

DNA甲基化在乳腺癌检测、预后和治疗中的研究进展

王浩妍^{1*}, 江瀚宇^{2*}, 王溯宜², 罗欣茹¹, 姚亚超^{1,2,3#}

¹暨南大学附属广东省第二人民医院检验医学部, 广东 广州

²广东医科大学第一临床医学院, 广东 湛江

³南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州

收稿日期: 2025年8月26日; 录用日期: 2025年9月19日; 发布日期: 2025年9月28日

摘要

乳腺癌是全球女性发病率最高的肿瘤, 但目前乳腺癌的过度诊断和个体化的治疗仍有不足, 这导致乳腺癌仍是女性癌症相关死亡的主要原因。DNA甲基化是参与肿瘤形成、侵袭和转移的关键表观遗传修饰因子, 而在许多研究中已经证实DNA甲基化与乳腺癌有关, DNA甲基化可能为乳腺癌早期诊断以及改善乳腺癌的预后提供价值。本文综述了目前乳腺癌中研究较多的甲基化基因及其应用方向, 这些基因可能是潜在地应用于液体活检的标志物, 最后总结了基于液体活检的甲基化检测在乳腺癌中的应用现状, 指出了目前存在的问题及未来的发展方向。

关键词

DNA甲基化, 乳腺癌, 液体活检

Research Progress in DNA Methylation in Breast Cancer Detection, Prognosis and Treatment

Haoyan Wang^{1*}, Hanyu Jiang^{2*}, Suyi Wang², Xinru Luo¹, Yachao Yao^{1,2,3#}

¹Department of Laboratory Medicine, Guangdong Second People's Hospital Affiliated to Jinan University, Guangzhou Guangdong

²The First Clinical Medical College of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong

³The Second Clinical Medical College of Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

Received: August 26, 2025; accepted: September 19, 2025; published: September 28, 2025

*共第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 王浩妍, 江瀚宇, 王溯宜, 罗欣茹, 姚亚超. DNA 甲基化在乳腺癌检测、预后和治疗中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2025, 15(10): 292-305. DOI: 10.12677/acm.2025.15102757

Abstract

Breast cancer is the most prevalent tumour in women globally, but there are still shortfalls in the over-diagnosis of breast cancer and individualized treatment, which results in breast cancer remaining the leading cause of cancer-related deaths in women. DNA methylation is a key epigenetic modifier involved in tumour formation, invasion and metastasis, and many studies have demonstrated that DNA methylation is associated with breast cancer, thus DNA methylation may provide value in the early diagnosis of breast cancer as well as in improving the prognosis of breast cancer. This paper reviews the more studied methylation genes in breast cancer and their application directions, which may be potential markers for application in liquid biopsy, and finally summarizes the current status of liquid biopsy-based methylation assays in breast cancer, pointing out the current problems and future development directions.

Keywords

DNA Methylation, Breast Cancer, Liquid Biopsy

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

DNA 甲基化 DNA 甲基化是常见的表观遗传修饰之一, 它将甲基添加到胞嘧啶的 5 位碳中, 这主要发生在 CpG 二核苷酸中。DNA 甲基化可以在不改变 DNA 序列的情况下调节基因活性, 控制基因沉默和表达。异常的 DNA 甲基化有助于肿瘤发生, 主要通过整体低甲基化、多个基因组区域(主要是 CpG 岛)的局灶性高甲基化以及甲基化胞嘧啶的直接诱发[1]。

在 2022 年的统计中, 乳腺癌是全球女性发病率最高的肿瘤, 也是女性癌症死亡的主要原因, 约占女性所有癌症的 23.8% [2], 在最新的指南中, 乳腺癌的筛查主要依靠乳腺 X 线、乳腺超声以及乳腺 MRI 等, 其中乳腺 X 线是最基本的方法, 但由于放射伤害、疼痛以及对致密型乳腺、近胸壁肿块的显示不佳, 不作为年轻女性的首选方法, 乳腺超声和 MRI 则通常作为乳腺 X 线的补充检查。同时, 乳腺癌过度诊断以及临床治疗仍缺乏个体化也是日益突出的问题。因此, 迫切需要寻找新的乳腺癌分子指标[3]。

在乳腺癌中也有广泛的 DNA 甲基化发生, 有研究发现在乳腺肿瘤或乳腺癌细胞系中已有超过 100 个基因被鉴定出现异常甲基化, 且 DNA 甲基化与乳腺癌临床病理特征存在显著相关性, 指出 DNA 甲基化可以作为早期乳腺癌诊断以及预后的重要分子标志物, 这可能比通过检测基因突变、抑癌基因失活等更为便捷准确[4]。

液体活检是通过识别癌细胞的生长和/或凋亡释放到血液中的肿瘤细胞或肿瘤 DNA 来进一步阐明肿瘤的特征的方法, 它侵入性较小, 易于被人们接受。液体活检通常检测循环肿瘤细胞(CTCs)、循环肿瘤 DNA(ctDNA)、外泌体、microRNA(miRNA)、外周血循环 RNA、肿瘤教育血小板(TEPs)和循环肿瘤血管内皮细胞 CTECs 等[5]。其中 ctDNA 被更广泛的研究, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了首个基于 ctDNA 的 EGFR 突变血浆检测, 这被认为是一个极具实用性的突破[6]。而最近的基于液体活检来检测甲基化的技术包括下一代测序、甲基化阵列、数字 PCR 等, 但目前基

于不同平台、不同检测方法的检测结果往往存在较为显著的差异[7], 根据样本、检测目的和实验室条件的不同来选择合适的检测方法, 采用标准化的检测程序, 参照适用标准进行严格的质量控制, 是准确检测 DNA 甲基化、得到满意的检测结果的关键。

本综述总结了 DNA 甲基化检测技术及其适用的场景, 并总结了目前在乳腺癌甲基化中研究较多的基因, 这些基因有作为早期检测及预后分析的潜力, 最后综述了目前的基于液体活检甲基化检测在乳腺癌中的应用现状。

2. 测量 DNA 甲基化的技术

首先要进行甲基化检测, 必须先将甲基化与未甲基化的 CpG 位点区分开来, 这需要对 DNA 进行预处理, 在过去的几年中, 已经开发了许多方法来区分甲基化和未甲基化的 CpG 位点的方法, 大致可分为三类: ① 经亚硫酸氢盐转化的方法; ② 限制性内切酶法; ③ 亲和富集法(如图 1、图 2、图 3 所示)。

