

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.09.003

· 基础研究 ·

TGF- β 1 对口腔癌相关成纤维细胞在二维和三维共培养条件下迁移的影响

杨津¹, 吴飞飞¹, 高庆红², 李小明³, MANABU Kato⁴, 程然⁵, 周红梅¹

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院口腔黏膜病科, 四川 成都(610041); 2. 四川大学华西口腔医院口腔颌面外科, 四川 成都(610041); 3. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院, 四川 成都(610041); 4. 三重大学医院肾内科, 日本 三重县(514-8507); 5. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院预防科, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 通过二维和三维条件下的细胞共培养模型观察转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)对口腔癌相关成纤维细胞(carcinoma associated fibroblasts, CAFs)迁移的影响。方法 二维培养条件下,以培养基中加入 10 ng/mL TGF- β 1 刺激的 CAFs 为实验组,以未经处理的 CAFs 细胞为对照组,通过划痕实验、Transwell 实验观察 CAFs 的迁移现象;通过逆转录病毒转染,培养绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)阳性的 CAFs 细胞,建立人舌鳞癌细胞 SCC25、GFP(+) CAFs 和 CAFs 三维细胞共培养模型,以培养基中加入 10 ng/mL TGF- β 1 刺激下培养的三维模型为实验组,以未加的 TGF- β 1 的三维模型为对照组,观察在三维模型的细胞迁移现象。结果 在二维培养条件下验证了 10 ng/mL TGF- β 1 可促进口腔 CAFs 的迁移;成功建立 SCC25、GFP(+) CAFs 和 CAFs 三维细胞共培养模型,观察到 CAFs 和口腔癌细胞的迁移现象,但 10 ng/mL 的 TGF- β 1 对上述细胞的迁移在三维条件下无明显促进作用。结论 体外 TGF- β 1 对口腔 CAFs 迁移的影响与二维和三维不同培养模式有关。

【关键词】 癌相关成纤维细胞; 迁移; 三维细胞共培养模型; 转化生长因子- β 1; 口腔癌

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)09-0562-07



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 杨津, 吴飞飞, 高庆红, 等. TGF- β 1 对口腔癌相关成纤维细胞在二维和三维共培养条件下迁移的影响[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(9): 562-568.

Effects of TGF- β 1 on the migration of oral cancer-associated fibroblasts in two and three dimensional co-culture models YANG Jin¹, WU Feifei¹, GAO Qinghong², LI Xiaoyu³, MANABU Kato⁴, CHENG Ran⁵, ZHOU Hongmei¹.

1. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Oral Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Urology, Mie University Hospital, Mie 514-8507, Japan; 5. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Preventive Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZHOU Hongmei, Email: zhouhm@scu.edu.cn, Tel: 86-28-85503480; CHENG Ran, Email: chengran@scu.edu.cn, Tel: 86-28-85503486

【收稿日期】 2019-12-09; **【修回日期】** 2020-01-22

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81772898)

【作者简介】 杨津, 医师, 博士, Email: 2012181643016@stu.scu.edu.cn; 吴飞飞, 医师, 硕士, Email: wufei1122_qj@163.com; 杨津和吴飞飞为共同第一作者

【通信作者】 周红梅, 教授, 博士, Email: zhouhm@scu.edu.cn, Tel: 86-28-85503480; 程然, 副教授, 博士, Email: chengran@scu.edu.cn, Tel: 86-28-85503486; 周红梅和程然为共同通信作者

【Abstract】 Objective To observe the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the migration of oral carcinoma associated fibroblasts (CAFs) with two-dimensional culture model and three-dimensional model. **Methods** Under two-dimensional culture conditions, CAFs stimulated by TGF- β 1 with the addition of 10 ng/mL medium were used as the experimental group, and untreated CAFs were used as the control group. The migration of CAFs with the stimulation of TGF- β 1 was measured by cell scratch assay and transwell assay. CAFs positive for green fluorescent protein (GFP) were cultured by retrovirus transfection. Human tongue squamous cell carcinoma cells SCC25, GFP(+) CAFs and CAFs with three-dimensional cell co-culture models were established. The three-dimensional model cultured under the stimulation of TGF- β 1 with 10 ng/mL medium was used as the experimental group, and the three-dimensional model without TGF- β 1 was used as the control group. The migration of CAFs with the stimulation of TGF- β 1 was also measured by the three-dimensional models. **Results** It was verified that 10 ng/mL TGF- β 1 promoted the migration of CAFs in the two-dimensional culture model. The three-dimensional co-culture models of SCC25, GFP(+) CAFs and CAFs were successfully established. The migration of SCC25 and CAFs was detected in the three-dimensional model. However, 10 ng/mL TGF- β 1 had little effect on their migration. **Conclusion** The effect of TGF- β 1 *in vitro* on the migration of oral CAFs was associated with different culture models in two and three dimensions.

