DOI:10.16016/j.1000-5404.202009149

SOX6-SOCS3 通过 STAT3 信号通路调控缺氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞增殖

王 羽[1,3,4],王授衔[1,3,4],陈德伟[2,3,4],刘 宝[1,3,4],高钰琪[1,3,4] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:高原特需药品与器材研究室[1];病理生理学教研室[2];极端环境医学教育部重点实验室[3];全军高原医学重点实验室[4]

[摘要] **目的** 探究 SRY 盒转录因子 6(SRY-Box transcription factor 6,SOX6)-细胞因子信号转导抑制因子 3(suppressor of cytokine signaling 3,SOCS3)在缺氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary artery smooth cells,HPASMCs)增殖中的作用及其可能机制。**方法** ①4% O_2 缺氧处理 HPASMCs 分为 3 组:常氧组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组($n=3$)。②使用小 RNA 干扰 SOX6 或 SOCS3 表达,干扰 SOX6 表达分为 4 组:si-SOX6-NC 组、si-SOX6-1 组、si-SOX6-2 组、si-SOX6-3 组($n=3$),干扰 SOCS3 表达分为 3 组:si-SOCS3-NC 组、si-SOCS3-1 组、si-SOCS3-2 组($n=3$)。③构建慢病毒过表达 SOX6 细胞后缺氧处理 48 h,分为 4 组:常氧对照组、过表达 SOX6 组、缺氧对照组、缺氧+过表达 SOX6 组(n=3)。④采用 CCK-8 检测各组细胞增殖,RT-qPCR、Western blot 检测各组 SOX6、SOCS3、磷酸化信号转导与转录激活因子 3(phosphorylated-signal transduction and activators of transcription 3,p-STAT3)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达。**结果** 缺氧可降低 SOX6 和 SOCS3 的表达($P<0.01$),不仅能诱导 HPASMCs 增殖($P<0.05$),还能显著上调 p-STAT3、PCNA 的表达($P<0.05$)。在常氧条件下,干扰 SOX6 或 SOCS3 可显著增强 HPASMCs 的增殖($P<0.05$),细胞中 p-STAT3、PCNA 的表达也显著升高($P<0.01$)。在缺氧条件下过表达 SOX6 可显著抑制缺氧诱导的 HPASMCs 增殖($P<0.01$),并显著降低 p-STAT3、PCNA 的表达($P<0.01$)。**结论** SOX6-SOCS3 可抑制缺氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞的增殖,其机制可能与抑制 STAT3 信号通路有关。

[关键词] SOX6;SOCS3;STAT3;肺动脉平滑肌细胞;缺氧;增殖

[中图法分类号] R322.121; R363.21; R364.31 [文献标志码] A

SOX6-SOCS3 regulates hypoxia-induced proliferation of HPASMCs by targeting STAT3 signaling pathway

WANG Yu[1,3,4], WANG Shouxian[1,3,4], CHEN Dewei[2,3,4], LIU Bao[1,3,4], GAO Yuqi[1,3,4] [1]Department of Medicine and Equipment for High Altitude Region, [2]Department of Pathophysiology, [3]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, [4]Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of SRY-Box transcription factor 6 (SOX6)-suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) on hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMCs) and explore the possible mechanism. **Methods** ①The HPASMCs were treated with 4% O_2 for 24 h or 48 h. ② siRNA was used to decrease the expression of SOX6 (si-SOX6-NC, si-SOX6-1, si-SOX6-2, si-SOX6-3) and SOCS3 (si-SOCS3-NC, si-SOCS3-1, si-SOCS3-2) in the cells. ③ The HPASMCs with stable SOX6 overexpression induced by transfection with a lentiviral vector were exposed to

[基金项目] 十二五军队重大项目(AWS16J023)

[通信作者] 高钰琪,E-mail:gaoy66@yahoo.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

hypoxia for 48 h, with the cells cultured in normoxia condition, or simple hypoxia condition as control. ④CCK-8 assay was used to testify the proliferation of the above groups of cells. The expression of SOX6, SOCS3, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and phosphorylated-signal transduction and activators of transcription 3 (p-STAT3) at mRNA and protein levels were detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** Hypoxia decreased the expression levels of SOX6 and SOCS3 ($P<0.01$), induced the proliferation of HPASMCs and up-regulated the levels of p-STAT3 and PCNA ($P<0.05$). Under normoxia condition, the reduction of SOX6 or SOCS3 not only significantly increased the proliferation of HPASMCs ($P<0.05$) butalso the levels of p-STAT3 and PCNA ($P<0.01$). Under hypoxia, overexpression of SOX6 obviously suppressed hypoxia-induced proliferation and the expression levels of p-STAT3 and PCNA ($P<0.01$). **Conclusion** SOX6-SOCS3 can suppress the hypoxia-induced proliferation of HPASMCs. Its mechanisms may be related to the inhibition of STAT3 signaling pathway.

