

循环肿瘤DNA甲基化检测在乳腺癌早期筛查中的进展与展望

孙朝阳¹, 王晨宇¹, 刘长根^{1,2}, 尹晶晶¹, 赵 硕¹, 王 倩^{1,3*}, 崔 建^{1,2*}

¹青岛大学青岛医学院, 山东 青岛

²青岛大学附属医院乳腺病诊疗中心, 山东 青岛

³青岛大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 山东 青岛

收稿日期: 2026年6月17日; 录用日期: 2026年7月11日; 发布日期: 2026年7月17日

摘 要

乳腺癌位居全球女性恶性肿瘤发病与死亡首位, 传统筛查手段存在有创操作、致密乳腺漏诊、假阳性率偏高等缺陷。循环肿瘤DNA (ctDNA) 甲基化检测是液体活检领域的早筛热点技术。本文系统检索2013年1月~2026年4月PubMed、Embase、中国知网、万方数据库收录的相关文献, 纳入17项高质量病例对照研究、队列研究及专家共识, 从技术原理、标志物诊断效能、临床应用短板与未来发展方向开展定性系统分析, 并对比ctDNA甲基化检测与乳腺钼靶、超声、MRI及穿刺活检等传统筛查手段的优劣。纳入研究包含单基因甲基化标志物、多基因检测Panel、前瞻性队列研究三类。结果显示, ctDNA甲基化检测具备无创采样、特异性高、可溯源肿瘤原发灶等优势, 多基因检测Panel诊断乳腺癌的受试者工作特征曲线下面积(AUC)为0.80~0.89, 特异性均超过90%; 但该技术对I期乳腺癌的检测灵敏度仅为40%~60%。目前该技术临床转化仍面临多项瓶颈: 大样本前瞻性研究证据不足、全流程检测标准缺失、人群筛查阳性预测值偏低。综上, ctDNA甲基化检测暂无法替代常规筛查方案, 更适用于乳腺癌高危人群的分层筛查。未来需建立全流程标准化体系, 开展多中心前瞻性队列研究, 推进多组学联合检测技术研发, 助力该技术落地临床。

关键词

ctDNA, 甲基化, 乳腺癌, 早期筛查, 液体活检, 生物标志物

Progress and Prospects of Circulating Tumor DNA Methylation Detection in Early Breast Cancer Screening

Zhaoyang Sun¹, Chenyu Wang¹, Changgen Liu^{1,2}, Jingjing Yin¹, Shuo Zhao¹, Qian Wang^{1,3*}, Jian Cui^{1,2*}

*通讯作者。

文章引用: 孙朝阳, 王晨宇, 刘长根, 尹晶晶, 赵硕, 王倩, 崔建. 循环肿瘤 DNA 甲基化检测在乳腺癌早期筛查中的进展与展望[J]. 临床医学进展, 2026, 16(7): 1490-1502. DOI: 10.12677/acm.2026.1672669

¹Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Breast Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

³Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Basic Medical, Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: June 17, 2026; accepted: July 11, 2026; published: July 17, 2026

Abstract

Breast cancer ranks among the leading causes of morbidity and mortality in women worldwide. Conventional breast cancer screening methods are limited by invasiveness, missed diagnoses in dense breasts, and high false-positive rates. Circulating tumor DNA (ctDNA) methylation detection is a cutting-edge liquid biopsy technology for early cancer screening. Relevant literature published from January 2013 to April 2026 was retrieved from PubMed, Embase, CNKI and Wanfang databases. A total of 17 high-quality case-control studies, cohort studies and expert consensuses were included. A qualitative systematic analysis was conducted from four dimensions: technical principles, diagnostic performance of biomarkers, clinical challenges and future development directions. Meanwhile, we made a head-to-head comparison between ctDNA methylation detection and traditional screening methods including mammography, ultrasound, MRI and needle biopsy. The included studies were divided into three categories: single-gene methylation biomarkers, multi-gene detection panels and prospective cohort studies. The results indicated that ctDNA methylation detection has the advantages of non-invasive sampling, high specificity and tumor origin tracing. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of multi-gene panels for breast cancer diagnosis ranged from 0.80 to 0.89, with the specificity higher than 90%. However, its sensitivity for stage I breast cancer was only 40% to 60%. Multiple translational bottlenecks remain, such as insufficient evidence from large-sample prospective studies, lack of unified detection standards and low positive predictive value in population screening. In conclusion, ctDNA methylation detection cannot replace conventional screening methods at present, and it is recommended for risk-stratified screening of high-risk breast cancer populations. Further studies should focus on establishing a full-process standardization system, conducting multicenter prospective cohort studies and developing multi-omics combined detection technologies to promote the clinical application of this technique.

Keywords

ctDNA, Methylation, Breast Cancer, Early Screening, Liquid Biopsy, Biomarkers

Copyright © 2026 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. 引言

2024 年《CA: A Cancer Journal for Clinicians》发布的 2022 年全球癌症统计数据显示, 乳腺癌全球发病率居所有恶性肿瘤第 2 位(11.6%), 死亡率居第 4 位(6.9%), 全球女性 0~74 岁终身发病风险达 5.05%。[1]。国家癌症中心 2022 年数据表明, 乳腺癌已成为我国女性新发恶性肿瘤首位, 占女性新发癌症的 16.72% [2]。早期筛查与诊断是降低乳腺癌死亡率、改善患者预后的核心手段。

液态活检作为体外诊断的重要分支, 通过检测血液中肿瘤释放的生物标志物(如血清肿瘤标志物、循

环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)、循环肿瘤 DNA (circulating tumor Deoxyribonucleic Acid, ctDNA) 等)实现无创诊断, 具有快速便捷且侵入性小的优点, 为癌症的早筛早诊提供了极具潜力的技术途径[3]。ctDNA 是肿瘤细胞凋亡或坏死释放到外周血中的游离 DNA 片段, 携带与原发肿瘤一致的分子遗传特征, 基于对肿瘤相关驱动基因变异的检测, 利用 ctDNA 进行肿瘤筛查可能具有较好的特异性[4]。DNA 甲基化是 DNA 化学修饰的一种形式, 是真核细胞生物最普遍的修饰方式, 也是最早发现的表观遗传学途径之一。其中 ctDNA 甲基化因具有早期出现、肿瘤特异性高、可组织溯源等特点, 被认为是最具潜力的癌症早筛技术之一。

