

REVIEW ARTICLE

## 간세포암종의 액체 생검 현황과 전망

강주미, 김순선

아주대학교 의과대학 소화기내과학교실

### Current Status and Prospects of Liquid Biopsy for Hepatocellular Carcinoma

Jumi Kang and Soon Sun Kim

Department of Gastroenterology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a leading cause of cancer-related deaths globally. Early detection and treatment response monitoring of HCC are vital for improved outcomes. Traditional diagnostic methods rely on imaging, serum tumor markers, and invasive liver tissue biopsy. The advent of liquid biopsy has revolutionized cancer diagnostics and management. Liquid biopsy involves the detection and analysis of tumor-derived components, such as circulating tumor DNA, circulating tumor cells, and extracellular vesicles, in various body fluids. These components reflect tumor characteristics, genetic alterations, and functional changes, providing valuable information for HCC diagnosis and treatment response monitoring. Liquid biopsy offers several advantages, including its non-invasive nature, potential for repetitive sampling, and real-time monitoring of disease progression and treatment response. However, challenges remain, including the sensitivity of detection methods, and standardization. In this review, we discuss the methods, current status, and prospects of liquid biopsy for HCC, highlighting its potential as a valuable tool in HCC management. (*Korean J Gastroenterol* 2023;82:1-9)

**Key Words:** Liquid biopsies; Carcinoma, hepatocellular; DNA, circulating tumor; Neoplastic cells, circulating; Extracellular vesicles

## 서론

원발성 간암은 세계적으로 여섯 번째로 가장 흔히 진단되는 암이며 세 번째로 가장 흔한 암 사망 원인이다.<sup>1</sup> 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC)은 원발성 간암 중 가장 흔한 유형으로 원발성 간암의 약 80%를 차지한다.<sup>2</sup> 간세포암종의 조기 발견과 정확한 치료 반응 모니터링은 치료 결과 및 환자의 예후에 매우 중요하다. 기존 간세포암종의 진단은 영상 이미지, 혈청 AFP 및 간 조직 생검에 의존하고 있으나,

간 조직 생검의 경우 침습성, 비용 및 샘플링 오류 가능성 측면에서 한계가 있다.<sup>3</sup> 최근 액체 생검(liquid biopsy)의 출현은 다양한 암종에서 진단, 치료 및 모니터링에 큰 변화를 가져오고 있다. 이 원고에서는 간세포암종에 대한 액체 생검의 연구 방법 및 현황과 전망에 대해 논하고자 한다.

Received July 3, 2023. Revised July 17, 2023. Accepted July 18, 2023.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2023. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 김순선, 16499, 수원시 영통구 월드컵로 164, 아주대학교 의과대학 소화기내과학교실

Correspondence to: Soon Sun Kim, Department of Gastroenterology, Ajou University School of Medicine, 164 WorldCup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea. Tel: +82-31-219-7822, Fax: +82-31-219-7820, E-mail: cocorico99@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6862-1896>

Financial support: This research was supported by grants from the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute, funded by the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (HR21C1003 and HR22C1734) and the Bio and Medical Technology Development Program of the National Research Foundation (NRF-2022R1H1A2093189, NRF-2022R1A2C2092422, NRF-2022M3A9G101451421, and NRF-2021R1C1C1009619) funded by the Korean government (Ministry of Science and ICT).

Conflict of interest: None.

## 본 론

### 1. 액체 생검의 개요

#### 1) 액체 생검의 정의와 원리

액체 생검은 혈액, 소변 및 뇌척수액을 포함한 다양한 체액에서 순환 종양 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 순환 종양 세포(circulating tumor cell, CTC) 및 세포 외 소포(extracellular vesicle, EV)와 같은 종양 유래 성분을 검출 및 분석하는 최소 침습 진단 접근법을 말한다. 액체 생검은 조직 생검 없이도 종양 특성, 유전적 변형 및 치료 반응에 대한 정보를 제공할 수 있다.<sup>4</sup> 액체 생검은 종양 유래 성분이 체액으로 방출되는 원리에 기반하는데, 종양 유래 성분은 세포사멸, 괴사 또는 종양 세포에 의한 활성 분비와 같은 과정을 통해 혈류로 들어갈 수 있다. 액체 생검은 암 발견, 치료 반응 모니터링 및 질병 진행 평가를 위한 비침습적 수단을 제공하기 위해 체액에 이러한 종양 유래 성분의 존재 여부나 양을 측정하는 방식을 이용한다. 순환 종양 DNA, 순환 종양 세포 및 세포 외 소포와 같은 종양 유래 구성 요소의 분석을 통해 유전

자 변형, 돌연변이 프로파일, 유전자 발현 패턴 및 기타 바이오마커를 식별할 수 있다.<sup>5</sup>

#### 2) 액체 생검의 종류

액체 생검에는 체액에서 검출 및 분석할 수 있는 다양한 종류의 바이오마커가 포함되며, 대표적으로 순환 종양 DNA, 순환 종양 세포, 세포 외 소포, 종양 유래 혈소판(tumor-derived platelets, TDPs) 및 순환 RNA (circulating RNA)가 있다(Table 1). 순환 종양 DNA는 괴사 또는 세포 사멸을 겪는 종양 세포에서 방출된 조각난 DNA를 말한다.<sup>6</sup> 순환 종양 세포는 원발성 종양 또는 전이 부위에서 분리되어 순환계로 들어가는 종양 세포이다.<sup>7</sup> 세포 외 소포는 종양 세포에 의해 방출되는 작은 막 소포로 내부에 단백질, 핵산 및 지질을 비롯한 다양한 카고(cargo)를 함유하며, 대표적인 세포 외 소포에 엑소좀(exosome)이 해당한다.<sup>8</sup> 순환 RNA (circulating RNA)는 micro RNA (miRNA), circular RNA (circRNA) 및 long non-coding RNA (lncRNA)와 같은 종양 특이적 발현 패턴 및 기능을 반영하는 순환계에서 발견될 수 있는 비암호화 RNA이다.<sup>9</sup> 종양 유래 혈소판은 종양세포에 의해 영향을

