

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.017

原发性肝细胞癌组织免疫微环境的分析

郑晓彬^a, 林丽平^a, 陈强^a, 郑雄伟^b, 力超^b, 叶韵斌^a (福建医科大学教学医院福建省肿瘤医院 a. 肿瘤免疫学研究室; b. 病理科, 福建福州 350014)

[摘要] 目的: 探讨原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中免疫细胞的浸润及分布情况。方法: 采用免疫组化 S-P 法, 检测采集自福建省肿瘤医院 30 例 HCC 癌组织、癌周组织(距肿瘤边缘 < 2 cm)、非癌肝组织(距肿瘤边缘 > 5 cm)石蜡标本中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、FoxP3⁺、CD20⁺、CD56⁺、CD68⁺ 的表达。结果: 免疫组织化学结果显示, HCC 患者 CD3⁺、CD4⁺、FoxP3⁺ 细胞数在癌周组织中最高, 癌组织中其次, 非癌肝组织中最低 ($P < 0.05$); CD8⁺、CD56⁺、CD68⁺ 细胞数在癌周组织中最高, 非癌肝组织其次, 癌组织中最低 ($P < 0.05$); CD20⁺ 细胞数在肝癌组织、癌周组织、非癌肝组织中无明显差异 ($P > 0.05$)。肝癌组织中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、CD68⁺ 细胞主要分布于癌巢中的间质区, FoxP3⁺ 细胞呈散在分布。结论: 肝癌组织局部微环境中, 杀伤性免疫细胞减少, 抑制性免疫细胞增加, 从而导致局部免疫抑制状态。

[关键词] 癌, 肝细胞; 微环境; 杀伤性免疫细胞; 抑制性免疫细胞

[中图分类号] R392.12; R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0450-05

Investigation of immune microenvironment of primary hepatocellular carcinoma

ZHENG Xiao-bin^a, LIN Li-ping^a, CHEN Qiang^a, ZHENG Xiong-wei^b, LI Chao^b, YE Yun-bin^a (a. Department of Tumor Immunology; b. Department of Pathology, Fujian Province Tumor Hospital & Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the infiltration and distribution of immunocytes in primary hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. **Methods:** Thirty HCC tissues were obtained from Tumor Hospital of Fujian Province. The expressions of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, FoxP3⁺, CD20⁺, CD56⁺, and CD68⁺ cells in liver tumor tissues, liver peri-tumor tissues and non-tumor liver tissues were detected by immunohistochemistry S-P assay. **Results:** Immunohistochemistry results showed that the numbers of CD3⁺, CD4⁺, FoxP3⁺ cells were highest in liver peri-tumor tissues, less in liver tumor tissues, and least in the corresponding non-tumor liver tissues ($P < 0.05$); the numbers of CD8⁺, CD56⁺, CD68⁺ cells were highest in the liver peri-tumor tissues, less in non-tumor liver tissues, and least in liver tumor tissues ($P < 0.05$); and the CD20⁺ cell numbers had no significant difference between liver tumor tissues, liver peri-tumor tissues, and non-tumor liver tissues ($P > 0.05$). CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺, and CD68⁺ cells were mainly distributed in the mesenchyma of the liver tumor tissue, and FoxP3⁺ cells were scattered among the whole tumor tissue. **Conclusion:** Cytotoxic immunocyte is decreased and the inhibitory immunocyte is increased in the microenvironment of hepatocellular carcinoma, which results in an immunosuppression status in tumor tissues.

[Key words] hepatocellular carcinoma; microenvironment; cytotoxic immunocyte; inhibitory immunocyte

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 450-454]

肝脏是一个免疫细胞丰富的器官。研究^[1]表明,原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者存在免疫功能低下、免疫应答紊乱,表现为肝癌微环境中免疫细胞之间的平衡被打乱,在抗肿瘤中发挥主要作用的细胞免疫功能受到抑制;肝癌病灶局部的免疫状态对患者预后具有重要影响^[2]。文献^[3-4]报道,瘤内 CD8⁺ T 细胞浸润与肿瘤的预后成正相关;Treg 细胞在肿瘤内表达增加,且与肿瘤预后

呈负相关。本研究应用免疫组化方法对肝癌组织、

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(No. 2008I0012)。Project supported by the Key Foundation of Science and Technology Bureau of Fujian Province(No. 2008I0012)

