

SOCS3 基因在人肺腺癌细胞株 A549 中的表达及其对细胞增殖的影响

余祖滨 白莉 闵家新 姚珂 张国强

【摘要】 目的 探讨 SOCS3 基因在人肺腺癌细胞株 A549 中的表达及其对细胞增殖的影响。方法 以脂质体为载体将 pEFSOCS3 和 pSV2neo 共转染至人肺腺癌细胞株 A549, 利用 G418 筛选获得阳性克隆; 应用 RT-PCR 和免疫细胞化学法测定转染前后细胞中 SOCS3 表达情况; 采用四甲基偶氮唑兰 (MTT) 显色法检测基因转染前后细胞生长情况; 应用流式细胞仪进行细胞周期分析。结果 RT-PCR 和免疫细胞化学法证实转染前 A549 细胞中无 SOCS3 基因表达, 转染后 A549 细胞中 SOCS3 基因呈稳定表达。MTT 检测显示转染 pEFSOCS3 的 A549 细胞生长明显受到抑制, 抑制率为 41.07%。流式细胞仪检测结果显示转染 pEFSOCS3 的 A549 细胞 G₀/G₁ 期细胞比例显著增高, S、G₂/M 期细胞比例显著降低。结论 SOCS3 蛋白可能通过负性调控细胞内信号通路抑制肺癌细胞增殖。

【关键词】 SOCS3 信号传导 肺腺癌 增殖

【中图分类号】 R734.2

Expression of SOCS3 gene and its effect on cell proliferation in human lung adenocarcinoma cell line A549 YU Zubin, BAI Li, MIN Jiaxin, YAO Ke, ZHANG Guoqiang. Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, P. R. China

Corresponding author: YU Zubin, E-mail: ybll@21cn.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of the SOCS3 gene and its effect on proliferation of A549 cells. **Methods** A549 cells were cotransfected with pEFSOCS3 and pSV2neo by liposome, then G418 was used to screen the positive cells. Expression of SOCS3 mRNA and protein was detected by RT-PCR and immunocytochemistry respectively before and after transfection. MTT assay was used to detect the cell growth. Flow cytometric DNA analysis was used to determine the cell cycle. **Results** RT-PCR and immunocytochemistry showed that no expression of SOCS3 mRNA and protein was detected in A549 cells before transfection, but a stable expression of SOCS3 gene was observed after transfection with SOCS3 gene. Compared with control group, growth of A549 cells transfected with SOCS3 gene was significantly suppressed, with a suppressive rate of 41.07%. The cells at G₀/G₁ cell phases increased, and those at S and G₂/M phases decreased significantly after transfection. **Conclusion** SOCS3 protein might inhibit the proliferation of A549 cells by negatively regulating cellular signal pathways.

【Key words】 SOCS3 Signal transduction Lung adenocarcinoma Proliferation

细胞信号负调控因子家族 (suppressors of cytokine signaling, SOCS) 是 1997 年被发现的 STAT 信号通路的负调控因子, 通过改变 STAT 蛋白酪氨酸磷酸化水平, 负性调控其介导的信号通路^[1]。SOCS 家族包括 CIS 和 SOCS1~7 共 8 个成员, 其中 SOCS1 和 SOCS3 的作用最强。研究已证实, STAT3 的持续激活与肺癌的发生密切相关, 而 SOCS3 启动子上含有

STAT3 的结合位点。那么在肺癌细胞中是否有 SOCS3 表达及其对细胞增殖有何影响, 目前尚无报道。本研究通过探讨 SOCS3 基因在肺腺癌 A549 细胞株的表达及其对细胞增殖的影响, 以期揭示 SOCS3 在肺癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器 pEFSOCS3 真核表达载体和 pEF 载体由澳大利亚 Melbourne 大学 Douglas J. Hilton 博士惠赠。pSV2neo 筛选质粒由美国 New Mexico 大学 Jac Nickoloff 博士惠赠。另有 lipofectamine 2000 脂质体 (Invitrogen 公司)、羊抗人 SOCS3

