

[文章编号] 1000-4718(2007)10-2063-02

急性非淋巴细胞白血病患者 NK 细胞亚群及其 NCR 受体测定

楼瑾^{1,2}, 汪明春^{2△}, 李明², 聂李平²¹广州医学院, 广东 广州 510182; ²深圳市第二人民医院血液内科、深圳血液病研究所, 广东 深圳 518035)

[摘要] 目的: 探讨初发的急性非淋巴细胞白血病患者 NK 细胞亚群分布及自然细胞毒受体(NCR)的水平。方法: 应用流式细胞仪技术测定 26 例初发急性非淋巴细胞白血病患者外周血 NK 细胞、NK 细胞亚群、自然细胞毒受体。结果: 初发急性非淋巴细胞白血病患者外周血 NK 细胞明显低于对照组 ($P < 0.01$), CD56^{bright} 及 CD56^{dim} NK 细胞明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), NKp30、NKp44、NKp46 在 CD56⁺ CD3⁻ 细胞中的表达均低于正常对照组 ($P < 0.05$)。结论: 急性非淋巴细胞白血病发病可能与 NK 细胞及亚群减低, 自然细胞毒受体表达降低有关。

[关键词] 白血病, 非淋巴细胞, 急性; 杀伤细胞, 天然; 受体, 自然细胞毒

[KEY WORDS] Leukemia, nonlymphocytic, acute; Killer cells, natural; Receptors, natural cytotoxicity

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

急性非淋巴细胞白血病的发病及发展与机体的免疫系统水平降低有着密切的关系。自然杀伤细胞(natural killer cells, NK cells)主要以非 MHC 限制性方式杀伤肿瘤细胞, 在与肿瘤的发生发展相关的天然和获得性免疫中发挥重要的作用^[1]。NK 细胞不是均质性群体, 目前许多学者主张以 CD56 表达密度将 NK 细胞分为 CD56 表达密度高的 CD56^{bright} NK 细胞亚群和 CD56 表达密度低的 CD56^{dim} NK 细胞亚群 2 群^[2]。自然细胞毒受体(natural cytotoxicity receptor, NCR)属于免疫球蛋白样受体家族中的一员, 均为 NK 细胞所特有, 是非 MHC 分子依赖的杀伤活化型受体, 包括 NKp30、NKp44、NKp46^[3]。本研究采用流式细胞技术分析 26 例初发急性非淋巴细胞白血病外周血中 NK 细胞和亚群分布以及 NCR 表达情况。

材 料 和 方 法

1 临床资料

2004 年 9 月至 2005 年 9 月在我院诊断的 26 例初发急性髓系白血病患者, 诊断标准参照 FAB 及 1986 年全国白血病分类研讨会^[4], 均未行任何治疗。其中 2 例 ANLL-M1、10 例 ANLL-M2、7 例 ANLL-M3、3 例 ANLL-M4、4 例 ANLL-M5, 平均年龄 33 岁。正常对照组为 26 例健康体检者, 平均年龄 30 岁。

2 实验试剂与仪器

标记单克隆抗体 4 色同型对照 Ig - G1、CD16 - FITC、NKp30 - PE、NKp44 - PE、NKp46 - PE、CD3 - ECD、CD56 - CY5 购自法国 Immunotech 公司, 红细胞溶解液均购自美国 Immunoprobe 公司。采用美国 Beckman - Coulter 公司 EPICS XL 4 色流式细胞仪。

3 方法

NK 细胞亚群及其受体检测应用流式细胞技术 4 色单克隆抗体直接免疫荧光染色, 4 只试管中各加入 100 μ L EDTA 抗凝静脉血, 再分别加入 10 μ L 的 4 色标记单克隆抗体, 4 色同型对照 Ig - G1、CD16 - FITC/NKp30 - PE/CD3 - ECD/CD56 - CY5、CD16 - FITC/NKp44 - PE/CD3 - ECD/CD56 - CY5、CD16 - FITC/NKp46 - PE/CD3 - ECD/CD56 - CY5 室温避光孵育 15 min 后, 加 1 000 μ L 红细胞溶解液溶解红细胞 5 min, 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 再以 0.5 mL PBS 缓冲液悬浮细胞, 流式细胞仪分析 5 000 个细胞, 制备标本后放入流式细胞仪中进行免疫荧光测定, 计数至少 5 000 个细胞数, 分别读取测定细胞数。

4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数的比较采用 t 检验或近似 t 检验。

结 果

26 例初发急性非淋巴细胞白血病患者 NK 细胞百分率与正常对照组相比明显降低 ($P < 0.01$), CD56 表达密度高的 CD56^{bright} NK 细胞亚群和 CD56 表达密度低的 CD56^{dim} NK 细胞亚群百分率均明显降低 ($P < 0.01$)。CD56^{bright} NK 细胞亚群与 CD56^{dim} NK 细胞亚群比率显著改变 ($P < 0.01$)。

表 1 NK 细胞及其 NK 细胞亚群

Tab 1 NK cells and NK cell subsets (% $\cdot \bar{x} \pm s$, $n = 26$)

Group	NK (%)	CD56 ^{bright} (%)	CD56 ^{dim} (%)	CD56 ^{bright} / CD56 ^{dim}
Experiment	6.39 \pm 4.63	0.21 \pm 0.22	6.23 \pm 4.57	0.05 \pm 0.05
Normal	22.38 \pm 6.19	2.12 \pm 0.76	19.52 \pm 5.47	0.14 \pm 0.04

[收稿日期] 2006-01-16

[修回日期] 2006-09-10

△通讯作者

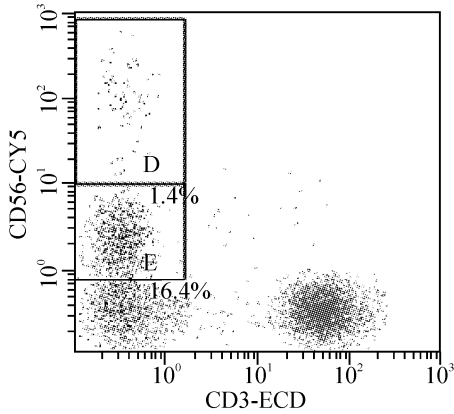


Fig 1 NK cell subsets in normal.

