

IDO 基因稳定转染 HepG₂ 细胞系的建立

刘春亮 冯惠枝 刘 燕 卜晓倩 申慧琴 张 瑞 唐运萍 王 琦

摘 要 **目的** 建立稳定转染 IDO 基因的 HepG₂ 细胞系,为进一步研究 IDO 基因在肝癌免疫逃逸中的作用奠定基础。**方法** 应用脂质体将真核细胞表达质粒 pcDNA3.1-IDO 和空载质粒 pcDNA3.1 转染入 HepG₂ 细胞,经 G418 进行筛选后,挑取单克隆进行培养,用反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 方法验证获得的表达细胞株。**结果** 经 RT-PCR 和 Western blotting 检测证实空质粒转染组和空白对照组 HepG₂ 细胞无 IDO 基因及蛋白的表达,而重组质粒组的 HepG₂ 细胞表达 IDO 基因和蛋白。**结论** pcDNA3.1-IDO 质粒体外稳定转染入肝癌细胞 HepG₂,可以有效地使 IDO 基因在 RNA 水平和蛋白水平平均表达,成功建立了稳定转染基因 IDO 的 HepG₂ 细胞系,为进一步探讨该基因的功能奠定了一定基础。

关键词 吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO) HepG₂ 细胞 稳定转染

Construction of a HepG₂ Cell Line with IDO Gene Steady Transfection. Liu Chunliang, Feng Huizhi, Liu Yan, Bo Xiaoqian, Shen Huiqin, Zhang Rui, Tang Yunping, Wang Qi. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To establish a human hepatoma carcinoma cell line with IDO gene steady transfection and verify the gene expression of IDO in HepG₂ cell, which provides the foundation for the tumorous immune escape effect of pcDNA3.1-IDO. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-IDO and empty vector pcDNA3.1 were transfected into HepG₂ cells with lipofectamine. G418 was used for selecting the positive clone. After being screened with G418, the single cell clone was sought out and cultured. The expression of IDO in HepG₂ cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blotting. **Results** Not only at the level of transcription but also translation, IDO gene expressed in IDO transfectant confirmed by RT-PCR and Western blotting respectively. **Conclusion** Stably transfected HepG₂ of pcDNA3.1-IDO Plasmid can lead to upregulating IDO mRNA and protein expression obviously, which shows transfection HepG₂ of pcDNA3.1-IDO successfully.

Key words Indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO); HepG₂ cell; Steady transfection

吲哚胺 2,3-双加氧酶(human indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是肝脏外唯一催化色氨酸(L-tryptophan)沿犬尿素途径分解代谢初始步骤的限速酶^[1]。IDO 可通过降解局部的色氨酸来调节 T 细胞免疫,从而介导了肿瘤的免疫逃逸^[2]。本研究主要通过 IDO 基因稳定转染肝癌 HepG₂ 细胞,并建立稳定的高表达 IDO 的 HepG₂ 细胞的克隆株,为体内外研究 IDO 介导的人类肝癌的细胞和分子机制提供基础。为打破机体肿瘤免疫耐受状态,改善肿瘤免疫治疗的效果提供新的理论支持。

材料与方法

1. 材料:肝癌细胞株 HepG₂(山西大学生物技术研究所); pcDNA3.1(+)(上海生博生物科技有限公司); pcDNA3.1-IDO(日本的 Osamu Takikawa 教授惠赠); G418(Invitrogen 公

司); RPMI-1640 培养基(美国 Gibco BRL 公司); lipofectamineTM2000 转染试剂(Invitrogen 公司); RNA 提取试剂盒(美国 Gentra 公司); PCR 反应试剂盒(美国 Promega 公司); 绵羊抗人 IDO 多克隆抗体(美国 CHEMICON 公司); 辣根过氧化物酶标记的兔抗绵羊 IgG 抗体(美国 Lifeholder 公司)。

2. 方法:

G418 筛选浓度确定试验: HepG₂ 细胞接种至 24 孔板,取对数生长期的 HepG₂ 细胞,0.25% 胰酶消化,1~2min 终止消化,1000r/min 离心 5min,加含 10% 胎牛血清而无抗生素的 RPMI1640 培养基 5ml,计数细胞液浓度。取适量细胞液接种至 24 孔板,然后加 RPMI1640 培养基,使每孔终体积 2ml,细胞浓度 4×10^4 /ml。培养 24h 后每孔依次加入 G418,将每两孔中的 G418 浓度稀释至 0、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100μg/ml 的 12 个级别浓度梯度。培养、观察:37℃,5% CO₂ 培养 10~14 天,根据培养基的颜色和细胞生长情况,每 2~3 天更换 1 次筛选培养基。每日观察细胞的生长死亡情况。2 周时观察细胞全部死亡的最低 G418 浓度为最佳筛选浓度,维持使用筛选浓度的一半。

