

网络出版时间: 2020-12-25 11:12 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201224.1107.016.html>

肿瘤相关成纤维细胞与上皮性卵巢癌顺铂耐药性的研究

江 玉, 孙 磊, 张 英, 陈 颖, 张晓慧, 颜士杰, 肖 兰

摘要 目的 探讨卵巢癌相关成纤维细胞(CAFs)对卵巢癌细胞顺铂敏感性的影响及其可能作用机制。方法 收取上皮性卵巢癌及正常卵巢上皮组织各10例,分离纯化培养CAF和正常卵巢成纤维细胞(NFs),免疫荧光法鉴定CAF;收集CAF或NFs培养上清液与卵巢癌SKOV3细胞建立间接共培养体系;CKK8法检测细胞增殖及顺铂毒性、划痕实验检测细胞迁移能力;DCFH-DA法测定共培养体系中活性氧(ROS)含量;qPCR及Western blot法检测共培养体系SKOV3细胞耐药相关基因YAP、CTGF和Cyr61在mRNA及蛋白水平表达。结果 成功分离培养CAF或NFs,免疫荧光结果显示CAF中平滑肌激动蛋白- α (α -SMA)与成纤维细胞活化蛋白(FAP)表达阳性;SKOV3细胞与CAF间接共培养后其增殖能力($P < 0.001$)、顺铂半数抑制浓度(IC_{50})($P < 0.01$)、迁移能力($P < 0.01$)均较SKOV3细胞单独培养或与NFs共培养组增加,差异有统计学意义;CAF共培养体系细胞中ROS含量增加($P < 0.01$),差异有统计学意义;CAF共

培养SKOV3细胞中耐药相关基因YAP($P < 0.01$)、CTGF($P < 0.05$)、Cyr61($P < 0.01$)在mRNA及蛋白水平较单独培养或与NFs共培养SKOV3中表达升高,差异有统计学意义。结论 CAFs可促进SKOV3细胞增殖、迁移,降低SKOV3细胞对顺铂敏感性。其机制一方面可能与ROS促进SKOV3细胞自噬相关;另一方面与卵巢癌细胞中耐药基因YAP、CTGF及Cyr61表达上调有关。

关键词 肿瘤相关成纤维细胞;上皮性卵巢癌;分离;YAP;顺铂耐药

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0255-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.016

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是女性生殖系统常见高度恶性肿瘤之一,病死率位居各妇科肿瘤首位,全球每年有超过14万的卵巢癌相关死亡病例^[1]。化疗耐药是卵巢癌高致死率的重要因素之一,目前发生机制尚不十分明确。肿瘤微环境理论认为,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)和细胞外基质是肿瘤对化疗反应的重要决定因素^[2]。肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)作为TME中重要基质细胞,分泌可溶性因子如促血管生成因子、基质金属蛋白酶、

2020-09-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81603138);安徽省中央引导地方科技发展专项项目(编号: 2017070802D149);安徽省高校优秀拔尖人才培养项目(编号: gxgwf20190006)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

作者简介: 江 玉, 女, 硕士研究生;

肖 兰, 女, 副教授, 研究员, 责任作者, E-mail: emma_02000@163.com

Western blot. Superoxide dismutase(SOD) activity and Malondialdehyde(MDA) content were detected by the kit. **Results** Compared with the control group, HR and FS in MI/R group significantly reduced ($P < 0.05$); CK-MB and cTnI concentrations increased significantly ($P < 0.05$); myocardial tissue damage was obvious; apoptotic cells and Bax/Bcl-2 expression ratio significantly increased ($P < 0.05$); SOD activity significantly decreased ($P < 0.05$), while MDA content significantly increased ($P < 0.05$); phosphorylation of ERK1/2 and NF- κ B p65 significantly increased ($P < 0.05$). The above results were reversed in MI/R rats after administration of imperatorin. Compared with the MI/R group, the HR and FS of the medium and high doses imperatorin groups were significantly recovered ($P < 0.05$); the concentration of CK-MB and cTnI decreased significantly ($P < 0.05$); myocardial tissue injury improved obviously; apoptotic cells and Bax/Bcl-2 expression ratio decreased significantly ($P < 0.05$); SOD activity significantly increased ($P < 0.05$), while MDA content significantly decreased ($P < 0.05$); phosphorylation of ERK1/2 and NF- κ B p65 decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Imperatorin can alleviate myocardial injury and oxidative stress in MI/R rats by inhibiting the activation of ERK1/2 and NF- κ B p65 pathway proteins.

