

CD44 and CD133 as Cancer Stem Cell Markers for Gastric Cancer

Hyun-Joo Lee, Young-Sil Choi, Sung-Joo Kim, and Hyoun Jong Moon¹

Department of Surgery, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul,

¹Department of Surgery, Myongji Hospital, Kwandong University College of Medicine, Goyang, Korea

Purpose: Currently, the two most influential gastric stem cell marker candidates are CD44 and CD133. The aim of this study was to make a comparison and determine the appropriate marker for use in gastric cancer stem cell research.

Materials and Methods: We analyzed the expressions of CD44, CD133, and CD24 from the gastric cancer cell lines MKN45, MKN74, KATO-III, NCI-N87, SNU-1, SNU-216, SNU-601, SNU-638, and SNU-688 using flow cytometry. In addition, we measured the change in viability after applying 5 fluorouracil (5-FU) to the MKN45, MKN74, KATO-III, and NCI-N87 cell lines using a Cell Counting Kit 8.

Results: CD133 expression was above moderate in the KATO-III, SNU-216, SNU-601 cell lines, whereas it was below 1% in the remaining cell lines. CD44 was expressed at levels above 5% in all gastric cancer cell lines. The effect of 5-FU on viability and CD133 or CD44 expression in the cell lines were not related.

Conclusions: Expression of CD133 positive cells was insufficient in the gastric cancer cell lines. Therefore, of the cell lines tested, CD44 was the most appropriate tumor marker for research on gastric cancer stem cells.

Key Words: Gastric cancer, Cancer stem cells, CD44, CD133

Introduction

암의 발생과 재발에 비정상적 줄기세포가 위계적으로 (hierarchical model) 관여한다는 암줄기세포 이론(cancer stem cell theory)은 근치적 절제술 후 암의 재발과 항암제 내성의 원인을 설명하고 새로운 암 치료 방향을 제시하고 있는 새로운 연구 분야이다. 이미 1997년에 혈액암,(1) 2003년에 유방암(2)에서 암줄기세포가 분리되어 줄기세포로서의 기능과 특징이 확인되었지만 다른 종양생물학적 연구 분야에 비하면 아직 많은 연구가 이루어지고 있지 않다. 특히 위암 관련 암줄기세포 연구 결과는 현재까지 한두 편에 불과하다.

암줄기세포는 자가복제능력(self-renewal)과 다른 종류의 세

포로 분화될 수 있는 능력(differentiation)을 동시에 가지는 종양 내 특정 세포군으로 정의된다.(3) 암줄기세포 이론에 따르면 암 줄기세포가 새로운 암종괴를 형성할 수 있기 때문에 암줄기세포가 아닌 종양 세포들을 수술로 완전히 제거하고 항암화학치료를 시행해도 암줄기세포가 남아있으면 암은 다시 재발하게 된다. 따라서 암을 완전하게 치료하기 위해서는 암줄기세포를 제어할 수 있는 방법을 알아내야만 한다. 이런 암줄기세포 연구를 수행하기 위해서는 암줄기세포를 다른 세포들로부터 분리할 수 있는 암줄기세포 표지자를 선정하는 과정이 필수적이다.

위암은 우리나라에서 가장 빈발하는 암이지만 아직 위암에 대한 암줄기세포 연구가 보고된 적은 없다. 본격적 연구에 앞서 위암 줄기세포 표지자가 먼저 제시된다면 위암 줄기세포 관련 연구가 활성화 되는데 도움이 될 것으로 판단한다. 현재 가장 가능성 있는 위암 줄기세포 표지자는 CD133과 CD44로 CD133은 가장 많은 암에서 암줄기세포 분리를 위해 사용되었고 CD44는 최근 Takaishi 등(4)이 위암 세포주에서 암줄기세포를 분리하기 위해 사용하였다.