【Key words】 carcinoma-associated fibroblasts; migration; three-dimensional cell culture model; transforming growth factor- β 1; oral carcinoma

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(9): 562-568.

癌相关成纤维细胞(carcinoma associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境中最重要的间质细胞,在肿瘤的发生发展过程中扮演关键角色^[1-2]。本课题组前期研究结果显示:与正常成纤维细胞相比,口腔CAFs无论在形态结构、生长方式、分泌特性、染色体核型还是基因型等方面均发生了显著变化,而正是这类生物学特性异常活跃的CAFs促进了口腔癌的发生发展^[3-5]。被募集迁移至癌巢区域是CAFs重要的生物学特性之一^[6-7],但有关口腔CAFs是否发生迁移,目前仅有本课题组前期在二维培养条件下观察到的初步结果^[8]。因二维细胞模型较难准确模拟体内环境^[9],因此,有必要建立三维细胞模型观察CAFs的迁移现象,为进一步研究转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)对CAFs的迁移调控机制奠定实验基础,本研究拟通过二维和三维细胞共培养模型探讨TGF- β 1对CAFs迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

倒置荧光相差显微镜(Olympus公司,日本);青链霉素双抗(HyClone,美国);10%胎牛血清(Gibco,美国);高糖型DMEM培养基(Gibco,美国);胰蛋白酶(HyClone,美国);波形蛋白(vimentin)兔抗人单克隆抗体(Abcam,英国);成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)兔抗人

多克隆抗体(Abcam,英国); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)兔抗人单克隆抗体(Abcam,英国);细胞角蛋白(cytokeratin)兔抗人多克隆抗体(Abcam,英国);生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒(索莱宝,中国);polybrene(汉恒生物)。

1.2 标本收集及口腔CAFs原代细胞分离培养

经患者知情同意,选取2014~2016年在四川大学华西口腔医院颌面外科收集的新鲜口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)组织块。将组织置于含有青链霉素双抗的PBS缓冲液中备用。本实验经四川大学华西口腔医院医学伦理委员会审查通过。用青链霉素双抗和PBS冲洗组织块,眼科剪剪切至1~3 mm³大小,均匀地排列在瓶底,相互距离约0.5 cm。10%胎牛血清高糖型DMEM培养基注入培养瓶底部,置于37℃,5%CO₂孵箱中培养。待组织块周围爬出的细胞铺满培养瓶底90%时,胰蛋白酶消化。传代2次纯化CAFs。用第3代纯化细胞做鉴定。具体方法参照本课题组前期建立的组织块法^[10]。

1.3 免疫细胞化学染色鉴定

细胞成单层铺于盖玻片上后,用4%多聚甲醛溶液固定细胞。PBS漂洗后,用0.1%TritonX-100处理细胞。采用生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒进行免疫细胞化学染色。一抗包括波形蛋白(vimentin)兔抗人单克隆抗体、成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)兔抗人多克

隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)兔抗人单克隆抗体和细胞角蛋白(cytokeratin)兔抗人多克隆抗体,PBS作为阴性对照。于倒置相差显微镜下观察,将胞质中出现淡棕色或棕黄色颗粒判为阳性结果。

1.4 二维培养:细胞划痕实验和 Transwell 小室实验

1.4.1 分组 未经处理的 CAFs 细胞为对照组,以培养基中加入 10 ng/mL TGF- β 1 刺激的 CAFs 为实验组。

1.4.2 细胞划痕实验 6 孔板中接种 1×10^6 个 CAFs 培养 24 h 至铺满,饥饿 24 h 后,用 10 μ L 的枪尖划线 3 条、冲洗;分别加入含 10 ng/mL TGF- β 1 的和不含 TGF- β 1 的无血清高糖型 DMEM 培养基培养;分别取 0 h、24 h、48 h 后观察、采图。

1.4.3 Transwell 小室实验 Transwell 小室实验中,Transwell 下室加入 500 μ L 含 0.5% 胎牛血清的培养基,实验组下室中加入外源性刺激因子 10 ng/mL TGF- β 1;上室加入 200 μ L 密度为 2×10^5 个/mL 的 CAFs 细胞混悬液。培养 24 h 后,取出小室,冲

洗,4%多聚甲醛固定,结晶紫染色,光镜下观察计数。

1.5 制备绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)(+)CAF s

CAF s 细胞计数 1.5×10^6 个后培养 24 h,换 1 mL 新鲜培养基和 5 μ g 的 polybrene。每瓶中加入 4.5×10^7 IU 慢病毒溶液进行转染,慢病毒质粒中插入 GFP 片段和平阳霉素抗性基因片段。培养 24 h 后换为含 10 ng/mL 平阳霉素的新鲜培养基,筛选稳定表达 GFP 的细胞,同时,向空白组的 CAF s 中加入同等量的平阳霉素,隔天换液培养。待空白组的 CAF s 全部死亡后,将 GFP(+)细胞培养液换为无平阳霉素的含 10% 胎牛血清的培养基。

