

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.06.022

综述

游离 DNA 在肝脏疾病中的应用进展

何粤川, 帕成周, 何玲华综述 陈刚审校

基金项目: 云南省科技厅重大科技专项计划项目(202302AA310018);“春城计划”高层次创新创业团队专项(2022SCP002)

作者单位: 650011 云南省昆明市第一人民医院/昆明医科大学附属甘美医院肝胆胰外科

通信作者: 陈刚, E-mail: kmcg123@163.com



【摘要】 体液活检与传统侵入性检查相比具有许多独特的优势,尤其在产前诊断、器官移植后免疫排斥反应、肿瘤早期诊断和肝脏疾病诊疗方面展现出巨大潜力。在肝脏疾病领域,游离 DNA 参与机体内在的炎症反应和凝血过程。基于表观遗传学的研究,游离 DNA 片段的甲基化分析对肝脏恶性肿瘤的早期诊断和治疗大有帮助。在器官移植后,游离 DNA 有望成为监测免疫排斥反应的重要标志物,为关于免疫排斥反应机制的研究提供了新角度。文章对游离 DNA 的来源、提取方法、检测方法,以及其在肝移植、肝癌、肝衰竭等疾病中的研究应用进展进行综述。

【关键词】 游离 DNA;肝癌;肝移植;炎症反应**【中图分类号】** R575;R446.1 **【文献标识码】** A

Advances in the use of free DNA in liver disease He Yuechuan, Pa Chengzhou, He Linghua, Chen Gang. Department of Hepatobiliary Pancreatic and Vascular Surgery, First Hospital of Kunming/ The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Province, Kunming 650011, China

Funding program: Major Science and Technology Special Plan Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology(202302AA310018); Spring City Plan; the High-level Talent Promotion and Training Project of Kunming(2022SCP002)

Corresponding author: Chen Gang, E-mail: kmcg123@163.com

【Abstract】 Body fluid biopsy exhibits significant promise in prenatal diagnostics, post-organ transplantation immune rejection monitoring, early tumor detection, and liver diseases due to its distinct advantages over conventional invasive examinations. In the realm of liver diseases, circulating-free DNA not only mirrors hepatic function but potentially participates in the pathophysiological cascades of inflammation and coagulation alterations. The unique fragments within free DNA, coupled with methylation analysis, contribute to the early diagnosis of tumors and provide guidance for treatment strategies. Following organ transplantation, circulating-free DNA emerges as a pivotal marker for immune rejection reaction surveillance, offering a novel vantage point for scrutinizing rejection mechanisms. This article reviews the sources, extraction methods, and detection methods of free DNA, and the progress of its research application in liver transplantation, hepatocellular carcinoma, and liver failure.

【Key words】 Free DNA; Hepatocellular carcinoma; Liver transplantation; Inflammation

体液活检因其无创、方便获取等特性,已成为临床活动中具有前景的检查方法,其标本包括血液、脑脊液、胆汁等,最常用于检测的标本类型为血液。通过相应技术对血液中游离 DNA(circulating free DNA, cf-DNA)进行检验和分析,可获得大量有意义的生物学信息。cf-DNA 在胎儿遗传疾病的产前诊断中已广泛应用,在癌症、移植抗宿主病、自身免疫性疾病中也被发现可用作诊断的生物标志物^[1-2]。此外,cf-DNA 还可以参与到人体的一些病理生理过程中,如炎症反应中的中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs)、凝血过程中的血小板激活、血栓形成等^[3]。cf-DNA 在肝脏疾病中的研究和应用呈现出广阔的前景,为许多肝脏相关良恶性疾病的诊治提供新的参考思路,文章就其在肝脏疾病中的应用进展进

