

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.002

卵巢上皮性癌细胞系来源肿瘤干细胞的免疫特性研究*

姚秉彝^{1,3} 周倩^{2Δ} 罗成凤² 仲伟国³ 刘平³ 马成斌³

(1 同济大学医学院 上海 200092; 2 同济大学附属上海市第一妇婴保健院 上海 201204; 3 上海市长宁区妇幼保健院 上海 200051)

摘要 目的:探讨卵巢上皮性癌细胞系(SKOV3)来源肿瘤干细胞的免疫特性。**方法:**通过干细胞特异性标记物乙醛脱氢酶1(ALDH1)表达鉴定富集肿瘤干细胞(CSCs)的球状细胞(SDC)。将富集CSCs的SDC与相应的贴壁培养的普通卵巢癌细胞(MDC)进行比较。通过Transwell法(细胞侵袭试验)检测SDC和MDC对于T细胞增殖以及分泌功能的影响。RT-PCR检测SDC以及MDC免疫抑制基因表达情况。**结果:**以球体细胞形成方法获得的CSC富集SDC群比MDC表现出更高比例的ALDH1表达。将T细胞分别与SDC和MDC共培养,SDC组T细胞增殖率显著低于MDC组。MDC共培养的T细胞分泌IFN- γ 、IL-2水平明显高于与SDC共培养的T细胞($P<0.05$)。SDC表达免疫抑制基因ArginaseII、IDO、IL-8、TGF- β 水平明显高于MDC,以ArginaseII、IL-8的上调最为明显($P<0.05$)。**结论:**球体细胞形成试验是获得卵巢肿瘤干细胞的可靠方法。在卵巢上皮性癌细胞系(SKOV3)中,CSCs比普通肿瘤细胞表现出更强大的免疫抑制性,这可能是妨碍免疫治疗的免疫逃逸机制。

关键词:肿瘤干细胞;卵巢癌;ALDH1;免疫抑制;肿瘤免疫;SKOV3

中图分类号:R-33;R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-205-05

Research on the Immune Response of Ovarian Cancer Cell Line Derived Cancer Stem Cells*

YAO Bing-yi^{1,3}, ZHOU Qian^{2Δ}, LUO Cheng-feng², ZHONG Wei-guo³, LIU Ping³, MA Cheng-bin³

(1 Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200092, China; 2 Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Shanghai, 201204, China; 3 Shanghai Changning Maternity & Infant Health Hospital, Shanghai, 200051, China)

ABSTRACT Objective: The dimensional cultures (spheroids) were generated from Ovarian cancer cell lines (SKOV3) in order to enrich for CSCs. **Methods:** Stem cell markers ALDH1 were compared between CSC-enriched spheroid culture-derived cells (SDC) and the corresponding monolayer culture-derived cells (MDC). We evaluated the effect on proliferation and function of SDC or MDC on T cells in transwell assays. To compared the immune suppression gene expression of the SDC and MDC in RT-PCR assays. **Results:** We show that CSC-enriched SDC populations exhibit a higher proportion of ALDH1 expressing cells as compared with corresponding MDCs. The proliferation rate of T cells cocultured with SDC was significantly less than that of T cells cocultured with MDC. The expression of cytokine production of IFN- γ and IL-2 by T cells cocultured with SDC was significantly less than that of T cells cocultured with MDC ($P<0.05$). RT-PCR results showed that the expression of SDC gene, such as ArginaseII, IDO, IL-8 and TGF- β , was significantly higher than that of MDC, specially in ArginaseII and IL-8. **Conclusion:** Spheroid culture is a reliable method for obtaining ovarian tumor stem cells. Consistently, we have found in ovarian cell lines (SKOV3) a strong immunosuppressive activity exerted by CSC. All T cell functions investigated were suppressed upon co-culture with SDC significantly stronger than by MDC. This maybe an escape mechanism from immune cells supporting sustained growth of tumors and hampering immune therapeutic strategies.