本文通过系统梳理 ctDNA 甲基化检测的技术体系、在乳腺癌早期检测中的应用现状和局限性等, 批判性地评估现有证据的强度, 讨论该技术从实验室研究走向大规模人群筛查所面临的关键挑战与未来发展方向。

2. 研究现状

ctDNA 甲基化检测的技术基础

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化下, 将甲基基团共价结合到特定核苷酸残基的表观遗传修饰过程[5] (见图 1), 脊椎动物中主要发生于 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5 号碳原子上。与可遗传的序列信息不同, 甲基化模式是在一个程序化的过程中建立的, 而且贯穿了整个发育过程, 建立起稳定的基因表达谱[6] [7]。

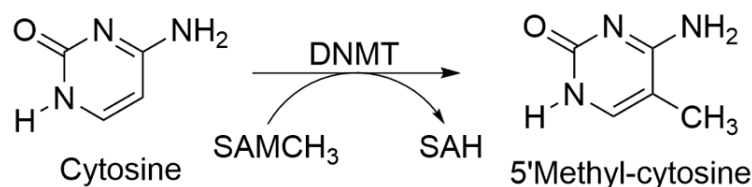


Figure 1. Schematic of DNA methylation
图 1. DNA 甲基化示意图

CpG 基序中胞嘧啶残基发生甲基化可导致基因沉默。DNA 甲基转移酶(DNMT)催化甲基基团从 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)转移至胞嘧啶, 生成 5'-甲基胞嘧啶与 S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)。

这种 DNA 甲基化范式在医学中扮演了关键的角色, 使其位点有了在癌症中发挥作用的可能[8]。与基因突变相比, DNA 甲基化具有三个核心优势: 一、肿瘤特异性高, 正常组织中几乎不出现; 二、早期出现, 在癌前病变阶段即可检测到; 三、具有组织特异性, 可实现肿瘤溯源[9]。目前有大量研究结果表明 DNA 甲基化模式的异常与多种疾病, 尤其是癌症的发生发展密切相关。如王韞格等人发现 SRY-box transcription factor 1 (SOX1)、Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM3)、Zinc Finger Protein 671 (ZNF671)和 Distal-Less Homeobox 1 (DLX1)的 DNA 甲基化水平与宫颈病变严重程度密切相关[10], Peng, DF、Kanai, Y 等人证实 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase1, DNMT1)蛋白表达的增加参与了胰腺癌从癌前阶段到导管癌恶性进展的发生过程[11]。

目前临床应用最广泛的 ctDNA 甲基化检测技术为亚硫酸盐测序法, 包括全基因组亚硫酸盐测序 (WGBS)和靶向甲基化 Panel 测序。WGBS 可绘制全基因组甲基化图谱, 适用于标志物筛选; 靶向 Panel 测序仅检测特定的甲基化位点, 具有深度高、成本低、灵敏度高优势, 是临床转化的首选技术。数字 PCR 技术因具有绝对定量、灵敏度高的特点, 也被广泛用于单基因甲基化位点的验证。

样本前处理对检测性能的影响：血液样本处理是影响 ctDNA 甲基化检测结果准确性的关键环节。研究表明，血液采集后超过 6 小时未处理会导致白细胞裂解，释放大量正常 DNA，显著降低 ctDNA 的检出率；血浆体积不足(<5 mL)会导致 ctDNA 总量不足，增加假阴性风险；反复冻融超过 3 次会导致 DNA 片段化，破坏甲基化位点信息。因此，标准化的样本采集、运输和保存流程是保证检测结果可靠性的前提。

3. ctDNA 甲基化在乳腺癌早期筛查研究现状

3.1. 传统早筛手段

无创性肿瘤生物标志物的发现和血液检测技术的发展具有必然性。现今临床上乳腺癌应用较多的检测大都局限于对于乳腺组织细胞的直接检测，目前常用的乳腺癌筛查手段包括临床乳腺检查、乳腺 X 线摄影、超声检查和磁共振成像等。这些传统的癌症早筛手段具有不可替代性，但同时也具有筛查导致的不适、疼痛和可能的假阳性及过度诊断[12]。研究表明，将乳腺 X 线摄影应用于早期诊断所带来的辐射及其致癌风险仍不明确[13]且对于致密乳腺存在漏诊风险。乳腺超声检查对于钙化检出不佳，且检查效果过于依赖操作者的技术和经验。基于以上，患者虽可以根据自身情况在医生的指导下选择多样的筛查方案[14]，但传统手段的缺陷和不足降低了大众进行全身肿瘤筛查的意愿，因此实际中进行全身肿瘤筛查的人群比例较低，这为推动癌症的早期诊断和筛查工作带来了困难，目前临床急需精准便捷的癌症早筛技术，而通过血液检测进行乳腺癌早期筛查则是其中极具潜力的发展方向。

3.2. ctDNA 甲基化检测的优越性

随着人们对无创性非介入性癌症检测手段的追求，液体活检技术应运而生，在目前液体活检针对的生物标志物中，ctDNA 识别早期癌症的能力最强[15]。研究表明，ctDNA 含有与其起源的肿瘤 DNA 相同的分子特征[16]。相比较于基因突变发生于特定的位点，ctDNA 甲基化发生于海量的抑癌基因启动子 CpG 岛上，有研究显示 CpG 岛在正常细胞内未甲基化，而在肿瘤细胞内呈现甲基化[17]，并且其位置较为稳定，便于检测。ctDNA 是基于对肿瘤相关驱动基因变异的检测，因而利用 ctDNA 进行肿瘤筛查可能具有较好的特异性。更有相关研究显示，检测血液中 ctDNA 的甲基化情况，相较于检测 ctDNA 基因拷贝数变异，检测基因甲基化对乳腺癌的预测性更高[18]。

DNA 甲基化在肿瘤发生中起着极其重要的作用。DNA 甲基化为 DNA 化学修饰的一种形式，能够在不改变 DNA 序列的前提下，改变遗传表现。相关研究表明，肿瘤细胞的 DNA 异常甲基化与抑癌基因和 DNA 修复基因的沉默有关[19]。许多研究表明，基因启动子区域的甲基化改变在癌症的发生的早期阶段就会出现，甚至早于基因突变出现之前，且被认为是促进癌症发生的重要原因之一[20]。更重要的是，有研究表明，DNA 甲基化具有组织特异性[21]，可以反映肿瘤所在的位置。由此，寻找合适的甲基化生物标记物、探索更有效的 ctDNA 测序技术用于乳腺癌的早期筛查成为国内外学者的研究热点。

