



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research

New Technology of Tumor Diagnosis and Treatment—Review

早期监测肝细胞癌的新型非蛋白生物标志物

Ghassan K. Abou-Alfa^{a,b,*}, 吴琳^c, Augusto Villanueva^d

^a Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York City, NY 10065, USA

^b Weill Medical College, Cornell University, New York City, NY 10065, USA

^c Berry Oncology Corporation, Beijing 102200, China

^d Division of Liver Diseases, Division of Hematology/Medical Oncology, Liver Cancer Program, Department of Medicine, Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York City, NY 10029, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2020

Revised 16 November 2020

Accepted 24 February 2021

Available online 24 July 2021

关键词

肝细胞癌

早期检测

生物标志物

液体活检

摘要

肝细胞癌(HCC)早期检测是对处于早期阶段的肝细胞癌进行检出的方法,对降低高风险患者的HCC死亡率至关重要。然而,对于早期HCC,目前仍然缺乏具有高度灵敏性和特异性的监测生物标志物。近年来,人们对循环系统中可检测到的肿瘤源性分子特征进行了大量研究,比如循环肿瘤脱氧核糖核酸(ctDNA)和循环肿瘤核糖核酸(ctRNA),以探讨它们作为多种肿瘤类型的候选非侵入性生物标志物的潜力。本文汇总了目前有关早期HCC检测的新方法及应用的研究。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

肝细胞癌(HCC)发病数占原发性肝癌的90%,是世界上最常见、最致命的癌症之一。许多国家的新增病例仍在迅速增加。肝细胞癌的主要风险因素包括慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染、丙肝病毒感染、过度饮酒和非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。不同原因的肝硬化容易使患者患肝细胞癌,年发病率达2%~4% [1]。2000—2014年肝细胞癌患者的五年净生存率为5%~30%,并且大多数国家的这一比例在20年间(1995—2014年)的变化很小[2]。如果早期检测到肝细胞癌并给予治疗,五年生存率可提高至70% [3]。由于许多肝细胞癌患者在早期并无症状,因此几乎

一半的患者到晚期才被诊断出患癌[4],而此时治疗窗口已经非常窄。因此,在癌症监测的范畴下已经证实早期肝细胞癌的检测可降低高危患者的肝细胞癌死亡率[5]。

对于早期肝细胞癌,现在仍然缺乏具有高灵敏度和特异性的监测生物标志物。目前,肝细胞癌监测依靠影像学检查和血清学检验。腹部超声检查或结合血清甲胎蛋白(AFP)检测是肝细胞癌监测的主流方法,美国肝病研究协会(American Association for the Study of Liver Diseases) [6]和2018年欧洲肝病学会指南(European Association for the Study of the Liver guideline 2018) [7]都推荐了这两种方法。在临界值为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的情况下,甲胎蛋白对肝硬化患者的灵敏度有限,为41%~65%,特异性为80%~

* Corresponding author.

E-mail address: abou-alf@MSKCC.ORG (G.K. Abou-Alfa).

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2021, 7(10): 1369–1374

引用本文: Ghassan K. Abou-Alfa, Lin Wu, Augusto Villanueva. Novel Non-Protein Biomarkers for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.02.020>

94%。而甲胎蛋白对早期肿瘤的灵敏度甚至更低，仅为32%~49% [8]。另外，超声检查对早期肝细胞癌的检测效果较差，灵敏度为63% [9]。最近对10 000多名患者进行综合荟萃分析，发现超声检查和甲胎蛋白检测早期肝细胞癌的联合灵敏度为63% [10]。还有研究人员将甲胎蛋白-L3和脱羧凝血酶原（DCP，也被称为维生素K缺乏或拮抗剂II诱导蛋白）等其他血清靶蛋白作为早期肝细胞癌检测的生物标志物[11]，但它们的临床效用尚未在队列研究中得到证实。一种涉及上述三种血清蛋白生物标志物以及年龄和性别的GALAD（即性别、年龄、AFP-L3、AFP和DCP）诊断模型被开发，TNM（T表示原发肿瘤大小，N

表示局部淋巴结是否受影响，M表示是否存在远处转移）早期和晚期肝细胞癌的曲线下面积（AUC）分别为0.95和0.98 [12]。2020年年初，美国食品药品监督管理局（US Food and Drug Administration）授予GALAD评分检测突破性医疗器械认定，以支持肝细胞癌的早期诊断[13]。

近年来，除血清蛋白外，还研究了循环系统中可检测的肿瘤源性分子特征作为多种肿瘤类型的可能生物标志物。本文总结了目前有关这些新方法及其在早期肝细胞癌检测领域应用的研究。如表1 [14-26]所示，许多新的生物标志物已经被发现并用于测试其在肝细胞癌检测中的作用，其中有些生物标志物表现出早期检测的潜力。

