

专栏导读: 为了扩大杂志的影响,推动《中国普通外科杂志》的发展、充分利用学术平台为广大普通外科工作者服务,本刊从2015年第1期开始与AME Publishing Company合作共同打造“AME科研时间专栏”。2014年,AME中文平台——“科研时间”的诞生,为广大从事临床和基础研究的科研工作者提供了更多科研交流和学习分享的机会,一经推出得到了广大读者的喜爱,引起了广大临床工作者的不同反响;其学术前沿、科研与临床、医学与人文等内容更是让读者耳目一新。欢迎广大读者关注我们“AME科研时间专栏”,给我们提出宝贵的建议和意见,以便于将这个专栏建设得更好,成为读者喜闻乐见的一个栏目。

肝癌的治疗一直是医学界的难题,尽管机制方面的研究不断深入,高水平的基础研究成果大量涌现,但临床应用方面仍进展缓慢。因此,研究进展如何实现临床转化,从而影响对肝癌患者的诊断与治疗,是一个需要深入思考的问题。本期推荐意大利学者的综述文章,该文通过介绍多种肝癌动物模型与肝癌分子生物学方面的机制,并结合临床实践与进展进行了相关性讨论,可为我们在思考基础与临床之间如何形成有效的对接、整合与互动方面提供有益的启迪。



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.001
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.001
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(1):1-9.

• AME 科研时间专栏 •

肝细胞癌的新见解：从实验到临床

Samuele De Minicis, Marco Marzioni, Antonio Benedetti, Gianluca Svegliati-Baroni

(意大利马尔凯理工大学 胃肠外科, 安科纳)

摘要

肝细胞癌(简称肝癌)是一个多步骤病变过程,其间涉及不同的遗传变异,最终导致肝细胞的恶性转化。肝脏是多种不同肿瘤转移的主要靶向器官之一,也是慢性疾病过程中的一个重要且较易发生恶变的场所。事实上,肝癌是慢性肝脏疾病自然演变的结果,从肝纤维化,到肝硬化最后肝癌的过程。肝癌是全球第6位常见癌症,每年约630 000例新诊断病例。此外,大约80%肝癌患者经历了疾病由肝纤维化发展为肝硬化最后肝癌的临床过程。导致肝癌的3大主因是乙型肝炎病毒感染、丙肝病毒感染和酗酒。另外,代谢性疾病[如非酒精性脂肪肝(NAFD),非酒精性脂肪性肝炎(NASH)]和一些发病率较低的自身免疫性疾病也可能导致肝癌的发生。另外一个少见的导致肝脏癌变的病因是黄曲霉毒素B1的感染,尤其多见于一些非洲和亚洲国家。这些病因导致肝癌发生涉及了广泛的途径和分子,具体机制还在研究当中。总之,肝脏癌变是成熟肝细胞基因发生改变,并以细胞增殖和死亡失去控制为主要特征的多因素过程主要源于将基础研究和临床科学相结合,相关作用机制的研究进展是寻找新的潜在疗法的基础。该综述从基础和临床两方面分析了当前用于肝癌基础研究的模型。

关键词

癌,肝细胞;肝硬化;脂肪肝
中图分类号:R735.7

1 肝癌小鼠模型

为进一步研究肝脏癌变机理和新疗法,越来越多的兴趣致力于创建能够模拟人肝癌特征的用于基础研究的实验模型。

人肝癌细胞株在体外检测通常是在抗癌药物研发过程中的早期阶段,需要检测细胞活力,细胞增殖,克隆形成和细胞凋亡能力。目前文献中常用的细胞株有以下几种:Huh7.5, HepG2, Hep3B和SK-Hep1^[1]。

虽然细胞实验结果能够为药物疗效和作用机

制提供重要信息,但体外实验很难捕捉肿瘤和其微环境之间的复杂关系。

基于以上,在肝癌研究中,体内模型扮演着重要角色^[2]。关于肝癌的实验模型,遗传模型、条件性基因敲除或转基因模型主要用于研究参与癌化过程的特定蛋白质^[3-4],而化学[如N-二乙基亚硝胺(DEN)]诱导肝癌模型是研究不同分子和药物相互作用的主要模型。但是化学诱导肝癌小鼠模型不能完全模拟人肝癌。

DNE肝癌模型主要用于基础研究以及在大鼠、小鼠中促癌发生。DEN可以在不同年龄段的

小鼠注射,但有效性和效率不一。为缩短肝癌发展的时间并且限制致癌原的注射量,一些研究采用将促进剂组合为单剂量的DEN注射即所谓的肝癌“两阶段模型”。在这些促进子中,苯巴比妥(PB)需要引起重视:PB作用于DEN诱导肝癌因小鼠的品系、性别和年龄的不同而变化很大^[5-7]。这些模型是定义和研究原发性HCC结节的模型,而非肝硬化结节的优良模型,在文献中有大量应用。

