肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001401

卵巢癌肿瘤间质中癌相关成纤维细胞全基因表达谱分析

侯靓思，叶小琳，令狐华
（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：寻找上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer，EOC）癌相关成纤维细胞（cancer associated fibroblasts，CAFs）和正常成纤维细胞（normal fibroblasts，NFs）中差异表达的 mRNA 并进行分析，为进一步阐明肿瘤间质中癌相关成纤维细胞影响卵巢癌细胞恶性行为的机制提供依据。**方法**：分别提取 3 例上皮性卵巢癌的 CAFs 及 3 例正常卵巢组织的 NFs，抽提总 RNA，进行全基因表达谱分析。对差异基因进行基因本体论（Gene Ontology，GO）富集及信号通路联合分析，推定相关差异基因生物学功能，并对MDM2、NR3C1 等 6 个上调的差异基因进行荧光定量 PCR 验证。**结果**：对芯片结果的分析显示差异基因共 1 636 个。qRT-PCR 对 MDM2、NR3C1 等 6 个差异基因的验证结果与芯片结果相符，生物信息学分析显示上述差异基因与癌相关通路、肌动蛋白细胞骨架重塑通路等有关，提示可能参与了对卵巢癌细胞恶性行为的促进作用。**结论**：EOC 肿瘤间质中的成纤维细胞存在调控癌细胞的差异基因，分析这些差异基因为进一步研究卵巢癌成纤维细胞调控癌细胞生物学行为的分子机制提供了基本依据。

【关键词】上皮性卵巢癌；癌相关成纤维细胞；全基因表达谱；芯片
【中图分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-03-22

DNA microarray screening for ovarian cancer associated fibroblasts

Hou Liangsi, Ye Xiaolin, Linghu Hua
(*Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To seek the differential genes of cancer associated fibroblasts (CAFs) from normal fibroblasts (NFs) that might function in regulating the malignancy of cancer cells of EOC. ***Methods***: CAFs and NFs were isolated from fresh ovarian tissue of patients of epithelial ovarian cancer (EOC) (n=3) and with benign diseases (n=3). Total RNAs were extracted for detecting the differentially expressed genes between CAFs and NFs through DNA microarray. Gene Ontology and KEGG pathway analysis were conducted using DAVID to analyze the biological function of the deferentially expressed genes. qRT-PCR was applied to verify the reliability of DNA microarray result. ***Results***: Totally 1 636 genes changed were identified in CAFs. qRT-PCR analysis of 6 genes validated the array results. Bioinformatics analysis indicated the likely involvement of these differential genes in carcinogenesis and regulation of actin cytoskeleton, which might promote the malignant behavior of EOC. ***Conclusion***: Differentially expressed genes found in CAFs of EOC provide a basis for further studying the promotive role of CAFs for EOC.

【Key words】epithelial ovarian cancer; cancer associated fibroblasts; gene expression profiling; DNA microarray

上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer，EOC）是目前死亡率最高的妇科恶性肿瘤。由于缺乏早期筛查手段，70%以上的患者诊断时已出现广泛的盆腹腔转移[1]。虽然给予了手术治疗辅助放化疗，复发率仍高达 80%[2]。

作者介绍：侯靓思，Email：houliangsi@163.com，研究方向：妇科肿瘤。
通信作者：令狐华，Email：linghu_hua@126.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81572562）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170919.1548.006.html（2017-09-19）

癌症的进展过程不仅依赖于癌细胞本身的特性，更与肿瘤微环境的特性相关[3]。肿瘤微环境包括细胞外基质（extracellular matrix，ECM）、巨噬细胞、炎症细胞、上皮细胞以及癌相关成纤维细胞（cancer associated fibroblasts，CAFs），其中 CAFs 是微环境的主要细胞成分。相较于正常成纤维细胞（normal fibroblasts，NFs）可以抑制肿瘤细胞的生长[4]，CAFs 可以促进肿瘤的恶性表型改变，比如化疗耐药、抗凋亡、侵袭转移等，这在乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌等多种肿瘤中都得到证实[5-11]。本课题组前期证实CAFs

可以促进 EOC 细胞迁移侵袭，但 CAFs 如何调控 EOC 癌细胞生物学行为的分子机制尚不清楚。CAFs 和 NFs 中基因的不同表达可能是由后天因素造成的，也可能是由于遗传学的改变[12-14]。许多关于基质成分（成纤维细胞、炎症细胞、内皮细胞）的全基因表达谱分析表明，基质中的基因表达可能有效预测临床预后和治疗反应性[15-16]。

