

DOI: 10.3969/j.issn.2096-6113.2024.04.001

引用格式:王红阳,陈磊,姚汝铖.精准医疗在肝细胞癌治疗中的应用——基因变异与治疗策略的展望[J].巴楚医学,2024,7(4):1-12.

中国工程院院士、发展中国家科学院院士、教育部长江特聘教授,国家肝癌科学中心创始主任、上海东方肝胆外科医院肿瘤临床医学中心主任,科技创新团队负责人。兼任中国女科技工作者协会会长,中国医师协会临床精准医疗专委会主任委员,曾任国家自然科学基金委医学部主任。始终面向临床救治重大需求,着力解决我国肝胆肿瘤诊疗的瓶颈问题,形成了分子机制研究和诊疗新技术研发、转化两大特色,为提升我国肝胆肿瘤诊疗水平做出了重要贡献。自主研发了 Glypican3 肝癌特异抗体诊断试剂,规模化开展我国肝癌早筛临床研究和新技术研发,解决了我国肝胆肿瘤高危人群预警监测、早诊分型和耐药监测技术问题,研发了老药新用等治疗新策略,引领了肝胆肿瘤防治研究的前沿学科发展。先后主持国家传染病重大科技专项课题、国家创新研究群体基金和国家基金委重点项目、军队后勤科研重大项目、国家杰出青年基金、“973”、“863”课题以及上海市重大科技攻关项目等。在 *Nature*、*Cell*、*Cancer Cell*、*Science Translational Medicine* 等有国际影响的学术期刊发表论文近 400 篇。以第一完成人获国家科技进步一等奖创新团队奖、国家自然科学基金二等奖,是全国创新争先奖(奖章)、吴阶平医学奖获得者,全球高被引学者。



精准医疗在肝细胞癌治疗中的应用

——基因变异与治疗策略的展望

王红阳¹ 陈磊¹ 姚汝铖²

(1. 国家肝癌科学中心,上海 201805; 2. 三峡大学第一临床医学院[宜昌市中心人民医院]肝胆胰外科,湖北宜昌 443003)

摘要: 肝细胞癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,尽管近年来在治疗方面取得了一定进展,但它仍然是全球死亡率较高的恶性肿瘤之一。随着对肝细胞癌分子机制研究的不断深入,推动了基于分子特征的个性化精准治疗,为患者带来了新的希望。本文将从肝细胞癌发生发展的驱动因素、分子分类与亚型、靶向免疫治疗现状及临床前模型开发四个方面,阐述精准医疗在肝细胞癌治疗中的实践应用与未来发展前景。

关键词: 肝细胞癌; 基因变异; 靶向免疫治疗; 精准医疗

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-6113(2024)04-0001-12

Application of Precision Medicine in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma

——Outlook on Genetic Mutations and Treatment Strategies

Wang Hongyang¹ Chen Lei¹ Yao Rucheng²

(1. National Center for Liver Cancer, Shanghai 201805; 2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Yichang Central People's Hospital, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, China)

基金项目:国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(No: U21A20376)

作者简介:王红阳,女,博士,中国工程院院士、发展中国家科学院院士、教育部长江特聘教授,主要从事肝胆肿瘤防治相关研究。

E-mail: hywangk@vip.sina.com

Abstract Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignant tumor of the digestive system. Although there have been some advances in the treatment of HCC in recent years, it remains one of the cancers with a high global mortality rate. With the continuous deepening of research into the molecular mechanisms of HCC, personalized precision treatment based on the molecular characteristics of patients with HCC offers new hope. This article will discuss the practical application and future development prospects of precision medicine in the treatment of HCC from four aspects: driving factors of HCC, molecular classification and subtypes, the status of targeted immunotherapy, and preclinical models.

Keywords hepatocellular carcinoma (HCC); genetic variation; targeted immunotherapy; precision medicine

肝癌是全球第六大常见癌症,也是2020年全球第三大癌症死因^[1]。全球每年新发肝癌病例超过865 000例,相关死亡病例数达到757 000例^[2]。以上流行病学数据揭示了肝癌对人类健康存在巨大威胁,强调了开发更为有效的肝癌诊断及治疗策略的紧迫性。其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占原发性肝癌病例的80%,是全球范围内最主要的肝脏恶性肿瘤疾病^[3]。HCC的发生与多种遗传和环境因素紧密相关,具有显著的地域差异性,尤其是在亚洲及撒哈拉以南的非洲地区,疾病负担十分严重。在中国,约85%的HCC患者与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染有关,而在西方国家和日本,酒精和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是其主要的风险因素^[4]。另外值得注意的是,与代谢综合征相关的非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)正逐渐发展成为HCC的主要危险因素之一^[5]。尽管近年来HCC的基础研究及临床诊疗技术均得到了一定的发展,但患者的生存获益仍然不尽如人意。事实上,HCC患者的预后不良与大多数患者在确诊时已处于疾病的晚期阶段密切相关。同时,肿瘤的高度异质性导致治疗效果和预后在不同患者之间存在显著差异^[6]。因此,深入了解HCC的分子基础和遗传异质性对于开发新的治疗靶点至关重要^[7]。

近年来,HCC的靶向免疫治疗研究取得了显著进展,免疫检查点抑制剂与靶向药物的联合治疗已成为新的治疗策略。例如,阿替利珠单抗联合贝伐珠单抗(“T+A方案”)在IMbrave150研究中显著延长了晚期HCC患者的生存期,被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)和中国国家药监局(National Medical Products Administration, NMPA)批准为肝癌一线治疗方案^[8]。相关研究进展不仅为HCC患者提供了更多的治疗选择,也推动了HCC靶向免疫治疗领域的进一步发展。

为了进一步阐明HCC的发生发展机制并深入

评估药物的疗效及安全性,大量临床前模型被广泛应用于各类HCC相关研究。其中患者来源的肿瘤异种移植瘤(patient-derived tumor xenograft, PDX)和患者来源的类器官(patient-derived organoids, PDOs)在HCC相关研究中扮演着至关重要的角色,上述模型不仅用于模拟人类肿瘤的微环境和遗传特性,而且在新药疗效的评估和个性化治疗的探索中发挥着重要作用。

本文探讨了HCC发生发展的核心驱动因素以及与临床诊疗密切相关的分子分型。此外,本文总结了HCC靶向免疫治疗领域的最新进展,最后讨论了临床前模型在HCC研究中的应用价值。通过对上述基础研究及临床诊疗领域的综述,本文旨在阐明精准医疗在HCC治疗中的实践应用与未来发展前景。

