

· 综述 ·

DOI: 10.12449/JCH250629

液体活检在肝细胞癌诊断及治疗中的应用

李玉龙, 张欣欣

上海交通大学医学院附属瑞金医院感染科临床病毒研究室, 上海 200025

通信作者: 张欣欣, zhangx@shsmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-0598-6425)

摘要: 肝细胞癌早期无明显特异性症状, 确诊往往已是疾病晚期, 预后较差。如能在早期及时确诊并采取有效治疗可以显著延长患者生存期。液体活检技术通过检测分析肿瘤相关生物标志物, 包括循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA和细胞外囊泡等, 可无创获得肿瘤相关信息, 用于疾病的早期诊断、分子病理学分型及预后预测等。本文概述液体活检技术在肝细胞癌诊断及治疗中的临床应用研究进展。

关键词: 肝细胞癌; 液体活组织检查; 肿瘤细胞, 循环; 循环肿瘤DNA; 细胞外囊泡

基金项目: 国家“十三五”科技重大专项(2018ZX10302204-001-003)

Research advances in the application of liquid biopsy in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma

LI Yulong, ZHANG Xinxin

Department of Infectious Diseases, Research Laboratory of Clinical Virology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding author: ZHANG Xinxin, zhangx@shsmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-0598-6425)

Abstract: Hepatocellular carcinoma is one of the most common cancers, and due to the lack of obvious specific symptoms in its early stage, patients are often in the advanced stage at the time of diagnosis and tend to have a poor prognosis. Timely diagnosis and effective treatment in the early stage can help to prolong the survival time of patients. Liquid biopsy is a noninvasive technique that can obtain the information of tumor by detecting and analyzing related biomarkers, including circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and extracellular vesicles, thereby contributing to early diagnosis, molecular pathological typing, and prognosis prediction. This article reviews the research advances in the application of liquid biopsy in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular Carcinoma; Liquid Biopsy; Neoplastic Cells, Circulating; Circulating Tumor DNA; Extracellular Vesicles

Research funding: National Science and Technology Major Projects of the 13th Five-Year Plan (2018ZX10302204-001-003)

原发性肝癌是癌症死亡的第二大常见原因^[1], 其中肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌的主要类型^[2]。HCC存在多种风险因素, 主要包括HBV、HCV、酒精、代谢紊乱(糖尿病、血脂异常、过度肥胖等)、非酒精性脂肪性肝病、黄曲霉素等^[3], 通常的发展顺序是肝损伤、慢性炎症、肝纤维化、肝硬化, 继而演变为HCC^[4]。目前HCC早期检测的准确性并不理想, 液体活检作为一种新的检测方法, 有助于帮助解决这一临床问题, 同时对治疗效

果评估和预后判断有一定临床价值。液体活检是指对体液中(通常是血液)循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)、循环microRNA和细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)进行检测分析, 从而获取患者肿瘤有关信息, 用以辅助诊断治疗^[5]。与传统手术或穿刺活检相比, 液体活检有副作用小、操作简便、方便重复检测、成本低廉等优点。

1 CTC、ctDNA、EV的特性及其检测方法

1.1 CTC CTC是从原发性实体瘤转移到外周血或淋巴系统,最终在血液、骨髓、淋巴结或其他健康器官中生长的肿瘤细胞,是肿瘤转移的重要原因,可以被生动地描述为“肿瘤的种子”。CTC至今有多种定义,CellSearch系统的定义被认定为当前的标准:CTC是血液中表达上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、表达细胞角蛋白(cytokeratin, CK)8、18和/或19、白细胞特异性抗原45阴性且直径大于4 μm 的细胞^[6]。分析血液中CTC的数量、蛋白表达、基因序列等可以获取肿瘤的病变信息。CTC检测主要包括从蛋白、染色体、DNA和RNA水平实现对肿瘤细胞的定性分析。

