

循环细胞游离 DNA 在乳腺癌中的研究进展

王伟 夏添松 王水

【摘要】 在乳腺癌发展过程中,肿瘤细胞内的 DNA 片段可进入血液循环,形成细胞游离 DNA (cfDNA)。随着肿瘤研究的发展以及诊断技术的进步,cfDNA 尤其是循环肿瘤 DNA (ctDNA) 检测在肿瘤的早期诊断、病情评估、药物反应监测、复发转移及预后的预测等方面均有着重要的应用价值,有望成为新一代的乳腺癌诊断新方法。笔者就 cfDNA 的生成机制以及乳腺癌中有关 cfDNA/ctDNA 的研究内容作一综述。

【关键词】 乳腺肿瘤; 肿瘤细胞,循环; DNA

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

1948年,Mandel等^[1]报道了人类血液中存在细胞游离核酸(cell-free nucleic acid, cfNA)物质。1977年,Leon等^[2]检测出乳腺癌患者血浆中含有约0~2 μg/ml的细胞游离DNA(cell-free DNA, cfDNA),并且发现cfDNA浓度的改变与疾病的状态相关。1994年,科学家在癌症患者血液中检测到突变的RAS基因片段,推测这些突变基因可能来源于肿瘤细胞^[3]。cfDNA包括DNA、信使RNA(message RNA, mRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)等。其中cfDNA具有相对稳定,容易提取等优点,因而受到较多关注。cfDNA的应用领域包括产前诊断、肿瘤的诊断及监测以及创伤、休克的病情评估等。在癌症研究中,cfDNA检测被认为是具有广阔应用前景的肿瘤分子诊断新方法^[4]。

一、cfDNA的起源

研究发现,患者体内cfDNA的量与肿瘤负荷呈正相关^[5]。100g肿瘤组织约含 3×10^{10} 个肿瘤细胞,其中每天约有3.3%的基因组DNA或线粒体DNA进入循环^[6]。基因组DNA多为完全游离的形态,而线粒体DNA可以完全游离或与其他颗粒相结合的形式存在。进入外周血的DNA可被核酸酶降解,最后经肝肾被清除,其半衰期约十几分钟至几个小时^[7]。cfDNA可来源于原发灶肿瘤细胞、循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)、微转移灶以及正常的血细胞、基质细胞等。目前,有关DNA释放到细胞外并最终进入循环的具体机制尚不清楚,可能的原因包括细胞的凋亡、坏死、主动分泌等^[8]。

1. 细胞凋亡

细胞凋亡的一个重要标志是核固缩、破裂,破裂核释放出的染色体DNA最终会被降解为180~200bp的片段^[9]。对肿瘤患者的研究发现,在肿瘤组织未出现明显坏死前,cfDNA的浓度已明显高于健康人^[10];而体外诱导肿瘤细胞

凋亡后,细胞外DNA浓度明显升高^[11],提示cfDNA可能来源于凋亡细胞。对cfDNA片段大小及序列的分析发现,癌症患者cfDNA的长度主要集中于160~180bp或者是其整数倍,这与凋亡细胞核小体DNA的电泳结果相似^[12]。此外,对肝癌患者cfDNA的测序结果提示,携带肿瘤特异度突变基因的DNA片段长度多集中于160bp左右^[13],进一步说明肿瘤细胞来源的cfDNA并非随机生成,而是凋亡过程中核酸酶剪切核小体间DNA序列后形成的具有一定长度特征的片段。

2. 细胞坏死或被吞噬后释放

肿瘤在生长过程中,因供血、供氧不足或者是免疫细胞的吞噬、破坏,可出现局部坏死。细胞的非程序性死亡,导致DNA在被剪切、降解前即进入血液,因而释放出的DNA片段变异度较大,并且以长片段(大于1000bp)居多^[14]。

