

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.008

· 临床研究 ·

集落刺激因子1受体介导Bax和Bcl-2表达对人鼻咽癌6-10B细胞凋亡的影响

陈嘉羽^{1,2}, 蒿艳蓉^{2Δ}, 陈甲信^{2Δ}, 黄俐², 敖雯² (1. 武汉大学人民医院 肿瘤科, 湖北 武汉 430060; 2. 广西壮族自治区人民医院 化疗一区, 广西 南宁 530021)

[摘要] **目的:** 研究过表达集落刺激因子1受体(colony stimulating factor-1 receptor, CSF-1R)对人鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)6-10B细胞凋亡的抑制作用及其与Bax和Bcl-2表达之间的关系。**方法:** 体外利用慢病毒构建的CSF-1R过表达载体LV-CSF1R(16957-1)转染到人鼻咽癌6-10B细胞中, 实验分转染组和对照组; 采用实时荧光定量PCR及Western blotting检测转染后两组细胞中CSF-1R、Bcl-2、Bax的表达情况; CCK-8法检测两组细胞活力; 流式细胞术检测两组细胞凋亡情况。**结果:** 转染组的6-10B细胞中其CSF-1 mRNA表达水平明显高于对照组(7.01 ± 0.23 vs 0.09 ± 0.03 , $P < 0.01$); Bax的mRNA表达水平显著下调($P < 0.01$), 而Bcl-2的mRNA表达水平显著上调($P < 0.01$)。转染组的6-10B细胞中CSF-1的蛋白表达水平明显高于对照组; Bax的蛋白表达水平显著下调, 而Bcl-2的蛋白表达水平稍上调。与对照组相比, 转染组6-10B细胞的活力明显提高($P < 0.01$); 凋亡率显著降低[(10.82 ± 0.75)% vs (17.11 ± 0.46)%, $P < 0.05$]。**结论:** 过表达CSF-1R可以通过调节Bax/Bcl-2之间的比例关系来促进鼻咽癌6-10B细胞的恶性生长, 并抑制细胞凋亡。

[关键词] 集落刺激因子1受体; Bax; Bcl-2; 鼻咽癌; 细胞凋亡

[中图分类号] R73-36+2; R735.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2017)012-1207-05

Colony stimulating factor-1 receptor-mediated Bax/Bcl-2 expression inhibits apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship of Colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) over-expression and Bax/Bcl-2 expression in human nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells. **Methods:** The 6-10B cells were transfected with CSF-1R lentiviral vector LV-CSF1R(16957-1). The expression of CSF-1R, Bcl-2, Bax was detected by Real-time PCR and Western blotting. CCK-8 assay and flow cytometry (FCM) were used to detect the cell activity and apoptosis. **Results:** The expression of CSF-1R at mRNA and protein levels was increased significantly in the 6-10B cells compared with negative control (NC) group ($P < 0.01$). The expression of Bax at mRNA and protein levels was significantly down-regulated compared with the negative control groups ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 at mRNA level was significantly up-regulated ($P < 0.01$), but the expression at protein level shows a slight increase. The activity of 6-10B cells were extremely increased after transfected with CSF-1R ($P < 0.01$). The apoptotic changes between transfected group and NC group were observed using FCM. **Conclusion:** Over-expression of CSF-1R significantly promotes the growth and inhibits the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells by down-regulating the expression of Bax and increasing Bcl-2.