细胞转染: HepG₂ 细胞接种至 6 孔板,转染前 1 天,取对

基金项目:山西省科研攻关项目(200903110)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第二临床医院

通讯作者:王琦,教授,电子信箱:wangqiqi72000@yahoo.com.cn

数生长期的 HepG₂ 细胞,0.25% 胰酶消化,用含 10% 胎牛血、无抗生素的 RPMI1640 培养基将细胞浓度调整为 2×10^5 /ml,接种 6 孔板中(2 毫升/孔) 37℃,5% CO₂ 培养,至细胞密度达 80% 时进行转染。转染严格按照 lipofectamine™ 2000 说明书进行。①用 250μl 无血清无抗生素的 RPMI - 1640 稀释 1μg pcDNA3.1。轻柔混匀,制成 pcDNA3.1 稀释液、pcDNA3.1 - IDO 稀释液各 2 份,每份 250μl;②250μl 无血清无抗生素的 RPMI - 1640 稀释 3μl lipofectamine™ 2000,轻轻混匀;③分别室温孵育 5min 后,将 DNA 与 lipofectamine™ 2000 稀释液混合;④轻轻混匀,室温孵育 20min 后,制成 DNA - lipofectamine™ 2000 复合物。将待转染的细胞用 PBS 洗涤 2 次;⑤将 DNA - lipofectamine™ 2000 复合物加至含有待转染细胞的 6 孔板中,再加无血清无抗生素的 RPMI - 1640 至终体积 2ml。分 pcDNA3.1 - IDO 转染组、pcDNA3.1 转染组和未转染组 3 组,每组 2 个孔。沿十字方向轻轻摇动培养板混匀;⑥37℃,5% CO₂ 培养 5h 后,弃除转染混合液,加入有血清无抗生素的 RPMI - 1640,继续培养 20h。

G418 筛选稳定转染的细胞:转染 24h 后,分别以 1:5、1:10、1:100 比例消化传代至 10cm 直径的培养皿,注意细胞稀释要尽可能均匀。然后继续培养 24h。转染 48h 后,去掉培养液,PBS 洗 1 次,加入按筛选浓度配置好的 G418 筛选培养基。根据培养基的颜色和细胞生长情况,每 2~3 天更换 1 次筛选培养基。每日显微镜下观察细胞死亡情况。继续培养 10 天后,显微镜下观察,空白对照组细胞完全死亡,将转染组已形成单克隆的培养皿在待挑取的克隆位置做好标记。在超净台内,弃去培养基,PBS 缓冲液轻轻冲洗两次,用无菌 200μl 微量枪头吸取 0.25% 胰酶 5~10μl 轻轻吹在所标记位置,培养箱孵育 1~2min 后,吸取细胞消化液至 24 孔板另一新孔的培养基内,注意标记所在的组别及来源。如此挑取多个细胞克隆后,维持剂量的 G418 继续筛选、培养。用维持剂量的 G418、20% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基维持、继续培养 14 天后,建立稳定表达的 HepG₂ 细胞系。G418 筛选后,挑取的单克隆由 24 孔板转入 6 孔板,扩大培养,用以检测 IDO mRNA 和蛋白的表达。

稳定转染细胞中 IDO mRNA 的检测(RT - PCR):细胞总 RNA 的提取,分别取对数生长期未转染 HepG₂ 细胞、pcDNA3.1 - IDO 转染细胞、pcDNA3.1 转染细胞,倾弃原培养液,用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍,吸净;Trizol 一步法提取细胞总 RNA,反转录按操作说明进行。IDO 引物设计是根据 GenBank 库中 IDO 的 cDNA 序列进行:IDO 的上游引物:5' - GCAAATG-CAAGAACGGGACACT - 3'; IDO 下游引物:5' - TCAGG-GAGACCAGAGCTTTCACAC - 3';扩增片段 464bp。内参照为磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH),其上游引物:5' - ATGCTGAAGGTCGGTGTGAACG-GATTTGCG - 3';下游引物:5' - GCATCGAAGGTGGAAGAGT-GGGAGTTGCTG - 3';扩增片段 307bp。扩增条件:首次 95℃ 预变性 2min,然后 95℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,

