

CSF-1R 在鼻咽癌细胞株中的表达情况及对细胞增殖、凋亡、侵袭转移能力的影响

曾 兵 郭海霞 徐清榜 张晓旻 郭莉莉 万 野

摘 要 **目的** 研究集落刺激因子 1 受体 (colony-stimulating factor 1 receptor, CSF-1R) 在鼻咽癌中的表达, 并对其功能进行初步探讨。**方法** 培养 5-8F、6-10B、CNE-2、NP69 细胞株, 用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 4 种细胞株中 CSF-1R 的表达情况, 通过比较 5-8F、6-10B、CNE-2 鼻咽癌细胞株与 NP69 正常鼻咽上皮细胞株中 CSF-1R 的表达, 筛选出 CSF-1R 高表达细胞株和低表达细胞株; 通过实时荧光定量 PCR 检测两种细胞株的增殖因子 Cyclin D1、凋亡因子 Bcl-2 和 Bax、侵袭转移因子 MMP-2 的 mRNA 表达情况, 分析 CSF-1R 的表达与鼻咽癌预后的关系。**结果** 5-8F 鼻咽癌细胞株中 CSF-1R 呈现高表达水平 ($P=0.000$), 6-10B 鼻咽癌细胞株中 CSF-1R 呈现低表达水平 ($P=0.000$ 、 $P=0.370$), CNE-2 鼻咽癌细胞株中 CSF-1R 的表达与正常鼻咽上皮细胞株差异无统计学意义 ($P=0.057$ 、 $P=0.481$)。CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 的增殖、侵袭转移能力明显强于 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B (P 均 $=0.000$), 而凋亡能力则弱于 6-10B 细胞株 ($P=0.000$)。**结论** 鼻咽癌细胞与正常鼻上皮细胞株之间 CSF-1R 的表达差异有统计学意义。CSF-1R 的表达与细胞增殖因子 Cyclin D1、凋亡因子 Bcl-2 及 BAX、侵袭转移因子 MMP-2 的表达有一定的相关性, CSF-1R 表达水平越高, 细胞的增殖、侵袭转移能力越强, 凋亡能力越弱。

关键词 CSF-1/CSF-1R 鼻咽癌 增殖 凋亡 侵袭转移

中图分类号 R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.031

Expression of CSF-1R in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line and Its Influence on Cell Proliferation, Apoptosis, Invasion and Metastasis.

Zeng Bing, Guo Haixia, Xu Qingbang, et al. Department of Otolaryngology, The Second People's Hospital of Jingmen, Hubei 448000, China

Abstract **Objective** To study the expression of CSF-1R in nasopharyngeal carcinoma and explore its function. **Methods** On the basis of clinical specimens experiment, we cultivated 5-8F, 6-10B, CNE-2, NP69 cell lines, and then detected the expression of CSF-1R in this four cell lines through RT-PCR and Western blot. By comparing the expression of CSF-1R of 5-8F, 6-10B, CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cell lines to NP69 normal nasopharyngeal epithelial cell line, we selected CSF-1R high expression cell line and CSF-1R low expression cell line, detected the mRNA expression of proliferation factor Cyclin D1, the apoptosis factors Bcl-2 and Bax, invasion and metastasis factor MMP-2 in two cell lines by RT-PCR, and analyzed the relationship between the expression of CSF-1R and the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. **Results** The expression level of CSF-1R in 5-8F cell line was over expressed ($P=0.000$), while was under expressed in 6-10B cell line ($P=0.000$, $P=0.370$). But there was no difference between the expression of CSF-1R in CNE-2 cell line and in NP69 normal nasopharyngeal epithelial cell line ($P=0.057$, $P=0.481$). (2) The ability of proliferation, invasion and metastasis of cells in 5-8F cell line was obviously weaker than in cell line 6-10B all ($P=0.000$), while apoptosis ability was weaker than 6-10B cell lines ($P=0.000$). **Conclusion** There was a significant difference in the expression of CSF-1R between nasopharyngeal carcinoma cells and normal nasal epithelial cell lines. A certain relevance exists between the expression of CSF-1R and the cell proliferation factor Cyclin D1, the apoptosis factors Bcl-2 and Bax, the invasion and metastasis factor MMP-2. The up-regulation of expression of CSF-1R promoted the ability of cell proliferation, invasion and metastasis and reduce the apoptosis ability of tumor cells.