1 HCC发生发展的驱动因素

HCC的发生与发展受到多种遗传和表观遗传因素影响,这些因素参与调节细胞的增殖、侵袭、代谢和凋亡等关键生物学过程。深入理解这些关键驱动因素对于开发针对性治疗策略、提高诊断准确性以及优化预后评估模型至关重要。

1.1 HCC的遗传易感性

HCC的发生发展通常与遗传易感性有关,包括单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)、家族遗传倾向等。SNPs是广泛存在于人群中的遗传变异,其存在可能影响疾病的发生发展、临床表现及预后转归^[9]。目前已有多种方法可用于检测与疾病发生发展相关的SNPs。候选基因法是一种选择简单、统计检验效率高且具有高性价的SNPs检测手段。其基础原理是基于生物学假设和文献分析来进行目标SNPs检测。现已有多项研究报告炎症激活(如肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素-1 β , 白细胞介素-10, 转化生长因子- β 等)、铁代谢(如HFE1)、氧化应激(如GSTM1, SOD2, MPO等)、DNA修复(如

MTHFR, TP53, MDM2 等)通路中特定 SNPs 与 HCC 发生发展间存在密切联系^[10-13]。

全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 是一种可用于在人类全基因组范围内识别特定疾病或性状相关的 SNPs 检测手段。在 HCC 研究领域中, GWAS 已经识别出一系列与酒精相关性肝病 (alcohol-related liver disease, ARLD) 及 NAFLD 进展为肝硬化密切相关的 SNPs, 如 PNPLA3 rs738409 和 TM6SF2 rs58542926^[14-15] 等。PNPLA3 rs738409 是一个影响脂质代谢的编码变异 (I148M), 而 TM6SF2 rs58542926 则可影响肝细胞中的脂肪酸积累^[16-19]。相关后续的研究显示, 这些 SNPs 与肝病病因相关的 HCC 发展风险高度相关^[20]。此外, 有研究人员基于 GWAS 鉴定了 HSD17B13 rs72613567, 该突变可导致 7- β 羟基类固醇脱氢酶 13 (7- β hydroxysteroid dehydrogenase 13, 7 β -HSDH13) 功能缺失, 从而减缓 ARLD 及 NAFLD 向肝纤维化的进展^[21-22]。

虽然 SNPs 相关研究已取得了一定的进展, 但目前尚无证据支持 SNPs 在临床实践中的应用。多个 SNPs 检测结果与现有临床检查相结合, 可用于提高临床预测模型的灵敏性和特异性。

1.2 重要的基因突变与肝癌

1.2.1 TERT 启动子突变

肝癌的发病机制涉及众多信号通路和大量的体细胞基因突变, 这一突变景观异常复杂。在众多的遗传改变中, 端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 启动子突变最为常见^[23-24], 且通常出现较早, 据统计 30%~60% 的 HCC 患者均存在 TERT 启动子突变^[23]。TERT 启动子 ATG 起始位点上游-124 和-146 的两处突变已被报道可通过调控 TERT 基因表达进而影响人类恶性肿瘤 (包括 HCC) 中端粒酶的活化^[24]。TERT 启动子突变导致端粒酶活性异常增高, 这有助于肿瘤细胞维持其端粒长度, 从而实现无限增殖。这种突变在 HBV 感染相关的 HCC 中更为常见。端粒酶重新激活的方式包括: TERT 启动子区域突变 (可见于 40%~60% 的 HCC 患者)、TERT 扩增 (约 5%)、TERT 易位 (2%~3%)^[24]。研究表明^[24], 在肝硬化的癌变早期阶段需要端粒酶的重新激活, 而 TERT 启动子突变是在低级别和高级别异型增生 (TERT 突变率 5%~20%) 以及早期 HCC (TERT 突变率高达 60%) 中观察到的唯一一种反复出现的驱动突变^[25]。因此, TERT 启动子突变是 HCC 发生发展过程中最关键的驱动突变之一。

1.2.2 TP53 突变

TP53 基因是人类癌症中突变最频繁的基因, 它在生理状态下承担着监控和抑制肿瘤的功能。在 HCC 中, TP53 基因突变的频率根据病因不同而变化较大, 其幅度在 15%~40% 内变动。另外, 与 TP53 突变相关的 HCC 病程进展与饮食习惯等因素密切相关, 因此在地理分布上具有很大的差异性^[26]。例如, 部分地区人群易食用受黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 污染的食物, 而该毒素可在肝脏中诱发多种遗传改变^[27]。AFB1 在肝细胞中经过一系列的羟基化、去甲基化反应和环氧化、水合作用转化, 生成具有强致癌和致畸性的 AFB1-8, 9-环氧化物 (aflatoxin B1-8, 9-epoxide, AFBO) 以及其他毒性较低的代谢产物。其中 AFBO 可以迅速与鸟嘌呤残基反应形成加合物, 导致 DNA 损伤和突变^[28]。在 TP53 基因的突变中, 最常报告的由 AFB1 引发的突变为 249 密码子从精氨酸到丝氨酸的错义突变 (R249S), 这一密码子位于 p53 蛋白的 DNA 结合域内^[29], 该突变可降低 p53 蛋白对 DNA 的结合能力。事实上, p53 蛋白中 249 位精氨酸被替换为任意其他氨基酸都会影响其结合功能。另一个由 AFB1 引发的 TP53 热点突变是 V157F, 常导致 HCC 患者预后不良。另外, 当 TP53 突变与 HBV 导致的慢性炎症并发时, 这些突变可能进一步促进 HCC 的发生与发展^[30]。此外, 慢性 HBV 感染患者在暴露于 AFB1 之后, 还能够显著诱导从 G/C 到 A/T 的转变^[28]。综上所述, TP53 基因的突变频率和类型在不同人群中存在显著差异, 这些差异与地理、饮食习惯以及环境暴露等因素紧密相关, 揭示了肝癌预防和治疗策略需要针对不同人群进行定制化的必要性 (见图 1)。

除了直接影响 TP53 基因序列的突变外, 涉及 TP53 负反馈环路的基因发生突变也可能诱导疾病的发生发展。例如, 位于 MDM2 的 p53 响应性启动子内的 309T>G 突变 (SNP 309, rs2279744) 可导致其与转录激活因子 Sp1 的亲合力增加, 使得 MDM2 的转录增强, 从而抑制 p53 的 DNA 结合功能并泛素化 p53 诱导其降解^[31]。这一突变与慢性 HCV 感染患者 HCC 的早期发病机制密切相关^[32]。综上所述, TP53 基因本身及其负反馈环路中的核心基因发生的特定突变, 可能通过影响 p53 蛋白的数量与功能促进 HCC 的发生与发展。

