

IDO1 天然小分子抑制剂的筛选及抗肿瘤作用研究

庞伟强¹, 高磊², 窦玥莹¹, 刘璐¹, 张娜¹, 刘晓嘉¹, 刘阳¹,
杨兆勇¹, 宋丹青¹, 邓洪斌^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050;

2. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 130000)

摘要: PCR 扩增人吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 基因启动子上游区域 1 245 bp 基因片段, 将其插入到 pGL4.20-basic 载体中构建了 pGL4-IDO1-luc 荧光素酶重组质粒。基于双荧光素酶报告基因方法建立 IDO1 抑制剂筛选模型, 筛选能够下调肿瘤细胞中 IDO1 表达的天然活性小分子化合物。采用 MTT、Western blotting 和乳酸脱氢酶 (LDH) 等方法探讨阳性化合物的抗肿瘤作用及其对 IDO1 的调控机制。化合物川楝素 (toosendanin, NS-180) 能显著下调 IFN- γ 诱导的肿瘤细胞中 IDO1 表达。在 A549 细胞中, NS-180 可抑制 STAT1 和 STAT3 的磷酸化, 从而下调 IFN- γ 诱导的 IDO1 蛋白表达。LDH 释放实验表明, NS-180 可促进 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用。综上所述, 筛选获得的天然小分子 NS-180 是一类新型高效的 IDO1 抑制剂, 可能成为靶向 IDO1 的肿瘤免疫治疗候选药物。

关键词: 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1; 启动子; 荧光素酶; 川楝素

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1416-08

Screening of natural small molecule IDO-1 inhibitors with anti-tumor role

PANG Wei-qiang¹, GAO Lei², DOU Yue-ying¹, LIU Lu¹, ZHANG Na¹, LIU Xiao-jia¹,
LIU Yang¹, YANG Zhao-yong¹, SONG Dan-qing¹, DENG Hong-bin^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Jilin Institute for Drug Control, Changchun 130000, China)

Abstract: Fragments of the human indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) gene 5'-UTR (untranslated 1 245 bp region) promoters were amplified by PCR and cloned into pGL4.20 vector in the construction of reporter vector pGL4-IDO1-luc. A549 cells were transfected with the constructed plasmid and IDO1 inhibitor screening model was established with dual-luciferase reporter assay. Based on the model, we screened natural small molecules which could down-regulate the expression of IDO1 on tumor cells. The anti-tumor activities were examined by MTT, Western blotting and lactic dehydrogenase (LDH) release assays. Toosendanin (NS-180) down regulated the IDO1 expression and inhibited IFN- γ -induced STAT1 and STAT3 phosphorylation in A549 cells. Moreover, NS-180 significantly increased the cytotoxicity of co-cultured NK cells on A549 cells in LDH release assays. In summary, NS-180 is a novel and potent IDO1 inhibitor, which has an antitumor activity for cancer immunotherapies.

收稿日期: 2017-05-22; 修回日期: 2017-06-12.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (81473248); 中国医学科学院重大协同创新项目-重大前沿研究 (2016-12M-1-011).

*通讯作者 Tel: 86-10-63169876, Fax: 86-10-63017302, E-mail: hdeng@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0506

Key words: indoleamine 2, 3-dioxygenase 1; promoter; luciferase; toosendanin

目前, 恶性肿瘤的诊疗仍是医学界最大的挑战之一, 而传统的恶性肿瘤治疗手段如化疗和放疗等, 虽经不断发展, 却仍存在一定的局限和弊端, 如不良反应大及易诱导耐药等。近年来, 随着肿瘤免疫相关研究的不断深入, 免疫治疗成为改善恶性肿瘤患者预后的新希望。肿瘤与宿主免疫系统之间的相互作用复杂而多变^[1]。科学家们正试图阐明两者之间的作用机制, 希望借此改善肿瘤治疗现状。相应的, 肿瘤免疫疗法已成为制药工业的热门研究领域。

作为众多肿瘤免疫周期调节因子中的一员, 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 备受关注^[2,3]。IDO1 是色氨酸分解代谢的第一限速酶, 可通过介导色氨酸的耗竭及其代谢产物犬尿氨酸的积累来诱导 T 细胞和 NK 细胞的凋亡或功能紊乱, 从而减弱机体的抗肿瘤免疫^[4-7]。在多数组织中, IDO1 处于沉默状态, 但在多种实体肿瘤如肺癌、肝癌、乳腺癌和结肠癌等肿瘤组织中则呈持续高表达状态, 且与预后差密切相关^[8]。研究表明, IDO1 活性的抑制可以促进免疫接种及化学治疗的疗效, 使得 IDO1 成为肿瘤免疫治疗药物的一个重要靶标。近年来, 抑制 IDO1 的活性在肿瘤治疗中的作用引起了众多学者的关注^[9]。因此, 筛选高效的 IDO1 抑制剂, 激活 T 细胞和 NK 细胞的功能, 打破肿瘤免疫耐受, 可能为肿瘤免疫治疗带来新的突破。

