生 物 工 程 学 报
Chinese Journal of Biotechnology
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
DOI: 10.13345/j.cjb.220699

Apr. 25, 2023, 39(4): 1425-1444
©2023 Chin J Biotech, All rights reserved

·综 述·

乳腺癌早期筛查和诊断生物标志物研究进展

梁有沣[1]，郝明炫[1]，郭蕊[1]，李小宁[1]，李永超[1,2]，喻长远[1]，杨昭[1,2*]

1 北京化工大学生命科学与技术学院 分子诊断技术创新研究中心，北京 100029
2 塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室，新疆阿拉尔 843300

梁有沣, 郝明炫, 郭蕊, 李小宁, 李永超, 喻长远, 杨昭. 乳腺癌早期筛查和诊断生物标志物研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1425-1444.
LIANG Youfeng, HAO Mingxuan, GUO Rui, LI Xiaoning, LI Yongchao, YU Changyuan, YANG Zhao. Biomarkers for early screening and diagnosis of breast cancer: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1425-1444.

摘 要：2020年全球乳腺癌(breast cancer, BC)新发病例达226万例，占全部肿瘤新发病例的11.7%，是全世界发病率最高的癌症。早期发现、早期诊断和早期治疗是降低乳腺癌死亡率及改善预后的关键。尽管乳房X光筛查被广泛用作乳腺癌筛查的工具，但其假阳性、辐射性和过度诊断仍是亟待解决的问题。因此，亟需开发易于获取且稳定可靠的生物标志物，用于乳腺癌无创筛查和诊断。近年来多项研究显示来自乳腺癌患者血液中的循环肿瘤细胞 DNA (circulating tumor cell DNA, ctDNA)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原 15-3 (carbohydrate antigen 15-3, CA15-3)、细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)、循环 miRNA 和 *BRCA* 基因突变等生物标志物，以及来自人体尿液、呼出气体(volatile organic compounds, VOCs)和乳头吸出液(nipple aspirate fluid, NAF)中的磷脂、miRNA、苯乙酮和十六烷等多种生物标志物与乳腺癌早期筛查和诊断密切相关。本文综述了上述生物标志物在乳腺癌早期筛查和诊断中的应用。

关键词：乳腺癌；生物标志物；早期筛查；诊断；无创

资助项目：中央高校基本科研业务费(buctrc201910)；2021年新疆科协青年人才托举工程项目；京津冀基础研究合作专项[19JCZDJC65800(Z)]；新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2022AB022)
This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (buctrc201910), the Young Elite Scientists Sponsorship Program by Xinjiang Association for Science and Technology, China (2021), the Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Special Project (19JCZDJC65800(Z)), and the Scientific and Technological Research Project of Xinjiang Production and Construction Corps, China (2022AB022).
*Corresponding author. Tel: +86-10-64421335, E-mail: yangzhao@mail.buct.edu.cn
Received: 2022-09-01; Accepted: 2023-01-26

Biomarkers for early screening and diagnosis of breast cancer: a review

LIANG Youfeng[1], HAO Mingxuan[1], GUO Rui[1], LI Xiaoning[1], LI Yongchao[1,2], YU Changyuan[1], YANG Zhao[1,2*]

1 Innovation Center of Molecular Diagnostics, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China
2 Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: The estimated new cases of breast cancer (BC) patients were 2.26 million in 2020, which accounted for 11.7% of all cancer patients, making it the most prevalent cancer worldwide. Early detection, diagnosis and treatment are crucial to reduce the mortality, and improve the prognosis of BC patients. Despite the widespread use of mammography screening as a tool for BC screening, the false positive, radiation, and overdiagnosis are still pressing issues that need to be addressed. Therefore, it is urgent to develop accessible, stable, and reliable biomarkers for non-invasive screening and diagnosis of BC. Recent studies indicated that the circulating tumor cell DNA (ctDNA), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 15-3 (CA15-3), extracellular vesicles (EV), circulating miRNAs and *BRCA* gene from blood, and the phospholipid, miRNAs, hypnone and hexadecane from urine, nipple aspirate fluid (NAF) and volatile organic compounds (VOCs) in exhaled gas were closely related to the early screening and diagnosis of BC. This review summarizes the advances of the above biomarkers in the early screening and diagnosis of BC.

