

DOI: 10.13376/j.cbbls/2015034

文章编号: 1004-0374(2015)03-0237-12



王红阳, 中国工程院院士、发展中国家科学院 (TWAS) 院士, 教育部长江“特聘教授”。长期从事恶性肿瘤的基础与临床研究, 对肿瘤发生发展的分子机制、细胞信号转导和肝癌个性化诊治等有重要建树。1997年回国创办了第二军医大学国际合作生物信号转导研究中心和东方肝胆外科医院综合治疗病区, 建成样品规范、资料齐全的肝癌样本库, 形成基础与临床结合的创新研究基地。

在 *Nat Commun*、*Nat Cell Biol*、*Cancer Cell*、*JEM*、*Gut*、*Gastroenterology*、*Hepatology*、*Cancer Res*、*Nature* 和 *Oncogene* 等主流期刊发表论文 150 余篇; 主持研发的 Glypican-3 肝癌诊断试剂盒获得国家食品药品监督管理总局 (CFDA) 颁发的三类医疗器械注册证 (是我国第一个以具有完全自主知识产权的单克隆抗体为基础研发获批的试剂盒)。以第一完成人获国家科学技术进步奖创新团队奖 (首届, 2012)、国家自然科学基金二等奖、何梁何利科技进步奖、上海自然科学一等奖、上海医学科技一等奖等, 获 2010 年爱茉莉太平洋女科学家奖 (韩国)。现担任国家肝癌科学中心主任、国家自然科学基金委员会医学科学部主任、上海交通大学“癌基因及相关基因”国家重点实验室名誉主任、全军医学科技委员会副主任委员、国家重大专项总体组成员、“863”现代生物医药专家、*Mol Carcinogen* 副编辑。

## 我国肝癌研究的现状与前景

吕桂帅<sup>1</sup>, 陈磊<sup>1</sup>, 王红阳<sup>1,2\*</sup>

(1 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; 2 国家肝癌科学中心, 上海 201805)

**摘要:** 肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一。我国每年约有 38.3 万人死于肝癌, 占全球肝癌死亡病例数的 51%, 严峻的形势给我国的社会和医疗带来了沉重的负担。不断增加的科研经费投入为我国肝癌研究带来了快速发展的新机遇。主要介绍近年来我国科学家在肝癌流行病学、发病机制及诊疗方面取得的主要进展。

**关键词:** 肝癌; 发生机制; 诊疗前景

中图分类号: R735.7 文献标志码: A

## Research progress and prospect of liver cancer in China

LV Gui-Shuai<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>1</sup>, WANG Hong-Yang<sup>1,2\*</sup>

(1 Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China;

2 National Center for Liver Cancer, Shanghai 201805, China)

**Abstract:** Primary liver cancer is the leading cause of cancer-related mortality in China, with approximately 383 000 deaths annually, accounting for 51% of the mortality of liver cancer worldwide. It is a global burden for Chinese society and public health to face with this heavy situation. Chinese scientists are industriously unveiling the

收稿日期: 2015-03-18

\*通信作者: E-mail: hywangk@vip.sina.com

mechanisms of liver cancer with ever-accelerated science and technology. Here we summarize recent findings in the field of liver cancer research and outlook involving mechanism, diagnosis and therapy in China.

**Key words:** liver cancer; mechanisms; diagnosis and therapy

慢性肝脏炎症的持续进展和恶性转化可以导致肝癌发生。我国有大约 3 亿人患有肝脏疾病, 主要包括病毒性肝炎(感染 HBV 的乙型肝炎和感染 HCV 的丙型肝炎为主, 我国 HBV 感染的乙型肝炎更多见)、非酒精性脂肪性肝病和酒精性肝病等<sup>[1]</sup>。最新的流行病学调查数据表明, 我国自 1992 年实施扩大城乡计划免疫以来, 乙型病毒性肝炎新发感染病例数显著下降, 而非酒精性脂肪性肝病和酒精性肝病的发病率却呈现出明显增长的趋势<sup>[1]</sup>。肝炎、肝硬化、肝癌及其他终末期肝病对国人的健康和社会经济带来严峻挑战。

自 20 世纪 90 年代起, 为摘掉“肝病大国”的帽子, 我国投入了大量资金用于支持肝病的基础和临床研究、疫苗和药品的研发以及疾病的防控。活跃在肝病研究前沿领域的我国基础和临床科技人员, 在肝病的预防、早诊和治疗方面取得了引人注目的重要进展, 逐步形成了以肝病的炎-癌转化、代谢与肝癌、微环境与肝病、肝脏与免疫为特色, 以再生医学以及多组学关键技术应用为推动力的肝病基础和临床转化研究的平台与优势。

这里仅选择几个方面简述近年来我国肝癌基础研究的主要进展。

## 1 我国肝癌的流行病学特征

### 1.1 HBV 感染

原发性肝癌分为肝细胞型肝癌(HCC)、胆管细胞型肝癌(CC)及混合型肝癌, 其中 HCC 最为多见<sup>[2]</sup>, 约占 85%~90%。肝癌是异质性最强、死亡率最高的难治性恶性肿瘤, 我国肝癌的病死率位居肿瘤第二位, 仅次于肺癌。目前认为 HCC 的发生发展多由遗传和环境因素相互作用, 多诱因、多基因参与、多步骤调控的复杂过程。HBV 慢性持续感染是我国 HCC 最重要的危险因素。

HBV 感染随地域不同而呈现差异性。HBV 在美国和西欧国家感染率较低(0.1%~2.0%), 在日本和地中海国家较高(2%~8%), 而在非洲和亚洲大部分国家感染率很高(8%~20%)<sup>[3]</sup>。1992 年进行的大规模血清流行病学筛查发现, 我国人群 HBV 表面抗原(HBsAg)阳性率为 9.8%, 随后政府发布并实施了 HBV 计划免疫政策。从 2005 年起, 推行新生

儿全免费乙肝疫苗接种。此后, 我国的 HBsAg 阳性率由 1992 年 9.8% 下降到 7.2% (2006 年), 其中 10 岁以下的儿童 HBsAg 阳性率降到 1.5%<sup>[4]</sup>。因此, 乙肝疫苗对我国的肝炎防控作用重大, 这也间接对肝癌发生起到抑制作用。

HBV 有 A、B、C、D 四个基因型。国人的 HBV 基因型与欧美人存在较大差异。欧美人以 A、D 型居多, 而我国以 B、C 型为主; 除此之外, 我国南方人群以 B 型为主, 北方 C 型更为多见, 且以 C2 型为主, 相比之下, C1 型南方居多。与 HBV 的 B 基因型不同, C 型在年轻患者中复制活性低, 但却与肝癌突变高度相关<sup>[5]</sup>。