[**Key words**] SOX6; SOCS3; STAT3; human pulmonary artery smooth cells; hypoxia; proliferation

Supported by the Major Project of the "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (AWS16J023). Corresponding author: GAO Yuqi, E-mail: gaoy66@yahoo.com

缺氧性肺动脉高压(hypoxia pulmonary artery hypertension,HPH)是一组由缺氧引起的以肺动脉压力增高并伴有右心室肥大的慢性进行性疾病,其主要病理特征包括肺血管的异常收缩和肺血管结构重建[1-4]。而慢性缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖是肺血管结构重建发生的重要环节,抑制肺血管平滑肌细胞的增殖可显著缓解 HPH,刺激肺血管平滑肌细胞的增殖可导致 HPH 显著恶化[5-9],因此缺氧诱导的肺血管平滑肌细胞增殖在 HPH 的发生发展中发挥着重要作用。可见,探究缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖的分子基础及其调控机制可为 HPH 的防治提供重要的理论依据。

SOCS3 是 SOCS 家族中最活跃一员,参与调节多种细胞因子介导的信号通路,影响细胞的生长、增殖、凋亡等生物学行为。SOCS3 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来抑制多种细胞增殖[10-13]。STAT3 信号通路的激活可以刺激其下游靶基因 cyclinD1、Myc、BCL、VEGF 等表达增多进而促进细胞增殖[14]。STAT3 信号通路在血管平滑肌细胞增殖调控中也发挥着重要的作用,研究证实抑制 STAT3 信号通路的激活可有效抑制血管平滑肌细胞的增殖[15-18],而过表达 SOCS3 可明显抑制大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖[19]。文献研究和生物信息学分析均证实,SOX6 是调控 SOCS3 基因表达的关键转录因子,SOCS3 基因启动子区域具有 SOX6 的特征识别序列且在物种间高度保守[20]。SOX6 是 Y 染色体性别决定区(sex determination region of Y chromosome, SRY)相关基因家族中的一员,大量研究表明 SOX6 参与神经发育、软骨形成、骨髓造血、骨骼肌分化等重要的生理过程[21-22]。抑制 SOX6 的表达可显著刺激多种肿瘤细胞增殖,如:前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞等[23-25],提示 SOX6 在调控细胞增殖中发挥重要的作用,但 SOX6-SOCS3 在缺氧引起的人肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用及其机制尚未见报道。因此,本研究拟通过小干扰 RNA、慢病毒转染过表达等技术探讨 SOX6-SOCS3 在缺氧诱导的 HPASMCs 增殖中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 原代人肺动脉平滑肌细胞(HPASMC)购自 ScienceCell 公司,细胞用平滑肌细胞培养基(货号:1101,ScienceCell 公司)培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 小干扰 RNA 购自锐博生物公司,SOX6 干扰序列:si-SOX6-1 的靶序列为 GAACGCGCTTTGAGAATTT;si-SOX6-2 的靶序列为 AGATCCACTTAGAGAAGTA;si-SOX6-3 的靶序列为 GGGAAACTGTCCTCCATAA,SOCS3 干扰序列:si-SOCS3-1 的靶序列为 CAGCATCTCTGTCGGAAGA;si-SOCS3-2 的靶序列为 CACCTGGACTCCTATGAGA。SOX6 抗体(货号:ab64946)购自英国 Abcam 公司;SOCS3 抗体(货号:14025-1)购自美国 Proteintech 公司;p-STAT3 抗体(货号:9145)、PCNA 抗体(货号:2586S)均购自美国 CST 公司;CCK-8 试剂盒(货号:CK04)购自日本同仁公司;PBS、TBS、封闭蛋白干粉均购自博士德公司;细胞组织裂解液(RIPA)、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 均购自碧云天公司;RNA 提取试剂盒(货号:R6834-02)购自美国 OMEGA 公司;SOX6 上游引物 5′-GGATGCAATGACCCAGGATTT-3′,

下游引物 5′-TGAATGGTACTGACAAGTGTTGG-3′,SOCS3 上游引物 5′-ATCCTGGTGACATGCTCCTC-3′,下游引物 5′-GGCACCAGGTAGACTTTGGA-3′,引物由美国 Invitrogen 公司合成;LipofectamineRNAiMAX(货号:13778-150)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;带 GFP 荧光的 SOX6 过表达慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司设计合成;缺氧工作站购自英国 Baker Ruskinn 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞缺氧处理 将 HPASMC 细胞消化后,取适量单细胞悬液均匀接种到培养皿中,待细胞生长至对数生长期,换液,然后置于缺氧工作站(37 ℃,4% O_2)内分别培养 24、48 h 后取出进行后续实验,分为 3 组:常氧组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组($n=3$)。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 SOX6 和 SOCS3 的 mRNA 表达水平 用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,测 RNA 样品的浓度和纯度,使得 $D(260)/D(280)$ 值在 1.8~2.0 之间,反转录后得到 cDNA,荧光定量 PCR 检测各组 SOX6 和 SOCS3 的 mRNA 表达,实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法检测细胞中 SOX6、SOCS3、PCNA、p-STAT3 蛋白的表达 分别收集各组的细胞,用 RIPA+PMSF 裂解细胞,提取总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白定量。SDS-PAGE 电泳后,恒流转膜 2 h,脱脂奶粉封闭 1 h,SOX6 抗体(1∶100)、SOCS3 抗体(1∶500)、PCNA 抗体(1∶1 000)、p-STAT3 抗体(1∶500)4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。HRP 标记的山羊抗兔二抗(1∶2 000)、山羊抗鼠二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,蛋白显像,实验重复 3 次。

