

论著 · 基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.003

SOCS3 基因转染对小鼠 CD4⁺ Th 细胞分化及炎症细胞因子表达的影响及机制研究*

张沛¹, 董念国², 刘金平^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院胸心外科 400010; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院心脏大血管外科, 武汉 410030)

[摘要] 目的 观察 SOCS3 基因对小鼠 CD4⁺ Th 细胞分化及细胞因子表达的影响。方法 分离、培养并转染小鼠 CD4⁺ Th 细胞, 以植物血凝素(PHA)刺激靶细胞, 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测相应细胞因子基因表达; 蛋白质印迹法(Western blot)检测目的细胞因子蛋白表达。结果 与对照组相比较, 转染组 T-bet、白细胞介素(IL)-2、干扰素-γ(IFN-γ)、信号转导及转录激活因子(STAT)4、IL-12Rβ2 基因表达明显下调, 细胞因子信号抑制物(SOCS)3、GATA-3、IL-4、IL-6、IL-10、STAT6 基因表达明显上调, T-bet、IL-2、IFN-γ、STAT4、IL-12Rβ2 蛋白表达明显下调, SOCS3、GATA-3、IL-4、IL-6、IL-10、STAT6 蛋白表达明显上调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 SOCS3 基因转染可上调小鼠 CD4⁺ Th 细胞 SOCS3 基因表达, 下调 STAT4 活化和磷酸化, 抑制 Th1 细胞分化, 并下调炎症细胞因子基因和蛋白表达, 同时间接促进 Th2 细胞分化, 并上调相应炎症细胞因子基因和蛋白表达。

[关键词] T 淋巴细胞, 辅助诱导; 细胞因子信号转导蛋白抑制因子; 细胞分化; 细胞因子类

[中图分类号] R392.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5049-03

The effects and mechanism of SOCS3 gene transfection in CD4⁺ Th cell differentiation and expression of inflammatory cytokines of mouse*

Zhang Pei¹, Dong Nianguo², Liu Jinping^{2△}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 410030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of adenovirus vector mediated SOCS3 gene transfection in CD4⁺ Th cell differentiation and expression of inflammatory cytokines of mouse. **Methods** The CD4⁺ Th cells were isolated from spleen of C57bl/6 mouse and cultured. Ad-SOCS3 were transfected into the CD4⁺ Th cells. PHA was used for culturing with the CD4⁺ Th cells. RT-PCR were used to detect the mRNA expression, and Western blot were used to detect the protein expression of cytokines. **Results** Compared with the control group, the gene and protein expression of T-bet, IL-2, IFN-γ, STAT4 and IL-12Rβ2 in the transfected group were significantly down-regulated, the gene and protein expression of SOCS3, GATA-3, IL-4, IL-6, IL-10 and STAT6 were significantly up-regulated($P < 0.01$). **Conclusion** The results indicate that SOCS3 gene transfection can up-regulate SOCS3 mRNA and protein expression in the CD4⁺ Th cells, down-regulate the JAK/STAT pathway, inhibition of Th1 cell differentiation, and down regulation of inflammatory cytokine gene and protein expression, and indirectly promote Th2 cell differentiation, and up the corresponding inflammatory cytokine gene and protein expression.

[Key words] T-lymphocytes, helper-inducer; suppressor of cytokine signaling proteins; cell differentiation; cytokines

移植植物血管病(CAV)的典型病理表现是移植内血管内膜增生, 引起弥漫性和向心性的冠状动脉狭窄, 最终导致移植植物缺血和失功能。在移植内局部浸润的炎症细胞及其所表达的炎性细胞因子、生长因子是调控内膜增生的重要因素^[1]。而在这些炎症细胞中, Th1 细胞及其所表达的细胞因子, 对内膜增生最为重要。因此, Th1 细胞是对移植植物血管病研究中的重要靶细胞^[2]。

