



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.013
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.013
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(1):92-98.

· 文献综述 ·

乙肝病毒 X 蛋白调控肝癌干细胞维持肝细胞癌生物学行为的研究进展

孙为民, 查勇

(云南省肿瘤医院 / 昆明医科大学第三附属医院 腹部外科, 云南 昆明 650118)

摘要

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染已经被认为是肝细胞癌发生的危险因素。乙型肝炎病毒 X 蛋白 (HBx) 是一个多功能的调节因子, 能够调节相关信号通路以及表观遗传的基因表达, 并且能参与细胞增殖、凋亡等途径。HBx 能促进肝癌干细胞 (LCSCs) 自我更新能力、分化、抵抗化疗等生物学行为, 进而促使肿瘤转移、浸润和复发。笔者对 HBx 调控 LCSCs 维持肝细胞癌的生物学行为进行综述。

关键词

癌, 肝细胞; 癌基因蛋白质类, 病毒性; 肿瘤干细胞; 综述文献
中图分类号: R735.7

Hepatitis B virus X protein regulating liver cancer stem cells to maintain biological behaviors of hepatocellular carcinoma: recent research progress

SUN Weimin, ZHA Yong

(Department of Abdominal Surgery, Yunnan Cancer Hospital/the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, China)

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the common malignant tumors in China. Chronic hepatitis B virus (HBV) infection has been considered as a risk factor for HCC. Hepatitis B virus X protein (HBx) is a multifunctional regulator that regulates signal transduction and epigenetic gene expressions, and also is involved in cell proliferation and apoptotic pathways. HBx can promote the self-renewal ability, differentiation, and resistance to chemotherapy and other biological behaviors of the liver cancer stem cells (LCSCs), and thereby promote tumor metastasis, infiltration and recurrence. The authors address HBx regulating LCSCs to maintain the biological behaviors of HCC.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Oncogene Proteins, Viral; Neoplastic Stem Cells; Review
CLC number: R735.7

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560497); 云南省应用基础研究计划资助项目 (2015FB073)。

收稿日期: 2018-11-11; 修订日期: 2018-12-17。

作者简介: 孙为民, 云南省肿瘤医院 / 昆明医科大学第三附属医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

通信作者: 查勇, Email: zhayong888@sina.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC, 以下简称肝癌) 在恶性消化道肿瘤中病死率仅次于胃、食管, 在中国范围内肝癌病死率在所有恶性肿瘤中排名第二, 我国每年死于肝癌约11万例, 占全世界肝癌死亡人数的45%^[1]。乙型肝炎病毒X (hepatitis B virus X protein, HBx) 蛋白与肝癌发生密切相关^[2]。HBx能够维持肝癌干细胞 (liver cancer stem cells, LCSCs) 的干性相关表型, 在肝癌的发生发展中起到了促进作用^[3]。传统化疗药物, 如阿霉素、5-氟尿嘧啶、铂类等都不能有效消除肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs), 而残存的CSCs因其高度耐药性和自我更新能力, 成为肿瘤复发转移和耐药的根源。肝癌干细胞的存在使肝癌缺乏有效治疗方法, 临床上通过手术切除、放化疗、介入等治疗, 仍不能防止肝癌的复发转移。

1 HBx

HBx是一种小的17 kDa可溶性蛋白, 由HBV基因组4个开放阅读框架 (ORF) 中最小的X基因编码, 在HBV生物学和肝癌发展中起着关键作用。HBx是一种多功能蛋白, 研究表明HBx基因缺陷的HBV在体内外病毒复制量明显减少, 提示HBx对于HBV持续复制以及在人体不断感染起着重大作用^[4]。有研究^[5]表明病原微生物可以诱导成熟细胞转变为癌症干细胞, HBV促进肝癌发生便是一个例子, HBV刺激肝脏成熟细胞去编程化, 转变为LCSCs, 维持自我更新。

