

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.28.003

沙利霉素增强肝癌细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性及其作用机制研究*

刘 鹏¹, 黄美松², 胡阳黔^{1△}

(1. 湖北医药学院附属东风医院消化内科, 湖北十堰 442008;

2. 十堰市中西医结合医院内分泌科, 湖北十堰 442011)

[摘要] **目的** 研究沙利霉素(Sal)增强肝癌细胞对 5-氟尿嘧啶(5-FU)敏感性及其机制,为抗药性原发性肝癌患者提供新的治疗方案。**方法** 选用肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 和 MHCC-97H 为研究对象,运用 MTT 方法,克隆形成实验,流式细胞仪检测 Sal 和 5-FU 联合作用下对肝癌细胞增殖抑制率、克隆形成、细胞凋亡和肿瘤干细胞增殖的影响;Western-blot 方法检测 Sal 和 5-FU 联合作用对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**结果** Sal 和 5-FU 联合作用能够显著抑制肝癌细胞增殖和克隆形成并诱导细胞凋亡,具有协同作用;5-FU 能促进肝癌肿瘤干细胞增殖,而 Sal 降低 5-FU 的这一作用;同时 Sal 能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。**结论** Sal 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路增强肝癌细胞对 5-FU 的敏感性;Sal 和 5-FU 联合作用为抗药性原发性肝癌患者提供新的治疗方案。

[关键词] 肝肿瘤;氟尿嘧啶;沙利霉素;药物协同作用;抗药性**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)28-3903-05

Sensitivity and mechanism of salinomycin affecting the liver cancer cells to 5-fluorouracil*

Liu Peng¹, Huang Meisong², Hu Yangqian^{1△}

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei Medicine College,

Shiyan, Hubei 442008, China; 2. Department of Endocrinology, Shiyan Hospital of Integrated

Traditional and Western Medicine, Shiyan, Hubei 442011, China)

[Abstract] **Objective** To study salinomycin (Sal) enhance the sensitivity of liver cancer cell to 5-fluorouracil (5-FU) and its mechanism, and to provide drug-resistant primary hepatocellular carcinoma (HCC) patients with a new treatment. **Methods** Hepatoma cell line HepG2, SMMC-7721, MHCC-97H were used for the research. The effect of Sal combined with 5-FU on the cell proliferation inhibition rate, colony formation, apoptosis and tumor stem cell proliferation were detected by the MTT assay, colony formation assay, flow cytometry. And the effect on Wnt/ β -catenin when Sal combined with 5-FU were detected by Western-blot. **Results** Sal combined with 5-FU significantly inhibited the liver cancer cell proliferation and colony formation and induced cell apoptosis, showed the synergistic effect. 5-FU promoted the proliferation of hepatocarcinoma stem, but Sal reduced the function of 5-FU. At the same time Sal could inhibit the Wnt/ β -catenin signal pathway. **Conclusion** The Sal can increase the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to 5-FU by inhibiting Wnt/ β -catenin signal pathway; Sal combined with 5-FU could provide drug-resistant HCC patients with a new treatment.

[Key words] liver neoplasms; fluorouracil; salinomycin; drug synergism; drug resistance

原发性肝癌(HCC)是世界上常见的恶性肿瘤之一,近几年的发病率呈上升趋势,其病因和发病机制尚未清楚^[1]。HCC 的耐药性是 HCC 晚期患者预后差和易复发的主要原因之一,因此,探索 HCC 耐药性机制和寻找有效治疗 HCC 的方法是研究人员最关心的问题之一。目前,有近 100 多种抗癌药物用于 HCC 的治疗,而化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)是治疗大多数早期癌症如结直肠癌^[2]、乳腺癌^[3]、食管癌^[4]以及原发性肝癌^[5]有效的抗癌药物。然而,由于中晚期癌症患者对 5-FU 的耐药性从而限制了其在临床上的应用,更为重要的是使用 5-FU 的患者容易对其他化疗药物产生耐药性^[6-7]。

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的发现提示为什么 5-FU 能有效治疗早期癌症患者,而对晚期癌症失效甚至对患者造成严重的不良反应^[8-9]。研究认为 5-FU 能够靶向识别并抑制无限增殖和已分化的肝癌细胞,而对未分化的 CSCs 不起作用,提示 CSCs 是导致患者预后差和易复发最直接的原