**Table 1.** Summary of Characteristics of Different Biomarkers Used in Liquid Biopsy

Biomarker	Description	Analysis target	Advantages	Disadvantages
Circulating tumor DNA	Freely circulating single- or double- stranded DNA, shed by either living or dying tumor	ctDNA concentration, mutations of DNA and DNA methylation patterns	Higher concentration and stability Established analysis techniques (e.g., NGS, ddPCR) Capturing tumor heterogeneity Available in a variety of body fluids	Short half-life Low concentration (ctDNA:cfDNA ratio) in early stage Difficult differentiating ctDNA from cfDNA
Circulating tumor cell	Rare, intact tumor cells from solid tumors that have been shed into blood or lymphatic vessels	Cell counts or cell contents (DNA, RNA, and proteins)	Detecting CTCs originating from both primary tumor and metastatic sites CellSearch <sup>TM</sup> is the only FDA-approved method for breast, colon and prostate cancer	Low plasma counts Difficult differentiating CTCs from other cells
Extracellular vesicle	Small membrane vesicles released by tumor cells	Levels of circulating exosomes and analysis of their contents (RNA and microRNA)	Can be found in blood, ascites, and pleural fluid	Early in development
Tumor-educated platelets	Tumor cells interact with platelets by activating surface receptors, which alters expression of platelet cytokines and mRNA	mRNA profiles	Highly stable and abundant Potential use for multiple cancer-type screening Routinely available clinical tests for quantification (e.g., CBC)	Limited research Lack of reliable methods for reproducible and practical application in clinical setting
Circulating RNA	Freely circulating RNA, shed by either living or dying tumor	Upregulation or downregulation of expression of specific circulating RNAs	Providing information on tumor's genetic profile Monitoring tumor expression changes over time	More difficult isolation compared to cfDNA Unstable molecule No reliable methods for reproducible and practical application

NGS, next generation sequencing; ddPCR, digital droplet PCR; ctDNA, circulating tumor DNA; cfDNA, cell free DNA; CBC, complete blood count; CTC, circulating tumor cell.

받거나 변형된 혈소판을 일컫는다.<sup>10</sup> 본 원고에서는 대표적인 액체 생검인 순환 종양 DNA, 순환 종양 세포 및 세포 외 소포를 중심으로 기술하고자 한다.

## 2. 순환 종양 DNA

### 1) 순환 종양 DNA의 검출 및 정량화

순환 종양 DNA는 액체 생검의 핵심 구성 요소로 종양 세포에 의해 혈류로 방출된 조각난 DNA를 말하며, DNA 메틸화(methylation) 변화, 복제수 변이(copy number variation), 체세포 돌연변이와 같은 종양 특이적인 유전자 변화 및 돌연변이를 수반한다.<sup>11,12</sup> 순환 종양 DNA의 존재 여부와 양은 종양 부하(tumor burden)를 반영하고 종양 역학에 대한 정보를 제공할 수 있다.

순환 종양 DNA 분석을 위해서는 5 ng의 DNA를 포함하고 있는 약 20 mL의 혈액이 필요하며,<sup>13</sup> 무세포 DNA (cell-free DNA, cfDNA)의 보존 및 세포 안정화 버퍼가 포함되어 있어 순환 종양 DNA의 수율과 질을 높일 수 있는 특수 튜브를 사용하는 것이 좋다.<sup>14</sup> 현재로서는 다른 무세포 DNA로부터 순환 종양 DNA를 특이적으로 분리할 수 있는 방법이 없으며, 순환하는 무세포 DNA에서 종양 특이적 돌연변이를 검출하는 것만이 순환 종양 DNA 여부를 나타낸다.<sup>15</sup> 순환 종양 DNA의 반감기는 16분에서 2.5시간 사이로 알려져 있다.<sup>16</sup> 순환 종양 DNA의 분석법에는 소수의 알려진 특정 변이를 PCR (polymerase chain reaction)로 표적 분석하는 방법과 수백만 개의 DNA 조각을 비표적 시퀀싱하는 방법이 있다. 표적 분석법에는 디지털 PCR (digital PCR)과 증폭 내성 변이 시스템(amplification-refractory mutation system)이 포함되며, 비표적 분석법은 생어 시퀀싱(Sanger sequencing)과 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS)이 대표적이다.<sup>17,18</sup> 디지털 PCR은 DNA 샘플을 수많은 개별 반응으로 나누어 희귀 DNA 분자의 검출 및 정량화를 가능하게 하는 매우 민감한 기술로, 양성 반응의 수를 세어 표적 DNA 분자의 절대 정량화를 제공할 수 있다.<sup>19</sup> 디지털 PCR의 높은 감도는 순환 종양 DNA에서 낮은 빈도의 특정한 유전적 변이를 검출할 때 유리하다. 반면 차세대 시퀀싱 기술은 수백만 개의 DNA 조각의 병렬 시퀀싱을 가능하게 하여 순환 종양 DNA의 유전적 변형을 식별할 수 있다. 전체 유전체 시퀀싱(whole genome sequencing), 표적 유전자 패널 시퀀싱 및 전체 엑솜 시퀀싱(whole exome sequencing)은 일반적으로 사용되는 차세대 시퀀싱이다. 차세대 시퀀싱은 단일 염기 변이, 삽입 및 결실(indel), 복제수 변이 및 구조 변이를 포함한 순환 종양 DNA의 포괄적인 유전체 프로파일링을 제공할 수 있다.<sup>20</sup>

### 2) 간세포암종 조기 진단에서 순환 종양 DNA의 역할

초기에는 순환 종양 DNA의 정량을 통해서 간세포암종을 조기 진단하는 연구들이 진행되었다. 2018년에는 순환 종양 DNA 정량값과 환자의 나이 및 AFP 수치를 통합한 모델이 보고되었는데, 민감도 87%, 특이도 100%, area under the ROC Curve (AUC) 0.98 (95% confidence interval [CI] 0.92–1.00)의 높은 조기 진단력을 보여주었다.<sup>21</sup> 그러나 연구마다 다른 결정값(cut-off)을 제시하는 점이나, 순환 종양 DNA의 정량 분석이 종양의 기원이나 유전자 변형 등의 정보를 제공하지 않는다는 점에서 한계가 있다.

