

血清外泌体miR-223联合AFP与PIVKA-II在肝细胞癌诊断中的研究进展与展望

刘春杰^{1*}, 赵江桥^{2#}

¹承德医学院研究生学院, 河北 承德

²沧州市人民医院肝胆胰外科, 河北 沧州

收稿日期: 2026年7月8日; 录用日期: 2026年8月2日; 发布日期: 2026年8月12日

摘要

肝细胞癌(HCC)早期诊断是改善预后的关键。传统筛查依赖腹部超声与甲胎蛋白(AFP), 但敏感性与特异性有限。异常凝血酶原(PIVKA-II)与液体活检标志物如外泌体miR-223为HCC无创诊断提供了新方向。本文系统综述AFP、PIVKA-II及血清外泌体miR-223在HCC诊断中的研究进展, 重点阐述三者联合应用的生物学基础与临床价值。其中AFP反映肿瘤细胞去分化状态与负荷, PIVKA-II关联肿瘤代谢异常与侵袭性, 外泌体miR-223则表征肿瘤微环境免疫状态。基于生物学互补性, 整合三类标志物构建多维度诊断模型在理论上有望提升早期及AFP阴性HCC的检出率、鉴别诊断准确性及预后评估效能, 但目前尚缺乏直接针对该三联模型的前瞻性研究证据。外泌体miR-223检测面临分离得率低、标准化不足及成本高昂等技术瓶颈, 微流控芯片与数字PCR等新技术有望突破这些限制; 同时miR-223功能双重性所带来的诊断不确定性, 可通过联合免疫细胞亚群分析等指标予以规避。未来需推进检测标准化、开展前瞻性验证并融合多组学数据, 以实现该联合策略的临床转化。

关键词

肝细胞癌, 诊断, 甲胎蛋白, 异常凝血酶原, 外泌体, miR-223, 联合模型, 肿瘤微环境, 微流控芯片, 数字PCR, 未来研究框架

Research Progress and Prospects of Serum Exosomal miR-223 Combined with AFP and PIVKA-II in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

Chunjie Liu^{1*}, Jiangqiao Zhao^{2#}

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 刘春杰, 赵江桥. 血清外泌体 miR-223 联合 AFP 与 PIVKA-II 在肝细胞癌诊断中的研究进展与展望[J]. 临床个性化医学, 2026, 5(4): 195-205. DOI: 10.12677/jcpm.2026.54240

Abstract

Early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) is essential for improving prognosis. Conventional surveillance relies on abdominal ultrasound and alpha-fetoprotein (AFP), yet both exhibit limited sensitivity and specificity. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) and liquid biopsy markers such as exosomal miR-223 have opened new avenues for non-invasive diagnosis of HCC. This review systematically summarizes the research progress on AFP, PIVKA-II, and serum exosomal miR-223 in HCC diagnosis, with emphasis on the biological rationale and clinical value of their combined application. AFP reflects the dedifferentiation status and tumor burden of cancer cells, PIVKA-II is associated with metabolic dysregulation and tumor invasiveness, and exosomal miR-223 characterizes the immune status of the tumor microenvironment. Based on biological complementarity, an integrated multi-dimensional diagnostic model incorporating these three markers is theoretically expected to improve the detection rate of early-stage and AFP-negative HCC, enhance differential diagnostic accuracy, and strengthen prognostic assessment. However, direct prospective evidence for this specific triple-marker panel is currently lacking. Detection of exosomal miR-223 faces technical bottlenecks including low isolation yield, insufficient standardization, and high cost; emerging technologies such as microfluidic chips and digital PCR hold promise to overcome these limitations. Meanwhile, the diagnostic uncertainty arising from the dual functionality of miR-223 may be mitigated by incorporating complementary indicators such as immune cell subset profiling. Future efforts should focus on standardizing detection methods, conducting prospective validation studies, and integrating multi-omics data to achieve clinical translation of this combined strategy.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Diagnosis, Alpha-Fetoprotein, PIVKA-II, Exosomes, miR-223, Combined Model, Tumor Microenvironment, Microfluidic Chip, Digital PCR, Future Research Framework

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

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是全球范围内严重的公共卫生问题,其发病率和死亡率在恶性肿瘤中位居前列。2020年全球癌症统计报告显示,HCC年新发病例约90.5万例,死亡病例约83万例,是全球癌症死亡的第三大常见原因,带来了沉重的疾病负担[1]。HCC的预后与诊断时的疾病分期紧密相关,早期HCC患者可通过手术切除、肝移植或局部消融等根治性手段实现长期生存,5年生存率可达70%以上;而进展期HCC患者治疗选择有限,预后极差[2][3]。因此,在高危人群(如肝硬化、慢性乙型或丙型肝炎病毒感染者)中实施高效、可靠的早期筛查与诊断,是降低HCC相关死亡率的关键策略[4]。

目前,国际主流指南建议对HCC高危人群每6个月进行一次腹部超声(Ultrasound, US)检查,可联合或不联合血清甲胎蛋白(Alpha-Fetoprotein, AFP)检测[4]。然而,这一标准监测方案存在明显局限。超声检

查的敏感性受操作者经验、患者体质指数及肝脏背景病变(如严重脂肪肝、结节型肝硬化)影响较大,对直径小于2厘米的早期病灶检出率较低[5]。AFP作为临床应用最为广泛的血清标志物,但它的诊断效果不理想。一项纳入373项研究的Cochrane系统评价表明,以20 ng/mL为临界值,AFP诊断HCC的合并敏感性和特异性分别为60%和84%;若将临界值提高至200 ng/mL以获取99%的特异性,其敏感性则急剧降至36%[5]。此外,临床上约30%~40%的HCC患者血清AFP水平始终正常,也就是“AFP阴性HCC”,导致现有监测策略对这部分人群的有效性大幅降低[6]。

