

# 正常人外周血淋巴细胞(PBL)中的天然杀伤(NK)效应细胞组分分析

林桃珍 余新生 田培坤 张前进 刘鹭雯

(上海市肿瘤研究所免疫学及细胞生物学研究室)

近年来已有许多报道,证明未致敏机体的淋巴细胞,对同系、同种异体、异种肿瘤靶细胞,病毒感染的细胞及体外长期培养的正常细胞株等具有自然杀伤功能。这现象引起了免疫学界的极度重视和广泛兴趣,因为它不仅与同种异体骨髓移植的排斥和自身免疫现象有关<sup>[1]</sup>,而且也涉及抗病毒感染和防御肿瘤的免疫监视<sup>[2]</sup>。行使这自然杀伤功能的效应者称NK细胞。国外对这细胞群已进行了大量的研究<sup>[3-12]</sup>。

本文主要报道正常人PBL分别用抗胸腺血清处理及去除EA玫瑰花结形成细胞(EA-RFC)后,应用微量细胞毒性试验来检测它们对自然杀伤的影响,以分析其效应细胞的组分。

## 材料和方法

### 一、制备兔抗人胸腺血清(RATS)

混合人胎胸腺制成单细胞悬液。选用对人PBL无天然抗体的白兔(五斤左右)进行免疫注射,一组用 $1 \times 10^8$ 胸腺细胞(1毫升),经静脉注入,另一组以同样细胞数加弗氏完全佐剂,在脚掌及皮下多点注射,每隔一周免疫一次,共注射三次,末次注射后三周放血。

抗血清以人A、B、O血型红细胞,在37℃、室温、4℃分别吸收,再用混合的正常人外周血经尼龙棉分离所获得的B淋巴细胞吸收。所有的抗血清经40%饱和硫酸铵沉淀初步纯化,最后以6号砂芯漏斗灭菌过滤,分装成小瓶,置低温冰箱保存待用。在补体的参与下,将1:32稀释的RATS处理PBL,其E玫瑰花结形成细胞(E-RFC)值均为 $\leq 1\%$ 。

以下实验所用的RATS均为稀释32倍。

### 二、RATS对淋巴细胞转化的抑制效应

正常供主肝素抗凝全血0.3毫升+0.3毫升RATS  $\xrightarrow[30']{37^\circ\text{C}}$ 再加PHA及培液作淋巴细胞转化试验,观察指标为分裂率。以0.3毫升肝素抗凝全血+0.3毫升培液先温育30分钟作为对照,详细方法见<sup>[13]</sup>。

### 三、补体

选用对人淋巴细胞无天然细胞毒性抗体的白兔新鲜血清,灭菌过滤后,置低温冰箱备用,一般不超过一个月。

### 四、微量细胞毒性试验

(一)靶细胞:7402人体肝癌细胞株,引自中科院上海细胞生物研究所,由本所细胞库传代培养。

(二)效应细胞:12例正常人,取其外周静脉全血(肝素抗凝 $50\mu/\text{ml}$ ),用比重1.077淋巴细胞分离液(上海试剂二厂出品)梯度离心,所获单个核的细胞经37℃45分钟贴壁培养,以去除单核细胞,得到较纯的PBL。将这PBL分成三份:

(1)第一部分形成EA花结,详细方法见<sup>[12]</sup>;

(2)第二部分+RATS  $\xrightarrow[30']{37^\circ\text{C}}$ +1640培液继续培育一小时。

(3)第三部分+RATS  $\xrightarrow[30']{37^\circ\text{C}}$ +补体(C)后再继续在37℃培育一小时。

把以上(1)、(2)、(3)部分,再次梯度离心,所获的界面层细胞分别为去除EA-RFC(即Fc-R $\oplus$ 细胞)的PBL、经RATS处理的PBL、去T细胞的PBL。各组分的纯度用形成E、EA花结来鉴定。去EA-RFC前的PBL中EA-RFC的百分率 $24.95 \pm 5.66$ ,去EA-RFC后为 $5.88 \pm 2.6$ ;总PBL中E-RFC是 $59.74 \pm 5.28$ ,单独RATS处理的PBL为 $4.87 \pm 1.88$ ,而去T细胞后的PBL中E-RFC则仅为 $\leq 1\%$ 。

