

文章编号: 0529-6579 (2000) 06-0197-07

优势化 II 型 T 细胞表达 Ly49C 和 Ly49A 及其功能*

段连宁^{1,2}, 郭坤元², 潘兴华², 杜江², 李树浓¹

(1. 中山医科大学病理生理教研室, 广东 广州 510089; 2. 第一军医大学珠江医院血液科)

摘 要: 探讨 KIR 分子参与优势化的 Th2、Tc2 细胞活化抑制和免疫耐受的可能机制。① 体外经 IL-4 优势化诱导 II 型 T 细胞; ② ABC 法检测 Ly49A 表达; ③ 优势化 II 型 T 淋巴细胞的 Ly49CmRNA 的原位分子杂交; ④ ³H-TdR 掺入法测定单向和双向 MLR 中 B6 (H-2^b) 小鼠优势化 II 型 T 淋巴细胞增殖; ⑤ Ly49C 阻断后活化 II 型 T 细胞对 EL9611 细胞的杀伤活性测试。结果有: ① 在 mIL-4、ConA 和 Ionomycin 环境下体外培养 4 天即可使静息淋巴细胞 mIL-4 的分泌水平由低于 20 μg/mL 提高到 833.33 ± 28.73 μg/mL ($P < 0.01$); ② 优势化的 II 型 T 淋巴细胞的 Ly49CmRNA 表达阳性率为 (25.6 ± 6.2)% (静息 T 细胞的质量分数 < 3%), Ly49A 的膜表达为 (22.5 ± 4.9)% (静息 T 细胞的质量分数 < 5%)。FCM 检测结果显示: Ly49C 在 II 型 T 细胞表达阳性率 (29.8 ± 4.3)%, 其中 CD4⁺ 细胞表达阳性率为 (10.2 ± 0.9)%, CD8⁺ 细胞阳性表达率为 (17.8 ± 1.3)%。抗 Ly49C 单克隆抗体 (5E6) 可以使 C57BL/6^{H2b}-BALB/c^{H2d} 之间单向 MLR 和双向 MLR 的增殖活性分别提高 (21.5 ± 3.4)% 和 (13.8 ± 1.6)%。5E6 抗体使 C57BL/6 鼠 II 型 T 细胞对 EL9611 细胞的杀伤活性提高 (47.2 ± 8.5)%。经 IL-4 诱导的优势化 II 型 T 细胞杀伤细胞抑制性受体 Ly49A、Ly49C 表达增高, 该受体与 MHC I 分子结合, 建立了对 T 细胞抑制性信号传导通路。

关键词: T 细胞; 杀伤细胞抑制性受体; 小鼠

中图分类号: Q813.5 **文献标识码:** A

杀伤细胞抑制性受体 (killer cell inhibitory receptors, KIRs) 是近年来发现的一种主要表达在 NK 和部分 T 细胞上的抑制性信号传递分子^[1]。鼠的 KIR 属 C 凝集素家族的 II 类跨膜蛋白, 现被称为 Ly49 家族。在细胞免疫识别或激活后再识别阶段, Ly49 分子特异地与不同的 MHC I 分子配体结合传递抑制性信号, 抑制杀伤细胞的早期活化, 消除 T、NK 细胞毒活性, 可减少杀伤性细胞因子分泌, 下调 TCR 分子表达^[2]。所以, 我们推测该分子在免疫耐受免疫调节方面有着重要的意义。

既然 T 细胞同 NK 细胞一样有 KIR 表达, 那么, 经 IL-4 体外训练的 Th2、Tc2 细胞表达 Ly49A 和 Ly49C 分子的情况如何呢? 其在细胞杀伤或细胞免疫中的功能怎样呢? 本文分别采用 ABC 法和地高辛标记的 Ly49CcDNA 寡核苷酸探针原位杂交组织化学 (ISHH, *In situ* hybridization histochemistry) 的方法, 检测 Ly49A 抗原、Ly49C mRNA 在小鼠正常 T 细胞、优势化的 Th2、Tc2 细胞和 NK 细胞的表达, 探讨 KIR 分子参与 T 淋巴细胞活化抑制和免疫耐受的可

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870330)

收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 段连宁 (1964~), 男, 博士后; 研究方向: 异基因造血干细胞移植免疫耐受。

能机制.为进一步体内应用优势化Ⅱ型T细胞建立移植免疫耐受提供理论基础和依据.

