

文章编号: 1001-6325(2020)05-0615-06

吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 抑制剂 Epacadostat 联合 γ 干扰素诱导三阴乳腺癌细胞系凋亡

胡庆庆, 鲁 亮*

(浙江大学医学院附属第四医院 药剂科, 浙江 金华 322023)

摘要:目的 探讨 γ 干扰素(IFN- γ)与吲哚胺 2,3-双加氧酶 1(IDO1)抑制剂 Epacadostat(Epa)联用对三阴乳腺癌细胞系 4T1 和 MDA-MB-231 凋亡作用的影响。方法 IFN- γ 与 Epa 单独或联合处理 4T1 和 MDA-MB-231 细胞 48 h,流式细胞仪检测细胞凋亡;蛋白免疫印迹检测 IFN- γ 处理后细胞 IDO1 分子的表达;ELISA 检测培养上清中犬尿氨酸的含量;CRISPR-Cas9 法敲除 IDO1 分子,蛋白免疫印迹检测敲除效率。结果 IFN- γ 诱导三阴乳腺癌细胞系凋亡的作用较弱;IFN- γ 可显著上调三阴乳腺癌细胞系 IDO1 的表达($P<0.001$),而且细胞内 Kyn 的水平也显著上调($P<0.01$);敲除 IDO1 后 IFN- γ 对 4T1 和 MDA-MB-231 细胞的凋亡作用大大增强;IFN- γ 联用 Epa 促进了 4T1 和 MDA-MB-231 细胞的凋亡,大大延长了荷瘤小鼠的生存时间。结论 IDO1 抑制剂 Epa 可大大增强 IFN- γ 对三阴乳腺癌的治疗作用。

关键词: 三阴乳腺癌; γ 干扰素;吲哚胺 2,3-双加氧酶 1

中图分类号:R737.9 文献标志码:A

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitor Epacadostat combined with IFN- γ induces apoptosis of triple-negative breast cancer cell lines

HU Qing-qing, LU Yan*

(Department of Pharmacy, the Fourth Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Jinhua 322023, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of IFN- γ combined with IDO1 inhibitor Epacadostat(Epa) on the treatment of triple-negative breast cancer cell lines 4T1 and MDA-MB-231. **Methods** Following treatment with IFN- γ , Epa or IFN- γ combined with Epa on 4T1 and MDA-MB-231 cells for 48 h, the apoptosis of cells in each group was detected by flow cytometry. The expression of IDO1 was detected by Western blot and the yield of Kyn in 4T1 or MDA-MB-231 cell lysate was detected by ELISA. The IDO1 was knocked out by using CRISPR-Cas9 system and knockout efficiency was examined by Western blot. **Results** IFN- γ showed a weaker killing effect on triple-negative breast cancer cells; IFN- γ significantly up-regulated the expression of IDO1 in triple-negative breast cancer cell lines ($P<0.001$), and the level of Kyn in cell lysate was also significantly up-regulated ($P<0.01$); cell apoptosis of IDO1 knock-out 4T1 ($P<0.01$) or MDA-MB-231 ($P<0.01$) cells treated with IFN- γ for 48 h was also significantly increased; IFN- γ combined with IDO1 inhibitor Epa promoted the apoptosis of 4T1 and MDA-MB-231 cells, and also prolonged the survival time of tumor-bearing mice. **Conclusions** The IDO1 inhibitor Epa might significantly enhance the therapeutic effect of IFN- γ on triple-negative breast cancer.

