文章编号:1000-5404(2010)16-1703-05

论著

β-catenin 降低外源性 hS100A6 对骨肉瘤细胞的抑制作用

卫 佳[1],李星星[1],陈英华[1],吴丽美[1],马 闻[1],何通川[2],周 兰[2] (400016 重庆,重庆医科大学:生物医学工程系,重庆市生物医学工程学重点实验室,重庆市超声医学工程重点实验室,省部共建国家重点实验室培育基地[1],医学检验系临床生化教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 研究外源性 hS100A6 抑制骨肉瘤细胞作用与 Wnt/β-catenin 信号途径的关系。**方法** 用携带人 β-catenin 及其 siRNA 基因的重组腺病毒 Adβ-catenin 和 AdSiβ-catenin 分别上调和下调 MG63 和 U2OS 细胞中 β-catenin 水平,再用重组 hS100A6 处理这些细胞,然后通过 MTT 法检测细胞增殖能力的变化,Hochest 染色法检测细胞凋亡的变化,划痕愈合实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力的变化。**结果** ①外源性 hS100A6 抑制 2 株骨肉瘤细胞的增殖($P<0.05$);β-catenin 过表达和低表达则分别减弱和增强 hS100A6 对这 2 株细胞的增殖抑制作用($P<0.05$);②外源性 hS100A6 促进 2 株骨肉瘤细胞的凋亡($P<0.05$);β-catenin 过表达和低表达则分别增强和减弱 hS100A6 对这 2 株细胞的促凋亡作用($P<0.05$);③外源性 hS100A6 抑制骨肉瘤细胞株 MG63 的迁移($P<0.05$);β-catenin 过表达和低表达则分别减弱和增强 hS100A6 对 MG63 的迁移抑制作用($P<0.05$)。**结论** β-catenin 负性调节 hS100A6 对骨肉瘤的抑制作用;hS100A6 对骨肉瘤的抑制作用可能经由 Wnt 信号途径及其他信号途径共同调控。

【关键词】 β-catenin;S100A6;生物学作用;骨肉瘤
【中图法分类号】 R738.1;R394.3;R73-362 **【文献标志码】** A

β-catenin decreases hS100A6-induced inhibition in osteosarcoma cell lines MG63 and U2OS

Wei Jia[1], Li Xingxing[1], Chen Yinghua[1], Wu Limei[1], Ma Wen[1], He Tongchuan[2], Zhou Lan[2] ([1] State Key Laboratory of Medical Ultrasound Engineering Co-founded by Chongqing and Ministry of Science and Technology, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Chongqing, Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine of Chongqing, Faculty of Biomedical Engineering, [2]Key Laboratory of Medical Diagnostics of Chongqing and Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the inhibition of hS100A6 on osteosarcoma cell lines MG63 and U2OS and Wnt/β-catenin signaling pathway. Methods Adenoviruses carrying human β-catenin and its siRNA gene respectively were used to up-regulate and down-regulate the expression of β-catenin in MG63 and U2OS cells. Then MTT assay, Hoechst staining, scratching test and Transwell assay were used to detect cells proliferation, apoptosis and migration, respectively after the treatment of hS100A6. Results Adβ-catenin and AdSiβ-catenin up- and down-regulated β-catenin expression in MG63 and U2OS ($P<0.05$), respectively. Exogenous hS100A6 inhibited the proliferation of wild osteosarcoma cell lines MG63 and U2OS ($P<0.05$), while over- or low-expression of β-catenin reduced or enhanced the inhibitive effect of S100A6 on cell proliferation respectively ($P<0.05$). Exogenous hS100A6 promoted the apoptosis of 2 wild cell lines ($P<0.05$), but over- or low-expression of β-catenin enhanced or reduced the ability of hS100A6 respectively ($P<0.05$). Exogenous hS100A6 inhibited the migration of MG63 cells, however, over- or low-expression of β-catenin reduced or enhanced the ability of hS100A6 to inhibit migration ($P<0.05$). Conclusion The inhibitory role of hS100A6 on osteosarcoma cells is regulated negatively by β-catenin. This inhibitory role may be controlled by Wnt/β-catenin and other signaling pathways.

