

肿 瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001766

肿瘤相关成纤维细胞通过 p38/MAPK 信号通路
促进人乳腺癌细胞迁移

付立新, 席磊, 陈燕林, 杨丹, 柳满然

(重庆医科大学教育部临床检验诊断学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)对人乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的迁移能力影响及可能的分子机制。**方法:**CAF 上清液作用人乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 后, 采用 Transwell 迁移实验检测 BT549 和 MDA-MB-231 细胞的迁移能力变化, 蛋白质印迹法检测迁移相关蛋白 E-cadherin、Vimentin 的表达及 p38/MAPK 通路的活化情况。CAF 上清液处理人乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 后, 采用 SB203580 抑制 p38/MAPK 通路, Transwell 迁移实验和蛋白质印迹分别检测 BT549 和 MDA-MB-231 细胞的迁移能力及 E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达变化。**结果:**CAF 作用后乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的穿膜细胞数增多($P<0.05$), 抑制 BT549 和 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 表达水平($P<0.01$), 上调 Vimentin 的表达水平($P<0.05$); CAF 激活乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 p38/MAPK 信号通路, 促进通路关键分子 p-P38 蛋白表达($P<0.01$); SB203580 抑制 p38/MAPK 通路, CAF 作用后乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 穿膜细胞数明显减少($P<0.01$), 且上调 E-cadherin 蛋白表达水平($P<0.05$)、下调 Vimentin 蛋白表达水平($P<0.01$)。**结论:**CAF 通过激活 p38/MAPK 信号通路促进人乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的迁移。

【关键词】肿瘤相关成纤维细胞; p38/MAPK 信号通路; 乳腺癌; 细胞迁移

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-19

Cancer-associated fibroblast(CAF) promotes migration of human breast
cancer cells via activating the p38/MAPK signaling pathway

Fu Lixin, Xi Lei, Chen Yanlin, Yang Dan, Liu Manran

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of cancer-associated fibroblast(CAF) on migration of human breast cancer BT549 and MDA-MB-231 cells and its possible molecular mechanism. **Methods:** Effects of CAF on migration of BT549 and MDA-MB-231 were measured by transwell migration test after treated with CAF supernatant. Effects of CAF on migration related proteins E-cadherin and Vimentin were investigated by Western blot after treated with CAF supernatant. After treating the human breast cancer cell line BT549 and MDA-MB-231 with CAF supernatant, SB203580 was used to inhibit the p38/MAPK pathway, then Transwell migration assay and Western blot were used to detect the changes of migration and the expressions of E-cadherin and Vimentin in BT549 and MDA-MB-231 cells respectively. **Results:** CAF increased the number of migration cells in BT549 and MDA-MB-231 breast cancer cells($P<0.05$), inhibited the expression of E-cadherin($P<0.01$) and up-regulated the expression of Vimentin in BT549 and MDA-MB-231 cells($P<0.05$). CAF activated the p38/MAPK signaling pathway of BT549 and MDA-MB-231 breast cancer cells and promoted the expression of p-P38 protein($P<0.01$). The ability of CAF to increase the number of migration cells in BT549 and MDA-MB-231 cells was significantly inhibited($P<0.01$), and the expression of E-cadherin protein was up-regulated($P<0.05$), while the expression of Vimentin protein was down-regulated($P<0.01$) after SB203580 inhibited the p38/MAPK pathway. **Conclusion:** CAF promotes migration of human breast cancer BT549 and MDA-MB-231 cells via activating the p38/MAPK signaling pathway.

