

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002072

人肺腺癌中癌相关成纤维细胞的分离培养与初步分析

孙世杰¹, 田 雷², 李 丹³, 刘先俊¹, 卜友泉¹

(1. 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院胸外科, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:分离鉴定人肺腺癌组织中的癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs), 分析 CAFs 对肺癌细胞增殖和迁移能力的影响, 为进一步探索 CAFs 在肺癌发生发展中的作用及机制奠定基础。**方法:**获取人肺腺癌患者手术样本, 分离并培养癌组织中的成纤维细胞。采用相差显微镜观察细胞形态, 采用间接免疫荧光实验分析关键分子标志物的表达。采用 CCK-8 法检测细胞增殖, 采用流式细胞仪分析细胞周期; 采用 Transwell 实验分析细胞迁移能力。采用共培养和制备条件培养基方法分析 CAFs 对肺腺癌细胞 A549 增殖和迁移能力的影响。采用 qRT-PCR 检测关键基因表达的变化。**结果:**从人肺腺癌新鲜组织中分离获得 CAFs, 其形态为长梭形, 表达纤粘蛋白和波形蛋白等成纤维细胞标志物, 不表达上皮细胞角蛋白 8/18(CK8/18)等上皮细胞标志物。肺腺癌 CAFs 增殖活跃。肺腺癌 CAFs 能明显促进 A549 的增殖和迁移能力, 并明显上调 A549 细胞中 c-Myc、PIM1、SOCS3 和 CCND1 基因的表达。**结论:**成功分离了人肺腺癌 CAFs, 其能明显促进肺癌细胞的增殖和迁移能力。

【关键词】肺癌; 成纤维细胞; 癌相关成纤维细胞; 原代培养**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-01-22

Isolation and identification of cancer-associated fibroblasts from human lung adenocarcinoma

Sun Shijie¹, Tian Lei², Li Dan³, Liu Xianjun¹, Bu Youquan¹

(1. Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University;

2. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

3. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To isolate and identify cancer-associated fibroblasts (CAFs) from human lung adenocarcinoma tissue, to investigate the effect of CAFs on the proliferation and migration of lung cancer cells, and to lay a foundation for further research on the role and mechanism of CAFs in the development and progression of lung cancer. **Methods:** Surgical specimens were obtained from patients with lung adenocarcinoma, and fibroblasts were isolated and cultured. A phase-contrast optical microscope was used to observe cell morphology, and indirect immunofluorescence assay was used to measure the expression of key molecular markers. CCK-8 assay was used to evaluate cell proliferation, flow cytometry was used to analyze cell cycle, and Transwell assay was used to assess cell migration ability. The co-culture method and a conditioned medium were used to analyze the effect of CAFs on the proliferation and migration of lung adenocarcinoma A549 cells, and qRT-PCR was used to measure the change in the expression of key genes. **Results:** CAFs were isolated from fresh human lung adenocarcinoma tissue, with a spindle-like shape. Immunofluorescence assay showed the expression of the fibroblast markers fibronectin and Vimentin in CAFs, while epithelial keratin 8/18 was not found in CAFs. The CAFs isolated from lung adenocarcinoma tissue showed active proliferation and significantly promoted the proliferation and migration of A549 cells and remarkably upregulated the mRNA expression of c-Myc, PIM1, SOCS3, and CCND1 in A549 cells. **Conclusion:** CAFs are successfully isolated from human lung adenocarcinoma tissue and such CAFs can significantly promote the proliferation and migration of lung cancer cells.

【Key words】lung cancer; fibroblast; cancer-associated fibroblast; primary culture

作者介绍: 孙世杰, Email: 1950944784@qq.com,

研究方向: 分子肿瘤学。

通信作者: 卜友泉, Email: buyouqen@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81672301); 重庆市基础科学与前沿技术研究重点资助项目 (编号: cstc2017jcyjBX0069)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190416.0939.004.html>

(2019-04-16)

肺癌是世界范围内癌症相关死亡最常见的原因之一。在绝大多数国家,肺癌的发病率和死亡率均呈明显上升趋势。据 2016 年全球癌症最新统计,新增肺癌确诊病例增加 14%,与肺癌相关的死亡率约占全球癌症死亡人数的 1/4^[1]。大量研究证实,肿瘤的发生发展除与肿瘤细胞自身的遗传改变相关外,与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)具有非常密切的关系^[2-3]。