【Key words】 β-catenin;S100A6;biological role;osteosarcoma

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772548). Corresponding author: Zhou Lan, Tel: 86-23-68485023, E-mail: zhoulan0111@gmail.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30772548)
【通信作者】 周 兰,电话:(023)68485023,E-mail:zhoulan0111@gmail.com

S100蛋白家族是一组具有EF手型的钙依赖调节蛋白,具有多种生理功能,参与细胞的增殖和分化、钙稳态、蛋白质磷酸化、酶活性和转录因子的调节,甚至与肿瘤的生长和预后等有着较密切的关系[1]。S100A6是S100蛋白家族的成员,在黑色素瘤、骨肉瘤、结肠癌中呈高表达,并且其高表达与Wnt/β-catenin信号途径的活性升高常同时存在[2],提示S100A6参与骨肉瘤的发生和发展。我们的前期研究也证实,外源性hS100A6对人骨肉瘤细胞具有抑制性作用[3]。我们的研究同时还发现:外源性hS100A6可增加人骨肉瘤细胞株中β-catenin的表达和上调Wnt/β-catenin信号途径活性[3,4];而Wnt/β-catenin信号途径的活性增强是促进肿瘤发生、发展的机制之一[5]。S100A6对骨肉瘤细胞作用的这个矛盾现象既抑制其增殖和迁移、促进凋亡,又上调其Wnt/β-catenin信号途径活性,目前尚难以解释。

本研究拟通过重组腺病毒技术和RNA干扰技术人为地上调和下调细胞中β-catenin的表达后,观察外源性hS100A6对骨肉瘤细胞作用的变化,为阐明β-catenin与外源性hS100A6对骨肉瘤细胞抑制性作用之间的关系以及S100A6复杂的生物学作用及机制积累实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM、MEM培养基(美国HyClone公司),胎牛血清(MD genics Inc),MTT、台盼蓝、纤维连接素(美国Sigma公司),细胞凋亡与坏死检测试剂盒(江苏碧云天生物技术公司),Transwell小室(美国Corning Costar公司)。

1.2 细胞株和腺病毒

人骨肉瘤细胞株MG63和U2OS购自中国科学院上海细胞库。重组腺病毒Adβ-catenin(以绿色荧光蛋白GFP为报告基因)和AdSiβ-catenin(以红色荧光蛋白RFP为报告基因)及其各自的对照腺病毒AdGFP和AdRFP[6]均由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤学实验室惠赠并自行扩增。

1.3 实验分组

MG63细胞实验分6组:①BLK(空白对照)组;②AdGFP + GST-MG63组;③AdRFP + GST-MG63组;④GST-hS100A6-MG63组;⑤Adβ-catenin + GST-hS100A6-MG63组;⑥AdSiβ-catenin + GST-hS100A6-MG63组。

U2OS细胞实验分6组:①BLK组;②AdGFP + GST-U2OS组;③AdRFP + GST-U2OS组;④GST-hS100A6-U2OS组;⑤Adβ-catenin + GST-hS100A6-U2OS组;⑥AdSiβ-catenin + GST-hS100A6-U2OS组。

1.4 重组融合蛋白GST-hS100A6和GST制备及腺病毒干预细胞有效性鉴定

方法参见文献[7]。将构建成功的质粒pGST-moluc-hS100A6及对照质粒pGST-moluc,转化大肠杆菌BL21,IPTG诱导重组菌表达蛋白,Glutathion-Sepharose 4B球珠分离纯化;将携带有相关基因的腺病毒转染骨肉瘤细胞,提取细胞总蛋白;SDS-PAGE及Western blot鉴定产物。

1.5 MTT法检测细胞增殖

用0.25%胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,每孔适量的相同数量的细胞接种于96孔板中,每孔200 μl完全培养基。24 h内进行实验干预,每组设3个复孔,干预蛋白的终浓度均为100 μg/ml,此时记为0 d;于37 ℃、5% CO_2的饱和湿度箱中继续培养和观察,分别于24、48、72和96 h取出一个培养有6个组实验细胞的96孔板,加入180 μl完全培养基和20 μl MTT溶液,37 ℃继续培养4 h,离心后小心吸弃上清。再加入200 μl DMSO,振荡10 min,使紫色结晶体充分溶解。选择490 nm,在酶标仪测定各孔光密度值D(490)。实验重复3次。计算各组光密度的平均值。

