

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.05.002

miR 200c-3p CXCR6 与乳腺癌患者总生存期 无病生存期的相关性研究*

李珊珊 夏重升 苏修军 李 扬 李雪芹 山长平[△]
(济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 **目的** 探讨 miR 200c-3p、CXCR6 与乳腺癌患者的总生存期、无病生存期的关系。**方法** 选取 2013 - 2015 年在我院接受放化疗的乳腺癌患者 120 例(三阴 VS 非三阴乳腺癌各 60 例), 获取该 120 患者的临床病理资料及术后组织石蜡切片, 通过固定组织 RNA 提取试剂盒提取乳腺癌石蜡组织切片中的总 RNA, 再通过 All-inOne™ miRNA 定量 PCR 检测试剂盒检测乳腺癌石蜡组中 miR 200c-3p 的表达, 同时应用免疫组化方法检测肿瘤组织中 CXCR6 的表达, 根据 miR-200c-3p 及 CXCR6 不同的表达情况将 120 例乳腺癌患者分为 4 组, 分析四组患者的生存情况, 并分析 miR 200c-3p 及 CXCR6 表达高低与乳腺癌患者生存期的关系。**结果** miR-200c-3p 低表达患者与高表达患者的总生存期($P=0.428$)及无病生存期($P=0.542$)均无差异; CXCR6 高表达患者的总生存期差于低表达患者($P=0.006$), CXCR6 高表达组的无病生存期差于低表达组($P=0.042$); 四组患者的总生存期存在差异($P=0.022$), 无病生存期无差异($P=0.160$)。两两比较显示 CXCR6 高表达 miR-200c-3p 高表达组的总生存期短于 CXCR6 低表达 miR-200c-3p 高表达组及 CXCR6 低表达 miR-200c-3p 低表达组, P 值分别为 0.002、0.001。**结论** 乳腺癌患者 miR 200c-3p 表达与预后无明显关系, CXCR6 表达高低与总生存期及无病生存期相关。

关键词 乳腺癌; miR 200c-3p; CXCR6; 总生存期; 无病生存期

中图分类号: R737 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)10-309-06

Expression and correlation of miR200c-3p and CXCR6 and survival period of breast cancer

LI Shanshan, XIA Chongsheng, SU Xiujun, LI Yang, LI Xueqin, SHAN Changping[△]
(Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between miR 200c-3p and CXCR6 and the overall survival and disease-free survival of breast cancer patients. **Methods** 120 breast cancer patients (60 cases of Triple-negative VS. 60 cases of non-Triple-negative breast cancer) were recruited according to the diagnostic criteria and inclusion criteria screening out in the Affiliated Hospital of Jining Medical University from 2013 to 2015. The paraffin sections of the 120 patients were obtained, and the mammary glands were extracted by fixed tissue RNA extraction kit. Total RNA in paraffin section of cancer tissue was detected by all-in-one™ microRNA quantitative PCR kit. The expression of microRNA 200c-3p in paraffin group of breast cancer was detected by immunohistochemistry method. 120 breast cancer patients were divided into four groups according to the different expression of microRNA-200c-3p and CXCR6. The survival of the four groups and the relationship between the expression of microRNA 200c-3p and CXCR6 were analyzed. **Results** There was no difference in total lifetime ($P=0.428$) and disease-free lifetime ($P=0.542$) between the low-expression group and the high-expression group of miR 200c-3p. The total lifetime of the high-expression group of CXCR6 was shorter than that of the low-expression group ($P=0.006$). The disease-free lifetime of the high-expression group of CXCR6 was lower than that of the low-expression group ($P=0.042$). The total lifetime of the four groups was

* [基金项目] 济宁医学院附属医院博士科研启动基金(2016-BS-0056)

△ [通信作者] 山长平, E-mail: scp9933@163.com

different ($P=0.022$), and the disease-free lifetime was no difference ($P=0.160$). Comparing two groups separately, it was found that the total survival time of CXCR6 high-expression group was shorter than that of CXCR6 low-expression group and CXCR6 low-expression group with P values of 0.002 and 0.001. **Conclusion** The expression of microRNA 200c-3p in breast cancer patients has no significant relationship with prognosis. The expression of CXCR6 in breast cancer patients was correlated with overall survival and disease-free survival.

