DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.016
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1549-04

论著

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

余祖滨[1],白 莉[2],闵家新[1],姚 珂[1],张国强[1] (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,重庆 400037)

提 要:目的 探讨SOCS3基因对人肺腺癌细胞株A549中*c-fos*、*c-jun* mRNA表达及细胞增殖的影响。方法 以脂质体为载体将pEFSOCS3和pSV2neo共转染至人肺腺癌细胞株A549,RT-PCR和免疫细胞化学法测定转染前后细胞中SOCS3 mRNA和蛋白表达;半定量RT-PCR测定转染前后细胞中*c-fos*、*c-jun* mRNA水平表达变化;^{3}H-TdR掺入法检测基因转染前后细胞增殖情况。结果 RT-PCR和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证实转染后细胞中*c-fos*、*c-jun* mRNA水平显著降低($P<0.01$);且转染组细胞^{3}H-TdR掺入量显著降低($P<0.01$)。结论 SOCS3蛋白可能通过负性调控STAT3介导的信号通路降低*c-fos*、*c-jun*的表达,从而抑制肺癌细胞增殖。

关键词:SOCS3;*c-fos*;*c-jun*;肺腺癌;增殖
中图法分类号:R394.2;R730.2;R734.2 文献标识码:A

Effects of transfected SOCS3 gene on expression of *c-fos* and *c-jun* mRNA and proliferation of A549 cells

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

Abstract: Objective To explore the effects of transfected SOCS3 gene on the expression of *c-fos* and *c-jun* mRNA and proliferation of A549 cells. Methods A549 cells were cotransfected with pEFSOCS3 and pSV2neo by liposome. Expressions of SOCS3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and immunocytochemical method, respectively. The expression of *c-fos* and *c-jun* mRNA was assessed by semi-quantitative RT-PCR. ^{3}H-TdR incorporation was used to measure the cell proliferation. Results The SOCS3 expression in A549 cells transfected with SOCS3 gene was confirmed by RT-PCR and immunocytochemical method, respectively. Compared with that in the control group, *c-fos* and *c-jun* mRNA level decreased significantly in pEFSOCS3-transfected A549 cells ($P<0.01$). ^{3}H-TdR incorporation in pEFSOCS3-transfected A549 cells was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). Conclusion SOCS3 protein might decrease the expression of *c-fos* and *c-jun* and inhibit the proliferation of A549 cells by regulating STAT3-mediated signal pathway negatively.

Key words: SOCS3; *c-fos*; *c-jun*; lung adenocarcinoma; proliferation

研究已证实,肺癌组织及细胞中存在信号转导和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)持续激活并高度表达,且STAT3的活化水平与肿瘤的恶性程度、分期密切相关[1]。1997年以来相继发现的细胞信号负调控因子(suppressors of cytokine signaling, SOCS)家族,可通过抑制STAT蛋白酪氨酸磷酸化水平,负性调控其介导的信号通路[2]。SOCS家族包括CIS和SOCS1~7共8个成员,其中SOCS1和SOCS3的作用最强。而SOCS3启动子上含有STAT3的结合位点,STAT3活化可诱导SOCS3基因表达,那么在肺癌细胞中有无SOCS3基因表达及其对细胞增殖有何影响,目前少见相关报道。本研究拟初步探讨SOCS3基因在肺癌A549细胞系的表达,同时我们将SOCS3基因导入A549细胞中,观察该基因对STAT3下游相关基因*c-fos*、*c-jun*及对A549细胞增殖的影响。

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. D 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。羊抗大鼠SOCS3

作者简介:余祖滨(1974-),男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌临床方面的研究。电话:(023)68774724,E-mail:yblll@21cn.com

收稿日期:2004-03-02;修回日期:2004-06-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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。

1.2 细胞株与细胞培养

人肺腺癌细胞株A549，购自中国科学院上海生物研究所。采用含10%小牛血清的RPMI 1640培养基，置37 ℃，5%CO_2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 实验分组与基因转染

