

Volume 2 / Number 11 / September 2019

肿瘤标志物通讯

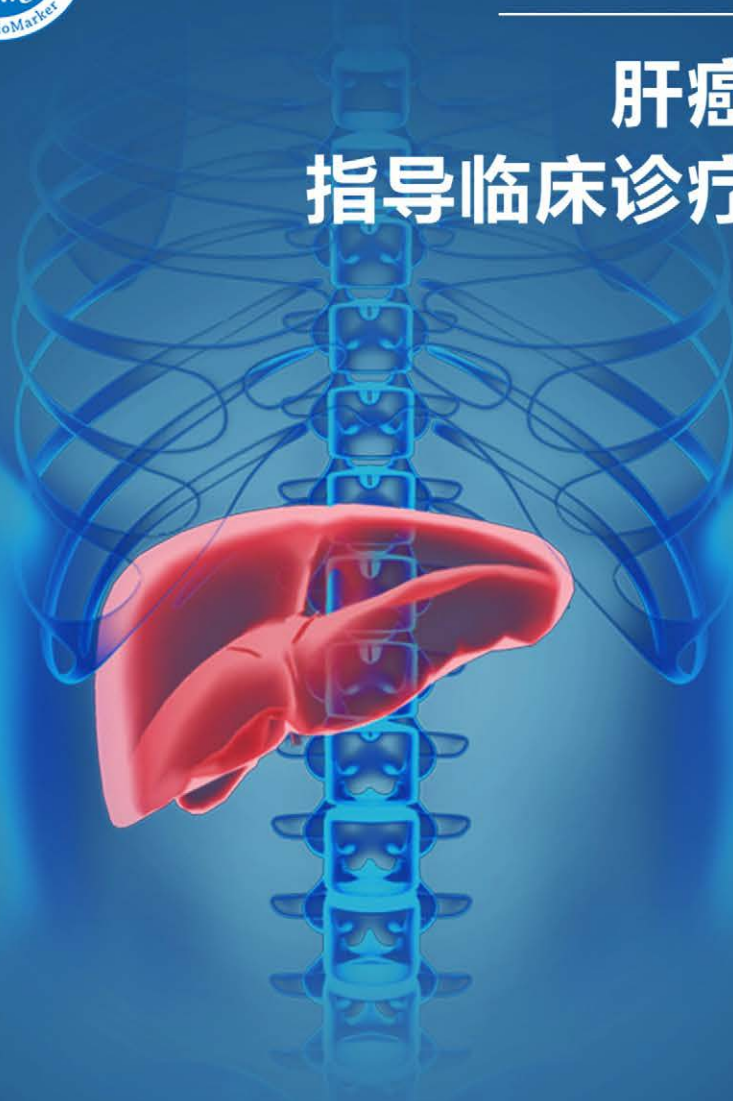
TUMORBIOMARKER COMMUNICATIONS

创新 转化 合作 共享



2019年新版第3期
总第13期

肝癌标志物 指导临床诊疗新进展



中国抗癌协会
中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会
www.tumorbiomarker.com



《肿瘤标志物通讯》新版第3期主编风采



主编：袁响林教授

- 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心主任
- 中国抗癌肿瘤标志专业委员会常委
- 武汉市医学会肿瘤学分会主任委员



执行主编：向邦德教授

- 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科主任
- 中国抗癌协会肝癌专业委员会青年委员会副主任委员



执行主编：余红平教授

- 广西医科大学附属肿瘤医院副院长
- 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会常务委员
- 广西抗癌协会肿瘤标志委员会主任委员



执行主编：马良教授

- 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科主任医师
- 中国抗癌协会胆道肿瘤专业委员会委员
- 广西抗癌协会肝癌专业委员会常委兼秘书



执行主编：梁世雄教授

- 广西医科大学附属肿瘤医院放疗科主任
- 广西壮族自治区放射治疗质量质控中心主任
- 第十一届广西青年科技奖获得者



执行主编：黄启超副教授

- 空军军医大学基础医学院生理与病理生理学教研室副教授
- 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会青年委员
- 陕西省抗癌协会肿瘤标志专委会副主任委员



执行主编：曲凯副教授

- 西安交通大学第一附属医院肝胆外科副研究员
- 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会青年委员
- 陕西省抗癌协会肿瘤标志专委会副主任委员



执行主编：尹菡博士

- 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士后
- 中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会会员



执行主编：齐鲁楠博士

- 广西抗癌协会青年委员会副主任委员
- 广西医科大学博士后工作站“创新计划”研究员
- 广西医科大学杰青



执行主编：叶甲舟博士

- 广西抗癌协会青年委员会委员
- 美国加利福尼亚大学戴维斯分校（UC Davis）博士后研究员
- 主持国家自然科学基金青年基金1项



执行主编：苏廷世博士

- 广西医科大学附属肿瘤医院
- 主持国家青年科学基金1项
- 在放疗红皮、绿皮等杂志发表SCI论文10篇



执行主编：钟鉴宏博士

- 广西医科大学附属肿瘤医院
- 第一届八桂青年学者
- 第十三届广西青年科技奖获得者



目次

【原创专家述评】 <i>Nature</i> : 我国早期肝癌研究新突破——蛋白质组学驱动下的精准治疗	01
【原创专家述评】 ACOT-12 依赖的乙酰辅酶 A 水平改变通过表观遗传学诱导上皮 - 间质转化, 进而促进肝癌的转移	03
【原创专家述评】 <i>Cancer Discovery</i> : β - 连环蛋白活化在肝癌治疗中促进免疫逃逸和抗 PD-1 治疗耐药	07
【原创专家述评】 <i>GUT</i> : 肝癌联合免疫治疗新方向: 靶向 M-MDSC 内增强子显著提高免疫治疗疗效	09
【原创专家述评】 p38 γ 在细胞周期进展和肝脏肿瘤发生过程中的关键作用	13
【原创专家述评】 <i>Journal of Experimental Medicine</i> : 脂联素引起肝癌发病中的性别差异	17
【原创专家述评】 <i>Cancer Cell</i> : 混合型肝癌多重组学分析揭示分子特征及潜在诊断标志物	19
【原创专家述评】 液体活检用于检测无症状乙型肝炎表面抗原血清阳性患者中的早期肝细胞癌	22
【原创专家述评】 <i>Nature Materials</i> : ctDNA 甲基化标志物用于早期诊断和预测肝癌预后	26
【原创专家述评】 <i>GUT</i> : 综合多组学分析揭示了 HCC 的综合肿瘤异质性和新的免疫表型分类	29
【原创专家述评】 <i>Nature</i> : 中国科学院院士联手共同揭示 HBV 相关性早期肝癌治疗新靶点	31
【原创专家述评】 <i>Hepatology</i> : 早期至晚期肝细胞癌基因组多样性的临床影响	36
【原创专家述评】 <i>Clinical Cancer Research</i> : 二代测序为发现肝细胞癌靶向治疗和免疫治疗的标志物提供了新方法	39
【原创专家述评】 <i>Hepatology</i> : 血管包绕的肿瘤巢团 (VETC) 可作为判断 HCC 预后简单有效的标志物	41
【原创专家述评】 <i>JCO</i> : 新辅助放疗——原发性肝癌合并 II/III 型门脉癌栓的治疗新策略, IL-6 可能可作为预测放疗疗效的标志物	43
<i>Journal of Hepatology</i> : 基因组测序鉴定 WNK2 为肝细胞癌的驱动因子和早期复发的危险因素	48
β -catenin 激活是 HCC 免疫治疗潜在耐药 Biomarker	56
<i>GUT</i> : RSPO2 基因重排是肝癌肿瘤细胞内 β -catenin 激活的强效驱动因素	60
<i>Journal of Viral Hepatitis</i> : 慢乙肝 HBeAg 血清学转换后的 HBcrAg 水平可预测肝癌风险	61
<i>Annals of Surgery</i> : 老年早期肝癌患者的治疗选择, 一项来自日本全国性队列研究	62
<i>Hepatology</i> : 免疫联合靶向, 揭示肝癌 PD-1 /VEGFR-2 疗法的双重阻断机制	63
<i>GUT</i> : 通过游离 DNA 检测早期肝癌的新方法	65

Nature: 我国早期肝癌研究新突破——蛋白质组学驱动下的精准治疗

原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

【专家点评】 中国是肝炎大国，也是肝癌大国。据统计，中国每年新发肝癌病例 35 万例，约占世界一半。肝癌早期不易发现，预后较差，严重危害人民健康。早期肝癌虽经手术切除后可达到较好疗效，但 5 年生存率目前低于 70%。寻找早期肝癌分层治疗干预新靶点，对提高早期肝癌患者总体生存率具有重要意义。

今年上半年，由国家重点实验室贺福初院士团队、钱小红研究员团队以及复旦大学中山医院樊嘉院士团队开展的研究在肝细胞癌领域取得了重大突破——通过测定早期肝癌的蛋白质组表达谱和磷酸化蛋白质组图谱，发现了肝细胞癌精准治疗的潜在新靶点。

肝细胞癌是全球癌症死亡的第三大原因。感染乙型肝炎病毒是发展肝细胞癌的主要危险因素之一，特别是在东亚地区。虽然手术治疗可能在早期阶段有效，但肝癌整体 5 年生存率仅为 50%~70%。研究人员通过对 110 例乙型肝炎病毒感染相关的临床早期肝细胞癌的肿瘤组织和非肿瘤组织使用蛋白质组学和磷酸蛋白质组学分析。最终鉴定出了 9 252 种蛋白，其中包括 5 847 种磷酸化蛋白及其上的 27 651 个磷酸化位点。随后还对这些组织进行了基因组和转录组测序。数据显示早期肝癌存在明显的异质性，研究人员将其分为 S-I、S-II 和 S-III 3 种亚型。其中第三类患者占比约 30%，一线手术治疗后总体生存率最差（图 1）。

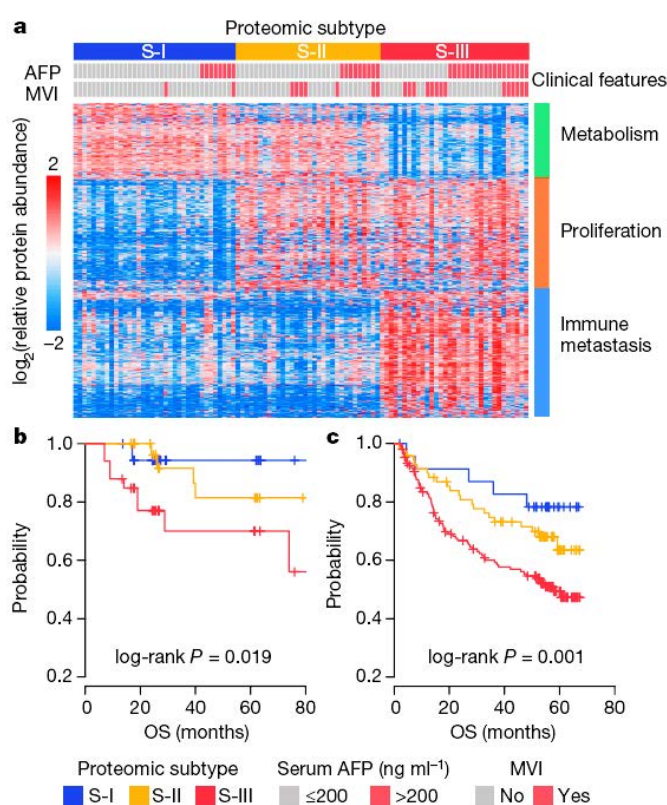


图1 S-III患者术后预后最差

后续研究发现，S-III亚型的特点是胆固醇代谢通路受损。这类患者虽然血清胆固醇水平无明显变化，但与胆固醇稳态相关的蛋白如 LDLR（摄取）、NPC1（转运）、SCAP、SREBF2（调控）、HMGCR（合成）、CYP7A1（代谢）以及 SOAT1（酯

化) 均出现明显升高。其中将胆固醇转变成胆固醇酯储存的甾醇 O- 酰基转移酶 (SOAT1) 升高最为显著, 与患者不良预后明显相关 (图 2)。

能成为 SOAT1 高表达肝癌患者潜在的靶向治疗药物。

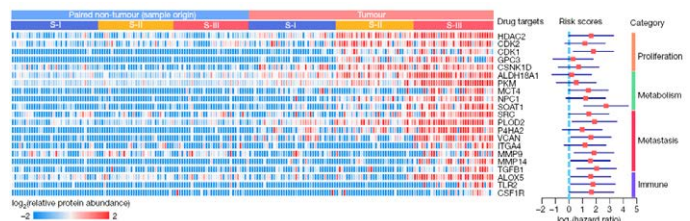


图2 SOAT1 的蛋白表现最为突出, 在所有更差预后的风险因子中排第一

然后研究人员通过体外细胞试验证实通过抑制 SOAT1 基因表达, 能明显减少胞外胆固醇的转运, 降低细胞质膜上的胆固醇水平, 可有效抑制肝癌细胞的增殖和迁移。最后, 研究人员在肝癌患者来源的肿瘤异种移植小鼠模型中 (PDX 模型), 研究人员发现用 SOAT1 抑制剂阿伐麦布 (avasimibe) 治疗能显著抑制肿瘤的生长 (图 3)。表明 SOAT1 不仅可能作一种预后较差的早期肝癌患者的诊断生物标志物, 而且阿伐麦布可

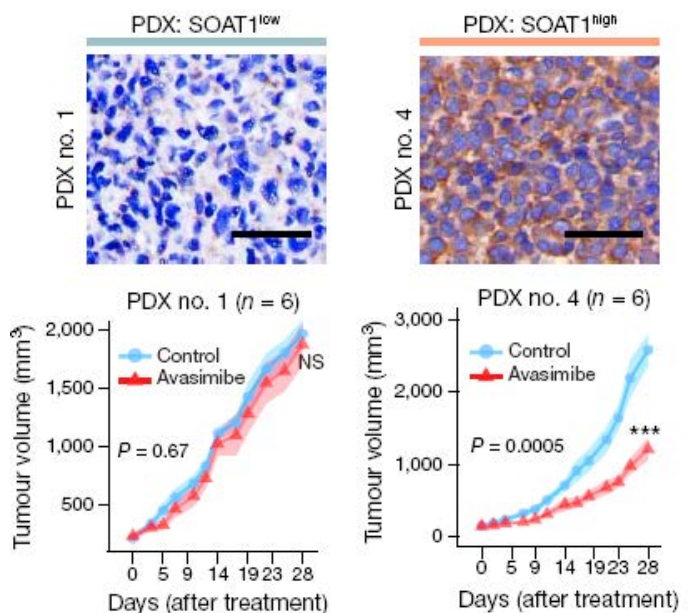


图3 在SOAT1高表达PDX模型中, 阿伐麦布治疗可减小肿瘤体积

【参考文献】

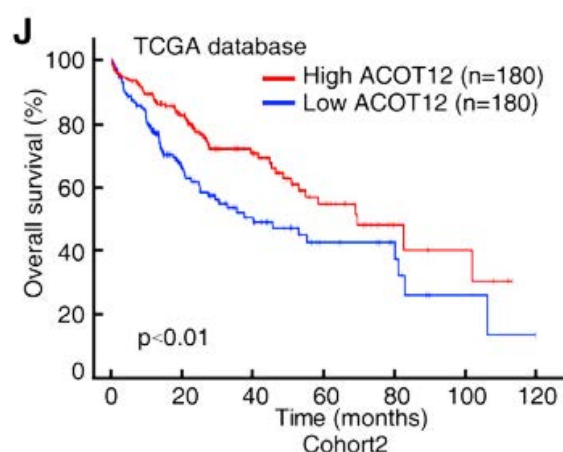
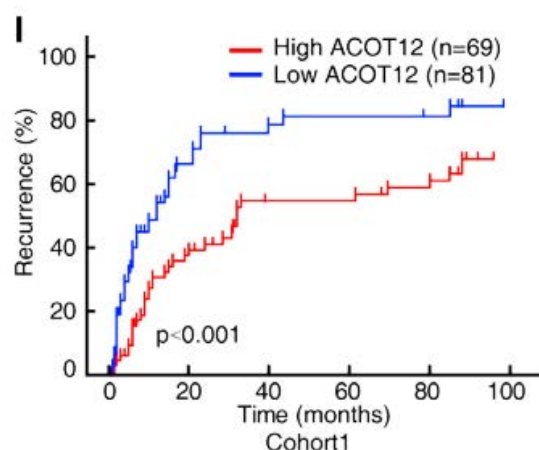
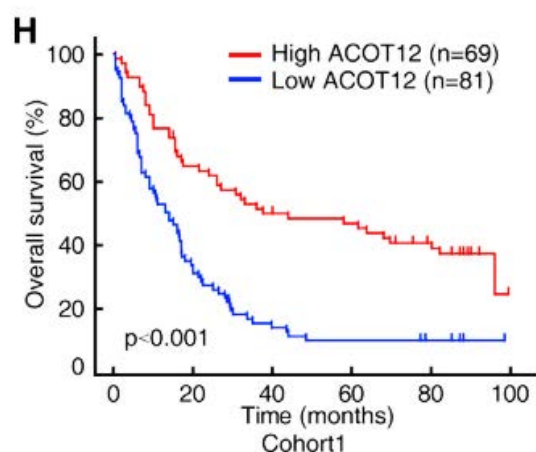
Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Nature, 2019, 567(7747):257-261.

ACOT-12 依赖的乙酰辅酶 A 水平改变通过表观遗传学诱导上皮 - 间质转化，进而促进肝癌的转移

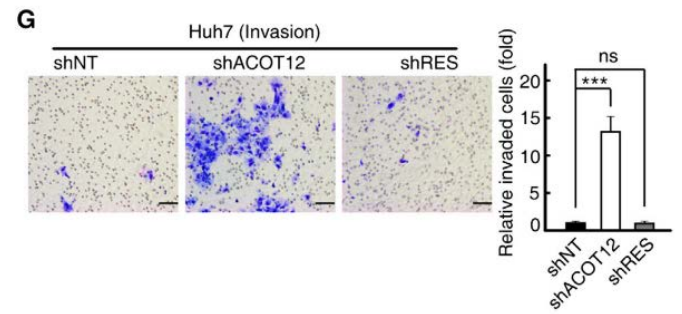
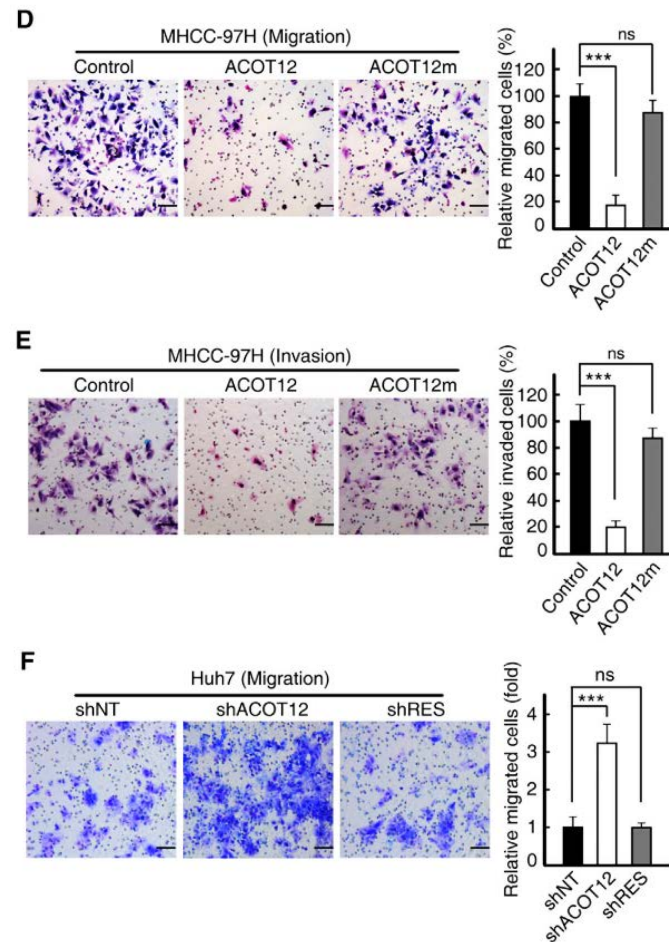
原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

虽然代谢重编程在支持肿瘤生长方面发挥着重要作用，但目前对促进肿瘤转移的代谢改变知之甚少。此项工作确定了酰基辅酶 A 硫酯酶（ACOT12）在促进肝细胞癌上皮间质转化和转移过程中的重要作用。ACOT12 在 HCC 组织中的表达显著下调，并与 HCC 转移和 HCC 患者生存不良密切相关。功能获得和敲除实验证明 ACOT12 在体内和体外都可抑制 HCC 转移。进一步的机制研究表明，ACOT12 调控肝癌细胞乙酰辅酶 A 水平和组蛋白乙酰化，ACOT12 的下调通过表观遗传诱导 TWIST2 表达和促进上皮 - 间质转化来促进 HCC 转移。综上所述，ACOT12 可能作为 HCC 的预后标志物，并可能成为潜在的药物靶点。

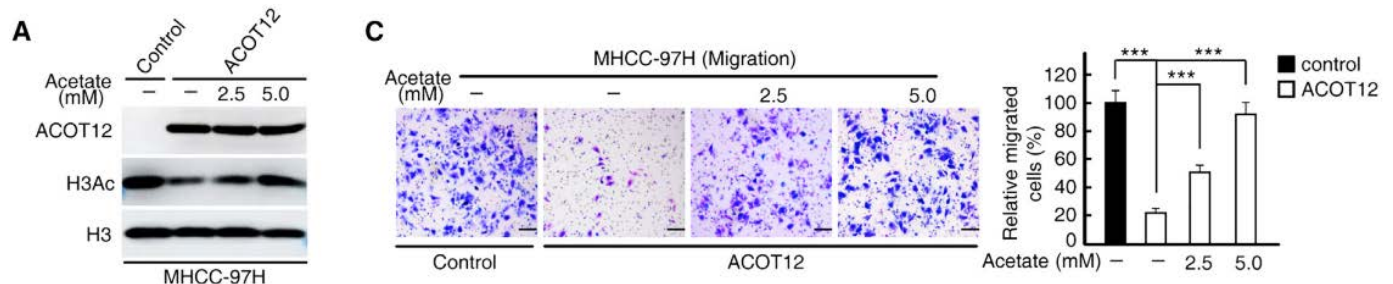
在之前已报道的工作中，此团队采用全基因组 cDNA 芯片分析伴有或不伴有转移的原发性肝癌或结直肠癌（CRC）纯肿瘤细胞基因表达谱的差异，并发现与非转移性 HCC 和 CRC 相比，转移性 HCC 和 CRC 中 ACOT12 表达显著下调。为了验证其预后价值，作者对来自 150 名患者的 HCC 组织进行了一项基于组织微阵列的免疫组化研究，结果证实 ACOT12 的下调与 HCC 患者的不良预后密切相关。

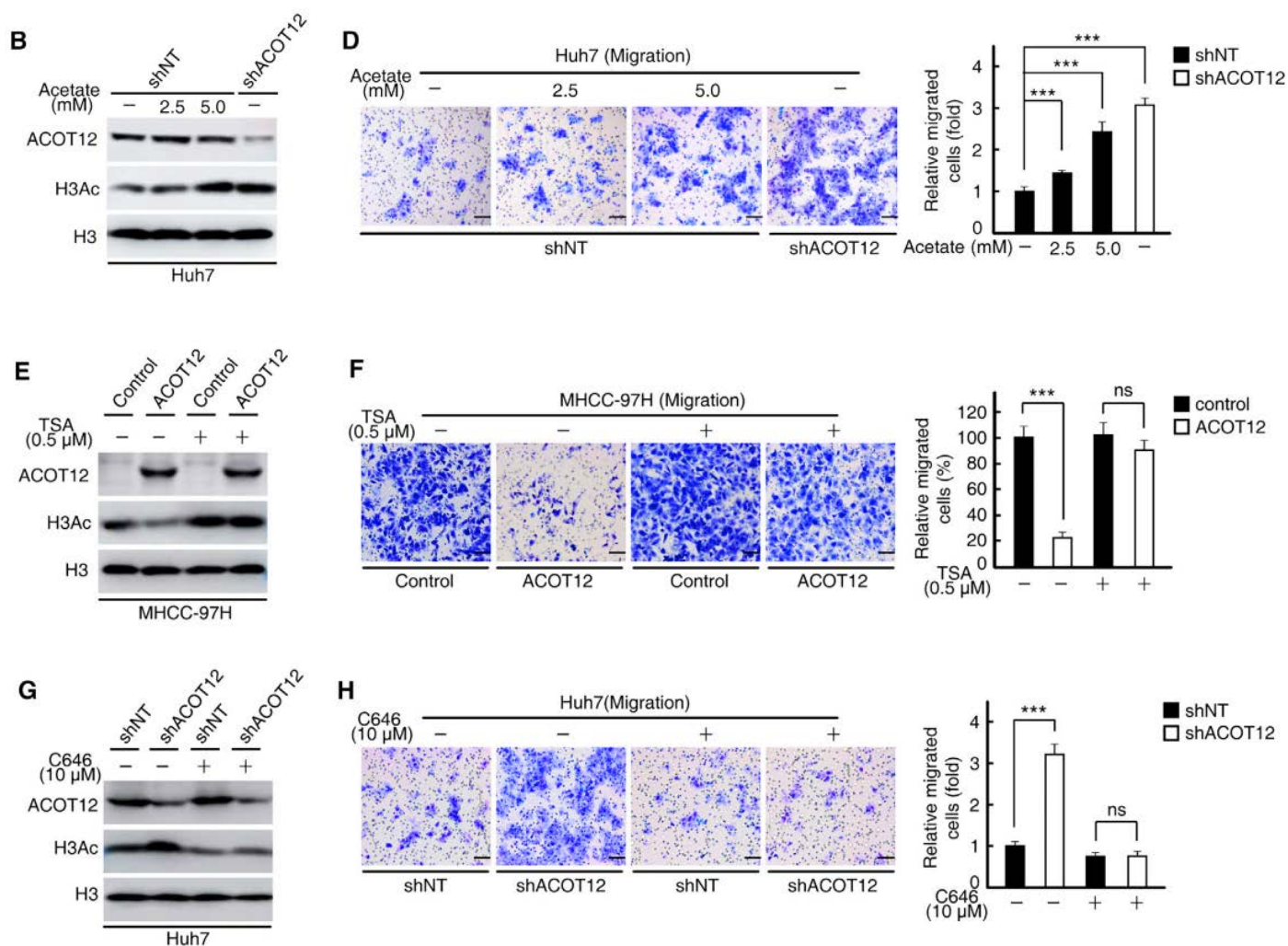


紧接着，作者们在体内和体外都进行了功能获得和敲除研究，以评估 ACOT12 在 HCC 细胞中的的功能性作用。在 MHCC-97H 及 HCC-LM3 细胞株中，发现过表达 ACOT12 可显著抑制的体外细胞迁移和侵袭，而在 Huh7 和 PLC 细胞株中，沉默 ACOT12 可显著增强其迁移和侵袭能力。结果证实 ACOT12 在抑制 HCC 转移中发挥重要作用，并提示 ACOT12 的酶活性是其抗转移作用所必需的。



前人研究已表明 ACOT12 可将乙酰辅酶 A 水解成乙酸酯和辅酶 A (CoA)，作者检验了调控 ACOT12 表达对乙酸酯和辅酶 A 水平的影响，证实 ACOT12 可调控肝癌细胞中乙酰辅酶 A 的水平 and H3 乙酰化，紧接着，为了验证 ACOT12 的抗转移作用是否需要依赖于这两个过程，作者用组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂 Trichostatin A (TSA)，或 p300 乙酰转移酶抑制剂 C646 (或姜黄素) 来处理细胞，以调节 H3 乙酰化水平。发现 TSA 处理阻碍了过表达 ACOT12 对降低 MHCC-97H 细胞 H3 乙酰化和抑制细胞迁移的作用，反之，C646 或姜黄素处理阻碍了敲除 ACOT12 对增加 Huh7 细胞 H3 乙酰化的影响，其促细胞迁移能力的作用也被阻断。类似的实验也证明乙酰辅酶 A 水平降低是 ACOT12 发挥抗转移作用的必要条件。





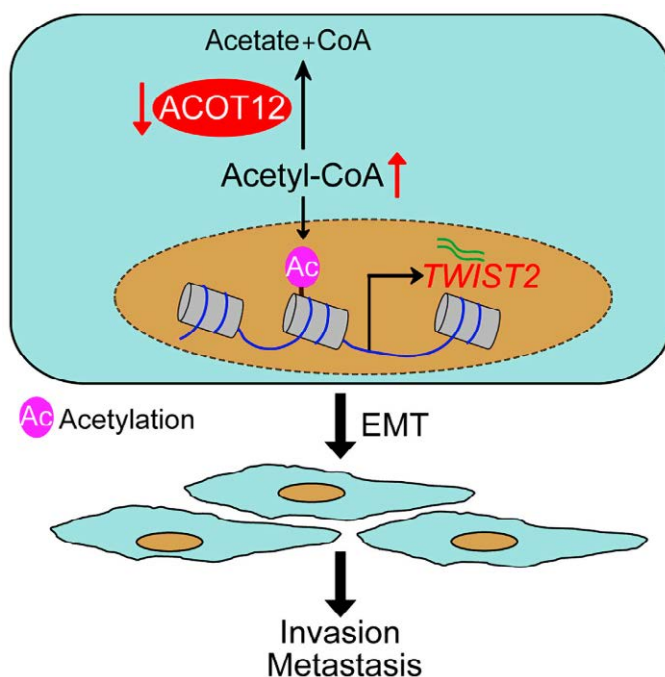
众所周知，组蛋白乙酰化与转录活性有关。为了阐明 ACOT12 抑制 HCC 转移的机制，作者进行了全基因组 cDNA 阵列分析，以确定 ACOT12 下调的潜在转录靶点。结果确定了四个重叠基因，包括 TWIST2、ADH1c、TTN 和 FAT3，接着他们在一个独立的样本集中验证了这些潜在候选选项的表达。值得注意的是，TWIST2 是唯一在过表达 ACOT12 的 MHCC-97H 细胞中下调而在过表达 ACOT12m 的 MHCC-97H 细胞中未明显下调的基因。验证结果还证明 TTN 和 FAT3 是微阵列分析的假阳性结果。这些都指向 TWIST2 可能是参

与 ACOT12 介导的抑制肝癌转移的下游基因。TWIST2 是上皮间质转化（EMT）的关键转录因子，EMT 在肿瘤细胞侵袭转移中发挥重要作用。接下来，作者通过 western blot 验证了调节 ACOT12 表达对 TWIST2 及其在 HCC 细胞中的靶点的表达的影响。一系列后续实验证明，ACOT12 通过改变乙酰辅酶 A 水平和改变其启动子区域的 H3 乙酰化来调控 TWIST2 表达，也就是说，ACOT12 通过表观遗传学下调 TWIST2 表达，进而抑制 HCC 的转移。

最后，作者在原位异种移植模型和人类 HCC 样本中验证了上述结论，最终这些结果有

力地支持了 ACOT12 下调与人类肝癌乙酰辅酶 A 水平升高、H3 乙酰化和 TWIST2 表达之间的正相关关系。

总之，此项研究表明 ACOT12 的下调是 HCC 转移的一个重要特征。ACOT12 的下调增加乙酰辅酶 A 水平，并通过表观遗传学诱导 TWIST2 表达导致 EMT，进而促进 HCC 的转移。ACOT12 可能成为肝癌转移的一种新的预后标志物，设计可刺激 ACOT12 活性的小分子靶向药物可能为抑制肝癌转移提供一种新思路。



【参考文献】

Roessler S, Lin G, Forgues M, et al. Integrative genomic and transcriptomic characterization of matched primary and metastatic liver and colorectal carcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(1):88-98.



