

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

犬 NK 細胞接受器之研究(2/3) 期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-026-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：朱瑞民

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中華民國 96年05月31日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

犬NK細胞接受器之研究 (2/3)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： 95-2313-B-002-026-

執行期間： 95 年08 月01 日至96 年07 月31 日

執行單位： 國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人： 朱瑞民

報告類型： 精簡報告

處理方式： 本計畫可公開查詢

中華民國96 年05 月31 日

摘要

自然殺手細胞 (NKC) 在許多物種中均已有許多相關研究，包括人類、小鼠、大鼠、豬和牛。而在犬方面，目前仍缺乏NK特異性接受器或表面抗原之資訊。本實驗室先前發現在犬週邊血液淋巴球中之CD5陽性細胞可區分為兩群，CD5低表現 (CD5 low density, CD5^{lo}) 和CD5高表現 (CD5 high density, CD5^{hi}) 細胞。以光學及電子顯微鏡觀察此兩群細胞發現CD5^{lo}細胞在IL-2激化後較CD5^{hi}細胞大，並具於細胞質中有較多量的大型顆粒。因此我們進一步研究並證實CD5^{lo}細胞在IL-2激化後對CTAC細胞株 (犬NKC之標的細胞) 有很強的毒殺能力。除此之外，藉由定量RT-PCR的方法，我們發現CD5^{lo} PBL較CD5^{hi} PBL表現較高量的NKC相關基因包括NKG2D、CD16、CD94、CD160、perforin和granzyme B。在IL-2激化後CD5^{lo}細胞較CD5^{hi}細胞表現較高量的NKC相關基因包括NKp30、NKp44、CD16和CD94。綜合上述結果，我們認為CD5^{lo}細胞族群與犬NKC具有密切的關係。

關鍵字：自然殺手細胞、週邊血液淋巴球、淋巴激素活化殺手細胞、CD5^{lo}細胞、自然毒殺作用。

Abstract

Natural killer cells (NKC) have been well-studied in many species, including humans, mouse, rat, porcine and bovine. As for canine species, there is lack of data related to NK cell specific receptors or markers. Previous study of our laboratory had discovered that CD5 positive cells in canine peripheral blood lymphocytes can be divided into two populations, CD5 low density (CD5^{lo}) cells and CD5 high density (CD5^{hi}) cells. The size of CD5^{lo} cells were larger than most of T cells and CD5^{hi} cells, and contained numerous large cytoplasmic granules after IL-2 stimulation examined by light and electron microscopy. For this reason, we further studied and prove that after IL-2 stimulation, the CD5^{lo} cell had strong cytotoxicity for CTAC, the target cell for canine NKC, after IL-2 stimulation. In addition, by real-time RT-PCR, we found that CD5^{lo} PBL had higher level of mRNAs of NK cell-related receptor than CD5^{hi} PBL including NKG2D, CD16, CD94, CD160, perforin and Granzyme B. After IL-2 stimulation, CD5^{lo} cells had significantly higher NK cell-related receptor mRNAs than CD5^{hi} cells including NKp30, NKp44, CD16 and CD94. Taken together, we believe that CD5^{lo} subset is strongly associated with canine NKC activities.

Key words : natural killer cells、peripheral blood lymphocytes (PBL)、lymphokine-activated killers (LAK)、CD5^{lo} cells、natural cytotoxicity.

前言

自然殺手細胞 (natural killer cells, NK 細胞) 為細胞內含大型顆粒之淋巴球，此細胞對受病毒感染之細胞和腫瘤細胞生長之抑制及清除極為重要。另一方面，NK 細胞在正常個體之免疫調節系統中亦是不可或缺的，如 NK 細胞會調節體內之樹突狀細胞 (dendritic cells, DC) 的成熟，NK 細胞會抑制自體免疫的現象及避免流產的發生。

NK 細胞表面通常不具有 T、B 細胞之表面抗原，此細胞之調控主要是來自其表面二種不同功能之接受器的平衡：抑制型接受器 (inhibitory receptors) 和活化型接受器 (activation receptors)。抑制型接受器可以藉由辨識 MHC class I 分子，而抑制 NK 細胞之活性，活化型接受器和其受體結合後，則會傳遞信息活化 NK 細胞，使 NK 細胞具有分泌細胞激素或具有毒殺的能力。目前於犬 NK 細胞的研究中，除了本實驗室之前發現之 CD8 分子外，尚無其他具有特異性之犬 NK 細胞接受器或表面抗原之資訊，但已有許多 NK 細胞接受器於人類、小鼠及大鼠體內被發現，如 KIR、Ly49、CD94/NKG2、NKG2D、NCR、2B4、ILTs 等。由本實驗室的一些前驅實驗得到的結果，我們挑選 CD5 作為研究目標，希望藉此能夠找出犬 NKC 之特定抗原及接受器。

研究目的

本研究以找出犬 NKC 接受器或表面抗原為目的，並希望進一步瞭解犬 NKC 之特性。

文獻探討

NKC，為胞質內具有大型顆粒之淋巴球，細胞表面不具有 T、B 細胞之表面抗原，佔所有淋巴球族群之 5~15%(1)。NKC 的基本觀念來自“missing self”(2)，即 NKC 認出不屬於自己的分子，此分子主要指 MHC (Major histocompatibility complex)。廣義來說，此細胞認得在 MHC 分子上的變化，包括 MHC 分子的大量減少及改變，甚至僅一個 allele 的變化也能辨認(3)。當 NKC 認得正常正確 MHC 時，抑制性接受器被活化因而抑制 NKC 的作用不會造成毒殺。反之當 NKC 認出 MHC 分子發生變化後，因為不同而不能與抑制性接受器結合，如果此標的細胞同時亦具有活化型接受器之 ligand 時，它與 NKC 結合後活化刺激性接受器，NKC 因而產生毒殺作用(4)。透過以上的方式，NKC 可以迅速且全面性的清除不正常細胞，如腫瘤細胞或受病毒感染的細胞，因此在先天免疫反應中扮演重要的角色。另外，NKC 除了參與先天免疫反應外，也可藉由與 dendritic cell (DC) (5-7) 和 T cell (8) 之交互作用參與後天免疫反應。

有關於犬 NK 細胞目前只對其型態及毒殺能力有較多相關的研究，現今僅有二個疑似犬 NK 細胞接受器之基因序列被鑑定出來。目前犬 NK 細胞之特異性表面抗原或表面接受器相關的研究有以下幾篇報告，1999 年 Penden 等人以南方

墨點法發現犬、猴子、小鼠、大鼠、兔子和牛之基因體 DNA 中皆含有類似人類 NKp30 之 DNA 片段，因此懷疑犬可能也有 NKp30 基因的存在 (9)；到了 2003 年 Gagnier 等人從家犬之 PBMC 中找到犬 Ly49 之基因 (10)；最近 Bonkobara 等人於 2005 年在犬第五條染色體中鑑定出 CD56 基因，此基因會表現於經 phytohemagglutinin (PHA) 刺激過後之白血球及一些神經和內分泌系統之細胞中 (11)，但以上之研究皆無法明確指出任何 NK 細胞表面抗原或接受器之基因或蛋白質存在於犬 NK 細胞中。

本實驗室發現在犬週邊血液淋巴球中之 CD5 陽性細胞可區分為兩群，CD5 低表現 (CD5 low density, CD5^{lo}) 和 CD5 高表現 (CD5 high density, CD5^{hi}) 細胞 (12)。初步分析這群 CD5^{lo} 細胞之表面抗原，由於它們不表現 B 細胞之表面抗原 CD21，因此初步可排除為 B 細胞之可能性。同時，使用 ConA 以及 IL-2 刺激發現 IL-2 僅會刺激 CD5^{lo} 細胞增生，但並未讓 CD5^{lo} 轉為 CD5^{hi} 變成為成熟 T 細胞，同時 Con A 並不會刺激 CD5^{lo} 細胞增生，卻會刺激 CD5^{hi} 細胞增生，因此說明 CD5^{lo} 細胞不具有 T 細胞之特性 (12)，因此我們推測 CD5^{lo} 細胞有可能是 NKC 之族群。CD5^{lo} 與 NKC 之間的關係目前只有在人和牛中發現 (13, 14)。在牛方面，於週邊血球細胞中可發現 CD5^{low} 族群之存在，此細胞群對異體抗原和不活化之病毒顆粒的刺激沒有反應，但在 IL-2 及 ConA 刺激下則可以進行增生，於週邊血液純化出之新鮮的 CD5^{low} 細胞呈現很低之 NK 毒殺作用，但在加入 IL-2 刺激培養後則可對牛之 NK 標的細胞進行毒殺作用 (14)。因此推斷牛之 CD5^{low} 細胞族群含有一群具有 LAK 毒殺能力之前驅細胞 (14)。而在人類方面，研究發現在肺結核以及多發性黑色素瘤的病人之週邊血液少部份 CD16⁺ NKC 具有 CD5^{low} 之表型，但是在正常人並無法發現 CD5^{low} 之 NKC (13)。分選出之 CD5^{low} CD16⁺ NKC 具有高的毒殺能力，並表現活化之 NKC 之表型，HLA-DR。因此推測 CD5^{low} NKC 可能為活化之 NKC (13)，以上實驗雖然發現了 CD5^{lo} NKC 的存在，但並未針對正常人之 CD5^{lo} NKC 進行研究。除此之外，CD5^{lo} 的相關資訊如詳細的表型表現、細胞激素之分泌等討論在人類及牛均無相關研究。

