

# 血浆游离DNA甲基化靶向测序在乳腺癌中的应用价值

刘艳佳<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 王业滢<sup>1</sup>, 王博<sup>2</sup>

(1.佳木斯大学临床医学院, 黑龙江 佳木斯 154000;

2.佳木斯大学附属第一医院肿瘤外科, 黑龙江 佳木斯 154003)

**摘要:**目的 检测乳腺癌(BRC)患者血浆游离DNA(Cf-DNA)的甲基化水平,并分析其临床应用价值。方法 收集2021年12月—2022年6月就诊于佳木斯大学附属第一医院肿瘤外科50例患者血液标本,其中乳腺癌患者(I~III期)30例为实验组(tumor组),乳腺良性疾病患者20例为对照组(control组),采用化学发光法检测血清糖类抗原153(CA153)、血清糖类抗原125(CA125)、癌胚抗原(CEA)水平,提取实验组及对照组患者Cf-DNA,行高通量甲基化靶向测序检测,评估甲基化水平;ROC曲线评估Cf-DNA和CA153、CA125、CEA单独及联合检测筛查乳腺癌的临床价值。结果 实验组CA153、CA125、CEA水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );两组血浆Cf-DNA浓度比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组CCDC181启动子区甲基化水平、总体甲基化水平比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );ROC曲线显示,血清CEA诊断乳腺癌的曲线下面积(AUC)=0.766(95%CI:0.633~0.897),CA153的AUC=0.730(95%CI:0.591~0.869),CA125的AUC=0.788(95%CI:0.661~0.914),三者联合的AUC=0.923(95%CI:0.852~0.993),联合诊断的灵敏度、特异度、AUC均高于CA153、CA125和CEA单一诊断;CpG2120诊断乳腺癌的灵敏度及特异度最高,CpG1984、CpG2016及CpG2120联合诊断及单一诊断的灵敏度、特异度、AUC均高于CA153、CA125和CEA单一或联合诊断。结论 血浆Cf-DNA甲基化检测在乳腺癌筛查中的敏感性和特异性较高,具有较好的临床应用价值,联合肿瘤标志物可以提高乳腺癌的早期诊断率。

**关键词:**乳腺癌;DNA甲基化;CCDC181;血浆游离DNA

中图分类号:R736.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.04.017

文章编号:1006-1959(2023)04-0088-06

## Application Value of Plasma Free DNA Methylation Targeted Sequencing in Breast Cancer

LIU Yan-jia<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, WANG Ye-di<sup>1</sup>, WANG Bo<sup>2</sup>

(1.School of Clinical Medicine,Jiamusi University,Jiamusi 154000,Heilongjiang,China;

2.Department of Oncology Surgery,the First Affiliated Hospital of Jiamusi University,Jiamusi 154003,Heilongjiang,China)

**Abstract: Objective** To detect the methylation level of plasma free DNA (cell-free DNA, Cf-DNA) in patients with breast cancer (BRC) and analyze its clinical value. **Methods** The blood samples of 50 patients who were admitted to the Department of Oncology Surgery, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University from December 2021 to June 2022 were collected, including 30 patients with breast cancer (stage I-III) as the experimental group (tumor group) and 20 patients with benign breast disease as the control group (control group). The levels of serum carbohydrate antigen 153 (CA153), serum carbohydrate antigen 125 (CA125) and carcinoembryonic antigen (CEA) were detected by chemiluminescence. Cf-DNA was extracted from the experimental group and the control group, and high-throughput methylation targeted sequencing was performed to evaluate the methylation level. ROC curve was used to evaluate the clinical value of Cf-DNA and CA153, CA125, CEA alone and combined detection in screening breast cancer. **Results** The levels of CA153, CA125 and CEA in the experimental group were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in plasma Cf-DNA concentration between the two groups ( $P>0.05$ ). There were significant differences in the methylation level of CCDC181 promoter region and the overall methylation level between the two groups ( $P<0.05$ ). The ROC curve showed that the area under the curve (AUC) of serum CEA in the diagnosis of breast cancer was 0.766 (95%CI:0.633-0.897), the AUC of CA153 was 0.730 (95%CI:0.591-0.869), the AUC of CA125 was 0.788 (95%CI:0.661-0.914), and the combined AUC was 0.923 (95%CI:0.852-0.993), while the sensitivity, specificity and AUC of combined diagnosis were higher than those of CA153, CA125 and CEA alone; the sensitivity and specificity of CpG2120 in the diagnosis of breast cancer were the highest; the sensitivity, specificity and AUC of CpG1984, CpG2016 and CpG2120 combined diagnosis and single diagnosis were higher than those of CA153, CA125 and CEA single or combined diagnosis. **Conclusion** Plasma Cf-DNA methylation detection has high sensitivity and specificity in breast cancer screening, and has good clinical application value. Combined with tumor markers, it can improve the early diagnosis rate of breast cancer.

