- [3] Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood* 1999, 94(1): 333.
- [4] Whiteside T L, Herbman R B. Role of human natural killer cells in health and disease [J]. *American Soci Microbiol* 1994, 1(2): 125.
- [5] Berthou C, Legros-maida S, Soulie Annie, *et al.* Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to peripheral blood T lymphocytes [J]. *Blood* 1995 85(6): 1540.
- [6] Winter C C, Gumperz J E, Parham P, *et al.* Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition [J]. *J Immunol* 1998, 161(2): 571.

(下转第72页 to page 72)

NEVA。其的优缺点正好和 RigiScan 相反,前者对阴茎长短和粗细变化的测定值是通过生物电阻变化推算的,比较容易产生测定误差,但是通过阴茎血流变化可以较直观的诊断动脉性 ED 和静脉性 ED。动脉性 ED 的图谱特征是血流波峰低平,其量化标准如(表 1)所示,静脉性 ED 图谱特征是阴茎血流从波峰下降时急转直下,进一步结合阴茎海绵体血管活性药物注射试验等检查可以提高诊断的准确性。应该注意的是 NPT 测定结果中可能会出现一些假阳性或假阴性^[7]。笔者的体会是假阴性多数出现在睡眠欠佳的时候,对于容易失眠的患者一般让他们在家里做测定。我们曾经对几例失眠患者投与安眠药,虽可检测到勃起波形,但未作统计对比。对某些司法鉴定的病例,我们事先没有告诉患者有关 NPT 测定的机理。有人提议为了防止患者作假,NPT 测定和睡眠检测应同时进行。另一类假阴性是测定方法不对,或者电极脱落、电池电力不足、阴茎包皮过长。对于可疑病例最好连续测定 2~3 次。在测定过程,当电极接触不良或者摆弄阴茎时可能出现血流上升曲线的假阳性图谱,这些曲线反应过高、波峰过密,比较容易识别。高位截瘫的患者由于脊髓下部勃起中枢依然有兴奋活动也可能出现假阳性结果。表 1 所示诊断标准来自西方人的数据,对于国人能否完全适用,值得考虑,有待我们的进一步研究。

总体来说,ED 的形成有多种病理过程,依靠单

一检查方法不可能全面了解 ED 病因。对于 ED 诊断本院开展以 NPT 测定为重点,同时辅以阴茎海绵体造影、阴茎动脉造影、阴茎海绵体灌流、彩色双功能超声检查等,这对于选择适应外科、内科、心理、性行为训练治疗的病例当有很大的帮助^[8,9]。

参考文献:

- [1] Knoll L D, Abrams J H. Application of nocturnal electro-bioimpedance volumetric assessment: a feasibility study in men without erectile dysfunction[J]. J Urol, 1999, 161(4): 1137.
- [2] 张滨,王庭槐,吴家清.阳痿及早泄患者阴茎海绵体内压测定[J].广东医学,2000,21(10):836.
- [3] Lehmann K, Eichlisberger R, Gasser TC. Lack of diagnostic tools to prove erectile dysfunction: consequences for reimbursement[J]. J Urol, 2000, 163(1): 91.
- [4] 张滨,冈田耕市. Dynamic infusion cavemosometry and cavernosography (DICC) による静脈性インポテンスの検討[J]. IMPOTENCE, 1994, 9(3): 231.
- [5] 永岛弘登志,冈田耕市. RigiScan-Plus による NPT (RAU+TAU) の臨床的解析—本邦正常域についての検討[J]. Impotence, 1999, 14(3): 279.
- [6] Karacan I, Goodenough DR, Shapiro A, et al. Erection cycle during sleep in relation to dream anxiety[J]. Arch Gen Psychiatry, 1966, 15: 183.
- [7] 郭应禄,辛钟成.勃起功能障碍的外科治疗学[M].北京:北京医科大学出版社,2000.92~121.
- [8] 梅骅,章咏裳.泌尿外科手术学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2000.632~640.
- [9] 吴阶平.泌尿外科[M].济南:山东科学技术出版社,1993.683~694.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 69 页 from page 69)

- [7] Mingari M C, Schiavetti F, Ponte M, et al. Human CD8⁺ T lymphocyte subsets that express HLA class I sepecific receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(22): 12433.
- [8] 韩子英,马宝骊.杀伤细胞抑制性受体研究进展[J].国外医学免疫学分册,2000,23(3):146.
- [9] Glickman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors [J]. N Engl J Med, 1997, 337(6): 373.
- [10] Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among

562 recipients of placental blood transplants from unrelated donors [J]. N Engl J Med, 1998, 339(22): 1565.

- [11] 黄绍良,方建培,周敦华,等.脐血造血干细胞移植治疗重型β地中海贫血1例[J].中山医科大学学报,1998,19(2):封2.
- [12] 方建培,黄绍良,陈纯,等.脐带血、新生儿外周血混合移植治疗1例重型β地中海贫血[J].中山医科大学学报,2001,22(3):205.

(编辑 张恩健)