***Cancer Discovery*: β -连环蛋白活化在肝癌治疗中促进免疫逃逸和抗 PD-1 治疗耐药**

肝癌是发生率和死亡率最高的消化系统肿瘤之一，每年造成全球 70 多万人死亡。在过去的几十年中，肝癌的手术、射频消融、介入治疗、放化疗以及靶向治疗等多种治疗方式取得了极大的进展。肿瘤免疫治疗是当下十分热门的研究方向，也是被认为最有可能治疗恶性肿瘤的方法之一。尽管目前这种治疗方式在一部分肝癌患者的治疗过程中颇见成效，但大多数肝癌病人仍缺乏反应，预后差异巨大。

原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

在这项研究中，研究人员通过新型小鼠模型模拟人类肝癌的发生，发现 CTNNB1 (β -连环蛋白) 在肝癌的免疫调节及免疫检查点阻断治疗中起到了关键作用。 β -连环蛋白的激活能诱使 CD103⁺ 树突状细胞和抗原特异性 T 细胞的缺陷募集，从而抑制抗肿瘤免疫。

MYC (约 17% 为扩增) 和 TP53 (约 33% 缺失或突变) 是肝癌患者中突变频率最高的两个基因。研究人员首先利用流体动力学尾静脉注射的方法注射载体基因，靶向小鼠肝细胞基因 MYC 过表达和 p53 缺失，建立小鼠模型 MYC-luc, sg-p53 和 MYC-lucOS ; sg-p53 (表达 SIYRYYGL, SIINFEKL 和 OVA323-339 外源性抗原)，模拟人类肝癌的发生。通过观察发现，在两组小鼠中，携带 MYC-lucOS, sg-p53 肿瘤的小鼠无明显肿瘤生长，且明显生存获益。而在 Rag2^{-/-} 小鼠和给予 CD4⁺ 和 CD8⁺ 抗体处理的 WT 小鼠中 MYC-lucOS, sg-p53 肿瘤失去这种优势。表明在 MYC 过表达和 p53 缺失的情况下，外源抗原的表达引发了由 CD8⁺T 细胞介导的免

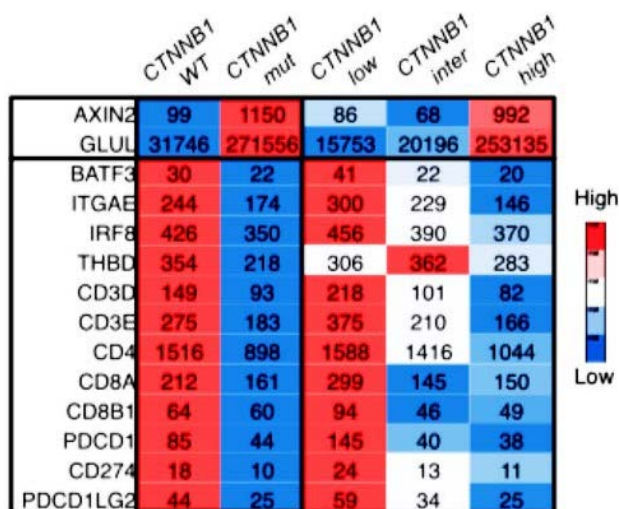
疫监视。

紧接着，研究人员对两组小鼠的肝脏肿瘤组织进行 RNA 测序分析，发现在携带 MYC-lucOS, sg-p53 肿瘤的小鼠中，与 CTNNB1 (β -连环蛋白) 突变相关的分子显著富集。且携带 MYC-lucOS, CTNNB1 与 MYC-luc, CTNNB1 肿瘤的两组小鼠生存时间和肿瘤大小无明显差异。结合前期对肝癌患者样本的转录分析发现 CTNNB1 突变与 T 细胞排斥存在相关性，表明 β -连环蛋白激活可能参与肝癌患者免疫逃逸和 PD-1 抵抗的过程。

为了进一步确定 β -连环蛋白激活诱发免疫逃逸的机制，研究人员对健康小鼠、携带 MYC-lucOS, CTNNB1 或 MYC-lucOS, sg-p53 肿瘤的小鼠进行肝脏流式细胞学分析，发现在 MYC-lucOS, sg-p53 肝脏中，SIINFEKL 特异性 CD8⁺T 细胞和树突状细胞 (DC1) 更为丰富。研究者还发现携带了 MYC-lucOS, sg-p53 肿瘤的 Batf3^{-/-} 小鼠中，由于 DC 的缺失消除了 WT 小鼠中观察到的生存获益。证明树突状细胞是活化

抗原特异性 CD8⁺T 细胞的关键。

研究者根据 CTNNB1 突变型肝癌患者的基因富集程度将 360 名肝癌患者分为低、中、高三层。与 β- 连环蛋白通路低度活化组相比，中度活化与高度活化的肝癌患者免疫细胞的转录产物表达更少。进一步表明 β- 连环蛋白通路的激活水平对免疫排斥的程度有影响。



研究人员通过 RNA 测序定量分析 MYC-luc, sg-p53 肿瘤（对照，未暴露于免疫压力）和 β- 连环蛋白驱动肿瘤中趋化因子的表达（MYC-lucOS, CTNNB1 和 MYC-luc, CTNNB1），发现并证实了 β- 连环蛋白通路的活化程度与 CCL5 降低水平密切相关，并在 TCGA HCC 患者样本中验证了这一结论。此外，与携带 MYC-luc, CTNNB1-CCL5 肿瘤的小鼠相比，携带 MYC-lucOS, CTNNB1-CCL5（CCL5 过表达）肿瘤的小鼠肿瘤的形成率与生存时间都明显延迟，即 CCL5 的重新表达恢复了正常的免疫监视。但在树突细胞缺陷型 Batf3^{-/-} 小鼠中生存率降低。并进一步证实了 CCL5 在产生抗肿瘤免疫应答中的重要作用。

研究人员还发现携带 MYC-lucOS, sgp53 的

小鼠对抗 PD-1 治疗有反应，而携带 MYC-luc, sg-p53 肿瘤的小鼠却没有反应，证明肿瘤抗原的表达是响应抗 PD-1 疗法的必要条件。而在 β- 连环蛋白驱动的肿瘤中，MYC-lucOS, CTNNB1 或 MYC-luc, CTNNB1 模型均对抗 PD-1 治疗无反应。同样，10 名 CTNNB1 活化突变的肝癌患者中无一例对抗 PD-1/PD-L1 治疗有反应，而 50% 的 CTNNB1-WT 患者有反应。证明在肝癌中，β- 连环蛋白激活促进对免疫疗法的抵抗。

西奈山医院收集了 15 名接受 nivolumab 治疗的 HCC 患者的肿瘤标本。其中，6 名（40%）患者对抗 PD-1 治疗有反应，中位生存时间为 22.2 个月，9 名（60%）患者无反应，中位生存期为 6.2 个月（ $P = 0.034$ ）。值得注意的是，3 名携带 CTNNB1 突变的患者中，2 名患者为无应答者，1 名为应答者。这与先前的数据一起表明 CTNNB1 在促进肝癌抵抗 PD-1 治疗中起到了重要的作用。

这项研究证明了在肝癌细胞，β- 连环蛋白的激活导致了 CD103⁺ 细胞的缺陷募集。CD103⁺ 树突状细胞是产生有效抗肿瘤免疫应答的关键细胞，树突细胞的募集缺陷反过来又削弱了肝脏中的抗原特异性 CD8⁺T 细胞的浸润，进一步促进了免疫逃逸的发生。该研究揭示了 β- 连环蛋白在肿瘤免疫治疗中的作用，也为后续找出提示患者免疫治疗受益的生物标志物提供了方向。

【参考文献】

Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sánchez P, et al. β-Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer Discov, 2019, 9(8):1124-1141

GUT: 肝癌联合免疫治疗新方向: 靶向 M-MDSC 内增强子显著提高免疫治疗疗效

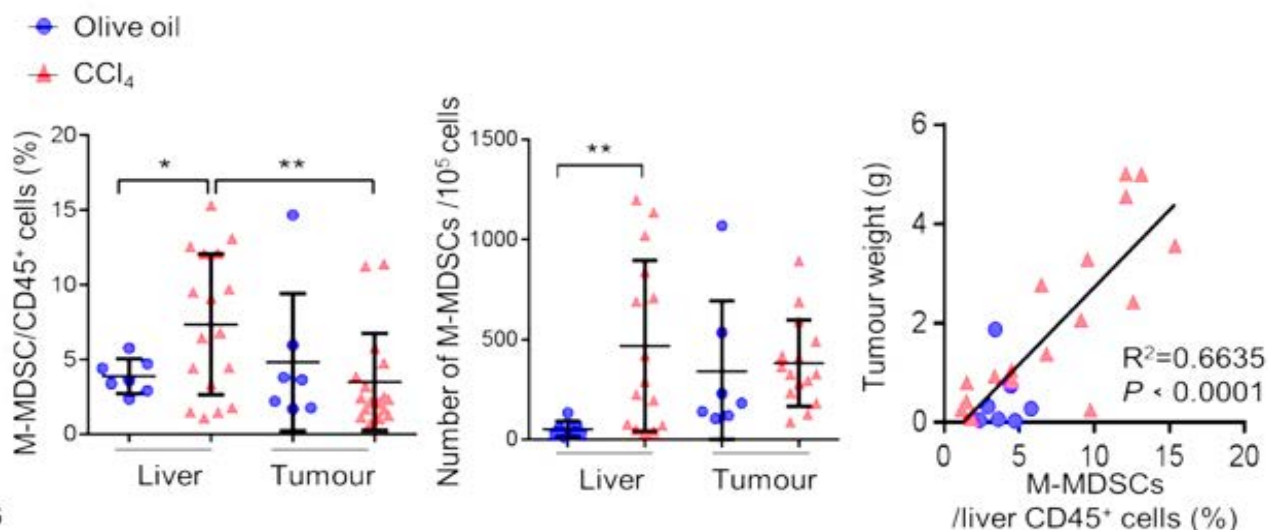
作为世界上致死率最高的癌种之一, 肝癌的发生、发展及治疗一直是研究热点。肝癌的主要危险因素包括慢性乙型肝炎病毒感染和丙型肝炎病毒感染、酒精性肝炎、非酒精性脂肪性肝病等。大多数危险因素在病理上具有纤维化的背景, 但纤维化对肝癌发生、发展及治疗的影响尚未完全阐明。近年来, 免疫治疗的兴起为肝癌治疗提供了新的手段, 针对进展型肝癌应用 PD-1/PD-L1 抗体临床试验也报导了良好的结果, 然而相对肺癌、黑色素瘤等实体瘤, 肝癌免疫治疗的客观缓解率仍较低。近期, 来自香港大学 Alfred Sze-lok cheng 研究团队, 针对肝纤维化背景下的单核细胞样 - 髓系来源免疫抑制细胞 (M-MDSC) 的一系列研究, 揭示了 M-MDSC 对肝癌发展及治疗的影响, 为肝癌的免疫治疗提供了新方向, 研究成果于 2019 年 4 月发表在 *GUT* 杂志上。

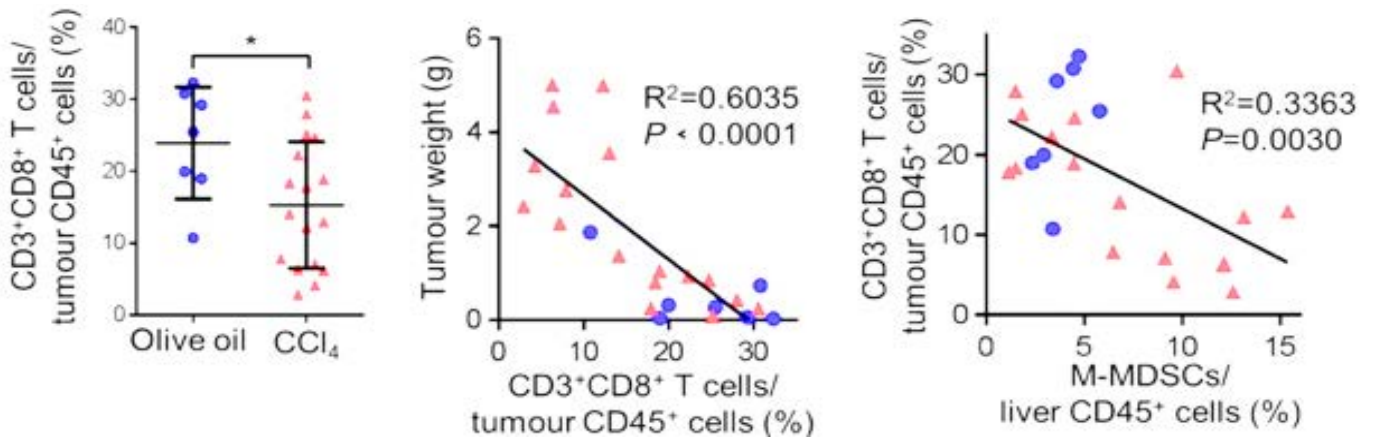
原创专家述评: 袁响林教授; 尹菡博士

1 肝纤维化通过增加M-MDSC浸润促进肝癌进展

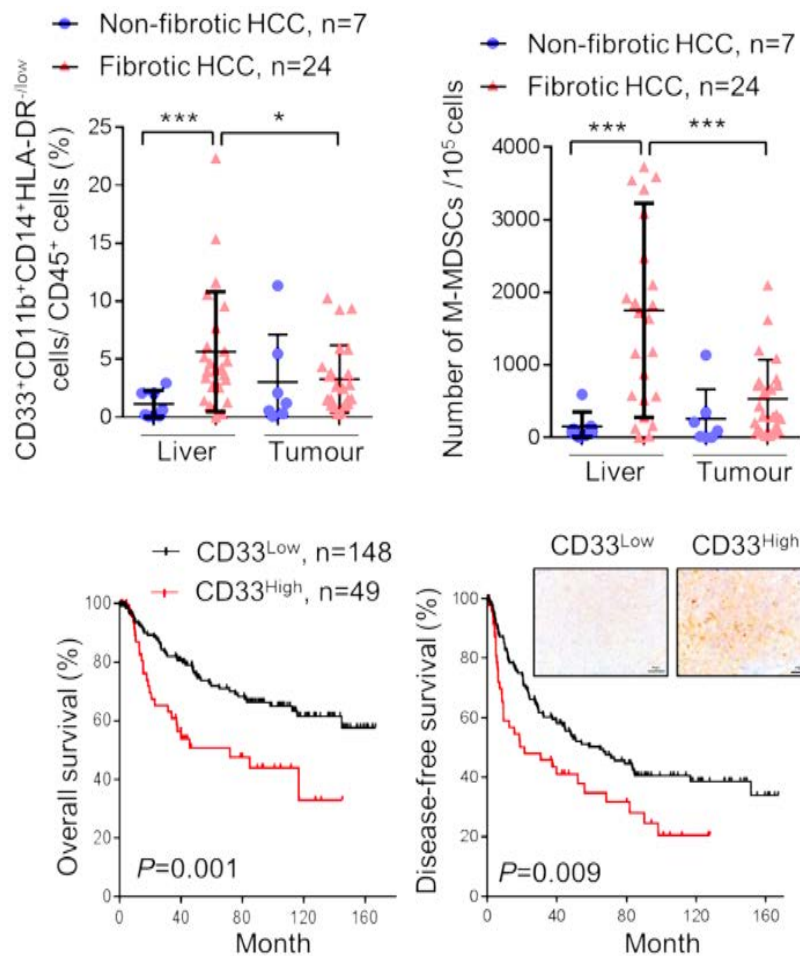
研究者首先通过 CCl₄ 诱导小鼠肝脏纤维化模拟肝癌发生前的纤维化微环境, 以橄榄油处理作为对照, 在此基础上通过小鼠肝脏原位注射建立肝癌模型。通过对肿瘤重量及免疫浸润细胞分析, 发现经过 CCl₄ 处理的小鼠肿瘤更重, 肝

脏和肿瘤内 M-MDSC 比例更高, 而 CD8⁺ T 细胞显著减少。进一步分析发现, M-MDSC 的比例与肿瘤重量成正相关, 与 CD8⁺ T 细胞成负相关 (Fig.1)。这说明, 纤维化环境可能有助于肝癌的进展, 这种关联可能是由于 M-MDSC 增多, T 细胞浸润受抑制有关。





研究者进一步收集了 24 名有肝脏纤维化背景和 7 名无纤维化背景的肝癌患者肿瘤标本，通过对标本中 M-MDSC 染色，发现纤维化的肝脏及肿瘤内部有显著的 M-MDSC 聚集。CD33 为人 M-MDSC 特征性表面标志之一，研究者通过对 197 名患者的肿瘤细胞进行免疫组化染色，发现 CD33 阳性率高的患者，其肿瘤恶性程度更高、生存更差 (Fig.2)。这进一步证实了微环境中的 M-MDSC 对肝癌进展的影响，纤维化环境中的 M-MDSC 可能是预测临床上肝癌进展和恶性程度的重要指标之一。



2 肝纤维化通过影响M-MDSC内源p38 MAPK通路影响M-MDSC分布及功能

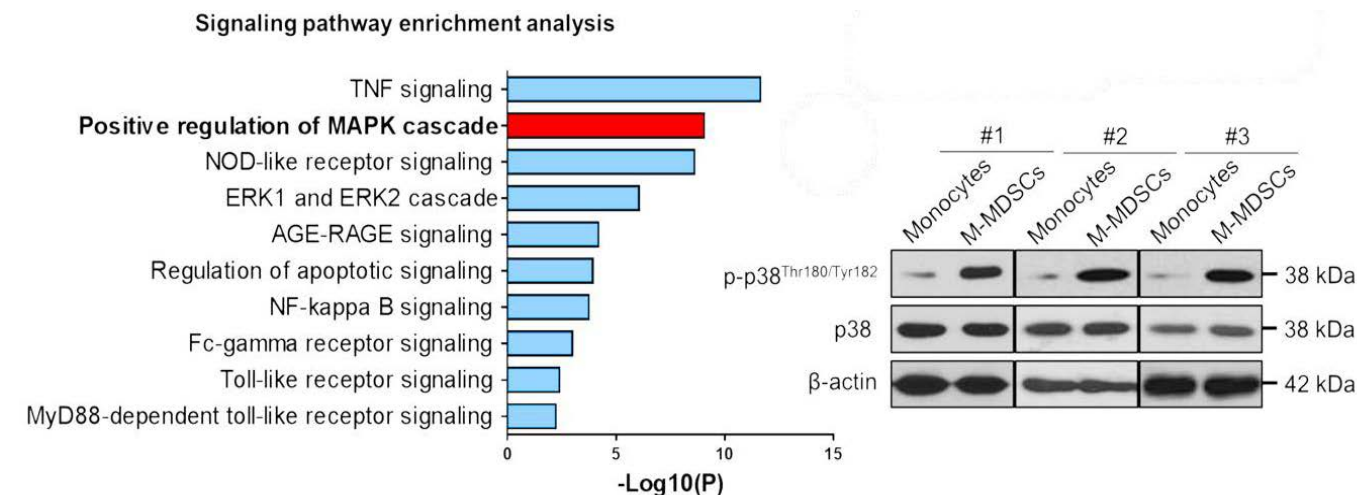
为了探索纤维化对 M-MDSC 的影响机制，研究者将人外周血单个核细胞 (PBMC) 与人肝星状细胞系 LX-2 上清共培养，得到了 M-MDSC，该 M-MDSC 具有与纤维化型肝癌中相似的表型及功能 (抑制 CD8⁺ T 细胞)。针对此 M-MDSC

的高通量测序揭示了其 MAPK 正调节通路有显著上升，研究者进一步通过 western blot 证实了此结论 (Fig.3)。

为了进一步证明 p38-MAPK 通路对微环境中 M-MDSC 的影响，研究者对纤维化荷瘤小鼠应用 p38 抑制剂 GW85653，发现其 M-MDSC 浸润显著下降，且其肝癌肿瘤重量及异质性显著下降

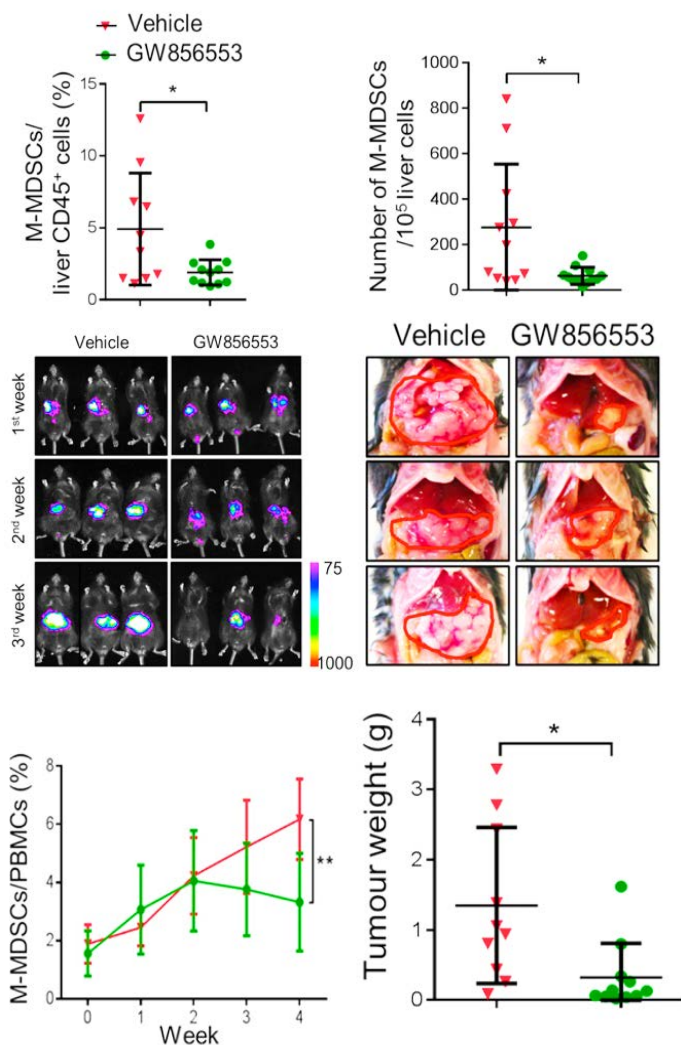
(Fig.4)。研究者进一步对纤维化肝癌患者与无纤维化肝癌患者的 M-MDSC 比较, 同样发现了肝纤维化背景的肝癌患者 M-MDSC 内磷酸化 p38 水平显著高于无纤维化患者, 这一发现证实了动物

实验的结果。将肝纤维化患者的 PBMC 分离后, 再用 p38 抑制剂处理, 其 M-MDSC 比例显著下降 (Fig.5)。这提示, 纤维化通过激活 p38 MAPK 正调节通路, 影响 M-MDSC 浸润, 影响肝癌的进展。



3 BET抑制剂的应用: 将冷肿瘤变成热肿瘤

为了进一步了解 p38-MAPK 通路调节 M-MDSC 的机制, 研究者将视线集中到了该通路的染色质调节功能上。经过对肝星状细胞系 LX-2 诱导出的 M-MDSC 内源通路一系列研究发现, 该通路的激活导致肝星状细胞诱导的 M-MDSC 内部增强子 C/EBP β 及 p300 依赖的增强子调节途径显著激活, 参与 M-MDSC 的调节。BET 蛋白的主要作用为招募并参与增强子 RNA 的合成, 研究者进一步使用 BET 抑制剂 JQ1, 发现此抑制剂在抑制 C/EBP β 、p300 等合成的同时, 降低了 M-MDSC 的扩增及其抑制杀伤 T 细胞的功能。BET 抑制剂 i-BET762 目前处于 I 期 /II 期临床研究中, 研究者将此抑制剂应用于纤维化肝癌患者 PBMC, 发现 M-MDSC 的比例显著下降, 证实了 BET 抑制剂对纤维化肝癌患者可能是有效的。这既表明了 p38-MAPK 通路是通过其增强子调节通路影响 M-MDSC 的一系列功能, 也



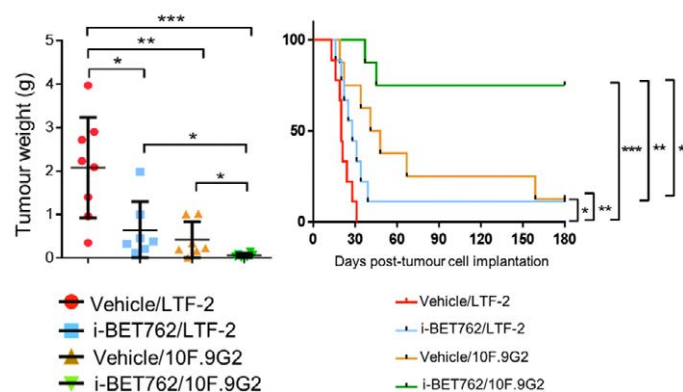
给 BET 抑制剂临床应用带来了新的思路。

► 总结

本篇研究通过对多种模型下纤维化肝癌免疫微环境的探索，首次揭示了纤维化中 M-MDSC 对肝癌发展及治疗的影响，并为免疫治疗找到了新的适用人群和联用方式。研究者首先发现，纤维化肝癌的小鼠及患者中 M-MDSC 比例越高，其肿瘤的生长速率越快、恶性程度越高，生存期相应缩短，M-MDSC (CD33) 可能作为预测纤维化肝癌预后的标志之一。在对 M-MDSC 的功能调节探索过程中，研究者发现了 M-MDSC 的功能受到 p38-MAPK 通路染色质调节功能的影响，从而成功应用 BET 抑制剂靶向增强子，减轻了微环境中 M-MDSC 对免疫系统的抑制作用。BET 抑制剂的应用有效的将纤维化肝癌的“冷肿瘤”环境变成“热肿瘤”，为免疫治疗提供了基础。BET 抑制剂和 PD-L1 的联用达到了肿瘤的完全消除，并显著延长了小鼠的生存期，取得了较好的效果，为 BET 抑制剂联合 PD-L1 临床试验的开展提供了理论依据。此外，针对 p38-MAPK 通路的机制研究，同样为 p38-MAPK 抑制剂的临床应用提供了依据。

4 BET抑制剂联合PD-L1免疫治疗：最佳的抗肿瘤效应

上述研究揭示了 BET 抑制剂能通过抑制 p38 MAPK 的染色质调节功能，抑制 M-MDSC 的功能。因此，研究者在肝纤维化 - 肝癌小鼠肿瘤模型中应用 i-BET762 联合 PD-L1 免疫治疗 (10F.9G2)，发现联合用药时肿瘤达到了完全消除，且肝细胞中及肿瘤内 M-MDSC 均显著降低，CD8⁺T 细胞显著增加，联合用药的小鼠生存期显著延长。



【参考文献】

Liu M, Zhou J, Liu X, et al. Targeting monocyte-intrinsic enhancer reprogramming improves immunotherapy efficacy in hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2019, 10.



p38 γ 在细胞周期进展和肝脏肿瘤发生过程中的关键作用

原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

细胞周期是受到细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) - 细胞周期蛋白复合物严格调控的过程，但是，从 G0 期到 G1 期的转换过程是如何调控的仍然有待研究。该研究证明了 p38 MAPK γ (p38 γ) 作为 CDK 样激酶与 CDK 相互配合，从而调节细胞周期过程。p38 γ 与 CDK 家族成员具有高度一致的序列同源性，抑制敏感性和底物特异性。在小鼠肝脏实验中，p38 γ 通过在已知的 CDK 靶点位置上促进视网膜母细胞瘤肿瘤抑制蛋白的磷酸化来诱导部分肝切除术后的细胞增殖，而缺乏 p38 γ 或使用 p38 γ 的抑制剂吡非尼酮可以防止化学方法诱导的肝脏肿瘤形成。此外，人类肝细胞癌的活组织检查显示 p38 γ 高表达，因此提示 p38 γ 可能成为肝癌的治疗靶点。

尽管 CDKs 在细胞周期进程中的作用已经明确，但是在大多数细胞类型中触发细胞周期的启动的精确分子机制是未知的。p38 MAPKs (p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ) 和 CDKs 属于 CMGC 蛋白激酶超家族。这个超家族的蛋白质催化结构域的序列分析表明 p38 MAPKs 与 CDKs 家族形成了姐妹群。对激活状态的 CDK1 和 CDK2 的三维 (3D) 搜索显示与其他应激激酶相比，p38 γ 表现出更高的结构相似度。分子动力学模拟显示 CDK1 抑制剂 RO3306 对 p38 γ 和 CDK1 的 ATP 位点结合具有相似的亲和力；对 CDK2 和 p38 δ 的位点亲和力较弱，对 p38 α

没有亲和力。这表明 p38 γ 和 CDK1 具有相似的抑制机制。

为了检测 p38 γ 和 CDKs 是否共有共同的底物，该研究对视网膜母细胞瘤肿瘤抑制蛋白 (Rb) 进行了研究。Rb 在 G0 期中仍然存在低磷酸化和活化，但在细胞周期进程期间，它被 CDKs 顺序磷酸化；该蛋白随后的失活促进进入细胞周期和增殖。体外激酶测定显示 p38 γ 同样在 12 个 CDK 靶点位置上磷酸化 Rb，并且在肝脏裂解物中检测到 p38 γ 的免疫沉淀物中存在 Rb (图 1a)。通过肝脏特异性腺相关病毒感染的 p38 γ 敲除 (Mapk12 $^{-/-}$) 小鼠表达组成型活性形式的 p38 γ (AAVp38 γ^*)，表明在肝脏中 p38 γ 介导体内 Rb 的磷酸化 (图 1b)。这些数据表明 p38 γ 具有与 CDKs 的相似之处：两者具有结构同源性，在 ATP 结合位点上对 RO3306 具有类似的结合动力学以及类似的底物特异性。

在肝细胞中，磷酸化 Rb 蛋白的失活足以促进 G0 期向 G1 期的转换。部分肝切除术 (PHx) 是一种成熟的肝细胞增殖模型，在该过程中 p38 γ 磷酸化并被激活 (图 1c)。为了解决 PHx 后 p38 γ 介导的 Rb 磷酸化的生理效应，该研究比较了肝细胞中缺乏 p38 γ 的小鼠 (AlbCre-p38 γ) 和对照 AlbCre 小鼠 (AlbCre $^{+/-}$) 的肝细胞增殖情况。研究发现，PHx 诱导对照小鼠中 Rb 的磷酸化，而这种作用在 AlbCre-p38 γ 小



鼠中消除 (图 1d) 且 CDKs 的表达没有变化。AlbCre-p38 γ 小鼠中 Rb 磷酸化的缺失与细胞周期蛋白 E 和 A 的诱导减少相关。通过 BrdU 法测定, Ki67 免疫染色和增殖细胞核抗原表达 (图 1e-g) 检测发现, AlbCre-p38 γ 小鼠的肝脏 DNA 显著降低。而 AlbCre-p38 γ 小鼠肝脏再生程度降低表明肝细胞增殖也明显减少 (图 1h)。总之, 这些结果表明 p38 γ 是肝细胞中 Rb 磷酸化和肝脏再生所必需的。

p38 γ 缺失会影响肝再生, 但是并不影响生存 (扩展数据图 3a)。这与 PHx 后 60 h Rb 磷酸化和肝细胞增殖达到峰值的结果一致。p38 δ 是与 p38 γ 最密切相关的 p38 同种型, 可以弥补 p38 γ 缺乏并可使其底物磷酸化。AlbCre-p38 γ 小鼠的 p38 δ 的表达在 PHx 后增加, 并且在缺乏这两种激酶的肝细胞中 (AlbCre-p38 $\gamma\delta$), Rb 磷酸化被消除, 肝细胞增殖也显著延迟。此外, 激活 p38 γ 介导的细胞周期调控不仅限于肝细胞, p38 γ 也被发现在葡聚糖硫酸钠处理的肠上皮细胞中磷酸化 Rb。

已知 CDK1 消融可以预防肝脏肿瘤发生。值得注意的是, 人肝细胞癌 (HCC) 样本中 CDK1 和 p38 γ 的突变率相似, 而位于 p38 γ 的 L16 环突变会诱导其活化。本研究发现 p38 γ 在人类 HCC 细胞系中的表达高于原代肝细胞, 并且基因工程 HCC 小鼠模型的肝脏中 p38 γ 被激活。此外, p38 γ 染色在人体 HCC 活组织检查中相比非肿瘤组织显著增强 (图 2a)。MAPK12 表达与 ACTA2 和 COL1A 的表达直接相关, 这些基因分别编码肌动蛋白和胶原蛋白, 它们是肝脏纤维化的标志物, 而肝脏纤维化通常会发生在肝癌之前

(图 2b)。此外, 高 p38 γ 表达也与预后较差的肝癌病例相关 (图 2c), p38 γ 敲低会减少 HCC 细胞系中的增殖以及集落形成。这些研究结果可能表明 p38 γ 可能参与人体肝脏肿瘤的发生发展。

注射二乙基亚硝胺 (DEN) 后 p38 γ 会被激活, p38 γ 缺乏则明显减弱 DEN 诱导的 Rb 磷酸化和代偿性增殖, 这与增殖细胞核抗原表达降低以及减少的肝细胞增殖相关。此外, HCC 在 AlbCre-p38 γ 小鼠中被强烈抑制, 肿瘤减少减小, 生存时间增加 (图 2d-g)。

在通过四氯化碳或与高脂肪饮食组合诱导的肝癌模型中, AlbCre-p38 γ 小鼠被很好保护。本研究接下来评估了 p38 γ 失活对肝脏肿瘤发生的影响。p38 γ 抑制剂吡非尼酮结合并抑制 p38 γ 但不影响 CDK2 活性 (图 3a), 导致野生型小鼠模型中的肝脏 DNA 合成减少但是不影响 AlbCre-p38 γ 小鼠 (图 3b)。吡非尼酮减少了 DEN 处理后的小鼠肝脏肿瘤的数量和大小, 并提高了它们的存活率, 同时没有明显的副作用 (图 3c-e)。此外, p38 γ 抑制剂的治疗作用已经通过在肿瘤建立后使用 AAV2/8-CAG-Cre 对 p38 γ 进行特异性消融后被证实。值得注意的是, 在吡非尼酮处理的小鼠中肿瘤不表达 Rb (图 3f); 这表明在吡非尼酮治疗后, 只有缺乏 Rb 的肿瘤才能够增殖。这些数据与肿瘤抑制因子失活例如 Rb 在肿瘤发展过程中通过染色体突变后的结果一致, 从而表明吡非尼酮可以有效对抗持续表达 Rb 的 HCC 肿瘤。

本研究结果表明 p38 γ 与 CDKs 发生相互作用, 这类似于最近酵母菌中发现的 MAPK 在 CDK 信号传递中的作用。p38 MAPK 蛋白家族

的成员可以分为两类，p38 α 和 p38 β 是一类，p38 γ 和 p38 δ 在另一类。这个家庭的所有成员都有同样的上游 MAPK 激酶激活机制；然而，这两类不共享底物特异性或抑制选择性。p38 α 通过 Rb 的 N-末端磷酸化增加细胞存活，这导致 Rb 对 CDKs6 的失活不敏感，因此在肝细胞中敲低 p38 α 会导致 HCC 的加速进展。这些结果强化了不同类型的 p38 可能有相反的功能的观点。

本研究证明了即使 CDKs 的表达下调，p38 γ 也足以诱导进入细胞周期。这为细胞周期调节提供了新思路，表明不同于典型的促有丝分裂信号和 CDKs 激活途径，细胞周期反而可能是通过应激损伤以及 p38 γ 活化起作用，并最终对细胞周

期进行严密调控。该研究表明当 CDK- 细胞周期蛋白复合物较少时，非经典的 CDK 途径也可以在静止时以不依赖于细胞周期蛋白的方式启动细胞周期。p38 γ 可能代表一种独特类型的激酶，能够使细胞在应激刺激时摆脱静止状态。同时本研究证实 p38 γ 对 Rb 依赖性细胞周期以及肝脏肿瘤的发生发展至关重要，强有力地支持了 p38 γ 作为 HCC 治疗靶点的潜力，并为治疗该疾病提供了一种全新方法。

【参考文献】

Tomás-Loba A, Manieri E, González-Terán B, et al. p38 γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis[J]. Nature, 2019, 568(7753):557-560.