本研究运用全基因表达谱芯片技术，对原代培养的卵巢癌 CAFs（n=3）及正常卵巢组织的 NFs（n=3）进行分析，寻找卵巢 CAFs 和 NFs 中的差异表达基因并进行验证，对相关基因的功能进行深入分析。为进一步研究卵巢癌成纤维细胞调控癌细胞生物学行为的分子机制提供基础证据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM-F12 培养基（美国 Hyclone 公司）、Ⅳ型胶原酶（美国 SIGMA 公司）、免疫组化染色试剂盒（北京中杉金桥公司）、鼠源 a-SMA 抗体（武汉博士德公司）、兔源 vimentin（北京博奥森生物技术有限公司），表达谱芯片分析采用 Affymetrix 901838，由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。

1.2 标本来源

标本来源于重庆医科大学附属第一医院妇科 2015 年 3 月至 2015 年 12 月患者，无吸烟饮酒史，未接触过放射性物质和生物化学毒物等可能导致基因突变的物质，且未合并其他癌症及免疫缺陷疾病。3 例正常卵巢组织为其他妇科良性病变同时行卵巢切除者，年龄为（54.00 ± 7.07）岁，病检结果示：正常卵巢；3 例卵巢癌组织为初治的原发 EOC 患者，术前未行放化疗，年龄为（48.25 ± 7.41）岁，病检结果示：卵巢高级别（低分化）浆液性乳头状腺癌。

1.3 原代成纤维细胞的提取、培养及分离

组织剪至 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小，0.1% Ⅳ型胶原酶消化（37 ℃）4~8 h 至组织成絮状样。离心后弃上清，加入培养基混匀，种于 T25 培养瓶中，在细胞培养箱中静置 30 min。镜下观察，大部分细胞已贴壁，将悬浮细胞移至另一培养瓶中继续培养 30 min，重复上述操作，直至细胞基本分离完全。

1.4 原代成纤维细胞的鉴定

原代成纤维细胞消化重悬后计数，种于 24 孔板中的爬片中。经 4%多聚甲醛固定，3% H_2O_2 37 ℃孵育 20 min；山羊血清封闭（37 ℃，30 min），加一抗 4 ℃过夜。加生物素标记的二抗（37 ℃，45 min），辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素（SABR，37 ℃，30 min）后 DAB 反应染色。

1.5 表达谱芯片分析（由上海吉凯基因化学技术有限公司完成）

采用 Trizol 法进行样品的总 RNA 抽提，总 RNA 样品通过 Agilent 2100 分析后，通过一链合成得到 cDNA，进一步经过二链合成得到双链 DNA 模板，然后通过体外反转获得带生物素标记的 amplified RNA（aRNA）。将 aRNA 进行纯化，然后将其片段化后与芯片探针杂交。杂交完成后，对芯片进行洗染，最后扫描得到图片和原始数据。

1.6 生物信息学分析

通过 Affymetrix 官网提供的 Affymetrix Expression Console 软件进行质量控制和解析，使用 R-project 进行双样本非成对 t 检验，经过显著性分析，Benjamini-Hochberg 算法进行校正，获得最终的差异基因。根据芯片原始数据结果，通过 database for annotation，visualization and integrated discovery（DAVID）v 6.7 对差异基因进行基因本体论（gene ontology，GO）分析及 Pathway 富集分析。

1.7 qRT-PCR 验证芯片结果

为验证芯片结果的可靠性，重新提取 4 例 CAFs 和 4 例 NFs，对差异基因中可能和 ECM 重塑相关的 6 个基因进行 qRT-PCR 检测。按照说明书使用 TaKaRa 的 TRIzol 试剂盒分别从各个细胞中提取总 RNA，然后取 2 μg 的 RNA 在 20 μL 的反应体系中按照 TaKaRa 说明书加入逆转录试剂盒中试剂，将 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 扩增体系为 10 μL 体系，冰上于八排管中加入 5 μL SYBR Green、2 μL × 0.2 g cDNA、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、2.2 μLDEPC 水，混匀放入 CFX96TM Real-Time 系统（Bio-Rad）反应，内参为 Actin。循环过程为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。反应结束后，于 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光，利用分析软件确定各个样本的基因表达量结果。所得 NF 表达量取平均值，计算 CAFs 表达量与 NFs 表达量均值的比值，比较 CAFs 相对于 NFs 的改变。其中 PCR 引物使用 Primeor3.0 设计，见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 的引物

