

S100A9对宫颈癌Hela细胞的增殖和迁移的影响及其机制探讨

李雪茹 孙 晖 查 何 段 亮 李 欢 袁世梅 李爱芳 谷 月 周 兰*
(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为初步探讨S100A9在宫颈癌中的生物学作用, 利用携带有人S100A9基因的腺病毒(AdhS100A9)感染于低表达S100A9的宫颈癌Hela细胞, 通过MTT法检测细胞增殖能力, 划痕愈合试验和Transwell试验检测细胞迁移能力, 通过倒置显微镜观察细胞形态变化, 采用RT-PCR和蛋白质印迹法检测上皮细胞标志蛋白E-钙黏着蛋白(E-cadherin, E-cad)、间质细胞标志蛋白波形蛋白(vimentin, Vim)及Wnt/ β -联蛋白(β -catenin, β -cat)信号通路相关分子的表达。结果显示, 与对照组相比, 过表达S100A9的Hela细胞增殖活性增强、迁移率增高, 细胞形态由“铺路石”样向“梭形”转变, 排列紊乱, 伴随E-cad降低($P < 0.05$)和Vim升高($P < 0.01$); 同时, 过表达S100A9的Hela细胞中Wnt/ β -cat信号通路的关键分子 β -联蛋白水平增加($P < 0.01$), 并且入核增多($P < 0.01$), 该通路的下游靶基因*c-myc*、*Snail*及*Twist*表达也明显上调。该研究结果提示, S100A9促进宫颈癌Hela细胞的增殖、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 激活Wnt/ β -cat信号通路; S100A9促进增殖和迁移作用的机制可能与其促进EMT和激活Wnt/ β -cat信号通路相关。

关键词 S100A9; 宫颈癌; 增殖; 迁移; 上皮间质转化; Wnt/ β -联蛋白信号通路

The Effects of S100A9 on Proliferation and Migration of Human Squamous Cervical Carcinoma Hela Cell Line and Its Mechanisms

Li Xueru, Sun Hui, Zha He, Duan Liang, Li Huan, Yuan Shimei, Li Aifang, Gu Yue, Zhou Lan*
(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the role of S100A9 in human squamous cervical carcinoma, the cervical carcinoma cells (Hela cell line) were infected with recombinant adenovirus expressing S100A9. Then, MTT was used to detect cell proliferation; Wound-healing test and Transwell assay were used to determine cell migration; Inverted microscope was used to observe the morphologic changes; Reverse transcription-PCR (RT-PCR) and Western blot were utilized to detect the mRNA or protein levels of E-Cadherin, Vimentin and the relevant molecules of Wnt/ β -catenin signaling pathway, respectively. The results showed that S100A9 over-expression promoted the proliferation and migration of Hela cells, and induced a morphology transition from a round cobblestone-like phenotype to a slender and fusiform appearance, also led to reduction of E-cadherin ($P < 0.05$) and increase of Vimentin ($P < 0.01$). Moreover, the levels of β -catenin, c-myc, Snail and Twist in S100A9 over-expressed Hela cells were also increased. The results demonstrated that S100A9 could promote the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal tran-

收稿日期: 2015-07-26

接受日期: 2015-10-26

*通讯作者。Tel: 18523323947, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

Received: July 26, 2015

Accepted: October 26, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-18523323947, E-mail: zhoulan0111@foxmail.com

网络出版时间: 2015-12-23 11:12:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151223.1112.004.html>

sition (EMT) of Hela cells and also activated the Wnt/ β -catenin signaling pathway. The mechanisms that S100A9 increased the cell proliferation and migration of Hela cell line might be associated with its promoting effect on EMT and the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords S100A9; cervical carcinoma; cell proliferation; cell migration; epithelial-mesenchymal transition; Wnt/ β -catenin signaling pathway

