

研究论文

盐霉素抑制急性早幼粒细胞白血病细胞增殖并诱导分化

赵毅^{1,2} 刘北忠^{1,2} 姚仕菲^{1,2} 刘路² 陈敏^{1,2} 李连文¹ 肖春兰^{1,2}单志灵² 淦柳根^{1,2} 徐婷^{1,2} 钟梁^{2*}¹重庆医科大学附属永川医院, 中心实验室, 重庆 402160;²重庆医科大学, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨盐霉素(salinomycin, SAL)对急性早幼粒细胞白血病NB4细胞增殖和分化的影响及其可能的机制。采用CCK-8(cell counting kit-8)实验检测细胞增殖, 瑞氏染色观察细胞形态学变化, 流式细胞术检测粒细胞分化标志物CD11b的表达, Western blot检测相关蛋白质水平变化。结果显示, SAL抑制了细胞增殖; SAL作用72 h后, 细胞呈现典型分化形态学改变。随着SAL的浓度升高, CD11b阳性的细胞比例以及CD11b、C/EBP β 蛋白质水平逐渐增加。此外, SAL降低了 β -catenin以及下游分子C-myc、Cyclin D1的蛋白质水平。该研究还探讨了联合使用Wnt/ β -catenin信号通路的抑制剂IWR-1与SAL对细胞分化的影响。结果显示, 与单独使用SAL相比, 联合使用SAL和IWR-1促进了SAL诱导的NB4细胞分化。该研究结果提示, SAL可抑制NB4细胞的增殖, 并可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路诱导细胞分化。

关键词 急性早幼粒细胞白血病; 盐霉素; 细胞增殖; 细胞分化; Wnt/ β -catenin信号通路

Salinomycin Inhibits Acute Promyelocytic Leukemia Cells Proliferation and Induces Differentiation

Zhao Yi^{1,2}, Liu Beizhong^{1,2}, Yao Shifei^{1,2}, Liu Lu², Chen Min^{1,2}, Li Lianwen¹, Xiao Chunlan^{1,2},Shan Zhiling², Gan Liugen^{1,2}, Xu Ting^{1,2}, Zhong Liang^{2*}

(¹Central Laboratory, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study is aimed to investigate the effects of salinomycin (SAL) on cell proliferation and differentiation in acute promyelocytic leukemia cell line NB4 and its potential mechanisms. In this study, cell proliferation was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and cell morphological changes was evaluated by performing Wright Giemsa staining. The expression of cell surface differentiation marker CD11b was detected by flow cytometry. The protein levels of CD11b, C/EBP β , β -catenin, C-myc and Cyclin D1 were detected by Western blot. The results indicated that SAL significantly inhibited cell proliferation, cells displayed morphological features of differentiation after treated with SAL for 72 h. SAL treatment significantly increased the percentage

收稿日期: 2017-07-24 接受日期: 2017-09-11

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485388, E-mail: 530659075@qq.com

Received: July 24, 2017 Accepted: September 11, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Natural Science Foundation of Major Project of Chongqing (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485388, E-mail: 530659075@qq.com

网络出版时间: 2017-10-25 17:57:04 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171025.1757.026.html>

of CD11b-positive cells and protein levels of CD11b and C/EBP β in a dose-dependent manner. In addition, SAL decreased the protein levels of β -catenin, C-myc and Cyclin D1. This study also investigated the effect of combined treatment of IWR-1, which was an inhibitor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and SAL on cell differentiation. Compared with SAL treatment alone, the combination with SAL and IWR-1 promoted NB4 cell differentiation induced by SAL. These results suggest that SAL effectively inhibits cell proliferation and promotes cell differentiation possibly by blocking of Wnt/ β -catenin signaling.

Keywords acute promyelocytic leukemia; salinomycin; cell proliferation; cell differentiation; Wnt/ β -catenin signaling

急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的一种特殊类型, 其特点是 t(15; 17) (q22; q21) 染色体易位, 产生早幼粒细胞白血病维甲酸受体 α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha, *PML-RAR α*) 融合基因^[1]。因早期易并发出血且死亡率高, APL 曾被认为是最凶险的白血病类型。随着全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 和三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 的运用, APL 的治疗取得重大进展, 目前 APL 病人经治疗后缓解率可达 90% 以上^[2]。但目前 APL 治疗仍存在一些挑战, 如研究表明 5%~20% APL 病人存在复发、ATRA 引起的分化综合征、ATO 的毒副作用等^[3-5]。因此, 探索一些新的辅助治疗策略以进一步提高 APL 病人预后是十分必要的。

