doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.16.001

·基础研究·

结直肠癌细胞外泌体激活肝星状细胞为癌相关成纤维细胞 *

郑宾宾 刘友东 庄晓鹏 管冰杰 严东旺△

（上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海 200080）

摘要 目的:探讨结直肠癌(CRC)细胞上清外泌体对肝星状细胞(HSC)细胞的影响。**方法:**通过超高速离心结合过滤法提取和纯化CRC细胞上清外泌体,然后以透射电电子显微镜(TEM)、纳米颗粒跟踪分析仪(NTA)和蛋白免疫印迹(WB)实验鉴定所提取的外泌体的形态、大小、粒径分布,以及外泌体表面标志蛋白HSP90和TSG101。再通过激光共聚焦显微镜(LSCM)观察荧光标记的外泌体被HSC细胞摄取的情况。以WB实验验证CRC细胞上清外泌体处理后的HSC中成纤维细胞活化蛋白(FAP)和α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达水平。**结果:**TEM显示结直肠癌细胞外泌体呈"茶托样"杯型或类圆形囊泡样结构;NTA分析发现结直肠癌细胞外泌体直径峰值和大小分布范围分别为57 nm和30-150 nm;WB显示外泌体表面标志蛋白HSP90和TSG101均为阳性。LSCM观察发现DiO标记的外泌体(绿色),能够被Dil标记的HSC(红色)摄取。CRC细胞上清外泌体处理后的HSC中FAP和α-SMA表达水平较对照组显著升高。**结论:**HSC与CRC细胞上清外泌体共孵育后能够被激活成癌相关成纤维细胞。

关键词:结直肠癌细胞;外泌体;肝星状细胞;癌相关成纤维细胞;肿瘤微环境

中图分类号:R-33;R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)16-3001-05

Hepatic Stellate Cell are Activated into Cancer-associated Fibroblasts by Colorectal Cancer Cells Exosomes*

ZHENG Bin-bin, LIU You-dong, ZHUANG Xiao-peng, GUAN Bing-jie, YAN Dong-wang△

(Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore the impact of exosomes isolated from colorectal cancer cells supernatants on hepatic stellate cell. **Methods:** The exosomes from supernatants of CRC cells were extraction and purification via Ultracentrifugation and filtration. Then, the morphological appearance, size and particle distribution of exosomes extracted from CRC cells supernatants, as well as the exosome maker proteins HSP90 and TSG101, were identified by transmission electron microscope (TEM), nanoparticle tracking system (NTA) and western blot (WB). The endocytosis of fluorescently-labeled exosomes from CRC cells supernatants was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM). The Protein expression levels of fibroblast activated protein (FAP) and alpha smooth muscle actin (α-SMA) in hepatic stellate cell (HSC) co-cultured with exosomes of CRC cells supernatants were verified by western blot. **Results:** TEM revealed that the exosomes derived from CRC cells presented "saucer like" cup-shaped morphology or rather round membrane vesicles; NTA analysis showed that the peak diameter of exosomes isolated from CRC cells supernatants were 57 nm and particle size distribution ranged from 30 to 150 nm; WB analysis indicated that exosome protein makers HSP90 and TSG101 were expressed in exosomes extracted from CRC cells supernatants; LSCM observed that DiO-labeled exosomes (green) secreted from supernatants of CRC cells were ingested by Dil-labeled HSC (red); Expression levels of FAP and α-SMA in HSC after exosomes released from CRC cells treatment were significantly higher than those in control group. **Conclusion:** HSC can be activated into cancer-associated fibroblasts after co-incubation with exosomes derived from supernatants of CRC cells.

Key words: Colorectal cancer cell; Exosomes; Hepatic stellate cell; Cancer-associated fibroblasts; Tumor microenvironment

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.3 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)16-3001-05

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球发病率高居第三位的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在中国逐年增加[1-3]。肝脏是

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81871931);上海市科委医学引导项目(17411968200)

作者简介:郑宾宾(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向:胃肠肿瘤的基础及微创外科临床研究,

电话:18516378616, E-mail: zhengbinbin1015@163.com

△ 通讯作者:严东旺(1970-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:胃肠肿瘤的基础及微创外科临床研究,E-mail: yandw70@163.com

(收稿日期:2020-02-23 接受日期:2020-03-18)