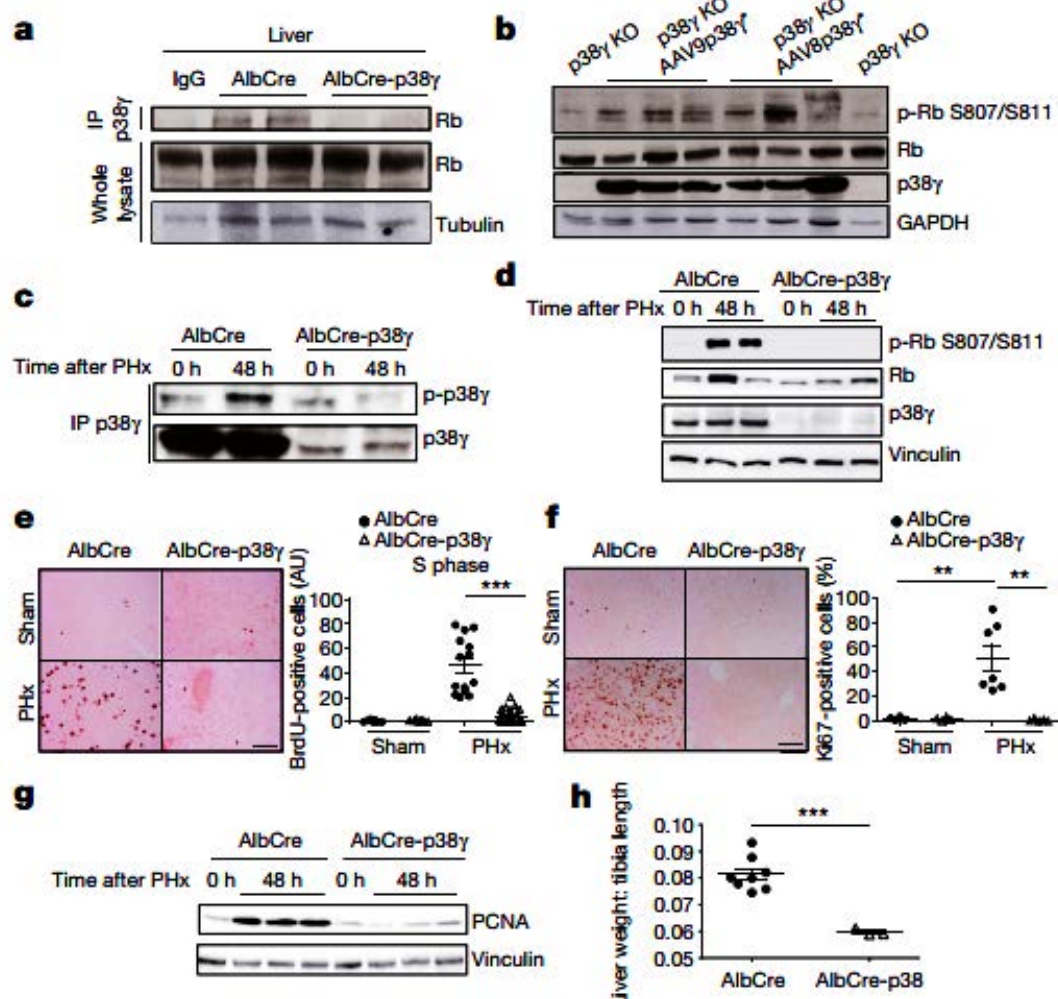


图1 肝部分切除术后p38 γ 磷酸化Rb并促进肝细胞增殖

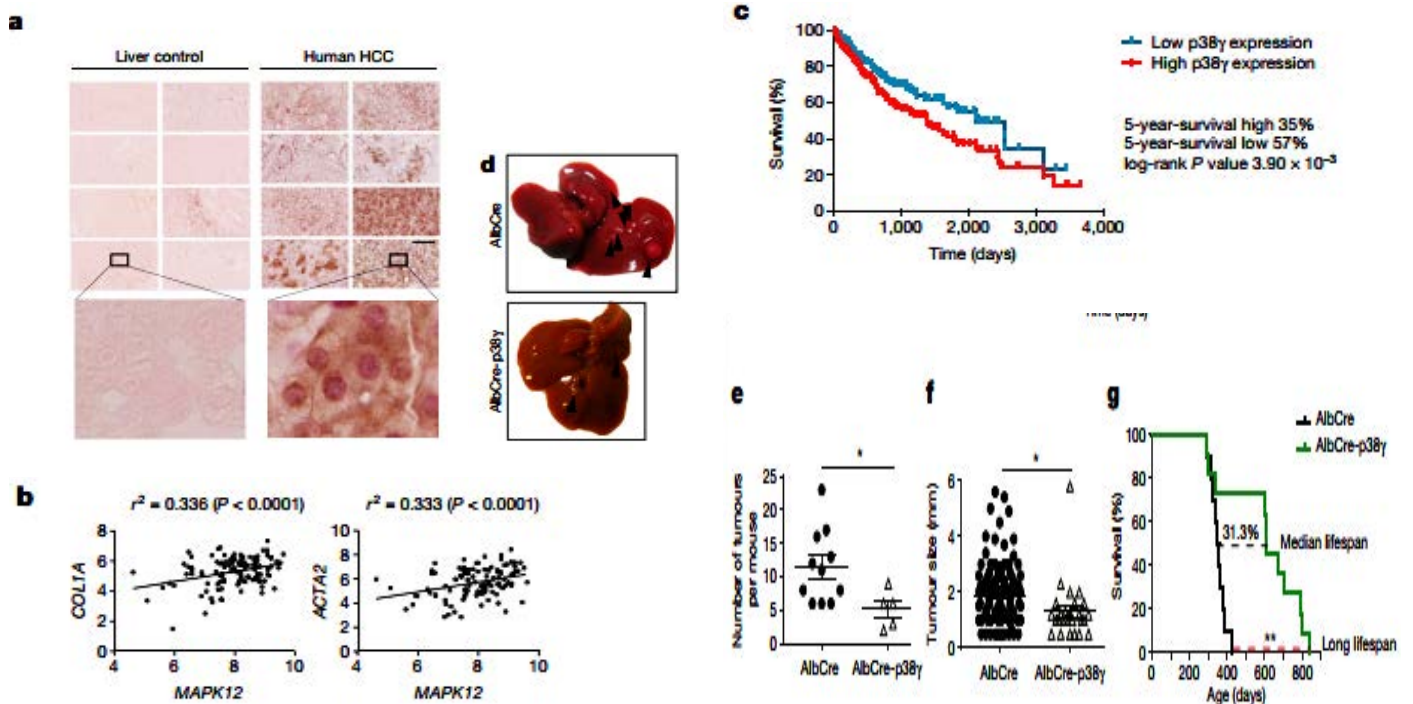


图2 p38γ促进肝细胞癌的发生发展

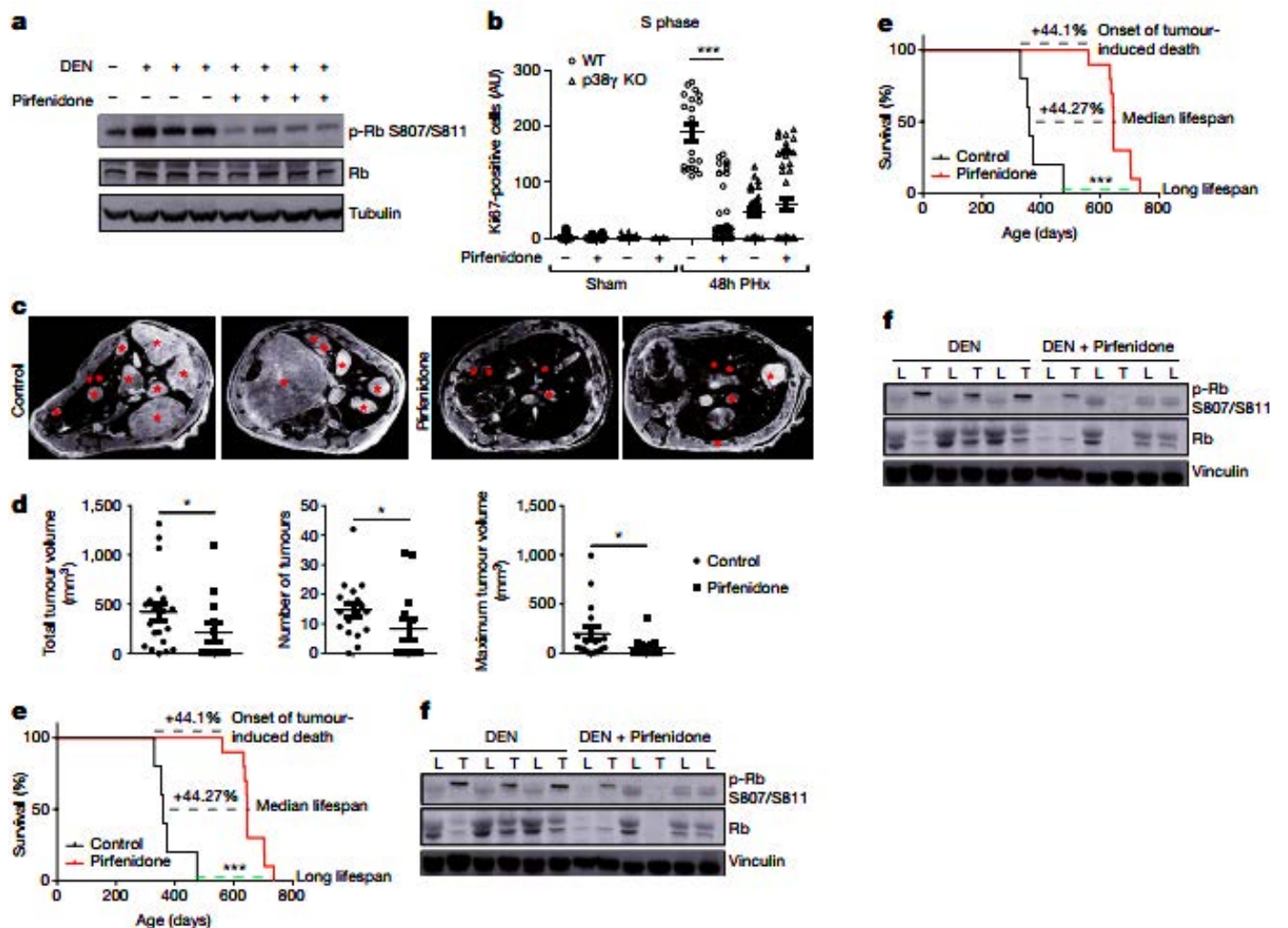


图3 吡非尼酮抑制p38γ活性并对DEN诱导的肝细胞癌起保护作用

Journal of Experimental Medicine: 脂联素引起肝癌发病中的性别差异

临床上,男性的肝癌发生率一直高于女性,是什么造成了这种性别差异呢?本文中的研究团队发现女性机体中由脂肪细胞分泌的脂联素水平较高,脂联素通过激活 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 和 p38 α 来阻断细胞增殖并抑制肿瘤生长。睾酮能激活小鼠和人脂肪细胞中的 JNK 蛋白, JNK 介导脂联素分泌抑制。这一发现提示了脂肪组织与肝癌的作用关系,并在分子层面解释了肝癌发展过程中的性别差异原因,为肝癌的治疗提供了新思路。

原创专家述评:袁响林教授;尹菡博士

2019 年 5 月的 *JEM* 杂志上,Guadalupe Sabio 带领的科学团队发表了一篇题为“Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence”的文章。对肝癌发生的性别差异原因在分子层面进行了阐述。

1 女性的高脂联素水平减少肝癌的发生

研究者首先纳入一组健康受试者,发现女性脂联素水平高于男性。同时他们也在小鼠模型中得到了相同的验证。为了进一步研究性别如何影响脂联素水平,研究者发现了阉割的雄性小鼠的脂联素水平与雌性小鼠一致。为了确定脂联素生产中的性别差异是否影响肿瘤生长,他们在雄性、脂联素 KO (Adipoq^{-/-}) 的雌性小鼠和 WT 小鼠中进行了同种异体移植实验。在 WT 小鼠中,他们观察到雄性的肿瘤比雌性大,而 Adipoq^{-/-} 小鼠没有显示性别差异。

为了进一步评价脂联素对雌性小鼠的保护作用,研究者采用二乙基亚硝胺 (DEN) 诱导的 WT

小鼠肝癌模型和 Adipoq^{-/-} 小鼠肝癌模型。结果显示脂联素的缺乏使肿瘤数目略有增加,证实了女性高脂联素水平能够预防肝癌发生。

2 脂肪组织中缺乏 JNK 1 可以防止肝癌的进展。

脂肪组织 JNK 控制重要脂肪因子的产生来调节肝脏代谢。研究者测试了雄性小鼠的脂肪组织 JNK 活性均高于雌性,这与脂联素水平降低有关。研究者发现睾酮能激活小鼠和人脂肪细胞中的 JNK。为了证明,研究者阉割了雄性小鼠,阉割雄性小鼠脂肪组织 JNK 活性明显降低,而睾酮代替处理后,两组小鼠 JNK 活化程度相似。

接下来文章构建了脂肪组织特异性敲除 JNK 的雄性小鼠 (FKO) 并检测 (FKO) 或对照小鼠 (FWT) 的雄性血清脂联素浓度。脂联素水平在 FKO 雄性显著高于 FWT 雄性,而 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 水平无基因型差异。同种异体移植瘤形成的检测发现在 FKO 雄性小鼠的脂联素水平较高,且肿瘤生长比对照组慢,死后检查显示肿瘤较小。同样地,在 DEN 诱导的肝癌模型中也得

到了相同的结果。

3 高水平的脂联素能阻止FKO雄性小鼠肝癌的发生

为了评价脂联素在 FKO 雄性小鼠抗肝癌中的潜在作用，研究者将 WT 和 JNK 1 缺陷小鼠与缺乏脂联素的小鼠 (Adipoq^{-/-}) 杂交。肿瘤生长在 FWT Adipoq^{-/-} 和 FKOADipoq^{-/-} 雄鼠中是一致的，提示 FKO 雄性中脂联素水平升高是导致其肿瘤生长减少的原因。继而研究者分析了 DEN 诱导的 FWT Adipoq^{-/-} 和 FKOADipoq^{-/-} 雄鼠肝癌的大小以及数目均无明显差异，这表明脂联素在肝癌产生中起到保护作用。

3 脂联素激活AMPKα和p38α阻断癌症进展

脂联素通过激活 p38α 和 AMPK 两条通路在肝脏中传递其信号，在肝癌发展中起到重要作用。为此研究者观察到高脂联素水平的雌性小鼠中，有较高 p38α 和 AMPK 激活的水平。而在 Adipoq^{-/-} 小鼠中未观察到 p38α 和 AMPK 激活的性别差异，提示雌性中这些激酶的激活是脂联素水平升高的结果。研究者又分别用二甲双胍处理动物以激活 AMPK，在移植后第 9、22 天注射含活性 p38α 的逆转录病毒激活 p38α，确定了 p38α 和 AMPK 激活是对雌性小鼠肝癌的保护作用 (图 1)。

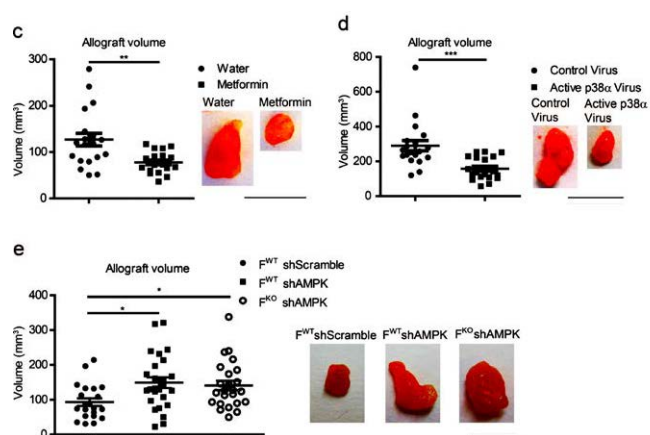
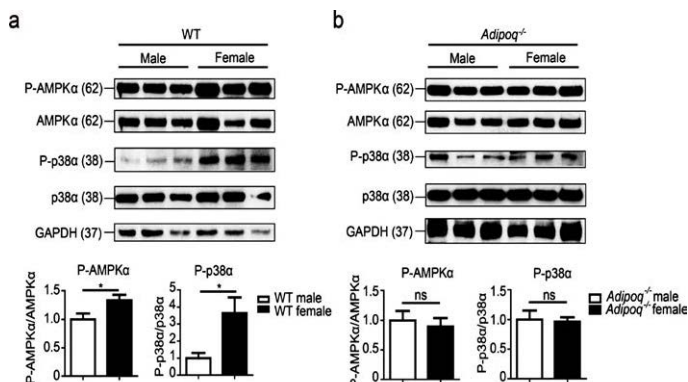


图1 AMPKα and p38α activation protects against tumor growth.

4 总结

肝癌是全世界第四大最常见的癌症死亡原因，男性肝癌的发生率高于女性。文章通过一系列实验证实了，脂肪组织中的 JNK 通过影响脂联素的分泌水平最终影响 p38α 以及 AMPK 的激活从而影响肿瘤增殖。而雄性与雌性小鼠由于性激素的不同，导致脂肪组织中 JNK 活化程度的不同，睾酮能激活脂肪细胞中名为 JNK1 的蛋白的表达，而 JNK1 能够抑制脂联素的产生，最终导致了肝癌的发生在不同性别中存在差异。文章同样提示我们，用于治疗 2 型糖尿病的 AMPK 激活剂二甲双胍也可以提高肝癌患者的生存率，AMPK 正在成为一种重要的代谢肿瘤抑制因子，有望成为癌症预防和治疗的潜在靶点。



【参考文献】

Manieri E, herrera-melle L, Mora A, et al. Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence[J]. 2019, 216(5):1108-1119.

Cancer Cell: 混合型肝癌多重组学分析揭示分子特征及潜在诊断标志物

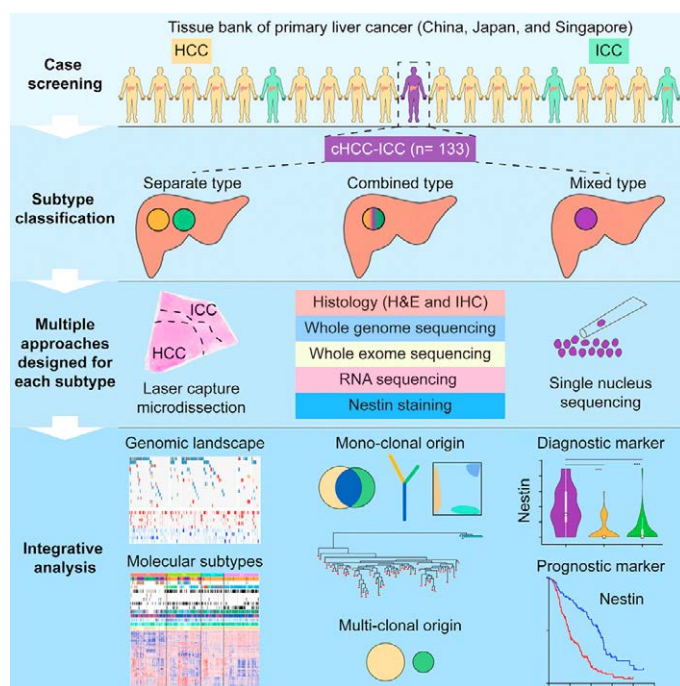
原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

肝细胞癌（HCC）和肝内胆管癌（ICC）是原发性肝癌（PLC）的两种主要类型，分别占约 80% 和 15%。混合型肝癌（cHCC-ICC）是一种罕见的原发性肝癌，长久以来对于其是一种独特的实体癌还是肝细胞癌（HCC）或肝内胆管细胞癌（ICC）的亚型长期存在争议。由于混合型肝癌具有更强的侵袭性和更差的预后，而目前缺乏有效的治疗方法，手术切除仍然是最主要的治疗选择。因此，迫切需要研究混合型肝癌的分子表征，以促进其生物标志物发现，推进其的分子诊断并加速靶向治疗的开发。

2019 年 5 月 23 日发表在 *Cancer Cell* 杂志上，来自北京大学第一医院张宁团队和北京大学生物医学前沿创新中心白凡团队、中山大学肿瘤防治中心曾木圣团队和日本理化研究所（RIKEN）中川英刀团队联合研究的文章

“Genomic and Transcriptomic Profiling of Combined Hepatocellular and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals Distinct Molecular Subtypes” 中，研究人员综合运用多重测序方法以及数据分析手段，全面研究混合型肝癌三种病理亚型的基因组以及转录组特

征，提出了混合型肝癌的分子分型，深入探究了混合型肝癌中两种病理成分即肝细胞癌和肝内胆管细胞癌两种成分的克隆起源关系，并且发现了新的诊断和预后标志物，这些结果为混合型肝癌的临床诊断、预后和治疗提供了重要的生物学和临床见解。



文章提出根据两种肿瘤成分的空间分布，将混合型肝癌分为以下三个亚型：Separate type（分离型）、Combined type（结合型）和 Mixed type（混匀型）。

文章首次构建了 133 个混合型肝癌患者的基因组和转录组学图谱：通过外显子测序、全



基因组测序和转录组测序系统分析了混合型肝癌的高频驱动事件，包括体细胞突变、HBV 插入位点、拷贝数变异，融合基因，结构变异，差异表达基因等。接下来通过与 TCGA，ICGC 等国内外医学团队发表的肝细胞癌和胆管细胞癌数据综合分析比较后，研究者发现：混合型肝癌中 TP53 突变显著富集，同时匮乏肝细胞癌中富集的 CTNNB1 突变，并缺乏胆管细胞癌中富集的 KRAS 突变。研究得到的混合型肝癌基因组图谱以及转录组图谱，显示了混合型肝癌看具有独特的基因组印记，为我们揭开了混合型肝癌分子图谱的神秘面纱。

接下来，研究者通过分子分型综合探究混合型肝癌与肝细胞癌和肝内胆管癌的分子亚型特征，发现 Combined type 混合型肝癌和 Mixed type 混合型肝癌是具有不同临床和分子特征的不同亚型——其中 Combined type 混合型肝癌的分子图谱更接近胆管细胞癌，而 Mixed type 混合型肝癌同肝细胞癌分子图谱相近。此外研究人员还发现这两种亚型的免疫微环境也有所差异，这预示针对两种亚型的免疫治疗或许将取得完全不同的疗效。以上研究结果提示，临床医生在处理这两种类型混合型肝癌时，采取不同的治疗方案区别对待或许能取得更好的疗效。

此外，通过整合激光显微切割，突变肿瘤细胞占比分析和单核测序，该研究进一步揭示了 Separate type 混合型肝癌具有单克隆和多

克隆起源，而 Combined type 和 Mixed type 混合型肝癌都是单克隆来源。混合型肝癌的 HCC 和 ICC 成分是否来自相同的克隆来源是另一个长期存在的问题。本文研究者还通过重构性亚克隆组分析，发现不同表型的病变可以来自相同的克隆起源，表明存在表型转变，亚克隆结构分析显示潜在的转移病变之间的路径。

另外该研究还发现了混合型肝癌新的分子标志物。先前的动物实验证明 Nestin 可能作为混合型肝癌的诊断标志物，由此研究者通过比较分析显示混合型肝癌的 Nestin 的表达水平显著高于 HCC, 但与 ICC 的表达水平无显著差异。随后在多例患者（128 例混合型肝癌、99 例肝细胞癌以及 86 例肝内胆管癌）的免疫组化染色显示，混合型肝癌展现出更高的 Nestin 表达，这提示 Nestin 可作为混合型肝癌的诊断和预后标志物。以上数据表明：高水平的 Nestin 表达是混合型肝癌的关键特征，可以为双线性分化和高细胞可塑性奠定基础。随之的预后分析显示，混合型肝癌患者中 Nestin 表达阳性的患者显示更差的预后，类似的，该结论在肝细胞癌和肝内胆管癌也同样适用。以上研究表明：Nestin 蛋白可以作为混合型肝癌以及肝细胞癌和肝内胆管癌的诊断及预后标志物。

► 总结

该研究中研究者提供了混合型肝癌的详细基因组图谱，并对混合型肝癌与肝细胞肝癌和肝内胆管癌进行了全面比较。综合分析显示，



Combined type (结合型) 和 Mixed type (混匀型) 是具有不同临床和分子特征的不同亚型。Combined type (结合型) 混合型肝癌表现出较强的肝内胆管癌特征, 比如高表达 EPCAM、KRT19 和 PRDM5 以及富集 KRAS 突变和的更高表达 KRAS。相比之下, Mixed type (混匀型) 显示出类似肝细胞肝癌的分子特征, 例如更高水平表达 AFP, GPC3, APOE 和 SALL4, 以及更高水平的血清 AFP。该研究解释了在先前混合型肝癌的研究中先前相互矛盾的观察结果可能由于样本仅涉及混合型肝癌的一种亚型。更重要的是研究发现 Allen 和 Lisa 标准与 cHCC-ICC 的分子分类一致, 可能指导 cHCC-ICC 的未来治疗选择: ICC 治疗可能更适合 Combined type (结合型), 而 HCC 治疗可用于治疗 Mixed type (混匀型) 患者。

值得注意的是, 虽然 Combined type (结合型) 和 Mixed type (混匀型) 是不同的分子亚型, 但它们都显示出干样特征和非常差的预后。如何在混合型肝癌中维持高干性仍然是一个有趣但很少得到探讨的问题。本研究发现在 Combined type (结合型) 和 Mixed type (混匀型) 肝癌中 Nestin 表达显着更高。该研究结果表明 Nestin 可以作为诊断混合型肝癌的生物标志物, 减少 Nestin 表达并将肿瘤细胞从干细胞状态重定向至分化状态的潜在疗法可为混合型肝癌患者提供治疗干预的机会。

【参考文献】

Xue R, Chen L, Zhang C, et al. Genomic and Transcriptomic Profiling of Combined Hepatocellular and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals Distinct Molecular Subtypes[J]. Cancer Cell, 2019, 35(6): 932-947.

液体活检用于检测无症状乙型肝炎表面抗原血清阳性患者中的早期肝细胞癌

基于无细胞 DNA 和蛋白质的液体活组织检查已展示出检测不同组织类型早期癌症的潜力。然而，目前已有的研究大部分是回顾性研究，实验组为具有明确癌症诊断的患者，对照组为健康人群。本研究开发了一种名为肝细胞癌筛查的检测方法，该方法所需血浆量少，成功地从 331 名乙肝表面抗体阳性的人群中筛选出 4 例早期肝细胞癌患者（< 3 厘米），而这些患者的血清甲胎蛋白和超声检查均为阴性，该检测具有 17% 的阳性预测值，远远高于目前已报道的研究。这项研究表明，在肝癌高危但无症状表现的社区人群中，无细胞 DNA 和血清蛋白标记物的联合检测对早期肝癌的诊断具有重要意义。

原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

1 受试者的临床参数和随访

研究者对四个筛查中心的社区人群（ $n = 72\,720$ ）进行血液乙肝表面抗原检测和问卷调查，其中乙型肝炎表面抗原阳性个体（ $n = 3\,793$ ）继续进行甲胎蛋白 / 超声筛查。在这些乙型肝炎表面抗原阳性的个体中，176 人有与之相关的甲胎蛋白 / 超声结果（命名为甲胎蛋白 / 超声阳性 / 疑似组），而其余的乙型肝炎表面抗原阳性患者组成甲胎蛋白 / 超声阴性组（ $n = 3\,617$ ）。为了确定他们的肝细胞癌状态，这部分阴性患者在初次筛查后 2 个月内进行动态电脑断层扫描 / 核磁共振成像检查。其中对肝细胞癌状态有可靠诊断的患者被纳入本研究的训练队列，研究者对这些患者的基线甲胎蛋白 / 超声筛查血样进行了肝细胞癌筛查检测（图 1）。

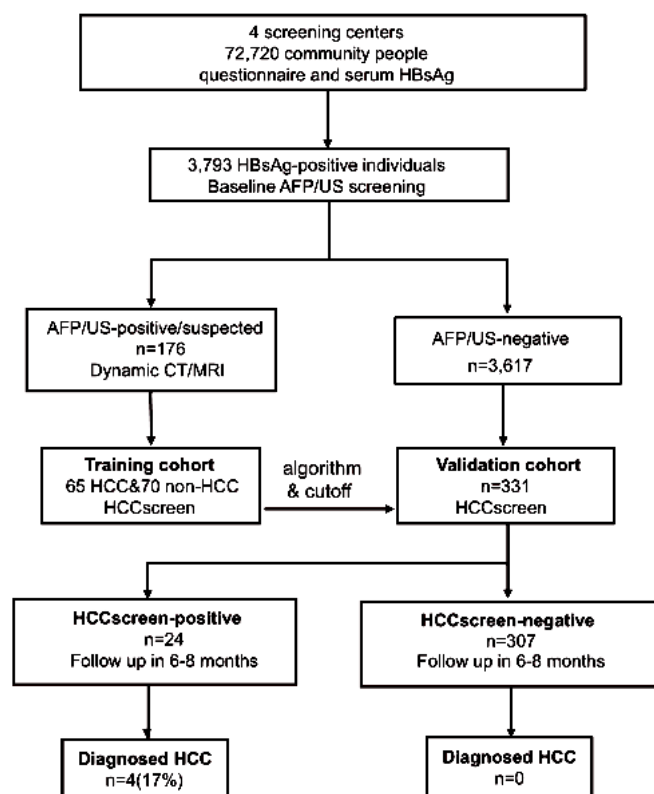


Fig. 1. Study design. The enrollment, training of the HCCscreen model, and validation in sampled AFP/US-negative individuals.

在 3 617 名甲胎蛋白 / 超声阴性个体中，约 60% 在本研究的基线筛查之前已接受甲胎蛋白 / 超声检查（图 1）。为了减少随访过程中



的焦虑和不依从性，本研究主要选择在之前 1 至 3 年接受过甲胎蛋白 / 超声检查的人群作为验证队列 ($n = 331$)。根据性别、超声检测到的肝硬化比例和血清白蛋白水平，采样的甲胎蛋白 / 超声阴性参与者的分布与乙肝表面抗原阳性参与者总数相当。研究者在基线甲胎蛋白 / 超声筛查时对从验证队列中收集的血液样本进行了肝细胞癌液体活检测试，并在基线筛查后 6 至 8 个月对其进行随访。此外研究者还对 70 名没有乙肝病毒感染的健康人进行了肝细胞癌筛查。

2 肝细胞癌标记分子的选择和检测

研究者开发了具有两类生物标志物的肝细胞癌筛查分析：①在肝细胞癌中非常普遍的基因改变；②血清蛋白标记物甲胎蛋白和去 γ 羧基凝血酶原。在以前的癌症基因组研究中，大多数与乙肝病毒相关的肝细胞癌在以下基因 / 位置至少有一个突变：TP53、CTNNB1、AXIN1 或 TERT 启动子。乙肝病毒的整合断点同样被视为肝细胞癌的潜在生物标志物。研究者设计了一种可以同时检测多种遗传变异的分析方法，将提取的无细胞 DNA 连接到一个定制的带 DNA 条形码的适配器上，然后扩增生成一个完整的基因组文库。用一种类似于快速扩增 cDNA 末端 (RACE) 的方法，利用覆盖 TP53、CTNNB1 和 AXIN1 编码区、TERT 启动子区和 HBV 序列的多重引物，丰富点突变和乙肝病毒整合位点。而下一代测序的读数可以用

上述条形码追踪到原始的无细胞 DNA，以从测序 / 扩增错误中过滤假阳性单核苷酸突变。

研究者过去的研究和针对肝细胞癌、肝硬化和慢性肝炎的住院患者的其他研究均表明，血清甲胎蛋白和去 γ 羧基凝血酶原的组合在鉴别早期肝细胞癌和失代偿性肝硬化方面表现出明显的敏感性和特异性。因此，本研究将这两种血清蛋白标记物与无细胞 DNA 相结合，探究基于液体活检的检测方法（包括甲胎蛋白、磷酸二氢钙和无细胞 DNA）是否能够有效筛查早期肝细胞癌。

3 临床诊断与肝细胞癌筛查检测的一致性

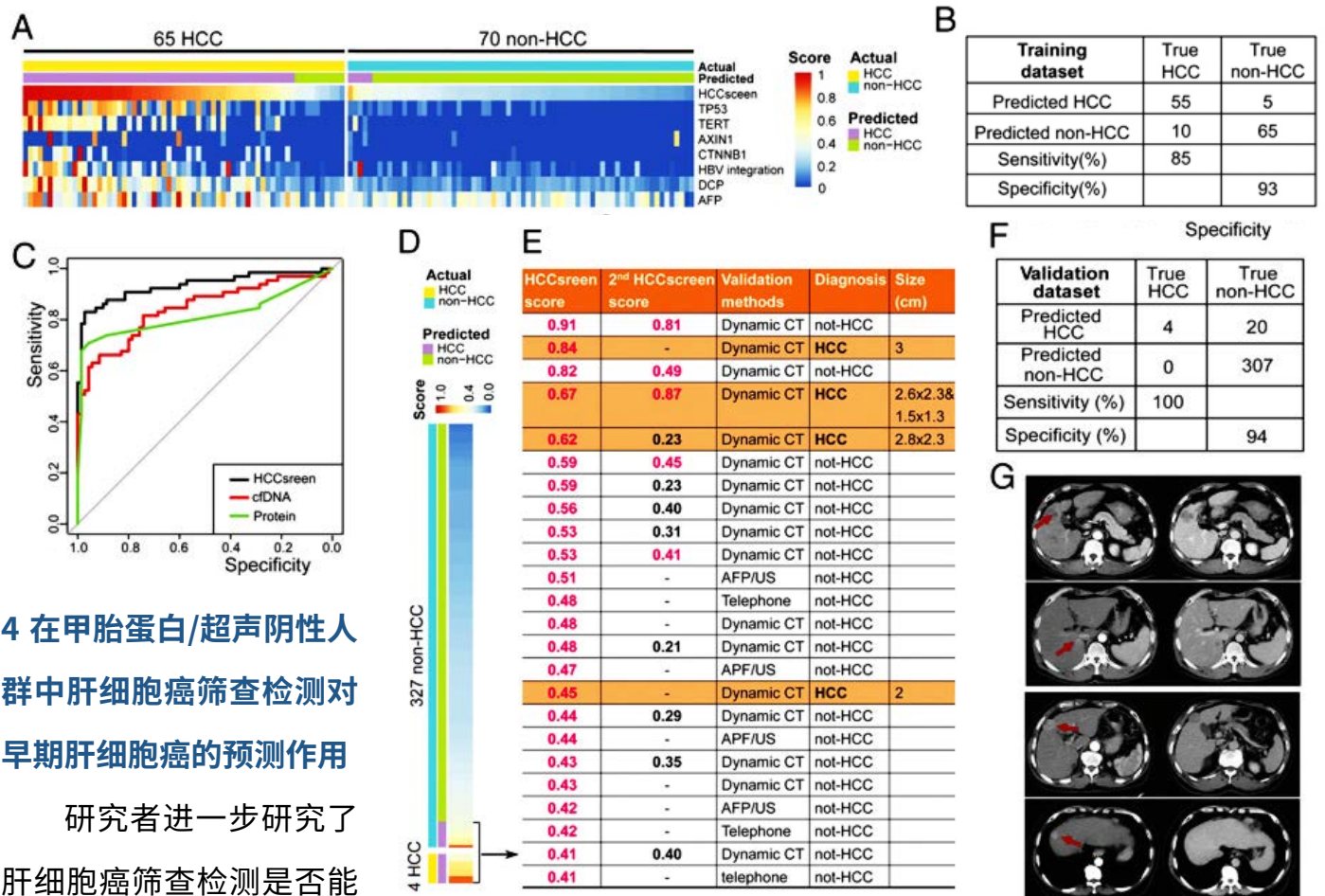
研究者对诊断为肝细胞癌或非肝细胞癌的患者进行肝细胞癌筛查试验，他们分别从甲胎蛋白 / 超声阳性 / 疑似病例组中选择了 65 例肝细胞癌病例和 70 例非肝细胞癌病例，由动态螺旋 CT/ 磁共振成像和组织学判定其是否为肝细胞癌。这 135 例患者构成了训练队列，随后研究者将他们的肝细胞癌筛查结果与临床诊断结果进行对比。为了构建一个整合不同类型生物标记的分类系统，研究者首先将不同类型的无细胞 DNA 突变分解为每个基因或位点的感兴趣区域 (ROI) 分数。除此之外，研究者还增加了两个结构变异特征 (TERT 启动子区位点和其他乙肝病毒整合位点)、一个实验特征 (无细胞 DNA 浓度)、两个蛋白质标记 (甲胎蛋白和去 γ 羧基凝血酶原) 和两个临床特征 (年龄和性别) 以构建预测肝细胞癌状态的分类系统 (表 1)。应用带有这些标记的惩罚逻辑回归算

法，该系统清晰地区分了肝细胞癌患者与非肝细胞癌患者（图 2A）。通过对 65 个肝细胞癌病例和 70 个非肝细胞癌病例的训练数据集进行 100 次重复的遗漏交叉验证，研究者发现该试验在肝细胞癌诊断中的灵敏度为 85%，特异性为 93%（曲线下面积 = 0.928）（图 2B.C）。最高尤登指数得分的肝细胞癌筛选得分截止值为 0.4。这说明无细胞 DNA 和蛋白质标记对肝细胞癌的鉴定起到重要作用（图 2C）。

Table 1. Characteristics of HCCscreen features and their coefficients

Feature class	Features	Coefficients
cfDNA	TP53 other than R249S	2.02
	TP53 R249S	0.21
	TERT	1.37
	SV_TERT	0.70
	CTNNB1	1.20
	AXIN1	0.01
	HBV integrations	0.82
	cfDNA concentration	-0.27
	AFP	0.21
	DCP	1.59
Protein		
Clinical information	gender	0.66
	age	1.69
	(Intercept)	-2.68

Penalized logistic regression: $\lambda = 0.14$; $\alpha = 0$.