肿瘤微环境是指肿瘤所处的细胞环境,包括围绕和支持肿瘤生长的血管、非肿瘤细胞以及分泌的各种细胞介质等。目前,肿瘤微环境研究主要关注 3 类非肿瘤细胞:血管生成性血管细胞(angio-genic vascular cells, AVCs)、浸润免疫细胞(infiltrating immune cells, IICs)和癌相关成纤维细胞(Cancer-associated fibroblasts, CAFs)^[2-3]。血管生成细胞为肿瘤细胞提供新生血管的形成提供营养物质。几乎所有的实体肿瘤都浸润多种免疫细胞,最近研究表明 IICs 提供直接和间接的促有丝分裂生长介质,可刺激肿瘤细胞及其邻近基质细胞增殖^[4]; CAFs 表达和分泌信号蛋白,包括促有丝分裂的上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF),以及表皮生长因子家族成员中的胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)、基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等,刺激肿瘤细胞的增殖^[5-8]。在肿瘤原发部位, CAFs 可通过释放生长因子和细胞因子进入循环,间接或直接刺激癌细胞向周围组织侵袭,从而增强肿瘤细胞的转移^[9-11]。

本研究旨在通过原代培养的方式,对人肺腺癌组织中的癌相关成纤维细胞进行分离鉴定,并进一步分析其对肺腺癌细胞的增殖和迁移能力的影响,为深入研究肺癌的分子发病机制以及开发新的肺癌精准诊断和治疗方案奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织标本

新鲜的肺腺癌肿瘤组织来自重庆医科大学第一附属医院胸外科,患者男性,49 岁,肺腺癌。本研究标本的采取获得患者知情同意并经重庆医科大学伦理委员会批准。

1.2 癌相关成纤维细胞的分离和培养

肺腺癌组织块浸泡于无菌 PBS 中(1%双抗),于冰上运

输至实验室。用无菌的器械去除坏死的组织与脂肪,使用 PBS 冲洗 3 次,去除血液。将组织块用无菌的剪刀剪切为 2~4 mm 小块,酶解 1 h(Miltenyi Biotec; 130-095-929)。1 500 r/min 离心后去上清,加入含 10%胎牛血清(ExCell Bio)的 F-12 培养基(HyClone)终止消化,200 目网筛过滤后,接种于 10 cm 无菌培养皿中,培养 48 h 换液,去除悬浮细胞。传代培养数代至形态学大致相近后,贴壁细胞即为成纤维细胞。

1.3 间接免疫荧光实验

将成纤维细胞与 A549 以适宜的细胞数目在 24 孔板中铺种于细胞爬片上。24 h 后 4%多聚甲醛固定细胞 15 min, 0.1% triton-100 处理 10 min, 10%山羊血清封闭 1 h。以 1:150 比例稀释抗体 CK8/18(福州迈新; MAB-0650), fibronectin(苏州睿瀛; RLM3137), Vimintin(苏州睿瀛; RLM3158)4 ℃孵育过夜。PBS 冲洗 3 次,荧光二抗染色 1 h,复洗 3 次后, DAPI 染色 5 min。

1.4 免疫组织化学

患者样本固定于 4%多聚甲醛 2 d,切片。放置 60 ℃烤箱烤片 2 h,然后浸泡于二甲苯 60 ℃烤箱脱蜡 2 次,各 30 min。梯度水化,每次 3 min,将切片置于摇床, PBS 漂洗 3 次。抗原修复:切片浸泡于柠檬酸修复液中,加热至煮沸, 15 min,自然冷却至室温;免疫组化染色(中杉金桥; pv-9002):滴加内源性过氧化物酶阻断剂封闭 10 min。一抗 4 ℃湿盒孵育过夜。次日, PBS 漂洗 3 次,加入反应增强液,室温孵育 20 min。漂洗后加入二抗室温孵育 15 min; DAB 显色 (ZLI-9018):滴加稀释好的染色剂,在显微镜下观察,避免染色过深。漂洗后 HE 染色 1 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片观察。

