

网络出版时间: 2022-11-28 18:31 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1717.021.html>

S100A8/A9 通过 Wnt/ β -catenin 促进口腔鳞癌的侵袭迁移

蒋 岑¹, 马 洪^{1,2}, 胡 赞³, 周 可¹, 孙俊泽¹, 鲍玲娜¹

摘要 目的 研究外源性钙结合蛋白 A8/A9(S100A8/A9)通过 Wnt/ β -catenin 促进口腔鳞癌(OSCC)细胞 CAL-27 和 SCC-25 迁移和侵袭能力。方法 分别或共同添加 S100A8、S100A9 蛋白培养 CAL-27、SCC-25, 蛋白印记法(Western blot)检测 β -catenin 的表达情况; 免疫荧光鉴定添加 S100A8/A9 蛋白培养 CAL-27、SCC-25 48 h 后 β -catenin 的表达; 加入 20 μ g/ml Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 Dickkopf 相关蛋白 1(DKK-1), Western blot 和实时定量荧光 PCR(qPCR)检测 β -catenin 的表达; 采用 Transwell 实验比较正常对照组(Control 组)、添加 S100A8/A9 蛋白组、加入 DKK-1 组、加入 DKK-1 并添加 S100A8/A9 蛋白回复组的细胞侵袭和迁移能力; Western blot 实验检测细胞髓细胞瘤病毒癌基因(c-Myc)和细胞周期蛋白 D(cyclinD1)的表达。结果 S100A8、A9 能激活 Wnt/ β -catenin 通路, 与 S100A8 和 S100A9 分别培养相比, 共同培养时 CAL-27 和 SCC-25 细胞中的 β -catenin 表达随着时间上调, qPCR 结果与 Western blot 结果一致; 在免疫荧光实验中, SCC-25 及 CAL-27 细胞的细胞质和细胞核内均观察到 β -catenin 表达量变化, SCC-25 及 CAL-27 细胞内 β -catenin 蛋白在 48 h 表达量增加($P < 0.05$); 加入 DKK-1, Western blot 和 qPCR 显示 β -catenin 的表达降低($P < 0.001$); 添加 S100A8/A9 组细胞迁移和侵袭数多于 Control 组($P < 0.001$), 添加 DKK-1 抑制剂组细胞侵袭迁移数量减少, 加入 DKK-1 并添加 S100A8/A9 蛋白回复组细胞侵袭迁移数量减少, 提示 DKK-1 能够抑制外源性 S100A8/A9 蛋白对 SCC-25 及 CAL-27 细胞的侵袭迁移能力的促进作用, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 加入 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 DKK-1, Western blot 实验显示 Wnt/ β -catenin 通路关键分子 c-Myc 和 cyclinD1 的表达降低($P < 0.001$)。结论 外源性 S100A8/A9 蛋白可通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进 SCC-25 和 CAL-27 细胞的侵袭和迁移。

关键词 S100A8/A9; Wnt/ β -catenin; DKK-1; 侵袭; 迁移

2022-09-16 接收

基金项目: 贵州省普通高等学校特色重点实验室(编号: 黔教合 KY 字 [2017] 005)

作者单位: ¹ 贵州医科大学口腔医学院, 贵阳 550004

贵州医科大学附属口腔医院² 口腔颌面外科、³ 口腔病理科, 贵阳 550004

作者简介: 蒋 岑, 男, 硕士研究生;

马 洪, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mahong1966@126.com

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1971-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.021

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部癌症之一, 其 5 年存活率为 20% ~ 50%^[1]。在口腔恶性肿瘤中占 80% 以上, 具有恶性程度高、侵袭能力强、转移快、预后差等特点, 是人类第 6 大恶性肿瘤^[2]。原发癌只引起约 10% 的癌症患者死亡, 而 90% 的癌症患者最终死于肿瘤的侵袭转移, 因此, 了解 OSCC 侵袭转移的分子调控机制对其治疗至关重要。近年来, 越来越多的研究^[3]表明 S100 钙结合蛋白 A8/A9(S100A8/A9)在胃癌、结直肠癌及鼻咽癌等肿瘤中异常表达, 促进肿瘤的侵袭转移。S100A8、A9 常常形成 S100A8/A9 异二聚体发挥作用, 作为一对分泌的可溶性炎症因子, 对白细胞有趋化作用^[4]。Wnt/ β -catenin 是参与炎症反应过程的途径之一, 且 β -catenin 信号失调与慢性炎症和各种类型的癌症有着极大的关系^[5]。该研究选取 OSCC 细胞株 CAL-27 和 SCC-25, 通过 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂减弱细胞的迁移和侵袭来表明 DKK-1 能与 Wnt 结合阻断信号传递, 进而抑制肿瘤的发生发展, 提示 Wnt/ β -catenin 抑制剂在 CAL-27 和 SCC-25 临床应用和药物研发中有一定的潜力。

1 材料与方法

1.1 主要材料 口腔鳞癌细胞 SCC-25 和 CAL-27 (美国 ATCC 公司), S100A8 蛋白、S100A9 蛋白(美国 Abcam 公司), 胎牛血清、RPMI 1640 培养基、双抗、胰蛋白酶和 PBS(美国 Gibco 公司), GAPDH、 β -catenin、cyclinD1 抗体、羊抗兔辣根过氧化物(HRP)标记二抗、羊抗兔荧光二抗(美国 Proteintech 公司), c-Myc 抗体(美国 CST 公司), DKK-1(美国 MCE 公司), 显影液(美国 Millipore 公司), Transwell 小室、培养板和培养皿(美国 Corning 公司), RNA 提取试剂盒(瑞士 Roche 公司), 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司), Triton X-400(北京索莱宝科技有限公

司), SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 外源性 S100A8/A9 蛋白培养细胞 复苏细胞, 常规培养。细胞铺满培养瓶底部后消化细胞, 离心后去除上清液, 加入新鲜培养基, 混匀后以 1×10^5 个/孔的细胞量接种于 6 孔板中。待细胞融合度至 50% 时加入外源性 S100A8/A9 蛋白, 并分别于 6、24、48 h 提取细胞蛋白并收集 RNA。

1.2.2 Western blot 实验 Western blot 检测 β -catenin、GAPDH 的表达和 Wnt/ β -catenin 通路关键分子 c-Myc 和 CyclinD1 的表达。实验分为 Control 组、DKK-1 组、DKK-1 + S100A8/A9 组。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DKK-1 处理 CAL-27、SCC-25 细胞 6 h 后加入 S100A8/A9 蛋白共同培养 48 h 后收集蛋白。转膜结束后取出 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭膜 2 h, 加入相应的一抗溶液(稀释比例均为 1:1 000), 置于水平摇床, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。取出 PVDF 膜, TBST 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗(1:10 000) 室温孵育 2 h; TBST 洗 PVDF 膜 3 次。将 PVDF 膜平整放入化学发光仪, 均匀滴加超敏 ECL 化学发光试剂, 曝光。

1.2.3 细胞免疫荧光染色 将 CAL-27、SCC-25 细胞接种于有细胞爬片的 12 孔板中。取出外源性 S100A8/A9 蛋白培养细胞 48 h 后的爬片及对照组并用 PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次。加入 0.3% Triton X-100 通透 50 min, PBS 洗涤; BSA 室温封闭 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 β -catenin 抗体过夜。隔天取出 12 孔板, PBS 洗 3 次, 滴加羊抗兔荧光二抗, 避光孵育 2 h 后 PBS 洗 3 次, DAPI 染核 15 min 后, 滴加 10 μl 抗荧光衰减封片剂, 封片; 荧光显微镜下观察 β -catenin 的表达情况并拍照。

1.2.4 Transwell 侵袭和迁移实验 预先在 Transwell 侵袭小室中加入 100 μl 基质胶(基质胶: DMEM 培养基 = 1:8), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h。实验分为 Control 组、DKK-1 组、DKK-1 处 + S100A8/A9 组。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DKK-1 处理 CAL-27、SCC-25 细胞 6 h 后加入 S100A8/A9 蛋白共同培养 48 h 后消化细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/100 μl 。在 Transwell 小室的上室加 100 μl 细胞悬液, 下室加入 1 ml 含有 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S100A8/A9 蛋白的培养基, 24 h 后将迁移小室取出(48 h 后将侵袭小室取出) 清洗, 多聚甲醛

固定, 结晶紫染色, ddH₂O 清洗 3 次, 干燥。

1.2.5 实时定量荧光 PCR(qPCR) 检测 将细胞接种在 24 孔板中培养, 实验分为 3 个组, 分别为 Control 组、DKK-1 组、DKK-1 + S100A8/A9 组。RNA 的检测方法参照试剂盒说明书。以 Control 组作为对照组, 计算 Ct 值后, 根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 算出各个组的 mRNA 相对表达情况。见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
	R: AGGGGCCATCCACACTCTTC
β -catenin	F: CTGAGGACAAGCCACAAGATTA
	R: ATCCACCAGAGTGAAAAGAACG

1.3 统计学处理 实验重复 3 次, 每次 3 个副孔, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用统计软件 SPSS 20.0 进行分析, 两个组的比较用独立样本 t 检验, 多个组的比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S100A8/A9 蛋白对 CAL-27、SCC-25 细胞 Wnt/ β -catenin 通路的影响 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S100A8 蛋白单独培养 CAL-27 和 SCC-25 细胞, 细胞 β -catenin 在 6 h 表达上调, 随着时间逐渐降低; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S100A9 蛋白单独培养 CAL-27 和 SCC-25 细胞, CAL-27 细胞 β -catenin 随着时间表达上调, SCC-25 细胞 β -catenin 6、24 h 表达上调, 48 h 表达下降。 β -catenin 细胞表达上调, 说明 S100A8、S100A9 都能激活 Wnt/ β -catenin 通路, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 1)。共同添加 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S100A8/A9 蛋白培养后, CAL-27 和 SCC-25 细胞 β -catenin 表达量在 48 h 内升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 2)。免疫荧光染色结果(图 3) 显示, 细胞质和细胞核内都观察到 β -catenin 表达量增加, 与 Western blot 检测的结果一致, 提示 S100A8/A9 蛋白能激活 Wnt/ β -catenin 通路。

2.2 S100A8/A9 对 CAL-27、SCC-25 细胞的侵袭和迁移的影响 S100A8/A9 能够使 β -catenin 表达上升后, 通过 Transwell 实验比较 S100A8/A9 对 CAL-27、SCC-25 细胞侵袭和迁移能力的影响(图 4、5), 结果显示, 加入 S100A8/A9 后的 CAL-27 和 SCC-25 细胞侵袭迁移数量均比 Control 组多(表 2),

