

靶向肝癌干细胞的肿瘤治疗进展

章 健 来维洁 周秀梅 王毅刚*

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘要 肝癌是最常见的五大癌症之一,也是患者死亡的重要癌症类型之一。传统方法对治疗早期肝癌取得了一定的进展,但是癌症的复发、转移和耐药仍未得到根本解决,而这些现象可通过癌症干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论进行解释。原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC),目前认为其可能部分起源于肝癌干细胞。与肝癌干细胞有关的Wnt/ β -catenin、TGF- β 、Notch和Hedgehog等信号通路和EpCAM、Lin28和miR-181等分子,在体内外调节肝癌干细胞活性,并可用来设计预防或治疗癌症的分子靶点。然而,肝癌和肝癌干细胞涉及一个复杂的发生和调节机制,存在相互干扰和冗余的信号通路,因此针对单个分子或途径的治疗效果有限。该文综述了肝癌干细胞与肝癌发生的进展及其相关的信号通路与关键分子,与针对肝癌干细胞治疗的新策略。

关键词 肝癌; 肝癌干细胞; 信号通路; 靶向治疗

The Progress of Tumor Therapy Targeting Liver Cancer Stem Cells

Zhang Jian, Lai Weijie, Zhou Xiumei, Wang Yigang*

(College of Life Sciences Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Liver cancer is one of the five most common cancers and has become one of important types of cancer causing death. Conventional treatment for early liver cancer has made a certain progress, but cancer recurrence, metastasis and drug-resistance still occur, which may be explained by the theory of cancer stem cells (CSCs). Primary liver cancer mainly includes hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), which are considered that they may derive partially from liver cancer CSCs. Wnt/ β -catenin, TGF- β , Notch and Hedgehog signaling pathway, and EpCAM, Lin28, and miR-181 molecule are also related with liver cancer CSCs. The above can be invoked as molecular targets, and directly modulate CSCs *in vivo* and *in vitro*, and assist in designing novel strategies to prevent or treat human cancers. However, CSCs and liver cancer are involved in a complex carcinogenesis and regulatory mechanism with a mutual interference and redundant signaling pathway. Therefore, therapeutic effect is limited to a single molecule or pathway. In this paper, we review the progress of liver cancer CSCs, carcinogenesis, and the related signaling pathways and key molecules, as well as new strategies of treatment targeting liver cancer CSCs.

Keywords liver cancer; CSCs; signaling pathway; targeted therapy

收稿日期: 2016-08-30 接受日期: 2016-10-14

国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省自然科学基金资助(批准号: LZ13H160004、LY16H160056)和浙江省大学生科技创新活动计划(批准号: 2016R406007)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

Received: August 30, 2016 Accepted: October 14, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LZ13H160004, LY16H160056) and College Students' Science and Technology Innovation Activities in Zhejiang Province (Grant No.2016R406007)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

网络出版时间: 2016-12-28 16:25:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161228.1625.004.html>

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第五大常见癌症和第三位癌症死亡原因^[1]。尽管近年来在肝癌治疗方面有了一定进展,手术、射频消融术治疗和化疗均能有效去除或减小肿瘤组织,但对预防转移和复发的能力有限^[2]。癌症或癌症干细胞(cancer stem cells, CSCs)的概念已经提出多年,过去10年中,肿瘤中存在CSCs的依据逐渐增加。CSCs首次在血液恶性肿瘤急性髓系白血病中被发现,但最近HCC中的CSCs及其自我更新能力、分化、抵抗化疗和无限分裂等研究取得了较大进展。利用鉴定的表面标志物, CSCs在越来越多的上皮和其他类型恶性肿瘤中被发现,表明大多数恶性肿瘤的发生可能均与CSCs有关。此外,许多在胚胎时期激活或抑制的CSCs能调节干细胞/祖细胞癌组织的潜在生物表面标志物和信号通路,也被成功识别,并被用于靶向治疗肿瘤,且效果较好。本文综述了肝癌干细胞的起源、涉及的相关标志及信号通路以及靶向肝癌干细胞的治疗新策略。

1 肝癌干细胞的起源及功能

人类肝癌干细胞很可能引起HCC和肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC),该假说源于许多肝癌肿瘤组织中含有一种混合型成熟细胞,细胞表型类似于HPC(hepatic precursor cell)。免疫表型分析显示,28%~50%的肝癌高表达干细胞表面标志物,如CK7(cytokeratin 7)和CK19,并且还存在着一种与成熟肝细胞之间相互联系的中间表型干细胞。已有证据表明,肝癌患者的肝细胞和胆管细胞携带表面标志物(如白蛋白、CK7和CK10)表达程度高,则手术切除和肝移植后复发率也偏高。

CSCs假说基于干细胞在癌症组织和细胞层次结构形成中均出现,并且与正常组织相似。肿瘤形成、生长和转移均由具有干细胞特性的细胞所维持。目前,肝癌中的CSC可由数个细胞表面抗原所识别,包括c-kit、CD133、CD90、CD44、OV6和CD326[又称为上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)]或通过Hoechst染色技术分离侧群干细胞(side population, SP)。与non-SP细胞相比,SP细胞在肝癌组织中具有更高的增殖潜能、致瘤性和抗凋亡属性。

此外,从肝癌细胞中分离出的CD133⁺细胞在体内形成肿瘤组织的能力更大,具有类似于干细胞特

征基因表达、自我更新能力,并能分化成非肝细胞样细胞^[3]。同时,CD133⁺肝癌细胞仅占肿瘤细胞极少部分,在人类肝细胞癌标本中,CD133水平与肿瘤级别、疾病进展和复发率呈正相关,与生存期负相关。最近研究表明,肝内胆管癌可能源于肝干细胞而不是成熟的胆管细胞,这可通过识别肝细胞并结合ICC和HCC的形态和表型间的中间特征来获得证据^[4]。也有一些动物模型表明,ICC可来源于HPC(未发表数据)。此外,在少数人ICC中一些肿瘤细胞表达特定肝干细胞的标志,显示出了可能的干细胞来源^[5]。然而,目前没有充分证据说明ICC中干细胞的起源,以期通过进一步免疫组化实验研究肝脏干细胞相关标志物的表达来更清楚地阐明ICC干细胞起源。

