

吲哚胺 2,3-双加氧酶基因转染对肝癌细胞凋亡的影响及相关机制研究*

卜晓倩 张 瑞 申慧琴 罗 静 刘 燕 张路英 刘春亮 王 琦**

(山西医科大学 太原 030001)

摘要 目的:通过细胞培养和在体实验探讨吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)基因转染后对肝癌细胞凋亡的影响及相关细胞免疫机制的研究。方法:提取健康人外周血中的 T 细胞利用细胞培养和基因转染技术将 T 细胞和肝癌细胞混合培养。实验分为 6 组:根据是否加入 D-1-MT 分为未干预组和干预组,每组根据培养细胞的不同又分为 T 细胞与 HepG2 细胞组、T 细胞与 pcDNA3.1-HepG2 细胞组、T 细胞与 pcDNA3.1-IDO-HepG2 细胞组。于混合培养 2 天后应用流式细胞术、MTT 法检测各组中 HepG2 细胞的凋亡情况和 T 细胞抗 HepG2 细胞的细胞毒活性。在混合培养 5 天后应用流式细胞术检测调节性 T 细胞(Regulatory T cell, Treg)的比例。并建立人肝癌细胞小鼠模型,用流式细胞仪检测荷瘤小鼠外周血中 Treg 细胞的比例。结果:1. 混合培养 2 天后,转染 IDO 基因的肝癌细胞其凋亡率和 T 细胞抗 HepG2 细胞的细胞毒活性均明显降低,分别为 $(1.65 \pm 0.14)\%$ 和 $(35.00 \pm 2.20)\%$ ($p < 0.05$);加入 1-MT 干预后,以上指标均明显高于干预前,且干预前后比较有明显的统计学意义($P < 0.05$)。2. 混合培养 5 天后,IDO-HepG2 细胞组 Treg 细胞的比例明显升高 $(10.53 \pm 1.05)\%$,与其余两个未干预组比较有统计学意义($p < 0.05$);加 1-MT 干预后,Treg 细胞比例均明显降低($p < 0.05$)。3. 转染 IDO 的荷瘤小鼠模型中外周血 Treg 细胞比例明显升高 $(15.33 \pm 1.18)\%$,与其余两组比较有统计学意义($p < 0.05$)。结论:1. IDO 可能通过增加调节性 T 细胞的比例来抑制肝癌细胞(HepG2 细胞)的凋亡和 T 细胞的免疫毒性功能。1-MT 可抑制 IDO 的这种作用。2. 在体实验证实 IDO 的过量表达可提高外周血 Treg 细胞的比例。

关键词 吲哚胺 2,3 双加氧酶 肝癌细胞 T 细胞 Treg 细胞 凋亡

中图分类号 Q813

肝癌的发生发展与机体免疫耐受的形成密切相关,其主要机制有克隆清除、克隆忽视、克隆无能、嵌合体的形成和克隆抑制等。IDO 是一种可使机体获得性免疫耐受的酶类,包括本课题组在内的多个研究表明 IDO 在部分实体肿瘤细胞和血液系统恶性肿瘤细胞中的表达增高,同时伴有局部 T 淋巴细胞增殖受抑,从而引发肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击,这就暗示 IDO 可能在肿瘤的免疫逃逸中发挥了重要的作用。研究将带有人全长 IDO 基因系列的质粒转染到 HepG2 细胞,

通过细胞培养探讨 IDO 基因转染对肝癌细胞的凋亡和 T 细胞、Treg 细胞的影响,并于在体实验研究 IDO 转染后外周血 Treg 细胞的变化。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 实验细胞及分组 HepG2 细胞、转染 pcDNA3.1-IDO 质粒及空质粒的 HepG2 细胞株均来源于山西医科大学第二医院消化内科实验室,以上转染细胞均已采用 RT-PCR 和 Western blot 分析法检测了 IDO-mRNA 和 IDO 蛋白的表达;T 淋巴细胞由健康人的外周血分离而得;绵羊红细胞由绵羊血分离而得。实验根据是