HBV并不能直接诱导肝癌发生^[6], 而HBx能够通过转录因子和信号转导诱导功能转变, 是促进肝癌进展的关键因子^[7]。最近研究^[8]显示, HBx参与各种细胞信号传导途径, 包括Wnt/ β -连环蛋白 (catenin), 核因子 κ B (NF- κ B), Janus激酶/信号转导和转录激活子 (STAT) 以及Ras/Raf/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等途径。在线粒体中, HBx通过下调线粒体酶和促进活性氧 (ROS) 产生和脂质过氧化作用破坏线粒体稳定性; 阻断Fas/FasL凋亡信号通路, 干预细胞凋亡, 这些变化可以解释肿瘤细胞的能量代谢异常以及HBV相关肝癌中的细胞死亡抵抗; 在内质网内, HBx通过诱导内质网应激维持慢性肝脏炎症和增殖^[9], 以上结果提示HBx通过这些信号通路及相关机制参与到肝癌干细胞的生物学行为中, 促进HBV相关肝癌发展、侵袭和转移。

此外, 有研究^[10]表明, 当HBV基因组整合到宿主细胞中时, 作为基因突变和mRNA编辑的结果, HBx经历序列突变, 尤其是羧基末端截短的HBx (Ct-HBx), 在肝癌组织中经常被检测到, 但在相邻的非肿瘤组织中很少发现。表明Ct-HBx蛋白在肝癌发展中选择性存在, Ct-HBx蛋白可能影响对肝癌起始和进展至关重要的生物学过程。实际上, 突变HBx蛋白增加信号转导和转录激活因子3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)、NF- κ B和PI3K/Akt信号的阈值并诱导C-jun/MMP-10活化以促进肝癌肿瘤浸润和转移^[6]。

2 LCSCs

近来研究^[11]发现, 在肿瘤组织中存在极少量CSCs, CSCs是指具有无限增殖、自我更新和分化潜能的一类肿瘤细胞, 并且与肿瘤的浸润转移、化疗耐药密切相关。近年来, 相关专家学者在白血病、乳腺癌、肺癌、脑肿瘤、结直肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中均已成功分离出CSCs, 均证实了CSCs学说^[12-14]。肝癌被认为也是一种CSCs疾病, 在其癌组织中同样存在LCSCs, 与临床上肝癌的复发转移、抵抗化疗有关。越来越多的研究人员认为, 提高肝癌治疗疗效的关键在于根除LCSCs, 肝癌的治疗可能仅仅杀死癌细胞, 减少肿瘤体积, 却不根除LCSC^[15]。

关于LCSCs来源有两种学说: 一是成熟肝脏细胞或胆管细胞去分化; 二是肝干细胞突变。两种不同来源细胞最后均演变为肝癌起始细胞 (cancer cell of origin, CCO), 共同组成LCSCs。LCSCs能够通过DNA损伤修复、多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 表型、CSCs的相对静止、生长通路和干性相关通路激活等途径维持自我更新^[16-17]。

LCSCs的分离鉴定一直是研究的难点, 其数量较肿瘤细胞少且现有技术手段很难将他们分离。随着CSCs表面分子标志物的明确, 越来越多的学者对LCSCs展开研究, 希望通过干性表面标志物将LCSCs从肝癌组织中成功分离出来, 作为治疗靶点克服癌症复发、转移和耐药的难题。目前已鉴定出LCSCs的多种表面标志物, 主要有细胞表面抗原决定簇CD分子, 包括CD133、CD90、CD44、OV6、CD24、CD13、K19、上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM亦称CD326) 等^[18-21]。此外, 侧群 (side population, SP)

细胞分选也被用于CSCs的分离, SP细胞是指通过ABC(ATP binding cassette)转运蛋白将DNA染料Hoechst 33342泵出细胞外的一类细胞群, 与非SP细胞相比, SP细胞在肝癌组织中具有更高的增殖潜能、成瘤能力和抗凋亡属性^[22]。SP高表达多药耐药相关蛋白(ABCG2、ABCB), 对常见化疗药物5-FU、多柔比星更为耐药, 而多药耐药相关蛋白可促进化疗药物的外排, 介导LCSCs自我更新、致瘤性及抵抗化疗药物等特性^[23-25]。表面标志物显然不能去定义CSCs, 而且更重要的是这些标志物也并非CSCs所特有。CD133存在与LCSCs表面, 也存在于正常脑干细胞中, CD44与许多生理过程有关, 如白细胞归巢, 被认为是胞外基质中的主要黏附分子^[26-27]。因此独立应用单一标志物分选得到LCSCs, 在目前来说很难令人信服, 而利用联合标志物分离鉴定LCSCs在许多文献见报道^[28]。