近来,肿瘤相关钙信号转导蛋白1(tumor associated calcium signal transduction protein 1, *TACSTD1*)编码产生的一个泛癌抗原上皮细胞黏附分子(EpCAM),被确定为肝癌的早期生物标志物^[6]。EpCAM是Wnt- β /catenin信号通路的直接转录产物。EpCAM⁺AFP(alpha fetal protein)⁺是有功能的肝干细胞的肝细胞癌亚型,EpCAM⁺肝癌细胞与肿瘤进展和侵袭性相关。此外,该表面分子也在癌变前HPC和胆管上皮等肝组织中高度表达,但在大多数成熟肝细胞中不表达。目前普遍认为,儿童最常见的肝CSCs是上皮和间质组织来源的,并可传代,这些肿瘤甚至可以模仿肝内胆管结构和形成导管状结构,其形成的模式见图1^[7]。

2 靶向肝癌干细胞的治疗进展

2.1 溶瘤病毒的靶向治疗

目前,在靶向CSCs的肿瘤基因治疗研究中,利用溶瘤病毒作为载体显现许多优势:(1)病毒能够介导抑癌基因进入肿瘤细胞并长期表达;(2)有些病毒对CSCs具有天然的靶向性,通过改造后,可以提高其抗癌效果以及安全性;(3)病毒不易引起耐药性^[8]。本课题组先在CTGVT(cancer targeting gene-viro therapy)溶瘤腺病毒系统的基础上,通过删除Ad-E1B55KDa病毒蛋白,并设计运用GOLPH2(Golgi phosphoprotein 2)特异性启动子控制病毒基因的选择性表达,进而构建了肝癌特异性溶瘤腺病毒GD55,从而提高病毒的靶向性和安全性,并且体外和活体实验中证明可以限制肝癌细胞的增殖。GOLPH2又称为GP73,为高

尔基膜蛋白, 是一个诊断HCC的良好的标志, 其特异性比常见的肝癌标志物甲胎蛋白更高, 敏感性和特异性分别达到75%和75%, 而AFP为58%和85%^[10]。通过实验发现, 溶瘤病毒GD55能很好地抑制肝癌CSCs的生长、克隆形成和体内肿瘤发生, 并且利用诱导细胞凋亡和抗血管生成来抑制肝癌肿瘤生长, 与肝癌干细胞形成肿瘤的理论相吻合, 提示其具有很好的临床治疗肝癌的应用前景。

2.1.1 溶瘤腺病毒 腺病毒一直是溶瘤病毒研究领域中的热点, 其在肿瘤细胞内有复制特异性和选择性。但腺病毒存在本身缺乏靶向性, 同时还有免疫原性。因此, 近年来, 研究者在增强腺病毒的肿瘤靶向性和削弱免疫排斥方面展开了大量的实验, 以便更好地杀伤CSCs。谭晓华^[11]通过删除、突变调控腺病毒参与细胞周期基因或调控特异性启动子影响E1A(human adenovirus type early-region 1A)表达来加强溶瘤腺病毒的靶向性。此外, 通过使用双启动子^[12]、缺氧调控元件^[13]和增强子^[14]等方法均能提升其靶向性。由于腺病毒的免疫原性, 病毒直接进入人体内会产生免疫反应导致出现中和抗体而致其失效。研究人员发现, 以各类细胞包括干细胞为载体, 可使溶瘤病毒随细胞经过血液循环到达肿瘤部位。有研究证明, 利用载体细胞运输溶瘤病毒所能到达病变部位的病毒数量比直接静脉注射病毒多万倍以上^[15-16], 并且也能应用于靶向肝癌干细胞。

由于溶瘤腺病毒载体可以选择性地在肿瘤细胞内复制且裂解细胞, 而其携带的治疗基因特异性表达加强, 两者形成协同作用, 显著提高肿瘤治疗的效果。目前, 许多科研人员致力于这方面的研究, 如陈泽建等^[17]构建了重组溶瘤腺病毒Ad.haf-E1-Δ55, 使其进入细胞核内, 调控HREAF[血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)上游的缺氧应答元件(hypoxia responsive element, HRE)与AFP核心启动子AFO.3构成的杂合启动子]序列和E1A基因特异性表达, 启动病毒的增殖周期, 并证实肝癌细胞株HepG2和Bel7402在其作用下的增殖有所下降。目前, 针对溶瘤病毒的研究已从单靶向转变成双靶向或多靶向策略, 由单一走向联合治疗^[18]。许多研究证明, 联合两种及其以上的靶向策略不仅能够使安全性得到提高, 对肿瘤及CSCs的杀伤作用也不断加强。王娟等^[19]所构建的TD55-TRAIL双靶向病毒

