DOI:10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0289

论著

乳腺癌源性肿瘤相关成纤维细胞的永生化及鉴定

付豪,冯玉梅

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所生物化学与分子生物学研究室,乳腺癌防治教育部重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,国家恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 **目的:**构建可在体外稳定培养和传代的肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)并鉴定其生物学特征。**方法:**取人乳腺浸润性导管癌组织,采用酶解-组织块培养法和差速贴壁法分离纯化CAFs,用免疫荧光检测α-肌动蛋白、血小板源性生长因子受体β和广谱细胞角蛋白;采用人端粒酶表达慢病毒感染CAFs使其永生化;在商品化FGM-2(fibroblast growth medium-2)培养基的基础上添加谷氨酰胺、非必需氨基酸和抗坏血酸以优化培养条件,在体外连续培养传代,并用β-半乳糖苷酶染色鉴定各代细胞中衰老细胞的比例。对构建成功的CAF1、CAF2和CAF3细胞系进行高通量RNA测序,分析差异表达基因(DEGs)及其相关信号通路;基于3个CAF细胞系CAF亚型标志基因的表达水平,鉴定其生物学特征。**结果:**成功分离原代CAFs,并构建3株永生化CAF细胞系;成功优化了CAFs的培养条件,使CAF细胞系在体外培养时不易发生细胞衰老表型(t=2.972、7.049,均P<0.05);RNA测序结果分析显示,CAF1与CAF2有3 150个DEGs,CAF2与CAF3有3 544个DEGs; 而CAF1与CAF3有343个DEGs。对DEGs进行GO富集分析(gene ontology enrichment analysis)表明,CAF2高表达基因主要参与蛋白水解、细胞外基质重塑、血管生成和细胞黏附等信号通路;CAF1和CAF3高表达基因主要参与细胞分裂、细胞周期、DNA损伤修复和有丝分裂等信号通路。对3个CAF细胞系亚型特征性分析表明,CAF1和CAF 3具有炎性CAFs特征,CAF2具有基质型CAFs特征。**结论:**成功构建得到3株可在体外稳定传代且具有不同生物学特征的CAF细胞系, 为CAFs在乳腺癌发生和进展中作用机制的研究提供了可靠的细胞模型。

关键词 乳腺癌;肿瘤相关成纤维细胞;永生化;RNA测序分析;CAF亚型

中图分类号 R73-35+1 **文献标志码** A **文章编号** 1006-8147(2024)04-0289-06

Immortalization and identification of cancer associated fibroblasts derived from breast cancer

FU Hao, FENG Yumei

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Ministry of Education, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To establish cell lines of cancer associated fibroblasts(CAFs) forstable culture and passage *in vitro* and identify the biological characteristics. **Methods:** CAFs were isolated from human breast invasive ductal carcinoma tissues using a combination method of enzymatic digestion and explant culture.CAFs were purified using the differential adhesion method.α-Smooth muscle actin, platelet-derived growth factor receptor β and pan-cytokeratin were detected by immunofluorescence. CAFs were immortalized by transinfected human telomerase reverse transcriptase lentivirus. Glutamine, non-essential amino acid, and ascorbic acid were supplemented in commercial fibroblast growth medium-2 medium to optimize culture condition, supporting continuous cultureand passage *in vitro*. Senescent cell ratio was characterized by using β X-galactosidase staining.High-throughput RNA sequencing was conducted on-successfully constructed CAF1, CAF2 and CAF3 cell lines, and differential expressed genes (DEGs) and related signaling pathways were analyzed. Expression levels of CAF subtype specific genes of the three CAF cell lines were analyzed, and their biological characteristics were identified. **Results:** Primary CAFs were successfully isolated, and three immortalized CAF cell lines were constructed.Culture conditions for CAFs were successfully optimized to reduce the occurrence of cellular senescence phenotype *in vitro*. Analysis of RNA sequencing results revealed 3 150 DEGs between CAF1 and CAF2, 3 544 DEGs between CAF2 and CAF3 and 343 DEGs between CAF1 and CAF3. The Gene Ontology enrichment analysis of DEGs showed that highly expressed genes in CAF2 were mainly involved in proteolysis, extracellular matrix remodeling, angiogenesis, and cell adhesion signaling pathways. Highly expressed genes in CAF1 and CAF3 are mainly involved in cell division, cell cycle, DNA damage repair and mitosis signaling pathways. The characteristic analysis of the subtypes of the three CAF cell lines showed that CAF1 and CAF3 exhibited inflammatory CAF characteristics, while CAF2 exhibited matrix CAF characteristics. **Conclusion:** Three stably passaged CAF cell lines with different biological characteristics were successfully established, providing a reliable cell line model for research on the mechanism of CAFs in the occurrence and progression of breast cancer.