3 HBx对LCSCs调控的相关信号通路

3.1 Wnt/ β -catenin信号通路

经典的Wnt/ β -catenin信号传导被认为是干细胞生物学中的基本途径^[29]。Wnt/ β -catenin通路是进化上高度保守的信号转导通路, 在细胞增殖、分化、癌变中起着重要作用, Wnt/ β -catenin信号通路异常激活后能够促进细胞增值、调节血管生成因子如MMP-2、VEGF-A的水平而导致肝细胞癌的发展、侵袭和转移^[30]。Shen等^[31]利用Ad-HBx感染小鼠胎肝祖细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)发现在HBx处理后富集在胞质中的 β -catenin蛋白转向胞核, 进一步PCR分析HBx也促进 β -catenin mRNA和蛋白水平的表达, 这说明在HPCs中HBx的表达激活了Wnt/ β -catenin信号通路, Wnt与受体复合物结合后被激活, 抑制下游蛋白质复合物(Axin、APC、GSK-3 β)的活性, 从而激活 β -catenin, 与转录因子TCF/LEF形成复合体, 启动包括c-myc、cyclin D1、CD44等一系列靶基因的转录^[32]。也有研究^[33]报道, HBx增强趋化因子CXCR4(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)和CXCL12表达, CXCR4/CXCL12随后激活Wnt/ β -catenin信号通路, 增强OV6(+)LCSCs增殖、迁移能力, 并且表现出对吡柔比星、奥沙利铂及羟基树碱化疗耐药, 而在随后加入CXCR4抑制剂AMD3100后, OV6+肝癌干细胞特性被明显减弱。Shen等^[34]用相同剂量的索拉非尼或顺铂处理时肝癌细胞, 与对照细胞相比, 敲低

KLF8(krupple-like factor 8, KLF8)的肝癌细胞中的细胞凋亡显著增加, 而KLF8通过激活Wnt/ β -连环蛋白信号通路并促进化疗抗性维持干细胞样特征, 在肝癌发生中起着潜在的致癌作用, 因此, 靶向KLF8可以提供抑制肝癌致瘤能力的有效治疗方法。因此研究Wnt/ β -catenin信号通路能够帮助理解肝癌转移及复发的分子机制, 对于我们靶向此通路为彻底治愈肝癌提供参考依据。

3.2 PI3K/Akt信号通路

PI3K信号通路通过与络氨酸残基结合, 激活P85的SH2构域从而进一步活化P85-P110复合物或者直接通过Ras和P110直接结合, 导致PI3K的活化。激活后的PI3K与下游Akt结合, Akt能直接磷酸化多种转录因子, 可以抑制凋亡因子表达和增强抗凋亡因子表达, 促进肿瘤细胞存活^[35]。此外, Akt也能正调控转录因子NF- κ B和Bcl-2, NF- κ B与许多细胞因子和生长因子引起的细胞分化、凋亡和生存有关, 在促进肿瘤细胞存活方面起着重要作用^[36]。Zhu等^[37]利用免疫组化检测发现HBV(+)/AFP(+)肝癌患者组织中干性转录因子Oct4、Klf4、Sox2和c-myc以及抗凋亡通路中pAkt的表达均高于正常组织, 随后Western blot检测发现干性标志物CD44、CD133和EpCAM相比较HBV(-)/AFP(-)组织也高表达, 提示HBV可以驱动AFP表达, 增加干性标志物及转录因子高表达, 而且AFP本身很可能也是一个干性标志物。而进一步细胞学实验发现, HBx驱动AFP表达, 抑制PTEN活性, 随后激活PI3K/Akt信号通路, 激活的PI3K/Akt信号通路诱导重编程相关蛋白的表达, 且利用siRNA抑制AFP表达能够抑制集落形成并抑制重编程相关蛋白和pAkt(Ser473)表达, 因此AFP通过激活PI3K/Akt信号通路在诱导干细胞生成和促进肝细胞恶性转化中起关键作用^[38]。以上结果表明HBx能诱导肝脏正常细胞向干细胞转化, 并且HBx可以优先驱动AFP的表达, 促进重编程相关蛋白Oct4、Klf4、Sox2和c-myc表达, 促进肝脏细胞恶性转化, 研究AFP/PI3K/Akt信号通路可以了解并掌控肝癌转移及侵袭的分子机制, 为进一步探讨靶向LCSCs彻底治愈肝癌提供重要参考依据, 其可能成为肝癌基因诊断和治疗的新靶点。

