

可用于 IDO1 抑制剂药效学研究的 KPIC 原位胰腺癌小鼠模型的构建

李天祺¹ 赛音贺西格² 杨青^{1Δ}

(¹ 复旦大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, ²遗传学和遗传工程系 上海 200438)

【摘要】 目的 构建 KPIC 原位胰腺癌小鼠模型用于吲哚胺 2,3-双加氧酶 1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)抑制剂药效学研究。**方法** 采用实时定量荧光 PCR 和 Western blot 等方法鉴定 KPIC 细胞中 IDO1 的表达情况;使用 HPLC 检测 IDO1 抑制剂 1-甲基-L-色氨酸(1-methyl-L-tryptophan, 1-L-MT)对 KPIC 细胞中 IDO1 活性的抑制作用及 KPIC 原位胰腺癌小鼠血清中 IDO1 活性;接种 KPIC 细胞到小鼠胰腺构建 KPIC 原位胰腺癌小鼠;免疫组化法检测 KPIC 原位胰腺癌小鼠肿瘤中 IDO1、肿瘤增殖指数 Ki67、胆系标志物 Sox9 的表达。**结果** 经 mRNA 及蛋白质水平鉴定, KPIC 细胞内有 IDO1 及其同工酶的表达;1-L-MT 能够下调 KPIC 细胞中 IDO1 活性;KPIC 原位胰腺癌小鼠构建成功,在原位肿瘤中 IDO1、Ki67 和 Sox9 均有表达,小鼠血清中 IDO1 活性上调。**结论** KPIC 原位胰腺癌小鼠表达 IDO1,可用于 IDO1 抑制剂的筛选及药效学评价。

【关键词】 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1(IDO1); 胰腺癌; 1-甲基-L-色氨酸(1-L-MT); 小鼠模型

【中图分类号】 R965.1 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.05.002

Construction of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice model for the pharmacodynamics study of IDO1 inhibitor

LI Tian-qi¹, SAIYIN He-xi-ge², YANG Qing^{1Δ}

(¹ Department of Biochemistry, ² Department of Genetics and Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China)

【Abstract】 Objective To establish a KPIC orthotopic pancreatic cancer mice model for the pharmacodynamics study of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor. **Methods** The expression of IDO1 in KPIC cells was investigated by real-time quantitative PCR and Western blot. The inhibitory effect of the IDO1 inhibitor 1-methyl-L-tryptophan (1-L-MT) on IDO1 activity in KPIC cells and serum IDO1 activity in orthotopic pancreatic cancer mice were analyzed by HPLC. KPIC cells were inoculated into mouse pancreas to construct KPIC orthotopic pancreatic cancer mice. The expression of IDO1, proliferative index Ki67 and biliary marker Sox9 in KPIC orthotopic pancreatic cancer mice was detected by immunohistochemistry. **Results** The mRNA and protein expressions of IDO1 and its isozymes were identified in KPIC cells. 1-L-MT was able to inhibit IDO1 activity in KPIC cells. KPIC orthotopic pancreatic cancer mice were successfully constructed. IDO1, Ki67 and Sox 9 were expressed in KPIC tumor, and serum IDO1 activity was enhanced in orthotopic pancreatic cancer mice. **Conclusions** The KPIC orthotopic pancreatic cancer mice express IDO1, it can be used for screening and pharmacodynamics evaluation of IDO1 inhibitors.

【Key words】 indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1); pancreatic cancer; 1-methyl-L-tryptophan (1-L-MT); mice model

* This work was supported by the Key Biomedical Program of Shanghai (18431902600, 17431902200).

胰腺癌是一种高致命性的恶性消化系统肿瘤。吸烟、慢性胰腺炎、肥胖、糖尿病和家族遗传史等都是胰腺癌的高致病因素^[1-2]。大多数胰腺癌患者确诊时即为晚期,且手术切除^[3]、放化疗^[4]等传统治疗方法都不能显著延长患者生存时间^[5]。随着对胰腺癌分子机制的探索,近年来免疫治疗已经成为研究热点^[6]。

目前肿瘤免疫治疗方法有肿瘤过继免疫治疗法、肿瘤特异性疫苗及免疫检查点抑制疗法等。免疫检查点是免疫系统的负调节因子,在维持自身免疫耐受方面发挥关键作用^[7]。肿瘤可利用免疫检查点负调节免疫这一特性逃脱免疫系统的监视,因此免疫检查点抑制疗法是肿瘤免疫治疗策略的关键部分^[8-9]。主要的免疫检查点有程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death-1, PD-1)及其配体(PD-ligand 1, PD-L1)^[10]、细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)^[11]和吲哚胺 2,3-双加氧酶 1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)^[12]等。IDO1 是催化人体必需氨基酸色氨酸(tryptophan, Trp)沿犬尿氨酸途径(kynurenine pathway, KP)分解代谢的限速酶。IDO1 多表达于肿瘤细胞及基质免疫细胞(如树突细胞等)^[13],IDO1 在肿瘤中的过表达会诱导效应 T 细胞的凋亡及功能障碍,诱导抑制性调节 T 细胞增殖^[14],激活骨髓衍生的抑制细胞(myeloid derived suppressor cell, MDSC)^[15]。IDO1 可促进肿瘤的新血管生成^[16],还可通过诱导肿瘤休眠程序而影响肿瘤重建细胞的存活^[17]。IDO1 作为 PD-1 和 CTLA-4 之外的新免疫检查点,可通过多种机制促进肿瘤发展及免疫逃逸。

