

文章编号 1006-8147(2017)06-0489-04

论著

# 乳腺癌基质成纤维细胞分离培养的优化及对乳腺癌细胞作用的初步研究

吴潇然

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津 300060)

**摘要** 目的: 分离培养乳腺癌基质成纤维细胞, 初步探讨其生物学特性及对乳腺癌细胞增殖转移能力的影响。方法: 取自临床手术新鲜标本, 用 I 型胶原酶和透明质酸酶消化法获得原代乳腺癌成纤维细胞 (CAFs) 及与之配对的正常乳腺成纤维细胞 (NFs); 显微镜观察细胞形态; 免疫印迹和免疫荧光实验检测上皮细胞、间质细胞和成纤维细胞标志物表达; 胶原收缩实验比较细胞收缩能力; 平板克隆形成和 Transwell 细胞体外迁移侵袭实验, 观测 CAFs 和 NFs 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果: 分离得到 CAFs 和 NFs, 2 次传代后可获得纯化细胞; 成纤维细胞中高表达 Vimentin 和  $\alpha$ -SMA, 低表达 E-cadherin; CAFs 胶原收缩能力较 NFs 更强; CAFs 条件培养基处理后的乳腺癌细胞体外增殖、迁移和侵袭能力增强。结论: 成功获得 CAFs 和 NFs, 且与 NFs 相比, CAFs 活化程度更高, CAFs 对乳腺癌细胞体外增殖和转移能力的促进作用更强。

**关键词** 乳腺癌; 癌相关成纤维细胞; 分离; 原代培养; 转移

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

## Optimization of isolation and culture of breast cancer stromal fibroblasts and their effects on breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF7

WU Xiao-ran

(Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin 300060, China)

**Abstract Objective:** To isolate and culture primary breast cancer stroma fibroblasts, to explore their biological characteristics, and also to study their influence on proliferation and metastasis of breast cancer cells. **Methods:** The primary breast cancer tissues were obtained from fresh specimen. Primary breast cancer associated fibroblasts (CAFs) and their paired normal breast fibroblasts (NFs) were isolated by collagenase and hyaluronidase digestion. Morphology was observed by microscope. Cell markers were detected by western blot and immunofluorescence. The collagen gel contraction assay was used to compare the contractile ability of CAFs and NFs. The influence of CAFs and NFs on proliferation and metastasis of breast cancer cells was measured by colony formation assay and transwell assay. **Results:** The purified CAFs and NFs were maintained after passage 2. The protein levels of Vimentin and  $\alpha$ -SMA were highly expressed, however, the protein level of E-cadherin was not detected in CAFs and NFs. The contractile ability of CAFs was stronger than NFs. CAFs-CM could promote the ability of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells compared with NFs-CM. **Conclusion:** The isolation and primary culture of CAFs and NFs with digestion method could be performed successfully. The status of activation of CAFs and the ability of CAFs to promote proliferation and metastasis of breast cancer cells are higher than NFs.

**Key words** breast cancer; cancer-associated fibroblasts; isolation; primary culture; metastasis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。目前已有研究表明, 由肿瘤基质构成的肿瘤微环境对乳腺癌起始和进展具有重要作用<sup>[1-4]</sup>。癌相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 作为活化的成纤维细胞, 是肿瘤微环境中数量最多的基质细胞, 具有肌成纤维细胞特性, 表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), 胶原收缩能力强<sup>[5]</sup>,

可通过分泌细胞因子、趋化因子或重塑细胞外基质等作用影响肿瘤细胞的生长、侵袭和转移, 进而促进乳腺癌进程<sup>[6]</sup>。为探究成纤维细胞在乳腺癌发生、进展中的作用, 我们通过优化乳腺癌基质成纤维细胞分离培养方法, 成功得到乳腺癌相关成纤维细胞 (CAFs) 及其配对的正常乳腺成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs), 比较其形态特征, 利用免疫印迹实验, 细胞免疫荧光技术和胶原收缩实验分析标志物表达水平及细胞活化状态, 运用平板克隆形成实验