1.2.3 CTNNB1 突变

CTNNB1 基因编码 Wnt 信号通路中的核心组分 β -连环蛋白 (β -catenin)^[33]。 β -catenin 在 Wnt 信号通路未激活时, 会被复合体 (包括 APC、Axin 和 GSK-3 β

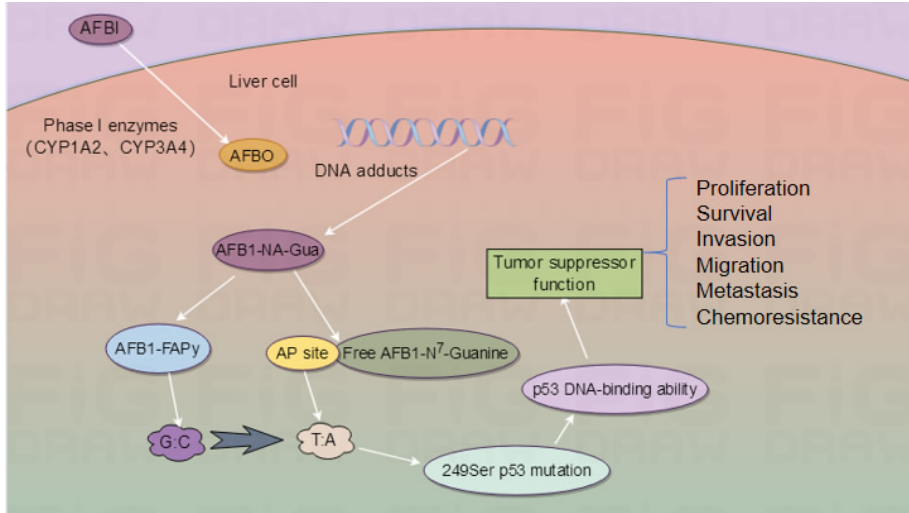


图 1 TP53 突变与肝癌

等蛋白)通过磷酸化标记后降解^[34]。当 Wnt 信号通路激活后,这种降解作用被抑制,β-catenin 在细胞内积累并转移到核内,与具有双向调节功能的 TCF/LEF 家族转录因子结合,使 TCF/LEF 发挥转录促进作用,进而诱导下游基因的表达^[35]。既往研究显示^[34],Wnt 通路的激活通常与细胞增殖及黏附功能相关。研究表明^[36],在许多具有 CTNNB1 突变的 HCC 组织中发现了 TERT 启动子突变,表明这两个基因可能具有协同致病作用。与之相反的是,CTNNB1 突变和 TP53 突变之间存在互斥作用^[37],HCC 细胞通常根据其异质性携带其中的一个突变。

HCC 中最常见的 CTNNB1 突变形式是点突变,这类突变通常发生在其磷酸化区域,导致 β-catenin 无法被正常降解,从而在细胞内积累。β-catenin 的积累导致 Wnt 通路下游基因的持续激活,如 Cyclin D1、c-MYC 等。上述基因的高表达加快了细胞周期的进程,促进了细胞增殖,进而为肿瘤的发生发展创造了条件^[38]。CTNNB1 基因及其编码的 β-catenin 蛋白在 HCC 的发生发展中扮演了复杂且关键的角色(见图 2)。通过更好地理解该基因在 HCC 中的作用,可以为精确医疗中个体化治疗策略的设计提供重要信息。

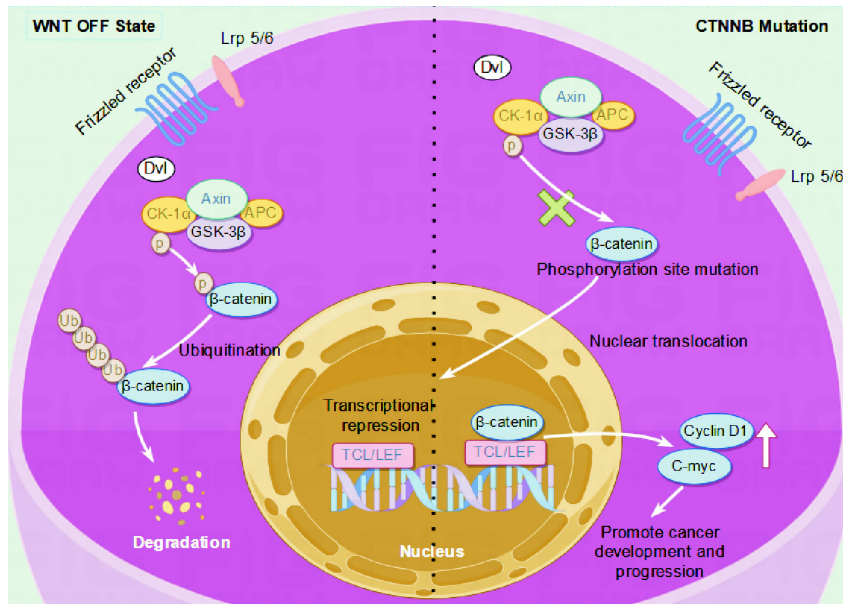


图 2 CTNNB1 突变与肝癌

随着二代测序技术(next generation sequencing, NGS)的持续进步,学界对于 HCC 病因相关分子机制的理解正在不断深入。本课题组于 2024 年 2 月在 *Nature* 杂志上发表的一项研究,报道了 494 个 HBV

相关 HCC 样本的全基因组深度测序分析。此项研究不仅再次夯实了多个已知的关键驱动基因,还新发现了 6 个编码区潜在的驱动基因(FGA、HNF1A、PRDM11、CDKN1B、BMP5 和 ECHS1)以及 28 个非

编码区的驱动因素。这些发现显著拓宽了我们对于 HCC 驱动基因网络的理解,为深入探索 HCC 的发生机制提供了宝贵的新视角,并有望推动未来 HCC 靶向治疗策略的发展^[39]。

1.3 HBV 基因整合和突变

在我国,病毒感染是 HCC 的重要病因。病毒基因的整合和病毒蛋白的表达可以直接或间接引起宿主基因的突变。在 HBV 感染周期中,HBV 整合只作为一种偶发事件出现在约 0.1%~1% 的受感染肝细胞中^[40]。这种整合通常发生在 HBV 感染的早期阶段,随着慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者年龄的增长,携带有 HBV 基因整合的肝细胞会逐渐以克隆方式扩增,这些克隆很可能是 HCC 的前体细胞^[41]。值得关注的是,CHB 患者肝组织中的 HBV 基因整合可随机发生在各个染色体上,然而在 HCC 中,HBV 基因整合更倾向于发生在特定的几个位点^[42]。目前的研究已发现 HBV 相关的 HCC 基因组中存在两个主要的 HBV 整合热点:一个位于 TERT 基因启动子区域(可见于约 25% 的 HCC 患者),另一个位于 MLL4 基因的第 3 至第 6 外显子(可见于约 12% 的 HCC 患者),以及一些不太常见的整合热点,如 Cyclin E1 和 Cyclin A2^[43]。HBV-TERT 整合倾向于发生在 TERT 启动子区域。在大多数非肿瘤细胞中,TERT 基因没有转录活性,而 HBV-TERT 整合可导致 TERT 表达水平急剧上调^[44]。HBV-TERT/TERT 启动子突变与 CTNNB1 突变在 HBV/HCV 相关的 HCC 中同时发生,这也进一步强调了 TERT 和 Wnt/ β -catenin 通路在病毒感染相关 HCC 发生中的协同作用^[45]。

