

液体活检技术在肝癌诊治中的现状和发展

李林翰*, 张大志#

重庆医科大学附属第二医院传染病科, 重庆

收稿日期: 2024年1月27日; 录用日期: 2024年2月21日; 发布日期: 2024年2月28日

摘要

肝癌多是在慢性肝病基础上产生的一种肿瘤。由于其早期诊断率低, 多数患者初诊时已经处于中晚期。随着基因组学技术的发展, 液体活检在肝癌中的应用已被研究得较多。本文主要介绍了循环游离DNA (cfDNA)、循环肿瘤细胞(CTCs)、外泌体在肝癌的诊断、预后评价、疗效监测几个方面的应用。

关键词

肝癌, 液体活检, 早期诊断, 预后

The Current Status and Development of Liquid Biopsy Technology in the Diagnosis and Treatment of Liver Cancer

Linhan Li*, Dazhi Zhang#

Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Jan. 27th, 2024; accepted: Feb. 21st, 2024; published: Feb. 28th, 2024

Abstract

Liver cancer typically arises as a tumor developed from chronic liver disease. The early diagnosis rate for liver cancer is notably low, resulting in the majority of patients being diagnosed at an already advanced stage. The advancements in genomic technology have led to significant research on the utility of liquid biopsy in liver cancer. This article primarily aims to explore and discuss the applications of circulating free DNA (cfDNA), circulating tumor cells (CTCs), and exosomes for di-

*第一作者。

#通讯作者。

agnostic purposes, prognosis evaluation, and treatment monitoring of liver cancer.

Keywords

Liver Cancer, Liquid Biopsy, Early Diagnostic, Prognosis

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

2020年,世界卫生组织发布的《全球癌症报告》显示,肝癌是全球第六最常见的癌症,也是第三大导致癌症相关死亡的原因。据统计,中国60%至80%的肝癌患者在被确诊时已处于中晚期。因此,对肝癌的早期筛查、早期诊断和早期治疗显得尤为重要[1]。穿刺活检或手术切除活检被视为肝癌的金标准诊断方法,而传统的肝癌筛查方法包括甲胎蛋白(AFP)和影像学检查。但穿刺活检和手术切除活检这两种诊断方式创伤较大,患者难以接受;而AFP和影像学检查的敏感度不高[2]。例如,AFP对早期肝癌的灵敏度仅为30%至40%;约有1/3的肝癌患者血清AFP始终为阴性;超声对早期肝癌的灵敏度约为47%;即便是AFP联合超声,其对早期肝癌检测的灵敏度也仅达到63% [3]。因此,现在迫切需要一种早期筛查肝癌的方法,该方法具备较高的灵敏度和特异度。液体活检是在1948年首次提出的一种精准医疗方式,其指通过从人体血液中获得游离的肿瘤信息来反映全身的肿瘤状态。液体活检技术在临床应用中主要分为三个方面,即循环游离DNA(cfDNA)、循环肿瘤细胞(CTCs)和外泌体(exosomes) [4]。

2. 液体活检的内容

2.1. 循环游离DNA

cfDNA是一类长度约为120~180 bp的DNA片段,通常被认为是肿瘤细胞凋亡或细胞坏死后释放到血液循环中的产物。研究表明,肿瘤患者的血清中cfDNA含量明显高于非肿瘤患者[5],与肝细胞癌导致的肝细胞损伤可能有关。此外,这些cfDNA片段上的甲基化状态、基因突变也与肿瘤组织相似[6]。因此,通过对HCC患者的cfDNA进行深度测序,可以检测到肝癌中常见的突变,这为cfDNA作为肝癌诊断指标打下了基础。目前,常见的cfDNA检测方法包括定性检测和定量检测。定量检测方法包括实时荧光PCR,而定性检测方法包括高通量测序(NGS)、数字PCR、微流控芯片以及基于流式技术的磁珠乳液扩增方法(Beaming)等。定性检测和定量检测各有优势。例如,Marika [7]等人使用实时PCR扩增技术对142个血浆样本中的hTERT基因进行定量检测,发现高含量的cfDNA水平与患者肝癌的大小和较晚的HCC分期相关,并与较短的生存期和预后不良相关。因此,定量检测是一种重要的检测手段。然而,定量检测无法确定cfDNA中存在的特定突变类型,而定性检测则可以明确变异类型,如拷贝数变异(CNV)、末端序列(Motif)、片段大小(Fragment size)以及核小体印迹(nucleosome footprint)等多种变异信息。研究人员通过综合分析cfDNA中的多种变异类型可以更好地提高检测的准确性。