1 实验材料

1.1 动物

普通级 C57BL/6^{H-2b}鼠(购于中山医科大学动物实验室),清洁级 CB6F1, C57BL/6^{H-2b} × BALB/c^{H-2d}(购于第一军医大学清洁动物实验室),小鼠红白血病细胞(EL9611^{H-2d},中国医学科学院血液学研究所提供).

1.2 试剂与其它材料

1.2.1 试剂 mL-4 (PharMingen 公司产品), Ionomycin、ConA、rhIL-2 (均为 Sigma 公司产品), Dig-Labeling Kit (Boehringer-Mannheim Production), 小鼠 Ly49C 特异性引物 3'-GTAG-TAGGGAATATTACAGTC cDNA 寡核苷酸探针^[3] (由上海生化所 DNA 合成室合成), $\rho = 4\%$ 多聚甲醛, Ly49A 单抗 A1 (BALB/c 抗 C57BL/6, 美国 Yokoyama 教授惠赠), 羊抗鼠 IgG (A2, 由神经生物研究所王军博士赠送), ABC Kit (Vector 公司产品、由神经生物研究所张魁华博士提供), 羊抗鼠 IgG 二抗 (Sigma 公司产品), Anti-Ly49C (5E6) McAb、R-PE anti-Ly49C McAb、FITC anti-CD₄ (L3T4)、FITC anti-CD₈ (以上均为 PharMingen 公司产品). ³H-胸腺嘧啶核苷 (1 mCi/mL, 中国原子能研究所, 北京).

1.2.2 其他材料 尼龙毛柱 (上海产), 200 目金属网及眼科手术器械.

1.3 细胞准备

1.3.1 正常 T 淋巴细胞 洗尼龙毛柱法常规制备小鼠脾 T 细胞.

1.3.2 优势化Ⅱ型 T 淋巴细胞 (1) 取上述已制备的 T 淋巴细胞; 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$; 加入 mL-4 ($1\,000\text{ u/mL}$)、ionomycin ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$)、ConA ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) 后分为 6 个培养瓶, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%\text{ CO}_2$ 条件下培养; 96 h 后可收集细胞. 即 Th2 和 Tc2 细胞.

1.3.3 NK1.1⁺ 细胞的制备 另取 C57BL/6 鼠 1 只, 常规制备脾细胞, 冲洗时用 $\rho = 0.083\%$ 的氯化铵溶液溶解红细胞后, 用 RPMI-1640 洗 3 次, 调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$. 在一次性塑料培养瓶中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%\text{ CO}_2$ 环境中培养 24 h 后 (含 $\varphi = 10\%$ 小牛血清的 RPMI-1640), 收集悬浮细胞, 加 hIL-2 ($1\,000\text{ u/mL}$) 后继续培养 3 d; 弃悬浮细胞, 保留贴壁细胞, 加 hIL-2 ($1\,000\text{ u/mL}$) 继续培养 5 d; 收获细胞即为 NK1.1⁺ 细胞. 该方法制得的 NK1.1 细胞纯度可达 95% 以上^[4].

1.4 细胞甩片标本的制备

将上述各类 (T 细胞、Th2、Tc2 和 NK 细胞) 细胞在 $\rho = 4\%$ 多聚甲醛中固定 4 h 后, 经离心涂片机甩片, 滴加 $\rho = 0.001\%$ 多聚赖氨酸粘片 4 h.

2 实验方法

2.1 ABC 方法检测 Ly49A 表达^[5]

0.01 mol/L PBS ($\text{pH } 7.2$) 漂洗 $3 \times 10\text{ min}$, 加入 A1 (抗体稀释度 ($V:V$) 为 $1:5\,000$) 置湿盒中于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、48 h; 0.01 mol/L PBS 漂洗 $3 \times 10\text{ min}$, 加 Bio-IgG (羊抗鼠二抗稀释度 ($V:V$) 为 $1:200$) 置湿盒中于室温 3 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗 $3 \times 10\text{ min}$, 滴加 ABC 复合物 ($1:100, V:V$) 置湿盒中于室温反应 2 h, GDN 法 (葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺) 显色, 室温 30 min. 干燥、脱水、透明, DPX 封片后显微镜下观察, 呈蓝紫色者为阳性,

