

· 综述 ·

DOI: 10.12449/JCH251129

甲胎蛋白阴性肝细胞癌早期诊断生物标志物研究进展

赵思汝, 熊枝繁

华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科, 武汉 430060

通信作者: 熊枝繁, xiongzhihan@126.com (ORCID: 0000-0001-7190-8073)

摘要: 肝细胞癌(HCC)是全球癌症相关死亡的主要原因之一,也是我国临床最常见恶性肿瘤之一。HCC起病隐匿且进展迅速,大多数患者在诊断时已处于中晚期,预后较差。其中甲胎蛋白阴性HCC占HCC病例总数的30%~40%,传统诊断标志物血清甲胎蛋白在该人群中敏感性不足,容易造成漏诊。本综述探讨了经典生物标志物、新型蛋白质标志物、液体活检标志物及代谢组学标志物对甲胎蛋白阴性HCC早期筛查的潜力,旨在提高甲胎蛋白阴性HCC早期诊断率,减轻肝癌疾病负担。

关键词: 甲胎蛋白; 癌, 肝细胞; 液体活组织检查; 生物标记, 肿瘤

基金项目: 华中科技大学同济医学院梨园医院内科研基金(2023LYYYCXTD0002)

Research advances in biomarkers for the early diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma

ZHAO Siru, XIONG Zhifan

Department of Gastroenterology, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430060, China

Corresponding author: XIONG Zhifan, xiongzhihan@126.com (ORCID: 0000-0001-7190-8073)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide and is also one of the most common malignant tumors in clinical practice in our country. HCC is characterized by insidious onset and rapid progression, and most patients are in the advanced stage at the time of diagnosis, resulting in a poor prognosis. Alpha-fetoprotein (AFP)-negative hepatocellular carcinoma (ANHCC) accounts for approximately 30%—40% of all HCC cases, and the traditional diagnostic biomarker, serum AFP, has insufficient sensitivity in this population, which can easily lead to missed diagnoses. This article reviews the potential of classic biomarkers, novel protein markers, liquid biopsy markers, and metabolomics markers in the early screening for ANHCC, in order to improve the early diagnosis rate of ANHCC and reduce the disease burden of liver cancer.

Key words: alpha-Fetoproteins; Carcinoma, Hepatocellular; Liquid Biopsy; Biomarkers, Tumor

Research funding: Intramural Scientific Research Fund of Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (2023LYYYCXTD0002)

肝细胞癌(HCC)是肝癌最主要的病理类型,占比约80%^[1]。肝癌位列全球恶性肿瘤发病率第六位,致死率第三位,也是癌症相关过早死亡的第二大原因,该疾病负担总体较为严重^[2]。研究预计在全球范围内,2020—2040年肝癌患者每年增加约55.0%,2040年肝癌患者将高达140万人;肝癌死亡患者较前增加56.4%,2040年将

有130万人死于肝癌^[2]。在我国,HCC发病率和死亡率分居恶性肿瘤第四位和第二位,占全球肝癌病例的45.3%和肝癌死亡人数的47.1%,我国肝癌疾病负担位列全球首位。目前,慢性HBV感染仍是HCC的首要致病因素,但随着乙型肝炎疫苗的普及,过量酒精摄入及代谢综合征相关疾病(糖尿病、肥胖、脂肪肝)已成HCC

新发病因^[3]。由于HCC临床症状不明显、起病隐匿、进展迅速,约70%的患者就诊时已处于中晚期,失去根治性治疗的机会,生存率较低。因此,HCC早期筛查、诊断和治疗对提高生存率至关重要。

1 甲胎蛋白(AFP)阴性HCC概述

HCC的早期筛查主要依赖AFP检测联合影像学检查。AFP是一种单链糖蛋白,正常生理状态下,在成年人血清检查中含量极低(<20 ng/mL),当肝细胞发生癌变时,血清AFP水平可显著升高。部分HCC患者血清AFP水平始终不升高或低于诊断阈值(<20 ng/mL),这类HCC被称为AFP阴性HCC,在HCC中占比为30%~40%,因缺乏可靠的生物标志物,在肝癌早期筛查时容易漏诊^[4]。AFP阴性HCC与AFP阳性HCC存在一定差异。在病因方面,AFP阴性HCC主要与非病毒性致癌因素(黄曲霉毒素暴露等)和代谢异常密切相关,而AFP阳性HCC主要与肝炎病毒感染相关。在病理方面,AFP阴性HCC的肿瘤细胞分化程度相对较高,较少侵犯周围组织和血管,肿瘤直径较小,多表现为早期小病灶,在小HCC患者(<3 cm)中,AFP阴性HCC的比例约达到40%^[5]。增强CT/MRI虽具较高分辨率,但在早期AFP阴性HCC中特征性影像学表现不明显,且检查成本较高,难以作为普筛手段^[5];腹部超声操作便捷、价格低廉,但其对早期HCC的敏感性存在明显不足,超声检测早期HCC的敏感度仅为47%^[6]。因此,迫切需要寻找更敏感、更具有特异性的生物学指标,以提高AFP阴性HCC早期筛查率。