1.5 细胞增殖分析

细胞增殖使用 cell counting kit-8(Biomaker; B34302)试剂分析。A549 与成纤维细胞分别以 2 000 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。在细胞培养液中加入 1/10 体积的 CCK-8,充分混匀于 37 ℃培养箱中培养 2 h。在分光光度计中记录在 450 nm 波长下的吸光度值。

1.6 细胞周期分析

取对数期生长的细胞,用 0.25%的胰酶消化, 1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀,弃去上清, PBS 洗涤 2 次,加入预冷 75%乙醇,于 4 ℃固定过夜。1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,以 3 mL 的 PBS 洗涤 1 次,加入 400 μL 的 CCAA 溶液(PI 染液, 50 μg/mL, engreen), 100 μL 的 RNase A(100 μg/mL), 4 ℃避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测,计数 2 万~3 万个细胞,结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.7 Transwell 迁移实验

实验组中,提前 24 h 将 CAFs 接种于 24 孔板, 2×10⁴/孔,对照组不接种。第 2 天,无血清培养基重悬 A549,稀释密度为 1×10⁵/mL,接种于 Transwell (corning; 3422)小室中,上室 200 μL 无血清细胞悬液,下室 600 μL 培养基(10%血清),放置 37 ℃培养箱中。24 h 后, PBS 清洗,甲醇固定 30 min, 0.5%结晶紫溶液染色 10 min, PBS 清洗,显微镜观察拍照, 200×镜下随机 5 个视野计数并绘制柱状统计图。

1.8 CAFs 条件培养基的制备

将原代培养的 CAFs 接种于 10 cm 培养皿,用含 10%FBS 的 DMEM 培养细胞至融合度 100%,PBS 洗去培养皿中残余的 FBS 以及死细胞,加入无血清的 DMEM 培养 3 d,吸取培养基,0.45 μm 过滤器过滤,作为条件培养基(CM)4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.9 CAFs 条件培养基处理 A549 细胞

96 孔板中接种 A549,每孔 1 000 个细胞,待细胞完全贴壁后,用 PBS 洗去残余血清,实验组加入 CM,对照组加入无血清 DMEM,每天在细胞培养液中加入 10%的 CCK-8,记录 450 nm 处的吸光度值,绘制条形统计图。

1.10 定量 RT-PCR 分析

实验组 A549 与 CAFs 共培养,Transwell 上室接种 CAFs,对照组 A549 单独培养,无血清条件下培养 72 h,加入适量的 RNAiso Plus 收集细胞,室温静置 5 min,加入 1/5 提及的氯仿混合为匀浆,静置 5 min 后,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。取上清,加入等体积的异丙醇混匀静置 10 min,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,小心弃去液体。在沉淀中加入 1 mL 的 75%的乙醇清洗,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后干燥几分钟,使用 DEPC 水溶解总 RNA。使用 Takara 逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录为 cDNA 并稀释 20 倍,作为定量 PCR 模板,反应体系 10 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,设定 39 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线分析 5 s。GAPDH 作为内参,基因引物见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行相关基因表达结果分析。

表 1 定量 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
GADPH	上游引物 5'-ACGCAGGCCUUAAGGAGAATT-3'
	下游引物 5'-UUCUCCUUAAGGCCUGCGUTT-3'
STAT3	上游引物 5'-GCCACGTTGGTGTTCATAATC-3'
	下游引物 5'-TTCGAAGGTTGTGCTGATAGAG-3'
IL-6	上游引物 5'-TCTCCACAAGCGCCTTCG-3'
	下游引物 5'-CTCAGGGCTGAGATGCCG-3'
C-MYC	上游引物 5'-TTCGGGTAGTGGAACACAG-3'
	下游引物 5'-CAGCAGCTCGAATTTCTTCC-3'
PIM1	上游引物 5'-GACCCGAGTGATAGCCCTC-3'
	下游引物 5'-AAGAAAACCTGGCCCTGAT-3'
SOCS3	上游引物 5'-CACCTACTGAACCCCTCCTCC-3'
	下游引物 5'-AGAGATGCTGAAGAGTGGCC-3'
IRF1	上游引物 5'-ATGCTTCCACCTCTCACCAA-3'
	下游引物 5'-TGTAGCTGCTGTGTCATCA-3'
CCND1	上游引物 5'-GACGGCCGAGAAGCTGTGCA-3'
	下游引物 5'-GCCACCATGGAGGGCGGATT-3'
Twist1	上游引物 5'-GCCTTCTCGGTCTGGAGGAT-3'
	下游引物 5'-TTTCTCCTTCTCTGAAACAATGAC-3'
Snail	上游引物 5'-GGTTCTTCTGCGCTACTGCT-3'
	下游引物 5'-GTTAGGCTTCCGATTGGGGT-3'
N-Cadherin	上游引物 5'-ATCAACCCCATACACCAGCC-3'
	下游引物 5'-ACTAACCCGTCGTTGCTGTT-3'
Zeb1	上游引物 5'-TGCAGTGTGAGGAAAGAC-3'
	下游引物 5'-TGGTGATGCTGAAAGAGACG-3'