【Key words】cancer-associated fibroblast; p38/MAPK signaling pathway; breast cancer; cell migration

作者介绍: 付立新, Email: 17940921@qq.com,

研究方向: 乳腺癌。

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: 31171336)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180528.1033.012.html>

(2018-05-29)

乳腺癌是威胁女性健康的发病率最高的癌症^[1],与其他肿瘤相比乳腺癌预后较好,但易发生骨、脑转移^[2],长期生存率不容乐观。手术治疗可清除原发病灶,但对远处转移却无能为力。因此,探讨乳腺癌转移的机制对临床治疗方案的研究具有重要意义。

然而,随着研究的不断深入,发现肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在肿瘤发生、浸润、转移过程扮演着十分重要的角色^[3]。所谓 TME 是指影响肿瘤发生、生长、侵袭、转移的多种成分组成的复杂整体,这些成分统称 TME,主要的细胞成分包括肿瘤细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、内皮细胞、炎症细胞及少量浸润细胞等^[4]。研究证明肿瘤的发生发展与其所处的 TME 密切相关^[5]。其中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是癌组织周围的一种基质成纤维细胞,是 TME 中最主要的宿主细胞之一^[6],具有促肿瘤形成和生长作用^[3,7]。CAF 主要来源于骨髓细胞、血管系统、邻近组织或者发生上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)的肿瘤细胞,可以通过直接接触、免疫系统、血管系统及重塑细胞外基质(extracellular matrix, ECM)对肿瘤细胞产生影响^[8]。经相关文献及课题组前期研究发现,相对于正常成纤维细胞(normal fibroblast, NF),CAF 更能促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭,其粘附、迁移、侵袭和收缩的能力更强^[9-10],然而具体分子机制还有待进一步的深入研究。

本文主要是采用条件培养基(condition medium, CM)作用于 BT549 和 MDA-MB-231 两种乳腺癌细胞,并通过检测 2 种乳腺癌细胞的迁移能力以及相关标志物 E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白含量,来探讨 CAF 对人乳腺癌细胞迁移能力的影响及可能的分子机制,从而丰富 TME 与乳腺癌发生发展关系的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高糖培养液 DMEM、RPMI1640 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;兔抗人 E-cadherin、Vimentin、t-p38、p-p38 多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司;抗人 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠及抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物技术公司;p38/MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 购自美国 Selleck 公司;蛋白质提取相关的试剂购于碧云天公司;

ECL 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;孔径 8.0 μm 的 Transwell 小室和聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)均购自美国 Millipore 公司。

1.2 细胞及细胞培养

CAF 及其相对应的 NF 由本课题组前期构建^[11],人乳腺癌 BT549 和 MDA-MB-231 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,CAF、NF、BT549 以及 MDA-MB-231 细胞分别用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 和 RPMI 1640 培养液,培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 体积分数的恒温无菌培养箱。用 0.25%的胰蛋白酶传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 CM 的制备

将 CAF 或 NF 用含 10%高糖的 DMEM 培养基培养,当细胞达 70%左右融合度时,更换无血清培养基,36 h 后收集上清,1 200 r/min 离心 15 min,取上清液,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 Transwell 迁移实验检测 BT549 和 MDA-MB-231 细胞迁移能力

探讨 CAF 对 BT549 和 MDA-MB-231 细胞迁移能力影响时,实验分为 BT549、BT549+NF、BT549+CAF 及 MDA-MB-231、MDA-MB-231+NF、MDA-MB-231+CAF 组。Transwell 小室中,底层加 10%胎牛血清培养基,BT549 和 MDA-MB-231 细胞消化离心后用 CAF 或 NF 上清稀释重悬,置于小室上层,调整细胞密度为 2.5×10^4 个/mL,培养 12 h 后,取出 Transwell 小室,PBS 洗 2 遍,用棉签轻轻擦去小室内细胞,晾干,结晶紫染 5 min,显微镜下计数小室膜底的细胞数,随机选 5 个视野($200 \times$),计数细胞数反映细胞的迁移能力。实验均独立重复 3 次。筛选信号通路时,采用 p38/MAPK 信号通路抑制剂,实验分为 BT549+CAF、BT549+CAF+DMSO、BT549+CAF+SB203580 及 MDA-MB-231+CAF、MDA-MB-231+CAF+DMSO、MDA-MB-231+CAF+SB203580 组。BT549 和 MDA-MB-231 细胞处理同前,更换上清时分别加入等体积的 CAF 上清、CAF+DMSO、CAF+SB203580,SB203580 终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。Transwell 迁移实验操作同前。