3. 细胞主动分泌

有研究发现,肿瘤细胞培养液上清液中游离DNA浓度与癌细胞的增殖成正比,而与细胞死亡无明显相关性,提示部分cfDNA可能来源于活细胞^[4]。细胞分泌DNA的确切机制尚不清楚,可能与细胞主动分泌的颗粒如外泌体(exosomes)有关^[15]。如Lehmann等^[16]通过凝胶电泳就证明外泌体中包含的DNA量及片段大小与细胞凋亡、坏死无关。

二、cfDNA在乳腺癌诊断中的应用

cfDNA近年来被认为是除CTC之外又一种可用于癌症无创分子诊断的物质。在乳腺癌中,相关的研究集中于cfDNA浓度、完整性指数(DNA integrity index, DII)、甲基化改变、基因改变及外泌体等^[17]。

1. cfDNA浓度及完整性

研究发现,健康人cfDNA的平均浓度约为30ng/ml,而肿瘤患者为180ng/ml^[5]。cfDNA浓度是否能够作为诊断指标尚存在争议,主要原因在于cfDNA浓度在个体间的差异较大,尤其是恶性肿瘤与良性肿瘤之间存在重叠。此外,在创伤、炎症性疾病中还发现cfDNA浓度要高于健康人,因而特异度较差^[18]。在乳腺癌中的研究发现DII的诊断效力优于cfDNA浓度及传统血清学指标,因而有望成为乳腺癌的一个

新的诊断及预后标志物。DII 为一个相对值,反应的是 cfDNA 的碎片化程度。其计算方法是采用定量 PCR (quantitative PCR, Q-PCR) 法检测基因组中广泛分布的重复序列(如 ALU 和 LINE1)的长、短片段(短序列位于长序列内部),并以长片段与短片段量的比值来表示。目前有关 DII 的研究还存在争议。有的研究者认为癌症患者的 DII 要高于健康人,其理论根据在于健康人 cfDNA 主要来源于凋亡细胞,而癌细胞可因坏死、自噬等病理过程释放更多长 DNA 片段^[19-20]。与之相反, Madhavan 等^[21]则发现乳腺癌患者血浆 DII 明显低于健康人并且在转移性乳腺癌中具有预后价值。此外,作者还在体外实验上观察到乳腺癌细胞株(MCF-7、BT474)的 DII 小于正常乳腺细胞株(MCF-10A),进一步证实了临床发现。对肝癌的研究同样发现,cfDNA 短片段(160 bp 左右)多携带肿瘤特异度的突变,而长链 DNA 分子不携带这类特征,提示肿瘤来源的 cfDNA 片段长度多小于健康人^[13]。Mouliere 等^[22]采用特异度 Q-PCR 法证实肿瘤来源的 DNA 碎片化程度更高,所要扩增的目标片段的长度会动态影响 cfDNA 的浓度,说明检测及计算方法的不同可能导致 DII 研究结果的不一致。

2. 甲基化改变

癌症发生早期常伴有表观遗传学的改变。正常细胞中位于 DNA 重复序列内的大部分 CpG 位点为甲基化状态,而位于启动子附近的 CpG 岛为低甲基化,在癌细胞中,这种正常的甲基化模式会发生改变,如启动子附近的非甲基化 CpG 位点被甲基化,而位于 DNA 重复原件内的甲基化 CpG 位点去甲基化。启动子 CpG 岛的甲基化可抑制抑癌基因的功能,而低甲基化状态可导致基因组的不稳定^[23]。将癌组织进行全基因组甲基化水平分析后发现,将乳腺癌患者按照 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)进行分类后,可区分出不同转移风险的患者^[24]。可见基因甲基化模式的改变在肿瘤发生、发展中发挥重要作用并与癌症的预后密切相关。目前,在乳腺癌中有关 cfDNA 甲基化标志物的研究还缺乏大规模前瞻性临床试验。Legendre 等^[25]在 cfDNA 中检测到与转移性乳腺癌及 DFS 明显相关的 21 个 DNA 高甲基化热点。此外, GSTP1、APC、RASSF1A、RAR β 、SEPT9、ESR1、CDKN2A、CST6、BRCA1、PR 等基因或者 DNA 重复原件(LINE1、ALU)甲基化水平改变也被证明可用于乳腺癌早期诊断并与预后存在明显的相关性^[9]。然而,单个基因甲基化水平检测往往敏感度较低(小于 30%)。Shan 等^[26]在乳腺癌、乳腺良性疾病患者及健康人血清中同时检测 SFN、P16、hMLH1、HOXD13、PCDHGB7 和 RASSF1a 基因启动子甲基化状态,发现乳腺癌组与健康组、良性对照组相比分别可达到 79.6%、82.4% 的诊断敏感度和 72.4%、78.1% 的特异度。

