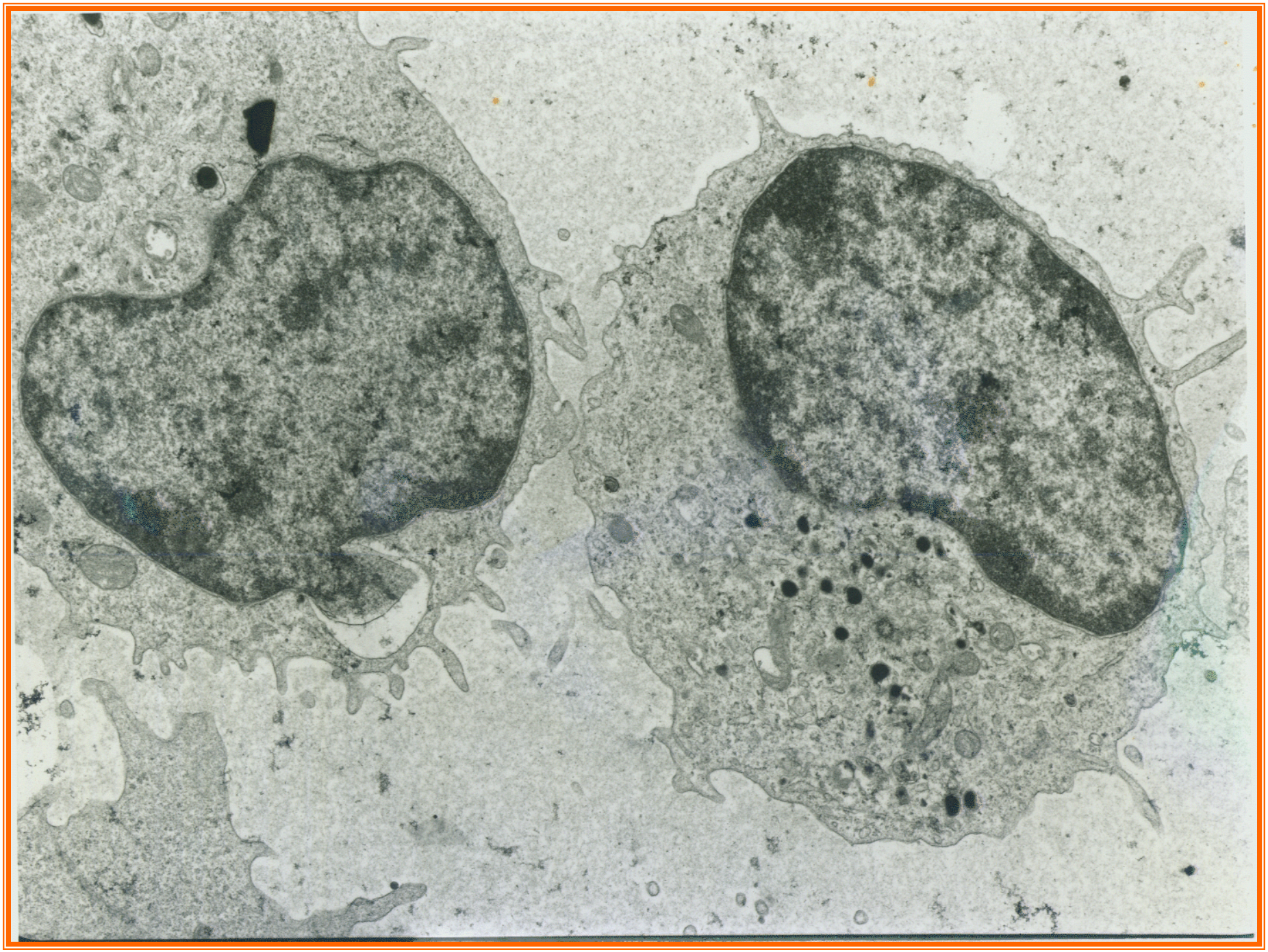
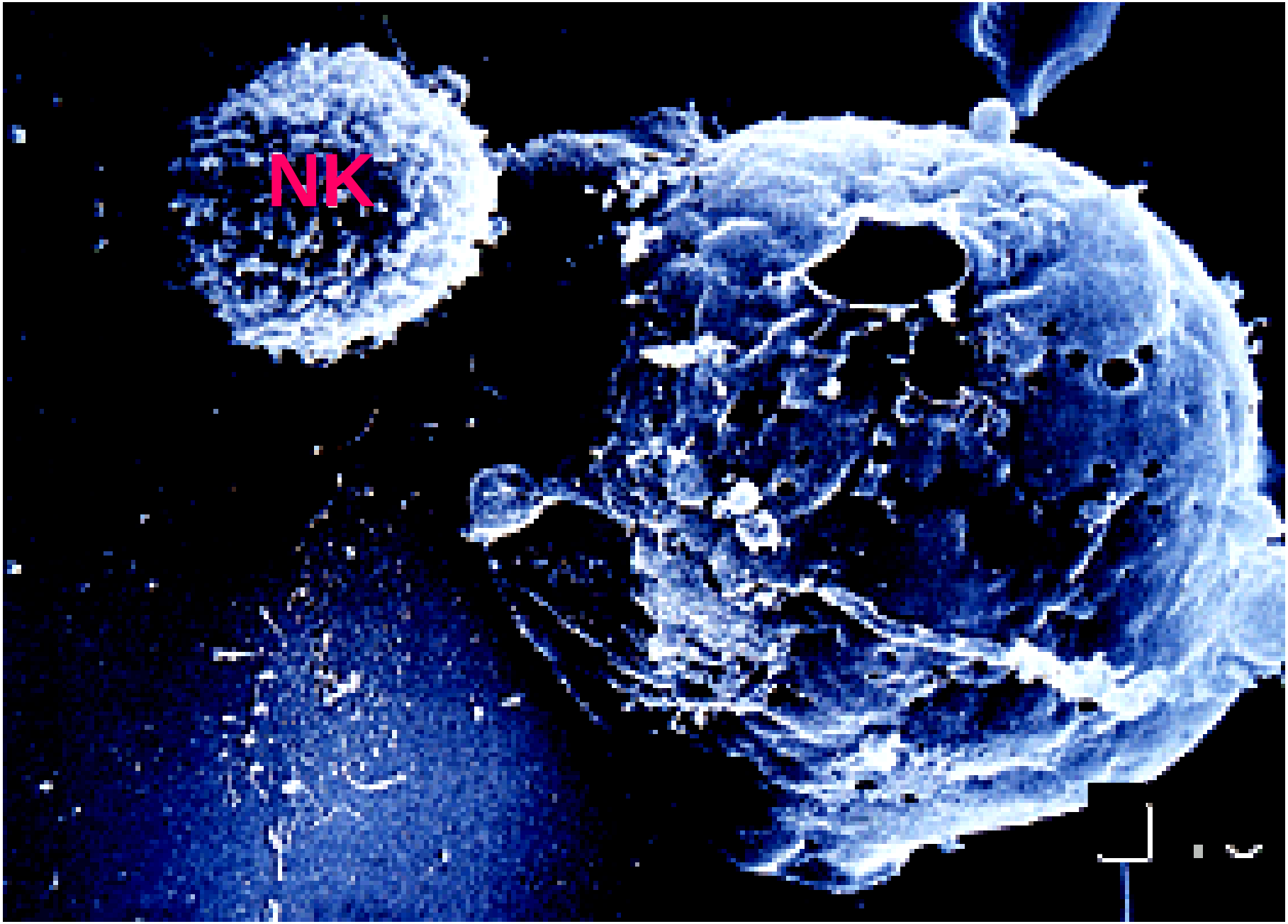
自然杀伤细胞
（Natural killer cell, NK）

张赟

第四军医大学免疫学教研室




NK

- NK细胞的研究历史
- NK细胞受体的分类
- NK细胞受体识别的配体
- NK细胞其它膜分子及其识别的配体
- NK细胞的生物学活性
- NK细胞的亚群
- NK细胞与临床
- NK细胞的发育分化

NK细胞的研究历史

早期研究

- 70年代初抗肿瘤研究中发现，无需Ab存在和预先致敏条件下即可杀伤肿瘤细胞的淋巴细胞
- 大颗粒淋巴细胞（LGL）
- 参与固有免疫（innate immunity）
- 如何区别“自身”和“非己”？

90年代有重要突破

- 90年代初提出“失去自己（missing self）”假设
- 发现NK细胞受体（种类繁多，活化型或抑制型）
- 鉴定出一批NK细胞受体识别的配体
- NK细胞表面标志（CD分子和黏附分子等）
- 信号转导、功能及临床研究的深入

NK细胞受体的分类

- 按其配体是否为MHC I类分子

  识别MHC I类(Ia或Ib)分子的受体

  识别非MHC I类分子的受体

- 按受体胞膜外区结构：IgSF和CL-SF

- 按其基因定位分为不同家族

  KIR、ILT/LIR、CD94/NKG2、Ly49和NKR-P1家族以及NCR家族

- 按功能：抑制型受体和活化型受体

按受体基因定位分为不同家族

KIR家族 (killer immunoglubulin-like receptor) IgSF

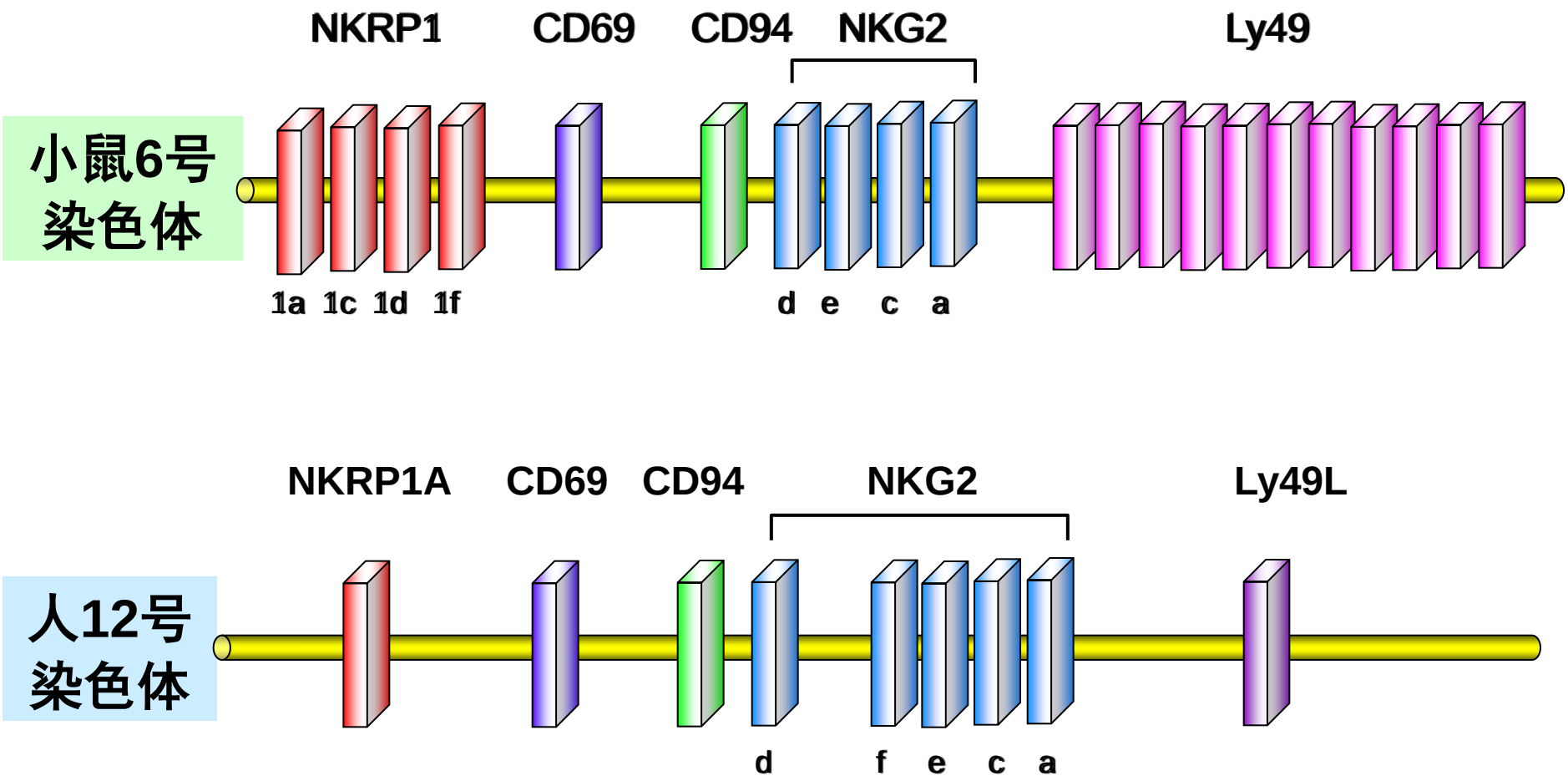
ILT/LIR家族(immunoglubulin-like transcript/leukocyte immunoglubulin-like receptor) IgSF

