

## 研究论文

TGF- $\beta$ 1信号在成纤维细胞促血管生成中作用的研究

毛熙贤 王伟 李德卫\*

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

**摘要** 该研究旨在探讨转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)信号在成纤维细胞促血管生成中的作用。实验通过ELISA检测了Hepal-6细胞上清液中TGF- $\beta$ 1的含量。将胎鼠成纤维细胞分三组, 分别用普通培养液(DMEM/F12组)、含Hepal-6细胞上清液的条件培养液(Hepal-6组)以及加入1  $\mu$ mol/L TGF- $\beta$ 1受体抑制剂(GW788388)的条件培养液(GWHepal-6组)培养。采用免疫荧光双染法、qPCR检测培养的成纤维细胞中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)的蛋白质及mRNA表达水平。采用基质胶(Matrigel)血管形成实验检测成纤维细胞上清液作用下EA.hy 926细胞的血管形成能力。ELISA结果显示, 与DMEM/F12相比, Hepal-6细胞上清液中TGF- $\beta$ 1表达量明显升高( $P < 0.01$ )。免疫荧光双染法和qPCR结果显示, 与DMEM/F12组和GWHepal-6组比较, Hepal-6组成纤维细胞中 $\alpha$ -SMA和VEGFA蛋白质及mRNA相对水平明显增加( $P < 0.01$ ), 且在第5 d时达最高, 其上清液诱导EA.hy 926细胞的血管形成能力明显增强( $P < 0.01$ )。该研究表明, TGF- $\beta$ 1信号通路可以诱导成纤维细胞 $\alpha$ -SMA和VEGFA的表达, 进而促进EA.hy 926细胞形成小管样结构。

**关键词** TGF- $\beta$ 1; 成纤维细胞; 肌成纤维细胞;  $\alpha$ -SMA; VEGFA; 小管形成

The Role of TGF- $\beta$ 1 Signaling in Fibroblasts of Angiogenesis

Mao Xixian, Wang Wei, Li Dewei\*

(Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The aim of this study is to investigate the effect of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling pathway on angiogenesis promoted by fibroblasts *in vitro*. TGF- $\beta$ 1 released from Hepal-6 cells was determined by ELISA. Fetal mouse fibroblasts were divided into three groups, in which cells in DMEM/F12 group were cultured by ordinary culture medium, while those in Hepal-6 group were cultured by conditional medium containing Hepal-6 cell supernatant, and those in GWHepal-6 group were cultured by conditional medium containing Hepal-6 cell supernatant and GW788388 (1  $\mu$ mol/L), a TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitor. The protein and mRNA levels of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in cultured fetal mouse fibroblasts were determined by qPCR and immunofluorescence double staining, respectively. The tube formation of EA.hy 926 cells was detected by matrigel angiogenesis assay under the fibroblasts

收稿日期: 2015-12-13 接受日期: 2016-03-10

国家自然科学基金(批准号: 81470898)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

Received: December 13, 2015 Accepted: March 10, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81470898)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89011191, E-mail: lidewei406@sina.com

网络出版时间: 2016-05-19 16:54:09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160519.1654.002.html>

supernatant condition. The levels of TGF- $\beta$ 1 released from Hepa1-6 cells was significantly increased as compared with DMEM/F12 ( $P < 0.01$ ). The relative mRNA and protein levels of  $\alpha$ -SMA and VEGFA in Hepa1-6 group fibroblasts were significantly increased as compared with DMEM/F12 group and GWHepa1-6 group ( $P < 0.01$ ), and the highest levels was on the 5 day. The fibroblasts supernatant conditional medium in Hepa1-6 group enhanced the angiogenesis ability of EA.hy 926 cells ( $P < 0.01$ ). Our results suggested that TGF- $\beta$ 1 signaling pathways could promote the angiogenesis of EA.hy 926 cells via the levels of  $\alpha$ -SMA and VEGFA in fibroblasts.

