

液态活检技术用于检测肝癌术后复发的研究进展

莫慧敏¹, 朱文钊² (1. 广东医科大学第一临床学院, 广东 湛江 524000; 2. 广东医科大学附属肇庆市第一人民医院 普外科, 广东 肇庆 526000)

摘要: 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的治疗目前仍以根治性切除疗效最佳, 但术后复发率及转移率较高, 远期疗效较差。肝癌术后复发是一个复杂的过程, 涉及多种因素, 根据复发转移的危险因素筛选高危人群, 术后及时使用靶向治疗、免疫治疗或再次行肝切除术可有效提高肝癌患者远期生存率甚至治愈。因此, 研究与肝癌术后复发相关的危险因素是必要的。近年来生物医学技术在肿瘤领域的应用日趋成熟, 通过液态活检技术对体内生物标志物进行检测已成为精准医疗领域的热点。本文就近年来通过液态活检在预测肝细胞癌术后复发相关生物标记物方面的研究进行综述。

关键词: 液态活检; 肝细胞癌; 肝癌术后; 复发预测

Research progress of liquid biopsy technology on postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma

Mo Huimin¹, Zhu Wentian² (1. The First Clinical College of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524000, China; 2. Department of General Surgery, First People's Hospital of Zhaoqing, Guangdong Medical University, Guangdong Zhaoqing 526000, China)

Abstract: Currently, radical hepatectomy is still the most effective treatment for hepatocellular carcinoma (HCC), however, the postoperative recurrence and metastasis rates are high, and the long-term efficacy is poor. Postoperative recurrence of liver cancer is a complex process involving multiple factors. Screening high-risk populations based on risk factors for recurrence and metastasis, timely use of targeted therapy, immunotherapy, or repeat liver resection after surgery can effectively improve the long-term survival rate and even cure liver cancer. Therefore, it is necessary to research the risk factors associated with postoperative recurrence of liver cancer. In recent years, the application of biomedical technology in the field of cancer has become increasingly mature, and the detection of *in vivo* biomarkers through liquid biopsy technology has become a hot topic in the field of precision medicine. This paper reviewed the recent research on biomarkers related to predicting postoperative recurrence of liver cancer through liquid biopsy.

Keywords: Liquid biopsy; Hepatocellular carcinoma; Postoperative liver cancer; Recurrence prediction

原发性肝癌在组织学上可分为肝细胞癌、胆管细胞癌及混合型肝癌, 其中肝细胞癌 (以下简称肝癌) 最为常见, 约占90%, 是成年人最常见的消化道恶性肿瘤, 在全球范围内其发病率位于第7位, 是造成癌症患者死亡的第2大原因^[1]。肝癌可由病

毒、化学致癌物质等多种因素共同导致, 具有明显的地区性^[2], 在我国最常见的是乙型肝炎病毒感染, 约90%患者有感染背景^[3]。目前对于肝癌的治疗仍以根治性切除为主^[4], 由于肝癌起病比较隐匿, 早期症状不明显, 出现临床表现时已属中晚期或已发生转移, 另外肝癌侵袭性高, 术后5年肿瘤复发率可达70%^[5], 给患者带来了巨大的生理和心

理负担。积极探索与肝癌术后复发相关的因素,筛选出高危人群并做出早期预警以及采取相应干预措施,可使一些早期复发与转移的病例获得再治疗,提高肝癌患者术后的生存率。目前肝癌术后监测随访的常规手段是检测血清甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)水平和肝脏超声,但其准确性有限。随着生物学研究在肿瘤领域的不断进展,通过液态活检技术对体内生物标志物进行检测(主要包括蛋白质、DNA及RNA等)能更早、更准确地预警复发。现就近年来液态活检在预测肝癌术后复发相关生物标志物的研究进展进行综述。

1 液体活检技术概述

液体活检技术是一种非入侵方式,通过检测患者体液(如:血液、尿液^[6]、胃液、脑脊液^[7]等)中的生物标志物获取肿瘤的遗传信息,实时监测肿瘤的发展变化,在早期诊断、监测疾病复发、疗效监控等方面具有重要的临床意义^[8]。相较于传统组织穿刺,液体活检不仅创伤较小、医疗成本较低,而且通过取自全身性循环的分子进行检测,有效避免了肿瘤异质性带来的偏差。近年来,液态活检技术在肿瘤研究方面迅速发展,已广泛应用于乳腺癌、甲状腺癌、肺癌及结直肠癌肿瘤等,经临床验证较可靠^[9-11]。