Key words breast cancer; cancer associated fibroblasts; immortalization; RNA-sequencing analysis; subtype of CAF

基金项目 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-009A)

作者简介 付豪(1997-),男,硕士在读,研究方向:肿瘤分子生物学;通信作者:冯玉梅,E-mail:ymfeng@tmu.edu.cn。

肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)是肿瘤微环境中数量最多的细胞群体，在调节肿瘤细胞的上皮-间充质转化(EMT)、干性、耐药性,细胞外基质(ECM)重塑和免疫微环境重塑中起重要作用[1-3]。CAFs细胞群体具有高度异质性,乳腺癌微环境中的CAFs可根据特征性基因表达的水平分为多种亚型,包括基质型CAFs(mCAFs)、炎性CAFs(iCAFs)、血管型CAFs(vCAFs)和分裂型CAFs(dCAFs)等,不同亚型CAFs在肿瘤中的功能亦不相同[4-5]。mCAFs和iCAFs是肿瘤微环境中数量最多的两个CAF亚群,mCAFs高表达α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)而低表达白细胞介素(IL)-6[6],由肿瘤细胞的直接接触激活,通过促进肿瘤ECM重塑、EMT和治疗耐药,促进肿瘤进展[7-8]。iCAFs高表达IL-6而低表达α-SMA,由肿瘤细胞释放的细胞因子如IL-1α和肿瘤坏死因子(TNF)-α激活[9]。iCAFs可通过分泌细胞因子和生长因子,促进肿瘤细胞增殖、转移和肿瘤免疫微环境(TIME)抑制[10]。此外,vCAFs和dCAFs等CAF群体在肿瘤中亦具有不同的功能[11]。因此,生物学特征明确的CAF细胞系的构建对CAF复杂的生物学研究尤为重要。目前,原代CAF细胞系的分离主要依赖于乳腺癌组织中分离并体外培养,然而长期传代易导致细胞衰老，限制了其在离体后的研究和应用。因此,乳腺癌源性CAF细胞模型构建方法的优化亟需解决。本研究通过将人乳腺癌源性CAFs永生化和培养条件的优化,成功构建3个可稳定传代的CAF细胞系，并通过高通量RNA测序（RNA-seq)分析,确定3个CAF细胞系的生物学亚型,为CAFs的体外和体内研究提供了细胞模型。

1 材料与方法

1.1 组织标本来源 收集2022年3—6月济宁医学院附属医院3例乳腺浸润性导管癌患者的新鲜组织，患者临床信息见表1。患者均签署知情同意书，并获得济宁医学院附属医院伦理委员会批准(编号:2021C055)。

表1 CAFs来源乳腺癌患者临床信息

Tab.1 Clinical informationof CAFs derived from breast cancer patients

病例	年龄(岁)	组织分级	肿瘤体积(cm)	ER	PR	HER2	Ki-67	分子亚型
1	54	Ⅱ	2.0×1.8×1.8	3+,80%	3+,80%	0	15%~20%	Luminal B
2	45	Ⅲ	1.7×1.5×1.2	2+,80%	2+,90%	0	30%~40%	Luminal B
3	53	Ⅲ	1.0×0.9×0.9	1+,25%	1+,25%	3+	10%~15%	Luminal B

注:ER:雌激素受体;PR:孕激素受体;HER2:人表皮生长因子受体;Ki-67:增殖标志蛋白Ki-67;0:阴性,1+:弱阳性表达,2+:中等阳性表达,3+:强阳性表达

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 DMEM/F12细胞培养基(Gibco,C11995500BT)、Opti-MEM培养基(Gibco,C119955-00BT,31985-070)、青霉素-链霉素溶液(Gibco,15140-122)、胰蛋白酶(Gibco,25200-072)、谷氨酰胺添加剂GlutaMAX(Gibco,C11995500BT,25030-081)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco,16000-044)、Lipo2000 (Invitrogen,11668-019)、山羊抗兔AF594荧光二抗(Thermo Fisher,A11012)、山羊抗鼠AF488荧光二抗(Thermo Fisher,A11001)、人重组碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human FGFbasic,Rh-bFGF)(Proteintec,HZ-1285)、胰岛素(MCE,HY-P0035)、嘌呤霉素(MCE,HY-B1743A)、抗坏血酸(Sigma,PHR1008)、Ⅳ型胶原酶(Sigma,C4-BIOC)、DNase Ⅰ(Sigma,3750-OP)、PEG8000(翌圣生物,60304ES76)、FGM-2人成纤维细胞培养基(Lonza,cc-3132)、β-半乳糖苷酶染色试剂盒(CST,9860)、α-SMA抗体(CST,19245)、血小板源性生长因子受体β(platelet-derived growth factor receptor β,PDGFRβ)抗体(CST,4564)、组织保存液(Milteny biotec,130-100-008)、广谱细胞角蛋白(pan-cytokeratin, pan-CK)抗体(中杉金桥,ZM-0069)、人端粒酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)表达质粒pLV-CMV-hTERT(中国丰晖生物科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 正置光学显微镜(NIKON,德国)、倒置荧光显微镜(ZEISS,德国)、低温高速离心机(ThermoScientific,美国)、CO_2培养箱(Thermo Scientific,美国)、超净工作台(Thermo Scientific,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织的获取与处理 将手术切除的乳腺癌组织剔除脂肪和坏死组织,剪碎至直径小于2 mm,用含有200 U/mL青/链霉素的冰PBS洗涤组织块3次,于组织保存液中保存。

