

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2025070901

CSTR:32061.14.hjhx.2025070901

吕政贤, 杨剑鑫, 刘平果, 等. 基于 DNA 逻辑门的 SP-ICP-MS 细胞外囊泡分析平台用于肝细胞癌的早期诊断[J]. 环境化学, 2025, 44(10): 3576-3587.

LV Zhengxian, YANG Jianxin, LIU Pingguo, et al. DNA Logic Gate-Based SP-ICP-MS extracellular vesicles analysis platform for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Environmental Chemistry, 2025, 44 (10): 3576-3587.

基于 DNA 逻辑门的 SP-ICP-MS 细胞外囊泡分析平台用于 肝细胞癌的早期诊断*

吕政贤^{1,3†} 杨剑鑫^{4†} 刘平果² 严晓文^{1**} 王秋泉^{1**}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 厦门, 361005; 2. 厦门大学附属中山医院肝胆外科, 福建省慢性肝病和肝细胞癌重点实验室, 厦门, 361004; 3. 国科大杭州高等研究院环境学院, 浙江省新污染物环境与健康重点实验室, 杭州, 310024; 4. 莆田学院附属医院, 莆田学院, 莆田, 351100)

摘 要 细胞外囊泡 (EVs) 因承载多种疾病相关蛋白而被认为是提升诊断效能的重要标志物. 本文提出了一种基于 DNA 逻辑门的 EVs 表面多蛋白联合分析策略, 通过单颗粒电感耦合等离子体质谱 (SP-ICP-MS) 对 EVs 的精准定量分析, 实现肝细胞癌 (HCC) 的早期诊断. 本方法设计了可识别 EpCAM (上皮细胞黏附分子)、GPC3 (硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 3) 和 CD63 (分化簇 63) 3 种蛋白的适配体-DNA 逻辑回路, 利用多标志物共定位的方式对 EVs 进行特异性识别, 进而触发滚环扩增反应, 生成特征 DNA 序列并与纳米金探针杂交, 实现 SP-ICP-MS 信号放大检测. 该策略显著提升了肿瘤 EVs 识别的特异性, 有效克服了传统方法灵敏度不足及血清基质干扰等难题, 检测限可达 950 particles· μL^{-1} . 应用于 50 例临床样本检测结果显示, EpCAM/GPC3/CD63 三阳性表达的 EVs 亚群可用于区分 HCC 与肝硬化患者, 诊断敏感度为 82.4%, 特异性为 91.3%, 优于常规血清甲胎蛋白检测. 本研究所提出的 SP-ICP-MS 血清 EVs 分析策略为 HCC 的早期诊断提供了新思路, 同时也推动了 SP-ICP-MS 技术在精准医学中的进一步应用.

关键词 肝细胞癌, 细胞外囊泡, DNA 逻辑回路, SP-ICP-MS, 早期诊断.

中图分类号 X-1; O6 **文献标识码** A

DNA Logic Gate-Based SP-ICP-MS extracellular vesicles analysis platform for early diagnosis of hepatocellular carcinoma

LV Zhengxian^{1,3†} YANG Jianxin^{4†} LIU Pingguo²
YAN Xiaowen^{1**} WANG Qiuquan^{1**}

(1. Department of Chemistry & the MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis and Instrumentation, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, 361005, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory for Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma, Xiamen, 361004, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Environment and Health of New Pollutants, School of Environment, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou, 310024, China; 4. The Affiliated Hospital of Putian University, Putian, 351100, China)

2025 年 7 月 9 日收稿 (Received: July 9, 2025).

* 国家自然科学基金 (22193053, 21535007, 22074127) 和国家重点研究与发展计划项目 (2022YFF0710200) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (22193053, 21535007, 22074127) and the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0710200).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: xwyan@xmu.edu.cn; qqwang@xmu.edu.cn

† 作者贡献相同 **Contribute equally**.

Abstract Extracellular vesicles (EVs), carrying multiple disease-related proteins, have emerged as promising markers to enhance diagnostic performance in early hepatocellular carcinoma (HCC) detection. In this study, we propose a DNA logic gate-based strategy for multiplexed protein biomarker-based detection on the surface of extracellular vesicles (EVs), enabling highly sensitive quantification of HCC-derived EVs using single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) for precise early diagnosis of HCC. The method employs aptamer-based DNA logic circuits capable of recognizing EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), GPC3 (Glypican-3), and CD63 (Cluster of Differentiation 63) proteins. Upon co-localization of these markers on EVs, the system triggers a rolling circle amplification (RCA) reaction to generate characteristic DNA sequences, which then hybridize with gold nanoparticle probes, thereby enabling signal amplification and subsequent SP-ICP-MS detection. This approach significantly enhances the specificity of tumor EVs recognition, and effectively overcomes the limitations of conventional methods, such as low sensitivity, and interference from complex serum matrices. The detection limit for EVs reaches down to $950 \text{ particles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The EVs subsets with positive expressions of EpCAM, GPC3 and CD63 were used to distinguish patients with hepatocellular carcinoma from those with liver cirrhosis, the diagnostic sensitivity and specificity of triple-positive EVs were 82.4% and 91.3%, respectively, outperforming conventional serum alpha-fetoprotein (AFP) testing. In conclusion, this study proposes a novel serum EVs analysis strategy, offering a new approach for the early diagnosis of HCC and promoting the further application of SP-ICP-MS technology in precision medicine.

Keywords hepatocellular carcinoma, extracellular vesicles, DNA logic gates, SP-ICP-MS, early diagnosis.

近年来,随着工业化进程加快,环境中各种污染物不断积聚,通过诱导慢性炎症、氧化应激反应及细胞遗传毒性损伤等机制,显著增加了癌症的发病风险^[1,2]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内最常见的原发性肝癌类型,具有发病率高、进展快和预后差的特点。尽管近年来诊疗手段不断发展,但由于 HCC 早期多无明显症状,超过 70% 的患者在确诊时已处于中晚期,错过了手术切除或局部治疗的最佳窗口^[3-6]。因此,发现高敏感性、高特异性、可在早期阶段实现精准识别的生物标志物是提高 HCC 患者总体生存率的关键环节,也是当前肝癌研究领域的核心科学问题之一。目前,血清甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP)仍是最常用的 HCC 血清标志物。然而,大量研究证实,AFP 作为单一生物标志物的敏感性和特异性均存在明显缺陷^[7,8]: 约 30%—40% 的早期 HCC 患者 AFP 水平并无升高;同时,慢性乙型肝炎、丙型肝炎以及肝硬化等良性肝病患者亦可出现 AFP 轻度升高,增加了假阳性率,严重影响其筛查效能。为此,研究者尝试引入 AFP-L3(AFP 异质体)、PIVKA-II(蛋白诱导的维生素 K 缺乏或拮抗物-II)等新指标,开展多指标联合检测以提升诊断性能^[9,10]。尽管这些策略在部分研究中表现出优于 AFP 单独检测的诊断效能,但仍无法解决肝硬化背景下标志物表达交叉干扰的问题,且未形成统一的标准化检测和解读方案,限制了其推广施用。

