

流式细胞术在肿瘤相关成纤维细胞增殖检测中的应用

符蓉¹ 石兆鹏² 糜军^{2*}

(¹上海交通大学医学院基础医学公共技术平台, 上海 200025;

²上海交通大学医学院细胞生物学与分子细胞生物学系, 上海 200025)

摘要 肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是肿瘤组织中数目最多的一种基质细胞, 对肿瘤的发生发展起着重要作用。该文利用流式细胞术(flow cytometry, FCM)对比分析肿瘤相关成纤维细胞和非活化成纤维细胞(non-activated fibroblast, NAF)两者在细胞增殖和DNA倍性等方面的差异。在细胞形态学观察和细胞计数的基础上, 通过PI、EdU和Ki-67等染色后利用FCM进行定量检测, 并采用GraphPad软件对获得的数据进行统计分析。研究表明, 与NAF细胞相比, CAF细胞增殖减缓, 细胞周期在G₀/G₁期被阻滞, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。该文首次利用FCM量化CAF细胞的生物学特性, 尝试为进一步机制的研究提供理论依据。

关键词 流式细胞术; 肿瘤相关成纤维细胞; 非活化成纤维细胞; 增殖

The Application of Flow Cytometry in Analysis of Cancer-Associated Fibroblast Proliferation

FU Rong¹, SHI Zhaopeng², MI Jun^{2*}

(¹Core Facility of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medicine Sciences,

Shanghai 200025, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology,

Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medicine Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract CAF (cancer-associated fibroblast) are the most numerous stromal cells in tumor tissues and play an essential role in the occurrence and development of tumors. This paper used FCM (flow cytometry) to compare and analyze the differences in cell proliferation and DNA ploidy between cancer-associated fibroblasts and NAF (non-activated fibroblasts). Based on cell morphology observation and cell count, quantitative detection was performed by FCM after staining with PI, EdU and Ki-67, the obtained data were statistically analyzed by GraphPad software. The study showed that compared with NAF cells, the proliferation of CAF cells was slowed down; the cell cycle was blocked in the G₀/G₁ phase; and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In this paper, FCM is used for the first time to quantify the biological characteristics of CAF cells. It tries to provide a theoretical basis for further mechanism research.

Keywords flow cytometry; cancer-associated fibroblast; non-activated fibroblast; proliferation

肿瘤是由肿瘤细胞、间质细胞和基质组成的病理组织, 具有低氧、低pH和高压的特点^[1]。1999年, 学者从前列腺癌组织中分离获得一种成纤维细胞, 该细胞具有促进肿瘤形成和生长的能力, 故他们将

其命名为肿瘤相关成纤维细胞^[2]。

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)主要来源于癌细胞周围正常成纤维细胞(non-activated fibroblasts, NAF)的活化^[3-6], 是肿瘤组织中最主要的基质细胞^[7-8], 其中比较典型的有乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌相关成纤维细胞^[9-11]。静止成纤维细胞主要呈梭型^[12], 活化后平滑肌肌动蛋白

收稿日期: 2022-05-14

接受日期: 2022-07-25

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776491, E-mail: jmei@sjtu.edu.cn

Received: May 14, 2022

Accepted: July 25, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776491, E-mail: jmei@sjtu.edu.cn

(activated smooth muscle actin, α -SMA)和成纤维细胞特异性蛋白1(fibroblast specific protein 1, FSP1)表达量增加。同时发现, 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板衍生生长因子受体(platelet derived growth factor receptor, PDGF-R)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activating protein, FAP)等在CAF细胞中也高表达^[13-15]。

CAF细胞能够分泌多种物质, 包括细胞外基质降解酶、生长因子、细胞因子、趋化因子以及大量的代谢产物^[16], 在促进肿瘤的发生、发展和转移等方面起着非常重要的作用^[17-20]。而CAF细胞的这些特性均提示其是癌症治疗的潜在靶标^[21]。另外, CAF细胞和肿瘤细胞一样, 也存在高度异质性, 不仅不同类型肿瘤中的CAF细胞有差异, 而且同一肿瘤不同部位的CAF也会有不同的表型^[22-23]。