2 血清蛋白质标志物

2.1 经典标志物的优化

2.1.1 甲胎蛋白异质体(AFP-L3) AFP-L3是AFP的糖基化异构体,其形成与肝癌细胞内N-乙酰葡萄糖胺转移酶V(GnT-V)活性密切相关。在肝癌细胞中,GnT-V活性升高,导致AFP糖链中岩藻糖含量增加,从而形成小扁豆凝集素结合型AFP(即AFP-L3),这种糖基化重编程过程赋予AFP-L3显著的肿瘤特异性,使其成为诊断AFP阴性HCC的重要潜在生物标志物。AFP-L3占AFP的百分比称为AFP-L3%,与AFP水平无相关关系($r=-0.125, P>0.05$)。此外,Choi团队^[7]对112例AFP<20 ng/mL的患者血清进行回顾分析发现,糖基化程度而非单纯AFP浓度更能反映AFP阴性HCC的生物学特征。为突破传统检测方法的敏感度限制(AFP-L3的定量下限0.300 ng/mL),研究者近年来开发出了一种分析敏感的多反应监测-质谱

(MRM-MS)测定法,通过优化糖肽检测敏感度(检测下限达0.051 ng/mL),使得AFP-L3在AFP阴性患者筛查中的应用价值大幅提升^[8]。另有研究报道,对AFP低浓度患者进行AFP-L3检测可以更早预警HCC发生^[9]。总之,随着研究的深入,AFP-L3有望在AFP阴性HCC的诊断中发挥更大的作用。

2.1.2 异常凝血酶原(DCP) DCP即维生素K缺乏或拮抗剂-II诱导的蛋白质(PIVKA-II),在维生素K缺乏或肝癌等情况下,由于缺乏维生素K依赖的 γ -羧化作用而产生的一种非功能性的凝血酶原。通过回顾性研究发现,虽然PIVKA-II诊断AFP阴性HCC的阳性率略低于诊断HCC(56.2% vs 65.9%),但其受试者操作特征曲线下面积(AUC)仍可达到0.789^[10]。此外,另一项多中心回顾性研究证实了PIVKA-II在区分AFP阴性HCC患者与健康对照组以及良性肝病患者时的诊断效能,其AUC分别为0.88($P<0.01$)和0.76($P<0.01$)^[11]。为突破单一标志物的生物学局限性,PIVKA-II与血小板计数、白蛋白多指标联合检测,对肝硬化背景下AFP阴性HCC的诊断效能明显(AUC=0.977,敏感度为91.3%,特异度为94.2%),可有效区分肝硬化患者中AFP阴性HCC人群^[12]。通过多变量分析证实,PIVKA-II独立于AFP、AFP-L3及肿瘤特征($P>0.05$),为AFP阴性HCC早期诊断进一步提供了特异性生物学依据^[7]。然而,维生素K缺乏症、营养不良、酒精性肝病等干扰因素可致非HCC患者血清PIVKA-II水平升高,需注意鉴别,避免误诊,故PIVKA-II临床上不建议单独应用于AFP阴性HCC早期筛查,最好联合其他生物标志物和影像学检查。

2.2 新型血清蛋白类标志物

2.2.1 高尔基体蛋白73(GP73) GP73是细胞高尔基体上的一种跨膜蛋白,正常生理状态下主要表达于胆管上皮细胞,而在HCC及慢性肝病进程中呈现显著高表达特征,这种表达模式转换可能与慢性肝病进程中的内质网应激机制相关。He等^[13]进行前瞻性队列研究发现,GP73诊断AFP阴性HCC的最佳临界值为103 ng/mL(约5倍于健康人群平均水平)。在最佳临界值下,其单指标诊断特异度高达93%。此外,该研究首次表明CK18全长蛋白(CK18-M65)可以作为AFP阴性HCC诊断的独立影响因素,并基于GP73(恶性转化标志)与CK18-M65(程序性死亡标志)构建诊断模型,通过双路径捕获HCC生物学特征,具有优异的判别能力(AUC=0.946)和良好的拟合优度($P=0.82$),为AFP阴性HCC早期诊断提供了从分子机制到临床转化的整合性证据链^[13]。值得注意的是,血

