

M-CSF 上调 cyclinD1/D3 和 CDK2/6 的表达促进 HeLa 细胞增殖 *

涂 剑^{1)**} 吴海燕^{1)**} 张蒙夏²⁾ 张晓红²⁾ 罗红梅²⁾
龙治峰²⁾ 汪煜华¹⁾ 雷小勇¹⁾ 唐圣松^{1, 2)***}

(¹⁾南华大学药物药理研究所, 药物蛋白质组学湖南省高等学校重点实验室, 衡阳 421001; ²⁾南华大学组织胚胎学教研室, 衡阳 421001)

摘要 非分泌型巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的表达在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用, 为探讨胞质 M-CSF 对细胞增殖的影响, 采用基因重组技术构建胞内稳定表达 M-CSF 的 HeLa 细胞系, 以空载体(pCMV/myc/cyto)转染 HeLa 细胞和未转染 HeLa 细胞作为对照, MTT 法及反义寡核苷酸抑制实验分析 M-CSF 对细胞增殖的影响, 并计算细胞倍增时间, RT-PCR 观察胞内 M-CSF 对 G1 期细胞周期相关蛋白的影响. 结果显示, 与对照组比较, 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞倍增时间明显缩短、增殖能力显著增强, M-CSF 的特异性反义寡核苷酸能抑制转染 M-CSF 的 HeLa 细胞的增殖, 且抑制率随着反义寡核苷酸浓度的增高而增强, 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞的 cyclinD1/D3 和 CDK2/6 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$). 提示: M-CSF 可上调 cyclinD1/D3 和 CDK2/6 的 mRNA 表达, 促进 HeLa 细胞的增殖.

关键词 巨噬细胞集落刺激因子, HeLa 细胞, pCMV/myc/cyto-M-CSF 载体, 细胞增殖, 细胞周期相关蛋白
学科分类号 Q2, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00874

巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF), 也称集落刺激因子-1(CSF-1), 是由多种细胞产生的一种具有谱系特异性的细胞因子^[1]. M-CSF 作为细胞外的信号分子, 正常生理条件下或游离于体液, 或与细胞外基质结合, 或仅在胚胎期出现于细胞膜表面, 完成功能后即被内吞, 在细胞内降解. 因此, 一般情况下, 细胞内测不出 M-CSF 的表达. 但近年来的研究发现^[2-5]: 许多恶性肿瘤如白血病、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等细胞内, 出现了非分泌型的 M-CSF, 包括膜结合型、胞外基质结合型、胞内结合型(含胞质与胞核结合型), 胞质内及胞核中 M-CSF 的异常高表达在肿瘤的发生、发展中起着重要的调控作用. 尽管对于这些异位存在的 M-CSF 的作用已有所发现, 但其作用模式及其机制, 目前知之甚少.

因此, 本研究利用南华大学药物药理研究所已建立的 pCMV/myc/cyto-M-CSF 靶向定位表达载体, 通过脂质体转染给人宫颈癌 HeLa 细胞, 建立胞质稳定高表达 M-CSF 的 HeLa 细胞系, 旨在探讨胞质高表达 M-CSF 对 HeLa 细胞增殖及 G1 期细胞周期相关蛋白的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

HeLa 细胞购自中山大学细胞库, RPMI1640 购自美国 GIBCO 公司, 无支原体新生牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, pCMV/myc/cyto 载体、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒、G418 购自美国 Invitrogen 公司, 重组载体 pCMV/myc/cyto-M-CSF 由南华大学药物药理研究所构建, First-Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI 公司, 2×Taq PCR MasterMix 购自北京天为时代科技有限公司, 鼠抗人 M-CSF 单克隆抗体为 Santa Cruze 公司产品, 兔抗 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记

* 国家自然科学基金资助项目(30270684), 湖南省自然科学基金资助项目(08JJ5004), 湖南省教育厅科技计划项目(07A059, 07C635)和湖南省科技计划重点项目(06FJ3203).

