

胞质 M-CSF 诱导 HeLa 细胞侵袭和迁移 *

张蒙夏^{2,3)} 刘琪³⁾ 吴海燕⁴⁾ 李响³⁾ 唐圣松^{1,4)**}

(¹⁾ 湖南医药学院生物医学研究中心, 怀化 418000; (²⁾ 湖南中医药大学组织胚胎学教研室, 长沙 410208;

(³⁾ 南华大学组织学与胚胎学教研室, 衡阳 421001; (⁴⁾ 南华大学药物药理研究所, 药物蛋白质组学湖南省高等学校重点实验室, 衡阳 421001)

摘要 为探讨巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)对人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)侵袭和迁移的影响及机制, 采用胞质定位空载体 pCMV/cyto/myc 与重组载体 pCMV/cyto/myc-M-CSF 稳定转染 HeLa 细胞株, 建立稳定高表达胞质 M-CSF 的细胞系(HeLa-M 细胞)。经 Transwell 实验观察胞质 M-CSF 对 HeLa 细胞侵袭和迁移能力的影响, 逆转录-聚合酶链式反应及蛋白质印迹检测细胞 Rho 三磷酸鸟苷酶(Rho GTPases)及基质金属酶的表达, 明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 2 的活性。结果显示, 与转染空载体的 HeLa 细胞(HeLa-C 细胞)和对照组 HeLa 细胞比较, 胞质 M-CSF 的高表达可明显增强 HeLa 细胞在体外的侵袭和迁移能力, 其机制与 Rho GTPases 的活化, 以及 MMP2 表达上调及其活性增高密切相关。

关键词 巨噬细胞集落刺激因子, 宫颈癌, 基质金属蛋白酶 2, 侵袭, 迁移

学科分类号 R737.33

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0045

巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)是由多种细胞产生的一种具有谱系特异性的细胞因子, 因其具有多种生物学功能而受到广泛重视^[1]。M-CSF 作为细胞外的信号分子, 在正常生理条件下, 游离于体液或与细胞外基质结合, 或仅在胚胎期出现于细胞膜表面, 一般在完成功能后即被内吞, 然后在细胞内降解, 细胞内往往不容易检测到 M-CSF 的表达。大量研究发现, 许多恶性肿瘤细胞中, 如白血病、乳腺癌和肺癌、淋巴瘤等^[2-5], 出现了非分泌型的 M-CSF, 包括膜结合型、胞外基质结合型、胞质内及胞核中的 M-CSF (总称异型 M-CSF) 的异常高表达, 并在肿瘤的发生和发展中起着重要的调控作用。Aharinejad 等^[6]在乳腺癌小鼠动物模型中发现 M-CSF 高表达, 且其癌细胞的侵袭和转移能力增强。Kirma 等^[7]用转基因技术发现 M-CSF 能促进肿瘤的发生和生长, 经小鼠乳腺肿瘤病毒启动子调节, 使 M-CSF 蛋白在乳腺组织中过度表达, 病理组织切片显示乳腺导管分支增加、增生、发育异常以及出现其他癌前病变, 表明 M-CSF 可促进细胞的不典型增生。研究发现, 与正常女性相比, 宫颈癌患者血清中 M-CSF 水平增高^[8], 而 Kirma 等^[9]检

测了临床上 17 例宫颈癌标本, 结果发现宫颈癌组织中 M-CSF 的表达亦明显上调, 提示 M-CSF 可能在宫颈癌的发生发展中起重要作用, 但其确切的作用机制仍不清楚。

基质金属酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一种以 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子作为辅助因子的内肽酶家族^[10], 通过对细胞外基质和基底膜的降解而促进肿瘤的浸润和转移^[11-13], 其中基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)与肿瘤的转移潜能关系最密切^[6, 14-15], 它们能破坏基底膜的完整性引起肿瘤细胞发生局部侵袭和远处转移。有研究^[16]发现, M-CSF 表达上调, 可引导肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)在瘤组织中的聚集, 并刺激其产生 MMP-2, 同时诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的生成, 促进肿瘤血管新生、肿瘤细胞侵袭

* 湖南省高校创新平台开放基金项目(09K072, 12K120), 湖南省教育厅青年项目(11B110)资助。

** 通讯联系人。Tel: 0745-2377102

E-mail: tangss111@163.com, tangss_submit@163.com

收稿日期: 2017-06-08, 接受日期: 2017-08-21

和转移. 此外, M-CSF 也可诱导肺癌组织 MMP-2 的表达而促进其癌细胞的侵袭. Aharinejad 等^[6]将 M-CSF 的反义寡核苷酸用于治疗人结肠癌细胞小鼠移植瘤, 结果发现 M-CSF 的反义寡核苷酸能减少肿瘤新生血管的形成, 并下调 MMP-2 和血管生成因子的表达. 这些研究均表明 M-CSF 对肿瘤的侵袭、血管新生等过程中发挥重要的调控作用, 可能与 MMP-2 相关. 本研究拟通过转染建立 M-CSF 胞质稳定高表达的人宫颈癌细胞系(HeLa 细胞), 检测细胞 MMP2、MMP9 的表达及活性, 并观察细胞迁移和侵袭的变化, 研究胞质 M-CSF 对 HeLa 细胞侵袭和迁移的影响及分子机制, 为探讨 M-CSF 在宫颈癌发生发展中的作用提供新的实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

