

·基础研究·

癌相关成纤维细胞促进胃癌细胞迁移与侵袭

周 畅¹, 陈伟强², 王宇恒¹, 杨晓夏¹, 涂 幸¹, 刘 靖¹, 罗 利¹
(广东药科大学 1. 生命科学与生物制药学院; 2. 护理学院, 广东广州 510006)

摘 要:【目的】本研究旨在探讨癌相关成纤维细胞(CAFs)对胃癌细胞迁移与侵袭能力的影响及作用机制。【方法】采用酶消化法分离培养正常成纤维细胞(NFs)及癌相关成纤维细胞(CAFs)并进行特征指标鉴定。收集两种细胞的条件培养基(NFs-CM、CAF-CM),分别作用于胃癌细胞系 AGS 及 MGC803,利用细胞划痕实验检测胃癌细胞迁移能力;Transwell 小室迁移及侵袭实验评价胃癌细胞迁移与侵袭能力;光学显微镜观察胃癌细胞形态变化;荧光定量 PCR 检测胃癌细胞中“上皮-间质”转化(EMT)相关指标的表达变化。【结果】我们成功分离培养 NFs 及 CAFs;与 NFs-CM 组相比,CAF-CM 组胃癌细胞的迁移与侵袭能力均增强($P < 0.05$),胃癌细胞形态由扁圆的上皮细胞形态演变为梭形的间质细胞形态,胃癌细胞中上皮细胞标志 E-钙粘蛋白(E-cadherin)表达降低,间质细胞标志波形蛋白(Vimentin)和 N-钙粘蛋白(N-cadherin)表达上升($P < 0.05$)。【结论】CAF 可通过调节 EMT 进程促进胃癌细胞迁移与侵袭。

关键词:癌相关成纤维细胞;胃癌;迁移;侵袭;“上皮-间质”转化

中图分类号:R735.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2020)04-0501-08

Cancer Associated Fibroblasts Promote Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Inducing Epithelial-mesenchymal Transition

ZHOU Chang¹, CHEN Wei-qiang², WANG Yu-heng¹, YANG Xiao-xia¹, TU Xing¹, LIU Jing¹, LUO Li¹
(1. School of Biosciences & Biopharmaceutics; 2. School of Nursing, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: LUO Li; E-mail: josephluoli@hotmail.com

Abstract:【Objective】To explore the effects of cancer associated fibroblasts (CAF) on migration and invasion of Gastric cancer (GC) cells and the underlying mechanism.【Methods】The primary CAFs and the normal fibroblasts (NFs) were isolated from GC tissues and their matched adjacent normal gastric mucosa tissue respectively ($n=3$). The conditioned medium from cultured NFs (NFs-CM) and CAFs (CAF-CM) were obtained and then incubated with the GC cell lines AGS and MGC803. GC cell migration and invasion were determined by wound healing assay and Transwell assay. Light microscopy was performed to observe the morphological changes of GC cells. Quantitative real-time PCR was employed to detect the changes in expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) associated markers in GC cells.【Results】CAF and NFs were successfully cultured and identified. Compared with NFs-CM, CAF-CM accelerated migration and invasion of GC cells (all $P < 0.05$); showed more shuttle-like or spindle-like shape of GC cells; revealed decreased expression of E-cadherin, increased expression of Vimentin and N-cadherin in GC cells (all $P < 0.05$).【Conclusion】CAF could enhance the migration and invasion of GC cells AGS and MGC803 via regulating EMT.

收稿日期:2020-04-07

基金项目:国家自然科学基金(81901524);广东省自然科学基金(2018A0303130304, 2018A030313579);广东省大学生创新创业训练项目(201810573041)

作者简介:周畅,博士,讲师,研究方向:肿瘤学,E-mail:zhouchang80@126.com;罗利,通信作者,博士,副教授,研究方向:干细胞、神经生物学,E-mail:josephluoli@hotmail.com

Key words: cancer associated fibroblasts (CAFs); gastric cancer (GC); migration; invasion; epithelial mesenchymal transition (EMT)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(4): 501-508]

