

鱼类非特异性细胞毒性细胞(NCC)的研究进展

魏世娜, 简纪常, 吴灶和, 鲁义善, 闫秀英

(广东海洋大学 水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨广东省高等学校水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 自然杀伤细胞(NK)进化上的前体细胞在鱼类中被称作非特异性细胞毒性细胞(NCC), 主要来源于血液和淋巴器官, 是防御细菌、病毒、寄生性原生动物的第一道防线, 在非特异性免疫中起重要作用, 还具有体外杀伤肿瘤细胞的功能。近年来免疫荧光显微镜技术表明 NCAMP-1 和 NCCRP-1 两种受体蛋白均表达于 NCC 膜上, 并且这种免疫细胞从鱼类到哺乳动物上的进化是保守的, 这些膜蛋白在鱼类炎症反应期可能通过颗粒胞吐途径参与抗菌的先天性免疫。本文就 NCC 的分离鉴定、形态结构、功能受体作用机制等方面的研究成果作一综述, 旨在为深入研究 NCC 在鱼类先天性防御中的作用提供依据。[中国水产科学, 2010, 17(2): 374-380]

关键词: 非特异性细胞毒性细胞; 分离鉴定; NCC 受体

中图分类号: S97

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0374-07

硬骨鱼类具有多种细胞毒性细胞, 它们能够识别和破坏病毒感染的变异细胞。细胞毒性细胞的功能和哺乳动物的相似, 包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)。这 4 种细胞的形态在大多数鱼类中已得到鉴定^[1]。非特异性细胞毒性细胞(nonspecific cytotoxic cell, NCC)被称为第 5 种细胞毒性细胞, 与哺乳动物自然杀伤细胞功能相似。NCC 在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和其他鱼类先天性免疫反应中的细胞毒性效应机制中起重要的作用^[2], 特别是血液、淋巴组织和黏膜中的 NCC 在机体早期抗肿瘤和免疫监视中具有重要作用, 即通过细胞与细胞的接触, 非特异性地杀死各种靶细胞, 包括同种异源和异种异源肿瘤细胞、病毒感染的细胞和寄生性原生动物的。本文对硬骨鱼类 NCC 的分离鉴定方法和功能等方面作一综述, 旨在为深入研究鱼类非特异免疫机理提供参考。

1 NCC 的发现与特性

1984 年, Evans 等^[3]首次从斑点叉尾鲷中分离出非特异性细胞毒性细胞, 随之, 有关 NCC 的研究日益增多。据文献报道, NCC 广泛存在于虹鳟(*Onchorhynchus mykiss*)、罗非鱼、雀鲷(*Stegastes partitus*)和鲤(*Cyprinus carpio* L.)等鱼类的淋巴器官如胸腺、肾脏和脾脏, 以及腹腔和血液中。肾、腹腔中 NCC 最多, 血液中较少, 且血液中的 NCC 活性最低。NCC 是最小的白细胞, 呈多形性, 核有裂口和相对少的细胞质, 表面有微绒毛, 通过长的胞膜纤维吸附于靶细胞上。NCC 的杀菌作用是自发的, 不需要任何诱导。其溶解靶细胞的敏感性与靶细胞的激活状态无关, 即 NCC 与靶细胞混匀后, 细胞毒性立即起作用, 在 2~8 h 内, 毒性作用达到最强。NCC 的细胞毒性虽然是非特异性的, 但其作用对象有选择性。它能够识别和杀伤人类细胞系包括 NC-37、P3HR-1、K562 和鼠细胞系 YAC-1 和 P815, 对成纤

收稿日期: 2009-04-09; 修订日期: 2009-06-18.

基金项目: 国家自然科学基金-广东省自然科学基金联合资助项目“石斑鱼分子免疫系统及其免疫应答机理的系统研究”(U0631009).