**Key words:** Breast cancer; DNA methylation; CCDC181; Plasma free DNA

基金项目:黑龙江省卫健委基金资助项目(编号:2020-329)

作者简介:刘艳佳(1998.2-),女,广东惠州人,硕士研究生,主要从事乳腺癌早期诊断研究

通讯作者:王博(1971.2-),男,黑龙江佳木斯人,硕士,副主任医师,硕士生导师,主要从事乳腺疾病和甲状腺疾病诊治与研究

乳腺癌(breast cancer)是女性常见的恶性肿瘤,高居我国女性恶性肿瘤发病率的第 1 位。乳腺癌早期诊断仍依靠影像学,组织病理学是诊断的金标准,细胞涂片检查的准确性仍待提高,目前在早期诊断上有很多研究将重点转移到分子层面,探索更高敏感度和特异性的诊断方式。循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA,Ct-DNA)是由肿瘤细胞在坏死、凋亡后释放到血浆中的游离 DNA(cell-free DNA,Cf-DNA),其携带的遗传信息与原发肿瘤组织保持着高度一致性,能克服常规组织活检所无法突破的肿瘤异质性问题<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化被证明是肿瘤发生的重要机制之一,是最常见的表观遗传修饰形式,S-腺苷甲硫氨酸的甲基基团在 DNA 甲基化转移酶作用下,转移到胞嘧啶的 5' 位上,使之转化为 5'-甲基胞嘧啶<sup>[2]</sup>。DNA 中富含 CpG 岛甲基化位点的区域称之为 CpG 岛(CpG island),其主要分布在启动子及第一外显子区。很多肿瘤的发生与启动子区的高甲基化抑癌基因沉默,低甲基化原癌基因激活有关。C1orf114,也称为 CCDC181,编码含有 181 的盘绕线圈结构域,是一种功能未知的蛋白质。CCDC181 高甲基化与许多癌症有关,包括前列腺癌、肺癌、口咽鳞癌和乳腺癌等,且 CCDC181 的甲基化和乳腺癌的早期诊断、术后监测以及预后中都有意义<sup>[3]</sup>。基于此,本研究拟从肿瘤标志物、血浆循环游离 DNA 及 CCDC181 甲基化层面探索乳腺癌的诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2021 年 12 月-2022 年 6 月佳木斯大学附属第一医院肿瘤外科收治的乳腺疾病患者的病历资料。纳入标准:①经临床表现、实验室检查等确诊,乳腺癌符合《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021 版)》<sup>[4]</sup>中诊断标准;②临床资料无缺失;③入院前未接受相关治疗。排除标准:①非首次治疗;②合并凝血功能障碍或其他影响本研究的疾病;③妊娠期女性;④合并其他部位肿瘤。最终纳入 50 例乳腺疾病患者,均为女性。按照病理检查结果

显示,其中 30 例乳腺癌患者作为实验组(tumor 组),20 例良性乳腺疾病患者作为对照组(control 组)。实验组年龄 38~69 岁,平均年龄(45.96±6.651)岁;临床分期按照 AJCC 第 8 版乳腺癌分期系统<sup>[5]</sup>分为 0 期 3 例,I 期 12 例,Ⅱ期 11 例,Ⅲ期 4 例。对照组年龄 38~70 岁,平均年龄(46.28±6.21)岁。两组年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。本研究已通过佳木斯大学生物和医学伦理委员会的审批准。

1.2 肿瘤标志物检测 CA153、CA125、CEA 均采用化学发光法检测,试剂盒由罗氏公司提供。使用 411 全自动化学发光免疫分析仪,严格按照操作规程进行测定。两组受检者均在清晨空腹状态下采集 4 ml 静脉血,采血后尽快分离出血清,避免脂血和溶血,当日测定。正常参考值:CA153<28 U/ml,CA125<35 U/ml,CEA<3.5 μg/ml。

