



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.011
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.011
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(10):1288-1294.

· 基础研究 ·

FH535 对结直肠癌肿瘤干细胞自我更新及侵袭迁移的抑制作用及机制

成蕾¹, 肖云峰², 李孝琼², 李佳丽², 夏金蓉², 李思宇², 冷政伟²

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 神经外科, 湖北 武汉 430022; 2. 川北医学院 肝胆胰肠疾病研究所, 四川南充 637000)

摘要

目的: 探讨小分子药物 FH535 对结直肠癌肿瘤干细胞 (CRC-CSCs) 自我更新、迁移侵袭的影响及机制。
方法: 通过流式细胞术从人结直肠癌 DLD-1 细胞中分选 CD133⁺CD44⁺ 的 CRC-CSCs, 不同浓度 (20、30、40 μmol/L) FH535 作用 CRC-CSCs 并计算半数抑制率 (IC₅₀) ; 用 IC₅₀ 浓度作用 CRC-CSCs, 以无处理的 CRC-CSCs 为对照组, 然后分别采用成球实验及有限浓度稀释法检测细胞的自我更新能力, Transwell 迁移侵袭实验及实时迁移侵袭实验 (RTCA) 检测细胞迁移侵袭能力, qRT-PCR 及流式细胞术检测 Wnt/β-catenin 信号通路相关分子及下游分子的 mRNA 及蛋白质表达变化。

结果: FH535 对 CRC-CSCs 的 IC₅₀ 为 40 μmol/L。与对照组细胞比较, 40 μmol/L FH535 作用后的 CRC-CSCs 成球能力明显减弱 (57.33 vs. 313.67, $P < 0.01$), CSCs 比例明显下降 (11.60/100 vs. 75.50/100, $P < 0.05$), 迁移 (Transwell: 10.66 vs. 90.00; RTCA: 0.17 vs. 0.37) 及侵袭 (Transwell: 8 vs. 20; RTCA: 0.14 vs. 0.37) 能力受到明显抑制 (均 $P < 0.01$) ; Wnt/β-catenin 信号通路分子 LEF1、AXIN1 及下游分子 c-myc、VEGF、cyclin D1、survivin 的 mRNA 与蛋白表达均明显下调 (均 $P < 0.01$) 。

结论: FH535 可能通过抑制 Wnt/β-catenin 通路的活性而削弱 CRC-CSCs 的自我更新、侵袭迁移能力。

关键词

结直肠癌; 肿瘤干细胞; 细胞自我更新; 肿瘤浸润; Wnt 信号通路
中图分类号: R735.3

Inhibitory effect of FH535 on self-renewal, migration and invasion of colorectal cancer stem cells and the mechanism

CHENG Lei¹, XIAO Yunfeng², LI Xiaoqiong², LI Jiali², XIA Jinrong², LI Siyu², LENG Zhengwei²

(1. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China; 2. Hepatobiliary, Pancreatic & Intestinal Diseases Research Institute, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract

Objective: To investigate the effects of FH535 on the self-renewal, migration and invasion of colorectal cancer stem cells (CRC-CSCs) and the mechanism.

Methods: CD133⁺CD44⁺ CSCs were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) from the human DLD-1 colorectal cancer cell line. CRC-CSCs were treated with different concentrations of FH535 (20, 30, 40 μmol/L) and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81402444) ; 四川省教育厅重点基金资助项目 (16ZA0226) 。

收稿日期: 2018-06-05; 修订日期: 2018-09-17。

作者简介: 成蕾, 华中科技大学同济医学院附属协和医院护师, 主要从事消化系统及神经系统肿瘤转移复发方面的研究。

通信作者: 冷政伟, Email: lengzhengwei@163.com

the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value was calculated. CRC-CSCs were treated with concentration of FH535, using untreated CRC-CSCs as control, and then, their self-renewal capacity was determined by limiting dilution assay (LDA) and sphere-forming assay, the migration and invasion abilities were measured by Transwell assay and real-time cell analysis (RTCA), and the mRNA and protein expressions of molecules involved in Wnt/ β -catenin signaling pathway as well as the downstream molecules were evaluated by qRT-PCR and flow cytometry, respectively.

Results: The IC₅₀ of CRC-CSCs to FH535 was determined to be 40 μ mol/L. In CRC-CSCs treated with 40 μ mol/L FH535 compared with those in control group, the sphere forming capacity was significantly decreased (57.33 vs. 313.67, $P < 0.01$) and CRC-CSCs ratio was significantly reduced (11.60/100 vs. 75.50/100, $P < 0.05$), the migration (Transwell: 10.66 vs. 90.00; RTCA: 0.17 vs. 0.37) and invasion (Transwell: 8 vs. 20; RTCA: 0.14 vs. 0.37) were all significantly inhibited (all $P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of LEF1 and AXIN1 in Wnt/ β -catenin signaling pathway and the downstream molecules c-myc, VEGF, cyclin D1 and survivin were all significantly down-regulated (all $P < 0.01$).

