

文章编号 1006-8147(2022)01-0020-07

论著

基于肿瘤突变负荷构建肝细胞癌风险评分预后模型

王凤松¹,朱刘洋¹,白易²,张雅敏²

(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300192;2.天津市第一中心医院肝胆外科,天津 300192)

摘要 目的:通过分析癌症基因组图谱数据库(TCGA)中肿瘤突变负荷(TMB)数据,构建并验证肝细胞癌(HCC)风险评分预后模型。方法:从TCGA数据库下载HCC患者体细胞突变数据、基因表达数据和临床信息。绘制HCC患者基因突变图谱,分析TMB水平与HCC患者预后的关系。利用生物信息学分析筛选预后基因并构建HCC风险评分预后模型,单因素及多因素分析评估模型预测能力。结果:基因突变图谱揭示了HCC患者基因突变特征。*Kaplan-Meier*分析显示低TMB组HCC患者总体生存率较高($\chi^2=6.632, P=0.01$),且较高的TMB水平与高龄($\chi^2=10.328, P=0.0017$)、男性($\chi^2=9.384, P=0.0029$)和N0分期($\chi^2=4.723, P=0.03$)有关。将所有HCC样本随机分为训练集($n=177$)和验证集($n=178$),在训练集中,生物信息学方法确定了*FABP6*、*PFKF*和*PROK1*3个预后基因并构建HCC风险评分预后模型:风险评分=($0.13208 \times FABP6$ 表达量)+($0.15383 \times PFKF$ 表达量)+($-0.18047 \times PROK1$ 表达量)。将训练集及验证集中样本按风险评分分为高风险组和低风险组,训练集中低风险组HCC患者总体生存率较高($\chi^2=66.725, P<0.0001$),验证集中结果相同($\chi^2=38.364, P<0.0001$)。单因素及多因素分析显示,风险评分($HR=2.016, 95\%CI: 1.356\sim 2.997, P<0.001$)、病理分期($HR=1.591, 95\%CI: 1.274\sim 1.987, P<0.001$)是HCC独立的预后因素。结论:TMB水平与HCC预后相关,风险评分预后模型具有良好的预后预测能力,是HCC患者的独立预后因素。

关键词 肝细胞癌;TCGA数据库;肿瘤突变负荷;预后模型

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

Identification of a risk score prognostic model of hepatocellular carcinoma based on tumor mutation burden

WANG Feng-song¹, ZHU Liu-yang¹, BAI Yi², ZHANG Ya-min²

(1.First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To construct and verify a risk score prognostic model of hepatocellular carcinoma (HCC) based on tumor mutation burden (TMB) data of the Cancer Genome Atlas (TCGA). **Methods:** Somatic mutation data, gene expression data and clinical information of HCC patients were downloaded from TCGA database. The gene mutation profiles of HCC patients were made, and the relationship between the level of TMB and the prognosis of HCC was analyzed. Prognostic genes were identified and HCC risk score prognosis model was constructed by bioinformatics analysis. Univariate and multivariate analysis were used to evaluate the predictive ability of the model. **Results:** The gene mutation profiles revealed the characteristics of gene mutation in patients with HCC. *Kaplan-Meier* analysis showed that the overall survival rate of HCC patients with low TMB was higher ($\chi^2=6.632, P=0.01$), and the higher TMB level was associated with older age ($\chi^2=10.328, P=0.0017$), male ($\chi^2=9.384, P=0.0029$) and N0 stage ($\chi^2=4.723, P=0.03$). All HCC samples were randomly divided into training set ($n=177$) and verification set ($n=178$). Three prognostic genes (*FABP6*, *PFKF* and *PROK1*) were determined by bioinformatics method in the training set, and the risk score prognostic model of HCC was constructed as follows: risk score = ($0.13208 \times FABP6$ expression) + ($0.15383 \times PFKF$ expression) + ($-0.18047 \times PROK1$ expression). The training set and validation set samples were divided into high-risk group and low-risk group according to risk score. In the training set, the overall survival rate of the low-risk group was higher ($\chi^2=66.725, P<0.0001$), and the result was same in the validation set ($\chi^2=38.364, P<0.0001$). Univariate and multivariate analysis showed that risk score ($HR=2.016, 95\%CI: 1.356\sim 2.997, P<0.001$) and pathological stage ($HR=1.591, 95\%CI: 1.274\sim 1.987, P<0.001$) were independent prognostic factors of HCC. **Conclusion:** The level of TMB is related to the prognosis of HCC. The risk score prognostic model has a good ability to predict the prognosis and is an independent prognostic factor for patients with HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; TCGA database; tumor mutation burden; prognostic model

原发性肝癌是世界范围内最常见的消化系统恶性肿瘤之一。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)

是原发性肝癌的主要病理类型,占85%~90%,5年生存率仅为12%,这也与大多数患者确诊时已处于晚期有关^[1]。目前,临床医生可以根据病理分期、肿瘤分级、淋巴结转移等临床信息预测HCC患者预后,但预测能力有限^[2]。因此,进一步探索新的生物标志