根据 IDO1 的调节及效应机制, 以 IDO1 为靶点的治疗可通过抑制 IDO1 基因表达、抑制 IDO1 活性及阻滞其效应途径, 发挥治疗的作用。目前国内外研究开发的以 IDO1 为靶点的小分子抑制剂主要集中在以直接抑制 IDO1 活性方面的研究, 如 1-甲基-色氨酸 (1-methyl-tryptophan, 1-MT)、NLG919 和 INCB024360 等^[10]。但是它们普遍存在抑制效率低下、无法透过细胞膜及产生吲哚环结构代谢物质等问题^[11]。

本研究拟构建包含人的 IDO1 启动子片段的荧光素酶报告基因载体, 建立 IDO1 抑制剂筛选模型, 并从天然小分子化合物库中筛选新型高效的能够下调 IDO1 表达的活性化合物。此外, 还对筛选出的阳性化合物的抗肿瘤作用及其对 IDO1 的调控机制进行初步研究。

材料与方法

主要试剂及材料 DMEM、DMEM/F12、RPMI

1640 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶 (trypsin)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、青霉素/链霉素溶液、琼脂糖和溴化乙锭 (EB) 购自美国 Sigma 公司; 1-MT 购自美国 Selleck 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、Tris 碱、过硫酸铵及 Tween-20 均购自美国 Amresco 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; ECL Plus 超敏免疫印迹检测试剂盒购自美国 Amersham Pharmacia 公司; 一抗 IDO、STAT3、STAT1、phospho-STAT3 (Ser727)、phospho-STAT1 (Tyr701)、phospho-ACC (Ser79)、 α -tubulin、 β -actin 和羊抗兔或小鼠二抗均购自美国 Cell Signaling 公司; Prime STAR HS DNA Polymerase、*Kpn* I、*Hind* III、*T4* ligase 酶、广谱型基因组 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 片段纯化试剂盒均购自大连宝生物公司; 高纯度质粒小提中量试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; VigoFect 转染试剂购自北京威格拉斯生物技术有限公司; Dual-Luciferase Reporter Assay System kit 试剂盒和 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity 试剂盒购自美国 Promega 公司; 天然小分子化合物库购自上海诗丹得生物技术有限公司。

仪器 Berthold LB942 荧光检测仪为德国伯托公司产品; Tanon-5100 凝胶成像系统为上海天能公司产品; Multiskan FC 型酶标仪为赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司产品。

细胞系和质粒 人正常肝细胞 L02、人非小细胞肺癌 A549 细胞由本实验室保存; 人 NK 细胞由中国医学科学院医药生物技术研究所杨兆勇教授课题组提供; pGL4.20-basic 质粒和 pRL-TK 质粒购自美国 Promega 公司。

人 IDO1 启动子报告基因载体的构建

PCR 反应模板的制备 收集人正常肝细胞 L02, 裂解后参照 TaKaRa 公司的广谱型基因组 DNA 小量纯化试剂盒的使用说明, 进行全基因组 DNA 的提取, 制备应用于 PCR 反应的模板, -80 °C 保存。

引物的设计与合成 根据 IDO1 基因启动子的序列 (GenBank: JN382541.1) 并且参考 Konan 等^[12] 的实验方案设计 PCR 引物。引物由上海生工公司合成, 在合成的引物序列中导入了 *Kpn* I 和 *Hind* III 内切酶酶切位点 (斜体部分), 供后续酶切鉴定用。上游

和下游引物分别为: 5'-gggtaccGATTCCCAAAGTAT TAGC-3'; 5'-ccaagctTCTTGTAGTCTGCTCCTC-3'。

IDO1 启动子基因的克隆 以试剂盒提取的 L02 细胞全基因组 DNA 为模板, 用上述设计引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 复性 15 s, 72 °C 延伸 2 min 12 s, 循环 3 次; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 复性 15 s, 72 °C 延伸 2 min 12 s, 循环 27 次; 最后 72 °C 再延伸 20 min。用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶进行电泳。参照 TaKaRa 公司的胶回收试剂盒操作说明, 回收并纯化 1 245 bp PCR 产物。

质粒的构建及鉴定 回收 PCR 产物, 用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切 IDO1 启动子基因的 PCR 产物和 pGL4.20-basic 载体, 回收 PCR 产物和载体大片段, 用 T4 连接酶 25 °C 连接 4 h 后, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌并涂平板。挑取单克隆接入 5 mL 带 Amp 抗性的 LB 培养基中, 用高纯度质粒小提中量试剂盒提取菌液中质粒。经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后送上海生工公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pGL4-IDO1-luc。