HeLa 细胞由中山大学提供; Matrigel™ Basement Membrane Matrix 购自 BD 公司; Polycarbonate Membrane Transwell Inserts 购自 Corning 公司; pCMV/myc/cyto 和 pCMV/cyto/GFP 购自美国 Invitrogen 公司; 重组载体 pCMV/myc/cyto-M-CSF 由本课题组构建; 氨苄青霉素和链霉素购自华美公司; RPMI-1640 细胞培养基购自 Invitrogen 公司; 无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; Lipofectamine™2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 无内毒素质粒小提试剂盒(离心柱型)购于北京天为时代科技有限公司; 鼠抗人 M-CSF 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗等抗体购自 Santa Cruze 公司; 引物由上海生工公司合成; 其他试剂为进口或国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 HeLa 细胞稳定转染和阳性克隆的鉴定

HeLa 细胞株培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中, 置 37℃、5% CO₂ 的培养箱内静置培养, 取对数生长期细胞进行实验. 质粒经无内毒素质粒抽提试剂盒(离心柱型)提取和纯化(操作按试剂盒说明进行). 采用 Lipofectamine™2000 试剂盒进行转染后扩增细胞, 并采用逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)对稳定转染细胞进行鉴

定. 转染空载体的 HeLa 细胞称为 HeLa-C 细胞, 未转染的 HeLa 细胞称为 HeLa 细胞, 转染 M-CSF 的细胞称为 HeLa-M 细胞.

1.2.2 体外细胞迁移和侵袭实验

细胞迁移实验采用 Transwell 培养板, 迁移孔上下槽间为直径 6.3 mm, 孔径 8 μm 的多聚碳酸酯膜. 将 1:3 容积比稀释的基质胶均匀铺在 Transwell 嵌套上层, 置 37℃培养箱中孵育 1~2 h. 消化细胞用无血清培养基洗 3 次, 含 0.1% BSA 的无血清培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml. 用无血清培养基洗基质胶 1 次后, 在上室加入 200 μl 孔的细胞悬液, 下室中加入 500 μl 含有 10%FBS 条件培养基, 37℃培养箱中孵育 24 h. 取出 Transwell 用 PBS 洗 2 遍, 4%多聚甲醛固定, 室温孵育 15 min. 然后加入结晶紫(0.1%)染色 10 min, PBS 洗 2 遍, 用棉球擦去上表面细胞, 显微镜下观察, 随机计数 10 个视野内的细胞数, 计算平均值进行统计学分析. 以每个 400 倍高倍视野侵袭至滤膜下表面的细胞数目的多少反映肿瘤细胞侵袭能力的高低. Transwell 嵌套用 33%的醋酸将结晶紫染色洗脱下来, 洗脱液在酶标仪上测 A₅₇₀ 间接反映细胞数.

1.2.3 细胞骨架免疫荧光检测

根据武汉博士德生物工程有限公司的 SAB-Cy3 免疫组化试剂盒说明书操作.

1.2.4 逆转录-聚合酶链式反应

以 TRIZOL 法常规抽提细胞总 RNA, 按逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒说明进行逆转录聚合酶链式反应, 反应体系 25 μl, 含 cDNA 样品 2 μl, 上游引物和下游引物各 1 μl(10 mmol/L), Master Mix 为 12.5 μl, 其余用去离子水补足至 25 μl. 上机反应后, 取 10 μl 反应产物, 1.5%琼脂糖电泳分析, 以凝胶成像系统及相应的分析软件 AlphaImager 2200 分析产物的光密度值. 所用引物序列见表 1.

1.2.5 明胶酶谱法分析细胞 MMPs 的活性

收集培养的细胞, 用无血清培养液洗 2 次, 调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml, 并接种入 24 孔板, 常规培养 48 h, 离心 7 500 r/min, 4℃ 5 min, 取上清, 分装后在 -20℃ 保存备用. 在 10% 的 SDS-PAGE 电泳的分离胶中加入终浓度 1 g/L 的明

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer
Rac1	5' TCCGTGCAAAGTGGTATCCTG 3'
	5' CGGATCGCTTCGTCAAACAC 3'
cdc42	5' GCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA 3'
	5' TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA 3'
MMP-2	5' TGACGGTAAGGACGGACTC 3'
	5' TGCCCTGGAAGCGGAATGG3'
MMP-9	5' TCCCTGGAGACCTGAGAACC 3'
	5' GGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT 3'
GAPDH	5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG 3'
	5' TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG 3'

胶, 进行常规电泳. 以 2.5% TritonX-100 于室温摇床轻柔振荡洗涤电泳胶 2 次, 每次 20 min. 再以酶解缓冲液于室温下孵育 24 h, 期间每 12 h 换液 1 次. 然后经 0.25% Coomassie 蓝 R-250 室温染色 4 h, 此时明胶显示为兰色背景上有白色的条带, 摄像并分析其灰度值.

