

外泌体miRNA在肝癌中的诊治进展

谭聪聪^{1,2*}, 戴毅², 余华^{3#}

¹成都中医药大学医学与生命科学学院, 四川 成都

²遂宁市中心医院肝胆外科, 四川 遂宁

³成都中医药大学附属医院普外科, 四川 成都

收稿日期: 2024年4月29日; 录用日期: 2024年5月24日; 发布日期: 2024年5月31日

摘要

肝癌(liver cancer)是全球危害人类健康的主要癌症之一, 具有发病隐匿、恶性程度高、治疗效果及预后差等特点。外泌体(Exosomes)是细胞间通讯的重要载体, 是细胞分泌的囊泡, 包含蛋白质、miRNA、mRNA等。近年来, 大量研究表明外泌体microRNA (miRNA)在肝癌发生发展不同时期呈现不同表达, 因此miRNA被认为是肝癌诊断和治疗极具潜力的生物标志物。本文就miRNA作为诊断与治疗的生物标志物在肝癌发展的各阶段最新研究进展进行综述。重点介绍miRNA在肝癌的诊断、治疗及其预后方面的研究进展。

关键词

肝癌, 外泌体, microRNA, 乙肝相关性肝癌, 早期诊断, 靶向治疗

Advances in the Diagnosis and Treatment of Exosomal miRNA in Liver Cancer

Congcong Tan^{1,2*}, Yi Dai², Hua Yu^{3#}

¹School of Medical and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

²Department of Hepatobiliary Surgery, Suining Central Hospital, Suining Sichuan

³Department of General Surgery, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

Received: Apr. 29th, 2024; accepted: May 24th, 2024; published: May 31st, 2024

Abstract

Liver cancer is one of the major cancers jeopardizing human health worldwide, characterized

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 谭聪聪, 戴毅, 余华. 外泌体 miRNA 在肝癌中的诊治进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(5): 2093-2102.

DOI: 10.12677/acm.2024.1451655

by insidious onset, high degree of malignancy, and poor therapeutic effect and prognosis. Exosomes are important carriers of intercellular communication and are vesicles secreted by cells that contain proteins, miRNAs, mRNAs and so on. In recent years, a large number of studies have shown that exosomal microRNAs (miRNAs) are differently expressed at different periods of liver cancer development, and thus miRNAs are considered to be highly promising biomarkers for liver cancer diagnosis and treatment. This article provides a review of the latest research advances on miRNAs as biomarkers for diagnosis and treatment at various stages of liver cancer development and focuses on the research progress of miRNAs in the diagnosis and treatment of liver cancer and their prognosis.

Keywords

Liver Cancer, Exosomes, microRNA, Hepatitis B-Associated Liver Cancer, Early Diagnosis, Targeted Therapies

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

肝癌(liver cancer, LC)是全球危害人类健康的主要肿瘤之一,全世界每年约有 905,677 个新发病例和 830,180 个死亡病例[1]。肝癌患者的疗效与预后在很大程度上取决于其诊断的时期,早期肝癌的预后要远大于晚期肝癌。因此,通过对肝癌的早诊断、早治疗是提高肝癌患者生存率与生命质量的重要保障。

针对肝癌所处的时期,肝癌的主要治疗方法有手术切除、肝移植、射频消融、化疗栓塞术和系统治疗[2] [3]。高强度聚焦超声(海扶技术)也是肝癌治疗的一种有效方法[4] [5] [6] [7], Tan To Cheung 等人的研究表明,尤其是对于晚期肝硬化和肝癌患者,高强度聚焦超声是安全有效的[5], Yongshuo Ji 等人认为:无论肿瘤是否原发或转移,高聚焦超声都可认为是一种安全且有效的治疗方法[7]。但是尽管目前肝癌的治疗方法众多,但肝癌的治疗效果仍欠佳,5 年生存率低。

CT 和 MRI 等影像学方法为肝癌的诊断提供了巨大的价值,但在微小肝癌的诊断方面却限制了其应用[8]。而作为金标准的穿刺活检和病理学检查,却因为其有创性不适用于大规模筛查和早期诊断,并且在疾病早期,穿刺活检也存在一定的假阴性率[9] [10]。甲胎蛋白(AFP)是临床医生最常用的肝癌诊断的非侵入性生物标志物,也因其敏感性和特异性相对较低而限制了应用[11] [12] [13], AFP 高于 20 ng/ml 应进行检查排除肝癌,但其敏感性只有 62.4%,特异性为 89.4% [13]。

随着分子生物学的不断发展,对高风险人群监测和早期诊断的技术也在不断更新。

外泌体(Exosome),是细胞内容酶体微粒内陷形成的多囊泡体。与循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)和循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)共同作为液体活检技术最早应用的生物标志物[14] [15] [16]。外泌体性质稳定且广泛存在于各种体液中,故其可作为各种疾病早期诊断的生物标志物[17] [18]。作为细胞间信息传递与物质交换的载体,外泌体广泛存在于各类体液中,通过对肿瘤细胞分泌的外泌体提取与合成,可实现肿瘤的早期诊断与治疗。

作为常见的外泌体,miRNA 是一种短非编码 RNA,长度约为 22 个核苷酸。miRNA 在特定疾病中的过表达和低表达使之可以成为疾病诊治的有效生物标志物。在肝癌发展的各个时期,miRNA 呈现不同的表达。

