

[文章编号] 1000-4718(2005)12-2310-04

SOCS3 基因对缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞原癌基因 c-myc mRNA 表达及细胞增殖的影响*

白莉¹, 余祖滨², 钱频³, 钱桂生^{1△}, 关崧¹(第三军医大学新桥医院¹全军呼吸内科研究所, ²胸外科, ³超声诊断科, 重庆 400037)

[摘要] 目的:探讨 SOCS3 基因对缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)原癌基因 c-myc mRNA 表达及细胞增殖的影响。方法:以脂质体为载体将 pEFSOCS3 和 pSV2neo 共转染至体外培养的 PASMCs, G418 筛选阳性克隆,应用免疫细胞化学法测定转染前后细胞中 SOCS3 蛋白表达;缺氧处理转染组和对照组 PASMCs,采用半定量 RT-PCR 检测转染前后常氧组、缺氧培养 2 h、6 h、12 h、16 h、24 h 细胞 c-myc mRNA 表达水平变化; [³H]-TdR 掺入法检测转染前后上述各时间点细胞增殖情况。结果:免疫细胞化学证实转染后细胞中有 SOCS3 稳定表达;半定量 RT-PCR 结果显示,SOCS3 基因转染组细胞 c-myc mRNA 表达水平在缺氧各时间点均显著低于同时点对照组细胞($P < 0.01$);SOCS3 基因转染组细胞在常氧和缺氧各时间点 [³H]-TdR 掺入量显著低于对照组细胞($P < 0.01$)。结论:SOCS3 蛋白可能通过下调 c-myc 基因表达从而抑制缺氧诱导的 PASMCs 增殖。

[关键词] 缺氧;肺动脉;肌,平滑;血管;信号转导;原癌基因

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of SOCS3 gene on the expression of c-myc mRNA and proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia conditions

BAI Li¹, YU Zu-bin², QIAN Pin³, QIAN Gui-sheng¹, GUAN Song¹(¹Institute of Respiratory Diseases, ²Department of Thoracic Surgery, ³Department of Ultrasonics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effect of SOCS3 gene on the expression of c-myc mRNA and proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) under hypoxia conditions. **METHODS:** PASMCs was cotransfected with pEFSOCS3 and pSV2neo by lipofectamine, and positive cell clones were obtained after being screened with G418. Expressions of SOCS3 protein in PASMCs before and after transfection were detected by immunocytochemistry, respectively. Before and after transfection, PASMCs were exposed to normoxic and hypoxia conditions at various time-points, respectively, and the expressions of c-myc mRNA were assessed by semi-quantitative RT-PCR. [³H]-TdR incorporation method was used to detect the cell proliferation. **RESULTS:** The expression of SOCS3 protein was confirmed by immunocytochemistry in PASMCs transfected with SOCS3 gene. c-myc mRNA level in the SOCS3 gene-transfected cells exposed to hypoxia were remarkably lower than that in the control cells, respectively ($P < 0.01$). Compared with the control groups at the same time points, [³H]-TdR incorporation in SOCS3 gene-transfected cells was significantly low. **CONCLUSION:** SOCS3 protein may inhibit the proliferation of PASMCs by downregulating the c-myc gene expression under hypoxia conditions.

[KEY WORDS] Anoxia; Pulmonary artery; Muscle, smooth, vascular; Signal transduction; Proto-oncogenes

研究表明,多种细胞因子在低氧肺动脉高压形成过程中介导肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)异常增殖。上述物质与其受体结合后,受体形成寡聚体,并激活受体酪氨酸激酶或胞浆内游离酪氨酸激酶,最终把信号传到核

内,激活相应基因的表达从而发挥其生物学效应。原癌基因 c-myc 表达产物与细胞增殖调控有关的主要核蛋白,在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖调控中的作用受到广泛关注^[1,2]。1997 年以来,相继被发现的细胞因子信号负

[收稿日期] 2004-04-28 [修回日期] 2004-07-02

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.39970329)