文献中有使用注射黄曲霉毒素B1(AFB)的HCC实验模型,特别用于AFB诱导肝癌发生相关机制的研究,仅限于那些需要解释AFB作用机理的特殊病例,因AFB的机制还需进一步研究^[8-9]。

最近越来越多的兴趣关注于人肝由单纯的脂肪变性发展为HCC的代谢状态。这个问题也导致了以饮食为基础的小鼠模型的建立,例如:胆碱缺乏饮食(CDD)。最初这种饮食就在大鼠和小鼠中诱发脂肪性肝炎,肝纤维化和肝硬化^[10-11]。近来发现老鼠喂养CDD饮食50~52周后可发展为肝癌^[10]。CDD作用的效果也通过联合注射的化学毒性物质来评价的^[12]。添加乙硫氨酸的CDD饮食能够增强对椭圆形细胞的刺激性,进而提高其癌化潜能^[13-14]。同样,将CDD和DEN联合应用能够更快诱导肝癌的形成^[12]。目前饮食方面一个小的变化是采用胆碱缺乏与加铁L-氨基酸所定义的CDAA饮食在短期内取得与CDD饮食所产生的同样效果^[11,15]。

另外一个用于癌症基础研究的方法是异种移植模型:在这种模型中,肿瘤通过在免疫缺陷小鼠中注入人癌细胞而诱导,此种免疫缺陷小鼠,如无胸腺(裸鼠)或严重的联合免疫缺陷(SCID)小鼠^[16]。在这些模型中,主要有:(1)异位模型,将人癌细胞小鼠侧翼皮下注射;(2)原位模型,肿瘤细胞直接注入小鼠肝脏组织。这些模型大量出现于研究转移性肿瘤的文献中^[17]。

最后,相当多的基础肝癌研究目前采用了基因修饰模型。基因修饰小鼠模型(GMM)用于模拟肝癌的病理生理特征和分子特征^[18]。这种方法用于检测致癌剂存在与否对癌基因产生的影响。GMM模型将通过构建包含特殊启动子的cDNA载体进一步提高,这种启动子可以针对具体的细胞类型^[19]。具有白蛋白启动子的小鼠经常应用于这个领域。

采用转基因小鼠模型诱导获得某基因,而不是构建组织特异性缺失表达的基因。这些模型中,值得注意的就是表达肝炎病毒基因的转基因小鼠模型。大多数乙型肝炎病毒(HBV)相关转

基因动物模型表达HBx基因,而这些基因与改变了的肝细胞功能以及肝癌形成相关^[20]。而表达核心结构蛋白E1和E2的转基因小鼠主要用于丙型肝炎病毒(HCV)的基础研究^[21]。

好几种转基因小鼠模型已经被创建用于证实体外实验所发现的肝癌中信号传导通路,并已经在文献^[22]中报道。myc转基因小鼠与预后好的人HCC有相近的遗传性,有可能将被用于这个水平上整个信号通路的研究^[23]。 β -catenin转基因小鼠已经被应用于肝癌的研究: β -catenin在肝脏的发育和再生中发挥作用, β -catenin的突变是肝脏癌变的早期事件^[24]。生长因子基因的突变,如转化生长因子 α (TGF α),表皮生长因子,成纤维生长因子19,血小板衍生长因子(PDGF)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)证实参与肝癌的进展^[25-26]。综上所述,特定的转基因小鼠已经在基础研究中建立。

另外,表达人种形式的运输受损的 α 1抗胰蛋白酶(AAT)^[27]转基因小鼠是研究AAT缺乏对肝脏的影响的良好模型。AAT缺乏症是一种常染色体隐性遗传疾病,突变导致AAT产生却不能被运输^[27]。这样就导致了AAT在血清中的活性下降且过度沉积在肝脏内。杂合子和纯合子个体都将发展为肝硬化和肝癌。52~90周的时间AAT缺陷小鼠就可发展为肝癌^[27]。

体外实验证实PTEN是一个抑癌基因,参与调控丝氨酸苏氨酸激酶蛋白激酶B(PKB/akt)通路因此,在66%的雄性和30%的雌性周龄40~44的PTEN敲除小鼠模型中也发展为肝癌^[28]。PTEN缺失导致细胞过度增殖,抑制细胞凋亡和癌形成^[29]。肝脏特异性PTEN缺失的小鼠发展为肝细胞脂肪变性,炎症和纤维化,与人非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的特征相似^[28]。