本文将总结近年来 miRNA 在乙肝相关性肝癌和肝癌发生发展不同时期的表达特点,并介绍其在乙肝相关性肝癌和肝癌诊断和治疗中的进展。

2. miRNA 与 HBV 相关性肝癌

2.1. miRNA 在 HBV 相关性肝癌诊断中的作用

在 HBV 相关性肝癌细胞和组织中,miR-1271-5p 呈低表达,因此,通过对细胞与组织中的 miR-1271-5p 检测,可实现对 HBV 相关性肝癌的早期诊断[19]。miR-768-3p 在 HBV 相关肝癌中低表达,其高表达可抑制细胞增殖、迁移和侵袭,这说明 miR-768-3p 是 HBV 相关性肝癌的潜在诊断标志物[20]。miR-487b 过表达与肿瘤淋巴结转移分期和巴塞罗那临床肝癌分期相关。Xiangang Cao 等人的实验也证实 miR-487b 高表达可促进细胞增殖、迁移和侵袭[21]。Asahiro Morishita 等人的研究表明:miR-210-3p 是 HBV 相关性肝癌中唯一表达增强的 miRNA 且是关键生物标志物[22]。Li Zhao 等人研究发现血清中高表达的 miR-324-3p 可能参与 HBV 相关性肝癌的进展[23]。因此,miR-487b、miR-210-3p 和 miR-324-3p 均认为在 HBV 相关性肝癌诊断中具有较大潜力。

2.2. miRNA 在 HBV 相关性肝癌鉴别诊断中的作用

对于鉴别肝癌是否由乙肝病毒感染进展导致,相关 miRNA 的研究也阐释了这个问题,比如:miR-487b 在 HBV 导致的肝癌患者中的表达水平要远远高于其他病因来源及健康人,这奠定了 miR-487b 在肝癌病因的鉴别诊断中的价值[24]。miRNA-30b-5p 在 HBV 相关性肝癌患者中的差异性表达使其可作为新型诊断生物标志物[25]。miR-222-3p 在肝癌组织和细胞中呈高表达,但与其他原因导致的肝癌相比,其在 HBV 相关性肝癌中表达更高,这对于不同原因肝癌的鉴别诊断具有重要意义[26]。miR-93-5p 用途更广,血液和尿液来源的 miR-93-5p 均可用于 HBV 相关性肝癌病例,且不受肿瘤分期的影响,对于 HBV 相关性肝癌的诊断,其敏感性超过 85%,特异性超过 93%,除此之外,miR-93-5p 还可用于预测 HBV 相关性肝癌患者的预后[27]。

2.3. miRNA 在 HBV 相关性肝癌治疗中的作用

2.3.1. miRNA 与信号通路相关治疗靶点

MiR-520c-3p-PTEN 促进 EMT 激活 AKT-NF κ B 信号通路,导致 HBV 相关性肝癌进展,miR-520c-3p 可调节 HBV 进展[28]。miR-1271-5p 能抑制 HBV 诱导的肝癌,其机制是竞争性靶向水通道蛋白 5 (AQP5) [19]。miR-361 通过 NF-kappaBp65 抑制 HBV 相关肝癌的进展[29]。miR-0308-3p 作用于 HBV 相关性肝癌的机制是抑制 CDK6 和 CyclinD1 的表达,其高表达可抑制癌细胞的增殖,这对临床上新药物靶点的研发具有及其重要的意义[30]。FOXO1 可促进肝癌细胞的生长、侵袭与转移,miR-374a/b-5p 抑制 HBV 相关性肝癌细胞的凋亡则是通过对 FOXO1 的抑制来实现,通过此机制来实现对 HBV 相关性肝癌的诊治[31]。故通过对 miR-520c-3p、miR-1271-5p、miR-361、miR-0308-3p、miR-374a/b-5p 各自信号通路的调控来实现对肝癌诊治。

2.3.2. miRNA 与乙型肝炎抗原相关治疗靶点

乙型肝炎核心抗原(HBc)通过囊泡相关膜蛋白 2 (VAMP2)轴从而促进 miR-135a-5p 的产生,可使靶向药物的耐药性增加,Xiaocui Wei 等人研究表明:miR-135a-5p/VAMP2 调控轴可在 HBV 相关性肝癌的耐药性方面发挥作用,从而使其成为治疗靶点[32]。miR-203a 被 HBsAg 抑制后促进肝癌的发展,导致预后不良,因此,miR-203a 被认为是 HBV 相关性肝癌的关键治疗靶点,但目前缺乏动物实验验证[33]。

2.3.3. miRNA 与抑制血管生成相关治疗靶点

缺氧诱导因子 1 (FIH-1)具有抑制血管生成的作用, miR-3 被乙肝病毒编码后, 生成 HBV-miR-3, 该物质可以抑制 FIH-1, 从而促进血管生成, 故 miR-3 可作为 HBV 相关性肝癌抗血管生成治疗的新靶点[34]。

2.3.4. miRNA 受 HBX 作用后治疗靶点

miR-1236 和 miR-329 在受到 HBX 干扰后的表达降低从而使 AFP 增加导致肝癌的发生, 该机制的发现使得 miR-1236 和 miR-329 成为 HBV 相关性肝癌治疗的又一途径[35]。miR-155 受 HBX 影响后呈高表达, 加速肿瘤的恶性转化, 研究发现其机制是 PTEN/PI3K-AKT 通路被抑制, 因此, 对 miR-155 的阻断是该类肿瘤治疗靶点的重要研究方向[36]。miR-187 在受到 HBX 影响后促进肝癌进展, 通过对 miR-187 相关轴的调控可实现对 HBV 相关性肝癌的诊治[37]。HBV 感染诱导 miR17-92 和 miR106b-25 的表达增加, miR17-92/miR106b-25 拮抗剂可作为抗肿瘤和抗病毒的双重策略[38]。