2.2. 循环肿瘤细胞

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是肿瘤细胞自发或通过各种医疗操作进入血液循环的现

象。这个概念最早由 Ashworth 医生于 1869 年提出。CTC 通过改变表型从原发肿瘤扩散, 并穿过血管, 其中包括上皮-间充质-间质转化[8]。CTC 在几乎所有实体转移性肿瘤中都能够检测到, 并且在某些早期和中期肿瘤中也存在。CTC 代表了局部病变和远处转移之间的中间阶段。通过检测和测序 CTC, 可以发现与转移行为相关的基因, 并反映肿瘤在患者体内的动态变化[9]。目前, 常见的肝癌 CTC 分子标记物包括 MAGE-1、MAGE3、GPC-3、K19、CD44、hTERT mRNA 等[10], 其中 MAGE 基因已被认为是肝癌的一种特异的转录标记物。除了与临床医生的提示相关的相关基因外, CTC 的数量也在临床中发挥着重要作用, 可以在一定程度上反映患者肿瘤复发的时间和无复发生存期[11]。由于 CTC 在外周血液中数量非常稀少, 因此分离、富集和检测的方法显得非常重要。目前常见的分离和富集方法包括密度梯度离心、免疫磁珠富集和过滤等, 检测方法包括基于 PCR 技术、流式细胞技术和荧光原位杂交等技术方式。

2.3. 外泌体

外泌体(exosome)是由各种细胞分泌的直径在 40~100 nm 的盘状囊泡。它存在于血液、唾液、尿液和母乳中, 内部含有 RNA 和蛋白质。其中包括 mRNA、miRNA、lncRNA 等不同类型的 RNA。细胞分泌的外泌体在信号转导过程中发挥作用, 影响靶细胞, 可能导致细胞损伤和恶性转化。例如, 来自 HCC 的外泌体可以通过 MAPK/ERK 信号通路诱导 HCC 的上皮-间质转化、进展和复发[12], 因此外泌体的检测在液体活检中非常重要。对外泌体的检测包括分离、鉴定和内容物分析。分离方法包括离心法和磁珠分选法等, 鉴定方法包括纳米颗粒跟踪、电子显微镜以及酶联免疫印迹和蛋白印记法等免疫学方法。对外泌体内容物的分析主要使用 PCR 等传统方法, 以及一些新的分析方法, 例如电化学夹心免疫传感器法[13]。

3. 液体活检的应用

3.1. 液体活检在肝癌诊断中的应用

液体活检技术在肝癌中应用非常广泛, 涵盖了早期诊断、治疗和预后评估等领域。首先, cfDNA 在肝癌早期诊断中发挥重要作用。目前国内最大样本量的研究使用了 3234 例临床样本的 cfDNA 进行了研究[14]。通过 NGS 分析 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmc)、核小体足迹(NF)、5'末端基序和片段化的 cfDNA 图谱, 通过对以上多个基因变异指标进行分析, 并经过三组独立的训练集、验证集和测试集充分验证, 稳定可靠的 HIFI 模型被用于肝癌和非肝癌人群的区分。该方法可以很好地用于肝癌患者的早期诊断。此外, Cohen 等人[15]建立了一种肿瘤早筛模型“cancerSEEK”, 通过基因改变和蛋白质双标记的联合分析, 不仅可以提示早期癌症的存在, 甚至可以定位起源器官。该研究设计了一个由 61 个扩增子组成的小组, 通过 PCR 方法分析样本中的肿瘤高频基因突变, 并通过免疫测定平台检测 8 种对区分肿瘤和非肿瘤有用的蛋白标志物, 该方法也被证明在肝癌和非肝癌患者之间具有稳定可靠性(灵敏度为 97%, 特异度为 60%), 特别是对于肝癌的早期诊断, 5 例 I 期肝癌患者的灵敏度达到了 100%。Foda 等人[16]使用 cfDNA 片段分析评估了来自美国、欧盟或香港的 724 名肝细胞癌患者或肝细胞癌平均风险、高风险患者, 使用包含多特征片段的机器学习模型, 在平均风险人群中检测肝癌的敏感度为 88%, 特异度 98%, 高风险个体中分别为 85%、80%, 该方法为肝癌的诊断提供了一种成本较低、性能较高的方法。