除了用上述模型来评价单纯的癌变机制,也发现在HCC形成过程中相关炎症途径方面有了新进展。这个问题已通过应用特异性NEMO缺失的肝细胞(即参与NF- κ B通路调节过程中的IKK- γ 亚蛋白)很好证实。几项研究显示,肝细胞中NEMO介导的NF- κ B激活有一个重要的生理功能,即防止自发发展为脂肪性肝炎和肝癌,证实NEMO作为抑癌基因存在于肝脏中。NEMO特异性肝细胞缺失小鼠10~12个月后自发形成肿瘤^[30-32]。

最后,还有一个基因修饰小鼠模型已被用于证实肝纤维化和癌症之间存在相关性的基础研究:被广泛证实的肝细胞特异性TAK1缺失小鼠导

致自发性肝细胞死亡, 炎症, 纤维化, 因此, 9个月后形成具有80%清晰可辨的大结节的肝癌^[33]。

2 信号通路

体内研究和相关体外实验对特异分子的研究要求研究者探究癌化过程所涉及的潜在机制, 定义这个过程中严格相关的几条通路(图1)。

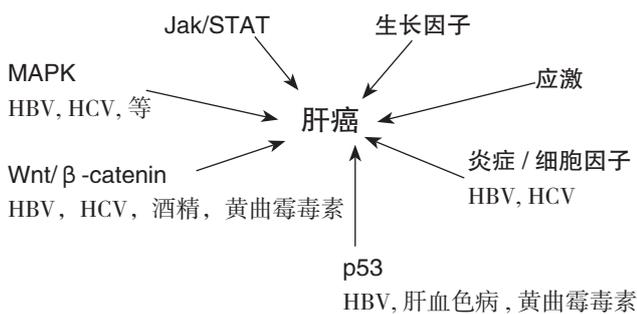


图1 肝癌形成和发展过程中涉及的细胞内通路

因此, 这种基础研究方法提供发现癌化过程所涉及的几条机制: 其中, 特别提到的是在许多肿瘤包括肝癌中显著失调的Wnt信号通路^[34]。Wnt通路参与乙肝、丙肝和酒精性肝硬化导致的肝癌。在肝癌中常常观测到其组成部分Frizzled-7和β-catenin去磷酸化上调表达^[35-36]。β-catenin转基因小鼠可以直接展示肝癌形成过程中所参与分子, 引导研究者深入研究此机制。基于这些模型, 证实β-catenin在肝癌中发生突变。这一事件也在暴露于丙肝病毒感染和黄曲霉毒素的患者中得到证实^[37-38]。

在肝癌相关的系列基因中, p53发挥着关键作用。几项研究表明p53突变和失活在肝癌中发挥着重要作用。肝癌实验模型的体内研究也在人体内得以证实。尤其, 小鼠模型和人体内都证实p53突变与黄曲霉毒素B1诱导的肝癌具有相关性。因此, 血浆中p53突变体检测可作为AFB暴露和HCC存在的一个潜在生物标志。

人ras蛋白H-Ras, N-Ras, K-ras4A, 和K-Ras4B是小GTP结合蛋白, 作为影响细胞生长、分化和凋亡的分子开关^[39]。最初在由多种化学物质如DNE引发的肝癌中, 观察到H-ras第13位密码子, N-ras的第12位密码子和K-ras的第61位密码子有单点突变^[40-43]。通过应用该模型, 发现Ras与下

游的丝氨酸/苏氨酸激酶Raf-1相互作用引起其活化和下游的信号通路包括MAPK激酶MEK1和MEK2的激活, 调节细胞增殖和分化^[44]。Ras基因活化和Ras通路蛋白如p21的表达不光在细胞株中, 也在实体瘤中有报道过^[45-46]。应用反义RNA抑制蛋白激酶和Ras表达的策略已经成功应用于细胞系和动物模型^[47-48]。

体内小鼠肝癌模型也已应用于Jak/STAT通路的研究^[49]。STAT激活是通过Jak将酪氨酸磷酸化实现的。活化的STAT刺激细胞信号因子(SOCS)基因的抑制子的转录。SOCS蛋白反过来结合磷酸化的Jak和其受体从而抑制该通路, 进而防止细胞因子刺激细胞的过度激活^[50]。因此, SOCS是Jak/STAT环路负反馈的组成部分。文献^[51]报道中的其它两个STAT抑制剂成员包括活化的STAT蛋白抑制剂和包含SH2的蛋白。Jak激活STAT促进细胞增殖, 迁移, 分化和凋亡, 且抑制因子的失调将会致病包括癌症^[49]。肝癌中SOCS-1和一种Jak结合蛋白SSI-1的失活已有报道过^[49-50], 因Jak/STAT途径的活化无处不在^[52]。

