

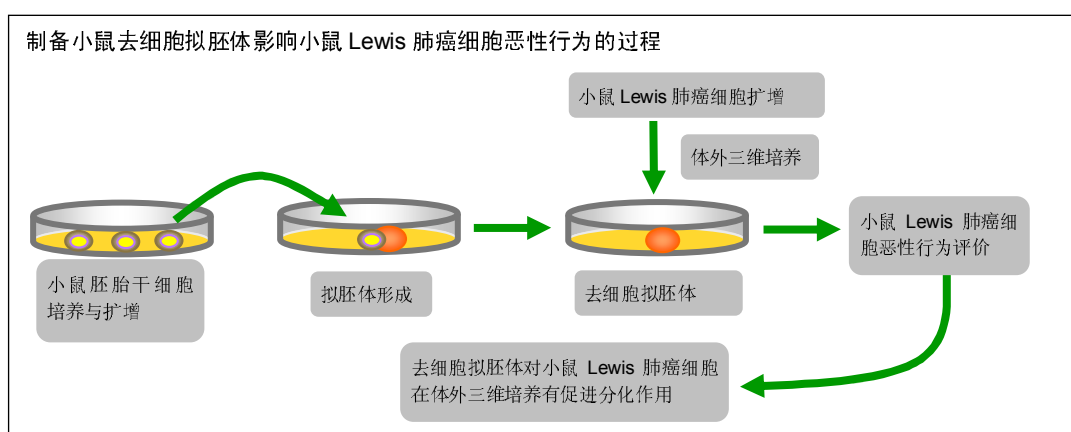
制备小鼠去细胞拟胚体对Lewis肺癌细胞的促分化作用

吕卫东¹, 蔡琳², 张家东^{1,3}, 雷光焰¹, 刘志刚¹, 张新伟¹, 陆建荣² (陕西省肿瘤医院, ¹胸外科, ²病理科, 陕西省西安市 710061; ³陕西中医学院附属医院, 陕西省咸阳市 712046)

引用本文: 吕卫东, 蔡琳, 张家东, 雷光焰, 刘志刚, 张新伟, 陆建荣. 制备小鼠去细胞拟胚体对Lewis肺癌细胞的促分化作用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(20):2972-2978.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.20.012 ORCID: 0000-0003-2685-4218(吕卫东)

文章快速阅读:



吕卫东, 男, 1976年生, 河南省灵宝市人, 博士, 副主任医师, 主要从事生物材料组织工程学在肿瘤中的应用研究。

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)20-02972-07

稿件接受: 2016-03-17

http://www.crter.org

文题释义:

去细胞拟胚体: 胚胎干细胞可在一定条件下分化成具有内、中、外3胚层结构的拟胚体, 而拟胚体用去细胞技术处理后得到的脱细胞三维细胞外基质材料即为去细胞拟胚体, 其可能因为保留拟胚体的细胞外基质成分、三维空间结构和生物机械性能而有拟胚体的一些功能。

三维培养: 传统研究肿瘤发生的方法包括体外肿瘤细胞二维培养和建立体内鼠肿瘤模型, 但是二者均有局限性: 肿瘤细胞二维培养不能很好的反映体内肿瘤的微环境, 而体内实验在控制单独细胞信号方面功能不足。体外三维培养能够克服以上不足。三维培养下肿瘤细胞的形态和表型类似于体内肿瘤, 能够动态观察肿瘤细胞变化, 已经被用于设定培养条件下肿瘤的发生、生长和转移的相关研究。

摘要

背景: 胚胎干细胞或胚胎组织与癌细胞共培养, 能够诱导癌细胞分化为正常上皮细胞或恶性程度降低, 而去细胞拟胚体保留了胚胎组织的结构和重要细胞因子。

目的: 成功制备一种来源于小鼠胚胎干细胞的去细胞拟胚体, 探讨去细胞拟胚体在小鼠 Lewis 肺癌细胞体外三维培养中的作用。

方法: 先将小鼠胚胎干细胞(D3)动态培养7 d后形成拟胚体, 然后用十二烷基硫酸钠进行去细胞处理。小鼠 Lewis 肺癌细胞与去细胞拟胚体三维共培养7 d, 对照组肺癌细胞在 Matrigel 上三维培养7 d。Ki67免疫组化染色检测细胞增殖情况, Western blot 检测 Paxillin, E-cadherin 蛋白表达水平, RT-PCR 检测 Slug 和 E-cadherin mRNA 表达水平。