作者简介: 魏世娜(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害防治. E-mail: weishinazi@163.com

通讯作者: 简纪常, 教授, 博士生导师. 主要从事水产动物免疫学及病害控制. E-mail: jianjc@gmail.com

维细胞系、上皮细胞系或恶性转化的细胞系也有明显杀伤作用,但对正常分化细胞无作用。这表明 NCC 可预防肿瘤的形成,对防止病毒和寄生虫感染也有重要作用。

2 NCC 的纯化

为了深入研究 NCC 的作用机制,在体外研究 NCC 的功能过程中,首先是要分离 NCC,分离到高纯度、高活性的 NCC 是开展 NCC 研究的关键;其次,才是测定分离细胞的纯度和毒性。由于 NCC 分离纯化成本高、操作复杂等因素,其研究在国内尚为鲜见。目前,国外通常采用的 NCC 分离方法包括:流式细胞分选技术和 Percoll 液密度梯度离心法。

2.1 流式细胞仪分离纯化 NCC

国外大多采用流式细胞分选技术来分离并鉴定 NCC 纯度^[4],流式细胞分选技术是借助流式细胞仪,将荧光素标记的单克隆抗体加入细胞悬液内,使两者特异性结合。单克隆抗体 5C6 用于纯化和鉴定 NCC^[5]。通过流式细胞仪以每秒 5 000 个细胞的速度分离和收集无菌的淋巴细胞,纯度可达 90%~99%,且细胞活性不受影响,但是这项技术的成本昂贵。还有学者通过非放射性检测 NCC 毒性,即利用聚化丙啶加入细胞悬液后过流式细胞仪检测细胞毒性^[6]。

2.2 Percoll 密度梯度离心法分离 NCC

Percoll 为一种新型密度梯度离心剂,是聚乙酰胺吡咯烷酮的硅胶颗粒,在液体中颗粒大小不一,在一定离心场中可形成一定密度梯度,这种密度梯度分离剂对细胞无吸附作用,产生的渗透压很小,在全部密度范围保持等张。此外, Percoll 不穿透生物膜,对细胞无毒害。因此 Percoll 广泛用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒,还可将受损细胞及其碎片与完好的活细胞分离。由于不同密度的细胞分布于不同密度层,借此可将 NCC 与其他单个核细胞分离,从而达到去除大量 T 细胞的目的。根据硬骨鱼类的种类不同,分离 NCC 所采用的 Percoll 液的浓度也是不同。Cuesta 等^[7]采用 48% Percoll 分离到金头鲷 (*Sparus aurata* L.) 头肾组织的 NCC, Oumouna 等^[8]通过 45.5%

Percoll 分离到斑点叉尾鲷头肾组织的 NCC, Reid Bishop 等^[9]也通过 45.5% Percoll 分离到奥利亚罗非鱼外周血的 NCC,其操作程序较简单,细胞收获量较大,纯度较高,基本可满足对细胞特性研究的需要。

3 NCC 的识别和杀伤机制

NCC 是先天性免疫系统中主要的淋巴细胞,与 NK 细胞的靶细胞及识别靶细胞的机制相似,而且都参与介导裂解传染性微生物。Greenlee 等^[10]研究表明,虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 头肾、脾脏、末梢血管中的 NCC 可直接与靶细胞接触,通过自身产生的淋巴毒素来杀伤、破坏靶细胞。NCC 通过受体来识别靶细胞,与靶细胞结合后,通过释放穿孔素、颗粒酶及 FasL/Fas 介导的程序性细胞死亡 2 种方式来诱导靶细胞凋亡。

3.1 穿孔素和颗粒酶介导的靶细胞凋亡

穿孔素 (perforin, 又称孔形成蛋白, pore forming protein, PFP) 和颗粒酶 (granzyme) 是在细胞介导的细胞毒作用中发挥其相关功能的蛋白质,在破坏感染病毒、细菌或寄生虫等异物抗原的宿主细胞,维护机体的健康方面也具有重要的意义。颗粒酶是一类重要的细胞毒素,属丝氨酸蛋白酶。穿孔素 (PFP) 通过在靶细胞膜上形成活性孔道使靶细胞渗透压改变而溶解,或者与颗粒酶协同作用而诱导靶细胞凋亡。有关穿孔素与颗粒酶介导靶细胞凋亡的作用机制仍未完全清楚。最新观点认为颗粒酶首先与丝甘蛋白聚糖 (serglycin) 形成复合体,然后由穿孔素单体介导转运进入靶细胞^[11],也可能与穿孔素再形成大分子复合体一起转运进入靶细胞,且至少在一定程度上通过免疫细胞表面表达的 6-磷酸甘露糖受体 (mannose 6-phosphate receptor, MPR) 的胞吞作用介导^[12],而并不依赖于穿孔素在胞膜上孔道的形成。Kesavannair 等^[13]报道了斑点叉尾鲷 NCC 在体外细胞毒性试验中上清液蛋白酶活性的分析,一种具有催化活性的重组粒酶,即 CFGR-1 的产生,通过序列比较和分子模型,在体外酶动力学试验中用不同的底物也证实了它具有纤维蛋白溶酶活性。粒酶活性试验证明了 NCC 中糜蛋白酶和纤维蛋白溶酶