Key words imperatorin; ERK1/2; NF- κ B p65; myocardial ischemia reperfusion; oxidative stress

细胞因子等^[3],促进肿瘤生长、血管生成、浸润和转移,并增加肿瘤耐药性。研究已证实 CAFs 参与调节多种恶性肿瘤耐药^[4],而 CAFs 在 EOC 化疗耐药中作用及其机制目前仍不明确。该研究在成功分离培养原代人 CAFs、正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs)的基础上,将 CAFs 与 EOC 细胞系 SK-OV3 细胞建立间接共培养体系,观察 CAFs 在 EOC 细胞顺铂耐药中的作用,并探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与标本 DMEM 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自德国 GIBCO 公司;TRIzol 试剂购自美国 InvitroGen 公司;逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;CCK8 试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司; α -SMA 与 FAP 抗体分别购自英国 abcam 及美国 CST 公司;YAP、CTGF、Cyr61 抗体分别购自美国 CST 公司、英国 abcam 公司。选取 2019 年 7—12 月在安徽医科大学第一附属医院进行手术切除的 10 例 EOC 患者的新鲜卵巢癌肿瘤组织标本,患者年龄 40~60 岁,术前未行放化疗及免疫治疗,术中临床分期 II~IV 期,术后病理诊断为 EOC;对应收集同期 40~60 岁因良性疾病(子宫肌瘤)行全子宫双附件切除患者新鲜上皮性卵巢组织标本。

1.2 方法

1.2.1 CAFs、NFs 的分离纯化与传代培养 含双抗冰 PBS 清洗 2 次,去除脂肪及出血坏死组织,剪至 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,加入与组织块体积比 1:1 的 IV 型胶原酶(1 mg/ml),37℃、5% CO₂ 培养箱中消化 2~3 h,加入含血清培养基终止消化,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液去除胶原酶,加入 1~2 ml 含 20% 胎牛血清、1% 双抗、0.01% 生长因子的 DMEM,接种于培养瓶中。于 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育培养。3~4 d 左右成纤维细胞贴壁,7 d 左右去除组织,瓶底细胞长满后,以含 20% 胎牛血清、1% 双抗、0.01% 生长因子的 DMEM 进行常规传代培养,酶消化时间差法进行纯化,取第 3~9 代成纤维细胞进行实验。

1.2.2 免疫荧光实验鉴定卵巢癌 CAFs 取对数生长期的 CAFs、NFs,接种于共聚焦皿中,培养 48 h 后,吸弃培养基,PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,加入 4% 多聚甲醛固定 20~30 min,固定完毕后 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,0.3% Triton × 100 溶液穿膜 15 min,

PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,1% BSA 封闭 30 min。吸弃 BSA 分别加入一抗 α -SMA (1:100) 和 FAP (1:100) 4℃ 孵育过夜,室温复温 1 h 后 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,滴加荧光二抗 Alexa Fluor 488 (1:200) 锡纸包裹室温孵育 1 h,PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,滴加 DAPI 染色液避光孵育 10 min,PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,滴加含抗荧光淬灭剂的封片液封片后立即于共聚焦显微镜下观察并拍照记录。