1.6 三维细胞共培养模型的建立

借助 GFP(+)CAF s 对现有的三维细胞迁移模型进行改进,建立了肿瘤细胞和 CAF s 迁移的三维细胞培养模型(图 1),该模型中,基质胶上方为口腔癌细胞株 SCC25,基质胶分为上下层,上层为 GFP 标记的 CAF s,下层为无标记的 CAF s,以方便观察上层 CAF s 向下层的迁移。

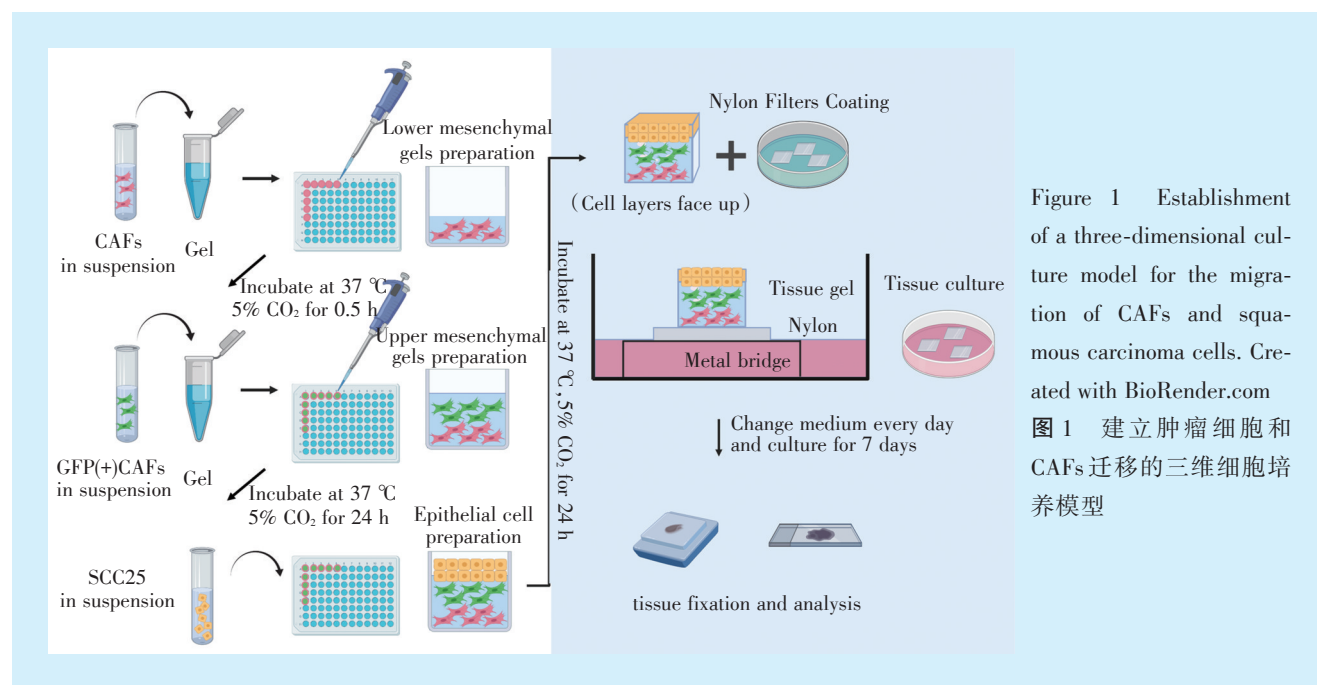


Figure 1 Establishment of a three-dimensional culture model for the migration of CAFs and squamous carcinoma cells. Created with BioRender.com
图 1 建立肿瘤细胞和 CAFs 迁移的三维细胞培养模型

三维培养体系基质成分按照表 1 的比例混合,放于冰上备用,制备为组织基质。吸取 CAFs 与上述配制的基质混匀,取 100 μ L(细胞数 5×10^5 个/mL)加入 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱孵育 0.5 h,待基质凝固,制备为下层间质组织;GFP(+)CAF s 与基质混匀,取 100 μ L(细胞数 5×10^5 个/mL)加入 96 孔板中基质的上层,37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵箱

孵育 0.5 h 后,制备为上层间质组织,加入 100 μ L 培养基,再培养 24 h。在制备好的间质组织上种植肿瘤细胞,吸取 SCC25 细胞混悬液 100 μ L(细胞数 2×10^5 个/mL)加入 96 孔板中,培养 24 h。

用 I 型胶原浸泡尼龙膜,置于孵箱中孵育 30 min 后,用含 1% 戊二醛的 PBS 固定^[11],置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 1 h 后 PBS 和培养基交替冲洗,浸泡于培养基中,