1.11 数据统计

利用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组数据间的比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 肺腺癌患者组织病理分析

患者男性,49 岁,病理诊断左下肺浸润性腺癌。实验室免疫组化结果显示腺癌细胞特异性蛋白角蛋白 8/18(CK8/18)表达阳性,如图 1 所示,证明获得的样本及实验取材为肺腺癌组织,符合临床诊断。

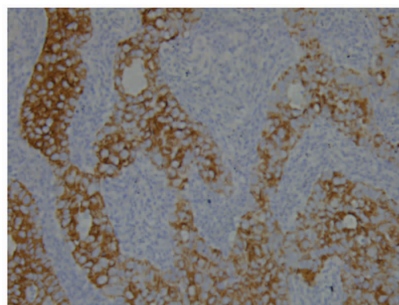
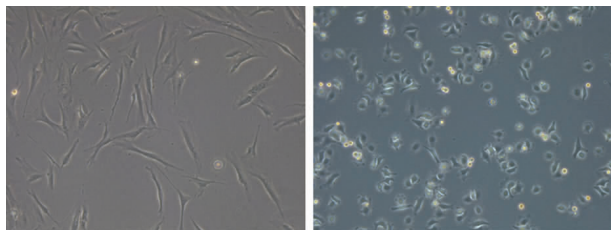


图 1 肺腺癌的免疫组织化学病理检测

2.2 肺腺癌 CAFs 的分离培养及鉴定

从肺腺癌患者手术样本中成功分离出成纤维细胞,10% 胎牛血清的 F-12 培养基培养,48 h 后可见少量贴壁细胞。镜下可见“长梭形”细胞为主且生长优势明显,其细胞形态与 A549 的多角形明显不同(图 2)。传代培养 3 次后获得形态统一的细胞,能够稳定传代 10 次以上,冻存复苏良好。



左图为 CAFs 形态为长梭形,右图为 A549 形态为多边形

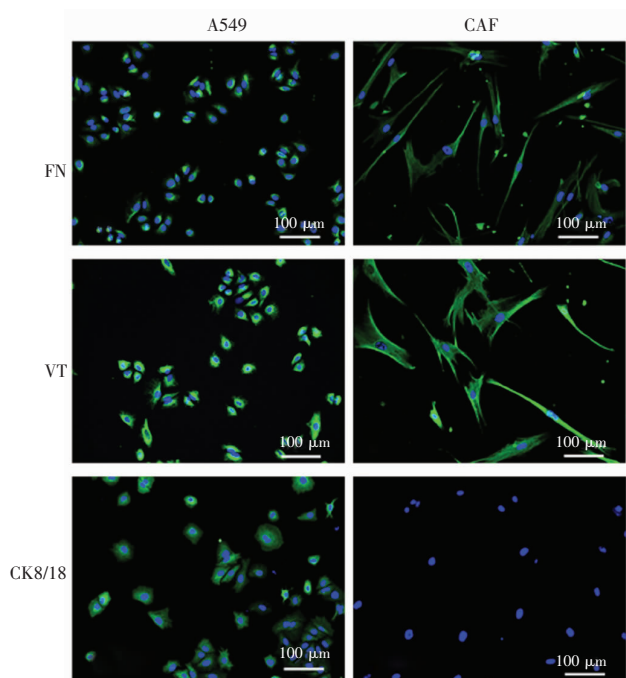
图 2 CAFs 和 A549 的形态 (400 $\times$)