CD94/NKG2家族 CL-SF

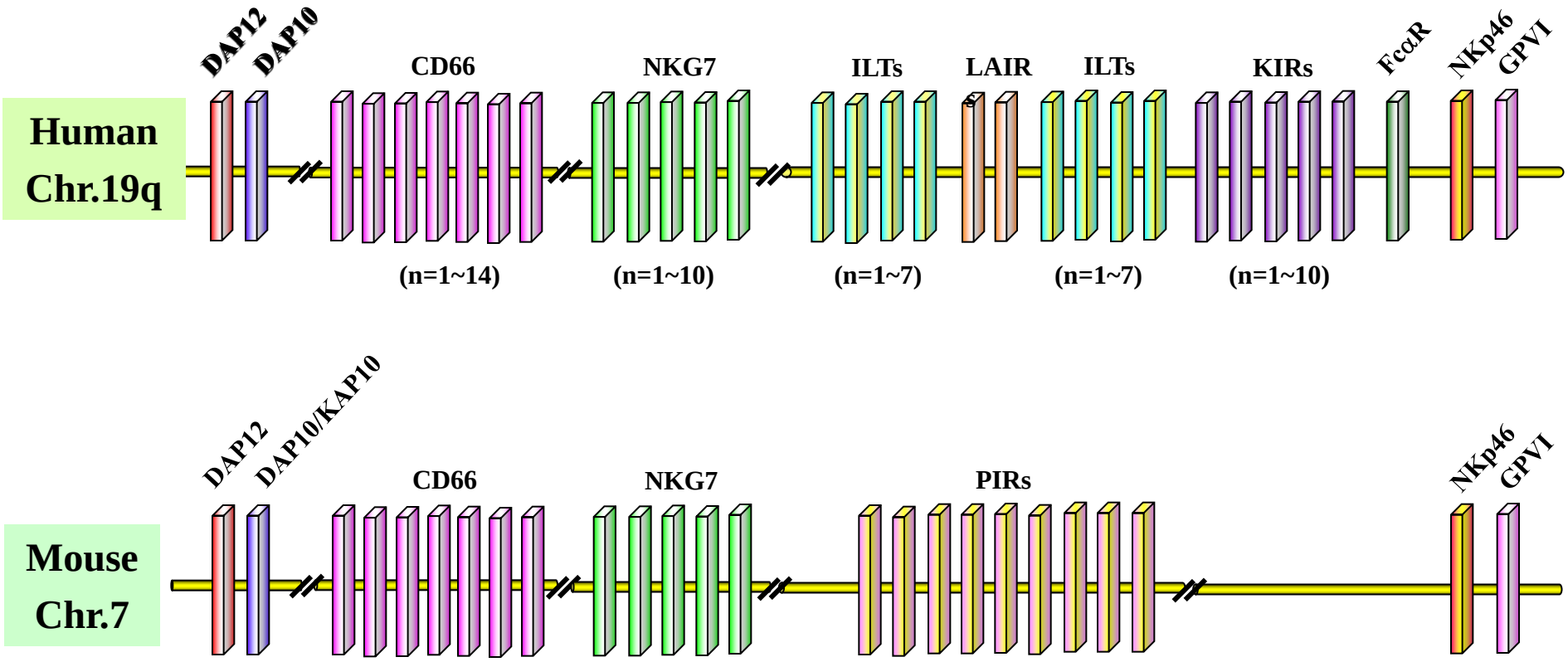
Ly49家族 CL-SF

NKR-P1家族 CL-SF

NCR家族(natural cytotoxicity receptor) IgSF

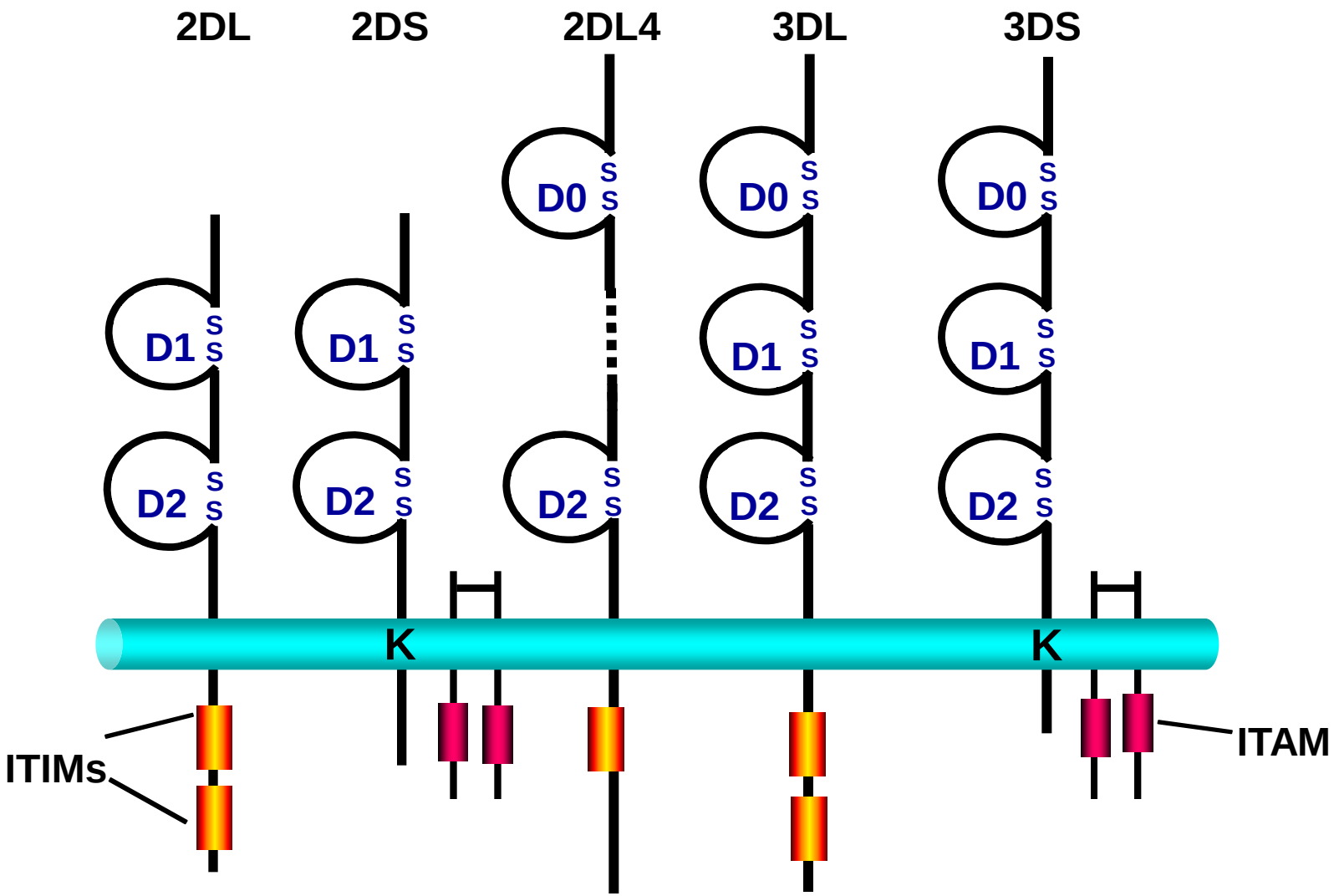

NKRP1
CD69
CD94
NKG2
Ly49
小鼠6号
染色体
1a 1c 1d 1f
d e c a
NKRP1A
CD69
CD94
NKG2
Ly49L
人12号
染色体
d f e c a