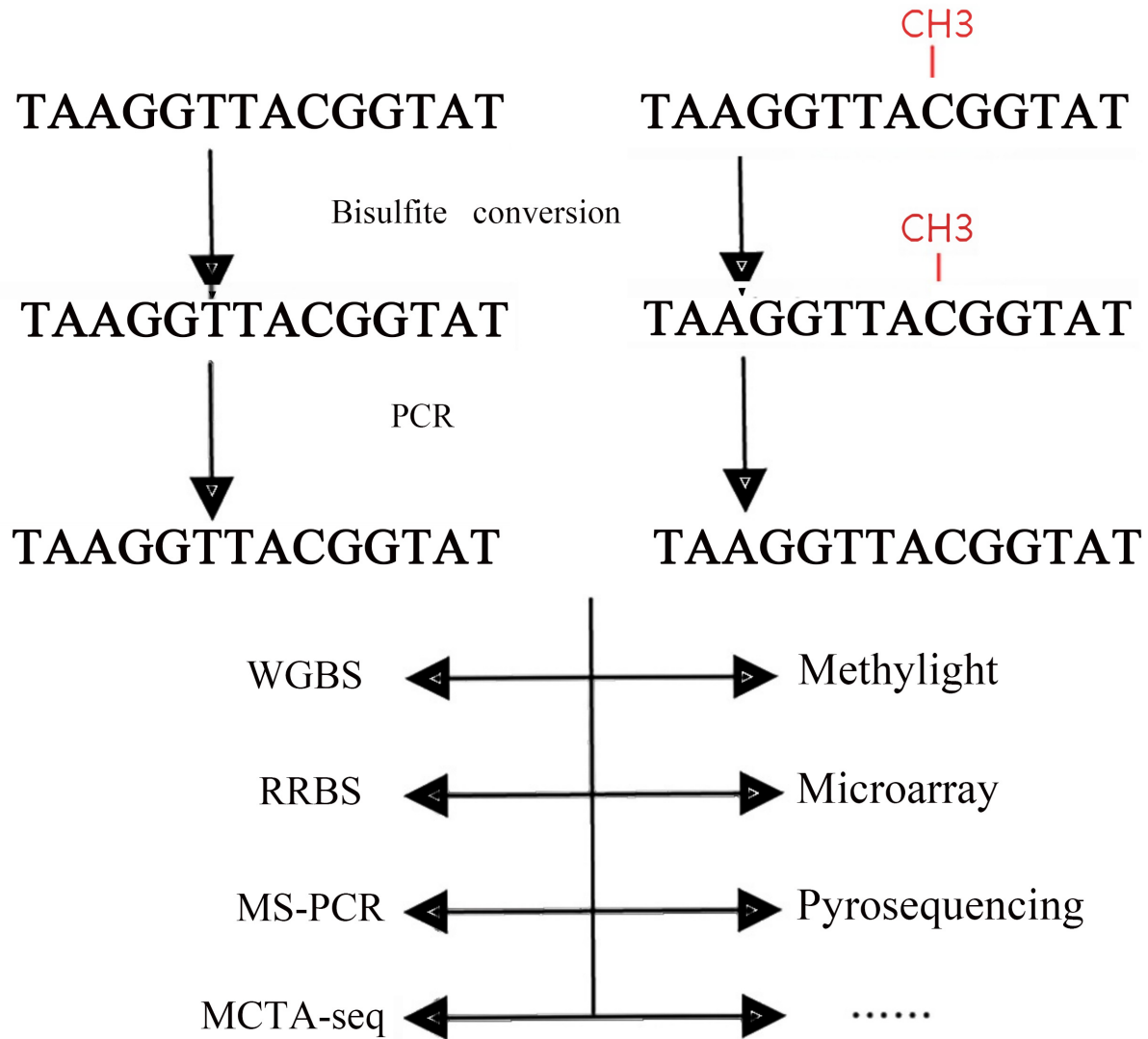


Figure 1. Principles of bisulfite conversion and representative technologies
图 1. 亚硫酸氢盐转化原理及代表性技术

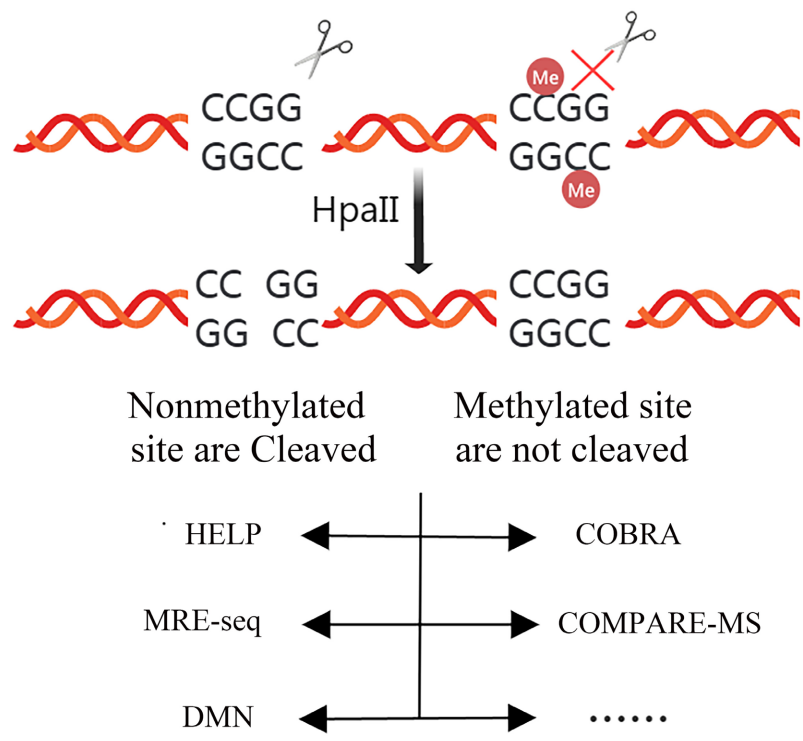


Figure 2. Principles of the restriction endonuclease method and the techniques it represents
图 2. 限制性内切酶方法的原理及其代表的技术