计 200 个细胞的阳性百分率。同时用鼠血清稀释液代替 A1 抗血清, 设立空白对照进行上述免疫组织化学步骤。

2.2 Ly49C 分子 mRNA 表达的原位分子杂交^[6]

(1) 杂交前处理. 用 $\rho = 4\%$ 多聚甲醛固定细胞甩片 2 h; $\rho = 0.01\%$ 多聚赖氨酸粘附细胞 1 h; 0.01 mol/L PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min, PTW (含 $\rho = 0.3\%$ TritonX-100 的 0.01 mol/L PBS) 洗 4 次, 每次 15 min, 加入不含探针的杂交液 (内含 $\rho = 50\%$ Formamide、 $5 \times \text{SSC}$ 、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Porula-Yeast RNA、100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ wheat germ tRNA、50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Heparin、 $\rho = 0.1\%$ Tween-20) 预杂交 1.5 h (39 $^{\circ}\text{C}$ 水浴);

(2) 杂交及后处理. ① 细胞片膜上滴加 20 μL 探针杂交液 (含杂交探针 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中孵育 16 h; ② PBT、SMT 各洗 4 次, 每次 5 min, 用显色剂显色, 呈黑紫色者为阳性细胞, 镜检 200 个细胞计阳性率; ③ 设 RNA 酶消化对照、Ly49CcDNA 寡核苷酸及空白对照。

(3) PBT、SMT 各洗 4 次, 每次 5 min, 贴片、镜检。

2.3 Th2、Tc2 细胞表达 Ly49C 的 FCM 分析

(1) 用 0.01 mol/L PBS (无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗涤 2 次

(2) 计数优势化 II 型 T 细胞 (活细胞率在 90% 以上), 用 0.01 mol/L PBS 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$

(3) 每 FCM 用离心管中加入 1 mL 细胞悬液

(4) 将上述细胞悬液离心 (1 000 r/min)、倾到上清, 用手弹起细胞沉淀、悬浮, 分组加入 PE-antiLy49C (1 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞) 和 FITC-CD₄ (5 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞) 或 CD₈ (5 $\mu\text{g}/10^6$ 细胞), 25 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下染色 30 min

(5) 加 PBS 至总体积为 1 000 μL 。

(6) 上机检测。

2.4 Ly49C 分子与优势化 II 型 T 淋巴细胞细胞增殖关系

2.4.1 ^3H -TdR 掺入法测定单向 MLR 中 B6 (H-2b) 小鼠优势化 II 型 T 淋巴细胞增殖 无菌取 BALB/c 鼠脾细胞, 破坏红细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。按终浓度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入 MitC, 37 $^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\% \text{ CO}_2$, 30 min。将上述细胞洗涤 3 次, 除去残余的 MitC, 作为刺激细胞。无菌制备 C57BL/6 鼠脾细胞, 破坏红细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 在 96 孔反应板中, 每孔加 100 μL C57BL/6 鼠脾细胞, 即反应细胞。在上述各孔中加入刺激细胞 100 μL 。均设 3 个复孔。同时设单独反应细胞、刺激细胞孔, 为阴性对照。均设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\% \text{ CO}_2$, 培养 5 d。加入 ^3H -TdR (1 $\mu\text{Ci}/\text{cell}$), 16 h 后, 收集个孔所有细胞, 加入闪烁瓶中。测每 min 脉冲数。

2.4.2 ^3H -TdR 掺入法测定双向 MLR 中 B6 (H-2b) 小鼠优势化 II 型 T 淋巴细胞增殖 在前述方法的基础上, 不对靶细胞进行处理, 即不经 MitC 处理。

2.5 Ly49C 阻断后优势化 II 型 T 细胞对 EL9611 细胞的杀伤活性

2.5.1 不同效靶比观察优势化 II 型 T 细胞对 EL9611 细胞的杀伤活性

(1) 无菌取 EL9611 红白血病细胞 (来源于发病的 BALB/cH-2d 鼠), 破坏红细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。按终浓度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入 MitC, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, $\varphi = 5\% \text{ CO}_2$ 条件下处理 30 min。将上述细胞洗涤 3 次, 洗去残余的 MitC, 作为靶细胞。调整已收获的优势化 II