2.3.5. miRNA 与 HBV 相关性肝癌其他治疗靶点

miR-124 可以缓解肝炎病毒导致的肝坏死, 但具体机制还不清楚, 相关研究指出可能与 miR-124 降低白介素 6 (IL-6)的表达有关, 这意味着对于由乙型肝炎病毒相关的急性慢性肝衰竭, miR-124 是极具潜力的治疗靶点[39]。miRNA-30b-5p 被认为是糖酵解旁路增殖肿瘤细胞的刺激因子, 从而导致 HBV 相关性肝癌, 因此, 其也是 HBV 相关性肝癌治疗的潜在药物靶点[25]。miR-3 抑制 HBV 复制的机制是 JAK/STAT 信号通路的激活, 使张力蛋白同源物(PTEN)上升, 但是 miR-3 在受到 HBV 的影响后, 会导致 PTEN 下降, 从而有助于 HBV 相关性肝癌的发展, 这为 miR-3 作为 HBV 相关性肝癌治疗靶点开拓了思路[40] [41], PTEN 还是 miR-181a/382/362/19a 的靶标, 因此, miR-181a/382/362/19a 也是 HBV 相关性肝癌的潜在治疗靶点[42]。

miRNA-mRNA 轴的研究也是 HBV 相关性肝癌治疗的方向[43] [44], Danping Huang 等人的研究确定 Hsa-miR-195-5p/CDK1、has-miR-5589-3p/CCNB1 和 has-let-7c-3p/CKS2 可作为 HBV 相关性肝癌生物标志物和治疗靶点[44]。

3. miRNA 与肝癌

3.1. miRNA 在肝癌诊断中的作用

3.1.1. miRNA 相关检测技术的发展

MiRNA 在肝癌早期诊断的相关研究早在 10 年前就吸引了众多研究者的兴趣, Jian Zhou 等人开发了一种 miRNA 组合(miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a 和 miR-801), 通过一系列试验验证, 该组合对肝癌的诊断准确性很高[45]。近些年来, 许多提高 miRNA 检测灵敏度的方法也层出不穷。比如, 将单链 DNA 更换成支链 DNA 后, miRNA 检测的灵敏度提高 2 个数量级[46]; 仿生纳米通道在提高核酸灵敏度检测有巨大潜力, Siqi Zhang 等人设计的纳米通道传感系统是通过级联 INHIBIT-OR 逻辑门来实现对 miR-122 和 miRLet-7a 的检测, 很大程度上提高了检测的阈值[47]。Jiamin Wu 等人通过 SERS 生物传感器使 miRNA-122、miRNA-223、miRNA-21 的检测值分别达到 349 aM、374 aM 和 311 aM [48]。我们团队通过熵驱动催化(EDC)助行器和智能响应 DNAzymewalker 的双助行器生物传感策略检测 miRNA-21, 可使检测限达到 70 fM [49]。

3.1.2. miRNA 在肝癌诊断中的作用

甲胎蛋白(AFP)是目前临床上最常见的肝癌诊断标志物, 但对于原发性肝癌的诊断来说, 甲胎蛋白的敏感度相对较低, 一部分原发性肝癌患者和转移性肝癌患者甲胎蛋白呈阴性, 这让部分患者存在漏诊风险[12]

[13]。miRNA 的出现可以很好地解决该问题[50]，miR-21-5p 在甲胎蛋白阴性的早期肝癌患者中呈现高表达，可作为其早期诊断标志物[50]。has-miR-21-5p/hsa-miR-199a-5p 和 has-miR-155-5p/hsa-miR-199a-5p 比率也是这一类型肝癌潜在的生物标志物[51]。

miR-199a-3p 在肝癌患者中呈现低表达，有研究表明其可以作为肝癌诊断标志物[52]。在早期肝癌患者血清中，miR-107 表达显著增高，这提示 miR-107 在肝癌早期诊断方面具有极大潜力，但值得注意的是，miR-107 与肿瘤分期分级无关[53]。竞争性内源性 RNA (ceRNA) 可作用于 miR-23c，在肝癌细胞或组织中，ceRNA 增高可使 miR-23c 表达下降，这说明 miR-23c 对于肝癌早期诊断具有较大潜能[54]。

相比单一 miRNA 对肝癌诊断来说，多 miRNA 组合、miRNA 与 AFP 组合或者 miRNA 联合影像学方法会在一定程度上提高肝癌诊断的敏感性、特异性和准确性。有研究成果表明：单 miR-21 对肝癌诊断的敏感性、特异性和准确性分别为 64.29%、87.00% 和 75.00%，但联合 CT 后对肝癌诊断的敏感性、准确率可提高至 96.43%、88.68%，但特异性稍有下降，为 80% [55]。这预示这未来对于肝癌早期诊断的研究方向是多方法、多标志物组合的，单一方法或者单一标志物对于肝癌早期诊断在当前尚有挑战，当然，得益于分子生物学与液体活检技术的蓬勃发展，miRNA 相关研究成果正在实现从实验室到临床应用的过渡阶段，相信在未来，单一 miRNA 对于特定肿瘤的早期诊断会真正运用于临床。