1.2.6 蛋白质印迹检测蛋白质表达

收集细胞, 使用三去污裂解液常规提取细胞总蛋白. 以 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳, 转移蛋白质至二氟化树脂膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF), 经 5% 的牛奶封闭 1~2 h 后, 依次序孵育相应蛋白质的一抗和二抗, 以高灵敏度化学发光检测试剂盒显色, 蛋白质条带经凝胶图像分析系统采集图像并进行半定量分析.

1.2.7 统计学分析

实验数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 SPSS 13.0 统计软件进行分析. 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 视为差异具有显著性.

2 实验结果

2.1 胞质 M-CSF 对 HeLa 细胞形态的影响

相差倒置显微镜观察显示, 与 HeLa 细胞和 HeLa-C 细胞比较, HeLa-M 细胞在显微镜下呈多边形、体积增大(图 1a). 三种细胞进行 HE 染色后发现, 与对照组细胞(HeLa 和 HeLa-C 细胞)相比, HeLa-M 细胞呈多边形、体积增大明显(图 1b).

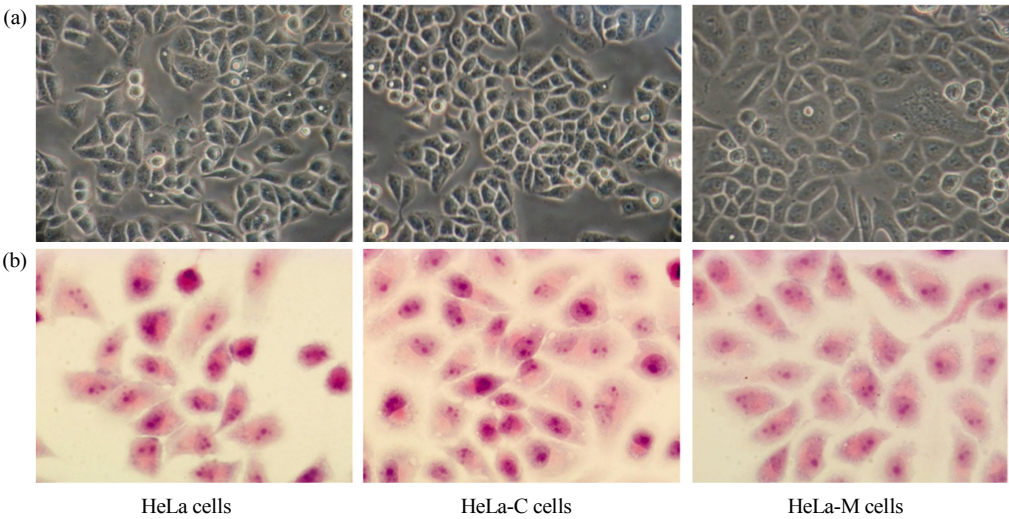


Fig. 1 The morphological changes of cell in HeLa cells, HeLa-C cells and HeLa-M cells(×200)

HeLa cells, HeLa-C cells and HeLa-M cells were cultured in the normal conditions, respectively. Morphology of cells was identified by inverted phase contrast microscope (a) and observed by microscope after HE staining (b).

2.2 胞质 M-CSF 对细胞骨架的影响

采用鼠抗人 α -Tubulin 单克隆抗体检测细胞骨架中微管蛋白的结构改变. 免疫荧光结果显示:

HeLa-M 细胞的微管蛋白在胞核附近呈圆环状, 放射状排列, 且较粗厚; 而对照细胞 (HeLa 和 HeLa-C 细胞)微管蛋白则弥漫分布呈细丝状(图 2).

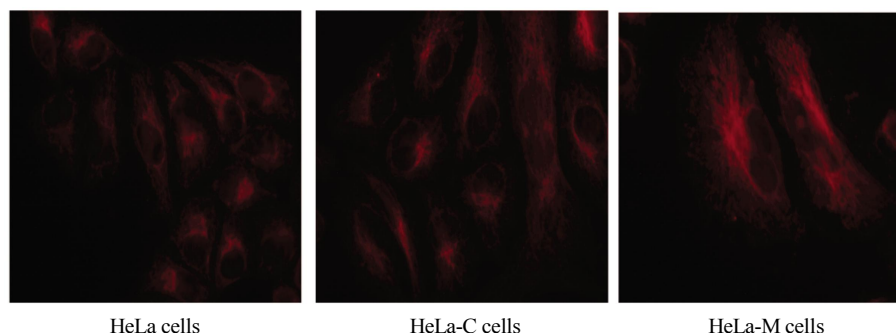


Fig. 2 The effect of M-CSF on cytoskeleton was measured by immunofluorescence of α -Tubulin ($\times 400$)

2.3 胞质 M-CSF 提高 HeLa 细胞的体外迁移能力

通过 Transwell 培养板进行体外细胞迁移实验, 迁移至 Transwell 微孔滤膜下表面的细胞, 经结晶紫染色(图 3a), 随机选取 10 个视野计数平均值. 结果显示, HeLa-M 细胞迁移能力显著高于 HeLa 细胞和 HeLa-C 细胞(图 3b, $P < 0.01$).

