

基础研究 DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000020

c-Ski 癌基因对肿瘤相关成纤维细胞活化的影响

杨得志¹, 王黎阳², 柳满然²

(1. 广西柳州市中医院病理科, 柳州 545001; 2. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究癌基因 c-Ski 对乳腺癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)活化的影响。**方法:**应用基因重组技术,将 c-Ski 基因克隆到载体 pBABE-puro,转染至永生化的正常乳腺成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs),嘌呤霉素药物筛选稳定转染细胞株;Western blot 检测转染后 c-Ski、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)的表达;通过 MTT 法、流式细胞术、细胞划痕实验及 Transwell 细胞侵袭实验研究转染前、后成纤维细胞增殖、迁移、侵袭能力的差异;收集细胞上清制备条件培养基,用 Transwell 细胞侵袭实验分析转染后成纤维细胞对 MD-MB-231 细胞侵袭能力的影响。**结果:**成功构建重组质粒 pBABE-puro-Ski;Western blot 检测结果显示, pBABE-puro-Ski 转染组细胞中 c-Ski、 α -SMA 和 FAP 表达明显高于空白对照组细胞($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.002$);MTT 法结果显示转染组细胞增殖能力高于空白对照组细胞($P=0.011$);转染组细胞的 S 期含量(38.58 ± 1.28)明显高于空载体组(25.05 ± 0.52)和空白对照组(26.01 ± 0.86),差异具有统计学意义($P=0.000$);细胞划痕实验及 Transwell 细胞侵袭实验结果表明转染组细胞的迁移、侵袭能力均高于空载体组和空白对照组细胞;转染组细胞条件培养基能明显促进 MD-MB-231 细胞的侵袭能力。**结论:**c-Ski 癌基因表达上调能促进 NFs 活化为 CAFs,并进一步促进乳腺癌细胞 MD-MB-231 的侵袭能力。

【关键词】乳腺癌; c-Ski 癌基因; 成纤维细胞**【中图分类号】**R737.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-08

Effects of c-Ski oncogene on the activation of cancer-associated fibroblasts

Yang Dezhi¹, Wang Liyang², Liu Manran²

(1. Department of Pathology, Hospital of Traditional Chinese Medicine in Liuzhou;

2. Key Laboratory of Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research the effect of c-Ski oncogene on the activation of breast cancer-associated fibroblasts (CAFs). **Methods:** The c-Ski gene was cloned into the vector pBABE-puro to construct the expression vector pBABE-puro-Ski then was transfected into normal fibroblasts (NFs); the stable transfected fibroblasts were selected by puromycin. Western blot was used to analyze the expression of c-Ski, α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast activation protein (FAP) after the transfection. MTT assay, flow cytometry, wound-healing experiment and Transwell assay were used to study the differences of cell proliferation, migration and invasion before and after the transfection. Conditioned media were collected and used to study the effect of fibroblasts on the invasion of MDA-MB-231 cells by Transwell assay. **Results:** The recombinant plasmid pBABE-puro-Ski was successfully constructed. Western blot showed that the expressions of c-Ski, α -SMA and FAP were higher in cells transfected with pBABE-puro-Ski than in those untransfected cells ($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.002$). MTT showed that the proliferation of pBABE-puro-Ski transfected cells was higher than that of untransfected cells ($P=0.011$). FCM showed that the S phase of pBABE-puro-Ski transfected cells (38.58 ± 1.28) was significantly higher than that of empty vector transfected (25.05 ± 0.52) or untransfected cells (26.01 ± 0.86) ($P=0.000$). Wound-healing experiment and Transwell assay revealed enhanced migration and invasion of the pBABE-puro-Ski transfected cells compared with those of the other two groups. Transwell assays showed that pBABE-puro-Ski transfected cells could promote the invasion of MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** Overexpression of c-Ski could stimulate the activation of breast CAFs and activated CAFs further promote the invasion of MDA-MB-231 cells.