[作者简介] 郑晓彬(1983-),女,福建省莆田市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫研究方面的工作。E-mail: xiaobin0126@sohu.com

[通信作者] 叶韵斌(YE Yun-bin, corresponding author), E-mail: yunbin_ye@yahoo.com

癌周组织以及非癌肝组织中浸润的 T、B 淋巴细胞、Treg 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等免疫细胞进行检测,旨在探讨肝癌局部肿瘤组织中的免疫微环境的改变,为肝癌的治疗研究提供一些新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

收集福建省肿瘤医院 2008 年 10 月至 2009 年 6 月间 30 例原发性肝细胞癌患者经手术切除的肝癌组织、癌周组织(距肿瘤边缘 < 2 cm)、和非癌肝组织标本(距肿瘤边缘 > 5cm,且病理证实无瘤细胞存在)。所有病例术前均未接受过包括肝动脉栓塞化疗在内的任何治疗,排除免疫相关性疾病,术后病理证实均为肝细胞性肝癌。其中低分化 3 例,中分化 24 例,高分化 3 例;男性 25 例,女性 5 例;年龄 32 ~ 82 岁,中位年龄 51 岁;HbsAg 阳性 28 例,阴性 2 例。

抗人 CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD20、CD56、CD68 单克隆抗体和 S-P 超敏免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 免疫组化法检测原发性肝细胞癌组织中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺、CD56⁺、CD68⁺ 的表达

石蜡包埋的组织经切片后,采用常规 S-P 法同时进行染色。阳性细胞判定标准:CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺、CD56⁺、CD68⁺ 为细胞膜、细胞质出

现棕黄色信号为阳性细胞;FoxP3⁺ 为细胞核出现棕黄色信号为阳性细胞,且呈圆形或椭圆形。各选择 10 个高倍视野(10 × 40)计数阳性细胞。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS11.0 统计软件进行分析,采用 Wilcoxon 符号秩和检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织、癌周组织、非癌肝组织中免疫细胞的浸润情况

应用免疫组化 S-P 法对上述 30 例 HCC 患者肝癌组织、癌周组织和非癌肝组织进行 CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD20、CD56、CD68 染色,对阳性细胞数进行定量分析,取每高倍视野中的平均阳性细胞数进行 3 种组织间的比较。结果(表 1)显示,CD3⁺、CD4⁺、FoxP3⁺ 浸润细胞数在癌周组织中最高,癌组织中其次,非癌肝组织中最低,各组相比均有统计学差异($P < 0.05$);CD8⁺、CD56⁺、CD68⁺ 细胞数以癌周组织中最高,非癌肝组织其次,而癌组织中最低,各组相比均有统计学差异($P < 0.05$);CD20⁺ 细胞数在肝癌组织、癌周组织、非癌肝组织中无统计学差异($P > 0.05$,表 1)。

表 1 肝癌组织、癌周组织和非癌肝组织中免疫细胞的浸润($n = 30, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Immunocytes infiltration in liver tumor tissues, liver peri-tumor tissues, and non-tumor liver tissues of hepatocellular carcinoma patients ($n = 30, \bar{x} \pm s$)

Immunocyte	Tumor tissue	Peri-tumor tissue	non-tumor liver tissue
CD3 ⁺	30.58 ± 23.54	41.85 ± 17.42*	20.98 ± 10.63*
CD4 ⁺	13.72 ± 7.66	19.58 ± 9.34*	4.70 ± 3.73*
FoxP3 ⁺	4.96 ± 2.72	6.80 ± 3.00*	1.46 ± 1.17*
CD20 ⁺	10.05 ± 7.49	13.82 ± 8.05	10.47 ± 9.22
CD8 ⁺	12.29 ± 10.99	20.63 ± 12.32*	14.02 ± 9.40* ^Δ
CD56 ⁺	2.20 ± 0.64	7.18 ± 3.54*	4.24 ± 1.44* ^Δ
CD68 ⁺	22.03 ± 10.25	49.32 ± 20.45*	41.22 ± 10.69* ^Δ

* $P < 0.05$ vs tumor tissues; ^Δ $P < 0.05$ vs peri-tumor tissues

2.2 肝癌癌巢中免疫细胞的亚分布情况

为了探讨浸润的免疫细胞在肝癌组织中的生物学行为,进一步分析肝癌癌巢中各种细胞分布情况,发现 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞主要成簇分布在癌巢内的间质纤维组织,部分散布于血窦;而 FoxP3⁺ 细

