文章编号:1000-5404(2008)02-0127-03

论著

SOCS3基因转染对人肺腺癌细胞株A549裸鼠移植瘤生长的影响

余祖滨[1],白 莉[2],姚 珂[1],闵家新[1],张国强[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 3, SOCS3)对人肺腺癌细胞株A549裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 将A549细胞、稳定转染空载体的A549细胞、稳定转染SOCS3载体的A549细胞分别接种至裸鼠皮下,复制A549裸鼠皮下移植瘤模型,观察各组细胞在裸鼠体内的成瘤率,测量肿瘤体积、瘤质量并绘制肿瘤生长曲线;免疫组织化学法和Western blot法检测肿瘤组织中信号转导和转录活化因子3(signal transduction and activators of transcription 3, STAT3)酪氨酸磷酸化水平。**结果** 与未转染组、空质粒转染组相比,SOCS3稳定表达组细胞裸鼠移植瘤生长缓慢,细胞成瘤数、瘤体体积和瘤质量显著降低($P<0.01$);瘤组织标本中酪氨酸磷酸化STAT3水平显著降低($P<0.01$)。**结论** SOCS3能显著抑制A549细胞在体内的生长能力,其机制可能与下调细胞内STAT3活性水平有关。

关键词:SOCS3;肺;腺癌;转录活化因子
中图法分类号:R394.3;R73-35;R734.2 **文献标识码**:A

SOCS3 gene inhibits the growth of A549 cell transplantation tumor in nude mice

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

Abstract: Objective To explore the effect of transfected SOCS3 gene on the growth of A549 cells *in vivo*. Methods Nude mice were transplanted subcutaneously with A549 cells, A549 cells stably transfected with SOCS3, A549 transfected with empty vectors, respectively. The tumor volume and weight were measured. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the level of tyrosine-phosphorylated protein STAT3 in tumor tissue. Results Compared with A549 cells and A549 transfected with empty vectors, A549 cells stably transfected with SOCS3 showed lower tumorigenicity and grew slowly in tumor volume and weight, as well as lower tyrosine-phosphorylated STAT3 level in tumor tissue (all $P<0.01$). Conclusion SOCS3 inhibits the growth of A549 cells by lowering the tyrosine-phosphorylated protein STAT3 level *in vivo*.

Key words: SOCS3; lung; adenocarcinoma; activators of transcription

大量研究证实,控制细胞分化、增殖的细胞内信号转导通路的持续激活是细胞恶性转化、肿瘤发生和演进的关键环节。STAT3蛋白作为信号转导和转录活化因子(signal transduction and activators of transcription, STATs)家族的主要成员,参与细胞恶性转化、增殖、凋亡等多种基本生命活动的调控,已证实STAT3持续活化与多种肿瘤的发生、发展密切相关,下调其表达和(或)活性水平可显著抑制肿瘤进展,目前被认为是一个有效的肿瘤治疗的靶点[1]。细胞因子信号负调控因子3(suppressors of cytokine signaling 3, SOCS3)是细胞内负性调节STAT3信号分子活性的主要成分,现有研究表明SOCS3基因启动子区CpG岛甲基化可能是肿瘤组织中STAT3持续活化的主要原因,那么恢复SOCS3表达或使其高表达有可能抑制或逆转肿瘤的发生和转移[2,3]。本研究将建立SOCS3基因稳定表达人肺腺癌的细胞株A549及裸鼠皮下移植瘤模型,观察SOCS3基因对体内A549细胞生长的影响。

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,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:yzbpostl@126.com
通讯作者:白 莉,电话:(023)68774603
收稿日期:2007-07-02;修回日期:2007-11-09

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验动物

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 脂质体为 Invitrogen 公司产品。Tripure 为德国 B. M 公司产品。兔抗人 pTyr 705-STAT3 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。S-P 免疫组化试剂盒购自北京中山公司，其余试剂为国产分析纯。BALB/c 裸小鼠 27 只，雌雄不分，鼠龄 4～6 周，体质量 15～20 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 基因转染和实验分组