3.3. ctDNA 甲基化血液检测与传统筛查方式对比

本研究从灵敏度、特异度、成本效益、患者接受度、核心优势、核心局限性六大核心维度，系统对比了基于外周血的 ctDNA 甲基化检测方法，与乳腺癌传统筛查诊断手段(包括乳腺钼靶、乳腺超声、乳腺增强 MRI，以及诊断金标准组织活检)的临床性能、应用场景、固有优势与局限性(见表 1)。

通过头对头对比，本研究明确了各类检测手段在乳腺癌全病程诊疗管理中的专属临床定位，同时重点阐明了 ctDNA 甲基化检测作为无创、无辐射检测工具，在乳腺癌高风险人群影像学检查前风险分层、纵向动态监测中的独特优势，也客观指出了其目前在早期病变检测中存在的局限性。

Table 1. Performance comparison of blood-based ctDNA methylation assays and conventional breast cancer screening and diagnostic modalities

表 1. 血液 ctDNA 甲基化检测与传统乳腺癌筛查及诊断手段的性能对比

	ctDNA 甲基化血液检测	乳腺 X 线(钼靶)	乳腺超声	乳腺增强 MRI	组织活检
敏感性	对早期较低, 对转移敏感, 但能早于影像学数月提示风险	钙化敏感, 致密乳腺低	致密乳腺好, 钙化低	极高	金标准
特异性	较好	较好	中等	中等	金标准
成本效益	高危人群筛查和持续监测效果好	40 岁以上常规筛查效果好	年轻人群或致密型乳腺初筛效果好	高危人群筛查效果好, 但成本高	仅确诊, 不适合筛查
接受度	极高(无创、无辐射)	中等(有压迫、低辐射)	高(无辐射、无痛苦)	低(耗时、造影剂、幽闭恐惧)	低(有创、并发症风险)
核心优势	无创、对残留微小病灶监测强	钙化检出强	致密乳腺显影好、无辐射	软组织分辨率高	确诊金标准
主要缺点	早期灵敏度有限、成本高, 微小钙化无法直接检出	有辐射、致密乳腺漏诊	钙化检出差、依赖操作者	费用高、假阳性率高	有创、并发症风险

4. 代表性研究

4.1. 已确定乳腺癌相关基因

已确定与乳腺癌相关的基因以 Breast Cancer Susceptibility Gene 1 (BRCA1), Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2)等为代表, 为遗传筛查与靶向治疗提供靶点[22] [23]。

BRCA1 的甲基化在乳腺癌的发生与治疗中起重要作用。Turner 等人发现在其样本中有 63%的间变性乳腺癌存在 BRCA1 甲基化, 其数据远高于对照组[24]。Iwamoto 等人也发现外周血细胞中的 BRCA1 启动子甲基化与 BRCA1 启动子甲基化的乳腺癌风险显著相关[25]。这些研究中发现的 BRCA1 功能异常的高发性, 可为开发针对基底样乳腺癌的靶向治疗新方法提供应用。同样的 Her-2 的表达也与乳腺癌的恶性程度和转移密切相关, 因此在乳腺癌的发生和发展中可能发挥协调作用, 可用于乳腺癌治疗或预防复发疾病[26] [27]。

目前, 这些相关基因数据如 HER-2、BRCA1、BRCA2 等已被广泛应用于临床乳腺癌早期筛查及治疗中[28] [29]。

4.2. 单基因甲基化标志物

2013 年 Chimonidou 等人通过对 79 例原发性乳腺肿瘤、114 例配对的 CTCs 和游离 DNA (cell-free Deoxyribonucleic Acid, cfDNA)样本, 以及 60 名健康个体中的 SOX17 甲基化情况的病例对照。研究发现, SRY-box transcription factor 17 (SOX17)启动子在原发乳腺肿瘤患者及早期乳腺癌患者的 ctDNA 中均呈高度甲基化状态, 提示其可作为乳腺癌的甲基化生物标志物 [30], 这一发现打破了早期认为 ctDNA 仅能用于晚期肿瘤监测的认知, 提示其在乳腺癌早期筛查中具有潜在价值, 为后续研究提供了重要靶点参考。然而, 该研究存在多项显著局限性。首先, 研究未按照美国癌症联合委员会乳腺癌肿瘤 - 淋巴结 - 转移分期系统(the American Joint Committee on Cancer Tumor Node Metastasis Staging System, AJCC TNM, I~IV

期)对入组患者进行进一步分层;此外,也未收集肿瘤大小、淋巴结转移状态等临床病理特征与甲基化的关联数据。其次,该研究为单中心小样本研究,入组例数少,无外部独立队列验证,研究结果的外推性有限。最后,研究未通过前瞻性随访完成验证,也无法评估其预后价值,进一步限制了该生物标志物的临床转化潜力。

2015年,Mishima等人进一步提出 Tripartite Motif Containing 9 (TRIM9)可能是乳腺癌的特异甲基化标志物,且健康人群中特异性100%,其特异性显著高于传统血清标志物[31]。TRIM9启动子区域的高甲基化可在乳腺癌组织中富集,证实其作为晚期乳腺癌无创检测标志物的潜在价值,为晚期乳腺癌的病情监测提供了新的研究思路,为特异性标志物提供了经典范式。但本研究为单中心内部验证研究,无独立外部队列验证、无前瞻性随访验证,也无与传统检测手段的对比验证。且其仅纳入转移性晚期乳腺癌患者,未探索 TRIM9 甲基化在早期乳腺癌外周血 ctDNA 中的可检测性,无法评估其作为乳腺癌早期筛查标志物的价值。

单基因标志物的主要局限性是灵敏度低,难以满足早期筛查需求。不同研究间结果差异较大,主要与样本处理方法、检测技术及入组人群异质性有关。

4.3. 多基因甲基化 Panel

为提高检测灵敏度,研究者们开发了包含多个甲基化位点的检测 Panel。

2016年,Shan, M; Yin, HZ 团队检测了从血清中提取的循环游离 DNA 中六个基因(SFN、P16、hMLH1、HOXD13、PCDHGB7 和 RASSF1a)的启动子甲基化,使用高通量 DNA 甲基化检测方法检测了749例血清样本[32]。该六基因甲基化检测方法在乳腺癌诊断中的灵敏度分别为79.6%和82.4%,特异性则分别为72.4%和78.1%。本研究队列样本量较大,是同期乳腺癌领域统计效能最充足的早期多基因甲基化研究之一。研究队列覆盖了AJCC TNM I-IV全分期乳腺癌,且首次探究了多基因甲基化检测 Panel 对早期乳腺癌的检测价值。其研究设计与真实世界临床筛查场景高度契合,不仅为乳腺癌无创早期筛查提供了全新的研究方向,也进一步丰富了乳腺癌早期诊断的生物标志物体系。与健康 and 良性疾病对照组相比,这六个基因甲基化检测面板在乳腺癌诊断中的敏感性和特异性均显示良好,证明了血清中的表观遗传标记具有诊断乳腺癌的潜力。但同时他也缺少前瞻性随访,临床应用场景受限。