3.2. miRNA 在肝癌治疗中的作用

3.2.1. miRNA 在改善靶向药物疗效的作用

miR-3677-3p 与 FBXO31 结合并抑制 FBXO31 表达被认为有助于 HCC 的发展和索拉非尼耐药性[56]。miR-20a 抑制肝癌的增殖和转移的机制是 miR-20a 直接靶向组蛋白甲基转移酶 EZH1，而 UNC1999 作为 EZH1 的抑制剂，可以增加肿瘤细胞对索拉非尼的敏感性，这不失为解决肝癌耐药性的方法[57]。miR-93 在肝癌组织中为高表达，尤其是在顺铂或索拉非尼耐药的肝癌组织中，这是因为 miR-93 可调节肝脏的肿瘤起始细胞(T-IC)，该细胞可被肌管蛋白相关蛋白 3(MTMR3)的 3'-UTR 来调节，miR-93 的干扰使肝癌细胞对顺铂或索拉非尼治疗敏感，这使得 miR-93 成为肝癌治疗的新靶点及 TACE 术后或者靶向药物的标志物[58]。

3.2.2. miRNA 在调节肿瘤信号通路的作用

miR-155 通过调控 SRPK1 在肝癌细胞的增殖与转移来抑制了肝癌细胞的发展[59]。miR-513b-5p 抑制了肝癌的进展与转移则是通过靶向 PIK3R3 来实现的，因此，通过对 miR-513b-5p 的调节可实现对肝癌的治疗[60]。有动物实验表明：小鼠肝癌组织中的 CREB5 显著高表达，说明 CREB5 有致癌的性质，miR-206 抑制肝癌发展的机制是抑制 CREB5 的表达和 PI3K/AKT 信号通路的激活，这为 miR-206 作为肝癌治疗靶点的研究提供了思路[61]。circ-ZEB1 可使 miR-199a-3p 沉默，从而促进 PIK3CA 的表达，进一步促进肝癌的进展，因此还可以通过抑制 circ-ZEB1 来实现对肝癌的治疗[52]。

Xiaobo Nie 等人的实验表明：miR-382-5p 在肝癌组织中呈现高表达，其主要是在体外抑制 NR1H4 基因编码的法尼醇 X 受体(FXR)来促进肝癌细胞增殖，因此，miR-382-5p 是肝癌治疗的重要靶点[62]。F-box 和 WD 重复结构域 7 (Fbxw7)是一种抑癌蛋白，miR-25 通过抑制该蛋白来实现肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭，从而达到肝癌治疗作用[63]。赖氨酸乙酰转移酶 5 (KAT5)和含溴结构域 8mRNA (BRD8mRNA)在肝癌组织中呈高表达，BRD8 被 miR-876-3p 调控后通过调节 KAT5 抑制肝癌细胞发展，促进其凋亡，故 miR-876-3p 是肝癌治疗的重要靶点[64]。

3.2.3. miRNA 在肝癌其他治疗靶点的作用

miR-342-3p 在肝脏肿瘤中的表达呈现双相性，在肿瘤患者中呈低表达，但在肿瘤消退时呈高表达[65] [66] [67]。动物实验表明：腺相关病毒载体介导的 miR-342-3p (AAV-miR-342-3p)的体内给药明显抑制肝

脏肿瘤的发展并提高生存率, 该项研究表面 miR-342-3p 在肝脏肿瘤治疗具有较大潜力[66]。miR-223 抑制肝癌发展的机制是促使程序性细胞死亡 1 (PD-1) T 细胞和程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 的激活, 其关键作用靶点是调节缺氧诱导的肿瘤免疫抑制和血管生成, 这预示着 miR-223 在未来极有可能成为肝癌新的治疗靶点[68]。染色体外环状 DNA (eccDNA) 被认为普遍存在于肝癌基因组中, 最新研究对人 HCC 中的 eccDNA 进行了全面表征, 结果显示: 含有 miRNA-17-92 的 eccRNA 具有促进肿瘤进展的作用, 这一结果对肝癌的发病机制及治疗的研究具有极大的推进作用[69]。

3.3. miRNA 在肝癌预后中的作用

Heqing Huang 等人的研究表明: 与正常组织相比, miR-125b-2-3p 在肝癌组织中呈现低表达, 但 miR-125b-2-3p 下调却提示肝癌患者预后不良[70]。肝纤维化被认为是肝癌发展过程中的一个重要环节, miR-571 的上调与 Notch3 和 Jagged1 的上调呈现正协同效应, 促进肝纤维化的进展[71]。同样与纤维化有关的还有 miR-150-3p, 但其高表达是抑制肝癌迁移和侵袭性, 只有当 miR-150-3p 在癌症相关成纤维细胞 (CAFs) 衍生的外泌体中降低时, 才可导致肝癌的发展与复发[72]。miR-652-3p 高表达促进肝癌细胞的发展、侵袭与转移, 其被作为判断肝癌预后因素的指标[73]。细胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白 3 (CPEB3) 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭起抑制作用, miR-20b-5p 过表达抑制了 CPEB3 的作用, 从而促进了肿瘤的发展, 通过对 miR-20b-5p 表达量的监测来评估患者的预后[74]。miR-638 在肝癌患者中呈现高表达预示肿瘤复发, 其机制是 miR-638 抑制 VE-钙粘蛋白和 ZO-1 的表达导致内皮连接完整性被破坏[75]。

