



· 论 著 ·

# 炎症癌相关成纤维细胞介导结直肠癌细胞耐药的机制研究

蔡家洛<sup>1, 2</sup>, 朱锐秋<sup>1, 3</sup>, 李 森<sup>1</sup>, 曹亦军<sup>1</sup>, 黄 坊<sup>4</sup>

1. 上海中医药大学附属普陀医院普外科, 上海 200062;
2. 华东理工大学药学院, 上海 200237;
3. 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062;
4. 上海中医药大学附属普陀医院病理科, 上海 200062

[摘要] 背景与目的: 结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 但是其产生肿瘤耐药的机制仍不清楚。肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME), 尤其是其中的癌相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblast, CAF), 在肿瘤的发生、发展及耐药过程中都发挥重要作用。本研究旨在探讨炎症CAF (inflammatory CAF, iCAF) 对CRC细胞耐药的影响及可能的分子机制。方法: 提取来自上海中医药大学附属普陀医院 (2022年8月—2022年9月) 诊治的CRC患者并经手术切除的CRC组织以获得原代CAF [获得上海中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准, 编号: PTEC-A-2023-5 (S)-1], 按照CAF的表面标志物血小板源性生长因子受体 $\alpha$  (platelet derived growth factor receptor  $\alpha$ , PDGFRA) 对原代细胞进行分选, 筛选出iCAF。使用不添加血清的培养基分别对人结肠成纤维细胞 (human intestinal fibroblast, HIF) 和iCAF进行培养以获取HIF条件培养基 (HIF-conditioned medium, HIF-CM) 和iCAF条件培养基 (iCAF-conditioned medium, iCAF-CM)。根据处理方式将结肠癌细胞分为对照组 (不处理)、实验组1 (加入HIF-CM) 和实验组2 (加入iCAF-CM)。观察经HIF或iCAF刺激后CRC细胞的存活率变化、凋亡率、蛋白水平、mRNA水平变化及对Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路的影响。结果: 经iCAF刺激后, CRC细胞的半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC<sub>50</sub>) 较对照组和HIF-CM组升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组和HIF-CM组相比, iCAF-CM组肿瘤细胞的凋亡率明显下降, 凋亡蛋白caspase-3的表达量下降, 抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL和survivin表达量均上升 ( $P < 0.05$ )。iCAF-CM组Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路被激活。结论: iCAF可以介导CRC细胞产生耐药, 其机制与激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路有关。

[关键词] 结直肠癌; 炎症癌相关成纤维细胞; 耐药; Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路

中图分类号: R735.3+5; R735.3+7 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.12.001

## Mechanism of inflammatory cancer-associated fibroblast-mediated drug resistance in colorectal cancer cells

CAI Jialuo<sup>1,2</sup>, ZHU Ruiqiu<sup>1,3</sup>, LI Sen<sup>1</sup>, CAO Yijun<sup>1</sup>, HUANG Fang<sup>4</sup> (1. Department of General Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062, China; 4. Department of Pathology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

Correspondence to: HUANG Fang, E-mail: fangfang830805@163.com.

[Abstract] **Background and purpose:** Colorectal cancer (CRC) is one of the common malignancies, but the mechanism by which it develops resistance to drug remains unclear. The tumor microenvironment (TME), especially cancer-associated fibroblast (CAF), plays an important role in the occurrence, development and drug resistance of tumors. This study aimed to investigate the effect of inflammatory cancer-associated fibroblasts (iCAF) on drug resistance in CRC cells and its possible mechanism. **Methods:** The primary CAFs were collected from CRC patients underwent surgery in Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional

基金项目: 上海市普陀区中心医院雏鹰计划 (2022-RCCY-08)。

第一作者: 蔡家洛 (ORCID: 0009-0001-8102-026X), 硕士。

通信作者: 黄坊 (ORCID: 0009-0005-2372-4639), 硕士, 主治医师, E-mail: fangfang830805@163.com。

Chinese Medicine from Aug. 2022 to Sep. 2022, and the primary cells were sorted according to the surface marker of CAF [ approved by the Ethics Committee of Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine: PTEC-A-2023-5(S)-1 ], platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA), to screen iCAF. Human intestinal fibroblast (HIF) and iCAF cells were cultured using serum-free medium to obtain conditioned medium. According to the treatment method, colon cancer cells were divided into control group (no treatment), experimental group 1 (treated with HIF-CM) and experimental group 2 (treated with iCAF-CM). We observed the changes in the survival rate and apoptotic rate of CRC cells, the changes in protein and mRNA levels and the effect on the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway after stimulation with HIF-CM or iCAF-CM. **Results:** After iCAFs stimulation, the half inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) of CRC cells was higher compared with the control group and HIF-CM group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group and HIF-CM group, the apoptotic rate of tumor cells in iCAF-CM group decreased significantly, the expression of caspase-3 was decreased, and the expressions of Bcl-2, Bcl-xL and survivin were increased ( $P < 0.05$ ). The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway was activated in the iCAF-CM group. **Conclusion:** iCAFs can mediate drug resistance in CRC cells, and the mechanism is related to the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