细胞因子信号抑制物(SOCS)蛋白家族具有广泛的功能和复杂的调控机制, SOCS3 作为其中功能最强大的一员, 通过调控细胞因子和激素表达, 可以对多种疾病产生调控作用^[3]。目前认为, 由于 SOCS3 蛋白功能强大, 可以调节多条信号通路, 在疾病进程中, 能够通过不同的信号通路协作或拮抗性地调节

同一目的信号因子或靶细胞, 因此, 研究中有时会得到与预期不符的效果^[4]。但是, SOCS3 基因对 Th 细胞的作用和机制尚不明确, 本实验利用植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)刺激诱导小鼠脾脏来源 CD4⁺ Th 细胞分化, 观察重组小鼠 SOCS3 基因腺病毒载体转染对其分化和炎症细胞因子表达的影响。利用该体外实验, 进一步研究移植植物血管病中 SOCS3 对 Th 细胞分化的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 8 周大雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠(H-2b)购于武汉大学动物实验中心。小鼠 SOCS3 基因重组腺病毒载体由(苏州)赛业生物科技有限公司构建, 行空斑形成实验, 检测鉴定病毒滴度为 1×10^{10} pfu/mL。磁珠分选装置及

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81270322)。 作者简介: 张沛(1982—), 主治医师, 讲师, 博士, 主要从事心脏移植研究。

△ 通讯作者, E-mail: jinping@hust.edu.cn。

CD4⁺ Th 细胞磁珠分选试剂盒购于德国 Miltenyi Biotec 公司。SOCS3、信号转导及转录激活因子(STAT)4、P-STAT4 抗体购于美国 Bioworld 公司,干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-2 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,重组抗小鼠 IL-4 抗体、FITC-抗小鼠 CD4 抗体、FITC-抗小鼠 IFN-γ 抗体、FITC-抗小鼠 GATA-3 抗体、重组小鼠 IL-12 购于加拿大 eBioscience 公司。PHA 购于美国 sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。引物合成、测序均由南京金斯瑞生物技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞原代培养 90 只 C57BL/6 小鼠随机分为 3 个组:对照组、Ad-SOCS3 组、Ad-GFP 组,每组 30 只。脱颈椎法处死小鼠,无菌获取 C57BL/6 小鼠脾脏,制成单个细胞悬液。加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至总体积 2 mL,加入同等体积的淋巴细胞分离液,以密度梯度离心法 2 000 r/min 条件下离心 15 min, RPMI 1640 培养基重悬,加 CD4 微珠,混匀,2~8 ℃避光孵育 15 min,洗涤后,PBS 重悬,将细胞置入事先用 RPMI 1640 培养基润洗过的 MS 柱中,收集 MS 柱吸附的细胞,即为 CD4⁺ 细胞。

1.2.2 小鼠 SOCS3 基因重组腺病毒载体体外转染小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞 以无血清的 RPMI 1640 培养基,使待转染细胞同步化。收集细胞悬液,1 000 r/min 条件下离心 10 min,调整细胞浓度为 2×10^6 /mL。 2×10^5 /孔接种于 12 孔细胞培养板。每孔中加入含 10% 胎牛血清(FBS) RPMI 1640 培养基 1 mL,同时加入不同感染复数(MOI)值的 Ad-SOCS3,然后在 5%CO₂、37 ℃培养箱内继续培养。培养 2 h 后,收集细胞悬液,1 000 r/min 条件下离心 10 min,重悬,加入 10%FBS RPMI 1640 培养基,于 5%CO₂、37 ℃继续培养。分别在不同时点于荧光显微镜下观察转染效果,观察不同 MOI 和不同时间点的 Ad-SOCS3 对小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞转染效果的影响。

1.2.3 细胞制备及转染 根据实验分组,在 Ad-SOCS3 组、Ad-GFP 组和对照组中,根据上一步实验结果所得出的最佳 MOI 值及最佳转染时间,分别照上一步方法转染 Ad-SOCS3、Ad-GFP 和 100 μL 无菌 PBS,荧光显微镜下直接观察细胞感染效率,并用于后续部分实验。