Keywords: breast cancer; biomarkers; early screening; diagnosis; noninvasiveness

乳腺癌是一种由乳房腺上皮组织发生恶性增生而引发的肿瘤疾病，目前已取代肺癌成为全世界发病率最高的癌症[1]。据 2020 年《临床医师癌症杂志》(*CA*：*A Cancer Journal for Clinicians*)的全球癌症统计报告[2]，当年全球女性乳腺癌新发病例 226.141 9 万例，死亡病例 68.499 6 万例，分别占女性癌症新发和死亡总数的 24.5%和 15.5%。其标化发病率和死亡率分别为 4.78/万和 1.36/万，0–74 岁累计发病和死亡风险分别为 5.20%和 1.49%。同年 Cao 等[3]统计指出，我国女性乳腺癌发病率为 5.90/万，居全国女性恶性肿瘤发病谱首位(约占中国女性癌症新发病例总数的 19.9%)；死亡率为 1.66/万，居全国女性恶性肿瘤死亡谱第 4 位，严重威胁了女性的生理、心理和生命健康。

癌症统计报告显示[4]：诊断为早期乳腺癌患者的相对生存率远高于诊断为晚期乳腺癌患者的相对生存率。诊断为 0 期和 I 期乳腺癌患者的 5 年生存率接近 100%，II 期为 93%，III期为 72%。由于乳腺癌的一级预防尚无良策，因此早期发现、早期诊断和早期治疗是降低乳腺癌死亡率及改善预后的关键。

当前，乳腺癌临床诊断的常用方法有组织病理学诊断和影像学诊断。组织病理学诊断是乳腺癌诊断的“金标准”，其病理检查报告通常作为疾病确诊的最终参考。但其获取乳腺组织

样本时需要对检查者的身体进行穿刺，会给检查者的身体和心理带来双重负担。影像学诊断包括 B 超、X 光和核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)。其中 B 超检查简单便捷、对检查者的辐射量小，但由于其诊断表现与乳腺癌的病理分型相关，所以对早期乳腺癌的诊断准确率很差。乳房 X 光检查是当前乳腺癌筛查的首选方法，但其存在着对致密型乳腺诊断准确率差的缺点。MRI 对人类组织的成像效果很好，临床上常作为 B 超和乳房 X 光检查的补充方法，因其检查费用昂贵不适用于大范围的早期筛查。因此，亟需开发一种诊断准确率高的无创性乳腺癌诊断方法。

肿瘤生物标志物是指由肿瘤组织或宿主与肿瘤相互作用所产生的一类活性物质，常常存在于血清、细胞、尿液、体液或组织中并能够提示肿瘤存在与生长变化。理想的肿瘤生物标志物应当同时满足 3 个基本要求[5]，即分析有效性(analytical validity)、临床有效性(clinical validity)和临床可用性(clinical utility)。具体而言，分析有效性要求标志物具备一定的准确性、灵敏度、特异性和稳健度。临床有效性要求标志物可以检测出疾病状态和预测结局。临床可用性要求，与未使用该标志物相比，使用该标志物可以改善患者的结局(在癌症诊断、治疗、管理或预防方面有统计学意义的改善)。随着科技的进步和发展，肿瘤生物标志物已在肿瘤筛查和诊断中发挥重要作用。在已发现的乳腺癌肿瘤生物标志物中糖类抗原 15-3 (carbohydrate antigen 15-3, CA15-3)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)主要应用于转移性乳腺癌患者的病程检测[6]，具有较高的应用价值，但同时也存在着诊断灵敏度低和特异性差等缺点。对此，已有许多研究工作致力于在开发出一种新型无创的乳腺癌生物标志物，并将其应用于乳腺癌的早期筛查和诊断，以期降低人群中的乳腺癌死亡率。本文将从无创性肿瘤生物标志物(按血液、尿液、呼出气体和乳头吸出液 4 种来源划分)在乳腺癌早期筛查和诊断研究领域作一综述。

