

循环肿瘤DNA在肝细胞癌早期诊断中的研究进展

李国印¹, 李金莹², 庄康敏², 黄卫^{1,2} (1.暨南大学附属第一医院 消化内科, 广州 510630; 2.暨南大学附属第一医院 内镜中心, 广州 510630)

摘要: 监测肝细胞的恶性转化对肝细胞癌的早期诊断和及时干预至关重要。肿瘤细胞主动或被动释放核酸片段进入血液循环中, 成为循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 其携带有与肿瘤细胞一致的遗传信息。近几年, 随着新一代基因检测技术的发展, 基于“液体活检术”的ctDNA检测以其独特的优势逐渐成为研究热点, 被认为是新一代肿瘤分子标志物, 现从循环细胞游离DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 浓度、ctDNA基因突变和ctDNA的甲基化改变来阐述ctDNA检测在肝细胞癌早期诊断中的作用。

关键词: 循环肿瘤DNA; 循环细胞游离DNA; 肝细胞癌; 早期诊断

Progress on circulating tumor DNA in early diagnosis of hepatocellular carcinoma

Li Guoyin¹, Li Jinying², Zhuang Kangmin², Huang Wei^{1,2} (1.Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2.Department of Endoscopy Center, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Monitoring the malignant transformation of hepatocytes is very important for the early diagnosis and timely intervention of hepatocellular carcinoma. Tumor cells actively or passively release nucleic acid fragments into the blood circulation, becoming circulating tumor DNA (ctDNA), which carries genetic information consistent with tumor cells. In recent years, with the development of next-generation gene detection technology, ctDNA detection based on “liquid biopsy” has gradually become a research hotspot with its unique advantages, considered as a new generation of tumor molecular marker. In this review, the role of ctDNA detection in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma is discussed from the concentration of circulating cell free DNA (cfDNA), mutation of ctDNA gene and methylation of ctDNA.

Key words: Circulating tumor DNA; Circulating cell-free DNA; Hepatocellular carcinoma; Early diagnosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的癌症之一, 病死率极高。2018年全球新发肝癌841080例, 是全球第4大癌症死亡原因^[1]。肝癌起病隐匿, 多数患者早期临床症状不明显, 确诊时大多已是中晚期。早期诊断率低及术后复发率高是肝癌患者预后不佳的重要因素。目前临床最常用的血清标志物为甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP), 其对HCC的诊断价值有限, 敏感性仅为50%。用于HCC诊断的肝癌监测试验、肝脏超声检查及AFP联合使用时, 其敏感性也仅为63%^[2], 无法满足临床需求。因此, 寻找一种具备

高灵敏度和高特异度的检测手段早期诊断肝癌并对其进行实时监测迫在眉睫。在精准医疗的时代背景下, 基于液体活检的循环肿瘤DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 检测凭借其可对肿瘤进行无创、实时、全面的动态监测, 同时还能够克服传统肝组织活检的局限性等优势, 迅速成为研究热点, 在肿瘤的诊治方面具有较高的临床价值。

早在20世纪50年代, 研究人员已经发现了外周血液循环中DNA的存在。循环细胞游离DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 是一种胞外短片段双链DNA (长度160~180 bp), 存在于所有人群的血液循环中。正常器官来源的cfDNA中, 淋巴样细胞和髓样细胞的脱落DNA所占比例最大^[3]。cfDNA在健康人群中水平较低, 而在发生

癌症、外科手术、炎症和组织损伤等患者血液中水平升高。ctDNA是cfDNA的一部分,来源于坏死或凋亡的肿瘤细胞或吞噬坏死肿瘤细胞的巨噬细胞的产物,仅占外周血cfDNA总量的一小部分(有时<0.01%)^[4,5]。血浆中ctDNA的变化分为定量和定性两种,定量指总ctDNA浓度的变化,定性指ctDNA变异,如单核苷酸突变、拷贝数变异和甲基化变化等^[5]。ctDNA携带有肿瘤细胞的基因组片段,含有肿瘤特异性突变,这提示通过对外周血ctDNA水平和肿瘤相关突变的检测可能有助于肿瘤的临床诊断和治疗^[6]。然而,ctDNA占cfDNA的比例较小,易被来自非癌变来源的大量DNA稀释。目前,尚无从cfDNA中特异性分离ctDNA的方法,只有通过检测cfDNA的肿瘤特异性突变方可证实ctDNA的存在^[7]。可从cfDNA的定量分析和ctDNA的定性分析两方面来揭示ctDNA在HCC早期诊断中的临床价值。目前研究也表明ctDNA在HCC的早期诊断、预后评估、疗效评价及术后肿瘤复发监测等方面具有较高的应用价值。最近,美国一项纳入206例HCC患者的多中心前瞻性队列研究中,利用ctDNA的综合基因组检测(guardant health, CA)分析患者的血液样本,结果表明181例患者(87.8%)均存在至少1种基因改变,进一步分析表明HCC患者基因变异数高,其中前10位最常改变的可操作基因为:EGFR、ERBB2、MET、CCNE1、MYC、BRAF、CCND1、CDK6、FGFR2和ARID1A,最常见的改变基因为TP53和CTNNB1,而扩增最常见的为MET和CCND1。提示cfDNA的检测是一种发现HCC的有效分子分析方法,其在HCC的诊断及分子靶向治疗方面具有潜在的临床应用价值^[8]。本文现对cfDNA和ctDNA这两种新型肿瘤分子标志物对HCC的早期诊断价值进行综述。