含 IDO1 启动子报告基因载体的活性检测

细胞培养 转染 24 h 前, 采用 0.25% 胰酶消化, 利用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基将处于对数生长期的细胞制备成单细胞悬液, 按 1×10⁵ 个/孔接种至 24 孔板中, 每孔培养基为 500 μ L, 置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养, 待细胞生长至铺满孔底 70% 左右进行实验。

瞬时转染与加药处理 用 150 mmol·L⁻¹ NaCl 稀释待转染的质粒, pGL4.20-basic 载体、pGL4-IDO1-luc 均按每孔 400 ng 的量, pRL-TK 按每孔 20 ng 的量, 以每孔 50 μ L 体积稀释质粒, 轻轻混匀, 每个质粒做 3 个复孔。参照 VigoFect 转染试剂说明, 在 A549 细胞中进行 pGL4-IDO1-luc/pRL-TK 共转染, 同时设立 pGL4.20-basic/pRL-TK 共转染作为阴性对照组。细胞在 37 °C 培养 24 h 后, 弃去培养液, 根据实验需要加入相应的药物处理 (如 IFN- γ), 继续培养 24 h, 检测荧光素酶活性。

双荧光素酶报告基因活性的检测 参照试剂盒说明书测定荧光素酶活性。去除培养孔中的培养液, 用 1×PBS (pH 7.4) 清洗 2 次; 每孔加被动裂解缓冲液 PLB 100 μ L, 室温振摇 15 min; 每孔裂解产物取上清 20 μ L 转移至 96 孔板中; 使用荧光素酶检测试剂 II (LAR II) 和 Stop&Glo®试剂进行目的报告基因萤火虫荧光素酶 (firefly luc) 及内参海肾素荧光素酶 (renilla luc) 检测, 计算萤火虫荧光素酶与海肾素荧

光素酶的比值, 并以空载体 pGL4.20-basic 和 pRL-TK 共转染细胞作为对照。实验数据采用 GraphPad prism 5 软件进行统计学分析。

MTT 法检测 A549 细胞增殖的变化 取对数生长期 A549 细胞制备单细胞悬液, 以 6×10³ 个/孔密度接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔, 同时设空白对照 (仅加培养液)。待细胞密度达到 50% 左右, 加入相应的药物作用 48 h 后, 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h。每孔加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 使紫色结晶充分溶解, 酶标仪检测各孔吸光度 (A₅₇₀) 值。

Western blotting 将用药物处理或未处理的细胞用细胞刮刀刮下, 1 200 ×g 离心收集细胞。加入适量裂解液 (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5、1% Triton-100、150 mmol·L⁻¹ NaCl、2 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ 钒酸钠、50 mmol·L⁻¹ NaF、1 mmol·L⁻¹ PMSF、1 mg·mL⁻¹ aprotinin 和 1 mmol·L⁻¹ leupeptin), 冰浴 30 min, 然后 14 000 ×g 离心 15 min, 收集上清液即为蛋白提取液。用标准 Bradford 方法测定样品的蛋白浓度。于 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 半干法将蛋白转至 PVDF 膜。转膜结束后, 将其放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST (20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、150 mmol·L⁻¹ NaCl 和 0.1% Tween-20, pH 7.6) 中振荡封闭 1 h。封闭后的膜装入杂交袋与一抗溶液 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 以洗去未结合的一抗。与辣根过氧化物酶标记的二抗溶液 (抗兔二抗 1:2 000 稀释、抗鼠二抗 1:5 000 稀释) 在室温孵育 1~2 h 后, TBST 洗膜 3 次, 按照 ECL Plus 免疫试剂盒说明书进行显色, 通过 Tanon-5100 凝胶成像系统捕获并分析图像。

细胞共培养与乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验 将 A549 细胞消化后传代于 96 孔板中, 待细胞完全贴壁后弃原培养液。分别加入 DMSO、NS-180 和 1-MT 等药物预处理 2 h 后, 再加入 5 ng·mL⁻¹ IFN- γ 刺激 24 h。细胞孵育 24 h 后更换新鲜培养基, 按照 NK 细胞:A549 细胞=10:1 的比例向每孔加入 NK 细胞, 细胞共培养 16 h, 取上清, 按照 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity 试剂盒说明检测 LDH 酶活性。同时设立空白组 (只有 A549 细胞, 不加 NK 细胞) 作为自然释放组, 用 1.0% NP40 溶液裂解细胞作最大释放组。