[Key words] colony stimulating factor-1 receptor; bax; bcl-2; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1386-1391. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.008]

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81260348)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81260348)

[作者简介] 陈嘉羽(1992-), 女, 湖北武汉人, 研究生, 主要从事鼻咽癌综合治疗的研究, E-mail: 834972786@qq.com

[通信作者] 蒿艳蓉(HAO Yanrong, corresponding author), 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事恶性肿瘤临床及基础的研究工作, E-mail: 282174944@qq.com; 陈甲信(CHEN Jiixin, co-corresponding author), 医学硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事鼻咽癌的放射治疗、肿瘤放疗敏感性及与正常组织放射损伤研究工作, E-mail: cjl166@yahoo.com.cn。Δ为共同通信作者

鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 又称“广东癌”, 是中国广东、广西等地区最常见的头颈部恶性肿瘤, 其5年生存率不高于70%^[1]。放射治疗是NPC主要的治疗方式, 但放疗抵抗是其局部复发和远处转移的根源^[2]。研究^[3-4]表明巨噬细胞集落刺激因子-1/巨噬细胞集落刺激因子-1受体(colony stimulating factor-1/colony stimulating factor-1 receptor, CSF-1/CSF-1R)在各种恶性肿瘤中高表达, 在一些恶性肿瘤中, 循环血液中CSF-1R的表达量也被定义为肿瘤标志物^[5]。CSF-1R是一种由972个氨基酸残基组成的单链穿膜糖蛋白, 参与并促进肿瘤的发生发展, NPC组织中CSF-1R表达越强的患者越容易发生复发和转移^[6]。通过DNA芯片检测发现, CSF-1R在放疗抵抗型病人组织中表达上调, 在放疗敏感型病人组织中表达下调, 且表达水平差异达4.1倍^[7]。NPC是一种多基因多阶段侵袭性疾病, 有一定的遗传倾向, 这可能和癌基因的激活与抑癌基因的失活所引起的细胞抗凋亡有关^[8], 其中B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族在细胞凋亡的分子调控中占有重要地位。

本研究通过用携带CSF-1R基因的慢病毒载体转染人NPC6-10B细胞, 观察转染后细胞CSF-1R、Bcl-2、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 Associated X protein, BAX)表达及细胞增殖及凋亡能力的变化, 探讨CSF-1R对人NPC6-10B细胞抗凋亡作用的相关机制, 揭露NPC放疗抵抗的可能原因, 寻找NPC新的特异性治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人鼻咽癌6-10B细胞株获赠于中山大学肿瘤实验中心, 用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液在5%CO₂的37℃的恒温培养箱中培养(每2天更换一次培养液)。RPMI1640培养基购自Life Technologies公司, 胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司, PBS缓冲液购自Thermo公司, CCK-8试剂盒及ECL发光试剂盒均购自碧云天公司, 总RNA抽提试剂TRIzol购自美国Invitrogen公司, 转染慢病毒LV-CSF1R(16957-1)及空白对照慢病毒购自上海吉凯基因有限公司, cDNA第一链合成试剂盒和RealMasterMix(SYBR Green)荧光定量PCR试剂盒购自天根生化试剂公司, CSF 1R多克隆兔抗(#3152)、bcl-2单克隆兔抗(#4223)、山羊抗兔IgG二抗(#7074)均购自CST公司, Bax单克隆兔抗(ab32124)、GAPDH单克隆兔抗(ab181602)购自abcam公司, Annexin V-APC/7-AAD凋亡试剂盒购自KeyGEN BioTECH公

司。

1.2 CSF-1R过表达慢病毒载体转染NPC6-10B细胞

CSF-1R慢病毒载体由上海吉凯基因有限公司构建, 病毒携带增强型绿色荧光蛋白(eGFP)。磷酸平衡盐溶液用于稀释病毒并分装, 分装的病毒液浓度为 5×10^8 TU/ml。吉凯基因慢病毒载体系统由GV慢病毒载体系列、pHelper 1.0载体和pHelper 2.0载体三质粒组成。已知6-10B细胞病毒感染的MOI=100, 并将病毒液稀释至浓度为 1×10^8 TU/ml备用。根据吉凯基因慢病毒使用手册说明提供的资料进行转染。用完全培养基制备密度为 4×10^4 个/ml的细胞悬液, 取2 ml接种至6孔板中, 培养24 h后更换培养基。向6孔板中加入800 μ l新鲜培养基与浓度为 1×10^8 TU/ml病毒液200 μ l, 混匀后感染12 h, 换回常规培养基继续培养48 h。于感染72 h后利用荧光显微镜检测eGFP的表达量判定感染效率, 感染效率在80%左右时说明6-10B细胞CSF-1R慢病毒载体转染成功, 作为转染组(transfection group)进行下一步实验, 仅转染慢病毒空载体的鼻咽癌6-10B细胞为对照组(mock group), 未转染病毒的6-10B细胞为空白对照组(negative control group, NC group)。