Key words CSF-1/CSF-1R; Nasopharyngeal carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Invasion and metastasis

作者单位: 448000 荆门市第二人民医院耳鼻咽喉科(曾兵、郭海霞), 普外科(张晓旻), 检验科(郭莉莉), 神经外科(万野); 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院疼痛科(徐清榜)

通讯作者: 曾兵, 电子信箱: hbzengbing@126.com

集落刺激因子 1 受体(CSF-1R)是免疫系统最主要的调节因子之一,由原癌基因 *c-fms* 编码而产生。通过调节单核-吞噬谱系细胞的生成与生物活性来影响肿瘤的进一步发展。在体内,CSF-1 通过结合 CSF-1R 后自身磷酸化,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。然后,效应蛋白的酪氨酸残基磷酸化,引起巨噬细胞活化。被激活的单核巨噬细胞系统可以通过许多途径促进肿瘤的发展,例如促进肿瘤生长、促进肿瘤新生血管生成、促进肿瘤细胞外基质分解以及促进肿瘤细胞的侵袭和转移。此外,CSF-1/CSF-1R 也直接影响肿瘤细胞的生长。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^[1-3]。但遗憾的是,目前仍没有 CSF-1/CSF-1R 是否影响鼻咽癌进展的相关报道。本研究通过实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法从细胞实验层面探讨 CSF-1R 在鼻咽癌细胞中的表达对细胞增殖、凋亡、侵袭转移能力的影响。笔者希望能为鼻咽癌的诊断及预后找到一个新的预测指标以及可能成为鼻咽癌患者的治疗新靶点。

对象与方法

1. 对象:(1)细胞:5-8F、6-10B 鼻咽癌细胞株及 NP69 永生化正常鼻咽上皮细胞株购自 APTT 细胞库,CNE-2 鼻咽癌细胞株由笔者医院实验中心惠赠。5-8F、6-10B、CNE-2 鼻咽癌细胞株使用 RPMI1640 培养基混合 10% 胎牛血清于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。NP69 鼻咽上皮细胞株使用加入 0.05mg/ml BPE 和 5ng/ml EGF 的 K-SFM 培养基于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。(2)主要试剂:CSF-1R 兔抗人单克隆抗体(ab61137)购自英国 Abcam 公司;鼠抗兔多克隆即用型二抗购自中杉金桥公司;免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司;DAB 显色试剂盒购自中杉金桥公司;南美洲胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RPMI1640 基础培养基购自美国 Gibco 公司;K-SFM 培养基购自美国 Gibco 公司;细胞总 RNA 抽提试剂盒购自天地扬生物科技公司;反转录试剂盒购自天地扬生物科技公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自天地扬生物科技公司;RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所以;CSF-1R 兔抗人单克隆抗体购自美国 CST 公司;鼠抗兔多克隆抗体购自中山金桥公司;ELC 发光系统购自碧云天生物技术研究所以。

2. 免疫组织化学实验检测治疗前组织标本的 CSF-1R 蛋白:将切片置于烤片架上放入 60℃ 烤箱

中烤片 2h。将切片浸泡于二甲苯中脱蜡,15 分钟/次,共 3 次。然后按从高浓度到低浓度的顺序,依次将切片浸泡于梯度乙醇(乙醇浓度依次为:100%、95%、90%、80%、70%)中,每个浓度中均浸泡 5min。然后用双蒸水洗片 5 分钟/次,共 3 次。接着用 PBS 洗片 5 分钟/次,共 3 次。具体步骤严格按照试剂盒说明进行。每一批次实验中均设置阳性对照片和阴性对照片。已知阳性反应标本做为阳性对照,与实验切片采用同种一抗、二抗。PBS 代替一抗作为阴性对照进行同步染色。