2022年曹艳妮,李前忠等人的研究也取得了新进展,基于对癌症基因组图谱-浸润性乳腺癌数据集(the Cancer Genome Atlas-Breast Invasive Carcinoma Dataset, TCGA-BRCA)分析,证实了18个与预后相关的关键基因(17个抑癌基因和1个癌基因)存在导致乳腺癌的一些重要DNA甲基化区域[33]。但其筛选出的甲基化区域未进行临床检测可行性分析,无法直接支撑后续液体活检标志物的开发,与临床转化存在较大差距。

2025年高丽杰团队利用血浆游离DNA鉴定乳腺癌特异性甲基化标志物,开发了多重数组微滴PCR检测方法,从TCGA数据库筛选21个特异性CpG位点,其中8个基因(如C1orf230、CCND2)在血浆cfDNA中区分乳腺癌与健康对照的AUC达0.856,特异性95.2%,I期和II期灵敏度分别为55.4%、66.7%;将这些甲基化标记与钼靶和超声结合使用后,在区分乳腺癌与良性肿瘤时,AUC达到了0.898,减少了23%的不必要活检[34],显著提高了诊断性能。该研究为乳腺癌的无创液体活检提供了新的特异性标志物和实用的检测技术,甲基化标志物与影像学的联合检测方案也为临床乳腺癌筛查和诊断提供了更优选择,直接对接临床需求,具有重要的临床转化价值。但同时其对应于早期乳腺癌的敏感度仍偏低,若想将其应用于乳腺癌早期筛查领域仍需进一步探究,其结论仍需在前瞻性、多中心临床试验中得到巩固。

同年,Alexander, GE 等人的研究完成了基于cfDNA靶向甲基化的泛癌早筛技术(含组织来源预测)

的系统分析验证,证实其具有 0.07%~0.17%超低检测限、99.3%高特异性、优异重复性及 88%组织溯源准确率[35]。

多基因 Panel 显著提高了检测灵敏度,但仍存在两个核心问题:首先是不同 Panel 的基因组成差异较大,缺乏统一标准;其次对 I 期乳腺癌的灵敏度仍低于预期,难以满足早期筛查的核心需求。

4.4. 三阴性乳腺癌(TNBC)特异性甲基化标志物

TNBC 是乳腺癌中恶性程度最高、预后最差的亚型,缺乏有效的筛查和治疗靶点。

Glodzik 等人首次证实 BRCA1 高甲基化是 TNBC (尤其年轻患者)的关键致病因素,且可作为“无 BRCA1 突变但同源重组缺陷阳性”患者的筛查靶点,指导聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(Poly (ADP-ribose) Polymerase, PARP)抑制剂等靶向治疗选择[36]。

Yamashita 等人同样注意到 BRCA1 启动子甲基化仅在三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)病例中发现, BRCA1 启动子甲基化与 BRCA1 表达降低、侵袭性表型和不良预后显著相关,得出了 BRCA1 启动子甲基化是导致 BRCA1 功能丧失的重要机制的结论[37]。

2023 年 Mehdi Manoochehri 团队通过评估来自 TNBC 组织和正常乳腺组织、TNBC 外周血和对照的外周血以及分选的血液和乳腺细胞的参考样品的全基因组 DNA 甲基化数据,证明了基于 cfDNA 的甲基化标记作为诊断 TNBC 的非侵入性液体活检标记物的可行性[38]。这是 TNBC 液体活检领域首个系统筛选并验证 cfDNA 甲基化特异性标志物的关键研究,证实了基于血浆 cfDNA 甲基化特征可实现早期 TNBC 的无创诊断。但由于没有与传统检测手段对比,没有前瞻性随访验证等,使其在临床应用中同样具有一定的局限性。这些乳腺癌检测的甲基化标志物的发现,有望助力于乳腺癌的早期筛查和诊断工作。

TNBC 特异性甲基化标志物的开发,为解决 TNBC 早筛难题提供了新方向,但目前研究仍处于单中心小样本阶段,需多中心大样本验证。

4.5. 国内外临床转化进展

各项相关研究也在不断推动基于甲基化标志物的乳腺癌早期筛查产品的研发与上市,其中 GRAIL 公司的 Galleri 检测进展最为成熟,核心用于无症状人群早期泛癌筛查,2026 年初已递交上市申请。该检测整合了 ctDNA 甲基化和片段组学特征,其核心临床证据来自两项关键研究:PATHFINDER 1 纳入 6621 名 50 岁以上无症状高危人群,证实 Galleri 可一次性检测 50 余种癌症,对乳腺癌的灵敏度为 51.5%、特异性达 99.5%,初步验证了其临床可行性[39]。随后开展的 PATHFINDER 2 为注册性、多中心、前瞻性干预研究,纳入 35,878 名受试者,是目前全球规模最大的多癌早筛临床研究。2025 年 ESMO 年会公布的结果显示:Galleri 总体灵敏度为 40.4%,对 12 种高致死癌种灵敏度达 73.7%,特异性高达 99.6%,假阳性率仅 0.4%;其检出的癌症中 53.5%为 I~II 期早期病变,且 74%为当前缺乏标准筛查手段的癌种;当与乳腺钼靶、肠镜等常规筛查联合使用时,可使癌症检出率提升 7 倍以上,显著弥补了传统单癌种筛查的不足[40]。上述研究表明,基于甲基化的多癌早筛技术在无症状人群中具备良好的早期检出能力与安全性,尤其对乳腺癌等常见癌种可形成有效补充,为泛癌早期筛查提供了新的循证医学证据。

