DOI：10.16781/j.CN31-2187/R.20210661

·综　述·

肝细胞癌的血液检测指标研究进展

范浙才[1,2]，杨　钊[3*]
1. 海军军医大学（第二军医大学）国家肝癌科学中心医学转化研究室，上海 201805
2. 海军军医大学（第二军医大学）第三附属医院国际合作生物信号转导研究室，上海 200438
3. 海军军医大学（第二军医大学）第三附属医院肝外二科，上海 200438

［**摘要**］ 原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，病死率高，其主要病理类型为肝细胞癌。大多肝细胞癌患者在初诊时已是晚期，5 年生存率低于 16%，实现肝癌的早发现和早诊断有助于改善患者的预后。血液检测具有微创、客观、经济、可重复和可动态监测的优点，可用于肝细胞癌高危人群的筛查和辅助诊断。本文回顾了已有报道的肝细胞癌血液检测指标，分为血清中可直接检出的标志物、细胞外囊泡中的标志物及循环肿瘤细胞中的标志物 3 类，阐述其优势及局限性，并对未来肝癌早期筛查的血液学检测新策略进行展望。

［**关键词**］ 肝肿瘤；肝细胞癌；肿瘤生物标志物；筛查；早期诊断
［**中图分类号**］ R 735.7　　［**文献标志码**］ A　　［**文章编号**］ 2097-1338(2023)01-0080-11

Blood test indicators for hepatocellular carcinoma: research progress

FAN Zhe-cai[1,2], YANG Zhao[3*]
1. Department of Medical Transcription, National Center for Liver Cancer, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 201805, China
2. International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China
3. Department of Hepatic Surgery (Ⅱ), The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

［**Abstract**］ Primary liver cancer is one of the most common malignant tumors in China, with high incidence and mortality, and the main pathological type is hepatocellular carcinoma (HCC). Most patients with HCC are already at the advanced stages at the first diagnosis, with the 5-year survival rate being less than 16%. Early detection and early diagnosis of liver cancer can help improve the prognosis of patients. Blood testing is commonly used to screen patients with high risks of liver cancer because it is minimally invasive, objective, economical, repeatable and easy to monitored. This article summarized 3 types of reported indicators for blood screening of liver cancer: biomarkers that could be directly detected in the serum, biomarkers in the cargoes transferred by extracellular vesicles, and biomarkers in circulating tumor cells. The advantages and limitations of each category were discussed. We also provided perspectives for the promising strategies of blood testing for HCC screening and diagnosis in future.

［**Key words**］ liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; tumor biomarkers; screening; early diagnosis
［Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(1): 80-90］

原发性肝癌是全球第六大常见肿瘤和第三大肿瘤相关死亡的病因[1]，也是我国发病率和死亡率较高的恶性肿瘤，严重威胁人类生命和健康[2]。肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是原发性肝癌的主要病理类型，约占 75%～85%[3]。HCC 起病隐匿、进展迅速、恶性程度高，早期诊断困难，大部分病例在初诊时已为晚期，采用手术等干预治疗效果较差[4-5]。晚期 HCC 患者 5 年生存率低于 16%，而早期 HCC 患者 5 年生存率高于 70%[6]。因此，高效的早期检测和诊断方法对于 HCC 患者的治疗和预后至关重要。

HCC 的高危因素主要包括 HBV 感染、丙型肝

［**收稿日期**］ 2021-07-01　　［**接受日期**］ 2022-01-06
［**作者简介**］ 范浙才，助理实验师．E-mail: fanzhecai_1203@163.com
*通信作者（Corresponding author）. Tel: 021-81875513, E-mail: wangzhao36110@163.com

炎病毒感染、长期酗酒、肝硬化、非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）等[7]，其中NAFLD正成为发达地区HCC的主要原因[8-9]。目前，超声检查是HCC监测的常用方法，但其准确度高度依赖于操作者的熟练程度，临床诊断的成功率低于预期值。血清肿瘤标志物的检测具有微创、客观、可重复及可动态监测的优点，是HCC监测和早期诊断的重要方法，其中甲胎蛋白（α-fetoprotein，AFP）是临床常用的HCC血清学标志物，但灵敏度不高。我国《原发性肝癌诊疗指南（2022年版）》建议高风险人群每6个月进行一次超声联合血清AFP检测来监测HCC的发生风险[2]。随着分子生物学和生物信息学技术的进步，越来越多的HCC血清学标志物被发现。本文回顾了已报道的HCC血液学检测指标，分为血清中直接可检出的标志物、细胞外囊泡为载体的标志物及循环肿瘤细胞中的标志物3类，对其研究进展进行综述。

1 血清中直接可检出的标志物

1.1 *蛋白类标志物* AFP是一种单链糖蛋白，在临床上广泛应用于HCC的辅助诊断和预后评估。AFP诊断HCC的灵敏度为60%，特异度为90%[10]。但AFP在30%～40%的HCC患者血清中呈阴性（＜20 ng/mL），且在急慢性肝炎、肝硬化等良性肝病患者中呈现不同程度的升高[11]。AFP除了作为HCC的诊断标志物外，还具有多种生物学功能，在诱导肝细胞恶性转化及调节细胞增殖、迁移、凋亡和免疫逃逸等方面发挥重要作用[12]。高水平血清AFP通常意味着HCC的进展风险和不良预后[13]。

根据与小扁豆凝集素（lens culinaris agglutinin，LCA）的亲和力，AFP可分为3种类型：AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3[14]。其中AFP-L3主要来源于肝癌细胞。临床以血清中AFP-L3占总AFP的比例（AFP-L3%）作为肝癌的诊断指标（临界值为10%），其特异度高达95%，灵敏度为51%[15]。AFP-L3的灵敏度与HCC临床分期相关，在小HCC（直径≤2 cm）中AFP-L3的灵敏度约为35%～45%，而当肿瘤直径增大（≥5 cm）时其灵敏度可达80%～90%[16]。由于AFP-L3的灵敏度相对较低，通常与AFP联用作为HCC的辅助诊断标志物。

脱-γ-羧基凝血酶原（des-γ-carboxy prothrombin，DCP）又称维生素K缺乏或拮抗剂-Ⅱ诱导的蛋白质（protein induced by vitamin K absence or antagonist-Ⅱ，PIVKA-Ⅱ），在维生素K缺乏或HCC患者的血清中升高。国内的一项大样本多中心研究发现，在HBV相关HCC患者中，DCP（临界值40 mAU/mL）准确度高于AFP[14]。另外，DCP与AFP无相关性，两者对诊断HCC具有互补性，AFP和DCP联合诊断HCC准确度高于单独使用DCP或AFP[17]。