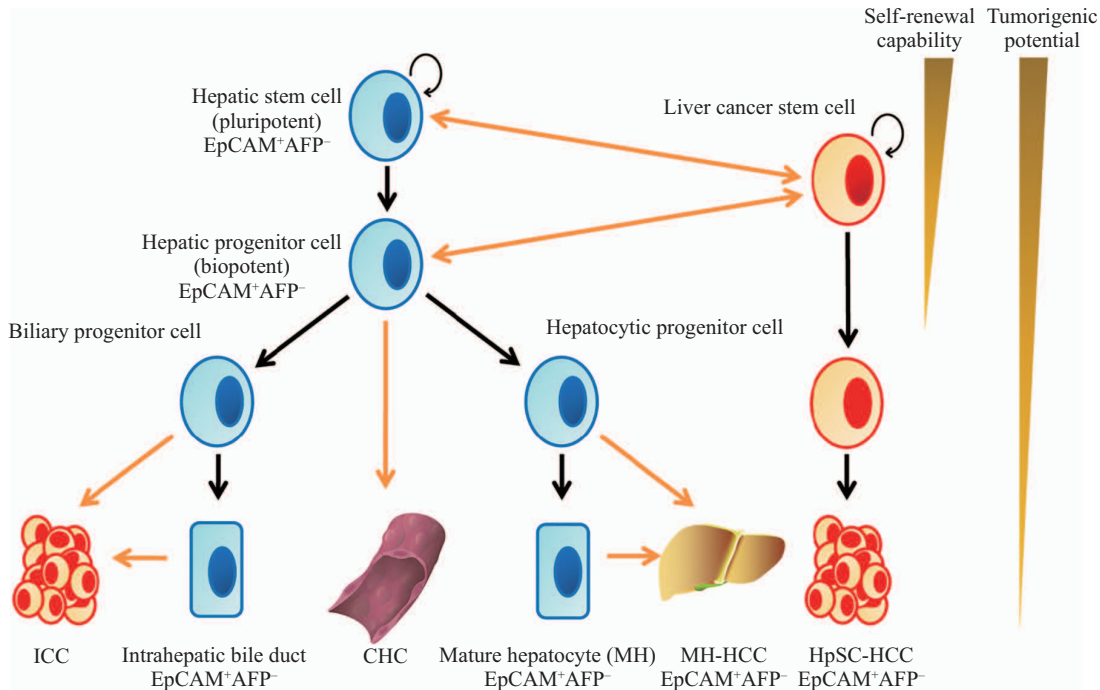
比之前出现的ZD55-TRAIL病毒的安全性更强, 靶向作用更好。而曾祯等^[20]研究携带TRAIL与IL-24两种基因的重组溶瘤腺病毒(即三靶向溶瘤腺病毒), 发现其对肿瘤的抑制效果愈加显著。本课题组也进行了溶瘤腺病毒靶向治疗肝癌干细胞的研究。其中, 张新敏等^[21]研究的溶瘤腺病毒ZD55对肝癌干细胞的抑制效应, 证实ZD55对肝癌干细胞有明显的细胞毒性效应, 能够使高达60%细胞发生凋亡。

2.1.2 其他溶瘤病毒 目前已经发现多类病毒具有天然嗜肿瘤特性, 根据其特征可以将其改造成溶瘤病毒以杀伤CSCs, 如单纯疱疹病毒-1(herpes simplex virus-1, HSV-1)、新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)和溶瘤痘苗病毒(oncolytic vaccinia virus)等。

经过基因工程改造后的HSV-1类的溶瘤病毒是一类具有选择性复制及特异性杀伤的病毒^[22]。2015年10月, Kasuya等^[23]构建的HSV-1类溶瘤病毒T-VEC被美国FDA正式批准为恶性黑色素瘤患者首次术后复发的局部治疗措施, 是第一个被FDA获批准的溶瘤病毒药物。其中, 一类改造为引入特异性启动子或增强子的方法来构建所需的溶瘤病毒, 如G92A是将白蛋白增强子引入HSV-1早期蛋白ICP4基因, 可在肝癌细胞内进行特异性复制^[24]。在ICP4基因前加入人端粒酶逆转录启动子的 α HSV1-hTERT在肿瘤细胞内高表达端粒酶基因的条件下复制, 研究表明, 此病毒在肝癌荷瘤小鼠模型中显现出明显的抗癌效果^[25]。NDV属于感染禽类的副黏性病毒科腮腺炎病毒属, 已经广泛应用于肿瘤研究并取得较好的结果。Freeman等^[26]对NDV的一种减毒病毒株NDV-HUJ进行临床实验, 检测其以静脉给药方式对恶性肿瘤的安全性和治疗效果, 显示了良好的治疗效果。

2.2 靶向信号通路的抑制

研究表明, Wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog、FGF、TGF- β /BMP信号通路涉及维持组织内稳态, 调节正常干细胞的自我更新和祖细胞的增殖或分化^[27]。目前已经明确Wnt/ β -catenin和Hedgehog信号通路对胚胎发生和发展、CSCs和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)至关重要。受损的信号通路会导致正常干细胞向CSCs的转换。此外, 由于表观遗传变化或干细胞的遗传信号转导相关基因改变引起CSCs干细胞获得自我更新潜力。分析失调的Wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog、FGF和TGF- β /BMP信号通路在肝癌CSC中的作用并靶向



正常肝干细胞能自我更新和分化, 形成一个正常肝组织。致癌突变发生在正常干细胞或分化细胞, 并称为肝癌干细胞。肝癌干细胞具有自我更新能力和分化潜能, 有助于肿瘤的形成与转移。

Normal liver stem cells are characterized by self-renewal and differentiate to form normal liver tissue. Carcinogenic mutations occur in normal stem cells or differentiated cells, named as liver cancer stem cells. They possess the ability to self-renew and differentiation, and contribute to tumor formation and metastasis.