3. 实时荧光定量 PCR 检测:应用 Primer5.0 引物设计软件设计引物,并由 Life Technologies 公司合成:CSF-1R:上游引物:5'-TCTGGTCCTATGGCATCCTC-3',下游引物:5'-GATGCCAGGGTAGGGATTC-3';Cyclin D1:上游引物,5'-GCGAGATGAGGCGATGGGGC-3',下游引物:5'-CCTTCAGGGCGGCTGTGGTG-3';Bcl-2:上游引物:5'-GTGACTTCCGATCAGGAAGG-3',下游引物:5'-CTTCCAGACATTCGGAGACC-3';BAX:上游引物:5'-AGTAACATGGAGCTGCAGAGG-3',下游引物:5'-ATGGTTCTGATCAGTTCCGG-3';MMP-2:上游引物:5'-ACTGTTGGTGGGAAGTCTCAGAAG-3',下游引物:5'-CAAGGTCAATGTCAGGAGAGG-3';GAPDH:上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3',下游引物:5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'。5-8F、6-10B、CNE-2、NP69 4 株细胞分别培养之后使用胰蛋白酶处理制成细胞悬液,用细胞计数板计数细胞后,取含有约 1×10^6 个细胞的细胞悬液转移至 RNase-Free 的离心管中,离心收集细胞沉淀。其余步骤严格按照试剂盒说明进行。实时荧光定量 PCR 实验结果采用 $\Delta\Delta CT$ 计算方法,即样品 mRNA 值 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。 ΔCT = 目的基因 CT 值 - 内参基因 CT 值; $\Delta\Delta CT$ = 实验组 ΔCT - 对照组 ΔCT 。实验组即 5-8F、6-10B、CNE-2 细胞株;对照组即 NP69 细胞株。

4. Western blot 法检测:5-8F、6-10B、CNE-2、NP69 4 株细胞分别培养约 1×10^6 个细胞后,用 PBS 洗 2 遍,然后用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液 300 μ l 处理细胞,吹打数下,使裂解液充分接触细胞,待细胞充分裂解后,14000 $\times g$ 离心 5min,取上清分装于 EP 管中保存于 -70℃ 冰箱内。Western blot 法实验条带采用扫描仪图像扫描后,用 Quantity One 4.6.2 软件进行条带处理分析。目标蛋白相对表达量 = 目标蛋白灰度值/内参灰度值。实验组为 5-8F、6-10B、

CNE-2 细胞株;对照组为 NP69 细胞株。

5. 统计学方法:所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,数据使用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式记录,不同细胞株之间 CSF-1R 及相关因子的表达情况的比较采用方差分析和 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 实时荧光定量 PCR 检测 CSF-1R 的表达情况:如图 1、表 1 所示,发现 5-8F 细胞株中 CSF-1RmRNA 的表达明显高于 NP69 细胞株($P = 0.000$),6-10B 细胞株中 CSF-1RmRNA 的表达明显低于 NP69 细胞株($P = 0.000$),CNE-2 细胞株中 CSF-1RmRNA 的表达水平略高于 NP69 细胞株,差异无统计学意义($P = 0.057$)。

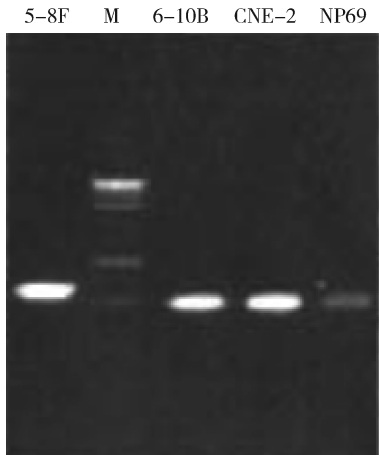


图 1 实时荧光定量 PCR 检测

表 1 5-8F、6-10B、CNE-2 及 NP69 细胞株中 CSF-1RmRNA 的相对表达水平

细胞株	<i>n</i>	CSF-1RmRNA 相对表达情况即 $2^{-\Delta\Delta CT}$
5-8F	10	7.01 ± 0.23
6-10B	10	0.09 ± 0.03
CNE-2	10	1.49 ± 0.19
NP69	10	1.00 ± 0.01

2. Western blot 法检测 CSF-1R 的表达情况:如表 2 所示,发现仅 5-8F 鼻咽癌细胞株中 CSF-1R 蛋白表达阳性,6-10B($P = 0.370$)、CNE-2($P = 0.480$)鼻咽癌细胞株及 NP69 正常鼻咽上皮细胞株中 CSF-1R 蛋白表达均为阴性(图 2)。5-8F 细胞株相对于 NP69 细胞株明显呈现 CSF-1R 蛋白高表达($P = 0.007$)。

表 2 CSF-1R 在 5-8F、6-10B、CNE-2 及 NP69 细胞株中的相对表达量比较

细胞株	<i>n</i>	CSF-1 相对表达量
5-8F	10	1.00 ± 0.01
6-10B	10	0.19 ± 0.03
CNE-2	10	0.28 ± 0.04
NP69	10	0.24 ± 0.01

