

## 肝细胞癌中干细胞的生物标志物和靶向治疗研究进展

刘佳琳, 周婷婷\*, 张卫东

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要:** 原发性肝细胞癌作为肝癌的主要病理类型, 是我国常见的恶性肿瘤之一。肝细胞癌干细胞 (liver cancer stem cells, LCSCs) 除具有干细胞自我更新、多向分化和无限增殖的性质外, 还具有多药耐药、抗放疗以及高致瘤性等特性, 因而对患者采用常规方法治疗后, 常会有肿瘤的复发和转移, 造成预后不良。因此, 靶向肝细胞癌干细胞的有效治疗有彻底治愈肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的可能。本文对用于识别肝细胞癌干细胞的常见生物标志物以及针对肝细胞癌干细胞的靶向治疗进行综述。

**关键词:** 肝细胞癌干细胞; 生物标志物; 靶向治疗

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0709-07

## Advances in biomarkers and stem cell-targeted therapy for hepatocellular carcinoma

LIU Jia-lin, ZHOU Ting-ting\*, ZHANG Wei-dong

(School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Primary hepatocellular carcinoma as the main pathological type of liver cancer is one of the common malignant tumors in our country. Liver cancer stem cells (LCSCs) have the characteristics of multidrug resistance, anti-radiotherapy and high tumorigenicity in addition to the characteristics of stem cells, namely, self-renewal, multi-directional differentiation and unlimited proliferation. Based on the above features, relapse and metastasis often occur after the patients being treated with conventional methods, which results in poor prognosis. Effective treatment targeting LCSCs has the potential to cure hepatocellular carcinoma (HCC) completely. This article reviews the common biomarkers used in identification of LCSCs and development of stem cell-targeted therapy for HCC.

**Key words:** liver cancer stem cell; biomarker; targeted therapy

肝癌是世界第五大常见肿瘤、第三大致命癌症, 其中 90% 是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 目前针对肝细胞癌主要的治疗策略是手术切除、肝脏移植、放疗和化疗, 然而, 由于治疗后复发和转移率高, 患者的预后状况很差, 因此, 目前针对肝细胞癌治疗方面的研究受到了广泛的关注。

近年来, 肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 理

论已经随着干细胞的概念发展起来, 并已被应用于肿瘤学研究, 该理论认为, 肿瘤组织中有少量细胞具有自我更新能力和多向分化潜能以产生异质性的肿瘤细胞, 这些细胞被称为肿瘤干细胞, 其中大多数 CSCs 处于细胞周期的 G<sub>0</sub> 阶段, 可在一定程度上抵抗放疗和化疗<sup>[1]</sup>。研究已经证明了 CSCs 在白血病<sup>[2]</sup>和乳腺癌<sup>[3]</sup>中的作用, 其他研究表明 CSCs 也可能存在于肝癌组织<sup>[4]</sup>中, 肝细胞癌细胞中一小部分具有干性特征的细胞通常被称为肝细胞癌干细胞 (liver cancer stem cells, LCSCs), 是造成肿瘤生长、复发、转移以及化疗和放疗失败的根本原因, 因此, 肝细胞癌干细胞理论为肝

收稿日期: 2017-12-13; 修回日期: 2018-01-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573584, 81773862).

\*通讯作者 Tel: 86-21-81871262, E-mail: tingting\_zoo@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1241

细胞癌的诊断、治疗和预防提供了新的见解<sup>[5]</sup>。

了解与预后、转移和耐药相关的干细胞和干性标志物能更好地理解和治疗肝细胞癌, 这些标志物是分离 LCSCs 和分析其生物学特性所必需的, 以达到靶向治疗的目的。因此, 本文总结了当前关于肝细胞癌中干细胞潜在标志物和靶向治疗的研究进展, 以便更具体地靶向和消除肝细胞癌中的干细胞。