4. 总结与展望

外泌体 miRNA 在 HBV 相关性肝癌及肝癌的发病机制、疾病进展、疾病诊断、治疗与预后中发挥重要作用。miRNA 具有高敏感性、高特异性、非侵入性的特点, 易于被开展临床应用, 较影像学检查, 其可以更早得出诊断; 较病理学活检, 其对组织的损伤几乎可忽略不计; 尤其是在对 AFP 阴性的病例更是突出了其优势。随着像 RT-PCR、Western blotting 等技术的不断升级, 对 miRNA 的提取与分离变得简便, 更有利于 miRNA 相关研究的进行, 除此之外, miRNA 在人体内含量丰富, 通过各种常见的体液即可获取。近年来, miRNA 与 miRNA、miRNA 与其他外泌体, miRNA 与现有方法的组合也受到研究者的喜爱, 使其对肝癌的发病因素、发病机制、诊断、治疗及预后等研究具有巨大的意义。综上, 外泌体 miRNA 在肝癌的研究上具有不可替代的作用和不可估量的价值。

然而, miRNA 的临床应用还有许多需要解决的问题。首先, 外泌体 miRNA 是一个较大的概念且可通过不同的方法对其进行提取, 目前并没有完整的规范与指南使其提取过程标准化, 现有的研究很大一部分并没有说明提取的外泌体 miRNA 是由哪种体液提取, 从而可能出现不同的方法对同一种 miRNA 的提取出现较大数据上的误差, 不同体液来源的同种 miRNA 可能也会出现较大误差, 而且 miRNA 提取过程相对复杂, 对设备和检测技术的要求高。其次, 已在研究的这些 miRNA 基本都面临着同一个问题, 它们对于肿瘤细胞的出现绝大部分都很敏感, 但特异度普遍偏低, 在不同肿瘤的体液中, 基本上都可检测到异常表达。除此之外, 现阶段对 miRNA 确切致病机制并不是特别清楚且研究处于较初期的阶段, 没有对患者的性别、年龄、地区等可能会影响 miRNA 表达量的因素标准化。最后, 当前的研究基本都停留在实验室阶段, 缺少临床数据的支持。

因此, 未来需要我们对现阶段存在的各种问题一一完善。我们需要对 miRNA 相关的概念进行细化, 对操作规范化, 不断提高检测水平技术, 开发出更好的检测方法和试剂。对同种疾病不同时期不同来源的 miRNA 分别进行研究, 多种方法联合, 多种 miRNA 联合, 不断提高诊断效率与治疗效果, 使其尽快转化成临床成果。

基金项目

四川省科学技术厅重点研发项目(2022YFS0201); 四川省中医药管理局面上项目(2023MS637)。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] European Association for the Study of the Liver and European Organisation for Research and Treatment of Cancer (2012) EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **56**, 908-943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- [3] Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., *et al.* (2018) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **69**, 182-236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- [4] Kennedy, J.E., Wu, F., Ter, Haar, G.R., *et al.* (2004) High-Intensity Focused Ultrasound for the Treatment of Liver Tumours. *Ultrasonics*, **42**, 931-935. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2004.01.089>
- [5] Cheung, T.T., Fan, S.T., Chan, S.C., *et al.* (2013) High-Intensity Focused Ultrasound Ablation: An Effective Bridging Therapy for Hepatocellular Carcinoma Patients. *World Journal of Gastroenterology*, **19**, 3083-3089. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.3083>
- [6] Cheung, T.T., Poon, R.T., Jenkins, C.R., *et al.* (2014) Survival Analysis of High-Intensity Focused Ultrasound Therapy vs. Transarterial Chemoembolization for Unresectable Hepatocellular Carcinomas. *Liver International*, **34**, e136-e143. <https://doi.org/10.1111/liv.12474>
- [7] Ji, Y., Zhu, J., Zhu, L., *et al.* (2020) High-Intensity Focused Ultrasound Ablation for Unresectable Primary and Metastatic Liver Cancer: Real-World Research in a Chinese Tertiary Center with 275 Cases. *Frontiers in Oncology*, **10**, Article 519164. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.519164>
- [8] Schraml, C., Kaufmann, S., Rempp, H., *et al.* (2015) Imaging of HCC-Current State of the Art. *Diagnostics*, **5**, 513-545. <https://doi.org/10.3390/diagnostics5040513>
- [9] (2009) Pathologic Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma: A Report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*, **49**, 658-664. <https://doi.org/10.1002/hep.22709>
- [10] Forner, A., Reig, M., Bruix, J. (2018) Hepatocellular Carcinoma. *Lancet*, **391**, 1301-1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)
- [11] Ahn, J.C., Teng, P.C., Chen, P.J., *et al.* (2021) Detection of Circulating Tumor Cells and Their Implications as a Biomarker for Diagnosis, Prognostication, and Therapeutic Monitoring in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **73**, 422-436. <https://doi.org/10.1002/hep.31165>
- [12] Harris, P.S., Hansen, R.M., Gray, M.E., *et al.* (2019) Hepatocellular Carcinoma Surveillance: An Evidence-Based Approach. *World Journal of Gastroenterology*, **25**, 1550-1559. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i13.1550>
- [13] Trevisani, F., D'Intino, P.E., Morselli-Labate, A.M., *et al.* (2001) Serum α -Fetoprotein for Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Liver Disease: Influence of HBsAg and Anti-HCV Status. *Journal of Hepatology*, **34**, 570-575. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00053-2)
- [14] Vaidyanathan, R., Soon, R.H., Zhang, P., *et al.* (2018) Cancer Diagnosis: From Tumor to Liquid Biopsy and Beyond. *Lab on a Chip*, **19**, 11-34. <https://doi.org/10.1039/C8LC00684A>
- [15] Yu, W., Hurley, J., Roberts, D., *et al.* (2021) Exosome-Based Liquid Biopsies in Cancer: Opportunities and Challenges. *Annals of Oncology*, **32**, 466-477. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>
- [16] Cai, X., Janku, F., Zhan, Q., *et al.* (2015) Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends in Genetics*, **31**, 564-575. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.06.001>
- [17] Zhu, Z., Wang, H., Pang, Y., *et al.* (2020) Exosomal Long Non-Coding RNA UCA1 Functions as Growth Inhibitor in Esophageal Cancer. *Aging*, **12**, 20523-20539. <https://doi.org/10.18632/aging.103911>
- [18] Xu, M.L., Liu, T.C., Dong, F.X., *et al.* (2021) Exosomal LncRNA LINC01711 Facilitates Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma via the MiR-326/FSCN1 Axis. *Aging*, **13**, 19776-19788. <https://doi.org/10.18632/aging.203389>
- [19] Li, Z., Ma, L., Di, L., *et al.* (2021) MicroRNA-1271-5p Alleviates the Malignant Development of Hepatitis B Virus-Mediated Liver Cancer via Binding to AQP5. *Molecular Medicine Reports*, **23**, Article No. 386. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12025>
- [20] Cao, C. and Wang, C. (2020) Clinical Significance of Serum MiR-768-3p in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma

- and Its Potential Mechanism. *Clinical and Experimental Medicine*, **20**, 569-576.
<https://doi.org/10.1007/s10238-020-00646-z>
- [21] Cao, X., Yang, Q., Yu, Q. (2020) Increased Expression of MiR-487b Is Associated with Poor Prognosis and Tumor Progression of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Open Forum Infectious Diseases*, **7**, ofaa498.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa498>
- [22] Morishita, A., Fujita, K., Iwama, H., *et al.* (2020) Role of MicroRNA-210-3p in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **318**, G401-G409.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00269.2019>
- [23] Zhao, L., Yang, Q. and Liu, J. (2021) Clinical Value Evaluation of MicroRNA-324-3p and Other Available Biomarkers in Patients with HBV Infection-Related Hepatocellular Carcinoma. *Open Forum Infectious Diseases*, **8**, ofab108.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofab108>
- [24] Li, X., Guo, Y., Wang, X., *et al.* (2021) Clinical Significance of Serum MiR-487b in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma and Its Potential Mechanism. *Infectious Diseases*, **53**, 546-554.
<https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1901981>
- [25] Chen, W., Jiang, J., Gong, L., *et al.* (2021) Hepatitis B Virus P Protein Initiates Glycolytic Bypass in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma via A FOXO3/MiRNA-30b-5p/MINPP1 Axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, Article No. 1. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01803-8>
- [26] Sun, Y., Shi, P., Wu, Q., *et al.* (2021) MiR-222-3p Induced by Hepatitis B Virus Promotes the Proliferation and Inhibits Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma by Upregulating THBS1. *Human Cell*, **34**, 1788-1799.
<https://doi.org/10.1007/s13577-021-00577-1>
- [27] Zhou, G., Zeng, Y., Luo, Y., *et al.* (2022) Urine MiR-93-5p Is a Promising Biomarker for Early Detection of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, **48**, 95-102.
<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2021.06.015>
- [28] Liu, Y., Wang, J., Chen, J., *et al.* (2022) Upregulation of MiR-520c-3p via Hepatitis B Virus Drives Hepatocellular Migration and Invasion by the PTEN/AKT/NF- κ B Axis. *Nucleic Acids*, **29**, 47-63.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.05.031>
- [29] Yu, G., Mu, H., Zhou, H., *et al.* (2021) MicroRNA-361 Suppresses the Biological Processes of Hepatic Stellate Cells in HBV-Relative Hepatic Fibrosis by NF- κ B P65. *Cells & Development*, **167**, Article ID: 203711.
<https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203711>
- [30] Dai, X., Huang, R., Hu, S., *et al.* (2020) A Novel MiR-0308-3p Revealed by MiRNA-Seq of HBV-Positive Hepatocellular Carcinoma Suppresses Cell Proliferation and Promotes G1/S Arrest by Targeting Double CDK6/Cyclin D1 Genes. *Cell & Bioscience*, **10**, Article No. 24. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00382-7>
- [31] Wang, C., Su, K., Lin, H., *et al.* (2022) Identification and Verification of a Novel MAGI2-AS3/MiRNA-374-5p/FOXO1 Network Associated with HBV-Related HCC. *Cells*, **11**, Article 3466.
<https://doi.org/10.3390/cells11213466>
- [32] Wei, X.C., Xia, Y.R., Zhou, P., *et al.* (2021) Hepatitis B Core Antigen Modulates Exosomal MiR-135a to Target Vesicle-Associated Membrane Protein 2 Promoting Chemoresistance in Hepatocellular Carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, **27**, 8302-8322. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i48.8302>
- [33] Qin, Y.F., Zhou, Z.Y., Fu, H.W., *et al.* (2023) Hepatitis B Virus Surface Antigen Promotes Stemness of Hepatocellular Carcinoma through Regulating MicroRNA-203a. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, **11**, 118-129.
- [34] Chen, H., Cao, D., Han, N., *et al.* (2023) Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA (HBV-MiR-3) Inhibits FIH-1 Expression to Promote Tumor Angiogenesis in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, **10**, 2337-2353. <https://doi.org/10.2147/JHC.S436926>
- [35] Zhang, C., Liu, P. and Zhang, C. (2020) Hepatitis B Virus X Protein Upregulates Alpha-Fetoprotein to Promote Hepatocellular Carcinoma by Targeting MiR-1236 and MiR-329. *Journal of Cellular Biochemistry*, **121**, 2489-2499.
<https://doi.org/10.1002/jcb.29471>
- [36] Niu, L.J., Huang, T., Wang, L., *et al.* (2022) HBx Suppresses PTEN to Promote the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma through Mi-R155 Activation. *Annals of Hepatology*, **27**, Article ID: 100688.
<https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100688>
- [37] Deng, Y., Wang, L., Zhang, Y., *et al.* (2023) HBx Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression by Repressing the Transcription Level of MiR-187-5p. *Aging*, **15**, 7533-7550. <https://doi.org/10.18632/aging.204921>
- [38] Mani, S., Yan, B., Cui, Z., *et al.* (2020) Restoration of RNA Helicase DDX5 Suppresses Hepatitis B Virus (HBV) Biosynthesis and Wnt Signaling in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Theranostics*, **10**, 10957-10972.
<https://doi.org/10.7150/thno.49629>
- [39] Wang, J., Zhang, X., Han, J., *et al.* (2023) MicroRNA-124 Expression in Kupffer Cells Modulates Liver Injury by