2 常用的液体活检

由于液体活检相关标志物的半衰期比血清蛋白生物标志物短,当肿瘤复发转移时,可较早出现指标异常,因此在预测肝癌术后肿瘤复发转移中具有重要的研究价值。目前在肝癌领域中主要专注于分析患者血液中的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)以及外泌体RNA等。

2.1 CTC CTC是从原发灶或转移灶脱落释放进入外周血的肿瘤细胞,可存活并沉积在远处器官或再循环回肝脏残体,形成肿瘤的复发和转移^[12]。大多数侵入循环的肿瘤细胞会在短期内死亡,只有极少数具有高度转移倾向和活力的CTC才能存活,因此术后监测外周血中CTC水平有助于实时评估肝癌切除术后患者的复发风险。刘霞等^[13]通过检测肝癌患者术后CTC与AFP值来预测复发转移,其研究发现CTC阳性组患者术后发生转移的概率(68.52%)远大于AFP阳性患者(35.00%),且认为CTC阳性是一项预测肝癌术后复发转移的可靠指标,受试者工作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线分析显示两者联合检测复发转移的敏感度(83.3%)及特异度(81.6%)均较单一指标高。王学斌等^[14]分别检测术前、术后4周、术后24周和

术后48周肝癌患者CTC表达及AFP水平,结果表明术前CTC测定值高或术后CTC下降后再次升高提示肿瘤复发可能性大;且在肿瘤复发组中,CTC出现升高时间(4周内)明显早于AFP(24周后),可见测定CTC值更能为肿瘤复发早期预警。Fan等^[15]对23篇文献进行Meta分析,共纳入1785例肝癌患者,结果显示与CTC阴性患者相比,阳性表达患者的复发率和死亡率显著增高。陈明等^[16]对肝癌术后患者随访6个月发现,CTC表达与术后肿瘤复发密切相关。Qi等^[17]对外周血CTC分型的研究表明,发生上皮间质转化的CTC(mesenchymal circulating tumor cell, MCTC)计数百分比 $\geq 2\%$ 可作为肝癌早期复发的预测指标,且在临床检出复发结节前,大多数患者的CTC计数和MCTC百分比均已升高。这与方法状等^[18]的研究一致,其结果为术前MCTC $\geq 1\%$ 的患者更易复发。可见CTC与肝癌术后肿瘤复发和转移密切相关已得到诸多学者的认可,虽然不同研究所报道的界值可能不同,但大体趋势较一致,均具有较高的预测价值。

2.2 ctDNA 正常情况下,人的体液中存在大量游离DNA片段,可来源于正常细胞或肿瘤细胞,经脱落或凋亡后释放入循环血液中的DNA片段总称为循环游离DNA(circulating cell-free DNA, cfDNA)^[19],而ctDNA是指仅来源于肿瘤细胞的DNA片段,携带着肿瘤体细胞基因突变的生物标志物,如点突变、扩增、重排、DNA甲基化等,在评估肿瘤异质性时ctDNA特异性较高,更可靠^[20-22]。陈延华等^[23]研究表明ctDNA是预测肝癌患者根治性肝切除术后肿瘤短期复发的独立危险因素,其中短期复发组ctDNA阳性表达率显著高于非短期复发组(87.80%比68.48%),提示ctDNA预测疾病复发具有较高效能。丁巍等^[24]研究表明ctDNA预测肝癌患者预后的最佳截断值为64.89 ng/ml(敏感度为79.80%,特异度为87.10%),肝癌切除术后1个月ctDNA > 64.89 ng/ml应警惕病灶复发或转移。近年来ctDNA分离技术的进步使得DNA甲基化作为肝癌生物标志物得到更好的发展应用, Xu等^[25]研究表明DNA甲基化与血浆中ctDNA水平高度相关,其利用1098例肝癌患者和835例正常对照者cfDNA样本构建的预测模型显示,cfDNA与肝癌肿瘤负荷、治疗反应和分期高度相关,且表现优于AFP,结果提示ctDNA甲基化标志物对于评估肝癌术后治疗反应和监测复发可能有一定作用。现有文献已证实术前术后ctDNA水平都可用于预测肝癌术后复发^[26]。