图1 干细胞对肝组织生长和肿瘤发生的影响(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 The effect of stem cells on liver growth and tumorigenesis (modified from reference [8])

抑制CSCs可望在肝癌治疗中发挥重要作用。

2.2.1 Wnt/ β -catenin信号通路 Wnt/ β -catenin信号通路是一种相对稳定的信号通路, 维持正常的细胞过程, 如增殖、再生和自我更新。Wnt信号通过配体结合七次跨膜卷曲的(Fzd)受体和单跨膜脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)5/6受体。Wnt受体Fzd-7在90%的肝癌中被发现, 并且20%~40%的肝癌出现异常细胞质和核 β -catenin积累现象。目前证实, 小鼠肝干/祖细胞以突变 β -catenin导致*BM11*(B-cell specific moloney leukemia virus)基因的强烈表达, 获得过多的自我更新能力和致瘤性。Wnt/ β -catenin信号通路在啮齿动物椭圆形细胞和OV6阳性肿瘤细胞中被激活, 导致肝癌细胞产生药物抗性^[28]。此外, Wnt/ β -catenin信号异常对于干细胞的转换有重要作用。Cairo等^[29]发现, Wnt/ β -catenin和Myc信号的相互作用会激活一个截然不同的转录程序, 与肿瘤的侵袭性有关。王磊等^[30]通过特异性敲除小鼠肝细胞中 β -catenin发现, 卵圆细胞活化受到明显抑制, 表明靶向抑制Wnt/ β -catenin信号对肝癌的抑制具有调控作用。

2.2.2 Notch信号通路 Notch信号通路在维持干细胞的自我更新和分化中起着重要的作用。Notch信号通路在胚胎发生过程的肝脏形成和胆管形成中具有突出的作用。此外, Notch家族成员参与血管生成和血管内皮形成。据报道, Notch1作为一个肿瘤抑制基因参与其他信号通路(如Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的交互作用), 并在肿瘤抑制基因*P-ten*(phosphatase and ten sinhomologue delet2ed on chromosome ten)的监管下完成^[31]。最近的证据表明, 激活Notch1信号会引起死亡受体5(death receptor, DR5)的表达水平提高, 增加TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)诱导的体内外的肝癌细胞凋亡^[31]。目前, 临床试验Notch通路抑制剂治疗实体肿瘤正在接受审核, Notch通路抑制剂治疗肝癌的有效性尚不清楚。

2.2.3 BMI1信号通路 *BMI1*是多梳家族基因(polycomb-group proteins, PcG)的一种, 在进化过程中高度保守, 其对胚胎和干细胞自我更新具有调节作用。目前有研究人员通过实验证实, *BMI1*不仅通过调节TN4a(inhibitor of CDK4)/Arf(alternative reading frame)

信号通路影响肝卵圆细胞增殖, 而且还是调控肝卵圆细胞介导的肝癌发生的重要因素^[32]。BMI1在维持肝脏CSCs的作用通过BMI1在小鼠肝干细胞/祖细胞中的异位表达被证实。在这些细胞中, BMI1和Wnt/ β -catenin通路调节正常肝脏或CSCs的自我更新。BMI1的特异性表达在抑制肝干细胞/祖细胞的致癌性转化中起着关键作用。

2.2.4 Hedgehog信号通路 Hedgehog信号通路(HH)从果蝇到人类中都为保守信号通路, 通过控制细胞命运和模式的形成, 在胚胎发育和维持成熟组织内稳态中发挥重要作用。其功能重要性体现在出生缺陷病症和恶性肿瘤突变相关的异常激活途径。哺乳动物中存在三个Hedgehog的同源基因, Sonic Hedgehog、Indian Hedgehog和Desert Hedgehog, 其中Sonic是HCC的重要标志, 多达60%的人肝细胞癌表达Sonic。通过特异性阻断该途径, 发现其下游转录因子Gli介导的目标基因表达下调^[33]。此外, Smo作为HH的必要信号传导子(signal transducer), 其致癌性激活可以调节原癌基因的过度表达, 在肝脏致癌中作为一个重要的致病基因。最近的研究还表明, 激活相关的Hedgehog信号与CSC和EMT特性在许多类型的癌症包括结肠癌、胃癌、食道癌、肝癌和其他癌症密切相关。因此, 抑制HH途径可以作为一种潜在的抑制肝癌CSC的策略。

2.2.5 TGF- β TGF- β 是一种多功能细胞转化因子, 通过细胞依赖调控肿瘤的发生。肿瘤细胞响应TGF- β 有选择性地失去生长抑制, 但保留TGF- β 信号通路的原本功能, 在TGF- β 刺激下可能表现出迁移的增强和侵袭行为。TGF- β 信号通路下游受体分子十分复杂, 其中, Smad信号已被证明是胚胎发生的肝细胞增殖以及胃肠道癌症形成的关键信号^[34]。Guo等^[35]发现, TGF- β 可以调控肝癌干细胞中信号转导通路, 抑制肝癌干细胞的自我更新及分化, 从而抑制肿瘤的发展, 在肝癌的发生中起重要作用。TGF- β 在肝癌早期可以抑制癌细胞增殖, 但在晚期会通过抑制免疫反应, 刺激血管生成等促进肝癌的发展。最近发现, 由于真核起始因子(eukaryotic initiation factor, ELF)的减少, TGF- β 受体和信号分子在肝脏中通过肝细胞的增殖和血管生成刺激导致癌症的形成^[36]。

2.3 microRNA与靶向肝癌干细胞治疗

microRNA(miRNA)在许多生理活动过程中扮演关键的角色, 包括在癌症中通过与特定的信使

RNA(mRNA)碱基配对直接互动, 然后通过多种分子机制抑制靶基因的表达。miRNA能在致癌作用中发生异常调节, 它们可以作为癌基因和肿瘤抑制基因。干扰肿瘤细胞的miRNA表达水平, 可能导致表观遗传调控的miRNA异常表达、miRNA基因的正常加工、miRNA在癌症相关的基因区域的位置异常。因此, miRNA的异常表达是实体肿瘤包括肝癌的一个常见的特性^[37]。在肝脏癌变的组织中, miRNA被发现具有肿瘤抑制作用(miR-122、miR-26、miR-223)和致癌作用(miR-130b、miR-221、miR-222)^[38]。有研究人员通过比较肝癌干细胞和非肝癌干细胞之间的miRNA差异表达谱, 揭示miRNA对肝癌干细胞恶性表型的调控作用。通过实验发现, miR-150通过调控其靶基因*c-Myb*的表达, 在维持CD133⁺肝癌干细胞恶性表型的分子机制中发挥了重要作用^[39]。另有研究表明, miR-491通过Nf-KB/snail信号通路调控肝癌干细胞特性从而影响肝癌的发生以及发展^[40]。这些结果对于我们利用miRNAs进行抑制肝癌的治疗提供了很好的基础。