随着液体活检概念的提出,研究者开始聚焦于非侵入性、动态可监测的新型生物标志物。其中,细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)因其高度稳定性、生物来源特异性和分子负载能力,成为 HCC 早期诊断领域极具前景的标志物载体^[11,12]。EVs 是细胞主动分泌的纳米级膜性囊泡,广泛存在于血液、尿液、唾液等体液中,能够携带多种生物信息分子(包括蛋白质、核酸、脂类等),并反映其母细胞的生理或病理状态。相比传统血清蛋白标志物, EVs 表面蛋白具备以下优势^[13]: (1) 稳定性高: 其磷脂双层膜结构可有效保护内部及表面分子免受体液中酶的降解,保障检测过程中信号的稳定性和可靠性; (2) 特异性强: EVs 膜蛋白来源于特定组织细胞,具有良好的组织与疾病特异性,有助于区分肿瘤来源 EVs 与其他背景噪声; (3) 灵敏性好: 多项研究证实, EVs 表面蛋白表达水平与肿瘤负荷、恶性程度密切相关,具备良好的早期诊断与疾病动态监测价值。尽管 EVs 在乳腺癌^[14]、肺癌^[15]、胰腺癌^[16]等多种肿瘤中的诊断潜力已得到初步验证, EVs 在 HCC 早期筛查中的转化仍面临一系列问题: 首先,目前多数

研究聚焦于单一 EVs 标志分子(如 miRNA、lncRNA 或某一膜蛋白), 缺乏多标志物协同识别的策略, 导致诊断灵敏性和特异性仍受限; 其次, EVs 的分离纯化过程繁琐, 传统超速离心或免疫富集技术往往回收率低、操作复杂, 不利于临床推广; 此外, 当前 EVs 的检测手段在技术上仍存在诸多限制. 例如, 流式细胞术虽然可在单颗粒水平分析, 但对纳米级 EVs 分辨率不足, 且受荧光串扰和背景信号干扰, 尤其在复杂血清环境中特异性下降. ELISA 作为经典免疫检测方法, 具备高通量和良好重复性, 但依赖单一标志物, 难以解析 EVs 的异质性, 其定量能力也受限于酶促反应效率和背景噪声. 因此, 迫切需要构建能够在单颗粒水平上实现多标志物精准识别的技术平台, 并发展具有高通量、简便化和临床可转化潜力的检测方法.

近年来, 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)因其具有超高的灵敏度、分辨率和强的抗基质干扰能力等优势, 在生物分子分析领域得到了广泛应用. 得益于元素标记策略的发展, 已成功实现对蛋白^[17]、核酸^[18], 甚至细胞^[19]、细菌^[20]等基本生物单位的检测. 与传统荧光检测技术相比, SP-ICP-MS 配备硬电离源, 可显著避免背景干扰, 特别适用于复杂生物样本中痕量组分分析.

基于此, 本研究选取 EpCAM(上皮细胞黏附分子)、GPC3(硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 3)和 CD63(分化簇 63)的 3 种 EVs 表面蛋白作为 HCC 来源 EVs 的特异性标志物^[21-23], 构建了一种以 DNA 逻辑门为核心的多标志物识别平台, 结合 SP-ICP-MS 用于肝癌来源 EVs 的高灵敏检测, 其工作原理如图 1 所示. 在 3 种蛋白共定位的条件下, DNA 回路被激活, 进而引发滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)反应, 生成高拷贝数的 DNA 序列. 扩增产物可进一步与修饰有互补序列的单分散 DNA-AuNPs 发生杂交反应, 形成纳米金聚集体, 从而实现 EVs 的 SP-ICP-MS 检测. 相比流式细胞术和 ELISA 等传统 EVs 检测手段, 本策略具备更强的定量能力与抗背景干扰能力, 其可在未经预纯化的血清样本中实现多标志物 EVs 亚群的精准检测. 初步临床样本研究表明, 该策略可有效区分健康人、肝硬化患者与 HCC 患者血清中的 EVs 表达特征, 且 EpCAM/GPC3/CD63 三阳性 EVs 在区分 HCC 与良性肝病方面的表现优于传统血清 AFP. 这为构建高性能、可转化的 HCC 早期诊断平台提供了新的技术支撑, 展现出应用前景.

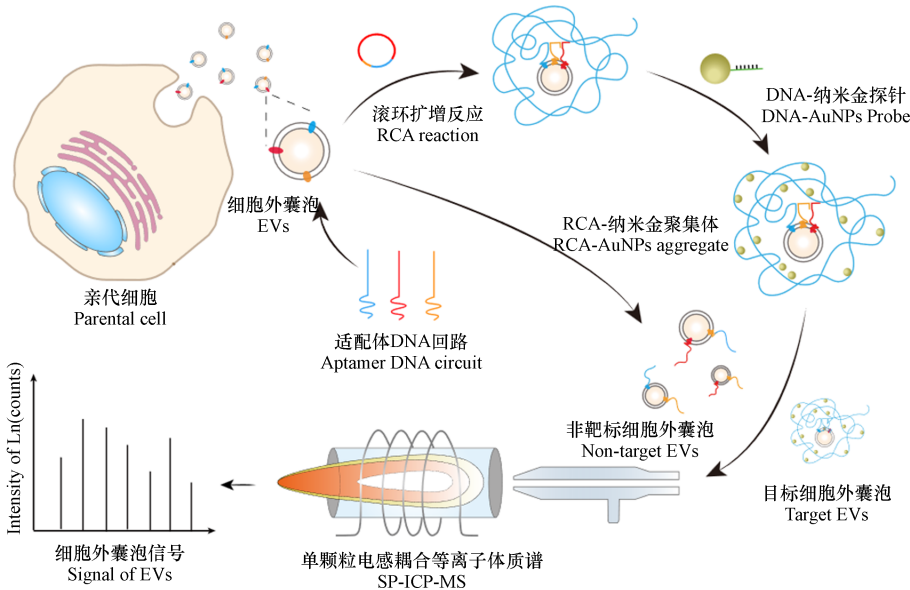


图 1 DNA 回路介导的 RCA 信号放大策略用于 EVs 的 SP-ICP-MS 分析原理示意图
Fig.1 Principle of the DNA loop-mediated RCA signal amplification strategy for SP-ICP-MS analysis of EVs

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与试剂

本工作所用的微孔板荧光仪为 Molecular devices, SpectraMax iD3, 激发波长设置为 488 nm, 发射波

长为 520 nm; 流式细胞术实验使用 Beckman Coulter, CytoFLEX 流式; 超速离心机为 Optima XE-90 Ultracentrifuge. 单颗粒电感耦合等离子体质谱仪型号为 PerkinElmer NexION 2000. DNA 序列均由上海生工生物技术公司(Sangon Biotech, Shanghai, China)定制合成, 并经高效液相色谱系统(HPLC)纯化, 寡核苷酸的序列及修饰见表 1. Phi29 DNA 聚合酶(Phi29)、脱氧核糖核酸混合物(dNTPs)同样购自生工生物技术公司. 酵母 t-RNA 购自上海源叶生物科技有限公司. 人类肝癌细胞(HepG2)、人正常肝细胞(HL7702)购自中国科学院上海细胞库, 用含有 10% 胎牛血清(FBS)和双抗($0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素/链霉素)的 DMEM 完全培养基培养, CO_2 含量 5%, 温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 待细胞密度为 80% 左右时进行传代操作. 血清标本取自厦门大学附属中山医院.