基金项目 天津市科技计划项目(19ZXDBSY00010)

作者简介 王凤松(1981-),男,硕士在读,研究方向:肝胆肿瘤;通信

作者:张雅敏, E-mail: 13802122219@163.com。

物对判断 HCC 患者预后和选择治疗方案具有重要意义。

近年来,随着针对 HCC 晚期患者的免疫检查点抑制剂(ICIS)的开发,其治疗策略发生了革命性的变化^[3]。肿瘤突变负荷(tumor mutation burden,TMB)和程序性死亡配体-1(PD-L1)的表达已逐渐成为多种肿瘤免疫检查点选择的最佳生物标志物,包括肺癌、结直肠癌、前列腺癌和乳腺癌^[4]。本研究从肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库下载多组学数据,探讨 TMB 水平与 HCC 预后的关系,并运用生物信息学方法筛选出 3 个与 TMB 相关的风险基因,建立风险评分预后模型。作为独立的预后因素,该预后模型为判断肝癌患者的预后和治疗方案的选择提供了一种新的工具,具有潜在临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 数据下载与处理 从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载截至 2020 年 12 月 1 日的 HCC 患者的多组学数据(删除病理类型为非 HCC 的样本),包括 364 例 HCC 组织和 49 例正常肝组织的 mRNA 表达数据(Illumina HiSeq RNA-Seq 平台)、354 例体细胞突变数据和 367 例患者临床资料。对基因表达数据进行注释(http://asia.ensembl.org/homo_sapiens/info/index),重复的基因计算表达量平均值,所有基因表达量进行 $\log_2(\text{基因表达值} + 1)$ 转换用于后续分析。

1.2 基因突变图谱及肿瘤突变负荷 通过“maftools”R 包^[5]绘制 HCC 患者基因突变图谱。运用 Perl 软件确定每个样本的基因突变总数以计算 TMB,基因突变包括碱基置换、编码移位、插入和缺失等。根据 X-Tile 软件(版本 3.6.1)^[6]产生的最佳截止值,将 HCC 样本分为高 TMB 组($n=279$)和低 TMB 组($n=69$)。Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验分析 TMB 水平与 HCC 患者总体生存率的关系。Wilcoxon 秩和检验和卡方检验分析 TMB 水平与 HCC 患者临床特征的相关性,包括年龄、性别、体重指数(BMI)、T 分期、M 分期、N 分期、病理分期、肿瘤分级及乙肝病毒感染。

1.3 构建并验证风险评分预后模型 将每个样本 TMB 数据与基因表达数据合并,利用“edgeR”R 包^[7],分析得到高、低 TMB 组之间差异表达基因及肝癌组织、癌旁组织之间差异表达基因($|\log_2 \text{FC}| > 1, \text{FDR} < 0.01$),两组差异表达基因取交集得到 TMB 相关差异表达基因。合并基因表达数据和生存数据,将 355 个肝癌样本随机平均分为训练集和验证集。根据 X-Tile 软件产生的最佳截止值,在训练集中对交

集差异表达基因进行批量生存分析,筛选 $P < 0.01$ (Log-rank 检验)的基因为预后相关差异表达基因以进一步分析。通过 LASSO(least absolute shrinkage and selection operator,1 000 次重复中出现 >950 次)及多元回归分析确定模型基因及风险系数。TMB 相关的风险评分预后模型构建如下:风险评分 = $\sum(\text{风险系数} \times \text{基因的表达式})$ 。计算训练集中每个样本的风险评分,由 X-Tile 软件确定的最佳截止值以分成高、低风险组,绘制风险评分的生存曲线,并通过受试者特征(ROC)曲线及曲线下面积(AUC)评估风险评分预后模型的预测性能。此外,在验证集中验证风险评分预后模型的预测能力。

1.4 独立预后因素分析 为评估 HCC 风险评分预后模型临床预测能力,将风险评分与其他临床特征(年龄、性别、BMI、病理分期、肿瘤分级和乙肝病毒感染)进行单因素和多因素分析。其中,单因素分析中具有统计学意义的变量被纳入多因素分析以确定独立预后因素。

1.5 统计学处理 采用 R 软件(版本 3.6.0)及 SPSS26.0 软件进行统计学分析及绘图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 患者基因突变图谱 TCGA 数据库 354 例 HCC 患者基因突变图谱中,327 例(92.7%)具有基因突变(图 1A),所有 HCC 样本基因突变量的中位值为 71。其中最常见基因突变类型是错义突变,但在某些基因中错义突变比例较小,如 AXIN1 和 RB1。单核苷酸多态性(SNP)是最常见的变异类型,C>T、T>C 和 C>A 是最常见的 SNP。HCC 中最常见的突变基因是 TP53(30%)、TTN(24%)、CTNNB1(25%),见图 1B。