IDO1 抑制剂作为治疗肿瘤的新型药物会带来巨大的社会和经济效益^[18]。目前尚无 IDO1 抑制剂药物上市,但已有数个 IDO1 抑制剂进入临床试验阶段。目前用于 IDO1 抑制剂药效学研究的肿瘤动物模型多采用高表达 IDO1 的肿瘤皮下荷瘤模型,成瘤模式单一,造模方式有待改进。

IDO1 在胰腺癌中高表达,且与患者不良预后相关^[19],IDO1 抑制剂有望用于治疗胰腺癌。使用

高表达 IDO1 的胰腺癌细胞构建有效模拟胰腺癌特性的动物模型,对于 IDO1 抑制剂的药效学研究具有重要意义。本文选取基因突变胰腺癌小鼠源的胰腺癌细胞系 KPIC,检测细胞中 IDO1 表达情况及 IDO1 抑制剂 1-甲基-L-色氨酸(1-methyl-L-tryptophan, 1-L-MT)对其抑制效率;构建 KPIC 原位胰腺癌小鼠模型,观察血清中 IDO1 活性,研究该动物模型作为 IDO1 抑制剂药效学研究工具的可能性。

材 料 和 方 法

试剂和药品 Kan、Amp 抗生素(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),0.25 %胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 HyClone 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),IDO1 一抗(杭州华安生物技术有限公司),IDO 一抗(美国 Protech 公司),IDO2 一抗(美国 Santa Cruz 公司),GAPDH 一抗(杭州华安生物技术有限公司),Sox9 一抗(英国 Abcam 公司),Ki67 一抗、IFN- γ (上海碧云天生物技术有限公司),L-Trp、苯甲基磺酰氟(PMSF)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),ECL 显色液(上海天能科技有限公司),Trizol 试剂(日本 Takara 公司),1-L-MT、L-犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)、多聚甲醛(美国 Sigma-Aldrich 公司),小鼠饲料及垫料(上海斯莱克实验动物有限公司)。

仪器和设备 垂直平板电泳槽(北京百晶生物技术有限公司),转膜仪、CFX96 Touch Real-Time PCR(美国 Bio-Rad 公司),Multiskan FC 酶标仪、超低温冰箱、Legend Micro 17R 高速离心机、Forma Series CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),SW-CJ-1FD 洁净工作台(苏州净安泰空气技术有限公司),凝胶成像系统(上海实验设备仪器厂),立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司),高效液相色谱(美国 Agilent 公司),石蜡切片机(德国 Leica 公司)。

KPIC 细胞的培养及鉴定 小鼠胰腺癌细胞 KPIC 经测序验证后使用。细胞培养采用 10% DBS + 90% DMEM 培养基,内含氨苄青霉素 100 U/mL,硫酸链霉素 100 U/mL,培养条件为 37 °C、5% CO₂。

实时荧光定量 PCR 将细胞吹打均匀,传代于 6 cm 细胞培养板,待生长至 90% 汇合时,用 Trizol (RNA iso plus)提取细胞总 RNA,37 °C 连接 15 min,逆转录 PCR (85 °C、5 s)得到 cDNA,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,55 °C 复性 20 s,循环 45 次,95 °C、30 s,65 °C、5 s 扩增。实时荧光定量 PCR 检测 KPIC 细胞中 IDO1 及其同工酶 mRNA 水平。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>m-IDO1</i>	F: CCTGCAATCAAAGCAATCC
	R: CCACAAAGTCACGCATCCT
<i>m-IDO2</i>	F: TTATCTCCGCTGCCACCA
	R: GGTCTTCTCCCTGACACTCTTC
<i>m-TDO</i>	F: GAACGACGACTGTCATACCG
	F: TGAGCGTGTCAATGTCCATAA
<i>m-β-Actin</i>	F: CTGTCCCTGTATGCCTCTG
	R: ATGTCACGCACGATTTC

F: Forward; R: Reverse.

Western blot 提取细胞总蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度后进行 Western blot 检测。每孔上样量为 80 μg。经 SDS-PAGE (10%) 后,将胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜,使用 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h。加入抗鼠 IDO1 一抗(1:1 000)、抗鼠 IDO2 一抗(1:500)、抗鼠 TDO 一抗(1:1 000)和 GAPDH 一抗(1:10 000),4 °C 孵育过夜,PBST(含 0.2% Tween-20 的 PBS 缓冲液)洗膜 3 次,每次 15 min。加入相应二抗(1:1 000)室温孵育 45 min,PBST 洗膜 3 次。使用 ECL 显色试剂盒检测 KPIC 细胞 IDO1 及其同工酶的蛋白质水平。

CCK-8 检测 1-L-MT 对 KPIC 细胞活力影响

将 KPIC 细胞接种于 96 孔板(铺板密度:5 000 个/孔),培养 6 h 使细胞贴壁。吸弃培养基,加入梯度浓度 1-L-MT,使每孔终体积为 200 μL,孵育 24 h;吸弃培养基,每孔加入 CCK-8 检测试剂 10 μL,补加培养基 100 μL,培养 30 min 后于 450 nm 处检测吸光度(*D*)。细胞活力(%) = $[D_{\text{给药}} - D_{\text{空白}}] / [D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}] \times 100$ 。