表 1 本工作中使用的寡核苷酸序列
Table 1 Oligonucleotide sequences employed in this work

寡核苷酸 Oligonucleotide	序列 Sequence (5'-3')
Trip-HP-A	CACAAGCAACCTTAACCTGTGACGTGTTTTTTTTTTTTTTT TTCCACTTCCAT
B ₄₋₄	CTCACCTACCACCTTTTTTTTTTTTTTTTACGTCACCCTCGTTCCAGTATT
B ₄₋₅	CTCACCTACCACCTTTTTTTTTTTTTTTTACGTCACCCTCGTTCCAGGATT
B ₅₋₆	CTCACCTACCACCTTTTTTTTTTTTTTTTACGTCACCCTCGTTCCAGGTTT
C	TGCTTACTGTCATTTTTTTTTTTTTTTACCTGGCATCCCATGTGTCTT
T _{A+B}	ATGGAAGTGGAATTTTTTTTTTTTGTGGTAGGTGAG
T _{A+C}	ATGGAAGTGGAATTTTTTTTTTTTGACAGTAAGCA
T _{B+C}	GTGGTAGGTGAGTTTTTTTTTTTGACAGTAAGCA
T _{A+B+C}	ATGGAAGTGGAATTTGTGGTAGGTGAGTTTGACAGTAAGC
Blocker ₁₅	CATCCCATGTGTC-BHQ
Blocker ₁₈	TCGCATCCCATGTGTC-BHQ
FAM-Report	FAM-GACACACATGGGATGCGAGGGTTAAGGTTG
FAM-CD63	FAM-TTTTCACCCACCTCGTCCCGTGACACTAATGCTA
FAM-EpCAM	CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGGTTGGCCTGTTTT-FAM
FAM-GPC3	FAM-TTTTAACGCTGACCTTAGCTGCATGGCTTTACATGTTCCA
Triplex-CD63	CACAAGCAACCTTAACCTGTGACGTGTTTTTTTTTTTTTTTTCACCCACCTCGTCCCGTGACAC TAATGCTA
Triplex-GPC3	TAACGCTGACCTTAGCTGCATGGCTTTACATGTTCCATTTTTTTTTTTTTTTTACGTCACCCTCG TTCCAGGATT
Triplex-EpCAM	CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGGTTGGCCTGTTTTTTTTTTTTTTTACCT GGCATCCCATGTGTCTT
RCA Template	GACACACATGGGATGCGAGGGTTAAGGTTGTTCTCACACTCACCTACCAGATTCGCTTGGTAGGTGA GAGACGCTCTGGCATATACAAGACAGTA
RCA Blocker	TCGCATCCCATGTGTCTTTT-Inverted dT
Label DNA	SH-TTTTTTTTTTTTTT GACACACATGGGATG

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 逻辑回路的构建

将 DNA 用 $1\times$ PBS 配置成浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 在 96 孔板中将 DNA 回路的工作序列按以下顺序混合至最终反应浓度为 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HP-A 链、 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ B 链、 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ C 链, $20\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Target 链, 溶液总体积为 $100\text{ }\mu\text{L}$, 缓冲条件为 $1\times$ PBS, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 室温孵育 10 min 后, 向溶液中加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ $400\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 报告链 R(FAM-Report), 采用 488 nm 的激发波长, 在发射波长 520 nm 处测定荧光强度. 动力学研究中, 荧光测量在室温下每 5 分钟进行 1 次, 总分析时间为 1 h. 在 DNA 回路的优化以及线性测试中, 依据实验情况选择不同的 Target 链和浓度.

1.2.2 DNA-AuNP 探针的制备

将 $50\text{ }\mu\text{L}$ 巯基修饰的 Label DNA($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $10\text{ }\mu\text{L}$ TCEP($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 $1\text{ }\mu\text{L}$ NaAc-HAc 缓冲液($500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.2)混合并孵育 1 h 以还原二硫键. 还原后的 Label DNA 与 5 mL AuNPs 溶液混

合, 旋转孵育 6 h. 分 6 次向溶液中逐滴加入 1M NaCl, 直至溶液中 NaCl 浓度达到 200 mmol·L⁻¹, 注意摇匀后再滴加下一滴, 每次滴加完后继续孵育 6 h 13000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 弃去上清液, 使用 1 mL 超纯水将沉淀重悬, 重复清洗 10 次, 最后 DNA-AuNPs 保存在超纯水中以供进一步使用.

1.2.3 DNA 回路介导的 RCA 扩增

向含有 50 nmol·L⁻¹ DNA 逻辑回路工作链的 96 孔板中加入 20 μ L Target 链/EVs 样品, 总体积调整至 100 μ L. 缓冲条件为 1 $\times$ PBS(含 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1 mg·L⁻¹ BSA 和 0.1 mg·L⁻¹ 酵母 t-RNA), 将混合物在室温下孵育 30 min 后, 加入 10 μ L 浓度为 400 nmol·L⁻¹ 的环形 RCA 扩增模板链, 并继续反应 1 h. 取 15 μ L 反应液, 依次加入 1 μ L 10 $\times$ Reaction Buffer 溶液、2 μ L 10 mmol·L⁻¹ dNTP 混合物以及 1 μ L Phi29 DNA 聚合酶(20 U), 并在 35 $^{\circ}$ C 条件下反应 1 h 以完成 RCA 扩增.

1.2.4 细胞培养基 EVs 提取

细胞培养基经低速(4200 r·min⁻¹, 20 min)和高速(9400 r·min⁻¹, 20 min)离心去除细胞及碎片后, 将上清液转入超速离心管中(30000 r·min⁻¹, 2 h)沉淀 EVs, 并用 PBS 重悬后再次超速离心洗涤以去除污染蛋白. 最终用 100 μ L PBS 重悬 EVs, -80 $^{\circ}$ C 分装保存, 避免反复冻融. 用纳米流分析仪分析 EVs 的大小和颗粒数, 纯化后的 EVs 浓度为 1.5×10^7 particle· μ L⁻¹.

1.2.5 流式细胞术表征 EVs 表面蛋白

将 30 μ g EVs 与乳胶醛微珠(4 μ m)在室温孵育 15 min 后加 PBS 稀释并继续孵育 30 min, 随后加入封闭液(1 mol·L⁻¹ 甘氨酸和 2% BSA)终止反应. 微珠经两次离心清洗(8000 r·min⁻¹, 3 min, PBS 含 2% BSA)后重悬于 40 μ L 含 0.5% BSA 的 PBS 中. 取 4 μ L 微珠与 FAM 标记适配体(200 nmol·L⁻¹)在室温孵育 30 min, 经结合缓冲液洗涤后重悬于 500 μ L PBS 中, 通过流式细胞术检测荧光信号.

1.2.6 肝细胞癌 EVs 的 SP-ICP-MS 分析

RCA 扩增结束后, 取 1 μ L 反应液与 10 μ L DNA-AuNPs(100 pmol·L⁻¹)混合, 再加入 1 μ L 10 $\times$ PBS 缓冲液, 在室温下孵育 30 min. 之后, 加入 10 μ L 40 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 溶液, 测试前先用 PBS 将混合物稀释 20 倍, 最后取 5 μ L 用超纯水进一步稀释 200 倍后立即用于 SP-ICP-MS 进样分析. 样品注入的速度设置为 10 μ L·min⁻¹, 补充液为超纯水, 流速 15 μ L·min⁻¹, 雾化器流量 1.2 L·min⁻¹, 驻留时间 50 μ s, 脉冲信号采集时间为 40 s.