1.3 Realtime PCR检测转染后细胞中CSF-1R、Bcl-2、Bax的相对表达情况

3组细胞经6孔板培养48 h后, 胰蛋白酶处理制成细胞悬液, 用细胞计数板计数细胞后, 取含有 2×10^6 个细胞的细胞悬液转移至RNase-Free的离心管中, 用TRIzol提取各组6-10B细胞的总RNA, 紫外分光光度计下测A260/A280比值处于1.8~2.1之间的RNA即符合纯度要求。取1 μ g总RNA进行逆转录反应, 按照FastQuant RT试剂盒(TIANGEN, Beijing, China)说明书配制miRNA逆转录液合成cDNA, 按照Super Real Pre Mix Plus SYBR Green PCR试剂盒说明书配制25 μ l realtime PCR反应体系: 2 μ l cDNA、12.5 μ l 2 \times SYBR[®]Premix Ex Taq TM II(TliRNaseH Plus)、8.5 μ l双蒸水、每对引物(10 μ mol/L)1.0 μ l。每个样本设3个复孔。PCR反应步骤为95 $^{\circ}$ C 15min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共40个循环, 并以GAPDH作为内参照。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行分析。应用Primer5.0引物设计软件设计引物(表1), 并由Life Technologies公司合成。

1.4 Western blotting检测CSF-1R、Bax和Bcl2蛋白表达情况

RIPA裂解液(Biyotime Biotechnology Co., Ltd.)与蛋白酶抑制剂cocktail按100:1进行混合用于提取各组细胞蛋白, 冰上裂解30分钟, 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g离心20分钟收集上清液, 后按5:1比例加入SDS上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ C煮沸5 min。按顺序加样, 电泳

分离,湿转法,250 mA的恒流进行转膜约1.5 h,将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉常温封闭1.5 h, TBST充分洗膜,加特异性一抗:CSF 1R多克隆兔抗(1:1 000;#3152,CST),bcl-2单克隆兔抗(1:1 000;#4223,CST),Bax单克隆兔抗(1:2 000;ab32124,abcam)和GAPDH单克隆兔抗(1:1 000;ab181602,abcam)。放置于4℃孵育过夜,后加入山羊抗兔IgG二抗(1:3 000,CST),37℃孵育1.5 h。TBST充分洗膜后,加入ECL发光液反应1 min,随后进行显影。

表1 Real time PCR 基因引物
Tab. 1 Primers of Real time PCR

Gene	Primers' sequence
CSF-1R	F:5'-TCTGGTCCTATGGCATCCTC-3'
	R:5'-GATGCCAGGGTAGGGATTC-3'
Bcl-2	F:5'-GTGACTTCCGATCAGGAAGG-3'
	R:5'-CTTCCAGACATTCGGAGACC-3'
Bax	F:5'-AGTAACATGGAGCTGCAGAGG-3'
	R:5'-ATGGTTCTGATCAGTTCCGG-3'
GAPDH	F:5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	R:5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'

1.5 CCK-8 法检测转染后的细胞活力

6-10B细胞及转染后6-10B细胞按照 10^4 个/孔分别接种于96孔板,每个样本设5个复孔。于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中培养,使细胞贴壁贴壁。分别于接种后24、48、72 h在超净台中避光加入CCK-8,每孔10 μl,加好后轻轻敲击培养板以帮助混匀。继续放入恒温孵育箱培养1~2 h后用酶标仪测定450 nm波长下的光密度(D)值。