1.5 蛋白质印迹法检测 E-cadherin、Vimentin、p-P38、t-P38 蛋白的表达

探讨 CAF 对 BT549 和 MDA-MB-231 细胞 E-cadherin、Vimentin 表达的影响及激活的信号通路时,实验分为 BT549、BT549+NF、BT549+CAF 及 MDA-MB-231、MDA-MB-231+NF、MDA-MB-231+CAF 组。BT549 和 MDA-MB-231 细胞生长正常传代,待生长到 70%融合度后,2 种细胞的 3 个组分分别更换为无血清培养基、NF 上清及 CAF 上清,培养 24 h 后提取总蛋白。BCA 法测定浓度后,每组取 60 μg 蛋白上样电泳,采用 10% SDS-PAGE 胶,电泳后将蛋白转印至 0.45 μm 孔径的 PVDF 膜,接着用含 5%脱脂奶粉的 TBST 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,分别加稀释的一抗(稀释比例 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的稀释二抗(稀释比例 1:2 000),室温反

应 1 h, 洗膜后, 显影。采用 Quantity One 4.6.2 软件条带进行分析, 以目的条带与内参 β -actin 条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达水平。实验均重复 3 次。进行信号通路探讨时, 实验分为 BT549+CAF、BT549+CAF+DMSO、BT549+CAF+SB203580 及 MDA-MB-231+CAF、MDA-MB-231+CAF+DMSO、MDA-MB-231+CAF+SB203580 组, 细胞处理同 1.4, SB203580 抑制 p38/MAPK 通路后, 培养 24 h 收细胞提总蛋白, 进行免疫印迹试验检测 E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达情况。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析进行多组间比较, SNK- q 检验对各组均数进行组间两两比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

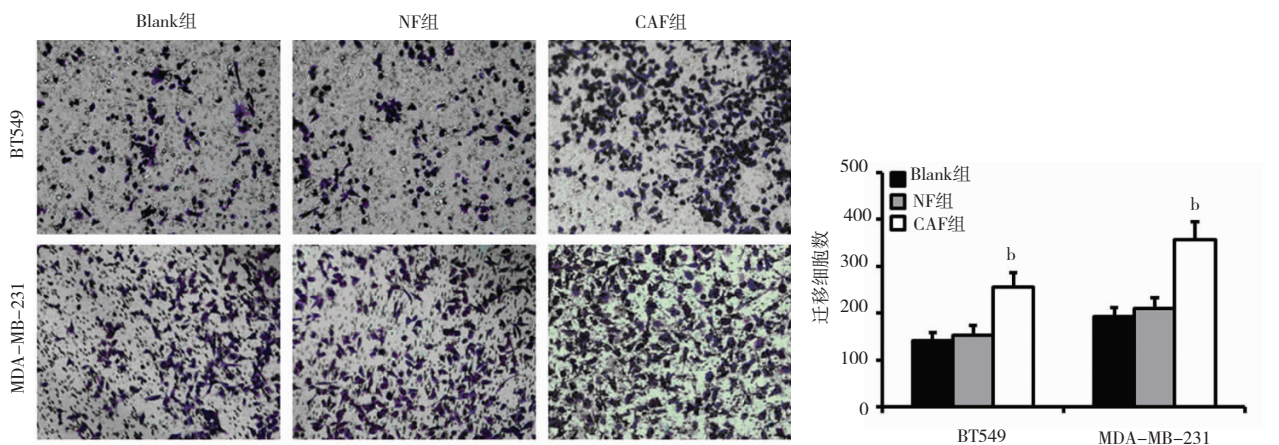
2.1 CAF 促进乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的迁移

