

非小细胞肺癌肿瘤微环境中 IFN- γ 、TGF- β 1、IDO 表达变化及其相关性

陈琬玲^a, 朱旭^b, 师娟^a, 杜美翠^c, 李臣^a, 李永光^d, 陆晓刚^d (武警云南省总队医院 a. 肿瘤科; b. 呼吸科; c. 护理部; d. 医务处, 云南昆明 650111)

[摘要] **目的:** 探讨不同分期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)肿瘤微环境中 IFN- γ 、TGF- β 1 和吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)表达的变化及 IFN- γ 、TGF- β 1 表达与 IDO 表达的相关性。**方法:** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 6 月间昆明医科大学第一附属医院胸外科手术切除或纤维支气管镜取得的 107 例 NSCLC 患者肿瘤组织(实验组)和 19 例肺部外伤患者的正常肺组织(对照组)进入研究,实验组按 2010 年 AJCC 第七版肺癌分期标准分为 4 组:1 组, I 期患者 28 例;2 组, II 期患者 26 例;3 组, III 期患者 28 例;4 组, IV 期患者 25 例。ELISA 法检测组织中 IFN- γ 、TGF- β 1、IDO 蛋白浓度;免疫组化染色检测组织中 IDO 表达水平;分析 IFN- γ 、TGF- β 1 浓度与 IDO 浓度的相关性,分析肺癌组织中 IDO、IFN- γ 和 TGF- β 1 表达间的相关性。**结果:** 与对照组相比, I 期 NSCLC 组织中 IFN- γ 的浓度显著升高($P < 0.05$),而 III、IV 期组织中 IFN- γ 浓度显著降低($P < 0.05$),并且 IV 期浓度显著低于 III 期($P < 0.05$);IDO 浓度变化与 TGF- β 1 相似,在 I 期 NSCLC 肿瘤组织中的浓度与正常肺组织无显著差异($P > 0.05$),但在 II、III、IV 期肿瘤组织中浓度显著高于正常肺组织($P < 0.05$),且随分期升高而升高。Pearson 相关分析显示,正常组织、I 期 NSCLC 肿瘤组织中 IDO 的浓度与 IFN- γ 浓度呈正相关($r = 0.969$, $P < 0.01$; $r = 0.853$, $P < 0.01$),与 TGF- β 1 无相关性。但 II、III、IV 期肿瘤组织中 IDO 的浓度与 TGF- β 1 浓度呈正相关($r = 0.678$, $P < 0.01$; $r = 0.810$, $P < 0.01$; $r = 0.630$, $P = 0.01$),与 IFN- γ 无相关性。**结论:** 早期 NSCLC 患者免疫微环境中 IFN- γ 增高,但随着疾病进展,患者免疫力降低,IFN- γ 表达减少,IDO、TGF- β 1 表达增加,早期 IDO 表达可能与 IFN- γ 有关,而晚期则可能与 TGF- β 1 有关。

[关键词] 非小细胞肺癌;肿瘤微环境;吲哚胺 2,3-二氧酶;干扰素- γ ;转化生长因子 β 1

[中图分类号] R734.2; R730.2; R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)04-0510-05

Expression changes of IFN- γ , TGF- β 1 and IDO and their correlation in the tumor microenvironment of non-small cell lung cancer

CHEN Wanling^a, ZHU Xu^b, SHI Juan^a, DU Meicui^c, LI Chen^a, LI Yongguang^d, LU Xiaogang^d (a. Department of Oncology; b. Department of Respiratory; c. Department of Nursing; d. Medical Service, General Hospital of Armed Police Forces of Yunnan Province, Kunming 650111, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression changes of IFN- γ , TGF- β 1 and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) in tumor microenvironment of non-small cell lung cancer(NSCLC) patients at different clinical stages, as well as the correlation between IDO expression and the expressions of IFN- γ , TGF- β 1. **Methods:** 107 NSCLC tissue samples (experiment group) were obtained from patients who underwent surgical therapy or bronchoscopy biopsy at the Department of Thoracic Surgery of The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University From January 2013 to June 2015, and 19 normal lung tissues (control group) were obtained from lung injury patients. The samples of experiment group were divided into four groups according to the 7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) tumor-node-metastasis (TNM) system. Group 1: patients with stage I (28 patients), group 2: patients with stage II (26 patients), group 3: patients with stage III (28 patients) and group 4: patients with stage IV (25 patients). The protein concentrations of IFN- γ , TGF- β 1 and IDO were detected by ELISA and the IDO expression in tissues was assessed by immunohistochemis-