** 共同第一作者. 吴海燕现在湖南省郴州市第一人民医院病理科工作.

*** 通讯联系人.

Tel: 0734-8282753, E-mail: tangss111@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-23, 接受日期: 2009-03-25

的羊抗鼠、羊抗兔二抗及生物素标记的羊抗鼠 IgG 二抗为北京中杉金桥生物技术有限公司产品, MTT 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染. HeLa 细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37℃、5%CO₂ 的培养箱内培养. 按 Invitrogen 公司脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染程序转染, G418 筛选, 同时采用空载体 pCMV/myc/cyto 转染细胞及未转染的 HeLa 细胞作为对照.

1.2.2 转染细胞的 RT-PCR 检测. 提取细胞总 RNA, 按 First-Strand cDNA Synthesis Kit 方法合成 cDNA 第一链. M-CSF 特异性的引物上游: 5' CTTGCCATGGAGGAGGTGTCGGAGTACTG 3', 含有 Nco I 酶切位点; 下游: 5' ATGTGTCGACCT-CCTGGAGCTGCGGGCTG 3', 含有 Sal I 酶切位点; Neo 引物上游: 5' TCCATCATGGCTGATGCA-ATGCGGC 3', 下游: 5' GATAGAAGGCAGTGCG-CTGCGAATCG 3'; GAPDH 引物上游: 5' TCACC-ATC TTCCAGGAGCGAG 3', 下游: 5' TGTCGCT-GTTGAAGTCAGAG 3'. 扩增 PCR: 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环后 72℃ 终延伸 7 min, 终止反应. 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.3 转染细胞的 Western blot 检测. 裂解细胞, 用 BCA 试剂测定蛋白质含量, 上样缓冲液调各组蛋白质量一致, 经 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜, 预染蛋白 marker 确定蛋白质分子质量标准的位置. 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封闭, 1: 500 加入 M-CSF 或 β-actin 一抗, 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 孵育过夜, TBST 液洗 3 次, 1: 1 000 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗, 37℃ 孵育 0.5 h, TBST 液洗后压片、显影、定影于 X 光片.

1.2.4 转染细胞的免疫细胞化学检测. 细胞分组接种于 6 孔板中, 4% 多聚甲醛溶液固定(室温, 15 min), PBS 液洗 3 次, 0.2% TritonX-100 通透液中透化 5 min, PBS 洗 3 次, 滴加过氧化物酶阻断溶液室温孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性. PBS 洗 3 次, 滴加 50 μl 正常非免疫动物血清, 室温下孵育 10 min. 除去血清, 每孔滴加 50 μl M-CSF 一抗(1: 200)于湿盒中 4℃ 孵育过夜, PBS 液洗 3 次, 每孔滴加 50 μl 生物素标记的羊抗小鼠 IgG 二抗, 37℃ 孵育 1 h, PBS 液洗 3 次, 滴

加 50 μl 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 10 min. 自来水冲洗, 苏木素复染, 自来水冲洗返蓝, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片.

1.2.5 计算细胞倍增时间. 胰酶消化, 收集细胞并计数, 调节细胞浓度接种入 24 孔培养板, 以 1 天(即 24 h)为间隔取 3 孔细胞胰酶消化收集计数, 取均值, 连续计数 7 个时间点共计 8 天. 倍增时间的计算公式为: 倍增时间 / d =
$$\frac{\text{终止时间} - \text{起始时间}}{\log_2[\text{终止细胞浓度} / \text{起始细胞浓度}]}$$

1.2.6 MTT 法. 胰酶消化计数细胞, 调节细胞浓度每孔 180 μl 接种入 96 孔培养板, 培养 44 h 后加入 20 μl MTT (5 g/L) 继续培养 4 h, 去上清后加入 200 μl DMSO 振荡 10 min 后使用酶标仪检测, 以 570 nm 波长处的光吸收值(A)代表细胞活力.

1.2.7 反义寡核苷酸抑制细胞增殖实验. 调节细胞浓度为 5×10⁴ 个/ml 接种 96 孔培养板, 每孔 180 μl, 反义寡核苷酸(核苷酸硫代修饰) 5' GCGCCCC-GCGCGGTCAT 3' 及随机片段对照物(核苷酸硫代修饰)序列 5' CGCACGCCTGCTGCTCG 3', 用 RPMI1640 培养基溶解, 以 1、3、5、7、9 nmol/L 反义寡核苷酸加入细胞培养孔, 培养 44 h, 加入 20 μl MTT (5 g/L) 继续培养 4 h, 去上清后加入 200 μl DMSO, 振荡 10 min 后使用酶标仪检测各组 550 nm 波长处的光吸收值(A), 反义寡核苷酸的抑制率(Inhibitory rate)计算公式为: 抑制率 / % =
$$\frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{ASODN}}) \times 100\%}{A_{\text{Control}}}$$