Transwell 迁移实验结果显示, BT549+CAF 组平均穿膜细胞数 (256 ± 31) 较 BT549 组 (141 ± 17) 及 BT549+NF 组 (153 ± 18) 明显增多 ($F=22.850, P=0.002$), MDA-MB-231+CAF 组平均穿膜细胞数 (351 ± 38) 较 MDA-MB-231 组 (194 ± 21) 及

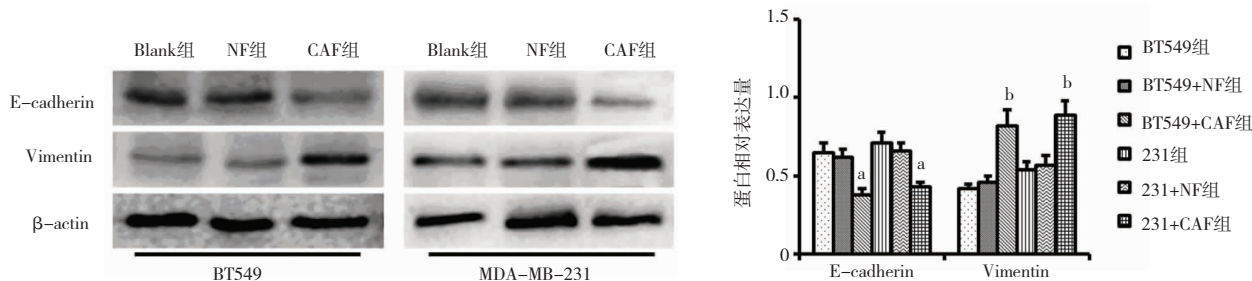
MDA-MB-231+NF 组 (210 ± 24) 明显增多 ($F=29.520, P=0.001$), 差异均具有统计学意义 ($P<0.01$, 图 1A), 提示 CAF 能促进 BT549 和 MDA-MB-231 细胞的迁移。蛋白质印迹法结果显示, BT549+CAF 组 E-cadherin 蛋白表达水平 (0.24 ± 0.04) 较 BT549 组 (0.39 ± 0.06) 及 BT549+NF 组 (0.38 ± 0.05) 低 ($F=22.410, P=0.002$), MDA-MB-231+CAF 组 E-cadherin 蛋白表达水平 (0.20 ± 0.03) 较 MDA-MB-231 组 (0.37 ± 0.07) 及 MDA-MB-231+NF 组 (0.35 ± 0.05) 低 ($F=28.180, P=0.0019$), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$, 图 1B)。BT549+CAF 组 Vimentin 蛋白表达水平 (0.82 ± 0.10) 较 BT549 组 (0.42 ± 0.03) 及 BT549+NF 组 (0.46 ± 0.04) 高 ($F=168.000, P=0.000$), MDA-MB-231+CAF 组 Vimentin 蛋白表达水平 (0.89 ± 0.09) 较 MDA-MB-231 组 (0.54 ± 0.05) 及 MDA-MB-231+NF 组 (0.57 ± 0.06) 高 ($F=23.850, P=0.001$), 差异均有统计学意义 ($P<0.01$, 图 1B)。综上, CAF 促进乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 迁移。

2.2 CAF 激活乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 p38/MAPK 信号通路

蛋白质印迹法检测 p38/MAPK 信号通路中 p-P38 和 t-P38 的表达, 结果显示, BT549+CAF、BT549、BT549+NF 3 组 t-P38 蛋白表达水平分别为: 0.93 ± 0.11 、 0.95 ± 0.10 、 0.98 ± 0.095 , 差异无统计学意义 ($F=0.238, P=0.795$, 图 2), MDA-