Conclusion: FH535 can weaken the abilities of self-renewal, migration and invasion of CRC-CSCs, and the mechanism may be probably associated with its inhibiting the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words

Colorectal Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Cell Self Renewal; Neoplasm Invasiveness; Wnt Signaling Pathway

CLC number: R735.3

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 发病率和病死率在我国恶性肿瘤中排名第五; 在美国已跃居第三, 居消化系统肿瘤第一位^[1-2], 其已经成为重大的社会问题^[3]; 肝脏是CRC最常见的转移部位, 约有60%的CRC患者在病程中出现结直肠癌肝转移 (colorectal liver metastases, CRLM), 其中大部分无法手术切除, CRLM也是CRC患者最主要的死亡原因^[4]。大量研究^[5-6]证实, 肿瘤中一小群具有强大自我更新能力和多向分化能力的细胞介导了肿瘤转移复发, 这一群细胞被称为肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs)。因此, 从CSCs角度深入探讨CRC转移信号通路的机制是CRC及其远处转移的重要研究方向。目前科学家通过标记CD133、CD44、ALDH1、Lgr5、SP等来分析分选CRC-CSCs, 其中CD133⁺CD44⁺被认为是CRC-CSCs可靠的表面标识^[7]。

大量研究^[8-9]证实Wnt/ β -catenin的异常激活介导了CRC的转移复发, 但Wnt/ β -catenin通路对CRC-CSCs自我更新、侵袭转移能力的影响及机制未见研究。小分子药物FH535能够通过抑制Wnt/ β -catenin通路影响细胞的多种病理生理过程^[10], 如Liu等^[11]证明, FH535能够与紫杉醇协同进一步抑制胃癌细胞增殖及侵袭能力; Chen等^[12]研究发现FH535通过抑制Wnt/ β -catenin通路抑制结直肠癌细胞的增殖及侵袭迁移能力。但FH535在介导结直肠癌转移复发根源细胞即CRC-CSCs中的作用及

机制未见报道。故本课题首先分选CD133⁺CD44⁺的CRC-CSCs, 将Wnt/ β -catenin通路抑制剂FH535作用于CSCs, 研究此通路在人CRC-CSCs自我更新、侵袭转移过程中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠癌DLD-1细胞购自美国ATCC公司; RPMI-1640培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清、7-氨基-放线菌素D (7-AAD) 购自美国Gibco公司; 胰岛素、表皮生长因子 (EGF)、重组成纤维细胞生长因子 (FGF)、BSA、B27购自美国PeproTech公司; CD133-PE、CD44-FITC及对应同型对照流式细胞抗体购自德国美天妮公司; FH535购自美国Selleckchem公司; LEF1、AXIN1、c-myc、VEGF、cyclin D1及survivin一抗及相应二抗均购自美国CST公司; 所有引物由美国Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养参考课题组前期文章^[13]。前期研究已经证明结直肠癌DLD-1细胞在无血清培养情况下能够获得更多的CSCs, 故本课题通过流式细胞术分选获得的DLD-1细胞中CD133⁺CD44⁺的CRC-CSCs培养于含5 mg/mL胰岛素、0.4%BSA、2%B27、10 ng/mL FGF、10 ng/mL

EGF的无血清DMEM/F12培养基中培养48 h后进行后续实验。

1.2.2 流式细胞术分选 CD133⁺CD44⁺表达的CRC-CSCs 2 × 10⁶细胞加入1 mL封闭液(含20%胎牛血清及0.4%BSA的PBS)4 ℃作用2 h后离心收集细胞并悬浮于50 μL封闭液中,加入5 μL CD133-PE、5 μL CD44-FITC及其同型对照抗体,4 ℃避光孵育30 min,离心收集细胞并悬浮于1 mL冷PBS中,分选上机前加入终浓度为2 μg/mL的7-AAD室温染色10 min以利分选时去除死细胞,使用BD FACSAria Fusion流式细胞仪分选获得CD133⁺CD44⁺表达的CRC-CSCs。

1.2.3 有限浓度稀释法 细胞以每孔不同浓度(0.5、1、1.5、2个细胞/孔)接种于96孔板中培养2周后记录每孔中细胞球数量,阴性孔比例与细胞稀释浓度作图并进行线性回归分析,计算CSCs比例^[14]。