저자들은 위암 줄기세포 연구의 시작에 필요한 암줄기세포 표지자를 결정함으로써 위암 줄기세포 연구를 시작하려는 연구자들에게 도움을 주고자 Takaishi 등(4)이 보고한 CD44 표

Correspondence to: Hyoun Jong Moon

Department of Surgery, Myongji Hospital, Kwandong University College of Medicine, 697-24, Hwaajeong-dong, Deogyang-gu, Goyang 412-270, Korea

Tel: +82-31-810-6339, Fax: +82-31-969-0500

E-mail: toto68@freechal.com

Received June 4, 2010

Accepted July 26, 2010

This work was supported by BumSuk Academic Research Fund of 2007.

지자를 이용한 위암 줄기세포 연구의 유세포 분석을 재현하고 CD133 및 CD44에 대한 문헌 검색을 실시하였다.

Materials and Methods

1. 위암 세포주

Takaishi 등(4)의 연구에서 유세포 분석 결과 CD44 양성인 위암 세포주 MKN45, MKN74, NCI-N87와 CD133 양성인 위암

세포주 KATO-III 그리고 SNU-1들은 한국세포주은행(<http://cellbank.snu.ac.kr/index.htm>)에서 분양 받았다. 위암 세포주 SNU-216, SNU-601, SNU-638, SNU-688은 삼성서울병원 최민규 교수로부터 공여 받았다. 모든 세포주는 10% 소태아 혈청과 1% 항생 및 항진균 용액을 포함하는 RPMI 1640배지(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 배양하여 사용하였다.