1.3.2 CAFs分离 将1.3.1中的组织块剪碎至直径小于1 mm,加入10 mL组织消化液(DMEM/F12,10% FBS,1 mg/mL胶原酶Ⅳ,300 μg/mL DNase Ⅰ,200 U/mL青/链霉素)，置于37℃摇床,110 r/min消

化约 25 min,肉眼可见组织松散后,加入 20 mL 无菌 PBS,4℃、400×*g* 离心 5 min; 用洗涤液将组织块重悬,4℃、400×*g* 离心 5 min,重复洗涤步骤 2 次。将组织沉淀用 3 mL 培养基重悬后铺在 6 孔板中,37℃培养箱中孵育 48 h。待细胞从组织块中爬出,用镊子小心的移去残留组织块,用胰蛋白酶消化贴壁细胞,通过差速贴壁法进一步去除上皮细胞。

1.3.3　CAFs 免疫荧光鉴定　将处于生长对数期的 CAFs 消化重悬后铺于腔室载玻片上,细胞贴壁后 12 h 弃培养基,加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min;PBS 浸洗 2 次后,0.5% Triton-100 通透细胞膜;加入 3% FBS 室温封闭 10 min 后,分别加入 α-SMA(1∶100 稀释)和 pan-CK(1∶100 稀释)或 PDGFRβ(1∶100 稀释)和 pan-CK 抗体混合物,4℃孵育过夜;弃抗体,PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,加入对应种属的荧光标记二抗(1∶1 000 稀释),室温避光孵育 30 min;弃抗体,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,擦干玻片后滴加含有 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindole)的封片剂封片。

1.3.4　慢病毒包装　将病毒包装质粒 psPAX、pMD2.0 g 和 hTERT 质粒按照 4.5 μg∶1.5 μg∶6 μg 混合溶于 500 μL Opti-MEM 培养基, 同时将 24 μL lipo2000 溶于 500 μL Opti-MEM 培养基。室温静置 5 min 后将二者混合,震荡混匀后室温静置 10 min,将混合液加入到融合度为 80%的 293 T 细胞中。6 h 后更换新鲜培养基,48 h 后收集病毒上清, 使用 20%的 PEG8000 溶液浓缩病毒。

1.3.5　CAFs 永生化　将 hTERT 慢病毒按照合适比例加入到传代至第 3 代的 CAFs 中,24 h 后换新鲜培养基,48 h 后用终浓度为 1 μg/mL 的嘌呤霉素筛选,未死亡细胞为感染慢病毒成功的细胞。

1.3.6　培养体系改良　成纤维细胞基础培养基:Lonza FGM-2 培养基(Basic medium, 2% FBS,5 ng/mL Rh-bFGF,5 μg/mL 胰岛素,1%青霉素-链霉素溶液)。优化培养基配方:DMEM/F12,1 × GlutaMAX,1% 非必需氨基酸,10% FBS,5 ng/mL Rh-bFGF,5 μg/mL 胰岛素,1%双抗,50 μg/mL 抗坏血酸。