因此我們希望進一步鑑定犬 CD5^{lo} 細胞於型態、表型、特定基因表現及功能性之特性，以瞭解 CD5^{lo} 細胞與 NKC 之關係。

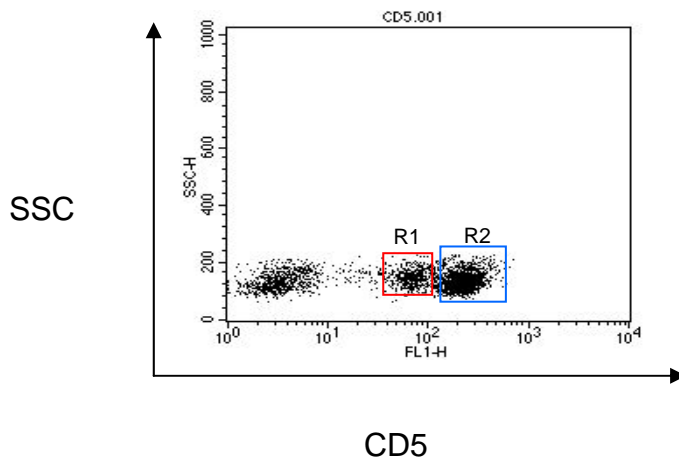
研究方法

本實驗首先將特定細胞族群進行純化，我們使用 BD FACS Vantage flow cytometer 和 FACS Aria flow cytometer 進行 CD5^{lo} 和 CD5^{hi} 細胞分選，得到純化的細胞後先以各種不同表面抗原之抗體進行細胞表型分析，同時於光學及電子顯微鏡下觀察細胞之型態，並以 NK 毒殺試驗和 IFN- γ 分泌試驗瞭解細胞之功能性，再以定量 RT-PCR 瞭解不同細胞群之 NKC 相關基因和細胞激素基因之表現。

結果與討論

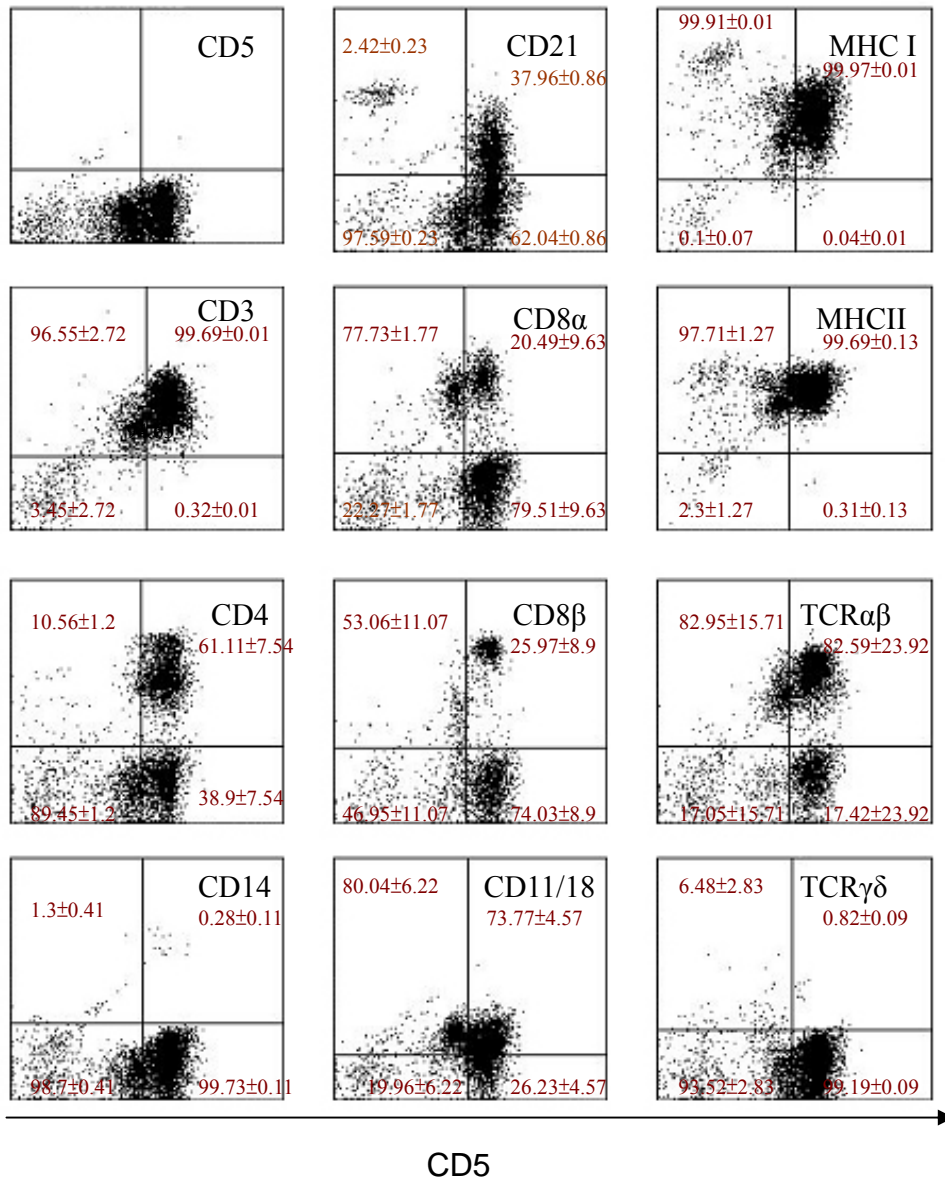
1.細胞表面抗原分析

我們發現犬PBL中以CD5抗體染色發現，CD5陽性之細胞可分為兩群，一群為低度表現CD5的細胞 (CD5 low density, CD5^{lo})，另一群為高度表現CD5的細胞 (CD5 high density, CD5^{hi}) (圖一)。CD5^{lo}細胞佔PBL中之 14.9 ± 6.68%，CD5^{hi}細胞為 59.65 ± 8.32%。本研究進一步分析其細胞表現之表面抗原，結果發現CD5^{hi}細胞之表型為CD3⁺、CD4^{+/-}、CD8α^{+/-}、CD8β^{+/-}、CD21^{+/-}、CD14⁻、α/β TCR^{+/-}、γ/δ TCR⁻、CD11/18⁺、DLA I⁺及DLA II⁺，而CD5^{lo}細胞之表型為CD3⁺、CD4⁻、CD8α⁺、CD8β^{+/-}、CD21⁻、CD14⁻、α/β TCR^{+/-}、γ/δ TCR^{+/-}、CD11/18⁺、DLA I⁺及DLA II⁺，(圖二)。因此CD5^{lo}細胞表型不同於CD5^{hi}細胞，似乎為一群特定之細胞族群。為了瞭解此族群的功能，我們利用FACS Vantage flow cytometer或FACS Aria flow cytometer進行CD5^{lo}及CD5^{hi}之細胞分選，分選後細胞純度均大於90%(圖三)。CD5^{lo}細胞純度平均為 93.56 ± 2.3%，range為 91%~97%。CD5^{hi}細胞純度平均為 94.67 ± 4.24%，range為 89%~99%。N = 4。