NK基因复合体

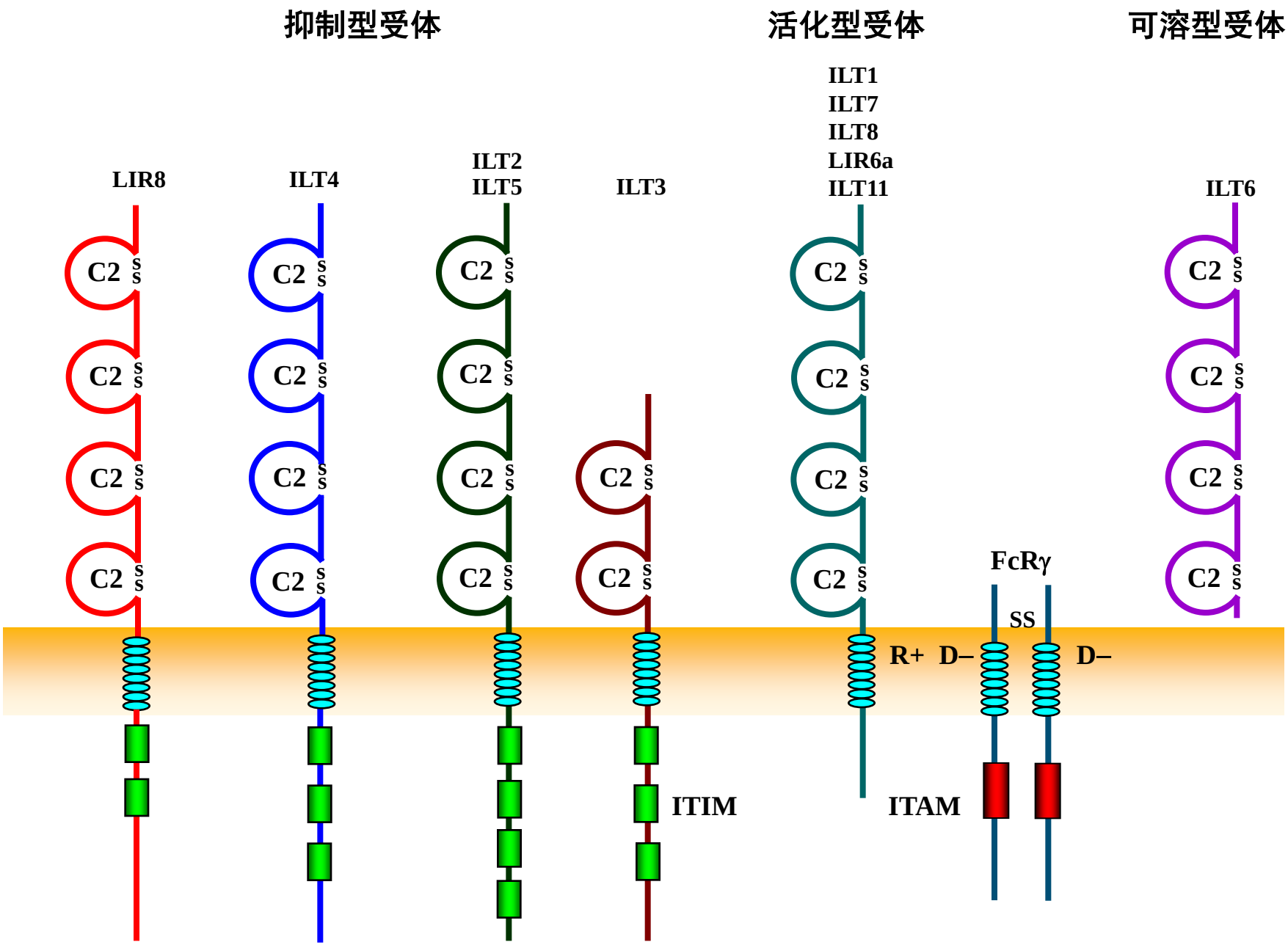


白细胞受体复合体(LRC)的组成

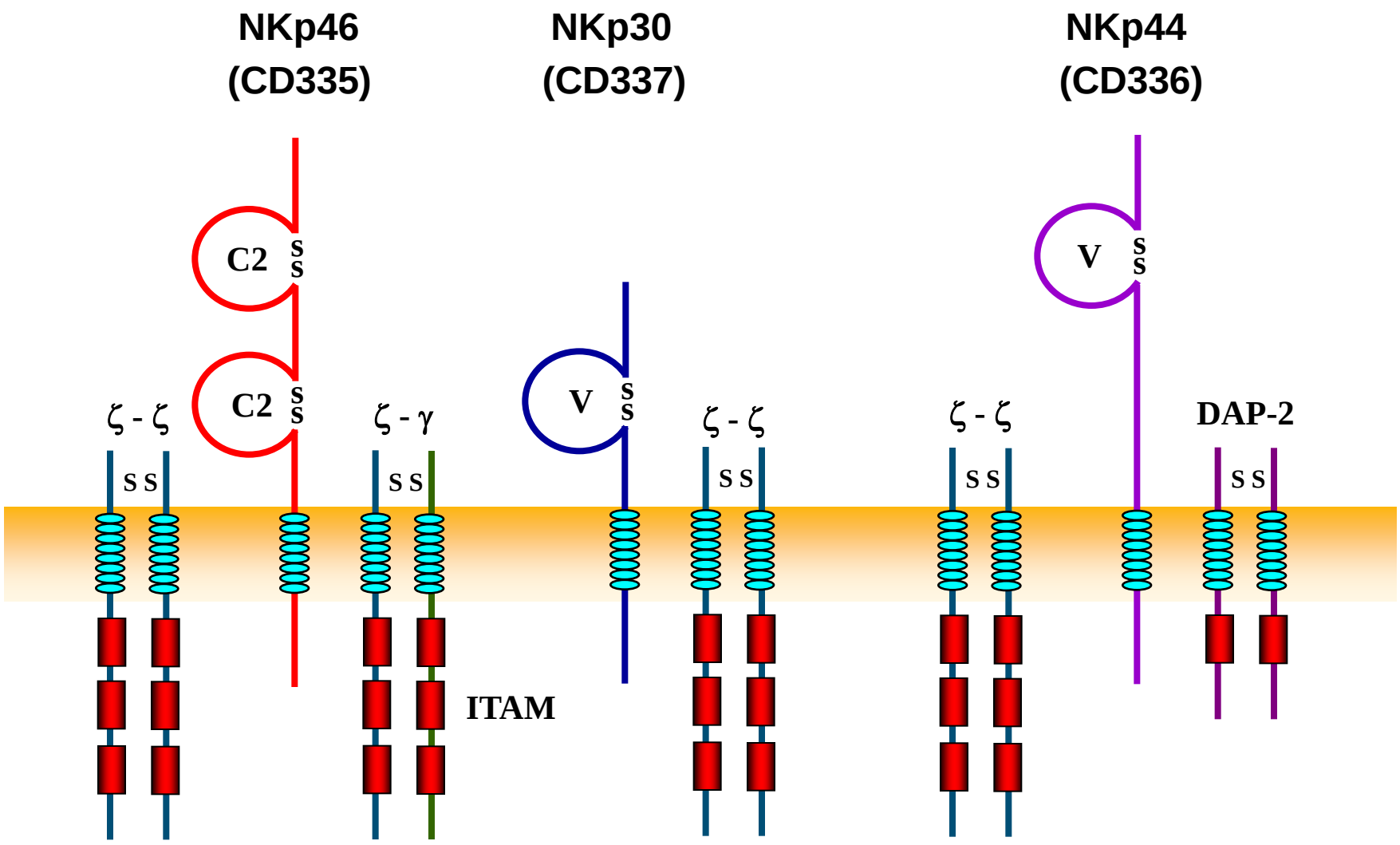
LRC: leukocyte receptor complex



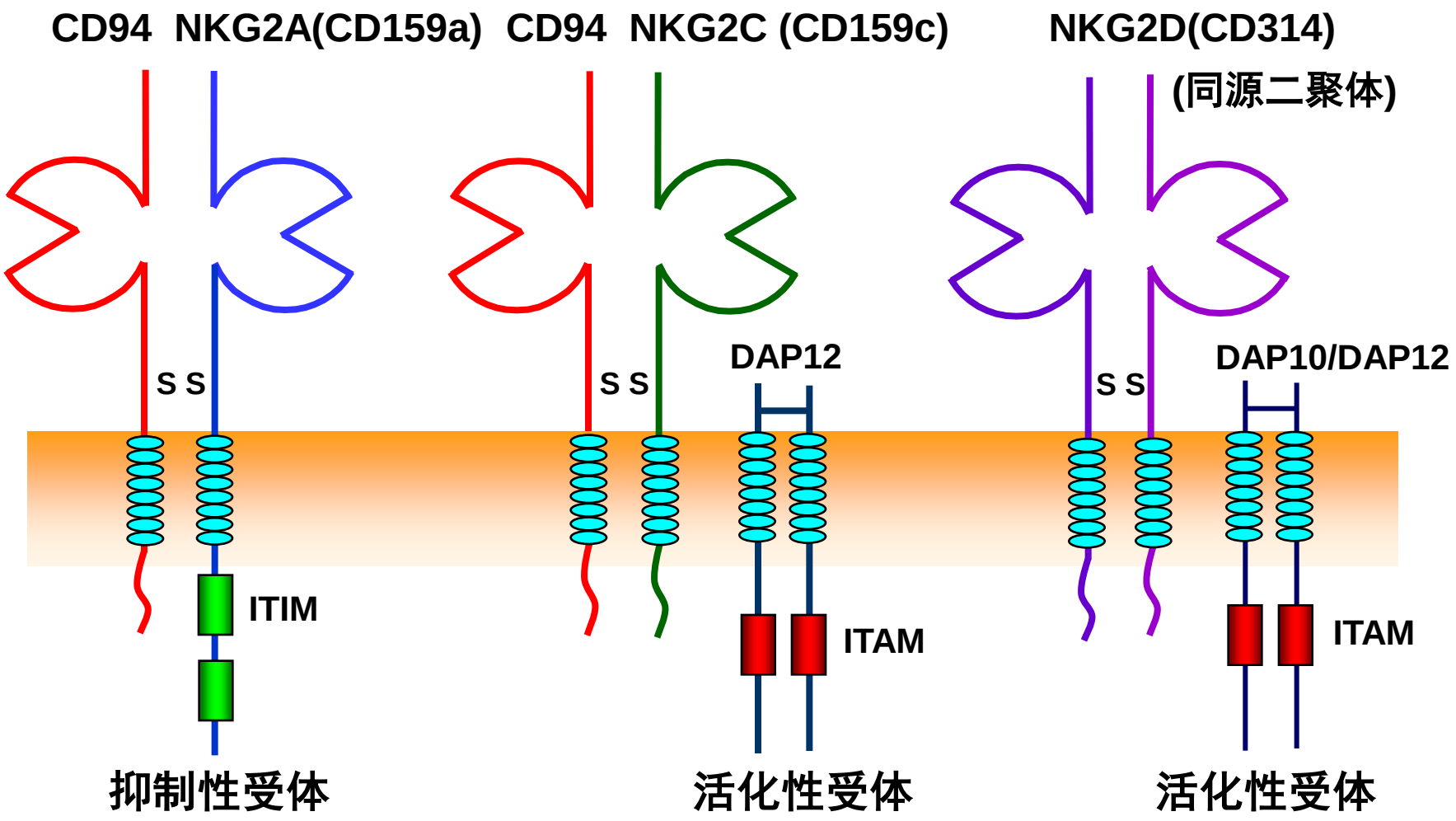
KIR分子的结构



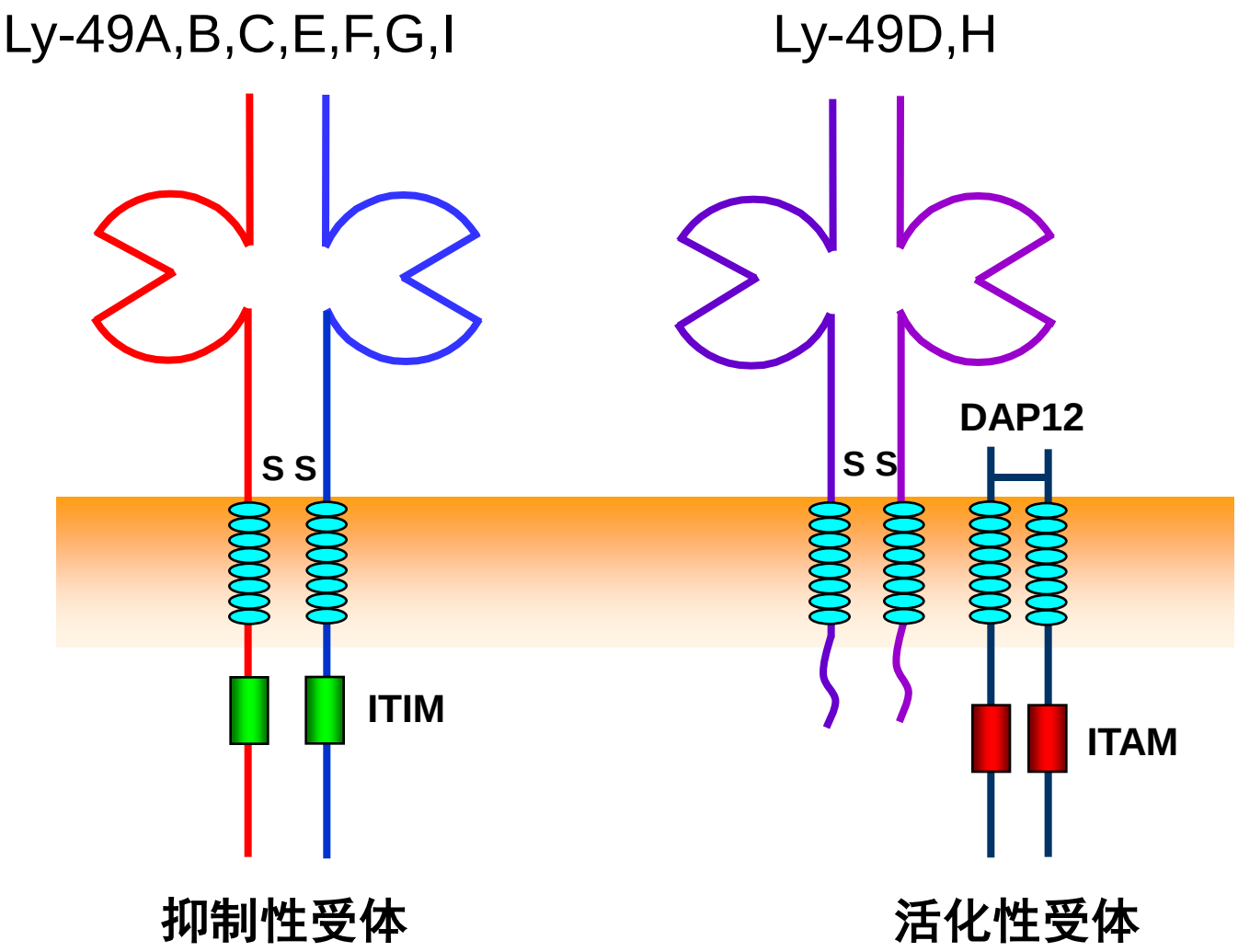
ILT/LIR家族的组成和分子结构



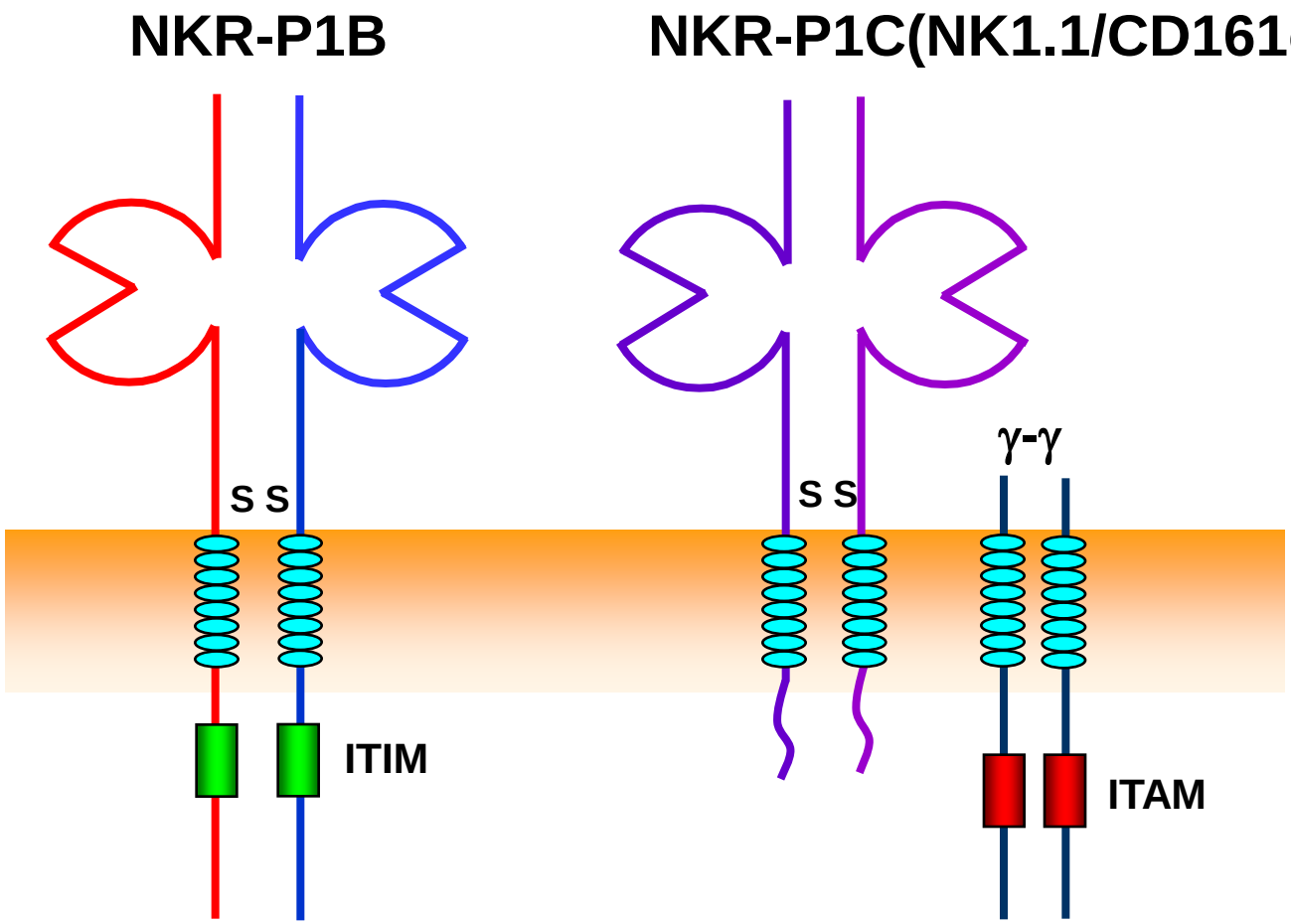
NCR的分子结构及其膜相关分子



CD94/NKG2的分子结构



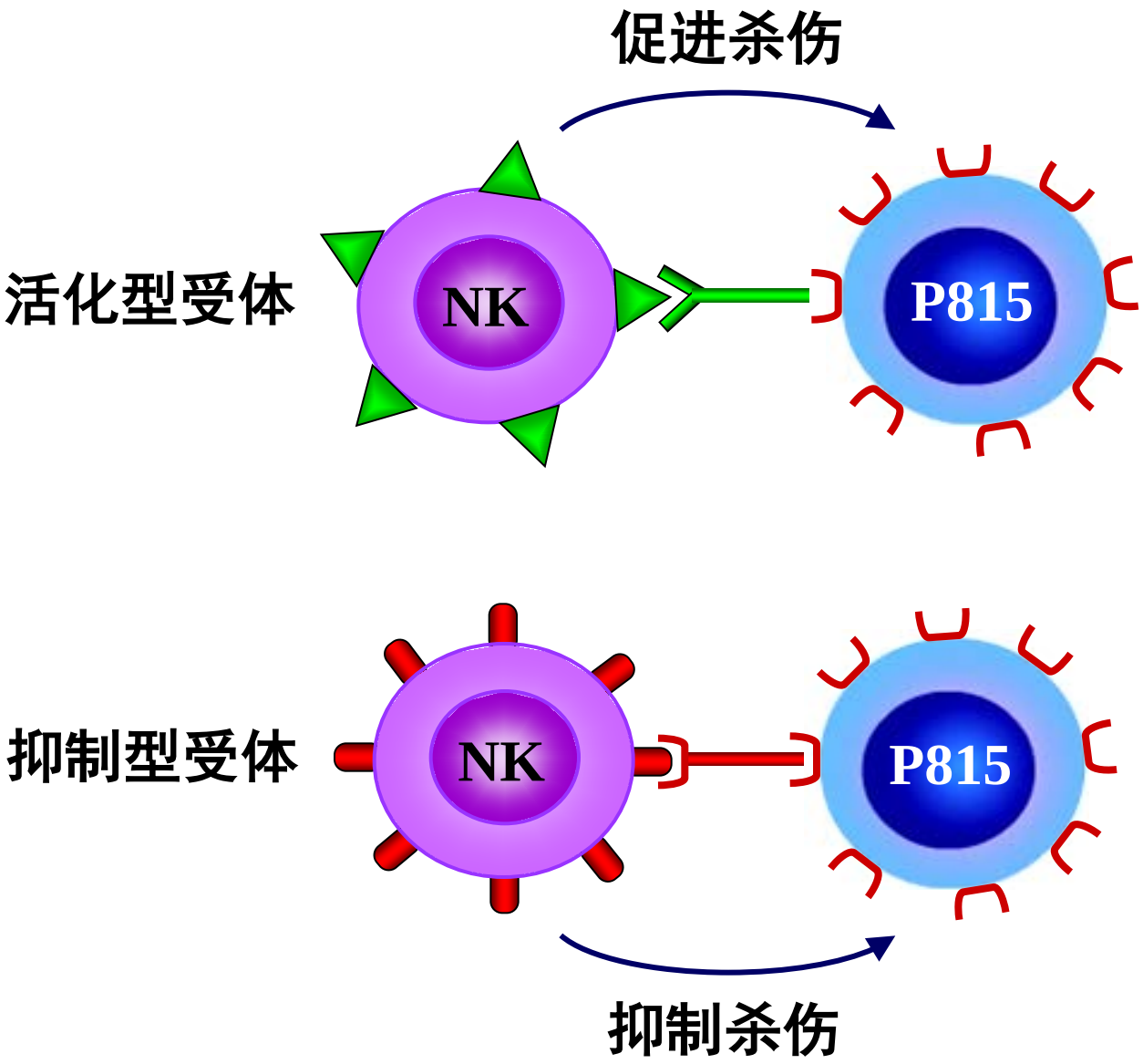
Ly49分子的结构



NKR-P1分子结构

NK1.1/CD161c单抗在研究中的应用

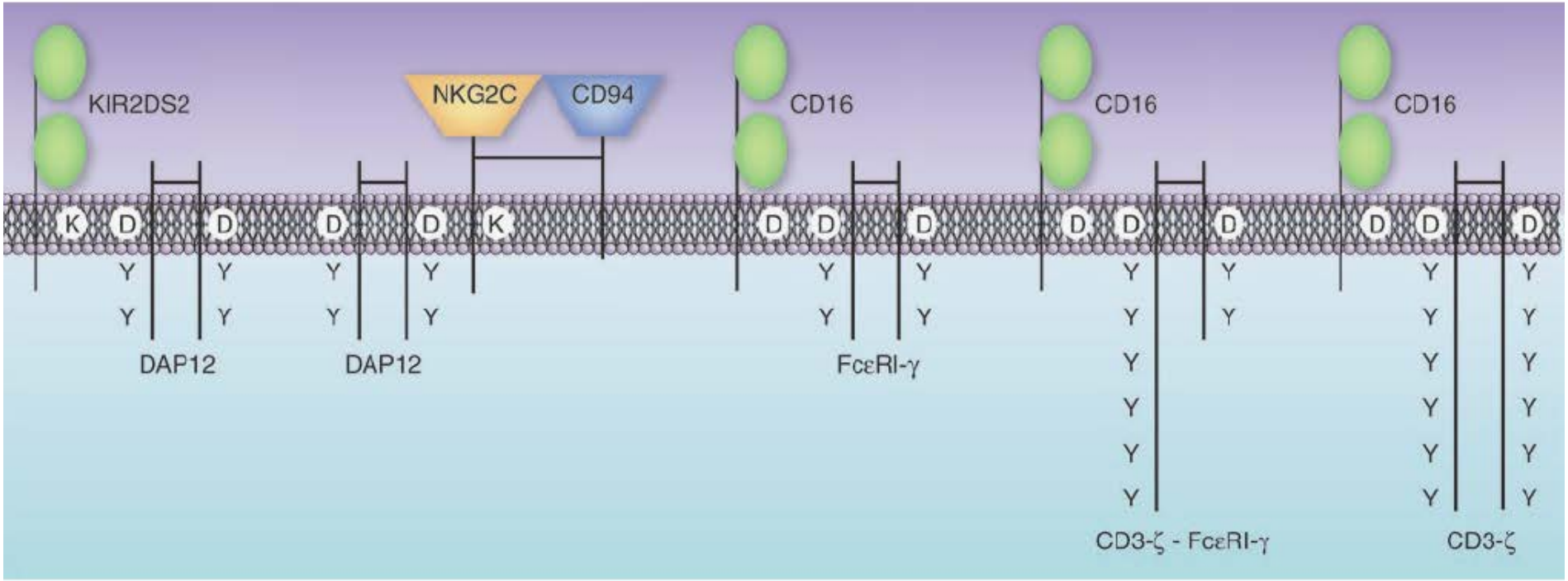
- 是小鼠NK细胞的标志
- 体内注射NK1.1 mAb是清除小鼠体内NK细胞的方法
- $NK1.1^{+}$ $CD3^{+}$为小鼠NK T细胞标志