人肺腺癌细胞株 A549，购自中国科学院上海生物研究所。采用 10% 小牛血清 1640 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规培养，0.25% 胰蛋白酶（含 0.02% EDTA）消化传代。SOCS3 稳定转染株的建立和鉴定参照文献[4]进行。实验分为以下 3 组：未转染组（A）；空质粒转染组（AP）；SOCS3 稳定表达组（AS）。其中 A 和 AP 组为对照组。

1.3 A549 裸鼠移植瘤模型的建立

收集对数生长期各组细胞，0.01 mol/L PBS 洗涤，重悬后进行细胞计数，调整细胞浓度至 1×10^7/ml。BALB/c 裸小鼠随机分组，每组 9 只。消毒裸小鼠右下肢皮肤，用带 6 号针头注射器抽取细胞悬液 200 μl，注射入裸鼠右下肢皮下，拔针后用镊子夹住针孔数秒，以防瘤细胞漏出。成瘤后每隔 3 天使用游标卡尺测量肿瘤的最长径（a）和最短径（b），按公式求出肿瘤体积 $V=ab^2/2$。接种 30 d 后处死小鼠，取出肿瘤称质量，中性甲醛固定，石蜡包埋，制备切片。根据公式计算抑瘤率 =（1 − 实验组肿瘤平均质量/对照组肿瘤平均质量）×100%。

1.4 免疫组织化学法检测肿瘤组织中酪氨酸磷酸化 STAT3（pTyr705- STAT3）表达

肿瘤切除标本均经 10% 中性福尔马林固定，石蜡包埋，连续 5 μm 厚度切片。具体步骤如下：3% H_2O_2 消除内源性过氧化酶活性后，组织抗原微波修复；10% 山羊血清封闭，滴加兔抗人 pTyr705-STAT3 单克隆抗体一抗；阴性对照用 0.01 mol/L PBS（以下同）代替一抗，37 ℃孵育 1 h；4 ℃过夜。滴加生物素标记的二抗，37 ℃孵育 1 h；滴加辣根过氧化酶标记的链酶素卵白素，37 ℃孵育 1 h。各步骤之间用 PBS 冲洗5 min，连续 3 次。DAB 显色，脱水，封片。

1.5 Western blot 检测 pTyr 705-STAT3 蛋白

取生长在 100 ml 培养瓶中各时相点细胞，弃培养液，0.01 mol/L PBS 液清洗，0 ℃ 500 μl 细胞裂解液（50 mmol/L pH 8.0 Tris · HCl，150 mmol/L NaCl，0.02% 叠氮钠，100 g/L 苯甲基磺酰氟，1 mg/L 抑肽酶，1% Triton）裂解细胞，15～30 min 后，用细胞刮收获细胞，于 4 ℃离心（12 000 r/min）10 min，牛血清白蛋白（BSA）法进行蛋白定量，取 40 μg 总蛋白选择 8% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳，完毕后将蛋白质电转印（15 V，1 mA，50 min）至 PVDF 膜，加封闭液（5% 脱脂奶粉，0.05% Tween-20，TBS 溶解）封闭 1 h，加封闭液 1∶1 000 稀释的兔抗 STAT3 磷酸化抗体 37 ℃孵育 1 h，4 ℃过夜后，含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min × 3 次，然后加 HRP 标记的二抗（封闭液稀释至 1∶1 000）孵育 2 h，于含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗膜 5 min × 3 次，再用 TBS 洗膜 5 min，将膜至 DAB 显色，直至洗出清晰条带。结果扫描存盘，Alpha Imager 2200 图像分析系统测定杂交带的吸光度值。

1.6 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 SOCS3 对肺腺癌细胞株 A549 裸鼠移植瘤生长的影响

A、AP、AS 3 组成瘤率分别为 8 只（分组太小，不便计算率用绝对数即可）、9 只、5 只，平均成瘤时间依次为 3.6、4.4、6.7 d，且 AS 组成瘤后瘤体生长缓慢（图 1）。至第 30 天断颈处死裸鼠后，剥离瘤体，A、AP、AS 3 组瘤体的平均质量分别为（1.06 ± 0.13）、（1.01 ± 0.10）、（0.33 ± 0.08）g，AP 组平均瘤体质量与 A 组无显著差异（$P>0.05$），AS 组平均瘤体质量显著低于 A 组，抑瘤率达 68.9%（$P<0.01$）。