Key words: Cancer stem cells; Ovarian cancer; ALDH1; Immunosuppression; Tumor immunity; SKOV3

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-205-05

前言

卵巢癌是目前全世界范围内导致妇女死亡最主要的生殖器官肿瘤之一,其中上皮性肿瘤占恶性卵巢肿瘤的比例最高。尽管对卵巢癌治疗的研究不断有新进展,但多数晚期卵巢癌患者的预后仍然不佳。肿瘤干细胞(CSCs)是一类具有干细胞特征的肿瘤细胞,具有自我更新、多向分化潜能以及肿瘤形成能力

^[1]。CSCs对常规放化疗和免疫治疗等均不敏感,是肿瘤治疗失败和复发、转移的根源^[2,3]。因此,彻底根除CSCs可能是治疗肿瘤的有效方法^[4],而针对卵巢肿瘤干细胞的靶向疗法可能成为治疗卵巢癌的重要途径。

对肿瘤的抑制,早期可以由固有免疫系统(又称非特异性免疫)(即,吞噬细胞,NK细胞,NKT细胞,细胞因子和补体蛋白)介导产生,之后由适应性免疫系统产生(又称特异性免疫。包

* 基金项目:上海市自然科学基金项目(16ZR1427300)

作者简介:姚秉彝(1981-),女,学士,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:13661903713,E-mail:13816852233@163.com

Δ 通讯作者:周倩,电话:13301762658,E-mail:shzhouqian@126.com

(收稿日期:2016-08-24 接受日期:2016-09-20)

括体液免疫和细胞免疫)(即,B 细胞和 T 细胞)^[5]。然而,越来越多的证据表明极少量的被称作 CSCs 的恶性细胞不但具有人类胚胎干细胞多能性和自我更新能力^[6,7],还可以分泌多种 CSC 物质,通过其和细胞的膜相互作用,抑制固有和适应性免疫系统,维持肿瘤生长和疾病进展。因此,本研究主要探讨了卵巢上皮性癌细胞系(SKOV3)来源肿瘤干细胞的免疫特性,以期对卵巢癌的临床治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 卵巢上皮性癌细胞系 SKOV3 购自上海生命科学院细胞库(ATCC)。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM 培养基(Invitrogen 公司),RPMI1640 培养基青霉素(100U/mL),链霉素(100 μg/mL),10%胎牛血清(Biochrom 公司),EGF 和 bFGF(Biochrom 公司),白介素 IL-2 和 IL-7(ImmunoTools 公司),ALDEFLUOR 测定试剂盒(干细胞技术,北卡罗来纳州达勒姆,美国);CO₂ 培养箱(日本三洋公司),流式细胞仪(BD 公司,美国),倒置显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 人外周血单核细胞(PBMC)的制备 PBMC 从健康供体的血液中获得,通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离 PBMC。再置入补充有 10 μg/mL 的 EGF 和 10 ng/mL bFGF,白介素 IL-2 和 IL-7,1%的青霉素和链霉素的无血清量子 263 培养基中培养,置 37℃,72 h 后收集培养上清液,离心去除细胞并置于 -20℃ 保存。

1.2.2 球体细胞形成试验 使用 0.25%胰酶将处于生长期的卵巢癌细胞来源细胞系 SKOV3 消化制成单细胞悬液,200 rpm 离心 10 min 后弃去上清液,将细胞按 2×10^4 个/孔的密度,接

种到低黏附板中;每孔加无血清培养基 2~3 mL,无血清培养液 RPMI1640 中含 10 ng/mL bFGF、10 ng/mL EGF。每隔 3~4 天半量换液,显微镜下观察 SKOV3 细胞的成球情况,实验用第 2-3 代以后的悬浮球。

1.2.3 ALDEFLUOR 分析 采用 ALDEFLUOR 分析方法对卵巢癌细胞 ALDH1 的表达进行分析,根据试剂盒说明书进行实验具体步骤操作。40 μm 滤器收集的细胞球,经胰酶消化 8 min 后,反复吹打 10 次并形成单细胞悬液。悬浮在含有 5 μL ALDH 底物 BAAA 中,37℃ 下孵育 40 min。作为阴性对照,对于每个样品,将等分试样加入 5 μL 处理过的 ALDH 抑制剂 DEAB。反应结束后用缓冲液冲洗 3 次,并重悬于 100 IxI 孵育缓冲液中待流式细胞仪上机检测。

1.2.4 Transwell 共培养 球体或单层细胞接种于在 24 孔培养板的上层以 1:5 的计数比例(癌细胞:外周血单核细胞)。细胞群用半透膜分离(0.4 μm 孔径)。外周血单核细胞增殖刺激使用抗 CD3/CD28 磁珠(Invitrogen)。刺激的 PBMC 单独作为阳性对照。未受刺激的外周血单核细胞共培养的球体及其同源的单层细胞作为阴性对照组细胞增殖实验。外周血单核细胞与球体或单层细胞共培养 6 天后,上流式细胞仪进行分析。

