

SOCS-3 基因在 Balb/c 小鼠脑组织中的表达与脑不对称性*

赵丽纯 苏 芸 李康生**

(汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室, 汕头 515031)

摘要 为探讨细胞因子信号传导抑制因子-3 (suppresso of cytokine signaling-3, SOCS-3) 在 Balb/c 小鼠皮层、海马、下丘脑中的表达及其与脑不对称性的关系. 通过伸爪取食法将 Balb/c 小鼠分为左利组和右利组, 取左、右侧皮层, 左、右侧海马及下丘脑, 以 RT-PCR 法间接测定 SOCS-3 mRNA 水平. 结果表明: a. 在左利鼠右侧皮层中, SOCS-3 基因表达水平显著高于左侧皮层 ($P < 0.05$); 右利鼠左侧皮层 SOCS-3 表达显著高于左利鼠左侧皮层 ($P < 0.05$). b. 海马中 SOCS-3 表达: 左利鼠右侧海马 SOCS-3 表达显著高于左侧海马 ($P < 0.05$); 右利鼠左侧海马 SOCS-3 表达显著高于左利鼠左侧海马 ($P < 0.05$). c. 右利鼠下丘脑中 SOCS-3 显著高于左利鼠 ($P < 0.05$). 上述研究结果提示, Balb/c 小鼠脑中 SOCS-3 表达与脑不对称性有关.

关键词 SOCS-3, 脑不对称, 神经免疫内分泌

学科分类号 R392.9

近来研究发现细胞因子信号传导抑制因子 (suppressor of cytokine signaling, SOCS) 在细胞因子信号传导中发挥重要作用, 其为多种细胞因子、生长因子和激素信号传导途径的负向调节者^[1]. 已证实此家族至少包括 8 位成员, 即 SOCS-1 ~ SOCS-7 和 CIS. 机体内多种组织中检测到 SOCS 表达. 正常脑组织中亦存在 SOCS-1、SOCS-2、SOCS-3、SOCS-5 等, 其中 SOCS-1、SOCS-3 在神经免疫内分泌调节中的作用正日益受到关注^[2].

细胞因子、神经肽类、激素等为神经免疫内分泌网络的共同信息分子. 以往研究证实脑不对称性可影响细胞因子的产生, 如 Balb/c 小鼠左右皮层中 IL-1 β 、IL-6 水平存在差异^[3], 而且 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子可诱导脑组织中 SOCS-3 表达^[4]. 目前尚未见有关中枢神经系统中细胞因子信号传导相关分子与脑不对称性关系的报道. 为此本文探讨了 SOCS-3 在 Balb/c 小鼠皮层、海马、下丘脑中的表达与脑不对称性的关系, 以期进一步在分子水平探讨 SOCS-3 在神经免疫内分泌调节中的作用规律.

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 Balb/c 小鼠, 雌性, 4 周龄, 由广州第一军医大学实验动物中心提供. 在本校清洁级实验动物中心喂养, 自由饮水摄食, 每天保持 12 h 明暗环境.

1.2 主要试剂

Trizol (BBI 公司, 加拿大)、cDNA 第一链合成试剂盒 (Invitrogen 公司, USA)、引物为 SOCS-3: 上游 TGC GCC ATG GTC ACC CAC AGC AAG TTT; 下游 GCT CCT TAA AGT GGA GCA TCA TAC TGA; β -肌动蛋白 (β -actin): 上游 TCT TTG CCA ATA GTG ATG ACT TGG C; 下游 GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA^[5].

1.3 脑不对称动物模型的建立

动物适应环境一周后经伸爪取食法区分为左利、右利和双利三组. 方法概述如下: 小鼠禁食 12 ~ 18 h 后, 置于测试盒内, 以小饲料块经伸爪取食模型盒中央的小管逗引小鼠伸爪取食, 记录 50 次伸爪取食中伸右爪次数, 即为右利分 (right paw entry, RPE). 两周内共测试 4 次, 平均计分 1 ~ 20 分为左利鼠 (left pawed mice), 21 ~ 29 分为双利鼠 (ambidextrous mice), 30 ~ 50 分为右利鼠 (right pawed mice)^[6,7]. 剔除实验过程中不伸爪取食者. 行为测试及最后的实验均在上午 10 时开始进行.