Downs, BM 等人通过开发 10 基因甲基化 Panel 及自动化检测系统,为乳腺癌早期筛查,尤其是资源匮乏地区的筛查提供了创新解决方案[41],2023 年王传新等人发明出乳腺癌早期筛查的多重基因甲基化检测荧光定量 PCR 试剂盒,提供了可直接临床落地的 4-CpG 位点检测工具,解决了早期乳腺癌血液筛查“特异性低、操作复杂”的痛点[42]。当前研究已从单基因验证迈入多标志物整合、亚型精准靶向、技术多组学融合的新阶段,部分 Panel 在早期乳腺癌中的 AUC 已突破 0.8,展现出良好的临床转化潜力,但其在真实世界筛查中的有效性、可及性和成本效益仍有待全面评估。

5. ctDNA 甲基化用于乳腺癌早期筛查的核心局限性

虽然从技术层面讲,以 ctDNA 甲基化标志物为核心进行乳腺癌早期筛查工作完全可行,但我们依旧不能忽视诊断试验与实际筛查工作之间的巨大鸿沟。

5.1. 生物学挑战

5.1.1. 早期病变灵敏度不足

肿瘤异质性也是 ctDNA 甲基化临床应用核心生物学挑战之一[43],乳腺癌存在显著瘤内、瘤间、原发灶-转移灶甲基化异质性:同一患者不同肿瘤细胞、不同乳腺癌分子亚型(Luminal 型、三阴性 TNBC、HER2 阳性型)甲基化图谱差异明显;不同患者间甲基化特征不统一,单一甲基化位点或固定 Panel 难以覆盖全部乳腺癌亚型。同时良性乳腺增生、乳腺腺瘤等良性病变可出现类癌样异常甲基化模式,进一步干扰信号判读,放大检测偏差。

5.1.2. 人群异质性与外推性问题

不同种族人群的 DNA 甲基化谱存在显著差异。例如,中国女性乳腺癌患者中 Luminal B 型和 TNBC 的比例高于欧美人群,其甲基化标志物谱也可能存在差异。因此,基于中国人群开发的甲基化 Panel 是否适用于欧美人群,以及欧美人群的研究结果能否直接推广至中国人群,仍需进一步验证。

5.2. 技术挑战

5.2.1. 全流程检测标准化缺失

ctDNA 甲基化检测全流程缺乏统一标准,包括样本采集、运输、保存、DNA 提取、亚硫酸盐转化、测序技术、数据处理及结果判读等环节。不同实验室采用的检测方法和试剂差异较大,导致研究结果可比性差,难以实现多中心交叉验证。2026 年发布的《血液游离 DNA 甲基化肿瘤标志物实验室检测与临床应用专家共识(2025 版)》为标准化提供了初步指导,但仍需进一步细化和完善[44]。

5.2.2. 肿瘤溯源困难

在这类检测的实际应用中,最常见的问题是:检测结果仅能提示受检者存在肿瘤,却无法明确肿瘤的原发组织起源[45]。而肿瘤原发灶的精准定位,正是这项早期筛查技术在研发推进与临床成熟化进程中,面临的一大核心技术瓶颈。

5.2.3. 微量 ctDNA 富集与信号分辨技术短板

血液中微量肿瘤甲基化片段易被正常白细胞 DNA 干扰,现有 WGBS、靶向 Panel 测序、数字 PCR 均存在信号分辨上限;亚硫酸盐转化过程会造成 DNA 片段降解,丢失部分甲基化位点信息,进一步削弱早期病灶检出能力。

5.3. 临床应用挑战

5.3.1. 证据等级不足

通过系统性地回顾相关研究文献,我们认识到这些研究几乎全部采用的病例对照研究方法。而在这种研究方法中,由于纳入研究的患者均已出现临床症状,且多数为晚期癌症患者,筛查检测的敏感性、特异性以及阳性预测值往往会被高估。同时对照组的人群构成与实际筛查人群相比,追求数据纯度,常选用年轻、无任何乳腺良性疾病史、无吸烟饮酒等混杂因素的志愿者作为对照,呈现出多样性不足的情况,也导致了实验数据过于理想化。某些良性病患者血浆 ctDNA 甲基化谱与健康对照存在显著差异,部分良性病变可呈现类似于“癌样”甲基化模式[46][47]。这意味着,病例对照研究中被排除的良性病变

人群，恰恰是真实筛查场景中假阳性的主要来源。前瞻性、基于大规模筛查队列的研究对于验证其临床效用至关重要，而此类证据目前仍非常有限。

同时这类回顾性研究、仅以诊断准确性为终点的研究，完全无法排除领先时间偏倚，无法证实 ctDNA 甲基化早筛能为患者带来真实的生存获益。且现有 ctDNA 甲基化检测乳腺癌早筛的相关研究，在入组人群、检测技术、研究设计、结局指标上存在显著的临床与方法学异质性，研究间结果可比性差，无法通过 Meta 分析合并得到高等级的循证医学证据。由此可知，现有证据等级远不足以支持其进入临床常规筛查。

5.3.2. 阳性预测值、阴性预测值和敏感性结果不理想

筛查面向的是大量无症状、低患病率人群，在此场景下，检测方法的灵敏度与阴性预测值(Negative Predictive Value, NPV)是其核心性能评价指标，同时也要求检测的阳性预测值(Positive Predictive Value, PPV)达到合理水平。

较高的阴性预测值能够可靠排除阴性受检者的乳腺癌患病风险，减少后续随访复查带来的医疗资源消耗；而优异的特异度可有效压低假阳性率，防止健康人群遭受过度诊断与不必要的侵入性治疗。阳性预测值是人群筛查难以突破的关键短板：普通群体乳腺癌发病基数低，即便检测灵敏度、特异度均突破 90%，PPV 仍会大幅下降。现有大量研究证实，以 ctDNA 甲基化标志物为核心的乳腺癌早筛体系，针对各类肿瘤的 PPV 普遍不足 10%。偏低的阳性预测值与较高的早期漏检率，共同制约了该技术独立用于大规模规范化筛查的可行性。

依据 GRAIL 公司公布的研究数据显示，基于 ctDNA 甲基化分析而进行的多癌早筛检测所体现出的早期癌症的检测敏感性表现堪忧：I 期癌症仅为 16.8%，II 期癌症为 40.4%，且这些数据均来源于病例对照研究，其真实世界的检测性能大概率存在高估[48]。在 Pathfinder 研究中，仅 1.4% 的受试者多癌早期检测(multi-cancer detection, MCD)测试呈阳性，真阳性病例仅 35 例，假阳性病例却达 57 例。另有 121 例确诊癌症的受试者为 MCD 测试假阴性，提示该检测方法的假阴性(漏检)率已达到不可忽视的水平。对于乳腺癌这种有成熟的临床标准筛查方案的癌种，MCD 测试对 I 期癌症的敏感性远低于最优临床标准筛查手段[49]，同时较高的假阳性率会导致过度诊疗，不仅造成有限医疗资源的大量浪费，还会触发一系列不必要的诊断检查，给患者带来沉重的身体、心理与经济负担。