**Keywords** TGF- $\beta$ 1; fibroblasts; myofibroblasts;  $\alpha$ -SMA; VEGFA; tube formation

肝细胞移植前景广阔<sup>[1]</sup>, 但血管化不足是移植肝细胞增殖困难和长期效果不理想的主要障碍<sup>[2-3]</sup>。虽然对移植细胞及组织的血管化研究较多, 但仍未取得实质性突破。研究表明, 作为肿瘤微环境中的重要组成成分, 成纤维细胞在肿瘤的发生、发展起了十分重要的作用<sup>[4]</sup>。成纤维细胞可被肿瘤分泌的多种细胞因子激活并上调多种促血管生成因子的表达, 进而对肿瘤新生血管的形成发挥至关重要的作用<sup>[5-7]</sup>。但其具体机制仍无定论。本研究探讨了转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)信号介导成纤维细胞促血管生成的作用, 以期为研究肝细胞移植后的血管生成奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Hepa1-6小鼠肝癌细胞由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。EA.hy 926细胞由本实验室冻存<sup>[8]</sup>。SPF级孕12~14 d昆明小鼠由重庆医科大学动物中心提供。

### 1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养基购自Gibco公司; 胎牛血清(FBS)购自PAN-Biotech GmbH公司; 0.25%胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗购自Hyclone公司; 小鼠TGF- $\beta$ 1 ELISA试剂盒购自Invitrogen公司; 基质胶(Matrigel)、TGF- $\beta$ 1受体抑制剂GW788388购自Sigma公司; 兔抗小鼠 $\alpha$ -SMA购自Abcam公司; 小鼠抗小鼠VEGFA-FITC购自Biorbyt公司; 荧光二抗Anti Alexa Fluor 647、Gaot-FITC购自R&D公司; DAPI购自碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂购自Western Biotechnology公司。

低温高速离心机购自Sigma公司; 荧光定量PCR仪FTC2000购自Canada公司; CelDoc2000凝胶

成像系统购自美国Bio-Rad公司; 激光扫描共焦显微镜购自德国Leica公司; 倒置相差显微镜购自日本Olympus公司。

### 1.3 Hepa1-6小鼠肝癌细胞培养与检测其上清液中TGF- $\beta$ 1的表达量

将Hepa1-6小鼠肝癌细胞用含10% FBS、1%青霉素链霉素双抗的DMEM/F12培养基制成浓度为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 取3 mL接种于50 mL一次性培养瓶中, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养48 h后, 收集细胞的上清液, 于4 °C、5 000 r/min离心10 min后放于-20 °C保存, 用于配制条件培养基。严格按照小鼠TGF- $\beta$ 1 ELISA试剂盒(Invitrogen公司)说明书操作, 检测收集的Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液中TGF- $\beta$ 1的表达量。

### 1.4 成纤维细胞的制备及分组

1.4.1 制备成纤维细胞 按照Boucherat等<sup>[9-10]</sup>的方法提取原代成纤维细胞。取孕14 d左右的昆明小鼠, 未行麻醉, 断颈处死, 75%酒精中浸泡5 min后置于超净工作台内, 相对无菌取出子宫, 置于含有1%青霉素链霉素双抗的冷PBS溶液中, 移至另一准备好的超净台中。剖开子宫, 去除胚胎表面的胎膜。将背部皮肤剪成约1 mm<sup>2</sup>大小的组织块, 离心, 加入5 mL 0.25%胰蛋白酶, 置于37 °C水浴箱中消化20 min, 每隔5 min震荡摇匀1次。加入等量含血清的培养液终止消化, 用200目的筛网滤过后以1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 加入含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养液, 吹打重悬, 将细胞接种于含3 mL培养液的细胞瓶内。最后将培养瓶置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h, 待成纤维细胞贴壁后换液, 除去培养瓶中的其他杂质细胞。

1.4.2 实验分组及培养基的制备 第1组用DMEM/F12培养基培养(DMEM/F12组), 第2组用收集好的

表1 荧光定量PCR检测引物  
Table 1 Primer sequences of qPCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
$\alpha$ -SMA	ACT CTC TTC CAG CCA TCT TTC ATT	CTT CGT CGT ATT CCT GTT TGC T
VEGFA	TGT TCA GAG CGG AGA AAG CAT	ACG TTC GTT TAA CTC AAG CTG C
GAPDH	AGG CCG GTG CTG AGT ATG TC	TGC CTG CTT CAC CAC CTT CT

Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液与等体积含20% FBS的2×DMEM/F12培养基混合在一起作为条件培养基(Hepa1-6组)<sup>[11]</sup>, 在Hepa1-6组培养基中加入1  $\mu$ mol/L TGF- $\beta$ 1抑制剂GW788388作为第3组的条件培养基(GWHepa1-6组)<sup>[5]</sup>。将成纤维细胞传代培养至第3~4代时分别用上述3种培养基连续培养5 d, 期间不传代, 隔天换液并观察细胞状态。

### 1.5 免疫荧光双染法检测各组成纤维细胞 $\alpha$ -SMA和VEGFA的表达

培养5 d后将3组成纤维细胞分别在培养板中进行爬片, PBS浸洗爬片3遍, 每次3 min。4%的多聚甲醛(PBS配制)常温固定细胞爬片15 min。PBS浸洗爬片3次, 每次3 min, 吸水纸吸干残留较多的PBS。0.5% Triton X-100(PBS配制)通透细胞15 min。在细胞爬片上滴加山羊血清, 室温封闭60 min。吸水纸吸掉封闭液, 不浸洗, 每张爬片上直接滴加足够量的稀释的一抗[ $\alpha$ -SMA和VEGFA-FITC混合, Anti  $\alpha$ -SMA(1:800)为兔来源; Anti VEGFA-FITC(1:800)为小鼠来源]并放入湿盒, 4  $^{\circ}$ C孵育过夜。取出湿盒, 37  $^{\circ}$ C复温45 min, PBS浸洗爬片3次, 每次5 min, 吸水纸吸干爬片上残留的PBS溶液后滴加稀释好的荧光二抗[Anti Alexa Fluor 647(1:1 000)、Gaot-FITC(1:1 000)], 放于湿盒中37  $^{\circ}$ C孵育60 min(注: 从此步起后面所有步骤均在暗室中进行)。PBS浸洗爬片3次, 每次5 min。滴加DAPI避光孵育5 min, 对本标本进行染核, PBS浸洗爬片3次, 每次5 min, 洗去多余的DAPI。用吸水纸吸干爬片上的残留PBS, 并用抗荧光淬灭剂封片。最后在激光共聚焦显微镜下观察采集图像。

### 1.6 qPCR检测各组成纤维细胞 $\alpha$ -SMA和VEGFA mRNA的表达

用Trizole试剂分别提取培养至第0、1、3、5 d 3组成纤维细胞总mRNA, 按照Western Biotechnology

反转录试剂盒说明书操作反转录为cDNA, 反转录条件: 25  $^{\circ}$ C 10 min, 42  $^{\circ}$ C 50 min, 85  $^{\circ}$ C 5 min。按照Western Biotechnology荧光定量PCR扩增试剂盒说明书操作, 扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C预变性4 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 60  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环35次; 72  $^{\circ}$ C检测信号。

### 1.7 基质胶小管形成实验

3组成纤维细胞条件培养基的收集: 分别取3组细胞各 $5 \times 10^6$ /mL, 3 mL接种于50 mL培养瓶中, 于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养4 d后更换含2% FBS的DMEM/F12培养基, 24 h后收集各组成纤维细胞上清作为小管形成实验的条件培养基。铺基质胶: 将基质胶以每孔40  $\mu$ L的量加入96孔板中, 放入37  $^{\circ}$ C细胞培养箱内1 h备用。在基质胶中加入EA.hy 926细胞: 取EA.hy 926细胞 $3 \times 10^4$ /孔接种于96孔板中, 设置5个平行复孔。观察基质胶上EA.hy 926细胞形成的小管并计数: 8 h后在倒置显微镜下观察并照相, 任取10个视野拍照并计数成管数。

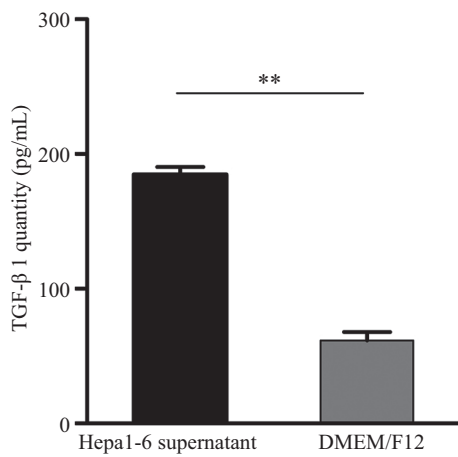
### 1.8 数据统计

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。TGF- $\beta$ 1蛋白质表达量、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)和血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)mRNA表达量及各组EA.hy 926细胞成管数(个), 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3组间样本均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异显著,  $P < 0.01$ 认为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液中TGF- $\beta$ 1蛋白质表达量

采用免疫酶联吸附试验(ELISA)测得培养48 h后Hepa1-6小鼠肝癌细胞上清液中TGF- $\beta$ 1蛋白质表达量为 $184.95 \pm 5.49$  pg/mL, 明显高于对照组(含10%



\*\* $P < 0.01$ .