3. 基因改变

随着癌症基因组测序的发展,越来越多肿瘤相关的遗传学改变被发现,如杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)、微卫星不稳定(microsatellite instability)、基因突变等。对 388 例原发性乳腺癌患者 cfDNA 的分析发现患者可出现

TIG1、PTEN、cyclin D、RB1、BRCA1 的杂合性缺失,尤其是 cyclin D2 可能是一个重要的预后标志物。此外,作者还发现短链 DNA 分子发生 LOH 的频率显著高于长链 DNA 分子^[27]。在卵巢癌中也有类似发现,而化疗可降低 LOH 的发生频率^[28]。

肿瘤在进化过程中可伴随出现一些基因的突变即体细胞突变(somatic mutation)。由于体细胞突变在正常组织中不发生或者发生率很低,因而可以作为肿瘤的特异度标志物。此外,一些突变在驱动肿瘤发展,诱导肿瘤耐药方面发挥重要作用,有望成为肿瘤治疗的重要靶点。cfDNA 中来源于肿瘤细胞并携带肿瘤特异度突变的 DNA 被称为循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)。Diehl 等^[29]认为 ctDNA 可用于监测肿瘤的动态变化;对 640 例不同类型癌症的研究发现,超过 75% 的晚期癌症患者 ctDNA 阳性,并且在早期乳腺癌中的阳性率可达 50%^[30];对 30 例晚期乳腺癌患者 cfDNA 中 TP53 和 PIK3CA 基因突变热点的检测发现,ctDNA 的阳性率要明显高于 CTC 或糖类抗原 153,且 ctDNA 在监测体内肿瘤负荷中的意义更大^[31];ctDNA 检测还可用于预测接受新辅助化疗的乳腺癌患者的复发风险,并为制定个体化治疗方案提供依据^[32-33];对于接受内分泌治疗的晚期乳腺癌患者,若血浆中检测到 ESR1 突变往往提示对芳香化酶抑制剂耐药^[34-36]。此外,ctDNA 检测还可用于分子靶向治疗效果的评估^[37-38]。对于无法多次获得组织样本的 HER-2 阳性乳腺癌患者,检测血浆 cfDNA 中 HER-2 的表达量是一个有效的替代途径^[39]。ctDNA 检测方法包括全基因组或全外显子测序和对候选基因已知位点的靶向检测,如质谱、等位基因特异度 PCR、数字 PCR、标记扩增深度测序(tagged-amplification deep sequencing)、癌症个体化深度测序(cancer personalized profiling by deep sequencing)等^[40]。全基因组或全外显子测序覆盖面广,可检测到少见的突变,但其耗时、花费大、敏感度低。靶向检测运用较多的是数字 PCR,其优点是检测剪接度高、能绝对定量、费用低,但由于只能检测已知基因的已知突变位点,因而检测通量较低^[41]。为增加检测的敏感度和特异度,可进行多基因、多位点联合检测。Newman 等^[42]利用定制化的突变位点库作为“筛选器”,对样本进行靶向捕获后再进行超深度测序(测序覆盖深度可达到 10 000 \times),在早期肿瘤中 ctDNA 的检测率可达 50%,晚期肿瘤的检测率达 100%,特异度达 96%。

