

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000593

低氧诱导乳腺癌相关成纤维细胞能量代谢 重塑细胞模型的构建

唐石伏¹, 周明莉², 孙一帆¹, 王林春¹, 刘春明¹, 杨丽², 唐曦², 张海龙², 高超²,黄光明³, 渠海洋⁴, 杜燕娥², 徐丽云², 文思阳², 郎磊², 柳满然²

(1. 广西中医药大学第三附属医院检验科, 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;

3. 四川省达州市中西医结合医院消化内科, 达州 635000;

4. 重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室脂质研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建低氧诱导的乳腺癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)能量代谢重塑(energy metabolism reprogramming, EMR)细胞模型, 为其后续分子机制和生物学功能研究奠定基础。**方法:**以成对的永生化的乳腺癌旁组织来源正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NF)和 CAF 为处理对象, 根据 $[O_2]$ 不同, NF 和 CAF 细胞各分为常氧处理组和低氧处理组。不同氧浓度分别处理 NF 和 CAF 细胞 0、1、3、6、12 h 和 24 h。葡萄糖消耗实验和乳酸生成实验检测细胞糖酵解水平; 线粒体活性检测实验评估细胞氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OP)活性; Western blot 实验检测细胞能量代谢相关蛋白包括单羧酸转运子 4(monocarboxylate transporters 4, MCT4)、细胞色素氧化酶 IV 亚基(cytochrome oxidase IV subunit, COX IV)和低氧诱导因子 1 α 亚基(hypoxia inducible factor 1 α subunit, HIF1 α)的蛋白表达量。**结果:**低氧与 CAF 细胞 EMR 呈剂量效应和时间效应关系, 1% $[O_2]$ 作用 24 h 为最佳低氧处理条件。与 NF 常氧组相比, 低氧处理(1% $[O_2]$ 作用 24 h)使 CAF 葡萄糖吸收和乳酸产生能力分别增强 2 倍和 3.1 倍, 明显抑制其氧化磷酸化活性, 使 CAF 细胞中 MCT4 和 HIF1 α 蛋白表达量分别上升 3.1 倍和 3.9 倍及 COX IV 下调 90%。**结论:**低氧(1% $[O_2]$ 作用 24 h)使 CAF 具有典型的 EMR 表型。本研究成功构建低氧诱导的乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型。

【关键词】乳腺癌; 癌相关成纤维细胞; 低氧; 能量代谢重塑; 细胞模型**【中图分类号】**R737.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-30

Establishment of cell model of breast cancer-associated fibroblasts' energy metabolism reprogramming induced by hypoxia

Tang Shifu¹, Zhou Mingli², Sun Yifan¹, Wang Linchun¹, Liu Chunming¹, Yang Li², Tang Xi², Zhang Hailong²,
Gao Chao², Huang Guangming³, Qu Haiyang⁴, Du Yan², Xu Liyun², Wen Siyang², Lang Lei², Liu Manran²

(1. Department of Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine;

2. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Founded by Ministry of Education, College of Laboratory Medicine,

Chongqing Medical University; 3. Department of Gastroenterology, Dazhou Hospital of Integrated Traditional

Chinese and Western Medicine; 4. Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose,

Center for Lipid Research, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish the cell model of energy metabolism reprogramming (EMR) of breast cancer-associated fibroblasts (CAF) induced by hypoxia and to lay a firm foundation for subsequently exploring its molecular mechanism and biological functions.

Methods: Based on the O_2 concentration, paired immortalized normal fibroblasts (NF) and CAF derived from the same breast cancer patient were divided into hypoxic group and normoxic group. NF/CAF were treated with different O_2 concentrations for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h. The glycolysis activity of NF and CAF was tested by the glucose consumption assay and the lactate generation assay; the

oxidative phosphorylation activity of NF and CAF was detected by the mitochondrial activity assay; the protein expression levels of MCT4, COX IV and HIF1 α were determined by Western blot; the data were analyzed with the SPSS 17.0 software. **Results:** There was dose-effect and time-effect between hypoxic levels and the EMR degree of CAF. 1% $[O_2]$ for 24 h was optimum for

