

Advances in Molecular Diagnostic Markers and Related Omics Techniques for Liver Cancer

Zhongqiong Tang, Yao Xiao, Feng Wang*

Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan
Email: 647896049@qq.com, 1282585263@qq, wangfeng0766@126.com

Received: Dec. 29th, 2018; accepted: Jan. 15th, 2019; published: Jan. 22nd, 2019

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors in China with high invasive and recurrence rate. Because the early symptoms of liver cancer are not obvious and the early diagnosis is difficult, it has a high mortality rate. Early diagnosis is one of the most important measures to prevent liver cancer and improve the survival rate of patients with liver cancer. Screening and early diagnosis markers for the identification of cancer of the liver are the primary task. It is urgent to explore new methods of diagnosis and treatment with the help of related omics research techniques, by finding new specific molecular markers of liver cancer, to establish a more comprehensive and more effective molecular classification layered system, and improve survival of patients with liver cancer by early diagnosis. This paper reviews the research progress of traditional and potential markers for early diagnosis of liver cancer and their detection methods.

Keywords

Liver Cancer, Early Diagnosis, Molecular Markers, Omics, Detection Methods

肝癌分子诊断标志物及相关组学技术研究进展

汤忠琼, 肖瑶, 王峰*

昆明理工大学, 云南 昆明
Email: 647896049@qq.com, 1282585263@qq, wangfeng0766@126.com

*通讯作者。

收稿日期：2018年12月29日；录用日期：2019年1月15日；发布日期：2019年1月22日

摘要

肝癌具有高度侵袭性和复发率，是我国常见恶性肿瘤之一。由于肝癌早期症状很不明显，早期诊断又比较困难，因此具有很高的致死率。早期诊断是预防肝癌、提高肝癌患者生存率最重要的措施之一，筛选和鉴定肝癌的早期诊断标志物是首要任务，利于相关组学研究技术来探寻新的诊疗方法刻不容缓，通过寻找新的特异性肝癌分子标志物，以建立更全面更有效的分子分型分层系统，通过早期诊断提高肝癌患者的生存率。本文对传统的、潜在的肝癌早期诊断标志物及其检测方法的研究进展作一综述。

关键词

肝癌，早期诊断，分子标志物，组学，检测方法

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是我国常见的一种恶性肿瘤，位居肿瘤发生率的第三位，死亡率的第二位[1]。近年来，虽然肝癌的诊断和治疗技术取得了长足的进步，我国的肝癌诊断和治疗形式仍然十分严峻，早期诊断率低、复发转移率高、治疗手段匮乏、精准治疗方案欠缺等依然是困扰着肝癌诊疗工作的主要方面。肿瘤标志物检测对肝癌影像学及病理学诊断具有重要的补充价值，通过监测肝癌标志物，能比其他方法提前 3~5 个月发现肿瘤或肿瘤的复发、转移，提高预测和诊断的针对性，从而提高疗效，改善预后[2]。AFP 是全世界应用最广泛的肝癌诊断标志物，但其敏感性、特异性目前均不令人满意。单一标志物诊断早期肝癌存在缺陷，而多种标志物联合可提高诊断的敏感性和特异性。因此，急需早期肝癌的新型诊断标志物和新型的治疗策略，以期改善预后。新的基因组学和蛋白质组学技术的发展对筛选新的肝癌分子诊断标志物提供了很大的帮助。近年来有研究指出，肝癌的发生可能与肠道菌群失调存在非常密切的联系，肠道菌群可以作为新的肝癌标志物。已知动物模型中肠道微生物通过“肠肝轴”促使肝癌恶化，但人类患者的肠道微生物特征还未报道[3]。肠道微生物作为特殊疾病的预测手段已经取得了喜人的进展，人体肠道微生态与肝病密切相关，其作为肿瘤或特定疾病的无创诊断标志物具有潜在的可能性[4]。

2. 肝癌诊断标志物的研究技术及方法

随着分子生物学研究的深入，新的肝癌标志物不断被发现，推动了肝癌的早期诊断，而肝癌标志物的灵敏、准确的定性定量检测也是提高肝癌患者生存率的重要举措。具有诊断或联合诊断价值的肝癌标志物及其检测方法近来进展迅速。肝癌诊断标志物的研究已经不再局限于传统的免疫分析等方法，基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学与质谱、芯片等高通量分析方法和技术的联合使用，将是以后的发展趋势，相信这些研究方法和技术的发展将从根本上大大加快肝癌早期分子诊断标志物的筛选和鉴定。