其他蛋白类标志物如骨桥蛋白（osteopontin，OPN）[18]、高尔基蛋白73（Golgi protein 73，GP73）[19]、α-1-岩藻糖苷酶（α-1-fucosidase，AFU）[20]等在早期HCC的诊断上有一定价值。

1.2 *糖类标志物* 随着目前糖生物学、糖蛋白质组学及糖组学研究技术的不断深入，糖基化异常与HCC的关系受到越来越多的关注。Liu等[21]对临床不同分级的肝纤维化、HCC患者的血清N-聚糖图谱进行比较，结果显示在肝硬化患者中筛查HCC时，GlycoHCCTest（三半乳糖-α-1,3-分支岩藻糖基化三天线结构/双半乳糖-α-1,6-核心岩藻糖基化平分型二天线结构比值的对数值）与AFP具有相似的灵敏度与特异度。同时在相关糖组学的研究中还发现，血清IgG来源的N-糖链对AFP阴性的HCC患者具有重要的补充诊断价值。以上研究表明部分糖蛋白糖基化产物在HCC的诊断中具有重要的参考价值[22]。

1.3 *联合生物标志物及相关数学模型* 单一血清学检测指标在诊断早期HCC的临床应用中经常存在漏诊和误诊的情况，联合使用多个血清学检测指标或可提高HCC的检出率，例如国际上应用较为广泛的肝癌三联检就是联合检测AFP、AFP-L3%和DCP[23]，而联合检测AFP、丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）和中性粒细胞与淋巴细胞比值（neutrophil-lymphocyte ratio，NLR）有助于HBV相关HCC的诊断[24]。Best等[25]基于临床数据和血清肿瘤标志物构建了GALAD评分系统，其公式为GALAD＝－10.08＋0.09×年龄＋1.67×性别＋2.34×lg AFP＋0.04×AFP-L3＋1.33×lg DCP，公式中的性别为男取值1、女取值0；当GALAD评分临界值定为－0.63时，诊断HCC的灵敏度为

68.0%、特异度为 95.0%，其 AUC 高于超声检查。然而，该队列样本中非病毒性感染是早期 HCC 的主要致病因素，而我国大部分 HCC 患者主要是由于 HBV 感染造成肝硬化最终演变而来，GALAD 评分系统不一定适用于 HBV 感染为主要风险因素的 HCC 患者。在该评分系统的基础上，国内研究团队建立了基于病毒感染相关 HCC 为主的 GALAD-C 评分系统。GALAD-C＝－11.501＋0.099× 年龄＋0.733× 性别＋0.840×lg AFP＋0.073×AFP-L3%＋2.364×lg DCP，公式中的性别为男取值 1、女取值 0；该模型预测病毒感染 HCC 的灵敏度和特异度分别为 82.60% 和 85.90%[26]。GALAD、GALAD-C 等评分系统有助于早期 HCC 的筛查和诊断，但其临床价值仍需大规模队列研究进一步验证。血清中直接可检出的肝癌诊断相关蛋白标志物及多参数模型见表 1。

表 1　血清中直接可检出的 HCC 诊断相关蛋白标志物及多参数模型

Tab 1　Directly detectable protein markers for HCC diagnosis in serum and multi-parameter model

Item	Sensitivity/%	Specificity /%	Critical value	Reference
Protein marker				
AFP	60.00	90.00	20 ng/mL	［10］
AFP-L3%	51.00	95.00	10%	［15］
DCP	82.63	89.12	40 mAU/mL	［17］
AFP	67.80	91.23	20 ng/mL	［17］
OPN	79.21	63.80	14.64 ng/mL	［18］
AFP	54.46	81.00	20 ng/mL	［18］
GP73	96.90	96.90	17.5 ng/mL	［19］
AFU	90.00	97.50	2.300 5 μmol/(L•min)	［20］
AFP	70.00	85.00	15.25 ng/mL	［20］
Combination of multiple markers				
DCP＋AFP	91.10	87.02	40 mAU/mL, 20 ng/mL	［17］
OPN＋AFP	88.12	74.21	14.64 ng/mL, 20 ng/mL	［18］
AFU＋AFP	95.00	100.00	2.300 5 μmol/(L•min), 15.25 ng/mL	［20］
AFP＋AFP-L3%＋DCP	82.80	73.20	20 ng/mL, 10%, 40 mAU/mL	［23］
Multi-parameter mathematical model				
AFP＋ALT＋AST＋NLR	87.70	77.70	0.378	［24］
GALAD (gender＋age＋AFP＋AFP-L3＋DCP)	68.00	95.00	－0.63	［25］
GALAD-C (gender＋age＋AFP＋AFP-L3＋DCP)	82.60	85.90	－0.374	［26］

HCC: Hepatocellular carcinoma; AFP: α-fetoprotein; AFP-L3%: The percentage of α-fetoprotein L3; DCP: Des-γ-carboxy prothrombin; OPN: Osteopontin; GP73: Golgi protein 73; AFU: α-1-fucosidase; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; NLR: Neutrophil-lymphocyte ratio.

1.4　miRNA　miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子。随着液体活检技术的发展，越来越多的研究发现在患者体液（包括血清、唾液、尿液和粪便等）中存在大量的 miRNA[27]，且其表达具有一定的稳定性[28]。血清中可检出多种 miRNA，其水平与肝病进展密切相关[27,29-31]。肝脏来源的 miRNA 可能通过细胞凋亡和坏死被动进入血清或通过外泌体和病毒颗粒的分泌主动进入血清[32]，而检测血清 miRNA 的创伤性远小于组织活检，因此，以血清中 miRNA 水平评估肝脏中 miRNA 水平是较有推广前景的检测手段。

研究表明，循环 miRNA-21 水平升高可用来区分 HCC 与慢性肝炎（灵敏度和特异度分别为 61.1% 和 83.3%）及 HCC 与健康对照样本（灵敏度和特异度分别为 87.3% 和 92.0%），ROC 曲线分析显示 miRNA-21 预测 HCC 的 AUC 为 0.773，预测 HCC 的效能优于 AFP[33]。此外，HCC 患者血清中 miRNA-15b 和 miRNA-130b 的表达也显著上调[34]，miRNA-130b 在检测 HCC 中的 AUC 为 0.913，灵敏度和特异度分别为 87.7% 和 81.4%；相比之下，虽然 miRNA-15b 检测 HCC 的灵敏度高达 98.3%，但其特异度却仅为 15.3%。血清 miRNA-15b 和 miRNA-130b 的高灵敏度提示两者可以作为 AFP 水平较低的早期 HCC 患者筛查和预警的生物标志物。