清GP73水平在AFP阳性HCC患者与AFP阴性HCC患者之间未见明显差异,证明其可有效识别AFP阴性HCC患者,突破了传统血清学AFP检测盲区。在AFP<20 ng/mL的人群中,当CK18-M65>329 U/L和GP73>103 ng/mL时,发生AFP阴性HCC的风险高达0.979^[13],建议对该高危人群进行定期监测。但现有结论仅限于单中心研究,未来应用于临床前还需使用多中心大样本和前瞻性队列进一步验证其普适性。

2.2.2 醛酮还原酶1B10(AKR1B10) AKR1B10是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸依赖的氧化还原酶,属于醛酮还原酶超家族,参与细胞解毒和代谢调控。正常情况下,AKR1B10在肝脏、肠道等组织中低表达,但在多种癌症(如HCC、结直肠癌、肺癌)中显著上调。曹德良教授团队^[14]纳入1 244例参与者进行大规模多中心研究证实,血清AKR1B10对早期AFP阴性HCC具有较高的诊断效能,其AUC达0.891,敏感度为71.2%,特异度为92.6%,并在66例AFP阴性HCC患者的验证队列中得到了一致证实。此外,术后3天AKR1B10水平基本恢复正常,提示其可能是AFP阴性HCC潜在的转移和复发生物标志物。

进一步探索了AKR1B10与传统标志物AFP的联合检测方案,研究显示该联合检测方案不仅能够提前2~3年预警肝硬化背景下的HCC发生,还能在术后复发监测中发挥重要作用,其敏感度是AFP的6~7倍。这为AFP阴性HCC的早期检测及术后复发监测提供了更为有力的工具^[14]。

2.2.3 Midkine(MDK) MDK是一种肝素结合生长因子,属于神经生长因子家族,参与调控细胞增殖、迁移、血管生成和抗凋亡等过程,在胚胎的分化早期和大多数恶性肿瘤中强烈表达,但在正常人中几乎检测不到。通过系统评价和荟萃分析得出,MDK在AFP阴性HCC诊断中具有较高的准确性,其AUC高达0.91,敏感度为88.5%,特异度为83.9%^[15]。值得注意的是,MDK的检测不受AFP水平影响,即使AFP水平正常,血清MDK水平也可出现急剧升高,检测率高达95%^[16]。此外,MDK在早期HCC的诊断中具有较大优势。与AFP相比,二者特异度相似(83.9% vs 86.3%),但MDK敏感度远高于AFP(87.1% vs 46.7%),区分AFP阴性HCC与非HCC(AUC=0.926)和肝硬化(AUC=0.931)方面表现突出^[16]。这些结果表明MDK可以作为AFP阴性HCC的潜在补充标志物,但不同研究之间在样本来源、检测方法和诊断标准上存在显著差异,临床应用价值尚需进一步验证。

2.2.4 骨桥蛋白(OPN) OPN是一种糖基化蛋白,广泛存在于细胞外基质中,参与细胞增殖、迁移、炎症反应和免疫调节等多种生物学过程。在正常的肝细胞中基本不表达,但是在肝癌细胞中表达水平显著升高。OPN对AFP阴性HCC具有良好的诊断效能,其AUC为0.75,敏感度为65%,特异度为68%^[17]。在肿瘤直径<2 cm的患者中,OPN对AFP阴性HCC的诊断效能尤为显著,诊断AFP阴性HCC的AUC为0.854^[18]。更重要的是,OPN表达升高还与多种癌症的肿瘤侵袭、进展或转移有关,OPN已被提议作为HCC治疗有前途的靶点^[19]。同时,该研究表明在抗PD-L1免疫治疗中,OPN高表达的HCC患者生存期可得到显著延长^[19]。因此,OPN不仅可以作为AFP阴性HCC潜在诊断标志物,还可作为预测治疗反应的指标,以更好地服务于临床诊断和治疗。