型 T 细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 在培养瓶中经 IL-2 ($1\ 000\ \text{u/mL}$) 活化 36 h 后, 在 96 孔反应板中, 每孔加 $100\ \mu\text{L}$ 活化后的优势化 II 型 T 细胞, 即效应细胞. 在上述各孔中加入刺激细胞 $100\ \mu\text{L}$. 均设 3 个复孔. 同时设单独效应细胞、靶细胞孔, 为阴性对照. 再设不同效靶比 (1:1、20:1、40:1、60:1) 的实验孔, 各组均设 3 个复孔. Ly49 阻断组加抗 Ly49C 的终浓度为每 10^6 细胞 $1\ \mu\text{g}$. $37\ ^\circ\text{C}$, $\varphi = 5\%\ \text{CO}_2$, 培养 5 d.

(2) MTT 法测定细胞毒活性 (%) 方法同前.

$$\text{细胞毒活性}(\%) = \frac{(\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞 A 值})}{\text{靶细胞 A 值}} \times 100\%$$

3 结 果

3.1 Ly49A 的表达

空白对照 (同时用鼠血清稀释液代替 A1 抗血清) 均为阴性; 静息淋巴细胞表达 0% ~ 5% 之间; 活化 T 细胞 4% ~ 9%; NK1.1⁺ 细胞有高表达为 45% ~ 62%.

3.2 Ly49CmRNA 的表达

RNA 酶消化对照和 Ly49C 寡核苷酸对照均为阴性; 静息淋巴细胞表达 1% ~ 3%; 活化 T 细胞表达 3% ~ 8%; NK1.1⁺ 细胞的表达阳性率为 55% ~ 64%.

3.3 Th2、Tc2 细胞表达 Ly49C 的 FCM 分析结果

用 PE-Ly49C 抗体单标混合 Th2、Tc2 优势化细胞检测显示总体优势化 T 细胞 (含 CD4⁺、CD8⁺ 细胞) 表达 Ly49C 较正常 T 细胞高, 为 31.2%. 用 FITC-CD4 或 FITC-CD8 抗体和 PE-Ly49C 抗体双标检测结果为: CD4⁺ Th2 细胞 Ly49C⁺ 率为 9.69%, CD8⁺ Tc2 细胞 Ly49C⁺ 率为 19.13%. Ly49C⁺ 的优势化 T 细胞主要为 Tc2 细胞.

3.4 Ly49C 阻断后优势化 II 型 T 细胞增殖能力均提高

双向 MLR 中, 抗 Ly49C 单克隆抗体 (5E6) 可以使 C57BL/6 鼠的 II 型 T 细胞对同种异体 BALB/c 鼠 T 细胞的反应增殖率提高 12% ($P = 0.02$) (表 1). 在单向 MLR 中, 5E6 可以使 C57BL/6 鼠的 II 型 T 细胞对同种异体 BALB/c 鼠 T 细胞的反应增殖率提高 21% ($P = 0.00$) (表 2).

表 1 B6 鼠 T 细胞与 BALB/c 鼠 T 细胞双向 MLR $^3\text{H-TdR}$ 掺入率

分 组	cpm 计数/min	p 值
control	66.68 ± 3.05	
C57BL/6	2933.67 ± 161.50	
BALB/c	2939.00 ± 174.22	
C57BL/6: BALB/c	$6634.33 \pm 243.64^*$	0.00
C57BL/6: BALB/c (5E6 ⁺)	$7410.33 \pm 358.06^{* \#}$	* 0.00、# 0.02

* 与 C57BL/6 组比较; # 与无 5E6 阻断的 C57BL/6: BALB/c 组比较

3.5 抗 Ly49C (5E6) 可以提高细胞杀伤活性

随着效/靶比的提高, IL-2 活化后的优势化 II 型 T 细胞的细胞毒活性也增高. 抗 Ly49C 抗体可以明显提高其细胞毒活性.