1.3 DNA 提取及亚硫酸氢盐处理 采集被检查者 10 ml 血样置于 EDTA 抗凝管,4 h 内完成离心、分装等前处理。血样本在 4 ℃低温情况下离心,先在 3000 r/min 离心 10 min,取上层清液再次 16 000 r/min 离心 10 min 之后取上清血浆于-80 ℃冰箱冻存备用。Cf-DNA 提取以及靶向甲基化检测。使用磁珠法通用型基因组 DNA 提取试剂盒(DP705)(TIANGEN 公司)说明书提取血浆游离 DNA,基于 Acegen Targeted Methyl Panel 多重靶向亚硫酸盐测序系统软件设计目标序列多重亚硫酸盐 PCR 扩增引物池(上游引物池 A 和下游引物池 B,引物长度 26~35 碱基,退火温度 55 ℃~65 ℃,扩增子长度 70~200 bp),具体各引物的序列见表 1,扩增产物以使用于测序文库制备。Cf-DNA 经过亚硫酸盐转化回收(ZYMO EZ DNA Methylation -Gold Kit,Zymo Research, Irvine,CA,USA),用于多重亚硫酸盐 PCR 扩增 25~33 个循环;靶向扩增产物用 1X 的磁珠(Agencourt AMPure XP,Beckman Coulter)纯化回收后用于 DNA 小片段文库制备。

表 1 基因引物序列

targetSeq	ID	pD	pE
CCDC181	20220726T1	CACCAAAATCCTAAAAA	ATTAATTTCTACT
		TTTTTCATACAAAATAA	TATCACCAAAATCC
CCDC181	20220726T2	CCATTTTTTAATATACCA	TTCTTACAATATCCAAATA
		TTTCAAAATCTACTTAA	AATACCATTTTTTAATATAC
CCDC181	20220726T3	TTTATCCATTATATC	TTACCATAAAATTAATAA
		CCAAAAACCTAATC	TCATTTATCCATTATATCC

1.4 TBS 靶向甲基化测序 在所有研究对象中随机选抽取实验组 15 例, 对照组 10 例, 进行下游 CCDC181 基因启动子区甲基化水平检测。将制备好的文库经 Qubit 3.0 和安捷伦 2100 Bioanalyzer 进行质检测定浓度(构建及测序均由深圳艾斯基因科技有限公司完成), 合格文库用于 NGS 测序, 采用 Illumina 测序系统, 测序策略为双端 index 测序, 测序读长 PE150; 靶向区域测序扩增子深度不低于 200X。甲基化水平均按如下公式进行计算: C 位点的甲基化水平 = 支持甲基化的 reads 数 / (支持甲基化的 reads 数 + 支持非甲基化的 reads 数)。并统计每个位点在每个样本的中甲基化水平, 其中如果深度小于 30X 的, 将表示为 NA。

1.5 统计学分析 本研究采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析。非正态分布的计量数据用  $[M(P_{25}, P_{75})]$  表示, 组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验; 符合正态分布的计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验。ROC 曲线评价 CA153、CA125、CEA 单独及联合检测血浆 Cf-DNA 甲基化及对乳腺癌的筛查价值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两组肿瘤标志物水平比较 实验组 CA153、CA125、CEA 水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

2.2 两组血浆 Cf-DNA 浓度比较 实验组血浆 Cf-DNA 浓度为  $(0.266 \pm 0.068)$  ng/ml, 对照组为  $(0.227 \pm 0.074)$  ng/ml, 两组血浆 Cf-DNA 浓度比较, 差异无统计学意义 ( $t = 1.876, P = 0.067$ ), 见图 1。

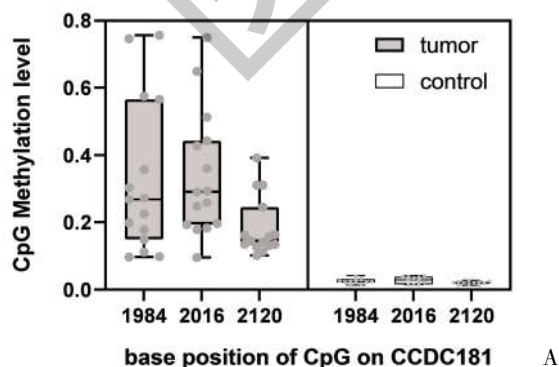


表 2 两组肿瘤标志物水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CA153(U/ml)	CA125(U/ml)	CEA(ng/ml)
实验组	30	27.25±8.78*	33.46±8.77*	8.59±4.71*
对照组	20	20.47±4.71	224.89±5.95	4.20±1.44
F		9.926	24.22	3.158
P		9.3536e-4	3.899e-4	2.8883e-5