胞则散在性地分布于整个癌组织中。CD56⁺、CD68⁺ 细胞亦多见于癌巢内的间质纤维组织中。癌巢内间质区中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD56⁺、CD68⁺ 细胞数均高于癌细胞区,FoxP3⁺ 细胞数在癌细胞区和间质区差异无统计学意义(图 1,表 2)。

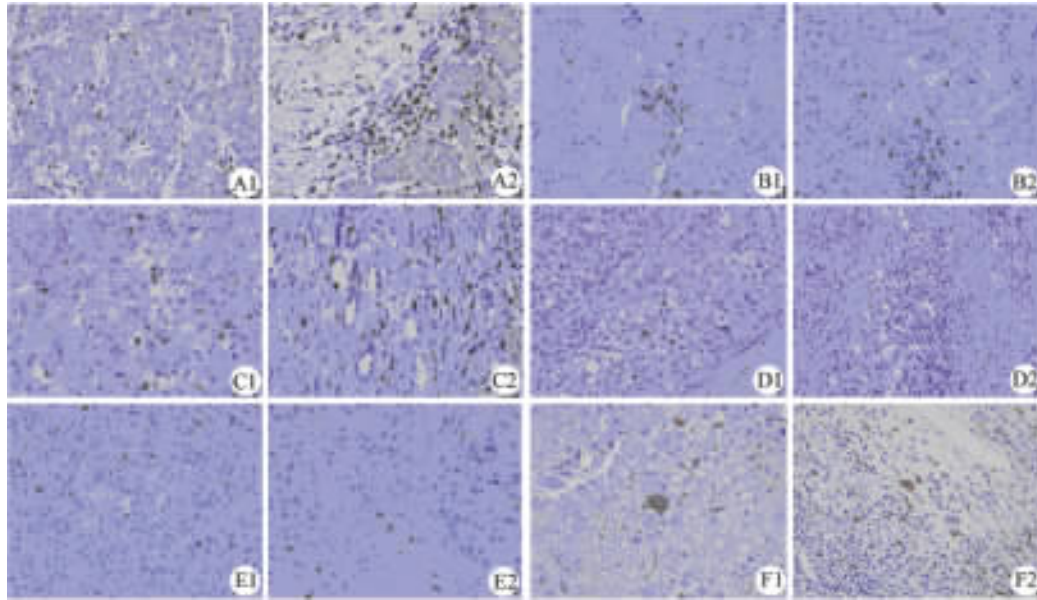


图1 免疫组织化学法检测癌巢内各种免疫细胞的分布(×400)

Fig.1 Distribution of different kinds of immunocytes in liver cancer nests as detected by immunohistochemistry method(×400)

A: CD3; B: CD4; C: CD8; D: FoxP3; E: CD56; F: CD68

1: District of cancer cell; 2: District of stroma

表2 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、FoxP3⁺、CD56⁺、CD68⁺阳性细胞在肝癌癌巢中的分布(n=30, $\bar{x} \pm s$)

Tab.2 CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, FoxP3⁺, CD56⁺ and CD68⁺ cells distributed in the tumor tissue (n=30, $\bar{x} \pm s$)

Immunocyte	Tumor tissue	
	Parenchyma	Mesenchyma
CD3 ⁺	14.43 ± 7.87	43.05 ± 15.49*
CD4 ⁺	8.98 ± 4.32	18.87 ± 7.65*
CD8 ⁺	6.32 ± 3.06	17.34 ± 6.73*
FoxP3 ⁺	4.24 ± 3.01	4.99 ± 2.88
CD56 ⁺	1.44 ± 0.65	2.63 ± 1.08*
CD68 ⁺	10.45 ± 7.23	28.92 ± 12.47*

* P < 0.05 vs parenchyma

3 讨论

机体的免疫状况与恶性肿瘤的发生和发展有着密切的联系。当宿主的免疫功能低下或受到抑制时,肿瘤发生率高;而肿瘤一旦发生后,一方面可刺激机体产生免疫应答,另一方面又可通过被动逃逸或主动抑制逃避宿主的免疫攻击,而肿瘤演变最终归宿则取决于肿瘤与宿主的相互作用^[5]。在此