3.3 STAT3/NANOG信号通路

STAT3参与许多细胞过程, 如增殖、存活、抗凋亡、侵袭、血管生成和转移以及免疫逃逸等^[39]。NANOG是干细胞效能和胚胎干细胞自我更新的关键转录因子^[40]。有研究^[39]发现STAT3可以通过结

合OCT3/4上调NANOG转录因子的表达,两者协同维持多能性和自我更新能力。Ching等^[41]研究发现HBx增加了干性相关基因NANOG和SOX2以及干性标志物CD133和CD47的表达,STAT3信号传导活性在HBx表达细胞和HBx转基因小鼠中增强,导致致癌作用,提示HBx对CSCs干性表达及维持有重要作用,而Western blot检测分析HBx优先诱导STAT3和干细胞转录因子NANOG的表达,在加入STAT3抑制剂S3I-201后,NANOG的表达处于下调状态,并且球体形成实验也发现HBx诱导的自我更新消失了。总之,这些研究结果表明HBx通过STAT3介导的NANOG上调增强LCSCs高致瘤性和干性特征。HBx通过调节CSCs在肝癌发展和进展中起关键作用,其涉及STAT3/NANOG途径的优先激活,更好地了解HBx蛋白的分子机制将提高对肝癌发病机制的认识,目的是为这种致命疾病开发更有效的管理。希望能开发针对HBx诱导的STAT3/NANOG的靶向治疗以及鉴定预测疾病结果和肿瘤复发的新标记提供了新的见解。STAT3、NANOG基因可能在乙肝相关肝癌发生发展中发挥关键作用,其可能成为肝癌基因诊断和治疗的新靶点。

4 HBx 调节表观遗传增加干性表达

表观遗传调控在癌症生物学中起到了关键的作用,基因表达的表观遗传调控是一个积极和动态的过程,包括组蛋白修饰,DNA甲基化和染色质重塑。DNA甲基化是干细胞分化过程重要的调控因子,能使干细胞向不同的亚型分化,DNA甲基化被认为是维持CSCs的潜在表观遗传机制^[42]。异常的表观遗传调控与癌症的发生直接相关,尤其是组蛋白的去甲基化,引起染色质结构改变,进而促进癌症进展。

组蛋白去甲基化酶(histone lysine demethylases, KDMs)能够参与到肿瘤生长、血管生成、侵袭、转移以及化疗耐药等多种肿瘤行为中。Wang等^[43]研究发现在乙肝感染相关肝癌患者病例中,肝脏祖细胞干性标志物,如EpCAM、AFP、PROM1以及NANOG大量表达在KDM5B高表达的肝癌患者当中,并且KDM5B水平和EpCAM、AFP水平成正相关,这些结果表明KDM5B是维持干细胞特性的重要分子。而接下来作者研究发现,HBx能够上调KDM5B、EpCAM、AFP、PROM1和NANOG表达,其具体机制仍然不是很明确。以上结果表明,HBx通过上调KDM5B,而

KDM5B特异性去除甲基化残留,抑制基因转录,增加肝癌干细胞成球、转移和侵袭能力,而且基于KDM5B在维持干性相关中的作用,与HBx相互作用,成为肝癌患者预后不良因素。Fan等^[44]研究发现HBx能通过DNA甲基化诱导EpCAM表达,EpCAM是肝癌干细胞重要的上皮黏附分子,利用染色质免疫沉淀测定证明HBx依赖NF- κ B/RelA通路,NF- κ B/RelA位点位于EpCAM转录起始位点下游的CpG岛中,敲低RelA则抑制CpG去甲基化和EpCAM表达,而在HBx表达后,RelA结合甲基转移酶EZH2、TET2和DNA甲基转移酶(DNMT3L)形成复合物,激活下游转录因子,促进肝癌干细胞中EpCAM表达上调。有研究^[45]报道,HBx也能激活DNMT,促进钙黏蛋白启动子甲基化,影响Wnt/ β -catenin信号通路的激活,进而影响下游靶点EpCAM表达,并且DNMT对于CSC是必需的,DNMT的缺失可以通过限制CSCs库来减少肿瘤发生。因此,靶向表观遗传修饰因子尤其是DNA甲基化提供了治疗人类癌症的可选策略。