1.2.4 小干扰 RNA 转染细胞 按照说明书将 siRNA 配成终浓度 20 μmol/L 的工作液,以 6 孔板为例(96 孔板可按比例计算),取 450 μL Opti-MEM 培养液,加入 3.75 μL 的 siRNA 工作液,加入 7.5 μL LipofectamineRNAiMAX,混匀后室温静置 20 min,然后加入细胞孔内,培养箱内继续培养 24 h 后,换液,24、48 h 后进行相应的处理及检测。干扰 SOX6 表达分为 4 组:si-SOX6-NC 组(阴性对照组)、si-SOX6-1 组、si-SOX6-2 组、si-SOX6-3 组($n=3$),干扰 SOCS3 表达分为 3 组:si-SOCS3-NC 组(阴性对照组)、si-SOCS3-1 组、si-SOCS3-2 组($n=3$)。

1.2.5 CCK-8 检测细胞的增殖能力 消化细胞后,按照每孔 5 000 个细胞接种在 96 孔板中,每组设 3 个复孔,进行转染和缺氧处理。检测前吸干孔内培养基,PBS 轻柔洗两遍,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 和 90 μL PBS,37 ℃、5%二氧化碳培养箱中培养 4 h 后,酶标仪 450 nm 测定吸光度 $D(450)$ 值,实验重复 3 次。

1.2.6 过表达 SOX6 肺动脉平滑肌细胞的建立及鉴定 将生长状态良好的 HPASMC 细胞按 10^5/孔接种到 6 板中,待细胞融合率约 30%时,PBS 漂洗细胞 3 次,更换新鲜培养基,病毒稀释液中加入促转染试剂 polybrene(聚凝胺),终浓度为 5 μg/mL,按照细胞 MOI 值计算并加入相应量的病毒。将培养基和病毒液充分混匀置于培养箱中孵育 48 h,换成新鲜培养基,同时按照 1∶1 000 的比例加入嘌呤霉素进行筛选。24 h 后换液,荧光显微镜下观察转染效率,用于后续实验。分为 4 组:常氧对照组、过表达 SOX6 组、缺氧对照组、缺氧+过表达 SOX6 组($n=3$)。

1.3 *统计学分析*

应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,各组计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间的比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 *缺氧诱导平滑肌细胞增殖,并显著降低 SOX6 和 SOCS3 的表达*

采用 4% O_2 缺氧处理 HPASMCs,CCK-8 检测结果显示,与常氧组相比,缺氧 24 h 组 CCK-8 相对水平(1.27±0.09)和缺氧 48 h 组 CCK-8 相对水平(1.27±0.06)显著升高($P<0.05$)。同时,Western blot 结果显示缺氧 24 h 组和缺氧 48 h 组 SOX6、SOCS3 的蛋白表达水平显著下降、PCNA 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$,图 1),提示 SOX6 和 SOCS3 可能参与缺氧引起的肺动脉平滑肌细胞增殖。

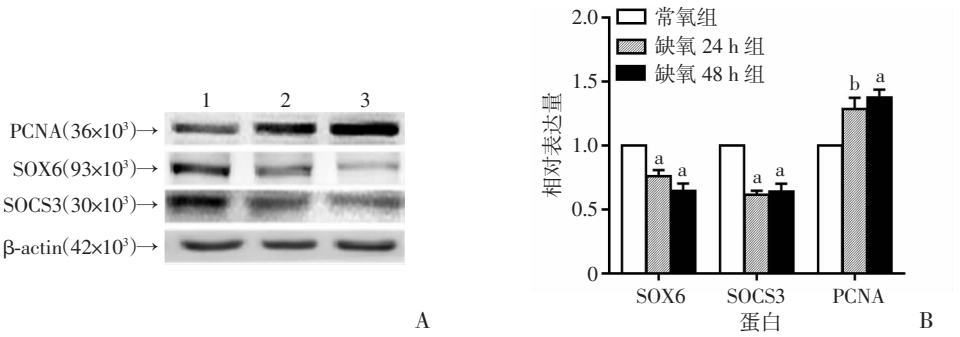
2.2 *敲低 SOX6 或 SOCS3 的表达可显著增强平滑肌细胞增殖*

为了进一步证实 SOX6、SOCS3 参与调控平滑肌细胞的增殖,分别用 siRNA 干扰平滑肌细胞中 SOX6、SOCS3,采用 RT-qPCR 及 Western blot 检测其表达,结果显示,siRNA 干扰可显著降低 SOX6($P<0.001$,图 2)或 SOCS3($P<0.001$,图 2)的 mRNA 和蛋白表达水平。且敲低 SOX6 后,SOCS3 的蛋白和 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$,图 3)。CCK-8 检测结果显示,与阴性对照组相比,si-SOX6-1 组 CCK-8 相对水平(1.20±0.09)、si-SOX6-2 组 CCK-8 相对水平(1.25±0.06)、si-SOX6-3 组 CCK-8 相对水平(1.25±0.06)、si-SOCS3-1 组 CCK-8 相对水平(1.25±0.04)、si-SOCS3-2 组 CCK-8 相对水平(1.23±0.05)均显著升高($P<0.05$),同时 PCNA 的蛋白水平也明显升高($P<0.01$,图 4)。证实干扰 SOX6 或 SOCS3 表达后,平滑肌细胞的增殖显著

