

· 基础研究 ·

细胞外基质的力学表征对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响和机制

钱俊¹, 唐诗佳¹, 胡克², 徐雪琴², 史凡¹, 封一苇², 杜纯月², 章非敏^{1*}

¹南京医科大学附属口腔医院修复科, 南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学生物医学工程与信息学院, 临床医学工程校重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**初步探索细胞外基质力学表征对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响。**方法:**在不同力学性能的水凝胶上接种两种口腔鳞癌细胞 CAL27 和 HSC3, 通过光学显微镜观察细胞形态变化; 利用免疫荧光观察层黏连蛋白 $\beta 2$ (laminin $\beta 2$, LAMB2)、VI型胶原 $\alpha 1$ (collagen type VI $\alpha 1$, COL6A1) 以及 E-钙黏蛋白 (E-cadherin, CDH1) 的表达定位以及表达水平; 使用 qPCR 检测细胞多能性指标 (SOX2、NANOG)、LAMB2、COL6A1、CDH1、整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的亚基 $\alpha 6$ (integrin $\alpha 6$, ITGA6) 和亚基 $\beta 4$ (integrin $\beta 4$, ITGB4) 基因的表达水平。**结果:**不同力学性能的水凝胶会改变口腔鳞癌细胞的黏附性, 高力学性能的水凝胶会增加细胞黏附效率。使用高力学性能水凝胶进行细胞培养时, 细胞的生物学行为和细胞培养板培养的表型相似。在低力学性能水凝胶的作用下, CAL27 细胞会形成紧密肿瘤细胞球, 而 HSC3 细胞则会形成不紧密的细胞团块。使用低力学性能水凝胶进行细胞培养时, 两种细胞中 LAMB2 和 COL6A1 都会高表达, 并且 LAMB2 在细胞上的受体整合素 $\alpha 6\beta 4$ 表达也会增高。细胞多能性指标 (SOX2、NANOG) 和 CDH1 在 CAL27 细胞中会随水凝胶力学性能增加而降低, 而 HSC3 细胞则相反。**结论:**细胞外基质的力学性能可以调节细胞黏附效率、细胞外基质合成、肿瘤细胞多能性和细胞间黏合等多种生物学行为。细胞外基质的力学性能可能是通过改变细胞外基质蛋白的表达来改变细胞的生物学行为, 细胞生物学行为改变的差异还与细胞系有关。

[关键词] 细胞外基质; 力学性能; 口腔鳞癌; 细胞生物学行为

[中图分类号] R739.85

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1289-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20200908

Influence and mechanism of mechanical properties of extracellular matrix on biological behaviors of oral squamous carcinoma cells

QIAN Jun¹, TANG Shijia¹, HU Ke², XU Xueqin², SHI Fan¹, FENG Yiwei², DU Chunyue², ZHANG Feimin^{1*}

¹Department of Prosthodontics, Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Key Laboratory of Clinical Engineering, School of Biomedical Engineering and Informatics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the influence and mechanism of mechanical properties of extracellular matrix on biological behaviors of oral squamous carcinoma cells. **Methods:** Two kinds of oral squamous carcinoma cells, CAL27 and HSC3, were cultured on hydrogel with different mechanical properties. Cell morphological changes were observed by microscope. The location and expression of laminin $\beta 2$ (LAMB2), collagen VI $\alpha 1$ (COL6A1) and E-cadherin (CDH1) were detected by immunofluorescence. The mRNA expression level of SOX2, NANOG, LAMB2, COL6A1, integrin $\alpha 6\beta 4$ (ITGA6 and ITGB4) and CDH1 were detected by qPCR. **Results:** The mechanical properties of hydrogel changed the adhesion of oral squamous carcinoma cells, and the high mechanical properties of hydrogel increased cell adhesion. The biological behavior of cells on hydrogel with high mechanical properties is similar to those on traditional cell culture plates. CAL27 formed tight multicellular tumor spheroid on hydrogel with low mechanical properties, while HSC3 formed loose cell clusters. On hydrogels with low mechanical properties, the expression of LAMB2, COL6A1, integrin $\alpha 6\beta 4$

[基金项目] 国家重点研发计划纳米科技重点专项(2016YFA0201704, 2016YFA0210700); 南京医科大学校级人才引进基金(KY101RC1707); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fmzhang@njmu.edu.cn

4 in the two kinds of cells were increase. Cell stemness markers (SOX2, NANOG) and E-cadherin (CDH1) in CAL27 decreased with mechanical properties increased in hydrogels, whereas HSC3 were opposite. **Conclusion:** The mechanical properties of extracellular matrix can regulate cell adhesion, extracellular matrix protein synthesis, tumor cell stemness and intercellular adhesion. The mechanical properties of extracellular matrix may change the biological behavior of cells by changing the protein expression of extracellular matrix. However, the specific cell biological behavior is related to the specificity of cell line.

