

# 宫颈及宫颈癌间质成纤维细胞的分离、 鉴定与衰老检测研究

陈玮<sup>1</sup> 陈亚萍<sup>1</sup> 杨恭<sup>2,3</sup>

1. 复旦大学附属上海市第五人民医院妇产科, 复旦大学上海医学院妇产科学系, 上海 200240;
2. 复旦大学附属上海市第五人民医院中心实验室, 复旦大学上海医学院妇产科学系, 上海 200240;
3. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

**[摘要]** **背景与目的:** 宫颈癌作为最常见的妇科恶性肿瘤之一, 近年来发病呈年轻化趋势。目前认为人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的感染, 特别是高危型HPV感染是其发生的主要因素。已有研究证实, 在肿瘤发生的微环境中, 间质成纤维细胞衰老可能促进上皮性肿瘤的发生, 但宫颈癌的发生是否也伴有间质成纤维细胞的衰老鲜见报道。本研究拟对正常宫颈和宫颈癌间质成纤维细胞进行特异性研究, 以揭示慢性炎症诱导宫颈癌发生的机制, 旨在为宫颈癌的诊治提供新的理论依据。**方法:** 分离纯化正常宫颈成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs)和宫颈癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs), 通过ELISA法检测细胞因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的分泌水平; 并用衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶染色(senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal)、细胞计数和蛋白质印记法(Western blot)分别鉴定细胞衰老、绘制细胞生长曲线和检测NFs与CAF中p16蛋白表达。**结果:** CAFs分泌的细胞因子IL-6和VEGF比NFs高2倍以上( $P < 0.05$ ); CAFs中SA- $\beta$ -gal的活性比NFs高; 而CAF中p16水平的表达水平比NFs中高。**结论:** 间质成纤维细胞衰老可能与宫颈癌的发生和HPV密切相关, 研究细胞因子介导的宫颈癌间质衰老可能有助于宫颈癌的预防、诊断和治疗。

**[关键词]** 宫颈癌; 间质成纤维细胞; 细胞衰老; 上皮肿瘤细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.04.004

中图分类号: R73-34 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)04-0258-08

**Isolation, identification, and senescence examination of cervical cancer and normal cervical fibroblasts** CHEN Wei<sup>1</sup>, CHEN Ya-ping<sup>1</sup>, YANG Gong<sup>2,3</sup> (1. Department of Gynecology and Obstetrics, the 5<sup>th</sup> People's Hospital Affiliated to Fudan University; Department of Gynecology and Obstetrics, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200240; 2. Central Laboratory, the 5<sup>th</sup> People's Hospital Affiliated to Fudan University; Department of Gynecology and Obstetrics, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200240; 3. Cancer Research Laboratory, Fudan University Shanghai Cancer Center; Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: YANG Gong E-mail: yanggong@fudan.edu.cn

**[Abstract]** **Background and purpose:** Cervical cancer is most common gynecological malignancy. In recent years, the number of the young patients has obviously risen. It is now believed that almost all cases of cervical cancer are caused by exposure to a high-risk human papilloma virus (HPV). It has demonstrated that epithelial cancer can induce the senescence of normal stromal fibroblasts and senescent fibroblasts can promote tumor growth. This study by comparing the secretion of interleukin-6(IL-6) and vascular endothelial growth factor(VEGF) helped us to understand the mechanism of cervical cancer, and provided more adequate theoretical and experimental basis for clinical early diagnosis and treatment of the disease. This study characterized normal fibroblasts (NFs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) to understand the mechanism how the chronic inflammation induced cervical cancer, and to provide novel

theoretical basis for clinical diagnosis and treatment of the disease. **Methods:** NFs and CAFs were isolated and purified from normal and cervical cancer tissues. The expression levels of IL-6 and VEGF in cell culture medium were measured by ELISA and cellular senescence was detected by senescence-associated beta galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining. The senescent marker p16 was analyzed by Western blot. **Results:** Our data showed that the expressions of both IL-6 and VEGF were higher in CAFs than in NFs ( $P < 0.05$ ), and that the blue staining of SA- $\beta$ -gal and the expression of p16 and VEGF were stronger in CAFs than in NFs. **Conclusion:** Cervical epithelial cancer may be resulted from the senescence of stromal fibroblasts and HPV infection. Studying on cytokine-mediated stromal senescence may have a potential value for prevention, diagnosis, and treatment of cervical cancer.