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$

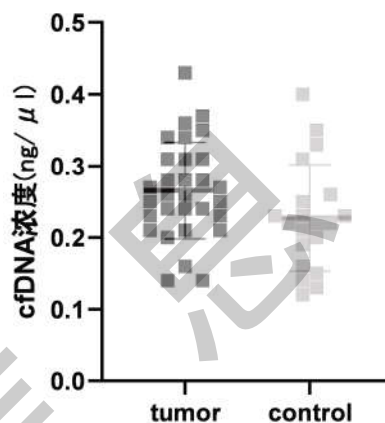
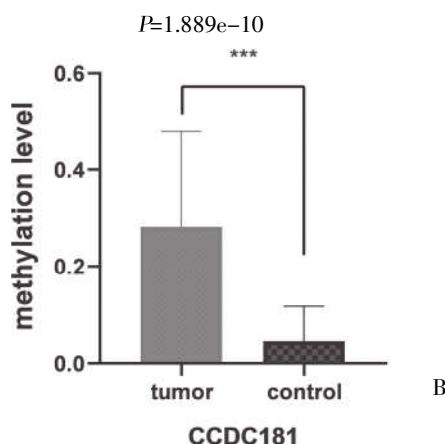


图 1 两组血浆 Cf-DNA 浓度比较

2.3 两组 CCDC181 启动子区甲基化水平比较 TBS 靶向甲基化测序实验结果显示, CCDC181 基因启动子区上 3 个 CpG 位点: 1984、2016 和 2120 (分别位于基因组 169463204, 169463236, 169463340) 的甲基化水平见图 2A; 实验组 CCDC181 启动子区 CpG 岛甲基化水平为  $[0.245(0.139, 0.377)]$ , 对照组为  $[0.024(0.018, 0.035)]$ , 两组总体甲基化水平比较, 差异有统计学意义 ( $Z = 6.440, P = 1.889e-10$ ), 见图 2B。



注: A: 两组 CCDC181 启动子区 3 个 CpG 岛的甲基化水平; B: 两组 CCDC181 的甲基化水平比较, \*\*\* $P < 0.05$

图 2 两组 CCDC181 启动子区甲基化水平比较

2.4 Cf-DNA 和 CA153、CA125、CEA 单独及联合检测筛查乳腺癌的价值

2.4.1 肿瘤标志物筛查乳腺癌的价值 ROC 曲线显示,显示 CEA 诊断乳腺癌的灵敏度高于 CA153 和 CA125, 特异度最高的是 CA153,CA153、CA125 和 CEA 三者联合诊断乳腺癌的灵敏度、特异度及曲线下面积(AUC)均高于单一诊断,见图 3、表 3。

2.4.2 CCDC181 启动子区 CpG 岛甲基化水平筛查乳腺癌的价值 ROC 曲线显示,CpG2120 诊断乳腺癌的灵敏度及特异度最高,CpG1984、CpG2016 及 CpG2120 联合诊断及单一诊断的灵敏度、特异度、AUC 高于 CA153、CA125 和 CEA 单一或联合诊断。

对比肿瘤标志物,CCDC181 启动子区甲基化水平对乳腺癌的诊断能力更高,见图 4、表 4。

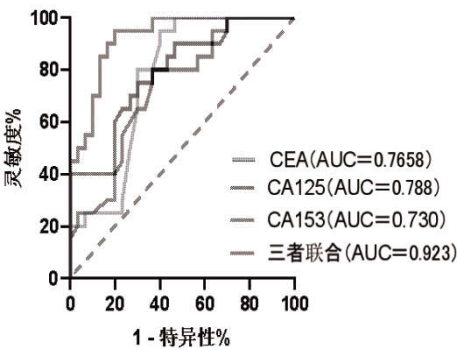


图 3 血清肿瘤标志物的单独及联合筛查乳腺癌的 ROC 曲线

表 3 肿瘤标志物筛查乳腺癌的价值

项目	灵敏度(%)	特异度(%)	Cut-off 值	AUC
CEA	95.00	60.00	7.05 ng/ml	0.766(95%CI:0.633~0.897)
CA153	63.33	80.00	23.25 U/ml	0.730(95%CI:0.591~0.869)
CA125	75.00	70.00	27.3 U/ml	0.788(95%CI:0.661~0.914)
三者联合	95.00	80.00	/	0.923(95%CI:0.852~0.993)