[ **Key words** ] Colorectal cancer; Inflammatory cancer-associated fibroblasts; Drug resistance; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化系统恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。尽管针对癌症进展的新药不断涌现, 但耐药性问题仍然是该领域的一个挑战<sup>[2]</sup>。近年来, 肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 在化疗耐药中的重要性已广受关注<sup>[3]</sup>。癌相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblast, CAF) 是TME的主要组成成分, 其分泌的细胞因子、趋化因子等参与肿瘤的发生、增殖、侵袭、转移和耐药过程。CAF具有异质性, 分为肌成纤维CAF (myofibroblastic CAF, myCAF)、炎症CAF (inflammatory CAF, iCAF) 和抗原提呈CAF (antigen-presenting CAF, apCAF)<sup>[4]</sup>。CAF因其独特的细胞状态和多种机制介导的促肿瘤功能, 成为分析TME在化疗耐药中作用的重要靶点<sup>[5]</sup>。iCAF作为CAF的炎症亚型, 通过产生细胞因子等物质参与肿瘤的耐药过程<sup>[6]</sup>。然而, iCAF对CRC耐药的影响还有待确定。本研究以iCAF无血清培养刺激iCAF分泌炎症因子以获得条件培养基, 再以iCAF条件培养基 (iCAF-conditioned medium, iCAF-CM) 刺激CRC细胞, 探讨iCAF与CRC细胞耐药的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

人结肠癌RKO细胞、HCT116细胞购自美

国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 细胞库, 人肠成纤维细胞 (human intestinal fibroblast, HIF) 购自美国ScienCell研究实验室, CRC组织来源的CAF从CRC患者 (于2022年8月—2022年9月在上海中医药大学附属普陀医院经手术切除) 的癌组织中分离得到。细胞培养条件是37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%。组织标本的使用均征得患者的知情许可。本研究获得上海中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准 [ 伦理批件编号: PTEC-A-2023-5 (S)-1 ]。

#### 1.1.2 试剂

DMEM培养基、RPMI-1640培养基、双抗、胰酶均购自美国Gibco公司, 上样缓冲液、RIPA裂解液均购自美国CST公司, 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本同仁化学研究所; Annexin V-EGFP/PI细胞凋亡检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, TritonX-100、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulphate, SDS)、免疫染色固定液、细胞核蛋白抽提试剂盒均购自上海Beyotime公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 试剂盒购自美国EZBioscience公司。

#### 1.1.3 仪器

酶标仪、PCR仪均购自美国Thermo Fisher公

司, 凝胶电泳仪购自美国Bio-Rad公司, 共聚焦显微镜购自德国Zeiss公司, CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养

分别用RPMI-1640和DMEM培养基 [ 加入100 U/L青霉素+链霉素, 10%胎牛血清 ( fetal bovine serum, FBS ) ] 对冻存的HCT116、RKO和HIF细胞进行复苏, 以 $1 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>进行培养, 置于细胞培养箱中 ( 37 ℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5% )。待细胞数量长至对数期时, 进行传代。

### 1.2.2 提取原代CAF

取患者新鲜CRC组织标本, 采用组织块培养法分离培养CAF。

### 1.2.3 免疫荧光

CAF ( $2 \times 10^4$ ) 在显微镜玻片上接种培养过夜。用PBS洗涤2次, 甲醇固定15 min, 0.2% TritonX-100渗透5 min, 在室温下使用5%牛血清白蛋白 ( bovine serum albumin, BSA ) 封闭1 h后, 4 ℃下一抗 [ FAP ( 1 : 100稀释, 兔源 )、血小板源性生长因子受体  $\alpha$  ( platelet derived growth factor receptor alpha, PDGFRA ) ( 1 : 500稀释, 兔源 ) ] 温育过夜, 然后与二抗 [ 山羊抗小鼠IgGH&L ( AlexaFluor<sup>®</sup>488 ) ] 和 [ 山羊抗兔IgGH&L ( AlexaFluor<sup>®</sup>594 ) ] 温育2 h。用DAPI进行核定位评估。

### 1.2.4 筛选iCAF并获得iCAF-CM

从参考文献<sup>[7]</sup>可知, PDGFRA是iCAF的标志物, 因此本研究使用PDGFRA作为筛选iCAF的标志物, 通过免疫荧光, 从CAF中筛选出高表达PDGFRA的CAF, 即为iCAF。

