

转录因子 MafB 在非小细胞肺癌中的表达及对 CD14⁺单核细胞分泌 I 型干扰素的影响

李 彧¹, 殷智颖², 刘 屹¹

(1. 陕西省人民医院, 西安医学院附属医院, 陕西 西安 710068;

2. 中国人民解放军陆军第九四九医院, 新疆 阿勒泰 836599)

摘要: [目的] 研究非小细胞肺癌(NSCLC)患者中转录因子 MafB 的表达变化,并评估 MafB 对 NSCLC 患者 CD14⁺单核细胞分泌 I 型干扰素和诱导 CD4⁺T 细胞分化的影响。[方法] 入组 41 例 NSCLC 患者(28 例鳞癌和 13 例腺癌)和 21 例健康志愿者。收集外周血和支气管肺泡灌洗液(BALF),分离血浆和外周血单个核细胞(PBMC),纯化 CD14⁺单核细胞和 CD4⁺T 细胞。酶联免疫吸附实验检测血浆和 BALF 干扰素(IFN)- α 和 IFN- β 的水平,反转录实时定量 PCR 检测外周血和 BALF 中 MafB mRNA 相对表达量,Western blot 检测 MafB 蛋白水平。利用 MafB siRNA 转染 CD14⁺单核细胞,观察抑制 MafB 对 CD14⁺单核细胞分泌 IFN- α 和 IFN- β 的影响,检测干扰素调节因子 3(IRF3)磷酸化水平。建立 CD14⁺单核细胞和 CD4⁺T 细胞的直接接触和间接接触培养系统,通过 ELISA 法检测培养上清中 IFN- γ 、白细胞介素(IL)-4、IL-17 和 IL-21 表达水平评估抑制 MafB 对 CD14⁺单核细胞调控 CD4⁺T 细胞分化的影响。[结果] 血浆 IFN- α 和 IFN- β 水平在健康志愿者和 NSCLC 患者之间差异无统计学意义,但肿瘤部位 BALF 中 IFN- α ($242.5 \pm 59.98 \text{ pg/ml}$ vs $282.5 \pm 45.24 \text{ pg/ml}$, $P=0.013$) 和 IFN- β ($12.40 \pm 2.81 \text{ pg/ml}$ vs $34.42 \pm 7.83 \text{ pg/ml}$, $P<0.0001$) 水平均显著性低于非肿瘤部位。PBMC 中 MafB mRNA 相对表达量和蛋白水平在健康志愿者和 NSCLC 患者之间差异亦无统计学意义,但肿瘤部位 BALF 中 MafB mRNA 和蛋白水平则显著性高于非肿瘤部位($P<0.0001$)。MafB siRNA 转染可显著性抑制 CD14⁺单核细胞中 MafB mRNA 和蛋白的表达。MafB siRNA 转染可促进 CD14⁺单核细胞 IFN- β 的分泌($16.09 \pm 5.79 \text{ pg/ml}$ vs $6.73 \pm 1.78 \text{ pg/ml}$, $P<0.0001$),增加 IRF3 磷酸化($P<0.0001$),但对 IFN- α 表达无明显影响($P>0.05$)。而抑制 NSCLC 患者 CD14⁺单核细胞中 MafB 对 CD14⁺单核细胞和 CD4⁺T 细胞共培养系统中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-21 的分泌水平并无显著性影响($P>0.05$)。[结论] NSCLC 患者肿瘤部位过度表达的 MafB 可能诱导了 I 型干扰素抑制,但 MafB 对肿瘤部位 CD14⁺单核细胞的免疫调控功能可能无影响。

主题词: 非小细胞肺癌; MafB; CD14⁺单核细胞; I 型干扰素

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0567-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B001

Expression of Transcriptional Factor MafB in Non-small Cell Lung Cancer Patients and Its Effect on Type I Interferon by CD14⁺ Monocytes

LI Yu¹, YIN Zhi-ying², LIU Yi¹

(1. Shaanxi Provincial People's Hospital, The Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710068, China; 2. The 949th Hospital of PLA, Altay 836599, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of transcriptional factor MafB in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, and to evaluate its effect on type I interferon production by CD14⁺ monocytes. [Methods] Forty-one NSCLC patients (28 cases with squamous carcinoma and 13 cases with adenocarcinoma) and 21 healthy individuals were enrolled in this study. Peripheral bloods and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated, while CD14⁺ monocytes and CD4⁺ T cells were purified. Interferon (IFN)- α and IFN- β expression in plasma and BALF were measured by ELISA. MafB mRNA relative level and protein expression were assessed in peripheral bloods and BALF by real-time RT-PCR and Western blot, respectively. CD14⁺ monocytes were transfected by MafB siRNA. IFN- α /IFN- β production by CD14⁺ monocytes and interferon regulatory factor 3 (IRF3) phosphorylation was investigated in response to MafB inhibition. The direct contact and indirect contact co-culture system of CD14⁺ monocytes and CD4⁺ T cells was set up. The effect of MafB inhibition on CD14⁺ monocyte regulation for CD4⁺ T cells differentiation was investigated by measurements of IFN- γ , IL-4, IL-17, and IL-21 expression in culture supernatant. [Results] There were no significant differences in plasma IFN- α and IFN- β expression between healthy individuals and NSCLC patients. IFN- α ($242.5 \pm 59.98 \text{ pg/ml}$ vs $282.5 \pm 45.24 \text{ pg/ml}$, $P=0.013$) and IFN- β ($12.40 \pm 2.81 \text{ pg/ml}$ vs $34.42 \pm 7.83 \text{ pg/ml}$, $P<0.0001$) expression in BALF were significantly down-regulated in tumor site when compared with non-tumor site. There were also no significant differences of circulating MafB mRNA relative level and protein expression between healthy individuals and NSCLC patients. However, MafB mRNA relative level and protein expression in BALF