增强,表明 SOX6、SOCS3 参与调控平滑肌细胞增殖。

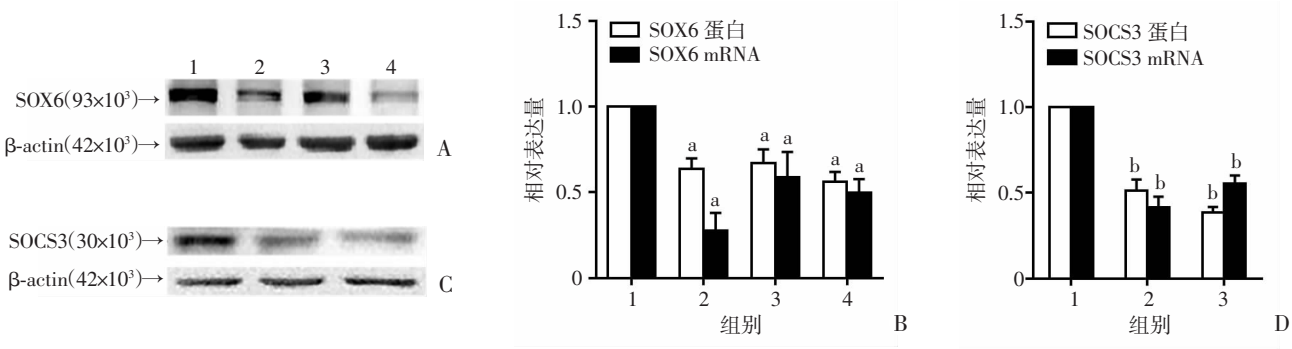
2.3 敲低 SOX6 或 SOCS3 可促进 STAT3 磷酸化,诱导平滑肌细胞增殖

为了探究 SOX6、SOCS3 调控平滑肌细胞增殖背后的机制,在敲低 SOX6、SOCS3 的平滑肌细胞中,进一步用 Western blot 检测了 p-STAT3 的蛋白表达变化。结果显示,在敲低 SOX6、SOCS3 后,平滑肌细胞中 p-STAT3 的蛋白表达水平显著升高($P<0.01$,图 5)。提示常氧条件下敲低 SOX6 或 SOCS3 的表达对平滑肌细胞增殖的增强作用是通过促进 STAT3 磷酸化来实现。



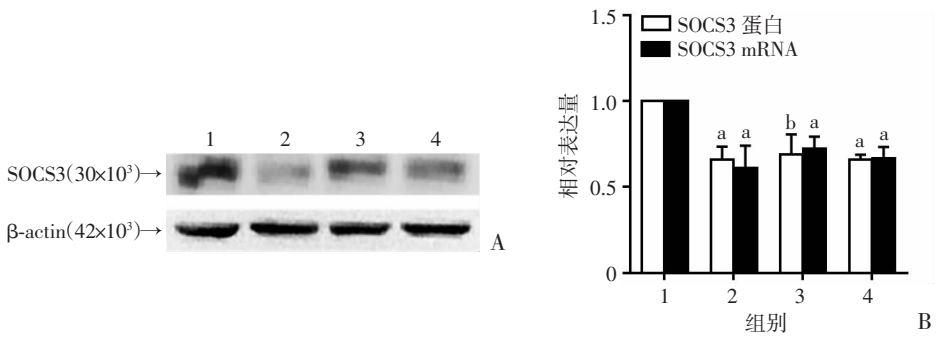
A:Western blot 检测 PCNA、SOX6、SOCS3 的蛋白表达水平;B:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:常氧组;2:缺氧 24 h 组;3:缺氧 48 h 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与常氧组比较

图 1 缺氧对 PCNA、SOX6、SOCS3 蛋白表达的影响



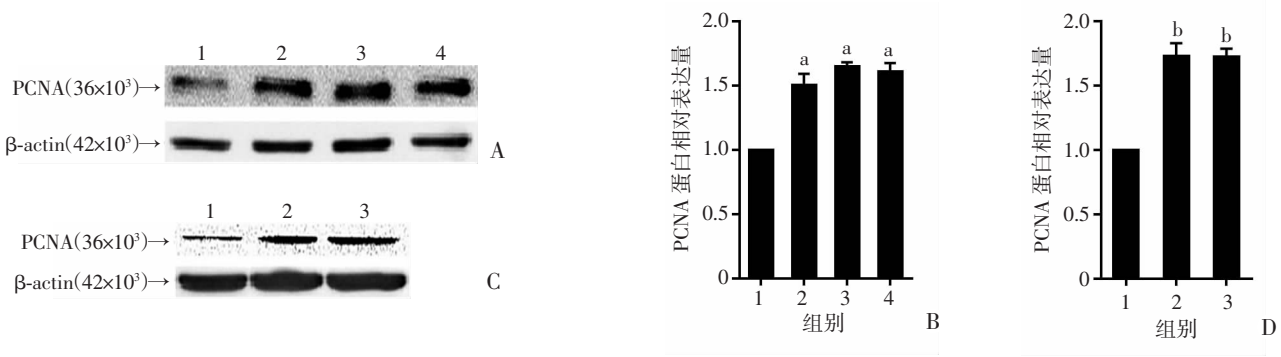
A:Western blot 检测干扰 SOX6 效率;B:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOX6-NC 组;2:si-SOX6-1 组;3:si-SOX6-2 组;4:si-SOX6-3 组;a:$P<0.001$,与 si-SOX6-NC 组比较;C:Western blot 检测干扰 SOCS3 效率;D:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOCS3-NC 组;2:si-SOCS3-1 组;3:si-SOCS3-2 组;b:$P<0.001$,与 si-SOCS3-NC 组比较