△通讯作者 E-mail: ybl@21cn.com

调控因子(suppressors of cytokine signaling, SOCSs)家族,通过参与负性调节多种细胞因子介导的信号通路,最终影响细胞的生长、增殖、凋亡等基本生物学行为。这一家族包括 CIS 和 SOCS1-7 共 8 种亚型,目前发现其中 SOCS1 和 SOCS3 在体内分布较为广泛^[2,3]。本研究拟将 SOCS3 基因真核表达载体转染体外培养的大鼠 PSMCs,观察转染前后缺氧条件原癌基因 *c-myc* 表达水平及细胞增殖变化,探讨 SOCS3 基因是否参与缺氧条件下 PSMCs 中 *c-myc* 基因表达的调控及对缺氧 PSMCs 增殖的影响,从而为缺氧肺动脉高压的发病机制的阐明以及防治提供必要的理论依据。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

pEFSOCS3 真核表达载体和 pEF 载体由澳大利亚 Melbourne 大学 Dr. Douglas J. Hilton 惠赠。pSV2neo 筛选质粒由美国 New Mexico 大学 Dr. Jac Nickoloff 惠赠。Lipofectamine 2000 脂质体 (Invitrogen 公司)。^[3H]-TdR (中国科学院上海原子核研究所)。羊抗大鼠 SOCS3 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司)。S-P 免疫组化试剂盒 (北京中山公司),其余试剂为国产分析纯。

2 PSMCs 培养及缺氧处理分组^[4]

取体重在 150-200 g 左右成年 Wistar 大鼠,购自第三军医大学实验动物中心。10% 乌拉坦腹腔注射麻醉后,无菌条件下开胸取出肺动脉干和左右肺动脉,组织块法培养 PSMC。培养液为含 10% 胎牛血清 DMEM,取第 4、5 代细胞用于实验,按 S-P 试剂盒说明书进行 α -SM actin 免疫细胞化学染色鉴定。用 0.25% 胰酶将细胞消化传代,德国贺氏自动常压缺氧孵箱进行缺氧处理 (参数设置: 37 °C; O₂ 浓度 2.5%; CO₂ 浓度 5%)。

3 实验分组与基因转染

实验分为以下 3 组: pEFSOCS3 和 pSV2neo 共转染组 (PSN)、未转染组 (P)、pEF 和 pSV2neo 共转染组 (PN),后两者为对照组。上述各组细胞分以下 6 个时点进行处理: 常氧 (21% O₂) (N) 和缺氧 (2.5% O₂) 2 h (H2)、6 h (H6)、12 h (H12)、16 h (H16)、24 h (H24)。进行各指标检测前用含 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养基静息 48 h。按 Lipofectamine 2000 说明书进行转染,150 mg/L G418 筛选,经 2 周后形成阳性克隆,扩增培养备用。

4 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的各组细胞,

0.01 mol/L PBS 漂洗,4% 多聚甲醛固定 30 min;按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行。

5 半定量 RT-PCR 法检测转染前后 *c-myc* mRNA 表达

Tripure 试剂盒提取 PSMCs 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 μ g 总 RNA 进行逆转录后各取 5 μ L 行 PCR 反应, β -actin 为内参照。*c-myc* 引物:上游引物: 5'-GGG CTT CTC ACA GGC TTG GC-3';下游引物: 5'-CGT CCT TGC TCG GGT GTT GTA-3';产物长度: 341 bp。 β -actin 引物:上游引物: 5'-CCA AGC CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3';下游引物: 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3';产物长度: 587 bp。反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 40 s, 58 °C 50 s, 72 °C 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。循环完成后,取 10 μ L PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,AlphaImager 图像分析仪进行灰度扫描,读取各带的吸光度值 (A),结果以 *c-myc* / β -actin 的吸光度值之比 ($A_{c-myc} / A_{\beta-actin}$) 进行半定量分析。