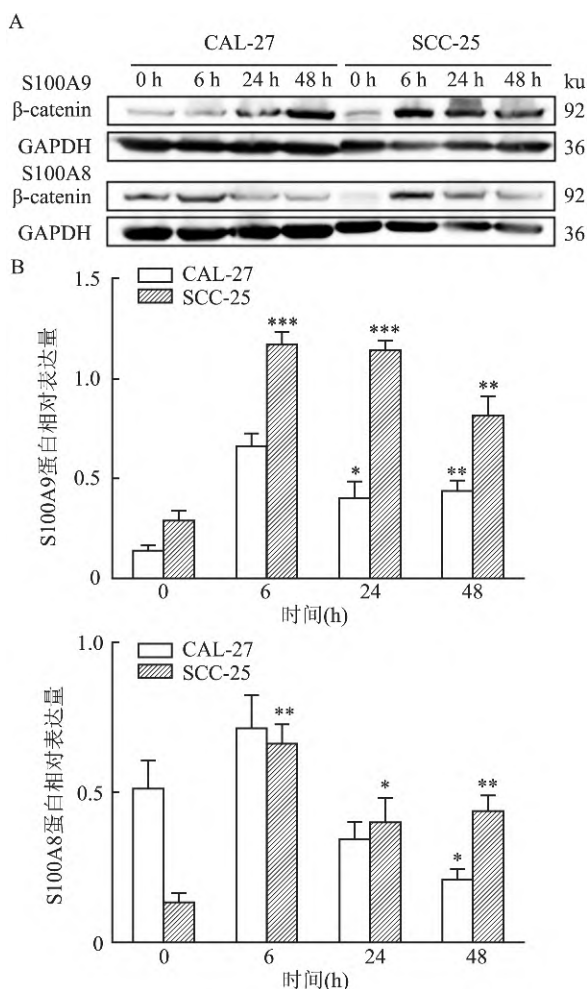


图1 S100A8、S100A9 处理 OSCC 激活 Wnt/ β -catenin 通路的蛋白免疫印迹鉴定

A: 分别用 S100A8、S100A9 处理 CAL-27 和 SCC-25, Western blot 检测 β -catenin 的表达; B: 蛋白印迹的定量统计; 与 0 h 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

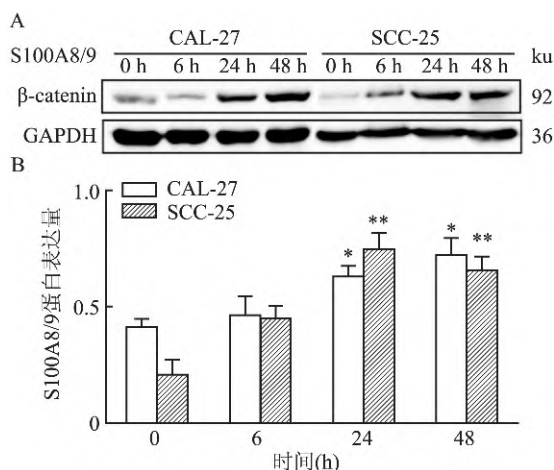


图2 S100A8/A9 处理 OSCC 激活 Wnt/ β -catenin 通路的 Western blot 鉴定

A: 共同添加 S100A8、S100A9 处理 CAL-27 和 SCC-25, Western blot 检测 β -catenin 的表达; B: 为图 A 蛋白印迹的定量表达; 与 0 h 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 DKK-1 抑制 S100A8/A9 蛋白对 CAL-27、SCC-25 细胞侵袭迁移的影响 选择 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 DKK-1 观察 S100A8/A9 是否通过 Wnt/ β -catenin 通路影响 CAL-27 和 SCC-25 侵袭迁移的能力,实验结果见图 4、5,加入 DKK-1 后 CAL-27 和 SCC-25 细胞侵袭迁移数目比 Control 组少,在加入 DKK-1 且用外源 S100A8/A9 蛋白回复后,CAL-27 和 SCC-25 细胞侵袭迁移数量变化不明显(表 3)。

表2 S100A8/A9 对 OSCC 侵袭和迁移实验中 穿模细胞数的统计($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	CAL-27 细胞	SCC-25 细胞
侵袭		
Control	104.0 $\pm$ 15.62	88.0 $\pm$ 12.12
S100A8/A9	293.7 $\pm$ 36.17**	291.0 $\pm$ 3.91**
迁移		
Control	135.0 $\pm$ 25.15	164.0 $\pm$ 20.40
S100A8/A9	329.3 $\pm$ 31.99**	366.0 $\pm$ 17.62**

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

表3 DKK-1 影响 OSCC 侵袭和迁移实验中 穿模细胞数的统计($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	CAL-27 细胞	SCC-25 细胞
侵袭		
DKK-1	60.33 $\pm$ 4.702**	56.33 $\pm$ 8.511***
DKK-1 + S100A8/A9	87.33 $\pm$ 10.598**	96.67 $\pm$ 4.631***
迁移		
DKK-1	135.00 $\pm$ 25.150*	164.00 $\pm$ 20.400**
DKK-1 + S100A8/A9	65.67 $\pm$ 7.055**	83.00 $\pm$ 10.540***

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 DKK-1 对 S100A8/A9 诱导 β -catenin 增加的影响 在 CAL-27 和 SCC-25 细胞中加入 DKK-1 后, Western blot 验证 β -catenin 的表达量是否被抑制,结果如图 6 所示,DKK-1 能够降低 CAL-27 和 SCC-25 细胞中 β -catenin 的表达量,回复加入 S100A8/A9 蛋白 48 h 后, β -catenin 的表达没有变化。qPCR 验证结果与 Western blot 结果一致,DKK-1 能抑制 S100A8/A9 诱导的 β -catenin 的增加。