2.1. 高通量测序技术

高通量测序(NGS)技术能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,是近几年兴起的分子遗传学诊断技术[5]。在个体化用药、遗传病、肿瘤、产前诊断以及微生物的鉴定等领域,高通量测序技术显示出强大的功能,部分传统检验项目有可能被测序技术所取代[6]。其最大特点是能够在全基因组范围内对 CNVs 进行高通量、高分辨率、高敏感性的分析,在亚显微结构水平上比其他检测技术具有优势[7]。目前,高通量测序开始广泛应用于寻找疾病的候选基因上。

2.2. 基于液相色谱-质谱等分离技术的代谢组学

液质联用技术(LC/MS)是具有高效、快速分离效能的 LC 与灵敏、准确的 MS 或 MSn 的结合,被广泛应用于难挥发性化合物、极性化合物、热不稳定化合物和大分子化合物(包括蛋白质、多肽、多糖、多聚物等)的分析,是分析复杂生物样品中代谢产物的检测和识别潜在生物标志物的理想选择[8]。利用代谢组学,可以通过研究血清中所有代谢产物在健康和疾病状态下的规律来揭示与疾病发生发展相关的代谢途径,可以发现和鉴定一些肝癌的诊断标志物。

2.3. 血清蛋白质组学技术

蛋白质组学主要是依靠生物化学的手段对细胞的所有蛋白质进行大规模研究[9],是筛选和鉴定肿瘤标志物的有效方法之一。利用蛋白质组学技术对肝癌相关的尿液、血液、培养细胞、组织提取物等样品进行分析,可以高通量发现新的肝癌特异性蛋白,特别是在肝癌病人血清中表达的特异性分子标志物[10][11]。

2.4. 液体芯片检测技术

液体芯片检测技术是一种新型检测技术,它集中了免疫学、分子生物学、高分子化学、激光检测技术、微流体技术和计算机等方面的先进技术为一体,利用细胞大小的塑料颗粒作为载体,以流式细胞术作检测平台,可在较短时间内对核酸、多肽、小分子蛋白质等进行快速检测[12][13]。液体芯片技术检测灵敏低限可至 10 pg;反应时间短,速度快,在 35~60 min 内完成测定。具有很高的准确性和重复性,反应条件比较温和,有利于探针和被检测物的充分反应,大多数反应不需洗涤,反应过程接近天然状态。将这项技术应用于肝癌标志物的筛选,可以加快当前的研究进程。

2.5. 表面增强的激光解析/电离化飞行时间质谱技术

SELDI-TOF-MS 技术是通过亲合作用使蛋白质结合到芯片的化学或生物位点上,激光脉冲使芯片中的分析物解析形成荷电子,根据蛋白质到达检测器的时间得到一张质谱图,经计算机软件处理形成模拟质谱图,同时显示出样品中各种蛋白的分子量和含量等信息。通过对肝癌相关的蛋白质谱图进行数据分析处理,从而可以发现新的肝癌特异性蛋白。SELDI-TOF-MS 技术,具有快速、准确、高通量、灵敏度高等特点,大大加快了肿瘤标记物的筛选和鉴定[14]。SELDI-TOF-MS 技术检测范围广泛,可检测尿液、血液、培养细胞、组织提取物等。并可用于多个研究领域,进行特定蛋白质表达物的识别、药物筛选、小分子物质测定等,尤其适合于鉴定癌症及遗传性疾病特异性蛋白[15]。

综上所述,肝癌诊断标志物的研究已经不再局限于传统的免疫分析等方法,基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学与质谱、芯片等高通量分析方法和技术的联合使用,将是以后的发展趋势,相信这些研究方法和技术的发展将从根本上大大加快肝癌早期分子诊断标志物的筛选和鉴定。

3. 常用肝癌诊断标志物

3.1. 已进入临床应用的肝癌诊断标志物

3.1.1. 甲胎蛋白(AFP)

AFP 是目前肝癌诊断和预后的首选标志物, 对肝癌的确诊、预后推测、疗效判断及复发转移的监测具有良好的临床价值。临床上大概有 30%~40%的肝癌患者 AFP 为阴性[16]。

3.1.2. 甲胎蛋白异质体(AFP-L3)