Key words: triple-negative breast cancer; IFN- γ ; indoleamine 2,3-dioxygenase 1

收稿日期:2019-08-15 修回日期:2020-01-02

基金项目:国家自然科学基金(81502473)

* 通信作者 (corresponding author):2504159@zju.edu.cn

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指不表达雌激素受体 (estrogen receptor, *ER*)、孕酮受体 (progesterone receptor, *PR*) 和表皮生长因子 2 (human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*) 基因的一种乳腺癌亚型, 其发病率约占 15.5%, 具有转移能力强、复发率高和患者预后差等临床特点, 是目前威胁女性健康常见的恶性肿瘤之一^[1-3]。由于其细胞表面缺乏激素受体, 使得乳腺癌常规靶向疗法对 TNBC 收效甚微^[4], 目前临床治疗手段仍以传统的化疗为主。然而 TNBC 除了不表达 *ER*、*PR* 和 *HER2* 外, 往往也伴随着乳腺癌基因 (breast cancer gene, *BRCA*) 等多种基因的突变^[5-6], 导致其成为一种高度异质性的肿瘤类型, 易对化疗药物产生抗性, 进一步增加了治疗难度。

在过去几十年中肿瘤治疗方法取得了显著进步, 特别是基于嵌合抗原受体 T 细胞疗法、免疫检查点 (PD-1、PD-L1 和 CTLA-4) 抗体等新型免疫疗法^[7-8]在临床中的成功应用, 使得肿瘤的治疗进入了一个新的里程碑, 而 CD8⁺T 细胞无疑是这场对抗肿瘤的新战役中的焦点。在肿瘤微环境中, 激活的 CD8⁺T 细胞除了分泌穿孔素、颗粒酶外, 还会分泌大量的 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 来杀伤肿瘤细胞。越来越多的研究发现, IFN- γ 具有激活免疫系统、抑制血管生成和诱导肿瘤细胞周期阻滞等多种抗肿瘤作用^[9]。然而临床试验发现低剂量的 IFN- γ 抗肿瘤作用有限, 而高剂量的 IFN- γ 易引起全身性的不良反应^[10-11], 因此 IFN- γ 在肿瘤的临床治疗中应用有限。

本文将以肿瘤细胞的色氨酸代谢为突破点, 研究低剂量的 IFN- γ 联合吡哆胺 2, 3-双加氧酶 1 (indoleamine 2, 3-dioxygenase 1, IDO1) 抑制剂 Epacadostat (Epa) 对 TNBC 的治疗作用, 为将来针对 TNBC 的耐药和复发而进行的临床治疗提供新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及细胞: 40 只 SPF 级雌性 6 周龄 NOD-SCID 小鼠, 体质量 (20 \pm 2)g [浙江省实验动物中心, 许可证号: SCXK (浙) 2016-0002]。小鼠三阴乳腺癌细胞系 4T1 和人三阴乳腺癌细胞系 MBA-MD-231 (中国

医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)。

1.1.2 试剂: Epacadostat (Epa) (Selleck 公司); 重组人 IFN- γ 、重组鼠 IFN- γ (R&D 公司); RNA 反转录试剂盒 (ABI 公司); pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) 质粒 (Addgene 公司); FITC-annexin V/PI 凋亡染色试剂盒 (BD 公司); 抗人、鼠 IDO1 抗体 (CST 公司, 1:1 000 稀释)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理: 分别将 5×10^4 个 4T1 或 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔板中, 每组设 3 复孔。实验分为对照组、IFN- γ (100 ng/mL) 组、Epa (20 nmol/L) 组和联用组。作用 48 h 后, 用无 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 获得单细胞悬液, 用于细胞凋亡检测。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡: 取各组细胞, 加入 0.25% (无 EDTA) 的胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 $\times g$ 离心 5 min。弃上清, 每管加入 1 mL 冷 PBS 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 $\times g$ 离心 5 min, 清洗细胞。弃上清, 每管加入 100 μL 1 \times 偶联缓冲液重悬细胞, 然后每管分别加入 2 μL annexin V 和 PI, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。加入 400 μL 重悬细胞, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡的情况。