2.2 TMB 与预后和临床特征有关 计算得到 HCC 患者 TMB,合并 TMB 数据和临床信息得到 348 个 HCC 样本(删除 6 个生存天数为 0 及缺乏生存信息的样本)。根据 X-tile 得到的最佳截止值($\text{TMB}=1.895$),将所有样本分为两组,其中高 TMB 组有 279 个样本,低 TMB 组有 69 个样本。Kaplan-Meier 分析表明低 TMB 组的 HCC 患者总体生存率较高($\chi^2=6.632, P=0.01$),见图 2。对 TMB 水平与临床特征的关系分析显示,较高的 TMB 水平与高龄($\chi^2=10.328, P=0.0017$)、男性($\chi^2=9.384, P=0.0029$)和 N0 分期($\chi^2=4.723, P=0.03$)有关(图 3)。

2.3 TMB 相关差异表达基因 合并 HCC 患者 TMB 数据和基因表达数据,高、低 TMB 组差异表达分析得到 690 个差异表达基因。其中在高 TMB 组,

282 个基因表达上调,408 个基因表达下调。对 364 个 HCC 组织和 49 个癌旁组织进行差异表达分析得到 8 562 个差异表达基因,在 HCC 组织中有 6 943 个基因表达上调和 1 619 个基因表达下调。两组差异表达基因取交集,共有 457 个与 TMB 相关的差异表达基因。

2.4 构建并验证风险评分预后模型 将基因表达数据和生存数据合并得到 355 个样本,按照 1:1 的比

例随机分组,其中训练集有 177 个样本,验证集有 178 个样本。在训练集中,457 个 TMB 相关差异表达基因进行批量生存分析显示,62 个基因与 HCC 患者预后显著相关(均 $P < 0.01$)。对 62 个基因进行 LASSO 分析得到风险基因为 *FABP6*、*PFKP* 和 *PROK1*,多元回归分析得到 3 个基因的风险系数分别为 0.132 08、0.153 83 和 -0.180 47。风险评分预后模型构建如下:风险评分=(0.13208×*FABP6* 表达量)+

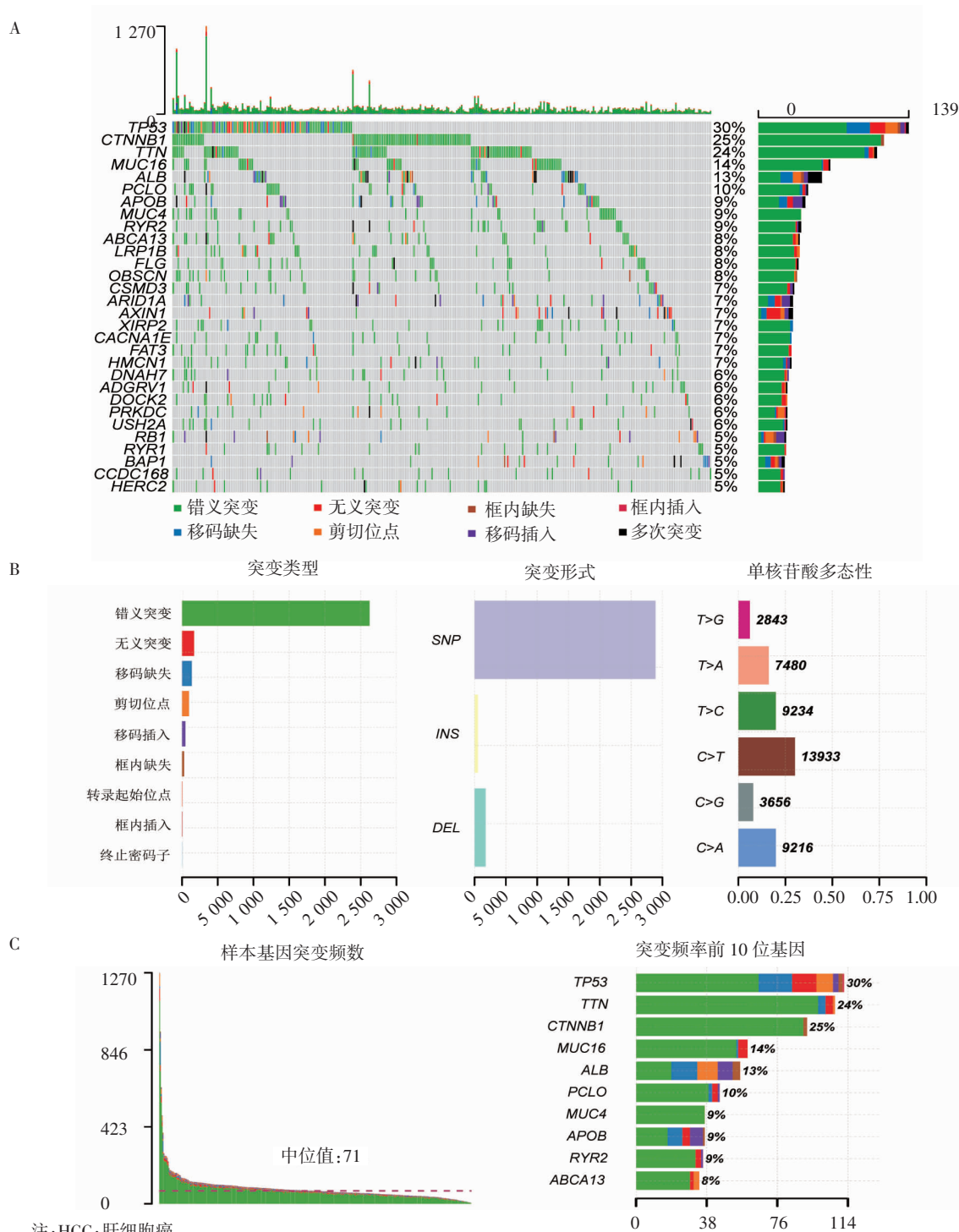
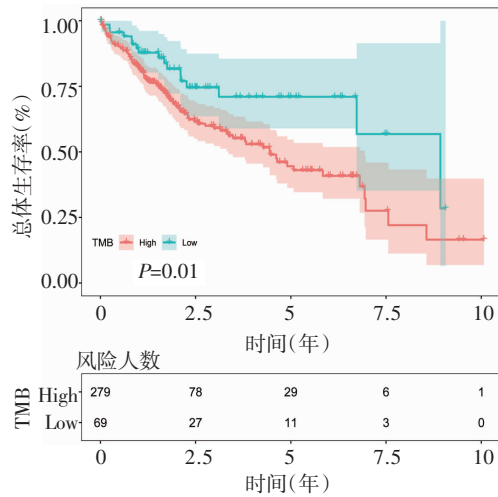