AFP-L3 是肝癌患者诊断的一个重要血清学标志物, 其肝癌假阴性或假阳性率均可能高达 40%, AFP-L3 在肝细胞癌中明显增高, 并且与肝功能不佳、肿瘤低分化程度及生物学恶性行为相关, AFP-L3 在肝癌的预后预测方面具有更好的优越性[17]。AFP-L3 可用于对肝脏良恶结节的判别, 且敏感性和特异性优于总 AFP 水平检测。

3.1.3. 脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)

DCP 是在维生素 K 缺乏的情况下所异常产生的一类凝血酶原。在维生素 K 的作用下, 这些谷氨酸残基转变为羟基谷氨酸残基最终产生成熟蛋白[18]。因此, DCP 成为了反映异常肝功能的潜在标志物。而作为肝癌的肿瘤标志物, DCP 可能要优于 AFP。相对于 AFP, DCP 对肝癌的特异性更高, 在慢性肝病病程中, 其升高倾向也相对不明显。它的血清浓度与血清 AFP 水平间无相关性, 但在肝癌患者中明显高于正常人及良性肝病患者。

3.2. 处于实验室研究阶段极具前景的肝癌分子标志物

3.2.1. 高尔基体蛋白 73 (GP73)

GP73 是存在于高尔基体中的一种跨膜蛋白, GP73 在早期肝癌患者血清内表达上调, 近年来有很多研究认为 GP73 是最有潜力的肝癌血清标志物之一。在病毒(HBV 及 HCV)感染及非病毒原因(酒精性肝病及自身免疫性肝炎)引起的肝癌组织中, GP73 水平均显著上调[19]。因此, GP73 的表达可能与肝癌进展相关, 其在各种病因的肝癌中都可以体现出高表达, 提示该蛋白对肝癌的病因学诊断可能并无帮助, 但可以作为肝癌的总体诊断标志物[20]。

3.2.2. 磷脂酰基醇蛋白聚糖 3 (GPC3)

GPC3 是一种膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白, GPC3 亦名 MXR7, MXR7 基因在肝癌组织中呈高水平表达, 其表达的时空分布与 AFP 基因很相似[21]。目前多采用实时荧光定量 PCR 方法检测外周血 MXR7 mRNA 的含量, 从转录水平判断血液中游离癌细胞的存在, 从而提高 HCC 的早期诊断率, GPC3 在健康人群和肝炎患者肝细胞中不表达, 在肝癌细胞中高表达, 可与其他指标联合检测协同诊断 HCC [22]。

3.2.3. 血清 miRNA

血清 miRNA 是一种高度保守的单链非编码小 RNA, 长度为 20~25 个核苷酸。它通过调控靶基因的表达, 大量研究表明 miRNA 在肿瘤中起着促癌基因或抑癌基因的作用, 并能同时调节多个靶基因, 参与肿瘤的发生发展[23]。因此, 肝癌患者和正常人血清样本中表现出显著差异的 miRNA 可能对肝癌患者的诊断和预后有着潜在的指示作用[24]。血清 miRNA 作为生物分子标志物已展现出良好的应用前景, 不仅有助于肝癌的早期诊断和预后评价, 还有助于创建一种新的治疗模式。

4. 肠道微生物作为新的肝癌标志物

肠道微生物群由细菌、病毒、真菌和寄生虫组成, 在许多疾病中被改变, 并可能严重影响癌症风险

[25]。通过采集粪便样本提取 DNA, PCR 扩增提取的 DNA 样本, 构建 DNA 文库, 并进行高通量测序, 采用操作分类单元 OTUs 分析方法对菌群进行分类注释, 构建 OTU 生物标志物识别与疾病发生概率, 从而得知促进 HCC 发展的肠道微生物。使用多种研究方法分析微生物组, 通过对病例状况的严格验证, 来提高预防、筛查和治疗来降低癌症发病率和死亡率的转化机会。正常肠道菌群在正常微生态的情况下是没有致癌作用的, 肠道菌群的失衡包括对乳酸菌、双歧杆菌和肠球菌的显著抑制, 以及大肠杆菌和奇异菌属的显著增长[26]。一旦肠道菌群失调, 可导致肠道屏障功能受损、肠道通透性增加、细菌过度生长及其各种代谢物等移位进入肠外器官, 过度激活机体免疫系统, 引起异常免疫反应, 导致肝细胞凋亡坏死, 从而有可能导致肝癌发生[27]。Qin Nan 等人通过对 98 例肝硬化患者和 83 例健康对照患者的比较, 分析了肝硬化患者肠道菌群的特征, 得出 HCC 的发展与肠道菌群有关[28]。因此, 微生物靶向生物标志物可能是诊断不同疾病的有力工具。

