

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.006

阿霉素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制口腔鳞癌干细胞迁移和侵袭*

谭力芯 叶艳艳 熊宇 税桦桦 黄文静 丁大莲 曾宁碧 王迪[△]

(陆军军医大学第一附属医院口腔科 重庆 400038)

摘要 目的:探讨阿霉素对口腔鳞癌干细胞迁移、侵袭、凋亡的影响及其可能的机制。**方法:**体外培养人口腔鳞癌细胞系 SCC25, 通过流式细胞术分选 CD44⁻ 和 CD44⁺ 细胞, RT-PCR 检测 CD44⁻ 和 CD44⁺ 细胞的 Oct4、CD133、CD44 和 GAPDH 的 mRNA 表达; 检测和比较 CD44⁻ 和 CD44⁺ 细胞的克隆形成能力。CD44⁺ 细胞用阿霉素或 β -catenin 抑制剂 LF3 进行处理, 分别使用 Transwell 和细胞划痕检测细胞侵袭和迁移能力, 一步法 TUNEL 检测细胞凋亡水平, WB 检测 β -catenin 和 TCF-4 的蛋白表达。**结果:**流式细胞术成功分离 CD44⁻ 和 CD44⁺ 细胞, RT-PCR 检测 CD44⁺ 细胞高表达 Oct4、CD133 和 CD44 mRNA, CD44⁻ 细胞弱表达 Oct4 mRNA, 不表达 CD133 和 CD44 mRNA; CD44⁺ 细胞的克隆形成能力显示显著强于 CD44⁻ 细胞 ($P < 0.05$)。阿霉素显著降低了 CD44⁺ 细胞的侵袭能力和迁移能力 ($P < 0.05$), 显著提高了 CD44⁺ 细胞的凋亡率 ($P < 0.05$); 阿霉素显著降低了 CD44⁺ 细胞 β -catenin 和 TCF-4 的蛋白表达 ($P < 0.05$), LF3 对 β -catenin 和 TCF-4 蛋白表达的影响与阿霉素比较无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论:**阿霉素可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路降低口腔鳞癌干细胞迁移、侵袭能力, 促进细胞凋亡。

关键词: 口腔鳞癌干细胞; 阿霉素; Wnt/ β -catenin 信号通路; 迁移; 侵袭

中图分类号: R-33; R739.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)03-429-07

Inhibitory Effects of Adriamycin on the Migration and Invasion of Oral Squamous Carcinoma Stem Cells via Wnt/ β -catenin Signaling Pathway*

TAN Li-xin, YE Yan-yan, XIONG Yu, SHUI Hua-hua, HUANG Wen-jing, DING Da-lian, ZENG Ning-bi, WANG Di[△]

(Department of stomatology, First Affiliated Hospital of Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of adriamycin on the migration, invasion and apoptosis of oral squamous cell carcinoma stem cells and its related signal pathways. **Methods:** Human oral squamous cell carcinoma cell line SCC25 was cultured in vitro. CD44⁻ and CD44⁺ cells were sorted and compared by flow cytometry. RT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of Oct4, CD133, CD44, and GAPDH in CD44⁻ and CD44⁺ cells. CD44⁻ and CD44⁺ cells were tested for their ability to form clones. CD44⁺ cells were treated with adriamycin or inhibitor LF3, and Transwell and cell scratches were used to detect cell invasion and migration ability. One-step TUNEL was used to detect apoptosis. WB was used to detect β -catenin and TCF-4 protein expression levels. **Results:** CD44⁻ and CD44⁺ cells successfully isolated by flow cytometry. RT-PCR detected that CD44⁺ cells strongly expressed Oct4, CD133 and CD44 mRNA. CD44⁻ cells weakly expressed Oct4 mRNA, and did not express CD133 and CD44 mRNA. The results of clonal formation analysis showed that CD44⁺ cells were significantly stronger than CD44⁻ cells ($P < 0.05$). Adriamycin significantly reduced CD44⁺ cell invasion capacity ($P < 0.05$). Adriamycin significantly reduced CD44⁺ cell migration capacity ($P < 0.05$). Adriamycin significantly increased CD44⁺ cell apoptosis levels ($P < 0.05$). Adriamycin significantly reduced β -catenin and TCF-4 protein expression in CD44⁺ cells ($P < 0.05$), and the expression of β -catenin and TCF-4 protein by LF3 culture was not significantly different with adriamycin ($P > 0.05$). **Conclusion:** Adriamycin reduces the migration and invasion ability of oral squamous cell carcinoma stem cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and promotes apoptosis.

Key words: Oral squamous cell carcinoma stem cells; Doxorubicin; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Migration; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-429-07

前言

口腔癌在全球癌症发病率排名中居第八位^[1], 每年因此死亡人数约 8000 人^[2-4], 尽管医学界进行大量研究, 其发病及死亡

率依然很高^[6,7]。相关研究表明癌细胞在功能上存在异质性, 每个肿瘤都包含一小部分具有自我更新能力的细胞亚群, 即癌症干细胞(CSC, Cancer Stem Cell)^[8,9]。CSC 的概念是 Reya 在 2001 年提出的, 由于其特性, CSC 对药物具有天然抗药性, 因此导致

* 基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目(HG2015-002); 院级军科基金项目(SWH2016JSTSYB-40N)

作者简介: 谭力芯(1989-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 口腔颌面外科

[△] 通讯作者: 王迪(1987-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 口腔医学, 电话: 023-68754439, E-mail: 736460853@qq.com