1.2.4 成球实验及Transwell迁移、侵袭实验 实验方法参考课题组研究^[15],3 × 10⁵细胞悬浮于50 μL无血清RPMI-1640培养基中,置于8 μm孔径滤膜的Transwell小室上室,小室为100 μL含10%FBS的RPMI-1640培养基,小室铺设基质胶(侵袭实验)或不铺设基质胶(迁移实验),细胞培养箱中孵育15 h,迁移侵袭通过滤膜的细胞被0.1%结晶紫在室温下染色10 min,显微镜下照相、计数统计^[7]。

1.2.5 实时迁移侵袭实验 参考课题组前期发表研究^[15]。采用实时细胞分析(RTCA)平台,细胞迁移侵袭到下层接触电极板产生电信号,通过系统换算为细胞指数,该指数大小与细胞数成正比,每15 min检测1次信号,以实时检测细胞迁移侵袭能力。

1.2.6 qRT-PCR实验 实验方法参考课题组前期研究^[7,13],采用TRIzol法提取RNA并逆转录为cDNA,采用SYBR Green法检测相关基因表达。95 ℃预温10 min,95 ℃变性10 min为一循环,共40个循环,60 ℃作用10 s退火后,72 ℃作用10 s延伸以检测Wnt/β-catenin信号通路关键基因mRNA相对表达量,GAPDH作为内参,2^{-ΔΔCt}表示基因相对表达量。引物序列如下:
GAPDH: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3', 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3';
LEF1: 5'-CAA ATA AAG TGC CCG TGG TG-3',

5'-GGA CAT GCC TTG TTT GGA GT-3'; AXIN1: 5'-CAT GAC GGA CAG CAG TGT AGA TG-3', 5'-GGG TTC TCG GGA AAT GAG GTA G-3'; c-myc: 5'-CCA CAG CAA ACC TCC TCA CA-3', 5'-CTG ACA CTG TCC AAC TTG ACC C-3'; VEGF: 5'-ATC CAA TCG AGA CCC TGG TG-3', 5'-ATC TCT CCT ATG TGC TGG CC-3'; cyclin D1: 5'-CGG ACT ACA GGG GAG TTT TG-3', 5'-AGG AGG TTG GCA TCG GGG T-3'; survivin: 5'-GAA ACT GCG GAG AAA GTG CG-3', 5'-GAA TAA ACC CTG GAA GTG GTG C-3'。

1.2.7 CCK-8法检测细胞增殖 实验方法参考课题组前期研究^[7],96孔板中每孔接种1 × 10³细胞在细胞培养箱中培养72 h后加入CCK-8试剂10 μL,室温下孵育15 min后,获取每孔在450 nm处的读数并输入SPSS软件计算FH535对CRC-CSCs的半数抑制率浓度(IC₅₀)及时间作为后续研究使用浓度。

1.2.8 流式细胞术检测 Wnt/β-catenin 通路蛋白质表达

2 × 10⁵细胞使用BD穿膜液在室温下固定40 min,然后与1/100比例的一抗在4 ℃避光下孵育40 min;冷PBS洗涤后与FITC和APC标记的1:100二抗在37 ℃下孵育30 min;不添加一抗,直接与1:100二抗孵育设定为同型对照。冷PBS洗涤后细胞悬浮于500 μL PBS中,上机检测,获得数据使用FlowJo 10.0软件进行分析。平均荧光强度比值与蛋白质表达量成正比,平均荧光强度比值 = 样本平均荧光强度 / 对应同型对照样本平均荧光强度。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行分析。正态分布计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133⁺CD44⁺ CRC-CSCs 特征的鉴定

首先分选出CD133⁺CD44⁺细胞(图1A),再采用国际通用的成球实验来鉴定其肿瘤干细胞特征,数据显示:CD133⁺CD44⁺与CD133⁻CD44⁻细胞成球数量分别为324.33 ± 9.29,18.33 ± 3.06,差异有统计学意义($t = 54.19, P = 0.00$),与其他研究组结论相同^[16](图1B)。提示CD133⁺CD44⁺是研究CRC-CSCs可靠的细胞模型。