Keywords: Breast cancer; miR 200c-3p; CXCR6; Total survival; Disease-free survival

乳腺癌是发生于乳腺上皮组织的恶性肿瘤。全球乳腺癌发病率从 20 世纪 90 年代开始呈上升趋势^[1]。根据世界卫生组织 (WHO) 发表的《全球肿瘤报告 2018》数据显示乳腺癌是全球女性中最常见的肿瘤, 2018 年全球新发乳腺癌 210 万例, 死亡 78 万例。在我国, 据全国肿瘤登记中心收集的 22 个肿瘤登记地区的数据 (2014 - 2015 年) 显示乳腺癌的发病率逐年上升, 位居城乡女性之首, 且呈年轻化趋势, 2011 年我国新发乳腺癌约 27.89 万例, 死亡约 6.6 万例^[2]。因此, 乳腺癌的早期诊断及治疗显得十分重要。研究发现乳腺癌的恶性程度及治疗效果与乳腺癌细胞的侵袭、转移等恶性生物学行为相关^[3], 而这些生物学行为, 与多种基因表达相关, 如雌激素受体 (estrogen receptor, ER)^[4]、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor, HER2)^[5] 和 ki-67^[6] 等相关。MicroRNA (miRNA, miR) 是在真核生物中发现的一类多功能小分子, 可以在转录后靶向调控 mRNA, 抑制 mRNA 的翻译过程或促进 mRNA 的降解。miRNA 参与机体各种调节途径如病毒防御、脂肪代谢等^[7]。并且已发现 miRNA 在多种肿瘤中异常表达, 包括乳腺癌^[8]。多个研究对不同侵袭性的乳腺癌细胞系 miRNA 表达进行了比较分析, 发现 miR-200c-3p、miR-375 和 miR-203 在高侵袭性乳腺癌细胞 (三阴乳腺癌细胞 MDA-MB231) 系中的表达明显低于其他乳腺癌细胞系^[9]。上调 miR-200c-3p 的表达, 可降低高侵袭性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移能力^[10]。此外, 趋化因子受体 CXCR6 在多种肿瘤包括乳腺癌中异常表达, 并与其肿瘤细胞的恶性生物学行为以及患者预后相关。CXCR6 在乳腺癌及其淋巴结转移灶中的表达高于正常乳腺组织^[11], 提示 CXCR6 可能与乳腺癌的恶性度相关。CXCR6 在不同侵袭性的乳腺癌细胞系中表达不同, CXCR6 与乳腺癌的侵袭性呈正相关, 且通过机制通路研究发现 CXCR6 通过激

活 Ak/mTOR 通路发挥促癌作用, 这可能成为抑制乳腺癌发生发展的靶点。本实验通过收集乳腺癌临床标本及相关临床病理信息, 检测 miR-200c-3p 及 CXCR6 的表达, 分析两者在乳腺癌预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

从海泰电子病历系统中筛出 2013 年 1 月 1 日至 2015 年 12 月 31 日在济宁医学院附属医院接受诊治符合纳入排除标准的乳腺癌患者 120 例 (三阴 VS 非三阴乳腺癌各 60 例), 获取该 120 患者的临床病理资料及术后组织石蜡切片。纳入标准: 1) 经组织病理确诊的乳腺癌; 2) 经乳腺外科手术治疗, 可获得首次乳腺癌手术石蜡组织切片; 3) 术前未进行新辅助治疗。排除标准: 1) 伴有其他肿瘤; 2) 组织样本中肿瘤细胞所占比例 < 50%; 3) 未行 ER、PR、HER2 检测; 4) 病理诊断为原位癌; 5) 临床信息不完整; 6) 无法完成随访工作。

1.2 方法

1.2.1 获取石蜡组织 经 2 名独立的病理科医师确认是乳腺癌组织, HE 染色切片中肿瘤细胞达到 50%。组织的获取: 连续切片, 每张切片厚度为 4 μ m。制作 4~5 张连续切片装管用于 miR-200c-3p 的 qRT-PCR 检测; 5 张载有组织切片的玻片用于 CXCR6 的免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测。

1.2.2 材料 超低温 (-80 $^{\circ}$ C) 冰箱、低温高速离心机、高速离心机、Real-time PCR 仪 (美国 Thermo 公司); Envision 试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥有限公司); miRNA qPCR U6 引物、miRNA qPCR has-miR-200c-3p 引物、固定组织 RNA 提取试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); All-in OneTM miRNA 定量 PCR 检测试剂盒、All-in OneTM SuperRT cDNA 第-链合成试剂盒 (美国 GeneCopoeia 公司); 兔抗人-CXCR6 抗体 (美国 Ab-

cam 公司)。

1.2.3 引物的设计与合成 由广州复能基因有限公司合成针对 miR-200c-3p 和 RNU6 的实时荧光定量 PCR 引物, 信息如下: miR-200c-3p: Catalog# HmiRQP0302, Primer ID hsmq-0627, Mature_Acc MIMATO000617; RNU6: Catalog # HmiRQP9001, Primer ID hsnRNA-u6, Mature_AccNR_002752。