国内研究人员开展了一项包括 7 个医学中

心的回顾性研究，通过严格的筛选标准从 9 287 例慢性乙型肝炎患者中筛选出 195 例临床前患者（确诊 HCC 前平均 6 个月采集的样本）和 435 例慢性乙型肝炎患者，并从血清中鉴定出一组 miRNA（miRNA-193a-3p、miRNA-369-5p、miRNA-672、miRNA-429、let-7i*），该组血清 miRNA 可用于预测慢性乙型肝炎患者进展为 HCC 的风险[35]。此外，在 HBV 相关早期 HCC（巴塞罗那分期 0 期和 A 期）的诊断中，一组 7 种 miRNA 的组合（miRNA-122、miRNA-192、miRNA-21、miRNA-223、miRNA-26a、miRNA-27a 和 miRNA-801）也被证明具有较高的准确性，AUC 可达到 0.888[36]。

1.5 长链非编码 RNA（long non-coding RNA，lncRNA） lncRNA 是一种长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究发现，与正常肝组织相比多种 lncRNA 在 HCC 中异常表达，比如 LINC00794[37]、lncRNA SPRY4-IT1[38]、lncRNA MALAT[39]等。但是，部分 lncRNA 在其他癌症或非癌肝损伤中也异常表达。因此，lncRNA 与其他分子尤其是已知的 HCC 生物标志物联用，可能是一种更理想的 HCC 诊断方法。例如，lncRNA UCA1 和 lncRNA WRAP53 与 AFP 的组合实现了高达 100% 的灵敏度[40]。类似地，另外 2 种 lncRNA 人浆细胞瘤转化迁移基因 1（plasmacytoma variant translocation 1，PVT1）和 lncRNA uc002mbe.2 与 AFP 的组合也比单独使用 AFP 效果更好[41]。另外，研究发现循环血中 3 种 lncRNA（LINC00152、RP11-160H22.5 和 XLOC014172）与 AFP 联合检测可预测肝硬化患者和健康受试者向 HCC 进展的潜在风险[42]。

除了诊断价值外，lncRNA 也可作为 HCC 的潜在预后标志物。例如，lncRNA WRAP53 也是一种独立的预后标志物，可预测 HCC 患者的高复发率[40]。lncRNA-ATB 上调提示 HCC 患者肿瘤易发生转移，且往往预后不良[43]；相反，具有转移抑制功能的 lncRNA miR503HG 上调则是一个有利的预后指标[44]。

1.6 环状 RNA（circular RNA，circRNA） circRNA 是缺乏 5′和 3′末端的内源性非编码 RNA，是前体 mRNA 反向剪接的产物[45]。circRNA 的环状结构使其不受 RNA 酶影响，表达稳定且不易降解。circRNA 序列中存在特定的 miRNA 结合位点，可调控 miRNA 的表达，因此，circRNA 的异常表达也可介导肿瘤的进展。由于其高稳定性和丰度，体液中的 circRNA 被认为是很有前景的液体活检生物标志物[46]。

通过临床样本的检测发现，circRNA CDYL 在肝癌早期特异性升高，并显著促进了上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule，EpCAM）阳性的肝癌起始细胞的形成。circRNA CDYL 通过竞争性结合 miRNA-892a 和 miRNA-328-3p，分别与调节肝癌来源生长因子（hepatoma-derived growth factor，HDGF）和低氧诱导因子天冬酰胺羟化酶（hypoxia-inducible factor asparagine hydroxylase，HIF1AN）的 mRNA 形成相互作用网络。因此，circRNA CDYL 或 circRNA CDYL 联合 HDGF 和 HIF1AN 均可作为 HCC 诊断的标志物[47]。另有研究分析了 exoRBase 数据库中 HCC 和正常人血液样本的 circRNA 表达谱，认为 hsa_circ_0004001、hsa_circ_0004123、hsa_circ_0075792 及三者的组合在 HCC 的诊断中具有潜在价值[48]。血清中直接可检出的肝癌诊断或进展核酸类标志物见表 2。

综上所述，蛋白类血清生物标志物是目前推广应用最为广泛的诊断标志物，对 HCC 的早期诊断起到辅助作用，由于单个标志物的诊断效能往往受到多方面因素的限制，因此研究人员将多个生物标志物联合应用诊断 HCC，但其效能还需要进一步的多中心大样本验证；miRNA、lncRNA 和 circRNA 是当前血清中可直接检出生物标志物研究的新方向，与 HCC 的进展密切相关，该类标志物的稳定性及预测 HCC 的效能也还有待进一步验证。

2 细胞外囊泡为载体的生物标志物

细胞外囊泡是指从细胞膜上脱落或由细胞分泌的双层膜结构的囊泡状小体，包括外泌体和微囊泡。有研究表明细胞外囊泡携带着一系列具有生物活性的物质，如可溶性蛋白、膜结合蛋白、脂质、代谢物、DNA 和 RNA[49]，且与供体细胞相比细胞外囊泡中的内容物通常更加富集、浓度较高、更易检出[50]。同时，以液体活检的方式检测血液中细胞外囊泡可以减少对病患的侵入性伤害，因此，细胞外囊泡运输的核酸及蛋白具有作为 HCC 生物标志物的潜在价值。

表2　血清中直接可检出的HCC诊断或进展核酸类标志物

Tab 2　Directly detectable nucleic acid markers for diagnosis or progression of HCC in serum