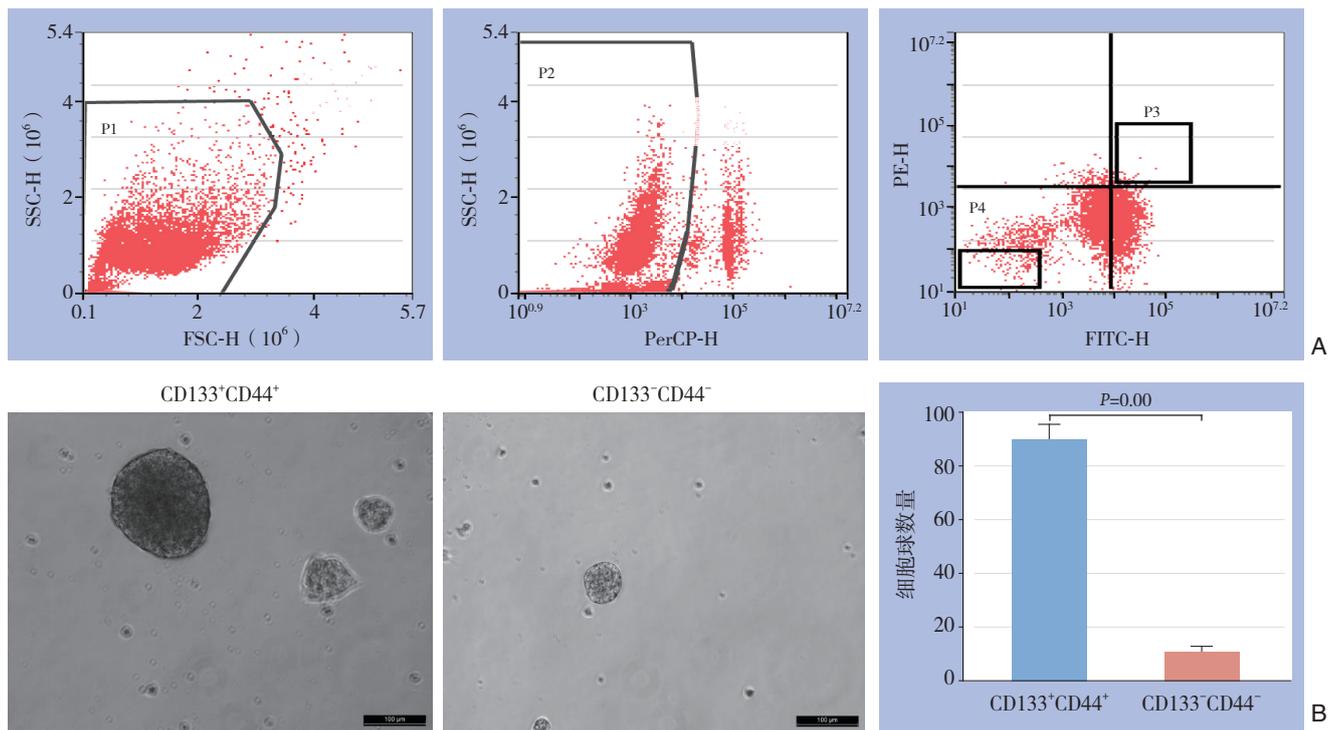


图1 CRC-CSCs的分选与鉴定 A: 流式细胞术分选 CD133⁺CD44⁺ (P3) 及 CD133⁻CD44⁻ (P4) 细胞; B: 成球实验检测细胞自我更新能力

Figure 1 Sorting and identification of CRC-CSCs A: Fluorescence-activated cell sorting for isolation of CD133⁺CD44⁺ (P3) and CD133⁻CD44⁻ (P4) cells; B: Sphere-forming assay for determination of self-renewal ability

2.2 FH535 药物浓度的确定

1×10^3 CRC-CSCs 接种于96孔板中, 使用不同浓度FH535作用0、24、48、72 h, 对照组不加入药物。采用CCK-8法检测酶标仪在450 nm处的读数输入SPSS 19.0软件计算确定FH535的IC₅₀为40 μmol/L, 并作为后续研究使用浓度。

2.3 FH535对CRC-CSCs自我更新能力的影响

采用成球实验及有限浓度稀释法检测CRC-CSCs自我更新能力的变化。成球实验数据显示: 实验组、对照组细胞球数量为 57.33 ± 5.03 、 313.67 ± 13.05 , 差异有统计学意义 ($t = -31.74$, $P = 0.00$); 有限浓度稀释法结果: 实验组、对照组CRC-CSCs成球比例分别为 $11.60/100 \pm 1.60/100$ 、 $75.50/100 \pm 3.98/100$, 差异有统计学意义 ($t = -25.81$, $P = 0.00$)。