## 1 肝细胞癌中干细胞的识别

自从肿瘤干细胞首次在急性骨髓性白血病中发现以来, 在包括肝细胞癌在内的许多肿瘤研究中发现了肿瘤干细胞的存在以及用于鉴定肝细胞癌中干细胞的多种生物标志物<sup>[6]</sup>。根据生物标志物分布位置的不同, 可以分为细胞表面蛋白或膜蛋白 (CD133、CD90、CD44、CD13、CD47、EpCAM 和 DLK1), 细胞质蛋白 (OV6、Nestin 和 ALDH) 以及核蛋白 (SOX2、OCT4 和 Nanog)<sup>[7]</sup>。另外, 还可以根据 LCSCs 的免疫原性或功能特征对其进行分离和富集。通过靶向某些细胞生物标志物的抗原方法, 可以从肝细胞癌中获得不同的 LCSCs; 按功能分离 LCSCs 是基于其特定的特征, 如侧群细胞和高活性的醛脱氢酶<sup>[8]</sup>。

### 1.1 靶向细胞生物标志物的抗原方法识别肝细胞癌中干细胞

靶向不同的细胞生物标志物的抗原方法已被用来识别分离 LCSCs, 从只利用一种标志物来识别 LCSCs, 到联合两种或多种标志物对其进行识别的过程是为更准确筛选 LCSCs 所进行的不断探索。目前已报道的 HCC 中干细胞标志物有 CD133<sup>[9]</sup>、CD90<sup>[10]</sup> 以及 CD44<sup>[4]</sup> 等, 并且其中已有标志物被证明在 HCC 中具有调节作用<sup>[11]</sup>。

**1.1.1 细胞表面蛋白或膜蛋白作为标志物** CD133 (prominin-1) 是一个 5 次跨膜单链糖蛋白, 最初发现于造血干细胞和来自人胎肝、骨髓和外周血的造血祖细胞。由于在 Huh-7 细胞中, CD133<sup>+</sup> 细胞高达 65%, 根据肝细胞癌中仅有一小部分细胞为 LCSCs 的理论, Chen 等<sup>[11]</sup> 以 Huh-7 细胞中的上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 和 CD133 作为生物标志物进行研究时发现, 对非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠皮下注射 CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup>EpCAM<sup>-</sup> 细胞, 仅 500 个 CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> 细胞便可在 NOD/SCID 小鼠体内形成肿瘤, 而其余 3 种细胞在该条件下并不形成肿瘤, 因此联合 CD133 和 EpCAM 可以更为精确地表征 LCSCs; 同时通过比较 Huh-7 细胞中 CD133 和 EpCAM 与 LCSCs 的密切

程度发现, 在体外 CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> 细胞高表达干性相关基因, 在体内 CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>-</sup> 细胞的致瘤潜力也比 CD133<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> 细胞强, 这表明与 EpCAM 相比, CD133 与 LCSCs 的特征更为相关。另外, 有研究<sup>[12]</sup> 发现从 Huh-7 细胞和原代 HCC 细胞中分离的 CD133<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup> 细胞表现出典型的 LCSCs 特征。

CD90 (Thy-1) 是一种在许多细胞类型 (包括 T 细胞、胸腺细胞、神经元等) 上表达的 25~37 kDa 糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的细胞表面蛋白, 是细胞-细胞及细胞-基质间相互作用的重要调节因子, 同时在转移、炎症反应及纤维化中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。从 HCC 细胞系中分离的 CD90<sup>+</sup> 细胞有致瘤性, Yang 等<sup>[10]</sup> 在 HCC 患者的组织标本及血样中可以检测到 CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞, 而在正常、肝硬化和平行的非肿瘤肝脏中却检测不到; 另外, 该课题组发现 CD90<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 细胞比 CD90<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> 更具侵袭性, 而抑制 CD44 可以诱导 CD90<sup>+</sup> 细胞的凋亡。Peng 等<sup>[13]</sup> 用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 处理 MHCC-97H 细胞后发现, CD90<sup>+</sup> 亚群的克隆能力、成瘤能力及 CD90 的蛋白表达水平均降低, 说明 MHCC-97H 细胞中 CD90<sup>+</sup> 细胞的干性依赖 PI3K/AKT 信号通路。