循环 32 次,最后 72℃ 延伸 10min。取扩增产物 5μl,用 2% 的琼脂糖凝胶(EB 浓度为 0.5μg/ml)电泳,以 100bp 为 DNA 相对质量标准,在 300nm 紫外光下摄影,通过图像分析软件进行分析。实验重复 3 次,作图列出其中 1 次结果。

稳定转染细胞中 IDO 蛋白的检测(western blot analysis):细胞总蛋白提取,分别取对数生长期未转染 HepG₂ 细胞、pcDNA3.1 - IDO 转染细胞、pcDNA3.1 转染细胞,倾弃原培养液,用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍,吸净,加入 40μl RIPA butter,将培养瓶置于冰上。30min 后,4℃ 离心(11000r/min,20min),取上清液,加入点样缓冲液,沸水浴 5min;取等量蛋白样品及蛋白 Marker 上样进行 SDS - PAGE 凝胶电泳;电泳后将 PAGE 凝胶中的蛋白通过电转移槽转至 PVDF。用质量分数为 3% 的脱脂乳封闭已转 PVDF 膜 2h,继续加入抗人 IDO 抗体(PBS 1:300 稀释),4℃ 封闭过夜,用 PBS 洗膜 5 次,每次 5~10min。洗膜后加入二抗(PBS 1:1000 稀释),室温下缓慢振荡 1h,再用 PBS 洗膜 5 次,每次 5~10min。最后用化学发光试剂盒显色、曝光,对 IDO 蛋白的表达进行检测。实验重复 3 次,做图列出其中 1 次结果。

结 果

1. G418 筛选浓度确定试验:2 周时观察 800、900、1000、1100μg/ml 的级别浓度梯度的细胞全部死亡。细胞全部死亡的最低 G418 浓度为 800μg/ml,故筛选浓度确定为 800μg/ml,维持浓度为 400μg/ml。

2. 稳定转染细胞中 IDO mRNA 的检测:用脂质体介导的方法将质粒 pcDNA3.1 - IDO 和空载体 pcDNA3.1 稳定转染 HepG₂ 细胞后,分别挑取抗 G418 的 pcDNA3.1 - IDO 单克隆株、pcDNA3.1 单克隆株各 10 个,然后扩大培养至足够量,提取细胞总 RNA,以反转录生成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,pcDNA3.1 转染组都未能扩增出片段,而 pcDNA3.1 - IDO 转染组成功扩增出 464bp 的目的基因片段(图 1),说明 IDO 基因已成功转染 HepG₂ 细胞。

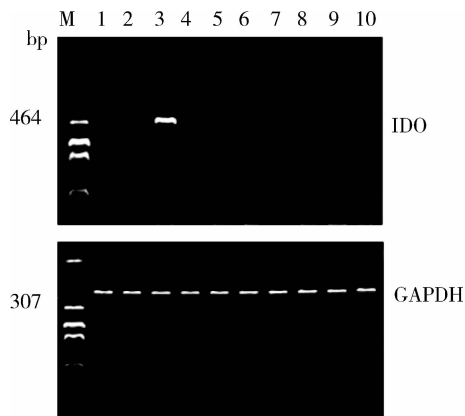


图 1 RT - PCR 检测各组细胞 IDO mRNA 的表达

M. Marker; 1. HepG₂; 2~8. pcDNA3.1 - IDO - HepG₂; 9~10. pcDNA3.1 - HepG₂

3. 稳定转染细胞中 IDO 蛋白的检测: Western Blot 检测显示, 质粒 pcDNA3.1-IDO 稳定转染的 HepG₂ 细胞表达 IDO 蛋白, 而质粒 pcDNA3.1 稳定转染 HepG₂ 细胞与未转染的 HepG₂ 细胞则不表达 IDO 蛋白(图 2)。