1 乳腺癌

乳腺癌的组织学表现形式是大量的幼稚化的癌细胞无限增殖和无序状拥挤成团，挤压并侵蚀破坏周围的正常组织，破坏乳房的正常组织结构[7]。在乳腺癌发病初期，腺上皮细胞在多种致癌因子(如雌二醇 E2 和或孕激素 P4 等)的共同作用下，会发生基因突变，致使细胞增生失控，由于癌细胞的生物行为发生了改变，呈现出无序、无限制的恶性增生[8]。

传统的乳腺癌诊断筛查方法有 B 超、X 光和 MRI。乳房 B 超检查具有无创、便捷、价格低廉和辐射性低的优点，是妊娠或哺乳期女性检查乳腺癌的首选方法。它显示病灶形态时不受致密型乳腺的影响，且彩色多普勒血流分析对乳腺肿瘤的良、恶性区分很精确。但 B 超的诊断表现受乳腺癌的病理分型影响很大，还对检查医师的专业素质要求很高，复查时难以获得准确的对比图像，对病灶的诊断定性往往不如乳房 X 光的重现性好[9]。

乳房 X 光检查应用最为广泛，是乳腺疾病筛查和诊断的首选方法，对钙化型乳腺癌的显示能力很强，被证明能有效降低乳腺癌的死亡率和改善预后。但它对致密型乳腺和乳腺癌微小病变分辨不清容易漏诊，此外还会给检查者带来辐射和过度诊断的危害，其过度诊断的估计范围为 0%至 40%−50%[10]。

MRI 对人类组织的成像显影效果极佳、诊断灵敏度和准确率较高，且能对 B 超和乳房 X 光检查不能确定的乳腺病灶提供诊断依据。在乳腺小

病灶、多病灶和多中心性癌灶以及乳腺深层癌灶方面的诊断和评价上具有优势。但它也存在着检查成本高、操作复杂和假阳性高的缺点。

2 血液

在乳腺癌早期诊断方面，血液检测相较于乳房 X 光检查和组织活检具有检测成本低、便捷无创和易于大规模筛查等优点，能够在乳腺癌的早期检测中发挥重要作用。此外，癌细胞通常会将其产生的特异性核酸、蛋白质或细胞囊泡等排入到人体血液中，因而分析血液中上述成分的存在可能提供一种检测癌症的方法。下文将围绕血液来源的肿瘤生物标志物展开，包括循环肿瘤细胞 DNA (circulating tumor cell DNA, ctDNA)、CEA、CA15-3、细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)、循环 miRNA 和乳腺癌易感基因(breast susceptibility gene, *BRCA*)突变等(图 1)。

2.1 循环肿瘤细胞 DNA

循环肿瘤细胞 DNA (circulating tumor cell DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞凋亡、坏死或分泌产生的 DNA 片段，分类上归属于循环游离 DNA (circulating free DNA, cfDNA)，可从人体外周血中获得[11]。通常，ctDNA 包含有与起源肿瘤细胞一致的基因突变，如点突变重排和扩增，因而是潜在的疾病诊断生物标志物，有可能作为肿瘤组织切片的补充诊断手段[12]。

ctDNA 可用于检测 40%−70%的癌症，包括乳腺癌、脑肿瘤、结直肠癌和黑色素瘤等[13]。Yang 等[14]发现早期癌症患者的 ctDNA 浓度(0.77 ng/μL)明显低于晚期癌症患者的 ctDNA 浓度(1.52 ng/μL) (P=0.014 9)，且 ctDNA 浓度随癌症分期增加而增加。