1.2.5 T 细胞内细胞因子分析 使用最终质量体积比为 10 μg/mL BFA 进行细胞固定、破膜,并在 37℃、50 mL/L CO₂ 孵箱中刺激 T 细胞 18 h,再分别用 IFN-γ-FITC、IL-2-PerCP,标记 IFN-γ,IL-2,PBS 清洗后,加入 400 μL PBS 重悬细胞,流式细胞仪上机检测。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测干细胞相关转录因子及免疫抑制基因的表达:12.5 μL 2× SYBR Green PCR Master Mix, 1 μL 的 cDNA,引物的终浓度为 0.3 μmol/L,反应条件:反应条件:95℃,5 min,40 个循环:95℃ 变性 15 s,58℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s。用 GAPDH 作为参考基因,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR in immunosuppressive expression analysis

Transcript name	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')
Arginase II	TCGGTACCATTAGTGGCCATG	CTGTCCATGGAGATTTCCTGATG
IDO	AGTCCGTGAGTTTGTCTTTCAA	TTTCACACAGGCGTCATAAGCT
IL-6	CACAGACAGCCACTCACCTC	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT
IL-8	TGCCAAGGAGTGCTAAAG	TCCACAACCCTCTGCAC
IL-10	GGTGATGCCCAAGCTGA	TCCCCAGGGAGTTCACA
TGF-β	ACCTGCAAGACCATCGACATG	CGAGCCTTAGTTTGACAGGAT

1.3 统计学分析

统计比较使用 SPSS 软件的 Windows (version 15; SPSS, Chicago, IL, USA)。用 t 检验分析数据的差异,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢上皮性癌细胞系来源细胞中球悬浮状体的形成

人卵巢上皮性癌细胞系来源细胞 SKOV3 细胞株在含有 bFGF 和 EGF 的无血清低密度培养基悬浮培养 7-10 天。该细

胞株中细胞均形成了高度致密的悬浮球状体。这些聚集体无法通过吸取造成机械性的分散(图 1)。

2.2 卵巢上皮性癌细胞系 MDC 和 SDC 的表型特征

本研究中,在人卵巢上皮性癌细胞系来源细胞 SKOV3 细胞株中,通过对其中 MDC 和 SDC 中 ALDH1 酶活性的测定来明确肿瘤干细胞群的存在。如图 2 所示,SDC 从的 SKOV-3 (MDC:9.70±0.265%,SDC:58.9±1.049%)(P<0.05)。

2.3 对 T 细胞增殖的抑制

干细胞的免疫识别敏感性较低,本研究对 CFSE 稀释试验

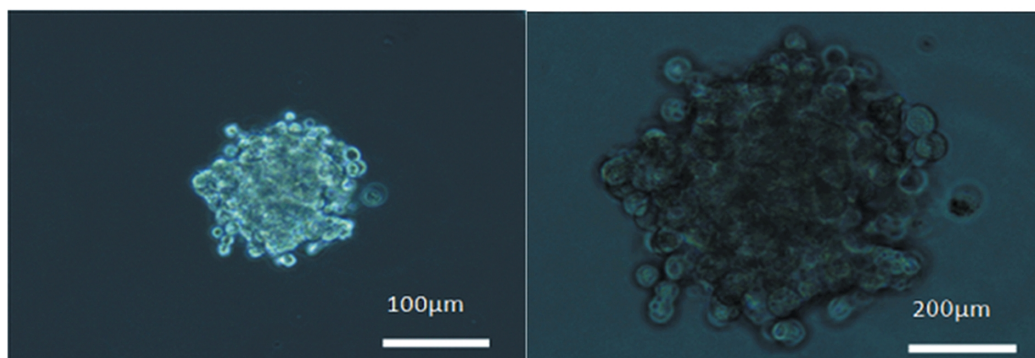


图1 电子显微镜下显示的用含有 bFGF 和 EGF 的无血清低密度培养基悬浮培养 7-10 天后(SKOV3)形成的高度致密的悬浮球状体

Fig.1 Representative images of SDCs from ovarian cancer cell lines SKOV-3 in suspension cultures

