

ANO1对口腔鳞癌SCC-25细胞株的影响

李雅冬* 张劲松 杨凯 张福军 陈睿 陈丹

(重庆医科大学附属第一医院口腔科, 重庆 400016)

摘要 采用免疫组化检测160例口腔鳞癌组织及相应正常组织的ANO1表达, 并进行多项体外实验, 以明确ANO1对SCC-25细胞迁移的影响。结果显示, 正常组织中的ANO1阳性表达明显低于口腔鳞癌组织; 有淋巴结转移的口腔鳞癌组织的ANO1阳性表达显著高于无转移的口腔鳞癌组织; 多项体外实验表明, ANO1过表达有利于SCC-25细胞的迁移; 尼氟灭酸能减缓细胞的迁移速度。综上所述, ANO1促进了口腔鳞癌患者体内的肿瘤转移, 并增加了SCC-25细胞的体外移动、侵袭、伸展、剥脱能力, 有望成为治疗口腔鳞癌的新的靶点。

关键词 口腔鳞癌; 氯离子通道; 转移

The Effect of ANO1 on SCC-25 Oral Cancer Cell Line

Li Yadong*, Zhang Jinsong, Yang Kai, Zhang Fujun, Chen Rui, Chen Dan

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The specimens of 160 patients with oral squamous cell carcinoma were examined by immunohistochemistry. SCC-25 cell line was used to do many assays *in vitro* to find out how ANO1 affect on the migration of SCC-25 cells. ANO1 protein expression was significantly higher in oral squamous cell carcinoma than those in normal oral tissue, and showed significant correlation with clinical stage of oral squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. The results of cell detachment assay, spreading assay, adhesion assay, boyden chamber migration assay and *in vitro* wound healing experiments showed that ANO1 overexpression favored the migration of SCC-25 cells; Niflumic Acid blocking chloride channel experiments showed that Niflumic Acid decreased the migration speed of SCC-25 cell. In summary, ANO1 may promote clinic metastasis of oral squamous cell carcinoma. ANO1 overexpression significantly increases the migration, invasion, spreading, detachment capacities of oral squamous cell carcinoma, and these biological characteristics are significant correlated with invasion and metastasis of the tumor cell. so ANO1 could become the new gene treatment target of oral squamous cell carcinoma.

Key words oral squamous cell carcinoma; chloride channel; metastasis

在口腔癌中, 舌癌最常见, 其发病率在口腔癌中居首位。由于舌部组织疏松, 具有丰富的淋巴管和血液循环, 并且舌的机械运动频繁, 因此舌癌极易

发生转移, 且常常是致死的原因^[1]。虽然外科手术、放射治疗及辅助化疗等治疗方法的综合应用在一定程度上提高了舌癌患者生存率, 但大部分研究表明,

收稿日期: 2013-07-09 接受日期: 2013-09-05

2012年重庆市科委自然科学基金计划资助项目(批准号: cstc2012jjA10039)、重庆市卫生局2011年医学科研项目(面上项目)(批准号: 2011-2-013)和重庆市教委科学技术研究项目(批准号: KJ130318)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89012907, E-mail: llxyydd2006@sina.com

Received: July 9, 2013 Accepted: September 5, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.cstc2012jjA10039), Chongqing Municipal Health Bureau (Grant No.2011-2-013) and Chongqing Municipal Commission of Education (Grant No.KJ130318)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012907, E-mail: llxyydd2006@sina.com

网络出版时间: 2013-12-11 11:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0213.html>

其晚期患者5年生存率仍较低^[2-3]。因此,研究舌癌发生发展过程中的分子生物学机制,为舌癌的治疗提供新靶点具有重要意义。

众所周知,氯离子是生物体内最多的阴离子,广泛分布于哺乳动物的组织器官和各种细胞中。氯离子通道开放可调节膜静息电位稳定和电兴奋性、胞内ATP水解、容积调节、电解质转运、细胞pH值等。对多种肿瘤的研究结果表明,在肿瘤细胞发生发展过程中,有氯电流的激活。氯离子通道参与细胞形态变化的过程与细胞的迁移和侵袭密切相关。例如神经胶质瘤细胞具有较强的侵袭性,其细胞膜的氯离子通道表达上调,提高了神经胶质瘤细胞转运氯离子的能力,而在其侵袭迁移过程中,细胞的体积和形态发生很大的变化,使得容积敏感性氯离子通道激活,利用药物阻断剂NPPB或者他莫西芬阻断离子通道,可以阻止神经胶质瘤细胞的迁移^[4]。因此,氯离子通道与细胞的迁移侵袭密切相关。近年的研究表明,ANO1具有需钙离子激活的氯离子通道功能^[5-7],可作为前列腺癌的临床诊断及预后标志物^[8]。本文就ANO1与舌癌细胞迁移的关系进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