2.5 DKK-1 对 S100A8/A9 诱导的 Wnt/ β -catenin 通路关键分子 c-Myc 和 cyclinD1 的影响 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 途径中的靶基因 c-Myc 和 Cyclin D1 的表达,验证 S100A8/A9 是通过 Wnt/ β -catenin 来影响 CAL-27 和 SCC-25 细胞的侵袭迁移的。结果如图 7 所示,在 2 株 OSCC 中加入 S100A8/9 48 h 后,c-Myc 和 Cyclin D1 的表达上升,

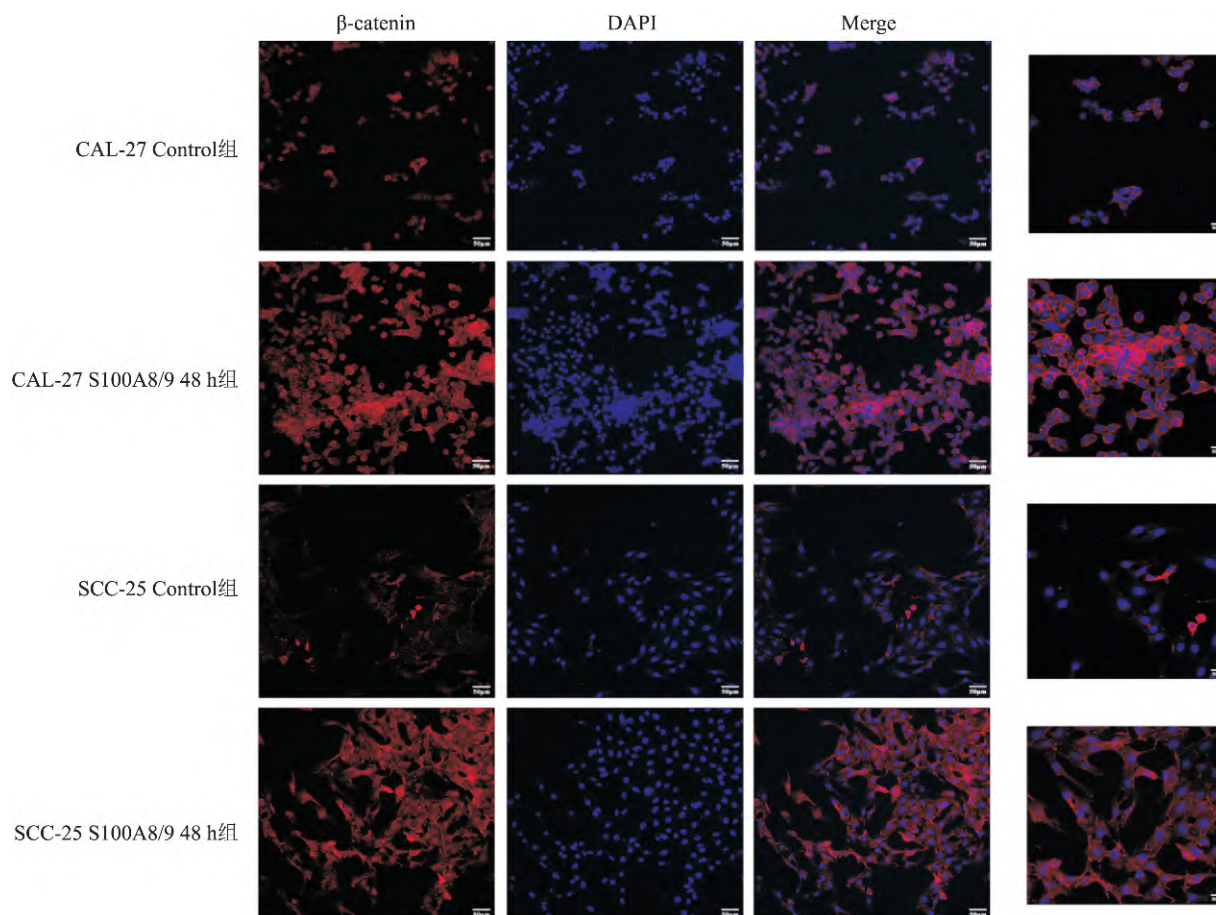


图3 S100A8/A9处理OSCC激活Wnt/β-catenin通路的免疫荧光鉴定

图中前3列图片×100;第4列图片×200

DDK-1抑制了2株OSCC中的c-Myc和Cyclin D1的表达水平。在DDK-1的作用下,S100A8/9引起c-Myc和Cyclin D1的上调被显著抑制。结果显示,DDK-1能够抑制S100A8/A9诱导的Wnt/β-catenin通路关键分子c-Myc和cyclinD1的升高,S100A8/A9可能是通过Wnt/β-catenin促进OSCC侵袭迁移的作用。

3 讨论

S100A8和S100A9不仅参与细胞运动和细胞内 Ca^{2+} 稳态的维持,并且促进感染和自身免疫性疾病的炎症反应,并参与癌症和肿瘤的侵袭、迁移。有研究^[8]表明S100A8在巨噬细胞和小鼠膝关节中诱导Wnt/β-catenin信号传导。Huang et al^[9]的研究表明Wnt/β-catenin信号调节和上皮衍生的S100A8/A9是巨噬细胞表型和功能的有效调节剂。Gao et al^[8]研究认为S100A8/A9通过S100A9亚基和TLR4介导的NF-κB和MAPK信号通路促进人类