在以往的研究中多采用蛋白质印迹、免疫荧光或免疫组化等方法对CAF细胞进行检测与鉴定。虽然这三种方法操作方便, 反应灵敏, 且能够通过特异性标志蛋白鉴定CAF细胞, 但也容易出现非特异性染色而造成假阳性的结果。另外, 这三种方法只能对CAF细胞进行定性分析, 缺少定量数据。流式细胞术是一种以流式细胞仪为检测手段, 对单个细胞的理化特性进行定量分析和分选的技术。因其具有快速、精准、多参数和大数据的优势, 在目前的科研手段中得到极为广泛的应用^[24]。

本文通过分离新鲜的临床结肠癌和肝癌标本来获得CAF和NAF细胞。在细胞形态学观察和细胞计数的基础上, 经PI、EdU和Ki-67染色后利用流式细胞术深入研究CAF和NAF细胞在细胞增殖以及细胞周期倍性等方面的差异。本研究首次引入流式细胞术的方法, 探索CAF细胞的增殖特性, 尝试为今后相关的机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞

实验所用细胞株为本实验室分离培养的结肠癌和肝癌的NAF和CAF细胞。

1.2 主要试剂和仪器

试剂包括: DMEM(Hyclone)、FBS(ThermoFisher)、0.25% Trypsin-EDTA(ThermoFisher)、胶原酶I(SIGMA)、PBS(Dycent bio)、Triton X-100(Amresco)、

DAPI(beyotime)、PI(beyotime)、EdU试剂盒(invitrogen)、Ki-67试剂(eBioscience)。

仪器包括: TE2000-U倒置生物显微镜(Nikon)、流式细胞仪CytoFLEX S(Beckman)、离心机Centrifuge 5910R(eppendorf)。

1.3 实验步骤

1.3.1 细胞培养 将CAF和NAF细胞培养于完全培养基DMEM内(含10% FBS和1%双抗), 并置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中。

1.3.2 细胞分离 从人结肠癌和肝癌组织中分离并获得CAF细胞, 从癌旁组织中分离并获得NAF细胞。将样本组织置于PBS(含1%双抗)中反复洗涤, 加入0.25% Trypsin-EDTA和0.1%胶原酶I消化, 用350目尼龙膜过滤细胞悬液, 以1 000 r/min离心5 min, 去上清。将细胞沉淀用DMEM(含10% FBS和1%双抗)培养30 min后, 更换培养基, 附着在培养皿底部的为成纤维细胞。通过Western blot检测CAF细胞活化标记物FAP的表达情况, 以此来确保分离出正确的细胞。细胞经三次传代后, 用于后续实验。

1.3.3 细胞形态学观察 待细胞长至40%~50%的密度时, 将培养皿放置在倒置生物显微镜观察台上, 观察CAF和NAF细胞形态特征, 再将细胞放大10倍后进行拍照并分析比较。

1.3.4 细胞计数 确保NAF和CAF细胞的初始接种量为 1×10^5 个, 设置24 h、48 h、72 h和96 h四个时间节点, 用0.25% Trypsin-EDTA消化细胞, 再用计数板计数。按公式计算细胞数量: 每毫升细胞数=四个大格内细胞总数 $\times 10^4/4$ 。记录数据。

1.3.5 EdU染色 前期按说明书配置好所需试剂。在每个细胞培养皿内按1:1 000加入EdU染料, 终浓度为10 μ mol/L, 置于37 °C、5% CO₂培养箱内孵育2 h。0.25% Trypsin-EDTA消化细胞, 1 500 r/min离心5 min, 去上清, PBS漂洗1次。500 μ L固定剂室温固定15 min, 1 500 r/min离心5 min, 去上清。500 μ L透化液室温透化15 min, 1 500 r/min离心5 min, 去上清, PBS漂洗1次。加入Click-iT反应液, 室温避光孵育30 min。最后用1 \times EdU Buffer漂洗1次, 200 μ L DAPI(1 μ g/mL)重悬, 上机检测。

1.3.6 DNA倍性分析 0.25% Trypsin-EDTA消化细胞, PBS漂洗1次。加入300 μ L PBS重悬细胞, 逐滴加入700 μ L预冷的无水乙醇, 4 °C固定过夜。次日, 加入PBS将固定后的细胞混匀吹散, 1 500 r/min离心

5 min, 去上清, PBS漂洗1次。加入10 μL RNA酶(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和100 μL PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。加入20 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 350目尼龙膜过滤细胞悬液, 上机检测。

