

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.017

IDO 对胃癌细胞移植瘤中 E-cadherin、N-cadherin 及 IL-6 水平的影响

Effects of IDO on level of E-cadherin, N-cadherin and IL-6 in gastric cancer bearing mice

李建稳, 王改, 申慧琴, 刘小丽, 武希润, 李哲萍, 康贵云, 王琦(山西医科大学第二医院 消化内科, 山西 太原市 030001)

[摘要] **目的:**检测转染吡啶胺 2,3-双加氧酶(IDO)的 MFC 胃癌细胞移植瘤中 E-cadherin、N-cadherin 及 IL-6 的表达水平。**方法:**建立 MFC 胃癌细胞移植瘤模型,分为 MFC 胃癌细胞组、pcDNA3.1-MFC 细胞(空质粒)组、pcDNA3.1-IDO-MFC 细胞组,免疫组化方法检测 3 组的 E-cadherin 和 N-cadherin 表达情况,酶联免疫吸附试验检测 3 组荷瘤小鼠血清中 IL-6 的表达水平。**结果:**pcDNA3.1-IDO-MFC 组移植瘤组织中,E-cadherin 的表达较空质粒组和 MFC 细胞组明显减少($P < 0.05$),N-cadherin 的表达较其他两组明显增多($P < 0.05$)。pcDNA3.1-IDO-MFC 细胞组荷瘤小鼠血清 IL-6 水平较其他两组明显增高($P < 0.05$)。**结论:**IDO 转染导致胃癌细胞移植瘤中 E-cadherin 水平下调、N-cadherin 和 IL-6 水平上调,该结果为 IDO 参与肿瘤细胞的侵袭和转移提供实验依据。

[关键词] 胃癌;E-cadherin;N-cadherin;IL-6;吡啶胺 2,3-双加氧酶;上皮-间质转换

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)03-0334-03

恶性肿瘤能在人体内发生、发展,免疫逃逸是原因之一,其次是肿瘤的侵袭和转移能力。研究^[1-2]已经证明,吡啶胺 2,3-双加氧酶(IDO)可以诱导肿瘤免疫逃逸,参与了肿瘤的侵袭和转移,但其机制仍然不清楚。一般认为,细胞黏附分子在肿瘤的发生、浸润和转移中起了重要作用^[3]。

E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)及 N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-cad)是细胞黏附分子的重要代表。E-cad 主要分布于上皮组织中,对于维持上皮细胞形态结构的完整性及极性起重要作用,其表达下调,细胞间黏附力减弱,促进肿瘤的侵袭和转移;N-cad 一般表达于间充质细胞,在上皮细胞中很少表达,其表达上调可增强癌细胞的能动性及侵袭表型^[4]。IL-6 作为一种多功能的炎症细胞因子,在肿瘤的发生发展中起着重要作用。本实验以 MFC 胃癌细胞移植瘤小鼠为研究对象,检测 IDO 转染对移植瘤组织中 E-cad、N-cad 和荷瘤小鼠血清中 IL-6 水平的影响,为探讨 IDO 参与肿瘤侵袭转移的机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清购自杭州四季青, RPMI1640 培养基及胰蛋白酶购自 Hyclone, Anti-E-cadherin 及 Anti-N-cadherin 购自北京博奥森公司,免疫组化试剂盒购自北京康为世纪, pcDNA3.1(+)购自上海生博生物科技, pcDNA3.1-IDO 质粒由日本 Osamu Takika-

wa 教授惠赠, G418 购自 Invitrogen 公司, lipofectamine™2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司, 小鼠 IL-6 试剂盒购自达科为生物技术。