除了 cfDNA, 在肝癌早期诊断中, 外泌体也具有优秀的表现。Cho 等人[17]通过分析公共组学数据发现, 来自肿瘤细胞的外泌体 miR-10b-5p 可以作为早期肝癌的诊断标志物, 其灵敏度高达 90.7%, 特异度为 75.0%, AUROC = 0.934, 并且经过了对肝病独立队列血清样本的验证。Li 等人[18]检测了 HCC 患者血清外泌体 miR-320d, 发现了 HCC 患者血清及中的 mi-R320d 表达水平显著降低, 血清外泌体中的 miR-320d 能够高准确度的区分 HCC 患者和健康对照者。

相对于 cfDNA 和外泌体, CTC 在肝癌早期诊断中的应用没有那么广泛, 但仍然有一定作用。CTC 可以在肝癌约 1cm 大小时检测到, 而传统的影像学方法通常只能检测到至少 2 cm 大小的肝癌。Cheng 等人[19]检测了 176 例受试者的不同类型 CTC, 发现了 HCC 组患者外周血中各种类型的 CTC 数量明显多于非肝癌组, 总的 CTC 具有最大诊断价值(AUC 0.77495, 可信区间 0.704~0.834), 总 CTC、AFP 和二者组合的 AUC 分别为 0.774、0.669、0.821。因此, 总 CTC 是比 AFP 更好的肝癌诊断指标。总体来说, 相比于 cfDNA 和外泌体, CTC 在肝癌早期诊断中的应用范围较窄, 可能是因为早期肝癌患者循环中 CTC 数量较少, 使得现有的检测方法难以有效检测。

3.2. 液体活检在肝癌的预后中的应用

Park 等人[20]进行了一个 55 例 HCC 患者的前瞻性研究。所有患者在放疗前及放疗后进行了 cfDNA 的定量检测。研究结果显示, 放疗前具有更高 cfDNA 的患者其分期比低 cfDNA 患者组晚, 肿瘤也较大。放疗后低 cfDNA 组的患者其肿瘤应答率、肝内无衰竭率和局部控制率明显优于高 cfDNA 组。该研究表明, 放疗后的 HCC 患者 cfDNA 与其治疗的结果呈负相关, 且 cfDNA 的水平可以作为放疗后治疗的反映和局部控制的早期预测指标。Takuya 等人[21]分析了未系统治疗的晚期 HCC 患者血浆 cfDNA, 发现了基线 cfDNA 水平低于中位数的患者总生存率更高, 4 周时 cfDNA 与基线 cfDNA 比率可以预测放射学疾病反应。在有肿瘤进展的患者中, 4 周时 cfDNA 浓度显著增加。除了 cfDNA 的含量以外, 其中某些基因也与预后相关。例如在甲基化方面, Li 等人[22]检测了 155 名通过手术切除治疗的 HCC 患者, 检测了 IGFBP7 甲基化状态, Kaplan-Meier 曲线分析显示 IGFBP7 启动子甲基化与总生存期显著相关($p < 0.001$), 它也是 HCC 术后总生存期和早期肿瘤复发的独立预后指标。在预测 HCC 患者的预后上, 对 CTC 的检测也具有一定的能力。Wang 等人[23]为了解决常规检测方法在 CTC 检测中的限制, 使用新型的 SE-iFISH 方法对接收手术切除的肝癌患者进行了全面的 CTC 检测, 并进行了表型和核型特征鉴定, 该研究发现, 术后每 6 ml 血液中大于等于五个细胞的三倍体小型 CTC 与肝细胞癌患者的预后差显著相关, 这提示了对术后患者中, 对特定亚型的 CTC 的检测有助于预测患者肿瘤复发。外泌体的某些 miRNA 下调也与肝癌患者的预后不佳相关。前文提及的 Li [18]等人检测了 HCC 患者血清外泌体 miR-320d, 其表达减少与晚期肿瘤、淋巴结转移和低分化肿瘤相关, 血清外泌体 miR-320d 水平较低的患者总生存期和无病生存期较短, 它是 HCC 的独立不良预后因素。