牙龈成纤维细胞的炎症反应。

Wnt信号通路的异常激活是肿瘤发生的重要因素,而β-catenin大量积聚是引发Wnt通路激活及肿瘤发生的关键原因^[10]。有研究^[11]表明沉默circ-PIP5K1A能通过抑制Wnt/β-catenin信号活性发挥对OSCC细胞生长与转移的抑制作用。Wnt/β-catenin信号通路调节癌细胞中的细胞生长及周期,促进癌细胞的侵袭迁移,阻止其激活将减缓癌症的发展,从而为新产品的开发提供了希望^[11],该课题组前期研究^[12]表明,S100A8和S100A9与OSCC转移和侵袭相关。

该研究选取口腔鳞癌细胞株CAL-27和SCC-25,以1 μg/ml S100A8、S100A9蛋白分别单独培养CAL-27和SCC-25细胞,β-catenin表达量在6 h明显上升,24 h与48 h时变化不明显。随后添加S100A8/A9蛋白处理CAL-27和SCC-25细胞,Western blot检测显示,细胞内β-catenin表达量在48 h内持续上升,说明S100A8、A9虽然均为可溶性促炎

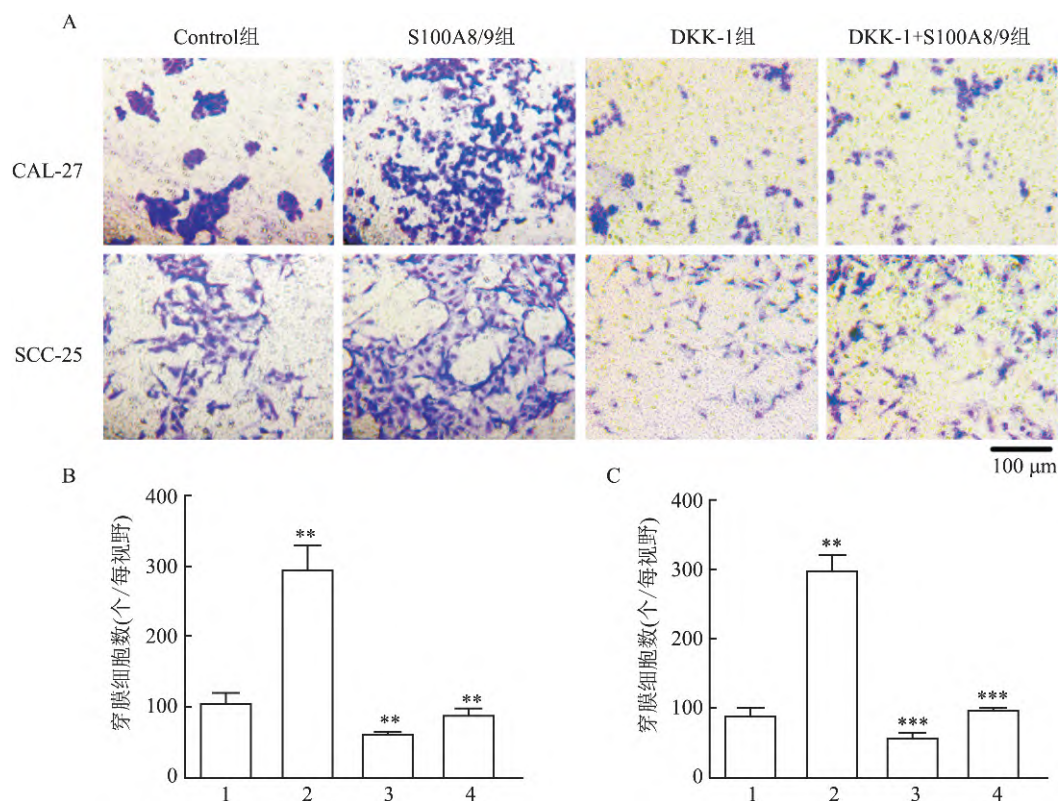


图4 Transwell 实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞的侵袭能力

A: Transwell 实验检测各组的侵袭能力 × 100; B、C: CAL-27 和 SCC-25 穿膜细胞的统计; 1: Control 组; 2: S100A8/A9 组; 3: DKK-1 组; 4: DKK-1 + S100A8/A9 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