1.3.7 Ki-67染色 0.25% Trypsin-EDTA消化细胞, PBS漂洗1次。加入500 μL 多聚甲醛室温固定20 min, 1 500 r/min离心5 min, 去上清。加入500 μL 破膜打孔剂(0.2% TritonX-100)反应10 min, 1 500 r/min离心5 min, 去上清, PBS漂洗1次。加入5 μL Ki-67试剂, 室温避光孵育30 min, PBS漂洗1次。加入200 μL DAPI(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 350目尼龙膜过滤细胞悬液, 上机检测。

1.3.8 统计学方法 所有的实验数据均来自于一次实验的至少3个重复或至少3个以上的独立实验, 并选取具有代表性的数据进行展示。实验数据采用GraphPad统计, 统计学分析以*t*-test分析为主, 其中* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 表示具有统计学差异。

2 实验结果

2.1 NAF与CAF细胞的形态学差异

从新鲜的结肠癌和肝癌组织中分离得到NAF和CAF细胞, 再经过三次传代, 保持状态稳定, 并确保最后一次传代时两者细胞铺板数量基本相同, 在显微镜下观察两者细胞形态(图1)。两者都呈现成

纤维细胞特异的长梭形, NAF细胞生长迅速, 比较密集; 而CAF细胞生长较为缓慢, 相对稀疏, 较NAF细胞体积稍大, 同时伴有多个不规则突起。

2.2 NAF与CAF细胞的生长速率差异

确保两者细胞铺板数量相同的条件下, 以0 h为对照, 通过细胞计数的方法观察两者在24、48、72和96 h四个时间节点的细胞数量变化(图2)。NAF细胞的细胞数量随培养时间的增加而持续增多, 而CAF细胞生长缓慢。通过多次独立重复实验得到的统计数据如下, 结果以 $(\bar{x} \pm s) \times 10^5$ 显示, 以结肠癌分离的NAF和CAF细胞为例: 24 h时, NAF细胞数量为 $(1.50 \pm 0.01) \times 10^5$, CAF细胞数量为 $(0.78 \pm 0.01) \times 10^5$, $P = 0.013$ $0 < 0.05$; 48 h时, NAF细胞数量为 $(2.43 \pm 0.02) \times 10^5$, CAF细胞数量为 $(1.20 \pm 0.01) \times 10^5$, $P = 0.000$ $2 < 0.01$; 72 h时, NAF细胞数量为 $(3.52 \pm 0.02) \times 10^5$, CAF细胞数量为 $(1.30 \pm 0.01) \times 10^5$, $P = 0.000$ $2 < 0.01$; 96 h时, NAF细胞数量为 $(5.03 \pm 0.01) \times 10^5$, CAF细胞数量为 $(1.60 \pm 0.01) \times 10^5$, $P = 0.000$ $1 < 0.01$ 。各时间节点的细胞数量有统计学差异, 提示CAF细胞生长速率减缓。