### 1.2.5 获得条件培养基

单独培养HIF和iCAF, 当细胞生长至80%时, 将培养基更换为不含FBS的培养基。处理48 h后, 收集细胞悬液作为条件培养基。高速离心后收集条件培养基, 用0.22  $\mu$ m微孔膜过滤, 于-20 ℃冰箱保存。

### 1.2.6 实验分组

将肿瘤细胞分为对照组 ( 仅加入培养基 )、实验组1 [ 加入HIF条件培养基 ( HIF-conditioned

medium, HIF-CM ) ] 和实验组2 ( 加入iCAF-CM )。每组均设置HCT116和RKO两种肿瘤细胞。

### 1.2.7 CCK-8法检测肿瘤细胞存活率

以 $2 \times 10^4$ 个/孔分别接种HCT116和RKO细胞到96孔板中培养24 h, 随后分别使用奥沙利铂 ( oxaliplatin, OXA ) 和5-FU药物作用24 h, 以每孔100  $\mu$ L CCK-8溶液加入孔中, 培养温育30 min, 于450 nm波长处检测吸光度 ( D ) 值。实验重复3次, 取平均值。

### 1.2.8 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡率

选择各组中对照组的1/2半数抑制浓度 ( half inhibition concentration, IC<sub>50</sub> ) 作为诱导凋亡的药物浓度, 给药24 h后, 使用Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡, 根据两种染料不同的激发波长, 分别使用流式细胞仪所带的异硫氰酸荧光素 ( fluorescein isothiocyanate, FITC ) 和PE通道对样品进行检验。

### 1.2.9 蛋白质印迹法 ( Western blot ) 检测caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL和survivin蛋白水平

分别用HIF-CM和iCAF-CM对肿瘤细胞进行刺激。48 h后, 用对照组IC<sub>50</sub>浓度的OXA和5-FU分别对肿瘤细胞进行处理。24 h后, PBS冲洗且在冰上裂解后, 4 ℃超速离心, 提取上清液, 定量。随后沸水中煮5 min, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE ) 凝胶分离, 转移到聚偏二氟乙烯 ( polyvinylidene fluoride, PVDF ) 膜上, 在5%脱脂奶粉中封闭1.5 h后加入一抗鼠抗 $\beta$ -actin ( 1 : 5 000 )、兔抗caspase-3 ( 1 : 1 000 )、鼠抗Bcl-2 ( 1 : 1 000 )、兔抗Bcl-xL ( 1 : 1 000 )、兔抗survivin ( 1 : 500 ) 于4 ℃摇床温育过夜, 用含有吐温-20三乙醇胺缓冲盐溶液 ( tris-buffered saline Tween, TBST ) 漂洗后, 加入辣根过氧化物酶 ( horseradish peroxidase, HRP ) 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G ( immunoglobulin G, IgG ) ( 1 : 20 000 ) 和山羊抗兔IgG ( 1 : 20 000 ) 室温温育1 h, 随后用TBST漂洗, 采用电化学发光 ( electrochemical luminescence, ECL ) 法, 在凝胶成像系统中曝

光检测, 用Image J 软件对Western blot结果进行定量分析。

1.2.10 用RTFQ-PCR法检测caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL和survivin的mRNA表达水平

裂解液裂解细胞后, 使用RNA快速提取试剂盒提取细胞总RNA, 反转录合成cDNA, 随后用RTFQ-PCR检测caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL和survivin的mRNA表达, 扩增条件为: 95 °C 预变性5 min进入循环, 95 °C 变性45 s, 54 °C 退火45 s, 72 °C 1 min, 共30个循环, 72 °C 延伸5 min, 以 $\beta$ -actin为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量,  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。引物设计时,  $\beta$ -actin的上游引物序列为5'-CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-3', 下游引物序列为5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'; Caspase-3的上游引物序列为5'-CCAAAGATCATAACATGGAAGCG-3', 下游引物序列为5'-CTGAATGTTTCCCTGAGGTTTG-3'; Bcl-2的上游引物序列为5'-GACTTCGCCGAGATGTCCAG-3', 下游引物序列为5'-GAACTCAAAGAAGGCCACAATC-3'; Bcl-xL的上游引物序列为5'-GCATATCAGAGCTTTGAACAGG-3', 下游引物序列为5'-GAAGGAGAAAAAGGCCACAATG-3'; Survivin的上游引物序列为5'-CCGCATCTCTACATTCAAGAAC-3', 下游引物序列为5'-CTCCTTGAAGCAGAAGAAACAC-3'。

1.2.11 通过Western blot探究iCAF对Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路的影响