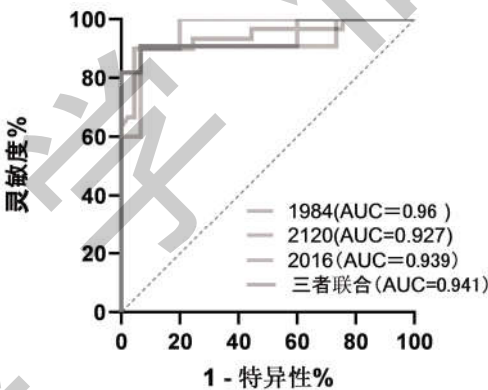


图 4 CCDC181 启动子区 3 个 CpG 岛甲基化水平单独及联合检测筛查乳腺癌的 ROC 曲线

表 4 CCDC181 启动子区 CpG 位点甲基化水平筛查乳腺癌的价值

项目	灵敏度(%)	特异度(%)	Cut-off 值	AUC
CpG1984	90	93.3	0.07	0.960(95%CI:0.891~1.000)
CpG2016	90.9	93.33	0.08	0.939(95%CI:0.831~1.000)
CpG2120	90.91	93.33	0.05	0.927(95%CI:0.798~1.000)
三者联合	90	95.56	0.05	0.941(95%CI:0.880~1.000)

3 讨论

血清肿瘤标志物检测是生化检测,具有费用低廉,损伤小,实时操作、检测便捷,患者易接受等特点,但是受不同个体以及技术条件限制,特异性及灵

敏度不高,三者联合可提高敏感度和特异度。乳腺癌常用的早期筛查方法有肿瘤标记物、乳腺超声、乳腺核磁共振、乳腺钼靶等检查<sup>[6]</sup>。乳腺超声检查因其较低的特异性而受到质疑,造成了许多乳腺良性病变

的活检损伤<sup>[7]</sup>。目前组织活检病理学诊断仍是诊断乳腺癌的金标准,但必须是影像学诊断结果或临床表现提示可疑或高度恶性,才可以进行乳腺活组织检查<sup>[8]</sup>。乳腺超声和钼靶检查已被用于筛查,但取决于医师经验、患者年龄、乳房密度和绝经后荷尔蒙治疗等因素,其敏感度在68%~93%<sup>[9]</sup>。Cf-DNA检测作为液体活检技术,正成为一种创新的、微创的和高效的癌症细胞研究方法,可以有效反映肿瘤细胞中基因的一些特征,如特异性突变、DNA甲基化<sup>[10]</sup>等。有研究在组织中共发现了18种乳腺癌特异性DNA甲基化模式,最佳候选者EFC#93被验证用于临床,是化疗前样本中独立的不良预后标志物,说明血清DNA甲基化模式的检测为乳腺癌的早期诊断和管理提供了一个新工具<sup>[11]</sup>。Cf-DNA及甲基化检测,可以大大提高乳腺癌的早期诊断率并且可以监测治疗效果。有研究通过在癌症基因组数据库(TCGA)中对DNA甲基化谱进行计算分析,结果建立了26个具有标记的诊断预测模型,Cf-DNA甲基化标记群具有较高的诊断能力,且与Cf-DNA甲基化和乳房钼靶诊断乳腺癌的能力相比,其比乳房钼靶检查优秀<sup>[12]</sup>。另有研究通过定量甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)测序的具有5个甲基化差异标记物的基因组合可以将食管癌与健康对照者区分开来,其中诊断I~IV期食管癌的特异性为91%,敏感性分别为43%、64%、77%和92%<sup>[13]</sup>。

