

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.01.010

· 基础研究 ·

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对结肠癌肝转移的促进作用及其可能机制

丁欣^{1,2}, 吕忠霖², 许可^{2,3}, 侯春梅², 肖鹤², 王仁喜², 韩根成², 冯健男², 黎燕², 沈倍奋², 陈国江^{1,2} (1. 安徽医科大学研究生院, 安徽合肥 230031; 2. 军事医学科学院基础医学研究所免疫学研究室, 北京 100850; 3. 福建医科大学药学院, 福建福州 350000)

[摘要] **目的:** 探讨粒细胞-巨噬细胞集落因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 对结肠癌肝转移的促进作用及其可能机制。 **方法:** 采用稳定转染方法将 GM-CSF 基因以及靶向 GM-CSF 的 shRNA 分别导入人结肠癌细胞系 HCT116 和 SW480, 用 ELISA 法检测 GM-CSF 表达水平。脾内注射结肠癌细胞建立结肠癌肝转移模型, 部分模型小鼠隔天腹腔注射不同剂量 (3、0.6 μg) 的重组人 GM-CSF。模型建立后 4 周后观察肝大体及肿瘤转移灶, 实时荧光定量 PCR 检测神经钙黏素 (N-cadherin) 和基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 的表达, Western blotting 检测上皮钙黏素 (E-cadherin) 的表达。 **结果:** 根据 GM-CSF 表达量建立 GM-CSF 低、中、高表达细胞系 (GM^{lo}、GM^{im}、GM^{hi} HCT116) 和 GM^{KD} SW480 细胞系。大体和病理结果均显示, 接种高表达 GM-CSF 的 HCT116 细胞或外源性给予 GM-CSF 明显增加小鼠结肠癌肝转移灶数量, 而敲低 GM-CSF 的作用则相反。GM-CSF 能够显著上调 N-cadherin 和 MMP2 的表达, 同时下调 E-cadherin 的表达 ($P < 0.05$)。 **结论:** GM-CSF 能够促进结肠癌移植瘤的肝转移, 该效应可能与 E-cadherin 表达的下调和 N-cadherin 以及 MMP2 表达的上调有关。

[关键词] 粒细胞-巨噬细胞集落因子; 结肠癌; 肝转移; 上皮钙黏素; 神经钙黏素; 基质金属蛋白酶 2

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)01-0056-06

Promoting effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on liver metastasis of colon cancer and its underlying mechanisms

DING Xin^{1,2}, LYU Zhonglin², XU Ke^{2,3}, HOU Chunmei², XIAO He², WANG Renxi², HAN Gencheng², FENG Jianan², LI Yan², SHEN Beifen², CHEN Guojiang^{1,2} (1. Graduate School, Anhui Medical University, Hefei 230031, Anhui, China; 2. Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on liver metastasis of colon cancer and the underlying mechanisms. **Methods:** GM-CSF gene and shRNA targeting GM-CSF were stably transfected into human colon cancer HCT116 and SW480 cell lines, respectively; the expression of GM-CSF was detected by ELISA. Liver metastasis model of colon cancer was established by injecting cancer cells into spleen. Some of the model mice were intraperitoneally injected with recombinant human GM-CSF every other day (3 μg , 0.6 μg /mice). Four weeks after model establishment, liver gross and tumor metastasis were observed. The expression of N-cadherin and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) was detected by Real-time fluorescent quantitative PCR while E-cadherin was detected by Western blotting. **Results:** According the expression of GM-CSF, HCT116 cells were grouped into low, median and high expression subgroups (GM^{lo}, GM^{im}, GM^{hi} HCT116); Meanwhile, GM^{KD} SW480 group (GM-CSF knockdown) was established. Liver gross and pathological results showed that injecting of GM-CSF-overexpressed HCT116 cells or exogenous GM-CSF remarkably increased the amounts of liver metastasis; In contrast, knockdown of GM-CSF showed the opposite effect. Furthermore, GM-CSF over-expression significantly up-regulated the levels of N-cadherin and MMP2 as well as down-regulated the levels of E-cadherin ($P < 0.05$). **Conclusion:** GM-CSF can potently promote liver metastasis of colon cancer xenograft, which may