1-L-MT 对 KPIC 细胞内 IDO1 活性的影响

将细胞分为 3 组:对照组、低浓度给药组(50 μmol/L

1-L-MT)及高浓度给药组(100 μmol/L 1-L-MT)。KPIC 细胞计数,铺板,培养于 12 孔板,加入梯度浓度 1-L-MT (0、50、100 μmol/L)培养 24 h,吸取细胞上清 200 μL,加入等体积 5% 高氯酸溶液,混匀 30 s。室温静置 15 min,充分沉淀上清中的蛋白质,16 000 × *g* 离心 10 min,取上清液,加入 1/2 体积甲醇(色谱纯),振荡 2 min,16 000 × *g* 离心 10 min。0.22 μm 过滤器过滤上清后上样,HPLC 检测 IDO1 活性。使用 HPLC 检测 Trp 和 Kyn 浓度,计算 Kyn/Trp 比值。

细胞因子 IFN-γ 可诱导 IDO1 表达^[20],IFN-γ 处理 KPIC 细胞系研究 1-L-MT (100 μmol/L)对上调的 IDO1 活性的影响。将细胞分为 3 组:对照组、IFN-γ 处理组(100 ng/mL IFN-γ)及给药组(100 μmol/L 1-L-MT + 100 ng/mL IFN-γ)。给药组中加入梯度浓度 1-L-MT (0、100 μmol/L),并加入终浓度为 100 ng/mL 的鼠源 IFN-γ,刺激细胞中 IDO1 上调。培养 24 h 后,吸取细胞上清 200 μL,加入等体积 5% 高氯酸溶液,混匀 30 s。室温静置 15 min,以便充分沉淀上清中的蛋白质,然后 16 000 × *g* 离心 10 min,取上清液加入 1/2 体积甲醇(色谱纯),振荡 2 min,16 000 × *g* 离心 10 min。0.22 μm 过滤器过滤上清后上样,HPLC 检测 IDO1 活性。

KPIC 原位胰腺癌小鼠模型的构建及鉴定

肿瘤模型的构建 于 10 cm 细胞培养板培养 KPIC 细胞,待细胞生长至 80% 汇合时,用胰蛋白酶消化细胞,PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为 4.5×10^6 个/mL。C57BL/6 小鼠(雌性,6 周龄)购自上海杰思捷公司,饲养及实验过程均符合标准。用异氟烷麻醉小鼠,左侧肋骨下缘脱毛,剪开皮肤及肌肉组织,找到脾脏和胰脏,向胰脏注射 KPIC 细胞(4.5×10^5 个/只),缝合肌肉组织及外侧皮肤,全程注意控制麻醉剂量,防止小鼠因麻醉过量死亡。术后复温,待小鼠苏醒即放入新的鼠笼中。术后 24 h 内密切观察小鼠状态:饮食、饮水是否正常。接种 KPIC 细胞的小鼠饲养 15 天后,引颈处死,解剖,取出瘤块。PBS 冲洗瘤块,剪碎(1 mm × 2 mm),置于 PBS 中备用。实验接种用小鼠的手术过程同前,不同之处在于:将胰腺剪口,瘤块包于其中,缝合胰脏后归位。全程注意控制麻醉剂量,防止小鼠死亡。待小鼠苏醒即放入新的鼠笼中,术后 24 h 密切观察小鼠状态:有无出血及感染。

肿瘤模型的鉴定 用 PBS 冲洗解剖所得新鲜

组织,4 %多聚甲醛于 4 ℃固定 48 h,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡浸泡 2~3 h,包埋,切片。

HE 染色检测肿瘤生长情况 切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后,行常规 HE 染色,脱水、透明、封片后于显微镜下观察。

免疫荧光检测肿瘤 IDO1 表达 切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后,使用过氧化氢除去组织内源性过氧化物,使用 EDTA-柠檬酸钠抗原修复液修复抗原(微波法)。滴加血清封闭液,室温孵育 1 h;滴加抗-IDO1 一抗 50 μ L,4 ℃过夜。PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 15 min。加入相应二抗及 DAPI (1:1 000),室温避光孵育 45 min,PBS 洗膜 3 次,封片,于显微镜下观察染色情况。

免疫组化检测肿瘤增殖及转录因子表达 抗原修复过程同前。滴加血清封闭液,室温孵育 1 h;滴加抗-Ki67 一抗 50 μ L,抗-Sox 9 一抗 50 μ L,4 ℃过夜。PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 15 min。加入相应二抗,室温避光孵育 45 min,使用 DAB 显色试剂盒显色。PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 15 min。对细胞核行 HE 染色。自来水冲洗 10 min,脱水,透明,封片,于显微镜下观察。

KPIC 原位胰腺癌小鼠血清的制备 小鼠麻醉后摘眼球取血,室温静置 10 min,4 ℃下 3 600 \times g 离心 15 min,取上清,即为粗血清。粗血清经 3 600 \times g 离心 10 min,吸取上清,加入等体积 5 %高氯酸溶液,混匀 30 s。室温静置 15 min,充分沉淀血清中的蛋白质,16 000 \times g 离心 10 min,取上清,加入 1/2 体积甲醇(色谱纯),振荡 2 min,16 000 \times g 离心 10 min,经 0.22 μ m 过滤器过滤后上样,于 HPLC 检测 Trp 和 Kyn 浓度,检测值为实际浓度的 1/3。