盐霉素 (salinomycin, SAL) 是一种离子载体抗生素。2009 年, 科学家通过对 16 000 种化合物进行筛选发现, SAL 可以作用于乳腺癌干细胞, 且其作用比传统化疗药物紫杉醇强 100 倍^[6]。近年来研究发现, SAL 可作用于多种肿瘤细胞, 包括胃癌、前列腺癌和乳腺癌等^[7]。肿瘤干细胞的存在可能是肿瘤复发耐药的原因, 研究发现, SAL 对肿瘤干细胞也具有作用^[7-8]。在白血病中, SAL 通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路诱导了慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 细胞凋亡^[9]; Fuchs 等^[10]证明, SAL 可作用于类似白血病干细胞的 KG-1a 细胞株。最近研究发现, 低剂量 SAL 具有明显的抗白血病作用, 且对正常单个核细胞没有明显毒副作用^[11]。这些研究均表明, SAL 是一种潜在的抗白血病药物。

目前, 关于 SAL 的抗白血病作用主要集中在其细胞毒性, 如抑制细胞增殖、诱导凋亡, 还未有关于 SAL 诱导白血病细胞分化的文献报道。因此, 本研究旨在探讨 SAL 对白血病细胞分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SAL 和 ATRA 分别购于 MedChem Express 和 Sigma 公司, 均溶解于二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 中并于 -80 °C 保存待用。人早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 细胞由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于 Gibco 公司。CCK-8 试剂盒购于上海七海复泰生物科技有限公司。瑞氏-吉姆萨染液购于北京索莱宝生物科技有限公司。PE 标记 CD11b 流式抗体购于 Biolegend 公司。兔抗人 CD11b 单克隆抗体购于 Abcam 公司; 兔抗人增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer-binding protein beta, C/EBP β) 多克隆抗体购于万类生物科技有限公司; 兔抗人 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 单克隆抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司。小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔或鼠 IgG 二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

NB4 细胞接种于含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL) 的 RPMI 1640 培养基中, 并置于 37 °C、含 5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 CCK-8 实验

取对数生长期细胞按 1×10^5 /mL 的浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L。加入 SAL 使其终浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μ mol/L, 同时设置 DMSO 阴性对照组、空白对照组 (仅有培养基), 每组设置 5 个复孔。常规培养指定时间后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂继续培养 2 h 后, 于 450 nm 波长下测定每孔吸光度 (*D*) 值。细胞活性率 (%) = (*D*_{实验组} - *D*_{空白组}) / (*D*_{对照组} - *D*_{空白组}) $\times$ 100%。

实验独立重复3次。

1.4 瑞氏-吉姆萨染色实验

0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用NB4细胞72 h后, 收集细胞并用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗3次, 适量PBS(100 μL)重悬细胞。取10 μL 细胞悬液进行涂片, 晾干后瑞氏染液染色。待晾干后显微镜下观察各组细胞形态并拍照。

1.5 流式细胞术检测CD11b表达

NB4细胞经0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA作用72 h后, 离心收集细胞并用预冷的PBS洗3次。100 μL PBS重悬细胞, 并加入5 μL CD11b-PE荧光抗体避光孵育30 min。经PBS洗涤3次后, 流式细胞仪检测各组CD11b表达情况。

1.6 Western blot

分别收集对照组和处理组细胞并提取总蛋白, BCA法检测蛋白质浓度。等量蛋白质样品(30或50 μg)经SDS-PAGE分离后, 转移至PVDF膜, 用5%脱脂奶粉封闭2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗(1:1 000)过夜, 洗膜后室温孵育HRP标记二抗(1:4 000)1 h, 再次洗膜后ECL化学发光显影。以 β -actin作为内参, 实验独立重复3次。

1.7 数据分析

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, 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), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SAL对NB4细胞增殖的影响