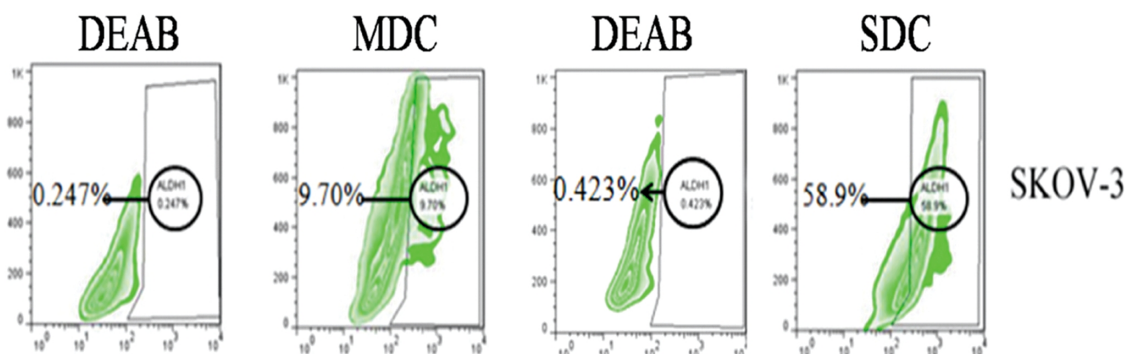


图2 采用 ALDEFLUOR 分析方法对卵巢癌细胞株 SKOV3 中 ALDH1 的表达的进行分析,结果显示 ALDH1 在 SDC 中的表达明显高于相对应的 MDC

Fig.2 The results showed that the expression of ALDH1 in SDCs was significantly higher than that in the MDCs by ALDEFLUOR analysis

中 T 细胞的增殖进行了初步探索。SDC 和 MDC 用 CFSE 标记的 T 细胞以 1:5 的计数比例进行共培养。SDC 和 MDC 平铺在 Transwell 小孔的下面(2×10^4 个/孔), T 细胞(10^5 个细胞)加入到孔中。经过 6 天的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞共培养,用流式细胞

仪检测 T 细胞增殖。结果显示:SKOV3 中的 SDC 和 MDC 均表现为对 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞的增殖抑制(CFSE C)。此外,相较于 MDC,SDC 对 T 细胞增殖有着更显著的抑制作用(如图 3) ($P < 0.05$)。

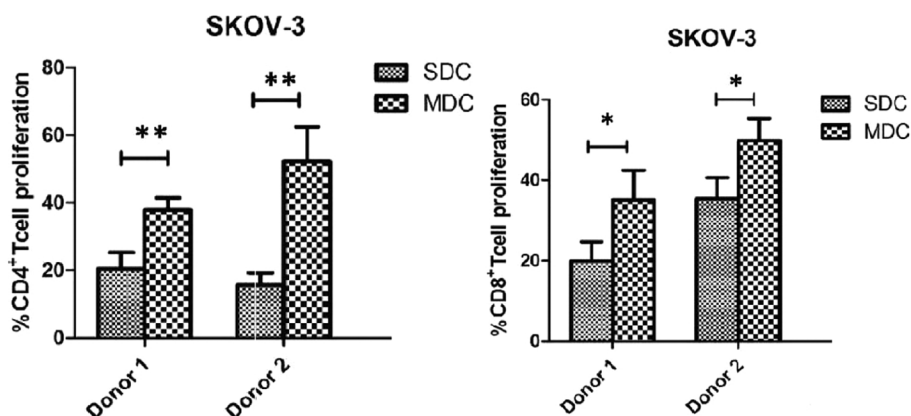


图3 外周血单核细胞与球体或单层细胞共培养 6 天后,流式细胞仪进行分析提示在 SKOV3 细胞株中,SDC 和 MDC 均表现为对 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞的增殖抑制,并且 SDC 对 T 细胞增殖抑制更为显著

Fig.3 Ovarian cancer cell lines SKOV-3 SDCs and MDCs inhibit the proliferation of T cells. Compared to MDCs, SDCs showed much stronger inhibitory on T cell proliferation

2.4 对 T 细胞细胞因子分泌的抑制

进一步研究 SDC 和 MDC 的对 T 细胞功能的影响,通过细胞内染色对 SDC 或 MDC 共培养的 T 细胞 IFN- γ , IL-2 分泌进行测定。图 4 提示与 MDC 共培养的 T 细胞分泌 IFN- γ , IL-2