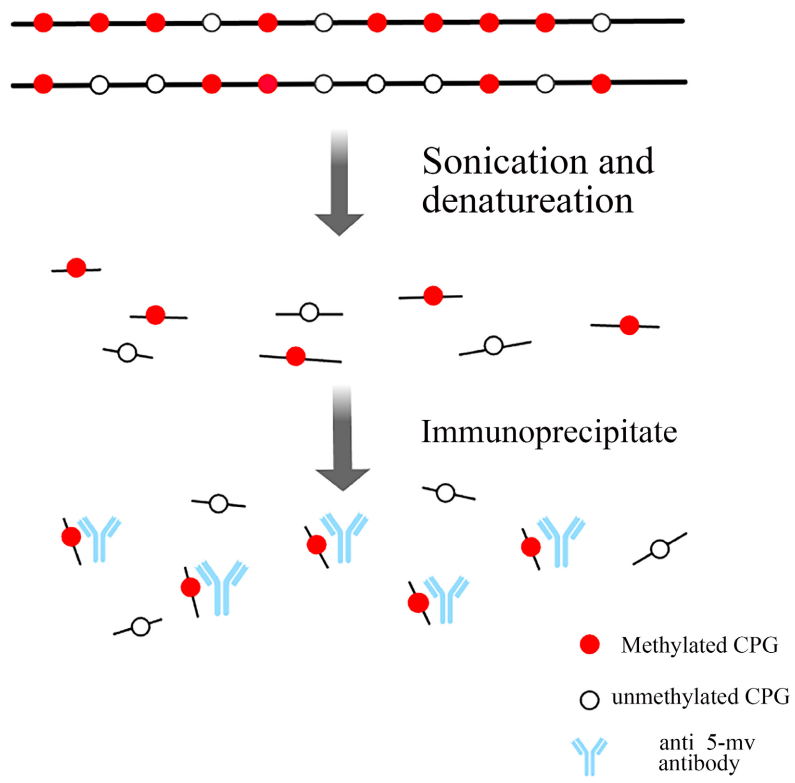


Figure 3. Principle of affinity enrichment
图 3. 亲和富集原理

2.1. 基于亚硫酸氢盐处理的方法

用亚硫酸氢盐处理是应用最广泛的一种方法, 亚硫酸氢盐转化是一个三步反应, DNA 中的胞嘧啶首先转化为磺化胞嘧啶, 然后脱氨为磺化尿嘧啶, 最后转化为尿嘧啶, 随后的 PCR 反应将尿嘧啶扩增为胸腺嘧啶。而甲基化的胞嘧啶的脱氨步骤比 C 慢了近两个数量级, 因此可以将甲基化和未甲基化的位点进行区分[8]。基于亚硫酸氢盐转化的方法包括一代和二代测序, 如焦磷酸测序、亚硫酸氢盐修饰后测序(BSP)、全基因组亚硫酸盐测序(WGBS)等; 使用 PCR 的方法, 如甲基化特异性 PCR (MSP)、Methylight 技术、数字微滴 PCR 等; 此外, 还有基于芯片的方法。

但亚硫酸氢盐处理会诱导随机 DNA 断裂, 产生短的单链 DNA 片段。且反应条件恶劣, 会极大地影响 DNA 的回收率, 特别是对于已经高度片段化且浓度非常低的 cfDNA [9], 这为 DNA 甲基化在早期肿瘤检测方面的应用增加了难度。因此, 许多无亚硫酸氢盐转换的方法也被开发出来, 目前主要有限制性内切酶法和亲和富集法, 以及一些三代测序和新技术的开发, 摆脱了冗杂的亚硫酸氢盐转化过程。

2.2. 基于限制性内切酶处理的方法

利用甲基化敏感性限制性内切酶对甲基化区域不切割的特性, 将 DNA 消化为大小不同的片段后再进行分析。甲基化敏感的限制性内切酶(MSRE), 如 HpaII、McrBC、AciI 和 Hin6I, 它们只能切割未甲基化的区域, 保护甲基化的 CpG 位点; 而甲基化不敏感的酶(如 MspI、ApeKI 和 TaqI)切割 DNA 序列而不考虑相关序列的甲基化状态。常使用的甲基化敏感的限制性内切酶有 HpaII-MspI (识别序列 CCGG)和 SmaI-XmaI (CCCGGG)等, 其中 HpaII和 MspI均能识别 CCGG 序列, 然而当序列中的胞嘧啶发生甲基化时, HpaII不切割, 利用 HpaII-MspI的这种属性处理 DNA, 随后进行 Southern 或 PCR 扩增分离产物, 可以明确甲基化状态[10]。如 HELP 技术便是通过连接介导的 PCR 测序进行 HpaII 微小片段富集, 该方法使用甲基化敏感的 HpaII 和甲基化不敏感的 MspI [11], 允许胞嘧啶甲基化的基因组内分析和基因组间比较。

2.3. 亲和富集法

亲和富集预处理的甲基化检测技术, 原理是利用抗甲基胞嘧啶抗体进行免疫沉淀, 或甲基 CpG 结合蛋白的特异性来富集甲基化的基因组区域, 以供后续分析[12]。基于亲和富集的 DNA 甲基化检测技术主要有甲基化 DNA 免疫沉淀技术(MeDIP) [13]与甲基化 CpG 结合蛋白亲和捕获技术(MBDCap)等。MeDIP 方法基于 IP 的原理, 将基因组 DNA 超声波打断并变性后, 使用 5-mc 特异性抗体富集甲基化片段, 再分离纯化得到甲基化 DNA 片段, 然后再用测序(MeDIP-Seq)或 DNA 微阵列(MeDIPChip)等方法分析; MBDCap 技术与 MeDIP 方法类似, 利用甲基化 DNA 结合蛋白来对甲基化的 DNA 进行免疫沉淀, 因为采用的富集蛋白不同, MeDIP 普遍富集 CpG 低密度的甲基化区域, 而 MBDCap 则普遍富集 CpG 高密度的甲基化区域。

2.4. 三代测序技术

与一、二代测序相比, 第三代测序技术有以下几个优点: ① 实现真正的单分子测序, 无需 PCR 扩增步骤; ② 超长的测序读长, 平均测序读长 10 kb~15 kb, 最长读长可达到 40 kb; ③ 可直接检测 DNA 甲基化, 无须亚硫酸氢盐处理。第三代测序技术通过分子量区分不同的碱基, 因此甲基化修饰的碱基也可以通过分子量差异被检测出。避免了亚硫酸氢盐处理, 同时读长优势降低了重复序列的比对和拼接难度。

目前常用的甲基化检测方法如表 1 所示。

Table 1. Commonly used DNA methylation testing techniques and their advantages and disadvantages
表 1. 常用 DNA 甲基化检测技术及其优缺点

名称	检测范围	前处理方式	所需样本量	成本	优势	劣势	引文
WGBS	全基因组	亚硫酸氢盐转化	50 ng~100 ng	高	最全面的 DNA 甲基组分析	成本高、操作复杂	[42]
RRBS	全基因组	甲基化特异性内切酶	100 ng~1 µg	低于 WGBS	较高的 CGIs 覆盖率(覆盖 85% 的 CpG 位点)	需要更多 DNA 样本	[42]
MCTA-seq	全基因组	亚硫酸氢盐转化	33 ng~66 ng	中等	较高的 CGIs 覆盖率	仅限于 CpG 位点, 且会减少其他甲基化背景	[43]
Microarry	全基因组	均可	6~18	低	可设计覆盖热点的 CpG 位点	全基因组覆盖率较低	[44]
MeDIP-seq	全基因组	亲和富集		Low	灵敏度高, 适用于微量 DNA 样本, 可检测非 CpG 位点的甲基化, 可以区分 5 mc 和 5 hmc	无法提供单个 CpG 位点的详细信息	[14]
MSP	特定位点	亚硫酸氢盐转化	24 µg~48 µg	Low	可以直接测量 DNA 甲基化, 简单快速	一次只能检测 1~2 个 CpG 位点, 引物和探针设计复杂	[45]
Pyrophosphate sequencing	特定位点	亚硫酸氢盐转化	200 µg	High	检测特定位点甲基化的“金标准”, 高分辨率	成本高, 耗时, 对样品的要求较高	[46]
Methylight	特定位点	亚硫酸氢盐转化	<100 µg	High	高灵敏度和特异性, 相对定量, 可同时检测多个位点	需要设计特定的引物和探针, 成本高	[45]
dPCR	特定位点	亚硫酸氢盐转化	6.5 µg~10 µg	moderate	高灵敏度和特异性, 绝对定量	需要设计特定的引物和探针	[45]
5hmC-Seal	特定位点	亲和富集	1~10	moderate	链亲和素对含有 5 hmC 的 cfDNA 具有特异性	对含 5 hmc 的 DNA 亲和力和低, 不能提供单基分辨率	[47]
Nanopore sequencing	全基因组	-	-	Low	读取长度长, 通量高, 设备成本低, 实时获取测序信息, 无需 PCR 扩增直接测序	连续碱基检测误差大, 错误率高, 对样本量要求高	[48]
SMRT	全基因组	-	-	High	可直接对 DNA/RNA 进行测序, 可对未扩增的 DNA 进行检测, 不需使用重亚硫酸盐	昂贵, 依赖于 DNA 聚合酶活性, 高错误率	[49]