1.2.7 统计学分析

采用 Origin 9.0 和 Excel 对 SP-ICP-MS 测试数据进行处理, 以 AuNPs 在 SP-ICP-MS 中的脉冲信号为阈值, 将高于该阈值的信号视为有效信号, 而低于该阈值的则被视为背景信号. 对 AuNPs 阈值的计算基于 3 次标准差(3 σ)的迭代算法: (1)计算整个数据集的平均信号值和标准差, 收集大于 3 σ 和平均值之和的数据. (2)用同样的方法重新计算简化后的数据集, 直到没有数据点高于 3 σ 与平均值之和, 将高于该阈值的所有信号收集起来. (3)由于每个单颗粒峰都包含了若干数据点, 所以将一组连续信号的频率计为 1 次, 使用 Excel 宏编程进行频率统计. 采用 GraphPad Prism 9.0 软件对临床样本数据进行处理, 基于方差分析(ANOVA test)对不同患者血清样本中 EVs 浓度进行差异比较. 采用 ROC 曲线描述各种指标(血清 AFP 浓度、EVs 亚群浓度)对 HCC 诊断的敏感度和特异性.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 三靶标 DNA 逻辑回路的设计

DNA 逻辑回路基于“邻近重构”的设计原理, 其 3 条工作序列在同步识别特定靶标后, 通过邻近作用驱动原本分离的工作序列重新组装, 从而形成一个介稳结构域, 进而启动 DNA 回路的链置换反应并释放信号. 为了进行概念验证, 首先用单链 DNA 作为模拟靶标构建一个理想的 DNA 回路运行体系, 以方便进行序列的优化. DNA 回路包含 3 个组分, 工作序列(HP-A, B, C)、报告序列 R 和目标序列 T(图 2A). 其中报告序列 R 是一个双链结构, 包含一条 3'端标记有 BHQ 猝灭基团的 Blocker 序列和一条 5'端标记有 FAM 荧光基团的信号序列. 三靶标回路的激活过程如图 2A 所示, 报告序列 R 在初始状态下荧光被 Blocker 猝灭; 当分离的三条工作序列(HP-A, B, C)与目标链 T 杂交后, 三条链彼此接近而

导致局部浓度急剧增加, HP-A 与 B 之间转化为关联区域 dd', B 与 C 之间形成关键区域 ee'; 三条链在 dd' 和 ee' 的介导下重构形成一个介稳结构域(a+b+c), 最终在 R 的立足点区域 a' 的介导下完成链迁移反应, Blocker 序列在链迁移的过程中被释放, R 荧光信号恢复.

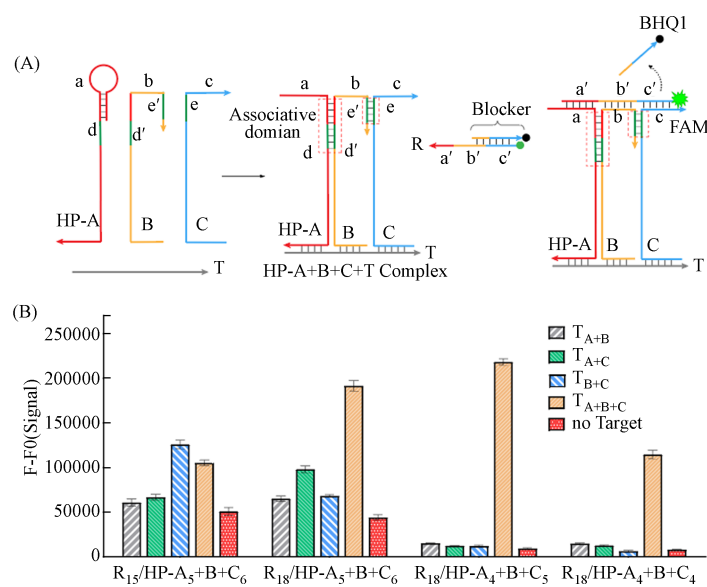


图 2 三靶标 DNA 回路设计(A)及 DNA 回路探针的优化(B)

注: 反应条件: 探针浓度 50 nmol·L⁻¹, 目标链浓度 20 nmol·L⁻¹, 报告链浓度 40 nmol·L⁻¹, 反应时间 1 h (n=3)

Fig.2 (A) Principle of the triplex-based DNA circuit. (B) Optimization of DNA circuit probe

Note: DNA circuit probe 50 nmol·L⁻¹, target sequence 20 nmol·L⁻¹, report sequence 40 nmol·L⁻¹, reaction time 1 h (n=3)

为了防止 DNA 回路没有靶标参与的情况下, 自发启动出现“泄漏”现象而造成信噪比降低, 将 HP-A 链中的 a 区域以“发夹锁”的形式“封闭”起来, 保证在静态条件下 A、B 链不会发生非特异性的杂交, 最大程度地减少 DNA 回路的泄漏. 另一方面, 对 Blocker 长度, A、B 链之间结合域 dd' 的双链长度, B、C 链结合域 ee' 的长度进行了优化, 这些因素不仅影响着 DNA 回路的整体泄漏程度, 也会关系到 DNA 回路在后面应用时的选择性和灵敏度. 图 2B 中对不同长度结构域 dd'、ee'、Blocker 的组合进行了比较: 当 Blocker 长度为 15 个碱基时(R15), R15/HP-A5+B+C6 的组合不仅出现十分严重的非特异性信号, 而且对不同的靶标序列几乎没有选择性, 甚至是出现了 TB+C>TA+B+C 的情况, 这意味着 15 nt 的 Blocker 长度过短, 不足以提供足够的自由能垒去限制 DNA 回路的非特异性启动; 当 Blocker 长度从 15 nt 增加到 18 nt (R18/HP-A5+B+C6)时, 可以看到 TA+B+C 信号显著增强且对 TB+C 的选择性大幅提高, 这是因为采用较长的 Blocker 一方面可以在热力学上限制 TB+C 的非特异性反应, 另一方面相当于缩短了立足点的长度, 加快了 R18 的周转率, 促进了反应动力学; 继续对 dd'、ee' 进行优化, 当 dd' 关联长度从 5 nt(HP-A5)减小到 4nt(HP-A4)时, 泄漏显著减少且选择性大幅提高, 因此, 结合域 dd' 被限制在 4 nt, 而 ee' 长度保持在 5 nt, 最终得到最佳 DNA 回路的组合为 R18/HP-A4+B+C5.