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2015CB553704); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81672803, 81472647)。Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (No. 2015CB553704), and the National Natural Science Foundation of China (No. 81672803, 81472647)

[作者简介] 丁欣 (1991-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: dingxinhedq@163.com

[通信作者] 陈国江 (CHEN Guojiang, corresponding author), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事肿瘤生物学及免疫治疗基础研究, E-mail: guogangch@hotmail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20180116.1051.014.html>

be due to the down-regulation of E-cadherin and up-regulation of N-cadherin and MMP2.

[Key words] granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); colon cancer; liver metastasis; E-cadherin; N-cadherin; matrix metalloproteinase 2(MMP2)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 56-61. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.01.010]

近年来结肠癌的发病率呈明显上升趋势,已严重威胁人类的健康^[1]。结肠癌的发生发展是多途径、多因素共同作用的结果^[2]。在结肠癌形成过程中,肠上皮屏障系统的破坏可以引起持续性炎症反应及大量的炎性细胞浸润,继而释放细胞因子及活性介质。在炎症期,以多种炎性细胞因子(如IL-1 β 、IL-6)大量持续性释放为标志,IL-6通过激活STAT3信号途径增强中性粒细胞促进肿瘤血管生成的功能^[3],IL-1 β 在单核细胞中通过MAPK信号通路调控TNF α 水平发挥促炎效应^[4-6]。粒细胞-巨噬细胞集落因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)为重要的前炎细胞因子^[7],具有多种免疫调节活性^[8],包括促进免疫细胞的分化,激活并募集DC,改变细胞因子的分泌,影响细胞的信息传递。结肠癌患者肠黏膜中GM-CSF表达水平明显升高^[9],其生物学活性通过细胞表面CSF2受体 α (CSF2R α)和CSF2R β 表达呈现出来^[10]。人结肠癌细胞株HCT116表达CSF2R α ^[11]。课题组前期研究^[12]中发现,GM-CSF并不影响HCT116细胞的增殖,但却明显增强其迁移和侵袭能力。本研究构建了过表达和沉默GM-CSF的结肠癌细胞系及裸鼠结肠癌肝转移模型,并对相关肿瘤转移标志物及可能的信号通路进行了检测,旨在探讨GM-CSF对结肠癌肝转移的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系、动物和主要试剂

人结肠癌细胞系HCT116和SW480、鼠结肠癌细胞系CT26购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。雄性、质量18~22 g、6~8周龄的SPF级BALB/c-nu裸鼠(动物合格证号:201504)购自北京军事医学科学院动物中心。人GM-CSF过表达、沉默以及空载质粒(美国GeneCopoeia公司),DMSO(美国Sigma公司),RPMI 1640培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(FBS,元亨金马公司),人GM-CSF ELISA试剂盒(美国eBioscience公司),TRIzol(美国Invitrogen公司),逆转录试剂盒(北京全式金公司),2 \times Taq PCR Mix(天根生化科技有限公司),SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix(日本TOYOBO公司),实时荧光定量PCR(qPCR)引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成,BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司),神经钙黏素(N-cadherin)、上皮钙黏素(E-cadherin)、GAPDH(德国CST公司),辣根过氧化物酶(HRP)标

记羊抗兔和羊抗小鼠抗体(美国KPL公司),重组人GM-CSF(美国Pepro Tech公司),Transwell小室(美国康宁公司),基质胶(美国BD公司)。

1.2 细胞培养

将人结肠癌HCT116和SW480细胞及鼠源结肠癌CT26细胞分别置于含有10%FBS的RPMI 1640培养基中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。每天观察细胞生长情况,2~3 d换一次培养液,当细胞汇合至培养瓶的80%~90%时进行传代,传代比例为1:2,以后每隔2~3 d传代一次。取对数生长期的细胞用于后续试验。