水平明显高于与 SDC 共培养的 T 细胞($P < 0.05$)。

2.5 免疫抑制基因的表达

定量 PCR 测定卵巢癌细胞系来源的 SDC 以及 MDC 免疫抑制相关基因的表达。结果显示:SDC 表达免疫抑制基因

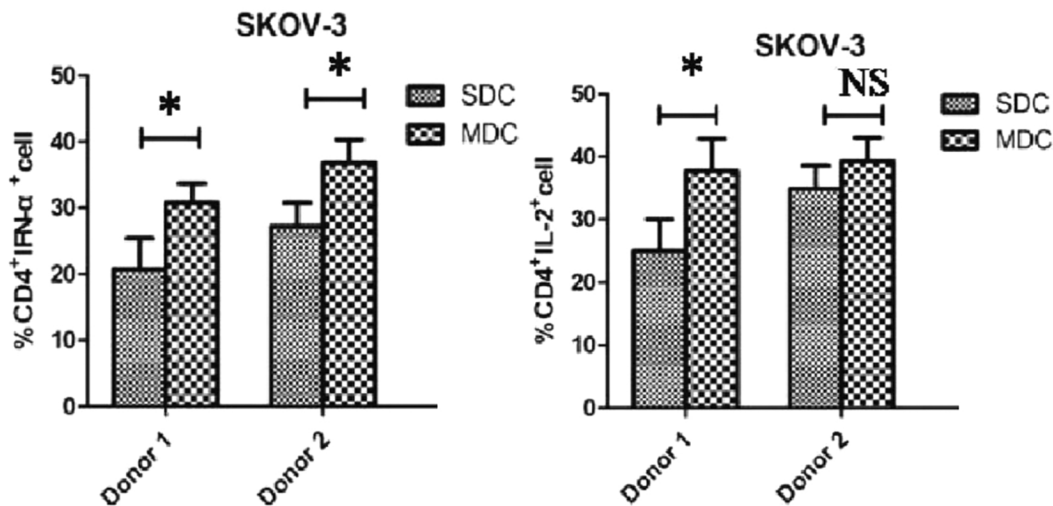


图4 流式细胞仪检测显示在 SKOV3 中,与 MDC 共培养的 T 细胞分泌 IFN- γ , IL-2 水平高于与 SDC 共培养的 T 细胞

Fig.4 Suppression of cytokine expression by SKOV3 CSCs. The expression of IFN- γ , IL-2 in CD4⁺T cells from 2 donors co-cultured with SDCs was significantly higher than that in the MDCs

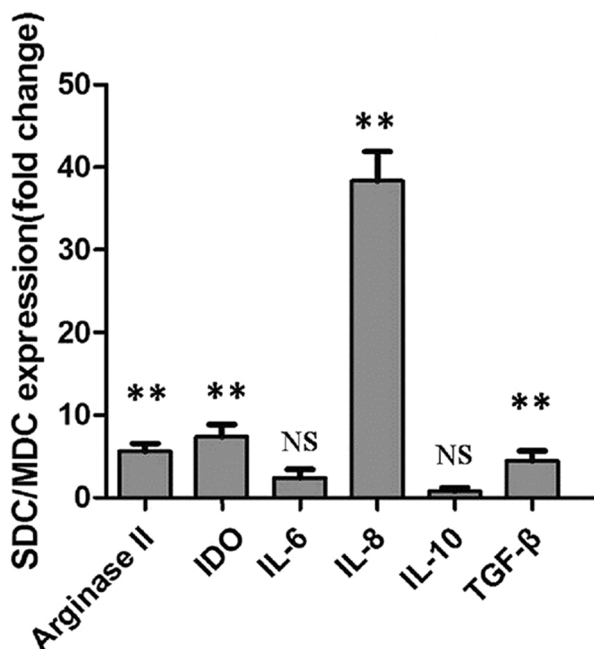


图5 定量 PCR 测定提示在 SKOV3 中,SDC 表达免疫抑制基因明显高于 MDC,具有明显统计学差异 $P < 0.05$,其中,IL-8, ArginaseII 等的上调最为明显

Fig.5 Quantitative PCR analysis of the mRNA expression of immunosuppressive factors. The expression of mRNA isolated from SDCs was higher than that in MDCs, especially in IL-8, Arginase II. Significant differences were $p < 0.05$

ArginaseII、IDO、IL-8、TGF- β 水平明显高于 MDC,其中 ArginaseII、IL-8 的上调最为明显($P < 0.05$)(图 5)。