SCC-25细胞株由重庆医科大学中心实验室提供。MEM培养基、胎牛血清、MEM培养基、siRNA试剂、Boyden小室、ANO1抗体(美国Sigma公司),激光共聚焦扫描显微镜(德国Leica),CF15型低温离心机(德国Heraeus公司),脂质体Lipofectamine™ 2000(美国Invitrogen公司)。

1.2 临床资料及标本

收集重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科2000~2011年的160例口腔癌患者的手术标本。所有患者均为首次口腔癌手术治疗,对本研究均知情同意,并具有完整的临床资料,包括年龄、性别、症状、病程等。160例患者中男性102例,女性58例,年龄平均52.3±11.4岁。根据患者临床部位分:颊癌34例、口底癌30例、舌癌48例、口咽癌48例。按1997年WHO口腔鳞癌的组织学标准进行分类,高分化鳞癌56例、中分化鳞癌74例、低分化鳞癌30例,发生颈部淋巴结转移116例、未发生颈部淋巴结转移44例。按2002年UICC口腔鳞癌临床分期II期56例、III期64例、IV期40例。瘤体均被全切。同时,切取距

瘤体边缘大于1.5 cm的少许黏膜组织作为正常组织,液氮中保存。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化检测 先将标本用石蜡包埋后,切片,然后脱蜡、水化、冲洗,顺次滴加免疫组化试剂,封片。设置阴性对照:将一抗用PBS液替代,其余步骤相同。阳性表达以细胞被染为深褐色为准。

1.3.2 siRNA沉默ANO1实验和Western blot检测

每孔加 1×10^5 /mL SCC-25细胞到盛有改动的伊格尔培养基的24孔培养板中,于37 °C、5% CO₂培养箱内培养,待细胞长至70%时,进行siRNA转染, Si1: 5'-TTA CGT GGC GTT CTT CAA A-3'; Si2: 5'-GCA CGA TTG TCT ATG AGA T-3'; Si3: 5'-GAA TCA TTG TCT TCC TGT ATT-3'。弃培养液。参照Lipofectamine™ 2000试剂说明操作,以Si1、Si2、Si3为实验组, SiLuc、SiRISC、SiGFP为对照组,转染24 h后,收集细胞,进行Western blot实验,一抗为anti-ANO1(1:1 000稀释)和anti-TBP(1:2 000稀释)溶液,二抗为辣根过氧化物酶标记鼠抗兔IgG抗体(1:1 000稀释)。用美国BioRad公司Quantity One系统进行灰度分析,以目的蛋白条带与内参蛋白条带的比值为蛋白相对表达水平。在以下的实验中,均将SiLuc、SiRISC、SiGFP沉默ANO1的SCC-25作为实验组, Si1、Si2、Si3沉默ANO1的SCC-25细胞作为对照组。

1.3.3 间接免疫荧光法 将玻片放入6孔板,将实验组和对照组的细胞分别加入6孔板培养。待细胞爬满玻片后, PBS液冲洗3遍,滴加100%乙醇固定细胞,常温10 min后,以蒸馏水冲洗1遍。加入抗体,37 °C保温摇床上震荡60 min。PBS冲洗3次。滴加荧光标记二抗,震荡60 min。取出玻片,滴加一滴甘油缓冲液,再覆以盖玻片。荧光显微镜高倍视野下观察,判定结果。