LDH 杀伤率 (%)=(LDH_{实验孔}-LDH_{自然释放孔})/
(LDH_{最大释放孔}-LDH_{自然释放孔})×100

数据统计与处理 每组实验重复 3 次, 实验数据

以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

结果

1 人 IDO1 启动子基因片段的 PCR 结果

以提取的人正常 L02 细胞基因组为模板, 进行 PCR, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 1 245 bp 处呈现特异性目的条带, 与预计相符, 表明已获得 IDO1 启动子区基因片段 (图 1)。

2 含 IDO1 启动子区基因质粒的酶切鉴定

重组质粒 pGL4-IDO1-luc 经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后电泳, 得到与对应目的基因大小相符 (约 1 245 bp) 的条带, 另外还有一条约 5 000 bp 的线性空载体条带 (图 2)。而 pGL4.20-basic 空载体经双酶切后仅有一条线性条带, 这表明已成功构建重组质粒 pGL4-IDO1-luc。

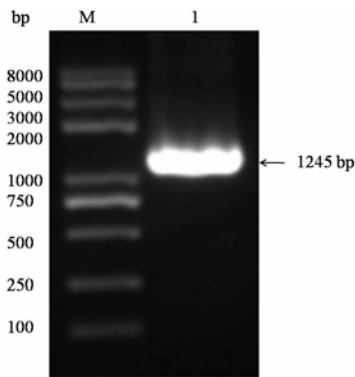


Figure 1 Amplification of IDO1-promotor region gene fragments by PCR. M: 2 kb plus marker; 1: IDO1-promotor 1 245 bp. IDO1: Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1

3 含 IDO1 启动子基因片段的测序鉴定

对重组 pGL4-IDO1-luc 质粒的插入片段进行测序, 结果表明各酶切位点正确, 经比对后证实测序序列与 GeneBank 中报道的 IDO1 启动子区序列相符。选取 pGL4-IDO1-luc 测序的部分截图 (图 3), 下划线序列为上游引物, 表明重组质粒 pGL4-IDO1-luc 构建成功。对测序得到的 IDO1 启动子区进行序列分析发现, 该启动子区含有干扰素刺激反应元件 1/2

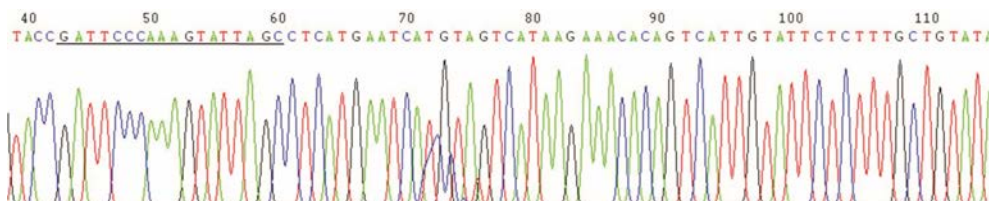


Figure 3 Sequences analysis of the IDO1 gene 5'-UTR promoter

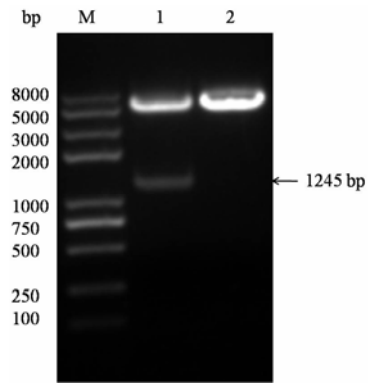


Figure 2 *Kpn* I and *Hind* III double digestion result of recombinant plasmid pGL4-IDO1-luc and pGL4.20-basic. M: 2 kb plus marker; 1: pGL4-IDO1-luc doubled digested by *Kpn* I+*Hind* III; 2: pGL4.20 basic double digested by *Kpn* I+*Hind* III

(interferon stimulation reaction element 1/2, ISRE-1/2)、干扰素 γ 激活序列 1/2 (gamma activation sequences 1/2, GAS1/2) 及淋巴增强子结合因子 1/T 细胞因子 (lymphoid enhancer-bind factor 1/T cell factor, LEF-1/TCF) 等多个转录因子结合位点 (图 4), 与文献报道一致^[13]。