5.4. 经济与伦理挑战

目前 ctDNA 甲基化检测的成本较高(约 3000~5000 元/次)，远高于传统筛查手段，难以纳入医保和大规模推广。此外，早筛阳性结果可能给受检者带来长期的心理焦虑，检测数据的隐私保护也是需要关注的伦理问题。

6. 总结与展望

综上所述，ctDNA 甲基化检测在乳腺癌早期筛查中具有巨大的应用潜力，其无创、高特异性、可动态监测的特点，弥补了传统筛查手段的不足。但目前该技术仍处于临床转化早期阶段，面临证据等级不足、早期灵敏度低、标准化缺失等多重挑战。

6.1. 现有技术临床定位

现阶段 ctDNA 甲基化检测尚不适合作为普通人群的常规筛查手段，其最佳临床定位是乳腺癌高危人群的初筛工具。对于 BRCA 突变携带者、有乳腺癌家族史、既往有乳腺不典型增生等高危人群，可先进行 ctDNA 甲基化检测，阳性者再行影像学检查，以提高筛查效率，减少不必要的影像学检查和有创活检。

利用其无创性提升该群体的筛查依从性,并凭借高特异性降低频繁影像学检查带来的假阳性率[50]。对于普通人群,对于普通人群,应继续采用乳腺 X 线联合超声的传统筛查方案。同时尝试构建 ctDNA 甲基化检测与传统影像学筛查的联合体系,实现表观遗传分子检测与形态学诊断的优势互补。

6.2. 多组学联合检测协同发展

单一 ctDNA 甲基化标志物仅依靠表观遗传修饰特征识别肿瘤,信号维度单一,对早期低负荷病灶检出能力有限,多组学整合是突破早期灵敏度瓶颈的核心方向,其中 ctDNA 甲基化联合 cfDNA 片段组学是现阶段转化价值最高的组合方案。

cfDNA 片段组学包含片段长度分布、末端基序特征、核小体定位图谱三类核心指标:肿瘤来源 ctDNA 片段普遍短于正常白细胞游离 DNA,乳腺癌特异性 ctDNA 集中分布在 90~150 bp 区间;同时肿瘤细胞凋亡释放的 DNA 末端碱基基序存在特征性偏移,可与甲基化位点形成双重肿瘤特异性信号。对于 I 期乳腺癌,单独甲基化检测灵敏度仅 40%~60%,叠加片段长度、末端基序特征后,可过滤大量正常白细胞背景干扰,将整体检出灵敏度显著提升,同时维持高特异性,降低假阴性。

6.3. 人工智能与机器学习赋能 ctDNA 甲基化全流程研发与临床决策

人工智能(Artificial Intelligence, AI)、机器学习算法将贯穿标志物筛选、检测模型构建、临床风险分层全链条,解决现有研究异质性大、判读标准模糊、筛查效能不足等痛点,是技术落地的关键支撑手段。

6.3.1. AI 加速特异性甲基化标志物挖掘

传统甲基化位点筛选依赖人工批量比对 TCGA、临床血浆数据集,效率低且易遗漏低丰度早期肿瘤特异性位点。现可基于深度学习的卷积神经网络、自动编码器可批量解析全基因组亚硫酸盐测序海量甲基化数据,自动识别癌前病变、I 期乳腺癌独有的低丰度异常 CpG 位点;同时自动剔除乳腺良性病变、衰老带来的非肿瘤性甲基化干扰信号,快速筛选高特异性、高灵敏度多基因 Panel,大幅缩短标志物研发周期。针对中国女性人群,机器学习可分层构建适配 Luminal、TNBC、HER2 阳性亚型的专属甲基化位点组合,解决人群异质性带来的效能衰减问题。

6.3.2. 机器学习优化多组学联合诊断模型

整合甲基化、片段长度、末端基序、临床基线信息(年龄、乳腺病史、家族史)等数十维特征,动态平衡灵敏度与特异度。相较于人工固定阈值判读,AI 模型可根据人群乳腺癌患病率动态调整临界值:普通筛查人群提高特异度以降低假阳性,高危人群上调灵敏度减少漏诊;多组学 AI 模型可显著提升乳腺癌诊断 AUC,减少不必要的乳腺穿刺活检。

6.3.3. AI 辅助标准化质控与临床决策随访

搭建全流程 AI 质控系统,自动识别样本溶血、存放超时、DNA 降解等不合格样本,统一不同测序平台数据校正算法,消除实验室间检测偏差,建立跨中心通用标准化判读体系。临床端构建智能决策辅助系统:输入患者 ctDNA 多组学检测结果、影像学报告、病理病史,AI 自动输出肿瘤患病风险分层、病灶定位提示、复查周期、活检指征建议;针对甲基化阳性但无影像学病灶的人群,AI 可动态评估年度癌变风险,制定个体化随访方案,缓解患者焦虑、优化医疗资源分配。

6.4. 临床转化落地配套体系建设方向

ctDNA 甲基化检测在乳腺癌早筛领域的发展,需跳出单纯提升技术指标的误区,构建适配乳腺癌防控实际需求的技术体系与临床应用模式。建立全流程标准化体系,开展多中心前瞻性队列研究,开发多

组学整合检测技术，明确临床应用路径。

对于 ctDNA 甲基化早筛阳性的结果，首先应进行阳性结果复核与基线风险分层评估，避免因假阳性启动不必要的诊疗，而后通过影像学定位与病因排查，实现病灶定位，明确阳性信号的病因，严格把控有创检查的指征。若存在明确影像学可疑病灶则通过组织学确诊与病理评估，进行临床干预与随访管理。

开发低成本国产化靶向甲基化检测试剂盒、微滴 PCR 自动化检测平台，降低单次检测成本，推动医保纳入，提升基层医疗机构可及性。

完善表观遗传检测数据隐私保护法规，配套筛查阳性人群心理疏导、规范化随访管理制度，平衡技术收益与伦理风险。

综上所述，ctDNA 甲基化检测是乳腺癌早期筛查领域的重要研究方向。随着技术的不断优化和证据的不断积累，其有望成为传统筛查手段的有效补充，为乳腺癌防控做出重要贡献。