结直肠癌转移最常见的部位，大约 15-25 %的结直肠癌患者确诊前已经发生肝转移[4]。肿瘤频繁复发，转移致死和顽固性肿瘤微环境是肿瘤治疗失败的三大关键问题[5]。癌相关成纤维细胞（Cancer-associated fibroblasts, CAF）作为肿瘤微环境中的主要成分，在肿瘤的发生、进展和转移等过程中发挥着重要作用[6]。外泌体是具有脂质双层膜结构，包含有大量蛋白、核酸等遗传物质，大小介于 30-150 nm 之间的微小囊泡[7-9]。外泌体能够作为转运载体将携带的生物信息传递到远端组织，在细胞与细胞之间、细胞与微环境之间进行信息交换相互影响[10-12]。比如肿瘤细胞通过外泌体将生物信息转运到远处，把正常基质细胞转化成肿瘤相关基质细胞，再反过来促进肿瘤细胞的增殖，凋亡，迁移和侵袭，肿瘤和基质细胞就形成了相互作用的环路[13]。我们旨在探究结直肠癌细胞外泌体对微环境中成纤维细胞的影响，为进一步研究其中的具体机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的结直肠癌细胞株 HCT116 从中国科学院上海生命科学研究院的细胞库购买。人肝星状细胞（Hepatic stellate cell, HSC）细胞株 LX2 来自于复旦大学附属中山医院临床研究院。高糖 DMEM 培养基购自美国的 Gibco 公司。胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和去外泌体的胎牛血清均购自以色列的 Biological Industries 公司。抗体肿瘤特异性糖蛋白 101（Tumor-specific glycoproteins,TSG101）、热休克蛋白 90（Heat shock protein, HSP90）、成纤维细胞活化蛋白（Fibroblast activation protein, FAP）和 α- 平滑肌肌动蛋白（Alpha smooth muscle actin, α-SMA）均购自美国的 Abcam 公司。荧光染料 DiO、Dil 和 DAPI 均购自上海生工。高速离心机、超高速离心机（Optima XPN100）及超高速离心管均购自美国 Beckman 公司。透射电子显微镜（Transmission electron microscope, TEM, TF20）购自美国 FEI 公司。纳米颗粒跟踪分析仪 (Nanoparticle tracking system, NTA, NS300)购自英国马尔文公司。电泳仪及相应的转膜装置均购自美国 Bio-Rad 公司。激光扫描共聚焦荧光显微镜 (Laser scanning confocal microscope, LSCM, TCS SP8)购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结直肠癌细胞株 HCT116 和人肝星状细胞株 LX2 的常规培养用含 10 %胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，置于 37 ℃、5 % CO_2 的恒温细胞培养箱内培养。当细胞融合度达到 90 %左右，进行常规的传代和冻存。用于外泌体提取的结直肠癌细胞株 HCT116 的特殊培养是用无外泌体的胎牛血清代替普通的胎牛血清进行培养。

1.2.2 细胞上清外泌体的提取和纯化 采用多步骤差速超高速离心法并结合过滤法提取和纯化结直肠癌细胞上清外泌体。超高速离心的所有步骤均要在 4 ℃条件下进行，所使用的器材均要进行灭菌处理。收集好的细胞上清液，置于 300× g，4 ℃条件下离心 5 分钟，去除上清液中的细胞成分；上一步骤留取的上清液置于 2000× g，4 ℃条件下离心 20 分钟，去除上清液中的死细胞成分；上一步骤留取的上清液置于 15000× g，4 ℃条件下离心 30 分钟，去除上清液中的细胞器及碎片成分；上一步骤留取的上清液用 0.22 μm 过滤器过滤，去除上清液中的杂蛋白成分；上一步骤留取的上清液置于 110000× g，4 ℃条件下离心 120 分钟，然后用 1 mL 无菌的过滤后的 PBS 重悬外泌体沉淀，重悬后的外泌体悬液再次置于 110000× g，4 ℃条件下离心 120 分钟进行纯化，最后用 50-100 μL 无菌的过滤后的 PBS 重悬外泌体沉淀获得外泌体重悬液，置于 -80 ℃冰箱保存。

1.2.3 透射电子显微镜（TEM）观察细胞上清外泌体的形态和大小 采用负染技术鉴定细胞上清外泌体的形态和大小。取 10 μL 混合均匀的细胞上清外泌体混悬液滴加于亲水化处理后的电镜铜网上，室温静置 5 分钟，用无菌滤纸吸干周围液体。随后用醋酸双氧铀溶液染色，室温静置 2 分钟，用无菌滤纸吸干周围染液，自然晾干后置于透射电子显微镜下观察并拍照记录细胞上清外泌体的形态和大小。