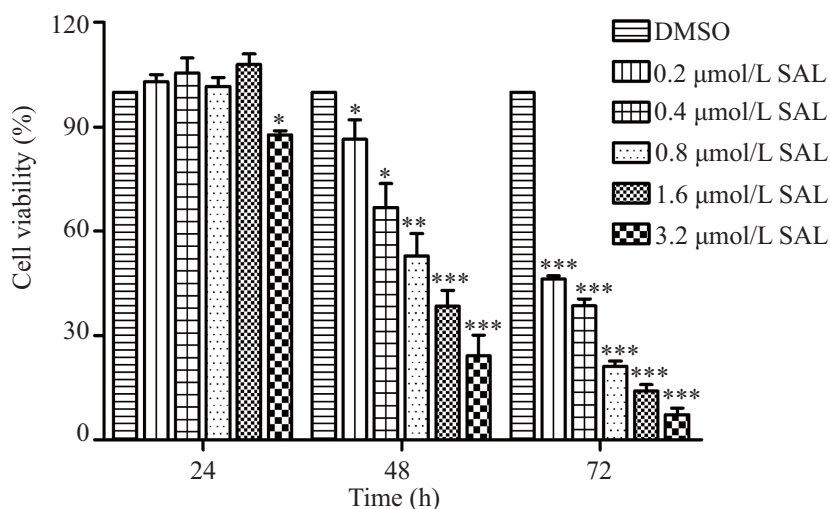
分别用0(DMSO)、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 $\mu\text{mol/L}$ 的SAL处理NB4细胞24、48、72 h后, CCK-8检测细胞增殖情况。结果显示, SAL处理24 h后, 细胞活性没有受到明显影响, 仅高浓度(3.2 $\mu\text{mol/L}$)SAL抑制了细胞的增殖($P < 0.05$)。但48或72 h后, SAL明显抑制了细胞的增殖且呈浓度依赖的方式($P < 0.05$), 其 IC_{50} 分别为0.96 $\mu\text{mol/L}$ 和0.20 $\mu\text{mol/L}$ (图1)。

2.2 SAL对NB4细胞表面分化抗原CD11b表达的影响

为探讨SAL对NB4细胞分化的影响, 我们分别用0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的SAL处理NB4细胞, 同时设置阴性对照组(DMSO组)和阳性对照组(ATRA组)。72 h后收集细胞, 流式细胞术检测粒细胞表面分化标志物CD11b的表达情况。结果显示, 阴性对照组细胞中, CD11b阳性的细胞比例为 $4.73\% \pm 1.35\%$, 0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL和1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理后其比例分别为 $30.11\% \pm 6.12\%$ 、 $45.47\% \pm 7.40\%$ 、 $55.05\% \pm 6.69\%$ 、 $81.28\% \pm 10.51\%$ 。此结果表明, SAL呈浓度依赖地诱导了NB4细胞的分化(图2)。

2.3 SAL对NB4细胞形态学的影响

细胞形态学观察显示, 阴性对照组(DMSO组)细胞呈现早幼粒细胞形态学改变: 细胞核较大, 呈圆形或椭圆形, 细胞核/细胞质比例大。经SAL或ATRA处理后, 细胞核明显变小凹陷, 细胞核/细胞质

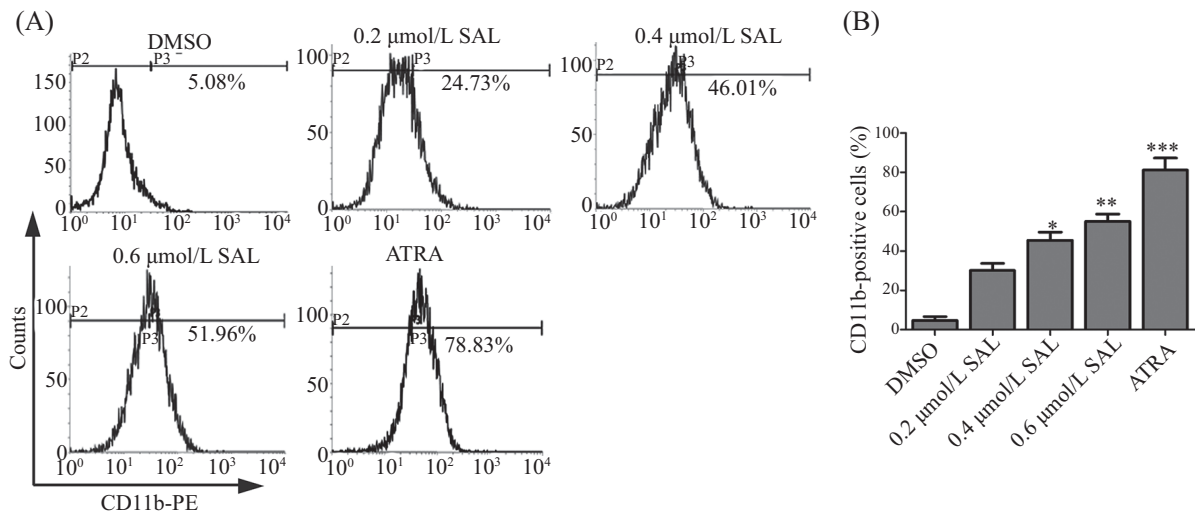


CCK-8检测NB4细胞的增殖情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组(DMSO组)比较。

The viability of NB4 cells was determined by CCK-8. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (DMSO) group.