1.3.4 Boyden小室迁移试验 根据制造商的说明书进行细胞迁移试验。首先,用含I型胶原蛋白(collagen I)的无血清培养基制备细胞悬液。调整细胞密度至 4×10^5 /mL。每个Boyden小室内加入细胞悬液200 μL,37 °C孵育4 h。之后,取出Boyden小室,滤膜下层向上, PBS洗涤,3%戊二醛固定, HE染色,用棉花棒擦净小室滤膜上层未迁移的细胞。使用倒置显微镜进行观察和拍照,算出穿过滤膜的细胞百分比。

1.3.5 细胞黏附试验 取对数生长期的细胞用0.25%胰蛋白酶消化后,制成单细胞悬液,接种到6孔板内,每孔 10^6 个细胞,在37 °C下孵育10 min后,用

PBS洗涤两次,收集未黏附的细胞,计数未黏附和黏附细胞。算出细胞黏附百分比。

1.3.6 细胞伸展试验 取对数生长期的细胞用0.25%胰蛋白酶消化后,制成单细胞悬液,接种到6孔板内,每孔 10^6 个细胞,用倒置显微镜收集图像,2 h后,计数伸展和未伸展细胞,算出细胞伸展百分比。

1.3.7 细胞剥脱试验 将细胞接种到6孔板内,每孔 10^6 个细胞,在37 °C温度下孵育2 d后,用0.02%胰蛋白酶在常温下消化10 min,用PBS洗涤两次,收集剥脱的细胞,计数剥脱和黏附细胞。算出细胞剥脱百分比。

1.3.8 体外划痕愈合试验 将细胞接种于24孔板,直到细胞长满孔底,用200 mL的一次性塑料吸头在孔底做划痕,每孔内均加入5 $\mu\text{mol/L}$ 阿非迪霉素。在32 h内,用倒置显微镜收集图像(40 \times),用Adobe Photoshop CS2测量划痕两侧边缘之间的距离和面积,计算划痕面积百分比和细胞迁移速度。

1.3.9 尼氟灭酸(niflumic acid, NA)阻断氯离子通道实验 将细胞接种于24孔板,直到细胞长满孔底,用200 mL的一次性塑料吸头在孔底做划痕,每孔内均加入5 $\mu\text{mol/L}$ 阿非迪霉素和100 μM NA。在32 h内,用倒置显微镜每收集图像(40 \times),利用Adobe Photoshop CS2测量划痕两侧边缘之间的距离和面积。计算划痕面积百分比和细胞迁移速率。

1.4 统计学方法

实验所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据分析采用SPSS 10.0软件,方差分析, t 检验,秩和检验,卡方检验, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 ANO1蛋白在口腔鳞癌组织中的表达

ANO1在口腔鳞癌组织中的表达表现为细胞染为褐色(图1),阳性率为82.5%,在正常组织中,ANO1均为阴性($P<0.05$);有淋巴结转移的口腔鳞癌组织中,ANO1阳性表达高于无转移的口腔鳞癌组织($P<0.05$);随着口腔鳞癌临床分期的升高,ANO1的阳性表达率升高($P<0.05$);而ANO1的阳性表达率与病理分级,年龄和性别暂无关(表1)。

2.2 siRNA沉默ANO1

在各组SiRNA转染后24 h,经Western blot检测结果显示,在37 kDa处蛋白条带亮度大致均一,说明样本中蛋白量基本一致。在100 kDa处各组均出现目的

条带,但亮度有明显差别。实验组较对照组有明显下降,其中,Si1下降最明显。应用Quantity One 4.5.0软件进行分析,以对照组的条带为标准(亮度定为100),本实验结果表明,实验组对ANO1蛋白表达抑制率为68.21%,两组D值差异有显著性($P<0.05$);并证明了Si1、Si2和Si3能有效地阻断ANO1的表达(图2)。

2.3 间接免疫荧光法检测ANO1的表达

实验组细胞内有红色荧光,而对照组细胞内仅有较暗、较浅的红色荧光,表明Si1、Si2和Si3有效地阻断了ANO1的表达(图3)。

2.4 Boyden小室迁移试验检测细胞迁移情况

实验组穿过滤膜的细胞百分比是54% \pm 5%,对照组穿过滤膜的细胞百分比是26% \pm 1%,可见稳定高表达ANO1的SCC-25细胞迁移能力是对照组的两倍,两组结果有显著性差异($P<0.05$)(图4)。