本研究收集I~III期乳腺癌患者和乳腺良性疾病患者血浆标本,检测结果证实二者血浆Cf-DNA浓度基本一致,分析其原因与乳腺癌分期有关。有学者发现<sup>[14]</sup>,转移性乳腺癌Cf-DNA总量和循环肿瘤细胞(CTC)数量是总生存期(OS)的预测因素,而Cf-DNA总量是无进展生存期(PFS)的唯一预测因素。考虑乳腺癌本身存在异质性,其中常见突变的频率较低,很可能无法检出带有突变信息的DNA片段。其次,在乳腺癌中Ct-DNA分析的检测灵敏度较低(<40%)<sup>[15]</sup>,血浆中Ct-DNA含量很低,临床取样时采集的血液量有限(一般10 ml),很可能无法检出带有突变信息的DNA片段。

DNA甲基化的修饰具有组织特异性、变化范围广、高敏感性等特点,非常适合作为癌症早期检测的标志物。有研究表明,GCM2、ITPRIPL1和CCDC181的循环无细胞甲基化敏感度水平为97%,曲线下面积(AUC)为0.955,联合检测灵敏度水平可达

100%,AUC为0.961,且术后有明显下降。这证明了CCDC181甲基化是乳腺癌的早期诊断的良好生物标志物,具有高的敏感度和特异度,也可以用于乳腺癌的治疗监测<sup>[3]</sup>。有研究使用靶向甲基化测序分析,计算治疗前后结直肠癌、乳腺癌、黑色素瘤和非小细胞肺癌患者甲基化评分,发现甲基化评分对结直肠癌的诊断准确率最高,其次是乳腺癌。低甲基化分数与高甲基化分数相比,与更长的生存期和更长的治疗失败时间有关,血浆Cf-DNA甲基化评分与治疗效果一致。Cf-DNA甲基化不仅可以用于乳腺癌的早期诊断,也在乳腺癌治疗的效果的监测中有很大的应用前景<sup>[16]</sup>。本研究发现,血浆Cf-DNA甲基化、CCDC181启动子区甲基化水平可以有效诊断乳腺癌,若其联合血清肿瘤标志物检测,可提高筛查乳腺癌的敏感性和准确性,在乳腺癌早期筛查中具有较好的应用价值。本研究发现,乳腺癌患者血清CA153、CA125、CEA及CCDC181启动子区甲基化水平均升高,说明血清CA153、CA125、CEA水平变化在乳腺癌中呈现高表达状态,证实了其与乳腺癌的相关性。其中CA153是乳腺细胞上皮表面糖蛋白的变异体,当乳腺细胞发生癌变时,癌细胞会向血液循环中释放,从而导致血清中的CA153水平异常增高,早期乳腺癌的阳性检出率可达60%,晚期乳腺癌的阳性检出率高达80%,对乳腺癌患者的预后评估效果也较好,是目前公认的诊断乳腺特异性较高的一种肿瘤标志物<sup>[17]</sup>。同时CEA诊断乳腺癌的灵敏度于三者之中最高,但是仍不及CCDC181的诊断能力。CCDC181启动子区的CpG位点检测乳腺癌的能力高于肿瘤标志物,其诊断乳腺癌的灵敏度及特异度均高于90%,三者联合特异度可高达95%。CCDC181基因编码的包含卷曲结构域的蛋白家族的一个新成员的分子特征。CCDC181是一种Hook1相互作用蛋白<sup>[18]</sup>。在众多研究中,可以发现CCDC181甲基化在癌症诊断中的巨大潜力,如前列腺癌<sup>[19]</sup>、口咽鳞状细胞癌<sup>[20]</sup>、肺腺癌<sup>[21]</sup>和乳腺癌<sup>[22]</sup>等癌症中,CCDC181的甲基化是新的诊断和预后癌症生物标志物,可能指导临床实践中的治疗决策。

本研究的不足之处主要有2个方面:一是样本量较小,二是未纳入健康人进行对照实验。在今后的研究中需增加样本量,同时开展健康人群血浆Cf-DNA甲基化检测,进一步验证其诊断效能。

综上所述,乳腺癌患者外周血中的Cf-DNA浓

度与乳腺良性疾病患者无差异, 不能通过 Cf-DNA 浓度区分二者。而通过高通量测序检测 Cf-DNA 中特定区域的甲基化, 可以有效地区分乳腺癌与乳腺良性疾病。CCDC181 启动子区 3 个 CpG 位点可以进行 Cf-DNA 无创液体活检多靶点甲基化检测, 联合血清肿瘤标志物可提高乳腺癌筛查的敏感性和准确性, 具有较好的临床价值, 可作为潜在的乳腺癌辅助诊断指标。