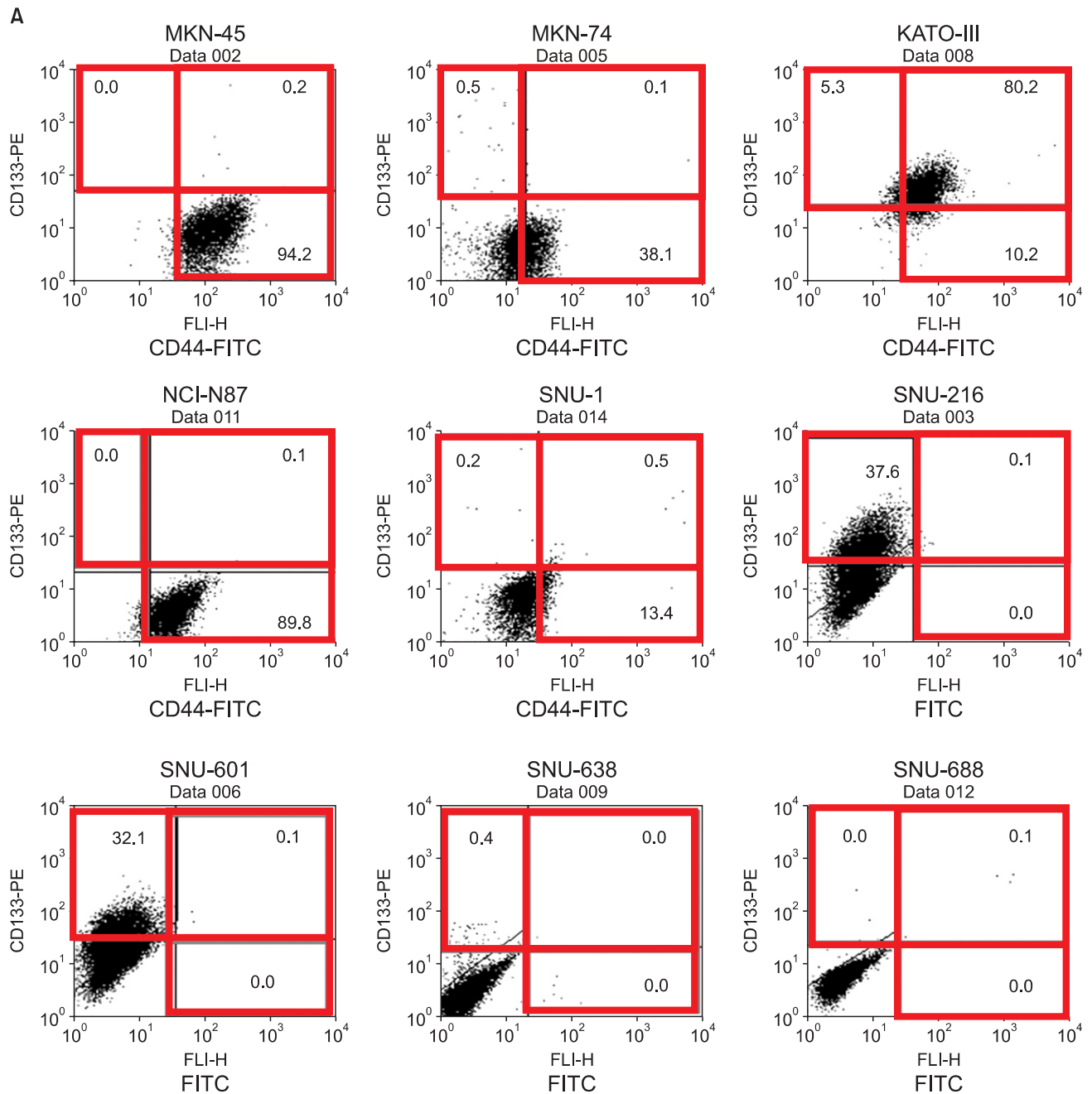


Fig. 1. Expression of CD133, CD44, CD24 on gastric cancer cell lines using flow cytometry. (A) Expression of CD133 was detected only on KATO-III, SNU-216 and SNU-601. (B) Expressions of CD44 were above 5% on all cell lines. CD44⁺/CD24⁺ subpopulations were found to be highly expressive on MKN45 and SNU-688.