1.2.8 RT-PCR 检测细胞周期相关蛋白的 mRNA 表达. 如前所述, 提取细胞总 RNA, 合成 cDNA 第一链. 各细胞周期相关蛋白的引物: cyclinE 上游 5' ATCCCCACACCTGACAAAGAAG 3', 下游 5' CCTGAACAAGCTCCATCTGTCA 3'; cyclinD1, 上游 5' GAGGAACAGAAGTGCGAGG 3', 下游 5' TCTGGAGAGGAAGCGTGT G 3'; cyclinD2, 上游 5' GGAACAGAAGTGCGAAGAAG 3', 下游 5' GGAGTTGTCTGGTGTAATGC 3'; cyclinD3, 上游 5' ATGCTGGCTTACTGGATGC 3', 下游 5' CAATCACAGCAGCCAGGTC 3'; CDK2, 上游 5' GCTTTCTGCCATTCTCATCG 3', 下游 5' GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT 3'; CDK4, 上游 5' ATTGGTGTCTGGTGCCTATGG 3', 下游 5' ACGGGTGTAAGTGCCATCTG 3'; CDK6, 上游

5' CACCTGGAGACCTTCGAGCAC 3', 下游 5' TTATTTGTCCGCTGCTGGTCAC 3'. 以上所有引物均由上海生工生物技术公司合成. 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 反应 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.9 统计学处理. 实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS12.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结 果

2.1 高表达 M-CSF HeLa 细胞系的建立

相对于空载体(pCMV/myc/cyto)转染细胞及未转染的 HeLa 细胞组, M-CSF mRNA 及蛋白质在 pCMV/ myc/cyto-M-CSF 转染细胞的胞质中高表达, 与此同时, 转染空载体和 M-CSF 的 2 组 HeLa 细胞表达质粒自身 Neo 基因, 如图 1a, b, c 所示, 预示高表达 M-CSF 的 HeLa 细胞系的建立.

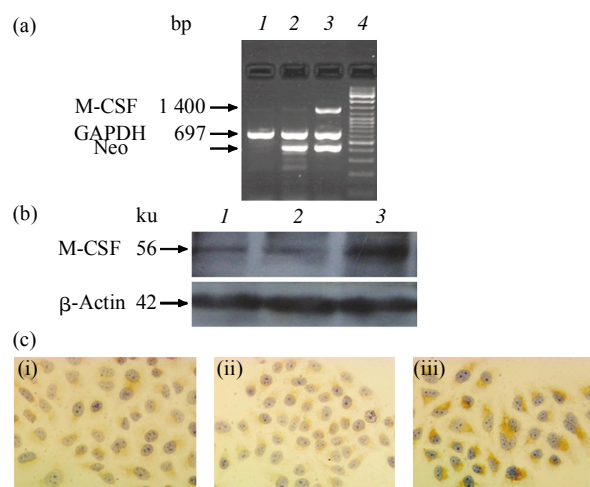


Fig. 1 M-CSF mRNA and protein expression in HeLa cells by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry
(a) The mRNA expression of M-CSF in HeLa cells was detected by RT-PCR, the length of GAPDH gene is 697 bp and that of M-CSF is 1 400 bp, which corresponds with the size of the extracellular region of M-CSF. 1: Untransfected HeLa cells; 2: pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; 3: pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells; 4: 1 000 bp DNA marker. (b) The protein expression of M-CSF in HeLa cells was confirmed by Western blot, M-CSF is 56 ku while β -actin as a normalizing control is 42 ku. 1: Untransfected HeLa cells; 2: pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; 3: pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells. (c) Immunocytochemistry was used to further confirm the protein expression and localization of M-CSF in HeLa cells. Only M-CSF-transfected HeLa cells were expressed M-CSF protein at a high level in the cytoplasm (200 $\times$). (i) Untransfected HeLa cells; (ii) pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; (iii) pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells.