[基金项目] 昆明市西山区科技计划项目基金资助(No. 西科学 24 号)。Project supported by the Foundation of Science and Technology Planning Project of Xishan District of Kunming City (No. Xike 24)

[作者简介] 陈琬玲(1971-),女,重庆市大足县人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤外科学研究,E-mail:wlchmm1971@163.com

[通信作者] 陈琬玲(CHEN Wanling, corresponding author), E-mail: wlchmm1971@163.com

try. At same time, the correlations between IDO expression and IFN- γ , TGF- β 1 expression in cancer tissues were evaluated. **Results:** Compared with control group, the IFN- γ expression in tissues of group 1 was significantly elevated ($P < 0.05$), while its expressions in group 3 and group 4 were significantly decreased ($P < 0.05$). Moreover, the IFN- γ expression in tissues of group 4 was significantly less than that of group 3 ($P < 0.05$). Similar to TGF- β 1, the IDO expression in group 1 was not significantly different with control group ($P > 0.05$); but the TGF- β 1 and IDO expressions in group 2, 3 and 4 were higher than those of normal tissues ($P < 0.05$). Furthermore, The TGF- β 1 and IDO expressions increased as the tumor stage went higher. Pearson correlation analysis showed that the IDO expressions in control group and group 1 were directly correlate with IFN- γ ($r = 0.969, P < 0.01, r = 0.853, P < 0.01$), but not correlate with TGF- β 1. However, in group 2, 3 and 4, the IDO expressions were directly correlate with TGF- β 1 ($r = 0.678, P < 0.01, r = 0.810, P < 0.01, r = 0.630, P = 0.01$), but not correlate with IFN- γ . **Conclusion:** Expression of IFN- γ in immune microenvironment of NSCLC patients increased at early stage, then with the progress of the disease, the immune function of patients was weakened and the expression of IFN- γ was reduced while the expressions of IDO and TGF- β 1 were increased, indicating that IDO expression might be relate to IFN- γ at early stage of NSCLC, and relate to TGF- β 1 at late stage.

[**Key words**] non-small cell lung cancer(NSCLC); tumor microenvironment; indoleamine 2,3-dioxygenase; interferon-gamma(IFN- γ); transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1)

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 510-514. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.009]

自 20 世纪 80 年代起,肺癌已成为全球发病率最高的癌症,且发病率正逐年上升。目前认为,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 的发生、发展和转移均与肺癌原发灶和转移灶局部免疫微环境中的免疫耐受状态密切相关^[1]。近年来,色氨酸分解代谢限速酶——吲哚胺-2,3 双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)在参与形成免疫耐受微环境中的作用引起了关注^[2]。研究^[3]发现, IDO 在许多肿瘤细胞系中能被 IFN- γ 和 TGF- β 1 诱导表达。因此本研究采用 ELISA、免疫组化分析不同临床分期 NSCLC 肿瘤组织微环境中 IFN- γ 、TGF- β 1 的变化及该变化对 IDO 表达的影响,为进一步探讨 NSCLC 组织免疫微环境中 IDO 相关免疫抑制机制提供临床理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

一抗(大鼠抗人 IDO 抗体)和二抗(羊抗大鼠 IgG-HRP),均购自美国 Invitrogen 公司。人 IFN- γ ELISA 检测试剂盒、人 TGF- β 1 ELISA 检测试剂盒和人 IDO ELISA 检测试剂盒均购自中国博研生物科技有限公司,免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司。人胎盘组织取自本院同期足月分娩产妇。