5 HBx 促进 LCSCs 的增殖及抑制凋亡

LCSCs的增殖成为肝癌复发与转移的重要原因之一,如何抑制其增殖成为治疗的一大研究方向。越来越多的证据表明,HBx能调节肿瘤细胞生存和凋亡途径中多种转录因子的活性,包括细胞周期相关蛋白(p27、cyclin D1、p21和p53)和促凋亡蛋白(PARP)等^[46]。Yu等^[47]研究HBx促进小鼠胚胎祖细胞(fetal HPCs, FHPCs)增殖实验中发现这些FHPCs阳性表达EpCAM、CD133等干细胞表面标记物,在体外实验中,FHPCs能转变分化为成熟肝细胞和胆管细胞,组成肝癌起始细胞,这些行为类似于肝癌干细胞。而HBx的C末端能促进FHPCs的增殖,表明HBx能通过调节FHPCs的增殖,增加干性的表达。有研究^[46, 48]发现HBx通过降低Bax/Bcl2比例,抑制caspase-3和caspase-9的表达,进而抑制caspase下游靶标PARP(poly ADP-ribose polymerase)激活,从而抑制肿瘤细胞的凋亡。另外,HBx能通过PI3K/AKT通路中的Akt直接或者通过Raf-1和P65-PAK来磷酸化Bad的Ser136位残基,终止Bad对Bcl-2或Bcl-XI拮抗作用,释放后的Bcl-2或Bcl-XI恢复抗细胞凋亡的功能,而且Akt也能抑制caspase-9的活性,抑制肿瘤细胞凋亡,增强肿瘤细胞生存能力并且表现出对缺氧和营养不良的耐受^[49]。以上研究结果提示,

HBx通过改变细胞周期检查点,改变细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的表达或蛋白水解降解来引起不受控制的细胞增殖。

6 结论与展望

肝癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,是癌症相关死亡的主要原因之一^[50]。在过去的几十年中,自早期诊断和综合治疗进展以来,肝癌患者的预后逐渐得到改善,但是总生存率仍不理想,特别是对于失去治愈性治疗机会的晚期肝癌患者。虽然手术切除和肝移植是肝癌患者的治愈性治疗方法,但大多数肝癌容易发生侵袭和转移,长期预后仍然不能令人满意。对于晚期肝癌患者,经动脉栓塞化疗(TACE)是二线治疗,但由于肿瘤的高化学耐药性,其整体效果不尽如人意^[28, 51]。LCSCs存在于肝细胞癌中,其特征在于无限增殖,自我更新和多向分化能力,近来相关研究通过靶向干性分子标记物CD90、CD44、CD133和EpCAM等,通过联合多个标记物可以区分LCSCs和肝癌细胞^[52-55]。LCSCs的存在可能诱导肝癌细胞对化疗抵抗以及术后复发等问题,因此,临床肝癌治疗应更多地关注LCSCs治疗,尤其在手术、放疗和/或化疗后必须考虑如何治疗LCSCs^[56]。

乙型肝炎病毒X蛋白在启动和促进HBV诱导的肝癌发展中起着至关重要的作用。HBx调控LCSCs促进肝细胞癌转移浸润和复发,已经成为HBV-肝癌发展的重要生物指标。虽然研究人员已经确定了导致HBx诱导的肝癌肿瘤发生的一些因素,如相关干性通路的调节,基因组不稳定性,插入突变,表观遗传变化和增殖以及抑制凋亡等^[57],但迄今为止,大多数研究只局限在细胞和动物模型中,尚未对人类进行全面科学研究。相关研究报道了针对HBx的5'-三磷酸RNA(3p-siHBx)的小干扰RNA可通过HBx沉默赋予有效的抗乙型肝炎病毒功效,通过3p-siHBx疗法可改善HBV载体肝脏中的免疫微环境并抑制HBV复制,从而达到抑制HBx表达,消除HBx的功能^[58]。HBx调控LCSCs生物学行为和功能的机制可能成为治疗肝癌新的突破点,因此,在乙肝相关肝癌肿瘤中靶向HBx的策略需要进一步的研究。

参考文献

[1] Liu R, Li Y, Tian L, et al. Gankyrin drives metabolic reprogramming

to promote tumorigenesis, metastasis and drug resistance through activating beta-catenin/c-Myc signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2019, 443:34-46. doi:10.1016/j.canlet.2018.11.030.