1.2.4 纳米颗粒跟踪分析仪(NTA)分析细胞上清外泌体的大小和分布 将获取的细胞上清外泌体用无菌 PBS 重悬为 1 mL 悬液，然后用一次性的 1 mL 注射器吸取混匀后的外泌体悬液缓慢注入检测器的样品池中。根据纳米颗粒跟踪分析仪记录的外泌体颗粒数量调整参数，然后等待机器自动分析并记录形成报告。

1.2.5 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 提取结直肠癌细胞上清外泌体总蛋白，按照 1 ：3 的比例加入裂解液，冰上静置 30 分钟。结直肠癌细胞上清外泌体处理后的肝星状细胞 LX2（3× 10^5 个 / 孔）按常规步骤提取细胞总蛋白。然后通过 BCA 法测定蛋白浓度。按说明书加入适量 5× 蛋白上样缓冲液，100 ℃煮沸 10 分钟。根据目的蛋白分子量大小按照说明书配置对应浓度的 SDS-PAGE 凝胶，然后进行电泳，转膜，将目的蛋白转印至 PVDF 膜上。接着用 5 %脱脂牛奶室温封闭 1.5 小时，TBST 缓冲液洗涤后，加入对应的一抗溶液，4 ℃条件下在摇床上孵育过夜。孵育结束后，TBST 缓冲液洗涤三次，然后选择相应的辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育，室温 1 小时，TBST 缓冲液洗涤三次。最后使用电化学发光液(electrochemical luminescence, ECL)进行显影。

1.2.6 激光扫描共聚焦荧光显微镜(LSCM)观察细胞外泌体荧光标记和摄取 用 1 mL 无菌 PBS 重悬外泌体，按照制造商说明书配置好 DiO 待用，外泌体重悬液中加入适量 DiO 溶液，混匀共孵育 4 分钟。然后加入等体积的无外泌体血清终止染色。最后采用超速离心法将标记好的外泌体分离纯化。将标记好的外泌体重悬于无血清的培养基中和贴壁良好的 LX2 细胞置于 37 ℃、5 % CO_2 的恒温细胞培养箱内共孵育 4-5 小时。PBS 洗涤后，用 4 %多聚甲醛进行固定。PBS 洗涤后，用甘氨酸中和再次洗涤。之后加入 Dil 染液。PBS 洗涤后，加入 DAPI 染液。PBS 洗涤后，于激光扫描共聚焦荧光显微镜观察并拍照记录。

1.3 统计学分析

实验数据均采用均数± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 结直肠癌细胞上清外泌体的分离和鉴定

分离纯化结直肠癌细胞上清外泌体的步骤如图 1 中所示。如图 2A 中箭头所示，通过透射电镜，我们可以观察到外泌体形态特征呈现圆形或者类圆形双层膜性的囊泡状结构，如同 "

茶托样 " 的杯状囊泡。如图 2B 中所示，经纳米颗粒跟踪分析仪(NTA)分析，我们可以发现结直肠癌细胞 HCT116 细胞上清外泌体的粒径大小较为集中，大部分分布在 30-150 nm，直径的大小峰值为 57 nm，与外泌体大小的理论值相符 [14]，平均值为 127.7± 6.5 nm，众数值为 56.8± 1.3 nm，浓度为 3.35× 10^9± 2.76× 10^9 个 /mL。蛋白质免疫印迹(WB)实验结果显示我们提取的结直肠癌细胞上清外泌体能够表达外泌体标志蛋白 TSG101 和 HSP90(图 2C)。综上结果表明，我们通过超高速离心法并结合过滤法所提取的细胞外囊泡是外泌体。

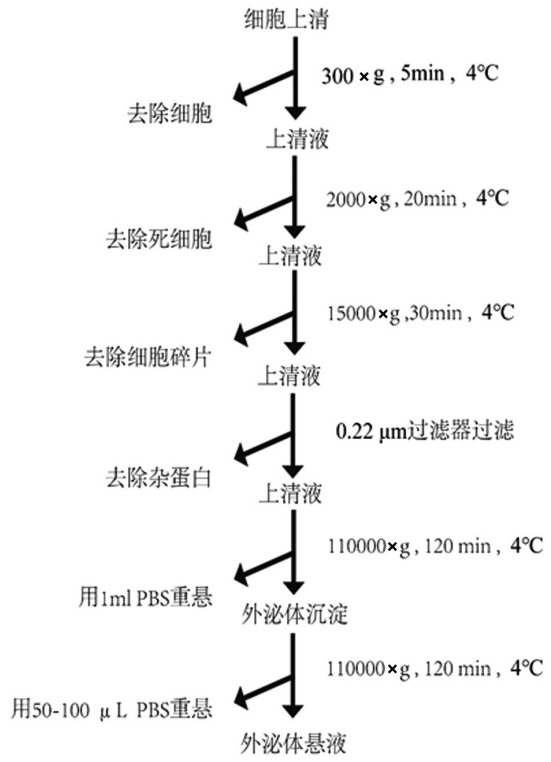

图 1 结直肠癌细胞 HCT116 细胞上清外泌体分离纯化流程图

Fig.1 The isolation and purification Procedure of exosomes derived from supernatants of CRC cells HCT116