过程中,T淋巴细胞亚群起主导作用。CD3分子表达于所有成熟的T细胞表面,代表总的T淋巴细胞,根据其表面CD分子的不同,可分为CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。CD4⁺T细胞主要指辅助性T细胞,CD8⁺T细胞称为细胞毒性T淋巴细胞,可特异性杀伤靶细胞,其杀伤活性在抗肿瘤作用中起着关键作用^[6]。许多研究^[7]证明,瘤内CD8⁺T细胞浸润与肿瘤的预后成正相关。CD4⁺和CD8⁺T细胞之间相互作用和制约对调节细胞免疫反应和维持免疫平衡有重要作用。CD20是B淋巴细胞表面标志。B淋巴细胞受抗原刺激后,分化增殖为浆细胞,合成抗体,发挥体液免疫的功能^[8]。本研究结果显示,CD20⁺细胞在癌组织和非癌组织中分布无差异,亦证明在肝癌局部免疫中,以T细胞免疫为主。

本实验对肝癌患者局部肝癌组织、癌周组织及非癌肝组织中的浸润T淋巴细胞进行研究后认为,肿瘤发生激起机体免疫反应,导致肿瘤组织免疫细胞浸润,免疫细胞主要集中在癌周组织中,癌组织中以辅助性T细胞——CD4⁺T淋巴细胞浸润增多为主,而起特异性杀伤作用的细胞毒性T淋巴细胞——CD8⁺T细胞在癌组织较非癌组织明显降低,肿瘤局部免疫抑制,从而导致肿瘤的发生、发展,这与陈罡等^[9]研究结果相同。

癌巢内 CD8⁺ T 细胞数量下降原因,可能与 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞有关。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是 1995 年由 Sakaguchi 等^[10]首先发现并命名的。天然 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞来源于胸腺,但也可以在持续性抗原刺激及 IL-10 等细胞因子条件下在外周诱导产生,是一类具有免疫负调控功能的 T 细胞亚群。Treg 具有免疫无能性和免疫抑制性两大特征^[11]。Treg 细胞可降低 APC 抗原提呈效率,阻碍 T 淋巴细胞的激活,并抑制 T 淋巴细胞的活,诱导 T 细胞的功能抑制,还可抑制 NK 细胞的杀伤及分泌 IL-12 的功能^[12],是迄今为止所知的最重要的抑制细胞。在许多肿瘤患者外周血或肿瘤组织中都发现 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在 CD4⁺ T 细胞中比例上升^[13-14]。研究^[15]显示,肝癌患者外周血及肿瘤组织中 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞也增多,导致肿瘤局部 CD8⁺ 杀伤 T 细胞浸润数量的下降及功能的抑制,并同肝癌的进展、预后的不良相关。Treg 细胞核内高表达 FoxP3,普遍认为 Foxp3 是调节性 T 细胞的特异性标志^[16]。因此本实验用免疫组化法检测 FoxP3⁺ Treg 细胞的数量,结果显示,癌组织 FoxP3⁺ Treg 细胞数量高于非癌组织,并且 FoxP3⁺ Treg 细胞在癌组织中呈散在分布,说明肝癌微环境中 Treg 细胞的表达增加,是局部免疫抑制的又一原因。Gao 等^[17]研究提示,肝癌微环境中,Treg 细胞抑制 CD4⁺ T、CD8⁺ T 增殖,进而影响它们的抗肿瘤作用。

自然杀伤(NK)细胞属淋巴细胞谱系,是人体对抗癌症和感染的第一道防线,能触发广泛的免疫应答,其特异性表达 CD56。NK 细胞在直接杀伤肿瘤及调节抗肿瘤免疫应答方面均发挥着重要作用^[18]。NK 细胞还可分泌多种细胞因子(如 IFN- γ 、TNF- α 、G-CSF 等),调节免疫应答^[19]。本研究结果显示,CD56⁺ NK 细胞在癌组织中较非癌组织低,这说明肝癌组织中 NK 细胞募集减少,不能发挥有效的杀伤肿瘤细胞作用,这可能是肝癌细胞免疫逃逸的又一重要原因。CD68 是单核/巨噬细胞包括 Kupffer 细胞的特异性表面标志。既往多认为,巨噬细胞是抗肿瘤免疫调节过程中的一种重要细胞群,可以直接杀伤肿瘤细胞,或者通过呈递肿瘤相关抗原诱导机体免疫应答从而清除肿瘤^[20]。本研究结果提示,巨噬细胞在癌组织中明显低于相应的非癌组织,由此推测,癌组织中的巨噬细胞浸润的减少可能与肿瘤的发生发展有关。另外,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞分布间质区中较多,说明细胞免疫主要发生在间质。而 NK 细胞、巨噬细胞癌组织中分布减少,癌细胞区中更少,反映其与肿瘤细胞免疫逃逸以及肿瘤发生