[2] He B, Peng F, Li W, et al. Interaction of lncRNA-MALAT1 and miR-124 regulates HBx-induced cancer stem cell properties in HepG2 through PI3K/Akt signaling[J]. *J Cell Biochem*, 2018. doi:10.1002/jcb.26823. [Epub ahead of print]

[3] Salpini R, Surdo M, Cortese MF, et al. The novel HBx mutation F30V correlates with hepatocellular carcinoma in vivo, reduces hepatitis B virus replicative efficiency and enhances anti-apoptotic activity of HBx N terminus in vitro[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018. pii: S1198-743X(18)30744-4. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.017. [Epub ahead of print]

[4] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(5):996-1003. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.015.

[5] Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3):1082-1096. doi:10.1172/jci61029.

[6] Rawat S, Bouchard MJ. The hepatitis B virus (HBV) HBx protein activates AKT to simultaneously regulate HBV replication and hepatocyte survival[J]. *J Virol*, 2015, 89(2):999-1012. doi:10.1128/jvi.02440-14.

[7] Zhang XD, Wang Y, Ye LH. Hepatitis B virus X protein accelerates the development of hepatoma[J]. *Cancer Biol Med*, 2014, 11(3):182-190. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.03.004.

[8] Zhang JF, Xiong HL, Cao JL, et al. A cell-penetrating whole molecule antibody targeting intracellular HBx suppresses hepatitis B virus via TRIM21-dependent pathway[J]. *Theranostics*, 2018, 8(2):549-562. doi:10.7150/thno.20047.

[9] Cho HK, Kim SY, Kyaw YY, et al. HBx induces the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via AP1 over-expressed as a result of ER stress[J]. *Biochem J*, 2015, 466(1):115-121. doi:10.1042/bj20140819.

[10] Ma NF, Lau SH, Hu L, et al. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(16):5061-5068. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-5082.

[11] Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, et al. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM[J]. *Oncogene*, 2011, 30(12):1470-1480. doi:10.1038/ncr.2010.531.

[12] Ghaderi F, Ahmadvand S, Ramezani A, et al. Production and characterization of monoclonal antibody against a triple negative breast cancer cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1):181-186. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.087.