在欧美, 成年 HBV 感染者只有不足 5% 发展为慢性感染; 而在我国, 由于感染多发生在早年, 容易慢性迁延和病毒持续复制, 终末期阶段更容易发展为肝癌。早有数据表明, HBV 慢性感染持续率在成人是 1%~5%, 幼儿是 20%~30%, 而围产儿可高达 90%~95%<sup>[6]</sup>。有报告指出, 我国 23.2% 的 HBsAg 阳性的家庭至少有 2 个 HBsAg 携带者<sup>[1]</sup>。由此可以看出, 我国的 HBsAg 感染呈现明显的家族聚集倾向, 而欧美这一现象并不明显。HBV 感染的家族聚集性可显著提升 HBV 相关肝癌的发生, 更促进了我国肝癌的高发。

### 1.2 代谢性疾病

代谢性肝病是一大类肝病, 包括肝-豆状核变性、遗传性血色病、 $\alpha 1$  抗胰蛋白酶缺乏、卟啉症、非酒精性脂肪性肝病、急性妊娠脂肪肝、淀粉样变、Reye's 综合征、遗传性酪氨酸血症、糖原累积病、脂类累积病(Wolman's 病、胆固醇脂累积病等)、鞘脂累积病(高雪氏病、尼曼-匹克氏病等)。其中有的发病率比较低, 有的临床罕见。但近年来随着诊断水平的提高, 代谢性肝病的诊断率有所上升。

近年, 非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为全球重要的公共健康问题之一, 亦是我国愈来愈严重的慢性肝病问题。NAFLD 的病理学改变与酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)相似, 但患者无过量饮酒史, 疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及其相关的肝硬化和肝细胞

癌<sup>[7]</sup>。

在西方, 普通成人 NAFLD 患病率为 20%~33%, 其中 NASH 和肝硬化分别占 10%~20% 和 2%~3%<sup>[8-10]</sup>。肥胖症患者 NAFL 患病率为 60%~90%、NASH 为 20%~25%、肝硬化为 2%~8%, 2 型糖尿病和高脂血症患者 NAFLD 患病率分别为 28%~55% 和 27%~92%<sup>[11]</sup>。随着肥胖症和代谢综合征在全球的流行, 近 20 年亚洲国家 NAFLD 增长迅速且呈低龄化发病趋势, 我国的上海、广州和香港等发达地区成人 NAFLD 患病率在 15% 左右<sup>[12]</sup>, 并逐年上升。

NAFLD 的危险因素包括高脂肪高热量膳食结构、少动的生活方式、IR、代谢综合征及其他(肥胖、高血压、血脂紊乱和 2 型糖尿病等)<sup>[10,13]</sup>。尽管酒精滥用和丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝脂肪变关系密切, 但是全球脂肪肝的流行主要与肥胖症患病率迅速增长密切相关<sup>[11]</sup>。体质量和腰围的增加与 NAFLD 发病有关, 腰围比体质量指数(BMI)更能准确预测脂肪肝<sup>[10-12]</sup>。在非基因 3 型 HCV 感染者及乙型肝炎病毒(HBV)感染者中, 肝脂肪变主要与 IR 和代谢紊乱有关; NAFLD 是血清 HBV-DNA 低载量的慢性 HBV 感染者血清转氨酶增高的常见原因。

与慢性丙型肝炎和酒精性肝炎相比, NASH 为 NAFL 发生肝硬化的必经阶段<sup>[8-9]</sup>。但 NASH 患者肝纤维化进展相对缓慢, 失代偿期肝硬化和肝癌通常发生于老年人<sup>[8-9,11,14]</sup>。此外, 在其他慢性肝病患者中并存的 NAFL 及基础疾病可促进肝硬化和肝癌的发生, 并降低非基因 3 型慢性丙型肝炎患者干扰素抗病毒治疗应答<sup>[15]</sup>。

## 2 肝癌发生发展的分子机制

### 2.1 基因与基因突变

一些研究认为 *Ptpn11* (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) 是原癌基因。*Ptpn11* 基因编码一种称为 Shp2 的非受体酪氨酸磷酸酶, Shp2 可在细胞因子、生长因子及激素等激活的下游通路中参与活化 Ras-Erk 信号。新的研究发现, 在肝脏中 Shp2 发挥重要的抑癌因子效应。在肝细胞中选择性敲除 *Ptpn11*/Shp2 可引起肝脏炎症及坏死, 导致肝脏出现结节再生性增生。在 Shp2 敲除的小鼠中发现, Shp2 缺失引发的炎症信号促进了肝癌发生, 导致小鼠自发性肿瘤及二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导的肝癌风险显著增高。研究进一步证实, Shp2 在肝细胞中对 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 有重要负调

控作用, Shp2 敲除导致 IL-6 诱导的 STAT3 磷酸化水平显著增高并增强肝脏中的炎症信号, 进而促炎症-癌转化, 促进肝癌形成。当在肝细胞中共同敲除 Shp2 和 STAT3 时可抑制 Shp2 缺失的促肝癌效应。由此可见, Shp2 在肿瘤形成中的诱癌或抑癌作用与肿瘤细胞的类型和不同阶段有关<sup>[16]</sup>。

采用 DNA 测序技术对乙型肝炎病毒感染相关的肝癌原发灶和侵犯肝脏门静脉的转移灶的全部基因组外显子进行比对分析发现, 肿瘤细胞存在 347 个突变基因, 平均每个肿瘤样本有 30~40 个基因突变, 它们可在原发灶和转移灶中同时出现, 说明肝癌发生和转移与基因突变密切相关。对这些突变基因在大量肝癌样本中进行评估以及大规模的功能实验分析发现, 仅少数基因突变决定了肿瘤的发病和转移, 其中 ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A)、VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) 和 CDK14 (cyclin-dependent kinase 14) 等基因突变发挥关键作用。肝脏肿瘤细胞的异质性和肿瘤微环境的异质性以及关键基因调控作用都使肝癌发生发展的分子机制与其他肿瘤差异很大, 也更为复杂<sup>[17]</sup>。

P53 是一个重要的抑癌基因, 它的突变对肿瘤的发生发展起着重要作用, 其在肝癌的上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)及转移中同样发挥功能。在敲减 p53 后, 研究发现胰岛素(insulin)和转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )的 EMT 表型以及细胞迁移能力均进一步增强<sup>[18]</sup>。此外, 研究还发现 p53 通过负向调控  $\beta$ -catenin 信号通路影响细胞 EMT 进程, 降低 p53 表达能够促进  $\beta$ -catenin 在细胞核内累积及转录活性升高, 抑制  $\beta$ -catenin 信号通路可阻断由 p53 降低所诱发的肝癌细胞 EMT、迁移和转移的发生<sup>[18]</sup>。

此外, 应用全基因组关联分析方法, 多个研究小组通过对上万例肝癌样本在全基因组范围内进行系统的筛选和实验验证, 在人体第 1 号染色体内发现一个由多个基因组成的区域, 如果该区域的基因发生了变异, 人类患肝癌的风险就会大为增加<sup>[19]</sup>。

肝癌肿瘤微环境中的细胞成分包括肿瘤细胞肝癌干细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞、枯否氏细胞(Kupffer's cell)、自然杀伤细胞(NK 细胞)、肿瘤相关成纤维细胞和肝脏星状细胞及内皮细胞等; 非细胞组分主要有细胞因子、趋化因子和其他可溶性蛋白, miRNA 及物理免疫微环境等。肿瘤微环境介导了肝癌的免疫调节、炎症