3. 代表的生物标志物

3.1. BRCA

BRCA 基因包括 BRCA1 和 BRCA2, 早在 1990 年, King 等人便发现染色体 17q12 与早发性遗传性乳腺癌存在明确关联, 1991 年, 将这段基因命名为 BRCA1 [14], 1994 年又发现了 BRCA2, BRCA 是一种肿瘤抑制基因, 起多功能泛素 E3 连接酶的作用。BRCA1 参与调节多种细胞过程, 包括转录、蛋白质泛素化、细胞周期调节和 DNA 损伤反应, 在同源重组 DNA 修复中起着特别重要的作用。近年来, 研究表明 BRCA 的功能失活是乳腺癌发病机制的重要机制。

在曾经, 我们认为 BRCA 基因突变主要与遗传性/家族性乳腺癌相关, 超过 60% 的 BRCA1 和 BRCA2 中任何一个杂合种系突变的女性最终在 70 岁时患上乳腺癌, 而 BRCA 基因甲基化几乎只发生在散发性乳腺癌患者中[15], 在 1997 年 A Dobrovic 等人用 southern 印迹在 7 例散发性乳腺癌组织样本中的 2 例中观察到 BRCA1 启动子区域高甲基化, 但在任何正常组织中均未观察到高甲基化, 这些观察结果与人类癌症中表观遗传机制的重要作用一致[16]。基于组织样本的结果, 2009 年发表了一篇血浆中 BRCA1 基因甲基化对乳腺癌诊断价值的研究, 在本研究中, 乳腺癌血浆样本中 BRCA1 基因甲基化的检出率为 31.7% (20/63), 所有健康标本均未检出任一基因甲基化, 即特异性为 100%。且与肿瘤组织类型、淋巴结转移明显相关, 提示 BRCA1/P13 基因甲基化可以指导乳腺肿瘤的病理分型并为临床手术治疗提供思路[17]。

三阴性乳腺癌(TNBC)是雌激素受体(ER)、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、孕激素受体(PR)表达均呈阴性的一种病理类型, 发生率占有病理类型的 10%~20%, 且与其他类型不同的是, 三阴性乳腺癌常发生于绝经前的年轻女性身上, 它侵袭性强, 复发率高, 可选择的治疗手段少, 预后较差。而有研究发现, BRCA1 启动子甲基化似乎与三阴性乳腺癌有关。有研究显示, 外周血细胞中的 BRCA1 启动甲基化的患者 TNBC 的风险增加约五倍[18], 且正常组织中 BRCA1 启动子甲基化与 TNBC 发生的风险显著相关, 表明其有预测 TNBC 发生的能力[19]。而在三阴性乳腺癌中, 与 BRCA1 未甲基化相比, BRCA1 甲基化的患者对辅助化疗敏感, 生存率较高[20]-[21]。大豆植物雌激素对乳腺癌具有保护作用的机制也被证明与逆转 DNA 高甲基化并恢复 BRCA1 和 BRCA2 的表达有关[22]。

3.2. RASSF1A

Ras 关联结构域家族 1A (RASSF1A)是 RASS 家族(RASSF)的成员, 该家族包括 10 个基因(RASSF1 至 RASSF10)。这些基因在调控细胞周期、细胞凋亡和微管稳定中起关键作用。早在 2001 年, 就在许多肿瘤类型中报道了 RASSF1A CpG 岛的异常 DNA 甲基化及其相关基因沉默, 其中包括乳腺癌[23]。

在早期诊断方面, 一项关于乳腺癌家族诊断前血浆 DNA 中 RASSF1A 甲基化的检测证明, 高危人群和乳腺癌患者血浆中 RASSF1A 甲基化更频繁, 这可能为早期诊断提供价值, 但本研究的样本例数较少, 且灵敏度不高, 还需要更进一步的研究[24]。

而 RASSF1A 的主要应用价值在预后方面, 2012 年的一项研究测定了 HIN-1、RASSF1A、RIL 和 CDH13 四个基因甲基化与首次复发时间和总生存期的关系, 结果显示只有 RASSF1A 甲基化与首次复发时间和总生存期相关[25]。RASSF1A 的甲基化水平还被证明与雌激素(ER)和孕激素受体(PR)的表达有关, 这有助于对激素治疗反应的预测, 从而改善预后[26]。还有研究表明 RASSF1A 可以通过增强多西他赛诱导的细胞周期阻滞, 协同抑制癌细胞生长和增殖, 而 RASSF1A 的高甲基化会使其表达降低, 从而抑制这一过程, 因此高甲基化 RASSF1A 是以多西他赛为基础的化疗在乳腺癌中疗效的重要调节因素[27]。此外, 还有研究使用带有甲基化特异性限制性内切酶(RE-dMSP)的数字 PCR 来检测前哨淋巴结裂解物中 RASSF1A 基因的甲基化, 判断前哨淋巴结的转移状态, 从而改善预后。结果显示出较高的灵敏度和与 OSNA 的一致性[28] [29]。

3.3. APC

APC, 全名为结肠腺瘤性息肉病基因, 位于染色体 5q21~22, 为一个抑癌基因, 其蛋白表达产物是 Wnt 信号转导途径的重要组成部分, 在细胞的生长、发育、凋亡、移动、信号传递等方面起着重要的调控作用[30]。APC 突变是导致家族性腺瘤性息肉病(FAP)患者和非 FAP 患者罹患结直肠癌的重要原因, 而一项研究中运用基于酵母的灵敏检测发现 18% 的乳腺癌中也有体细胞 APC 基因突变(57% 结直肠癌, 小细胞肺癌没有发现) [31], 这也令我们开始着眼于 APC 基因在乳腺癌中的相关研究。