作者简介 吴潇然 (1991-), 女, 硕士在读, 研究方向: 乳腺癌微环境中成纤维细胞活化机制, E-mail: wxrxr151@163.com。

和 Transwell 细胞体外迁移侵袭实验初步观测 CAFs 和 NFs 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,并为进一步研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 标本收集 无菌条件下切取乳腺原发癌组织及其配对的癌旁正常乳腺组织各 5 例,标本取自天津医科大学肿瘤医院乳腺外科临床手术切除的乳腺癌组织。所有标本均新鲜、完整,包括上皮组织及其结缔组织,均经临床和病理证实。

1.1.2 细胞来源 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 MCF7 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640、DMEM、DMEM/F12 培养基及胎牛血清(Gibco 公司,美国);I 型胶原酶、透明质酸酶(Sigma 公司,美国);抗体: $\alpha$ -SMA(Sigma 公司,美国);E-cadherin、Vimentin 和  $\alpha$ -Tubulin(Cel l Signaling Technology 公司,美国);带有抗荧光淬灭剂和 DAPI 的封片剂(Invitrogen 公司,美国);I 型胶原和免疫荧光小室(Corning 公司,美国);Transwell 小室(BD 公司,美国)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 原代细胞培养:根据已报道的成纤维细胞分离方法,并结合实验室细胞培养条件,我们改进了分离培养方法,具体操作如下:(1)采用无菌袋将手术切取的乳腺癌组织标本于手术切除后 30 min 内取回至细胞培养室(组织清洗剪切至消化前过程须在标本取回后 1 h 内完成),将组织块放入盛有 DMEM/F12 培养基的无菌培养皿中。(2)在严格执行无菌培养操作基础上,用含抗生素(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)的生理盐水冲洗组织块,去除血细胞,待洗液清亮后,用无菌眼科剪将坏死组织、脂肪组织、血管剔除。(3)将组织于少量 DMEM/F12 培养基中剪切至约 1 mm<sup>3</sup> 大小,并用注射器内芯研磨;将研磨后的细胞悬液离心,1 200 r/min,5 min。弃上清,收集细胞,加入 8 mL 含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养;2 h 后分离培养,贴壁细胞为巨噬细胞,未贴壁细胞为癌细胞和成纤维细胞。(4)根据乳腺癌基质主要成分,利用 I 型胶原酶和透明质酸酶的混合酶消化液对新鲜组织进行消化,同时采用研磨、初次消化和再次消化方法收集细胞。将研磨后残留固体组织移出至新培养皿中,加入消化酶(160  $\mu$ g/mL I 型胶原酶,25  $\mu$ g/mL 透明质酸酶),于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱消化;2 h 后镜下观察消化情况,若有单细胞游离则吸出单细胞悬

液,加入同等体积的含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化,将混合液离心,1 800 r/min,10 min;弃上清,加入 8 mL 含 15% FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养;剩余组织继续消化,步骤同前,约 4 h 后,镜下观察,组织变得疏松,用枪尖吹打使细胞完全游离;终止消化后将混合液离心,1 800 r/min,10 min;弃上清,加入培养液,并于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。剪切、消化和培养过程中使用的培养基和消化酶均含有双抗。换液时用含双抗 PBS 缓冲液轻柔冲洗培养皿,保持培养皿清洁。(5)培养过程中,选用利于成纤维细胞生长的 DMEM/F12 培养基,血清浓度不低于 15%,每 3 d 换液 1 次,除每日例行细胞观察,尽量避免移动培养皿。一般 24 h 后即可见细胞贴壁伸展,1~2 周左右细胞生长近融合,传代培养。经过 2 次传代后,得到纯化的 CAFs 和 NFs。传代培养时,需控制胰蛋白酶作用时间。初次传代时,细胞密度不可过低。

1.2.1.2 乳腺癌细胞培养:用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 和 DMEM 完全培养基培养 MDA-MB-231 和 MCF7 细胞,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。对数生长期细胞用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 Western blot 将传至第 3 代的成纤维细胞,用 PBS 轻轻冲洗 3 次,弃去残留 PBS,加入蛋白裂解液,冰上孵育 30 min,于 4 ℃离心,12 000 r/min,20 min,收集上清。测蛋白浓度,100 ℃加热变性;10% SDS-PAGE 分离蛋白质,湿转至 PVDF 膜后,5%脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h,4 ℃一抗孵育过夜,TBST 洗膜,每次 5 min。室温条件下孵育二抗 50 min,TBST 洗膜,5 次,每次 10 min。ECL 化学发光试剂显色 1~2 min,X 胶片曝光检测蛋白表达量变化情况。