反应以及细胞间通讯,参与了肝癌的发生发展,也直接促成肝癌的高异质性。

## 2.2 肝癌起始细胞(肝癌干细胞)

肿瘤干细胞是肿瘤组织中具有很强增殖能力、表现部分干细胞特性的细胞亚群,对肿瘤放化疗抗性的产生和肿瘤的复发起关键作用。近年来,在肝癌组织中同样发现类似细胞,并称之为肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)或肝癌起始细胞(tumor initiation cells, TICs)。肝癌干细胞及其亚群的研究为深入理解肝癌发生进展机制及寻找肝癌诊治新方法、新策略奠定了新的基础。

### 2.2.1 肝癌干细胞标志物

2006年我国学者率先报导CD133阳性的一群细胞具有肝癌干细胞的部分潜能<sup>[20]</sup>;2009年,研究发现上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)也可作为一类肝癌干(前体)细胞的标志物<sup>[21]</sup>。本研究组先后通过流式细胞技术标记并分选出OV6阳性的肝癌细胞亚群,并利用体内、体外实验证实此类细胞群具有干(前体)细胞的潜能<sup>[22]</sup>;并发现在DEN诱癌的HBx(HBV X protein)转基因小鼠体内,HBx可以通过诱导OV6阳性肝癌干(前体)细胞增加而促进肿瘤发生<sup>[23]</sup>。另外,研究发现重要的肝癌癌基因P28/Gankyrin能通过抑制干性关键基因Oct4的降解而促进OV6阳性肝癌前体细胞的扩增<sup>[24]</sup>,这些研究为OV6阳性的肝癌干(前体)细胞调控肝癌进展提供了有力的直接证据。

2011年,利用基因表达谱芯片分析未经化疗药处理与化疗药长期处理产生抗药性的肿瘤细胞间基因表达差异,研究者发现一个新的肝癌干细胞表面标志物CD24。临床数据显示,肿瘤内CD24阳性肝癌干细胞数目较多的患者其手术后一年的复发率较肿瘤内CD24阳性肝癌干细胞数目比较少的患者高3倍;相应地,前者出现肿瘤转移的机会亦较高且生存率明显较低。进一步的研究发现,CD24阳性的肝癌干细胞通过激活STAT3信号维持肝癌干细胞自我更新,并促进肿瘤进展<sup>[25]</sup>。

### 2.2.2 靶向肝癌干细胞

鉴于肝癌干细胞在肿瘤复发、转移和耐药形成中的关键作用,靶向肝癌干细胞有可能成为干预肝癌进程的新的有效方法。多项研究通过筛选特异性抗体,从而可能靶向不同的肝癌干细胞亚群。

有研究利用全细胞免疫的方法,获得了一个针对复发肝癌来源细胞系的单克隆抗体1B50-1。大量实验证明该抗体反应阳性的肝癌细胞具有肿瘤干

细胞特性,且这种细胞在手术切缘组织中的异常表达是肝癌复发和总体生存期较短的独立危险因素。而目前文献中已报道的绝大多数CD13、CD133、EpCAM阳性肿瘤干细胞亚群其1B50-1抗体检测也是阳性。1B50-1识别的抗原被鉴定为电压依赖性钙通道组成亚基 $\alpha 2\delta 1$ (亚型5),过表达和敲减该亚基的实验进一步证实肝癌干细胞自我更新、耐药、成瘤等特性也受钙离子内流影响。使用1B50-1作为 $\alpha 2\delta 1$ (亚型5)的中和抗体可以减少肝细胞癌中肿瘤干细胞的比例,将其与多柔比星(Doxorubicin)联用,对诱发的小鼠肝癌模型也有较好的治疗作用。结合临床样本分析提示,手术切缘组织中 $\alpha 2\delta 1$ 阳性细胞是肝癌复发的起始细胞,1B50-1抗体有可能成为靶向肿瘤干细胞从而治疗肝癌的抗体药物<sup>[26]</sup>。

## 2.3 微环境与肝癌

NK细胞是机体重要的天然效应细胞,在抵抗肿瘤和病毒感染过程中起关键作用。正常情况下NK细胞和细胞毒性淋巴细胞(CTL)的免疫监视功能相互补充,互相协调。研究表明,与正常人相比肝癌患者外周血NK细胞数目显著降低,而肝组织中NK细胞却呈现聚集现象;与癌旁组织浸润淋巴细胞中的NK细胞相比,癌组织中NK细胞数目显著下降,并与癌症的恶性程度呈负相关<sup>[27]</sup>。这提示肝癌组织中NK细胞的数量减少有助于癌细胞逃逸NK细胞介导的免疫反应,从而促进肝癌的发生发展。NK细胞表面受体——NK激活受体的下调和NK杀伤抑制受体的上调在这一过程中起重要作用,如TGF- $\beta$ 、PGE2、IDO及sMICA可以通过下调NK激活受体NKG2D的表达,阻断NK细胞介导的免疫杀伤作用<sup>[28]</sup>;而持续的HBV、HCV感染促使NK杀伤抑制受体的上调或激活受体的下调,通过受体表达不平衡导致HBV、HCV相关肝癌的发生<sup>[29-30]</sup>。通过对294名未经治疗的肝癌患者的NK细胞进行详细的研究,发现瘤旁间质中单核/巨噬细胞的高度浸润与瘤内NK细胞功能活性受损呈正相关<sup>[31]</sup>。在接触肿瘤源性单核细胞后不久,NK细胞便经历快速、短暂激活,随后被耗尽并最终死亡。不同于来自非肿瘤性肝脏的单核细胞,来自肝癌组织的单核细胞高表达CD48蛋白,而阻断NK细胞上的CD48受体2B4则可显著减弱这种单核细胞诱导的NK细胞功能障碍<sup>[32]</sup>,提示不同类型免疫细胞能通过多种机制对NK细胞进行精密调控,肿瘤在不同微环境中对自身功能的动态调节可能是一种新型免疫逃逸方式。

成纤维细胞是肿瘤微环境中重要的组成成分,也是肿瘤生成过程中重要的基质细胞,参与了癌细胞的侵袭与转移。研究发现肝癌组织中成纤维细胞可以抑制NK细胞的功能。癌组织中激活的成纤维细胞通过表达PGE2和IDO破坏NK细胞分泌细胞因子的功能和细胞毒作用,而PGE2和IDO抗体可特异阻断成纤维细胞的类似功能,显著恢复NK细胞的免疫活性,提示成纤维细胞主要通过调节肝组织的免疫应答参与肝癌的发生<sup>[33-34]</sup>。