图1 盐霉素对NB4细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of SAL on the proliferation of NB4 cells

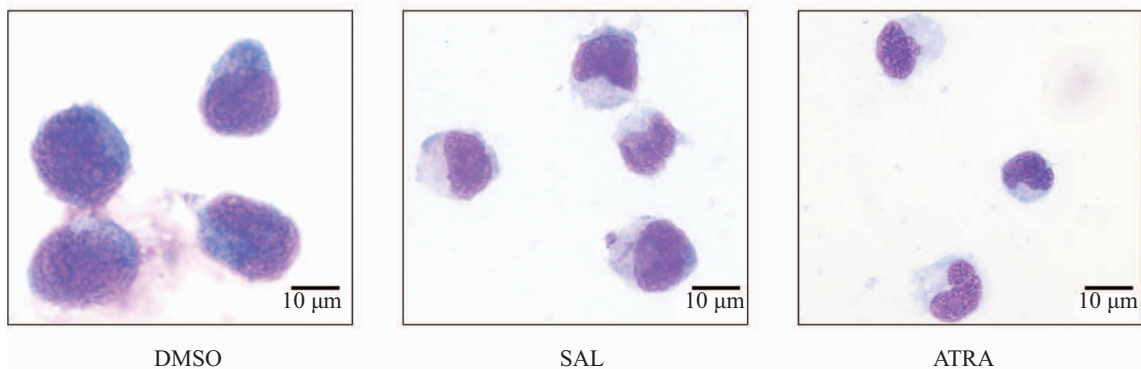


A: 0(DMSO)、0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理NB4细胞72 h后, 流式细胞术检测CD11b表达情况。B: 统计学分析CD11b表达比例。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组(DMSO组)比较。

A: NB4 cells were treated with 0 (DMSO), 0.2, 0.4, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL or 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA, then the expression of CD11b was detected by flow cytometry; B: CD11b expression rate was analysed by statistics. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control (DMSO) group.

图2 盐霉素对NB4表面分化抗原CD11b表达的影响

Fig.2 Effect of SAL on the expression of granulocyte surface differentiation antigen CD11b in NB4 cells



分别用 0(DMSO)、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL、1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理NB4细胞72 h, 瑞氏-吉姆萨染色后显微镜观察细胞形态。

NB4 cells were treated with 0 (DMSO), 0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL or 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA for 72 h, then cell morphological changes were imaged with a microscope after stained with Wright-Giemsa solution.

图3 SAL对NB4细胞形态学的影响

Fig.3 Effect of SAL on the morphology of NB4 cells

比例减小, 细胞形态学类似中晚幼粒细胞(图3)。形态学变化结果也表明, SAL诱导了NB4细胞的分化。

2.4 SAL对NB4细胞相关分化蛋白质水平的影响

NB4细胞经SAL或ATRA处理72 h后, Western blot结果表明, 与阴性对照组相比, 粒系表面分化标志物CD11b以及髓系分化标志蛋白C/EBP β 的水平表达明显增加($P<0.05$)(图4)。此结果进一步证明, SAL诱导了NB4细胞的分化。