基金项目: 国家自然科学基金(81402012); 陕西省卫生健康科研基金(2018A005)

通信作者: 刘屹, 主治医师, 博士; 陕西省人民医院, 西安医学院附属医院肿瘤内科, 陕西省西安市碑林区友谊西路 256 号(710068); E-mail: liuyi926999@yeah.net

收稿日期: 2019-06-27; **修回日期:** 2019-08-08

were significantly elevated in tumor site when compared with non-tumor site ($P < 0.0001$). MafB siRNA transfection significantly inhibited MafB mRNA and protein expression in CD14⁺ monocytes. MafB siRNA transfection promoted IFN- β production by CD14⁺ monocytes ($16.09 \pm 5.79 \text{ pg/ml}$ vs $6.73 \pm 1.78 \text{ pg/ml}$, $P < 0.0001$) and increased IRF3 phosphorylation ($P < 0.0001$), however, did not affect IFN- α production ($P > 0.05$). Moreover, MafB inhibition in CD14⁺ monocytes from NSCLC patients did not significantly change IFN- γ , IL-4, IL-17, or IL-21 expression in CD14⁺ monocytes and CD4⁺ T cells co-cultured supernatant ($P > 0.05$). [Conclusion] Overexpression of MafB in NSCLC patients may suppress type I interferon production, however, it may not affect the immunoregulatory activity of CD14⁺ monocytes.

Subject words: non-small cell lung cancer; MafB; CD14⁺ monocytes; type I interferon

肺癌可分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌, 其中 NSCLC 所占比例超过 85%, 是发病率最高的恶性肿瘤^[1]。转录因子 MafB 属于 Maf 基本区域/亮氨酸拉链转录因子家族成员, MafB 选择性表达于单核巨噬细胞中, 可诱导造血干细胞向单核巨噬样细胞分化, 是单核细胞调控的关键因子^[2]。MafB 还可通过抑制干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 功能影响干扰素 (interferon, IFN)- α 和 IFN- β 合成, 诱导 I 型干扰素抑制, 造成机体抗病毒免疫应答水平低下^[3]。本研究拟检测 MafB 在 NSCLC 患者外周血和肿瘤组织中的表达变化, 观察抑制 MafB 对 NSCLC 患者单核细胞分泌 IFN- α 和 IFN- β 以及对 CD14⁺ 单核细胞功能的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 6 月至 2018 年 3 月在陕西省人民医院肿瘤内科进行治疗的 NSCLC 患者 41 例, 平均年龄 (51.2 ± 12.8) 岁, 男性 26 例, 女性 15 例。所有患者在治疗前均经气管镜留取组织标本, 病例确诊为 NSCLC。鳞癌 28 例, 腺癌 13 例。同时, 收集 21 例年龄和性别相匹配的健康志愿者作为对照, 平均年龄 (47.5 ± 10.7) 岁, 男性 14 例, 女性 7 例。本研究方案经医院伦理委员会审批通过。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂与仪器

淋巴细胞分离液购自美国 Sigma 公司。MafB siRNA 质粒和对照 siRNA 购自美国 Santa cruz 公司。IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-21 酶联免疫

吸附实验 (enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自美国 R&D 公司。RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。PrimeScript 反转录试剂盒、TB Green 实时定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司。抗人 MafB 抗体、抗 IRF3、抗 IRF3(phospho S386) 购自美国 Abcam 公司。CD14 Microbeads 和 CD4⁺ 细胞分选试剂盒购自德国美天旎公司。Transwell 培养平板购自美国康宁公司。微孔读板仪为美国 Biorad 公司产品。实时定量 PCR 仪 ABI7500 为美国 Applied biosystems 公司产品。FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2.2 血浆和外周血单个核细胞制备

分别留取 NSCLC 患者和健康志愿者抗凝外周血 10ml, 首先于 3000g 离心 10min, 取上层血浆冻存于 -70℃ 冰箱备用。下层血细胞使用淋巴细胞分离液、利用密度梯度离心法分离血浆和外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 冻存于液氮中备用。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液制备

根据影像学结果确定病变部位, 然后在灌洗的肺段经活检孔注入 2% 利多卡因进行局部麻醉。将纤维支气管镜顶端紧密楔入亚段支气管开口处, 经活检孔快速注入灭菌生理盐水, 每次 40~50ml, 总量 200~250ml, 立即用 100mmHg 负压吸引回收灌洗液, 回收率 40%~60%。回收液体立即用双层无菌纱布过滤去除黏液, 记录总量。回收灌洗液于 4℃、1200g 离心 10min, 将上层液体冻存于 -70℃ 冰箱备用。离心后的沉淀细胞成分使用 Hank's 液洗涤 2 次, 然后加入 RPMI 1640+10% 胎牛血清调整细胞浓度至 10^6 个/ml。41 例 NSCLC 患者全部进行了肿瘤部位的灌洗, 其中 19 例患者对未发生肿瘤的部位也

进行了灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)作为对照。

1.2.4 CD14⁺细胞和 CD4⁺细胞分选

于 4℃、300×g 离心 10min 收集细胞,使用分离缓冲液重悬后加入 CD14 Microbeads,于 4℃避光孵育 15min 后加入置于分离架的 LD 磁力分离柱中,CD14⁺细胞吸附于分离柱中,加入分离缓冲液,收集穿过分离柱细胞(CD14⁻细胞),从分离架上取下 LD 分离柱后使用分离缓冲液洗涤,收集 CD14⁺单核细胞。将穿过分离柱的 CD14⁻细胞加入 CD4 生物素抗体鸡尾酒 Microbeads,于 4℃避光孵育 10min 后加入置于分离架的 LD 磁力分离柱中,收集穿过分离柱的细胞,即为 CD4⁺T 细胞。