2.2 胞质 M-CSF 缩短 HeLa 细胞倍增时间

转染 M-CSF 的 HeLa 细胞组的倍增时间 (HeLa-M, (2.26 ± 0.05) 天) 较 HeLa 未转染细胞组 (HeLa, (2.88 ± 0.12) 天) 和转染空质粒的 HeLa 细胞组 (HeLa-C, (2.81 ± 0.18) 天) 明显缩短 ($P < 0.05$, 表 1), 结果提示: 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞的增殖能力明显增强.

Table 1 Effect of M-CSF on doubling time of HeLa cells

t/d	HeLa	HeLa-C	HeLa-M
1	10 000 $\pm$ 6	10 000 $\pm$ 8	10 000 $\pm$ 8
7	42 500 $\pm$ 12	43 800 $\pm$ 15	63 000 $\pm$ 24
Doubling time	2.88 $\pm$ 0.12	2.81 $\pm$ 0.18	2.26 $\pm$ 0.05*

The M-CSF-transfected HeLa cells had shorter doubling time (2.26 ± 0.05) d than either pCMV/cyto/myc-transfected HeLa cells (2.81 ± 0.18) d or untransfected HeLa cells (2.88 ± 0.12) d ($n=3$, * $P < 0.05$ vs the other two groups). HeLa: Untransfected HeLa cells; HeLa-C: pCMV/myc/ cyto-transfected HeLa cells; HeLa-M: pCMV/ myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells. ($\bar{x} \pm s$)

2.3 胞质 M-CSF 促进 HeLa 细胞增殖

MTT 法的研究结果表明, 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞增殖能力显著大于两种对照细胞 (图 2, $P < 0.05$).

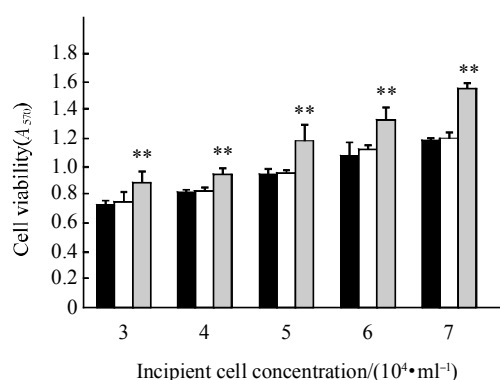


Fig. 2 Effect of M-CSF on viability of HeLa cells by MTT assay

The M-CSF-transfected HeLa cells had more significantly augmented reproductive activity than either pCMV/cyto/myc-transfected HeLa cells or untransfected HeLa cells ($n=3$, ** $P < 0.05$ vs the other two groups). HeLa: Untransfected HeLa cells; HeLa-C: pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; HeLa-M: tpCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells. ■: HeLa; □: HeLa-C; ▤: HeLa-M.

2.4 M-CSF 特异性反义寡核苷酸抑制 HeLa 细胞增殖

为了明确转染 M-CSF 的 HeLa 细胞增殖能力的增强与 M-CSF 表达的关系, 用 M-CSF 的特异性反义寡核苷酸处理细胞, 结果显示: M-CSF 的特异性反义寡核苷酸能抑制转染 M-CSF 的 HeLa 细胞增殖, 且抑制率随着反义寡核苷酸浓度的增高而增强, 但对未转染和转染空质粒的 HeLa 细胞的影响较小(图 3, $P < 0.05$).

2.5 胞质 M-CSF 对细胞周期相关蛋白 mRNA 表达的影响

本实验选取了细胞周期 G1 期的相关蛋白进行分析, 结果表明: HeLa-M 细胞 cyclinD1、cyclinD3 和 CDK2、CDK6 的表达均显著高于对照组细胞 ($P < 0.05$, 图 4), 而 cyclinD2、cyclin E 和 CDK4 的表达没有明显差异($P > 0.05$, 图 4).

