

# 重组人表皮生长因子对大鼠宫颈鳞状上皮细胞体外增殖的影响

张琳, 杨静\*, 张晶, 詹春  
(武汉大学医学院药理学系, 湖北 武汉 430071)

**摘要:** 目的 研究重组人表皮生长因子(rhEGF)是否促进大鼠宫颈鳞状上皮细胞(RCEC)增殖及有关机制。方法 分离培养 RCEC 并用免疫组织化学技术鉴定细胞纯度; MTT 法检测细胞增殖; 流式细胞术分析细胞周期; 逆转录聚合酶链反应检测细胞周期蛋白 D1(cyclin D1) mRNA 表达水平。结果 rhEGF 刺激 RCEC 的增殖呈时间及剂量依赖性, 且明显提高 S 期细胞分数。rhEGF 0.1, 1.0, 10 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  明显提高 cyclin D1 mRNA 表达, 以 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  于 d 3 的作用最强, 最高可达 50.7%。结论 rhEGF 对 RCEC 有促进增殖的作用, 其机制与增强 cyclin D1 mRNA 表达, 以及刺激细胞从 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期有关。

**关键词:** 表皮生长因子; 宫颈疾病; 鳞状上皮; 细胞培养; 细胞周期蛋白 D1

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)03-0214-06

复层鳞状上皮与宫颈柱状上皮移行处是宫颈癌好发部位, 而且该区域的复层鳞状上皮细胞的增殖和分化状态与宫颈糜烂和宫颈癌密切相关<sup>[1]</sup>, 因此, 研究宫颈鳞状上皮细胞增殖和分化的影响因素, 有利于阐明宫颈糜烂和宫颈癌的发病机制。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)广泛存在于人体多种组织及体液中, 与其受体(EGFR)结合可促进细胞的增殖和分化。研究表明 EGF 在生殖系统如子宫、卵巢、胎盘中表达, 近年来免疫组织化学技术证实 EGFR 也存在于人宫颈鳞状上皮<sup>[2]</sup>, 提示 EGF

及 EGFR 可能对宫颈鳞状上皮的增殖和分化有重要的调节作用。本文研究重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)对大鼠宫颈鳞状上皮细胞(rat cervical epithelial cells, RCEC)体外增殖的影响, 为深入探讨宫颈糜烂和宫颈癌的发病机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

rhEGF 由武汉百科基因有限公司提供, 纯度 > 98%, 比活性 >  $1 \times 10^9$  IU·g<sup>-1</sup>; 胰蛋白酶(trypsin), Difco 产品; 胶原酶 I 型(collagenase type I), Worthington 产品; 二乙胺四乙酸四钠盐(ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA), Amresco 产品; 转铁蛋白(transferrin)和霍乱毒素, Sigma 产品; RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum)和 Trizol 试剂盒, Gibco 公司产品; 小鼠抗大鼠细胞角蛋白多抗, Santa Cruz 产品; 小鼠抗大鼠波形蛋白(vimentin)单抗, 武汉博士德公司产品; 小牛血清, 杭州四季青公司产品、氢化可的松, 扬州制药有限公司产品, 胰岛素, 中美合资沈阳济世制药有限公司产品。

### 1.2 动物

SD 大鼠, ♀, 体重 40~50 g, 由武汉大学实验动物中心提供。动物许可证号, SYXK(鄂)2003-0004, SPF 级。

### 1.3 细胞分离和培养

参照文献[3]稍加改良。处死大鼠, 取宫颈部位的组织剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块, 用无菌 Hanks 平衡液(含 15 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, 青霉素 100 kU·L<sup>-1</sup>, 链霉素 100 mg·L<sup>-1</sup>, 两性霉素 B 0.25 mg·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)洗涤 3 次, 0.1% 胶原酶(189 kU·L<sup>-1</sup>) 在 37℃ 消化 50 min, 然后用 0.2% 胰蛋白酶 37℃ 消化 20 min, Hanks 平衡液洗涤 2 次, 用生长培养基悬浮, 将来自 2 个动物的宫颈组织接种于 60 mm 培养皿中, 在 34℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。生长培养基为 A 和 B

收稿日期: 2004-07-21 接受日期: 2005-01-28

作者简介: 张琳(1979-), 女, 药理学硕士研究生, 主要从事药物作用的分子机制研究; 杨静(1964-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为分子药理。