1.3 构建过表达或沉默GM-CSF的结肠癌细胞株

1.3.1 过表达GM-CSF的HCT116细胞株 在HCT116细胞中转入人GM-CSF过表达及空载质粒并使用G418(400 μ g/ml)进行稳定株筛选。将稳定过表达GM-CSF的HCT116细胞以细胞密度5 \times 10⁴/孔接种于24孔板,1 ml全培养基(1640培养基+10%FBS)培养24 h后收集上清,根据ELISA试剂盒说明书操作,用多功能酶标仪于450 nm处检测光密度(D)值,检测GM-CSF分泌水平。将过表达GM-CSF细胞株按GM-CSF的分泌水平分为:GM-CSF低表达(GM^{lo})、GM-CSF中等表达(GM^m)和GM-CSF高表达(GM^{hi})3组。

1.3.2 沉默GM-CSF的SW480细胞株 在SW480细胞中转入人GM-CSF沉默及空载质粒并使用嘌呤霉素(5 μ g/ml)进行稳定株筛选。将稳定沉默GM-CSF的SW480细胞以细胞密度3.75 \times 10⁵/孔接种于24孔板,1 ml全培养基(1640培养基+10%FBS)培养24 h后收集上清,根据ELISA试剂盒说明书操作,用多功能酶标仪于450 nm处检测光密度(D)值,检测GM-CSF分泌水平。建立命名为GM^{KD1}和GM^{KD2}的SW480稳定株。

1.4 裸鼠结肠癌肝转移模型的建立及观察

裸鼠腹腔注射麻醉药(氯胺酮55 mg/kg,甲苯噻嗪10 mg/kg,充分混合),完全麻醉后置手术台上,常规消毒腹部皮肤,依次切开皮肤(避免出血)、肌层和腹膜,在脾内注射结肠癌细胞(1 \times 10⁶/只,100 μ l),逐层缝合腹壁。模型建立4周后,用于后续实验:(1)结肠癌裸鼠模型建立后第1天,分别腹腔注射PBS缓冲液(对照组)、人GM-CSF不同剂量(3、0.6 μ g/只)(实验组),每2 d 1次,至实验结束;(2)处死小鼠,开腹取出肝,观察统计肝表面转移灶数量并拍照;剪取部分

组织于10%甲醛溶液中固定,石蜡包埋,常规石蜡切片、H-E染色后,在光镜下观察计数瘤结节以及肿瘤组织的病理变化。

1.5 Transwell实验检测过表达或沉默*GM-CSF*对结肠癌细胞迁移、侵袭的影响

1.5.1 迁移实验 收集*GM-CSF*(25 ng/ml)刺激21 d的HCT116细胞,以未刺激的HCT116细胞为对照组,分别将 1×10^5 细胞铺于Transwell专用8孔板中,200 μ l无血清1640培养基放于小室上层,其下层加800 μ l完全培养基,于37°C、5%CO₂孵箱中培养36 h,真空泵抽去上清后加1 ml的4%甲醛固定10 min,吸干甲醛,用Gimsa染液染色1 h,在荧光显微镜下($\times 200$)随机计数5个视野穿膜细胞数。实验重复3次。

1.5.2 侵袭实验 实验前将所有用具在4 °C预冷,将稀释的Matrigel基质胶(无血清RPMI与Matrigel凝胶1:1配制而成)包被Transwell小室基底膜,置37°C中2 h后加入100 μ l无血清RPMI培养基水化30 min,收集*GM-CSF*(25 ng/ml)刺激21 d的HCT116细胞,以未刺激的HCT116细胞为对照组,余标本处理及实验方法同迁移实验。实验重复3次。