1.2.4 小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞的体外诱导分化 重组腺病毒载体转染小鼠巨噬细胞成功后,在 3 组细胞培养瓶中,分别加入浓度 10 μg/mL 的 PHA,在 37 ℃、5%CO₂ 条件下培养 48 h,刺激诱导小鼠脾脏 CD4⁺ Th 向 Th1 型细胞分化。收集细胞悬液,离心,弃上清液,得到分化后的 CD4⁺ Th 细胞,用于下一步检测。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 检测 Ad-SOCS3、Ad-GFP 和 100 μL 无菌 PBS 干预后,各组小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞 SOCS3 mRNA 表达,以及体外诱导 Th 分化后的小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞的 SOCS3、STAT4、IFN-γ、IL-2 mRNA 表达。

1.2.6 Western blot 检测各组体外诱导分化后的小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞的 SOCS3、STAT4、P-STAT4、IFN-γ、IL-2 蛋白表达。

1.3 统计学处理 SOCS3 mRNA 和蛋白表达实验均在不同时间重复 3 次。采用 GraphPad Prism 5.0 软件或 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞的获取及鉴定 成功获取小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞,细胞形态多为圆形,悬浮生长,随培养时

间延长,可聚拢呈团块状生长,流式细胞学检测证实为 CD4⁺ Th 细胞,且纯度大于 95%,适用于后续实验。

2.2 腺病毒载体转染小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞的条件 转染后不同时间点,荧光显微镜下分别观察各组不同 MOI 值转染效果。其中 MOI=160 转染细胞组,转染 72 h 后,转染效果佳,荧光显微镜下观察见 90% 以上的小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞均表达绿色荧光蛋白,转染效率高,满足后续实验要求。后续实验即按照 MOI 为 160 感染小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞 72 h 条件进行。

2.3 重组腺病毒感染小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞效率 分别将感染复数 MOI 为 160 的 Ad-SdCS3 及 Ad-GFP 感染小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞,10%FBS RPMI 1640 培养液中继续培养 72 h。荧光显微镜下观察发出绿色荧光信号的细胞数占细胞总数 90% 以上,说明小鼠 SOCS3 基因重组腺病毒载体感染效率高。见图 1、2。

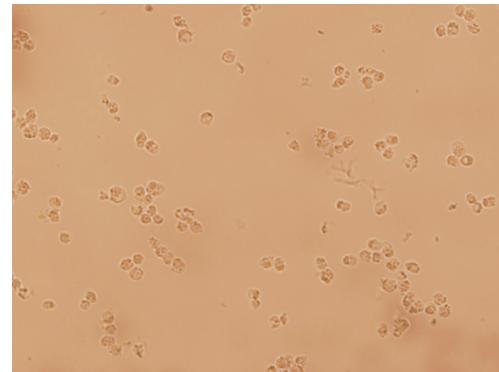


图 1 光镜下小鼠 CD4⁺ Th 细胞($\times 200$)

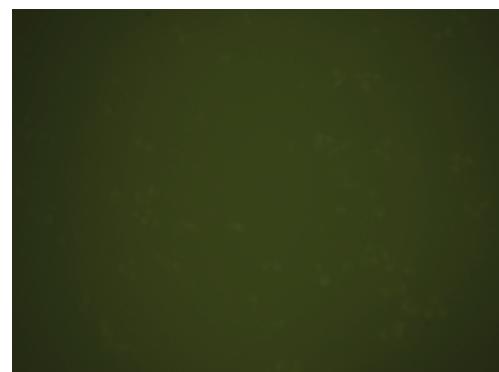


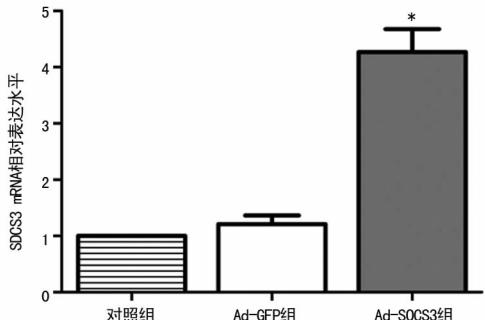
图 2 荧光显微镜下小鼠 CD4⁺ Th 细胞转染效果图($\times 200$)