2.2 结直肠癌细胞上清外泌体递送至肝星状细胞内

通过激光扫描共聚焦荧光显微镜，我们可以观察到荧光标记的外泌体呈绿色(图 3 中绿色箭头所示)，经过共孵育后绿色标记的外泌体可以被肝星状细胞 LX2(红色)摄取(图 3 所示)。

2.3 结直肠癌细胞上清外泌体激活肝星状细胞

结直肠癌细胞外泌体与肝星状细胞 LX2 共孵育后，通过蛋白免疫印迹实验，我们分析结直肠癌细胞外泌体处理后的肝星状细胞 LX2 表达癌相关成纤维细胞激活标志蛋白，成纤维细胞活化蛋白(FAP)和 α- 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达水平。如图 4 所示，我们发现，相对于对照组，结直肠癌细胞外泌体处理后的肝星状细胞 LX2 中 FAP 和α-SMA 均显著升高。以上结果表明结直肠癌细胞外泌体能够激活肝星状细胞 LX2 为癌相关成纤维细胞。

3 讨论

肿瘤微环境是指肿瘤细胞产生、生长以及转移所处的一个极其复杂的内环境网络，由细胞成分和非细胞成分所构成，细胞成分包括肿瘤细胞和内皮细胞、免疫细胞、脂肪细胞、癌相关成纤维细胞等非肿瘤细胞成分，非细胞成分主要是指细胞外基质以及各种细胞因子[15-17]。肿瘤细胞和微环境之间相互作用，相互影响，既能够相互促进，也可能相互拮抗[16-18]。肿瘤微环境中的各种成分在肿瘤的发生、发展、转移、耐药等过程中发挥着重要作用[15,17]。肿瘤细胞在微环境的形成过程中也发挥着至关重要的作用，比如微环境的重塑、细胞外基质的重塑、血管通透性的改变、基质细胞的激活等[16,17,19]。例如，在胰腺癌中癌相关成纤维细胞分泌的 SDF-1 通过 SDF-1/CXCR4/SATB-1 轴能够促进胰腺癌的进展和吉西他滨耐药[20]。成纤维细胞活化蛋白阳性的癌相关成纤维细胞可促进食管鳞状细胞癌发生淋巴结转移[21]。

外泌体可由绝大多数的细胞自然释放，包括癌相关成纤维细胞、干细胞、免疫细胞、肿瘤细胞等各种类型细胞[22]。因而外泌体可以参与各种生理或病理过程，包括肿瘤的发生、发展、转移、耐药等过程以及免疫调控、代谢重构、微环境重塑等各种过程[23,24]。外泌体作为细胞间信号转导的重要通讯介质，可以将其包含的多种核酸、脂质、特异性蛋白等重要生物信息从一个细胞转移到另一个细胞内，从而改变受体细胞的生物学功能[22-25]。外泌体既可以直接影响邻近细胞，又可以通过循环系统靶向作用于远处的受体细胞，从而改变其生物学功能[25]。例如，脂肪细

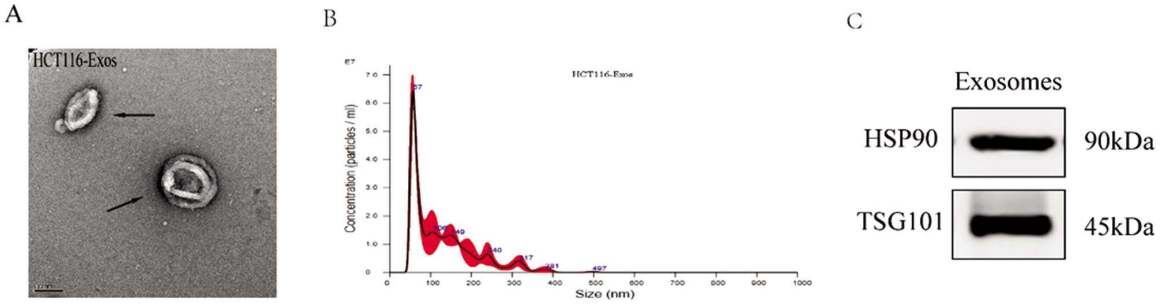

图 2 结直肠癌细胞 HCT116 外泌体的鉴定

A 细胞上清外泌体形态鉴定，外泌体如箭头所示，比例尺 100 nm。B 细胞上清外泌体粒径大小分布，平均值：127.2 nm，众数：56.7 nm。C 外泌体标志蛋白 TSG101 和 HSP90 的表达。