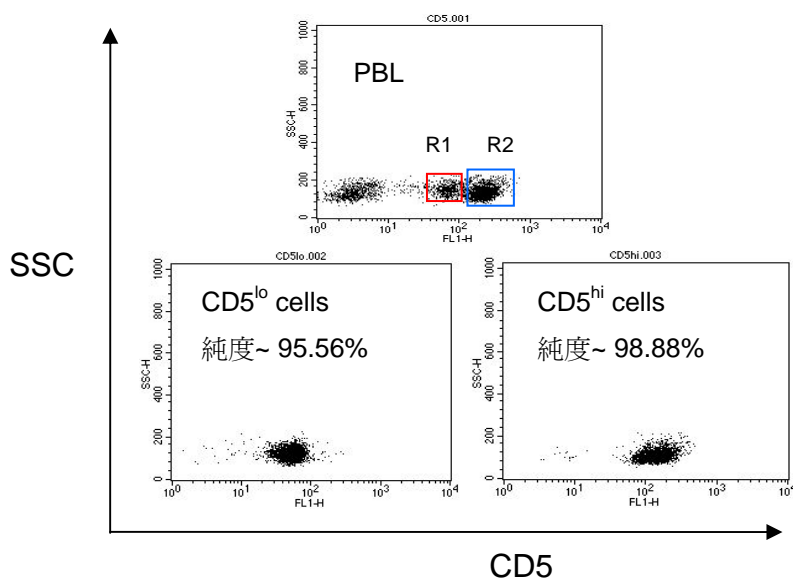
圖一、CD5 抗原表現於 PBL 中之細胞族群

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後進行anti-canine CD5 抗體染色，以BD FACScalibur flow cytometer收集檢體資料，並以BD CellQuest pro軟體進行資料分析。由上圖之dot plot中可知，CD5 陽性細胞可分為兩群細胞，R1 區域為CD5 低量表現之細胞，稱CD5^{lo}細胞；R2 區域為CD5 高量表現之細胞，稱CD5^{hi}細胞。圖中之X軸為CD5 螢光表現強度，Y軸為細胞顆粒性表現 (SSC)。



圖二、犬 PBL 中 CD5 陽性細胞之細胞表型。

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色，再與其他免疫細胞相關抗原之抗體進行雙染色，包括CD3、CD4、CD8α、CD8β、CD14、CD21、α/β TCR、γ/δ TCR、MHC I和MHC II。以BD FACScalibur flow cytometer收集檢體資料，並以BD CellQuest pro軟體進行資料分析。圖中均為dot plot，X軸為CD5 抗體螢光強度，Y軸為各種不同抗體螢光強度。圖中顯示之紅色數據為CD5^{lo} (左上與左下)和CD5^{hi} (右上與右下)細胞在不同表面抗原之表現的細胞百分比平均值。

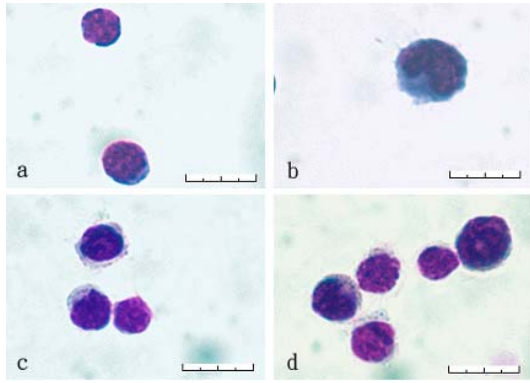


圖三、分選出犬PBL中之CD5^{lo}和CD5^{hi}細胞族群。

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage flow cytometer和FACSARIA flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，框選R1 區域細胞為CD5^{lo}細胞，R2 區域細胞為CD5^{hi}細胞。分選後以BD FACScalibur flow cytometer收集檢體資料，並以BD CellQuest pro軟體進行資料分析，分選後之細胞族群分別如圖中左下圖及右下圖所示，並以此圖分析分選後細胞之純度。

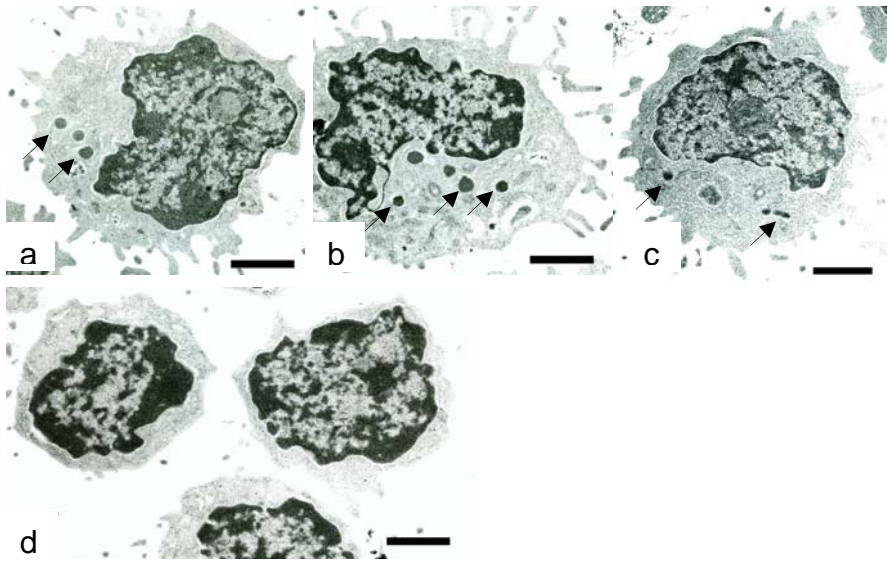
2. 細胞形態學觀察

為瞭解CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞的特性，首先觀察分選後之細胞型態。以May-Grunwald Giemsa stain染色後，於光學顯微鏡下觀察(圖四)，發現於未加入IL-2 培養之細胞其型態上不易發現不同。但以IL-2 刺激後之CD5^{lo} LAK細胞有較多型態為大型顆粒型淋巴球之細胞。CD5^{hi} LAK細胞族群中仍能觀察到大型之淋巴球(圖四.b)但數量較少。另外，以穿透式顯微鏡觀察CD5^{lo} LAK和CD5^{hi} LAK細胞亦發現於CD5^{lo} LAK細胞中具有較多之大型顆粒性淋巴球(圖五)。這些結果表示CD5^{lo}細胞族群於細胞型態上有類似NKC之特徵。



圖四、CD5^{lo}和CD5^{hi} IL-2 激化之lymphokine - activated killer (LAK)細胞型態，May-Grunwald Giemsa stain。

a與b圖為CD5^{hi} LAK細胞，c與d圖為CD5^{lo} LAK細胞。取犬之週邊血液以Ficoll-PaqueTM PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，分選後之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞以IL-2 刺激培養五天得到LAK細胞，將細胞塗抹於玻片上並待其乾燥，之後以May-Grunwald Giemsa stain進行染色，並以光學顯微鏡觀察其細胞型態。放大倍率為 100X，圖中右下角之比例尺為 10 μ m。

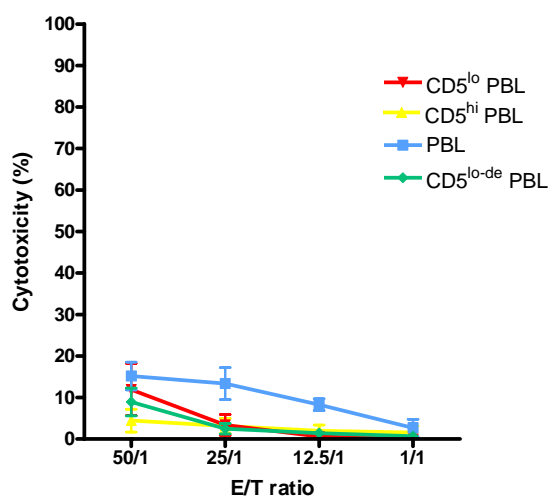


圖五、CD5^{lo}和CD5^{hi} LAK細胞之型態，穿透式顯微鏡觀察。

圖a, b, c為CD5^{lo} LAK細胞，圖d為CD5^{hi} LAK細胞。取犬之週邊血液以Ficoll-PaqueTM PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，分選後之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞以IL-2 刺激培養五天得到LAK細胞。將細胞pellate以glutaraldehyde/osmium-tetroxide固定，以Spurr's resin kit包埋後製成超薄切片，染色後，以JEOL 1200EXII transmission electron microscope觀察。黑色箭號為細胞內顆粒球所在位置，放大倍率為 8000X。比例尺為圖中右下角之黑色橫線，為 1 μ m。

