

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.20.027

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220531.1536.006.html\(2022-06-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220531.1536.006.html(2022-06-01))

基于二代测序的肝癌基因组学研究进展*

殷瑞康,李 萍 综述,付振明[△] 审校
(武汉大学人民医院肿瘤中心,武汉 430060)

[摘要] 肝细胞癌作为原发性肝癌中最常见的组织学亚型,其基因组学、表观遗传学及以此为基础的肿瘤发展、转移及治疗,一直是肝癌的研究热点。本文对肝细胞癌的全基因组测序、全外显子组测序等二代测序的发展,以及该领域的重要研究发现与进展进行综述,以期为后续研究提供一定的参考。

[关键词] 肝细胞癌;基因组学;全基因组测序;全外显子测序;综述

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)20-3559-05

Research progress of hepatocellular carcinoma genomics based on second generation sequencing*

YIN Ruikang, LI Ping, FU Zhenming[△]

(Cancer Center, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

[Abstract] Hepatocellular carcinoma is the most common histological subtype of primary hepatic carcinoma. Its genomics, epigenetics and related tumor progression, metastasis and treatment have always been the hotspots of liver cancer research. This paper reviewed the development of the second generation sequencing of hepatocellular carcinoma, such as whole genome sequencing and whole exome sequencing, as well as the important research findings and progress in this field in order to provide certain references for follow up study.

[Key words] hepatocellular carcinoma; genomics; whole genome sequencing; whole exome sequencing; review

原发性肝癌是癌症相关死亡的第二大原因,发病率位居第 6^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌中最主要的组织学亚型,占 85%~90%。HCC 主要的致癌因素包括乙型肝炎病毒(hepatitis b virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis cvirus, HCV)感染、酒精性肝病、烟草、食物污染等。这些致癌因素的内源性或外源性作用过程反映在基因组上的结果称为突变特征。通过分析突变特征可以了解细胞恶变的机制、肿瘤发展的风险因素,有助于更好地理解 HCC 基因组学发展。目前部分突变特征已得到揭示,较为常见的如年龄与甲基胞嘧啶的脱甲基化相关,烟草中多环芳烃可致碱基 C 到 A 的替换,CTNNB1 基因突变常见于酒精相关 HCC;较为少见的如 HBV 导致 TERT、CCNE1 和 CcNA2 基因的插入突变、错配修复缺陷引起碱基 C 到 T 的替换及缺失,马兜铃酸引起三核苷酸中碱基 T 到 A 的替换等。近年来随着全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)、全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)、转录组测序(RNA sequencing, RNA-

Seq)等二代测序检测手段不断发展,HCC 基因组学得到了进一步揭示及剖析。本文将在 HCC 基因组研究的大方向之下,回顾及综述近年该领域的进展。

1 肝癌基因组学第二代测序

DNA 测序技术的发展已经使生命研究从单一、局部的基因或基因的片段转变成了整个基因组。近年飞速发展的 WGS、WES、RNA-Seq 等高通量二代测序技术,具有通量高、检测高速、灵敏度高、成本低等特点。高通量测序能够对基因组进行多种分析,如单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)、基因组的插入及缺失(insertion or deletion, InDel)、染色体结构变异(structural variation, SV)、拷贝数目变异(copy number variant, CNV)、杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)。目前,WGS 和 WES 应用最为频繁,WGS 相较于 WES 可以检测基因组的完整序列,包括非编码区,尽管较为复杂,对于涉及大型结构基因组的翻译和临床意义至关重要,如 CNV 和染色体重排。WES 则往往针对编码基因组,更易于鉴定影响蛋白质结构和功能的 SNV、InDel 和 SV 等。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81773555)。 作者简介:殷瑞康(1995-),在读硕士研究生,主要从事消化道肿瘤营养研究。