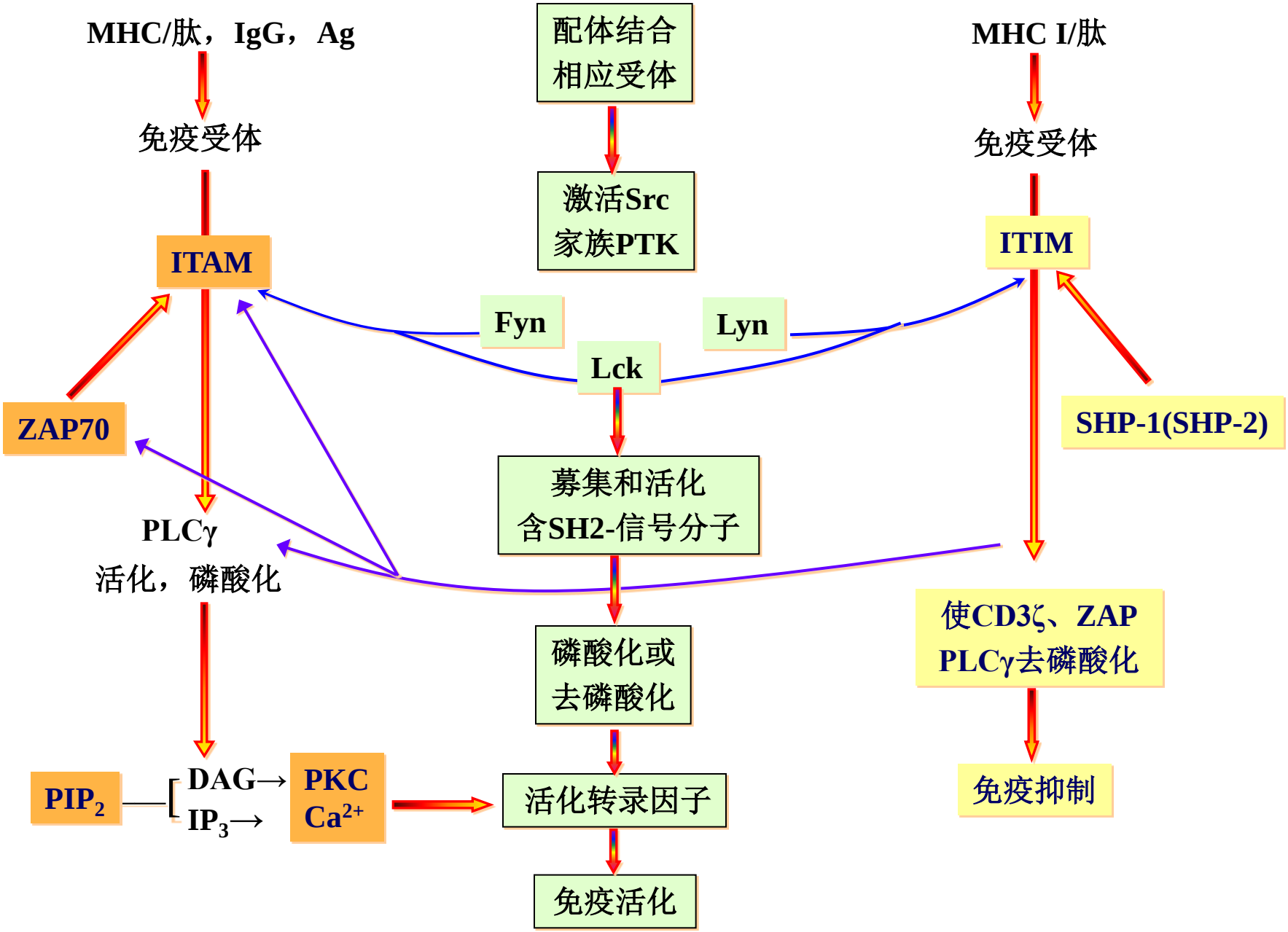
重导向杀伤试验确定NK活化型/抑制型受体

与具有ITAM膜相关分子相连的NK细胞受体

膜相关分子	ITAM基序数	相连的NK细胞受体
ζ–ζ	3/3	CD16、NKp46、NKp30
ζ–γ	3/1	CD16、NKp46
γ–γ	1/1	CD16、ILT1、ILT1样蛋白、ILT7 ILT8、LIR6a、NKR–P1C(CD161c)
DAP–12 (同源二聚体)	1/1	KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3 KIR3DS、NKp44、CD94/NKG2C、E Ly49D、Ly49H
DAP–10 (同源二聚体)	1/1	NKG2D



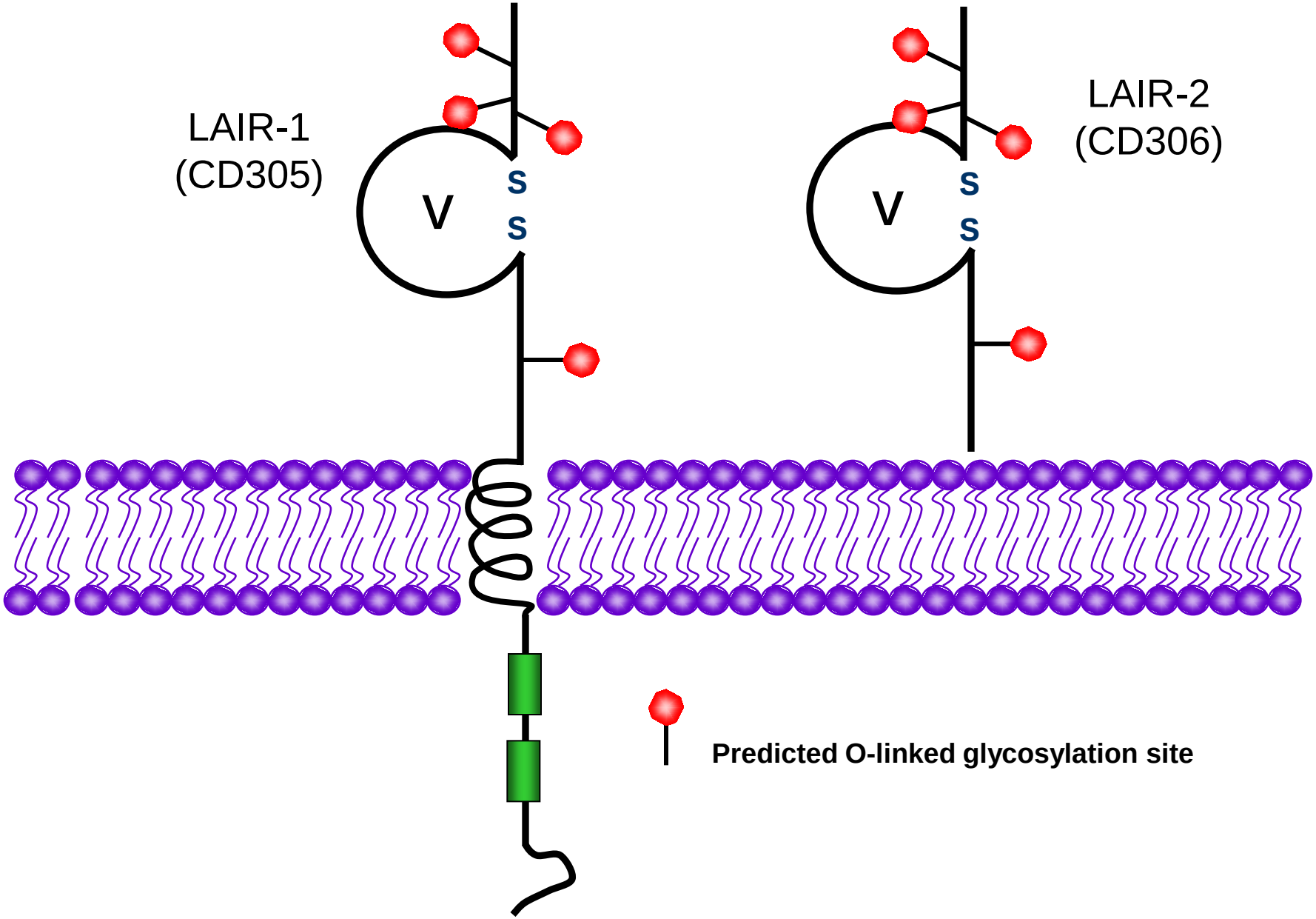
具有ITAM模体NK活化型受体示意图



ITAM、ITIM免疫受体与信号转导网络关系

NK细胞其它膜分子及其参与NK细胞的功能

种 类 和 成 员	参 与NK 功 能
整合素家族	
VLA1–6(β1)	促进NK杀伤功能,黏附内皮细胞,穿越血管,局部浸润
LFA-1(CD11a/CD18,β2)	黏附内皮细胞,迁移到淋巴结和组织
α4/β7	沿血管滚动
选凝素	
CD62L	穿越内皮细胞到组织
C型凝集素样超家族	
CD69	活化NK细胞
碳水化合物	
CD57	
CD15s	沿血管滚动
CD162R(PEN5)	结合L–selectin,黏附和迁移
Link结构	
CD44	穿越血管和局部浸润



LAIR-1 and LAIR-2结构示意图

NK细胞其它膜分子及其参与NK细胞的功能

种 类 和 成 员	参 与NK 功 能
CD16(FcγRIIIA)	活化NK,ADCC
CD160(BY55)	协同受体
CD2(LFA–2)	活化性受体,黏附内皮细胞, 穿越血管,局部浸润
CD226(PTA1/DNAM–1)	活化性受体
CD96	活化NK表达水平明显增加
PECAM–1(CD31)	黏附内皮细胞
CD56	不清
CD223(LAG–3)	活化NK细胞
CD244(2B4)	MHC非限制性杀伤,活化性受体
LAIR–1(9.1C3)	抑制性受体

NK细胞受体识别的配体

受体家族	识别配体
KIR家族	HLA Ia (A,B,C); HLA Ib(G)
LIR家族	HLA I, HLA-G
NCR家族	HA, B7-H6, BTA-3
CD49/NKG2家族	HLA-E
NKG2D	ULBP, MICA/B
Ly49家族	H-2 I 类分子
NKR-P1家族	LLT1, Clr-B