2.4 FH535对CRC-CSCs迁移、侵袭能力的影响

采用传统的Transwell迁移、侵袭实验检测两组细胞迁移侵袭能力变化。实验组、对照组迁移细胞数分别为 10.66 ± 2.08 、 90.00 ± 5.00 ($t = -25.37$, $P = 0.00$); 侵袭细胞数分别为 8 ± 1 、 20 ± 5 ($t = -4.08$, $P = 0.015$) (图2A)。由于CRC-CSCs数量较少, 进一步采用RTCA平台实时检测细胞在25 h后的迁移侵袭能力变化。实

验组、对照组迁移细胞指数分别为 0.17 ± 0.05 、 0.37 ± 0.09 ($t = 3.38$, $P = 0.03$); 侵袭细胞指数分别为 0.14 ± 0.04 、 0.37 ± 0.07 ($t = -5.05$, $P = 0.007$) (图2B)。

2.5 FH535对CRC-CSCs中Wnt/β-catenin通路的影响

最后对FH535抑制CSCs自我更新、迁移侵袭能力的机制进行探讨, 通过qRT-PCR及流式细胞术分别检测了Wnt/β-catenin通路关键基因LEF1、AXIN1及下游基因c-myc、VEGF、cyclin D1、survivin的mRNA及蛋白质表达变化^[17]。qRT-PCR数据显示: 实验组、对照组中LEF1、AXIN1、c-myc、VEGF、cyclin D1、survivin的mRNA相对表达量分别为 1.15 ± 0.14 、 1.72 ± 0.18 、 1.38 ± 0.46 、 1.72 ± 0.06 、 1.12 ± 0.12 、 1.27 ± 0.04 及 2.33 ± 0.22 、 3.19 ± 0.32 、 2.22 ± 0.28 、 3.95 ± 0.09 、 2.61 ± 0.07 、 1.98 ± 0.03 ($t = -7.871$ 、 -7.02 、 -5.07 、 -20.39 、 -16.10 、 -24.60 , 均 $P < 0.00$)。流式细胞术检测蛋白质数据显示: 实验组、对照组中LEF1、AXIN1、c-myc、VEGF、cyclin D1、survivin的蛋白质相对表达量为 0.48 ± 0.07 、 0.82 ± 0.05 、 0.38 ± 0.05 、 1.38 ± 0.06 、

0.67 ± 0.08、0.27 ± 0.06 及 1.27 ± 0.07、1.56 ± 0.11、0.90 ± 0.02 (t=-13.79、-21.68、1.70 ± 0.05、0.93 ± 0.07、2.30 ± 0.31、-11.16、-4.94、-11.19、-18.45, 均P<0.01) (图3)。