实验分为以下3组：未转染组(1组)，pEF和pSV2neo共转染组(2组)，pEFSOCS3和pSV2neo共转染组(3组)，前两者为对照组。按lipofectamine 2000说明书进行转染，加入500 μg/ml G418筛选，经2周后形成阳性克隆，扩增培养备用。

1.4 外源性SOCS3基因整合的鉴定

1.4.1 RT-PCR检测细胞中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}/A_{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，β-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。β-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。退火温度：58 ℃。循环完成后，取10 μl PCR产物1.5%琼脂糖凝胶进行电泳、照相。

1.4.2 免疫酶化学法检测细胞中SOCS3蛋白表达 取出盖玻片上用于免疫组化的各组细胞，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 RT-PCR法检测转染细胞中*c-fos*、*c-jun*表达

方法同1.4.1。根据人*c-fos*、*c-jun* mRNA序列，设计引物。均以β-actin为内参照。*c-fos*引物：上游：5′-GCC TTT CCT ACT ACC ATT CCC-3′；下游：5′-CAT CTT ATT CCT TTC CCT TCG-3′；产物长度：371 bp；退火温度：60 ℃。*c-jun*引物：上游：5′-AAT GGG CAC ATC ACC ACT ACA C-3′；下游：5′-CGT CTG CGG CTC TTC CTT CA-3′；产物长度：294 bp；退火温度：63 ℃。扩增产物1.5%琼脂糖凝胶电泳，凝胶分析系统测定各条带积分光密度值(A_{570})。以目的基因产物与内参照产物条带积分光密度值之比作数据分析，以此反映*c-fos*、*c-jun* mRNA的表达程度。

1.6 ^{3}H-TdR掺入检测

计数细胞数，调整细胞浓度为以2×10^4/ml。分别取1组、2组、3组细胞各1 ml接种于96孔培养板，每组设3个重复孔。培养24 h后，每孔加入37 kBq ^{3}H-TdR(37 kBq/孔)，继续培养6 h后弃培养基，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纸上，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 ℃干烤30 min，放入闪烁液中，于液体闪烁计数仪计数(Bq)。

1.7 统计学处理

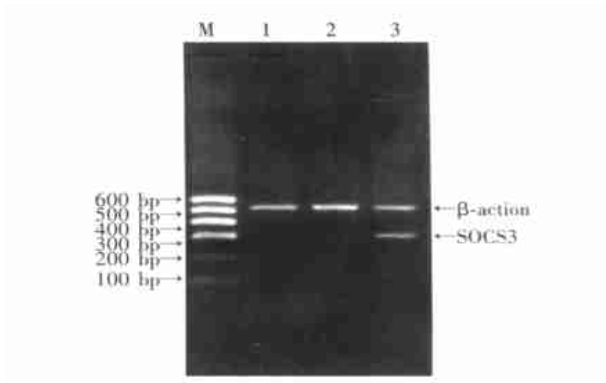
所有结果以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS10.0软件进行F检验和q检验。

2 结果

2.1 转染鉴定

RT-PCR法检测SOCS3 mRNA表达，电泳结果显示，1和2组仅出现1条条带，即587 bp的β-actin扩增产物，说明对照组A549细胞中未检测到SOCS3 mRNA表达；3组出现2条条带，341 bp的SOCS3扩增产物和587 bp的β-actin扩增产物，提示SOCS3真核表达载体成功导入*A*549细胞(图1)。

免疫酶细胞化学结果显示，仅3组细胞胞浆内出现棕黄色颗粒，提示SOCS3蛋白在转染细胞中表达(图2)。



M：Marker；1：Group 1；2：Group 2；3：Group 3

图1 RT-PCR显示转染pEFSOCS3 A549细胞中SOCS3mRNA表达

Fig 1 Expression of SOCS3mRNA in pEFSOCS3-transfected A549 cells revealled by RT-PCR



图2 转染pEFSOCS3 A549细胞胞浆内SOCS3蛋白表达 (S-P×200)

Fig 2 Expression of SOCS3 protein in the cytoplasm of pEFSOCS3-transfected A549 cells (S-P×200)