表1 三维培养体系基质成分
Table 1 Proportion of gel components

Gel components ¹⁾	Proportion
Collagen type I (4 mg/mL)	50% ²⁾
Matrigel	20% ²⁾
10× basal DMEM medium	10%
Fetal bovine serum(FBS)	10%
DMEM+10% FBS	10%

1): adjust the final pH to 7.0; 2): the ratio of collagen type I to Matrigel is adjustable, when the total amount is 70%

4℃储存备用,制备尼龙膜。取出96孔板中已凝结成组织块的三维细胞培养模型放至培养皿尼龙膜上,浸泡含10%胎牛血清的培养基,培养1周。隔天换液。实验组的培养皿中的培养基中加入外源性10 ng/mL TGF-β1,对照组中不加入TGF-β1,以比较TGF-β1对口腔癌细胞和CAF_s细胞迁移的影响。培养1周后4%多聚甲醛固定24 h,脱水机中脱水,液体蜡包埋后切片。组织切片行HE染色:将组织切片放入二甲苯中脱蜡,然后置于梯度酒

精中进行水化,于苏木素染液中染色水洗,1%盐酸酒精分色,置于伊红染液中染色,梯度酒精脱水,置于二甲苯中透明,中性树脂封片。分别置于普通光学显微镜、荧光显微镜下观察采图。

1.7 统计学分析

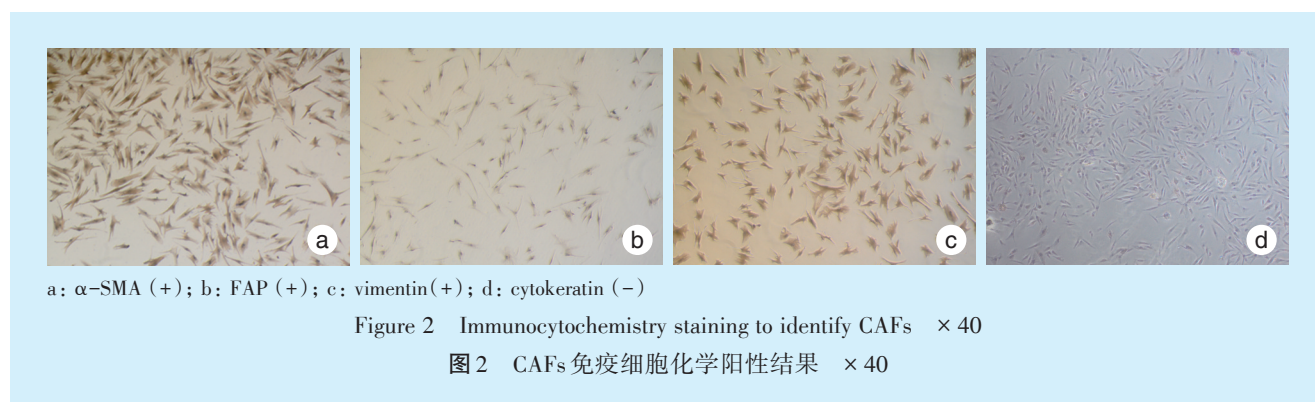
所有数据采用SPSS 21.0软件统计分析,采用非参数检验中的K-S检验方法对两组数据进行正态性检验,若数据资料服从正分布,则采用student-*t*检验;若数据资料不服从正态分布,则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAF_s的原代培养和鉴定

原代培养的CAF_s 5 d可见组织块周围有少量细胞爬出,细胞呈长梭形。原代培养的3株细胞的细胞角蛋白表达均呈阴性,波形蛋白表达均呈阳性,说明细胞来源于间质,而非来源于上皮。