1.6 流式细胞术测凋亡

将各组细胞接种至六孔板,使每孔的数量大致均一,培养至细胞汇合率80%~90%,使用不含EDTA的胰酶消化细胞,洗涤后用1×结合缓冲液重悬细胞使细胞浓度达 1×10^6 个/ml。取100 μl至流式管,1~6号管加入感染细胞悬液,1号管加入100 μl缓冲液,2号管加入100 μl缓冲液+5 μl Annexin V-APC,3号管加入100 μl缓冲液+5 μl 7-AAD,4-6号管加入100 μl缓冲液+5 μl Annexin V-APC+5 μl 7-AAD;7-9号管加入未感染细胞悬液,100 μl缓冲液+5 μl Annexin V-APC+5 μl 7-AAD。常温避光孵育15 min,最后上机检测,收集数据。

1.7 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料多组间比较采用单因素方差分

析(one-way ANOVA),两组间比较时采用T检验,率的比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染情况

如图1,用带有eGFP的LV-CSF1R慢病毒转染液转染人NPC6-10B细胞72 h后,于荧光显微镜下拍照观察转染效率。

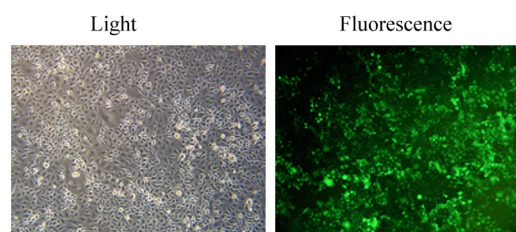
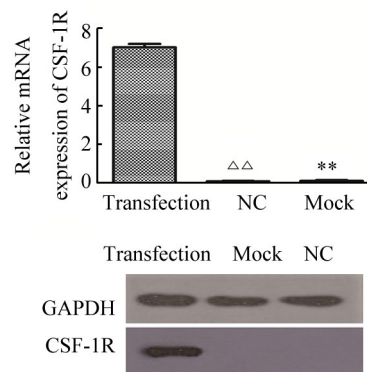


图1 荧光显微镜观察转染效率($\times 100$)

Fig. 1 Transfection efficiency was verified using a fluorescence microscope ($\times 100$)

2.2 CSF-1R在6-10B细胞中的表达情况

实时荧光定量PCR检测结果显示,转染后转染组CSF-1R mRNA表达量较NC组和Mock组呈明显上调趋势(7.04 ± 0.10 vs 0.10 ± 0.01 、 0.12 ± 0.02 , $P < 0.01$),蛋白水平也显著升高(图2)。



** $P < 0.01$ vs transfection group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs transfection group

图2 转染后NPC 6-10B细胞CSF-1R蛋白表达升高

Fig. 2 Expression of CSF-1R in human NPC 6-10B cells were increased after transfection

2.3 CSF-1R对Bax/Bcl-2 mRNA表达的影响

实时荧光定量PCR检测结果(图3)显示,转染组Bax mRNA表达量与NC组、Mock组相比明显下调,差异具有统计学显著性(12.12 ± 0.68 vs 40.64 ± 0.48 、 42.10 ± 0.61 , $P < 0.01$),而Bcl-2 mRNA表达量与NC组、Mock组相比明显上调,差异具有统计学显著性(15.23 ± 0.51 vs 5.13 ± 0.43 、 4.56 ± 0.33 , $P < 0.01$)。