2.4 靶向肝癌干细胞表面标记

目前, 识别CSC标志及其靶向治疗是肝癌干细胞治疗的一个重要研究方向。已有研究表明, 肝癌CSCs可通过多个细胞表面抗原进行分选, 如CD133^[43-44]、CD90、CD44^[45]、OV6^[52-53]和EpCAM^[46]以及通过Hoechst染色技术分选出SP细胞。考虑到CSCs与正常干细胞之间的表型相似性与差异, 这些标志是合理推断CSCs的表型区别于正常肝干细胞的依据。目前, 已有包括CD133⁺、CD133、CD133⁺/CD44⁺、EpCAM和CD13等在肝癌类干细胞中被发现并假定为肝癌干细胞的表面标志物(表1)。

2.4.1 CD133 CD133/prominin-1是一种长效五羟淀粉跨膜糖蛋白, 是一个重要的CSCs表面标志, 在各种实体瘤包括肝脏中被发现。CD133表达细胞被认为是干细胞在肝细胞癌中致瘤的关键, 通过优先激活PKB(protein kinase B, 又称为AKT)和Bcl-2生存反应来赋予细胞药物抗性。运用AKT1抑制剂治疗CD133⁺肝癌细胞, 限定于AKT/PKB途径, 能显著降低生存蛋白的表达。此外, 运用与人类CD133共轭的小鼠抗体强效细胞毒性药物抑制CD133的表达, 降低Hep3B细胞在体外的增殖率, 减缓肿瘤在严重混合型免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠中的生长^[54]。研究者还发现, CD133⁺/CD44⁺肝

表1 目前已报道的肝癌干细胞表面标志物

Table 1 Reported the assumed liver cancer stem cell markers

标志物 Markers	肝癌细胞来源 Sources of liver cancer cells	参考文献 References
CD133 ⁺	Huh-7, Hep-3B, SMMC-7721	[41]
	MHCC-LM3, MHCC-97L	[42]
CD133	SMMC-7721, Huh-7	[43-44]
CD133 ⁺ /CD44 ⁺	MHCC-LM3, SMCC-7721	[42]
	MHCC-97L	[45]
EpCAM	Huh-1, Huh-7	[46]
CD13	Huh-7, PLC/PRF/5	[47]
ABCG2 (adenosine triphosphate-binding cassette superfamily G member 2)	Huh7, PLC/PRF/5	[48]
CD24	HepG2, Huh-7	[49]
LGR5 (eucine-rich repeat-containing g-protein coupled receptor 5)	HepaRG	[50]
NAPLN1 (hyaluronan and proteoglycan link protein 1)	HepaRG	[51]
OV6	SMCC-7721, Hep-3B	[52-53]

癌细胞显示干细胞特性, 包括增殖、自我更新和分化成癌细胞组织块, 并且CSCs表型可以通过CD133和CD44细胞表面标记的共表达精确定义^[42]。这些发现表明, 靶向CD133可能是一个新颖的肝癌治疗策略。

相比CD133/CD44, CD13被视为CSCs中半静态标志物。研究发现, 联合CD13抑制剂和5-FU使用能显著减少肿瘤体积, 联合使用的效果比单独使用其中一个有明显的提高。5-FU抑制CD13⁺半静态CSCs的增殖, 而CD13抑制剂抑制细胞自我更新和CSCs休眠肿瘤起源。这些结果表明, 结合CD13抑制剂与5-FU介导化疗/放疗可以提高肝癌的治疗效果^[55]。

2.4.2 EpCAM 上皮细胞黏附分子(EpCAM)是一种上皮细胞跨膜糖蛋白, 最早作为肿瘤相关抗原被发现。最近, EpCAM被认定为Wnt/ β -catenin信号在HCC中的直接转录靶标。成熟肝细胞为EpCAM⁻, 而胆管上皮细胞为EpCAM⁺。此外, EpCAM在胎儿肝脏发育期间的表达, 与肝脏再生、肝脏修复以及肝硬化相关。由于EpCAM的下游分子, 如EpICD是Wnt通路的组分, EpCAM信号的异常还会通过影响Wnt信号通路调控肿瘤的发生和侵袭。冯国婷^[57]通过磁珠分选P2-HCC与HepG2肝癌细胞的成瘤实验发现, *EpCAM*基因的表达量和EpCAM⁺细胞比例决定着肿瘤发生的特性和肿瘤的大小。目前, 有研究人员通过设计EpCAM-binding抗体进行肿瘤抗体治疗。

2.4.3 其他肝癌干细胞表面标记 CD90即Thy-1抗

原, 一种糖基磷酸酰肌醇连接糖蛋白, 对细胞黏附、凋亡以及肿瘤的生长转移具有一定的作用。Yang等^[58]在6种肝癌的细胞株中分离出了CD90⁺和CD90⁻两种细胞, 实验证实, CD90⁺细胞有形成移植瘤的能力, 且在不同的肝癌细胞系成瘤能力和转移能力与CD90⁺细胞数量成正相关, 因此CD90可能是一种潜在的肝癌干细胞表面标记。

CD44为细胞表面的黏附分子, 在肝干细胞中高表达。CD44⁺细胞被证实具有肝癌干细胞特征。同时, 在Yang等^[58]的研究中发现了CD90⁺细胞能致瘤, 将CD90与CD44细胞群相互结合表现更强的成瘤能力以及转移性。其中, CD90⁺/CD44⁺细胞群形成肿瘤能力与转移能力最高。