2.2.5 丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal(LC-SPIK) LC-SPIK是一种在HCC中显著升高的蛋白质,是仅由肝癌细胞分泌的特定亚型,能抑制细胞凋亡。与正常胰腺SPIK(pan-SPIK)相比,LC-SPIK具有特殊的3D结构,基于该结构的差异开发出了特异性识别LC-SPIK的抗体和ELISA检测试剂盒。对于不同病因的AFP阴性HCC诊断,LC-SPIK的准确率为71%~91%,AUC为0.78~0.91^[20]。值得注意的是,在所有肝病病因所致HCC中,LC-SPIK对HCC的诊断价值明显优于AFP,且在AFP阴性HCC患者中,LC-SPIK能够准确检测到其中超过70%的HCC患者,这对于AFP阴性HCC早期干预和治疗具有重要意义^[20]。当联合多种指标时,准确率可得到明显提高,LC-SPIK+AFP+PIVKA-II组合检测HCC的AUC高达0.932^[21]。总的来说,在各阶段和各种病因的HCC检测中,LC-SPIK表现优于传统标志物AFP,尤其在AFP阴性HCC诊断中更具优势。但目前还需大规模前瞻性研究评估在不同患者群体和临床环境中LC-SPIK的临床效用,以进一步对AFP阴性HCC高危人群进行监测。

2.2.6 白细胞介素41(IL-41) IL-41也称为meteroin样蛋白(METRNL),是一种新发现的免疫调节细胞因子或脂肪因子,于2004年首次被报道,在多种细胞和组织中表达^[22]。近年来,通过分析TCGA和GEO数据库,研究显示IL-41与AFP表达水平呈负相关,尤其是在AFP水平低于1 500 ng/mL时^[23]。这一结果表明IL-41在AFP阴性HCC诊断中具有潜在价值。进一步研究还发现,IL-41在AFP阴性HCC患者中的表达水平显著高于AFP阳性HCC患者、肝转移癌患者和健康对照组。与诊断HCC相比,IL-41对AFP阴性HCC更具诊断价值,是目前单独诊断

AFP 阴性 HCC 最敏感的血清学标志物^[23]。然而, IL-41 的特异性有限, 活动性肝炎引起的肝脏炎症和急性肝损伤会影响其准确性, 因此在临床应用中需要排除这些相关因素的干扰。此外, 研究中还发现血清 IL-41 高表达预示着预后不良和术后复发风险增加。IL-41 是一种有前途的诊断 AFP 阴性 HCC 的血清标志物, 未来的研究需要在更大样本量和多中心环境中验证 IL-41 的诊断效能, 并优化检测方法以提高其特异性^[23]。

综上所述, AFP-L3、PIVKA-II、GP73 等蛋白标志物在 AFP 阴性 HCC 的诊断中显示出较高的评估价值(表 1)。未来的研究应进一步验证这些标志物的诊断价值, 并探索其在临床实践中的应用。

3 液体活检标志物

液体活检是一种微创过程, 包括循环肿瘤 DNA (ctDNA)^[24]、外泌体(EV)、循环肿瘤细胞(CTC)等, 通过对生物体液中的肿瘤相关成分进行检测, 可提供原发肿瘤和转移性肿瘤的基因谱, 以实现肿瘤的监测。

3.1 ctDNA ctDNA 是从肿瘤细胞脱落或细胞凋亡后释放到循环系统中的无细胞状态的 DNA 片段。这些片段携带了肿瘤细胞的基因变异信息, 其中 ctDNA 中的 DNA 甲基化模式被称为肝癌的“身份指纹”, 对 AFP 阴性 HCC 检测具有重要价值^[25]。研究发现, 在 ctDNA 中检测到的 RASSF1A、COX2 和 APC 基因的高甲基化可以识别 AFP 阴性 HCC 患者, 进一步结合 miR-203 建立预测模型(MPM-B)具有较高价值, 可以检测到 75% 的 AFP 阴性 HBV 相关 HCC, 并且与肿瘤复发和生存预后不良的易感性更高有关^[26]。此外, 樊嘉院士团队^[25]开发的 HepaAiQ 检测法通过检测血液中与 HCC 相关的 ctDNA 甲基化标志物, 在早期 AFP 阴性 HCC 患者中也有较高的诊断价值, 敏感度达 75.1%, 且术后 HepaAiQ 评分高的患者显

示出更高的复发风险。综上, ctDNA 甲基化分析在 AFP 阴性 HCC 早期诊断中展现出巨大潜力, 但靶向甲基化检测单次成本高, 难以在高危人群筛查中普及。当前阶段, 其更适用于高风险人群分层, 而非替代现有诊断体系。