CD44 是介导细胞与细胞外基质之间的黏附、淋巴细胞的活化及归巢的跨膜糖蛋白, 其在癌症的浸润和转移中起重要作用, 与其他已知的 CSCs 标志物不同的是, CD44 仅能通过与其他标志物 (如: CD133<sup>[14]</sup> 和 CD90<sup>[10]</sup>) 联合使用, 来作为肝细胞癌干细胞标志物。在研究中, Zhu 等<sup>[14]</sup> 通过体内异种移植实验发现, CD133<sup>+</sup> 细胞的致瘤能力主要归因于 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 细胞亚群, 而不是 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> 细胞。用 ATP 竞争性 mTOR 抑制剂 PP242 处理 SNU-423 和 SNU-449 细胞, 可降低 CD44 以及 p-4EBP-1 等 mTOR 通路的下游效应分子的表达, 从而证实了 CD44 与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关系<sup>[15]</sup>。

**1.1.2 细胞质蛋白或核蛋白作为标志物** 肝卵圆细胞 (hepatic oval cells, HOCs) 被认为是肝干/祖细胞, 存在于肝赫令管处, 可分化为肝细胞和胆管细胞。OV6 是一种单克隆抗体, 存在于细胞质中, 是胎肝卵圆细胞的一种标志物<sup>[16]</sup>。Yang 等<sup>[17]</sup> 从 SMMC7721 和 Huh-7 细胞系中分离出的 OV6<sup>+</sup> 细胞, 在体外培养可形成悬浮球, 将其植入 NOD/SCID 小鼠体内可形成肿瘤, 并且患者的 OV6<sup>+</sup> 肿瘤细胞越多, 则预后不良, 这些均提示 OV6 可作为评估患者预后标志物之一。而为了确定  $\beta$ -catenin 与 HCC 标本中 OV6<sup>+</sup> 肝细胞癌干细胞的扩增是否相关, Zheng 等<sup>[18]</sup> 对标本中

$\beta$ -catenin 的表达进行检测,发现 PTP1B 低表达的同时,细胞核内  $\beta$ -catenin 增多,且患者肿瘤组织中 OV6<sup>+</sup> 细胞更多,这意味着可能是通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路降低 PTP1B 的表达从而使 OV6<sup>+</sup> 肝细胞癌干细胞扩增。

Nanog 是胚胎干细胞中的一个转录因子,同时也被认为是维持多潜能性的一个关键因子,其在实体瘤的发展进程中扮演着重要角色,与 Nanog<sup>-</sup> 细胞相比,Nanog<sup>+</sup> 细胞具有更强的自我更新、克隆形成、肿瘤形成等 LCSCs 特征<sup>[19]</sup>。而 OCT4/Nanog 在 HCC 中的共表达可用来表征肿瘤的侵袭性,从而可以作为鉴别术后复发的标志物<sup>[20]</sup>。

## 1.2 根据功能特征识别肝细胞癌干细胞

除以上可根据 LCSCs 的免疫原性对其进行识别和分离外,还可以根据功能特征对其进行分离,如:侧群 (side population, SP) 细胞对 Hoechst 33342 荧光染料的外排特性以及乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH) 的高活性。

### 1.2.1 侧群细胞

侧群细胞最初应用于造血干细胞的识别,其自身可通过 ATP 结合盒 (ABC) 膜转运蛋白排出 Hoechst 33342 荧光染料,表现为细胞核不着色或着色程度较低,应用这一能力可对其进行检测。Guo 等<sup>[21]</sup>从 HCCLM3 细胞中分选出主群 (main population, MP) 细胞和 SP 细胞,对二者干性特征进行比较发现,SP 细胞悬浮球形成能力、侵袭能力和成瘤能力明显高于 MP 细胞,并且 SP 细胞中干细胞相关基因 *ABCG2*、*Nanog*、*SOX2* 等 mRNA 表达水平均显著高于 MP 细胞。根据 SP 细胞可外排 Hoechst 33342 染料的特性,近年来有研究表明该特性与包括 HCC 在内的多种肿瘤的多药耐药性有关。Hou 等<sup>[22]</sup>采用 *N*-连接糖基化抑制剂衣霉素,可显著降低 *ABCG2* 表达,改变其亚细胞定位,并逆转其在多种肝细胞癌细