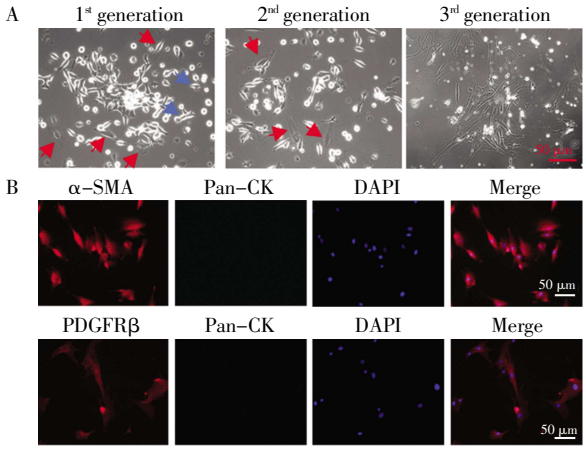
1.3.7　β 半乳糖苷酶染色　将贴壁培养的 CAFs 弃去培养基,使用 pH6.0 PBS 洗涤细胞 2 次,每次 5 min,用细胞固定液室温固定 30 min,再次使用 pH6.0 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min。用 X-Gal(5-Bromo-4-chloro-3-indolylB-D-galactopyranoside)染色液 37℃染色过夜,次日弃去染色液,用 PBS 洗涤后使细胞保持湿润,在光学显微镜下观察拍照。

1.3.8　RNA-seq 及生物信息学分析　使用 Trizol 裂解稳定传代的 3 个 CAF 细胞系,设置 3 个生物学重复,提取细胞总 RNA 进行 RNA-seq,比较 3 个 CAF 细胞系的 mRNA 水平,差异倍数 2 或 0.5 且错误发现率(false discovery rate, FDR)0.05 认为是差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)。分别比较 3 个 CAF 细胞系之间的 DEGs, 并基于 DEGs 进行 gene ontology(GO)分析,富集得到的信号通路按照 FDR 0.05 筛选并按照基因数量排序,取排名前 20位的信号通路进行展示。基于 3 个 CAF 细胞系的CAFs 亚型相关基因表达水平,高表达亚型特异性基因集的 CAF 细胞系被认为具有相关 CAF 亚型特征。

1.4　统计学处理　采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。正态分布的计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异比较采用非配对 *t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　原代 CAFs 的分离与鉴定　经Ⅳ型胶原酶消化的乳腺癌组织块松散,在 37℃培养箱中贴壁培养 48 h 后,细胞从组织块中迁移爬出,成纤维细胞呈短圆柱状或者扁平梭状, 掺杂的上皮细胞呈多边形。第 2 代细胞中的上皮细胞明显减少。第 3 代细胞鲜见上皮细胞,且 CAFs 形态趋向均质,呈扁平梭状(图 1A)。取第 3 代细胞进行细胞免疫荧光染色。结果显示,所有细胞均表达成纤维细胞特征性标志物 α-SMA 和 PDGFRβ, 均不表达上皮细胞标志物 pan-CK(图 1B)。



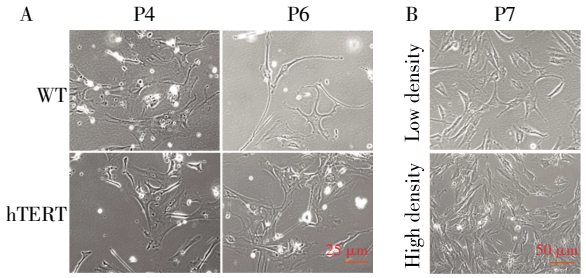
注:α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白;Pan-CK:广谱细胞角蛋白;DAPI:4′,6-二脒基-2-苯基吲哚;PDGFRβ: 血小板源性生长因子受体 β;Merge: 组合;1st generation: 第一代;2nd generation: 第二代;3rd generation:第三代;A:第 1~3 代乳腺癌源性 CAF 的形态(100×);B:第 3 代 CAF 的 α-SMA、PDGFRβ 和 Pan-CK 免疫荧光染色 (200×);红色箭头:成纤维细胞;蓝色箭头:上皮细胞

图 1　乳腺癌来源 CAFs 分离及鉴定

Fig.1　Isolation and identification of CAFs derived from breast cancer

2.2　CAFs 永生化　包装纯化 hTERT 表达慢病毒感染第 3 代 CAFs。感染 hTERT 的细胞传代 2 次后,细胞形态趋向均质化,未见衰老表型,而未感染端

粒酶的CAFs细胞在第5代后逐渐停止扩增，细胞拉长、扁平、生出多触角，呈现出细胞衰老样形态（图2A）。随着培养代数增加，永生化的细胞趋向均质生长，且无明显的核异型性和衰老样变化（图2B）。



注：WT：野生型；hTERT：人端粒酶过表达；P4：第四代；P6：第六代；P7：第七代；Low density：低密度；High density：高密度；A：永生化处理后与未永生化处理的CAFs形态对比（400×）；B：稳定传代的永生化CAFs不同细胞密度下的形态（200×）