1 血浆 cfDNA 浓度与 HCC 的诊断

多项研究表明,血浆cfDNA水平在HCC的筛查、检测、治疗监测和预测中具有潜在的临床应用价值。Huang等^[9]对72例HCC患者、37例肝硬化或慢性肝炎对照组和41例健康志愿者的研究表明,HCC患者cfDNA水平显著高于健康人群,cfDNA检测AFP鉴别HCC与健康对照的诊断价值较高,敏感性为95.1%,特异性为94.4%,提示cfDNA联合AFP检测可提高HCC的诊断水平。Yan等^[10]对24例HCC患者和62例乙型肝炎相关肝纤维化患者的研究也表明,HCC患者血浆cfDNA浓度显著高于非HCC患者,且cfDNA与年龄、AFP联合应用可显著提高HCC的诊断效能。一项涉及22项研究的Meta

分析共纳入2424例研究对象,其中HCC患者1280例,结果表明定量cfDNA对HCC的诊断具有潜在价值,敏感性为82%,特异性为96%,受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线的曲线下面积(area under curve, AUC)为0.96^[11]。Wang等^[12]对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关HCC患者血浆总cfDNA水平的研究表明,HBV相关性HCC患者血浆cfDNA浓度与HBV感染、肝功能、肿瘤因素(如肿瘤直径、肿瘤分期、肿瘤数量)相关,其可预测HBV相关HCC患者的早期复发。因此,判断cfDNA浓度在HCC的诊断效能时,需同时考虑这些因素的影响。

cfDNA的定量分析对HCC的诊断具有潜在临床价值,联合检测多个分子标志物可提高HCC的诊断水平。但目前尚缺乏统一的cfDNA提取、储存和检测方法以及受不同疾病状态的影响,循环cfDNA浓度与HCC诊断的关系尚无定论。

2 ctDNA 相关基因突变与 HCC 诊断

HCC的分子发病机制复杂,其发生发展中的基因水平具有高度异质性。目前,肝组织活检是HCC诊断的金标准,但有创性限制了其常规应用,且单次活检获得的肿瘤特征信息有限,不能完全反映其异质性。然而,液体活检能够克服这一弱点,提供所有癌变(原发和转移性肿瘤)的遗传特征,同时为系统和动态跟踪肿瘤基因组的演变提供可能^[13]。有研究比较了HCC原发肿瘤和血浆活检样本中DNA的变异,该研究纳入的30例HCC患者中26例同时存在肝硬化,这些患者肝组织活检和(或)cfDNA中至少能够检测到1种体细胞突变;在多发性HCC患者中的最大肿瘤直径>5 cm或已发生转移的7例患者中,cfDNA和肿瘤DNA突变检测率分别为87%(80/92)和95%(87/92),提示cfDNA和肿瘤DNA中存在相似比例的体细胞突变^[14]。同样,一项纳入29例HCC患者的研究利用扩增子测序技术对50个肿瘤相关基因的热点突变进行了分析,并对等位基因突变频率(mutant allele frequency, MAF)>1%的基因位点进行了进一步探讨,该研究采用深度测序法,共检测到35个突变基因,其中突变频率最高的基因为TP53、ATM和ALK;研究中共21例患者血浆cfDNA和肿瘤组织DNA基因突变一致,17例患者癌旁组织和肿瘤组织基因DNA突变一致。结果表明,扩增子测序技术对检测HCC患者血浆cfDNA突变基因具有较高的敏感性,血浆cfDNA可能是HCC诊断的有效分子标志物^[15]。提示在某些情况下,cfDNA可代替常规活检用于基因分析。