3.2 EV EV 是由大多数细胞分泌的纳米级囊泡(直径 30~150 nm), 具有磷脂双分子层结构, 可携带核酸、蛋白质及脂质等生物活性分子, 具有较高的稳定性, 在血清、血浆、尿液等多种体液中可被有效检测。既往研究证实, 外泌体在 AFP 阴性 HCC 诊断方面主要以 RNA 为主^[27]。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一种非编码 RNA, 稳定性较好, 其表达谱特征与 AFP 阴性 HCC 发生发展密切相关。与诊断 AFP 阳性 HCC 相比, 血清 miR-21 在 AFP 阴性 HCC 中仍保持其诊断效率, AUC 为 0.831, 敏感度为 81.2%, 特异度为 83.2%。此外, 血清 miR-21 水平与临床分期、远处转移有显著相关性, 但与 AFP 无关^[28]。该研究表明血清 miR-21 不仅在 AFP 阴性 HCC 的诊断中具有重要价值, 还可能作为预后评估的潜在标志物。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 通过调控表观遗传修饰或 miRNA 网络参与 AFP 阴性 HCC 进展。与健康体检者相比, 外泌体 lncRNA 00853、lncRNA FAM72D-3 水平在 AFP 阴性 HCC 患者中明显升高 (P 值均 < 0.05), 单标志物诊断 AUC 分别为 0.82 和 0.79^[29]。在肝硬化背景下, 外泌体 lncRNA RP11-85G21.1 (lnc85) 可通过靶向结合 miR-324-5p 促进 HCC 细胞增殖与迁移, 能够有效区分 AFP 阴性 HCC 患者与肝硬化和健康对照人群, 其 AUC 为 0.869, 敏感度为 80.0%, 特异度为 76.5%^[30]。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 因其闭环结构稳定性成为新兴标志物。研究发现基于 circ0000690、circ0001359 与 circ0000396 的联合检测模型, 对 AFP 阴

表 1 对 AFP 阴性 HCC 诊断具有潜在价值的血清蛋白质标志物

Table 1 Serum protein biomarkers with potential value for the diagnosis of AFP-negative HCC

标志物	AUC	敏感度	特异度	价值
AFP-L3 ^[7]	0.824	71.7%	83.8%	较影像学提前数月预警 HCC 的发生
PIVKA-II ^[11]	0.88	78.33%	91.3%	对肝硬化背景下诊断 AFP 阴性 HCC 效能明显
GP73 ^[13]	0.843	75.6%	93%	在 AFP 阳性 HCC 患者与 AFP 阴性 HCC 患者中表达无差异
AKR1B10 ^[14]	0.891	71.2%	92.6%	在 AFP 阴性 HCC 早期诊断和术后复发中具有较高价值
MDK ^[15]	0.91	88.5%	83.9%	在早期 HCC 中, 有效区分 AFP 阴性 HCC 与非 HCC、肝硬化
OPN ^[17]	0.75	65%	68%	与肿瘤进展密切相关, 已被提议作为癌症治疗的靶点
LC-SPIK ^[20]	0.78 ~ 0.91			对 AFP 阴性患者诊断准确率 $> 70%$
IL-41 ^[23]		96.63%	68.42%	目前单独诊断 AFP 阴性 HCC 最敏感的血清学标志物

性HCC诊断的AUC达0.859^[31]。此外,研究者开发出了一种新型的HCC EV SPA技术,能够精准检测肝癌患者血液中的肿瘤相关EV,该技术在肝硬化患者中对早期肝癌的检出率显著提高,敏感度>80%,为临床筛查提供了新的检测手段^[32]。

综上所述,EV在AFP阴性HCC的早期诊断和预后评估中展现出显著的潜力。然而,EV的分离和检测技术尚未标准化,不同研究中RNA的表达水平存在差异。未来的研究需要进一步优化EV RNA的检测方法,建立标准化流程,以推动EV RNA标志物在临床中的广泛应用。

3.3 CTC CTC是指从肿瘤病灶(原发灶或转移灶)脱落并进入外周血液中的肿瘤细胞^[33]。CTC检测作为一种非侵入性诊断技术,逐渐成为HCC早期诊断和预后评估的重要工具。在一项多中心、大规模的回顾性研究中发现,CTC诊断早期AFP阴性HCC的AUC为0.89,敏感度为75.4%,特异度为95.0%;在区分AFP阴性HCC与AFP阴性非肝癌患者时,CTC的诊断性能同样出色,AUC为0.89,敏感度为77.7%,特异度为95.0%^[34]。此外,通过整合CTC定量分析与表观遗传标志物(GNB4/Riplet基因甲基化状态)的多模态检测策略,将早期HCC诊断AUC从0.81提升至0.98,同时实现诊断敏感度(88.2% vs 70.6%)与特异度(100% vs 90.9%)的同步优化。该突破性进展源于对肿瘤细胞物理存在与表观遗传异常的双维度捕获,有效突破了传统单参数检测方法的固有局限性^[35]。值得注意的是,CTC联合检测技术对肝硬化背景下AFP阴性微小结节的鉴别具有重要临床意义,可有效识别常规影像学检查难以发现的隐匿性病灶,对提高AFP阴性HCC患者的生存率和治疗效果具有不可估量的价值^[36]。尽管CTC检测通过多标志物联合策略与技术创新显著提升了AFP阴性HCC的早期诊断及预后管理能力,但该领域仍面临诸多挑战。