1.2.3 间接共培养体系的建立 CAFs、NFs 长至 70%~80% 融合时,PBS 漂洗 2 次,更换无血清培养基 DMEM,继续培养 24 h 后收集细胞培养液,1 000 r/min 离心 5 min 后留取上清液即为卵巢 CAFs、NFs 的条件培养基,分装后 -20℃ 保存备用。选取对数生长期的卵巢癌 SKOV3 细胞以 3×10^5 /ml 的浓度接种于 6 孔板中,24 h 后换液,每孔中加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的条件培养基继续培养 24 h,取共培养后细胞进行后续实验。

1.2.4 实验分组 CAFs 与卵巢癌细胞共培养组(CAFs 组):含 10% 胎牛血清的 CAFs 条件培养基 2 ml 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h;NFs 与卵巢癌细胞共培养组(NFs 组):含 10% 胎牛血清的 NFs 条件培养基 2 ml 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h;SKOV3 细胞单独培养组(SKOV3 组):含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 2 ml 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.2.5 CCK8 法检测细胞增殖和细胞对顺铂半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)

0.25% 胰蛋白酶消化细胞,以 1×10^4 个/孔细胞密度接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别培养 12、24、48、72 h,每孔加入 10 μ l CCK-8 并孵育 1 h,酶标仪测量 450 nm 波长下 OD 值,每个样本做 5 个复孔,根据 OD 值绘制 0、24、48、72 h 增殖曲线;种板后培养 24 h,分别加入终浓度为 0、50、100、150 和 200 μ mol/L 含顺铂完全培养基,每组设 5 个复孔,37℃、5% CO₂ 条件细胞培养箱中作用 48 h,每孔加入 10 μ l 的 CCK8 试剂,继续培养 2 h 后,酶标仪检测 450 nm 波长处各孔吸光度 OD 值。重复 3 次,取平均值。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 将各组细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇聚度达到 100% 后,用灭菌枪头在单层细胞层上用力划线,划痕后 0、48 h 分别在显微镜下观察细胞划痕的恢复情况并拍照。用图像分析软件分析细胞划痕宽度并计算划痕愈合率。划痕愈合率 = (划痕宽度 0 h - 划痕宽度 48

h) /划痕宽度 $0 \text{ h} \times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 DCFH-DA 法检测 ROS 水平 取对数生长期的 SKOV3 接种于共聚焦皿,细胞贴壁后换液建立间接共培养体系,培养 24 h 后吸弃培养液,加入 1 ml 无血清培养基稀释好的 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱内孵育 20 min,无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,立即于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.8 qPCR 检测 YAP、CTGF 和 Cyr61 mRNA 表达

Trizol 法提取各组细胞总 RNA,经浓度、纯度测定符合要求后,用 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录 cDNA,根据说明书进行 SYBR GREEN 荧光实时定量 qPCR 检测 YAP、CTGF、Cyr61。设 3 个复孔,所有反应进行 3 次, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 YAP、CTGF、Cyr61 基因的相对表达量,各基因引物见表 1。

表 1 YAP、CTGF 和 Cyr61 mRNA 引物序列

基因	引物序列
YAP	F: 5'-CCTGCGTAGCCAGTTACCAACAC-3' R: 5'-GCTGCTCATGCTTAGTCCACTGTC-3'
CTGF	F: 5'-CCAACCATGACCGCCGCCAG-3' R: 5'-TCATGCCATGTCTCCGTACATCTTCTC-3'
Cyr61	F: 5'-ATTAGATCTATGAGCTCCCGCATCGCC-3' R: 5'-CGGGAATTCTTAGTCCCTAAATTTGTG-3'
β -actin	F: 5'-GTGGCCGAGGACTTTGATTG-3' R: 5'-CCTGTAACAACGCATCTCATATT-3'