α-SMA和FAP常作为鉴定CAF_s的标志蛋白,染色阳性表达(图2),说明培养的细胞为CAF_s^[12]。



2.2 二维培养培养条件下口腔CAF_s的迁移

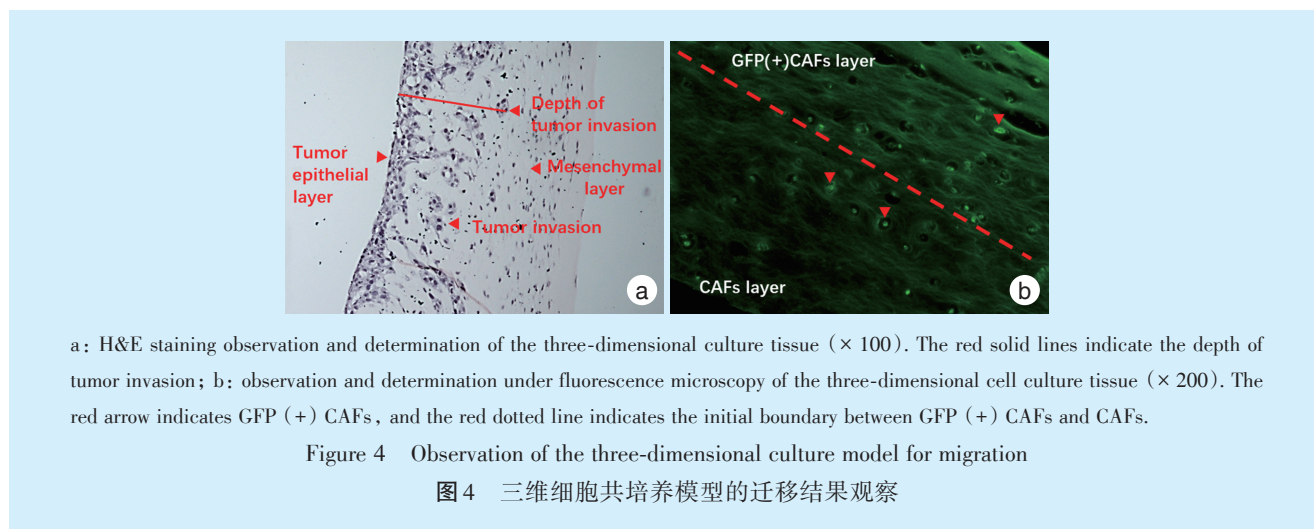
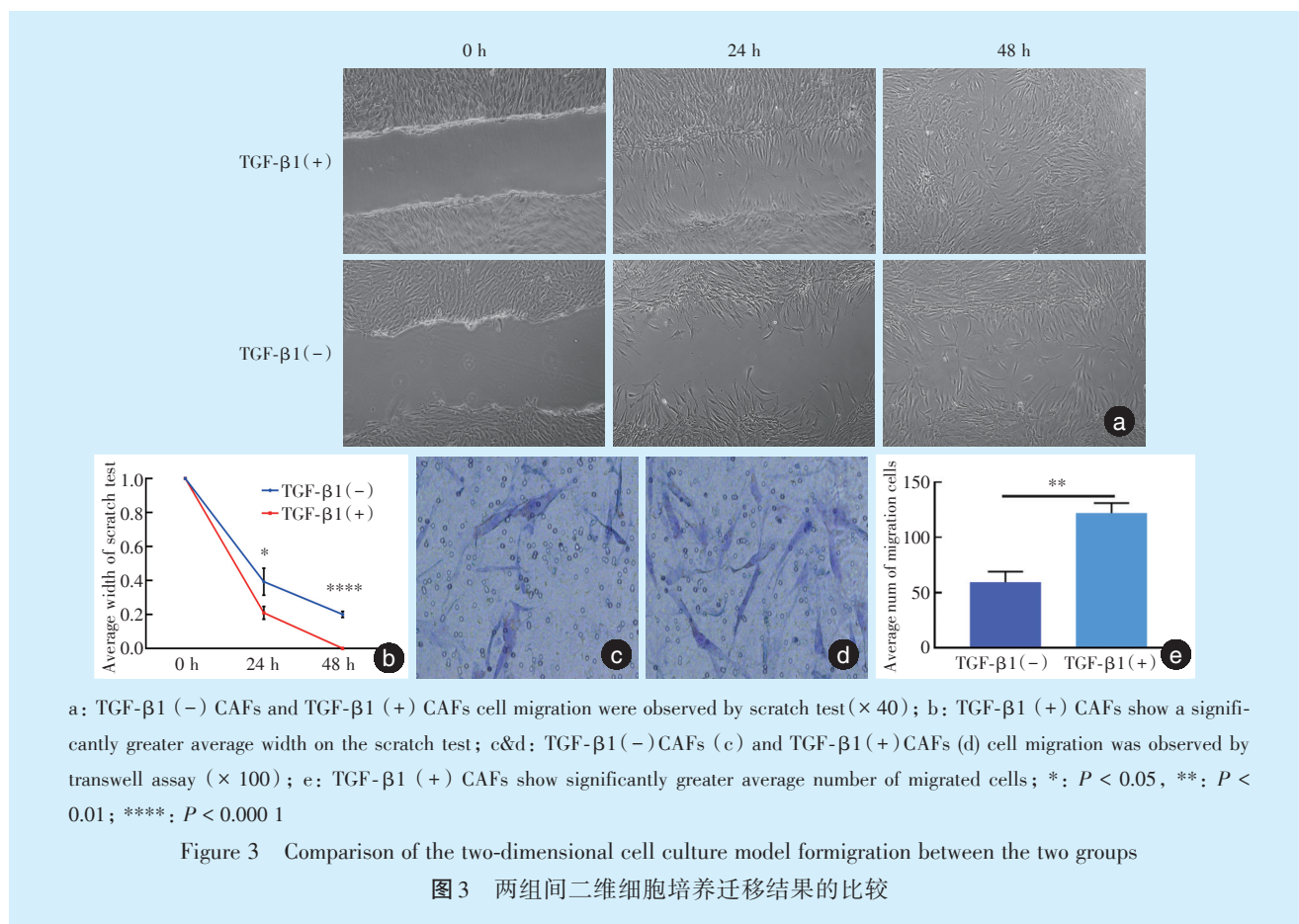
2.2.1 细胞划痕实验结果 在对照组中,24 h时可观察到细胞的迁移,48 h细胞迁移数增多,划痕宽度变小;在实验组中,24 h时细胞迁移数较对照组多,48 h时划痕基本愈合(图3a);24 h($t=3.595, P=0.023$)和48 h时($t=19.24, P<0.001$,图3b),两组间的平均划痕宽度的差异有统计学意义。