胃癌是我国第二大恶性肿瘤,是导致癌症相关死亡的第三大原因^[1-2]。转移是导致胃癌治疗失败的原因之一,转移不仅与肿瘤自身有关,更与肿瘤细胞所处的微环境相关^[3-4]。肿瘤微环境包括细胞外基质和多种间质细胞。肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)是间质细胞中最丰富的细胞类型^[5]。临床数据显示CAF与胃癌预后密切相关^[6]。然而CAF对胃癌细胞转移能力的影响及相关机制仍未明确。胃癌转移是复杂的演变过程,“上皮-间质”转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是影响转移的重要因素^[7]。EMT指上皮细胞向成纤维细胞表型的转变并获得迁移的能力^[8-9]。E-钙粘蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、N-钙粘蛋白(N-cadherin)是上皮-间质转化的重要标志物^[10]。E-cadherin可介导细胞粘附,抑制肿瘤转移^[11]。Vimentin和N-cadherin是间质细胞中的中间丝蛋白,参与细胞运动的调节^[12-13]。有研究表明肺癌CAF内高表达EMT相关基因,提示两者存在相关性^[14]。另有报道显示CAF可诱导前列腺癌和乳腺癌细胞的EMT进程^[15-16]。但有关CAF对胃癌细胞EMT影响的研究较少。在本研究将通过细胞功能实验评估CAF对胃癌细胞迁移和侵袭的影响;CAF作用于胃癌细胞后,通过光学显微镜观察胃癌细胞形态变化;通过荧光定量PCR检测胃癌细胞中EMT相关指标变化,以此证实CAF的促癌作用与胃癌中EMT进程激活有关。

1 材料与方 法

1.1 材 料

胃癌细胞株AGS及MGC803购自中国科学院上海细胞库;1640培养基、DMEM/F12培养基、PBS缓冲液、青链霉素、胎牛血清及胰酶均购自美国Hyclon公司;DNA酶、IV型胶原蛋白酶、透明质酸酶购自美国Sigma公司;Vimentin抗体、Alexa-Fluor 594结合山羊抗兔IgG(H+L)二抗购自美国Proteintech公司;DAPI购自北京索莱宝公司;Trizol

裂解液购自广州英伟创津公司;qRT-PCR引物由武汉谷歌生物公司合成;qRT-PCR检测试剂盒购自瑞士罗氏公司;细胞周期试剂盒购自上海碧云天公司;8.0 μm Transwell小室购自美国康宁公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 经广东药科大学临床医学伦理委员会的批准,收集3例胃癌手术患者的肿瘤组织及相配对的正常粘膜组织(距离肿瘤组织最近边缘 $>5\text{ cm}$),分别用于培养CAF及NFs。配置含DNA酶溶液(2 mg/mL)、透明质酸酶溶液(20 mg/mL)、IV型胶原蛋白酶溶液(20 mg/mL)、1%青霉素-链霉素双抗溶液、10%FBS的DMEM/F12培养基的组织消化液。在超净台内用含1%青霉素-链霉素双抗的PBS溶液清洗组织块3次,剪碎组织块至 1 mm^3 大小并加入组织消化液充分进行组织裂解。裂解液经筛网过滤,收集滤液离心(2 000 r/min, $r=10\text{ cm}$, 10 min),弃上清,用含20% FBS的DMEM/F12培养基重悬细胞,并接种于24孔细胞培养板内,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养。待细胞贴壁生长至融合度达到80%,用2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞进行传代。第3代传代后细胞可用于后续实验。待细胞贴壁生长至融合度达到90%,弃去培养基,PBS溶液清洗2次,加入无血清的DMEM/F12培养基。培养48 h后,收集两种细胞的培养液并离心(2 000 r/min, $r=10\text{ cm}$, 10 min),吸取上清冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。实验前解冻上述细胞培养液并加入10%FBS,此时获得两种细胞的培养基(NFs-CM、CAF-CM)。胃癌细胞AGS和MGC803采用含10%FBS的1640培养基,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 免疫荧光实验 2×10^4 个NFs或CAF在24孔板上爬行过夜,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下用40 g/L多聚甲醛固定30 min。预冷的100 μL 0.5% TritonX-100室温下处理15 min,PBS洗涤3次。5% BSA溶液 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵箱中封闭1 h,之后加入兔抗人Vimentin多克隆抗体(1:200) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。标本中加入Alexa-Fluor 594结合山羊抗兔IgG(H+L)二抗(1:500)在室温下

避光孵育 30 min 中, PBS 清洗后, 加入 DAPI 染色细胞核。最后用荧光显微镜对图像进行观察(放大倍率, 200 \times)。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA, RNA 作为模板反转录成 cDNA。按照荧光定量 PCR 使用说明书检测 α -SMA、FAP、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的表达水平, 反应

条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 34 s, 40 个循环, 肌动蛋白 (Actin) 用作内参。引物序列如表 1 所示。检测每个模板的 CT 值 (C 代表周期, T 代表阈值)。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。实验重复 3 次, 计算平均值。

表 1 检测基因的引物信息

Table 1 The primer information of detected genes

Gene	Forward primer	Reverse primer
α -SMA	GGCTATTGCTTCGTTACTACTGCT	CCATCAGGCAACTCGTAACTCT
FAP	GGCTGGTGGATTCTTTGTTTCA	CGTAGTCGCTGAAACTTGCTGTG
E-cadherin	CAACAAAGACAAAGAAGGCAAGG	TGAGAGAAGAGAGTGTATGTGGC
Vimentin	GGAGGAGATGCTTCAGAGAGAG	GGATTTCTCTTCGTGGAGTTTC
N-cadherin	ATTGGACCATCACTCGGCTTA	CACACTGGCAAACCTTCACG
Actin	CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT	CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC

