

人喉癌干细胞的培养鉴定及其增殖的抑制研究

王彬蓉 应畅 方慧玲 王毅刚*

(浙江理工大学生命科学与医药学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 喉癌发病率逐年上升, 常规化疗药物如顺铂(cisplatin, DDP)和盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)在杀伤喉癌细胞、减少远处转移和提高患者生存率方面至关重要, 但对肿瘤干细胞的杀伤效果欠佳。靶向性或选择性杀伤肿瘤干细胞, 有望提高化疗敏感性, 减少癌症转移及复发。该文主要通过体外悬浮培养人喉癌干细胞(Hep2 sphere), 运用qRT-PCR、Western blot等实验方法检测Hep2 sphere相关因子的表达、细胞周期和耐药性等数据。结果显示, 其在一定程度上具备肿瘤干细胞样特征。克隆形成实验和细胞计数法检测得到的人喉癌干细胞增殖能力弱, 多处于静息状态G₀/G₁期。qRT-PCR结果显示, 在Hep2 sphere中CD44、ALDH、p-AKT、bcl2和p21表达显著上调, bax和AKT表达下调。Western blot也证实, 在Hep2 sphere中bax和AKT蛋白表达下调, bcl2、p21蛋白表达显著上调。MTT实验检测表明, 在不同化疗药物处理下, Hep2 sphere的细胞存活率明显高于Hep2; 在腺病毒ZD55-Trail处理下, Hep2的细胞存活率则明显高于Hep2 sphere。研究证明, 悬浮培养的人喉癌干细胞具有喉癌干细胞特性; 腺病毒ZD55-Trail对人喉癌干细胞具有较强杀伤效果, 对分化的喉癌细胞影响较弱, DDP、Dox和5-Fu则相反。

关键词 人喉癌干细胞; Hep2; 化疗药物; 增殖能力; 耐药性

The Identification and Suppression Effect of Proliferation on Human Laryngeal Cancer Stem Cell

Wang Binrong, Ying Chang, Fang Huiling, Wang Yigang*

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology College of Life Sciences and Medicine Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract The incidence of laryngeal cancer is increasing year by year. Traditional chemotherapy drugs such as cisplatin, doxorubicin hydrochloride, are essential in killing laryngeal cancer cells, reducing laryngeal cancer distant metastasis and improving patient survival, but they are not effective in killing cancer stem cells (CSCs). Targeting or selectively killing CSCs is expected to improve the sensitivity of chemoradiation, reduce cancer metastasis and recurrence. In this paper, laryngeal cancer stem cells (Hep2 sphere) were obtained by suspension culture of Hep2 *in vitro*. The expressions of Hep2 sphere related factors, cell cycle and resistance were detected by qRT-PCR and Western blot, indicating that they have tumor stem cells characteristic to some extent. Cloning formation experiment and cell counting show that many Hep2 sphere are in the resting state G₀/G₁ phase and their proliferation ability is weak. qRT-PCR results indicated Hep2 sphere upregulated CD44, ALDH1, p-AKT,

收稿日期: 2018-06-07 接受日期: 2019-02-18

国家自然科学基金(批准号: 81803069)和浙江省自然科学基金(批准号: LY18C070002、LY16H160056)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0571-86843187, E-mail: wanyigang43@163.com

Received: June 7, 2018 Accepted: February 18, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81803069) and the Zhejiang Natural Science Foundation (Grant No.LY18C070002, LY16H160056)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wanyigang43@163.com

网络出版时间: 2019-07-17 10:40:50 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190717.1040.004.html>

bcl2 as well as *p21* gene and downregulated *bax*, *AKT* gene compared to Hep2 cells. Western blot results confirmed that *bax* and *AKT* protein expression was downregulated in Hep2 sphere, *bcl2* and *p21* protein expression were significantly upregulated. MTT assay showed that the cell viability of Hep2 sphere was significantly higher than that of Hep2 under different drug treatments. Under the treatment of adenovirus ZD55-Trail, the cell survival rate of Hep2 was significantly higher than that of Hep2 sphere. This study have shown that suspension cultured laryngeal cancer stem cells have stem cell characteristics; adenovirus ZD55-Trail has stronger killing effect on laryngeal cancer stem cells, and weaker on differentiated Hep2, but DDP, Dox and 5-Fu are on the contrary.