鉴于结晶紫只对细胞染色且可用醋酸洗脱, 洗

脱液测 A_{570} 可间接反映细胞数. 本实验将 Transwell 培养板染色用醋酸洗脱后测 A_{570} 值, 结果显示, HeLa-M 细胞组的 A_{570} 值为(0.54 ± 0.01), 与 HeLa 细胞组(0.27 ± 0.01)和 HeLa-C 细胞组(0.28 ± 0.01)比较有显著性增高(图 3c, $P < 0.01$), 而 HeLa 细胞与 HeLa-C 之间则无显著性差异.

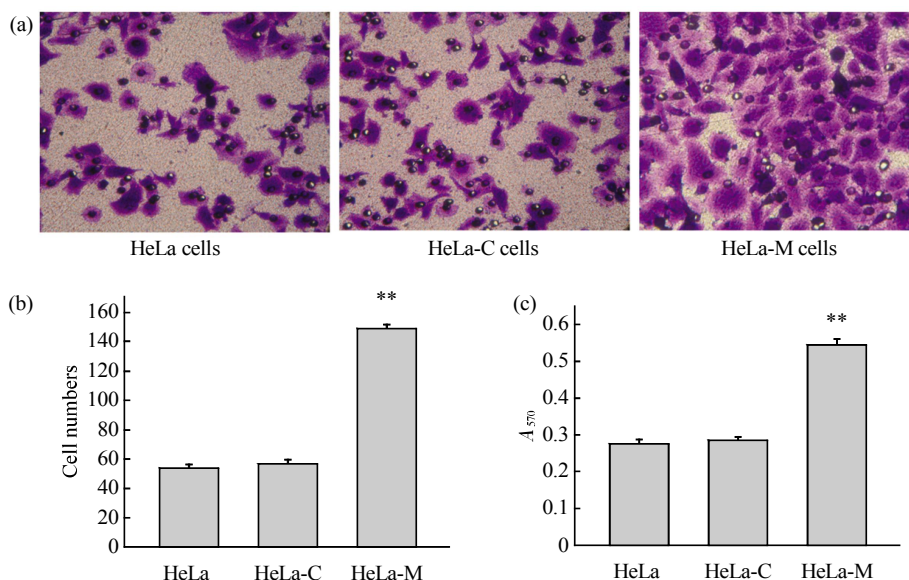


Fig. 3 The effect of M-CSF on the cells migration ability in vitro

The cells migration ability was detected by transwell method and crystal violet staining. (a) The morphology of cells was observed by microscope after staining with crystal violet; The average value of cell count (b) was counted from 10 visual fields and A_{570} value of acetic acid eluent (c) was detected by Microplate Reader, respectively. Each data point represents the mean of 3 independent experiments, ** $P < 0.01$, vs HeLa or HeLa-C groups.

2.4 胞质 M-CSF 对细胞迁移相关的 Rho GTP 酶表达的影响

采用半定量 RT-PCR 检测细胞迁移相关的 Rho

三磷酸鸟苷酶(Rho three phosphate guanosine, Rho GTPases)中的 ras 相关 C3 肉毒菌毒物底物 1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)和

(cell division control protein 42 homolog, cdc42)的 mRNA 表达, 结果发现, HeLa-M 细胞组的 Rac1 和 cdc42 基因明显上调(图 4a, b, c); 蛋白质印迹检

测显示 HeLa-M 细胞 Rac1 和 cdc42 蛋白表达上调(图 4d); 而免疫荧光结果还显示 HeLa-M 细胞的 cdc42 蛋白在胞质中表达明显增高(图 4e).