表 2 B6 鼠 T 细胞与 BALB/c 鼠 T 细胞单向 MLR ³H-TdR 掺入率

分 组	cpm 计数/min ⁻¹	P
contol	66.68 ± 3.05	
C57BL/6	3204.00 ± 103.13	
BALB/c	1230.00 ± 60.36	
C57BL/6: BALB/c	4431.33 ± 114.38*	0.00
C57BL/6: BALB/c (5E6 ⁺)	5352.67 ± 131.60* #	* 0.00、# 0.00

* 与 C57BL/6 组比较；# 与无 5E6 阻断的 C57BL/6: BALB/c 组比较

4 讨 论

CD₄⁺ Th2、CD₈⁺ Tc2 细胞作为成熟的有功能的 T 淋巴细胞，其在发育、成熟的过程中同样经过胸腺的阳性选择（positive selection）和阴性选择（negative selection）后获得 MHC 分子限制的能力。Th2 细胞可与抗原提呈细胞（APC）表面的 MHC II 类抗原非多态部分相结合。Tc2 则与 MHC I 类抗原非多态部分结合的同时识别外来抗原（如病毒抗原）和靶细胞上的 MHC I 类抗原复合物。研究发现，同样建立在上述识别机制的条件下，Th2、Tc2 细胞却多参与免疫应答的抑制过程，与免疫耐受有关^[7-9]。目前，对于其机理的研究尚不多，多数研究认为与该群细胞分泌和产生 II 类细胞因子有关。我们对 Th2、Tc2 细胞表达 Ly49A、Ly49C 分子增高的现象中推测，T 细胞活化的同时也可能启动了 KIR-MHC I 分子介导的活化抑制信号通路。KIR 分子在负调控优势化Ⅱ型 T 细胞建立免疫“无应答”过程中具有重要作用^[10]。

KIR 分子参与杀伤的基本条件是：不识别即杀伤。正常情况下，KIR 的存在可能是 NK 细胞不攻击自身组织的重要机制。我们的结果显示，Th2、Tc2 细胞可同时表达两种 KIR 分子（Ly49A、Ly49C），而且，优势化后 Ly49A、Ly49C 表达均增高。其机制不清楚，可能与 T 细胞活化剂 ConA 及 Ionomycin 对 T 细胞的激活有关。

对 KIR 分子在 Tc2、Th2 细胞中表达的研究，将有助于揭示除细胞因子“偏移”下调免疫应答反应之外的另一个可能机制。我们假设：① Tc2 和 Th2 细胞被优势化的过程本身就是被激活（IL-2、ConA 等）的过程，KIR 高表达实际上是对这种活化的一个负反馈调节，这也就是为什么 T 细胞不可能无休止地持续活化的机理之一；② 单纯给小鼠体内注射 IL-4 并不能有效建立免疫耐受，而优势化Ⅱ型 T 细胞却可以明显降低免疫反应。其可能机制是：Tc2、Th2 细胞在接触 MHC I 抗原时可通过本身表达的 KIR 分子，直接传递活化抑制性信号；③ Tc2、Th2 细胞除可以通过产生 II 类细胞因子抑制 Tc1、Th1 细胞的优势形成，是否可以上调 KIR 在 Tc1、Th1 的表达以降低细胞免疫反应，尚待证实。

Defu 用 NK1.1 + T 细胞进行异基因骨髓移植的结果表明宿主的 GVHD 明显减轻，他认为主要原因是与 NK1.1 + T 细胞分泌 IL-4，进而抑制 Th1 的优势化和减少 IFN-γ 等致损伤因子有关^[11]。从我们的结果可以推测，KIR 分子在减轻 GVHD 中的作用不应忽略。

参考文献：

[1] MINGARI M C, MORETTA A, MORETTA L. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes[J]. Immunol Today, 1998, 19: 153 ~ 157

[2] TAKEI F, BRENNAN J, MAGER D L. The Ly-49 family genes proteins and recognition of class I MHC[J]. Im-