宫颈癌是最常见的恶性肿瘤之一,在全世界女性癌症中发病率居第三位,严重威胁女性健康^[1]。尽管随着细胞学检查的普及,宫颈癌得到了有效的早期诊断,但是转移和复发仍是患者死亡的主要原因^[2]。因此,深入探讨宫颈癌发生发展的分子机制对于宫颈癌的临床治疗具有重要的指导意义。

S100家族是EF-手型钙结合蛋白家族中最大的多基因家族,其中S100A9(calgranulin B, MRP14)与其他15个成员基因均定位于1号染色体长臂2区1带,该区段稳定性较差,易发生染色体重排,与多种恶性肿瘤的发生发展和侵袭、转移关系密切^[3]。已知S100A9在肺癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中发挥重要作用^[4-6]。例如, Arai等^[7]在研究浸润性乳腺导管癌中的S100A9表达时,发现S100A9的表达与淋巴结转移以及临床分期相关,提示S100A9参与肿瘤的侵袭转移。Chao等^[8]采用基因芯片检测宫颈鳞癌和癌旁正常宫颈组织的差异表达基因时,也发现S100A9在癌组织中表达上调。但关于S100A9对宫颈癌增殖侵袭等作用的研究则鲜有报道。因此,本研究以宫颈癌Hela细胞为实验对象,观察S100A9对细胞增殖及转移的影响。

已知上皮细胞癌通过上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)减弱依赖E-cad的细胞间的黏附,导致癌细胞容易脱落,进而侵袭周围组织和实现远处转移^[9],宫颈癌的迁移和侵袭能力也与EMT是密切相关^[10]。同时,Wnt/ β -cat信号通路的异常激活参与大多数肿瘤的发生发展,包括宫颈癌^[11]。因此,本研究进一步探讨S100A9对EMT和Wnt/ β -cat信号通路的作用,以了解其影响宫颈癌增殖和迁移的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人宫颈癌细胞系Siha、Caski和Hela均由重庆医科大学检验医学院分子医学实验室提供;重组腺病毒AdhS100A9(含人S100A9基因和绿色荧光蛋白

基因)和对照腺病毒AdGFP(只含有绿色荧光蛋白基因)由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授馈赠;DMEM高糖培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自美国Gibco公司;TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒和引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;蛋白质印迹及蛋白质提取相关试剂购自碧云天生物技术研究所;鼠抗人 β -actin、 β -cat、Vim单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗人S100A9单克隆抗体购自美国Abcam公司;兔抗人Histone单克隆抗体购自上海Abmart公司;兔抗人E-cad多克隆抗体购自美国ImmunoWay公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG(二抗)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;MTT试剂购自北京Solarbiog公司;Transwell小室(24孔,孔径8.0 μ m)购于MERCCK Millipore公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

宫颈癌细胞Siha、Caski和Hela用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖完全培养基培养。当细胞汇合率约80%时,用0.25%胰蛋白酶消化并传代,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱中培养,此种细胞为贴壁生长。Hela细胞实验分为空白组、GFP组(AdGFP感染组)及S100A9过表达组(AdhS100A9感染组)。实验过程均选择对数生长期细胞,以感染24 h后细胞中荧光阳性者达30%~40%为宜。

1.3 半定量RT-PCR

提取待测细胞的总RNA,取其中2 μ g反转录成cDNA。以1 μ L cDNA为模板进行PCR,检测Hela细胞中内参GAPDH、S100A9以及Wnt信号通路下游靶基因*c-myc*、*Snail*、*Twist*的转录水平,引物见表1。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,62 $^{\circ}$ C~54 $^{\circ}$ C退火30 s,9个循环(每个循环依次降低1 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C延伸30 s;94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,22~25个循环;最后,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。然后行2%琼脂糖凝胶电泳,采用Quantity One 4.6.2软件