1.2.5 CD14⁺单核细胞转染

取 10⁵ 个分选的 CD14⁺单核细胞,使用 100μl siRNA 转染培养液稀释 2μl MafB 或对照 siRNA 复合物(A 溶液),使用 100μl siRNA 转染培养液稀释 2μl siRNA 转染试剂(B 溶液),将 A 溶液和 B 溶液混合,于室温孵育 45min 后加入 800μl siRNA 转染培养液,使用 2ml siRNA 转染培养液洗涤 CD14⁺单核细胞,加入含有 siRNA 复合物的转染培养液,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 5h,然后直接加入含有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养 24h,换液后继续培养 24h 后收集细胞和上清进行后续实验。

1.2.6 CD14⁺单核细胞和 CD4⁺T 细胞共培养系统建立

分别建立 CD14⁺单核细胞和 CD4⁺T 细胞共培养的直接接触培养系统和间接接触培养系统。直接接触培养系统:将 5×10⁴ 个 CD14⁺单核细胞和 5×10⁴ 个 CD4⁺T 细胞直接混合,加入 24 孔板中培养。间接接触培养系统:5×10⁴ 个 CD14⁺单核细胞用 200μl 培养液重悬后加入 Transwell 培养平板的上层小室,5×10⁴ 个 CD4⁺T 细胞用 500μl 培养液重悬后加入 Transwell 培养平板的下层小室,两层小室被孔径为 0.4μm 半透膜分隔,培养细胞无法穿过半透膜,但可溶性细胞因子可穿过半透膜。向培养液中加入抗 CD3 抗体,刺激培养 48h 后收集上清进行后续实验。

1.2.7 ELISA 法检测细胞因子水平

使用 ELISA 试剂盒按说明书对血浆、BALF 和培养上清中的细胞因子水平进行检测。

1.2.8 反转录实时定量 PCR 检测 mRNA 相对表达量

提取细胞总 RNA,取 1μg 总 RNA 利用以下反转录反应体系将 RNA 反转录为 cDNA:5×Prime-

Script Buffer(for Real Time) 2μl、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5μl、Oligo dT Primer(50μmol/L) 0.5μl、Random 6 mers (100μmol/L) 0.5μl、总 RNA 1μg、RNase Free dH₂O 调整至 10μl。反应条件:37℃ 15min、85℃ 5s。利用 TB Green 实时定量 PCR 法进行目标基因半定量检测。

实时定量 PCR 反应体系:TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10μl、上游引物(10μmol/L) 0.8μl、下游引物 (10μmol/L) 0.8μl、ROX Reference Dye 0.4μl、RT 反应液(cDNA 溶液)2μl、灭菌水 6μl。反应条件:预变性 1 个循环 95℃ 30s、PCR 反应 40 个循环 95℃ 5s 60℃ 30s。应用 2^{-ΔΔCT} 法对目标基因 mRNA 的相对表达量进行分析。

引物序列如下:MafB 上游:5'-CAGAAGCAC-CACCTGGAGAAT-3',MafB 下游:5'-GAACTCTGACAGACAGGTCCG-3';β-actin 上游:5'-AGCGGGAAA-TCGTGCGTG-3',β-actin 下游:5'-CAGGGTACATGTGCTGCC-3'。

1.2.9 Western blot 检测蛋白表达

向细胞中加入 50μl 细胞裂解液,于冰上孵育 15min,将裂解后的细胞于 95℃孵育 10min 后离心收集上清,向其中加入等量的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液,取 40μl 样本加入 SDS-PAGE 电泳浓缩胶孔中,120V 将蛋白电泳至分离胶后,电转移至 PVDF 膜,用封闭缓冲液封闭转膜后的 PVDF 膜,4℃孵育 1h 后洗涤。将抗 MafB 抗体和抗 β-actin 抗体用封闭缓冲液以 1:1000 比例稀释,加入 PVDF 膜,4℃孵育过夜。洗涤后将抗鼠 IgG-HRP 用封闭缓冲液以 1:2000 比例稀释,加入 PVDF 膜,室温孵育 2h。洗涤后利用化学发光法成像,利用 Image J 软件对蛋白条带的灰度进行半定量测定。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 软件进行数据分析。计量资料采用均数±标准差表示,两组计量资料的差异比较采用 *t* 检验,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析或 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSCLC 患者 BALF 中 IFN-α 和 IFN-β 水平降低

血浆中 IFN-α 和 IFN-β 水平在健康志愿者和 NSCLC 患者之间的差异均无统计学意义[IFN-α:

119.9 ± 19.56 pg/ml vs 124.8 ± 17.18 pg/ml, $t=1.033$, $P=0.306$ (Figure 1A); IFN- β : 28.86 ± 13.23 pg/ml vs 31.29 ± 13.18 pg/ml, $t=0.688$, $P=0.494$ (Figure 1B)]. 在鳞癌和腺癌患者之间, 血浆 IFN- α 和 IFN- β 差异亦无统计学意义 ($t=1.569$ 和 $t=1.332$, $P=0.129$ 和 $P=0.191$) (Figure 1C, Figure 1D)。