活性占主要地位。颗粒胞吐途径是 NCC 产生细胞毒性机制之一,在硬骨鱼类中,细胞介导的细胞毒性主要通过颗粒成分组成即干扰素、粒溶素等的表达产生杀伤效应机制。效应性淋巴细胞与靶细胞结合后,淋巴细胞释放颗粒物质,其中的穿孔素先在胞膜上形成跨膜管状结构,然后颗粒中的颗粒酶通过这种管状结构进入靶细胞,诱导靶细胞 DNA 降解,发生凋亡。

3.2 死亡受体介导的靶细胞凋亡

死亡受体(death receptor, DR)是指能够通过与其相应的死亡配体结合,传递细胞凋亡信号的细胞表面蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族。Fas 和 FasL 所导致由的细胞凋亡是一系列脱氨酸酰门冬氨酸特异性蛋白酶(caspase 酶)的激活所引起的。Fas 是一种跨膜蛋白,与 FasL 结合可以启动凋亡信号的转导引起细胞凋亡。Fas 作为一种普通表达的受体分子,可出现于多种细胞表面,但 FasL 的表达却有其特点,通常只出现于活化的 T 细胞和 NK 细胞表面,因而已被活化的杀伤性免疫细胞往往能够最有效地以凋亡途径置靶细胞于死地。Fas 分子胞内段带有特殊的死亡结构域(death domain, DD),三聚化的 Fas 和 FasL 结合后,使 3 个 Fas 分子的 DD 相聚成簇,吸引了细胞质中另一种带有相同 DD 的 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain, FASS)。

近年有研究提出免疫细胞受刺激活化后发生凋亡(activation induced cell death, AICD)可能是形成机体免疫耐受的一种机制。罗非鱼先天性免疫中的重要机制之一就是细胞的程序性死亡。Evans 等^[14]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)NCC 的凋亡在先天性免疫中的作用进行了研究, NCC 参与该免疫调节机制过程中对靶细胞的作用, NCC 在受到外源刺激后体内分泌的可溶性细胞因子释放到外周环境后可以特异性地结合细菌。如罗非鱼的 NCC 中含有组成型的可溶性死亡受体 Fas 的配体(FasL),可溶性的 FasL 可以附着并引起梨形四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*)的凋亡^[15]。这暗示着死亡受体 Fas 在鱼体中不仅在体内诱使肿瘤细胞的凋亡,同时在体外也可以杀死鱼体的寄生虫。罗非鱼 NCC 的活性也受到

了凋亡途径中的 2 种衔接蛋白 CAS、FADD 上调的影响。Graves 等^[16](1985a)进行的体外研究表明,斑点叉尾鲷 NCCs 能裂解被特异性抗血清脱纤毛或抑动的梨形四膜虫,并在此基础上提出了一个新的非特异性抗寄生虫细胞免疫机制。通过流式细胞仪分析脾、头肾和外周血 NCC 中蛋白的表达量,免疫印记分析结果表明,经过处理的血清中 NCC 的 FasL、CAS 和 FADD 的表达量增加。Evans 等^[17](1998)研究也表明,斑点叉尾鲷 NCCs 能结合并裂解一定的寄生原虫和癌细胞。高纯度的 NCCs 在体外可被寄生原虫梨形四膜虫激活, NCCs 能特异地识别寄生原虫上的一个抗原决定簇,与该抗原结合后产生一个激活信号,可能对先天性免疫的产生起很重要作用。Graves 等^[18](1985b)研究了斑点叉尾鲷免疫和感染小瓜虫后,头肾和外周血液白细胞中的 NCCs 的组织分布变化情况,与未感染鱼或免疫鱼相比,感染组濒死鱼的头肾组织中 NCCs 活性受到抑制。