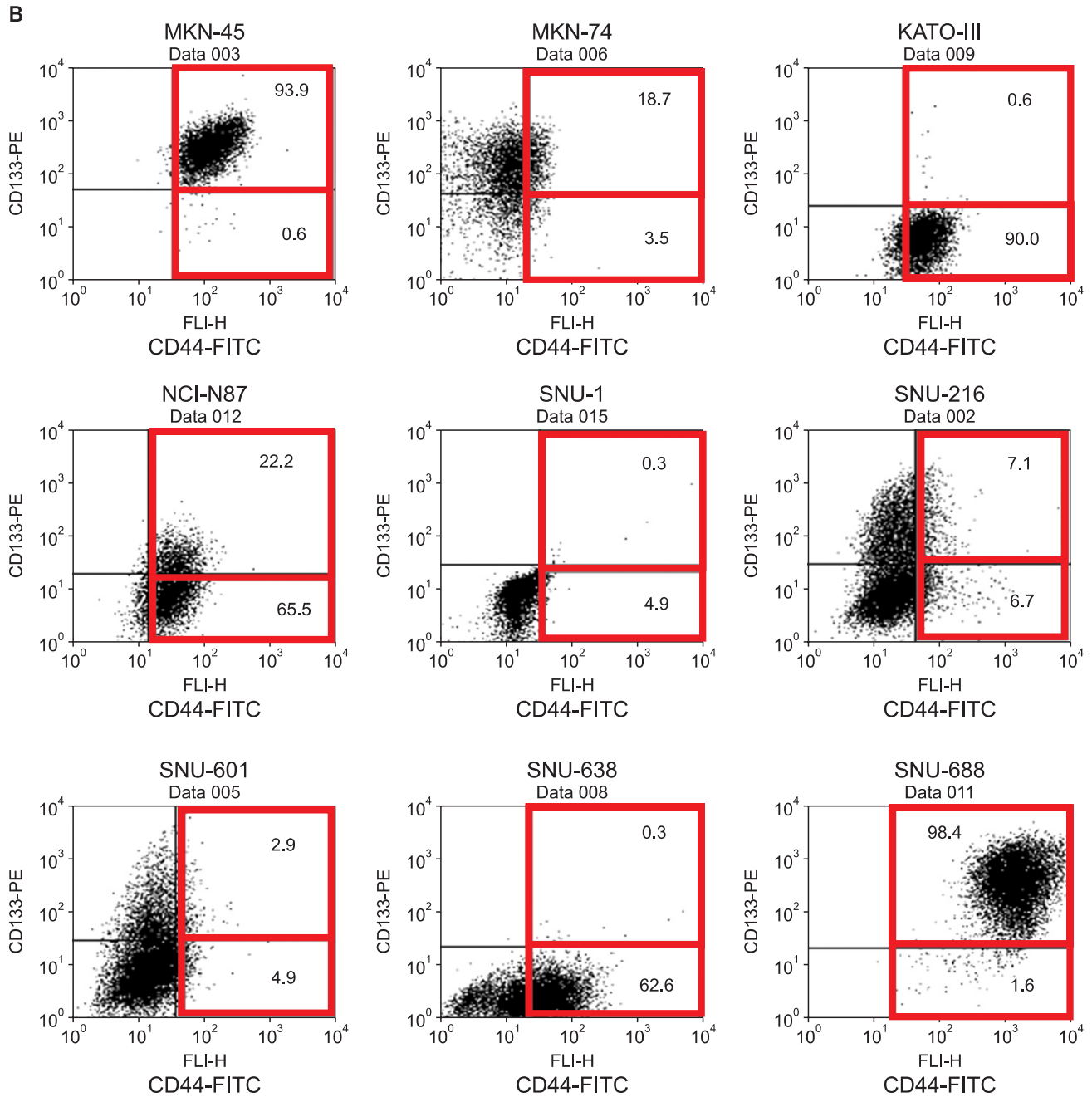


Fig. 1. Continued.

2. 분석 대상 표지자 선정

CD133와 CD44는 다양한 암에서 암줄기세포 분리를 위해 사용되었던 표지자들이다. 유방암, 췌장암 등에서 표지자로 사용되었던 CD24는(2,5,6) CD44와의 관계를 알아보기 위해 선택하였다.

3. 유세포 분석

유세포 분석은 각각의 위암 세포주에서 CD133, CD44, CD24 표지자의 발현 정도를 알아보기 위해 시행하였다. 100 mm의

세포 배양용기의 표면 70~80% 정도가 배양세포로 밀집되었을 때 배양 세포를 인산염완충용액으로 세척한 후 Trypsin-EDTA (Invitrogen)로 처리하여 해리시킨 뒤 원심 분리하였다. 침전된 세포괴를 다시 완충액에 부유시키고 100배로 희석된 anti-CD44-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD24-phycoerythrin (PE) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD133-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) anti-CD326-allophycocyanin (APC) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)와 4°C 냉장고에서 20분간 반

응시켰다. 염색한 세포는 다시 세척 후 최종적으로 2 ng/ml의 농도가 되도록 조정하여 BD FACSCalibur™ Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로 분석하였다.

4. CCK-8 분석

세포 주 MKN45, MKN74, KATO-III, NCI-N87의 CD133 과 CD44 발현 정도는 세포주의 암줄기세포 표지자 발현율과 상관이 있을 것으로 생각하고 fluorouracil (5-FU, 중외제약, Seoul, Korea)에 의한 세포 생존율을 Cell Counting Kit 8 (CCK-8 assay, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 각각 5천 개의 세포를 분주하여(100 μ l/well) 하룻밤 동안 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하여 각각 0, 5, 10, 20 μ M의 5-FU 용해에 노출시킨 뒤 2, 5, 8일째 CCK-8 용액과 4시간 동안 반응시키고 microplate reader (OD 450 nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Results