[Key words] Cervical cancer; Stromal fibroblast; Cellular senescence; Epithelial cancer cell

宫颈癌作为妇科最常见的恶性肿瘤之一，已成为危害全球女性生命健康的主要杀手，近年来发病呈低龄化的趋势。宫颈癌的发生是一个多步骤、多因素的发展过程，人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染，特别是高危型HPV感染是其发生的重要因素，其中宫颈鳞癌大部分为HPV16感染，宫颈腺癌最常见的是HPV18感染，但只有一部分感染高危型HPV的女性会发展为宫颈癌，提示存在其他协同因素<sup>[1-2]</sup>。已有研究证明，正常的间质成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs)对于维持上皮细胞的稳态有重要作用，而癌相关间质成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)能够诱导和促进上皮细胞发生瘤样转变<sup>[3]</sup>。宫颈感染会导致一个慢性炎症反应，宫颈内膜与宫颈上皮的微小溃疡，增加上皮的修复和增殖，一些研究已证实，细胞因子水平和端粒酶活性提高与宫颈上皮内瘤样病变级别的提高和浸润性宫颈癌相关<sup>[4-5]</sup>。而慢性炎症反应是多种上皮性肿瘤的重要高危因素<sup>[6-7]</sup>。炎症反应细胞产生的细胞因子、趋化因子等构成的炎症反应网络介导了间质细胞的衰老和上皮肿瘤的发生，此外，衰老的间质细胞释放的促炎性反应递质又通过旁分泌的方式作用于邻近的上皮细胞从而促进肿瘤上皮细胞生长<sup>[7-9]</sup>。但是宫颈癌中间质成纤维细胞是否衰老，其特性如何目前鲜见报道。本研究分离和建立了相应的正常和癌相关成纤维细胞系，探讨其与宫颈癌和HPV的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、组织及患者标本

选择复旦大学附属肿瘤医院妇科2012年3月收治的患者7例，所有患者均为初治患者，术前均未接受任何治疗。CAF<sub>s</sub>获取源(宫颈癌 I<sub>b1</sub>期行广泛子宫切除术加盆腔淋巴结清扫术患者标本1例和宫颈癌 I<sub>A1</sub>期行全子宫切除术患者标本2例)。NF<sub>s</sub>获取源(卵巢癌行全子宫加双侧附件切除术患者标本4例)。标本获取前均与患者签署知情同意书，获得本人许可。取生长速度接近的CAF<sub>s</sub>和NF<sub>s</sub>各两组进行细胞培养。

### 1.2 试剂

MCDB培养液和M199培养液以1:1比例混合，同时加入20%的胎牛血清(购自美国Gibco公司)，20 ng/mL上皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和1%的青霉素及链霉素。2.5%胰酶购自美国Gibco公司。MTT粉购自美国Sigma公司。双抗购自法国Biowest公司。GENMED细胞衰老特异性 $\beta$ -半乳糖苷酶检测试剂盒购自上海杰美医药科技有限公司。p16抗体购自美国Sigma-Aldrich公司(1:2 000稀释)。Vimentin(1:2 000稀释)和pan-cytokeratin(1:2 000稀释)用Santa cruz的抗体测定。 $\beta$ -actin抗体购自美国Sigma-Aldrich公司(A5441, 1:20 000稀释)。ELISA试剂盒购自美国Peprotech公司。