2.2.2 Transwell小室实验结果 Transwell小室实验中观察到了CAF_s的迁移现象,加入外源性TGF-β1刺激因子24 h后,实验组中平均细胞迁移数达到122个,而对照组平均细胞迁移数59.33个,实验组明显较对照组增多(图3c、3d)。两组间的平均细胞迁移数的差异有统计学意义($t=8.132, P=0.001$,图3e)。

2.3 三维细胞培养条件下肿瘤细胞和CAF_s迁移的观察

用慢病毒转染制备的GFP(+)CAF_s,慢病毒转染率达到了90%以上。借助GFP(+)CAF_s建立了肿瘤细胞和CAF_s迁移的三维细胞培养模型。结果发现,普通光镜下可发现明显的肿瘤上皮层和细胞间质层,肿瘤上皮细胞向间质明显浸润(图4a);在荧光显微镜观察,可发现图中GFP(+)的CAF_s分布在基质胶的全层中,即整个间质层中可观察到GFP标记的CAF_s,提示GFP(+)的CAF_s向下层胶中发生了迁移(图4b)。

在实验组细胞培养基中加入TGF-β1,HE染色后,进行比较(图5a),结果示实验组平均浸润深度/三维细胞培养组织全层深度的比值约0.436,对

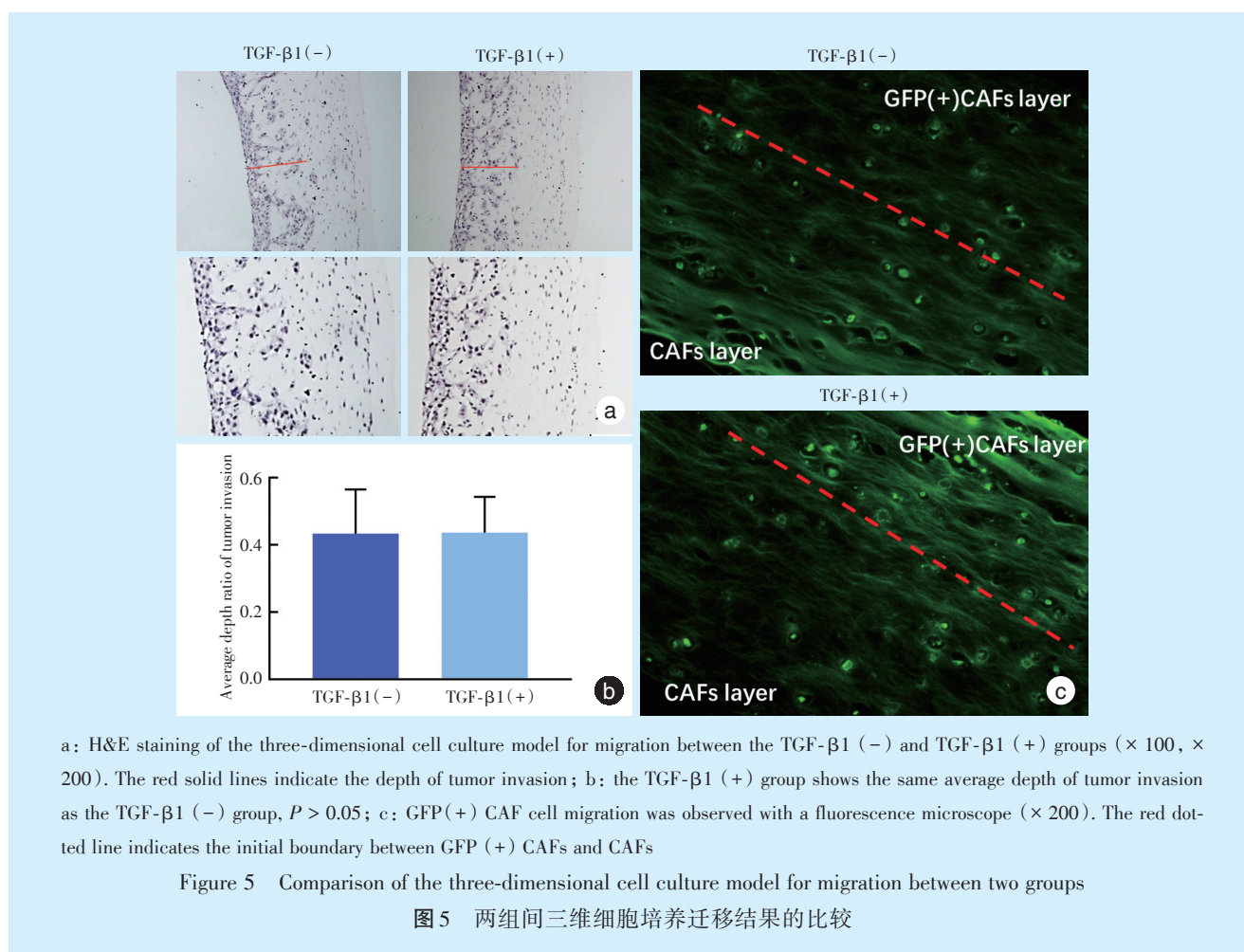


照组约0.433,两组间肿瘤细胞平均浸润深度比差异无统计学意义($t=0.03, P=0.977$,图5b);荧光成像比较GFP(+)CAFs在间质层的迁移,发现GFP(+)CAFs已迁移至未标记CAF_s细胞层(图5c),且10 ng/mL TGF-β1对CAF_s细胞迁移深度也无明显影响。

3 讨论

目前CAF_s研究大多采用二维模型,即划痕实

验和Transwell小室实验^[5-6,13]。二维培养条件较难模拟体内环境,缺乏与肿瘤细胞、细胞间基质的相互作用,与体内CAF_s真实生存环境有一定差异^[14]。为了能更好地模拟体内环境,研究者们模拟出三维共培养模型^[15-16],Horie等^[17]通过建立上皮细胞-CAF_s三维共培养模型,用以研究肺癌细胞与CAF_s间的作用,在组织培养5 d后,组织切片后可看到上皮细胞的浸润。Ham等^[9]通过三维基质-



