

乙肝相关性肝癌生物标志物的研究

金 濠, 唐翌姝*

重庆医科大学附属第一医院医学检验科, 重庆

收稿日期: 2026年2月28日; 录用日期: 2026年3月23日; 发布日期: 2026年4月1日

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)相关肝细胞癌(HCC)是全球主要的癌症负担, 约占所有肝癌病例的50%~80%。生物标志物在HBV-HCC的早期诊断、预后评估和治疗决策中发挥着关键作用。本综述系统总结了组织标志物和血清标志物在HBV-HCC中的研究进展, 重点关注2018年以来发表在JCR 2区及以上期刊的高质量研究。组织标志物方面, GPC3/HSP70/GS三联标志物、Ki-67、p53、 β -catenin、CK19等已被广泛验证用于诊断和预后评估。血清标志物方面, AFP、AFP-L3、DCP (PIVKA-II)及其组合算法(如GALAD评分)显著提高了早期检测能力。新兴的液体活检技术, 包括循环游离DNA (cfDNA)甲基化标志物、HBV整合片段检测、循环肿瘤细胞(CTCs)和外泌体标志物, 为HBV-HCC的无创诊断和监测提供了新途径。本综述旨在为临床医生和研究人员提供HBV-HCC生物标志物领域的最新进展和临床应用指导。

关键词

乙型肝炎病毒, 肝细胞癌, 标志物

A Study on Biomarkers for Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma

Hao Jin, Yishu Tang*

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: February 28, 2026; accepted: March 23, 2026; published: April 1, 2026

Abstract

Hepatitis B virus (HBV)-associated hepatocellular carcinoma (HCC) represents a major global cancer

*通讯作者。

文章引用: 金濠, 唐翌姝. 乙肝相关性肝癌生物标志物的研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(4): 682-691.

DOI: 10.12677/acm.2026.1641295

burden, accounting for approximately 50%~80% of all HCC cases. Biomarkers serve a pivotal role in the early diagnosis, prognostic evaluation and therapeutic decision-making of HBV-HCC. This review systematically summarizes the research progress of tissue biomarkers and serum biomarkers in HBV-HCC, with emphasis on high-quality studies published in JCR Q2 and above journals since 2018. For tissue biomarkers, the triple panel of GPC3/HSP70/GS, Ki-67, p53, β -catenin and CK19 have been extensively validated for diagnosis and prognostic assessment. For serum biomarkers, alpha-fetoprotein (AFP), AFP-L3, des- γ -carboxy prothrombin (DCP, also known as PIVKA-II) and their combined algorithms (e.g., the GALAD score) have significantly improved the capacity of early detection. Emerging liquid biopsy technologies, including circulating free DNA (cfDNA) methylation markers, detection of HBV integration fragments, circulating tumor cells (CTCs) and exosomal biomarkers, provide novel strategies for the noninvasive diagnosis and monitoring of HBV-HCC. This review aims to offer clinicians and researchers the latest advances and clinical application guidance in the field of HBV-HCC biomarkers.

Keywords

Hepatitis B Virus (HBV), Hepatocellular Carcinoma (HCC), Biomarkers

Copyright © 2026 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

乙型肝炎病毒(HBV)感染是肝细胞癌(HCC)的主要危险因素,全球约有 2.9~3 亿慢性 HBV 感染者,其中 15%~40%最终会发展为肝硬化和肝癌[1]。HBV 致癌机制复杂,涉及病毒 DNA 整合、HBx 蛋白致癌作用、慢性炎症和宿主基因组改变等多重途径[2]。早期诊断和准确的预后评估对改善 HBV-HCC 患者的生存至关重要,而生物标志物在这一过程中扮演核心角色。

生物标志物是指可客观测量和评估的生物学特征,用于指示正常生理过程、病理过程或对治疗干预的反应[3]。在 HBV-HCC 领域,生物标志物可分为组织标志物和血清/循环标志物两大类。组织标志物主要通过免疫组化、分子病理学和基因组学方法检测,提供肿瘤微环境和分子分型信息;血清标志物则通过血液检测获得,具有无创、可重复监测的优势[4]。

本综述系统回顾了 2018 年以来发表在高影响力期刊(JCR 2 区及以上)的 HBV-HCC 生物标志物研究,重点关注已验证的诊断标志物、预后标志物和新兴的液体活检技术,旨在为临床实践和未来研究提供参考。