1.2.3 细胞免疫荧光染色 胰酶消化细胞,将适宜浓度的细胞悬液加入免疫荧光小室中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养;24 h 后每室中加入适量 4%多聚甲醛室温固定细胞 30 min,50 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl 溶液清洗 10 min,0.3% Triton-X-100 室温通透细胞膜 20 min。2% BSA 室温封闭 20 min,4 ℃一抗孵育过夜;次日取出小室室温复温 30 min,避光加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h。用带有抗荧光淬灭剂和 DAPI 的封片剂封片,荧光显微镜下观察。

1.2.4 胶原收缩实验 胰酶消化细胞,将浓度为 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL 细胞悬液与 I 型胶原(终浓度为 2 mg/mL)混合均匀,加入预冷 24 孔板中,每孔 500  $\mu$ L,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱 30 min,待胶原凝固后用注射器针头沿孔壁轻划胶原,并加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培

培养基,每孔 1 mL。置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。观察并测量胶原表面积变化情况。

**1.2.5 平板克隆形成实验** 取对数生长期的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞,胰酶消化并吹打成单个细胞,以适当细胞密度接种于 6 孔板中,轻轻转动使细胞分散均匀,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次,每孔加 1:3 醋酸/甲醇 2 mL,固定 15 min。弃去固定液,Giemsa 染液染 20 min,流水缓慢洗去染液,空气干燥。将孔板置于网格纸上,肉眼计数克隆数。

**1.2.6 Transwell 细胞体外迁移侵袭实验** 胰酶消化对数生长期的 MDA-MB-231 和 MCF7 细胞,并于无血清培养基中重悬,调整细胞浓度为 5×10<sup>4</sup>/mL,将 500 μL 细胞悬液接种到迁移侵袭小室上室中,下室中加入 750 μL 含 20%胎牛血清的培养基及成纤维细胞条件培养基的混合液(侵袭小室使用前要置于 37 ℃水化 2 h)。12 h 和 24 h 后分别取出迁移和侵袭小室,4%多聚甲醛固定 20 min,Giemsa 染液染色 20 min,显微镜下观察。

**1.3 统计学分析** 用 SPSS17.0 软件对数据进行 *t* 检验差异分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 成功分离乳腺癌基质成纤维细胞** 通过优化实验方法,成功分离得到 CAFs 和 NFs。结果证实,以上方法可成功控制细胞污染,一般 24 h 即可见细胞贴壁伸展,1~2 周左右细胞生长近融合。经过 2 次传代后,得到纯化的 CAFs 和 NFs。

**2.2 细胞形态观察** NFs 呈长梭形,胞体较 CAFs 更大更长,胞浆中颗粒物较少,边缘有刺状突起,排列规则,具有一定极性。CAFs 呈梭形或三角形,胞核亦呈卵圆形,胞浆中含较多颗粒物,边缘较 NFs 不整齐,亦有刺状突起(图 1A)。细胞长至 70%~80% 饱和度时,NFs 和 CAFs 均呈旋涡状生长。

**2.3 成纤维细胞中高表达 Vimentin 和 α-SMA 低表达 E-cadherin** 为检测分离得到的 NFs 和 CAFs 的纯度,Western blot 方法检测传至第 3 代的 NFs 和 CAFs 细胞中高表达间质标志物 Vimentin,低表达上皮标志物 E-cadherin。CAFs 胞浆中成纤维细胞活化标志物 α-SMA 表达水平明显高于 NFs(图 1B、1C)。

**2.4 CAFs 胶原收缩能力增强** 利用原代分离培养的 NFs 和 CAFs 进行胶原收缩实验,发现培养 48 h 后,与 NFs 组相比 CAFs 组胶原表面积更小。NFs 和 CAFs 均具有胶原收缩能力,CAFs 收缩能力更强,且