图 2 荧光定量 PCR 与 Western blot 检测 SOX6、SOCS3 干扰效率



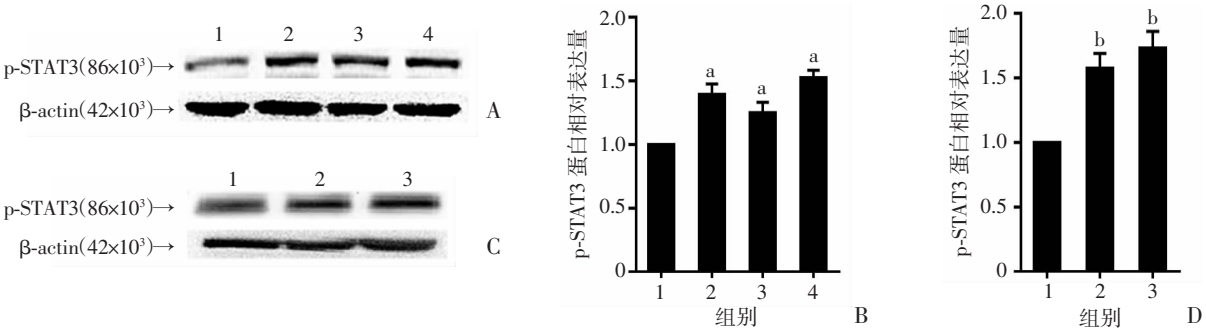
A:Western blot 检测干扰 SOX6 对 SOCS3 蛋白表达的影响;B:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOX6-NC 组;2:si-SOX6-1 组;3:si-SOX6-2 组;4:si-SOX6-3 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 si-SOX6-NC 组比较

图 3 荧光定量 PCR 与 Western blot 检测干扰 SOX6 对 SOCS3 表达的影响



A:Western blot 检测干扰 SOX6 对 PCNA 表达的影响;B:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOX6-NC 组;2:si-SOX6-1 组;3:si-SOX6-2 组;4:si-SOX6-3 组;a:$P<0.01$,与 si-SOX6-NC 组比较;C:Western blot 检测干扰 SOCS3 对 PCNA 表达的影响;D:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOCS3-NC 组;2:si-SOCS3-1 组;3:si-SOCS3-2 组;b:$P<0.01$,与 si-SOCS3-NC 组比较

图 4 干扰 SOX6、SOCS3 对 PCNA 表达的影响

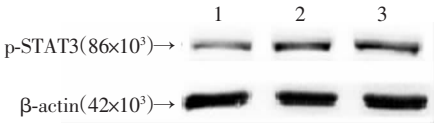


A:Western blot 检测干扰 SOX6 对 p-STAT3 蛋白表达的影响;B:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOX6-NC 组;2:si-SOX6-1 组;3:si-SOX6-2 组;4:si-SOX6-3 组;a:$P<0.01$,与 si-SOX6-NC 组比较;C:Western blot 检测干扰 SOCS3 对 p-STAT3 蛋白表达的影响;D:定量分析($n=3,\bar{x}\pm s$);1:si-SOCS3-NC 组;2:si-SOCS3-1 组;3:si-SOCS3-2 组;b:$P<0.01$,与 si-SOCS3-NC 组比较

图 5 敲低 SOX6、SOCS3 对 p-STAT3 表达的影响

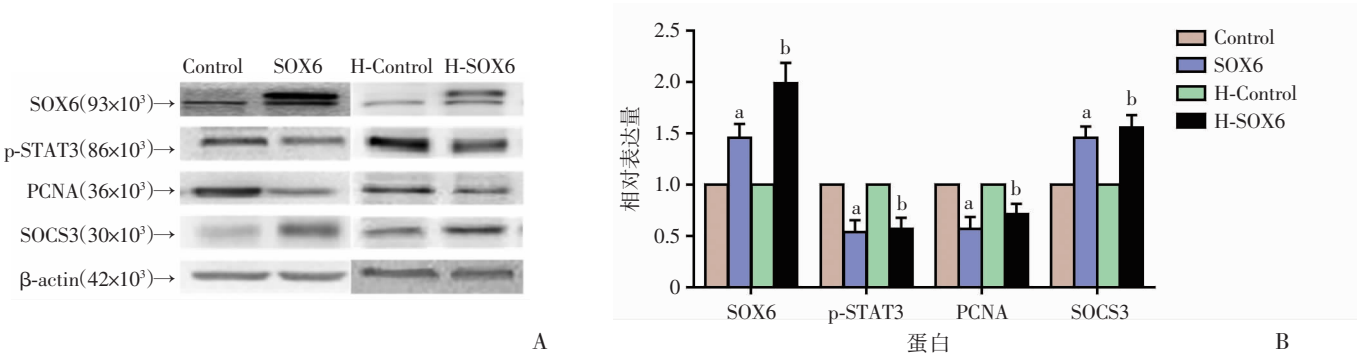
2.4 过表达 SOX6 可通过抑制 STAT3 磷酸化阻止缺氧诱导的平滑肌细胞增殖