3. NK 毒殺作用：

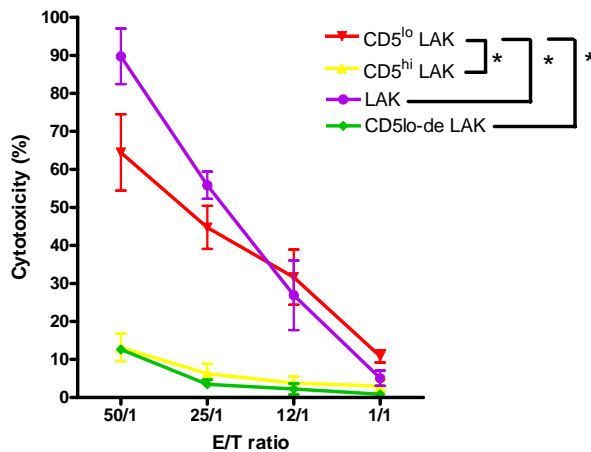
為瞭解CD5^{lo}細胞是否可能為NK細胞族群，我們利用CTAC細胞株為標的細胞測試不同細胞群的犬NK細胞毒殺能力，實驗發現在未經IL-2 刺激之CD5^{lo}及CD5^{hi}族群其毒殺能力與PBL比較並無顯著性差異（圖六）。進而測試加入IL-2 培養之CD5^{lo}及CD5^{hi} LAK細胞，發現CD5^{lo} LAK細胞之毒殺能力明顯高於CD5^{hi} LAK細胞（圖七），這代表CD5^{lo} LAK細胞中的確有一群具有犬NK毒殺能力之族群。PBL直接以IL-2 刺激培養之LAK細胞之毒殺能力卻顯著高於CD5^{lo} LAK細胞。



*

圖六、犬PBL中CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞之NK毒殺能力試驗

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage和FACS Aria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，並以CTAC細胞株測試犬PBL、CD5^{lo}細胞、CD5^{hi}細胞和CD5^{lo-de}細胞之NK毒殺能力。實驗使用CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay套組進行NK毒殺試驗。Target cells為CTAC細胞株 (T)，細胞數為 2x10³。Effector cells為犬PBL、CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞 (E)，E/T ratio為 50/1、25/1、12.5/1 及 1/1。X軸為E/T ratio，Y軸為NK毒殺能力之百分比。代表PBL，代表CD5^{hi}細胞，代表CD5^{lo}細胞，代表CD5^{lo-de}。 (N=4)



圖七、犬CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞之NK毒殺能力試驗

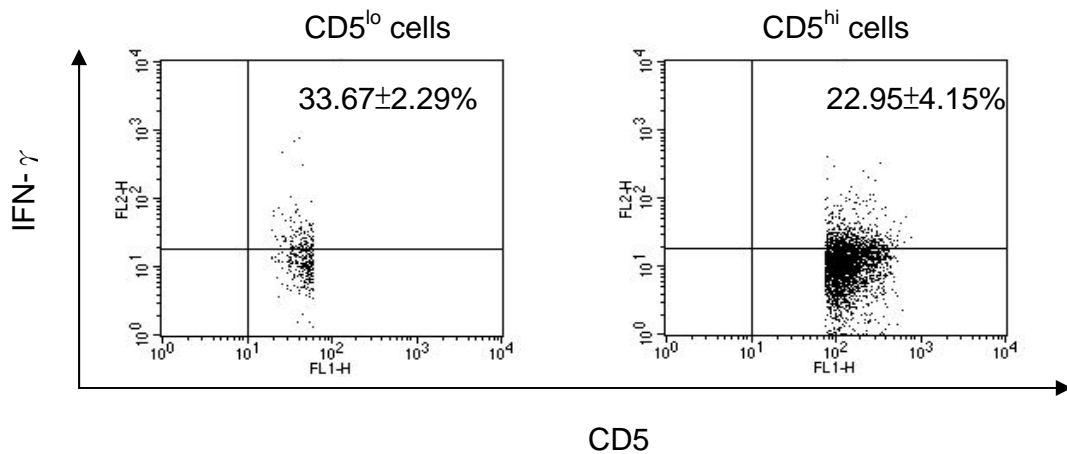
取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage和FACSaria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，取未經分選之全部PBL以及分選後之CD5^{lo}、CD5^{hi}細胞加入IL-2 培養五天取得LAK細胞。實驗使用CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay套組進行NK毒殺試驗。Target cells為CTAC細胞株 (T)，細胞數為2x10³。Effector cells為犬LAK細胞、CD5^{lo} LAK細胞、CD5^{hi} LAK細胞之NK毒殺能力。實驗使用之target cells為CTAC細胞株 (T)，effector cells為LAK、CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞(E)，X軸為E/T ratio，Y軸為NK毒殺能力之百分比。

● 代表LAK細胞， ▲ 代表CD5^{hi}LAK細胞， ▼ 代表CD5^{lo} LAK細胞， ◆ 代表CD5^{lo-de} LAK細胞。*代表顯著性差異 (P < 0.05) (N=4)。

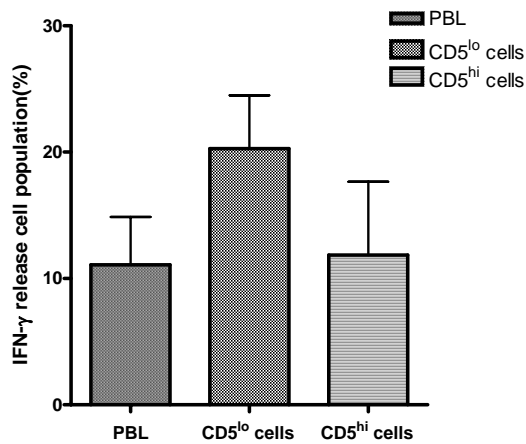
4. IFN-γ 的分泌：

NKC之功能除了對標的細胞的毒殺能力外，另一重要功能為細胞激素生產的能力。NKC在受到IL-12 刺激之下，可以大量分泌IFN-γ(15)。因此我們將PBL以IL-12 刺激三天後測定其中具IFN-γ生產能力之細胞族群 (圖八A)。結果發現CD5^{lo}細胞中分泌IFN-γ之細胞族群佔 36.67±2.29%顯著性地高於CD5^{hi}細胞中的 22.95±4.15%。另外將PBL分離後之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞同樣加入IL-12 培養三天後測定具IFN-γ生產能力之細胞族群百分比 (圖八B)，卻發現CD5^{lo}細胞和CD5^{hi}細胞之間並沒有顯著性差異，但仍可觀察到CD5^{lo}細胞百分比高於CD5^{hi}細胞之趨勢。

(A)



(B)



圖八、犬IL-12 刺激後之CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞 IFN-γ release 試驗

(A) 取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，加入IL-12 培養三天，以CD5 及 IFN-γ抗體進行雙染色測定IFN-γ生產之族群，以BD FACScalibur flow cytometer收集檢體資料，並以BD CellQuest pro軟體進行資料分析。左圖為CD5^{lo}細胞，右圖為CD5^{hi}細胞。X軸為CD5 染色之螢光強度，Y軸為IFN-γ染色之螢光強度。實驗結果是分析圖中右上格中之細胞百分比 (%)。N= 4。

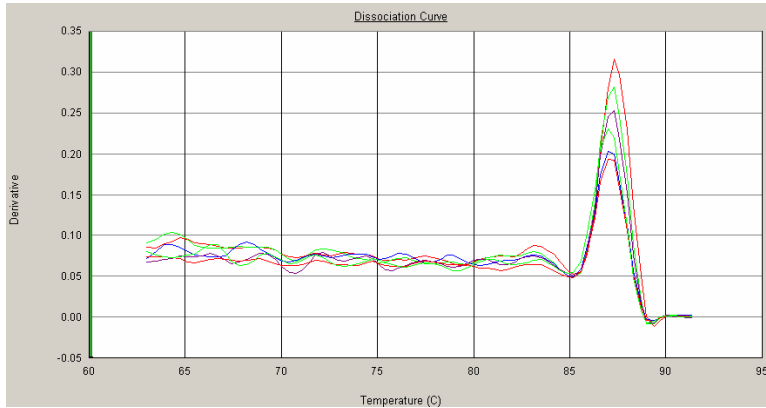
(B) 將PBL和以FACS Aria flow cytometer分選之CD5^{lo}、CD5^{hi}細胞以IL-12 刺激培養三天後以IFN-γ抗體進行染色以測定IFN-γ生產之族群，以BD FACScalibur flow cytometer收集檢體資料，並以BD CellQuest pro軟體進行資料分析。X軸為不同之細胞族群名稱，Y軸為分泌IFN-γ 染色之螢光強度。N= 4。