1.6 qPCR检测过表达*GM-CSF*对结肠癌细胞E-cadherin、N-cadherin及*MMP2* mRNA表达

将培养于6孔板的GM^oHCT116、正常CT26细胞及外源性加入*GM-CSF*(10 pg/ml, 1 000 pg/ml)培养7 d后的CT26细胞分别收集于EP管中加入1 ml TRIzol重悬,按照操作说明书提取细胞总RNA。使用逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA,用qPCR法检测样本中的*MMP2/9/26*和E-cadherin、N-cadherin表达水平,以*GAPDH*作为内参。引物序列:*hMMP2*上游为5'-TGACTTTCTTGGATCGGGTCG-3',下游为5'-AAGCACCATCAGATGACTG-3';*hMMP9*上游为5'-TGTACCGCTATGGTTACTCG-3',下游为5'-GGCAGGGACAGTTGCTTCT-3';*hMMP26*上游为5'-TCGGAATGGGACAGACCTACT-3',下游为5'-TCAAAGGGGTCACATTGCTCC-3';hE-Cadherin上游为5'-CGAGAGCTACACGTTACCGG-3',下游为5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3';hN-Cadherin上游为5'-TCAGGCTGTGGACATAGAAACC-3',下游为5'-GCTGTAAACGACTCTGGCACT-3';*hGAPDH*上游为5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3',下游为5'-ACACCATGTATTCCGGTCAAT-3'。通过熔解曲线检测引物扩增特异性,并通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达水平。实验重复3次。

1.7 Western blotting检测结肠癌细胞中E-cadherin的表达

将HCT116、GM^oHCT116和SW480细胞以 1×10^6 细胞/孔接种于12孔板,每种细胞设置3个复孔,1 ml完全培养基(1640培养基+10%FBS)体系培养,收集细胞置于EP管中,以600 \times g离心5 min,弃去上清,加100 μ l蛋白裂解液混匀,置于冰上摇动裂解10 min,加5 \times 上缓冲液液25 μ l,沸水煮10 min。紫外分光光度计测定蛋白浓度。定量后行SDS-PAGE。以空载体转染的细胞蛋白为对照,*GAPDH*蛋白为内参,分离后的蛋白电转至PVDF膜上,加一抗兔抗人E-cadherin抗体(1:1 000)、鼠抗人*GAPDH*抗体(1:1 000),孵育过夜。加羊抗小鼠IgG,羊抗兔IgG二抗,孵育1 h后显影。待测蛋白相对表达水平用待测蛋白与内参蛋白*GAPDH*电泳条带灰度比值表示。实验重复3次。

1.8 统计学处理

用SPSS统计分析软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用*t*检验,多组间资料比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

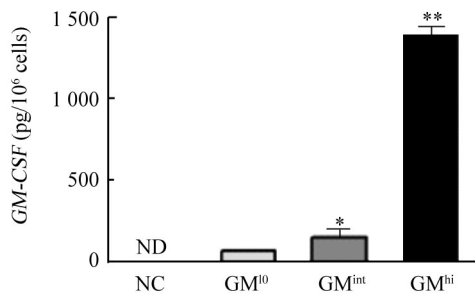
2 结果

2.1 过表达*GM-CSF*促进裸鼠结肠癌肝转移

成功建立过表达*GM-CSF*结肠癌HCT116细胞株。ELISA检测结果(图1)显示,根据*GM-CSF*的表达水平,获得GM^o[(85.0 \pm 1.2)pg/10⁶个细胞]、GM^m[(152.1 \pm 0.8)pg/10⁶个细胞]和GM^h[(1350.0 \pm 100.0)pg/10⁶个细胞]*GM-CSF*表达水平呈梯度的3个亚组HCT116细胞,而空载HCT116细胞(NC)不表达*GM-CSF*(ND)。用上述3种细胞株分别建立结肠癌肝转移模型,4周剖腹观察结果(图2)显示,对照组、GM^o、GM^m和GM^hHCT116组小鼠结肠癌肝转移发生例数分别为1/10、4/10、6/10、9/10,结果表明过表达*GM-CSF*能够促进结肠癌HCT116细胞肝转移,其中以GM^h组作用最为明显。