HBV 的整合还可能导致截断的人类基因或病毒-人融合基因表达。在 HCC 中,HBV 在 MLL4 基因的第 3 至 6 外显子中的整合导致 N'-末端截断的 MLL4 和/或 HBV-MLL4 融合转录物的表达,从而影响 MLL4 基因的正常功能^[45]。而 HBV 的整合可能导致 MLL4 基因的表达失调,进而影响细胞的增殖和分化。MLL4 基因的截断或融合可能导致其功能丧失或获得新的功能,这可能对肿瘤的发生和进展有重要影响。例如,MLL4 的缺失可能导致 DNA 去甲基化信号通路上调,进而影响相关基因的表达^[45]。

除了调控局部基因转录外,HBV 整合还涉及基因组的结构变化,如基因重排、拷贝数变异和染色体间融合。这些高级结构变化可能导致肿瘤抑制因子 TP53 的缺失、促癌基因 TERT、MYC 的扩增以及端粒的删除^[46]。上述基因组异常可能使个体倾向于肿瘤形成,并通过不同机制加剧个体 HCC 的异质性。

本课题组通过对 HBV 相关 HCC 样本进行全基因组测序分析,识别了含有 HBV 片段的染色体外环状 DNA(extrachromosomal circular DNA, ecDNA)。这些 ecDNA 显著影响了已知的促癌基因,如 TERT、MLL4、MYC 等。虽然 HBV 与 TERT 基因的整合在 HCC 中已被充分报道,但本课题组的数据分析提示,这些整合通过 ecDNA 的环状结构得以扩增到数百个拷贝。因此,这些发现强调了基于 ecDNA 的扩增可能在 HBV 相关 HCC 中扮演了关键角色。这一机制的揭示为进一步理解 HBV 驱动的 HCC 发生与发展提供了新的视角^[39]。

2 肝癌的分子分类与亚型

随着转录组、蛋白质组等多组学技术的发展,HCC 的分子分型逐渐被建立,由于技术使用的差异,分子分型的类型也各有不同。研究发现^[47-53],2004 年首次通过转录组数据结合患者生存率及生物学特征,将 HCC 分为 A 组和 B 组,随后在此基础上出现了多种分类方法:G1-G6、S1-S3、C1-C3 和 iClust1-iClust3 等。也有学者提出,为了更好的避免分歧,将 HCC 主要分为增殖型和非增殖型^[47-48,54],其中增殖型 HCC 约占总肝细胞癌病例的 50%,其主要表现为肿瘤组织分化不良、血管浸润度更高,侵袭能力增强等特点,且在 HBV 相关 HCC 中更为常见。

而基于蛋白质组的分子分型则根据蛋白质的表达特征将肝癌分为 S-I、S-II 和 S-III 亚型^[55]。S-I 亚型的特征在于其代谢靶标(如 CYP1A2、CYP3A4 和 OTC)的活性更高,而 S-II 亚型的增殖相关靶标(如 CDK1、HDAC2 和 PCNA)表达更高。与 S-I 和 S-II 相比,S-III 亚型的临床预后更差,具有更强的侵袭性^[55]。

近来,随着肿瘤微环境在 HCC 免疫治疗中的重要地位得到越来越多的关注,许多学者将 HCC 分子分型的标准聚焦在肿瘤微环境中,通过肿瘤微环境进行的 HCC 分子分型,可能更有助于指导 HCC 患者的治疗^[56]。Sia 等^[57]分析了 228 个 HCC 样本的免疫表达模式,发现约 25% 的样本中炎症标志物的表达水平更高,免疫细胞浸润也较多。在该免疫分类中,进一步识别出两个亚类:一是活跃免疫反应亚类,其特点是适应性免疫反应基因和干扰素特征的表达水平更高;二是耗竭免疫反应亚类,以 T 细胞耗竭和转化生长因子- β 通路的激活为标志。在随后的研究中,这种分类被进一步细化。所有的 HCC 病例被分为两大类:炎症类和非炎症类,分别占 35% 和 65%。

炎症类包括之前识别的免疫类(22%)和新划分的类免疫亚类(15%),而非炎症类则包括排除亚类(20%)和中间亚类(43%)。有趣的是,类免疫亚类中CTNNB1突变的频率很高,这与以往观察到的这类突变通常不引起炎症的情况相悖。与非炎症类的对应亚类相比,这一亚类显示出CCL5和CCL4的表达水平升高,以及如TAP1、B2M和HLA-B等抗原呈递基因的甲基化水平降低。最近有学者基于机器学习算法并结合单细胞分析,通过肝癌的肿瘤微环境将肝癌分子分型分为Class1、Class2、Class3、Class4以及Class5五个亚型,并根据不同分型制定了不同的肝癌治疗策略,如Class1和Class3对靶向治疗更敏感,而Class2和Class4对动脉栓塞化疗更敏感^[58]。

这些分型方法不仅体现了HCC的异质性,并且揭示了对不同亚型HCC患者进行个性化治疗的潜在可能性,有助于提高治疗的针对性和效率。通过综合基因表达、蛋白表达以及免疫微环境的信息,能够更准确地预测HCC患者的治疗效果及预后,并有助于开发创新治疗策略。

3 HCC 靶向免疫治疗现状及精准治疗策略

近年来,随着HCC分子机制研究的深入,越来越多的针对特定基因突变的靶向药物及免疫治疗药物成功应用于临床,给HCC患者的生存期带来了显著的改善。索拉非尼(sorafenib)是第一个在晚期HCC中发挥作用的多激酶抑制剂,它可以阻断酪氨酸激酶受体(VEGFR-2/3、PDGFR- β 、c-Kit、FLT-3、RET)、抑制下游通路激酶(Ras/Raf/MEK/ERK、JAK/STAT)活性并阻断其他相关靶点(c-Raf、B-Raf)。研究显示^[59],索拉非尼治疗的患者生存期延长了2.8个月,中位总生存期为10.7个月,显著的疗效也使得索拉非尼成为了众多新研发靶向药物疗效的参照对象。随着更多的多激酶抑制剂的临床应用,晚期HCC患者的生存期得到了进一步延长^[60]。