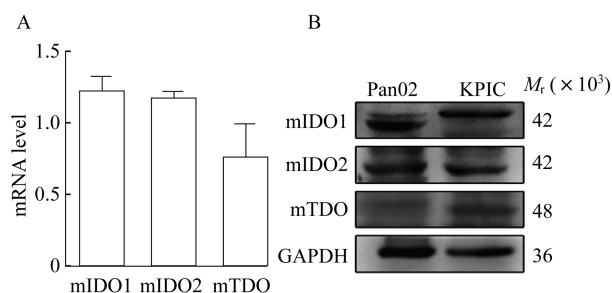
HPLC 检测条件 色谱条件:C18 柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);柱温 25 ℃;流动相为 15 mmol/L 乙酸钠-乙酸溶液(含体积分数为 6%的乙腈,pH = 3.6);流速 1 mL/min;进样量 20 μ L;检测波长:Trp 为 280 nm,Kyn 为 360 nm。用标准曲线法计算样本中 Trp 和 Kyn 含量。

统计学分析 统计分析采用 GraphPad Prism 6.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据间差异用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

KPIC 细胞中 IDO1 及其同工酶的表达 在

mRNA 水平检测到 KPIC 细胞表达 IDO1 及其同工酶 IDO2 和 TDO,且 IDO1 及 IDO2 mRNA 水平较高,TDO mRNA 水平较低(图 1 A)。以鼠源胰腺癌细胞系 Pan02 作为对照,在蛋白质水平检测到 KPIC 细胞表达 IDO1 及其同工酶 IDO2 和 TDO,且蛋白质水平趋势同 mRNA 水平趋势一致(图 1 B)。

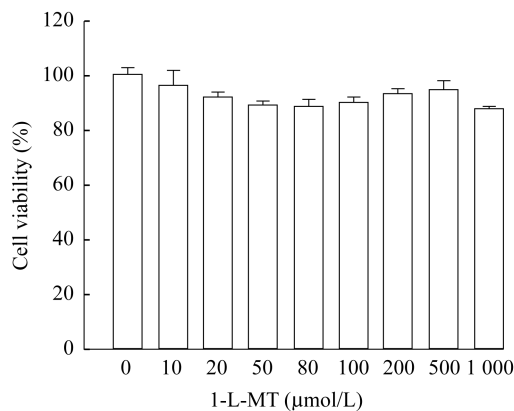


A: mRNA levels measured by real-time qPCR; B: Protein levels measured by Western blot.

图 1 KPIC 细胞中 IDO1 及其同工酶的表达

Fig 1 mRNA and protein levels of IDO1 and its isozyme in KPIC cells

1-L-MT 对 KPIC 细胞活力的影响 选取 IDO1 经典抑制剂 1-L-MT 作为阳性药物,检测其对 KPIC 细胞活力的影响。在 0~1 000 μ mol/L 的浓度范围内,1-L-MT 使 KPIC 细胞活力轻微下降,在 50 和 1 000 μ mol/L 时下降较为明显,但与未加药处理的细胞相比,差异无统计学意义(图 2)。



KPIC cell viability was measured by cell counting cck-8. Results were expressed as $\bar{x} \pm s$ from 3 independent experiments.