2.2 沉默*GM-CSF*抑制裸鼠结肠癌肝转移

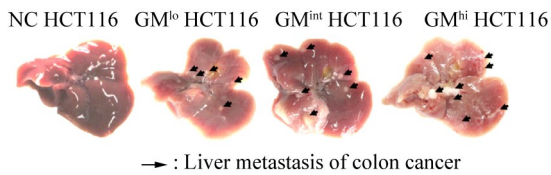
成功建立沉默*GM-CSF*的结肠癌SW480细胞株。ELISA检测结果(图3)显示:空载(NC)、GM^{KD1}、GM^{KD2}SW480细胞的*GM-CSF*分泌量分别为(48.0 \pm 0.8)、(14.0 \pm 1.0)和(18.0 \pm 2.0)pg/10⁶个细胞。用上述细胞株分别建立结肠癌肝转移模型4周后,剖腹观察结果(图4A)显示,NC组和敲低*GM-CSF*(GM^{KD1}, GM^{KD2})SW480组小鼠结肠癌肝转移发生例数分别为8/10、2/10、1/10。H-E染色结果(图4B)显示,GM^{KD}SW480组裸鼠结肠癌肝转移灶数量明显减少。实验结果表明,沉默*GM-CSF*能够显著抑制裸鼠结肠癌肝转移。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group

图1 成功建立过表达GM-CSF结肠癌HCT116细胞株

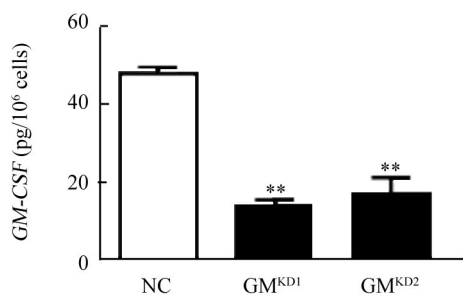
Fig. 1 Establishment of HCT116 cell line overexpression of GM-CSF



→ : Liver metastasis of colon cancer

图2 过表达GM-CSF促进裸鼠结肠癌肝转移

Fig. 2 Overexpression of GM-CSF can promote liver metastasis of colon cancer



** $P < 0.01$ vs NC group

图3 成功建立沉默GM-CSF的结肠癌SW480细胞株

Fig. 3 Establishment of SW480 cell line with GM-CSF knockdown

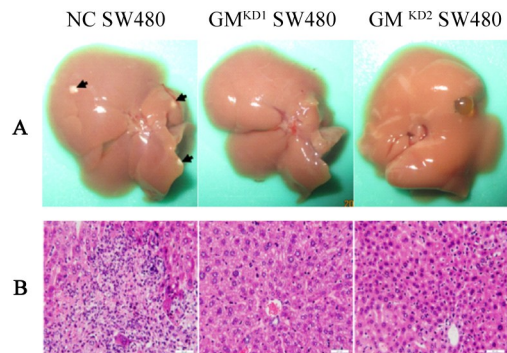
2.3 外源性GM-CSF促进结肠癌肝转移

给予腹腔注射外源性GM-CSF后,外源性GM-CSF能够显著增强裸鼠结肠癌肝转移结节个数:对照组(PBS)为1/8,低GM-CSF(0.6 μg/只)为5/8,高GM-CSF(3 μg/只)为8/8(图5 A)。H-E染色结果(图5B)显示,注射外源性GM-CSF的裸鼠结肠癌肝转移灶数量明显增多,且呈剂量依赖。结果表明,外源性GM-CSF可以促进裸鼠结肠癌肝转移。

2.4 GM-CSF刺激增强结肠癌HCT116细胞迁移及侵袭能力

Transwell迁移和侵袭实验结果(图6)发现,注射GM-CSF(25 ng/ml)3周后的结肠癌HCT116细胞的迁移及

侵袭能力显著强于未注射HCT116细胞组[(398.0±8.0) vs (203.0±12.0)个, $P < 0.05$; (430.0±12.0) vs (52.0±4.0)个, $P < 0.05$]。