2.5 细胞黏附试验检测细胞黏附情况

实验组黏附细胞百分比是56% \pm 3%,对照组黏附细胞百分比是10% \pm 2%,可见稳定高表达ANO1的SCC-25细胞黏附能力远远大于对照组,两组结果有显著性差异($P<0.05$)(图5)。

2.6 细胞伸展试验检测细胞伸展情况

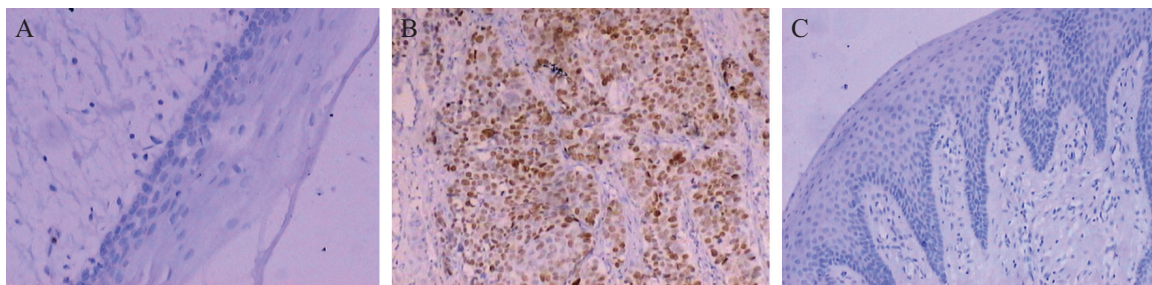
实验组伸展细胞百分比是62% \pm 13%,对照组伸

表1 口腔鳞癌组织ANO1表达与临床病理指标间的关系
Table 1 The relationship of the expression of ANO1 and pathogenic and clinic parameters of oral squamous cell carcinoma patients

	例数	ANO1	
	Number of cases	ANO1	
Differentiation		-	+
I	56	9	47
II	74	14	60
III	30	5	25
Lymph node			
N ₀	44	16	28
N _{1,2}	116	12	104*
Clinical stage			
II	56	18	38
III, IV	104	10	94*
Ages			
30-59	140	26	114
60-	20	2	18
Sex			
Male	102	18	84
Female	58	10	48

* $P<0.05$, N_{1,2}与N₀比较; III、IV与II比较。

* $P<0.05$, N_{1,2} compared with N₀; III and IV compared with II.



A: 在正常组织中, ANO1表达为阴性; B: 在口腔鳞癌组织中, ANO1表达为阳性; C: 在口腔鳞癌组织中, ANO1表达为阴性。
A: ANO1 is negative in oral normol tissue; B: ANO1 is positive in oral squamous cell carcinoma; C: ANO1 is negative in oral squamous cell carcinoma.

图1 ANO1在正常组织和口腔鳞癌中的表达(100×)

Fig.1 The expression of ANO1 in normal tissue and oral cancer tissue (100×)

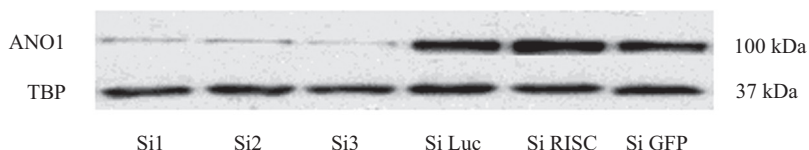
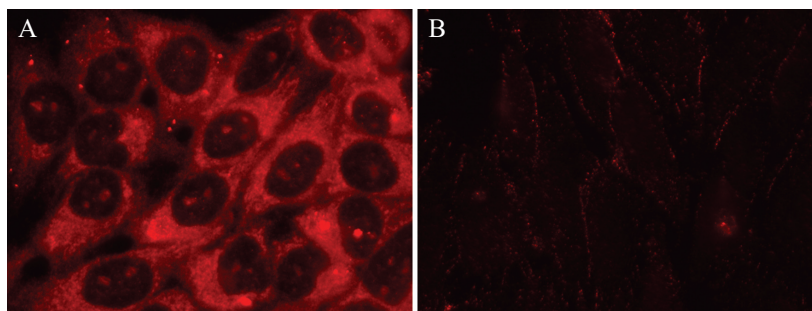