\* 联系作者 E-mail: yangjingliu@yahoo.com.cn Tel: (027)68758665

(1:1)两部分组成,A和B成分如下。

(A) 24 h 条件培养基: DMEM 培养基(含 10% FBS)培养 Swiss 3T3 细胞 24 h 后的培养基; (B) 宫颈上皮细胞培养基(cervical epithelial growth medium, CEGM): 由 HamF12 和 RPMI-1640(1:1) 组成,再添加 7.5% 猪血清、胰岛素( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、转铁蛋白( $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、氢化可的松( $6.5 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、霍乱毒素( $0.1 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、牛脑提取物( $150 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

3 d 后,弃去培养基,用 D-Hanks 轻轻漂洗除去组织碎片。然后加入 CEGM 培养,当细胞达到融合后,先用 D-Hanks 漂洗 1 h,然后加入 0.025% 胰蛋白酶和  $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA(1:1)消化,用 CEGM 重新悬浮,然后接种到预先铺有胶原凝胶(参照 Elsdale 等<sup>[4]</sup>方法预先制备)的 100 mm 培养皿上。此二代培养物可以传代,先添加 0.1% 胶原酶 0.005 L 在  $34^\circ\text{C}$  孵育直到胶原完全液化(约 1 h),用 D-Hanks 洗涤细胞悬液,再用 0.025% 胰蛋白酶与  $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA(1:1)在  $37^\circ\text{C}$  消化 10 min,细胞悬液经洗涤后重新悬浮在 CEGM 中,接种于预先铺有胶原凝胶的培养板,实验用第 2~3 代细胞。台盼蓝检测细胞活率大于 95%,细胞纯度鉴定采用免疫组化 SABC 法,将生长有细胞的盖玻片从培养板中取出,丙酮固定,以小鼠抗大鼠细胞角蛋白多抗为一抗,二氨基联苯胺(DAB)显色,胞浆被染成棕黄色者为阳性,实验同时设立阴性对照。显微镜下观察显色结果,细胞阳性率达 95% 以上。

#### 1.4 药物作用

在上述培养基中分别加入不同浓度的 rhEGF 为实验组,添加等容积的生理盐水为对照组,进行 MTT 试验,观察浓度效应和时间效应;在上述实验结果的基础上,选择 rhEGF 效应最大的时间收集各组细胞,进行流式细胞仪分析和 RT-PCR 测定。

#### 1.5 MTT 比色法观察细胞增殖

将细胞悬液调到  $1\times 10^9 \text{L}^{-1}$ ,接种于 96 孔培养板中,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,培养液不含小牛血清。分别加入 rhEGF  $100 \mu\text{L}$ ,使终浓度为 0.01,0.1,1.0,10 和  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,另设阴性对照孔以生理盐水代替 rhEGF,每种处理设 3 个复孔,分别培养 24,48,72 h,在培养终止前 4 h 各孔加入  $5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT  $10 \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,去上清,每孔加入二甲基亚砷  $200 \mu\text{L}$ 。将 96 孔培养板在振荡器上振荡 5 min,用酶标仪测定吸光度( $A_{570 \text{nm}}$ )值。

选择促进 RCEC 体外增殖最强的 rhEGF 浓度,

分别培养 1~5 d,用 MTT 法测定细胞增殖。

#### 1.6 流式细胞仪分析

细胞浓度同 MTT,接种在 30 mL 培养瓶中,分别加入 rhEGF,终浓度、培养时间同 MTT 法,培养液不含小牛血清。培养结束后,细胞用 PBS 洗涤,70% 冷酒精固定过夜。500 目滤网过滤,碘化丙啶(propidium iodide, PI,  $100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )染色 30 min。流式细胞仪分析细胞周期。用 MultiCycle for Windows 软件分析。

#### 1.7 RT-PCR 测定细胞周期蛋白 D1 mRNA 表达水平

细胞浓度同 MTT,接种在 30 mL 培养瓶中,分别加入 rhEGF,终浓度、培养时间同 MTT 法,培养液不含小牛血清。培养结束后,细胞用 PBS 洗涤,细胞总 RNA 按 Trizol 法制备,电泳分析表明 5,18 及 28 S 条带清晰可见,总 RNA 片段完整未降解。细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、内对照( $\beta$ -肌动蛋白,  $\beta$ -actin)引物设计和 RT-PCR 反应建立参照文献<sup>[5]</sup>,稍加改动。RT-PCR 产物经 1.25% 琼脂糖凝胶电泳分离并与 DNA 分子量标准(50 bp DNA 梯带, Gibco)比较鉴定。用 UVP 公司透射扫描仪进行电泳条带峰体积定量测定。以  $\beta$ -肌动蛋白 RT-PCR 产物为内对照,计算 cyclin D1 与  $\beta$ -肌动蛋白基因扩增条带峰体积的比值,作为 cyclin D1 mRNA 表达的相对水平。