综上所述,液体活检标志物对于诊断AFP阴性HCC具有较高价值(表2),目前亟待建立一套标准化的富集、鉴定与定量检测体系,以增强不同检测平台结果的一致性和可比性,并推动其实现临床转化。

表2 液体活检标志物对AFP阴性HCC的诊断价值
Table 2 The diagnostic value of liquid biopsy biomarkers for AFP-negative HCC

标志物	类别	敏感度	特异度
ctDNA 甲基化 ^[25]	ctDNA	75.1%	
miR-21 ^[28]	EV(miRNA)	81.2%	83.2%
lnc85 ^[30]	EV(lncRNA)	80.0%	76.5%
CTC ^[33]	CTC	77.7%	95.0%

4 代谢组学标志物

代谢组学是指对某一生物或细胞在一定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析。作为系统生物学的重要组成部分,代谢组学技术可在AFP阴性HCC患者的组织、血液和尿液中筛查出差异常表达的代谢产物,为疾病的早期诊断提供新的生物标志物。

在一项多中心、大规模的回顾性研究中,筛选出3种与AFP阴性HCC相关的关键代谢物:磷脂酰胆碱PC(16:0/16:0)、磷脂酰胆碱PC(18:2/18:2)和鞘磷脂SM(d18:1/18:1),基于这3种代谢物构建诊断模型,其对AFP阴性HCC具有较高诊断价值,AUC为0.913,敏感度为0.727,特异度为0.92^[37]。根据模型所示,对于AFP阴性但代谢物评分>1.2895的患者,仍应被视为HCC的高风险人群,需定期复查。代谢组学不仅有助于诊断,还能预测AFP阴性HCC患者的预后。该研究还发现,单酰甘油MG(18:2/0:0/0:0)是AFP阴性HCC患者无瘤生存和总生存的独立预后标志物^[37]。此外,国际共识建议将代谢标志物联合AFP纳入肝硬化患者的动态监测体系,并探索代谢-蛋白质多组学联合模型(如整合GP73、DKK1等蛋白标志物)在AFP阴性HCC早期诊断中的互补作用。值得注意的是,目前虽然识别了与AFP阴性HCC相关的代谢物,但这些代谢物在HCC发生和发展中的具体生物学功能尚不清楚,未来仍需进一步研究并验证上述标志物的临床适用性。

5 小结与展望

中国肝癌诊疗负担重,基层医疗需求量大,为标志物研发提供了广阔空间。本研究聚焦AFP阴性HCC早期诊断难题,系统探索多种生物标志物潜力。突破单一标志物局限,从多维度挖掘诊断标志物,为临床提供多层面思路,有助于综合诊断,提高早期诊断率,改善患者预后。然而,现有新型标志物和诊断技术在准确性、敏感度和特异度上仍有待提高,无法完全满足临床早期诊断需求;不同研究间诊断标准和方法差异大,缺乏统一标准和规范,给临床实践带来困扰;AFP阴性HCC的发病机制研究还不够深入,导致寻找特异性诊断标志物和治疗靶点进展缓慢。此外,目前尚未发现对AFP阴性HCC具有明确诊断价值的微生物组相关标志物,这一领域值得进一步挖掘研究,为发现新的诊断标志物提供了可能。总体而言,未来需加强相关基础研究,深入探索