2007 年 Liu Zhen 等人发现乳腺癌中 APC 基因启动子 1A 区甲基化会导致 APC 蛋白表达缺失、该基因失活, 从而诱导癌症发生[32]。2009 年 I Vander Auwera 等通过对 IBC 和非 IBC 的对比, 发现 IBC 中的 APC 启动子甲基化频率更高, 这一结果提示 APC 基因的甲基化可能与肿瘤的表型有关[33]。2015 年 Menha Swellam 等人首次对血清标本进行了甲基化 APC 基因的检测, 发现其在乳腺癌患者中显著高于良性或正常人群, 证明 APC 可能是早期检测乳腺癌的有价值的基于血清的分子标记物[34]。此外, 还有研究表明 APC 基因可能与低组织学分级[35]和侵袭行为(肿瘤大小、淋巴结和远处转移、生存率)有关[36]。

3.4. 其他基因

除了上面介绍的生物标志物外, 其他基因的甲基化在乳腺癌诊断中也有很大的潜力。还有其他相关基因如 SOX17、WNT5A、FOXA1 等基因, 以上所有基因相关的信息见表 2。

Table 2. Major methylation biomarkers in breast cancer
表 2. 乳腺癌的主要甲基化生物标志物

作者(发表年限)	样本量	样本类型	方法	应用	引用
BRCA					
A Dobrovic 等(1997)	7	组织样本	Southern blot	首次发现乳腺癌患者中 BRCA 基因高甲基化	[17]
Jing Feng 等(2009)	92	血清	MSP	乳腺癌的诊断、病理分型及治疗评价	[18]
Xinran Xu 等(2009)	851	组织样本	MSP	乳腺癌的预后分析	[50]
Y. Xu 等(2013)	1163	组织样本	MSP	三阴性乳腺癌患者的预后分析	[21]
Junkuo Li 等(2022)	70	组织样本	MSP	乳腺癌的预后分析及治疗评价	[51]
Per E 等(2022)	637	血清	RRBS	通过 BRCA1 甲基化预测三阴性乳腺癌风险	[20]
Oleksii Nikolaenko 等(2023)	411 成人和 1460 例新生儿	411 例组织样本和 1460 例脐带血	RRBS	产前 BRCA1 基因突变与三阴性乳腺癌的关系	[52]
Yuwei Wang <i>et al.</i> (2024)	485	组织样本	-	三阴性乳腺癌的预后分析	[22]
RASSF1A					
Hulya Yazici 等(2009)	100	血清	MSP	RASSF1A 甲基化对高危妇女的早期诊断价值	[25]
Jia Xu 等(2012)	193	组织样本	RRBS	RASSF1A 与首次复发时间和总生存期相关	[26]
Eun Young Gil 等(2012)	55	组织样本	MSP	RASSF1A 基因的甲基化与多西他赛疗效有关	[53]
Viera Kajabova 等(2013)	151/201	组织样本/血清	QM-MSP	RASSF1A 甲基化与 ER 和 PR 的表达有关	[27]
Mizuho Abe 等(2019)	166	前哨淋巴结活检	dPCR	评估前哨淋巴结的转移状态	[29]

续表

APC					
Liu Zhen 等(2007)	76	组织样本	MSP	乳腺癌中 APC 基因启动子 1A 区甲基化导致抑癌基因失活	[33]
I Van der Auwera 等(2009)	156	组织样本	MSP	APC 基因的甲基化可能与 IBC 表型相关	[34]
Menha Swellam 等(2015)	121	血清	MSP	APC 可能是早期检测乳腺癌的有价值的基于血清的分子标记物	[35]
Halaleh Shakeri 等(2016)	75	组织样本	MS-MLPA	APC 和 BRCA1 可作为乳腺癌患者早期检测和治疗的标志物	[35]
Saoussen Debouki-Joudi 等(2017)	135	组织样本	MSP	APC 的缺失与散发性和家族性乳腺癌的侵袭行为有关	[37]

4. 基于液体活检的 DNA 甲基化检测在乳腺癌中的研究进展及当前存在的问题

随着液体活检的理念和相关技术的进步,其优势逐渐显现,通过无创或微创方法,可以检测血液和其他类型体液中的肿瘤起源因子,以进行癌症诊断和监测,突破了传统癌症检测中样本获取难度大、病人依从性较低、检测灵敏度低等多种局限性。而液体活检研究的关键在于 ctDNA 的相关研究,肿瘤特异性 DNA 甲基化则是 ctDNA 的另一个关键畸变,其中也包括乳腺癌在内。

一项在血浆中的研究发现, DAPK1 启动子甲基化在 BC 与正常人中有明显差异,且与转移相关[39]。高 PTEN 和 SMAD4 甲基化程度被证明分别与肿瘤晚期、淋巴结转移阳性, ER 阳性、PR 阳性和 HER-2 阳性有关,且其在早期 BC 检测中优于 CEA 和 CA15 [40]。2018 年 Atefeh Shirkavand 等人研究了乳腺癌患者 VIM、CXCR4、DOK7 和 SPDEF 基因的全血 DNA 甲基化状态,结果显示 VIM、CXCR4、DOK7 在 BC 患者中低甲基化,可以作为早期诊断生物标志物[41]。

虽然已有许多研究表明,基于液体活检的 DNA 甲基化检测应用于乳腺癌的诊断等方面非常有前途,但 2018 年 Xue Cao 等人的研究使用 450 K 甲基化芯片检测了 48 例散在 BC 病例和 48 例健康对照中 RASSF1A 和 ATM 的甲基化水平,发现两者没有显著差异[42]。因此,还需要进一步寻找更高灵敏度的标志物组合,开发精度更高的甲基化检测方法来实现这一展望。

表 3 列举了目前将 DNA 甲基化应用于乳腺癌液体活检的相关进展。

Table 3. Advances in liquid biopsy-based DNA methylation detection in breast cancer

表 3. 基于液体活检的乳腺癌 DNA 甲基化检测研究进展

应用	基因	样本类型	方法	样本量	TNM 分期	ER/PR/HER-2 ⁺	灵敏度/特异性	ref
诊断	VIM/CXCR4/DOK7/SPDEF	全血	qPCR	60/40	-	-	-/-	[39]
诊断/预后	DAPK1/CAVIN3	全血	Methy SYBR	90/30	I、II/III、IV = 30/30	-	-	[37]
诊断/预后	PTEN/SMAD4	血清	qPCR	80/30	I、II/III、IV = 35/45	40/28/28	-	[38]
诊断	FHIT/BRCA1	血清	(BSP)	36/60	-/-/-	-/-/-	-	[54]
诊断	APC/BIN1/BRCA1/CST6/GSTP1/p16/p21/TIMP3	血清	Mass Spectrometry	36/30	I、II/III、IV = 27/9	28/23/-	-	[55]