图1 健康人NK细胞亚群

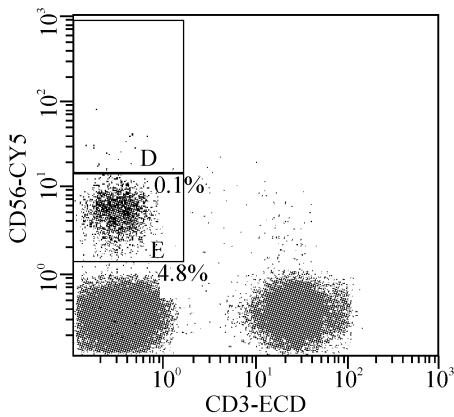


Fig 2 NK cell subsets in ANLL patients.

图2 急性非淋巴细胞白血病患者NK细胞亚群

26例初发急性非淋巴细胞白血病患者自然细胞毒受体NKp30、NKp44表达均明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)；NKp46表达明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。

表2 NKp30、NKp44、NKp46在NK细胞中的表达比例

Tab 2 The expression of NKp30, NKp44, NKp46 in NK cells (%). $\bar{x} \pm s$. $n = 26$

Group	NKp30	NKp44	NKp46
Patients	19.61 ± 9.61	2.91 ± 1.92	25.35 ± 10.84
Normal	44.64 ± 10.90	6.62 ± 1.87	68.98 ± 17.81

讨论

自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 是重要的天然免疫细胞^[5], 不需预先致敏, 无MHC限制性, 即可自发地杀伤MHC-1类分子缺陷或低表达的肿瘤细胞或转移癌细胞, 在机体免疫监视过程中起重要作用。

NK细胞不是均质性群体, 表达众多表面分子, 但这些表面标记许多不是NK细胞特有的, 仅具有相对特异性。通常将CD56⁺, CD16⁺, CD3⁻, TCR⁻, BCR⁻淋巴细胞认为是NK细胞。对于NK细胞亚群分类目前仍有很多方法, 目前许多学者主张以CD56表达密度将NK细胞分为CD56^{bright}和

CD56^{dim} 2群^[2], 认为CD56^{bright}NK细胞约占10%, 这类NK细胞表面的杀伤细胞免疫球蛋白样受体表达很低甚至缺失, 但可高水平表达抑制性受体CD94-NKG2A, 可分泌多种细胞因子, 与免疫调节密切相关, 而细胞毒活性弱; CD56^{dim}NK细胞数量比例较高, 约占90%, 高水平表达杀伤细胞免疫球蛋白样受体, 但CD94-NKG2A抑制性受体的表达水平很低, 可有效地发挥细胞毒作用^[6]。在此研究中我们发现初发急性非淋巴细胞白血病患者NK细胞百分率较正常健康者明显降低, 同时与免疫调节的CD56^{bright}NK细胞及与细胞毒作用有关的CD56^{dim}NK细胞均降低, 表明在急性非淋巴细胞白血病患者中存在NK细胞数量的减低, 同时存在质量异常。

NK细胞杀伤激活性受体多与非MHC配体结合, 传递活化信号, 直接诱导NK细胞杀伤功能。自然细胞毒受体 (natural cytotoxicity receptors, NCR) 在结构上属于杀伤激活性受体免疫球蛋白超家族, 包括NKp30、NKp44和NKp46。这3种受体均为NK细胞所特有, 无MHC分子限制性, 直接参与NK细胞对靶细胞的识别和杀伤, 结构上缺乏同源性, 它们细胞表面的密度与NK细胞克隆的自然细胞毒性密切相关, 细胞表面的密度越高, NK细胞的自然细胞毒性越强^[7]。它们在NK细胞对于多种靶细胞 (自体、同种、异种, 正常、肿瘤转化细胞) 的非MHC依赖的细胞毒作用中起关键作用。在这项研究中发现急性非淋巴细胞白血病患者组NK细胞杀伤激活性受体的NCR表达较健康对照组降低, 说明患者NK细胞杀伤活性可能较正常人有所降低。急性非淋巴细胞白血病的发病很可能与NK细胞数量及亚群降低、NCR表达改变有关。

[参考文献]

- [1] Liunggren HG, Karre K. In search of missing self: MHC molecules and NK cell recognition [J]. Immunol Today, 1990, 11(7): 237-244.
- [2] Cooper MA, Felhner 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.
- [3] Markel G, Lieberman N, Katz G, et al. CD66a interactions between human melanoma and NK cells; a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity [J]. J Immunol, 2002, 168(6): 2803-2810.
- [4] 杨天楹. 急性白血病 [A]. 见: 张之南 主编. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 184-194.
- [5] 谭进富, 吕明德, 刘大全. 微波消融肝癌对大鼠细胞免疫的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1214-1217.
- [6] Cooper MA, Felhner TA, Caligiuri MA, et al. The biology of human natural killer-cell subset [J]. Trends Immunol, 2001, 22(11): 633-640.
- [7] Moretta L, Biassoni R, Bottino C, et al. Human NK cell receptors [J]. Immunol Today, 2000, 21(9): 420-422.