为了解决早期诊断的难题,寻找新型、高效的生物标志物成为研究热点。异常凝血酶原(Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II, 亦称 Des- γ -carboxy prothrombin, DCP)因其在HCC发生中的独特作用机制和出色的诊断效能受到广泛关注[6]。同时,随着液体活检技术的发展,外泌体及其所携带的生物活性分子(如微小RNA)为HCC的无创、动态监测开辟了新的途径[7]。外泌体是细胞主动分泌的纳米级囊泡,其内部富含蛋白质、脂质及核酸,能在体液中稳定存在并反映来源细胞的病理生理状态,是理想的液体活检靶标[8][9]。在众多候选的循环微小RNA(miRNA)中,miR-223因其在髓系免疫细胞中的高表达及其在调控炎症、免疫反应和肿瘤进展中的复杂多重作用,在HCC研究领域引发广泛关注[10][11]。值得强调的是,PIVKA-II是继AFP之后临床验证最成功的蛋白标志物之一,而miR-223是链接慢性炎症与免疫的关键分子,这与HCC作为典型炎症相关肿瘤的特征高度契合。

基于此背景,本文旨在系统地综述AFP、PIVKA-II以及血清外泌体miR-223这三类标志物在HCC诊断中的研究进展,剖析其各自的价值与局限性,并重点探讨三者整合构建多维度联合诊断模型的科学依据。目前尚无直接针对“AFP+PIVKA-II+血清外泌体miR-223”这一特定三联组合的诊断模型研究报道,本文旨在提供理论依据与未来研究方向。

2. 甲胎蛋白(AFP): 对经典肿瘤标志物的再认知

自20世纪60年代发现AFP与HCC相关以来,它一直是临床诊断和筛查中至关重要的标志物。AFP是一种在胎儿期由卵黄囊和肝脏大量合成的糖蛋白,出生后其合成受到抑制,血清水平极低。成人血清AFP水平升高主要见于HCC、生殖细胞肿瘤及部分良性肝病活动期。

2.1. 诊断效能与核心局限

尽管AFP在临床中应用广泛,但作为单一诊断标志物,其敏感性与特异性难以兼具[5]。较低的敏感性导致大量早期或低分泌型HCC被漏诊;而相对较低的特异性意味着在活动性肝炎、肝硬化等良性肝病中出现的AFP升高易导致假阳性结果,引发不必要的侵入性检查和患者的焦虑情绪[12]。对于早期、小体积肝癌,AFP的诊断价值更为有限。例如,在亚厘米级HCC的诊断方面,传统加钆塞酸增强磁共振成像(EOB-MRI)的影像学特征(动脉期高强化、门静脉/移行期低信号)敏感性约为50%。而将血清AFP水平(>13.7 ng/mL)纳入诊断算法,结合更多影像特征可构建新标准,将敏感性显著提高至75.0%且不降低特异性[13]。这表明,即便对于AFP通过优化临界值或与影像学进行深度融合,仍可进一步挖掘其辅助诊断价值。

2.2. 衍生指标与组合应用策略

为提高AFP的鉴别诊断能力,AFP异质体(AFP-L3)得以应用。AFP-L3是AFP中与小扁豆凝集素(LCA)结合的部分,被认为与HCC具有更高的特异性。一项针对早期HCC的荟萃分析显示,AFP-L3%诊断的特异性高达92%,但敏感性仅为34%,提示其在AFP升高背景下用于“排除”HCC的价值可能大于“早期发现”[14]。因此,临床上常将AFP与AFP-L3、PIVKA-II进行联合检测,实现优势互补,以提高整体诊断的准确性[15][16]。

2.3. 在治疗监测与预后中的作用

AFP 的动态变化也用于评估治疗效果和预测预后。有研究表明, 在 HCC 患者接受免疫治疗期间, 早期的 AFP 反应(下降)联合白蛋白-胆红素(ALBI)评分, 可能为早期识别治疗应答提供线索[17]。然而, 关于 AFP 预后价值的结论存在分歧。有研究指出, 血清 AFP 水平与 HCC 患者预后无显著独立相关性, 而 PIVKA-II 是更强的预后预测因子[18]。

AFP 的作用已超越单纯诊断的范畴。研究发现其参与肿瘤免疫抑制微环境的构建, 推动了以 AFP 为靶点的免疫治疗探索[19]。

3. 异常凝血酶原(PIVKA-II/DCP): 兼具补充价值与潜力的诊断指标

PIVKA-II 指的是肝脏在维生素 K 缺乏或存在其拮抗剂的情形下, 所合成的一种未完全羧化的异常凝血酶原。在 HCC 细胞内部, 由于维生素 K 代谢循环出现障碍, 从而导致大量 PIVKA-II 生成并释放入血, 这使得 PIVKA-II 成为极具潜力的肿瘤标志物。

3.1. 卓越的诊断性能, 尤其适用于 AFP 阴性 HCC

多项临床研究表明, PIVKA-II 在 HCC 的诊断中表现出与 AFP 相当或更优的诊断能力。其最具突破性的优势在于对 AFP 阴性 HCC 的诊断能力。研究表明, PIVKA-II 诊断 AFP 阴性 HCC 的 AUC 为 0.789, 具有显著的诊断价值[20]。一项前瞻性研究甚至提示, 在高危人群中, 单独使用 PIVKA-II 的诊断敏感性可能优于单独使用 AFP [21]。