[Key words] extracellular matrix; mechanical properties; oral squamous cell carcinoma; cell biological behaviors

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1289-1296]

细胞外微环境在细胞生长过程中发挥了重要的作用,调控了细胞的多种生物学行为,如生长、迁移、分化等^[1]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)作为细胞外微环境的一部分,也在细胞生物学行为中发挥了重要作用。ECM通过激活整合素位点将细胞外生物信号和力学信号传递到细胞内,而细胞外基质的力学性能是目前的一个研究热点。越来越多的研究表明ECM的力学性能可以对于细胞分化、肿瘤细胞侵袭、神经突起生长等细胞活动产生影响^[2]。其中,ECM的弹性模量和配体密度是调控细胞生物学行为的两个重要力学因素^[3-4]: ECM的弹性模量参与调控细胞间的相互作用,如细胞黏附、迁移和增殖^[5];配体以不同密度存在于材料表面,与细胞表面的受体相互作用,影响多细胞信号和细胞相互作用^[6]。由于不同组织的弹性模量和配体密度各不相同,并且ECM力学性能调控细胞生物学行为的具体机制仍不清楚,因此ECM的力学性能对细胞生物学行为的影响仍然需要进一步探索^[7]。

水凝胶是近年来研究较多的一种用来模拟ECM的高分子材料,它具有控制释放能力以及可塑性强的优点^[5]。同时,水凝胶不仅拥有与软组织相似的力学性能,还可以在材料中加入各种配体来调控材料力学性能和细胞生物学行为。因此水凝胶被广泛应用于ECM力学性能和细胞之间相互作用的研究^[8]。

此前,我们利用静磁场辅助组装的方法,制备了具有各向异性结构的水凝胶,并调控其界面特性和力学性能,使得多种不同来源的肿瘤细胞可以在复合材料表面通过黏附、增殖、迁移和融合,自发形成具有早期肿瘤结构和功能特点的肿瘤多细胞球模型^[9]。本研究在此基础上改进了复合材料的制备工艺,进一步调整了材料的细胞黏附能力和力学性能。基于这种新颖的水凝胶,本研究探索了ECM力学性能对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响,并且初

步探索了可能的机制,为后续新型药物和治疗手段的体外评价筛选提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM培养基(Gibco公司,美国);DAPI(上海碧云天公司);Alexa Fluor 488标记的驴抗兔抗体(Life Technologies公司,美国);兔抗层黏连蛋白 β 2(laminin β 2, LAMB2)多克隆抗体、兔抗VI型胶原 α 1(collagen type VI α 1, COL6A1)单克隆抗体(Abcam公司,美国),兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin, CDH1)单克隆抗体(CST公司,美国);纳米压痕仪(杭州Piuma公司);聚乙二醇二丙烯酸酯[poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA, 上海阿拉丁公司];甲基丙烯酸酐化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA, 上海优墨公司)。

1.2 方法

1.2.1 材料制作及力学性能测试

本研究使用2种水凝胶,一种单纯使用PEGDA,另一种将PEGDA和GelMA按1:4的质量比制作水凝胶,并使用纳米压痕仪测试水凝胶的弹性模量。由于力学性能包括弹性模量和配体密度,因此在本研究将弹性模量高的水凝胶作为高力学组,弹性模量低的水凝胶作为低力学组,而将细胞培养板作为对照组。

1.2.2 细胞培育

人口腔鳞癌细胞CAL27、HSC3置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养。

1.2.3 细胞接板

水凝胶在接板前用含10%胎牛血清的DMEM培养基预培养24h。接板时,取 1×10^5 个/mL的细胞悬液50 μ L滴加在水凝胶上,4h后加入完全培养基浸没水凝胶,间隔1d换液。

1.2.4 免疫荧光染色

细胞接板后移除原培养基, PBS洗涤3遍后加入4%多聚甲醛固定30 min, 0.5% TritonX透膜30 min, 3% BSA室温封闭30 min, 兔抗LAMB2多克隆抗体、兔抗COL6A1单克隆抗体、兔抗CDH1单克隆抗体4℃避光孵育过夜。次日使用PBS洗涤3次, 每次5 min; 37℃避光孵育Alexa Fluor 488标记的驴抗兔抗体(1:200)30 min, PBS洗涤; DAPI染核, PBS洗涤后, 激光共聚焦显微镜拍照, 保存图像。