而在免疫治疗领域中,PD-L1单克隆抗体阿替利珠单抗(atenzolizumab)联合抗血管内皮生长因子单克隆抗体贝伐珠单抗(bevacizumab)的组合治疗在HCC治疗领域已经成为了一个新的里程碑^[61]。在具有标志性的IMbrave150试验中,上述药物联用在不可切除的HCC患者中提供了29.8%的总反应率,而与索拉非尼方案相比,接受这一药物联用方案的患者平均生存期延长了5.8个月^[61]。这是近十年来首

次出现与索拉非尼相比可显著改善HCC患者总生存期的治疗方法,并且这也是免疫检查点阻断剂首次用于HCC的一线治疗^[62]。

尽管多激酶抑制剂的成功为晚期HCC患者带来了希望,但总体而言,HCC患者的预后仍然不容乐观。很大一部分患者没有显示出治疗的益处,主要反映在低客观缓解率(objective response rate, ORR)(大多数为<10%,索拉非尼为2%~3%)和耐药性^[6]。大量的临床证据表明^[63],单一靶向药物治疗与肿瘤的耐药性产生显著相关,因此只能提供有限的临床获益。相比之下,联用多种靶向药物有利于克服耐药性,并且为患者带来更多的生存获益。近期一项临床试验表明^[64],仑伐替尼联合表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂吉非替尼(gefitinib)治疗HCC患者,在早期临床试验中取得了一定的疗效。也有研究表明^[64],仑伐替尼对EGFR的抑制会导致EGFR-PAK2-ERK5信号轴的反馈激活,这种反馈激活的信号会促进肿瘤的存活;而联用EGFR抑制剂则可以阻断该信号,从而显著改善患者的生存期。HCC患者中EGFR突变的发生率非常低(<5%),然而约有一半的HCC患者组织表现出EGFR表达水平升高的特征。因此,将高表达的EGFR作为生物标志物可能有助于更多晚期HCC患者从靶向治疗中获益^[65]。

有趣的是,在一项对720名未筛选HCC患者进行的Ⅲ期SEARCH研究中,索拉非尼与另一种EGFR抑制剂埃罗替尼(erlotinib)的组合未能显示出优于单用索拉非尼的疗效^[66]。这一结果可能归因于这项研究中的人群未经筛选,以及索拉非尼和仑伐替尼靶点的不同。除了上述组合外,早期临床研究虽然识别了一些其他的组合候选药物,但这些都需要在更大规模的试验中进一步验证。目前,用于治疗HCC的分子靶向药物的组合数量仍然有限。

与基于免疫检查点阻断的联合治疗相比,基于靶向药物的联合治疗往往伴随着更高的协同毒性风险,并且实现持久疗效的可能性相对较低^[66]。尽管如此,基于靶向药物的联合治疗在HCC治疗中仍扮演着不可替代的角色。

为了克服多激酶抑制剂的初期低响应率和先天耐药性,我们不仅需要联合不同靶点的药物,还需要在制定治疗方案时考虑患者个体间的差异性。目前许多临床研究试图基于生物标志物对患者进行分层,以实施精准治疗。在一项回顾性的Ⅱ期研究分析中,携带RAS突变的晚期HCC患者在接受MEK抑制剂雷帕替尼(reparixin)与索拉非尼的联合治疗时,展

现出了更为突出的临床效果^[67]。另外,有研究者发现了一种具有侵袭性行为的新 HCC 亚型,这些肿瘤携带 TSC1/2 突变,并对雷帕霉素治疗表现出高度敏感^[68]。

NGS 的快速发展为提升靶向治疗的精确度提供了新希望。基于生物标志物的靶向治疗可以通过 NGS 进行调整和定制,因此 NGS 能够区分肿瘤个体特征,并具有识别出新的治疗靶点的潜力,有利于精准医疗的进一步实现。目前多项研究已表明了 NGS 在 HCC 精准靶向治疗中的价值。在一项瑞戈非尼(regorafenib)治疗 HCC 患者的 III 期临床试验中,研究者收集了治疗患者的肿瘤组织和血浆样本,通过 NGS 检测发现了一组可以预测瑞戈非尼疗效的血浆 miRNA 和突变基因^[69]。在一项 BIOSTORM 研究

中^[70],研究者通过使用 NGS 技术筛选出了 146 个预测性基因指标,这些指标有助于区分那些在接受索拉非尼治疗后可以预防复发的 HCC 患者。此外,研究还发现,pERK 水平和微血管浸润是两个独立的预后工具,它们能够有效预测 HCC 患者在手术后的复发情况。这些发现为 HCC 的治疗提供了新的生物标志物,有助于实现更精准的个体化治疗策略。此外,NGS 也是筛选潜在药物敏感性标志物的关键工具。一项前瞻性研究中,研究人员通过 NGS 平台对 127 名 HCC 患者进行检测与筛选,结果显示,携带致癌性 PI3K-mTOR 突变的 HCC 患者在索拉非尼治疗中表现出明显较差的治疗结果,而 Wnt 活化相关突变的存在与对免疫检查点抑制剂的先天性耐药相关^[71],肝癌靶向治疗临床试验见表 1。