- Targeting IL-6/STAT3 Signaling. *Antiviral Research*, **211**, Article ID: 105510. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105510>
- [40] Zhao, X., Sun, L., Mu, T., *et al.* (2020) An HBV-Encoded MiRNA Activates Innate Immunity to Restrict HBV Replication. *Journal of Molecular Cell Biology*, **12**, 263-276. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz104>
- [41] Tang, J., Xiao, X., Jiang, Y., *et al.* (2020) MiR-3 Encoded by Hepatitis B Virus Downregulates PTEN Protein Expression and Promotes Cell Proliferation. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, **7**, 257-269. <https://doi.org/10.2147/JHC.S271091>
- [42] Ma, S., Qin, K., Ouyang, H., *et al.* (2020) HBV Infection Exacerbates PTEN Defects in Hepatocellular Carcinoma through Upregulation of MiR-181a/382/362/19a. *American Journal of Translational Research*, **12**, 3780-3791.
- [43] Lou, W., Liu, J., Ding, B., *et al.* (2019) Identification of Potential MiRNA-MRNA Regulatory Network Contributing to Pathogenesis of HBV-Related HCC. *Journal of Translational Medicine*, **17**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1761-7>
- [44] Huang, D.P., Zeng, Y.H., Yuan, W.Q., *et al.* (2021) Bioinformatics Analyses of Potential MiRNA-MRNA Regulatory Axis in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, **18**, 335-346. <https://doi.org/10.7150/ijms.50126>
- [45] Zhou, J., Yu, L., Gao, X., *et al.* (2011) Plasma MicroRNA Panel to Diagnose Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 4781-4788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.2697>
- [46] Cheng, L., Zhang, Z., Zuo, D., *et al.* (2018) Ultrasensitive Detection of Serum MicroRNA Using Branched DNA-Based SERS Platform Combining Simultaneous Detection of α -Fetoprotein for Early Diagnosis of Liver Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 34869-34877. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b10252>
- [47] Zhang, S., Cheng, J., Shi, W., *et al.* (2020) Fabrication of a Biomimetic Nanochannel Logic Platform and Its Applications in the Intelligent Detection of MiRNA Related to Liver Cancer. *Analytical Chemistry*, **92**, 5952-5959. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00147>
- [48] Wu, J., Zhou, X., Li, P., *et al.* (2021) Ultrasensitive and Simultaneous SERS Detection of Multiplex MicroRNA Using Fractal Gold Nanotags for Early Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Analytical Chemistry*, **93**, 8799-8809. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00478>
- [49] Fan, Z., Zhao, X., Dong, Y., *et al.* (2022) Protein-Free, Ultrasensitive MiRNA Analysis Based on an Entropy-Driven Catalytic Reaction Switched on a Smart-Responsive DNAzyme Dual-Walker Amplification Strategy. *International Journal of Biological Macromolecules*, **223**, 931-938. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.084>
- [50] Ghosh, S., Bhowmik, S., Majumdar, S., *et al.* (2020) the Exosome Encapsulated MicroRNAs as Circulating Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma with Low Alpha-Fetoprotein. *International Journal of Cancer*, **147**, 2934-2947. <https://doi.org/10.1002/ijc.33111>
- [51] Eldosoky, M.A., Hammad, R., Elmadbouly, A.A., *et al.* (2023) Diagnostic Significance of Hsa-MiR-21-5p, Hsa-MiR-192-5p, Hsa-MiR-155-5p, Hsa-MiR-199a-5p Panel and Ratios in Hepatocellular Carcinoma on Top of Liver Cirrhosis in HCV-Infected Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 3157. <https://doi.org/10.3390/ijms24043157>
- [52] Liu, W., Zheng, L., Zhang, R., *et al.* (2022) Circ-ZEB1 Promotes PIK3CA Expression by Silencing MiR-199a-3p and Affects the Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 72. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01529-5>
- [53] Loosen, S.H., Castoldi, M., Jördens, M.S., *et al.* (2021) Serum Levels of Circulating MicroRNA-107 Are Elevated in Patients with Early-Stage HCC. *PLOS ONE*, **16**, e247917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247917>
- [54] Xue, S., Lu, F., Sun, C., *et al.* (2021) LncRNA ZEB1-AS1 Regulates Hepatocellular Carcinoma Progression by Targeting MiR-23c. *World Journal of Surgical Oncology*, **19**, Article No. 121. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02176-8>
- [55] Feng, Y.S., Zhou, J.M., Sun, C.H., *et al.* (2021) the Diagnostic Value of MiR-21 Combined with CT in Patients with Liver Cancer. *Clinical and Translational Oncology*, **23**, 1238-1244. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02514-4>
- [56] He, H., Zhou, J., Cheng, F., *et al.* (2023) MiR-3677-3p Promotes Development and Sorafenib Resistance of Hepatitis B-Related Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting FOXM1 Ubiquitination. *Human Cell*, **36**, 1773-1789. <https://doi.org/10.1007/s13577-023-00945-z>
- [57] Zhang, Q., Deng, X., Tang, X., *et al.* (2021) MicroRNA-20a Suppresses Tumor Proliferation and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma by Directly Targeting EZH1. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article 737986. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.737986>
- [58] Li, J., Zhong, X., Wang, X., *et al.* (2021) MiR-93 Regulates Liver Tumor Initiating Cells Expansion and Predicts Chemotherapeutic Response of Patients. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **703**, Article ID: 108871. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108871>