3.2. 与肿瘤侵袭性特征的强关联性 & 预后价值

PIVKA-II 的血清水平与 HCC 的恶性临床病理特征存在密切关联。研究一致显示, 其水平与肿瘤大小、TNM 分期、微血管侵犯呈正相关, 与肿瘤分化程度呈负相关[6]。这种紧密联系使其不仅可作为诊断标志物, 还可作为潜在的预后生物标志物。在治疗监测方面, 成功实施手术切除或局部介入治疗后, 患者血清 PIVKA-II 水平通常会显著降低; 反之, 术后持续阳性或水平再度升高, 往往提示肿瘤残留、复发或进展, 预示着不良预后[18]。Chen 等[22]的最新研究进一步证实, 早期 PIVKA-II 反应可预测晚期 HCC 患者接受免疫检查点抑制剂治疗的疗效与生存结局。

3.3. 联合诊断价值的充分验证

PIVKA-II 与 AFP 的联合检测已被广泛证实能够显著提升诊断准确性, 成为临床实验室的优化选择[6][18]。对于 AFP 阴性患者, PIVKA-II 还可与其他血清学指标如 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)等联合使用, 构建有效的补充诊断模型[23]。当前, GALAD 评分(涵盖性别、年龄、AFP、AFP-L3 和 PIVKA-II)是最具代表性的多标志物模型之一, 在多项研究中已展现出对早期 HCC 的较高诊断价值[24], 且正在如“国家肝癌筛查试验(TRACER)”这类大规模前瞻性实用试验中进行最终效果验证[25]。

4. 血清外泌体 miR-223: 连接肿瘤微环境与液体活检的关键纽带

外泌体作为细胞间通讯的重要媒介, 参与调控肿瘤发生、发展、转移及耐药等多个进程。外泌体微小核糖核酸(miRNA)因其在体液中的高稳定性、疾病特异性及功能重要性, 成为液体活检领域颇具前景的靶点之一[8][9]。miR-223 是其中功能复杂且研究较为深入的成员。需要特别指出, 外泌体 miRNA 与游离循环 miRNA 在来源、稳定性及功能上存在差异, 本文聚焦于血清外泌体来源的 miR-223, 所引用的证据以明确分离外泌体的研究为主。

4.1. miR-223 在 HCC 中的表达、调控与功能悖论

miR-223 在肝脏中主要富集于髓系来源的免疫细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞),在固有免疫和炎症反应调控中发挥核心作用[11] [26]。在 HCC 组织层面,早期研究发现其表达下调,并通过靶向 STMN1 等基因发挥抑制细胞增殖的“抑癌”功能[27]。然而,后续研究揭示了 miR-223 功能的“环境依赖性”[10] [28]。在肿瘤微环境中,miR-223 可通过抑制缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)调控的 CD39/CD73-腺苷通路,间接下调免疫检查点分子 PD-1/PD-L1 的表达,从而缓解免疫抑制、抑制血管生成,表现出较强的抗肿瘤效应[29]。这一发现将其与肝脏疾病的免疫病理机制紧密关联[26] [30]。然而,在其他癌种中存在矛盾证据:在结直肠癌、胃癌等消化道肿瘤中,循环或外泌体中的 miR-223 水平升高并与不良预后相关,暗示其可能扮演“促癌”角色[31]-[33]。这种功能的双重性表明 miR-223 处于肿瘤与免疫系统相互作用网络的核心位置。这种功能双重性并非简单的对立,而可能反映其在免疫细胞与肿瘤细胞间差异化调控的结果:在免疫细胞中高表达有助于抗肿瘤免疫,而在某些肿瘤细胞或特定分化阶段异常表达则可能促进转移。为规避单一 miR-223 检测带来的诊断不确定性,未来可将其与外周血免疫细胞亚群(如中性粒细胞/淋巴细胞比值 NLR、单核细胞亚群分布)或细胞因子谱(如 IL-6、TGF- β)等指标进行联合分析,从而在功能层面锚定其生物学指向,提高诊断特异性。

4.2. miR-223 在 HCC 肿瘤微环境中的细胞来源与信号网络

miR-223 在 HCC 中的表达主要来源于肿瘤相关髓系免疫细胞,尤其是肿瘤浸润中性粒细胞和巨噬细胞,这些细胞在慢性炎症驱动的 HCC 发生发展中大量聚集于肿瘤微环境。外泌体作为细胞间通讯的关键载体,可将 miR-223 从免疫细胞转移至肿瘤细胞及内皮细胞等,从而在肿瘤微环境中发挥调控作用[9] [11]。在信号网络层面,miR-223 通过多靶点、多通路参与 HCC 的免疫调控、代谢重编程与血管生成。其主要机制包括:1) 靶向 HIF-1 α 通路:miR-223 直接结合 HIF-1 α mRNA 的 3'-UTR,抑制其表达,进而下调缺氧响应基因。HIF-1 α 作为缺氧应答的核心转录因子,其下调可抑制 CD39/CD73-腺苷通路的活化,减少免疫抑制性腺苷的积累,而腺苷通常通过腺苷受体(A2AR)上调 T 细胞与巨噬细胞上的 PD-1/PD-L1 表达,因此 miR-223 可间接降低 PD-1/PD-L1 的表达水平[29]。2) 调控免疫检查点:通过上述 HIF-1 α -CD39/CD73-腺苷轴,miR-223 间接抑制 PD-1/PD-L1 的表达,减轻肿瘤微环境中的免疫抑制状态[29]。3) 抑制血管生成:miR-223 通过下调 HIF-1 α 及其下游血管内皮生长因子(VEGF)等促血管生成因子,抑制肿瘤血管新生[29]。4) 其他靶基因调控:除 HIF-1 α 外,miR-223 还可直接靶向 STMN1 (Stathmin1)和 FOXO1 等基因,抑制肿瘤细胞增殖与存活[29]。综上所述,miR-223 作为一个多功能的调控分子,在 HCC 肿瘤微环境中通过复杂的信号网络影响免疫应答、代谢适应与血管生成,为其作为诊断标志物和治疗靶点提供了坚实的生物学基础。