1.2 病例筛选及分组

收集 2013 年 1 月至 2015 年 6 月昆明医科大学第一附属医院胸外科手术切除的或纤支镜取活检的 107 例 NSCLC 肿瘤组织(实验组)和 19 例正常肺组

织(对照组)。本研究程序遵循医学伦理学要求并获得伦理委员会批准,所有标本采集前均经患者同意并签署知情同意书。手术取组织后部分送病理检查确定诊断,部分储存于液氮罐待检。

实验组按 2010 年美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第七版肺癌分期标准^[4]分为 4 组(表 1):1 组, I 期患者 28 例; 2 组, II 期患者 26 例; 3 组, III 期患者 28 例; 4 组, IV 期患者 25 例。纳入标准:(1)病理诊断为 NSCLC; (2)年龄 18 ~ 65 岁; (3)有完整病历和随访资料。排除标准:(1)曾接受过放化疗及免疫治疗;(2)合并免疫系统疾病;(3)合并慢性消耗性疾病及传染病;(4)合并其他类型恶性肿瘤。

对照组男性 12 例、女性 7 例,年龄 21 ~ 70 岁,中位年龄 49 岁。纳入标准:(1)因肺部外伤入院需行手术的患者;(2)年龄 18 ~ 65 岁;(3)有完整病历资料。排除标准:(1)受伤超过 6 h;(2)合并免疫系统疾病;(3)合并慢性消耗性疾病及传染病;(4)合并恶性肿瘤。

1.3 ELISA 检测 NSCLC 组织中 IFN- γ 、TGF- β 1、IDO 蛋白表达水平

取适量实验组和对照组的组织,加入 10 倍组织质量的 4 °C 预冷生理盐水。迅速转入玻璃匀浆器中充分匀浆后 2 000 ~ 3 000 rpm 离心 20 min,取上清,按照试剂盒说明书操作,采用双抗体夹心法检测组织中 IFN- γ 、TGF- β 1、IDO 浓度。

1.4 免疫组化染色检测 NSCLC 组织中 IDO 的表达

取实验组和对照组的组织标本,石蜡包埋后切

片,H-E染色再次病理确诊。经脱蜡、水化后置于0.01 mol/L 枸橼酸盐(pH 6.0)中121℃高压锅内煮15 min 修复抗原。3% H₂O₂ 37℃孵育5 min,加鼠抗人IDO单克隆抗体(1:5 000)4℃孵育过夜。以胎盘组织切片作为阳性对照,阴性对照用PBS液代替一抗。滴加生物素标记二抗,DAB/H₂O₂反应染色,苏木精复染。常规脱水、透明、干燥、封片后光学显微镜下观察组织切片。

表1 实验组临床特征(n)

Tab.1 Clinical characteristics of experimental groups(n)

Clinical characteristics	I (n=28)	II (n=26)	III (n=28)	IV (n=25)
Age (t/a)				
Age Range	25-69	24-69	30-70	27-70
Median age	44	45	40	43
Gender				
Male	17	14	18	17
Female	11	12	10	8
Pathologic type				
Adenocarcinoma	23	19	22	20
Squamous carcinoma	3	5	5	3
Adenosquamous carcinoma	2	2	1	2

结果判定:使用二级计分法判定阳性细胞^[5]。在装有目镜网格测微尺的光学显微镜200倍视野下随机选取5个视野,计数500个细胞,根据阳性细胞比例及阳性着色强度,以阳性细胞数<5%、5%~

24%、25%~50%、51%~74%及≥75%,分别计为0、1、2、3、4分;每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计为0、1、2、3分;根据两项评分之和判定结果,0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~5分为中等阳性(++),6~7分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

使用IBM SPSS Statistics 19软件对结果进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数间的比较采用方差分析,若方差齐,组间多重比较采用LSD-t检验;若方差不齐,组间的多重比较采用Tamhane's T2检验。计数资料采用卡方检验。两样本相关性分析采用Pearson相关分析。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC组织中IFN-γ、TGF-β1、IDO的表达水平