发展之间的相关性,但尚待进一步研究。

肝癌局部微环境中,杀伤性免疫细胞减少,抑制性免疫细胞增加,从而导致局部免疫抑制状态,进一步促发肿瘤的发生、发展,如何改变这一免疫抑制状态已成为肝癌免疫治疗的重要研究方向。

[参考文献]

- [1] Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: The role of T-regulatory cells [J]. *Hepatology*, 2005, 41(14): 722-730.
- [2] Dong BW, Zhang J, Liang P, Yu XL, Su L, Yu DJ, et al. Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Hyperthermia*, 2003, 19(2): 119-33.
- [3] Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2328-2339.
- [4] Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Cell Mol Med*, 2010, 14(1/2): 426-433.
- [5] Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. Distribution of CD4⁺ CD25^{high} regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer [J]. *Surg Res*, 2005, 124(1): 151-157.
- [6] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival [J]. *Nat Med*, 2004, 10(9): 942-949.
- [7] Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied CG, Büttner M, Aigner M, et al. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: High expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor [J]. *Int J Cancer*, [2010-06-06]. [Epub ahead of print]
- [8] Mizuguchi J. A double-edged sword in B-cell-targeted therapy for inflammatory diseases [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009, 5(3): 283-290.
- [9] 陈 罡,罗殿中,李 萍,郭 芳. 原发性肝细胞癌、癌旁及肝硬化组织中 CD3⁺ 细胞的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(2): 142-145.
- [10] Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg [J]. *Immunol*, 2009, 39(9): 2331-2336.
- [11] Madakamutil LT, Maricic I, Sercarz EE, Kumar V. Immunodominance in the TCR repertoire of α -TCR peptide-specific CD4⁺ Treg population that controls experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunology*, 2008, 180(7): 4577-4585.
- [12] Nikolova M, Lelievre JD, Carriere M, Bensussan A, Lévy Y. Regulatory T cells differentially modulate the maturation and apoptosis of human CD8⁺ T-cell subsets [J]. *Blood*, 2009, 113(19): 4556 -

- 4565.
- [13] Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer [J]. *Cancer Res* 2001, 61(12): 4766-4772.
- [14] Sharma PK, Saha PK, Singh A, Sharma SK, Ghosh B, Mitra DK. FoxP3⁺ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in military tuberculosis [J]. *Respir Crit Care Med*, 2009, 179(11): 1061-1070.
- [15] Lin GH, Wang J, Li SH, Wang J, Xu L, Li SP. Relationship and clinical significance of TGF- β 1 expression with Treg cell infiltration in hepatocellular carcinoma [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(4): 403-407.
- [16] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, et al. FoxP3⁺ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3): 902-911.
- [17] Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection [J]. *Clin Oncol*, 2007, 25(18): 2586-2593.
- [18] Kim SD, Kim JM, Jo SH, Lee HY, Lee SY, Shim JW, et al. Functional expression of formyl peptide receptor family in human NK cells [J]. *Immunology*, 2009, 183(9): 5511-5517.
- [19] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 605-612.
- [20] Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes [J]. *Blood*, 2007, 110(2): 587-595.
- [收稿日期] 2010-04-22 [修回日期] 2010-06-05
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