作者单位: 400037 重庆, 第三军医大学附属新桥医院胸外科 (余祖滨、闵家新、姚珂、张国强), 全军呼吸内科研究所 (白莉) (通讯作者: 余祖滨, E-mail: ybll@21cn.com)

多克隆抗体 (Santa Cruz 公司)、四甲基偶氮唑兰 (MTT) (Sigma 公司) 和 ^3H TdR (中国科学院上海原子核研究所)。其余试剂为国产分析纯。主要仪器为 PTC-200 DNA 扩增仪 (MT research 公司, USA) 和 AlphaImager 2200 凝胶成像分析系统 (Alpha Innotech 公司, USA)。

1.2 细胞株与细胞培养 肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海生物研究所。采用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱常规培养, 每 3 天更换培养液, 细胞长满时, 以 0.25% 胰酶消化传代。

1.3 实验分组及基因转染 实验分为以下 3 组: (1) 未转染组, (2) pEF 和 pSV2neo 共转染组, (3) pEFSOCS3 和 pSV2neo 共转染组。 (1)、(2) 组为对照组, (3) 组为实验组。

按 lipofectamine 2000 说明书进行转染, 略加改动。具体方法如下: 将 A549 细胞以 2×10^4 /孔于转染前 24 h 接种于 12 孔培养板。分别取 1.2 μg pEF 和 0.4 μg pSV2neo 质粒、1.2 μg pEFSOCS3 和 0.4 μg pSV2neo 质粒加入不含血清的 DMEM 培养基 100 μl 中, 取 4 μl lipofectamine 2000 脂质体加入不含血清的 DMEM 培养基 100 μl 中, 孵育 5 min 后加入质粒混合液, 再共同孵育 20 min。弃去培养板内培养基, 用不含血清的 DMEM 培养基洗涤后, 加入脂质体-质粒转染复合液 200 μl, 混匀, 置细胞培养箱。转染 6 h 后弃转染液, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基 1 ml 继续培养。 (2) 组和 (3) 组细胞于转染 24 h 后加入 G418 500 μg/孔, 使 G418 浓度为 500 mg/L。经 10 天筛选后形成阳性克隆, 以 0.25% 胰酶消化后接种于 100 ml 培养瓶, 扩增培养备用。

1.4 转染鉴定

1.4.1 RT-PCR 检测 SOCS3 mRNA 表达 Tripure 试剂盒提取总 RNA, 凝胶电泳判断无降解, 紫外分光光度计测定纯度并定量, 吸光度 A_{260/280} 比值均在 1.80 左右。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后, 各取 5 μl 行 PCR 反应, -actin 为内参照。SOCS3 引物: 上游 5'-CCA AGA ACC TAC GCA TCA A-3', 下游 5'-GGA GTC CAG GTG ACC GTT G-3', 产物为 341 bp。-actin 引物: 上游 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3', 下游: 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GGC GCC AGA C-3', 产物为 587 bp。反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 58℃ 50 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。反应完成后, 取 10 μl PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳、照相。

1.4.2 免疫细胞化学法检测 SOCS3 蛋白表达 取出盖玻片上用于免疫细胞化学法检测的各组细胞, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min; 参照 S-P 免疫组化试剂盒方法进行 (一抗羊抗人 SOCS3 多克隆抗体工作浓度为 1:400)。DAB 显色, 苏木精复染。

1.5 细胞生长曲线测定 采用 MTT 法。将处于对数生长期的各组细胞以 0.5×10^4 /孔接种于 96 孔培养板, 培养 1~9 天, 设置 3 个平行孔。收获细胞前 4 h, 每孔加入 5 g/L MTT 20 μl, 继续培养 4 h 后弃培养基, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μl, 室温下振荡 10 min。应用酶标仪, 在 570/690 nm 波长测光吸收度 A₅₇₀ 值。以时间为横轴, 细胞光吸收度为纵轴, 绘制细胞生长曲线。细胞生长抑制率 (%) = (对照组 A₅₇₀ 值 - 实验组 A₅₇₀ 值) / 对照组 A₅₇₀ 值 × 100%。