Keywords Hep2 sphere; Hep2; chemotherapy drugs; proliferation ability; resistance

喉癌的发病率逐年增高, 仅2018年全球新发病例17.74万, 死亡病例9.48万^[1], 放化疗主要针对处于分裂期的肿瘤细胞, 大部分处于静止期的肿瘤细胞对放化疗具有耐受性, 导致肿瘤生长、复发与转移, 影响患者生存^[2-3]。因此, 我们迫切需要从新的角度认识喉癌的发生、浸润、转移及复发机理, 从而为有效治疗喉癌奠定基础。

近年来, “肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)”理论的建立, 突破了传统的肿瘤研究方式。肿瘤干细胞在适当条件下可以通过对称分裂或不对称分裂重新产生众多的肿瘤细胞, 造成肿瘤的复发和转移导致治疗失败^[4-5]。靶向性或选择性杀伤肿瘤干细胞, 有望提高放化疗敏感性, 减少转移及复发, 提高患者的生存质量^[6-9]。1994年, Bonnet等^[10]首先在血液系统肿瘤中筛选出了CD34⁺CD38⁻白血病细胞。这群细胞不带有成熟细胞表面标志物, 与正常造血干细胞十分相似, 故认定为白血病干细胞。2003年, Al-Hajj等^[11]推断, ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}Lineage乳腺癌细胞在乳腺癌发生发展中扮演肿瘤干细胞的角色, 极大推动了实体瘤肿瘤干细胞的研究^[12-14]。2007年, Prince等^[15]证实, 头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中存在一群具有自我更新和多向分化潜能的致瘤性癌细胞; CD44在HNSCC组织中表达个体差异性较大, 而HNSCC细胞系中CD44稳定阳性表达且表达率均在90%以上, 认为CD44分子也可作为喉癌肿瘤干细胞的表面标志物之一。Chen等^[16]利用联合标记从7例头颈部鳞癌中分离出CD44⁺ALDH1⁺细胞, 结果表明, 该细胞具有更高的致瘤性和放疗耐受性等肿瘤干细胞特性, CD44⁺ALDH1⁺可以作为HNSCC干细胞标记。前期预实验中我们从喉鳞癌细胞中分离出CD44⁺ALDH1⁺细胞, 初步实验结果也表明其具有肿瘤干细胞特性。

在体外富集肿瘤干细胞可以用肿瘤细胞的悬

浮培养方法实现^[17-19]。正常的贴壁的肿瘤细胞可以在悬浮培养条件下可以重新编程形成具有干细胞特性的肿瘤细胞。肿瘤细胞的悬浮培养法, 即在无血清及特定的生长因子的培养条件下, 将肿瘤细胞铺在超低吸附的培养板上进行培养^[20-23]。经过这种特定培养的肿瘤细胞, 在一定程度上表现了肿瘤干细胞的特征, 比如干细胞相关转录因子表达增多, 对传统的化疗药物具有耐受性及其细胞周期发生改变等^[24]。

顺铂(cisplatin, DDP)是喉癌中晚期转移患者化疗的主要一线药物, 但耐药仍然是导致其化疗失败的关键因素。盐酸阿霉素(Dox)作为一种传统化疗药物, 抗肿瘤谱较广, 常应用于多种癌症的化疗^[25]。2001年, 中国科学院生化与细胞研究所的刘新垣院士就基因治疗和病毒治疗的优势, 首次提出了癌症的靶向基因-病毒治疗的概念, 为肿瘤治疗带来了新希望。肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TRAIL)能与死亡受体(DR4和DR5)相结合^[26], 启动凋亡信号转导通路, 诱导细胞凋亡, 而对正常细胞组织没有明显毒副作用^[27]。这些抗癌药物很可能是极具潜力的抗肿瘤干细胞的药物, 而其对喉癌干细胞的杀伤效果还没有相关报道。因此, 本文利用喉癌细胞Hep2根据肿瘤细胞悬浮培养技术富集喉癌干细胞(Hep2 sphere), 探讨了DDP、ZD55-Trail等抗癌药物分别对正常培养的贴壁的Hep2和悬浮培养获得的Hep2 sphere的干细胞相关因子表达、耐药性能、细胞周期变化及其杀伤效应等。