2. HBV 相关肝癌的组织标志物

2.1. 诊断性免疫组化标志物

组织学诊断是 HCC 确诊的金标准,但在小结节和早期病变中,形态学特征可能不典型,需要借助免疫组化标志物辅助诊断[5]。

2.1.1. GPC3/HSP70/GS 三联标志物

Glypican-3 (GPC3)、热休克蛋白 70 (HSP70)和谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase, GS)构成的三联标志物是目前最广泛验证的 HCC 诊断面板[6]。GPC3 是一种癌胚性膜蛋白多糖,在大多数 HCC 中表达,但在正常肝细胞中不表达。HSP70 是应激反应蛋白,在恶性肝细胞中上调。GS 是代谢酶,弥漫强阳性常

反映 Wnt/ β -catenin 通路激活。

临床应用, “ ≥ 2 项阳性”规则显示出较高的特异性($>90\%$), 但敏感性为中等($50\% \sim 80\%$), 因肿瘤分化程度和背景肝病不同而有所变化[6]。该标志物组合特别适用于区分早期/高分化 HCC 与良性/异型增生结节, 尤其在肝活检标本有限时具有重要价值。

2.1.2. 肝细胞谱系标志物

Arginase-1、HepPar-1 和 canalicular pattern (CD10/pCEA) 是确认肝细胞来源的关键标志物, 用于鉴别 HCC 与转移性癌, 特异性和敏感性均较高($>85\%$) [7]。在诊断流程中, 这些标志物应常规应用, 尤其是当转移性肿瘤需要与 HCC 鉴别时。

2.1.3. 血管相关标志物

CD34 用于标记血管内皮, HCC 显示血窦毛细血管化和弥漫性 CD34 表达增加。肿瘤微血管密度 (MVD-CD34) 与复发和较差预后相关, 多项研究显示非肿瘤肝组织中的 CD34 表达可能预测多中心复发 [7]。

2.2. 预后性组织标志物

2.2.1. 抑癌基因和癌基因

p53/TP53: TP53 突变在 HCC 亚群中常见, p53 免疫组化过表达(或缺失)作为替代标志物。TP53 突变/异常 p53 IHC 与不良生存和侵袭性特征相关。在 HBV-HCC 中, R249S TP53 突变是黄曲霉毒素特征性标志, 与 HBV 存在流行病学相互作用[8]。 β -catenin (CTNNB1): 核 β -catenin 免疫组化提示 Wnt 通路激活; CTNNB1 突变可通过测序检测。该亚型特征为特定组织学(常为高分化)、弥漫 GS 染色、免疫排斥现象, 与免疫检查点抑制剂 (ICI) 疗效差相关[9]。评估方法包括核 β -catenin IHC 和/或 CTNNB1 基因测序。TERT 启动子激活/HBV 整合: HBV 整合常靶向 TERT 启动子及其他癌基因, 这在 HBV-HCC 中非常频繁。通过靶向测序或捕获测定检测肿瘤组织中的 HBV 整合事件, 这些整合与 TERT 表达增加、基因组不稳定性及较差预后相关[10]。在 HBV-HCC 中, 检测 HBV 整合/TERT 改变提供机制和预后信息。

2.2.2. 祖细胞/胆管标志物

CK19、EpCAM 和 SALL4 表达提示祖细胞样或“胆管”表型。CK19 阳性 HCC 是一个可重复的高危亚型, 具有更早复发和较差生存, 多项 HBV-HCC 系列研究显示 CK19 阳性与复发相关[11]。CK19 在病理报告中常规应用。

2.2.3. 免疫生物标志物

PD-L1 (程序性死亡配体 1) 免疫组化评分(肿瘤和免疫细胞)用于预测免疫治疗疗效。荟萃分析显示, 较高的 PD-L1 表达与 PD-1/PD-L1 抑制剂更高的客观缓解率相关, 但需注意检测方法和评分标准的选择 [12]。

3. HBV 相关肝癌的血清标志物

血清标志物因其无创性、可重复检测和便于监测的特点, 在 HBV-HCC 的筛查、早期诊断和监测中具有重要临床价值[13]。

3.1. 传统血清标志物

3.1.1. 甲胎蛋白(AFP)