2.2 SOCS3蛋白对*c-fos*、*c-jun* mRNA表达的影响

半定量RT-PCR法检测*c-fos*、*c-jun* mRNA水平表达，电泳结果显示，1组和2组*c-fos*、*c-jun*扩增产物条带光密度值均无明显变化($P>0.05$)；与1组相比，3组*c-fos*、*c-jun*扩增产物条带光密度值均显著降低($P<0.01$)(表1、图3、4)。

2.3 SOCS3蛋白对细胞增殖的影响

^{3}H-TdR掺入法检测结果示，1组细胞为(24 444 3±

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

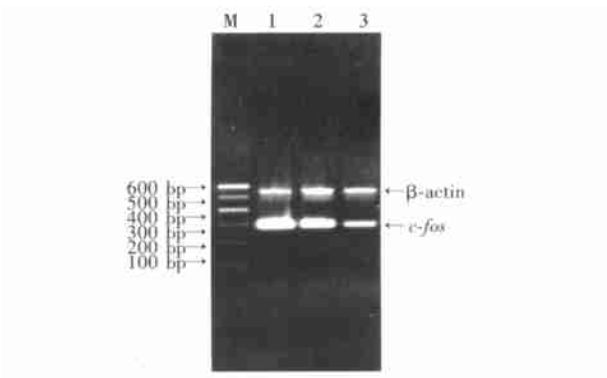
0.775 2)×10^5 Bq 与 2 组细胞(22.677 0±0.803 4)×10^5 Bq 差别不显著($P>0.05$), 3 组细胞(14.416 8±0.399 3)×10^5 Bq 显著降低($P<0.01$)。

表 1　SOCS3 基因对 A549 细胞 *c-fos*、*c-jun* mRNA 表达的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of SOCS3 gene on the expression of *c-fos* and *c-jun* mRNA in A549 cells ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	*c-fos* mRNA ($A_{c\text{-}fos}/A_{\beta\text{-actin}}$)	*c-jun* mRNA ($A_{c\text{-}jun}/A_{\beta\text{-actin}}$)
1	1.66±0.18	1.57±0.14
2	1.52±0.09	1.44±0.07
3	0.43±0.06#	0.91±0.11#

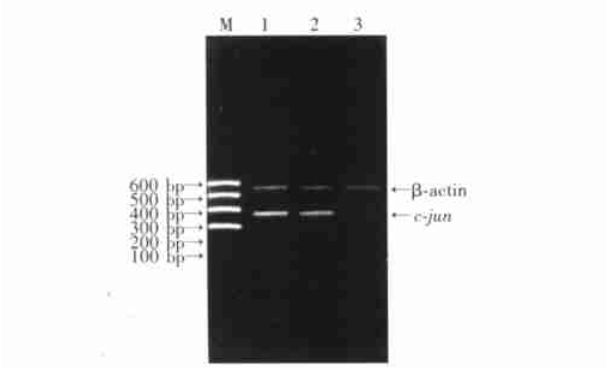
#: $P<0.01$, *vs* group 1



M: Marker; 1: Group 1; 2: Group 2; 3: Group 3

图 3　RT-PCR 显示转染 pEFSOCS3 A549 细胞中 *c-fos* mRNA 表达

Fig 3　Expression of *c-fos* mRNA in pEFSOCS3-transfected A549 cells by RT-PCR



M: Marker; 1: Group 1; 2: Group 2; 3: Group 3

图 4　RT-PCR 显示转染 pEFSOCS3 A549 细胞中 *c-jun* mRNA 表达

Fig 4　Expression of *c-jun* mRNA in pEFSOCS3-transfected A549 cells by RT-PCR

3　讨论

通过对 STAT3 和多种肿瘤及转化细胞系之间关系的研究[3~5], 已经表明在多种肿瘤细胞中存在 STAT3 的持续活化, 如肺癌、乳腺癌、前列腺癌等; 由 v-src 转化的 NIH3T3 细胞、v-sis 和 v-fps 转化的成纤维细胞中均表明持续激活的 STAT3; 提示 STAT3 在细胞的分化、生长、增殖过程中起着重要的调控作用[1]。