1.2 动物和细胞株

615 小鼠 24 只, 雌雄各半, 鼠龄 6~7 周, 由中国医学科学院血液学研究所实验动物中心提供[许可证号: SCXK(津)2009-0002], 在 SPF 环境中饲养。小鼠胃癌细胞株 MFC 购于中国科学院上海生命科学研究院, pcDNA3.1-IDO-MFC 细胞、pcDNA3.1-MFC 细胞由本课题组转染并经 PCR 及 Western blotting 证实 IDO 蛋白稳定表达^[5], 细胞株在 37℃, 5% 的 CO₂ 饱和湿度的温箱中培养。

1.3 MFC 胃癌细胞移植性肿瘤小鼠模型的制作及实验分组

24 只小鼠随机分为 3 组, 8 只/组, 分别是(1) MFC 胃癌细胞组; (2) pcDNA3.1-MFC 细胞组; (3) pcDNA3.1-IDO-MFC 细胞组。每组均取约 0.2 ml 的生长旺盛、形态良好、密度为 1×10^7 个/L 的细胞悬液接种于 615 小鼠的颈部皮下组织, 注射后小鼠置于 SPF 动物房中饲养观察。注射 5 d 左右皮下可见肿瘤生长, 球状, 质稍硬、触之滑动; 7~10 d 左右

[作者简介] 李建稳(1985-), 女, 河北衡水市人, 硕士生, 主要从事胃癌的免疫治疗研究。E-mail: lijianwen1986hs@163.com

[通信作者] 王琦(Wang Qi, corresponding author), E-mail: wangqiqi72000@163.com

皮下可触及约直径 1 cm 大小肿瘤,质坚韧,触之移动,默认造模成功。

1.4 免疫组织化学染色检测移植瘤组织中 E-cad 和 N-cad 的表达水平

取下的移植瘤组织用 10% 甲醛溶液浸泡固定,约 72 h,石蜡包埋,4 μ m 连续切片后,采用免疫组化 SP 法染色,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。石蜡切片脱蜡水化;切片抗原修复;加封闭用正常羊血清工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,切片甩干;加一抗 [E-cadherin/N-cadherin(1: 150),切片置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜];洗片;加二抗(加生物素标记羊抗兔二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min);洗片;加 HRP 标记的链霉素亲和素,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,PBS 充分淋洗;DAB 显色;苏木素染色;盐酸酒精分化;中性树胶封片,晾干后显微镜下观察。其中以 PBS 代替一抗,作为空白对照,结果为阴性;用已知阳性的乳腺癌组织切片 1 张作阳性对照。

在显微镜下,E-cadherin 染色阳性以细胞膜出现黄色或者棕黄色颗粒为标准,N-cadherin 染色阳性以细胞膜或者细胞质出现棕黄色或者棕褐色颗粒为标准。每张图片随机选择 6 个 400 倍视野进行照相,运用 BI-2000 医学图像分析系统进行图像分析,以平均光密度值为量化指标。

1.5 酶联免疫吸附实验检测荷瘤小鼠血清 IL-6 水平

采集小鼠外周静脉血,室温下血液自然凝固 20 min 后,3 000 r/min 离心 10 min 获血清。IL-6 检测

操作步骤严格按 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件,符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,对测量结果采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK 检验,相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 IDO 的转染上调荷瘤小鼠血清 IL-6 水平

酶联免疫吸附实验检测结果显示,pcDNA3. 1-IDO-MFC 细胞组小鼠血清液 IL-6 水平[(13. 2 \pm 0. 591)pg/ml] 高于 MFC 细胞组[(8. 15 \pm 0. 288) pg/ml]及转染空质粒组[(8. 35 \pm 0. 264)pg/ml], (均 $P < 0.05$),结果说明,高表达 IDO 瘤细胞的移植上调了荷瘤小鼠血清的 IL-6 水平。