差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 2A、2B)。

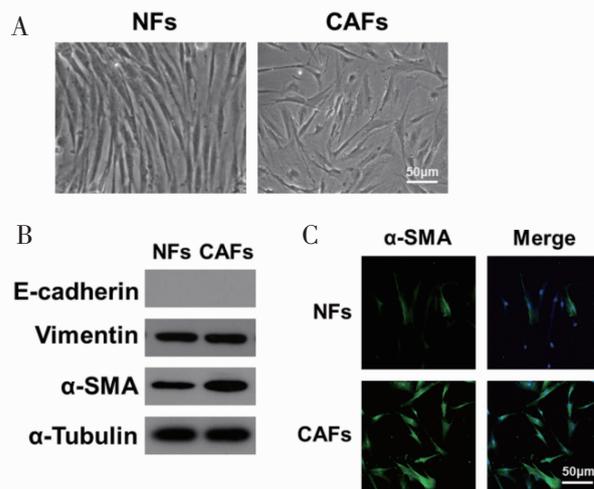
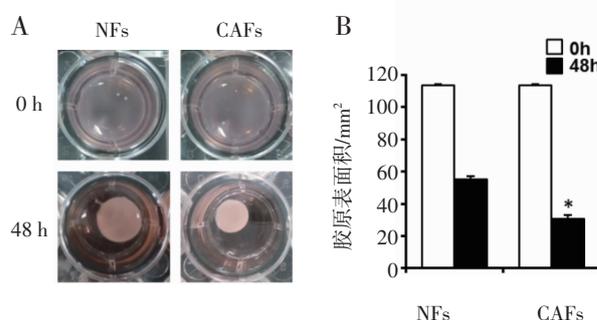


图 1 成纤维细胞形态及标志物表达水平

Fig 1 The cell morphology of fibroblasts and the protein levels of fibroblasts markers



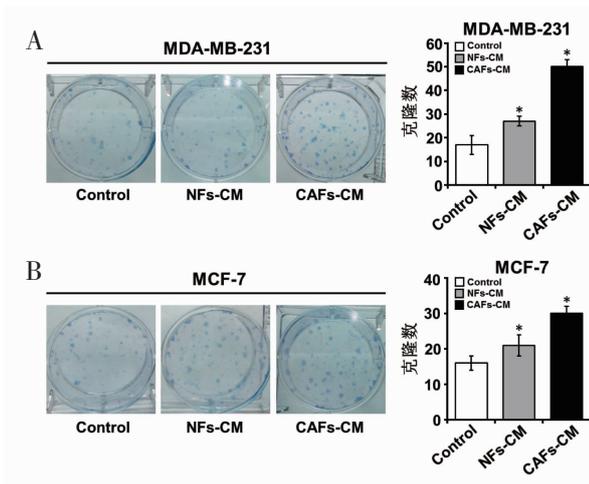
\*  $P < 0.05$

图 2 CAFs 胶原收缩能力增强

Fig 2 The ability of collagen gel contraction of CAFs is stronger than NFs

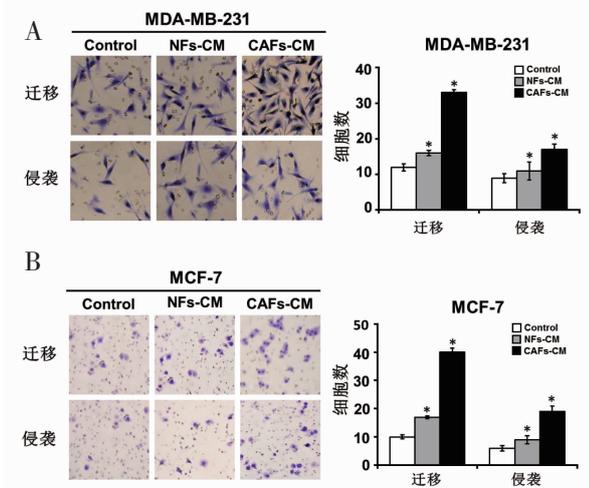
**2.5 CAFs 促进乳腺癌细胞增殖** 平板克隆形成实验结果显示,培养 2 周后,CAFs 条件上清处理组细胞形成克隆数明显多于 NFs 条件上清处理组,且克隆数与不加条件培养基的空白对照组相比均增多。与 NFs 相比,CAFs 可使乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖速度加快,增殖能力加强,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 3)。

**2.6 成纤维细胞对乳腺癌细胞侵袭迁移能力的影响** 利用 MDA-MB-231 细胞和 MCF7 细胞进行 Transwell 迁移侵袭实验,NFs 和 CAFs 条件上清处理组细胞迁移和侵袭数量多于空白对照组,CAFs-CM 处理组细胞的迁移侵袭数量显著高于 NFs-CM 处理组,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 4A、4B)。结果表明,CAFs 对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的促进作用较 NFs 更强。