为了进一步证实 SOX6-SOCS3 通过抑制 STAT3 磷酸化来阻止缺氧诱导的平滑肌增殖,采用 Western blot 检测细胞中 p-STAT3 蛋白表达水平,结果显示,与常氧组相比,缺氧 24 h 组细胞 p-STAT3 蛋白相对表达水平(1.50±0.20)、缺氧 48 h 组细胞 p-STAT3 蛋白相对表达水平(2.19±0.22)明显升高($P<0.01$,图 6)。通过慢病毒转染过表达平滑肌细胞中的 SOX6,采用 Western blot 检测过表达效果,结果显示,与常氧对照组相比,过表达组 SOX6 的蛋白表达显著升高($P<0.01$,图 7)。同时,SOCS3 的蛋白表达水平也显著升高,PCNA、p-STAT3 的蛋白表达水平则明显降低($P<0.01$,图 7)。为了进一步证实 SOX6-SOCS3 在调控缺氧诱导的平滑肌细胞增殖中作用及机制,将过表达 SOX6 的平滑肌细胞置于 4% O_2 的缺氧条件下培养 48 h,并进行 CCK-8 检测,与缺氧对照组相比,缺氧+过表达 SOX6 组细胞 CCK-8 相对水平(0.75±0.05)明显降低($P<0.01$),过表达 SOX6 可显著抑制缺氧诱导的平滑肌细胞增殖。且 SOX6、SOCS3 的蛋白表达水平显著升高,p-STAT3、PCNA 蛋白表达水平显著下降($P<0.01$,图 7)。表明 SOX6-SOCS3 通过抑制 STAT3 磷酸化来阻止缺氧诱导的平滑肌细胞增殖。



1:常氧组;2:缺氧 24 h 组;3:缺氧 48 h 组

图 6 缺氧对平滑肌细胞 p-STAT3 蛋白表达的影响



A:Western blot 检测过表达 SOX6 对常氧、缺氧条件下细胞中 SOX6、SOCS3、PCNA、p-STAT3 蛋白表达的影响;B:定量分析($n=3$,$\bar{x}\pm s$);Control:常氧对照组;SOX6:过表达 SOX6 组;H-Control:缺氧对照组;H-SOX6:缺氧+过表达 SOX6 组;a:$P<0.01$,与常氧对照组比较;b:$P<0.01$,与缺氧对照组比较

图 7 过表达 SOX6 对 SOX6、SOCS3、PCNA、p-STAT3 蛋白表达的影响

3 讨论

缺氧性肺动脉高压是肺源性心脏病、高原肺水肿和高原心脏病等发病的中心环节。因此深入研究缺氧性肺动脉高压的发生机制,制定有效的防治策略,对于改善高原群众和官兵的生存质量具有十分重要的意义。缺氧性肺动脉高压主要病理特征包括缺氧引起的肺血管异常收缩和肺血管结构重建,缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖是肺血管结构重建的重要环节,现有的研究发现血管紧张素-2、内皮素-1、血小板生长因子、内质网-线粒体相关膜的形成等都参与了缺氧诱导的肺血管平滑肌增殖[27-30]。同时发现,核苷酸结合的寡聚结构域蛋白 2(NOD2)的缺失可以通过促进肺血管平滑肌细胞的增殖来恶化缺氧诱导的肺动脉高压[28],白藜芦醇、丹参素、龙葵碱、长链非编码 RNA 都可以通过抑制肺血管平滑肌细胞的增殖进而改善肺动脉高压[31-33]。尽管缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖在缺氧性肺动脉高压的发生中十分重要,但其背后的分子机制仍不十分清楚。SOX6 在缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖中的作用尚少见报道。在本研究中我们探讨了 SOX6 在缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖中的作用及其可能的机制,研究结果发现 SOX6 通过 SOCS3 抑制 STAT3 的磷酸化进而抑制缺氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞增殖,为缺氧性肺动脉高压的发生机制研究提供了一个新的方向,也为干预缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖提供了一个新的靶点。

SOCSs 是 1997 年以来被发现的具有负性调控细胞因子信号通路功能的蛋白家族,目前对 SOCS3 和 SOCS1 了解的较为清楚,其广泛表达在不同类型的组织和细胞。已有研究发现,SOCS3 可能通过阻止 STAT3 磷酸化从而抑制缺氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖[9-12]。SOX6 作为调控 SOCS3 表达的关键转录因子,参与众多重要的生理过程[12-13]。有文献报道,SOX6 在多种肿瘤细胞中作为一种抑癌因子广泛发挥作用[34, 36],同时多种 micro RNA 可通过 SOX6 来调控肿瘤细胞的增殖、分化和侵袭[35, 37]。虽然已经明确 SOX6 可参与调控肿瘤细胞的增殖,但是关于 SOX6 调控平滑肌细胞增殖的具体作用和机制研究尚少见报道。本研究结果显示,与常氧组相比,缺氧组细胞中 SOX6、SOCS3 蛋白表达水平均显著降低,且伴有显著的增殖效应。敲低 SOX6、SOCS3 表达可显著增强平滑肌细胞增殖。提示 SOX6 调控细胞增殖的作用可能通过其下游 SOCS3 来实现。