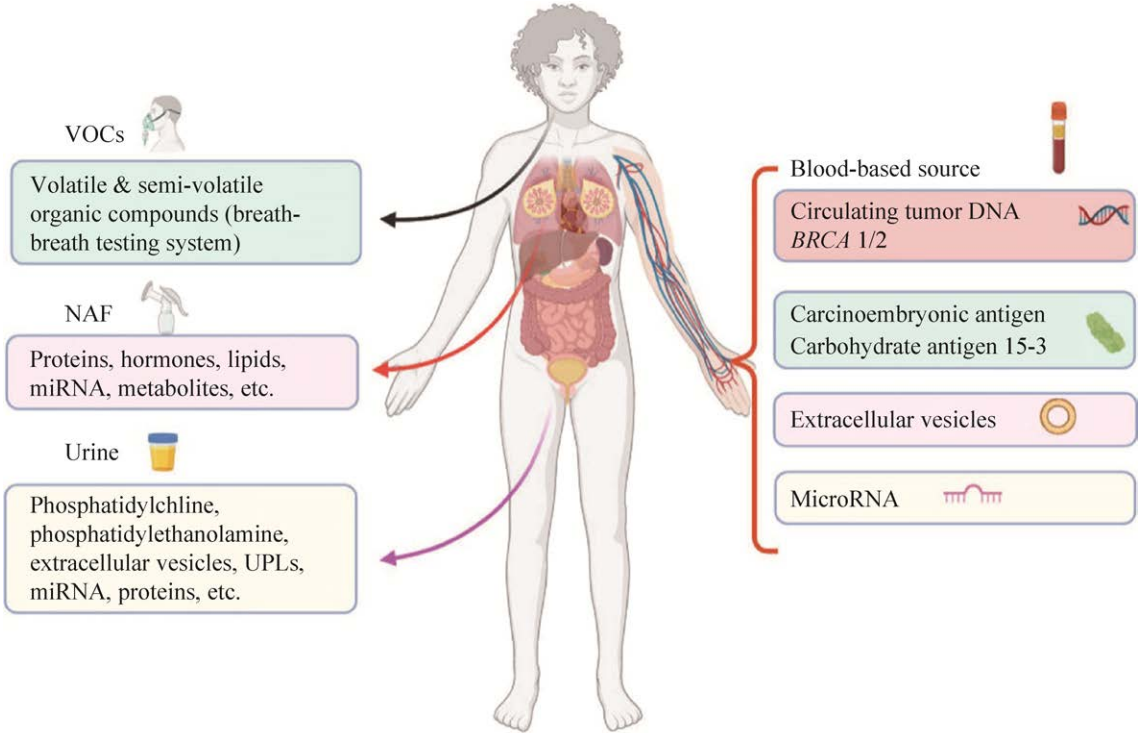

图 1 血液、尿液、呼出气体和乳头吸出液等来源的生物标志物

Figure 1 Biomarkers derived from blood, urine, exhaled gas and nipple aspirate fluid.

1977 年，美国的 Leon 等[15]随机抽取了 32 名乳腺癌患者和 55 名健康对照者的外周血液并对其 ctDNA 水平进行检测，发现乳腺癌症患者血清 ctDNA 浓度平均值(38 ng/mL)比健康对照者血清 ctDNA 浓度的平均值(7 ng/mL)高。同样地，Huang 等[16]于 2006 年发现乳腺癌患者的血清 DNA 浓度(65 ng/mL)要比健康对照组的血清 DNA 浓度(13 ng/mL)高，且实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)的检测灵敏度为 93.4%。2019 年，Zhang 等[17]研究对比了 102 名早期乳腺癌患者和 50 名良性乳腺肿瘤患者的血液 ctDNA 表达水平，发现将 ctDNA 与相应的乳腺影像报告和数据系统(breast imaging reporting and data system, BI-RADS)评分相结合时，其对乳腺癌诊断的阳性预测值为 92.4%、灵敏度为 74.2%、特异性为 92.0%，AUC=0.821。以上研究结果证明了 ctDNA 在乳腺癌筛查诊断中的潜力。