[13] Liu F, Li L, Li Y, et al. Overexpression of SENP1 reduces the

- stemness capacity of osteosarcoma stem cells and increases their sensitivity to HSVtk/GCV[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(5):2010–2020. doi:10.3892/ijo.2018.4537.
- [14] Wang Y, Chen H, Chen J, et al. The consensus on the monitoring, treatment, and prevention of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in China[J]. *Cancer Lett*, 2018, 438:63–75. doi:10.1016/j.canlet.2018.08.030.
- [15] Zhou P, Li B, Liu F, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):52. doi:10.1186/s12943-017-0624-9.
- [16] Flores-Télliz TN, Villa-Treviño S, Piña-Vázquez C. Road to stemness in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(37):6750–6776. doi:10.3748/wjg.v23.i37.6750.
- [17] 黄民, 黄黎宸, 刘卫辉. 肝内外干/祖细胞参与肝再生的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(7):926–933. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.018.
Huang M, Huang CC, Liu WH. Participation of intra- and extrahepatic stem/progenitor cells in liver regeneration: recent advances[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(7):926–933. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.018.
- [18] Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, et al. The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):13143. doi:10.1038/s41598-018-31421-6.
- [19] Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, et al. Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13):3081–3091. doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-1936.
- [20] Yamada T, Abei M, Danjoh I, et al. Identification of a unique hepatocellular carcinoma line, Li-7, with CD13(+) cancer stem cells hierarchy and population change upon its differentiation during culture and effects of sorafenib[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:260. doi:10.1186/s12885-015-1297-7.
- [21] Park NR, Cha JH, Jang JW, et al. Synergistic effects of CD44 and TGF-beta1 through AKT/GSK-3beta/beta-catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4):568–574. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.077.
- [22] 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(42):12190–12196. doi:10.3748/wjg.v21.i42.12190.
- [23] Hu C, Li H, Li J, et al. Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(12):2289–2297. doi: 10.1093/carcin/bgn223.
- [24] He XX, Shi LL, Qiu MJ, et al. Molecularly targeted anti-cancer drugs inhibit the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of MMP and TIMP gene families[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4):878–884. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.203.
- [25] Hayashi T, Yamashita T, Okada H, et al. A Novel mTOR Inhibitor; Anthracimycin for the Treatment of Human Hepatocellular Carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(7):3397–3403. doi:10.21873/anticanres.11706.
- [26] Holmberg Olausson K, Maire CL, Haidar S, et al. Prominin-1 (CD133) defines both stem and non-stem cell populations in CNS development and gliomas[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106694. doi:10.1371/journal.pone.0106694.
- [27] Erhart F, Blauensteiner B, Zirkovits G, et al. Gliomasphere marker combinatorics: multidimensional flow cytometry detects CD44+/CD133+/ITGA6+/CD36+ signature[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1):281–292. doi:10.1111/jcmm.13927.
- [28] Hu H, Han XK, Long XR, et al. Prognostic nomogram for post-surgical treatment with adjuvant TACE in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):58302–58314. doi:10.18632/oncotarget.11078.
- [29] Mavila N, Tang Y, Berlind J, et al. Prohibitin 1 Acts As a Negative Regulator of Wntless/Integrated-Beta-Catenin Signaling in Murine Liver and Human Liver Cancer Cells[J]. *Hepatol Commun*, 2018, 2(12):1583–1600. doi:10.1002/hep4.1257.
- [30] Vilchez V, Turcios L, Marti F, et al. Targeting Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(2):823–832. doi:10.3748/wjg.v22.i2.823.
- [31] Shen L, Zhang X, Hu D, et al. Hepatitis B virus X (HBx) play an anti-apoptosis role in hepatic progenitor cells by activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 383(1/2):213–22. doi:10.1007/s11010-013-1769-5.
- [32] Pandit H, Li Y, Li X, et al. Enrichment of cancer stem cells via beta-catenin contributing to the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):783. doi:10.1186/s12885-018-4683-0.
- [33] Wang C, Wang M D, Cheng P, et al. Hepatitis B virus X protein promotes the stem-like properties of OV6(+) cancer cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1):e2560. doi:10.1038/cddis.2016.493.
- [34] Shen YN, He HG, Shi Y, et al. Kruppel-like factor 8 promotes cancer stem cell-like traits in hepatocellular carcinoma through Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(2):751–760. doi:10.1002/mc.22532.
- [35] Song JH, Singh N, Luevano LA, et al. Mechanisms Behind Resistance to PI3K Inhibitor Treatment Induced by the PIM Kinase[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(12):2710–2721. doi:10.1158/1535-7163.mct-18-0374.
- [36] Wang Q, Zhang X, Song X, et al. Overexpression of T-cadherin inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma through the PI3K/AKT/mTOR intracellular signalling pathway[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 96:74–79. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.08.018.