结果与结论: ①实验成功制备一种大小均匀的小鼠拟胚体, 经十二烷基硫酸钠去细胞处理后, 拟胚体的细胞成分完全去除; ②小鼠 Lewis 肺癌细胞在 Matrigel 上三维培养7 d后形成球形的肿瘤多细胞球体, Ki67免疫组化染色阳性细胞比例高; 小鼠 Lewis 肺癌细胞在去细胞拟胚体支架上三维培养7 d, 可见肺癌细胞长入拟胚体, 但 Ki67 阳性细胞比例明显降低; ③相对于 Matrigel 组, 去细胞拟胚体组的 Paxillin 吸光度小于 Matrigel 组($P < 0.05$), 而 E-cadherin 吸光度大于 Matrigel 组($P < 0.05$); ④去细胞拟胚体组的 Slug mRNA 表达明显低于 Matrigel 组($P < 0.05$), 而 E-cadherin mRNA 表达高于 Matrigel 组($P < 0.05$); ⑤结果表明, 去细胞拟胚体对小鼠 Lewis 肺癌细胞在体外三维培养有促进分化作用。

关键词:

组织构建; 组织工程; 胚胎; 去细胞; 拟胚体; Lewis 肺癌细胞; 细胞外基质; 生物材料; 三维支架; 三维培养; 国家自然科学基金

Lv Wei-dong, M.D.,
Associate chief physician,
Department of Thoracic
Surgery, Tumor Hospital of
Shaanxi, Xi'an 710061,
Shaanxi Province, China

主题词:

胚状体; 细胞外基质; 癌, Lewis 肺; 细胞系, 肿瘤; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(31100686); 陕西省自然科学基金面上项目(2015JM8435)

Acellular embryoid bodies in mice: preparation and effect of promoting differentiation of Lewis lung carcinoma cells

Lv Wei-dong¹, Cai Lin², Zhang Jia-dong^{1,3}, Lei Guang-yan¹, Liu Zhi-gang¹, Zhang Xin-wei¹, Lu Jian-rong²
(¹Department of Thoracic Surgery, ²Department of Pathology, Tumor Hospital of Shaanxi, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ³Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Co-culture with embryonic stem cells or embryonic tissues can induce differentiation of carcinoma cells into normal epithelial cells or decrease malignancy of carcinoma cells. Acellular embryoid bodies retain the structure and important cytokines of embryonic tissues.

OBJECTIVE: To prepare acellular embryoid bodies from mouse embryonic stem cells and to investigate their effects on differentiation of mouse Lewis lung carcinoma cells at three-dimensional culture *in vitro*.

METHODS: Mouse embryonic stem cells (D3) were dynamically cultured for 7 days to produce embryoid bodies followed by decellularization with 0.1% sodium dodecyl sulfate. Mouse Lewis lung carcinoma cells were co-cultured with acellular embryoid bodies as test group or cultured in three-dimensional matrigel medium for 7 days as control group, respectively. Cell proliferation and expression of E-cadherin were detected by immunohistochemical staining and western blot assay, respectively. In addition, mRNA expressions of Slug and E-cadherin were observed using RT-PCR technology.

RESULTS AND CONCLUSION: Uniform mouse embryoid bodies were successfully prepared, and were completely decellularized with sodium dodecyl sulfate. After 7-day three-dimensional matrigel culture, in the control group, multicellular tumor spheroids were formed, accompanied by a higher Ki67 positive rate; Lewis lung carcinoma cells in the test group were repopulated in the acellular embryoid bodies showing significantly lower Ki67 positive rate. Compared with the control group, the absorbance of Paxillin in the test group was significantly smaller, and the absorbance of E-cadherin was significantly higher ($P < 0.05$). Besides, mRNA expressions of Slug and E-cadherin were significantly decreased and increased in the test group compared with the control group, respectively ($P < 0.05$). These findings indicate that the acellular embryoid bodies can promote differentiation of mouse Lewis lung carcinoma cells in three-dimensional culture *in vitro*.