4 NCC 的受体

免疫细胞活性的作用主要是通过胚系编码的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)识别与病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP),实现对外来病原体的早期识别,进而启动先天性免疫的效应机制。此受体与相应的配体结合后,可启动快速的信号传递,引起细胞因子的活化。非特异性细胞毒性细胞膜受体是 NCC 发挥功能的分子基础。NCCRP-1 和 NCAMP-1 的发现,使人们对 NCC 作用机制有了进一步认识。到目前为止,这些受体的功能研究仅仅局限于斑点叉尾鲷和罗非鱼,而在其他鱼类如斑马鱼(*Danio rerio*)中,这些受体基因也才被克隆。

4.1 NCCRP-1

2002 年, Oumouna 等^[19]观察到一种意外的情况,即一种回文序列 AACGTT,可以显著增强斑点叉尾鲷中 NCC 的活性,并且含 GpC 的序列表现出了更高的活性,也就是说 NCC 可以识别 C 和 G。除此之外,2004 年, Ishimoto 等^[20]用 GACGTT、AACGTT 刺激罗非鱼的头肾细胞后,分离到了一种非特异性

细胞毒性细胞受体(NCCRP) I型基因。非特异性细胞毒性细胞受体蛋白(NCCRP-1)属于Ⅲ型跨膜糖蛋白,包括238个氨基酸残基且具有3种不同的结构域,包含抗原结合域、信号域和转录激活域。抗原结合域位于104-119位上,主要用于识别靶细胞^[21]。NCC的激活就是通过靶细胞与NCCRP-1的交叉连接,导致其受体酪氨酸和丝氨酸磷酸化。胞内C-端包含高浓度的磷酸化位点(Y, S, T),分子的N-端也在细胞内部,含有标记性氨基酸即比咯氨酸丰富的序列,这是功能相关性的标志。NCCRP-1和蛋白酪氨酸激酶相作用,使STAT 6(信号传导子及转录激活子)移位入细胞核。这些结果表明NCCRP-1在NCC的活化方面可能起双重作用:首先,在靶细胞溶解过程中作为一种抗原识别分子;其二,是NCC释放细胞因子的启动者。

NCC特异性地通过NCCRP-1有序识别靶细胞上的(保守的)抗原序列。*nccrp-1* cDNA序列的测定揭示了这种保守蛋白不属于哺乳动物超基因家族。NCCRP-1的氨基酸序列最初是由鲟NCC的cDNA序列推测的。大西洋真鳕*nccrp-1*基因比较小,与鲤和斑点叉尾鲟*nccrp-1*内含子/外显子的结构^[22]有所不同,但也是比较保守的基因。NCC的激活是通过靶细胞抗原决定簇与多聚重复序列的NCC受体的结合,这种结合使NCC受体蛋白的表达量增加^[23]。因而,NCCRP-1在靶细胞识别和细胞毒性激活方面起了很重要的作用^[24]。此外,已克隆到了斑点叉尾鲟、鲤、金头鲟^[25]等的*nccrp-1*基因。斑点叉尾鲟*nccrp-1*的基因序列已得到确认,也是一种典型的Ⅲ型膜蛋白结构,其与已知的哺乳动物白细胞受体没有同源性^[26]。到目前为止,这些受体的功能研究仅局限于斑点叉尾鲟和罗非鱼。

4.2 NCC 阳离子抗菌蛋白-1 (NCAMP-1)

Connor等^[27]鉴定了1种保守性寡聚脱氧核苷酸连接膜蛋白,即NCC阳离子抗菌蛋白-1(NCAMP-1),经过免疫印记分析,证明了斑点叉尾鲟NCC乙酸提取物中含有NCAMP-1,且表达于NCC细胞膜上。乙酸提取物表现出杀伤革兰氏阴性致病菌的活性,如果加入抗NCAMP-1的多抗,其杀伤活性会受到