PBL+RATS+C组的细胞 $\geq 50\%$ 死亡,单独加RATS无C者与不加RATS组相同,均90%以

上存活。

(三) **细胞毒试验**: 将上述总 PBL、去 EA-RFC 的 PBL、RATS 处理过的 PBL 及去 T 细胞的 PBL 分别作为效应细胞, 每效应者作 5 个复份, 检测其杀伤靶细胞的能力<sup>[13]</sup>。

(四) **分析**: 各组都先求其平均贴壁细胞数和标准差, 只有当加效应细胞的实验组的平均贴壁细胞数与对照组的差异有统计学意义时 ( $P < 0.05$ ), 才分别计算该效应细胞的真正细胞毒性能力, 细胞毒性以贴壁细胞抑制率 Q 表示:

$$Q = \frac{\text{对照组贴壁细胞均数} - \text{实验组贴壁细胞均数}}{\text{对照组贴壁细胞均数}} \times 100\%$$

### 结 果

一、从 12 例淋转资料中发现 RATS 对 PHA 引起的淋巴细胞转化, 显示了不同程度的抑制, 从 11%—93% 不等。它和 E 花结抑制及对 7402 人体肝癌细胞株的自然杀伤未见

有明显的相关性。

二、从本组实验看, 正常人对人肝癌细胞株 7402 的天然杀伤 (NK) 与性别、年龄无关, 这与本室以前检测了近百名正常人所获结果一致, 本实验的细胞毒性试验结果显示, 经过各种处理的效应细胞。其 NK 没有超过总的 PBL 者。单独 RATS 处理与去除 T 细胞的 PBL 情况相似, 只是单独 RATS 处理的 PBL 丧失的 NK 较明显, 该组 NK 消失者占 7/14, 而去 T 细胞后的 PBL NK 消失者仅 4/12 (见表 1)。

去除 Fc 受体阳性细胞 (EA-RFC) 后的 PBL, 只有二例 (11、12 号见表 1) 仍然有 NK, 但已明显减弱, 并且它们去 T 细胞以后的 PBL, NK 分别为完全消失或大部分丧失, 可见其 NK 效应细胞主要是具有 Fc 受体的 T 淋巴细胞, 另有小部分为无 Fc 受体的 T 与非 T。另 10 例, 去除 EA-RFC 后 PBL 的 NK 完全消失, 它们有下列三种情况:

表 1 经各种不同处理后 PBL 自然杀伤率 (%) 及效应细胞组分

PBL 供主号	总 PBL	去 EA-RFC 后 PBL	去 T 细胞后 PBL	经 RATS 处理的 PBL	效应细胞组分
石 × × 1	50.67	(-) <sup>o</sup>	42.77	48.97	Fc-R ⊕ 的非 T 细胞
杨 × × 2	64.39	(-)	57.41	38.70	
潘 × × 3	95.97	(-)	20.37	23.55	Fc-R ⊕ 的 T 细胞及 Fc-R ⊕ 的非 T 细胞
徐 × × 4	77.26	(-)	40.68	29.31	
△金 × × 5	78.54	(-)	30.06	(-)	
张 × × 6	52.05	(-)	33.06	(-)	
虞 × × 7	74.11	(-)	44.92	35.03	
杨 × × 8	21.33	(-)	(-)	(-)	Fc-R ⊕ 的 T 细胞
秦 × × 9	42.18	(-)	(-)	(-)	
俞 × × 10	78.29	(-)	(-)	(-)	
王 × × 11	79.60	16.53	(-)	(-)	Fc-R ⊕ 及 Fc-R ⊖ 的 T 细胞
孔 × × 12	87.93	41.75	29.76	(-)	Fc-R ⊕ 的 T 及非 T Fc-R ⊖ 的 T 及非 T

<sup>o</sup> 表示 NK 消失。

△ 该例的 PBL 有部分经尼龙棉处理获较纯的 T 淋巴细胞, 测得其 NK 为 72.40%, 与总的 PBL 的 NK 相同, 说明 NK 细胞不是 B 细胞。