ELISA检测结果(表2)显示,IFN-γ、TGF-β1、IDO浓度在各组表达有显著性差异。

IFN-γ在I期NSCLC肿瘤组织中的浓度较正常肺组织显著升高(P=0.044),但在III期、IV期显著低于正常肺组织(P=0.007,P<0.01),并且IV期浓度显著低于III期(P=0.016)。

与IFN-γ相反,TGF-β1和IDO在I期NSCLC肿瘤组织中的浓度与正常肺组织无显著性差异(P=1.000,P=0.998),但在II、III、IV期肿瘤组织中浓度显著高于正常肺组织(P<0.01),并且IV期高于III期(P<0.01),III期高于II期(P=0.026,P=0.010)。

表2 NSCLC组织中IFN-γ、TGF-β1、IDO表达水平[ρ_B/(pg·ml⁻¹)]

Tab.2 Expressions of IFN-γ, TGF-β1 and IDO in NSCLC tissues [ρ_B/(pg·ml⁻¹)]

Group	n	IFN-γ	TGF-β1	IDO
1	28	224.18 ± 85.08*	1 384.19 ± 496.45	872.83 ± 319.55
2	26	144.40 ± 77.26 [△]	2 918.91 ± 769.58* [△]	2 079.15 ± 1 079.47* [△]
3	28	88.62 ± 56.53* ^{△▲}	3 625.36 ± 872.93* ^{△▲}	3 143.88 ± 1 161.41* ^{△▲}
4	25	45.49 ± 36.01* ^{△▲▽}	7 976.39 ± 2129.48* ^{△▲▽}	4 657.53 ± 1 270.05* ^{△▲▽}
Control	19	157.85 ± 66.37	1 421.85 ± 439.16	796.29 ± 377.91

* P<0.05 vs control group; [△] P<0.05 vs group 1; [▲] P<0.05 vs group 2; [▽] P<0.05 vs group 3

2.2 NSCLC组织中IDO表达随病理分期升高
将I期和II期合并为甲组,将III期和IV期合并

为乙组;将阴性和弱阳性定义为阴性,将中等阳性和强阳性定义为阳性;则甲组中IDO阳性表达率为

31.48% (17/54), 乙组中 IDO 阳性表达率为 83.02% (44/53), 正常对照组组织中 IDO 阳性表达率为 5.26% (1/19)。其中乙组 IDO 阳性表达率显著高于甲组 ($\chi^2 = 28.98, P < 0.01$)。甲组和乙组 IDO 阳性表达率均显著高于正常对照组 ($\chi^2 = 5.20, P = 0.023; \chi^2 = 36.08, P < 0.01$)。

2.3 IFN- γ 、TGF- β 1 与 IDO 的相关性

相关性分析结果(图 1-4)显示:正常对照组、I 期 NSCLC 肿瘤组织中 IDO 的质量浓度与 IFN- γ 质量浓度呈正相关($r = 0.969, P < 0.01; r = 0.853, P < 0.01$), 与 TGF- β 1 无相关性。但 II 期($r = 0.678, P < 0.01$)、III 期($r = 0.810, P < 0.01$)、IV 期($r = 0.630, P = 0.01$)肿瘤组织中 IDO 的质量浓度与 TGF- β 1 质量浓度呈正相关, 与 IFN- γ ($r = 0.137, P = 0.514; r = -0.164, P = 0.403; r = -0.164, P = 0.403$)无相关性。