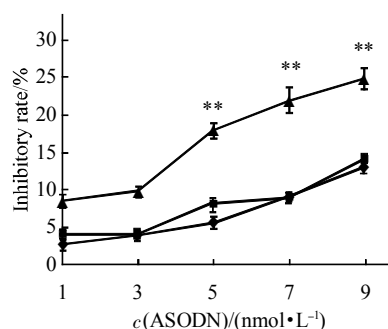


Fig. 3 Effect of M-CSF-specific antisense oligonucleoside on viability of pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells

M-CSF-specific antisense oligonucleotides significantly inhibited the proliferation of the M-CSF-transfected cells in a concentration-dependent manner ($n=3$, $**P < 0.05$ vs the other two groups), but had little effect on the other two groups. HeLa: Untransfected HeLa cells; HeLa-C: pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; HeLa-M: pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells. ◆—◆: HeLa; ■—■: HeLa-C; ▲—▲: HeLa-M.

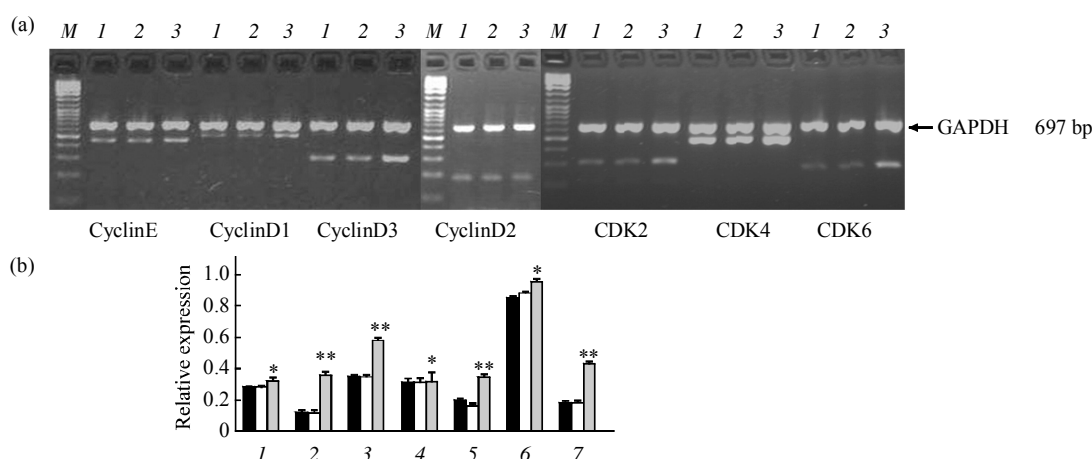


Fig. 4 Effect of M-CSF on the mRNA expression of cell cycle related protein in HeLa cells

(a) Detected by RT-PCR, M-CSF up-regulated the mRNA expression of cyclinD1, cyclinD3, CDK2 and CDK6, but had little effect on the mRNA expression of cyclinD2, cyclin E and CDK4. M: 1 000 bp DNA marker; 1: HeLa, Untransfected HeLa cells; 2: HeLa-C, pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells; 3: HeLa-M, pCMV/myc/cyto-M-CSF-transfected HeLa cells. (b) Quantification of the expression levels of the RT-PCR results presented in (a) ($n=3$, $**P < 0.05$ vs the other two groups, $*P > 0.05$ vs the other two groups). 1: CyclinE; 2: CyclinD1; 3: CyclinD3; 4: CyclinD2; 5: CDK2; 6: CDK4; 7: CDK6. ■: HeLa; □: HeLa-C; ▒: HeLa-M.

3 讨 论

巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)是细胞信号调控网络的一个重要的细胞因子。有文献报道^[6, 7]: 许多恶性肿瘤细胞出现了非分泌型 M-CSF 的异常表达, 当 M-CSF 出现在恶性肿瘤细胞胞质和胞核时, 预示恶性肿瘤细胞运动和侵袭能力增强, 患者预后不良, 但机制不清。

为研究胞质 M-CSF 在肿瘤细胞发生发展过程

中的作用, 本课题组构建了 pCMV/myc/cyto-M-CSF 载体, 此载体含有一个胞质定位序列, 可使 M-CSF 强制性定位于细胞质中, 且在我们构建的重组载体中的 M-CSF 分子已经缺失 N 端 32 个氨基酸残基组成的出胞信号肽, 使得表达的 M-CSF 不分泌至细胞外作为信号分子, 由此建立胞质稳定高表达 M-CSF 细胞系。基于这一思路, 我们将 pCMV/myc/cyto-M-CSF 通过脂质体转染人宫颈癌 HeLa 细胞, G418 筛选后, 获得阳性单克隆,