1.2.3 Western blot 检测 IDO1 的表达: 取各组细胞, 加入 0.25% (含 EDTA) 胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 $\times g$ 离心 5 min。弃上清, 每管加入 1 mL 冷 PBS 重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 $\times g$ 离心 5 min, 清洗细胞。加入适量 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 超声破碎仪超声 3 个循环, 充分裂解细胞。冰上裂解 20 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 20 000 $\times g$ 离心 15 min, 获得细胞总蛋白。BCA 法蛋白定量后, 取等量的总蛋白加入 1 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 8 min。经电泳、转膜和封闭后, 加入抗 IDO1 一抗 (1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次后加入二抗 (1:2 000 稀释), 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3 次后, ECL 曝光。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 IDO1 表达: 取各组细胞, 1 mL Trizol 裂解细胞, 经氯仿抽提、异丙醇沉淀和 75% 乙醇清洗总 RNA 后, 反转 mRNA 为 cDNA。Homo *GAPDH* 上游引物为 5'-GCCAGCTTCGAGAAAGAGTTG-3', 下游引物为 5'-ATCCAGAACTAGACGTGCAA-3'; Mus *IDO1* 上游引物为 5'-GCTTTGCTCTACCACATCCAC-3', 下游引物为 5'-CAGGC

GCTGTAACCTGTGT-3'。各成分按说明书配制好进行 RT-qPCR, 反应时间分别为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。利用 ABI 自带软件, 使用 Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来对 *IDO1* 的表达进行计算, 以 *GAPDH* 为内参对基因表达进行校正。

1.2.5 CRISPR-Cas9 敲除 *IDO1*: 每个基因分别设计 2 对 sgRNA (small guide RNA), 并在其 5'-端加上 CACCG 得到正向寡核苷酸序列, 同时在其互补链的 5'-端加上 AAAC 得到反向寡核苷酸序列, 分别合成正反向寡核苷酸序列 (表 1)。

表 1 *IDO1* sgRNA 序列
Table 1 Sequence of *IDO1* sgRNA

name	sequence (5'-3')
MUS <i>IDO1</i> sgRNA 1	F: CACCGACGCATACAGCCCTGGGTC R: AAACGACCCAGGGGCTGTATGCCGT
MUS <i>IDO1</i> sgRNA 2	F: CACCGTGTGGCTAGAAATCTGCCTG R: AAACCAGGCAGATTCTAGCCACA
HOMO <i>IDO1</i> sgRNA 1	F: CACCGGACAATCAGTAAAGACTAC R: AAACGTACTCTTACTGATTGTCC
HOMO <i>IDO1</i> sgRNA 2	F: CACCGTACCATATTGATGAAGAAGT R: AAACACTTCTTCATCAATATGGTA

引物合成后, 通过磷酸化、变性、退火, 得到具有 *Bbs* I 黏性末端的双链 DNA 片段。经快速连接酶的作用, 将该 DNA 片段连接到 PX458 载体质粒上。取 *Stb13* 大肠杆菌感受态细胞, 冰上解冻; 取 1 μ L 连接产物加入到 50 μ L *Stb13* 大肠杆菌感受态细胞中,

冰上孵育 30 min; 经 42 °C 热激 90 s、冰上静置 2 min 后, 将目的质粒导入到感受态细胞内。经涂板、摇菌、鉴定和质粒提取后获得浓度较高且不含内毒素的目的质粒。最后使用 Lipofectamine 3000 将目的质粒转染到细胞中, 48 h 后流式分选 GFP 强阳性的细胞, Western blot 鉴定敲除效率。

1.2.6 动物实验的分组及处理: 分为对照组、IFN- γ 组、Epa 组和联用组, 每组 10 只小鼠。1 \times 10⁶ 的 MDA-MB-231 细胞接种到 NOD-SCID 小鼠皮下, 待肿瘤生长至 5 mm \times 5 mm 左右时, 荷瘤小鼠开始给药治疗, 并每天测量肿瘤的大小。治疗组小鼠按 10 mg/kg 的剂量灌胃给予 Epa, 每 2 d 给药一次; IFN- γ 按 20 mg/kg 剂量瘤内注射给予, 2 d 给药 1 次。连续给药 10 次后, 观察荷瘤小鼠的肿瘤大小并记录各组小鼠的死亡时间。