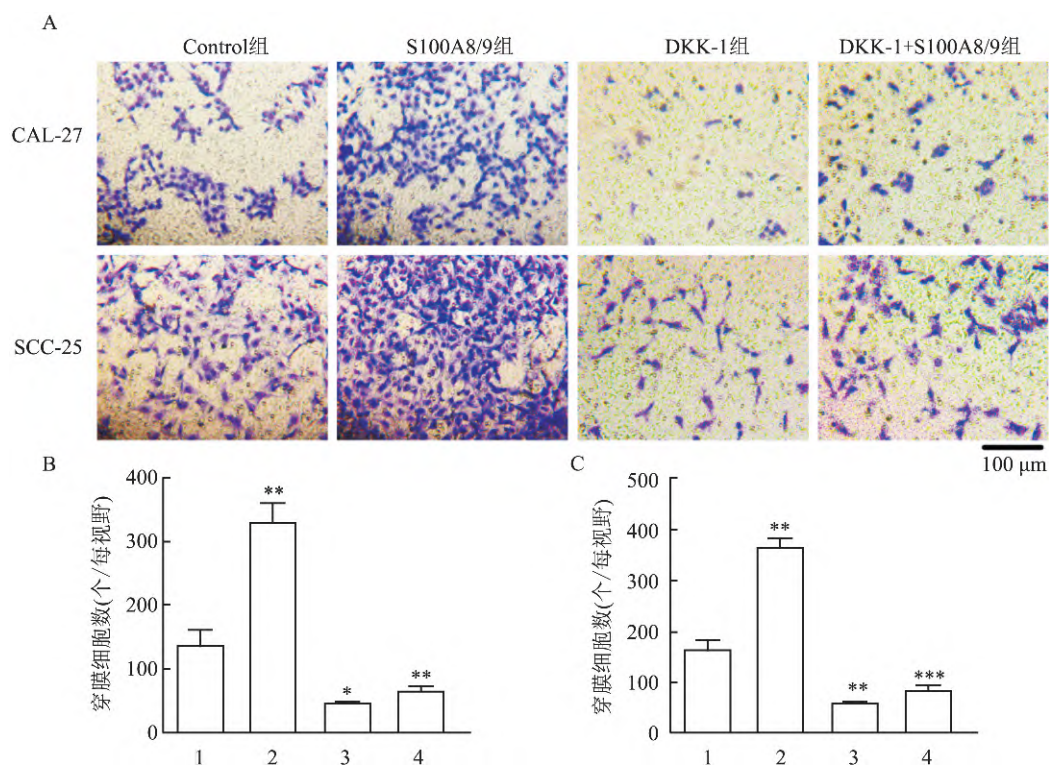


图5 Transwell 实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞的迁移能力

A: Transwell 实验检测各组的迁移能力 × 100; B、C: CAL-27 和 SCC-25 穿膜细胞的统计; 1: Control 组; 2: S100A8/A9 组; 3: DKK-1 组; 4: DKK-1 + S100A8/A9 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

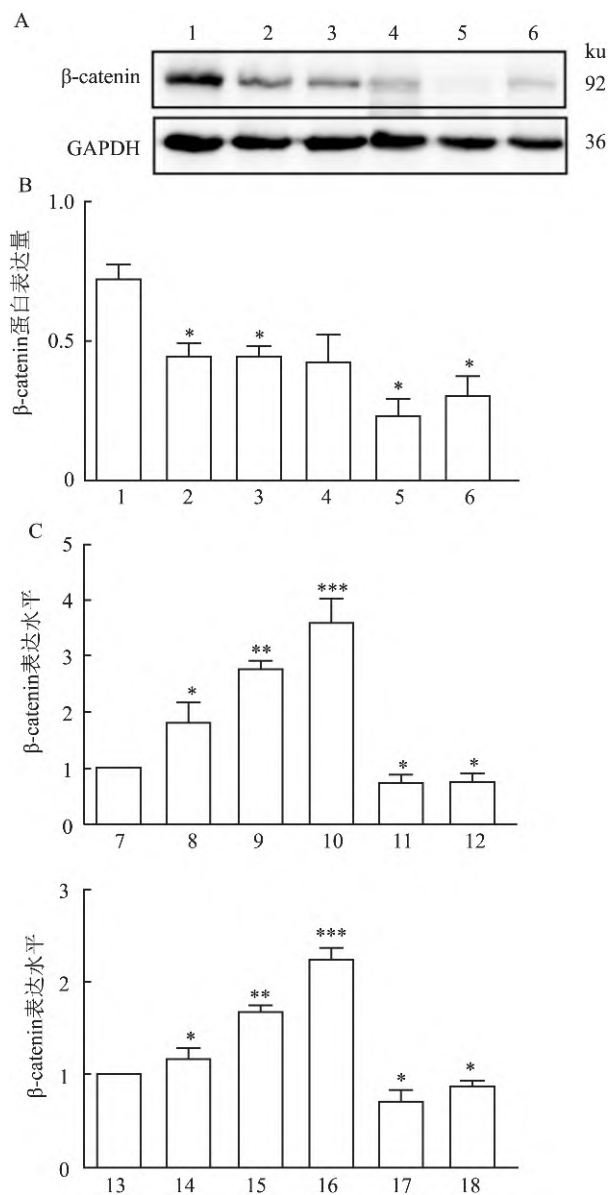


图6 Western blot 和 qPCR 检测 DKK-1

抑制剂对 β-catenin 表达的影响

A: Western blot 实验检测各组中 β-catenin 的表达; B: 灰度值的定量统计; C: qPCR 实验验证各组中 β-catenin 表达的统计结果; 1: CAL-27 Control 组; 2: CAL-27 + DKK-1 组; 3: CAL-27 + DKK-1 + S100A8/A9 组; 4: SCC-25 Control 组; 5: SCC-25 + DKK-1 组; 6: SCC-25 + DKK-1 + S100A8/A9 组; 7: CAL-27 Control 组; 8: CAL-27 + S100A8/A9 6 h 组; 9: CAL-27 + S100A8/A9 24 h 组; 10: CAL-27 + S100A8/A9 48 h 组; 11: CAL-27 + DKK-1 48 h 组; 12: CAL-27 + DKK-1 + S100A8/A9 48 h 组; 13: SCC-25 Control 组; 14: SCC-25 + S100A8/A9 6 h 组; 15: SCC-25 + S100A8/A9 24 h 组; 16: SCC-25 + S100A8/A9 48 h 组; 17: SCC-25 + DKK-1 48 h 组; 18: SCC-25 + DKK-1 + S100A8/A9 48 h 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