图1 ELISA检测Hepa1-6细胞上清液TGF-β1的表达量

Fig.1 Determination of the quantity of TGF-β1 in Hepa1-6 cells supernatant by ELISA

FBS的DMEM/F12培养液)中TGF-β1蛋白质表达量( $61.53 \pm 6.38$  pg/mL,  $P < 0.01$ )(图1)。

## 2.2 免疫荧光双染法检测各组成纤维细胞α-SMA和VEGFA的表达

成纤维细胞经3种不同的培养液培养5 d后进行α-SMA与VEGFA的免疫荧光双染。结果显示, Hepa1-6组成纤维细胞大量表达α-SMA蛋白质, 且可同时大量表达VEGFA蛋白质, 表明激活的成纤维细胞可以大量表达VEGFA蛋白质, 未激活的成纤维细胞则很少表达VEGFA蛋白质。GWHepa1-6组和DMEM/F12组成纤维细胞中α-SMA蛋白质表达明显较少, 表明成纤维细胞几乎不被激活, 同时VEGFA的表达也较少(图2)。以上结果提示, 当培养液中含有大量TGF-β1时, 成纤维细胞可被大量激活, 而当

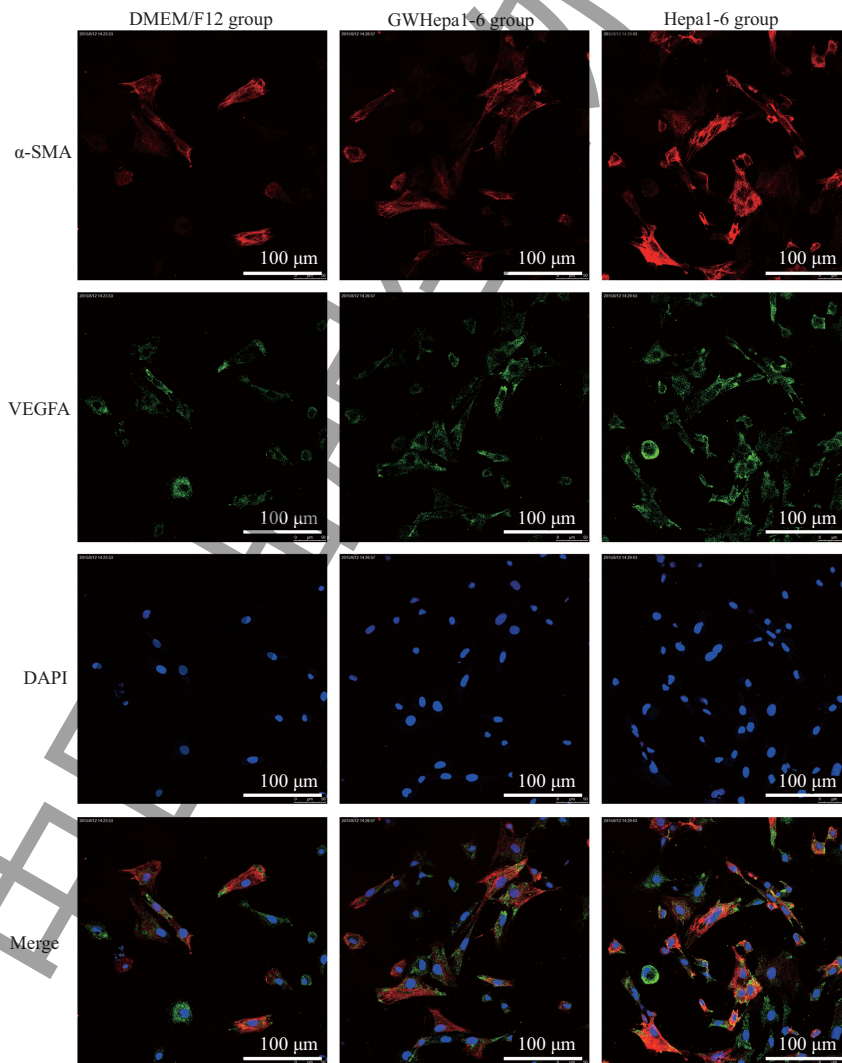
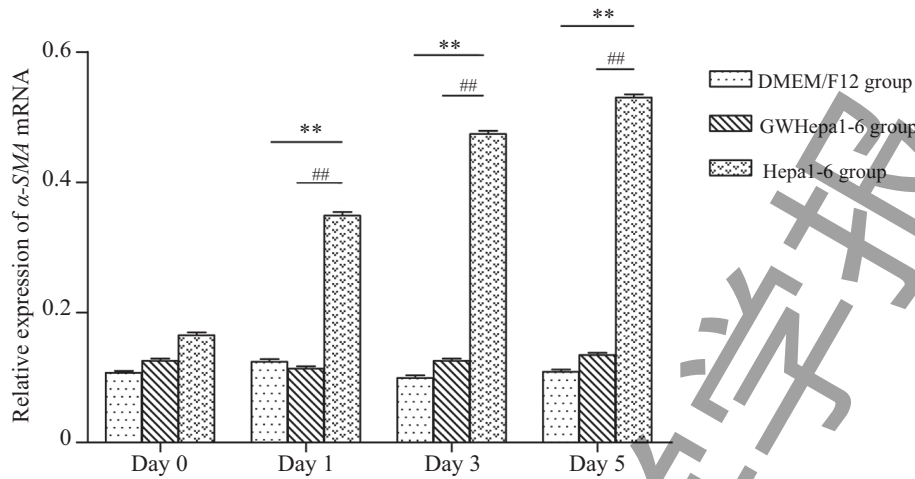