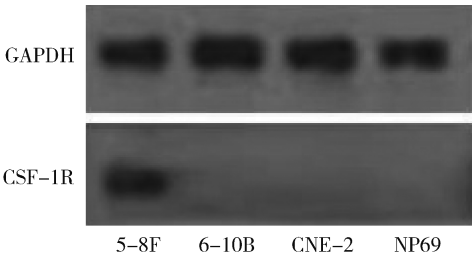


图 2 Western blot 法检测结果

3. CSF-1R 与细胞增殖因子 CyclinD1、凋亡因子 Bcl-2 及 BAX、侵袭转移因子 MMP-2 的相关性:如表 3 所示,发现 5-8F 细胞株中 CyclinD1mRNA 的表达水平均显著高于 6-10B 细胞株($P = 0.000$)。5-8F 细胞株中表达的 Bcl-2mRNA 显著高于 6-10B 细胞株($P = 0.000$),BAXmRNA 显著低于 6-10B 细胞株($P = 0.000$),Bcl-2mRNA/BAXmRNA 比值显著高于 6-10B 细胞株($P = 0.000$)。5-8F 细胞株中 MMP-2mRNA 的表达水平显著高于 6-10B 细胞株($P = 0.000$)。

表 3 5-8F 与 6-10B 细胞株中 CyclinD1、Bcl-2、BAX、MMP-2mRNA 的表达水平对比 ($n = 10$)

细胞株	Bcl-2	Bax	Bcl-2/BAX	MMP-2
5-8F	130.70 ± 7.38	0.01 ± 0.00	15840.09 ± 1747.31	44.86 ± 2.72
6-10B	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.09
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

讨 论

CSF-1 是由巨噬细胞、成纤维细胞和肿瘤细胞等非造血细胞合成分泌的一个负责激活巨噬细胞,并促进其增殖、分化的重要的生长因子。它通过结合其

受体 CSF-1R,促进细胞外结合域构象的改变,使得其相邻受体细胞间的交互作用更稳定,从而形成二聚体。同时促进二聚体细胞质酪氨酸残基磷酸化,进一步调节其效应细胞的生长、成熟,激活相应的靶细胞,

多方面协同效应促进肿瘤进一步发展^[4]。研究发现 CSF-1R 在头颈部肿瘤中表达异常增高,并且在结直肠癌中也发现 CSF-1R 表达高于正常组织^[5]。然而,到目前为止,据笔者查阅文献,本研究首次提出了 CSF-1R 在鼻咽癌组织中呈现高表达水平。并且笔者从多个角度证明了这种高水平的表达与鼻咽癌的预后有一定的关联性。CSF-1R 主要表达在鼻咽癌肿瘤组织细胞的核膜上,其次在细胞质中也有少量表达。免疫组织化学结果显示,CSF-1R 在鼻咽癌中明显高表达($P=0.000$)。但 Sabitha Aligeti 等研究显示当内源性的 CSF-1/CSF-1R 过度表达时,卵巢癌细胞的侵袭能力、附着力,以及能动性增加,肿瘤侵袭转移的概率大大增加^[6]。

通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法实验发现 5-8F 细胞株中 CSF-1R 在基因水平和蛋白水平均显著高表达($P=0.000$ 、 $P=0.007$),而 6-10B 细胞株中 CSF-1R 在基因水平明显低表达($P=0.000$),但蛋白水平与 NP69 正常鼻咽上皮细胞株一样均显示为阴性表达($P=0.370$)。说明 6-10B 不论是在基因水平,还是在蛋白水平均表现为 CSF-1R 低表达状态。此外,CNE-2 细胞株中 CSF-1R 在基因和蛋白水平的表达呈现与 NP69 差别不大($P=0.057$ 、 $P=0.481$)。因此,笔者选取 CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 和 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B 进行进一步研究。CyclinD1 是调控细胞由 G₁ 期向 S 期转化的周期素。当 CyclinD1 基因扩增时,细胞增殖周期将失调,从而促进肿瘤的发生。

本研究发现,CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 中 CyclinD1 的表达水平明显高于 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B($P=0.000$),说明 5-8F 鼻咽癌细胞增殖能力明显强于 6-10B。Bcl-2 抗凋亡蛋白和 Bax 促凋亡蛋白在鼻咽癌细胞凋亡调控过程中起到了重要作用。鼻咽癌细胞中,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。Bcl-2 与 Bax 表达的平衡直接决定细胞是否凋亡,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^[7]。