(一) 2例(第1、2号)去T细胞以后的NK与总的PBL相似,表示它们的NK细胞是PBL中具有Fc受体的非T细胞。

(二) 3例(第8、9、10号)的PBL去T淋巴细胞后NK消失,它们的NK细胞为Fc受体阳性的T淋巴细胞。

(三) 5例(第3、4、5、6、7号)的PBL,去T淋巴细胞后NK尚有,说明其效应细胞是具Fc受体的包括T和非T的细胞所组成。

## 讨 论

在对NK效应细胞本质的研究中,分离所获各淋巴细胞亚群的纯度是很关键的。作者以前曾用梯度离心法去除E-RFC,以期除去T细胞,但去T的组分内常仍有相当量的E-RFC。为此,本实验用自制RATS加补体处理PBL,这样能较满意地去除绝大部分E-RFC, E花结仅为 $\leq 1\%$ ,最高的一例也仅为 $3\%$ 。单独用RATS处理的PBL,虽然T细胞未被杀死,但也已明显地抑制了T细胞表面的SRBC受体和SRBC形成花结的能力,即E花结明显减少。去EA-RFC效果虽然不

及去T淋巴细胞那样彻底,但也可去除 $2/3$ 以上,最大的去除率可达 $96\%$ 。

进行这类研究所需血量较大,经各种处理细胞损耗又多,所以用减法以反证被减去的群体在NK中的作用,实为可取的方法。

NK细胞的特征仍是免疫学界争论的课题之一<sup>[8,12,14,15]</sup>。最初认为NK细胞与成熟的T、B及单核巨噬细胞不同,它无粘附能力,是具有Fc受体的中小淋巴细胞<sup>[2,6,8,15,16,17]</sup>。进一步又有报道NK细胞表面有T淋巴细胞的表面抗原,而认为T细胞的某亚群也导介NK<sup>[3,10,11,18-21]</sup>。本实验结果发现,正常人外周血淋巴细胞对7402人体肝癌细胞株的自然杀伤效应细胞主要是IgG Fc受体阳性的(Fc-R $\oplus$ )T细胞和Fc受体阳性的非T细胞,说明了本实验系统中NK细胞的异质性。而这Fc受体阳性的非T细胞可能不是B细胞,因为作者曾对1例(第5号)PBL经尼龙棉过滤,去除B细胞后,再作细胞毒试验,发现与该份样本总的PBL的Q值相似,分别为 $77.26\%$ 和 $72.40\%$ (见表1)。最近AH-KAU等报道<sup>[22]</sup>,用单克隆抗HLA-DR抗原的抗体进行研究,发现