益生菌是一种活的微生物, 在适当的剂量下, 它们会给宿主带来益处。益生菌发挥抗癌作用的机制包括它们与致癌物质结合的能力、肠道菌群的调节、肠道屏障功能的改善以及免疫调节, 益生菌可以通过调节肠道菌群抑制 HCC 的生长[29]。益生菌被认为是预防或治疗肝癌的一种新颖、安全、有效的方法。成功的益生菌菌株需要能够通过上消化道生存, 繁殖, 和在肠道中发挥作用[30]。它们大多来自人类, 乳酸菌和双歧杆菌菌株是发酵乳制品中常用的益生菌。

5. 展望

综上所述, 早期诊断对肝癌患者的治疗、预后意义重大。随着相关研究的深入, 新的肝癌标志物不断被发现, 找到肝癌发病早期特异的生物标志物, 对肝癌的诊断和治疗是至关重要的。虽然肝癌血清标志物的研究在近年取得了很大进展, 一些有潜在应用价值的候选标志物相继出现, 绝大部分的标志物尚停留在实验室研究阶段, 能为临床应用提供商品化试剂的也仅有 AFP、AFP-L3、DCP 等少数几种标志物。肠道微生物作为特殊疾病的预测手段(包括二型糖尿病、肝硬化和结直肠癌)已经取得了进展, 人体肠道微生态与肝病密切相关, 其作为肿瘤或特定疾病的无创诊断标志物具有潜在的可能性。肠道微生物靶向生物标志物是早期诊断肝癌的无创工具, 通过控制肠道微生物群探索益生菌在预防肝癌方面的益处的研究仍在进行中。相信随着基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等系统生物学技术与高通量分析方法的发展和进步, 将从根本上大大加快肝癌早期分子诊断标志物的筛选和鉴定[31]。

参考文献

- [1] Vineis, P. and Wild, C.P. (2014) Global Cancer Patterns: Causes and Prevention. *Lancet*, **383**, 549-557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62224-2)
- [2] 王丹霞, 全文婕, 史晓欣, 等. 肝癌早期诊断标志物及其检测方法的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2016, 6(1): 15-20.
- [3] Yu, L.X. and Schwabe, R.F. (2017) The Gut Microbiome and liver Cancer: Mechanisms and Clinical Translation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14**, 527-539. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.72>
- [4] Ren, Z., et al. (2018) Gut Microbiome Analysis as a Tool towards Targeted Non-Invasive Biomarkers for Early Hepatocellular Carcinoma. *Gut*, gutjnl-2017-315084.
- [5] 周进学. 基于肿瘤基因高通量捕获测序技术的肝癌分子分型研究[D]: [博士学位论文]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [6] Wooden, B., et al. (2017) Using Big Data to Discover Diagnostics and Therapeutics for Gastrointestinal and Liver Diseases. *Gastroenterology*, **152**, 53-67. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.065>
- [7] Brehahn, K., Gores, G. and Schirmacher, P. (2011) Strategies for Hepatocellular Carcinoma Therapy and Diagnostics: Lessons Learned from High Throughput and Profiling Approaches. *Hepatology*, **53**, 2112-2121. <https://doi.org/10.1002/hep.24313>
- [8] 邵雪. 基于 HPLC/TripleTOF-MS/MS 技术慢性乙型肝炎感染不同阶段的代谢组学研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2012.

