

仑伐替尼对肝细胞癌组织中肿瘤相关成纤维细胞自噬和迁移的影响

赵梓吟¹ 何明阳¹ 韩冰² 关鸽¹ 蔡金贞¹ 张斌¹

(青岛大学附属医院,山东 青岛 266100 1 器官移植中心; 2 肝胆胰外科)

【摘要】 目的 探讨仑伐替尼对于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)自噬和迁移的影响。方法 分离并培养 HCC 患者肿瘤组织中原代 CAFs,分别使用等体积的 DMSO 和 46 nmol/L 的仑伐替尼处理 72 h,分为 DMSO 组和仑伐替尼组,对两组细胞进行转录组学测序分析和药物靶点组学分析,对差异表达基因和差异表达肽段进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析;使用透射电镜观察仑伐替尼对 CAF 自噬的影响,通过 Transwell 和划痕实验检测仑伐替尼对 CAFs 迁移能力的影响。结果 DMSO 组与仑伐替尼组之间的差异表达基因和差异肽段主要富集在细胞迁移、自噬等相关功能和通路上;透射电镜观察显示,仑伐替尼组 CAFs 的自噬小体明显多于 DMSO 组($t=5.376, P<0.05$),Transwell 和划痕实验结果显示,仑伐替尼组 CAFs 迁移能力明显弱于 DMSO 组($t=10.31, 14.33, P<0.05$)。结论 仑伐替尼可诱导 HCC 组织中 CAFs 自噬,并抑制其迁移。

【关键词】 癌,肝细胞;仑伐替尼;癌相关成纤维细胞;细胞运动;自噬;体外培养技术

【中图分类号】 R735.7

【文献标志码】 A

EFFECT OF LENVATINIB ON THE AUTOPHAGY AND MIGRATION OF CANCER-ASSOCIATED FIBROBLASTS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA TISSUE ZHAO Ziyin, HE Mingyang, HAN Bing, GUAN Ge, CAI Jinzhen, ZHANG Bin (Organ Transplantation Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266100, China)

【ABSTRACT】 **Objective** To investigate the effect of lenvatinib on the autophagy and migration of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissue. **Methods** Primary CAFs from HCC patients were isolated and cultured and were then treated with an equal volume of DMSO (DMSO group) or 46 nmol/L lenvatinib (lenvatinib group) for 72 h. Transcriptomic sequencing and the omics analysis of drug targets were performed for the two groups, and GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed for differentially expressed genes and peptides. Transmission electron microscopy was used to observe the effect of lenvatinib on autophagy of CAFs, and Transwell assay and wound healing assay were used to observe the effect of lenvatinib on the migration ability of CAFs. **Results** The differentially expressed genes and peptides between the DMSO group and the lenvatinib group were mainly enriched in the functions and pathways such as cell migration and autophagy. Transmission electron microscopy showed that the lenvatinib group had a significantly higher number of autophagosomes than the DMSO group ($t=5.376, P<0.05$), and Transwell assay and wound healing assay showed that the lenvatinib group had a significantly weaker migration ability than the DMSO group ($t=10.31, 14.33, P<0.05$). **Conclusion** Lenvatinib can induce the autophagy of CAFs and inhibit their migration in HCC tissue.

【KEY WORDS】 Carcinoma, hepatocellular; Lenvatinib; Cancer-associated fibroblasts; Cell movement; Autophagy; *In vitro* techniques

全球范围内肝癌的发病率及死亡率呈现持续上升趋势,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌类型,其发病率约占原发性肝脏恶性肿瘤的 75%,确诊以后 5 年的生存率仅约为 18%^[1-2]。尽管手术切除、射频消融和经动脉化疗栓塞等治疗方案改善了无转移 HCC 患者的预后,但多数 HCC 患者确诊时已经是中晚期,对于无

法手术的中晚期 HCC 患者,往往只能采取保守方案治疗^[3]。目前治疗 HCC 的一线药物包括阿替利珠单抗+贝伐珠单抗、多纳非尼、仑伐替尼、索拉菲尼等,其中仑伐替尼作为多靶点的酪氨酸激酶抑制剂,适用于不可切除的肝功能为 Child-Pugh A 级的晚期 HCC 患者^[4-6]。