4 重组质粒 pGL4-IDO1-luc 的活性鉴定

利用 VigoFect 转染试剂将构建好的重组质粒 pGL4-IDO1-luc、空白对照质粒 pGL4.20 basic 和内参

```

-1236 gattcccaagatattagcctcatgaatcatgtagtcataagaacacagtcattgtatt
-1177 ctctttgctgataatttgggttcagtttccatttcctatttcaaggaacatttctctg
      IRSE-1          GAS-1    GAS-2
-1113 taaaatgacaggttgaagaaaacagccataatttagtagagaatagcgcgaga.....
-483  ttccggctgctgaaacatgacactaatatttcaagaactgtggaagcctaaaagg
      LEF-1/TCF
-424  aagccaatgagaataactaaatgagagtttaggactgcagccctcattttcattcaaga
      LEF-1/TCF
-363  tttaaaagtttccataaagttaaattgtcttctccgccacctgtttcatagttctgtg.....
-157  aaacaagaagaactagaaaatgaaccatccaaaagtgaagtaatttctcact.....
      ISRE-2
-30  tgaggggcaccagaggagcagactacaagaatggcacac
      ↑ +1
    
```

Figure 4 Nucleotide sequence of the promoter region of human IDO1 gene. Nucleotides ranging from -1 236 upstream to 9 downstream of the translation initiation site (ATG) are shown. Transcription factor ISRE, GAS and LEF-1/TCF binding sites are underlined and named below the sequence. GAS: Gamma activation sequences; ISRE: Interferon stimulation reaction element; LEF-1/TCF: Lymphoid enhancer-bind factor 1/T cell factor

质粒 pRL-TK 按 5 : 1 的比例共转至 A549 细胞中, 分别加入或不加 IFN- γ (5 ng·mL⁻¹) 刺激 24 h 后, 检测荧光素酶的表达情况。结果显示, IFN- γ 能显著增强 pGL4-IDO1-luc 荧光素酶的表达活性, 但并不影响空白质粒的荧光素酶活性 (图 5), 说明已成功构建了具有生物活性的 IDO1 启动子重组质粒 pGL4-IDO1-luc。

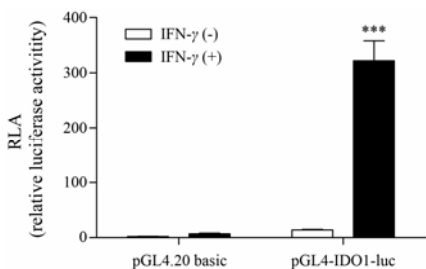


Figure 5 Functional analyses of IDO1 promoter in A549 cells. IDO1 promoter construct (pGL4-IDO1-luc) and renilla control vector (pRL-TK) were transiently transfected into A549 cells. The luciferase activities were measured in basal conditions, or after stimulation by IFN- γ (5 ng·mL⁻¹). Results are expressed as relative firefly luciferase units normalized to renilla luciferase. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs the pGL4.20 basic group

5 IDO1 抑制剂的筛选

将 pGL4-IDO1-luc 与内参质粒 pRL-TK 共转染入 A549 细胞, 24 h 后加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NS 系列不同天然小分子化合物处理 2 h 之后, 再加入 IFN- γ (5 ng·mL⁻¹) 刺激 24 h, 分别检测 IDO1 启动子荧光素酶的活性, 筛选能抑制 IDO1 基因表达的 NS 系列化合物。结果显示, 化合物 NS-101、NS-122、NS-123、NS-126、NS-137、NS-159、NS-180、NS-195、NS-197、NS-198、NS-203 和 NS-212 等 12 种化合物能显著抑制 IDO1 启动子荧光素酶的活性 (图 6A, B)。

进一步用 MTT 法检测上述 12 种化合物对 A549 细胞增殖的影响, 以排除细胞毒性化合物。结果发现, NS-180 (川楝素) 对 A549 细胞增殖的抑制作用最弱 (图 7)。荧光素酶和 MTT 结果共同表明, NS-180 可显著抑制 IDO1 启动子活性且对 A549 细胞的毒性最小, 因此本研究以 NS-180 为目标化合物, 对其调控 IDO1 表达进行下一步的研究。NS-180 的化学结构如 (图 8A) 所示。

6 NS-180 抑制 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达和 STAT1、STAT3 的磷酸化

使用不同浓度的 IFN- γ 刺激 A549 细胞 24 h, 或 5 ng·mL⁻¹ IFN- γ 刺激 A549 细胞不同时间, 采用 Western blotting 对 IDO1 蛋白水平进行分析, 结果表