A. 乳腺癌细胞迁移情况

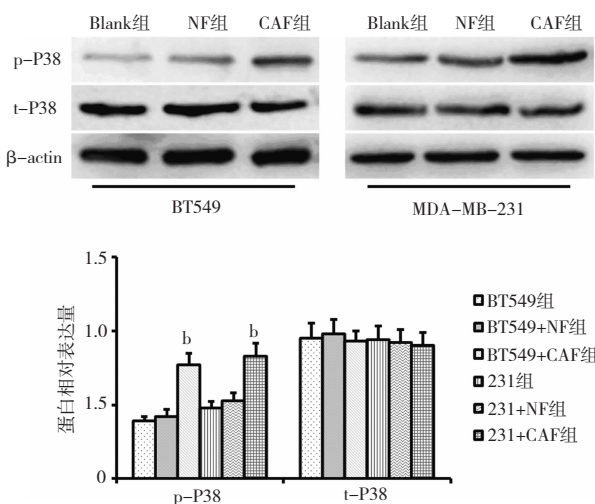


B. E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达情况

Blank组: 乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231); NF 组: 乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231)+NF 上清; CAF 组: 乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231)+CAF 上清; a: 实验组与 NF 组比较有统计学差异, $P<0.05$; b: 实验组与 NF 组比较有统计学差异, $P<0.01$

图 1 CAF 对乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 迁移能力的影响

MB-231+CAF、MDA-MB-231、MDA-MB-231+NF 3 组 t-P38 蛋白表达水平分别为: 0.90 ± 0.088 、 0.94 ± 0.093 、 0.92 ± 0.089 , 差异无统计学意义 ($F=0.148$, $P=0.865$, 图 2); BT549+CAF 组 p-P38 蛋白表达水平 (0.77 ± 0.08) 较对照组 BT549 (0.39 ± 0.03)、BT549+NF (0.42 ± 0.047) 高, 差异有统计学意义 ($F=42.240$, $P=0.000$, 图 2), MDA-MB-231+CAF 组 p-P38 蛋白表达水平 (0.83 ± 0.086) 较对照组 MDA-MB-231 (0.48 ± 0.04)、MDA-MB-231+NF (0.53 ± 0.05) 高, 差异有统计学意义 ($F=28.050$, $P=0.001$, 图 2), 提示 CAF 激活乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的 p38/MAPK 信号通路。



Blank组: 乳腺癌细胞(BT549或MDA-MB-231); NF组: 乳腺癌细胞(BT549或MDA-MB-231)+NF上清; CAF组: 乳腺癌细胞(BT549或MDA-MB-231)+CAF上清; b: 实验组与NF组比较有统计学差异, $P < 0.01$

图2 蛋白质印迹法检测CAF对乳腺癌BT549和MDA-MB-231细胞中p-P38和t-P38表达的影响

2.3 抑制 p38/MAPK 信号通路逆转 CAF 促 BT549 和 MDA-MB-231 迁移的作用

用SB203580抑制p38/MAPK信号通路,采用Transwell迁移实验及蛋白质印迹法分别检测抑制p38/MAPK信号通路后,CAF对乳腺癌细胞BT549和MDA-MB-231迁移能力的影响。Transwell迁移实验结果显示,BT549+CAF+SB203580组平均穿膜细胞数(130 ± 17)较BT549+CAF+DMSO组(228 ± 25)及BT549+CAF组(242 ± 22)明显减少($F=23.970$, $P=0.001$),MDA-MB-231+CAF+SB203580组平均穿膜细胞数(155 ± 16)较MDA-MB-231+CAF+DMSO组(363 ± 38)及MDA-MB-231+CAF组(388 ± 44)明显减少($F=40.500$, $P=0.000$),差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图3A)。蛋白质印迹法结果也显示,BT549+CAF+SB203580组E-cadherin蛋白表达水平(0.34 ± 0.04)较对照组BT549+CAF+DMSO(0.21 ± 0.02)、BT549+CAF组(0.20 ± 0.01)高($F=35.340$, $P=0.002$),MDA-MB-231+CAF+SB203580组E-cadherin蛋白表达水平(0.32 ± 0.04)较对照