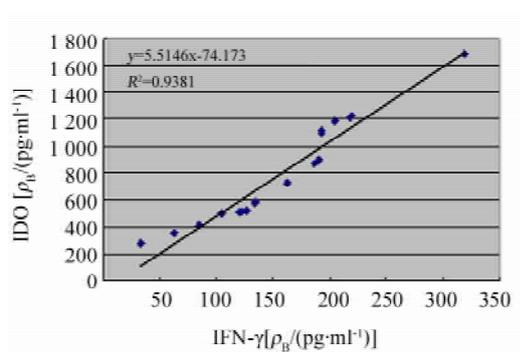


图 1 对照组 IDO 表达与 IFN- γ 呈正相关

Fig. 1 IDO expression and IFN- γ were positively correlated in control group

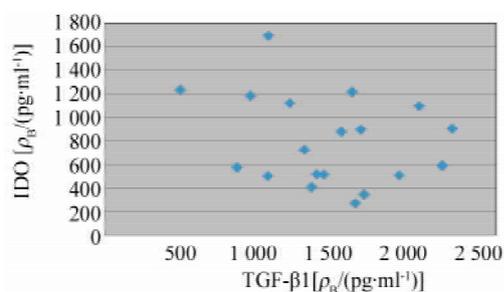


图 2 对照组 IDO 表达与 TGF- β 1 无相关性

Fig. 2 IDO expression was not associated with TGF- β 1 in control group

3 讨论

IFN- γ 具有增强巨噬细胞抗原提呈、吞噬能力

以及增强 T 细胞活性等功能^[6]。TGF- β 1 在肿瘤发生的早期可诱导凋亡和抑制细胞增殖;但在肿瘤的进展期则可抑制免疫功能、促使血管生成、诱导细胞外基质形成,从而促进肿瘤的侵袭和转移^[7]。IDO (EC1.13.11.17)是一种存在于细胞质内、能在多种细胞特别是一些涉及调节免疫反应关键步骤的细胞中表达的色氨酸代谢限速酶^[8]。目前已发现人类多种肿瘤组织可表达 IDO,其高表达预示临床预后不佳^[9]。IDO 及其产生的代谢产物均具免疫抑制能力^[10]。本研究发现,早期肺癌肿瘤微环境中 IFN- γ 有短暂升高,但随着疾病进展逐渐低于正常。而 TGF- β 1 与 IDO 在早期与正常肺组织无显著性差异 ($P > 0.05$),但随着疾病进展,其表达逐渐增高并显著高于正常组织,说明病程后期大多数患者肿瘤局部形成免疫耐受微环境。

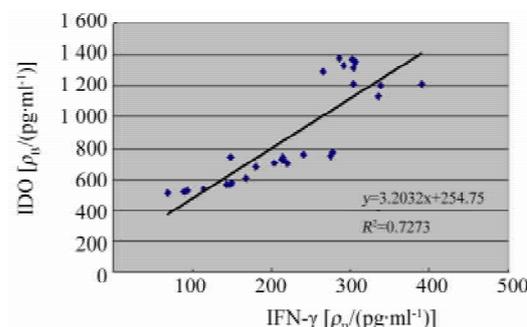


图 3 I 期肿瘤组织中 IFN- γ 与 IDO 表达呈正相关

Fig. 3 IDO expression and IFN- γ were positively correlated in the group of I stage tumor tissue

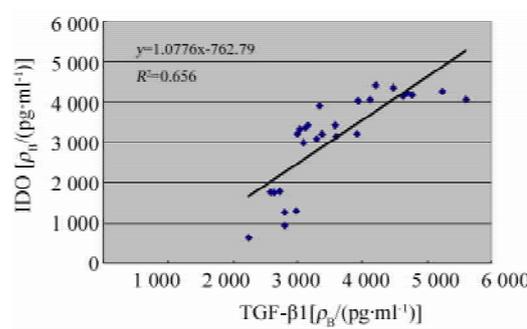


图 4 II~IV 期 3 组肿瘤组织中 TGF- β 1 与 IDO 表达呈正相关

Fig. 4 IDO expressions and TGF- β 1 were positively correlated in 3 groups of II ~ IV stage tumor tissues

研究^[11]表明,IFN- γ 和 TGF β 可在转录水平对 IDO 基因进行调节。本研究对不同分期 NSCLC 癌组织中 IDO 表达与 IFN- γ 和 TGF- β 1 表达进行相关性分析发现,在疾病早期 IDO 表达与 IFN- γ 表达呈