其它信号通路的蛋白和细胞因子也可以影响肝癌的分子动力学。例如, 血管内皮生长因子和成纤维生长因子在肝癌的发展过程中发挥重要作用^[53-54]。近来报道炎症本质上与癌症相关联, 一系列细胞因子参与肿瘤的发生和发展, 特别是感染肝炎病毒时^[55]。具体一点, 转移过程中Th2细胞因子被诱导而Th1细胞因子下降。因此, 调控细胞因子的表达并且应用炎症抑制因子可能在减缓肝癌进展中起关键作用。最近一项研究显示, 应用表皮生长因子受体抑制剂和转化生长因子的抑制剂可以阻碍小鼠肝癌的发展, 表明这些生长因子过量时的恶性本质^[56-57]。

3 临床相关性和目前的治疗

尽管基础研究做出了很多数据, 和发展药物潜在有效性的兴趣, 肝癌的临床和药物治疗仍然不能阻碍其恶性发展。

像临床实践中建立的那样, 有关肝癌的形成和最好的治疗要求参考巴塞罗那临床肝癌(BCLC)分级系统, 因它不仅是依据预后而将患者归类的有用工具, 而且是筛选最适治疗的一种方法(表1)^[58]。

外科手术是治疗首选。切除和原位肝移植

(OLT)在BCLC0和A的患者达到很好的效果。在非肝硬化患者中选择切除术,且大多数切除术患者耐受性好。然而,虽然目标是要减少发病率和病死率,但在肝硬化患者中肝功能受损使切除术受到了限制。独立性肝癌结节进行肝脏切除是最好的治疗。多瘤结节灶与复发和生存率低相关^[59-62]。因此,在符合米兰标准的多结节肝癌,OLT是最佳选择。事实上,肝移植最好的效果是应用米兰标准(≤ 5 cm的孤立性结节或者不超过3个结节、最大结节 ≤ 3 cm的多结节,没有血管浸润或者肝外转移)。符合这些条件的,5年生存率超过70%,复发介于5%~15%之间^[63-64]。

如果无法行OLT,在选定的病例中进行前瞻性队列内调查,手术切除仍然是考虑的方式。但是,越来越多的文献报道,早期肿瘤进行射频消融术(RFA)^[65-66]或者经动脉化疗栓塞(TACE)^[65]治疗取得很好的效果,比手术治疗更少的并发症。因此,不适合肝移植的多结节肝癌患者也可选择经皮射频消融术或者化疗栓塞治疗。目前为止,最适合TACE的患者是肝功能好(Child-Pugh分级A级),无肝外扩散或血管浸润(BCLC B级)。这些患者不经治疗的预估中位生存时间16个月,而TACE治疗后生存期延长,中位时间超过24个月^[67-68]。相比较,肝功能差的患者进行TACE治疗将导致严重的并发症且因肝衰竭而死亡^[69]。

对于早期肿瘤(≤ 2 cm),它的转移概率是

非常低的,应用RFA具达到完全反应且具安全边界的概率高达90%~100%,且和手术切除具有同样的效果。最近有报道,在BCLC0期患者中手术切除并没有比消融治疗生存率提高,RFA应为治疗首选,只在那些治疗失败的患者中才考虑手术

不同于其它,晚期肝癌患者达到BCLC C阶段(即肝外转移或者血管侵犯,或轻度肿瘤相关症状,肝功能尚存)的中位生存时间6~8个月。直到现在对于这类患者没有有效的治疗手段,化疗与抗雄激素、抗雌激素或干扰素一类的药物均不能使生存率提高^[70]。随着肝癌分子信号途径知识的不断增长,发展为多分子阻断多通路^[71]。目前,以索拉非尼为代表的多激酶抑制剂被确认为治疗晚期肝癌的有效药物。索拉非尼具有抗血管生成和抗增殖的作用,已经被证明可以改善晚期肝癌患者的生存^[72]。SHARP试验观察得到安慰剂组的中位生存期为7.9个月,而索拉非尼治疗组患者的中位生存时间为10.7个月(HR 索拉非尼/安慰剂=0.69,95% $CI=0.55\sim 0.88$)。两组对于生存时间的延长均不伴有放射反应,显著的区别在于进展时间,安慰剂组与索拉非尼组分别为2.8个月和5.5个月(HR 索拉非尼/安慰剂=0.58,95% $CI=0.45\sim 0.74$)。就像试验中论证的,维持治疗直到症状恶化,而不是到放射学检查发现肿瘤有进展为止。因此,临床上,治疗方案会维持到病情恶化除非有二线治疗方案。

