

# Detection and Application of Circulating-Free Cell DNA in Hepatopathy

Ken Chen, Hong Zhang

Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong  
Email: zhangh111@sina.com

Received: Jan. 3<sup>rd</sup>, 2013; revised: Jan. 28<sup>th</sup>, 2013; accepted: Feb. 19<sup>th</sup>, 2013

**Abstract:** Circulating-free cell DNA (cfDNA) is a class of extracellular DNA without cellular structure, presenting extensively in human body fluids. Recently, cfDNA has gradually received more attention, and extensive studies have indicated the relationship between cfDNA and clinical diseases. Here, we review the researches about detection of cfDNA and the research progress about cfDNA in liver disease in recent years.

**Keywords:** Circulating-Free Cell DNA; Detection; Hepatopathy

## 循环无细胞 DNA 检测及在肝病中的研究应用

陈 磊, 张 弘

南通大学附属医院消化内科, 南通  
Email: zhangh111@sina.com

收稿日期: 2013 年 1 月 3 日; 修回日期: 2013 年 1 月 28 日; 录用日期: 2013 年 2 月 19 日

**摘 要:** 循环无细胞 DNA 是一种无细胞状态的胞外 DNA, 广泛存在于人体体液中。近年来, 对循环无细胞 DNA 的研究逐渐受到人们的重视, 越来越多的研究将循环无细胞 DNA 与临床疾病的关系联系起来。现将近年来有关循环无细胞 DNA 检测的研究及循环无细胞 DNA 在肝病中的研究进展作一综述。

**关键词:** 循环无细胞 DNA; 检测; 肝病

### 1. 引言

游离循环核酸(free circulating nucleic acids)是一种存在于动植物和人体体液中的细胞外游离状态的核酸, 包括循环无细胞 DNA(circulating-free cell DNA, cfDNA)和循环无细胞 RNA(circulating-free cell RNA, cfRNA)。其中, cfDNA 是一种无细胞状态的胞外 DNA, 广泛存在于人体的血清和血浆等体液中。近年来, 对 cfDNA 的研究逐渐受到人们的重视, 越来越多的研究将 cfDNA 与临床疾病的关系联系起来。现将近年来 cfDNA 在肝病中的研究进展作一综述。

### 2. cfDNA 的来源和意义

1948 年, 法国科学家 Mandel 和 Metais 发表了人血浆中存在细胞外核酸的惊人发现, 由于当时的技术限制, 一直未引起注意<sup>[1]</sup>。几十年后, 研究植物冠瘿肿瘤的 Anker 和 Stroun 发现, 这些植物肿瘤的继发转移是通过循环无细胞核酸而不是完整的细胞, 其随后的研究表明, 从癌症病人血浆或血清中分离出的 cfDNA 隐藏一些肿瘤相关改变。1977 年 Leon 等用免疫法发现肿瘤患者血清 cfDNA 主要来源于肿瘤细胞, 浓度水平达 $(180 \pm 38) \text{ ng/ml}$ <sup>[2]</sup>, 尽管肿瘤患者血清

cfDNA 产生的机制尚未完全了解,但是多数研究表明主要来源于肿瘤细胞的坏死或凋亡、微转移灶或循环肿瘤细胞的裂解和增殖旺盛的肿瘤细胞释放。1999 年 Lo 等人分别在鼻咽癌患者和黑色素瘤患者血浆中发现 EB 病毒相关性 mRNA 和酪氨酸激酶 mRNA<sup>[3,4]</sup>。而健康人血清中仅存在少量 cfDNA,主要来源于细胞核 DNA 和线粒体 DNA,含量维持在较恒定的低水平,常小于 $(13 \pm 3)$  ng/ml。在各种癌症中,cfDNA 与癌细胞 DNA 有一些共性,目前,检测肿瘤相关 cfDNA 应用较多的是 K-ras 基因和 p53 基因。K-ras 基因是最常见的原癌基因之一,在多种肿瘤中存在点突变,尤其在胰腺癌和结肠癌中发生率较高,但这些基因突变在正常人的血清/血浆中不会出现。P53 基因是最常见的肿瘤抑制基因之一,其突变在肺癌、乳腺癌、头颈部癌和结肠癌患者血清/血浆中已经被检测到。