Olsson 等[18]回顾性分析了多项有关乳腺癌患者血浆 ctDNA 表达情况的研究，并从中发现 93%发生转移的患者在临床检测前 3 年内显示出肿瘤特异性 ctDNA 的证据。相反，在长期无病生存期患者中未检测到 ctDNA。同样，Coombes 等[19]在一项研究分析中指出，检测乳腺癌患者血浆 ctDNA 水平能够在 89%的复发患者中平均提前 8.9 个月检测到复发。以上研究结果在一定程度上展示出了 ctDNA 可作为一种生物标志物用于乳腺癌的早期筛查的潜力。综上所述，虽 ctDNA 在乳腺癌的诊断工作中具有一定的分析有效性(灵敏度和特异性良好)，但是其临床有效性(不能预测患者结局)和临床可用性(对改善患者结局的作用有限)均存在明显的不足。因此，循环肿瘤 DNA 作为一种乳腺癌早期筛查的生物标志物时作用有限，但在乳腺癌的转移和复发检测方面有一定作用。

相比于癌蛋白和循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)，ctDNA 具有以下优点：一是检测乳腺癌转移和复发的灵敏度高[20]；二是检测动态范围广、特异性强，能指示出肿瘤的异质性特征[21]；三是识别相对早期癌症的能力强[22]。

2.2 癌胚抗原 CEA

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是一种由正常的胎儿肠道组织和上皮肿瘤产生并参与细胞黏附的糖蛋白，于 1965 年首次被确定为结肠癌抗原[23]。分子生物学上，CEA 描述为来自 32 个基因家族的糖蛋白，能在各种组织中表达。通常，健康成人血浆中 CEA 水平非常低(<5 μg/L)，但它在人类多种癌症中过表达(>20 μg/L)，如乳腺癌、肺癌、胰腺癌和结直肠癌等，是重要的肿瘤生物标志物之一[24]。

Cui 等[25]统计分析了 7 510 名乳腺癌患者和 39 650 名健康对照者的血清 CEA 水平，发现乳腺癌患者的血清 CEA 水平(平均值 2.17、中位数 1.67 和$-\lg P$=37.85)显著高于健康对照者的 CEA 水平(平均值 1.78、中位数 1.55 和$-\lg P$=0.00)。上述研究结果在统计学上证明了 CEA 在乳腺癌患者和健康者中的表达水平不同。

Mujagić 等[26]分别检测了 47 名乳腺癌患者(实验组 I)、40 名健康对照者(对照组 I)和 33 名其他类型的癌症患者(对照组 II)的平均循环 CEA 水平。经过 t 检验和双向方差分析对数据进行分析处理，发现在乳腺癌患者的 CEA 循环水平显著高于健康女性(P<0.000 1)和其他癌症患者(P<0.007)，而其他癌症患者的血清 CEA 亦显著高于健康对照者(P<0.01)。其中 CEA 在乳腺癌筛查诊断的灵敏度和特异性分别为 65.0%和 57.1%。此外，Jia 等[27]研究对比了 115 名早期乳腺癌患者和 69 名健康对照者的 CEA 表达水平，发现早期乳腺癌患者的血清 CEA 浓度为

(20.03 ± 18.15) ng/mL，健康对照者的血清 CEA 浓度为(11.34 ± 3.65) ng/mL (P<0.000 1)，其诊断早期乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 46.1%和 79.7%，AUC=0.620。多项研究证明，乳腺癌患者的CEA水平与健康女性之间存在差异[28–30]，由于 CEA 是一种广谱肿瘤生物标志物，在某些良性肿瘤中的表达量也会升高，缺乏一定的分析有效性(特异性低)，故临床上不推荐作为乳腺癌的早期诊断的标志物，而通常将其作为疗效评价与术后监测转移和复发的指标。