Subject headings: Embryoid Bodies; Extracellular Matrix; Carcinoma, Lewis Lung; Cell Line, Tumor; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31100686; the Natural Science Foundation of Shaanxi, No. 2015JM8435

Cite this article: Lv WD, Cai L, Zhang JD, Lei GY, Liu ZG, Zhang XW, Lu JR. Acellular embryoid bodies in mice: preparation and effect of promoting differentiation of Lewis lung carcinoma cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(20):2972-2978.

0 引言 Introduction

胚胎干细胞是早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内环境,胚胎干细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。癌细胞与胚胎干细胞有许多共性,如胚胎干细胞与癌细胞都快速分裂、具有迁移性、可发生上皮-间质转化^[1]。

胚胎干细胞与癌细胞有不同的转归,胚胎干细胞分化为成体干细胞与祖细胞并最终分化成正常结构,而癌

细胞则无限制地增殖,其中细胞外基质结构的变化在癌症的形成过程中发挥核心作用。如正常乳腺上皮细胞可以通过诱导形成增生并进一步转变成癌组织^[2]。在不同的细胞微环境下,同一种细胞有不同的转归。

胚胎干细胞或胚胎组织与癌细胞共培养,能够诱导癌细胞分化成正常上皮细胞或恶性程度降低^[3-4]。胚胎干细胞在添加白血病抑制因子的培养基中诱导增殖,并可维持其未分化状态;胚胎干细胞进一步在无血清的培养基中诱导可形成拟胚体。拟胚体具有胚胎干细胞的特

征,但是由于其是多个细胞组织形成的集落,已经形成了细胞外基质骨架。由于胚胎干细胞或拟胚体植入体内将形成畸胎瘤,去细胞拟胚体受到重视。将拟胚体经去细胞处理后,保留了细胞外基质成分并已经成功用于组织工程研究^[5-8]。

作者设想将拟胚体去细胞处理,得到拟胚体的去细胞外基质支架,其可能因为保留拟胚体的细胞外基质成分、三维空间结构和生物机械性能,利于癌细胞的分化成熟,降低其复发、侵袭和转移。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年9月至2015年8月在陕西省肿瘤医院基础研究室及病理科完成。

1.3 材料

小鼠去细胞拟胚体的制备及其促小鼠 Lewis 肺癌细胞分化实验所用主要细胞、试剂和仪器:

细胞、试剂和仪器	来源
小鼠 D3 系胚胎干细胞	美国模式培养物集存库, ATCC
小鼠干细胞无血清无饲养层培养系统	Millipore
小鼠 Lewis 肺癌细胞系细胞	中国科学院上海细胞库
十二烷基硫酸钠(SDS)	生工生物工程(上海)股份有限公司
DNase- I 和 RNase-A	美国 Genview 公司
DMEM 培养液、胎牛血清	Hyclone 公司
Matrigel	BD Biosciences
Ki67, Paxillin, E-cadherin 和 β -actin 抗体	Santa Cruze 公司
RT-PCR 试剂盒, RT-PCR 仪	Applied Biosystems
E600 荧光显微镜	日本 Nikon 公司

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠胚胎干细胞D3系细胞拟胚体的培育 小鼠胚胎干细胞D3系细胞复苏后,培养于小鼠干细胞无血清无饲养层培养系统。传20-30代后, Accutase细胞分离溶液用于将胚胎干细胞从明胶包被的培养皿解离出来。以 $4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度动态悬浮培养于含体积分数为15%小牛血清, 1 000 U/mL青霉素, 100 g/L链霉素的DMEM完全培养液中,培养条件为37 °C,体积分数为5%CO₂, 转速40 r/min, 培养7 d。通过重力沉降作用收集拟胚体。

1.4.2 拟胚体采用SDS去细胞处理 预实验曾经用0.1% PAA、0.025% Trypsin/0.02% EDTA及0.5% Triton

X-100多步骤处理,以及0.5%SDS处理。处理过程类似于以前课题组对肿瘤组织的去细胞处理^[9]。结果表明,只有SDS组细胞去除彻底,并且细胞外基质成分保留良好,故最终用SDS进行去细胞处理。具体步骤如下:0.5% SDS在37 °C下处理24 h,然后在含20 U/mL DNase- I及0.2 g/L RNase-A的PBS中37 °C下处理24 h。各步骤间和处理后均以大量无菌PBS冲洗3次。