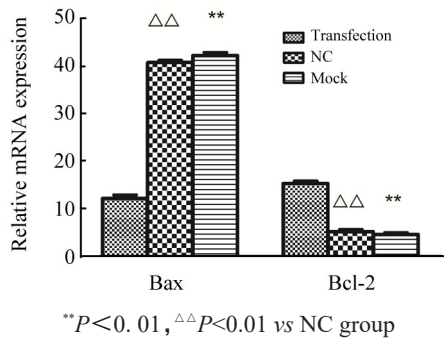


图3 过表达CSF-1R对人NPC 6-10B细胞Bax mRNA表达的影响

Fig.3 Effect of CSF-1R overexpression on the mRNA expression of Bax/Bcl-2 in human nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells

2.4 miRNA-7 对 Bax/Bcl-2 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图4)显示,转染组 Bcl-2的蛋白水平较NC组显著上调,而Bax 蛋白水平较NC组显著下调。

2.5 CSF-1R 促进6-10B 细胞活力

CCK-8 实验检测结果(图5)表明,转染后24 h,转染组D值开始显著高于NC组和Mock组($P<0.01$)转染组相比NC组而言有更强的增殖能力。

2.6 CSF-1R 抑制6-10B 细胞凋亡情况

流式细胞术检测结果(图6)显示,转染组6-10B 细胞凋亡率显著低于NC组[(10.82±0.75)% vs (17.11±

0.46)%], $P<0.05$],说明转染组的凋亡受到抑制。

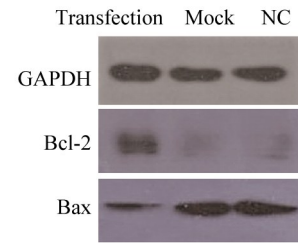
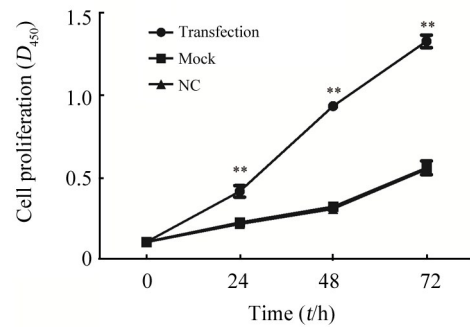


图4 CSF-1R 过表达对 NPC 6-10B 细胞对 Bax/Bcl-2 蛋白表达量的影响

Fig. 4 Effect of CSF-1R overexpression on the protein expression of Bax/Bcl-2 in human nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells



** $P<0.01$ vs NC or Mock group

图5 过表达 CSF-1R 促进6-10B细胞增殖

Fig. 5 CSF-1R overexpression increasing the proliferation of 6-10B cells

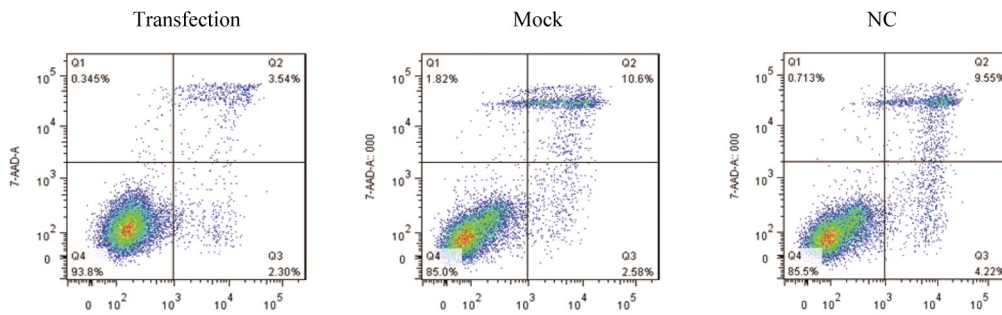


图6 过表达CSF-1R抑制6-10B细胞的凋亡

Fig. 6 CSF-1R overexpression inhibiting the apoptosis of 6-10B cells

3 讨论

虽然放射治疗在NPC治疗中取得了巨大成就,5年局部复发率约30%,30%~60%的患者仍会出现转移^[9]。NPC细胞对放射敏感性的差异导致其预后的不同。因此,为进一步探究NPC发展过程中的分子机制,揭露放疗抵抗的相关机制,为新型分子靶向治疗药物提供前期基础,本实验着手研究CSF-1R对