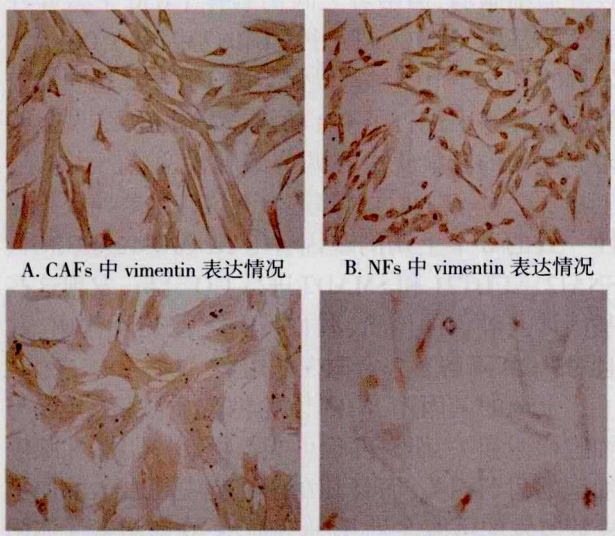
Tab.1 Quantitative real-time PCR primers

基因	引物	序列
HIF1α	正义链：	CTGCACAGGCCACATTCACG
	反义链：	GGTTCACAAATCAGCACCAAGC
MDM2	正义链：	GCTTCGGAACAAGAGACCCTG
	反义链：	GCACGCCAAACAAATCTCCTA
NR3C1	正义链：	TGGAATAGGTGCCAAGGATCT
	反义链：	TTGGGAGGTGGTCCTGTTGT
SNAI2	正义链：	CTGGGCTGGCCAAACATAAG
	反义链：	GGTCTGGAAAACGCCTTGC
NUDT21	正义链：	TCTGATTGTACATGAGCACCGG
	反义链：	GCAAAACTCCATCCTGACGAC
SMAD2	正义链：	GAAACCTTCCATGCATCACAGC
	反义链：	CTTCTTGTCATTTCTACCGTGGC

2 结 果

2.1 原代成纤维细胞的鉴定

对原代分离的 CAFs 和 NFs 进行免疫细胞化学检测。波形蛋白 vimentin 作为间质的标记物，在 NFs 和 CAFs 中均有表达。如图 1A、B 所示。α-SMA 作为成纤维细胞的活化标记物，在 CAFs 中阳性表达，而在 NFs 基本无表达，如图 1C、D 所示。



A. CAFs 中 vimentin 表达情况　B. NFs 中 vimentin 表达情况

C. CAFs 中 α-SMA 表达情况　D. NFs 中 α-SMA 表达情况

图 1 免疫细胞化学对原代提取的成纤维细胞的特征进行验证（光学显微镜，100×）

Fig.1 Characterization of CAFs and NFs (optical microscope, 100×)

2.2 差异基因的表达分析

2.2.1 CAFs 和 NFs 中显著性差异表达基因的筛选和聚类分析 通过对原始数据的分析，发现差异基因一共有 1 636 个，其中 CAFs 中上调的基因有 1 001 个，下调的有 635 个。基因表现有显著差异的筛选标准为符合 $|FC|>1.5$，且 $P<0.05$。从中筛选出有统计学差异，并且在 3 组趋化性一致的基因，即 CAFs 中 3 例标本测定值相近，NFs 中 3 例标本测定值相近的基因，其中 1~6 为 CAFs 中上调的基因，7~10 为下调基因，见表 2。

表 2 CAFs 中上调或下调前 10 位的基因

Tab.2 The top 10 up-or down-regulated genes in CAFs

排序	改变倍数	基因
1	4.916 864 4	NR3C1
2	3.259 554 9	MDM2
3	3.252 078 8	HIF1
4	2.681 417	NUDT21
5	2.615 828	SMAD2
6	2.286 190 7	SNAI2
7	-7.831 218 7	IFITM1
8	-3.469 598	CEBPD
9	-1.910 178 2	STAT3
10	-1.518 584 4	USP39

2.2.2 CAFs 和 NFs 中差异表达基因的 GO 分析和 Pathway 分析 利用 DAVID v6.7 对差异基因进行 Pathway 分析，从下图中可以看出，差异基因主要涉及的通路是关于癌症、肌动蛋白细胞骨架的调节、MAPK 信号通路等（图 2）。进行 GO 富集分析后可以观察到，GO 注释在三大分类中的分布情况，其中 55.7%为生物过程，33.5%为细胞组分，剩下 10.8%是分子功能（图 3A）。分别对不同分类的基因进行注释，发现这些基因表达主要集中在细胞核、细胞质和细胞器中。在生物过程中，差异基因主要富集到代谢及信号传导方面。而分子功能中占主导地位的是对酶活性的调节（图 3B~D）。