1.2.4 qRT-PCR 检测 RNA 提取试剂盒提取乳腺癌石蜡组织切片中的总 RNA, 采用美国 Genecopoeia 公司生产的 All-in One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit 进行 miRNA 的逆转录合成和 qRT-PCR 检测。qRT PCR 数据分析通过 $2^{-\Delta Ct}$ 法完成, Ct 值代表在 PCR 扩增过程中, 热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值。 $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{内参}$, 用 $2^{-\Delta Ct}$ 代表各个样本的表达量, 选择样本的 $2^{-\Delta Ct}$ 值设为 1, 以此作为对照。定义不低于中位数值为高表达, 低于中位数值为低表达。

1.2.5 免疫组织化学染色 (Envision 法) 将玻片放入恒温烤箱, 30min。按以下顺序脱蜡及脱水: 二甲苯 X4 缸, 每缸 10min; 100% 乙醇 10min; 90% 乙醇 5min; 30% 乙醇 5min; 纯净水冲洗 2min。3% 过氧化氢 (30% 过氧化氢用甲醇配至 3%) 处理切片, 室温避光封闭 25min, 阻断内源性过氧化物酶。蒸馏水洗, 摇床, 5min × 2 次。抗原修复处理, 采用枸橼酸缓冲液 (10mM, pH = 6.0) 高压煮沸修复, 将组织芯片置于装有枸橼酸抗原修复液 (1mM, pH = 6.0) 的容器中, 放入微波炉中高火加热 15min, 取出自然冷却至室温。摇床如上操作, 用 PBS 溶液清洗, 5min × 2 次。滴加 CXCR6 第一抗体 (1:40, PBS 空白对照) 后, 使用盖玻片盖住组织, 4℃ 孵育过夜。用 PBS 溶液冲去盖玻片后, 继续用 PBS 溶液清洗, 摇床, 5min × 2 次。滴加二抗, 再次用盖玻片盖住组织, 37℃ 恒温箱中孵育 60min。用 PBS 溶液冲去盖玻片后, 继续用 PBS 溶液清洗, 摇床, 5min × 2 次。DAB 显色, 并使用盖玻片盖住组织, 使 DAB 完全覆盖, 光镜下观察, 适时终止, 自来水冲洗。室温下, 苏木素复染 4min, 水冲后, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 自来水返蓝 15min。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 并用盖玻片和中性树胶封片。倒置显微镜观察拍摄。染色结果评估: CXCR6 以胞浆呈不同程度的黄色为阳性。每张切片高倍镜下随机选取 10 个视野共纪录 1000 个细胞, 综合染色强度和阳性细胞数量进行判定。肿瘤细胞染色强度

评分: 0 分 (无显色); 1 分 (淡黄色); 2 分 (棕黄色); 3 分 (棕褐色)。阳性细胞占同类细胞的百分比评分: 0 分 (阴性); 1 分 (< 10%); 2 分 (10% ~); 3 分 (50% ~); 4 分 (75% ~)。将 CXCR6 在肿瘤细胞中的染色强度评分及阳性百分比评分的乘积作为最终得分: < 3 分为阴性 (-); 3 ~ 分为弱阳性 (+); 7 ~ 分为阳性 (++) , 9 ~ 分为强阳性 (+++)

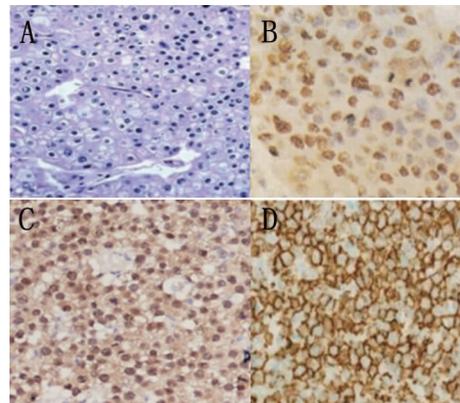
1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 乳腺癌患者术后病理组织 CXCR 免疫组化染色结果

见图 1。



注: A 阴性; B 弱阳性; C 阳性; D 强阳性

图 1 乳腺癌患者术后病理组织 CXCR 免疫组化染色结果 (抗酸染色 × 400)