【Key words】breast cancer; c-Ski oncogene; fibroblasts

作者介绍: 杨得志, Email: yangdezhi0214@hotmail.com,

研究方向: 肿瘤病理。

通信作者: 柳满然, Email: mliu-hncq@hotmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1114.019.html>

(2014-03-24)

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境的重要组成部分,与肿瘤的发生发展密切相关^[1]。一方面,CAFs 参与细胞外基质重塑,为肿瘤起始、侵袭提供机械应力支持;另一方面,CAFs 通过自分泌和旁分泌途径直接参与肿瘤血管形成、侵袭、转移、药物耐受等生理过程^[2]。CAFs 可由正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs)在细胞因子的作用下转分化而来,其主要的标志物是 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)^[3-4]。

Ski 癌基因首先作为 v-Ski 病毒癌基因在禽类 Sloan-Kettering 病毒中被鉴定出来^[5],随后发现其同源的细胞癌基因 c-Ski,其可诱导鸡胚成纤维细胞的致癌性转化^[6]。目前已发现 c-Ski 蛋白参与调控多种细胞生物学过程,并与肿瘤发生发展密切相关^[7],其在人类多种肿瘤细胞和组织中高表达,如乳腺癌、胃癌、黑色素瘤、直肠癌等。最近的研究表明 c-Ski 可促进创伤愈合并抑制瘢痕形成^[8],而创伤愈合中肉芽组织的活化过程与 CAFs 的活化非常相似,都涉及细胞外基质重塑、炎症、血管生成等。为进一步研究 c-Ski 基因与乳腺癌 CAFs 活化的相关性,本研究构建 pBABE-puro-Ski 表达载体,将其转染至永生化 NFs 细胞,检测相关生物学功能。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒和菌种

乳腺癌细胞 MDA-MB-231、质粒 pBABE-puro、感受态大肠杆菌 DH5 α 由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。质粒 pcDNA3-c-Ski 由第三军医大学周元国教授惠赠。

永生化 CAFs 细胞、永生化 NFs 细胞均取自乳腺组织,按文献方法^[9],将原代成纤维细胞分离培养后,导入人端粒酶蛋白催化亚单位基因,建立永生化成纤维细胞,由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

1.2 实验试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、Lipofectamine 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司。Transwell 小室购自 Millipore 公司。ECM 胶、MTT 购自 Sigma 公司。 β -actin 鼠抗人单抗、c-Ski 兔抗人多抗购自 Santa Cruz 公司。 α -SMA 兔抗人多抗、FAP 兔抗人多抗购自 Abcam 公司。高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamHI、DNA 连接酶、质粒小量抽提试剂盒购自 Takara 公司。引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.3 重组质粒 pBABE-puro-Ski 的构建及转染

根据 GenBank 人 Ski 基因的序列(序列号:NM_003036.3)设计引物如下:上游 P1:CTTCTCTAGGCGCCGGAAT,下游 P2:CGGGATCCCCGCGCCCCCTGCAC。扩增基因长度为 2 343 bp。以 pcDNA3-c-Ski 质粒为模板,通过以下条件进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10s,55 $^{\circ}\text{C}$ 15s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 20 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5min,将获得的 c-Ski 基因片段定向插入载体 pBABE-puro 的多克隆位点,扩增并提取纯化重组质粒。用脂质体法将构建成功的 pBABE-puro-Ski 和空载体 pBABE-puro 分别转染 NFs,培养 48 h 后加入嘌呤霉素 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 筛选培养 14 d,得到稳定转染的 c-Ski 转染细胞(NF/c-Ski)和空载体转染细胞(NF/Vec)。

1.4 Western blot 法检测 c-Ski、 α -SMA 和 FAP 的表达

常规培养细胞,收集转染组和对照组细胞,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。配制 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 50 μg 总蛋白,电泳。用半干转法将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)。常规封闭、洗膜后分别加入 c-Ski 兔抗人多抗(1:500 稀释)、 α -SMA 兔抗人多抗(1:1 000 稀释)、FAP 兔抗人多抗(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h。洗膜,ECL 显色后照相,用 Quantity One 软件分析实验结果。