2.3 NAF与CAF细胞周期倍性差异

在流式细胞术中常用碘化丙啶(PI)染色法观察细胞周期倍性差异。细胞周期指细胞从上一次分裂

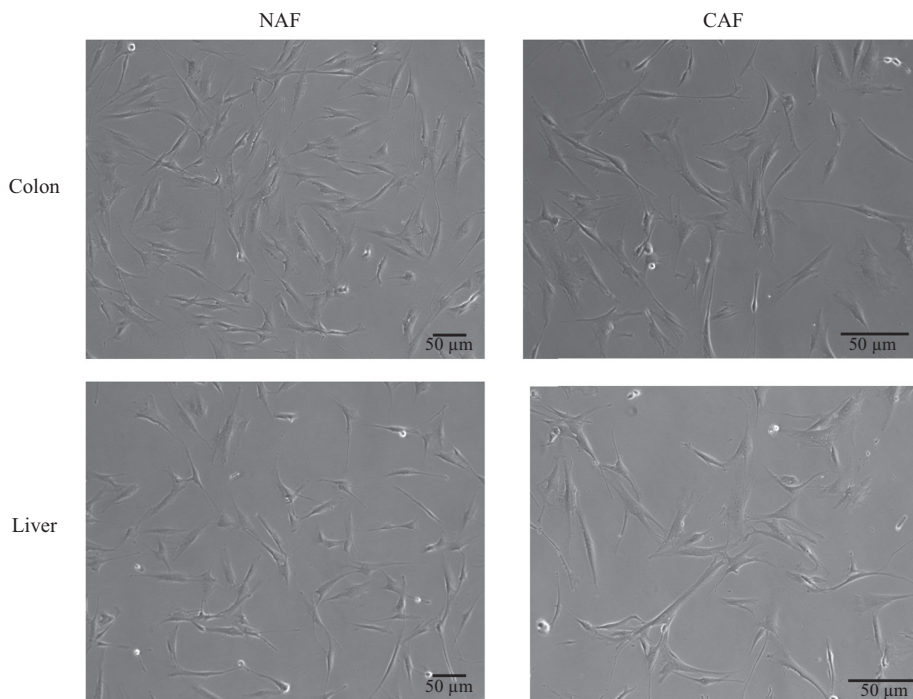
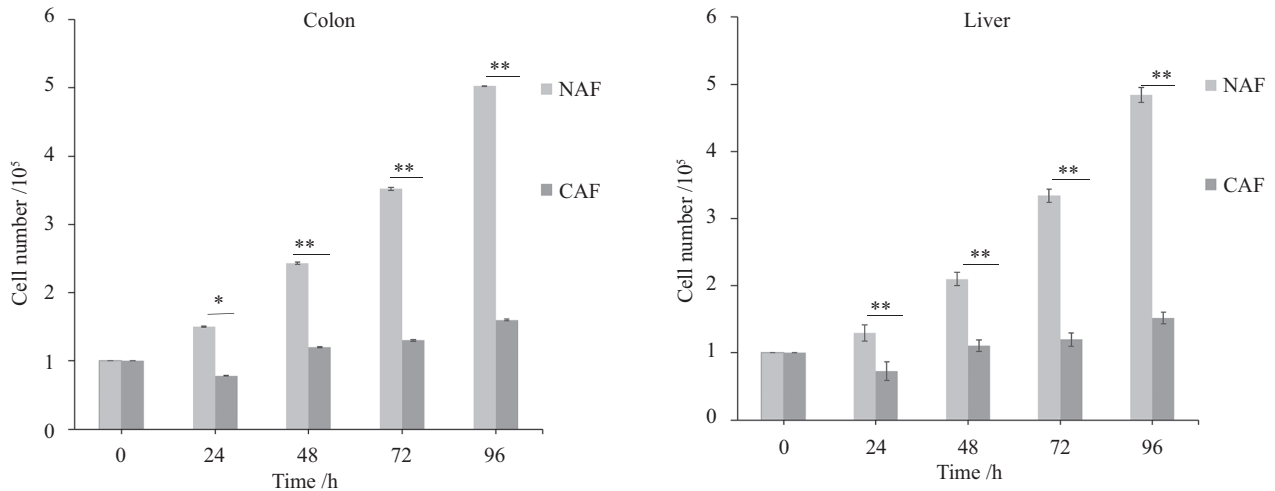


图1 NAF与CAF的形态学差异

Fig.1 The morphological differences between NAF and CAF

完成时开始, 到下一次完成分裂时为止的过程。细胞周期内各个时相的DNA含量不同, 根据PI的荧光强度将整个周期分为三个部分, 即 G_0/G_1 期(DNA合成前期)、S期(DNA合成期)和 G_2/M 期(DNA合成后期)^[25]。通过Modifit软件拟合出各个时相的百分比(图