### 1.3 宫颈和宫颈癌成纤维细胞的分离纯化与培养

无菌手术刀片切取标本组织即刻送至原代细胞培养室(整个过程控制在15 min内)，然后

进行下列无菌操作: 将组织块移至新的培养皿中, 10%双抗的PBS清洗3次, 用无菌手术刀片温和地刮下宫颈表面细胞, 直至整个组织块不能再刮为宜(0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm), 然后将细胞置于CO<sub>2</sub>体积分数为5%的37 °C温箱中, 3 d后更换新鲜培养基, 5~6 d可见到明显的贴壁细胞, 之后每隔48 h观察1次细胞同时更换新鲜培养基。正常情况下, 14 d后可见细胞贴满6 cm培养皿。在细胞生长密度达到80%~90%时进行细胞传代。由于上皮细胞与间质成纤维细胞混合生长, 本实验使用了2种方法分离纯化获得纯化的宫颈成纤维细胞<sup>[10]</sup>。①细胞时间差酶消化法: 将培养皿中培养基吸走, PBS冲洗2次, 加入胰酶使其流过所有细胞表面, 显微镜下持续观察, 大约60 s, 成纤维细胞脱离培养皿底部而上皮细胞仍然贴壁, 此时立即加入2 mL培养基中和, 然后加入适量培养基继续培养, 也可重复上述操作1次。下次传代时同上, 经过几次处理, 就可将上皮细胞和成纤维细胞分开, 再经过2~3次传代即可得到纯化的宫颈成纤维细胞。②细胞反复贴壁法: 成纤维细胞与上皮细胞相比, 其贴壁过程快, 大部分细胞能在短时间内(大约20~30 min)完成附着过程(但不一定完全伸展), 而上皮细胞(大部分)在短时间内不能附着或附着不稳定, 利用此差别可以纯化细胞。具体步骤如下: 将细胞悬液接种在1个培养瓶内静置30 min。在显微镜下观察, 见部分细胞贴壁, 稍加摇动也不浮起时, 将细胞悬液吸入另1个培养瓶中, 继续静置培养20 min, 然后重复上述操作, 在第1瓶和第2瓶以成纤维细胞为主, 往后几瓶即上皮细胞为主, 下次传代时同上便可最终得到纯化的宫颈NFs。显微镜下观察培养的宫颈NFs和CAFs的形态学特征。

#### 1.4 细胞中HPV16 E6的鉴定

细胞或组织中的总RNA用TRIzol试剂提取, 并测定其浓度, 所有样品均用5 μg RNA, 用SuperScript First Round Synthesis System(Invitrogen, Carlsbad, CA)试剂盒合成互补DNA(cDNA)。最后用50 ng DNA进行半定量PCR。GAPDH基因上游引物:

5'-GAGAACGGGAAGCTTGTCATC-3'; 下游引物: 5'-CCACGACGTACTCAGCGCCAG-3'; 扩增产物103 bp。HPV 16 E6 基因上游引物: 5'-GAATGTGTGTACTGCAAGC-3'; 下游引物: 5'-TGGATTCCCATCTCTATAT-3'; 扩增产物: 93 bp。反应条件为ABI自动程序95 °C 10 min 1个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 40个循环。结果用溴乙锭染色, 1%琼脂糖凝胶观察HPV 16 E6的扩增。

#### 1.5 宫颈癌组织和正常宫颈组织的HE染色以及间质细胞和上皮细胞鉴定

石蜡固定的宫颈鳞癌组织和正常宫颈组织, 经常规切片后进行伊红-苏木素(HE)染色。

#### 1.6 ELISA检测

将CAFs或NFs培养48 h, 待细胞生长密度达85%, 收集新鲜培养基或-80 °C保存, 根据美国R&D System公司的ELISA试剂盒说明书进行细胞因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的检测。

#### 1.7 衰老相关β-半乳糖苷酶染色(SA-β-gal)法检测

将细胞接种于6孔板中培养过夜, 隔天待细胞密度达到50%~60%时按文献[11]的方法进行操作: 用PBS将细胞洗2次, 然后用2%甲醛与0.2%戊二醛混合液在室温下固定细胞(3~5 min), 用PBS洗涤后, 加入衰老相关β-半乳糖苷酶染色液含1 mg x-gal, 40 mmol/L缓冲液(pH为6.0), 5 mmol/L亚铁氰化钾(potassium ferrocyanide), 5 mmol/L铁氰化钾(potassium ferricyanide), 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl, 避光37 °C染色2~16 h。CAFs的半乳糖苷酶活性较高(蓝色细胞较多), 而NFs呈现的活性(蓝色细胞)较少。最后在显微镜下拍照。

#### 1.8 成纤维细胞的Western blot检测

随着对宫颈癌发生和转移机制的深入研究发现, VEGF和抑癌基因p16发挥至关重要的作用。取出生长密度达到80%的细胞, 去除培养基, PBS清洗3次, 刮取细胞移入Eppendorf管中, 加入细胞裂解液, 放置冰上温育30 min,

14 000×g离心5 min, 取上清液。用Western blot检测NFs和CAFs中VEGF和p16蛋白水平的表达。

### 1.9 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。统计细胞衰老比率, 用Student *t*检验分析差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成纤维细胞及HPV感染鉴定

波形蛋白(vimentin)和总角蛋白(pan-cytokeratin)分别是成纤维细胞和上皮细胞特有的细胞标志物。Western blot检测结果表明, 总角蛋白只在上皮细胞中表达, 而波形蛋白主要在成纤维细胞中表达。在宫颈癌和正常宫颈上皮组织中有部分波形蛋白的表达是正常现象, 因为在组织分离过程中混有少量成纤维细胞(图1A)。随后, 我们对组织和成纤维细胞进行了HPV16 E6基因扩增的鉴定, 发现只有宫颈鳞癌

