

· 论 著 ·

IDO 基因转染小鼠树突状细胞体外诱导 Treg 细胞增殖的研究*

谢启超, 朱 波, 陈正堂[△]

(第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037)

摘要:目的 调节性 T 细胞(Treg)在肿瘤局部免疫耐受中发挥了重要作用,但其产生机制尚不清楚。本实验通过将吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)基因转染小鼠树突状细胞(DC),体外研究对 Treg 细胞的诱导增殖作用,为肺癌免疫耐受产生机制研究提供新的依据。**方法** 采用慢病毒转染技术,将含人全长 IDO 基因转染到小鼠 DC 细胞,G418 筛选获得 IDO-DC 细胞,同时设置空白对照组(DC 细胞)及空质粒转染组(EGFP-DC 细胞),将 3 种细胞分别与小鼠 T 淋巴细胞混合培养,利用流式细胞技术分析 3 种细胞对 Treg 细胞的诱导增殖作用。**结果** IDO 基因成功转染到小鼠 DC 细胞,与小鼠 T 淋巴细胞共培养后,Treg 细胞增殖明显,和 EGFP-DC 细胞(7.5% vs 3.6%, $P < 0.05$)及 DC 细胞(7.5% vs 3.1%, $P < 0.05$)相比差异显著。**结论** IDO 基因转染小鼠 DC 细胞在体外能明显增强 Treg 细胞的增殖,为肺癌局部免疫耐受机制研究提供了新的实验依据。

关键词:吲哚胺-2,3-双加氧酶;树突细胞;肺肿瘤;免疫耐受;调节性 T 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.20.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)20-1977-02

In vitro proliferation of regulatory T cell induced by mouse dendritic cell transfected with IDO gene*

Xie Qichao, Zhu Bo, Chen Zhengtang[△]

(The Institute of Cancer Research of People's Liberation Army, the Affiliated Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective Regulatory T(Treg) cells play the important role in the immune tolerance of cancer. But the mechanism is still not clear. The aim of this study was to investigate the effects of mouse DC cell transfected with IDO gene on inducing the proliferation of Treg cell in vitro. **Methods** By using the recombinant lentiviral vector, the human IDO cDNA was transfected into mouse DC cell(IDO-DC) and co-culture with T lymphocytes from the peripheral blood of C57 mouse. The parental DC cells and DC cells transfected with blank plasmid pEGFP(EGFP-DC) was used as control groups. After culture, the Treg cells were sorted using fluorescence-activated cell sorting (FACS). **Results** The IDO gene was transfected into DC cell successfully and the IDO-DC cells could induce the proliferation of Treg cell. There was significantly difference between the IDO-DC cells and EGFP-DC cells(7.5% : 3.6%, $P < 0.05$) and between the IDO-DC cells and DC cells(7.5% : 3.1%, $P < 0.05$). **Conclusion** Our results suggest that the DC cells transfected with IDO gene can induce the proliferation of Treg cell in vitro, which will be of benefit to the research of cancer immune tolerance.

Key words: indoleamine-2,3-dioxygenase; dendritic cells; lung neoplasms; immune tolerance; regulatory T cell

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是 T 细胞中的一个亚群,极少量的 Treg 细胞便可以通过与 T 细胞直接接触的方式或产生某些抑制性细胞因子来抑制 T 细胞增殖、T 细胞功能、甚至诱导 T 细胞凋亡,进而产生强烈的免疫抑制。研究表明,这种抑制作用与恶性肿瘤的转移关系密切。淋巴结作为人体免疫器官,是多种恶性肿瘤转移的重要发生部位,是导致癌症患者预后差的重要因素。前期研究中发现吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)(+)树突状细胞(dendritic cells, DC)在发生或未发生的肺癌引流淋巴结中出现,猜测可能与肺癌的淋巴结转移有密切关系。本研究应用阳离子脂质体将 IDO 基因转染到小鼠 DC 细胞,并与小鼠外周血 T 淋巴细胞混合培养,通过体外培养研究增强 IDO 在 DC 中的表达对 Treg 细胞的诱导增殖作用,阐明 IDO 在 DC 的增强表达与 Treg 细胞增殖的相互关系,为肺癌淋巴结转移机制研究提供新的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 小鼠 DC 细胞从 C57 小鼠骨髓中分离;真核表达