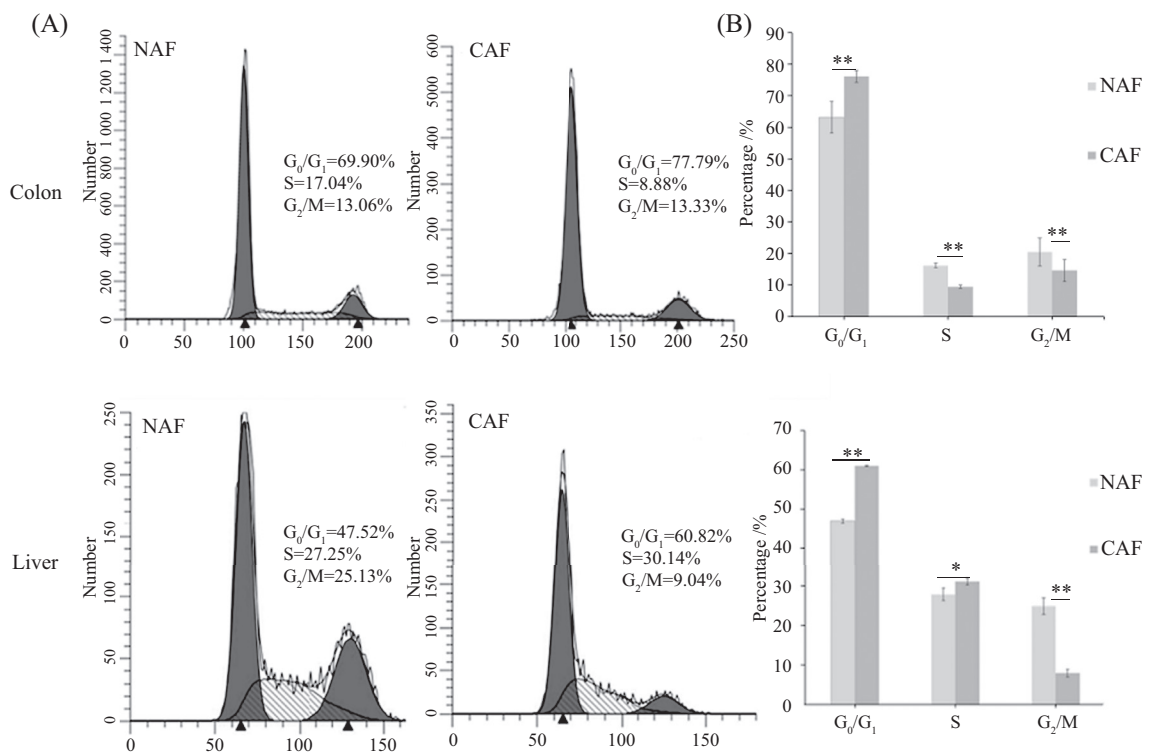
3)。以结肠癌分离的NAF和CAF细胞为例: NAF细胞和CAF细胞 G_0/G_1 期比例分别为69.90%和77.79%; S期比例分别为17.04%和8.88%; G_2/M 期比例分别为13.06%和13.33%。另外, NAF和CAF细胞的细胞增殖指数(proliferation index, PI)分别为0.30和0.22,



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图2 NAF与CAF细胞的生长速率差异

Fig.2 The difference in growth rate between NAF and CAF

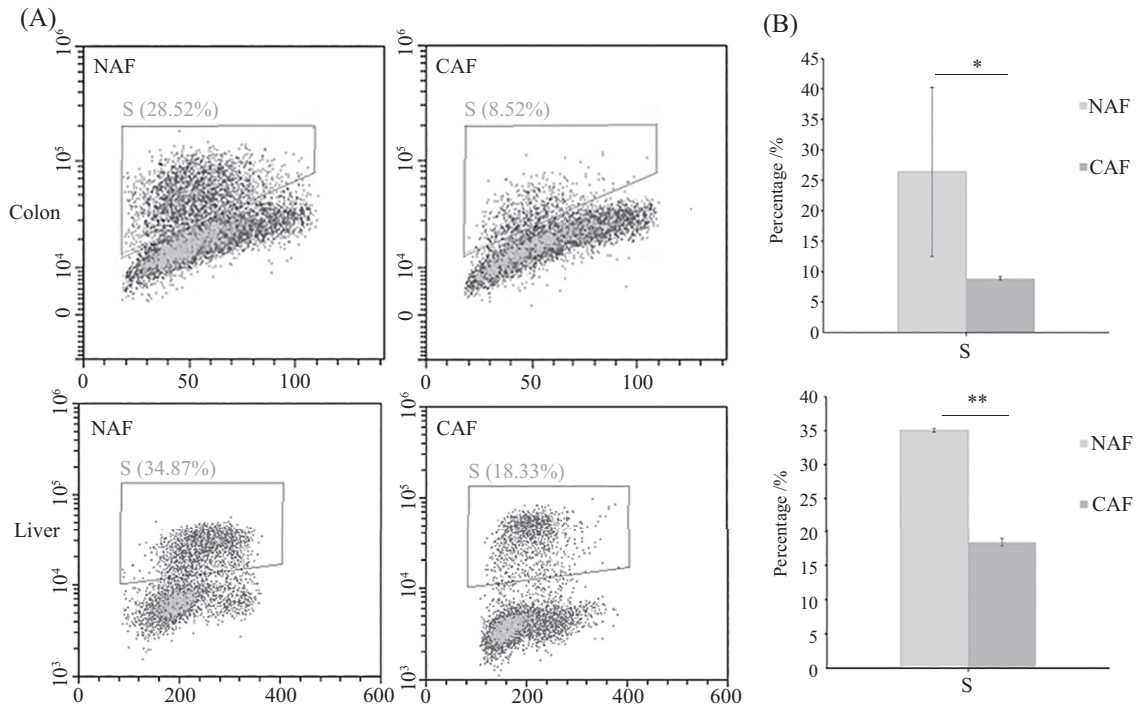


A: 细胞周期流式图; B: 细胞周期数据统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: cell cycle by FCM; B: statistical chart of cell cycle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 NAF与CAF细胞周期倍性差异