图 1 HCC 患者基因突变图谱

Fig 1 Gene mutation profiles of patients with HCC



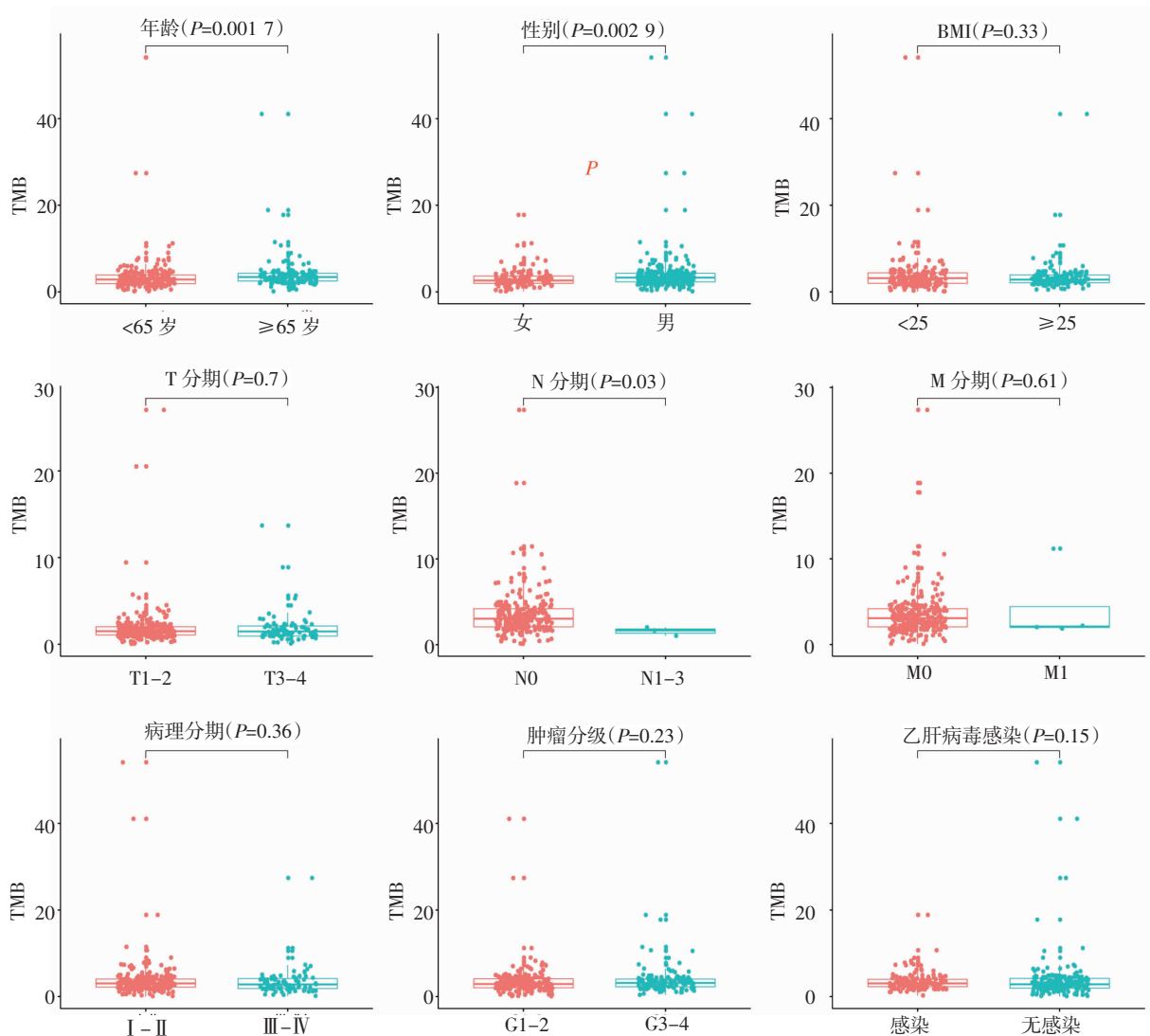
注:TMB:肿瘤突变负荷;HCC:肝细胞癌

图2 TMB水平与HCC患者总体生存率之间的关系

Fig 2 Relationship between TMB level and overall survival of patients with HCC

($0.153\ 83 \times PFKP$ 表达量) + ($-0.18047 \times PROK1$ 表达量)。计算训练集中每个样本的风险评分,根据 X-tile 软件生成的最佳截止值,高风险组有 49 个样本,低风险组有 128 个样本。