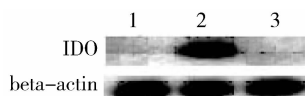


图 2 Western blotting 检测各组细胞 IDO 蛋白的表达

1. pcDNA3.1-HepG₂; 2. pcDNA3.1-IDO-HepG₂; 3. HepG₂

讨 论

目前已有对 IDO 蛋白在多种肿瘤中的表达及其意义的研究, Schroecksadel 等^[3]对妇科肿瘤、Brandacher 等^[4]和 Ino 等^[5]对结直肠癌标本的研究都表明, IDO 在癌组织表达高于正常组织, 且与恶性肿瘤患者远处转移的发生率和预后等均具有明显相关性, 甚至有学者提出该因子可以作为结直肠癌患者独立的预后因素。Nakamura 等^[6]通过研究宫颈癌患者病理标本后发现, 表达 IDO 的癌细胞具有更强的侵袭能力。Nonaka 等^[7]将 IDO 表达载体转染到人类卵巢癌细胞, 体内外研究 IDO 表达与癌细胞生长的关系, 结果发现 IDO 通过抑制自然杀伤细胞功能及血管发生促进卵巢癌的腹膜播散。但 IDO 在肿瘤的表达会因为肿瘤类型的不同而表达于不同细胞。目前国内研究 IDO 与肝癌关系报道较少。

Ishio 等^[8]研究发现将外周单核细胞和 HepG₂ 细胞混合培养后发现 HepG₂ 细胞表达 IDO mRNA, 而且表达水平较单独培养的外周单核细胞高, 进一步研究发现肝切除术后 IDO 阳性的病人复发率低于 IDO 阴性的病人, 所以对肝癌病人而言, IDO 可能发挥了抗肿瘤免疫作用。而本课题组在先前的研究发现 HCC 肿瘤细胞、癌旁肝硬变组织及肿瘤浸润组织中均有 IDO 的阳性表达, 证实除肿瘤细胞表达 IDO 外, 宿主细胞特别是抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC)也表达 IDO^[9]。说明宿主细胞特别是 APC 也参与了肝癌的免疫耐受; 体外实验证实 IDO 的高表达抑制 T 细胞正常增殖, 介导肿瘤细胞免疫逃逸, 应用 IDO 抑制剂可逆转此现象^[10]。Pan 等最近研究发现 IDO 过度表达与肝癌的转移率呈正相关, IDO 过度表达导致肝癌的预后不良, IDO 表达可作为肝癌患者生存的一个独立预后因素。综上所述, Ishio 研究发现 IDO 可能发挥了抗肿瘤免疫作用, 而本课题组、Pan 及大多数人研究发现 IDO 可能发挥了肿瘤的免

疫逃逸, IDO 的作用相反, 因此有必要从细胞和分子水平研究 IDO 与肝癌的关系。

本实验成功应用脂质体将真核细胞表达质粒 pcDNA3.1-IDO 转染到 HepG₂ 细胞, 并且应用 RT-PCR 和 Western blotting 技术证实 IDO 基因在转录和蛋白翻译水平上均表达。HepG₂ 细胞表达 IDO, 局部产生一个缺乏色氨酸的微环境, 并在其代谢物的协同作用下, 抑制 T 细胞应答, IDO 基因稳定转染 HepG₂ 细胞系的成功建立, 使体内外研究 IDO 与肝癌的关系成为可能, 为下一步本课题组在细胞和分子水平研究 IDO 介导的肝癌免疫逃逸和 IDO 抑制剂的免疫治疗奠定了基础。

(志谢: 感谢山西大学生物技术研究所李卓玉教授对本课题稳定转染技术的指导)。

参考文献

- Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T_H1 cell tolerance: immune suppression by starvation? [J]. Immunol Today, 1999, 20(10): 469-473
- Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signaling and non-canonical NF- κ B activation [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(10): 817-823
- Schroeksadel K, Zangerle R, Bellmann-Weiler R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and other interferon- γ -mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection [J]. Curr Drug Metab, 2007, 8(3): 225-236
- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1144-1151
- Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 95(11): 1555-1561
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer [J]. Cancer Sci, 2007, 98(6): 874-881
- Nonaka H, Saga Y, Fujiwara H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion [J]. Int J Oncol, 2011, 38(1): 113-120
- Ishio T, Goto S, Tahara K, et al. Immunoactive role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(3): 319-326
- 武亚娟, 王琦, 武希润, 等. 吡啶胺 2,3-双加氧酶在肝癌组织的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(6): 585-587
- 康璇, 王琦. 吡啶胺 2,3-双加氧酶介导肝癌细胞免疫逃逸的实验研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(5): 12-16

(收稿: 2011-07-12)

(修回: 2011-07-27)