分离纯化获得细胞培养 5 代后,免疫荧光染色,在荧光显微镜下观察到其表达成纤维细胞的生物标志物波形蛋白 (Vimentin) 和纤连蛋白 (Fibronectin),但不表达肺腺癌细胞特异性蛋白角蛋白 8/18(CK8/18)(图 3),证明成功分离获得了肺腺癌 CAFs。

2.3 肺腺癌 CAFs 的增殖特性分析

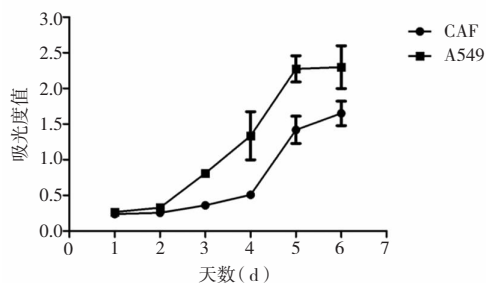
为了了解和对比 A549 与癌相关成纤维的生长特性,连续 6 d 检测肺腺癌细胞 A549 与肺腺癌 CAFs 的细胞增殖情况,绘制增殖曲线,均为 S 形曲线。起初 2 d 无明显差异,第 2 天后 A549 增殖速度大于成纤维细胞,两者均在第 4 天达到对数期,于第 6 天进入静止期(图 4)。肺腺癌 CAFs 增殖速度

略低于 A549,但两者有近似生长特性,说明 CAFs 也是肺腺癌组织中具有高增殖特性的细胞群体。



成纤维细胞表达生物标志物波形蛋白及纤连蛋白,但不表达肺腺癌细胞特异性蛋白角蛋白 8/18 (CK8/18)

图 3 肺腺癌 CAFs 和 A549 的间接免疫荧光分析



连续 6 d 使用 CCK-8 测定成纤维细胞与 A549 吸光度绘制增值曲线

图 4 肺腺癌 CAFs 与 A549 增殖特性比较

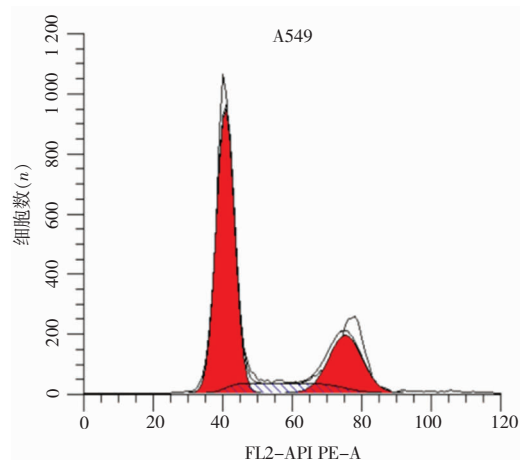
2.4 肺腺癌 CAFs 的细胞周期分析

流式细胞周期分析结果表明,肺腺癌细胞 A549 与肺腺癌 CAFs 处于 G1 期的细胞分别占总细胞数的 64.37%、60.66%, S 期分别为 11.65%、29.26%, G2/M 期分别占 23.98%、10.08% (图 5)。肺腺癌 CAFs 的 S 期细胞比例明显高于 A549,说明 CAFs 的 DNA 等分子的合成较为旺盛;而 A549 的 G2/M 期细胞比例明显较高,说明 A549 的增殖速度较快,这与前述的细胞增殖分析结果吻合。