4.3. 作为循环诊断与鉴别诊断标志物的潜力

尽管在肿瘤组织内可能下调,但在 HCC 患者的循环系统(包括血清/血浆及其外泌体)中,miR-223 常被检测到异常表达,这可能反映了全身或局部免疫与炎症状态的改变。一项针对胃肠道癌症的诊断性荟萃分析显示,循环 miR-223 诊断的汇总曲线下面积(AUC)为 0.83,敏感性为 77%,特异性为 75% [31]。在 HCC 特异性鉴别方面,Wong 等[34]的研究构建了一个包含 32 个 miRNA 的“HallMark-32”特征谱,其中 miR-223-3p 是区分 HCC 与健康对照及结直肠癌肝转移的关键下调分子之一,该模型对甲胎蛋白(AFP)阴性 HCC 的诊断灵敏度达到 100%。Boonkaew 等[35]则发现,在非病毒相关性 HCC 患者血浆外泌体中,miR-223-3p 水平显著高于对照组。外泌体作为载体,不仅增强了 miRNA 的稳定性,还可能提供更精确的细胞来源信息[9]。例如,Yu 等[32]证实,源自中性粒细胞的外泌体 miR-223-3p 是胃癌诊断的精准

标志物。此外, 外泌体 miR-223 在上皮性卵巢癌、膀胱癌的诊断中也显示出价值[36] [37], 提示其作为广谱肿瘤标志物的潜力。

然而, 将外泌体 miR-223 转化为常规临床检测仍面临显著技术瓶颈。首先, 外泌体分离是首要限速步骤。当前超速离心法虽被视为“金标准”, 但耗时长、依赖大型设备且回收率波动大; 聚合物沉淀法得率较高但纯度不足, 易共分离非外泌体 RNA 结合蛋白; 尺寸排阻色谱法能较好地保留囊泡完整性与纯度, 但通量有限。这些差异导致不同研究间数据可比性差, 难以建立统一的参考区间。其次, miRNA 定量平台也存在分歧, 定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 因其灵敏度高而广泛使用, 但内参选择(如 cel-miR-39、miR-16)尚无共识; 微阵列和二代测序虽然通量高, 但成本高昂且数据分析复杂。

解决这些瓶颈的潜在路径包括: 微流控芯片技术, 它可在厘米级芯片上集成外泌体免疫亲和捕获、裂解与 miRNA 检测等多个步骤, 大幅缩减样本用量(可至数十微升血浆)、操作时间与人工误差, 并易于实现自动化与标准化; 数字 PCR (如 ddPCR) 无需标准曲线即可实现对低丰度 miRNA 的绝对定量, 有助于提升低浓度外泌体 miR-223 的检测精确性与批间重复性, 且已逐步向多通道与全自动发展。将微流控前处理与数字 PCR 读数整合, 有望构建“样本进-结果出”的一体化检测系统, 显著降低单次检测成本与技术要求, 推动外泌体 miR-223 的大规模临床筛查应用。

4.4. 治疗反应监测、预后预测及治疗靶点潜力

miR-223 的动态变化可能与治疗反应密切相关。Abdelaziz 等[38]的研究显示, 在接受经动脉化疗栓塞术(TACE)的 HCC 患者中, 治疗无应答者的血清 miR-223-3p 水平显著低于有应答者, 提示其作为预测 TACE 疗效的生物标志物的潜力。马伟等[39]进一步发现, miR-223 联合血小板分布宽度(PDW)和红细胞分布宽度(RDW), 能有效预测乙型肝炎病毒(HBV)相关 HCC 患者 TACE 术后抗病毒治疗的反应性。这些研究表明, miR-223 不仅在诊断层面, 在疗效评估和预后分层领域亦具备应用前景。此外, miR-223 自身有可能成为治疗干预的潜在靶点。例如, 中药复方加味逍遥散的抗肝癌作用经证实, 可能与调控血浆外泌体 miR-223-3p 及其下游靶基因存在关联[40]; 植物活性成分 Celastrol 的抗 HCC 效应被阐明, 涉及 circ_SLIT3/miR-223-3p/CXCR4 信号轴[41]。

5. 构建 AFP、PIVKA-II 与外泌体 miR-223 联合诊断模型的实践与展望

HCC 具有高度的异质性, 单一生物标志物难以全面涵盖其生物学特征。因此, 联合不同类别、作用机制各异的标志物, 构建综合诊断与评估体系, 是提升整体效能的必然趋势。

5.1. 现有联合诊断模型的成功经验

蛋白质标志物联合: AFP、PIVKA-II 与 AFP-L3 的联合检测, 已成为提高血清学诊断准确性的经典方案, 其效能显著优于单项检测, 这一结论已被多项研究反复验证[15] [16] [18]。

外泌体核酸标志物联合: 基于外泌体环状 RNA 或特定微小 RNA 组合构建的诊断模型, 在 HCC(包括早期和 AFP 阴性 HCC)的诊断中表现出卓越效能[42]-[46]。这些研究为利用外泌体核酸进行联合诊断提供了技术路径和依据。