因子,但两者单独存在时作用减弱,两者的共同作用下细胞内 β-catenin 表达量在 48 h 内持续增加。

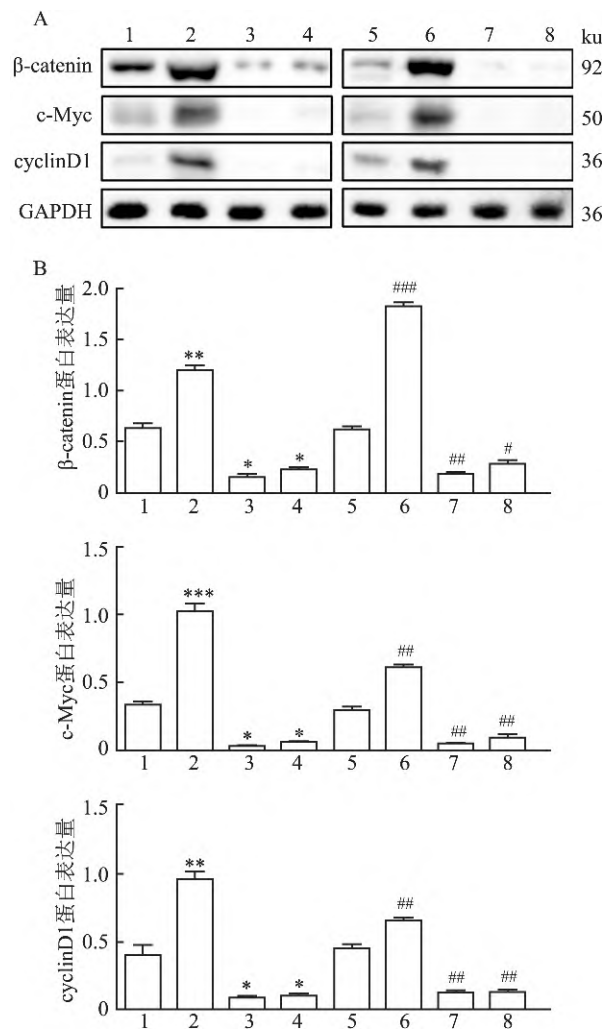


图7 Western blot 检测 DKK-1 对 c-Myc 和 cyclinD1 表达的影响

A: Western blot 实验检测各组中 β-catenin、c-Myc、cyclinD1 的表达; B: 灰度值的定量统计; 1: CAL-27 Control 组; 2: CAL-27 + S100A8/A9 48 h 组; 3: CAL-27 + DKK-1 48 h 组; 4: CAL-27 + DKK-1 + S100A8/A9 48 h 组; 5: SCC-25 Control 组; 6: SCC-25 + S100A8/A9 48 h 组; 7: SCC-25 + DKK-1 48 h 组; 8: SCC-25 + DKK-1 + S100A8/A9 48 h 组; 与 CAL-27 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 SCC-25 Control 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

Van et al^[3] 的研究结果显示, S100A8 在巨噬细胞和小鼠膝关节中诱导 Wnt 信号传导, 且 S100A8 的某些作用与 Wnt 通路的激活有关。免疫荧光实验也表明 S100A8/A9 激活 CAL-27 和 SCC-25 中 Wnt/β-catenin 信号通路。Zha et al^[4] 研究认为 S100A9 诱导的宫颈癌细胞增殖和迁移的增加可归因于 EMT 的促进和 Wnt/β-catenin 信号通路的异常激活。S100A8/A9 促进了 CAL-27 和 SCC-25 细胞侵袭和迁移能力, 与 Xu et al^[3] 的研究可溶性炎症因子 S100A8/A9 可能通过 p38 MAPK 信号通路促进癌症

迁移和侵袭结果相似。

DKK-1 是一种分泌的 Wnt 拮抗剂,可与 LRP5/6 结合并抑制 WNT/FZD /LRP5/6 复合物形成来阻断 Wnt 通路。通过 DKK-1 减弱 OSCC 细胞的侵袭迁移能力,S100A8/A9 对 CAL-27 和 SCC-25 细胞的侵袭和迁移能力的促进作用,因 β -catenin 蛋白的沉默而减弱,并通过 DKK-1 抑制 Wnt/ β -catenin 中的关键分子 c-Myc 和 cyclinD1 的表达水平,表明 S100A8/A9 可能是通过激活 β -catenin 蛋白而调控 CAL-27 和 SCC-25 的进展。该研究表明 S100A8/A9 通过 Wnt/ β -catenin 影响 OSCC 的侵袭迁移能力,提示 Wnt/ β -catenin 抑制剂在 CAL-27 和 SCC-25 临床应用和药物研发中有一定的潜力,但该研究仅仅针对的是某一鳞癌细胞系,与探讨真正的鳞癌侵袭迁移是有差距的,仍需要更多的实验研究来证实。