1.2.5 qPCR实验

将水凝胶移置于新的细胞培养板中, 使用胰酶消化细胞, 并离心收集细胞沉淀。加入1 mL TRIzol试剂冰上裂解5 min, 提取细胞中总RNA。目的基

因的扩增引物由上海生工生物设计并合成。反应条件为95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40个循环。实验重复3次, 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的亚基 $\alpha 6$ (integrin $\alpha 6$, ITGA6)和亚基 $\beta 4$ (integrin $\beta 4$, ITGB4)、LAMB2、COL6A1、CDH1和细胞多能性指标(NANOG、SOX2)引物序列见表1。内参选用人GAPDH。

1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 6.01软件进行相关统计学分析, 每组实验重复至少3次。实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 qPCR的引物序列

Table 1 Primer sequences of qPCR

基因名	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
ITGA6	GGCTATGATGTGGCGGTGGTG	TCTGCCTTGCTGGTTCATGTAGA
ITGB4	CAAGCTCCAGCAGACCAAGTTCC	CGCCATCAGCACTGTGTCCAC
LAMB2	CAGGCTTCGTGCGGCTACAG	GCAGCAGCAGGTCATAGTCCATAG
COL6A1	GGACTTCGTCTCAAGGTCATCG	GCATCTGGCTGTGGCTGTACTG
CDH1	GCTCTTCCAGGAACCTCTGTGATG	TGTAAGCGATGGCGGCATTGTAG
NANOG	ATAGCAATGCTGTGACGCAGAAGG	TGGTTGCTCCACATTGGAAGGTTCC
SOX2	GCTCGCAGACCTACATGAACGG	AGCTGGCCTCGGACTTGGACC

2 结果

2.1 两种水凝胶的力学性能测试

本研究使用PEGDA和GelMA制作了两种水凝胶, 并且使用纳米压痕仪测试了两种水凝胶的力学性能。研究表明单纯使用PEGDA的水凝胶力学性能要远强于PEGDA和GelMA以1:4比例配置的水凝胶($P < 0.01, n=3$, 图1)。因此后续研究中将单纯使用PEGDA配制的水凝胶作为高力学组, PEGDA和GelMA以1:4质量比配制的水凝胶作为低力学组。

2.2 水凝胶力学性能对口腔鳞癌细胞早期黏附效率的影响

为了研究不同力学性能的水凝胶对口腔鳞癌细胞早期黏附能力的影响, 使用光学显微镜观察了接板后8 h细胞的生长状况(图2)。结果显示细胞在细胞培养板中接板8 h后细胞黏附较少, 而在水凝胶上接板后8 h细胞黏附明显增多。然而不同力学性能的水凝胶上细胞的黏附效率和铺展效率是不同的, 相较于低力学组, 高力学组细胞黏附效率和完全铺展的细胞比例更高。这些结果说明水凝

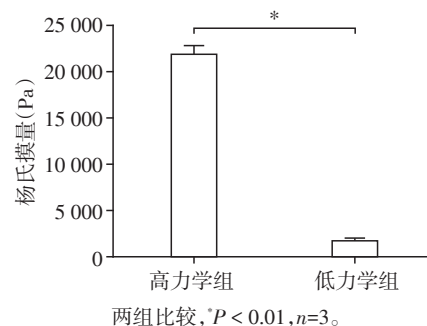


图1 两种水凝胶的力学性能

Figure 1 Mechanical properties of two hydrogels

胶可以促进细胞黏附和铺展, 而高力学性水凝胶能进一步促进细胞的黏附和铺展。

2.3 水凝胶力学性能对口腔鳞癌细胞表型的影响

接板后7 d可以观察到高力学组口腔鳞癌细胞是贴壁生长的, 其生长状态和细胞培养板类似。而低力学组口腔鳞癌细胞的生长状态不同, 两种细胞都可以呈三维团聚状生长, 且黏附密度较低(图3A)。然而在高倍镜下观察可以发现CAL27细胞呈现紧密的多细胞肿瘤细胞球样生长, 而HSC3细胞则相对疏松(图3B)。同时可以观察到低力学组

HSC3 细胞的黏附密度要大于 CAL27 细胞。这些结果说明不同力学性能的水凝胶会改变口腔鳞癌细胞的表型,且细胞间存在差异。

2.4 水凝胶力学性能对 ECM 蛋白表达的影响

为了研究水凝胶力学性能影响细胞表型的机制,使用免疫荧光和 qPCR 探索在不同力学性能水凝胶上 ECM 蛋白表达的差异。结果表明,相较于细胞培养板,CAL27 细胞和 HSC3 细胞中的 LAMB2 及 COL6A1 mRNA 在水凝胶组中高表达,并且在低力学组两种 mRNA 的表达进一步增高(图 4A、B)。免疫荧光结果说明 LAMB2 和 COL6A1 表达在细胞周围(图 4C、D)。这些结果说明水凝胶的力学性能可以调控 ECM 蛋白的表达。为了进一步研究 ECM 是否对细胞生物学行为产生影响,研究了层黏连蛋白在细胞表面的受体整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的基因表达水平。结果表明低力学组两种细胞的整合素 $\alpha 6\beta 4$ (ITGA6、ITGB4) 都会高表达(图 4A)。这些结果不仅说明水