本研究发现相对于细胞株 6-10B 细胞株,5-8F 中凋亡因子 Bcl-2 明显高表达、Bax 明显低表达

($P=0.000$ 、 $P=0.000$)。5-8F 细胞株中 Bcl-2/Bax 高于 6-10B 细胞株($P=0.000$)。换句话说 CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 的凋亡水平低于 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B。肿瘤从原发灶向周围组织侵袭转移的过程中,必须先降解细胞外基质和基膜,而基质金属蛋白酶基因家族在这一过程中起到了重要作用。MMP-2 是基质金属蛋白酶基因家族中降解 IV 型胶原最主要的酶之一。在多种肿瘤如头颈组织、肺、乳腺、前列腺、直肠等的进展过程中发挥着重要作用^[8-11]。

本研究发现,5-8F 细胞株中 MMP-2 侵袭转移因子表达水平明显高于 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B 细胞株($P=0.000$),说明 5-8F 细胞的侵袭转移能力强于 6-10B 细胞。通过将 CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 和 CSF-1R 低表达细胞株 6-10B 中 CyclinD1、Bcl-2/Bax、MMP-2 的表达水平进行比较,发现 CSF-1R 高表达细胞株 5-8F 的增殖、侵袭转移能力更强,而细胞凋亡能力则较弱。由此,笔者预测 CSF-1R 高表达的鼻咽癌患者更容易发生肿瘤进展,预后更差。这一结果正好与鼻咽癌组织免疫组化的结果相吻合。虽然 CSF-1R 高表达诱导鼻咽癌进展的具体机制尚不清楚,还有待于进一步研究。但就目前了解的资料来看,这可能与 CSF-1/CSF-1R 依赖性的巨噬细胞异常活跃有关^[12]。其他肿瘤研究的证据也支持笔者此观点。Allavena 等^[13]在骨肉瘤小鼠模型中的研究表明,CSF-1/CSF-1R 过表达可以促进肿瘤相关巨噬细胞的分化和功能的激活,从而促进肿瘤快速进展且预后较差^[14,15]。因此,笔者预测在不远的将来 CSF-1R 或许成为鼻咽癌诊疗的一个潜在靶点。

综上所述,鼻咽癌细胞与正常鼻上皮细胞株之间 CSF-1R 的表达差异有统计学意义。CSF-1R 的表达与细胞增殖因子 CyclinD1、凋亡因子 Bcl-2 及 BAX、侵袭转移因子 MMP-2 的表达有一定的相关性,CSF-1R 表达水平越高,细胞的增殖、侵袭转移能力越强,凋亡能力越弱。

参考文献

- 1 邢艺,赵明峰.粒细胞集落刺激因子受体突变和髓系肿瘤发生[J].中国医学科学院学报,2016,38(1):103-107
- 2 范志松,邢栋,左静,等.胃癌组织中 G-CSF 和 G-CSFR 的表达及意义[J].临床与实验病理学杂志,2016,32(1):80-82
- 3 裴宝祥,孙冰生,张钰,等.集落刺激因子 1 在肺癌组织中的表达及其对预后的影响[J].中华肿瘤杂志,2015,37(2):113-118

(下转第 149 页)

ground of Hirschsprung disease: a bridge between basic science and clinical application [J]. J Cell Biochem, 2017, 119(1): 28–33

5 McKeown SJ, Stamp L, Hao MM, *et al.* Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2013, 2(1): 113–129

6 Chatterjee S, Kapoor A, Akiyama JA, *et al.* Enhancer variants synergistically drive dysfunction of a gene regulatory network in Hirschsprung disease [J]. Cell, 2016, 167(2): 355–368

7 Zhang JR, Zhang ZB. Syndromic Hirschsprung's disease and its mode of inheritance [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(5): 428–432

8 Henderson D, Zimmer J, Nakamura H, *et al.* Hirschsprung's disease in twins: a systematic review and meta-analysis [J]. Pediatr Surg Int, 2017, 33(8): 855–859

9 Zhao J, Xie X, Yao Y, *et al.* Association of VAMP5 and MCC genetic polymorphisms with increased risk of Hirschsprung disease susceptibility in Southern Chinese children [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(4): 689–700

10 Gui H, Schriemer D, Cheng WW, *et al.* Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes [J]. Genome Biol, 2017, 18(1): 48–60

11 Jiang Q, Liu F, Miao C, *et al.* RET somatic mutations are underrecognized in Hirschsprung disease [J]. Genet Med, 2018, 20(7): 770–777