在构建三靶标 DNA 回路后, 进一步考察了缓冲液环境中 DNA 回路对不同浓度(500 pmol·L⁻¹、1 nmol·L⁻¹、5 mol·L⁻¹、10 nmol·L⁻¹、20 nmol·L⁻¹)靶标序列的实时荧光响应情况(图 3 A), 以评估其性能是否满足 EVs 的分析. 初始体系含有 50 nmol·L⁻¹ 工作序列(HP-A, B, C)和 40 nmol·L⁻¹ 报告序列 R, 监测时间为 120 min. 没有目标序列 T 时, 荧光动力学数据表明系统泄漏几乎不可见且保持稳定, 因此该 DNA 回路体系具有低背景的信号特点. 为了在转化率和反应时间之间找到一个平衡点, 设置了反应时间为 1h, 并以靶序列 T 浓度为横坐标 x, 溶液荧光强度 F-F0 数值为纵坐标 y 绘制标准曲线(图 3 B), 标准曲线公式为 $Y=10787X+10869$, $R^2=0.997$, 而在 20 nmol·L⁻¹ 的靶序列 T 存在的情况下最多可以产生高达 14.5 的信噪比(S/N), 根据 $3\sigma/\text{slope}$ 计算出的检测限为 418 pmol·L⁻¹, 该 DNA 回路优良的线性关系, 高信噪比为后续 EVs 的特异性标记提供了良好的可行性.

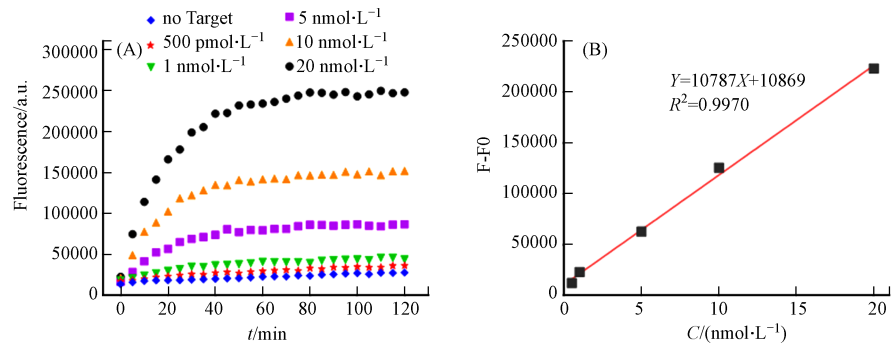


图 3 (A)不同靶标浓度下 DNA 回路动力学反应监测;(B)测试时间为 1 h 时 DNA 回路靶标浓度与的信号间线性关系 ($n=3$)

Fig.3 (A) Kinetic profile of the DNA circuit working in the presence of varying concentrations of target; (B) The equilibrium signal at $t = 1$ h plotted with the corresponding target concentrations tested ($n=3$)

2.2 DNA 回路介导的 SP-ICP-MS 信号放大检测

SP-ICP-MS 因其灵敏度高、扫描速度快、抗基质干扰能力强,已成为纳米颗粒分析的重要技术. 其原理在于: 每个金属纳米颗粒进入等离子体后会产生一个短暂、独立的信号脉冲, 信号强度与颗粒中金属元素的含量成正比. 由于单个纳米颗粒和其聚集体在信号强度上存在显著差异, SP-ICP-MS 能够在高稀释条件下准确区分单颗粒与聚集体, 并实现聚集事件的定量分析, 无需复杂的分离与洗脱步骤. 因此, 基于其单颗粒分辨能力, 设计了一种以 DNA 逻辑门为识别单元、以 RCA 反应为信号放大核心的 EVs 检测策略. 在该体系中, RCA 反应依赖一个特殊设计的“锁定-解锁”机制. 初始状态下, RCA 模板的 3'端通过一段互补 Blocker 寡核苷酸封闭, 其 3'端含有一个 3'-3'连接的倒置胸腺嘧啶(inverted dT), 可防止 Phi29 聚合酶识别模板, 从而有效抑制非特异性背景扩增. 当 EVs 同时表达目标蛋白并与 DNA 逻辑门结合后, 引物序列被空间定位至模板附近, 通过空间聚集效应实现对 Blocker 的竞争性取代, 进而启动 Phi29 介导的 RCA 反应(图 4). RCA 扩增产物含有多个重复 DNA 片段, 能够与修饰有互补探针的 DNA-AuNPs 高效杂交, 在 EVs 表面诱导形成高度可识别的金纳米颗粒聚集体. 聚集体显著提升了信号强度, 在 SP-ICP-MS 平台上表现为高幅度的单脉冲响应, 从而实现对目标 EVs 的灵敏识别与定量分析.

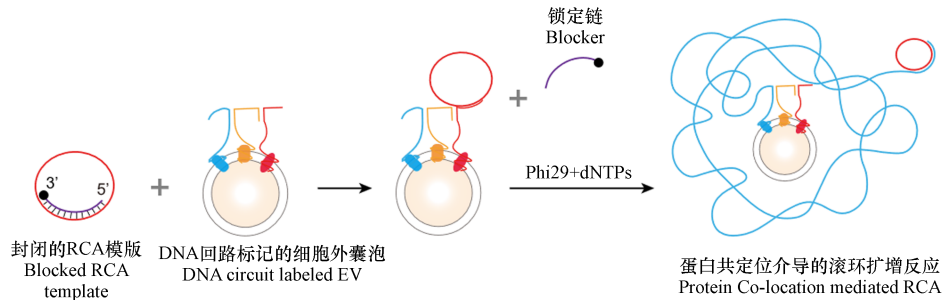


图 4 EVs 表面蛋白共定位激活的 RCA 反应

Fig.4 EVs surface protein co-localization activates RCA reaction

随后制备了与 RCA 扩增产物互补的 DNA-AuNPs 标签, 用于对 RCA 扩增产物的标记. 从图 5A 的透射电镜图中可以看出, 修饰了 DNA 的 AuNPs 由于颗粒之间存在电荷斥力因此保持了良好的单分散状态; AuNPs 标签可以和 RCA 扩增产物相互杂交形成了包含有数十个 AuNPs 的纳米颗粒聚集体 (RCA-AuNPs). AuNPs 和纳米颗粒聚集体中在 SP-ICP-MS 中的瞬时信号的强度如图 5B 所示. 使用的 AuNPs 颗粒的尺寸为 15 nm, 可以看出 15 nm AuNPs 在 SP-ICP-MS 中的脉冲信号较弱, 平均强度在 10 counts 以下; 而相比之下纳米颗粒聚集体则出现了明显增强的脉冲峰; 图 5C 对这两组数据做了高斯拟合后得到峰值对应的信号强度分布也表明 SP-ICP-MS 可以很好的区分单分散 AuNPs 和纳米颗粒聚集体.