최근에는 메틸화 패턴이나 돌연변이 등의 순환 종양 DNA의 분자적 특성에 대한 연구가 좀 더 활발히 진행되고 있다. 2019년 보고된 연구에서는 6개의 메틸화 마커로 이루어진 패널이(HOXA1, EMX1, AK055957, ECE1, PFKP, CLEC11A) 민감도 95%, 특이도 92%, AUC 0.96 (95% CI 0.93–0.99)의 높은 간세포암종 진단력을 보여주었으며 이는 AFP와 비교하였을 때도 우월하였다( $p < 0.0001$ ).<sup>22</sup> 특히 이 패널은 BCLC 0 병기의 75%, BCLC A 병기의 93%에서 양성을 보여 간세포암종의 조기 진단 가능성을 보여주었다. 다른 연구에서는 44쌍의 간세포암종 조직과 인접 조직에서 전체 유전체 비선택파이트 시퀀싱을 통해 간세포암종 특이적 차등 메틸화 영역(differentially methylated regions, DMRs)을 발굴하였고, 39개의 DMR 마커가 포함된 순환 종양 DNA 진단 패널이 간세포암종 진단에서 높은 민감도(81.3%)와 특이도(90.7%)를 보였다.<sup>23</sup> 최근에 다기관 연구를 통해 3개의 메틸화 마커(HOXA1, TSPYL5, B3GALT6)와 AFP, 성별을 포함하는 mt-HBT 알고리즘을 검증한 연구가 보고되었다. 156명의 간세포암종 환자(조기 간세포암종 50%)와 245명의 대조군으로 구성된 독립 코호트에서 검증한 결과, 전체 민감도 88%, 조기 진단 민감도 82%, 특이도 87%로 나타났다. 검증 코호트에서 mt-HBT 알고리즘의 조기 진단 민감도는 AFP (40%) 및 GALAD 점수(71%)보다 유의하게 높았지만, 특이도는 알파태아단백과 GALAD 점수(각각 100% 및 93%)가 더 높았다.<sup>24</sup>

순환 종양 DNA를 이용하여 질병 진단, 치료 반응 모니터링, 치료 저항성과 관련된 돌연변이를 식별을 하고자 하는 연구 및 간세포암종 조직 생검 시 직면하게 되는 종양 조직 이질성의 문제를 극복하고자 하는 노력이 이루어지고 있다. 과거 연구들에서 간세포암종 조직에서 확인된 돌연변이의 63–94%가 순환 종양 DNA에서 발견되었으며,<sup>17,25,26</sup> 반대로 순환 종양 DNA에서 검출된 돌연변이의 81%가 간세포암종 조직에서 검출되었다.<sup>26</sup> 한편 다른 연구에서는 순환 종양 DNA의 전체 엑솜 시퀀싱은 조직에서 검출된 돌연변이의 18%만 검출되었으나, 표적 심층 시퀀싱을 적용했을 때는 검출률이 84%로 증가하였다.<sup>27</sup> 이는 순환 종양 DNA 검출을 위한 검사법의 민감

도에 따라 연구 결과가 달라질 수 있음을 시사한다.

유전자 변이는 전통적인 혈액 단백 마커와 결합해서 사용하였을 때 흥미로운 결과를 보여주는데, 4개 유전자(TP53, CTNNB1, AXIN1, TERT), AFP 및 des- $\gamma$ -carboxy-prothrombin (DCP) 패널을 결합한 한 연구에서는 훈련 코호트(간세포암종 환자 65명, 대조군 70명)에서 85% 민감도와 93% 특이도를 보였고 331명의 고위험군을 대상으로 한 검증 코호트에서 100% 민감도와 94% 특이도를 나타냈다. 그러나 양성 예측도는 17%에 불과한 한계점을 보였다.<sup>28</sup> 또 다른 흥미로운 연구에서 순환 단백질과 순환 종양 DNA 변이를 결합한 CancerSEEK 검사법은 5가지 암 유형에 대해 69–98%에 이르는 민감도를 보여주었다. 특히 간암의 경우 이 분석법은 95%의 민감도와 99% 이상의 특이도를 나타냈다. 본 연구는 혈액 단백 마커와 순환 종양 DNA의 결합이 각종 암의 조기 진단을 위한 도구가 될 가능성을 제시하였다.<sup>29</sup>

3) 간세포암종의 치료 모니터링에서 순환 종양 DNA의 역할  
다수의 연구들이 순환 종양 DNA의 돌연변이 프로파일링이 치료 반응이나 질병 진행과 같은 모니터링 도구가 될 수 있음을 보여주었다.<sup>17,25,30</sup> 이 연구들에 따르면 간절제술 후 순환 종양 DNA 수치가 완전히 떨어지거나 소실되었다가 질병이 진행되기 전에 다시 상승하는 것으로 나타났다. 간세포암종 환자 3명의 종양 조직에서 574개의 유전자를 대상으로 한 최근 연구에서는 종양 조직에서 확인된 서브클론 돌연변이의 98–99%가 순환 종양 DNA에서 포착되었다. 또한, 서브클론 돌연변이의 수준은 환자의 종양 부하와 상관관계가 있으며, 절제 후에는 돌연변이 대립유전자 비율이 낮게 검출되지만, 재발 시에는 돌연변이가 더 높은 빈도로 검출되었다.<sup>31</sup> 간세포암종 환자 34명을 대상으로 한 후속 연구에서 수술 전 모든 간세포암종 환자와, 종양 재발 시 환자의 95%에서 순환 종양 DNA 내 단일 뉴클레오타이드 변이(single nucleotide variant) 및 복제수 변이의 임계치가 검출되었으며 이는 AFP (49%), AFP-L3 (45%) 및 DCP (77%)보다 높았다. 수술 후 연속적으로 측정하였을 때, 1년 이내에 재발한 환자의 59%에서 순환 종양 DNA가 확인되어 최소한의 잔류 질환을 모니터링할 수 있는 가능성을 시사하였다.<sup>32</sup>