凝胶的力学性能可以改变 LAMB2 的表达,还可说明 LAMB2 通过激活整合素 $\alpha 6\beta 4$ 影响细胞的生物学行为,因此推测 ECM 的力学性能可以通过调控 ECM 的蛋白表达水平来改变细胞表型。

2.5 水凝胶力学性能对 CDH1 和细胞多能性指标的影响

为了进一步探索其中可能的机制,研究了 CDH1 和两个经典的细胞多能性指标(SOX2 和 NANOG)的表达情况。CDH1 在上皮细胞的黏合中发挥重要作用。而 SOX2 和 NANOG 在肿瘤细胞的多能性表达中发挥重要作用。本研究表明相较于细胞培养板,在水凝胶上 CAL27 细胞的 CDH1 表达增高,HSC3 细胞也有类似的现象。而不同细胞系在不同力学性能的水凝胶上发生的变化各不相同。CAL27 细胞中 CDH1 的表达随着力学性能的增高而降低,HSC3 细胞则相反(图 5A)。这可能和两种细胞在低力学性能水凝胶上的细胞表型不同有关。同时,免疫荧

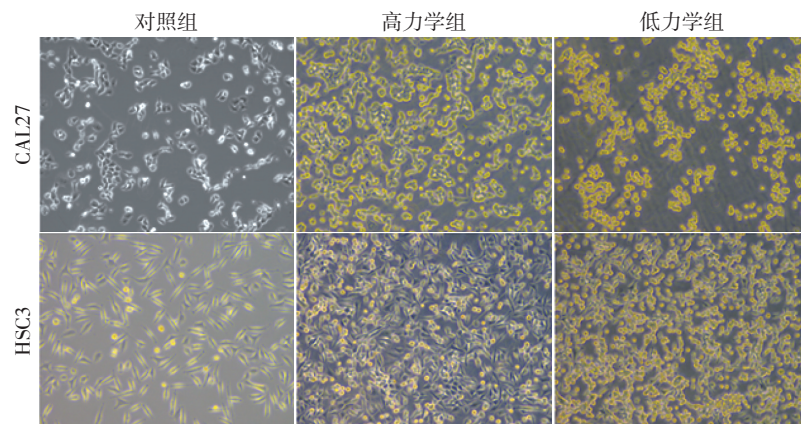
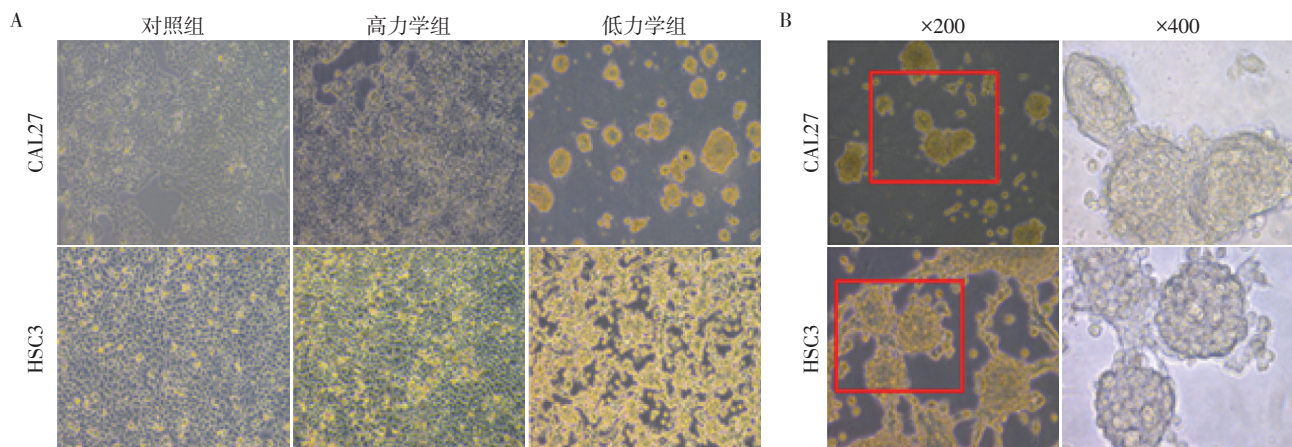