1. 유세포 분석

CD133의 발현은 KATO-III에서 85%, SNU-216에서 38%,

SNU-601에서 32%였으나 MKN45, MKN74, NCI-N87, SNU-1, SNU-638, SNU-688에서 모두 1% 미만으로 발현되었다. CD44의 발현은 MKN45에서 94%, MKN74에서 22%, KATO-III에서 91%, NCI-N87에서 88% SNU-1에서 5%, SNU-216에서 14%, SNU-601에서 9%, SNU-638에서 63%, SNU-688에서 100% 등 모든 세포주에서 5% 이상 발현되었다. 유방암이나(2) 췌장암(5)에서와 같이 CD44와 연계된 CD24의 발현을 보기위한 살페본 CD44+/CD24+ 세포의 비율은 MKN-45, SNU-688 세포주에서 높았으며 KATO-III, SNU-1, SNU-638 등에서는 거의 발현되지 않았다(Fig. 1).

2. CCK-8 분석

CCK-8 분석은 MKN45, MKN74, KATO-III, NCI-N87 세포주들에 대해 0, 5, 10, 20 μ M의 5-FU 농도로 시행되었으나 5 μ M 농도에서 2일째부터 이미 충분한 세포독성이 확인되고 10 및 20 μ M 농도의 실험결과가 5 μ M과 같아 5 μ M 농도 결과만 제시하였다. 광학현미경상에서 8일째 5-FU를 처리하지 않은 세포와 처리한 세포에서 생존율의 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 그래프에서 CD133 발현이 높았던 KATO-III 세포주에서 다른 세포주에 비해 시간이 지나면서 더 빠르게 사멸되는 양상이 관찰되었으나 세포주의 CD44 혹은 CD133 표지자의 발현과 세