Fig.2 Identification of exosomes derived from supernatants of CRC cells HCT116

A Morphological identification of exosomes released from supernatants of CRC cells; exosomes indicated by black arrows above. Scale bar, 100 nm. B The particle size distribution of exosomes derived from supernatants of CRC cells, mean: 127.2 nm, mode: 56.7 nm. C Levels of exosomes protein makers TSG101 and HSP90.

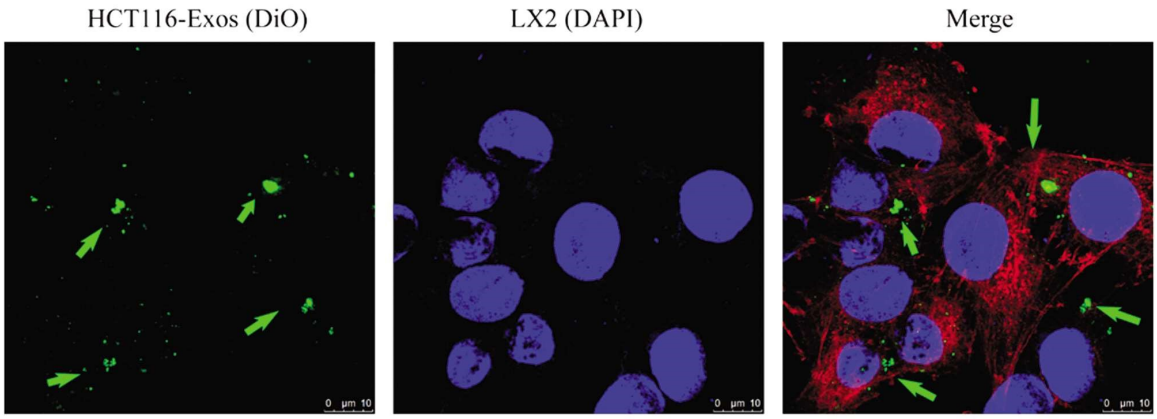

图 3 LX2 胞吞外泌体

注：结直肠癌细胞来源的外泌体（DiO 标记，绿色）递送至肝星状细胞内（Dil 标记细胞膜，红色；DAPI 标记细胞核，蓝色）。外泌体如绿色箭头所示，比例尺，10 μm。

Fig.3 Internalization of exosomes by LX2

Annotation: Exosomes (DiO labeled exosome, green) derived from supernatants of CRC cells were delivered to hepatic stellate cells (Dil labeled cell membrane, red; Nuclei were stained with DAPI, blue). Green arrows head point at exosomes, Scale bar, 10 μm.

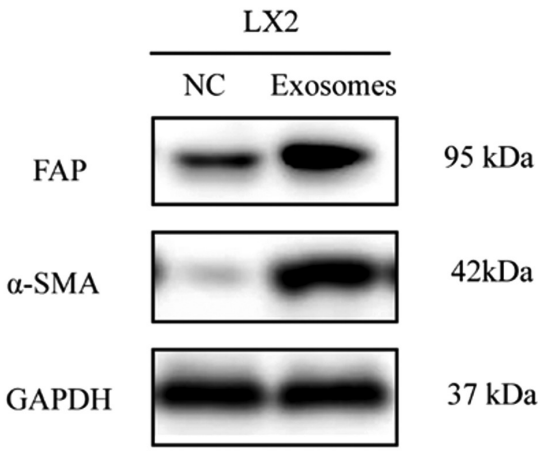

图 4 CRC 细胞外泌体与 LX2 共孵育后 FAP 和 α-SMA 的表达

Fig.4 The expression levels of FAP and α-SMA in LX2 after co-incubated with exosomes derived from supernatants of CRC cells