1.5 MTT 法测定 c-Ski 对成纤维细胞增殖的影响

取对数生长期的 NF/c-Ski、NF/Vec、NF、CAF 细胞,消化离心计数细胞,用含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FBS)的 DMEM 培养基调整细胞密度,接种于 96 孔板,5 $\times 10^3$ 个/孔,每孔 200 μl ,每组细胞重复 3 孔,同时另设 3 孔空白对照。于 5%CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱常规培养 5 d,每天取一块 96 孔板,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)10 μl ,继续培养 4 h 后吸弃上清,加入 200 μl 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡 10 min,用酶标分析仪在 492 nm 波长处测定各孔吸光度值,连续检测 5 d。以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的 NF/c-Ski、NF/Vec、NF、CAF 细胞,消化并接种于 6 孔板,用无血清 DMEM 培养基饥饿 24 h,细胞融合度达 75%时消化细胞,PBS 清洗 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 75%酒精重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,流式细胞仪检测各细胞周期。

1.7 细胞划痕实验检测 c-Ski 对成纤维细胞迁移的影响

分别将 NF/c-Ski、NF/Vec、NF 细胞,消化并接种于 6 孔板,常规培养 24 h,用 200 μl 移液枪头在 6 孔板内垂直划痕,PBS 清洗 3 次,更换为无血清 DMEM 培养基,于 5%CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱常规培养。48 h 后将 6 孔板置于倒置显微镜下观察并拍照。

1.8 Transwell 细胞侵袭实验检测 c-Ski 对成纤维细胞侵袭的影响

Transwell 小室中加入 40 μl ECM 胶溶液,保证液体平铺于小室底部,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min 使其凝固。取对数生长期的

NF/c-Ski、NF/Vec、NF 细胞,消化离心计数,以无血清培养基重悬,每个 Transwell 小室加入 200 μ l 含有 5×10^3 个细胞细胞悬液。Transwell 下室加入 600 μ l 含 10%FBS 的 DMEM 培养基。每组设 3 个重复样本。常规培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,吸弃上室液体,PBS 清洗 3 次,用棉签轻轻转动以吸干上室内水分并擦去内侧细胞,0.1%结晶紫染色 3 min,用流水冲去染液。每个小室置于正置显微镜 100 倍视野下观察,随机选取 5 个视野并计数,拍照。

1.9 Transwell 细胞侵袭实验检测成纤维细胞对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

取对数生长期的 NF/c-Ski、NF/Vec、NF、CAF 细胞,待其细胞融合度达到 80%,去除培养基,PBS 清洗 3 次,更换为无血清 DMEM 培养基,继续置于 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h,收集细胞上清,1 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片,即得用于 Transwell 侵袭实验的条件培养基,分别命名为: NF/c-Ski-CM、NF/Vec-CM、NF-CM、CAF-CM。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,消化后加入 Transwell 上室,下室中分别加入各组条件培养基,其余步骤与以上 Transwell 细胞侵袭实验相同。

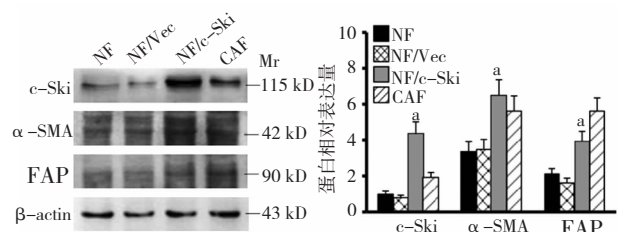
1.10 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 转染细胞中 c-Ski、 α -SMA 和 FAP 蛋白的表达

Western blot 结果经 Quantity One 软件扫描统计分析,由图 1 可见,不同组别的 c-Ski 表达量不全相同 ($F=98.073$, $P=0.000$),LSD-*t* 法两两比较,转染 NFs 细胞组较 c-Ski 空载体转染组 (NF/Vec) 和未转染组细胞 (NF) 明显高表达 ($t=16.620$, $P=0.000$)。同时,不同组别的 α -SMA 和 FAP 蛋白表达量均不全相同 (α -SMA: $F=43.123$, $P=0.000$; FAP: $F=10.044$, $P=0.000$),LSD-*t* 法两两比较,NF/c-Ski 组 α -SMA 和 FAP 表达量均明显高于 NF 组,差异有统计学意义 (α -SMA: $t=9.242$, $P=0.001$; FAP: $t=7.299$, $P=0.002$)。



a: 与 NF 组相比,差异有统计学意义

图 1 c-Ski 对成纤维细胞中 α -SMA 和 FAP 蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of c-Ski on the expression of α -SMA and FAP protein in fibroblasts