否加入 D-1-MT 分为未干预组和干预组,每组根据培养细胞的不同又分为 T 细胞与 HepG2 细胞组、T 细胞与 pcDNA3.1-HepG2 细胞组、T 细胞与 pcDNA3.1-IDO-HepG2 细胞组。

1.1.2 实验动物 实验小鼠 BALB/C 购自山西医科大学实验动物研究所,4~6 周龄,体重 18~20g,随机分组,每组 10 只。

1.1.3 试剂 G418 购于晶美生物公司,D-1-MT 购于美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 BD Biosciences 公司,重组人 IL-2 购自北京宝曼生物科技有限公司,抗鼠 CD25-PE 等单克隆抗体均购自 BioLegend 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分离 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 HepG2 细胞和 T 淋巴细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,加入 G418 至终浓度 400mg/L 的培养液培养 IDO-HepG2 细胞和 pcDNA3.1-HepG2 细胞,以上细胞均在恒温 37℃、5% CO₂ 条件温箱中培养。取经肝素抗凝的健康人的外周血,采用人淋巴细胞分离液行密度梯度离心分离出淋巴细胞;采用 E 花环沉降法,分离出 T 淋巴细胞。

$$\text{T 淋巴细胞活性}(\%) = \left[1 - \frac{\text{实验孔(T 淋巴细胞 + HepG2 细胞)} - \text{T 淋巴细胞对照孔 OD 值}}{\text{HepG2 细胞对照孔 OD 值}} \right] \times 100\%$$

1.2.4 混合反应体系中 Treg 细胞的比例的检测 分别将 5×10^4 个 HepG2 细胞、pcDNA3.1-HepG2 细胞和 IDO-HepG2 细胞接种于 6 孔板中;12h 后,每孔分别加入 1×10^7 个 T 淋巴细胞以及 200u/ml 的 IL-2;然后分为未干预组和干预组,干预组加 D-1-MT(2.5mmol/L),置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中混合培养第 3 天,给各孔换液;混合培养 5 天之后,收集每组中的悬浮细胞,洗涤离心后用抗体标记,上流式细胞仪检测 Treg 细胞的比例。

1.2.5 人肝癌小鼠外周血中 Treg 的比例的检测 分别取对数生长期的 HepG2 细胞、pcDNA3.1-HepG2 细胞和 IDO-HepG2 细胞,用 PBS 缓冲液洗 3 遍,制成 5×10^6 /ml 细胞悬液,吸取 0.2ml 细胞悬液,接种于 BALB/C 小鼠背部皮下,定期观察小鼠肿瘤生长,每组细胞分别接种 10 只 BALB/C 小鼠,观察 4 周后,取肝素抗凝的小鼠外周血,用抗体标记上流式细胞仪测试。

1.2.6 统计方法 每组数据以均数 ± 标准差表示,组间两两比较用 SNK 检验;全部数据采用 SPSS13.0 软件

1.2.2 混合反应体系中 HepG2 细胞的凋亡率的检测

分别将增殖状态良好的 HepG2 细胞、pcDNA3.1-HepG2 细胞和 IDO-HepG2 细胞进行胰酶消化,制成单细胞悬液;并取 5×10^4 个上述细胞接种于 6 孔板中;12h 后,每孔分别加入 1×10^7 个 T 淋巴细胞;然后分为未干预组和干预组,干预组加 D-1-MT(2.5mmol/L);每组设 5 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中混合培养 48h 后,收集每组中的贴壁细胞,洗涤离心(1 000r/min)后用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒通过流式细胞术检测 HepG2 细胞的凋亡率。

1.2.3 混合反应体系中 T 淋巴细胞的细胞毒活性的检测 分别将 1×10^3 个 HepG2 细胞、pcDNA3.1-HepG2 细胞和 IDO-HepG2 细胞接种于 96 孔板中;12h 后,每孔分别加入 1×10^6 个 T 淋巴细胞;然后分为未干预组和干预组,干预组加 D-1-MT(2.5mmol/L);每组设 5 个复孔;将其置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中混合培养 48h;每孔加入 15μl 浓度为 5mg/ml 的 MTT 液,培养箱中再孵育 4h;离心培养板,弃上清;各孔分别加入 112.5μl 的二甲亚砷(DMSO),微型振荡器振荡 10min,酶标仪 490nm 处测吸光度(OD)值。