胞系中的药物外排作用,以增加其对化疗药物的敏感性。

### 1.2.2 乙醛脱氢酶 (ALDH)

ALDH 是将各种脂肪醛和芳香醛氧化为相应酸的一组酶,这些酶可能参与醇衍生的乙醛的解毒和具有羰基的皮质类固醇、生物胺和外源性代谢中间产物的代谢过程。人体中 17 种 ALDH 的亚型,在细胞质及线粒体均有分布。现在,越来越多的研究表明 ALDH 的高活性会使 LCSCs 产生耐药性,Lingala 等<sup>[23]</sup>在人类 HCC 组织,特别是浸润的血管中鉴别出了 CD133<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup> 细胞,并且证明 CD133、ALDH、EpCAM、CD44 和 CD90 的组合染色可以鉴定 LCSCs,随后,该课题组<sup>[24]</sup>比较了 Huh-7 和 Hep3B 细胞中的 CD133<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup>/ALDH<sup>-</sup> 细胞群,发现前者形成悬浮球的数量更多;而后者细胞的化学耐药性和转移性更强,造成这一现象的原因可能是上皮间质转化的发生和 hedgehog 信号的增强。

ALDH1 是多种肿瘤中的干细胞标志物。如:在骨肉瘤中,ALDH1 的表达升高可能促进骨肉瘤组织中的血管生成,并与骨肉瘤的浸润、局部复发和转移过程有关<sup>[25]</sup>;在前列腺癌中,ALDH1 与肿瘤分期和淋巴血管浸润等密切相关<sup>[26]</sup>。然而也有一些研究得出的结论是相反的。ALDH1 家族有 ALDH1A1、ALDH1A2 和 ALDH1A3 三种亚型,其中 ALDH1A1 不仅可以作为造血干细胞和神经干细胞等成体干细胞的标志物,在一些恶性肿瘤中,还可以作为肿瘤干细胞标志物,Tanaka 等<sup>[27]</sup>在研究 ALDH1A1 与 HCC 的关系时发现,较高的 ALDH1A1 与血清中低水平的甲胎蛋白 ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP),肿瘤直径小,淋巴血管浸润少,良好的预后显著相关,所以 ALDH1A1 过表达细胞可能存在于 HCC 的分化细胞而不存在于 LCSCs 中。

除上述标志物 (表 1) 外,目前已知的 LCSCs 生物标志物还有很多,无论是对已知标志物的深度研

**Table 1** Isolation of liver cancer stem cells (LCSCs). OV6: Oval cell marker; Nanog: Nanog gene/ protein; SP: Side population; ALDH: Aldehyde dehydrogenase

Classification method	Protein position	Biomarker	Coexpression	Reference
Antigenic approach	Surface or membranous proteins	CD133	CD133 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> /ALDH <sup>+</sup>	[11, 12, 14, 23, 24]
		CD90	CD45 <sup>-</sup> CD90 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	[10]
		CD44	CD90 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	[10, 14]
Functional approach	Cytoplasmic or nuclear proteins	OV6		
		Nanog	OCT4/Nanog	[20]
		SP		
		ALDH	CD133 <sup>+</sup> /ALDH <sup>+</sup>	[23, 24]

究, 还是发现新的标志物, 均为肝细胞癌的治疗奠定了基础。

## 2 针对肝细胞癌干细胞的靶向治疗

肝细胞癌干细胞的对称分裂产生两个子代肝细胞癌干细胞; 不对称分裂产生一个肝细胞癌干细胞和一个分化的肝细胞癌细胞, 对 HCC 的发生发展起着十分关键的作用, 因此消除 LCSCs 成为治愈肝细胞癌的关键。

目前, 对肝细胞癌的常规治疗方法包括放疗、化疗、手术切除等, 放疗和化疗仅能杀伤快速增殖的已分化 HCC 细胞, 无法作用于 LCSCs; 手术切除的方法会使残存的 LCSCs 继续分化、增殖甚至转移以产生原位或转移瘤。传统的治疗方法仅是在宏观上减小了肿瘤的体积以暂时控制患者病情的发展, 但由于 LCSCs 的存在, 往往会导致术后肿瘤的复发、转移以及不良的预后, 会对放疗化疗产生抗性。肝细胞癌干细胞的靶向治疗可以减少甚至消除 LCSCs, 从而减少或消除手术切除后的复发及转移, 突破传统治疗方法所遭遇的瓶颈, 但目前在靶向 LCSCs 的治疗方面还存在许多待解决的问题, 比如由于 LCSCs 与正常干细胞在许多方面有相似性, 因此如何提高靶向治疗的特异性则是目前急待解决的问题之一。