疾病发生机制,开发更准确、特异的诊断方法和标志物;同时,加强多中心、大样本的临床研究,建立统一诊断标准和规范,进一步推动成果转化应用。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 赵思汝负责查找文献,撰写论文;熊枝繁负责拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] RUMGAY H, FERLAY J, de MARTEL C, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype[J]. *Eur J Cancer*, 2022, 161: 108-118. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.11.023.
- [2] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-1606. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.08.021.
- [3] HAN BF, ZHENG RS, ZENG HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53. DOI: 10.1016/j.jncc.2024.01.006.
- [4] SHE S, XIANG Y, YANG M, et al. C-reactive protein is a biomarker of AFP-negative HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 543-554. DOI: 10.3892/ijo.2015.3042.
- [5] WANG T, ZHANG KH. New blood biomarkers for the diagnosis of AFP-negative hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1316. DOI: 10.3389/fonc.2020.01316.
- [6] TZARTZEVA K, OBI J, RICH NE, et al. Surveillance imaging and alpha fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: A meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6): 1706-1718. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.01.064.
- [7] CHOI JY. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(3): 339. DOI: 10.3748/wjg.v19.i3.339.
- [8] KIM H, SOHN A, YEO I, et al. Clinical assay for AFP-L3 by using multiple reaction monitoring-mass spectrometry for diagnosing hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(8): 1230-1238. DOI: 10.1373/clinchem.2018.289702.
- [9] TAKETA K, ENDO Y, SEKIYA C, et al. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(22): 5419-5423.
- [10] LIU Z, DU XH, CHAI WG. Efficacy of des- γ -carboxy-prothrombin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and its association with the clinical features of hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Hepatol*, 2024, 40(10): 2014-2018. DOI: 10.12449/JCH241014.
刘智, 杜晓宏, 柴文刚. 异常凝血酶原对肝细胞癌的诊断效能及其与肿瘤临床特征的相关性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(10): 2014-2018. DOI: 10.12449/JCH241014.
- [11] FENG HL, LI BL, LI Z, et al. PIVKA-II serves as a potential biomarker that complements AFP for the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 401. DOI: 10.1186/s12885-021-08138-3.
- [12] WEI FY, RUAN XL, MENG JY, et al. The value of combined detection of PLT, PIVKA-II and ALB in the differential diagnosis of AFP-negative hepatocellular carcinoma and cirrhosis[J]. *Lab Med Clin*, 2024, 21(15): 2155-2158. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.003.
韦芳沂, 阮学莲, 蒙继煜, 等. PLT、PIVKA-II、ALB联合检测在AFP阴性肝细胞癌和肝硬化中的鉴别诊断价值[J]. *检验医学与临床*, 2024, 21(15): 2155-2158. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.003.
- [13] HE L, ZHANG C, LIU LL, et al. Development of a diagnostic nomogram for alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma based on serological biomarkers[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2024, 16(6): 2463-2475. DOI: 10.4251/wjgo.v16.i6.2463.
- [14] YE X, LI CY, ZU XY, et al. A large-scale multicenter study validates aldo-keto reductase family 1 member B10 as a prevalent serum marker for detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2489-2501. DOI: 10.1002/hep.30519.
- [15] LU QQ, LI J, CAO H, et al. Comparison of diagnostic accuracy of Midkine and AFP for detecting hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): BSR20192424. DOI: 10.1042/BSR20192424.
- [16] ZHU WW, GUO JJ, GUO L, et al. Evaluation of midkine as a diagnostic serum biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3944-3954. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-12-3363.
- [17] SHANG SF, PLYMOTH A, GE SK, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2): 483-490. DOI: 10.1002/hep.24703.
- [18] ZHU MY, ZHENG J, WU F, et al. OPN is a promising serological biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(12): 3596-3603. DOI: 10.1002/jmv.25704.
- [19] WU MT, ZOU F, HE SY, et al. Serum osteopontin enhances hepatocellular carcinoma diagnosis and predicts anti-PD-L1 immunotherapy benefit[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2025, 12: 729-745. DOI: 10.2147/JHC.S514144.
- [20] LU F, OTT C, BISTA P, et al. Three-dimensional structure of novel liver cancer biomarker liver cancer-specific serine protease inhibitor kazal (LC-SPIK) and its performance in clinical diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. *Diagnostics*, 2024, 14(7): 725. DOI: 10.3390/diagnostics14070725.
- [21] CAVIGLIA GP, NICOLOSI A, ABATE ML, et al. Liver cancer-specific isoform of serine protease inhibitor kazal for the detection of hepatocellular carcinoma: Results from a pilot study in patients with dysmetabolic liver disease[J]. *Curr Oncol*, 2022, 29(8): 5457-5465. DOI: 10.3390/curroncol29080431.
- [22] CHENG K, CAI N, ZHU JH, et al. Tumor-associated macrophages in liver cancer: From mechanisms to therapy[J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(11): 1112-1140. DOI: 10.1002/cac2.12345.
- [23] LI YZ, WANG HY, REN DF, et al. Interleukin-41: A novel serum marker for the diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1408584. DOI: 10.3389/fonc.2024.1408584.
- [24] HAO MD, YANG YZ, WANG MD, et al. Application strategy of circulating tumor DNA in entire process of precision medicine for hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Dig Surg*, 2025, 24(1): 86-92. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20241224-00578.
赫明达, 杨钰泽, 王明达, 等. 循环肿瘤DNA在肝细胞癌精准医疗全程中的应用策略[J]. *中华消化外科杂志*, 2025, 24(1): 86-92. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20241224-00578.
- [25] GUO DZ, HUANG A, WANG YC, et al. Early detection and prognosis evaluation for hepatocellular carcinoma by circulating tumour DNA methylation: A multicentre cohort study[J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(5): e1652. DOI: 10.1002/ctm2.1652.
- [26] LU CY, CHEN SY, PENG HL, et al. Cell-free methylation markers with diagnostic and prognostic potential in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6406-6418. DOI: 10.18632/oncotarget.14115.
- [27] ZENG YL, HU SY, LUO Y, et al. Exosome cargos as biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(9): 2365. DOI: 10.3390/pharmaceutics15092365.
- [28] GUO X, LV XH, LV X, et al. Circulating miR-21 serves as a serum biomarker for hepatocellular carcinoma and correlated with distant metastasis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44050-44058. DOI: 10.18632/oncotarget.17211.
- [29] WU CH, QIAN CR, YIN GY, et al. Expression and clinical prognostic value of serum exosomal LncRNA 00853 and LncRNA FAM72D-3 in AFP-negative hepatocellular carcinoma patients[J]. *Int J Lab Med*,