#### 4) 순환 종양 DNA와 간세포암종의 예후

순환 종양 DNA는 간세포암종의 진단 뿐 아니라 예후에도 중요한 역할을 할 수 있다. 높은 순환 종양 DNA 농도를 보이는 경우, 메틸화 마커가 검출이 많이 되거나 혹은 특정 돌연변이 유무에 따라 간세포암종 환자의 생존 기간이 달라진다고 보고되었다.<sup>33–35</sup> 1,098명의 간세포암종 환자와 835명의 건강 대조군을 대상으로 한 연구에서 8개의 메틸화 마커가 독립적

인 전체 생존율의 나쁜 예후인자임이 보고되었다.<sup>11</sup> 또 다른 연구에서는 97명의 간절제술을 시행 받은 환자를 대상으로 1,021개 이상의 유전자를 분석하였을 때, 수술 7일 후에 순환 종양 DNA가 검출되는 경우 독립적인 나쁜 예후인자임을 보고하였다.<sup>36</sup>

### 3. 순환 종양 세포

#### 1) 순환 종양 세포의 검출

혈액 내 순환 종양 세포의 수는 매우 적으나, 검출 또는 분리 기술에 따라 혹은 사용되는 순환 종양 세포의 정의에 따라 밀리리터 당 최대 수백 개까지 계산되기도 한다. 현재까지 많은 "순환 종양 세포"의 정의가 존재하며, CellSearch<sup>TM</sup>의 정의에 따르면 순환 종양 세포는 4  $\mu$ m 이상의 순환 핵세포로, 상피 단백질 EpCAM과 사이토케라틴(cytokeratin) 8, 18, 19를 발현하는 동시에 백혈구 특이 항원 CD45에 음성이라고 명시되어 있다.<sup>7</sup>

혈류에서 순환 종양 세포의 반감기는 짧으며(1–2.4시간),<sup>37</sup> 원발성 종양 절제 후 수개월 또는 수년 후 환자 혈액에서 순환 종양 세포가 검출되는 경우 종양 재발 또는 전이를 의미할 수 있다. 그러나 순환 종양 세포의 임상 적용은 여전히 어려운 과제인데, 가장 중요한 어려움은 암 병기가 초기일수록 순환 종양 세포의 수가 적다는 것이다. 순환 종양 세포가 순환계에 들어가면 세포 외 기질에 대한 접착력 상실, 혈액학적 전단력(shearing force), 신체 면역 체계의 공격 및 항암 표적 약물로 인해 세포 사멸을 겪게 되며, 순환계로 방출된 순환 종양 세포 중 0.01% 미만만이 생존하여 전이를 일으킨다.<sup>38,39</sup> 이러한 특성으로 인해 조기 암 진단에 순환 종양 세포 검출을 적용하는 데 한계가 있다. 따라서 순환 종양 세포의 임상 적용 가능성을 확대하기 위해서는 민감도와 특이도가 높은 검출 기술이 필요하다.

순환 종양 세포 분리 기술은 일반적으로 물리적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 전자는 주로 크기(여과 기반 장치), 밀도(Ficoll 원심분리), 전하(전기 영동), 이동 능력 및 변형성과 같은 순환 종양 세포의 물리적 특성에 기반한다.<sup>40</sup> 후자는 주로 상피 세포 부착 분자(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 전립선 특이 항원(PSA) 등 종양 특이적 바이오마커에 대한 항체를 사용하여 항원-항체 결합에 의존하는 방법이다.<sup>41</sup> EpCAM은 상피 유래 세포에서 거의 보편적으로 발현되고 혈액 세포에는 존재하지 않기 때문에 순환 종양 세포 정제에 가장 일반적으로 사용되는 항원이다.<sup>41</sup> 그러나 이 접근법은 상피 마커의 발현 감소와 중간엽 특성의 획득을 특징으로 하는 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition) 과정의 잠재적 종양 세포

를 놓칠 수 있고,<sup>42</sup> 간세포암종의 경우 일부(0-20%)만이 EpCAM에 양성 반응을 보인다.<sup>43,44</sup> 마지막으로 순환 종양 세포 칩은 마이크로유체공학과 생체센서 기술을 활용하여 설계되었으며, 혈액 내의 순환 종양 세포를 높은 효율로 포획하고 분리한다. 순환 종양 세포 칩은 특수한 표면 구조와 생체센서를 가지고 있어 높은 포획 효율뿐 아니라 높은 정확성을 보여준다. 또한, 적은 샘플 양으로도 효과적인 검출을 할 수 있고, 포획과 동시에 후속 분석을 위한 분리 또는 세포학적, 유전학적, 단백질학적 특성 조사를 수행할 수 있다.<sup>45</sup>

## 2) 순환 종양 세포와 간세포암종의 재발 및 예후

메타분석에 따르면 순환 종양 세포는 간세포암종의 진단을 위한 독립적인 진단 도구로는 권고되지 않지만, 재발을 모니터링하고 예후를 예측하는 도구로는 유용할 수 있다.<sup>46</sup>

간세포암종 절제술 전 EpCAM 양성 순환 종양 세포  $\geq 2/7.5$  mL는 수술 후 간세포암종 환자, 특히 AFP 수치가  $\leq 400$  ng/mL이거나 종양 재발 위험이 낮은 그룹에서 간세포암종 재발에 대한 예측 인자임이 보고되었다.<sup>47</sup> 그럼에도 불구하고 간세포암종 환자의 약 35%만이 EpCAM을 발현하기 때문에 다른 방법들이 시도되고 있으며, 그 중 한 가지는 EpCAM 양성 순환 종양 세포에 추가로 CD4, CD25, Foxp3를 공동 발현하는 Treg 세포를 검출하는 방법이다. 실제로 EpCAM 양성 순환 종양 세포 또는 Treg 값이 높은 환자는 낮은 환자보다 수술 후 간세포암종 재발 위험이 유의하게 높다고 보고되었다(66.7% 대 10.3%,  $p < 0.001$ ).<sup>48</sup> 좀 더 정확한 순환 종양 세포의 다른 하위 그룹을 찾기 위한 노력이 이루어졌는데, 한 연구에서 62명의 간세포암종 환자 중 재발 그룹에서 중간엽 순환 종양 세포와 혼합 순환 종양 세포가 비재발 그룹보다 유의하게 높았으며, 중간엽 순환 종양 세포가 조기 재발의 독립적 위험 인자임을 보고하였다.<sup>49</sup>

한편 간세포암종 환자 중 EpCAM 양성 순환 종양 세포가 검출되는 코호트에서 전체 생존율과 무병 생존율이 유의하게 짧았으며,<sup>50</sup> 이 그룹은 높은 AFP 수치 혹은 혈관 침범과 관련을 보였다.<sup>51</sup> 그러나 연구마다 순환 종양 세포 양성에 대한 정의를 다르게 내렸는데, 일부 연구에서는 " $\geq 1$  CTC" 또는 " $\geq 2$  CTC"로 정의한 반면, 다른 연구에서는 " $\geq 5$  CTC"를 사용하였다. 또한, 순환 종양 세포의 경우 간세포암종 특이적이지 않을 수 있어 결과 해석에 주의를 요할 수 있다.