1.2.4 细胞周期分析 收集 1×10^6 个 NFs 和 CAFs, PBS 洗 2 次后, 缓慢加入预冷的 70% 乙醇溶液中, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。PBS 洗 2 次后, 加入细胞周期试剂盒中的碘化丙啶染色液 (50 ng/mL)/RNase (0.2 mg/mL)/0.1% Triton X-100 混合液重悬细胞, 并在 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中, 避光孵育 30 min。采用流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.5 划痕试验 将 5×10^5 个 AGS 接种于 6 孔板中, 用 NFs-CM 和 CAFs-CM 培养至细胞融合率达 90%。MGC823 细胞也进行同样的处理。之后用 10 μ L 无菌移液管头垂直于培养孔底划 3 条平行线, 造成伤口。PBS 洗涤脱落细胞, 之后加入无血清 1640 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 培养箱培养, 镜下观察 0、24 和 48 h 划痕愈合程度(放大倍率, 200 \times)。

1.2.6 Transwell 细胞迁移和侵袭实验 侵袭试验将基质胶用预先冷却的无血清 1640 培养基稀释(稀释比为 1:3), 将 50 μ L 稀释后的凝胶加入 Transwell 小室上室面并置入培养箱中 2 h, 将 1×10^5 个 AGS 用 200 μ L 无血清培养基重悬后, 接种于 8.0 μ m Transwell 小室上室, 并将 600 μ L NFs-CM 或 CAFs-CM 加入下室。在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 的培养箱中培养 48 h 后, 取出 Transwell 小室, 弃去小室中培养液, PBS 清洗 2 遍, 在室温下用 100% 甲醇固定 15 min。

用棉签擦拭未穿 Transwell 小室基底膜的细胞。膜用结晶紫染色 15~20 min。迁移实验不铺基质胶, 4×10^4 个 AGS 加入 Transwell 小室上室, 其他步骤同侵袭实验。在光学显微镜下选择 5 个代表性视野进行拍照计数(放大倍率, 200 \times)。MGC803 细胞迁移与侵袭实验的操作流程同上。

1.3 统计学分析

所有实验数据显示为 3 个独立实验的均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。使用 SPSS 20.0 软件对所获得实验数据进行统计分析。两样本之间比较, 数据呈正态分布且方差齐的数据采用 t 检验; 方差不齐的数据采用校正 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NFs 与 CAFs 的分离培养及鉴定

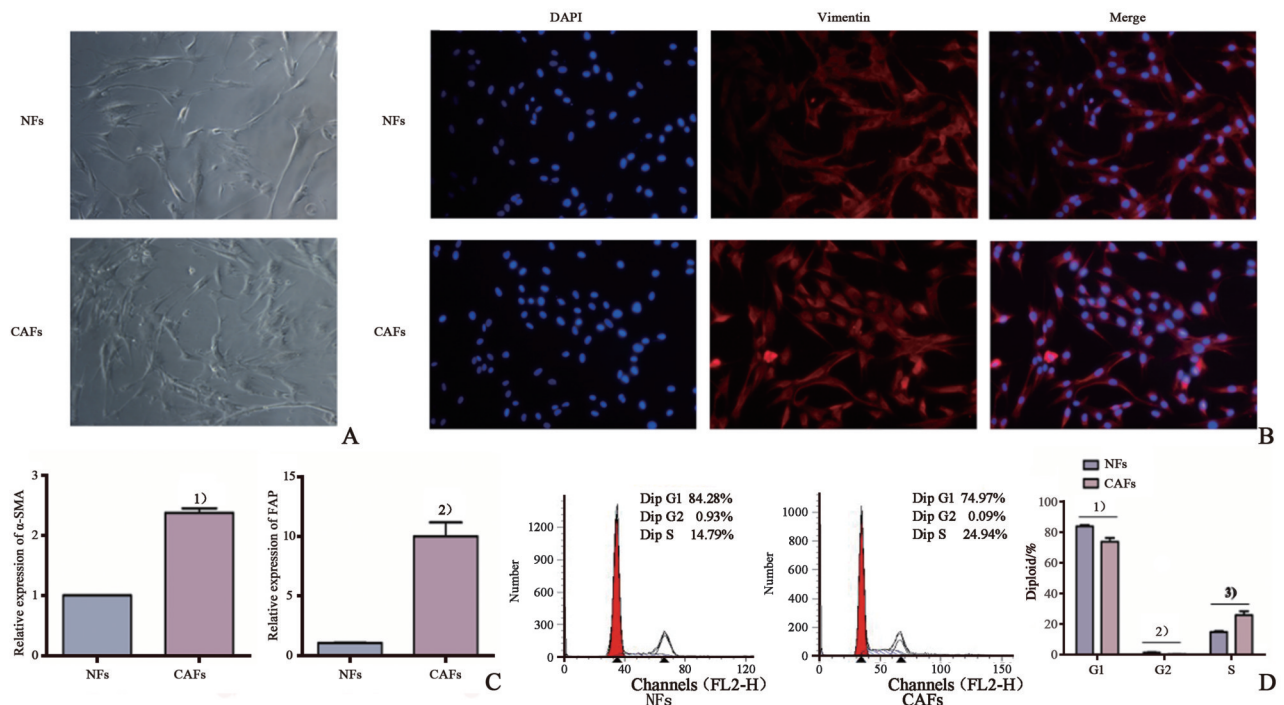
NFs 和 CAFs 分别从胃癌手术患者的配对的正常粘膜组织及胃癌组织中分离培养 ($n=3$)。传代第 3 代后的 NFs 和 CAFs 形状均为长梭形; 但与 NFs 相比, CAFs 多出现胞质突起, 排列较紊乱, 更易发生融合性生长 (图 1A)。为了检测 NFs 和 CAFs 的纯度, 我们对这两种细胞株的间质细胞标记物——Vimentin 进行检测。免疫荧光结果显示 NFs 和 CAFs 均表达 Vimentin (图 1B)。后对 CAFs 的特征