AFP 是最经典和广泛应用的 HCC 血清标志物。在 HBV 相关肝硬化患者中, AFP 联合超声检查可提

高早期 HCC 检出率。荟萃分析显示, 使用 AFP ≥ 20 ng/mL 作为阈值, 敏感性为 60%, 特异性为 80%; 而 AFP > 200 ng/mL 的特异性可达 95% 以上, 但敏感性降低至 30% [14] [15]。

需要注意的是, 约 30%~40% 的早期 HCC 患者 AFP 水平正常 (< 20 ng/mL), 且肝炎急性发作、肝再生和某些良性肝病也可导致 AFP 升高, 限制了其作为单一标志物的应用 [13]。因此, AFP 应与其他标志物和影像学检查联合使用。

3.1.2. 甲胎蛋白异质体 L3 (AFP-L3)

AFP-L3 是 AFP 的岩藻糖基化异构体, 通过 Lens culinaris 凝集素(LCA)反应性检测。与总 AFP 相比, AFP-L3 具有更高的肿瘤特异性, 因为它主要由恶性肝细胞产生, 而不是再生肝细胞 [16]

高灵敏度 AFP-L3 检测方法(μ TAS)可在总 AFP < 20 ng/mL 的患者中检测到 AFP-L3, 有助于早期发现 HCC [17] [18]。研究显示, AFP-L3 $\geq 10\%$ 与 HCC 诊断相关, 联合 AFP 和 DCP 可提高诊断准确性 [19]。

特异性虽高但应用受限: 虽特异度高, 但单独使用价值有限, 需与 AFP 联合检测

3.1.3. 异常凝血酶原(DCP/PIVKA-II)

DCP (des-gamma-carboxy prothrombin), 也称为 PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II), 是由于维生素 K 缺乏或拮抗导致凝血酶原异常羧基化产生的蛋白 [20]。DCP 在 HCC 中高度特异, 不受肝炎或肝硬化的影响。多项研究显示, DCP ≥ 40 mAU/mL 作为阈值, 诊断 HCC 的敏感性为 48%~62%, 特异性为 81%~98% [19] [20]。DCP 与 AFP 互补, 两者联合使用可显著提高诊断性能。

受维生素 K 影响: 维生素 K 缺乏、胆道梗阻或服用维生素 K 拮抗剂(如华法林)时, DCP 水平可能升高, 导致假阳性。特异度有限: 部分肝病患者(如严重肝炎、肝硬化)也可能出现 DCP 轻度升高, 需结合其他指标判断。

3.1.4. GALAD 评分

GALAD 评分是一个综合性诊断模型, 整合了性别(Gender)、年龄(Age)、AFP-L3、AFP 和 DCP 五个参数。该模型通过 logistic 回归算法计算得分, 用于 HCC 早期检测 [21]。多项前瞻性验证研究显示, GALAD 评分在检测早期 HCC (BCLC 0-A 期)方面优于单一标志物, AUC 值达 0.85~0.92 [22]-[24]。在 HBV 相关肝硬化人群中, GALAD 评分特别有价值, 可作为超声检查的补充工具 [23]。

3.2. 新型血清标志物

3.2.1. Dickkopf-1(DKK1)

DKK1 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的拮抗剂。一项大规模多中心研究纳入 833 例 HBV-HCC 患者和 777 例对照, 显示 DKK1 (≥ 2.15 ng/mL) 诊断 HCC 的敏感性为 70.4%, 特异性为 90.2%, 在 AFP 阴性 (< 20 ng/mL) 患者中表现更佳 [25] [26]。

3.2.2. 中期因子(Midkine, MDK)

MDK 是一种肝素结合生长因子, 在 HCC 中过表达。研究显示, 血清 MDK 水平 (≥ 0.6 ng/mL) 诊断 HC 的 AUC 为 0.78, 与 AFP 联合后 AUC 提升至 0.85, 特别适用于 AFP 阴性 HCC 的检测 [27]。

3.2.3. 高尔基体蛋白 73 (GP73)

GP73 在 HCC 患者血清中显著升高。一项中国研究显示, GP73 (≥ 100 ng/mL) 诊断 HCC 的敏感性为 74.6%, 特异性为 97.4%, 在早期 HCC 和 AFP 阴性患者中也显示出良好的诊断价值 [28]。

但受肝纤维化影响: 慢性肝炎、肝硬化患者血清 GP73 水平也可能升高, 影响诊断特异性, 需结合肝功能指标综合判断。

3.2.4. 骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)