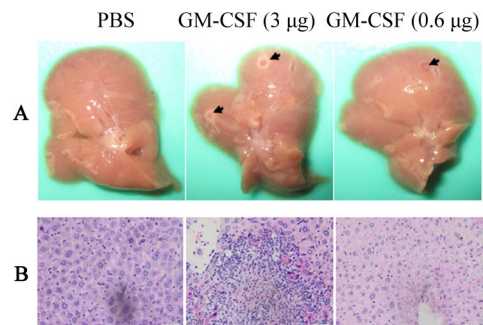


A: Liver gross specimen; B: Pathological tissue sections

(H-E staining, ×200)

图4 沉默GM-CSF抑制结肠癌肝转移

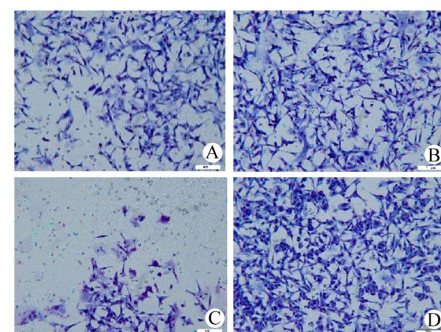
Fig. 4 Silence of GM-CSF can suppress liver metastasis of colon cancer



A: Liver gross specimen; B: H-E staining, ×200

图5 外源性注射GM-CSF促进结肠癌肝转移

Fig. 5 Injection of exogenous GM-CSF can promote liver metastasis of colon cancer



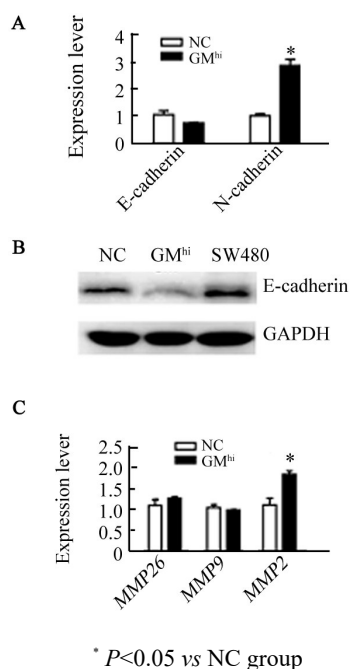
A, C: No injection group; B, D: Injection group

图6 GM-CSF增强结肠癌HCT116细胞的迁移(A、B)及侵袭(C、D)能力(Gimsa染色, ×200)

Fig. 6 GM-CSF can increase migration(A, B) and invasion(C, D) abilities of HCT116 cells (Gimsa staining, ×200)

2.5 GM-CSF 刺激诱导结肠癌细胞 N-cadherin、E-cadherin 和 MMP2 的表达

qPCR 检测结果(图7)发现,与对照组比较,GM-CSF 能够显著上调 N-cadherin mRNA 的表达(图7A),同时下调 E-cadherin 蛋白的表达(图7B),且 MMP2 的表达显著增加(1.75 ± 0.23 vs 1.20 ± 0.50 , $P < 0.05$),而 MMP9、MMP26 的表达水平无明显变化(MMP9: 1.03 ± 0.05 vs 1.15 ± 0.30 , $P > 0.05$; MMP26: 1.48 ± 0.25 vs 1.18 ± 0.50 , $P > 0.05$; 图7C)。结果表明,GM-CSF 可能通过诱导 EMT 和 MMP2 的表达促进结肠癌肝转移。



A: Expression of E-cadherin and N-cadherin by qPCR; B: Expression of E-cadherin by Western blotting; C: Expression of MMP26, MMP9 and MMP2 by qPCR

图7 GM-CSF 影响结肠癌细胞 N-cadherin、E-cadherin 和 MMP2 的表达

Fig. 7 Effect of GM-CSF on the expressions of N-cadherin, E-cadherin and MMP2 in colon cancer cells