一、经典的MHC I类和 II类基因

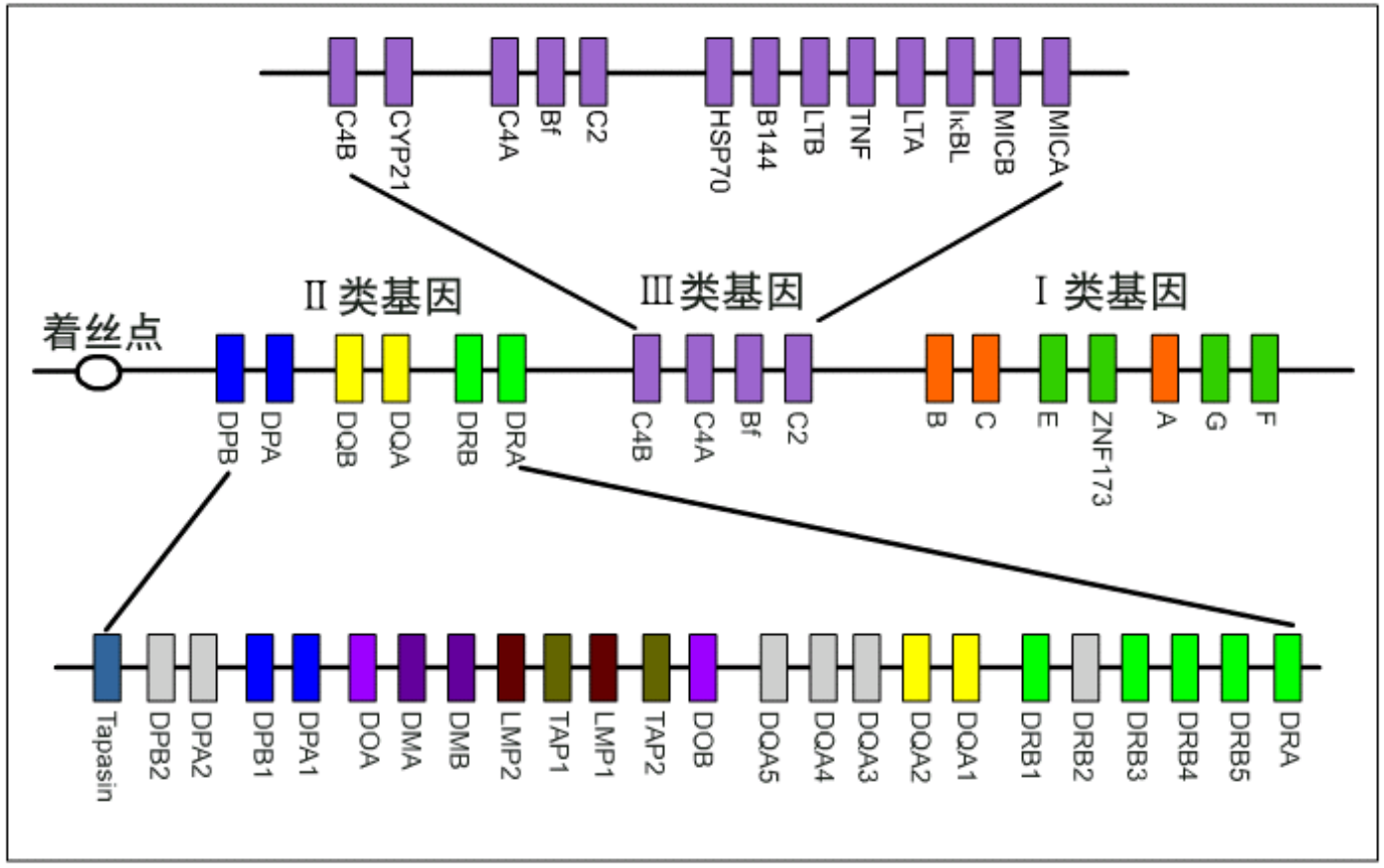
小鼠H-2　　人HLA

I 类基因

II 类基因

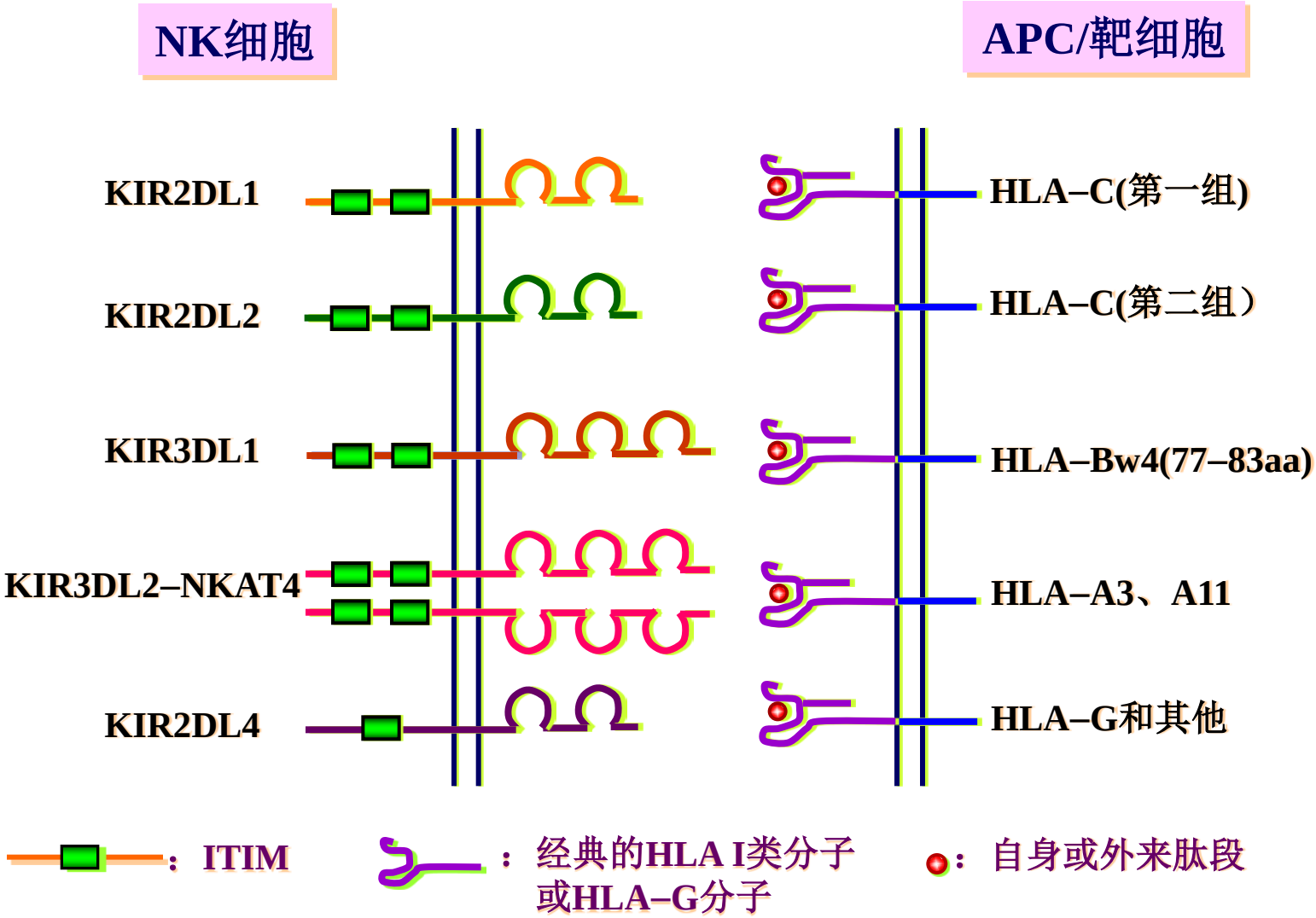
免疫功能相关基因

非经典的MI

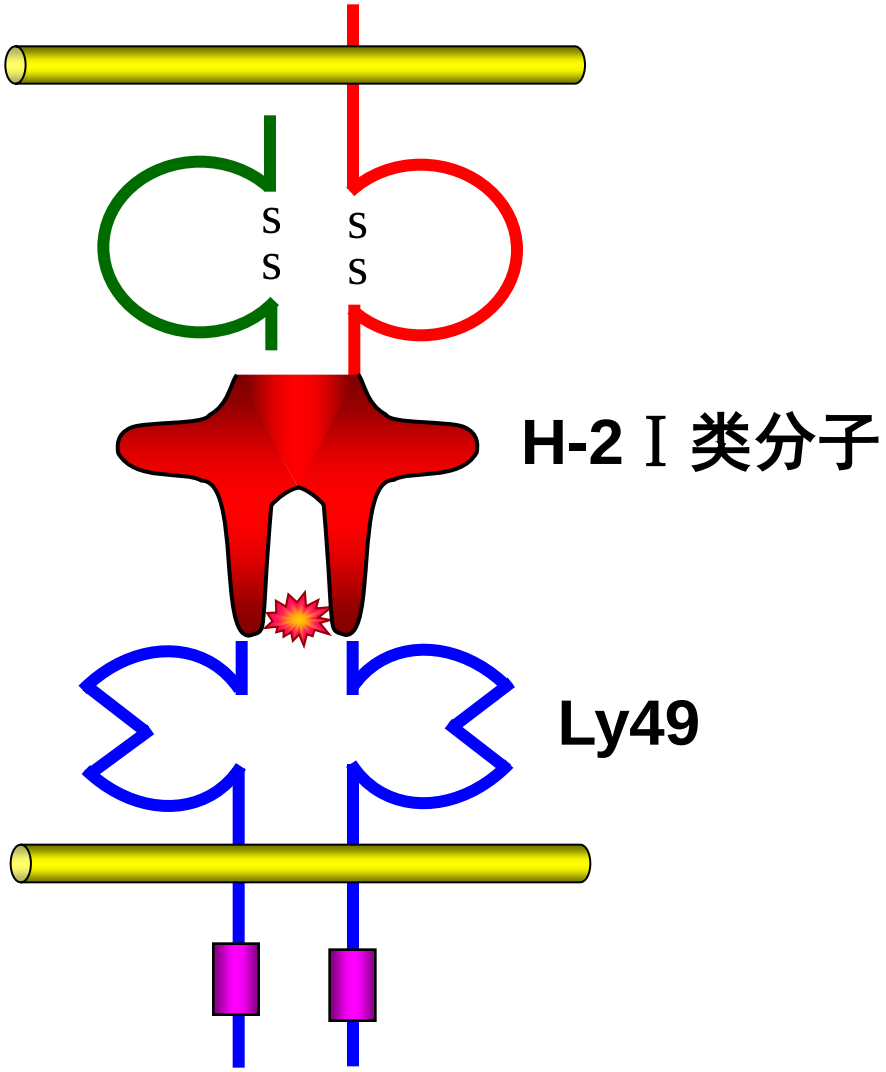


HLA胚系基因图

Immunology



KIR识别经典MHC I类分子的特异性



Ly49家族识别H-2 I类分子

配体为非经典MHC I类分子

- **HLA-E**

相应受体：CD94/NKG2

调节NK活性：CD94/NKG2A抑制性（为主）

CD94/NKG2C刺激性

胎盘滋养层表达HLA-E，抑制母体蜕膜中CD94/NKG2A^{+} NK的杀伤作用，维持胎盘免疫耐受; 肿瘤细胞丢失HLA-I类分子和上调HLA-E分子，分别逃逸CTL和NK两种细胞的杀伤

配体为非经典MHC I类分子

- **HLA-G**

  相应配体：ILT2、ILT4、KIR2DL4

  表达：高表达于胎盘外绒毛细胞滋养层

  作用：抵抗NK细胞杀伤，维持胎盘免疫特免作用；

  黑素瘤可高表达HLA-G，抑制NK杀伤

NCR的配体

- NKp46　血凝素 (HA)(如流感病毒)
- NKp44　HA(如流感病毒), BCG
- NKp30　BAT3 (HLA-B associated transcript 3)
  B7-H6

HLA-B相关转录物3(BAT3)由肿瘤细胞所释放,B7-H6表达于肿瘤细胞

配体为凝集素分子

- 小鼠抑制性受体NKR-P1B配体

C型凝集素相关b (C type lectin-related b, Clr-B)，同源二聚体，编码基因定位于NK基因复合体，肿瘤细胞表达Clr-B水平与对杀伤敏感性相关

- 人抑制性受体NKR-P1A配体

凝集素样转录物1 (lectin-like transcript 1, LLT1)，与人NKR-P1A结合后抑制NK细胞的细胞毒和IFN-γ分泌。胶质瘤细胞高表达LLT1，与肿瘤免疫逃逸有关

其它NK细胞膜分子识别的配体

NK细胞膜分子	结构特征	相 应 配 体
NKR–P1A(大鼠)	NKD	多种碳水化合物
CD69	NKD	不清
CD2(LFA–2)	IgSF	LFA–3
CD16(FcγR IIIA)	IgSF	IgG Fc段
CD56(NCAM)	IgSF	CD56
CD96(Tactile)	IgSF	CD155
CD226(PTA1/DNAX–1)	IgSF	CD155, CD112
NKG2D	IgSF	ULBP,MICA/B
CD244(2B4)	IgSF	CD48
CD223(LAG3)	IgSF	MHC II类分子
CD57	寡糖	L–selectin,P–seletin、LN
CD162R	碳水化合物	L–selectin
CD305(LAIR-1)	IgSF	胶原

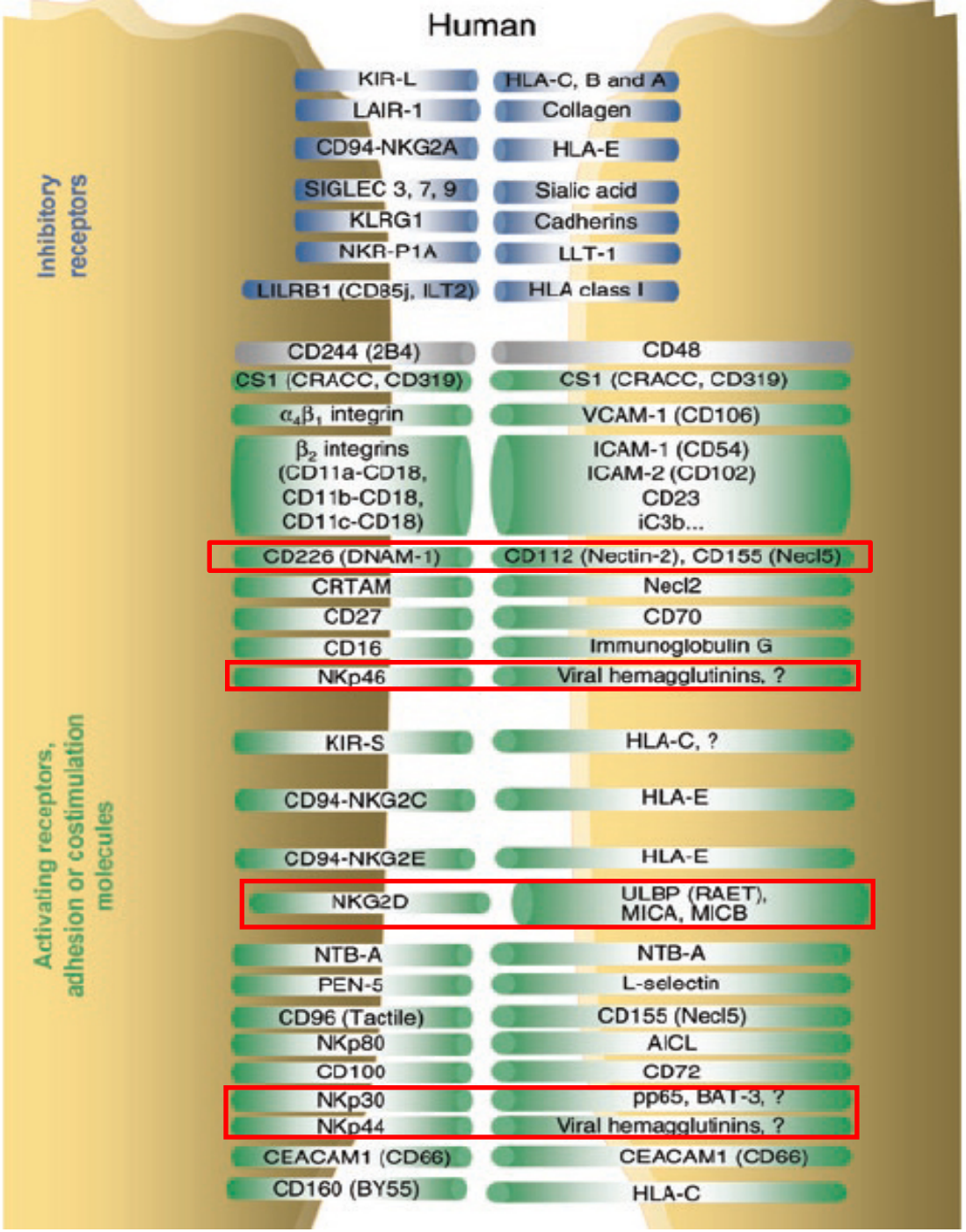
参与NK细胞识别靶细胞的黏附分子

NK细胞膜分子	靶细胞上相应配体
IgSF	
CD2	LFA–3
CD16	结合靶细胞上的IgG
PTA1	CD155, CD112
CD96	CD155
CD160(BY55)	HLA-C
整合素	
LFA–1	ICAM–1, –2
Mac–1,p150,95	ICAM–1, –2
CD44	HA,FN,MAdCAM–1

NK细胞参与黏附、穿越内皮细胞的膜分子

作用时相	NK细胞膜分子	配　体
滚　动	L–selectin(CD62L)	sLeX (CD15s)
	sLeX(CD15s)	E–selectin(CD62E),P–selectin(CD62P)
	α4/β7	VCAM–1 (CD106), MAdCAM–1,FN
	CD57	P–selectin,L–selectin(CD62L),LN
黏附内皮细　胞	LFA–1(CD11a/CD18)	ICAM–1(CD54), ICAM–2(CD102)
	VLA–4(α4/β1)	VCAM–1, FN
	LFA–2(CD2)	LFA–3(CD58)
	PECAM–1(CD31)	PECAM–1
穿越血管和浸润	VLA–1 (α1/β1)	CO,LN
	VLA–2 (α2/β1)	CO,LN
	VLA–4 (α4/β1)	FN
	VLA–5(α5/β1)	FN
	VLA–6(α6/β1)	LN
	CD44	HA,FN,CO
	LFA–2	LFA–3

与活化NK细胞功能相关的膜分子



Publishing Group http://www.nature.com/natureimmunology

NATURE IMMUNOLOGY
VOLUME 9 NUMBER 5
MAY 2008

NK细胞的生物学活性

- 细胞毒

  方式：自然杀伤和ADCC

  途径：脱颗粒途径(穿孔素、粒酶B)和凋亡诱导配体途径

  (Fas/FasL、TRAIL/DR4 DR5和TNF/TNFR)

- 合成和分泌细胞因子发挥免疫效应和免疫调节功能

  IFN-γ：活化Mϕ，诱导Th0→Th1，Ig类别转换

  TNF：直接杀伤靶细胞和免疫调节作用

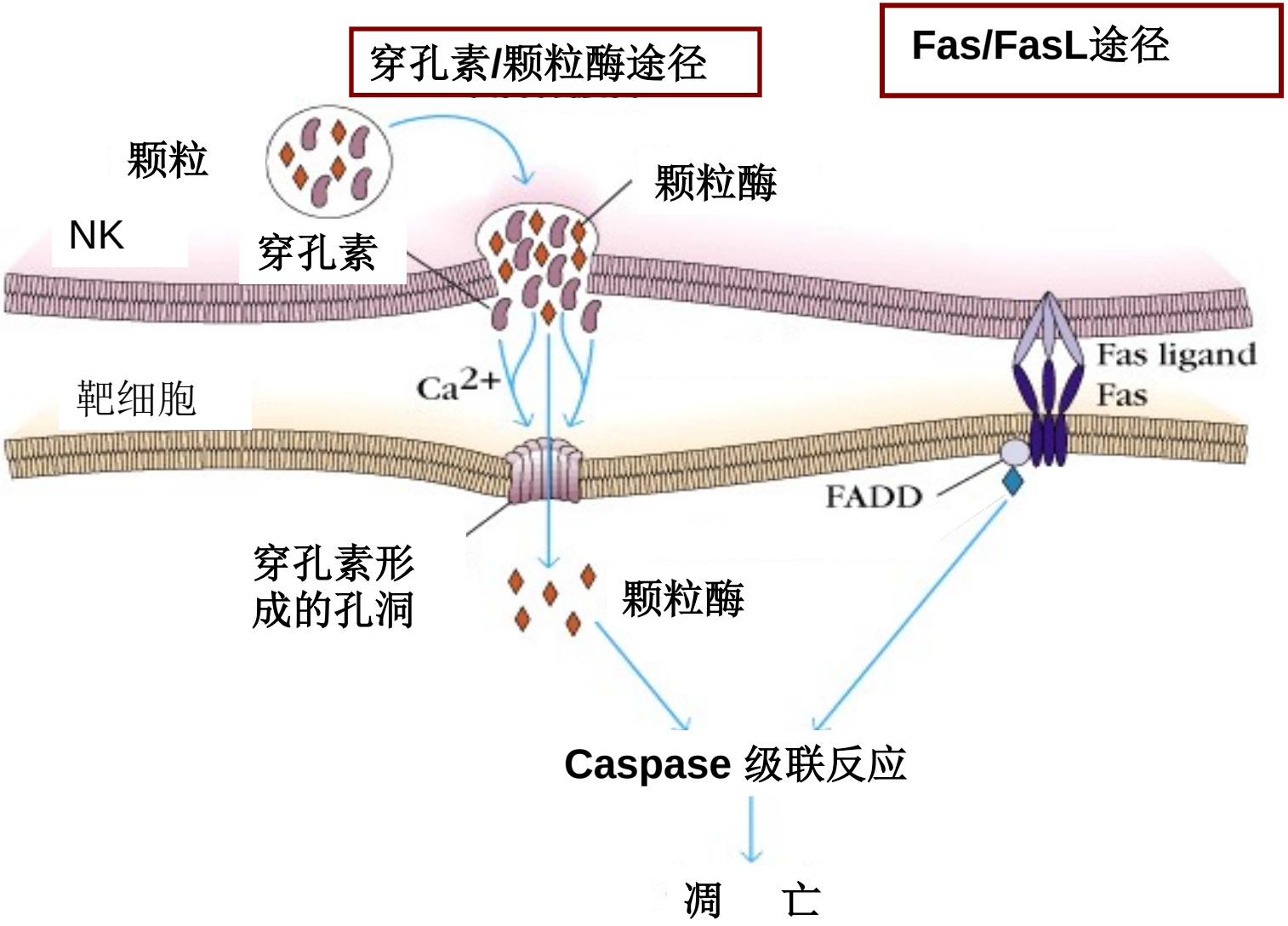
  GM-CSF、M-CSF：可能参与造血调控

  IL-10和TGF-β：免疫负调节

- 抗原提呈功能：活化NK细胞(NKp44$^+$ MHCⅡ$^+$ CD86$^+$)