1.2.9 Western blot 检测细胞 YAP、CTGF 和 Cyr61 蛋白表达 取各组细胞,离心后收集; PBS 溶液清洗 2~3 次,加入裂解液 (RIPA : PMF = 100 : 1) 置冰上充分裂解,以 $14\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min (4°C); 吸取上清液即为蛋白质提取物。采用 BCA 试剂盒测量蛋白质含量; 取蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜上; 室温封闭 2 h; $5\% \text{BSA}$ 4°C 孵育一抗过夜,洗膜 2~3 次,每次 10 min,二抗孵育 1.5 h,洗膜。随后取适量 ECL 显影,化学发光检测仪成像。分别依次使用 YAP (1 : 1 000)、CTGF (1 : 1 000)、Cyr61 (1 : 400) 和 GAPDH (1 : 1 000) 抗体作为一抗,相应辣根过氧化物酶标记作为二抗 (1 : 10 000)。以目标蛋白与内参蛋白条带灰度比值计算各组蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件及 Image J 软件分析实验数据,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对资料 t 检验和单因素方差分

析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAFs 的鉴定 免疫荧光法测定 CAFs 高表达癌相关成纤维细胞激活标志物 α -SMA 和 FAP,而 NFs 无明显阳性 α -SMA 和 FAP 表达阳性 (图 1)。证实原代分离培养细胞为人卵巢癌相关成纤维细胞 (CAFs) 和正常成纤维细胞 (NFs),为后期研究提供可靠的细胞模型。

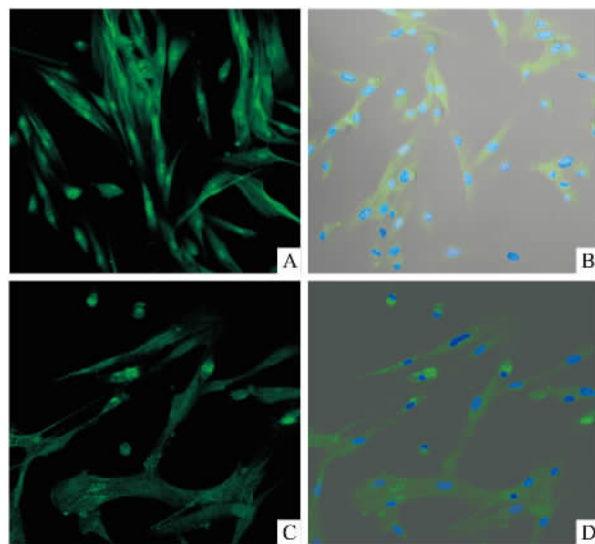


图 1 CAFs 细胞中 α -SMA 和 FAP 蛋白阳性表达 ($\times 40$)

蓝色荧光为 DAPI 染色细胞核,绿色荧光分别为 FITC 荧光二抗标记 α -SMA (A、B) 和 FAP (C、D) 表达

2.2 CAFs 对卵巢癌细胞增殖的影响 检测各组细胞培养 12、24、48、72 h 后增殖情况,相对于 SKOV3 组和 NFs 组细胞,CAFs 组细胞增殖更快,在 48 h 时 CAFs 组 SKOV3 细胞增殖活性高于 SKOV3 组和 NFs 组,差异有统计学意义 ($F = 34.02$, $P < 0.001$); 72 h 时 CAFs 组 SKOV3 细胞增殖活性高于 SKOV3 组和 NFs 组,差异有统计学意义 ($F = 60.01$, $P < 0.001$) (图 2)。提示 CAFs 可促进 SKOV3 细胞增殖。

2.3 CAFs 对 SKOV3 细胞顺铂化疗敏感性的影响

不同浓度的顺铂作用 48 h 后,在相同浓度顺铂作用下,CAFs 组 SKOV3 细胞存活率高于 SKOV3 组和 NFs 组,差异有统计学意义 ($F = 18.71$, $P < 0.05$) (图 3); CAFs 组 SKOV3 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 较 SKOV3 组或 NFs 组升高,差异有统计学意义 ($F = 18.98$, $P < 0.01$) (图 4)。上述结果提示,CAFs 可降低 SKOV3 细胞对顺铂敏感性。