分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养

2.1.1 混合反应 2 天后 HepG2 细胞凋亡的变化 混合培养 2 天后转染 IDO 的 HepG2 细胞的早期凋亡率明显低于转染空质粒组和普通肝癌细胞组;在体系中加入一定浓度的 D-1-MT 培养后,与干预前相比 HepG2 细胞的早期凋亡率明显升高(表 1,图 1)。

2.1.2 混合反应两天后 T 淋巴细胞抗 HepG2 细胞的细胞毒活性的变化 混合培养两天后 HepG2-IDO 细胞组 T 淋巴细胞抗 HepG2 细胞的细胞毒活性明显低于 pcDNA3.1-HepG2 细胞组和 HepG2 细胞组。各体系分别加入 1-MT 后,T 淋巴细胞抗 HepG2 细胞的细胞毒活性均较前明显升高(表 2)。

2.1.3 混合反应 5 天后 Treg 细胞的变化 混合培养 5 天后 HepG2-IDO 细胞组 Treg 细胞占 T 细胞的比例高于空质粒转染组和普通肝癌细胞组;以上各组分别加

表 1 混合反应体系中 HepG2 细胞的
早期凋亡率($\bar{x} \pm SD$) %

Table 1 The earlier apoptosis rate of HepG2 cell
was determined by ($\bar{x} \pm SD$) %

分组	未干预组	干预组
HepG2 + T 细胞	6.93 ± 0.33	11.55 ± 1.05 △
空质粒 + T 细胞	7.17 ± 0.24	10.50 ± 1.51 △
IDO + T 细胞	1.65 ± 0.14 *	4.41 ± 0.70 △ ○

Note: * compared with the other two groups in not intervened, $p < 0.05$; ○ compared with the other two groups in intervened, $p < 0.05$; △ adding 1-MT in each groups, compared with before, $p < 0.05$.

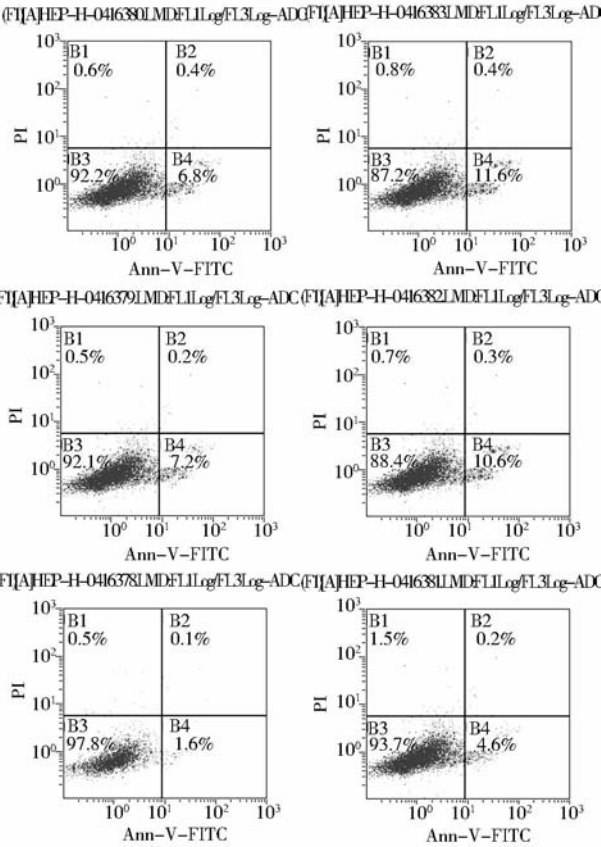


图 1 混合反应体系中 HepG2 细胞的早期凋亡率
Fig. 1 The earlier apoptosis rate of HepG2 cell

表 2 混合反应体系中 T 细胞抗 HepG2 细胞的
细胞毒性($\bar{x} \pm SD$) %

Table 2 The cytotoxicity of T-lymphocyte against
HepG2 cell was determined by ($\bar{x} \pm SD$) %

分组	未干预组	干预组
HepG2 + T 细胞	75.30 ± 1.67	80.91 ± 1.95 △
空质粒 + T 细胞	74.51 ± 1.44	81.27 ± 2.42 △
IDO + T 细胞	35.00 ± 2.20 *	71.33 ± 2.10 △ ○

Note: * compared with the other two groups in not intervened,

$p < 0.05$; ○ compared with the other two groups in intervened, $p < 0.05$; △ adding 1-MT in each groups, compared with before, $p < 0.05$.