OPN 是一种细胞外基质蛋白, 参与肿瘤侵袭和转移。研究表明, 血清 OPN 水平在 HCC 患者中升高, 与肿瘤分期和预后相关, 可作为辅助诊断和预后标志物[29]。

3.3. 病毒学标志物

3.3.1. HBV DNA 水平

高 HBV DNA 载量(>2000 IU/mL 或>10⁴ copies/mL)是 HCC 发生的独立危险因素。REVEAL-HBV 研究显示, HBV DNA 水平与 HCC 风险呈剂量依赖关系, HBV DNA > 10⁶ copies/mL 的患者 HCC 风险是未检测到病毒患者的 6.1 倍[30]。

3.3.2. HBsAg 定量

在低病毒载量(HBV DNA < 2000 IU/mL)的 HBV 感染者中, 高 HBsAg 水平(>1000 IU/mL)仍与 HCC 风险增加相关, 可作为补充的风险分层标志物[31]。

3.3.3. HBV 基因型和变异

HBV 基因型 C 相比基因型 B 与更高的 HCC 风险相关。Pre-S 区缺失、BCP(基本核心启动子)和 PreC(前核心)区突变也与 HCC 发生风险增加有关, 可用于高危人群识别[32] [33]。

4. 液体活检和循环标志物

液体活检技术的发展为 HBV-HCC 的无创诊断、监测和预后评估提供了新途径[34]。

4.1. 循环游离 DNA (cfDNA)甲基化标志物

cfDNA 甲基化是近年来 HCC 液体活检领域的重要突破。肿瘤细胞释放的 cfDNA 携带特异性甲基化模式, 可用于肿瘤检测和溯源[34]。

4.1.1. 单基因甲基化标志物

在肝细胞癌(HCC)的分子诊断研究中, 多项研究已聚焦于单基因甲基化标志物, 并建立了相应的检测技术。其中, SEPT9 基因甲基化检测已获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于结直肠癌诊断, 同时在 HCC 中也被证实具有一定的诊断价值; 此外, RASSF1A、p16、APC 等抑癌基因的启动子区甲基化在 HCC 中呈高频发生态势, 且该类甲基化异常可通过 cfDNA 样本实现无创检测, 为 HCC 的早期诊断提供了潜在分子靶点[35]。

4.1.2. 多基因甲基化 Panel

2019 年 Gut 杂志报道的 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)全基因组图谱分析, 构建了 32 个 5hmC 标志物的 HCC 诊断模型, 在训练集和验证集中 AUC 分别达 0.88 和 0.87, 对早期 HCC (BCLC 0-A 期)的检测敏感性为 85% [35]。

Hepatology 杂志报道的一项大规模多中心研究开发了基于甲基化的 HCC 检测方法(HCCBloodTest), 在发现队列、phase I pilot 和 phase II 临床验证中, 该检测对早期 HCC 的敏感性达 95%, 特异性为 94% [36]。

4.2. cfDNA 基因组学特征

4.2.1. cfDNA 片段组学(Fragmentomics)

cfDNA 的片段长度、末端坐标和覆盖模式携带肿瘤特异性信息。研究显示, HCC 患者 cfDNA 显示

特征性的短片段富集和特定基因组区域覆盖度改变, 可用于 HCC 检测和组织溯源[37] [38]。

4.2.2. HBV 整合片段检测

循环 cfDNA 中可检测到 HBV-人类基因组整合片段。由于 HBV 整合是 HCC 的致癌驱动事件, 检测循环 HBV 整合片段具有高度肿瘤特异性。全基因组测序研究显示, 循环 HBV 整合片段可用于 HBV-HCC 的早期检测和微小残留病灶(MRD)监测[39]。

4.2.3. 体细胞突变检测

通过超深度靶向测序(NGS)检测 cfDNA 中的体细胞突变(如 TERT 启动子、TP53、CTNNB1 等), 可实现 HCC 的无创分子分型和动态监测。研究显示, 在 HCC 患者中 cfDNA 突变与组织突变的一致性达 70%~85% [40]。

4.3. 循环肿瘤细胞(CTCs)