续表

诊断	APC/ESR1/RASSF1A	血清	qMSP	79/19	-/-/-	53/38/26	-	[56]
诊断	ITIH5/DKK3/RASSF1A	血清	qMSP	138、604	-/-/-	109/96/20	67/69or82	[57]
诊断	APCme/FOXA1me/RASSF1Ame	血清	Multiplex qMSP	44/39	I/II/III = 16/19/9	40/37/-	81.8/76.9	[58]
诊断	RASSF1A/MAL/SFRP1	血清	methyLight qPCR	39/49	I、II/III、 IV = 31/4	I、II/III、 IV = 31/4	41/10	[59]
诊断	HIN-1/RASSF1A/RAR-β	血清	QM-MSP	119/125	I/II/III = 44/21/24/	48/52/22	96.6/81.6	[60]
预后	ESR1	血清	Real-time MSP	122/30	-	19ER ⁺ /HER2 ⁻	-	[61]
预后	GSTP1/RASSF1A/RARβ2	血清	OS-MSP	336/80	-	-	-	[61]
预后	KLK10, SOX17, WNT5A, MSH2, GATA3	血清	MSP	200/35	-	-	-	[62]

5. 结论

本文回顾了 DNA 甲基化在乳腺癌早期诊断、预后评估和治疗指导中的潜在应用，并讨论了乳腺癌 DNA 甲基化检测液体活检技术的现状和挑战。目前将该技术广泛应用于临床还需要解决一些关键问题，首先，ctDNA 在外周血含量非常少，根据估计，在早期癌症中，1 ml 血浆只能纯化两份 ctDNA [63]。其次，乳腺癌不同于肺癌、结直肠癌等，可以使用痰液、粪便等体液作为样本，使得其在早期诊断中的灵敏度进一步降低，但可以与乳腺癌的常规筛查方式(如钼靶、B 超等)方式结合进一步提高早期检出率。在后续研究中，我们需要建立更标准化的样本处理流程和数据分析方法，增加采集量(如 10 mL 全血)以确保有足够的 ctDNA 用于分析、除了常见的 ctDNA 甲基化，还可以采用外泌体特异性 RNA(如 miRNA)和蛋白质标志物(如肿瘤相关抗原)的检测 panel，提高 DNA 甲基化作为乳腺癌生物标志物的可靠性。此外，还需要关注提高检测技术的准确性和可重复性，以及开发反映肿瘤微环境和肿瘤进展的多标志物组合。总之，DNA 甲基化在乳腺癌研究和临床应用中显示出巨大潜力，但仍需通过多学科合作和技术创新来克服现有挑战，以实现其在乳腺癌精准医疗中的广泛应用。

作者贡献声明

王浩妍和江瀚宇构思了这项工作。王浩妍、江瀚宇、王溯宜和罗欣茹讨论并编辑了手稿，所有作者阅读并批准了手稿的最终版本。

利益冲突声明

作者声明，不存在利益冲突。

参考文献

[1] Hotchkiss, R.D. (1948) The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, **175**, 315-332. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)57261-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)57261-6)

[2] Muddather, H.F., Faggad, A. and Elhassan, M.M.A. (2022) Relapse-free Survival in Sudanese Women with Non-Metastatic Breast Cancer. *Global Epidemiology*, **4**, Article ID: 100082. <https://doi.org/10.1016/j.gloepi.2022.100082>

[3] Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., et al. (2024) Global Cancer Statistics

- 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **74**, 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- [4] Michaels, E., Worthington, R.O. and Rusiecki, J. (2023) Breast Cancer: Risk Assessment, Screening, and Primary Prevention. *Medical Clinics of North America*, **107**, 271-284. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2022.10.007>
- [5] Huo, Q., Wang, J. and Xie, N. (2023) High HSPB1 Expression Predicts Poor Clinical Outcomes and Correlates with Breast Cancer Metastasis. *BMC Cancer*, **23**, Article No. 501. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10983-3>
- [6] Barrett, J.E., Herzog, C., Jones, A., Leavy, O.C., Evans, I., Knapp, S., et al. (2022) The WID-BC-Index Identifies Women with Primary Poor Prognostic Breast Cancer Based on DNA Methylation in Cervical Samples. *Nature Communications*, **13**, Article No. 449. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27918-w>
- [7] Li, W., Liu, J., Hou, L., Yu, F., Zhang, J., Wu, W., et al. (2022) Liquid Biopsy in Lung Cancer: Significance in Diagnostics, Prediction, and Treatment Monitoring. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 25. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01505-z>
- [8] Galbraith, K. and Snuderl, M. (2022) DNA Methylation as a Diagnostic Tool. *Acta Neuropathologica Communications*, **10**, Article No. 71. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01371-2>
- [9] Martisova, A., Holcakova, J., Izadi, N., Sebuyoya, R., Hrstka, R. and Bartosik, M. (2021) DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 4247. <https://doi.org/10.3390/ijms22084247>
- [10] Lissa, D. and Robles, A.I. (2016) Methylation Analyses in Liquid Biopsy. *Translational Lung Cancer Research*, **5**, 492-504. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.10.03>
- [11] Šestáková, Š., Šálek, C. and Remešová, H. (2019) DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. *Biological Procedures Online*, **21**, Article No. 19. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0107-z>
- [12] Khulan, B., Thompson, R.F., Ye, K., Fazzari, M.J., Suzuki, M., Stasiak, E., et al. (2006) Comparative Isoschizomer Profiling of Cytosine Methylation: The HELP Assay. *Genome Research*, **16**, 1046-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.5273806>
- [13] Zuo, T., Tycko, B., Liu, T., Lin, H.L. and Huang, T.H. (2009) Methods in DNA Methylation Profiling. *Epigenomics*, **1**, 331-345. <https://doi.org/10.2217/epi.09.31>
- [14] Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., et al. (2005) Chromosome-Wide and Promoter-Specific Analyses Identify Sites of Differential DNA Methylation in Normal and Transformed Human Cells. *Nature Genetics*, **37**, 853-862. <https://doi.org/10.1038/ng1598>
- [15] Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., et al. (1990) Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*, **250**, 1684-1689. <https://doi.org/10.1126/science.2270482>
- [16] Tapia, T., Smalley, S.V., Kohen, P., Muñoz, A., Solis, L.M., Corvalan, A., et al. (2008) Promoter Hypermethylation of BRCA1 Correlates with Absence of Expression in Hereditary Breast Cancer Tumors. *Epigenetics*, **3**, 157-163. <https://doi.org/10.4161/epi.3.3.6387>
- [17] Dobrovic, A. and Simpfendorfer, D. (1997) Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Research*, **57**, 3347-3350.
- [18] Feng, J., Hu, L.H., Lu, J., Li, Y.R. and Xie, F. (2009) [Diagnostic Value of BRCA1 and p16 Gene Methylation in Sporadic Breast Cancer]. *Cancer*, **28**, 436-440.
- [19] Prajzandanc, K., Domagała, P., Hybiak, J., Ryś, J., Huzarski, T., Szwiec, M., et al. (2019) BRCA1 Promoter Methylation in Peripheral Blood Is Associated with the Risk of Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Cancer*, **146**, 1293-1298. <https://doi.org/10.1002/ijc.32655>
- [20] Lønning, P.E., Nikolaienko, O., Pan, K., Kurian, A.W., Eikesdal, H.P., Pettinger, M., et al. (2022) Constitutional *brca1* Methylation and Risk of Incident Triple-Negative Breast Cancer and High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncology*, **8**, 1579-1587. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.3846>
- [21] Xu, Y., Diao, L., Chen, Y., Liu, Y., Wang, C., Ouyang, T., et al. (2013) Promoter Methylation of BRCA1 in Triple-Negative Breast Cancer Predicts Sensitivity to Adjuvant Chemotherapy. *Annals of Oncology*, **24**, 1498-1505. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt011>
- [22] Wang, Y., Dackus, G.M.H.E., Rosenberg, E.H., Cornelissen, S., de Boo, L.W., Broeks, A., et al. (2024) Long-Term Outcomes of Young, Node-Negative, Chemotherapy-Naïve, Triple-Negative Breast Cancer Patients According to BRCA1 Status. *BMC Medicine*, **22**, Article No. 9. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03233-7>
- [23] Bosviel, R., Dumollard, E., Déchelotte, P., Bignon, Y. and Bernard-Gallon, D. (2012) Can Soy Phytoestrogens Decrease DNA Methylation in BRCA1 and BRCA2 Oncosuppressor Genes in Breast Cancer? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **16**, 235-244. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0105>
- [24] Agathangelou, A., Honorio, S., Macartney, D.P., Martinez, A., Dallol, A., Rader, J., et al. (2001) Methylation