HCC相关基因的改变(突变、缺失及表观遗传改变等)可作为HCC的肿瘤标志物。多项研究已证实, *TP53*^[16]、*ITH*^[17]、*HCK*^[18]、*CTNNB1*和*TERT*^[19]中的肿瘤特异性突变在HCC患者外周血中较常见,提示可通过检测患者ctDNA的肿瘤特异性突变来早期诊断和靶向治疗HCC。Huang等^[20]采用靶向测序法对8对HBV相关HCC及其邻近非肿瘤组织中6个与肿瘤相关的基因(*PIK3CA*、*TP53*、*FAT4*、*IRF2*、*HNF4a*及*ARID1A*)进行分析,并采用Sanger测序、定量聚合酶链式反应、免疫印迹实验和RNA干扰介导的基因敲除等方法进一步验证。结果表明,靶向测序中发现13个非同义突变,其中*FAT4*基因9个(69%),*TP53*基因4个(31%)。28对HCC组织和非肿瘤组织中*FAT4*和*TP53*的表达谱进一步证实,与非肿瘤组织相比,两种基因在肝癌组织中的表达均显著下调($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)。RNA干扰介导的*FAT4*基因敲除功能分析显示,*FAT4*基因敲除可促进癌细胞的生长和增殖,提示*FAT4*在肝癌中可能具有抑癌作用,*FAT4*和*TP53*基因变异的检测可能对HCC的早期诊断具有一定价值。一项队列研究^[21]利用血浆cfDNA中HCC特异性突变基因组成基因突变模板来验证其在诊断价值,结果表明,在不考虑AFP水平的情况下,其对HCC诊断的AUC为0.92,敏感性为65%,特异度为100%,联合AFP检测可提高诊断性能。Qu等^[22]开发了一种基于血清蛋白标记物和cfDNA突变,名为HCC筛检(HCC screen)的液体活检方法,用于从社区无症状乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性个体中鉴别HCC。对于有肝脏结节和(或)AFP水平升高的患者,该方法可较好地地区分HCC与非HCC患者,敏感性为85%,特异度为93%。进一步将此方法应用于331例HBsAg阳性,同时肝脏超声和血清AFP水平均正常的无症状患者,24例试验阳性的患者经过6~8个月的临床随访后,4例被确诊为早期HCC(肿瘤直径<3 cm),而307例试验阴性个体均未诊断出HCC病例,该试验在验证队列中的敏感性为100%,特异度为94%,阳性预测值为17%。提示cfDNA突变联合蛋白标志物检测可有效从社区无症状HBsAg阳性个体中识别早期HCC,具有重要应用前景。ctDNA相关基因突变检测的不足是未能确定基因突变来源的潜在组织,原因是相同的基因突变会导致多种肿瘤类型,基于基因组分析的液体活检术一般不能单独确定原发肿瘤的解剖位置。一种被称为CancerSeek的新血液检测技术,其通过基因改变和蛋白质生物标记物

的联合检测,不仅能够识别相对早期癌症的存在,还能定位这些癌症的器官来源。最近在一项对多种癌症的研究中,报告了名为CancerSeek的HCC早期检测数据,其中包括44例HCC和812例健康对照,大多数(54%)HCC患者均为I~II期,CancerSeek检测HCC的敏感性>95%,特异度>99%^[23]。Cai等^[24]通过对34例长期随访的HCC患者血浆进行靶向测序和低覆盖全基因组测序,分别捕获肿瘤体细胞单碱基变异体(single-nucleotide variants, snvs)和拷贝数变异体(copy-number variants, cnvs),并与临床应用的蛋白质生物标记物比较,用以评价ctDNA对HCC诊断和预后的影响。结果表明,术前血浆标本均显示与肿瘤组织相似的体细胞遗传变异,整合的完整ctDNA突变谱可准确评估患者的肿瘤负担,并与影像学结果相一致。该策略比影像学可提前平均4.6个月发现肿瘤的发生,具有比血清生物标志物AFP、甲胎蛋白-L3(alpha-fetoprotein-L3, AFP-L3)和去甲丙种球蛋白样凝血酶原(des-gamma carboxy prothrombin, DCP)更加优越的性能,还可准确预先检测最小残留病灶,并预测患者无复发生存期($P = 0.001$)和总生存期($P = 0.001$)的预后;ctDNA与DCP联合检测可提高最小残留病灶检测的敏感性。提示HCC患者血浆cnv和snv水平与肿瘤负荷动态相关。综合突变谱整合策略比传统策略能更准确地评估患者的预后风险,提前发现肿瘤的发生,但在合理成本内获得相对完整的突变谱是ctDNA临床应用的一个重要挑战。由此可见,ctDNA中HCC相关突变基因的检测尤其是联合多个蛋白质生物标记物有利于HCC的早期诊断。