性标记物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和成纤维细胞活化蛋白(FAP)进行检测,荧光定量PCR结果表明:CAF_s中 α -SMA和FAP的mRNA表达水平高于NF_s,差异具有统计学意义(α -SMA: $t=17.847$, $P=0.000\ 058$; FAP: $t=7.698$, $P=0.016\ 456$;图1C)。细胞周期实验常常用来反映细胞的增殖能力。流式细胞仪检测细胞周期分布结果显示:与NF_s相比,CAF_s的细胞周期主要分布在S期,而相应的G1期在细胞周期实验中减少,差异具有统计学意义(G1: $t=3.793$, $P=0.019\ 218$; G2: $t=-3.169$, $P=0.033\ 903$; S: $t=4.379$, $P=0.011\ 888$;图1D)。这些数据表明我们成功地从正常的胃粘膜组织中分离及培养NF_s,并成功地从胃癌组织中分离及培养CAF_s。

2.2 CAF_s-CM促进GC细胞的迁移和侵袭

为了探索CAF_s对胃癌细胞的迁移和侵袭是否产生影响,我们收集NF_s-CM($n=3$)及CAF_s-CM($n=3$)作用于胃癌细胞并进行划痕实验,划痕实验结果显示无论在24 h还是48 h, CAF_s-CM作用后的AGS细胞迁移率高于NF_s-CM组细胞,差异有统计学意义(AGS 24 h: $t=10.575$, $P=0.000\ 452$; AGS