### 2.1 针对肝细胞癌干细胞的特性治疗 HCC

干细胞具有自我更新, 多向分化和无限增殖三大特点, LCSCs 除具有干细胞特点外, 还具有复发、转移、耐药性、抗放疗以及高致瘤性等特性, 因此可以针对 LCSCs 的不同特性来治疗 HCC。You 等<sup>[28]</sup>通过基因转染技术使 MHCC97-H 的 SP 细胞过表达 Tg737, 可显著抑制 SP 细胞的浸润和转移; 另外, 与周围非肿瘤肝组织相比, HCC 组织中 Tg737 的表达通常较低, 因而在 LCSCs 中, 低表达 Tg737 可提高其浸润和转移能力, 由此, Tg737 可作为一个治疗靶点。LCSCs 具有自我更新能力, Zhu 等<sup>[29]</sup>发现用于维持 LCSCs 自我更新能力的锌指转录因子 ZIC2 (zinc finger transcription factor, ZIC2) 在 LCSCs 中高表达, ZIC2 将核重塑因子 (nuclear remodeling factor, NURF) 集中于 OCT4 启动子, 从而激活 OCT4, 由此, ZIC2、OCT4 及 NURF 复合物均可作为根除 LCSCs 的靶标。Musashi 2 (MSI2) 是一种 RNA 结合蛋白, Fang 等<sup>[30]</sup>发现敲除 *Lin28A* 可在很大程度上减弱由 MSI2 过表达引起的耐药特性, 所以 *Lin28A* 和 MSI2 可作为消除 LCSCs 的靶点。Fernando 等<sup>[31]</sup>研究发现, 若在间充质细胞中敲除 *CD44*, HCC 则对索拉非尼诱导的细胞凋亡敏感, 该结果表明靶向 *CD44* 同时应用索拉非

尼进行治疗是一项非常有效的治疗措施。Lee 等<sup>[32]</sup>对 LCSCs 进行  $\gamma$  射线照射后, 敲除 *14-3-3 $\zeta$*  可通过减弱抗辐射能力而降低细胞生存能力及悬浮球形成数量, 因此, 下调 *14-3-3 $\zeta$*  的表达可提高 HCC 对放疗的敏感性。Kimura 等<sup>[33]</sup>对 NOG 小鼠接种从 PLC/PRE5 或 Li-7 细胞系中分离出来的 EpCAM<sup>+</sup> 及 EpCAM<sup>-</sup> 细胞群后发现, 形成肿瘤所需的 EpCAM<sup>+</sup> 细胞数量更少; 另外, 与 EpCAM 数量相同的 EpCAM<sup>+</sup> 细胞形成肿瘤的时间更早, 肿瘤体积也更大, 该结果充分说明 EpCAM<sup>+</sup> 细胞的致瘤能力比 EpCAM<sup>-</sup> 细胞强。

### 2.2 RNA 与治疗

随着对评估 HCC 的生物学特性、探究其发生的分子机制以及判断患者预后状况等方面研究的不断深入, HCC 与 RNA 的关系成为分子生物学领域的另一研究热点。目前的研究主要为微小 RNA (microRNA, miRNA) 和长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 在 HCC 的发生、复发、转移、治疗及预后等方面的作用。所以靶向 RNA 成为又一潜在的治疗 HCC 的方法。

miRNA 是一种小型的非编码 RNA, 它在基因表达中具有转录后调控作用, 其中人类 miRNA-1246 通过抑制 AXIN2 和糖原合成酶激酶  $\beta$  的表达, 激活了 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 从而提高了肿瘤的自我更新、耐药性、致瘤性和转移等干性特征, 由此, 该 miRNA 可作为 HCC 中抗肿瘤干性的一个靶点<sup>[34]</sup>。lncRNA 在包括 HCC 在内的各种恶性肿瘤中的表达异常, 其中 lnc-DILC (lncRNA downregulated in liver cancer stem cells) 可介导 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号转导和自分泌 IL-6/STAT3 级联之间的串扰, 并将肝脏炎症与肝细胞癌干细胞扩增连接起来, 其可能是针对 LCSCs 的治疗靶点<sup>[35]</sup>。