Biomarker	Diagnosis/ prognosis	Biological function	Reference
miRNA			
miRNA-21↑	Diagnosis	Early screening of HCC	［33］
miRNA-15b, miRNA-130b↑	Diagnosis	Early screening of HCC	［34］
miRNA-193a-3p, miRNA-369-5p, miRNA-672, miRNA-429, let-7i*	Diagnosis	Early screening of HCC	［35］
miRNA-122, miRNA-192, miRNA-21, miRNA-223, miRNA-26a, miRNA-27a, miRNA-801	Diagnosis	Early screening of HCC	［36］
lncRNA			
lncRNA UCA1, lncRNA WRAP53↑	Diagnosis	Early screening of HCC	［40］
lncRNA PVT1, lncRNA uc002mbe.2	Diagnosis	Early screening of HCC	［41］
LINC00152, RP11-160H22.5, XLOC014172	Diagnosis	Early screening of HCC	［42］
lncRNA WRAP53↑	Prognosis	Correlated with HCC metastasis	［40］
lncRNA-ATB↑	Prognosis	Promoting HCC metastasis	［43］
lncRNA miR503HG↑	Prognosis	Suppressing HCC recurrence and metastasis	［44］
circRNA			
circ-CDYL/circ-CDYL, HDGF, HIF1AN↑	Diagnosis	Early screening of HCC	［47］
hsa_circ_0004001/hsa_circ_0004123/hsa_circ_0075792/ hsa_circ_0004001, hsa_circ_0004123, hsa_circ_0075792↑	Diagnosis	TNM staging and tumor size	［48］

HCC: Hepatocellular carcinoma; miRNA: MicroRNA; lncRNA: Long non-coding RNA; circRNA: Circular RNA.

2.1　*外泌体为载体的生物标志物*　外泌体是一种直径约30～150 nm的圆盘状或杯状细胞外囊泡，其内富含RNA、蛋白质等。近期研究发现，相比于慢性肝炎或非HCC患者，HCC患者外泌体中miRNA-21-5p、miRNA-10b-5p、miRNA-221-3p和miRNA-223-3p上调[51]；另有研究表明HCC患者血清外泌体中miRNA-18a、miRNA-221、miRNA-222和miRNA-224水平升高，而miRNA-101、miRNA-106b、miRNA-122、miRNA-195和miRNA-125b水平下降[52-53]；另外来源于外泌体的LINC00161在HCC患者的血清样本中上调，且结果具有稳定性和特异性[54]。这些结果提示循环外泌体miRNA和lncRNA可用于辅助诊断HCC，尤其可以作为AFP阴性的HCC患者早期预警指标[51]。此外，在肝移植术后复发HCC患者的血清中检测到外泌体中抑癌基因miRNA-718显著低于未复发患者[55]，血清外泌体中miRNA-1247-3p表达水平与HCC的转移相关[56]，以上研究表明循环外泌体miRNA可用于预测肿瘤复发或转移。

除了miRNA，HCC患者血清外泌体中运载的蛋白质也可提示肝癌进展。研究发现，半乳糖凝集素3结合蛋白（galectin-3-binding protein，LG3BP）和聚合免疫球蛋白受体（polymeric immunoglobulin receptor，PIGR）在HCC患者中高表达，二者联合使用可预测HCC的发生，AUC值高于AFP[57]。此外，HCC患者外周血中存在富含SMAD家族成员3（SMAD family member 3，SMAD3）的外泌体，其水平与HCC患者的疾病分期和病理分级密切相关[58]。另一项研究表明，高转移性细胞分泌的外泌体中腺苷酸环化酶相关蛋白1（adenylyl cyclase-associated protein 1，CAP1）显著富集，其与HCC转移和复发有一定的关联[59]。

2.2　*微囊泡为载体的生物标志物*　微囊泡是一种直径为100～1 000 nm的细胞外囊泡，由质膜出芽形成，其内包含部分细胞质[60]，由于其直径大于外泌体，常作为大分子蛋白质载体发挥作用。目前已有一些研究探究了微囊泡中的蛋白质作为HCC诊断和预后指标的可能性。例如，HCC患者的血浆微囊泡M2型丙酮酸激酶（pyruvate kinase M2，PKM2）的水平显著高于健康人，与HCC发生呈正相关[61]。肝移植术后早期复发的HCC患者中$HepPar1^{+}$微囊泡的数量显著高于未复发的患者，或可用于预测HCC患者预后[62]。近期发表的一项研究评估了肿瘤相关微粒（tumor-associated microparticle，taMP）用于HCC和胆管癌检测和

监测的价值。研究发现，在 HCC 和胆管癌中膜联蛋白Ⅴ（annexin Ⅴ）$^+$ EpCAM$^+$ CD147$^+$ taMP 显著升高，同时，annexin Ⅴ$^+$ EpCAM$^+$去唾液酸糖蛋白受体 1（monoclonal antibody to asialoglycoprotein receptor 1，ASGPR1）$^+$ CD133$^+$ taMP 可用于鉴别肝脏恶性肿瘤患者（HCC 和胆管癌）、肝硬化患者和非肝癌肿瘤患者。相比肝硬化患者，肝癌患者的annexin Ⅴ$^+$ EpCAM$^+$ ASGPR1$^+$ taMP 显著增加，其水平在肝癌根治术后 7 d 内下降，这一发现表明该 taMP 与肿瘤形成密切相关[63]。除了囊泡表面标志物的变化外，taMP 浓度变化也可用于评估 HCC 的发生和进展程度。HCC 患者外周血微囊泡水平显著高于肝硬化患者，且与 HCC 肿瘤大小、病理类型和 TNM 分期相关[64]。综上所述，细胞外囊泡的血浆水平变化及其作为载体传递的核酸及蛋白均可为肝癌的诊断及预后提供一定的参考，具有作为肝癌潜在诊断和预后生物标志物的可能性（表 3）。

表 3　细胞外囊泡为载体的 HCC 诊断或预后标志物

Tab 3　Diagnosis or prognostic markers of HCC with extracellular vesicles as carrier

Biomarker	Diagnosis/prognosis	Biological function	Reference
Exosome			
miRNA-21-5p, miRNA-10b-5p/miRNA-221-3p/miRNA-223-3p↑	Diagnosis	Promoting HCC development	［51］
miRNA-18a, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-224 ↑	Diagnosis and prognosis	Inducing the proliferation and migration of HCC cells	［52-53］
miRNA-101, miRNA-106b, miRNA-122, miRNA-195, miRNA-125b ↓	Diagnosis and prognosis	Suppressing HCC progression	［52-53］
miRNA-718 ↓	Prognosis	Suppressing cell proliferation in HCC	［55］
miRNA-1247-3p↑	Prognosis	Promote lung metastasis of HCC	［56］
LINC00161 ↑	Prognosis	Promoting tumor migration and invasion in HCC	［54］
LG3BP, PIGR ↑	Prognosis	Promoting HCC progression, tumor cell transformation, invasion and proliferation	［57］
SMAD3 ↑	Diagnosis and prognosis	Inducing cell adhesion, promoting lung metastasis	［58］
CAP1 ↑	Prognosis	Correlated with HCC metastasis	［59］
Microvesicle			
PKM2 ↑	Diagnosis	Remodeling the TME to promote HCC progression through inducing monocyte-to-macrophage differentiation	［61］
Circulating HepPar1$^+$microparticles ↑	Prognosis	Correlating with tumor recurrence	［62］
Annexin Ⅴ$^+$ EpCAM$^+$ASGPR1$^+$taMP↑	Diagnosis	Promoting liver cancer progression	［63］

