

· 论 著 ·

# 丁酸钠通过下调细胞干扰素调节因子-1 抑制鼻咽癌细胞 CNE2 吲哚胺-吡咯 2,3-双加氧酶的表达\*

郭芝刚<sup>1</sup>, 曾 军<sup>1</sup>, 张锦宏<sup>2</sup>, 何玉文<sup>2△</sup>

(广州医学院:1. 基础学院;2. 第一附属医院药剂科 510120)

**摘要:**目的 研究丁酸钠(NaB)抑制鼻咽癌细胞 CNE2 吲哚胺-吡咯 2,3-双加氧酶(IDO)表达从而解除肿瘤免疫耐受的分子机制。方法 体外培养人鼻咽癌上皮细胞 CNE2,采用 NaB 和(或)IFN- $\gamma$  处理 CNE2 细胞;免疫印迹检测 CNE2 细胞 IDO 的表达情况;RT-PCR 检测 JAK/STAT 的细胞因子信号抑制因子 1(SOCS1)和 SOCS3 的转录水平;Real time PCR 检测 CNE2 细胞干扰素调节因子-1(IRF-1)的转录情况。结果 在 NaB 作用下,CNE2 细胞内 IDO 的表达减少,并且 IFN- $\gamma$  诱导的 IDO 表达也被显著抑制;SOCS1 和 SOCS3 的转录水平未见改变;而 IFN- $\gamma$  诱导的 IRF1 转录受到 NaB 的显著抑制。结论 NaB 抑制 IFN- $\gamma$  诱导的 IDO 表达,不是通过增加 SOCS1 和 SOCS3 的转录,而可能是通过下调 IRF-1,抑制 IFN- $\gamma$  诱导的 IDO 表达。

**关键词:**鼻咽肿瘤;羟丁酸盐类;吲哚胺-吡咯 2,3-双加氧酶;干扰素调节因子-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)08-0850-03

## Sodium butyrate inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase expression via down regulating interferon regulatory factor-1\*

Guo Zhigang, Zeng Jun, Zhang Jinhong, He Yuwen<sup>△</sup>

(1. School of Foundation Studies; 2. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

**Abstract: Objective** To study the molecular mechanism of sodium butyrate(NaB) inhibiting CNE2 indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO) expression in nasopharyngeal carcinoma cell line for unlocking cancer cell immune tolerance. **Methods** Human nasopharyngeal carcinoma epithelial cells CNE2 were cultured *in vitro* and treated with NaB in the presence or absence of IFN- $\gamma$ . IDO expression, JAK/STAT-SOCS1 and SOCS3 transcription of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in CNE2 cells were detected by Western blot, RT-PCR and real-time PCR, respectively. **Results** NaB and/or IFN- $\gamma$  inhibited IDO expression induced by IFN- $\gamma$  in CNE2 cells, while transcription of SOCS1 and SOCS3 remained stable. Moreover, NaB significantly inhibited IFN- $\gamma$ -induced IRF-1 transcription. **Conclusion** NaB inhibiting IFN- $\gamma$ -induced IDO expression is not by increasing SOCS1 and SOCS3 transcription, but through down-regulation of IRF-1 transcription.

**Key words:** nasopharyngeal neoplasms; sodium oxybate; indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase; interferon regulatory factor-1

研究表明,吲哚胺-吡咯 2,3-双加氧酶(indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase, IDO)在肿瘤逃避免疫监视、肿瘤发生、发展中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。多种人肿瘤细胞和原发性肿瘤组织表达 IDO,其抑制抗原特异性 T 淋巴细胞的增生,使肿瘤逃避免疫攻击<sup>[3-4]</sup>。研究发现,抑制 IDO 表达可以抑制自发性肿瘤的生长<sup>[5]</sup>,丁酸钠(sodium butyrate, NaB)也能抑制 IDO 的表达,但机制不明确。本研究主要探讨 NaB 抑制鼻咽癌细胞 CNE2 内 IDO 表达的分子机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** CNE2 细胞株为人鼻咽癌上皮细胞,由中山大学肿瘤医院基础部赠送。

**1.1.2 试剂** 试剂 Soudim butyrate, 购自 Sigma 公司;注射用重组人干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),海雷泰,国药准字 S19990059;兔抗 IDO 抗体(中山大学微生物与生化制药研究室制作); $\beta$ -肌动蛋白抗体( $\beta$ -actin)购自北京博奥森生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自 Promega 公司;SYBR Green PCR 检测试剂盒购自 Toyobo 公司;RPMI-1640 培养基粉末购自美国 Gibco 公司;新生牛血清购自北京晨曦勇创公司。