2.3 外泌体循环RNA 非编码RNA由于缺乏开放阅读

框,并不具备转录成蛋白质的功能。越来越多的研究表明,非编码RNA参与肿瘤发生发展的多种生物学过程,包括基因的转录和翻译^[27],其中多项研究显示其与监测肝癌术后复发也密切相关。

2.3.1 循环微RNA (micro RNA, miRNA) miRNA是一类短小的内源性非编码单链RNA,长度为18~25个核苷酸序列,通过参与多种信号调控途径控制mRNA的转录、翻译和裂解,在肿瘤的基因转录调控中扮演重要角色^[28]。越来越多的证据表明miRNA的异常表达可预测肝癌术后复发情况^[29]。Zhang等^[30]对131例肝癌切除术后患者的3年随访发现,复发患者miR-143高表达比例显著低于无复发患者(8.97%比30.19%),提示miR-143表达与肝癌患者血管侵犯、肿瘤复发转移及生存呈负相关,miR-143高表达患者复发风险较大。Wang等^[31]研究发现,miR-486-5p是术后复发的独立预测因素,预测肝癌术后1年内复发的准确率为76.79%(敏感度为81.58%,特异性度65.38%),其与AFP及微血管侵犯(microvascular invasion, MVI)三者联合预测的ROC曲线显示特异度为69.2%、敏感度高达为92.1%。Hu等^[32]对射频消融术后肝癌患者的随访发现,复发患者血清miR-130b水平显著高于未复发患者,且术前miR-130b水平高的患者肝外转移发生率较高;同时姚升娟等^[33]研究也发现复发患者血清中miR-204显著低于未复发患者,血清miR-204预测射频消融术后肿瘤复发的ROC曲线下面积为0.822,截断值为1.34,敏感度为71.9%,特异度为84.2%,总体预测效能较高,因此术后miR-130b及miR-204水平可作为监测肝癌消融术后患者复发及预后的理想指标。Ali等^[34]研究发现,血清miRNA表达水平会随肝癌的转移和复发发生变化,肝癌术后miR-497表达水平下调时发生淋巴结转移及远处转移的可能性较大,因此,检测术后患者miR-497表达情况可有效监测肿瘤复发进展。目前的研究多关注于采用肝癌组织内miRNA进行术后复发预测,而对非肿瘤组织内的miRNA研究相对较少,因此对非肿瘤组织miRNA与肝癌术后复发的研究仍具有科研前景。

2.3.2 环状RNA (circular RNA, circRNA) circRNA是一种无5'端帽子和3'端多聚腺苷酸尾呈单链闭合环状的内源性非编码RNA分子,其不受RNA外切酶的影响,因此不易被降解,更能稳定表达。circRNA通过与蛋白质相互作用、调节基因转录以及作为翻译模板,在复杂的调控过程发挥重要作用,是目前新型的潜在生物标志物^[35]。王迎等^[36]研究表明,癌旁组织中circ_101237表达水平显著低于

肝癌组织(1.01 ± 0.18 比 2.09 ± 0.26), circ_101237高水平提示患者预后不佳且有复发可能。罗涛等^[37]研究表明,早期复发组患者肝癌组织中circ RNA表达显著高于早期无复发组,进一步分析发现, circ RNA_0005218高表达与早期复发密切相关,对复发具有预测价值。柳东红^[38]通过对比分析肝癌组织和癌旁组织中circ KCNN2表达情况发现,低表达患者无复发生存期短,提示circ KCNN2在复发过程中具有重要作用,有望成为预测肝癌复发的分子标记物。

2.3.3 长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) lncRNA是一类长度大于200 nt的长链非编码RNA,是非编码基因组的重要组成部分,可通过与miRNA结合,间接影响mRNA表达,也可直接与mRNA结合,影响mRNA翻译、剪切、降解^[39,40]。近来研究发现其在预测肝癌术后复发中也具有重要作用^[41],齐兴峰等^[42]对lncRNA HULC基因位点rs7763881多态性与肝癌术后患者复发关系的研究表明,CA/CC基因型患者复发转移风险显著增加,且无复发及总生存期较短,提示其可作为评估肝癌术后复发、转移的指标。