而在 BALF 中, 肿瘤部位 BALF 中 IFN- α 水平较非肿瘤部位轻度降低 (242.5 ± 59.98 pg/ml vs 282.5 ± 45.24 pg/ml, $t=2.578$, $P=0.013$) (Figure 2A), 而肿瘤部位 BALF 中 IFN- β 水平较肿瘤部位显著性降低, 差异具有统计学意义 (1240 ± 281 pg/ml vs 3442 ± 7.83 pg/ml, $t=14.58$, $P<0.0001$) (Figure 2B)。但在鳞癌和腺癌患者肿瘤部位 BALF 中 IFN- α 和 IFN- β 的差异无统计学意义 (Figure 2C, 2D)。

2.2 NSCLC 患者 BALF 中 MafB 表达水平升高

PBMC 中 MafB mRNA 相对表达量在健康志愿者和 NSCLC 患者中差异无统计学意义 ($t=0.861$, $P=0.393$) (Figure 3A), 而肿瘤部位 BALF 中 MafB mRNA 相对表达量则显著性高于非肿瘤部位 ($t=6.068$, $P<0.0001$) (Figure 3B), 但 PBMC 和 BALF 中 BALF MafB mRNA 的相对表达量在鳞癌和腺癌之间均无统计学差异 ($t=0.888$ 和 $t=0.568$, $P=0.380$ 和 $P=0.573$) (Figure 3C, 3D)。进一步对 9 例健康志愿者和 9 例 NSCLC 患者 PBMC 和 BALF 中 MafB 蛋白的表达水平进行检测。Western blot 结果如 Figure 3E 所示, 通过对蛋白条带灰度进行半定量检测发现, PBMC 中 MafB 蛋白水平在健康志愿者和 NSCLC 患者中的表达差异无统计学意义 ($t=1.179$, $P=0.256$) (Figure 3F), 而肿瘤部位 BALF 中 MafB 蛋白水平则显著性

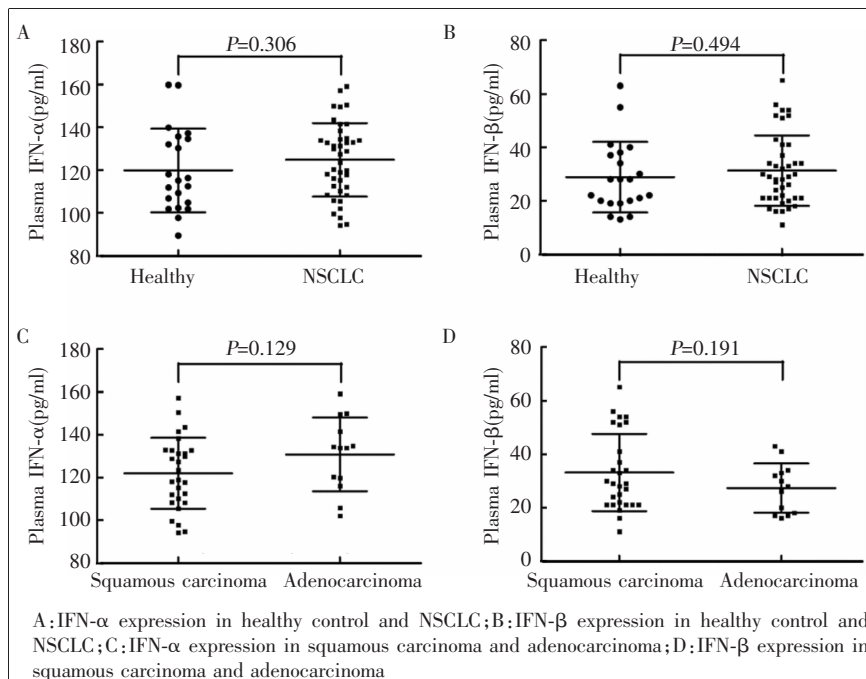


Figure 1 Changes in plasma IFN- α and IFN- β in patients with NSCLC

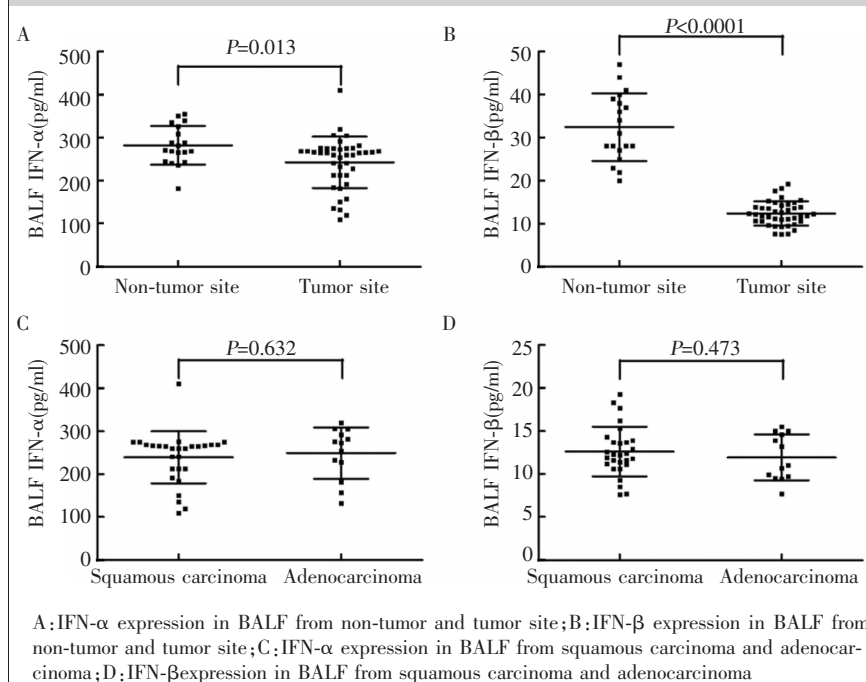


Figure 2 Changes in IFN- α and IFN- β in BALF of patients with NSCLC

高于非肿瘤部位 ($t=7.109$, $P<0.0001$) (Figure 3G)。

2.3 抑制 MafB 对 BALF 分离的 CD14⁺单核细胞分泌 IFN- α 、IFN- β 和 IRF3 磷酸化的影响

分选 14 例 NSCLC 患者 BALF 中的 CD14⁺单核细胞, 使用 MafB siRNA 或对照 siRNA 转染, 48h 后收集细胞和培养上清。MafB siRNA 转染可有效抑制