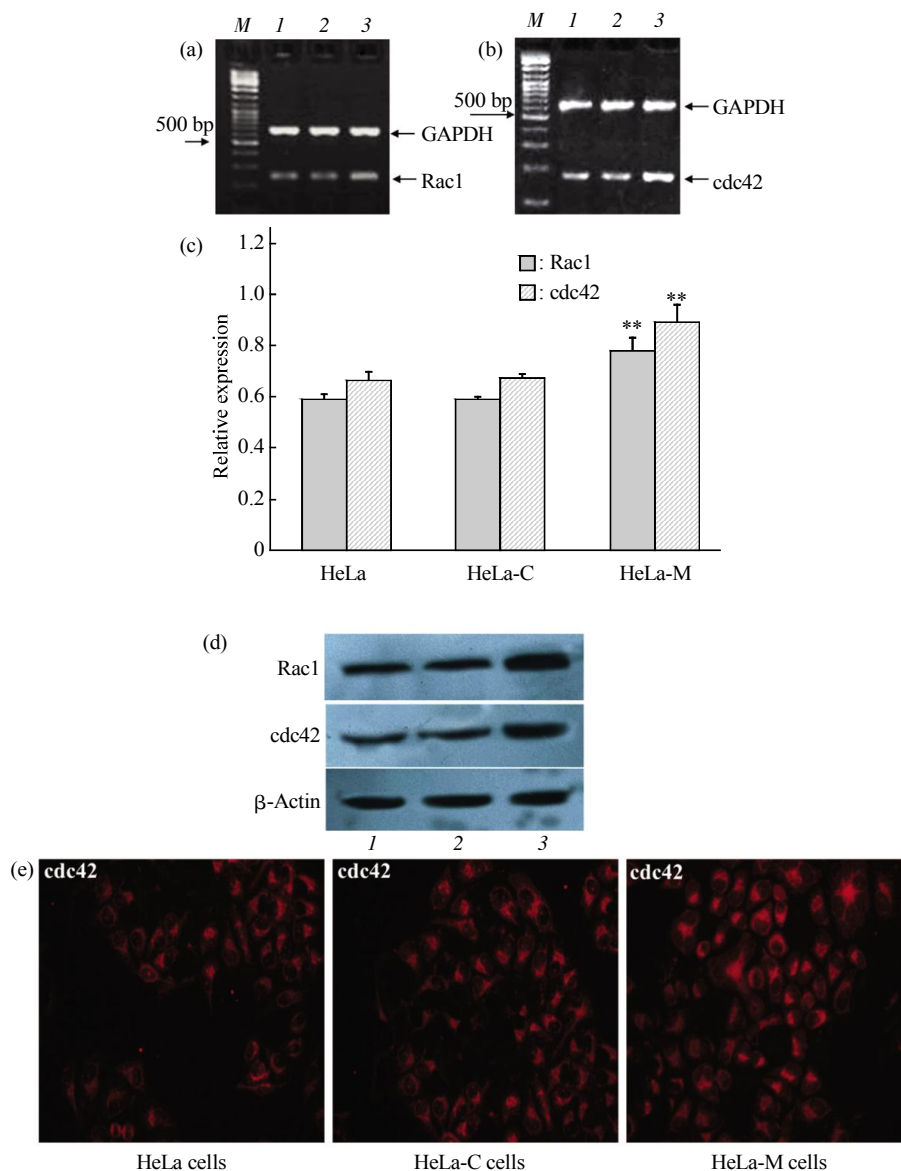


Fig. 4 The effect of M-CSF on the expression of Rho GTP (Rac1, cdc42)

(a, b) The expressions of Rac1 mRNA and cdc42 mRNA were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). M: 1 kb Marker, 1: the group of HeLa cells, 2: the group of HeLa-C cells, 3: the group of HeLa-M cells. (c) Bar Graph showed the levels of mRNA expression by densitometric analysis. (d) Western blot showed the changes in protein expression of Rac1 and cdc42. (e) Immunofluorescence showed the expression of cdc42 protein in cytoplasm. Each data point represents the mean of 3 independent experiments, $**P < 0.01$, HeLa-M vs HeLa or HeLa-C groups.

2.5 胞质 M-CSF 提高 HeLa 细胞的体外侵袭能力

采用 Transwell 侵袭实验观察胞质 M-CSF 对细胞侵袭的影响, 侵袭至 Transwell 微孔滤膜下表面的

细胞, 经结晶紫染色计数(图 5a, b)和醋酸洗脱液测 A_{570} 值(图 5c). 结果显示, HeLa-M 直接计数值为 (79.00 ± 2.34) , 其 A_{570} 值为 (0.35 ± 0.01) ; HeLa 组细

胞组直接计数为 (37.00 ± 6.89) , 其 A_{570} 值为 (0.21 ± 0.02) ; HeLa-C 组细胞直接计数值为 (42.60 ± 3.50) , 其 A_{570} 值为 (0.22 ± 0.02) , 表明 HeLa-M 组细胞侵

袭能力显著强于 HeLa 组和 HeLa-C 组的细胞 ($P < 0.01$).

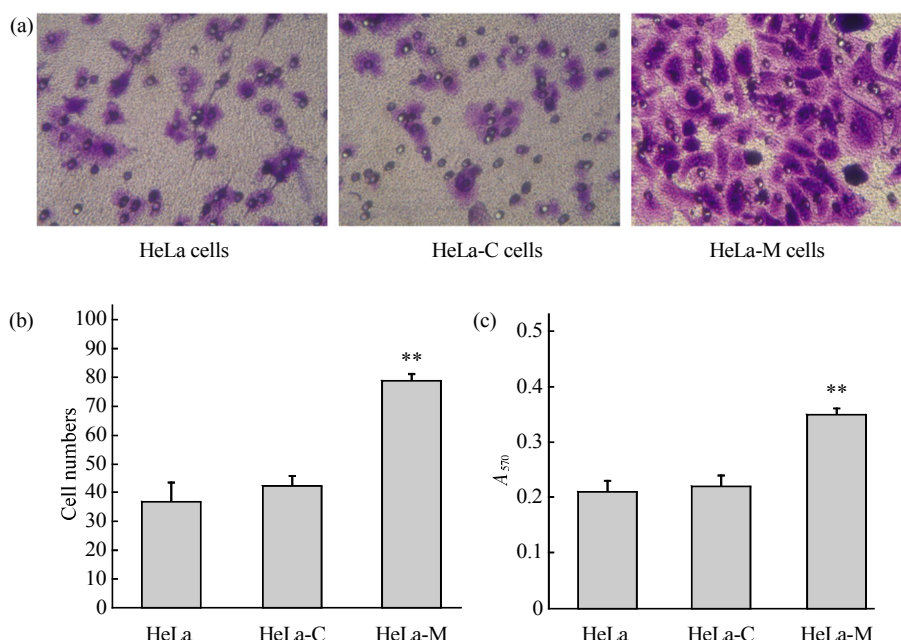


Fig. 5 The effect of M-CSF on the cells invasion ability in vitro

The cells invasion ability was detected by Transwell method and crystal violet staining. (a) The morphology of cells was observed by microscope after staining with crystal violet; The average value of cell count (b) was counted from 10 visual fields and A_{570} value of acetic acid eluent (c) was detected by Microplate Reader, respectively. Each data point represents the mean of 3 independent experiments, ** $P < 0.01$, HeLa-M vs HeLa or HeLa-C groups.