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, 结构相似, 由 N 区、中央区 SH2 结构域和 C 端的 SOCS box 盒组成。作为 SOCS 家族成员的 SOCS3 基因, 其启动子上含有 STAT3 的结合位点, STAT3 活化后入核诱导 SOCS3 基因表达, 其表达产物 SOCS3 蛋白通过最终抑制 STAT 酪氨酸磷酸化过程从而负性调控 STAT3 介导的信号通路[6]。Schuringa 等[7] 和 Brender 等[8] 分别在急性髓性白血病细胞系和 T 细胞淋巴瘤中检测到 SOCS3 和 STAT3 mRNA 表达; Auernhammer 等[9] 报道 SOCS3 启动子含有 STAT1/STAT3 结合位点, 在 AtT-20 细胞中阻断 STAT3 活化后, 发现 LIF 诱导的 SOCS3 表达明显受到抑制, 说明活化 STAT3 可诱导 SOCS3 表达。上述研究结果推测 SOCS3 蛋白可能参与肿瘤发生、发展、演进过程。

本研究在肺癌细胞株 A549 细胞中, 无论是 mRNA 还是蛋白水平均未检测 SOCS3 基因表达。我们利用共转染方式将 pEFSOCS3 真核表达载体和 pSV2neo 筛选质粒导入 *A*549, 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(3∶1), 成功的将二者导入细胞内, 获得外源基因的高效表达, 并建立了稳定表达细胞系。^{3}H-TdR 掺入实验结果表明, 高效表达 SOCS3 蛋白可抑制肺腺癌细胞株 A549 的增殖。

SOCS3 蛋白是通过何种途径抑制细胞增殖呢? *c-fos*、*c-jun* 是激活蛋白 1(activator protein1, AP-1)的成员, 是细胞内的重要转录因子, 其信号转导通路的活化与细胞癌变、增殖、凋亡等多种生物学效应有关[10]。我们在实验中发现转染 SOCS3 基因的细胞中 *c-fos*、*c-jun* mRNA 表达水平明显降低。由于 *c-fos*、*c-jun* 表达下降可使参与细胞丝裂信号的 AP-1 转录因子合成发生障碍, 从而使被转染 SOCS3 蛋白的肺腺癌细胞增殖受到抑制。已证实 STAT3 信号分子参与 *c-jun* 和 *c-fos* 基因表达的调控[4,11], 实验过程中我们也发现 SOCS3 蛋白可以降低 A549 细胞内 STAT3 活性水平(有关结果正待发表), 因此有理由推测 SOCS3 蛋白可能通过降低 STAT3 磷酸化活性而下调 *c-jun* 和 *c-fos* 基因表达, 但由于在细胞增殖过程中参与调控 *c-jun* 和 *c-fos* 基因表达的机制复杂, SOCS3 是否还通过下调其他信号通路如 Fas、Ras/MAPK, PKC 等其他途径抑制细胞增殖, 还需进一步研究。

参考文献:

[1] Boudny V, Kovarik J. JAK/STAT signaling pathways and cancer. Janus ki-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

nases/signal transducers and activators of transcription[J]. Neoplasma, 2002, 49(6): 349—355.
[2] Starr R, Willson T A, Viney E M, *et al*. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling[J]. Nature, 1997, 387(6636): 917—921.
[3] Levy D E, Lee C K. What does Stat3 do[J]? J Clin Invest, 2002, 109(9): 1143—1148.
[4] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis[J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1139—1142.
[5] Mora L B, Buettner R, Seigne J, *et al*. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6659—6666.
[6] 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.
[7] Schuringa J J, Wierenga A T, Kruijer W, *et al*. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6[J]. Blood, 2000, 95(12): 3765—3770.
[8] Brender C, Nielsen M, Kaltoft K, *et al*. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma[J]. Blood, 2001, 97(4): 1056—1062.
[9] Auernhammer C J, Bousquet C, Melmed S. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(12): 6964—6969.
[10] Jochum W, Passegue E, Wagner E F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis[J]. Oncogene, 2001, 20(19): 2401—2412.
[11] Ivanov V N, Bhoumik A, Krasilnikov M, *et al*. Cooperation between STAT3 and *c-jun* suppresses Fas transcription[J]. Mol Cell, 2001, 7(3): 517—528.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)17-1552-01