- 2023, 44(11): 1353-1358. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.11.015.
武彩虹, 钱成荣, 银广悦, 等. 血清外泌体LncRNA 00853、LncRNA FAM72D-3在AFP阴性肝细胞癌患者中的表达及临床预后价值[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(11): 1353-1358. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.11.015.
- [30] HUANG XJ, SUN LY, WEN S, et al. RNA sequencing of plasma exosomes revealed novel functional long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2020, 111(9): 3338-3349. DOI: 10.1111/cas.14516.
- [31] MENG J, WANG JQ, FEI XC, et al. Establishment and validation of a plasma exosome-derived circular RNA model for HCC diagnosis[J]. Lab Med, 2022, 37(1): 1-10. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.01.001.
孟俊, 王俊青, 费晓春, 等. 血浆外泌体circRNA诊断HCC联合检测模型的建立与验证[J]. 检验医学, 2022, 37(1): 1-10. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2022.01.001.
- [32] 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, 2022, 77(3): 774-788. DOI: 10.1002/hep.32692.
- [33] WANG L, HE WX, XIE P, et al. Changes in circulating tumor cells (CTCs) before and after surgery and their correlation with pathological factors in colorectal cancer patients[J]. Clin J Med Offic, 2023, 51(12): 1291-1293. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2023.12.22.
王立, 何维新, 谢鹏, 等. 循环肿瘤细胞在结直肠癌患者手术前后变化及其与肿瘤病理因素相关性[J]. 临床军医杂志, 2023, 51(12): 1291-1293. DOI: 10.16680/j.1671-3826.2023.12.22.
- [34] GUO W, SUN YF, SHEN MN, et al. Circulating tumor cells with stem-like phenotypes for diagnosis, prognosis, and therapeutic response evaluation in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(9): 2203-2213. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-17-1753.
- [35] LIANG WJ, XU ZG, KONG FY, et al. Circulating tumour cell combined with DNA methylation for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 1065693. DOI: 10.3389/fgene.2022.1065693.
- [36] ZHANG Q, RONG Y, YI KZ, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: Single-cell based analysis, preclinical models, and clinical applications[J]. Theranostics, 2020, 10(26): 12060-12071. DOI: 10.7150/thno.48918.
- [37] LIN ZY, LI HG, HE CY, et al. Metabolomic biomarkers for the diagnosis and post-transplant outcomes of AFP negative hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1072775. DOI: 10.3389/fonc.2023.1072775.

收稿日期: 2025-05-28; 录用日期: 2025-06-27

本文编辑: 王亚南

引证本文: ZHAO SR, XIONG ZF. Research advances in biomarkers for the early diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(11): 2390-2396.

赵思汝, 熊枝繁. 甲胎蛋白阴性肝细胞癌早期诊断生物标志物研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(11): 2390-2396.

读者·作者·编者

《临床肝胆病杂志》推荐使用的规范医学名词术语

有关名词术语应规范统一,以全国自然科学名词审定委员会公布的各学科名词为准。现将本刊常见规范医学名词整理如下(前者为规范名词):

概率—几率	综合征—综合症	人畜共患—人蓄共患
黏膜—粘膜	标志物—标记物	侧支循环—侧枝循环
粘连—黏连	适应证—适应症	红细胞比容—红细胞压积
暴发—爆发	禁忌证—禁忌症	革兰阴性菌—革兰氏阴性菌
食管—食道	抗生素—抗菌素	血管升压素—血管加压素