3 ctDNA 甲基化与 HCC 诊断

DNA甲基化是目前研究较为深入的一种表观遗传学机制。DNA甲基化不涉及DNA序列的改变,且往往早于肿瘤发生的遗传学机制,在肿瘤的早期诊断中具有特殊的应用价值。

DNA甲基化是基因表达的表观遗传调节因子,通常可导致基因沉默^[25]。肿瘤抑制基因甲基化增加是较多肿瘤的早期事件,表明改变的DNA甲基化模式可能是与肿瘤发生相关的首先可检测到的改变之一^[26-28]。多项研究表明,包括*p15*、*p16*、*APC*、*SPINT2*、*SFRP1*、*p16INK4a*、*TFPI2*、*GSTP1*、*RASSF1A*、*DBX2*、*TGR5*、*MTIM*、*MT1G*和*Ink4a*基因在内的DNA甲基化改变与HCC的发生发展有关,提示检测这些基因的甲基化改变将有助于HCC的早期诊断。*SEPT9*基因是细胞分裂和肿瘤抑制的关键调控因子,其高甲基化与HCC的发生有关。

Oussalah等^[29]通过分析289例肝硬化患者(其中HCC患者为98例)血浆cfDNA中 $SEPT9$ 启动子甲基化($mSEPT9$)情况评估其对肝硬化患者HCC诊断的准确性。结果表明, $mSEPT9$ 对HCC诊断的准确性较高,其AUC为0.944(95%CI: 0.900~0.970, $P < 0.0001$),对于巴塞罗那分期为A期的早期HCC患者, $mSEPT9$ 检验的AUC为0.863($P < 0.0001$),且敏感性和特异度均较高。尤其对于丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)相关肝硬化患者, $mSEPT9$ 在HCC诊断中的准确性高于AFP。提示 $mSEPT9$ 是一个有希望在单个患者水平上进行HCC诊断的循环表观遗传生物标志物。G蛋白偶联胆汁酸受体Gpbar1(G-protein-coupled bile acid receptor 1, $TGR5$)是一种新发现的重要抑癌基因,Han等^[30]通过甲基化特异性聚合酶链反应分别检测160例HCC患者、88例慢性乙型肝炎患者和45例健康对照组cfDNA中 $TGR5$ 启动子的甲基化状态,发现 $TGR5$ 基因启动子区的甲基化现象在HCC中的发生率更高,其联合AFP检测可提高HCC诊断的敏感性。Xu等^[31]通过分析485000个CpG标记比较了HCC组织和正常个体血液白细胞中的差异甲基化谱,进而鉴定富集在HCC中的甲基化标记板。其进一步比较了甲基化标记模型和当前可用方法(如AFP和TNM分期)在1098例HCC患者和835例正常个体中对HCC诊断和预后的有效性,结果表明ctDNA甲基化分析可作为HCC诊断、监测和预后的可靠生物标志物。Huang等^[32]采用甲基化敏感的限制性内切酶定量聚合酶链式反应检测了72例HCC患者、37例良性肝病组和41例正常对照者的150份血浆中 APC 、 $GSTP1$ 、 $RASSF1A$ 和 $SFRP1$ 这4个基因的甲基化状态。结果表明HCC患者血浆中上述基因的甲基化水平均显著高于正常对照组和良性肝病组($P < 0.05$),这4个基因的联合分析可提高HCC与正常对照的鉴别诊断价值,敏感性为92.7%,特异度为81.9%。

为提高HCC早期诊断的敏感性和特异度,有研究将与HCC密切相关的多个基因组合起来构建诊断预测模型,将3个异常甲基化基因(APC 、 $COX2$ 、 $RASSF1A$)和1个微小RNA(miRNA, miRNA) 203组合在一起构建预测模型,该模型可检测出近75%无法被AFP($< 20 \mu\text{g/L}$)所诊断的HCC患者^[33],提高了HCC早期诊断效能。Xu等^[31]确定了1个HCC特异性甲基化标记面板,包括10个标记,并建立了诊断预测模型,该模型诊断的特异度(90.5%)和敏感性(83.3%)均较高,优于AFP(AUC: 0.969 vs 0.816),且该诊断预测模