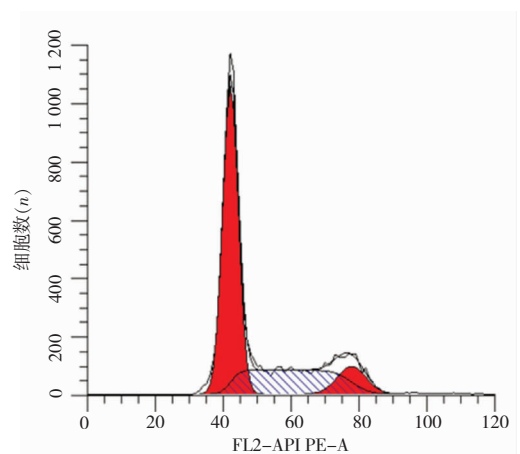
2.5 肺腺癌 CAFs 的条件培养基促进肺癌细胞的增殖

无血清培养基培养 CAFs 后 3 d 收集并过滤制备为条件培养基。实验组为条件培养基培养 A549,对照组为无血清培养基培养 A549。使用 CCK-8 试剂记录细胞增殖情况。肺腺癌 CAFs 的条件培养基培养的 A549 与 DMEM 组在起初 2 d

没有明显差异,但在第 3 天,CM 组细胞数目明显多于 DMEM 组,提示癌相关成纤维细胞的条件培养基对 A549 细胞的增殖有一定的促进作用(图 6)。

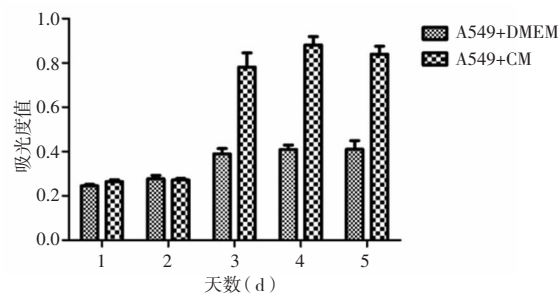


A. A549 的细胞流式周期结果



B. CAFs 细胞流式周期结果

图 5 流式细胞周期分析

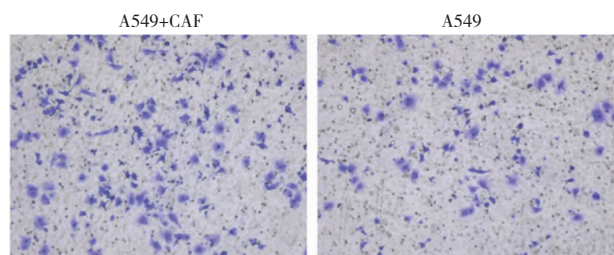


连续监测 6 d,CM 组于第 3 天开始大于 DMEM 组

图 6 CCK-8 检测 CM 对 A549 增值的影响

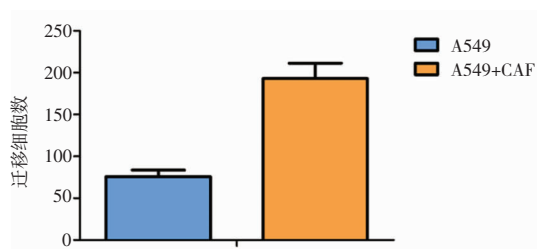
2.6 肺腺癌 CAFs 促进肺癌细胞的迁移

在 Transwell 迁移实验中,实验组在下室提前接种相同数量的 CAFs,对照组不接种,无血清培养基悬浮 A549 细胞并将其接种于 Transwell 上室中,下室为 10%FBS,24 h 后,实验组穿过 Transwell 小室的细胞数多于对照组(图 7),表明肺癌相关成纤维细胞可以促进肺癌细胞的迁移。