* 国家自然科学基金资助项目 (30271211 和 30371315) 和汕头大学研究与发展基金资助项目 (L00011).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0754-8900456, E-mail: kslu@stu.edu.cn

收稿日期: 2004-02-17, 接受日期: 2004-03-28

1.4 脑组织总 RNA 提取

按 Trizol 试剂盒提取皮层、海马、下丘脑总 RNA, 测定 RNA 含量, 电泳检测 RNA 完整性。

1.5 cDNA 合成

按 Invitrogen cDNA 第一链合成试剂合成 cDNA 第一链。方法简述如下: 取模板 RNA (皮层 2.5 μg 、海马、下丘脑各 0.7 μg), 与 dNTP、Oligo dT 各 0.5 μl 混匀, 补足体积至 5 μl , 65 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上冷却后加入 10 $\times$ RT 缓冲液 1 μl 、25 mmol/L MgCl_2 2 μl 、0.1 mol/L DTT 1 μl 、RNAase OUT 抑制剂 0.5 μl , 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min; 加入 0.5 μl 逆转录酶, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min 后, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 冰上冷却后离心, 加入 RNase H, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.6 PCR

取 cDNA 反应液 1 μl , 加入 0.5 ml PCR 管中, 分别加入 2 mmol/L dNTP 4 μl , 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μl , 上、下游引物各 1 μl (8.3 $\mu\text{mol/L}$), Taq 酶 2.5 U, 加 DEPC 水至终体积 50 μl , 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 9 μl PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶在图像分析处理系统上计算出 SOCS-3 和 β -actin 密度, 用 β -actin 密度作为参照, 求出 SOCS-3 基因表达的相对值。

1.7 统计方法

SPSS 软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 Balb/c 小鼠左利、右利、双利模型的建立

共 16 只 Balb/c 小鼠接受伸爪取食训练, 2 只始终未伸爪取食, 从实验中剔除。其中左利鼠 5 只, 右利鼠 7 只, 双利鼠 2 只, 由于双利鼠较少, 未加入实验。

2.2 RNA 抽提

抽提的脑组织总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示所抽提 RNA 完整。所有标本总 RNA A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0 间。

2.3 RT-PCR 检测 SOCS-3 基因表达

利用 RT-PCR 技术和设定的引物, 得到 SOCS-3 和 β -actin 扩增产物的大小分别为 725 bp 和 690 bp。采用 PCR 扩增的 DNA 含量间接表示 mRNA 水平, 其 PCR 产物电泳后, 将凝胶置于图像分析处理系统进行扫描。

2.3.1 左利、右利小鼠左、右侧皮层中 SOCS-3 的表达: 左利、右利小鼠左、右侧皮层 PCR 产物电泳结果见图 1a, 皮层中 SOCS-3 基因表达的相对密度测定见图 1b。结果表明: 左利鼠右侧皮层中 SOCS-3 显著高于左侧皮层 ($P < 0.05$), 而右利鼠左、右皮层中 SOCS-3 表达无显著差异; 右利鼠左侧皮层 SOCS-3 表达显著高于左利鼠左侧皮层 ($P < 0.05$)。

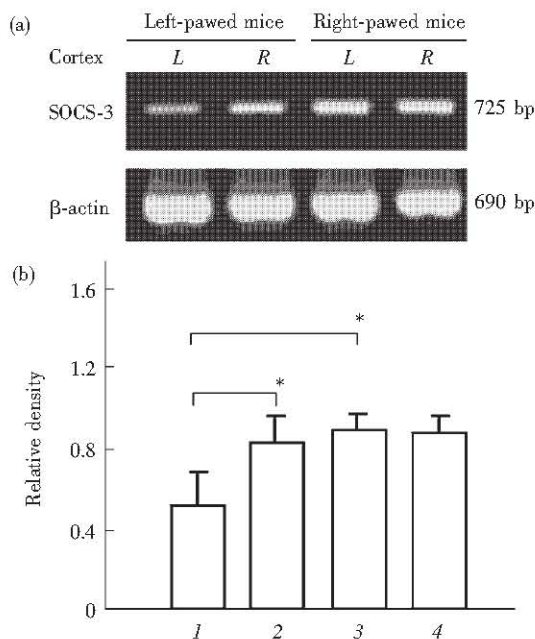


Fig. 1 The expression of SOCS-3 in the cortex

(a) RT-PCR (L: left, R: right); (b) Relative density, * $P < 0.05$. 1: Left cortex of left-pawed mice; 2: Right cortex of left-pawed mice; 3: Left cortex of right-pawed mice; 4: Right cortex of right-pawed mice. $n = 5$.