表1 肝细胞癌早期检测的候选生物标志物

Molecular candidate	Biomarkers	Technology	Performance	Validation cohort	EDRN phase	Reference
DNA methylation (5mC)	19 markers	MCTA-Seq	94% sensitivity and 89% specificity for HCC versus non-HCC	36 HCC/17 LC/38 normal	2	[14]
	Ten markers (cg10428836, cg26668608, cg25754195, cg05205842, cg11606215, cg24067911, cg18196829, cg23211949, cg17213048, cg25459300)	Targeted bisulfite sequencing	AUC of 0.944 (95% CI, 0.928–0.961)	383 HCC/275 normal	2	[15]
	Six markers (HOXA1, EMX1, AK055957, ECE1, PFKP, and CLEC11A) normalized by B3 GALT6	TELQAS	AUC of 0.96 (95% CI, 0.93–0.99) for HCC versus non-HCC; HCC sensitivity of 95% (88%–98%) with 75% stage 0 and 93% stage A, at specificity of 92% (86%–96%)	95 HCC (4 stage 0, 42 stage A)/51 LC/98 healthy	2	[16]
5hmC modification	32 markers	5hmC-Seal	AUC of 88.4% (95% CI, 85.8–91.1%) in cohort 1 for HCC versus non-HCC AUC of 84.6% (95% CI, 80.6–88.7%) in cohort 2 for HCC versus controls	Cohort 1: 220 early HCC/129 CHB or LC/256 control Cohort 2: 24 early HCC/180 control	2	[17]
CNV	Global	Low-depth WGS	AUC of 0.920 in cohort 1 AUC of 0.812 in cohort 2	Cohort 1: 38 early HCC/38 HBV Cohort 2: 51 early HCC/48 HBV	2	[18]
Fragment size	Global	Low-depth WGS	AUC of 0.88 for HCC versus non-HCC	90 HCC/32 healthy/67 HBV/36 LC	2	[19]
miRNA	Seven markers (miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, and miR-801)	qPCR	AUCs for BCLC stages 0, A, B, and C versus non-HCC were 0.888, 0.888, 0.901, and 0.881, respectively AUCs for HCC versus healthy, CHB, and cirrhosis were 0.941, 0.842, and 0.884, respectively	196 HCC/66 healthy/72 CHB/z 56 LC	2	[20]

Molecular candidate	Biomarkers	Technology	Performance	Validation cohort	EDRN phase	Reference
	Eight markers (miR-206, miR-141-3p, miR-433-3p, miR-1228-5p, miR-199a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-26a-5p)	qRT-PCR	AUCs of 0.879 for HCC versus non-HCC, 0.893 for HCC versus healthy, and 0.892 for HCC versus cirrhosis	103 HCC/78 LC/60 healthy	2	[21]
	Seven markers (miR-29a, miR-29c, miR-133a, miR-143, miR-145, miR-192, and miR-505)	qPCR	AUC of 0.817 (0.769–0.865) in cohort 1 and 0.884 (0.818–0.951) in cohort 2 for HCC versus non-HCC 74.5% sensitivity and 89.9% specificity for HCC versus CHB/LC; 85.7% sensitivity and 83.3% specificity for HCC versus inactive HBsAg carrier Sensitivity of 29.6%, 48.1%, 48.1%, and 55.6% in 12, 9, 6, and three months for HCC before clinical diagnosis in cohort 3	Cohort 1: 153 HCC/60 healthy/68 CHB/71 LC Cohort 2: 49 HCC/48 healthy/42 IHC Cohort 3 (nested case-control study): 27 HCC/135 controls (CHB or LC)	2,3	[22]
lncRNA	Three markers (LINC00152, RP11-160H22.5, and XLOC014172)	qRT-PCR	AUC of lncRNA panel was unavailable AUC of 0.986 and 0.985 for HCC versus CH and HCC versus healthy, respectively, when combine with AFP	100 HCC/100 CHB/100 healthy	2	[23]
Viral exposure signature	Unique epitopes corresponding to 61 viral strains	Serological profiling with VirScan	AUC of 0.91 at baseline and 0.98 at diagnosis	Prospective at-risk cohort: 44 HCC/129 cancer-free	3	[24]
Multi-analyte	DNA mutation, HBV integrations, cfDNA concentration, protein markers, gender, and age	PCR-based sequencing and CLIA	17% PPV	Prospective AFP/ultrasound negative cohort: 24 HCC/307 cancer-free after 6–8 months	3	[25]
	5hmC, end motifs, fragmentation, and nucleosome footprints	5hmC sequencing and low-pass WGS	Sensitivity of 95.42% and specificity of 97.83% for HCC versus LC Sensitivity of 95.42% and specificity of 97.91% for HCC versus non-HCC	131 HCC/1800 LC/116 healthy	2	[26]