间充质干细胞(MSCs)是干细胞家族的重要成员,这种纺锤形细胞能分化为成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞及多种结缔组织细胞。与肝癌相关的MSCs(LC-MSCs)和肝癌之间的交互作用报道较少,我国研究首次确定肝癌组织中存在MSCs,并证实LC-MSCs能促进肿瘤生长及瘤细胞球形成。cDNA微阵列分析表明,相比来自邻近无癌组织的正常MSCs(LN-MSCs),LC-MSCs的S100A4表达显著增高,LC-MSCs分泌的S100A4通过促进miR-155表达,进一步介导细胞因子信号活性抑制因子1(suppressor of cytokine signaling-1, SOCS1)的下调,导致STAT3信号激活并促进MMP9表达,从而增强肿瘤的侵袭性<sup>[35]</sup>。

## 2.4 非编码RNA与肝癌

非编码RNA(non-coding RNA)是指不编码蛋白质的RNA,其中包括rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA和microRNA等多种已知功能的RNA,还包括未知功能的RNA。

### 2.4.1 MicroRNA与肝癌

MicroRNA(miRNA)是近年来新发现的一类非编码单链小分子RNA,长约19~25 nt,在转录后水平调控基因的表达,与动植物的组织器官发育、细胞分化和凋亡、胰岛素分泌、脂肪代谢等生命活动密切相关,其表达异常会导致肿瘤等重大疾病。miRNA还具有癌基因和抑癌基因的作用,表现为不同类型的肿瘤有其特异性的miRNA表达谱<sup>[36]</sup>。目前已知多种miRNA与肿瘤的发生、分化程度、转移及预后密切相关。

2009年,我国研究发现体内miR-26在乙型肝炎病相关的肝癌发生中起较为关键的作用,肝癌组织中miR-26的低表达与IL-6、NF- $\kappa$ B表达异常增高有关。miR-26表达水平低的患者最有可能采用干扰素预防肝癌复发,从而延长生存期。通过功能获得性和功能缺失实验证实,miR-26a能显著抑制细胞增殖、迁移和侵袭,并导致肝癌细胞G<sub>1</sub>期阻滞

而加速细胞凋亡。在肝癌细胞中抑制IL-6可获得与miR-26a诱导相似的效应,同时miR-26a还能显著抑制STAT3靶基因,如Bcl-2、Mcl-1、cyclin D1和MMP2的表达<sup>[37]</sup>。

通过4个独立的肝癌患者临床队列分析,研究发现人正常肝脏高丰度表达的miR-199在肝癌中的表达显著降低,并且miR-199的低表达与肝癌患者的生存期缩短密切相关。进一步研究还发现,肝癌组织中组蛋白甲基化异常导致了miR-199表达降低,而miR-199通过靶向抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶4(PAK4)进而抑制下游的ERK信号通路,从而阻碍肝癌细胞的生长。通过肝靶向性腺病毒载体介导的miR-199基因治疗,可明显延长荷瘤裸鼠的生存期,提示miR-199是肝癌预防判断与治疗的新潜在靶标<sup>[38]</sup>。

2015年,研究发现EpCAM阳性的肝癌前体细胞能通过分泌包含miR-429的外泌体囊泡促进周围细胞表型转化,显著提高EpCAM肝癌前体细胞亚群比例,促进肿瘤的进展和化疗耐药<sup>[39]</sup>。

最近,研究还发现miR-10a可以通过抑制酪氨酸激酶受体EphA4的功能调控上皮间质转化过程和 $\beta$ 1-整合素信号途径,从而抑制肿瘤的转移<sup>[40]</sup>。另外,肝癌组织中染色体8q24.3位点扩增引起的miR-151及其宿主基因局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的高表达,也能通过活化Rac、cdc42及Rho GTPase并抑制RhoGDIA表达而促进癌细胞的迁移、侵袭与转移<sup>[41-42]</sup>。

### 2.4.2 长链非编码RNA

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类转录本长度超过200 nt、不编码蛋白质的RNA。lncRNA起初被认为是RNA聚合酶转录的副产物,不具有生物学功能,是基因转录的“噪音”<sup>[43]</sup>。然而,近年研究表明,众多lncRNA具有生物学功能,并参与癌症的发生发展。

新近发现一种与肝癌微血管浸润相关的长链非编码RNA(lncRNA MVIH)在肝癌中普遍高表达。在215名肝癌患者中,MVIH过表达与频繁的微血管浸润及较高的肿瘤淋巴结转移以及无复发生存率下降有关。在小鼠模型中,MVIH可以通过启动血管发生从而促进肿瘤生长以及肝内转移,并通过抑制磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase1, PGK1)促进肿瘤诱导的血管生成。这表明lncRNA MVIH失控可作为肝切除术后肝癌患者无复发生存率不良的预测因子,可为对抗异常活跃的血管生成提供一

种新辅助治疗的潜在靶点<sup>[44]</sup>。

另外,在对 HBx 转基因小鼠和对照组小鼠肝脏 lncRNA 表达谱差异筛查中发现, lncRNA-Dreh (AK050349) 表达量在所有年龄和性别的转基因小鼠中都显著下调。对 lncRNA-Dreh 进行深入研究发现其能抑制细胞的增殖和迁移;通过结合中间丝蛋白并抑制其表达,改变细胞骨架结构和形态,阻止癌细胞转移。该分子在癌组织中表达量比正常组织低,且与患者的预后呈负相关关系<sup>[45]</sup>。

## 2.5 代谢异常与肝癌

代谢异常被视为是肿瘤的一个重要特征,近年来随着研究的逐渐深入和认识的拓展,人们发现恶性肿瘤不但存在多种基因突变、信号通路的异常<sup>[46]</sup>,还常常存在能量代谢的异常和代谢酶的变化<sup>[47]</sup>。值得指出的是,代谢异常并不仅仅是肿瘤发生发展的结果,还可能直接参与肿瘤的始发过程。

代谢组学是研究肝癌代谢异常的常用方法,有助于阐明肝癌的发病机理和寻找新的诊断标志物。基于超高效液相色谱-高分辨质谱分析平台,研究人员对 50 例肝癌患者的癌组织、癌旁近端组织和远端组织进行代谢谱分析,发现肝癌患者体内存在多种类型的代谢异常,主要包括糖酵解加速、三羧酸循环抑制、糖异生和  $\beta$ -氧化、脂肪酸代谢相关的  $\Delta$ -12 脱氢酶活性显著下调。此外,谷胱甘肽等抗氧化分子水平增高,炎症相关的多不饱和脂肪酸和磷脂酶 A2 水平下降。将组织中发现的差异代谢物在 298 例慢性肝炎、肝硬化和肝癌患者血清样本中检测,研究结果提示甜菜碱与丙酰肉碱联合可用于诊断原发性肝癌,与甲胎蛋白结合则呈现更好的诊断互补性<sup>[48]</sup>。

氧化型胆固醇是一类重要的胆固醇代谢产物,参与许多生物学过程,但是过量的氧化型胆固醇具有比胆固醇自身更大的细胞毒性。因此,在生理条件下,全身来源的氧化型胆固醇被转运到肝脏进行进一步代谢。肝癌使肝脏功能受到极大的损伤,包括胆固醇代谢在内的许多代谢过程均出现病理性变化。然而,胆固醇代谢变化在肝癌发生发展中的作用还不清楚。有发现在部分肝癌组织中存在一条特异性的胆固醇代谢途径,其包括胆固醇酰基转移酶 (acetyl-coenzyme A acetyltransferase 2, ACAT2) 基因的高表达与 ACAT2 介导的过量氧化型胆固醇的酯化分泌过程,肝癌细胞通过这条代谢途径消除过量氧化型胆固醇的细胞毒性<sup>[49]</sup>。ACAT2 基因启动子区域的低甲基化在肝癌细胞诱导 ACAT2 高表达中