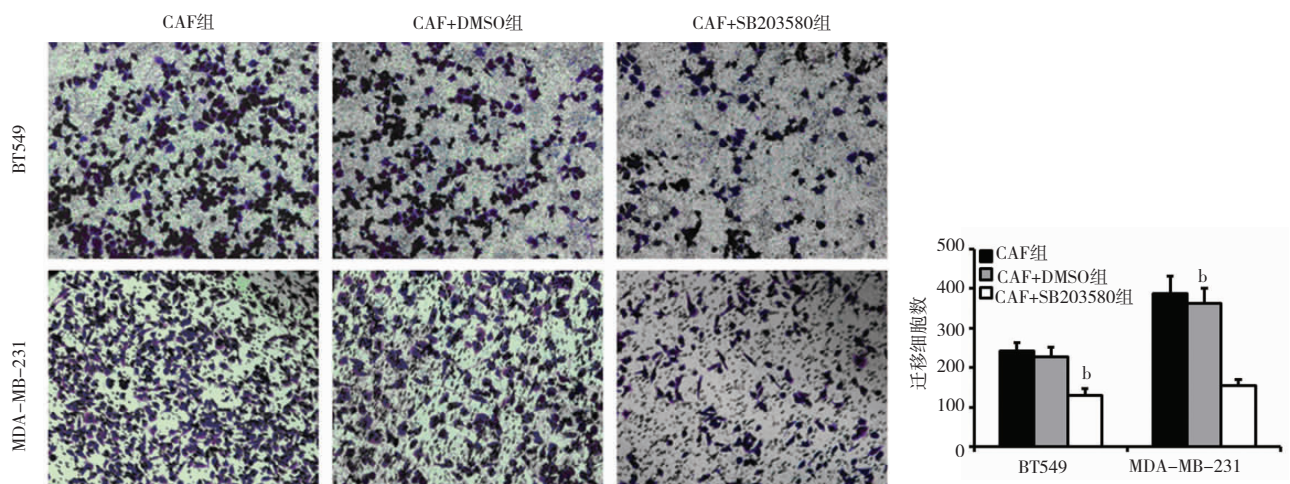
组MDA-MB-231+CAF+DMSO(0.18 ± 0.04)、MDA-MB-231+CAF组(0.17 ± 0.03)高($F=19.830$, $P=0.007$),差异均有统计学意义($P < 0.05$,图3B);BT549+CAF+SB203580组Vimentin蛋白表达水平(0.35 ± 0.03)较对照组BT549+CAF+DMSO(0.73 ± 0.08)、BT549+CAF组(0.76 ± 0.07)低($F=38.530$, $P=0.000$),MDA-MB-231+CAF+SB203580组Vimentin蛋白表达水平(0.44 ± 0.05)较对照组MDA-MB-231+CAF+DMSO(0.80 ± 0.07)、MDA-MB-231+CAF组(0.82 ± 0.08)低($F=29.830$, $P=0.001$),差异均有统计学意义($P < 0.01$,图3B)。综上,抑制p38/MAPK信号通路逆转CAF促BT549和MDA-MB-231迁移的作用。