行综述。

1 cf-DNA 概述

cf-DNA 是指在外周血、尿液等体液中检测到的因细胞死亡或主动转运释放出来的双链 DNA 片段,其种类主要包括游离核 DNA(cf-nDNA)和游离线粒体 DNA(cf-mtDNA)。cf-nDNA 主要来源于凋亡的血细胞及部分活细胞的主动释放,其片段大小为 180~200 bp^[4]。cf-mtDNA 则以环状、双链 DNA 的形态存在于血液中,其中可包含 37 个基因。cf-DNA 在体液中的存在方式主要有 3 种:游离状态、附着于特定蛋白质以及封装或附着于细胞外囊泡(外泌体、微囊泡、凋亡小体)^[5]。血液中 cf-DNA 的清除主要有 3 种途径:通过肝脏系统和脾脏系统中网状内皮系统主动摄取;通过肾脏系统过滤;通过血液中特定核酸

酶降解^[6]。

血浆内的 cf-DNA 不稳定,其提取及保存在国际上没有统一标准。影响提取 cf-DNA 质量的因素主要有:收集管类型和抗凝剂、处理延迟和温度、离心方案和速度、血浆储存时间和温度、冻融事件次数等。研究发现在收集 cf-DNA 标本的过程中,乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝的血样采集管其抗凝作用优于肝素与柠檬酸钠的采集管。对于离心方式而言,相较于只离心一次,二次离心法(先进行低速离心,再进行高速离心)更有益于 cf-DNA 的收集^[7]。常用的方法主要有酚-氯仿法、QIAgene 试剂盒法、Omega 法、磁珠吸附法、微柱吸附法等。其中 QIAgene 试剂盒法与 Omega 法可以更加有效地清除各种血液中的其他成分(如血浆蛋白、细胞碎片)。磁珠吸附法可用于小片段 cf-DNA 的提取,获得的 cf-DNA 纯度较高。采用磁珠吸附法对 cf-DNA 进行分离具有提取效率高、丢失率小、可重复性高等优势^[8]。常规用于 cf-DNA 检测方式有 4 种:荧光定量 PCR 技术、高通量测序、数字 PCR、微流控芯片技术。其中最常用的方法为荧光定量 PCR 技术,而高通量测序则有助于检测 cf-DNA 片段中的突变基因和异常甲基化等信息。

2 cf-DNA 在肝脏疾病中的应用

2.1 自身免疫性肝病 外周血中检测到的 cf-DNA 约 90% 来源于血细胞,其中仅有少部分来源于免疫细胞。常用于机体炎症反应的实验室指标(如降钙素原、C 反应蛋白等)往往只反映机体中存在炎症反应的状态及程度,但不能对炎症反应、免疫反应的部位进行识别。通过对 cf-DNA 的甲基化分析能识别出该 cf-DNA 由具体何种免疫细胞分泌,再根据该免疫细胞的活动特性,从而推测出目前体内正在发生炎症免疫反应的部位^[9-10]。原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)和原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)是 2 种免疫系统功能障碍导致的自身免疫性肝病。此类疾病缺少对病情评估有效的非侵入性检查指标,而 cf-DNA 在病情评估方面展现了其潜力。随着病情进展 PSC 与 PBC 都会引起肝脏损伤的加重,通过评估肝脏细胞来源的 cf-DNA 可明确疾病进展情况。有研究证实,晚期 PBC 与 PSC 患者较早期患者而言其血液中肝脏来源的 cf-DNA 明显升高,其具有成为评估 PBC 与 PSC 患者预后标志物的潜力^[11]。

2.2 慢加急性肝衰竭 慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)是指在原有慢性肝病的基础上,机体接触引起肝脏损害加重的因素,导致的以黄疸加重、凝血功能障碍为主要表现的临床综合征,同时可能包含一系列并发症以及肝外其他器官及系统功能衰竭^[12]。ACLF 的发病机制十分复杂,且因为全球不同地区,不同人种之间 ACLF 的病因、诱因、发病机制并不完全相同。目前其整个病理生理过程并未研究明确。ACLF 病情进展迅速,发病短期内病死率高,目前,除接受肝脏移植手术以外,并没有长期有效的治疗措施,通常以内科治疗、器官支持治疗为主,通过改善急性期患者肝脏功能状态,延缓病情进展,以期得到肝脏移植治疗^[13]。Lehmann-Werman 等^[14]在研究中发现基于检测 cf-DNA 片段上 3 个特殊甲基化位点(ITIH4、IGF2R 和 VTN),可在器官层面定位肝脏来源的 cf-DNA,从而更