最近,对 cfDNA 的研究逐渐受到人们的重视,越来越多的研究将 cfDNA 与临床疾病的关系联系起来。CA125-cfDNA 可以在卵巢癌尤其卵巢粘液性囊癌诊断和监测中作为血清 CA125 的一个有效的补充<sup>[5]</sup>。心肌梗死病人血清中 cfDNA 显著增高,且 cfDNA 与 CK-MB、肌钙蛋白 I 和肌红蛋白之间没有联系<sup>[6]</sup>。cfDNA 与妊娠相关性疾病、自身免疫病、移植排斥反应、创伤、急救医学等有着密切关系,其检测对疾病的早期诊断、分期、监测、预后判断等有重要意义。有研究发现,当发生异位妊娠时,孕妇血浆总 DNA 和胎儿 DNA 水平均出现不同程度的异常升高,目前通过检测胎儿 cfDNA 已经可以诊断的遗传疾病包括强直性肌营养不良、地中海贫血、囊性纤维化、先天性肾上腺增生等。在 SLE 患者血浆中,cfDNA 的含量明显高于健康人血清水平,且随病情的变化发生波动。器官移植术后,若发生移植排斥反应或移植损伤时,供体或受体的 DNA 可能会释放到血循环中,cfDNA 水平可以作为移植排斥反应的检测指标。创伤病人血浆 cfDNA 水平与损伤程度、病人的预后和并发症有关。

### 3. cfDNA 的检测方法

#### 3.1. 定性分析

肿瘤特异性 cfDNA 改变包括 cfDNA 大小的改变,癌基因的突变、微卫星的改变以及抑癌基因启动子高

甲基化等。

cfDNA 来源于凋亡和坏死的细胞,凋亡时由于程序酶解的结果,自凋亡细胞释放的 cfDNA 大小在 185~200 bp。因此,可以用较长 cfDNA 和较短 cfDNA 的多少来推测来源。Wang 等<sup>[7]</sup>在来自肿瘤病人的血浆标本中,发现长度 400 bp 的 B-肌动蛋白有较高的比率,来自非肿瘤病人的血浆标本, DNA 的长度仅 100 bp。但是, Holdenrieder 等<sup>[8]</sup>在各种类型的癌症病人以及相应的良性疾病病人之间,比较研究了 cfDNA 的大小,认为其大小在恶性与良性组之间并不能进行区分。原癌基因中 K-ras 突变是研究较多的,通常从结肠癌、胰腺癌和肺癌的病人中取得样本。大约 1/4 的结直肠癌和 1/2 的胰腺癌病人的血浆中可以检测到突变的 K-ras 序列。在一个结肠镜的前瞻性研究中,在血浆中检测到得 K-ras 突变占在肿瘤活组织检查中类似突变的 83%。那些肿瘤活组织检查阴性的病人中大约有 1/4 存在 K-ras 突变,这些突变大多是结直肠癌的危险因素。总的来说,在血浆中存在 K-ras 突变的病人有 39%患有结直肠癌,相比之下,只有 3%的病人没有 K-ras 突变。因此,这个试验可能在结直肠癌的筛查中起到作用<sup>[9]</sup>。但是,也有相反意见,认为在肿瘤和 cf-DNA 样本中,发现 K-ras 突变的一致性是相当低的,它取决于肿瘤类型、阶段、大小和转移状况<sup>[10]</sup>。

微卫星是一段重复的 DNA 序列,大小 2~6 bp,因为 DNA 的不同有不同的可变长度,适当的引物可以使其放大 DNA 片段,从而可以用作染色体微卫星标志物,并且这种标志物有一个嵌合体,可以用于肿瘤的分析描述。关于肿瘤病人 cf-DNA 中微卫星的改变,已经有许多研究报告发表,包括头颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌等病人。在头颈癌病人研究中,1/3 显示血清中有一个以上的微卫星标志物与原发肿瘤相符。但是, von Knobloch 等<sup>[11]</sup>用荧光微卫星分析技术研究了膀胱癌病人 17 项微卫星标志物,结果显示:单项微卫星标志物敏感度在 2.6%和 51%之间,而联合所有这些标志物,敏感度增加到 84.5%,用于癌症过筛,微卫星的改变是无用的。