1.6 Hoechst染色检测细胞凋亡

细胞消化后,制成单细胞悬液,以每孔0.5×10^4接种于96孔板中,每孔200 μl完全培养基。24 h内进行实验干预,实验分组同前。每组设3个复孔,GST和GST-hS100A6融合蛋白的终浓度均为100 μg/ml,此时记为0 d;于37 ℃、5% CO_2的饱和湿度箱中继续培养和观察,分别于24、48和72 h取出一个96孔板,吸弃培养基,用PBS洗细胞1次,每孔中加入等量的事先准备好的Hoechst染液(按试剂盒说明书制备),4 ℃孵育30 min,PBS洗涤3次,荧光显微镜下观察。每孔选择3个视野,每视野计数300个细胞,计算凋亡率,实验重复3次,以每组的平均值为其凋亡率。

1.7 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力

接种适量细胞于48孔板中,每孔加入1 ml完全培养基。待24 h细胞贴壁,融合度达到80% ~90%时,选择孔内融合度相当处,用10 μl的tip头进行划痕,更换完全培养基,并进行实验干预,实验分组同前,此时记为0 d,倒置显微镜下观察照相,标记上照相点。37 ℃、5% CO_2的饱和湿度箱中继续培养和观察,分别于24、36、48 h取出孔板,在同一观察点处观察划痕愈合情况。比较各组细胞的愈合情况,通过测量多个点划痕宽度,计算平均划痕愈合率。

划痕愈合率 = (0 h划痕宽度 - 24 h/48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%

1.8 Transwell检测细胞的迁移能力

将生长良好的细胞用0.25%胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,以5×10^4接种于48孔板,24 h内进行实验干预,实验分组同前。用不含血清的培养液再培养细胞24 h后,消化各孔细胞并计数,每孔接种2.0×10^4细胞在每个Transwell小室的上腔中,下腔中加入700 μl含20 μg/ml FN的完全培养液,小室

上腔中继续加入相应的蛋白。36 h 后取出小室,PBS 淋洗,用棉签小心擦去微孔膜上层的细胞,95% 酒精固定,HE 染色。随机选择 5 个 200 倍显微视野,于倒置显微镜下计数转移至微孔膜下层的细胞,实验重复 3 次,取其平均值进行统计分析。

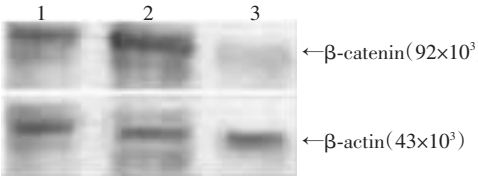
1.9 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件,多组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 2 种重组腺病毒有效干预细胞中 β-catenin 的表达

感染 Adβ-catenin 和 AdSiβ-catenin 48 h 后的 MG63 细胞中 β-catenin 表达的灰度值分别为 1.27 ± 0.23、0.26 ± 0.21,而空白组为 0.69 ± 0.19。感染 Adβ-catenin 和 AdSiβ-catenin 后,β-catenin 水平分别较空白组增加 85%($P < 0.05$)和降低 63%($P < 0.05$,图 1)。提示重组腺病毒 Adβ-catenin 和 AdSiβ-catenin 能够携带相应基因进入细胞成功表达,并有效干预目的基因的表达。



1:BLK 组 2:Adβ-catenin + MG63 组 3:AdSiβ-catenin + MG63 组

图 1 Western blot 检测重组腺病毒感染后 MG63 细胞中 β-catenin 的表达

2.2 β-catenin 的过表达和低表达分别减弱和增强 hS100A6 对这 2 株细胞的增殖抑制作用

2.2.1 hS100A6 抑制 MG63 和 U2OS 细胞的增殖　AdGFP + GST、AdRFP + GST 组与相应空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);GST-hS100A6 组 48 h 后均出现细胞增殖的抑制($P < 0.05$),见表 1、2。