图2 Western blot检测转染后SCC-25细胞ANO1蛋白的表达

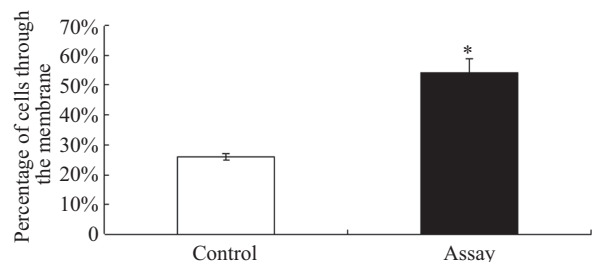
Fig.2 Expression of ANO1 protein after transfection by Western blot



A: 实验组; B: 对照组。
A: assay group; B: control group.

图3 免疫荧光实验检测转染后SCC-25细胞ANO1蛋白的表达(400×)

Fig.3 Expression of ANO1 protein after transfection by immunofluorescence assay (400×)

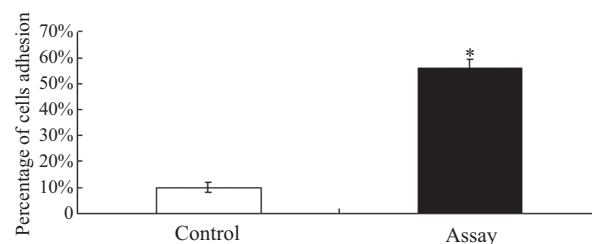


* $P < 0.05$, 与对照组细胞比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group.

图4 Boyden小室迁移试验检测细胞迁移情况

Fig.4 Assessment of cell migration by Boyden chamber migration assay



* $P < 0.05$, 与对照组细胞比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group.

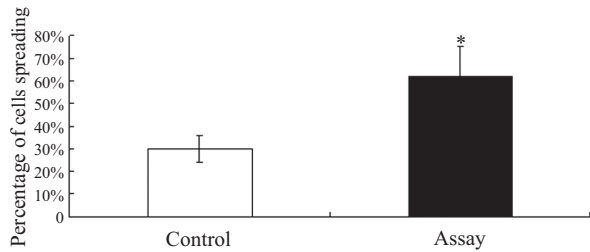
图5 细胞黏附试验检测细胞黏附情况

Fig.5 Assessment of cell adhesion by cell adhesion assay

展细胞百分比是 $30\% \pm 6\%$, 可见稳定高表达ANO1的SCC-25细胞伸展能力远远大于对照组, 两组结果有显著性差异($P < 0.05$)(图6)。

2.7 细胞剥脱试验检测细胞剥脱情况

实验组剥脱细胞百分比是 $87\% \pm 2\%$, 对照组剥脱细胞百分比是 $37\% \pm 1\%$, 稳定高表达ANO1的SCC-25细胞剥脱能力远远大于对照组, 两组结果有显著性差异($P < 0.05$)(图7)。

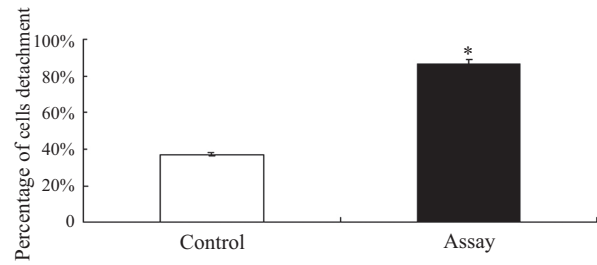


* $P < 0.05$, 与对照组细胞比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group.