与本文主题最接近的直接证据包括: 张敬磊等[47]的研究表明, 包含 miR-223 在内的 7 种血清 miRNA 与 AFP 联合, 其诊断效能(曲线下面积 $AUC = 0.864$)优于单独使用 AFP ($AUC = 0.819$), 但该研究检测的是血清总 miRNA, 并非外泌体特异性 miR-223。郭琴[48]构建了包含 AFP、外泌体 miR-140-3p、HBsAg 和年龄的逻辑回归诊断模型($AUC = 0.951$), 虽未涉及 miR-223, 但证实了外泌体 miRNA 与传统标志物联合的可行性。目前尚无直接针对“AFP + PIVKA-II + 外泌体 miR-223”这一特定组合的验证研究, 这正是本综述提出的核心科学构想。

5.2. AFP、PIVKA-II 与外泌体 miR-223 联合模型的科学构想与潜在价值

通过整合 AFP、PIVKA-II 及血清外泌体 miR-223 构建多层次 HCC 诊断体系。具有坚实的生物学互补性。该体系覆盖了 HCC 发生发展的两个核心维度: 肿瘤细胞自身特征与宿主免疫反应。从各标志物的特征来看, AFP 主要来源于肝癌细胞, 反映肿瘤的去分化状态与负荷, 其诊断意义在于基础筛查但敏感度较低, 预后价值存在争议; PIVKA-II 同样来源于肝癌细胞, 反映维生素 K 代谢异常及肿瘤侵袭性(如微血管侵犯), 在诊断上可有效补充 AFP, 尤其对 AFP 阴性 HCC 具有较高价值, 且预后预测能力较强; 外泌体 miR-223 则主要来源于肿瘤微环境中的髓系免疫细胞, 表征局部免疫与炎症状态及免疫抑制调控, 能够提供独立于肿瘤细胞的信息, 具有潜在的预后价值。这一多维度的生物学互补性, 使得三者联合有望在诊断效能上实现协同增强。

为进一步从性能层面支撑联合模型的可行性, 现有研究表明: AFP 的诊断敏感性为中至低, 特异性中等, 对 AFP 阴性 HCC 无效, 主要局限性在于敏感性不足且良性肝病易导致假阳性[5] [12]; PIVKA-II 的诊断敏感性为中至高, 特异性高, 对 AFP 阴性 HCC 具有明确诊断价值(AUC 约 0.76-0.79), 预后预测能力强[18] [20], 其主要局限在于临界值需优化, 且在维生素 K 缺乏或抗凝治疗时可能升高[6]; 外泌体 miR-223 的诊断敏感性和特异性均为中等水平, 对 AFP 阴性 HCC 具有潜在诊断价值, 预后预测潜力较强[38] [39], 但其功能具有环境依赖性[10] [28], 且检测技术尚未标准化、成本较高[49] [50]。基于上述互补性, 三者联合模型预期能够显著提升诊断敏感性和特异性, 尤其能显著提高对 AFP 阴性 HCC 的检出率, 并在预后评估方面展现更强效能。当然, 该模型的构建较为复杂, 验证周期长, 临床转化路径尚待明确。

具体而言, 该联合模型具有以下潜在价值: 第一, 提升早期及 AFP 阴性 HCC 检出率。PIVKA-II 与 miR-223 在 AFP 阴性 HCC 中均显示出独立诊断潜力[20] [34], 三者联合有望构建更灵敏的检测网络。第二, 优化鉴别诊断。miR-223 的特征性表达模式可能有助于区分 HCC 与良性肝病活动期或其他肝转移瘤[34], 结合 PIVKA-II 的高特异性, 可进一步提高鉴别准确性。第三, 一体化疗效检测与预后管理。PIVKA-II 动态变化直接反映肿瘤负荷; miR-223 变化可能更早提示肿瘤微环境免疫状态改变及治疗耐受[22] [38]。二者结合可为全程管理提供更全面的信息。

5.3. 临床转化面临的挑战与未来研究方向

要使 AFP、PIVKA-II 和外泌体 miR-223 联合模型从理论走向临床实践, 需要克服以下核心挑战, 并开展针对性研究:

标准化与可重复性: 外泌体分离、miRNA 提取与定量检测的标准化是当前最大瓶颈之一。未来需建立并获得国际共识的操作规范(SOP)及参考物质, 确保不同中心结果的可比性[49] [50]。未来需建立国际共识的操作规范(SOP)及参考值。

检测技术革新: 开发低成本、高通量、自动化的外泌体 miRNA 检测平台是推广的关键。目前的 qPCR、测序成本较高, 难以应用于大规模筛查。

生物学机制深度挖掘: 需进一步明确不同病因(HBV、HCV、非酒精性脂肪性肝炎)所致 HCC 中, 外泌体 miR-223 的细胞来源谱、靶基因网络及其与 AFP/PIVKA-II 表达的相关性, 为精准应用提供依据[51]。

前瞻性临床验证: 应设计严谨的前瞻性队列研究, 在高危人群中验证该联合模型相较于现行标准(US $\pm$ AFP)的增量诊断价值, 计算其敏感度、特异度及预测值。最终需通过社区为基础的筛查试验评估其是否能降低 HCC 相关死亡率并进行卫生经济学评价。

临床实施障碍应对: 需考虑该联合检测的成本、医保支付可能性、检验科技术储备以及临床医生与

患者的接受度, 通过提供明确的临床净获益证据来推动应用。

5.4. 未来研究设计框架: 验证三联模型的关键步骤

为将“AFP + PIVKA-II + 血清外泌体 miR-223”三联诊断模型推向临床验证, 本节提供一份可操作的研究设计框架, 供研究者参考。

目标人群: 以肝硬化患者(任何病因)为核心纳入对象, 覆盖 Child-Pugh A 级与 B 级, 因该人群是 HCC 发生的最高危群体; 同时建议纳入慢性乙型/丙型肝炎合并非肝硬化纤维化 F3 级的患者, 以扩展适用性。应记录详细的病因学信息(病毒性、酒精性、代谢相关脂肪性肝病等), 以便亚组分析。