2.2 c-Ski 对成纤维细胞增殖的影响

MTT 法检测 4 组细胞的体外增殖能力,细胞增殖曲线结果表明 CAFs 细胞的增殖能力强于 NFs 细胞,而过表达 c-Ski 能明显促进 NFs 细胞的增殖能力 (图 2)。对第 5 天各组细胞的数据进行分析,4 组之间比较使用方差分析,差异有统计学意义 ($F=25.936$, $P=0.000$),再进行两两比较, NF/c-Ski 组和 CAF 组的吸光度值明显高于 NF 组,差异具有统计学意义 (NF vs. NF/c-Ski: $t=4.484$, $P=0.011$; NF vs. CAF: $t=6.104$, $P=0.004$),见表 1。

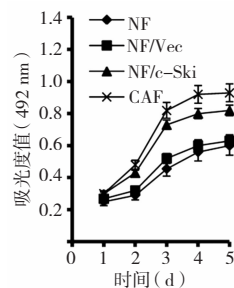


图 2 c-Ski 对成纤维细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of c-Ski on the proliferation of fibroblasts

表 1 不同组别细胞体外增殖能力比较

Tab.1 Comparison on cell proliferation in vitro among four groups

细胞分组	例数 (n)	吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
NF	3	0.600 $\pm$ 0.077	25.936	0.000
NF/Vec	3	0.630 $\pm$ 0.036		
NF/c-Ski	3	0.820 $\pm$ 0.037 ^a		
CAF	3	0.930 $\pm$ 0.054 ^a		

注:a,与 NF 组相比,差异有统计学意义

2.3 流式细胞仪结果分析

流式细胞检测的结果显示,不同组别的 S 期百分比不全相同 ($F=96.309$, $P=0.000$),LSD-*t* 法两两比较,CAF 组细胞的 S 期百分比 (34.65 ± 1.67) 明显高于 NF 组 (26.01 ± 0.86),而 NF/c-Ski 组的 S 期 (38.58 ± 1.28) 也明显高于 NF 组,差异具有统计学意义 (NF vs. NF/c-Ski: $t=14.138$, $P=0.000$; NF vs. CAF: $t=7.965$, $P=0.001$) (表 2)。

表 2 不同组别细胞周期组成比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Composition on composition of cell cycle among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期组成 (%)		
	G1期	S期	G2/M期
NF	67.28 $\pm$ 0.64	26.01 $\pm$ 0.86	6.71 $\pm$ 0.33
NF/Vec	68.55 $\pm$ 0.23	25.05 $\pm$ 0.52	6.40 $\pm$ 0.29
NF/c-Ski	50.73 $\pm$ 1.67	38.58 $\pm$ 1.28 ^a	10.70 $\pm$ 1.42
CAF	57.71 $\pm$ 2.23	34.65 $\pm$ 1.67 ^a	7.64 $\pm$ 1.27
F 值	103.489	96.309	12.150
P 值	0.000	0.000	0.002

注:a,与 NF 组相比,差异有统计学意义

2.4 c-Ski 对成纤维细胞迁移的影响

细胞划痕实验的结果表明,划痕 48 h 后,NF 和 NF/Vec 组划痕仍处于愈合期,NF/c-Ski 组的细胞划痕已完全愈合,说明过表达 c-Ski 能够促进成纤维细胞的迁移能力(图 3)。