3 展望

肝癌术后复发是一个复杂的过程,由于肿瘤的易变性、差异性、多样性的特点使得术后准确及时监测复发受到极大阻碍^[43]。因此,探索更准确和更少侵入性的方法监测术后复发是目前肝癌领域极具挑战性的任务^[44,45]。液体活检是一种新的、微创及较有特异性的肝癌生物标志物发现工具,取材方便,可重复检测,且能动态监测肿瘤发展^[46,47]。与传统肿瘤标志物相比,其具有更高的诊断价值,更易推广到临床应用,被认为是未来应用广泛的肿瘤检测手段之一^[48]。液态活检在早期诊断或肝癌术后复发预测方面已有较多研究,CTC、cfDNA、miRNA及lncRNA等都具有广阔的应用前景,但许多指标仍处于研究阶段,具体功能尚未完全明确,无法做到细化预测,还需后续更大样本量的研究进一步验证其临床应用价值。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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(3):209-249.
- [2] MOHAMMADIAN M, ALLAH B K, MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI A. International epidemiology of liver cancer: geographical distribution, secular trends and predicting the future[J]. J Prev Med Hyg, 2020, 61(2):E259-E289.
- [3] DE MARTEL C, MAUCORT-BOULCH D, PLUMMER M, et al. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2015, 62(4):1190-2000.