对照组设立: 除经影像学与病理确诊的 HCC 病例组外, 须设立多重对照组, 包括: 1) 单纯肝硬化或慢性肝病活动期患者(炎症对照组); 2) 其他肝脏占位性病变患者, 如肝血管瘤、结直肠癌肝转移等(鉴别诊断对照组); 3) 健康对照。所有对照均应经至少 6 个月随访确认无 HCC 发生, 以降低错分偏倚。

关键评价指标定义: 主要终点为三联模型诊断早期 HCC(BCLC 0/A 期)的曲线下面积(AUC), 并以灵敏度、特异度、阳性预测值与阴性预测值作为辅助指标。次要终点包括: 对 AFP 阴性 HCC 的检出灵敏度; 联合模型相较于 AFP 单独检测、AFP + PIVKA-II 双标检测的净重分类改善指数(NRI)和整体鉴别指数(IDI); 模型区分良性肝病活动期与 HCC 的特异性; 6 个月至 1 年内发生 HCC 的预测效能(纵向队列)。

标本与检测方案标准化: 样本采集需使用统一真空采血管(如 EDTA 血浆或促凝血), 采血后 2 小时内完成离心并冻存外泌体分离用标本。外泌体分离推荐采用尺寸排阻色谱法或基于免疫亲和的微流控芯片, miR-223 定量采用数字 PCR, 并以内源性(如 cel-miR-39)组合内参进行均一化。所有检测应在通过 ISO 15189 认证的中心实验室分批盲法完成。

统计学考量: 样本量估算应根据预期灵敏度和特异度, 采用 Buderer 公式, 以双侧 $\alpha=0.05$ 、检验效能 80% 计算, 且须预留约 20% 的无效标本或失访率。模型构建可使用 Logistic 回归及 10 折交叉验证或 LASSO 算法避免过拟合; 将年龄、性别、病因等临床变量作为协变量纳入调整模型。最终模型需在独立外部队列中进行时间验证或外部验证, 并报告决策曲线分析以评估临床净获益。此类前瞻性、多中心、多阶段验证研究将为三联模型的实际应用提供关键证据, 也为后续卫生经济学评价和社区筛查试验奠定基础。

6. 总结与展望

肝细胞癌的早期诊断正从依赖单一传统标志物的阶段, 逐步转向整合多组学信息的精准医学新阶段。AFP 作为经过半个世纪验证的标志物, 其价值在于仍是诊断体系中不可或缺的基础组成部分。PIVKA-II 凭借其卓越的诊断性能, 尤其是对 AFP 阴性 HCC 的识别能力, 已成为该体系中坚实且重要的新板块。而血清外泌体 miR-223 作为连接肿瘤生物学与全身免疫炎症反应的液体活检探针, 补充完善了诊断体系中有关肿瘤微环境互动信息的关键环节。

基于 AFP、PIVKA-II 和血清外泌体 miR-223 的联合诊断模型, 通过整合肿瘤细胞固有特征(蛋白标志物)与宿主免疫微环境信息(外泌体 miRNA), 在理论上实现了诊断维度的交叉互补与协同增强。需要强调的是, 目前这一构想尚需大量临床前和临床研究验证, 直接证据的缺乏是当前的主要局限。