*Kaplan-Meier* 分析显示低风险组 HCC 患者总体生存率较高 ($\chi^2=66.725$, $P<0.000\ 1$,图 4B),且 3 个模型基因均与预后显著相关(图 4A)。ROC 显示,该模型在 1 年、3 年及 5 年的 AUC 分别为 0.764、0.707、0.716,表现出良好的预后能力(图 4C)。

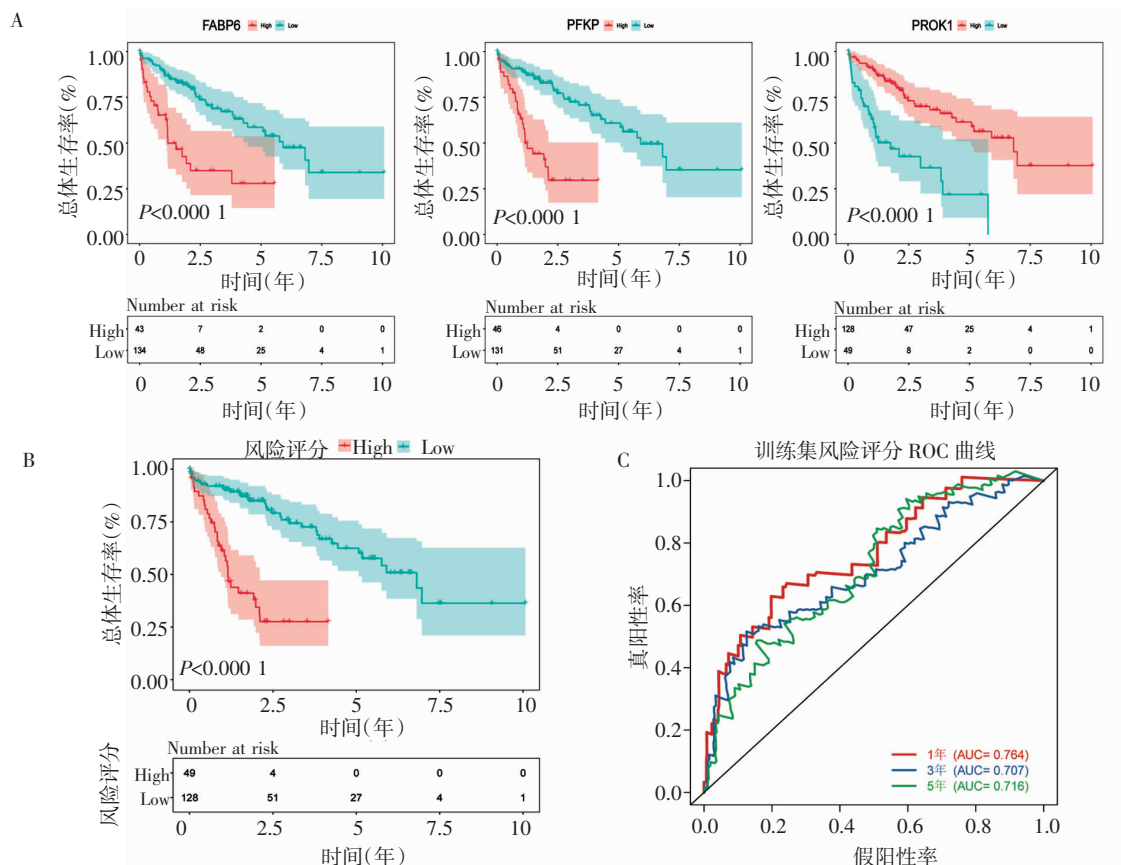
在验证集中,根据已建立的模型计算 178 个样本的风险评分,其中高风险组有 46 个样本,低风险组有 132 个样本。与训练集结果一致,*Kaplan-Meier* 分析显示低风险组 HCC 患者总体生存率较高 ($\chi^2=38.364$, $P<0.000\ 1$,图 5),且 3 个模型基因均与 HCC 患者预后相关。验证集中 ROC 曲线显示,该模型在 1 年、3 年及 5 年的 AUC 分别为 0.682、0.689、0.724。