型在HCC组和肝病组及健康对照组中的评估有显著性差异($P < 0.05$)。最近,一项涉及2554例受试者的多中心临床试验^[34]利用5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosines, 5hmC)检测技术捕获外周血cfDNA中的5hmC序列,测量并分析其水平,通过比较早期HCC与健康对照组、早期HCC与慢性乙型肝炎患者或肝硬化患者中5hmC序列水平,筛选出5hmC的表达特征量用于建模。然后利用建立的模型对验证组进行性能验证,结果表明,5hmC模型不仅可准确区分早期HCC和健康对照组,同时还可区分早期HCC和慢性乙型肝炎或肝硬化,更重要的是5hmC模型可区分出AFP(截断值为 $20 \mu\text{g/L}$)误判为阴性的HCC患者,如验证组中160例早期HCC患者血液中的AFP未达到诊断HCC的水平,而5hmC模型的曲线下面积可达92.4%。此外,5hmC结合AFP可进一步提高诊断早期HCC的曲线下面积,该5hmC诊断模型具有HCC组织特异性。但也有研究表明,每个甲基化标记均存在于癌组织和cfDNA中,而癌组织中的突变仅有一部分能在cfDNA中被检测到^[35],在最少量cfDNA中获得可靠和定量甲基化值的测量仍具有挑战性,需更灵敏的分析方法。

以上研究表明,ctDNA甲基化分析对HCC的早期诊断及预后评估具有极大的临床应用价值,多种热甲基化基因的联合检测可提高HCC早期诊断的敏感性和特异度,基因甲基化联合包括AFP在内的多个分子标志物的检测可提高HCC的诊断性能,进而早期诊断HCC,进行及时干预,提高患者的生存率及生活质量。

4 总结和展望

采用无创方法早期发现肿瘤并对肿瘤的进展进行实时监测仍是HCC生物标志物研究中突破性发现的主要挑战。二代基因测序技术的发展极大地促进了循环中ctDNA的研究,近几年对ctDNA的定量分析及定性分析,尤其是对ctDNA中的HCC特异性基因突变及基因甲基化改变的研究表明,ctDNA的检测对HCC的早期诊断及预后评估具有极大的临床应用前景,有望成为新一代分子标志物,同时联合多个分子标志物(包括AFP、miRNA等)检测可提高对HCC的诊断价值。但目前的研究大多为小样本回顾性研究,尚缺乏高质量的大样本研究,同时存在一些其他的问题,如检测方法的标准化、检测敏感性和特异度的提高及成本等问题亟待解决。相信随着研究的进一步深入,ctDNA在HCC中的临床转化将会实现。