作者介绍: 唐石伏, Email: sftang221019@sina.com,

研究方向: 肿瘤能量代谢重塑及机制研究。

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

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81472476)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150403.0929.014.html>

(2015-04-03)

inducing the EMR of CAF. Hypoxic treatment increased the glycolysis activity, suppressed the oxidative phosphorylation levels, increased the protein expression of MCT4 and HIF1 α 2 times or 3.9 times respectively, and decreased the protein expression of COX IV by 10% in CAF compared with NF. **Conclusion:** Hypoxic treatment (1% O₂ for 24 h) made CAF have a typical EMR phenotype. It is successfully established that the cell model of the EMR of breast cancer-derived CAF induced by hypoxia (1% O₂ for 24 h). **【Key words】** breast cancer; cancer-associated fibroblasts; hypoxia; energy metabolism reprogramming; cell model

正常情况下,细胞主要供能物质葡萄糖被人体非增殖细胞如静止的正常成纤维细胞吸收后,经糖酵解、三羧酸循环和细胞氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OP)途径彻底氧化成 ATP、二氧化碳和水,为细胞生命活动供能。当低氧或增殖信号刺激下,绝大多数人体细胞的主要能量来源从 OP 转向糖酵解,这一转变现象即为能量代谢重塑(energy metabolism reprogramming, EMR)^[1]。乳腺癌是癌细胞与肿瘤微环境(tumor environment, TM)长期相互作用、共同进化的结果。癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)是乳腺癌微环境中最主要基质细胞,在乳腺癌发生发展中起重要作用。EMR 是乳腺癌 CAF 的新特征^[2],具有促乳腺癌细胞生长和增殖等作用^[3]。与癌细胞相互作用,自身增殖信号激活等各种细胞内外因素均可导致 CAF 细胞 EMR。然而,CAF 细胞 EMR 的分子机制及生物学功能尚未阐明,亟待深入研究,这有利于进一步阐明乳腺癌发生机制和发现防治乳腺癌的新靶点,对于乳腺癌的防治具有重要的理论意义和潜在的应用价值。体外 CAF EMR 模型是开展相关研究的必要条件。而国内外尚缺少模拟体内乳腺癌 CAF 细胞 EMR 情形的体外细胞模型。乳腺癌等实体肿瘤内部常处于低氧状态,所以低氧($\leq 2\% \text{O}_2$)很可能是体内乳腺癌 CAF 细胞 EMR 的重要诱因^[1,4]。另外,原代乳腺癌 CAF 细胞在体外不能无限传代,不适合建立长期传代的体外细胞模型。本研究旨在以前期建立的永生化乳腺癌 CAF 细胞为基础,构建低氧诱导的体外人乳腺癌 CAF 细胞 EMR 细胞模型,为深入研究其机制和生物学功能提供良好的实验手段。

1 材料与方法

1.1 细胞

同一乳腺癌患者来源的永生化正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NF)和 CAF 细胞(永生化 NF 和 CAF 细胞在下文分别简称为 NF 和 CAF 细胞)均为本课题组前期构建^[5]。NF 和

CAF 细胞在 37 °C, 5%CO₂ 条件下用 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)维持培养。

1.2 试剂和仪器

南美胎牛血清(FBS)、DMEM/H 培养基和胰蛋白酶均购自 Gibco 公司;葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Mito-Tracker Green(线粒体绿色荧光探针)试剂盒、青霉素-链霉素溶液(100X)、RIPA 裂解液(强)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司;单羧酸转运子 4(monocarboxylate transporters 4, MCT4)抗体购自 Santa Cruz 公司;低氧诱导因子 1 α 亚基(hypoxia inducible factor 1 α subunit, HIF1 α)和细胞色素氧化酶 IV 亚基(cytochrome oxidase IV subunit, COX IV)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体和 Actin 抗体均购自北京中杉金桥公司;化学发光试剂盒和 PVDF 膜(0.45 μm)购自 Millipore 公司;其他试剂均为国产分析纯。重要仪器有二氧化碳培养箱(Thermo scientific),三气培养箱(Thermo scientific),多功能酶标仪(Sunrise)和倒置荧光显微镜(Nikon)。