选择具有最大促增殖效应的 rhEGF 浓度,分别培养 1~5 d。

#### 1.8 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析。

## 2 结果

#### 2.1 rhEGF 对大鼠宫颈上皮细胞增殖的影响

rhEGF( $0.1 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )浓度依赖性促进大鼠宫颈上皮细胞增殖,浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 3 d 达到最大促增殖效果(表 1,2)。

流式细胞仪分析结果显示,与对照组相比, rhEGF  $0.1 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 3 d,  $G_0/G_1$  期细胞百分比明显减少, S 期细胞分数明显增高,表明 rhEGF 能刺激 RCEC 由  $G_0/G_1$  期进入 S 期,使分布在 S 期的细胞数增加(表 3 和图 1)。

#### 2.2 rhEGF 对细胞周期蛋白 D1 mRNA 表达的影响

rhEGF 0.1,1.0,10 和  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度依赖性增加 cyclin D1 mRNA 表达,与对照组相比差异具有统计学意义。rhEGF  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 1 d, cyclin D1 mRNA

表达即增加,于 d 2 达高峰,结果见表 4,表 5 和图 2。

**Tab 1. Accelerative effect of recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) of various concentration on rat cervical epithelial cells proliferation**

rhEGF/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{570\text{ nm}}$	Accelerative effect/%
Control	$0.41 \pm 0.07$	—
0.01	$0.46 \pm 0.08$	12.5
0.1	$0.55 \pm 0.08^*$	36.1
1	$0.58 \pm 0.10^{**}$	41.3
10	$0.64 \pm 0.14^{**}$	56.8
100	$0.60 \pm 0.11^{**}$	48.4

Rat cervical epithelial cells (RCEC) were treated with rhEGF in cervical epithelial growth medium (CEGM) without calf serum and cultured for 72 h. In control group, rhEGF was substituted with saline solution.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the control group.

**Tab 2. Accelerative effect of  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  rhEGF added in culture for different time on rat cervical epithelial cells proliferation**

Incubation time/d	$A_{570\text{ nm}}$	Accelerative effect/%
1	$0.44 \pm 0.07$	10.1
2	$0.54 \pm 0.09^*$	34.4
3	$0.61 \pm 0.10^{**}$	52.0
4	$0.59 \pm 0.14^{**}$	47.5
5	$0.50 \pm 0.09$	26.6

See Tab1 for the medium.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the  $A_{570}$  value of control group on d 1 ( $0.398 \pm 0.066$ ).

**Tab 3. Influence of rhEGF of various concentration on rat cervical epithelial cell cycle**

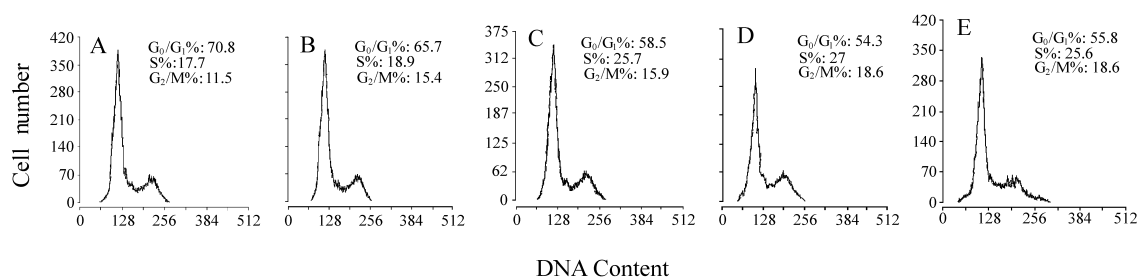
rhEGF/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$ /%	S /%	$G_2/M$ /%
Control	$68.5 \pm 2.6$	$18.0 \pm 2.4$	$13.5 \pm 2.0$
0.1	$63.6 \pm 3.2$	$23.0 \pm 3.0^*$	$13.5 \pm 2.4$
1	$61.7 \pm 2.9^*$	$24.6 \pm 3.0^{**}$	$13.7 \pm 2.6$
10	$57.0 \pm 2.8^{**}$	$26.6 \pm 5.4^{**}$	$16.4 \pm 1.9$
100	$58.4 \pm 2.9^{**}$	$25.3 \pm 5.1^{**}$	$16.5 \pm 2.1$

RCEC were seeded into the 30 mL culture bottle at a density of  $1 \times 10^9\ \text{L}^{-1}$  in CEGM containing 0.1, 1.0, 10 and  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  rhEGF but not calf serum and cultured for 72 h. DNA was measured by flow cytometry. In control group, rhEGF was substituted with saline solution.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group.

