文章编号:1000-5404(2007)05-0419-03

论著

# 巨噬细胞集落刺激因子对肺癌细胞株A549在体外的抑制作用

彭胜祖,闵家新,蒋 力 (第三军医大学新桥医院胸外科,重庆 400037)

**提 要:目的** 观察巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)对肺腺癌细胞株A549的作用。**方法** 观察肺腺癌A549细胞形态的变化。M-CSF对体外培养肺腺癌A549细胞的生长抑制作用采用MTT检测法,用流式细胞仪检测细胞DNA含量,分析M-CSF对细胞周期的影响。采用RT-PCR检测M-CSF受体mRNA表达的变化。**结果** M-CSF能显著抑制肺腺癌A549细胞的生长,并且呈浓度、时间依赖关系,在M-CSF浓度为10 ng/ml时有最大抑制效应。流式细胞仪检测分析显示M-CSF作用后$G_0/G_1$期细胞增加。RT-PCR显示经M-CSF作用后M-CSF受体的mRNA表达水平有所下降。**结论** M-CSF对肺癌细胞株A549在体外有抑制作用。

**关键词:** M-CSF;肺癌;生长抑制;细胞周期;M-CSF受体
**中图法分类号:** R329.1;R734.2;R730.2 **文献标识码:** A

# Inhibitory effect of macrophage colony stimulating factor on lung cancer cell line A549

PENG Sheng-zu, MIN Jia-xin, JIANG Li (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To explore the effect of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) on lung cancer cell line A549. Methods After M-CSF at 0.1, 1 and 10 ng/ml was given to cultured A549 cells for 0, 24, 48, 72 and 92 h respectively, their morphological changes were observed with inverted microscopy, proliferation was measured by MTT assay, and cell cycles were determined by flow cytometry. RT-PCR was used to detect the change of expression of M-CSF receptor. Result The growth of A549 was significantly inhibited by M-CSF in a concentration- and time- dependent manner. The maximum response was obtained at 10 ng/ml of M-CSF. Flow cytometric analysis revealed that the treated A549 cells arrested at the $G_0/G_1$ phase of the cell cycle. RT-PCR showed that the mRNA expression of M-CSF receptor was reduced after the M-CSF treatment. Conclusion M-CSF has an anti-tumour activity on lung cancer cell A549.

**Key words:** macrophage colony stimulating factor; lung cancer; growth inhibition; cell cycle; macrophage colony stimulating factor receptor

巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)属于糖蛋白生长因子,可以由多种细胞产生,包括成纤维细胞、骨髓基质细胞、成骨细胞及丝裂素激活的T、B淋巴细胞和内皮细胞等[1]。研究表明,M-CSF不仅能选择性刺激巨噬细胞集落形成,诱导巨噬细胞的增殖分化,而且在许多肿瘤的发生、发展过程中也扮演重要的角色,包括调节细胞的生长、细胞的黏附与迁移、促进肿瘤新生血管的形成等[2]。Mroczko等[3]发现肺癌患者的血清M-CSF水平显著高于对照组,且与非小细胞肺癌(NSCLC)的分期密切相关,提示M-CSF与NSCLC的发生、发展有密切关系。本研究从肺癌细胞系A549入手,进一步研究M-CSF对肺癌细胞在体外培养的影响,为肿瘤发生、发展及治疗提供理论依据和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及试剂

肺腺癌细胞株A549,购自本院呼吸研究所;重组人M-CSF,购自英国PeproTech EC公司;Trizol购自天根生物工程公司;RT-PCR试剂盒,购自宝生物工程有限公司。

### 1.2 细胞培养

A549细胞培养在DMEM高糖培养基(含5%灭活小牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 mg/ml)。细胞置于$CO_2$孵箱中,恒温37 ℃,5% $CO_2$饱和湿度培养。每3天换液1次,5~7 d

作者简介:彭胜祖(1978-),男,山西省大同市人,硕士研究生,医师,主要从事普通胸外科方面的研究。E-mail: pengshengzu@163.com
通讯作者:闵家新,电话:(023)68755616
收稿日期:2006-07-31;修回日期:2006-11-30