作者贡献声明

孙朝阳：综述框架的整体设计、论文撰写及文献数据的系统整理；王晨宇：图表整理及配图制作工作；刘长根：对全稿进行系统审校，修订研究核心观点；尹晶晶：论文的语言润色，文献检索工作；赵硕：文献检索与筛选，论文格式校对；王倩：论文相关学术问询的处理；崔建：项目整体设计、研究方案优化与经费资助，全程统筹论文撰写、修改与定稿全流程，为研究方向把控及研究中关键技术难题的解决提供指导。

致谢

感谢本次科研及论文协作过程中导师及同学的指导和大力支持。

基金项目

山东省大学生创新创业训练计划项目(项目编号：S202411065142)。

利益冲突

所有作者声明无利益冲突。

参考文献

- [1] 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>
- [2] Zheng, R., Zhang, S., Zeng, H., Wang, S., Sun, K., Chen, R., *et al.* (2022) Cancer Incidence and Mortality in China, 2016. *Journal of the National Cancer Center*, **2**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.02.002>
- [3] Jia, S., Xie, L., Li, L. and Qian, B. (2019) Liquid Biopsy in Early Screening of Cancer: Current Status and Perspectives. *Bulletin of Chinese Cancer*, **28**, 774-779.
- [4] Chin, R., Chen, K., Usmani, A., Chua, C., Harris, P.K., Binkley, M.S., *et al.* (2019) Detection of Solid Tumor Molecular Residual Disease (MRD) Using Circulating Tumor DNA (ctDNA). *Molecular Diagnosis & Therapy*, **23**, 311-331. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00390-5>
- [5] Bird, A. (2002) DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes & Development*, **16**, 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- [6] Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals. *Nature Genetics*, **33**, 245-254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- [7] Jones, P.A. (2012) Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- [8] Dor, Y. and Cedar, H. (2018) Principles of DNA Methylation and Their Implications for Biology and Medicine. *The*

- Lancet*, **392**, 777-786. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31268-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31268-6)
- [9] 肿瘤 DNA 甲基化标志物检测及临床应用专家共识(2024 版) [J]. 中国癌症防治杂志, 2024, 16(2): 129-142.
 - [10] 王韞格, 刘云龙, 王玲菲, 等. 宿主 DNA 甲基化标志物在宫颈癌筛查中的应用: ZNF671 的关键贡献与联合模型评价[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2025, 45(9): 1242-1250.
 - [11] Peng, D., Kanai, Y., Sawada, M., Ushijima, S., Hiraoka, N., Kosuge, T., *et al.* (2005) Increased DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein Expression in Precancerous Conditions and Ductal Carcinomas of the Pancreas. *Cancer Science*, **96**, 403-408. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00071.x>
 - [12] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国乳腺癌筛查与早期诊断指南[J]. 中国癌症杂志, 2022, 32(4): 363-372.
 - [13] Mattsson, A., Leitz, W. and Rutqvist, L.E. (2000) Radiation Risk and Mammographic Screening of Women from 40 to 49 Years of Age: Effect on Breast Cancer Rates and Years of Life. *British Journal of Cancer*, **82**, 220-226. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0903>
 - [14] Gennari, R., Veronesi, U., Andreoli, C., Betka, J., Castelli, A., Gatti, G., *et al.* (2007) Early Detection of Cancer: Ideas for a Debate. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **61**, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.08.002>
 - [15] Cohen, J.D., Li, L., Wang, Y.X., *et al.* (2018) Detection and Localization of Surgically Resectable Cancers with a Multi-Analyte Blood Test. *Science*, **359**, 926-930.
 - [16] Wyatt, A.W., Annala, M., Aggarwal, R., Beja, K., Feng, F., Youngren, J., *et al.* (2018) Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **109**, djx118. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx118>
 - [17] Costello, J.F., Frühwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., *et al.* (2000) Aberrant CPG-Island Methylation Has Non-Random and Tumour-Type-Specific Patterns. *Nature Genetics*, **24**, 132-138. <https://doi.org/10.1038/72785>
 - [18] Gao, Y., Widschwendter, M. and Teschendorff, A.E. (2018) DNA Methylation Patterns in Normal Tissue Correlate More Strongly with Breast Cancer Status than Copy-Number Variants. *eBioMedicine*, **31**, 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.04.025>
 - [19] Ballestar, E. (2002) The Impact of Chromatin in Human Cancer: Linking DNA Methylation to Gene Silencing. *Carcinogenesis*, **23**, 1103-1109. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.7.1103>
 - [20] Luo, H., Wei, W., Ye, Z., Zheng, J. and Xu, R. (2021) Liquid Biopsy of Methylation Biomarkers in Cell-Free DNA. *Trends in Molecular Medicine*, **27**, 482-500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.12.011>
 - [21] Wang, B., Wang, M., Lin, Y., Zhao, J., Gu, H. and Li, X. (2024) Circulating Tumor DNA Methylation: A Promising Clinical Tool for Cancer Diagnosis and Management. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, **62**, 2111-2127. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1327>
 - [22] Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., *et al.* (1994) BRCA1 Mutations in Primary Breast and Ovarian Carcinomas. *Science*, **266**, 120-122. <https://doi.org/10.1126/science.7939630>
 - [23] 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>
 - [24] Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., *et al.* (2007) BRCA1 Dysfunction in Sporadic Basal-Like Breast Cancer. *Oncogene*, **26**, 2126-2132. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210014>
 - [25] Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y. and Noguchi, S. (2011) BRCA1 Promoter Methylation in Peripheral Blood Cells Is Associated with Increased Risk of Breast Cancer with BRCA1 Promoter Methylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, **129**, 69-77. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1188-1>
 - [26] Disis, M.L., Pupa, S.M., Gralow, J.R., Dittadi, R., Menard, S. and Cheever, M.A. (1997) High-Titer HER-2/Neu Protein-Specific Antibody Can Be Detected in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **15**, 3363-3367. <https://doi.org/10.1200/jco.1997.15.11.3363>
 - [27] Du, J.W., Xu, K.Y., Fang, L.Y. and Qi, X.L. (2012) Clinical Significance of Mena and HER-2 Expression in Breast Cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, **33**, 455-458.
 - [28] 韩露, 马培, 周新. 基因诊断在乳腺癌个体化医疗中的应用[J]. 中国医药导报, 2015, 12(26): 39-42.
 - [29] Liu, W. (2012) The Gene of BRCA1 and Breast Cancer. *Pharmaceutical Biotechnology*, **19**, 361-363.
 - [30] Chimonidou, M., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V. and Lianidou, E.S. (2013) SOX17 Promoter Methylation in Circulating Tumor Cells and Matched Cell-Free DNA Isolated from Plasma of Patients with Breast Cancer. *Clinical Chemistry*, **59**, 270-279. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.191551>
 - [31] Mishima, C., Kagara, N., Matsui, S., Tanei, T., Naoi, Y., Shimoda, M., *et al.* (2015) Promoter Methylation of TRIM9 as a Marker for Detection of Circulating Tumor DNA in Breast Cancer Patients. *SpringerPlus*, **4**, Article No. 635. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1423-7>