正相关,但在中晚期则与 TGF- β 1 表达呈正相关。这可能与肿瘤组织中 DC 有关,DC 可利用 IDO 根据微环境中细胞因子变化来诱导不同的免疫抑制机制,当微环境中细胞因子主要是 IFN- γ 时,IFN- γ 诱导 DC 表达 IDO 引起强烈但却短暂的色氨酸消耗机制来抑制机体天然免疫反应或炎性免疫反应。当微环境中细胞因子主要是 TGF- β 1 时,TGF- β 1 则诱导 DC 表达 IDO 导致机体长期、稳定的免疫抑制^[3]。其机制可能是色氨酸代谢导致色氨酸水平降低、色氨酸代谢产物水平增高,引起 T 细胞抑制或死亡^[12]。此外,IDO 诱导具有免疫抑制功能的 Tregs 增殖,进一步形成肿瘤局部长期稳定的免疫耐受^[13]。

因此,本研究结果提示,在 NSCLC 在病程不同时期 IDO 表达可能由不同因子诱导。早期 NSCLC 微环境中 IFN- γ 可能是 IDO 表达的主要诱导因子之一,但后期可能主要由 TGF- β 1 诱导。TGF- β 1、IDO 共同参与 NSCLC 微环境中免疫耐受形成,其中 TGF- β 1 诱导 IDO 表达可能是引起 NSCLC 免疫抑制的重要通路。

[参考文献]

- [1] KOYAMA S, AKBAY E A, LI Y Y, et al. STK11/LKB1 deficiency promotes neutrophil recruitment and proinflammatory cytokine production to suppress T-cell activity in the lung tumor microenvironment [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 999-1008. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [2] JIANG T, SUN Y, YIN Z, et al. Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(2): 185-201. DOI: 10.4155/fmc.14.151.
- [3] PALLOTTA M T, ORABONA C, VOLPI C, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(9): 870-880. DOI: 10.1038/ni.2077.
- [4] 韩宝惠, 孙加源. 非小细胞肺癌新分期对临床实践的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(3): 253-255.
- [5] 王绪常, 张振兴, 宋晓峰, 等. JAK2-STAT3 信号通路在大鼠脑出血模型中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20): 5708-5711. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.20.012.
- [6] SALAH F S, EBBINGHAUS M, MULEY V Y. Tumor suppression in mice lacking GABARAP, an Atg8/LC3 family member implicated in autophagy, is associated with alterations in cytokine secretion and cell death [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2205 [2016-02-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/27124579>. DOI: 10.1038/cddis.2016.93.
- [7] DU S, BOUQUET S, LO C H, et al. Attenuation of the DNA damage response by transforming growth factor-beta inhibitors enhances radiation sensitivity of non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 91(1): 91-99. DOI: 10.1016/j.ijrobp.
- [8] LING W, ZHANG J, YUAN Z, et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment [J] *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1576-1587. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [9] JOHNSON T S, MUNN D H. Host indoleamine 2,3-dioxygenase: contribution to systemic acquired tumor tolerance [J]. *Immunol Invest*, 2012, 41(6/7): 765-797. DOI: 10.3109/08820139.2012.689405.
- [10] HASCITHA J, PRIYA R, JAYAVELU S, et al. Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients [J/OL]. *Clin Biochem*, 2016 [2016-02-10] [Epub ahead of print]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912016300145>. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.04.008.
- [11] BASSAL N K, HUGHES B P, COSTABILE M, et al. Prostaglandin D2 is a novel repressor of IFN γ induced indoleamine-2,3-dioxygenase via the DP1 receptor and cAMP pathway [J/OL]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2016 [2016-02-10] [Epub ahead of print]. [http://www.plefa.com/article/S0952-3278\(16\)00032-6/abstract](http://www.plefa.com/article/S0952-3278(16)00032-6/abstract). DOI: 10.1016/j.plefa.2016.01.006.
- [12] SANTHANAM S, ALVARADO D M, CIORBA M A, et al. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer [J]. *Transl Res*, 2016, 167(1): 67-79. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.07.003.
- [13] CURRAN T A, JALILI R B, FARROKHI A, et al. IDO expressing fibroblasts promote the expansion of antigen specific regulatory T cells [J]. *Immunobiology*, 2013, 17(6): 201-208. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.06.008.

[收稿日期] 2016 - 02 - 29

[修回日期] 2016 - 05 - 14

[本文编辑] 黄静怡

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