1.4.3 去细胞的评估 拟胚体和去细胞处理的拟胚体用FDA/PI双染色。将拟胚体和去细胞处理的拟胚体离心浓缩,蒸馏水冲洗1次,加入配好的FDA和PI,室温下放置10 min,离心,蒸馏水再次冲洗1次,涂片后在荧光显微镜下观察。

1.4.4 小鼠Lewis肺癌细胞扩增及与去细胞拟胚体共培养 小鼠Lewis肺癌细胞系由中国科学院上海细胞库提供。细胞复苏后,培养于含体积分数为10%小牛血清, 1 000 U/mL青霉素, 100 g/L链霉素的DMEM完全培养液中,培养条件为37 °C,体积分数为5%CO₂,待单层细胞片层达到80%以上融合时,以0.25%胰蛋白酶消化并收集细胞,PBS冲洗,用锥虫蓝拒染法测定活细胞数大于95%,调整细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的悬液备用。去细胞拟胚体用梯度乙醇消毒(体积分数为30%, 50%, 60%和75%各1 h)后无菌PBS反复冲洗备用。小鼠Lewis肺癌细胞在去细胞拟胚体支架上三维培养。用小鼠Lewis肺癌细胞培养于Matrigel支架上三维培养作对照。培养7 d取出评价。

1.4.5 细胞增殖标记物Ki67免疫组化染色 将种植小鼠Lewis肺癌细胞的去细胞拟胚体($n=12$)离心后收集沉淀物,种植小鼠Lewis肺癌细胞的Matrigel支架则整块取出,用体积分数为10%甲醛溶液固定24 h,制成石蜡切片,厚度5 μm ,以SABC法对Ki67进行免疫组化染色,最后通过DAB(棕黄色)显色,以苏木精复染。

1.4.6 Western blot法检测Paxillin、E-cadherin和 β -actin水平 种植小鼠Lewis肺癌细胞的去细胞拟胚体或Matrigel($n=12$)冰上匀浆后,加入蛋白裂解液及PMSF,冰上放置40 min,在4 °C下12 000 r/min高速离心40 min,取上清液,以BSA为标准,用考马斯亮蓝法对上清进行蛋白定量。取20 μg 蛋白样品,加缓冲液后高温蛋白变性,点样于10% SDS-PAGE后电泳,100 V转移1 h至硝酸纤维素膜,加封闭液37 °C封闭1 h,加Paxillin, E-cadherin或 β -actin一抗4 °C过夜,反复洗膜然后加碱性磷酸酶标记的IgG二抗室温孵育1 h,再次洗膜后,用Western blot印迹观察。操作过程设立阳性对

照、阴性对照和空白对照。以已知Paxillin和E-cadherin表达阳性的结肠癌组织为阳性对照,以一抗用PBS代替为阴性对照,以内参 β -actin为空白对照。结果以电泳图和半定量灰度分析表示。用Image-Pro Plus软件测量条带的透光度,计算目的蛋白(Paxillin和E-cadherin)灰度值与内参蛋白(β -actin)灰度值的比值。

1.4.7 RT-PCR检测Slug和E-cadherin mRNA表达 种植小鼠Lewis肺癌细胞的去细胞拟胚体或Matrigel ($n=3$)从液氮罐取出后低温下充分匀浆,用Trizol抽取总RNA,取RNA 5 μ L,在20 μ L反转录体系中合成cDNA,以5 μ L的cDNA为模板加入靶基因上下游引物,20 μ L体系中进行PCR扩增。所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,Slug上游引物序列 5'-CTC CAT CTG ACA CCT CCT-3',下游引物序列5'-ACT GTA GTC TTT CCT CTT CAT C-3'; E-cadherin上游引物序列 5'-CCT CTA CGG TTT CAT AA-3',下游引物序列 5'-CTG TAT TCA GCG TGA CTT-3'; 内参 β -actin上游引物序列 5'-TTC CTT CTT GGG TAT GGAAT-3',下游引物序列 5'-GAG CAA TGA TCT TGA TCT TC-3'。反应条件: 90 $^{\circ}$ C变性40 s, 60 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s,扩增40个循环。取反应产物与缓冲液混匀后,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳。结果以电泳图和灰度分析表示。用Image-Pro Plus软件测量条带的透光度,用目的基因(Slug和E-cadherin)和内参基因(β -actin)吸光度比值表示目的基因的表达水平。