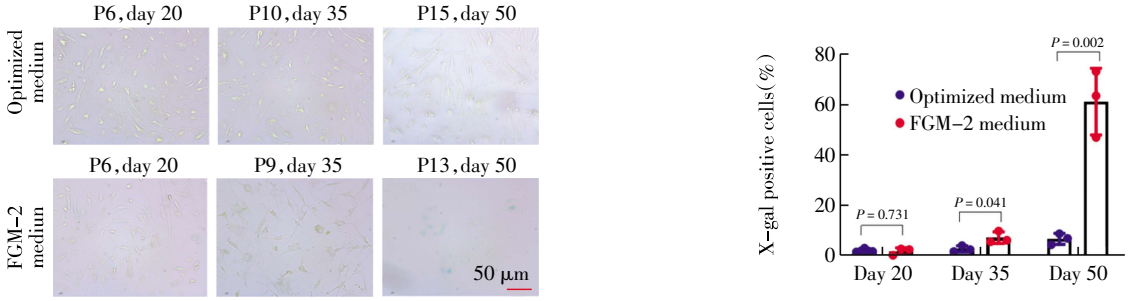
图2 永生化处理与未永生化处理CAFs的细胞形态图片

Fig.2 Morphology photograph of immortalized and non-immortalized CAFs

2.3 永生化CAFs体外培养优化 在FGM-2培养基中添加非必需氨基酸、谷氨酰胺和抗坏血酸以优化培养条件。永生化CAFs分别使用FGM-2和优化培养基培养，细胞融合至80%左右传代，持续至第50天。结果显示，与FGM-2培养基相比，优化培养基培养的CAFs增殖速度更快，第35天和第50天时X-Gal阳性细胞比例更少（t=2.972、7.049，均P<0.05，图3）。

2.4 CAF1、CAF2和CAF3的RNA-seq数据分析 对3株CAF细胞系进行RNA-seq。结果显示，与CAF2相比，CAF1有1 996个高表达的基因和1 154个低表达的基因（图4A）。CAF1与CAF3仅有343个DEGs（图4B）；与CAF3相比，CAF2有2 490个高表达的基因和1 054个低表达的基因（图4C）。CAF1与CAF3基因表达差异较小。

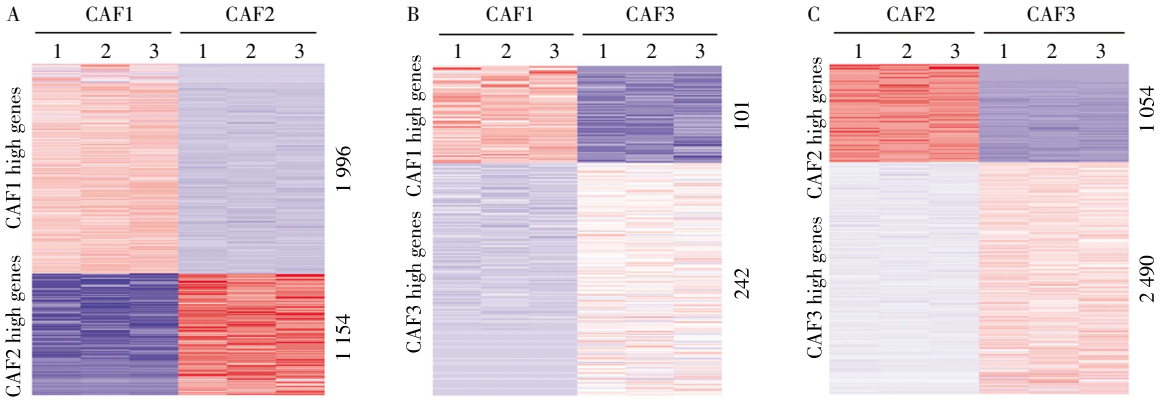
2.5 3株CAF细胞系的生物学特征分析 基于3株CAFs之间的DEGs进行GO信号通路富集分析，结果显示，与CAF1和CAF3相比，CAF2高表达的基因富集得到的主要是蛋白水解、ECM重塑、血管生成和细胞黏附相关信号通路；与CAF2相比，CAF1和CAF3高表达的基因富集得到的主要是细胞分裂、细胞周期、DNA损伤修复和有丝分裂相关信号通路（图5B、5C）。基于3个CAF亚型特征性基因比对分析，发现与CAF1和CAF3相比，CAF2高表达mCAFs相关基因如*COL1A1*、*COL1A2*、*MMP1*和*MMP3*等；而CAF1和CAF3高表达dCAFs和i-CAFs相关基因如*MKI67*、*CDK1*、*CDK2*、*IL1A*、*IL11*和*CXCL16*（图5D）。



注：Optimized medium：优化培养基；FGM-2 medium：成纤维细胞生长-2商品化培养基；P4：第四代；P10：第十代；P15：第十五代；X-gal positive cells：β-半乳糖苷酶染色阳性细胞