对电泳结果进行灰度值分析。

1.4 蛋白质印迹法

提取待测细胞的总蛋白,行10% SDS-PAGE,再湿转至聚偏二氟乙烯膜,5%小牛血清封闭2 h,分别加入一抗(β -actin、S100A9、 β -cat、E-cad、Vim均以1:1 000稀释,Histone以1:5 000稀释),4 °C孵育过夜;洗膜,加入二抗(兔二抗和鼠二抗均为1:5 000稀释),37 °C反应1 h;洗膜,按照电化学发光试剂盒说明进行显影。采用Quantity One 4.6.2软件对蛋白质条带进行灰度值分析。

1.5 MTT法

将对数生长期的Hela细胞以3 000/孔接种于96孔板中,分组同前,每组设5个平行孔。培养1~3 d后,避光加入MTT,继续培养4 h,终止培养;吸弃孔内培养液,每孔加入150 μ L DMSO,震荡混匀10 min至结晶物充分溶解;用酶联免疫检测仪检测波长490 nm处各孔的光密度(D)值,以 D 值表示细胞的增殖活力。

1.6 划痕愈合试验

接种Hela细胞于6孔板中,待细胞汇合度为70%~80%时感染重组腺病毒,分组同前,6~8 h后换液,用自制0.5 mm中性笔尖行“十”字划痕,PBS洗2次后换成1% FBS培养基,于倒置显微镜下观察并记0 h划痕宽度。然后将细胞放入培养箱继续培养,24 h后取出6孔板,在相同位置观察并拍照。

1.7 Transwell小室试验

胰蛋白酶消化6孔板内腺病毒处理48 h的Hela细胞,分组同前,再离心、无血清培养液重悬和计数,然后接种到Transwell上室(4×10^4 /孔);下室中加入20% FBS培养基700 μ L,继续培养24 h,用湿棉签擦

去微孔膜上层的细胞,无水乙醇固定20 min,结晶紫染色后计数穿膜细胞。

1.8 统计学方法

所有实验均独立重复3次,实验数据用均数 \pm 标准差表示,利用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5软件进行统计学分析,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三株宫颈癌细胞中内源性S100A9的检测

RT-PCR及蛋白质印迹法检测三株宫颈癌细胞Siha、Caski和Hela内S100A9的表达。如图1所示,两种方法的检测结果一致,即在三株细胞中均有S100A9基因的表达,但是以Hela细胞的表达量最低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此,后续实验中选取Hela细胞作为过表达S100A9的实验对象,以观察S100A9对宫颈癌细胞的作用。

2.2 S100A9基因过表达验证

RT-PCR结果显示,AdhS100A9处理组的细胞中S100A9 mRNA水平较空白组和GFP组显著升高($P < 0.001$,图2A)。蛋白质印迹法进一步证实,Adh-S100A9感染组S100A9蛋白质水平较GFP组增加1.2倍($P < 0.05$,图2B)。此结果提示,AdhS100A9感染的Hela细胞中S100A9成功过表达,可用于后续研究。