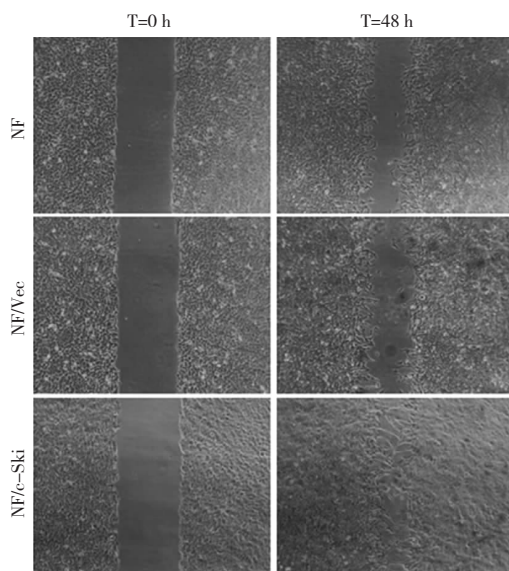
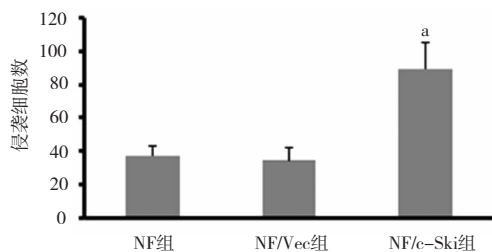
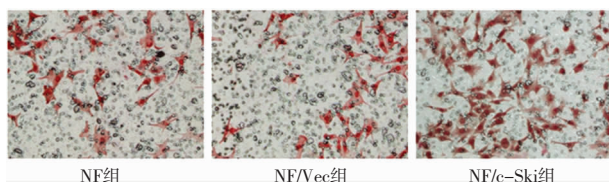


图 3 c-Ski 对成纤维细胞迁移的影响

Fig.3 Effect of c-Ski on the migration of fibroblasts

2.5 c-Ski 对成纤维细胞侵袭的影响

由图 4 可见侵袭实验中,不同组别的侵袭细胞数差异明显($F=114.760, P=0.000$),LSD- t 法两两比较,NF/c-Ski 组细胞侵袭穿过 Transwell 小室的侵袭细胞数明显多于 NF 组,差异具有统计学意义($t=12.737, P=0.000$),说明过表达 c-Ski 能够促进成纤维细胞的侵袭能力。



a, 与 NF 组相比, 差异有统计学意义

图 4 c-Ski 对成纤维细胞侵袭的影响

Fig.4 Effect of c-Ski on the invasion of fibroblasts

2.6 成纤维细胞对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

由图 5 可见,侵袭实验中,CAF-CM 组中 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力高于 NF-CM 组,同时,与 NF-CM 和 NF/

Vec-CM 组相比,NF/c-Ski-CM 组中 MDA-MB-231 细胞侵袭穿过 Transwell 小室的细胞数明显增多,说明 NF/c-Ski 可促进 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力,具有与 CAF 相似的生物学功能。

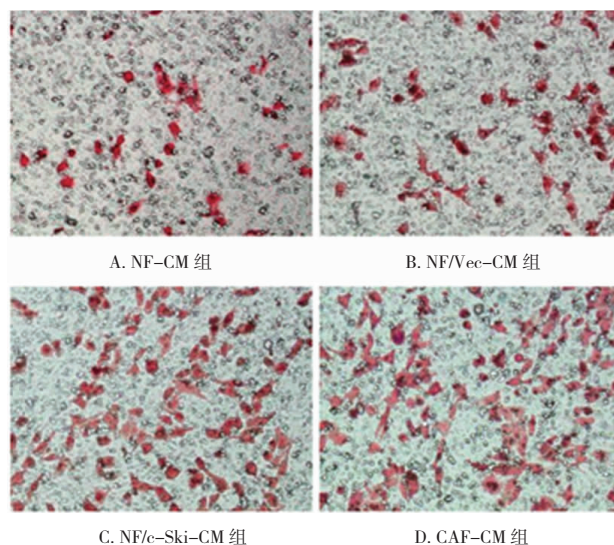


图 5 成纤维细胞对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

Fig.5 Effect of fibroblasts on the invasion of MDA-MB-231 cells

3 讨论

乳腺癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤,近年在中国的发病率也呈上升趋势^[10]。目前对于肿瘤的相关研究,肿瘤微环境越来越受到关注。肿瘤微环境是包含多种成分的动态结构,这些成分包括肿瘤细胞、间质组织以及周围的细胞外基质。CAFs 是肿瘤间质的主要成分之一,参与肿瘤进展的多个方面,在肿瘤发生发展中起重要作用。研究发现正常的成纤维细胞可被周围的肿瘤细胞诱导分化为 CAFs 并与肿瘤细胞之间发生相互作用^[11-12]。c-Ski 是一个高度保守的癌蛋白,在细胞的多种生物学过程中发挥重要作用,如增殖、分化、转化和肿瘤进展^[13-15]。目前的研究表明 c-Ski 的异常表达与多种肿瘤的起始和进展有密切关系,并且 c-Ski 通过促进肌成纤维细胞的增殖而促进创伤愈合^[8]。创伤愈合过程与肿瘤进展之间具有很多相似性,不同的是 CAFs 逃避细胞凋亡,持续活化进而促进肿瘤生长,而目前 c-Ski 在 CAFs 中的作用还未明确。