DNA: deoxyribonucleic acid; cfDNA: cell-free DNA; 5mC: 5-methylcytosine; 5hmC: 5-hydroxymethylcytosine; MCTA-Seq: methylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) tandems amplification and sequencing; CNV: copy number variation; BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer; HBsAg: hepatitis B surface antigen; EDRN: Early Detection Research Network; TELQAS: target enrichment long-probe quantitative amplified signal; CI: confidence interval; WGS: whole-genome sequencing; LC: liver cirrhosis; CHB: chronic hepatitis B; IHC: inactive HBsAg carrier; CH: chronic hepatitis; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; qRT-PCR: quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction; PCR: polymerase chain reaction; RNA: ribonucleic acid; miRNA: microRNA; lncRNA: long non-coding RNA; CLIA: chemical luminescence immunity analyzer; PPV: positive predictive value; HOXA1: homeobox A1; EMX1: empty spiracles homeobox 1; ECE1: endothelin-converting enzyme 1; PFKP: phosphofructokinase; CLEC11A: C-type lectin domain containing 11A; B3GALT6: beta-1,3-galactosyltransferase 6.

2. 循环肿瘤脱氧核糖核酸

循环肿瘤 DNA (ctDNA) 是指因细胞凋亡或坏死导致细胞死亡而释放到血流中的肿瘤源性 DNA 片段。这些片段携带肿瘤特异性变异, 包括单核苷酸变异 (SNV)、插入/缺失 (In/Del)、结构变异以及表观遗传变异, 因此它们具有作为生物标志物的潜力。使用 ctDNA 进行早期

癌症检测的最大挑战是, ctDNA 仅占总循环细胞游离 DNA (cfDNA) 的一小部分。据估计, 在早期癌症患者的 cfDNA 中, ctDNA 所占比例低于 1%, 甚至可低至 0.01% [27]。许多先进技术试图解决这个问题, 比如数字液滴聚合酶链反应 (PCR) 或二代测序 (NGS) 中单分子标签的使用 [28]。对于肝细胞癌, 有证据表明超深度测序能够在早期检测出患者血液中的组织突变 [29]。

DNA 甲基化通常是指 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 修饰, 这是基因表达的一种表观遗传调控因子, 通常导致基因沉默。抑癌基因的 DNA 甲基化增加是许多肿瘤的早期事件, 这使 DNA 甲基化成为早期检测的潜在生物标志物。不同于每个样本中有限的 DNA 突变事件和位点数量, DNA 甲基化出现在多个靶区和各基因组靶区内多个变异的胞嘧啶-磷酸盐-鸟嘌呤 (cytosine-phosphate-guanine, CpG) 位点中[30], 因而提供比 DNA 突变更多的潜在靶点。多个研究小组开发了甲基化检测技术, 并探究了它们在早期肝细胞癌检测中的有用性。2015 年, Wen 等[14]开发了一种甲基化 CpG 串联扩增测序 (MCTA-Seq) 方法, 可检测 cfDNA 全基因组中超甲基化的 CpG 岛 (以 0.25% 等位基因频率的灵敏度)。他们采用这种方法分析了一个小队列, 包括 27 名肝细胞癌患者、17 名肝硬化患者和 28 名健康对照者, 并在血液中确定了 19 种检测小肝细胞癌 (≤ 3 cm) 的高效标志物, 其中 4 种 [G 蛋白信号 10 (RGS10) 调控因子、ST8 α -N-乙酰基神经氨酸盐- α -2,8-唾液酸转移酶 6 (ST8SIA6)、RUNX 家族转录因子 2 (RUNX2) 和波形蛋白 (VIM)] 与肿瘤中的超甲基化一致, 另外 15 种标志物在正常肝组织中已经超甲基化。由这些生物标志物组成的分类器模型对 36 名肝细胞癌患者、17 名肝硬化对照受试者和 38 名健康对照者的血浆样本的灵敏度为 94%, 特异性为 89%。值得注意的是, 15 名甲胎蛋白阴性的肝细胞癌患者均被成功识别, 这表明未来有可能将这些 DNA 甲基化生物标志物和甲胎蛋白结合。2017 年, Xu 等[15]通过靶向亚硫酸盐测序法分析了较大队列 (包括 1098 名肝细胞癌患者和 835 名健康对照者) cfDNA 样本的甲基化特性, 以识别和验证可用于早期检测的肝细胞癌特异的甲基化生物标志物组合。该研究小组使用所谓的甲基化相关区域作为单位量化 CpG 甲基化水平, 构建由 10 种甲基化标志物 (cg10428836、cg26668608、cg25754195、cg0520-5842、cg11606215、cg24067911、cg18196829、cg2321-1949、cg17213048、cg25459300) 组成的诊断预测模型, 在验证队列 (包括 383 名肝细胞癌患者和 275 名健康对照者) 的 AUC 为 0.944 [95% 置信区间 (CI) 0.928~0.961]。联合诊断评分 (cd-score) 与肿瘤负担、治疗反应和分期高度相关。然而, 这项研究中大多数肝细胞癌病例的肿瘤处于晚期, 限制了该研究结果外推至早期监测的临床场景。另有一项关于 DNA 甲基化检测方法的研究报道了高于 90% 的灵敏度和特异性[16], 优于目前推荐的肝细胞癌监测工具的性能。循环无细胞基因组图谱 (CCGA) 联盟也发现, 检出率和肿瘤分期呈正相关。该联盟针对 50 多种癌症 (包括肝癌) 患者的血浆 DNA 中 100 000 多个甲基