图3 不同培养时间下优化培养基与FGM-2培养基培养的CAFs细胞的X-gal染色与定量统计

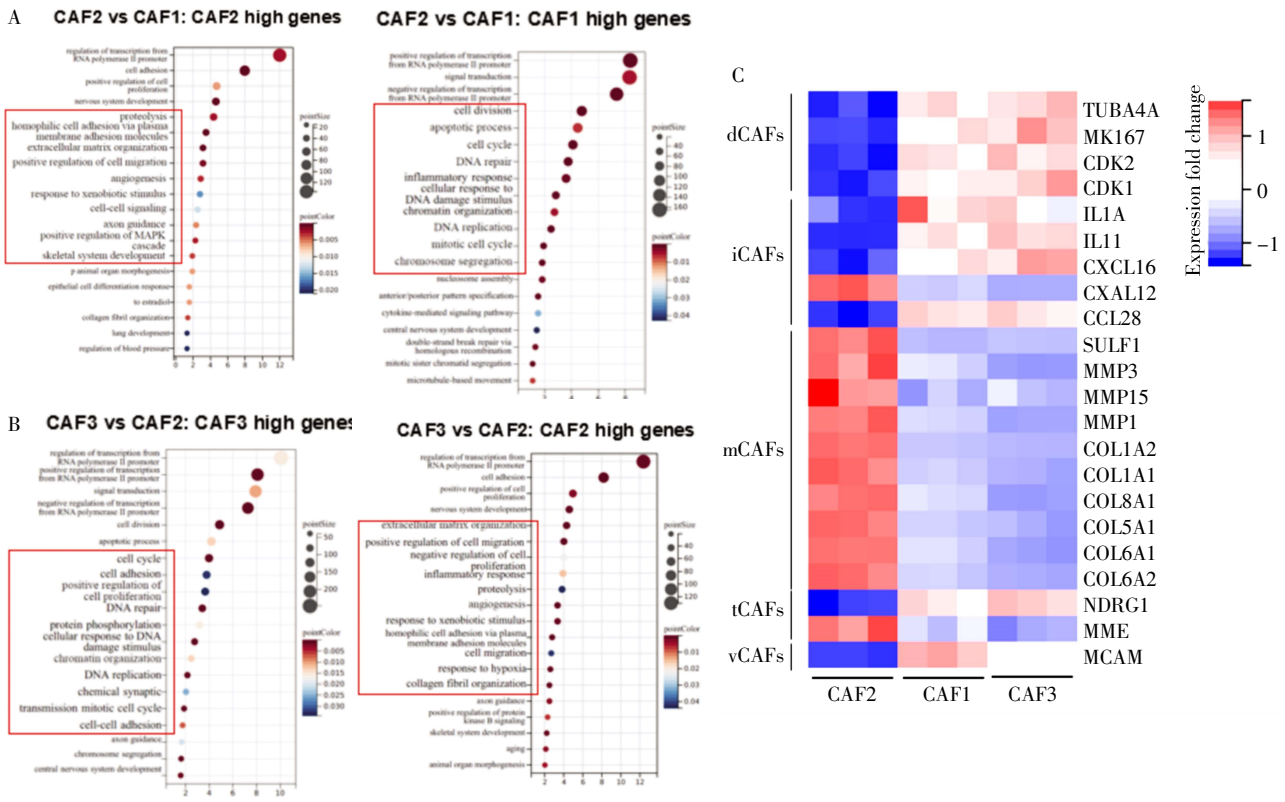
Fig.3 X-gal staining and quantification of CAFs cultured in optimized medium and FGM-2 medium at different time point



注：A：CAF1和CAF2的DEGs热图；B：CAF1和CAF3的DEGs热图；C：CAF2和CAF3的DEGs热图

图4 3个CAFs细胞系的DEGs热图

Fig.4 Heatmap of DEGs among three CAF cell lines



注:A、B:CAF1 和 CAF2 以及 CAF2 和 CAF3 的 DEGs GO 分析;C:3 个 CAF 细胞系的亚型特征性基因表达热图;dCAFs:分裂样 CAFs;iCAFs:炎性 CAFs;mCAFs:间质型 CAFs;tCAFs:肿瘤样 CAFs;vCAFs:血管样 CAFs

图 5　3 株 CAF 细胞系的 DEGs GO 分析和 CAF亚型特异性基因分析

Fig.5　GO analysis of DEGs among three CAF cell lines and CAF subgroup signature genes analysis

