论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0588-04

SOCS3对肺腺癌细胞株A549迁移和侵袭能力的影响

余祖滨[1],白 莉[2],姚 珂[1],张国强[1],闵家新[1],肖颖彬[3] (第三军医大学新桥医院:[1]胸外科,[2]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[3]全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 观察细胞因子信号负调控因子3(suppressors of cytokine signaling, SOCS3)对人肺腺癌细胞株A549迁移和侵袭能力的影响,并初步探讨其机制。方法 建立SOCS3稳定表达细胞株;Boyden Chamber分析法测定细胞的迁移和侵袭能力;半定量RT-PCR检测细胞基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)2,9 mRNA表达;明胶酶谱分析法测定MMP2,9蛋白活性水平。结果 SOCS3稳定表达株细胞迁移和侵袭能力显著下降($P<0.05$);半定量RT-PCR和明胶酶谱分析结果显示SOCS3可显著抑制MMP2,9表达和活性($P<0.05$)。结论 SOCS3能通过抑制MMP2,9表达和活性明显降低A549的体外迁移和侵袭能力。

关键词:肺腺癌;侵袭;转移;SOCS
中图法分类号:R394.2;R730.23;R734.2 文献标识码:A

Effects of SOCS3 gene on migration and invasion of lung adenocarcinoma cell line A549

YU Zu-bin[1], BAI Li[2], YAO Ke[1], ZHANG Guo-qiang[1], MIN Jia-xin[1], XIAO Ying-bin[3] ([1]Department of Thoracic Surgery, [2]Institute of Respiratory Diseases, [3]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of SOCS3 on the migration and invasion of human lung adenocarcinoma cell line A549. Methods A549 cells that express SOCS3 stably were generated. The migration and invasion abilities of A549 cells were observed by Boyden Chamber assay. The mRNA and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 were assessed by semi-quantitive RT-PCR and gelatin zymography respectively. Results Compared with the control group, the migration and invasion abilities of A549 cells with stable SOCS3 expression were significantly lower ($P<0.05$). The mRNA expression and activities of MMP-2 and MMP-9 in A549 cells with stable SOCS3 expression were inhibited significantly ($P<0.05$). Conclusion SOCS3 protein inhibits the migration and invasion abilities of A549 cells probably by down-regulating the expression and activation of MMP-2 and MMP-9.

Key words: lung adenocarcinoma; invasion; migration; SOCS

细胞因子信号转导负调控因子(suppressors of cytokine signaling, SOCS)通过负性调控以JAK/STAT为主的多条细胞内信号通路,维持着细胞因子网络的平衡和细胞正常生物学功能[1]。由于多种信号分子的持续活化是导致肿瘤发生和转移的重要事件,因此负性调控细胞内信号通路的SOCS基因功能缺失极有可能与肿瘤的发生、发展密切相关[2]。有研究表明,肺癌组织中SOCS3基因启动子区CpG岛甲基化是导致SOCS3基因功能缺失的主要原因,那么恢复SOCS3表达或高表达是否可能抑制或逆转肿瘤的发生和转移呢?He等[3]及我们前期研究中均发现外源性SOCS3蛋白可显著抑制肺癌细胞增殖[4]。为进一步揭示SOCS3在肺癌发生、发展中的作用,本研究将重点观察SOCS3对肺癌细胞株迁移和侵袭能力的影响,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pEFSOCS3真核表达载体和pEF载体由澳大利亚Melbourne大学Dr. Hilton惠赠。pSV2neo筛选质粒由美国New Mexico大学Dr. Nickoloff惠赠。Lipofectamine 2000脂质体为Invitrogen公司产品。Tripure为德国B. M公司产品。Millicell

基金项目:国家自然科学基金(30700823)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30700823)
作者简介:余祖滨,男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌发病机制及防治方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68774724,E-mail:yzbpost@126.com
通信作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
收稿日期:2007-06-11 修回日期:2007-09-10

小室购自美国 Millipore 公司。Matrigel 胶购自美国 BD 公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2　基因转染和实验分组

SOCS3 稳定表达株通过共转染 pEFSOCS3 表达质粒和 pSV2neo 筛选质粒建立，转染、筛选和鉴定均参照文献[4]进行。实验分为 3 组：未转染组、空载体组和 SOCS3 稳定表达组（简称 SOCS3 组）。