4 在甲胎蛋白/超声阴性人群中肝细胞癌筛查检测对早期肝细胞癌的预测作用

研究者进一步研究了肝细胞癌筛查检测是否能

从甲胎蛋白 / 超声阴性且无临床症状的乙肝表面抗原阳性人群中检测到肝细胞癌。共有 331 名甲胎蛋白 / 超声阴性受试者经过该测试，根据训练队列的算法确定了 24 例阳性病例（称为肝细胞癌筛选阳性）（图 2D）。

研究者对这 24 名患者进行了 6~8 个月的随访。其中 17 人接受了动态电脑断层扫描检查，4 人接受了甲胎蛋白 / 超声检查，3 人接受了电话随访。最终有 4 名患者诊断为肝细胞癌，该检测的阳性预测值达到 17%（图 2E）。



除此之外，70 例筛查阴性的受试者中没有发现新的肝细胞癌病例。综上所述，在甲胎蛋白 / 超声检查阴性群体中，肝细胞癌筛查试验具有 17% 的阳性预测值、100% (4/4) 的灵敏度和 94% 的特异性 (307/327) (图 2F)。通过动态计算机断层扫描诊断时，所有四个肝细胞肿瘤均小于 3 厘米 (图 2G)，并且根据基线时的超声结果，四名患者均未发生肝硬化。

在第一次采血后 6~8 个月，研究者对 24 例肝细胞癌筛查阳性中的 13 例患者再次采血，进行第二次肝细胞癌筛查检测。一名第一次抽血检测阳性的肝细胞癌患者第二次检测仍为阳性，并且得分更高。另一名肝细胞癌病例在第二次抽血时已经通过外科手术完成肿瘤切除，其肝细胞癌筛查结果为阴性，与临床情况一致。11 例非肝细胞癌但其肝细胞癌筛查为阳性的患者中，有 7 例 (64%) 在第二次检测中为阴性，尽管其中 2 例检测结果接近阈值 (0.40)。其余四例非肝细胞癌病例在第二次肝细胞癌筛查中仍然呈阳性 (图 2E)。这些结果表明，通过在第二时间点再次进行检测，该检测阳性预测值可以进一步提高。目前这些患者仍在继续接受随访以验证该检测的有效性。

5 在健康人群中肝细胞癌筛查检测的验证

肝细胞癌筛查检测显示出其在高风险人群中识别肝细胞癌的强大能力。先前的研究预测，若将肿瘤患者与未受乙肝病毒感染或其他危险因素影响的健康人群进行比较，这种高风险队列的敏感性和特异性将下降。为了验证这一假设，研究者对 70 名无乙肝病毒感染 (乙肝表面

抗原阴性) 的健康个体进行了检测，并使用这些数据替换了训练队列中 70 名乙肝表面抗原阳性的非肝细胞癌病例数据。通过对无细胞 DNA 和蛋白质标记物进行图谱分析，该检测很好地从健康人群中识别出肝细胞癌病例，具有 98% 的灵敏度和 100% 的特异性。然而，来自该训练队列 (肝细胞癌和健康个体) 的算法在乙肝表面抗原阳性的非肝细胞癌病例中表现不佳。大多数非肝细胞癌病例被归类为阳性，根据算法，肝细胞癌和非肝细胞癌病例高度重叠。此外，验证队列的表现同样不佳。尽管所有四个肝细胞癌病例在测试中都是阳性的，但是许多乙型肝炎表面抗原阳性个体被分类为阳性，仅有 58% 和 2.8% 的特异性和阳性预测值。另一方面，来自肝细胞癌和非肝细胞癌病例的算法正确地将所有健康个体 (100%) 分类为阴性。

6 总结

该研究证明在高危人群中基于无细胞 DNA 和蛋白质标记物的筛查，能有效识别肝细胞癌患者。它是一种非侵入性的检测早期和晚期肿瘤检测方法，易于操作，可行性强。我们相信，随着更多前瞻性临床试验的开展，肝细胞癌筛选检查有望使更多的患者在疾病初期得到诊断，从而改善肝细胞癌目前的治疗困境。

【参考文献】

Qu C, Wang Y, Wang P, et al. Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019.



Nature Materials: ctDNA 甲基化标志物用于早期诊断和预测肝癌预后

肝癌是我国最常见的肿瘤之一，每年新发病例占全世界肝癌新发病例的 50%。肝癌起病隐匿，预后凶险。与其他恶性肿瘤类似，早期诊断能使肝癌患者获得更为有效的治疗，从而明显的改善预后。但是目前仍缺乏理想的肝癌早期诊断手段，甲胎蛋白（AFP）虽然在肝癌中有较高的特异性，但是其敏感性只有 50%-60%，并非肝癌早期诊断的理想标志物。因此，为了找到更理想的肝癌早期诊断手段，徐瑞华教授和张康教授团队把目光投向了循环肿瘤细胞 DNA（ctDNA）。

原创专家述评：袁响林教授；尹菡博士

ctDNA 是肿瘤细胞坏死、凋亡所释放到外周血中的遗传物质的片段，由于其携带有与原发性肿瘤组织相一致的甲基化改变，理论上可以利用 ctDNA 的甲基化谱对肿瘤进行诊断，这一无创的“液体活检”新技术已经成为当前肿瘤研究领域的热点之一。相比于与传统的肝癌诊断技术，液体活检技术具有明显的优越性。首先是无创性，该技术仅凭少量外周血标本即可完成检测，可以在治疗期间的任何时间内完成，实现对肿瘤中的分子变化的实时监测，动态反应出肿瘤细胞的遗传改变和演变进程，其次可用于诊断对影像学不敏感或不确定肿瘤，最后，ctDNA 可全面反映体内肿瘤细胞的分子遗传信息的全貌，避免肿瘤内部异质性对组织活检结果的影响。

在这项研究中，两位华人科学家将目光聚焦于 ctDNA 的甲基化检测上。甲基化是基因表达的一种重要调控方式，能够影响细胞的生长和变化。抑癌基因甲基化的增加作为肿瘤发生过程中的早期分子事件之一，常导致相应的抑癌基因失

活，因此可作为肿瘤早期诊断的理想标志物。

研究人员首先从全基因组水平上对肝癌组织和正常血液 DNA 的 485 000 个 CpG 位点甲基化水平进行了比较，筛选出差异性最显著的位点；设计相应的锁式探针（padlock probe），对近两千例肝癌和正常人血浆中提取的微量 ctDNA 进行了甲基化 PCR 扩增和测序；确定了这些位点的甲基化水平后，进而通过大量的统计学分析和计算，并利用多种人工智能模拟的机器学习方法，最后分别筛选出 10 个和 8 个位点建立了诊断模型和生存预后模型。该诊断模型在训练组 715 例肝癌患者和 560 例正常人中的诊断敏感性和特异性分别达到了 85.7% 和 94.3%，在验证组 383 例肝癌患者和 275 例正常人中的诊断敏感性和特异性分别达到了 83.3% 和 90.5%，均明显高于现有肝癌血清标志物 AFP。并且该模型还能准确的区分肝癌患者和慢性肝炎（HBV/HCV）和脂肪肝患者，显示出在肝癌早期诊断中的巨大价值。此外，该模型还能准确的反映肝癌

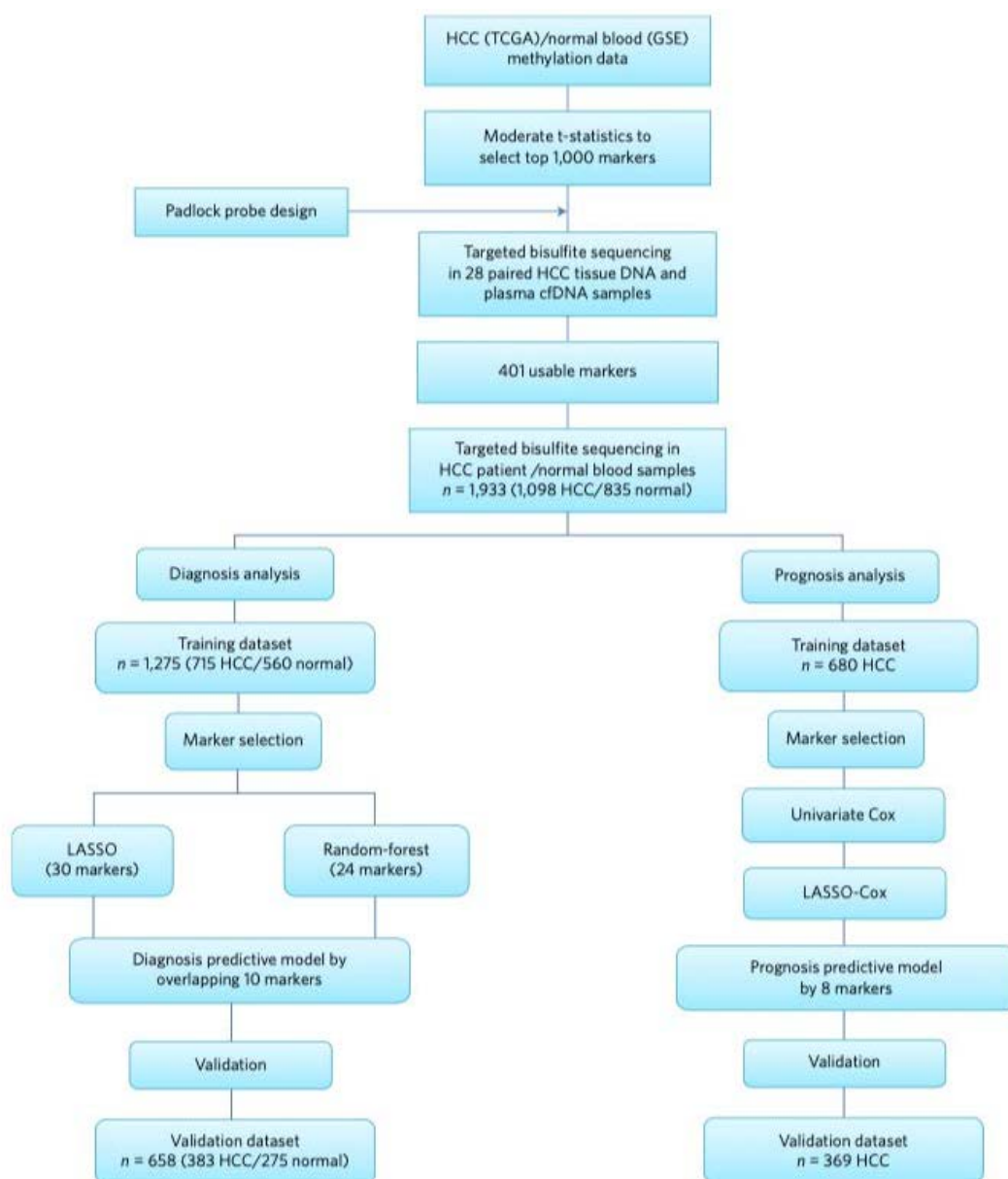
患者的 TNM 分期、体内有无肿瘤残留、对治疗的反应以及有无复发等。而对 1 049 例生存资料完整的肝癌患者，依据生存预后模型进行评分，低风险组患者的预后显著优于高风险组患者，显示出利用该模型可以准确预测肝癌患者的预后，有利于对不同的风险的患者进行更为个体化的治疗。

这一成果为肝癌的筛查、诊断、疗效监测与预后预测提供了新的有效手段。这一成果的进一步转化推广将极大的提高肝癌早期诊断的敏感性

和准确性，有助于发现更多亚临床期的早期肝癌病例，还有利于开展更为有效的个体化治疗，对于提高肝癌患者的整体疗效具有重大意义，具有广阔的临床应用前景和巨大的社会效益。

【参考文献】

Xu RH,Wei W,Krawczyk M,et al.Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma.Nat Mater 2017;16:1155-1161.



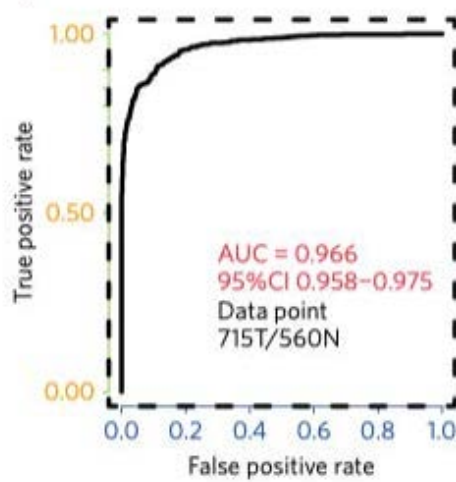
a

Training dataset	Real HCC	Real normal	
Predict HCC	613	32	
Predict normal	102	528	Totals
Totals	715	560	1,275
Correct	613	528	1,162
Sensitivity (%)	85.7		
Specificity (%)		94.3	

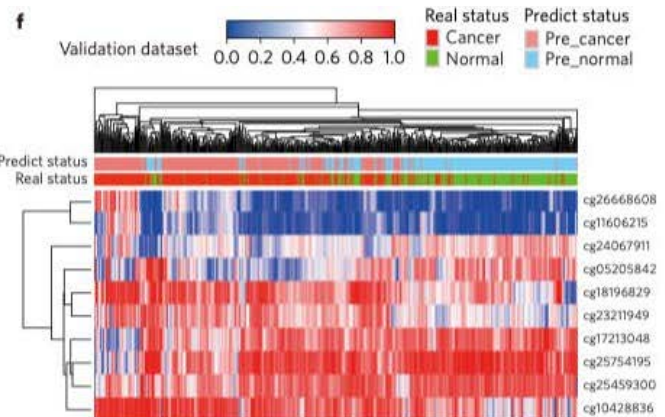
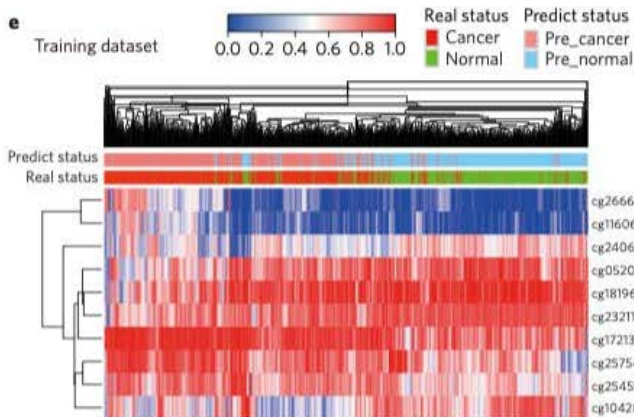
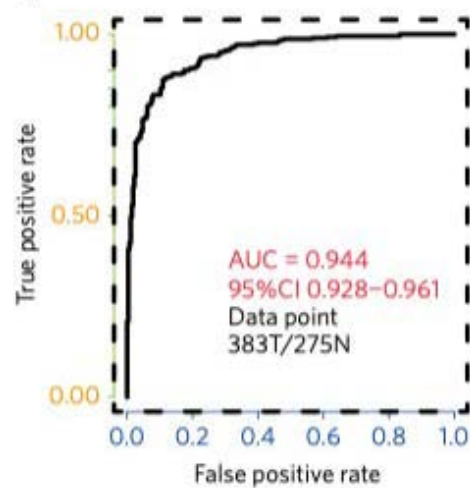
b

Validation dataset	Real HCC	Real normal	
Predict HCC	319	26	
Predict normal	64	249	
Totals	383	275	658
Correct	319	249	568
Sensitivity (%)	83.3		
Specificity (%)		90.5	

c



d



GUT: 综合多组学分析揭示了 HCC 的综合肿瘤异质性和新的免疫表型分类

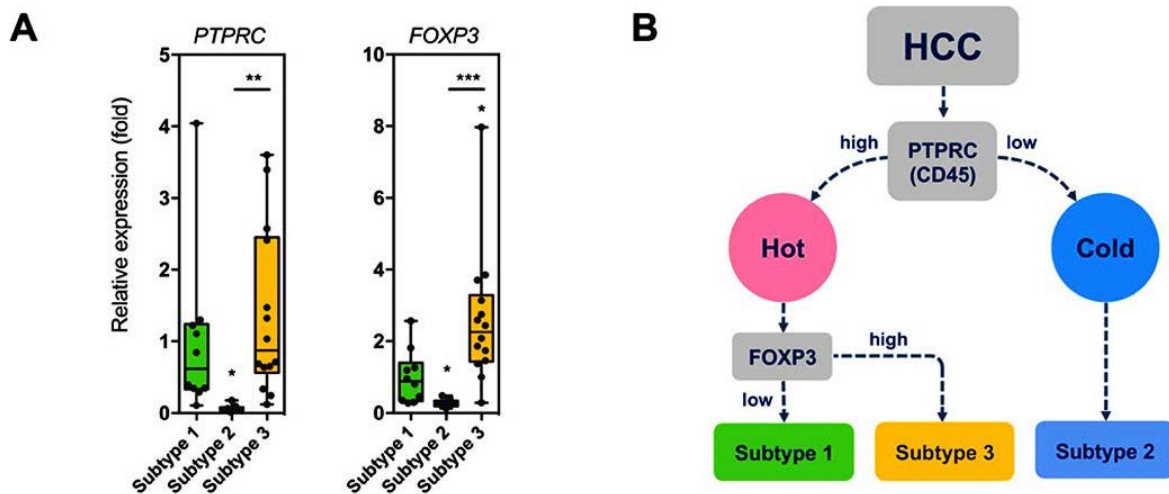
原创专家述评：向邦德教授；齐鲁楠博士

【专家点评】 肝细胞癌异质性是肝癌治疗疗效不佳的难题之一，浙江大学第一附属医院梁廷波教授采用全外显子组测序、RNA 测序、基于质谱的蛋白质组学和代谢组学，质谱流式细胞技术和单细胞分析等多种技术评估 8 例 HCC 患者中 42 个样本肿瘤异质性，发现 HCC 微环境免疫状态的异质性相对较少。确定了具有免疫活性、免疫缺陷和免疫抑制特征的三种独特 HCC 亚型，并能准确预测预后，这为肝癌精准治疗探索了新方法。

肝细胞癌 (HCC) 具有异质性，尤其是在多灶性肿瘤中，异质性降低了临床治疗的疗效。在开发新的治疗策略时，了解肿瘤异质性至关重要。然而，缺乏对 HCC 中肿瘤异质性的全面研究，并且关于肿瘤异质性的现有证据并未导致临床实践的改善。因此，我们从 8 例 HCC 患者中收集了 42 个样本，并使用全外显子组测序、RNA 测序、基于质谱的蛋白质组学和代谢组学，质谱流式细胞技术和单细胞分析来评估肿瘤异质性。进行免疫组织化学和定量聚合酶链反应以确认基因的表达水平。进一步使用三个独立队列来验证

结果。

病变和肿瘤的基因组、转录组、蛋白质组和代谢组具有相当大的异质性。HCC 微环境免疫状态的异质性相对较少。以局部免疫为靶点是一种精度和实用性均较好的干预方法。通过聚集 HCC 微环境中的免疫细胞，确定了具有免疫活性、免疫缺陷和免疫抑制特征的三种独特 HCC 亚型。并进一步揭示了不同亚型的特定代谢特征和细胞因子 / 趋化因子表达水平。使用免疫组织化学确定 CD45 和 Foxp3 的表达水平促进了 HCC 患者的正确分类和预测其预后 (图 1)。



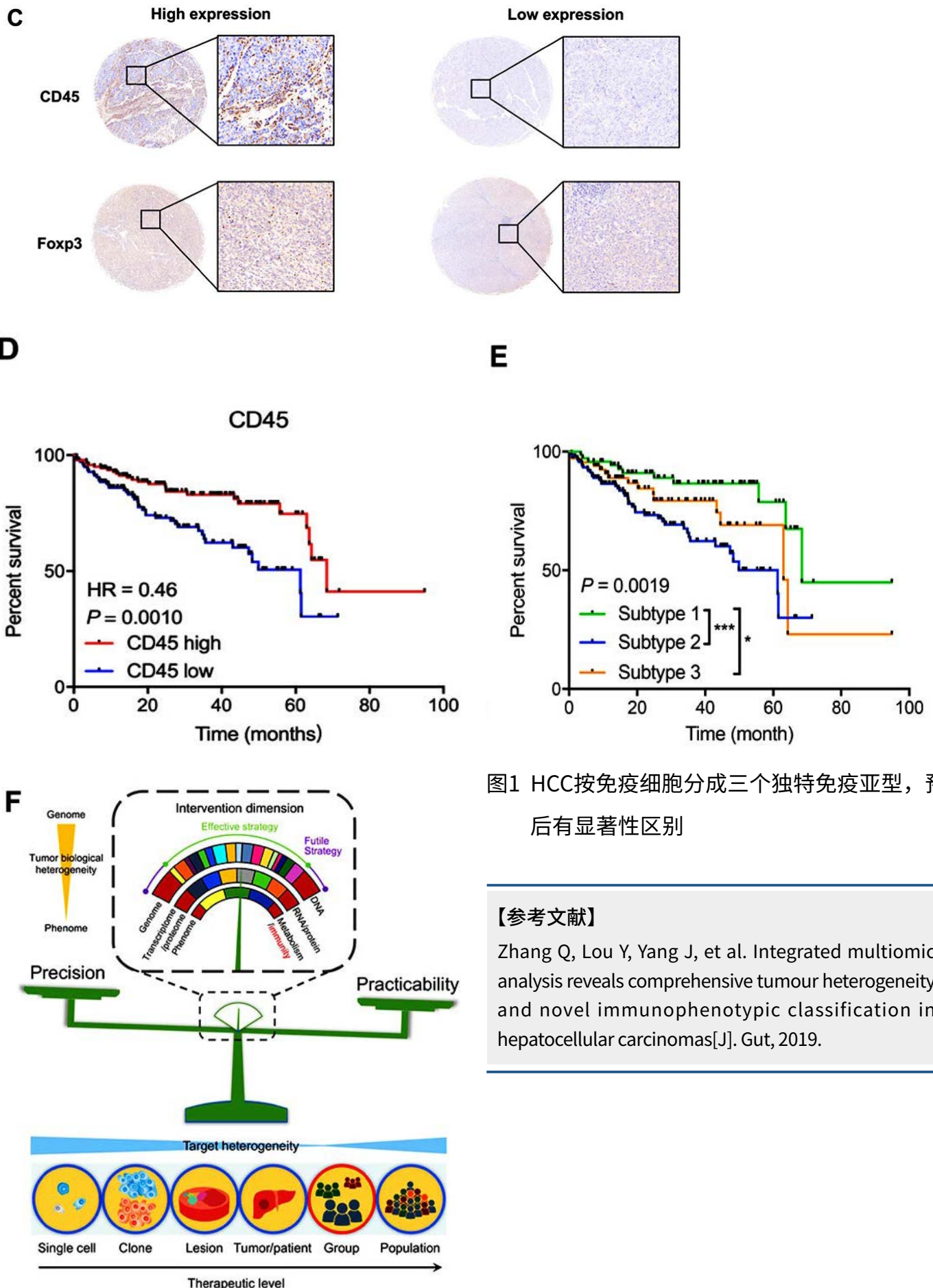


图1 HCC按免疫细胞分成三个独特免疫亚型，预后显著性区别

【参考文献】

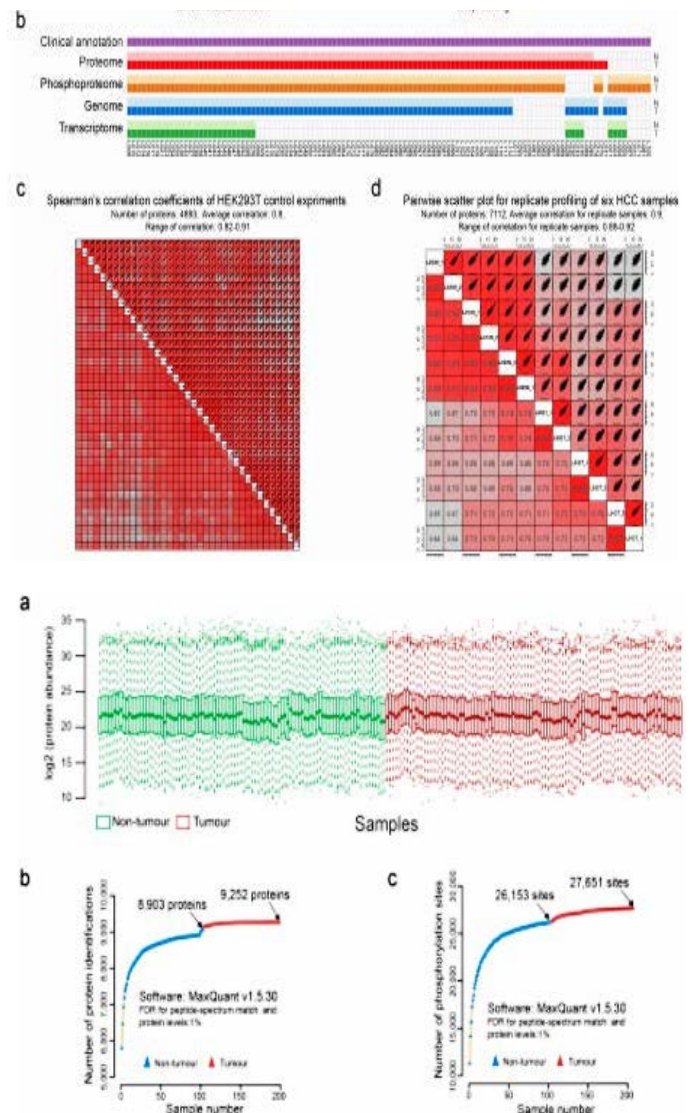
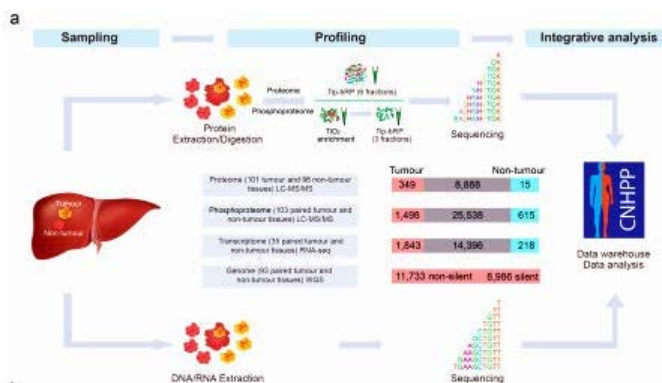
Zhang Q, Lou Y, Yang J, et al. Integrated multiomic analysis reveals comprehensive tumour heterogeneity and novel immunophenotypic classification in hepatocellular carcinomas[J]. Gut, 2019.

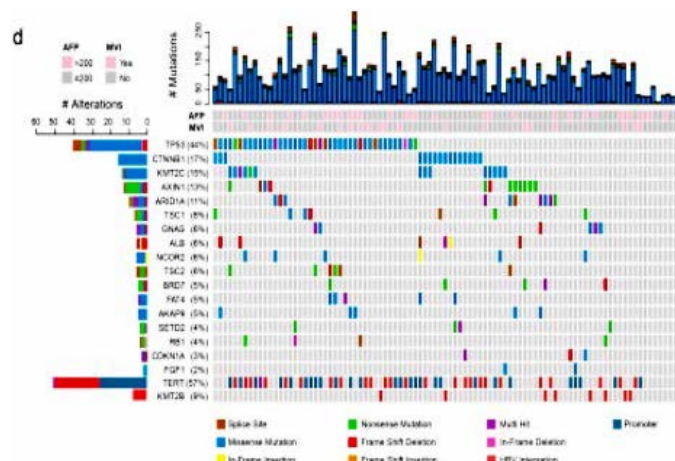
Nature: 中国科学院院士联手共同揭示 HBV 相关性早期肝癌治疗新靶点

肝细胞癌在我国具有着极高的发病率和死亡率。“根治性手术切除”为目前肝癌治疗的一线方案。然而，由于术后复发率高居不下，严重制约着肝癌总体治疗水平。即使是早期肝癌患者，其术后 5 年总生存率也只有 60%~70%。是什么导致超过 30% 早期肝癌患者即便给予根治性手术治疗，依然出现预后差的情况？这类肝癌具有什么特殊的生物学特性？是否具有特殊的分子靶点？基于“精准医学”理念，对于早期肝癌相关综合治疗新靶点的探索，已成为当今肝癌领域的研究热点之一。

原创专家评述：向邦德教授；齐鲁楠博士

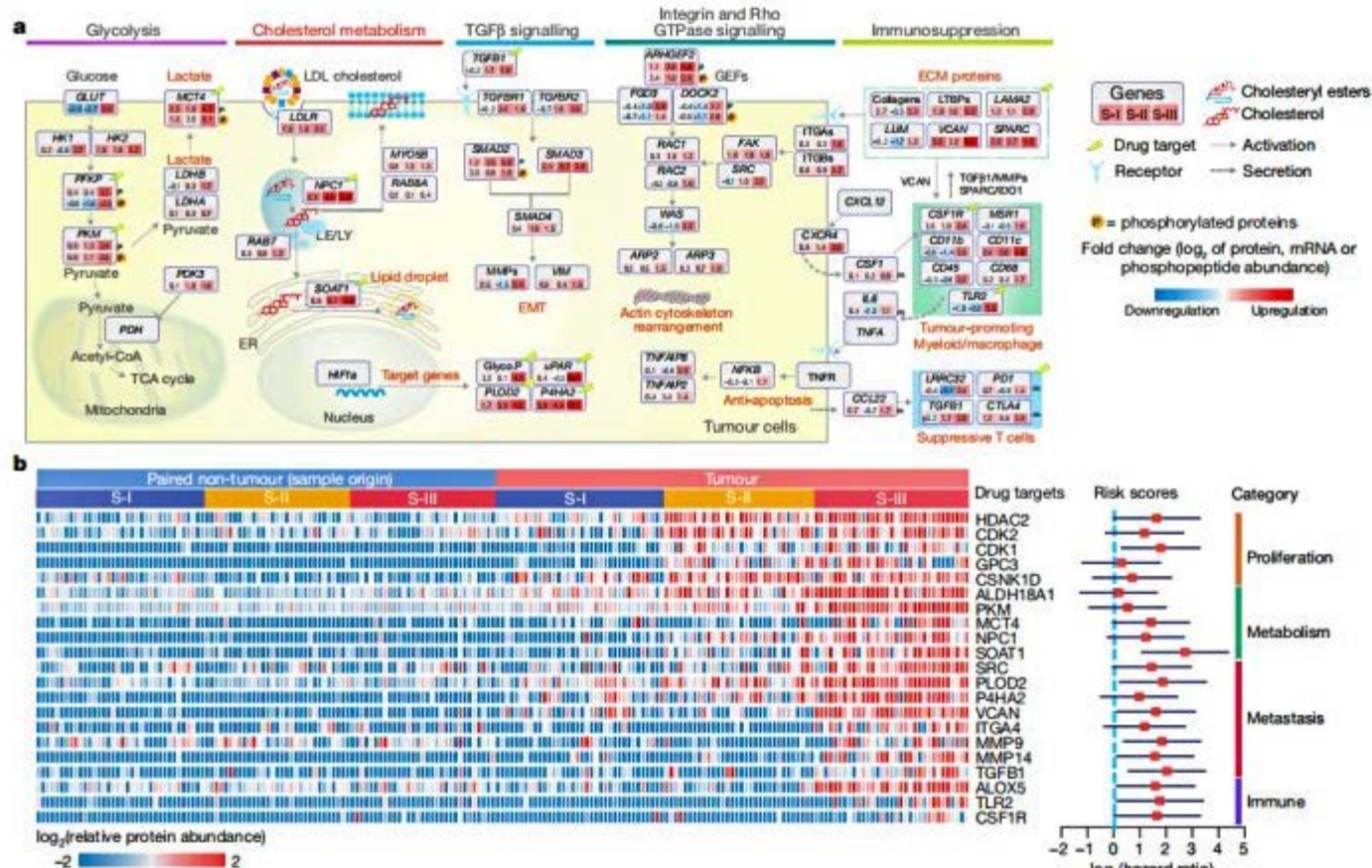
来自中国蛋白质科学中心的贺福初院士、钱小红教授和复旦大学的樊嘉院士组成的联合研究团队，通过高级蛋白组学的方法，绘制出了 HBV 相关性早期肝细胞癌患者的差异蛋白表达图谱，并结合全基因组与转录组数据，全方位探讨了 HBV 相关性早期肝癌的分子生物学特征。同时，研究者们还鉴定出一个在肝癌的发生和转移中发挥了关键作用的新型蛋白 SOAT1，有望成为 HBV 相关性早期肝细胞癌治疗的新靶点。并且，这个靶点还被发现具有治疗多种癌症的潜力（如癌、肾癌、前列腺、胰腺癌等），该成果 2019 年 3 月发表在世界顶级期刊 *Nature* 上。