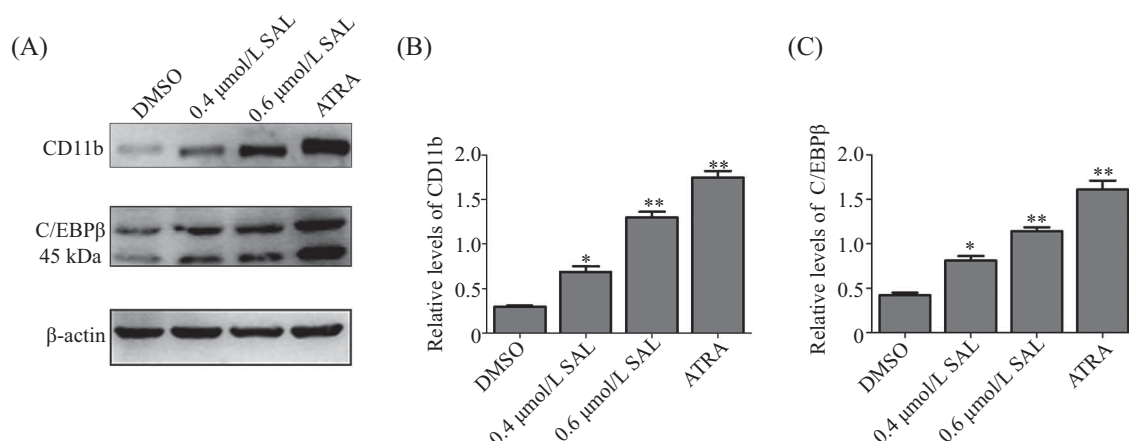
2.5 SAL对Wnt/ β -catenin通路的影响

Western blot结果显示, 在SAL浓度为0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时,

β -catenin以及C-myc、Cyclin D1的表达与对照组相比无明显变化; 但当浓度为0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时, SAL下调了 β -catenin以及C-myc、Cyclin D1的水平($P<0.05$)。此结果表明, SAL诱导NB4细胞分化时抑制了Wnt/ β -catenin途径。此外, ATRA也抑制了这些蛋白质水平($P<0.01$)(图5)。

2.6 IWR-1促进了SAL诱导的NB4细胞分化

为进一步探讨SAL诱导细胞分化的机制, 我们用0(DMSO)、10 $\mu\text{mol/L}$ IWR-1、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL以及两者联用或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA分别处理NB4细

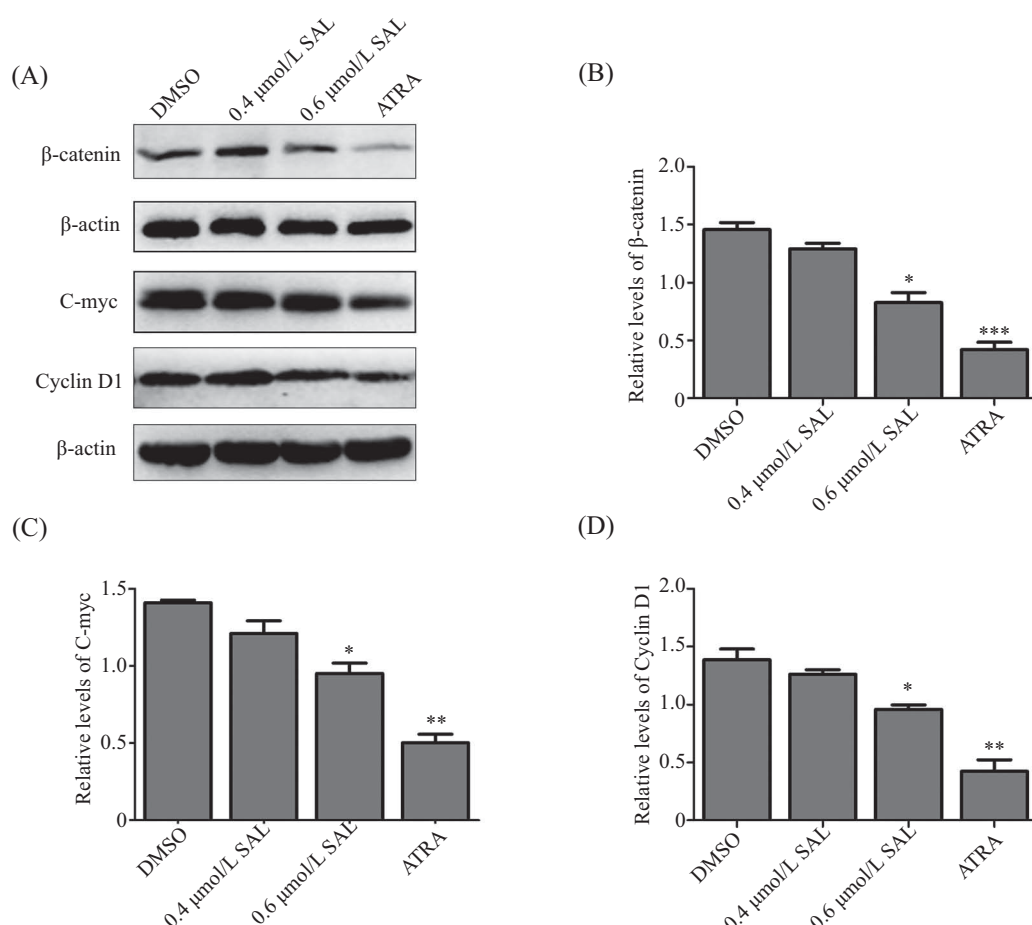


A: 分别用0(DMSO)、0.4、0.6 μmol/L SAL或1 μmol/L ATRA处理NB4细胞72 h后, Western blot检测CD11b、C/EBPβ蛋白水平; B、C: 各组细胞中CD11b、C/EBPβ的相对水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(DMSO组)比较。