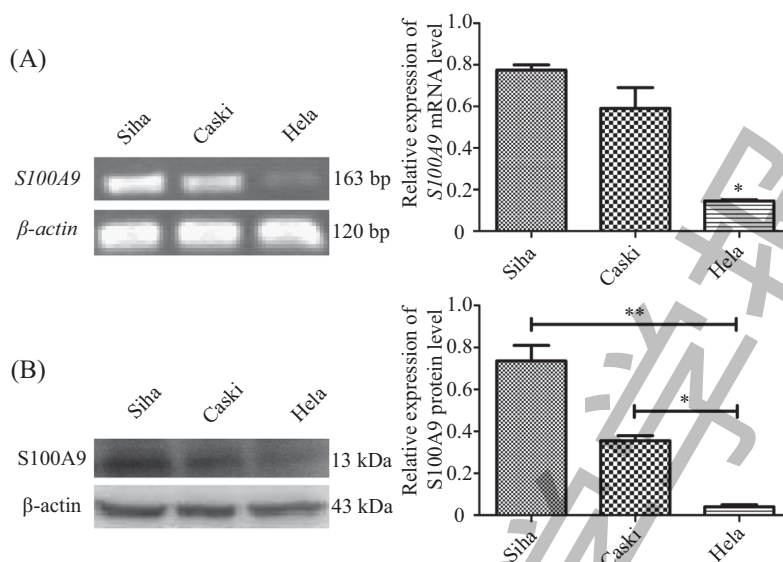
2.3 过表达S100A9基因对Hela细胞增殖的影响

腺病毒处理后第1、2 d,三组细胞之间的 D 值无明显差异;第3 d,空白组、GFP组及S100A9过表达组 D 值分别为 0.870 ± 0.124 、 0.833 ± 0.164 、 1.257 ± 0.158 ,其中,S100A9过表达组的值较对照

表1 引物信息

Table 1 Information of primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	产物大小 Product size
S100A9	Forward: 5'-ACC CAG ACA CCC TGA ACC-3' Reverse: 5'-AGC ATG ATG AAC TCC TCG A-3'	163 bp
c-myc	Forward: 5'-TAC CCT CTC AAC GAC AGC AG-3' Reverse: 5'-TCT TGA CAT TCT CCT CGG TG-3'	478 bp
Snail	Forward: 5'- ACC CCA CAT CCT TCT CAC TG-3' Reverse: 5'- TAC AAA AAC CCA CGC AGA CA-3'	217 bp
Twist	Forward: 5'- TCT TAC GAG GAG CTG CAG AC-3' Reverse: 5'- TAT CCA GCT CCA GAG TCT CT-3'	406 bp
GAPDH	Forward: 5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC-3' Reverse: 5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT-3'	120 bp

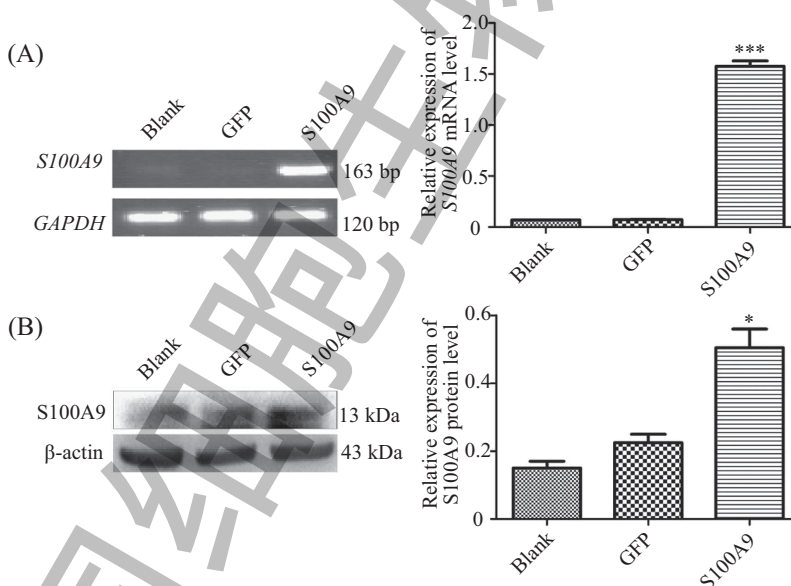


A: RT-PCR检测三株宫颈癌细胞中*S100A9*的mRNA水平, * $P<0.05$; B: 蛋白质印迹法检测*S100A9*的蛋白质水平, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: the levels of *S100A9* mRNA in three cervical carcinoma cells were detected by RT-PCR, * $P<0.05$; B: the levels of *S100A9* protein in three cervical carcinoma cells were detected by Western blot, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 三株宫颈癌细胞系的*S100A9*的内源性表达

Fig.1 The endogenous expression of *S100A9* in three cervical carcinoma cell lines



A: Adh*S100A9*处理Hela细胞后, RT-PCR检测Hela细胞中*S100A9*的mRNA水平, *** $P<0.001$, 与对照组相比较; B: 蛋白质印迹法检测*S100A9*的蛋白质水平, * $P<0.05$, 与对照组相比较。

A: the levels of *S100A9* mRNA in cervical carcinoma HeLa cells were detected by RT-PCR. *** $P<0.001$ compared with control group; B: the levels of *S100A9* protein in cervical carcinoma HeLa cells were detected by Western blot. * $P<0.05$ compared with control group.