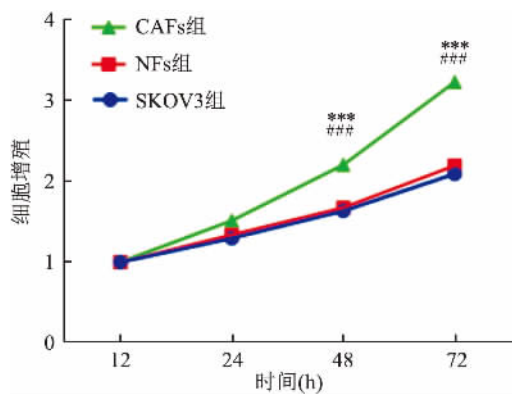


图2 各组共培养后 SKOV3 细胞增殖

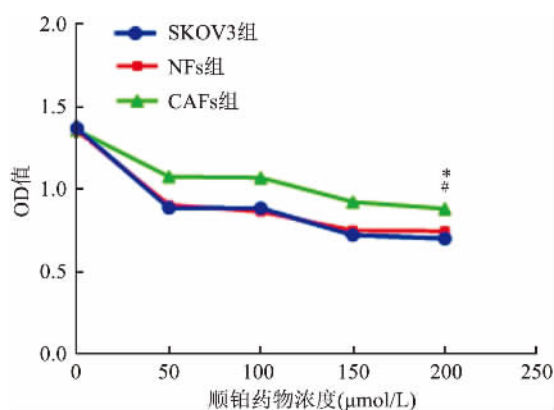
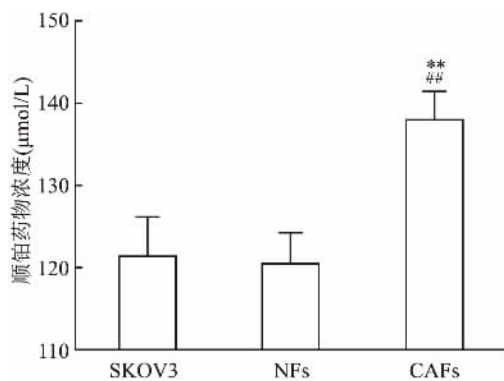
与 SKOV3 组比较: *** $P < 0.001$; 与 NFs 组比较: ### $P < 0.001$ 

图3 顺铂对各组共培养后 SKOV3 细胞增殖的影响

与 SKOV3 组比较: * $P < 0.05$; 与 NFs 组比较: # $P < 0.05$ 图4 各组共培养后 SKOV3 细胞 IC₅₀与 SKOV3 组比较: ** $P < 0.01$; 与 NFs 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 CAFs 对卵巢癌细胞迁移能力的影响 划痕愈合实验检测各组 SKOV3 细胞迁移能力。SKOV3 组划痕愈合率为 $(14.15 \pm 1.25)\%$, NFs 组划痕愈合率为 $(15.84 \pm 1.06)\%$, CAFs 组划痕愈合率为 $(52.15 \pm 1.26)\%$ (图 5), CAFs 组与 SKOV3 组和 NFs 组比较差异有统计学意义 ($F = 19.82, P < 0.01$)。提示 CAFs 可促进 SKOV3 细胞迁移能力。

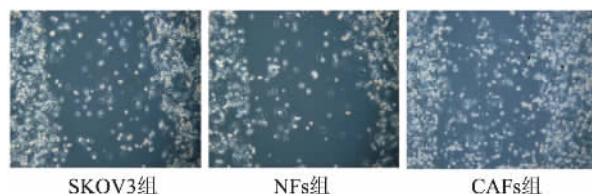


图5 各组共培养后细胞迁移能力 ×10

2.5 共培养细胞的 ROS 含量 各组荧光染色情况如图 6 所示,应用 Image J 软件测得每组平均荧光强度 (图 7)。CAFs 组 ROS 平均荧光强度高于 SKOV3 组和 NFs 组,差异有统计学意义 ($F = 10.58, P < 0.01$)。