1 材料与方法

1.1 材料

人喉癌细胞系Hep2由本实验室保存; 细胞培养液为含10% FBS的RPMI-1640、DMEM购自Thermo Fisher Scientific公司; FBS、Accutase消化液、B27购

自Gibco公司; DMEM/F12和HEPES购自吉诺生物科技有限公司; 细胞生长因子EGF、bFGF和IGF1购自PeproTech公司; MTT染料购自Ameresco公司; 逆转录试剂盒和SYBR GREEN Real-time PCR Master Mix购自Toyobo公司; Dox、5-Fu购自生工生物(上海)工程股份公司; DDP购自Sigma公司; p-AKT、AKT、bax、p21、bcl2抗体及 β -actin抗体购自Cell Signaling Technology公司, 二抗购自Earthox公司; 细胞裂解液和胰酶购自碧云天生物技术公司; 超低吸附6孔板购自Corning公司。

1.2 人喉癌干细胞的悬浮培养

人喉癌细胞系Hep2在含有10% FBS的1640培养基中进行正常的贴壁培养。Hep2 sphere的悬浮培养是在无血清的DMEM/F12培养基中, 于超低吸附的6孔板中进行非贴壁培养, 每孔铺 2×10^4 个细胞, 并添加100 IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL IGF1、2% B27和10 mmol/L HEPES等无血清添加剂。悬浮培养大约4天, 在培养的第2天添加1次新鲜的含无血清添加剂的DMEM/F12。在培养的第4天收集Hep2微球细胞, 将6孔板中的Hep2微球细胞吸入离心管中, 500 r/min离心5 min; 弃上清, 用PBS洗1次, 加1 mL的Accutase消化液消化3~5 min, 将消化成单个细胞的Hep2细胞进行后续实验。

1.3 MTT检测药物和腺病毒对喉癌细胞的杀伤作用

分别取正常贴壁的Hep2和Hep2 sphere, 用胰酶或Accutase消化液将其消化成单个细胞, 计数并以每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板, 5% CO₂、37 °C培养12 h后, 分别在相应孔中加入不同浓度梯度的药物和不同感染复数(MOI)的病毒, 实验组与对照组分别设6个复孔, 37 °C培养48 h后, 每孔加入20 μ L 50 mg/mL的MTT继续培养4 h后, 弃去孔内细胞培养液, 每孔加入150 μ L 二甲基亚砜, 置于摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 利用酶标仪测量490 nm处各孔的吸光度值, 同时设置调零孔, 实验重复3次。细胞生存率=(处理组D值-调零组D值)/(对照组D值-调零组D值) $\times 100\%$ 。

1.4 克隆形成实验

分别取正常贴壁的Hep2和Hep2 sphere, 以每孔1 000个细胞铺于6孔板中, 进行正常的贴壁培养。37 °C、5% CO₂大约培养7天后用结晶紫染色并拍照,

对大于80个细胞的克隆进行计数统计。

1.5 qRT-PCR检测相关因子的表达

分别取正常贴壁Hep2和Hep2 sphere直接进行qRT-PCR, 分析其相关肿瘤干细胞转录因子ALDH1、CD44表达情况, 细胞凋亡因子bax、bcl2以及抑癌基因p21的表达情况。用Trizol提取总RNA并检测RNA浓度。每管加入等质量的RNA利用逆转录试剂盒进行反转录得到cDNA, 利用SYBR GREEN Real-time PCR Master Mix作为荧光染料, 加入不同引物, 进行PCR。每组实验设置6个复孔, 实验重复3次。CD44, F: 5'-CTG CCG CTT TGC AGG TGT A-3'; R: 5'-CAT TGT GGG CAA GGT GCT ATT-3'。ALDH1, F: 5'-GCA CGC CAG ACT TAC CTG TC-3'; R: 5'-CCT CCT CAG TTG CAG GAT TAA AG-3'。