加直观地体现肝细胞的损伤水平。同时该研究还表明,通过与丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶的对比分析,肝脏来源的 cf-DNA 能更早、更准确地体现肝细胞的损伤程度。肝细胞损伤、全身炎症反应和凝血功能障碍是驱动急性肝衰竭病情进展的三大重要因素^[15]。而有研究表明,急性肝衰竭病程中全身炎症反应会进一步加重患者凝血功能障碍程度,而凝血功能障碍的严重程度则直接关系到急性肝衰竭患者的预后^[16]。炎症反应中的 NETs 过程产生的 cf-DNA 在激活体内内源性凝血中起到关键作用。髓过氧化物酶(MPO)-DNA 复合物是 NETs 形成的特异性标志物,通过对该复合物的检测可以评估患者体内产生 NETs 的程度,在急性肝衰竭患者中 cf-DNA 和 MPO-DNA 复合物水平明显升高,分别为健康人体内的 7.1 倍、2.5 倍,且 NETs 的形成与凝血功能异常有关,并可作为提示急性肝衰竭患者预后的标志物^[17]。然而在 ACLF 患者中 cf-DNA、炎症反应和氧化应激表达水平比肝硬化失代偿期更高,但凝血激活标志物与 cf-DNA、炎症反应和氧化应激之间并无线性相关关系,这表明 MPO-DNA 复合物与凝血或与 ACLF 结局无关,NETs 相关凝血改变似乎并不会驱动肝衰竭的进展^[18]。此外,NETs 具有促凝血活性,其中 cf-DNA 通过激活凝血的内在途径触发凝血酶的产生,但研究表明肝脏移植过程中没有发现 NETs 在驱动凝血激活中发挥作用,移植过程中来自缺血再灌注损伤的肝细胞释放的 cf-DNA 似乎推动了凝血系统的激活^[3, 19]。因此,肝衰竭中 cf-DNA、NETs、凝血功能三者之间的关系仍需进一步研究。

2.3 肝恶性肿瘤 肿瘤患者血液 cf-DNA 中有一部分是属于肿瘤细胞死亡从而释放入血的 cf-DNA 称为循环肿瘤 DNA(ct-DNA),血液中可检出的 ct-DNA 只占 cf-DNA 总量的一小部分,但对其进行特殊的处理即可得到反映体内肿瘤情况的重要信息。在机体发生肿瘤性病变的早期,可以找到血液中的 ct-DNA。通过对 ct-DNA 的基因突变片段进行检测以及甲基化分析,从中解读出其包含的生物学信息从而提高对肿瘤性病变的诊断效率。研究表明,仅有 27% 的肿瘤患者可以通过检测血液中突变的基因实现早期确诊^[20]。这可能由于部分早期肿瘤患者中 ct-DNA 的基因突变片段较少,难以解读出肿瘤发病的可靠信息^[21]。但在肿瘤病变早期,ct-DNA 即存在甲基化改变,且出现的时间早于基因突变片段^[22-24]。因此,通过检测 ct-DNA 的甲基化改变,可以更早地实现对肿瘤性病变的诊断。

目前,我国采用血清甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)与腹部超声结合的方法对肝细胞癌发病的高危人群进行早期筛查。但是相关研究表明,这种联合检查方式的敏感度不高,特异度不强^[25]。因此,临床工作中亟需一种敏感度高、特异度强的方法来早期诊断肝细胞癌。越来越多的研究表明,ct-DNA 甲基化分析在早期诊断肝细胞癌中展现出了巨大的潜力。基于一项超过 50 种肿瘤类型的 2 000 余例肿瘤患者的研究,对 ct-DNA 中超过 10 000 个富集的甲基化区域进行分析,发现 ct-DNA 对于 I ~ III 期肝细胞癌患者诊断敏感度达 68%^[26]。Kisiel 等^[27]通过对肝细胞癌患者的 ct-DNA 进行甲基化分析,找到了与发病相关的 12 组特殊甲基化片段,使用该方法检出早期肝细胞