重组质粒 pEGFP-IDO 由暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室何贤辉教授馈赠;大肠杆菌 DH5 α 由本研究所保存,高保真 DNA Taq 聚合酶为美国 Promega 公司产品,TRIzol 试剂、RT-PCR 系统购自晶美公司,质粒抽提试剂盒为晶美公司产品,淋巴细胞分离液为挪威 NYCOMED 产品,DMEM 培养基及胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 公司产品,IL-2、DNA Ladder、G418(promega)、HRP 化学发光检测试剂购于晶美生物公司;荧光标记的抗鼠单克隆抗体 Foxp3-PE 及 CD4-PECY5 均购自晶美生物公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 DC 细胞的分离和培养 无菌条件下制备 C57 小鼠骨髓,先后用红细胞裂解液、抗鼠 CD4、CD8、B 细胞 McAb 和补体溶液,依次去除红细胞、T 细胞、B 细胞、粒细胞和单核-巨噬细胞等混杂细胞而获得纯化的 DC 细胞及其前体;在 GM-CSF 和 IL-4 协同诱导下培育,DC 前体分化发育成 DC 细胞;小鼠 DC 细胞常规培养于 RPMI-1640 完全培养液中(含 10% 胎牛血清,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL),经 0.25%

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801389);重庆市自然科学基金资助项目(2008BB5284)。[△] 通讯作者, Tel: (023)68755626; E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn。

胰蛋白酶溶液消化传代,细胞培养及转染等均在 37 °C 饱和湿度及含 5%CO₂ 的培养箱中进行。

1.2.2 慢病毒转染 构建非线性病毒穿梭质粒,筛选人全长 IDO 基因阳性克隆,并进行测序鉴定,对于测序正确的阳性克隆,与慢病毒包装质粒(lentiviral packaging plasmids)共转染 293T 细胞,在细胞中完成病毒的包装,再收集病毒液并浓缩、纯化,测定病毒滴度,用收集到的高滴度病毒感染小鼠树突状细胞,用 G418 筛选后获得稳定表达具有生物学功能 IDO 的 IDO-DC 细胞,空白对照质粒 pEGFP 转染同上,获得的细胞命名为 EGFP-DC。

1.2.3 转染的鉴定 插入片段的测序由上海申博公司完成,结果与基因库 NCBI 比对;转染后的细胞应用 RT-PCR 检测 IDO mRNA 表达情况,上游引物:5'-GCG CTG TTG GAA ATA GCT TC-3',下游引物:5'-CAG GAC GTC AAA GCA CTG AA-3',扩增片段长度为 234 bp,引物由申博公司合成;RT-PCR 及 Western blot 方法检测 IDO 基因的表达。

1.2.4 小鼠 T 细胞的分离及培养 利用小鼠淋巴细胞分离液,在无菌条件下肝素抗凝、眼眶取血,利用标准的密度梯度离心法分离获取单个核细胞,计数细胞后,用含 10% 胎牛血清 1640 培养基(Gibco)调节细胞浓度至 1×10^6 /mL,加入终浓度为 20 U/mL 的白细胞介素-2,置培养箱内培养 48 h,收集培养后的 T 细胞,分别加入 IDO-DC、EGFP-DC 或 DC 细胞(DC : T = 1 : 10),继续培养 72 h。

1.2.5 流式细胞仪(FCM)检测 上述混合细胞群继续培养 72 h 后,收集所有细胞,离心,取细胞数约 1×10^5 ,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,0.2% triton x-100 穿膜后加入荧光标记的抗体 FOXP3-PE 和 CD4-PECY5,避光孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,4 h 内上机检测,每次均设置加入小鼠 IgG1-PE、IgG1-PECY5 荧光抗体作为非特异对照,实验均重复 3 次,结果取均值。

1.2.6 统计学处理 所测数据取均值 $\bar{x} \pm s$,组间差异采用 *t* 检验,使用统计软件 SPSS13.0 对数据进行统计分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IDO 基因转染及筛选 IDO 基因质粒构建完成后与基因库比对,结果与基因库完全一致;转染并经 G418 筛选后,所得细胞均为绿色荧光表达阳性(图 1),RT-PCR 和 Western blot 检测结果表明 IDO 正常表达(图 2、3)。

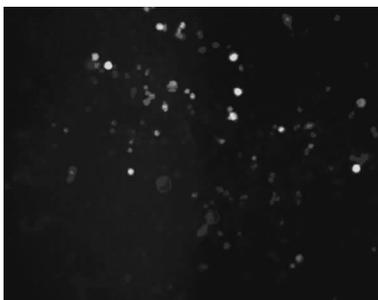
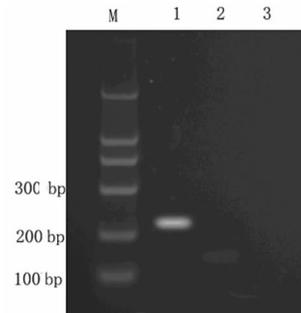


图 1 转染后 IDO 融合蛋白在 IDO-DC 细胞中的表达 (×200)