近年来,对于肿瘤发展机制和治疗方法的研究探索重心逐渐从肿瘤本身转向其所处的肿瘤微环境(TME)^[7-8],TME 中基质细胞具有遗传稳定性,可有效降低肿瘤耐药和复发风险^[9-11]。肿瘤相关成纤

【收稿日期】 2023-01-12; **【修订日期】** 2023-03-27

【基金项目】 希思科-默沙东肿瘤研究基金项目(Y-MSDP20-220315)

【通讯作者】 张斌,Email:18661808021@163.com

维细胞(CAFs)是激活的成纤维细胞,作为 TME 中最主要的基质细胞成分以及细胞外基质的关键来源^[12],CAFs 在促进肿瘤进展和转移中有关键作用,目前已经作为潜在肿瘤治疗靶点^[13-15]。研究发现,仑伐替尼可通过作用于肿瘤的多个靶点达到抑癌的作用,比如可靶向阻断肿瘤的血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)途径抑制肿瘤血管生成,可通过使肿瘤细胞饥饿和缺氧抑制肿瘤细胞生长致死亡,但仑伐替尼能否影响 CAFs 的生物学行为尚无相关研究报道。本研究拟探究仑伐替尼对 CAFs 生物学功能的影响及其机制,旨在为 HCC 患者的个性化治疗提供理论依据,同时为靶向 TME 的治疗方式提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

收集于青岛大学附属医院肝胆胰外科确诊为 HCC 的 3 例患者的肿瘤组织以及癌旁正常组织标本用于原代 CAFs 分离培养。胶原酶、青链霉素购买于美国 Sigma 公司; α -SMA 抗体购买于美国 CST 公司,仑伐替尼购买于美国 MCE 公司;NEBNext UltraTM RNA 文库准备试剂盒购于美国 Illumina 公司。JEM-1200EX 透射电镜购于日本 JEOL 公司,超薄切片仪购买于美国 Ultracut 公司,光学显微镜购于日本尼康公司。

1.2 CAFs 的分离、纯化、培养及分组

取 3 例患者的癌组织以及癌旁正常组织,用含 10 g/L 青链霉素的 PBS 溶液 4 °C 下清洗 2 次,剪碎组织后,置于 10 mL 含体积分数 0.10 胎牛血清以及体积分数 0.001 的 IV 型胶原酶溶液中,37 °C 下恒温摇床中消化 30 min。将消化液用 200 目滤网过滤,670 r/min 离心 5 min,弃上清液后再漂洗 2 次,使用红细胞裂解液去除红细胞后,置于完全培养基(含体积分数 0.10 的胎牛血清及 10 g/L 青链霉素的 DMEM 高糖型培养基)中继续培养,3 d 后更换新的完全培养基。在含有 100 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的完全培养基中采用自然传代法对 CAFs 进行纯化,获得原代 CAFs 细胞。再将原代 CAFs 细胞重新培养于完全培养基中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的恒温培养箱中常规培养。待 CAFs 传代 3 次且细胞融合度达 80%~90%时,分别于培养基中加入 46 nmol/L 的仑伐替尼和等体积的 DMSO,分为仑伐替尼组和 DMSO 组,继续培养 72 h 用于后续实验。

1.3 CAFs 的免疫荧光检测

将培养 72 h 的 DMSO 组和仑伐替尼组 CAFs 接种于铺有细胞爬片的 24 孔板中,在 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h,PBS 清洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 30 min。再以 PBS 配置的体积分数 0.003 的曲拉通溶液常温渗透 15 min,PBS 配置的体积分数 0.05 山羊血清常温封闭 1 h, α -SMA 一抗孵育过夜后,加入 FITC 二抗室温孵育 2 h,DAPI 复染 7 min,PBS 清洗后滴加甘油封片。使用激光共聚焦显微镜拍照并观察两组细胞中的 α -SMA 荧光强度。

1.4 CAFs 的转录组学测序及富集分析

委托上海吉凯基因医学科技股份有限公司对培养 72 h 的 DMSO 组和仑伐替尼组的 CAFs 进行转录组学测序,每组设 3 个重复样本。根据基因表达分析结果筛选两组间差异表达的基因($P < 0.05$),并对差异表达基因进行 GO 功能富集分析(<http://geneontology.org>)以及 KEGG 信号通路富集分析(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。