1.5 主要观察指标 ①去细胞拟胚体和Matrigel上种植的小鼠Lewis肺癌细胞增殖情况。②反映癌细胞恶性程度与侵袭性的Paxillin和E-cadherin蛋白表达差异以及Slug和E-cadherin mRNA的表达差异。

1.6 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件包进行统计分析,进行两样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 拟胚体的获得 小鼠胚胎干细胞在明胶包被的培养皿中大小不均匀,呈圆形,无明显融合现象(图1A);动态悬浮培养7 d后得到的拟胚体大小均匀,光镜下呈圆盘状,表面凹凸不平(图1B)。

2.2 拟胚体和去细胞拟胚体比较 新鲜的小鼠拟胚体组织含有大量的细胞结构,并且细胞核明显显色(图2A);去细胞处理后得到的脱细胞拟胚体细胞去除完全,因自身荧光的作用,细胞外基质结构也显色,可

见组织间空泡(图2B)。

2.3 肺癌细胞种植后Ki67免疫组化染色 小鼠Lewis肺癌细胞在Matrigel上三维培养7 d后形成球形的肿瘤多细胞球体,Ki67免疫组化染色阳性细胞比例高,提示细胞增殖活跃(图3A);小鼠Lewis肺癌细胞在去细胞拟胚体支架三维培养7 d,可见肺癌细胞长入拟胚体,但Ki67阳性细胞比例明显降低(图3B);去细胞拟胚体组Ki67指数明显小于Matrigel组(图3C, $P<0.05$)。

2.4 Western blot和RT-PCR结果 Western blot检测结果提示,相对于Matrigel组,去细胞拟胚体组的Paxillin蛋白表达小于Matrigel组,而E-cadherin蛋白表达大于Matrigel组(图4A);去细胞拟胚体组的Paxillin/ β -actin比值小于Matrigel组($P<0.05$),而去细胞拟胚体组的E-cadherin/ β -actin比值大于Matrigel组($P<0.05$,图4B)。RT-PCR结果表明去细胞拟胚体组的Slug表达明显低于Matrigel组,而E-cadherin表达高于Matrigel组(图4C);去细胞拟胚体组的Slug/ β -actin比值小于Matrigel组($P<0.05$),而去细胞拟胚体组的E-cadherin/ β -actin比值大于Matrigel组($P<0.05$,图4D)。

3 讨论 Discussion

利用组织工程的方法来恢复正常的细胞微环境,从而逆转癌症发展是令人鼓舞的^[10-11]。如果模仿胚胎组织的材料支架能使癌细胞恢复到正常上皮,那么这些材料在肿瘤切除后应用就可能防止癌症的复发^[12]。此项研究就在于开发一种组织工程癌症治疗方法。

去细胞技术广泛用于生物材料组织工程科学研究中,其去除组织或器官的细胞成分,而保留细胞外基质的结构和功能^[13-15]。已有研究用去细胞方法处理小鼠或人拟胚体,较好地保留了拟胚体的细胞外基质成分^[7-8, 16]。

小鼠胚胎干细胞的分离方法基本成熟,且已广泛应用于生命科学研究的各个领域。而人类胚胎干细胞的研究工作引起了全世界范围内的很大争议^[17-20]。此项研究以小鼠胚胎干细胞为研究对象,用悬滴法动态培养小鼠胚胎干细胞,培养7 d后得到大小均匀的拟胚体。作者及课题组成员对得到的拟胚体开展了去细胞技术的探索研究,最后用SDS结合DNase- I /RNase-A两步骤去细胞处理,得到了细胞成分去除彻底的脱细胞拟胚体,并且基本保留了其细胞外基质成分。