发挥至关重要的作用。该研究发现一条肝癌自身生长特异的胆固醇代谢途径,对肝癌特别是晚期肝癌的临床治疗具有重要的意义。

糖异生是肝细胞代谢的基本特点,  $11\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 1 ( $11\beta$ -HSD1) 和  $11\beta$ -羟基类固醇脱氢酶 2 ( $11\beta$ -HSD2) 是调节糖皮质激素活性的关键酶。研究发现人和鼠的肝脏癌细胞中不存在糖异生,相反  $11\beta$ -HSD1、 $11\beta$ -HSD2 在肝癌细胞中高表达,导致内源性糖皮质激素生成受阻及糖异生功能缺失,且  $11\beta$ -HSD1、 $11\beta$ -HSD2 的表达与肝癌患者的预后密切相关。地塞米松是由糖皮质激素合成的活性药物,能通过抑制  $11\beta$ -HSD 酶的异常调节恢复癌细胞内的糖异生,从而有助于肝癌的治疗。因此,在阐明肝癌细胞糖异生缺失的基础上,为肝癌的分子靶向治疗提出了新的策略<sup>[50]</sup>。

肠道稳态 (gut homeostasis) 是宿主 (肠道黏膜和免疫屏障)、肠道内环境 (包括肠道菌群)、营养和代谢产物等相互作用所构成的动态平衡状态,受到环境、生活方式、饮食习惯等多种因素影响。近来发现,肠道稳态影响肝癌的发生和发展。急性肝损伤及慢性肝病的进展会引起肠道稳态的改变,包括肠道菌群 (gut microbiota/Gut Microflora) 的失调以及肠道通透性的增加等<sup>[51-52]</sup>。动物实验研究表明,肠道菌群的失调及肠道通透性的增加通过 LPS (lipopolysaccharide)/TLR4 (Toll like receptor 4) 信号通路的持续激活,引起 TNF- $\alpha$  及 IL-6 等慢性炎症因子的升高,促进肝脏慢性炎症向肝癌的恶性转化<sup>[53-54]</sup>。另有研究表明,TLR4 的内源性配体 HMGB1 (high mobility group box-1 protein) 的释放同样促进慢性肝病的进展甚至肝癌的发生<sup>[55-57]</sup>,而肠道稳态的失调可以促进 HMGB1 释放<sup>[52]</sup>。通过使用益生菌制剂调节肠道稳态既可以减少外源性配体 LPS 的入血,又可以抑制内源性配体 HMGB1 的释放,并在一定程度上抑制肝癌的发生<sup>[52]</sup>。还有研究表明,肥胖引起的肠道菌群的失调通过促进肝星状细胞的衰老并分泌炎症因子促进肝癌的发生<sup>[58]</sup>。总之,肠道稳态失调促进肝脏炎-癌转化已经被广泛认可。但目前,关于哪些类型的肠道菌群直接影响肝癌的发生发展还没有明确的研究结论,益生菌制剂能否有效抑制慢性肝病患者的恶性进展,减少肝癌的发生,尚需要进一步的临床研究。

## 3 肝癌的预测与早诊

肝癌是全球发病率位居第五位的恶性肿瘤,它

以侵袭性强、死亡率高著称。我国肝癌患者被诊断时多已处于进展期或晚期, 其治疗手段非常受限, 同时伴随着血行转移和癌栓形成, 直接导致我国肝癌术后五年生存率与欧美发达国家相比处于较低的水平。因此, 实现肝癌的早期诊断对于肝癌的有效治疗和改善预后转归尤为重要。

### 3.1 诊断标志物

目前临床上常用的肝癌诊断标记物为甲胎蛋白, 简称 AFP。然而, AFP 诊断肝癌的敏感度和特异度并不十分理想。在妊娠妇女、急慢性肝炎、生殖腺肿瘤和胃肠道肿瘤等人群中 AFP 亦可升高, 约 40% 的肝癌患者 AFP 并不升高, 呈 AFP 阴性。因此, 寻找特异性和敏感性均较高的诊断标志物, 特别是早期肝癌的分子标记物是目前临床研究的重点和难点。

#### 3.1.1 磷脂酰肌醇蛋白多糖3 (glypican-3, GPC3)

GPC3 属于 GPC 家族, 是一种硫酸乙酰肝素聚糖蛋白, 通过磷脂酰肌醇锚定于细胞表面<sup>[59]</sup>。GPC3 在胚胎时期高表达, 在成人体内低表达, 与 AFP 同属于胚胎型蛋白。继 Hsu 等<sup>[60]</sup>首次发现 GPC3 基因在肝癌组织中异常表达, 多项研究表明, 与健康人群相比, 肝癌患者癌组织 GPC3 的 mRNA 水平与蛋白质水平同时增高, 且在其他肝损伤及健康人中含量较低。除此之外, GPC3 在 33% 的 AFP 检测阴性的肝癌患者组织中可检测到高表达, 其与 AFP 联合使用可显著提高肝癌诊断的敏感性。在血清水平, GPC3 蛋白 N 端的肽段可被切断入血, 形成可溶性 GPC3, 并在血液中检测到。通过对血清 GPC3 的检测发现, 其诊断肝癌 (阈值 = 2 ng/mL) 的敏感度为 55.2%、特异度为 86.2%。还发现血清 GPC3 能区分良恶性肝脏结节, 在 50% 的早期肝癌血清中 GPC3 浓度高于 300 ng/L, 且这些患者 AFP 值均低于 100 g/L<sup>[61]</sup>。

在此基础上, 本研究组还建立了病理诊断试剂盒的标准化检测和评价方案, 自主完成了 GPC3 检测试剂盒。作为我国第一个以具有完全自主知识产权单克隆抗体为基础研发的试剂盒, 其临床有效性优于国外已上市的同类 GPC3 产品。该试剂盒主要用于肝癌的病理诊断与分型, 尤其是肝脏肿瘤疑难病例、良/恶性的鉴别诊断, 对临床开展肝脏肿瘤恶性病例个性化治疗和避免良性病例过度治疗具有重要的应用价值<sup>[62]</sup>。

另一组研究还发现, T 淋巴细胞的细胞毒活性与肝癌细胞的 GPC3 表达水平相关, 利用表达靶向

GPC3 嵌合抗体的 T 细胞可在体外有效清除 CPC3 阳性的肝癌细胞; 另外, 体内实验发现, 表达第三代靶向 GPC3 嵌合抗体的 T 细胞能够消除高表达 GPC3 的肿瘤, 同时抑制低表达 GPC3 肿瘤的生长; Huh-7 肝癌细胞系荷瘤的裸鼠在给予 GPC3 嵌合抗体 T 细胞治疗后, 其生存期得到明显延长。该发现进一步证实, GPC3 不仅可以作为诊断肝癌的标志物, 同时也可以作为治疗肝癌的有效靶点<sup>[63]</sup>。