1.6 Western blot检测相关目的蛋白及细胞凋亡蛋白

分别取正常贴壁的Hep2和Hep2 sphere直接进行Western blot检测, 分析喉癌干细胞标志物ALDH、CD44表达情况、细胞凋亡因子bax、bcl2以及抑癌基因p21蛋白的表达情况。按照Western blot收集总蛋白的操作方法裂解细胞, 并用BCA蛋白定量试剂盒定量收集的总蛋白浓度。每孔加入等体积蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后进行转膜(PVDF膜), 5%的BSA室温封闭1 h, 加入一抗(1:1 000稀释), 4 °C孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次10 min, 然后加入二抗(1:10 000稀释), 室温摇床孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次15 min, 对蛋白进行拍照分析。

1.7 统计学分析

所有实验结果的数据采用SPSS 25.0进行统计学分析, 本文中所有实验都在相同条件下重复3次, 全部实验结果用(平均值 \pm 标准差)表示, 对两组间数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有显著性差异, $P < 0.01$ 则差异极显著。

2 结果

2.1 体外悬浮培养富集人喉癌干细胞

结合文献[20-23]和实验平台, 利用悬浮培养方法来富集喉癌细胞系Hep2中的肿瘤干细胞。B27是悬浮培养肿瘤细胞的干性添加剂, 有利于肿瘤干细胞的富集; 生长因子bFGF和EGF在DMEM/F12无血清培养基中可以促进细胞的增殖。人喉癌干细胞悬浮培养中, 微球状的细胞团(Hep2 sphere)即为富集

后的人喉癌干细胞, 直径100~200 μm , 其由几十到几百个具肿瘤干细胞特性的细胞相互黏连在一起形成(图1)。

2.2 qRT-PCR检测人喉癌干细胞相关因子表达

研究表明, $\text{CD44}^+\text{ALDH1}^+$ 细胞具有更高的致瘤性、放疗耐受性等干细胞特性^[28], $\text{CD44}^+\text{ALDH1}^+$ 可以作为HNSCC的干细胞标记。qPCR检测发现, CD44 在Hep2和Hep2 sphere中的相对表达量分别为 1.01 ± 0.13 、 2.46 ± 0.42 ; ALDH1 在Hep2和Hep2 sphere中的相对表达量分别为 0.84 ± 0.15 、 1.78 ± 0.37 。悬浮培养方法富集的Hep2 sphere, CD44 和 ALDH1 基因表达上调, 具有人喉癌干细胞特征(图2)。

2.3 人喉癌干细胞生长、增殖能力的检测

分别取正常贴壁Hep2和Hep2 sphere, 用胰酶或Accutase将其消化成单个细胞, 计数, 并以每孔 5×10^4 个细胞接种于6孔板, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养。分别在1、3、

5天后用胰酶消化液消化成单个细胞, 计数。实验重复3次。Hep2的增殖速度明显快于Hep2 sphere。5天时, Hep2细胞数目显著多于Hep2 sphere, $(14.33\pm 1.25)\times 10^5$ vs $(7.33\pm 0.48)\times 10^5$ (图3)。

然后, 取正常贴壁的Hep2和Hep2 sphere, 以每孔1 000个细胞铺于6孔板中进行正常的贴壁培养; 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养7天后用结晶紫染色并拍照, 对大于50个细胞的克隆进行计数统计。运用细胞克隆形成实验来分析正常贴壁的Hep2和悬浮培养的Hep2 sphere的细胞生长速率。Hep2 sphere细胞克隆形成数与Hep2相比较少, 234.33 ± 3.09 vs 634.67 ± 6.54 (图3)。这说明, 相对于Hep2, Hep2 sphere更多处于静息状态。