图2 免疫荧光双染法检测α-SMA和VEGFA的表达情况

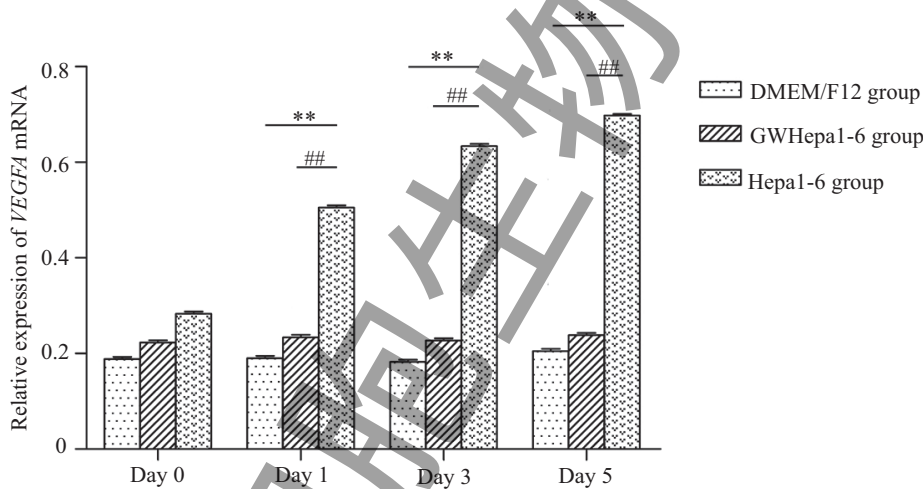
Fig.2 Expressions of α-SMA and VEGFA detected by immunofluorescence double staining



\*\* $P < 0.01$ , ## $P < 0.01$ .

图3 qPCR检测不同培养液培养的成纤维细胞中 $\alpha$ -SMA基因的mRNA水平

Fig.3 Determination of mRNA levels of  $\alpha$ -SMA in fibroblasts in various media by qPCR



\*\* $P < 0.01$ , ## $P < 0.01$ .