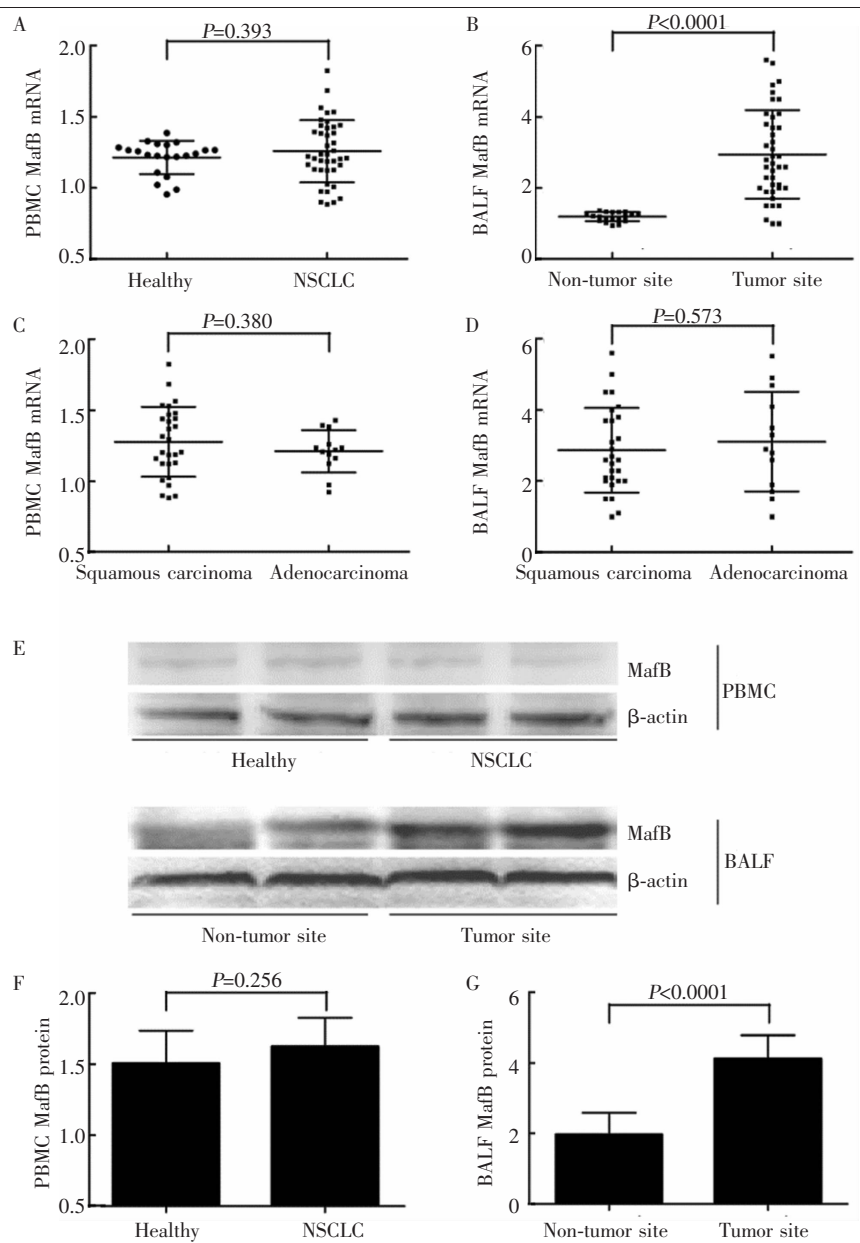
CD14⁺单核细胞中 MafB mRNA (SNK-*q* 检验, $Z=13.24$, $P<0.0001$) (Figure 4A)和蛋白(Figure 4B)的表达。应用 ELISA 法检测培养上清中 IFN- α 和 IFN- β 水平, IFN- α 水平在未转染细胞、对照 siRNA 转染细胞和 MafB siRNA 转染细胞中分泌水平差异无统计学意义 ($F=0.135$, $P=0.874$) (Figure 4C), 但抑制 MafB 可显著性降低 IFN- β 分泌, MafB siRNA 转染的 CD14⁺单核细胞分泌的 IFN- β 水平 ($16.09\pm5.79\text{pg/ml}$) 显著性高于未转染细胞 ($6.73\pm1.78\text{pg/ml}$) 和对照 siRNA 转染的细胞 ($6.16\pm2.01\text{pg/ml}$) ($Z=6.094$ 和 $Z=5.771$, $P<0.0001$) (Figure 4D)。抑制 MafB 亦可增加 IRF3 磷酸化(Figure 4E、4F), 但对总 IRF3 蛋白表达并无明显影响(Figure 4E)。