### 2.3 靶向肝细胞癌干细胞的免疫治疗

靶向肿瘤干细胞的免疫治疗引起了越来越多学者的关注, 成为近年来的研究热点之一。Zhang 等<sup>[36]</sup>制备了两种抗 EpCAM 单克隆抗体 (1H8 和 2F2) 和一种由 1H8 衍生而来的抗 EpCAM 双特异性抗体 (BiTE) 1H8/CD3, 其中前者在体外及体内都没有明显的抗 HCC 活性, 而后者在 Huh-7 和 Hep3B 细胞中诱导强的外周血单核细胞依赖性细胞毒性, 体内可完全抑制 Huh-7 和 Hep3B 细胞的生长。Pan 等<sup>[37]</sup>发现, 过表达膜联蛋白 A3 (annexin A3, ANXA3) 会增加 CD133<sup>+</sup> 细胞的比例, 并增强其致瘤性, 其机制可能是 ANXA3 介导的 LCSCs 活性的维持与 HIF1 $\alpha$ /Notch 通路有关, 若采用 ANXA3 转染树突状细胞可

以诱导产生更多的功能活性 T 细胞, 这些效应 T 细胞在体外和体内均可优先杀死 CD133<sup>+</sup> LCSCs。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 是浸润在肿瘤微环境中的重要免疫细胞, 然而 TAMs 可诱导免疫抑制, Fan 等<sup>[38]</sup>用 TAM 条件培养基共培养 Hepa1-6 细胞, 可提高其肿瘤干细胞样特性, 与其他表型的巨噬细胞相比, TAMs 分泌更多的转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor beta1, TGF- $\beta$ 1), TGF- $\beta$ 1 的消耗可阻断肿瘤干性特征的获得, 因此针对 TGF- $\beta$ 1 也是治疗 HCC 的方法之一。

#### 2.4 临床靶向治疗药物

肿瘤靶向治疗药物最大的优点在于其与传统化疗药物相比, 具有更强的特异性, 因而可以选择性地抑制或杀死肿瘤细胞, 却不损伤正常细胞。目前, 临床上应用的肿瘤靶向治疗药物有血管生成抑制剂、单激酶抑制剂、多激酶抑制剂以及细胞生长周期和凋亡调节剂等。

多激酶抑制剂索拉非尼 (sorafenib) 是第一个被批准用于治疗肝细胞癌的多靶点分子靶向药物, 一方面, 其可以抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路, 另一方面, 可以抑制血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR), 从而发挥双重抗肿瘤作用<sup>[39]</sup>。III 期临床试验表明, 索拉非尼能显著延长不能采用手术切除的 HCC 患者的总生存期<sup>[40]</sup>, 但与安慰剂组相比, 索拉非尼组出现腹泻、体重减轻、手足皮肤反应等不良反应的频率更高<sup>[41]</sup>。并且索拉非尼在抑制 Raf/MAPK/ERK 信号传导途径的同时会激活 PI3K/AKT 信号通路, 两信号通路产生串扰, 从而导致耐药性<sup>[42]</sup>, 因此, 当采用索拉非尼治疗晚期肝细胞癌的不良反应大或者无效时, 联合治疗以及研发二线靶向治疗药物则有希望在减小不良反应的同时提高治疗效果。瑞戈非尼 (regorafenib) 也是一种多靶点、多激酶抑制剂, 由于其靶向的激酶范围更广, 药理作用更强, 因此应用于索拉非尼治疗后病情出现进展的肝细胞癌患者的二线治疗<sup>[43]</sup>, 并且此适应证目前已经在美国、日本和欧盟获得批准。

在靶向治疗药物的发展过程中, 当二线药物治疗肝细胞癌无效时, 三线靶向药物的研发及靶向药物与化疗、放疗、介入治疗等多种方式的联合治疗则显得尤为重要, 探究联合治疗的疗效及研发新的靶向药物已成为该领域学者的研究热点。