传代。

### 1.3 细胞形态改变的观察

用含相同细胞数量的细胞悬液传代，设对照组（用不含 M-CSF 的 DMEM 培养基培养）和实验组（用含 10 ng/ml M-CSF 的 DMEM 培养基培养），培养 72 h 后用倒置显微镜观察细胞形态的改变。

### 1.4 MTT 法测 M-CSF 对肺癌细胞株 A549 的作用

取对数生长期的 A549 细胞，制成单细胞悬液，以 $1\times10^4$/孔接种于 96 孔板。待细胞贴壁后吸出培养液，加入含不同浓度的 M-CSF（0.1、1、10 ng/ml）的完全培养液继续培养。设不含 M-CSF 培养液的对照组。分别于培养 0、24、48、72、96 h 后各浓度取 5 孔进行实验，选择 570 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光值[$D(570)$]，每组结果取平均值，并计算细胞增殖活性百分率。

$$\text{细胞增殖活性}(\%)=\frac{\text{实验组 } D(570)}{\text{对照组 } D(570)}\times100\%$$

### 1.5 流式细胞仪检测细胞周期的改变

取对数生长期的细胞分成对照组和实验组（与 1.3 分组方法相同），$CO_2$ 孵箱内继续培养 48 h，收集各组细胞（每组细胞 $>1\times10^6$），加 70% 乙醇 500 μl 固定，4 ℃过夜，PBS 洗涤，离心后细胞沉淀中加入 PI 染色液（10 mg/L）0.5 ml，室温避光染色 1 h 后上机检测细胞周期和凋亡率。

### 1.6 RT-PCR 检测 M-CSF 受体 mRNA 含量

实验分对照组和实验组（与 1.3 分组方法相同）。待细胞约长满 100 ml 的培养瓶底时收集细胞。应用 Trizol 试剂提取总 RNA。按照试剂盒说明书进行逆转录及 PCR 反应。M-CSF 受体（M-CSFR 或 CSF-1R）引物参考 Li 等[4]的研究，由上海生物工程有限公司合成，上游引物 5′-TCCAACTACATTGTCAAGGGCAATGCCCGCCT-3′；下游引物 5′-CAGATTGGTATAGTCCCGCTCTCTCCTGTCCT-3′，扩增片段 360 bp。内参照物 β-actin 上游引物 5′-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3′；下游引物 5′-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′，扩增片段 569 bp。

### 1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行 $t$ 检验。

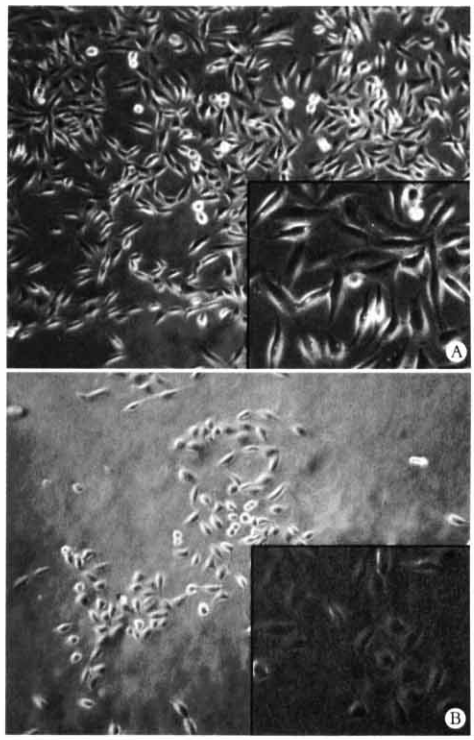
## 2 结果

### 2.1 M-CSF 作用后细胞形态的改变

对照组和实验组细胞培养 72 h 后在倒置显微镜下可见，对照组细胞密集，细胞之间排列紧密，具有连接成片的能力，细胞呈扁平的细长梭形（图 1A）。实验组细胞变圆，贴壁能力降低；细胞之间连接不紧密，连接成片的能力降低，部分细胞呈短梭形或椭圆形（图 1B）。