组织中有HPV16的感染, 而在CAFs、正常宫颈上皮组织和NFs中均未发现HPV 16的感染, 而宫颈癌中HPV 16感染的结果也与临床检测的结果相一致(图1B)。最后我们对原始分离组织进行了HE染色, 发现宫颈癌和正常宫颈组织中均有上皮细胞和成纤维细胞的存在(图1C)。

### 2.2 衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

我们成功地分离并建立了两株正常成纤维细胞系(NF3和NF7)和两株宫颈癌相关成纤维细胞系(CAF11和CAF15), 首先在不同传代时间测定了细胞衰老的主要标志物SA- $\beta$ -gal, 发现CAFs中蓝染的衰老细胞(38%)比NFs中的蓝染的细胞数量(7%)多而且染色强度高( $P < 0.05$ ), 说明同代CAFs的细胞衰老程度大于NFs(图2A)。接着, 我们又绘制了两株正常成纤维细胞系和两株宫颈癌相关成纤维细胞系生长曲线图, 发现宫颈正常的成纤维细胞生长速度明显快于宫颈癌相关成纤维细胞生长速度(图2B、C)。

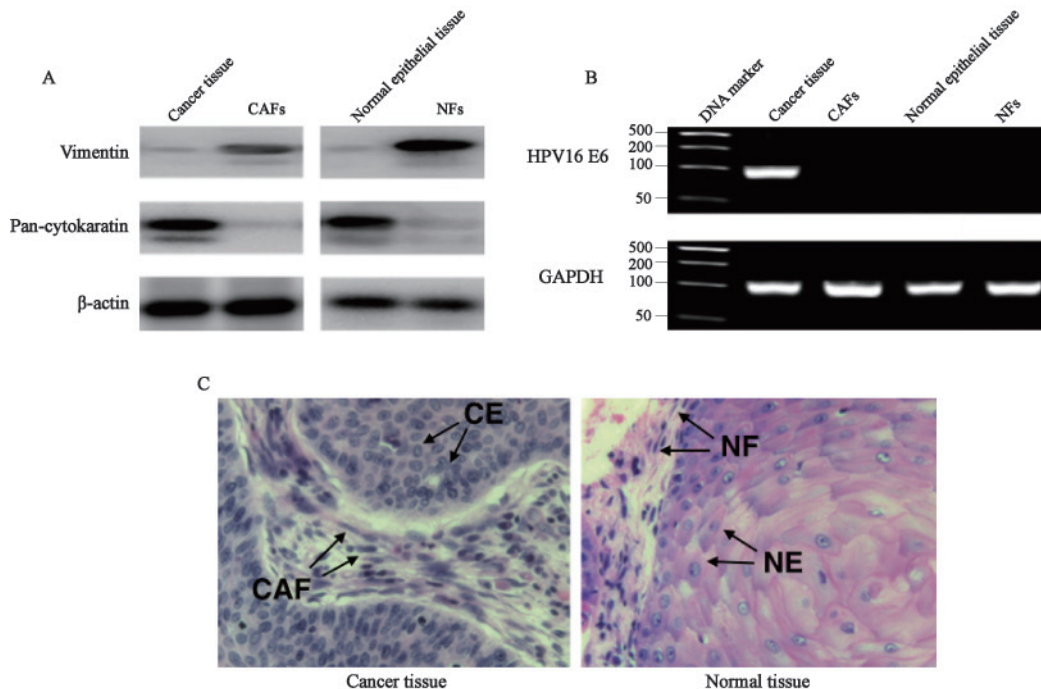


图1 间质细胞的分离和HPV感染的检测

Fig. 1 Identification of stromal cells and examination of HPV infection

A: Detection of vimentin and cytokeratin in both epithelial tissues and fibroblasts by Western blot; B: RT-PCR analysis of HPV 16 E6 amplification; GAPDH was used as control; C: Histological staining of cervical cancer tissue and normal cervical tissue ( $\times 400$ ), showing stromal fibroblasts (CAF and NF) and epithelial cancer cells (EC) and normal squamous epithelial cells (NE).