#### 3 小结与展望

综观国内外所发表的有关 HCC 中干细胞标志物识别的文献, 用于识别 HCC 中干细胞的生物标志物有很多, 尽管在此领域已取得了一些进展, 目前却仍然没有统一的标准。大多数根据生物标志物分离的细胞具有 LCSCs 特征, 然而标志物间的交叉表达却较少。另外, LCSCs 被认为是肝细胞癌细胞的一小部分, 但一些标志物如 CD133、EpCAM 等可以在 HCC 细胞系中占据 50% 或更高的比例, 因此, 为了提高 LCSCs 标志物的特异性, 一些学者建议联合使用多种标志物来定义肝细胞癌干细胞, 如 EpCAM<sup>+</sup>AFP<sup>+</sup> HCC 被认为是侵袭性最强的 HCC 亚型之一, 其与肿瘤生长、转移、治疗抵抗和不良预后密切相关<sup>[44]</sup>, 此外还有 CD133 和 CD44 以及 CD133 和 ALDH 等, 但哪些生物标志物或标志物组合具有较高的特异性仍是今后研究的重点之一。

由于包括放疗和化疗在内的常规肿瘤治疗策略仅能杀伤已分化的肝细胞癌细胞, 而不能根除 LCSCs, 残余的 LCSCs 可进一步分化、增殖及转移以产生新的肿瘤, 因而靶向 LCSCs 来治疗肝细胞癌已成为热点研究内容, 这也为肝细胞癌的治疗提供了新思路。虽然这一方法具有特异性强的优点, 但有些 LCSCs 生物标志物如  $\beta$ -catenin, 不仅调控 HCC 中干细胞干性, 其作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的关键蛋白, 还参与其他生理过程的调控。因此包括分离特异性 LCSCs 在内的一系列问题还有待进一步研究。相信随着 LCSCs 生物学特性的不断阐明, 可研发出针对 LCSCs 特异性靶点的药物, 在消除 LCSCs 的同时, 对正常细胞无不良影响, 使彻底治愈肝细胞癌成为可能。

#### References

- [1] Zhu CP, Wang AQ, Zhang HH, et al. Research progress and prospects of markers for liver cancer stem cells [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 12190-12196.
- [2] Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. Nat Med, 2006, 12: 1167-1174.
- [3] Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 4234-4241.
- [4] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. Hepatology, 2008, 47: 919-928.

- [5] Sun JH, Luo Q, Liu LL, et al. Liver cancer stem cell markers: progression and therapeutic implications [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 3547–3557.
- [6] Nio K, Yamashita T, Kaneko S. The evolving concept of liver cancer stem cells [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16: 4.
- [7] Xiang Y, Yang T, Pang BY, et al. The progress and prospects of putative biomarkers for liver cancer stem cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1–14.
- [8] Cheng Z, Li X, Ding J. Characteristics of liver cancer stem cells and clinical correlations [J]. *Cancer Lett*, 2016, 379: 230–238.
- [9] Piao LS, Hur W, Kim TK, et al. CD133<sup>+</sup> liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2012, 315: 129–137.
- [10] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13: 153–166.
- [11] Chen Y, Yu DK, Zhang H, et al. CD133<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma huh-7 cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 992–1004.
- [12] Tang HM, Jin YK, Jin SL, et al. Arsenite inhibits the function of CD133<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> liver cancer stem cells by reducing PML and Oct4 protein expression [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37: 1–13.
- [13] Peng YC, Peng NF, Xie ZB, et al. Role of PI3K/AKT signaling pathway in clonogenicity and tumorigenicity of CD90<sup>+</sup> stem-like cells of the hepatocellular carcinoma cell line MHCC-97H [J]. *Chin J Hepatol (中华肝病杂志)*, 2016, 24: 285–290.
- [14] Zhu Z, Hao XF, Yan MX, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> population in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 2067–2078.
- [15] Kim J, Jiang J, Badawi M, et al. miR-221 regulates CD44 in hepatocellular carcinoma through the PI3K-AKT-mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487: 709–715.
- [16] Hu Y, Wang Y. Research progress of liver cancer stem cell markers [J]. *Mod Pract Med (现代实用医学)*, 2012, 24: 1077–1080.
- [17] Yang W, Wang C, Lin Y, et al. OV6<sup>+</sup> tumor-initiating cells contribute to tumor progression and invasion in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 57: 613–620.
- [18] Zheng LY, Zhou DX, Lu J, et al. Down-regulated expression of the protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is associated with aggressive clinicopathologic features and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420: 680–684.
- [19] Shan JJ, Shen JJ, Liu LM, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2012, 56: 1004–1040.
- [20] Yin X, Li YW, Zhang BH, et al. Coexpression of stemness factors Oct4 and Nanog predict liver resection [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19: 2877–2887.
- [21] Guo Z, Xiang BD, Jiang JH, et al. Isolation and stem cell property assessment of side population cells in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Chin J Cancer Biother (中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2015, 22: 220–224.
- [22] Hou HL, Sun HF, Lu P, et al. Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12: 2874–2884.
- [23] Lingala S, Cui YY, Chen X, et al. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89: 27–35.
- [24] Chen X, Lingala S, Khoobyari S, et al. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations [J]. *J Hepatol*, 2011, 55: 838–845.
- [25] Qian TB, Yu L, Zhang CC, et al. Increase in immunohistochemical expression of CD133 and ALDH1 and angiogenesis in osteosarcoma [J]. *J Histochem Cytochem (中国组织化学与细胞化学杂志)*, 2016, 25: 143–147.
- [26] Matsika A, Srinivasan B, Day C, et al. Cancer stem cell markers in prostate cancer: an immunohistochemical study of ALDH1, SOX2 and EZH2 [J]. *Pathology*, 2015, 47: 622–628.
- [27] Tanaka K, Tomita H, Hisamatsu K, et al. ALDH1A1-overexpressing cells are differentiated cells but not cancer stem or progenitor cells in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 24722–24732.
- [28] You N, Tan Y, Zhou L, et al. Tg737 acts as a key driver of invasion and migration in liver cancer stem cells and correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 358: 217–226.
- [29] Zhu PP, Wang YY, He L, et al. ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 3795–3808.
- [30] Fang T, Lv HW, Wu FQ, et al. Musashi 2 contributes to the stemness and chemoresistance of liver cancer stem cells *via* LIN28A activation [J]. *Cancer Lett*, 2017, 384: 50–59.
- [31] Fernando J, Malfettone A, Cepedaetal EB. A mesenchymal-