## 4. 세포 외 소포

### 1) 세포 외 소포의 검출

세포 외 소포는 지질 이중층으로 구분되어 복제할 수 없는, 즉 기능적 핵을 포함하지 않는 세포에서 자연적으로 방출되는

입자의 총칭이다.<sup>52</sup> 세포 외 소포에는 모세포에서 유래한 다양한 표면 마커와 카고가 포함되어 있다. 세포 외 소포는 크기와 생물학적 기원에 따라 엑소좀, 마이크로소포체, 세포사멸체의 세 가지 주요 그룹으로 분류되며, "세포 외 소포"라는 용어는 일반적으로 방금 언급한 세 가지 그룹을 포괄하는 데 사용된다.<sup>53</sup> 세포는 여러 자극에 반응하여 다양한 메커니즘을 통해 세포 외 소포를 분비할 수 있다. 따라서 표면 마커와 운반체는 세포 기원, 손상 유형, 분비 기전뿐만 아니라 모세포의 병리학적 상태도 반영할 수 있다.<sup>54</sup> 엑소좀 및 마이크로소포체와 달리 세포사멸체는 세포 간 통신과 관련이 없다. 최근 가이드라인에 따르면, 생물학적 기원을 실험적으로 증명하기가 어렵고, 엑소좀과 마이크로소포체의 표면 마커에 대한 합의가 이루어지지 않았기 때문에 1) 크기(예:  $<100$  nm 또는  $<200$  nm 인 경우는 소형,  $>200$  nm인 경우는 대형 또는 중형) 또는 밀도와 같은 물리적 특성, 2) 생화학적 구성, 3) 기원 세포에 대한 설명 등의 용어를 사용하여 세포 외 소포를 명명하는 것을 권장한다.<sup>52</sup>

아직까지 세포 외 소포의 정량화, 분리 및 특성화를 위한 최적의 프로세스에 대한 명확한 합의는 없지만 국제 세포 외 소포 학회는 연구 간 재현성을 강화하여 세포 외 소포 연구의 신뢰성을 뒷받침하기 위해 가이드라인을 개발하였다.<sup>52</sup> 분리 및 특성화 절차에는 물리적(크기, 밀도, 형태 등) 또는 생물학적 특성(카고, 항원 발현)에 기반한 다양한 방법이 포함된다.

먼저 초원심분리법(ultracentrifugation)은 현재 세포 외 소포 분리에 가장 일반적으로 사용되는 기술이다.<sup>55</sup> 원심분리는 밀도와 크기의 차이에 의해 분리가 이루어지며, 연속적인 원심 분리를 통해 다른 입자의 수를 줄이고 세포 외 소포를 농축하므로 비용이 저렴하다는 장점이 있지만, 회전자(rotor)의 유형에 따라 효율에 큰 영향을 미쳐 세포 외 소포의 손실을 유발하여 낮은 재현성을 보일 수 있다.<sup>56</sup> 나노막 초원심분리 스핀 장치(nanomembrane ultracentrifugation spin device)는 최근 소변 및 혈장에서 세포 외 소포를 분리하는 데 성공을 거두었다. 이 방법은 소량의 샘플에서 고순도의 최종 제품을 얻을 수 있지만, 분별(fractionation) 및 필터 선택 과정에서 샘플 손실의 우려가 있다.<sup>57</sup> 미세유체학(microfluidics)은 물리적 및 생화학적 특성(크기, 밀도, 면역 친화성, 전기영동)에 기반하여 세포 외 소포의 정량화와 표면 마커 및 카고 단백질을 분석할 수 있다. 조직 특이적 세포 외 소포 분리를 위한 면역 비드(immunobead)는 표면 마커에 따라 세포 외 소포를 선택적으로 분리하는 데 사용되지만, 원하는 세포 외 소포의 특성에 대한 사전 지식이 필요하다.<sup>58</sup> 연구에 따르면 비드 기반 검출은 유세포 분석법(flow cytometry)보다 엑소좀 검출에 대해서는 더 민감하고, 더 큰 세포 외 소포를 검출하는 데 덜 민감하다고 보고되었다.<sup>59</sup>

세포 외 소포 농축(enrichment) 후에는 세포 외 소포를 특성화하고 계수하는 과정이 필요하다. 나노 추적 분석(nano-tracking analysis, NTA)은 크기와 농도를 분석하는 데 널리 사용되지만 여러 개의 작은 입자가 샘플을 오염시켜서 정량에 영향을 줄 수 있으며, 비용이 비싸다.<sup>60</sup> 또한, 높은 비용으로 인해 사용이 제한적일 수 있다. 레이저 빔의 산란에 의존하는 또 다른 기술인 동적 광 산란(dynamic light scattering, DLS)은 1 nm에서 6 nm 범위의 입자를 측정할 수 있지만 입자 크기 프로파일링은 더 큰 입자의 영향을 많이 받는다.<sup>61</sup> 전자 현미경은 DLS 및 NTA와 달리 정량 분석에는 적합하지 않지만 형태와 크기를 분석하기 위한 고해상도 이미지를 얻는 데 유용하다. 유세포 분석법은 특성화, 정량화 및 분리에 널리 사용되며, 여러 항원의 수준에 따라 다양한 소포 집단을 분석할 수 있으나 작은 크기의 세포 외 소포는 검출할 수 없고 염색 전에 샘플을 처리해야 하며(초원심분리, 침전, 자기 정제 등), 미세 입자와 같은 파편에 의해 배지가 오염될 수 있다는 한계가 있다.<sup>62</sup> 그럼에도 불구하고 유세포 분석은 세포 외 소포 정량화 및 표현형 특성화 기준을 충족하는 데 있어 가장 유망한 기술로 간주된다.