- [4] 夏永祥, 张峰, 李相成, 等. 原发性肝癌10 966例外科治疗分析[J]. 中华外科杂志, 2021, 59(1): 6-17.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(2): 277-292.
- [6] 任晓东, 苏宁, 孙献歌, 等. 尿液游离DNA在肿瘤分子诊断中的应用价值及研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2022, (12): 1293-1296.
- [7] BOBILLO S, CRESPO M, ESCUDERO L, et al. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas[J]. *Haematologica*, 2021, 106(2): 513-521.
- [8] TADIMETY A, SYED A, NIE Y, et al. Liquid biopsy on chip: a paradigm shift towards the understanding of cancer metastasis[J]. *Integr Biol(Camb)*, 2017, 9(1): 22-49.
- [9] LYU X, TSUI YM, HO D W, et al. Liquid biopsy using cell-free or circulating tumor DNA in the management of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(6): 1611-1624.
- [10] HINESTROSA J P, KURZROCK R, LEWIS J M, et al. Early-stage multi-cancer detection using an extracellular vesicle protein-based blood test[J]. *Commun Med (Lond)*, 2022, 2: 29.
- [11] SHODA K, SAITO R, MARUYAMA S, et al. Liquid biopsy as a perioperative biomarker of digestive tract cancers: review of the literature[J]. *Surg Today*, 2021, 51(6): 849-861.
- [12] 郝以杰, 牛哲禹, 卢俊. 循环肿瘤细胞在肝癌中的研究及应用进展[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(13): 690-693.
- [13] 刘霞, 方喜生, 翁成荫, 等. 原发性肝癌患者循环肿瘤细胞检测及其与术后复发转移的关系[J]. 广州医药, 2020, 51(2): 36-39.
- [14] 王学斌, 董勤. 原发性肝癌行肝癌根治术前后循环肿瘤细胞(CTC)、血清甲胎蛋白(AFP)测定值变化分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2022, 44(2): 139-142.
- [15] FAN J L, YANG Y F, YUAN C H, et al. Circulating tumor cells for predicting the prognostic of patients with hepatocellular carcinoma: a Meta analysis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 629-640.
- [16] 陈明, 王旭林, 邢人伟, 等. 早期肝癌患者细胞免疫功能, 血清VEGF表达及CTC微转移与术后复发的相关性[J]. 重庆医学, 2020, 49(3): 356-359, 364.
- [17] QI L N, XIANG B D, WU F X, et al. Circulating tumor cells undergoing EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4731-4744.
- [18] 方法状, 陆晓琰, 方建明, 等. 间质表型循环肿瘤细胞检测在肝癌临床应用价值[J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(5): 443-446, 456.
- [19] MATHIOS D, JOHANSEN J S, CRISTIANO S, et al. Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5060.
- [20] LIU S, WANG J. Current and future perspectives of cell-free DNA in liquid biopsy[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(6): 2695-2709.
- [21] 肇伟奇, 于津浦, 袁响林, 等. ctDNA高通量测序临床实践专家共识(2022年版)[J]. 中国癌症防治杂志, 2022, 14(3): 240-252.
- [22] 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.
- [23] 陈延华, 邓凯文. ctDNA对肝细胞肝癌患者根治性肝切除术后短期复发的预测价值[J]. 实用医药杂志, 2021, 38(6): 504-507, 577.
- [24] 丁巍, 贾春花. 原发性肝癌术后外周血循环肿瘤DNA的临床意义[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(4): 245-247, 252.
- [25] XU R H, WEI W, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Na Mater*, 2017, 16(11): 1155-1161.
- [26] AHN J C, TENG P C, CHEN P J, 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.
- [27] 郑洁, 王丽蕊. 外泌体在酒精性肝病中的功能[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(2): 27-31.
- [28] 马韶慧, 崔巍, 高红军. 肝癌外周血循环微RNA的临床应用价值与展望[J]. 肿瘤研究与临床, 2023, 35(3): 223-228.
- [29] MORISHITA A, OURA K, TADOKORO T, et al. MicroRNAs in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: a review[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3): 514.
- [30] ZHANG J, LIN H, WANG X Y, et al. Predictive value of microRNA-143 in evaluating the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 19(3): 257-262.
- [31] WANG L, LIU M, ZHU H, et al. Identification of recurrence-related serum microRNAs in hepatocellular carcinoma following hepatectomy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(10): 1445-1452.
- [32] HU X Y, LI L, WU H T, et al. Serum miR-130b level, an ideal marker for monitoring the recurrence and prognosis of primary hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation treatment[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1655-1660.
- [33] 姚升娟, 曲静琦, 曹宇, 等. MRI联合血清miR-204水平对原发性肝癌经皮穿刺射频消融术后疗效及复发的预测价值[J]. 放射学实践, 2022, 37(1): 62-67.
- [34] ALI D A, SABRY N M, KABEL A M, et al. The expression of circulating miR-497 and metadherin in hepatocellular carcinoma: relation to the tumor characteristics and patients' survival[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(9): 866.
- [35] 李叶晟, 杨宗国, 陈赐, 等. 肝癌血清外泌体环状RNA表达谱差异及其临床意义[J]. 肝胆胰外科杂志, 2022, 34(5): 283-287.
- [36] 王迎, 王亮, 徐红伟, 等. 环状RNA_101237调控肝细胞进展的分子机制[J]. 中华实验外科杂志, 2023, 40(1): 51-54.
- [37] 罗涛. 环状RNA circ_0005218在肝细胞癌术后早期复发中的作用及分子机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2020.
- [38] 柳东红. 肝细胞癌复发相关关键环状RNA筛选及其作用机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [39] KONDO Y, SHINJO K, KATSUSHIMA K, et al. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers[J]. *Cancer science*, 2017, 108(10): 1927-1933.
- [40] WOLFF A C, HAMMOND M E H, ALLISON K H, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(20): 2105-2122.
- [41] 苗德伟, 靳道春, 周远博, 等. 肝细胞癌自噬相关标志物生物信息学分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(1): 40-46.
- [42] 齐兴峰, 孙东杰, 叶显宗, 等. HULC基因位点rs7763881多态性与肝癌根治术后复发转移的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(3): 281-287.
- [43] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [44] SINGAL A G, REIG M, VILLANUEVA A. Emerging tools for hepatocellular carcinoma surveillance[J]. *Am J Gastroenterol*, 2022, 117(12): 1948-1951.
- [45] CANALE M, FOSCHI F G, ANDREONE P, et al. Role of circulating microRNAs to predict hepatocellular carcinoma recurrence in patients treated with radiofrequency ablation or surgery[J]. *HPB (Oxford)*, 2022, 24(2): 244-254.
- [46] NIKANJAM M, KATO S, KURZROCK R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 131.
- [47] 郝新, 邓淑云, 王坤远, 等. 液体活检在肝细胞癌早筛和复发预测中的应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(8): 814-819.
- [48] HEITZER E, HAQUE I S, ROBERTS C, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2): 71-88.

收稿日期: 2023-06-15

莫慧敏, 朱文钊. 液态活检技术用于检测肝癌术后复发的研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2024, 16(2): 29-32.