1.3 细胞低氧处理

待细胞在常氧条件下,融合生长至 70%~80%时,更换新鲜的 DMEM 完全培养基,转移至三气培养箱,在 1%O₂、5%CO₂ 和 37 °C 条件下低氧处理 24 h。处理完后,立即进行后续实验如葡萄糖、乳酸测定和 WB 实验等。

1.4 葡萄糖检测实验

待细胞生长至 70%左右,将细胞消化成分散良好的细胞悬液,以 2.5×10^5 个/孔密度接种 12 孔板,3 个空白对照组,每个处理组 3 个平行孔,置于 CO₂ 培养箱常氧条件下培养。当细胞融合生长至 70%左右时,更换新鲜 DMEM 完全培养基,每孔为 400 μl 。将低氧处理组细胞放入三气培养箱进行低氧处理 24 h (1%O₂、5%CO₂ 和 37 °C)。处理完毕,收集上清液,采用葡萄糖检测试剂盒检测每孔中葡萄糖消耗量(μmol),计算每孔细胞总数,最后得到各处理组细胞葡萄糖消耗量($\mu\text{mol}/10^6$)。同样地,采用乳酸检测试剂盒测定每孔中乳酸产生量(μmol),计算各处理组细胞乳酸产生量($\mu\text{mol}/10^6$)。实验重复 3 次。

1.5 线粒体活性检测实验

NF 与 CAF 细胞各传 2 个 12 孔板的 2 个孔,爬片培养。当细胞 50%融合生长时,更换新鲜 DMEM 完全培养基。需低氧处理细胞,转入三气培养箱(1%O₂、5%CO₂ 和 37 °C),低氧处理 24 h。处理完毕,弃旧培养基,加入新鲜 DMEM 完全培

培养基配置的线粒体绿色荧光探针(1:200)工作液,500 μl /孔,按原培养条件继续孵育 30 min,然后于暗室制片,避光保存,立即用倒置荧光显微镜下观察、记录结果。

1.6 Western blot

NF 与 CAF 细胞各传 2 个中号瓶,待细胞常氧条件下融合生长至 80%时,每种细胞各取 1 瓶细胞,直接抽提细胞总蛋白。另 2 瓶细胞转到三气培养箱,低氧处理(1% O_2 、5% CO_2 和 37 $^{\circ}\text{C}$)24 h。处理结束,收集细胞,抽提总蛋白,定量,经 10%不连续 SDS-PAGE 胶分离,转膜,封闭,孵一抗[MCT4 (1:1 000)、COX IV (1:1 000)、HIF1 α (1:1 000)和 Actin (1:1 000)],洗膜,孵二抗,洗膜,化学发光成像,Quantity one 软件进行灰度值测定。实验重复 3 次。

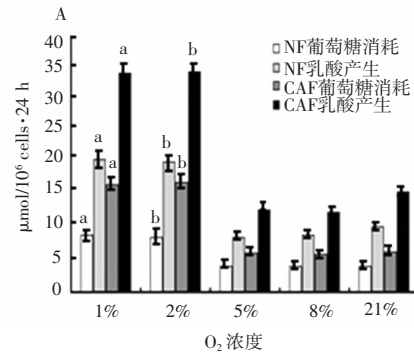
1.7 统计学方法

运用 SPSS 17.0 统计软件,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用双因素方差分析法比较各组总体均数差异,采用 LSD- t 法比较组间总体均数差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