Cai [24]等人对 34 例行肝切除术的 HCC 患者进行了长期随访, 并对其进行了外周血 cfDNA 检测, 整合了全面的 cfDNA 突变谱, 其评估的肿瘤负荷与影像学结果一致性高。研究者对这些受试者长期的监测发现, cfDNA 能够在影像学发现肿瘤前平均 4.6 个月就发现肿瘤的复发, 并且优于 AFP、DCP 等血清学指标。cfDNA 作为肝癌患者疗效监测有着较高的价值, 甚至能够在影像学发现肿瘤复发前提示肿瘤的复发。Wang 等人[25]对 62 名术后的 HCC 患者外周血进行了 CTC 检测, 发现了复发患者组中总 CTC 数、间质 CTC 数和混合 CTC 数显著高于未复发的患者组, 并且间质 CTC 阳性是复发的独立风险因素, 间质 CTC 阳性患者术后无病生存时间明显缩短($P < 0.001$)。上述试验揭示了 cfDNA、CTC 和外泌体在肝癌患者的预后中都有着举足轻重的作用。

4. 讨论

肝癌是乙肝、丙肝病毒感染、酒精性肝病、自身免疫性肝病等疾病引起的一种常见癌症, 2020 年世界卫生组织发布的《全球癌症报告》显示, 肝癌是全球第六最常见的癌症。由于肝癌的特点, 该疾病常在中晚期才能明确诊断, 因此迫切需要一种简便、快速、准确的筛查方法, 以便早期发现肝癌[26]。目前, AFP 加超声或影像学筛查方式的灵敏度和特异度有限, 而肝穿刺活检或手术切除活检作为“金标准”,

操作上困难且风险较高, 不常被使用。因此, 我们需要一种简便易行、易被接受, 且具有较高灵敏度和特异度的肝癌筛查方式。

液体活检是精准医疗中的一种方法, 通过从人的血液中获得游离的肿瘤信息来反映全身肿瘤情况[27]。液体活检在肝癌的早期诊断、治疗选择和预后预测方面具有独特的价值[28] [29]。液体活检主要包括 cfDNA 检测、CTC 检测和外泌体检测, 每种检测方式都有其优势。例如, cfDNA 和外泌体检测在肝癌的早期诊断方面具有较高的灵敏度和特异度, 而外泌体和 CTC 在预测肝癌患者预后方面有独特的应用, CTC 在评估肝癌切除术后的复发风险方面具有极高的价值。这些生物标志物的动态评估提供了关于肿瘤进展、治疗反应、癌症复发的有价值的信息[30]。