采用条件培养基和对照组IC<sub>50</sub>浓度的OXA和5-FU处理细胞, 使用细胞核蛋白抽提试剂盒提取核内蛋白。采用Western blot检测肿瘤细胞总蛋白的表达水平以及细胞核中 $\beta$ -catenin和Lamin B1蛋白的表达水平。

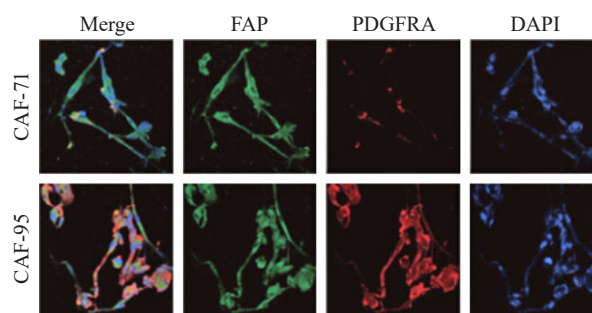
### 1.3 统计学处理

数据用GraphPad Prism 7和SPSS 25.0软件进行统计分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和Tukey's multiple comparisons test进行组间比较,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 原代CAF提取及亚型鉴定

首先使用CRC组织标本提取原代CAF, 对细胞株命名为CAF-71和CAF-95。镜下观察其形态呈长梭形 (图1)。提取的原代细胞表达CAF常见表面标志物FAP和PDGFRA, 表明提取的原代细胞是成纤维细胞, 其中CAF-95对PDGFRA高表达, 为iCAF, 因此选用CAF-95细胞进行培养并获得条件培养基 (95-CM), 以便后续实验的进行。



(CAF immunofluorescence confocal microscope,  $\times 400$ )

图1 原代CAF验证及筛选

Fig. 1 Primary CAF verification and screening

### 2.2 CRC细胞的IC<sub>50</sub>升高

随着OXA和5-FU药物浓度的上升, HCT116和RKO细胞的存活率不断下降。结果显示, HCT116细胞中, 对照组OXA的IC<sub>50</sub>为10.701 4  $\mu\text{mol/L}$ , HIF-CM组OXA的IC<sub>50</sub>为12.972 2  $\mu\text{mol/L}$ , 95-CM组OXA的IC<sub>50</sub>为30.380 4  $\mu\text{mol/L}$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.000 1$ ); RKO细胞中, 对照组OXA的IC<sub>50</sub>为29.785 5  $\mu\text{mol/L}$ , HIF-CM组OXA的IC<sub>50</sub>为32.536 8  $\mu\text{mol/L}$ , 95-CM组OXA的IC<sub>50</sub>为55.690 8  $\mu\text{mol/L}$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.000 1$ )。HCT116细胞中, 对照组5-FU的IC<sub>50</sub>为87.531 2  $\mu\text{mol/L}$ , HIF-CM组5-FU的IC<sub>50</sub>为86.861 9  $\mu\text{mol/L}$ , 95-CM组5-FU的IC<sub>50</sub>为135.781 0  $\mu\text{mol/L}$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); RKO细胞中, 对照组5-FU的IC<sub>50</sub>为18.235 5  $\mu\text{mol/L}$ , HIF-CM组5-FU的IC<sub>50</sub>为21.732 0  $\mu\text{mol/L}$ , 95-CM组5-FU的

IC<sub>50</sub>为36.817 9 μmol/L, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图2)。95-CM培养后, HCT116和RKO细胞对OXA和5-FU的IC<sub>50</sub>明显升高, 存活率升高, 说明经iCAF刺激后, CRC细胞可能产生了耐药。

### 2.3 iCAF抑制CRC细胞凋亡

两种癌细胞在两种抗肿瘤药物的分别作用下, 相较于对照组和HIF-CM组, 95-CM组中的细胞凋亡水平明显下降(图3)。

为验证以上结果, 我们进一步检测了iCAF

刺激的肿瘤细胞中凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的表达水平变化(图4)。与对照组和HIF-CM组相比, 95-CM组中, 凋亡蛋白caspase-3的表达水平明显下降, 而抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL和survivin的表达水平均有所上升 ( $P < 0.05$ )。采用RTFQ-PCR检测了以上几种蛋白的mRNA水平, 所得结果与Western blot一致, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图5)。上述结果说明经iCAF刺激后, 肿瘤细胞的凋亡减少, 也就证明iCAF能够介导CRC细胞耐药。