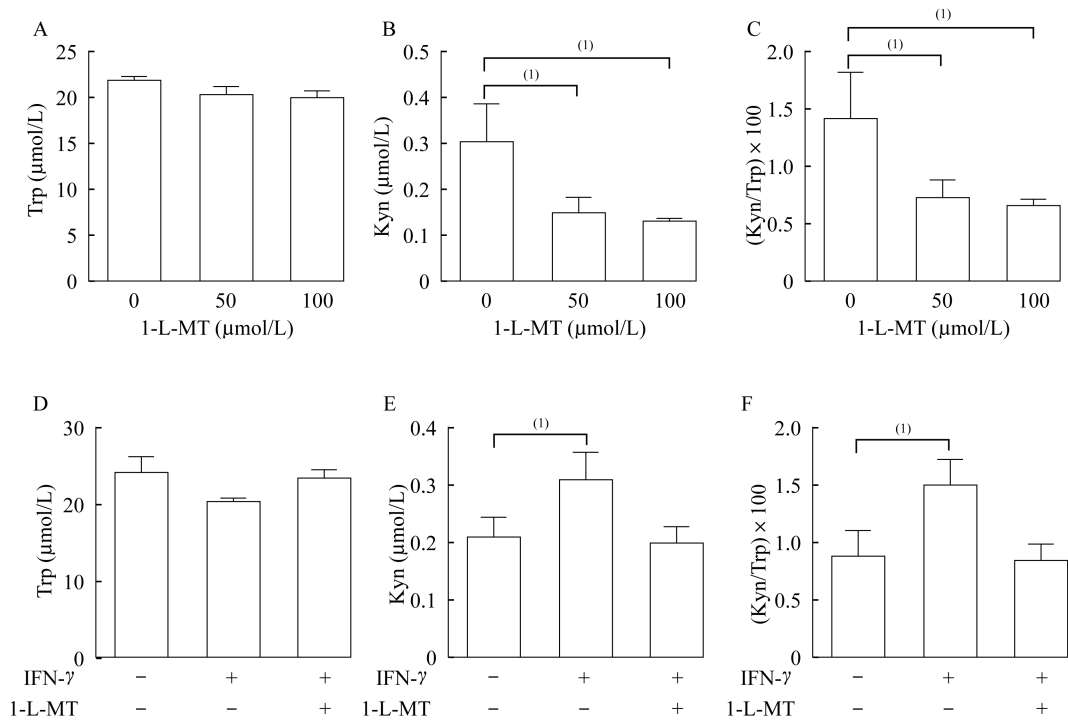
图 2 1-L-MT 对 KPIC 细胞活力的影响

Fig 2 The effect of 1-L-MT on cell viability of KPIC

1-L-MT 对 KPIC 细胞中 IDO1 活性的影响 1-L-MT 处理细胞 24 h 后,经 HPLC 检测发现细胞上清中 Trp 含量无明显变化(图 3A),Kyn 含量降低,差

异有统计学意义(低浓度给药组, $P=0.0318$;高浓度给药组, $P=0.0178$;图 3B)。Kyn/Trp 显示 IDO1 活性下调(低浓度给药组, $P=0.0447$;高浓度给药组, $P=0.0287$;图 3C)。与对照组相比,经 IFN- γ 处理的 KPIC 细胞 Trp 含量降低(图 3D),Kyn 含量升高($P=0.0223$,图 3E),Kyn/Trp 比值升高($P=0.0154$,

图 3F),再加入 1-L-MT (100 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h, Trp、Kyn 含量及 Kyn/Trp 比值均恢复到对照组的水平(表 2)。实验结果表明,1-L-MT 不仅可以下调 KPIC 细胞本底的 IDO1 活性,还可以逆转异常上调的 IDO1 活性。KPIC 细胞可用于后续 IDO1 抑制剂药效学研究动物模型的构建。



A-C: KPIC cells were treated with 1-L-MT (50 or 100 $\mu\text{mol/L}$, 24 h); D-F: KPIC cells were pretreated with IFN- γ (100 ng/mL, 24 h), then treated with 1-L-MT (100 $\mu\text{mol/L}$, 24 h). Results were expressed as $\bar{x} \pm s$ from 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

图 3 HPLC 检测 1-L-MT 对 KPIC 细胞中 IDO1 活性的抑制作用

Fig 3 Inhibitory effect of 1-L-MT on IDO1 activity in KPIC cells determined by HPLC

表 2 KPIC 细胞上清中 Trp 和 Kyn 含量及比值

Tab 2 Concentrations of Trp and Kyn and the ratio of Kyn/Trp in the supernatant of KPIC cells

Index	Group 1			Group 2		
	A	B	C	A	B	C
Trp ($\mu\text{mol/L}$)	21.68 \pm 0.60	20.25 \pm 0.98	19.98 \pm 0.66	24.05 \pm 2.31	20.53 \pm 0.35	23.48 \pm 1.14
Kyn ($\mu\text{mol/L}$)	0.30 \pm 0.08	0.15 \pm 0.04	0.13 \pm 0.01	0.21 \pm 0.04	0.31 \pm 0.05	0.20 \pm 0.03
(Kyn/Trp) $\times 100$	1.40 \pm 0.41	0.73 \pm 0.14	0.65 \pm 0.06	1.05 \pm 0.24	1.51 \pm 0.21	0.86 \pm 0.15

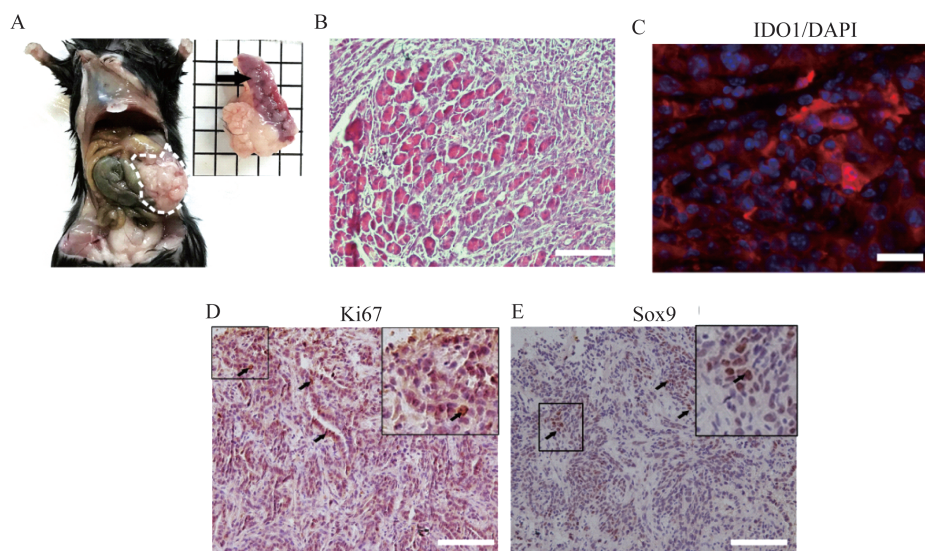
Group 1A: KPIC cells; Group 1B: KPIC cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ 1-L-MT for 24 h; Group 1C: KPIC cells treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ 1-L-MT for 24 h; Group 2A: KPIC cells; Group 2B: KPIC cells treated with 100 ng/mL IFN- γ for 24 h; Group 2C: KPIC cells pretreated with 100 ng/mL IFN- γ for 24 h, then treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ 1-MT for 24 h.