- [59] Wang, Q., Wang, G.T. and Lu, W.H. (2021) MiR-155 Inhibits Malignant Biological Behavior of Human Liver Cancer Cells by Regulating SRPK1. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **20**. <https://doi.org/10.1177/1533033820957021>
- [60] Jin, W., Liang, Y., Li, S., et al. (2021) MiR-513b-5p Represses Autophagy during the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma by Targeting PIK3R3. *Aging*, **13**, 16072-16087. <https://doi.org/10.18632/aging.203135>
- [61] Chi, Y., Gong, Z., Xin, H., et al. (2022) MicroRNA-206 Prevents Hepatocellular Carcinoma Growth and Metastasis via Down-Regulating CREB5 and Inhibiting the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cell Cycle*, **21**, 2651-2663. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2108275>
- [62] Nie, X., Liu, H., Wei, X., et al. (2021) MiRNA-382-5p Suppresses the Expression of Farnesoid X Receptor to Promote Progression of Liver Cancer. *er Management and Research*, **13**, 8025-8035. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S324072>
- [63] El-Mezayen, H., Yamamura, K., Yusa, T., et al. (2021) MicroRNA-25 Exerts an Oncogenic Function by Regulating the Ubiquitin Ligase Fbxw7 in Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, **28**, 7973-7982. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-09778-2>
- [64] Yu, Z., Chen, T., Mo, H., et al. (2020) BRD8, Which Is Negatively Regulated by MiR-876-3p, Promotes the Proliferation and Apoptosis Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells via KAT5. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **693**, Article ID: 108550. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108550>
- [65] Gao, Y., Zhang, S.G., Wang, Z.H., et al. (2017) Down-Regulation of MiR-342-3p in Hepatocellular Carcinoma Tissues and Its Prognostic Significance. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **21**, 2098-2102.
- [66] Komoll, R.M., Hu, Q., Olarewaju, O., et al. (2021) MicroRNA-342-3p Is A Potent Tumour Suppressor in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **74**, 122-134. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.039>
- [67] Xu, C., Sun, W., Liu, J., et al. (2022) MiR-342-3p Inhibits LCSC Oncogenicity and Cell Stemness through HDAC7/PTEN Axis. *Inflammation Research*, **71**, 107-117. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01521-7>
- [68] Fu, Y., Mackowiak, B., Feng, D., et al. (2023) MicroRNA-223 Attenuates Hepatocarcinogenesis by Blocking Hypoxia-Driven Angiogenesis and Immunosuppression. *Gut*, **72**, 1942-1958. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327924>
- [69] Zou, S., Chen, S., Rao, G., et al. (2024) Extrachromosomal Circular MiR-17-92 Amplicon Promotes HCC. *Hepatology*, **79**, 79-95. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000435>
- [70] Huang, H.Q., Chen, G., Xiong, D.D., et al. (2021) Down-Regulation of MicroRNA-125b-2-3p Is a Risk Factor for a Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Bioengineered*, **12**, 1627-1641. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1921549>
- [71] Cong, S., Liu, Y., Li, Y., et al. (2021) MiR-571 Affects the Development and Progression of Liver Fibrosis by Regulating the Notch3 Pathway. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 21854. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00638-3>
- [72] Yugawa, K., Yoshizumi, T., Mano, Y., et al. (2021) Cancer-Associated Fibroblasts Promote Hepatocellular Carcinoma Progression through Downregulation of Exosomal MiR-150-3p. *European Journal of Surgical Oncology*, **47**, 384-393. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.08.002>
- [73] Chi, X., Jiang, Y., Chen, Y., et al. (2021) Upregulation of MicroRNA MiR-652-3p Is a Prognostic Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma and Regulates Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Bioengineered*, **12**, 7519-7528. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1979861>
- [74] Li, Z., Wu, L., Tan, W., et al. (2021) MiR-20b-5p Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation, Migration and Invasion by Down-Regulating CPEB3. *Annals of Hepatology*, **23**, Article ID: 100345. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100345>
- [75] Yokota, Y., Noda, T., Okumura, Y., et al. (2021) Serum Exosomal MiR-638 Is a Prognostic Marker of HCC via Downregulation of VE-Cadherin and ZO-1 of Endothelial Cells. *Cancer Science*, **112**, 1275-1288. <https://doi.org/10.1111/cas.14807>