2.6 GM-CSF 上调 MMP2 mRNA 表达呈剂量-效应关系

qPCR 检测结果(图8)表明,给予结肠癌 HCT116 细胞 10、100 pg/ml 的 GM-CSF 刺激后, MMP2 mRNA 表达水平有剂量依赖倾向,尤以 100 pg/ml 组细胞表达水平显著高于与对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本课题采用稳定转染方法建立了过表达和沉默 GM-CSF 的结肠癌细胞系和结肠癌肝转移裸鼠模型。此外,通过给予外源性人 GM-CSF 进一步评价 GM-

CSF 对结肠癌肝转移的影响,并对可能的机制进行了的探究,初步证实了 GM-CSF 对结肠癌肝转移的促进作用。

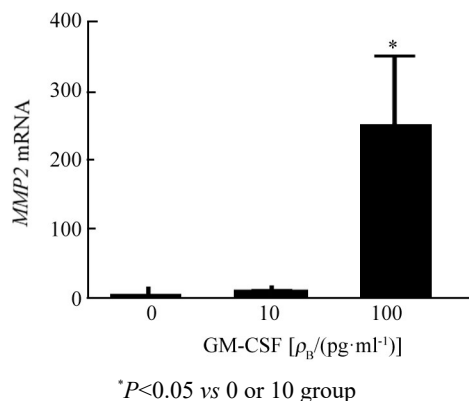


图8 GM-CSF 上调结肠癌 HCT116 细胞 MMP2 mRNA 表达
Fig. 8 GM-CSF up-regulates the expression of MMP2 mRNA in HCT116 cells

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤细胞的浸润与转移过程中起着重要作用^[13]。N-cadherin 和 E-cadherin 属于 EMT 相关蛋白^[14-15], MMP2 也与肿瘤浸润与转移有关^[16]。在上皮组织中, N-cadherin 的表达上调可使癌细胞更容易获得迁移及侵袭能力。MMP-2 则能够降解胶原, 促进肿瘤细胞转移。E-cadherin 主要介导同型上皮细胞间的黏附, 其在肿瘤细胞的表达水平降低有助于细胞迁移。

CSF 包括巨噬细胞 CSF (macrophage CSF, M-CSF)、粒细胞 CSF (granulocyte CSF, G-CSF)、GM-CSF、多重 CSF、干细胞因子和红细胞生成素等^[17-18]。有研究^[19]表明, M-CSF、G-CSF 在肿瘤细胞浸润与转移过程中发挥重要作用。GM-CSF 在胰腺导管癌的进展以及迁移中通过影响肿瘤微环境发挥重要作用, 同时 GM-CSF 能显著增加胰腺癌患者化疗后胰腺细胞以及肿瘤组织多样性, 诱导单核细胞转变为髓系抑制型细胞^[20]。肿瘤的浸润及转移是一个复杂的多基因、多步骤、多阶段的调控过程, 其中的关键步骤是发生 EMT 和 MMP 的过表达。EMT 是以上皮细胞丧失极性和黏附性并获得间质特性为主要特征的复杂过程, 其中钙黏蛋白表达的异常发挥重要作用, 包括 E-cadherin 的表达降低和 N-cadherin 的表达升高。MMP 通过降解细胞外间质便于肿瘤转移^[21], MMP-2 属明胶酶类, 是能够降解胶原的主要基质水解酶。本研究发现, GM-CSF 能够显著增强 EMT 过程以及上调 MMP2 的表达, 其中的分子机制值得深入探究。此外, 作为对免疫系统具有明确和显著影响的前炎因子, 是否存在 GM-CSF 通过调节免疫反应