- [32] Shan, M., Yin, H., Li, J., Li, X., Wang, D., Su, Y., *et al.* (2016) Detection of Aberrant Methylation of a Six-Gene Panel in Serum DNA for Diagnosis of Breast Cancer. *Oncotarget*, **7**, 18485-18494. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7608>
- [33] Cao, Y., Li, Q., Liu, Y., Jin, W. and Hou, R. (2022) Discovering the Key Genes and Important DNA Methylation Regions in Breast Cancer. *Hereditas*, **159**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/s41065-022-00220-5>
- [34] Gao, L., Zhang, L., Liu, J., Wang, L., Fu, Q., Liu, S., *et al.* (2025) Discovery and Validation of Cell-Free DNA Methylation Markers for Specific Diagnosis, Differentiation from Benign Tumors, and Prognosis of Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, **27**, Article No. 108. <https://doi.org/10.1186/s13058-025-02066-x>
- [35] Alexander, G.E., Lin, W., Ortega, F.E., Ramaiah, M., Jung, B., Ji, L., *et al.* (2023) Analytical Validation of a Multi-Cancer Early Detection Test with Cancer Signal Origin Using a Cell-Free DNA-Based Targeted Methylation Assay. *PLOS ONE*, **18**, e0283001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283001>
- [36] Glodzik, D., Bosch, A., Hartman, J., Aine, M., Vallon-Christersson, J., Reuterswärd, C., *et al.* (2020) Comprehensive Molecular Comparison of BRCA1 Hypermethylated and BRCA1 Mutated Triple Negative Breast Cancers. *Nature Communications*, **11**, Article No. 3747. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17537-2>
- [37] Yamashita, N., Tokunaga, E., Kitao, H., Hitchins, M., Inoue, Y., Tanaka, K., *et al.* (2015) Epigenetic Inactivation of BRCA1 through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, **15**, 498-504. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2015.06.009>
- [38] Manoochehri, M., Borhani, N., Gerhäuser, C., Assenov, Y., Schöning, M., Hielscher, T., *et al.* (2023) DNA Methylation Biomarkers for Noninvasive Detection of Triple-Negative Breast Cancer Using Liquid Biopsy. *International Journal of Cancer*, **152**, 1025-1035. <https://doi.org/10.1002/ijc.34337>
- [39] Beer, T.M., McDonnell, C.H., Nadauld, L., Liu, M.C., Klein, E.A., Reid, R.L., *et al.* (2021) Interim Results of PATHFINDER, a Clinical Use Study Using a Methylation-Based Multi-Cancer Early Detection Test. *Journal of Clinical Oncology*, **39**, 3010-3010. https://doi.org/10.1200/jco.2021.39.15_suppl.3010
- [40] Giridhar, K.V., Demeure, M.J., Kim, R.H., Chen, J.A., Gadgeel, S., Kurbegov, D., *et al.* (2024) Abstract 4784: PATHFINDER 2: A Prospective Study to Evaluate Safety and Performance of a Multi-Cancer Early Detection Test in a Population Setting. *Cancer Research*, **84**, 4784. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2024-4784>
- [41] Downs, B.M., Mercado-Rodriguez, C., Cimino-Mathews, A., Chen, C., Yuan, J., Van Den Berg, E., *et al.* (2019) DNA Methylation Markers for Breast Cancer Detection in the Developing World. *Clinical Cancer Research*, **25**, 6357-6367. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-3277>
- [42] 王传新, 杜鲁涛, 李培龙, 等. 乳腺癌早期筛查的多重基因甲基化检测荧光定量 PCR 试剂盒[P]. 中国专利, CN202210915507.4. 2023-09-08.
- [43] Li, L. and Sun, Y. (2024) Circulating Tumor DNA Methylation Detection as Biomarker and Its Application in Tumor Liquid Biopsy: Advances and Challenges. *MedComm*, **5**, e766. <https://doi.org/10.1002/mco2.766>
- [44] 中华医学会检验医学分会. 血液游离 DNA 甲基化肿瘤标志物实验室检测与临床应用专家共识(2025 版) [J]. 中华检验医学杂志, 2026, 49(2): 160-171.
- [45] Pons-Belda, O.D., Fernandez-Urriarte, A. and Diamandis, E.P. (2022) Can Circulating Tumor DNA Support a Successful Screening Test for Early Cancer Detection? the Grail Paradigm. *Diagnostics*, **11**, Article 2171. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122171>
- [46] Zhang, Y. and Cheng, L. (2024) DNA Methylation Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Diagnosing Breast Cancer from Benign Breast Lesions. *Journal of Translational Medicine*, **22**, Article No. 1070. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05842-z>
- [47] Adashek, J.J., Kato, S., Lippman, S.M. and Kurzrock, R. (2020) The Paradox of Cancer Genes in Non-Malignant Conditions: Implications for Precision Medicine. *Genome Medicine*, **12**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-0714-y>
- [48] Klein, E.A., Richards, D., Cohn, A., Tummala, M., Lapham, R., Cosgrove, D., *et al.* (2021) Clinical Validation of a Targeted Methylation-Based Multi-Cancer Early Detection Test Using an Independent Validation Set. *Annals of Oncology*, **32**, 1167-1177. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.806>
- [49] Schrag, D., Beer, T.M., McDonnell, C.H., Nadauld, L., Dilaveri, C.A., Reid, R., *et al.* (2023) Blood-Based Tests for Multicancer Early Detection (PATHFINDER): A Prospective Cohort Study. *The Lancet*, **402**, 1251-1260. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(23\)01700-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(23)01700-2)
- [50] Thierry, A.R. and Tanos, R. (2018) Liquid Biopsy: A Possible Approach for Cancer Screening. *Médecine/Sciences*, **34**, 824-832. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018208>