肿瘤细胞转移到外周血发生在肿瘤发展的每个阶段。因此,CTC可以作为疾病早期诊断和监测复发的重要标志物。由于CTC在血液中的含量非常低(每毫升几百个)并且存在的半衰期较短(1~2.4 h),长期以来研究一直受到阻碍。近年来,随着技术的提高,CTC的分离和浓缩技术取得了巨大进步。根据CTC的物理性质和生物性质可将富集方法分为两种类型。基于物理性质的方法包括设计特定尺寸的过滤器件、Ficoll离心法、双向电泳技术等^[7]。基于生物学特性的技术依赖于抗原-抗体结合反应,可以分为免疫磁珠法和利用微流控芯片的免疫吸附法,免疫磁珠法又可分为阳性富集法和阴性富集法。EpCAM是CTC纯化分离最常用、最重要的抗原,它在血细胞中不存在,但在上皮来源的非血细胞中广泛存在。基于EpCAM的CellSearch系统(使用抗EpCAM涂层的磁珠,从血液中提取CTC,固定、染色和手动计数)是基于免疫磁珠法的CTC阳性富集系统,是第一个通过美国食品药品监督管理局临床验证的CTC捕获方法,但是这种方法会错过很多潜在肿瘤细胞,尤其在肝癌中,只有一小部分患者(20%)EpCAM呈阳性^[8]。对于HCC,EpCAM和波形蛋白联合GPC3(磷脂酰肌醇蛋白聚糖3)蛋白的分离方案可用于更彻底的CTC分离,该组合方案具有毒性低、特异性强(96.94%)、灵敏度高(98.12%)、检出率高(98.64%)等优点,能够特异、准确、高效地富集血液中的CTC^[9]。使用免疫磁珠的阴性富集法通过去除背景血细胞来富集CTC。通过上述富集方法处理外周血可以降低血细胞水平,从而检测和分析剩余细胞群。目前CTC的检测方法主要包括免疫荧光标记、RNA原位杂交、荧光定量PCR、流式细胞术等^[10]。

1.2 ctDNA 血浆游离DNA(cellfree DNA, cfDNA)是血浆中游离存在的DNA,有的来自正常细胞,有的来自异常细胞(如肿瘤细胞),还有部分来自外部(如病毒DNA)^[11]。ctDNA指的是由肿瘤细胞释放到血液循环系统中的DNA。来自坏死肿瘤细胞、CTC和肿瘤细胞分泌的外泌体,它包含着肿瘤细胞特异性突变的基因信息。

ctDNA只占cfDNA的一小部分(0.01%~1%),并且总是被大量非癌细胞来源的DNA稀释,目前无法通过捕获技术特异性分离ctDNA,因此检测肿瘤特异性突变是检测ctDNA的最有效方法。由于细胞损伤,癌症患者的cfDNA水平远高于健康个体,这在化疗或放疗后尤为明显;cfDNA的半衰期很短,只有不到2 h^[12],这些因素使ctDNA的检测更加困难。只有检测cfDNA上的肿瘤特异性相关特征才能有效地证明ctDNA的存在,例如单核苷酸突变、甲基化变化和癌症相关的病毒序列。最近有研究表明一种基于琥珀酰磷乙醇胺的脂质体可以在体外抑制单核吞噬细胞系统,从而短暂地增加血液中cfDNA的回收率;或者使用单克隆抗体与cfDNA结合,从而减慢其被核酸酶降解的速度。上述两种调节体内cfDNA清除效率的方法已在小鼠中得到证实,有希望在临床应用中提高液体活检的灵敏度和实用性^[13]。

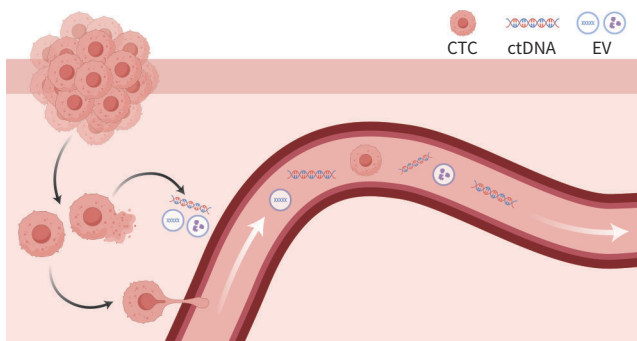
血浆中ctDNA的变化分为定量和定性,前者指ctDNA总浓度,或者指DNA突变。近年来已经开发了许多具有高灵敏度和特异度的方法,包括数字PCR和二代测序(NGS)用于检测DNA畸变的先进技术。BEAMing技术是一种相对灵敏且廉价的已知突变筛查方法,把PCR和流式细胞术结合,可以检测低至0.01%频率水平的突变^[14]。虽然基于PCR的技术有着很高的灵敏度,但该技术只能检测有限数量的突变。为了克服这一问题,NGS测序技术用于获得更完整的基因组图谱,涉及深度测序的方法包括Safe-SeqS、Capp-Seq、Tam-Seq和Ampli-Seq等。通过这些技术检测出的癌症基因图谱可为患者提供个性化治疗^[15]。