- like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136: E161–E172.
- [32] Lee YK, Hur W, Lee SW, et al. Knockdown of 14-3-3 $\zeta$  enhances radiosensitivity and radio-induced apoptosis in CD133<sup>+</sup> liver cancer stem cells [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46: e77.
- [33] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)<sup>+</sup> cell population in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101: 2145–2155.
- [34] Chai S, Ng KY, Tong M, et al. Octamer 4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ $\beta$ -catenin activation in liver cancer stem cells [J]. *Hepatology*, 2016, 64: 2062–2076.
- [35] Wang X, Sun W, Shen WF, et al. Long non-coding RNA DILC regulates liver cancer stem cells *via* IL-6/STAT3 axis [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: 1283–1294.
- [36] Zhang PF, Shi BZ, Gao HP, et al. An EpCAM/CD3 bispecific antibody efficiently eliminates hepatocellular carcinoma cells with limited galectin-1 expression [J]. *Cancer Immunol Immun*, 2014, 63: 121–132.
- [37] Pan QZ, Pan K, Wang Q, et al. Annexin A3 as a potential target for immunotherapy of liver cancer stem-like cells [J]. *Stem Cells*, 2015, 33: 354–366.
- [38] Fan QM, Jing YY, Yu GF, et al. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties *via* transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2014, 352: 160–168.
- [39] Wu XM, Li YQ, Guo L, et al. The effects and adverse reaction of sorafenib in treating middle and advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Anti-tumor Pharm (肿瘤药)*, 2015, 5: 298–300.
- [40] Bruix J, Cheng AL, Meinhardt G, et al. Prognostic factors and predictors of sorafenib benefit in patients with hepatocellular carcinoma: analysis of two phase 3 studies [J]. *J Hepatol*, 2017, 67: 999–1008.
- [41] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2008, 359: 378–390.
- [42] Lu MX, Fei ZH, Zhang GL. Synergistic anticancer activity of 20(S)-ginsenoside Rg3 and sorafenib in hepatocellular carcinoma by modulating PTEN/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97: 1282–1288.
- [43] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2016, 389: 56–66.
- [44] Zhao XL, Parpart S, Takai A, et al. Integrative genomics identifies YY1AP1 as an oncogenic driver in EpCAM<sup>+</sup>AFP<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 5095–5104.