2.6 胞质 M-CSF 对细胞外基质金属蛋白酶 2/9 表达以及活性的影响

分别用半定量 RT-PCR 和明胶酶谱法检测了胞质 M-CSF 对细胞外基质金属蛋白酶 2/9 的表达以及活性的影响. HeLa-M 细胞的 MMP-2 mRNA 和蛋白的表达水平显著高于对照细胞(图 6a, $P < 0.01$), 而 3 种细胞的 MMP-9 表达水平无明显差别(图 6b, $P > 0.05$); 明胶酶活性电泳显示, HeLa-M, HeLa-C 和 HeLa 细胞均表达活性 MMP-2(~ 64 ku), 但 HeLa-M 细胞中 MMP2 的活性显著高于 HeLa-C 细胞和 HeLa 细胞(图 6d, $P < 0.01$).

3 讨 论

M-CSF 是一种具有多功能的细胞因子, 研究发现, 肿瘤细胞可出现非分泌性的 M-CSF 的异常高表达, 可导致肿瘤细胞的运动和侵袭能力增强, 患者预后不良, 也可能影响肿瘤细胞的耐药性^[17-18]. 提示非分泌型的 M-CSF 异常高表达可能对肿瘤的

发生和发展有重要的影响, 但其具体机制仍不清楚. 本研究以我们课题组已成熟构建的胞质稳定表达 M-CSF 的 HeLa 细胞(HeLa-M 细胞)模型为研究对象, 以探讨胞质 M-CSF 对 HeLa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及初步机制.

细胞骨架是维持细胞的形态结构和内部结构的基本结构, 在细胞运动、物质运输和细胞分化等方面有重要作用. 细胞骨架中的微管和中间纤维是维持细胞形态的支架性结构, 微管主要分布在核周围, 并呈放射状向胞质四周扩散, 微管的重构为细胞生命周期和分裂功能所必需. 因此, 为探讨胞质稳定高表达 M-CSF 后, 是否会影响 HeLa 细胞的形态及细胞骨架的重构, 本研究在显微镜下观察了转染 M-CSF 后 HeLa 细胞的形态变化以及微管蛋白的分布. 结果发现, 转染 M-CSF 的 HeLa 细胞体积明显增大、可见大量多核细胞, 免疫荧光显示该细胞的微管蛋白集中在胞核附近呈圆环状、放射状排列、且较粗厚, 而对照组的 HeLa 细胞微管蛋