## 2) 간세포암종과 세포 외 소포

간세포암종 환자 55명, 간경변증 환자 40명, 건강 대조군 21명을 대상으로 한 연구에서 마이크로소포체를 측정하였을 때 간세포암종 환자에서 마이크로소포체 수치가 높게 나타났으며, 간세포암종 초기 진단에 알파태아단백보다 좋은 결과를 보였다. 또한, 수술 전 높았던 마이크로소포체 수치는 간절제술 후 감소하는 경향을 보였다.<sup>62</sup> 다른 연구에서는 간 악성 종양(간세포암종 및 담관세포암종) 특이 세포 외 소포를 감별하기 위한 표면 마커를 분석하였는데, AnnexinV+ EpCAM+ ASGPR1+ CD133+ taMP의 조합을 통해 간 악성 종양과 간경변증을 구분할 수 있음을 보여주었으며, 다른 종양과의 감별이 가능하다고 보고하였다. 또한 종양 절제 후 7일이 지나면 AnnexinV+ EpCAM+ ASGPR1+ taMPs가 감소하는 결과를 보였다.<sup>63</sup> 간세포암종 초기 진단과 관련하여 세 가지 세포 외 소포 하위 집단인 EpCAM+ CD63+, CD147+ CD63+, GPC3+ CD63+ 중 하나라도 양성을 보이는 경우는 간세포암종의 초기 진단 능력을 보였다(민감도 91%, 특이도 90%, AUC 0.95 [95% CI, 0.90–0.99]).<sup>64</sup> 같은 저자들은 세포 외 소포 정제 시스템을 개발하였는데(EV Click Chip), 이를 통해 높은 간세포암종 초기 진단 능력을 보고하였다(AUC 0.93 [95% CI, 0.86–1.00], 민감도 94.4% 및 특이도 88.5%).<sup>65</sup> 다른 연구자들은 간세포암종 수술 전 높은 HepPar1+미세입자 수치는 초기 재발과 연관이 있다고 보고하였으며,<sup>66</sup> 이는 세포 외 소포의 간암 예후 바이오마커로서 잠재적 역할을 시사한다.

암 유래 세포 외 소포는 건강한 세포와는 다른 종류의 내부

물질을 가지고 있으며, miRNA, lncRNA와 같은 다양한 유형의 RNA가 포함된다. 지금까지 세포 외 소포 내 miR-10b-5p, miR-18a, miR-21, miR-21-5p, miR-101, miR-106b, miR-122, miR-148a, miR-195, miR-221, miR-221-3p, miR-222, miR-223-3p, miR-224 등의 miRNA와 LINC00853, lnc85 등의 lncRNA가 간세포암종의 진단과 연관이 있다고 보고되었다.<sup>67-72</sup>

## 5. 기타

### 1) 종양 유래 혈소판

혈소판이 초기 암 진단에 효과적인 바이오마커로서 사용될 가능성이 있다는 증거가 제시되고 있다. 종양에 의해 방출된 생체 분자는 소포 의존적 또는 독립적인 방식으로 혈소판에 흡수되어 혈소판에 특이한 변화를 일으킨다. 이러한 종양 관련 생체 분자의 전달을 통해 혈소판은 종양 세포의 “교육”을 받는다. 혈소판의 messenger RNA (mRNA) 레퍼토리는 생체 분자 섭취와 종양과의 직접적인 상호 작용의 복합적인 작용에 의해 변경되며, 혈소판의 역동적인 mRNA 레퍼토리는 초기 암 발견을 위한 바이오마커로서 활용될 수 있다.<sup>73</sup> 또한, 종양 유래 혈소판은 암 진행, 전이 및 종양 미세환경 형성에 중요한 역할을 한다. 이들은 종양세포와 상호작용하여 신생혈관 생성을 촉진하고 면역 회피를 도우며 암세포의 전이를 촉진하는 것으로 알려졌다.<sup>10</sup>

간세포암종을 대상으로 한 종양 유래 혈소판 연구는 제한적인데, 한 연구에서 20명의 간세포암종 환자와 10명의 대조군 혈액에서 종양 유래 혈소판의 mRNA를 분석한 결과, 대조군에 비해 간세포암종 환자의 종양 유래 혈소판에서 TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B, VEGF의 mRNA 발현이 각각 2.48배, 2.35배, 2.78배로 유의미하게 높은 것으로 나타났으며, 반면에 AKT와 PI3K는 대조군에 비해 각각 0.6배, 0.65배 발현이 감소한 것으로 관찰되어 종양 유래 혈소판의 간세포암종 진단 바이오마커로서 가능성을 시사하였다.<sup>74</sup>

### 2) 순환 RNA

인간의 혈청과 혈장에는 단백질 합성하는데 관여하는 mRNAs 뿐 아니라 miRNAs, piwi-interacting RNAs, small interfering RNA, lncRNA 등의 비암호화 RNA (non-coding RNA) 분자가 포함되어 있다.<sup>75</sup> 이러한 순환 RNA는 일부는 질병의 표현형과 연관되어 있기 때문에 비침습적 바이오마커로서 상당한 잠재력을 가지고 있다. 지금까지 대부분의 연구는 순환하는 miRNA를 분석하여 그 기능을 이해하고 바이오마커로서 잠재력을 파악하는데 중점을 두었다.<sup>76</sup> 그러나 miRNA 발현의 변화는 질병, 나이, 성별 등의 다양한 생물학

적 요인 및 기술적 요인의 영향을 받을 수 있고 이는 miRNA 프로파일에 큰 영향을 미칠 수 있어 해석에 주의를 요한다.<sup>77</sup>