化区域进行了亚硫酸盐测序[31], 结果发现 DNA 甲基化生物标志物在早期检测中的效用并非最佳。

5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 是另一种表观遗传标志物。它是一种稳定的脱甲基化产物, 由 10-11 易位家族双加氧酶氧化 5mC 而产生[32]。增强子、启动子和基因体中的 5hmC 修饰影响基因表达。2017 年两个不同的实验室报道了检测 cfDNA 中 5hmC 修饰的技术, 分别为 hMe-Seal 和 5hmC-Seal, 涉及 5hmC 选择性化学标记、富集和测序[33-34]。2019 年, Cai 等[17]采用 5hmC-Seal 技术分析了来自 1204 名肝细胞癌患者、392 名慢性乙肝 (CHB) 感染/肝硬化 (LC) 患者, 以及 958 名健康对照者/良性肝损伤患者的 cfDNA 样本的全基因组 5hmC。他们关注基因体中 5hmC 的变化, 开发了一种 32 基因分类器, 用于区分早期肝细胞癌 [0/A 期, 巴塞罗那临床肝癌 (BCLC)] 与非肝细胞癌, AUC 为 88.4% (95% CI, 85.8%~91.1%); 区分早期肝细胞癌与高危人群, AUC 为 84.6% (95% CI, 80.6%~88.7%)。这两种情况都与潜在的混杂因素 (比如吸烟或饮酒史) 无关。

结构变异是癌症的标志。数个研究小组开发了评估 ctDNA 拷贝数变异 (CNV) 的方法, 以进行肝细胞癌的早期检测。2015 年, Xu 等[35]基于低深度 ($0.1\times\sim 0.2\times$) 全基因组测序 (WGS) 对 31 名肝细胞癌患者和 8 名慢性肝炎/肝硬化患者的小队列血浆样本进行 CNV 分析。通过 CNV Z 评分分析, 他们发现了几个差异变量 (如肝细胞癌中的 1q、7q 和 19q 增加) 和一些差异较小的变量 (4q 和 13q 减少, 17q 和 22q 增加) 区域, 在此基础上他们提出了 CNV 评分方法, 在 31 名肝细胞癌患者中有 26 人显示阳性结果 (83.9%), 在 16 名肿瘤尺寸高达 50 mm (68.8%) 的肝细胞癌患者中有 11 人显示阳性结果, 在 7 例肿瘤尺寸高达 30 mm (57.1%) 的肝细胞癌患者中有 4 例显示阳性结果。值得注意的是, 8 名慢性肝炎或肝硬化患者样本评分均为阴性。虽然单独的 CNV 分析用于肝细胞癌的早期检测不是足够好, 但它可以作为模型建立的参数。2020 年, Tao 等[18]用深度更高的低深度 ($5\times$) 全基因组测序分析了包含乙肝病毒相关肝细胞癌患者和无细胞乙肝病毒患者在内的 384 个血浆样本的 CNV。他们利用机器学习通过由 209 名患者组成的发现队列开发了一种模型, AUC 为 0.893; 早期 (0~A 期巴塞罗那临床肝癌) AUC 为 0.874, 晚期 (B~D 期巴塞罗那临床肝癌) AUC 为 0.933。该模型的性能通过仅包括 0~A 期肝细胞癌患者和乙肝病毒感染患者的两个队列 (76 名和 99 名患者) 得到验证, AUC 分别为 0.920 和 0.812。此外, 研究人员发现, 对于早期检测, 降低测序深度会导致灵敏度的降低, 这表明为了确保该模

型的性能稳定, 可能需要适当的测序深度。

3. 片段组学

cfDNA 因内切核酸酶对无核小体区的酶切而高度片段化。cfDNA 片段化并不是随机的, 可能携带组织或肿瘤特异性特征。片段组学是指对 cfDNA 片段化模式的分子特征的分析, 包括血浆 DNA 大小、末端特征和核小体印迹[36]。使用全基因组测序数据可以很容易分析 cfDNA 的这些分子特征。