1.5 仑伐替尼在 CAFs 上的药物靶点组学测序及富集分析

委托上海中科新生命生物科技有限公司对培养 72 h 的 DMSO 组和仑伐替尼组的 CAFs 进行药物靶点组学测序。通过质谱分析对肽段酶切产物进行序列鉴定和数据非依赖性采集(DIA)蛋白质组学定量分析,确定仑伐替尼在 CAFs 上结合的靶蛋白及序列,并对靶蛋白进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。

1.6 CAFs 的透射电镜扫描

将培养 72 h 的 DMSO 组和仑伐替尼组 CAFs 接种于铺有细胞爬片的 24 孔板中,在 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h,然后 4 °C 下以体积分数 0.025 的戊二醛固定 4 h。用 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次,每次 10 min,再用 4 °C 体积分数为 0.01 的锇酸固定细胞 2 h,用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min。用体积分数 0.3、0.5、0.7、0.8、1.0 的梯度乙醇对两组细胞依次脱水,每次 10 min。之后 Epon812 环氧树脂包埋样本,依次以 37、45、65 °C 温箱固化,每级温度下 24 h。半薄切片定位后用超薄切片仪切片,醋酸双氧铀硝酸铅染色,最后使用透射电镜观察。

1.7 CAFs 的 Transwell 实验

将培养 72 h 后的 DMSO 组和仑伐替尼组的 CAFs 更换为无血清 DMEM 培养基,继续培养 24 h

后,接种于无血清 DMEM 培养基的 Transwell 上室 (8 μm /孔)中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05 的 CO_2 培养箱中继续培养 24 h,室温下对迁移至下室的细胞用 0.5%结晶紫染色 20 min。使用光学显微镜对染色细胞进行拍照,对迁移 CAFs 进行计数。

1.8 CAFs 划痕实验

将培养 72 h 的 DMSO 组和仑伐替尼组的细胞平铺在 6 孔板中,待 CAFs 融合度达 90%以上时,使用 200 μL 滤芯吸头尖端在 6 孔板上划痕。划痕后将原培养基立即更换为含体积分数 0.02 胎牛血清的低血清培养基,用电子显微镜拍摄划痕区域,分别于划痕后 0、24 h 时采集图像,并计算伤口愈合百分比,计算公式为:伤口愈合百分比 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAFs 转录组学的测序结果及其 GO 功能及 KEGG 信号通路富集分析结果

免疫荧光染色结果显示,CAFs 标志物 $\alpha\text{-SMA}$

染色阳性率 $> 90\%$ (图 1),图中红色为 $\alpha\text{-SMA}$ 染色的 CAFs,蓝色为 DAPI 染色的细胞核,提示分离培养培养成功,可用于后续实验。转录组学测序结果显示,与 DMSO 组进行比较,仑伐替尼组 CAFs 共有 2 054 个基因显著上调,2 109 个基因显著下调 ($P < 0.05$);GO 功能富集分析显示,差异基因与细胞迁移调节、成纤维细胞迁移、自噬体、溶酶体等功能密切相关;KEGG 信号通路富集分析显示,差异基因参与的通路主要有溶酶体相关通路、PI3K-AKT 通路、动物自噬相关通路、癌症相关通路、肝细胞癌相关通路等。

2.2 CAFs 药物靶点组学的测序结果及其富集分析

对 CAFs 药物靶点组学测序结果中筛选出的 $P < 0.05$ 的差异肽段进行 GO 功能及 KEGG 信号通路富集分析,显示显著富集的差异肽段与细胞迁移、细胞动力、细胞骨架、溶酶体等相关,差异基因参与的通路主要有细胞骨架调节、肝细胞癌、细胞凋亡、PI3K-AKT 通路、癌症相关通路等。

2.3 仑伐替尼对 CAFs 自噬及迁移的影响

透射电镜扫描结果显示,DMSO 组和仑伐替尼组 CAFs 中自噬小体(黄色箭头所示)数目分别为 2.00 ± 1.00 、 7.67 ± 1.53 ,两组相比较差异显著 ($t = 5.38, P < 0.05$),见图 2。Transwell 实验结果显示,