A: NB4 cells were treated with 0 (DMSO), 0.4, 0.6 μmol/L SAL or 1 μmol/L ATRA for 72 h, then the levels of CD11b and C/EBPβ were determined by Western blot; B,C: the relative levels of CD11b, C/EBPβ proteins were analysed by statistics, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (DMSO) group.

图4 SAL对NB4细胞相关分化蛋白的影响

Fig.4 Effect of SAL on the expressions of differentiation related proteins in NB4 cells

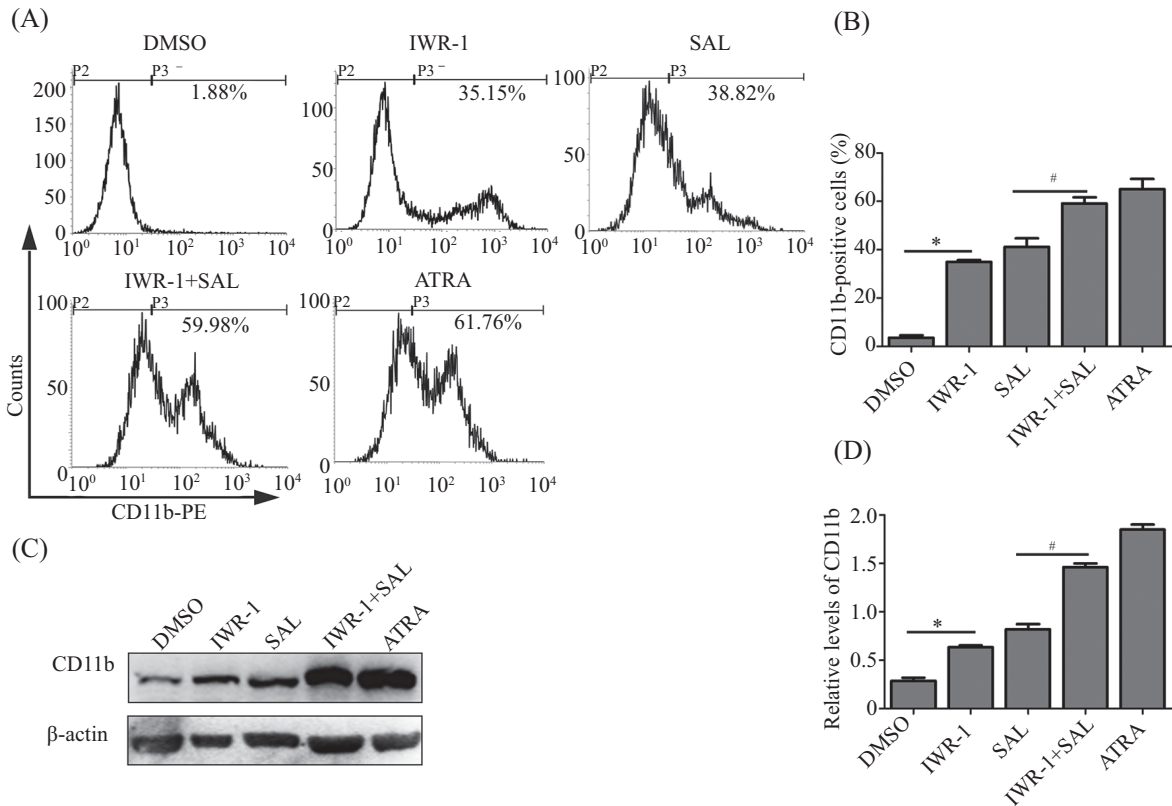


A: 0(DMSO)、0.4、0.6 μmol/L SAL或1 μmol/L ATRA处理NB4细胞72 h后, Western blot检测β-catenin、C-myc、Cyclin D1的蛋白水平; B~D: 各组细胞中β-catenin、C-myc、Cyclin D1的相对水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组(DMSO组)比较。

A: NB4 cells were treated with 0 (DMSO), 0.4, 0.6 μmol/L SAL or 1 μmol/L ATRA for 72 h, then the levels of β-catenin, C-myc, Cyclin D1 were determined by Western blot; B-D: the relative levels of β-catenin, C-myc, Cyclin D1 proteins were analysed by statistics, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (DMSO) group.