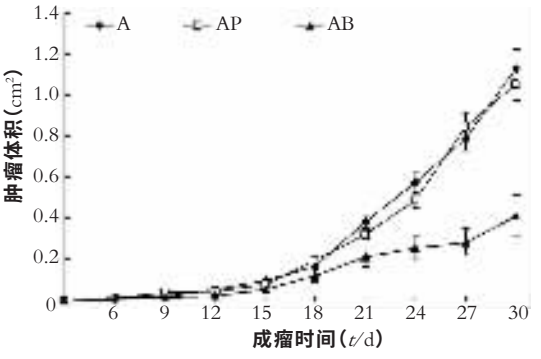
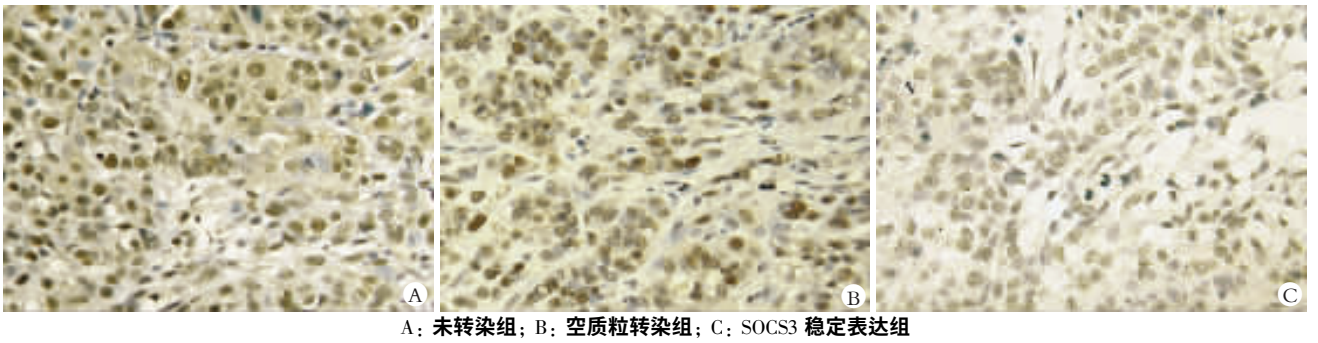


图 1 A、AP、AS 组细胞裸鼠移植瘤生长曲线比较

2.2 SOCS3 对 pTyr705-STAT3 表达的影响

2.2.1 免疫组织化学检测 pTyr705-STAT3 的表达

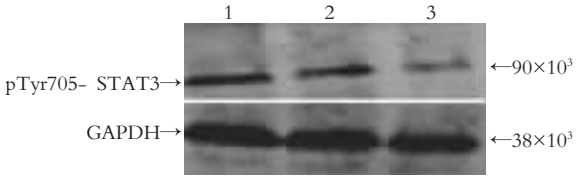
pTyr705-STAT3 主要位于核内表达，在瘤细胞的细胞核中可见深黄色染色颗粒。在 A、AP 组中，可见大部分肿瘤细胞中细胞核呈深黄色染色。而在 AS 组中，阳性染色细胞数减少，且核染色明显变浅（图 2）。



A：未转染组；B：空质粒转染组；C：SOCS3 稳定表达组

图 2 pTyr705- STAT3 免疫组化染色 （S-P × 400）

2.2.2　Western blot 检测 pTyr705-STAT3 的表达　pTyr705-STAT3 蛋白相对分子质量为 90×10^3。Western blot 检测结果显示，与 A 组比较，AS 组 pTyr705-STAT3 蛋白表达量显著降低（$P<0.01$），而 AP 组 pTyr705-STAT3 蛋白表达量与 A 组无显著差异（$P>0.05$）（图 3）。