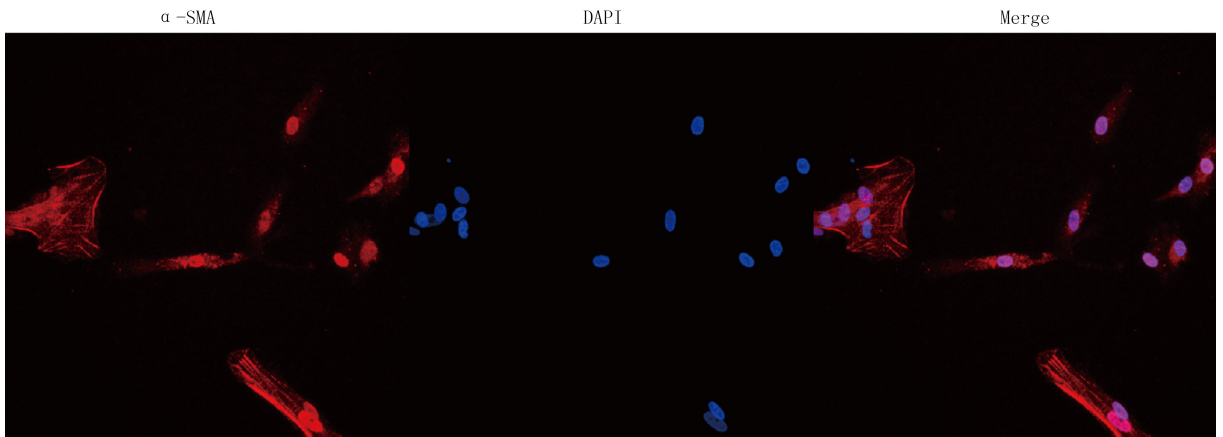
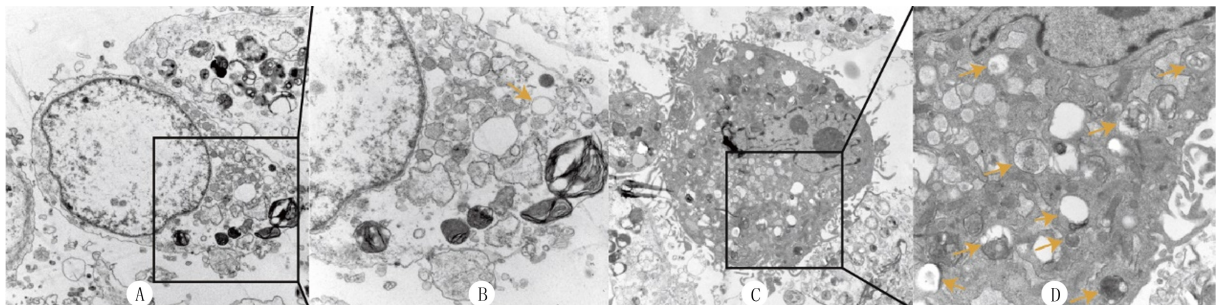


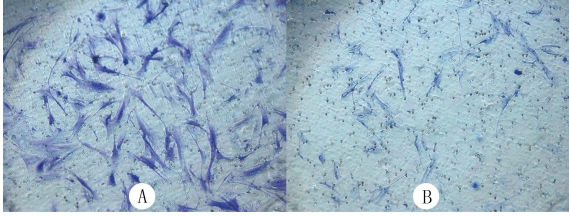
图 1 CAFs 的激光共聚焦显微镜观察结果(免疫荧光染色,60 倍)



A、B 为 DMSO 组,C、D 为仑伐替尼组;图中黄色箭头所示为自噬小体;B、D(25 000 倍)为 A、C(8 000 倍)中选中的部分的局部放大

图 2 CAFs 的透射电镜扫描图像

DMSO 组和仑伐替尼组中 CAFs 迁移数目分别为 60.00 ± 5.00 、 26.67 ± 2.52 ，两组比较差异有显著性 ($t=10.31, P<0.05$)，见图 3。划痕实验结果显示，DMSO 组和仑伐替尼组迁移的 CAFs 伤口愈合百分比分别为 58.00 ± 4.00 、 21.00 ± 2.00 ，两组比较差异有显著性 ($t=14.33, P<0.05$)。