1.6 细胞周期分析 将用于细胞周期分析的各组细胞, 胰蛋白酶消化液消化细胞呈悬浮状, HBSS 液冲洗 2 次, 离心 (1 000 r/min), 弃上清, 沉淀用少量 HBSS 液反复吹散成单一细胞。将单细胞悬液滴入 4℃ 预冷的 70% 乙醇中固定 12 h 以上, 加 RNA 酶 37℃ 反应 30 min, 冰浴终止反应, 碘化丙啶 4℃ 闭光染色 30 min, 在 300 目尼龙网过滤后用流式细胞仪以 480 nm 的红色荧光测定 10 000 个细胞的 DNA 含量和 G₁/G₀/S 及 G₂/M 各期的细胞比例。

1.7 统计学处理 采用 SPSS10 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 转染细胞克隆形成 (图 1) (2) 和 (3) 组细胞经 500 mg/L G418 筛选 10 天后形成细胞克隆。

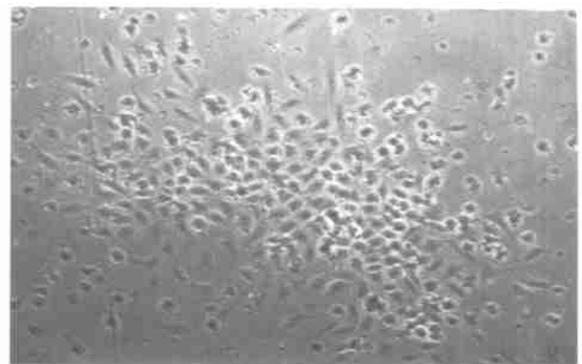


图 1 转染组细胞经 G418 筛选 10 天后形成的细胞克隆 (×100)
Fig 1 Acquired cell clone after screening by G418 for 10 days in transfected groups (×100)

2.2 RT-PCR 检测 SOCS3 mRNA 表达 电泳结果显示(图 2), (1)、(2)组仅出现一条条带, 即 587 bp 的 β -actin 扩增产物, 说明 A549 细胞中未检测到 SOCS3 mRNA 表达。(3)组出现两条条带, 分别为 341 bp 的 SOCS3 扩增产物和 587 bp 的 β -actin 扩增产物。

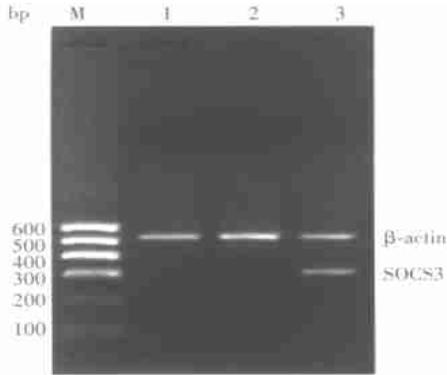


图 2 RT-PCR 显示转染 pEFSOCS3 的 A549 细胞中有 SOCS3 mRNA 表达

Fig 2 RT-PCR showed the expression of SOCS3 mRNA only in pEFSOCS3-transfected A549 cells

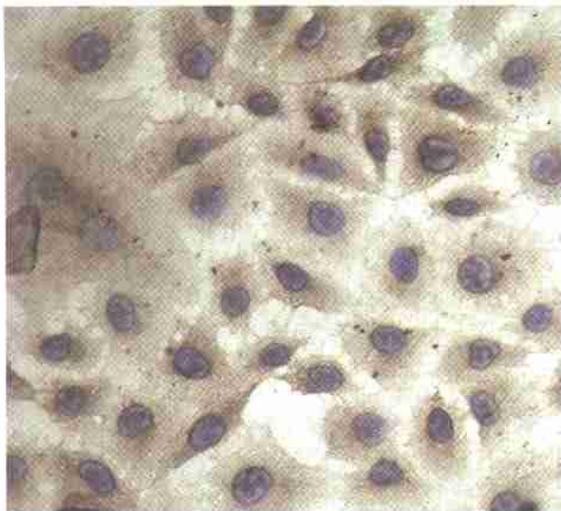


图 3 转染 pEFSOCS3 的 A549 细胞胞浆内 SOCS3 蛋白呈阳性表达 (DAB×400)