注:TMB:肿瘤突变负荷;HCC:肝细胞癌;BMI:体重指数

图3 TMB水平与HCC患者临床特征的关系

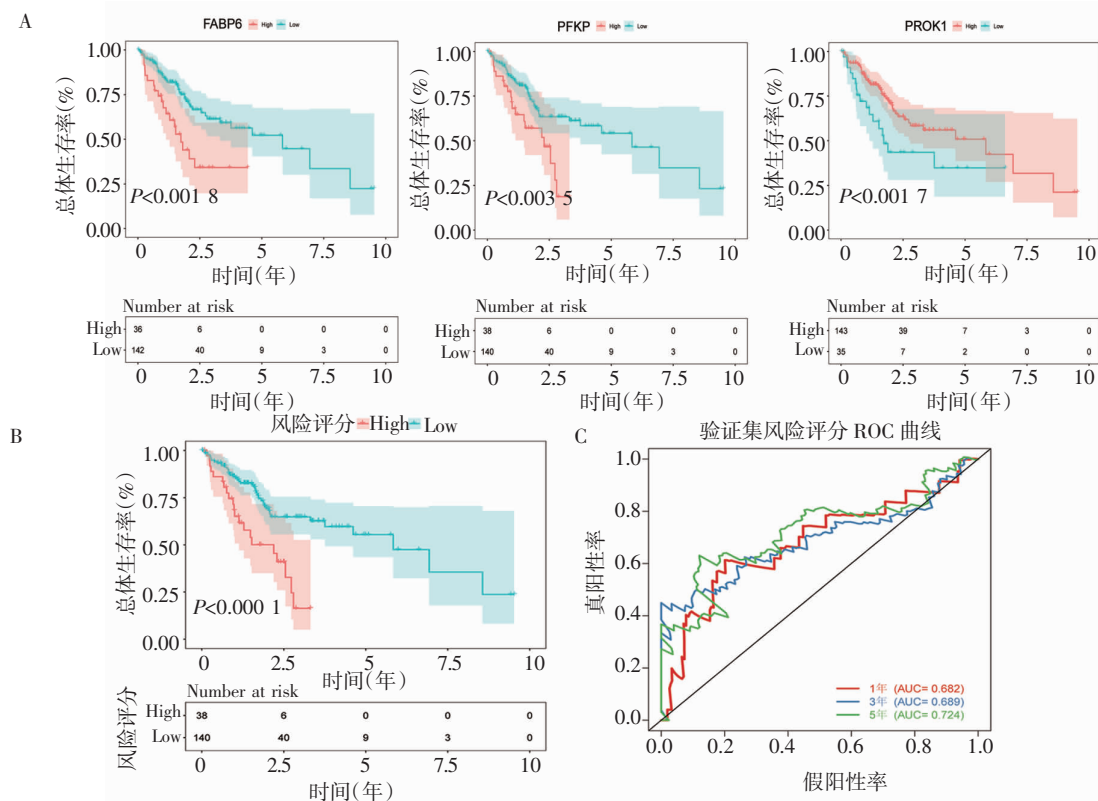
Fig 3 Relationship between TMB level and clinical characteristics of patients with HCC