4. 凋亡小体(apoptotic body)及外泌体

循环中 cfDNA 还可能与组蛋白结合或包含在凋亡小体、外泌体内。生理情况下,凋亡细胞以凋亡小体的形式释放出 DNA 及核小体。凋亡小体很快被吞噬细胞吞噬、降解。当肿瘤细胞凋亡率超过了降解率后,循环中核小体的浓度也随之增加^[43]。然而,在乳腺癌中,核小体浓度增加仅能提示细胞凋亡率增加,并不能有效的区分良、恶性肿瘤^[44]。Snyder 等^[45]发现 cfDNA 片段包含了不同细胞来源的核小体的结构特点,通过对 cfDNA 的分析来反映核小体在血液中留下的痕迹可用于监测疾病状态,作者认为这是一种不依赖于基因分析的新思路。

外泌体是细胞主动分泌的,直径约 30 ~ 100 nm,由脂质双分子层构成的小囊泡其在细胞间信息传递中发挥重要作用^[46]。有关外泌体的研究多集中于其内的 mRNA、miRNA、蛋白质、脂类等,并发现这些分子具有促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移、耐药、抗凋亡等作用^[47]。然而,外泌体内的 DNA 量及意义目前还知之甚少。

三、cfDNA 对肿瘤细胞功能的影响

1999年,García-Olmo等^[48]发现 ctDNA 有促肿瘤转移的作用,并提出基因转移(genometastasis)假说。研究者在随后的研究中发现用结直肠癌患者的血浆培养小鼠胚胎成纤维细胞后可得到与患者 cfDNA 中一致的突变型基因的细胞,将含有该基因突变型的细胞植入小鼠体内后可形成肿瘤^[49]。Tuomela等^[50]在乳腺癌中同样发现来源于凋亡细胞的 DNA 可增加癌细胞的侵袭力。可见,cfDNA 尤其是 ctDNA 不仅可用于诊断,对肿瘤细胞功能还具有直接影响,但具体的作用机制还需进一步研究。

四、结语

越来越多的研究显示 cfDNA 尤其是 ctDNA 检测作为一种无创、可重复且更加敏感、特异的检测方法在肿瘤诊断、治疗反应监测及预后判断中均有重要的应用价值^[51]。相较于其他血液标志物,肿瘤异质性往往是制约诊断准确性及疗效的重要因素,而 ctDNA 检测可有效的避免这种差异带来的诊断敏感度的下降,能更早的提示患者出现微转移,并为制定进一步的治疗方案提供依据。然而,cfDNA 检测还存在一些不足,如费用高、无规范的操作流程、不同平台间可比性较差等。在乳腺癌研究中,目前还缺乏针对不同人群的特异性检测靶点;cfDNA 检测联合其他诊断方法的应用价值还需更多随机临床试验去验证。此外,cfDNA 是否与血液中游离的 miRNA、外泌体等类似可直接影响细胞的功能同样值得关注。