OV6是肝前体细胞的标志分子, Yang等^[28]在癌细胞株中分离出OV6⁺细胞, 发现OV6⁺细胞群在Wnt/ β -catenin通路中有内源性活化的特性, β -catenin表达抑制导致OV6⁺细胞的比例显著上升并表现出更强的致瘤性。此外, OV6⁺肝癌干细胞样细胞的化疗可以通过靶向 β -catenin microRNA的慢病毒递送稳定表达逆转。这些结果突出了Wnt/ β -catenin通路在正常啮齿动物模型和人类肝癌中活化肝癌干细胞增殖的重要性。OV6⁺肿瘤细胞赋予肝癌细胞耐药性并可能提供一个特定的方法来破坏该抑制机制, 成为靶向Wnt/ β -catenin治疗肝癌的突破口, 以提高对肿瘤的治疗效果。

2.5 靶向肝癌血管生成

抗血管生成是治疗实体瘤晚期患者如HCC的

常规方法之一,但目前临床效果并不理想,可能与CSCs的存在相关。研究发现,CSCs主要通过释放促血管生成因子调控血管生成,同时肿瘤微环境中的血管也通过分泌生长因子支持CSCs的生长并保持其干性^[58]。肝脏肿瘤微环境中存在着CSCs与血管生成之间的正反馈回路,并且有证据表明,CSCs与血管生成之间存在联系。Yang等^[59]发现,肝癌细胞中CD133⁺阳性CSCs高表达IL-8,诱导肿瘤的血管生成以及自我更新。Conigliaro等^[60]发现,CD90⁺ CSCs释放含有lncRNA H19的外分泌体来调控HCC血管内皮细胞的血管生成表型。因此,靶向抑制CD133和CD90表达有望达到抗血管生成/肝癌干细胞的正反馈调节通路。

缺氧是肿瘤微环境的一个重要特征,已被确认为肝癌血管异常发生的主要原因,并且高表达低氧因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的肝癌患者生存时间更短。诱导肿瘤缺氧结合经导管肝动脉化疗已广泛应用于治疗不可切除的肝细胞癌,但治疗效果并不理想,只有小部分的患者从中受益。在原发性肝癌大鼠模型的实验中发现,HIF-1 α 可能是导致治疗失败的原因。因此,缺氧驱动凋亡性肿瘤细胞的克隆选择,缺氧诱导多药耐药基因1(multidrug resistance 1, *MDR1*)表达和血管生成,解释了缺氧治疗比传统抗癌治疗更有效。几项研究已经证实,肝细胞癌肿瘤的生长和侵袭依赖于血管生成特异性表达^[61]。证据表明,针对生长因子驱动血管生成过程治疗肝癌,靶向HIF-1 α 可作为一个潜在治疗肝癌的治疗策略。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一个重要的血管生成因子,目前几种药物靶向VEGF或VEGFR正处于开发阶段,将用于治疗肝细胞癌。这些药物包括酪氨酸激酶抑制剂Vatalanib(PTK787)和单克隆抗体Bevacizumab^[62]、索拉非尼^[63]、舒尼替^[64]、Brivanib(bms-582664)^[65]和Linifanib(abt-869)。此外,与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)结合的配子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),与肿瘤血管生成和扩散有至关重要的作用,被认为主要通过RAF/MEK/ERK活化和PI3K/AKT/mTOR通路发挥作用。EGF在肝细胞癌以及其他实体瘤的恶化和发展中有着不可或缺的作用,从而靶向EGF/EGFR信号的药物在肝癌中具有治疗效

果。这些药物包括酪氨酸激酶抑制剂Erlotinib^[66]拉帕替尼(GW572016)^[67]、吉非替尼^[68]和单克隆抗体Cetuximab^[69]。

3 问题与展望

CSCs研究领域发展迅速,结合全基因组筛选技术,重要的新CSCs标记和信号途径被识别,这些发现是癌症治疗重要的进展。当然,一些重要的问题亟待解决,如生物治疗的安全性。大多数CSCs的关键途径也存在于正常干细胞/祖细胞中,针对这些途径的药物对正常细胞可能有不利影响,如CSCs靶向疗法。尽管初步实验结果表明,靶向治疗具有临床应用前景,但其潜在的短期和长期的副作用尚不清楚。该疗法如果不能靶向CSCs,其非靶向效应会由于干细胞的再生可能导致组织和器官损伤,甚至出现急性和不可逆转的器官衰竭。因此,确定CSCs及其组织特定的干细胞之间的分子差异至关重要,防止损害正常成体干细胞并确保选择性地针对CSCs。随着研究进展,识别出对CSCs生存和分化至关重要而对正常干细胞功能不影响的候选基因和信号通路。

肝癌和肝癌CSCs可能涉及一个复杂的发病机理,有庞大的潜在性串扰和冗杂的信号通路,因此,针对单个分子或途径对肝癌CSCs可能治疗效果不佳,需要通过组合疗法来克服信号通路间的复杂网络,并最终控制肿瘤的生长和发展。另一方面,使用组合方案可能导致耐药性和药物之间的相互作用,而使用分子靶向制剂的联合治疗则可能更有效。因此,利用可精确筛选CSCs的可用标志物结合理想的CSCs靶向疗法,减少对正常细胞的副作用以及保留组织的再生能力是将来肿瘤治疗的新方向。此外,将CSCs领域的发现应用到其他干细胞领域研究,利用许多与正常干细胞类似的CSCs标记基因产物,将更好地了解并调控细胞增长、分化和细胞迁移过程,将有助于基于再生医学的肿瘤治疗进展,将彻底改变传统肿瘤治疗策略并为癌症患者带来新的希望。

参考文献 (References)

- 1 Elserag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis 2001; 5(1): 87-107.
- 2 Eguchi S, Kanematsu T, Arii S, Omata M, Kudo M, Sakamoto M, et al. Recurrence-free survival more than 10 years after liver

- resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2011; 98(4): 552-7.
- 3 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2542-56.
 - 4 Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 2007; 45(3): 716-24.
 - 5 Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, *et al.* Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008; 47(5): 1544-56.
 - 6 Song W, Li H, Tao K, Li R, Song Z, Zhao Q, *et al.* Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract* 2008; 62(8): 1212-8.
 - 7 Zimmermann A. Hepatoblastoma with cholangioblastic features ('cholangioblastic hepatoblastoma') and other liver tumors with bimodal differentiation in young patients. *Med Pediatr Oncol* 2002; 39(5): 487-91.
 - 8 Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int Biol Sci* 2011; 7(5): 517-35.
 - 9 刘 佳, 马蕾娜, 王毅刚, 刘新垣, 钱其军. 癌症治疗新思路: 靶向肿瘤干细胞. *科学通报*(Liu Jia, Ma Leina, Wang Yigang, Liu Xinyuan, Qian Qijun. New ideas for cancer therapy: Targeting cancer. *Science Bulletin*) 2008; 53(9): 1003-10.
 - 10 Broker ME, Ijzermans JN, Witjes CD, van Vuuren HJ, de Man RA. The predictive value of Golgi protein 73 in differentiating benign from malignant liver tumors. *PLoS One* 2014; 9(7): e100187.
 - 11 谭晓华. 溶瘤腺病毒肿瘤靶向治疗: 从实验室到临床. *中国肿瘤生物治疗杂志*(Tan Xiaohua. Oncolytic adenoviruses for targeted cancer therapy: From the laboratory to the clinic. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*) 2012; 19(6): 569-76.
 - 12 Li Y, Idamakanti N, Arroyo T, Thorne S, Reid T, Nichols S, *et al.* Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinical models. *Clin Cancer Res* 2005; 11(24 Pt 1): 8845-55.
 - 13 Kwon OJ, Kim PH, Huyn S, Wu L, Kim M, Yun CO. A hypoxia-and- α -fetoprotein-dependent oncolytic adenovirus exhibits specific killing of hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2010; 16(24): 6071-82.
 - 14 Chen HH, Cawood R, El-Sherbini Y, Purdie L, Bazan-Peregrino M, Seymour LW, *et al.* Active adenoviral vascular penetration by targeted formation of heterocellular endothelial-epithelial syncytia. *Mol Ther* 2011; 19(1): 67-75.
 - 15 Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, McGuire A, Parato KA, *et al.* Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 2007; 15(9): 1686-93.
 - 16 Willmon C, Harrington K, Kottke T, Prestwich R, Melcher A, Vile R. Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther* 2009; 17(10): 1667-76.
 - 17 陈泽建. 肝癌靶向性溶瘤腺病毒的构建及其对肝癌细胞的特异性杀伤研究. *军事医学科学院基础医学研究所(博士学位论文)*(Chen Zejian. Preparation of oncolytic adenovirus selectively killing hepatocarcinoma cells. Institute of Basic Medical Sciences) 2003.
 - 18 李 冲, 王志平. 溶瘤腺病毒抗肿瘤策略研究进展. *基础医学与临床*(Li Chong, Wang Zhiping. Advances in antitumor therapy by oncolytic adenovirus. *Basic & Clinical Medicine*) 2016; 36(4): 547-51.
 - 19 Wang J, Gu JF, Yang SY, Xiao T, Qi R, Sun LY, *et al.* Security of dual cancer-specific targeting vector and its cytotoxic effect when harbored. *Ai Zheng* 2006; 25(4): 385-92.
 - 20 曾 祯, 刘新垣. 携带TRAIL和IL-24的双基因三靶向溶瘤腺病毒构建及其抗癌效果的研究. *中国科学论文在线*(Zhen Zhen, Liu Xinyuan. Triple-regulated oncolytic adenovirus mediates coexpression of TRAIL and IL-24 linked by IETD sequence. *Science Paper Online*) 2012.
 - 21 张新敏, 张 蓉, 孟树林, 谢文杰, 王毅刚. 溶瘤腺病毒ZD55对类肝癌干细胞的抑制效应. *生物化学与生物物理进展*(Zhang Xinmin, Zhang Rong, Meng Shulin, Xie Wenjie, Wang Yigang. The inhibitory effect of oncolytic adenovirus ZD55 on liver cancer stem cells. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2016; 43(5): 496-505.
 - 22 郝蒙茹, 黄承浩, 夏宁邵. HSV-1溶瘤病毒在肿瘤治疗研究中的新进展. *病毒学报*(Hao Mengru, Huang Chenghao, Xia Ningshao. The advances of oncolytic herpes simplex virus in cancer therapy. *Chinese Journal of Virology*) 2016; 32(4): 516-22.
 - 23 Kasuya H, Kodera Y, Nakao A, Yamamura K, Gewen T, Zhiwen W, *et al.* Phase I dose-escalation clinical trial of HF10 oncolytic herpes virus in 17 Japanese patients with advanced cancer. *Hepatogastroenterology* 2014; 61(131): 599-605.
 - 24 Miyatake S. Gene therapy using tissue-specific replication competent HSV. *Hum Cell* 2002; 15(3): 130-7.
 - 25 Zhang W, Ge K, Zhao Q, Zhuang X, Deng Z, Liu L, *et al.* A novel oHSV-1 targeting telomerase reverse transcriptase-positive cancer cells via tumor-specific promoters regulating the expression of ICP4. *Oncotarget* 2015; 6(24): 20345-55.
 - 26 Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, *et al.* Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* 2006; 13(1): 221-8.
 - 27 Hing HK, Sun X, Artavanis-Tsakonas S. Modulation of wingless signaling by Notch in *Drosophila*. *Mech Dev* 1994; 47(3): 261-8.
 - 28 Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Zhang SH, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008; 68(11): 4287-95.
 - 29 Cairo S, Armengol C, De Reynies A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, *et al.* Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/ β -catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 14(6): 471-84.
 - 30 王 磊, 单云峰, 施红旗, 张启瑜. β -catenin在肝卵圆细胞中的表达及意义. *实用医学杂志*(Wang Lei, Shan Yunfeng, Shi Hongqi, Zhan Qiyu. The expression of β -catenin in the hepatic oval cell and its significance. *The Journal of Practical Medicine*) 2008; 24(21): 3634-5.
 - 31 Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, *et al.* Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63(23): 8323-9.