2.4 抑制 MafB 对 CD14⁺单核细胞诱导 CD4⁺T 细胞分化的功能无影响

IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-21 的表达水平在 CD14⁺单核细胞/CD4⁺T 细胞间接接触共培养系统和 CD4⁺T 细胞单独培养中的差异无统计学意义 (P 均 >0.05) (Figure 5A~5D), 抑制 MafB 亦不影响间接培养系统中上述细胞因子的表达 (P 均 >0.05) (Figure 5A~5D)。CD14⁺单核细胞/CD4⁺T 细胞直接接触共培养系统中 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-21 水平平均显著性高于 CD4⁺T 细胞单独培养系统 (P 均 <0.05) (Figure 5A~5D), 但抑制 MafB 并不影响直接培养系统中上述细胞因子的表达 (P 均 >0.05) (Figure 5A~5D)。

3 讨论

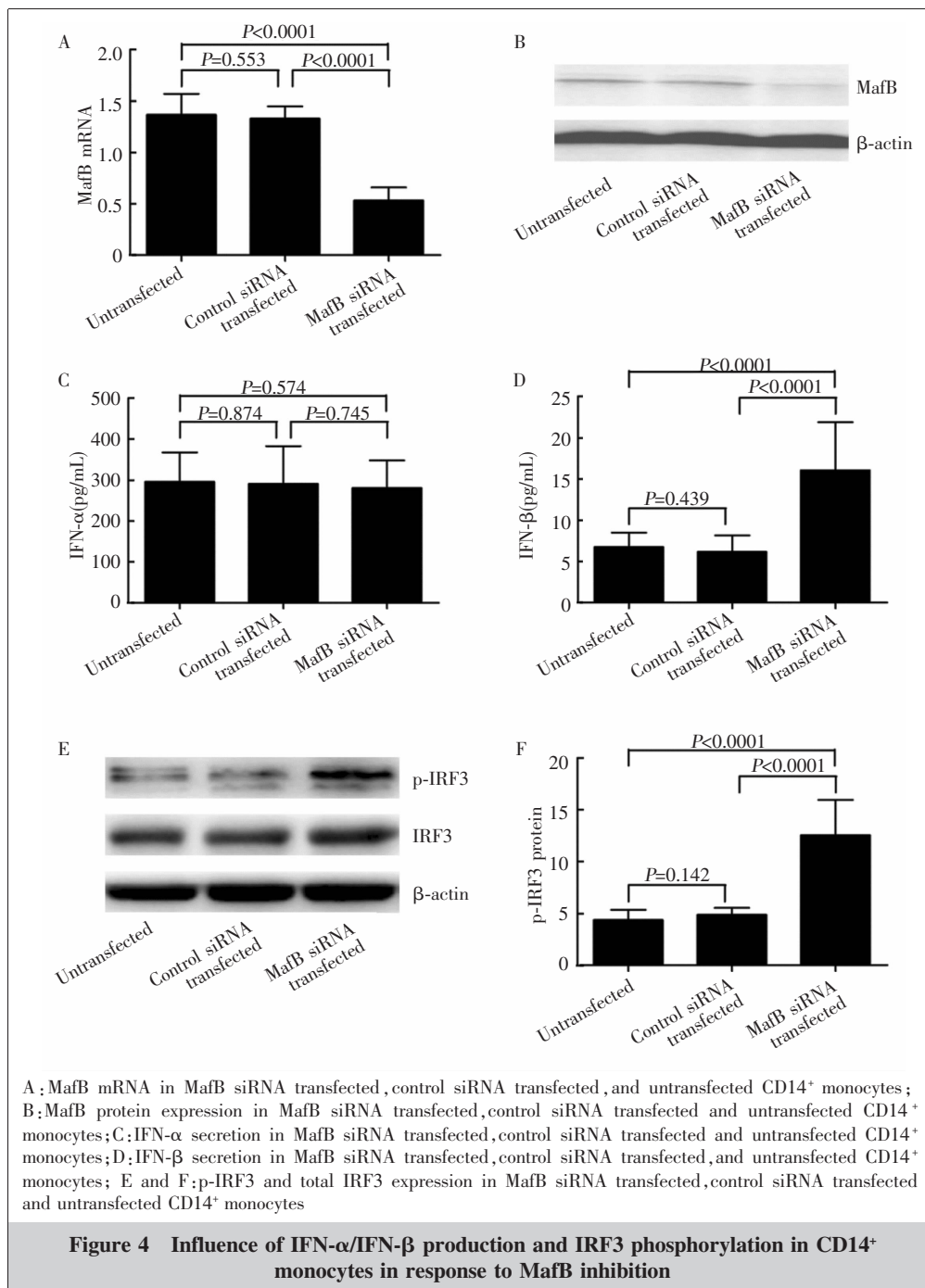
Maf 蛋白家族中的多数成员在造血过程中发挥重要作用。MafB 在 CD34⁺来源的单核细胞前体中特



A: MafB mRNA in PBMC from healthy control and NSCLC; B: MafB mRNA in BALF from non-tumor and tumor site; C: MafB mRNA in PBMC from squamous carcinoma and adenocarcinoma; D: MafB mRNA in BALF from squamous carcinoma and adenocarcinoma; E: Western blot assay for MafB protein; F: MafB protein in PBMC from healthy control and NSCLC; G: MafB protein in BALF from non-tumor and tumor site

Figure 3 Changes in MafB expression in PBMC and BALF of patients with NSCLC

异性高表达,但在粒细胞前体中表达水平极低^[4]。MafB 全基因组 cDNA 转染原代 CD34⁺造血干细胞可诱导大量单核巨噬样细胞分化,提示 MafB 主要调控单核巨噬细胞的分化和功能^[5]。同时, MafB 也参与了某些恶性肿瘤的发病。MafB 可通过上调细胞周期蛋白 D1 表达促进肝癌细胞增殖^[6],类泛素化的