表1 修订简表关于肝癌分类和治疗策略的 BCLC 分期系统 (Bruix, Hepatology 2011)

特征	分期	治疗
单个结节 <2 cm	超早期	手术切除、肝移植、RFA
单个或3个结节 <3 cm	早期	肝移植、RFA
多结节	中期	TACE
门静脉浸润	晚期	索拉非尼
危重状态	终末期	系统治疗

4 展 望

4.1 干 / 祖细胞在肝癌中的作用

经过数年,已证实肝细胞和胆管细胞在创伤后能够再生肝组织^[73]。因此,肝脏干细胞的概念直到过去10年才被认可。此外,越来越多的证据也表明,肿瘤干细胞维持肿瘤的形成与生长^[74-75]。肿瘤干细胞在其它许多肿瘤中相继被证实,包括脑^[76-78],前列腺^[79],乳腺^[80],骨髓^[81],胃^[82],结肠^[83-84],和肺^[85],也强化了肝脏中也存在干细胞

的观点。早期体外研究也显示小鼠胚胎干细胞分化为功能性肝细胞^[86-87]。后续一些实验也证实,小鼠和骨髓来源的间叶干细胞体内外都可以分化为肝细胞^[88-89]。对骨髓移植受者的研究也显示这些细胞可以定位于肝脏,并分化为正常肝细胞^[90]。最常见的肝脏干细胞是卵圆细胞^[91]。卵圆细胞表达标志为肝细胞和胆管细胞所共有,提示它们是双电位。事实上在体外适当的培养条件下,它们可分化肝细胞和胆管细胞^[92]。在酒精性肝病和丙型肝炎病毒感染这些疾病中,卵原细胞增多,且与

疾病的严重度相关^[93]。几个研究小组运用卵圆细胞已经分别从胆碱缺乏饮食喂养的小鼠^[92], c-Met 转基因小鼠^[93], p53 敲除小鼠^[94], 和小鼠胚胎肝细胞^[95]中分离出肝祖细胞株。成功从肝肿瘤中分离卵圆细胞并建立肝祖细胞株^[96], 以及从人细胞株中分离出肿瘤干细胞已经陆续被报道^[97]。肿瘤干细胞的存在以及肿瘤组织中成功分离卵圆细胞提示肿瘤干/祖细胞在肿瘤形成中发挥关键作用。近来, 也发现一种新的肝脏起源祖细胞, 并从健康、未受伤的小鼠肝脏分离出来^[98]。对这些祖细胞的进一步研究将为肿瘤进展中调节分化的分子机制提供新见解。

4.2 肝癌中 miRNA 的研究

上个世纪90年代初期证实的小的非编码RNA 引发了一个新的研究领域的发展^[99]。哺乳动物细胞中多种不同的非编码RNA 被发现。包括小干扰RNA^[100], 小核RNA^[101]和微小RNA (即miRNA)^[102]。miRNA 复合物与靶基因3'非翻译区不完全匹配结合, 通过mRNA 下降或者抑制翻译负调控基因表达^[102-103]。近来研究显示, miRNA 基因的改变将导致肿瘤的形成; 有研究也证实几种miRNA 不是参与调节肿瘤抑制, 就是参与促肿瘤形成^[104]。例如, 下调表达miR-15和miR-16导致bcl2、cdk6和cdc27的过表达; 而miR-21过表达将抑制PTEN和TPN1^[105]。一些参与调控抑癌基因p53和p53反应基因的miRNA 也被证实。这些miRNAs 中, miR-34 调节p53在细胞周期阻滞, 细胞衰老和凋亡方面的功能^[106]。

因此, miRNA 表达谱不仅提供肿瘤分期标志, 也提供潜在治疗方案^[107]。根据Girard等^[108]的综述在肝脏表达最丰富的miR-122, 参与调控细胞应激反应, 肝癌发生和抑制丙肝病毒复制。因此, 有人提出miR-122的下调可作为肝癌的潜在生物标志物^[109]。

其它文献报道, 基因芯片谱也发现miR-21 高表达于肝癌和细胞株中。在培养的肝癌细胞中抑制miR-21能够上调肿瘤抑癌基因PTEN的表达, 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和浸润。相反, 上调miRNA 的表达显示相反的结果。这些数据揭示miR-21和PTEN间的相互作用, 提示肿瘤发生中miR-21的直接参与作用^[110]。进一步的肝癌中miRNA 表达谱与患者生存预后比较研究显示, 共19个miRNA 参与细胞分裂、有丝分裂和G₁-S过渡期等生物过程, 与疾病预后显著相关^[111]。综上所述,