图2 水凝胶力学性能对口腔鳞癌细胞早期黏附效率的影响($\times 100$)

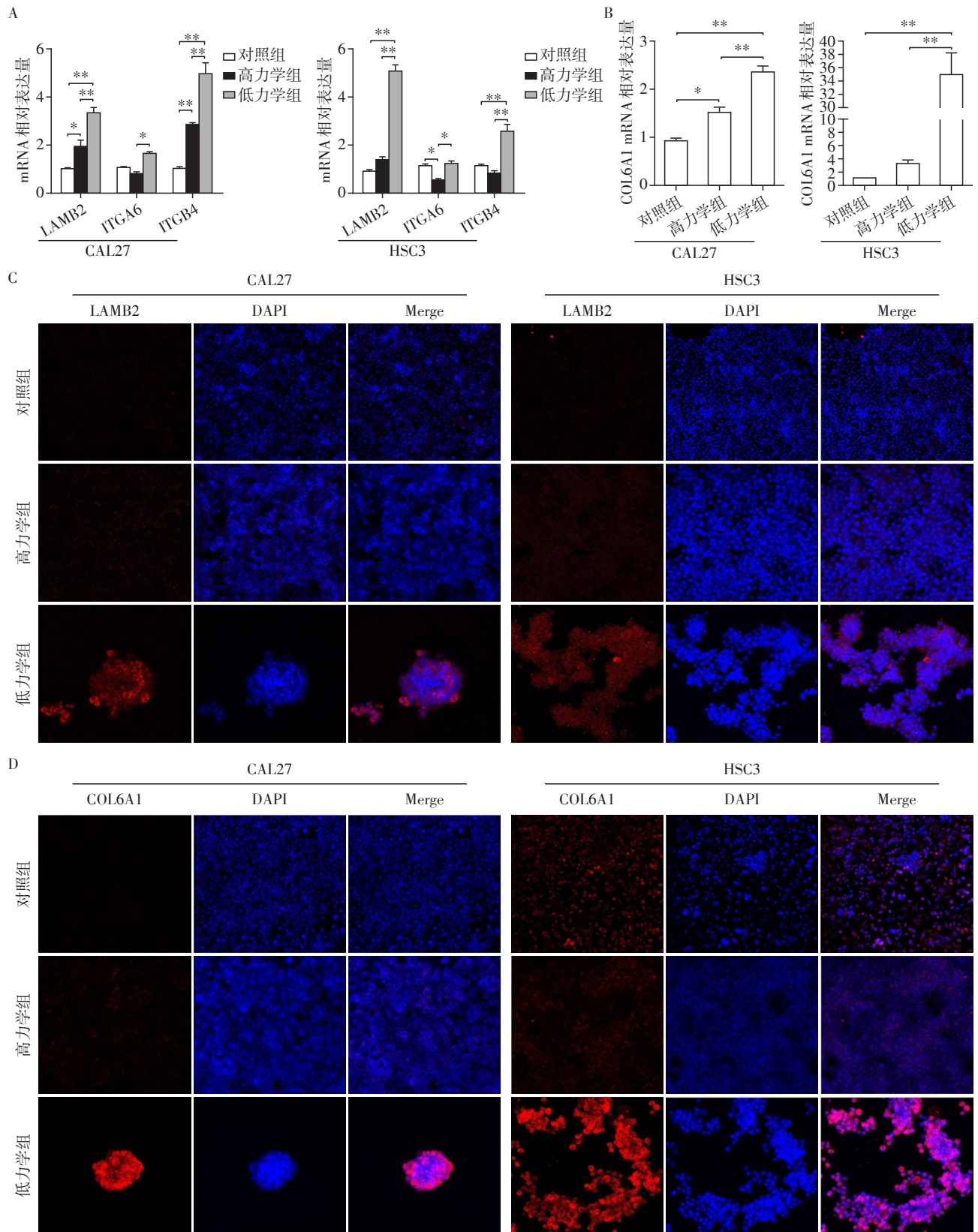
Figure 2 Influence of mechanical properties of hydrogel on early adhesion efficiency of oral squamous carcinoma cells($\times 100$)



A: 低倍镜下光镜图($\times 100$); B: 低力学组高倍镜下光镜图($\times 200, \times 400$)。

图3 水凝胶力学性能对口腔鳞癌细胞表型的影响

Figure 3 Influence of mechanical properties of hydrogel on phenotype of oral squamous carcinoma cells