1.3　细胞迁移和侵袭能力测定

1.3.1　迁移能力测定　　采用 Boyden-Chamber 分析法。将具有孔径为 8 μm PET 膜的 Millicell 小室放入 24 孔培养板中，各孔中加入 600 μl 含 1% 血清的培养液，在 Millicell 内加入各组细胞，细胞数为 5×10^4/孔，每组各时点均设立 3 个重复孔，置入细胞培养箱中继续培养 6、12、18 h，终止培养。取出 Millicell，用棉签小心擦去微孔滤膜上层的细胞，PBS 漂洗，4% 中性多聚甲醛固定 10 min，吉姆萨染色 10 min。光镜下（×400）取上、下、左、右、中心 5 个视野，计数已穿透小室滤膜的细胞数，计算平均值。

1.3.2　侵袭能力测定　　4 ℃环境中于 Millicell 内的微孔膜上加基质胶 Matrigel（50 μl/孔），并均匀铺满滤膜，37 ℃过夜固化。其他步骤同迁移能力测定 1.3.1 相似。细胞培养 12、24、48 h 后，终止培养，按上述方法计数。

1.4　半定量 RT-PCR 法检测 MMP2，MMP9 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 $D(260)/D(280)$ 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，GAPDH 为内参照。MMP2 引物：上游：5′-TGACGGTAAGGACGGACTC-3′；下游：5′-TGGAAGCGGAATGGAAAC-3′；产物长度为 342 bp，退火温度：55 ℃。MMP9 引物：上游：5′-AGGACGGCAATGCTGATG-3′；下游：5′-CCGCCACGAGGAACAAAC-3′，产物长度为 363 bp，退火温度：58 ℃。GAPDH 引物：上游：5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′；下游：5′-AGGGTACATGGTGGTGGCGCCAGAC-3′，产物长度为 605 bp，退火温度 55～60 ℃。循环完成后，取 10 μl PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳、照相。凝胶分析系统测定各条带积分光密度值[$D(570)$]。

1.5　明胶酶谱法测定明胶酶活性

取等量各组细胞接种在 6 孔板上，用含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养至 80% 汇合，换含 0.1% 小牛血清的 1640 培养基继续培养 48 h，收集上清液。牛血清白蛋白（BSA）法测定上清液总蛋白含量，取含 50 μg 总蛋白的上清液与非还原性上样缓冲液混合后，在含 0.1% 明胶的 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离，恒压电泳 3～4 h（浓缩胶 80 V，分离胶 120 V）。电泳结束后，凝胶移入 2.5% TritonX-100 溶液中洗脱 4 次，每次 15 min，洗涤液洗涤 3 次，每次 5 min。加入明胶酶底物缓冲液在 37℃孵育 18 h。考马斯亮蓝染色液染色 4 h，脱色 4～8 h，直至出现明显清晰的负染条带。凝胶成像并使用 Alpha Imager 图像分析软件进行定量分析。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析和 q 检验。

2　结果

2.1　SOCS3 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响

2.1.1　SOCS3 对 A549 细胞迁移的影响　　结果显示（表 1），SOCS3 稳定表达细胞在培养 12、18 h 穿过滤膜的细胞显著低于未转染组（$P<0.01$），而空载体组在各个时相点与未转染组无显著差异（$P>0.05$）。

表 1　SOCS3 对 A549 细胞迁移能力的影响（个/视野，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	培养时间		
	6 h	12 h	18 h
未转染组	7.0±1.0	16.3±2.5	41.7±3.5
空载体组	6.7±1.5	14.0±2.0	37.7±4.2
SOCS3 组	6.3±0.6	7.7±1.2[a]	19.3±2.1[a]

a：$P<0.01$，与未转染组比较

2.1.2　SOCS3 对 A549 细胞侵袭能力的影响　　结果显示（表 2），细胞培养 12、24 h，穿过含 Matrigel 胶滤膜的各组细胞数无明显差异。细胞培养 48 h 后，穿过含 Matrigel 胶滤膜的 SOCS3 稳定表达组细胞明显低于未转染组胞（$P<0.05$），而空载体组在各个时相点与未转染组之间无明显差异（$P>0.05$）。