2.2 IDO 影响移植瘤组织中黏附分子 E-cad 和 N-cad 的表达水平

免疫组化检验结果(图 1)显示,E-cad 表达于细胞膜,呈棕黄色颗粒,N-cad 表达于细胞膜或者细胞质,呈黄色或者棕黄色颗粒。pcDNA3. 1-IDO 转染组瘤组织 E-cad 的表达显著低于 pcDNA3. 1 转染组和 MFC 未转染组[(0. 238 \pm 0. 019)vs (0. 267 \pm 0. 044),(0. 260 \pm 0. 042); $P < 0.05$]。pcDNA3. 1-IDO 转染组瘤组织 N-cad 的表达显著高于其他两组[(0. 362 \pm 0. 029)vs (0. 324 \pm 0. 072),(0. 336 \pm 0. 495), $P < 0.05$]。

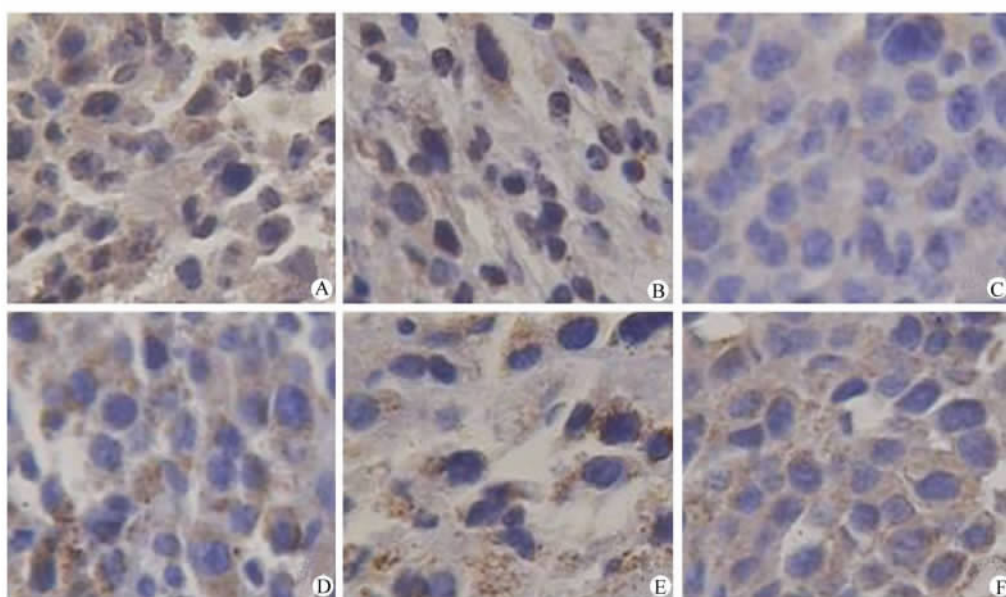


图 1 E-cad 和 N-cad 在不同组移植瘤组织中的表达($\times 400$)
 A :MFC 组-Ecad; B:转染空质粒组-Ecad; C:转染 IDO 组-Ecad;
 D:MFC 组-Ncad; E:转染空质粒组-Ncad; F:转染 IDO 组-Ncad

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,胃癌细胞的免疫逃逸和侵袭转移在肿瘤进展中起着重要作用。Munn等^[1]证明,由IDO介导的色氨酸代谢机制促进了肿瘤的免疫逃逸,具体机制可能与IDO消耗色氨酸以及产生有毒的色氨酸代谢产物如犬尿酸使T细胞功能受抑制,诱导T细胞凋亡和激活调节性T细胞(Tregs)有关。最近的研究^[2,6]发现,IDO也参与了肿瘤的侵袭和转移,推测IDO通过Tregs细胞、LIP等多种途径促进重要的细胞因子IL-10、TGF- β 、IL-6等产生,从而影响肿瘤的侵袭转移。然而,作为在肿瘤的发生及浸润转移中起了重要作用的细胞黏附分子在其中扮演何种角色值得关注。