胚胎干细胞或胚胎组织与癌细胞共培养能够降低癌细胞的恶性程度^[3-4, 21-23],但去细胞拟胚体和癌细胞培养能否降低癌细胞恶性程度未知。此项研究用小鼠

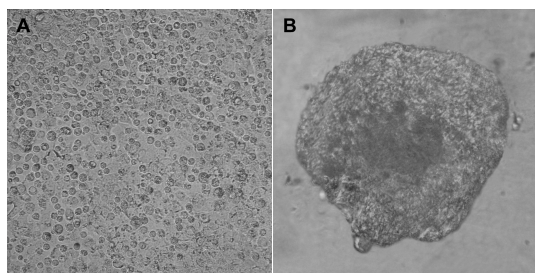


图 1 小鼠胚胎干细胞及培养 7 d 形成的拟胚体光镜下表现(×200)
Figure 1 Morphology of mouse embryonic stem cells and embryoid bodies after 7-day culture under light microscopy (×200)
图注: 图中 A 为小鼠胚胎干细胞, 呈圆形, 无明显融合现象; B 为形成的拟胚体, 光镜下呈圆盘状, 表面凹凸不平。

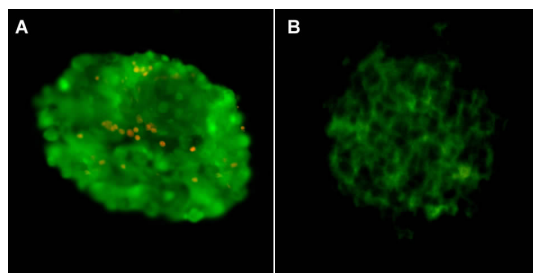


图 2 小鼠拟胚体及去细胞拟胚体染色荧光显微镜下表现(×200)
Figure 2 Morphology of mouse embryoid bodies and acellular embryoid bodies under fluorescence microscope (×200)
图注: 图中 A 为小鼠拟胚体, 含有大量的细胞结构, 并且细胞核明显显色; B 为去细胞拟胚体, 细胞去除完全, 因自身荧光的作用, 细胞外基质结构也显色, 可见组织间空泡。

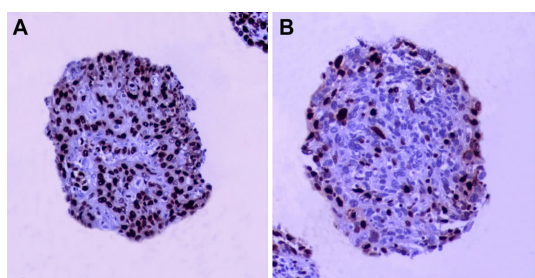


图 3 小鼠 Lewis 肺癌细胞培养后 Ki67 免疫组化染色(×200)
Figure 3 Ki67 immunohistochemical staining of mouse Lewis lung carcinoma cells at three-dimensional culture (×200)
图注: 图中 A, B 分别为 Matrigel 组和去细胞拟胚体组免疫组化染色, 可见去细胞拟胚体组 Ki67 阳性细胞比例明显降低; C 为两组 Ki67 指数($n=12$), 与 Matrigel 组比较, $^aP < 0.05$ 。

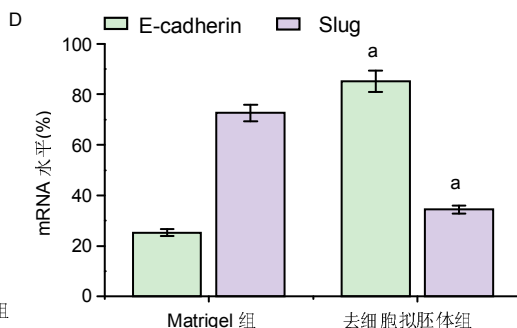
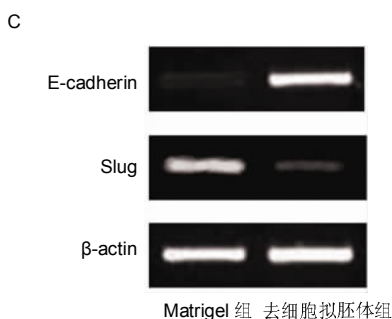
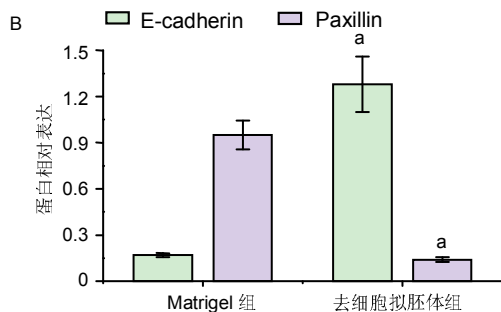
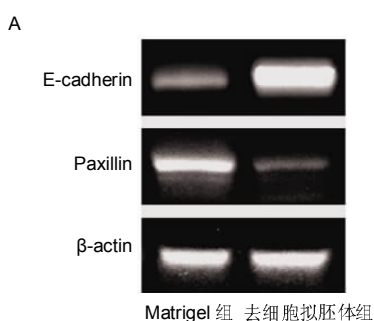
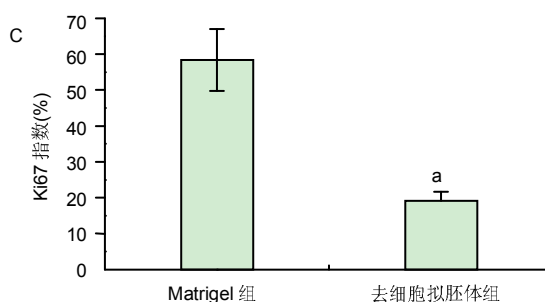