胞来源的外泌体中一种与去泛素化有关的环状 RNA circ-DB (has_circ_0025129)通过抑制 miR-34a 和激活 USP7 / Cyclin A2 信号通路能够促进肝细胞癌生长[26]。胆管细胞衍生的外泌体中长非编码 RNA-H19（lncRNA-H19）能够激活肝星状细胞，在胆汁淤积性肝纤维化中起到重要作用，并且有可能成为新的治疗靶点和诊断标志物[27]。肝癌细胞来源的外泌体中 miR-1247-3p 能够激活成纤维细胞为癌相关成纤维细胞并促进肝癌发生肺转移[28]。肝细胞癌衍生的外泌体中 miRNA-21 通过靶向 PTEN 从而激活 PDK1/AKT 通路进而促进肝癌进展[29]。

我们通过超高速离心结合过滤法提取结直肠癌细胞的外泌体，并经由透射电镜、纳米颗粒跟踪分析仪和蛋白免疫实验进行了鉴定。我们发现通过上述方法提取的外泌体呈现典型的 " 茶托样 " 杯形囊泡结构；大部分分布于 30-150 nm，符合经典外泌体的粒径分布标准 [7,14]；WB 结果显示外泌体标志蛋白 HSP90 和 TSG101 表达阳性，进一步证明了我们所提取的是外泌体。我们通过荧光示踪技术发现，结直肠癌细胞外泌体可以被肝星状细胞摄取，结果表明结直肠癌细胞外泌体内的成分可以转移到肝星状细胞内，为进一步发挥生物学作用奠定基础。

我们通过将结直肠癌细胞外泌体和肝星状细胞共孵育，结果发现癌相关成纤维细胞激活标志蛋白 -- 成纤维细胞活化蛋白（FAP）和 α- 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达升高。成纤维细胞活化蛋白（FAP 或者 seprase）是一种Ⅱ型跨膜蛋白，最早在 1986 年被 Rettig 等人发现[30]，属于丝氨酸蛋白酶家族的一员。由于 FAP 在 CAFs 内高表达，因而成为鉴定 CAFs 的标志物之一[31]。FAP 通过酶促和非酶促的途径在细胞外基质的降解、肿瘤组织中微血管的生成、肿瘤微环境的重塑等过程中发挥作用，从而调控肿瘤的生长、侵袭和转移[32]。由于 FAP 在自身免疫性疾病、消化道炎症、恶性肿瘤中表达丰富，因而在疾病的诊断、靶向治疗和预后评估中 FAP 具有重要的临床价值[33-35]。综上所述，鉴于孵育后的肝星状细胞 FAP 和α-SMA 表达升高，因此表明肝星状细胞可摄取结直肠癌细胞外泌体并进一步活化为癌相关成纤维细胞。

此前，针对肿瘤治疗和预后评估的思路大多局限在肿瘤细胞本身，然而，近年来，肿瘤微环境尤其是含量丰富的 CAFs 在肿瘤治疗和预后评估等临床行为中的价值受到了越来越多人的关注。随着科学家们对 CAFs 组织分类和功能异质性、CAFs 活化机制、CAFs 和肿瘤细胞相互作用机制的深入研究[36]。越来越多的证据表明，靶向 CAFs 及其分泌和表达的衍生物、调控关键驱动分子逆转 CAFs 的亚型、调控 CAFs 的活化通路以及 CAFs 和肿瘤细胞之间的信号通路在肿瘤治疗和预后评估中具有重要的临床价值[37-39]。例如，在前列腺癌中，通过将 FAP 抗体加载到细胞穿透肽的纳米颗粒上，从而构建靶向 CAF 的 siRNA 传递系统，该系统能够特异性下调在 CAF 内表达的基质成纤维细胞衍生因子 -1（SDF-1））从而使癌相关成纤维细胞失活，重塑肿瘤微环境达到治疗肿瘤的效果[40]。食管鳞状细胞癌基质中 CAFs 标志物的表达与不良预后之间存在正相关，是评估肿瘤预后可靠且重要的指标，而且在肿瘤的诊断和治疗上具有重要的临床价值[41,42]。靶向皮肤鳞状细胞癌相关成纤维细胞内驱动因子核激素受体可以有效抑制肿瘤的化学耐药性[43]。

本研究之外，我们可以延伸出一个有价值的问题。结直肠癌细胞外泌体中的何种成分，又是通过何种途径将成纤维细胞

转化为癌相关成纤维细胞。接下来,我们将通过二代测序技术找出结直肠癌细胞外泌体中调控成纤维细胞活化的差异显著的分子,然后,结合生物信息进一步分析,最后通过实验逐一验证,找出关键的调控分子。综上所述,本研究为进一步探讨结直肠癌细胞外泌体调控正常成纤维细胞活化为癌相关成纤维细胞的具体机制提供基础。为探讨癌相关成纤维细胞如何影响结直肠癌细胞生物学功能提供参考。有望为结直肠癌的诊断和治疗提供新的思路。