因^[10]。最近, Gupta 等^[11]通过高通量筛选技术对 16 000 种抑制人乳腺癌 CSCs 的化合物进行筛选,发现只有沙利霉素(salinomycin, Sal)能选择性抑制乳腺癌 CSCs 的增殖。研究发现 Sal 能抑制骨肉瘤 CSCs 和子宫内膜 CSCs 的增殖^[12-13];近新研究证实 Sal 能抑制 CD133+ 阳性(干细胞生物标志物)肝癌细胞和胰腺癌细胞的增殖^[14-15]。这些研究结果提示 5-FU 与 Sal 联合作用对处于不同阶段的癌细胞发挥抑制作用。因此,本文将 5-FU 与 Sal 联合作用研究这种联合作用是否能增加 HCC 对 5-FU 的敏感性从而杀死 HCC 干细胞,探讨 HCC 发生与发展的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞(中科院上海细胞生物研究所);5-FU 和 MTT(Sigma 公司);沙利霉素(宜昌永诺药业);DMEM 培养基(Gibco)、胎牛血清(FBS)、青霉素和链霉素(北京鼎国生物公

* 基金项目:湖北省教育厅指导项目(B2014054)。作者简介:刘鹏(1979—),主治医师,主要从事消化内科基础医学与临床研究。

△ 通讯作者: Tel: 0719-8272546; E-mail: huyangqian999@163.com。

司);AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(成都艾特姆生物科技有限公司);兔抗人 CD133、EPCAM、p-GSK-3 β -Tyr216、 β -actin 抗体(Santa 公司);p- β -catenin 抗体、 β -catenin(Cell Signaling Technology 公司);辣根标记山羊抗兔 IgG 二抗购自中杉金桥公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒(Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2, SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞培养于含 10% FBS、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 及完全湿度的培养箱中。待细胞融合度达到 80% 左右时进行细胞传代。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 将增殖期的 HepG2, SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞以 4.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,设置 6 个复孔,培养 24 h 后弃掉培养基,各加入 200 μ L 含不同终浓度 5-FU(0、2、4、8、16 μ g/mL)和 Sal(0、2、4、8、16 μ g/mL)的 DMEM 培养基,同时设置对照组(含 DMSO 的 DMEM 培养基),分别培养 24、48、72 h。后加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 继续培养 4 h,弃上清液,加入 150 μ L DMSO,振荡使结晶完全溶解,用酶标仪测定 492 nm 处的吸光值(OD 值)。重复 3 次,按公式(1)计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 均值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 5-FU 和 Sal 联合作用 将增殖期的 HepG2, SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞以细胞密度为 4.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,设置 6 个复孔,培养 24 h 后弃掉培养基,分别混合交叉加入 200 μ L 含不同终浓度 5-FU(0、2、4、8、16 μ g/mL)+Sal(0、2、4、8、16 μ g/mL)的 DMEM 培养基,同时设置对照组(含 DMSO 的 DMEM 培养基),培养 48 h 后运用 MTT 法测定每孔 OD 值。

1.2.4 克隆形成实验 将增殖期的 HepG2, SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞离心收集后计数,以 200 个/皿接种于 10 cm 细胞培养皿中培养 24 h;向培养皿中加入 5-FU 和 Sal 使其终浓度分别为 8 μ g/mL 和 4 μ g/mL,同时设置对照组,培养 12 d,直到通过肉眼能清晰观察到可见的细胞克隆;将培养基倒掉,PBS 洗涤,甲醇固定 10 min,PBS 洗涤,吉姆萨染色 10 min,自来水清洗,晾干后计数,按公式(2)计算细胞克隆形成率。

$$\text{克隆形成率(\%)} = \frac{\text{细胞克隆数平均值}}{\text{铺板细胞总数}} \times 100\% \quad (2)$$