6 [³H]-TdR 掺入检测

计数细胞数,调整细胞浓度为 2×10^7 /L。分别取各组细胞 1 mL 接种于 96 孔培养板,每个时点设 3 个重复孔。培养 24 h 后,分别在各时点终止培养前 6 h 加入 3.7×10^4 Bq [³H]-TdR (3.7×10^4 Bq/well),在相应时点终止培养,弃去培养液,冷 PBS 液终止掺入,加入 0.25% 胰酶消化细胞,使之脱离孔壁,用多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维膜上,生理盐水冲洗 3 次,然后用 10% 三氯乙酸固定,无水乙醇脱色,80 °C 干烤 30 min,放入闪烁液中,于液体闪烁计数器计数 (counts/min)。

7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行 *F* 检验和 *t* 检验。

结 果

1 PSMCs 的原代培养和鉴定

原代培养 PSMCs 细胞呈梭形,部分区域多层重叠,呈平滑肌细胞特征性的“峰-谷”状生长。 α -SM actin 免疫细胞化学染色结果显示细胞胞浆内存在与细胞长轴相平行的细丝状棕黄色免疫沉淀,证实为平滑肌细胞 (图 1)。

2 转染细胞克隆的形成及转染鉴定

2.1 转染细胞克隆的形成 经 150 mg/L G418 筛选

的细胞,约 15 d 左右形成细胞克隆(图 2)。

2.2 转染鉴定 SOCS3 基因转染 PSN 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;对照组 P 和 PN 组细胞无阳性染色。表明 SOCS3 基因成功导入 PSMCs,并在蛋白水平获得高效表达(图 3、图 4)。



Fig 1 Immunocytochemical staining of α -SM actin showing brown filament in cytoplasm of primarily cultured PSMCs (ABC, $\times 400$).

图 1 原代培养的 PSMCs 胞浆内可见与棕黄色细丝

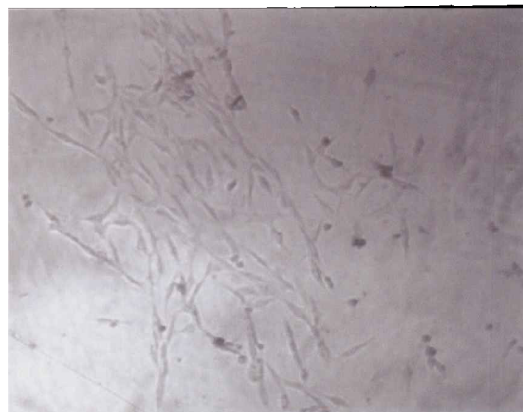


Fig 2 Acquired cell clone screened by G418 after 15 days being cotransfected with pEFSOCS3 and pSV2neo ($\times 100$).

图 2 PSN 组细胞经 G418 筛选 15 d 后形成的细胞克隆

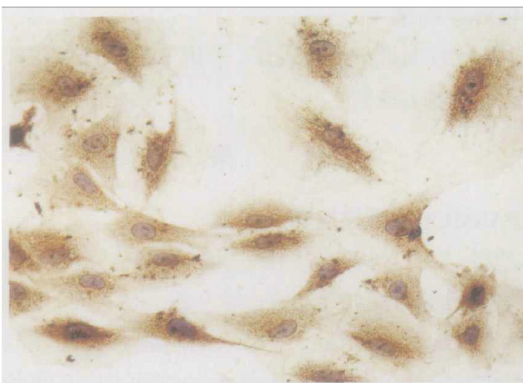


Fig 3 Immunocytochemical staining of SOCS3 protein showing brown particles in cytoplasm of PSMCs transfected with pEFSOCS3 (ABC, $\times 400$).