入 1-MT 混合培养后,相应组中 Treg 细胞比例均有所降低(表 3,图 2)。

表 3 混合反应体系中 Treg 细胞的比例($\bar{x} \pm SD$) %

Table 3 The percentage of Treg cell was
determined by ($\bar{x} \pm SD$) %

分组	未干预组	干预组
HepG2 + T 细胞	3.34 ± 0.18	1.57 ± 0.13 △
空质粒 + T 细胞	4.03 ± 0.17	1.43 ± 0.10 △
IDO + T 细胞	10.53 ± 1.05 *	6.37 ± 0.15 △ ○

Note: * compared with the other two groups in not intervened, $p < 0.05$; ○ compared with the other two groups in intervened, $p < 0.05$; △ adding 1-MT in each groups, compared with before, $p < 0.05$.

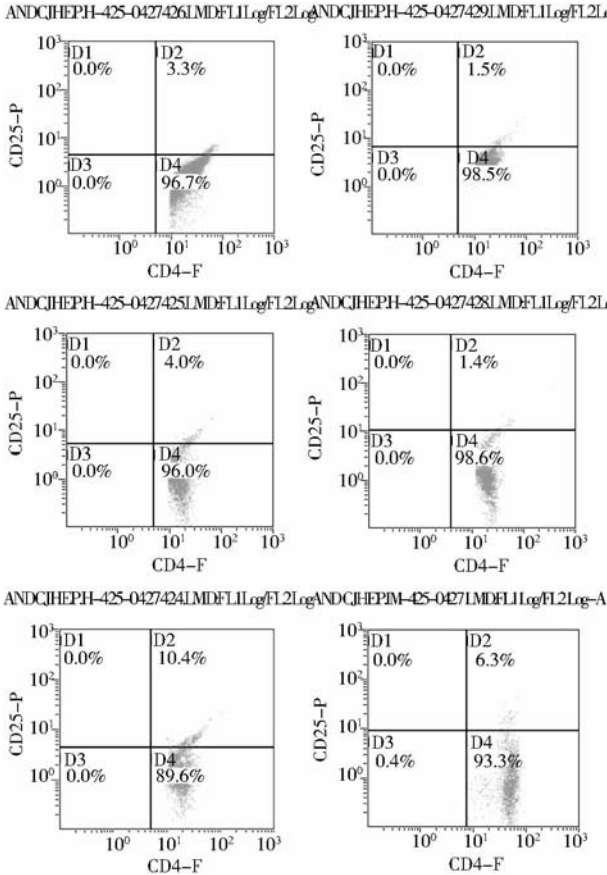


图 2 混合反应体系中 Treg 细胞的比例
Fig. 2 The percentage of Treg cell

2.2 在体实验

BALB/C 小鼠种植瘤实验及外周血中 Treg 细胞检测。BALB/C 小鼠背部皮下接种细胞后,观察 2 周,所

有小鼠均形成种植瘤,形成时间不一致,HepG2-IDO 细胞形成时间平均比 pcDNA3.1-HepG2 细胞或 HepG2 细胞少 24h,后二者肿瘤形成时间均为两周左右。植瘤肿块呈膨胀侵袭性生长,突起于背部,皮肤表面张力较大,形态大多规则,为圆球状或椭圆状;外周血流式细胞术分析表明,种植 HepG2-IDO 细胞的小鼠外周血中 Treg 细胞比例明显高于种植 pcDNA3.1-HepG2 细胞和 HepG2 细胞组(表 4,图 3)。

表 4 荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞的比例($\bar{x} \pm SD$) %
Table 4 The percentage of Treg cell was determined by ($\bar{x} \pm SD$) %