癌的特异度及敏感度均高于 AFP。Wu 等^[28]的研究中阐述了 ct-DNA 中 6 个特殊位点 (CDKN2A、RASSF1A、STEAP4、TBX2、VIM 和 ZNF154) 的甲基化水平与早期肝癌的关系,发现其中 TBX2 的甲基化水平与肝细胞癌风险呈正相关,TBX2 甲基化水平增加则肝细胞癌发生风险增加,OR (95% CI) 为 3.2 (1.8 ~ 6.0)。Luo 等^[29]在研究中构建了一种基于 ct-DNA 甲基化分析的模型,该模型可以准确区分早期肝细胞癌患者和有肝硬化或慢性肝炎病史的高危人群。对 ct-DNA 的检测不仅可以用于早期肝细胞癌的诊断,同时对于 ct-DNA 片段中含有的恶性肿瘤突变基因的分析还有助于选择临床治疗方案。肝细胞癌患者活体肿瘤细胞中表现的基因突变序列,与血液中 ct-DNA 片段上表现的基因突变序列一致^[30-31]。目前对于肝细胞癌基因突变序列的检测主要依赖于活体肝穿刺,但其穿刺难度大、出血风险高,导致其在临床治疗过程中难以实施,可以通过对 ct-DNA 进行基因测序从而获得肝细胞癌患者的基因图谱,通过 ct-DNA 突变基因中提供的信息能够指导患者的个性化治疗。

2.4 肝移植 肝移植是终末期肝病最有效的治疗方案^[12]。但终末期肝病经过肝脏移植手术治疗后,仍面临发生移植后相关免疫排斥反应的风险。对肝脏移植患者机体免疫排斥反应程度的判断是影响移植患者预后的重要因素。肝脏活检能够清晰有效地展现移植患者现阶段肝脏的免疫状态,是诊断肝脏免疫排斥反应的“金标准”。肝移植受体血液中能检测出供体来源的特异性 DNA 序列,称供体来源的 cf-DNA (donor-derived cell-free DNA, dd-cf-DNA),其含量可以表征移植后供体肝细胞死亡的情况,从而进一步推测移植肝的免疫排斥反应程度^[32]。在欧洲的一项多中心研究中,肝移植患者发生免疫排斥反应时,其 dd-cf-DNA 较未发生免疫排斥患者明显升高^[33]。量化评估 SRY cf-DNA、 β -珠蛋白 cf-DNA 在反映肝损伤时被证明更具特异性,前者似乎是区分特异性移植植物损伤和一般损伤的标志物,在发生胆汁性腹膜炎或手术伤口感染时未能被检出^[34]。采用定量荧光聚合酶链反应 (QF-PCR) 的短串联重复 (STR) 分析测量 dd-cf-DNA,其检测的 dd-cf-DNA 甚至在肝移植患者发生急性免疫排斥反应前 1 ~ 2 周即提前升高,展示了 dd-cf-DNA 对比传统肝功能检测用于评估患者免疫排斥反应的敏感性^[35]。总之,dd-cf-DNA 与传统肝功能检测比较,具有剪度高、特异性强等优势,对肝移植患者免疫抑制方案的制定有十分重要的意义。但因为其较长的检测时间,较高的检测费用目前无法常规应用于临床。dd-cf-DNA 是通过基因测序的方法将血液中受体 cf-DNA 与供体 cf-DNA 进行区别,但现阶段并不能区分同一供体不同器官来源的 cf-DNA^[36]。即接受了同一供体多个器官移植的患者,dd-cf-DNA 不能识别出何种移植器官发生排斥反应。但前文提到的一种检测 cf-DNA 片段上 3 个特殊甲基化位点 (ITIH4、IGF2R 和 VTN) 的方法,可以辨别出肝脏特异性的 cf-DNA^[37]。此技术的实现有望更加准确地鉴定 cf-DNA 的肝脏来源,更加准确地评估肝细胞损伤情况。