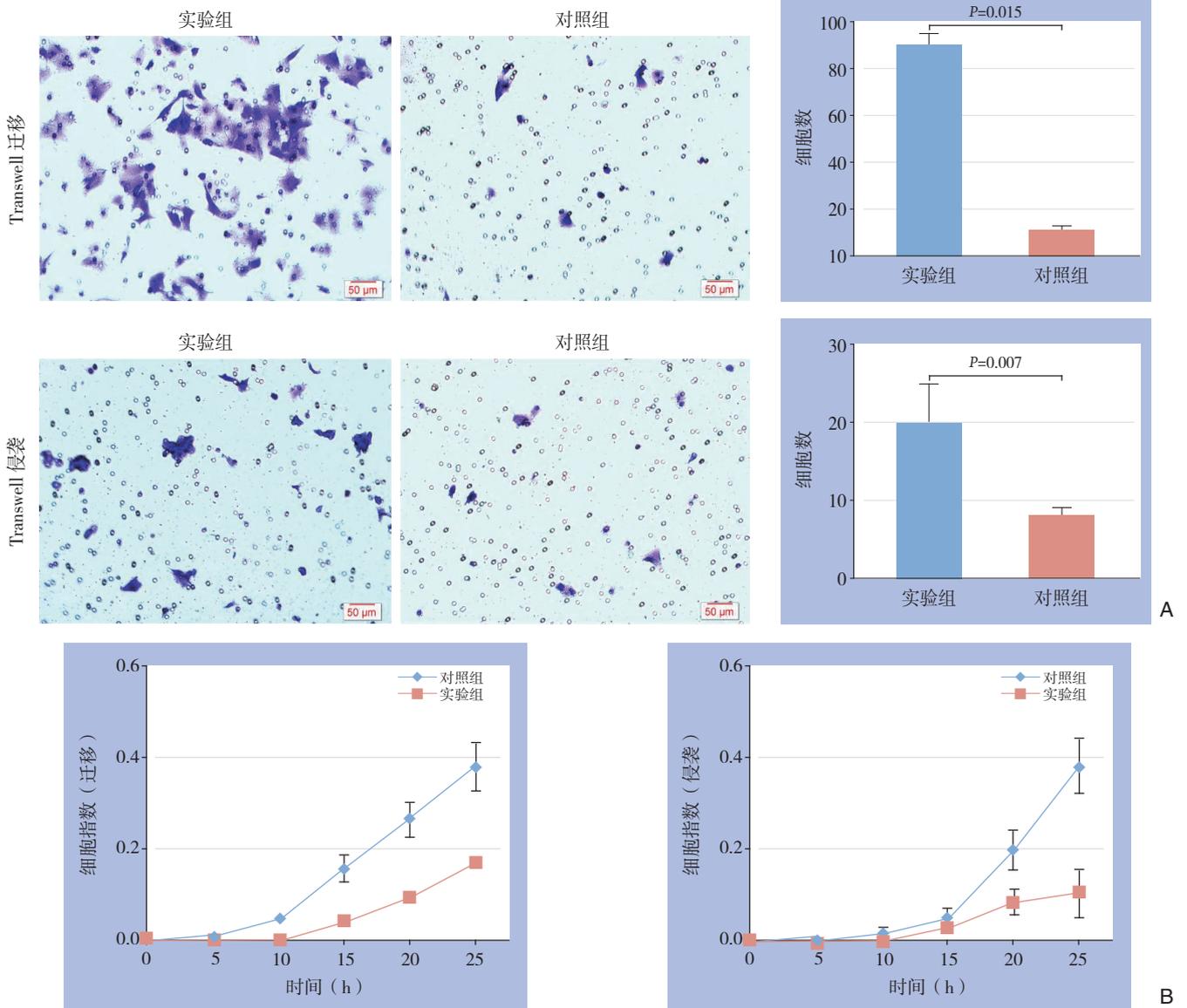


图 2 细胞迁移、侵袭能力检测 A: Transwell 法; B: RTCA

Figure 2 Measurement of migration and invasion abilities A: Transwell assay; B: RTCA

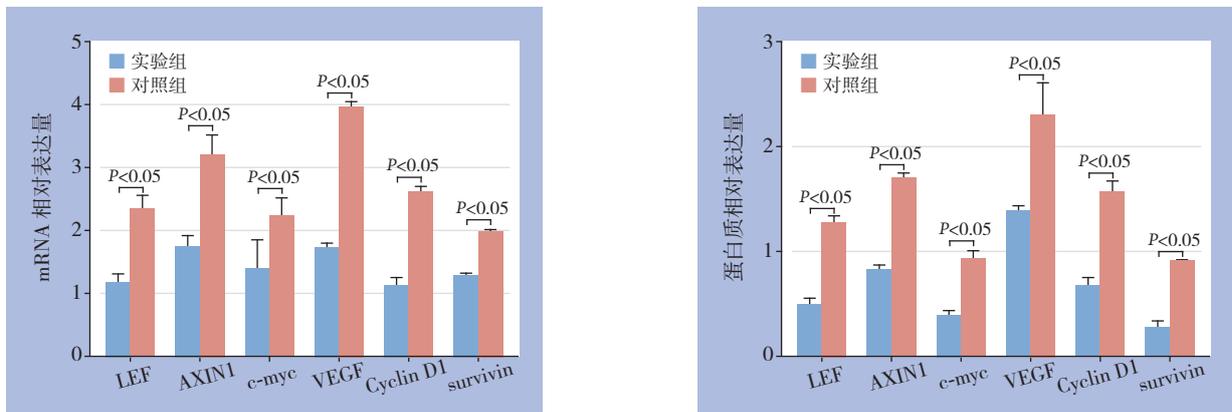


图 3 qRT-PCR 及流式细胞术检测细胞 mRNA 及蛋白质表达

Figure 3 Detection of the the mRNA and protein expressions by qRT-PCR and flow cytometry

3 讨论

大量研究^[18-19]证实Wnt/ β -catenin通路的异常激活是导致结直肠癌发生、进展的关键因素,因此Wnt/ β -catenin通路已经成为结直肠癌治疗的关键靶点。一部分Wnt/ β -catenin通路抑制剂例如OMP-18R5、OMP-54F28、PRI-724等已经进入结直肠癌治疗的临床实验^[20]。与上述抑制剂机制不同的是, FH535通过抑制激活因子GRIP1和 β -catenin对PPAR γ 和PPAR δ 的募集作用,进一步抑制 β -catenin/TCF-转录,最终导致Wnt/ β -catenin通路抑制发挥抗肿瘤效应^[10, 21-22]。