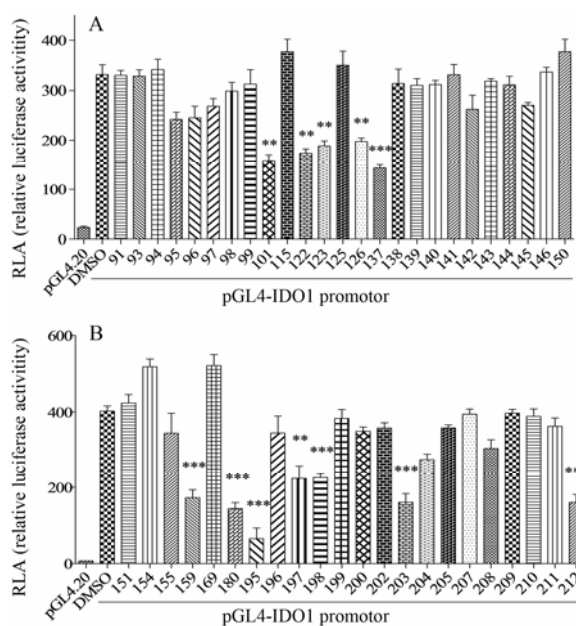


Figure 6 Screening of natural small molecule IDO-1 inhibitors. (A, B) A549 cells were transiently transfected with pGL4.20 basic or pGL4-IDO1-luc reporter construct and the pRL-TK as an internal control, followed by pretreatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of different natural small (NS) molecules or DMSO as control for 2 h. After stimulation by IFN- γ (5 ng·mL⁻¹), the level of luciferase activities were determined as described. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the DMSO group

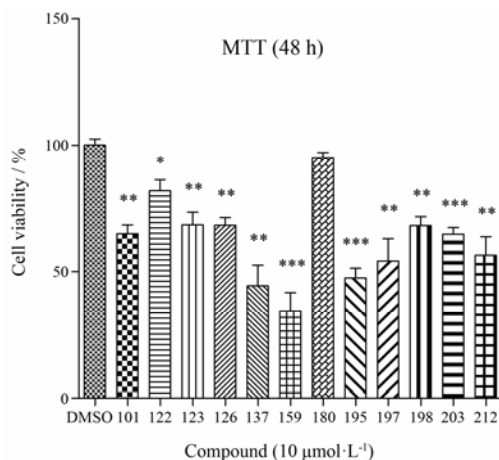


Figure 7 Effects of different compounds on A549 cell viability. A549 cells were treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of different NS molecules for 48 h, and cell toxicity was measured by MTT assay. Control cells were treated with 0.5% (v/v) DMSO. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the DMSO group

明 IFN- γ 可诱导 A549 细胞中 IDO1 的高表达并且具有时间依赖性和剂量依赖性 (图 8B, C)。在 A549 细胞中, 使用不同浓度的 NS-180 处理 2 h 后, 再加入 5 ng·mL⁻¹ IFN- γ 刺激 24 h, Western blotting 法检测发现 NS-180 可抑制 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达 (图 8D)。研究表明, 转录激活因子 (signal transducer and

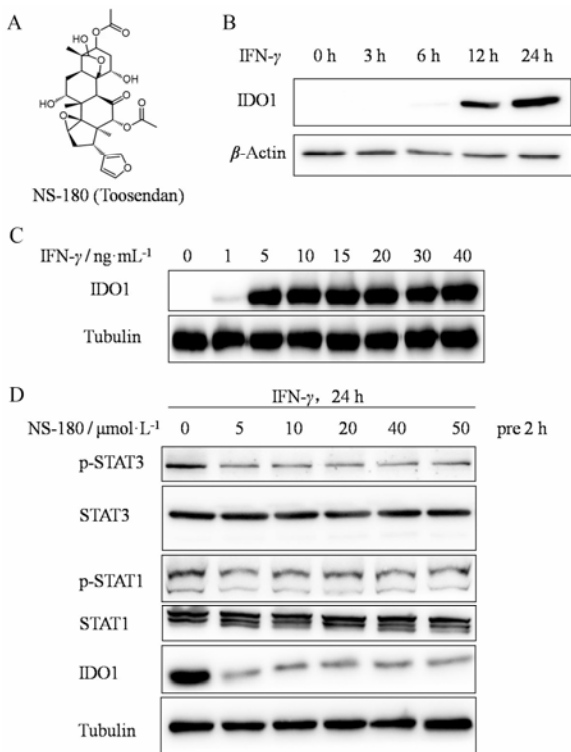


Figure 8 NS-180 down-regulates the IFN- γ -induced expression of IDO1 and inhibits STAT1/STAT3 phosphorylation. The chemical structure of NS-180 (A). A549 cells were treated with IFN- γ (5 ng·mL⁻¹) for the indicated times (B), or treated with different concentrations of IFN- γ for 24 h (C), the IDO1 expression level was detected by Western blotting. β -Actin or tubulin served as the loading control. A549 cells were pre-treated with various concentrations of NS-180 for 2 h, followed by IFN- γ (5 ng·mL⁻¹) treatment for 24 h (D). The phosphorylation of STAT1 and STAT3 and expression level of IDO1 were measured by Western blotting using corresponding antibodies. Tubulin served as the loading control

activator of transcription, STAT) 可在转录水平调控 IDO1 的表达^[14-20]。为了证实 NS-180 是否通过影响 STAT 活性在转录水平抑制 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达, 本研究分析了 NS-180 对 IFN- γ 诱导的 STAT1 和 STAT3 磷酸化的影响。Western blotting 结果表明, NS-180 能显著抑制 STAT1、STAT3 的磷酸化, 并抑制 IFN- γ 诱导的 IDO1 的表达 (图 8D)。