### 2.2 M-CSF 对细胞增殖活性的影响

MTT 实验结果显示，与对照组相比，不同浓度（0.1、1、10 ng/ml）M-CSF 对肺癌细胞株 A549 均有抑制增殖效应，作用 96 h 后增殖活性分别为（82.81 ± 2.0）%、（78.14 ± 2.2）%、（58.93 ± 1.1）%，与对照组相比差异显著（$P$ 值分别为 0.027、0.020 和 0.001）。同一浓度，随时间延长，抑制作用有所增强，在 M-CSF 浓度为 10 ng/ml 时最显著。

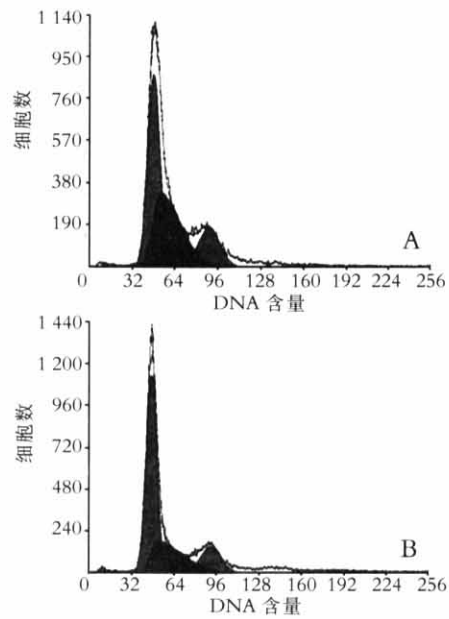



A：对照组；B：实验组

**图 1 培养 72 h 后倒置显微镜下肺癌 A549 细胞形态的改变** （大图：×100，小图：×200）

### 2.3 细胞周期的变化

培养 48 h 后，经流式细胞分析仪检测细胞周期发现两组无明显凋亡峰。对照组 $G_0+G_1$ 期细胞为（46.8 ± 1.7）%，S 期细胞为（36.9 ± 1.5）%；实验组 $G_0+G_1$ 期细胞为（56.1 ± 1.6）%，S 期细胞为（28.9 ± 1.7）%。两组间比较有显著性差异（$P$ = 0.002）。见图 2。

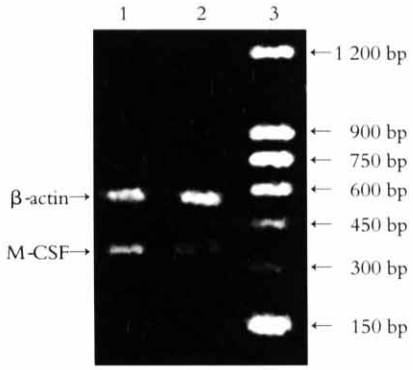



A：对照组；B：实验组；第 1 个峰表示 $G_0/G_1$ 期细胞数量；第 2 个峰显示 S 期的细胞数量；第 3 个峰显示 $G_2/M$ 期的细胞数量

**图 2 M-CSF 对肺癌细胞株 A549 细胞周期的影响**

### 2.4　M-CSF 受体 mRNA 含量表达的变化

对照组 M-CSF 受体 mRNA 相对表达量为(0.78 ± 0.05)，实验组 M-CSF 受体 mRNA 相对表达量为(0.67 ± 0.06)，两组相比有显著性差异($P$ = 0.037)。见图 3。




1：对照组；2：实验组；3：标准

**图 3　肺癌 A549 细胞 M-GSFR mRNA 的表达变化**

## 3　讨论

人造血系统生长因子不仅对造血细胞有作用，而且对非造血系统的恶性细胞也有作用。Kawakami 等[5]报道了 M-CSF 可以抑制 3 种卵巢癌细胞株的生长。本实验结果显示了外源性添加的 M-CSF 对肺腺癌细胞株 A549 有抗增殖活性，并且这种效应呈时间－浓度依赖关系。正常人血中的 M-CSF 浓度为 150 ~ 500 U/ml(0.4 ~ 1.3 ng/ml)，本实验使用了 0.1、1、10 ng/ml 3 个浓度梯度，是临床可以达到的补给剂量。我们观察到，在 10 ng/ml 浓度时获得最大的抑制效应。我们还观察到实验组的细胞形态也发生了变化，由扁平的细长梭形变成短梭形、甚至变圆，连接成片的能力也有所下降。