图6 细胞伸展试验检测细胞伸展情况

Fig.6 Assessment of cell spreading by cell spreading assay

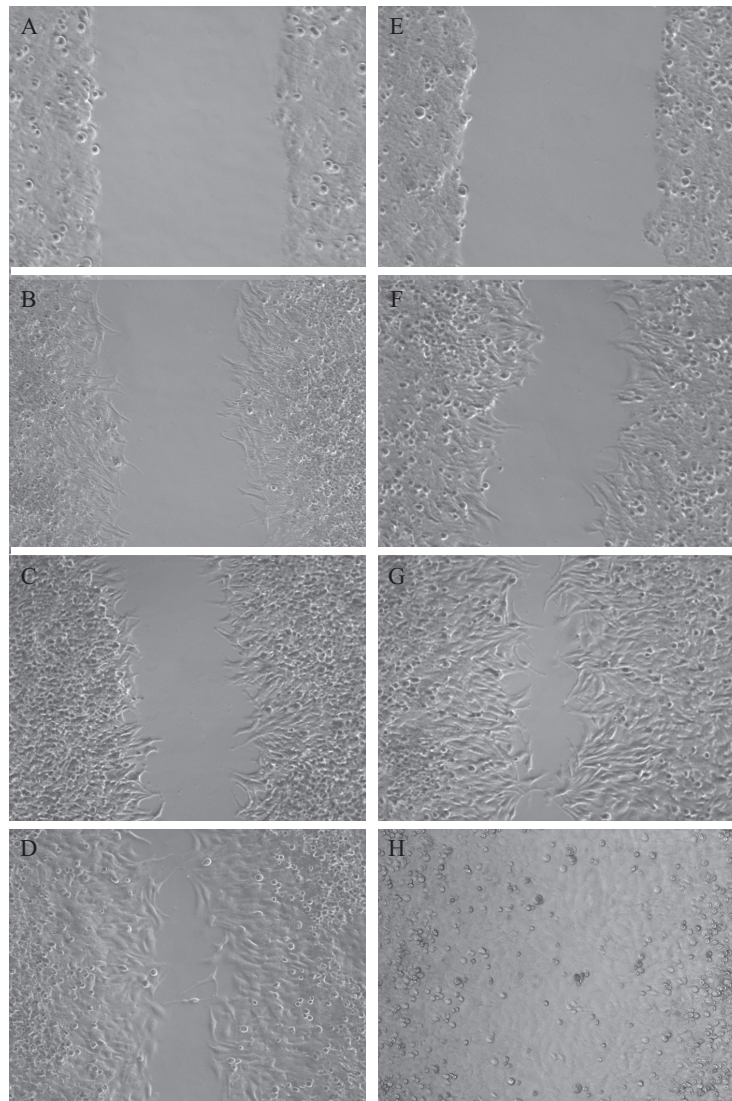


* $P < 0.05$, 与对照组细胞比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group.

图7 细胞剥脱试验检测细胞剥脱情况

Fig.7 Assessment of cell detachment by cell detachment assay



A-D: 实验组0, 8, 24, 32 h细胞迁移; E-H: 对照组0, 8, 24, 32 h细胞迁移。

A-D: migration of cells in assay group for 0, 8, 24, 32 h; E-H: migration of cells in control group for 0, 8, 24, 32 h.