**Tab 4. Effect of rhEGF of various concentration on expression of cyclin D1 mRNA in rat cervical epithelial cells cultured for 72 h**

rhEGF/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$10^{-2} \times$ Relative level of mRNA expression	Accelerative effect /%
Control	$0.71 \pm 0.06$	—
0.1	$0.91 \pm 0.07^*$	28.2
1	$0.97 \pm 0.13^*$	36.6
10	$1.07 \pm 0.11^{**}$	50.7
100	$0.96 \pm 0.13^*$	35.2

See Tab 1 for the medium. Relative level of mRNA expression = the ratio of peak volumes(cyclin D1:  $\beta$ -actin).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group.

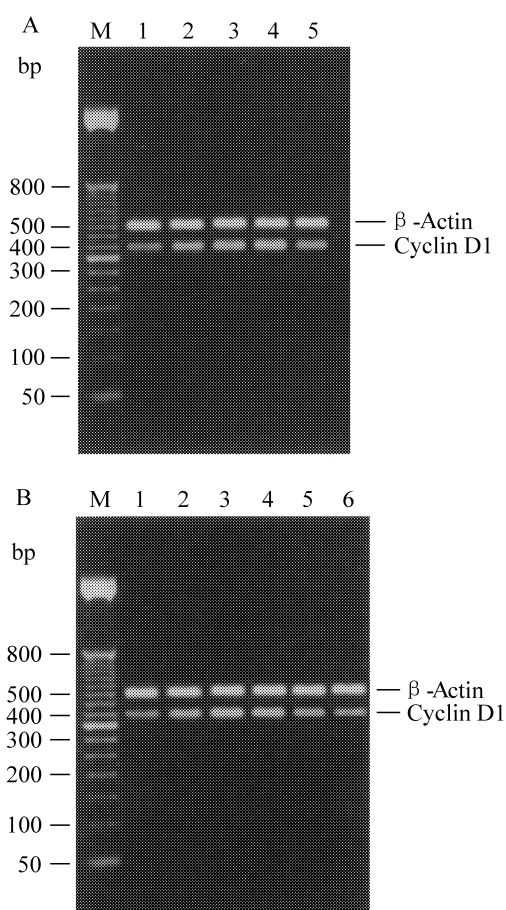


**Fig 1. Flow cytometric analysis of rhEGF with various concentration on rat cervical epithelial cell cycle.** See legend of Tab 3 for cell treatments. (A) Control group. (B,C,D,E) rhEGF 0.1, 1.0, 10 and  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

**Tab 5. Effect of  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  rhEGF added in culture for different time on expression of cyclin D1 mRNA in rat cervical epithelial cells**

Incubation time /d	$10^{-2} \times$ Relative level of mRNA expression	Accelerative effect /%
1	$0.90 \pm 0.05^*$	26.8
2	$1.03 \pm 0.13^{**}$	45.1
3	$1.06 \pm 0.15^{**}$	49.3
4	$0.88 \pm 0.07^*$	23.9
5	$0.84 \pm 0.04$	—

See Tab 1 for the medium.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the relative expression level ( $71 \pm 6$ ) of control group.



**Fig 2. Effect of rhEGF on the expression of cyclin D1 mRNA determined by RT-PCR in rat cervical epithelial cells.** (A) Lane 1: control group. Lanes 2–5: rhEGF  $0.1, 1, 10$ , and  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 72 h, respectively. M: Marker. (B) Lane 1: control group. Lanes 2–6: rhEGF  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 1, 2, 3, 4 and for 5 d, respectively. M: Marker.