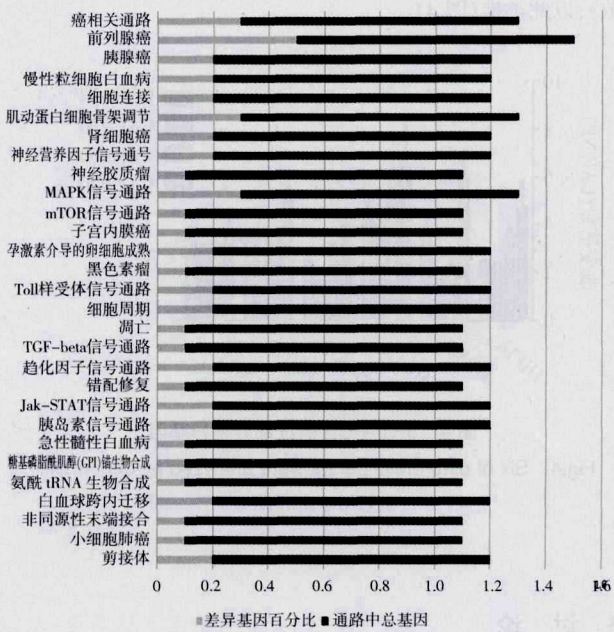
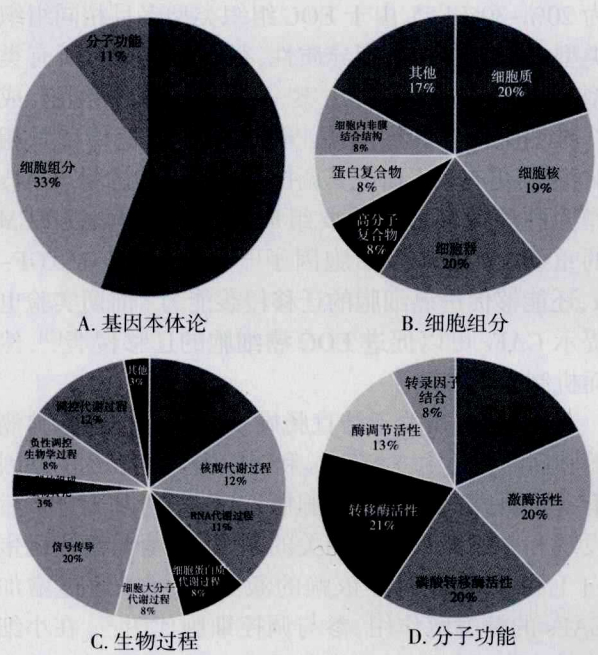


图 2 差异基因 Pathway 富集分析

Fig.2 The pathway enrichment analysis of differential genes



A. 基因本体论　B. 细胞组分

C. 生物过程　D. 分子功能

图 3 对差异基因进行 GO 富集分析

Fig.3 The GO enrichment analysis of differential genes

2.3 qRT-PCR 验证部分芯片结果

为了验证表达谱芯片测得与 ECM 重塑可能相关的上述 6 个基因是否具有普适性，重新分别提取 4 例 CAFs 和 4 例 NFs，对 6 个上调的基因进行了荧光定量 PCR 实验。结果显示，HIF1α、MDM2、NR3C1、SNAI2、NUDT21 和 SMAD2 均在 CAFs中呈现不同倍数的增加，其结果与芯片改变倍数基本一致。其中 $\overline{NF}$ 为 4 例 NFs 取平均值。CAF1/$\overline{NF}$ 表示第 1 例CAF 相应基因相对于 NF 的相对表达量（改变倍数），CAF2/$\overline{NF}$表示第 2 例 CAF 相应基因相对于 NF 的相对表达量（改变倍数），以此类推（图 4）。