(收稿日期: 2020-05-27 接受日期: 2020-06-23)

化疗后肿瘤的复发和转移^[10]。相关研究人员通过基于 CSC 特性的独特方法成功地从实体肿瘤中分离了 CSC^[8,9,11],如根据 CSC 特异性细胞表面标记(例如 CD44 或 CD133),通过流式细胞术可以分离 CSC^[12,13]。

作为一种广谱抗癌药物,阿霉素可通过干扰转录过程来诱导肿瘤细胞凋亡,但包括阿霉素在内的大多数传统化学治疗剂主要在增殖期杀死细胞,尽管其可减少肿瘤体积或可导致完全缓解,但不能根除 CSC^[14,15]。如果机体的免疫力不足,残余的小部分 CSC 很可能通过迁移、侵袭导致肿瘤复发。包括阿霉素在内的传统化学治疗剂是否对肿瘤细胞的迁移和侵袭有影响是近年来化疗药物研发的热点。在本研究中,我们探讨了阿霉素对口腔鳞癌干细胞迁移和侵袭及与之相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,旨在更好地了解阿霉素抑制口腔鳞癌干细胞的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人口腔鳞癌细胞系 SCC25 (ATCC);LF3(SELLECK);RT Master Mix 试剂盒(TAKARA);DMEM 培养基、胎牛血清(FBS, Fatal Bovine Serum)、2.5%胰酶+0.02% EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)、磷酸盐缓冲液 (PBS, Phosphate Buffer Solution)(Gibco);TRIzol (Invitrogen);CD44 MicroBeads(moltenyi);CD44、Oct4、CD133、 β -catenin、TCF-4、 β -actin 抗体 (abcam);Transwell 板(Corning);0.22 μ m 针孔过滤器(Millipore)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SCC25 细胞按 2×10^4 细胞 /mL 接种于培养皿中,使用 DMEM+10% FBS 培养基在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养,当细胞汇合度在 90%左右时传代。细胞经 PBS 清洗一遍后,加入适量 2.5%胰酶+0.02% EDTA,37℃ 培养箱中消化细胞 2~3 min,加入培养基中止并小心吹散,按 1:3 传代培养。阿霉素和 LF3 药物处理细胞依照说明书浓度(40-60 μ mol/L)处理细胞 24 h 后换成完全培养基用于后续实验。

1.2.2 流式细胞术分选 将生长良好的细胞使用 2.5%胰酶+0.02% EDTA 消化为单细胞,以 $300 \times g$ 离心细胞悬液 10 min,弃上清,每 10^7 个细胞使用 80 μ L PBS 重悬细胞沉淀。加入 20 μ L CD44 MicroBeads 充分混合,然后在 4℃ 避光孵育 15 min。加入 2 mL PBS 洗涤细胞,并以 $300 \times g$ 离心 10 min,弃上清,加入 500 μ L PBS 重悬细胞沉淀,上机分选。按照操作说明将色谱柱放在合适的 MACS 分离器的磁场中并相应收集细胞。

1.2.3 细胞克隆形成能力分析 分别将生长良好的 CD44⁺ 或 CD44⁻ 细胞按 500 个细胞接种在 60 mm 培养皿中,使用 DMEM+10% FBS 培养基在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 7~14 d,每天观察细胞克隆大小,当在培养皿中观察到细胞克隆可肉眼观察到时,弃培养基,PBS 清洗 2 遍,使用 4%多聚甲醛固定细胞 10 min,PBS 清洗 2 遍后加入 0.2%结晶紫染色 5 min,用水清洗 3 遍后拍照计数。每组设 3 个重复。计数方法为将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆,或在显微镜(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数。最后计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。

1.2.4 总 RNA 提取和 RT-PCR 分别将生长良好的 CD44⁺ 或

CD44⁻ 细胞用 TRIzol 裂解处理,静置 5 min 后加入 200 μ L 氯仿,4℃ 条件下 12000 rpm 离心 10 min,收集上清加入等体积的异丙醇,室温静置 10 min 后在 4℃ 条件下 12000 rpm 离心 15 min,加入新制备的 75% DEPC 酒精清洗 2 遍,加入适量 DEPC 水溶解,并通过 NanoDrop 分光光度计检测浓度。使用 Primer 6.0 软件设计引物,并通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成,Oct4、CD133、CD44 和 GAPDH 引物序列见表 1。Oct4、CD133、CD44 和 GAPDH 使用来自 RT Master Mix 试剂盒的随机引物从总 RNA 合成 cDNA。使用 PCR Master Mix,根据制造商的方案 RT-PCR。

表 1 Oct4、CD133、CD44 和 GAPDH 的检测引物序列

Table 1 The PCR primer sequences for Oct4, CD133, CD44 and GAPDH

Name	Sequences
Oct4 F	5'-ATGTGGTCCGAGTGTGGTTC-3'
Oct4 R	5'-GAGACAGGGGAAAGGCTTC-3'
CD133 F	5'-AACAGTTTGCCCCAGGAAA-3'
CD133 R	5'-GGTTTGCACGATGCCACTTT-3'
CD44 F	5'-CACACCCTCCCTCATTAC-3'
CD44 R	5'-TGGATGGCTGGTATGAGCTG-3'
GAPDH F	5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3'
GAPDH R	5'-GGTAACCAGGCGTCCGATAC-3'