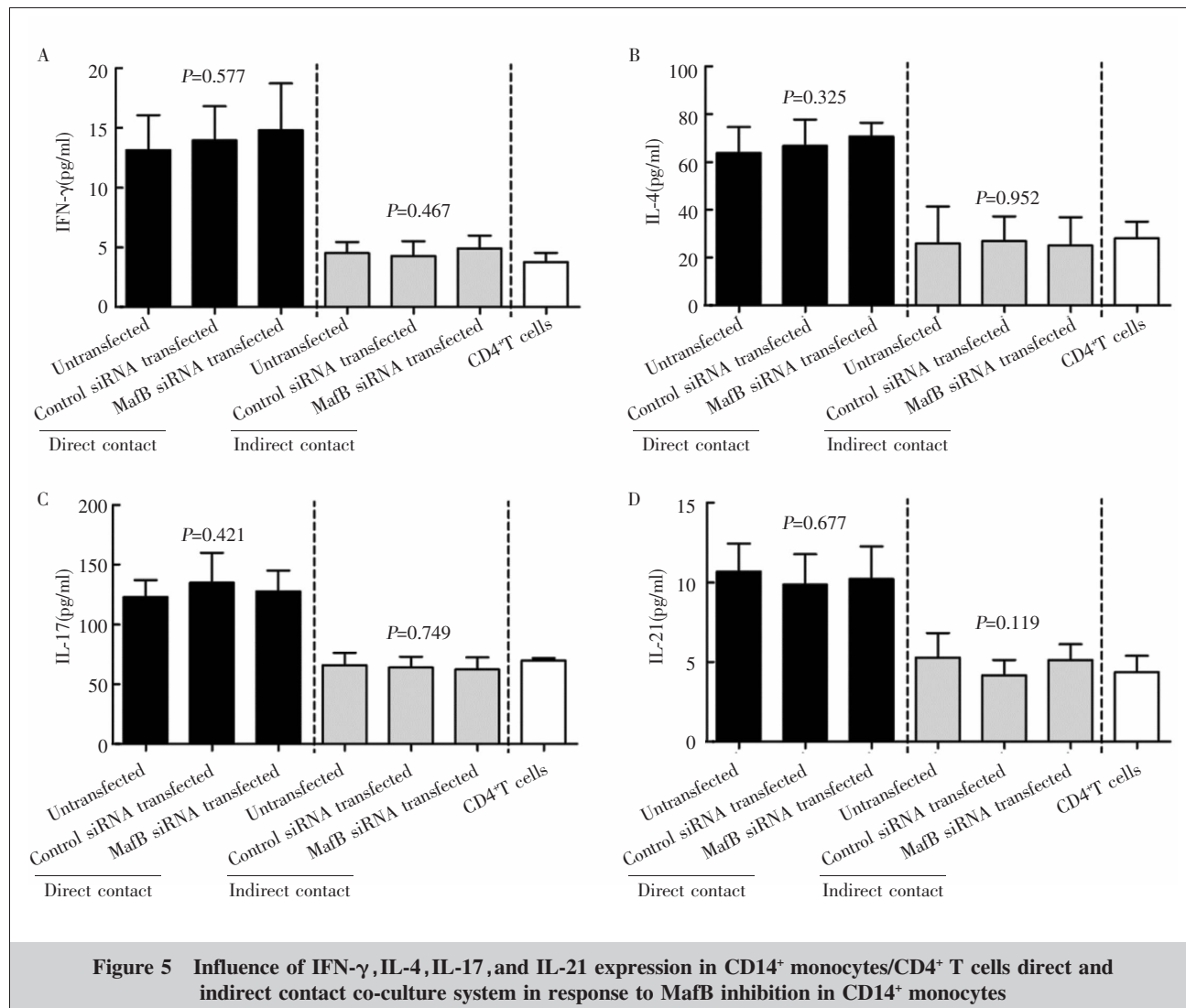


MafB 也可促进结肠癌的肿瘤发生^[7], miR-223 也可通过下调 MafB 的表达抑制鼻咽癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[8], MafB 还可增强急性 T 淋巴细胞白血病患者中 Notch 信号通路的致癌性^[9]。但是, 抑制巨噬细胞中 MafB 的表达并不影响氨基甲酸乙酯诱导的肺癌小鼠模型中的肿瘤发生和生长^[10]。而 Sato 等^[11]在吸烟者的肺泡巨噬细胞中发现了 MafB 表达, 在 MafB 有呼气受限的吸烟者中的表达明显高于无呼

气受限的吸烟者, 且与 FEV1/FVC 相关, 参与慢性阻塞性肺病的病理生理学过程。由于 MafB 主要在免疫细胞中表达, 本研究发现, NSCLC 患者 PBMC 和 BALF 中存在 MafB mRNA 和蛋白表达, 虽然外周血 MafB 在健康志愿者和 NSCLC 之间的表达水平并无显著性差异, 但支气管肺泡灌洗液中 MafB 的水平在肿瘤部位则显著性升高, 在鳞癌和腺癌患者之间 MafB 的表达亦并无统计学差异, 上述结果提示肺部升高表达的 MafB 可能参与了 NSCLC 发病, 但其中机制仍有待深入研究。

I 型干扰素主要包括 IFN-α 和 IFN-β, 可通过活化 STAT2 信号通路在体内发挥抑制肿瘤生长的作用^[12], 而抑制 I 型干扰素信号通路可介导肿瘤患者对抗 PD-1 抗体治疗的耐药^[13]。在小鼠