**1.2 细胞培养** CNE2 细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,以每孔  $3 \times 10^5$  个接种

6 孔板,待细胞覆盖率达 60%~70%,加入 NaB 和(或)IFN- $\gamma$  处理细胞。

**1.3 Western blot 免疫印迹检测 IDO 的表达** 取上述培养的细胞,加入 2 mmol/L NaB 处理 CNE2 细胞 0、6、12、24 h 后,加入 100 U/mL IFN- $\gamma$  刺激 24 h 后裂解细胞,进行蛋白定量,每孔 20  $\mu$ g 蛋白上样,120 V 电压进行 10% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,在 100 V,90 min 的条件下电转,5% 脱脂奶粉(TBST 配制)封闭 1.5 h 后,IDO 抗体按 1:1 000 的比例与封闭液混合,4  $^{\circ}$ C 过夜孵育电转膜, TBST 洗涤 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000),室温摇床振荡 1 h, TBST 洗涤 3 次,加入 ECL 发光液后用 X 光片曝光。

**1.4 RT-PCR 检测细胞因子信号抑制因子(suppress of cytokine signaling, SOCS)的转录** 采用 2 mmol/L NaB 和 100 U/mL IFN- $\gamma$  同时处理 CNE2 细胞 6 h, Trizol 抽提总 RNA;42  $^{\circ}$ C 60 min,95  $^{\circ}$ C 5 min 进行逆转录;以逆转录的 cDNA 为模板,94  $^{\circ}$ C 变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, SOCS1 44  $^{\circ}$ C、SOCS3 51  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,终止反应,进行 PCR 反应(表 1)。

**1.5 Real time PCR 检测干扰素调节因子-1(interferon regulatory factor-1, IRF-1)的转录水平** 取 2 mmol/L NaB,100 U/mL IFN- $\gamma$  单独或同时处理 CNE2 细胞 6 h 后, Trizol 抽提总

\* 基金项目:广东省药学会基金资助项目(2011A12);广州市教育局课题资助项目(10A274);广州医学院基金资助项目(110508);广州医学院青年基金资助项目(098603)。作者简介:郭芝刚(1976~),讲师,博士,主要从事肿瘤的侵袭与转移的研究。△ 通讯作者, Tel:(020) 83062528; E-mail: heyuwen82@126.com。

RNA;42 ℃ 60 min,95 ℃ 5 min 进行逆转录;用 25 μL 标准 PCR 反应体系检测 IRF-1 的转录,25 μL 标准 PCR 反应体系:2×SYBR Green 12.5 μL,PCR Forward Primer(10 μmol/L) 1 μL,PCR Reverse Primer(10 μmol/L)1 μL,DNA 模板 1~5 μL,加 H<sub>2</sub>O 到 25 μL。采用两步法进行 Real time PCR 反应:步骤 1:95 ℃ 30 s,步骤 2:95 ℃ 5 10 s,60 ℃ 40 s 40 个循环,反应结束后分析 Real time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。IRF-1 引物 F:ATG GCT GGG ACA TCA ACA AGG, R:CAT GGC ACA GCG AAA GTT GG。

表 1 检测 SOCS1 和 SOCS3 转录的引物

转录基因	寡核苷酸序列(5'-3')	产物大小 (bp)
SOCS1	F:AGG GAG CGG ATG GGT GTA G	300 bp
	R:GAG GTA GGA GGT GCG AGT TCA G	
SOCS3	F:TCT ACT CTG TGC CTC CTG ACT ATG	580 bp
	R:GTA TGT GGC TTT CCT ATG CTG G	
β-actin	F:CAA TGA GCT GCG TGT GGC TCC C	540 bp
	R:ATA CCC CTC GTA GAT AAA CAC A	

2 结 果

Western blot 和 RT-PCR 检测 NaB 对 CNE2 细胞 IDO、SOCS1、SOCS3 转录的影响(图 1~3)。结果显示 SOCS1 和 SOCS3 的转录没有显著变化。提示两者未参与 NaB 抑制 IDO 表达的信号传导。NaB 抑制 IRF-1 的转录,间接影响 IDO 的表达,见图 4。