1.2.5 细胞侵袭能力分析 将 Matrigel 加入到无血清 DMEM 培养基中混匀制成 20%浓度的混合液,在 Transwell 上室中加入 100 μ L 混合液,于 37℃ 培养箱中孵育 5 h。将分离的 CD44⁺ 消化为单细胞并用无血清培养基清洗 3 遍,加入含 Matrigel 的培养基制成细胞悬液,上室每孔加入 100 μ L,下室加入 500 μ L 含 0.4 μ M 阿霉素或不含阿霉素的 20% FBS 的 DMEM 培养基。37℃ 培养 24 h 后,取出上室清洗 2 遍,固定后,加入 0.2%结晶紫染色 5 min,用水清洗 3 遍后拍照计数。

1.2.6 细胞迁移能力分析 取生长良好的 2×10^4 细胞 /mL 的 CD44⁺ 细胞接种到 6 孔板中,加入 DMEM+10% FBS 培养基在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养,当细胞汇合后,用 10 μ L 枪头垂直于皿底划直线。用 PBS 清洗细胞 3 次,加入含 0.4 μ M 阿霉素或不含阿霉素的无血清 DMEM 培养基。于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。按 24 h 取样,拍照。

1.2.7 一步法 TUNEL 检测 不同处理的细胞经 PBS 清洗 1 次,加入适量的 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次后加入适量的 0.1% Triton X-100 通透 2 min,PBS 清洗 3 次后在样品上加入 50 μ L TUNEL 检测液,室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次后在样品上加入适量抗荧光淬灭剂并封片,在荧光显微镜下观察拍照。

1.2.8 Western blotting 培养的细胞加入适量细胞裂解液,使用细胞刮刀收集细胞裂解悬液,4℃ 过夜裂解,13000 转离心提取总蛋白质,并通过 BCA 蛋白质测定蛋白浓度。通过 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,然后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF, Polyvinylidene Fluoride)膜。用 5%脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 在 Tris 缓冲盐水中封闭膜,并

分别使用 Oct4、CD 133 和 CD 44 一抗在 4℃ 下轻轻摇动过夜。一抗反应结束后用 HRP 标记的二抗进行孵育。使用 ECL 试剂处理曝光检测蛋白。

1.2.9 免疫共沉淀 取 50 μ L protein A/G 免疫磁珠加入 1.5 mL 离心管, 置于磁力架上, 待磁珠贴壁后吸去上清。用 200 μ L PBST (PBS+Tween-20) 稀释 10 μ g 的 β -catenin 抗体装入带有免疫磁珠的离心管中, 室温孵育 10 min 后, 置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。再用 200 μ L PBST 洗涤磁珠 3 次。然后加入 1 000 μ L 的含有细胞裂解液的细胞悬液, 用移液器吹打混匀。37℃ 孵育 15 min 使抗原和结合有抗体的免疫磁珠结合后置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。用 200 μ L PBS 洗涤免疫磁珠-抗体-抗原复合物 3 次。洗涤完后用 100 μ L PBS 重悬磁珠, 进行后续的免疫印迹验证与 β -catenin 结合的 TCF-4 的表达量。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件统计处理数据, 数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔鳞癌干细胞的分离及鉴定

通过流式细胞术将口腔鳞癌细胞系 SCC25 通过 CD44 免疫磁珠为标准进行分选, 结果显示 CD44⁺ 细胞占总细胞量的 1.5%, 经分选后 CD44⁺ 的细胞纯度为 99.6%, CD44⁺ 的细胞纯度为 95.6%(图 1)。RT-PCR 及凝胶电泳结果显示, CD44⁺ 细胞高表达 Oct4、CD133 和 CD44; CD44⁻ 细胞低表达 Oct4, 不表达 CD133 和 CD44(图 2)。我们进一步通过 Western Blotting 方法检测了 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞的 Oct4、CD133 和 CD44 蛋白表达(图 3), 趋势与 PCR 结果一致。