抑制。从硬骨鱼类到哺乳动物免疫细胞,NCAMP-1的先天性免疫功能的进化是保守的。NCAMP-1也存在于人类NK细胞系YT-INDY的颗粒提取物和细胞膜上。

EST技术表明,NCAMP-1也存在于斑点叉尾鲟和斑马鱼的不同组织中。NCAMP-1的重复性标记实验与组蛋白样的多肽比较表明,多重赖氨酸序列的存在是由AKKA前激肽释放酶重复组成的^[28]。这种蛋白已在大肠杆菌中克隆表达。Evans等^[29]还总结了NCAMP-1分子特征,包括序列分析、系统进化分析和抗菌活性。NCAMP-1的两端和重组蛋白的全长显示了抗菌活性。但是真核生物的DNA对NCC毒性没有影响。这种重组NCAMP-1连接GpC寡聚脱氧核苷酸和人未甲基化寡聚脱氧核苷酸(CpG-ODN),通过同源的抗NCAMP-1的多克隆抗体来检测。研究表明NCC识别未甲基化的DNA,这些相互作用的结果会增加先天性抗菌免疫反应^[30]。Liliana等^[31]研究还表明,硬骨鱼类NCC和哺乳动物NK细胞上的功能相关分子受体都具有(中间丝)波形蛋白样的抗原决定簇,因此在识别靶细胞方面起了同样的作用,预测NCC溶解活性的增强机制可能是由这些细胞sFasL表达量的增加导致的^[32]。由此推断,NCAMP-1可能是1种具有双重功能的分子。首先,作为膜蛋白,它是一种模式识别受体;其二,是NCC胞质颗粒中的一种抗菌肽,以溶解的方式来杀死病原微生物。但是关于NCC中这种分子的分泌机制有待于进一步研究。

5 应激对 NCC 活性的影响

影响NCC活性的因素较多,例如饵料、温度、应激状态、鱼类种类和鱼龄等。在强烈的应激反应中,NCC和其他非特异性效应因子(吞噬细胞等)产生先天性防御。应激可能由多种刺激原引起^[33],比如感染病原(细菌、病毒和寄生性原生动植物)或不利的环境条件(水温变化、低氧、拥挤和麻醉)。低温下,鱼类NCC活性较高;当有淋巴细胞反应时,应激后的NCC活性被抑制。这表明当特异性(淋巴细胞介导)的免疫应答相对低时,NCC细胞毒性作用特别

重要。此外,像哺乳动物一样,NCC也参与肿瘤细胞免疫监视。

Evans等^[34]研究了罗非鱼体内注射灭活的海豚链球菌的不同菌株,其NCC细胞毒性发生了变化但数量没有增殖。经过刺激后,NCC可以在几分钟内释放可溶性细胞因子样的物质到外周血中,使其细胞活性增加3~4倍。Evans等^[35]对来自斑点叉尾鲷的NCC进行体外试验,即加入不同浓度的维生素A醋酸酯和聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸(poly I:C),结果表明维生素A醋酸酯能显著增加NCC活性,而无论是在试验前还是在细胞毒性试验中加入不同浓度的poly I:C,NCC活性没有受到影响。因此,应激对鱼体免疫细胞活性的影响是相当复杂的,其详细机理还有待进一步研究。

6 问题与展望

硬骨鱼类NCC在增强鱼体非特异性免疫,提高抗病能力方面起了重要的作用。目前国外学者对硬骨鱼类NCC进行了深入广泛的研究,从细胞形态到功能基因来研究其在鱼类中的细胞毒性;以铬释放法检测NCC杀伤活性;以流式细胞仪检测NCC数量;以RT-PCR技术检测NCC杀伤效应介质-穿孔素、颗粒酶A及B的mRNA表达水平;受体蛋白的克隆与功能表达等已经涉及到了分子细胞免疫学,通过提高应用于水产养殖中可以增强鱼体非特异性免疫,提高抗病能力及养殖成活率。随着许多现代生物技术的高速发展,对鱼类NCC研究的手段也在不断更新,由于国内缺乏特异性抗体如单抗5C6,很难获得纯化的细胞系,因此应用单克隆或多克隆抗体技术、免疫荧光技术、流式细胞技术以及分子生物学技术对鱼类NCC进行分选、培养来研究其功能机制显得尤为重要,然而对于受体之间信号途径的联系及一些激活和抑制信号之间的调控仍有许多不明之处,尚有待于进一步深入探讨。随着这些新技术方法的成功应用,相信在今后一段时间内,这些新方法还将在鱼类免疫细胞研究中发挥更重要的作用,从而进一步推动鱼类免疫细胞以及与之相关的鱼类免疫学研究向更深的层次发展。