图2 RT-PCR及蛋白质印迹法验证*S100A9*的过表达

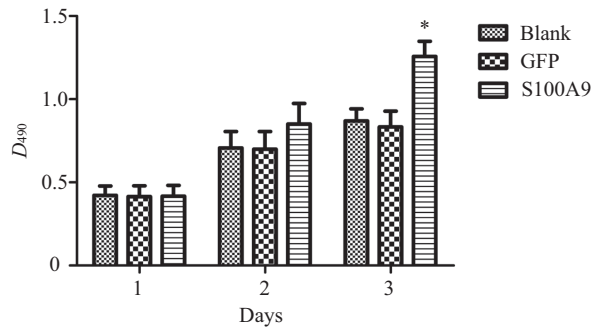
Fig.2 Over-expression of *S100A9* was confirmed by RT-PCR and Western blot

组增加51%($P<0.05$), 而GFP组和空白组之间差异无统计学意义($P>0.05$, 图3)。此结果提示, 过表达*S100A9*可促进Hela细胞的增殖。

2.4 过表达*S100A9*基因对Hela细胞迁移能力的影响

划痕愈合实验显示, 在划痕24 h后*S100A9*过表

达组的划痕愈合能力显著高于空白组和GFP组(图4A)。Transwell小室实验结果显示, 空白组、GFP组及*S100A9*过表达组中Hela细胞的穿膜数分别为(74.67±14.05)个、(66.00±14.42)个、(128.67±22.03)个, 其中, *S100A9*过表达组的穿膜细胞数较GFP组增加95%($P<0.05$), 而GFP组和空白组之间差异无显



* $P < 0.05$, 与对照组相比较。

* $P < 0.05$ compared with control group.

图3 过表达S100A9基因对Hela细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of S100A9 over-expression on cell proliferation of HeLa cells

著性($P > 0.05$, 图4B和4C)。以上结果均提示, 过表达S100A9可促进Hela细胞的迁移。

2.5 过表达S100A9基因对Hela细胞EMT的影响

倒置显微镜观察空白组、GFP组和S100A9过表达组的细胞形态, 发现空白组和GFP组的细胞呈“铺路石”样。而S100A9过表达组的细胞则细长呈梭形, 松散不规则生长(图5A)。蛋白质印迹法检测EMT标志物发现, 与GFP组相比, S100A9过表达组的Hela细胞内E-cad水平降低63%($P < 0.05$), 而Vim表达水平增加88%($P < 0.01$)(图5B)。这提示, 过表达S100A9可促进Hela细胞EMT的进程。