Fig.3 The difference in cell cycle ploidy between NAF and CAF



A: EdU染色流式图; B: S期数据统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: Edu staining by FCM; B: statistical chart of phase S. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 NAF和CAF细胞S期差异

Fig.4 The difference in phase S between NAF and CAF

增殖指数越大,表示细胞增殖越快。以上结果提示CAF细胞增殖速率降低。

2.4 NAF和CAF细胞S期差异

细胞增殖的关键是合成新的DNA,因此检测细胞DNA合成状态能反映细胞增殖情况。EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)掺入法可以特异性地标记细胞周期中的S期(图4)。以结肠癌分离的NAF和CAF细胞为例,NAF和CAF细胞S期比例分别为28.52%和8.52%,与NAF细胞相比,CAF细胞S期比例显著减少。这表明CAF细胞的增殖较NAF细胞有明显的减缓。

2.5 NAF和CAF细胞G₀和G₁期差异

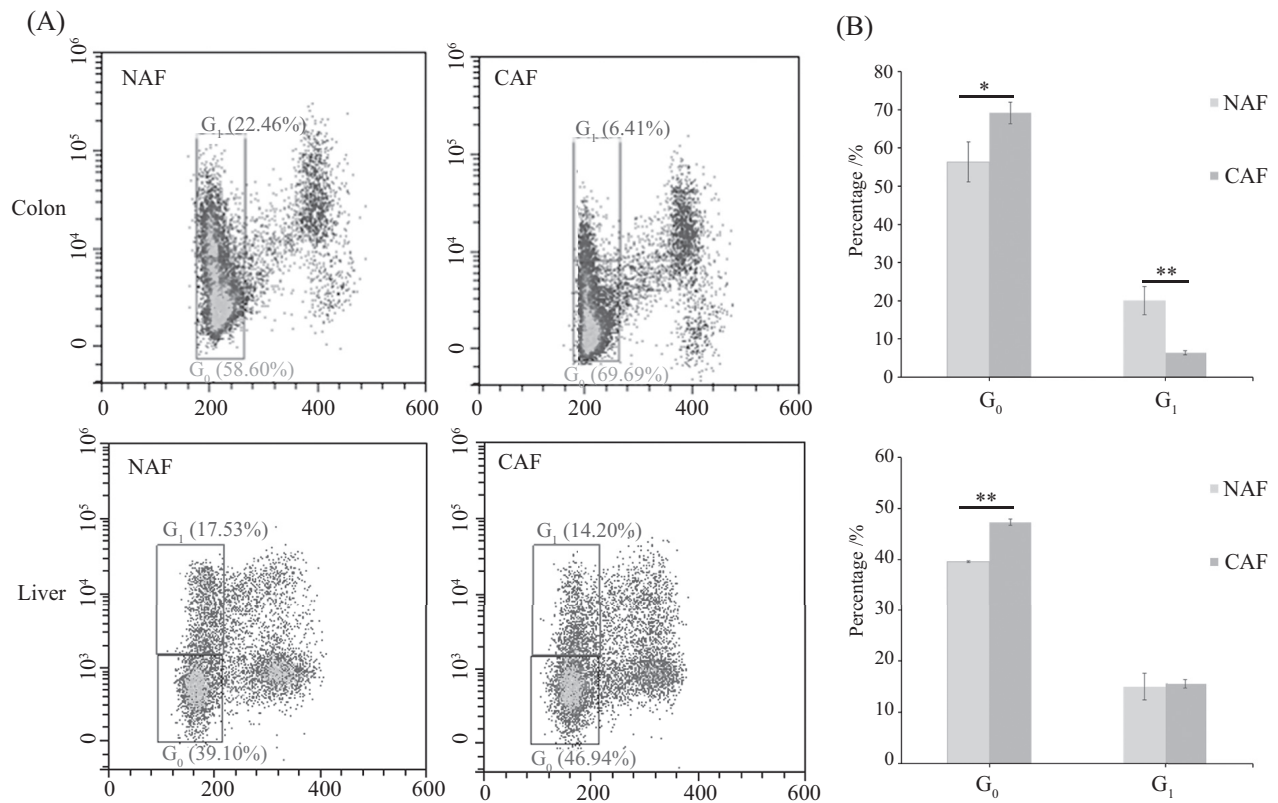
从上述的几组实验数据中我们得到CAF细胞在G₀/G₁期被阻滞,但具体是阻滞在G₀期还是G₁期不得而知。因此,用Ki-67抗原进一步探索(图5)。以结肠癌分离的NAF和CAF细胞为例,NAF和CAF细胞G₀期比例分别为58.60%和69.69%,G₁期比例分别为22.46%和6.41%,与NAF细胞相比,CAF细胞G₀期比例明显增加,G₁期比例显著减少。