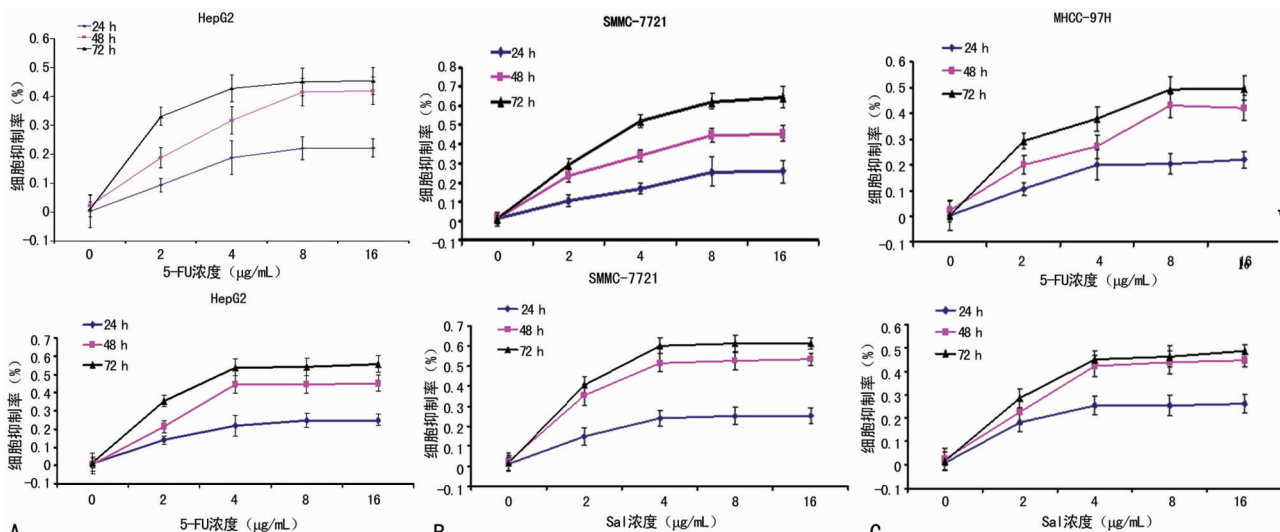
1.2.5 流式细胞实验 将增殖期的 SMMC-7721 细胞经消化后接种到 6 孔板中,培养 24 h 后弃掉培养基,按下列实验因素作用细胞:PBS 组,5-FU(8 μ g/mL),Sal(4 μ g/mL),5-FU(8 μ g/mL)+Sal(4 μ g/mL),作用 48 h 后用 PBS 洗涤 3 次,消化离心收集细胞。按照 Annexin-V/PI 试剂盒说明书操作,先加入 500 μ L 的 Binding buffer 重悬细胞,再加入 5 μ L FITC 标记的 Annexin-V 和 5 μ L PI 混匀,室温下避光孵育 15 min,运用流式细胞仪测定细胞凋亡。将生长状态良好的 SMMC-7721 细胞经相同的方法分组处理后离心收集细胞,用藻红蛋白偶联的 CD133 抗体和 FITC 偶联的 EPCAM 抗体 4 °C 孵育 30 min,同时以加入藻红蛋白偶联的鼠 IgG 作为对照。死细胞通过标记 7-放线菌素 D 识别,运用流式细胞仪测定 CD133(+)-EPCAM(+)-阳性 SMMC-7721 细胞。

1.2.6 Western blot 检测 将增殖期的 SMMC-7721 细胞经消化后接种到 6 孔板中,培养 24 h 后弃掉培养基,按实验 1.2.5 方法处理细胞,作用 48 h 后收集细胞。细胞经 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白,按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将总蛋白 50 μ g 进行 SDS-PAGE,转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育一抗(p-GSK-3 β -Tyr216, p- β -catenin, β -actin 抗体),4 °C 过夜。洗膜、加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1:2 000)室温孵育 1 h。照片经 ECL 后扫描,蛋白表达灰度值经 Quantity-One 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,结果用均数 \pm 标准误差(mean \pm SEM)表示。组间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差分析后的成对比较采用 S-N-K 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-FU 和 Sal 抑制肝癌细胞的增殖 5-FU 和 Sal 均能抑制肝癌细胞的增殖,细胞抑制率与浓度呈时间-剂量依赖效应,见图 1。相同条件下,Sal 对肝癌细胞的抑制作用大于 5-FU 对肝癌细胞的抑制作用,当 5-FU 和 Sal 浓度分别为 8 μ g/mL 和 4 μ g/mL 时细胞抑制率达到最大,5-FU 和 Sal 对 SMMC-7721 细胞的抑制作用大于 HepG2 和 MHCC-97H 细胞。因此,在细胞凋亡实验和机制研究中以 SMMC-7721 细胞为研究对象。



A: HepG2; B: SMMC-7721; C: MHCC-97H.