表 1 β-catenin 对 hS100A6 抑制 MG63 细胞增殖作用的影响 [D(490), $\bar{x} \pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
BLK 组	0.56 ± 0.09	0.95 ± 0.04	1.28 ± 0.10	3.45 ± 0.05
AdGFP + GST 组	0.54 ± 0.06	0.91 ± 0.04[a]	1.27 ± 0.05[a]	3.47 ± 0.20[a]
AdRFP + GST 组	0.58 ± 0.02	0.99 ± 0.05[a]	1.12 ± 0.07[a]	3.41 ± 0.20[a]
GST-hS100A6 组	0.55 ± 0.04	0.73 ± 0.04	1.08 ± 0.06	3.04 ± 0.17
Adβ-catenin + GST-hS100A6 组	0.64 ± 0.12	1.24 ± 0.18[a]	1.62 ± 0.06[a]	4.56 ± 0.26[a]
AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 组	0.44 ± 0.03	0.62 ± 0.03[a]	0.84 ± 0.09[a]	1.43 ± 0.01[a]

a:$P < 0.05$,与 GST-hS100A6 组比较

2.2.2 β-catenin 过表达减弱 hS100A6 抑制骨肉瘤细胞增殖的作用　2 株细胞的 Adβ-catenin + GST-hS100A6 实验组与 GST-hS100A6 组比,D(490)值均增高。其中,MG63 细胞实验组的 D(490)值在 48、72 和 96 h 时分别较 GST-hS100A6 组增加 69.86%、50% 和 50.15%($P < 0.05$);U2OS 细胞实验组的 D(490)值分别较 GST-hS100A6 组增加 66.67%、60.53% 和 61.04%($P < 0.05$,表 1、2)。提示 β-catenin 能够减弱 hS100A6 对骨肉瘤细胞的增殖抑制作用。

表 2 β-catenin 对 hS100A6 抑制 U2OS 细胞增殖作用的影响 [D(490), $\bar{x} \pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
BLK 组	0.26 ± 0.04	0.64 ± 0.03	0.94 ± 0.05	1.67 ± 0.09
AdGFP + GST 组	0.24 ± 0.06	0.63 ± 0.05[a]	0.89 ± 0.05[a]	1.66 ± 0.07[a]
AdRFP + GST 组	0.24 ± 0.01	0.65 ± 0.10[a]	0.91 ± 0.03[a]	1.71 ± 0.03[a]
GST-hS100A6 组	0.25 ± 0.09	0.48 ± 0.01	0.76 ± 0.05	1.54 ± 0.03
Adβ-catenin + GST-hS100A6 组	0.30 ± 0.04	0.80 ± 0.04[a]	1.22 ± 0.13[a]	2.48 ± 0.04[a]
AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 组	0.24 ± 0.02	0.45 ± 0.01[a]	0.58 ± 0.01[a]	1.25 ± 0.07[a]