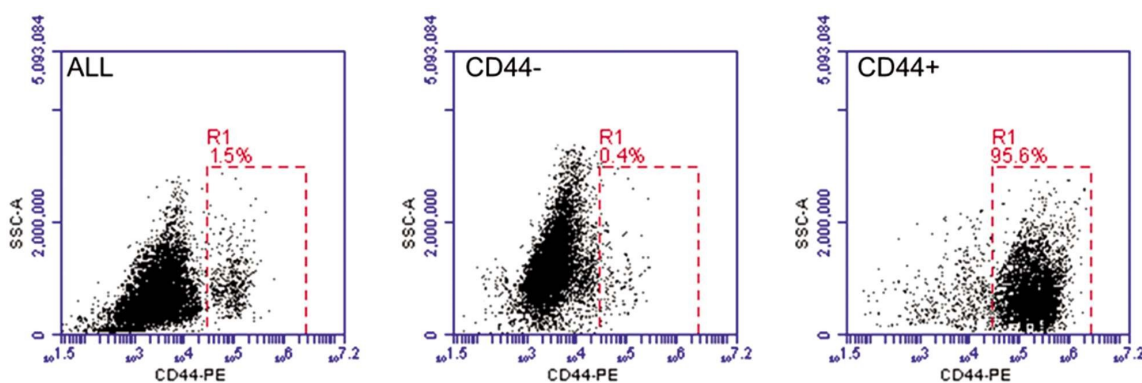


图 1 流式细胞术分选 SCC25 细胞系中的 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞群

Fig.1 CD44⁺ and CD44⁻ cell groups in SCC25 cell line separated by flow cytometry

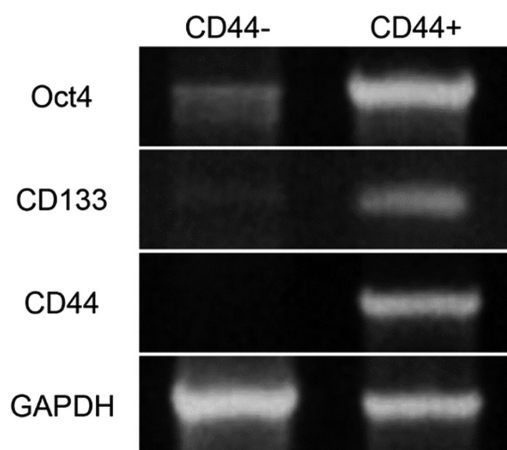


图 2 RT-PCR 检测分选后的两种细胞 Oct4、CD133 和 CD44 的 mRNA 表达

Fig.2 The mRNA expression of Oct4, CD133 and CD44 in both cell groups tested by RT-PCR

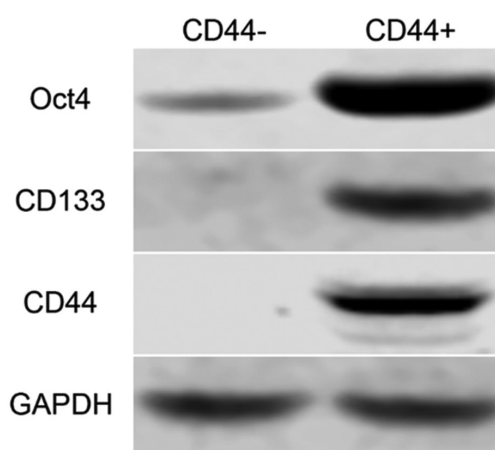


图 3 WB 检测分选后的两种细胞 Oct4、CD133 和 CD44 的蛋白表达水平

Fig.3 The protein expression of Oct4, CD133 and CD44 in both cell groups tested by WB

2.2 细胞克隆形成能力分析

细胞克隆形成能力结果显示: CD44⁺ 细胞接种后贴壁的细胞成活并形成克隆的数量有 365 个, 占总接种细胞数的 73%, 而 CD44⁻ 细胞接种后贴壁细胞成活并形成克隆的数量有 51 个, 占总接种细胞数的 10%(图 4B), 表明 CD44⁻ 细胞克隆形成能力显著低于 CD44⁺ 细胞($P < 0.05$)(图 4A)。

2.3 阿霉素对口腔鳞癌干细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 检测口腔鳞癌干细胞侵袭结果显示阿霉素显著减弱了口腔鳞癌干细胞的侵袭能力($P < 0.05$)(图 5); 细胞划痕检测口腔鳞癌干细胞迁移结果显示阿霉素显著减弱了口腔鳞癌干细胞的迁移能力($P < 0.05$)(图 6)。

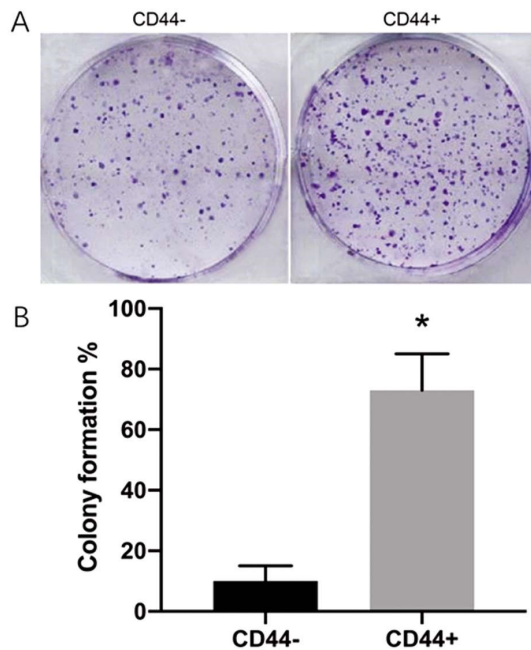


图4 CD44⁻和CD44⁺细胞克隆形成能力的比较

注:A CD44⁻和CD44⁺的克隆形成吉姆萨染色结果;B 细胞克隆形成数量统计。*代表两组具有显著差异($P<0.05$)。

Fig.4 The ability of colony formation of CD44⁻ and CD44⁺ cells

Note: A.The Giemsa staining for the colony formation of CD44⁺ and CD44⁻; B. The statistical analysis of colony formation of CD44⁺ and CD44⁻.

* represents significant difference ($P<0.05$).