围产期窒息新生儿护理体位的初步研究

Postures for nursing perinatal asphyxial neonates

曾小奇, 于瑞英, 刘素秀, 周晓凤, 史 源 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所儿科, 重庆 400042）

本研究对 30 例围产期窒息的新生儿采用不同体位, 观察不同体位舒适度和对心肺功能的影响, 报告如下。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

2002 年 1 至 12 月我科新生儿病房收入的围产期窒息新生儿 30 例, 包括宫内窒息 14 例和新生儿窒息 16 例。宫内窒息纳入标准为符合以下情况者: ①胎动明显减少, 12 h< 10 次; ②胎心监测< 100 次/min; ③胎粪污染, 羊水呈Ⅲ度以上混浊。新生儿窒息诊断标准: 出生 1 min Apgar 评分≤7 分。

1.2 研究方法

将 30 例新生儿分为仰卧位、头低脚高 15° 俯卧位、头高脚低 15° 俯卧位 3 组, 每组 10 例。3 组新生儿的胎龄、日龄、性别、出生体重、Apgar 评分等均无显著差异。从以下二个方面进行 8 h 的动态观察和研究: ① 不同体位舒适度比较: 观察不同体位下, 新生儿是否安静, 有无哭闹, 睡眠时间长短, 进食量多少等。②不同体位对心肺功能的影响: 动态观察心率、呼吸频率、血氧饱和度以及呼吸暂停、发绀等发生的次数。

1.3 统计学处理

采用方差分析。

2 结果

各组之间新生儿在是否安静, 有无哭闹, 睡眠时间长短, 进食量多少等方面无显著差异。各组之间新生儿的血氧饱和度以及呼吸暂停、发绀等发生的次数方面无显著差异。不同体位下呼吸和心率的比较也无显著差异($P>0.05$), 见表 1。

表 1 不同体位下呼吸、心率比较(次/min)

时相	仰卧位		头低脚高俯卧位		头高脚低俯卧位	
(h)	呼吸	心率	呼吸	心率	呼吸	心率
0	49.4±10.8	136.7±11.2	48.3±7.1	124.4±14.7	44.9±3.9	128.2±10.1
1	41.7±7.4	133.3±13.1	47.4±6.6	130.8±9.1	45.6±4.1	129.5±12.0
2	41.3±8.4	133.3±9.9	49.0±9.2	128.2±13.6	45.5±2.7	130.6±16.1
3	44.4±7.4	132.1±8.8	53.6±13.7	130.2±10.9	45.6±4.0	131.1±14.2
4	45.4±8.3	136.9±11.3	50.5±12.6	128.1±10.9	45.2±3.5	128.8±16.7
5	44.8±8.5	139.7±11.5	49.1±9.2	129.9±10.2	45.3±5.9	133.1±13.5
6	43.3±8.8	139.7±8.7	48.6±6.3	128.1±7.4	43.3±3.3	137.4±11.1
7	44.1±8.5	138.8±9.1	48.7±7.7	129.5±11.1	44.8±3.9	134.8±12.5
8	44.9±7.3	140.1±12.6	49.0±11.4	130.1±7.6	46.9±6.7	136.8±10.1

3 讨论

尽管围产医学取得了很大进展, 目前仍有 10% 新生儿发生窒息并且需要支持治疗和护理。对于窒息新生儿, 应该采取的体位从两个方面考虑: 第一, 应该最有利于新生儿气体的交换, 维持有效的呼吸、循环功能; 第二, 应该最大程度地减少并发症的发生[1]。目前窒息新生儿通常采用的体位, 在西方国家为俯

（下转 1556 页）

作者简介: 曾小奇(1968—), 女, 重庆市人, 主管护师, 主要从事围产期新生儿护理方面的研究。电话: (023)68757345

收稿日期: 2003-06-30; 修回日期: 2003-10-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net