[△] 通信作者,E-mail:davidfuzming@whu.edu.cn。

2 基于测序的重要研究发现

2.1 SNV

SNV 可存在于胚系和体细胞中。前者为发生在配子中的突变亦称为遗传突变,后者是不参与遗传的体细胞突变。经典的遗传突变如 ATP7B、FAH、HFE 和 SERPINA1,可以分别产生肝豆状核变性、酪氨酸血症、血色沉着症、 α -1 抗胰蛋白酶缺乏症,继而增加肝硬化、HCC 的发展倾向;HSD17B13 rs72613567、PNPLA3 rs738409、TM6SF2 rs58542926 等位点的不稳定性则直接与肝硬化和 HCC 阶段相关^[2-4]。体细胞突变中,目前研究发现较为确切的基因有 TERT 启动子、ACVR2A、ARID1A、ARID2、AXIN1、CTNNB1 和 FGF19 等基因^[5-6]。

SNV 作为 HCC 中最普遍的的基因组学改变,常存在于 HCC 中最为熟知的突变基因如 CTNNB1、TP53 及 TERT 启动子^[5]。细数 SNV 的分类,C:G>T:A 和鸟嘌呤转化是最多见的^[7]。近年新发现了 Ash1、NCOR1 和 MACROD2 等 HCC 驱动基因的突变,及 RPS6KA3、RB1、LZTR1、EEF1A1 和 SF3B1 等频繁发生而缺少研究的体细胞突变^[6]。按 HCC 病因、环境风险因素分类,AXIN1、TP53 突变常见于 HBV 阳性病例中,ARID1A 突变更常见于非病毒病例中。按肿瘤分期分,TERT 启动子突变常见于早期 HCC,FGF3、FGF4、FGF19 或 CCND1 扩增,TP53 和 CDKN2A 改变出现在较晚期^[5]。按肿瘤来源分,多中心来源的 HCC 一般分别起源于独立的突变,尽管体细胞突变存在差异,但它们的全基因组替换模式是相似的。按相关信号通路及机制分,新发现的 LZTR1、EEF1A1 分别编码含 CUL3 的 E3 连接酶复合物接头、翻译延伸因子基因;而如 AZIN1、RP1L1、GPATCH4、CREB3L3、AHCTF1 和 HIST1H1 等显著突变基因暂时未得到相关研究^[6]。

在预测 HCC 发展和预后方面,LAMA2 突变预示着复发和较差生存;TP53 突变与微血管浸润独立相关,CTNNB1 突变与 AFP 独立相关,暗示它们可能是通过调节 p53 通路和端粒修复通路来促进 HCC 的发生和发展的^[7]。MACROD2 的缺失则通过激活 GSK-3 β / β -Catenin 通路促进肿瘤的生长^[8]。

2.2 InDel

InDel 是在基因组的某个位置上所发生的小片段序列的插入或者缺失,长度通常在 2~50 bp。近年,大型研究确定了非编码区 InDel 可以将细胞谱系与肿瘤紧密联系起来,无论在 HCC 还是他肿瘤类型中,谱系决定基因具有非编码区 InDel 热点,而 InDel 热点与 AAT AAT D 序列和特殊的染色质内容相关联^[9]。比如,HCC 中与 HCV 阳性相关的 ARID1A 和与酒精摄入相关的 ARID2 属于染色质内容突变,均以 InDel 为主,ARID 家族基因的下调促进了细胞增殖,其中 ARID2 的敲除影响 DNA 修复过程,继而引起更多

潜在的突变。另外,三磷酸腺苷(ATP)结合盒蛋白亚家族 B 成员 5 被发现存在终止密码子和影响 mRNA 剪接的非编码区 InDel^[10]。既往该蛋白过表达被认为能够增强肿瘤干细胞特性,在黑色素瘤中影响肿瘤生长和化疗耐药,目前在 HCC 中同样有所发现。这些 InDel 对于细胞蛋白质功能是不利的。

2.3 SV

SV 是指基因组中一种较大的结构性的染色体变异,包括大片段丢失、插入、重复,以及拷贝数的变异、倒位、易位。HCC 中受 SV 影响最大的基因是 MACROD2^[8]。MACROD2 因发生 SV 呈现低表达状态,继而抑制糖原合成酶激酶-3 β 活性,激活 β -Catenin 通路,明显促进上皮间充质转化和肿瘤增殖、侵袭。SV 同样存在于 AXIN1、CTNNB1 和 TERT 基因中。TERT 启动子的 SV 主要为 HBV 整合和非病毒依赖性的易位。HBV 整合的 SV 还存在于 MLL4、CCNE1 及纤维化相关基因 FN1、HS6ST3、KNG1 和 ROCK1 中,可引起 CCNE1、HBx-MLL4 融合蛋白等的高表达,进一步驱动 HCC 的发生^[11]。预后方面,发生 SV 的基因组中存在双特异性蛋白激酶这个关键的有丝分裂检查点调节因子,且该调节因子与 p53 信号通路有关。因此,包含 SV 的差异表达基因功能富集分析可能有助于揭示 HCC 的进化、侵袭性等生物学过程。