HCC: Hepatocellular carcinoma; miRNA: MicroRNA; LG3BP: Galectin-3-binding protein; PIGR: Polymeric immunoglobulin receptor; SMAD3: SMAD family member 3; CAP1: Adenylyl cyclase-associated protein 1; PKM2: Pyruvate kinase M2; TME: Tumor microenvironment; EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule; ASGPR1: Monoclonal antibody to asialoglycoprotein receptor 1; taMP: Tumor-associated microparticle.

3　循环肿瘤细胞中的标志物

循环肿瘤细胞指从实体肿瘤病灶（原发灶、转移灶）脱落进入外周血的各类肿瘤细胞。肿瘤 DNA 可从原发性或转移性肿瘤及进入癌症患者血液中的循环肿瘤细胞中释放出来[65]。使用 CanPatrol 富集技术和原位杂交进行循环肿瘤细胞检测，发现 90.18% 的 HCC 患者中可检出一定水平的循环肿瘤细胞[66]，且其含量与 HCC 的 TNM 分期密切相关[67]，有望用于 HCC 的预后判断[68-69]。

目前普遍认为，大多数循环肿瘤 DNA（circulating tumor DNA，ctDNA）来自凋亡和坏死的肿瘤细胞，这些细胞释放片段化的 DNA 到循环中，理论上，ctDNA 含有与其来源的肿瘤细胞相同的遗传缺陷[70-73]。目前 ctDNA 的检测分析方法主要分为两大类：（1）针对少量突变位点检测，如鉴定非小细胞肺癌患者中的表皮生长因子受体突变；（2）采用高通量测序手段对多基因区域的 ctDNA 进行检测，但检出的基因组突变可能为体细胞突变。

HCC 患者的血浆中还存在大量来自其他细胞的循环游离 DNA（circulating cell-free DNA, cfDNA），这些小片段 DNA 主要由细胞凋亡产生[74-75]。有研究发现 cfDNA 水平（临界值 73.0 ng/mL）具有区分 HCC 和丙型肝炎病毒感染的潜在作用，灵敏度为 69.2%，特异度为 93.3%[76]。大量研究证明，cfDNA 与 AFP 联用可以提高 HCC 的诊断灵敏度[77-78]。但是，目前研究中所运用的 cfDNA 的提取、分离、富集、检测方法各不相同，对于 cfDNA 水平升高的定义没有统一的标准，因此 cfDNA 血浆水平在 HCC 早期筛查中的作用还有待商榷。

除了血浆 cfDNA 水平的异常升高外，HCC 患者中还可以检测到 cfDNA 的单核苷酸突变、拷贝数畸变、异常甲基化等。cfDNA 的异常变化可能具有 HCC 筛查和诊断的临床应用价值，但往往不能单独作为 HCC 的诊断标准[79]。近年来，对于血浆中 cfDNA 的异常甲基化的相关研究已经有了更为深入的进展。Wong 等[80]应用甲基化特异性 PCR 技术发现，在 HCC 患者的血浆、血清、组织样本中检测异常甲基化 p15、p16，并发现 p15/p16 甲基化与 HCC 进展有关。此后，许多研究人员分析了 HCC 患者的 cfDNA 甲基化谱。在 90% 的 HCC 患者中检测到 Ras 关联域家族 1A（Ras association domain family protein 1 isoform A，RASSF1A）启动子高甲基化[81]，据此可以将 HCC 患者与健康对照和慢性丙型肝炎患者区分开，准确度分别为 77.5% 和 72.5%。启动子区域的高甲基化极有可能是肿瘤发生的重要早期事件。因此，cfDNA 中的启动子异常甲基化往往意味着 HCC 发生的高风险。另外有研究通过检测 2 554 例样本（1 204 例 HCC，392 例慢性乙肝 / 肝硬化，958 例正常对照）血浆 cfDNA 中 5- 羟甲基胞嘧啶（5-hydroxymethylcytosine，5-hmc）的表达情况，从中发现一组血浆 cfDNA 上的 5-hmc 标签能准确的判断早期肝癌的发生，AUC 为 0.855（95% *CI* 0.818～0. 893）[82]。循环肿瘤细胞中的肝癌诊断或进展标志物见表 4。

表 4　循环肿瘤细胞中的 HCC 诊断或进展标志物

Tab 4　Markers of HCC diagnosis or progression in circulating tumor cells

Biomarker	Detection and analysis method	Function	Reference
Circulating tumor cells	CanPatrol circulating tumor cells enrichment technology/*in situ* hybridization	The content of circulating tumor cells is related to TNM stage of HCC, which is expected to be used for the prognosis of HCC	［66-69］
ctDNA	Detection for a small number of mutation sites/ high-throughput sequencing	The ctDNA has the same genetic defects as the tumor cells it comes from	［70-73］
cfDNA	Abnormally high levels of cfDNA	Early screening of HCC	［76-78］
	Abnormal methylation of p15/p16	Correlated with HCC progress	［80］
	RASSF1A methylation	High risk of HCC development	［81］
	5-hmc	Early screening of HCC	［82］

HCC: Hepatocellular carcinoma; ctDNA: Circulating tumor DNA; cfDNA: Circulating cell-free DNA; RASSF1A: Ras association domain family protein 1 isoform A; 5-hmc: 5-hydroxymethylcytosine.