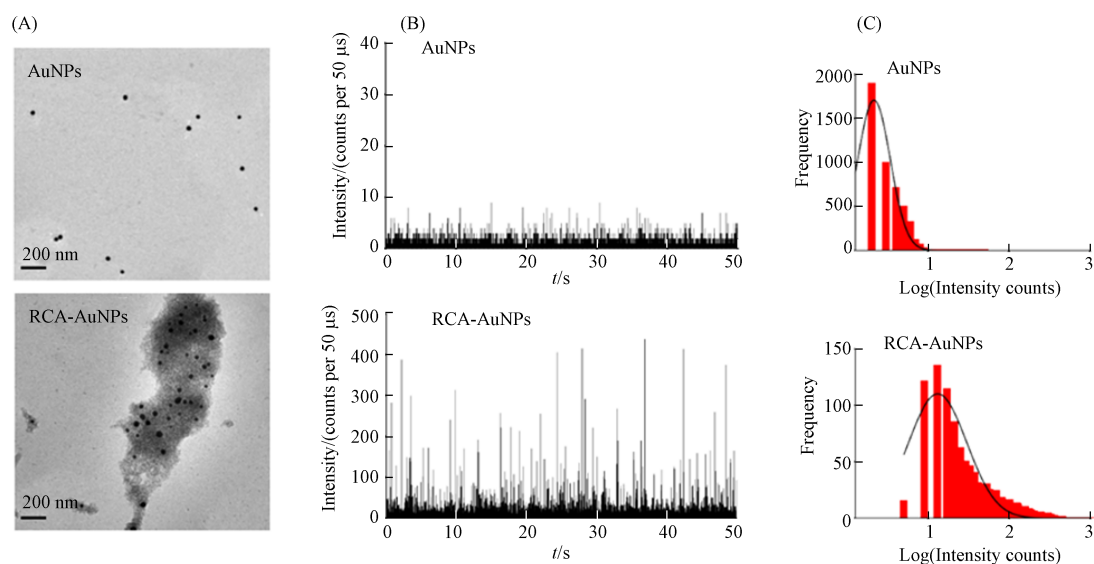


图 5 单分散 AuNPs 和 RCA-AuNPs 聚集体 TEM (A), SP-ICP-MS 谱图(B) 及频率直方分布图(C)

Fig.5 TEM images (A), SP-ICP-MS signal profiles (B) and histogram distributions (C) of monodisperse AuNPs and RCA-AuNPs aggregates

2.3 肝细胞来源 EVs 的 SP-ICP-MS 分析

为了验证 SP-ICP-MS 对肝细胞来源 EVs 的检测能力, 选择了肝癌细胞 HepG2 以及正常肝细胞 HL-7702 作为细胞模型, 将适配体识别模块整合到 DNA 回路中, 对不同细胞来源 EVs 表面的 3 种蛋白 (EpCAM、GPC3、CD63) 进行标记. EpCAM 是一种的多种肿瘤的诊断和预后标志物, 在大多数癌症中都有高表达. GPC3 蛋白是一种膜相关蛋白多糖, 在肝癌细胞上高表达但在正常肝组织中不表达. CD63 是一种 EVs 特异性膜蛋白, 在 EVs 上高表达. 在进行 SP-ICP-MS 分析之前, 首先通过流式细胞术对 EVs 进行表征(图 6A), 以验证其表面 3 种蛋白的表达情况. 由于 EVs 尺寸只有纳米级, 表面能携带的标志物分子十分有限, 已经超过了传统流式细胞仪的分辨极限, 所以先将 EVs 固定在 4 μm 醛乳胶微珠上, 再进行细胞流式表征. 结果证明, 相比于正常对照, 3 种蛋白在 HepG2 细胞 EVs 中都具有更高的表达水平. 透射电镜表征也显示, EVs 在具有囊泡典型的双层膜结构, 尺寸分布大约在 70 nm 至 150 nm 之间(图 6B).

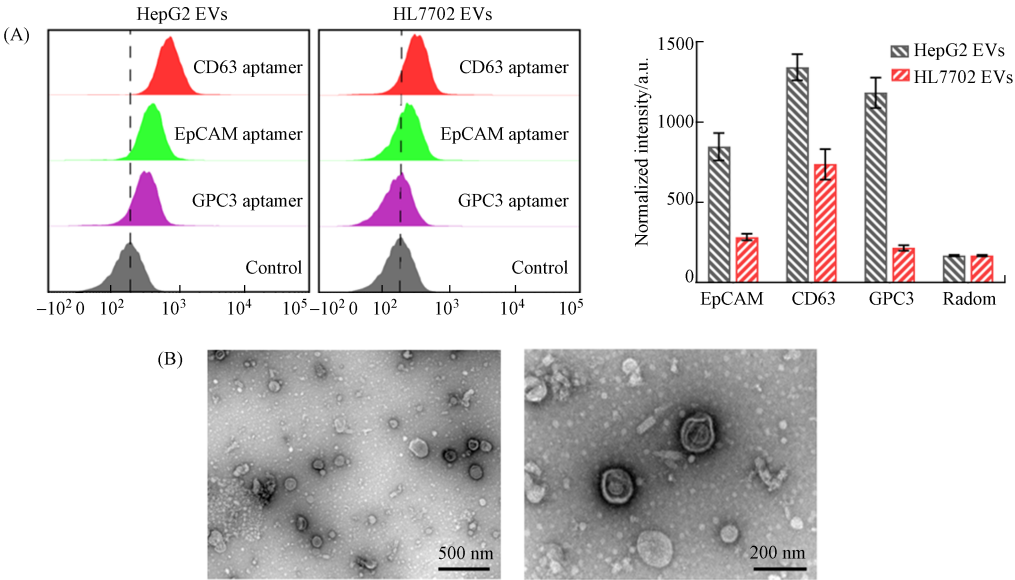


图 6 (A)HepG2 细胞和 HL-7702 细胞 EVs 表面蛋白分析; (B)双层膜结构 EVs 的透射电镜表征

Fig.6 (A) Profiling of surface proteins on EVs from the HepG2 cell and HL-7702 cell ; (B) TEM images of EVs with the bilayer structure

之后,利用适配体修饰的 DNA 回路对细胞上清中提取的 EVs 进行识别与纳米金组装,并结合 SP-ICP-MS 分析. 如图 7A 所示,空白组(Blank)和随机序列 DNA 回路组(Random)均未检测到显著信号;而适配体修饰的 DNA 回路在加入 HepG2 EVs 后,单位时间内采集到的 SP-ICP-MS 脉冲信号数量显著增加. 此外,与 HL-7702 EVs 的对照实验结果表明,该分析方法对特定 EVs 亚型具有可靠的选择性. 为了验证 SP-ICP-MS 在复杂血清样本中对 EVs 分析的能力,分别评估了血清环境中 EVs 的响应特性和回收率. 首先,采用胎牛血清(FBS)模拟血清环境,并向不同稀释倍数的血清中加入 DNA 回路工作序列及 $1\times 10^6\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ HepG2 EVs,随后记录 SP-ICP-MS 的脉冲信号变化. 如图 7B 所示,该方法在不同血清浓度下对目标 EVs 仍表现出稳定的响应能力,表明血清的存在不会显著干扰检测结果. 接下来,以 4% 血清作为验证体系,不同浓度($5\times 10^2\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 至 $5\times 10^6\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)的 HepG2 EVs 添加至血清中,评估其在血清与 PBS 体系中的回收率差异. 由图 7C 可知,尽管在 4% 血清条件下检测效率略有降低,但通过斜率对比分析发现,回收率仍可达到 PBS 体系的 86% 以上. 基于单位时间(40 s)内 SP-ICP-MS 脉冲信号个数与 EVs 浓度之间的线性关系,建立了回归方程 $Y=80.13X-209.3(R^2=0.993)$. 通过该方程计算得出的 4% 血清条件下 EVs 检测限约为 $950\text{ particle}\cdot\mu\text{L}^{-1}(3\sigma/\text{slope})$.