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.
- [2] TZARTZEVA K, OBI J, RICH N E, 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.
- [3] SNYDER M W, KIRCHER M, HILL A J, et al. Cell-free DNA Comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2):57-68.
- [4] ALIX-PANABIÈRES C, SCHWARZENBACH H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Annu Rev Med*, 2012, 63:199-215.
- [5] YIN C Q, YUAN C H, QU Z, et al. Liquid biopsy of hepatocellular carcinoma: circulating tumor-derived biomarkers[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016:1427849.
- [6] TAKAI E, YACHIDA S. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(38):8480-8488.
- [7] PANTEL K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction?[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(21):6384-6388.
- [8] KASEB A O, SANCHEZ N S, SEN S, et al. Molecular profiling of hepatocellular carcinoma using circulating cell-free DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20):6107-6118.
- [9] HUANG Z, HUA D, HU Y, et al. Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2012, 18(2):271-276.
- [10] YAN L, CHEN Y, ZHOU J, et al. Diagnostic value of circulating cell-free DNA levels for hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Infect Dis*, 2018, 67:92-97.
- [11] LIAO W, MAO Y, GE P, et al. Value of quantitative and qualitative analyses of circulating cell-free DNA as diagnostic tools for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(14):e722.
- [12] WANG D, HU X, LONG G, et al. The clinical value of total plasma cell-free DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22):650-659.
- [13] CROWLEY E, DI NICOLANTONIO F, LOUPAKIS F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(8):472-484.
- [14] NG C K Y, DI COSTANZO G G, TOSTI N, et al. Genetic profiling using plasma-derived cell-free DNA in therapy-naïve hepatocellular carcinoma patients: a pilot study[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(5):1286-1291.
- [15] HE G X, CHEN Y H, ZHU C P, et al. Application of plasma circulating cell-free DNA detection to the molecular diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3):1428-1445.
- [16] YU L, LIU X, HAN C, et al. XRCC1 rs25487 genetic variant and TP53 mutation at codon 249 predict clinical outcomes of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a cohort study for 10 years' follow up[J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(8):765-774.
- [17] HUANG A, ZHAO X, YANG X R, et al. Circumventing intratumoral heterogeneity to identify potential therapeutic targets in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):293-301.
- [18] CAI Z X, CHEN G, ZENG Y Y, et al. Circulating tumor DNA profiling reveals clonal evolution and real-time disease progression in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(5):977-985.
- [19] Huang A, Zhang X, Zhou S L, et al. Detecting circulating tumor DNA in hepatocellular carcinoma patients using droplet digital PCR is feasible and reflects intratumoral heterogeneity[J]. *J Cancer*, 2016, 7(13):1907-1914.
- [20] HUANG F Y, WONG D K, TSUI V W, et al. Targeted genomic profiling identifies frequent deleterious mutations in FAT4 and TP53 genes in HBV-associated hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):789-798.
- [21] XIONG Y, XIE C R, ZHANG S, et al. Detection of a novel panel of somatic mutations in plasma cell-free DNA and its diagnostic value in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:5745-5756.
- [22] QU C, WANG Y, WANG P, et al. Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(13):6308-6312.
- [23] COHEN J D, LI L, WANG Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J]. *Science*, 2018, 359(6378):926-930.
- [24] Cai Z, Chen G, Zeng Y, et al. Comprehensive liquid profiling of circulating tumor DNA and protein biomarkers in long-term follow-up patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(17):5284-5294.
- [25] ESTELLER M. Epigenetics in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11):1148-1159.
- [26] BAYLIN S B, JONES P A. Epigenetic determinants of cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(9):a019505.
- [27] IRIZARRY R A, LADD-ACOSTA C, WEN B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(2):178-186.
- [28] BAYLIN S B, JONES P A. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10):726-734.
- [29] Oussalah A, Rischer S, Bensenane M, et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2018, 30:138-147.
- [30] Han L Y, Fan Y C, Mu N N, et al. Aberrant DNA methylation of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) is a potential biomarker for hepatitis B Virus associated hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(2):164-171.
- [31] XU R H, WEI W, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Mater*, 2017, 16(11):1155-1161.
- [32] HUANG Z H, HU Y, HUA D, et al. Quantitative analysis of multiple methylated genes in plasma for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(3):702-707.
- [33] LU C Y, CHEN S Y, PENG H L, et al. Cell-free methylation markers with diagnostic and prognostic potential in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4):6406-6418.

- [34] CAI J, CHEN L, ZHANG Z, 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(12): 2195-2205.
- [35] PISHVAIAN M J, JOSEPH BENDER R, MATRISIAN L M, et al. A pilot study evaluating concordance between blood-based and patient-matched tumor molecular testing within pancreatic cancer patients participating in the Know Your Tumor (KYT) initiative[J]. Oncotarget, 2017, 8(48): 83446-83456.
- 收稿日期: 2020-01-12

李国印, 李金莹, 庄康敏, 等. 循环肿瘤DNA在肝细胞癌早期诊断中的研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(3): 6-11.

· 消息 ·

《中华实验和临床感染病杂志（电子版）》征稿启事

本刊为中国科技论文统计源期刊（中国科技核心期刊）收录，且拥有国家新闻出版署等多种网上查询路径。

本刊特色栏目：

- （1）继续教育园地（视频）；
- （2）临床病例荟萃（病例分析、典型图像分析、专家点评）。

本刊的办刊宗旨是：

贯彻党和国家的卫生工作方针政策，贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针，反映我国感染病临床和科研工作的重大进展，促进国内外感染病学学术交流。

欢迎登陆本刊采编系统，网址为：<http://zhshylcgr.j-ditan.com/>，欢迎您点击和投稿。您只需简单登陆，即可免费下载期刊的PDF版文章。

本刊为双月刊，每期定价28元，全年定价168元。编辑部常年办理邮购，邮发代号：80-729，欢迎订阅。

通讯地址：北京市朝阳区京顺东街8号《中华实验和临床感染病杂志（电子版）》编辑部

邮编：100015

电话：010-84322058

传真：010-84322059