2.2 流式细胞仪(FCM)检测结果 FCM 检测结果提示与 IDO-DC 细胞联合培养的体系中,CD4(+)细胞占 T 细胞总数的 (47.4 ± 5.7)%,Foxp3(+)细胞比例为 (7.5 ± 2.5)%,而与 EGFP-DC 或 DC 细胞联合培养的体系中,CD4(+)细胞的比例分别为 (45.1 ± 7.4)% 和 (43.8 ± 8.3)%,Foxp3(+)细胞比例分别为 (3.6 ± 1.6)% 和 (3.1 ± 1.7)%,前者与后二者比较,

CD4(+)细胞比例差异无统计学意义,而 Foxp3(+)细胞比例差异有统计学意义(*t* = 4.51, *P* < 0.05; *t* = 3.43, *P* < 0.05)。



M:Marker;1:IDO-DC 细胞;2:EGFP-DC 细胞;3:DC 细胞。

图 2 RT-PCR 检测 IDO 基因的表达

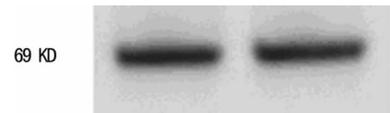


图 3 Western blot 检测 IDO 蛋白在 IDO-DC 细胞中的表达

3 讨 论

免疫耐受是肿瘤形成的重要机制,同时也是肿瘤免疫治疗效果不佳的最主要原因之一,在免疫耐受的微环境中,机体免疫系统无法对肿瘤细胞进行有效地识别和杀伤。目前认为,肿瘤细胞诱导的外周免疫耐受形成机制主要包括肿瘤抗原缺失、抗原提呈细胞的抗原识别、加工、提呈障碍以及某些细胞因子如转化生长因子-β(TGF-β)等介导的 T 细胞增殖受阻或功能抑制等^[1-3]。最近研究发现,Treg 细胞是导致肿瘤细胞免疫耐受的一个关键因素^[4-5],Treg 细胞是 T 细胞中一个独特的亚群,这种细胞可以以抗原非特异性的方式、通过细胞间的直接接触来抑制效应 T 细胞的功能,从而减弱甚至消除免疫反应的效果,由于 Treg 细胞在肿瘤局部免疫耐受的维持和形成中具有重要地位,所以,该细胞亚群一经发现便在肿瘤免疫耐受研究中受到极大的重视。DC 细胞是人体内迄今为止所发现的功能最强大的抗原递呈细胞,在肿瘤免疫中具有重要的地位,它通过识别提取抗原并向 T 细胞递呈来引导抗肿瘤免疫反应的发生。最近研究发现,DC 细胞可以通过增强 IDO 基因的表达来诱导局部的免疫耐受,从而导致肿瘤的侵袭和转移。

人类 IDO 基因位点位于第 8 号染色体上,为单拷贝基因,编码的 IDO 分子量约 42 kD,由 403 个氨基酸组成,主要在胞质中发挥作用,人体内调控 IDO 表达主要为 IFN-γ 等一些细胞因子,研究表明,IDO 可以通过调节色氨酸的代谢来诱导局部的免疫耐受微环境^[6-8]。最近有研究表明部分患者 DC 细胞内可以检测到 IDO 表达明显增强,同时伴有局部的免疫耐受,在肿瘤引流淋巴结中,多个研究发现有 IDO(+)DC 的存在,而无论是否已经发生转移。Fallarino 等^[9]在鼠肿瘤引流淋巴结中检测到 IDO 在浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid DC)内表达明显增强;Orabona 等^[10]在小鼠脾脏内发现 IDO 在 DC 内高表达,且 IRF-8 是维持 IDO 表达和功能的主要调控因子;国内有研究者研究结肠癌区域淋巴结转移时也发现,在一些尚未发现肿瘤转移的前哨淋巴结中,检测到 IDO(+)DC 明显增多,但在更远的淋巴结中却没有发现此现象^[11],这些现象提示 IDO(+)DC 有可能是造成肿瘤引流淋巴结发生转移的一个重要原因,但是,IDO(+)DC 是否可以诱导(下转第 1981 页)