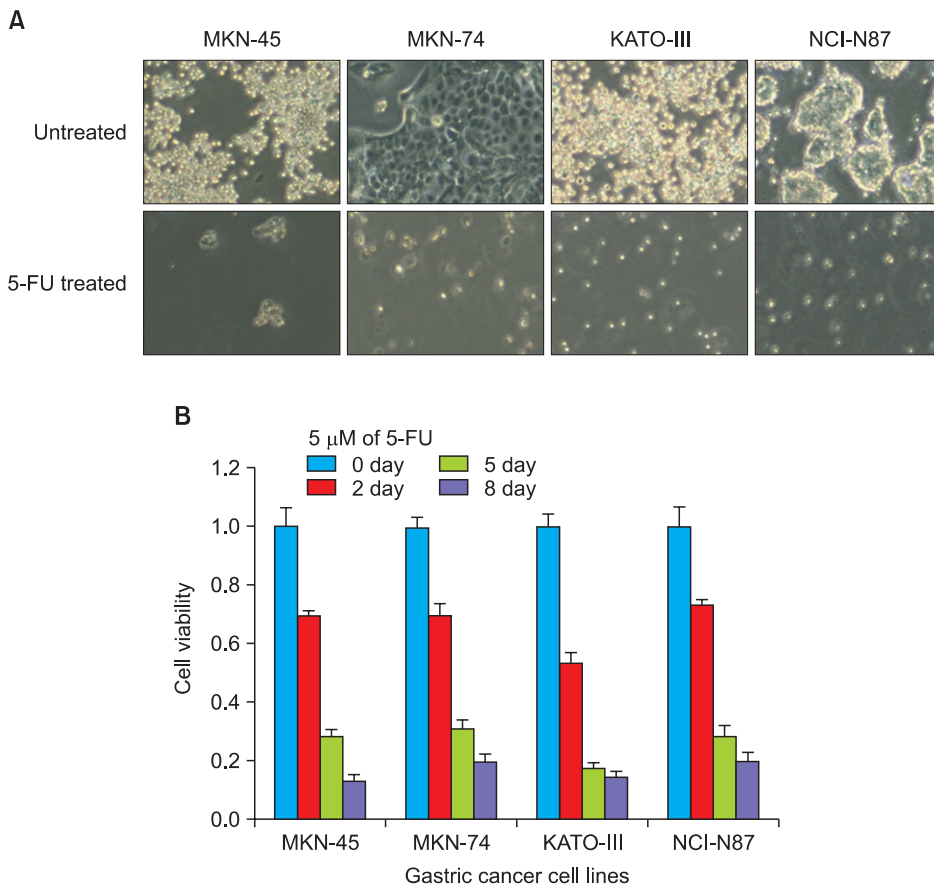


Fig. 2. Morphologic appearance and viability of 5-FU treated gastric cancer cell lines; MKN45, MKN74, KATO-III, NCI-N87. (A) Gastric cancer cells were incubated with RPMI and 5 μ M of 5-FU. Cells were examined by light microscopy on the 8th day of treatment. (B) Cell viability measured by CCK-8 assays. 5 μ M of 5-FU was added to gastric cancer cell lines and cell viability was measured using the CCK-8 assay on 0 day, 2 day, 5 day and 8 day. Cell viability was slightly more decreased in KATO-III cells than others.

포 생존율의 연관성은 확인되지 않았다(Fig. 2).

Discussion

진행성 위암의 경우 근치적 수술과 보조적 항암화학치료에도 불구하고 암이 재발되어 환자가 사망에 이르게 되는 경우가 많다.(7) 이런 한계를 극복할 수 있는 가능성을 제시하는 종양생물학적 연구 분야가 위암 줄기세포 연구이다. 암줄기세포 연구를 위해서는 암줄기세포를 인체 조직 혹은 세포주에서 분리하는데 사용될 표지자를 우선 결정해야 한다. 하지만 선택한 표지자가 얼마나 정확히 암줄기세포를 분리시키지는 선택한 표지자를 이용하여 분리한 세포들이 기능적으로 암줄기세포의 특성을 얼마나 가지고 있는지 알아보는 후속 실험을 통해서 판단되어야 한다. 따라서 본 연구에서 위암 줄기세포 연구를 위한 표지자로 거론하는 CD133과 CD44의 발현들은 위암 줄기세포 자체의 발현과는 다르게 받아들여져야 하며 후속 연구가 필요하다는 점을 전제로 해석되어야 한다.

CD133은 혈액 줄기세포의 표면 항원으로 처음 알려진 세포막 통과 당단백질로 현재까지 여러 암줄기세포를 분리하기 위해 가장 흔하게 사용되어져 왔던 표지자이다. 최근까지 뇌종양, 대장암, 간암, 폐암, 갑상선암, 난소암, 후두암, 유방암, 육종, 자궁내막암 등 10종의 고형암 18예에서 사용이 보고되었다.(8-14) 하지만 위암에 관련된 CD133 연구는 Smith 등(15)이 KATO-III 위암 세포주에서 CD133 발현이 높아 항암화학치료의 표적으로 사용될 수 있다고 보고한 예와 Boeg 등(16)이 CD133의 발현이 진행성 위암에서 상대적으로 약해 암 생성능을 가늠할 수 있는 인자로서 사용하는 것이 적절치 않다고 보고한 예를 제외하면 찾아보기 힘들다. 본 연구에서 CD133에 대한 유세포 분석 결과는 Takaishi 등(4)과 Smith 등(15)의 연구 결과와 같이 KATO-III에서 높은 발현을 보였으며, SNU-216과 SNU-601에서도 중등도 이상의 발현이 확인되었다. 하지만 나머지 3분의 2에 해당하는 6종의 위암 세포주에서는 1% 미만으로 발현되었다. 전체 세포 중 1% 미만의 세포를 분리하여 실험을 수행하는 것이 기술적으로 어렵다는 점을 감안하면 CD133을 위암에서 일반적 암줄기세포 표지자로 사용하는 것이 제한적일 것으로 판단된다. 하지만 KATO-III와 같이 CD133 발현이 높은 세포주들에 한정하여 수행하는 연구는 고려할 수 있을 것으로 보인다. LaBarge와 Bissell(17)과 Shmelkov 등(18)은 CD133 양성과 음성 세포 모두 면역억제 마우스에서 새로운 종양을 형성할 수 있다고 보고하면서 CD133을 암줄기세포 분리 표지자로 사용하는 것 자체에 대한 부정적 의견을 제시하기도 하였다.