然而, 目前液体活检仍存在一些不足之处。首先, 该技术尚未得到大规模推广, 检测难度和价格较高, 一些基层医院可能无法进行相关检测。其次, 在液体活检的评估方面还存在一些待解决的问题, 由于使用不同的检测方式, 液体活检中的阳性和阴性截断点仍存在争议, 并且在液体活检的检测中尚未完全清楚检测的影响因素, 例如 cfDNA 可能会受到未定潜能的克隆造血(CHIP)的影响[31]。再者, 液体活检技术尚未在各地区和医院得到统一的检测技术标准化, 其诊断标准化仍需进一步发展。综上所述, 液体活检技术是一种具有巨大潜力的新型肝癌诊断方法, 尤其在无法使用影像学检查时具有重要意义。在未来的研究中, 我们需要进一步努力推广液体活检技术, 并解决其所面临的技术和标准化问题。这将有助于提高肝癌的早期诊断率, 并为患者的治疗选择和预后预测提供更准确的依据。

参考文献

- [1] Singal, A.G., Zhang, E., Narasimman, M., *et al.* (2022) HCC Surveillance Improves Early Detection, Curative Treatment Receipt, and Survival in Patients with Cirrhosis: A Meta-Analysis. *Journal of Hepatology*, **77**, 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.023>
- [2] Wang, W. and Wei, C. (2020) Advances in the Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Genes & Diseases*, **7**, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.01.014>
- [3] Tzartzeva, K., Obi, J., Rich, N.E., *et al.* (2018) Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis: A Meta-Analysis. *Gastroenterology*, **154**, 1706-1718.E1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.064>
- [4] Mandel, P. and Metais, P. (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes rendus des séances de la société de biologie et de ses filiales*, **142**, 241-243.
- [5] Van Helden, E.J., Angus, L., *et al.* (2019) RAS and BRAF Mutations in Cell-Free DNA Are Predictive for Outcome of Cetuximab Monotherapy in Patients with Tissue-Tested RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *Molecular Oncology*, **13**, 2361-2374. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12550>
- [6] Lo, Y.M.D., Han, D.S.C., Jiang, P., *et al.* (2021) Epigenetics, Fragmentomics, and Topology of Cell-Free DNA in Liquid Biopsies. *Science (New York, N.Y.)*, **372**, eaaw3616. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3616>
- [7] Piciocchi, M., Cardin, R., Vitale, A., *et al.* (2013) Circulating Free DNA in the Progression of Liver Damage to Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology International*, **7**, 1050-1057. <https://doi.org/10.1007/s12072-013-9481-9>
- [8] Guarino, M. (2007) Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumour Invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 2153-2160. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.011>
- [9] Chen, V.L., Xu, D., Wicha, M.S., *et al.* (2020) Utility of Liquid Biopsy Analysis in Detection of Hepatocellular Carcinoma, Determination of Prognosis, and Disease Monitoring: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **18**, 2879-2902E9. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.019>
- [10] El-Mazny, A., Sayed, M. and Sharaf, S. (2014) Human Telomerase Reverse Transcriptase Messenger RNA (TERT MRNA) as a Tumour Marker for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Arab Journal of Gastroenterology: The Official Publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology*, **15**, 68-71. <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2014.04.001>
- [11] Deng, Z., Wu, S., Wang, Y., *et al.* (2022) Circulating Tumor Cell Isolation for Cancer Diagnosis and Prognosis. *EBioMedicine*, **83**, Article ID: 104237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104237>
- [12] Chen, L., Guo, P., He, Y., *et al.* (2018) HCC-Derived Exosomes Elicit HCC Progression and Recurrence by Epitheli-