分组	Treg 细胞的比例($\bar{x} \pm SD$) %
HepG2 + T 细胞	8.14 ± 0.57
空质粒 + T 细胞	8.96 ± 0.53
IDO + T 细胞	15.33 ± 1.18 *

Note: * compared with the other two groups, $p < 0.05$

3 讨 论

近年来的研究认为肿瘤的发生发展与机体免疫耐受的形成有关,其主要机制为克隆清除、克隆忽视、克隆无能、嵌合体的形成和 Treg 细胞介导的克隆抑制等^[1-3]。故干预上述环节,恢复免疫监督作用渐成为肿瘤治疗的新模式。

IDO 是一种免疫抑制酶,可使机体产生获得性免疫耐受^[2-3],也是体内肝脏以外唯一分解色氨酸的限速酶。针对 IDO 的免疫调节机制,目前主要存在两种假设,即色氨酸分解理论和调节性 T 细胞的作用。有学者认为 IDO 介导局部色氨酸代谢引起的犬尿酸增加,会上调 T 细胞表面作为信号分子的压力敏感型激酶,从而引发 T 细胞功能损伤。另有研究表明,因为 T 细胞对色氨酸耗竭特别敏感,所以当 IDO 导致色氨酸浓度较低时,正在增殖的 T 细胞就会静止在 G1 期,于是 T 细胞活化就会受到抑制。Curti 等^[4]通过体内试验直接证实急性髓样白血病的肿瘤微环境中,IDO 的表达与 Treg 细胞的数目增加有关,并且依靠 IDO 相关机制,可以将 CD4⁺CD25⁻ T 细胞直接转化为 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞,从而使白血病细胞诱导 T 细胞产生机体的免疫耐受。而对于 IDO 基因转染对肝癌细胞是否具有免疫抑制作用以及其在肝癌微环境中对 Treg 细胞产生的影响目前还尚不清楚。