1.3 EV EV是指正常细胞和肿瘤细胞释放的纳米颗粒的总称。根据形成过程EV可以大致分为3类:外泌体、微囊泡和凋亡小体^[16]。EV的直径为40~160 nm,通常被脂质双分子层包裹,内含有DNA、RNA、蛋白质、代谢产物和脂质等生物分子。鉴于EV同样在早期就存在于血液中,分析肿瘤来源的EV可以作为一种诊断早期癌症的方法。

与CTC和ctDNA相比,EV在数量上有巨大优势,每毫升血液中有 10^9 数量级,更容易获得^[17]。目前至少有6种不同类型的分离方法,包括:超速离心、过滤法、体

积排阻色谱法、沉淀法、免疫亲和捕获法和微流控法,这些方法各有特点和优劣,可以单独或组合使用,以达到临床应用所需要的回收率和纯度^[18]。通过分析EV所包含的miRNA、lncRNA、mRNA、蛋白等分子标志物,可以获取更有特异性的癌症信息,辅助诊断和治疗。例如研究人员通过对EV中RNA测序的方法区分早期HCC与高危肝硬化人群,受试者操作特征曲线下面积(AUC)达0.93^[19]。

CTC、ctDNA、EV源自癌细胞或癌细胞裂解后产物(图1)。CTC携带一整套肿瘤细胞的遗传信息(包括DNA、RNA、蛋白质等),并且与肿瘤的发生和传播有密切联系,在临床中有许多潜在应用,包括疾病诊断、预后评估、个体化治疗等。然而由于CTC在外周血浓度低且离体培养困难,对CTC生物学信息理解尚处起步阶段。ctDNA和EV可以携带有关肿瘤的片段化信息,其中EV在体液中有明显的数量优势,不过异质性限制了其应用。由于无法对人类药物进行高通量筛选,ctDNA和EV作为药物疗效的标志物未得到充分利用^[20]。



注:CTC从原始或转移性肿瘤自然脱落后在血液中循环,是肿瘤的“种子”,可以导致新的致命转移;ctDNA来源于凋亡和坏死的肿瘤细胞,这些细胞将其片段化的DNA释放到循环中;EV由肿瘤细胞分泌释放,内含有DNA、RNA、蛋白质等生物分子。

图1 外周血中的CTC、ctDNA和EV

Figure 1 CTC, ctDNA, and EV in the peripheral blood

2 液体活检在HCC中的临床应用

2.1 CTC在HCC中的预后价值

研究表明EpCAM阳性CTC与高AFP水平相关,并且与血管浸润相关,表明EpCAM阳性CTC有潜力成为评估HCC患者预后的生物学指标。CTC的阳性临界值尚未形成统一论,一些研究者将CTC阳性定义为“每7.5 mL外周血中CTC \geq 1或 \geq 2”,一些研究者认为“每7.5 mL外周血中CTC \geq 5”的癌细胞活动性较强。毫无疑问的是,CTC阳性的HCC患者总生存期和无病生存期显著缩短,并且检测到的CTC越多,患者的预后越差^[21]。

目前EpCAM阳性的CTC已经在HCC中深入研究,

但是与其他几乎普遍表达EpCAM的上皮细胞肿瘤不同,EpCAM不在成熟肝细胞中表达,仅在少部分HCC肿瘤中表达。因此,可能有EpCAM阴性的HCC细胞存在于血液中,并且使用EpCAM富集方法无法检测到,这可能是无法在某些HCC患者中检测出CTC的原因。非EpCAM阳性富集方法,例如唾液酸糖蛋白或广谱角蛋白表达,或根据细胞大小富集检测出的CTC阳性率高于EpCAM检测法,但是相关研究数据较少,不具有可比性。HCC的最佳CTC富集方法可能需要几种生物标志物联合使用^[22]。在一项涉及270例HCC患者的研究中,把DAPI⁺/CD45⁻/CK⁺细胞定义为CTC阳性,并在术前外周血中计数。对比术前肿瘤大小(阳性定义为 >5 cm)、AFP水平(阳性定义为 >20 ng/mL)和BCLC分期(阳性定义为 $>A$ 期),CTC数量与HCC肿瘤负荷密切相关并且可以更好地预测HCC复发(AUC=0.95)^[23]。