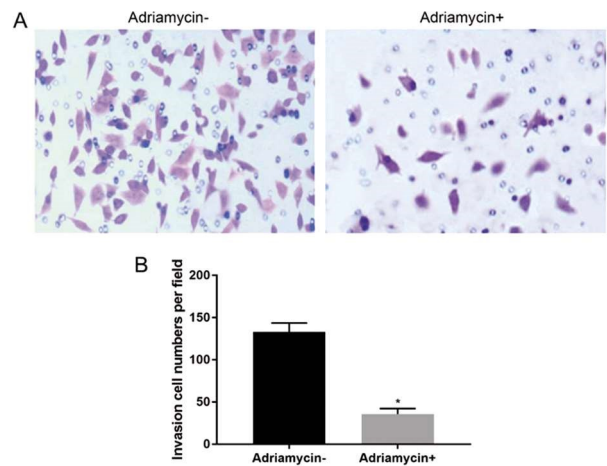


图5 阿霉素对口腔鳞癌干细胞侵袭的影响。

注:A 侵袭至 Transwell 膜中的细胞经吉姆萨染色结果;B 单位面积细胞数量。*代表两组具有显著差异。

Fig.5 Effect of Adriamycin on the invasion of oral squamous cell carcinoma stem cells

Note: A.The Giemsa staining for the cell invasion to transwell after Adriamycin treatment; B. The statistical analysis of invasion cell numbers per field after treatment of Adriamycin. * represents significant difference ($P<0.05$).

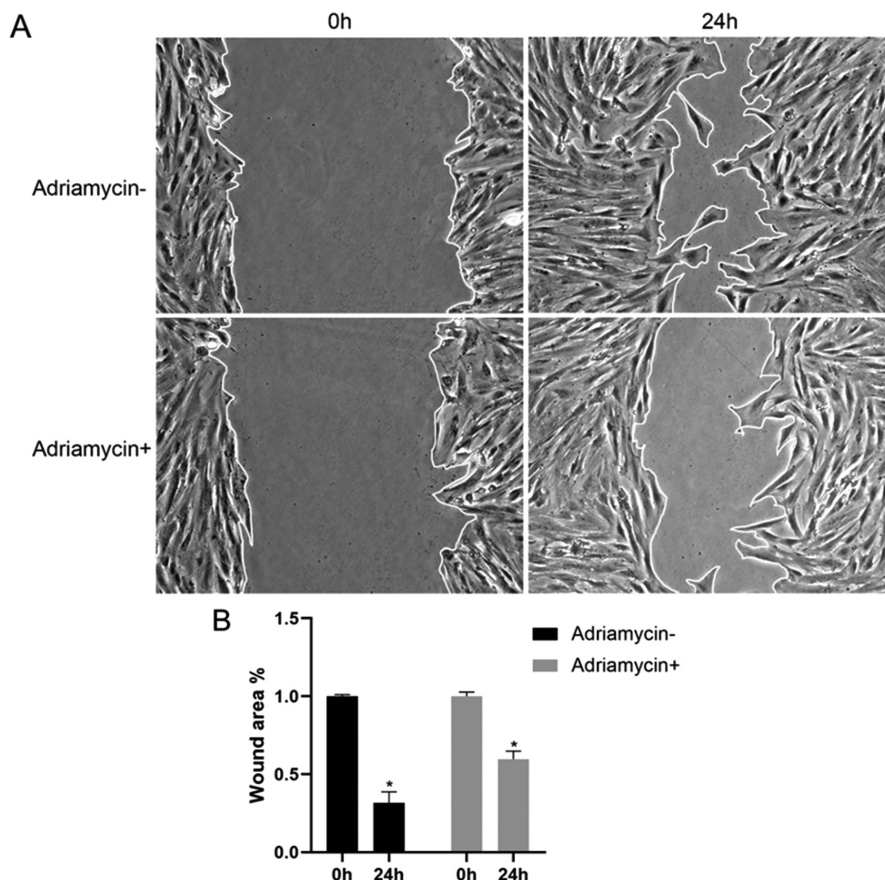


图6 阿霉素对口腔鳞癌干细胞迁移的影响。

注:A 划痕检测细胞迁移图;B 细胞迁移面积图。*代表两组具有显著差异。

Fig.6 Effect of Adriamycin on the migration of oral squamous cell carcinoma stem cells

Note: A. Cell migration detected by scratch test after Adriamycin incubation; B. The statistical analysis of wound area after treatment of Adriamycin.

* represents significant difference ($P<0.05$).