文献报道,在缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖中,STAT3 通路的激活发挥着重要作用,阻断 STAT3 信号通路可有效抑制血管平滑肌的增殖[15-18]。STAT3 是一种重要的转录因子,其磷酸化可激活 STAT3 信号通路,在调节细胞增殖方面发挥重要的作用[14]。现有研究发现,SOCS 家族蛋白可通过抑制 JAK 激酶的活性阻断 STAT3 磷酸化,进而抑制 JAK-STAT3 通路激活[10-13]。本研究结果显示,敲低平滑肌细胞中的 SOX6、SOCS3 可显著上调 STAT3 的磷酸化水平,缺氧组细胞中 STAT3 的磷酸化水平显著增高。过表达 SOX6 可显著降低 STAT3 的磷酸化水平,同时显著抑制缺氧诱导的增殖。综合比较发现,SOX6 可通过 SOCS3 抑制 STAT3 信号通路的激活来显著抑制缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖。

综上,增强 SOX6-SOCS3 的表达可显著抑制缺氧诱导的人肺动脉平滑肌的增殖,其机制与 STAT3 信号通路抑制密切相关。缺氧下调 SOX6、SOCS3 表达,进

而激活 STAT3 信号通路刺激细胞增殖可能是缺氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的分子机制之一。而过表达 SOX6 可显著抑制缺氧诱导的平滑肌细胞增殖,提示 SOX6 可作为干预缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖的新靶点。除此之外,SOX6 可通过抑制 STAT3 的磷酸化来阻止 STAT3 信号通路的激活,STAT3 信号通路的激活与中枢神经系统疾病、肿瘤、心血管系统疾病等有着密切的关系,提示 SOX6 可能在多种疾病的发生发展过程中发挥着重要的作用。但 SOX6 抑制 STAT3 磷酸化的具体机制仍需进一步的研究。

参考文献:

[1] 高钰琪.高原军事医学[M]. 重庆:重庆出版社,2005. 54-74.
GAO Y Q. Plateau military medicine[M]. Chongqing, Chongqing: Publishing House,2005. 54-74.

[2] LAI Y C, POTOKA K C, CHAMPION H C, *et al*. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome[J]. Circ Res, 2014, 115(1): 115-130. DOI: 10.1161/circresaha.115.301146.

[3] OLSCHEWSKI H, KOVACS G. ESC-Leitlinien 2015 zur pulmonalen hypertonie[J]. Herz, 2015, 40(8): 1055-1060. DOI: 10.1007/s00059-015-4381-5.

[4] LAN N S H, MASSAM B D, KULKARNI S S, *et al*. Pulmonary arterial hypertension: pathophysiology and treatment[J]. Diseases, 2018, 6(2): 38. DOI: 10.3390/diseases6020038.

[5] DODSON M W, BROWN L M, ELLIOTT C G. Pulmonary arterial hypertension[J]. Heart Fail Clin, 2018, 14(3): 255-269. DOI: 10.1016/j.hfc.2018.02.003.

[6] JAITOVICH A, JOURD'HEUIL D. A brief overview of nitric oxide and reactive oxygen species signaling in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Pulm Vasc Redox Signal Heal Dis, 2017: 967: 71-81. DOI: 10.1007/978-3-319-63245-2_6.

[7] THENAPPAN T, ORMISTON M L, RYAN J J, *et al*. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. BMJ, 2018, 360: j5492. DOI: 10.1136/bmj.j5492.

[8] WANG Y, ZHONG B, WU Q, *et al*. Aldosterone contributed to pulmonary arterial hypertension development via stimulating aquaporin expression and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation[J]. Pharmacology, 2020, 105(7/8): 405-415. DOI: 10.1159/000504228.

[9] KWON M Y, HWANG N, PARK Y J, *et al*. NOD2 deficiency exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Oncotarget, 2018, 9(16): 12671-12681. DOI: 10.18632/oncotarget.23912.

[10] QIN M Z, QIN M B, LIANG Z H, *et al*. Effect of SOCS3 on lung injury in rats with severe acute pancreatitis through regulating JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(22): 10123-10131. DOI: 10.26355/eurrev_201911_19582.

[11] ZHANG J R, ZHU R H, HAN X P. MiR-410 affects the proliferation and apoptosis of lung cancer A549 cells through regulation of SOCS3/JAK-STAT signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(18): 5994-6001. DOI: 10.26355/eurrev_201809_15934.

[12] BAUS D, PFITZNER E. Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells[J]. Int J Cancer, 2006, 118(6): 1404-1413. DOI: 10.1002/ijc.21539.

[13] HACKETT A R, LEE D H, DAWOOD A, *et al*. STAT3 and SOCS3 regulate NG2 cell proliferation and differentiation after contusive spinal cord injury[J]. Neurobiol Dis, 2016, 89: 10-22. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.01.017.