注:A:3个模型基因与 HCC 预后的关系;B:风险评分与 HCC 预后的关系;C:训练集风险评分 ROC 曲线;HCC:肝细胞癌;ROC:受试者工作特征

图 4 训练集中构建风险评分预后模型

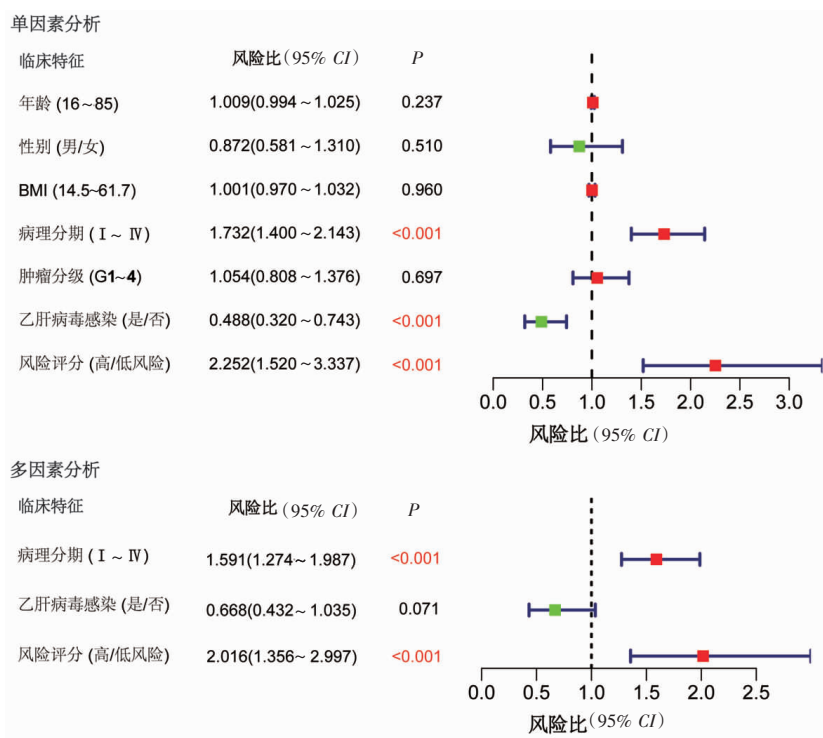
Fig 4 Construction of risk score prognostic model in training set



注:A:3个模型基因与 HCC 预后的关系;B:风险评分与 HCC 预后的关系;C:验证集风险评分 ROC 曲线;HCC:肝细胞癌;ROC:受试者工作特征

图 5 验证集中验证风险评分预后模型

Fig 5 Construction of risk score prognostic model in validation set



注: BMI: 体重指数; HCC: 肝细胞癌

图 6 风险评分及临床特征对 HCC 患者预后影响的单因素及多因素分析

Fig 6 Univariate and multivariate analysis of the influence of risk score and clinical characteristics on the prognosis of patients with HCC

2.5 单因素及多因素分析预后影响因素 将风险评分、年龄、性别、BMI、病理分期、肿瘤分级和病毒感染状态纳入单因素分析,其中风险评分($HR=2.252$, $95\%CI: 1.520\sim 3.337$, $P<0.001$)、病理分期($HR=1.732$, $95\%CI: 1.400\sim 2.143$, $P<0.001$)及病毒状态($HR=0.488$, $95\%CI: 0.320\sim 0.743$, $P<0.001$)与 HCC 预后显著相关。多因素分析结果显示,风险评分($HR=2.016$, $95\%CI: 1.356\sim 2.997$, $P<0.001$)及病理分期($HR=1.591$, $95\%CI: 1.274\sim 1.987$, $P<0.001$)为独立预后因素(图 6)。

3 讨论

由于其复杂的分子机制和细胞异质性, HCC 是我国致死率较高的恶性肿瘤之一^[8]。尽管在免疫治疗及靶向治疗方面取得了巨大进展,晚期 HCC 患者的预后仍然较差。HCC 患者的常见临床信息对判断预后具有一定的意义,但其预测能力有限。因此,发现新的生物标志物对更加准确预测 HCC 患者预后具有重要临床意义,有助于指导治疗方案的选择。

通过对 TCGA 数据库中 HCC 样本分析发现,低 TMB 的患者预后较好。作为一种新的生物标志物, TMB 与免疫抑制剂对非小细胞肺癌和恶性黑色素瘤的治疗效果有关^[9]。有研究证实,在非小细胞肺癌和恶性黑色素瘤中,高 TMB 的患者具有更好的预后,而在肾透明细胞癌、结肠癌和前列腺癌中则相反^[10]。

有研究表明,高 TMB 促进了自然杀伤(NK)细胞的激活, NK 细胞通过分泌血小板衍生因子和血管内皮细胞生长因子,促进血管生成和肿瘤进展^[11-12]。另外,由 NK 细胞分泌的干扰素- γ 增加了肿瘤细胞中 HLA-G 的表达,并抑制免疫应答,导致 HCC 患者预后较差,但其具体机制仍然需要进一步研究^[13-14]。

本研究通过生物信息学方法筛选出 3 个风险基因 (*FABP6*、*PFKP* 和 *PROK1*), 其中 *PFKP* 和 *FABP6* 的高表达与 HCC 患者预后不良有关,而 *PROK1* 可能与预后较好有关。*PFKP* 基因编码血小板型磷酸果糖激酶,作为糖酵解的重要调节酶,其异常表达与许多类型的肿瘤有关,包括肺癌、肾透明细胞癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤^[15-17]。除了促进肿瘤生长和增殖之外, *PFKP* 还通过与癌基因的相互作用在肿瘤转移中发挥着重要作用^[18]。*FABP6* 是脂肪酸结合蛋白之一,已被证明在结肠癌中的异常高表达可导致肿瘤的快速进展^[19]。Ohata 等^[20]发现,脂肪酸结合蛋白 5 可以通过上皮间充质转化,促进 HCC 的进展和转移,可作为 HCC 预后生物标志物和治疗靶标。Monnier 等^[21]发现,在 HCC 中 *PROK1* 具有抑制血管生成的效果,从而抑制肿瘤的增殖和迁移。