200 × 镜下左为 A549 与 CAFs 非接触式无血清共培养, 右为 A549 单独无血清培养, 24 h 后, 共培养组穿过的细胞明显多于单独培养组

A. 镜检观察细胞状态



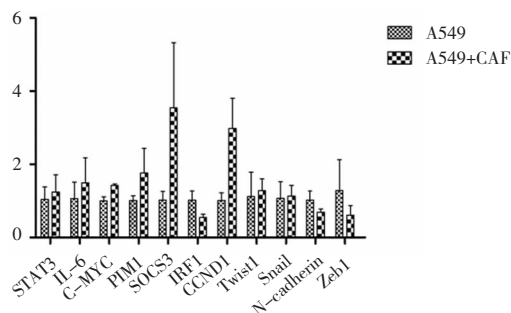
200 × 镜下随机 5 个视野计数绘制条形统计图

B. 细胞迁移计数

图 7 Transwell 迁移实验

2.7 与 CAFs 共培养后对 A549 基因表达的影响

为了进一步探讨肺腺癌 CAFs 促进肺癌细胞增殖与迁移的分子机制,本研究采用 qRT-PCR 技术检测了肺腺癌 CAFs 共培养后 A549 细胞中 STAT3 等与肿瘤增殖和迁移相关的关键基因表达的变化。定量 RT-PCR 结果表明,无血清培养 72 h 后,共培养组 c-Myc、PIM1、SOCS3 和 CCND1 基因的表达水平明显升高,IRF1 基因的表达水平明显降低(图 8),提示 CAFs 可能通过调节肺癌细胞内这些基因的表达而促进肺癌细胞的增殖和迁移能力。



无血清培养 72 h 后,共培养组 c-Myc、PIM1、SOCS3 和 CCND1 基因的表达水平明显升高,IRF1 基因的表达水平明显降低

图 8 共培养 CAFs 对肺腺癌细胞 A549 基因表达影响

3 讨论

肿瘤微环境不仅由恶性上皮细胞构成,还由多种间质细胞构成。自从“种子和土壤”假说提出以来,肿瘤微环境的生物学重要性已被广泛接受^[12]。与癌症相关的成纤维细胞被认为对许多癌症的发生、

促进和进展有影响^[13]。CAFs 是胶原生成细胞的主要来源,直接与癌细胞及内皮细胞、炎性细胞等基质细胞进行沟通。广泛的临床证据和实验小鼠模型的使用支持 CAFs 在肿瘤进展中的生物学重要性^[14]。肺癌细胞产生的氧化应激会造成周围基质中的 CAFs 发生自噬和线粒体氧化损伤^[15],产生大量的乳酸供给癌细胞生长,使之数量增加,诱导产生氧化应激的能力增强,CAFs 接受氧化应激后又重复自噬,由此产生恶性循环^[16]。CAFs 通过分泌一些信号分子,包括炎性细胞因子、生长因子和趋化因子来刺激肿瘤细胞并重塑细胞外基质。通过这些特性^[17-20],CAFs 通过促进肿瘤生长、生存、血管生成、炎症、耐药、侵袭和转移为肿瘤进展提供了合适的条件。除此之外,CAFs 通过旁分泌信号调节肺癌肿瘤干细胞特性,增强肿瘤细胞的耐药性和恶性程度^[21]。

本研究成功从肺腺癌组织中分离获得了肺腺癌的 CAFs。细胞增殖和细胞周期分析结果表明,CAFs 与肺腺癌细胞 A549 形态上具有明显差别,虽然增殖速度略小于 A549,但两者有近似生长特性,提示 CAFs 在肿瘤组织中生长旺盛,在实体肿瘤中有着不可或缺的重要作用。进一步分析分离获得的肺腺癌 CAFs 对肺腺癌细胞 A549 的增殖和迁移能力的影响,发现在共培养肺腺癌细胞与 CAFs 或使用条件培养基培养时,CAFs 能够促进肺腺癌细胞的增殖和迁移。该结果与乳腺癌中 CAFs 的报道一致^[22]。

有文献报道,CAFs 可激活肝癌细胞的 STAT3/Notch 通路,促进癌细胞的增殖和迁移能力^[23]。也有文献报道,CAFs 可上调 Twist1 促进 CXCL12 的表达和分泌,活化的 CXCL12/CXCR4 信号通路通过 ERK/AKT-twist1-MMP1/E-cadherin 通路促进食管癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的过程^[24]。本研究结果表明,CAFs 共培养后,A549 中的 c-Myc、PIM1、SOCS3 和 CCND1 基因转录上调,IRF1 转录下调,这几个基因均为 IL-6 介导的 STAT3 信号通路的下游靶基因,提示 CAFs 很可能通过激活肺癌细胞的 STAT3 通路而促进肺癌细胞的增殖与迁移。但是否如此,仍需进一步深入研究。实验结果中 Twist1、Snail、N-cadherin 和 Zeb1 没有明显变化,提示肺腺癌 CAFs 可能不影响肺癌细胞的 EMT。