CTCs 是从原发或转移灶脱落进入外周血的肿瘤细胞, 可提供实时的肿瘤生物学信息[41]。

4.3.1. CTCs 检测技术

ImageStream 流式细胞成像系统结合多重免疫荧光标记(EpCAM、CK8/18/19、CD45 等)可实现 CTCs 的高灵敏度检测和表型分析[41]。

4.3.2. 肝癌干细胞样 CTCs

表达肝癌干细胞标志物(EpCAM+、CD133+、CD90+)的 CTCs 与 HCC 术后复发和较差预后密切相关。一项前瞻性研究显示, 术后检测到 ≥ 2 个 EpCAM+ CTCs 的患者复发风险显著增加(HR = 5.2) [42] [43]。

4.4. 外泌体和细胞外囊泡(EVs)

外泌体是细胞分泌的纳米级膜性囊泡, 携带蛋白质、核酸(mRNA、microRNA、lncRNA)和脂质等生物活性分子[44]。

4.4.1. 外泌体蛋白质标志物

蛋白质组学分析发现多个外泌体蛋白标志物在 HCC 中特异性表达, 如 GPC3、CD147、EpCAM、AFP 等, 可通过 ELISA 或液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)检测[45] [46]。

4.4.2. 外泌体 miRNA

外泌体 miRNA 在 HCC 诊断和预后预测中显示出巨大潜力。研究发现, 外泌体 miR-21、miR-10b、miR-122、miR-223 等在 HCC 患者血清中显著改变, 可构建诊断 panel [47] [48]。一项研究开发了包含 7 个 miRNA (miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a、miR-801)的 HCC 诊断模型, 在训练集和验证集中 AUC 分别为 0.941 和 0.864 [49]-[51]。

5. 生物标志物的临床整合与未来展望

5.1. 多标志物联合策略

在疾病诊断中, 单一生物标志物往往存在灵敏度或特异性偏低的局限, 难以满足临床精准诊断的需求, 因此多标志物联合检测已成为提升诊断性能的关键策略。目前常用的联合模式主要包括三类: 血清蛋白标志物组合, 如 GALAD 评分体系及 AFP + AFP-L3 + DCP 三联检测方案; 血清标志物与影像学检查联合, 通过整合分子指标与影像特征构建综合风险评分模型, 实现优势互补; 液体活检多维度信息整合, 即融合 cfDNA 甲基化、基因突变、片段组学及蛋白标志物等多组学数据, 进一步提升诊断的精准性

与可靠性。

5.2. 人工智能和机器学习的应用

人工智能(Artificial Intelligence, AI)及机器学习(Machine Learning, ML)技术已成为医学科研领域的重要研究方向。其中,机器学习算法可有效整合基因组学、转录组学、蛋白质组学及影像组学等多维度生物标志物数据,构建精准的疾病诊断、预后评估及治疗反应预测模型。深度学习作为机器学习的重要分支,在 cfDNA 片段组学特征解析及影像学辅助诊断中已展现出独特优势,为进一步提升临床检测效能提供了新的技术路径。

5.3. 新标志物发现

肝细胞癌(HCC)新分子标志物的挖掘,是进一步优化疾病早期诊断、预后评估及个体化诊疗的关键。目前,新标志物的发现主要聚焦于三个核心研究方向:一是多组学数据整合策略,通过系统性整合基因组学、表观基因组学、转录组学、蛋白质组学及代谢组学数据,实现 HCC 诊断及预后相关新标志物的高效挖掘;二是肿瘤微环境相关标志物,重点关注免疫细胞浸润特征、肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)及血管生成相关标志物等,探究其与 HCC 发生发展、侵袭转移的关联;三是微生物组相关标志物,近年来肠道菌群及肝内微生物组的异常改变与 HCC 发病机制的关联成为研究热点,为 HCC 新标志物的发现提供了全新视角。

6. 结论

生物标志物在 HBV 相关肝癌的早期诊断、预后评估和治疗监测中发挥着不可替代的作用。组织标志物如 GPC3/HSP70/GS panel、Ki-67、p53、 β -catenin、CK19 等为精准诊断和分子分型提供了重要信息。血清标志物 AFP、AFP-L3、DCP 及其组合(GALAD 评分)显著提高了早期 HCC 的检出率。新兴的液体活检技术,特别是 cfDNA 甲基化、HBV 整合检测、CTCs 和外泌体分析,为无创诊断和动态监测开辟了新途径。未来,通过多标志物联合策略、人工智能辅助决策和多组学整合,生物标志物将更好地服务于 HBV-HCC 患者的精准医学管理,最终改善患者预后和生存质量。新标志物发现、持续的技术创新、大规模临床验证和标准化推广是实现这一目标的关键。