三阴性乳腺癌细胞培养,方便地模拟 CAFs 与三阴性乳腺癌细胞的相互作用,量化其对癌细胞信号传导和耐药的影响。Bertero 等^[11]应用了由成纤维细胞诱导的鳞状细胞癌细胞集体侵袭的三维模型。Nakamura 等^[18]利用三维培养模型发现平足蛋白(+) CAFs 对肺腺癌肿瘤细胞的促生长作用。三维模型与 Transwell 小室等其他共培养体系相比较,实验结果更加直观,且更接近真实环境^[19]。课题组对现有的三维共细胞迁移模型进行了改进,以更直观地观察口腔 CAFs 的迁移现象。三维培养通过肿瘤上皮层和基质层的建立,能模拟体内的肿瘤微环境,研究肿瘤细胞与 CAFs 间的相互作用。本实验中通过对基质分层、上层细胞标记后,可以更加直观地观察到 CAFs 的迁移。

TGF-β1 作为肿瘤细胞和 CAFs 之间相互作用的重要细胞因子^[20-21],既可促进肿瘤的发展^[22],也可加强 CAFs 的迁移能力。在 TGF-β1 调控下,结肠癌 CAFs 中的连接蛋白 claudin-11 表达上调,可促使 CAFs 集中迁移^[23]。旁分泌的 TGF-β1 在 CAFs 诱导

的上皮间质转化和乳腺癌细胞转移中起重要作用^[22]。并且 TGF-β1 的相互旁分泌作用可增强 CAFs 诱导的癌细胞侵袭^[6-7]。本实验在二维培养条件下,通过细胞划痕实验、Transwell 小室实验观察到了 CAFs 的迁移现象,并证实了 TGF-β1 可促进 CAFs 的迁移。但三维共培养模型中,未发现 TGF-β1 对肿瘤细胞和 CAFs 迁移的明显影响。二维培养和三维培养需要的 TGF-β1 的浓度有差异,三维共培养模式下梯度渗透^[16]后,细胞直接接触的 TGF-β1 浓度相较于二维培养接触的浓度低,不同的培养方式提示 TGF-β1 对细胞迁移的效应呈浓度依赖性。本实验结果也说明二维培养模拟体内具有局限性,三维培养更接近于真实情况,TGF-β1 在真实的肿瘤微环境中对 CAFs 迁移是否起到作用,还有待进一步研究。

综上所述,使用肿瘤细胞、CAFs 以及胶原建立的三维模型能良好地模拟体内肿瘤微环境的组成、结构和形态,可以更好地模拟肿瘤微环境,模拟体内环境下 CAFs 的迁移。三维模型为研究肿