本研究构建了人 c-Ski 基因的重组表达质粒,并成功转染至正常成纤维细胞,显著上调了 CAFs

标志物 α -SMA 和 FAP 蛋白的表达。研究 c-Ski 对成纤维细胞生物学特性的影响发现,过表达 c-Ski 可明显促进成纤维细胞的增殖、迁移和侵袭能力,使 NFs 表现出于 CAFs 相似的生物学特性。进一步研究成纤维细胞对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭的影响发现,转染 c-Ski 组成纤维细胞与 CAFs 均能明显促进 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

CAFs 是肿瘤微环境的重要组成,参与肿瘤发生发展的多个过程,其主要通过自分泌和旁分泌途径与肿瘤细胞相互作用,进而促进肿瘤的发生发展^[4],c-Ski 可能是通过调控细胞因子,如转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)、人基质细胞衍生因子 1(stroma cell-derived factor 1,SDF-1)等,参与 CAFs 的活化过程,研究 c-Ski 对 CAFs 相关的细胞因子的影响以研究 c-Ski 促进 CAFs 活化的分子机制是我们下一步的研究重点。目前关于 c-Ski 对肿瘤发展的作用尚不完全清楚^[7],需要更广泛地研究 c-Ski 在不同肿瘤以及不同病理阶段的作用及分子机制,而本研究发现的 c-Ski 与 CAFs 活化之间的关系,说明 c-Ski 可能通过影响 CAFs 进而促进了肿瘤的发展,为研究其对肿瘤发展的作用提供了一个新的思路。综上所述,本研究发现 c-Ski 可以促进乳腺癌 CAFs 的活化,进而促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭能力。这个发现有助于了解 CAFs 活化的分子机制,并提示 c-Ski 可能是一个针对乳腺癌治疗的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(1): 19-25.
- [2] Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, et al. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(11): 1403-1418.
- [3] Liu R, Li H, Liu L, et al. Fibroblast activation protein: a potential therapeutic target in cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(3): 123-129.
- [4] Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(1): 67-73.
- [5] Ferrand N, Atfi A, Prunier C. The oncoprotein c-Ski functions as a direct antagonist of the transforming growth factor- β type I receptor[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8457-8466.
- [6] Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, et al. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- β signal in gastric cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3334-3344.
- [7] Bonnon C, Atanasoski S. c-Ski in health and disease[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 51-64.
- [8] Li P, Liu P, Xiong RP, et al. Ski, a modulator of wound healing and scar formation in the rat skin and rabbit ear[J]. *J Pathol*, 2011, 223(5): 659-671.
- [9] 彭琼乐, 王黎阳, 赵浏阳, 等. 人端粒酶蛋白催化亚单位基因逆转录病毒真核表达质粒的构建及其对人乳腺癌相关成纤维细胞增殖的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(12): 1594-1598.
- [10] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [11] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 332-337.
- [12] Lu Y, Yang W, Qin C, et al. Responsiveness of stromal fibroblasts to IFN- γ blocks tumor growth via angiostasis[J]. *J Immunol*, 2009, 183(10): 6413-6421.
- [13] Kim KO, Sampson ER, Maynard RD, et al. Ski inhibits TGF- β /phospho-Smad3 signaling and accelerates hypertrophic differentiation in chondrocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(6): 2156-2166.
- [14] Ding B, Sun Y, Huang J. Overexpression of SKI Oncoprotein Leads to p53 Degradation through Regulation of MDM2 Protein Sumoylation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14621-14630.
- [15] Kiyono K, Suzuki HI, Morishita Y, et al. c-Ski overexpression promotes tumor growth and angiogenesis through inhibition of transforming growth factor- β signaling in diffuse-type gastric carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1809-1816.

(责任编辑:唐宗顺)