未来, 推动该联合模型临床应用的关键在于: 一、建立并推广从样本处理到数据分析的全流程标准化体系; 二、通过设计严谨的前瞻性队列研究, 逐级验证其诊断效能与临床效用; 三、推动检测技术的便捷化与智能化发展, 降低成本。在此过程中, 上述未来研究设计框架可为研究者提供明确路径, 加速从假设到证据的转化。最终, 通过此类高效精准的多标志物联合策略, 结合影像组学、基因组学等多维度信息, 有望构建更完善的 HCC 早期预警与诊断体系。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *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] Song, H.L., Jiang, S.F., Yang, X., *et al.* (2025) Current Status and Prospects for Screening Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Chinese Journal of Hepatology*, **33**, 70-76.
- [3] Wang, Z., Qin, H., Liu, S., Sheng, J. and Zhang, X. (2023) Precision Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Chinese Medical Journal*, **136**, 1155-1165. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000002641>
- [4] Singal, A.G., Zhang, E., Narasimman, M., Rich, N.E., Waljee, A.K., Hoshida, Y., *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>
- [5] Colli, A., Nadarevic, T., Miletic, D., Giljaca, V., Fraquelli, M., Štimac, D., *et al.* (2021) Abdominal Ultrasound and Alpha-Fetoprotein for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Adults with Chronic Liver Disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2021**, CD013346. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd013346.pub2>
- [6] Feng, H., Li, B., Li, Z., Wei, Q. and Ren, L. (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>
- [7] Zhang, Q., Zhang, X., Xie, P. and Zhang, W. (2024) Liquid Biopsy: An Arsenal for Tumour Screening and Early Diagnosis. *Cancer Treatment Reviews*, **129**, Article 102774. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2024.102774>
- [8] Li, B., Cao, Y., Sun, M. and Feng, H. (2021) Expression, Regulation, and Function of Exosome-Derived miRNAs in Cancer Progression and Therapy. *The FASEB Journal*, **35**, e21916. <https://doi.org/10.1096/fj.202100294rr>
- [9] Aseervatham, J. (2023) Dynamic Role of Exosome microRNAs in Cancer Cell Signaling and Their Emerging Role as Noninvasive Biomarkers. *Biology*, **12**, Article 710. <https://doi.org/10.3390/biology12050710>
- [10] Favero, A., Segatto, I., Perin, T. and Belletti, B. (2021) The Many Facets of miR-223 in Cancer: Oncosuppressor, Oncogenic Driver, Therapeutic Target, and Biomarker of Response. *WIREs RNA*, **12**, e1659. <https://doi.org/10.1002/wrna.1659>
- [11] Gu, J., Xu, H., Chen, Y., Li, N. and Hou, X. (2022) MiR-223 as a Regulator and Therapeutic Target in Liver Diseases. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 860661. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.860661>
- [12] Sharma, K.K., Mohsin, M., Mittal, P., Ali, Z., Fatma, N., Upadhyay, P., *et al.* (2024) Diagnosis of the Initial Stage of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, **30**, 1708-1724. <https://doi.org/10.2174/0113816128298875240321073907>
- [13] Huang, P., Wu, F., Hou, K., Zhou, C., Xiao, Y., Wang, C., *et al.* (2024) Diagnostic Algorithm for Subcentimeter Hepatocellular Carcinoma Using Alpha-Fetoprotein and Imaging Features on Gadoteric Acid-Enhanced MRI. *European Radiology*, **34**, 2271-2282. <https://doi.org/10.1007/s00330-023-10214-0>
- [14] Zhou, J.M., Wang, T. and Zhang, K.H. (2021) AFP-L3 for the Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Medicine*, **100**, e27673. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000027673>
- [15] 金春花. 甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体比例和异常凝血酶原联合应用在肝癌诊断中的临床意义[J]. 延边大学医学学报, 2021, 44(4): 294-297.
- [16] 李兰亚, 屠涛. 血清 AFP-L3、PIVKA-II联合检测在慢性乙型肝炎相关肝细胞癌中的诊断价值[J]. 肝脏, 2025, 30(4): 449-452.
- [17] Chan, L.L. and Chan, S.L. (2023) The Combination of ALBI and AFP Response: A Small Step Forward in HCC. *Liver International*, **43**, 271-273. <https://doi.org/10.1111/liv.15494>
- [18] Tian, S., Chen, Y., Zhang, Y. and Xu, X. (2023) Clinical Value of Serum AFP and PIVKA-II for Diagnosis, Treatment and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **37**, e24823. <https://doi.org/10.1002/jcla.24823>
- [19] Głowska-Ciemny, J., Szymański, M., Kuszerska, A., Malewski, Z., von Kaisenberg, C. and Kocylowski, R. (2023) The Role of Alpha-Fetoprotein (AFP) in Contemporary Oncology: The Path from a Diagnostic Biomarker to an Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 2539. <https://doi.org/10.3390/ijms24032539>
- [20] 刘智, 杜晓宏, 柴文刚. 异常凝血酶原对肝细胞癌的诊断效能及其与肿瘤临床特征的相关性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(10): 2014-2018.
- [21] Suttichaimongkol, T., Mitpracha, M., Tangvoraphonkchai, K., Sadeea, P., Sawanyawisuth, K. and Sukeepaisarnjaroen, W. (2023) PIVKA-II or AFP Has Better Diagnostic Properties for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis in High-Risk Patients. *Journal of Circulating Biomarkers*, **12**, 12-16. <https://doi.org/10.33393/jcb.2023.2453>