图 1 MTT 法测定 5-FU 和 Sal 对肝癌细胞增殖的影响

表 1 5-FU 与 Sal 联合作用对 HepG2 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

5-FU($\mu\text{g/mL}$)	Sal($\mu\text{g/mL}$)				
	0	2	4	8	16
0	0	0.248 \pm 0.035	0.312 \pm 0.006	0.348 \pm 0.023	0.471 \pm 0.021
2	0.319 \pm 0.025	0.446 \pm 0.078	0.523 \pm 0.018	0.541 \pm 0.091	0.583 \pm 0.033
4	0.412 \pm 0.081	0.519 \pm 0.062	0.562 \pm 0.091	0.633 \pm 0.048	0.715 \pm 0.042
8	0.513 \pm 0.059	0.573 \pm 0.088	0.611 \pm 0.102	0.682 \pm 0.055	0.748 \pm 0.072
16	0.588 \pm 0.042	0.650 \pm 0.079	0.739 \pm 0.083	0.783 \pm 0.031	0.899 \pm 0.038

表 2 5-FU 与 Sal 联合作用对 SMMC-7721 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

5-FU($\mu\text{g/mL}$)	Sal($\mu\text{g/mL}$)				
	0	2	4	8	16
0	0	0.300 \pm 0.034	0.394 \pm 0.016	0.431 \pm 0.045	0.498 \pm 0.011
2	0.368 \pm 0.022	0.476 \pm 0.066	0.583 \pm 0.065	0.562 \pm 0.085	0.611 \pm 0.067
4	0.472 \pm 0.063	0.587 \pm 0.054	0.605 \pm 0.077	0.671 \pm 0.044	0.775 \pm 0.009
8	0.549 \pm 0.021	0.598 \pm 0.021	0.641 \pm 0.062	0.702 \pm 0.035	0.808 \pm 0.058
16	0.602 \pm 0.044	0.682 \pm 0.032	0.782 \pm 0.073	0.795 \pm 0.062	0.914 \pm 0.073

表 3 5-FU 与 Sal 联合作用对 MHCC-97H 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

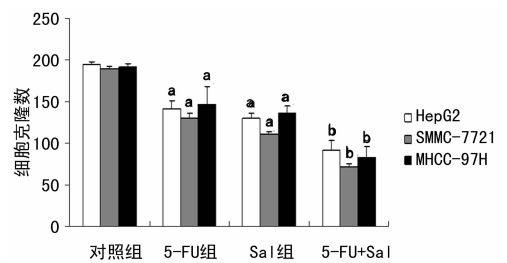
5-FU($\mu\text{g/mL}$)	Sal($\mu\text{g/mL}$)				
	0	2	4	8	16
0	0	0.285 \pm 0.088	0.361 \pm 0.022	0.415 \pm 0.055	0.444 \pm 0.063
2	0.341 \pm 0.015	0.442 \pm 0.047	0.548 \pm 0.079	0.541 \pm 0.089	0.591 \pm 0.059
4	0.428 \pm 0.033	0.538 \pm 0.081	0.585 \pm 0.041	0.649 \pm 0.081	0.682 \pm 0.029
8	0.505 \pm 0.063	0.567 \pm 0.034	0.602 \pm 0.064	0.684 \pm 0.077	0.778 \pm 0.066
16	0.582 \pm 0.058	0.665 \pm 0.051	0.713 \pm 0.057	0.735 \pm 0.041	0.854 \pm 0.091

2.2 5-FU 和 Sal 联合作用对肝癌细胞增殖的影响 MTT 结果显示 5-FU 和 Sal 联合作用肝癌细胞 48 h 后,细胞抑制率明显高于 5-FU 或 Sal 单独作用肝癌细胞时的抑制率,并且随着 5-FU 或(和)Sal 浓度的增加,这种协同作用越强。结果显示, SMMC-7721 细胞对 5-FU 和 Sal 协同作用的敏感性大于 HepG2 和 MHCC-97H 细胞,提示 5-FU 和 Sal 协同作用对不同的癌细胞存在差异性(表 1~3)。结果证实,5-FU 和 Sal 对肝癌细胞增殖抑制具有协同作用,且对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用最强。

2.3 5-FU 和 Sal 协同作用抑制肝癌细胞克隆形成 5-FU(8 $\mu\text{g/mL}$)、Sal(4 $\mu\text{g/mL}$)和 5-FU(8 $\mu\text{g/mL}$)+Sal(4 $\mu\text{g/mL}$)分别作用 HepG2、SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞 48 h 后,肝癌细胞增殖能力被显著抑制($P < 0.01$)。当 5-FU+Sal 共同作用肝癌细胞时表现出协同作用,肝癌细胞的克隆数显著低于 5-FU 或 Sal 单独作用细胞时的克隆数,见图 2。