参考文献

- [1] Burki, T. (2024) WHO's 2024 Global Hepatitis Report. *The Lancet Infectious Diseases*, **24**, e362-e363. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(24\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(24)00307-4)
- [2] Levrero, M. and Zucman-Rossi, J. (2016) Mechanisms of HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **64**, S84-S101. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.021>
- [3] Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **69**, 89-95.
- [4] European Association for the Study of the Liver (2018) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **69**, 182-236.
- [5] Goodman, Z.D. (2007) Neoplasms of the Liver. *Modern Pathology*, **20**, S49-S60. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800682>
- [6] Di Tommaso, L., Franchi, G., Park, Y.N., Fiamengo, B., Destro, A., Morengi, E., *et al.* (2007) Diagnostic Value of HSP70, Glypican 3, and Glutamine Synthetase in Hepatocellular Nodules in Cirrhosis. *Hepatology*, **45**, 725-734. <https://doi.org/10.1002/hep.21531>
- [7] Li, B., Huang, L., Huang, J. and Li, J. (2025) An Update of Immunohistochemistry in Hepatocellular Carcinoma. *Diagnostics*, **15**, Article 2144. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15172144>
- [8] Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J. and Harris, C.C. (1991) Mutational Hot Spot in the P53 Gene in Human Hepatocellular Carcinomas. *Nature*, **350**, 427-428. <https://doi.org/10.1038/350427a0>

- [9] Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., *et al.* (2015) Exome Sequencing of Hepatocellular Carcinomas Identifies New Mutational Signatures and Potential Therapeutic Targets. *Nature Genetics*, **47**, 505-511. <https://doi.org/10.1038/ng.3252>
- [10] Fujimoto, A., Furuta, M., Totoki, Y., Tsunoda, T., Kato, M., Shiraiishi, Y., *et al.* (2016) Whole-Genome Mutational Landscape and Characterization of Noncoding and Structural Mutations in Liver Cancer. *Nature Genetics*, **48**, 500-509. <https://doi.org/10.1038/ng.3547>
- [11] Lee, J.I. (2012) Prognosis of Hepatocellular Carcinoma Expressing Cytokeratin 19: Comparison with Other Liver Cancers. *World Journal of Gastroenterology*, **18**, 4751-4757. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4751>
- [12] Wang, H., Hu, W., Xia, Z., Liang, Y., Lu, Y., Lin, S., *et al.* (2019) High Numbers of CD163+ Tumor-Associated Macrophages Correlate with Poor Prognosis in Multiple Myeloma Patients Receiving Bortezomib-Based Regimens. *Journal of Cancer*, **10**, 3239-3245. <https://doi.org/10.7150/jca.30102>
- [13] Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., *et al.* (2018) Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, **68**, 723-750. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>
- [14] Tzartzeva, K., Obi, J., Rich, N.E., Parikh, N.D., Marrero, J.A., Yopp, A., *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>
- [15] Singal, A.G., Pillai, A. and Tiro, J. (2014) Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PLOS Medicine*, **11**, e1001624. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001624>
- [16] Taketa, K., Endo, Y., Sekiya, C., *et al.* (1993) A Collaborative Study for the Evaluation of Lectin-Reactive Alpha-Fetoproteins in Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, **53**, 5419-5423.
- [17] Kumada, T., Toyoda, H., Tada, T., Kiriyama, S., Tanikawa, M., Hisanaga, Y., *et al.* (2013) High-Sensitivity Lens Culinaris Agglutinin-Reactive Alpha-Fetoprotein Assay Predicts Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, **49**, 555-563. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0883-1>
- [18] Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Kaneoka, Y., Maeda, A., Kanke, F., *et al.* (2011) Clinical Utility of Highly Sensitive lens Culinaris Agglutinin-Reactive Alpha-Fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma Patients with Alpha-Fetoprotein < 20 Ng/ml. *Cancer Science*, **102**, 1025-1031. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01875.x>
- [19] Marrero, J.A., Feng, Z., Wang, Y., Nguyen, M.H., Befeler, A.S., Roberts, L.R., *et al.* (2009) A-Fetoprotein, Des- γ Carboxyprothrombin, and Lectin-Bound α -Fetoprotein in Early Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, **137**, 110-118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.005>
- [20] Biselli, M., Conti, F., Gramenzi, A., Frigerio, M., Cucchetti, A., Fatti, G., *et al.* (2015) A New Approach to the Use of α -Fetoprotein as Surveillance Test for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis. *British Journal of Cancer*, **112**, 69-76. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.536>
- [21] Johnson, P.J., Pirrie, S.J., Cox, T.F., Berhane, S., Teng, M., Palmer, D., *et al.* (2014) The Detection of Hepatocellular Carcinoma Using a Prospectively Developed and Validated Model Based on Serological Biomarkers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **23**, 144-153. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-13-0870>
- [22] Berhane, S., Toyoda, H., Tada, T., Kumada, T., Kagebayashi, C., Satomura, S., *et al.* (2016) Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **14**, 875-886.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.12.042>
- [23] Best, J., Bechmann, L.P., Sowa, J., Sydor, S., Dechêne, A., Pflanz, K., *et al.* (2020) GALAD Score Detects Early Hepatocellular Carcinoma in an International Cohort of Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **18**, 728-735.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.11.012>
- [24] Yang, J.D., Addissie, B.D., Mara, K.C., Harmsen, W.S., Dai, J., Zhang, N., *et al.* (2019) GALAD Score for Hepatocellular Carcinoma Detection in Comparison with Liver Ultrasound and Proposal of GALADUS Score. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **28**, 531-538. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-18-0281>
- [25] Shen, Q., Fan, J., Yang, X., Tan, Y., Zhao, W., Xu, Y., *et al.* (2012) Serum DKK1 as a Protein Biomarker for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Large-Scale, Multicentre Study. *The Lancet Oncology*, **13**, 817-826. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(12\)70233-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(12)70233-4)
- [26] Yu, B., Yang, X., Xu, Y., Yao, G., Shu, H., Lin, B., *et al.* (2009) Elevated Expression of DKK1 Is Associated with Cytoplasmic/Nuclear β -Catenin Accumulation and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinomas. *Journal of Hepatology*, **50**, 948-957. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.11.020>
- [27] Zhu, W., Guo, J., Guo, L., Jia, H., Zhu, M., Zhang, J., *et al.* (2013) Evaluation of Midkine as a Diagnostic Serum Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **19**, 3944-3954. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3363>