a:$P < 0.05$,与 GST-hS100A6 组比较

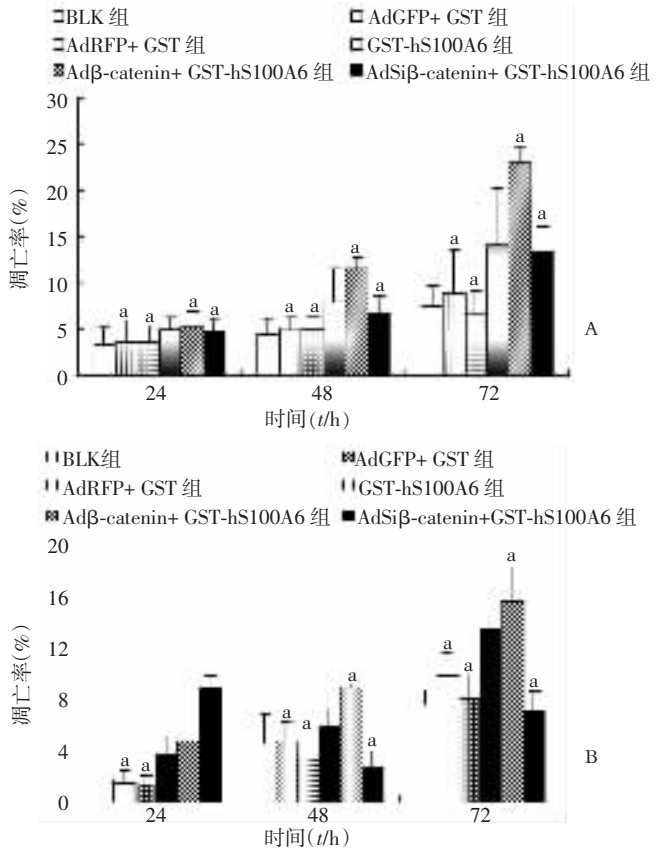
2.2.3 β-catenin 低表达促进 hS100A6 抑制骨肉瘤细胞增殖的作用　从 48 h 起,AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 实验组的增殖抑制作用较 GST-hS100A6 组更为明显。其中,MG63 细胞实验组的 D(490)值在 48、72 h 和 96 h 较 GST-hS100A6 组分别降低 15.07%、22.23% 和 52.97%($P < 0.05$);U2OS 细胞实验组的 D(490)值较 GST-hS100A6 组分别降低 6.25%、18.84% 和 24.69%($P < 0.05$,表 1、2)。进一步证实 hS100A6 抑制骨肉瘤细胞增殖,而 β-catenin 则减弱 hS100A6 的该抑制性作用。

2.3 β-catenin 的过表达和低表达分别增强和减弱 hS100A6 对这 2 株细胞的促凋亡作用

2.3.1 hS100A6 促进 MG63 和 U2OS 细胞的凋亡　24、48 和 72 h 时,AdGFP + GST、AdRFP + GST 组与空白对照组比差异无统计学意义($P > 0.05$);GST-hS100A6 组均出现细胞凋亡率的增加($P < 0.05$),见图 2。

2.3.2 β-catenin 过表达增强 hS100A6 促进骨肉瘤细胞凋亡的作用　Adβ-catenin + GST-hS100A6 实验组与 GST-hS100A6 组比较,细胞凋亡率增加。其中,MG63 实验组的细胞凋亡率在 24、48 h 和 72 h 时分别较 GST-hS100A6 组增加 30.25%、48.83% 和 10.81%($P < 0.05$);U2OS 实验组的细胞凋亡率分别较 GST-hS100A6 组增加 9.21%、46.51% 和 62.23%($P < 0.05$,图 2)。

2.3.3 β-catenin 低表达减弱 hS100A6 促进骨肉瘤细胞凋亡的作用　AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 实验组的细胞凋亡率较 GST-hS100A6 组降低。MG63 实验组的细胞凋亡率在 24、48 和 72 h 时较 GST-hS100A6 组分别下降 30.25%、48.83% 和 10.81%($P < 0.05$);U2OS 实验组的细胞凋亡率在 48、72 h 则分别较 GST-hS100A6 组降低 23.95% 和 11.84%($P < 0.05$,图 2)。提示 hS100A6 促进细胞凋亡的作用至少在一定程度上依赖 β-catenin 的存在。