KPIC 原位胰腺癌小鼠模型构建 选取 5 只 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠,将肿瘤组织接种于小鼠胰腺处。肿瘤生长较快,接种后 7 天左右可触及腹腔内肿瘤,小鼠生存期约为 23 天。小鼠引颈处死后腹腔解剖可见肿瘤,且肿瘤已累及周围脏器(如脾

脏等),剥离的肿瘤与脾脏粘连较为严重,脾脏上可见白色的肿瘤转移灶(图 4 A)。HE 染色结果显示,肿瘤分化程度较低,细胞核排列混乱,视野内胰腺正常腺泡等已不可见,癌变较为严重(图 4 B)。免疫荧光染色结果表明肿瘤组织中有 IDO1 表达

(图 4 C)。KPIC 肿瘤切片的免疫组化显现大片 Ki67 阳性信号,肿瘤区有较多 Ki67 阳性细胞(箭头所示),说明小鼠具备肿瘤特征(图 4 D)。Sox9 在该模型中也有一定程度的表达(箭头所示),结合细胞形态及阳性信号可确定检测区域为癌变胰腺而非

正常胰腺部位(图 4 E)。免疫组化研究表明,KPIC 小鼠病理表现与临床胰腺癌病理特征相近,正常胰腺结构已不可见,小鼠腹腔内肿瘤已发生转移,肿瘤恶性程度较高,肿瘤细胞内表达 IDO1、Ki67 及 Sox9,KPIC 原位胰腺癌小鼠模型构建成功。



A: Anatomical results of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice; B: HE staining (scale bar = 100 μm); C: Immunofluorescence staining of IDO1 (red) in KPIC tumors with DAPI (blue) (scale bar = 20 μm); D: Immunostaining of Ki67 in KPIC tumors (scale bar = 100 μm); E: Immunostaining of Sox9 in KPIC tumors (scale bar = 100 μm).

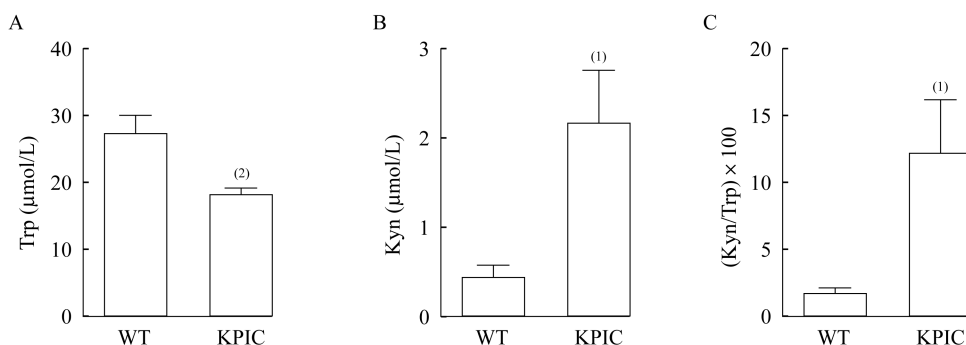
图 4 KPIC 原位胰腺癌小鼠解剖表现及 IDO1、Ki67 和 Sox9 免疫组化

Fig 4 Anatomical characteristics of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice and immunohistochemical staining of IDO1, Ki67 and Sox9

KPIC 原位胰腺癌小鼠血清 IDO1 活性检测

为了进一步检测 KPIC 原位胰腺癌小鼠体内的 IDO1 活性是否异常升高,选取手术后 20 天的小鼠,采集血清,以野生型小鼠血清为对照,HPLC 检测小鼠血清中 Trp、Kyn 浓度及 IDO1 活性(每组 5

只)。与野生型 C57 小鼠相比(表 3),KPIC 原位胰腺癌小鼠的 Trp 含量较低(图 5A, $P = 0.0006$),而 Kyn 含量较高($P = 0.0212$,图 5B),接受手术的 KPIC 原位胰腺癌小鼠血清中 IDO1 活性显著升高($P = 0.0285$,图 5C)。



Serum of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice ($n = 5$) and wild type mice ($n = 5$) were collected on day 20 after tumor implantation. Results were expressed as $\bar{x} \pm s$ from 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.001$. WT: Wild type.

图 5 KPIC 原位胰腺癌小鼠血清中 IDO1 活性

Fig 5 Serum IDO1 activity of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice

表3 KPIC 原位胰腺癌小鼠血清中 IDO1 活性
Tab 3 Serum IDO1 activity of KPIC orthotopic pancreatic cancer mice ($\bar{x} \pm s$)

Index	WT	KPIC
Trp ($\mu\text{mol/L}$)	27.07 \pm 3.05	18.36 \pm 1.81 ⁽¹⁾
Kyn ($\mu\text{mol/L}$)	0.43 \pm 0.16	2.16 \pm 1.34 ⁽²⁾
(Kyn/Trp) \times 100	1.61 \pm 0.58	12.23 \pm 8.89

WT: Wild type. vs. WT, ⁽¹⁾ $P = 0.0006$, ⁽²⁾ $P = 0.0212$.