为了了解肝细胞癌 cfDNA 片段的大小分布, 2015 年 Jiang 等[37]对 90 名肝细胞癌患者、67 名慢性乙肝患者、36 名乙肝相关肝硬化患者和 32 名健康对照者的 cfDNA 片段大小特性进行了全基因组分析。他们发现, 肝细胞癌患者的 cfDNA 长度较为多变, 有异常短和异常长的 cfDNA。短 cfDNA 优先携带肿瘤相关拷贝数畸变。研究人员还发现, 肝细胞癌患者血浆中线粒体 DNA 数量升高。这些分子比血浆中的核 DNA 短得多。2019 年, Cristiano 等[38]评估了整个基因组中 cfDNA 的片段化模式, 发现健康对照者的片段化模式反映出白细胞的核小体模式, 而癌症患者的片段模式发生了改变。利用全基因组片段化特征的机器学习模型对 7 种癌症进行检测, 灵敏度为 57%~99%、特异性为 98%、总 AUC 为 0.94。可惜的是, 这项研究没有纳入肝癌样本。

为探究 cfDNA 片段末端位置的效用, 2018 年 Jiang 等[19]研究了是否存在与早期肝细胞癌有关的优选血浆 DNA 末端坐标形式的 ctDNA 标记。通过研究肝细胞癌患者和慢性乙肝患者血浆中的 DNA 末端特征, 他们在基因组中发现了数百万个肿瘤相关的血浆 DNA 末端坐标。与非肝细胞癌受试者 (32 名健康对照者、67 名乙肝病毒携带者和 36 名肝硬化患者) 相比, 90 名肝细胞癌患者血浆样本中肿瘤和非肿瘤相关的优选末端的比例显著增加, 区分肝细胞癌患者和健康对照者的 AUC 为 0.88。作为血浆中特异性癌症标记, 血浆 DNA 末端坐标比体细胞突变更容易被检测到。为了探究片段末端信息的效用, 2020 年该研究小组进一步研究了肝细胞癌的 5'末端基序, 发现肝细胞癌患者的血浆 DNA 末端基序的多样性显著增加[39]。特别是, 肝细胞癌患者血浆 DNA 基序 CCCA 的丰度明显低于无肝细胞癌者。通过比较该末端基序和其他类型癌症的丰度异常的末端基序, 研究人员观察到, 来自同一器官 (比如肝脏、胎盘和造血细胞) 的血浆 DNA 末端基序结构通常聚集在一起, 表明这些标志物携带起源组织的信息。虽然肝细胞癌的 4-聚体末端基序的优先模式被找到, 但其

在区分肝细胞癌与肝硬化方面的作用尚不清楚。

cfDNA 反映核小体印迹。在活跃转录的基因中, 启动子区和下游基因体没有核小体, 从而导致比对其上的序列频率降低。从健康对照者 cfDNA 中推断出的核小体间距与淋巴和骨髓细胞的表现遗传特征密切相关[40]。Ulz 等[41]表明, cfDNA 转录起始位点附近的核小体占位可能导致表达基因和沉默基因的测序读长的深度覆盖度模式不同。最近, Chen 等[26]探究了 cfDNA 中的核小体印迹和其他基因组特征用于肝癌检测, 发现使用单独的核小体印迹区分肝细胞癌和肝硬化时, AUC 可达到 0.973。

4. 循环肿瘤核糖核酸(RNA)

循环微小 RNA (miRNA) 和长链非编码 RNA (lncRNA) 也可能是良好的癌症生物标志物。miRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的内源性非编码小 RNA 转录物, 而 lncRNA 是长度超过 200 个核苷酸的较长非蛋白编码转录物。miRNA 和 lncRNA 都是重要的基因表达调节分子, 它们参与多个细胞过程。它们的调节异常与癌症等多种疾病有关。在健康对照者和患病者的循环系统中都可见 miRNA 和 lncRNA, 而在肝细胞癌的早期检测中循环 RNA 的研究远早于 ctDNA 的研究。

已经有很多关于 miRNA 作为肝细胞癌生物标志物的研究性文章。一些文章通过微阵列或二代测序分析确定了靶点, 而另一些对文献检索选出的候选 miRNA 进行了测试。量化 miRNA 靶点的方法通常为定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 测定法。早在 2011 年, Zhou 等[20]利用包括 934 名受试者 (健康对照者、慢性乙肝患者、肝硬化患者和乙肝病毒相关肝细胞癌患者) 的三个独立队列开展了一项研究。研究人员首先使用靶向 723 个 miRNA 的微阵列在 137 个样本中分析血浆 miRNA 表达情况, 并确定了区分肝细胞癌和非肝细胞癌的 7 个潜在生物标志物 (miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a 和 miR-801)。然后通过定量聚合酶链反应 (qPCR) 评价该组合 miRNA 的表达情况。基于 407 个样本的训练队列而建立的逻辑回归模型在 390 个样本的验证队列中的 AUC 为 0.888, 该性能与疾病状态无关, 对巴塞罗那临床肝癌 0、A、B 和 C 期的 AUC 分别为 0.888、0.888、0.901 和 0.881。该 miRNA 组合在区分肝细胞癌患者与健康对照者 (AUC 为 0.941) 方面的表现优于区分慢性乙肝患者 (AUC 为 0.842) 和肝硬化患者 (AUC 为 0.884)。