3　讨论

随着对肿瘤认识的深入,仅针对肿瘤细胞本身的诊疗方案已经不能满足肿瘤精准化治疗的需求,针对肿瘤微环境细胞如 CAFs 和免疫细胞的治疗越来越被重视[12-13]。CAFs 与肿瘤细胞交互作用的研究依赖于细胞系和转基因动物模型[14-15]。而乳腺癌源性 CAFs 体外培养传代易发生衰老表型,限制了其在基因改造和肿瘤细胞共培养等实验中的应用。因此,原代 CAFs 在体外稳定、长期培养的问题亟需解决。本研究通过酶解-组织培养法分离得到 3 例乳腺癌 CAFs,细胞免疫荧光明确了提取得到的细胞均为 CAFs。TERT 是真核细胞维持端粒长度的核心组分,端粒长度的维持可减少细胞在 DNA 复制过程中的损伤,延长细胞寿命[16]。在正常细胞中过表达端粒酶可防止细胞发生 DNA 复制型衰老。本研究中使用 hTERT 慢病毒感染 CAFs,与野生型原代 CAFs 相比,使用 hTERT 感染的 CAFs 短期未见明显衰老样变化,提示过表达端粒酶可延缓体外培养 CAFs 的衰老样表型。体外培养 CAFs 所用培养基目前尚无统一标准,文献中使用较多的是细胞基础培养基(DMEM,10% FBS,1%青霉素-链霉素溶液)[17]。与细胞基础培养基相比,Lonza 公司出品的成纤维细胞培养基 FGM-2 可延长 CAFs 体外培养时间[18]。有报道指出,抗坏血酸可减轻各种理化因素对成纤维细胞造成的 DNA 损伤[19-21],非必需氨基酸和谷氨酰胺可以增加细胞稳态,增加细胞存活率[22-23]。因此,本研究在 FGM-2 的基础上,添加谷氨酰胺、非必需氨基酸和 50 μg/mL 抗坏血酸进行优化。X-Gal 衰老相关染色证实,优化培养基培养的永生化CAFs 在第 15 代未发现明显衰老特征。以上实验结果证实,在本研究优化的培养体系下,永生化的CAF 细胞系可作为稳定的 CAF 模型。

CAFs 是肿瘤间质细胞的主要成分,具有很强的异质性[4-5]。伴随单细胞测序、空间转录组测序和组织多色共染等技术的推广,对 CAF 的异质性得到了更深层次的认识[24-26]。在人乳腺癌中,CAFs 被分为 mCAFs、iCAFs 和 dCAFs 等亚群,同一亚群的 CAFs 具有相似的基因表达特征和生物学特性,不同亚群的 CAF 细胞对肿瘤的作用有很大区别,因此,明确乳腺癌微环境中 CAF 亚型的分布和比例在指导乳腺癌诊断和治疗策略选择中起重要作用。本研究中对 3 例永生化 CAFs 进行 RNA-Seq,通过分析 3 者 DEGs 及其功能聚类分析,发现与 CAF1、CAF3 细胞系相比,CAF2 高表达蛋白水解、细胞外

基质重塑、血管生成和细胞黏附相关等信号通路的相关基因;CAF1 与 CAF3 高表达细胞分裂、细胞周期、DNA 损伤修复和有丝分裂等信号通路的相关基因。以上结果提示,尽管同样来源于 Luminal B 型乳腺癌，不同患者分离得到的 CAFs 具有显著的生物学特征差异,选择细胞模型为研究载体时应当严谨考虑。通过对本研究中构建 CAF 细胞系的亚群特征性基因表达水平分析，发现 CAF1 与 CAF3 高表达 iCAFs 和 dCAFs 相关基因，提示 CAF1 与 CAF3 可能主要由 iCAFs 或 dCAFs 构成,促进 TIME 重塑和 CAFs 增殖[27];而 CAF2 高表达 mCAFs 相关基因,可能主要由 mCAFs 构成,促进肿瘤细胞 EMT、耐药和细胞外基质的重塑[28]。

原代 CAF 细胞系是研究肿瘤微环境中不同类型细胞间交互作用不可替代的实验工具。本研究丰富了 CAF 细胞系来源,增加了体外培养的细胞稳定性和传代次数,明确了获得 CAFs 的生物学特征,为 CAFs 研究提供了可靠细胞模型。

参考文献:

[1] QUAIL D F,JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis [J]. Nat Med,2013,19(11): 1423-1437.

[2] HU D,LI Z,ZHENG B,et al. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: challenges and opportunities[J]. Cancer Commun (Lond), 2022,42(5): 401-434.

[3] DELINASSIOS J G,HOFFMAN R M. The cancer-inhibitory effects of proliferating tumor-residing fibroblasts[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2022,1877(1): 188673.