表 2　SOCS3 对 A549 细胞侵袭能力的影响（个/视野，$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	培养时间		
	12 h	24 h	48 h
未转染组	6.3±0.6	10.3±3.0	23.0±4.0
空载体组	6.3±1.5	11.0±1.7	21.7±3.1
SOCS3 组	5.0±1.0	8.3±1.5	12.3±2.5[a]

a：$P<0.05$，与未转染组比较

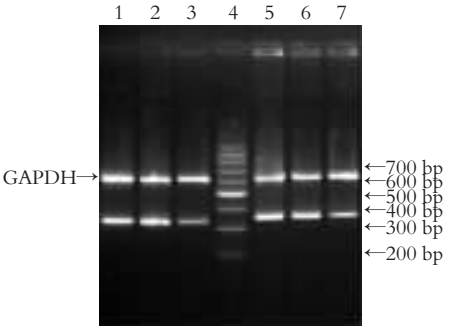
2.2　SOCS3 对 A549 细胞 MMP2、MMP9 mRNA 表达的影响

半定量 RT-PCR 法结果显示（表 3，图 1），与未转染组相比，空载体组细胞 MMP2、MMP9 表达水平无显著差异（$P>0.05$）；而 SOCS3 稳定表达细胞 MMP2、MMP9 表达水平显著低于对照组（$P<0.01$）。

表 3　SOCS3 对 A549 细胞 MMP2、MMP9 mRNA 表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	穿过滤膜细胞数	
	MMP2 mRNA（D_{MMP2}/D_{GAPDH}）	MMP9 mRNA（D_{MMP9}/D_{GAPDH}）
未转染组	0.79±0.07	0.94±0.06
空载体组	0.83±0.10	0.96±0.11
SOCS3 组	0.49±0.06[a]	0.62±0.07[a]

a：$P<0.05$，与未转染组比较

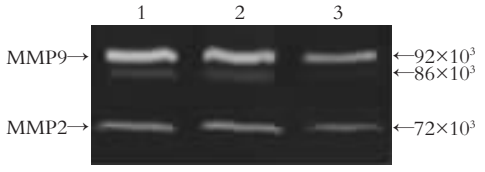


1－3：MMP2；4：标准；5－7：MMP9；1，5：未转染组；2，6 空载体组；3，7：SOCS3 组

图 1　RT-PCR 检测 A549 细胞中 MMP2、MMP9 mRNA 表达

2.3 SOCS3 对 MMP2、MMP9 活性的影响

肿瘤细胞培养上清中通常含有 MMP2，MMP9 酶原（pro）和活性（active）形式，其中 pro-MMP2 和 active-MMP2 相对分子质量约为 72×10^3 和 66×10^3，pro-MMP9 和 active-MMP2 约为 92×10^3 和 86×10^3。电泳后负染酶带亮度的强弱和面积大小可以半定量地反映明胶酶活性大小。明胶酶谱分析结果显示（图2、表4）：SOCS3 组细胞培养液上清中 MMP9 明胶酶活性（pro 和 active 形式）显著低于未转染组（$P<0.01$），pro-MMP2（72×10^3）活性降低（$P<0.05$），而各组中均未检测到 active-MMP2（66×10^3）。未转染组和空载体组酶谱分析结果无显著差异（$P>0.05$）。



1：未转染组；2：空载体组；3：SOCS3 组

图2 明胶酶谱分析检测 A549 细胞中 MMP2、MMP9 的活性

表4 SOCS3 基因对 A549 细胞 MMP2、MMP9 活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	相对分子质量		
	92×10^3	86×10^3	72×10^3
未转染组	3 835±305	617±39	1 554±104
空载体组	3 593±411	635±55	1 563±199
SOCS3 组	1 808±159[b]	156±21[b]	1 119±57[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与未转染组比较

3 讨论

SOCS 家族是 1997 年以来被发现的 JAK/STATs 途径负性调节因子，包括 CIS 和 SOCS1～7 共 8 个成员，结构相似，由 N 区、中央区 SH2 结构域和 C 端 SOCS box 盒组成。细胞因子通过 STAT 信号途径诱导 SOCS 基因表达，其表达产物 SOCS 蛋白最终抑制 STAT 酪氨酸磷酸化过程从而负性调控 STAT 介导的信号通路[1,2]。近来研究表明 SOCS 除参与负性调控 JAK/STAT 通路外，还可能参与其他细胞内信号分子如 Ras/MAPK、PI3K/AKT、Src 激酶、FAK 激酶等的调控，因此，SOCS 基因与多条细胞内信号通路构成细胞内信号转导的负反馈环路，维持着细胞因子网络的平衡，并参与调控多种细胞生物学功能如细胞存活、增殖、迁移、凋亡等[5,6]。