2014 年, Tan 等[21]利用 667 个样本 (261 名肝细胞癌患者、233 名肝硬化患者和 173 名健康对照者) 开展了类

似的研究。他们首先通过二代测序对混合的肝细胞癌患者和混合的对照者血清样本进行 miRNA 表达的初步筛选。该研究小组确定了 8 个 miRNA (hsa-miR-206、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-433-3p、hsa-miR-1228-5p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-122-5p、hsa-miR-192-5p、hsa-miR-26a-5p)。训练组 (357) 和验证组 (241) 的逻辑回归模型组合的 AUC 分别为 0.887 和 0.879, 这与 Zhou 等[20]的组合结果相似。与 Zhou 等[20]的组合不同的是, 这个 miRNA 组合在区分肝细胞癌患者和健康对照者 (AUC = 0.893) 以及区分肝细胞癌患者和肝硬化患者 (AUC = 0.892) 方面的能力几乎相同。然而, 这个组合是否与肝细胞癌分期无关尚不清楚。2015 年, Lin 等[22]发布了一项研究, 测试他们团队确定的 miRNA 组合在预测临床前肝细胞癌的效用。在经过利用肝细胞癌患者、乙肝病毒感染相关肝硬化患者、非活动性乙肝表面抗原 (HBsAg) 携带者和健康对照者进行回顾性队列研究的发现和验证阶段后, 他们提出 7-miRNA 组合 (miR-29a、miR-29c、miR-133a、miR-143、miR-145、miR-192、miR-505) 的血清 miRNA 分类器 (Cmi)。该组合对区分肝细胞癌患者与慢性乙肝患者及肝硬化患者的灵敏度为 74.5%, 特异性为 89.9%; 对区分肝细胞癌患者与非活动性 HBsAg 携带者的灵敏度为 85.7%, 特异性为 83.3%。该报道包括 27 例巢式病例对照研究。研究发现, 分类器在临床诊断前 12、9、6 和 3 个月检测肝细胞癌的灵敏度分别为 29.6%、48.1%、48.1% 和 55.6%。

与循环 miRNA 的研究相比, 有关循环 lncRNA 作为肝细胞癌生物标志物的研究很少, 且用到的队列也小得多。例如, 2017 年, Yuan 等[23]利用 qRT-PCR 检测了从文献中选取的 10 个候选循环 lncRNA, 并在 20 名肝细胞癌患者和 20 名对照者训练组中识别出 4 个 lncRNA, 随后在 100 名肝细胞癌患者和 100 名对照者验证组中进一步缩小到 3 个 lncRNA (LINC00152、RP11-160H22.5 和 XLOC014172)。这 3 个 lncRNA 与甲胎蛋白联合使用时, 区分肝细胞癌患者与慢性肝炎患者或健康对照者的 AUC 分别为 0.986 和 0.985。

5. 病毒暴露标记

肝细胞癌是一种与病毒相关的恶性肿瘤, 病毒感染可改变宿主免疫力, 从而决定了癌症的发病。因此, 由病毒-宿主相互作用产生的独特病毒暴露标记能够反映一系列可能改变患肝细胞癌风险的事件。为了验证这一假设, Liu 等[24]利用合成的人类病毒组 VirScan, 对来自美国国

家癌症研究所与马里兰大学 (NCI - UMD) 合作开展的病例对照研究中的 899 人的病毒感染史进行了血清学分析。他们开发了一种病毒暴露标记, 并通过 173 名需长期随访肝细胞癌发生的高危患者的纵向队列验证了结果。病毒暴露标记与验证队列中风险个体的肝细胞癌状态显著相关, 基线时 AUC 为 0.91, 诊断时 AUC 为 0.98。病毒标记可在临床诊断前识别出肝细胞癌患者, 性能优于甲胎蛋白。

6. 多维分子分析

由于癌症固有的分子异质性, 早期检测生物标志物可能需要包含多个分子维度, 以便取得有竞争力的表现。例如, Cohen 等[42]开发了一种血液检测法 CancerSEEK, 通过评估 cfDNA 和 39 种循环蛋白的突变水平来检测 8 种常见癌症。这些突变通过 61 个扩增子组合进行检测, 每个扩增子平均覆盖 33 个碱基对, 来自常见癌症的 16 个高频突变基因。CancerSEEK 对肝癌的灵敏度高达 98%, 总体特异性大于 99%。然而, CancerSEEK 的灵敏度取决于肝癌的分期, 并且研究纳入的肝细胞癌早期样本很少。此外, 同一研究小组的随访研究报道, 利用纯血液测试检测不同肿瘤类型的阳性预测值较低[43]。