图 4 Western blot 和 RT-PCR 检测结果
Figure 4 Expressions of Paxillin and E-cadherin by western blot assay and mRNA expressions of Slug and E-cadherin by RT-PCR technology
图注: 图中 A 和 B 为 Western blot 检测 Paxillin、E-cadherin 蛋白表达水平($n=12$), 与 Matrigel 组比较, $^aP < 0.05$; C 和 D 为 RT-PCR 检测 Slug 和 E-cadherin mRNA 表达水平($n=3$), 与 Matrigel 组比较, $^aP < 0.05$ 。

Lewis 肺癌细胞培养于小鼠去细胞拟胚体, 观察到肺癌细胞在去细胞拟胚体中生长增殖。Matrigel 是从富含细胞外基质蛋白的 Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)小鼠肉瘤中提取出的基底膜成分, 癌细胞在其内培养可以形成肿瘤多细胞球体^[24-25]。实验比较在三维培养条件下小鼠

Lewis 肺癌细胞在去细胞拟胚体和 Matrigel 中生长的增殖情况以及反映恶性程度的一些细胞表型的表达。Ki67 反映细胞的增殖活跃程度, Ki67 阳性细胞比例越高, 提示癌细胞增殖越活跃, 恶性程度越高^[26-27]。实验结果显示, 去细胞拟胚体组的 Ki67 阳性细胞比例明显低于

Matrigel 组, 说明癌细胞在去细胞拟胚体中培养恶性程度降低。

Paxillin 是一种黏附斑相关的含磷酸酪氨酸的蛋白质, 在多种细胞信号通路中起作用, 其高表达和恶性肿瘤的浸润转移密切相关^[28-29]。E-cadherin 是一种介导细胞间同质黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白, 其表达降低和侵袭性增加与转移能力增强相关^[30-32]。Slug 是一种锌指转录因子, 可作为一种抗肿瘤凋亡因子, 通过转录下调 E-cadherin 的表达起作用^[33-34]。Western blot 检测结果提示去细胞拟胚体组的 Paxillin 表达明显低于 Matrigel 组, 而 E-cadherin 表达高于 Matrigel 组; 进一步 RT-PCR 结果提示去细胞拟胚体组的 Slug 表达明显低于 Matrigel 组, 而 E-cadherin 表达高于 Matrigel 组, 这说明去细胞拟胚体组的癌细胞恶性程度与侵袭性及转移能力明显下降。

当然, 研究有一定的局限性, 作为对照组的 Matrigel 是从小鼠肉瘤中提取的基底膜成分, 本身含有许多促肿瘤生长因子。但此研究至少证明了作为一种支持干细胞和癌细胞生长的三维支架, 癌细胞在其上有分化成熟及恶性程度降低的趋势。在后续研究中将用除 Matrigel 之外的对照组, 如用单成分不含细胞因子的明胶、壳聚糖或透明质酸等作为对照组, 将可以排除因 Matrigel 含有多种促肿瘤生长因子而引起的实验偏差。

作者贡献: 实验设计为吕卫东和雷光焰, 项目实施为吕卫东、张家东、蔡琳和陆建荣, 实验评估为刘志刚和雷光焰, 资料收集为蔡琳和张新伟。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署