- [37] Zhu M, Li W, Lu Y, et al. HBx drives alpha fetoprotein expression to promote initiation of liver cancer stem cells through activating PI3K/AKT signal pathway[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(6):1346–1355. doi:10.1002/ijc.30553.
- [38] Wang S, Zhu M, Wang Q, et al. Alpha-fetoprotein inhibits autophagy to promote malignant behaviour in hepatocellular carcinoma cells by activating PI3K/AKT/mTOR signalling[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10):1027. doi:10.1038/s41419-018-1036-5.
- [39] Rios-Fuller TJ, Ortiz-Soto G, Lacourt-Ventura M, et al. Ganoderma lucidum extract (GLE) impairs breast cancer stem cells by targeting the STAT3 pathway[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(89):35907–35921. doi:10.18632/oncotarget.26294.
- [40] García-López G, Ávila-González D, García-Castro IL, et al. Pluripotency markers in tissue and cultivated cells in vitro of different regions of human amniotic epithelium[J]. *Exp Cell Res*, 2018. pii: S0014-4827(18)30933-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.12.007. [Epub ahead of print]
- [41] Ching RHH, Sze KMF, Lau EYT, et al. C-terminal truncated hepatitis B virus X protein regulates tumorigenicity, self-renewal and drug resistance via STAT3/Nanog signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):23507–23516. doi:10.18632/oncotarget.15183.
- [42] Samadani AA, Norollahi SE, Rashidy-Pour A, et al. Cancer signaling pathways with a therapeutic approach: An overview in epigenetic regulations of cancer stem cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108:590–599. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.048.
- [43] Wang X, Oishi N, Shimakami T, et al. Hepatitis B virus X protein induces hepatic stem cell-like features in hepatocellular carcinoma by activating KDM5B[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(18):3252–3261. doi:10.3748/wjg.v23.i18.3252.
- [44] Fan H, Zhang H, Pascuzzi PE, et al. Hepatitis B virus X protein induces EpCAM expression via active DNA demethylation directed by RelA in complex with EZH2 and TET2[J]. *Oncogene*, 2016, 35(6):715–726. doi:10.1038/ncr.2015.122.
- [45] Lee JO, Kwun HJ, Jung JK, et al. Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1[J]. *Oncogene*, 2005, 24(44):6617–6625. doi:10.1038/sj.onc.1208827.
- [46] Al-Anazi M R, Nazir N, Colak D, et al. Deletion and Functional Analysis of Hepatitis B Virus X Protein: Evidence for an Effect on Cell Cycle Regulators[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5):1987–1998. doi:10.1159/000493670.
- [47] Yu L, Chen S, Luo N, et al. The C-terminus domain of the hepatitis B virus x protein stimulates the proliferation of mouse foetal hepatic progenitor cells, although it is not required for the formation of spheroids[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2):400–410. doi:10.3892/ijmm.2017.3026.
- [48] Lo J, Lau EY, Ching RH, et al. Nuclear factor kappa B-mediated CD47 up-regulation promotes sorafenib resistance and its blockade synergizes the effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2):534–545. doi:10.1002/hep.27859.
- [49] Han B, Jiang P, Li Z, et al. Coptisine-induced apoptosis in human colon cancer cells (HCT-116) is mediated by PI3K/Akt and mitochondrial-associated apoptotic pathway[J]. *Phytomedicine*, 2018, 48:152–160. doi:10.1016/j.phymed.2017.12.027.
- [50] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [51] Hu Z, Huang P, Yan Y, et al. Hepatitis B virus X protein related lncRNA WEE2-AS1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(1):79–86. doi:10.1016/j.bbrc.2018.11.091.
- [52] Wang Y, Wang B, Xiao S, et al. miR-125a/b inhibits tumor-associated macrophages mediated in cancer stem cells of hepatocellular carcinoma by targeting CD90[J]. *J Cell Biochem*, 2018. doi:10.1002/jcb.27436. [Epub ahead of print]
- [53] Wang Y, Jiang M, Du C, et al. Utilization of lung cancer cell lines for the study of lung cancer stem cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5):6791–6798. doi:10.3892/ol.2018.8265.
- [54] Song Y, Kim I K, Choi I, et al. Oxytetracycline have the therapeutic efficiency in CD133(+) HCC population through suppression CD133 expression by decreasing of protein stability of CD133[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):16100. doi:10.1038/s41598-018-34301-1.
- [55] Yang C, Cai WC, Dong ZT, et al. lncARSR promotes liver cancer stem cells expansion via STAT3 pathway[J]. *Gene*, 2018, 687:73–81. doi:10.1016/j.gene.2018.10.087.
- [56] Sun JH, Luo Q, Liu LL, et al. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(13):3547–3557. doi:10.3748/wjg.v22.i13.3547.
- [57] Ko CJ, Li CJ, Wu MY, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule as a predictor of poor outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6):4810–4816. doi:10.3892/etm.2018.6794.
- [58] Han Q, Hou Z, Yin C, et al. 5'-triphosphate siRNA targeting HBx elicits a potent anti-HBV immune response in pAAV-HBV transfected mice[J]. *Antiviral Res*, 2018, 161:36–45. doi:10.1016/j.antiviral.2018.11.006.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 孙为民, 查勇. 乙肝病毒X蛋白调控肝癌干细胞维持肝细胞癌生物学行为的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(1):92–98. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.013

Cite this article as: Sun WM, Zha Y. Hepatitis B virus X protein regulating liver cancer stem cells to maintain biological behaviors of hepatocellular carcinoma: recent research progress[J]. *Chin J Gen Surg*, 2019, 28(1):92–98. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.013