2.4 Western blot检测人喉癌干细胞相关蛋白表达的变化

通过悬浮培养富集的Hep2 sphere会诱导喉癌干细胞标志物的高表达。Western blot检测发现, p21、

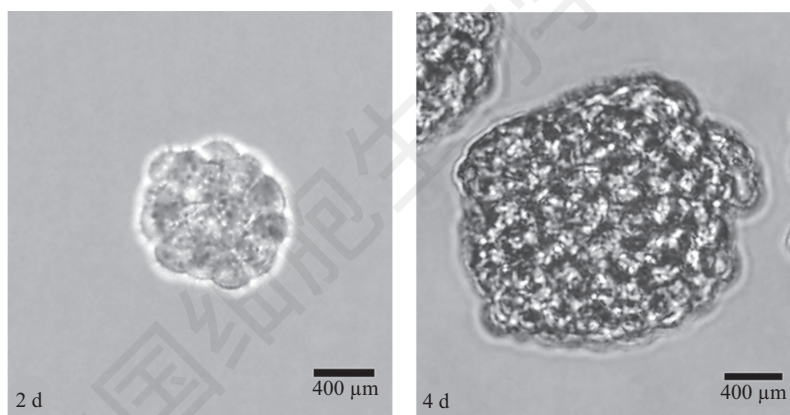
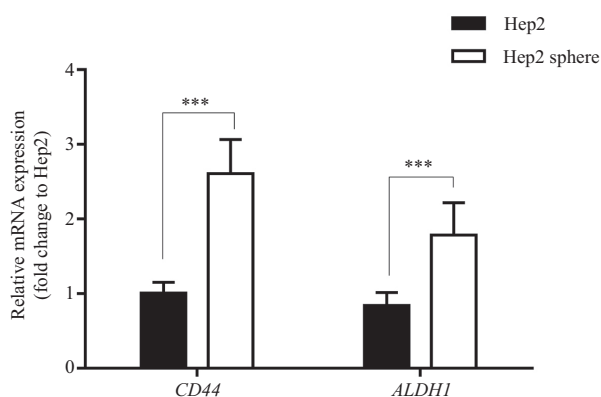


图1 人喉癌干细胞的形态学观察

Fig.1 Morphology observation of Hep2 sphere

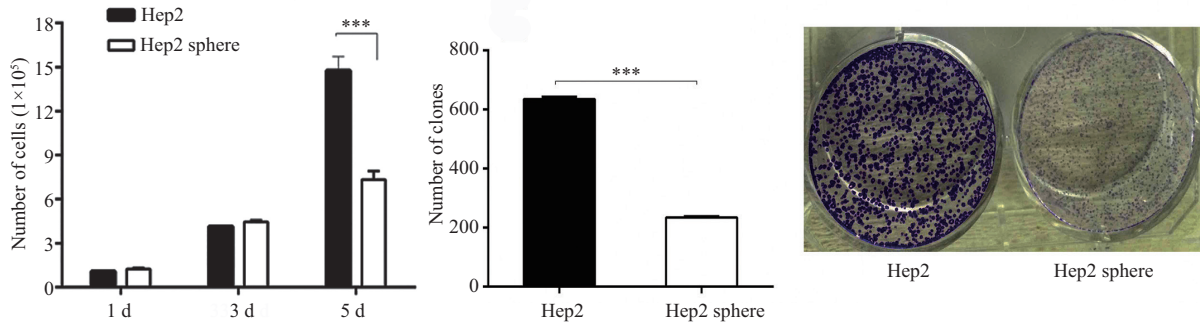


人喉癌干细胞过表达相关基因如 CD44 和 ALDH1 , $***P < 0.001$, 与Hep2相比。

Hep2 sphere over-expressed relative genes such as CD44 and ALDH1 , $***P < 0.001$ compared with Hep2.