最新研究^[23]证明, CSCs介导了肿瘤的耐药、迁移侵袭及转移复发。目前已有FH535抑制普通肿瘤细胞恶性行为的研究,但在决定肿瘤预后的CSCs中却未见相关报道。故本研究通过流式细胞术分选出CD133⁺CD44⁺的CRC-CSCs,探讨FH535对CSCs自我更新、迁移侵袭的影响及机制。细胞通过自我更新产生至少一个完全保留干性特征子代细胞,以维持其干细胞潜能;同时获得另外一个肿瘤细胞以促进肿瘤细胞群的生长^[24]。研究已经证实,自我更新能力是CSCs介导肿瘤转移复发的根源。本研究通过成球实验及有限浓度稀释法证实FH535作用后CRC-CSCs自我更新能力受到明显抑制。

肿瘤细胞由原发病灶处脱离,通过淋巴系统、血液循环等途径在转移器官中定植并继续增殖形成转移灶。细胞的迁移侵袭能力是决定CSCs能否转移成功的最重要因素之一,因此本研究观察FH535是否对CRC-CSCs迁移侵袭能力产生直接影响。本研究Transwell迁移侵袭实验及实时迁移侵袭实验均提示, FH535作用CRC-CSCs后,细胞迁移侵袭能力明显被削弱。最后,本研究探讨FH535抑制CRC-CSCs自我更新、迁移侵袭的分子机制。qRT-PCR结果显示, FH535作用CRC-CSCs后,细胞中Wnt/ β -catenin信号通路基因LEF1、AXIN1及下游基因c-myc、VEGF、cyclin D1及survivin的mRNA表达明显下调;而后通过流式细胞术检测了上述基因蛋白质表达变化,与mRNA表达情况一致。传统的蛋白质检测多采用Western blot技术,该技术操作流程相对简单,对实验设备要求不高,但检测需要2~3 d、所需细胞大概为1~2 \times 10⁶个细胞/样本。而课题组研究提示CRC-CSCs所占比例极小(0.5%左右),甚至无法检

测,采用Western blot技术检测蛋白质无疑十分困难。所以本课题组采用高灵敏度的流式细胞术检测蛋白质表达。流式细胞术检测蛋白质由于技术含量相对较高而没有广泛开展,但其具有操作时间短、所需样本少、检测更加准确的优势,该技术只需要1 \times 10⁵个细胞/2样本在3 h内即可获取蛋白质表达数据,其检测精度并不亚于Western blot技术^[25-26]。

综上,本研究在纯化的CRC-CSCs中发现FH535可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路活性,最终导致CSCs自我更新、迁移侵袭能力明显削弱。结果可能为靶向抑制CSCs介导的肿瘤转移复发提供新的思路。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442.
- [2] 陈校力, 罗庆伟, 周志军, 等. 腹腔镜手术联合新辅助化疗在结直肠癌治疗中的作用[J]. *川北医学院学报*, 2018, 33(2):261-263. doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2018.02.032.
Chen XL, Luo QW, Zhou ZJ, et al. Effect of laparoscopic surgery combined with neoadjuvant chemotherapy in treatment of colorectal cancer[J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2018, 33(2):261-263. doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2018.02.032.
- [3] 张乐, 刘凯东, 刘铭, 等. 腹腔镜微创手术对老年直肠癌患者生理耐受性、生存质量及3年随访预后观察[J]. *川北医学院学报*, 2018, 33(3):364-368. doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2018.03.018.
Zhang L, Liu KD, Liu M, et al. The physiological tolerance, quality of life and prognosis of laparoscopic surgery for elderly patients with rectal cancer in the past 3 years[J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2018, 33(3):364-368. doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2018.03.018.
- [4] Yamashita S, Chun YS, Kopetz SE, et al. Biomarkers in colorectal liver metastases[J]. *Br J Surg*, 2018, 105(6): 618-627. doi: 10.1002/bjs.10834.
- [5] Medema JP. Targeting the Colorectal Cancer Stem Cell[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9): 888-890. doi: 10.1056/NEJMcibr1706541.
- [6] 吕阳, 许戈良. 肿瘤干细胞与肿瘤转移的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(3):359-362. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.021.
Lu Y, Xu GL. Relationship between cancer stem cells and tumor metastasis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2013, 22(3):359-362. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.03.021.
- [7] Leng Z, Tao K, Xia Q, et al. Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells[J]. *PLoS*