[14] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.8.

[15] PARK S, KIM J K, OH C J, *et al*. Scoparone interferes with STAT3-induced proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. Exp Mol Med, 2015, 47(3): e145. DOI: 10.1038/emm.2014.113.

[16] QIAN Z J, LI Y J, YANG H Y, *et al*. PDGFBB promotes proliferation and migration via regulating miR-1181/STAT3 axis in human pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 315(6): L965-L976. DOI: 10.1152/ajplung.00224.2018.

[17] HEISS E H, LIU R, WALTENBERGER B, *et al*. Plumericin inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells by blocking STAT3 signaling via S-glutathionylation[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20771. DOI: 10.1038/srep20771.

[18] DANIEL J M, DUTZMANN J, BIELENBERG W, *et al*. Inhibition of STAT3 signaling prevents vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation[J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(3): 261. DOI: 10.1007/s00395-012-0261-9.

[19] 白莉, 余祖滨, 钱频, 等. 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[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(12): 2310-2313.
BAI L, YU Z B, QIAN P, *et al*. Effects of SOCS3 gene on the expression of c-myc mRNA and proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia conditions [J]. Chin J Pathophysiol, 2005, 21(12): 2310-2313.

[20] CANTÙ C, IERARDI R, ALBORELLI I, *et al*. SOX6 en-

hances erythroid differentiation in human erythroid progenitors[J]. Blood, 2011, 117(13): 3669-3679. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282350.

[21] LIU C F, LEFEBVRE V. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drivechondrogenesis[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(17): 8183-8203. DOI: 10.1093/nar/gkv688.

[22] LI J, LAI Y, LUO J, *et al*. SOX6 downregulation induces γ-globin in human β-thalassemia major erythroid cells[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9496058. DOI: 10.1155/2017/9496058.

[23] JIANG W, YUAN Q, JIANG Y, *et al*. Identification of Sox6 as a regulator of pancreatic cancer development[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1864-1872. DOI: 10.1111/jcmm.13470.

[24] LI Y C, LI C F, CHEN L B, *et al*. MicroRNA-766 targeting regulation of SOX6 expression promoted cell proliferation of human colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2981-2988. DOI: 10.2147/ott.s89459.

[25] GUO X D, YANG M, GU H, *et al*. Decreased expression of SOX6 confers a poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(5): 732-736. DOI: 10.1016/j.canep.2013.05.002.

[26] SPIEKERKOETTER E, KAWUT S M, DE JESUS PEREZ V A. New and emerging therapies for pulmonary arterial hypertension[J]. Annu Rev Med, 2019, 70: 45-59. DOI: 10.1146/annurev-med-041717-085955.

[27] HUETSCH J C, WALKER J, UNDEM C, *et al*. Rho kinase and Na+ /H+ exchanger mediate endothelin-1-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Physiol Rep, 2018, 6(9): e13698. DOI: 10.14814/phy2.13698.

[28] SONG Y, WU Y, SU X, *et al*. Activation of AMPK inhibits PDGF-induced pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation and its potential mechanisms[J]. Pharmacol Res, 2016, 107: 117-124. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.03.010.

[29] CHOWDHURY A, SARKAR J, PRAMANIK P K, *et al*. Cross talk between MMP2-Spm-Cer-S1P and ERK1/2 in proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells under angiotensin II stimulation[J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 603: 91-101. DOI: 10.1016/j.abb.2016.05.013.

[30] YANG Y D, LI MM, XU G, *et al*. Nogo-B receptor directs mitochondria-associated membranes to regulate vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2319. DOI: 10.3390/ijms20092319.

[31] KWON M Y, HWANG N, PARK Y J, *et al*. NOD2 deficiency exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Oncotarget, 2018, 9(16): 12671-12681. DOI: 10.18632/oncotarget.23912.

[32] GUAN Z, SHEN L, LIANG H, *et al*. Resveratrol inhibits hypoxia-induced proliferation and migration of pulmonary artery vascular smooth muscle cells by inhibiting the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1653-1660. DOI: 10.3892/mmr.2017.6814.

[33] ZHANG N, DONG M, LUO Y, *et al*. Danshensu prevents hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via TGF-β-smad3-associated pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820: 1-7. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.12.010.

[34] NIE X, DAI Y, TAN J, *et al*. A-Solanine reverses pulmonary vascular remodeling and vascular angiogenesis in experimental pulmonary artery hypertension[J]. J Hypertens, 2017, 35(12): 2419-2435. DOI: 10.1097/hjh.0000000000001475.

[35] LI Z W, WANG Y. MiR-96 targets SOX6 and promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(3): 365-371. DOI: 10.1139/bcb-2017-0183.

[36] LI Y, XIAO M, GUO F. The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis[J]. Tumour Biol, 2017, 39(5): 1010428317705508. DOI: 10.1177/1010428317705508.

[37] YU Y, WANG Z, SUN D, *et al*. miR-671 promotes prostate cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor SOX6[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 823: 65-71. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.01.016.

(收稿:2020-09-19;修回:2020-10-16)

(编辑 栾 嘉)