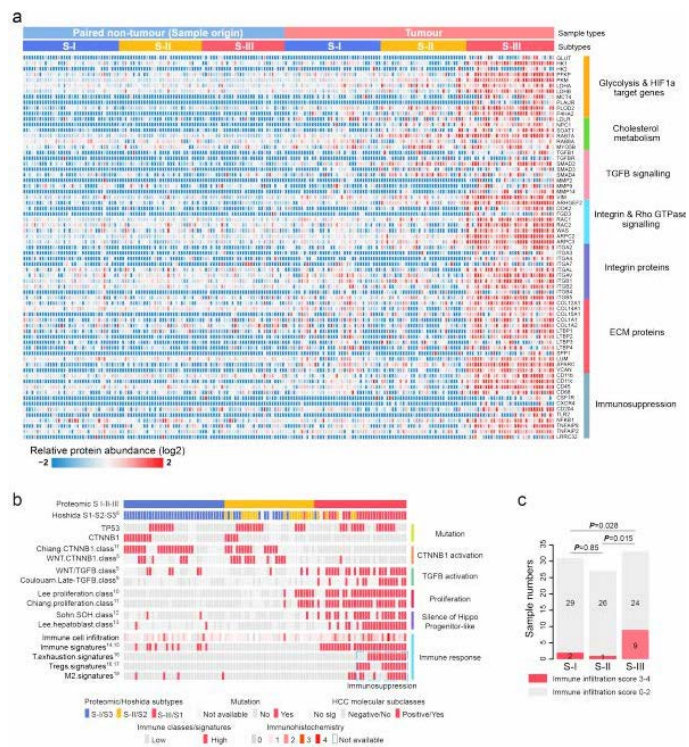


癌症的本质，归根到底就是一大类“基因组异常性”疾病。由于体细胞基因组稳定性缺失及基因 / 蛋白表达模式的改变，导致细胞信号通路的异常，从而促进癌症的发生与发展。蛋白质是活细胞功能的主要承担者，相对于 DNA 和 RNA 层面，蛋白质的变化更能反映细胞生物学功能变化真实的情况。为此本研究中，研究人员针对

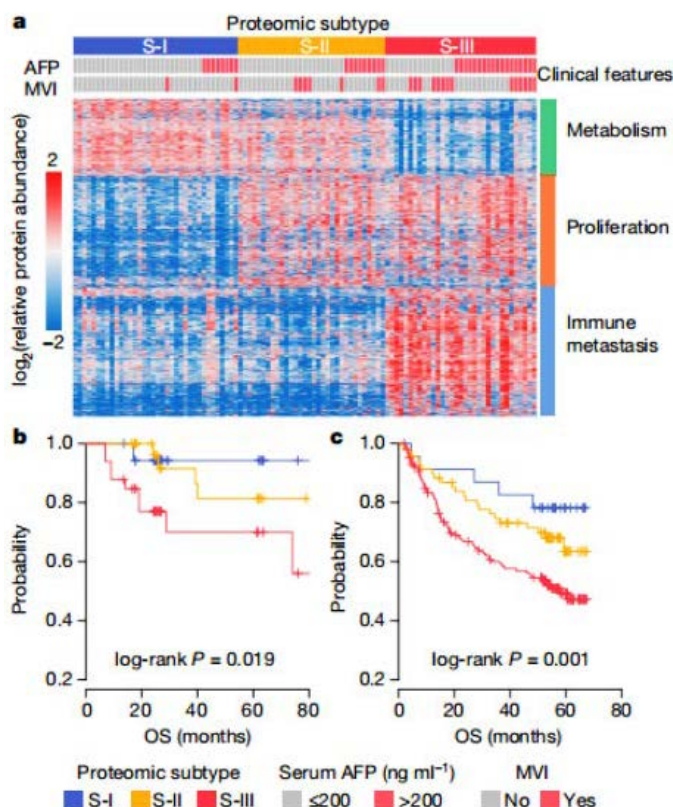
110 名早期 HBV 相关性肝细胞癌患者，运用质谱技术（Proteomic Signatures）鉴定出了 9 252 种肝癌差异蛋白，其中包括 5 847 种磷酸化蛋白及其结构上的 27 651 个磷酸化位点。同时，在基因组和转录组层面也进行了相应的高通量验证。随后，通过 KEGG 通路富集分析表明：上调表达的蛋白质（组）主要参与细胞周期调控，PDGF、MAPK、TNF、MET 等途径，而 PPAR 信号和代谢相关途径相关蛋白质以低表达表为主。磷酸化蛋白质组数据显示：某些信号通路的关键蛋白出现过磷酸化表现，包括 p38 途径、RHO 途径、肌球蛋白途径、Rb1 途径和 IL-1 信号通路，而这些通路具有着某种共同特点：对肿瘤“炎症 - 免疫 - 转移相关微环境”具有着重要调控作用。



接下来，结合患者的临床特征以及上述蛋白组研究结果，研究人员将早期 HBV 相关性肝癌分为三大类型：S-I、S-II 和 S-III。相比 S-I 和 S-II 患者，S-III 型早期患者具有术后复发率高、无瘤生存期及总生存期短、预后更差的特点。主要因为 S-III 型早期患者血清 AFP 阳性率及癌旁组织微血管侵犯 (microvascular invasion, MVI) 发生率明显升高。同时，研究人员聚焦于 S-III 型早期患者，深入剖析其差异蛋白组学特征，发现与 S-I、S-II 相比，许多细胞增殖调控因子蛋白 (CDK1、PCAN、HDAC2 等)、侵袭 / 转移相关蛋白 (TGF-beta、MMPs、HIF1 等) 明显上调。此外，许多调控“药物 - 毒物代谢”及“炎症 - 免疫微环境”蛋白分子 (如：M2 型巨噬细胞、免疫抑制调节性 T 细胞浸润相关分子等) 在这类患者中出现明显富集，而这些蛋白很多是我们熟知的药物靶点。

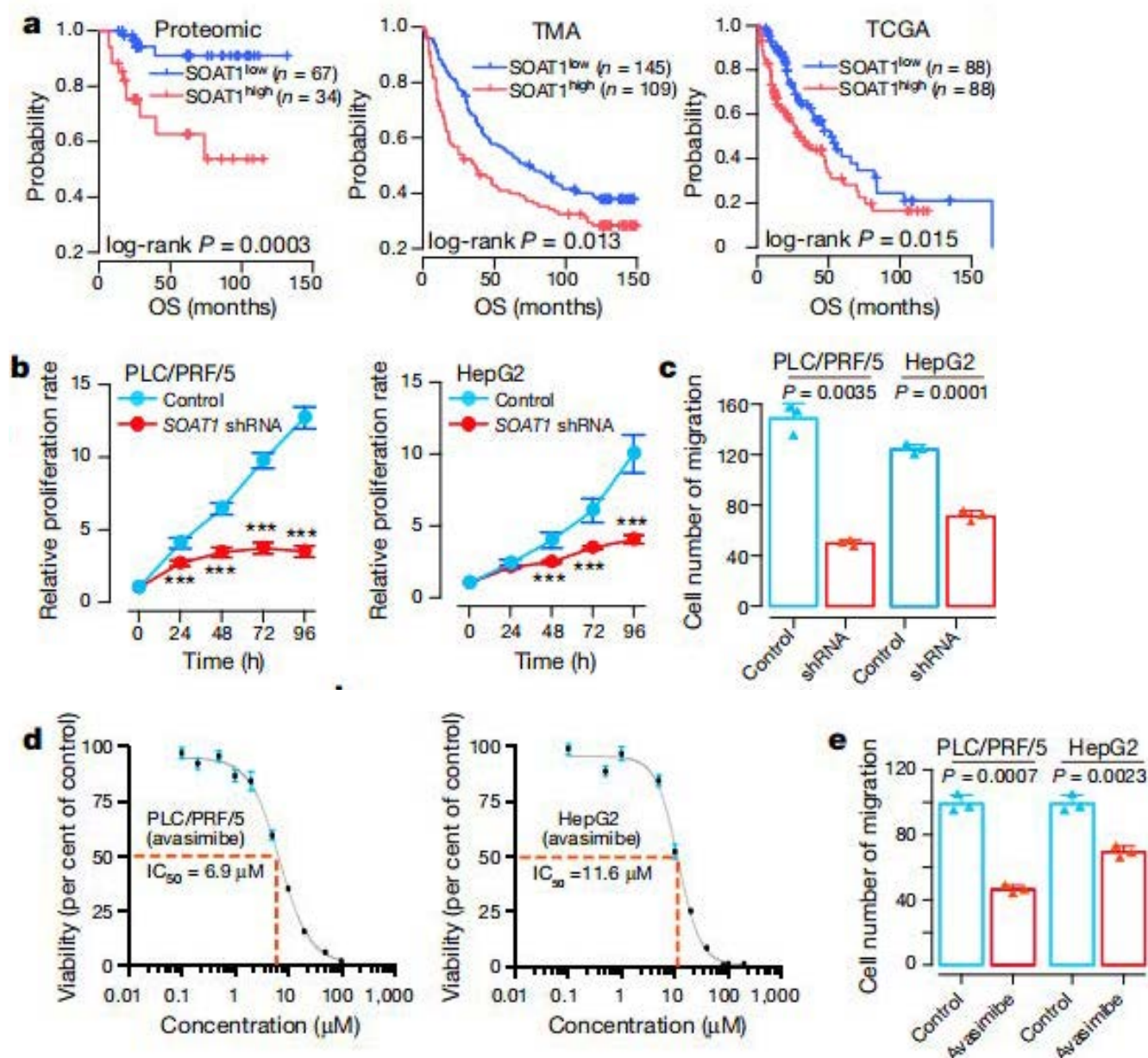


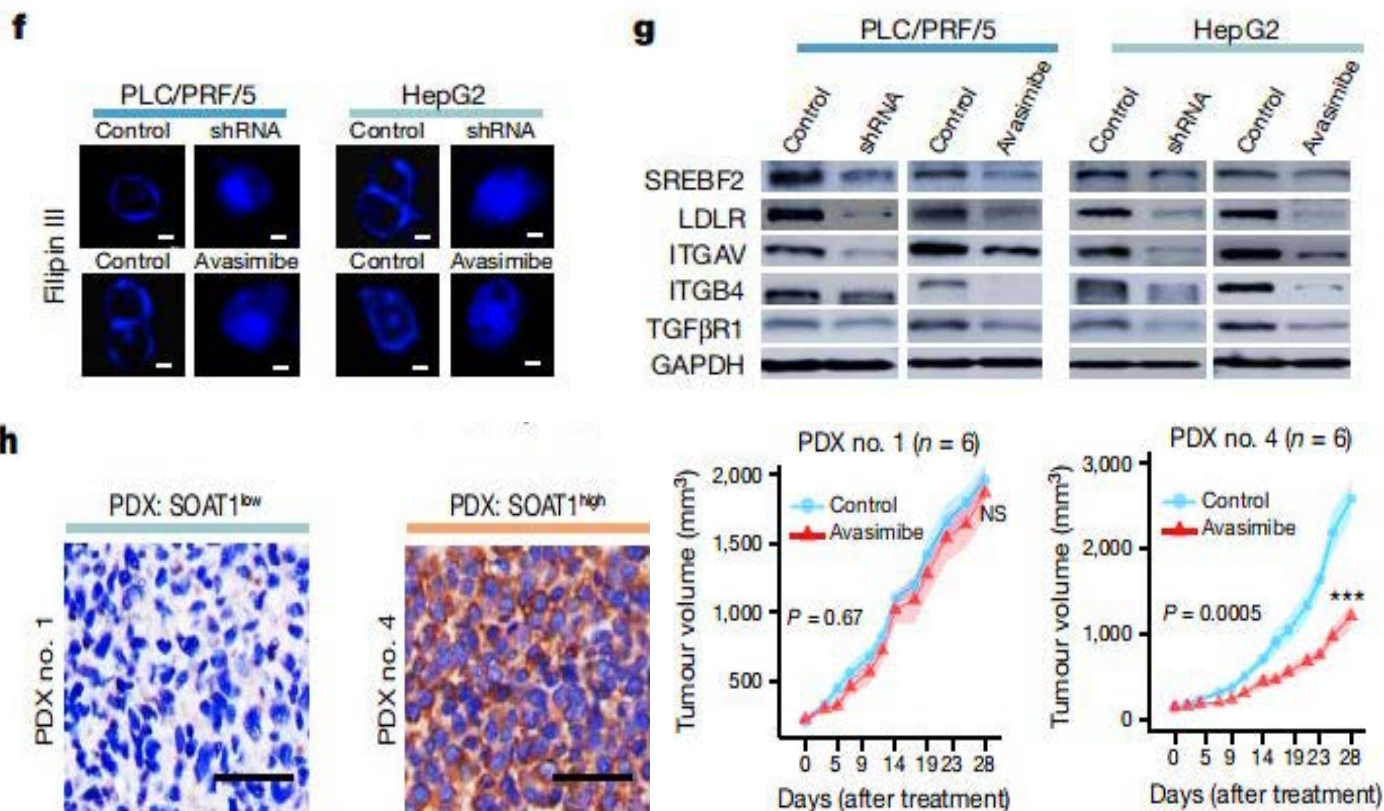
在众多的调控“免疫 / 代谢”途径的差异蛋白中，研究者们发现 SOAT1 (Sterol O-acyltransferase 1) 的表达差异最为显著，特别是 S-III 型早期患者。SOAT1 分子所参与的过程大家已经耳熟能详，它是以胆固醇为底物，催化形成胆固醇酯。在某些心疾病 (动脉粥样硬化、冠心病等) 发生发展中扮演者“首恶分子”之角色。研究报道：他汀类药物具有肝癌的功能，或许因为其能参与调控胆固醇合成通路。2016 年中国科学家发现，SOAT1 抑制剂 -- 阿伐麦布 (一种他汀类降脂药)，可以通过助力治疗，改善肝癌患者的预后。因此，基于上述理论基础，研究人员锁定 SOAT1 分子进行后续深入研究。通过扩大样本量，证实无论是蛋白水平还是转录水平，相比正常肝组织，SOAT1 在肝癌中的表达水平均明显上调。通过本研究的队列及对比 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 数据综合分析，提示：肝癌组织中 SOAT1 过表达直



接关系着患者的不良预后。接着，研究者们构建 SOAT1 干扰载体 shRNA，沉默 SOAT1 在肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 HepG2 中的表达，发现癌细胞的增殖、迁移/侵袭潜能均受到了明显的抑制。另一方面，采用 SOAT1 抑制剂——阿伐麦布处理肝癌细胞，也得到了近乎同样的结果。研究人员还观察到，随着细胞系中 SOAT1 表达沉默，癌细胞膜上多种重要的胆固醇脂类受体（LDLR、ITGAV、ITGB4、TGF-betaR2 等）出现大幅度减少，而这些受体对癌细胞的生长、迁移/侵袭

非常重要。由此，研究人员推测：SOAT1 主要通过促进胆固醇脂的合成，上调细胞胆固醇脂类受体（LDLR、ITGAV、ITGB4、TGF-betaR2 等）的表达，进而促进肝癌症的发生与转移。这实际上与酪氨酸激酶突变致癌的作用类似。随后，研究人员还构建 PDX 动物模型（patient-derived tumor xenograft mouse），并采用阿伐麦布进行处理后，发现小鼠移植肿瘤的生长明显被抑制。由此表明，SOAT1 有望成为是一个治疗肝癌细胞癌的潜在靶点。





事实上，研究人员发现：不仅仅是肝癌，SOAT1 过表达也同样影响着多种实体瘤患者的预后，如：甲状腺癌、头颈癌、胃癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌等。由此表明：SOAT1 或许能被广泛用于多种肿瘤的预后生物标志物和治疗靶点。因此，这个研究的发现具有普适性意义，未来或将有助于更多类型肿瘤的治疗。

【参考文献】

Jiang Y, Fan J, Qian XH, Fuchu He, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Nature, 2019, 567(7747):257-261.

Hepatology: 早期至晚期肝细胞癌基因组多样性的临床影响

由于缺少典型的症状和体征，肝癌早期诊断困难。另外，由于病毒感染、肝病背景和肿瘤分期的不同，肝癌的临床异质性高。迄今为止，肝癌的基因组分析仅限于接受肝切除治疗的早期肝癌。本研究探索并比较早期、中期和晚期肝癌的基因组图谱，筛选出最常的基因突变基因，发现 5 基因评分可预测切除术治疗、消融治疗和晚期 HCC 患者的总生存，晚期 HCC 患者伴有 MET 扩增时接受特定 MET 抑制剂治疗后可能取得较好的疗效。

原创专家述评：向邦德教授；钟鉴宏博士

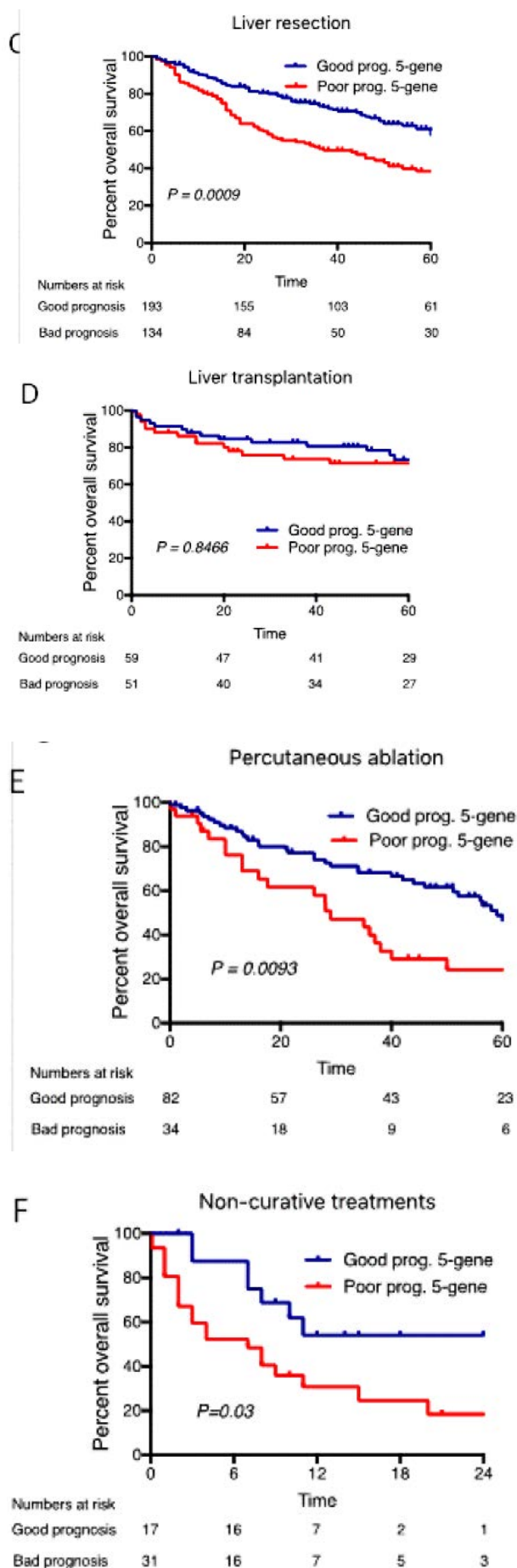
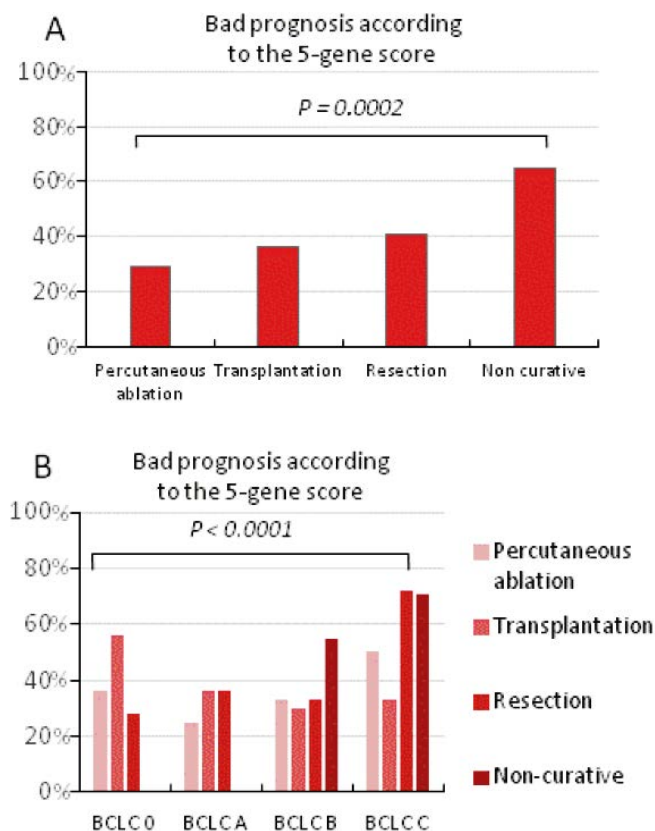
由于病毒感染、肝病背景和肿瘤分期的不同，肝细胞癌（HCC）是一种异质性很大的疾病。既往研究（*Hepatology*, 2007, 45:42-52）通过转录组基因型分型把 HCC 分为 6 个亚型（G1-G6），能显著区分 HCC 患者预后。另有研究（*Gastroenterology*, 2013, 145:176-87）显示，基于 5 个基因（HN1、RAN、RAMP3、KRT19 和 TAF9）表达构成的评分系统（5-基因评分）能显著预测接受肝切除术的 HCC 患者总生存期（OS）和无瘤生存期（DFS）。但迄今为止，肝细胞癌（HCC）的基因组分析仅限于接受肝切除治疗的早期 HCC。为此，近期法国科学家探究了早期、中期和晚期 HCC 的基因组图谱，研究结果发表在 *Hepatology*。

该研究纳入分析了 720 例 HCC 患者（410 例肝切除术、137 例肝移植、122 例经皮消融和 52 例姑息性治疗）的 801 个肿瘤，检测了 190 个基因的表达和 31 个突变基因。姑息性治疗组的样本从组织活检获取。同时对 41 例接受姑息治疗的中晚期 HCC 和 156 例 BCLC 0/A 期 HCC

进行全外显子测序分析，并分析基因组图谱与肿瘤分期、患者临床特征及生存率之间的关系。

纳入的患者中，BCLC 0、A、B 和 C 期分别占 9.4%（67 例）、59.5%（425 例）、16.2%（116 例）和 14.9%（106 例）。801 个肿瘤中最常见的基因突变为 TERT（57.3%）、CTNNB1（30.3%）、TP53（18.6%）、ARID1A（13.2%）、ALB（11.3%）、APOB（9.5%）和 AXIN1（9.1%）。进一步分别使用 G1-G6 分级和 5-基因评分两个系统对驱动基因进行分组。转录组分析结果显示，G1-G6 的比例分别为 6.7%、8.1%、14.7%、44.6%、17.3% 和 8.6%，晚期 HCC 患者 G3 富集（ $P < 0.0001$ ）、预后评分低（ $P < 0.0001$ ）且在转录组水平增殖和去分化增加。根据 5-基因评分系统，全组中有 61% 的肿瘤被归为“良好预后”组，39% 的肿瘤被归为“不良预后”组。相比于肝切除术组（40%）、肝移植组（36%）和消融组（29%），姑息治疗组（64%）有更多比例的患者存在“不良预后”的 5 基因评分（ $P=0.0002$ ）。基于不同治疗方式的亚组分析

后的多因素分析发现，5- 基因评分是预后不良的独立危险因素；“良好预后”组患者的总生存率显著高于“不良预后”组。根据 5 基因评分可预测切除手术治疗 ($P < 0.0001$)、消融治疗 ($P=0.01$) 和晚期 ($P=0.04$) HCC 患者的总生存。对 41 例接受姑息治疗的中晚期 HCC 和 156 例接受肝切除手术治疗的早期 HCC 进行全外显子测序分析发现，41 例中晚期 HCC 中有 6 543 个编码序列的突变；两组患者编码序列的中位突变数分别为 104 (20-604) 和 103 (1-784) 个；但两组患者的异常染色体片段或拷贝数改变无显著差异。中晚期 HCC 患者有更高频率的基因突变，包括 SF3B1 ($P=0.0003$)、P53 ($P=0.0006$) 和 RB1 ($P=0.03$)。22% 的中晚期 HCC 具有潜在的可药化基因改变，MET 扩增与晚期 HCC 患者接受特定 MET 抑制剂治疗后的肿瘤完全缓解有关。



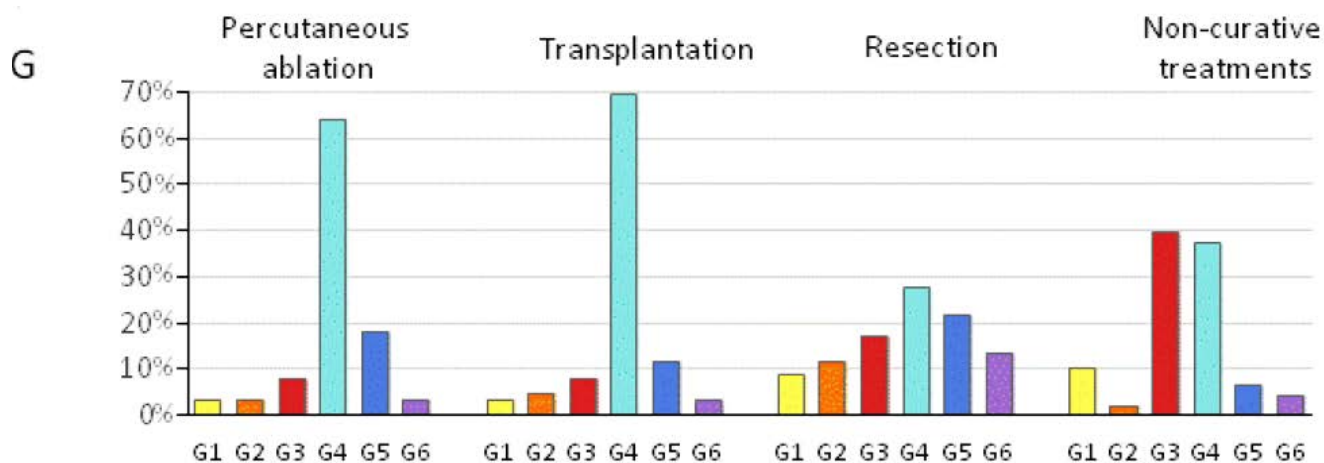


图1 根据HCC治疗方式不同进行的转录组学分类

A. 根据5-基因评分进行的亚组分析 ($n=695$)；B. 根据BCLC分期系统和治疗方式不同进行的亚组分析；C. 根据5-基因评分进行的预后分析；D. 肝移植组；E. 消融组；F. 姑息治疗组；G. 根据G1-G6系统和治疗方式不同进行的亚组分析 ($n=757$)。

综上所述，HCC 不同分期的基因组分析揭示了肿瘤进展的机制，有助于识别靶向治疗的生物标志物。

【参考文献】

Nault JC, Martin Y, Caruso S, et al. Clinical impact of genomic diversity from early to advanced hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2019.



Clinical Cancer Research: 二代测序为发现肝细胞癌靶向治疗和免疫治疗的标志物提供了新方法

对晚期 HCC 患者的临床标本进行前瞻性基因分型，以筛选相应肿瘤标志物以帮助临床决策的研究鲜见报道。此项研究采用二代测序（next generation sequencing, NGS）技术前瞻性地检测了 127 例 HCC 患者临床标本，发现携带致癌 PI3K-MTOR 通路改变的 HCC 在索拉非尼治疗中疗效更差，而 WNT/ β -catenin 通路的活化与对免疫检查点抑制剂的原发耐药性相关。基于患者遗传信息的基因组测序数据，为针对性地选择适当和最佳疗法提供重要的参考。

原创专家述评：余红平教授；叶甲舟博士

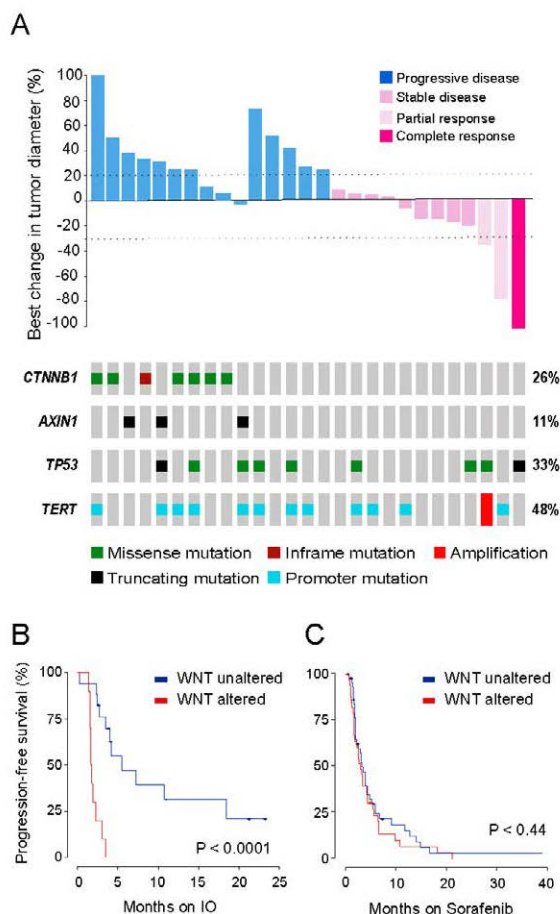
PD-1 免疫检查点抑制剂在肝细胞癌（HCC）患者中取得了可喜的疗效，但并非所有患者均可从治疗中获益。疗效预测标志物对临床筛选敏感精准治疗意义重大。肝细胞癌的遗传分子信息已被广泛研究。然而，绝大多数的肿瘤标本都来源于早期患者，缺乏治疗后比如免疫治疗后的临床样本数据。本研究目的为运用 NGS 检测晚期 HCC 患者的临床标本，探索该人群潜在预测疗效和预后的基因组生物标志物。该项研究前瞻性地纳入 127 例 HCC 患者，采集其肿瘤组织及血清样本，使用 MSK-IMPACT 进行二代测序，分析基因组表达情况、肿瘤突变负荷（TMB）及肿瘤微卫星不稳定性（MSI），获得结果与临床疗效及预后进行相关分析。

主要研究结果：① 95% 的 HCC 患者中检测到基因组表达改变。突变最频繁的前五名基因依次为 TERT(55.6%)、CTNNB1(35.7%)、TP53 (32.5%)、ARID1A (12.7%) 和 TSC2 (10.6%)；除了 CTNNB1，WNT/ β -catenin 通路的数个

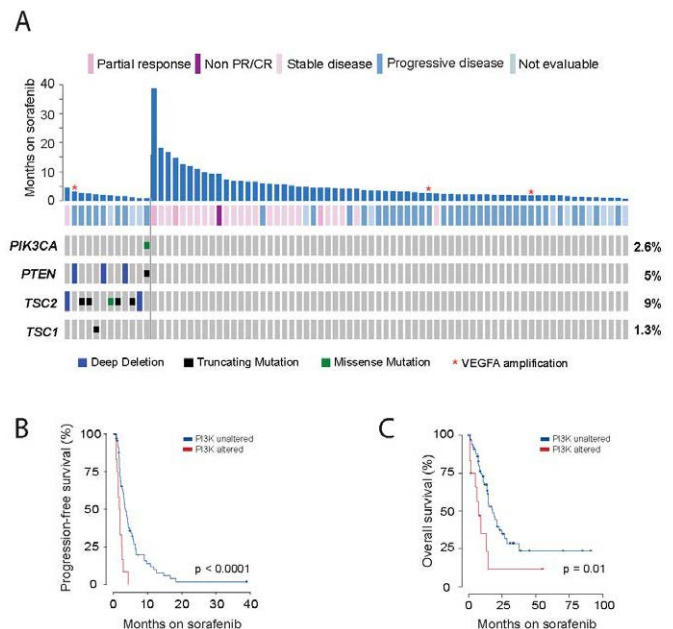
主要分子均发生突变，包括 AXIN1 (6.3%)，AXIN2 (0.05%) 和 APC (5.2%)；拷贝数扩增的基因为 CCND1/FGF19 (7%)，MYC (6.1%)，MET (1.5%) 和 VEGFA ($< 1\%$)，拷贝数减少的基因为 HLA-B (2.7%)。基因结构改变，尤其是融合发生率很低。②整体队列的 TMB 中位数为 4.08，与 TCGA 数据库其他恶性肿瘤比较，TMB 的方差值低，仅比生殖肿瘤略高 (2.71 *vs* 1.75)；未检测到 MSI-H 及超突变。③与作者之前的肿瘤基因组分析结果一致，TP53 突变很少与 WNT 通路改变同时发生，提示他们代表相互排斥的不同的分子亚型。④在索拉非尼治疗的亚组分析中 ($n=81$)，癌基因 PI3K-mTOR 通路改变与较低的 DCR (8.3% *vs* 40.2%)、较短的中位 PFS 及 OS (1.9 *vs* 5.3 个月；10.4 *vs* 17.9 个月) 相关。⑤在免疫检查点抑制剂治疗的亚组中 ($n=31$)，WNT/ β -catenin 通路激活的患者比未激活的患者疗效及预后更差 (DCR 为 0% *vs* 53%，中位 PFS 为 2.0 *vs* 7.4 个月；中位 OS 为

9.1 vs 15.2 个月)。整体 TMB 偏低, 中位 TMB 仅为 3.8, 只有 1 例患者的 TMB > 10。免疫治疗有效组和无效中位 TMB 分别为 3.8 和 3.9 ($P = 0.98$)。以 TMB 分层分析的 HCC 患者中位 PFS 并无显著差异 (TMB < 3.8: 3.1 个月; TMB 3.8: 3.0 个月, $P = 0.21$)。⑥只有 24% 的患者携带了 OncoKB 数据库注释的肿瘤驱动基因突变, 但并没有发生 1 级或 2A 级改变, 无法预判药物反应。⑦在接受系统治疗的 87 名患者中, 仅有

5 人 (5.7%) 携带的基因突变与治疗靶点匹配, 其中 1 人一线治疗接受依维莫司 PFS 为 5 个月, 另 4 人一线使用索拉非尼后均不到 3 个月出现病情进展, 二线接受依维莫司后其中 3 例达到 5 个月的生存获益。本研究表明在肝细胞癌中, PI3K-mTOR 通路改变可能是预测索拉非尼疗效的有效标志物, Wnt/CTNNB1 突变有可能作为预测对免疫检查点抑制剂的耐药的生物标志物, 但需要对这些数据进行更大样本的临床验证。



Wnt/CTNNB1 突变有可能作为预测对免疫检查点抑制剂的耐药的生物标志物



PI3K-mTOR 通路改变可能是预测索拉非尼疗效的有效标志物

【参考文献】

Harding JJ, Nandakumar S, Armenia J, et al. Prospective Genotyping of Hepatocellular Carcinoma: Clinical Implications of Next Generation Sequencing for Matching Patients to Targeted and Immune Therapies[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(7):2116-2126.