抑癌基因启动子高甲基化是抑癌基因失活的一个重要机制。常用于检测是否发生甲基化的基因有谷胱甘肽 S 转移酶 P1(GSTP1)、O6 甲基鸟嘌呤甲基转

移酶(MGMT)和 P16 等。P16 基因启动子的甲基化检测, 在肺癌和肝癌中较常见。Goessl 等将血浆 GSTP1 甲基化应用于前列腺癌的诊断, 发现 72% 患者的血浆中可检测到, 而良性对照者的组织及血浆中均为阴性。在其他恶性肿瘤中, GSTP1 甲基化发生率远低于前列腺癌, 认为 GSTP1 甲基化对于诊断前列腺癌特异性较好<sup>[12]</sup>。

### 3.2. 定量分析

血清中的核酸(DNA 或 RNA)水平可以准确的反映病原体的复制能力。现有的定量血清中 cfDNA 的方法主要有两类, 一是以聚合酶链反应(PCR)为基础, 如竞争 PCR、荧光定量 PCR 等, 另一类是以核酸杂交为基础, 如斑点杂交试验、纸层析杂交试验和树状 DNA(branched DNA, bDNA)杂交试验等。这些技术均不能做到敏感性、特异性、精确性和稳定性兼顾<sup>[13-15]</sup>。

PCR 技术发展的最为迅速, 最早的是 RT-PCR, 目前, 国内外应用较多的是实时荧光定量 PCR, 检测敏感性和特异性不断提高, 且实现了全自动定量检测, 宜于临床推广。但是, 由于血清中 cfDNA 含量极少, 从中提取游离 DNA 受到限制, 提取 DNA 的浓度和纯度不容易达到理想的效果。

纸层析杂交试验<sup>[16]</sup>利用了毛细作用力使 DNA 分子在膜上移动, 通过杂交作用被固定在膜上反应区的探针捕获, 而未被杂交捕获的 DNA 分子则在毛细作用力下移走。其微量的杂交反应体积提高了杂交速

率。结合纸层析杂交与 bDNA 杂交原理, 采用酶的显色底物显色来快速判断结果, 整个试验操作简便、快速, 不需要特殊仪器, 且避免了 PCR 方法中有致癌危险的溴化乙锭(EtBr), 适用于一定范围内以核酸杂交为基础的病原体的快速检测。

bDNA 杂交技术是新近发展起来的一项新技术, 可在组织和细胞水平上对特异性基因进行亚细胞定位和一定水平的定量分析, 具有很高的灵敏性和特异性, 不仅可以用于 DNA 或 RNA 的检测, 也可以用于检测细胞内基因的表达水平, 应用前景非常广阔。bDNA 杂交技术与 PCR 技术相比, 它只放大杂交信号, 不扩增靶序列, 因而不存在假阳性<sup>[17-19]</sup>。该技术最初用于病毒核酸的检测, 如人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)RNA、乙肝病毒(HBV)DNA、巨细胞病毒(CMV)DNA 等, 进一步应用于细胞内 mRNA 表达水平的检测和定量。目前, 一种类似酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)的检测手段, 选择敏感度和特异性较好的重复序列 Alu, 为在亚临床期及时发现肿瘤及其复发或转移提供可能, 该技术示意图见图 1。Alu 家族<sup>[20]</sup>是灵长类基因组特有的含量丰富的中度重复序列, 在基因组中的拷贝数已经超过了 100 万, 每个拷贝长度约 300 bp。基因组全部基因的四分之三都和 Alu 有关(见图 2)。Alu 家族具有很高的同源性(70%~98%)。用分子系统学和分子进化学的方法可确定一致序列(282 bp)。在 Alu 元件的第 170 位置左右有段序列 AGCT, 能被限制性内切酶