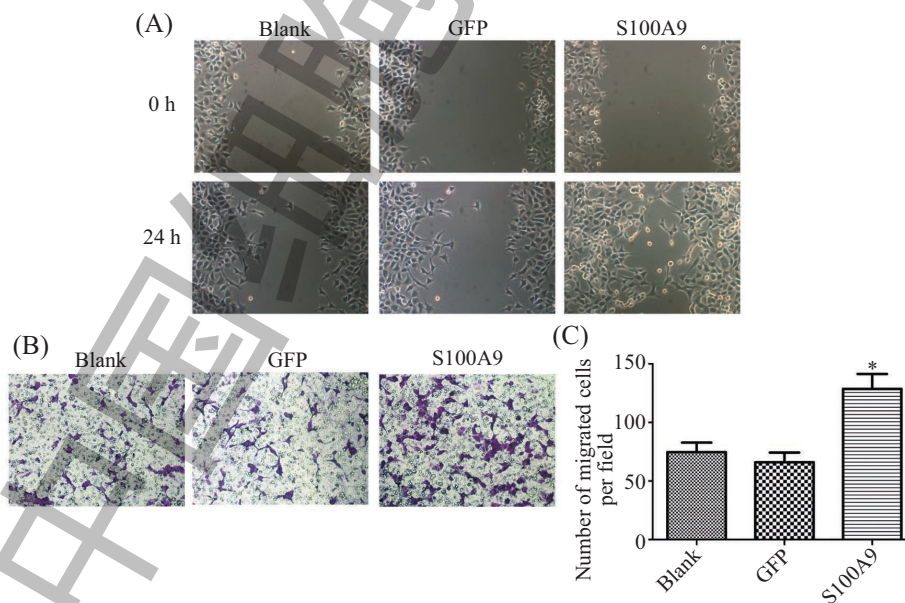
2.6 过表达S100A9基因对Wnt/ β -catenin信号通路的影响

RT-PCR和蛋白质印迹法检测Wnt/ β -cat信号通路相关信号分子的表达水平。如图6A所示, S100A9过表达组细胞内总的及胞核内的 β -cat表达量均增加, 分别为GFP组的1.4倍、2.2倍($P < 0.01$)。同时, 过表达S100A9后下游靶基因*c-myc*、*Snail*和*Twist1*的mRNA水平也随之均有不同程度升高(图6B)。以上提示, 过表达S100A9可激活经典的Wnt/ β -cat信号通路。

3 讨论

据近年统计, 宫颈癌发病率位于女性生殖系统三大恶性肿瘤之首, 直接蔓延为宫颈癌转移最常见的播散方式, 向前侵犯膀胱, 向后侵犯直肠。此外, 由于宫旁淋巴管丰富, 淋巴转移也是其转移扩散的主要途径。肿瘤的扩散转移给病人带来极大的痛苦, 甚至威胁到生命。因此, 明确宫颈癌迁移的具体机制对于降低患者病死率及改善预后具有重大意义。

S100A9是钙结合蛋白S100蛋白家族的成员, 最初发现是在髓系细胞分化过程中表达, 并且在粒细胞和单核细胞中高表达^[12]。越来越多研究证实, S100A9高表达于多种肿瘤, 参与肿瘤的发生发展。

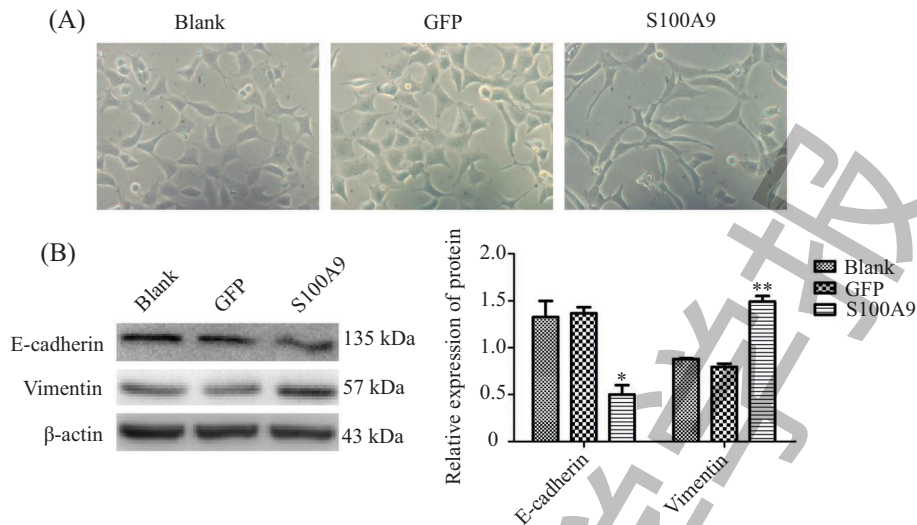


A: 光镜下观察划痕愈合实验中过表达S100A9后Hela细胞的侧向迁移能力变化(100 \times); B: 观察Transwell迁移实验中迁移到小室下层的细胞(结晶紫染色, 100 \times); C: 对Hela细胞进行计数和分析, * $P < 0.05$, 与对照组相比较。

A: the change of migration ability of HeLa cells after over-expression of S100A9 was detected by wound-healing test (100 \times); B: migratory cells were detected by Transwell assay test (stained with crystal violet, 100 \times); C: HeLa cells were counted and analyzed. * $P < 0.05$ compared with control group.