- [28] Mao, Y., Yang, H., Xu, H., Lu, X., Sang, X., Du, S., *et al.* (2010) Golgi Protein 73 (GOLPH2) Is a Valuable Serum Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Gut*, **59**, 1687-1693. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.214916>
- [29] Shang, S., Plymoth, A., Ge, S., Feng, Z., Rosen, H.R., Sangrajang, S., *et al.* (2012) Identification of Osteopontin as a Novel Marker for Early Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **55**, 483-490. <https://doi.org/10.1002/hep.24703>
- [30] Chen, C. (2006) Risk of Hepatocellular Carcinoma across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. *JAMA*, **295**, 65-73. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>
- [31] Tseng, T., Liu, C., Yang, H., Su, T., Wang, C., Chen, C., *et al.* (2012) High Levels of Hepatitis B Surface Antigen Increase Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Low HBV Load. *Gastroenterology*, **142**, 1140-1149.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.007>
- [32] Yin, J., Zhang, H., Li, C., Gao, C., He, Y., Zhai, Y., *et al.* (2008) Role of Hepatitis B Virus Genotype Mixture, Subgenotypes C2 and B2 on Hepatocellular Carcinoma: Compared with Chronic Hepatitis B and Asymptomatic Carrier State in the Same Area. *Carcinogenesis*, **29**, 1685-1691. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm301>
- [33] Qu, L., Liu, J., Liu, T., Shen, X., Chen, T., Ni, Z., *et al.* (2014) Association of Hepatitis B Virus Pre-S Deletions with the Development of Hepatocellular Carcinoma in Qidong, China. *PLOS ONE*, **9**, e98257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098257>
- [34] Xu, R., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flagg, K., *et al.* (2017) Circulating Tumour DNA Methylation Markers for Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Nature Materials*, **16**, 1155-1161. <https://doi.org/10.1038/nmat4997>
- [35] Cai, J., Chen, L., Zhang, Z., Zhang, X., Lu, X., Liu, W., *et al.* (2019) Genome-Wide Mapping of 5-Hydroxymethylcytosines in Circulating Cell-Free DNA as a Non-Invasive Approach for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Gut*, **68**, 2195-2205. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318882>
- [36] Kisiel, J.B., Dukek, B.A., V.S.R. Kanipakam, R., Ghaz, H.M., Yab, T.C., Berger, C.K., *et al.* (2019) Hepatocellular Carcinoma Detection by Plasma Methylated DNA: Discovery, Phase I Pilot, and Phase II Clinical Validation. *Hepatology*, **69**, 1180-1192. <https://doi.org/10.1002/hep.30244>
- [37] Jiang, P., Sun, K., Tong, Y.K., Cheng, S.H., Cheng, T.H.T., Heung, M.M.S., *et al.* (2018) Preferred End Coordinates and Somatic Variants as Signatures of Circulating Tumor DNA Associated with Hepatocellular Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, E10925-E10933. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814616115>
- [38] Cristiano, S., Leal, A., Phallen, J., Fiksel, J., Adleff, V., Bruhm, D.C., *et al.* (2019) Genome-Wide Cell-Free DNA Fragmentation in Patients with Cancer. *Nature*, **570**, 385-389. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>
- [39] Sung, W., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., *et al.* (2012) Genome-Wide Survey of Recurrent HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma. *Nature Genetics*, **44**, 765-769. <https://doi.org/10.1038/ng.2295>