2.4 各组小鼠 CD4⁺ Th 细胞 SOCS3 mRNA 表达 Ad-SOCS3 组 SOCS3 mRNA 表达较 Ad-GFP 组及对照组明显上调($P < 0.01$),而 Ad-GFP 组与对照组比较无明显差异($P > 0.05$)。见图 3。

2.5 SOCS3 基因转染对小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞各种炎症细胞因子 mRNA 表达的影响 与对照组和 Ad-GFP 组相比较,Ad-SOCS3 组 T-bet、IL-2、IFN-γ、STAT4、IL-12R β 2 基因表达明显下调($P < 0.01$),SOCS3、GATA-3、IL-4、IL-6、IL-10、STAT6 基因表达明显上调($P < 0.01$)。Ad-GFP 组与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4。

2.6 SOCS3 基因转染对小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞各种炎症细胞因子蛋白表达的影响 Ad-SOCS3 组与对照组比较,T-bet、IL-2、IFN-γ、STAT4、IL-12R β 2 蛋白表达明显下调,SOCS3、GATA-3、IL-4、IL-6、IL-10、STAT6 蛋白表达明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。Ad-GFP 组与对照组比较,差异

无统计学意义($P>0.05$)。见图 5。



*: $P<0.05$, 与对照组、Ad-GFP 组比较。

图 3 各组 SOCS3 mRNA 表达

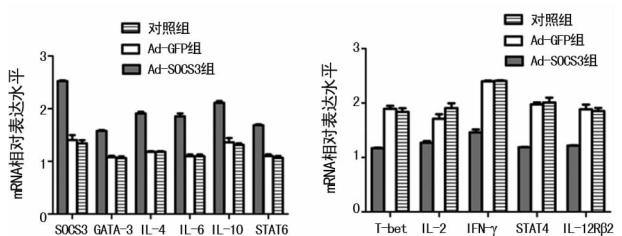
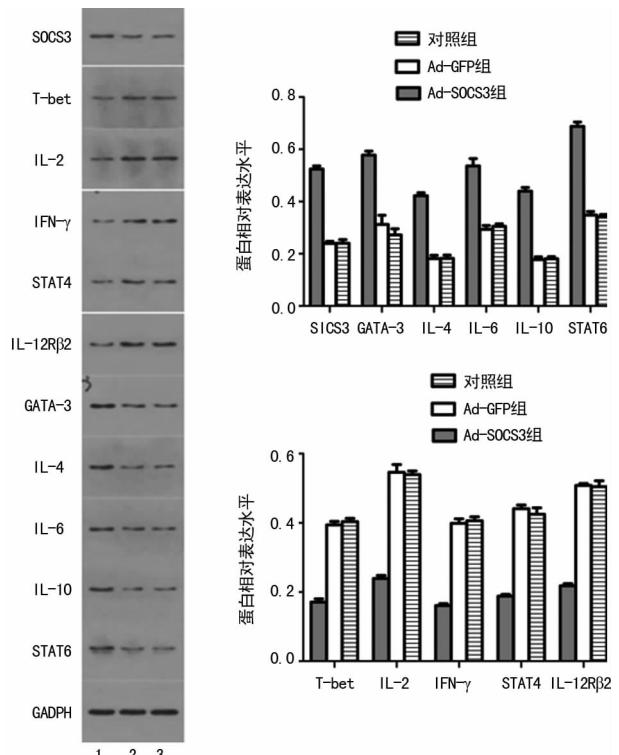


图 4 各组小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞中炎症因子 mRNA 相对表达量



1: Ad-SOCS3 组; 2: Ad-GFP 组; 3: 对照组。

图 5 各组小鼠脾脏 CD4⁺ Th 细胞中炎症因子蛋白表达

3 讨 论

Th 细胞是机体中一类重要的免疫细胞,其正常功能表达依赖它在免疫器官内或作用靶点的外周分化的正常进行。本实验利用 PHA 刺激诱导小鼠脾脏来源 CD4⁺ Th 细胞分化,观察重组小鼠 SOCS3 基因腺病毒载体转染对其分化和炎症细胞因子表达的影响。结果发现小鼠脾脏来源 CD4⁺ Th 细胞内 SOCS3 基因过表达,可抑制其在促炎因素诱导下的 Th1 型炎