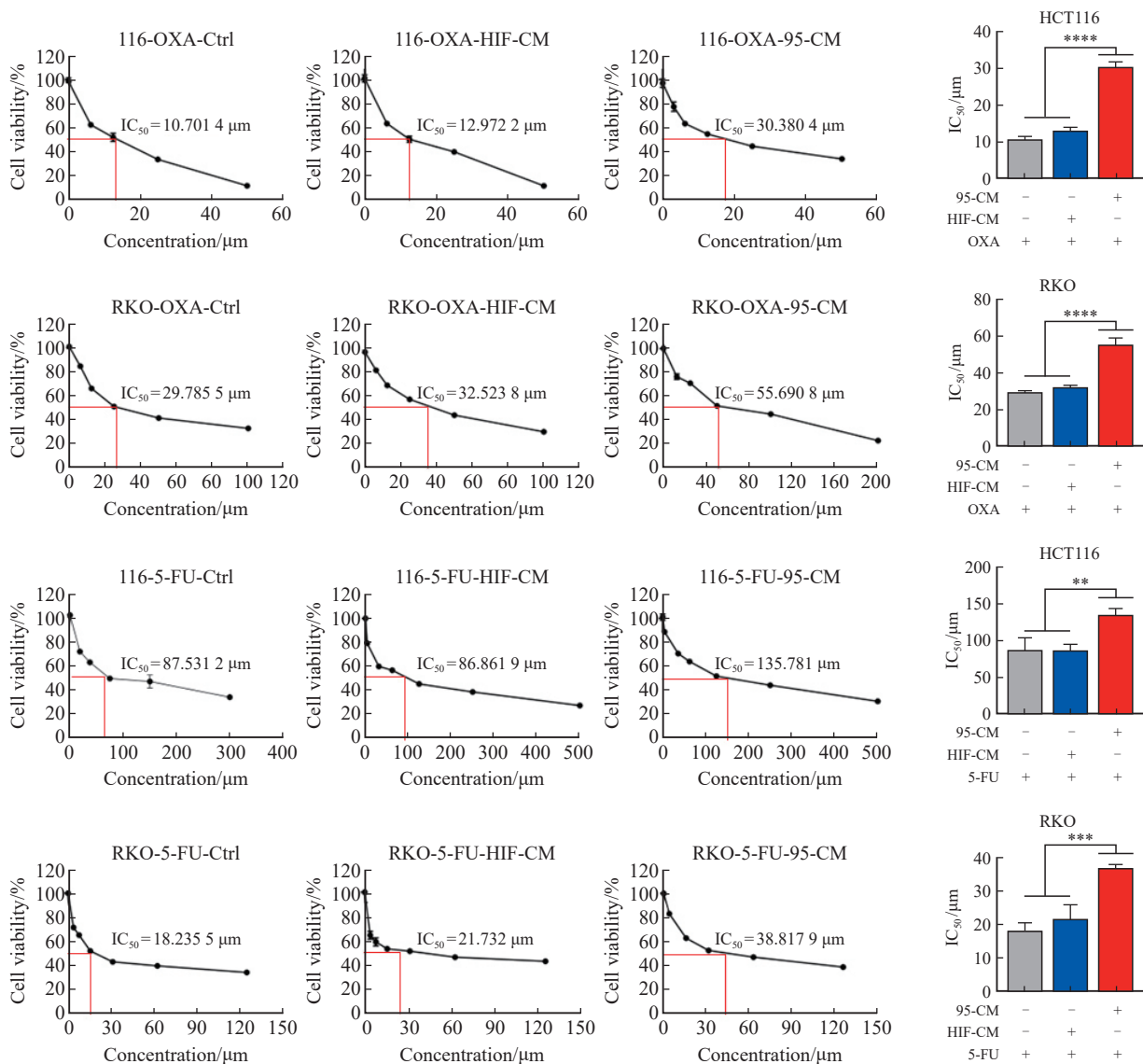


图2 CCK-8检测加入95-CM前后肿瘤细胞的存活率变化

Fig. 2 Cell viability of tumor cells treated with or without 95-CM tested by CCK-8

\*\*: $P < 0.01$ , compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group; \*\*\*: $P < 0.001$ , compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group; \*\*\*\*: $P < 0.0001$ , compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group.