表 1 肝癌靶向治疗临床试验

临床试验	试验方案	靶点	作用通路或机制	临床试验分期
TRIPLET ^[72]	卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼	PD-1 抑制剂;VEGFR2	靶向治疗联合免疫治疗	II 期
START-FIT ^[73]	序贯动脉化疗与放疗后免疫治疗	PD-L1 抑制剂	放化疗序贯免疫治疗	II 期
HIMALAYA ^[74]	曲美木单抗联合度伐利尤单抗	PD-1 抑制剂;CTLA4 单抗	免疫治疗	III 期
CARES-310 ^[75]	卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼和 sorafenib	PD-1 抑制剂; VEGFR2 TKI; RAF、VEGFR 和 PDGFR 多靶点抑制剂	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
IMbrave050 ^[76]	阿替利珠单抗联合贝伐珠单抗	PD-1 抑制剂;VEGF	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
CheckMate 459 ^[77]	纳武利尤单抗联合索拉非尼	PD-1 抑制剂;RAF、VEGFR 和 PDGFR 多靶点抑制剂	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
LAUNCH ^[78]	仑伐替尼联合化疗	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGFR1, PDGFR, cKit, Ret	靶向治疗联合化疗	III 期
COSMIC-312 ^[79]	卡博替尼联合阿替利珠单抗与索拉非尼	VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、KIT、TRKB、FLT-3、TIE-2; PD-1 抑制剂、VEGFR2	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
LEAP-002 ^[80]	仑伐替尼联合帕博利珠单抗	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGFR1, PDGFR, cKit, Ret; PD-1 抑制剂	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
ZGDH ^[81]	多纳非尼联合索拉非尼	RAF、VEGFR 和 PDGFR 多靶点抑制剂; CRAF、BRAF、V600EBRAF、c-kit、FIT-3、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-β	靶向治疗	III 期
ORIENT-32 ^[82]	信迪利单抗联合贝伐珠单抗及索拉非尼	PD-1 抑制剂; VEGFR2 TKI; RAF、VEGFR 和 PDGFR 多靶点抑制剂	靶向治疗联合免疫治疗	III 期
NCT03916627 ^[83]	西米普利单抗用于新辅助治疗	PD-1	免疫治疗	II 期
LEAP-012 ^[84]	经动脉化疗栓塞联合或不联合仑伐替尼联合帕博利珠单抗	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGFR1, PDGFR, cKit, Ret; PD-1 抑制剂	化疗联合靶向、免疫治疗	III 期
NCT02973685 ^[85]	奥沙利铂、氟尿嘧啶和亚叶酸肝动脉输注对比动脉化疗栓塞	化疗药物	化疗输注方式对比研究	III 期
NCT01963429 ^[86]	质子束放疗对比射频消融对复发性肝癌的影响	无	放疗手段对比	III 期

这些研究结果表明, NGS 技术在临床实践中的推广应用, 能通过识别特定的分子标志物来个性化地优化治疗方案, 为癌症治疗提供精准指导。特别是在靶向治疗和免疫治疗的选择上, NGS 技术的应用显得尤为重要。同时, 这些研究也凸显了在执行个性化和精准医疗策略时, 深入了解患者的基因突变对于匹配最有效治疗方案的重要性。通过 NGS 技术, 医疗专业人员能够为每位患者量身定制更精确的治疗方案, 以期提高疗效并减少不必要的副作用。

4 临床前模型研究

临床前模型在 HCC 的研究中扮演着关键角色, 其应用不仅有助于我们理解肿瘤的生物学特性, 而且是测试新药和研究疾病机制的重要工具。临床前模型主要包括 PDX 和 PDOs。

1969 年, 丹麦学者 Rygaard 首次成功将人类结肠癌肿瘤移植于裸鼠体内, 这是 PDX 模型建立的重要里程碑^[87-88]。1996 年, 研究人员首次建立了 HCC 的 PDX 模型^[89]。尽管后续 HCC 的 PDX 模型发展缓慢且效率低下, 但近年来的临床研究结果为 PDX 模型在肝癌研究中的应用带来了希望。目前, HCC 的 PDX 模型技术已经成熟并被认为是一种理想的肿瘤模型, 它能够精确地复制人类肿瘤的遗传复杂性, 模拟肿瘤与其周围组织在体内的相互作用, 并且展现出良好的临床预测性。这使得 PDX 模型在 HCC 的研究和药物开发中发挥着重要作用, 有助于更好地理解疾病机制和评估新疗法的有效性^[90-91]。

PDOs 是一种体外培养的三维结构模型, 能够自我分化形成具有干细胞特性的细胞团。这种模型能够再现原始肿瘤的细胞异质性和空间结构, 模拟组织起源的功能和生物学行为, 同时保留病理组织学特征和多种遗传特性, 包括驱动基因的突变和扩增^[87]。在 HCC 领域, PDOs 在生长模式、分化程度、HCC 特异标志物的表达、基因改变以及在异种移植模型中形成肿瘤的能力方面与原始肿瘤高度一致^[92]。这些特点使得 PDOs 成为精准医学研究的理想模型, 尤其适用于治疗抗性研究、药物筛选和治疗响应预测。通过建立 HCC PDOs, 研究人员发现 HCC 对索拉非尼产生抗性可能与某些信号通路的重新激活有关, 特别是与受体酪氨酸激酶相关的 MEK/ERK 和 AKT 信号通路的激活^[93]。这一发现表明, PDOs 不仅有助于我们深入理解肿瘤的生物学特性, 还能为开发个性化的治疗方案提供关键信息, 进而可能改善肝癌患者的治疗结果。因此, 基于患者衍生的肝癌 PDOs 模型来开

发个性化治疗方法具有极大的潜力, 这些方法有望提升肝癌患者的预后。

5 小结与展望

HCC 的发生发展受到遗传、表观遗传以及环境因素的复杂影响, 这些因素共同作用于肝细胞的增殖、侵袭、代谢、凋亡等。虽然目前我们对 HCC 的基本生物学特征有了较为深入的认识, 但 HCC 的高度异质性和复杂的肿瘤微环境给治疗和预后评估带来了重大挑战。这使得 HCC 的治疗策略需要更加精准和个性化, 以应对其复杂的病理生理特点。

在精准医疗的大背景下, 全球的科研人员正通过高通量组学技术、GWAS 以及深入的分子生物学研究, 探索影响 HCC 发生发展的关键影响因素。这些研究极大地扩展了我们对 HCC 遗传多样性的理解, 并为开发新的靶向药物制定治疗策略提供了技术与理论支撑。例如, 通过识别特定的易感性基因、驱动基因突变(如 TERT、TP53 和 CTNNB1 突变)以及相关的分子标记, 可以实现对 HCC 患者更为精准的治疗。这些分子标记有助于预测患者对特定治疗的反应, 从而为患者提供个性化的治疗方案。此外, 研究者也在探索 HCC 的表观遗传学改变, 如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、miRNA 和 lncRNA 的异常表达, 这些改变可能在将来作为新的治疗靶点^[94-95]。

随着临床前模型技术的不断进步, 尤其是患者来源的 PDX 和 PDOs 模型的开发, 研究者现在能够更准确地模拟人类肿瘤的遗传特性和肿瘤微环境的交互作用。PDX 模型因其在分子和组织病理学层面高度保留原代肿瘤特征, 重现了原代肿瘤内和患者群体间的异质性与多样性, 而在抗肿瘤药物筛选与评价、生物标志物的发现与验证、转化研究以及精准医疗的探索中得到广泛应用。通过利用基因编辑技术对肿瘤驱动基因进行定向修改, 研究者已经成功开发出了基因修饰的 PDOs 模型。这些模型不仅用于探究肿瘤基因突变背后的促癌机制, 还广泛应用于肿瘤生物学研究、耐药性机制的探索, 对新型癌症治疗策略的开发起到了重要的推动作用。