讨 论

肿瘤小鼠模型主要有:原发癌症的转基因小鼠模型;将人类肿瘤移植至裸鼠体内的异种移植模型^[21];皮下荷瘤小鼠模型以及本研究所采用的原发癌症的转基因小鼠来源的同种移植模型。原发癌症的转基因小鼠虽能模拟临床患者发病情况,但造模周期较长,一般耗时数月,人力、物力成本大。异种移植模型选取的裸鼠为免疫缺陷鼠,不能完整模拟含有免疫系统的肿瘤微环境,也不能用于免疫治疗药物的药效学研究。皮下荷瘤小鼠模型虽然造模相对容易且肿瘤大小易于测量,但相较于原位接种模型,荷瘤模型中肿瘤脱离了原发部位,不能很好模拟肿瘤的实际生长环境。本研究构建的 KPIC 原位胰腺癌小鼠属于原发癌症的转基因小鼠来源的同种移植模型,可以与原发癌症的转基因小鼠一样模拟患者临床发病情况,造模周期也较转基因小鼠短。人源化 PDX 小鼠属于异种移植模型,接种的是临床患者的肿瘤组织,理论上比 KPIC 原位胰腺癌小鼠更接近临床病理特征。但是 PDX 小鼠均为免疫缺陷的裸鼠,不能用于免疫治疗药物包括 IDO1 抑制剂的药效学研究。

测定细胞水平 IDO1 活性经典的方法有 HeLa 细胞 IFN- γ 刺激法和 HEK293 细胞转染 IDO1 质粒等方法^[22],两者都是特异性表达 IDO1 的细胞系,而 KPIC 细胞中 IDO1、IDO2 及 TDO 均有表达,不适于特异性评价 IDO1 抑制剂的细胞水平 IC₅₀,在此未使用 KPIC 细胞检测 1-L-MT 对 IDO1 的 IC₅₀。作为 IDO1 经典抑制剂,1-L-MT 的体外抑制活性已有报道,酶水平对 IDO1 的 IC₅₀ 为 380 $\mu\text{mol/L}$,细胞水平对 IDO1 的 IC₅₀ 为 120 $\mu\text{mol/L}$ ^[22]。1-L-MT 对 KPIC 细胞无显著杀伤作用。IDO1 抑制剂不同于化疗药物,一般不会直接杀死肿瘤细胞^[23]。Pan 等^[24]报道,使用 MTT 法测定其研发的 IDO1 抑制

剂对 HeLa 细胞、MCF-7 细胞及 HEK293T 细胞的毒性,结果表明这些抑制剂在抑制 IDO1 的有效浓度范围内没有细胞毒性。

用于 IDO1 抑制剂药效学研究的模型多为荷瘤小鼠,将表达 IDO1 的肿瘤接种于小鼠腋下,通过测量肿瘤大小评估药物的治疗效果。用于 IDO1 抑制剂胰腺癌药效学研究的动物模型是 Pan02 荷瘤小鼠,美国 Incyte 公司曾选取 Pan02 荷瘤小鼠研究其 IDO1 抑制剂 INCB024360 的药效作用^[25]。

本文旨在建立一种更接近于临床胰腺癌病理特征的、可用于 IDO1 抑制剂类药物药效学研究的动物模型。KPIC 转基因胰腺癌小鼠带有 *KRAS* (*Kras*^{G12D})、*TP53* (*Trp53*^{R172H/+})、*CDKN2A* (*Ink4*^{fllox/+}) 和 *Ptf1/p48-Cre* (KPIC) 基因突变^[26]。研究表明,约 90% 的胰腺癌患者 *KRAS* 致癌基因发生突变,60%~70% 的胰腺癌患者 *p53* 抑癌基因发生突变,大于 50% 的患者 *CDKN2A* 抑癌基因发生突变,50% 的患者 *SMAD4* 抑癌基因发生突变^[27]。本研究将从 KPIC 转基因胰腺癌小鼠中分离得到的鼠源胰腺癌 KPIC 细胞注射到小鼠胰腺,构建 KPIC 原位胰腺癌小鼠,该模型可以稳定表达临床胰腺癌患者突变率较高的 3 种基因,能够很好地模拟胰腺癌患者的病理特征,更适用于药效学研究。

IDO1 作为除 PD-1、CTLA-4 之外的新的免疫检查点,在多种肿瘤中高表达,包括胰腺癌^[28]。本研究首先确认 KPIC 细胞中存在 IDO1 及其同工酶,经典的 IDO1 抑制剂 1-L-MT 对 KPIC 细胞活力无显著影响,但可有效降低 KPIC 细胞本底 IDO1 活性以及 IFN- γ 处理后上调的 IDO1 活性,为今后开展动物实验提供了基础。构建 KPIC 原位胰腺癌小鼠,经解剖研究证实接种的瘤块已生长为肿瘤,且肿瘤已累及周围脏器,并伴有转移灶产生,该结果与临床患者相似。肿瘤增殖指数 Ki67 代表肿瘤细胞的增殖能力,常用于肿瘤诊断指标^[27]。Sox9 作为胆系标志物,多被用于胰腺肿瘤诊断,通过 Sox9 的阳性信号的位置以及肿瘤切片 HE 染色结果可以判定是否发生胰腺癌变^[30]。HE 染色结果表明肿瘤恶性程度较高,Sox9 及 Ki67 免疫组化染色结果表明该瘤块为胰腺导管癌。免疫荧光染色证实肿瘤组织表达 IDO1。以上结果表明 KPIC 原位胰腺癌小鼠模型构建成功,且结果稳定。HPLC 检测发现, KPIC 原位胰腺癌小鼠血清中 IDO1 活性相比于野