染色体碎裂是一种灾难性的 SV,经过大规模的破坏、重新排布,染色体区域片段会整合成一种新的基因组配置。研究发现,HCC 中的染色体碎裂既能影响染色体臂 1q 和 8q 以产生基因扩增及癌基因的高表达,也可以影响肿瘤耐药,它通过驱动环状染色体外 DNA 的扩增使其不断进化而获得药物耐受性,因此与 HCC 不良预后也是密切相关的^[12]。

2.4 CNV

CNV 是一种基因组结构变异,覆盖的核苷酸数量远超 SNV,表现为基因组片段的拷贝数增加或者减少。CNV 对 HCC 基因组某些特定区域基因的表达和调控具有极为重要的生物学意义,它引起的基因组片段扩增、缺失可能与癌基因、抑癌基因相关。基于 CNV 的研究发现,染色体位点 15q13.3 的低频率重复与 HBV 相关性 HCC 的风险密切相关^[13]。该区域的小核仁 RNA SNORA18L5 过表达可抑制 p53 依赖的细胞周期阻滞和凋亡,从而促进 HCC 的发生和发展。类似地,MYC、RSPO2、CCND1 和 FGF19 高拷贝扩增可以使 p53、Wnt、磷脂酰肌醇 3 激酶(PIK3)/RAS、细胞周期和染色质重塑通路均发生异常。抑癌基因 GATA4 的 CNV 在 HCC 中也极为常见^[14]。GATA4 可直接结合并有效地抑制 β -Catenin 的转录活性,因此,癌基因 β -Catenin 本身也是抑癌基因。检测循环肿瘤 DNA 中 CNV 和 SNV 水平,较蛋白生物标记物(如甲胎蛋白、去 γ -羧基凝血酶原)能更提前预

测 HCC 的发生^[15]。但相较于传统的肿瘤标志物, CNV 等突变检测的应用成本稍高,其准确性也有待进一步研究。

2.5 LOH

LOH 是染色体上某一对具有高度多态性等位基因上一个等位基因的缺失,失去杂合性的改变常造成相应抑癌基因的失活,从而促进 HCC 的发生。HCC 中 LOH 常存在于 1p、4q、6q、8p、9p、10q、16q、17q 等染色体臂^[16]。其中,8p 区域 DLC1、CCDC25、ELP3、PROSC、SH2D4A、SORBS3 基因的 LOH 常发生于 HCC 早期,提示着不良预后。D4S2964 区域的 ARD1B、SEPT11 基因的 LOH 与较差的总生存期相关,6q26-q27 区域甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子受体 2(M6P/IGF2R)的 LOH 预示着 HCC 手术切除患者的不良预后。近来,还发现 19p13 区域 PRKACA 的 LOH 与无慢性肝病或肝硬化的女性相关,它的存在提示病理发展倾向于肝纤维板层癌^[17]。LOH、杂合性增益和 SNV 负载之间存在相关性,这几种突变负荷在肝硬化肝比正常肝中更常见^[18]。总之,LOH 往往提示着 HCC 的发展与不良的预后。

3 表观遗传学修饰

不同的表观遗传机制,比如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 的表达,控制着染色质结构和 DNA 对转录机制的可及性。DNA 启动子甲基化的改变往往发生于在肝硬化和 HCC 的前期,甚至可能早于遗传突变和基因组不稳定的发生^[19]。组蛋白甲基化修饰酶突变主要发生在 MLL 基因家族,其中最为常见的是 MLL4 基因的 HBV 插入^[20]。染色质重塑相关的突变基因为 ARID1A、ARID2^[5]。酗酒者 HCC 中抑癌基因 ARID1A 失活明显比其他病因的肿瘤更常见,该突变与 CTNBN1 突变相关,其引起的 PI3K/蛋白激酶 B(AKT)通路激活是 HCC 发生的关键机制之一。ARID2 同样参与基因转录激活、抑制,但它的低发生率限制了相关研究。