- One, 2013,8(2): e56082. doi: 10.1371/journal.pone.0056082.
- [8] 张能, 王子卫. Wnt/ β -catenin通路与KLF4在胃肠道肿瘤中的作用及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(10):1109–1112.
Zhang N, Wang ZW. Therole of Wnt/ β -catenin pathway and KLF4 on gastrointestinal tumors and its mechanism[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2011, 20(10):1109–1112.
- [9] 陈志雄, 洪钟时, 邱成志, 等. 人结肠癌细胞中高尔基磷酸蛋白3表达与Wnt信号通路的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(10):1444–1449. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2016.10.013.
Chen ZX, Hong ZS, Qiu CZ, et al. Relationship between Golgi phosphoprotein 3 expression and Wnt signaling pathway in human colon cancer cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(10):1444–1449. doi:10.3978/j.issn.1005–6947.2016.10.013.
- [10] Shi M, Cheng J, He Y, et al. Effect of FH535 on in vitro maturation of porcine oocytes by inhibiting WNT signaling pathway[J]. Anim Sci J, 2018,89(4):631–639. doi: 10.1111/asj.12982.
- [11] Liu X, Du P, Han L, et al. Effects of miR-200a and FH535 combined with taxol on proliferation and invasion of gastric cancer[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(3): 442–449. doi: 10.1016/j.prp.2017.12.004.
- [12] Chen Y, Rao X, Huang K, et al. FH535 Inhibits Proliferation and Motility of Colon Cancer Cells by Targeting Wnt/ β -catenin Signaling Pathway[J]. J Cancer, 2017, 8(16): 3142–3153. doi: 10.7150/jca.19273.
- [13] Leng Z, Yang Z, Li L, et al. A reliable method for the sorting and identification of ALDH(high) cancer stem cells by flow cytometry[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 2801–2808. doi: 10.3892/etm.2017.4846.
- [14] Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. Dev Biol, 1996, 175(1):1–13. doi: 10.1006/dbio.1996.0090.
- [15] Leng Z, Xia Q, Chen J, et al. Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(2): 860–872. doi: 10.1159/000488743.
- [16] Zhou JY, Chen M, Ma L, et al. Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 7657–7666. doi: 10.18632/oncotarget.7084.
- [17] Zhao YX, Liu JF, Sun WJ, et al. Long non-coding RNA-ENST00000434223 suppresses tumor progression in gastric cancer cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2018,120(Pt A):491–501. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.079.
- [18] Lee SK, Hwang JH, Choi KY. Interaction of the Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways involving co-stabilization of both β -catenin and RAS plays important roles in the colorectal tumorigenesis[J]. Adv Biol Regul, 2018, 68:46–54. doi: 10.1016/j.jbior.2018.01.001.
- [19] Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY. Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin pathway[J]. NPJ Precis Oncol, 2018, 2(1):5. doi: 10.1038/s41698–018–0049-y.
- [20] Novellasademunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2015, 309(8):C511–521. doi: 10.1152/ajpcell.00117.2015.
- [21] Gustafson CT, Mamo T, Shogren KL, et al. FH535 Suppresses Osteosarcoma Growth In Vitro and Inhibits Wnt Signaling through Tankyrases[J]. Front Pharmacol, 2017,8:285. doi: 10.3389/fphar.2017.00285.
- [22] Wen D, Liao T, Ma B, et al. Downregulation of CSN6 attenuates papillary thyroid carcinoma progression by reducing Wnt/ β -catenin signaling and sensitizes cancer cells to FH535 therapy[J]. Cancer Med, 2018, 7(2):285–296. doi: 10.1002/cam4.1272.
- [23] Jin X, Jin X, Kim H. Cancer stem cells and differentiation therapy[J]. Tumour Biol, 2017, 39(10):1010428317729933. doi: 10.1177/1010428317729933.
- [24] Zhang D, Tang DG, Rycaj K. Cancer stem cells: Regulation programs, immunological properties and immunotherapy[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 2):94–106. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.05.001.
- [25] Bardet V, Tamburini J, Ifrah N, et al. Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry[J]. Haematologica, 2006, 91(6):757–764.
- [26] Grafone T, Palmisano M, Nicci C, et al. Monitoring of FLT3 phosphorylation status and its response to drugs by flow cytometry in AML blast cells[J]. Hematol Oncol, 2008, 26(3):159–166. doi: 10.1002/hon.854.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 成蕾, 肖云峰, 李孝琼, 等. FH535对结直肠癌肿瘤干细胞自我更新及侵袭迁移的抑制作用及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(10):1288–1294. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2018.10.011

Cite this article as: Cheng L, Xiao YF, Li XQ, et al. Inhibitory effect of FH535 on self-renewal, migration and invasion of colorectal cancer stem cells and the mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2018, 27(10):1288–1294. doi:10.7659/j.issn.1005–6947.2018.10.011