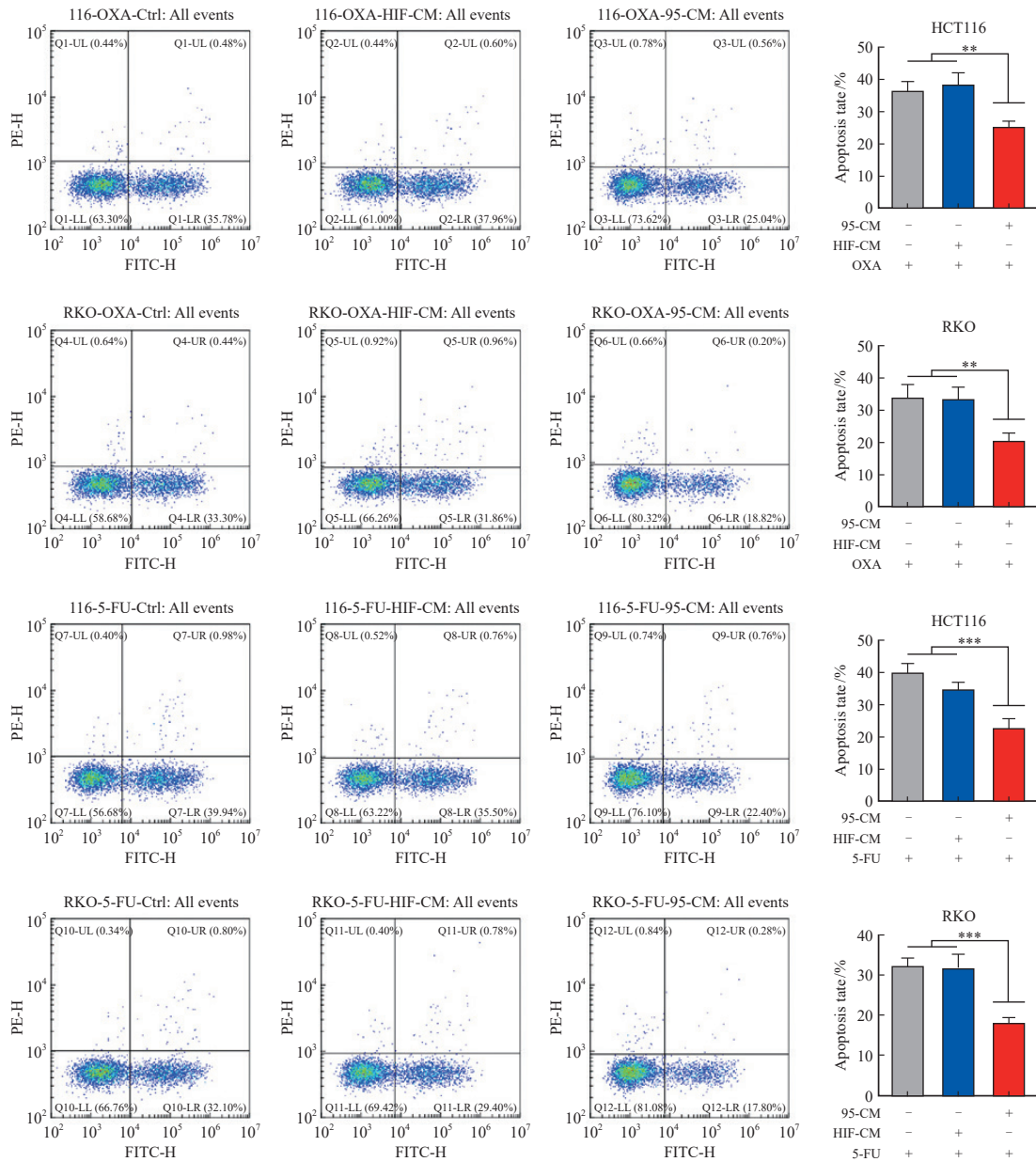


图3 流式细胞术检测加入95-CM前后肿瘤细胞的凋亡水平变化

Fig. 3 Apoptosis rate of tumor cells treated with or without 95-CM tested by flow cytometry

\*\**P*<0.01, compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group; \*\*\**P*<0.001, compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group.

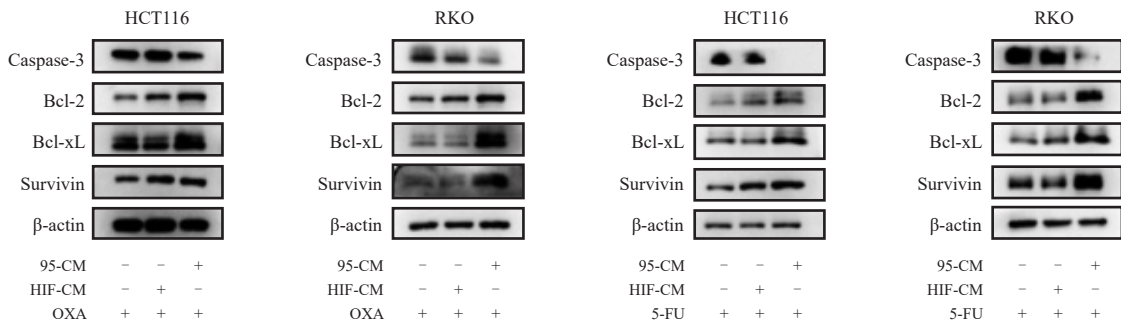


图4 Western blot检测β-actin、caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL和survivin的表达