3 讨论

众所周知,CAF细胞和肿瘤细胞关系密切,CAF

细胞通过分泌一系列的细胞因子、趋化因子以及大量中间代谢产物来促进肿瘤细胞的快速增殖和转移,而肿瘤细胞也通过分泌各种因子诱导并维持成纤维细胞的活化^[26]。而且,CAF具有一定的异质性。但是目前对CAF细胞的分析方法以定性检测为主,不利于我们深入了解CAF细胞的异质性。因此,本文首次尝试利用流式细胞术,以NAF细胞为正常对照,深入探索CAF细胞的增殖特性。

通过流式细胞术分析细胞增殖最常用方法的是细胞周期实验。实验结果表明,CAF细胞较NAF细胞G₀/G₁期比例增加,S期比例减少,增殖指数降低,提示CAF细胞增殖减缓,被更多地阻滞在G₀/G₁期。这与细胞计数得到的实验结果一致。分析DNA合成S期常用EdU^[27]和BrdU(5-Bromodeoxyuridine)^[28]两种生物染料。但BrdU染色过程必须进行DNA变性操作,导致实验结果存在较大误差。故采用固定破膜步骤温和的EdU染色,实验结果很直观地反映两者在S期的数值变化。CAF细胞较NAF细胞S期数值有显著减少,表明CAF细胞在DNA合成期进程减缓,增殖减少。当然,我们也可以选择示踪染料标记法检测细胞增殖,其中CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)染料是最常用的,但是在样本制备过程中怎样



A: Ki-67染色流式图; B: G₀、G₁期数据统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: Ki-67 staining by FCM; B: statistical chart of phase G₀ and G₁. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 NAF和CAF细胞G₀和G₁期差异

Fig.5 The difference in G₀ and G₁ phase between NAF and CAF

控制染料的浓度和染色时间使得数据CV值比较小是一个难点,需要在实验过程中慢慢摸索。

另外, Ki-67抗原是一种与细胞增殖特异相关的核抗原,在G₀期不表达而在G₁后期出现,所以可以将G₀/G₁期更详细地区分为G₀和G₁两个时期^[29]。我们的实验结果显示, CAF细胞G₁期比例降低, G₀期比例增加,提示细胞被更多地阻滞在G₀期,即细胞周期的休止期,表明CAF细胞处于相对静止的状态。当然,我们可以在后期的研究中把G₂/M期再细分为G₂与M两个期,使得研究更为完善。

从上述一系列的研究结果中我们得到CAF细胞较NAF细胞增殖减缓的结论,并且从多个方面互相验证了这个结论的可靠性。当然,流式细胞术只是一个现象的分析技术,而所涉及到的内部机制需要更深入的机制探索。近来有学者发现, TGF- β 2触发G₁/S位点而下调CAF的细胞增殖,与我们所阐述的结论一致^[30]。他们认为, CAF细胞通过降低自身对周边各类因子以及代谢产物的消耗,将代谢中间产物尽可能多地提供给肿瘤细胞,以促进肿瘤细胞的生长^[30]。

总之,在本研究中,我们聚焦CAF细胞的周期变化,关注了G₀、G₁、S以及G₂/M期这四个时期的数值变化,进一步用量化的数据证实了CAF细胞增殖变慢的事实。

参考文献 (References)