  具有抗原提呈功能, 细胞毒活性和细胞因子产生能力也明显升高

细胞毒作用


穿孔素/颗粒酶途径
Fas/FasL途径
颗粒
颗粒酶
NK
穿孔素
Fas ligand
Fas
靶细胞
Ca2+
FADD
穿孔素形
成的孔洞
颗粒酶
Caspase 级联反应
凋　亡

快速

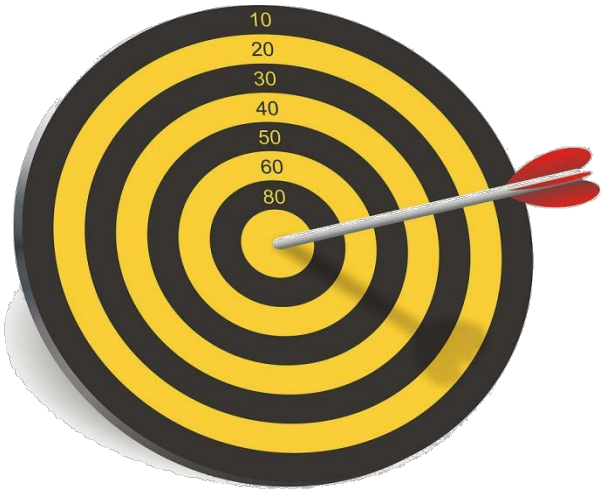
数分钟内发生，数小时后靶细胞被杀伤。

高效

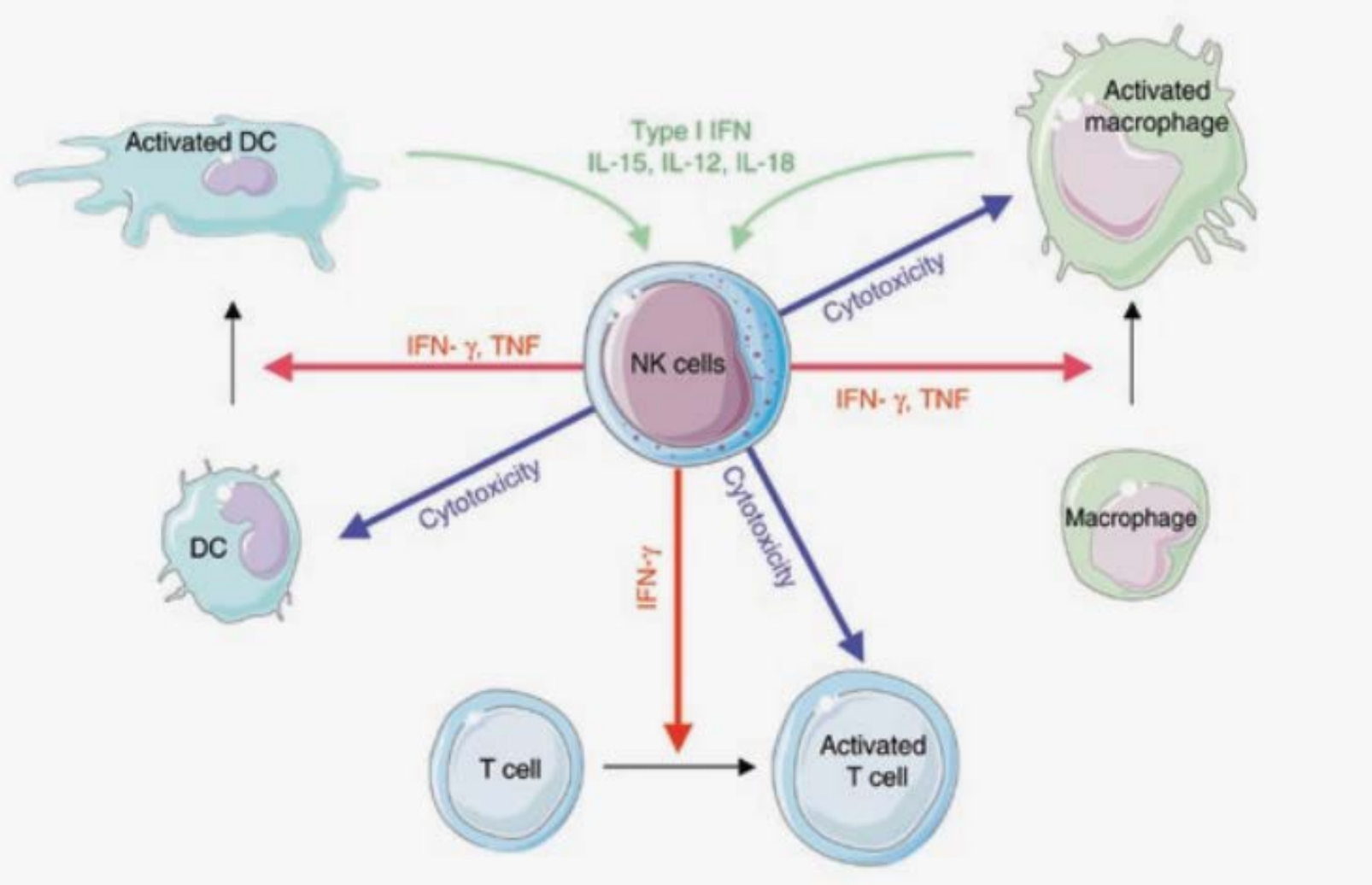
连续杀伤多个靶细胞，自身保持完好。

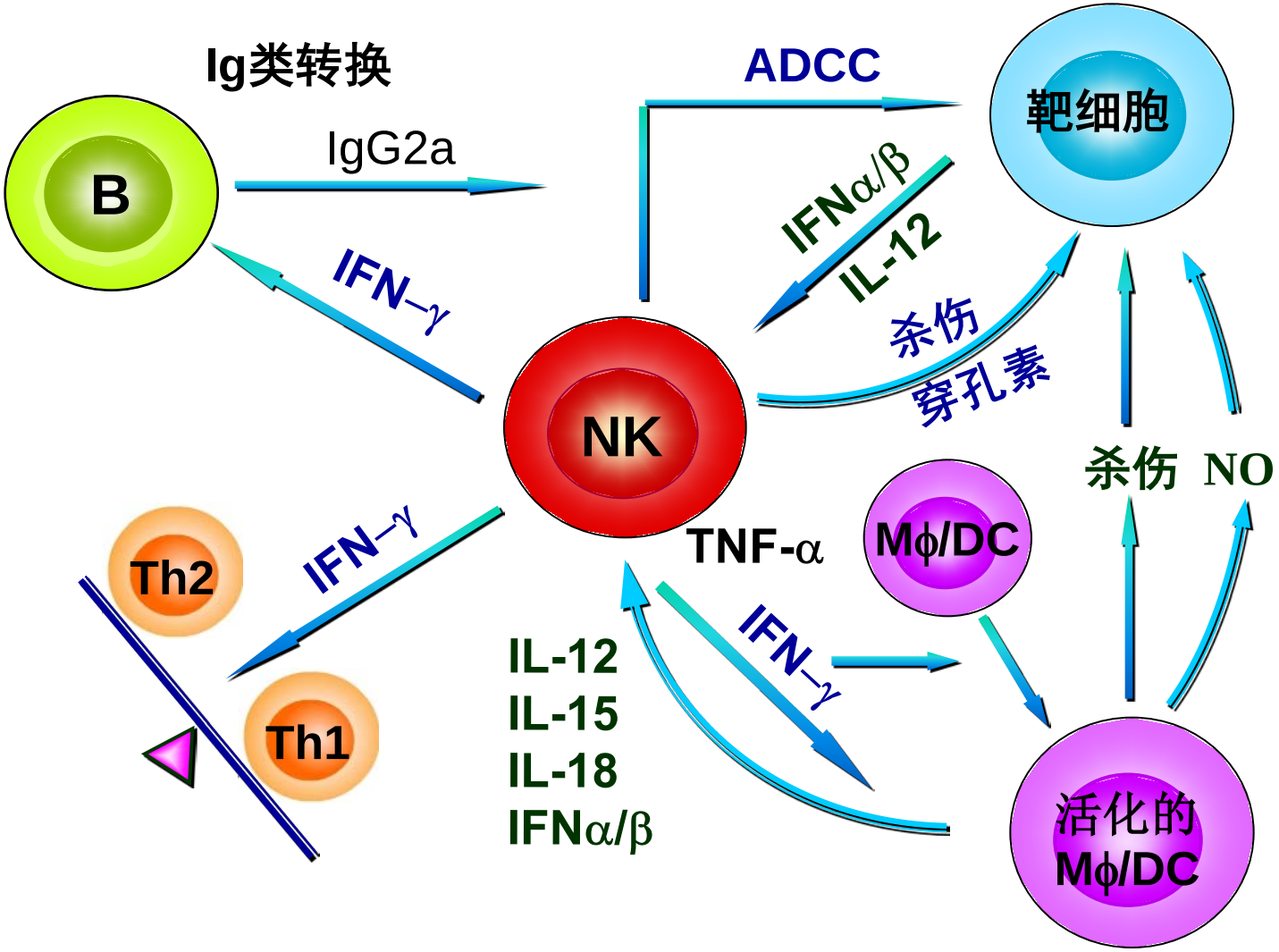
定向

只杀伤靶细胞，而不杀伤邻近的正常细胞。

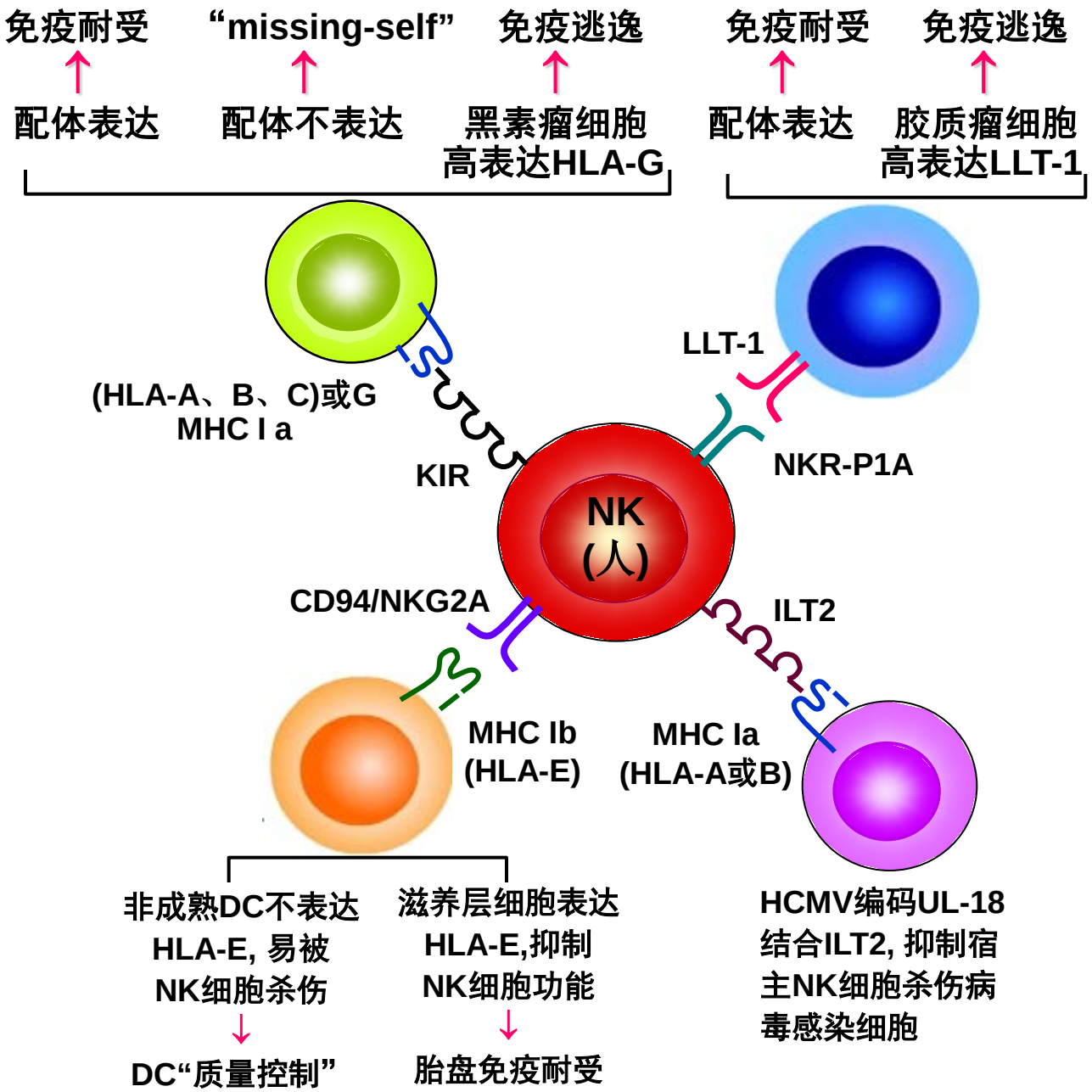


合成和分泌细胞因子

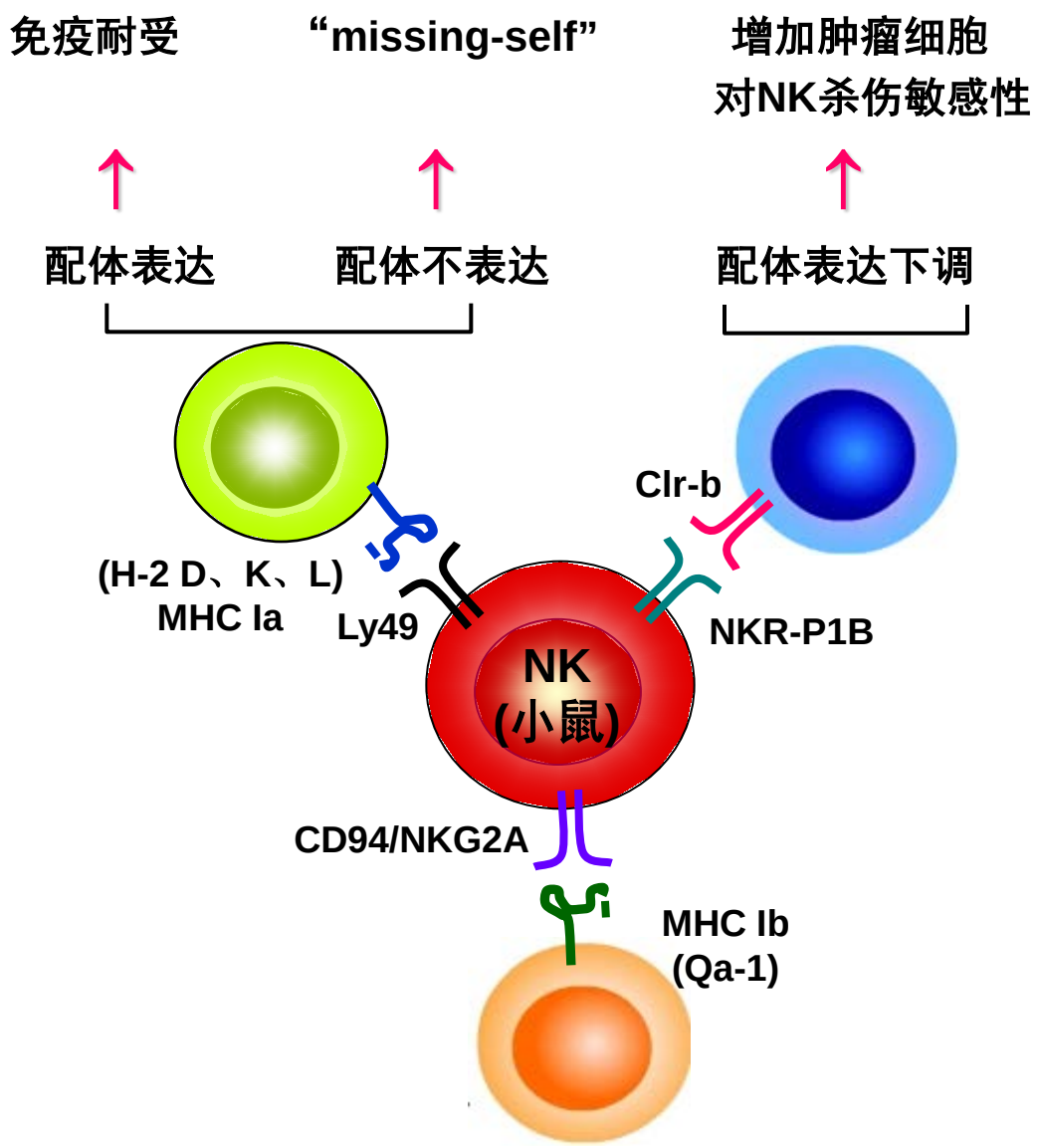

Activated DC
Type I IFN
IL-15, IL-12, IL-18
Activated macrophage
Cytotoxicity
IFN- γ, TNF
NK cells
IFN- γ, TNF
Cytotoxicity
DC
Cytotoxicity
IFN-γ
Macrophage
T cell
Activated T cell