Fig 3 Immunocytochemistry showed SOCS3 protein located in the cytoplasm of pEFSOCS3-transfected A549 cells (DAB×400)

2.3 免疫细胞化学检测 SOCS3 蛋白表达 免疫细胞化学染色结果显示, (3)组细胞胞浆内可见棕黄色阳性颗粒, 说明胞浆中有 SOCS3 蛋白表达, 而(1)、(2)组细胞无阳性染色; 提示 SOCS3 真核表达载体成功导入 A549 细胞并稳定表达(图 3、4)。

2.4 MTT 比色法结果 各组 A_{570} 值测定结果见表 1。培养第 9 天, 与(1)组 A_{570} 值(2.24 ± 0.06)相比, (3)组细胞 A_{570} 值(1.32 ± 0.03)显著降低 ($P < 0.01$), (2)组细胞 A_{570} 值(2.18 ± 0.05)则无显著性差异 ($P > 0.05$)。提示 SOCS3 基因转染组细胞增殖明显受到抑制, 空载体转染对细胞生长则无明显影响。第 9 天的 A549 细胞生长抑制率为 41.07%。

2.5 细胞周期分析(表 2) (1)组和(2)组之间 G_0/G_1 期、S、 G_2/M 期细胞比例均无显著性差异 ($P > 0.05$); 与(1)组比较, (3)组 G_0/G_1 期细胞比例显著升高, S、 G_2/M 期细胞比例显著降低 ($P < 0.01$)。

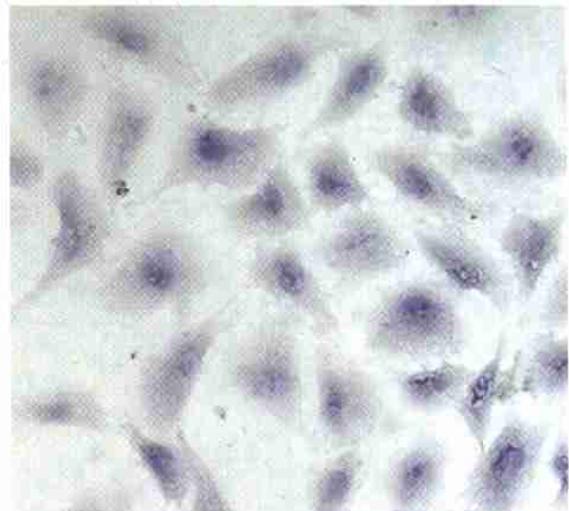


图 4 对照组 A549 细胞胞浆内未见 SOCS3 蛋白表达 (DAB×400)

Fig 4 Immunocytochemistry showed no positive staining of SOCS3 protein was found in A549 cells in control group (DAB×400)

表 1 MTT 法检测 SOCS3 基因转染前后 A549 细胞的增殖活性 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Proliferative activity of A549 cells before and after transfection with SOCS3 by MTT ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Group	A_{570} value								
	D1 **	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	0.18 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.98 ± 0.03	1.38 ± 0.06	1.94 ± 0.05	2.20 ± 0.04	2.24 ± 0.06
2	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.68 ± 0.03	1.03 ± 0.03	1.30 ± 0.04	1.83 ± 0.04	2.15 ± 0.03	2.18 ± 0.05
3	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.82 ± 0.02	1.04 ± 0.03	1.23 ± 0.03	1.32 ± 0.03

*: $P > 0.05$ vs group 1; : $P < 0.01$ vs group 1; ** : D1 = day 1

表 2 SOCS3 基因转染前后 A549 细胞的细胞周期变化

Tab 2 Changes of cell cycle of A549 cells before and after transfection with SOCS3 gene