### 2.3 衰老相关蛋白标志物检测

我们用Western blot同时测定了VEGF的细胞内表达水平,发现CAF中的表达确实比NFs中高,这项结果也验证了上述用ELISA测定的细胞培养基分泌水平。此外由于p16是公认的细胞衰老标志物,因此我们用p16的抗体也测定了NFs和CAF中的p16表达水平,发现CAF中p16蛋白表达比NFs中p16蛋白表达明显增强(图3)。

### 2.4 细胞因子IL-6、VEGF分泌

VEGF是促进肿瘤血管生成的主要因子之

一,细胞衰老过程中是否伴随VEGF的升高尚无明确报道,而IL-6是重要的促肿瘤生长的细胞因子,因此我们用ELISA法同时测定了VEGF和IL-6在细胞培养基中的分泌水平。通过收集生长密度达到85%的两株CAF和两株NFs的培养基,用ELISA试剂盒进行IL-6和VEGF的检测,结果发现两组CAF中IL-6和VEGF水平均明显高于NFs中的IL-6和VEGF水平,说明CAF分泌的细胞因子IL-6和VEGF的量比NFs分泌的细胞因子IL-6和VEGF多(图4)。

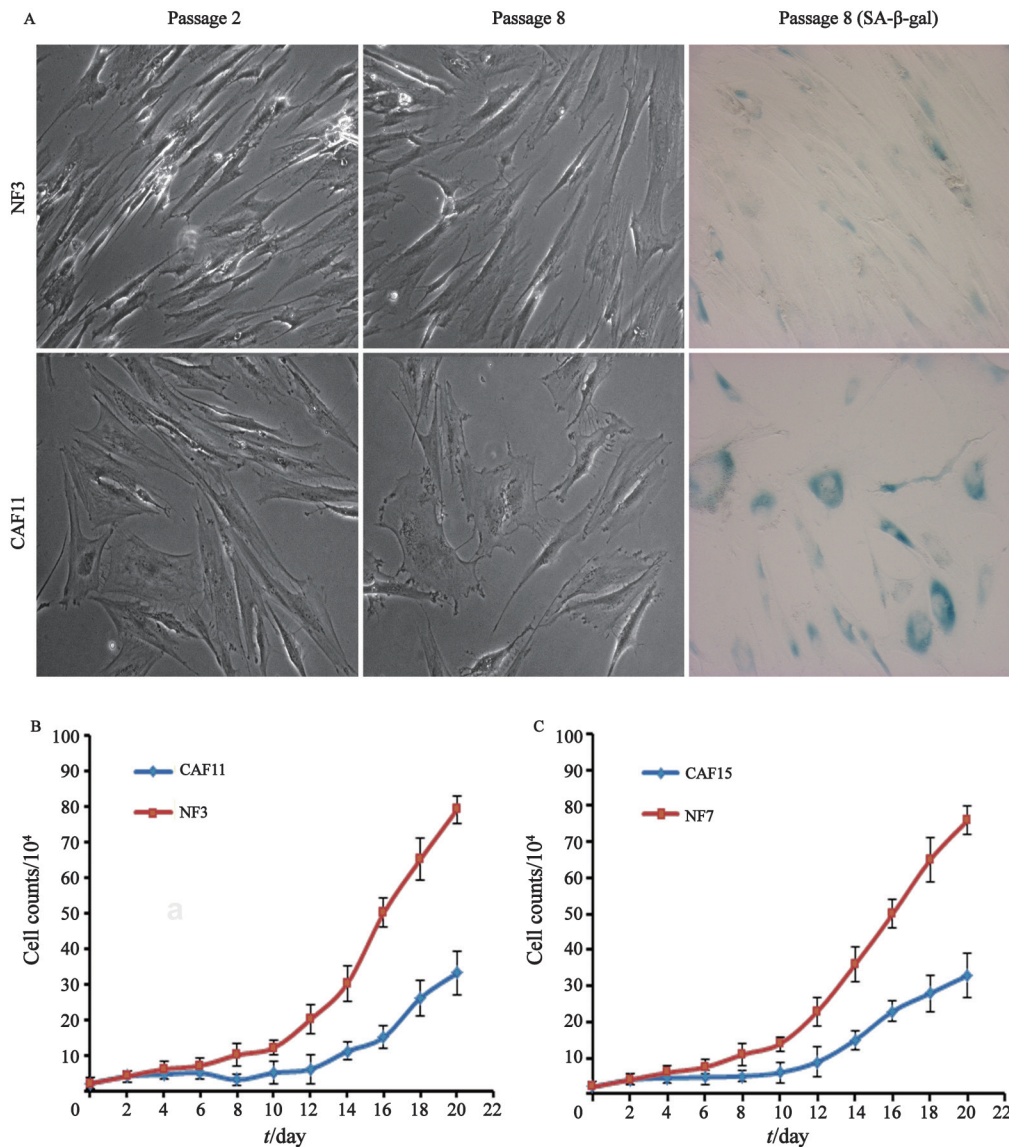


图2 正常宫颈NFs和宫颈CAFs传代培养及生长曲线

Fig. 2 Normal fibroblasts (NFs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) cultured figures and growth curves