循环肿瘤细胞、ctDNA 是目前液体活检技术中的热门方向，具有微创、可重复、可动态监测等优点，有助于患者进行 HCC 早筛、制定个体化治疗方案以及监测是否复发。依目前的检测技术来看，循环肿瘤细胞、ctDNA 作为 HCC 的诊断标准存在很多限制，如 ctDNA 在早期 HCC 患者中含量较少，且容易受到 cfDNA 的干扰。

4　展　望

由于检测的便捷性、经济性及易重复等优点，血清中直接可检出的标志物是目前应用最为广泛的 HCC 诊断标志物，其中最为常用的为 AFP，应用于 HCC 的早筛。AFP-L3 和 DCP 也已经在临床中应用，而 GP73 等蛋白类标志物、血清 N- 糖组及血清糖蛋白糖链及多分子联合诊断模型对 HCC 的诊断效能仍需进一步的验证。单个标志物的诊断效能往往受到多方面因素的限制，灵敏度和特异度有限，且较多关于诊断标志物的研究使用的队列样本有限，还有待多中心、大样本的队列验证。因此，研究人员尝试将多个生物标志物联合应用以提高 HCC 诊断的效能，但是这些多分子诊断模型目前仍仅限于研究层面，在临床上尚未有更好的分子标志

物可以取代 AFP 用于大规模的筛查。核酸类标志物 miRNA、lncRNA 和 circRNA 是当前血清中可直接检出生物标志物研究的新方向，多项研究表明其水平与 HCC 的进展密切相关，然而该类标志物检测的稳定性及其预测 HCC 的效能也还有待进一步验证。

细胞外囊泡作为核酸、蛋白等生物活性分子的运输载体，在细胞之间的信息传递中起着重要作用。既往研究表明细胞外囊泡中运输的内容物具有一定程度的富集，水平差异较组织本底水平可能更为显著，且具有一定的稳定性，因此，细胞外囊泡中的成分有望成为新型的非侵入性辅助诊断肝癌的生物标志物。但是在细胞外囊泡分子生物标志物进入临床应用阶段前仍有需要解决的技术瓶颈，例如目前细胞外囊泡的抽提最为广泛使用的方法仍为高速离心法，耗时较长，且对分离操作有一定的技术要求；其纯化及鉴定也需要标准化的操作规范和质量控制，成本较血清中可直接检出的标志物显然更高。同时，细胞外囊泡的释放及其对生物活性物质的特异性选择机制均尚未阐明，不同处理条件是否会造成抽提和检测偏差还有待进一步深入研究。

循环肿瘤细胞、ctDNA 是液体活检技术中的热门方向，具有微创、可重复、可动态监测等优点，有助于患者进行 HCC 早筛、制定个体化治疗方案及监测是否复发。依目前的检测技术来看，循环肿瘤细胞、ctDNA 作为 HCC 的诊断标准存在很多限制，例如，ctDNA 仅占总 cfDNA 的一小部分，还存在被大量非肿瘤来源的 DNA 稀释的风险；该方法相比之下成本更高，耗时更长，且稳定性更低，因此基于 ctDNA 的检测尚未大量开展。然而，随着液体活检技术的进步，循环肿瘤细胞、ctDNA 的检测或可在肿瘤起始的早期阶段比血清学中的标志物更早预警肿瘤的发生，有助于将 HCC 的早期筛查时间更向前推进一步。

随着生物信息学技术的进步，我们已经迎来了大数据时代，肿瘤的精准分子分型和人工智能技术水平的不断提高，将为疾病的诊断方法提供更多的模型和新的思路，未来多种方法、多个标志物的联合使用或许能为肝癌的早诊早筛和预后判断提供更为准确的参考。

[参 考 文 献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 209-249.

[2] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 临床肝胆病杂志，2022，38：288-303.

[3] HARRIS P S, HANSEN R M, GRAY M E, MASSOUD O I, MCGUIRE B M, SHOREIBAH M G. Hepatocellular carcinoma surveillance: an evidence-based approach[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25: 1550-1559.

[4] JUN L, YANG G, ZHISU L. The utility of serum exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 1221-1227.

[5] GONG X L, QIN S K. Progress in systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22: 6582-6594.

[6] TSUCHIYA N, SAWADA Y, ENDO I, SAITO K, UEMURA Y, NAKATSURA T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21: 10573-10583.

[7] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2019, 380: 1450-1462.

[8] OMER R E, KUIJSTEN A, KADARU A M Y, KOK F J, IDRIS M O, EL KHIDIR I M, et al. Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma[J]. Nutr Cancer, 2004, 48: 15-21.

[9] LAURSEN L. A preventable cancer[J]. Nature, 2014, 516: S2-S3.

[10] TREVISANI F, D'INTINO P E, MORSELLI-LABATE A M, MAZZELLA G, ACCOGLI E, CARACENI P, et al. Serum α-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status[J]. J Hepatol, 2001, 34: 570-575.

[11] GALLE P R, FOERSTER F, KUDO M, CHAN S L, LLOVET J M, QIN S K, et al. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2019, 39: 2214-2229.

[12] ZHENG Y F, ZHU M Y, LI M S. Effects of alpha-fetoprotein on the occurrence and progression of hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146: 2439-2446.

[13] BAI D S, ZHANG C, CHEN P, JIN S J, JIANG G Q. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma[J/OL]. Sci Rep, 2017, 7: 12870. DOI: 10.1038/s41598-017-12834-1.

[14] PIÑERO F, DIRCHWOLF M, PESSÔA M G. Biomarkers in hepatocellular carcinoma: diagnosis, prognosis and treatment response assessment[J/OL]. Cells, 2020, 9: 1370. DOI: 10.3390/cells9061370.

[15] BERTINO G, ARDIRI A, MALAGUARNERA M,

MALAGUARNERA G, BERTINO N, CALVAGNO G S. Hepatocellualar carcinoma serum markers[J]. Semin Oncol, 2012, 39: 410-433.

[16] TAKETA K. Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology[J]. Hepatology, 1990, 12: 1420-1432.

[17] JI J, WANG H, LI Y, ZHENG L, YIN Y P, ZOU Z Z, et al. Diagnostic evaluation of des-gamma-carboxy prothrombin versus α-fetoprotein for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in China: a large-scale, multicentre study[J/OL]. PLoS One, 2016, 11: e0153227. DOI: 10.1371/journal.pone.0153227.

[18] ZHU M Y, ZHENG J, WU F, KANG B, LIANG J, HESKIA F, et al. OPN is a promising serological biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis[J/OL]. J Med Virol, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25704.

[19] SHAKER M K, ATTIA F M, HASSAN A A, SHEDID M M, ABOELMAGD M A, FAISAL A S. Evaluation of Golgi protein 73 (GP73) as a potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J/OL]. Clin Lab, 2020, 66: DOI: 10.7754/Clin.Lab.2020.190911.

[20] FAWZY MONTASER M, AMIN SAKR M, OMAR KHALIFA M. Alpha-L-fucosidase as a tumour marker of hepatocellular carcinoma[J]. Arab J Gastroenterol, 2012, 13: 9-13.