A: qPCR检测LAMB2、ITGA6和ITGB4表达; B: qPCR检测COL6A1的表达情况; C: 免疫荧光检测LAMB2($\times 200$); D: 免疫荧光检测COL6A1($\times 200$)。两组比较, $P < 0.05$, $**P < 0.01$, $n=3$ 。

图4 水凝胶力学性能对细胞外基质蛋白表达的影响

Figure 4 Influence of mechanical properties of hydrogel on expressions of extracellular matrix proteins

光结果显示在低力学组,CDH1 主要集中表达在细胞间,在CAL27形成的多细胞球中,CDH1 主要集中表达在细胞球中心部位(图5B),而非细胞周围,因此推测,CDH1 可能在多细胞肿瘤细胞球的形成中发挥了重要的黏合作用。而SOX2和NANOG也显示类似的趋势(图5C)。这些结果说明,不同力学性能的水凝胶可以改变细胞表型,但是细胞生物学行为改变的差异还与细胞本身有关。

3 讨论

细胞外微环境在细胞活动中发挥了重要作

用。细胞外微环境包括ECM、小分子物质、微生物菌群、生物力等^[10]。其中,研究最多的是ECM。越来越多的研究表明ECM在调节细胞活动中发挥了中心作用,ECM蛋白通过细胞上整合素等受体将细胞外生物信号和力学信号传递到细胞内^[11]。不同组织的ECM力学性能是不同的,因此ECM的力学性能对细胞生物学行为的影响受到越来越多的关注。多个研究表明ECM的力学性能对细胞黏附、迁移、增殖等活动产生了重要影响。然而,传统的细胞培养板力学性能远大于体内软组织,这无法模拟体内细胞外微环境。因此选择一种合适的材料模