#### 3.1.2 Dickkopf-1 (DKK1)

DKK1 是 Wnt 信号通路的抑制因子, 能够与低密度脂蛋白受体相关蛋白 LRP5/6 结合, 并在膜蛋白 Kremen1/2 参与下引起 LRP5/6 内吞, 抑制 Wnt-Frizzled-LRP5/6 复合体形成, 抑制经典的 Wnt 信号通路。我国研究团队于 2003 年首次发现并证明, 分泌型蛋白 DKK1 在人类多种肿瘤包括肝癌中特异高表达, 并在人类多种肿瘤细胞的培养液上清和肝癌患者血清中检测到其高表达, 可作为肿瘤血清蛋白标志物用于肺癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤的血清诊断。在此基础上, 研究者设计开展了肿瘤血清蛋白标志物 DKK1 用于肝细胞癌血清诊断的大规模、多中心临床试验研究, 发现 DKK1 对肝细胞癌总体诊断的敏感性可达 69.1%, 特异性为 90.6%; 特别是对早期肝细胞癌 (BCLC 0+A) 和小肝癌 (单个 < 2 cm) 的诊断敏感性分别可达 70.9% 和 58.5%。同时, DKK1 能够弥补甲胎蛋白 (AFP) 对肝细胞癌诊断能力的不足, 并可从甲胎蛋白阳性 (>20 ng/ml) 的慢性乙型肝炎及肝硬化等高危患者中鉴别诊断肝细胞癌, 将 DKK1 与甲胎蛋白联合应用, 可将肝细胞癌总体诊断率提高至 88%; 此外, 手术后患者血中的 DKK1 浓度迅速下降, 提示血清 DKK1 蛋白亦可作为肝癌疗效监测和预后判断指标。该研究确认 DKK1 可提高 AFP 阴性肝癌患者的确诊率, 并将肝癌与非恶性慢性肝脏疾病区分开来, 是一种有效的肝癌诊断标志物<sup>[64]</sup>。

#### 3.1.3 miRNAs

通过高通量芯片和实时荧光定量 PCR 技术筛选出 7 个肝癌相关血浆 microRNAs, 利用这 7 个血浆 microRNAs 建立的诊断模型可以较准确地诊断早期肝癌, 包括 AFP 阴性的肝癌, 诊断准确率达 88%。另外, 该模型对于小于 2 cm 的肝癌诊断准确率也接近 90%, 提示使用该组合 microRNAs 的血清试剂盒将有可能大幅提高早期肝癌的诊断率, 有助于实现肝癌的早期诊断<sup>[65]</sup>。

## 4 肝癌治疗的新策略、新进展

### 4.1 肝癌的靶向治疗

索拉菲尼 (Sorafenib) 是第一个用于治疗晚期肝癌的口服药物<sup>[66]</sup>, 其通过抑制细胞内多种丝/苏氨酸激酶和酪氨酸激酶 (如 B-Raf 和 VEGFR 等) 的活性, 抑制肿瘤细胞生长和血管生成<sup>[67]</sup>。但是, 尚不清楚索拉菲尼能否在手术治疗的早期肝癌患者中抑制术后肿瘤的复发和转移。我国研究者利用荧光素酶标记的异种原位移植 (orthotopic xenograft) 肝癌小鼠模型, 并设计“种植-切除-复发”的过程来模拟和探索索拉菲尼对肝癌术后复发转移的影响, 发现索拉菲尼能显著抑制小鼠肝癌切除术后肿瘤的原位复发和腹腔转移, 并延长小鼠的生存时间。相比原发肿瘤, 索拉菲尼能更加有效地抑制复发肿瘤的生长。进一步的研究表明, 术后与肝脏再生相关生长因子的表达上调所诱导的 ERK 活性提高了肝癌细胞对索拉菲尼的敏感性, 这一研究结果为索拉菲尼应用于肝癌术后治疗提供了有力的实验依据<sup>[68]</sup>。

人体的 EGFR 蛋白可以控制细胞的生长, 在许多癌症中都存在该蛋白的突变体; 另外, 研究还发现 EGFR 在肝细胞和枯否氏细胞中的双面作用可能是索拉菲尼只对部分患者有效的原因之一。在 DEN 诱导肝脏形成肿瘤的过程中, 肝细胞表面 EGFR 活化起到阻止肝细胞凋亡、抑制肿瘤形成的作用; 相反, 肝脏枯否氏细胞表面 EGFR 活化则扮演着炎症促癌的角色。EGFR 在两类细胞中截然不同的功能也恰恰反映了肝癌发生发展的复杂性。相关研究的开展对于更好地认识肝癌, 以及开发肝癌靶向治疗药物提供了重要的理论基础<sup>[69]</sup>。

### 4.2 肝癌的抗病毒治疗

抗病毒治疗是治疗乙型肝炎的主要方法, 同时抗病毒治疗也可减少慢性乙肝感染患者肝癌发生的风险。

#### 4.2.1 干扰素

通过筛选肝癌组织中干扰素效应分子的表达谱, 并经过肝癌患者不同临床队列验证, 初步确定 RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) 的低表达与肝癌患者的生存期降低显著相关; 进一步临床标本分析表明, RIG-I 表达水平高低与干扰素治疗肝癌患者临床疗效密切相关, 只有 RIG-I 高表达的肝癌患者对干扰素治疗才有疗效。进一步研究发现, RIG-I 可以与干扰素下游效应信号分子 STAT1 结合, 阻滞其去磷酸化, 促进其效应信号通路, 从而增强干扰

素抗肿瘤效应, 为进一步开展肝癌等肿瘤免疫治疗及临床应用奠定基础<sup>[70]</sup>。

#### 4.2.2 核苷类似物

最近, 对术后应用核苷 (酸) 类似物抗病毒药物治疗的肝癌患者进行的临床研究, 历时 6 年采用 2 个阶段设计, 发现术后抗病毒治疗能延迟乙型肝炎病毒 DNA 阳性肝癌的术后复发, 显著延长患者生存期, 并显著降低术后肝组织慢性炎症, 促进术后肝功能恢复正常<sup>[71]</sup>。

台湾地区研究人员也发现, 使用口服抗病毒药物核苷 (酸) (NUC) 能够降低慢性乙型肝炎患者肝癌发生的长期风险。这项回顾性研究对几种治疗肝癌药物的风险进行分析发现, NUC 处理患者肝癌发病率显著低于对照组。总体而言, NUC 治疗能降低癌症的风险, 其在无肝硬化年轻患者和非糖尿病患者中效果最明显。因此, 使用 NUC 能够降低慢性乙型肝炎患者的肝癌风险, 特别是在最小肝损害的年轻患者中效果尤为明显<sup>[72]</sup>。