- [1] VON AHRENS D, BHAGAT T D, NAGRATH D, et al. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 76.
- [2] OLUMI A F, GROSSFELD G D, HAYWARD S W, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 5002-11.
- [3] LAWRENSEN K, GRUN B, LEE N, et al. NPPB is a novel candidate biomarker expressed by cancer-associated fibroblasts in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 2014, 136(6): 1390-401.
- [4] SOSULSKI M L, GONGORA R, DANCHUK S, et al. Deregulation of selective autophagy during aging and pulmonary fibrosis: the role of TGFbeta1 [J]. *Aging Cell*, 2015, 14(5): 774-83.
- [5] MADAR S, GOLDSTEIN I, ROTTER V. 'Cancer associated fibroblasts': more than meets the eye [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(8): 447-53.
- [6] SAMPSON N, BRUNNER E, WEBER A, et al. Inhibition of

- Nox4-dependent ROS signaling attenuates prostate fibroblast activation and abrogates stromal-mediated protumorigenic interactions [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(2): 383-95.
- [7] XING Y, ZHAO S, ZHOU B P, et al. Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment [J]. *FEBS J*, 2015, 282(20): 3892-8.
- [8] ROULIS M, KAKLAMANOS A, SCHERNTHANNER M, et al. Paracrine orchestration of intestinal tumorigenesis by a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2020, 580(7804): 524-9.
- [9] LIU T, HAN C, WANG S, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 86.
- [10] WEN S, NIU Y, YEH S, et al. BM-MSCs promote prostate cancer progression via the conversion of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 719-27.
- [11] LI J, LI H, LONG Q, et al. Breast cancer-associated fibroblasts: a new target for breast cancer therapy [J]. *Adv Clin Med*, 2019, 9(4): 606-12.
- [12] NORTON J, FOSTER D, CHINTA M, et al. Pancreatic cancer associated fibroblasts (CAF): under-explored target for pancreatic cancer treatment [J]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1347.
- [13] PARK D, SAHAI E, RULLAN A. SnapShot: cancer-associated fibroblasts [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 486.e1.
- [14] PRAKASH J. Cancer-associated fibroblasts: perspectives in cancer therapy [J]. *Trends Cancer*, 2016, 2(6): 277-9.
- [15] BIFFI G, TUVESON D A. Deciphering cancer fibroblasts [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(12): 2967-8.
- [16] CIRRI P, CHIARUGI P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4): 482.
- [17] YANG K, YAO Y. Mechanism of GPER promoting proliferation, migration and invasion of triple-negative breast cancer cells through CAF [J]. *Am J Translat Res*, 2019, 11(9): 5858.
- [18] DONG R, GUO J, ZHANG Z, et al. Polyphyllin I inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating the expression of fibroblast activation protein alpha (FAP) and hepatocyte growth factor (HGF) in cancer-associated fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(4): 1129-34.
- [19] YANG F, GUO Z, HE C, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cell proliferation and invasion via paracrine Wnt/IL1beta signaling pathway in human bladder cancer [J]. *Neoplasma*, 2021, 68(1): 79-86.
- [20] WANG Y, GAN G, WANG B, et al. Cancer-associated fibroblasts promote irradiated cancer cell recovery through autophagy [J]. *EBioMedicine*, 2017, 17: 45-56.
- [21] PEREIRA B A, VENNIN C, PAPANICOLAOU M, et al. CAF subpopulations: a new reservoir of stromal targets in pancreatic cancer [J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(11): 724-41.
- [22] WHITTLE M C, HINGORANI S R. Fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma: biological mechanisms and therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 2085-96.
- [23] OZDEMIR B C, PENTCHEVA-HOANG T, CARSTENS J L, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(6): 719-34.
- [24] GALKOWSKI D, RATAJCZAK M Z, KOCKI J, et al. Of cytometry, stem cells and fountain of youth [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(4): 465-81.
- [25] CROWLEY L C, CHOJNOWSKI G, WATERHOUSE N J. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, doi: 10.1101/pdb.prot087247.
- [26] LUO H, TU G, LIU Z, et al. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 155-63.
- [27] CHEN M, QU D, CHI W, et al. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine as a molecular probe of cell proliferation for high-content siRNA screening assay by "click" chemistry [J]. *Science China Chemistry*, 2011, 54(11): 1702-10.
- [28] TANAKA R, TAINAKA M, OTA T, et al. Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies [J]. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(8): 791-8.
- [29] MACCALLUM D E, HALL P A. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle [J]. *J Pathol*, 2000, 190(5): 537-44.
- [30] WU J, FU R, LIU Z, et al. Cell proliferation downregulated by TGF-beta2-triggered G₁/S checkpoint in clinical CAFs [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(2): 172-8.