2.2 miR-200c-3p 表达水平与乳腺癌患者总生存期、无病生存期的关系

miR-200c-3p 的表达高低患者总生存期中位生存时间分别为 69.5 月、72.0 月, 无病生存期中位生存时间分别为 64.0 月、65.5 月。(图 2、图 3)。通过 Log-Rank 检验可知两组总生存时间比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.133, P = 0.144$); 两组患者的无病生存期中位生存时间比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.956, P = 0.328$)。

2.3 CXCR6 表达水平与乳腺癌患者总生存期及无病生存期的关系

CXCR6 的表达高低患者总生存期中位生存时间分别为 65.5 月、75.0 月, 无病生存期中位生存时间分别为 56.0 月、63.5 月。(图 4、图 5)。通过 Log-Rank 检验可知两组总生存时间, 差异有统计

学意义($\chi^2 = 16.906, P < 0.001$); 两组无病时间比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.737, P = 0.030$)。

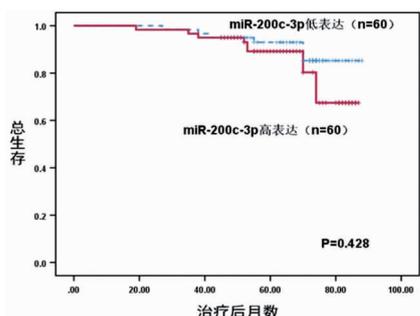


图 2 miR-200c-3p 表达水平与乳腺癌患者总生存期的关系

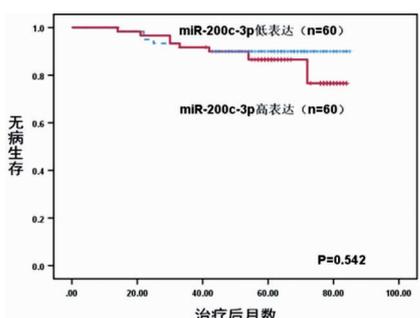


图 3 miR-200c-3p 表达水平与乳腺癌患者无病生存期的关系

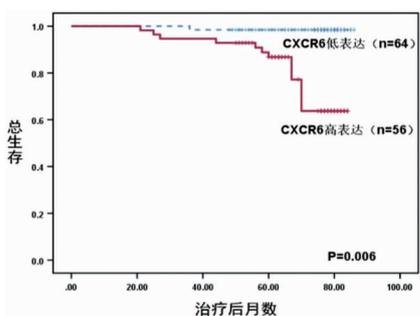


图 4 CXCR6 表达水平与乳腺癌患者总生存期的关系

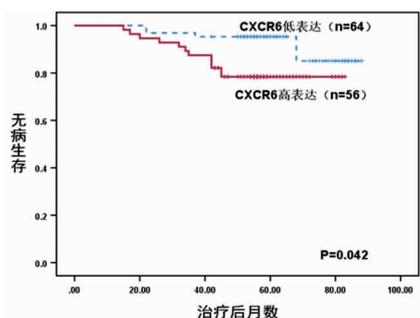


图 5 CXCR6 表达水平与乳腺癌患者无病生存期的关系

2.4 miR-200c-3p 表达与 CXCR6 表达情况分析

通过 qRT-PCR 检测, 根据所得数据的中位数将 miR-200c-3p 的表达分为高表达组 (表达量高于中位数) 跟低表达组 (表达量低于中位数)^[12]。根据 CXCR6 及 miR-200c-3p 的高低表达情况, 将 120 例乳腺癌患者分为 4 组, 分别为: CXCR6 高表达 miR-200c-3p 高表达组 (CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↑ 组), CXCR6 高表达 miR-200c-3p 低表达组 (CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↓ 组), CXCR6 低表达 miR-200c-3p 高表达组 (CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↑ 组), CXCR6 低表达 miR-200c-3p 低表达组 (CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↓ 组)。并将 4 组患者的总生存及无病生存期进行了 Kaplan-Meier 单因素分析, 发现 4 组的总生存期存在统计学差异 ($P = 0.022$, 图 6), 4 组患者的总生存期中位生存时间通过 Log-Rank 检验可知, 差异有统计学意义 ($P = 0.001$, 表 1)。两两比较显示 CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↑ 组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.902, P = 0.002$); CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↑ 组与 CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↓ 组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.264, P = 0.001$)。