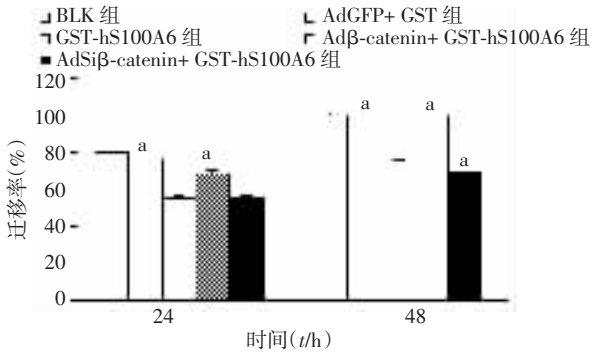
A:MG63 细胞;B:U2OS 细胞

a:$P<0.05$,与 GST-hS100A6 组比较

图2　β-catenin 对 hS100A6 促进 MG63 和 U2OS 细胞凋亡的影响

2.4　β-catenin 的过表达和低表达分别减弱和增强 hS100A6 MG63 的迁移抑制作用

2.4.1　MG63 细胞　Transwell 实验发现,AdGFP + GST 对照组与 BLK 组穿膜细胞数比较差异无统计学意义($P>0.05$),分别为 74.00 ± 4.18、74.60 ± 3.65;GST-hS100A6 组穿过膜的细胞数较 AdGFP + GST 对照组减少 41%($P<0.05$),为 44.00 ± 5.29;β-catenin 过表达 48 h,Adβ-catenin + GST-hS100A6 实验组穿过膜的细胞数为 59.60 ± 2.20,较 GST-hS100A6 组增加 35.45%($P<0.05$);β-catenin 低表达48 h 时,AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 实验组穿过膜的细胞数为 33.00 ± 3.74,较 GST-hS100A6 组减少 25%($P<0.05$)。划痕愈合实验所得结果与 Transwell 实验结果完全一致(图 3)。AdGFP + GST、AdRFP + GST 对照组与 BLK 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);GST-hS100A6 组在 24 h 和 48 h 的划痕愈合率分别降低了 31.03% 和 26.25%($P<0.05$);β-catenin 过表达后,Adβ-catenin + GST-hS100A6 实验组在 24 h 和 48 h 的划痕愈合率较 GST-hS100A6 组比分别增加 24.16% 和 26.25%($P<0.05$);β-catenin 低表达后,24 h 时 GST-hS100A6 组和 AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 组均具有抑制细胞迁移的作用,2 组差异无统计学意义($P>0.05$);48 h 时 AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 实验组愈合率则较 GST-hS100A6 组降低 5.88%($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与 GST-hS100A6 组比较

图3　划痕愈合实验检测 β-catenin 对 S100A6 抑制 MG63 细胞迁移的影响

2.4.2　U2OS 细胞　划痕愈合实验显示:直到 72 h,空白对照组与 AdGFP + GST 对照组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);GST-hS100A6 组细胞的划痕愈合率较 AdGFP + GST 对照组降低 1.05%($P>0.05$);β-catenin 过表达后,Adβ-catenin + GST-hS100A6 实验组细胞的划痕愈合率较 GST-hS100A6 实验组增加 2.44%($P>0.05$);β-catenin 低表达后,AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 实验组较 GST-hS100A6 实验组减少 1.58%($P>0.05$,图 4)。

3　讨论

S100A6 系 S100 家族的一员,其基因定位于染色体 1q21-22 上,而此位点的异常(如基因的扩增或重排)频发于骨肉瘤患者[8]。研究也发现:S100A6 在骨肉瘤



A:BLK 组;B:AdGFP + GST 组;C:GST-hS100A6 组;D:Adβ-catenin + GST-hS100A6 组;E:AdSiβ-catenin + GST-hS100A6 组

图4　划痕愈合实验检测 72 h 时 β-catenin 对 hS100A6 抑制 U2OS 细胞迁移的影响　(倒置显微镜 ×100)

细胞中高表达,且抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移,并促进细胞的凋亡,表现出对骨肉瘤的抑制性作用[4]。但其具体作用机制和作用途径仍未阐明。

Wnt/β-catenin 信号途径是涉及肿瘤发生、发展的主要途径之一。β-catenin 是该途径的中心分子,其表达增加常常导致该途径的异常活化。在骨肉瘤中也存在 β-catenin 的增加和该途径的异常活化[9]。我们的研究发现:hS100A6 增加人骨肉瘤细胞株中 β-catenin 的表达和上调 Wnt/β-catenin 信号途径活性。众所周知,β-catenin 的增多、Wnt/β-catenin 信号活性的上调是促进细胞增殖的。那么,S100A6 对骨肉瘤细胞的抑制性作用和对其 Wnt/β-catenin 信号的上调作用之间是什么关系呢?