2.4 5-FU 和 Sal 联合作用对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 MTT 和克隆形成实验结果已表明,5-FU 和 Sal 对 HepG2、SMMC-7721 和 MHCC-97H 细胞的增殖抑制具有协同作用,而且这一作用对 SMMC-7721 细胞最为明显。而流式细胞术检测 5-FU 和 Sal 对 SMMC-7721 细胞凋亡结果如图 3 显示,5-FU 和 Sal 浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 和 4 $\mu\text{g/mL}$ 时,SMMC-7721 细胞

凋亡率分别为(18.52 \pm 3.45)%和(20.64 \pm 2.15)%;当二者联合作用时,SMMC-7721 细胞凋亡率达到(27.93 \pm 3.56)% ,明显高于二者单独作用时的细胞凋亡率。

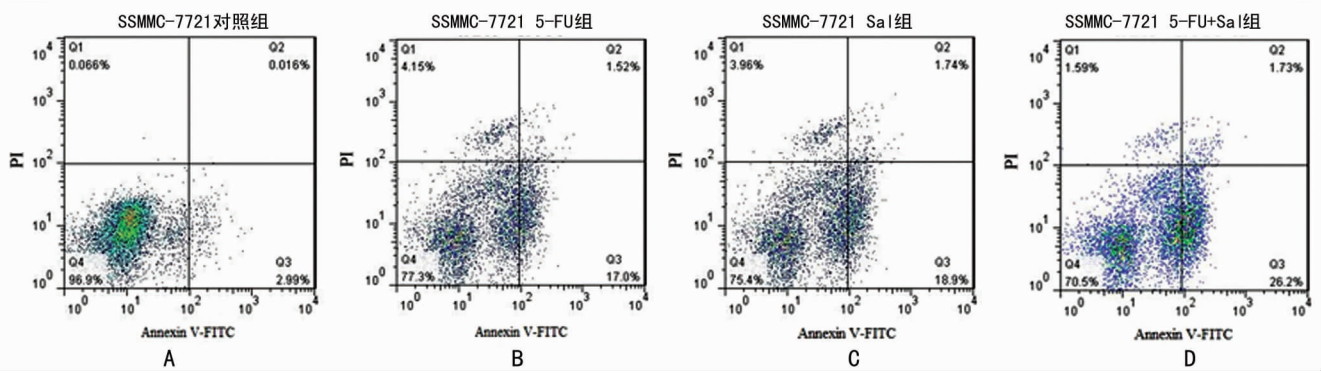


^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 5-FU 组或 Sal 组比较。

图 2 5-FU 和 Sal 联合作用对肝癌细胞单克隆形成的影响

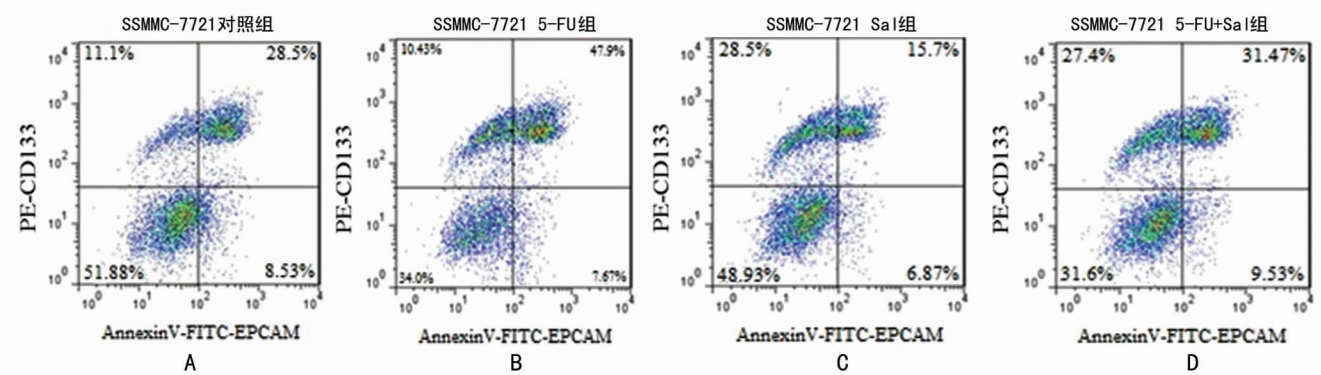
2.5 5-FU 和 Sal 联合作用对肝癌细胞 SMMC-7721 肿瘤干细胞的影响 利用流式细胞仪测定 SMMC-7721 细胞经 5-FU、Sal、5-FU 和 Sal 作用 48 h 后 CD133(+)-EPCAM(+) 阳性 SMMC-7721 细胞水平,发现 SMMC-7721 细胞经 5-FU 作用 48 h 后 CD133(+)-EPCAM(+) 细胞数量从(28.5 \pm 3.71)% 增加到(47.9 \pm 4.33)% ($P < 0.01$); 而细胞经 Sal 作用后 CD133(+)-EPCAM(+) 细胞数量显著降低,从(28.5 \pm 3.71)% 降低到(15.7 \pm 2.15)% ($P < 0.01$)。当 5-FU 和 Sal 联合作用细胞后 CD133(+)-EPCAM(+) 阳性 SMMC-7721 细