生型小鼠显著上调。

综上所述,KPIC 原位胰腺癌小鼠适用于 IDO1 抑制剂的筛选及药效学评价,为研究 IDO1 在胰腺癌中引起的免疫耐受现象及相关机制提供了一个良好的研究工具,将在新药研发中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] PINHO AV, CHANTRILL L, ROOMAN I. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer [J]. *Cancer Letters*, 2014, 345(2): 203–209.
- [2] 莫镇州, 黄博. 胰腺癌的危险及预后因素研究现状[J]. 临床医药实践, 2018, 27(1): 56–60.
- [3] 黄长山, 余伟, 王谦, 等. 扩大胰十二指肠切除与标准胰十二指肠切除治疗胰腺癌的临床研究[J]. 肝胆外科杂志, 2018, 26(1): 35–38.
- [4] HAN H, VON HOFF DD. SnapShot: pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 424.
- [5] 蒋会娟, 张洪志, 李文博. 胰腺癌术后辅助化疗和辅助放疗的临床疗效分析[J]. 北方药学, 2018, 15(4): 132–133.
- [6] SIDERAS K, BIERMANN K, YAP K, et al. Tumor cell expression of immune inhibitory molecules and tumor-infiltrating lymphocyte count predict cancer-specific survival in pancreatic and ampullary cancer[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(3): 572–582.
- [7] PARDOLL DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252–264.
- [8] KYI C, POSTOW MA. Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges [J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(7): 821–837.
- [9] COLLIN M. Immune checkpoint inhibitors: a patent review (2010–2015)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(5): 555–564.
- [10] BOUSSIOTIS VA. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(18): 1767–1778.
- [11] ITO A, KONDO S, TADA K, et al. Clinical development of immune checkpoint inhibitors [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 605478.
- [12] BROCHEZ L, CHEVOLET I, KRUSE V. The rationale of indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibition for cancer therapy [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 76: 167–182.
- [13] BILIR C, SARISOZEN C. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO): only an enzyme or a checkpoint controller? [J]. *J Oncol Sci*, 2017, 3(2): 52–56.
- [14] ZHAI L, SPRANGER S, BINDER DC, et al. Molecular pathways: targeting IDO1 and other tryptophan dioxygenases for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(24): 5427–5433.
- [15] PRENDERGAST GC, MALACHOWSKI WJ, MONDAL A, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 336: 175–203.
- [16] MONDAL A, SMITH C, DUHADAWAY JB, et al. IDO1 is an integral mediator of inflammatory neovascularization[J]. *EBioMedicine*, 2016, 14: 74–82.
- [17] LIU Y, LIANG X, YIN X, et al. Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15207.
- [18] LI F, ZHANG R, LI S, et al. IDO1: an important immunotherapy target in cancer treatment [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47: 70–77.
- [19] ZHANG T, TAN X, XU Y, et al. Expression and prognostic value of indoleamine 2, 3-dioxygenase in pancreatic cancer [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(6): 710–716.
- [20] VIDAL C, LI W, SANTNER-NANAN B, et al. The kynurenine pathway of tryptophan degradation is activated during osteoblastogenesis[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(1): 111–121.
- [21] HWANG C, BOJ SF, CLEVERS H, et al. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Pathol*, 2016, 238(2): 197–204.
- [22] KOBLISH HK, HANSBURY MJ, BOWMAN KJ, et al. Hydroxyamidines inhibitors of indoleamine-2, 3-dioxygenase potentially suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2): 489–498.
- [23] MUNN DH, MELLOR AL. IDO in the Tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance[J]. *Trends Immunol*, 2016, 37(3): 193–207.
- [24] PAN L, ZHENG Q, CHEN Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives as IDO1 inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 157: 423–436.
- [25] VACCHELLI E, ARANDA F, EGGERMONT A, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy[J]. *Onco Immunol*, 2014, 3(10): e957994.
- [26] MA L, SAIYIN H. LSL-KrasG12D; LSL-Trp53R172H/+; Ink4flox/+; Ptf1/p48-Cre mice are an applicable model for locally invasive and metastatic pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e176844.
- [27] KAMISAWA T, WOOD LD, ITOI T, et al. Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388(10039): 73–85.
- [28] UYTENHOVE 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(10): 1269–1274.
- [29] QIN R, SMYRK TC, REED NR, et al. Combining clinicopathological predictors and molecular biomarkers in the oncogenic K-RAS/Ki67/HIF-1 α pathway to predict survival in resectable pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(3): 514–522.
- [30] SHROFF S, RASHID A, WANG H, et al. SOX9: a useful marker for pancreatic ductal lineage of pancreatic neoplasms [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(3): 456–463.

(收稿日期: 2018-09-13; 编辑: 段佳)