图4 qPCR检测不同培养液培养的成纤维细胞中VEGFA基因的mRNA水平

Fig.4 Determination of mRNA levels of VEGFA in fibroblasts in various media by qPCR

TGF- $\beta$ 1信号被阻断或培养液中只含有少量TGF- $\beta$ 1时,成纤维细胞几乎不被激活且很少表达VEGFA蛋白质(图2)。

### 2.3 3组不同培养液培养的成纤维细胞中 $\alpha$ -SMA和VEGFA基因mRNA水平

qPCR结果显示,DMEM/F12组和GWHepa1-6组成纤维细胞在5 d的培养过程中, $\alpha$ -SMA和VEGFA基因的mRNA水平无明显变化。Hepa1-6组成纤维细胞在第5 d时 $\alpha$ -SMA和VEGFA基因mRNA水平最高,且从第1 d开始在同一时间点明显高于DMEM/F12组和GWHepa1-6组的mRNA水平( $P < 0.05$ ),第3 d以

后mRNA水平稳定(图3和图4)。

### 2.4 3组成纤维细胞上清液促进EA.hy 926细胞成管能力的检测

采用基质胶血管生成实验检测培养5 d后3组成纤维细胞上清液促进EA.hy 926细胞的成管能力,培养8 h后,在200倍光学显微镜下观察,DMEM/F12组小管样结构数为(6.3 $\pm$ 1.7)个,GWHepa1-6组小管样结构数为(5.9 $\pm$ 1.9)个,Hepa1-6组小管样结构数为(18.2 $\pm$ 2.8)个,结果表明,Hepa1-6组成纤维细胞上清液能诱导EA.hy 926细胞交联形成的小管样结构数明显多于GWHepa1-6组( $P < 0.01$ )和DMEM/F12组

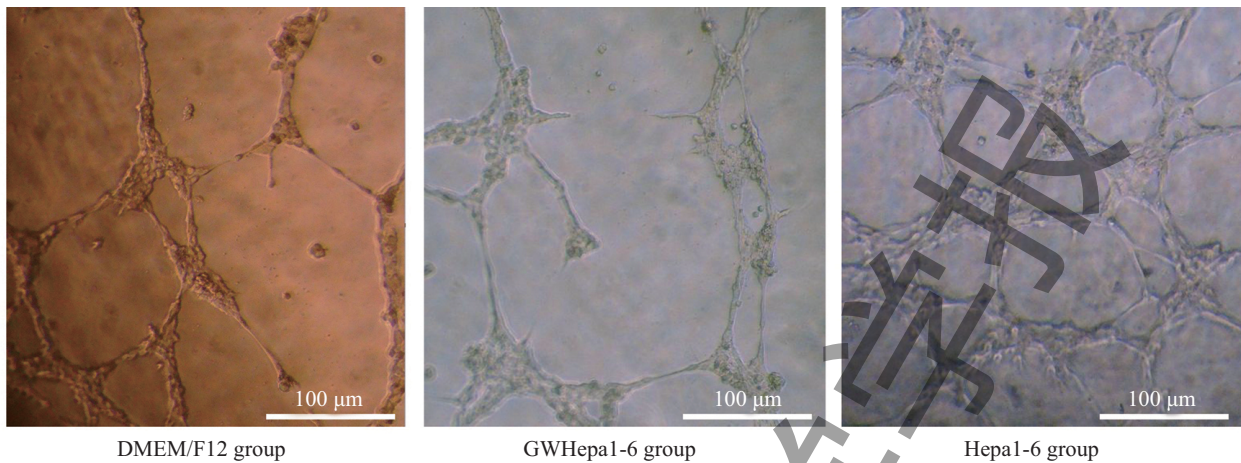


图5 不同成纤维细胞上清液诱导EA.hy 926细胞的成管情况

Fig.5 The situation of tube formation induced by different fibroblasts supernatant

( $P < 0.01$ )。以上结果提示, Hepl-6组成纤维细胞可以分泌大量促血管生成因子, 进而诱导EA.hy 926细胞形成小管样结构(图5)。

### 3 讨论

由于供肝的短缺, 使得肝细胞移植作为另一种治疗终末期肝病的可行方法越来越受到人们的关注。但血管化不足仍是导致移植肝细胞长期存活和增殖困难的主要障碍。因此, 促进肝细胞移植后血管化是移植成功与否的关键步骤<sup>[3]</sup>。成纤维细胞在肿瘤血管生成中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>, 其在肿瘤分泌的多种细胞因子作用下被激活, 并表达多种促血管生成因子, 从而促进肿瘤血管生成。因此, 这对利用激活的成纤维细胞来促进移植肝细胞血管化有很大的帮助。