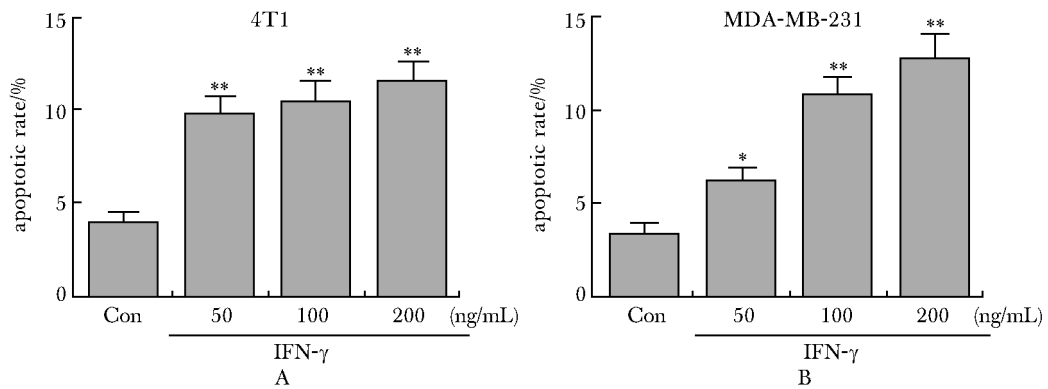
1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。实验数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组的组间比较采用单因素方差分析, 动物生存时间比较采用 Kaplan-Meier 法分析。

2 结果

2.1 IFN- γ 体外诱导三阴乳腺癌细胞凋亡

分别将 50、100 和 200 ng/mL 的 IFN- γ 作用于 4T1 和 MDA-MB-231 细胞, 48 h 后收获细胞, 流式检测细胞凋亡。结果表明 IFN- γ 诱导三阴乳腺癌细胞凋亡的作用呈剂量依赖性 (图 1)。



A. proportion of apoptotic cells of 4T1 cells treated with 50, 100 or 200 ng/mL IFN- γ ; B. proportion of apoptotic cells of MDA-MB-231 cells treated with 50, 100 or 200 ng/mL IFN- γ ; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with control group

图 1 不同剂量 IFN- γ 对 4T1 和 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用

Fig 1 Killing effect of 4T1 and MDA-MB-231 cells treated by different doses of IFN- γ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 IFN- γ 诱导三阴乳腺癌细胞上调表达 IDO1

100 ng/mL 的 IFN- γ 处理 4T1 和 MDA-MB-231 细胞 24 h 后,可在基因和蛋白水平显著上调 IDO1 的表达($P<0.001$) (图 2A, B),并且显著促进培养上清中 Kyn 的产生($P<0.01$) (图 2C)。当敲除 IDO1 后,IFN- γ 诱导 4T1 和 MDA-MB-231 的凋亡能力显著增强($P<0.01$) (图 2D)。

2.3 IFN- γ 联合 IDO1 抑制剂 Epa 诱导肿瘤细胞凋亡

与 IFN- γ 或 Epa 单药组相比,IFN- γ 联合 Epa 组可显著增强三阴乳腺癌细胞的凋亡比例。($P<0.01$) (图 3A, B)。此外,IFN- γ 联合 Epa 治疗组的肿瘤生长速度也明显低于 IFN- γ 和 Epa 单药组($P<0.01$) (图 3C),荷瘤小鼠的生存时间明显延长($P<0.01$) (图 3D)。