Hepatology: 血管包绕的肿瘤集团 (VETC) 可作为判断 HCC 预后简单有效的标志物

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 其发生和发展的分子机制与微血管 (angiogenesis) 生成密切相关。然而, 反映微血管的分子标志物是否可作为判断 HCC 预后的肿瘤标记物, 值得进一步探索。近来, 一项多中心的队列研究表明, 血管包绕的肿瘤集团 (vessels encapsulating tumor clusters, VETC) 与 HCC 的快速侵袭转移并与 HCC 手术后预后有着密切联系, 并且在 HCC 中很容易检测到, VETC 可作为 HCC 预后判断简单有效的标志物。

原创专家述评: 马良教授; 叶甲舟博士

HCC 的恶性程度尤其侵袭转移的能力与其肿瘤微环境当中的分子机制密切相关, 多年来诸多研究一直探索与 HCC 侵袭转移能力息息相关的分子标志物, 而这类标志物, 也是预测 HCC 预后的重要分子标志物。近期, 一项由意大利米兰仁爱临床研究中心 (Humanitas Research Hospital, Rozzano, Italy)、韩国延世大学医学院 (Severance Hospital, Seoul, Korea)、日本大学医学院 (Kurume University Hospital, Kurume, Japan) 共同发起一项多中心的队列研, 对来自意大利、韩国和日本的 541 例经肝切除治疗患者的 HCC 组织进行了血管包绕的肿瘤集团 (VETC) 检测并与临床和病理的所有变量进行匹配及分析发现, 血管生成的异质性与 HCC 的预后有关, 揭示了 HCC 中 VETC 血管生长模式对于 HCC 手术后预后判断的临床意义。

该研究显示, 通过对术后 HCC 样本的整个切片和小尺寸组织进行组织芯片检测发现, VETC 表型 (定义为 CD34 免疫染色的肿瘤面积 $\geq 55\%$) 可被检测到并且易于重复操作。VETC-HCCs 占整个队列的 18.9%, 其中最小肿瘤队列的比例最低 (8.7%, 日本队列)。同时, VETC 的表达水平与血清高浓度平 AFP、肿瘤大小 $> 5\text{ cm}$ 、HCC 低分化、粗小梁型、致密型少、炎性浸润少、微血管侵犯频发等临床病理特征显著正相关。进一步的多变量分析显示, VETC 与早期复发 [HR: 1.52 (1.06-2.19), $P=0.023$]、DFS [HR: 1.66 (1.21-2.27), $P=0.002$] 及 OS [HR: 2.26 (1.37-3.72), $P=0.001$] 密切相关。根据 HBV、HCV、血管侵犯、特殊分子基因表型 (β -catenin/GS+) 对 HCC 患者进行分层分析后, 结果同样表明 VETC 明显对 HCC 患者的生存造成影响。

VETC 这一独特的血管模式在主要表现在粗小梁 HCC 亚型中富集，其发生率约为 7.8% (42/541)，并且与 AFP 水平高、HCC 低分化差等临床病理特征密切相关。

这些结果表明，VETC 血管生长模式与 HCC 的快速侵袭转移有着密切联系，并与 HCC 手术后患者的预后有关，是一个影响生存率的强有力病理发现。并且，VETC 模式在

HCC 中很容易检测到，可作为判断 HCC 患者手术治疗后预后的有力依据 (图 1)。

【参考文献】

Renne SL, Woo HY, Allegra S, et al. VETC (vessels encapsulating tumor clusters) is a powerful predictor of aggressive hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2019.

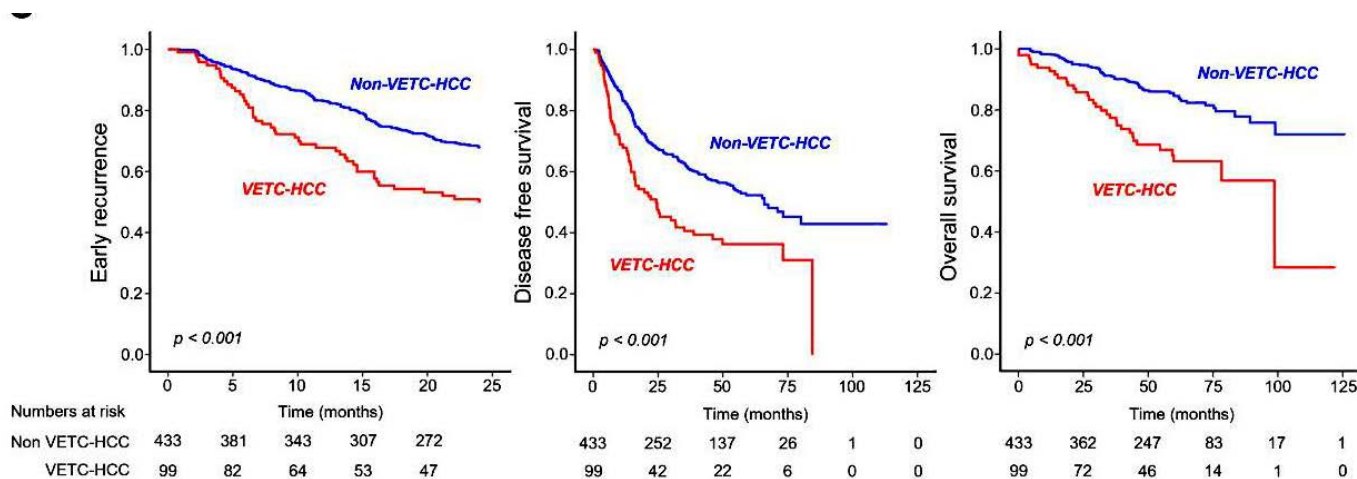
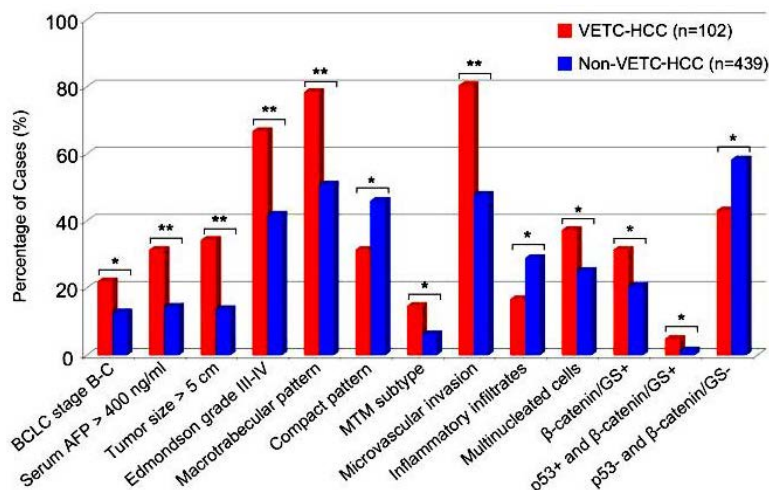
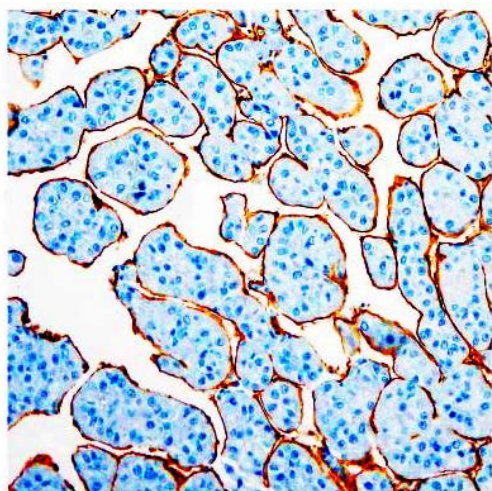


图1 VETC表型相关的病理临床特征及其对HCC患者生存的影响



JCO: 新辅助放疗——原发性肝癌合并 II/III 型门脉癌栓的治疗新策略, IL-6 可能可作为预测放疗疗效的标志物

既往原发性肝细胞癌 (HCC) 放疗地位偏低, 缺乏 I 类证据。对于合并 PVTT 的肝癌治疗策略, 在西方和东方的专家存在着较大争议。西方专家基于巴塞罗那分期与治疗策略, 考虑 HCC 伴 PVTT 属于进展期 (BCLC-C 期), 索拉非尼是唯一推荐的治疗策略。但索拉非尼对于合并 PVTT 肝癌患者获益有限, 尤其是对于慢性乙肝为背景的亚太人群的总生存时间仅提高 1.5 个月。而在我国, 肝癌合并 PVTT 患者的治疗方案多样化, 包括外科手术、介入、靶向、化疗、放疗等治疗手段, 但其证据级别都较低, 且缺乏最佳的治疗策略推荐。

原创专家述评: 梁世雄教授; 苏庭世博士

东方肝胆外科医院程树群教授团队的一项随机、开放性、多中心随机对照研究显示, 对于原发灶可切除 HCC 伴 PVTT 病例, 低剂量 (18Gy) 新辅助放疗组较单纯手术组显著提高了患者的 OS 和 DFS, 且放疗并未增加手术并发症; 同时发现血浆 IL-6 可能可作为预测放疗疗效的标志物。既往 NCCN 指南已将放射治疗作为局部无法手术切除 HCC 的推荐治疗方式之一 (仅为 IIb 类证据), 该研究将确立了放疗在晚期肝癌的新辅助地位, 为原发灶可切除 PVTT 提供更优的治疗策略。

原发性肝细胞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 据世界卫生组织估计, 2030 年将有 100 多万患者死于 HCC。HCC 容易侵犯门静脉系统, 是预后差的重要类型之一。在我国, 约 10%~40% 患者初诊时已经形成门脉癌栓 (PVTT), 其预后不容乐观, 若未经治疗, 中位生存期只有 2~5 个月。在我国, 肝癌合并 PVTT

患者的治疗方案不一, 包括外科手术、介入、靶向、化疗、放疗等治疗手段。但其证据级别都较低, 缺乏头对头的前瞻性随机研究。上世纪 90 年代以来, 三维适形放疗 (3D-CRT) 应用于 HCC 合并 PVTT 的治疗并取得了可观疗效。此前东方肝胆外科医院程树群团队一项回顾性分析显示, 通过新辅助放疗降低术前 PVTT 侵犯范围和分型, 降低肿瘤扩散或残留肿瘤的机会, 改善术后生存率, 但缺乏新辅助放疗的高级别临床证据。

基于此, 2019 年 7 月 8 日 *Journal of Clinical Oncology* 杂志发表东方肝胆外科医院程树群团队的一项随机、开放性、多中心随机对照研究, 比较了 HCC 合并 PVTT 新辅助放疗后手术与单纯手术的疗效, 前瞻性评估新辅助放疗的价值, 为临床提供了新策略; 同时探讨 IL-6 作为预测放疗疗效生物标志物的可能性。

研究设计: 这项随机、开放的多中心对照临床研究, 主要入组标准为年龄 18~70 岁, 活检

或欧洲肝脏协会无创标准确诊为 HCC，HCC 原发灶可切除，PVTT 按程氏分型为 II / III 型（PVTT 侵犯门静脉右支、左支或主干）。总纳入 164 名患者，按 1 : 1 随机分配至单纯手术组（ $n = 82$ ）和新辅助放疗 + 手术组（ $n = 82$ ），放疗模式为三维适形放疗，计划靶区的计划总剂量为 18 Gy，单次分割剂量为 3 Gy/ 次，新辅助放疗组在完成新辅助放疗后 4 周内重新评估，如果患者没有出现手术禁忌，则立即计划手术并在 5 d 内施行；单纯手术组的患者，在随机分组后 5 d 内立即计划并施行手术。

新辅助放疗疗效评价及 IL-6 预后标志物分析：研究中采用 mRECIST 标准评价原发病灶放疗的疗效；对于 PVTT，程式分型中出现的任何分型下降或门静脉血流明显恢复均被视为部分缓解（PR），反之，任何的分型上升均被视为进展性疾病（PD），其余则定义为稳定疾病（SD）。只要原发肿瘤或 PVTT 疗效为 PD，则总体放疗疗效定义为 PD；如果原发肿瘤或 PVTT 疗效为其中一项 PR 而另一项 SD 以上，则总体放疗疗效定义为 PR；如果原发肿瘤或 PVTT 疗效都为 SD，总体放疗疗效定义为 SD。研究终点是总生存期（OS），次要终点是是无病生存期（DFS）、手术相关并发症及住院期间死亡。

新辅助放疗组中位随访时间为 15.2 个月，其总有效率为 20.7%（17/82 例 PR），58 例（70.7%）为 SD，7 例（8.5%）为 PD。17 例中有 12 例获得 PVTT 降期（PVTT 从程式分型的 III 型降至 II 型或从 II 型到 I 型）。在新辅助放疗后出现 PD 的患者对比 PR 和 SD 的患者，基线血浆 IL-6 水平显著更高（ $P = 0.047$ ）。在 HCC 组

织中，取得 SD 对比取得 PR 的患者，IL-6 表达水平显著更高（ $P = 0.018$ ）。其结果显示，IL-6 可能可以作为放疗疗效的预测指标。

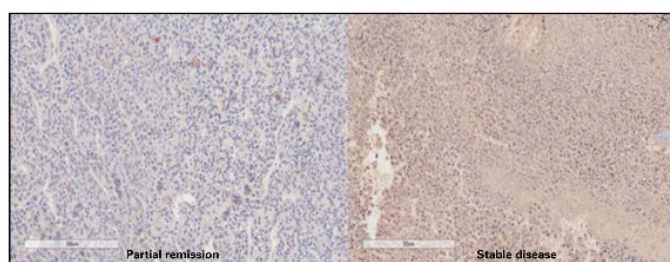
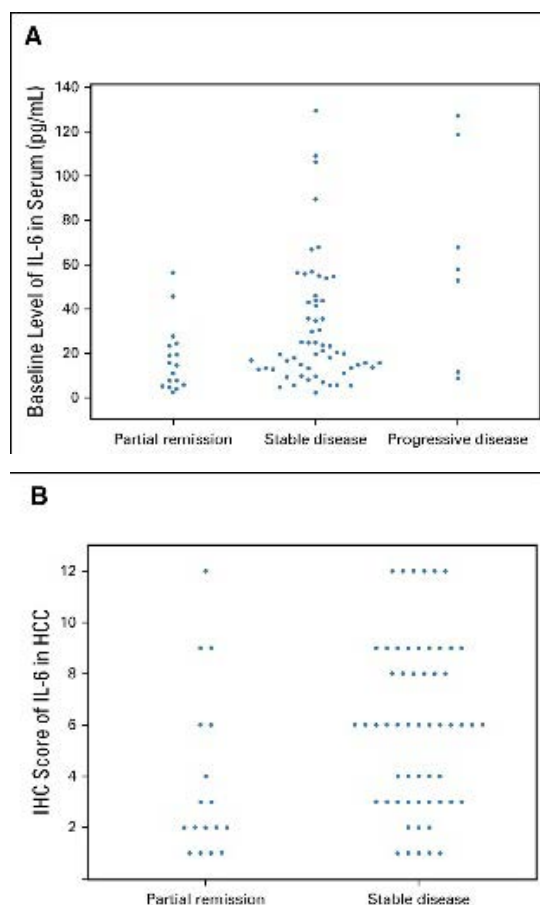
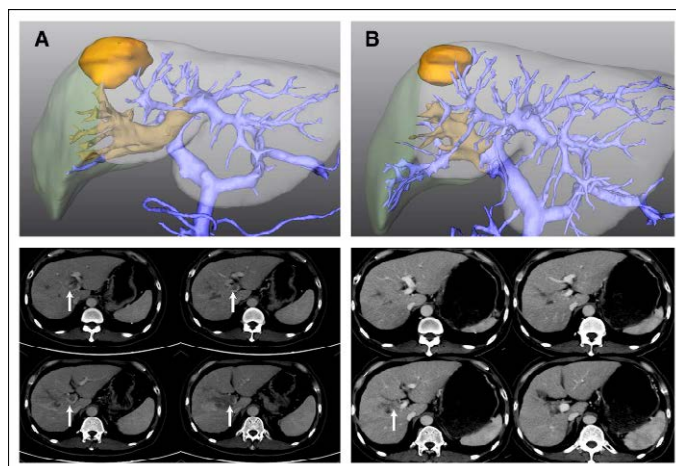




TABLE A5. Univariable Analysis of Risk Factors for Progressive Disease After Neoadjuvant Radiotherapy in Patients With Hepatocellular Carcinoma With PVTT

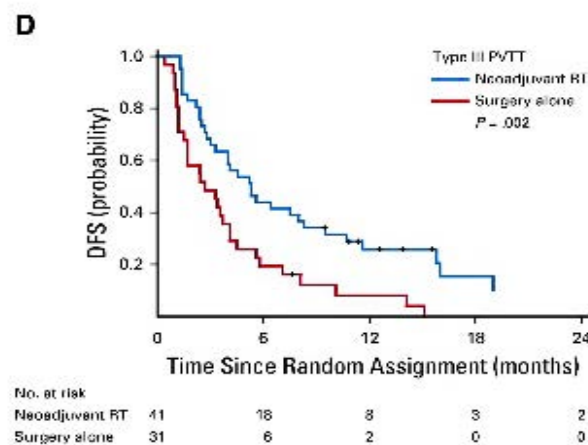
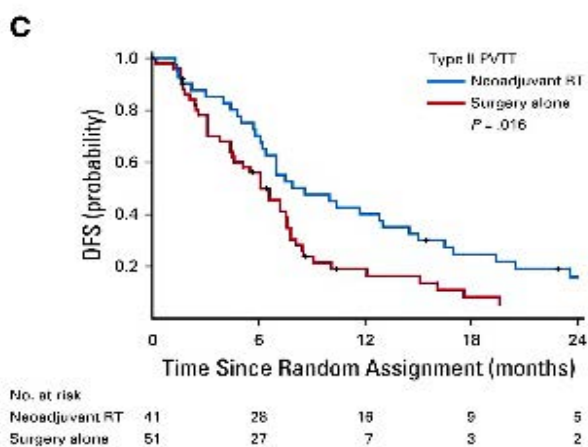
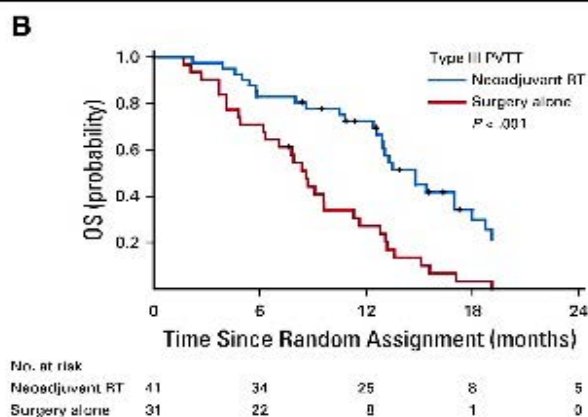
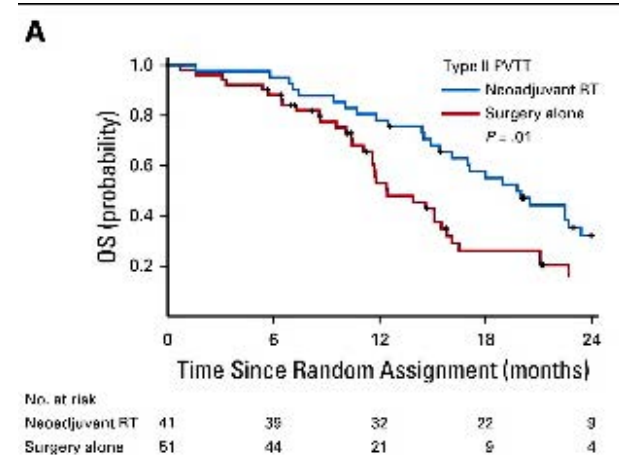
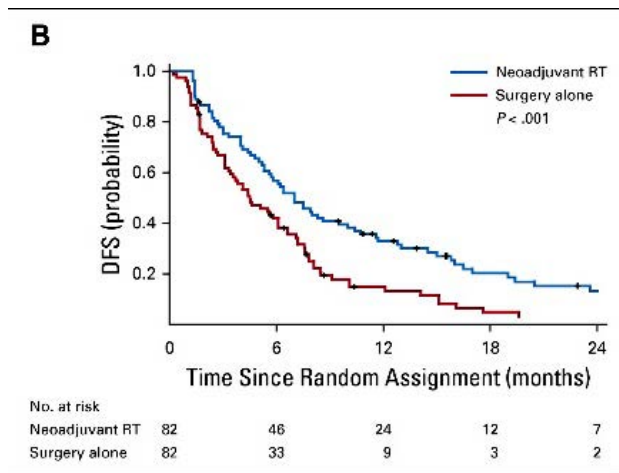
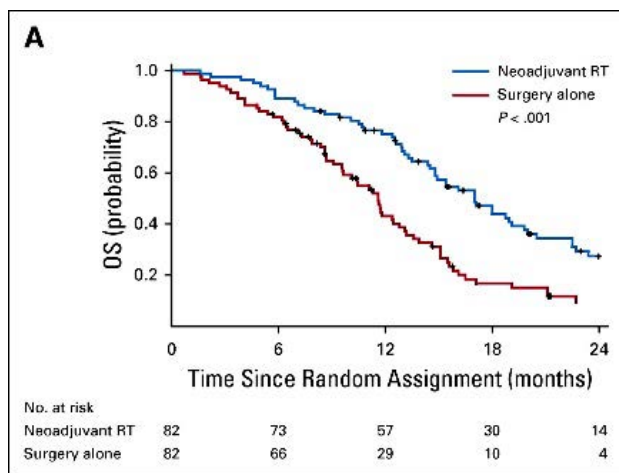
Characteristic	Progressive Disease, No.	Stable Disease/Partial Remission, No.	P
No. of patients	7	75	
Median age, years (range)	53 (22-70)	53 (33-59)	.684
Male sex	6	61	.774
ECOG performance status			
0	0	18	.338
1/2	7	57	
Viral serology			
Positive for HBsAg	7	68	.773
Positive for HBeAg	2	13	.606
Seral HBV DNA load ($\geq 2,000$ IU/mL)	2	36	.442
Antivirus treatment	3	28	1.0
Liver function status			
Child-Pugh grade A	7	72	1.0
Child-Pugh grade B	0	3	
PVTT type			
II	3	38	1.0
III	4	37	
Median tumor diameter, cm (range)	11.5 (5-14)	8.5 (2.5-20.7)	.406
Tumor No.			.571
Single	6	8	
Multiple	11	67	
Liver cirrhosis			1.0
No/mild	6	63	
Yes	1	12	
Median IL-1 β level, pg/mL (range)	8.2 (6-15.2)	9.4 (2.4-65.6)	.556
Median IL-2 receptor level, U/mL (range)	568 (375-1,374)	468 (94-1,919)	.245
Median IL-6 level, pg/mL (range)	57.9 (8.5-127)	19.3 (2.2-129.4)	.047*
Median IL-8 level, pg/mL (range)	220 (55-763)	206 (56-3,003)	.967
Median IL-10 level, pg/mL (range)	7.7 (4.4-13.2)	5 (2.5-18.5)	.072
Median TNF level, pg/mL (range)	12.6 (5-21.3)	12.2 (3.5-43.8)	.947
Median AFP level, ng/mL (range)	16,770 (7.7-324,600)	1,610 (1.6-849,000)	.292
Median DCP level, mAU/mL (range)	2,357 (205-45,650)	2,561 (22-90,781)	.648

NOTE. Categorical variables were analyzed using the Fisher's exact test. Continuous variables were analyzed using Mann-Whitney *U* test. Abbreviations: AFP, α -fetoprotein; DCP, Des-gamma carboxyprothrombin; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; IL, interleukin; mAU, milli arbitrary unit; PVTT, portal vein tumor thrombus; TNF, tumor necrosis factor.

**P* < .05.

OS 和 DFS 分析：新辅助放疗组的 OS 与手术组为 81.7%、43.1%、16.7% 和 9.4% (*P* < 0.001)。新辅助放疗组 6 个月、12 个月、18 个月、12 个月、18 个月和 24 个月的 OS 分别为 89.0%、75.2%、43.9% 和 27.4%，而单纯手术组为 42.1%、20.3% 和 13.3%，而单纯手术组为 42.1%、20.3% 和 13.3%。

14.9%、5.0% 和 3.3% ($P=0.005$)。亚组分析显示，无论对于 II 型还是 III 型 PVTT，新辅助放疗组 OS 和 DFS 都显著优于单纯手术组 ($P < 0.05$)。新辅助放疗组与单纯手术组相比具有更低的复发率与死亡率，新辅助放疗组中 66 例发生 HCC 复发，56 例死于 HCC。而在单纯手术组中，75 例发生 HCC 复发，66 例死于 HCC。



手术并发症：在新辅助放疗组中，2 例出现 2 级肝酶升高的患者，延迟 7 d 进行手术。9 例出现手术禁忌证的患者，包括 7 例 PD 和 2 例 3 级肝脏毒性，未接受手术治疗，剩余 73 例患者在新辅助放疗后接受手术。所有患者在术中均确诊合并 PVTT。两组共 8 例患者出现重大术后并发症（Clavien-Dindo 分类为 3 级或更高），两组手术相关并发症和病死率相当。



TABLE 3. Comparison of Surgery-Related Complications in the Neoadjuvant RT and Surgery-Alone Groups

Type of Complication	Grade I/II, No.			Grade III/IV, No.			Grade V (in-hospital mortality), No.		
	Neoadjuvant RT (n = 73)	Surgery Alone (n = 82)	P	Neoadjuvant RT (n = 73)	Surgery Alone (n = 82)	P	Neoadjuvant RT (n = 73)	Surgery Alone (n = 82)	P
Total	16	23	.380	4	1	.188	1	2	1.0
Intra-abdominal hemorrhage				2					
Liver failure				1	1		1	1	
Portal vein thrombosis								1	
Bile leak	1	2							
Intra-abdominal infection	2	3							
Pulmonary infection		2		1					
Wound infection	2	2							
Pleural effusion	2	3							
Ascites	6	5							
Dysrhythmia	1	2							
Other	2	4							

NOTE. Graded by Clavien-Dindo classification. For patients with more than one complication of different grades, the one with the higher grade was counted. For patients with more than one complication of the same grade, the one that occurred first was counted.

Abbreviation: RT, radiotherapy.

► 总结:

对于肝癌合并 PVTT 患者低剂量 (18Gy) 新辅助放疗优于单纯手术, 且放疗并未增加手术并发症; IL-6 可能可作为预测肝癌放疗具有较好标志物^[1]。

【参考文献】

Wei X, Jiang Y, Zhang X, et al. Neoadjuvant Three-Dimensional Conformal Radiotherapy for Resectable Hepatocellular Carcinoma With Portal Vein Tumor Thrombus: A Randomized, Open-Label, Multicenter Controlled Study[J]. J Clin Oncol, 2019.



Journal of Hepatology: 基因组测序鉴定 WNK2 为肝细胞癌的驱动因子和早期复发的危险因素

来源：探肝；推荐专家：黄启超副教授

► 研究背景

肝细胞癌（HCC）是一种常见的癌症类型，其发病率和死亡率持续上升。每年全球发生的 782 500 例新发肝癌病例和 745 500 例肝癌死亡病例中约有一半发生在中国。随着医学的发展，肝癌患者治疗和管理的进展提高了生存率，然而，肝癌的早期复发率仍然很高，这限制了手术切除后的长期生存率，尽管一些研究揭示了 HCC 进展和预后的分子机制，但遗传机制与 HCC 早期复发之间的关联仍然很大程度上未知。本研究旨在系统地定义中国 HCC 患者的基因组变化，并确定与这些患者早期肿瘤复发相关的突变。

► 研究结果

原发性肝癌早期复发患者的基因组变化

为了发现中国肝癌患者在根治性切除术后早期肿瘤复发的基因组突变情况，对 49 例 HCC 患者（均早期肿瘤根治性切除术后复发）进行了肿瘤组织和正常组织的的全基因组测序（肿瘤的平均测序深度是 54.5 倍，正常组织的平均测序深度是 36.1 倍）。之后将序列比对到人类参考基因组，共鉴定出 1 662 031 个体细胞单核苷酸变异（snvs）和 36 684 个 indel，每个肿瘤基因组有 2 446~99 031 个突变。用 Sanger 测序验证

1 146 个随机选择的体细胞编码突变显示出高的真实发现率（95.5%）。每 Mb 平均有 6.52 个体细胞突变（图 1A），将突变率 $> 10/\text{Mb}$ 的 7 个肿瘤样本（14.3% 的样本）分类为高突变。在所有 HCC 样本中 C $\rightarrow$ A 颠换和 C $\rightarrow$ T 和 T $\rightarrow$ C 转换普遍存在（图 1B）。然而，在 7 个超突变 HCC 样本中的 6 个都具有显性 T $\rightarrow$ A 颠换，且剩余的超突变肿瘤样本具有显性 C $\rightarrow$ G 颠换模式，这个结果暗示这些碱基突变可能有助于 HCC 中的超突变。同时还鉴定了 32 个扩增片段，其中包含几个已知的癌基因，如 CCND1，TERT 和 MYC，结果还鉴定了 18 个缺失片段，其中包括肿瘤抑制因子，包括 TP53（17p13），RB1（13q14）和 CDKN2A（9q21）（图 1E）。此外，也检测到丰富的基因组结构变异（SVs），每个样本平均 43.4 个 SVs。这些基因结构变异包括 483 个基因缺失，18 个倒位缺失，189 个插入缺失，414 个串联重复，3 个插入和 1 019 个染色体内或染色体间易位（图 1F）。同时还在 26 个（53%）肿瘤样本中发现了 HBV 整合的发生。且在 TERT（一种众所周知的 HCC 驱动基因）上也发现了复发性 HBV 整合事件。以及在肿瘤样本中鉴定到了 CCNE1 上游的 HBV 插入，这与肿瘤的侵袭性有关。