- Associated Inactivation of RASSF1A from Region 3p21.3 in Lung, Breast and Ovarian Tumours. *Oncogene*, **20**, 1509-1518. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204175>
- [25] Yazici, H., Terry, M.B., Cho, Y.H., Senie, R.T., Liao, Y., Andrulis, I., *et al.* (2009) Aberrant Methylation of *rassf1a* in Plasma DNA before Breast Cancer Diagnosis in the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **18**, 2723-2725. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-1237>
 - [26] Xu, J., Shetty, P.B., Feng, W., Chenault, C., Bast, R.C., Issa, J.J., *et al.* (2012) Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in Breast Cancer Is Associated with Clinical Characteristics, but Only RASSF1A Methylation Is Associated with Outcome. *BMC Cancer*, **12**, Article No. 243. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-243>
 - [27] Kajabova, V., Smolkova, B., Zmetakova, I., Sebova, K., Krivulcik, T., Bella, V., *et al.* (2013) RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients. *Translational Oncology*, **6**, 297-304. <https://doi.org/10.1593/tlo.13244>
 - [28] Gil, E.Y., Jo, U.H., Jeong, H., Whang, Y.M., Woo, O.H., Cho, K.R., *et al.* (2012) Promoter Methylation of RASSF1A Modulates the Effect of the Microtubule-Targeting Agent Docetaxel in Breast Cancer. *International Journal of Oncology*, **41**, 611-620. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1470>
 - [29] Abe, M., Kagara, N., Miyake, T., Tanei, T., Naoi, Y., Shimoda, M., *et al.* (2019) Highly Sensitive Detection of Sentinel Lymph Node Metastasis of Breast Cancer by Digital PCR for RASSF1A Methylation. *Oncology Reports*, **42**, 2382-2389. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7363>
 - [30] Park, S.A., Masunaga, N., Kagara, N., Ohi, Y., Gondo, N., Abe, K., *et al.* (2023) Evaluation of RASSF1A Methylation in the Lysate of Sentinel Lymph Nodes for Detecting Breast Cancer Metastasis: A Diagnostic Accuracy Study. *Oncology Letters*, **26**, Article No. 475. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.14063>
 - [31] Chang, Y., Lin, C., Yang, S., Ho, C. and Chang, J. (2016) Analysing the Mutational Status of *Adenomatous polyposis coli* (APC) Gene in Breast Cancer. *Cancer Cell International*, **16**, Article No. 23. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0297-2>
 - [32] Furuuchi, K., Tada, M., Yamada, H., Kataoka, A., Furuuchi, N., Hamada, J., *et al.* (2000) Somatic Mutations of the APC Gene in Primary Breast Cancers. *The American Journal of Pathology*, **156**, 1997-2005. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65072-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65072-9)
 - [33] Liu, Z., Yang, L., Cui, D.X., Liu, B.L., Zhang, X.B., Ma, W.F. and Zhang, Q. (2007) [Methylation Status and Protein Expression of *Adenomatous polyposis coli* (APC) Gene in Breast Cancer]. *Cancer*, **26**, 586-590.
 - [34] Van der Auwera, I., Van Laere, S.J., Van den Bosch, S.M., Van den Eynden, G.G., Trinh, B.X., van Dam, P.A., *et al.* (2008) Aberrant Methylation of the *Adenomatous polyposis coli* (APC) Gene Promoter Is Associated with the Inflammatory Breast Cancer Phenotype. *British Journal of Cancer*, **99**, 1735-1742. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604705>
 - [35] Swellam, M., Abdelmaksoud, M.D.E., Sayed Mahmoud, M., Ramadan, A., Abdel-Moneem, W. and Hefny, M.M. (2015) Aberrant Methylation of *APC* and *RAR β* Genes in Breast Cancer Patients. *IUBMB Life*, **67**, 61-68. <https://doi.org/10.1002/iub.1346>
 - [36] Shakeri, H., Fakhrou, A., Nikanfar, A. and Mohaddes-Ardebili, S. (2016) Methylation Analysis of BRCA1 and APC in Breast Cancer and It's Relationship to Clinicopathological Features. *Clinical Laboratory*, **62**, 2333-2337. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2016.160418>
 - [37] Debouki-Joudi, S., Trifa, F., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., Frikha, M., Daoud, J., *et al.* (2017) CPG Methylation of APC Promoter 1A in Sporadic and Familial Breast Cancer Patients. *Cancer Biomarkers*, **18**, 133-141. <https://doi.org/10.3233/cbm-160005>
 - [38] Ghalkhani, E., Akbari, M.T., Izadi, P., Mahmoodzadeh, H. and Kamali, F. (2021) Assessment of DAPK1 and CAVIN3 Gene Promoter Methylation in Breast Invasive Ductal Carcinoma and Metastasis. *Cell Journal*, **23**, 397-405.
 - [39] Swellam, M., Saad, E.A., Sabry, S., Denewer, A., Abdel Malak, C. and Abouzid, A. (2021) Alterations of PTEN and SMAD4 Methylation in Diagnosis of Breast Cancer: Implications of Methyl II PCR Assay. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **19**, 54. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00154-x>
 - [40] Aleyasin, S., Shirkavand, A. and Boroujeni, Z. (2018) Examination of Methylation Changes of VIM, CXCR4, DOK7, and SPDEF Genes in Peripheral Blood DNA in Breast Cancer Patients. *Indian Journal of Cancer*, **55**, 366-371. https://doi.org/10.4103/ijc.ijc_100_18
 - [41] Cao, X., Tang, Q., Holland-Letz, T., Gündert, M., Cuk, K., Schott, S., *et al.* (2018) Evaluation of Promoter Methylation of RASSF1A and ATM in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients and Healthy Control Individuals. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article 900. <https://doi.org/10.3390/ijms19030900>
 - [42] Lea, A.J., Vilgalys, T.P., Durst, P.A.P. and Tung, J. (2017) Maximizing Ecological and Evolutionary Insight in Bisulfite Sequencing Data Sets. *Nature Ecology & Evolution*, **1**, 1074-1083. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0229-0>
 - [43] Wen, L., Li, J., Guo, H., Liu, X., Zheng, S., Zhang, D., *et al.* (2015) Erratum: Genome-Scale Detection of Hypermethylated CPG Islands in Circulating Cell-Free DNA of Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cell Research*, **25**, 1376-1376.