3 讨论

本研究旨在评估卵巢上皮性癌细胞系来源(SKOV-3)的肿瘤干细胞的免疫抑制效应。我们通过检测干细胞表面分子的方法鉴定卵巢上皮性癌细胞系来源的肿瘤干细胞。肿瘤干细胞这一存在于肿瘤组织中的少量具有干细胞性质的细胞群体^[8,9],可引起无限增殖和

多向分化?迄今为止,尚无公认的针对其的特异性干细胞标记物,其筛选方法主要通过特定标记物分选或功能学(SP、EMT、无血清悬浮)等进行培养鉴定。ALDH1 是一个被广泛认可的肿瘤干细胞标记物。近年来关于 ALDH1 作为肿瘤干细胞标记的研究在多种肿瘤中显示出一致的结果,表明 ALDH1 阳性的细胞亚群具有致瘤、分化和自我更新等肿瘤干细胞特有的特性,并且通过增加肿瘤细胞耐药、复发与转移等方式^[10,11],影响患者的预后^[12,13],已被广泛应用于卵巢肿瘤干细胞的鉴定^[12]。本研究结果显示由卵巢上皮性癌细胞系来源细胞株 SKOV-3 培养的悬浮球状体表达 ALDH1 水平显著高于相对应的普通卵巢癌细胞,这表明球体细胞形成试验是获得卵巢上皮性肿瘤 CSCs 的可靠方法。

目前肿瘤免疫逃逸机制已经取得了诸多进展,肿瘤干细胞能够有效避免机体的免疫识别^[15]。它们过产生免疫抑制因子,低水平表达肿瘤抗原,抑制免疫作用的细胞群的生长来破坏免疫个体的整体性,达到抵抗化疗药物,逃避宿主免疫监视的目的^[16,17]。随着越来越多的研究证实了肿瘤细胞的异质性。Al-Hajj 报道用肿瘤干细胞表型标志物 CD44⁺CD24⁻/low Lineage^[18]进行细胞分离时少数表达肿瘤干细胞表型的细胞能够在小鼠中形成肿瘤,而数以万计的非表达此分子表型的细胞接种后则无法形成肿瘤^[18]。在急性髓性白血病和结肠等肿瘤中^[5,20]也得到了同样的结果。可见,肿瘤干细胞在恶性肿瘤的发生发展上起着极为关键的作用。然而,关于此类细胞的免疫学特性的研究却开展较少。因此,本研究进一步探讨了卵巢上皮性癌细胞系来源的肿瘤干细胞免疫学特性。

肿瘤干细胞的免疫抑制特性在其他类型的肿瘤中已逐渐被发现。例如 Chikamatsu 等^[21]报道头颈部鳞状细胞癌细胞系中鉴定出的 CSCs 相较于普通肿瘤细胞表现出更强的免疫抑制作用,不仅能抑制 T 细胞的增殖,而且能更有效的诱导 Treg 细胞和髓源性抑制细胞。与以上相似,本研究结果表明从卵巢上皮性癌细胞系来源(SKOV-3)中分离的 SDC 和 MDC 可以同时抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的增殖,抑制 T 细胞分泌细胞因子如 IFN- γ 和 IL-2;其中 SDC 表现出更为强大的抑制作用。一般来

说,肿瘤免疫包括三个阶段:免疫清除、免疫平衡及免疫逃逸^[2]。肿瘤的免疫逃逸机制不能简单的由宿主的免疫系统不能识别肿瘤来解释,肿瘤干细胞有可能是通过对T细胞增殖及分泌细胞因子的抑制作用来改变肿瘤局部的免疫微环境,使其一直处于免疫抑制状态,造成免疫应答缺失,从而导致肿瘤进行性、持续性地生长。