A: DMSO 组, B: 仑伐替尼组; 结晶紫染色, 10 倍

图 3 仑伐替尼对 CAFs 迁移能力的影响

3 讨论

HCC 的高复发率和转移率导致 HCC 患者的长期存活率不理想^[1-2]。因此,进一步探究肝癌的转移机制及探究新的治疗策略,对于延长肝癌患者生存时间至关重要^[16-17]。肝癌的转移不仅需要肝癌细胞逃避凋亡信号及宿主免疫反应,还需要 TME 中细胞间通讯支持,因此目前对于肿瘤发病机制和治疗方法的探索重心也逐渐从肿瘤本身转向其所处微环境,靶向 TME 的治疗方式被寄予厚望,主要有以下几方面原因:肿瘤微环境中的其他细胞具有遗传稳定性,比易发生基因突变的肿瘤细胞更容易靶向治疗寻找靶点^[18];不同于肿瘤细胞的获得性耐药,靶向肿瘤微环境的治疗可有效减少耐药风险和肿瘤复发。

CAFs 是激活的成纤维细胞,是 TME 中最主要的基质细胞成分以及细胞外基质 (ECM) 的关键来源,在促进肿瘤进展和转移中具有关键作用,并且也是潜在的肿瘤治疗靶点。目前,针对靶向 CAFs 的治疗策略研究主要集中为以下 3 个方面:通过靶向特异性表面标志物 (如成纤维细胞活化蛋白 FAP) 去除 CAFs、靶向 CAF 的下游效应器和信号通路、将促肿瘤性 CAF 的激活状态恢复为相对静止状态或肿瘤抑制型。

仑伐替尼可以通过靶向阻断 VEGFR2 途径抑制肿瘤血管生成,使肿瘤细胞饥饿和缺氧,从而导致其严重生长迟缓甚至死亡。仑伐替尼还可以作用于 HCC 本身及其 TME 内多种细胞的多个靶点^[19]。目前仑伐替尼对肝癌细胞的直接作用机制研究较为成熟,但尚未见仑伐替尼对 CAFs 的生物学行为影响的研究。

为探索仑伐替尼对 CAFs 生物学行为的影响,本研究首先分离培养了原代 CAFs,通过免疫荧光染色的方法鉴定 CAFs 的标志物,即平滑肌肌动蛋白 α -SMA,结果显示,本研究培养的原代 CAFs 中 α -SMA 免疫荧光染色阳性率 $>90\%$,可以用于后续细胞实验。

通过转录组学测序和药物靶点组学测序,本研究发现 DMSO 组和仑伐替尼组的 CAFs 之间的差异基因和差异肽段主要富集在细胞迁移、自噬等相关功能和通路上,提示仑伐替尼可能主要通过影响 CAFs 的自噬以及迁移的能力,进一步影响 HCC 的进展。自噬是一种细胞组分被运送到溶酶体进行降解的过程,以保持细胞成分的基础周转,同时提供能量和大分子前体^[20]。到目前为止,关于自噬在肿瘤进展和抑制中的双重作用仍然存在着争议,自噬在肿瘤发展的不同阶段中起着动态的促癌或者抑癌的作用^[21]。对自噬的调控可以作为肿瘤治疗的有效介入策略。本研究结果显示仑伐替尼与 CAFs 自噬相关,并且可能通过这一途径抑制了 CAFs 的促癌作用。

本研究同时通过透射电镜观察 CAFs,以验证仑伐替尼对 CAFs 自噬的诱导作用,transwell 和细胞划痕实验结果均显示,仑伐替尼对 CAFs 迁移具有抑制作用。根据已有研究报道,CAFs 可通过化学途径调节血管生成、基质重塑,分泌能促进肿瘤生长和抑制肿瘤免疫的细胞因子、趋化因子、炎症因子和生长因子,并促进肿瘤细胞的上皮-间充质转化 (EMT) 和干细胞特性 (CSCs),从而促进肿瘤的侵袭转移^[22-24]。除此之外,CAFs 还可以通过机械力的作用,以物理方式对肿瘤起到协同转移作用^[25]。结合本研究的结果,提示仑伐替尼除了直接作用于肿瘤细胞外,也可以通过作用于 CAFs 间接抑制肿瘤进展。

综上所述,本研究首次对于仑伐替尼处理过的 CAFs 进行转录组学测序和药物靶点组学测序,首次发现了仑伐替尼可诱导 CAFs 自噬,并抑制其迁移。本研究不仅验证了靶向药物仑伐替尼除了对肿瘤细胞本身的作用之外,而其对 TME 的作用也为 CAFs 靶向治疗提供了新思路。未来应进一步探索 CAFs 的特异性靶点及作用机制,为 HCC 的治疗探索新的方向。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准 (文件号 QYFYWZLL27592)。