3 讨论

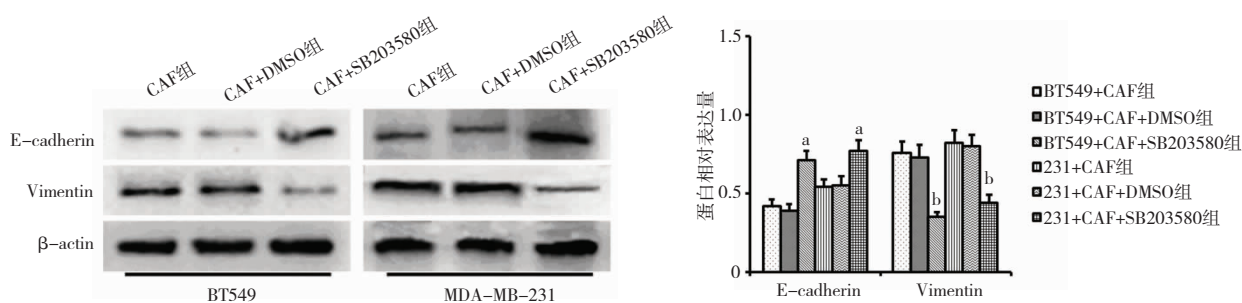
乳腺癌严重威胁女性健康,发病机制复杂,与其异质性密切相关^[12]。随着肿瘤发病机制研究的深入,肿瘤微环境引起研究者更多的关注。TME与肿瘤的进展密不可分,在乳腺癌TME中,存在大量持续活化的CAF,与正常成纤维细胞相比CAF通过分泌细胞因子、蛋白水解酶、甾体类激素促进乳腺癌的发生发展^[13-16]。因此,深入研究CAF与乳腺癌发生发展的关系意义重大。诸多研究报道证实,正常乳腺间质与乳腺癌间质有很多基因表达差异,如细胞因子、基质金属蛋白酶^[17-19],这些分子参与肿瘤微环境中细胞之间的“交互对话”,从而影响肿瘤细胞的增殖、粘附、侵袭^[20]。课题组前期的研究发现,与NF相比CAF中存在诸多异常活化的信号通路^[9],且增殖、粘附、侵袭、迁移能力明显增强^[3]。

为了更进一步探索CAF影响乳腺癌进程的机制,本实验采用CAF上清液处理乳腺癌细胞BT549和MDA-MB-231,并通过观察2种乳腺癌细胞的迁移能力以及迁移相关标志物E-cadherin和Vimentin的蛋白含量,进一步探究CAF对人乳腺癌细胞迁移能力的影响及可能的分子机制。本实验结果证实,经CAF上清液处理的乳腺癌细胞BT549和MDA-MB-231的迁移能力增强,E-cadherin蛋白水平降低,Vimentin蛋白水平上调,说明CAF可在一定程度内增强乳腺癌细胞的迁移能力,同时可相应改变迁移相关蛋白E-cadherin和Vimentin的含量,从而对乳腺癌细胞迁移及侵袭能力有一定的促进作用。

人乳腺癌细胞在迁移的过程中,所活化的信号



A. 抑制 p38/MAPK 信号通路后乳腺癌细胞迁移情况



B. 抑制 p38/MAPK 信号通路后 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达情况

CAF组:乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231)+CAF 上清;CAF+DMSO 组:乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231)+CAF 上清+DMSO;CAF+SB203580 组:乳腺癌细胞(BT549 或 MDA-MB-231)+CAF 上清+SB203580;a:实验组与 CAF+DMSO 组比较有统计学差异, $P<0.05$;b:实验组与 CAF+DMSO 组比较有统计学差异, $P<0.01$

图 3 抑制 p38/MAPK 信号通路后 CAF 对乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 迁移能力的影响

通路主要有 PI3K/AKT^[21]、p38/MAPK^[22]和 NF- κ B/p65^[23]。据有关文献报道^[24]及课题组相关人员实验显示,CAF 促进人乳腺癌细胞的迁移作用可能是受 p38/MAPK 信号通路调控的。故本文选用 p38/MAPK 通路进行研究,探讨 CAF 是否激活乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 p38/MAPK 信号通路。实验中使用蛋白质印迹法检测 p38/MAPK 信号通路中 p-P38 和 t-P38 的表达。结果显示,BT549 和 MDA-MB-231 细胞的各 3 组 t-P38 蛋白表达水平均无差异($P>0.05$,图2);而 p-P38 蛋白的表达水平较空白组与对照组均有提高,差异有统计学意义(图 2),提示 CAF 激活乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的 p38/MAPK 信号通路。