1：未转染组；2：空质粒转染组；3：SOCS3 稳定表达组

图 3　Western blot 检测 pTyr705- STAT3 的表达

3　讨论

目前已经在多种肿瘤及转化细胞系中发现了持续激活的 STAT3，Ni 等[5]和 Huang 等[6]分别发现前列腺癌和卵巢癌细胞内的 STAT3 持续激活。Kube 等[7]发现霍奇金淋巴瘤细胞内 STAT3 持续激活，引起细胞的自发性生长及恶性转化。Mukohara 等[8]发现在非小细胞肺癌中，约 58% 标本中存在 STAT3 过度活化。另外，在脑瘤、乳腺癌、头颈癌等肿瘤细胞系中也发现了 STAT3 分子的持续激活[1]。这些结果表明 STAT3 基因的高表达和过度活化在细胞的恶性转化、异常增殖中起着重要的调控作用。多种针对下调 STAT3 表达和活性的方法如反义寡核苷酸、RNAi、多肽、小分子抑制剂等能够显著抑制多种肿瘤细胞的过度增殖，因此 STAT3 被认为是一个极有前途的肿瘤治疗靶点[9]。

细胞因子信号负调控因子（SOCSs）是 1997 年以来相继被发现的细胞内具有负性调控 JAK/STAT 信号通路的蛋白家族[2]。SOCSs 家族由 SOCS1～SOCS7 和 CIS 共 8 种成员组成，其中 SOCS3 是 STAT3 主要的负性调控因子，现有研究表明部分肺癌、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，SOCS3 在肿瘤组织中低表达和或不表达可能导致了细胞内信号分子如 STAT3 持续激活，最终参与肿瘤的发生、发展[10－12]。因此恢复 SOCS3 在肿瘤组织中表达或促使其高表达，极有可能阻止或逆转肿瘤的进展。

我们在前期工作中已经建立了 SOCS3 稳定表达的 A549 细胞株，发现体外培养的 SOCS3 稳定表达的 A549 细胞增殖明显受到抑制[4]。本研究重点观察了外源性 SOCS3 对肺腺癌细胞株 A549 移植瘤生长的影响。首先我们将转染空质粒组（AP）、SOCS3 稳定表达组（AS）及未转染组（A）分别接种于裸鼠皮下。接种后 AS 组细胞成瘤率低下，成瘤潜伏期延长，瘤体生长明显缓慢，且瘤体的体积和质量显著低于未转染组，抑瘤率达到 68.9%；免疫组织化学和 Western blot 检测结果显示 AS 组瘤细胞中 STAT3 酪氨酸磷酸化水平显著低于未转染组。这些结果结合以往工作，提示 SOCS3 基因能有效地抑制 A549 细胞的体内外生长。

现有研究显示除 STAT3 外，src 激酶、PI3K/AKT、v-ras、FAK 过度激活也是导致肿瘤发生和转移的重要细胞内分子事件。近来有报道显示 SOCS3 可能参与负性调控 STAT3 外的其他细胞内信号分子活性如 Ras/MAPK、PI3K/AKT、Src 激酶、FAK 激酶等[13]，由此推测 SOCS3 可能成为较 STAT3 更为理想的肿瘤基因治疗的靶点，值得我们深入研究。

参考文献：

[1] Aggarwal B B, Sethi G, Ahn K S, *et al*. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1091: 151－169.

[2] Wormald S, Hilton D J. Inhibitors of cytokine signal transduction[J]. J Biol Chem, 2004, 279(2): 821－824.

[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] Ni Z, Lou W, Lee S O, *et al*. Selective activation of members of the signal transducers and activators of transcription family in prostate carcinoma[J]. J Urol, 2002, 167(4): 1859－1862.

[6] Huang M, Page C, Reynolds R K, *et al*. Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells[J]. Gynecol Oncol, 2000, 79(1): 67－73.

[7] Kube D, Holtick U, Vockerodt M, *et al*. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines[J]. Blood, 2001, 98(3): 762－770.

[8] 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) [J]. Lung Cancer, 2003, 41(2): 123－130.

[9] Deng J, Grande F, Neamati N. Small molecule inhibitors of Stat3 signaling pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(1): 91－107.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

（编辑　陈聪连）