5. CD5 細胞 NK 表面抗原、接受器及細胞激素之基因表現分析

為了要進一步證明CD5^{lo}細胞是否具有NKC之特性，我們設計了一些與NKC相關之接受器及分子之引子，包括NKG2D、NKp30、NKp44、CD56、CD16、CD94、CD160、perforin及granzyme B。希望能藉由real-time RT-PCR來瞭解CD5^{lo}細胞族群中，NKC相關分子之mRNA表現狀況。實驗以real-time RT-PCR偵測之樣品包括犬CD5^{lo} PBL、CD5^{hi} PBL、CD5^{lo} LAK和CD5^{hi} LAK細胞群中各種和犬NK細胞相關基因之表現量。各種引子之專一性以dissociation curve之偵測進行確認(圖九)。Dissociation curve之產生是於real-time RT-PCR步驟結束後，將PCR產物由60°C加溫至95°C，於此過程中PCR產物之雙股DNA會隨著溫度上升而解離，鍵結在DNA上之螢光(SYBR green)即隨著溫度升高而改變，因此產生dissociation curve。若設計之引子具有專一性則可增幅出一段特異性DNA產物，因此由dissociation curve可得到single peak。此peak不明顯或多個peak則代表特異性不佳。本研究所用之引子均屬此方法測試無誤。

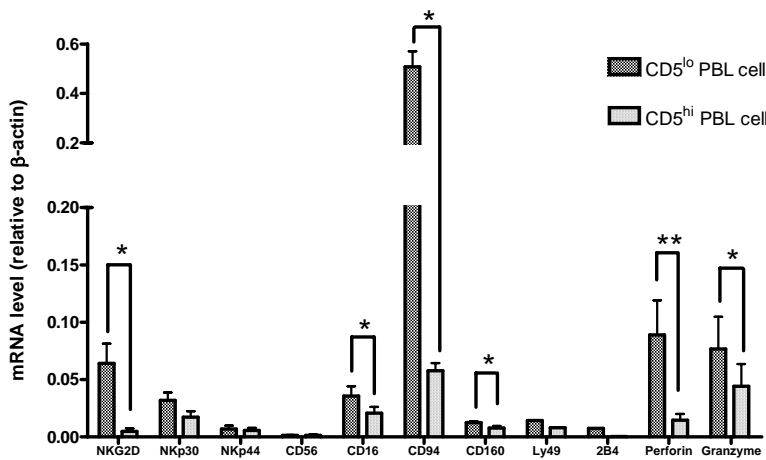
(a) NK 表面抗原及接受器之比較

比較PBL中未經IL-2刺激之CD5^{lo}細胞及CD5^{hi}細胞族群，發現CD5^{lo}細胞在NKG2D、CD16、CD94、CD160及Granzyme B的基因表現上顯著地高於CD5^{hi}細胞($P < 0.05$)，在perforin之表現上更是有極顯著之差異($P < 0.01$)。但在NKp30、NKp44、CD56、Ly49及2B4的基因表現上差異並不明顯(圖十)。反之，在IL-2激化之LAK細胞，同樣比較CD5^{lo} LAK和CD5^{hi} LAK細胞族群，結果發現CD5^{lo} LAK卻在NKp30、NKp44、CD16之基因表現上顯著地高於CD5^{hi} LAK細胞族群($P < 0.05$)，而在其他基因方面雖然表現量均高於CD5^{hi} LAK細胞，卻無顯著性差異(圖十一)。綜合上述結果，雖然未加入或加入IL-2培養後，NKC相關基因表現之pattern有所不同，但是CD5^{lo}細胞群不論有無經過IL-2刺激下，NKC相關基因表現量均高於CD5^{hi}細胞群。因此，除了型態學上之表現和細胞表面抗原表現之外，再加上NK表面抗原及接受器的表現之結果，一再指出CD5^{lo}細胞與NKC關係密切。



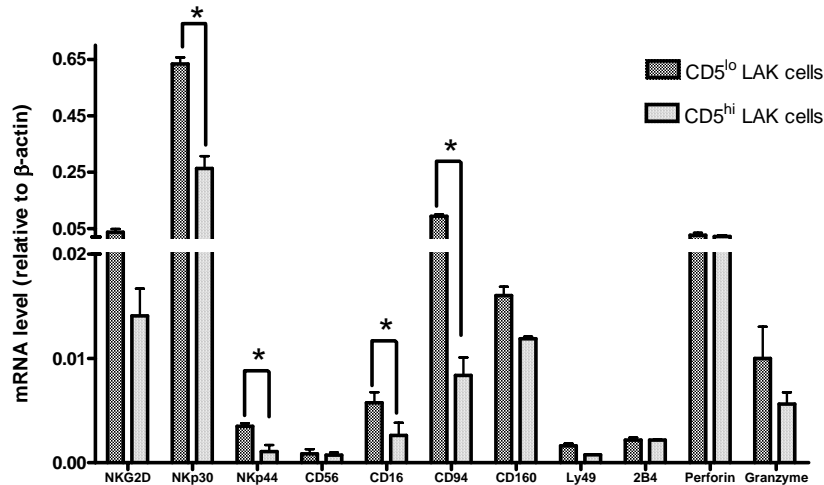
圖九、引子專一性測試

Dissociation curve 之產生是於 real-time RT-PCR 步驟結束後，將 PCR 產物由 60°C 加溫至 95°C，於此過程中 PCR 產物之雙股 DNA 會隨著溫度上升而解離，鍵結在 DNA 上之螢光 (SYBR green) 即隨著溫度升高而改變，因此產生 dissociation curve。若設計之引子具有專一性則可增幅出一段特異性 DNA 產物，因此觀察 dissociation curve 可得到 single peak，若有非特異性增幅則可觀察到非 single peak 之圖形。此圖可看到 dissociation curve 均呈 single peak，表示未出現非特異性增幅，也同時代表此引子具有專一性 (此圖以 β -actin 為例)。



圖十、犬PBL中之CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞族群各種NKC接受器及分子之基因表現量。

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage和FACS Aria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選。萃取PBL中之CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞中之mRNA，以real-time RT-PCR方法偵測CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞中和犬NK 細胞接受器和抗原相關之基因的表現量。X軸為各種NK接受器及分子之名稱，Y軸為各基因相對犬 β -actin基因的mRNA表現量。代表CD5^{lo} PBL細胞，代表CD5^{hi} PBL細胞。* 代表P<0.05，** 代表P<0.01。(N=4)



圖十一、犬CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞族群中各種NKC接受器及分子相關之基因表現量。

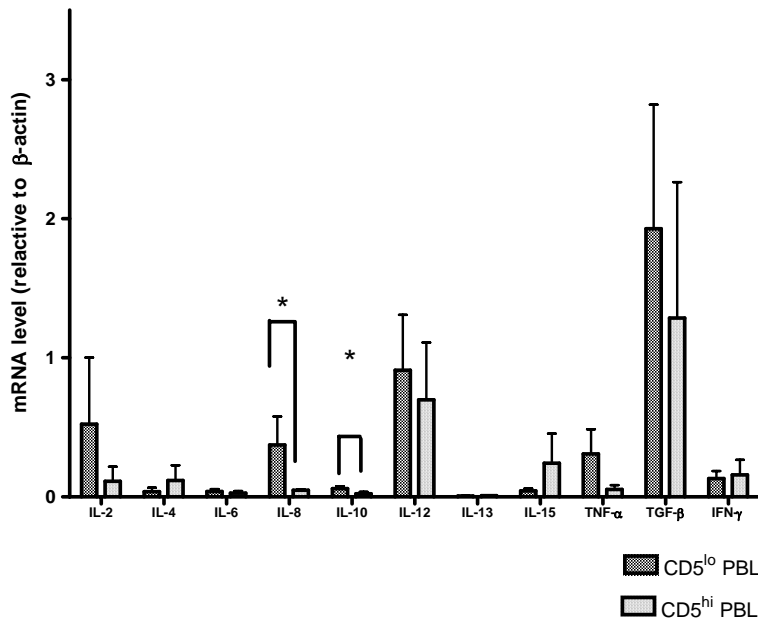
取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage和FACSria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，分選後之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞以IL-2 刺激培養五天得到LAK細胞。萃取CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞中之RNA並反轉為cDNA後，以real-time RT-PCR偵測此兩群細胞中和犬NKC接受器和相關分子之基因表現量。X軸為各種NKC接受器及分子之名稱，Y軸為各基因相對犬β-actin基因的mRNA表現量。代表CD5^{lo} LAK細胞，代表CD5^{hi} LAK細胞。* 代表P<0.05，** 代表P<0.01。(N=4)

(b) 細胞激素之比較

除了NKC相關分子的基因表現外，我們同時也測定細胞激素的基因表現。使用real-time RT-PCR偵測犬CD5^{lo} PBL、CD5^{hi} PBL、CD5^{lo} LAK和CD5^{hi} LAK細胞群中各種細胞激素基因之表現量。