- al-Mesenchymal Transition through MAPK/ERK Signalling Pathway. *Cell Death & Disease*, **9**, Article No. 513. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0534-9>
- [13] Doldán, X., Fagúndez, P., Cayota, A., *et al.* (2016) Electrochemical Sandwich Immunosensor for Determination of Exosomes Based on Surface Marker-Mediated Signal Amplification. *Analytical Chemistry*, **88**, 10466-10473. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02421>
- [14] Chen, L., Abou-Alfa, G.K., Zheng, B., *et al.* (2021) Genome-Scale Profiling of Circulating Cell-Free DNA Signatures for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients. *Cell Research*, **31**, 589-592. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00457-7>
- [15] Cohen, J.D., Li, L., Wang, Y., *et al.* (2018) Detection and Localization of Surgically Resectable Cancers with a Multi-Analyte Blood Test. *Science (New York, N.Y.)*, **359**, 926-930.
- [16] Foda, Z.H., Annapragada, A.V., Boyapati, K., *et al.* (2023) Detecting Liver Cancer Using Cell-Free DNA Fragments. *Cancer Discovery*, **13**, 616-631. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0659>
- [17] Cho, H.J., Eun, J.W., Baek, G.O., *et al.* (2020) Serum Exosomal MicroRNA, MiR-10b-5p, as a Potential Diagnostic Biomarker for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, **9**, Article No. 281. <https://doi.org/10.3390/jcm9010281>
- [18] Li, W., Ding, X., Wang, S., *et al.* (2020) Downregulation of Serum Exosomal MiR-320d Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **34**, E23239. <https://doi.org/10.1002/jcla.23239>
- [19] Cheng, Y., Luo, L., Zhang, J., *et al.* (2019) Diagnostic Value of Different Phenotype Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, **23**, 2354-2361. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-04067-y>
- [20] Park, S., Lee, E.J., Rim, C.H., *et al.* (2018) Plasma Cell-Free DNA as a Predictive Marker after Radiotherapy for Hepatocellular Carcinoma. *Yonsei Medical Journal*, **59**, 470-479. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.4.470>
- [21] Watanabe, T., Suzuki, Y., Kuroda, H., *et al.* (2023) Circulating Cell-Free DNA as a Biomarker for Prognosis and Response to Systemic Therapy in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *Oncology*, **101**, 714-722. <https://doi.org/10.1159/000531671>
- [22] Li, F., Qiao, C.Y., Gao, S., *et al.* (2018) Circulating Cell-Free DNA of Methylated Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 Predicts a Poor Prognosis in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma after Hepatectomy. *Free Radical Research*, **52**, 455-464. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1443448>
- [23] Wang, L., Li, Y., Xu, J., *et al.* (2018) Quantified Postsurgical Small Cell Size CTCs and EpCAM(+) Circulating Tumor Stem Cells with Cytogenetic Abnormalities in Hepatocellular Carcinoma Patients Determine Cancer Relapse. *Cancer Letters*, **412**, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.004>
- [24] Cai, Z., Chen, G., Zeng, Y., *et al.* (2019) Comprehensive Liquid Profiling of Circulating Tumor DNA and Protein Biomarkers in Long-Term Follow-Up Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **25**, 5284-5294. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3477>
- [25] Wang, Z., Luo, L., Cheng, Y., *et al.* (2018) Correlation between Postoperative Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, **22**, 633-639. <https://doi.org/10.1007/s11605-017-3619-3>
- [26] Feng, H., Li, B., Li, Z., *et al.* (2021) PIVKA-II Serves as a Potential Biomarker That Complements AFP for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **21**, Article No. 401. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08138-3>
- [27] Shaik, M.R., Sagar, P.R., Shaik, N.A., *et al.* (2023) Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma: The Significance of Circulating Tumor Cells in Diagnosis, Prognosis, and Treatment Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 10644. <https://doi.org/10.3390/ijms241310644>
- [28] Ma, S., Zhou, M., Xu, Y., *et al.* (2023) Clinical Application and Detection Techniques of Liquid Biopsy in Gastric Cancer. *Molecular Cancer*, **22**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01715-z>
- [29] Zhang, Z., Wu, H., Chong, W., *et al.* (2022) Liquid Biopsy in Gastric Cancer: Predictive and Prognostic Biomarkers. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 903. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05350-2>
- [30] Trevisan França De Lima, L., Broszczak, D., Zhang, X., *et al.* (2020) The Use of Minimally Invasive Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, **1874**, Article ID: 188451. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188451>
- [31] Nikanjam, M., Kato, S. and Kurzrock, R. (2022) Liquid Biopsy: Current Technology and Clinical Applications. *Journal of Hematology & Oncology*, **15**, Article No. 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>