CTC除了用于评估患者预后之外,还为疾病的演变提供动态指标,也可以为耐药性等提供线索。NGS技术可以揭示单个肿瘤内或原发肿瘤与其转移肿瘤之间的异质性。CTC提供了一种新型的非侵入性肿瘤DNA获得手段,可更方便地用于NGS测序和分子分析。

2.2 ctDNA在HCC中的诊断价值

ctDNA在HCC中表现出重要的诊断价值。近年来,ctDNA的“甲基化修饰”一直是研究热点。因为ctDNA的甲基化表达发生在肿瘤早期,所以检测甲基化表达可能为早期癌症诊断提供帮助。每一种细胞的甲基化修饰都是独一无二的,并且在生理或者病理条件下高度稳定。因此,识别不同的甲基化修饰可能成为新的HCC诊断工具。例如RAS相关家族1A基因中启动子的高甲基化可在92.5% HCC患者中检测到,并可以区分健康对照组和单纯慢性HCV感染群体,总体预测率分别为77.5%和72.5%^[24]。因此ctDNA中异常启动子甲基化可以作为HCC患者的筛查工具,尤其是早期高危人群的筛查。此外,几个热点甲基化基因位点的组合使用可以进一步提高灵敏度和特异度。总之,启动子区域的高甲基化被公认为是癌症发生的早期表现,不同肿瘤相关基因的甲基化在正常组织DNA中存在非常低或不存在的,检测这些甲基化对HCC诊断具有特异性。

ctDNA的定量分析也有一定的临床价值。ctDNA水平可以区分HCC和HCV携带者,最佳临界值为73.0 ng/mL,灵敏度为69.2%,特异度为93.3%^[25]。如果ctDNA和AFP或 α -L-岩藻糖苷酶(α -L-fucosidase, AFU)联合检测,可以进一步提高灵敏度。ctDNA、AFP和AFU在HCC的检测中无显著相关性。ctDNA联合AFP或AFU、ctDNA与AFP和

AFU三者联合的灵敏度分别为71.8%、87.2%和89.7%,而单独使用cfDNA、AFP和AFU的灵敏度分别为56.4%、53.8%和66.7%^[26]。

2.3 ctDNA在HCC中的预后价值 除了早期诊断外,ctDNA在HCC预后中也发挥重要作用。非靶向ctDNA、cfDNA的水平始终与总生存期和无病生存期呈负相关,有望成为评估HCC复发或转移风险的新指标^[27]。在一项包括41例HCC患者的研究中,根治性肝脏手术前ctDNA阳性率为63.4%,手术后ctDNA阳性率下降至46%,41例患者中有9例观察到疾病进展伴早期复发,中位随访时间为17.7个月,非复发组术前ctDNA阳性率显著低于复发组,术后是否复发与ctDNA检测结果之间存在显著相关性^[28]。

靶向ctDNA检测可以反映肿瘤的异质性,并且可以评估预后。TP53、CTNNB1和TERT等关注度较高的突变位点是检测ctDNA突变的首选目标。一项研究使用MiSeq系统检测相关突变,发现在血管浸润的患者中更容易检测到存在突变的ctDNA,并且预期无病生存期更短^[29]。需要注意的是,并非所有检测到的突变均来自肿瘤细胞,在cfDNA中的突变也会被检测并且有可能干扰结果,因此有必要筛选相应的样本以确定突变来源。

2.4 EV在HCC中的诊断价值 研究表明,EV参与慢性肝病进展、调节HCC增殖及HCC血管生成、促进肝癌转换、免疫逃逸和复发等过程。Sun等^[30]报道一种基于HCC EV表面蛋白测定的方法用于检测早期HCC,该方法通过评估3个HCC EV亚群(EpCAM CD63、CD147 CD63和GPC3 CD63)建立评分,区分早期HCC和肝硬化的AUC为0.95,敏感度为91%,特异度为90%,灵敏度和特异度显著优于血清AFP,有望帮助识别可治愈阶段的HCC并改善患者长期预后。尽管遵循《国际肝癌协会肝细胞癌生物标志物开发白皮书》,但该研究队列样本量较少,很难进行精细的亚组分析,在生物标志物对照研究中可能存在潜在偏倚,需要后期更大规模更深入的研究验证其在临床中的作用。