CD44는 히알루론산의 주수용체인 세포막의 당단백으로 세포와 세포사이, 세포와 세포외 기질사이의 상호작용에 관여하여 암세포의 부착 및 이동에 중요한 역할을 하는 대표적 세포

부착 분자로 알려져 있다.(19) 현재까지 췌장암, 간암, 전립선암, 난소암, 대장암, 담도암, 자궁 경부암, 유방암, 평편 세포암, 위암 등 9종의 암 11예에서 암줄기세포의 분리를 위해 CD44가 표지자로 사용되었다.(5,20-22) 위암 관련 CD44 연구는 Takaishi 등(4)이 CD44 양성 세포가 면역 억제 마우스에서 적은 수의 세포로도 암을 생성한다는 결과를 보고한 예가 암줄기세포 연구로는 대표적이며 나머지는 대부분 위암 중심부에서 관찰되는 CD44가 암의 침윤성, 전이성, 예후에 관련되어 있다고 보고한 연구들이다.(23) Mirecka 등(24)은 변형된 형태의 CD44가 위암에서 60~90% 이상 발현된다고 보고하였으며 정상 위점막의 Paneth 세포나 벽세포, 근육세포, 혈관내피세포 등에서도 발현된다고 보고하였다. Ishimoto 등(25)도 위암이 발생하는 유전자 변이 마우스의 정상 위점막의 편평원주상피 접합부에 있는 느린 세포 주기를 가지는 세포들에서 CD44가 정상적으로 발현된다고 하였으며 여기서부터 마우스의 위암이 시작되며 위암이 발생하면 CD44의 발현이 같이 증가한다고 보고하였다. Nishii 등(26)은 다른 암종에서 기능적으로 암줄기세포를 분리를 위해 사용하는 방법인 측면군락법(side population)으로 분리한 위암 세포군에서 상대적으로 높은 CD44 발현이 관찰된다고 보고하였다. 이런 연구 결과들은 암화 과정의 초기에 CD44 양성세포가 관련되어 있을 가능성을 뒷받침하며 CD44 양성세포가 암의 침윤과 전이의 시작을 유도하는 세포 중 하나일 가능성을 제시하고 있다. 따라서 CD44 양성 세포가 기능적으로 암줄기세포의 특성과 상당부분 일치할 가능성이 높다. 본 연구의 유세포 분석에서 CD44는 9종의 암 세포주에서 모두 5% 이상의 고른 발현을 보여 CD133에 비해 일반화하여 암줄기세포를 분리하기 위한 표지자로 사용하기 유리할 것으로 판단되었다.

암줄기세포의 일반적 특성 중 하나는 항암제 내성을 보이는 것이다. Dallas 등(27)은 항암제에 내성을 보이는 대장암 세포주에서 CD133의 발현이 30배 CD44의 발현은 2배 정도 높다고 보고하였으며 Hong 등(28)도 췌장암에서 분리한 CD44 양성 세포가 음성 세포에 비해 상대적으로 높은 항암제 내성을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서도 CD133 발현이 높았던 KATO-III나 CD44의 발현이 높았던 MKN-45 등에서 다른 항암제 내성 효과가 관찰될 것으로 기대하였으나 표지자의 발현 비율 차이에 따른 세포주간 세포 생존율의 차이는 관찰되지 않았다. 하지만 5-FU의 최소 농도 5 μ M에서 이미 모든 세포주에서 세포의 생존의 현저한 감소가 관찰되었던 점을 감안하면 5-FU의 최소 농도가 세포주에서 표지자의 발현 차이에 따른 항암제 내성의 차이를 구분해 내기에 지나치게 높았을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 표지자 발현의 분율 차이가 항암제에 대한 반응과 상관성이 있는지는 표지자를 이용하여 세포를 분리한 후 다양한 항암제 농도로 확인하는 연구를 통해서 밝혀져야 할 것이다.