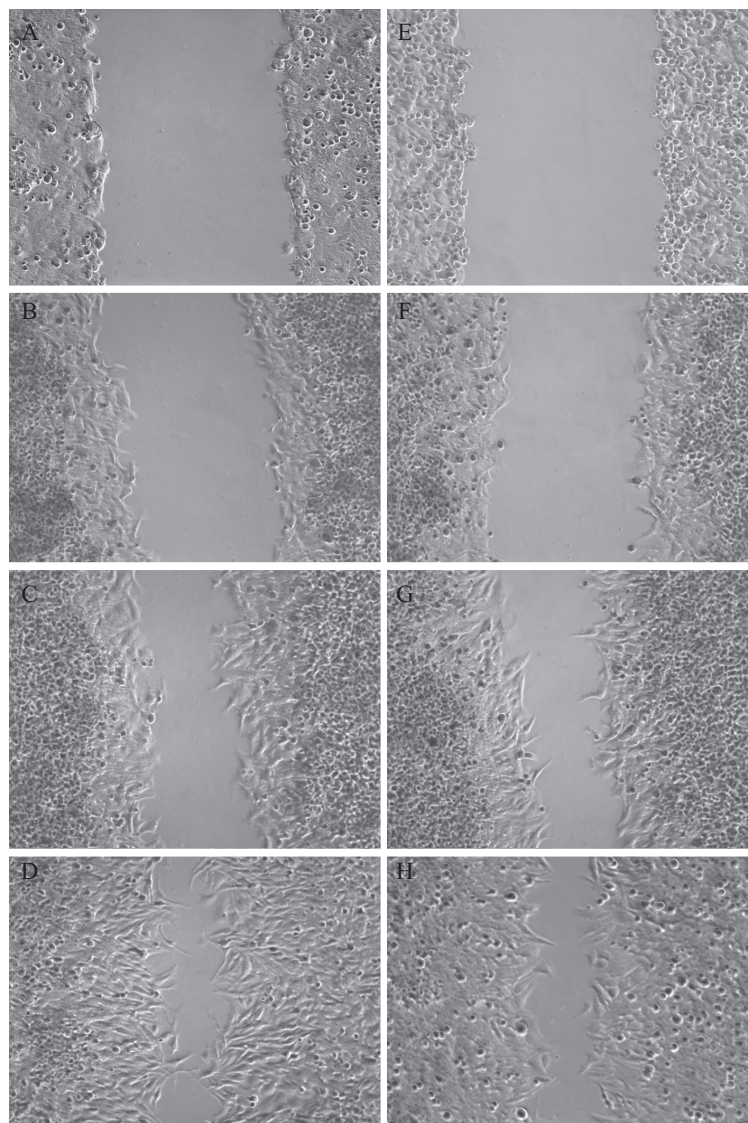
图8 SiRNA沉默ANO1的体外划痕愈合实验检测细胞迁移情况

Fig.8 Assessment of cell migration by *in vitro* wound assay after silencing ANO1

2.8 体外划痕愈合实验检测细胞迁移情况

32 h后, 对照组划痕面积百分比为0, 而实验组划痕面积百分比为35%, 两者差异有显著性($P < 0.05$),

对照组细胞平均迁移速率为 $0.16 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$, 实验组细胞平均迁移速率为 $0.11 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$, 两者差异有显著性($P < 0.05$), 本实验中在阿非迪霉素



A-D: 实验组0, 8, 24, 32 h细胞迁移; E-H: 对照组0, 8, 24, 32 h细胞迁移。

A-D: migration of cells in assay group for 0, 8, 24, 32 h; E-H: migration of cells in control group for 0, 8, 24, 32 h.

图9 NA减缓了稳定高表达ANO1的SCC-25细胞迁移

Fig.9 Niflumic acid (NA) decreases cell migration in ANO1 overexpressing SCC-25 cell clone

aphidicolin已阻止细胞分裂增殖的情况下, 划痕的愈合完全依赖细胞爬行迁移, 实验结果表明沉默ANO1可减缓SCC-25细胞的迁移速率(图8)。

2.9 尼氟灭酸(niflumic acid, NA)阻断氯离子通道检测细胞迁移情况

在32 h后, 实验组和对照组划痕面积百分比分别为20%和0, 两组差异有显著性($P < 0.05$), 实验组和对照组细胞平均迁移速率分别为 $0.12 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ 和 $0.16 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$, 两者差异有显著性($P < 0.05$), 表明NA能有效地阻断ANO1的氯离子通道活性, 并且减缓了SCC-25细胞的迁移速率, 再一次证明ANO1参与了SCC-25细胞的迁移活动, 并与ANO1的氯离

子通道功能有关(图9)。

3 讨论

目前, 已知ANO1属膜蛋白, 具有8个穿膜片段, 在ANO1的2个保守区域中, 有一个区域参与有丝分裂。人ANO1包含26个外显子, 位于人11号染色体长臂1区3带的CCND1-EMS1基因座内。本实验结果显示, ANO1在口腔颌面部鳞癌中的表达率明显高于正常组织; 而在有淋巴结转移的口腔鳞癌组织中, ANO1阳性表达高于无转移的口腔鳞癌组织; 随着口腔鳞癌临床分期的升高, ANO1的阳性表达率也随之升高。这些结果表明, ANO1与口腔颌面部组织发生

癌变有明显相关性,与鳞癌发生转移有明显相关性。

发生在舌部的鳞癌,其发生远处转移的时间早、比例高,并且很多患者并不是因为原发灶致死,而是由于发生远处转移,导致重要脏器功能丧失、全身衰竭、恶病质,最后死亡^[9-11]。既然ANO1与口腔癌的发生和转移有关,那么它对最常见的口腔癌(舌癌)有哪些具体的影响呢?目前国内外尚无报道,因此本研究着眼于ANO1对舌癌SCC-25的影响,结果表明ANO1的表达会促进细胞剥脱、伸展、黏附和迁移,而这些能力对肿瘤转移是相当重要的^[12-13]。