参考文献:

- [1] Jeffrey A Yoder. Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish [J]. *Compara Biochem Physiol*, 2004, 138 : 271-280.
- [2] Donald L Evans, Jaso-Friedmann L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 1: 109-121.
- [3] Donald L Evans, Kevin T Hogan, Scott S Graves, et al. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). III. Biophysical and biochemical properties affecting cytotoxicity [J]. *Dev Comp Immunol*, 1984, 8 (3) : 599-610.
- [4] JOSE R K Jr, AKKASHI K, CHIHAYA N, et al. Analysis of rainbow trout peripheral blood leucocytes separated by cytometry cell sorting [J]. *Fish Path*, 1999, 34 (1) : 1-6.
- [5] Linling Shen, Tor B Stuge, He Zhou, et al. channel catfish cytotoxic cells: a mini-review [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26: 141-149.
- [6] Donald L Evans, Mustapha Oumouna, Liliana Jaso-Friedmann. Nonradiometric detection of cytotoxicity of teleost nonspecific cytotoxic cells [J]. *Meth Cell Sci*, 2000, 22: 233-237.
- [7] A Cuesta, M A Esteban, J Meseguer. Natural cytotoxic cells of gilthead seabream: maximum percentage of lysis [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2002, 12, 111-118.
- [8] M. Oumouna, L Jaso-Friedmann, Donald L Evans. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: Binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26: 257-269.
- [9] G Reid Bishop, Susan Taylor, L Jaso-Friedmann, et al. Mechanisms of nonspecific cytotoxic cell regulation of apoptosis: cytokine-like activity of Fas ligand [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2002, 13: 47-67.
- [10] Anne R Greenlee, Ruth A Brown, Sandra S Ristow. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms [J]. *Dev Comp Immunol*, 1991, 15 (3) : 153-164.
- [11] Metkar SS, Wang B, Aguilar Santelises M, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B serglycin complexes into target cells without plasmamembrane pore formation [J]. *Immunity*, 2002, 16 (3) : 417-428.
- [12] Motyka B, Korbitt G, Pinkoski M J, et al. Mannose 6-phosphate insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T-cell-induced apoptosis [J]. *Cell*, 2000, 103 (3) : 491-500.
- [13] Kesavannair Praveen, John H Leary III, Donald L Evans, et al. Nonspecific cytotoxic cells of teleosts are armed with multiple