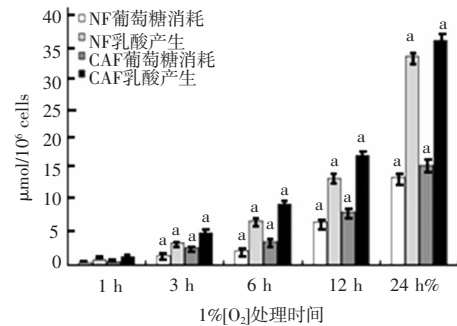
2.1 低氧增强 CAF 细胞的糖酵解水平

低氧是乳腺癌等实体肿瘤微环境的重要特征。NF 常氧处理组代表乳腺组织 NF 细胞能量代谢状况,CAF 低氧处理组代表乳腺癌组织由 NF 活化而成的 CAF 能量代谢状态。葡萄糖和乳酸检测结果表明:低氧程度与 CAF 葡萄糖的摄取和乳酸产生能力呈剂量-效应和时间-效应关系,1%氧浓度作用 24 h 效果最明显(图 1A 和 1B)。为了进一步明确低氧对 CAF 能量代谢影响,检测 1%氧浓度作用 24 h 对 CAF 能量代谢影响。在常氧条件下,CAF 细胞葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率均大于 NF 的细胞葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率,各为 NF 细胞葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率的 1.5 倍和 1.6 倍,即 CAF 细胞的糖酵解活性明显高于 NF 的糖酵解活性;在低氧条件下(1% O_2 ,24 h),NF 细胞葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率均上升,分别为常氧时 NF 葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率的 2.1 倍和 2.9 倍,CAF 细胞葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率也均上升,分别为常氧时 CAF 葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率的 2.3 倍和 3.2 倍;CAF 细胞低氧处理组葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率分别为 NF 细胞低氧处理组葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率的 2.2 倍和 3.2 倍,分别为 NF 常氧处理组葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率的 3 倍和 4.1 倍(图 1C 和 1D)。以上结果表明,低氧增强 NF 和 CAF 细胞糖酵解活性,且无论常氧或低氧条件下 CAF 糖酵解活性仍高于 NF 的糖酵解活性。Western blot 结果与代谢实验结果一致:在常氧条件下,CAF 中糖酵解的生物标志物 MCT4 蛋白表达量为 NF MCT4 蛋白表达量的 2.5 倍;在低氧条件下(1% O_2 ,24 h),NF 和 CAF 中 MCT4 蛋白表达量明显上调,且 CAF 中糖酵解的生物标志物 MCT4 蛋白表达量是 NF 低氧处理组 MCT4 蛋白表达量的 2.2 倍,是 NF 常氧处理组 MCT4 蛋白表达量的 4.1 倍(图 2)。



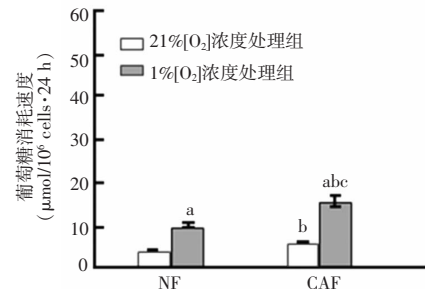
A. 氧浓度与 CAF 细胞糖酵解水平呈剂量效应关系($P=0.000$)

a, b, 与自身常氧处理组比较



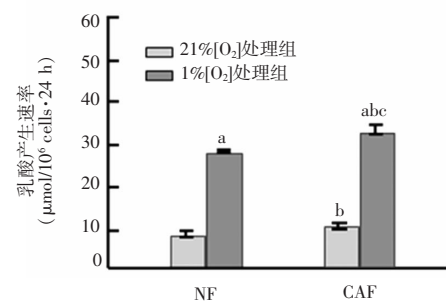
B. 低氧与 CAF 细胞糖酵解水平呈时间效应关系($P=0.000$)

a, 与前一时间点比较



C. 低氧(1% O_2)作用 24 h 增强 CAF 葡萄糖摄取能力

a, 与自身常氧处理组比较, $P=0.000$; b, 与 NF 常氧处理组比较, $P=0.000$; c, 与 NF 低氧处理组比较, $P=0.000$

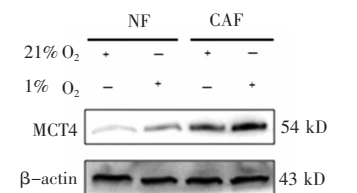


D. 低氧(1% O_2)作用 24 h 增强 CAF 乳酸产生能力

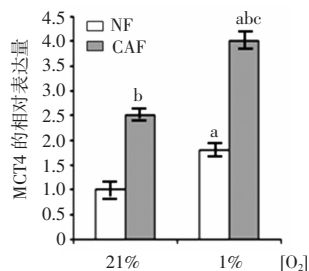
a, 与自身常氧处理组比较, $P=0.000$; b, 与 NF 常氧处理组比较, $P=0.000$; c, 与 NF 低氧处理组比较, $P=0.000$