有研究者认为,CAFs 是肿瘤肿块中的糖酵解室,为高能量需求的癌细胞提供其生长所必需的乳酸和代谢产物^[25]。也有研究发现,CAFs 不仅是肿瘤生存环境中的关键细胞成分,而且被认为与肿瘤和

肿瘤干细胞共同进化,通过分泌一些因子,如 IGF-II 和 IGF1-R 等来影响周围免疫细胞和肿瘤干细胞,从而促进和维持某些肿瘤干细胞的特征^[26]。但目前关于肺腺癌 CAFs 与癌细胞及肿瘤干细胞之间的交互作用研究很少,我们拟在本研究基础上开展该方面研究。

肿瘤细胞研究表明癌细胞在遗传上是不稳定的,经常发生变异;相反,在肿瘤微环境中的 CAFs 基因更稳定,这使其成为肿瘤治疗的最佳靶点^[27]。尽管如此,CAFs 对癌症进展的潜在影响机制仍不清楚。总之,本研究成功分离了肺腺癌 CAFs,并对其细胞生物学特性及其对肺癌细胞的增殖和迁移能力的影响进行了较为系统的鉴定和分析,为进一步探索 CAFs 在肺癌中的作用及机制奠定了良好基础。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil[J]. Cancer Letters, 2015, 368(1): 7-13.
- [3] Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 309-322.
- [4] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease[J]. Cancer Cell, 2005, 7(3): 211-217.
- [5] Erez N, Truitt M, Olson P, et al. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner[J]. Cancer Cell, 2010, 17(2): 135-147.
- [6] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. Cell, 2005, 121(3): 335-348.
- [7] Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(17): 2713-2722.
- [8] Scherz-Shouval R, Santagata S, Mendillo ML, et al. The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy[J]. Cell, 2014, 158(3): 564-578.
- [9] Elkabets M, Gifford AM, Scheel C, et al. Human tumors instigate granulocyte-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(2): 784-799.
- [10] Bruzzese F, Hägglöf C, Leone A, et al. Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15[J]. Cancer Res, 2014, 74(13): 3408-3417.
- [11] Miles FL, Sikes RA. Insidious changes in stromal matrix fuel cancer progression[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(3): 297-312.
- [12] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889[J]. Cancer Metastasis Rev, 1989, 8(2): 98-101.
- [13] Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas AG, et al. Metabolic co-operation between co-cultured lung cancer cells and lung fibroblasts[J]. Lab Invest, 2017, 97(11): 1321-1331.
- [14] Rønnevig-Jessen L, Petersen OW, Kotliarsky VE, et al. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells[J]. J Clin Invest, 1995, 95(2): 859-873.
- [15] Chaudhri VK, Salzler GG, Dick SA, et al. Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(6): 579-592.
- [16] Balliet RM, Capparelli C, Guido C, et al. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth; understanding the aging and cancer connection[J]. Cell Cycle, 2011, 10(23): 4065-4073.
- [17] Noma K, Smalley KS, Lioni M, et al. The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis[J]. Gastroenterology, 2008, 134(7): 1981-1993.
- [18] Grugan KD, Miller CG, Yao Y, et al. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(24): 11026-11031.
- [19] Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, et al. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis[J]. Cancer Res, 2015, 75(2): 284-295.
- [20] Zhang C, Wu M, Zhang L, et al. Fibrotic microenvironment promotes the metastatic seeding of tumor cells via activating the fibronectin 1/secreted phosphoprotein 1-integrin signaling[J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45702-45714.
- [21] Chen WJ, Ho CC, Chang YL, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3472.
- [22] Peng Q, Zhao L, Hou Y, et al. Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60321.
- [23] Xiong S, Wang R, Chen Q, et al. Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(2): 302-316.
- [24] Zhu X, Han S, Wu S, et al. Dual role of twist1 in cancer-associated fibroblasts and tumor cells promoted epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer[J]. Exp Cell Res, 2019, 375(2): 41-50.
- [25] Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, et al. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(7): 1045-1051.
- [26] Abe Y, Tanaka N. The hedgehog signaling networks in lung cancer: the mechanisms and roles in tumor progression and implications for cancer therapy[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 7969286.
- [27] Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 99(Pt B): 186-196.

(责任编辑:张辉洁)