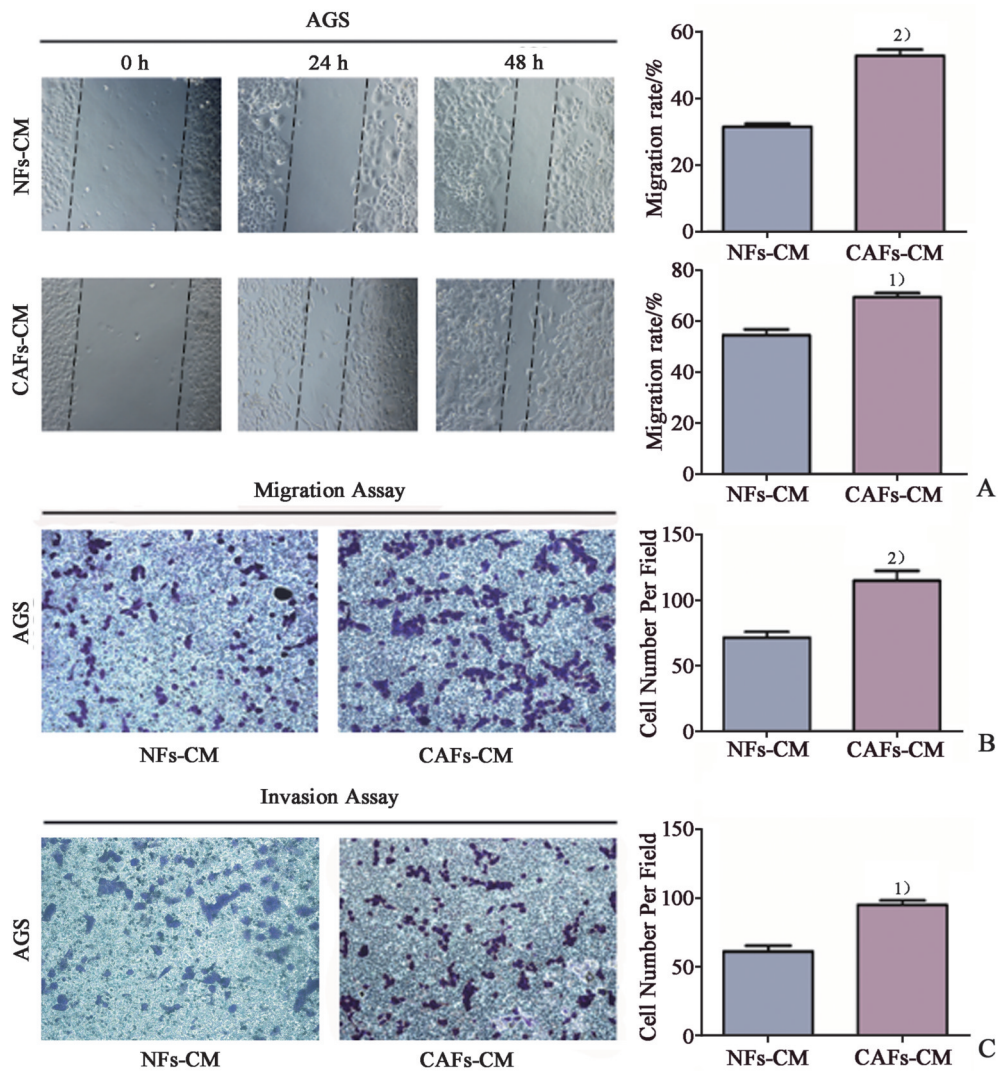
48 h: $t=-5.270$, $P=0.006$;图2A)。之后再利用Transwell小室的方法检测细胞迁移及侵袭能力。迁移实验结果显示与NF_s-CM组相比,CAF_s-CM能增加AGS细胞的迁移数量($t=-6.390$, $P=0.000\ 211$;图2B)。在侵袭实验中,我们观察到与NF_s-CM组相比,当CAF_s-CM作为吸引血清时,AGS细胞穿过基层胶的数量增加($t=-4.114$, $P=0.003\ 372$;图2C)。类似的结果也在MGC803细胞中得到证实。划痕实验结果显示无论在24 h还是48 h, CAF_s-CM作用后的MGC803细胞迁移率高于NF_s-CM组细胞,差异有统计学意义(MGC803 24 h: $t=-7.690$, $P=0.001\ 538$; MGC803 48 h: $t=-8.572$, $P=0.001\ 017$;图3A)。之后再利用Transwell小室的方法检测细胞迁移及侵袭能力。迁移实验结果显示与NF_s-CM组相比,CAF_s-CM能增加MGC803细胞的迁移数量($t=-10.826$, $P=0.000\ 005$;图3B)。在侵袭实验中,我们观察到与NF_s-CM组相比,当CAF_s-CM作为吸引血清时,MGC803细胞穿过基层胶的数量增加($t=-4.273$, $P=0.006\ 741$;图3C)。总之,这些数据表明CAF_s能促进胃癌细胞的迁移与侵袭。



A: NFs and CAF_s morphological observation by light microscope, magnification: 200 \times . B: The results of immunofluorescence showed Vimentin positive expression in both NFs and CAF_s, magnification: 200 \times . Blue: DAPI; red: Vimentin. C: QRT-PCR results showed that the expressions of α -SMA and FAP in CAF_s were higher than NFs. 1) $P<0.001$ compared with NFs, 2) $P<0.05$ compared with NFs. D: The cell cycle distribution of both NFs and CAF_s was analyzed. 1) 2) 3) $P<0.05$, compared with NFs ($n=3$).

图1 NFs和CAF_s的生长特性与特异标记

Fig. 1 The growth characteristics and special molecular markers of NFs and CAFs



The effects of CAFs-CM on AGS cells metastasis were tested using (A) wound healing ($n=3$), (B) transwell migration ($n=5$) and (C) invasion assays ($n=5$), magnification: 200 \times . Data was represented as the mean \pm SD of five different fields. ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$, all compared with NFs group.