\*  $P < 0.05$

图 3 CAFs 促进乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF7 细胞增殖  
Fig 3 CAFs promotes the proliferation ability of MDA-MB-231 and MCF-7



\*  $P < 0.05$

图 4 CAFs-CM 增强乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF7 细胞的迁移侵袭能力

Fig 4 CAFs-CM enhances the abilities of migration and invasion of breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7

### 3 讨论

乳腺癌作为一种异质性肿瘤,其癌组织主要由肿瘤细胞、基质细胞和细胞外基质构成。基质上皮相互作用对乳腺发育至关重要,且乳腺癌基质具备改变乳腺癌细胞增殖、存活、分化、侵袭和转移的能力<sup>[7]</sup>。作为肿瘤微环境基质细胞中含量最多的成纤维细胞在乳腺癌的转移过程中发挥重要作用。从离体癌组织中分离培养基成纤维细胞是研究其生物学特性和对肿瘤细胞影响的主要方法<sup>[8]</sup>。研究表明由多种癌组织中分离得到的基质生物学变化小,仍保持体内细胞特性,且高表达  $\alpha$ -SMA,如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌和食管腺癌<sup>[4,9]</sup>。

本文在参考已报道成纤维细胞原代分离培养

方法的基础上,对实验操作进行优化,以便更加高效地获得无污染、状态良好的原代成纤维细胞。首先,含有结缔组织的乳腺癌组织标本在手术切除后须尽快处理,以确保组织标本新鲜程度和细胞活力。其次,在分离过程中,无菌培养操作的严格执行和实验所用生理盐水、培养基及消化酶中添加双抗可有效清除环境中、组织中及人为原因造成的污染,达到更好的灭菌效果。再次, I 型胶原酶和透明质酸酶的混合酶液对乳腺癌基质主要成分消化能力更强,且可避免胰蛋白酶对细胞的伤害;消化时间经过多次实验,对于剪切后体积小约至  $1 \text{ mm}^3$  的组织块,4 h 后即可终止消化,但对于稍大组织块则需延长消化时间,或消化过夜,或经 2 次消化。通过对消化酶液和消化时间的调整能够获得更多原代基质细胞。最后,在培养过程中,采用使用较多且利于成纤维细胞生长的 DMEM/F12 培养基,同时提高血清浓度至 15%~20%,以促进原代细胞生长。为利于成纤维细胞贴壁,除换液和观察,需尽量避免移动培养皿。本研究成功构建了实验室条件下乳腺癌基质成纤维细胞的分离培养方法,为进一步的研究奠定基础。

分离得到 CAFs 和 NFs 后,初步比较了两者的生物学特性,利用 Western blot、免疫荧光检测了间质、上皮及成纤维细胞标志物表达水平,发现成纤维细胞中高表达 Vimentin 和  $\alpha$ -SMA,低表达 E-cadherin。由 CAFs 介导的组织收缩可增加组织液静水压,进而妨碍药物释放进入肿瘤组织<sup>[10]</sup>,同时 CAFs 具有重塑细胞外基质的作用<sup>[11]</sup>,本研究中利用胶原收缩实验证实 CAFs 收缩能力较 NFs 更强,可认为 CAFs 在改变或重塑肿瘤微环境或 ECM 结构过程中的能力更强,从而形成影响肿瘤细胞迁移侵袭的环境。平板克隆形成和 Transwell 实验检测成纤维细胞条件培养基处理后的乳腺癌细胞体外增殖、迁移和侵袭能力,发现 CAFs 对乳腺癌细胞体外增殖和转移能力的促进作用较 NFs 更强。以上实验结果可为进一步研究乳腺癌基质成纤维细胞活化机制及成纤维细胞与乳腺癌细胞相互作用提供线索。

目前,针对肿瘤微环境中成纤维细胞的研究大多以成纤维细胞的原代分离培养为基础<sup>[12]</sup>,如此不仅可使细胞更大程度保持体内环境中的生物学特征,同时可以比较分析不同个体来源成纤维细胞间形态结构和功能差异,为肿瘤患者的治疗和预后提供依据。因此,构建实验室条件下高效的成纤维细胞原代分离培养是深入研究的关键基础。

(下转第 501 页)