症因子表达,与此同时,上调 Th2 型炎症因子表达。

在抗原刺激、细胞因子等微环境的协同作用下,CD4⁺ Th 细胞可分化成为不同的亚群以发挥特定的生理学作用^[5]。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-β 等细胞因子,介导细胞免疫应答,在对抗病原体、肿瘤中起重要作用^[6]。自然杀伤细胞表达的 IFN-γ 和抗原呈递细胞(APCs)表达的 IL-27 可激活信号通路 STAT1,APCs 表达的 IL-12 可激活信号通路 STAT4,以上 3 种途径,可以分别启动 Th1 细胞分化。其中前两条途径,主要通过上调 IFN-γ 表达,使 Th1 细胞分化随细胞数量增加而稳定保持。后一条途径,一方面通过上调 IFN-γ 表达,保持 Th1 细胞分化数量,另一方面可以通过抑制 IL-4 负向调节 Th2 细胞分化,维持 Th1 细胞分化的方向^[7]。在本实验中,利用 PHA 刺激诱导小鼠脾脏来源 CD4⁺ Th 细胞分化,结果发现 T-bet、IL-2 和 IFN-γ 表达增加,说明该条件下,CD4⁺ Th 细胞向 Th1 细胞分化。同时,STAT4 和 IL-12Rβ2 基因和蛋白表达均增加,磷酸化上调,说明 IL-12/STAT4 信号通路在极化过程中被激活,并发挥信号转导作用。

SOCS 蛋白是先天和获得性免疫反应系统中关键的综合性调节物质^[8]。SOCS 家族成员广泛参与并调节了 Th 细胞的分化,以及干预炎症因子的产生和炎症反应的程度,从而在免疫性疾病中发挥重要作用^[9]。其中 SOCS3 的调节功能与 Th 细胞分化关系密切。在胸腺细胞发育的最早阶段,也就是其分化成为不同 T 细胞受体表型的阶段,SOCS3 即有表达^[10]。而此时在选择性敲除 SOCS3 基因动物模型中,会发现不同亚群 T 细胞比例改变。而在这之后,T 细胞发育的多个阶段中,SOCS3 都高水平表达,尤其在 CD4⁺、CD8⁺ Th 细胞中,有着相对更高的表达量^[11]。本实验中,利用腺病毒载体转染小鼠脾脏来源 CD4⁺ Th 细胞,使 SOCS3 过表达,可下调 STAT4 基因和蛋白表达,抑制其磷酸化,从而抑制 Th1 分化中 IL-12/STAT4 信号通路活性,负向调节 Th1 细胞分化,继而降低 IFN-γ、IL-2 等细胞因子表达水平。因为 SOCS3 不能直接调节 STAT4 信号通路,而 STAT4 通路活性下调在实验中被观察到,笔者认为 SOCS3 通过间接抑制 STAT4 通路活性作用达到这一效果。

Th2 细胞是另一种重要的 T 细胞亚群。其主要表达 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 等细胞因子,主要在机体内参与体液免疫的调节作用^[12]。Th2 细胞分化主要通过 STAT6 通路调控,而 SOCS3 基因不能直接作用该通路,因此,SOCS3 基因不能直接调控 Th2 分化。但是在 Th 细胞分化过程中,Th1/Th2 细胞亚群可以通过各自表达的细胞因子相互作用,产生竞争和抑制的关系。Th1 细胞特异性表达的 IFN-γ、IL-2 可抑制 Th2 细胞的增殖和功能,而同样 Th2 细胞表达的 IL-4 和 IL-10 也可以抑制 Th1 细胞分化。外源性增加 SOCS3 基因表达,通过作用于 IL-12/STAT4 通路,减弱 Th1 细胞分化作用,使 IFN-γ、T-bet、IL-2 等细胞因子表达下调,从而间接性减弱了对 Th2 分化的抑制作用。一定程度上促进了 Th2 细胞分化。本实验中,Th2 细胞亚群活化通路 STAT6 及特异性细胞因子 GATA-3、IL-4、IL-6、IL-10 表达上调,证实了这一结论。而 Th2 细胞分化增强,IL-4、IL-10 细胞因子表达上调,又可以进一步抑制 Th1 细胞分化。最终达到调节 Th1/Th2 亚群比例的效果。在本研究中,外源性增加 SOCS3 基因表达,(下转第 5055 页)