3 小结与展望

cf-DNA 中包含人体大量的生物学信息,虽然其相关的提取检测技术仍在不断更新,但目前国际上关于 cf-DNA 的提取、检

测方式并没有统一的标准。cf-DNA 与炎症反应中的 NETs 有着密切联系,能够用于指导肝衰竭、肿瘤的诊断与治疗。另外,cf-DNA 可用于肝脏移植术后的器官功能监测,为评估移植患者免疫排斥反应提供新的手段及思路。对 cf-DNA 的器官溯源性进一步研究,可在多器官移植术后发生免疫排斥的情况下,早期、准确地找出发生免疫排斥的器官。总之,cf-DNA 在肝脏疾病中应用广泛,随着大量基础研究的深入,有望将相关技术应用于临床实践。

参考文献

- [1] Manzi J, Hoff CO, Ferreira R, et al. Cell-free DNA as a surveillance tool for hepatocellular carcinoma patients after liver transplant [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (12): 3165. DOI: 10.3390/cancers15123165.
- [2] Junqueira-Neto S, Batista IA, Costa JL, et al. Liquid biopsy beyond circulating tumor cells and cell-free DNA [J]. *Acta Cytol*, 2019, 63 (6): 479-488. DOI: 10.1159/000493969.
- [3] Saravanan R, Choong YK, Lim CH, et al. Cell-free DNA promotes thrombin autolysis and generation of Thrombin-Derived C-Terminal fragments [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 593020. DOI: 10.3389/fimmu.2021.593020.
- [4] Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, et al. Circulating tumor nucleic acids: Biology, release mechanisms, and clinical relevance [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22 (1): 15. DOI: 10.1186/s12943-022-01710-w.
- [5] Szilagyi M, Pos O, Marton E, et al. Circulating cell-free nucleic acids: Main characteristics and clinical application [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (18): 6827. DOI: 10.3390/ijms21186827.
- [6] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (6): 426-437. DOI: 10.1038/nrc3066.
- [7] Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, et al. Harmonizing cell-free DNA collection and processing practices through Evidence-Based guidance [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (13): 3104-3109. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3015.
- [8] 赵超, 丁兰, 张丹, 等. 血浆游离 DNA 的临床应用新进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17 (33): 6580-6583. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.33.041.
- [9] Fox-Fisher I, Piyanzin S, Ochana BL, et al. Remote immune processes revealed by immune-derived circulating cell-free DNA [J]. *Elife*, 2021, 10: e70520. DOI: 10.7554/eLife.70520.
- [10] Fox-Fisher I, Shemer R, Dor Y. Epigenetic liquid biopsies: A novel putative biomarker in immunology and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44 (5): 356-364. DOI: 10.1016/j.it.2023.03.005.
- [11] Punia S, Juran BD, Ali AH, et al. Evaluation of circulating cell-free DNA in cholestatic liver disease using liver-specific methylation markers [J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21 (1): 149. DOI: 10.1186/s12876-021-01741-5.
- [12] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南 (2018 年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35 (1): 38-44. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2019.01.007.
- [13] Jindal A. Acute-on-Chronic liver failure [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383