#### 参考文献:

- [1] Fernandes Marques J, Pereira Reis J, Fernandes G, et al. Circulating Tumor DNA: A Step into the Future of Cancer Management[J]. *Acta Cytol*, 2019, 63(6):456-465.
- [2] Pan X, Ji P, Deng X, et al. Genome-wide analysis of methylation CpG sites in gene promoters identified four pairs of CpGs-mRNAs associated with lung adenocarcinoma prognosis[J]. *Gene*, 2021, 810:146054.
- [3] Wang SC, Liao LM, Ansar M, et al. Automatic Detection of the Circulating Cell-Free Methylated DNA Pattern of GCM2, IT-PRIP1 and CCDC181 for Detection of Early Breast Cancer and Surgical Treatment Response[J]. *Cancers*, 2021, 13(6):1375.
- [4] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范 (2021 版)[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31 (10):954-1040.
- [5] 唐林, 陈巍巍, 管晓翔. AJCC 第 8 版乳腺癌分期系统更新的解读[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(11):1038-1040.
- [6] Barba D, Leon-Sosa A, Lugo P, et al. Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know [J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2021, 157:103174.
- [7] Zhuang Z, Yang Z, Raj ANJ, et al. Breast ultrasound tumor image classification using image decomposition and fusion based on adaptive multi-model spatial feature fusion [J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2021, 208:106221.
- [8] Bevers TB, Helvie M, Bonaccio E, et al. Breast Cancer Screening and Diagnosis, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2018, 16 (11):1362-1389.
- [9] Schwartzberg LS, Kiedrowski LA. Olaparib in hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer with a somatic BRCA2 mutation [J]. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2021, 13:17588359211006962.
- [10] Barault L, Amatu A, Siravegna G, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer [J]. *Gut*, 2018, 67(11):1995-2005.
- [11] Palmieri M, Baldassarri M, Fava F, et al. Two-point-NGS analysis of cancer genes in cell-free DNA of metastatic cancer patients[J]. *Cancer Medicine*, 2020, 9(6):2052-2061.
- [12] Zhang X, Zhao D, Yin Y, et al. Circulating cell-free DNA-based methylation patterns for breast cancer diagnosis [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2021, 7(1):106.
- [13] Qiao G, Zhuang W, Dong B, et al. Discovery and validation of methylation signatures in circulating cell-free DNA for early detection of esophageal cancer: a case-control study [J]. *BMC Med*, 2021, 19(1):243.
- [14] Fernandez-Garcia D, Hills A, Page K, et al. Plasma cell-free DNA (cfDNA) as a predictive and prognostic marker in patients with metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Research*, 2019, 21 (1):149.
- [15] Moss J, Zick A, Grinshpun A, et al. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer[J]. *Annals of Oncology*, 2020, 31(3):395-403.
- [16] Liu L, Toung JM, Jassowicz AF, et al. Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification[J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29(6):1445-1453.
- [17] Jain M, Ingole SD, Deshmukh RS, et al. CEA, CA153, and miRNA expression as potential biomarkers in canine mammary tumors[J]. *Chromosome Res*, 2021, 29(2):175-188.
- [18] Schwarz T, Prieler B, Schmid JA, et al. Ccdc181 is a microtubule-binding protein that interacts with Hook1 in haploid male germ cells and localizes to the sperm tail and motile cilia[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2017, 96(3):276-288.
- [19] Gao C, Zhuang J, Li H, et al. Exploration of methylation-driven genes for monitoring and prognosis of patients with lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18:194.
- [20] Ren S, Gaykalova D, Wang J, et al. Discovery and development of differentially methylated regions in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2018, 143(10):2425-2436.
- [21] Li R, Yang YE, Yin YH, et al. Methylation and transcriptome analysis reveal lung adenocarcinoma-specific diagnostic biomarkers[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1):324.
- [22] Ishihara H, Yamashita S, Fujii S, et al. DNA methylation marker to estimate the breast cancer cell fraction in DNA samples[J]. *Medical Oncology*, 2018, 35(11):147.

收稿日期: 2022-10-22; 修回日期: 2022-11-17

编辑/成森