A: Normal fibroblasts (NFs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) cultured at passage number 2 and 8, respectively; Cellular senescence was detected at passage 8 of CAF, but not in NF; B, C: Growth rates of cultured cervical cancer fibroblasts and normal fibroblasts.

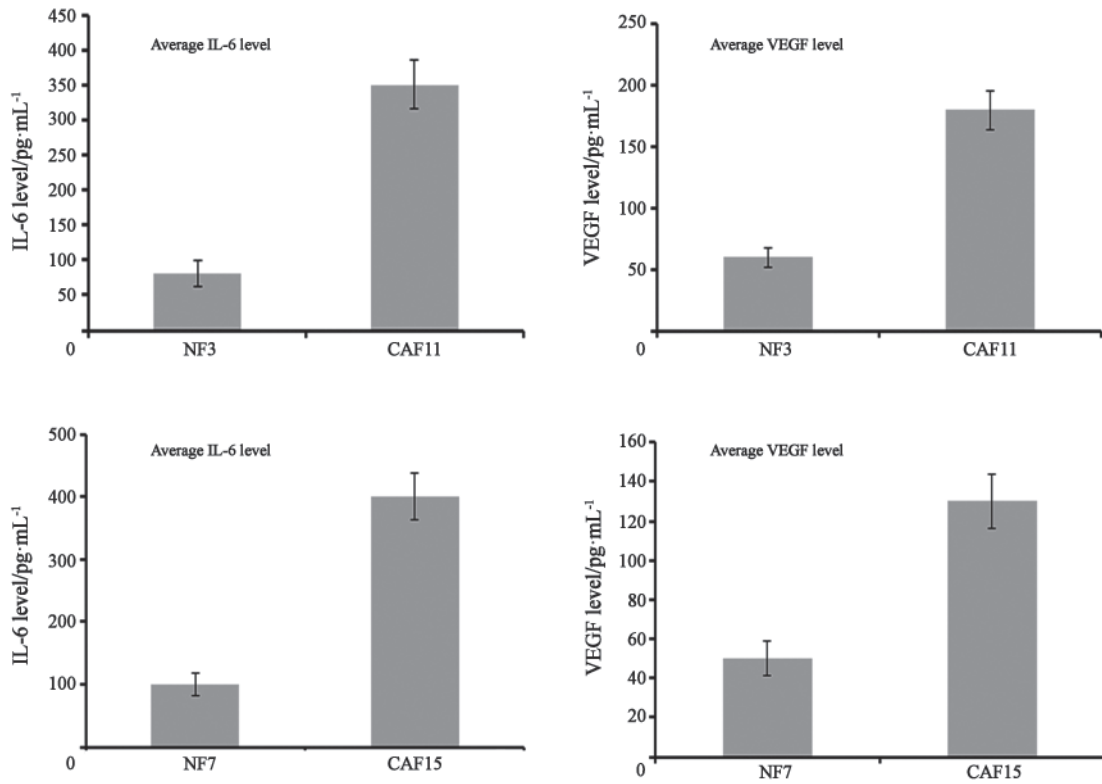


图3 ELISA法测定VEGF和IL-6在2株正常成纤维细胞系(NF3和NF7)和2株宫颈癌相关成纤维细胞系(CAF11和CAF15)培养基中的分泌水平

Fig. 3 Secretive expression of IL-6 and VEGF in NFs and CAFs detected by ELISA error bars represent the standard deviation of data collected from triplicate tests

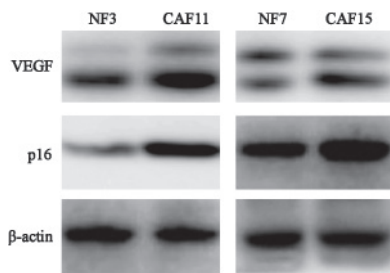


图4 Western blot检测结果显示CAF中p16和VEGF蛋白表达比NFs中p16和VEGF蛋白表达明显增强

Fig. 4 Western blot showed that the expression of VEGF and p16 was higher in CAFs than in NFs