有电子密度高的沉淀物(箭头)(未染色)。 $\times 5,200$

图6 三磷酸腺苷酶

嗜酸性白血球,胞浆内见到结晶颗粒(G),在细胞膜上见到电子密度高的沉淀物(箭头), (N)为细胞分叶核(未染色)。 $\times 6,400$

图7 硫酸素焦磷酸酶

大白鼠副辜上皮细胞胞浆内见到高尔基体(G)扁平囊泡及凹面小泡中有电子密度高的沉淀物, (N)为细胞核(铀和铅染色)。 $\times 7,900$

图8 硫酸素焦磷酸酶

大白鼠肝细胞的高尔基体(G)及毛细胆管(C)的微绒毛有电子密度高的沉淀物(未染色)。 $\times 7,900$

图9 葡萄糖-6-磷酸酶

肝细胞胞浆内质网及核膜见到电子密度高的沉淀物(箭头), (N)为细胞核(未染色)。 $\times 14,000$

图10 琥珀酸脱氢酶

大白鼠心肌线粒体嵴,嵴间间隙及外室有电子密度高的沉淀物, (M<sub>r</sub>)为肌原纤维(未染色)。 $\times 14,000$

## 韩玉升等图版说明

图1 碱性磷酸酶

小白鼠肾近曲小管刷状缘处见到电子密度高的沉淀物(箭头), (N)为上皮细胞核(未染色)。 $\times 1,100$

图2 碱性磷酸酶

人胃粘膜下层的毛细血管内皮细胞边缘(箭头)及管腔中红细胞膜(R)上有电子密度高的沉淀物(未染色)。 $\times 2,200$

图3 酸性磷酸酶

小白鼠肝血窦中枯氏细胞(K)胞浆内见到电子密度高的沉淀物(箭头), (D)为狄氏腔, (W)为血窦中白血球(未染色)。 $\times 7,900$

图4 酸性磷酸酶

人骨巨细胞瘤的多核巨细胞,胞浆内见到许多电子密度高的沉淀物(箭头)(未染色)。 $\times 16,000$

图5 三磷酸腺苷酶

小白鼠腹腔游离巨噬细胞(M)及红细胞(R)膜上

HLA-DR 抗原阴性的细胞有NK和ADCC效应,而HLA-DR抗原阳性的B细胞则无此效应,这支持了我们的观点。也有报道正常人PBL对同一靶的自然杀伤,在不同的时间差异很大<sup>[23]</sup>,并且各种不同靶对同一供主PBL自然杀伤的敏感性也不同。本实验结果显示:不同正常人PBL杀伤同一靶的NK细胞组成有个体差异,虽然均包括Fc-R $\oplus$ 的PBL,有的为T细胞,有的是非T细胞,有的则二者兼有之。说明同一个体对某一靶的NK效应细胞并非纯一群体,可有不同类型细胞组成,不同个体由于它们以往对靶抗原接触情况不同,可以通过不同的机制行使细胞毒效应。我们认为这个现象是可以理解的,因为人非纯系,各具不同的HLA系统,各人以往生活过程中接触的抗原各不相同,本实验应用肝癌细胞株作靶,虽然我们选择淋巴细胞的供主无肝炎史,但不能排除有与肝炎病毒相关抗原接触或隐性感染的可能性,而7402细胞的表面抗原不全清楚,它是否可能表达有与肝炎病毒相关抗原也未定论,况且我们进行的细胞毒试验是效靶接触48小时,在理论上也可能包含有激活或致敏的T淋巴细胞杀伤效应,可见较长时间的培育与短期<sup>51</sup>Cr释放试验的细胞毒机制不尽相同。最近报道人T细胞中Fc-R $\oplus$ 者称T<sub>G</sub>是NK和ADCC的效应细胞,并且证明NK和激活的淋巴细胞杀伤效应者不全相同<sup>[24]</sup>。

看来研究人体NK细胞较困难,但如果多选择几种靶,并同时研究靶抗原及用具有各种不同靶抗原的细胞进行竞争抑制试验,将有助于深入了解和研究NK细胞。

### 参 考 文 献

- [1] Tarkkanen, J. et al. 1980 *Scand, J, Immunol* 11: 383
- [2] Takasugi, M. et al. 1976. *U. Natl, Cancer. Inst* 56: 575
- [3] West, W. H. et al. 1977. *J. Immunol* 118: 355
- [4] Takasugi, M. et al. 1976 *J. Natl Cancer Inst* 57: 255
- [5] Herberman, R. B. et al. 1978 In "Advances in Cancer Research" G. Klein and Weinhouse Eds Vol 27 P305 Academic press New York
- [6] Kristencen, E. et al. 1978 *Cancer Immunol Immunother* 5: 71
- [7] West, W. H. et al. 1978 *J. Immunol.* 120: 90
- [8] Kay, J. D. et al. 1977 *J. Immunol* 118: 2058
- [9] Welsh, R. M. Jr et al. 1980 *Scand, J. Immunol* 11: 363
- [10] Glimcher, L. et al. 1977 *J. Exp. Med.* 145: 1
- [11] Kaplan, J. et al. 1978 *J. Natl Cancer Inst.* 60: 961
- [12] Welsh, R. M. Jr et al. 1980 *Scand. J. Immunol* 11: 363
- [13] "几种常见免疫测定方法" 上海肿瘤研究所 1978 (内部资料)
- [14] Klein, E. et al. 1977 *Int. J. Cancer* 19: 441
- [15] Parrillo, J. E. et al. 1978 *Scand. J. Immunol* 8: 99
- [16] David, L. E. et al. 1977 *J. Immunol* 119: 1401
- [17] Akira, D. et al. 1979 *Int. J. Cancer* 19: 747
- [18] Beverley, P. et al. 1979 *Nature* 278: 119
- [19] Kaplan, J. 1978 *J. Immunol* 121: 1366
- [20] Potter, MR. et al. 1979 *Immunology* 37: 187
- [21] Pope, G. R. et al. 1979 *Scand. J. Immunol* 9: 291
- [22] AH-KAU, et al. 1980 *J. Immunol* 124: 2336
- [23] Rosenberg, E. B. et al. 1974 *J. Natl Cancer Inst.* 52: 345
- [24] Maria, G. 1980 *J. Immunol* 123: 2438