图 3 PSN 组细胞 SOCS3 蛋白表达,胞浆内可见棕黄色颗粒

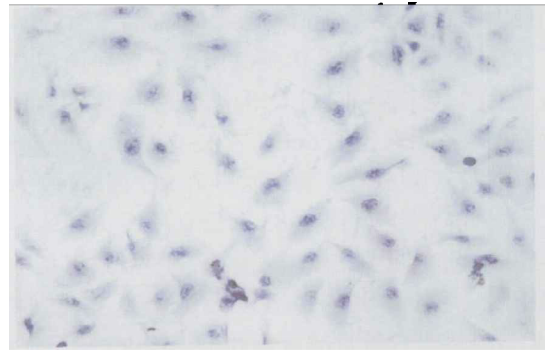


Fig 4 Immunocytochemical staining of SOCS3 protein showing negative staining in cytoplasm of the control PSMCs (ABC, $\times 200$).

图 4 对照组细胞未见 SOCS3 蛋白表达,胞浆内无阳性染色颗粒

3 SOCS3 基因对缺氧 PSMCs c-myc mRNA 表达的影响

结果见表 1,对照组细胞在缺氧 2 h、6 h、12 h、16 h c-myc PCR 产物条带吸光度之比显著高于同组未缺氧细胞 ($P < 0.01$);PSN 组细胞 c-myc PCR 产物条带吸光度之比在缺氧各时点与同组未缺氧时均无显著差异 ($P > 0.05$),且 PSN 组细胞各时点 c-myc PCR 产物条带吸光度之比显著低于同时点对照组细胞 ($P < 0.01$)。

表 1 SOCS3 基因对缺氧 PSMCs 中 c-myc mRNA 表达的影响

Tab 1 Effects of SOCS3 gene on PSMCs c-myc mRNA expression under hypoxia conditions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

	$A_{c-myc}/A_{\beta-actin}$		
	P	PN	PSN
N	0.19 ± 0.03	$0.21 \pm 0.02^*$	$0.18 \pm 0.01^*$
H2	$0.45 \pm 0.08^{\#}$	$0.48 \pm 0.06^{**}$	$0.14 \pm 0.06^{\#\#}$
H6	$0.95 \pm 0.10^{\#}$	$0.98 \pm 0.08^{**}$	$0.16 \pm 0.08^{\#\#}$
H12	$0.38 \pm 0.08^{\#}$	$0.40 \pm 0.07^{**}$	$0.13 \pm 0.03^{\#\#}$
H16	$0.39 \pm 0.07^{\#}$	$0.38 \pm 0.09^{**}$	$0.14 \pm 0.03^{\#\#}$
H24	$0.35 \pm 0.08^{\#}$	$0.32 \pm 0.03^{**}$	$0.08 \pm 0.01^{\#\#}$

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ vs P group; ## $P > 0.05$, # $P < 0.01$ vs N group.

4 [^3H] - TdR 掺入测定结果

结果显示(表 2),对照组细胞 PSMCs [^3H] - TdR 掺入量在缺氧 6 h 开始增加,随着缺氧时间的延长, [^3H] - TdR 掺入量逐渐增加,至缺氧 24 h 末 [^3H] - TdR 掺入量最高 ($P < 0.01$);PSN 组细胞 [^3H] - TdR 掺入量随缺氧时间的延长有一定的升高,且 PSN 组细胞在常氧及缺氧各时点 [^3H] - TdR 掺入量显著低于同时点对照组细胞 ($P < 0.01$)。

表2 SOCS3 基因对缺氧 PSMCs 细胞^[3H]-TdR 掺入量变化的影响Tab 2 Effects of SOCS3 gene on ^[3H]-TdR incorporation of PSMCs under hypoxia conditions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

	N	H6	H12	H16	H24
P	7 550 ± 431	9 537 ± 737 [△]	11 226 ± 1 142 [*]	11 750 ± 935 [#]	13 850 ± 1 395 [#]
PN	6 900 ± 404 [*]	8 659 ± 747 ^{*△}	10 476 ± 1 078 ^{*#}	10 852 ± 915 ^{*#}	12 661 ± 1 085 ^{*#}
PSN	3 517 ± 268 ^{**}	4 537 ± 410 ^{**△}	5 807 ± 456 ^{**#}	7 268 ± 564 ^{**#}	9 438 ± 494 ^{**#}

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ vs P group; [△] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ vs N group.