### 3 讨论

宫颈癌作为妇科最常见的恶性肿瘤之一，发病率在女性恶性肿瘤中仅次于乳腺癌，位居第二。宫颈癌的发生是宫颈上皮内瘤变-早期癌-浸润癌的一个由量变到质变的过程，完成这一

过程大约需要8~10年。其发生和转移与癌细胞所处的内外环境密切相关。早期的肿瘤研究大多将研究重点放在肿瘤细胞本身，关注肿瘤细胞的突变、增殖、凋亡、信号通路改变等。近年来，研究发现肿瘤组织中其他非肿瘤细胞或者间质对肿瘤的发生、发展同样起着非常重要的作用。与肿瘤转移相关的成纤维细胞、肿瘤相关巨噬细胞、细胞因子及其受体正在受到越来越多的关注与研究。

本研究分离和建立了正常宫颈和宫颈癌间质成纤维细胞，通过ELISA法检测炎症细胞因子IL-6、VEGF的分泌情况、SA-β-gal了解细胞衰老程度、细胞计数绘制细胞生长曲线、Western blot检测p16蛋白表达情况，并比较了CAF分泌的IL-6和VEGF与NF分泌的IL-6和VEGF；CAF中SA-β-gal的活性与NF中SA-β-gal的活性；以及CAF中p16蛋白的表达水平与

NFs中p16蛋白的表达水平差异, 从而推断, 间质成纤维细胞衰老可能与宫颈癌的发生和HPV是密切相关的。

目前, 对于肿瘤微环境的研究还处于起步阶段。已有研究表明, 间质细胞的衰老可以促进邻近上皮细胞肿瘤的形成, 从而为上皮肿瘤的研究提供新的理论。多种上皮肿瘤组织中均有癌相关成纤维细胞, 对肿瘤的发生、发展均有重要的促进或介导肿瘤的放、化疗抵抗作用<sup>[12-14]</sup>。有研究发现, 促炎性反应细胞因子IL-6在调节细胞衰老和肿瘤发生方面起着重要作用, 现在普遍认为促炎性反应递质和基质成分也促进肿瘤的发展, 因为其可以刺激细胞生长, 抑制凋亡, 使胞外基质有利于肿瘤细胞生长<sup>[15]</sup>。IL-6具有炎性反应分子的双重作用, 能抑制细胞生长(诱导衰老)和促进细胞生长(促进肿瘤)<sup>[16]</sup>。VEGF已被确认是迄今为止肿瘤组织中最重要促进血管生成的血管生长因子, 其通过受体在促进血管生成的同时提高血管通透性, 直接影响肿瘤的发生、侵袭及转移<sup>[17-18]</sup>, 而p16可以通过诱导细胞衰老而抑制血管生长和VEGF的表达<sup>[19-20]</sup>。肿瘤的发生转移是一个由多因素参与的非常复杂的过程。而肿瘤转移和炎性反应细胞浸润有着相似的形成过程, 均涉及到细胞黏附和跨内皮迁移等, 趋化因子及其受体在炎性反应细胞活化、迁移和准确定位中发挥着重要的作用, 而这一过程中还有许多的疑问, 比如肿瘤间质中是否存在有消退间质成纤维细胞衰老的细胞因子及这种消退是否可以降低上皮肿瘤的发生转移? 炎性反应和肿瘤都是多因素控制的复杂病理过程, 如果能揭示慢性炎性反应如何导致肿瘤, 将对宫颈癌的新药研制带来新的方向。

#### [参 考 文 献]

- [1] SNIJDERS P J, VERHOEF V, ARBYN M, et al. High-risk HPV testing on self-sampled versus clinician-collected specimens: A review on the clinical accuracy and impact on population attendance in cervical cancer screening [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(10): 2223-2236.
- [2] WENTZENSEN N. Triage of HPV-positive women in cervical cancer screening [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(2): 107-109.
- [3] ORIMO A, GUPTA P B, SGROLD C, 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.
- [4] SHARMA A, RAJAPPA M, SAXENA A, et al. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2007, 17(4): 879-885.
- [5] MUKHERJEE S, DEY S, BHATTACHARYA R K, et al. Isothiocyanates sensitize the effect of chemotherapeutic drugs via modulation of protein kinase C and telomerase in cervical cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 330(1-2): 9-22.
- [6] BERHANE T, HALLIDAY G M, COOKE B, et al. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans [J]. *Br J Dermatol*, 2002, 146(5): 810-815.
- [7] HU B, ELINAV E, HUBER S, et al. Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9862-9827.
- [8] SHAN W, YANG G, LIU J. The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 4044-4057.
- [9] KULBE H, THOMPSON R, WILSON J L, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 585-592.
- [10] YANG G, ROSEN D G, LIU G, et al. CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(15): 3875-3886.
- [11] YANG G, ROSEN D G, 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.
- [12] LISANTI M P, MARTINEZ-OUTSCHOO U E, SOTGIA F. Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype: metabolic symbiosis and "fibroblast addiction" are new therapeutic targets for drug discovery [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(17): 2723-2732.
- [13] LAI D, MA L, WANG F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(2): 541-550.
- [14] CHEN S F, NIEH S, JAO S W, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Pathol*, 2013, 231(2): 180-189.
- [15] SCHAFFER M, WERNER S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,