图5 SAL对NB4细胞Wnt/β-catenin通路的影响

Fig.5 Effect of SAL on Wnt/β-catenin signaling in NB4 cells



0(DMSO)、10 $\mu\text{mol/L}$ IWR-1、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL或两者联用或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA分别处理NB4细胞72 h。A: 流式细胞术检测各组CD11b表达情况; B: 统计学分析CD11b表达比例; C: Western blot 检测CD11b的蛋白水平; D: 各组细胞中CD11b的相对水平。* $P<0.05$, # $P<0.05$ 。NB4 cells were treated with 0 (DMSO), 10 $\mu\text{mol/L}$ IWR-1, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL or both or 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA for 72 h. A: the expressions of CD11b were detected by flow cytometry; B: CD11b expression rate was analysed by statistics; C: the levels of CD11b were determined by Western blot; D: the relative levels of CD11b protein were analysed by statistics; * $P<0.05$, # $P<0.05$ 。

图6 IWR-1促进SAL诱导的NB4细胞分化

Fig.6 IWR-1 promoted NB4 cell differentiation induced by SAL

胞72 h后, 经流式细胞术检测CD11b表达。我们发现, 阴性对照组细胞中CD11b阳性的细胞比例为 $3.62\% \pm 1.67\%$, 10 $\mu\text{mol/L}$ IWR-1、0.6 $\mu\text{mol/L}$ SAL或两者联用或1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA处理后其比例分别为 $34.94\% \pm 1.45\%$ 、 $41.16\% \pm 6.25\%$ 、 $59.07\% \pm 4.43\%$ 、 $65.10\% \pm 7.21\%$ (图6)。此外, Western blot结果也证明, 单独使用IWR-1提高了CD11b的水平($P<0.01$), 联合使用IWR-1与SAL时CD11b的蛋白质水平较单独使用SAL高($P<0.05$), 表明IWR-1促进了SAL诱导的NB4细胞分化。

3 讨论

APL的主要特点是白血病细胞持续增殖、异常增多和细胞分化阻滞在早幼粒阶段。目前, APL的治疗以ATRA和ATO为主, 其主要机制为ATRA诱导细胞分化, ATO诱导细胞凋亡与分化。因此, 诱导细胞分化是APL治疗的一重要策略。虽然目前APL

的治疗取得重大进展, 但仍有部分患者存在严重并发症以及耐药、复发等情况。因此, 仍有必要寻找新的APL辅助治疗药物。SAL是一种从白色链霉菌中提取的离子载体抗生素, 具有杀死革兰阳性菌和抗禽类球虫病的作用^[12]。近年来研究表明, 盐霉素是一种潜在的抗白血病药物, 具有诱导类白血病干细胞株KG-1a细胞株以及CLL细胞凋亡的作用^[9-10]。Roulston等^[11]从细胞以及动物模型水平均证明了低剂量SAL具有明显的抗白血病作用, 且对人以及鼠正常单个核细胞不具有明显毒副作用。但目前关于SAL的抗白血病作用主要在于其细胞毒性, 尚未有关于SAL诱导APL细胞分化的文献报道。因此, 本研究探讨了SAL对APL细胞株NB4细胞的增殖、分化影响及其可能的机制, 发现SAL可以抑制NB4细胞的增殖, 且呈剂量依赖性。经SAL处理72 h后, 细胞呈现典型的分化形态学改变。此外, SAL增加了粒细胞表面分化标志物CD11b以及髓系分化标志物