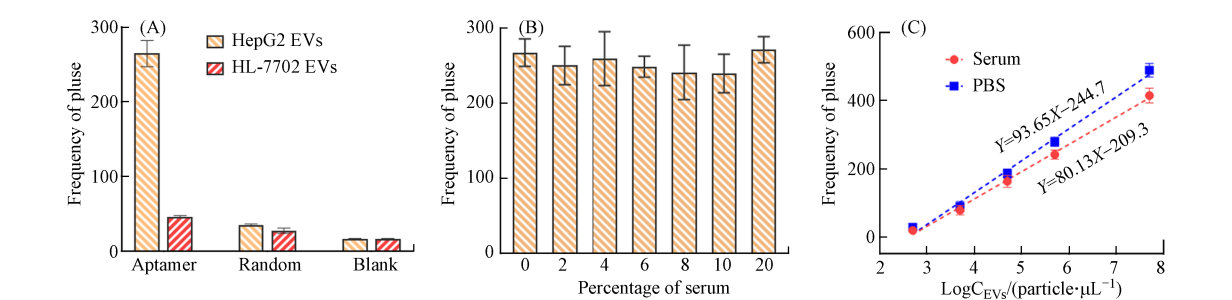


图 7 SP-ICP-MS 检测方法的特异性、耐受性与灵敏度评估
(A) HepG2 与 HL-7702 来源 EVs 的 SP-ICP-MS 脉冲信号对比. (B) HepG2 来源 EVs 在不同血清浓度(0—20%)中的 SP-ICP-MS 脉冲信号对比. (C) HepG2 来源 EVs 在 PBS 与 10% 血清背景中信号频率与浓度的线性关系曲线

Fig.7 Evaluation of the specificity, tolerance and sensitivity of the SP-ICP-MS detection method
(A) Comparison of SP-ICP-MS pulse signals of EVs from HepG2 and HL-7702 sources. (B) Comparison of SP-ICP-MS pulse signals of HepG2-derived EVs in different serum concentrations (0—20%). (C) The linear relationship curve of signal frequency and concentration of HepG2-derived EVs in PBS and 10% serum background

2.4 基于 SP-ICP-MS 的 HCC 早期诊断研究

AFP 是目前 HCC 诊断中最主要的标志物,然而,在临床实践中约 20%—30% 的 HCC 患者 AFP 水平不会显著升高,这使得这部分患者在诊断过程中容易与慢性肝病或肝炎引起的肝硬化混淆. 本研究以血清中 EpCAM/GPC3/CD63 三阳性的 EVs 亚群为检测指标,探索其在 HCC 早期诊断中的应用. 研究采用 10 名健康人、30 名 HCC 患者和 10 名 LC 患者的分组设计(表 2),通过方差分析(ANOVA test)对不同患者血清样本中的 EVs 浓度进行差异比较,并利用受试者工作曲线(ROC)评估 EVs 亚群浓度及血清 AFP 浓度对 HCC 诊断的敏感性和特异性. 结果显示(图 8A),健康人(HD)、肝硬化患者(LC)与 HCC 患者之间的 EVs 亚群浓度存在显著性差异($P<0.01$). ROC 曲线表明,无论是血清 AFP 还是 EVs 亚群作为诊断指标,均能较好地区分 HCC 患者与健康人,其曲线下面积(AUC)分别为 0.86 和 0.92(图 8B). 然而,在区分 HCC 患者与 LC 患者方面,EpCAM/GPC3/CD63 三阳性的 EVs 亚群表现更优,其 ROC 曲线的 AUC 可达 0.90(95% CI: 0.83—0.96),而相比之下,血清 AFP 作为诊断指标时的 AUC 仅为 0.72(95% CI: 0.65—0.79). 进一步计算显示,HCC 患者的 EpCAM/GPC3/CD63 三阳性 EVs 平均浓度为 $3.82\times 10^6\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,但个体间差异极大,变化范围可达 10 倍以上,而肝硬化患者 EVs 平均浓度为 $6.52\times 10^5\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. 基于 ROC 曲线约登指数确定的最佳诊断临界值为 $3.69\times 10^5\text{ particles}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,此时对应的诊断敏感度为 82.4%,特异性为 91.3%. 这些结果表明,通过监测 EpCAM/GPC3/CD63 三阳性 EVs 在实现 HCC 的早期诊断方面具有极大的潜力. 但由于样本量有限,该结果仍需在更大规模的临床队列中进一步验证.

表 2 临床病人样品信息

Table 2 The information of clinical patients

样品号 Sample no	阶段 Stage	埃德蒙森分级 Edmondson grading	SP-ICP-MS脉冲频率($n=3$) Frequency of SP-ICP-MS pulse	EVs浓度/ $(\times 10^6 \text{ particle} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ Conc. of EVs	AFP浓度/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ ^a Conc. of AFP
1	HD	—	37±6	0.36	8.1
2	HD	—	24±4	0.04	6.2
3	HD	—	36±4	0.33	6.3
4	HD	—	43±5	0.50	7.5
5	HD	—	52±6	0.72	5.3
6	HD	—	24±3	0.04	2.3
7	HD	—	52±6	0.72	4.4
8	HD	—	35±4	0.31	<0.6
9	HD	—	45±5	0.55	1.2
10	HD	—	36±6	0.33	5.8
11	HCC	I	27±3	0.12	113.2
12	HCC	I	63±4	0.99	443.7
13	HCC	I	43±5	0.50	43.3
14	HCC	I	47±9	0.60	186.8
15	HCC	II	43±3	0.50	73.4
16	HCC	II	84±8	1.49	69.2
17	HCC	II	93±8	1.71	1664
18	HCC	II	82±7	1.44	113.2
19	HCC	II	24±3	0.04	90.5
20	HCC	II	195±12	4.17	674.3
21	HCC	III	305±27	6.82	7204.0
22	HCC	III	206±22	4.44	435.4
23	HCC	III	434±39	9.93	12178.0
24	HCC	III	98±11	1.83	712.0
25	HCC	III	116±17	2.26	93.5
26	HCC	III	175±14	3.69	234.2
27	HCC	III	414±32	9.45	32474.0
28	HCC	III	257±33	5.66	75.7
29	HCC	III	118±18	2.31	374.0
30	HCC	III	201±22	4.31	2263.0
31	HCC	III	144±13	2.94	98.4
32	HCC	III	186±15	3.95	363.0
33	HCC	IV	292±37	6.51	4650.0
34	HCC	IV	135±21	2.72	1273.0
35	HCC	IV	114±21	2.22	364.11
36	HCC	IV	157±19	3.25	257.0
37	HCC	IV	363±42	8.22	40739.0
38	HCC	IV	243±25	5.33	1798.0
39	HCC	IV	244±27	5.35	431.4
40	HCC	IV	512±69	11.81	209666.0

续表 2

样品号 Sample no	阶段 Stage	埃德蒙森分级 Edmondson grading	SP-ICP-MS脉冲频率($n=3$) Frequency of SP-ICP-MS pulse	EVs浓度/ $(\times 10^6 \text{ particle} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ Conc. of EVs	AFP浓度/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ ^a Conc. of AFP
41	LC	—	32±5	0.24	6.3
42	LC	—	42±6	0.48	190.3
43	LC	—	32±6	0.24	234.2
44	LC	—	60±7	0.91	15.8
45	LC	—	47±4	0.60	99.4
46	LC	—	36±4	0.36	4.5
47	LC	—	73±7	0.33	308.5
48	LC	—	52±7	1.23	24.3
49	LC	—	62±9	0.72	86.1
50	LC	—	56±8	0.96	127.1

^a血清AFP含量数据由厦门大学附属中山医院采集并整理。
^aThe data on serum AFP content were collected and collated by Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University.