图2 人喉癌干细胞中相关基因的表达

Fig.2 The expression of relative genes in Hep2 sphere



*** $P < 0.001$.

图3 人喉癌干细胞的增殖情况

Fig.3 Proliferation condition of Hep2 sphere

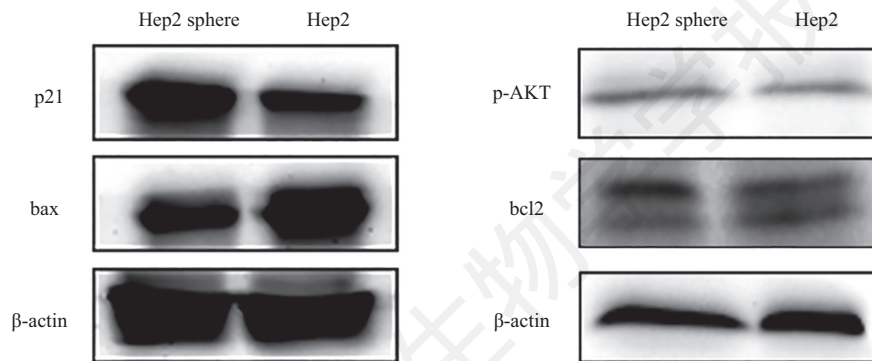


图4 人喉癌干细胞相关蛋白表达

Fig.4 The relative proteins expression of Hep2 sphere

bcl2和p-AKT都有显著上调,而bax显著下调(图4)。这表明, Hep2 sphere在一定程度上表现出肿瘤干细胞的状态特征。

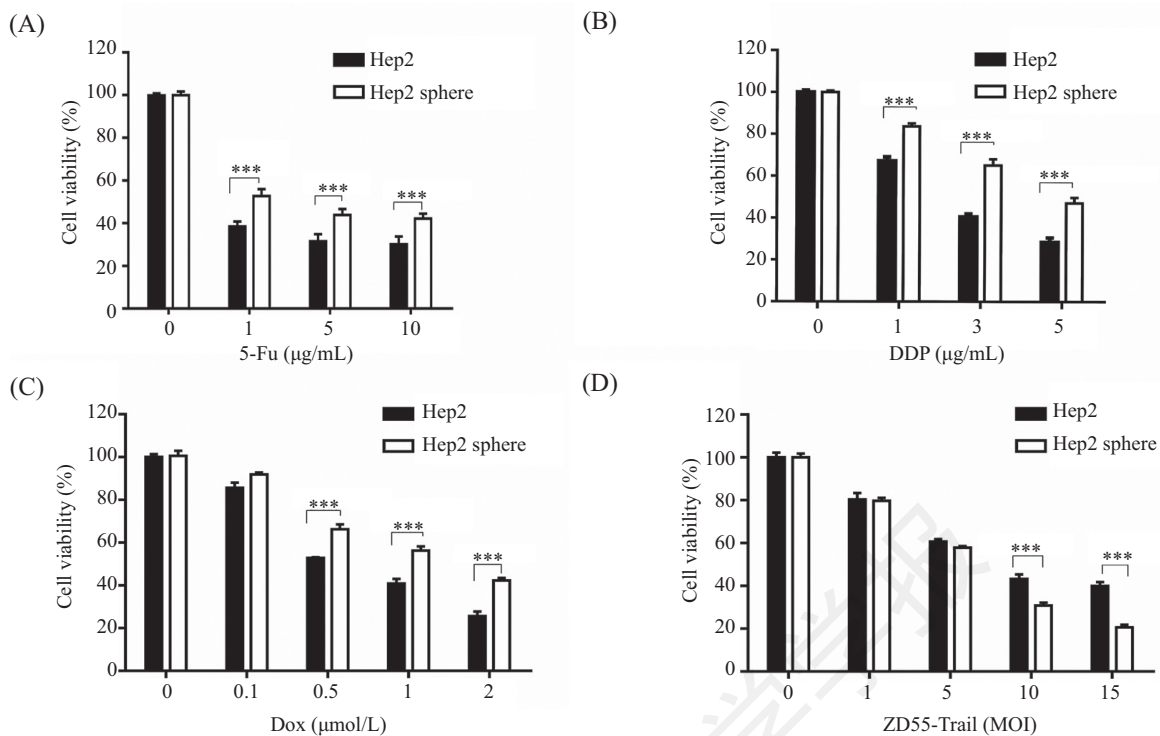
2.5 MTT检测不同化疗药物和腺病毒对人喉癌干细胞生长的抑制效果

分别用化疗药物Dox(0.1、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)、DDP(1、3、5、10 $\mu\text{g/mL}$)、5-Fu(1、5、10 $\mu\text{g/mL}$)处理正常贴壁培养的Hep2和悬浮培养的Hep2 sphere 48 h, MTT实验检测其杀伤效果。当5-Fu浓度为5、10 $\mu\text{g/L}$ 时, Hep2 sphere的细胞存活率约为Hep2的1.3倍;当DDP浓度为3、5 $\mu\text{g/mL}$ 时, Hep2 sphere的细胞存活率约为Hep2的1.6倍; Dox浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ 时, Hep2 sphere的细胞存活率约为Hep2的1.3倍。结果显示,相对于正常贴壁培养的Hep2细胞,在Dox、DDP、5-Fu处理下,悬浮培养的Hep2 sphere的细胞存活率高,这些药物对Hep2 sphere杀伤效果不如正常贴壁的Hep2。这说明, Hep2 sphere具有更强的耐药性(图5A~图5C)。

得到上面结果后,我们又用不同浓度的腺病毒ZD55-Trail(1、5、10、20 MOI)处理Hep2和Hep2 sphere 48 h, MTT实验检测其杀伤效果。数据显示,当ZD55-Trail为10 MOI时, Hep2的细胞存活率约为Hep2 sphere的72%;而处理浓度为20 MOI时, Hep2的细胞存活率是Hep2 sphere的52%(图5D)。这说明,随着ZD55-Trail MOI的增加,其对Hep2 sphere的杀伤效率显著增高。