NPC细胞发生发展中的作用,以及其可能分子机制。

CSF-1R 是一种由972个氨基酸残基组成的单链跨膜糖蛋白,属于酪氨酸激酶型受体(receptor tyrosine kinases, RTK)^[10],在巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞和肿瘤细胞中都有表达,能过调节巨噬细胞的形态和运动、单核吞噬细胞的增殖和分化,还是炎症病灶的趋化因子,在免疫应答中发挥重要作用^[11]。在体内,CSF-1通过结合CSF-1R后发生自身磷酸化,并

激活其磷酸化激酶域。与此同时,配体、受体结合形成二聚体形式^[12]。然后,效应蛋白的酪氨酸残基磷酸化,引起巨噬细胞活化。被激活的单核巨噬系统可以通过许多途径促进肿瘤的发展。目前,已有多种研究表明CSF-1/CSF-1R在各种恶性肿瘤中高表达,如乳腺癌^[13],头颈恶性肿瘤^[14],卵巢癌^[15],平滑肌肉瘤^[16]和结肠癌^[17]。其机制可能为CSF-1R高表达促进了肿瘤新血管的形成^[18],并通过促进炎症反应加速肿瘤发展^[19]。Bcl-2抗凋亡蛋白和Bax促凋亡蛋白在NPC细胞凋亡调控过程中起到了重要作用。NPC细胞中,Bcl-2存在于细胞线粒体上,通过改变线粒体膜的通透性阻止细胞色素C的释放而发挥抗凋亡作用;Bax则通过与线粒体膜上Bcl-2结合形成同源二聚体,参与构成跨线粒体膜的孔道蛋白,从而降低跨膜电位引导细胞色素C的外流引起细胞凋亡^[20]。Bcl-2与Bax表达的平衡直接决定细胞是否凋亡,Bax及Bcl-2作为细胞内最重要的凋亡调控点之一,两者的相对比例是诱导细胞凋亡过程发生的关键因素^[21]。许多因素在诱导肿瘤细胞凋亡的同时伴有Bax表达升高以及Bcl-2表达的降低,说明Bax和Bcl-2与肿瘤细胞凋亡密切相关。例如,杨连君等^[22]发现分别将bcl-2和bax转染到白血病细胞中,发现转染bax的细胞凋亡率明显增加,并且对化疗的敏感性增强了,而转染bcl-2的细胞在相同化疗药物作用后的凋亡率明显减低了。因此,Bcl-2与Bax的比率(Bcl-2/Bax)是临床肿瘤预后的标志物之一^[23]。

本实验通过慢病毒转染技术上调6-10B细胞株中CSF-1R的表达量,发现转染组Bcl-2表达量上调而Bax表达量下调,并且CSF-1R的过表达使6-10B细胞株呈增殖活力增高而凋亡减少。证明CSF-1R很可能抑制了NPC细胞凋亡。这表明体外过表达CSF-1R可能通过调节Bcl-2和Bax直接的平衡关系,使Bcl上调处于优势地位,并使Bax下调处于劣势地位,进而打破6-10B细胞内线粒体结构和功能的稳定性,使NPC6-10B细胞的凋亡减慢,最终抑制肿瘤细胞凋亡坏死。

综上所述,体外过表达CSF-1R可以显著促进NPC细胞的生长,抑制细胞凋亡坏死,其作用机制可能与CSF-1R调节Bcl-2/Bax直接的平衡比例关系有关。

致谢 感谢广西壮族自治区人民医院科学实验中心的技术支持。感谢黄俐及敖雯师姐前期的实验数据分享。感谢中山大学肿瘤中心曾木圣教授赠予人鼻咽癌6-10B细胞株”。

[参考文献]

[1] 万仁强,傅向军,张学辉,等. miR-21在鼻咽癌中的表达及对鼻咽癌细胞株增殖及凋亡的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,

2015, 21(5): 377-382. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201505007.