### 4.3 乙肝相关肝癌治疗的新发现

HBV 必须通过结合肝脏细胞表面受体分子, 才能进入到宿主细胞内实现对人体的感染。因此, 找到 HBV 的受体对乙肝及其肝癌的治疗尤为重要。研究人员从树鼩动物模型入手, 通过绘制树鼩肝细胞基因表达图谱并结合纯化技术和高分辨质谱分析手段, 发现肝脏胆酸转运蛋白 NTCP (钠离子-牛磺胆酸钠共转运多肽) 会与乙肝病毒表面包膜大蛋白的关键受体结合区发生特异性相互作用; 在 HBV 易感的肝细胞中进行的一系列基因敲除实验证明, NTCP 是病毒感染所需的细胞受体。而人肝癌细胞系 HepG2 通常情况下不表达 NTCP, 因此也不能被 HBV 感染。如果在该细胞系中外源性表达人或树鼩的 NTCP 后, 该细胞可以被 HBV 感染。乙肝受体的发现为高通量药物筛选打开大门, 也为乙肝及其相关疾病提供了有效的治疗靶点<sup>[73]</sup>。

最近, 研究还发现临床肝癌样本、乙肝病毒感染肝癌细胞系及 HBx 转基因小鼠的肝癌组织中的 Yes 相关蛋白 (YAP) 表达均显著增高。HBx 过表达可致肝癌细胞系中 YAP 表达上调, 而在上述细胞系中采用 HBx RNA 干扰则以剂量依赖性的方式减少 YAP 的表达, 这表明 HBx 可以正调控 YAP。通过染色质免疫沉淀法 (ChIP), 研究人员证实 HBx 能够结合到 YAP 的启动子区, 但当 CREB (cAMP-response element binding protein) 沉默时它不能发挥作用。这些结果表明 YAP 是 HBx 诱导肝癌形成的

一个关键驱动基因, 其或可作为一种治疗乙肝病毒相关肝癌的新靶点<sup>[74]</sup>。

#### 4.4 有潜在抗肝癌作用的老药新用

二甲双胍 (Metformin) 是 2 型糖尿病的一线治疗药物。近来的重要发现是, 二甲双胍除具有降血糖作用外, 还具有抑制多种肿瘤细胞增殖的作用, 包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胃癌等。二甲双胍主要通过激活 AMPK 蛋白激酶, 抑制转录因子 NF- $\kappa$ B 的信号活性, 抑制细胞增殖, 降低其体内成瘤能力。对 273 名肝癌患者的样本分析发现, 肝癌细胞中 AMPK 的活性降低, 且低水平 AMPK 活性与患者预后不良密切相关。该研究揭示, 未来二甲双胍在治疗肝癌方面可能具有极大的潜力<sup>[75]</sup>。

胺碘酮 (Amiodarone) 属于 III 类抗心律失常药, 具有轻度非竞争性的  $\alpha$  及  $\beta$  肾上腺素受体阻滞剂的效应。研究发现, 胺碘酮可抑制约 50% 的肝脏肿瘤生长。通过筛选 3 584 种小分子药物, 发现胺碘酮可有效增强大鼠肝癌发生模型中肝癌细胞的自噬反应, 同时降解 miR-224, 抑制肝脏肿瘤生长。由于胺碘酮成本低, 未来可望用于已无其他治疗选择的晚期肝癌患者<sup>[76]</sup>。

#### 4.5 肝再生

近年来, 诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells) 研究在国内外得到广泛重视<sup>[77]</sup>。应用 iPS 技术制备正常肝细胞用于肝癌治疗药物研究也是一个重要的前沿领域。我国研究人员率先将小鼠成纤维细胞在体外转化、分化为肝脏细胞, 并发现这种转化型肝细胞具有与体内肝细胞相似的上皮细胞形态、基因表达谱。经过筛选和优化, 研究人员还建立了诱导人成纤维细胞重编程为肝细胞 (hiHep 细胞) 的方法。转化型的肝细胞可以植入患有肝衰竭的实验小鼠体内并在被移植的肝脏中增殖。对比数据表明, 一组肝病小鼠在断药后未接受细胞移植, 6 周内均死亡; 而移植组的小鼠, 8 周后的存活率仍近 50%。未来转化型肝细胞不仅在临床上具有巨大的应用前景, 还可用于新药研发时的毒性代谢实验及医学基础研究所需的体外肝脏模型。然而, 这些转化型肝细胞虽具有一定的常规肝功能, 但并不能替代真正的肝脏, 因此, 将之应用于临床还需大量的研究<sup>[78-79]</sup>。

#### 4.6 其他

研究人员还对新型铁螯合剂 TSC24 (thiosemicarbazone-24) 的铁螯合效率和抗肝癌活性及其分子机理进行了深入研究, 发现 TSC24 可螯合铁, 抑制

铁吸, 收并打破细胞内铁的代谢平衡, 造成细胞缺铁, 同时诱导肝癌细胞 G<sub>2</sub>/M 周期阻滞, 通过 Caspase 途径诱导细胞凋亡, 从而发挥抗肝癌活性<sup>[80]</sup>。

## 5 结语

2013 年, 世界卫生组织宣布原发性肝癌引发全球 745 517 人死亡, 其中超过 50% 的患者来自我国。由于我国肝癌高危人群——慢性乙肝病毒携带者人群基数庞大 (超过 1.2 亿), 因此实现肝癌早诊早治、有效防治和精准治疗是一项长期而艰巨的任务。现阶段肝癌研究领域的挑战与机遇并存, 许多瓶颈问题 (包括肝脏疾病的流行病学特征、肝病发生发展的调控机制、诊断治疗的新理念、新策略和新技术及其临床转化应用等) 都需要海内外学者共同开展系统整合研究, 协同攻关, 以期尽快甩掉“肝癌大国”的帽子, 为患者带来福音。

### [参 考 文 献]

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-108
- [2] 陆再英, 钟南山. 内科学(第七版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008
- [3] Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1): S303-9
- [4] Luo Z, Li L, Ruan B. Impact of the implementation of a vaccination strategy on hepatitis B virus infections in China over a 20-year period. *Int J Infect Dis*, 2012, 16(2): e82-8
- [5] Wang HY, Li D, Liu W, et al. Hepatitis B virus subgenotype C2 is the most prevalent subgenotype in northeast China. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(5): 477-81
- [6] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2009, 373(9663): 582-92
- [7] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 (2010年修订版). *胃肠病学和肝病杂志*, 2010, 19(6): 483-7
- [8] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl1): S99-112
- [9] de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol*, 2008, 48(Suppl): S1042-12
- [10] Fan JG, Saibara T, Chitturi S, et al. What are the risk factors and settings of non-alcoholic fatty liver disease in Asia-Pacific? *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(6): 794-800
- [11] Cheung O, Sanyal AJ. Hepatitis C infection and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(3): 573-85