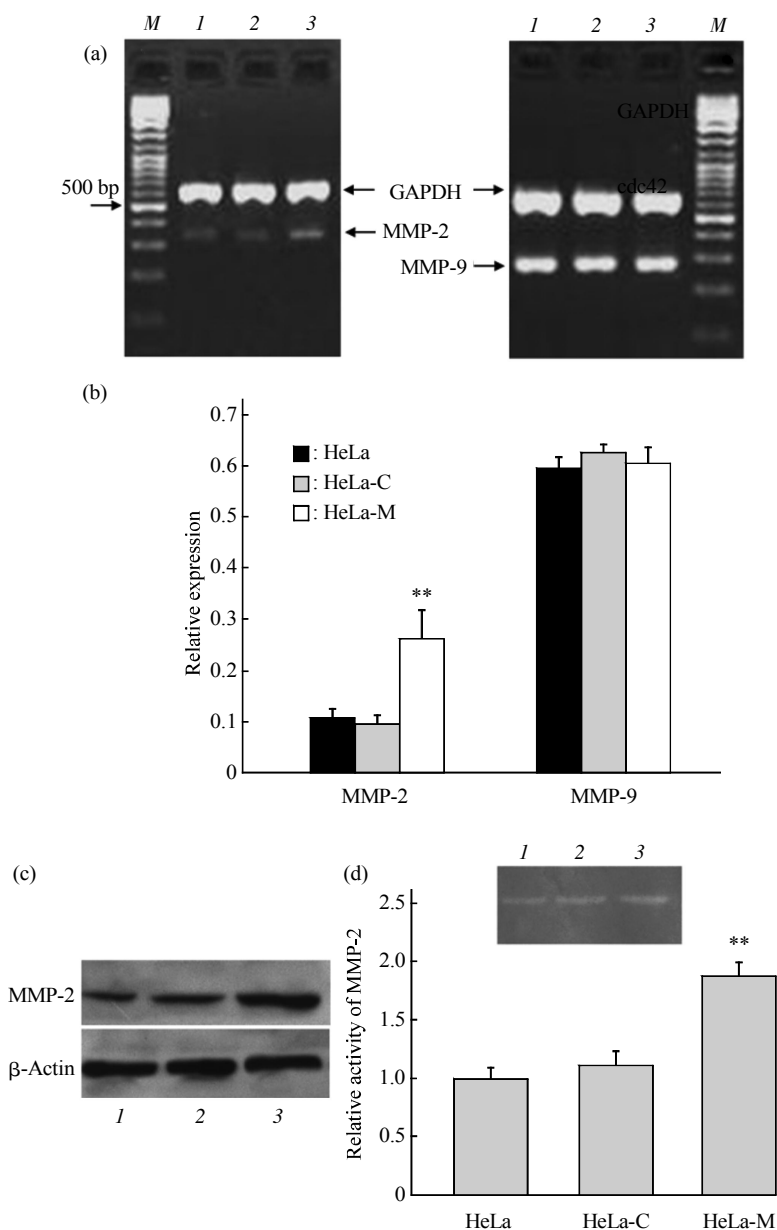


Fig. 6 The effect of M-CSF on the expression and activity of MMP-2

(a) The expressions of MMP-2 mRNA and MMP-9 mRNA were measured by RT-PCR. *M*: 1 kb Marker, *1*: the group of HeLa cells, *2*: the group of HeLa-C cells, *3*: the group of HeLa-M cells. (b) Bar Graph showed the levels of mRNA expression by densitometric analysis. (c) Western blot showed the changes in protein expression of MMP-2. (d) MMP-2 activity was detected by gelatin zymography assay. Each data point represents the mean of 3 independent experiments, ** $P < 0.01$, HeLa-M *vs* HeLa or HeLa-C groups.

白弥漫分布呈细丝状。这些结果提示胞质 M-CSF 可诱导微管蛋白的重构, 改变细胞的形态, 提示胞质高表达 M-CSF 可能会影响 HeLa 细胞的运动和增殖。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是最重要的恶性行为, 是肿瘤生长发展过程中密不可分的相关过程。整合

素诱导的 Rho GTPases 活化, 主要包括 Rac、Rho 和 Cdc42 的活化, 是影响肿瘤细胞迁移的重要因素^[19-20]。研究显示 Rho 的活化能够诱导肌动蛋白的弹力纤维的聚合及黏着斑复合体的形成, Rac 诱导肌动蛋白在细胞膜上的聚集, 继而产生丝状伪足, Cdc42 可以促进片状伪足在细胞边缘的形成, 进而

影响细胞的迁移^[21-22]。本研究通过 Transwell 实验观察了转染 M-CSF 后, HeLa-M 细胞的迁移运动能力, 结果发现, HeLa-M 细胞的迁移运动能力显著高于 HeLa 细胞与 HeLa-C 细胞, 并且 HeLa-M 细胞的 Rac1 和 cdc42 的表达明显上调, 提示胞质 M-CSF 上调 Rho GTP 酶(Rac1 和 cdc42)的表达可能是 HeLa 细胞迁移运动能力增强的原因之一。

此外, 本研究在 Transwell 培养板内铺薄层 Matrigel, 使之凝结后产生与细胞外基质相似的环境用于模拟体内的环境来测定 HeLa 细胞的侵袭能力。结果发现: 与 HeLa 细胞和 HeLa-C 细胞比对, 转染后稳定高表达 M-CSF 的 HeLa-M 细胞侵袭能力显著增强。基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 与肿瘤的侵袭密切相关, 它们主要通过降解细胞外基质和基底膜, 破坏基底膜的完整性而引起肿瘤细胞局部侵袭和远处转移^[15]。本研究则发现, HeLa-M 细胞 MMP2 的表达与 MMP2 酶活性显著高于 HeLa 细胞和 HeLa-C 细胞, 而 MMP9 的表达无明显变化, 提示胞质 M-CSF 高表达可能通过诱导 HeLa 细胞 MMP2 表达, 提高 MMP2 活性, 从而增强 HeLa 细胞的侵袭能力。