- 32 范灵灵. Bmi1在肝卵圆细胞扩增及肝癌发生中的作用. 华中科技大学(博士学位论文)(Fan Lingling. Bmi1 is required for hepatic progenitor cell expansion and liver tumor development. Huazhong University of Science and Technology) 2012.
- 33 Huang S, He J, Zhang X, Bian Y, Yang L, Xie G, *et al.* Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2006; 27(7): 1334-40.
- 34 Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, *et al.* Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(3): 897-907.
- 35 Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A, *et al.* miR-130b Promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 694-707.
- 36 Yuan F, Zhou W, Zou C, Zhang Z, Hu H, Dai Z, *et al.* Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/beta-catenin and TGF-beta signal path-ways. *Mol Cell Biochem* 2010; 43: 155-62.
- 37 张俊. microRNA-150调控肝癌干细胞恶性表型分子机制的研究. 重庆医科大学(博士学位论文)(Zhang Jun. microRNA-150 mediated regulation of the malignant phenotype of liver cancer stem cells. Chongqing Medical University) 2012.
- 38 刘雅炜. MicroRNA-491靶向作用EGFR通过STAT3信号通路在肝细胞癌肿瘤干细胞特性中作用的机制研究. 南京医科大学(硕士学位论文)(Liu Yawei. miR-491 blocks activation of STAT3 via EGFR and inhibits cancer stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma cells. Nanjing Medical University) 2015.
- 39 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(4): 820-4.
- 40 Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126(9): 2067-78.
- 41 Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, *et al.* CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120(7): 1444-50.
- 42 吴立胜. CD105/CD133作为肝癌干细胞表面标志物的筛选鉴定研究. 安徽医科大学(博士学位论文)(Wu Shengli. CD105/CD133 as cell surface markers for Screening and Identification of liver cancer stem cell. Anhui Medical University) 2014.
- 43 牛坚, 王月. 下调CD133表达对肝癌干细胞上皮间质化和侵袭能力影响及机制探讨. 中华肿瘤防治杂志(Niu Jian, Wang Yue. Inhibition effect of suppressing CD133 expression in liver cancer stem cells on epithelial mesenchymal transition and invasive ability. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*) 2016; 23(11): 710-5.
- 44 Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, *et al.* EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136(3): 1012-24.
- 45 Zhu P, Wang Y, Du Y, He L, Huang G, Zhang G, *et al.* C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling. *Nat Commun* 2015; 6: 7122.
- 46 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44(1): 240-51.
- 47 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(1): 100-9.
- 48 Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3326-39.
- 49 Liu AY, Cai Y, Mao Y, Lin Y, Zheng H, Wu T, *et al.* Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24. *Carcinogenesis* 2014; 35(3): 537-45.
- 50 Gong X, Azhdarinia A, Ghosh SC, Xiong W, An Z, Liu Q, *et al.* LGR5-targeted antibody-drug conjugate eradicates gastrointestinal tumors and prevents recurrence. *Mol Cancer Therap* 2016; 15(7): 1580-90.
- 51 Mebarki S, Desert R, Sulpice L, Sicard M, Desille M, Canal F, *et al.* De novo HAPLN1 expression hallmarks Wnt-induced stem cell and fibrogenic networks leading to aggressive human hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 2016; 7(26): 39026-43.
- 52 Zhu CP, Wang AQ, Zhang HH, Wan XS, Yang XB, Chen SG, *et al.* Research progress and prospects of markers for liver cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2015; 21(42): 12190-6.
- 53 Pang RW, Poon RT. Cancer stem cell as a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12(9): 1081-94.
- 54 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(1): 100-9.
- 55 Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3326-39.
- 56 Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3(7): 643-51.
- 57 冯国婷. EpCAM与肝肿瘤发生相关性研究. 第二军医大学(硕士学位论文)(Feng Guoting. Study on relationship between EpCAM and hepatocellular carcinoma. The Second Military Medical University) 2011.
- 58 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47(3): 919-28.
- 59 Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi Gm, *et al.* High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2010; 59(7): 953-62.
- 60 Conigliaro A, Costa V, Lo Dico A, Saieva L, Buccheri S, Dieli F, *et al.* CD90+ livercancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA. *Mol Cancer* 2015; 14(1): 1-11.
- 61 Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, *et al.* PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 2000; 60(8): 2178-89.
- 62 Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, *et al.* Humanization of an anti-vascular endothelial

- growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57(20): 4593-9.
- 63 Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 2006; 407: 597-612.
- 64 Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, *et al.* *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 327-37.
- 65 Cai ZW, Zhang Y, Borzilleri RM, Qian L, Barbosa S, Wei D, *et al.* Discovery of brivanibalaninate ((S)-((R)-1-(4-(4-fluoro-2-methyl-1H-indol-5-yloxy)-5-methylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yloxy)propan-2-yl)2-aminopropanoate), a novel prodrug of dual vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 kinase inhibitor (BMS-540215). *J Med Chem* 2008; 51(6): 1976-80.
- 66 Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(12): 851-67.
- 67 Johnston SR, Leary A. Lapatinib: A novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer. *Drugs Today (Barc)* 2006; 42(7): 441-53.
- 68 Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(6): 557-61.
- 69 Huether A, Hopfner M, Sutter AP, Schuppan D, Scherubl H. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatic. *J Hepatol* 2005; 43(4): 661-9.