综上所述, 深入探究肝癌的遗传和表观遗传基础, 开发并完善新型临床前模型, 以及利用这些模型验证创新的治疗策略, 对于为肝癌患者提供更精准、更有效的治疗至关重要。这些努力不仅能提升治疗效果、延长患者生存期, 还能显著改善患者的生活质量和治疗过程的体验。展望未来, HCC 研究需要跨学科的紧密合作, 结合前沿的生物信息学技术和先进

的数据分析手段,以期在 HCC 的诊断、治疗和预后评估等多个方面实现重大突破。

参考文献:

- [1] Runggay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] Burton A, Tataru D, Driver R J, et al. Primary liver cancer in the UK: incidence, incidence-based mortality, and survival by subtype, sex, and nation [J]. *JHEP Rep*, 2021, 3(2): 100232.
- [4] Runggay H, Ferlay J, de Martel C, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype[J]. *Eur J Cancer*, 2022, 161: 108-118.
- [5] Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 123-133.
- [6] Chen S Z, Cao Q Q, Wen W, et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities[J]. *Cancer Lett*, 2019, 460: 1-9.
- [7] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400: 1345-1362.
- [8] Cheng A L, Qin S K, Ikeda M, et al. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(4): 862-873.
- [9] Nahon P, Zucman-Rossi J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 663-674.
- [10] Nahon P, Sutton A, Rufat P, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodule the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1484-1493.
- [11] Nahon P, Sutton A, Rufat P, et al. Liver iron, HFE gene mutations, and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with cirrhosis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 102-110.
- [12] Wei Y G, Liu F, Li B, et al. Interleukin-10 gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility: a meta-analysis [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(34): 3941-3947.
- [13] Yoon Y J, Chang H Y, Ahn S H, et al. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(6): 1192-1196.
- [14] Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(4): 352-356.
- [15] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1461-1465.
- [16] Luukkonen P K, Zhou Y, Nidhina Haridas P A, et al. Impaired hepatic lipid synthesis from polyunsaturated fatty acids in TM6SF2 E167K variant carriers with NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 128-136.
- [17] Pirazzi C, Adiels M, Burza M A, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(6): 1276-1282.
- [18] Trépo E. Contribution of PNPLA3 gene to the natural history of liver diseases[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2017, 80(1): 43-51.
- [19] Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, et al. PNPLA3 gene in liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(2): 399-412.
- [20] Stickel F, Buch S, Nischalke H D, et al. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(10): 1475-1483.
- [21] Abul-Husn N S, Cheng X P, Li A H, et al. A protein-truncating HSD17B13 variant and protection from chronic liver disease[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(12): 1096-1106.
- [22] Ma Y L, Belyaeva O V, Brown P M, et al. 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13 is a hepatic retinol dehydrogenase associated with histological features of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1504-1519.
- [23] Nault J C, Ningarhari M, Rebouissou S, et al. The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(9): 544-558.
- [24] Huang D S, Wang Z H, He X J, et al. Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(8): 969-976.
- [25] Torrecilla S, Sia D, Harrington A N, et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral

- heterogeneity in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(6): 1222-1231.
- [26] Sun J, Lu H Q, Wang X, et al. MicroRNAs in hepatocellular carcinoma: regulation, function, and clinical implications[J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 924206.
- [27] Truong D J, Phlairaharn T, Ebwein B, et al. Non-invasive and high-throughput interrogation of exon-specific isoform expression [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(6): 652-663.
- [28] Jiao J J, Niu W B, Wang Y, et al. Prevalence of aflatoxin-associated TP53R249S mutation in hepatocellular carcinoma in hispanics in south texas[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2018, 11(2): 103-112.
- [29] Müller M, Bird T G, Nault J C. The landscape of gene mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(5): 990-1002.
- [30] Aguilar F, Harris C C, Sun T, et al. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver[J]. *Science*, 1994, 264(5163): 1317-1319.
- [31] Rodríguez C, Ramos-Araque M E, Domínguez-Martínez M, et al. Single-nucleotide polymorphism 309T>G in the MDM2 promoter determines functional outcome after stroke[J]. *Stroke*, 2018, 49(10): 2437-2444.
- [32] Xia Q, Shu Z Y, Ye T, et al. Identification and analysis of the blood lncRNA signature for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 595699.
- [33] Perugorria M J, 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.
- [34] Xu C R, Xu Z, Zhang Y, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154515.
- [35] Ng C K Y, Dazert E, Boldanova T, et al. Integrative proteogenomic characterization of hepatocellular carcinoma across etiologies and stages [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2436.
- [36] Pezzuto F, Izzo F, Buonaguro L, et al. Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54253-54262.
- [37] Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(5): 505-511.
- [38] Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(10): 5522-5527.
- [39] Chen L, Zhang C, Xue R D, et al. Deep whole-genome analysis of 494 hepatocellular carcinomas[J]. *Nature*, 2024, 627(8004): 586-593.
- [40] Tu T, Budzinska M A, Vondran F W R, et al. Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an in vitro infection model via sodium taurocholate cotransporting polypeptide-dependent uptake of enveloped virus particles[J]. *J Virol*, 2018, 92(11): e02007-17.
- [41] Tu T, Mason W S, Clouston A D, et al. Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(9): 737-753.
- [42] Toh S T, Jin Y, Liu L Z, et al. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(4): 787-798.
- [43] La Bella T, Imbeaud S, Peneau C, et al. Adeno-associated virus in the liver: natural history and consequences in tumour development[J]. *Gut*, 2020, 69(4): 737-747.
- [44] Li C L, Li C Y, Lin Y Y, et al. Androgen receptor enhances hepatic telomerase reverse transcriptase gene transcription after hepatitis B virus integration or point mutation in promoter region[J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 498-512.
- [45] Nault J C, Mallet M, Pilati C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2218.
- [46] Álvarez E G, Demeulemeester J, Otero P, et al. Aberrant integration of Hepatitis B virus DNA promotes major restructuring of human hepatocellular carcinoma genome architecture [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6910.
- [47] Boyault S, Rickman D S, de Reyniès A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets[J]. *Hepatology*, 2007, 45(1): 42-52.
- [48] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1327-1341. e23.
- [49] Chiang D Y, Villanueva A, Hoshida Y, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6779-6788.