表观遗传修饰可通过染色质重塑和转录后调节影响非编码 RNA 的活性,这些 RNA 包括微小 RNA、PIWI 关联 RNA、短干扰 RNA、增强子 RNA 和长链非编码 RNA(lncRNA)。近年,研究发现 lncRNA 在 HCC 中存在差异表达,且可通过各种机制影响 HCC 的发生、发展^[21]。lncRNA HAND2-AS1 可与染色质重塑子 INO80 复合体结合,诱导 BMPR1A 启动子使骨形成蛋白(BMP)信号通路激活而促进肝癌发生^[22]。lncRNA 牛磺酸上调基因 1(TUG1)可使组蛋白发生 H3K27 三甲基化而发生表达沉默,lncRNA Linc-GALH 则可改变 DNMT1 泛素化水平从而调控 Gankyrin 启动子的甲基化水平,进而影响 HCC 的转移^[23]。非编码 RNA 曾被认为不具生物学功能,是转录的“转录噪声”^[24]。随着分子生物学的发展,越来越多的研究表明这些分子发挥着重要的调节作用。

4 肝癌转移相关的基因组学

HCC 的转移途径包括直接侵犯、肝外播散和区别于其他恶性肿瘤的肝内转移。近年,ARID1A、ARID2、VACM1、CDK14 和 PIK3CA 等基因与 HCC 转移的关系得到进一步揭示。ARID1A 上调可促进 10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、p53、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚基 α (PIK3CA)基因表达上调,基质金属蛋白酶 9(MMP9)和表皮生长因子(VEGF)基因表达下调,使 HCC 细胞的迁移、侵袭、增殖和凋亡能力下降^[5]。WNK 基因主要发生 SNV(5.3%)和 CNV(27.2%),它的失活导致细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)信号激活、肿瘤相关巨噬细胞浸润^[25]。肝内转移方面,过去已确定了包括 H-ras、MDM2、C-myc、CD44、OPN、hTcf-4、RhoC 等一百余个显著相关的基因,而且原发肿瘤与其周围转移肿瘤的基因表达模式相似,这表明促进侵袭的基因激活始于原发性瘤灶。不同患者的所有病灶间共有的突变称为泛突变,泛突变百分比为 8%~97%^[26]。这暗示肿瘤内存在较大异质性,单个病灶的序列分析不足以描述 HCC 的基因组特征。血管生成的失调、lncRNA 和其他各种分子事件协同作用,同样促进 HCC 的转移。非编码高表达癌基因 lncRNA MCM3AP-AS1,可以促进叉头盒蛋白 A1(FOXA1)高表达,与患者预后呈负相关^[27]。这种直接或间接地与表观遗传调控因子相互作用,能够调节基因表达,影响 HCC 的转移。类似地,lncRNA UBE2CP3 通过调节血管生成参与 HCC 的转移,机制为抑制磷酸甘油酸激酶 1 的分泌来激活肿瘤诱导的血管生成。

转移灶数量方面,既往在肾癌伴肺转移患者中发现不同转移灶数量存在基因的差异表达,随着 HCC 寡转移概念的提出,类似的猜想支持着基因测序及相关研究的进行,但目前在寡转移与广泛转移之间未发现有意义的基因组学差别的证据。

5 肝癌基因组学相关治疗

目前,HCC 分子靶向治疗主要通过抑制 VEGF 来抑制血管生成和肿瘤生长,但基因测序分析发现 Wnt 信号、MDM4、MET、MCL1、IDH1、TERT 存在抑制剂的潜在治疗靶点^[6]。这些潜在靶点值得进一步研究攻克。另外,抗体靶向治疗自若干年前被提出,至今仍无明显进展,仅有某些数据表明抗 FGF19 抗体 1A6 可以选择性地抑制携带 FGF 或细胞周期蛋白 D1(CCND1)基因扩增的 HCC 细胞生长。