[21] LIU X E, DESMYTER L, GAO C F, LAROY W, DEWAELE S, VANHOOREN V, et al. N-glycomic changes in hepatocellular carcinoma patients with liver cirrhosis induced by hepatitis B virus[J]. Hepatology, 2007, 46: 1426-1435.

[22] YI C H, WENG H L, ZHOU F G, FANG M, JI J, CHENG C, et al. Elevated core-fucosylated IgG is a new marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J/OL]. Oncoimmunology, 2015, 4: e1011503. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1011503.

[23] LIM T S, KIM D Y, HAN K H, KIM H S, SHIN S H, JUNG K S, et al. Combined use of AFP, PIVKA-Ⅱ, and AFP-L3 as tumor markers enhances diagnostic accuracy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51: 344-353.

[24] DING Y Z, LIU K H, XU Y M, ZHAO Q Q, LOU S K, XIANG X G, et al. Combination of inflammatory score/liver function and AFP improves the diagnostic accuracy of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Med, 2020, 9: 3057-3069.

[25] BEST J, BECHMANN L P, SOWA J P, SYDOR S, DECHÊNE A, PFLANZ K, et al. GALAD score detects early hepatocellular carcinoma in an international cohort of patients with nonalcoholic steatohepatitis[J/OL]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18: 728-735.e4. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.11.012.

[26] LIU M X, WU R H, LIU X, XU H Q, CHI X M, WANG X M, et al. Validation of the GALAD model and establishment of GAAP model for diagnosis of hepatocellular carcinoma in Chinese patients[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2020, 7: 219-232.

[27] IGAZ I, TOPA L. Significance of microRNA expression in body fluids in the diagnosis of gastrointestinal tumors[J]. Orv Hetil, 2014, 155: 11-15.

[28] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, FRITZ B R, WYMAN S K, POGOSOVA-AGADJANYAN E L, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 10513-10518.

[29] CELIKBILEK M, BASKOL M, TAHERI S, DENIZ K, DOGAN S, ZARARSIZ G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Hepatol, 2014, 6: 613-620.

[30] CERMELLI S, RUGGIERI A, MARRERO J A, IOANNOU G N, BERETTA L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease[J/OL]. PLoS One, 2011, 6: e23937. DOI: 10.1371/journal.pone.0023937.

[31] ARRESE M, EGUCHI A, FELDSTEIN A E. Circulating microRNAs: emerging biomarkers of liver disease[J]. Semin Liver Dis, 2015, 35: 43-54.

[32] NOVELLINO L, ROSSI R L, BONINO F, CAVALLONE D, ABRIGNANI S, PAGANI M, et al. Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs[J/OL]. PLoS One, 2012, 7: e31952. DOI: 10.1371/journal.pone.0031952.

[33] TOMIMARU Y, EGUCHI H, NAGANO H, WADA H, KOBAYASHI S, MARUBASHI S, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56: 167-175.

[34] LIU A M, YAO T J, WANG W, WONG K F, LEE N P, FAN S T, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study[J/OL]. BMJ Open, 2012, 2: e000825. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-000825.

[35] LI L, CHEN J G, CHEN X, TANG J, GUO H, WANG X F, et al. Serum miRNAs as predictive and preventive biomarker for pre-clinical hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2016, 373: 234-240.

[36] ZHOU J, YU L, GAO X, HU J, WANG J P, DAI Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2011, 29: 4781-4788.

[37] TANG J, ZHUO H, ZHANG X, JIANG R, JI J, DENG L, et al. A novel biomarker Linc00974 interacting with KRT19 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma[J/OL]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1549. DOI: 10.1038/cddis.2014.518.

[38] JING W, GAO S S, ZHU M, LUO P, JING X, CHAI H Y, et al. Potential diagnostic value of lncRNA SPRY4-IT1 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2016, 36: 1085-1092.

[39] KONISHI H, ICHIKAWA D, YAMAMOTO Y,

ARITA T, SHODA K, HIRAMOTO H, et al. Plasma level of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 is associated with liver damage and predicts development of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2016, 107: 149-154.

[40] KAMEL M M, MATBOLI M, SALLAM M, MONTASSER I F, SAAD A S, EL-TAWDI A H F. Investigation of long noncoding RNAs expression profile as potential serum biomarkers in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Transl Res, 2016, 168: 134-145.

[41] YU J Y, HAN J Q, ZHANG J, LI G Z, LIU H, CUI X P, et al. The long noncoding RNAs PVT1 and uc002mbe.2 in sera provide a new supplementary method for hepatocellular carcinoma diagnosis[J/OL]. Medicine, 2016, 95: e4436. DOI: 10.1097/MD.0000000000004436.

[42] PEZZUTO F, BUONAGURO L, BUONAGURO F M, TORNESELLO M L. The role of circulating free DNA and microRNA in non-invasive diagnosis of HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1007. DOI: 10.3390/ijms19041007.

[43] YUAN J H, YANG F, WANG F, MA J Z, GUO Y J, TAO Q F, et al. A long noncoding RNA activated by TGF-β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell, 2014, 25: 666-681.

[44] WANG H, LIANG L H, DONG Q Z, HUAN L, HE J, LI B T, et al. Long noncoding RNA miR503HG, a prognostic indicator, inhibits tumor metastasis by regulating the HNRNPA2B1/NF-κB pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Theranostics, 2018, 8: 2814-2829.

[45] LI X, YANG L, CHEN L L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. Mol Cell, 2018, 71: 428-442.

[46] MEMCZAK S, PAPAVASILEIOU P, PETERS O, RAJEWSKY N. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood[J/OL]. PLoS One, 2015, 10: e0141214. DOI: 10.1371/journal.pone.0141214.

[47] WEI Y P, CHEN X, LIANG C, LING Y, YANG X W, YE X F, et al. A noncoding regulatory RNAs network driven by circ-CDYL acts specifically in the early stages hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2020, 71: 130-147.

[48] SUN X H, WANG Y T, LI G F, ZHANG N, FAN L. Serum-derived three-circRNA signature as a diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 226. DOI: 10.1186/s12935-020-01302-y.

[49] DEVHARE P B, RAY R B. Extracellular vesicles: novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis[J]. Mol Aspects Med, 2018, 60: 115-122.

[50] SAW P E, XU X D, CHEN J N, SONG E W. Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology[J]. Sci China Life Sci, 2021, 64: 22-50.