## 6. 액체 생검의 장점과 한계

액체 생검은 다음과 같은 장점을 가지고 있다. 첫 번째, 비침습성으로 액체 생검은 조직 생검과 같은 침습적 절차가 없어 환자의 불편함과 합병증을 줄일 수 있다.<sup>5</sup> 두 번째, 혈액 기반 액체 생검은 쉽게 접근할 수 있어 시간의 흐름에 따라 반복 샘플링을 통해 질병 진행 및 치료 반응을 모니터링할 수 있다.<sup>4</sup> 세 번째, 액체 생검은 체액 내 종양 유래 성분의 수준이 낮은 경우에도 이를 포착할 수 있기 때문에, 최소 잔여 질병을 모니터링하고 재발을 조기에 발견하는데 유용할 수 있다. 마지막으로 액체 생검을 통해 종양 진화(tumor evolution) 및 약물 저항성 관련 유전자 변이의 출현을 실시간으로 모니터링할 수 있어 적시에 치료 전략을 조정할 수 있는 장점이 있다.<sup>78</sup> 그러나 아직까지 다음과 같은 한계점을 보이는데, 우선 액체 생검 분석법의 민감도는 검출 방법에 따라 다양할 수 있으며 순환하는 종양 유래 성분의 양이 미량이기 때문에 경우에 따라 측정이 어려울 수 있다.<sup>5</sup> 또한, 액체 생검 방법의 표준화 및 검증은 여전히 진행 중이며 기술적 변화나 발전이 결과에 영향을 미칠 수 있다.

## 결 론

이번 원고에서는 액체 생검이 간세포암종의 진단과 예후 평가에 매우 유용한 비침습적 도구임을 확인하였다. 액체 생검은 혈액, 체액 또는 기타 생체 샘플을 통해 종양 관련 정보를 얻을 수 있는데, 이는 전통적인 간 조직 생검 방법에 비해 훨씬 간편하고 안전한 접근 방법이다. 특히 간세포암종은 기저 간질환 및 종양의 특성으로 인해 조직 생검 없이 진단하는 유일한 암종이며, 반복적인 간조직 생검은 환자에게 위협이 될 수 있어 간세포암종 환자를 진료하는데 있어 액체 생검은 더 이상 미룰 수 없는 선택으로 다가왔다. 우리는 액체 생검을 통해 간세포암종의 조기 진단, 예후 예측 및 치료 반응 모니터링에 대한 새로운 가능성을 열 수 있으며 이는 간세포암종 환자의 예후를 예측하고 개인 맞춤형 치료 전략을 개발하는 단계로 이어질 수 있다.

이처럼 액체 생검은 간세포암종의 치료 및 예후 예측에 대한 기존의 제한을 극복하는 새로운 방법으로 기대되지만, 아직까지 높은 재현성을 보여주는 결과는 부족한 실정이다. 따라서 여전히 추가적인 연구와 검증이 필요하며, 표준화된 프로토콜과 신뢰할 수 있는 바이오마커들의 도입이 중요하다. 또한, 대규모 코호트를 이용한 임상 검증과 환자들의 효용성에 대한 평가가 뒷받침되어야 실제 임상적용이 가능할 것으로

보인다.

## REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-249.
2. Rungay H, Ferlay J, de Martel C, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype. *Eur J Cancer* 2022;161:108-118.
3. Renzulli M, Pecorelli A, Brandi N, et al. The feasibility of liver biopsy for undefined nodules in patients under surveillance for hepatocellular carcinoma: Is biopsy really a useful tool? *J Clin Med* 2022;11:4399.
4. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:531-548.
5. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy in 2016: Circulating tumour cells and cell-free DNA in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:73-74.
6. Mody K, Kasi PM, Yang JD, et al. Feasibility of circulating tumor DNA testing in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2019;10:745-750.
7. van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 2011;71:5955-5960.
8. Wu P, Zhang B, Ocansey DKW, Xu W, Qian H. Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. *Biomaterials* 2021;269:120467.
9. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 2010;220:126-139.
10. Roweth HG, Battinelli EM. Lessons to learn from tumor-educated platelets. *Blood* 2021;137:3174-3180.
11. 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.
12. Ye Q, Ling S, Zheng S, Xu X. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Cancer* 2019;18:114.
13. Gao Y, Zhao H, An K, et al. Whole-genome bisulfite sequencing analysis of circulating tumour DNA for the detection and molecular classification of cancer. *Clin Transl Med* 2022;12:e1014.
14. Browne CD, Mattmann ME, Wycoco MJ, et al. Abstract 2758: Comparison of cell-free DNA blood collection tubes. *Cancer Res* 2017;77(13 Suppl):2758.
15. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 2013;73:6384-6388.
16. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985-990.
17. Chan KC, Jiang P, Zheng YW, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 2013;59:211-224.
18. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548-554.

19. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013;59:1722-1731.
20. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:9530-9535.
21. Yan L, Chen Y, Zhou J, Zhao H, Zhang H, Wang G. Diagnostic value of circulating cell-free DNA levels for hepatocellular carcinoma. *Int J Infect Dis* 2018;67:92-97.
22. Kisiel JB, Dukek BA, R VSRK, et al. Hepatocellular carcinoma detection by plasma methylated DNA: Discovery, phase I pilot, and phase II clinical validation. *Hepatology* 2019;69:1180-1192.
23. Xu W, Lu J, Zhao Q, et al. Genome-wide plasma cell-free DNA methylation profiling identifies potential biomarkers for lung cancer. *Dis Markers* 2019;2019:4108474.
24. Chalasani NP, Porter K, Bhattacharya A, et al. Validation of a novel multitarget blood test shows high sensitivity to detect early stage hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2022;20:173-182.e7.
25. Ono A, Fujimoto A, Yamamoto Y, et al. Circulating tumor DNA analysis for liver cancers and its usefulness as a liquid biopsy. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015;1:516-534.
26. Ng CKY, Di Costanzo GG, Tosti N, et al. Genetic profiling using plasma-derived cell-free DNA in therapy-naïve hepatocellular carcinoma patients: a pilot study. *Ann Oncol* 2018;29:1286-1291.
27. Howell J, Atkinson SR, Pinato DJ, et al. Identification of mutations in circulating cell-free tumour DNA as a biomarker in hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 2019;116:56-66.
28. Qu C, Wang Y, Wang P, et al. Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:6308-6312.
29. Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926-930.
30. Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18761-18768.
31. Cai ZX, Chen G, Zeng YY, et al. Circulating tumor DNA profiling reveals clonal evolution and real-time disease progression in advanced hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2017;141:977-985.
32. Cai Z, Chen G, Zeng Y, et al. Comprehensive liquid profiling of circulating tumor DNA and protein biomarkers in long-term follow-up patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2019;25:5284-5294.
33. Ren N, Qin LX, Tu H, Liu YK, Zhang BH, Tang ZY. The prognostic value of circulating plasma DNA level and its allelic imbalance on chromosome 8p in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:399-407.
34. Chan KC, Lai PB, Mok TS, et al. Quantitative analysis of circulating methylated DNA as a biomarker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem* 2008;54:1528-1536.
35. Kim SS, Eun JW, Choi JH, et al. MLH1 single-nucleotide variant in circulating tumor DNA predicts overall survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2020;10:17862.
36. Zhou L, Xu Y, Wang D, et al. Perioperative circulating tumor DNA analysis to predict patient prognosis in liver cancer. *J Clin Oncol* 2020;38:4593.
37. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8152-8162.
38. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol* 2017;23:5650-5668.
39. Strilic B, Offermanns S. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell* 2017;32:282-293.
40. Vona G, Estepa L, Beroud C, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 2004;39:792-797.
41. Patil MA, Gutgemann I, Zhang J, et al. Array-based comparative genomic hybridization reveals recurrent chromosomal aberrations and Jab1 as a potential target for 8q gain in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2005;26:2050-2057.
42. Thompson EW, Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat Med* 2011;17:1048-1049.
43. de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999;188:201-206.
44. Went PT, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:122-128.
45. Yu X, Wang B, Zhang N, et al. Capture and release of cancer cells by combining on-chip purification and off-chip enzymatic treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:24001-24007.
46. Sun C, Liao W, Deng Z, et al. The diagnostic value of assays for circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e7513.
47. Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology* 2013;57:1458-1468.
48. Zhou Y, Wang B, Wu J, et al. Association of preoperative EpCAM Circulating Tumor Cells and peripheral Treg cell levels with early recurrence of hepatocellular carcinoma following radical hepatic resection. *BMC Cancer* 2016;16:506.
49. Wang Z, Luo L, Cheng Y, et al. Correlation between postoperative early recurrence of hepatocellular carcinoma and mesenchymal circulating tumor cells in peripheral blood. *J Gastrointest Surg* 2018;22:633-639.
50. Yu JJ, Xiao W, Dong SL, et al. Effect of surgical liver resection on circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2018;18:835.
51. Kelley RK, Magbanua MJ, Butler TM, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls. *BMC Cancer* 2015;15:206.
52. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7:1535750.
53. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, et al. Membrane vesicles, current



- state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:2667-2688.
54. Arraud N, Linares R, Tan S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 2014;12:614-627.
  55. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep* 2020;10:1039.
  56. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3:Unit 3.22.
  57. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest* 2016;126:1152-1162.
  58. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int J Mol Sci* 2020;21:6466.
  59. Inglis HC, Danesh A, Shah A, Lacroix J, Spinella PC, Norris PJ. Techniques to improve detection and analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Cytometry A* 2015;87:1052-1063.
  60. Soo CY, Song Y, Zheng Y, et al. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* 2012;136:192-197.
  61. Kogej K, Bozic D, Kobal B, Herzog M, Cerne K. Application of dynamic and static light scattering for size and shape characterization of small extracellular nanoparticles in plasma and ascites of ovarian cancer patients. *Int J Mol Sci* 2021;22:12946.
  62. Wang W, Li H, Zhou Y, Jie S. Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark* 2013;13:351-357.
  63. Julich-Haertel H, Urban SK, Krawczyk M, et al. Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2017;67:282-292.
  64. Sun N, Zhang C, Lee YT, et al. HCC EV ECG score: An extracellular vesicle-based protein assay for detection of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2023;77:774-788.
  65. Sun N, Lee YT, Zhang RY, et al. Purification of HCC-specific extracellular vesicles on nanosubstrates for early HCC detection by digital scoring. *Nat Commun* 2020;11:4489.
  66. Abbate V, Marcantoni M, Giulianti F, et al. HepPar1-positive circulating microparticles are increased in subjects with hepatocellular carcinoma and predict early recurrence after liver resection. *Int J Mol Sci* 2017;18:1043.
  67. Wang Y, Zhang C, Zhang P, et al. Serum exosomal microRNAs combined with alpha-fetoprotein as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 2018;7:1670-1679.
  68. Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2014;2014:864894.
  69. Tian XP, Wang CY, Jin XH, et al. Acidic microenvironment up-regulates exosomal miR-21 and miR-10b in early-stage hepatocellular carcinoma to promote cancer cell proliferation and metastasis. *Theranostics* 2019;9:1965-1979.
  70. Kim SS, Baek GO, Ahn HR, et al. Serum small extracellular vesicle-derived LINC00853 as a novel diagnostic marker for early hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol* 2020;14:2646-2659.
  71. Huang X, Sun L, Wen S, et al. RNA sequencing of plasma exosomes revealed novel functional long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2020;111:3338-3349.
  72. Ghosh S, Bhowmik S, Majumdar S, et al. The exosome encapsulated microRNAs as circulating diagnostic marker for hepatocellular carcinoma with low alpha-fetoprotein. *Int J Cancer* 2020;147:2934-2947.
  73. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011;118:3680-3683.
  74. Asghar S, Waqar W, Umar M, Manzoor S. Tumor educated platelets, a promising source for early detection of hepatocellular carcinoma: Liquid biopsy an alternative approach to tissue biopsy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2020;44:836-844.
  75. Umu SU, Langseth H, Bucher-Johannessen C, et al. A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol* 2018;15:242-250.
  76. Koustas E, Trifylli EM, Sarantis P, et al. An insight into the arising role of microRNAs in hepatocellular carcinoma: Future diagnostic and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 2023;24:7168.
  77. Danielson KM, Rubio R, Abderazzaq F, Das S, Wang YE. High throughput sequencing of extracellular RNA from human plasma. *PLoS One* 2017;12:e0164644.
  78. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17:223-238.