C/EBP β 的表达。以上结果说明, SAL具有诱导NB4细胞分化的作用。

细胞分化是一个由多种途径调控的复杂过程。近年研究发现, Wnt/ β -catenin信号通路在AML中存在异常活化并与白血病的发生发展密切相关, 抑制Wnt/ β -catenin通路可能是白血病的潜在治疗靶点^[13]。 β -catenin是Wnt/ β -catenin信号通路的核心因子, 其在AML中存在异常激活。高表达的 β -catenin会抑制自噬从而抑制白血病细胞的分化^[14], shRNA介导 β -catenin下调促进了ATRA诱导的HL-60细胞分化^[15]。也有文献报道, 活化Wnt途径抑制了白血病细胞的分化^[16]。近年研究证明, SAL也是一种Wnt/ β -catenin信号通路的抑制剂。因此, 我们推测SAL可能通过抑制Wnt途径诱导了白血病细胞的分化。 β -catenin是经典Wnt信号通路的核心因子, 其在胞质聚集入核后会启动下游靶基因如*C-myc*、*Cyclin D1*的表达^[17]。通过检测 β -catenin、C-myc、Cyclin D1的水平, 我们发现, SAL抑制了Wnt/ β -catenin通路。此外, ATRA作为公认的诱导APL细胞分化的药物也明显抑制了Wnt/ β -catenin信号通路。IWR-1是一种Wnt通路抑制剂, 其可通过稳定Axin骨架破坏复合体来促进 β -catenin磷酸化, 进而促进 β -catenin的降解^[18-19]。已有文献报道, IWR-1可诱导AML细胞株HL-60分化, 并促进ATRA诱导的HL-60细胞分化^[20]。为进一步了解SAL诱导细胞分化的机制, 我们观察了SAL联合IWR-1对NB4细胞分化的影响, 发现与单独使用SAL相比, 联合使用IWR-1与SAL促进了SAL诱导的细胞分化。以上结果均表明, SAL可能通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路诱导NB4细胞的分化。

综上所述, SAL可以抑制NB4细胞增殖, 并可能通过抑制经典Wnt通路诱导了细胞的分化。本研究进一步表明, SAL可以作为一种潜在的抗白血病药物。

参考文献 (References)

- Puccetti E, Ruthardt M. Acute promyelocytic leukemia: PML/RAR α and the leukemic stem cell. *Leukemia* 2004; 18(7): 1169-75.
- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008; 111(5): 2505-15.
- Mi JQ, Li JM, Shen ZX, Chen SJ, Chen Z. How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(8): 1743-51.
- Sanz MA, Montesinos P. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2014; 123(18): 2777-82.
- Lengfelder E, Hofmann WK, Nowak D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(3): 433-42.
- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, *et al.* Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; 138(4): 645-59.
- Zhou S, Wang F, Wong ET, Fonkem E, Hsieh TC, Wu JM, *et al.* Salinomycin: a novel anti-cancer agent with known anti-coccidial activities. *Curr Med Chem* 2013; 20(33): 4095-101.
- Pellegrini P, Dyczynski M, Sbrana FV, Karlgren M, Buoncervello M, Hagg-Olofsson M, *et al.* Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells. *Oncotarget* 2016; 7(24): 35703-23.
- Lu D, Choi MY, Yu J, Castro JE, Kipps TJ, Carson DA. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(32): 13253-7.
- Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, Opelz G, Naujokat C. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(4): 1098-104.
- Roulston GD, Burt CL, Kettyle LM, Matchett KB, Keenan HL, Mulgrew NM, *et al.* Low-dose salinomycin induces anti-leukemic responses in AML and MLL. *Oncotarget* 2016; 7(45): 73448-61.
- Huczynski A. Salinomycin: a new cancer drug candidate. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79(3): 235-8.
- Staal FJ, Famili F, Garcia Perez L, Pike-Overzet K. Aberrant Wnt signaling in leukemia. *Cancer* 2016; doi: 10.3390/cancers8090078.
- Kuhn K, Cott C, Bohler S, Aigal S, Zheng S, Villringer S, *et al.* The interplay of autophagy and beta-Catenin signaling regulates differentiation in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov* 2015; 1: 15031.
- Gandillet A, Park S, Lassailly F, Griessinger E, Vargaftig J, Filby A, *et al.* Heterogeneous sensitivity of human acute myeloid leukemia to beta-catenin down-modulation. *Leukemia* 2011; 25(5): 770-80.
- Sheng Y, Ju W, Huang Y, Li J, Ozer H, Qiao X, *et al.* Activation of wnt/beta-catenin signaling blocks monocyte-macrophage differentiation through antagonizing PU.1-targeted gene transcription. *Leukemia* 2016; 30(10): 2106-9.
- McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, *et al.* Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/beta-catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia* 2014; 28(1): 15-33.
- Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, *et al.* Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Na Chem Biol* 2009; 5(2): 100-7.
- Lee SC, Kim OH, Lee SK, Kim SJ. IWR-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells through suppressing Wnt/beta-catenin signaling as well as survivin expression. *Oncotarget* 2015; 6(29): 27146-59.
- Zang S, Liu N, Wang H, Wald DN, Shao N, Zhang J, *et al.* Wnt signaling is involved in 6-benzylthioinosine-induced AML cell differentiation. *BMC Cancer* 2014; 14: 886.