了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):246-255.
- [2] Lopez JI, Kang I, You WK, et al. In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(9):910-921.
- [3] Dong W, Du J, Shen H, et al. Administration of embryonic stem cells generates effective antitumor immunity in mice with minor and heavy tumor load. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(11):1697-1705.
- [4] 孟龙, 张阳德. 小鼠 Lewis 肺癌细胞与胚胎干细胞体外共培养的生物学行为[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6794-6797.
- [5] Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog*. 2009;25(1):43-51.
- [6] Lin H, Yang G, Tan J, et al. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential. *Biomaterials*. 2012;33(18):4480-4489.
- [7] Goh SK, Olsen P, Banerjee I. Extracellular matrix aggregates from differentiating embryoid bodies as a scaffold to support ESC proliferation and differentiation. *PLoS One*. 2013;8(4):e61856.
- [8] Sart S, Ma T, Li Y. Extracellular matrices decellularized from embryonic stem cells maintained their structure and signaling specificity. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20(1-2):54-66.
- [9] Lü WD, Zhang L, Wu CL, et al. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. *PLoS One*. 2014 Jul 29;9(7):e103672.
- [10] Raof NA, Mooney BM, Xie Y. Bioengineering embryonic stem cell microenvironments for the study of breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7662-7691.
- [11] Raof NA, Raja WK, Castracane J, et al. Bioengineering embryonic stem cell microenvironments for exploring inhibitory effects on metastatic breast cancer cells. *Biomaterials*. 2011;32(17):4130-4139.
- [12] Ingber DE. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18(5):356-364.
- [13] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243.

- [14] Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(47):14452-14459.
- [15] Tapias LF, Ott HC. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(2):145-152.
- [16] Nair R, Shukla S, McDevitt TC. Acellular matrices derived from differentiating embryonic stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(4):1075-1085.
- [17] Jung KW. Perspectives on human stem cell research. *J Cell Physiol*. 2009;220(3):535-537.
- [18] Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009;30(3):204-213.
- [19] Robertson JA. Embryo stem cell research: ten years of controversy. *J Law Med Ethics*. 2010;38(2):191-203.
- [20] Lye JL, Soon LK, Wan Ahmad WA, et al. Knowledge and Attitude about Stem Cells and Their Application in Medicine among Nursing Students in Universiti Sains Malaysia, Malaysia. *Malays J Med Sci*. 2015;22(4):23-31.
- [21] Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3752-3757.
- [22] Bischof AG, Yüksel D, Mammoto T, et al. Breast cancer normalization induced by embryonic mesenchyme is mediated by extracellular matrix biglycan. *Integr Biol (Camb)*. 2013;5(8):1045-1056.
- [23] Dong W, Qiu C, Shen H, et al. Antitumor effect of embryonic stem cells in a non-small cell lung cancer model: antitumor factors and immune responses. *Int J Med Sci*. 2013;10(10):1314-1320.
- [24] Benton G, Arnaoutova I, George J, et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79-80:3-18.
- [25] Benton G, Kleinman HK, George J, et al. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;128(8):1751-1757.
- [26] Li LT, Jiang G, Chen Q, et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566-1572.
- [27] Huang G, Chen S, Wang D, et al. High Ki67 Expression has Prognostic Value in Surgically-Resected T3 Gastric Adenocarcinoma. *Clin Lab*. 2016;62(1-2):141-153.
- [28] Omran OM, Al Sheeha M. Cytoskeletal Focal Adhesion Proteins Fascin-1 and Paxillin Are Predictors of Malignant Progression and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2015;34(3):201-212.
- [29] Athanasopoulou A, Aroukatos P, Nakas D, et al. Decreased ezrin and paxillin expression in human urothelial bladder tumors correlate with tumor progression. *Urol Oncol*. 2013;31(6):836-842.
- [30] Chan KK, Matchett KB, McEnhill PM, et al. Protein deregulation associated with breast cancer metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(4):415-423.
- [31] Repetto O, De Paoli P, De Re V, et al. Levels of soluble E-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:408047.
- [32] Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):6-11.
- [33] Wang Y, Shi J, Chai K, et al. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13(9):963-972.
- [34] Zhang J, Cheng Q, Zhou Y, et al. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. *Oral Oncol*. 2013;49(11):1043-1050.