述, miRNA 可用于筛选肿瘤患者, 找出那些转移/复发的潜在患者。

5 结 论

动物模型是癌症研究中的重要工具, 它为研究者复制了肿瘤发展中重要的遗传、病理或者环境等方面异常。在过去的几年当中, 已建立了许多啮齿动物模型来研究肝癌的各个方面。基础和临床研究的合作促进了肝癌研究领域的重大发展, 形成了最佳诊断和治疗方案的框架, 如在BCLC分级系统所提供和概括的那样。很多情况下, 很难判断鼠模型能复制相应人体状态的特征到何种程度, 但是这些模型可以提供有用且独特的方式, 发现新通路, 未知的机制和潜在临床治疗方案。因此, 将来的研究, 新工具和通路的应用将导致新药的产生, 更好地干扰肝癌发展进程。

志谢: 本研究得到以下基金支持: MIUR 和 Ministero della Salute 授予 Marziani 博士的 PRIN 2009-prot. 2009X84L84_003 基金和 GR-2010-2306996 基金; MIUR 授予 Dr. Svegliati Baroni 的 PRIN 2009-prot. 2009YNERCE_002, FIRB 2010-prot RBAP10MY35_001 基金; 授予 Trauner 博士的来自奥地利科学基金会的 P 19118-B05, F3008-B05 和 F3517 和来自奥地利联邦科学 GEN-AU 项目基金。

做出这些数据的研究已经得到了欧盟第七框架计划 (FP7/2007-2013) 已收到基金的支持, 该计划依据编号为 HEALTH-F2-2009-241762 的 FLIP 项目准予协议。

参考文献

- [1] Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now[J]. *Oncology*, 2007, 72(Suppl 1):30-44.
- [2] De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma[J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45(6):450-459.
- [3] Feng H, Cheng AS, Tsang DP, et al. Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives β -catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(8):3159-3175.
- [4] Koch KS, Maeda S, He G, et al. Targeted deletion of hepatocyte Ikkbeta confers growth advantages[J]. *Biochem Biophys Res*

- Commun, 2009, 380(2):349-354.
- [5] Awuah PK, Rhieu BH, Singh S, et al. β -Catenin loss in hepatocytes promotes hepatocellular cancer after diethylnitrosamine and phenobarbital administration to mice[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e39771.
- [6] Kamino H, Yamazaki Y, Saito K, et al. Nuclear receptor CAR-regulated expression of the FAM84A gene during the development of mouse liver tumors[J]. Int J Oncol, 2011, 38(6):1511-1520.
- [7] Wang M, Halasi M, Kabirov K, et al. Combination treatment with bortezomib and thiothrepton is effective against tumor formation in mouse models of DEN/PB-induced liver carcinogenesis[J]. Cell Cycle, 2012, 11(18):3370-3372.
- [8] Hulla JE, Chen ZY, Eaton DL. Aflatoxin B1-induced rat hepatic hyperplastic nodules do not exhibit a site-specific mutation within the p53 gene[J]. Cancer Res, 1993, 53(1):9-11.
- [9] McGlynn KA, Hunter K, LeVoyer T, et al. Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans[J]. Cancer Res, 2003, 63(15):4594-4601.
- [10] Knight B, Yeoh GC, Husk KL, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice[J]. J Exp Med, 2000, 192(12):1809-1818.
- [11] Nakano T, Cheng YF, Lai CY, et al. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats[J]. J Hepatol, 2011, 55(2):415-425.
- [12] de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2008, 49(6):1055-1061.
- [13] Guest I, Ilic Z, Sell S. Age dependence of oval cell responses and bile duct carcinomas in male fischer 344 rats fed a cyclic choline-deficient, ethionine-supplemented diet[J]. Hepatology, 2010, 52(5):1750-1757.
- [14] Zhong B, Zhou Q, Toivola DM, et al. Organ-specific stress induces mouse pancreatic keratin overexpression in association with NF-kappaB activation[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 9):1709-1719.
- [15] Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, et al. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2009, 137(4):1467-1477.
- [16] Newell P, Villanueva A, Friedman SL, et al. Experimental models of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2008, 48(5):858-879.
- [17] Sun FX, Tang ZY, Lui KD, et al. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues[J]. Int J Cancer, 1996, 66(2):239-243.
- [18] Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(9):645-658.
- [19] Tuveson DA, Jacks T. Technologically advanced cancer modeling in mice[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(1):105-110.
- [20] Xiong J, Yao YC, Zi XY, et al. Expression of hepatitis B virus X protein in transgenic mice[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(1):112-116.
- [21] Naas T, Ghorbani M, Alvarez-Maya I, et al. Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 8):2185-2196.
- [22] Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(56):9007-9021.
- [23] Lee JS, Chu IS, Mikaelian A, et al. Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer[J]. Nat Genet, 2004, 36(12):1306-1311.
- [24] Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors[J]. Oncogene, 2006, 25(27):3778-3786.
- [25] Baek HJ, Lim SC, Kitisin K, et al. Hepatocellular cancer arises from loss of transforming growth factor beta signaling adaptor protein embryonic liver fodrin through abnormal angiogenesis[J]. Hepatology, 2008, 48(4):1128-1137.
- [26] Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, et al. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice[J]. Am J Pathol, 2002, 160(6):2295-2307.
- [27] Geller SA, Nichols WS, Kim S, et al. Hepatocarcinogenesis is the sequel to hepatitis in Z α 1-antitrypsin transgenic mice: histopathological and DNA ploidy studies[J]. Hepatology, 1994, 19(2):389-397.
- [28] Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(Suppl 1):S96-S100.
- [29] Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas[J]. J Clin Invest, 2004, 113(12):1774-1783.
- [30] Beraza N, Malato Y, Sander LE, et al. Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage[J]. J Exp Med, 2009, 206(8):1727-1737.
- [31] Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2007, 11(2):119-132.
- [32] Seki E, Brenner DA. The role of NF-kappaB in hepatocarcinogenesis: promoter or suppressor? [J]. J Hepatol, 2007, 47(2):307-309.
- [33] Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(2):844-849.
- [34] Herbst A, Kolligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for

- cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 361:63-91.
- [35] Merle P, Kim M, Herrmann M, et al. Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(5):854-862.
- [36] Terris B, Pineau P, Bregeaud L, et al. Close correlation between beta-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas[J]. *Oncogene*, 1999, 18(47):6583-6588.
- [37] Devereux TR, Stern MC, Flake GP, et al. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1[J]. *Mol Carcinog*, 2001, 31(2):68-73.
- [38] Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3):245-250.
- [39] Clark GJ, Quilliam LA, Hisaka MM, et al. Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(11):4887-4891.
- [40] Baba M, Yamamoto R, Iishi H, et al. Ha-ras mutations in N-nitrosomorpholine-induced lesions and inhibition of hepatocarcinogenesis by antisense sequences in rat liver[J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(5):815-820.
- [41] Bai F, Nakanishi Y, Takayama K, et al. Codon 64 of K-ras gene mutation pattern in hepatocellular carcinomas induced by bleomycin and 1-nitropyrene in A/J mice[J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2003, (Suppl 1):161-170.
- [42] Challen C, Guo K, Collier JD, et al. Infrequent point mutations in codons 12 and 61 of ras oncogenes in human hepatocellular carcinomas[J]. *J Hepatol*, 1992, 14(2/3):342-346.
- [43] Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(2):174-179.
- [44] Jagirdar J, Nonomura A, Patil J, et al. ras oncogene p21 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Pathol*, 1989, 4(1):37-46.
- [45] Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(4):1117-1128.
- [46] Liao Y, Tang ZY, Liu KD, et al. Apoptosis of human BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells released by antisense H-ras DNA-in vitro and in vivo studies[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(1):25-33.
- [47] Grisham JW. Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(1):59-81.
- [48] Liao Y, Tang ZY, Ye SL, et al. Modulation of apoptosis, tumorigenicity and metastatic potential with antisense H-ras oligodeoxynucleotides in a high metastatic tumor model of hepatoma: LCI-D20[J]. *Hepatogastroenterology*, 2000, 47(32):365-370.
- [49] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity[J]. *Nat Genet*, 2001, 28(1):29-35.
- [50] Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2):821-824.
- [51] Nagai H, Kim YS, Konishi N, et al. Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2002, 186(1):59-65.
- [52] Yasuda E, Kumada T, Takai S, et al. Attenuated phosphorylation of heat shock protein 27 correlates with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1):337-342.
- [53] Budhu A, Forgues M, Ye QH, et al. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(2):99-111.
- [54] Huang X, Yu C, Jin C, et al. Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3):1481-1490.
- [55] Schiffer E, Housset C, Cacheux W, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2005, 41(2):307-314.
- [56] Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, et al. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(11 Suppl):121S-131S.
- [57] Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, et al. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:232.
- [58] de Lope CR, Tremosini S, Forner A, et al. Management of HCC[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(Suppl 1):S75-87.
- [59] Arai S, Tanaka S, Mitsunori Y, et al. Surgical strategies for hepatocellular carcinoma with special reference to anatomical hepatic resection and intraoperative contrast-enhanced ultrasonography[J]. *Oncology*, 2010, 78(Suppl 1):125-130.
- [60] Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(2):200-207.
- [61] Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, et al. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7):1908-1916.