为了探讨 IDO 对肝癌细胞凋亡的影响,将带有人全长 IDO 基因系列的质粒转染到 HepG2 细胞,通过体

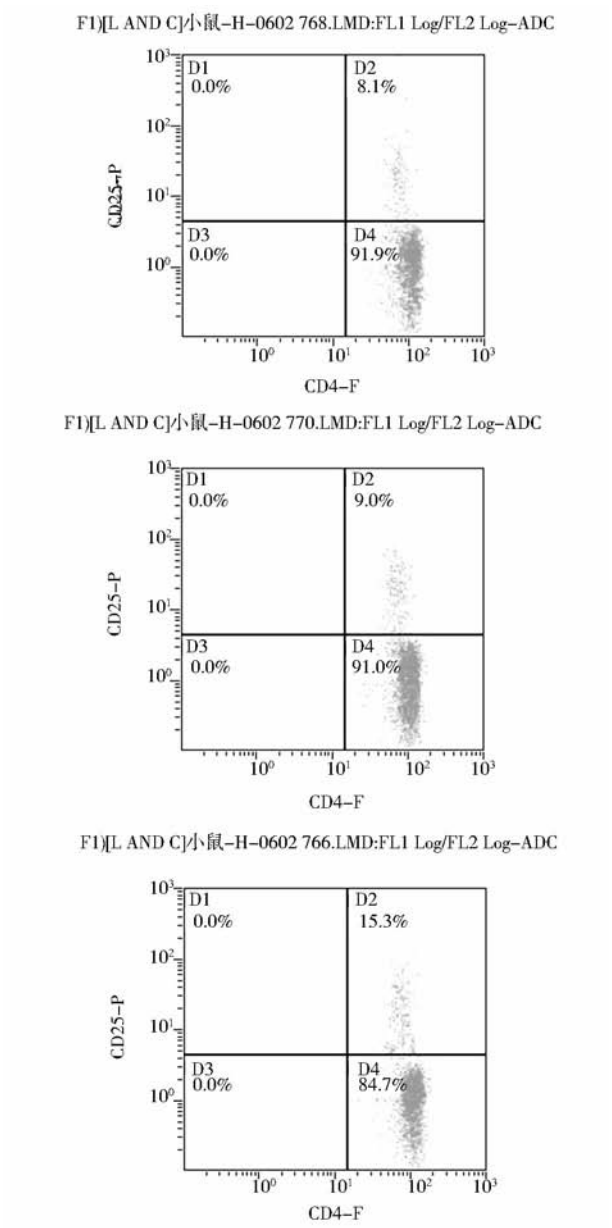


图 3 荷瘤小鼠外周血中 Treg 细胞的比例
Fig. 3 The percentage of Treg cell in the mouse mode

外实验发现在高表达内源性 IDO 的反应微环境中,HepG2 细胞的早期凋亡率和 T 淋巴细胞的细胞毒活性均明显降低,这就表明 HepG2-IDO 细胞具备了比其亲代细胞更强的诱导局部环境产生免疫耐受的能力。这一结果可用 IDO 的色氨酸分解理论来解释,即 IDO 的过量表达形成局部色氨酸饥饿,于是对其相当敏感的 T 淋巴细胞活化和增殖受到抑制,导致反应微环境免疫耐受的形成,肝癌细胞的凋亡明显减少。虽然色氨酸也是肝癌细胞存在和增殖的必需氨基酸之一,但由于肿瘤细胞对其饥饿的耐受力远远强于淋巴细胞,故通

过 IDO 的过量表达可以在一定程度上成功建立起肿瘤的免疫逃逸。此外结果还提示 HepG2-IDO 细胞的反应环境里 Treg 细胞的比例明显升高,并且这一结论在体外和在体实验中是一致的。这就表明 IDO 表达增强后可诱导 Treg 细胞在体内或体外增殖,从而抑制局部 T 淋巴细胞参与免疫反应,这样便有利于肝癌细胞的形成及生长。而且,Treg 细胞诱导的克隆抑制也是肿瘤免疫耐受形成的主要机制之一。目前,IDO(+)肿瘤细胞诱导 Treg 细胞增殖的具体机制尚不明确。根据 Babak 等^[5]的研究发现与 Toll 样受体 9(TLR9)配体相关的一定浓度的 CpG 可刺激鼠脾中的 Treg 细胞发挥其免疫抑制作用。具体来说,即 CpG 可以介导少量的 CD19(+)树突状细胞(pDC)表达一定浓度的 IDO,而抑制 IDO 的作用后,CpG 则不能活化 Treg 细胞,相反可以刺激 pDC 去表达炎症因子 IL-6,从而使 Treg 细胞向 Th17 细胞转化,产生炎性反应。因此,可以说 CpG 作为关键的分子枢纽可诱导 IDO 活化并使 Treg 细胞获得稳定的免疫抑制作用。另有研究表明,细胞因子 TGF- β 也与 Treg 细胞和 Th17 细胞的诱导生成有关^[6-8],这也提示了 Treg 细胞和 Th17 细胞是可以相互转化的^[9]。故 IDO(+)的肿瘤环境里 Treg 细胞向 Th17 细胞转化的作用通路可能是研究 IDO 作用具体机制的方向之一,而各种细胞因子在此过程中所发挥的作用也仍需探究。

此外,为了进一步研究是否是 IDO 引起的免疫抑制作用,将一定浓度的 IDO 抑制剂 D-1-MT 加入混合反应体系中,结果提示较干预前各反应体系中肝癌细胞的凋亡率明显增加,T 淋巴细胞的免疫毒性增强,Treg 细胞的比例升高。因为 IDO 是通过抑制特异性肿瘤免疫的过程起作用的^[10],故在使用 IDO 酶抑制剂的情况下,宿主的抗肿瘤效应会明显增强。已有研究证实 D-1-MT 作为抗癌药在化学免疫治疗上优于 L-1-MT。而且在美国 D-1-MT 已于 2007 年秋进入 I 期临床试验。

综上所述,IDO 在原发性肝癌免疫耐受形成中发挥

了重要的作用,但其机制尚需要深入研究,只有彻底阐明了 IDO 在肿瘤细胞免疫耐受形成过程中的信号通路,才有可能有效地阐明 1-MT 的作用机制,为下一步采取靶向治疗措施,克服肿瘤的免疫逃逸提供夯实的理论基础和临床依据。