2.3.2 左利、右利小鼠左、右侧海马中 SOCS-3 的表达: 左利、右利小鼠左、右侧海马 PCR 产物电泳结果见图 2a, 海马中 SOCS-3 基因表达的相对密度值见图 2b。结果表明: 左利鼠右侧海马中 SOCS-3 显著高于左侧海马 ($P < 0.05$), 而右利鼠左、右侧海马中 SOCS-3 表达无显著差异; 右利鼠左侧海马 SOCS-3 表达显著高于左利鼠 ($P < 0.05$)。

2.3.3 左利、右利小鼠下丘脑中 SOCS-3 的表达: 左利、右利小鼠下丘脑 PCR 产物电泳结果见图 3a, 下丘脑中 SOCS-3 基因表达的相对密度值见图 3b。结果表明: 左利鼠下丘脑中 SOCS-3 基因表达水平显著低于右利鼠 ($P < 0.05$)。

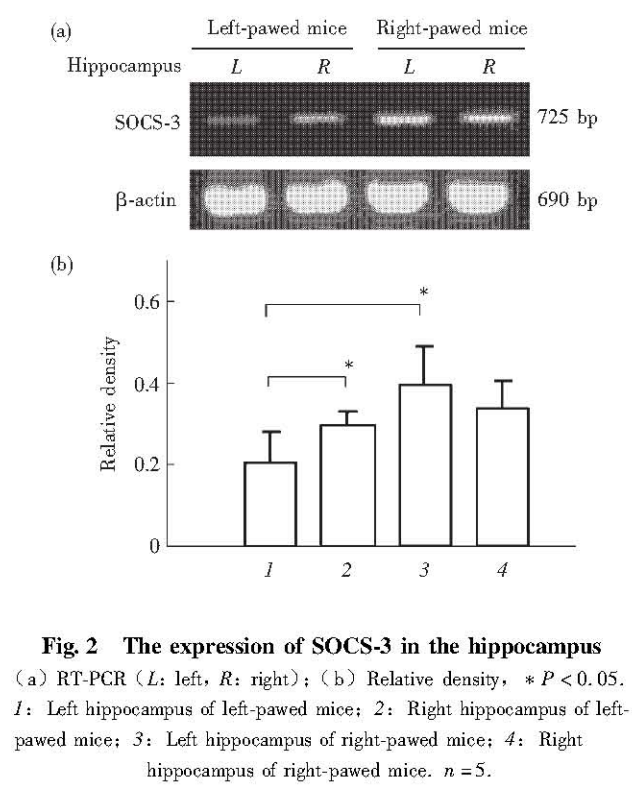


Fig. 2 The expression of SOCS-3 in the hippocampus
(a) RT-PCR (L: left, R: right); (b) Relative density, * $P < 0.05$.
1: Left hippocampus of left-pawed mice; 2: Right hippocampus of left-pawed mice; 3: Left hippocampus of right-pawed mice; 4: Right hippocampus of right-pawed mice. $n = 5$.

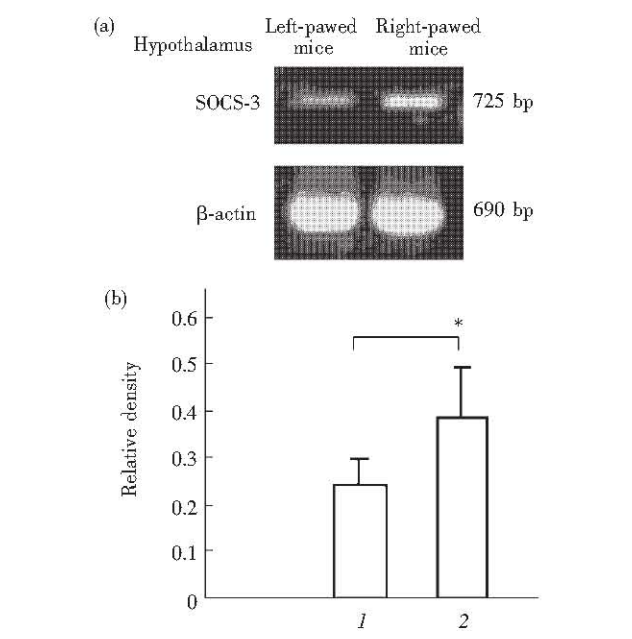


Fig. 3 The expression of SOCS-3 in the hypothalamus
(a) RT-PCR; (b) Relative density, * $P < 0.05$. 1: Left-pawed mice; 2: Right-pawed mice. $n = 5$.