瘤微环境中各组分的相关关系^[24],模拟细胞迁移、细胞生物力学^[25]、肿瘤细胞侵袭浸润^[26]、药物干预等^[27]提供了实验条件。

参考文献

- [1] Chen XM, Song EW. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2): 99-115.
- [2] Ligorio M, Sil S, Malagon-Lopez J, et al. Stromal microenvironment shapes the intratumoral architecture of pancreatic cancer[J]. *Cell*, 2019, 178(1): 160-175.
- [3] Bu L, Baba H, Yoshida N, et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment[J]. *Oncogene*, 2019, 38(25): 4887-4901.
- [4] Okuyama K, Suzuki K, Yanamoto S, et al. Anaplastic transition within the cancer microenvironment in early-stage oral tongue squamous cell carcinoma is associated with local recurrence[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(4): 1713-1720.
- [5] Shan T, Chen S, Chen X, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 1971-1979.
- [6] Li YY, Zhou CX, Gao Y. Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- β 1 mediated by podoplanin[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(1): 43-53.
- [7] Elmusrati AA, Pilborough AE, Khurram SA, et al. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(6): 867-875.
- [8] Meng W, Liu C, Gao Q, et al. Effect of TGF- β 1 on the migration of oral carcinoma-associated fibroblasts[J]. *J Oral Sci Res*, 2013, 29(8): 707-709.
- [9] Ham SL, Thakuri PS, Plaster M, et al. Three-dimensional tumor model mimics stromal--breast cancer cells signaling[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 249-267.
- [10] Meng W, Xia Q, Wu L, et al. Downregulation of TGF- β receptor types II and III in oral squamous cell carcinoma and oral carcinoma-associated fibroblasts[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 88.
- [11] Bertero T, Oldham WM, Grasset EM, et al. Tumor-stroma mechanics coordinate amino acid availability to sustain tumor growth and malignancy[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 124-140.
- [12] Liu Y, Hu T, Shen J, et al. Separation, cultivation and biological characteristics of oral carcinoma-associated fibroblasts[J]. *Oral Dis*, 2006, 12(4): 375-380.
- [13] Cheng R, Li D, Shi X, et al. Reduced CX3CL1 secretion contributes to the susceptibility of oral leukoplakia-associated fibroblasts to candida *albicans*[J]. *Front Cell Infect Mi*, 2016, 6(1): 150.
- [14] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells[J]. *Cells*, 2019, 8(1): 74.
- [15] Zhao Y, Yan X, Li B, et al. Three-dimensional co-culture microfluidic model and its application for research on cancer stem-like cells inducing migration of endothelial cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(9): 1425-1432.
- [16] Chiew GGY, Wei N, Sultania S, et al. Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: a model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(8): 1865-1877.
- [17] Horie M, Saito A, Yamaguchi Y, et al. Three-dimensional co-culture model for tumor-stromal interaction[J]. *J Vis Exp*, 2015, (96): 52469.
- [18] Nakamura H, Sugano M, Miyashita T, et al. Organoid culture containing cancer cells and stromal cells reveals that podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts enhance proliferation of lung cancer cells[J]. *Lung Cancer*, 2019, 134(1): 100-107.
- [19] Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92(3): 1505-1520.
- [20] Sampson N, Brunner E, Weber A, et al. Inhibition of Nox4-dependent ROS signaling attenuates prostate fibroblast activation and abrogates stromal-mediated protumorigenic interactions[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(2): 383-395.
- [21] Ren Y, Jia HH, Xu YQ, et al. Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- β 1 secretion[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 5.
- [22] Cirillo N, Hassona Y, Celentano A, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate keratinocyte cell-cell adhesion via TGF- β -dependent pathways in genotype-specific oral cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(1): 76-85.
- [23] Karagiannis GS, Schaeffer DF, Cho CK, et al. Collective migration of cancer-associated fibroblasts is enhanced by overexpression of tight junction-associated proteins claudin-11 and occludin[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 178-195.
- [24] Eder T, Weber A, Neuwirt H, et al. Cancer-associated fibroblasts modify the response of prostate cancer cells to androgen and anti-androgens in three-dimensional spheroid culture[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1458.
- [25] Yang L, Carrington LJ, Erdogan B, et al. Biomechanics of cell reorientation in a three-dimensional matrix under compression[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(1): 253-266.
- [26] Miyake M, Hori S, Morizawa Y, et al. CXCL1-mediated interaction of cancer cells with tumor-associated macrophages and cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in human bladder cancer[J]. *Neoplasia*, 2016, 18(10): 636-646.
- [27] Hwang HJ, Oh MS, Lee DW, et al. Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 258.

(编辑 张琳,曾曙光)



官网



公众号