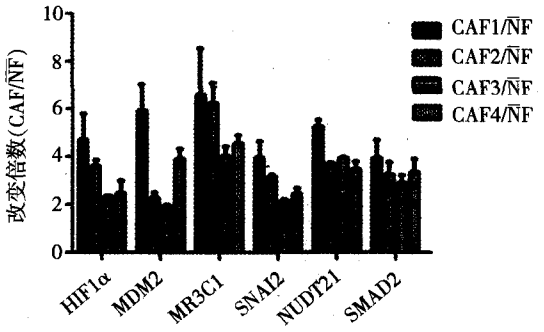


图 4 qRT-PCR 验证部分差异基因

Fig.4 Six of differential genes were analyzed by qRT-PCR in CAFs and NFs

3 讨 论

EOC 死亡率位于妇科肿瘤之首，五年生存率仅为 20%~30%[17-18]。由于 EOC 组织类型多且相同组织类型内部也存在高度异质性，很难找到针对所有类型 EOC 的普适性治疗方案。相比于 EOC 癌细胞，成纤维细胞位于肿瘤间质，异质性较小、遗传背景相对稳定，更有利于研究其调控癌症进展的机制。CAFs 作为肿瘤微环境的重要组成部分，能够调控 ECM 的重塑，分泌许多细胞因子[19-20]，如 SDF-1、TGF-α，还能够促进癌细胞的迁移侵袭能力。前期实验也提示 CAFs 可以促进 EOC 癌细胞的迁移侵袭[21]，然而机制尚不清楚。

近年来，在关于结直肠癌、乳腺癌、小细胞肺癌等肿瘤的报道中，对 CAFs 和 NFs 差异性表达的基因有一定研究[22-25]。在对乳腺癌 CAFs 进行基因分析后发现和肿瘤能量代谢相关的基因，如葡萄糖转运蛋白 1 和 3'磷酸肌醇依赖的激酶 1，可以通过增加 CAFs 的糖酵解作用，参与调控细胞代谢[22]。在小细胞肺癌中，部分 CAFs 内差异表达的基因参与 TGF-α信号通路的调控[25]。文献报道，乳腺癌中的 CAFs 可以分泌 TGF-α，通过激活 EMT 过程促进癌细胞的恶性生物学行为[26]，也可通过分泌 SDF-1 来促进癌细胞的生长[23]。

为了探讨卵巢癌中 CAFs 如何调控癌细胞的恶性行为，本研究提取卵巢原代成纤维细胞并进行培养鉴定，运用全基因表达谱芯片对 CAFs 和 NFs 进行分析，寻找差异基因。尽管成纤维细胞的异质性较肿瘤细胞弱，但两者之间仍然有 1 636 个差异性表达的基因，其中 CAFs 中上调的基因有 1 001 个，下调的有 635 个。对差异倍数大于 1.5 及趋同性较好的差异基因进行了 GO 功能注释分析，结果表明差异基因的功能集中在调节细胞代谢、信号传导、生物学行为等。通过对筛选出有统计学差异且趋化性一致的 6 个上调的基因，HIF1α、MDM2、NR3C1、SNAI2、NUDT21 和 SMAD2 进行 GO 分析，发现这些基因涉及肿瘤的增殖、凋亡、迁移、侵袭及代谢，并且对 ECM 降解有一定调控作用。

上调的基因中，NR3C1 为糖皮质激素受体，与细胞代谢相关，研究发现可能与早期三阴性乳腺癌细胞的耐药相关，而且其在癌细胞中高表达增加了癌症复发的可能性[27]。有研究显示，在雌激素受体阴性的乳腺癌间质中 NR3C1 的表达与乳腺癌分级呈正相关[28]。MDM2 和 HIF1α 在多种癌症中均报道与促进肿瘤恶性生物学行为相关，包括增殖、迁移等[29-31]。在前列腺癌中，HIF1 可以调控间质细胞和癌细胞的能量代谢[32]。HIF1α 能够增加胃癌 CAFs 分泌基质细胞衍生因子 1（stromal cell-derived factor 1，SDF-1）的能力[33]，从而可能影响癌细胞的生物学行为。SNAI2 作为 EMT 的主要调节蛋白，其表达水平和 E-cadherin 的转录相关[34]，提示可能与微环境中ECM 降解相关。在乳腺癌、肺癌、结肠癌和胰腺癌中，SNAI2 的高表达均提示预后不良[35-36]。然而这些因子如何调控卵巢癌 CAFs 促进癌细胞的作用，还需后续实验进一步证实。

本文利用全基因表达谱对卵巢癌 CAFs 进行了检测，通过 GO 分析和 Pathway 分析找到可能参与卵巢癌进展的差异表达基因，为后续研究卵巢癌 CAFs 对 EOC 癌细胞生物学行为影响的机制提供了基本依据。

参 考 文 献

[1] Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis[J]. Am J Pathol, 2010, 177(3): 1053-1064.