2.5 治疗评估 目前对实体肿瘤治疗反应的评估主要取决于影像学测量的肿瘤直径的动态变化。但是影像学监测效果不够敏感,限制了其在治疗早期阶段的应用。液体活检可以用于评估手术切除效果,有望在肿瘤直径明显变化前几周预测肿瘤反应^[31]。ctDNA的甲基化水平和CTC的数量在治疗后均有降低,可以用于评估手术切除效果,尤其是在肿瘤血源性播散和癌细胞转移方面。

CTC亚型可能与治疗反应相关,或可作为肝癌细胞

分子亚型的补充。不同亚型的癌细胞对不同化疗药物的敏感度不同,例如pERK⁺/pAkt⁻ CTC对索拉非尼更敏感^[32]。CTC的个体分析可能具有不同的临床意义,这将有助于选择更加个性化的治疗方法并预测治疗结果。ctDNA中检测到的突变也可为治疗方案选择提供参考,这种非侵入性检测方法获得的肿瘤DNA可以提供癌细胞基因组图谱,并在某些方面指导治疗。

CTC、ctDNA、EV的产生机制与肿瘤发生发展密切相关,并且携带大量相关信息,液体活检可通过无创方式提供大量基因组和转录组信息,提示肿瘤间的异质性。这和传统活检方法相比操作难度低,患者接受度高,更有可能普及并且实现对疾病的长期监测。现阶段研究尚未成熟,与传统AFP、影像学等检查结果相结合,可以进一步提高灵敏度和特异度。随着肿瘤基因组学和分子标志物进一步发展,液体活检技术有望发挥更大的作用。

3 小结与展望

总之,液体活检是一种在癌症领域非常有应用前景的技术,首先,它可以在肿瘤发生早期无创性地获取相关细胞或生物分子,通过对生物标志物检测而对HCC高危人群进行疾病筛查,结合影像学和传统生化指标,对疾病进行早期鉴别诊断,进一步提高生存预期。其次,对于接受靶向治疗的患者,对肿瘤有关分子标志物检测可以进一步获得肿瘤细胞异质性信息,为患者差异化个性化治疗方案的选择提供依据,从而提高治疗效果并减少副作用。最后,在接受手术切除治疗的HCC患者中,术后CTC、ctDNA的检测可以在治疗效果、预后判断和监测复发方面发挥关键作用。