- [2] GUO Y, ZHU X D. Identification of genes involved in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by integrating gene ontology and protein-protein interaction networks[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(1): 85-92. DOI: 10.3892/ijo.2011.1172.
- [3] CHITU V, STANLEY E R. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(1): 39-48. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.006.
- [4] 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[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 1918-1926. DOI:10.1158/0008-5472.
- [5] 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[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4162-4170. DOI:10.1158/0008-5472.
- [6] HUANG L, XU X M, HAO Y R. Overexpression of CSF-1R in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(4): 1279-1283.
- [7] YANG S, CHEN J, GUO Y, et al. Identification of prognostic biomarkers for response to radiotherapy by DNA microarray in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5): 1590-1600. DOI: 10.3892/ijo.2012.1341.
- [8] YOSHINORI N, CHIKAGE I, KUNIHITO Y, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins in invasive ductal carcinoma of the pancreas[J]. *Pancreas*, 2001, 22(3): 230-230. DOI:10.1097/0000676-200104000-00002.
- [9] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87- 108. DOI:org/10.3322/caac.21262.
- [10] PEYRAUD F, COUSIN S, ITALIANO A. CSF-1R inhibitor development:current clinical status[J]. *Curr Oncol Rep*, 2017, 19(11): 70. DOI:10.1007/s11912-017-0634-1.
- [11] YU W, CHEN J, XIOING Y, et al. Stanley ER.CSF-1 receptor structure/function in MacCsflr-/-macrophages:regulation of proliferation, defferetiation and morphology[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(3): 852-863. DOI:10.1189/jlb.0308171.
- [12] ALIGETI S, KIRMA N B, BINKLEY P A, et al. Colony-stimulating factor-1 exerts direct effects on the proliferation and invasiveness of endometrial epithelial cells[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(8): 2464-2466. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.03.026.
- [13] PIXLEY F J. Macrophage migration and its regulation by CSF-1[J]. *Int J Cell Biol*, 2012: 501962[2017- 09- 11]. <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2012/501962/>. DOI:10.1155/2012/501962.
- [14] GAZDAR A F, MINNA J D. Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2008, 1(3): 156-160. DOI:10.1158/1940-6207.
- [15] GRUENNER C, GRUENNER A, GLASER K, et al. Biomarkers and endosalpingiosis in the ovarian and tubal microenvironment of women at high-risk for pelvic serous carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(1): 61-72.

- [16] ESPINOSA I, EDRIS B, LEE C H, et al. CSF1 expression in non-gynecological leiomyosarcoma is associated with increased tumor angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 2100-2107. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.06.021
- [17] BACHIREDDY P, RAKHRA K, FELSHER D W. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: multiple roles for the immune system in oncogene addiction[J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 167(2): 188-194. DOI:10.1111/j.1365-2249.2011.04514.x.
- [18] SHIM A H, CHANG R A, CHEN X, et al. Multi-pronged attenuation of macrophage-colony stimulating factor signaling by Epstein-Barr virus BARP1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(32): 12962-12967. DOI: 10.1073/pnas.1205309109.
- [19] HUANG L, XU X M, HAO Y R. The possible mechanisms of tumor progression via CSF-1/CSF-1R pathway activation[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(2 Suppl): 501-506.
- [20] 贾炜. Bcl-2家族研究进展[J]. *当代医学*.2012, 18(3): 26-28. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2012.3.016.
- [21] TOMASIN R, GOMES-MARCONDES M C. Oral administration of Aloe vera and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(4): 619-623. DOI:10.1002/ptr.3293.
- [22] 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 232-234. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2003.3.070.
- [23] 王卫东, 陈正. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(4): 393-396. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2007.4.121.

[收稿日期] 2017-06-11

[修回日期] 2017-08-25

[本文编辑] 黄静怡