- [50] Désert R, Rohart F, Canal F, et al. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1502-1518.
- [51] Hoshida Y, Nijman S M, Kobayashi M, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7385-7392.
- [52] Lee J S, Chu I S, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling [J]. *Hepatology*, 2004, 40 (3): 667-676.
- [53] Yang C, Huang X W, Liu Z C, et al. Metabolism-associated molecular classification of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(4): 896-913.
- [54] Lee J S, Heo J, Libbrecht L, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12 (4): 410-416.
- [55] Jiang Y, Sun A H, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261.
- [56] Petitprez F, Meylan M, de Reyniès A, et al. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 784.
- [57] Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3): 812-826.
- [58] Chen Y H, Deng X Y, Li Y, et al. Comprehensive molecular classification predicted microenvironment profiles and therapy response for HCC[J]. *Hepatology*, 2024, 80(3): 536-551.
- [59] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.
- [60] Kudo M, Finn R S, Qin S K, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma; a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10126): 1163-1173.
- [61] Cheng A L, Qin S K, Ikeda M, et al. Updated efficacy and safety data from IMbrave150: atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(4): 862-873.
- [62] Finn R S, Qin S K, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-1905.
- [63] Boshuizen J, Peeper D S. Rational cancer treatment combinations: an urgent clinical need [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(6): 1002-1018.
- [64] Jin H J, Shi Y P, Lv Y Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib [J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 730-734.
- [65] Komposch K, Sibilica M. EGFR signaling in liver diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 17(1): 30.
- [66] Zhu A X, Rosmorduc O, Jeffrey Evans T R, et al. SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 559-566.
- [67] Lim H Y, Heo J, Choi H J, et al. A phase II study of the efficacy and safety of the combination therapy of the MEK inhibitor refametinib (BAY 86-9766) plus sorafenib for Asian patients with unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (23): 5976-5985.
- [68] Zugazagoitia J, Manzano A, Sastre J, et al. Sorafenib for non-selected patient population with advanced hepatocellular carcinoma: efficacy and safety data according to liver function [J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(2): 146-153.
- [69] Teufel M, Seidel H, Köchert K, et al. Biomarkers associated with response to regorafenib in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(6): 1731-1741.
- [70] Pinyol R, Montal R, Bassaganyas L, et al. Molecular predictors of prevention of recurrence in HCC with sorafenib as adjuvant treatment and prognostic factors in the phase 3 STORM trial [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1065-1075.
- [71] Harding J J, 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.
- [72] Zhang T Q, Geng Z J, Zuo M X, et al. Camrelizumab (a PD-1 inhibitor) plus apatinib (an VEGFR-2 inhibitor) and hepatic artery infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma in Barcelona clinic liver cancer stage C (TRIPLET): a phase II study [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 413.
- [73] Chiang C L, Chiu K W H, Chan K S K, et al. Sequential transarterial chemoembolisation and stereotactic body radiotherapy followed by immunotherapy as conversion therapy for patients with locally advanced, unresectable hepatocellular carcinoma (START-FIT): a single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 10(1): 100-110.

- tol, 2023, 8(2): 169-178.
- [74] Abou-Alfa G K, Lau G, Kudo M, et al. Tremelimumab plus durvalumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *NEJM Evid*, 2022, 1(8): EVIDoa2100070.
- [75] Qin S K, Chan S L, Gu S Z, et al. Camrelizumab plus rivoceranib versus sorafenib as first-line therapy for unresectable hepatocellular carcinoma (CARES-310): a randomised, open-label, international phase 3 study[J]. *Lancet*, 2023, 402(10408): 1133-1146.
- [76] Qin S K, Chen M S, Cheng A L, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus active surveillance in patients with resected or ablated high-risk hepatocellular carcinoma (IMbrave050): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2023, 402(10415): 1835-1847.
- [77] Yau T, Park J W, Finn R S, et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (Check-Mate 459): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(1): 77-90.
- [78] Peng Z W, Fan W Z, Zhu B W, et al. Lenvatinib combined with transarterial chemoembolization as first-line treatment for advanced hepatocellular carcinoma: a phase III, randomized clinical trial (LAUNCH)[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(1): 117-127.
- [79] Kelley R K, Rimassa L, Cheng A L, et al. Cabozantinib plus atezolizumab versus sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma (COSMIC-312): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(8): 995-1008.
- [80] Llovet J M, Kudo M, Merle P, et al. Lenvatinib plus pembrolizumab versus lenvatinib plus placebo for advanced hepatocellular carcinoma (LEAP-002): a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2023, 24(12): 1399-1410.
- [81] Qin S K, Bi F, Gu S Z, et al. Donafenib versus sorafenib in first-line treatment of unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma: a randomized, open-label, parallel-controlled phase II-III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(27): 3002-3011.
- [82] Ren Z G, Xu J M, Bai Y X, et al. Sintilimab plus a bevacizumab biosimilar (IBI305) versus sorafenib in unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENT-32): a randomised, open-label, phase 2-3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(7): 977-990.
- [83] Marron T U, Fiel M I, Hamon P, et al. Neoadjuvant cemiplimab for resectable hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase 2 trial[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(3): 219-229.
- [84] Llovet J M, Vogel A, Madoff D C, et al. Randomized phase 3 LEAP-012 study: transarterial chemoembolization with or without lenvatinib plus pembrolizumab for intermediate-stage hepatocellular carcinoma not amenable to curative treatment[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2022, 45(4): 405-412.
- [85] Li Q J, He M K, Chen H W, et al. Hepatic arterial infusion of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus transarterial chemoembolization for large hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(2): 150-160.
- [86] Kim T H, Koh Y H, Kim B H, et al. Proton beam radiotherapy vs. radiofrequency ablation for recurrent hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(3): 603-612.
- [87] Sato T, Stange D E, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762-1772.
- [88] Rygaard J, Povlsen C O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1969, 77(4): 758-760.
- [89] Sun F X, Tang Z Y, Lui K D, et al. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues[J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(2): 239-243.
- [90] Hu B, Cheng J W, Hu J W, et al. KPNA3 confers sorafenib resistance to advanced hepatocellular carcinoma via TWIST regulated epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cancer*, 2019, 10(17): 3914-3925.
- [91] He S, Hu B, Li C, et al. PDXliver: a database of liver cancer patient derived xenograft mouse models[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 550.
- [92] Nuciforo S, Fofana I, Matter M S, et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(5): 1363-1376.
- [93] Leung C O N, Tong M, Chung K P S, et al. Overriding adaptive resistance to sorafenib through combination therapy with src homology 2 domain-containing phosphatase 2 blockade in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 72(1): 155-168.
- [94] Akce M, El-Rayes B F, Wajapeyee N. Combinatorial targeting of immune checkpoints and epigenetic regulators for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Oncogene*, 2023, 42(14): 1051-1057.
- [95] Hama N, Totoki Y, Miura F, et al. Epigenetic landscape influences the liver cancer genome architecture[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1643.