免疫治疗则主要通过不断研究攻克包括细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白 1(PD-1)和程序性细胞死亡 1 配体 1(PD-L1)在内的免疫检查点受体或配体,来延缓免疫耐受及肿瘤进展。阻断骨桥蛋白/集落刺激因子 1/集落刺激因子 1 受体(OPN/CSF1/CSF1R)轴可阻止肿瘤相关巨噬细胞转运,从而增强免疫检查点抑制剂疗效^[28]。预后方

面,某些基因及其产物能够预测免疫治疗的效果,比如低 PD-L1 表达与免疫治疗效果不佳相关;细胞角蛋白 19(CK19)阳性或罗双树样蛋白 4(SALL4)阳性的患者预后较好^[29]。具有 Wnt 信号通路突变的 HCC 对免疫检查点阻滞剂的反应更差,其中位生存时间明显短于无上述突变的患者(9.1 个月 vs. 15.2 个月)^[30]。这可以用 Wnt-CTNNB1 突变、CNV 和 LOH 与免疫耐药和肿瘤逃逸密切相关来解释,因为 Wnt 通路常发生免疫相关基因的突变,免疫事件如树突状细胞的启动和激活、干扰素- γ 反应、调节性 T 淋巴细胞激活均受到影响^[31]。而检测患者免疫检查点抑制剂敏感性,需要通过第二代测序技术检测基因组中的肿瘤突变负荷。根据不同基因组特征,或许可以开发出 HCC 免疫反应的个性化评估,从而实现最佳的个性化免疫治疗。

6 小 结

目前,大多数 HCC 相关的基因事件仍待揭示,但随着基因测序和数据分析的自动化和跨越发展,更多未知的基因组序列可以转化为有价值的生物学见解。比如,循环肿瘤 DNA 特定位点甲基化水平的检测,可以对 HCC 进行准确的早期诊断及疗效和预后预测,具有无创性、实时性、准确性等特点,当前需要在 HCC 及更多实体瘤中进一步研究测试。与处理成千上万个细胞后得到平均变异水平的传统测序相比,单细胞测序这种新手段可以揭示每个细胞独特的变化,有利于探索各细胞亚群间的联系及相关的基因表达。最近出现的第 3 代测序,即可以绘制更加完整的人类基因组图谱的长读测序,更是克服了二代测序读数短、无法直接检测天然 DNA 表观遗传修饰等弱点^[32]。但产出如此高质量基因组组装仍需科研及市场的检验。治疗方面,除了既定的 HCC 治疗模式和方案外,全球范围都在积极进行靶向、免疫药物或全新治疗计划的临床试验,新时代的基因组学研究已为之后的治疗带来了曙光。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] YANG J, TREPO E, NAHON P, et al. A 17-Beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 13 variant protects from hepatocellular carcinoma development in alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 231-240.
- [3] STICKEL F, BUCH S, NISCHALKE H D, et al. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(10): 1475-1483.
- [4] YANG J, TREPO E, NAHON P, et al. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(3): 533-544.
- [5] NAULT J C, MARTIN Y, CARUSO S, et al. Clinical impact of genomic diversity from early to advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 164-182.
- [6] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1327-1341.
- [7] WANG S, SHI H, LIU T, et al. Mutation profile and its correlation with clinicopathology in Chinese hepatocellular carcinoma patients[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2021, 10(2): 172-179.
- [8] ZHOU Z J, LUO C B, XIN H Y, et al. MACROD2 deficiency promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis by activating GSK-3 β /beta-catenin signaling [J]. *NPJ Genom Med*, 2020, 5: 15.
- [9] IMIELINSKI M, GUO G, Meyerson M. Insertions and deletions target lineage-defining genes in human cancers[J]. *Cell*, 2017, 168(3): 460-472.
- [10] LEUNG I C, CHONG C C, CHEUNG T T, et al. Genetic variation in ABCB5 associates with risk of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 10705-10713.
- [11] TATSUNO K, MIDORIKAWA Y, TAKAYAMA T, et al. Impact of AAV2 and hepatitis B virus integration into genome on development of hepatocellular carcinoma in patients with prior hepatitis B virus infection[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6217-6227.
- [12] SHOSHANI O, BRUNNER S F, YAEGER R, et al. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer[J]. *Nature*, 2021, 591(7848): 137-141.
- [13] CAO P, YANG A, WANG R, et al. Germline duplication of SNORA18L5 increases risk for HBV-related hepatocellular carcinoma by altering localization of ribosomal proteins and decreasing levels of p53 [J]. *Gastroenterology*,