图4 过表达S100A9对Hela细胞迁移能力的影响

Fig.4 The effect of S100A9 over-expression on migration of HeLa cells

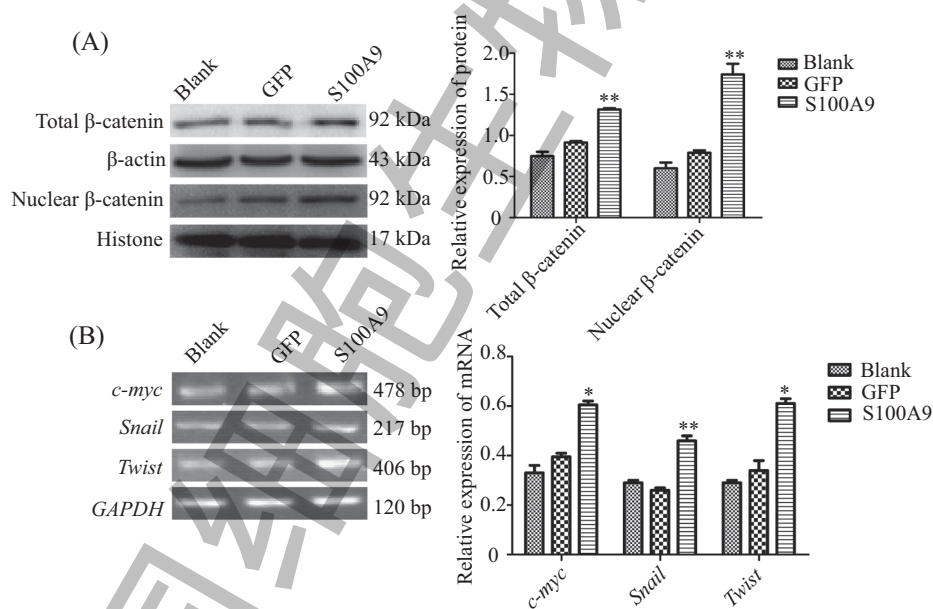


A: 光镜下观察过表达S100A9对Hela细胞形态的改变(100 \times); B: 蛋白质印迹法检测E-cadherin和Vimentin的蛋白水平。* P <0.05, ** P <0.01, 与对照组相比。

A: the effect of S100A9 over-expression on morphological of Hela cells was observed under inverted microscope (100 \times); B: the expression level of E-cadherin and Vimentin was detected by Western blot. * P <0.05, ** P <0.01 compared with control group.

图5 过表达S100A9对Hela细胞EMT的影响

Fig.5 The effect of S100A9 over-expression on EMT of Hela cells



A: 蛋白质印迹法检测空白组、对照组和过表达S100A9处理组 β -catenin蛋白质水平; B: RT-PCR检测EMT相关分子*c-myc*、*Snail*、*Twist*的mRNA水平。* P <0.05, ** P <0.01, 与对照组相比较。

A: the levels of β -catenin protein in three groups were detected by Western blot; B: the levels of *c-myc*, *Snail*, *Twist* mRNA were detected by RT-PCR. * P <0.05, ** P <0.01 compared with control group.