- 2008, 9(8): 628-638.
- [ 16 ] WISLEZ M, FUJIMOTO N, IZZO J G, et al. High expression of ligands for chemokine receptor CXCR2 in alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic kras [ J ] . Cancer Res, 2006, 66(8): 4198-4207.
- [ 17 ] LICHTENBERGER B M, TAN P K, NIEDERLEITHNER H, et al. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development [ J ] . Cell, 2010, 140(2): 268-279.
- [ 18 ] TRINH X B, TJALMA W A, VERMEULEN P B, et al. The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer [ J ] . Br J Cancer, 2009, 100(6): 971-978.
- [ 19 ] COPPE J P, RODIER F, PATIL C K, et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype [ J ] . J Biol Chem, 2011, 286(42): 36396-3403.
- [ 20 ] PRIEUR A, BESNARD E, BABLED A, et al. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression [ J ] . Nat Commun, 2011, 2: 473.
- (收稿日期: 2013-08-12 修回日期: 2014-01-23)

## 『 肿瘤治疗规范及放疗进展 』 2014上海学习班 第一轮通知

由上海医学会肿瘤放射治疗专科分会主办，复旦大学附属肿瘤医院承办的『肿瘤治疗规范及放疗进展』2014上海学习班，将于2014年8月13~15日在上海举办。会议将邀请东部地区放疗专家授课，系统介绍常见恶性肿瘤的治疗规范及放疗进展，主要面向高年住院医师和主治医师。会议课程如下，请有意参会人员填写会议回执时并就自己感兴趣内容予以标记，我们将根据大家的意愿对授课内容做适当调整。真诚欢迎全国的放疗同道积极参与。

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| 1. 原发性肝癌治疗规范         | 11. 乳腺癌治疗规范及放疗进展            |
| 2. 肺癌治疗规范及放疗进展       | 12. 淋巴瘤诊治进展                 |
| 3. 食管癌治疗规范及放疗进展      | 13. 前列腺癌治疗规范及放疗进展           |
| 4. 胃癌治疗规范及放疗进展       | 14. 放射治疗物理新技术               |
| 5. 恶性肿瘤的粒子治疗         | 15. 常见组织器官的放疗物理剂量限制值        |
| 6. 直肠癌治疗规范及放疗进展      | 16. 宫颈癌内外联合照射治疗方案的剂量学评估     |
| 7. 鼻咽癌治疗规范及放疗进展      | 17. 临床放射生物学进展               |
| 8. 头颈部肿瘤综合治疗规范       | 18. 实体恶性肿瘤的立体定向放射治疗         |
| 9. 头颈部肿瘤放疗中正常组织损伤和防护 | 19. 以放疗为基础的多学科综合治疗理论基础和临床应用 |
| 10. IV期恶性肿瘤的放射治疗     |                             |

注册费用: 800元, 食宿自理(8月13日-8月15日长航宾馆会议价, 大标间110元/床/日)

学 分: 国家级医学继续教育 I 类学分10分【2014-09-03-062】(国)

报到时间: 2014年8月13日上午9点-晚上10点(本市学员可在14日上午会场注册)

报到地点: 上海市零陵路518号长航宾馆一楼大厅(复旦大学附属肿瘤医院对面)

会议地点: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院2号楼5楼小会议厅

联 系 人: 王祥洪 13621674393, 李云海 13524251746

参加学习班回执 (复印有效)

姓 名	单 位 / 地 址 / 邮 编	手 机	电 子 邮 箱	感 兴 趣 内 容 编 号

回执可通过电子邮件发至liyunhai@cscs.org.cn