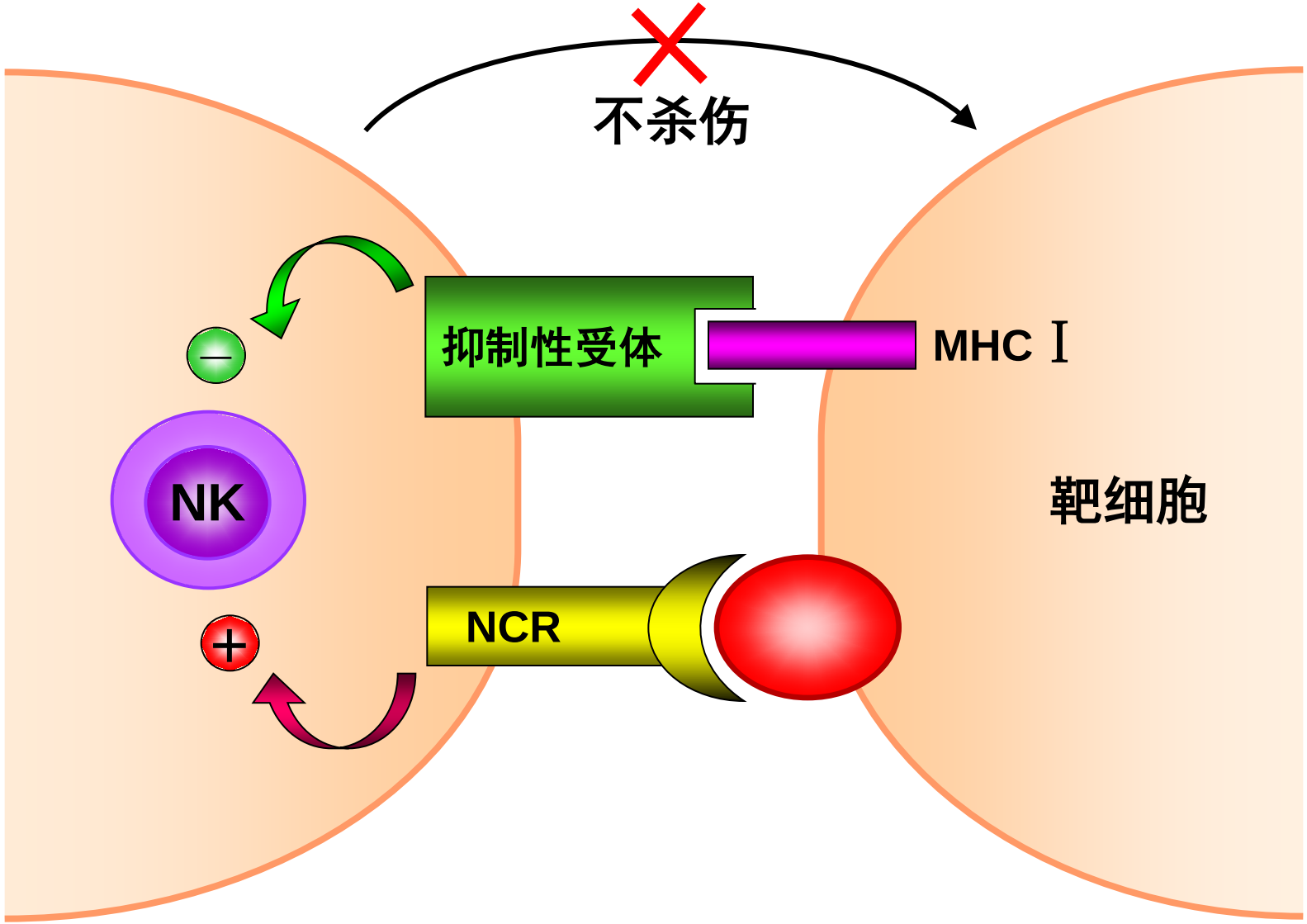
NK细胞参与抗感染的作用机制



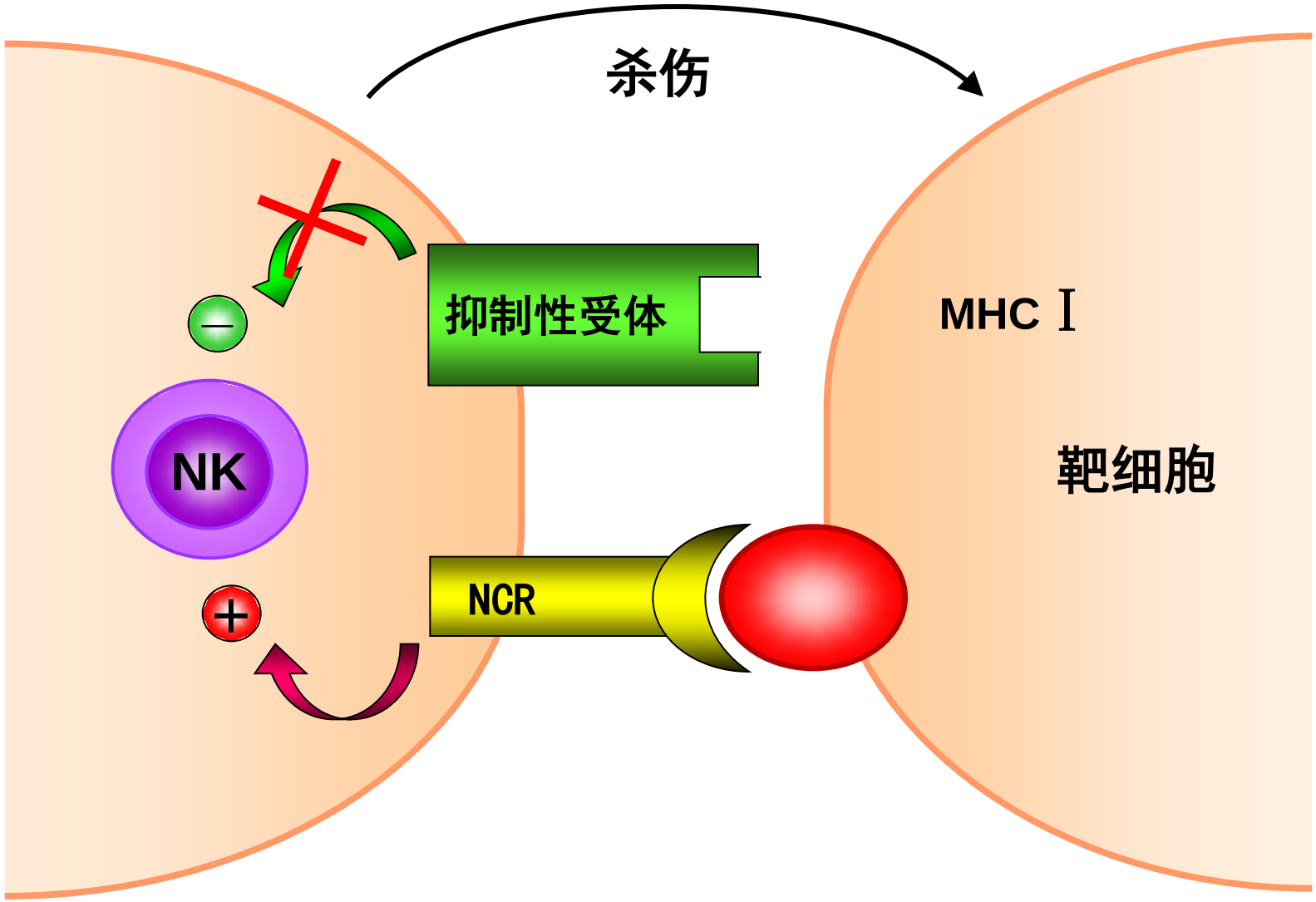
人NK细胞抑制型受体与相应配体结合参与免疫调节



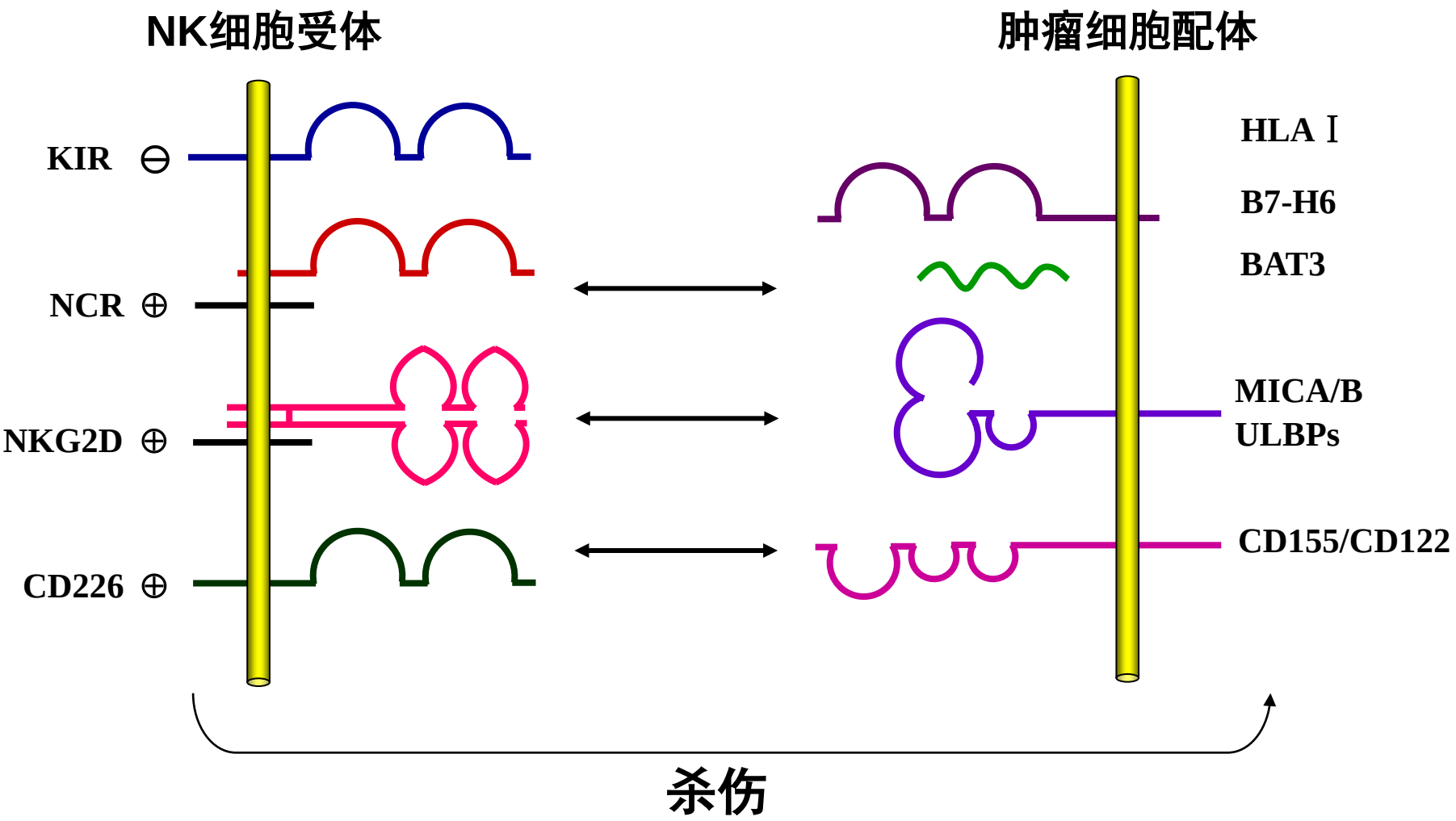
小鼠NK细胞抑制型受体与相应配体结合参与免疫调节



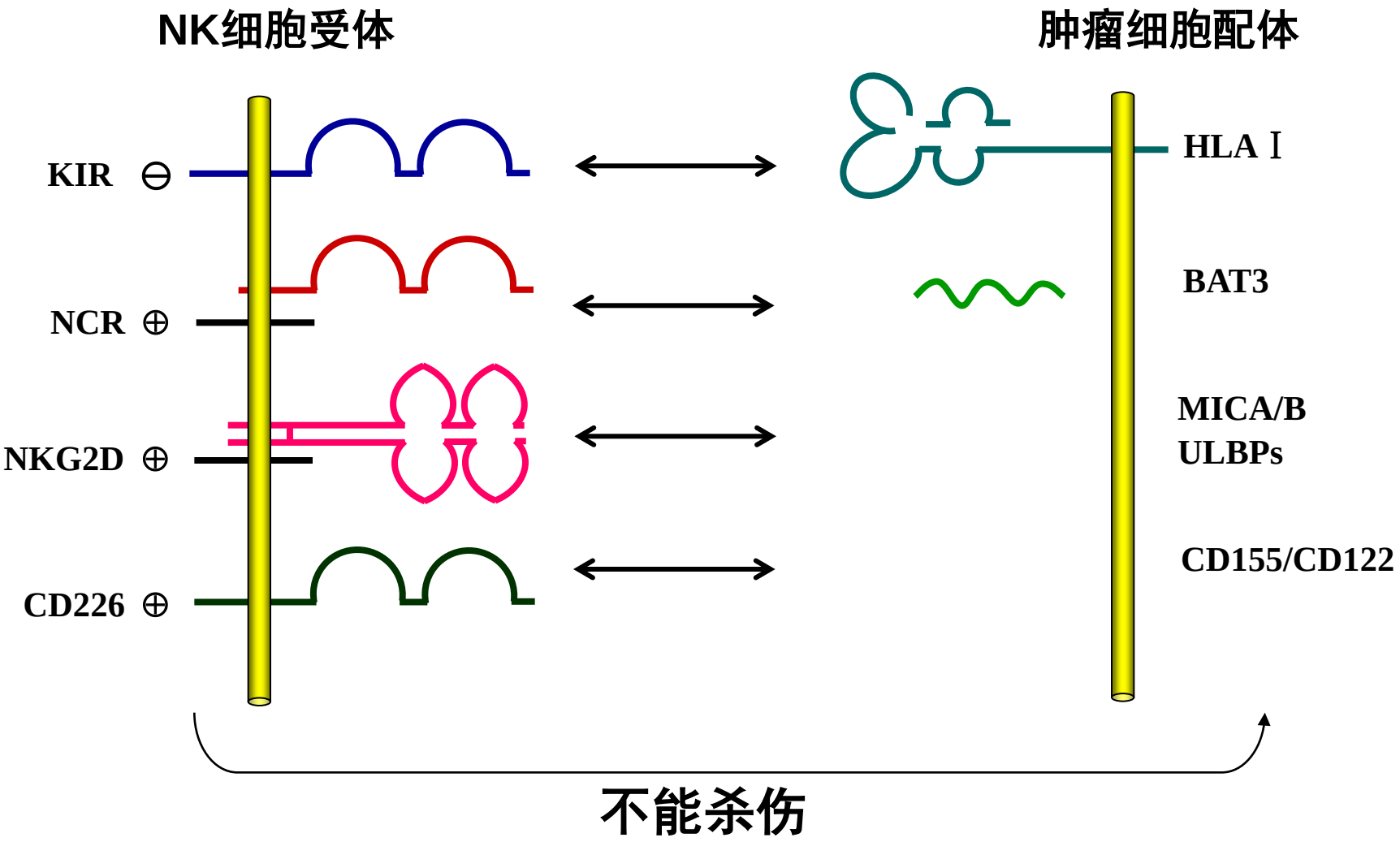
NKp46/p30/p44杀伤靶细胞示意图



NKp46/p30/p44杀伤靶细胞示意图



NK细胞抑制型和杀伤型受体的平衡决定NK细胞杀伤肿瘤细胞的活性

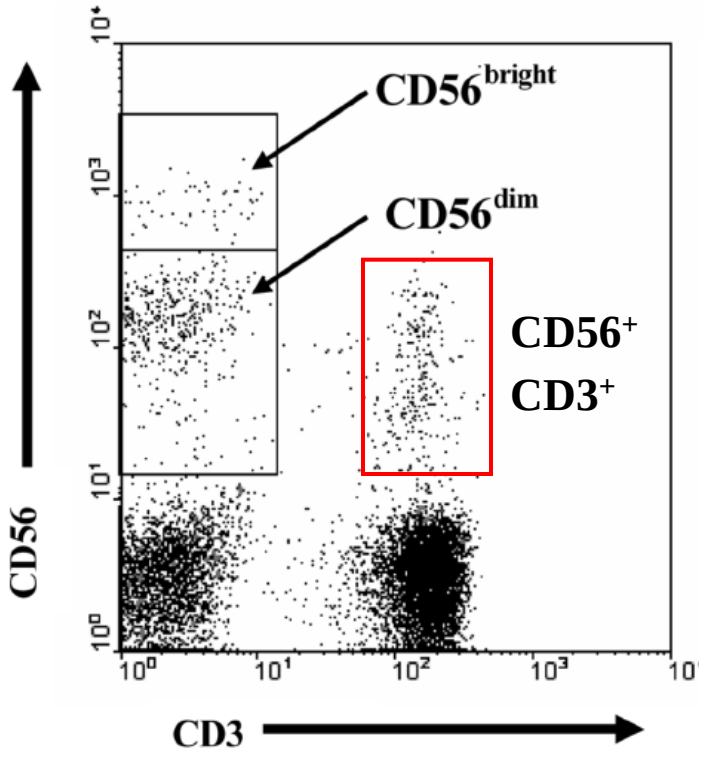


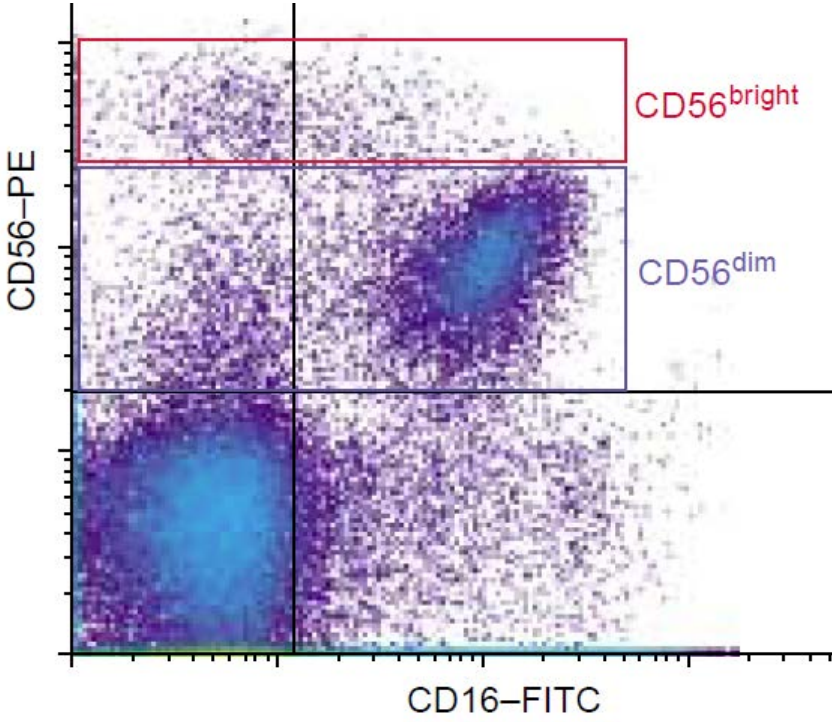
NK细胞抑制型和杀伤型受体的
平衡决定NK细胞杀伤肿瘤细胞的活性

人和小鼠NK细胞敏感和不敏感靶细胞

	敏感的靶细胞	不敏感的靶细胞
人	K562髓样白血病细胞 Molt-4急性T淋巴细胞白血病细胞 JM急性T淋巴细胞白血病细胞 Jurkat急性T淋巴细胞白血病细胞 U-937前单核细胞 某些新鲜肿瘤细胞	Daudi Burkitt淋巴瘤 Raji Burkitt淋巴瘤 LiBr黑色素瘤细胞
小鼠	Moloney病毒诱导的T淋巴瘤Yac-1 (A/Sn小鼠) MPC-11矿物油诱导的浆细胞瘤 (BALB/c小鼠) X-63	Benzpyrene诱导的胸腺淋巴瘤EL-4(C57BL/6) Methlycholanthrene诱导的肥大细胞瘤P815(DBA/2)

TRENDS in Immunology 2001,22:11





$CD56^{bri}$和$CD56^{dim}$ NK细胞亚群

$CD56^{dim}CD3^{-}$ $CD16^{bri}$ NK：高细胞毒活性NK亚群；

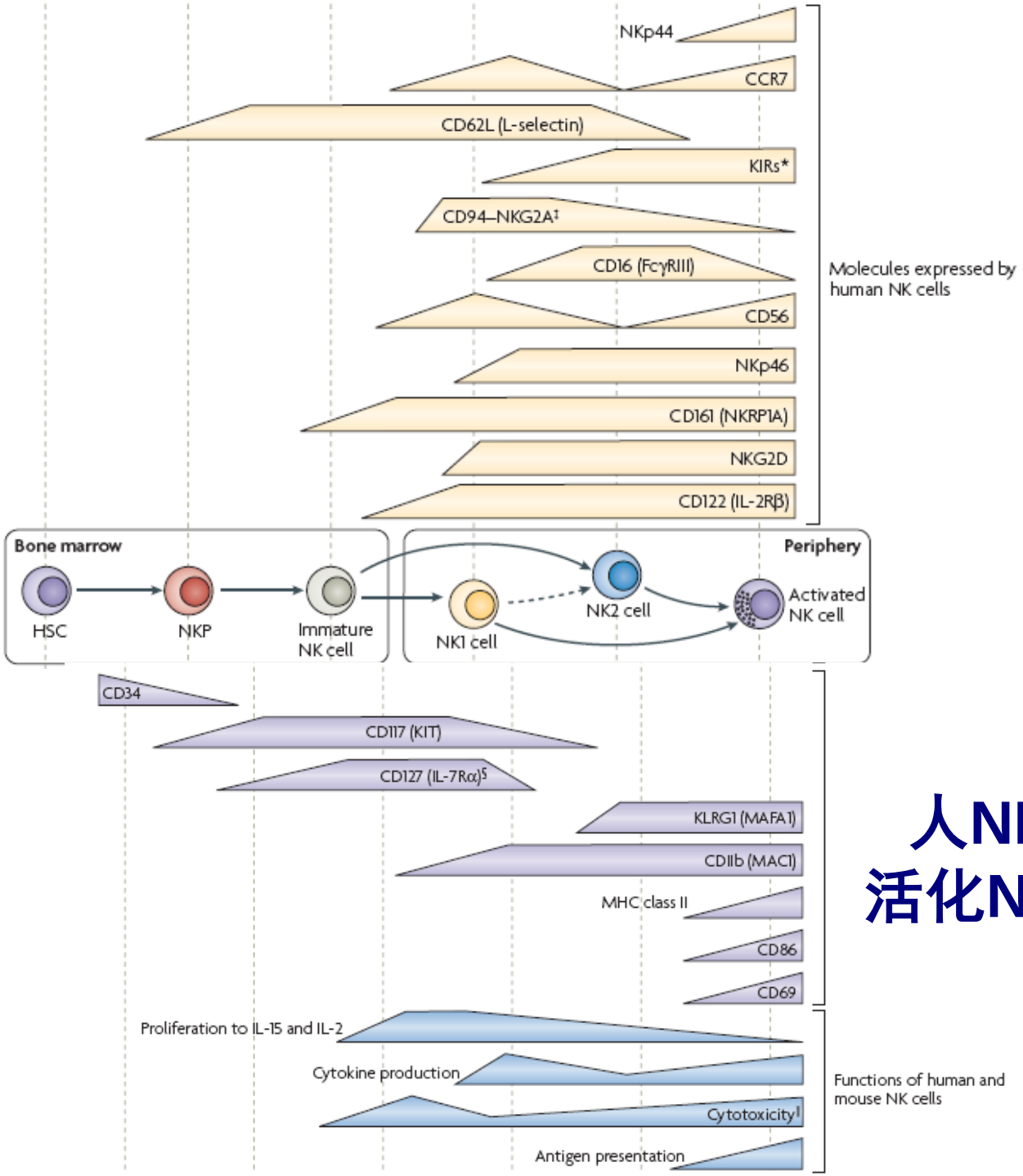
$CD56^{bri}CD3^{-}$ $CD16^{dim}$ NK：分泌细胞因子的NK亚群

人NK细胞的两个亚群

	CD56^{bright} NK亚群/NK1	CD56^{dim} NK亚群/NK2
生物学活性		
CD56	Bright	dim
占NK细胞百分率	~10%(妊娠妇女子宫中占多数)	~90%
胞浆颗粒(粒酶B、穿孔素)	少	多
天然杀伤活性	+	+++
ADCC	+	+++
体外增殖能力(IL-2和IL-15刺激)	高	低
NK细胞受体		
CD16	+/–(“–”占CD56^{bright} NK细胞的~50%~70%)	++ (ADCC+++), (>95%CD56^{dim})
KIR	+/–	++
CD94/NKG2A(抑制型受体)	++(大部分)	+/–
NKRP1A	+	+
NKG2D(活化型受体)	+	+
细胞因子受体		
IL-2Rαβγ(高亲和力)	+(对低浓度IL-2反应)	–
IL-2Rβγ(中亲和力)	+	+
IL-15Rα	+	–
c-kit(SCFR/CD117)	+	–

人NK细胞的两个亚群

	CD56^{bright} NK亚群/NK1	CD56^{dim} NK亚群/NK2
趋化因子受体		
CCR7	++(与迁移到外周淋巴器官有关)	–
CXCR3	++(对I-TAC和IP-10反应)	+/–
CXCR1	–	++(对IL-8反应)
CX3CR1	–	++(对fractalkine反应)
黏附分子		
CD2	++	+
CD62L	++(与迁移到外周淋巴器官有关)	+/–
PSGL-1	–	+(~70%)
LFA-1	(+)	++