2.4 IFN- γ 联合 IDO1 抑制剂 Epa 显著抑制 MDA-MB-231 肿瘤的生长

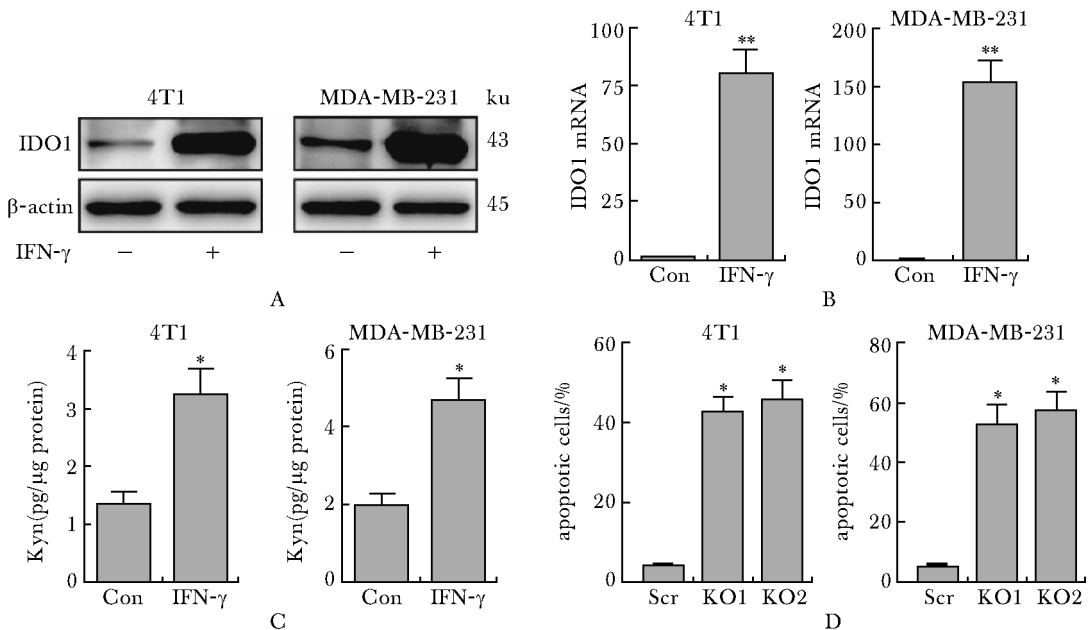
与 IFN- γ 或 Epa 单药组相比,IFN- γ 联合 Epa 组可显著抑制荷瘤小鼠体内肿瘤的生长速度($P<$

0.01) (图 4A)。此外,荷瘤小鼠的生存时间也显著延长($P<0.01$) (图 4B)。

3 讨论

IFN- γ 是主要由细胞毒性 CTL 和 NK 细胞产生的多效细胞因子,并且发挥重要的抗肿瘤作用。在与其受体结合后,IFN- γ 开启 JAK/STAT 信号级联,导致大量干扰素诱导基因的表达,一方面上调肿瘤细胞表达 MHC-I 类分子,增强抗原呈递能力,使得肿瘤细胞更容易受到细胞毒性 CTL 的杀伤。另一方面,IFN- γ 可直接诱导肿瘤细胞增殖停滞甚至死亡。体外实验结果表明,IFN- γ 对肿瘤细胞的直接杀伤作用十分微弱,200 ng/mL 的 IFN- γ 作用 48 h 才能杀伤约 12%。

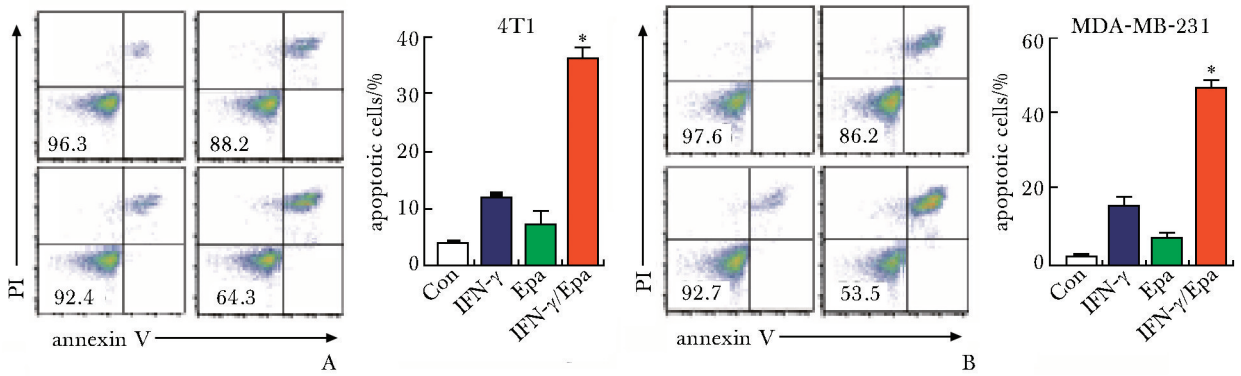
然而,IFN- γ 在抑制肿瘤细胞的同时也会上调其免疫抑制分子的表达,例如 PD-L1 和 IDO1 等分子,从而促进肿瘤细胞免疫逃避。IFN- γ 可通过其受体将信号传导入细胞内,并诱导酪氨酸蛋白激酶 JAK 磷酸化,进而诱导 STAT1 发生磷酸化。磷酸化