- <https://doi.org/10.1038/cr.2015.141>
- [44] Gallardo-Gómez, M., Moran, S., Páez de la Cadena, M., Martínez-Zorzano, V.S., Rodríguez-Berrocal, F.J., Rodríguez-Gironde, M., *et al.* (2018) A New Approach to Epigenome-Wide Discovery of Non-Invasive Methylation Biomarkers for Colorectal Cancer Screening in Circulating Cell-Free DNA Using Pooled Samples. *Clinical Epigenetics*, **10**, Article No. 53. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0487-y>
- [45] Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B. (1996) Methylation-Specific PCR: A Novel PCR Assay for Methylation Status of CPG Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9821-9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
- [46] Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A. and Versalovic, J. (2009) Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clinical Chemistry*, **55**, 856-866. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107565>
- [47] Hauser, S., Zahalka, T., Fechner, G., Müller, S.C. and Ellinger, J. (2013) Serum DNA Hypermethylation in Patients with Kidney Cancer: Results of a Prospective Study. *Anticancer Research*, **33**, 4651-4656.
- [48] Katsman, E., Orlanski, S., Martignano, F., Fox-Fisher, I., Shemer, R., Dor, Y., *et al.* (2022) Detecting Cell-of-Origin and Cancer-Specific Methylation Features of Cell-Free DNA from Nanopore Sequencing. *Genome Biology*, **23**, Article No. 158. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02710-1>
- [49] Korlach, J., Bjornson, K.P., Chaudhuri, B.P., Cicero, R.L., Flusberg, B.A., Gray, J.J., *et al.* (2010) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Methods in Enzymology*, **472**, 431-455. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)72001-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(10)72001-2)
- [50] Xu, X., Gammon, M.D., Zhang, Y., Bestor, T.H., Zeisel, S.H., Wetmur, J.G., *et al.* (2008) BRCA1 Promoter Methylation Is Associated with Increased Mortality among Women with Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **115**, 397-404. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0075-5>
- [51] Li, J., Li, P., Li, J., Yang, H., Liu, G., Shen, P., *et al.* (2022) Effects of the Methylation Levels for the Breast Cancer Associated Genes BCSG1 and BRCA1 on Cellular Proliferation and Migration. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **26**, 422-429. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2021.0304>
- [52] Nikolaienko, O., Eikesdal, H.P., Ognedal, E., Gilje, B., Lundgren, S., Blix, E.S., *et al.* (2023) Prenatal BRCA1 Epimutations Contribute Significantly to Triple-Negative Breast Cancer Development. *Genome Medicine*, **15**, Article No. 104. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01262-8>
- [53] Gil, E.Y., Jo, U.H., Jeong, H., Whang, Y.M., Woo, O.H., Cho, K.R., *et al.* (2017) Promoter Methylation of RASSF1A Modulates the Effect of the Microtubule-Targeting Agent Docetaxel in Breast Cancer. *International Journal of Oncology*, **50**, 1455-1455. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3900>
- [54] Liu, L., Sun, L., Li, C., Li, X., Zhang, Y., Yu, Y., *et al.* (2015) Quantitative Detection of Methylation of FHIT and BRCA1 Promoters in the Serum of Ductal Breast Cancer Patients. *Bio-Medical Materials and Engineering*, **26**, S2217-S2222. <https://doi.org/10.3233/bme-151527>
- [55] Radpour, R., Barekati, Z., Kohler, C., Lv, Q., Bürki, N., Diesch, C., *et al.* (2011) Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *PLOS ONE*, **6**, e16080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016080>
- [56] Van der Auwera, I., Elst, H.J., Van Laere, S.J., Maes, H., Huget, P., van Dam, P., *et al.* (2009) The Presence of Circulating Total DNA and Methylated Genes Is Associated with Circulating Tumour Cells in Blood from Breast Cancer Patients. *British Journal of Cancer*, **100**, 1277-1286. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605013>
- [57] Kloten, V., Becker, B., Winner, K., Schrauder, M.G., Fasching, P.A., Anzeneder, T., *et al.* (2013) Promoter Hypermethylation of the Tumor-Suppressor Genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as Novel Biomarkers for Blood-Based Breast Cancer Screening. *Breast Cancer Research*, **15**, Article No. R4. <https://doi.org/10.1186/bcr3375>
- [58] Salta, S., P. Nunes, S., Fontes-Sousa, M., Lopes, P., Freitas, M., Caldas, M., *et al.* (2018) A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *Journal of Clinical Medicine*, **7**, Article 420. <https://doi.org/10.3390/jcm7110420>
- [59] Agostini, M., Enzo, M.V., Bedin, C., Belardinelli, V., Goldin, E., Del Bianco, P., *et al.* (2012) Circulating Cell-Free DNA: A Promising Marker of Regional Lymphonode Metastasis in Breast Cancer Patients. *Cancer Biomarkers*, **11**, 89-98. <https://doi.org/10.3233/cbm-2012-0263>
- [60] Kim, J., Shin, M., Kweon, S., Park, M.H., Yoon, J.H., Lee, J.S., *et al.* (2010) Evaluation of Promoter Hypermethylation Detection in Serum as a Diagnostic Tool for Breast Carcinoma in Korean Women. *Gynecologic Oncology*, **118**, 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.016>
- [61] Mastoraki, S., Strati, A., Tzanikou, E., Chimonidou, M., Politaki, E., Voutsina, A., *et al.* (2018) ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-Up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clinical Cancer Research*, **24**, 1500-1510. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1181>
- [62] Panagopoulou, M., Karaglani, M., Balgkouranidou, I., Bizioti, E., Koukaki, T., Karamitrousis, E., *et al.* (2019)

- Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer: Size Profiling, Levels, and Methylation Patterns Lead to Prognostic and Predictive Classifiers. *Oncogene*, **38**, 3387-3401. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0660-y>
- [63] Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., *et al.* (2014) Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, **6**, 224ra24.