参考文献

- [1] Zhong L, Zhang C, Ren G, et al. Long-term results of a randomized phase III trial of TPF induction chemotherapy followed by surgery and radiation in locally advanced oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(21):18707–14.
- [2] Shield K D, Ferlay J, Jemal A, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):51–64.
- [3] Fatemeh, Shabani, Alireza, et al. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(10):801–2.
- [4] Zhang X, Tian Y, Yang Y, et al. Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(15):2773–82.
- [5] Luke J J, Bao R, Sweis R F, et al. WNT/ β -catenin pathway activation correlates with immune exclusion across human cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(10):3074–83.
- [6] Houschyar K S, Chelliah M P, Rein S, et al. Role of Wnt signaling during inflammation and sepsis: a review of the literature [J]. *Int J Artif Organs*, 2018, 41(5):247–53.
- [7] Huang Y, Wang M, Hong Y, et al. Reduced expression of antimicrobial protein secretory leukoprotease inhibitor and clusterin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021(9):1–13.
- [8] Gao H, Hou J, Meng H, et al. Proinflammatory effects and mechanisms of calprotectin on human gingival fibroblasts [J]. *J Periodontol Res*, 2017, 52(6):975–83.
- [9] Lim S Y, Yuzhalin A E, Gordon-Weeks A N, et al. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2016, 35(44):5735–45.
- [10] 王天雪, 孙强, 李佳. 沉默环状 RNA PIP5K1A 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路来降低口腔鳞癌细胞生长与转移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(8):1251–7.
- [11] Zhang X, Wang L, Qu Y. Targeting the β -catenin signaling for cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2020:104794.
- [12] 廖文尉, 章诚, 刘芙蓉, 等. Wnt/ β -catenin 信号调控 EMT 水平对小鼠胚胎干细胞向肝脏组织结构分化的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(30):2441–7.
- [13] Van D, Blom A B, Schelbergen R, et al. Induction of canonical wnt signaling by the alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(1):152–63.
- [14] Zha H, Li X, Sun H, et al. S100A9 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells by inducing epithelial mesenchymal transition and activating the Wnt/ β -actin pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(1):35–44.
- [15] Xu N, Zhang B B, Huang X N, et al. S100A8/A9 molecular complexes promote cancer migration and invasion via the p38 MAPK pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2021, 2021:9913794.

S100A8/A9 promote the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma through Wnt/ β -catenin

Jiang Cen¹, Ma Hong^{1,2}, Hu Yun³, Zhou Ke¹, Sun Junze¹, Bao Lingna¹

(¹School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, ³Dept of Oral Pathology, Affiliated Stomatological Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate whether exogenous calcium-binding protein A8/A9 (S100A8/A9) promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells CAL-27 and SCC-25 through Wnt/ β -catenin. **Methods** CAL-27 and SCC-25 were cultured with S100A8 and S100A9 proteins respectively or together, and the expression of β -catenin was detected by Western blot. 20 μ g/ml Wnt/ β -catenin pathway inhibitor DKK-1 was added, the expression of β -catenin was detected by Western blot and qPCR; Transwell assay was used to com-

pare the cell invasion and migration ability of normal control group, S100A8/A9 protein added group, DKK-1 added group, and DKK-1 added and S100A8/A9 protein recovery group; Western blot was used to detect the expression of c-Myc and cyclinD1. **Results** S100A8 and S100A9 could activate the Wnt/ β -catenin pathway. Compared with S100A8 and S100A9 cultured separately, the expression of β -catenin in CAL-27 and SCC-25 cells was up-regulated with time when co-cultured, and the qPCR results were consistent with them; in the immunofluorescence experiment, changes in the expression of β -catenin were observed in the cytoplasm and nucleus of SCC-25 and CAL-27 cells, and the expression of β -catenin protein in SCC-25 and CAL-27 cells increased at 48 h ($P < 0.05$). Adding DKK-1, Western blot and qPCR showed that the expression of β -catenin decreased ($P < 0.001$); the number of cell migration and invasion in the S100A8/A9 group was more than that in the blank group ($P < 0.001$), the number of cells invading and migrating decreased in the DKK-1 inhibitor group, and the number of cells in the DKK-1 and S100A8/A9 protein recovery group decreased, suggesting that DKK-1 could inhibit the promoting effect of exogenous S100A8/A9 protein on the invasion and migration ability of SCC-25 and CAL-27 cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$); adding Wnt/ β -catenin pathway inhibitor DKK-1, Western blot experiments showed that the expressions of key molecules c-Myc and cyclinD1 in the Wnt/ β -catenin pathway decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Exogenous S100A8/A9 can promote the invasion and migration of SCC-25 and CAL-27 cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words S100A8/A9; Wnt/ β -catenin; DKK-1; invasion; migration

(上接第 1970 页)

hsa-let-7e-5p inhibits the migration of lung adenocarcinoma cells

Feng Xiao¹, Li Yun¹, Bu Fan², Wang Fengsong³, Wu Quan¹

(¹Dept of Clinical Laboratory, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001;

²School of Life Sciences, USTC Life Sciences and Medicine, Hefei 230027;

³Dept of Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To screen differentially expressed miRNAs and explore its effect and mechanism on cell migration in lung adenocarcinoma (LUAD). **Methods** Differentially expressed miRNAs in LUAD tissues and normal lung tissues were screened by miRNA microarrays, and then bioinformatics analysis was used to predict their potential biological functions and signaling pathways. The cancer genome atlas (TCGA) analysis and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verified the expression level of hsa-let-7e-5p in LUAD tissues and cell lines. The effect of hsa-let-7e-5p cell migration in LUAD was examined by wound healing experiment. After screening the underlying target genes by bioinformatics analysis, the targeting relationship between hsa-let-7e-5p and DTX2, NME6, C8orf58, GATM and DHX57 were verified by qRT-PCR. **Results** The miRNA microarray results showed that 347 miRNAs were down-regulated while 229 miRNAs were up-regulated in lung adenocarcinoma tissues. Compared with normal lung tissue and cells, the expression level of hsa-let-7e-5p was significantly down-regulated. Besides, over-expression of hsa-let-7e-5p inhibited LUAD cell migration. **Conclusion** Non-coding RNA hsa-let-7e-5p is down-regulated in LUAD and inhibits the migration of lung adenocarcinoma cells. DTX2, NME6, C8orf58, GATM and DHX57 are the potential target genes of hsa-let-7e-5p.

Key words hsa-let-7e-5p; lung adenocarcinoma; miRNA microarray; tumor cell migration