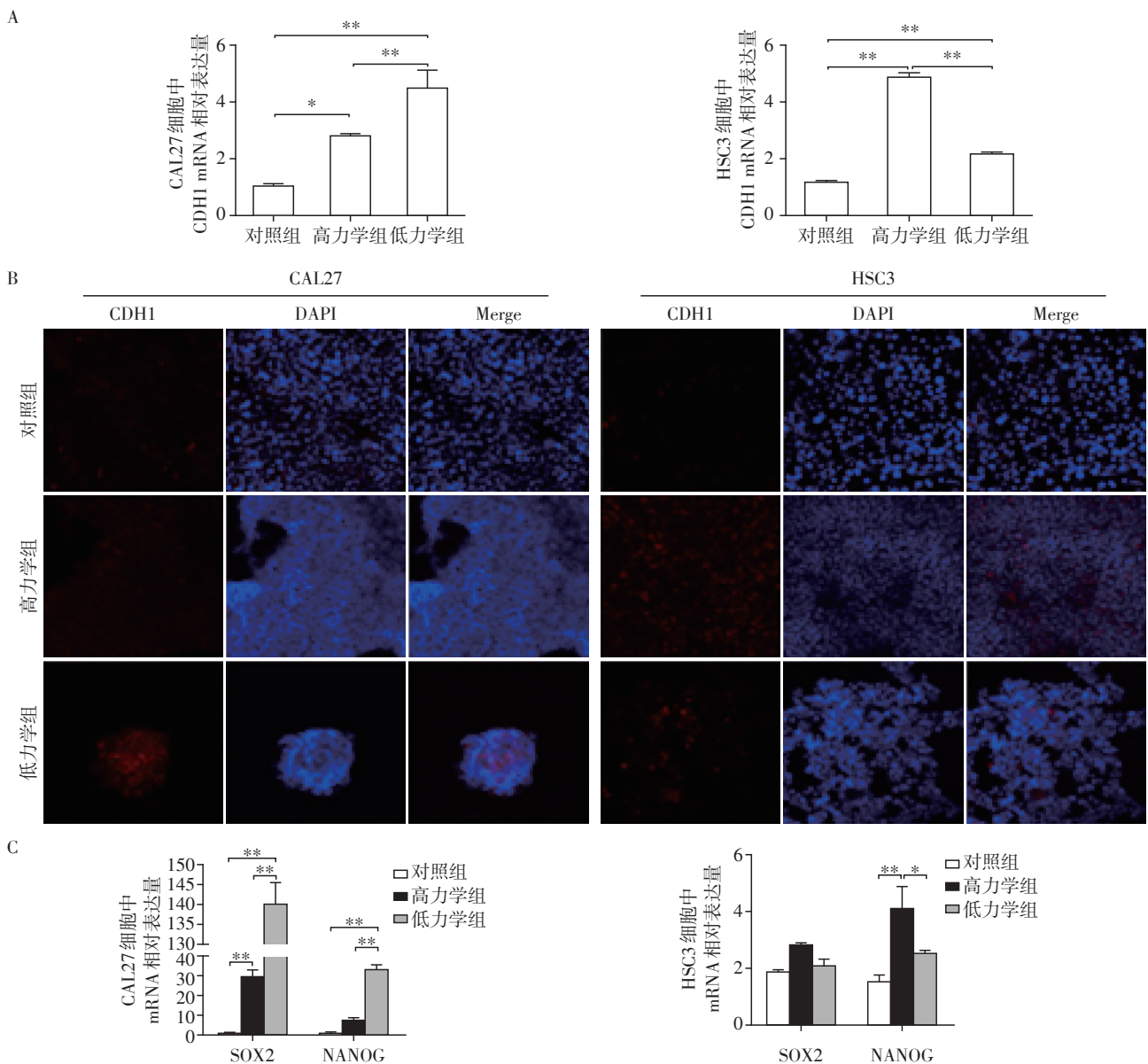


图5 水凝胶力学性能对CDH1和细胞多能性指标的影响

Figure 5 Influence of mechanical properties of hydrogel on CDH1 and cell stemness markers

拟细胞外微环境非常重要。水凝胶是一种常用的模拟ECM的高分子材料。此前本课题组的研究发现多种不同来源的肿瘤细胞可以在水凝胶复合材料表面通过黏附、增殖、迁移和融合形成多细胞肿瘤细胞球。本研究通过改变水凝胶的配体密度和弹性模量使水凝胶的力学性能发生改变,并基于此材料探索了ECM力学性能对口腔鳞癌细胞生物学行为改变的作用和机制。

相较于培养板培养的肿瘤细胞,多细胞球更符合体内无血管肿瘤的表型,是一种更能模拟肿瘤细胞体内生长状况的体外研究模型,广泛应用于药物筛选、机制研究等方面^[12]。SOX2和NANOG是两种主要的细胞多能性指标,细胞多能性越高说明肿瘤细胞的恶性程度越高^[13]。层黏连蛋白是ECM基底膜的主要蛋白,可以调控细胞增殖、分化等多种生物学行为,其在细胞上的主要受体为整合素 $\alpha 6 \beta 4$ ^[14]。研究表明,在肿瘤多细胞球中,SOX2、NANOG和层黏连蛋白表达均有升高^[15]。VI型胶原主要存在于细胞基底膜外的狭窄区域内,有研究表明VI型胶原可以促进肿瘤细胞的侵袭和迁移^[16]。在本研究中,低力学组CAL27和HSC3的细胞表型和高力学组明显不同。高力学组的细胞生长状态和传统的细胞培养板相似,而低力学组细胞的黏附效率和表型都发了变化,这说明ECM的力学性能会影响细胞的生物学行为。然而,在低力学性能的水凝胶上,CAL27和HSC3两种细胞所形成的细胞表型是不同的。CAL27细胞形成的多细胞肿瘤细胞球,相较于HSC3细胞更为紧密,且两种细胞SOX2、NANOG、CDH1等指标的表达趋势相反。CAL27细胞形成的表型具有明显的多细胞球特征,拥有很强的细胞多能性,而HSC3细胞所形成的表型则相反。上述结果说明虽然力学性能会影响细胞表型,但是具体的细胞生物学行为的改变还与细胞自身的差异有关。

CDH1是一种钙依赖性黏附分子,在上皮细胞的细胞间黏合中发挥了重要作用。CDH1在多种肿瘤细胞中表达,是肿瘤细胞侵袭和转移的前提^[17]。在本研究中,CAL27细胞形成的多细胞肿瘤细胞球的细胞间黏合紧密,并且PCR结果显示CDH1高表达,而HSC3细胞则相反,因此我们推测CDH1可能在多细胞肿瘤细胞球的形成中发挥了重要作用

然而与细胞多能性表达、CDH1表达不同的是,在低力学性能水凝胶上,CAL27和HSC3细胞的LAMB2和COL6A1表达都增高,且可以发现细胞培

养板、高力学性能、低力学性能水凝胶中LAMB2和COL6A1的表达量和力学性能呈负相关,这说明力学性能可以影响ECM的表达。整合素 $\alpha 6 \beta 4$ 作为层黏连蛋白在细胞上的受体,其在低力学组细胞中的表达量要高于高力学组,说明层黏连蛋白通过该受体调控细胞的生物学行为。因此,推测ECM的力学性能可能通过调节ECM蛋白的表达来调控细胞的生物学行为。