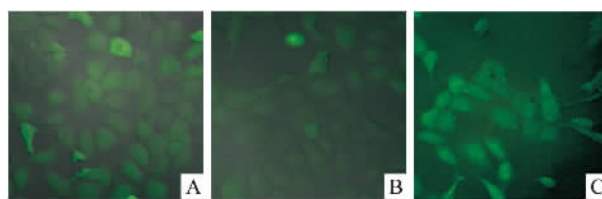


图6 各组共培养后 SKOV3 细胞 ROS 荧光染色 ×600

A: SKOV3 组 B: NFs 组 C: CAFs 组

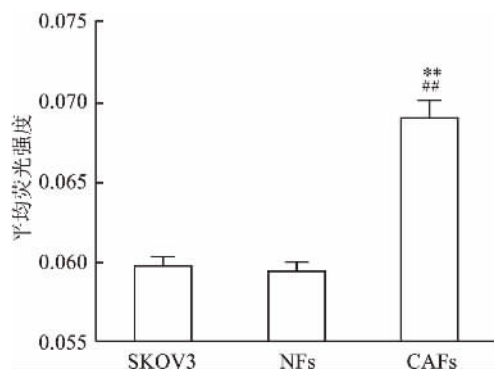


图7 各组共培养后 SKOV3 细胞 ROS 平均荧光强度

与 SKOV3 组比较: ** $P < 0.01$; 与 NFs 组比较: ## $P < 0.01$

2.6 CAFs-SKOV3 细胞间接共培养体系 YAP、CTGF 及 Cyr61 mRNA 水平表达 qPCR 结果显示:与 SKOV3 组和 NFs 组比较,CAFs 组中 YAP ($F = 20.67, P < 0.01$)、CTGF ($F = 8.53, P < 0.05$) 及 Cyr61 ($F = 21.74, P < 0.01$) 表达增加,差异有统计学意义 (图 8)。

2.7 CAFs-SKOV3 细胞间接共培养体系 YAP、CTGF 及 Cyr61 蛋白表达 Western blot 结果显示:与 SKOV3 组和 NFs 组比较,CAFs 组中 YAP ($F = 20.67, P < 0.01$)、CTGF ($F = 8.53, P < 0.05$) 及 Cyr61 ($F = 21.74, P < 0.01$) 表达增加,差异有统计学意义 (图 9)。

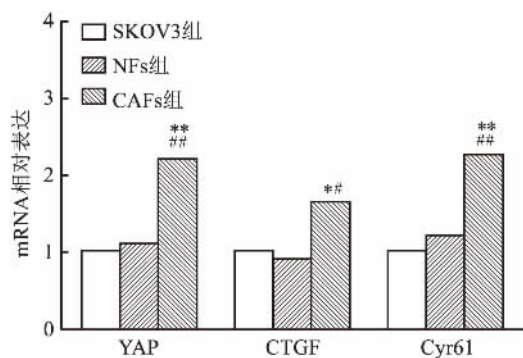


图8 各组共培养 SKOV3 细胞 YAP、CTGF、Cyr61 mRNA 相对表达量

与 SKOV3 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 NFs 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