肺癌模型中, I 型干扰素的缺乏可通过升高多种促转移蛋白的表达进而诱导中性粒细胞介导的转移前结节的形成^[14]。本研究发现, NSCLC 患者外周血 IFN-α 和 IFN-β 水平与健康志愿者比较无明显变化, 而肿瘤部位支气管肺泡灌洗液中 IFN-α 和 IFN-β 水平则显著性降低, 提示 NSCLC 患者肺部原位存在 I 型干扰素抑制。有研究发现, 在慢性病毒感染中, IFN-β 表达水平与 MafB 的浓度相关, MafB 可持



续抑制 IFNB1 转录^[3]。在抗病毒应答中, MafB 可通过 IRF3 途径介导 IFN-β 的表达水平, 在正常条件下, MafB 可调控由偶发抗病毒应答触发的 IRF3 介导的 IFNB1 转录。若 MafB 持续低水平表达, 可能导致 IFNB1 功能亢进, 诱发自身免疫应答; 而慢性病毒感染可诱导 MafB 持续高水平表达, IFNB1 基因表达不足, 导致免疫耐受, 不能清除病毒, 促进感染慢性化^[15]。本研究发现, 抑制 NSCLC 患者 CD14⁺ 单核细胞中 MafB 的表达可升高 IFN-β 分泌, 但对 IFN-α 分泌无显著性影响, 这一过程可能通过促进 IRF3 磷酸化而实现, 这与 Kim 等^[3]在病毒感染中的研究结果一致, 提示 MafB 介导的 I 型干扰素抑制亦可能参与了 NSCLC 的发病。

本研究还对抑制 MafB 对 CD14⁺ 单核细胞介导 CD4⁺ T 细胞分化的功能进行了研究。CD14⁺ 单核细胞

可促进类风湿性关节炎患者外周血 Th1 和 Th17 细胞的分化, 这一过程主要需通过 CD14⁺ 单核细胞和 CD4⁺ T 细胞的直接接触而实现^[16]。本研究亦发现, 在 NSCLC 患者中, CD4⁺ T 细胞分泌细胞因子的水平在间接接触培养系统中中和 CD4⁺ T 细胞单独培养中并无显著性差异, 而直接接触培养系统中 IFN-γ (Th1 细胞因子)、IL-4 (Th2 细胞因子)、IL-17 (Th17 细胞因子)、IL-21 (滤泡辅助性 T 细胞因子) 的水平则明显升高, 提示 NSCLC 中 CD14⁺ 单核细胞介导的 CD4⁺ T 细胞的分化需要细胞间的直接接触。但是, 抑制 CD14⁺ 单核细胞中 MafB 的表达对其介导的 CD4⁺ T 细胞分化的调控并无影响, 主要表现为培养上清中细胞因子的表达水平在抑制 MafB 后并无变化, 提示 MafB 对 NSCLC 患者中 CD14⁺ 单核细胞的分化调控功能可能无影响。

总之, NSCLC 患者肿瘤部位过度表达的 MafB 可能诱导了 I 型干扰素抑制, 但 MafB 对肿瘤部位 CD14⁺单核细胞的免疫调控功能可能无影响。

参考文献:

- [1] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung cancer statistics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1–19.
- [2] Cuevas VD, Anta L, Samaniego R, et al. MAFB determines human macrophage anti-inflammatory polarization: relevance for the pathogenic mechanisms operating in multi-centric carpal tunnel osteolysis [J]. *J Immunol*, 2017, 198(5): 2070–2081.
- [3] Kim H, Seed B. The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3 [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(8): 743–750.
- [4] Montanari M, Gemelli C, Tenedini E, et al. Correlation between differentiation plasticity and mRNA expression profiling of CD34⁺-derived CD14⁺ and CD14⁺ human normal myeloid precursors [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(12): 1588–1600.
- [5] Gemelli C, Montanari M, Tenedini E, et al. Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(10): 1686–1696.
- [6] Yu H, Jiang HL, Xu D, et al. Transcription factor MafB promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2): 700–708.
- [7] Yang LS, Zhang XJ, Xie YY, et al. Sumoylated MAFB promotes colorectal cancer tumorigenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83488–83501.
- [8] Yang W, Lan X, Li D, et al. MiR-223 targeting MAFB suppresses proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 461.
- [9] Pajcini KV, Xu L, Shao L, et al. MAFB enhances oncogenic Notch signaling in T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(505): pii: eaam6846.
- [10] Nemoto T, Shibata Y, Inoue S, et al. MafB silencing in macrophages does not influence the initiation and growth of lung cancer induced by urethane [J]. *Excli J*, 2017, 16: 914–920.
- [11] Sato M, Shibata Y, Kimura T, et al. Immunohistochemical staining for transcription factor MafB in alveolar macrophages is correlated with spirometric measures of airflow limitation in smokers [J]. *Respirology*, 2011, 16(1): 124–130.
- [12] Yue C, Xu J, Tan Estioko MD, et al. Host STAT2/type I interferon axis controls tumor growth [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(1): 117–126.
- [13] Wu CF, Andzinski L, Kasnitz N, et al. The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(4): 837–847.
- [14] Wang X, Schoenhals JE, Li A, et al. Suppression of type I IFN signaling in tumors mediates resistance to anti-PD-1 treatment that can be overcome by radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(4): 839–850.
- [15] Motohashi H, Igarashi K. MafB as a type I interferon rheostat [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(8): 695–696.
- [16] Yang H, Wang J, Li Y, et al. CD147 modulates the differentiation of T-helper 17 cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. *APMIS*, 2017, 125(1): 24–31.