讨 论

SOCS 家族是 JAK/STATs 途径的负性调节因子, 包括 CIS 和 SOCS1-7, 结构相似, 由 N 区、中央区 SH2 结构域和 C 端的 SOCS box 盒组成。细胞因子可诱导 SOCS 基因表达, 其表达产物 SOCS 通过以下机制负性调控细胞因子介导 JAK/STATs 通路, 构成一负反馈环路^[5]。此外, SOCS 蛋白还可以作用于其它信号分子如 Ras/MAPK、PI3K/AKT、Src 激酶等的磷酸化过程发挥负调节作用^[6]。因此提示 SOCS 可能在维持细胞因子网络的平衡中占有重要地位。

SOCS3 是 SOCS 家族主要成员之一, 表达较为广泛, 分子量在 30×10^3 D 左右, 静息条件下基本检测不到其表达, 但多种细胞因子、生长因子等细胞外刺激可诱导 SOCS 在 15-30 min 内迅速合成, 短期内可发生降解^[2]。我们研究发现, 体外培养的 PSMCs 中检测不到 SOCS3 表达, 在缺氧刺激 2 h 后 SOCS3 表达增高, 6 h 达高峰, 10 h 减弱, 24 h 消失(有关结论已被录用, 待发表)。因此我们推测作为细胞因子信号通路负调控因子家族的主要成员 SOCS3 可能在缺氧肺动脉高压形成过程中发挥了一定的作用。

为了揭示 SOCS3 基因对缺氧条件下 PSMCs 增殖的调控机制, 本研究利用共转染方式将 pEFSOCS3 真核表达载体和 pSV2neo 筛选质粒导入 PSMCs, 为了排除外源载体 DNA 的导入带来的生物学或免疫学效应, 我们设置空载体的对照实验; 同时在实验过程中, 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(6:1), 成功地将两者导入细胞内, 获得外源基因的高效表达, 并建立了稳定表达细胞系。^[3H]-TdR 掺入法结果显示转染 SOCS3 基因的细胞增殖明显受到抑制, 同时发现 SOCS3 基因可抑制缺氧条件下 PSMCs 中 c-myc mRNA 表达, 而对常氧条件下 PSMCs 中 c-myc mRNA 表达无影响, 至于 SOCS3 基因如何参与调控上述基因表达? 我们在前期研究中发现 SOCS3 基因可抑

制缺氧条件下 PSMCs 中信号转导及转录活化因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 活性(另文发表), 而 c-myc 基因为 STAT3 的下游靶基因之一^[7,8], 因此有理由推测 SOCS3 基因可能通过负性调控 STAT3 活性下调 c-myc 基因表达, 但由于细胞内参与调控 c-myc 基因表达的机制复杂^[9], 是否还通过调控其它信号通路如 Ca²⁺ 通道、Ras/MAPK、PKC 等下调 c-myc 基因表达, 还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 金惠铭. 细胞癌基因在非肿瘤性疾病中的作用[A]. 见: 汤健, 周爱如 主编. 细胞分子病理生理学[M]. 第2版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学出版社, 1990. 189-199.
- [2] Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling[J]. Nature, 1997, 387(6636): 917-921.
- [3] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS protein: negative regulators of cytokine signaling[J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 378-387.
- [4] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 等. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(4): 348-350.
- [5] 白 莉, 钱桂生, 王关嵩. 细胞因子信号转导负调控因子家族[J]. 生命的化学, 2002, 22(5): 448-451.
- [6] Yasukawa H, Hoshijima M, Gu YS, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways[J]. J Clin Invest, 2001, 108(10): 1459-1467.
- [7] Darnell JE Jr. STATs and gene regulation[J]. Science, 1997, 277(5532): 1630-1635.
- [8] Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(13): 7319-7324.
- [9] Pelengaria S, Khan M. The many faces of c-myc [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 416(2): 129-136.