### 3 讨论

EGF最初是Cohen等于1962年提取鼠颌下腺神经生长因子过程中发现的一种多肽生长因子,后来研究发现,EGF能促进表皮细胞的增殖,但对宫颈鳞状上皮的作用未见报道。生长因子对细胞增殖的调节往往涉及细胞周期调控,EGF作用的发挥主要依赖于Grb2/SOS/Ras/Raf/ERK通路的激活<sup>[6,7]</sup>,此通路一旦被活化,丝裂原活化蛋白激酶便从胞液进入胞核并诱导c-fos, c-myc和cyclin D1等转录因子的表达<sup>[8]</sup>。cyclin D1是细胞周期限速点G<sub>1</sub>/S转换中的关键蛋白质,它可通过激活CDK4或CDK6,介导Rb蛋白磷酸化,驱动细胞进入S期,发挥加速细胞增殖的正性调节作用。本研究首次证实, rhEGF明显刺激大鼠宫颈鳞状上皮细胞增殖和cyclin D1 mRNA表达,且S期细胞分数升高;其中, cyclin D1 mRNA表达于培养d 1即可显著增加,比出现明显促增殖效应的时间提前了1 d,因此,推测rhEGF可能是通过增强cyclin D1 mRNA表达,刺激细胞从细胞周期的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>向S期转化,从而促进宫颈鳞状上皮细胞的增殖。

近年来研究表明,原癌基因在组织再生、创伤愈合等引起细胞增殖反应的过程中被激活并参与细胞的增殖与分化,与组织修复密切相关<sup>[9]</sup>。其中,生长因子类在损伤修复中的作用日益受到人们的重视,EGF的作用尤为重要,它可促进表皮细胞和成纤维细胞的增殖与分化,利于创面再上皮化。付小兵等<sup>[10]</sup>的研究结果认为,EGF可通过诱导皮肤干细胞的增殖与分化加速受创表皮的再生修复,在组织重建中起重要作用。宫颈糜烂实为腺性糜烂,病变本质是宫颈移行处鳞状上皮转化为柱状上皮,常伴随炎症,糜烂的愈合有赖于鳞状上皮的再生和修复<sup>[1]</sup>。这种新生的鳞状上皮常呈片块状分布,且生长于炎性组织的基础上,故极易脱落而变薄,稍受刺激即又恢复糜烂,使得宫颈糜烂和宫颈愈合过程反复进行,极难痊愈。因此, rhEGF促进宫颈鳞状上皮细胞增殖的作用,可能有利于加速宫颈糜烂面的再表皮化。

文献报道, cyclin D1是一种原癌基因产物,与多种肿瘤如乳腺癌、前列腺癌的发生和发展关系密切<sup>[11,12]</sup>。目前已公认,人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌的主要致病因子<sup>[13]</sup>, HPV感染时, cyclin D1基因被激活、扩增及重组,使

细胞增殖失控而导致宫颈癌的发生和发展<sup>[14]</sup>。另有报道 EGF 明显增加 SiHa 宫颈癌细胞 HPV-16 E6/E7 蛋白表达<sup>[15]</sup>, EGFR 在 HPV-16 永生化的人宫颈上皮 ECE-16 细胞系中表达显著增加<sup>[16]</sup>。本实验结果显示, rhEGF 明显增加 cyclin D1 mRNA 表达, 提示 EGF, HPV 和 cyclin D1 对宫颈癌的发生发展具有一定的作用, 具体有待进一步研究。