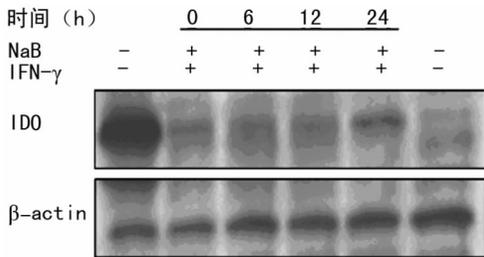


图 1 Western-blot 检测结果 NaB 对 CNE2 细胞 IDO 表达的影响

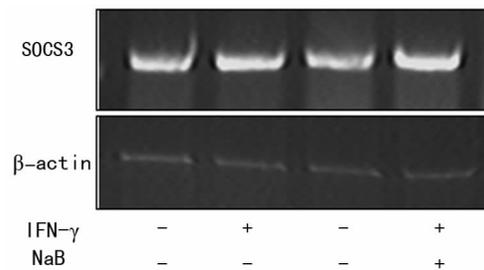


图 2 RT-PCR 检测 NaB 及 IFN-γ 对 CNE2 细胞内 SOCS1 转录的影响

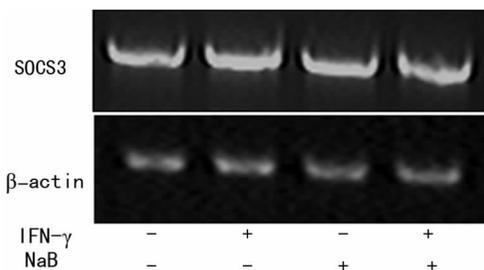


图 3 RT-PCR 检测 NaB 及 IFN-γ 对 CNE2 细胞内 SOCS3 转录的影响

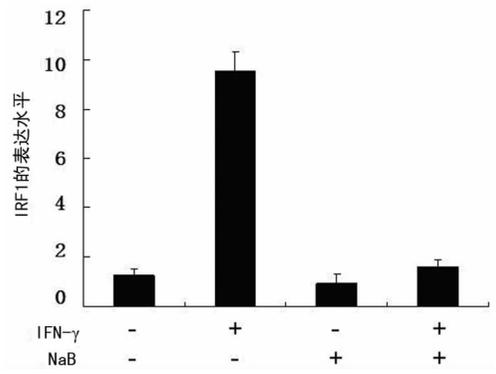


图 4 Real time PCR 检测 NaB 及 IFN-γ 对 CNE2 细胞内 IRF1 转录的影响

3 讨 论

NaB 是由厌氧菌分解发酵结肠中未经小肠消化的食物中的糖类(主要是纤维和蛋白)产生的,是结肠上皮细胞主要的能量来源,能刺激结肠肽或生长因子的释放,调节结肠黏膜血供,促进上皮细胞的增殖<sup>[6]</sup>。近来发现 NaB 能有效抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化、促进凋亡的作用。NaB 通过抑制组蛋白去乙酰化酶活性,导致组蛋白(非 H<sub>1</sub> 组蛋白 H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub>)高乙酰化,使组蛋白与相邻 DNA 的接触受抑制,改变了染色质的紧密结合,有利于转录因子激活特异性的基因,细胞分裂周期被阻滞于 G<sub>1</sub> 期,而达到 NaB 抗肿瘤的作用<sup>[7-8]</sup>。本研究发现 NaB 抑制 IFN-γ 诱导的 IDO 的表达。

IFN-γ 调节基因的转录主要是通过 Jak-STAT 信号通路,其中有 50 多种细胞调节因子参与<sup>[9-10]</sup>。在 IFN-γ 未结合其受体时,IFN-γ R1 和 IFN-γ R2 可能没有密切的联系。然而,最近研究发现在配体结合之前,IFN-γR1 和 IFN-γ R2 是装配好的。当 IFN-γ 与其受体结合后,受体的胞内区开放,Jak2 自身磷酸化,然后磷酸化激活 Jak1,两个 Jak1 可以形成一个招募 STAT1 同源二聚体的槽,STAT1 二聚体接着被 Jak2 磷酸化,磷酸化后的 STAT1 二聚体从受体上脱离下来。IFN-γ 激活其受体到 STAT1 二聚体从受体上脱离这一过程只需要 1 min 就完成了。STAT1 二聚体进入核内结合启动子,诱导或抑制 IFN-γ 调节的基因。STAT1 结合的元件有 GAS 和 ISRE。IFN-γ 诱导的第一批基因转录发生在 15~30 min 之内。许多 IFN-γ 诱导基因是细胞内的转录因子,它们由 IFN-γ 诱导转录,接着调节下一批基因的转录<sup>[11-12]</sup>。

细胞因子是一类由细胞分泌的调节细胞生长、分化、增殖的多肽小分子,它们不能直接进入细胞内发挥作用,而是通过细胞因子受体介导,经相应信号传导途径发挥其生物学效应。SOCS 是信号传导通路 JAK/STAT(Janus kinase/signal transduction and activators of transcription)的一个负性调控分子家族。SOCS 家族有 8 个成员,每个成员都有一个中央 SH2 域,除了通常的蛋白质降解的泛素化机制,SOCS1 和 SOCS3 能直接抑制 JAK 的酪氨酸激酶活性。