- granzymes and other components of the granule exocytosis pathway [J]. *Molec Immunol*, 2006, 43: 1152–1162.
- [14] D L Evans, J H Leary III, L Jaso-Friedmann. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 791–805.
- [15] Liliana Jaso-Friedmann, John H Leary III, Donald L Evans. Role of Nonspecific Cytotoxic Cells in the induction of Programmed Cell Death of Pathogenic Protozoans: Participation of the Fas Ligand-Fas Receptor System [J]. *Exper Parasitol*, 2000, 96: 75–88.
- [16] Graves S S, D L Evans and D L Dawe. Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Immunology*, 1985, 134 (1) : 78–85.
- [17] Evans D L, JH Jr Leary, P Nadella, et al. Evidence for antigen recognition by nonspecific cytotoxic cells: initiation of 3H-thymidine uptake following stimulation by a protozoan parasite and homologous cognate synthetic peptide [J]. *Dev Comp Immunol*, 1998, 22 (2) : 161–172.
- [18] Graves S S, D L Evans and, D L Dawe. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1985b, 8: 43–51.
- [19] Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans D L. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26 (3) : 257–269.
- [20] Ishimoto Y, Savan R, Endo M, et al. Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 type gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and analysis [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16 (2) : 163–172.
- [21] Liliana Jaso-Friedmann, John H Leary III, Donald L Evans. The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 701–711.
- [22] Marit Seppola, Borre Robertsen, Ingwill Jensen. The gene structure and expression of the non-specific cytotoxic cell receptor protein (NCCRP-1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 147: 199–208.
- [23] Liliana Jaso-Friedmann, John H. Leary III, Ziva Weisman, et al. Activation of Nonspecific cytotoxic Cells with a Multiple Antigenic Peptide: Specificity and Requirements for Receptor Crosslinkage [J]. *Cellul Immunol*, 1996, 170: 195–201.
- [24] Hirohiko Sakata, Ram Savan, Ryo Sogabe, Tomoya Kono, et al. Cloning and analysis of non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 from common carp *Cyprinus carpio* L [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 140: 287–294.
- [25] Alberto Cuesta, Maria Angeles Esteban, Jose Meseguer. Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29: 637–650.
- [26] Jaso-Friedmann L, Leary 3rd JH, Evans DL. NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells [J]. *Mol Immunol*, 1997, 34: 955–965.
- [27] Meghan A. Connor, Liliana Jaso-Friedmann, John H. Leary III, Donald L. Evans. Role of nonspecific cytotoxic cells in bacterial resistance: Expression of a novel pattern recognition receptor with antimicrobial activity [J]. *Molecul Immunol*, 2008, 2891: 1–9.
- [28] Froelich C J, Dixit V M, Yang X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis matters of viralmimicry and deadly proteases [J]. *Immunol Today*, 1998, 19 (1) : 30–36.
- [29] Donald L Evans, Harjeet Kaur, John Leary III, et al. Molecular characterization of a novel pattern recognition protein from nonspecific cytotoxic cells: Sequence analysis, phylogenetic comparisons and anti-microbial activity of a recombinant homologue [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29: 1049–1064.
- [30] M. Oumouna, L Jaso-Friedmann, D L Evans. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: Binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. *Dev Comp Immunol*. 2002, 26: 257–269.
- [31] Liliana Jaso-Friedmann, John H Leary III, et al. Nonspecific Cytotoxic Cells in Fish: Antigenic Cross-Reactivity of a function associated molecule with the intermediate filament vimentin [J]. *Cellul Immunol*, 1993, 148 (1) : 208–217.
- [32] Harjeet Kaur, Liliana Jaso-Friedmann, Donald L Evans. Single base oligodeoxyguanosine upregulates Fas ligand release by nonspecific cytotoxic cells [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 571–579.
- [33] Alberto Cuesta, M Angeles Esteban, Jose Meseguer. Effects of different stress agents on gilthead seabream natural cytotoxic activity [J]. *Fish Shellf Immunol*. 2003, 15: 433–441.
- [34] D L Evans, S L Taylor, J H Leary III, et al. In vivo activation of tilapia nonspecific cytotoxic cells by *Streptococcus iniae* and amplification with apoptosis regulatory factor (s) [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2000, 10: 419–434.
- [35] Donald L Evans, Scott S Graves, Vicki S Blazer. Immunoregulation of fish nonspecific cytotoxic cell activity by retinolacetate but not poly I: C [J]. *Comp Immunol*, 1984, 7 (2) : 91–100.

Research progress on nonspecific cytotoxic cell in teleostean fish

WEI Shina, JIAN Jichang, WU Zaohe, LU Yishan, YAN Xiuying

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals & Key Laboratory of Diseases Controlling for Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institutions; Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Nonspecific cytotoxic cell is the evolutionary precursor of mammalian natural killer cell in teleostean fish, which was mainly separated from blood and lymphoid organ as the first barrier of defense to protect the animal against bacteria, virus and protozoa parasitism, it plays an important role in nonspecific immunity and also has a function of killing tumor cells in vitro. In recent years the merged images from immunofluorescence microscopy showed that NCAMP-1 and NCCRP-1 are coexpressed on NCC membranes and may participate in innate immunity against bacteria by granule exocytosis during inflammatory responses in teleosts. These membrane proteins are evolutionarily conserved from teleostean fish to mammalian. In this review, the isolation and characterization, morphology and structure of NCC, and NCC receptor mechanism have been discussed in order to provide data for further research on NCC function in the innate immunity of fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2): 374–380]

Key words: NCC; isolation; function; NCC receptor

Corresponding author: JIAN Jichang. E-mail: jianjc@gmail.com