综上所述,ECM力学性能的改变会影响细胞和材料间的黏附效能,并且改变ECM合成、肿瘤细胞多能性和细胞间黏合等多种细胞生物学行为。而ECM可通过整合素影响细胞活动,使细胞表现出不同的生物学行为。因此推测ECM的力学性能可能是通过改变ECM蛋白的表达量来改变细胞的生物学行为,然而具体生物学行为的改变还是和细胞自身差异有关。本研究基于不同力学性能的水凝胶初步探索了ECM力学性能对口腔鳞癌细胞生物学行为的影响,为后续肿瘤细胞的相关研究提供了基础。

[参考文献]

- [1] SUN Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance[J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(1): 205-215
- [2] AHMADZADEH H, WEBSTER M R, BEHERA R, et al. Modeling the two-way feedback between contractility and matrix realignment reveals a nonlinear mode of cancer cell invasion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(9): 201617037
- [3] BAKER A E G, TAM R Y, SHOICHET M S. Independently tuning the biochemical and mechanical properties of 3D hyaluronan-based hydrogels with oxime and diels-alder chemistry to culture breast cancer spheroids [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(12): 4373-4384
- [4] JIANG T, XU G, CHEN X, et al. Impact of hydrogel elasticity and adherence on osteosarcoma cells and osteoblasts [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(9): e1801587
- [5] XIA T, LIU W, YANG L. A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(6): 1799-812
- [6] STANTON A E, TONG X, LEE S, et al. Biochemical ligand density regulates yes-associated protein translocation in stem cells through cytoskeletal tension and integrins [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(9): 8849-8857
- [7] DARNELL M, O'NEIL A, MAO A, et al. Material microenvironmental properties couple to induce distinct transcriptional programs in mammalian stem cells [J]. *Proc*

- Nat Acad Sci USA, 2018, 115(36):E8368-E8377
- [8] RAPE A D, ZIBINSKY M, MURTHY N, et al. A synthetic hydrogel for the high-throughput study of cell-ECM interactions[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:8129
- [9] HU K, ZHOU N, LI Y, et al. Sliced magnetic polyacrylamide hydrogel with cell-adhesive microarray interface: a novel multicellular spheroid culturing platform [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(24):15113-15119
- [10] BARRILA J, CRABBÉ A, YANG J, et al. Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment; three-dimensional cell culture comes of age[J]. *Infect Immun*, 2018, 86(11):e00282
- [11] CORREIA A L, BISSELL M J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(1-2):39-49
- [12] RAVI M, RAMESH A, PATTABHI A. Contributions of 3D cell cultures for cancer research[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(10):2679-2697
- [13] 陈俏羽, 赵丽华, 陈 袁, 等. miRNA-205 过表达载体的构建及其对猪诱导性多能干细胞建系的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(6):713-720
- [14] CAVACO A C M, REZAEI M, CALIANDRO M F, et al. The interaction between laminin - 332 and alpha3beta1 integrin determines differentiation and maintenance of CAFs, and supports invasion of pancreatic duct adenocarcinoma cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 11(1):14
- [15] LEE Y B, KIM E M, BYUN H, et al. Engineering spheroids potentiating cell-cell and cell-ECM interactions by self-assembly of stem cell microlayer [J]. *Biomaterials*, 2018, 165:105-120
- [16] OWUSU-ANSAH K G, SONG G, CHEN R, et al. COL6A1 promotes metastasis and predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(2):391-404
- [17] POWAN P, LUANPITPONG S, HE X, et al. Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 313(5):556-566
- [收稿日期] 2019-12-13

(上接第 1268 页)

- 2017, 25(1):77-87
- [18] HERZEL L, OTTOZ D, ALPERT T, et al. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(10):637-650
- [19] SCOTTI M, SWANSON M. RNA mis-splicing in disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1):19-32
- [20] MIKL M, HAMBURG A, PILPEL Y, et al. Dissecting splicing decisions and cell-to-cell variability with designed sequence libraries[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4572
- [21] BARUCCI G, CORNES E, SINGH M, et al. Small-RNA-mediated transgenerational silencing of histone genes impairs fertility in piRNA mutants [J]. *Nat Cell Biol*, 2020 22(2):235-245
- [22] ERNST C, ODOM D T, KUTTER C. The emergence of piRNAs against transposon invasion to preserve mammalian genome integrity[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1411
- [23] CARMELL M A, GIRARD A, VAN DE KANT H J, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(4):503-514
- [24] DING D, LIU J, DONG K, et al. PNLDC1 is essential for piRNA 3' end trimming and transposon silencing during spermatogenesis in mice[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):819
- [25] CHEN Y, ZHENG Y, GAO Y, et al. Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis [J]. *Cell Res*, 2018, 28(9):879-896
- [收稿日期] 2020-06-28