2.3 糖类抗原 15-3

糖类抗原 15-3 (carbohydrate antigen 15-3, CA15-3)是 *MUC*1 基因的产物，*MUC*1 基因存在于几乎所有上皮细胞中，其高表达通常与结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和胰腺癌有关[31]。CA15-3 在正常人血清中含量低于 30 U/mL[32]。由于 CA15-3 具有细胞黏附和细胞间相互作用的特性，所以细胞表面 *MUC*1 表达的增加往往伴随着癌细胞的侵袭和转移。此外，它对乳腺癌的特异性高于 CEA 和组织多肽抗原(tissue polypeptide antigen, TPA)，因而在乳腺癌早期发现和诊断具有极其重要的作用。

Bayo 等[33]研究对比了 63 名早期乳腺癌患者和 63 名健康对照者的 CA15-3 表达水平，发现早期乳腺癌患者的血清 CA15-3 浓度为 19.74 U/mL，显著高于健康对照者的 16.19 U/mL，其诊断早期乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 85.7%和 83.3%。在 Fu 等[34]的一项研究中，对 1 179 例乳腺癌患者和 493 名健康对照者进行了回顾性分析，指出血清中的 CA15-3 是乳腺癌的潜在生物标志物。他们通过分析发现 CA15-3 和 CEA 水平与乳腺癌对恶性肿瘤的易感性有显著关联(CA15-3: SMD=2.15, 95%CI: 2.00−2.30, P=1.8×10^{-8})，而 CA15-3 水平与乳腺癌对良性肿瘤的易感性之间没有显著关联(CA15-3: SMD=0.17, 95%CI: 0.21−0.38, P=0.382)。

马玲等[35]对 60 名乳腺癌患者和 40 名健康对照者的血清 CA15-3 水平进行了检测，发现乳腺癌患者的血清 CA15-3 水平 (28.68±4.53) U/mL 高于健康对照组的血清 CA15-3 水平(21.35±2.88) U/mL，且差异具有统计学意义(P<0.05)。其对乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 88.3%和 85.0% (P<0.001)，AUC 曲线下面积为 0.910。在另一项研究中，Ali 等[36]抽取了 30 名原发性乳腺癌患者和 20 名健康对照者的血清，随后使用酶联免疫吸附试验检测血清中的 CA15-3，结果发现乳腺癌患者的平均 CA15-3 水平(79.15±27.54) U/mL 明显高于健康对照组的平均 CA15-3 水平(24.34±11.68) U/mL (P<0.05)，对乳腺癌的检测灵敏度为 93.3%，特异性为 96.6%。

在临床上，CA15-3 在乳腺癌患者术前的预后评估、术后的病情监测和疗效评估等方面应用价值更高。当同时与其他指标或影像学检测联合诊断时，才可用于鉴别诊断乳腺癌。从肿瘤生物标志物的 3 个基本要求考虑，限制其应用在早期乳腺癌诊断的原因为，一是分析有效性差：CA15-3 缺乏足够的灵敏度和特异性，对早期乳腺癌的阳性率低，而对晚期乳腺癌和转移性乳腺癌的阳性率较高。*MUC*1 几乎在所有上皮细胞中表达，故 CA15-3 水平的升高并不仅仅与乳腺癌有关；二是临床有效性低：CA15-3 的水平升高除了与肿瘤发生、发展相关外，还受到生理状态、良性疾病、炎症、检测因素等多种因素影响，容易出现“假阳性”结果。

2.4 细胞外囊泡

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)是一种携带有各种蛋白质、脂质、核酸(RNA 和 DNA)和代谢物的由细胞释放的囊泡[37]，为一类脂质膜封闭的亚细胞结构[38]。EV 通常分为 3 大类[39]：从细胞凋亡经历细胞中释放为泡泡的凋亡体