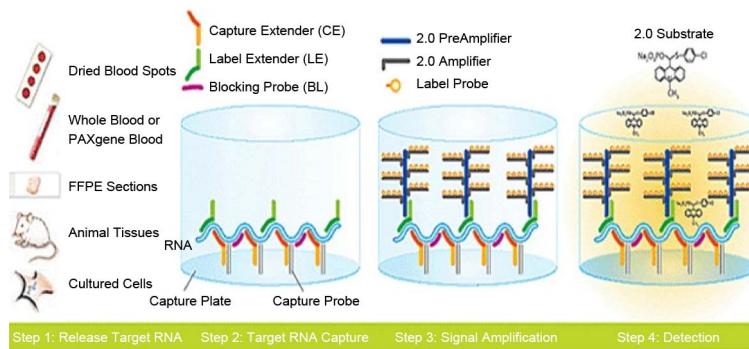


Figure 1. bDNA technology plan  
图 1. bDNA 技术示意图



Figure 2. Alu structure chart  
图 2. Alu 序列结构图

*Alu I* 识别并切割(AG ↓ CT), 这就是 *Alu* 家族名称的由来。*Alu* 序列的两翼存在长度为 7~20 bp 的正向重复序列。*Alu* 元件由两个单体组成, 右单体比左单体多 31 bp, 每个单体保留了一个 RNA 聚合酶 III 的启动子, 然而只有左单体中的启动子才有活性。在两单体之间有一个 A 富含区, 同时在 *Alu* 序列的 3' 翼还有一个长约 200 bp 的 poly (A) 尾, 在 *Alu* 序列中存在大量 Cp G 岛。*Alu* 家族占到了人类基因组的 5%~10%, 以不同的密度分散于整个基因组中, 每个拷贝的平均间隔只有 4 kb, 而实际上可能更加密集, 基因组全部基因的四分之三都和 *Alu* 有关。*Alu* 序列作为人类基因组应用广泛: 第一例癌基因就是利用 *Alu* 序列作为标记物从人肿瘤 DNA 转化的啮齿类细胞系中分离得到的; *Alu* 探针与人细胞基因组 DNA 上的 *Alu* 序列杂交, 通过观测探针的荧光量来判断人细胞的存在与否及存在的数量<sup>[21]</sup>; *Alu*-PCR 通过扩增 *Alu* 序列来判断 DNA 的量, 主要应用于法医学。根据 *Alu* 序列的结构, 分布等生物学特征, 建立一种无需提取血清游离 DNA, 直接以血清为检测样本, 检测血 *Alu* 的 bDNA 的方法。该方法操作简便, 有很好的可重复性, 无同位素污染, 省时, 同时克服了其他杂交法普遍存在的交叉污染<sup>[22]</sup>, 操作过程中温度较低, 更利于细胞完整性的保持。因此, bDNA 杂交技术不失为一个很好的检测技术。

#### 4. cfDNA 在肝病中的研究

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 尽管近年来 HCC 的临床治疗取得了很大的进展, 部分患者得到了较早的诊断并获得了及时的治疗, 但总体的预后情况仍不是十分理想。能够引起肝细胞癌的病因有很多, 其中最重要的一个病因就是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)或丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)的慢性感染。肝炎病毒感染的病原诊断和抗病毒疗效判断主要依赖血清特异性抗原抗体和肝炎病毒 DNA 的检测。

研究显示肿瘤病人的外周血中 cfDNA 的含量明显增加, 伴有转移的肿瘤病人更是高于早期病人, 且在 cfDNA 中可检测到与原发肿瘤细胞相一致的分子遗传学特征。因此, 对外周血 cfDNA 用于 HCC 的研究逐渐受到人们的重视, 越来越多的研究将重点转移