3 讨 论

细胞因子是神经免疫内分泌调节网络中重要的信息分子,可调节中枢神经系统的多种生物学功能,并在维持神经免疫内分泌系统的稳态中发挥着重要作用.细胞因子通过与细胞表面的相应受体结

合而导致细胞信号传导通路的活化.在细胞内存在的一系列正、负反馈调节通路影响着细胞因子的作用,如新近发现细胞因子负反馈调节通路——SOCS 家族. SOCS 发挥抑制细胞因子信号传导作用的机制在于其抑制 JAK/STAT 途径.

通过 RNA 印迹和原位杂交技术在海马、下丘脑、基底节等部位检测到 SOCS 基因表达^[8]. IL-1、细胞因子 IL-6 家族成员如 IL-11、LIF 等显著增加下丘脑等部位 SOCS-1、SOCS-3 表达^[9,10]. SOCS 可能在中枢神经系统中细胞因子的信号传导及其作用的时间和空间调节、强度等方面起关键作用.

脑不对称性是一个普遍存在的生物学现象.脑以不对称方式调节机体免疫功能.部分切除小鼠左侧皮层常伴有脾细胞数目减少、淋巴细胞增殖活性和 NK 细胞活性降低等,而右侧皮层损伤则无上述改变^[11,12].在群体水平研究也发现,C3H 左利小鼠 T 细胞反应性较高、自身抗体出现较早^[13],左利人群中自身免疫性疾病发病率较高^[14].但到目前为止中枢神经系统免疫调控异质性的分子基础尚不明确.我们以往的研究发现 Balb/c 小鼠左、右侧大脑皮层 IL-1 β 、IL-6 水平存在差异,即右侧皮层显著高于左侧皮层^[3].鉴于 IL-1 β 、IL-6 在中枢神经系统具有免疫抑制作用,提示我们 IL-1 β 、IL-6 在中枢神经系统中表达的不对称性可能是大脑皮层免疫调节异质性的原因之一.最近研究报道 IL-1 β 、IL-6 能诱导 SOCS 表达,而且 SOCS 表达的增加制约着 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子的作用^[15,16],因此我们预期中枢神经系统中 SOCS 的表达可能也受脑不对称性影响.为此本研究探讨了 SOCS-3 在正常 Balb/c 小鼠脑组织中的表达与脑不对称性的关系.

本研究中,我们通过伸爪取食法将小鼠区分为左利、右利鼠.通过 RT-PCR 法间接检测了左利、右利小鼠左、右侧皮层、左、右侧海马及下丘脑中 SOCS-3 基因表达水平.发现:生理条件下左利鼠左皮层、左海马中 SOCS-3 基因表达水平较低,而且左利鼠下丘脑中 SOCS-3 的表达低于右利鼠.这与我们研究发现左、右侧皮层中 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子表达的异质性呈一定相关性,提示我们:一方面,中枢神经系统中 SOCS-3 表达的异质性可能通过影响在神经免疫内分泌调节中起重要作用的细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 等,在脑不对称分区免疫调控中发挥作用;另一方面,从我们的研究结果可见,左利个体中枢神经系统中,SOCS-3 这一细胞

因子负向调节因子表达水平较低, 这可能部分解释左利小鼠 T 细胞反应性较高、自身抗体出现较早, 及左利人群中自身免疫性疾病发病率较高等现象。由此可见, SOCS-3 的表达可能在脑不对称调节神经免疫内分泌功能中发挥重要作用。

本研究发现 SOCS-3 基因在 Balb/c 小鼠中枢神经系统中的表达受脑不对称性影响, 这将为今后进一步探讨 SOCS-3 在神经免疫学、神经生物学中的作用奠定初步实验基础。由于神经免疫内分泌网络调节的机制十分复杂, 因此 SOCS-3 在脑不对称性影响神经免疫内分泌中的作用有待进一步深入和系统研究。