控制细胞生物学基本行为的细胞内信号分子的过度激活是细胞恶性转化、肿瘤发生和演进的关键环节，因此有理由推测作为细胞内信号通路的负调控因子-SOCS 基因极有可能在肿瘤发生和转移过程中部分或者完全丧失其功能。现有研究已经证实了这一设想，其中 SOCS3 基因与肿瘤发生的关系尤为密切[7]。研究发现部分肺癌、头颈部癌、肝癌、宫颈癌、黑色素瘤等肿瘤组织中 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛存在高度甲基化，而基因启动子区失活是导致抑癌基因失活的主要机制，提示 SOCS3 基因可能作为一个抑癌基因发挥作用[7-10]。我们在前期工作中发现外源性 SOCS3 基因可显著下调肺腺癌细胞株 A549 中 STAT3 酪氨酸磷酸化水平，体内外实验均已证实其能有效抑制肺腺癌细胞的生长[4]。近来有研究报道 SOCS3 基因除与细胞生长密切相关外，还参与调控细胞运动和迁移。Tokumaru 等[11] 报道 SOCS3 通过下调 STAT3 酪氨酸磷酸化水平抑制角质细胞的迁移能力，从而影响伤口的愈合。Niwa 等[6] 报道 SOCS3C 端与 FAK 酪氨酸位点结合，通过蛋白酶解途径下调 FAK 激酶活性，抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。本研究通过建立 SOCS3 稳定表达的细胞株，利用 boyden-chamber 分析测定了 SOCS3 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果显示，SOCS3 高表达的 A549 细胞迁移和侵袭能力显著下降。

SOCS3 通过何种机制抑制细胞的迁移和侵袭呢？基质金属蛋白酶（MMP2、MMP9）与肿瘤侵袭和转移的关系十分密切，不同肿瘤细胞系产生 MMP2 和 MMP9 的能力与其侵袭转移潜能呈正相关。而 MMP2、MMP9 基因的启动子区有核转录因子 STAT3 的结合位点[12,13]，其表达受 STAT3 调控，由于 SOCS3 蛋白可以显著降低 A549 细胞中 STAT3 活性水平，因此我们推测 SOCS3 可能通过负性调控 STAT3 活性水平而下调 MMP2、MMP9 表达和活性。本研究对转染前后 A549 细胞中 MMP2、MMP9 表达和活性进行了检测，半定量 RT-PCR 结果显示 SOCS3 基因转染组细胞中 MMP2、MMP9 mRNA 水平显著降低。明胶酶谱试验结果显示对照组中均可检测到 MMP2、MMP9 酶原（pro）和活性（active）形式，而在 SOCS3 稳定表达组细胞中发现 pro-MMP2、pro-MMP9、active-MMP9 活性显著下降。结果提示 SOCS3 对 MMP2、MMP9 表达和活性的下调可能是其抑制 A549 细胞侵袭和迁移的主要机制之一。

上述研究结果结合我们以往工作[4]，表明 SOCS3 除抑制肺癌细胞增殖外，还参与调控其迁移和侵袭能力，提示我们 SOCS3 基因可能作为一个抑癌基因在肺癌的发生发展中起关键作用，深入研究其在肺癌发生和转移中的作用及机制，有可能为肺癌发生机制的阐明及防治提供新的思路和线索。

参考文献：

[1] Krebs D L, Hilton D J. SOCS proteins：negative regulators of cytokine signaling[J]. Stem Cells, 2001, 19(5)：378－387.

[2] 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.

[3] He B, You L, Uematsu K, *et al*. SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer[J].

Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(24): 14133 - 14138.
[4] 余祖滨, 白 莉, 闵家新, 等. SOCS3 基因转染对肺腺癌细胞株 A549 原癌基因 *c-fos*、*c-jun* mRNA 表达及细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1549 - 1552.
[5] Cacalano N A, Sanden D, Johnston J A. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(5): 460 - 465.
[6] Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, *et al*. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24(42): 6406 - 6417.
[7] Dimitriadis E, Stoikos C, Tan Y L, *et al*. Interleukin 11 signaling components signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) regulate human endometrial stromal cell differentiation[J]. Endocrinology, 2006, 147(8): 3809 - 3817.
[8] Tokita T, Maesawa C, Kimura T, *et al*. Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas[J]. Int J Oncol, 2007, 30(3): 689 - 694.
[9] Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, *et al*. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2006, 131(1): 179 - 193.
[10] Weber A, Hengge U R, Bardenheuer W, *et al*. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition[J]. Oncogene, 2005, 24(44): 6699 - 6708.
[11] Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, *et al*. SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(1): 100 - 105.
[12] Xie T X, Wei D, Liu M, *et al*. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2004, 23(20): 3550 - 3560.
[13] Wang L, Luo J, He S. Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release[J]. BMC Cell Biol, 2007, 8: 14.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2008)07-0591-01