[2] Ledermann JA, El-Khouly F. PARP inhibitors in ovarian cancer:

clinicalevidence for informed treatment decisions[J]. Br J Cancer, 2015, 113(s1): 10-16.

[3] Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(1-2): 195-208.

[4] Kaler P, Owusu BY, Augenlicht L, et al. The role of STAT1 for crosstalk between fibroblasts and colon cancer cells[J]. Front Oncol, 2014, 4: 88.

[5] Hao M, Zhang L, An G, et al. Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression[J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52(9): 1787-1794.

[6] Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms[J]. Leukemia, 2003, 17(6): 1175-1182.

[7] Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta[J]. Cancer Res, 2004, 64(4): 1331-1337.

[8] Singh RR, Kunkalla K, Qu C, et al. ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncogene, 2011, 30(49): 4874-4886.

[9] Yang G, Rosen DG, Zhang Z, et al. The chemokine growth-regulated oncogene 1(Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(44): 16472-16477.

[10] Cai J, Tang H, Xu L, et al. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(1): 20-29.

[11] Straussman R, Morikawa T, Shee K, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion[J]. Nature, 2012, 487(7408): 500-504.

[12] Hu M, Yao J, Cai L, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers[J]. Nat Genet, 2005, 37(8): 899-905.

[13] Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, et al. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas[J]. Nat Genet, 2002, 32(3): 355-357.

[14] Patocs A, Zhang L, Xu Y, et al. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases[J]. N Engl J Med, 2007, 357(25): 2543-2551.

[15] Finak G, Bertos N, Pepin F, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer[J]. Nat Med, 2008, 14(5): 518-527.

[16] Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 68-74.

[17] Choi M, Fuller CD, Thomas CR, et al. Conditional survival in ovarian cancer: results from the SEER dataset 1988-2001[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2): 203-209.

[18] 刘 侃，陈红晓，张 虹. 晚期卵巢癌预后相关因素分析[J]. 现代妇产科进展，2010，19(12)：918-921.

[19] Shieh AC, Rozansky HA, Hinz B, et al. Tumor cell invasion is promoted by interstitial flow-induced matrix priming by stromal fibroblasts[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 790-800.

[20] Erez N, Truitt M, Olson P, et al. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner[J]. Cancer Cell, 2010, 17(2): 135-147.

[21] 戴洁敏.癌相关纤维母细胞在卵巢癌恶性行为中的可能作用[D]. 重庆：重庆医科大学，2014.

[22] Pasanen I, Lehtonen S, Sormunen R, et al. Breast cancer carcinoma-associated fibroblasts differ from breast fibroblasts in immunological and extracellular matrix regulating pathways[J]. Exp Cell Res, 2016, 344(1): 53-66.

[23] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. Cell, 2005, 121(3): 335-348.

[24] Mrazek AA, Carmical JR, Wood TG, et al. Colorectal cancer-associated fibroblasts are genotypically distinct[J]. Curr Cancer Ther Rev, 2014, 10(2): 97-218.

[25] Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, et al. Prognostic gene-expression signature of carcinomaassociated fibroblasts in non-small cell lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(17): 7160-7165.

[26] Yu Y, Xiao CH, Tan LD, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-b signalling[J]. Br J Cancer, 2014, 110(3): 724-732.

[27] Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, et al. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(22): 6163-6172.

[28] Smith RA, Lea RA, Weinstein SR, et al. Progesterone, glucocorticoid, but not estrogen receptor mRNA is altered in breast cancer stroma [J]. Cancer Lett, 2007, 225(1): 77-84.

[29] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4S): 62-67.

[30] Shen G, Li X, Jia YF, et al. Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(3): 336-341.

[31] Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The MDM2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation[J]. Cell, 1992, 69(7): 1237-1245.

[32] Fiaschi T, Marini A, Giannoni E, et al. Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay[J]. Cancer Res, 2012; 72(19): 5130-5140.

[33] Kinoshita H, Yashiro M, Fukuoka T, et al. Diffuse-type gastric cancer cells switch their driver pathways from FGFR2 signaling to SDF1/CXCR4 axis in hypoxic tumor microenvironments[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(12): 1511-1520.

[34] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(6): 1613-1618.

[35] Shioiri M, Shida T, Koda K, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 2006, 94(12): 1816-1822.

[36] Hotz B, Arndt M, Dullat S, et al. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16): 4769-4776.

（责任编辑：方 济）