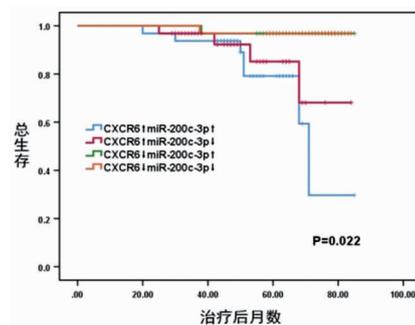


图 6 CXCR6、miR-200c-3p 不同表达与乳腺癌患者总生存期的关系

表 1 4 组患者的总生存期中位生存时间比较

组别	中位生存时间	χ^2	P
CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↑ (n = 28)	52.0	15.480	0.001
CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↓ (n = 28)	47.5		
CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↑ (n = 32)	69.5		
CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↓ (n = 32)	72.5		

注: 两两比较, $\alpha = 0.008$

3 讨论

通过 qRT-PCR 对 120 例乳腺癌临床标本进行了 miR-200c-3p 的检测, 发现 miR-200c-3p 的表达与乳腺癌患者预后并不相关。虽然在乳腺癌细胞系中发现 miR-200c-3p 与其恶性生物学行为相关,

miR-200c-3p 呈抑癌基因作用^[13],但在转移性乳腺癌组织中,其表达明显高于乳腺癌组织,起促癌基因作用^[14]。因此,miR-200c-3p 在乳腺癌可能扮演抑癌基因和促癌基因双重角色。在本项研究中,其在乳腺癌组织中的表达并未倾向于某种作用,进而导致结果无意义。乳腺癌患者的预后受多种因素影响,如受体状态、分期等临床病理因素。也就是说如果 miR-200c-3p 对乳腺癌发挥的作用不够明确,将不能从这些因素中突出,对乳腺癌患者预后产生一定作用。

趋化因子受体 CXCR6 是 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体,可表达于 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞表面。研究表明 CXCR6 与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及血管生成等相关,表达越高,其增殖、侵袭等恶性生物学行为越强。CXCR6 高表达于高侵袭性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞,低表达于其它低侵袭性乳腺癌细胞,而 miR-200c-3p 低表达于 MDA-MB-231 细胞,高表达于其他乳腺癌细胞^[15]。因此,我们在选择临床标本时,意向性选择了 60 例三阴乳腺癌,60 例其他受体状态的乳腺癌。希望通过探索两组临床标本中 CXCR6 及 miR-200c-3p 的表达,进一步探讨其与乳腺癌预后的相关性。由于 HER2 状态的评估可通过 FISH 结果判断,但是在回顾性筛选病例时,部分患者并没有进行 FISH 检测或者不知道结果,因此部分免疫组化 HER2⁺ 的患者无法确定 HER2 状态。因此,我们排除了 HER 免疫组化结果为 2⁺ 的这部分病例,在病例选择上可能会造成一定偏倚。

本文结果表明 miR-200c-3p 低表达组与高表达组的总生存期及无病生存期均无差异,CXCR6 高表达组的总生存期差于低表达组,CXCR6 高表达组的无病生存期差于低表达组;CXCR6 为 CXCR 家族蛋白中的趋化因子之一,在乳腺癌各亚型及癌旁组织中的表达均有所不同。后我们根据 CXCR6 及 miR 200c-3p 不同的表达情况,将 120 例乳腺癌患者分为 4 组,并分析 4 组患者的生存情况,结果显示 4 组患者的总生存期存在差异;两两比较时,发现 CXCR6 ↑ miR-200c-3p ↑ 的总生存期短于 CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↑ 组和 CXCR6 ↓ miR-200c-3p ↓ 组。提示我们在乳腺癌预后分析中,其实真正发挥作用的是 CXCR6 的表达,miR-200c-3p 的表达情况