#### 4 参考文献:

- [1] Tang SE. The relationship of cervical reserve cell with cervical erosion and carcinogenesis[J]. *J Beijing Med Univ*(北京医科大学学报), 1993, **25**(1):59-61.
- [2] Ngan HY, Liu SS, Yu H, Liu KL, Cheung AN. Proto-oncogenes and P53 protein expression in normal cervical stratified squamous epithelium and cervical intra-epithelial neoplasia[J]. *Eur J Cancer*, 1999, **35**(10):1546-1550.
- [3] Wright TC Jr, Nahabedian C. Growth requirements and characterization of rat cervical epithelial cells in culture[J]. *J Cell Physiol*, 1986, **126**(1):10-20.
- [4] Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior[J]. *J Cell Biol*, 1972, **54**(3):626-637.
- [5] Kawanaka H, Tomikawa M, Baatar D, Jones MK, Pai R, Szabo IL, et al. Despite activation of EGF-receptor-ERK signaling pathway, epithelial proliferation is impaired in portal hypertensive gastric mucosa: relevance of MKP-1, c-fos, c-myc, and cyclin D1 expression[J]. *Life Sci*, 2001, **69**(25-26):3019-3033.
- [6] Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity[J]. *Cell*, 1990, **61**(2):203-212.
- [7] Marques MM, Martinez N, Rodriguez-Garcia I, Alonso A. EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT[J]. *Exp Cell Res*, 1999, **252**(2):432-438.
- [8] Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G<sub>1</sub> phase progression in proliferating hepatocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(9):6003-6011.
- [9] Iwata A, Masago A, Yamada K. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA after transient focal ischemia: comparison with expression of c-fos, c-jun, and hsp-70 mRNA[J]. *J Neurotrauma*, 1997, **14**(4):201-210.
- [10] Fu XB, Sun XQ, Sun TZ, Dong YH, Gu XM, Chen W, et al. Epidermal growth factor stimulates tissue repair in skin through skin stem cell activation[J]. *Chin J Repair Reconstr Surg*(中国修复重建外科杂志), 2002, **16**(1):31-35.
- [11] Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 1994, **57**(3):353-361.
- [12] Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. The prognostic significance of p34cdc2 and cyclin D1 protein expression in prostate adenocarcinoma[J]. *Cancer*, 1997, **80**(4):753-763.
- [13] Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. *Eur J Cancer*, 2001, **37**(2):246-250.
- [14] Kurzrock R, Ku S, Talpaz M. Abnormalities in the PRAD1 (cyclin D1/BCL-1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Cancer*, 1995, **75**(2):584-590.
- [15] Peto M, Tolle-Ersu I, Kreysch HG, Klock G. Epidermal growth factor induction of human papillomavirus type 16 E6/E7 MRNA in tumor cells involves two AP-1 binding sites in the viral enhancer[J]. *J Gen Virol*, 1995, **76**(Pt 8):1945-1958.
- [16] Sizemore N, Rorke EA. Human papillomavirus 16 immortalization of normal human ectocervical epithelial cells alters retinoic acid regulation of cell growth and epidermal growth factor receptor expression[J]. *Cancer Res*, 1993, **53**(19):4511-4517.

## Effect of recombinant human epidermal growth factor on rat cervical epithelial cells proliferation *in vitro*

ZHANG Lin, YANG Jing\*, ZHANG Jing, ZHAN Chun

(Department of Pharmacology, Medical School, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** **AIM** To study if recombinant human epidermal growth factor(rhEGF) promotes rat cervical epithelial cells(RCEC) proliferation *in vitro* and its mechanism. **METHODS** Cultured RCEC were isolated from rat and the cell purity was evaluated by immunohistochemical technique. The proliferation of RCEC was detected by MTT assay and flow cytometry. The cyclin D1 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction. **RESULTS** rhEGF stimulated RCEC proliferation in a time- and concentration-dependent manner and increased the S-phase cells fraction. rhEGF 0.1, 1.0, 10 and 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  obviously increased cyclin D1 mRNA expression,

and the time course revealed that the accelerative effect reached the maximum at the concentration of 10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  on d 3, with an increase of 50.7%. **CONCLUSION** rhEGF promotes RCEC proliferation, possibly by increasing cyclin D1 mRNA expression and stimulating the progression of RCEC into S phase.

**Key words:** epidermal growth factor; cervix diseases; squamous epithelium; cell culture; cyclin D1

\* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)

## 会 议 消 息

中国毒理学会军事毒理专业委员会与总后卫生部科委防化医学专业委员会, 决定于2005年9月中旬在东北联合召开中国毒理学会军事毒理专业委员会第六届学术交流会暨全军防化专业委员会学术研讨会。

**会议主题:** 反化学恐怖袭击相关毒理学及化学事故的紧急处置

**征文内容:** 包括中毒机理、毒性评价、毒物代谢动力学、抗毒药的研究、中毒救治经验、安全评价、现场调查、卫勤保障及卫生标准制订等。

1. 化学防护毒理学及防化医学。
2. 有机磷农药、氯气、氨气、光气、氮氧化合物、一氧化碳和氰化物等工业毒物的毒理学。
3. 火箭推进剂、军用燃料及其添加剂、炸药、军用涂料及粘合剂等军事工业毒物的毒理学。
4. 航天、航空、航海毒理学。
5. 阵地、工事、坑道、场区和舱室等军事环境中有害物质毒理学。
6. 放射毒理学。
7. 法医毒理学。
8. 毒理学新理论、新技术、新方法及其他毒理学相关内容。

**收稿截止日期:** 2005年6月30日。欢迎通过电子邮件投稿。

**E-mail 地址:** smt\_6thmeeting@sina.com

**邮寄地址:** 北京市海淀区太平路27号军事医学科学院毒物药物研究所 邮编: 100850

**联系电话:** (010)66931630/66930754

**联系人:** 郭巧珍, 关勇彪