图6 过表达S100A9对Wnt/ β -catenin信号通路的影响

Fig.6 The effect of S100A9 over-expression on Wnt/ β -catenin signaling pathway

我们前期的研究发现, S100A9可促进肝癌HepG2细胞的增殖和侵袭^[13], 也促进结直肠癌细胞增殖和转移^[14]。本研究采用腺病毒感染的方法以内源性S100A9表达低下的宫颈癌Hela细胞为研究对象, 也发现过表达S100A9可促进Hela细胞增殖和迁移。

值得注意的是, 过表达S100A9后, Hela细胞形

状变得细长, 呈间质细胞形态, 同时, E-cad水平下调, Vim水平上调。以上提示, S100A9可促进宫颈癌细胞EMT的发生。Lee等^[15]发现, 促进EMT的发生可使宫颈癌向组织深部侵袭并发生远处转移。因此, 我们推测, S100A9促进Hela细胞迁移的机制可能涉及EMT。

有研究报道, Wnt信号通路不仅在胚胎发育调控中起至关重要的作用, 而且它与人类肿瘤的发生发展也密切相关。我们的研究也已证实, 在结直肠癌中, S100A9可激活Wnt/ β -cat信号通路, 从而发挥其促进肿瘤细胞增殖和转移的作用^[14]。在对宫颈癌的研究中, Lustig等^[16]认为, Wnt/ β -cat的高表达参与宫颈癌的病理过程, 并且在促进肿瘤细胞的增殖等方面起着重要作用; 同时, β -cat的异常表达与宫颈癌的发生也存在显著的相关性^[17]。因此, 我们猜想, Wnt/ β -cat通路可能参与S100A9促宫颈癌细胞增殖、迁移的过程。通过蛋白质印迹法检测 β -cat蛋白质水平, 结果显示, 过表达S100A9可上调总的及核内 β -cat的水平, 即促进 β -cat的堆积和入核。我们再通过RT-PCR验证该通路的下游靶基因*c-myc*、*Snail*和*Twist*的mRNA水平, 发现均明显升高。以上结果证实, S100A9可激活Wnt/ β -cat信号通路, 提示该通路的激活可能参与介导S100A9的促Hela增殖和迁移的作用。

综上所述, 本研究证实S100A9可促进宫颈癌Hela细胞的增殖、迁移和EMT, 其促进增殖和迁移的作用机制可能与其促进EMT和激活Wnt/ β -cat信号相关, 有待随后的进一步验证。本研究为阐明S100A9对宫颈癌的作用和机制积累了实验依据, 也为宫颈癌的诊断及治疗提供了潜在的新靶点和新思路。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Kodama J, Seki N, Masahiro S, Kusumoto T, Nakamura K, Hongo A, *et al*. Prognostic factors in stage IB-IIIB cervical adenocarcinoma patients treated with radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Surg Oncol* 2010; 101(5): 413-7.
- Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: Rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 1995; 25(3): 638-43.
- Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2011; 32(4): 641-6.
- Fan B, Zhang LH, Jia YN, Zhong XY, Liu YQ, Cheng XJ, *et al*. Presence of S100A9-positive inflammatory cells in cancer tissues correlates with an early stage cancer and a better prognosis in patients with gastric cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 316.
- McKiernan E, McDermott EW, Evoy D, Crown J, Duffy MJ. The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol* 2011; 32(3): 441-50.
- Arai K, Takano S, Teratani T, Ito Y, Yamada T, Nozawa R. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8(4): 243-52.
- Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, Chao AS, Chang TC, *et al*. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *Int J Cancer* 2006; 119(1): 91-8.
- Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2): 75-90.
- Qureshi R, Arora H, Rizvi MA. EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Lett* 2015; 356(2 Pt B): 321-31.
- Kirikoshi H, Katoh M. Expression and regulation of WNT10B in human cancer: Up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by beta-estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid. *Int J Mol Med* 2002; 10(4): 507-11.
- Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin—a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 2004; 53(3): 245-53.
- Wu R, Duan L, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, *et al*. S100A9 promotes the proliferation and invasion of HepG2 hepatocellular carcinoma cells via the activation of the MAPK signaling pathway. *Int J Oncol* 2013; 42(3): 1001-10.
- Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, *et al*. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One* 2013; 8(4): e62092.
- Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: Correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 2008; 14(15): 4743-50.
- Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129(4): 199-221.
- Cain JM, Ngan H, Garland S, Wright T. Control of cervical cancer: Women's options and rights. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 106(2): 141-3.