值得注意的是,液体活检技术从实验研究到临床应用仍面临巨大挑战。第一,由于CTC、ctDNA以及EV在外周血中的含量较低且半衰期较短,相关的分离、富集、捕获技术尚未成熟,相关技术有待进一步提高效率。第二,大多数液体活检研究缺乏有效性和实用性的有力证据,对检测的灵敏度和特异度存疑,未来各种多中心临床研究可能会解决这一问题。第三,目前许多研究或是对单一分子标志物进行对比,或是对几项参数进行综合评定,缺乏简单的评分标准,通过人工智能进行数据统计分析,有望获取多项指标中的内在联系,从而制订客观可应用的评分标准。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 李玉龙负责资料分析,撰写论文和最终定稿;张欣欣负责课题设计,拟定写作思路,指导修改论文。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] MCGLYNN KA, PETRICK JL, EL-SERAG HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021, 73(Suppl 1): 4-13. DOI: 10.1002/hep.31288.
- [3] KULIK L, EL-SERAG HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 477-491. e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.
- [4] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER PB, SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification[J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 1-61. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.10.001.
- [5] AHN JC, TENG PC, CHEN PJ, et al. Detection of circulating tumor cells and their implications as a biomarker for diagnosis, prognostication, and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021, 73(1): 422-436. DOI: 10.1002/hep.31165.
- [6] van de STOLPE A, PANTEL K, SLEIJFER S, et al. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: Toward routine clinical use[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(18): 5955-5960. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1254.
- [7] LOW WS, WAN ABAS WA. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 239362. DOI: 10.1155/2015/239362.
- [8] de BOER CJ, van KRIEKEN JH, JANSSEN-VAN RHIJN CM, et al. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver[J]. *J Pathol*, 1999, 188(2): 201-206. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<201::AID-PATH339>3.0.CO;2-8.
- [9] HUANG XY, LI F, LI TT, et al. A clinically feasible circulating tumor cell sorting system for monitoring the progression of advanced hepatocellular carcinoma[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 25. DOI: 10.1186/s12951-023-01783-9.
- [10] LI W, LIU JB, HOU LK, et al. Liquid biopsy in lung cancer: Significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 25. DOI: 10.1186/s12943-022-01505-z.
- [11] van der VAART M, PRETORIUS PJ. The origin of circulating free DNA[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(12): 2215. DOI: 10.1373/clinchem.2007.092734.
- [12] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990. DOI: 10.1038/nm.1789.
- [13] MARTIN-ALONSO C, TABRIZI S, XIONG K, et al. Priming agents transiently reduce the clearance of cell-free DNA to improve liquid biopsies[J]. *Science*, 2024, 383(6680): eadf2341. DOI: 10.1126/science.adf2341.
- [14] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: Current technology and clinical applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131. DOI: 10.1186/s13045-022-01351-y.
- [15] YE QW, LING SB, ZHENG SS, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 114. DOI: 10.1186/s12943-019-1043-x.
- [16] GUO SY, HUANG J, LI GP, et al. The role of extracellular vesicles in circulating tumor cell-mediated distant metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 193. DOI: 10.1186/s12943-023-01909-5.
- [17] von FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, DOGRA N, et al. Unannotated small RNA clusters associated with circulating extracellular vesicles detect early stage liver cancer[J]. *Gut*, 2021. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-325036.[Online ahead of print]
- [18] LEE YT, TRAN BV, WANG JJ, et al. The role of extracellular vesicles in disease progression and detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(12): 3076. DOI: 10.3390/cancers13123076.
- [19] YU D, LI YX, WANG MY, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 56. DOI: 10.1186/s12943-022-01509-9.
- [20] ZHU ZQ, HU EY, SHEN H, et al. The functional and clinical roles of liquid biopsy in patient-derived models[J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 36. DOI: 10.1186/s13045-023-01433-5.
- [21] YU JJ, XIAO W, DONG SL, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 835. DOI: 10.1186/s12885-018-4744-4.
- [22] KELLEY RK, MAGBANUA MJM, BUTLER TM, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: A pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 206. DOI: 10.1186/s12885-015-1195-z.
- [23] ZHAO LN, SONG JG, SUN YL, et al. Tumor-derived proliferative CTCs and CTC clusters predict aggressiveness and early recurrence in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(13): 13912-13927. DOI: 10.1002/cam4.5946.
- [24] YEO W, WONG N, WONG WL, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25(2): 266-272. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2005.01084.x.
- [25] IIZUKA N, SAKAIDA I, MORIBE T, 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.
- [26] CHEN K, ZHANG H, ZHANG LN, et al. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(20): 3143-3149. DOI: 10.3748/wjg.v19.i20.3143.
- [27] ONO A, FUJIMOTO A, YAMAMOTO Y, et al. Circulating tumor DNA analysis for liver cancers and its usefulness as a liquid biopsy[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, 1(5): 516-534. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2015.06.009.
- [28] ZHU GQ, LIU WR, TANG Z, et al. Serial circulating tumor DNA to predict early recurrence in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective study[J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(2): 549-561. DOI: 10.1002/1878-0261.13105.
- [29] LIAO WJ, YANG HY, XU HF, et al. Noninvasive detection of tumor-associated mutations from circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma patients by targeted deep sequencing[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40481-40490. DOI: 10.18632/oncotarget.9629.
- [30] SUN N, ZHANG C, LEE YT, et al. HCC EV ECG score: An extracellular vesicle-based protein assay for detection of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2023, 77(3): 774-788. DOI: 10.1002/hep.32692.
- [31] GOUDA MA, JANKU F, WAHIDA A, et al. Liquid biopsy response evaluation criteria in solid tumors (LB-RECIST) [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(3): 267-275. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.12.007.
- [32] LI J, SHI LH, ZHANG XF, et al. pERK/pAkt phenotyping in circulating tumor cells as a biomarker for sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2646-2659. DOI: 10.18632/oncotarget.6104.

收稿日期: 2024-08-13; 录用日期: 2024-12-10

本文编辑: 刘晓红

引证本文: LI YL, ZHANG XX. Research advances in the application of liquid biopsy in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(6): 1194-1198.

李玉龙, 张欣欣. 液体活检在肝细胞癌诊断及治疗中的应用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(6): 1194-1198.