胞数与 5-FU 单独作用时的细胞数比显著降低,从 $(47.9 \pm 4.33)\%$ 降低到 $(31.47 \pm 5.26)\%$, ($P < 0.01$), 见图 4。



A: 对照组; B: 5-FU 组; C: Sal 组; D: 5-FU+Sal 组。

图 3 流式细胞仪检测 5-FU 和 Sal 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响



A: 对照组; B: 5-FU 组; C: Sal 组; D: 5-FU+Sal 组。

图 4 5-FU 和 Sal 对 SMMC-7721 肿瘤干细胞增殖的影响

2.6 Sal 能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路 研究证实 Wnt/ β -catenin 信号通路参与致瘤性肝脏祖细胞活性的调节,外在作用下激活肝脏祖细胞转化为肝癌细胞^[17-18]。Western-blot 检测结果如图 5 所示,与 5-FU 处理组比较,Sal 和联合作用组细胞中 p-GSK-3 β (Tyr216)蛋白表达量显著增加;p- β -catenin 蛋白表达量在 Sal 处理组细胞中明显升高,当二者联合作用时降低。

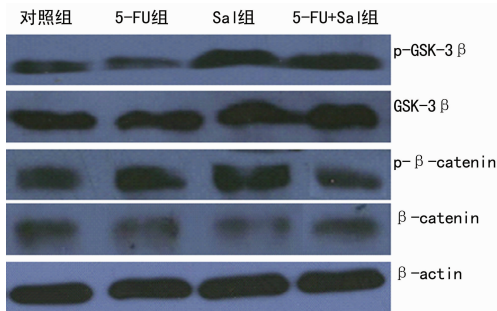


图 5 Western-blot 检测 5-FU 和 Sal 对 SMMC-7721 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白表达影响

3 讨论

在 HCC 患者中,仅有 30%~40% 患者符合根治性治疗,这些治疗手段包括手术切除,肝移植以及肝动脉栓塞化疗,大多数患者希望通过化疗来延长生命。最新数据显示 HCC 肿瘤干细胞对化疗药物(例如 5-FU)表现出抗药性。研究表明,EPCAM 和 CD133 蛋白是肝癌细胞 Huh7 中肿瘤干细胞膜表

面的生物标志物^[16]。以抑制肿瘤干细胞增殖为出发点用作临床治疗还面临诸多挑战,因为在杀死癌细胞和肿瘤干细胞的时候可能需要多种药物联合作用。Sal 是一种抗生素,能杀灭细菌,霉菌和寄生微生物,最新的研究表明,Sal 能选择性杀死乳腺癌肿瘤干细胞^[12]和结肠癌肿瘤干细胞^[19]。研究发现 Sal 能抑制 HCC 细胞中 CD133 阳性细胞的增殖^[15]。考虑到 Sal 这一独特功能,本文以 3 种人肝癌细胞株为研究对象研究 5-FU 和 Sal 素联合作用能否提高 HCC 细胞对 5-FU 的敏感性。