2.4 阿霉素对口腔鳞癌干细胞凋亡的影响

后细胞凋亡率显著上升($P<0.05$)(图 7)。

一步法 TUNEL 法荧光检测口腔鳞癌干细胞经阿霉素处理

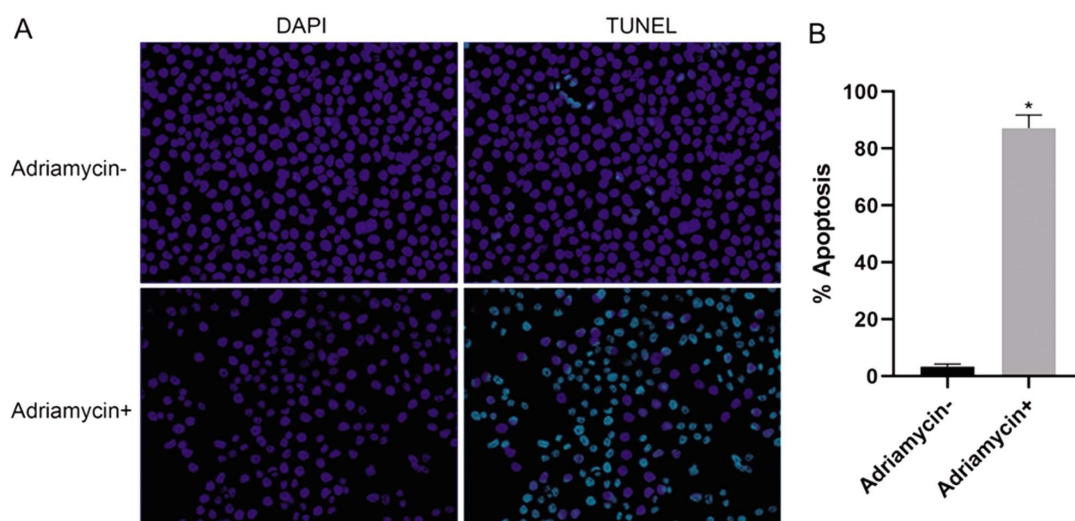


图 7 一步法 TUNEL 检测细胞凋亡情况。

注:A 细胞凋亡荧光图;B 口腔鳞癌干细胞经阿霉素处理后细胞凋亡水平显著上升($P<0.05$)。* 代表两组具有显著差异($P<0.05$)。

Fig.7 Effect of Adriamycin on the apoptosis of oral squamous cell carcinoma stem cells

Note: A. Cell death detected by TUNEL fluorescence test; B. The statistical analysis of apoptosis after treatment of Adriamycin. * represents significant difference ($P<0.05$).

2.5 阿霉素与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系

为了进一步验证阿霉素与 Wnt/ β -catenin 信号通路之间的关系,分别使用阿霉素和 β -catenin 通路抑制剂 LF3 处理口腔鳞癌干细胞,免疫共沉淀检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋

白 β -catenin 和其转录因子 TCF-4 的相互作用,结果显示阿霉素与 LF3 均可抑制 β -catenin 和 TCF-4 的相互作用($P<0.05$),但对二者的表达无显著影响(图 8),且阿霉素与 LF3 的作用比较组间无统计学差异($P<0.05$,图 9)。

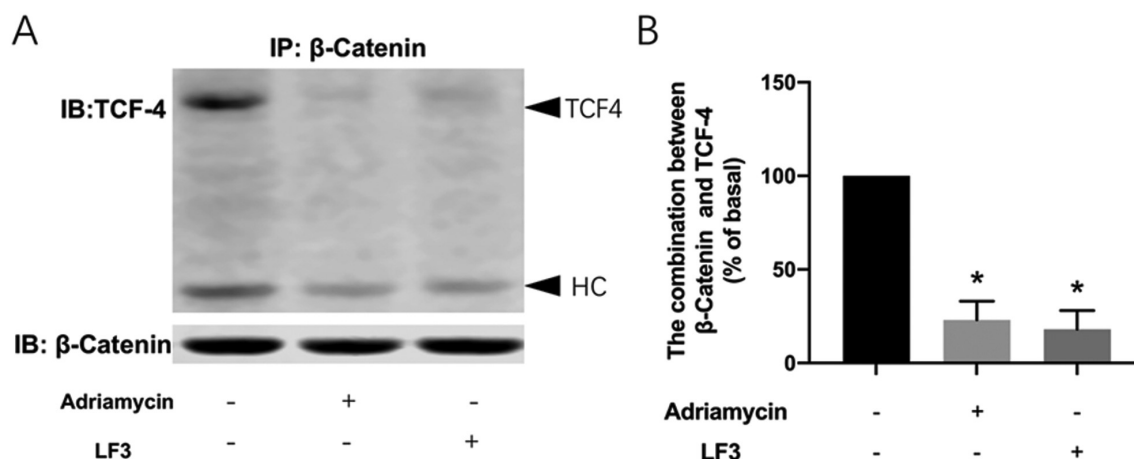


图 8 阿霉素对 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白相互作用的影响。

注:A 免疫共沉淀检测 β -catenin 和 TCF-4 的蛋白相互作用;B 相对定量 β -catenin 和 TCF-4 的结合力。* 代表两组对比具有显著差异($P<0.05$)。

Fig.8 Effect of Adriamycin on Wnt/ β -catenin signaling pathway

Note: A. The interaction between β -Catenin and TCF-4 detected by co-immunoprecipitation; B. The statistical analysis of combination between β -Catenin and TCF-4 after treatment of Adriamycin. * represents significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

CSC 在癌症的发展、转移、复发和多药耐药性中起重要作用^[15]。研究表明口腔鳞状细胞癌对常规化学疗法或放射疗法的耐药性可能是由于 CSC 的存在^[16,17],消除 CSC 可能是改善口腔鳞状细胞癌临床疗效的有效方法^[18]。Prince 等研究发现头颈鳞状细胞癌和许多上皮肿瘤一样,包含异质性癌细胞群,头颈鳞

状细胞癌肿瘤包括 $<10\%$ 的 $CD44^+$ 细胞,在体内新的肿瘤的细胞为 $CD44^+$ 细胞而非 $CD44^-$ 细胞,纯化的 $CD44^+$ 细胞产生的肿瘤重现了原始的肿瘤异质性,可以连续传代,具有自我更新和分化的功能^[19,20]。因此, $CD44$ 可作为 CSC 的标志物。我们通过 $CD44$ 免疫磁珠分离了 $CD44^+$ 细胞和 $CD44^-$ 细胞。相较于与 $CD44^-$ 细胞, $CD44^+$ 细胞高表达 Oct4、 $CD133$ 和 $CD44$,克隆形成能力显著高于 $CD44^-$ 细胞。越来越多的证据证实 $CD133$ 在