个案与短篇

巨大盆腹膜后淋巴管平滑肌瘤 1 例

温 全, 张 勇, 皮 健, 宁 平, 古建辉 (成都市第九人民医院外三科, 成都 610015)

患者, 女, 56 岁, 已退休。因发现盆腔包块 2 年, 腹痛 3 个月, 加重 3 d 入院。入院查体: 体温 36.7 ℃、脉搏 72 次/min、呼吸 20 次/min、血压 110/70 mmHg。心肺未见异常, 腹平坦, 无压痛、反跳痛及肌紧张, 未扪及明显包块结节, 肝脾未触及, 肝肾无叩痛。妇科检查: 右附件区扪及直径约 10 cm 大小包块, 质硬, 边界清, 欠活动, 无压痛。彩超提示: 盆腔右侧见不规则分叶状低回声团块, 大小约 10.0 cm × 9.5 cm, 后壁回声增强, 团块内见丰富的彩色血流信号和高舒张期的频谱。术中见: 包块呈分叶状, 大小约 12 cm × 10 cm, 质中偏硬, 位于盆腹膜后骶前与左髂总动静脉, 髂内、髂外动静脉紧密相邻, 并左输尿管盆内段粘连, 活动度差。盆腔及腹膜后未见肿大淋巴结。患者手术情况: 逐层分离包块周围组织, 游离出包块, 但因包块与盆腹膜后骶前静脉丛及左髂总动静脉, 髂内、髂外动静脉紧密相邻, 术中出血约 7 000 ml, 经积极输血、扩容及纱垫压迫处理后, 患者术中生命体征一直平稳, 术后严密监测, 术后 10 d 逐步拔出纱垫, 伤口痊愈出院。术后病理诊断: (盆腔腹膜后包块) 淋巴管平滑肌肿瘤, 部分区域生长活跃, 低度恶性。

讨论

淋巴管平滑肌瘤 (lymphangioleiomyomatoisis, LAM) 是一种少见但可危及生命的疾病, 多累及肺组织、淋巴系统和肾脏[1]。累及肺组织时, 以淋巴管、血管以及细小支气管管壁的平滑肌细胞和其他部位的平滑肌细胞不典型非瘤样增生为特征, 肺部影像学表现为弥漫性囊状改变[2]; 累及盆腹膜后骶前时, 瘤体固定, 周围血管丰富, 可与输尿管粘连, 给手术带来很大的风险。英国和法国统计发现 LAM 人群发病率约 1/100 万, 而绝大多数患者为育龄期女性, 平均年龄 24 岁。绝经后女性发病较为少见。发病者多有接受雌激素替代疗法治疗史。男性发病极为罕见, 国外偶见个案报道[3]。

目前尚未明确导致该病的具体因素, 但由于绝大多数患者为育龄期妇女, 妊娠及应用雌激素或口服避孕药能导致病情恶化, 在一些 LAM 患者的平滑肌组织中发现雌激素受体 (ER) 表达异常增高, 因此, 多数学者认为该病可能与雌激素水平异常有关。本例患者为绝经经期妇女, 其病因有待进一步研究。

关键词: 盆腹膜后; 淋巴管平滑肌瘤
中图法分类号: R735.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 候 杰. 淋巴管平滑肌瘤病[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(9): 566 - 567.
[2] 胡 红, 王炜芳, 王小光, 等. 肺淋巴管肌瘤病的临床分析[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(20): 1256 - 1260.
[3] San-Miguel P, Fernandez G, Sacristan F, *et al*. Renal smooth muscle tumor with features of lymphangioleiomyomatosis. Problems in histological diagnosis[J]. Urol Int, 2003, 71(4): 422 - 425.

(编辑 吴培红)

作者简介: 温 全, 男, 四川省成都市人, 副主任医师, 主要从事普通外科疾病临床诊治方面的研究, 发表论文 30 余篇。E-mail: vicent_dr@hotmail.com

收稿日期: 2008-01-08; 修回日期: 2008-03-01