Group	D3			D6			D9		
	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
1	52.1	34.3	13.6	55.2	32.1	12.7	57.1	29.9	13.0
2	52.8 *	32.5 *	14.7 *	54.9 *	31.5 *	13.6 *	56.8 *	28.1 *	15.1 *
3	65.3	21.7	13.0	66.6	21.3	12.1	72.9	15.9	11.2

* : $P > 0.05$ vs group 1; : $P < 0.01$ vs group 1

3 讨论

SOCS 家族是新近发现的细胞因子信号传导负调控因子,由 SOCS1 ~ 7 和 CIS 8 个成员组成,目前对 SOCS3 研究较为清楚^[1]。细胞因子通过 STAT 信号途径诱导 SOCS 基因表达,其表达产物 SOCS 蛋白通过抑制 STAT 酪氨酸磷酸化过程从而负性调控 STAT 介导的信号通路^[2],最终维持细胞的正常生长、分化及代谢。而细胞分化、生长调控异常是肿瘤发生的基础,SOCS 基因可能与肿瘤发生、发展密切相关。Schuringa 等^[3]在急性髓性白血病细胞株中检测到 SOCS3 mRNA 表达,但其在上述细胞中的功能尚不清楚。Brender 等^[4]研究发现,组成性表达 SOCS3 蛋白能够通过抑制 STAT 蛋白活性,降低 T 淋巴细胞表面受体对 IFN- 的敏感性,推测 SOCS3 蛋白可能参与肿瘤发生、发展过程。

最近研究发现,STAT3 的持续激活与肺癌的发生密切相关^[5],而 SOCS3 启动子上含有 STAT3 的结合位点。那么在肺癌细胞中是否有 SOCS3 表达及其对细胞增殖有何影响,目前尚无文献报道。

本研究在肺癌细胞株 A549 中未检测到 SOCS3 表达,并利用共转染方式将 pEFSOCS3 真核表达载体和 pSV2neo 筛选质粒导入 A549,建立稳定表达的细胞株。共转染方式可以使我省去许多繁琐的工作去构建既含有目的基因又含有筛选扩增基因的表达载体,而这样的载体只有在所采用的启动子足够强,或经过特殊构建的双顺反子载体才可使用。实验过程中,我们对转染程序进行了优化筛选,确定目的基因质粒和筛选基因质粒的最佳比例为 3 : 1,成功地将二者导入细胞内,获得外源基因的高效表达。同时,我们设置空载体(pEF 和 pSV2neo)转染的对照组,以排除外源载体 DNA 的导入带来的生物学和免疫学效应。MTT 法和细胞周期测定结果表明空载体转染对细胞生长和

增殖无影响,而转染 SOCS3 基因的细胞增殖明显受到抑制,这一结果说明 SOCS3 基因具有抑制肺癌细胞生长的作用。Yasukawa 等^[6]在小鼠 TAC 模型肥厚的心肌细胞内检测到 SOCS3 mRNA 和 STAT3 表达,利用腺病毒将 SOCS3 表达载体导入体外培养的心肌细胞中,CT-1 刺激后发现 SOCS3 转染组的心肌细胞生长明显受到抑制,同时伴有 STAT3、MEK1、ERK1/2 活化水平的降低;提示 SOCS3 基因可能通过下调细胞内信号分子活性而抑制细胞增殖。

由于 SOCS3 基因可显著抑制肺癌细胞增殖,因此有必要进一步研究 SOCS3 基因参与肺癌发生发展的信号传导通路,从而为肺癌的基因治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- 1 Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 1997, 387(6636) 924-929.
- 2 Chen XP, Losman JA, Rothman P. SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity*, 2000, 13(3) 287-290.
- 3 Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, et al. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood*, 2000, 95(12) 3765-3770.
- 4 Brender C, Nielsen M, Kalfout K, et al. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 2001, 97(4) 1056-1062.
- 5 Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 2003, 41(2) 123-130.
- 6 Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest*, 2001, 108(10) 1459-1467.

(收稿:2004-03-18 修回:2004-04-28)

(本文编辑 李蓓兰)