为了进一步证实 CAF 是否通过 p38/MAPK 通

路促进乳腺 BT549 细胞和 MDA-MB-231 细胞的迁移,采用信号通路抑制剂 SB203580 抑制 p38/MAPK 通路。结果显示,CAF 促 BT549 和 MDA-MB-231 细胞的迁移能力被明显抑制,且上调迁移相关蛋白 E-cadherin 水平、下调蛋白 Vimentin 水平。初步得出结论,CAF 通过激活 p38/MAPK 信号通路促进人乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 的迁移。综上,CAF 可促进乳腺癌细胞 BT549 和 MDA-MB-231 迁移,与其激活 p38/MAPK 信号通路相关,但 2 种细胞之间的“交互对话”通过何种机制实现,何种分子在其中发挥关键作用等问题尚未得知,其具体机制仍有待更深入的研究。本文丰富了乳腺癌 TME 中 CAF 细胞对肿瘤细胞影响的研究,为后续的研究者提供了思路。

本文尚有不足之处:仅探讨了 CAF 对 BT549 和 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响,对于 BT549 和 MDA-MB-231 细胞的其他表型,如增殖、侵袭、凋亡等,将在后续的研究中进一步证实和完善。CAF 的上清液作用于 BT549 和 MDA-MB-231 细胞影响其生物学特性,下一步实验研究将着手于 CAF 与 NF 上清液的差异研究,为乳腺癌微环境中细胞间“交互对话”的机制提供更多的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004, 31(s1): 149-161.
- [3] 彭琼乐, 孙 艳, 赵浏阳, 等. 癌相关成纤维细胞在肿瘤发生发展中的作用[J]. *生物医学工程学杂志*, 2013, 30(1): 200-203.
- [4] Xu BJ, Yan W, Jovanovic B, et al. Microdialysis combined with proteomics for protein identification in breast tumor microenvironment in vivo[J]. *Cancer Microenviron*, 2010, 4(1): 61-71.
- [5] Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4): 482-497.
- [6] Lin J, Liu C, Ge L, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor[J]. *Tumor Biology*, 2011, 32(3): 597-602.
- [7] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 彭琼乐, 罗浩军, 孙 艳, 等. 人乳腺癌微环境中癌相关成纤维细胞的生物学特征[J]. *肿瘤*, 2013, 33(10): 855-861.
- [11] 彭琼乐, 孙 艳, 赵浏阳, 等. 人乳腺癌相关成纤维细胞的原代培养及其生物学特性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(10): 1368-1372.
- [12] Knutson TP, Lange CA. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(1): 114-125.
- [13] Marco PD, Lappano R, Francesco EM, et al. GPER signalling in both cancer-associated fibroblasts and breast cancer cells mediates a feedforward IL1 β /IL1R1 response[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24354.
- [14] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [15] Barthes J, Özçelik H, Hindié M, et al. Cell Microenvironment engineering and monitoring for tissue engineering and regenerative medicine: the recent advances[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(3): 921905.
- [16] Han Y, Zhang Y, Jia T, et al. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1385-1394.
- [17] Patsialou A, Wang Y, Lin J, et al. Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(5): R139.
- [18] Hu M, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(1): 17-32.
- [19] Casey T, Bond J, Tighe S, et al. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer[J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2009, 114(1): 47-62.
- [20] Xu R, Mao JH. Gene transcriptional networks integrate microenvironmental signals in human breast cancer[J]. *Integrative Biology*, 2011, 3(4): 368-374.
- [21] Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1): 9-22.
- [22] Wang R, Li ZQ, Han X, et al. Integrin β 3 and its ligand regulate the expression of uPA through p38 MAPK in breast cancer[J]. *APMIS*, 2010, 118(12): 909-917.
- [23] Shao N, Lu Z, Zhang Y, et al. Interleukin-8 upregulates integrin β 3 expression and promotes estrogen receptor-negative breast cancer cell invasion by activating the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Cancer Lett*, 2015, 364(2): 165-172.
- [24] 文思阳, 徐丽云, 杜燕娥, 等. 稳定干扰 ITGB3 基因促进人乳腺癌 BT549 细胞的增殖[J]. *肿瘤*, 2016, 36(5): 538-544.

(责任编辑: 张辉洁)