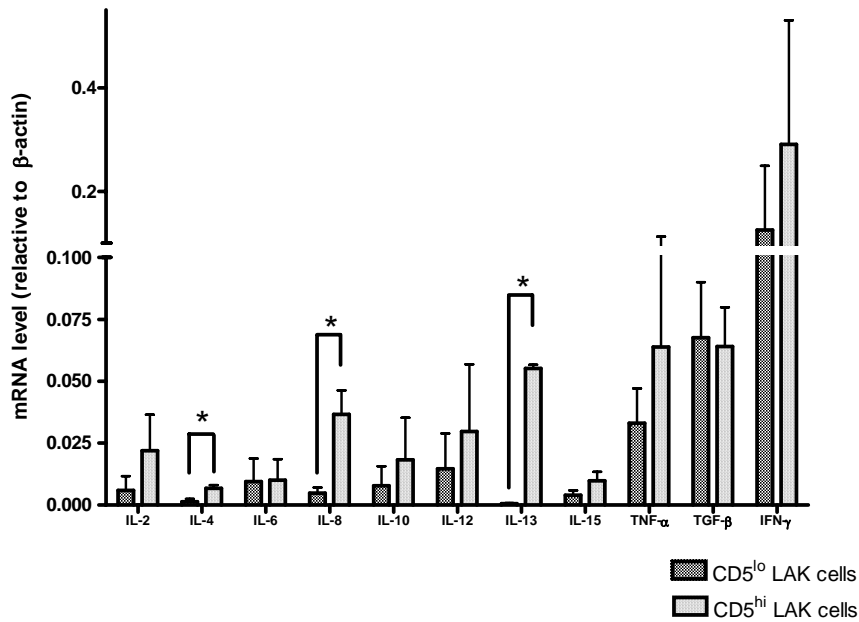
發現CD5^{lo}未加入IL-2 培養之細胞之IL-8 及IL-10 之表現量顯著地高於CD5^{hi}細胞 (P < 0.05)。在IL-2、IL-6、IL-12 及TNF-α之平均表現量雖高於CD5^{hi}細胞，但差異在統計學上並不明顯。此外，在IL-4、IL-13、IL-15 及IFN-γ之表現量CD5^{hi}細胞較高，但差異同樣不顯著 (圖十二)。

比較CD5^{lo} LAK和CD5^{hi} LAK細胞族群，結果發現CD5^{lo} LAK細胞之細胞激素幾乎均低於CD5^{hi}，在IL-4、IL-8 及IL-13 之表現明顯地低於CD5^{hi} LAK細胞 (P < 0.05)。而在IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、TNF-α及IFN-γ之表現於CD5^{lo} LAK細胞雖均略低於CD5^{hi} LAK細胞，但差異在統計學上不明顯。CD5^{lo} LAK細胞僅在TGF-β之表現上略高於CD5^{hi} LAK細胞，但是差異亦不明顯 (圖十三)。



圖十二、犬PBL中CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞族群各種細胞激素之基因表現量。

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACSVantage和FACSaria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選。萃取PBL中之CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞中之RNA並反轉為cDNA後，以real-time RT-PCR偵測CD5^{lo}細胞與CD5^{hi}細胞中各種細胞激素基因表現量。X軸為各種細胞激素之基因名稱，Y軸為各基因相對犬β-actin基因的mRNA表現量。 代表CD5^{lo} PBL細胞， 代表CD5^{hi} PBL細胞。* 代表P<0.05，** 代表P<0.01。(N=4)



圖十三、犬CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞族群中各種細胞激素相關之基因表現量。

取犬之週邊血液以Ficoll-Paque™ PLUS分離出PBL後，以anti-canine CD5 抗體進行染色並使用BD FACS Vantage和FACS Aria flow cytometer進行CD5^{lo}和CD5^{hi} 細胞分選，分選後之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞以IL-2 刺激培養五天得到LAK細胞。萃取CD5^{lo} LAK細胞與CD5^{hi} LAK細胞中之RNA並反轉為cDNA後，以real-time RT-PCR偵測此兩群細胞中各種細胞激素相關之基因的表現量。X軸為各種細胞激素之基因名稱，Y軸為各基因相對犬β-actin基因的mRNA表現量。代表CD5^{lo} LAK細胞，代表CD5^{hi} LAK細胞。* 代表P<0.05，** 代表P<0.01。(N=4)

綜合以上實驗結果可見犬PBL中之CD5^{lo}細胞之表現型為CD3⁺、CD4⁻、CD8α⁺、CD8β^{+/-}、CD21⁻、CD14⁻、α/β TCR^{+/-}、γ/δ TCR^{+/-}、CD11/18⁺、CD44⁺、CD45⁺、DLA I⁺及DLA II⁺。在型態學上，未加入IL-2 培養之細胞不易發現他們之不同。以IL-2 刺激後之CD5^{lo} LAK細胞有較多型態為大型顆粒型淋巴球之細胞，這表示CD5^{lo}細胞族群於細胞型態上有類似NKC之特徵。另外，PBL中之CD5^{lo}細胞在IL-2 刺激後擁有較強的NK毒殺能力，並具有較高之IFN-γ分泌能力。我們進一步分析細胞中NKC相關分子以及細胞激素之mRNA表現。在NKC相關分子之基因方面，我們發現未加入IL-2 培養之CD5^{lo}細胞表現較高量的NKG2D、CD16、CD94、CD160、perforin及Granzyme B的mRNAs，然而在LAK細胞方面，CD5^{lo} LAK表現較高量的NKp30、NKp44、CD16 之mRNAs。在細胞激素之mRNAs方面，PBL中之CD5^{lo}細胞表現較高量之IL-8及IL-10，而CD5^{lo} LAK表現較低量之IL-4、IL-8及IL-13。綜合上述實驗結果，我們認為CD5^{lo}細胞為犬血液中具有NKC特性之細胞族群。

討論

本研究為首先報告並證實犬PBL中之CD5^{lo}細胞為犬血液中具有NKC特性之細胞族群。因此CD5^{lo}的表現也許可視為犬NKC除CD8 α ⁺之外的第二個具代表性之細胞表型。

我們分析CD5^{lo}與CD5^{hi}這兩群細胞之表型，結果可發現CD5^{hi}與CD5^{lo}這兩群細胞明顯地於CD4、CD8 α 、CD8 β 、 $\alpha\beta$ TCR和CD21之表型上有所不同，且CD5^{lo}之族群在各種表型上呈現較專一的表現(例如CD3、CD4、CD14、CD21、MHC I、MHC II、 $\gamma\delta$ TCR的表現均大於90%)，這表示CD5^{lo}細胞群中的細胞種類較少，可能為一群特定之細胞群。由於本實驗室先前發現CD8 α 與NKC之間具有正相關(16)，而CD5^{lo} PBL細胞中大部份又為CD8 α ⁺細胞，所以我們認為CD5^{lo}細胞應為NKC之族群。

由於許多物種中之NKC型態上均屬於大型顆粒性淋巴球，包括人、小鼠以及牛等(1, 17-19)，但在CD5^{lo} PBL中並未觀測到此現象，除此之外，我們在NK毒殺試驗中發現PBL之CD5^{lo}細胞族群於未經IL-2刺激之情形下其NK毒殺能力很低，並且與PBL和CD5^{hi}細胞間沒有差異，這個結果並不符合NKC所具有的自然殺手之特性，這可能是因為在PBL中之大型顆粒性淋巴球在犬單核球型態相似之細胞群中(16)，而非在本細胞族群中。我們使用FACS Vantage flow cytometer進行CD5細胞分選的gating範圍內，為小型淋巴球，此群較大群之細胞並未包含在內，因此我們無法在CD5^{lo} PBL中看到大型顆粒性淋巴球。同時，研究指出確實有一細胞群表型為CD3⁻CD4⁻CD14⁻CD8⁻CD21⁻並且不具貼附能力之非T、非B、非單核球的細胞群，這群細胞可能為犬PBL中具大型顆粒性淋巴球特徵之NKC(16)，但仍需進一步確認。然而加入IL-2培養後之CD5^{lo} LAK細胞在光學及電子顯微鏡均發現較多型態為大型顆粒性淋巴球之細胞，並且對CTAC細胞株具有較高之毒殺能力，而在其它犬NKC相關之研究中也指出可對CTAC細胞株進行毒殺作用之細胞為大型顆粒性淋巴球(20, 21)，也符合我們的結果。另外，除了CD5^{lo} LAK細胞於細胞質中具有較多的顆粒外，其具有呈現腎形之細胞核，這與其他犬相關研究中所描述之NKC相符合(1, 22)。因此CD5^{lo}細胞於IL-2刺激培養後始具有NKC之特點。此IL-2激化之現象也與上述牛之研究類似(14)。