- [3] Hovland A, Jonasson L, Garred P, et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2):480-494.
- [4] Moss ME, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6(3):153.
- [5] Jansen F, Yang X, Nickenig G, et al. Role, function and therapeutic potential of microRNAs in vascular aging [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(3):324-330.
- [6] Menghini R, Stöhr R, Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis [J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 17(8):68-78.
- [7] Zhang ZH, Li J, Liu BR, et al. MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(3):312-319.
- [8] Luo X, Pan Z, Shan H, et al. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier Potassium current changes in atrial fibrillation [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5):1939-1951.
- [9] Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic Clue to the 'response to injury' hypothesis [J]. *Circulation*, 1997, 95(7):1760-1763.
- [10] Zhu HQ, Li Q, Dong LY, et al. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3):764-770.
- [11] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. *Circ Res*, 2013, 113(11):1231-1241.
- [12] Hopkins BD, Parsons RE. Molecular pathways: intercellular PTEN and the potential of PTEN restoration therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(21):5379-5383.
- [13] Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, et al. PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(2):197-207.
- [14] Bononi A, Bonora M, Marchi S, et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca^{2+} signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(12):1631-1643.

(收稿日期:2016-08-11 修回日期:2016-10-06)

(上接第 5051 页)

导致的 IFN- γ 、IL-2 下调和 IL-4、IL-10 上调, 均对抑制炎症反应和 CAV 进程起到了关键作用, 对术后排斥反应起到了保护作用。

本实验证明腺病毒载体介导的供体 SOCS3 基因转染能够通过调控 Th1/Th2 细胞分化, 抑制其促炎功能。在该研究方向上继续深入挖掘, 可能会获得更多信息。进一步明确 SOCS3 对移植植物血管病的影响和机制, 可能在慢性排斥反应的治疗方面取得新的突破口。

参考文献

- [1] Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy—recent developments [J]. *Circulation*, 2008, 117(16):2131-2141.
- [2] Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways regulation of T-Cell inflammation by SOCS1 and SOCS3 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5):980-985.
- [3] Gelpi C, Roldan C, Mirabet S, et al. Correlation of immunological markers with graft vasculopathy development in heart transplantation [J]. *J Heart Lung Tran*, 2012, 31(4S):S167.
- [4] Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(9):666-678.
- [5] Frey O, Kamradt T. Effector function plasticity of T helper lymphocytes [J]. *Z Rheumatol*, 2009, 68(10):834-835.
- [6] Zhu JF, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells [J]. *Cell Res*, 2010, 20(1):4-12.
- [7] Xu W, Di Santo JP. Taming the beast within: regulation of innate lymphoid cell homeostasis and function [J]. *J Immunol*, 2013, 191(9):4489-4496.
- [8] Bernink JM, Spits H. Th1-and Th2-like subsets of innate lymphoid cells [J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1):133-138.
- [9] Klose SC. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ T+ innate lymphoid cells [J]. *Nature*, 2013, 494(7436):261-265.
- [10] Carow B, Reuschl AK, Gavier-Widen DA, et al. Critical and independent role for SOCS3 in either myeloid or T cells in resistance to mycobacterium tuberculosis [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(7):e1003442.
- [11] Issa FS, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, 6(1):155-169.
- [12] Safinia N. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction [J]. *Kidney Int Suppl*, 2010(119):S2-12.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)