现已证明,肿瘤侵袭转移是多基因参与多步骤完成的复杂病理过程,但肿瘤细胞黏附能力减弱和运动能力增强是其转移的首要条件^[7]。E-cad以及N-cad是粘附分子的重要代表,E-cad表达的下调及N-cad表达的上调可以导致肿瘤细胞间黏附力减弱、游走迁移能力增加,促进肿瘤的侵袭和转移^[8,9]。有研究^[10]证实,N-cad不仅促使肿瘤细胞从肿瘤组织脱离,还介导肿瘤细胞间的同质性粘附,介导肿瘤细胞与同样表达N-cad的成纤维细胞,血管内皮细胞间的异质性粘附,从而有利于肿瘤细胞获得血管的侵袭转移能力。本实验成功建立了转染IDO的胃癌细胞移植瘤模型,经检测显示,转染IDO胃癌移植瘤组织中E-cad水平明显下调,N-cad水平明显上调,实验结果表明,IDO显著影响上述两个黏附分子的表达,从而进一步证实IDO参与肿瘤的侵袭和转移可能是通过影响黏附分子而发挥作用的。

IL-6是多功能的炎症细胞因子,在正常人的血清中含量很低,但在肿瘤患者血清中含量很高。IL-6在肿瘤中具有双重作用,既可通过免疫途径抑制肿瘤的生长,也可通过抑制抗肿瘤因子及甲基化等方式促进肿瘤的生长^[11-12]。本实验中,pcDNA3.1-IDO-MFC细胞组中IL-6的水平明显高于MFC胃癌细胞组及转染空质粒组,这可能与IDO通过激活与诱导Tregs细胞的产生进而促进IL-6的产生有关。转染了IDO的MFC胃癌细胞可能通过各种机制上调IL-6、TGF- β 等因子,IL-6可能通过激活JAK/STAT3信号通路促进EMT进程,进而抑制E-cad的表达,使上皮间连接的破坏导致癌细胞间粘

附性减弱,并通过上调N-cad而获得间质特性,使得易于脱离原发灶而发生侵袭转移。关于IDO对于肿瘤细胞免疫逃逸及侵袭转移能力的影响方面尚需更多的研究,现阶段结合临床,可以把IDO抑制剂及N-cad拮抗剂联合使用,应用于控制肿瘤的侵袭和转移不失为一种有意义的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1147-1154.
- [2] Inaba T, Ino K, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 117(3): 423-428.
- [3] 张华, 项明洁, 毛顺露, 等. 三项肿瘤标志物联合检测在乳腺癌诊断中的价值 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(1): 96-98.
- [4] Luo WR, Wu AB, Fang WY, et al. Nuclear expression of N-cadherin correlates with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Histopathology*, 2012, 61(2): 237-246.
- [5] 康贵云, 申慧琴, 王琦, 等. FOLFOX4与1-D-甲基色氨酸联合治疗对荷胃癌615小鼠细胞毒性淋巴细胞的影响 [J]. *中华普通外科杂志*, 2013, 28(12): 952-955.
- [6] Huber S, Schramm C. TGF- β and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1014-1023.
- [7] 樊冬梅, 史惠蓉, 陈志敏, 等. TGF- β 1和E-cadherin在卵巢癌原发灶和转移灶组织中的表达与意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(6): 1355-1358.
- [8] Avizienyte E, Fincham VJ, Brunton VG, et al. Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal-transition [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(9): 2794-2803.
- [9] 胡钦勇, 丁涛. N-cadherin蛋白在骨肉瘤中的表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(10): 1916-1917.
- [10] 祝迎锋, 吴继锋, 马伟, 等. TGF- β 1 Snail E-cadherin及N-cadherin在胃癌中的表达及意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(24): 1403.
- [11] Tang LP, Cho CH, Hui WM, et al. An inverse correlation between Interleukin 6 and select gene promoter methylation in patients with gastric cancer [J]. *Digestion*, 2006, 74(2): 85-90.
- [12] Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, et al. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(5): 1053-1063.

[收稿日期] 2014-02-20

[修回日期] 2014-05-25

[本文编辑] 阮芳铭