经 RT-PCR、Western blot 鉴定该阳性单克隆不仅高表达 M-CSF mRNA, 而且能高表达 M-CSF 蛋白, 免疫细胞化学实验显示 M-CSF 定位于阳性克隆的细胞质中。这些结果表明, 该阳性克隆胞质能稳定高表达 M-CSF, 以此克隆扩增建立的细胞系可作为研究胞质 M-CSF 作用的细胞模型。

细胞增殖是复杂有序并受多种因素严谨调控的过程, 其中, 细胞周期蛋白(cyclin)- 细胞周期蛋白依赖蛋白激酶(CDK)- 细胞周期蛋白抑制蛋白(CKI)调控网络在该过程中发挥重要作用。不同的细胞具有不同的增殖时相, 主要表现在 G1 期持续时间的不同, 而 G1 期的启动则是细胞周期的关键步骤, 细胞只要通过了 G1 期的限制点, 就可以顺利地通过其后的细胞周期, 完成一次有丝分裂, 因而 G1/S 期检查点的调控尤其重要, 这一检查点主要涉及 cyclinD1/D3/E, CDK2/4/6 和 CKI 等^[8~10]。本实验发现: 相对于未转染的 HeLa 细胞和转染空载体的 HeLa 细胞, 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞的倍增时间明显缩短, 增殖速度加快, 用 M-CSF 特异性反义寡核苷酸处理后, 可显著抑制其增殖速率, 且这种抑制效应随着反义寡核苷酸浓度的增大而增强, 提示转染 M-CSF 的 HeLa 细胞增殖速度加快是胞质 M-CSF 表达的结果。同时本实验还发现: 胞质 M-CSF 可明显上调 HeLa 细胞 cyclinD1、cyclinD3 和 CDK2、CDK6 的表达。Kirma 等^[11]研究表明: 胞质内异常表达的 M-CSF 可通过上调 G1 期细胞周期相关蛋白, 促进细胞周期的进展。张蒙夏等^[12]的研究指出: M-CSF 的单克隆抗体及其反义寡核苷酸能抑制肝癌 SMMC7721 细胞的增殖、下调 cyclinD1/E 的表达和上调 p16 的表达, 且 M-CSF 的单克隆抗体及其反义寡核苷酸的联合使用能进一步加强对 SMMC7721 细胞的抑制作用、增加下调 cyclinD1/E 和上调 p16 的表达幅度。这些结果与我们的结果一致。

综上所述, 我们得出结论: 胞质 M-CSF 可通过活化 cyclinD1/D3 和 / 或 CDK2/6 激酶, 缩短细胞增殖的倍增时间, 促进细胞增殖。

参 考 文 献

- 1 Csar X F, Wilson N J, McMahon K A, *et al.* Proteomic analysis of macrophage differentiation. p46/52 (Shc) Tyrosine phosphorylation is required for CSF-1-mediated macrophage differentiation. *J Biol Chem*, 2001, **276**(28): 26211~26217
- 2 Rao Q, Zheng G G, Li G, *et al.* Membrane-bound macrophage colony-stimulating factor mediated auto-juxtacrine downregulates matrix metalloproteinase-9 release on J6-1 leukemic cell. *Exp Biol Med* (Maywood), 2004, **229**(9): 946~953
- 3 Ławicki S, Szmitkowski M, Wojtukiewicz M. The pretreatment plasma level and diagnostic utility of M-CSF in benign breast tumor and breast cancer patients. *Clin Chim Acta*, 2006, **371**(1~2): 112~116
- 4 Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, *et al.* Effects of GM-CSF and M-CSF on tumor progression of lung cancer: roles of MEK1/ERK and AKT/PKB pathways. *Int J Mol Med*, 2006, **18**(2): 365~373
- 5 Cao Z Y, Wu K F, Song Y H, *et al.* M-CSF targeting into LCL nucleus behaves as a malignancy promotor. *Chin J Cancer Res*, 2003, **15** (4): 262~268
- 6 Li G, Song Y H, Wu K F, *et al.* Clone and expression of mutant M-CSF and its receptor from human leukemic cell line J6-1. *Leuk Res*, 2002, **26**(4): 377~382
- 7 Kirma N, Hammes L S, Liu Y G, *et al.* Elevated expression of the *oncogene* c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer Res*, 2007, **67**(5): 1918~1926
- 8 Gonzales A J, Goldsworthy T L, Fox T R. Chemical transformation of mouse liver cells results in altered cyclin D-CDK protein complexes. *Carcinogenesis*, 1998, **19**(6): 1093~1102
- 9 Kokkinakis D M, Liu X, Neuner R D. Modulation of cell cycle and gene expression in pancreatic tumor cell lines by methionine deprivation (methionine stress): implications to the therapy of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(9): 1338~1348
- 10 Chan K C, Wang C J, Ho H H, *et al.* Simvastatin inhibits cell cycle progression in glucose-stimulated proliferation of aortic vascular smooth muscle cells by up-regulating cyclin dependent kinase inhibitors and p53. *Pharmacol Res*, 2008, **58**(3~4): 247~256
- 11 Kirma N, Luthra R, Jones J, *et al.* Overexpression of the colony-stimulating factor (CSF-1) and/or its receptor c-fms in mammary glands of transgenic mice results in hyperplasia and tumor formation. *Cancer Res*, 2004, **64**(12): 4162~4170
- 12 张蒙夏, 罗红梅, 唐圣松, 等. 肝癌细胞增殖受 M-CSF 胞内和胞外自分泌的双重调控. *中国病理生理杂志*, 2005, **21**(12): 2382~2387