图2 CAFs体外促进AGS细胞迁移与侵袭

Fig. 2 CAFs promoted migration and invasion of AGS cells in vitro

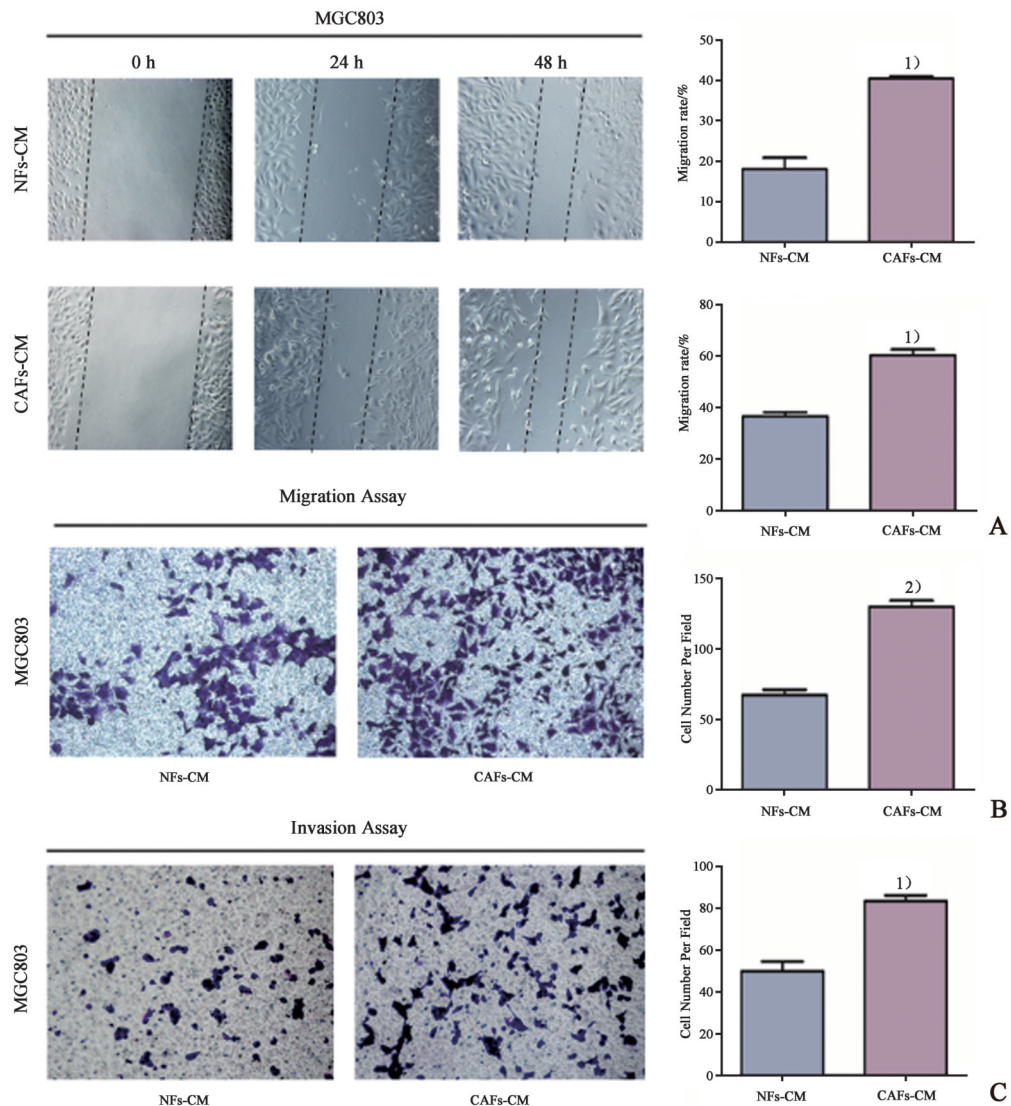
2.3 CAFs-CM启动GC细胞EMT过程

为进一步探讨CAF促进胃癌细胞迁移与侵袭的机制,我们通过光学显微镜观察到:与NFs-CM组相比,CAF-CM作用后的AGS和MGC803细胞形态均由鹅卵石状的上皮细胞形态变为梭形、纺锤形的间质细胞形态。细胞变细,突起增多。同时,细胞之间的联系变得松散(图4A)。进一步荧光定量PCR结果NFs-CM组相比,CAF-CM组AGS和MGC803细胞中的上皮标志物E-cadherin表达(AGS: $t = 2.801$, $P = 0.048767$; MGC803: $t = 5.933$, $P = 0.004046$;图4B)均降低,间质细胞标志物Vimentin (AGS: $t = 3.232$, $P = 0.031910$;

MGC803: $t = -6.382$, $P = 0.003094$;图4B)、N-cadherin (AGS: $t = -4.083$, $P = 0.015060$; MGC803: $t = -8.073$, $P = 0.001279$;图4B)表达上升。结果表明,CAF可通过调节EMT过程促进AGS和MGC803细胞的转移。

3 讨论

我国是胃癌的高发高死亡地区。大部分胃癌患者就诊时已处于进展期,多数病人易出现转移现象^[17]。胃癌的转移是多步骤、多因素参与的极其复杂的过程,其中最重要的一个因素是肿瘤细胞



The functions of CAFs-CM on MGC803 cells metastasis were determined using (A) wound healing ($n=3$), (B) transwell migration ($n=5$) and (C) invasion assays ($n=5$), magnification: 200 \times . Data was represented as the mean \pm SD of five different fields. 1) $P<0.01$, 2) $P<0.001$, all compared with NFs group.