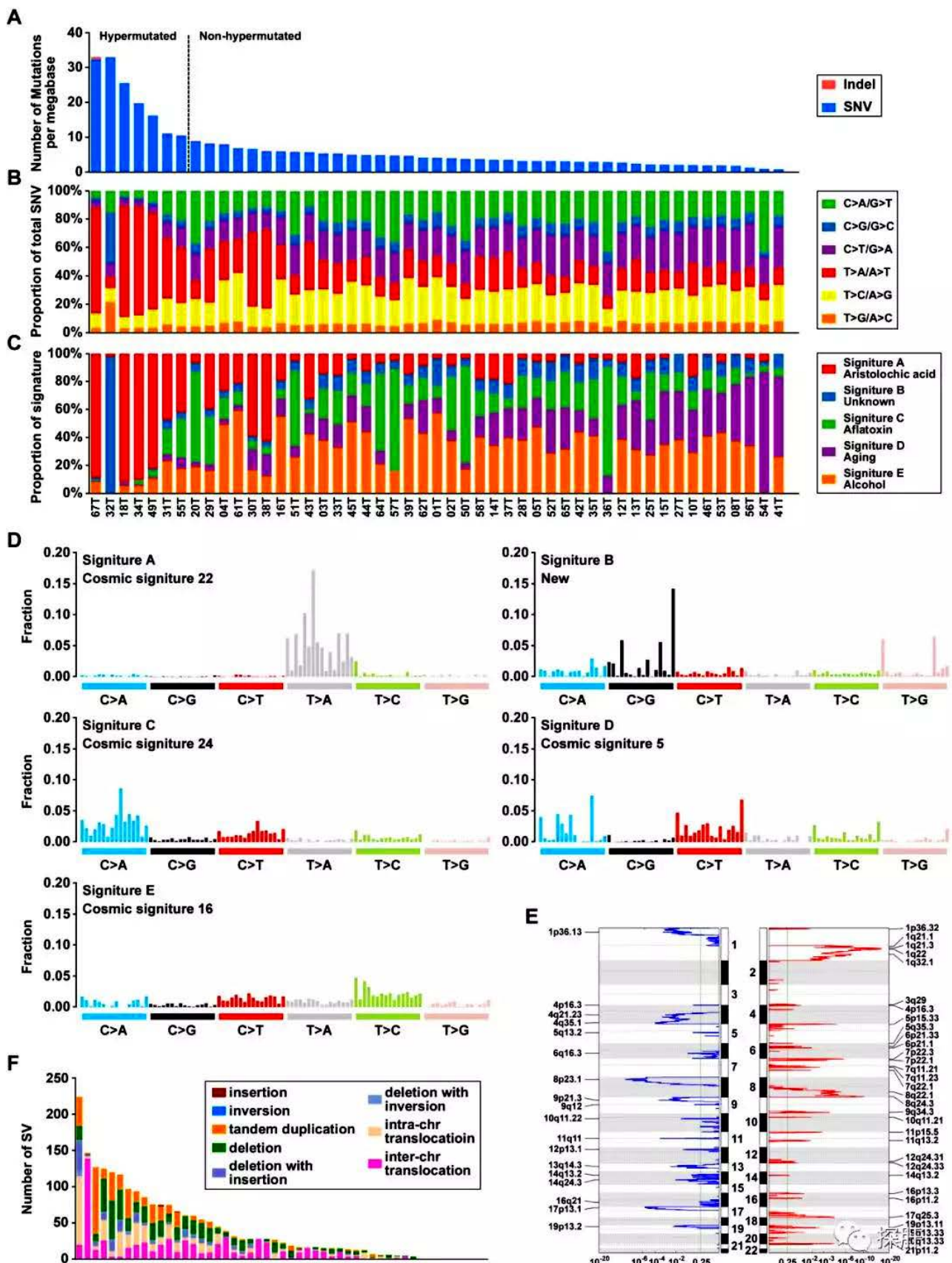


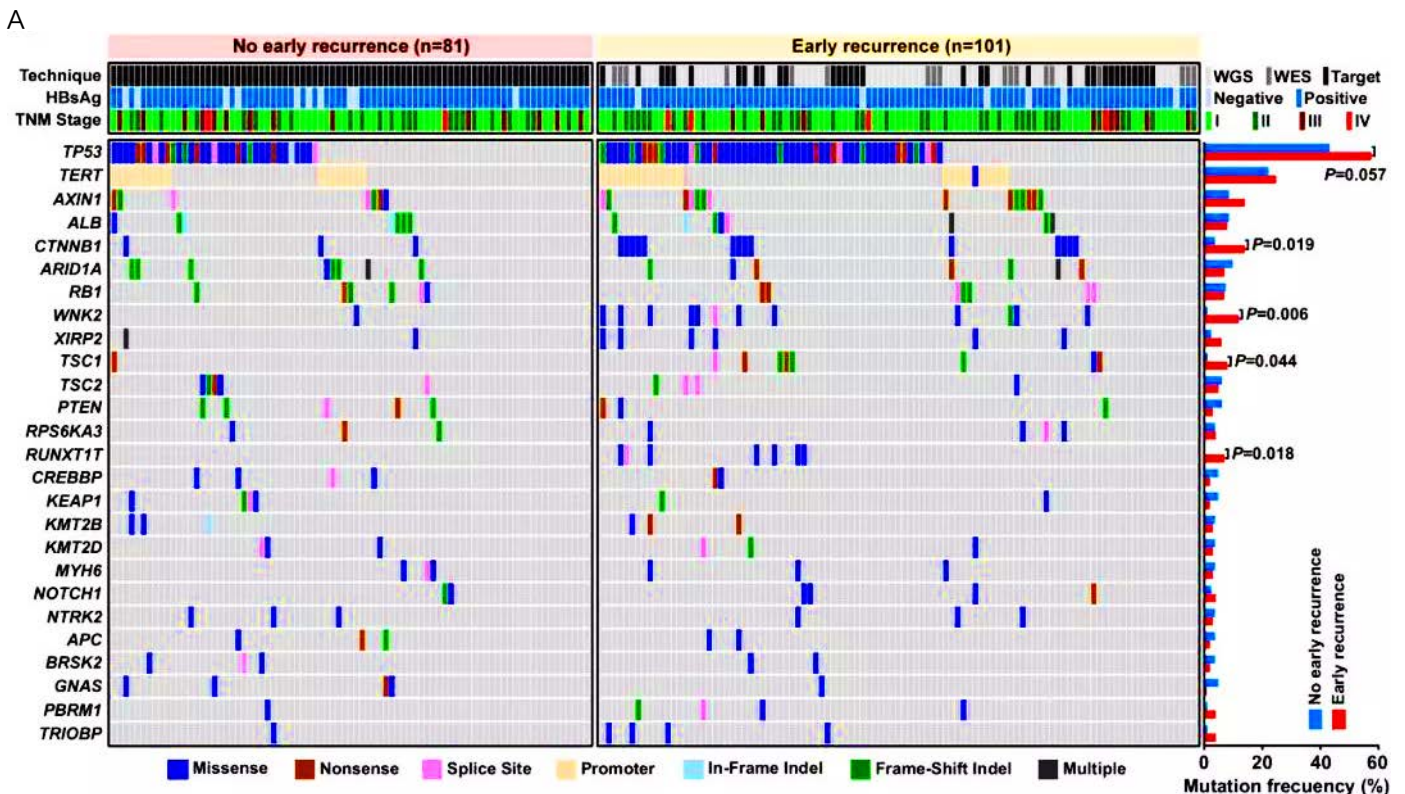
图1 49例中国原发性肝癌早期复发患者的基因组变化

A: 高突变率统计; B: 按总突变数分类的6种突变模式的分布; C: 每个HCC样本中观察到的特征的比例; D: 在49个HCC基因组中鉴定的五个特征; E: 拷贝数改变的全基因组分布; F: 基因组结构变异情况统计

► 治疗性切除术后HCC早期复发的WNK2, RUNX1T1, CTNNB1, TSC1和TP53体细胞突变的鉴定

接下来对 18 对肿瘤和匹配的正常组织进行了全外显子测序，并将蛋白质编码外显子中识别的体细胞 SNVs 和 Indels 与从 WGS 获得的数据相结合分析，鉴定出的 10 个显著突变的基因，其中 6 个 (TP53、AXIN1、CTNNB1、CDKN1A、ALB 和 ARID1A) 在以前的研究中已被鉴定为潜在的癌症驱动因素。进一步利用 182 份 HCC 样本的测序结果，比较了早期复发和未早期复发的 HCC 患者特异性基因体细胞突变的频率。发现 WNK2 在突变频率上有最显著的差异：101 例早期复发的 HCC 样本中有 12 例 (11.9%) WNK2 发生突变，而 81 例没有早期复发的 HCC 样本中只有 1 例 ($P=0.006$)。其他一些基因，如 RUNX1T1

($P=0.018$)、CTNNB1 ($P=0.019$) 和 CTNNB1 ($P=0.044$) 在两组患者之间的突变频率上也有显著差异，而 TP53 在两组患者之间有边际差异 ($P=0.057$) (图 2A，显示了存在于 5 个以上样本中的基因)。进一步观察这五个基因 (WNK2、RUNX1T1、CTNNB1、CTNNB1 和 TP53) 的组合时，发现 23 例患者中有 21 例 (91.3%) 有两个或多个基因突变，85 例患者中有 49 例 (57.6%) 只有一个基因突变，74 例 (49.1%) 无基因突变的患者中有 31 例发生早期复发 (图 2B-C)。此外，5 个基因中有 2 个或更多基因突变的患者 5 年累积复发率最高 (95.7%)，显著高于只有一个基因突变的患者 (72.6%) 和没有 5 个基因同时发生突变的患者。同样，两个或两个以上基因突变患者的 5 年 OS 率为 30.4%，显著低于只有一个基因突变和没有基因突变的患者 (图 2D)。



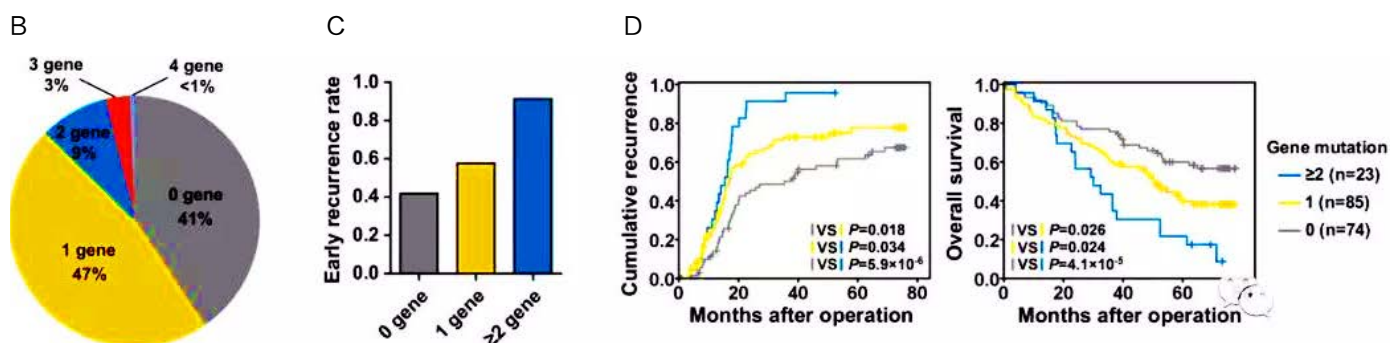


图2 182例原发性HCC治愈性切除术后肿瘤早期复发的基因突变

A: HCC中早期复发的突变谱情况; B: 携带WNK2、RUNX1T1、CTNNB1、TSC1和TP53突变的182个HCC的比例; C: 携带不同数量的突变基因的HCC患者早期复发率; D: WNK2、RUNX1T1、CTNNB1、TSC1和TP53突变的累积复发率和总体存活率分析

► 体细胞突变，拷贝数丢失和WNK2表达降低可预测治愈性切除后早期肿瘤复发

通过 Sanger 测序评估了另外 554 个 HCC 样品和成对正常组织中 WNK2 的所有编码外显子。在 117 例复发 HCC 患者中有 17 例发现了 WNK2 体细胞突变，并且在未经历早期复发的 437 例患者中有 9 例发现了 WNK2 体细胞突变。总体而言，从研究的 736 例 HCC 病例总数中，有 39 名不同患者中确定了 40 例发生 WNK2 体细胞突变：218 例患者中有 29 例（13.3%）经历过早期复发，518 例患者中有 10 例（1.9%）没有经历早期复发（图 3A-B）。WNK2 位于染色体 9q 的大基因组区域内，在初始 49 例 HCC 样品全基因组测序的中也发现了该基因的反复缺失（图 1E）。另外，又进行了 qPCR 用以评估所有 736 例 HCC 病例中 WNK2 的拷贝数，结果显示在 27.2% 的样品中 WNK2 拷贝数都丢失发生（图 3C）。此外又通过免疫组化的方法在 736 个 HCC 样本中进一步评估了 WNK2 表达情况，结果显示，与邻近的非肿瘤肝脏样品比，肿瘤样品中

WNK2 表达下调（图 3D-E）。接下来，将 WNK2 体细胞突变，拷贝数丢失和表达水平与患者的临床特征相关联。WNK2 体细胞突变与肿瘤大小的增加，血管侵犯和卫星病变相关。WNK2 拷贝数丢失与肿瘤大小的增加，肿瘤数量的增加，血管侵犯，卫星病变以及肿瘤分化和 TNM 分期增加相关。WNK2 的表达水平与较高的 GGT 水平，肿瘤大小和肿瘤数量增加，血管侵犯，卫星病变和 TNM 分期增加相关。另外，在 736 例 HCC 患者中，那些具有 WNK2 体细胞突变，拷贝数丢失或表达降低的患者表现出早期复发率升高（图 3F）。虽然一些临床特征如肿瘤大小和卫星病变等，可预测治愈性切除后早期肿瘤复发，但 WNK2 体细胞突变，拷贝数丢失或低表达的患者比没有这些特征的患者更容易出现肿瘤早期复发（图 3G）。通过 Kaplan-Meier 生存分析还显示，与没有这些特征的患者相比，WNK2 体细胞突变，拷贝数丢失或表达较低的患者 OS 显著缩短且累积复发率更高（图 3H）。

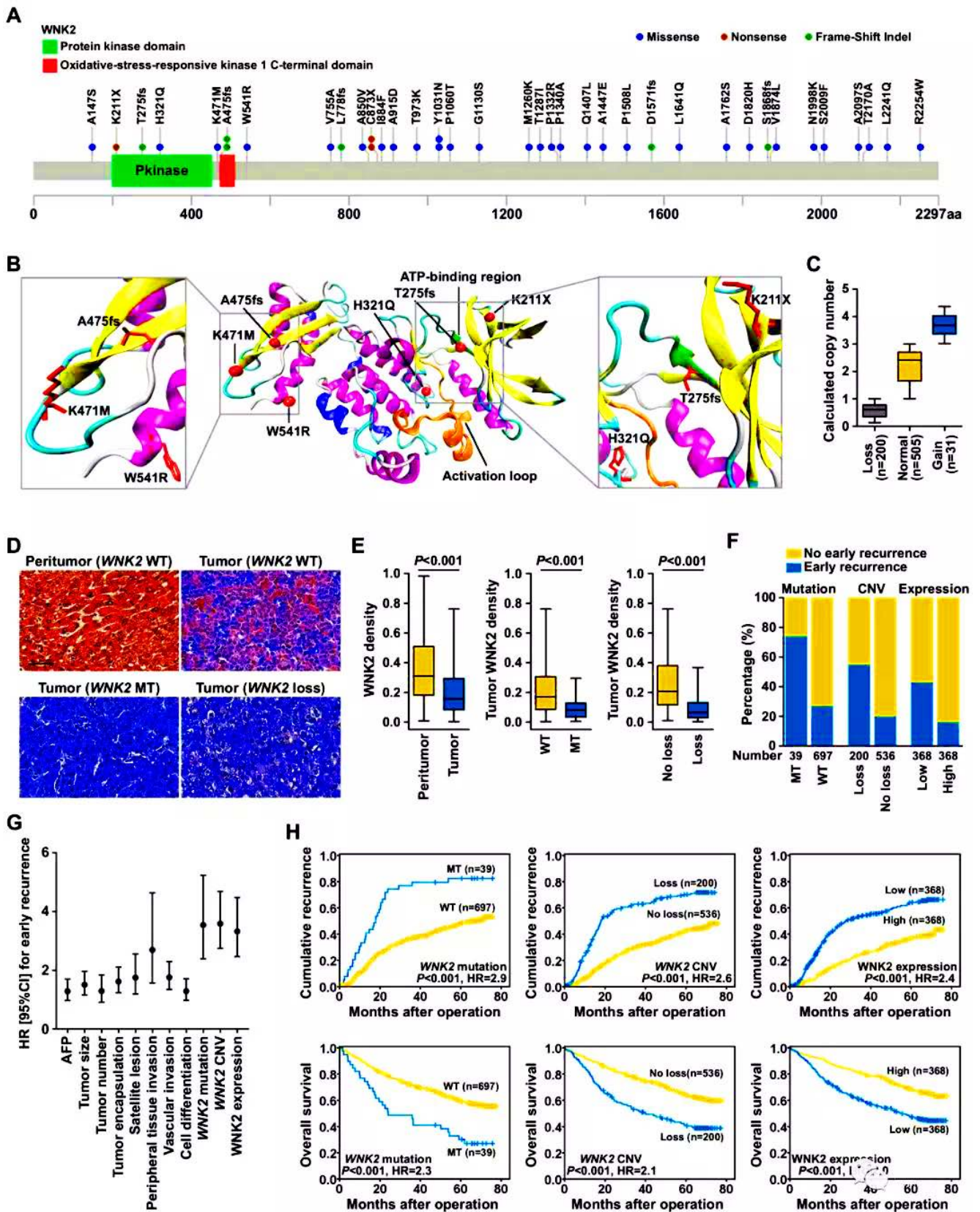


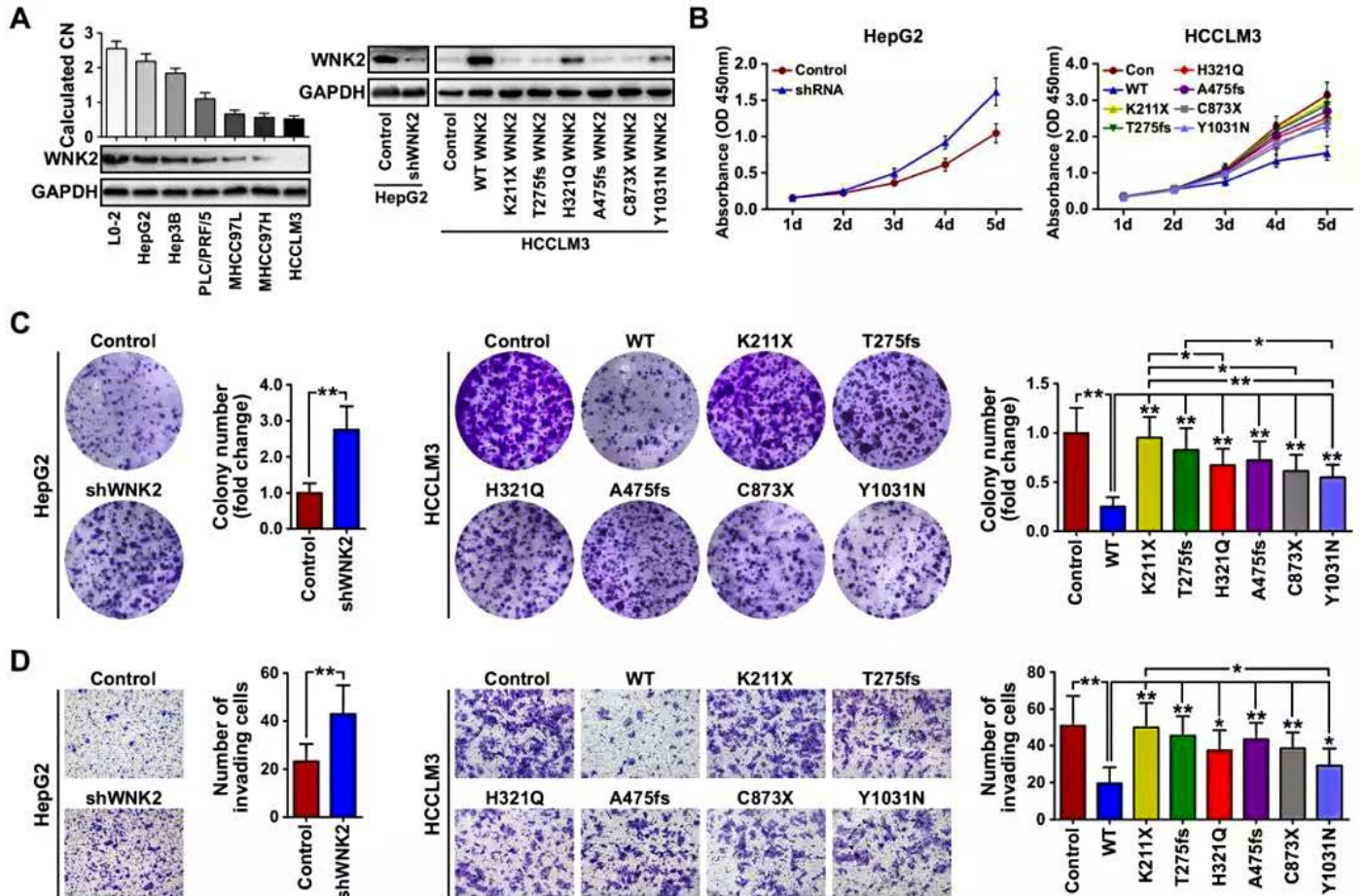
图3 736例HCC中WNK2改变的临床意义

A: WNK2中体细胞突变的分布; B: 结构域模型; C: 在736例HCC中计算的WNK2拷贝数; D-F: 免疫组化结果与表达统计; G: WNK2突变, 拷贝数变异和表达水平预测早期复发的能力; H: Kaplan-Meier生存分析显示基于WNK2突变, 拷贝数变异和表达水平的累积复发率和总体存活率

► WNK2在HCC中起肿瘤抑制基因的作用

上述结果表明 WNK2 在 HCC 中可能具有肿瘤抑制作用。为了检验该结果，研究又分析了六种 HCC 细胞系中 WNK2 的基因型和表达情况。qPCR 结果显示 HCC 细胞系: MHCC97L, MHCC97H 和 HCCLM3 具有 WNK2 拷贝数丢失 (图 4A)。蛋白质印迹结果证实, 与未转化的肝细胞系 L0-2 相比, 六种已建立的 HCC 细胞系中的 WNK2 蛋白水平降低, 尤其是那些具有高转移潜能的 HCC 细胞系 (MHCC97L、MHCC97H 和 HCCLM3; 图 4A)。接下来, 敲除了 HepG2 和 Hep3B 细胞中的 WNK2, 生物功能研究显示 WNK2 的敲低导致 HCC 细胞增殖和集落形成活性的增加 (图 4B-C) 并且增强了侵袭能力 (图

4D)。通过生成慢病毒构建体, 在 HCCLM3 和 MHCC97H 细胞中重新表达 WNK2 的细胞试验, 结果显示 WT WNK2 的过表达显著抑制 HCC 的细胞增殖, 集落形成和侵袭能力。与体外研究一致, 体内 HCC 小鼠模型的分析显示 WT WNK2 显著抑制肿瘤生长和肺转移, 而 MT WNK2 与 WT WNK2 相比产生更大的肿瘤体积和增加的肺转移 (图 4E)。此外, 研究发现无义突变体 WNK2K211X 和移码突变体 WNK2T275fs 几乎丧失了对 HCC 细胞的抑制作用, 这表明蛋白激酶结构域中的截短突变破坏了 WNK2 的功能。这些结果进一步证明了 WNK2 是 HCC 中的肿瘤抑制基因, 且某些体细胞突变可消除其功能及其肿瘤抑制作用的观点。



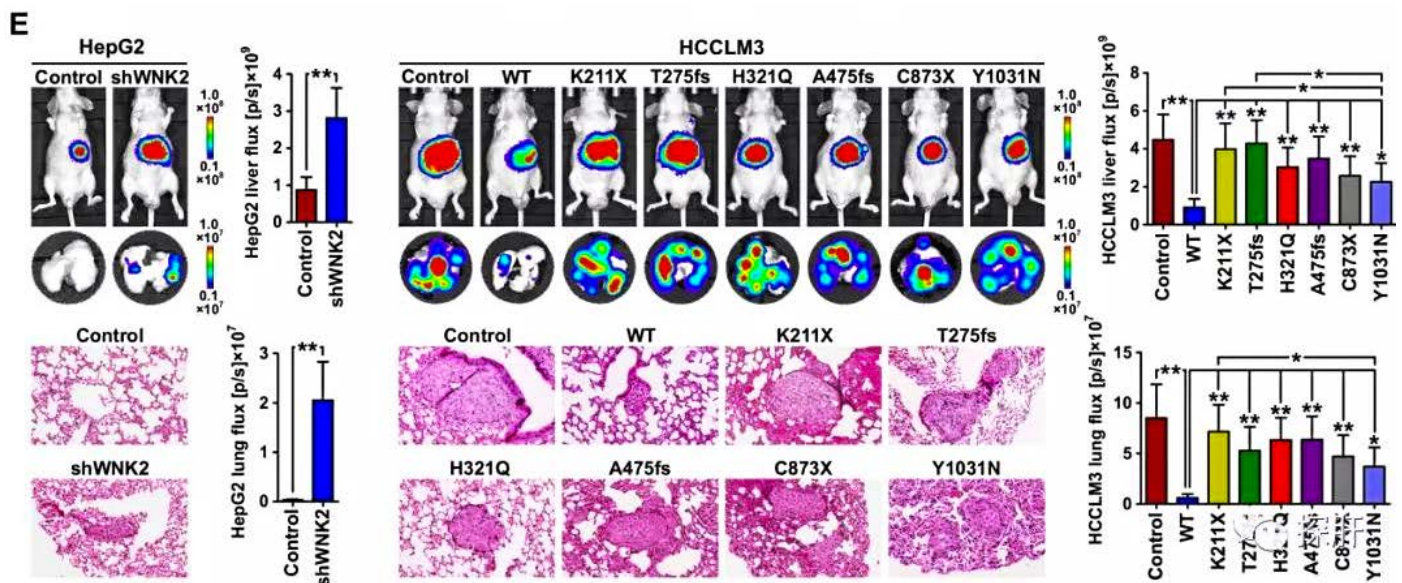


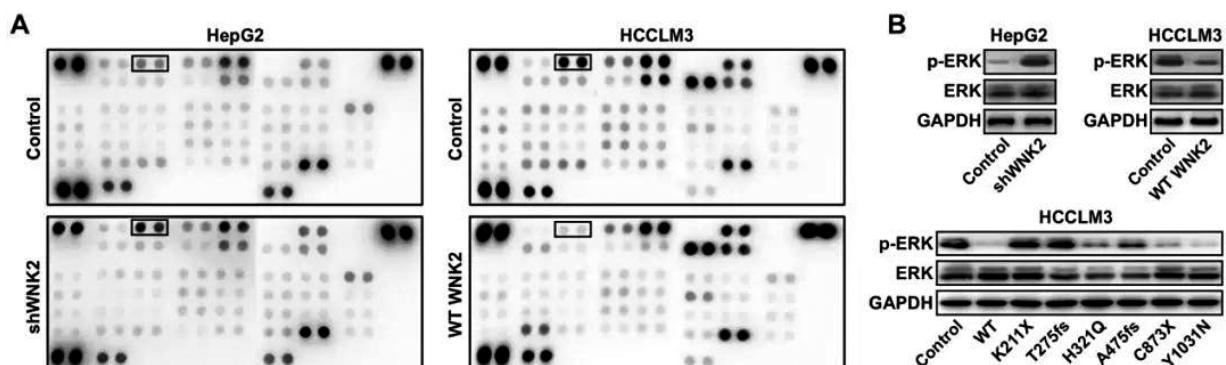
图4 鉴定WNK2作为HCC中的肿瘤抑制基因

A: qPCR以及蛋白印迹验证WNK2的拷贝数以及表达结果; B-D: WNK2敲除后HepG2细胞和野生型或突变型WNK2 HCCLM3细胞的增殖、集落生成活性及侵袭能力的分析结果; E: 小鼠肝肿瘤和肺转移的代表性生物发光图像, 以及肺中转移性结节的H & E染色图像。

► WNK2失活导致HCC细胞中ERK1/2信号传导激活

接下来研究了 HCC 细胞中 WNK2 功能的机制。结果显示, 在敲除 WNK2 后, HepG2 细胞中 p-ERK1/2 的上调超过 100 %, 而在 WNK2 过表达后, 它们在 HCCLM3 细胞中下调超过 50% (图 5A)。蛋白质印迹分析验证了这些结果并显示与 WT WNK2 相比, MT WNK2 未能抑制 ERK1/2 信号传导, 这表明 WNK2 负调节 ERK1/2 信号传导, 其突变或下调可激活 HCC 细胞中的信号传导途径 (图 5B)。在 HCC 细胞

衍生的小鼠模型的肿瘤切片中, 免疫组织化学染色显示出一致的结果 (图 5C)。具有 WNK2 体细胞突变或拷贝数丢失的临床 HCC 样品倾向于具有强的 p-ERK1/2 表达, 如免疫组织染色显示所示 (图 5D), 其进一步表明了 WNK2 的失活激活 HCC 中的 ERK1/2 信号传导。此外, U0126 (MEK1/2 抑制剂) 处理结果显示, 其显著降低了体外的细胞增殖, 集落形成和侵袭 (图 5E-G) 以及由 WNK2 诱导的体内肿瘤生长和肺转移 (图 5H)。结果进一步证明了 WNK2 通过失活 ERK1/2 信号传导促进 HCC 生长和转移。



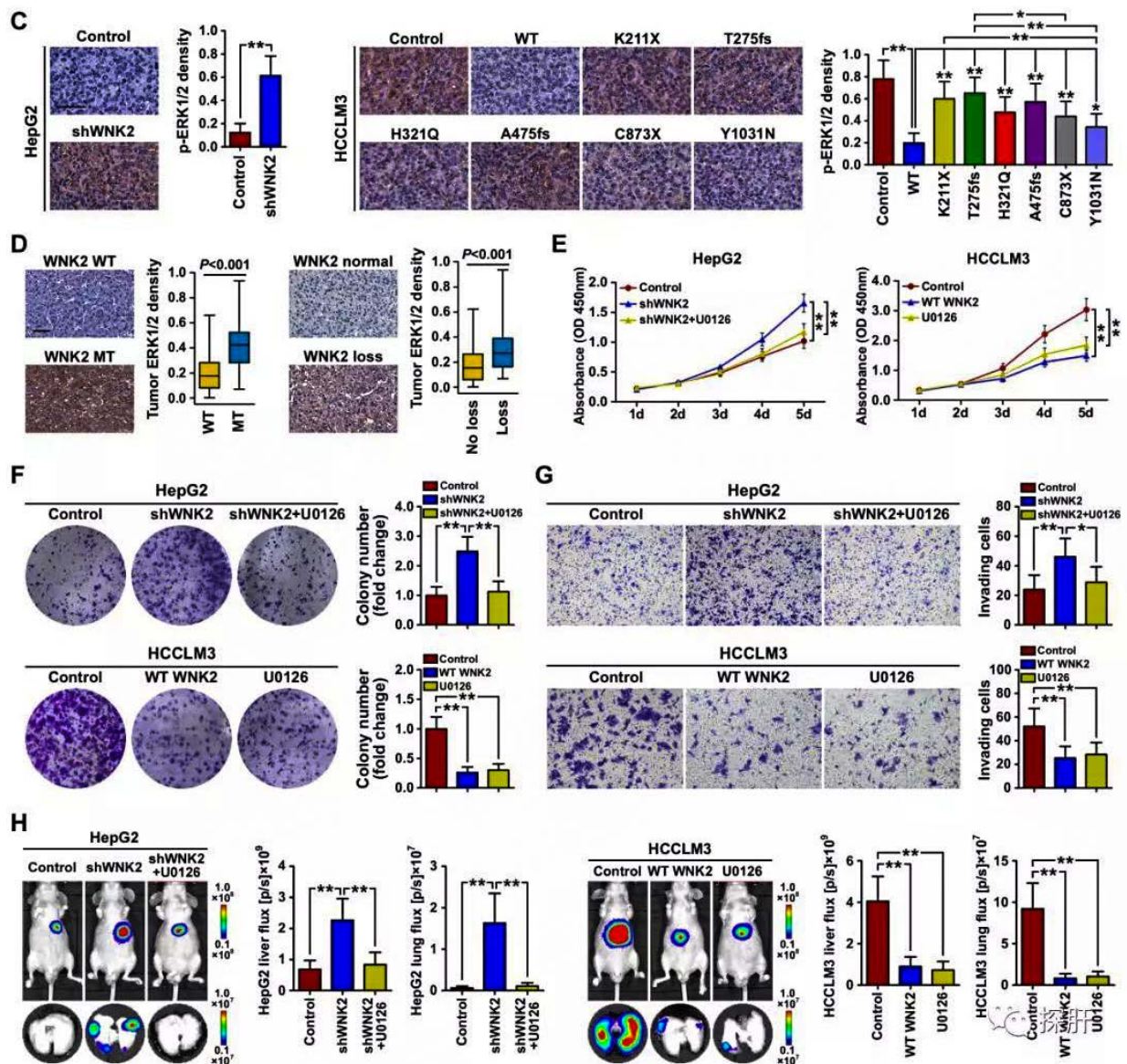


图5 WNK2失活导致HCC细胞中ERK1/2信号传导激活

研究总结

在 182 个原发性肝癌样本中，鉴定出五个携带体细胞突变的基因（WNK2、RUNX1T1、CTNNB1、TSC1 和 TP53）与治疗性切除后早期肿瘤复发有关。本研究以 WNK2 为研究对象发现其在 736 例 HCC 样本中的整体体细胞突变和拷贝数丢失分别为 5.3%（39/736）和 27.2%（200/736）。这两种变异都与较低的蛋白水平、较高的早期肿瘤复发率和较短的总生存率有关。此外，生物功能研究揭示了 WNK2 的抑癌作用：

其失活导致肝癌细胞 ERK1/2 信号激活以及增加了肿瘤相关巨噬细胞的浸润，肿瘤生长和转移。总结来说，本研究结果描述了中国肝癌的基因组特征，确定 WNK2 是肝癌的驱动因素，与治疗性切除后早期肿瘤复发有关。

参考文献

Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, et al. Genomic Sequencing Identifies WNK2 as a Driver in hepatocellular carcinoma and a Risk Factor for Early Recurrence[J]. J Hepatology, 2019

β-catenin 激活是 HCC 免疫治疗潜在耐药 Biomarker

预计到 2027 年，HCC 药物市场将达 40 亿美元，PD-1/PD-L1 抑制剂将是未来的主场。大约三分之一的 HCC（肝细胞肝癌）与功能获得性 CTNNB1（β-catenin）突变和肿瘤内 T 细胞含量稀缺相关。初步研究证据表明，这类型 HCC 病例难以用 PD-1 检查点抑制剂治疗。CTNNB1（β-catenin）突变是免疫检查点抑制剂治疗耐药的潜在 Biomarker。

来源：探肝；推荐专家：黄启超副教授

HCC 一直以来是医学界防控难题之一，因其发病率的增加和基于其活跃的基础临床研究，已从一种没有有效系统性治疗的疾病转变为临床工作者主要感兴趣的疾病之一。Dawkins J 和 Webster RM^[1] 根据目前 HCC 的治疗方式和重要的在研药物管线（图 1），对 HCC 的药物市场做出来预测：2017 年 HCC 的药物市场是 8.7 亿美元起，预计到 2027 年，HCC 药物的主要品牌销售额将达到近 40 亿美元（图 2）。这 40 亿美元中：①预计 PD-L1 抑制剂将成为销售领先的药物类别，主要市场销售额可达 17 亿美元，并超过 PD-1 抑制剂；PD-L1 抑制剂中近一半的销售额来自 durvalumab，durvalumab 既可单药也可与 tremelimumab 联用作为晚期患者的一线治疗方式；durvalumab 在中期患者中的市场也达到了 3.2 亿美元；atezolizumab（与贝伐珠单抗联用）预计仅在晚期患者的一线治疗中有市场，到 2027 年为 5.3 亿美；② PD-1 抑制剂的销售额将近 15 亿美元，其中 nivolumab 占 11 亿美元，占整个 2027 市场的 25% 以上；虽然晚期一线治疗的患者数最多，但 nivolumab 在辅助治疗

中的销售额约占其总销售额的一半；③ CTLA-4 抑制剂 ipilimumab 和 tremelimumab 的销售额合计 3.2 亿美元，远低于 PD-1/PD-L1 抑制剂；ipilimumab 和 tremelimumab 的销售额分别与 nivolumab 和 durvalumab 的联用挂钩；④在 2017 年的市场，抗血管生成抑制剂是市场销售领先的药物类别，尽管预测会有更多的生物和小分子血管生成抑制剂会获得批准，但销售额将在 2019 年达到峰值，然后在预测期剩余时间内下降，并估该类生物仿制药和仿制药将限制未来的销售潜力，以及整个 HCC 市场。

Product	Companies	Target or mechanism of action	Development status
Cabozantinib (Cabometyx)	Exelixis/Ipsen/Takeda	c-MET, RET, AXL and VEGFR1-3	Preregistration
Pembrolizumab (Keytruda)	Merck & Co.	PD1	Preregistration
Atezolizumab (Tecentriq)	Roche/Genentech/Chugai	PDL1	Phase III
Bevacizumab (Avastin)	Roche/Genentech/Chugai	VEGFA	Phase III
Durvalumab (Imfinzi)	AstraZeneca	PDL1	Phase III
Ramucirumab (Cyramza)	Eli Lilly	VEGFR2	Phase III
Tislelizumab	BeiGene/Celgene	PD1	Phase III
Tremelimumab	AstraZeneca	CTLA4	Phase III
Baviximab	Oncologie	Phosphatidylserine	Phase II
Capmatinib	Novartis Oncology	c-MET	Phase II
Galunisertib	Eli Lilly	TGFβR1	Phase II
Ipilimumab (Yervoy)	Bristol-Myers Squibb/Ono Pharmaceutical	CTLA4	Phase I/II
Spartalizumab	Novartis Oncology	PD1	Phase II