본 연구는 적은 수의 위암 세포주에서 유세포 분석의 결과

만을 바탕으로 문헌 고찰을 통해 위암에 합당한 암줄기세포 표지자를 선택하려고 한 축소된 초기 연구이다. 따라서 위암에서 CD44 혹은 CD133에 대한 기존 연구를 반영하여 인체 위암 조직에서의 직접 각 표지자의 발현 양상과 예후를 포함하는 환자의 임상적 결과를 연계한 연구가 후속되어야 보다 학문적이며 임상적 적용이 가능한 정보를 제공할 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 아직까지 위암 줄기세포 연구를 위한 표지자 선정에 참고할 만한 실험과 자료 수집이 제공되고 있지 않은 상태인 점을 감안하면 본 연구보다 확대된 연구를 시작하는데 참고 자료로는 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

지금 위암 줄기세포 연구를 시작하는 것은 여러 가지 측면에서 도전적 요소가 많다. 하지만 위암 연구자들이 암줄기세포 연구에 관심을 가지고 의견 교환을 지속하며 연구를 계획하고 시작한다면 최소한의 시행착오로 다른 암에서의 암줄기세포 연구 수준으로 빠른 시간 안에 발전 수 있을 것으로 판단한다.

위암 세포주에서 CD133 양성 세포의 비율은 3분의 2정도의 세포주에서 1% 미만으로 발현되고 있고 CD133가 암줄기세포 표지자로 사용되는 것에 대한 부정적 의견이 있으며 위암에 관련된 CD133 연구가 부족한 상태이다. 따라서 모든 위암 세포주의에서 5% 이상 발현되며 줄기세포 관련 혹은 분자생물학적, 임상적 연구결과가 축적되어 있는 CD44를 위암 세포주에서 암줄기세포 연구를 위한 표지자로 선택하는 것이 합당하다.

References

- Dick JE, Bhatia M, Gan O, Kapp U, Wang JC. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 1997;15(Suppl 1):199-203.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-3988.
- Dick JE. Stem cells: self-renewal writ in blood. *Nature* 2003; 423:231-233.
- Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009;27:1006-1020.
- Huang P, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Liu T, Xiong JX. Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14:3903-3907.
- Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009;568:161-173.
- Ha TK, Kwon SJ. Clinicopathologic characteristics according to the type of recurrence in curatively-resected gastric cancer patients. *J Korean Gastric Cancer Assoc* 2007;7:23-30.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445:106-110.
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:820-824.
- Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:4299-4311.
- Suva ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2009;69:1776-1781.
- Friedman S, Lu M, Schultz A, Thomas D, Lin RY. CD133+ anaplastic thyroid cancer cells initiate tumors in immunodeficient mice and are regulated by thyrotropin. *PLoS One* 2009;4:e5395.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008;15:504-514.
- Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 2008;99:100-109.
- Boegl M, Prinz C. CD133 expression in different stages of gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2009;100:1365-1366.
- LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? *J Clin Invest* 2008;118:2021-2024.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008;118:2111-2120.
- Hsieh HF, Yu JC, Ho LI, Chiu SC, Harn HJ. Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer. *Mol Pathol* 1999;52:25-28.
- Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3722-3727.
- Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar

- WL. CD44+ CD24(–) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 2008;98:756-765.
22. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008;68:4311-4320.
 23. Yook JH, Choi WY, Shin DG, Kim YJ, Kim JS, Oh ST, et al. Expression of E-cadherin and CD44H in bormann type IV gastric cancer. *J Korean Gastric Cancer Assoc* 2004;4:82-88.
 24. Mirecka J, Marx D, Schauer A. Immunohistochemical localization of CD44 variants 5 and 6 in human gastric mucosa and gastric cancer. *Anticancer Res* 1995;15:1459-1465.
 25. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, et al. CD44+ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 2010;101:673-678.
 26. Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:1397-1402.
 27. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G 2nd, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 2009;69:1951-1957.
 28. Hong SP, Wen J, Bang S, Park S, Song SY. CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2009;125:2323-2331.