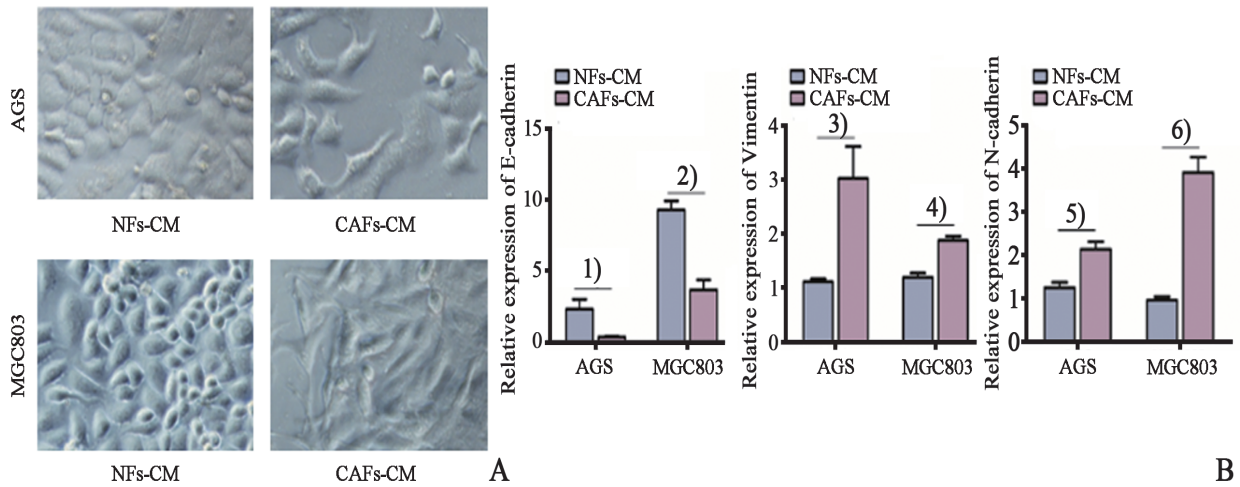
图3 CAFs体外促进MGC803细胞迁移与侵袭

Fig. 3 CAFs enhanced migration and invasion of MGC803 cells in vitro

和肿瘤微环境的相互影响。在肿瘤微环境中,活化的成纤维细胞被称CAF,可通过分泌生长因子和细胞因子作用于肿瘤细胞,促进肿瘤发生生长、血管的形成^[18]。但CAF影响胃癌进展的机制尚不清楚。

本研究成功分离并培养NFs及CAF, Vimentin在NFs及CAF中的高表达证实两者具有纤维细胞的特征。尽管CAF表现出异质性,但是 α -SMA及FAP常常被认为是区分CAF细胞和NFs细胞的重要标志物。 α -SMA是肌纤维母细胞的典型标志,也是间质细胞活化的标志。当NFs与肿瘤细胞接

触后,可以自发地转化为 α -SMA高表达的成纤维细胞,从而获得CAF的表型特征。并且 α -SMA高表达的CAF更容易促进肿瘤的侵袭与转移^[19]。FAP属于丝氨酸蛋白酶,常在CAF表面高表达,具有胶原酶活性,能溶解细胞外基质(ECM)促进肿瘤转移^[20]。本研究也同样发现 α -SMA和FAP在所培养的CAF中呈现高表达,证明所获得的CAF处于肿瘤刺激下的成纤维细胞活化状态。细胞周期分析表明:CAF较NFs的S期分布增加,而G1期分布减少;此结果表明CAF的增殖率高于NFs,CAF细胞具有异常增殖的特点。



A: CAFs-CM induced morphological change of AGS cells and MGC803 cells, magnification: 200×. B: QRT-PCR results indicated that compared with NFs-CM group, E-cadherin was downregulated while Vimentin and N-cadherin expressions were upregulated in CAFs-CM treating GC cells. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$, 5) $P < 0.05$, 6) $P < 0.01$, all compared with NFs-CM group ($n=3$).