7 NS-180 可增强 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用

根据文献^[4-7]报道, 肿瘤细胞中高表达的 IDO1 可抑制 NK 细胞的增殖并且影响 NK 细胞的免疫功能。为探讨 NS-180 抑制肿瘤细胞中 IDO1 表达后的生物学效果, 以 IDO1 抑制剂 1-MT 作为阳性对照, 通过 LDH 释放法, 在体外进行 NK 细胞和 A549 细胞的共培养实验。结果表明, 与对照组相比, NS-180 可增强 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用 (图 9), 其效果要优于 1-MT。

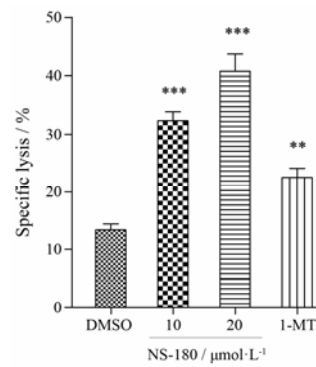


Figure 9 NS-180 enhances the specific lysis of NK cells to A549 cells. A549 cells were pre-treated with the indicated compounds for 2 h, followed by IFN- γ (5 ng·mL⁻¹) treatment for 24 h. Cells were washed and NK cells were co-cultured with A549 cells at 10:1 in RPMI 1640 plus 10% FBS for 16 h. The specific lysis of NK cells to A549 cells was determined by lactic dehydrogenase (LDH) releasing assay. 1-Methyl-tryptophan (1-MT) was used as the positive control. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. *** $P<0.01$, **** $P<0.001$ vs the DMSO group

讨论

基于 IDO1 在肿瘤发生发展和肿瘤免疫耐受过程中的重要作用, IDO1 已被证实是抑制恶性肿瘤形成和提高免疫治疗效果的重要靶点^[21-23]。IDO1 抑制剂作为肿瘤免疫治疗的潜在药物具有十分广阔的开发前景。

IDO1 抑制剂主要分为以下几类: 竞争性抑制剂, 如 1-MT; 非竞争性抑制剂, 如苯基咪唑; 反竞争性抑制剂, 如生物碱; 通过其他作用的抑制剂等。目前 IDO1 抑制剂的相关报道已经有很多, 但只有部分抑制剂如 1-MT 和 INCB024360 等进入了临床研究阶段, 目前还没有 IDO1 抑制类的药物上市。对于临床研究中的 1-MT, 由于其抑制浓度较高, 使得 1-MT 在使用时需要的剂量较大, 药物成本是不可忽视的问题。而对于 INCB024360, 其药物分子代谢快, 具有不稳定性。同时, 根据目前临床试验的结果, 单纯抑制 IDO1 活性仅能产生有限的治疗效果, 而在与传统的化学治疗、疫苗治疗等联用时则显著增强了抗肿瘤反应, IDO1 在肿瘤进展中的复杂作用不是十分清楚。基于以上分析, IDO1 及其抑制剂仍有较大发展空间和研究前景。

本研究构建了含有人 IDO1 启动子的荧光素酶报告基因的载体 pGL4-IDO1-luc 并且基于双荧光素酶报告基因系统, 建立了 IDO1 抑制剂筛选模型。从天然活性小分子化合物库中筛选能够下调 IDO1 表达的抑制剂, 发现 12 种阳性化合物能显著抑制 IDO1 启动子荧光素酶的活性。以抑制活性好、细胞毒性低的

NS-180 (川楝素) 为目标化合物进行初步机制研究。

STAT1/3 作为调节受 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达的重要转录因子, 它由 IFN- γ 受体胞质尾区的 JAK 激酶激活, 发生同源二聚化并转运至核内, 然后结合 GAS 序列, 直接激活 IDO 和 IRF-1 基因的转录表达。另外, STAT1 也能通过诱导 IRF-1 的表达, 使之结合 IDO 基因调节区的 ISRE-1 和 ISRE-2 元件, 从而间接地激活 IDO1 基因的转录表达^[24]。本研究的初步机制研究发现, NS-180 可抑制 STAT1、STAT3 的磷酸化, 从而下调 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达。此外, NS-180 还可增强 NK 细胞对 A549 细胞的杀伤作用, 表明 NS-180 可能是靶向下调 IDO1 的肿瘤免疫治疗候选药物, 但在动物体内的抗肿瘤效果还有待进一步验证。