本研究探讨了 Sal 能否降低肝癌细胞对 5-FU 的抗药性。CD133 和 EPCAM 蛋白是一种膜蛋白,在肝癌细胞中被视为肿瘤干细胞生物标志物^[20-21]。研究发现在肝癌细胞 Huh7 细胞中存在 CD133(+)-EPCAM(+)-阳性细胞^[22]。本研究显示 5-FU 和 Sal 联合作用后 CD133(+)-EPCAM(+)-阳性细胞数量显著降低,而 5-FU 单独作用后 CD133(+)-EPCAM(+)-阳性细胞数量明显增加;克隆形成实验结果显示二者联合作用显著抑制肝癌细胞的克隆形成。这一作用可能的原因是 5-FU 和 Sal 联合作用抑制肝癌细胞中 CD133(+)-EPCAM(+)-阳性细胞的增殖,提示通过 Sal 抑制肝癌细胞肿瘤干细胞的增殖来提高 HCC 细胞对 5-FU 的敏感性。研究证实 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活或抑制与癌细胞抗药性密切相关^[23];Wnt/ β -catenin 信号通路在维持干细胞处于未分化状态方面起着重要作用^[24]。 β -catenin 蛋白是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的重要组成部分,而 Gsk-3 β 蛋白是 β -catenin 基因的上游调控因子,在外界条件的刺激下 Gsk-3 β 蛋白与 β -catenin 蛋白结合进而使其

发生磷酸化而降解。经典的 Wnt 信号通路由 β -catenin 蛋白介导, 激活型 β -catenin 蛋白核转移的积累可促进肝癌细胞对 5-FU 的抗药性。本研究发现 Sal、5-FU+Sal 分别作用肝癌细胞后细胞通过上调 β -GSK-3 β (Tyr216) 的表达抑制激活型 β -catenin 蛋白的表达, 提示 5-FU 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 而 Sal 和 5-FU 联合作用可使这一功能得以恢复。

本研究发现 Sal 通过抑制 HCC 细胞中肿瘤干细胞的增殖来提高 HCC 细胞对 5-FU 的敏感性。由此推测, 除了 5-FU 之外, 仍有大量的化疗药物可能通过促进肿瘤干细胞增殖的途径使其对癌细胞治疗失去作用。本研究为临床对化疗药物失敏的 HCC 患者提供了新的治疗方案。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. *JAMA*, 2013, 310(9):982.
- [2] Cilley J, Mulcahy MF. Adjuvant therapy for colon cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2006, 8(3):161-166.
- [3] Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(22):2302-2313.
- [4] Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(10):725-730.
- [5] Lin DY, Lin SM, Yf L. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1997, 12(9/10):319-328.
- [6] Yoo BK, Gredler R, Vozhilla N, et al. Identification of genes conferring resistance to 5-fluorouracil[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(31):12938-12943.
- [7] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD133 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9):3326-3339.
- [8] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4):275-284.
- [9] Huntly BJ, Gilliland DG. Cancer biology: summing up cancer stem cells [J]. *Nature*, 2005, 435(7046):1169-1170.
- [10] Collura A, Marisa L, Trojan D, et al. Extensive characterization of sphere models established from colorectal cancer cell lines[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(4):729-742.
- [11] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. *Cell*, 2009, 138(4):645-659.
- [12] Tang QL, Zhao ZQ, Li JC, et al. Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells[J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(1):113-121.
- [13] Kusunoki S, Kato K, Tabu K, et al. The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 129(3):598-605.
- [14] Wang F, He L, Dai WQ, et al. Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e50638.
- [15] He L, Wang F, Dai WQ, et al. Mechanism of action of salinomycin on growth and migration in pancreatic cancer cell lines[J]. *Pancreatol*, 2013, 13(1):72-78.
- [16] Chen Y, Yu D, Zhang H, et al. CD133(+)EpCAM(+) phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(7):992-1004.
- [17] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11):4287-4295.
- [18] Wagner RT, Xu X, Yi F, et al. Canonical Wnt/ β -catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(10):1794-1804.
- [19] Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(11):4227-4239.
- [20] Lan X, Wu YZ, Wang Y, et al. CD133 silencing inhibits stemness properties and enhances chemoradiosensitivity in CD133-positive liver cancer stem cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2):315-324.
- [21] Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Hepatology*, 2013, 57(4):1458-1468.
- [22] Chen Y, Yu D, Zhang H, et al. CD133(+)EpCAM(+) phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(7):992-1004.
- [23] Noda T, Nagano H, Takemasa I, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(10):1647-1658.
- [24] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11):4287-4295.