- munol Today, 1997, 155: 67 ~ 77.
- [3] HELD W, ROLANG J, RAULET D H. Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells[J]. Nature, 1995, 376(27): 355 ~ 358.
 - [4] BRENNAN J, MAGER D, JEFFERISE W, et al. Expression of different members of the Ly49 gene Family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties[J]. J Exp Med, 1994, 180: 2287 ~ 2295.
 - [5] HSU S M, RAINE L, FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures[J]. J Histochem Cytochem, 1981; 29: 577 ~ 580.
 - [6] 张魁华, 舒斯云, 蔡宝塔. 介绍一种非放射性标记的原位杂交新方法[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志. 1999, 8(2): 235 ~ 239.
 - [7] MORETTA L M, MINGARI M C, PENDE D, et al. The molecular basis of Natural Killer (NK) cell recognition and function[J]. J Clin Immunol, 1996, 16(5): 243 ~ 53.
 - [8] 段连宁, 郭坤元, 袁进, 等. Th2 细胞移植减低 GVHD 和保留抗白血病效应的实验研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(1): 57 ~ 59.
 - [9] 段连宁, 郭坤元, 刘明, 等. Th2 细胞移植减低 GVHD 的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(8): 428 ~ 29.
 - [10] COLES M C, MCMAHON C W, TAKIZAWA H, et al. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. Eur J Immunol, 2000, 30(1): 236 ~ 244.
 - [11] DEFU Z, SUSSAN D J, SAMUEL S. Granulocyte colony-stimulating factor reduces the capacity of blood mononuclear cells to induce graft-versus-host disease: Impact on blood progenitor cell transplantation[J]. Blood, 1997, 90(1): 453 ~ 463.

Ly49A and Ly49C Expression and Their Functions of Polarized Type II T Cells in Mice

DUAN Lian-ning^{*}, GUO Kun-yuan, PAN Xing-hua, DU Jiang, LI Shu-nong

Abstract: To explore the possible mechanism of killer cell inhibitory receptors (KIR) in immunosuppression and immunity tolerance of the polarized Th2 Tc2 cells. ① T cells of C57BL/6 mice were induced to turn toward Th2, Tc2 cells (type II cells) by culture T cells with mIL-4, ionomycin and ConA In vitro; ② T cells producing IL-4 were confirmed by ELISA and FCM methods; ③ Ly49A on T cells were assayed by ABC method; ④ Ly49C mRNA in type II cells were detected by in situ hybridization histochemistry; ⑤ Proliferative activity of type II cells in B6^{H-2b} mice was examined by mix 3H-TdR into DNA; ⑥ Cytotoxic activity of type II T cell ligated Ly49C were measured by detecting the killing activity on EL9611 cells. Stationary T lymphocytes can be induced to turn toward class II cytokines producing cells after 4 days culturing with mIL-4 ConA and Ionomycin in vitro. The mIL-4 secreting level rises from 20 $\mu\text{g/mL}$ to $833.33 \pm 28.73 \mu\text{g/mL}$. The rate of Ly49A mRNA and Ly49A protein expressing cells in type II cells were $(25.6 \pm 6.2)\%$ and $(22.5 \pm 4.9)\%$ respectively ($P < 3\%$ and $P < 5\%$ respectively in stationary T cells). The results of FCM inspecting show that the rate

^{*} Department of Pathophysiology, Sun Yat-Sen Medical Science University, Guangzhou 510087, China

of Ly49C expressing cells in type Ⅱ cells was $(29.8 \pm 4.3)\%$, among of which, the rates of CD_8^+ and CD_4^+ cells were $(10.2 \pm 0.9)\%$ and $(17.8 \pm 1.3)\%$ respectively. The proliferative activity of T cells ligated Ly49C in directional and bi-directional MLR between C57BL/6^{H-2b} and C57BL/6^{H-2d} were elevated by $(21.5 \pm 3.4)\%$ and $(13.8 \pm 1.6)\%$ respectively after ligating Ly49A with. with mAb 5E6, Cytotoxic activity of T cells in C57BL/6 mice was heightened by $(47.2 \pm 8.5)\%$ when Ly49C was ligated by mAb 5E6. Conclusion: The Ly49A, Ly49C expressing increased in T cells while T cells were induced into type Ⅱ cells by culture with IL-4 and T cell activating reagents. Inhibitory signal transfer pass ways of T cells have been established by KIR on T cells conjunct with MHC-I expressed on target cells.

Keywords: T cell; killer cell inhibitory receptor; mice