在NK毒殺試驗中，我們觀察到一特別之現象，比較CD5^{lo} LAK細胞與未經分選之PBL直接培養之LAK細胞，CD5^{lo} LAK細胞之毒殺能力卻較低。同樣地，使用IL-12激化細胞後，我們發現未經分選後之IL-12激化LAK細胞，不論於CD5^{lo}或CD5^{hi}細胞中均可較分選後再進行IL-12激化之LAK細胞有較高比例的IFN- γ 分泌細胞。這可能是因為未經分選的細胞族群在培養的過程中可能有許多機制可以活化其中次族群之功能，例如細胞與細胞之交互作用或是不同細胞種類所分泌的細胞激素來促進NKC的活化，例如IL-2和IL-12可刺激CD4 T細胞分泌IFN- γ 和IL-4進而刺激NKC之活化(23)。

由於CD5^{lo}細胞大多為CD8 α 陽性，然而，在LAK中之CD8 α 陽性細胞與LAK及CD8 α 陰性細胞相比則具有較高的NK毒殺能力(16)，可見此毒殺能力之相對性與本實驗結果並不完全符合。若是CD5^{lo}細胞同樣為CD8 α NKC，為何在IL-2激

化後CD5^{lo}之NK毒殺能力不若CD8 α LAK，我們所推測的理論如下，CD5^{hi}細胞群中仍有一小群CD8 α 陽性細胞，此細胞群中可能包含有CD8 α NKC，但本實驗使用抗體以FACS Aria flow cytometer將CD5^{lo}去除掉，發現在PBL中只要去除CD5^{lo}細胞族群，即使在有IL-2 刺激的情形下，NK毒殺能力仍然失去，這說明CD5^{lo}細胞極可能為犬NKC中的重要族群。只要沒有CD5^{lo}細胞的存在，CD5^{lo}-CD8 α NKC就不會活化，因此CD5^{hi}細胞群中之CD8 α NKC需要非CD5^{hi}細胞之協助才能活化並產生NK毒殺能力。舉例來說，人類血液來源的DC可以直接活化休眠的NKC或是藉由活化T細胞分泌細胞激素間接地活化NKC(24)，或是由T細胞產生的IL-2 可以活化CD56^{bright} NK C(25)。是否犬之NK C與其它物種一樣有類似的細胞間交互作用？這個問題仍需進行更多的實驗來釐清。

除了NK毒殺能力試驗之外，我們測量了這些細胞族群受到IL-12 刺激後，具IFN- γ 生產能力之細胞百分比。結果發現LAK中CD5^{lo}細胞可分泌IFN- γ 之細胞比例顯著地比CD5^{hi}細胞還多，但是差距並不大。由於在CD5^{hi}細胞族群中分別有CD8 T細胞、CD4 T細胞和B細胞的存在，IL-12 雖然可刺激NK C分泌IFN- γ ，但CD4 T細胞、CD8 T細胞同時也可以直接被IL-12 刺激而分泌IFN- γ (26)。因此我們無法從IFN- γ 之結果區分出IL-12 對NK C之影響，只能間接說明在CD5^{lo}細胞族群中具有可分泌IFN- γ 之細胞族群，這表示NK C有可能存在於CD5^{lo}細胞族群中。由於CD5^{lo}細胞中分泌IFN- γ 細胞之百分比並不是很高，這表示IFN- γ 分泌之能力可能不是CD5^{lo}細胞族群之主要功能。這個結果可能類似於人類之CD56^{dim} NK C的特性，CD56^{dim} NK C佔週邊血液NK C中的90%左右，其主要特徵為較高之NK毒殺能力、較低之細胞激素分泌能力以及較高量的CD16 表現(27-29)。

在NK接受器和相關分子之基因表現的實驗中，我們偵測了NK相關基因。比較在PBL中之CD5^{lo}細胞和CD5^{hi}細胞族群，結果在CD5^{lo}細胞中NKG2D、CD16、CD94、CD160、 perforin和granzyme B顯著性地高於CD5^{hi}細胞。以上之mRNAs 雖然並非NK C特異性之標記，因此無法以這些基因的表現來區別出NK C與其他細胞，但是我們可根據這些NK C相關接受器和分子之高表現量來證明CD5^{lo}細胞中具有較多的NK C。這在其他物種中有許多相關的研究。如Perforin的高表現量，這個現象在豬之NK C有相似的情形，豬週邊血液中之CD8⁺細胞可藉由perforin表現區分出CD8 T細胞和NK C，若為perforin⁺細胞即為NK C (30)。CD16 (Fc γ RIIIA) 在人類為NK C重要的表面抗原(27-29)，是 IgG Fc 區域之接受器。可活化NK C進行ADCC (31)。CD94/NKG2A接受器的高表現為人類CD56^{bright} NK C的特徵之一，在CD56^{dim} NK C上同樣有表現(32)。然而比較在IL-2 刺激後之LAK細胞中CD5^{lo}細胞和CD5^{hi}細胞族群，結果發現CD5^{lo} LAK細胞表現較高量之NKp30、NKp44、CD16 和CD94 之mRNAs。NKp30 和NKp44 在許多物種中為NK C特異性之活化型接受器(9, 33)，而根據本實驗室先前之研究發現犬NKp30 之基因表現與具NK毒殺能力之細胞所佔比例成正相關(16)。雖然在PBL之CD5^{lo}細胞族群中看不到NKp30 mRNA上升的現象，但是在CD5^{lo} LAK細胞族群中，NKp30 基因之高表現量可為佐證。綜合以上結果，CD16 與CD94 之mRNA在PBL和LAK中均

出現高表現量，因此有可能可以將CD16 和CD94 基因高表現視為犬NKC的重要指標，未來在進行犬NKC之相關接受器研究時也可以先針對此兩種接受器進行研究。

在細胞激素之基因表現的實驗中，比較PBL中之CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞發現CD5^{lo}細胞之IL-8 及IL-10 之表現量顯著地高於CD5^{hi}細胞。PBL中包括未成熟與記憶型T細胞、NKC、B細胞均可分泌IL-10 (34)。IL-10 為免疫調節細胞激素，可以抑制許多單核球分泌之細胞激素包括IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 和GM-CSF等(35)。但另一方面，IL-10 可以促進Fc receptor之表現，包括CD16 和CD64(36)。因此我們在CD5^{lo} PBL中觀察到之高IL-10 表現可能與犬CD16 之基因表現有關連。在IL-8 方面，相關文獻指出NKC在未刺激的情形下可以自動分泌IL-8 (37)，符合我們的結果。比較在IL-2 刺激後之LAK細胞中CD5^{lo}細胞和CD5^{hi}細胞族群，但發現許多細胞激素的表现在CD5^{hi}細胞中卻較高，這可能是因為CD5^{hi}細胞中含有較多其它的細胞族群如CD8 T細胞、CD4 T細胞和B細胞，因此在IL-2 激化後可以大量生產各種細胞激素，例如T細胞可被IL-2 活化並分泌IL-2、IL-4、IL-10 和 IL-13 (38)。由於IL-2 激化後之細胞激素表現是由較複雜的細胞反應造成，因此我們較難觀察到具NKC特異性的情形。但我們在PBL中CD5^{lo}細胞的結果顯示，IL-8 和IL-10 的較高表現似乎可作為犬NKC分泌細胞激素之特點。

在mRNAs表現的實驗中我們發現到一個特殊現象，在PBL中的mRNA表現量遠高於IL-2 激化後的LAK，而在許多研究中均指出PBL經由IL-2 激化後許多基因之mRNA表現量均會增加(39)，因此我們進一步探討造成此現象之原因。第一，本實驗之mRNA表現量是先扣除housekeeping基因的表現來進行相對定量，因此若是housekeeping基因的表現量不穩定則會造成相對表現量的變動。使用於相對定量之housekeeping基因有很多種，其中 β -actin為細胞骨架之一，不管在基因或蛋白質表現層面均常用作各種實驗標準化之指標(40, 41)，因此我們選擇 β -actin來進行實驗之標準化。但是有些研究指出 β -actin在IL-2 激化後表現量會增加(42, 43)，因此這的確會影響到我們實驗的數據呈現，但由於本實驗主要是比較CD5^{lo}及CD5^{hi}細胞族群間之差異而非PBL與LAK間之差異，因此兩族群間之相對性比較受到此影響的機率較低。日後若要進行相關之實驗，我們應該挑選其他適當之housekeeping基因，例如 18S ribosomal RNA，以排除影響mRNA相對表現量的可能性(42)。第二，mRNAs之表現量與經細胞激素刺激活化後的時間點有密切關係，因此若沒有挑選適當的時間點，可能會錯失mRNAs最高的表現量。舉例來說，人類PBMC受到phytohemagglutinin (PHA)刺激後會分泌IL-24，IL-24 之mRNA表現在受到刺激後 12 個小時可達到最高之表現量，在第 72 小時之表現量降至最低(44)。本實驗採用之時間點為細胞激素刺激後之第五天，可能已經錯過mRNAs表現量之最高峰，因此造成LAK細胞中低mRNA之表現量。但同樣地，我們主要為比較相同時間點之CD5^{lo}和CD5^{hi}細胞族群，因此細胞族群間mRNAs表現量之相對性受到影響的機率較低，但仍可能造成細胞族群間之差異不顯著。