Fig. 4 The expressions of β-actin, caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL and survivin tested by Western blot

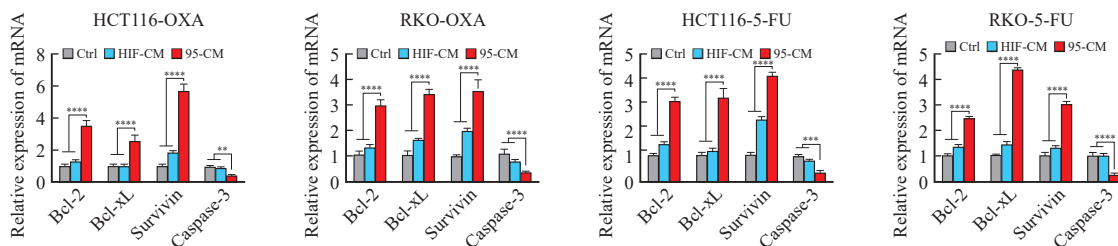


图5 RTFQ-PCR检测caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL和survivin的mRNA水平

Fig. 5 The mRNA expressions of caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL and survivin tested by RTFQ-PCR

\*\**P* < 0.01, compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group; \*\*\**P* < 0.001, compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group; \*\*\*\**P* < 0.000 1, compared with control group (Ctrl) and HIF-CM group.

### 2.4 iCAF激活Wnt/β-catenin信号转导通路

本研究进一步探索了Wnt/β-catenin信号转导通路的变化。结果显示，3组的肿瘤细胞内β-catenin蛋白的表达水平相比较，总蛋白未见明显差异，核内蛋白表达产生明显差异 (*P*

< 0.05，图6)。从图中可以看出，95-CM组中，β-catenin发生转移，在β-catenin总蛋白不变的情况下，细胞核中的β-catenin增多，说明经iCAF刺激后，Wnt/β-catenin信号转导通路被激活，从而导致CRC细胞耐药的产生。

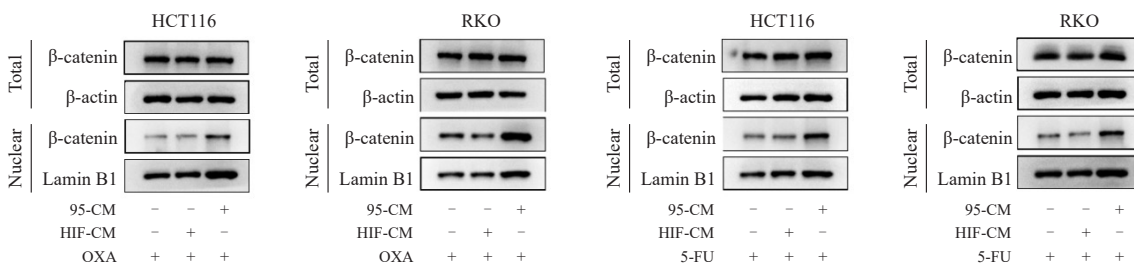


图6 经95-CM刺激后CRC细胞内Wnt/β-catenin信号转导通路的表达变化

Fig. 6 Changes of Wnt/β-catenin signalling pathway in CRC cells stimulated by 95-CM

## 3 讨论

CRC发病率在恶性肿瘤中重高居第3位，病死率高居第2位<sup>[8]</sup>。

近年来，TME在肿瘤耐药中的作用逐渐引起人们注意并被广泛研究<sup>[9]</sup>。其中，CAF是TME的重要组成部分，在肿瘤耐药中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。CAF可以通过多种途径介导肿瘤细胞耐药<sup>[11]</sup>：①抑制肿瘤细胞凋亡；②重塑细胞外基质；③促进肿瘤细胞上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)；④驱动免疫抑制；⑤增强肿瘤代谢；⑥调控肿瘤干细胞。

本研究通过免疫荧光，从原代CAF中筛选出iCAF即CAF-95后，使用95-CM刺激CRC细胞，运用CCK-8法检测到经刺激后，CRC细胞对抗癌药物OXA作用的存活率上升。本研究进一步发

现，经CAF-95刺激后，凋亡蛋白caspase-3及其mRNA的水平明显下降，抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL和survivin及其mRNA的水平均有所上升，证实iCAF能够促进CRC耐药。