川楝素是一种从传统的驱蛔中药楝科植物川楝的树皮或种子中分离得到的四环三萜类化合物, 具有驱蛔、杀虫、抗肉毒效应、抑制神经递质释放和抗肿瘤^[25, 26]等多种生物活性, 但川楝素能下调肿瘤细胞中 IDO1 的表达还是首次被发现。近年来, 川楝素的抗肿瘤作用受到了越来越广泛的关注, 研究者对多种人类肿瘤细胞进行了体外实验和体内实验, 但其作用机制尚不明确。川楝素来源广 (川楝子、川楝素和苦楝树等) 且生物活性多样, 尤其在人类对恶性肿瘤无法攻克时, 川楝素可作为新型抗肿瘤药物的候选者之一, 具有广阔的发展前景。

本研究发现 NS-180 是一类新型高效的 IDO1 抑制剂, 在体外对人非小细胞肺癌 A549 细胞可下调 IFN- γ 诱导的 IDO1 表达并且抑制 STAT1、STAT3 的磷酸化。通过使用川楝素来下调 IDO1 的表达, 逆转由 IDO1 介导的肿瘤细胞免疫耐受, 从而控制肿瘤细胞的生长, 可能成为防治恶性肿瘤的有效方法, 也可能成为川楝素的一种新的抗肿瘤机制。

References

- [1] Prendergast GC. Immunological thought in the mainstream of cancer research: past divorce, recent remarriage and elective affinities of the future [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1: 793–797.
- [2] Munn DH, Sharma MD, Baban B, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Immunity*, 2005, 22: 633–642.
- [3] Soliman H, Mediavilla-Varela M, Antonia S. Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? [J]. *Cancer J*, 2010, 16: 354–359.
- [4] Asuka T, Akihiko K, Yuzo S, et al. Association of increased indoleamine 2, 3-dioxygenase with impaired natural killer cell activity in hemodialysis patients [J]. *Ther Apher Dial*, 2014, 18: 19–23.
- [5] Della CM, Carlomagno S, Frumento G, et al. The tryptophan catabolite *L*-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function [J]. *Blood*, 2006, 108: 4118–4125.
- [6] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *J Exp Med*, 2002, 196: 459–468.
- [7] Peng YP, Zhang JJ, Liang W, et al. Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 738.
- [8] Uyttenhove C, Pilotte 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: 1269–1274.
- [9] Prendergast G. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 3889–3900.
- [10] Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3: e957994.
- [11] Vottero E, Balgi A, Woods K, et al. Inhibitors of human indoleamine 2, 3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast [J]. *Biotechnol J*, 2006, 1: 282–288.
- [12] Konan KV, Taylor MW. Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2, 3-dioxygenase gene [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 19140–19145.
- [13] Soichot M, Hennart B, Saabi AA, et al. Identification of a variable number of tandem repeats polymorphism and characterization of LEF-1 response elements in the promoter of the IDO1 gene [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e25470.
- [14] Jiang GM, He YW, Fang R, et al. Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the transcriptional and post-transcriptional levels [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42: 1840–1846.
- [15] Yu J, Du W, Yan F, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer [J]. *J Immunol*, 2013, 190: 3783–3797.
- [16] Yu J, Wang Y, Yan F, et al. Noncanonical NF- κ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer [J]. *J Immunol*,

- 2011, 193: 2574–2586.
- [17] Sun Y, Chin YE, Weisiger E, et al. Cutting edge: negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3 [J]. *J Immunol*, 2009, 182: 5899–5903.
- [18] Campia I, Buondonno I, Castella B, et al. An autocrine cytokine/JAK/STAT-signaling induces kynurenine synthesis in multidrug resistant human cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0126159.
- [19] Yang JW, Dong SH, Kim HW, et al. Expression of STAT3 and indoleamine 2,3-dioxygenase in cornea keratocytes as factor of ocular immune privilege [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250: 25–31.
- [20] 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: 3963–3970.
- [21] Kobayashi N, Kubota K, Kato S, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells and tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts the carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [J]. *Pancreatology*, 2010, 10: 631–640.
- [22] Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 220–225.
- [23] Liu X, Newton RC, Friedman SM, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9: 938–952.
- [24] Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42: 1932–1937.
- [25] Ju J, Qi Z, Cai X, et al. The apoptotic effects of toosendanin are partially mediated by activation of deoxycytidine kinase in HL-60 cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52536.
- [26] Li X, You M, Liu YJ, et al. Reversal of the apoptotic resistance of non-small-cell lung carcinoma towards TRAIL by natural product toosendanin [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42748.