IRAK-2 诱导 TRAF6 泛素化介导 TLRs 活化 NF- κ B

IL-1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinases, IRAKs)参与 TLRs 信号转导通路。目前已经发现 4 种 IRAKs: IRAK-1、IRAKs-2、IRAKs-4 和 IRAKs-M。一直以来, IRAK-1 被认为在 TLRs 诱导的 NF- κ B 活化中起决定作用。但是 Keating 等最近发现, IRAK-1 在某些 TLRs 诱导的 NF- κ B 和 IRF(interferon regulatory factor)活化中并非必须, IRAK-2 则起着较 IRAK-1 更重要的作用。痘病毒 A52 蛋白为胞质锌指蛋白, 通过结合 TRAF6、IRAK-2 抑制 TLR2、3、4、5、7、9 诱导的巨噬细胞 NF- κ B 活化; A52 蛋白不能抑制 TLR3、4 和 TRIF 诱导的 IRF3 活化, 以及 TLR7、TLR8 和 TLR9 诱导的 IRF5 和 IRF7 活化; A52 为 C 端缺失的突变型 A52, 只结合 IRAK-2, 不能结合 TRAF6, 但 A52 仍然可抑制 IL-1R、TLR3 和 TLR4 诱导的 NF- κ B 活化。上述结果提示, IRAK-2 参与 IL-1R、TLR3 和 TLR4 诱导的 NF- κ B 活化, 但 IRAK-2 不是 TLRs 激活 IRF3、IRF5 和 IRF7 所必须。报告基因的结果还证明, IRAK-2 在 p38 的激活中起重要作用, IRAK-2 转染剂量依赖性诱导 IL-8 启动子活化和 IL-8 表达。

为进一步证明 IRAK-2 在 TLR-3、4、8 诱导的 NF- κ B 活化中起重要作用, 作者合成特异性针对 IRAK-2 的 siRNA: siRNA-IRAK-2A 和 siRNA-IRAK-2B, 及对照 siRNA-control, 3 种 siRNA 分别转染稳定表达 TLR3、4 或 8 的 HEK293 细胞。结果表明, siRNA-IRAK-2A 和 siRNA-IRAK-2B 可抑制 poly(I:C)、LPS 和 CL075 诱导的 NF- κ B 活化, 而 siRNA-control 却无抑制作用。siRNA-IRAK-2B 还可抑制 LPS 诱导的人单核细胞分泌 IL-8。提示在生理状态下, IRAK-2 在 TLR-4 诱导的人单核细胞 NF- κ B 活化中起十分重要的作用。

作者还探讨了 IRAK-2 在 TLRs 信号转导通路中的作用靶点, 结果显示, siRNA-IRAK-2A 和 siRNA-IRAK-2B 可抑制 MyD88 与 Mal 诱导的 NF- κ B 活化, 由此提示, IRAK-2 在 MyD88 与 Mal 的下游起作用。siRNA-IRAK-2A 和 siRNA-IRAK-2B 抑制 poly(I:C)/TLR3 诱导的 NF- κ B 活化, 但是不抑制 TRIF 诱导的 NF- κ B 的活化。由此提示, IRAK-2 位于 TRIF 信号通路的上游。IRAK-2-Myc、TLR3-FLAG 转染 HEK293T 细胞, 免疫沉淀的结果表明, IRAK-2 和 TLR3 可形成复合物, 其结合不受 poly(I:C)刺激的影响, 并且在生理性情况下, IRAK-2 和 TLR3 间也存在相互作用。

将 IRAK-2 蛋白的第 528 和第 559 位的谷氨酸(E)突变为丙氨酸(A), 获得突变的 IRAK-2E528A 与 IRAK-2E559A, 以及 528 和 559 双突变的 IRAK-2DM。IRAK-2E559A 仍然可诱导 NF- κ B、p38 和 IL-8 启动子活化, 而 IRAK-2E528A 和 IRAK-2DM 则丧失上述功能。外源转染 IRAK-2 和突变体 IRAK-2E559A 可诱导 NF- κ B 活化和 TRAF6 泛素化, 突变型 IRAK-2E528A 和 IRAK-2DM 可结合 TRAF6, 但不能诱导 TRAF6 泛素化和 NF- κ B 活化。因此, IRAK-2 通过结合并诱导 TRAF6 泛素化参与 NF- κ B 的活化, 并且 IRAK-2 蛋白中第 528 位的谷氨酸在 IRAK-2 与 TRAF6 的相互结合中发挥重要作用。

总之, IRAK-2 通过结合并诱导 TRAF6 泛素化, 参与多种 TLRs 活化 NF- κ B, 在某些 TLRs 活化中较 IRAK-1 更具决定性作用。由于 IRAK-2 不参与 IRF3 的活化, 临床中有望通过阻断 IRAK-2, 特异性抑制 NF- κ B 诱发的炎症反应, 同时不影响 IRF3 诱导的 IFN 产生及抗病毒作用。

[马文聪 摘译, 徐红梅 审阅. Keating SE, Maloney GM, Moran EM, et al. *J Biol Chem*, 2007, 282(46): 33435-33433.]