对于肝癌的早期检测, 已经报道了使用多维分子分析的不同方法。Qu 等[25]开发了一种肝细胞癌筛查法, 该方法涉及 DNA 突变、乙肝病毒整合、cfDNA 浓度、蛋白质标志物、性别和年龄。这种方法能有效区分肝细胞癌患者和非肝细胞癌患者, 对训练组的灵敏度为 85%, 特异性为 93%, 而验证队列的阳性预测值为 17%。Chen 等[26]通过整合 cfDNA 的 4 个基因组特征: 5hmC 修饰、末端基序、片段化和核小体印迹, 开发了 HIFI 方法。这种方法在区分肝细胞癌和肝硬化方面具有较高的准确度, 对试验组的灵敏度为 95.42%, 特异性为 97.83%, 并且与个人基本资料和临床特征 (包括年龄、乙肝病毒状态、Child-Pugh 评分、巴塞罗那临床肝癌分期、肿瘤大小、甲胎蛋白状态) 无关。

7. 展望

我们迫切需要更好的早期肝细胞癌监测和检测工具。近年来, 在液体活检应用于生物医学的更广泛背景下, 许多新的分子方法旨在检测释放到血流中的肿瘤成分。这些新的尝试给肝细胞癌的早期检出带来了光明。通过直接比

较，这些分子生物标志物的AUC都优于甲胎蛋白。由于肝细胞癌的异质性以及早期循环系统中肿瘤特异性遗传物质比例相对较低，仅由一种生物标志物组成的早期检测模型在灵敏度和特异性方面存在局限性。目前对多维参数的组合研究的较少，但其有望显著提高早期检出率。多维参数也可能包括临床病理指数、蛋白质生物标志物和分子影像学等传统工具。

早期检测的生物标志物的开发一般需要5个阶段[44]。如早期检测研究网络（Early Detection Research Network, EDNRN）指南所列，这5个阶段为：临床前探索性研究、临床疾病的临床试验开发、回顾性纵向资源库研究、前瞻性筛查研究和癌症对照研究。本文总结的大多数早期检测方法仍处于第2阶段，在此阶段使用临床样本评估区分肝细胞癌和非肝细胞癌的能力。有几项研究已经进展到第3阶段，在此阶段对生物标志物检出临床前疾病的能力进行评价。从某种意义上来说，本文提到的所有研究都是回顾性研究，因为并没有根据这些检测结果进行转诊，因此，需要在前瞻性筛查研究中进一步进行临床有用性试验。

应该注意的是，本文综述的监测新工具都是用于早期监测，而不是诊断，因为根据监测方案的召回政策，应该对早期监测呈阳性的患者进行明确的诊断程序（如磁共振成像、活检）。考虑到这一点，在肝细胞癌早期检测的尖端技术的开发和临床应用方面有几个具有挑战性的问题：

（1）**目标人群**。目标人群包括肝细胞癌高危人群，比如肝硬化者、慢性肝炎病毒感染者、酗酒者、非酒精性脂肪性肝病者或有肝细胞癌家族史者。这些人应该每六个月进行一次甲胎蛋白/超声检查。

（2）**多种尖端技术和生物标志物的组合选择和成本效益**。可根据增加的检测价值和每种技术/生物标志物的成本选择多种技术和生物标志物的组合。技术发展带来的成本降低也应考虑在内。

（3）**风险个体对多种生物标志物检查的接受**。风险个体对进行多种生物标志物检查的接受程度将主要取决于所用检测工具的检出率、个体目前的健康状况和健康意识、检测成本及政府政策。