- [12] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol*, 2009, 50(1): 204-10
- [13] Angulo P. GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 25: 883-9
- [14] Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1682-98
- [15] Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, 2009, 49(1): 306-17
- [16] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell*, 2011, 19(5): 629-39
- [17] Huang J, Deng Q, Wang Q, et al. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2012, 44(10): 1117-21
- [18] Wang Z, Jiang Y, Guan D, et al. Critical roles of p53 in epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72846
- [19] Zhang H, Zhai Y, Hu Z, et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 755-8
- [20] Yin S, Li J, Gu J, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-50
- [21] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-24
- [22] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4287-95
- [23] Wang C, Yang W, Yan HX, et al. Hepatitis B virus X (HBx) induces tumorigenicity of hepatic progenitor cells in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine-treated HBx transgenic mice. *Hepatology*, 2012, 55(1): 108-20
- [24] Qian YW, Chen Y, Yang W, et al. p28(GANK) prevents degradation of Oct4 and promotes expansion of tumor-initiating cells in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1547-58.e14
- [25] Lee TK, Castilho A, Cheung VC, et al. CD24<sup>+</sup> liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(1): 50-63
- [26] Zhao W, Wang L, Han H, et al. 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  subunit. *Cancer Cell*, 2013, 23(4): 541-56
- [27] Jiang X, Chen Y, Peng H, et al. Memory NK cells: why do they reside in the liver? *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(3): 196-201
- [28] Chew V, Chen J, Lee D, et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2012, 61(3): 427-38
- [29] Varchetta S, Mele D, Mantovani S, et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2012, 56(3): 841-9
- [30] Sun C, Sun H, Zhang C, et al. NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Immunol*, 2014 [Epub ahead of print]
- [31] Chuang WL, Liu HW, Chang WY. Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma relative to early development and tumor invasion. *Cancer*, 1990, 65(4): 926-30
- [32] Wu Y, Kuang DM, Pan WD, et al. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology*, 2013, 57(3): 1107-16
- [33] Jia CC, Wang TT, Liu W, et al. Cancer-associated fibroblasts from hepatocellular carcinoma promote malignant cell proliferation by HGF secretion. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63243
- [34] Li T, Yang Y, Hua X, et al. Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Lett*, 2012, 318(2): 154-61
- [35] Yan XL, Jia YL, Chen L, et al. Hepatocellular carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote hepatocarcinoma progression: role of the S100A4-miR155-SOCS1-MMP9 axis. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2274-86
- [36] Sun X, He Y, Huang C, et al. Distinctive microRNA signature associated of neoplasms with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Cell Signal*, 2013, 25(12): 2805-11
- [37] Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361(15): 1437-47
- [38] Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2011, 19(2): 232-43
- [39] Li L, Tang J, Zhang B, et al. Epigenetic modification of MiR-429 promotes liver tumour-initiating cell properties by targeting Rb binding protein 4. *Gut*, 2015, 64(1): 156-67
- [40] Yan Y, Luo YC, Wan HY, et al. MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine kinase receptor A4-mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells. *Hepatology*, 2013, 57(2): 667-77
- [41] Luedde T. MicroRNA-151 and its hosting gene FAK (focal adhesion kinase) regulate tumor cell migration and spreading of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2010, 52(3): 1164-6
- [42] Ding J, Huang S, Wu S, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIa. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(4): 390-9
- [43] He Y, Meng XM, Huang C, et al. Long noncoding RNAs:

- novel insights into hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2014, 344(1): 20-7
- [44] Yuan SX, Yang F, Yang Y, et al. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2231-41
- [45] Huang JF, Guo YJ, Zhao CX, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin. *Hepatology*, 2013, 57(5): 1882-92
- [46] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70
- [47] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74
- [48] Huang Q, Tan Y, Yin P, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 4992-5002
- [49] Lu M, Hu XH, Li Q, et al. A specific cholesterol metabolic pathway is established in a subset of HCCs for tumor growth. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(6): 404-15
- [50] Ma R, Zhang W, Tang K, et al. Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma. *Nat Commun*, 2013, 4: 2508
- [51] Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, et al. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol*, 2012, 56(6): 1283-92
- [52] Zhang HL, Yu LX, Tan YX, et al. Profound impact of gut homeostasis on chemically-induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats. *J Hepatol*, 2012, 57(4): 803-12
- [53] Yu LX, Yan HX, Liu Q, et al. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1322-33
- [54] Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer cell*, 2012, 21(4): 504-16
- [55] Yan HX, Wu HP, Zhang HL, et al. p53 promotes inflammation-associated hepatocarcinogenesis by inducing HMGB1 release. *J Hepatol*, 2013, 59(4): 762-8
- [56] Alisi A, Carsetti R, Nobili V. Pathogen- or damage-associated molecular patterns during nonalcoholic fatty liver disease development. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1500-2
- [57] Li L, Chen L, Hu L, et al. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1620-30
- [58] Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 2013, 499(7456): 97-101
- [59] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2003, 125(1): 89-97
- [60] Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res*, 1997, 57(22): 5179-84
- [61] Jia X, Liu J, Gao Y, et al. Diagnosis accuracy of serum glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Arch Med Res*, 2014, 45(7): 580-8
- [62] <http://www.md.cn/2014/09/zizhuyanfaxinxingkangaizhen-duanshiji.html>
- [63] Gao H, Li K, Tu H, et al. Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6418-28
- [64] Shen Q, Fan J, Yang XR, et al. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study. *Lancet Oncol*, 2012, 13(8): 817-26
- [65] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36): 4781-8
- [66] Ben Mousa A. Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Saudi J Gastroenterol*, 2008, 14(1): 40-2
- [67] Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, et al. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol*, 2006, 33(4): 392-406
- [68] Feng YX, Wang T, Deng YZ, et al. Sorafenib suppresses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model. *Hepatology*, 2011, 53(2): 483-92
- [69] Lanaya H, Natarajan A, Komposch K, et al. EGFR has a tumour-promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(10): 972-81, 1-7
- [70] Hou J, Zhou Y, Zheng Y, et al. Hepatic RIG-I predicts survival and interferon- $\alpha$  therapeutic response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 49-63
- [71] Yin J, Li N, Han Y, et al. Effect of antiviral treatment with nucleotide/nucleoside analogs on postoperative prognosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a two-stage longitudinal clinical study. *J Clin Oncol*, 2013, 31(29): 3647-55
- [72] Wu CY, Lin JT, Ho HJ, et al. Association of nucleos(t)ide analogue therapy with reduced risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: a nationwide cohort study. *Gastroenterology*, 2014, 147(1): 143-51.e5
- [73] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 2012, 1: e00049
- [74] Zhang T, Zhang J, You X, et al. Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to

- promote growth of hepatoma cells. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2051-9
- [75] Zheng L, Yang W, Wu F, et al. Prognostic significance of AMPK activation and therapeutic effects of metformin in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(19): 5372-80
- [76] Lan SH, Wu SY, Zuchini R, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology*, 2014, 59(2): 505-17
- [77] Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*, 2009, 137(1): 13-7
- [78] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475(7356): 386-9
- [79] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocyte-like cells. *Cell stem cell*, 2014, 14(3): 370-84
- [80] Ba Q, Hao M, Huang H, et al. Iron deprivation suppresses hepatocellular carcinoma growth in experimental studies. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7625-33