- 2018,155(2):542-556.
- [14] LU F, ZHOU Q, LIU L, et al. A tumor suppressor enhancing module orchestrated by GATA4 denotes a therapeutic opportunity for GATA4 deficient HCC patients[J]. *Theranostics*, 2020,10(2):484-497.
- [15] CAI Z X, CHEN G, ZENG Y Y, et al. Comprehensive liquid profiling of circulating tumor DNA and protein biomarkers in long-term follow-up patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019,25(17):5284-5294.
- [16] ROESSLER S, LONG E L, BUDHU A, et al. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival[J]. *Gastroenterology*, 2012,142(4):957-966 e912.
- [17] HIRSCH T Z, NEGULESCU A, GUPTA B, et al. BAP1 mutations define a homogeneous subgroup of hepatocellular carcinoma with fibrolamellar-like features and activated PKA [J]. *J Hepatol*, 2020,72(5):924-936.
- [18] BRUNNER S F, ROBERTS N D, WYLIE L A, et al. Somatic mutations and clonal dynamics in healthy and cirrhotic human liver[J]. *Nature*, 2019,574(7779):538-542.
- [19] ZHANG X X, LIU L, YUAN X, et al. JMJD3 in the regulation of human diseases [J]. *Protein Cell*, 2019,10(12):864-882.
- [20] SZE K M, HO D W, CHIU Y T, et al. Hepatitis B Virus-Telomerase reverse transcriptase promoter integration harnesses host ELF4, resulting in telomerase reverse transcriptase gene transcription in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021,73(1):23-40.
- [21] XIE C, LI S Y, FANG J H, et al. Functional long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2021,500:281-291.
- [22] WANG Y, ZHU P, LUO J, et al. LncRNA HAND2-AS1 promotes liver cancer stem cell self-renewal via BMP signaling[J]. *EMBO J*, 2019,38(17):e101110.
- [23] XU X, LOU Y, TANG J, et al. The long non-coding RNA Linc-GALH promotes hepatocellular carcinoma metastasis via epigenetically regulating Gankyrin[J]. *Cell Death Dis*, 2019,10(2):86.
- [24] LIN R X, YANG S L, JIA Y, et al. Epigenetic regulation of papillary thyroid carcinoma by long non-coding RNAs[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022,83:253-260.
- [25] ZHOU S L, ZHOU Z J, ZQ H, et al. Genomic sequencing identifies WNK2 as a driver in hepatocellular carcinoma and a risk factor for early recurrence[J]. *J Hepatol*, 2019,71(6):1152-1163.
- [26] XUE R, LI R, GUO H, et al. Variable intra-tumor genomic heterogeneity of multiple lesions in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2016,150(4):998-1008.
- [27] WANG Y, YANG L, CHEN T, et al. A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis [J]. *Mol Cancer*, 2019,18(1):28.
- [28] ZHU Y, YANG J, XU D, et al. Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade [J]. *Gut*, 2019,68(9):1653-1666.
- [29] KUREBAYASHI Y, OJIMA H, TSUJIKAWA H, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification [J]. *Hepatology*, 2018,68(3):1025-1041.
- [30] PINYOL R, SIA D, LLOVET J M. Immune Exclusion-Wnt/CTNNB1 class predicts resistance to immunotherapies in HCC [J]. *Clin Cancer Res*, 2019,25(7):2021-2023.
- [31] MORITA M, NISHIDA N, SAKAI K, et al. Immunological microenvironment predicts the survival of the patients with hepatocellular carcinoma treated with anti-PD-1 antibody [J]. *Liver Cancer*, 2021,10(4):380-393.
- [32] VAN DIJK E L, JASZCZYSZYN Y, NAQUIN D, et al. The third revolution in sequencing technology [J]. *Trends Genet*, 2018,34(9):666-681.