图4 CAFs调控AGS、MGC803细胞中的EMT变化
Fig. 4 CAFs caused EMT in AGS cells and MGC803 cells

为了探索 CAFs 对胃癌细胞转移能力的影响。我们采用 CAFs-CM 与胃癌细胞共培养的方式进行实验,这种培养方式可达到成纤维细胞与胃癌细胞非接触式生长,并保证了细胞间正常信号传导及相互影响,更接近于人体肿瘤微环境。细胞划痕实验证明:与 NFs-CM 组相比,CAFs-CM 组创面愈合较快,说明 CAFs 促进了 AGS 细胞和 MGC803 细胞的迁移。同时我们采用 Transwell 迁移和侵袭实验研究 CAFs-CM 对 AGS 和 MGC803 细胞迁移与侵袭的作用。我们发现 CAFs 能促进 AGS 和 MGC803 细胞的迁移和侵袭。

最后我们对 CAFs 促胃癌细胞转移的机制进行了初步探究。EMT 在刺激许多癌症的侵袭性方面常发挥关键作用^[8,10,21]。在本研究中,我们观察到与 NFs-CM 组相比,CAFs-CM 处理的 AGS 细胞和

MGC803 细胞逐渐失去细胞间的连接,细胞变得松散,呈现长梭形外观。结果表明,AGS 细胞和 MGC803 细胞由上皮细胞向间质细胞形态转化。此外,我们还对 EMT 相关基因的表达进行检测。荧光定量 PCR 检测表明:与 NFs-CM 组相比,CAFs-CM 组上皮细胞标志物 E-cadherin 表达下调,而间充质细胞标志物 Vimentin 和 N-cadherin 表达上调。这些结果证实 CAFs 可以通过诱导 EMT 过程促进 AGS 细胞和 MGC803 细胞的生长。

在本研究中,我们成功地分离和培养了 NFs 和 CAFs。我们发现 CAFs 可以通过诱发 EMT 反应,促进 AGS 细胞和 MGC803 细胞的迁移和侵袭。今后,我们将继续深入探究 CAFs 通过哪些具体的分子信号通路影响胃癌细胞 EMT 的进程。

参考文献

[1] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of gastric cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18 (3) : 534-542.
[2] 李金梅,刘艳茹,陈红,等. 胃癌中 LRG1 的表达与肿瘤微血管生成的关系[J]. 广东医学, 2018, 39 (19) : 2903-2906.
Li JM, Liu YR, Chen H, et al. Relationship be-

tween LRG1 and tumor angiogenesis in gastric cancer tissue [J]. Guangdong Med, 2018, 39 (19) : 2903-2906.
[3] Lin C, He H, Liu H, et al. Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer[J]. Gut, 2019, 68(10) : 1764-1773.
[4] 葛曙雄,王涌. 微小 RNA 与肿瘤微环境[J]. 新医学, 2016, 47(1) : 7-11.

- Ge SX, Wang Y. MicroRNAs and tumor microenvironment[J]. *New Med*, 2016, 47(1): 7-11.
- [5] Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2): 99-115.
- [6] Kemi N, Eskuri M, Herva A, et al. Tumour-stroma ratio and prognosis in gastric adenocarcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(4): 435-439.
- [7] Gong J, Wang Y, Shu C. LncRNA CHRFB promotes cell invasion and migration via EMT in gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1168-1176.
- [8] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-226.
- [9] Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression[J]. *J Biochem*, 2018, 164(4): 257-264.
- [10] Sun Y, Han C. Long Non-Coding RNA TMPO-AS1 promotes cell migration and invasion by sponging miR-140-5p and inducing SOX4-mediated EMT in gastric cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 1261-1268.
- [11] Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(35): 4769-4780.
- [12] Wang L, Li K, Wang C, et al. miR-107 regulates growth and metastasis of gastric cancer cells via activation of the PI3K-AKT signaling pathway by down-regulating FAT4 [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 5264-5273.
- [13] Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116: 317-336.
- [14] Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1277-1289.
- [15] Shan T, Chen S, Chen X, et al. Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1): 121-128.
- [16] Wang H, Wei H, Wang J, et al. MicroRNA-181d-5p-Containing exosomes derived from CAFs promote EMT by regulating CDX2/HOXA5 in breast cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 654-667.
- [17] Deng J, Yamashita H, Seto Y, et al. Increasing the number of examined lymph nodes is a prerequisite for improvement in the accurate evaluation of overall survival of node-negative gastric cancer patients [J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(3): 745-753.
- [18] Komohara Y, Takeya M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment [J]. *J Pathol*, 2017, 241(3): 313-315.
- [19] Fujita H, Ochuchida K, Nakata K, et al. Alpha-smooth muscle actin expressing stroma promotes an aggressive tumor biology in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Pancreas*, 2010, 39(8): 1254-1262.
- [20] Ramirez-Montagut T, Blachere NE, Sviderskaya EV, et al. FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor [J]. *Oncogene*, 2004, 23(32): 5435-5446.
- [21] Gugnoni M, Sancisi V, Gandolfi G, et al. Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy [J]. *Oncogene*, 2017, 36(5): 667-677.

(编辑 余菁)