A. expression of IDO1 of 4T1 (left) and MDA-MB-231 (right) cells treated with or without 100 ng/mL IFN- γ was detected by quantitative PCR; B. expression of IDO1 of 4T1 (left) and MDA-MB-231 (right) cells treated with or without 100 ng/mL IFN- γ was detected by Western blot; C. Kyn levels in 4T1 (left) and MDA-MB-231 (right) cells lysate were determined; D. cell apoptosis of IDO1 knock-out 4T1 (left) and MDA-MB-231 (right) cells treated with 100 ng/mL IFN- γ for 48 hours; * $P<0.01$, ** $P<0.001$ compared with control group; Scr. Scramble(control); KO₁/KO₂. knock-out1/2

图 2 IFN- γ 诱导三阴乳腺癌细胞系 IDO1 表达上调

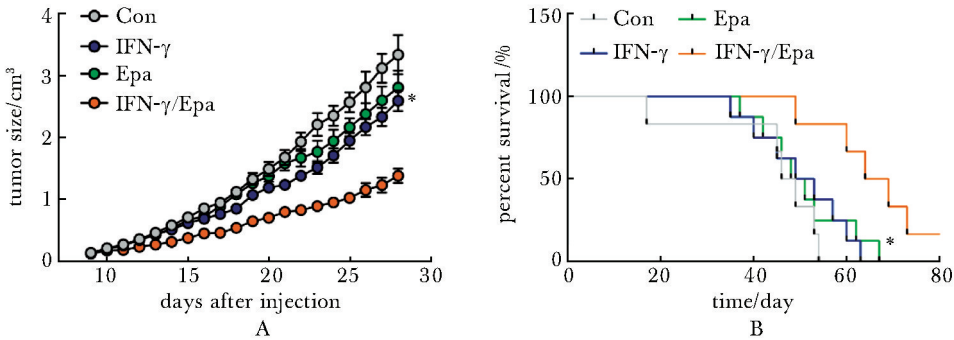
Fig 2 Expression of IDO1 was up-regulated in triple-negative breast cancer cells treated with IFN- γ ($\bar{x}\pm s, n=3$)



A. cell apoptosis of 4T1 cells treated with IFN- γ (100 ng/mL), Epa (20 nmol/L) or IFN- γ (100 ng/mL) combined with Epa (20 nmol/L) was determined by flow cytometry; B. cell apoptosis of MDA-MB-231 cells treated with IFN- γ , Epa or IFN- γ /Epa was determined by flow cytometry; * $P < 0.01$ compared with IFN- γ group

图3 IFN- γ 联合IDO1抑制剂Epa诱导肿瘤细胞凋亡

Fig 3 IFN- γ combined with IDO1 inhibitor Epa induced tumor cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A. NOD-SCID mice were inoculated with 1×10^6 MDA-MB-231 cells, when the tumor size was 5 mm \times 5 mm, mice were treated with IFN- γ , Epa or IFN- γ combined with Epa for 30 days, tumor growth was measured (A) and long-term survival (B) was analyzed; * $P < 0.01$ compared with IFN- γ group

图4 IFN- γ 联合IDO1抑制剂Epa显著抑制MDA-MB-231肿瘤的生长

Fig 4 IFN- γ combined with IDO1 inhibitor Epa significantly inhibited MDA-MB-231 tumor growth ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