与乳腺癌的预后无明显关系。

综上所述,CXCR6 与乳腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移等恶性生物学行为相关,与乳腺癌的发生发展呈正相关。我们的研究表明 CXCR6 对乳腺癌起促癌作用,CXCR6 表达越高,预后越差,CXCR6 是乳腺癌的独立预后因素,提示我们 CXCR6 可能成为乳腺癌的治疗靶点,值得大家更多的关注及进一步研究。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (2): 69-90. DOI: 10. 3322/caac. 20107.
- [2] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The Global Burden of Cancer 2013[J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505-527. DOI: 10. 1001/jamaoncol. 2015. 0735.
- [3] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床, 2015, (13): 668-674. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-8179. 20150571.
- [4] Saad ED, Katz A, Buysse M. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer; a review of recent randomized clinical trials[J]. J Clin Oncol, 2010, 28 (11): 1958-1962. DOI: 10. 1200/JCO. 2009. 25. 5414.
- [5] Fan C, Liu N, Fan S, et al. Comprehensive multigene mutation spectra of breast cancer patients from Northeast China obtained using the Ion Torrent sequencing platform[J]. Oncol Rep, 2019, 42 (4): 1580-1588. DOI: 10. 3892/or. 2019. 7253.
- [6] Engelhardt EG, Garvelink MM, de Haes JH, et al. Predicting and communicating the risk of recurrence and death in women with early-stage breast cancer; a systematic review of risk prediction models[J]. J Clin Oncol, 2014, 32 (3): 238-250. DOI: 10. 1200/JCO. 2013. 50. 3417.
- [7] Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women; a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Oncol, 2013, 31 (33): 4188-4198. DOI: 10. 1200/JCO. 2013. 48. 9021.
- [8] Billerbeck E, Kang YH, Walker L, et al. Analysis of CD161 expression on human CD8⁺ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (7): 3006-

3011. DOI:10.1073/pnas.0914839107.
- [9] Kufareva I, Salanga CL, Handel TM. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions; implications for therapeutic strategies[J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93(4):372-383. DOI:10.1038/icb.2015.15.
- [10] Fallahi P, Corrado A, Di DA, et al. CXCR3, CXCR5, CXCR6, and CXCR7 in Diabetes[J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(5):515-519. DOI:10.2174/1389450115666141229153949.
- [11] Rabquer BJ, Tsou PS, Hou Y, et al. Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1):R18. DOI:10.1186/ar3242.
- [12] Jie L, Klaus L. Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2014, 35(1):40-49.
- [13] Hald SM, Kiselev Y, Al-Saad S, et al. Prognostic impact of CXCL16 and CXCR6 in non-small cell lung cancer: combined high CXCL16 expression in tumor stroma and cancer cells yields improved survival[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:441. DOI:10.1186/s12885-015-1446-z.
- [14] Verbeke H, Struyf S, Laureys G, et al. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(5-6):345-358. DOI:10.1016/j.cytogfr.2011.09.002.
- [15] Tse SW, Radtke AJ, Espinosa DA, et al. The chemokine receptor CXCR6 is required for the maintenance of liver memory CD8⁺ T cells specific for infectious pathogens[J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(9):1508-1516. DOI:10.1093/infdis/jiu281.

(收稿日期 2019-09-09)

(本文编辑:甘慧敏)

.....

(上接第 308 页)

- [11] Park SY, Kwon HJ, Lee HE, et al. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression[J]. *Virchows Arch*, 2011, 458(1):73-84. DOI:10.1007/s00428-010-1013-6.
- [12] Suijkerbuijk KP, van Diest PJ, van der Wall E. Improving early breast cancer detection: focus on methylation[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(1):24-29. DOI:10.1093/annonc/mdq305.
- [13] Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, et al. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer[J]. *Mutat Res*, 2012, 751(2):304-325. DOI:10.1016/j.mrrev.2012.06.001.
- [14] 符德元,任传利,谭好升,等.乳腺癌患者血浆循环 DNA 中 Sox17 基因甲基化检测的临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2014, (11):808-813. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2014.11.002.
- [15] 李世荣,王振明,董爱萍,等.乳腺癌患者外周血及癌组织 RASSF1A 基因甲基化水平检测临床意义分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(24):1908-1911. DOI:10.3969/j.issn.1673-5269.2013.24.011.
- [16] Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 Pt 1):28-32.
- [17] Fackler MJ, Rivers A, Teo WW, et al. Hypermethylated genes as biomarkers of cancer in women with pathologic nipple discharge[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(11):3802-3811. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-1981.
- [18] Twelves D, Nerurkar A, Osin P, et al. DNA promoter hypermethylation profiles in breast duct fluid[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(2):341-350. DOI:10.1007/s10549-013-2544-8.
- [19] de Groot JS, Moelans CB, Elias SG, et al. DNA promoter hypermethylation in nipple fluid: a potential tool for early breast cancer detection[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17):24778-24791. DOI:10.18632/oncotarget.8352.
- [20] Fackler MJ, Malone K, Zhang Z, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR analysis doubles detection of tumor cells in breast ductal fluid[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(11 Pt 1):3306-3310. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-05-2733.

(收稿日期 2019-09-27)

(本文编辑:甘慧敏)