参考文献

- [1] Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, et al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. Clin Chim Acta, 2006, 364(1-2):82-90.
- [2] Munn D H, Mellor A L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest, 2007, 117(5):1147-1154.
- [3] Lee S Y, Choi H K, Lee K J, et al. The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. J Immunother, 2009, 32(1):22-28.
- [4] Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, et al. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. Blood, 2007, 109(7):2871-2877.
- [5] Babak B, Phillip R C, Madhav D S, et al. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. The Journal of Immunology, 2009, 183(4):2475-2483.
- [6] Li M O, Flavell R A. TGF- β : a master of all T cell trades. Cell, 2008, 134(3):392-404.
- [7] Korn T, Oukka M, Kuchroo V, et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol, 2007, 19(6):362-371.
- [8] Rubtsov Y P, Rudensky A Y. TGF- β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6):443-453.
- [9] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunol, 2008, 8(5):337-348.
- [10] Kim Y H, Choi B K, Kang W J, et al. IFN- γ -indoleamine-2,3-dioxygenase acts as a major suppressive factor in 4-1BB-mediated immune suppression in vivo. J Leukoc Biol, 2009, 85(5):817-825.

Effects of Hepatocellular Carcinoma Cells' Apoptosis and the Related Mechanisms after Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene Transfection

BU Xiao-qian ZHANG Rui SHENG Hui-qin LUO Jing LIU Yan ZHANG Lu-ying

LIU Chun-liang WANG Qi

(Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To explore after indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) gene transfection the influence of the hepatocellular carcinoma cells' apoptosis and the related cellular immune mechanisms by cell culture and in vivo. Methods: By cell culture and gene transfection technology, T-lymphocytes freshly isolated from healthy people and hepatocellular carcinoma cells were cocultured. The experiments were divided into six groups: T-lymphocytes and HepG2 cells group, T-lymphocytes and pcDNA3.1-HepG2 cells group, T-lymphocytes and pcDNA3.1-IDO-HepG2 cells group, and the three intervention groups which were added to IDO inhibitor 1-MT (1-methyl-tryptophan) on the basis of the above three groups. After two days of combine reaction, the apoptosis rate of HepG2 cell and the cytotoxicity of T-lymphocyte against HepG2 cell were examined by flow cytometer and MTT assay. After five days in mixed culture, the percentage of regulatory T cells (Treg) were analyzed by flow cytometer. Through establishment of the mouse model of human liver cancer cells, the percentage of Treg cells in peripheral blood of mouse was analyzed by flow cytometer. Results: 1. After two days of combine reaction, the apoptosis rate of HepG2 cell and the cytotoxicity of T-lymphocyte against HepG2 cell in IDO-HepG2 group were significantly lower than which in pcDNA3.1-HepG2 and HepG2 groups. They were respectively $(1.65 \pm 0.14) \%$ and $(35.00 \pm 2.20) \%$ ($p < 0.05$). With 1-MT groups, the above indexes were significantly higher than before the intervention ($p < 0.05$). 2. After five days in mixed culture, the percentage of Treg cells in IDO-HepG2 group was significant higher and that was $(10.53 \pm 1.05) \%$, it was considered statistically significant compared with the control group without 1-MT. In adding 1-MT groups, it decreased significantly ($p < 0.05$). 3. In the mouse model of human liver cancer cells, the percentage of Treg cells in peripheral blood of IDO-HepG2 group increased significantly, that is $(15.33 \pm 1.18) \%$ and compared with the other two groups was statistically significant ($p < 0.05$). Conclusion: 1. Though increasing the percentage of Treg cells in T-lymphocytes, IDO can suppress the apoptosis rate of hepatocellular carcinoma cells and the cytotoxicity of T-lymphocyte. 1-MT can reverse the role of IDO. 2. In vivo test, it can be confirmed that over-expression of IDO can increase the proportion of Treg cells in peripheral blood.

Key words Indoleamine 2,3-dioxygenase Hepatocellular carcinoma cells T-lymphocyte Treg cells Apoptosis