干扰素调节因子-1(IRF-1)是 IFN-γ 调节 IDO 表达通路上的关键因子,IRF-1 通过 IRF-E 位调节靶基因的表达,IRF-E 位的序列重叠于 ISR-E 的序列,此序列被 ISGF3 识别,其被 I 型、II 型 IFN-γ 诱导<sup>[13]</sup>。在本研究采用 Real time-PCR 检测了 NaB 和(或)IFN-γ 作用下 IRF-1 的转录水平,发现 IFN-γ 作用下 IRF-1 的转录水平显著增高,而 NaB 有效阻断了 IRF-1 的转录,结果提示 NaB 对 IFN-γ 调节 IDO 表达抑制,可能是通过抑制 IFN-γ 的下游信号通路来实现的。

本研究证明了 NaB 通过抑制 IRF-1 的转录,从而抑制

IDO 表达的细胞内信号通路,为其在鼻咽癌治疗的应用中提供了实验依据,为以 IDO 为靶点的鼻咽癌的免疫治疗提供一种新的策略。

#### 参考文献:

- [1] 张文颖. IDO、树突状细胞与免疫耐受[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(6): 364-367.
- [2] 王慧, 潘科, 夏建川. IDO 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在肿瘤免疫逃逸中相互作用的研究进展[J]. 癌症, 2009, 28(2): 221-224.
- [3] Uyttenhove C, Pilote L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. Nat Med, 2003, 9(10): 1269-1274.
- [4] Munn DH. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(2): 220-225.
- [5] Zeng J, Cai S, Yi Y, et al. Prevention of spontaneous tumor development in a ret transgenic mouse model by ret peptide vaccination with indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitor 1-methyl tryptophan[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3963-3970.
- [6] Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, et al. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation[J]. Proc Nutr Soc, 2003, 62(1): 101-106.
- [7] Budillon A, Di Gennaro E, Bruzzese F, et al. Histone deacetylase inhibitors; a new wave of molecular targeted anticancer agents[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2007, 2(2): 119-134.

- [8] Bi G, Jiang G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(4): 285-290.
- [9] Choi WH, Ji KA, Jeon SB, et al. Anti-inflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of interferon-gamma-induced JAK/STAT phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(1): 125-131.
- [10] David M, Petricoin E, Lerner AC. Activation of protein kinase a inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 4585-4598.
- [11] Heim MH, Kerr IM, Stark GR, et al. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the JAK-STAT pathway[J]. Science, 1995, 267(5202): 1347-1349.
- [12] Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, et al. STAT recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process[J]. Immunity, 1995, 2(6): 677-687.
- [13] Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(8): 4531-4538.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2012-12-28)

(上接第 849 页)

- [3] Langlands K, Down GA, Kealey T. Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(21): 5929-5933.
- [4] Jang TJ, Jung KH, Choi EA. Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 118(6): 1356-1363.
- [5] Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, et al. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(15): 5703-5706.
- [6] Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, et al. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma[J]. Cancer Lett, 2001, 165(2): 185-193.
- [7] Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, et al. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2044-2051.
- [8] Maw MK, Fujimoto J, Tamaya T. Expression of the inhibitor of DNA-binding (id)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers [J]. Br J Cancer, 2008, 99(10): 1557-1563.
- [9] Wilson JW, Deed RW, Inoue T, et al. Expression of Id el-

ix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8803-8810.

- [10] 曾达武, 方明霞, 刘豫瑞. RNA 干扰分化抑制因子-1 基因表达对食管鳞状细胞癌增殖与凋亡的影响[J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(6): 447-461.
- [11] Li W, Zhang CH, Hong YL, et al. Inhibitor of DNA-binding-1/inhibitor of differentiation-1 (ID-1) is implicated in various aspects of gastric cancer cell biology[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3): 3009-3015.
- [12] Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(8): 603-614.
- [13] Hua H, Sarvetnick N. Expression of Id1 in adult, regenerating and developing pancreas [J]. Endocrine, 2007, 32(3): 280-286.
- [14] Ling MT, Wang X, Ouyang XS, et al. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth[J]. Oncogene, 2002, 21(55): 8498-8509.
- [15] Nishiyama K, Takaji K, Kataoka K, et al. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis [J]. Circulation, 2005, 112(18): 2840-2850.

(收稿日期: 2012-10-21 修回日期: 2012-11-15)