图 1 低氧增强 CAF 的糖酵解能力

Fig.1 Hypoxia enhances the glycolysis activity of CAF



A. Western blot 检测 NF 和 CAF 细胞低氧处理前后 MCT4 的蛋白表达改变



B. 半定量分析结果

a, 与自身常氧处理组比较, $P=0.000$; b, 与 NF 常氧处理组比较, $P=0.000$; c, 与 NF 低氧处理组比较, $P=0.000$

图 2 低氧增强 CAF 中糖酵解关键调控蛋白 MCT4 的表达

Fig.2 Hypoxia enhances the protein expression of key glycolysis regulation protein MCT4 in CAF

2.2 低氧抑制 CAF 氧化磷酸化活性

线粒体绿色荧光探针是采用 Molecular Probes 公司的羧化青为荧光标记的线粒体示踪剂,用于活细胞线粒体特异性荧光染色,荧光强度与细胞线粒体氧化磷酸化活性呈正相关。活细胞线粒体活性检测结果表明:在常氧条件下,CAF 线粒体活性低于 NF 线粒体活性;在低氧条件下(1%O₂, 24 h),NF 和 CAF 氧化磷酸化活性均明显受抑制,且 CAF 氧化磷酸化活性的受抑制程度更明显,其活性也远低于 NF 常氧组氧化磷酸化活性(图 3)。Western blot 结果与线粒体活性检测结果一致:在常氧条件下,CAF 线粒体电子呼吸链 IV 复合体中 COX IV 蛋白表达量约为 NF 细胞 COX IV 蛋白表达量的 50%;低氧处理(1%O₂, 24 h)后,NF 和 CAF 中 COX IV 蛋白表达量均明显下调,且 CAF 中 COX IV 蛋白表达量为 NF 细胞 COX IV 蛋白表达量的 30%,为 NF 常氧组 COX IV 蛋白表达量的 10%(图 4)。

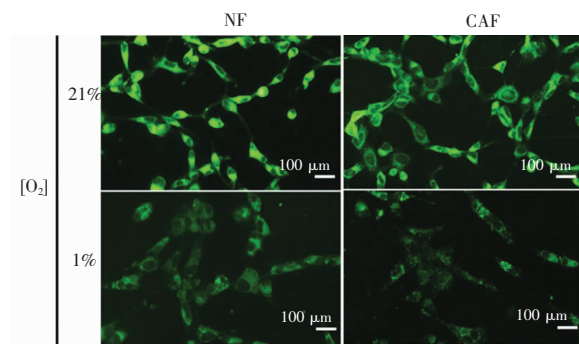
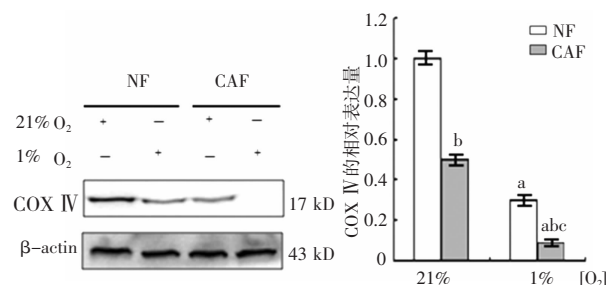


图 3 低氧抑制活 CAF 细胞中线粒体活性 (bar:100 μm)

Fig.3 Hypoxia suppresses the mitochondria activity of live CAF (bar:100 μm)