参 考 文 献(References)

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34

[2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424

[3] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 22

[4] Hur K, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer [J]. Gut, 2017, 66(4): 654-665

[5] Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(2): 99-115

[6] Hu JL, Wang W, Lan XL, et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 91

[7] Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis[J]. Cells, 2019, 8(7): E727

[8] Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2018, 18(8): 1-11

[9] Wang H, Lu Z, Zhao X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 133

[10] Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer[J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1163-1172

[11] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(4): 213-228

[12] Zhang L, Zhang S, Yao J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth [J]. Nature, 2015, 527(7576): 100-104

[13] M HR, Bayraktar E, G KH, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): E538

[14] Shao H, Im H, Castro CM, et al. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917-1950

[15] Li W, Ng JM, Wong CC, et al. Molecular alterations of cancer cell and tumour microenvironment in metastatic gastric cancer [J]. Oncogene, 2018, 37(36): 4903-4920

[16] Johan MZ, Samuel MS. Rho-ROCK signaling regulates tumor-microenvironment interactions [J]. Biochem Soc Trans, 2019, 47(1): 101-108

[17] Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis[J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(1): 229-236

[18] Cătană CS PM, Giannelli G, Gianluigi Giannelli, et al. Non-coding RNAs, the Trojan horse in two-way communication between tumor and stroma in colorectal and hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29519-29534

[19] Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment[J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(11): 863-875

[20] Wei L, Ye H, Li G, et al. Cancer-associated fibroblasts promote progression and gemcitabine resistance via the SDF-1/SATB-1 pathway in pancreatic cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11): 1065

[21] Kashima H, Noma K, Ohara T, et al. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2019, 144(4): 828-840

[22] Bae S BJ, Bonavida B. Exosomes derived from cancerous and non-cancerous cells regulate the anti-tumor response in the tumor microenvironment[J]. Genes & Cancer, 2018, 9(3-4): 87-100

[23] Huang T, Song C, Zheng L, et al. The roles of extracellular vesicles in gastric cancer development, microenvironment, anti-cancer drug resistance, and therapy[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 62

[24] Guo Y, Ji X, Liu J, et al. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 39

[25] Li Q, Wang H, Peng H, et al. Exosomes: Versatile Nano Mediators of Immune Regulation[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10): E1557

[26] Zhang H, Deng T, Ge S, et al. Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7 [J]. Oncogene, 2019, 38(15): 2844-2859

[27] Liu R, Li X, Zhu W, et al. Cholangiocyte-Derived Exosomal Long Noncoding RNA H19 Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Cholestatic Liver Fibrosis[J]. Hepatology, 2019, 70(4): 1317-1335

[28] Fang T, Lv H, Lv G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 191

[29] Zhou Y, Ren H, Dai B, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 324

[30] Rettig WJ, Chesa PG, Beresford HR, et al. Differential Expression of Cell Surface Antigens and Glial Fibrillary Acidic Protein [J]. Cancer Res, 1986, 46(12 Pt 1): 6406-6412

[31] Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, et al. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers[J]. Int J Cancer, 2020, 146(4): 895-905

[32] Pure E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics [J]. Oncogene, 2018, 37(32): 4343-4357

[33] Yazbeck R, Jaenisch SE, Abbott CA. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein [J]. Protoplasma, 2018, 255(1): 375-386

[34] Yu LN, Liu Z, Tian Y, et al. FAP-a and GOLPH3 Are Hallmarks of DCIS Progression to Invasive Breast Cancer [J]. Front Oncol, 2019, (9): 1424

(下转第 3016 页)

[14] Nicolas Asquier, Guillaume Bouchoux, Michael Canney, et al. Blood-brain Barrier Disruption in Humans Using an Implantable Ultrasound Device: Quantification With MR Images and Correlation with Local Acoustic Pressure[J]. J Neurosurg, 2019

[15] William Crowe, Lulu Wang, Zhongwei Zhang, et al. MRI Evaluation of the Effects of Whole Brain Radiotherapy on Breast Cancer Brain Metastasis[J]. Int J Radiat Biol, 2019, 95 (3): 338-346