所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言》(1996 版)和中国有关临床试验研究规范、法规进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:赵梓吟、张斌、韩冰参与了研究设计;赵梓吟、何明阳、关鸽、蔡金贞参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] HARKUS U, WANKELL M, PALAMUTHUSINGAM P, et al. Immune checkpoint inhibitors in HCC: Cellular, molecular and systemic data[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022,86(Pt 3):799-815.
- [2] FOERSTER F, GAIRING S J, MÜLLER L, et al. NAFLD-driven HCC: Safety and efficacy of current and emerging treatment options[J]. *J Hepatol*, 2022,76(2):446-457.
- [3] OURA K, MORISHITA A, TANI J, et al. Tumor immune microenvironment and immunosuppressive therapy in hepatocellular carcinoma: A review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5801.
- [4] AL-SALAMA Z T, SYED Y Y, SCOTT L J. Lenvatinib: A review in hepatocellular carcinoma[J]. *Drugs*, 2019, 79(6): 665-674.
- [5] JIN H J, SHI Y P, LV Y Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. *Nature*, 2021, 595(7869):730-734.
- [6] ZHAO Y, ZHANG Y N, WANG K T, et al. Lenvatinib for hepatocellular carcinoma: From preclinical mechanisms to anti-cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020,1874(1):188391.
- [7] JIN M Z, JIN W L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020,5(1):166.
- [8] QUAIL D F, JOYCE J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013,19(11): 1423-1437.
- [9] LEE S S, CHEAH Y K. The interplay between microRNAs and cellular components of tumour microenvironment (TME) on non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019:3046379.
- [10] AFFO S, YU L X, SCHWABE R F. The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2017,12:153-186.
- [11] JIA W T, LIANG S F, CHENG B B, et al. The role of cancer-associated fibroblasts in hepatocellular carcinoma and the value of traditional Chinese medicine treatment[J]. *Front Oncol*, 2021,11:763519.
- [12] KANG N L, SHAH V H, URRUTIA R. Membrane-to-nucleus signals and epigenetic mechanisms for myofibroblastic activation and desmoplastic stroma: Potential therapeutic targets for liver metastasis? [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(4):604-612.
- [13] MHAILLY R, MECHTA-GRIGORIOU F. Role of cancer-associated fibroblast subpopulations in immune infiltration, as a new means of treatment in cancer[J]. *Immunol Rev*, 2021, 302(1):259-272.
- [14] SU S C, CHEN J N, YAO H R, et al. CD10⁺GPR77⁺ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness[J]. *Cell*, 2018, 172(4):841-856.e16.
- [15] FANG T, LV H W, LV G S, 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.
- [16] YU J, XU Q G, WANG Z G, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2018,68(6):1214-1227.
- [17] ZHAO H K, YAN G F, ZHENG L, et al. STIM1 is a metabolic checkpoint regulating the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2020, 10(14):6483-6499.
- [18] BEJARANO L, JORDÃO M J C, JOYCE J. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment [J]. *Cancer Discov*, 2021,11(4):933-59.
- [19] YI C H, CHEN L R, LIN Z F, et al. Lenvatinib targets FGF receptor 4 to enhance antitumor immune response of anti-programmed cell death-1 in HCC[J]. *Hepatology*, 2021,74(5): 2544-2560.
- [20] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9):528-542.
- [21] LI X H, HE S K, MA B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020,19(1):1-16.
- [22] KAPS L, SCHUPPAN D. Targeting cancer associated fibroblasts in liver fibrosis and liver cancer using nanocarriers[J]. *Cells*, 2020,9(9):2027.
- [23] JIA C C, WANG G Y, WANG T T, et al. Cancer-associated Fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition via the Transglutaminase 2-dependent IL-6/IL6R/STAT3 axis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2542-2558.
- [24] LI Y W, WANG R H, XIONG S, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the stemness of CD24⁺ liver cells via paracrine signaling[J]. *J Mol Med*, 2019,97(2):243-255.
- [25] LABERNADIE A, KATO T, BRUGUÉS A, et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion[J]. *Nat Cell Biol*, 2017,19(3):224-237.

(本文编辑 范睿心 厉建强)