肿瘤细胞分泌的细胞因子众多, 究竟是何种信号在介导成纤维细胞促进肿瘤血管生成中发挥关键性作用还不十分清楚。肿瘤组织中成纤维细胞被激活的方式可能包括TGF- $\beta$ 1、COX-2/PGE2、Wnt等信号途径, 但Noma等<sup>[5]</sup>和Guo等<sup>[6]</sup>的研究显示, 单独激活TGF- $\beta$ 1信号通路可以激活成纤维细胞并能促进肿瘤血管生成, 提示TGF- $\beta$ 1信号通路可能在肿瘤血管生成过程中发挥关键性作用。同时, TGF- $\beta$ 1还有促进细胞增殖、分化以及修复受损组织等作用, 这些都为我们利用TGF- $\beta$ 1信号通路激活成纤维细胞提供了有利条件。

为了更好地研究TGF- $\beta$ 1信号通路是否在介导成纤维细胞促血管生成中发挥重要作用, 我们通过ELISA检测了小鼠肝癌细胞上清液中TGF- $\beta$ 1的表达情况, 发现其含量明显高于对照组, 证实了肿瘤细胞可以分泌大量的TGF- $\beta$ 1<sup>[13]</sup>。有研究表明, TGF- $\beta$ 1可以使成纤维细胞表型发生改变, 并使其稳定地分化为以 $\alpha$ -SMA为标志的肌成纤维细胞<sup>[14-15]</sup>。而肌成纤维细胞又可以表达多种促血管生成因子<sup>[16]</sup>, 如COX-2、HGF和VEGFA等, 其中COX-2的表达又可以促进VEGFA表达<sup>[17]</sup>, 而VEGFA是肿瘤新生血管形成过程中最重要的细胞因子之一, 它可以促进血管内皮细胞增殖、分化并诱导其形成小管样结构<sup>[18]</sup>。这为我们通过TGF- $\beta$ 1信号通路促进成纤维细胞中VEGFA等促血管因子表达, 进而促进移植肝细胞血管形成提供了理论基础。

本实验研究中, 当对Hepl-6和DMEM/F12组成纤维细胞进行研究时发现, 免疫荧光、qPCR均表明, 随着培养时间的延长 $\alpha$ -SMA表达量有所增加, 同时伴有VEGFA表达量的增加, 且只有当成纤维细胞激活为以 $\alpha$ -SMA为标志物的肌成纤维细胞时, VEGFA的表达量才会增加, 反之则不然, 这可能与肿瘤细胞上清液中的某些细胞因子有关<sup>[19]</sup>。然而, 当在Hepl-6组中加入1  $\mu$ mol/L TGF- $\beta$ 1受体抑制剂(GW788388)后,  $\alpha$ -SMA和VEGFA的表达不再随培养时间的延长而增加, 且与DMEM/F12组相比, 在同一时间点的表达量没有明显差异。这说明, TGF- $\beta$ 1不

仅具有维持肌成纤维细胞表型的作用,还具有间接上调成纤维细胞中VEGFA表达的作用。研究表明,TGF- $\beta$ 1能有效加快成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的速度<sup>[20-21]</sup>,而其是否是维持肌成纤维细胞表型所必需的还没有相关报道,有待进一步研究。

在本研究中,基质胶血管生成实验显示,Hepal-6组成纤维细胞上清液诱导形成的小管数明显多于其他两组,证实了TGF- $\beta$ 1信号通路激活的成纤维细胞上清液中含大量如COX-2、HGF和VEGFA等促血管生成因子,这与我们免疫荧光和qPCR结果一致。DMEM/F12组中小管形成数较少,可能是因为其培养液中含有少量的TGF- $\beta$ 1所致。GMHepal-6组中也有少量的小管形成,可能是成纤维细胞表面的TGF- $\beta$ 1受体未被完全阻断。由此可见,通过TGF- $\beta$ 1信号途径激活的成纤维细胞能有效介导血管生成,其可能是肌成纤维细胞分泌多种促血管生成因子直接与血管内皮细胞联系,进而促进血管生成<sup>[7]</sup>,具体机制尚不清楚,有待进一步研究。