- [22] Chen, C.T., Chuang, C.H., Hsu, C.H. and Shao, Y.Y. (2025) Early PIVKA-II Response Predicts Treatment Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, **12**, 2341-2349. <https://doi.org/10.2147/jhc.s548785>
- [23] 黄海霞, 温映华, 邓子昱, 刁志宏. PIVKA-II、AFU、NLR 联合检测对甲胎蛋白阴性肝细胞癌的诊断价值[J]. 现代诊断与治疗, 2024, 35(7): 957-960.
- [24] Piratvisuth, T., Tanwandee, T., Thongsawat, S., Sukeepaisarnjaroen, W., Esteban, J.I., Bes, M., *et al.* (2021) Multimarker Panels for Detection of Early-Stage Hepatocellular Carcinoma: A Prospective, Multicenter, Case-Control Study. *Hepatology Communications*, **6**, 679-691. <https://doi.org/10.1002/hep4.1847>
- [25] Singal, A.G., Parikh, N.D., Kanwal, F., Marrero, J.A., Deodhar, S., Page-Lester, S., *et al.* (2024) National Liver Cancer Screening Trial (TRACER) Study Protocol. *Hepatology Communications*, **8**, e0565. <https://doi.org/10.1097/hc9.0000000000000565>
- [26] Wang, X., He, Y., Mackowiak, B. and Gao, B. (2021) MicroRNAs as Regulators, Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Gut*, **70**, 784-795. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322526>
- [27] Wong, Q.W., Lung, R.W., Law, P.T., Lai, P.B., Chan, K.Y., To, K., *et al.* (2008) MicroRNA-223 Is Commonly Repressed in Hepatocellular Carcinoma and Potentiates Expression of Stathmin1. *Gastroenterology*, **135**, 257-269. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.003>
- [28] Barbagallo, D., Ponti, D., Bassani, B., Bruno, A., Pulze, L., Akkihal, S.A., *et al.* (2024) MiR-223-3p in Cancer Development and Cancer Drug Resistance: Same Coin, Different Faces. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 8191. <https://doi.org/10.3390/ijms25158191>
- [29] Fu, Y., Mackowiak, B., Feng, D., Lu, H., Guan, Y., Lehner, T., *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>
- [30] Iacob, D.G., Rosca, A. and Ruta, S.M. (2020) Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Hepatitis B Virus Liver Fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, **26**, 1113-1127. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i11.1113>
- [31] Aalami, A.H., Abdeahad, H., Mesgari, M. and Sahebkar, A. (2020) MicroRNA-223 in Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Diagnostic Meta-Analysis. *European Journal of Clinical Investigation*, **51**, e13448. <https://doi.org/10.1111/eci.13448>
- [32] Yu, D., Zhang, J., Wang, M., Ji, R., Qian, H., Xu, W., *et al.* (2024) Exosomal miRNAs from Neutrophils Act as Accurate Biomarkers for Gastric Cancer Diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, **554**, Article 117773. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.117773>
- [33] Mahmoud, H.A., El Amin, H.A., Ahmed, E.S.M., Kenawy, A.G., El-Ebidi, A.M., ElNakeeb, I., *et al.* (2022) Role of MicroRNA-223 and MicroRNA-182 as Novel Biomarkers in Early Detection of Colorectal Cancer. *International Journal of General Medicine*, **15**, 3281-3291. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s353244>
- [34] Wong, V.C., Wong, M., Lam, C., Lung, M.L., Lam, K. and Lee, V.H. (2021) Hallmark MicroRNA Signature in Liquid Biopsy Identifies Hepatocellular Carcinoma and Differentiates It from Liver Metastasis. *Journal of Cancer*, **12**, 4585-4594. <https://doi.org/10.7150/jca.59933>
- [35] Boonkaew, B., Sathawiwat, N., Pinjaroen, N., Chuaypen, N. and Tangkijvanich, P. (2023) Circulating Extracellular Vesicle-Derived MicroRNAs as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Non-Viral-Related Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 16043. <https://doi.org/10.3390/ijms242216043>
- [36] Yu, Z., Lu, C. and Lai, Y. (2023) A Serum miRNAs Signature for Early Diagnosis of Bladder Cancer. *Annals of Medicine*, **55**, 736-745. <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2172206>
- [37] Yang, L., Yang, Z., Liu, Z., Qi, N. and Tao, L. (2024) Diagnostic Value of Plasma-Derived Exosomal miR-223 for Epithelial Ovarian Cancer. *BMC Women's Health*, **24**, Article No. 150. <https://doi.org/10.1186/s12905-024-02976-6>
- [38] Abdelaziz, H.E., El-Guendy, N., Radwan, E.M., *et al.* (2022) Possible Use of miR-223-3p as a Prognostic Marker in Transarterial Chemoembolization Treatment of Hepatocellular Carcinoma Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **23**, 4125-4135. <https://doi.org/10.31557/apjcp.2022.23.12.4125>
- [39] 马伟, 刘炯, 雷世舟, 江斌. miR-223、PDW 联合 RDW 预测 HBV 相关性肝癌患者肝动脉化疗栓塞术后抗病毒治疗反应性效能[J]. 中西医结合肝病杂志, 2025, 35(2): 163-168.
- [40] 刘晓明, 程金来, 黎如霜, 等. 加味道遥散通过外泌体 miRNA 途径发挥抗肝癌作用[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(19): 4052-4062.
- [41] Si, H., Wang, H., Xiao, H., Fang, Y. and Wu, Z. (2021) Anti-Tumor Effect of Celastrol on Hepatocellular Carcinoma by the circ SLIT3/miR-223-3p/CXCR4 Axis. *Cancer Management and Research*, **13**, 1099-1111. <https://doi.org/10.2147/cmar.s278023>
- [42] 孟俊, 王俊青, 费晓春, 顾志冬. 血浆外泌体 circRNA 诊断 HCC 联合检测模型的建立与验证[J]. 检验医学, 2022,

- 37(1): 1-10.
- [43] 叶开, 李莉, 徐雪莹, 等. 外泌体 LncRNA SFTA1P 和 miR-483-3p 诊断乙型肝炎病毒相关性肝癌的价值研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2024, 45(11): 1007-1011.
- [44] 王路, 王魁, 银花, 等. 血清外泌体 miR-125b、miR-21 及 miR-122 对肝细胞癌诊断价值[J]. 临床检验杂志, 2022, 40(3): 183-189.
- [45] 陈文举, 周勇, 徐佳佳, 王攀. 血清外泌体 miR-23b-3p 和 miR-4429 诊断 HCC 的价值[J]. 检验医学, 2023, 38(7): 624-628.
- [46] 李洪, 冯雪晶, 秦维, 庄恢勇. 血清外泌体 miR-15b、miR-224、miR-501 检测对乙型肝炎相关早期肝细胞癌的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17): 2058-2061.
- [47] 张敬磊, 沈强, 王能, 等. 血清 7 种微 RNA 单独或联合甲胎蛋白检测对肝细胞癌的诊断价值[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(5): 636-639.
- [48] 郭琴. 探索肝癌早期诊断的外泌体 miRNA 新标志物并构建诊断模型[D]: [硕士学位论文]. 成都: 四川大学, 2021.
- [49] 任展志, 麻瑶瑶, 石玉群, 等. 不同来源外泌体在肝癌诊断与治疗中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(12): 2340-2346.
- [50] 周丁杰, 戈伟, 曹德东. 外泌体在肝细胞肝癌发展和诊断中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2023, 20(10): 42-44+54.
- [51] 罗业浩, 许栋涵, 吕挺, 等. 外泌体在肝细胞癌发生发展中的作用及潜在临床价值[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(3): 693-698.