Zhang M X, Luo H M, Tang S S, *et al.* *Chin J Pathophys*, 2005, **21**(12): 2382~2387

M-CSF Accelerates The Proliferation of HeLa Cells by Up-regulating The Expression of CyclinD1/D3 and CDK2/6*

TU Jian^{1)**}, WU Hai-Yan^{1)**}, ZHANG Meng-Xia²⁾, ZHANG Xiao-Hong²⁾, LUO Hong-Mei²⁾,
LONG Zhi-Feng²⁾, WANG Yu-Hua¹⁾, LEI Xiao-Yong¹⁾, TANG Sheng-Song^{1,2)***}

⁽¹⁾Institute of Pharmacy and Pharmacology, Hunan School of Higher Learning Key Laboratory for Pharmacoproteomics, Hengyang 421001, China;

⁽²⁾Department of Histology and Embryology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Non-secreted macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) plays an important role in genesis and progression of tumors. To explore the regulation of cytoplasmic M-CSF on the proliferation of HeLa cells, pCMV/myc/cyto-M-CSF vectors were transfected into HeLa cells. After confirmed by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry, the effect of cytoplasmic M-CSF on the proliferation of HeLa cells were analyzed by MTT and antisense oligonucleotides. The doubling time was counted according to cell growth curves. The mRNA expression of cyclinE, cyclinD1/2/3, CDK2/4/6 were assayed by RT-PCR. The results from RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry showed that both M-CSF mRNA and protein were expressed at a higher level and localized to the cytoplasm in M-CSF-transfected HeLa cells, compared with either pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells or untransfected HeLa cells. M-CSF-transfected HeLa cells had shorter doubling time and more significantly augmented reproductive activity than either pCMV/myc/cyto-transfected HeLa cells or untransfected HeLa cells. M-CSF specific antisense oligonucleotides significantly inhibited the proliferation of the M-CSF-transfected cells, but had little effect on the other two groups. Furthermore, cytoplasmic M-CSF up-regulated the mRNA expression of cyclinD1, cyclinD3, CDK2 and CDK6($P < 0.05$). So it was concluded that cytoplasmic M-CSF accelerates the proliferation of HeLa cells by up-regulating the mRNA expression of cyclinD1/D3 and CDK2/6.

Key words macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), HeLa cells, pCMV/myc/cyto-M-CSF vector, cell proliferation, cell cycle associated protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00874

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30270684), The Natural Science Foundation of Hunan Province (08JJ5004), Projects for Science Research for Department of Hunan Education (07A059, 07C635) and Key Project for Science Research of Hunan Province of China (06FJ3203).

**TU Jian and WU Hai-Yan were contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-734-8282753, E-mail: tangss111@yahoo.com.cn

Received: December 23, 2008 Accepted: March 25, 2009