黄秀红等^[22]通过筛选 miRNA 构建 HCC 风险评

分模型,预测准确性均优于 TNM 分期,并可作为独立预测 HCC 患者预后的模型。杨双燕等^[23]基于生物信息学分析发现,细胞周期蛋白 B2 可作为肝癌潜在预后生物标志物。本研究基于 TMB,通过多组学分析识别预后生物标志物,构建了 HCC 风险评分预后模型,该模型在训练集和验证集中均具有良好的预测能力。此外,该风险评分模型被证明是独立预后因素,对于临床医生判断患者预后和选择适当的治疗方案有很大的帮助,可实现对 HCC 患者的个性化精准治疗。但是,本研究仍然存在很多不足,TCGA 数据库中的 HCC 样本量较少且多为西方国家人群,因此有必要扩大样本量及纳入国内测序结果,以提高模型的预测能力。其次,本模型缺乏外部验证,需要在外部数据库及临床样本中验证其预测能力。此外,3 个风险基因影响 HCC 预后的具体机制仍需进一步研究,其可能成为 HCC 治疗的新靶点。

综上所述,本研究利用生物信息学方法分析 TCGA 数据库中 HCC 样本多组学数据,发现低 TMB 水平与 HCC 预后较好显著相关,并基于 TMB 构建了 HCC 风险评分预后模型,该模型具有良好的预后能力,是 HCC 患者独立预后因素。因此,该模型能作为新的生物标志物判断 HCC 患者预后,对治疗方案的选择具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] MCGLYNN K A, PETRICK J L, ELSEERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 73: 10.
- [2] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301–1314.
- [3] 黄成, 朱小东, 沈英皓, 等. 免疫检查点抑制剂在肝细胞癌治疗中的特征[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2020, 26(1): 75–80.
- [4] LEE D W, HAN S W, BAE J M, et al. Tumor mutation burden and prognosis in patients with colorectal cancer treated with adjuvant fluoropyrimidine and oxaliplatin[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6141–6147.
- [5] MAYAKONDA A, LIN D C, ASSENOV Y, et al. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer[J]. *Genome Res*, 2018, 28(11): 1747–1756.
- [6] CAMP R L, DOLLED M, RIMM D L. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21): 7252–7259.
- [7] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140.
- [8] YANG J D, HEIMBACH J K. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. *BMJ*, 2020, 371: m3544.
- [9] GOODMAN A M, KATO S, BAZHENOVA L, et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(11): 2598–2608.
- [10] HEEKE S, BENZAQUEN J, MIRA E, et al. In-house implementation of tumor mutational burden testing to predict durable clinical benefit in non-small cell lung cancer and melanoma patients[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1271.
- [11] LU L, FU X, LI Z, et al. Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) is overexpressed in NK/T-cell lymphoma and mediates cell survival[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(2): 525–531.
- [12] KRZYWINSKA E, KANTATI C, KERDILES Y, et al. Loss of HIF-1 α in natural killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1597.
- [13] HODGE G, BARNAWI J, JURISEVIC C, et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- γ by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 178(1): 79–85.
- [14] WU Y, LI J, KABOLI P, et al. Natural killer cells as a double-edged sword in cancer immunotherapy: a comprehensive review from cytokine therapy to adoptive cell immunotherapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104691.
- [15] MOON J S, KIM H E, KOH E, et al. Krüppel-like factor 4 (KLF4) activates the transcription of the gene for the platelet isoform of phosphofructokinase (PFKP) in breast cancer [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23808–23816.
- [16] WANG J, ZHANG P, ZHONG J, et al. The platelet isoform of phosphofructokinase contributes to metabolic reprogramming and maintains cell proliferation in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 27142–27157.
- [17] LEE S Y, JIN C C, CHOI J E, et al. Genetic polymorphisms in glycolytic pathway are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35603.
- [18] PARK Y Y, KIM S B, HAN H D, et al. T at-activating regulatory DNA-binding protein regulates glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the platelet isoform of phosphofructokinase through microRNA 520[J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 182–191.
- [19] STORCH J, THUMSER A E. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(43): 32679–32683.
- [20] OHATA T, YOKOO H, KAMIYAMA T, et al. Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(5): 1049–1061.
- [21] MONNIER J, SAMSON M. Prokineticins in angiogenesis and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2010, 296(2): 144–149.
- [22] 黄秀红, 谢肖立, 姜慧卿. 微 RNA 风险评分模型预测肝细胞癌预后的价值分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(5): 1110–1115.
- [23] 杨双燕, 任红, 李传飞, 等. 基于生物信息学分析筛选肝细胞癌中的核心基因: 细胞周期蛋白 B2 可作为肝癌潜在的诊疗和预后生物标志物[J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(9): 773–783.

(2021-08-21 收稿)