的STAT1会以同源二聚体的形式进入细胞核,启动IDO1的表达^[12]。目前研究发现,IDO1在多种肿瘤细胞中上调表达,而且IDO1是催化色氨酸代谢为犬尿氨酸的限速酶。肿瘤细胞高表达IDO1后不仅会引起色氨酸耗竭,抑制肿瘤微环境中的细胞毒性CTL、NK细胞等免疫细胞的活性^[13],而且,IDO1的代谢产物Kyn也会激活肿瘤细胞和CD8⁺T细胞的AhR信号通路,一方面经Kyn-AhR-P27信号通路诱导肿瘤细胞进入休眠状态^[14],躲避免疫杀伤;另一方面经Kyn-AhR-PD-1通路诱导CD8⁺T细胞PD-1的表达^[15],直接诱导T细胞耗竭。由此可见,IDO1的过度活化给肿瘤的免疫治疗又带来了新的难题。

因此,抑制IDO1的活性在肿瘤免疫治疗中有着重要的作用。

本实验采用三阴乳腺癌细胞系4T1和MDA-MB-231为研究对象,发现IFN- γ 体外对其直接的凋亡能力比较弱,但能够显著诱导4T1和MDA-MB-231细胞内的IDO1分子的表达,而且细胞内的Kyn也显著上调。而当利用CRISPR-Cas9系统稳定敲除了IDO1分子后,IFN- γ 诱导凋亡的能力大大增强,表明IDO1的上调表达在三阴乳腺癌细胞抵抗IFN- γ 的治疗中起着重要的作用。基于以上发现,采用IFN- γ 联用IDO1抑制剂Epa用于抑制三阴乳腺癌细胞系4T1和MDA-MB-231增殖。体内外实

验结果表明,IDO1 抑制剂 Epa 可显著促进 IFN- γ 对三阴乳腺癌细胞的凋亡作用,荷瘤小鼠的生存时间明显延长。

综上所述,IFN- γ 联用 IDO1 抑制剂对三阴乳腺癌有显著的促凋亡作用,这一发现为三阴乳腺癌的临床治疗提供潜在的方向和基础。

参考文献:

- [1] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13: 674-690.
- [2] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2017, 389: 1134-1150.
- [3] Jiagge E, Chitale D, Newman LA. Triple-negative breast cancer, stem cells, and african ancestry [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188: 271-279.
- [4] Denkert C, Liedtke C, Tutt A, *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies [J]. *Lancet*, 2017, 389: 2430-2442.
- [5] Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, *et al.* CDK12 inhibition reverses de novo and acquired PARP inhibitor resistance in BRCA wild-type and mutated models of triple-negative breast cancer [J]. *Cell Rep*, 2016, 17: 2367-2381.
- [6] Okuma HS, Yonemori K. BRCA gene mutations and poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1026: 271-286.
- [7] Gubin MM, Zhang X, Schuster H, *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens [J]. *Nature*, 2014, 515: 577-581.
- [8] Topalian SL, Taube JM, Anders RA, *et al.* Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 275-287.
- [9] Boehm U, Klamp T, Groot M, *et al.* Cellular responses to interferon-gamma [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 749-795.
- [10] Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon-gamma in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 6118-6124.
- [11] Kursunel MA, Esendagli G. The untold story of IFN-gamma in cancer biology [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 73-81.
- [12] Liu Y, Liang X, Yin X, *et al.* Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN-gamma-induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15207-15219.
- [13] Kiyozumi Y, Baba Y, Okadome K, *et al.* IDO1 expression is associated with immune tolerance and poor prognosis in patients with surgically resected esophageal cancer [J]. *Ann Surg*, 2019, 269: 1101-1108.
- [14] Liu Y, Lv J, Liu J, *et al.* STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN-beta-induced dormancy in tumor-repopulating cells [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128: 1057-1073.
- [15] Liu Y, Liang X, Dong W, *et al.* Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8(+) T cells by transferring kynurenine and AhR activation [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33: 480-497.