[16] 胡然, 杨华, 陈勇等. 动态增强 MR 成像在胰腺疾病中的应用[J].国际医学放射学杂志,2018, 41(4): 440-444

[17] William Crowe, Lulu Wang, Zhongwei Zhang, et al. MRI Evaluation of the Effects of Whole Brain Radiotherapy on Breast Cancer Brain Metastasis[J]. Int J Radiat Biol, 2019, 95(3): 338-346

[18] Muhammed Sedat Sakat, Recep Sade, Korhan Kilic, et al. The Use of Dynamic Contrast-Enhanced Perfusion MRI in Differentiating Benign and Malignant Thyroid Nodules [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2019, 71(Suppl 1): 706-711

[19] Marta Campos, Isabel Candelária, Nickolas Papanikolaou, et al. Perfusion Magnetic Resonance as a Biomarker for Sorafenib-Treated Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Pilot Study [J]. GE Port J Gastroenterol, 2019, 26(4): 260-267

[20] Swathi Chidambaram, Susan C Pannullo, Michelle Roytman, et al. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Perfusion Characteristics in Meningiomas Treated with Resection and Adjuvant Radiosurgery[J]. Neurosurg Focus, 2019, 46 (6): E10

[21] Lucia Manganaro, Matteo Saldari, Carlotta Pozza, et al. Dynamic Contrast-Enhanced and Diffusion-Weighted MR Imaging in the Characterisation of Small, Non-Palpable Solid Testicular Tumours[J]. Eur Radiol, 2018, 28 (2): 554-564

[22] Divya Thomas, Prakash Radhakrishnan. Tumor-stromal Crosstalk in Pancreatic Cancer and Tissue Fibrosis [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 14

[23] Li Wu, Peng Lv, Haitao Zhang, et al. Dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI assessment of microvascular characteristics in the murine orthotopic pancreatic cancer model [J]. Magn Reson Imaging, 2015, 33 (6): 737-760

[24] 姚秀忠, 曾蒙苏, 饶圣祥, 等. 3.0T MR 灌注加权成像和扩散加权成像在胰腺肿块诊断中的作用 [J]. 中华放射学杂志, 2011, 45(7): 646-652

[25] Xu J, Liang Z, Hao S, et a1. Pancreatic adenocareinoma: dynamic 64-slice helical CT with perfusion imaging[J]. Abdom Imaging, 2009, 34: 759-766

[26] Swathi Chidambaram, Susan C Pannullo, Michelle Roytman, et al. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging Perfusion Characteristics in Meningiomas Treated With Resection and Adjuvant Radiosurgery[J]. Neurosurg Focus, 2019, 46 (6): E10

[27] Anna G Sorace, Savannah C Partridge, Xia Li, et al. Distinguishing Benign and Malignant Breast Tumors: Preliminary Comparison of Kinetic Modeling Approaches Using Multi-Institutional Dynamic Contrast-Enhanced MRI Data From the International Breast MR Consortium 6883 Trial[J]. J Med Imaging (Bellingham), 2018, 5(1): 011019

[28] Yousef Mazaheri, Oguz Akin, Hedvig Hricak. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Prostate Cancer: A Review of Current Methods and Applications[J]. World J Radiol, 2017, 9(12): 416-425

（上接第 3005 页）

[35] Yang X, Lin Y, Shi Y, et al. FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling[J]. Cancer Res, 2016, 76(14): 4124-35

[36] 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

[37] Neesse A,Bauer CA, Öhlund D, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer-ready for clinical translation [J]. Gut, 2019, 68(1): 159-171

[38] Paulsson J, Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2014, (25): 61-68

[39] Kozlova N, Grossman JE, Iwanicki MP, et al. The Interplay of the Extracellular Matrix and Stromal Cells as a Drug Target in Stroma-Rich Cancers[J]. Trends Pharmacol Sci, 2020, 41(3): 183-198

[40] Lang J, Zhao X, Qi Y, et al. Reshaping Prostate Tumor Microenvironment To Suppress Metastasis via Cancer-Associated Fibroblast Inactivation with Peptide-Assembly-Based Nanosystem [J]. ACS Nano, 2019, 13(11): 12357-12371

[41] Yeo SY, Ha SY, Lee KW, et al. Twist1 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts of esophageal squamous cell carcinoma with a prognostic significance [J]. Oncotarget, 2017, 8 (39): 65265-65280

[42] Ha SY, Yeo SY, Xuan YH, et al. The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99955

[43] Chan JSK, Sng MK, Teo ZQ, et al. Targeting nuclear receptors in cancer-associated fibroblasts as concurrent therapy to inhibit development of chemoresistant tumors[J]. Oncogene, 2018, 37(2): 160-173