- [40] Liao, W., Yang, H., Xu, H., Wang, Y., Ge, P., Ren, J., *et al.* (2016) Noninvasive Detection of Tumor-Associated Mutations from Circulating Cell-Free DNA in Hepatocellular Carcinoma Patients by Targeted Deep Sequencing. *Oncotarget*, **7**, 40481-40490. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9629>
- [41] Ogle, L.F., Orr, J.G., Willoughby, C.E., Hutton, C., McPherson, S., Plummer, R., *et al.* (2016) Imagestream Detection and Characterisation of Circulating Tumour Cells—A Liquid Biopsy for Hepatocellular Carcinoma? *Journal of Hepatology*, **65**, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.014>
- [42] Sun, Y., Xu, Y., Yang, X., Guo, W., Zhang, X., Qiu, S., *et al.* (2013) Circulating Stem Cell-Like Epithelial Cell Adhesion Molecule-Positive Tumor Cells Indicate Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. *Hepatology*, **57**, 1458-1468. <https://doi.org/10.1002/hep.26151>
- [43] Guo, W., Sun, Y., Shen, M., Ma, X., Wu, J., Zhang, C., *et al.* (2018) Circulating Tumor Cells with Stem-Like Phenotypes for Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Response Evaluation in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **24**, 2203-2213. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1753>
- [44] Von Felden, J., Garcia-Lezana, T., Dogra, N., *et al.* (2021) Unannotated Small RNA Clusters Associated with Circulating Extracellular Vesicles Detect Early Stage Liver Cancer. *Gut*, **71**, 2069-2080.
- [45] Arbelaz, A., Azkargorta, M., Krawczyk, M., Santos-Laso, A., Lapitz, A., Perugorria, M.J., *et al.* (2017) Serum Extracellular Vesicles Contain Protein Biomarkers for Primary Sclerosing Cholangitis and Cholangiocarcinoma. *Hepatology*, **66**, 1125-1143. <https://doi.org/10.1002/hep.29291>
- [46] Wang, W., Li, H., Zhou, Y. and Jie, S. (2013) Peripheral Blood Microvesicles Are Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biomarkers*, **13**, 351-357. <https://doi.org/10.3233/cbm-130370>
- [47] Zhou, Y., Ren, H., Dai, B., Li, J., Shang, L., Huang, J., *et al.* (2018) Hepatocellular Carcinoma-Derived Exosomal Mirna-21 Contributes to Tumor Progression by Converting Hepatocyte Stellate Cells to Cancer-Associated Fibroblasts. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **37**, Article No. 324. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0965-2>
- [48] Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., *et al.* (2018) Minimal

Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, **7**, Article 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

- [49] Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., *et al.* (2010) Circulating Micromas, miR-21, miR-122, and miR-223, in Patients with Hepatocellular Carcinoma or Chronic Hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*, **50**, 136-142. <https://doi.org/10.1002/mc.20712>
- [50] Tomimaru, Y., Eguchi, H., Nagano, H., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., *et al.* (2012) Circulating MicroRNA-21 as a Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatology*, **56**, 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.04.026>
- [51] Zhou, J., Yu, L., Gao, X., Hu, J., Wang, J., Dai, Z., *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>