肿瘤在形成过程中可分泌TGF- β 、IL-6、表皮生长因子等多种炎症因子和趋化因子,这些因子可诱发人正常细胞增殖、突变,阻止细胞凋亡甚至恶变,并且能促进肿瘤细胞的生长、扩散、浸润^[23,24],它们在肿瘤微环境中共同组成炎症环境促进肿瘤的生长^[23,25]。(IL-8)作为白细胞介素的一种,已被证明可通过促进肿瘤细胞的增殖、转移和血管生成来促进卵巢癌的进展^[26]。本研究还表明从SKOV-3分离的SDC中免疫抑制细胞因子mRNA的表达也明显高于MDC。肿瘤细胞与肿瘤微环境可被视作一个完整的个体,它们在肿瘤的发展、增殖及浸润等进程中的功能互动性已经得到了普遍的认可。卵巢CSCs可能是通过表达免疫抑制基因并分泌免疫抑制细胞因子来改变肿瘤的微环境,实现对T细胞的免疫抑制,影响肿瘤所激发的特异性免疫应答,从而无法有效激活宿主的免疫系统,造成局部的低水平免疫或免疫无能,逃避机体免疫系统的识别和攻击,最终成功地使肿瘤细胞在体内生长、增殖和转移。

综上所述,球体细胞形成试验是获得卵巢肿瘤干细胞的可靠方法。卵巢上皮性癌细胞系来源(SKOV-3)的肿瘤干细胞展现出了强大的免疫抑制效应,通过抑制免疫细胞增殖、高水平表达肿瘤免疫抑制基因,产生大量免疫抑制因子等来改变肿瘤微环境,使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视和抗肿瘤免疫作用。因此,针对卵巢肿瘤细胞的免疫治疗可能成为新型免疫靶向治疗的一个研究方向,有望成为未来治愈卵巢癌的重要途径。

参考文献(References)

- [1] Santisteban M. ABC transporters as molecular effectors of pancreatic oncogenic pathways: the Hedgehog-Gli model [J]. Journal of gastrointestinal cancer, 2010, 41(3): 153-158
- [2] Mallini P, Lennard T, Kirby J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(3): 341-348
- [3] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review)[J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1806-1812
- [4] Schulenburg A, Ulrich-Pur H, Thurnher D, et al. Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology [J]. Cancer, 2006, 107(10): 2512-2520
- [5] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nature medicine, 1997, 3(7): 730-737
- [6] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. Cell, 2005, 122(6): 947-956
- [7] Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells[J]. Nat Genet, 2006, 38(4): 431-440
- [8] Hu M, Xiang F X, He Y F. Are cancer stem cells the sole source of tumor[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(5): 621-5
- [9] Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, et al. Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line [J]. Res Vet Sci, 2014, 96(2): 315-322
- [10] You Q, Guo H, Xu D. Distinct prognostic values and potential drug targets of ALDH1 isoenzymes in non-small-cell lung cancer [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9(2): 5087-5097
- [11] Yao T, Lu R, Li Y, et al. ALDH1 might influence the metastatic capability of HeLa cells[J]. Tumour Biol, 2015, 36(9): 7045-7051
- [12] Xu N, Shao M M, Zhang H T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is associated with a poor prognosis of bladder cancer[J]. Cancer Epidemiol, 2015, 39(3): 375-381
- [13] Wu S, Xue W, Huang X, et al. Distinct prognostic values of ALDH1 isoenzymes in breast cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2421-2426
- [14] T. Kuroda, Y. Hirohashi, T. Torigoe, et al. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65158
- [15] Kawasaki BT, Farrar WL. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion[J]. Trends in immunology, 2008, 29(10): 464-468
- [16] P De Vos Van Steenwijk, T Ramwadhoebe, R Goedemans, et al. Tumor infiltrating CD14 positive myeloid cells and CD8 positive T cells prolong survival in patients with cervical carcinoma, [J]. International journal of cancer, 2013(133): 2884-2894
- [17] M. Dean, T Fojo, S Bates, Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674
- [19] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 3983-3988
- [20] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110
- [21] Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, et al. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Head & neck, 2011, 33(2): 208-15
- [22] He Yan, Qian Hongyan. The roles of regulatory B cells in cancer[J]. Immunology Research, 2014, 215471
- [23] Lee K, Hwang H, Nam KT. Immune response and the tumor microenvironment: how they communicate to regulate gastric cancer[J]. Gut Liver, 2014, 8(2): 131-139
- [24] Cristiana A, Giuseppe M, Gina L, et al. Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50804
- [25] Yi KS, Nicolas B, Andras L, et al. HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts [J]. Clin Invest, 2012, 122(10): 3603-3617
- [26] Singha B, Gatla H R, Manna S, et al. Proteasome inhibition increases recruitment of I κ B kinase β (IKK β), S536P-p65, and transcription factor EGR1 to interleukin-8 (IL-8) promoter, resulting in increased IL-8 production in ovarian cancer cells [J]. BioChem, 2014, 289(5): 2687-2700