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤, 其癌细胞的侵袭迁移是决定其恶性程度和预后的关键因素, 而影响和调控宫颈癌细胞侵袭迁移的危险因素及分子机制仍未完全阐明。M-CSF 呈现分子的多态性, 因其定位分布不同以及分子大小不同而表现出不同的生物学功能。有研究提示 M-CSF 出现在恶性肿瘤细胞胞质和胞核时, 预示恶性肿瘤细胞运动和侵袭能力增强, 患者预后不良。本研究通过转染使宫颈癌 HeLa 细胞株胞质中高表达 M-CSF, 结果发现, 胞质 M-CSF 的高表达, 可明显增强 HeLa 细胞在体外的侵袭和迁移能力, 其初步机制与 Rho GTPases 的活化, 以及 MMP2 表达上调及其活性增高密切相关, 从而为揭示胞质 M-CSF 在宫颈癌发生发展的作用提供了新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*, 2016, **100**(3): 481-489
- [2] Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, *et al.* Functional relationship between tumor-Associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. *Front Immunol*, 2014, **5**(489): 1-15
- [3] Chockalingam S, Ghosh S S. Macrophage colony-stimulating factor and cancer: a review. *Tumour Biol*, 2014, **35**(11): 10635-10644
- [4] Li G, Song Y H, Wu K F, *et al.* Clone and expression of mutant M-CSF and its receptor from human leukemic cell line J6-1. *Leuk Res*, 2002, **26**(4): 377-382
- [5] van Haaften-Day C, Shen Y, Xu F, *et al.* OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125- II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal. *Cancer*, 2001, **92**(11): 2837-2844
- [6] Aharinejad S, Abraham D, Paulus P, *et al.* Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Res*, 2002, **62**(18): 5317-5324
- [7] 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. *Cancer Res*, 2004, **64**(12): 4162-4170
- [8] Adam R A, Horowitz I R, Tekmal R R. Serum levels of macrophage colony-stimulating factor-1 in cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, **180**(1): 28-32
- [9] 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. *Cancer Res*, 2007, **67**(5): 1918-1926
- [10] Lukaszewicz-Zajac M, Szmikowski M, Litman-Zawadzka A, *et al.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in comparison to other inflammatory proteins in gastric cancer (GC). *Cancer Invest*, 2016, **34**(7): 305-312
- [11] King S E. Matrix metalloproteinases: new directions toward inhibition in the fight against cancers. *Future Med Chem*, 2016, **8**(3): 297-309
- [12] Wiecek E, Jablonska E, Wasowicz W, *et al.* Matrix metalloproteinases and genetic mouse models in cancer research: a mini-review. *Tumour Biol*, 2015, **36**(1): 163-175
- [13] Al-Alem L, Curry T J. Ovarian cancer: involvement of the matrix metalloproteinases. *Reproduction*, 2015, **150**(2): R55-R64
- [14] Karthik S, Sankar R, Varunkumar K, *et al.* Romidepsin induces cell cycle arrest, apoptosis, histone hyperacetylation and reduces matrix metalloproteinases 2 and 9 expression in bortezomib sensitized non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2014, **68**(3): 327-334
- [15] Kostova E, Slaninka-Miceska M, Labacevski N, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 in patients with colorectal cancer. *Vojnosanit Pregl*, 2014, **71**(1): 52-59
- [16] Haines B P, Voyle R B, Rathjen P D. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**(4): 1369-1383
- [17] Zajkowska M, Glazewska E K, Bedkowska G E, *et al.* Diagnostic power of vascular endothelial growth factor and macrophage colony-stimulating factor in breast cancer patients based on ROC analysis. *Mediators Inflamm*, 2016, **2016**(5962946): 1-8

- [18] Zhang M, Zhang H, Tang F, *et al.* Doxorubicin resistance mediated by cytoplasmic macrophage colony-stimulating factor is associated with switch from apoptosis to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Biol Med* (Maywood), 2016, **241** (18): 2086–2093
- [19] Haga R B, Ridley A J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*, 2016, **7**(4): 207–221
- [20] Porter A P, Papaioannou A, Malliri A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*, 2016, **7**(3): 123–138
- [21] Begum R, Nur-E-Kamal M S, Zaman M A. The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Exp Mol Med*, 2004, **36** (4): 358–366
- [22] Cui X, Song L, Bai Y, *et al.* Elevated IQGAP1 and CDC42 levels correlate with tumor malignancy of human glioma. *Oncol Rep*, 2017, **37**(2): 768–776

Cytoplasmic M-CSF Induces Invasion and Migration of HeLa Cells*

ZHANG Meng-Xia^{2,3)}, LIU Qi³⁾, WU Hai-Yan⁴⁾, LI Xiang³⁾, TANG Sheng-Song^{1,4)**}

⁽¹⁾ Biomedical Research Center, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China;

²⁾ Department of Histology and Embryology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

³⁾ Department of Histology and Embryology, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁴⁾ Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract In order to study the effects and mechanisms of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) on invasion and migration in human cervical cancer cells (HeLa cell line), the empty vectors (pCMV/cyto/myc) and recombinant vectors (pCMV/cyto/myc-M-CSF) were transfected into HeLa cells to establish the stable cell line with high expression of cytoplasmic M-CSF (HeLa-M cells). Transwell tests were used to observe the effect of cytoplasmic M-CSF on the cell invasion and migration. MMP-2 activity was detected by gelatin zymography assay. The expression of mRNA and protein was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting. The results showed that the high expression of cytoplasmic M-CSF significantly enhanced the ability of invasion and migration ability in HeLa cells, compared with the empty vector transfected HeLa cells (HeLa-C cells) and the control group (HeLa cells). Our findings suggested that the mechanisms were closely related to the expressions of Rho GTPases (Rac1、cdc42), and the increasing activity and expression of MMP2.

Key words macrophage colony stimulating factor, cervical carcinoma, matrix metalloproteinase-2, invasion, migration

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0045

*This work was supported by grants from Hunan School of Higher Learning Foundation of Science and 266 Technology Innovation Platform (09K072, 12K120), Youth Foundation of the Education Department of Hunan Province (11B110).

**Corresponding author.

Tel: 86-745-2377102, E-mail: tangss111@163.com, tangss_submit@163.com

Received: June 8, 2017 Accepted: August 21, 2017