Wnt/β-catenin信号转导通路对肿瘤细胞的凋亡有一定作用，同时也参与EMT的过程。有研究<sup>[12]</sup>发现，CAF激活Wnt/β-catenin信号转导通路，通过抑制细胞凋亡调节剂1和含F框WD重复域蛋白7进而抑制线粒体凋亡，增强CRC细胞对抗癌药5-FU的耐药性。另外有研究<sup>[13]</sup>发现，与对照组相比，CAF上清液培养的卵巢癌细胞E-钙黏蛋白的表达水平更低，且CAF分泌的CXCL12可以激活肿瘤细胞中的CXCR4/Wnt/β-catenin信号转导通路诱导EMT，导致顺铂抗性增强。

Wnt/β-catenin信号转导通路在多种肿瘤中都被高度激活，有许多对癌症具有潜在治疗效果的Wnt信号转导通路抑制剂药物的

研究正在进行<sup>[14]</sup>。有研究<sup>[15]</sup>显示, Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路在CRC间质的CAF中高表达。因此我们推测iCAF介导CRC细胞耐药可能与Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路有关。本研究通过Western blot对95-CM刺激下的CRC细胞内 $\beta$ -catenin表达进行检测, 观察到细胞质中 $\beta$ -catenin减少, 进入细胞核增加, Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路被激活, 参与了耐药过程。

本研究仍存在一定局限性。首先, CAF具有异质性, 不同表型具有不同的功能, 本研究仅研究iCAF对CRC耐药的影响, 但CAF的其他表型(如myCAF)是否也具备同样的功能及可能存在的机制尚不清楚。其次, 本研究证明了iCAF通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路促进一系列凋亡蛋白的变化, 从而介导CRC耐药, 研究还不够深入, 具体机制仍有待探索。之后的研究可将重点放在Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路如何参与耐药过程, 如发现可能的结合位点和转运蛋白上。另外, Wnt信号转导通路与癌症发生密切相关, 但既往研究<sup>[14]</sup>表明, 阻断Wnt信号往往会伴随着不良反应的发生, 如破坏组织稳态和再生等。

综上所述, iCAF可能是通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路抑制肿瘤细胞的凋亡, 并促进肿瘤细胞的EMT过程, 进而诱导CRC细胞耐药。因此未来可以将iCAF视作设计抗癌药物的潜在靶点。

**利益冲突声明:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] 周昌明, 王泽洲, 郑莹. 2023年美国癌症数据解读及对中  
国癌症防治的启示 [J]. 中国癌症杂志, 2023, 33(2): 117-  
125.  
ZHOU C M, WANG Z Z, ZHENG Y. Interpretation of US cancer  
statistics 2023 and its implications for cancer prevention and  
treatment in China [J]. China Oncol, 2023, 33(2): 117-125..
- [2] NIKOLAOU M, PAVLOPOULOU A, GEORGAKILAS A G,  
et al. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a  
current overview [J]. Clin Exp Metastasis, 2018, 35(4): 309-

318.  
[3] SUN Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance  
[J]. Cancer Lett, 2016, 380(1): 205-215.  
[4] 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.  
[5] BU L K, BABA H, YASUDA T, et al. Functional diversity of  
cancer-associated fibroblasts in modulating drug resistance  
[J]. Cancer Sci, 2020, 111(10): 3468-3477.  
[6] YOSHIDA G J. Regulation of heterogeneous cancer-associated  
fibroblasts: the molecular pathology of activated signaling  
pathways [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 112.  
[7] CHEN Z H, ZHOU L J, LIU L 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.  
[8] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer  
statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and  
mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA  
Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.  
[9] KADEL D, ZHANG Y, SUN H R, et al. Current perspectives of  
cancer-associated fibroblast in therapeutic resistance: potential  
mechanism and future strategy [J]. Cell Biol Toxicol, 2019,  
35(5): 407-421.  
[10] 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.  
[11] 李学勤, 徐克. 肿瘤相关成纤维细胞促进肿瘤侵袭转移  
的作用机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019,  
35(4): 386-392.  
LI X Q, XU K. Mechanism of cancer-associated fibroblasts  
promoting tumor metastasis and invasion [J]. Chin J Biochem  
Mol Biol, 2019, 35(4): 386-392.  
[12] HU J L, WANG W, LAN X L, 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.  
[13] ZHANG F, CUI J Y, GAO H F, et al. Cancer-associated  
fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition and  
cisplatin resistance in ovarian cancer via CXCL12/CXCR4 axis  
[J]. Future Oncol, 2020, 16(32): 2619-2633.  
[14] JUNG Y S, PARK J I. Wnt signaling in cancer: therapeutic  
targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction  
complex [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(2): 183-191.  
[15] FERRARI N, RANFTL R, CHICHEROVA I, et al. Dickkopf-3  
links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive  
behaviours in cancer-associated fibroblasts [J]. Nat Commun,  
2019, 10(1): 130.

(收稿日期: 2022-11-17 修回日期: 2023-10-20)