A. Western blot 检测细胞

COX IV 蛋白表达水平

B. 半定量分析结果

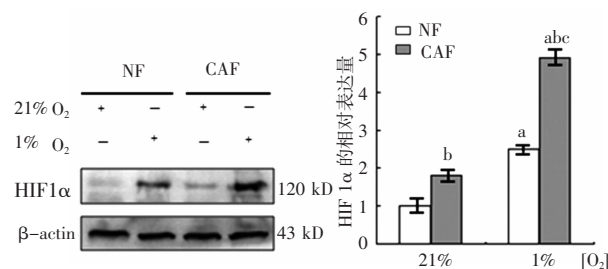
a, 与自身常氧处理组比较, $P=0.000$; b, 与 NF 常氧处理组比较, $P=0.000$; c, 与 NF 低氧处理组比较, $P=0.000$

图 4 低氧下调 CAF 中 COX IV 蛋白表达量

Fig.4 Hypoxia decreases the protein expression of COX IV in CAF

2.3 CAF 中能量代谢重塑关键信号通路 HIF1 被激活

Western blot 检测结果表明:在常氧条件下,CAF 中 HIF1α 蛋白表达量为 NF 细胞 HIF1α 蛋白表达量的 1.8 倍;在低氧条件下(1%O₂, 24 h),NF 和 CAF 中 HIF1α 蛋白表达量均明显上调,CAF 中 HIF1α 蛋白表达量为 NF 低氧组 HIF1α 蛋白表达量的 2 倍,为 NF 常氧组 HIF1α 蛋白表达量的 4.9 倍(图 5)。



A. Western blot 检测细胞

HIF1α 蛋白表达量

B. 半定量分析结果

a, 与自身常氧处理组比较, $P=0.000$; b, 与 NF 常氧处理组比较, $P=0.000$; c, 与 NF 低氧处理组比较, $P=0.000$

图 5 低氧上调 CAF 中 HIF1α 蛋白表达量

Fig.5 Hypoxia increases the protein expression of HIF1α in CAF

3 讨论

乳腺癌 CAF 细胞 EMR 现象自 2009 年首次报道以来,其相关研究已逐渐成为乳腺肿瘤微环境研究领域热点,并取得了一些重要进展。乳腺癌 CAF 细胞 EMR 主要诱因包括肿瘤微环境中癌细胞、生长因子和炎症因子等,具有促乳腺癌细胞生长和增殖等功能^[6]。尽管如此,乳腺癌 CAF 细胞 EMR 的诱发因素、机制和生物学功能尚未阐明。这主要是因为缺乏良好的体外乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型。所以,

建立能模拟乳腺癌 CAF 体内 EMR 的模型对研究乳腺癌 CAF 细胞 EMR 是一个非常紧迫的问题。低氧几乎能引起所有人细胞 EMR。这提示肿瘤低氧微环境很可能是乳腺癌 CAF 细胞 EMR 的重要诱因。这意味着,体外模拟体内低氧微环境诱导的乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型更接近体内实际情形,能为研究乳腺癌 CAF 细胞 EMR 提供良好细胞模型。