- [62] Huang J, Yan L, Cheng Z, et al. A randomized trial comparing radiofrequency ablation and surgical resection for HCC conforming to the Milan criteria[J]. *Ann Surg*, 2010, 252(6):903-912.
- [63] Cillo U, Vitale A, Bassanello M, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg*, 2004, 239(2):150-159.
- [64] Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(1):35-43.
- [65] Bargellini I, Sacco R, Bozzi E, et al. Transarterial chemoembolization in very early and early-stage hepatocellular carcinoma patients excluded from curative treatment: a prospective cohort study[J]. *Eur J Radiol*, 2012, 81(6):1173-1178.
- [66] Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, et al. Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice?[J]. *Hepatology*, 2008, 47(1):82-89.
- [67] Llovet JM, Real MI, Montaña X, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 359(9319):1734-1739.
- [68] Malagari K, Alexopoulou E, Chatzimichail K, et al. Transcatheter chemoembolization in the treatment of HCC in patients not eligible for curative treatments: midterm results of doxorubicin-loaded DC bead[J]. *Abdom Imaging*, 2008, 33(5):512-519.
- [69] Paleri V, Carding P, Chatterjee S, et al. Voice outcomes after concurrent chemoradiotherapy for advanced nonlaryngeal head and neck cancer: a prospective study[J]. *Head Neck*, 2012, 34(12):1747-1752.
- [70] Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):1020-1022.
- [71] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
- [72] Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(1):25-34.
- [73] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration[J]. *Science*, 1997, 276(5309):60-66.
- [74] Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12):895-902.
- [75] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859):105-111.
- [76] Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25):15178-15183.
- [77] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18):5821-5828.
- [78] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401.
- [79] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23):10946-10951.
- [80] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7):3983-3988.
- [81] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367(6464):645-648.
- [82] Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells[J]. *Science*, 2004, 306(5701):1568-1571.
- [83] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. *Nature*, 2007, 445(7123):106-110.
- [84] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445(7123):111-115.
- [85] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. *Cell*, 2005, 121(6):823-835.
- [86] Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2002, 36(1):22-29.
- [87] Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro[J]. *FEBS Lett*, 2001, 497(1):15-19.
- [88] Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 23):5655-5664.
- [89] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Hepatology*, 2004, 40(6):1275-1284.
- [90] Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells[J]. *Nature*, 2000, 406(6793):257.
- [91] Menthena A, Deb N, Oertel M, et al. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6):1049-1061.
- [92] Lázaro CA, Rhim JA, Yamada Y, et al. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture[J]. *Cancer Res*, 1998,

- 58(23):5514-5522.
- [93] Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, et al. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2):537-541.
- [94] Spagnoli FM, Amicone L, Tripodi M, et al. Identification of a bipotential precursor cell in hepatic cell lines derived from transgenic mice expressing cyto-Met in the liver[J]. *J Cell Biol*, 1998, 143(4):1101-1112.
- [95] Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, et al. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(3):435-445.
- [96] Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, et al. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(22):8360-8365.
- [97] Parent R, Marion MJ, Furio L, et al. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(4):1147-1156.
- [98] Sahin MB, Schwartz RE, Buckley SM, et al. Isolation and characterization of a novel population of progenitor cells from unmanipulated rat liver[J]. *Liver Transpl*, 2008, 14(3):333-345.
- [99] Hüttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, et al. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse[J]. *EMBO J*, 2001, 20(11):2943-2953.
- [100] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543):853-888.
- [101] Kiss T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions[J]. *Cell*, 2002, 109(2):145-148.
- [102] Kato M, Slack FJ. microRNAs: small molecules with big roles - C. elegans to human cancer[J]. *Biol Cell*, 2008, 100(2):71-81.
- [103] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [104] Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes[J]. *Oncogene*, 2006, 25(46):6188-6196.
- [105] Calin GA, Croce CM. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8):2059-2066.
- [106] He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23):11099-11101.
- [107] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18):8699-8707.
- [108] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(4):648-656.
- [109] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13):6092-6099.
- [110] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2):647-658.
- [111] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2):419-427.

(译者: 王强凤 审校: 史肖华)

[该文原载于 *Ann Transl Med*, 2013, 1(2):15.]

本文引用格式: De Minicis S, Marzioni M, Benedetti A, 等. 肝细胞癌的新见解: 从实验到临床[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):1-9. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.001

Cite this article as: De Minicis S, Marzioni M, Benedetti A, et al. New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(1):1-9. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.001