我们使用流式细胞仪来研究外源性添加 M-CSF 而引起的细胞周期的改变。对肺癌细胞 A549 添加外源性 M-CSF 培养后，并没有出现明显的凋亡峰，但增加了 $G_0 + G_1$ 期的细胞比例，减少了处于 S 期的细胞。这提示 M-CSF 的抗增殖作用并不是诱导细胞凋亡，可能涉及细胞周期的调整，使细胞阻滞于 $G_0 + G_1$ 期。

肿瘤局部微环境的细胞因子平衡以及肿瘤细胞表面细胞因子受体表达可能与肿瘤细胞增殖、分化和凋亡有关[6]。Ide 等[7]在造血生长因子对前列腺癌的作用研究中指出，CSFs 包括 M-CSF 可能是肿瘤自分泌或旁分泌网络机制中的组成部分，参与肿瘤的发生发展。本研究结果显示肺癌 A549 细胞在添加外源性 M-CSF 培养后，M-CSF 受体 mRNA 的表达水平也发生了显著变化。在某些恶性组织中，往往存在 M-CSF/M-CSF 受体的共表达，提示这一对信号分子以自分泌或邻分泌机制传递信号，在肿瘤和相关疾病中具有重要的病理学和临床意义。我们的研究表明当 M-CSF 发挥抑制作用的时候，M-CSF 受体 mRNA 的表达有所下降，这提示了 M-CSF 的抑制作用可能是通过干扰了肿瘤细胞的自分泌机制而发挥作用的。葛平江等[8]报道 M-CSF 对喉癌细胞 Hep-2 细胞具有抑制作用时也发现，在肿瘤细胞培养液中加入低浓度的 M-CSF 培养后，培养上清的 M-CSF 浓度会升高，而加入高浓度的 M-CSF 培养后，培养上清的 M-CSF 浓度会降低，提示肿瘤细胞对培养液中的 M-CSF 浓度有调节作用。这也说明了外源性添加 M-CSF 可以干扰肿瘤细胞的自分泌或邻分泌机制。

M-CSF 在许多恶性肿瘤的血清水平都异常升高，并且常于肿瘤分级成正相关。但本实验和许多研究都表明 M-CSF 又对体外培养的肿瘤细胞具有抑制作用。究竟 M-CSF 在肿瘤的发生、发展中起着怎样的作用，如何诱导 M-CSF 在体内发挥抑制肿瘤的作用，这些研究将是非常有意义的。更深入的对其作用机制的探讨也许可以为我们在肿瘤控制或治疗上提供新的方法。

**参考文献：**

[1] 王　昕，张　倩，宋玉华，等. 恶性细胞中巨噬细胞集落刺激因子及其受体的异源表达[J]. 中国实验血液学杂志，1998，6(1)：24－28.

[2] 刘磊玉，唐圣松. 巨噬细胞集落刺激因子与肿瘤[J]. 国外医学：肿瘤学分册，2005，32(7)：499－503.

[3] Mroczko B，Szmitkowski M. Macrophage-colony stimulating factor (M-csf) in diagnostic and monitoring of non-small-cell lung cancer (NSCLC)[J]. Pol Arch Med Wewn，2001，105(3)：203－209.

[4] Li Y，Chen B. Induction of macrophage colony-stimulating factor receptor up-regulation in THP-1 human leukemia cells is dependent on the activation of c-fyn protein tyrosine kinase[J]. Leuk Res，1997，21(6)：539－547.

[5] Kawakami Y，Nagai N，Ohama K，*et al*. Macrophage-colony stimulating factor inhibits the growth of human ovarian cancer cells in vitro[J]. Eur J Cancer，2000，36(15)：1991－1997.

[6] Dalton W S. The tumor microenvironment：focus on myeloma[J]. Cancer Treat Rev，2003，29(Suppl 1)：11－19.

[7] Ide H，Seligson D B，Memarzadeh S，*et al*. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(22)：14404－14409.

[8] 葛平江，张宝泉，张建民，等. 巨噬细胞集落刺激因子对喉鳞状细胞癌喉癌细胞株的作用[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2005，19(6)：265－268.

（编辑　王　红）