参 考 文 献

- [1] Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme[J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4): 241-243.
- [2] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.
- [3] Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia[J]. Br J Haematol, 1994, 86(4): 774-779.
- [4] Canzoniero JV, Park BH. Use of cell free DNA in breast oncology[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1865(2): 266-274.
- [5] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 426-437.
- [6] Diehl F, Li M, Dressman M, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(45): 16 368-16 373.
- [7] Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1775(1): 181-232.
- [8] Parsons HA, Beaver JA, Park BH. Circulating plasma tumor DNA[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 882: 259-276.
- [9] Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(5): 211.
- [10] van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA[J]. Clin Chem, 2007, 53(12): 2215.
- [11] Spellman PT, Gray JW. Detecting cancer by monitoring circulating tumor DNA[J]. Nat Med, 2014, 20(5): 474-475.
- [12] Morozkin ES, Babochkina TI, Vlassov VV, et al. The effect of protein transport inhibitors on the production of extracellular DNA[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1137: 31-35.
- [13] Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(11): E1317-1325.
- [14] Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12 Suppl 1: S209-215.
- [15] Sadovska L, Eglitis J, Line A. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets in breast cancer[J]. Anticancer Res, 2015, 35(12): 6379-6390.
- [16] Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7864-7871.
- [17] Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy[J]. Cancer Discov, 2016, 6(5): 479-491.
- [18] Gormally E, Hainaut P, Caboux E, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study[J]. Int J Cancer, 2004, 111(5): 746-749.
- [19] Stötzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, et al. Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(2): 1183-1191.
- [20] Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26): 4270-4276.
- [21] Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(1): 163-174.
- [22] Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e23418.
- [23] Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, et al. DNA methylation in cancer and aging[J]. Cancer Res, 2016, 76(12): 3446-3450.
- [24] Fang F, Turcan S, Rimner A, et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(75): 75ra25.
- [25] Legendre C, Gooden GC, Johnson K, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of cell-free DNA identifies signature associated with metastatic breast cancer[J]. Clin Epigenetics, 2015, 7: 100.
- [26] Shan M, Yin H, Li J, et al. Detection of aberrant methylation of a six-gene panel in serum DNA for diagnosis of breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 18 485-18 494.

- [27] Schwarzenbach H, Eichelsler C, Kropidlowski J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5719-5730.
- [28] Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P, et al. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall survival[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 325.
- [29] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics[J]. *Nat Med*, 2008, 14(9): 985-990.
- [30] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra24.
- [31] Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(13): 1199-1209.
- [32] Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): 302ra133.
- [33] Sundaresan TK, Haber DA. Does molecular monitoring matter in early-stage breast cancer? [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): 302fs35.
- [34] Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(313): 313ra182.
- [35] Guttery DS, Page K, Hills A, et al. Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (ESR1) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(7): 974-982.
- [36] Chu D, Paoletti C, Gersch C, et al. ESR1 mutations in circulating plasma tumor DNA from metastatic breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(4): 993-999.
- [37] Frenel JS, Carreira S, Goodall J, et al. Serial next generation sequencing of circulating cell free DNA evaluating tumour clone response to molecularly targeted drug administration [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(20): 4586-4596.
- [38] Fadoukhair Z, Zardavas D, Chad MA, et al. Evaluation of targeted therapies in advanced breast cancer; the need for large-scale molecular screening and transformative clinical trial designs [J]. *Oncogene*, 2016, 35(14): 1743-1749.
- [39] Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK, et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12): 3276-3284.
- [40] Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(6): 650-661.
- [41] Mazaika E, Homsy J. Digital droplet PCR: CNV analysis and other applications[J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2014, 82: 7.24.1-7.24.13.
- [42] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage [J]. *Nat Med*, 2014, 20(5): 548-554.
- [43] Ward TH, Cummings J, Dean E, et al. Biomarkers of apoptosis[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(6): 841-846.
- [44] Roth C, Pantel K, Müller V, et al. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 4.
- [45] Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 57-68.
- [46] O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(24): 2359-2362.
- [47] Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L. The role of exosomes in breast cancer [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(12): 1457-1465.
- [48] García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, et al. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. the hypothesis of the genomastasis [J]. *Histol Histopathol*, 1999, 14(4): 1159-1164.
- [49] García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 560-567.
- [50] Tuomela J, Sandholm J, Kaakinen M, et al. DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 142(3): 477-487.
- [51] Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48 832-48 841.

(收稿日期:2016-05-15)

(本文编辑:宗贝歌)

王伟,夏添松,王水. 循环细胞游离 DNA 在乳腺癌中的研究进展 [J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2017, 11(3): 175-178.