图1 HCC重要的在研管线

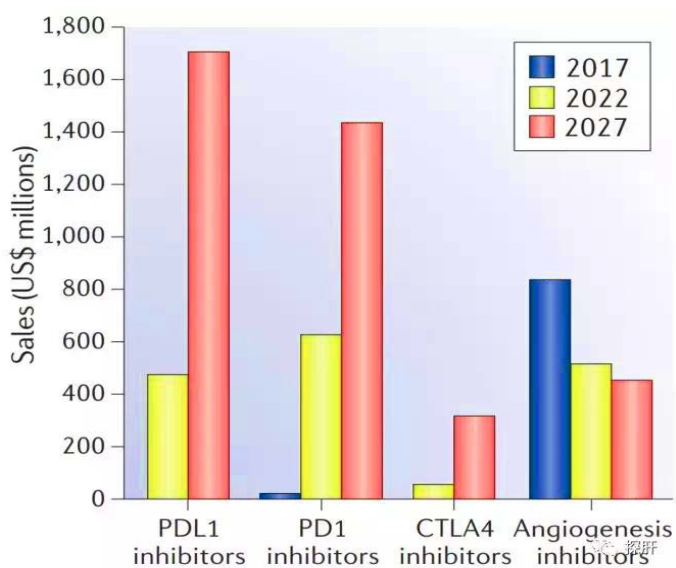


图2 HCC主要市场销售额预估 (按照药物类别划分)

目前免疫检查点抑制剂 nivolumab 和 pembrolizumab 均可用于 HCC 的二线或多线治疗。从 HCC 药物规模的市场预测来看, PD-1/PD-L1 抑制剂将是未来的主场, 通过分子分层筛选出最能从免疫治疗中获益患者也将成为临床实践中重点研究方向之一。在 MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) 的 Harding JJ 及其同事^[2] 使用 MSK-IMPACT 的杂交捕获 NGS 技术分析 HCC 患者 ($n=127$) 的肿瘤组织 DNA 及其配对的正常 DNA 情况, 将治疗结果和药物反应与分子图谱相关联。研究显示, WNT/ β -catenin 通路 (45%) 和 TP53 (33%) 上的突变最为频繁。该研究中, 有 31 位患者接受了免疫检查点抑制剂治疗, 患者接受的免疫检查点抑制剂治疗方式可见图 3。研究者将其中 27 名治疗可评估 HCC 患者的治疗反应与其基因组突变图谱相关联 (图 4), 并发现 WNT/ β -连环蛋白信号通路的激活突变与较低的 DCR (0% vs 53%), 较短的 mPFS (2.0 个月 vs 7.4 个月) 和较短的 mOS (9.1 个月 vs 15.2 个月) 相

关。该研究还显示, 24% 的患者携带可能可靶向的突变, 包括 TSC1/2 (8.5%) 失活/截短突变、FGF19 (6.3%) 和 MET (1.5%) 扩增, 以及 IDH1 错义突变 ($< 1\%$)。该研究表明携带 CTNNB1 突变的 HCC 患者根本没有对 PD-1 阻断治疗做出反应, 这也是该研究中最具有吸引力的数据, 也首次证实了由 Wnt/CTNNB1 突变定义的 HCC“冷肿瘤”对免疫治疗无反应这一假设。尽管在文中, 作者指出因为样本量小且缺乏对预测反应的混杂因素的分析限制, 但这一数据为在晚期 HCC 中寻找根据生物标志物驱动的治疗反应提供了新的见解, 是值得在前瞻性大规模临床研究中得到证实的。

Immunotherapy, N, (%)

Anti-CTLA-4 monotherapy	1	0.03
Anti-PD/PD-L1 monotherapy	25	0.81
Anti-PD-1/PD-L1 + immune checkpoint inhibitor	5	0.16
+ anti-CTLA4	1	0.03
+ anti-LAG3	2	0.065
+ anti-KIR	2	0.065

图3 MSKCC研究中, 31位患者接受的免疫检查点抑制剂治疗方式

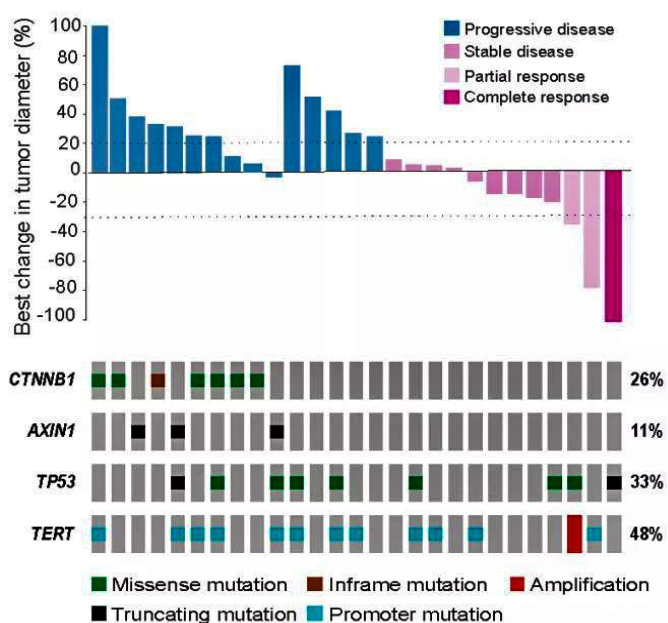


图4 27位HCC患者对免疫检查点阻断治疗反应的基因组决定因素

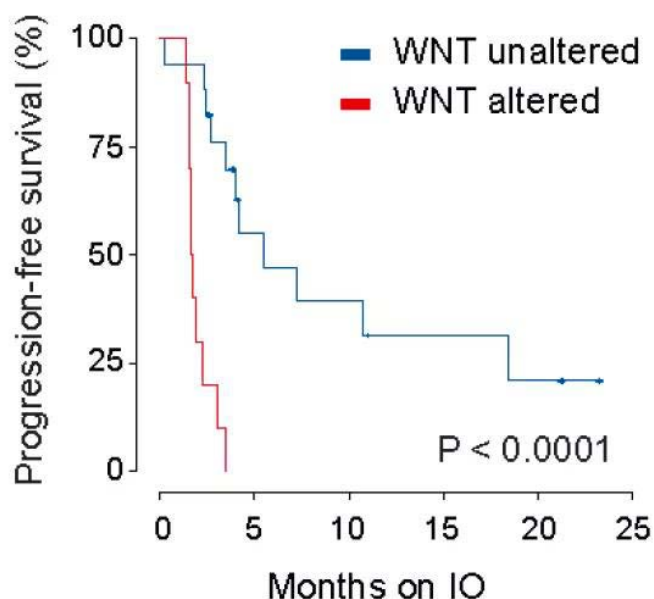


图5 WNT激活的HCC中免疫抑制剂治疗其PFS较短

在 WNT/ β -catenin 通路中， β -连环蛋白 (β -catenin) 是由 CTNNB1 基因编码的一种多功能蛋白。那么该通路中 CTNNB1 基因突变情况如何？Perugorria MJ 等人在撰写的综述中^[3]表明：① CTNNB1 中的突变导致 β -catenin 的稳定化和核转位，其促进参与细胞增殖、迁移和转移的基因的转录；② CTNNB1 中 75% 是错义替换，其激活突变发生在约 18.5% 的 HCC 中；③ CTNNB1 突变的频率取决于 HCC 病因，①与 HBV 相关的 HCC CTNNB1 突变频率 11% 相比，HCV 相关或非病毒性 HCC 具有更高的 CTNNB1 突变频率，分别为 28% 和 26%；② CTNNB1 突变与酒精相关的 HCC 相关，其突变频率为 42%。几乎每种实体瘤中的癌组织都显示出 T 淋巴细胞浸润密度的异质性，从免疫荒漠（即具有低 T 细胞浸润或无 T 细胞浸润的肿瘤）到拥有大量的 T 淋巴细胞，根据肿瘤组织中的肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 的多少，分别将其定义为“冷肿瘤”和“热肿瘤”。已经发现许多肿瘤中丰富的 CD8⁺

T 淋巴细胞对预后有益。既往的诸多研究也发现免疫疗法更可能在“热肿瘤”中起效。Pinyol R 等人在 2017 年描述了一种基于免疫特性分类的新的 HCC 分子分类方法（图 6）^[4]。简而言之，① 25% 的 HCC 富集 TILs，并且具有类似于黑色素瘤响应免疫治疗的分子特征，该类 HCC 被定义为 HCC 免疫类 (HCC Immune class)；② 约 30% 的患者表现出 TILs 排斥，富集 CTNNB1 突变和已知的原发性耐药分子特征，该类 HCC 被定义为 HCC 排斥类 (HCC Exclusion class)。

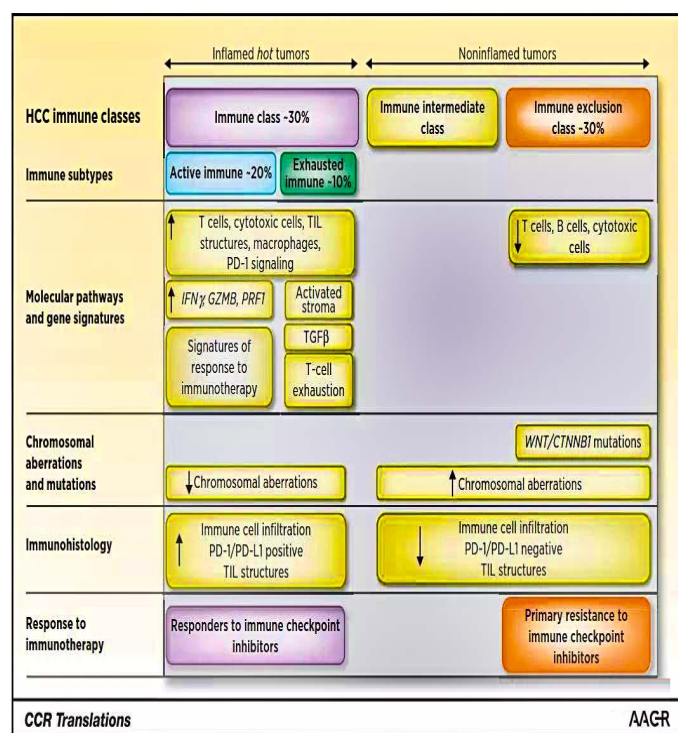


图6 基于免疫状态的HCC分子分类

Berraondo P 等在其研究^[5]中阐明，导致 β -catenin 通路激活的突变与免疫细胞不良浸润相关（图 7）。通过在基因修饰的小鼠模型上进行的癌变发生实验表明，激活状态的 β -连环蛋白的共表达导致较差的 T 细胞浸润、在免疫功能正常的宿主中较快的疾病进展，以及对检查点抑制剂的免疫治疗无反应。

免疫检查点抑制剂将是 HCC 未来药物市场的主场。基于基因分型，晚期 HCC 中存在 24% 可靶向的突变，但最终只有 6% 的患者接受相匹配的治疗。为提高患者免疫治疗反应，我们需要努力了解谁是真正受益于免疫疗法治疗的患者。生物标志物的筛选，可能有助于指导医生治疗方案的选择。在 HCC 中，以 Wnt/CTNNB1 突变表征的免疫排斥亚类可能是预测对免疫检查点抑制剂的耐药生物标志物，当然这需要更多前瞻性的临床验证。

【参考文献】

- [1] Dawkins J, Webster RM. The hepatocellular carcinoma market[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019,18(1):13-14.
- [2] Harding JJ, Nandakumar S, Armenia J, et al. Prospective genotyping of hepatocellular carcinoma: clinical implications of next-generation sequencing for matching patients to targeted and immune therapies[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(7):2116-2126.
- [3] Pinyol R, Sia D, Llovet JM. Immune Exclusion-Wnt/CTNNB1 Class Predicts Resistance to Immunotherapies in HCC[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25:2021-2023.
- [4] Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I. et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(2):121-136.
- [5] Berraondo P, Ochoa MC, Olivera I, et al. Melerol. Immune Desertic Landscapes in Hepatocellular Carcinoma Shaped by β -Catenin Activation[J]. Cancer Discov, 2019, 9(8):1003-1005

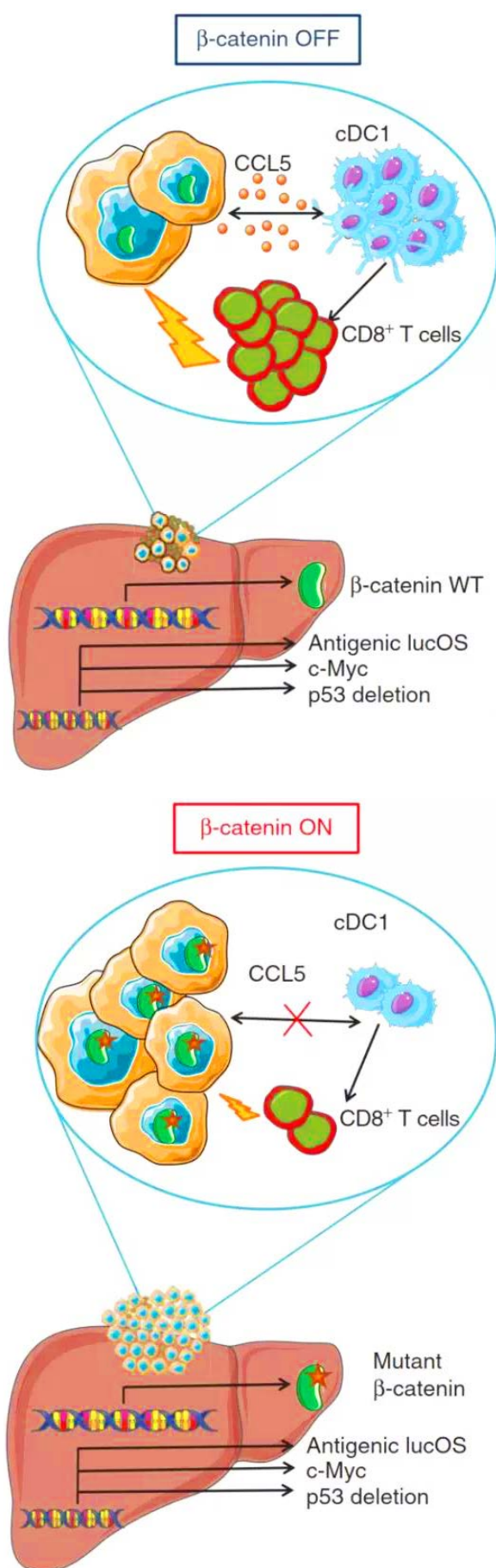


图7 β -catenin功能获得性突变导致HCC中的T细胞排斥

GUT: RSPO2 基因重排是肝癌肿瘤细胞内 β -catenin 激活的强效驱动因素

德国海德堡大学学者 Longerich 等近日的一项研究表明，RSPO2 基因重排导致 WNT 信号通路致癌信号激活，代表了 β -catenin 活化肝细胞腺瘤（bHCA）发生的一种替代机制，可能不需要额外的 TERT 启动子突变，即可驱动细胞的恶性转化。

来源：国际肝病；推荐专家：曲凯副教授

研究纳入了大样本的基于免疫组化确定的活化肝细胞腺瘤（HCAs, $n=185$ ）及肝细胞癌（HCC, $n=468$ ）患者队列，分析了至少中等程度核内 CTNNB1 蓄积的 b-HCA 和 HCC 中的 CTNNB1 基因突变状态，并通过深度测序方法来确定 CTNNB1 野生型及 β -catenin 活化的 HCA 及 HCC，分析 HCA 亚型的表达谱。

结果显示，因 8q23.1 染色体上 46.4 kb 大小的微缺失而导致的 RSPO2 基因重排可作为 β -catenin 活化的 HCA 的新型单分子驱动因子。RSPO2 融合阳性的 HCA 显示出 RSPO2 蛋白表达、核内 β -catenin 蓄积及 β -catenin-target 基因转录活性升高，提示了 WNT 信号通路的激活。RSPO2 基因重排的 b-HCAs 中，结构和细胞学的异型性以及间质性浸润均提示具有恶性转化

倾向。

此外，在 3 个慢性肝病基础的、 β -catenin 活化的 HCC 细胞系中，研究者也观察到了 RSPO2 基因的重排。此项研究提示，对于 RSPO2 基因重组的 HCA 和 HCC 而言，人类端粒酶逆转录酶启动子的突变——已知可驱动 CTNNB1 突变型 HCA 的恶性转化——似乎并非必要。

【参考文献】

Longerich T, Endris V, Neumann O, et al. RSPO2 Gene Rearrangement: A Powerful Driver of β -catenin Activation in Liver Tumours[J]. Gut, 2019, 68(7):1287-1296



Journal of Viral Hepatitis: 慢乙肝 HBeAg 血清学转换后的 HBcrAg 水平可预测肝癌风险

乙型肝炎核心相关抗原 (HBcrAg) 是 HBV 感染的新型血清学标志物, 对于在慢性乙型肝炎 (CHB) 患者发生 HBeAg 血清学转换后 HBcrAg 发挥何种临床意义, 目前尚不清楚。我国香港大学玛丽医院 To 等近日完成的一项研究表明, CHB 患者发生 HBeAg 血清学转换后 3 年内, 高水平 HBcrAg 与肝细胞癌 (HCC) 高风险独立相关。

来源: 国际肝病; 推荐专家: 曲凯副教授

该项研究纳入 207 例有明确记录自发性 HBeAg 血清学转换时间的 CHB 患者, 在发生 HBeAg 血清学转换后 3 年内 (作为基线值)、5 年和 10 年时, 检测 HBcrAg 和 HBsAg 水平, 基线时检测 HBV DNA, 应用多因素 Cox 回归模型, 分析发生 HCC 的预测因素, 对自发性 HBeAg 血清学转换后 HBcrAg 水平与 HCC 发生风险的相关性进行评估。

结果显示, 中位随访时间为 13.1 (11.8~15.5) 年, 14 例患者发生 HCC (15 年累积发生率为 7%), 与未发生 HCC 的患者相比, 发生 HCC 的患者基线时的中位 HBcrAg 水平有显著升高 (4.78 vs 5.68 log U/mL, $P=0.003$)。Cox 比例风险模型分析表明, 发生 HBeAg 血清学转

换时的年龄超过 40 岁 ($HR=4.60$, $P=0.049$)、基线时存在肝硬化 ($HR=6.23$, $P=0.003$) 以及基线 HBcrAg 水平较高 ($HR=1.75$, $P=0.032$) 与 HCC 发生风险独立相关。以基线 HBcrAg ≥ 5.21 log U/mL 为界值, 预测 HCC 风险的受试者工作特征曲线下面积 (AUROC) 为 0.74, 阴性预测值为 97.7%。

【参考文献】

To WP, Mak LY, Wong DK, et al. Hepatitis B Core-related Antigen Levels After HBeAg Seroconversion Is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma[J]. J Viral Hepat, 2019, 16



***Annals of Surgery*: 老年早期肝癌患者的治疗选择，一项来自日本全国性队列研究**

近日，日本学者完成了一项对老年早期肝细胞癌（HCC）患者的全国性队列研究。结果提示，对于老年且瘤体 ≤ 3.0 cm 的原发性早期 HCC 患者的治疗，选择手术切除可以降低患者的复发风险、提高总体生存（OS）。

来源：国际肝病；推荐专家：曲凯副教授

该研究纳入了年龄 ≥ 75 岁的 HCC 患者 6 490 例，其治疗方式包括：肝切除（HR， $n=2$ 020）、射频消融（RFA， $n=1$ 888）、微波消融（MWA， $n=193$ ）和经动脉化学栓塞（TACE， $n=2$ 389）。研究分析了患者的临床资料及生存情况，在瘤体 ≤ 3 cm 的 HR 及 RFA 亚组间，使用了匹配倾向评分分析（PSA）来消除基线偏倚。

结果显示，无复发生存期（RFS）方面，HR 组明显高于 RFA、MWA、TACE 组，其中 RFA 相对于 HR 的风险比为 1.22（95% CI：1.09~1.37， $P < 0.001$ ）；MWA 相对于 HR 的风险比为 1.51（95% CI：1.22~1.88， $P < 0.001$ ）；TACE 相对 HR 的风险比为 2.70（95% CI：2.44~2.99， $P < 0.001$ ）。OS 方面，RFA 和 HR 两组患者间差异无统计学意义（风险比

为 1.01，95% CI：0.87~1.17， $P=0.919$ ），前两组均显著高于 TACE 组（TACE 相对于 HR 的风险比为 2.11，95% CI：1.86~2.40， $P < 0.001$ ）。

将瘤体 ≤ 3.0 cm 且肝功能和肿瘤特征相似的 HR 和 RFA 两组患者经 PSA 成功匹配后，进一步的分析结果显示，HR 患者具有更高的 RFS（风险比：1.64，95% CI：1.29~2.10， $P < 0.001$ ）和 OS（风险比：1.57，95% CI：1.12~2.20， $P=0.009$ ）。Cox 风险比例分析显示，HR 组的预后优于 RFA。

【参考文献】

Kaibori M, Yoshii K, Hasegawa K, et al. Treatment Optimization for Hepatocellular Carcinoma in Elderly Patients in a Japanese Nationwide Cohort[J]. Ann Surg, 2019, 270(1):121-130.

Hepatology: 免疫联合靶向，揭示肝癌 PD-1 /VEGFR-2 疗法的双重阻断机制

目前，通过阻断程序性死亡受体 -1 (PD-1) 来激活抗肿瘤免疫应答的免疫疗法，仅可使部分肝细胞癌 (HCC) 患者获益。免疫联合靶向，例如阻断 PD-1 联合抗血管生成，已显示出非常好的治疗前景，可显著增加 HCC 患者治疗应答比例，但二者的相互作用机制尚不清楚。

来源：国际肝病；推荐专家：曲凯副教授

美国麻省总医院 Shigeta K 等人使用 HCC 的原位移植模型或诱导鼠模型重现了这些临床结果，揭示了免疫靶向与分子靶向联合治疗的作用机制：在 HCC 中，双重 PD-1 和 VEGFR-2 阻断疗法，不仅可促进血管正常化，而且可增强抗肿瘤免疫应答 (图 1)。

(VEGFR-2) 进行的特异性阻断显著减慢了原发性肿瘤的生长速度但未能延长生存，而抗 PD-1 抗体单药治疗表现出较小的生存优势。但是，双重抗 PD-1/VEGFR-2 疗法显著抑制原发性肿瘤生长，而且使两种模型的存活率都增加了一倍。

这种免疫与靶向联合的疗法重新编程了免疫微环境，通过增加 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞浸润和活化，改变肿瘤相关巨噬细胞的 M1/M2 比例，以及减少 HCC 组织中的 T 调节细胞 (Treg) 和 CCR2⁺ 单核细胞浸润来实现 (图 2)。

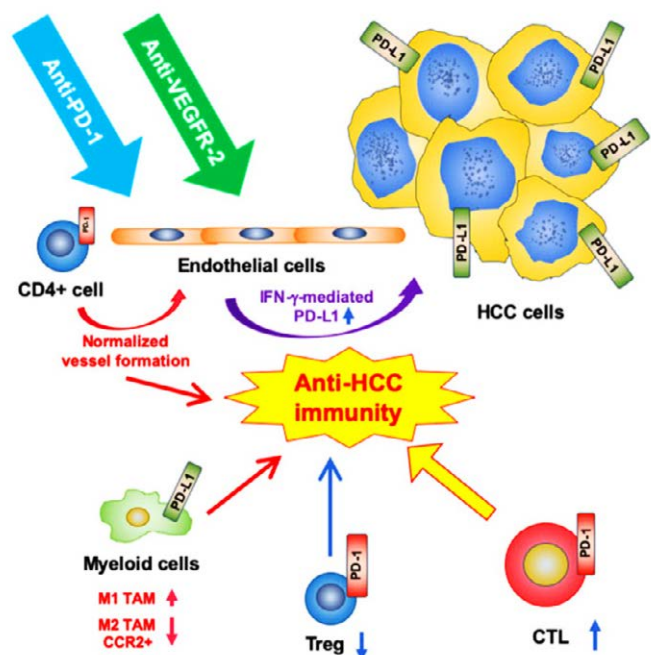


图1 HCC中抗PD-1治疗和抗VEGFR-2治疗的相互作用机制示意图

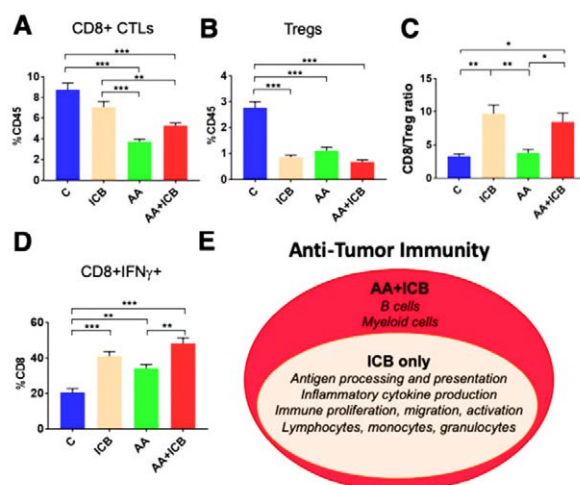


图2 双重抗PD-1/VEGFR-2阻断对HCC免疫刺激的影响

研究中，应用鼠抗体对血管内皮受体 2

在这些模型中，VEGFR-2 在肿瘤内皮细胞中选择性表达。通过 HCC 组织的球形培养，研究者发现：内皮细胞中抗 VEGFR-2 被阻断时，HCC 细胞以旁分泌方式诱导 PD-L1 表达，部分表达经干扰素- γ 表达诱导；VEGFR-2 阻断还会增加肿瘤浸润 CD4⁺ 细胞中的 PD-1 表达。

研究者还发现，在抗 VEGFR-2 抗体的抗血管生成治疗中，加入抗 PD-1 治疗可使 CD4⁺ 细胞发挥促进正常血管形成的作用（图 3）。

研究者表示：双重抗 PD-1/VEGFR-2 疗法用于 HCC 时，不仅具有持久的血管强化作用，而且可以克服抗 PD-1 治疗单用时的低应答率问题，同时可以增加总体生存。

【参考文献】

Shigeta K, Datta M, Hato T, et al. Dual PD-1 and VEGFR-2 blockade promotes vascular normalization and enhances anti-tumor immune responses in HCC[J]. Hepatology, 2019, 5.

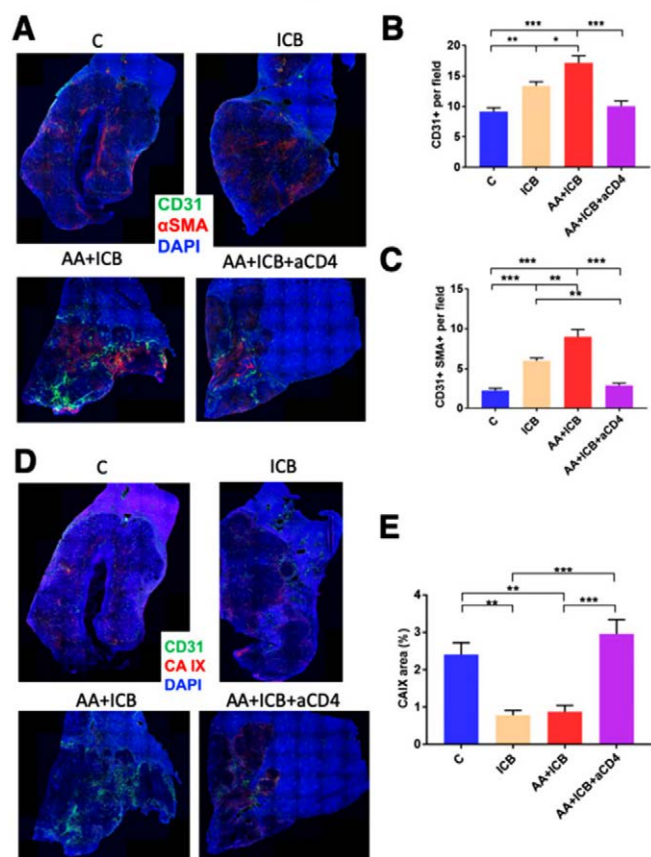


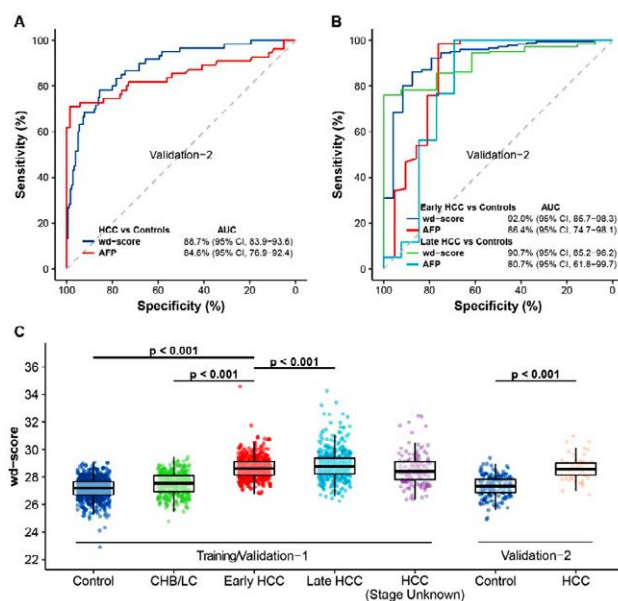
图3 双重抗PD-1/VEGFR-2阻断对HCC血管形成、结构和功能以及CD4⁺细胞作用的影响

GUT: 通过游离 DNA 检测早期肝癌的新方法

来源：国际肝病；推荐专家：曲凯副教授

缺乏高度敏感和特异性的诊断生物标志物是肝细胞癌患者不良预后的主要原因。我们试图发展一种非侵入性诊断方法，即利用游离 DNA (cfDNA) 检测早期肝癌。芝加哥大学何川教授、上海东方肝胆外科医院王红阳教授、西北大学范伯格医学院 Zhang Wei 教授、复旦大学附属中山医院樊嘉教授等联合团队，应用 5hmC-Seal 技术对 2 544 例中国受试者的游离 DNA 样本中的 5- 羟甲基胞嘧啶 (5HMC) 进行全基因组图谱的绘制 (其中 1 204 例肝癌患者、392 例慢性乙型肝炎或肝硬化患者、958 例健康或良性肝损伤人群。利用弹性网络正则化进行特征选择的病例对照分析，建立了早期肝癌的诊断模型。

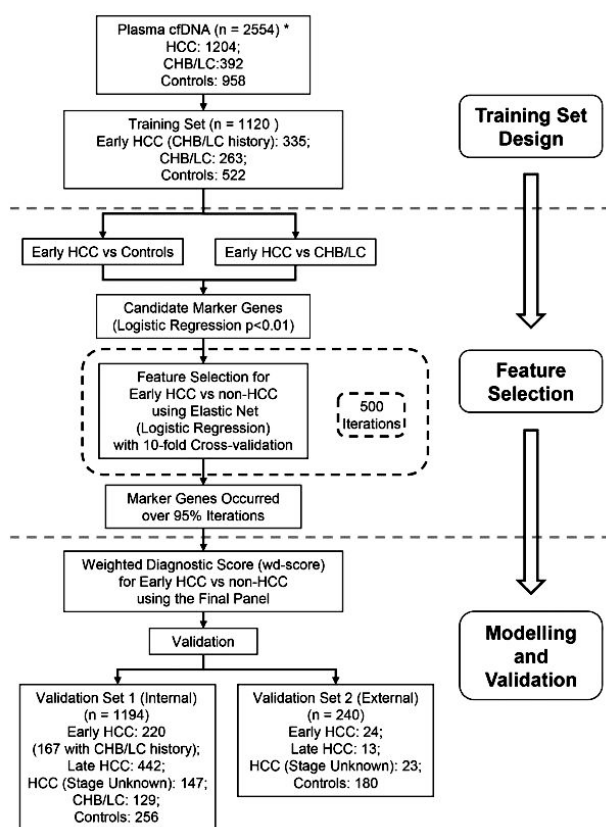
来自肝癌患者的 5hmC-Seal 数据显示，在全基因组范围内分布着丰富的肝源性增强子标记。研究者建立了一个 32 基因诊断模型，根据巴塞罗那肝癌分期系统准确区分早期肝癌 (0/A 期) 与非肝癌患者 (曲线下面积为 88.4%，95%CI：85.8%~91.1%)，显示其优于甲胎蛋白。



除了可以检测早期肝癌或小肿瘤 (如 ≤ 2.0 cm) 外，5hmC 模型在慢乙肝或肝硬化病史的高危受试者中发现早期肝癌的能力也显著优于 AFP (曲线下面积为 84.6%，95%CI：80.6%~88.7%)。

此外，5hmC 诊断模型似乎不受潜在混杂因素 (如吸烟、饮酒等) 的影响。

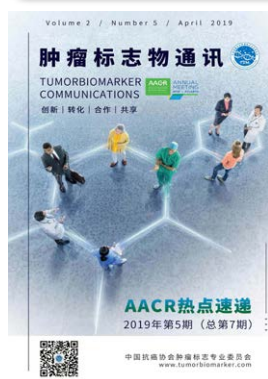
综上，研究团队已经开发并验证了一种非侵入性方法，该方法具有早期检测肝癌的临床应用潜力，而检测到的肝癌在高危人群中仍然可以手术切除，不会延误治疗最佳时机。





肿瘤标志物通讯

TUMORBIOMARKER COMMUNICATIONS



为了丰富内容，提供更好的阅读体验，《肿瘤标志物通讯》即将推出“在线主编”专刊，特别在此面向全国招聘若干在线主编。

1. 主要职责

①投稿：翻译或者原创述评肿瘤标志物领域最新进展，每篇 500~1 000 字（形式不限）；②审稿：遴选肿瘤标志物领域相关公众号素材，进行整理、编辑。

2. 工作方式

兼职，在线工作，地点不限，可使用笔名。

3. 获得福利

计件稿酬 + TBM 全国推广培训（学分制）+ 中国抗癌协会肿瘤标志物各类学术大会免注册参会，近距离接触业内大咖等不定期福利。

4. 要求

①肿瘤标志物医研企领域“笔耕爱好者”；②已取得生物学硕士、博士学位或在职研究生；③熟练阅读英文文献，具有一定的翻译及中文写作能力。

我们期待您的加入！请将个人简历发送至：tbmcommunications@126.com，联系方式：029-83655503（办公室）；18710300391（崔编辑），欢迎来电垂询！

版权声明：本刊编辑部保留一切版权，如欲转载，须获本刊编辑部许可。