本实验通过重组腺病毒技术和 RNA 干扰技术分别使 β-catenin 过表达和低表达,在此基础上研究 hS100A6 对骨肉瘤细胞生物学作用的变化。结果提示:①β-catenin 能减弱 hS100A6 对骨肉瘤细胞增殖和迁移的抑制作用。β-catenin 的该作用应该是经由 Wnt/β-catenin 信号途径的激活而实现的。因为该信号途径的激活将导致下游靶基因的转录和表达,后者是促进增殖和迁移的[10]。因此,我们认为,S100A6 一方面通过其他信号途径实现其骨肉瘤细胞增殖和迁移的抑制作用,同时又激活其 Wnt/β-catenin 信号途径促进增殖和迁移,从而在一定程度上拮抗其抑制性作用,这可能是 S100A6 分子自身的一种平衡调节机制。当外源性 hS100A6 作用时,在骨肉瘤细胞水平呈现的总效应是抑制性的。本实验观察到 72 h,未能够观察到 hS100A6、β-catenin 的过表达和低表达对骨肉瘤 U2OS 细胞迁移的明显作用。我们认为这与该细胞株生长缓慢和呈集落样生长,故而迁移能力低相关。拟延长观察时间后再做探讨。②β-catenin 增强 hS100A6 对骨肉瘤细胞的促凋亡作用。尽管已知 Wnt/β-catenin 信号途径的激活会增加抗凋亡因子 survivin 的表达,抑制凋亡[11],但是,也有报道指出在结肠癌,由 APC 导致的 Wnt/β-catenin 信号途径的高度活化可以促进细胞的凋亡[12,13];再结合 hS100A6 能够增加骨肉瘤细胞的 Wnt/β-catenin 信号活性和促进骨肉瘤细胞凋亡[14],我们认为 Wnt/β-catenin 信号途径可能参与介导 hS100A6 的促骨肉瘤细胞凋亡作用。

通过本研究我们推测:hS100A6 可通过 Wnt/β-catenin 信号途径及其以外的其他途径介导其对细胞的抑制性作用;而这些信号途径之间关系复杂,既相互协调,又相互制约,从而实现机体或者某个分子(hS100A6)对细胞行为的精细调控。这有待进一步验证。

参考文献:

[1] Salama I, Malone P S, Mihaimeed F, *et al*. A review of the S100 proteins in cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34(4):357-364.

[2] Lesniak W, Slomnicki L P, Filipek A. S100A6—new facts and features[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(4):1087-1092.

[3] Luu H H, Zhou L, Haydon R C, *et al*. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma [J]. Cancer Lett, 2005, 229(1):135-148.

[4] 陈英华, 卫佳, 李星星, 等. 外源性 S100A6 对人骨肉瘤细胞株 U2OS 的增殖、凋亡及 β-catenin 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7):817-821.

[5] Sakanaka C, Sun T Q, Williams L T. New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway[J]. Recent Prog Horm Res, 2000, 55:225-236.

[6] 赖天霞, 苗静琨, 何焕玲, 等. 钙结合蛋白 S100A6 对 Wnt/b-catenin 信号途径的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30 (1):12-15.

[7] 苗静琨 , 赖天霞, 左国伟, 等. 人 S100A6-GST 融合蛋白的原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10):1009-1012.

[8] Kansara M, Thomas D M. Molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(1):1-18.

[9] Leow P C, Tian Q, Ong Z Y, *et al*. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells[J]. Invest New Drugs, 2009 Sep 3. [Epub ahead of print].

[10] Zhang Y, Li X M, Zhang F K, *et al*. Activation of canonical Wnt signaling pathway promotes proliferation and self-renewal of rat hepatic oval cell line WB-F344 *in vitro*[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(43):6673-6680.

[11] Holsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, *et al*. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling[J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(5):631-639.

[12] Joo J H, Yoon S Y, Kim J H, *et al*. S100A6 (calcyclin) enhances the sensitivity to apoptosis via the upregulation of caspase-3 activity in Hep3B cells [J]. J Cell Biochem, 2008, 103(4):1183-1197.

[13] Bordonaro M, Lazarova D L, Sartorelli A C. Hyperinduction of Wnt activity: a new paradigm for the treatment of colorectal cancer? [J]. Oncol Res, 2008, 17(1):1-9.

[14] Guo Q, Wu M, Lian P, *et al*. Synergistic effect of indomethacin and NGX6 on proliferation and invasion by human colorectal cancer cells through modulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 330(1/2):71-81.

(收稿:2009-12-25 修回:2010-04-01)

(编辑 汪勤俭)