肿瘤内部低氧程度包括氧分压和低氧时间是动态变化的^[4]。氧分压和低氧时间是构建乳腺癌 CAF 体外 EMR 模型的关键。细胞能量代谢重塑的主要特征是细胞葡萄糖摄取增强,乳酸分泌增加^[7],线粒体活性减弱^[8],糖酵解途径代谢酶如 MCT4 表达增强^[9],氧化磷酸化途径代谢酶如 COX IV 表达下调^[8,10],EMR 调控关键信号通路 HIF1 α 活化^[11]。HIF1 通路活化后上调 MCT4 表达^[12]。本研究结果与此一致,而且发现 1% 氧浓度作用 24 h 对 CAF 细胞 EMR 最为明显。1% 氧浓度作用 24 h 后,CAF 低氧处理组葡萄糖摄取速率、乳酸产生速率、HIF1 α 和 MCT4 蛋白表达量均高于 NF 常氧处理组的;而 CAF 低氧处理组的线粒体活性和 COX IV 蛋白表达量低于 NF 常氧处理组的。NF 常氧处理组代表乳腺体内 NF 正常生理状况,而 CAF 低氧处理组代表乳腺癌体内 CAF 低氧状态。与体外 NF 细胞相比,体内 NF 一般处于非增殖状态,其糖酵解活性更弱,氧化磷酸化水平更强。这提示,体内 CAF 与 NF 之间 EMR 差异比本实验观察到(CAF 低氧处理组和 NF 常氧处理组之间差异)的要更大。以上结果表明,低氧是乳腺癌 CAF 细胞 EMR 的重要诱因,CAF 低氧处理组(1% $[O_2]$ 作用 24 h)能较好地模拟体内 CAF 细胞 EMR。另外,常氧条件下,NF 和 CAF 之 EMR 差异小很多,这也说明低氧条件下 CAF 能量代谢更接近体内状态。本研究还发现,低氧可以使 NF 的能量代谢状态倾向于 CAF 的。文献报道,低氧能诱导 NF 活化为 CAF^[4],这说明进一步表明低氧是 CAF 细胞 EMR 的重要诱因之一。综上,低氧(1% $[O_2]$ 作用 24 h)诱导的 CAF 细胞 EMR 模型是构建成功的。

乳腺癌 CAF 细胞 EMR 主要由低氧、癌细胞、炎症因子和生长因子等肿瘤微环境因素引起。这些因素交织一起使得 CAF 细胞 EMR 极具复杂性、异质性和多样性^[13]。这对构建能模拟体内 EMR 的体外乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型是个巨大的挑战。尽管如此,目前至少有 2 类细胞模型均可用于研究乳腺癌 CAF 细胞 EMR。一类是癌基因高表达如 Ras 或抑癌基因敲除如 CAVEOLIN-1 的永生化人乳腺癌 CAF

细胞模型^[14-15],但这类模型遗传背景被修饰,不能反映体内真实情形。另一类是永生化乳腺癌 CAF 与癌细胞共培养模型,这类模型应能较好地模拟肿瘤非低氧区域 CAF 能量代谢重塑^[16]。这 2 类模型均没有模拟肿瘤内部低氧对 CAF 能量代谢的影响。本研究建立的低氧诱导乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型能模拟肿瘤内部低氧区域 CAF EMR,无论是长期、短期或是交替性短期低氧。另外,CAF 细胞 EMR 的诱因具有多样性,而以上模型均只考虑 CAF 细胞 EMR 的单一诱导因素,多因素诱导的乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型有待进一步研究。

综上,低氧(1% O_2 处理 24 h)通过激活细胞能量代谢重塑关键通路 HIF1 从而引起乳腺癌 CAF 中其下游能量代谢相关基因如 MCT4 表达改变,增强乳腺癌 CAF 糖酵解能力,抑制乳腺癌 CAF 线粒体活性,使乳腺癌 CAF 具有 EMR 表型。这种低氧诱导的乳腺癌 CAF 细胞 EMR 模型是研究乳腺癌 CAF 细胞 EMR 的有力工具,能为深入研究其机制和生物学功能提供合适的体外模型。

参 考 文 献

- [1] Semenza GL. Oxygen homeostasis[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010, 2(3): 336-361.
- [2] Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma[J]. Cell Cycle, 2009, 8(23): 3984-4001.
- [3] Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth[J]. Semin Cancer Biol, 2014. Doi: 10.1016/j.semcancer.2014.01.005. [Epub ahead of print].
- [4] Cardenas-Navia LL, Mace D, Richardson RA, et al. The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5812-5819.
- [5] Wang L, Hou Y, Sun Y, et al. c-Ski activates cancer-associated fibroblasts to regulate breast cancer cell invasion[J]. Mol Oncol, 2013, 7(6): 1116-1128.
- [6] Costa A, Scholer-Dahirel A, Mehta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment[J]. Semin Cancer Biol, 2014. Doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.0007. [Epub ahead of print].
- [7] Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate[J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 3835-3837.
- [8] Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, et al. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue[J]. Cell Cycle, 2012, 11(7): 1445-1454.
- [9] Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, et al. Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors; MCT4