各种人类肿瘤中作为 CSC 标记的作用,CD133⁺ 癌细胞的分子生物学对于开发更有效的癌症治疗方法至关重要^[21]。

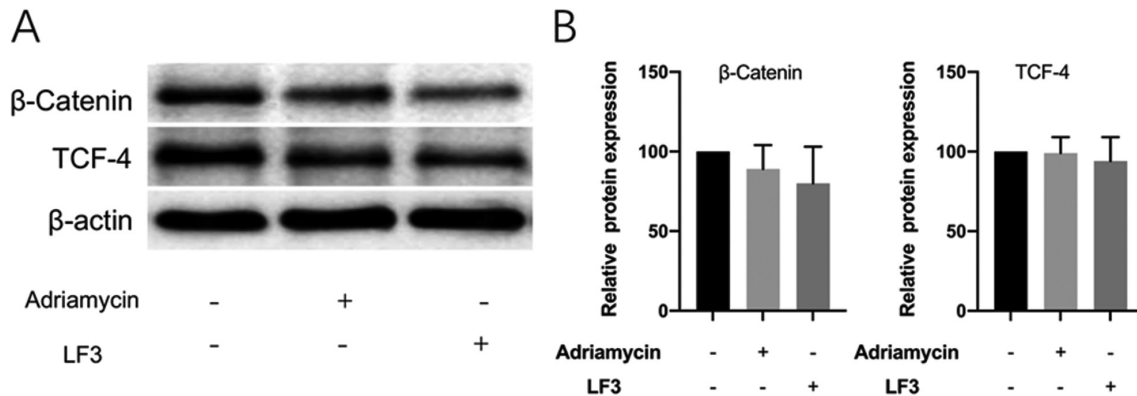


图9 阿霉素对 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白表达的影响。

注:A WB 检测 β-catenin 和 TCF-4 的蛋白表达水平;B 相对定量 β-catenin 和 TCF-4 的蛋白表达量。* 代表两组对比具有显著差异(P<0.05)。

Fig.9 Effect of Adriamycin on protein expressions in Wnt/β-catenin pathway

Note: A. The protein expression of β-Catenin and TCF-4 detected by WB; B. Relative protein expressions of β-Catenin and TCF-4 after treatment of Adriamycin. * represents significant difference (P<0.05).

已有研究证实在人癌细胞系中可检测到 Oct4、Sox2 和 Nanog 这些在胚胎干细胞中特异表达的基因的表达,这提示干细胞在癌症发展中的作用^[22],如 Oct4 在胚胎调控中起关键作用。Yuan 等的研究表明 Oct4 在肝癌中呈高表达,可能在肝癌干细胞中发挥重要作用,敲除 Oct4 后,HepG2 的克隆形成和迁移能力降低^[23]。Oct4、Wnt/β-catenin 家族和 TGF-β 家族基因之间存在复杂的关系,抑制 Oct4 可以降低 TGF-β 家族基因 ELF、Smad3、Smad4 和 Wnt/β-catenin 家族基因 Wnt10b 和 β-catenin 的表达^[24]。本研也显示阿霉素对口腔鳞癌干细胞迁移、侵袭有抑制作用,同时通过对 Wnt/β-catenin 通路检测表明其机制是通过抑制 Wnt/β-catenin 通路实现的,我们检测了流式分选的 CD44⁺ 和 CD44⁻ 的 Oct4 基因表达水平,结果显示 CD44⁺ 的 Oct4 基因表达水平高于 CD44⁻ 细胞。由此可见,我们分选的 CD44⁺ 为 CSC。

研究表明 Wnt/β-catenin 信号通路成分(如 EpCAM)对 CSC 的生长和侵袭发挥重要作用^[25]。Yanaga 研究结果显示 Wnt 信号通路是开发针对 CSC 的新型疗法的重要靶标。在头颈鳞状细胞癌细胞中,Wnt 信号通路的激活在 CSC 样细胞的增殖中起着至关重要的作用。Wnt/β-catenin 信号通路中,研究最深入和特征最全面的 Wnt 通路,该信号途径在成年人体内有助维持组织的结构和完整性,但在肿瘤细胞中被不适当地激活。肿瘤细胞劫持 Wnt/β-catenin 信号通路,促进其不受控制的生长、存活以及迁移^[26]。β-catenin 的水平受到泛素-蛋白酶体介导的降解的严格调控,该降解通过破坏复合物形成进行控制,该复合物由毒素、腺瘤性息肉肉病(APC)、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)等组成^[27]。β-catenin 可被 GSK-3β 磷酸化,导致其降解,进一步 Wnt/GSK-3β 将被抑制,导致非磷酸化 β-catenin 的积累,这可以避免降解并转移到细胞核中,在细胞核中,β-catenin 与 T 细胞转录因子(TCF)和其他辅因子形成复合物,以激活 Wnt 信号传导靶基因(如 c-Myc 和 Cyclin D1)的转录^[28]。

以往研究已证实 β-catenin 抑制剂 LF3 可以阻断肿瘤细胞周期、阻止其复制以及降低其迁移能力^[29,30]。我们通过阿霉素处

理 CD44⁺ 细胞,发现阿霉素可以显著减弱细胞迁移和侵袭能力,同时具有促进细胞凋亡。进一步分析阿霉素对 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白 β-catenin 和 TCF-4 的相互作用和表达结果显示,阿霉素有效破坏了 β-catenin 和 TCF-4 蛋白的相互作用,该结果与 Wnt 信号通路抑制剂 LF3 的作用结果类似,说明阿霉素对于口腔鳞癌干细胞的迁移、侵袭的抑制作用以及促凋亡作用与 Wnt/β-catenin 信号通路受抑制有关。