CD44	++	–
CD49e	++	–
分泌细胞因子		
IFN-γ	++(IL-12/IL-18活化后↑)	–(IL-12/IL-18刺激后略上调)
LTα	++	–
IL-10	++(IL-12/IL-15活化后↑)	–
IL-13	++	
GM-CSF	++(IL-15/IL-18活化后↑)	–



人NK1、NK2和活化NK细胞的比较

研究课题的撰写

To start an application

找到一个问题：立论依据

Science begins with wonder. “It is owing to wonder that people began to philosophize, and wonder remains the beginning of knowledge.”

工作中遇到的问题?社会公众关心的热点?读书思考的结果?

规划出一个解决的方案：研究内容

Anyone can wonder at this remarkable-yet commonplace-phenomenon, but the scientist seeks to discover how development actually occurs.

建立了可靠的研究信誉和资质：研究基础和条件

↓

开始申请书的撰写

立 论 依 据

国内外研究现状：

领域的基本知识介绍(Biology)

所研究的问题的研究现状(Molecule)

如果有预试验结果，最好包含在内(Biology)

以自己的主要研究内容和研究意义结尾

围绕课题的思路进行综述，层次清晰，观点鲜明，把自己的研究思路暗含在对文献的综述中

步步提示存在问题,最后用自己的研究提出解决办法

主要参考文献：

准确、格式规范一致，与正文对应(显示你的科学态度!)

研究目标、研究内容和拟解决的关键问题

（此部分为重点阐述内容）

研究目标：本课题的总体研究目标，要一目了然

通过xxx，阐明xxx，为xxx奠定基础.

研究内容：围绕着上述研究目标，打算开展几个方面的实验研究？每个方面都进行哪些实验？例如对一个新基因的功能研究：

1、在生物信息学预测的基础上，进行表达范围分析（Northern, RT-PCR, 原位杂交）、细胞内定位分析（免疫荧光染色、融合蛋白表达）

2、在体外对细胞功能的影响：转染、干扰；增殖、凋亡、分化、迁移、形态变化、等等

3、作用机制研究：转录调控？信号转导？上、下游分子？相互作用蛋白？

4、体内功能研究：KO？转基因小鼠？病例相关的分析？

拟解决的关键问题：

进行上述内容的研究时，可能会遇到什么障碍，以及应对措施

拟采取的研究方案及可行性分析

（包括有关方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）

研究方法：用xxx观察分析xxx

技术路线：最好图示

实验研究方案：结合技术路线，把研究内容里的各项实验具体化

简、繁得当！尤其不能过分简单

绝对不能出错!拿不准的事情要多咨询有关专家!

项目特色与创新之处

项目特色：

具有特殊的研究意义？

抓住了有特色的研究问题？

从特殊的角度研究问题？

建立了独特的实验平台和方法？

在基础临床结合上有独到之处？

创新之处：

与现在的研究前沿相比，通过本课题的研究会产生哪些新知识？能解决什么样的科学问题？会有什么样的社会贡献？

年度研究计划和预期结果

（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）

年度计划：

合理划分，三年

预期结果：

1、理论成果：阐明xxx，解决xxx问题

2、发表论文

3、可能产生的专利

4、人才培养