3 讨论

癌症的复发、转移和耐药性引起了患者的高死亡率和复发率。针对靶向肿瘤干细胞的抗癌药物非常重要,具有重大的临床意义^[26-27]。本文探讨了不同抗癌药物对体外培养的人喉癌干细胞的杀伤作用。实验结果表明,在Dox、DDP、5-Fu对Hep2 sphere的杀伤效果不如正常贴壁的Hep2。Hep2 sphere对这些药物具有更强的耐药性。而腺病毒ZD55-Trail对Hep2具有更强的杀伤作用,并且杀伤效率随着用量



A~D: 不同浓度的5-Fu、DDP、Dox和ZD55-Trail处理Hep2和Hep2 sphere 48 h, MTT实验检测其杀伤效果。*** $P < 0.001$ 。

A~D: different concentration treat of 5-Fu, DDP, Dox and ZD55-Trail treated normal Hep2 cells and Hep2 sphere cells for 48 h, killing effect was detected by MTT assay. *** $P < 0.001$.

图5 化疗药物和ZD55-Trail对人喉癌干细胞生长的抑制

Fig.5 Chemotherapeutic drugs and viruses inhibit Hep2 sphere growth

增加显著提高。

相对于分化的肿瘤细胞, 肿瘤干细胞中相关转录因子表达上调, 对传统的化疗药物具有耐受性, 且大多处于静息状态, 即细胞周期的 G_0/G_1 期。悬浮培养的人喉癌干细胞中相关的转录因子 $CD44$ 和 $ALDH1$ 高表达。并且相对于分化的喉癌细胞, 类肿瘤干细胞大多数处于静息状态, 即 G_0/G_1 期, 其生长速率较正常细胞明显变慢。

人喉癌干细胞中p-Akt是一个非常重要的转录因子, 它在调控肿瘤干细胞的自我更新方面发挥着关键作用。在我们培养的Hep2 sphere中其表达是明显上调的。 $p21$ 是 $p53$ 下游基因, 也是重要的抑癌基因。我们利用Western blot技术检测到, 在Hep2 sphere中 $p21$ 表达上调, 并且凋亡蛋白bax在Hep2 sphere中表达降低, 而bcl2蛋白表达上调, 说明Hep2 sphere的确启动了抑癌机制, 喉癌干细胞发生明显的凋亡。

Hep2 sphere对传统的化疗药物5-Fu、DDP和Dox均具有明显的耐药性; 我们运用MTT实验证明了ZD55-Trail对Hep2 sphere具有很强的杀伤效果。相对于DDP、Dox等传统的化疗药物, ZD55-Trail对Hep2 sphere细胞具有特异的杀伤作用, 且杀伤效率