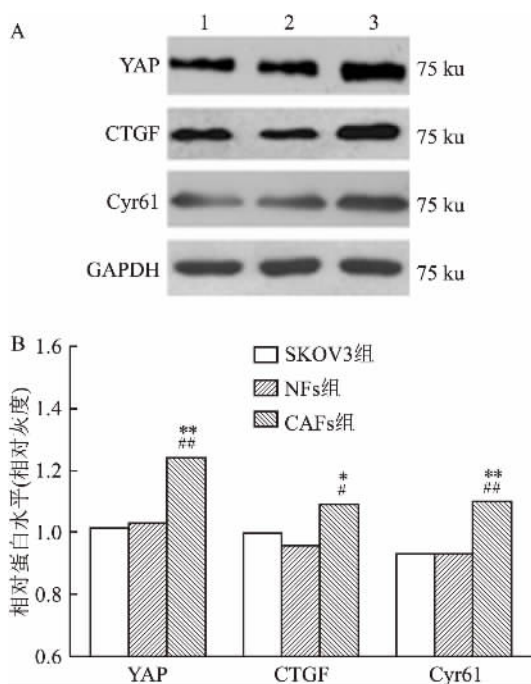


图9 各组共培养 SKOV3 细胞 YAP、CTGF、Cyr61 蛋白表达

A: 蛋白表达效果; B: 条带灰度值统计分析; 1: SKOV3 组; 2: NFs 组; 3: CAFs 组; 与 SKOV3 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 NFs 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

肿瘤细胞并非孤立存在,上皮性卵巢癌细胞再生及获得性耐药的发生离不开 TME 中各组分的相互作用和相互促进。TME 由肿瘤细胞及肿瘤间质构成,CAFs 是肿瘤间质内主要成分,研究证实,CAFs 与顺铂治疗后癌细胞相互作用可促进肺腺癌细胞再生^[5]; CAFs 还参与大肠癌^[6]、乳腺癌^[7]等多种恶性肿瘤药物耐药过程。目前,关于 CAFs 在卵巢癌顺铂耐药中的作用报道不多。本研究在成功分

离培养人原代 CAFs、NFs 的基础上建立 CAFs 与卵巢癌细胞间接共培养体系,体外效应实验证实 CAFs 可促进卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖($P < 0.001$)及迁移($P < 0.01$),降低 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性($P < 0.01$)。

ROS 是影响细胞凋亡和增殖的关键因素,有报道提出,衰老过程中 ROS 积累,可导致免疫衰老和自噬缺陷,进而转化成细胞免疫逃逸形成肿瘤。而肿瘤细胞产生的 ROS 作用于间质细胞,诱导间质产生高能代谢产物,为肿瘤细胞生存提供能量^[8]。为进一步明确 CAFs 促进卵巢癌细胞增殖、迁移能力及降低卵巢癌细胞对顺铂敏感性的作用机制,本实验探讨了各组卵巢癌 SKOV3 细胞 ROS 含量的变化,结果显示与 CAFs 共培养卵巢癌 SKOV3 细胞中 ROS 含量较 SKOV3 组和 NFs 组升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明 CAFs 诱导 SKOV3 细胞自噬产生。

YAP 是 Hippo 信号通路的关键组分,与多种癌症类型发展、进展以及临床预后相关。亦有研究指出,YAP 是介导肿瘤进展包括上皮间充质转换(mesenchymal transition in epithelium, EMT)、迁移及侵袭的关键因素。EMT 是一个动态可逆的生物学过程,特点是 Vimentin 和 N-cadherin 的表达,以及 E-cadherin 的表达抑制。相关实验研究表明,YAP 异常激活可经 TGF- β 1/SMAD2 通路诱导 EMT,而抑制 YAP 表达可抑制 EMT 过程,阻碍癌细胞侵袭,且 YAP/TEAD 协同激活可调节卵巢癌细胞多能性和化疗耐药^[9]。YAP 异常激活后与细胞核内 TEAD 结合,可引起下游基因如 CTGF、Cyr61 异常表达。而 CTGF^[10]、Cyr61^[11] 基因可促进卵巢肿瘤的形成及癌细胞的生长、增殖、转移,与卵巢癌患者的预后密切相关。本实验通过 qPCR 方法检测共培养体系 SKOV3 细胞耐药相关基因 YAP、CTGF 及 Cyr61 的表达情况,发现 CAFs 共培养 SKOV3 中 YAP($P < 0.01$)、CTGF($P < 0.05$)及 Cyr61($P < 0.01$)表达均较 SKOV3 组和 NFs 组上调,提示卵巢癌中 CAFs 可能直接或间接激活 YAP、CTGF 及 Cyr61,导致卵巢癌化疗耐药的发生。