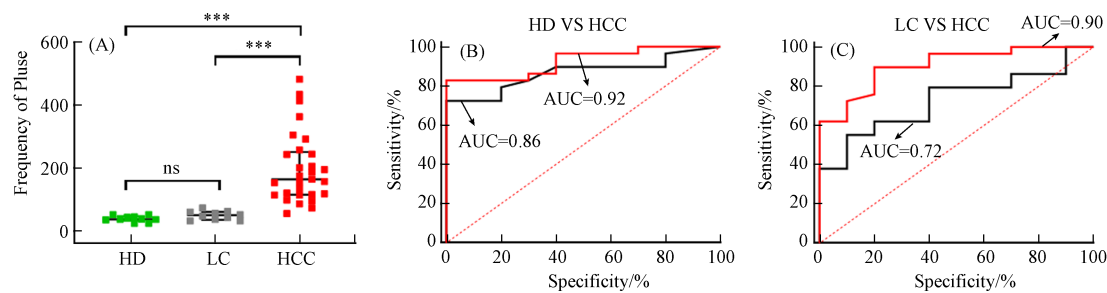


图 8 (A)不同受试者血清中 EVs 在 SP-ICP-MS 下的脉冲数(采集 40 s); (B)HCC vs HD 的 ROC 曲线(红: EVs, 黑: AFP); (C)HCC vs LC 的 ROC 曲线(红: EVs, 黑: AFP)

Fig.8 (A) Pulse counts of EVs in serum from different subjects measured by SP-ICP-MS (collection time: 40 s); (B) ROC curves for distinguishing HCC from HD (red: EV concentration; black: serum AFP); (C) ROC curves for distinguishing HCC from LC (red: EV concentration; black: serum AFP)

3 结论(Conclusion)

在本研究中, 针对传统 HCC 诊断依赖单一标志物所带来的灵敏度和特异性不足的问题, 发展了一种基于 DNA 逻辑回路促发纳米金组装的策略, 结合 SP-ICP-MS 技术, 实现了对肝癌来源 EVs 的多标志物协同识别与超灵敏度分析检测. 该方法具有以下显著优势: (1)通过构建可同时识别 EpCAM、GPC3 和 CD63 三种 EVs 表面蛋白的 DNA 逻辑回路, 实现了对肿瘤来源 EVs 的特异性组合识别, 有效提高了诊断准确率; (2)利用 EVs 表面原位触发的滚环扩增(RCA)反应对 DNA 输出信号进行纳米金组装放大, 增强了检测灵敏度; (3)结合 SP-ICP-MS 技术, 不仅克服了传统方法中灵敏度低、样本基质干扰大的问题, 还实现了无需分离的血清中 EVs 亚群直接分析. 基于该 SP-ICP-MS 分析平台, 系统评估了正常人、HCC 患者以及肝硬化患者血清样本中的 EVs 表达特征, 成功构建了用于 HCC 早期诊断的识别模型. 更重要的是, 该策略发现 EpCAM/GPC3/CD63 三阳性 EVs 在区分 HCC 与肝硬化患者方面表现出优于传统血清 AFP 的敏感性和特异性, 显著提升了 HCC 早期临床诊断的可靠性和实用性. 本研究不仅为 HCC 的精准早筛提供了新的技术路径, 也为 EVs 在肿瘤早期诊断和个体化管理中的应用拓展了更广阔的前景.

参考文献 (References)

[1] CHIN W S, PAN S C, HUANG C C, et al. Exposure to air pollution and survival in follow-up after hepatocellular carcinoma[J]. Liver

Cancer, 2022, 11(5): 474-482.

- [2] YU M C, YUAN J M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2004, 127(5): S72-S78.
- [3] LLOVET J M, PINYOL R, KELLEY R K, et al. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma[J]. Nature Cancer, 2022, 3(4): 386-401.
- [4] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(10): 589-604.
- [5] CRAIG A J, von FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(3): 139-152.
- [6] ZHOU J, SUN H C, WANG Z, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (2019 edition)[J]. Liver Cancer, 2020, 9(6): 682-720.
- [7] BAIG J A, ALAM J M, MAHMOOD S R, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC) and diagnostic significance of A-fetoprotein (AFP)[J]. Journal of Ayub Medical College, Abbottabad, 2009, 21(1): 72-75.
- [8] LUO P, WU S Y, YU Y L, et al. Current status and perspective biomarkers in AFP negative HCC: Towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage[J]. Pathology & Oncology Research, 2020, 26(2): 599-603.
- [9] CHOI J Y, JUNG S W, KIM H Y, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(3): 339-346.
- [10] KUDO M. Urgent global need for PIVKA-II and AFP-L3 measurements for surveillance and management of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Cancer, 2024, 13(2): 113-118.
- [11] XU R, RAI A, CHEN M S, et al. Extracellular vesicles in cancer: Implications for future improvements in cancer care[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2018, 15(10): 617-638.
- [12] KALLURI R, McANDREWS K M. The role of extracellular vesicles in cancer[J]. Cell, 2023, 186(8): 1610-1626.
- [13] LANE R E, KORBIE D, HILL M M, et al. Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: Opportunities and challenges[J]. Clinical and Translational Medicine, 2018, 7(1): e14.
- [14] LI Y K, DENG J Q, HAN Z W, et al. Molecular identification of tumor-derived extracellular vesicles using thermophoresis-mediated DNA computation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(3): 1290-1295.
- [15] CHEN J G, XU Y C, WANG X, et al. Rapid and efficient isolation and detection of extracellular vesicles from plasma for lung cancer diagnosis[J]. Lab on a Chip, 2019, 19(3): 432-443.
- [16] MELO S A, LUECKE L B, KAHLERT C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. Nature, 2015, 523(7559): 177-182.
- [17] FANG Z Y, ZHAO X Y, HOU R X, et al. Antibody-directed cell internalization of targeted covalent europium tag enables in situ kinase labeling and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) quantification[J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(23): 12125-12132.
- [18] LUO Y C, YAN X W, HUANG Y S, et al. ICP-MS-based multiplex and ultrasensitive assay of viruses with lanthanide-coded biospecific tagging and amplification strategies[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(20): 9428-9432.
- [19] LIU Z, LIANG Y, ZHOU Y, et al. Single-cell fucosylation breakdown: Switching fucose to europium[J]. iScience, 2021, 24(5): 102397.
- [20] LIANG Y, LIU Q, ZHOU Y, et al. Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(13): 8341-8349.
- [21] AYDIN Y, KOKSAL A R, THEVENOT P, et al. Experimental validation of novel glypican 3 exosomes for the detection of hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis[J]. Journal of Hepatocellular Carcinoma, 2021, 8: 1579-1596.
- [22] KOKSAL A R, THEVENOT P, AYDIN Y, et al. Impaired autophagy response in hepatocellular carcinomas enriches glypican-3 in exosomes, not in the microvesicles[J]. Journal of Hepatocellular Carcinoma, 2022, 9: 959-972.
- [23] TERRIS B, CAVARD C, PERRET C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology, 2010, 52(2): 280-281.