随着浓度的增加而明显增加。

从实验结果可以看出, ZD55-Trail对Hep2 sphere的杀伤效果明显强于Hep2; 传统的化疗药物DDP、Dox和5-Fu对人喉癌干细胞杀伤作用比较弱, 而对分化的喉癌细胞却具有较强的杀伤作用。体外悬浮培养富集的肿瘤干细胞可以作为一种用来快速评价针对特异靶向肿瘤干细胞药物的杀伤效果, 本文即利用此方法培养的人喉癌干细胞探讨了ZD55-Trail体外对人喉癌干细胞的杀伤作用, 验证了ZD55-Trail是一种特异性的针对喉癌干细胞的杀伤药物, 具有重要的临床价值。

参考文献 (References)

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
- 2 Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012; 48(1): 1-9.
- 3 Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, Wong MH. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol* 2011; 2011: 762780-7.
- 4 Liu C, Tang DG. MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res* 2011; 71(18): 5950-4.

- 5 Delude C. Tumorigenesis: Testing ground for cancer stem cells. *Nature* 2011; 480(7377): S43-5.
- 6 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, *et al.* Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 780-3.
- 7 Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, *et al.* Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2011; 481(7379): 85-9.
- 8 Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(2): 133-43.
- 9 Bautch VL. Cancer: Tumour stem cells switch sides. *Nature* 2010; 468(7325): 770-1.
- 10 George AA, Franklin J, Kerkof K, Shah AJ, Price M, Tsark E, *et al.* Detection of leukemic cells in the CD34⁺CD38⁻ bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97(12): 3925-30.
- 11 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983-8.
- 12 Pietras A. Cancer stem cells in tumor heterogeneity. *Adv Cancer Res* 2011; 112: 255-81.
- 13 Benitah SA. Tumour biology: Skin-cancer stem cells outwitted. *Nature* 2011; 478(7369): 329-30.
- 14 Krause M, Yaromina A, Eicheler W, Koch U, Baumann M. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(23): 7224-9.
- 15 Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(3): 973-8.
- 16 Chen H, Zhou L, Dou T, Wan G, Tang H, Tian J. BMI1'S maintenance of the proliferative capacity of laryngeal cancer stem cells. *Head Neck* 2011; 33(8): 1115-25.
- 17 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821-8.
- 18 Kai K, Osugihara N. Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci* 2009; 100(12): 2275-82.
- 19 Tsuchiya A, Heike T, Fujino H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, *et al.* Long-term extensive expansion of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel serum-free culture system. *Gastroenterology* 2005; 128(7): 2089-104.
- 20 Collura A, Marisa L, Trojan D, Buhard O, Lagrange A, Saget A, *et al.* Extensive characterization of sphere models established from colorectal cancer cell lines. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(4): 729-42.
- 21 Qiu X, Wang Z, Li Y, Miao Y, Ren Y, Luan Y. Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Lett* 2012; 323(2): 161-70.
- 22 Zhang L, Jiao M, Li L, Wu D, Wu K, Li X, *et al.* Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(4): 675-86.
- 23 Alimperti S, Lei P, Wen Y, Tian J, Campbell AM, Andreadis ST. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnol Prog* 2014; 30(4): 974-83.
- 24 Meng SL, Ma BY, Zhang XM, Yun GE, Zhang R, Huang PP, *et al.* Killing effects of thioridazine on liver cancer stem cell. *China Biotech* 2015; 35(2): 8-17.
- 25 Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf* 2001; 24(12): 903-20.
- 26 Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis. *Biofactors* 2013; 39(4): 343-54.
- 27 Dai Y, Liu M, Tang W, Li Y, Lian J, Lawrence TS, *et al.* A Smac-mimetic sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis *via* modulating both IAPs and NF-kappaB. *BMC Cancer* 2009; 9: 392-406.
- 28 Nazia R, Romana I, Sadia H, Iqbal A, EI-Nasir MA. Expression of androgen receptor and cancer stem cell markers (CD44⁺/CD24⁻ and ALDH1⁺): prognostic implications in invasive breast cancer. *Trans Oncol* 2018; 11(4): 920-9.