综上,阿霉素可能通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路降低口腔鳞癌干细胞迁移、侵袭能力,促进细胞凋亡。本研究结果有助于了解阿霉素在抑制口腔鳞癌干细胞的作用机制,并为今后的临床治疗提供思路。

参考文献 (References)

- [1] Petersen PE. Global policy for improvement of oral health in the 21st century-implications to oral health research of World Health Assembly 2007, World Health Organization [J]. Community dentistry and oral epidemiology, 2009, 37(1): 1-8
- [2] Frieden TR. A Safer, Healthier U.S.: The Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2016 [J]. Am J Prev Med, 2017, 52(3): 263-275
- [3] Jiang S, Dong Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future [J]. Curr Probl Cancer, 2017, 41 (5): 323-327
- [4] Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction [J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(9): 803-807
- [5] Fakhry C, Blackford AL, Neuner G, et al. Association of Oral Human Papillomavirus DNA Persistence With Cancer Progression After Primary Treatment for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma [J]. JAMA Oncol, 2019, 5(7): 985-992
- [6] Huang Z, Xie N, Liu H, et al. The prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis[J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(9): 788-798
- [7] Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Sayáns M, Rodríguez-Zorrilla S, et al. Dissecting the Proton Transport Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma

- ma: State of the Art and Theranostics Implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4222
- [8] Ganly I, Yang L, Giese RA, et al. Periodontal pathogens are a risk factor of oral cavity squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol and human papillomavirus[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(3): 775-784
- [9] Kamat M, Rai BD, Puranik RS, et al. A comprehensive review of surgical margin in oral squamous cell carcinoma highlighting the significance of tumor-free surgical margins [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(3): 449-454
- [10] Pollaers K, Massingham I, Friedland PL, et al. The economic burden of oral squamous cell carcinoma in Australia [J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(7): 588-594
- [11] Mroueh R, Haapaniemi A, Saarto T, et al. Non-curative treatment of patients with oral tongue squamous-cell carcinoma [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 276(7): 2039-2045
- [12] Sun LP, Xu K, Cui J, et al. Cancer-associated fibroblast derived exosomal miR-382-5p promotes the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(4): 1319-1328
- [13] Elhousiny M, Miller K, Ariyawadana A, et al. Identification of inflammatory mediators associated with metastasis of oral squamous cell carcinoma in experimental and clinical studies: systematic review [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2019, 36(6): 481-492
- [14] Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, et al. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23(7): 2849-2859
- [15] Soura E, Gagari E, Stratigos A. Advanced cutaneous squamous cell carcinoma: how is it defined and what new therapeutic approaches are available?[J]. *Curr Opin Oncol*, 2019, 31(5): 461-468
- [16] Allon I, Abba M, Kaplan I, et al. Oral variant of acantholytic squamous cell carcinoma- Histochemical and immunohistochemical features [J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(8): 151443
- [17] Hashimoto K, Shimizu D, Hirabayashi S, et al. Changes in oral microbial profiles associated with oral squamous cell carcinoma vs leukoplakia[J]. *J Investig Clin Dent*, 2019, 10(4): e12445
- [18] Agrawal R, Kumar N, Gupta K, et al. Nonkeratinizing squamous cell carcinoma: A rare case report with oral involvement [J]. *J Cancer Res Ther*, 2019, 15(3): 708-711
- [19] Lee NCJ, Eskander A, Park HS, et al. Pathologic staging changes in oral cavity squamous cell carcinoma: Stage migration and implications for adjuvant treatment[J]. *Cancer*, 2019, 125(17): 2975-2983
- [20] Bharadwaj R, Sahu BP, Haloi J, et al. Combinatorial therapeutic approach for treatment of oral squamous cell carcinoma [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 572-585
- [21] Zeng D, Xu H, Ji N, et al. In situ measurement of miR-138 expression in oral squamous cell carcinoma tissue supports the role of this microRNA as a tumor suppressor [J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(10): 911-918
- [22] Wei L, Wang X, Lv L, et al. The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 147
- [23] Sun Z, Huang G, Cheng H. Transcription factor Nrf2 induces the up-regulation of lncRNA TUG1 to promote progression and adriamycin resistance in urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6079-6090
- [24] Liang Y, Song X, Li Y, et al. CircKDM4C suppresses tumor progression and attenuates doxorubicin resistance by regulating miR-548p/PBLD axis in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(42): 6850-6866
- [25] Li D, Wang X, Yang M, et al. miR3609 sensitizes breast cancer cells to adriamycin by blocking the programmed death-ligand 1 immune checkpoint [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 380(1): 20-28
- [26] Gigliotti J, Madathil S, Makhoul N. Delays in oral cavity cancer[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 48(9): 1131-1137
- [27] Lins LS, Bezerra NV, Freire AR, et al. Socio-demographic characteristics are related to the advanced clinical stage of oral cancer [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2019, 24(6): e759-e763
- [28] Pilborough AE, Lambert DW, Khurram SA. Extranodal extension in oral cancer: A role for the nodal microenvironment? [J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(10): 863-870
- [29] Tang JY, Xu YH, Lin LC, et al. LY303511 displays antiproliferation potential against oral cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(8): 958-967
- [30] Fakhry C, Blackford AL, Neuner G, et al. Association of Oral Human Papillomavirus DNA Persistence With Cancer Progression After Primary Treatment for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(7): 985-992