到外周血 cfDNA 与 HCC 的关系上来。

乙型肝炎是我国最常见的高发病率和高死亡率的传染性肝病, 慢性乙型肝炎患者如果得不到及时的诊断和治疗, 有可能进一步发展成为肝硬化, 甚至进一步发展为肝癌, 导致患者死亡。目前, 有关 cfDNA 在肝脏疾病中的相关研究报道不多见, 特别在国内研究报道甚少。肝癌、肝硬化及活动性肝炎患者血浆 cfDNA 水平高于健康人, 伴肝内转移灶或脉管癌栓的 HCC 患者血浆 cfDNA 浓度明显高于不伴有肝内转移灶或脉管癌栓的 HCC 患者血浆 cfDNA 浓度, 且血浆 cfDNA 浓度与肝癌患者肿瘤大小、TNM 分期、2 年无肿瘤生存率、1 年和 2 年总体生存率密切相关<sup>[23]</sup>。我国是一个肝病大国, 肝癌有较高的发病率和死亡率, 尽管近年来, 肝癌的临床治疗取得了很大的进展, 但是由于肝癌早期发现的检出率不高, 影响了肝癌患者的早期手术治疗, 以致肝癌病人的预后仍不是十分理想, 有较高的复发率, 因此, 临床上迫切需要一种能早期准确诊断和迅速提供结果的生物学标记物。国外有学者研究报道, HCC 患者血清 cfDNA 水平高于 HBV 携带者和正常人, 根治性手术治疗后的 HCC 患者的血清 cfDNA 水平较治疗前有所下降, DNA 的完整性与 HCC 患者的血清 AFP 水平和有无肝硬化之间存在着相关性。Ren<sup>[24]</sup>等人对 79 例 HCC 患者血浆 cfDNA 进行了检测, 发现血浆 cfDNA 水平与患者肿瘤的大小和 TNM 分期密切相关, 并与 HCC 的预后呈负相关。国内有学者<sup>[25]</sup>通过研究发现, 血浆 cfDNA 水平, 与 HCC 病人长期生存呈负相关, 可能是 HCC 患者预后独立的影响因子。国内 HCC 病例大多数是由于 HBV 的感染引起的, 因此, cfDNA 可能是预测 HBV 相关 HCC 的前兆性标记物。

丙型肝炎是一种主要经血液传播的肝脏疾病, 丙型肝炎病毒(HCV)的慢性感染可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化, 部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌(HCC), 是欧美及日本等国家终末期肝病的最主要原因。Tokuhisa Y.<sup>[26]</sup>等人应用实时荧光定量 PCR 的方法检测血清中 cfDNA 水平, 在 96 例 HCV 相关的 HCC 病人血清中 cfDNA 水平( $115.9 \pm 98.3$  ng/ml)显著高于 100 例 HCV 携带但没有发展成为 HCC 病人血清中的水平( $34.4 \pm 40.4$  ng/ml), 在 87 例肝切除术后 HCC 病人中, 血清 cfDNA 高水平病人总生存时间明显短于

cfDNA 低水平病人, 血清 cfDNA 水平的增加与肿瘤去分化呈平行关系并且与肿瘤的大小有关, cfDNA 水平可以反映 HCV 相关 HCC 是否发生远处转移, 因此可以作为肝切除术后远处转移的前兆性标记物。

## 5. 展望

检测血清 cfDNA(定量和定性)简便易行、创伤小, 尤其可作为对于手术后无法作组织取样的肿瘤患者的实时监测手段。但是, 目前仍存在不少未解决的问题: 比如患者肝功能异常、免疫状态等对 cfDNA 的影响; 如何提高精确定量分析 cfDNA 的敏感性和特异性, 以期建立能够用于临床的明确的诊断标准和随访指标; 目前检测血清 cfDNA 主要依靠 PCR 技术, 易产生假阳性, 又由于肿瘤的异质性, 即同一肿瘤可表达不同的 DN 水平, 会产生假阴性。因而不断引用新技术, 改进检测思路, 提高灵敏度和特异性。血清 cfDNA 除在临床诊断应用方面的研究外, 有关其来源、性质、动力学等方面仍有很多问题值得探讨。游离核酸对抗体可能产生的作用, 清除机制, 是否参与疾病的发生、发展, 是否参与肿瘤的复发和转移等也都有待进一步研究。