研究至此，我們仍有許多問題需要釐清，例如CD5 是否在NK活性上有調節

的功能或僅只為不具功能性之表面抗原？細胞中之NKC接受器相關基因之表現是否等同於蛋白質表現？這些問題均需繼續研究。另外，除了CD5 表面抗原之外，鑑定出其他NKC特異性抗原或接受器在蛋白質層次上之表現也是未來重要的目標。無論如何，經由本研究的各種實驗，我們證明了CD5^{lo}細胞的確為犬NKC中之重要族群，並且觀察到一些特定基因的表現可供未來進行犬NKC相關研究作為參考。

參考文獻

1. Timonen, T., Ortaldo, J. R., and Herberman, R. B. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med*, *153*: 569-582, 1981.
2. Assarsson, E., Kambayashi, T., Persson, C. M., Chambers, B. J., and Ljunggren, H. G. 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function. *J Immunol*, *175*: 2045-2049, 2005.
3. Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med*, *178*: 1321-1336, 1993.
4. Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*, *31*: 1076-1086, 2001.
5. Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L., and Munz, C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*: 16606-16611, 2004.
6. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N. M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*, *195*: 335-341, 2002.
7. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, *195*: 327-333, 2002.
8. Molinero, L. L., Domaica, C. I., Fuertes, M. B., Girart, M. V., Rossi, L. E., and Zwirner, N. W. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent

- cytotoxicity. *Hum Immunol*, 67: 170-182, 2006.
9. Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*, 190: 1505-1516, 1999.
 10. Gagnier, L., Wilhelm, B. T., and Mager, D. L. Ly49 genes in non-rodent mammals. *Immunogenetics*, 55: 109-115, 2003.
 11. Bonkobara, M., Sato, T., Takahashi, N., Kasahara, Y., Yagihara, H., Tamura, K., Isotani, M., Azakami, D., Ono, K., and Washizu, T. Characterization of cDNA and the genomic sequence encoding canine neural-cell adhesion molecule, CD56/N-CAM. *Vet Immunol Immunopathol*, 107: 171-176, 2005.
 12. 洪紹文 傳染性花柳性腫瘤犬隻血液中淋巴球的變化. 國立台灣大學獸醫學研究所, Vol. 碩士論文. 國立台灣大學, 2002.
 13. Ishiyama, T., Watanabe, K., Fukuchi, K., Yajima, K., Koike, M., Tomoyasu, S., and Tsuruoka, N. The presence of CD5LOW+NK cells in normal controls and patients with pulmonary tuberculosis. *Immunol Lett*, 37: 139-144, 1993.
 14. O'Reilly, K. L. and Splitter, G. A. CD5dim peripheral blood lymphocytes proliferate to exogenous IL-2 in the absence of antigen and kill in an NK-like manner. *Cell Immunol*, 130: 389-400, 1990.
 15. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17: 189-220, 1999.
 16. 林奕君 犬周邊血液淋巴球和淋巴激素活化殺手細胞中含 NKp30 mRNA 之 CD8+ 細胞群具有自然殺手細胞毒殺能力. 國立台灣大學獸醫學研究所, Vol. 碩士論文. 國立臺灣大學, 2007.
 17. Boysen, P., Olsen, I., Berg, I., Kulberg, S., Johansen, G. M., and Storset, A. K. Bovine CD2-/NKp46+ cells are fully functional natural killer cells with a high activation status. *BMC Immunol*, 7: 10, 2006.
 18. Reynolds, C. W., Timonen, T., and Herberman, R. B. Natural killer (NK) cell activity in the rat. I. Isolation and characterization of the effector cells. *J Immunol*, 127: 282-287, 1981.
 19. Kumagai, K., Itoh, K., Suzuki, R., Hinuma, S., and Saitoh, F. Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification as effector cells in NK and K cytotoxicities. *J Immunol*, 129: 388-394, 1982.
 20. Knapp, D. W., Turek, J. J., DeNicola, D. B., Chan, T. C., Carter, W. O., Snyder, P. W., and Robinson, J. P. Ultrastructure and cytochemical staining characteristics of canine natural killer cells. *Anat Rec*, 243: 509-515, 1995.

21. Nariai Nakada, Y., Nariai, K., Kosaka, T., Kuwabara, M., and Kiuchi, Y. Morphological observation of canine natural killer cells mediated cytotoxicity. *J Vet Med Sci*, *61*: 835-838, 1999.
22. Neighbour, P. A., Huberman, H. S., and Kress, Y. Human large granular lymphocytes and natural killing ultrastructural studies of strontium-induced degranulation. *Eur J Immunol*, *12*: 588-595, 1982.
23. Swain, S. L. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity*, *1*: 543-552, 1994.
24. Munz, C., Dao, T., Ferlazzo, G., de Cos, M. A., Goodman, K., and Young, J. W. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood*, *105*: 266-273, 2005.
25. Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M. A. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, *101*: 3052-3057, 2003.
26. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, *3*: 133-146, 2003.
27. Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., and Phillips, J. H. Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*, *143*: 3183-3191, 1989.
28. Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., and Phillips, J. H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, *136*: 4480-4486, 1986.
29. Ellis, T. M. and Fisher, R. I. Functional heterogeneity of Leu 19^{bright}+ and Leu 19^{dim}+ lymphokine-activated killer cells. *J Immunol*, *142*: 2949-2954, 1989.
30. Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M., Zuber, B., and Takamatsu, H. H. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol*, *110*: 279-292, 2006.
31. Attallah, A. M., Lewis, F. A., Urritia-Shaw, A., Folks, T., and Yeatman, T. J. Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, *63*: 351-354, 1980.
32. Voss, S. D., Daley, J., Ritz, J., and Robertson, M. J. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells. *J Immunol*,

- 160: 1618-1626, 1998.
33. Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol*, *31*: 2680-2689, 2001.
 34. Chabot, S., Williams, G., Hamilton, M., Sutherland, G., and Yong, V. W. Mechanisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction. *J Immunol*, *162*: 6819-6828, 1999.
 35. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, *174*: 1209-1220, 1991.
 36. te Velde, A. A., de Waal Malefijt, R., Huijbens, R. J., de Vries, J. E., and Figdor, C. G. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol*, *149*: 4048-4052, 1992.
 37. Mariani, E., Meneghetti, A., Neri, S., Ravaglia, G., Forti, P., Cattini, L., and Facchini, A. Chemokine production by natural killer cells from nonagenarians. *Eur J Immunol*, *32*: 1524-1529, 2002.
 38. Tan, J., Deleuran, B., Gesser, B., Maare, H., Deleuran, M., Larsen, C. G., and Thestrup-Pedersen, K. Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-derived cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-13. *J Immunol*, *154*: 3742-3752, 1995.
 39. Frederick, M., Grimm, E., Krohn, E., Smid, C., and Yu, T. K. Cytokine-induced cytotoxic function expressed by lymphocytes of the innate immune system: distinguishing characteristics of NK and LAK based on functional and molecular markers. *J Interferon Cytokine Res*, *17*: 435-447, 1997.
 40. Schmittgen, T. D. and Zakrajsek, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, *46*: 69-81, 2000.
 41. Suzuki, T., Higgins, P. J., and Crawford, D. R. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, *29*: 332-337, 2000.
 42. Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., and Hammarstrom, M. L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, *59*: 566-573, 2004.

43. Capelli, E., Nano, R., Panelli, S., Sciola, L., Spano, A., and Barni, S. Cytoskeleton actin changes in IL-2 activated cells. *Eur J Histochem*, 44: 279-283, 2000.
44. Poindexter, N. J., Walch, E. T., Chada, S., and Grimm, E. A. Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*, 78: 745-752, 2005.