动图结果显示,模型组大鼠肺动脉压力明显高于对照组( $P=0.033$ ),模型组大鼠心房心室尚未出现结构性改变,但可以观察到部分模型组大鼠出现左、右心室室壁增厚伴不规则运动,提示正处于心房心室结构改变的初期。此外,由于动物数量的限制,尚需更大规模的实验进一步证实,后续将进行分子生物学相关的实验进一步探究。本实验的结果提示慢性间歇缺氧房颤心房纤维化模型的建立达到预期目标。此模型的建立对进一步认识 AF 的基质和机制,探索干预 AF 的可行途径具有一定意义。

#### 参考文献:

- [1] Wann L S, Curtis A B, January C T, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused update on the management of patients with atrial fibrillation (Update on Dabigatran)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(11): 1330
- [2] Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, et al. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 265
- [3] Everett T H 4th, Olgin J E. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation[J]. *Heart Rhythm*, 2007, 4(3 Suppl): 24
- [4] Nishida K, Michael G, Dobrev D, et al. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities[J]. *Europace*, 2010, 12(2): 160
- [5] Riley G, Syeda F, Kirchhof P, et al. An introduction to murine models of atrial fibrillation[J]. *Front Physiol*, 2012, 8(3): 296
- [6] Ramos P, Rubies C, Torres M, et al. Atrial fibrosis in a chronic murine model of obstructive sleep apnea: mechanisms and prevention by mesenchymal stem cells[J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 54
- [7] Qu Y C, Du Y M, Wu S L, et al. Activated nuclear factor- $\kappa$ B and increased tumor necrosis factor- $\alpha$  in atrial tissue of atrial fibrillation [J]. *Scand Cardiovasc J*, 2009, 43(5): 292
- [8] Katoh Y, Nakazato Y J. Can we predict electroanatomical remodeling of left atrium in patients with non-valvular atrial fibrillation by transforming growth factor- $\beta$  and tissue inhibitor of metalloproteinase-1[J]. *Circ J*, 2011, 75(3): 536
- [9] Diao S L, Xu H P, Zhang B, et al. Associations of MMP-2, BAX, and Bcl-2 mRNA and protein expressions with development of atrial fibrillation[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 1497
- [10] Jalife J, Kaur K. Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. Trends in cardiovascular medicine[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(6): 475
- [11] Wang J, Wang Y, Han J, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the left atrium of patients with nonvalvular paroxysmal[J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(5): 1018
- [12] Santulli G, Iaccarino G, De Luca N, et al. Atrial fibrillation and microRNAs[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 15
- [13] Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaiton P, et al. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2014, 7(5): 861
- [14] Satoh A, Niwano S, Niwano H, et al. Aliskiren suppresses atrial electrical and structural remodeling in a canine model of atrial fibrillation[J]. *Heart Vessels*, 2017, 32(1): 90
- [15] Fu H, Liu C, Li J, et al. Impaired atrial electromechanical function and atrial fibrillation promotion in alloxan-induced diabetic rabbits[J]. *Cardiol J*, 2013, 20(1): 59

(2017-01-04 收稿)

(上接第 492 页)

#### 参考文献:

- [1] Mao Y, Keller E T, Garfield D H, et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013,32(1/2):303
- [2] Swartz M A, Iida N, Roberts E W, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10):2473
- [3] Fleming J M, Miller T C, Quinones M, et al. The normal breast microenvironment of premenopausal women differentially influences the behavior of breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. *BMC Med*, 2010,8:27
- [4] Cichon M A, Degnim A C, Visscher D W, et al. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(4):389
- [5] Saito R A, Micke P, Paulsson J, et al. Forkhead box F1 regulates tumor-promoting properties of cancer-associated fibroblasts in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2010,70(7):2644
- [6] Joyce J A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2005,7(6):513
- [7] Franco O E, Shaw A K, Strand D W, et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(1):33
- [8] Erez N, Truitt M, Olson P, et al. Cancer-Associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate Tumor-Promoting inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent manner[J]. *Cancer Cell*, 2010,17(2):135
- [9] Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers[J]. *Nat Commun*, 2016,7:13050
- [10] Heldin C H, Rubin K, Pietras K, et al. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 806
- [11] Neri S, Hashimoto H, Kii H, et al. Cancer cell invasion driven by extracellular matrix remodeling is dependent on the properties of cancer-associated fibroblasts[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2):437
- [12] Gascard P, Tlsty T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(9):1002

(2017-01-16 收稿)