## 参考文献 (References)

- [1] P. Mandel, P. Metais. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l' Homme. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, 1948, 142(3): 241-243.
- [2] S. A. Leon, B. Shapiro, D. M. Sklaroff, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research*, 1977, 37(3): 646-650.
- [3] K. W. Lo, Y. M. D. Lo, S. F. Leung, et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus-associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(8): 1292-1294.
- [4] M. S. Kopeski, F. A. Benko, L. W. Kwak, et al. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5(8): 1961-1965.
- [5] 杨波, 吴小华, 孙东霞等. 卵巢上皮性癌患者血清无细胞 DNA 的检测及临床意义[J]. *肿瘤*, 2008, 28(4): 334-337.
- [6] R. R. Jing, J.-H. Zhu, H.-M. Wang, et al. A sensitive method to quantify human circulating free DNA in blood: Relevance to myocardial infarction screening. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(13): 1074-1079.
- [7] B. G. Wang, H. Y. Huang, Y. C. Chen, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Research*, 2003, 63(14): 3966-3968.
- [8] S. Holdenrieder, A. Burges, O. Reich, et al. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1137: 162-170.
- [9] M. S. Kopeski, F. A. Benko, D. J. Borys, et al. Somatic mutation screening: Identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *National Cancer Institute*, 2000, 92: 918-923.
- [10] Z. M. Shao, J. Wu, Z. Z. Shen, et al. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(8): 2222-2227.
- [11] R. Von knobloch, A. Hegele, H. Brandt, et al. Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *International Journal of Cancer*, 2001, 94(1): 67-72.
- [12] C. Goessl, H. Krause, M. Muller, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Research*, 2000, 60(21): 5941-5945.
- [13] I. J. Marin, M. Poljak, K. Seme, et al. Comparative evaluation of three commercial assays for quantitative measurement of hepatitis B virus DNA in serum samples. *Hepatology*, 2002, 49(47): 1390-1394.
- [14] S. K. Ho, T. M. Chan. An overview of assays for serum HBV DNA. *Clinical Laboratory*, 2000, 46(11-12): 609-614.
- [15] J. Saldanha. Validation and standardization of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *Journal of Clinical Virology*, 2001, 20(1-2): 7-13.
- [16] 傅占江, 范丽娜, 王沛等. 枝状 DNA 信号放大与纸层析杂交检测方法的建立[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(4): 468-469.
- [17] K. J. Livak, S. J. Flood, J. Marmaro, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 1995, 4(6): 357-362.
- [18] J. Hayashi, Y. Kawakami, A. Nabeshima, et al. Comparison of HCV RNA levels by branched DNA probe assay and by competitive polymerase chain reaction to predict effectiveness of interferon treatment for patients with chronic hepatitis C virus. *Digestive Diseases and Sciences*, 1998, 43(2): 384-391.
- [19] M. L. Collins, B. Irvine, D. Tyner, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(15): 2979-2984.
- [20] 罗迪贤, 李凯, 何淑雅等. Alu 家族及其生物学意义[J]. *遗传*, 2005, 27(2): 284-288.
- [21] L. Just, M. Timmer, J. Tinius, et al. Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe. *Journal of Neuroscience Methods*, 2003, 126(1): 69-77.
- [22] G. J. Nuovo, P. MacConnell. Detection of human papilloma virus DNA in formalin-fixed tissues by in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *American Journal of Pathology*, 1991, 139: 847-854.
- [23] 任宁, 钦伦秀, 屠红等. 肝细胞癌病人血浆 DNA 定量分析及其临床意义[J]. *复旦学报*, 2005, 32(2): 134-138.
- [24] N. Ren, L. X. Qin, H. Tu, et al. The prognostic value of circulating plasma DNA level and its allelic imbalance on chromosome 8p in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2006, 132(6): 399-407.
- [25] N. Ren, Q. H. Ye, L. X. Qin, et al. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(24): 3911-3914.
- [26] Y. Tokuhisa, N. Lizuka, I. Sakaida, et al. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2000, 97(10): 1399-1403.