肿瘤细胞的迁移是其侵袭转移的基础,而在肿瘤细胞迁移时,癌细胞的体积需发生改变以适应肿瘤细胞侵袭过程中周围环境状态,氯离子通道具有调节细胞体积的作用,并参与了细胞的运动^[14-15]。国内外有学者对人胶质瘤细胞^[16]和鼻咽癌^[17]的研究发现,氯离子通道在细胞表面具有丰富的表达,而氯离子通道阻滞剂NPPB可降低细胞的趋化迁移能力,从而表明细胞的迁移过程中氯离子通道的激活可能扮演重要的角色^[17]。

因此我们相信ANO1的离子通道活性促进了SCC-25细胞的迁移,在本实验中,我们利用NA阻断氯离子通道,明显减缓了SCC-25细胞的迁移,这充分表明ANO1的离子通道功能参与并促进了SCC-25细胞的迁移。这一结果与其他学者的研究结果^[18-20]一致,都证明了氯离子通道参与了癌细胞的迁移。

对于许多疾病,氯离子通道属尚未开发的药物靶点,其抑制剂和激活剂正在研究开发之中^[21]。而在对头颈鳞癌的治疗中,我们可以ANO1为目标,合理设计靶向治疗肿瘤的药物,有望为癌症患者带来福音。

参考文献 (References)

- Shrime MG, Ma C, Gullane PJ, Gilbert RW, Irish JC, Brown DH, *et al.* Impact of nodal ratio on survival in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009; 31(9): 1129-36.
- Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Holleczeck B, *et al.* Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS One* 2013; 8(1): e53415.
- Tan WJ, Chia CS, Tan HK, Soo KC, Iyer NG. Prognostic significance of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2012; 74(5): 264-70.
- Ransom CB, O'Neal JT, Sontheimer H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *J Neurosci* 2001; 21(19): 7674-83.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, *et al.* TMEM16A, A Membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322(5901): 590-4.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, *et al.* TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455(7217): 1210-5.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 2008; 134(6): 1019-29.
- Liu W, Lu M, Liu B, Huang Y, Wang K. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma. *Cancer Lett* 2012; 326(1): 41-51.
- Dahlstrom KR, Calzada G, Hanby JD, Garden AS, Glisson BS, Li G, *et al.* An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer at a major cancer center: A staging system in need of repair. *Cancer* 2013; 119(1): 81-9.
- Woźniak A, Szyfter K, Szyfter W, Florek E. Head and neck cancer—history. *Przegl Lek* 2012; 69(10): 1079-83.
- Davis SJ, Divi V, Owen JH, Bradford CR, Carey TE, Papagerakis S, *et al.* Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136(12): 1260-6.
- Ruoslahti E, Obrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996; 227(1): 1-11.
- Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4(4): E97-100.
- Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(5): F739-47.
- Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 2005; 205(3): 159-73.
- 徐冰, 罗祺, 王心蕊, 刘潇, 王医术, 孙连坤. CIC-3在人胶质瘤中的表达及分布. *中国病理生理杂志(Xu Bing, Luo Qi, Wang Xinrui, Lu Xiao, Wang Yishu, Sun Liankun. Expression and distribution of CIC-3 in human glioma specimen. Chinese Journal of Pathophysiology)* 2005; 21(11): 2188-91.
- Mao J, Wang L, Fan A, Wang J, Xu B, Jacob TJ, *et al.* Blockage of volume-activated chloride channels inhibits migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19(5/6): 249-58.
- Li M, Wang Q, Lin W, Wang B. Regulation of ovarian cancer cell adhesion and invasion by chloride channels. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(4): 526-30.
- Mao J, Chen L, Xu B, Wang L, Li H, Guo J, *et al.* Suppression of CIC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(9): 1706-16.
- Schneider L, Klausen TK, Stock C, Mally S, Christensen ST, Pedersen SF, *et al.* H-ras transformation sensitizes volume-activated anion channels and increases migratory activity of NIH3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch* 2008; 455(6): 1055-62.
- Verkman AS, Galletta LJ. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(2): 153-71.