综上所述,本研究发现,含有大量TGF- $\beta$ 1的小鼠肝癌细胞上清液能激活成纤维细胞,并使其在短时间内稳定表达 $\alpha$ -SMA和VEGFA。但当TGF- $\beta$ 1信号通路被阻断后,成纤维细胞几乎不能被激活,且很少表达 $\alpha$ -SMA和VEGFA。这进一步证实,肿瘤主要是通过TGF- $\beta$ 1信号通路激活成纤维细胞,从而达到促肿瘤血管生成作用。因此,TGF- $\beta$ 1信号通路在介导成纤维细胞促血管生成的过程中发挥着重要作用,为我们通过TGF- $\beta$ 1信号通路利用成纤维细胞解决肝细胞移植后血管化不足的问题提供了理论基础。

### 参考文献 (References)

- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2012; 93(4): 342-7.
- Yap KK, Dingle AM, Palmer JA, Dhillon RS, Lokmic Z, Penington AJ, *et al.* Enhanced liver progenitor cell survival and differentiation *in vivo* by spheroid implantation in a vascularized tissue engineering chamber. *Biomaterials* 2013; 34(16): 3992-4001.
- Hou YT, Ijima H, Takei T, Kawakami K. Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis. *J Biosci Bioeng* 2011; 112(3): 265-72.
- Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature* 2004; 427(6977): 787.
- Noma K, Smalley KS, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, E1-Deiry W, *et al.* The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134(7): 1981-93.
- Guo X, Oshima H, Kitamura T, Taketo MM, Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem* 2008; 283(28): 19864-71.
- Velazquez OC, Snyder R, Liu ZJ, Fairman RM, Herlyn M. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J* 2002; 16(10): 1316-8.
- Meri S, Mattila P, Renkonen R. Regulation of CD59 levels on the human endothelial cell line EA.hy 926. *Eur J Immunol* 1993; 23(10): 2511-6.
- Boucherat O, Franco-Montoya ML, Thibault C, Incitti R, Chaillley-Heu B, Delacourt C, *et al.* Gene levels profiling in lung fibroblasts reveals new players in alveolarization. *Physiol Genomics* 2007; 32(1): 128-41.
- Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello LA, Rubin LP. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(3): L448-56.
- 肖衡, 杜成友, 罗诗樵, 刘定志. 不同浓度肿瘤细胞上清液对成纤维细胞生长及表型转化的影响. 第三军医大学学报(Xiao Heng, Du Chengyou, Luo Shiqiao, Liu Dingzhi. Effect of different concentrations of tumor cell supernatant on growth and phenotypic transition of fibroblasts. *Journal of Third Military Medical University*) 2011; 33(23): 2454-8.
- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(1): 33-9.
- Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF $\beta$  in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(11): 788-99.
- 肖衡, 杜成友, 罗诗樵, 刘定志, 潘龙. 肿瘤细胞上清液对成纤维细胞表型转变及血管内皮生长因子-A表达的影响. 中国普外基础与临床杂志(Xiao Heng, Du Chengyou, Luo Shiqiao, Liu Dingzhi, Pan Long. Influences of tumor cells supernatant on phenotypic transition of fibroblasts and levels of vascular endothelial growth factor-A. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*) 2012; 19(2): 129-33.
- Yang L, Chang N, Liu X, Han Z, Zhu T, Li C, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor-beta1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am J Pathol* 2012; 181(1): 85-97.
- Du W, Xie Y, Li D, Chen Y. CBRH-7919 cell supernate promotes fibroblasts to express cyclooxygenase-2 and hepatocyte growth factor. *Transplant Proc* 2014; 46(4): 1237-9.
- Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, *et al.* Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal

- polyps. *Cancer Res* 2002; 62(2): 506-11.
- 18 Zhu HM, Tang WX, Zhou WP. Study on the angiogenic ability of tumor fibroblasts. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11(12): 735-8.
- 19 Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432(7015): 332-7.
- 20 Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(9): 4219-23.
- 21 Meyer-Ter-Vehn T, Gebhardt S, Sebald W, Buttman M, Grehn F, Schlunck G, *et al.* p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(4): 1500-9.

中国细胞生物学杂志