- diation dosage reduction and image quality [J]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr*, 1995, 163(2):383-389.
- [5] Gies M, Kalender WA, Wolf H, et al. Dose reduction in CT by anatomically adapted tube current modulation. I. Simulation studies [J]. *Med Phys*, 1999, 26(6): 2235-2239.
- [6] Westerman BR. Radiation dose from Toshiba CT scanners [J]. *Pediatr Radiol*, 2002, 32(2): 735-740.
- [7] Peng Y, Li J, Ma D, et al. Use of automatic tube current modulation with a standardized noise index in young children undergoing chest computed tomography scans with 64-slice multidetector computed tomography [J]. *Acta Radiol*, 2009, 50(10): 1175-1179.
- [8] Lehmann KJ, Wild J, Georgi M. Clinical use of software-controlled X-ray tube modulation with "Smart-Scan" in spiral CT [J]. *Aktuelle Radiol*, 1997, 7(1): 156-161.
- [9] Mulkens TH, Bellinck P, Baeyaert M, et al. Use of an automatic exposure control mechanism for dose optimization in multi-detector row CT examinations: clinical evaluation [J]. *Radiology*, 2005, 237(1): 213-218.
- [10] Rizzo S, Kalra M, Schmidt B, et al. Comparison of angular and combined automatic tube current modulation techniques with constant tube current CT of the abdomen and pelvis [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2006, 186(3): 673-680.
- [11] Russell MT, Fink JR, Rebeles F, et al. Balancing radiation dose and image quality: clinical applications of neck volume CT [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2008, 29(4): 727-732.
- [12] Lee EJ, Lee SK, Agid R, et al. Comparison of image quality and radiation dose between fixed tube current and combined automatic tube current modulation in craniocervical CT angiography [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009, 30(9): 1754-1759.
- [13] Matsubara K, Koshida K, Suzuki M, et al. Comparison between 3-D and z-axis automatic tube current modulation technique in multidetector-row CT [J]. *Radiat Prot Dosimetry*, 2008, 128(1): 106-110.
- [14] Matsubara K, Takata T, Koshida K, et al. Chest CT performed with 3D and z-axis automatic tube current modulation technique: breast and effective doses [J]. *Acad Radiol*, 2009, 16(4): 450-458.
- [15] Kalra MK, Maher MM, Kamath RS, et al. Sixteen detector-row CT of abdomen and pelvis: study for optimization of z-axis modulation technique performed in 153 patients [J]. *Radiology*, 2004, 233(1): 241-246.
- [16] Toth T, Ge Z, Daly MP. The influence of patient centering on CT dose and image noise [J]. *Med Phys*, 2007, 34(7): 3093-3098.

(收稿日期: 2010-11-14 修回日期: 2011-02-02)

(上接第 1978 页)

Treg 细胞的增殖从而诱导局部的免疫耐受微环境尚不清楚。

本研究通过将含有人全长 IDO 基因通过慢病毒系统转染到小鼠 DC 细胞, 得到具有正常 IDO 基因生物学功能的 DC 细胞, 再与小鼠 T 淋巴细胞共培养, 通过流式细胞仪检测, 结果表明 Treg 细胞增殖明显, 与亲本细胞和空质粒转染细胞对照组比较, 差异有统计学意义, 表明 IDO(+)DC 细胞在体外可以诱导 Treg 细胞的增殖, 为恶性肿瘤局部 Treg 细胞的产生和肿瘤淋巴转移机制的研究提供了新的实验依据, 同时也为恶性肿瘤患者的免疫干预研究提供了新的思路。但是, IDO(+)DC 细胞是通过哪种信号通路诱导了 Treg 细胞的增殖尚不明确, 本课题组正在进一步研究之中。

参考文献:

- [1] Theresa LW. Immune responses to malignancies [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(2): S272-S283.
- [2] Gajewski TF, Meng Y, Harlin H, et al. Immune suppression in the tumor microenvironment [J]. *J Immunother*, 2006, 29(3): 233-240.
- [3] Soldano F, Theresa LW. Tumor microenvironment and immune escape [J]. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 2007, 16(4): 755-774.
- [4] Nizar S, Meyer B, Galustian C, et al. T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1806(1): 7-17.
- [5] Dimitrios M, Aniruddha C, Alvaro L, et al. Regulatory T cells in cancer [J]. *Advances in Cancer Research*, 2010, 107(3): 57-117.
- [6] Maria Z, Anastasios EG, Vaios K. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. *Immunology Letters*, 2007, 111(2): 69-75.
- [7] Chung DJ, Rossi M, Romano E, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells [J]. *Blood*, 2009, 114(3): 555-563.
- [8] Chen W, Liang X, Peterson AJ, et al. The indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation [J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5396-5404.
- [9] Fallarino F, Vacca C, Orabona C, et al. Functional expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase by murine CD8 α + dendritic cells [J]. *Int Immunol*, 2002, 14(1): 65-68.
- [10] Orabona C, Puccetti P, Vacca C, et al. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells [J]. *Blood*, 2006, 107(1): 2846-2854.
- [11] 高艳芳, 彭瑞清, 伍小军, 等. 吡啶胺-2, 3-双加氧酶在结肠癌及其区域淋巴结中的表达与临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(14): 811-814.

(收稿日期: 2010-12-13 修回日期: 2011-04-15)