综上所述,CAFs 可促进卵巢癌细胞增殖、迁移,使 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性降低。其机制可能与 CAFs 共培养致细胞中 ROS 含量明显增加,促进卵巢癌细胞自噬及细胞中耐药相关基因 YAP、CTGF 及 Cyr61 表达升高有关,为卵巢癌化疗耐药治疗提供了新靶点。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6) : 394 – 424.
- [2] Son B, Lee S, Youn H, et al. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3) : 3933 – 45.
- [3] Jiang H, Hegde S, Denardo D G. Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(8) : 1037 – 48.
- [4] 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 – 21.
- [5] Hisamitsu S, Miyashita T, Hashimoto H, et al. Interaction between cancer cells and cancer-associated fibroblasts after cisplatin treatment promotes cancer cell regrowth [J]. *Human Cell*, 2019, 32(4) : 453 – 64.
- [6] 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]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1) : 91 – 106.
- [7] Cui Q, Wang B, Li K, et al. Upregulating mmp-1 in carcinoma-associated fibroblasts reduces the efficacy of taxotere on breast cancer synergized by collagen iv [J]. *Oncology Letters*, 2018, 16 (3) : 3537 – 44.
- [8] Ferro F, Servais S, Besson P, et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodeling [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2020, 98: 129 – 38.
- [9] Xia Y, Zhang Y L, Yu C, et al. Yap/tead co-activator regulated pluripotency and chemoresistance in ovarian cancer initiated cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11) : e109575.
- [10] Yang L, Hou J, Cui X H, et al. Mir-133b regulates the expression of ctgf in epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(24) : 5602 – 9.
- [11] Shen H, Cai M, Zhao S, et al. Cyr61 overexpression associated with the development and poor prognosis of ovarian carcinoma [J]. *Medical Oncology*, 2014, 31(8) : 117 – 26.

The study of cancer-associated fibroblasts in cisplatin resistance of human ovarian cancer cells

Jiang Yu, Sun Lei, Zhang Ying, et al

(*Dept of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the effect of cancer-associated fibroblasts (CAFs) on the cisplatin resistance of ovarian cancer cells, and to explore the possible mechanisms. **Methods** CAFs and NFs were isolated and cultured respectively from 10 cases of epithelial ovarian cancer tissue and 10 cases of normal ovarian epithelial tissue. The isolated CAFs were identified by immunofluorescence assay. Indirect co-culture system was established by collecting CAFs or NFs culture supernatants and ovarian cancer SKOV3 cells. Cell proliferation, cisplatin toxicity and cell migration ability were investigated by CCK8 and scratch assay. The content of reactive oxygen species (ROS) in the co-culture system was assessed by DCFH-DA method. The expression of SKOV3 cell resistance-related genes YAP, CTGF and Cyr61 at mRNA and protein levels were detected by real-time quantitative PCR(qPCR) and Western blot. **Results** Primary ovarian cancer CAFs were successfully separated. The expressions of α -SMA and FAP protein in the separated CAFs were significantly higher than those in the NFs. Co-cultured with CAFs, the proliferation, the half inhibitory concentration(IC_{50}) of cisplatin and migration abilities of SKOV3 cells significantly enhanced. Co-cultured with CAFs, ROS content of SKOV3 cells increased. Co-cultured with CAFs, the expressions of YAP, CTGF and Cyr61 of SKOV3 cells enhanced at mRNA and protein levels. **Conclusion** CAFs can promote the proliferation and migration of ovarian cancer cells and reduce the sensitivity of ovarian cancer SKOV3 cells to cisplatin. The mechanism is related to ROS promoting autophagy in ovarian cancer cells on the one hand, and it is related to up-regulation of drug resistance genes YAP, CTGF and Cyr61 in ovarian cancer cells on the other hand.

Key words CAFs; epithelial ovarian cancer; separate; YAP; cisplatin resistant