[51] GHOSH S, BHOWMIK S, MAJUMDAR S, GOSWAMI A, CHAKRABORTY J, GUPTA S, et al. The exosome encapsulated microRNAs as circulating diagnostic marker for hepatocellular carcinoma with low alpha-fetoprotein[J]. Int J Cancer, 2020, 147: 2934-2947.

[52] SOHN W, KIM J, KANG S H, YANG S R, CHO J Y, CHO H C, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma[J/OL]. Exp Mol Med, 2015, 47: e184. DOI: 10.1038/emm.2015.68.

[53] LIU W F, HU J, ZHOU K Q, CHEN F Y, WANG Z, LIAO B Y, et al. Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 3843-3851.

[54] SUN L, SU Y Y, LIU X X, XU M, CHEN X X, ZHU Y F, et al. Serum and exosome long non coding RNAs as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer, 2018, 9: 2631-2639.

[55] SUGIMACHI K, MATSUMURA T, HIRATA H, UCHI R, UEDA M, UEO H, et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation[J]. Br J Cancer, 2015, 112: 532-538.

[56] FANG T, LV H W, LV G S, LI T, WANG C Z, HAN Q, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J/OL]. Nat Commun, 2018, 9: 191. DOI: 10.1038/s41467-017-02583-0.

[57] ARBELAIZ A, AZKARGORTA M, KRAWCZYK M, SANTOS-LASO A, LAPITZ A, PERUGORRIA M J, et al. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2017, 66: 1125-1143.

[58] FU Q H, ZHANG Q, LOU Y, YANG J Q, NIE G, CHEN Q, et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer[J]. Oncogene, 2018, 37: 6105-6118.

[59] WANG S, CHEN G, LIN X, XING X H, CAI Z X, LIU X L, et al. Role of exosomes in hepatocellular carcinoma cell mobility alteration[J]. Oncol Lett, 2017, 14: 8122-8131.

[60] STAHL P D, RAPOSO G. Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis[J]. Physiology (Bethesda), 2019, 34: 169-177.

[61] HOU P P, LUO L J, CHEN H Z, CHEN Q T, BIAN X L, WU S F, et al. Ectosomal PKM2 promotes HCC by inducing macrophage differentiation and remodeling the tumor microenvironment[J/OL]. Mol Cell, 2020, 78: 1192-1206.e10. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.05.004.

[62] ABBATE V, MARCANTONI M, GIULIANTE F, VECCHIO F M, GATTO I, MELE C, et al. HepPar1-positive circulating microparticles are increased in subjects with hepatocellular carcinoma and predict early

recurrence after liver resection[J/OL]. Int J Mol Sci, 2017, 18: 1043. DOI: 10.3390/ijms18051043.

[63] JULICH-HAERTEL H, URBAN S K, KRAWCZYK M, WILLMS A, JANKOWSKI K, PATKOWSKI W, et al. Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2017, 67: 282-292.

[64] WANG W J, LI H Y, ZHOU Y, JIE S H. Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2013, 13: 351-357.

[65] ALIX-PANABIÈRES C, PANTEL K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. Cancer Discov, 2016, 6: 479-491.

[66] QI L N, XIANG B D, WU F X, YE J Z, ZHONG J H, WANG Y Y, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2018, 78: 4731-4744.

[67] WANG S Y, ZHANG C X, WANG G Z, CHENG B R, WANG Y L, CHEN F F, et al. Aptamer-mediated transparent-biocompatible nanostructured surfaces for hepotocellular circulating tumor cells enrichment[J]. Theranostics, 2016, 6: 1877-1886.

[68] CHEN J, CAO S W, CAI Z, ZHENG L, WANG Q. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells correlate with the clinical stages and cancer metastasis in hepatocellular carcinoma patients[J]. Cancer Biomark, 2017, 20: 487-498.

[69] YIN L C, LUO Z C, GAO Y X, LI Y, PENG Q, GAO Y. Twist expression in circulating hepatocellular carcinoma cells predicts metastasis and prognoses[J/OL]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3789613. DOI: 10.1155/2018/3789613.

[70] CROWLEY E, DI NICOLANTONIO F, LOUPAKIS F, BARDELLI A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10: 472-484.

[71] VAN DER VAART M, PRETORIUS P J. The origin of circulating free DNA[J/OL]. Clin Chem, 2007, 53: 2215. DOI: 10.1373/clinchem.2007.092734.

[72] STROUN M, LYAUTEY J, LEDERREY C, OLSON-SAND A, ANKER P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release[J]. Clin Chim Acta, 2001, 313: 139-142.

[73] SYLVAIN V, LAFARGE S, BIGNON Y J. Molecular pathways involved in response to ionizing radiation of ID-8 mouse ovarian cancer cells expressing exogenous full-length Brca1 or truncated Brca1 mutant[J]. Int J Oncol, 2001, 19: 599-607.

[74] DENNIS LO Y M, ZHANG J, LEUNG T N, LAU T K, CHANG A M Z, HJELM N M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma[J]. Am J Hum Genet, 1999, 64: 218-224.

[75] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, ROMANS K, GOODMAN S, LI M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. Nat Med, 2008, 14: 985-990.

[76] IIZUKA N, SAKAIDA I, MORIBE T, FUJITA N, MIURA T, STARK M, et al. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6C): 4713-4719.

[77] CHEN K, ZHANG H, ZHANG L N, JU S Q, QI J, HUANG D F, et al. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocelluar carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19: 3143-3149.

[78] YANG Y J, CHEN H, HUANG P, LI C H, DONG Z H, HOU Y L. Quantification of plasma hTERT DNA in hepatocellular carcinoma patients by quantitative fluorescent polymerase chain reaction[J/OL]. Clin Invest Med, 2011, 34: E238. DOI: 10.25011/cim.v34i4.15366.

[79] JIANG P Y, ALLEN CHAN K C, DENNIS LO Y M. Liver-derived cell-free nucleic acids in plasma: biology and applications in liquid biopsies[J]. J Hepatol, 2019, 71: 409-421.

[80] WONG I H, LO Y M, YEO W, LAU W Y, JOHNSON P J. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 3516-3521.

[81] YEO W, WONG N, WONG W L, LAI P B S, ZHONG S, JOHNSON P J. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2005, 25: 266-272.

[82] CAI J B, CHEN L, ZHANG Z, ZHANG X Y, LU X Y, LIU W W, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2019, 68: 2195-2205.

［本文编辑］　孙　岩