Compliance with ethics guidelines

Ghassan K. Abou-Alfa, Lin Wu, and Augusto Villanueva declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2019;380(15):1450–62.
- [2] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 2018;391(10125):1023–75.
- [3] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2(1):16018.
- [4] Cancer stat facts: liver and intrahepatic bile duct cancer [Internet]. Washington, DC: National Cancer Institute; c2020 [cited 2020 Jul 6]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/livibd.html>.
- [5] Van Meer S, de Man RA, Coenraad MJ, Sprengers D, van Nieuwkerk KMJ, Klümper HJ, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: results from a large cohort in the Netherlands. *J Hepatol* 2015;63(5):1156–63.
- [6] Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;68(2):723–50.
- [7] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69(1): 182–236.
- [8] Kanwal F, Singal AG. Surveillance for hepatocellular carcinoma: current best practice and future direction. *Gastroenterology* 2019;157(1):54–64.
- [9] Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MAM, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30(1):37–47.
- [10] Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, et al. Surveillance imaging and alpha fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2018; 154(6):1706–18.e1.
- [11] Choi JY, Jung SW, Kim HY, Kim M, Kim Y, Kim DG, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP. *World J Gastroenterol* 2013;19(3):339–46.
- [12] Johnson PJ, Pirrie SJ, Cox TF, Berhane S, Teng M, Palmer D, et al. The detection of hepatocellular carcinoma using a prospectively developed and validated model based on serological biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(1):144–53.
- [13] FDA grants Breakthrough Device Designation for Roche's Elecsys GALAD score to support earlier diagnosis of hepatocellular carcinoma [Internet]. Basel: Roche; c2021 [cited 2020 Jul 30]. Available from: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2020-03-04.htm>.
- [14] Wen L, Li J, Guo H, Liu X, Zheng S, Zhang D, et al. Genome-scale detection of hypermethylated CpG islands in circulating cell-free DNA of hepatocellular carcinoma patients. *Cell Res* 2015;25(11):1250–64.
- [15] Xu RH, Wei W, Krawczyk M, Wang W, Luo H, Flagg K, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16(11):1155–61.
- [16] Kisiel JB, Dukek BA, Kanipakam RVSR, Ghoz HM, Yab TC, Berger CK, et al. Hepatocellular carcinoma detection by plasma methylated DNA: discovery, phase I pilot, and phase II clinical validation. *Hepatology* 2019;69(3):1180–92.
- [17] Cai J, Chen L, Zhang Z, Zhang X, Lu X, Liu 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. *Gut* 2019; 68(12): 2195–205.
- [18] Tao K, Bian Z, Zhang Q, Guo X, Yin C, Wang Y, et al. Machine learning-based genome-wide interrogation of somatic copy number aberrations in circulating tumor DNA for early detection of hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2020;56:102811.
- [19] Jiang P, Sun K, Tong YK, Cheng SH, Cheng THT, Heung MMS, et al. Preferred end coordinates and somatic variants as signatures of circulating tumor DNA associated with hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(46):E10925–33.
- [20] Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011; 29(36):4781–8.
- [21] Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, et al. A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PLoS ONE* 2014;9(9):e107986.

- [22] Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, Xie C, Yang XJ, Zhang Q, et al. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol* 2015;16(7):804–15.
- [23] Yuan W, Sun Y, Liu L, Zhou B, Wang S, Gu D. Circulating lncRNAs serve as diagnostic markers for hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2017;44(1):125–32.
- [24] Liu J, Tang W, Budhu A, Forgues M, Hernandez MO, Candia J, et al. A viral exposure signature defines early onset of hepatocellular carcinoma. *Cell* 2020;182(2):317–28.e10.
- [25] Qu C, Wang Y, Wang P, Chen K, Wang M, Zeng H, et al. Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(13):6308–12.
- [26] Chen L, Abou-Alfa GK, Zheng B, Liu JF, Bai J, Du LT, et al. Genome-scale profiling of circulating cell-free DNA signatures for early detection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Cell Res* 2021;31(5):589–92.
- [27] Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 2017;545(7655):446–51.
- [28] Von Felden J, Garcia-Lezana T, Schulze K, Losic B, Villanueva A. Liquid biopsy in the clinical management of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2020;69(11):2025–34.
- [29] Labгаа I, Villacorta-Martin C, D'Avola D, Craig AJ, von Felden J, Martins-Filho SN, et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2018;37(27):3740–52.
- [30] Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-González J, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56.
- [31] Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, Liu MC, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol* 2020;31(6):745–59.
- [32] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009;324(5929):930–5.
- [33] Song CX, Yin S, Ma L, Wheeler A, Chen Y, Zhang Y, et al. 5-hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. *Cell Res* 2017;27(10):1231–42.
- [34] Li W, Zhang X, Lu X, You L, Song Y, Luo Z, et al. 5-hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. *Cell Res* 2017;27(10):1243–57.
- [35] Xu H, Zhu X, Xu Z, Hu Y, Bo S, Xing T, et al. Non-invasive analysis of genomic copy number variation in patients with hepatocellular carcinoma by next generation DNA sequencing. *J Cancer* 2015;6(3):247–53.
- [36] Ivanov M, Baranova A, Butler T, Spellman P, Mileyko V. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC Genomics* 2015;16(Suppl 13):S1.
- [37] Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VS, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(11):E1317–25.
- [38] Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature* 2019; 570(7761):385–9.
- [39] Jiang P, Sun K, Peng W, Cheng SH, Ni M, Yeung PC, et al. Plasma DNA end-motif profiling as a fragmentomic marker in cancer, pregnancy, and transplantation. *Cancer Discov* 2020;10(5):664–73.
- [40] Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016;164(1–2):57–68.
- [41] Ulz P, Thallinger GG, Auer M, Graf R, Kashofer K, Jahn SW, et al. Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA. *Nat Genet* 2016;48(10):1273–8.
- [42] Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359(6378):926–30.
- [43] Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, Warren A, Honushefsky A, Cohain AT, et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science* 2020;369(6499):eabb9601.
- [44] Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(14):1054–61.