参 考 文 献

- 1 Starr R, Willson T A, Viney E M, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature*, 1997, **387** (6636): 917 ~ 921
- 2 Christoph J A, Shlomo M. The central role of SOCS3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest*, 2001, **108** (12): 1735 ~ 1740
- 3 Fu Q L, Shen Y Q, Gao M X, *et al.* Brain interleukin asymmetries and paw preference in mice. *Neuroscience*, 2003, **116** (3): 639 ~ 647
- 4 Auernhammer C J, Chesnolova V, Bousquet C, *et al.* Pituitary corticotrophin SOCS3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotrophin secretion. *Mol Endocrinol*, 1998, **12** (7): 954 ~ 961
- 5 Egwuagu C E, Yu C R, Zhang M F, *et al.* Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells:

implication for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol*, 2002, **168** (7): 3181 ~ 3187

- 6 Neveu P J, Moya S. In the mouse, the corticoid stress response depends on lateralization. *Brain Res*, 1997, **749** (2): 344 ~ 346
- 7 高明霞, 李康生, 董 菁, 等. 脑不对称 Balb/c 小鼠血浆 IL-1 β 、IL-6 及皮质酮水平变化. *中国免疫学杂志*, 2000, **16** (1): 19 ~ 22
- 8 Gao M X, Li K S, Dong J, *et al.* *Chin J Immunol*, 2000, **16** (1): 19 ~ 22
- 9 Polizzotto M N, Bartlett P F, Turnley A M, *et al.* Expression of "suppressor of cytokine signaling" (SOCS) genes in the developing and adult mouse central nervous system. *J Comp Neurol*, 2000, **423** (2): 348 ~ 358
- 9 Chesnokova V, Melmed S. Leukemia inhibitory factor mediates the hypothalamic pituitary adrenal axis response to inflammation. *Endocrinology*, 2000, **141** (11): 4032 ~ 4040
- 10 Bjorbaek C, Elmquist J K, Frantz J D, *et al.* Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1998, **1** (4): 619 ~ 625
- 11 Barneoud P, Neveu P J, Vitiello S, *et al.* Early effects of right or left cerebral cortex ablation on mitogen-induced spleen lymphocyte DNA synthesis. *Neurosci Lett*, 1988, **90** (3): 302 ~ 307
- 12 Betancur C, Neveu P J, Vitiello S, *et al.* Natural killer cell activity is associated with brain asymmetry in male mice. *Brain Behav Immun*, 1991, **5** (2): 162 ~ 169
- 13 Neveu P J. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. *Behav-Genet*, 1996, **26** (4): 373 ~ 377
- 14 Geschwind N, Behan P. Left-handedness: association with immune disease, migraine, and with developmental learning disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79** (16): 5097 ~ 5100
- 15 Lang R, Pauleau A L, Parganas E, *et al.* SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol*, 2003, **4** (6): 546 ~ 550
- 16 Croker B A, Krebs D L, Zhang J G, *et al.* SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling *in vivo*. *Nat Immunol*, 2003, **4** (6): 540 ~ 545

The Heterogeneity of SOCS-3 in The Brain of Balb/c Mice and Brain Lateralization*

ZHAO Li-Chun, SU Yun, LI Kang-Sheng**

(Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

Abstract To investigate the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in Balb/c mice brain and the association with brain lateralization, the paw preference test was used to select right-pawed, left-pawed mice. The SOCS-3 expression level was detected by RT-PCR. The results showed that, (1) The SOCS-3 expression level in right cortex was higher than that in left cortex of left-pawed mice ($P < 0.05$) and it was also higher in the left cortex of right-pawed mice than that in the left cortex of left-pawed mice ($P < 0.05$), (2) The SOCS-3 expression level in right hippocampus was higher than that in the left hippocampus of left-pawed mice ($P < 0.05$) and it was also higher in the left hippocampus of right-pawed mice than that in the left hippocampus of left-pawed mice ($P < 0.05$), (3) The SOCS-3 expression level in hypothalamus of right-pawed mice was higher than that of the left-pawed mice ($P < 0.05$). These results indicate that the SOCS-3 expression level in Balb/c mice brain is associated with brain lateralization.

Key words SOCS-3, brain lateralization, neuroimmunoendocrinology

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30271211, 30371315) and Research and Development Foundation of Shantou University (L00011).

** Corresponding author. Tel/Fax: 86-754-8900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: February 17, 2004 Accepted: March 28, 2004