- [9] Takashima, M., *et al.* (2006) Proteomic Analysis of Autoantibodies in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Proteomics*, **6**, 3894-3900. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500346>
- [10] 李克, 曹璐颖. 血清蛋白质组学技术在肿瘤血清标志物筛选中的应用[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(9): 18-21.
- [11] Mustafa, M.Z., *et al.* (2016) Autoantibody Signatures Defined by Serological Proteome Analysis in Sera from Patients with Cholangiocarcinoma. *Journal of Translational Medicine*, **14**, 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0751-2>
- [12] 同颖娜, 李丹. microRNA 的液体芯片检测方法[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(3): 200-202.
- [13] 梁惠仪, 彭娟, 李明, 等. 液体芯片技术定量测定人体血清 CEA、AFP、NSE 和 tPSA [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4): 266-271.
- [14] Chen, L., *et al.* (2010) Enhanced Detection of Early Hepatocellular Carcinoma by Serum SELDI-TOF Proteomic Signature Combined with Alpha-Fetoprotein Marker. *Annals of Surgical Oncology*, **17**, 2518-2525. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1038-8>
- [15] Lu, H.B., *et al.* (2010) Five Serum Proteins Identified Using SELDI-TOF-MS as Potential Biomarkers of Gastric Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **40**, 336-342. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp175>
- [16] Della, C.C., *et al.* (2016) Early Diagnosis of Liver Cancer: An Appraisal of International Recommendations and Future Perspectives. *Liver International*, **36**, 166-176. <https://doi.org/10.1111/liv.12965>
- [17] Huang, T.S., *et al.* (2013) Diagnostic Performance of Alpha-Fetoprotein, Lens Culinaris Agglutinin-Reactive Alpha-Fetoprotein, Des-Gamma Carboxyprothrombin, and Glypican-3 for the Detection of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol. *Systematic Reviews*, **2**, 37. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-2-37>
- [18] 梁广舒, 顾志冬. 脱- γ -羧基凝血酶原的基础和临床研究进展[J]. 诊断学理论与实践, 2016(5): 532-536.
- [19] Jiang, K., *et al.* (2016) Aberrant Expression of Golgi Protein 73 Is Indicative of a Poor Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology Reports*, **35**, 2141-2150. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4601>
- [20] Maitra, A. and Thuluvath, P.J. (2004) GP73 and Liver Disease: A (Golgi) Complex Enigma. *The American Journal of Gastroenterology*, **99**, 1096-1098. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40410.x>
- [21] Ning, S., *et al.* (2012) Glypican-3, a Novel Prognostic Marker of Hepatocellular Cancer, Is Related with Postoperative Metastasis and Recurrence in Hepatocellular Cancer Patients. *Molecular Biology Reports*, **39**, 351-357. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0745-y>
- [22] Kandil, D., *et al.* (2007) Glypican-3 Immunocytochemistry in Liver Fine-Needle Aspirates: A Novel Stain to Assist in the Differentiation of Benign and Malignant Liver Lesions. *Cancer*, **111**, 316-322. <https://doi.org/10.1002/encr.22954>
- [23] Pogribny, I.P. (2018) MicroRNAs as Biomarkers for Clinical Studies. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, **243**, 283-290. <https://doi.org/10.1177/1535370217731291>
- [24] Wen, Y., *et al.* (2015) Plasma miRNAs as Early Biomarkers for Detecting Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer*, **137**, 1679-1690. <https://doi.org/10.1002/ijc.29544>
- [25] Vogtman, E. and Goedert, J.J. (2016) Epidemiologic Studies of the Human Microbiome and Cancer. *British Journal of Cancer*, **114**, 237-242. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.465>
- [26] Wan, M. and El-Nezami, H. (2018) Targeting Gut Microbiota in Hepatocellular Carcinoma: Probiotics as a Novel Therapy. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, **7**, 11-20. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2017.12.07>
- [27] 刘珍, 邓天好, 尹抗抗, 等. 肝复方对原发性肝癌模型小鼠肠道菌群影响的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(7): 167-169.
- [28] Qin, N., *et al.* (2014) Alterations of the Human Gut Microbiome in Liver Cirrhosis. *Nature*, **513**, 59-64. <https://doi.org/10.1038/nature13568>
- [29] Tozun, N. and Vardareli, E. (2016) Gut Microbiome and Gastrointestinal Cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **50**, S191-S196. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000714>
- [30] 李可欣, 马浩然, 张男男, 等. 肠道菌群在肝癌中的作用研究进展[J]. 实用医学杂志, 2018(9): 1575-1578.
- [31] Rozeik, M.S., *et al.* (2017) Evaluation of CD44 and CD133 as Markers of Liver Cancer Stem Cells in Egyptian Patients with HCV-Induced Chronic Liver Diseases versus Hepatocellular Carcinoma. *Electron Physician*, **9**, 4708-4717. <https://doi.org/10.19082/4708>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org