- (9);892. DOI:10.1056/NEJMc2023198.
- [14] Lehmann-Werman R, Magenheimer J, Moss J, et al. Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA [J]. *JCI Insight*, 2018, 3 (12): e120687. DOI: 10.1172/jci.insight.120687.
- [15] Stravitz RT, Lee WM. Acute liver failure - Authors' reply [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10240): 1833-1834. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30054-4.
- [16] Lisman T, Leebeek FW. Hemostatic alterations in liver disease: A review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment [J]. *Dig Surg*, 2007, 24(4): 250-258. DOI: 10.1159/000103655.
- [17] Von Meijenfelt FA, Stravitz RT, Zhang J, et al. Generation of neutrophil extracellular traps in patients with acute liver failure is associated with poor outcome [J]. *Hepatology*, 2022, 75 (3): 623-633. DOI: 10.1002/hep.32174.
- [18] Blasi A, Patel VC, Adelmeyer J, et al. Plasma levels of circulating DNA are associated with outcome, but not with activation of coagulation in decompensated cirrhosis and ACLF [J]. *JHEP Rep*, 2019, 1 (3): 179-187. DOI: 10.1016/j.jhepr.2019.06.002.
- [19] Von Meijenfelt FA, Burlage LC, Bos S, et al. Elevated plasma levels of cell-free DNA during liver transplantation are associated with activation of coagulation [J]. *Liver Transpl*, 2018, 24 (12): 1716-1725. DOI: 10.1002/lt.25329.
- [20] Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention [J]. *Science*, 2020, 369 (6499): eabb9601. DOI: 10.1126/science.abb9601.
- [21] Yang S, Zhihua P, Yu J, et al. Early cancer detection using low-coverage whole-genome sequencing of cell-free DNA fragments [J]. *CLIN ONCOL*, 2021, 39 (15_suppl): e22510. DOI: 10.1200/jco.2021.39.15_suppl.e22510.
- [22] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11 (10): 726-734. DOI: 10.1038/nrc3130.
- [23] Hattori N, Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(1-2): 3-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.140.
- [24] Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8 (9): a019505. DOI: 10.1101/eshperspect.a019505.
- [25] Huang DQ, Singal AG, Kanwal F, et al. Hepatocellular carcinoma surveillance - utilization, barriers and the impact of changing aetiology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20 (12): 797-809. DOI: 10.1038/s41575-023-00818-8.
- [26] Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31 (6): 745-759. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.02.011.
- [27] Kisiel JB, Dukek BA, V S R Kanipakam R, et al. Hepatocellular carcinoma detection by plasma methylated DNA: Discovery, phase I pilot, and phase II clinical validation [J]. *Hepatology*, 2019, 69 (3): 1180-1192. DOI: 10.1002/hep.30244.
- [28] Wu HC, Yang HI, Wang Q, et al. Plasma DNA methylation marker and hepatocellular carcinoma risk prediction model for the general population [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38 (10): 1021-1028. DOI: 10.1093/carcin/bgx078.
- [29] Luo B, Ma F, Liu H, et al. Cell-free DNA methylation markers for differential diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 8. DOI: 10.1186/s12916-021-02201-3.
- [30] Labgaa I, Villacorta-Martin C, D'Avola D, et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (27): 3740-3752. DOI: 10.1038/s41388-018-0206-3.
- [31] Ikeda S, Tsigelny IF, Skjervek AA, et al. Next-Generation sequencing of circulating tumor DNA reveals frequent alterations in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Oncologist*, 2018, 23 (5): 586-593. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0479.
- [32] Lo YM, Tein MS, Pang CC, et al. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients [J]. *Lancet*, 1998, 351(9112): 1329-1330. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)79055-3.
- [33] Joehmans I, Fieuws S, Tiekens I, et al. The impact of implantation time during liver transplantation on outcome: A eurotransplant cohort study [J]. *Transplant Direct*, 2018, 4 (6): e356. DOI: 10.1097/TXD.0000000000000793.
- [34] Macher HC, Suarez-Artacho G, Guerrero JM, et al. Monitoring of transplanted liver health by quantification of organ-specific genomic marker in circulating DNA from receptor [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e113987. DOI: 10.1371/journal.pone.0113987.
- [35] Fernandez-Galan E, Badenas C, Fondevila C, et al. Monitoring of donor-derived cell-free DNA by short tandem repeats: Concentration of total cell-free DNA and fragment size for acute rejection risk assessment in liver transplantation [J]. *Liver Transpl*, 2022, 28 (2): 257-268. DOI: 10.1002/lt.26272.
- [36] Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, et al. Validation of a clinical-grade assay to measure Donor-Derived cell-free DNA in solid organ transplant recipients [J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18 (6): 890-902. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.07.003.
- [37] Lehmann-Werman R, Magenheimer J, Moss J, et al. Monitoring liver damage using hepatocyte-specific methylation markers in cell-free circulating DNA [J]. *JCI Insight*, 2018, 3 (12): e120687. DOI: 10.1172/jci.insight.120687.

(收稿日期: 2024 - 01 - 25)