进而间接影响肿瘤转移也值得进一步研究。

为了深入了解GM-CSF与结肠癌肝转移的确切关系,还需采集临床结肠癌患者肝标本并检测GM-CSF表达,同时需要评估阻断GM-CSF对结肠癌肝转移的抑制效应。总之,本研究初步证明了GM-CSF对结肠癌肝转移的促进作用,提示GM-CSF可能是结肠癌肝转移临床干预的潜在靶点,为后续的进一步研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] KUNICKA T, PROCGAZKA P, KRUS I, et al. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 795[2017-07-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5062913/>. DOI: 10.1186/s12885-016-2826-8.
- [2] TEMRAZ S, MUKHERJI D, ALAMEDDINE R, et al. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 89(2): 217-230. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.015.
- [3] YAN B, WEI J J, YUAN Y, et al. IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation[J]. *J Immunol*, 2013, 190(11): 5882-5893. DOI: 10.4049/jimmunol.1201881.
- [4] BRUCHARD M, MIGNOT G, DERANGERE V, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth[J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 57-64. DOI: 10.1038/nm.2999.
- [5] ESPELIN C W, GOLDSIPE A, SORGER P K, et al. Elevated GM-CSF and IL-1beta levels compromise the ability of p38 MAPK inhibitors to modulate TNFalpha levels in the human monocytic/macrophage U937 cell line[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(10): 1956-1972. DOI: 10.1039/c002848g.
- [6] VERMA R, VERMA N, PAUL J. Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2013, 24(3): 130-138. DOI: 10.1684/ecn.2013.0343.
- [7] BECHER B, TUGUES S, GRETER M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation[J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 963-973. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.
- [8] LEE J S, TAE S S, KIM D Y, et al. Do IL-3/GM-CSF effect on the myofibroblastic differentiation of human adipose derived stromal cells?[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 355(2): 67-82. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.056.
- [9] WAGHRAY M, YALAMANCHILI M, DZIUBINSKI M, et al. GM-CSF mediates mesenchymal-epithelial cross-talk in pancreatic cancer[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(8): 886-899. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0947.
- [10] HAMILTON J A. GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015, 11(4): 457-465. DOI: 10.1586/174466X.2015.1024110.
- [11] WANG YI, HAN G C, WANG K E, et al. Tumor-derived GM-CSF promotes inflammatory colon carcinogenesis via stimulating epithelial release of VEGF[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(3): 716-726. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [12] 王一. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素(IL)-1 β 在慢性肠炎恶性转化中的作用及机制研究[D]. 北京:军事医学科学院, 2014.
- [13] JIA S, QU T, WANG X, al. KIAA1199 promotes migration and invasion by Wnt/beta-catenin pathway and MMPs mediated EMT progression and serves as a poor prognosis marker in gastric cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175058[2017-07-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5397282/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0175058.
- [14] ZHANG B, YU W, FENG X, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on tumor cells and tumor-infiltrating mononuclear cells in upper tract urothelial carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(5): 94. DOI: 10.1007/s12032-017-0941-2.
- [15] CHEN H F, MA R R, HE J Y, et al. Protocadherin 7 inhibits cell migration and invasion through E-cadherin in gastric cancer[J/OL]. *Tumour Biol*, 2017, 39(4): 1010428317697551[2017-07-24]. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1010428317697551>. DOI: 10.1177/1010428317697551.
- [16] GUTSCHALK C M, YANAMANDRA A K, LINDE N, et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression[J]. *Cancer Med*, 2013, 2(2): 117-129. DOI: 10.1002/cam4.20.
- [17] NIJAGUNA M B, PATIL V, URBACH S, et al. Glioblastoma-derived macrophage colony-stimulating factor (MCSF) induces microglial release of insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) to promote angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(38): 23401-23415. DOI: 10.1074/jbc.M115.664037.
- [18] VINZENS S, ZINDEL J, ZWEIFEL M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor producing anaplastic carcinoma of the pancreas: case report and review of the literature[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1): 223-228. DOI: 10.21873/anticancer.11310.
- [19] HAMILTON J A, COOK A D, TAK P P. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 16(1): 53-70. DOI: 10.1038/nrd.2016.231.
- [20] CHEN Z, SHEN Z, HU L, et al. Identification of matrix metalloproteinase-2 and 9 as biomarker of intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(2): 291-296. DOI: 10.5604/16652681.1231589.
- [21] HAMILTON J A, COOK A D, TAK P P. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 16(1): 53-70. DOI: 10.1038/nrd.2016.231.

[收稿日期] 2017-09-26

[修回日期] 2017-11-16

[本文编辑] 党瑞山