[4] BARTOSCHEK M,OSKOLKOV N,BOCCI M,et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing[J]. Nat Commun,2018, 9(1): 5150.

[5] CORDS L,TIETSCHER S,ANZENEDER T,et al. Cancer-associated fibroblast classification in single-cell and spatial proteomics data [J]. Nat Commun,2023,14(1): 4294.

[6] YAZDANI S,BANSAL R,PRAKASH J. Drug targeting to myofibroblasts: implications for fibrosis and cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017,121: 101-116.

[7] SAHAI E,ASTSATUROV I,CUKIERMAN E,et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts[J]. Nat Rev Cancer,2020,20(3): 174-186.

[8] TSCHUMPERLIN D J,LAGARES D. Mechano-therapeutics: targeting mechanical signaling in fibrosis and tumor stroma[J]. Pharmacol Ther,2020,212: 107575.

[9] CHHABRA Y,WEERARATNA A T. Fibroblasts in cancer: unity in heterogeneity[J]. Cell,2023,186(8): 1580-1609.

[10] LI X,SUN Z,PENG G,et al. Single-cell RNA sequencing reveals a pro-invasive cancer-associated fibroblast subgroup associated with poor clinical outcomes in patients with gastric cancer[J]. Theranostics,2022,12(2): 620-638.

[11] BARTOSCHEK M,OSKOLKOV N,BOCCI M,et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing[J]. Nat Commun,2018, 9(1): 5150.

[12] SU S,CHEN J,YAO H,et al. CD10(+)GPR77(+) cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness[J]. Cell,2018,172(4): 841-856.

[13] HUELSKEN J,HANAHAN D. A subset of cancer-associated fibroblasts determines therapy resistance[J]. Cell,2018,172(4): 643-644.

[14] GASCARD P,TLSTY T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy[J]. Genes Dev,2016, 30(9): 1002-1019.

[15] WANG H,LI N,LIU Q,et al. Antiandrogen treatment induces stromal cell reprogramming to promote castration resistance in prostate cancer[J]. Cancer Cell,2023,41(7): 1345-1362.

[16] BARLOW C,HIROTSUNE S,PAYLOR R,et al. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia[J]. Cell,1996,86(1): 159-171.

[17] KAY E J,PATERSON K,RIERA-DOMINGO C,et al. Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix[J]. Nat Metab,2022, 4(6): 693-710.

[18] ZAGHDOUDI S,DECAUP E,BELHABIB I,et al. FAK activity in cancer-associated fibroblasts is a prognostic marker and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer[J]. EMBO Mol Med,2020, 12(11): e12010.

[19] GEGOTEK A,JAROCKA-KARPOWICZ I,SKRZYDLEWSKA E. Cytoprotective effect of ascorbic acid and rutin against oxidative changes in the proteome of skin fibroblasts cultured in a three-dimensional system[J]. Nutrients,2020,12(4):1074.

[20] GEGOTEK A,BIELAWSKA K,BIERNACKI M,et al. Comparison of protective effect of ascorbic acid on redox and endocannabinoid systems interactions in *in vitro* cultured human skin fibroblasts exposed to UV radiation and hydrogen peroxide[J]. Arch Dermatol Res, 2017,309(4): 285-303.

[21] MAEDA J,ALLUM A J,MUSSALLEM J T,et al. Ascorbic acid 2-glucoside pretreatment protects cells from ionizing radiation,UVC, and short wave length of UVB[J]. Genes (Basel),2020,11(3):238.

[22] KILBERG M S,SHAN J,SU N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation[J]. Trends Endocrinol Metab, 2009,20(9): 436-443.

[23] SCALISE M,POCHINI L,CONSOLE L,et al. The Human SLC1A5 (ASCT2) amino acid transporter: from function to structure and role in cell biology[J]. Front Cell Dev Biol,2018,6: 96.

[24] ELYADA E,BOLISETTY M,LAISE P,et al. Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts[J]. Cancer Discov,2019,9 (8): 1102-1123.

[25] CHEN Z,ZHOU L,LIU L,et al. Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma[J]. Nat Commun,2020,11(1): 5077.

[26] COSTA A,KIEFFER Y,SCHOLER-DAHIREL A,et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer[J]. Cancer Cell,2018,33(3): 463-479.

[27] OHLUND D,HANDLY-SANTANA A,BIFFI G,et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer[J]. J Exp Med,2017,214(3): 579-596.

[28] WU S Z,RODEN D L,WANG C,et al. Stromal cell diversity associated with immune evasion in human triple-negative breast cancer[J]. EMBO J,2020,39(19): e104063.

(2024-02-06 收稿)