12 Löf Granström A, Svenningsson A, Hagel E, *et al.* Maternal risk factors and perinatal characteristics for hirschsprung disease [J]. Pediatrics, 2016, 138(1): e20154608

13 Lai FP, Lau ST, Wong JK, *et al.* Correction of hirschsprung-associated mutations in human induced pluripotent stem cells via clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9, restores neural crest cell function [J]. Gastroenterology, 2017, 153(1): 139–153

14 Widowati T, Melhem S, Patria SY, *et al.* RET and EDNRB mutation screening in patients with Hirschsprung disease: functional studies and its implications for genetic counseling [J]. Eur J Hum Genet, 2015,

24(6): 823–829

15 Li S, Wang S, Guo Z, *et al.* miRNA profiling reveals dysregulation of RET and RET-regulating pathways in Hirschsprung's disease [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150222

16 Tang CS, Gui H, Kapoor A, *et al.* Trans-ethnic meta-analysis of genome-wide association studies for Hirschsprung disease [J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(23): 5265–5275

17 Uesaka T, Nagashimada M, Yonemura S, *et al.* Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1890–1898

18 Garcia-Barceló MM, Sham MH, Lui VC, *et al.* Chinese patients with sporadic Hirschsprung's disease are predominantly represented by a single RET haplotype [J]. J Med Genet, 2003, 40(11): e122

19 Cornes BK, Tang CS, Leon TY, *et al.* Haplotype analysis reveals a possible founder effect of RET mutation R114H for Hirschsprung's disease in the Chinese population [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e10918

20 Sribudiani Y, Chauhan RK, Alves MM, *et al.* Identification of variants in RET and IHH pathway members in a large family with history of Hirschsprung disease [J]. Gastroenterology, 2018, 155(1): 118–129

21 Torroglosa A, Alves MM, Fernandez RM, *et al.* Epigenetics in ENS development and Hirschsprung disease [J]. Dev Biol, 2016, 417(2): 209–216

22 Wallace AS, Schmidt C, Schachner M, *et al.* L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development [J]. Neurobiol Dis, 2010, 40(3): 622–633

23 Di Zanni E, Adamo A, Belligni E, *et al.* Common PHOX2B poly-alanine contractions impair RET gene transcription, predisposing to Hirschsprung disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1863(7): 1770–1777

(收稿日期: 2018-06-20)

(修回日期: 2018-07-04)

(上接第 139 页)

4 范志松, 左静, 李勇, 等. 实体肿瘤中 G-CSF 和 G-CSFR 的表达及作用的研究进展 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(10): 1145–1147

5 顾昊, 钱亚云, 刘延庆, 等. 集落刺激因子-1 通路对肿瘤相关巨噬细胞的调节作用 [J]. 中华全科医学, 2015, 13(10): 1687–1690

6 Moritz A, Li Y, Guo A, *et al.* Akt-RSK-S6-kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases [J]. Sci Signal, 2010, 3(136): ra64

7 王凤琴, 章许晶. 黏着斑激酶在鼻咽癌细胞系 6-10 B 中的表达及其对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(23): 5844–5846

8 孙春风. 基质金属蛋白酶-2 的结构和功能 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(3): 330–332

9 张波, 李航, 杨永生, 等. 基质金属蛋白酶及其抑制物与乳腺癌关系的研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(8): 1534–1537

10 张明明, 徐玉清. MMP-2 和 MMP-9 在恶性肿瘤中的研究进展

[J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(11): 820–823

11 曹敏, 卢宁. CD147 与 MMP-2 和 MMP-9 在乳腺癌中的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(7): 1209–1211

12 Huang L, Xu X, Hao Y. The possible mechanisms of tumor progression via CSF-1/CSF-1R pathway activation [J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(Suppl 2): 501–506

13 Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment [J]. Clin Exp Immunol, 2012, 167(2): 195–205

14 Lee CL, Blum JM, Kirsch DG. Role of p53 in regulating tissue response to radiation by mechanisms independent of apoptosis [J]. Transl Cancer Res, 2013, 2(5): 412–421

15 Dai W, Kloner RA. Potential role of renin-angiotensin system blockade for preventing myocardial ischemia/reperfusion injury and remodeling after myocardial infarction [J]. Postgrad Med, 2011, 123(2): 49–55

(收稿日期: 2017-08-12)

(修回日期: 2017-09-19)