(直径 1 μm)，来自内体和多泡体与质膜融合的外泌体(直径 10−200 nm)，以及通过质膜向外萌芽和裂变产生的微囊泡(直径 30−300 nm)。不同类别的囊泡通过不同的机制释放[40]，外泌体通过 Rab27a/b 通路通过多泡体的胞吐作用释放，而凋亡体和微囊泡则由质膜的浸出释放。

细胞外囊泡特别是外泌体是细胞间通讯的重要介质，在生理学上，EV 有助于体内平衡并促进宿主防御机制，包括止血和炎症[37]；而在病理学中，癌细胞分泌的 EV 量远高于健康细胞，在癌症患者的血浆以及肿瘤细胞培养物中可检测到更多数量的 EV[41]，可见 EV 有潜力成为各种癌症的筛查和诊断标志物[42–44]。

分析 EV 中包含的癌症相关内容可以帮助诊断乳腺癌，特别是已知肿瘤来源的 EV 携带致癌 miRNA，它们可以通过分析血液中循环的 EV-miRNA 的表达水平用于诊断早期癌症[45]。多项研究结果表明：从乳腺癌患者血浆中分离得到的 EV 中存在多种不同的肿瘤生物标志物，如局灶性黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)、表皮生长因子受体蛋白[46]、凋亡抑制基因[47]等。因此，分析 EV 中含有的生物标志物可以帮助乳腺癌早期诊断，并将乳腺癌与良性和非癌性疾病区分开来。

Kim 等[45]从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中选择了 7 种来自 EV 的 miRNA 用于验证肿瘤衍生的 EV (tumor-derived EV, TDE)中 miRNA 的表达水平，样本来自 55 名早期乳腺癌患者和 20 名健康对照者。发现其中的 4 种 miRNA (miR-9, miR-16, miR-21 和 miR-429)的表达水平在早期乳腺癌患者中显著升高。这 4 种 miRNA 的组合用于乳腺癌早期诊断具有高灵敏度(96.8%)和特异性(80.0%)，AUC=0.880 (95%CI: 0.78−0.99)，优于目前的诊断方法，具备一定的分析有效性。其中，miR-16 在区分乳腺癌患者和健康对照者方面具有最佳的鉴别能力，AUC=0.850 (95%CI: 0.77−0.94)，其次是 miR-21 (AUC, 0.700; 95%CI: 0.56−0.82)，miR-9 (AUC, 0.710: 95%CI: 0.59−0.82)和 miR-429 (AUC, 0.710: 95%CI: 0.60−0.83)。

与直接暴露在血清中的 miRNA 相比，EV 中所含的 miRNA 在血浆中的半衰期更长，因为 EV 的脂质膜保护 miRNA 免受核糖核酸酶降解。此外，TDE 及其内含物对癌细胞具有高度特异性，因为它们反映了起源的特征。因此，基于 miRNA 表达模式分析，含 miRNA 的 EV 被提出作为癌症诊断的理想来源。另一方面，与传统的组织活检相比，EV 具有侵入性较小，可检测早期无症状癌症的优势。综上所述，细胞外囊泡有助于提高癌症诊断准确性和辅助指导后续治疗决策，但也存在着预测患者结局(临床有效性)和改善患者治疗(临床可用性)方面的不足。

2.5 循环 miRNA

miRNA (microRNA)是一类长度为 20−30 个核糖核苷酸的短链非编码 RNA，具有控制蛋白质翻译和/或影响信使 RNA (mRNA)稳定性的能力[48]。在细胞存活、分化、衰老、凋亡、致癌和转移等方面中起着至关重要的作用。

Shimomur 等[49]从国家癌症中心随机抽取了 1 280 名乳腺癌患者(实验组 I)、2 836 名非癌症对照者(对照组 I)、451 名其他类型的癌症患者(对照组Ⅱ)和 63 名非乳腺良性疾病患者(对照组Ⅲ)的血清样品，使用高灵敏度的微阵列分析全面评估了血清 miRNA 表达谱。在对比乳腺癌和非乳腺癌患者中的 miRNA 表达后发现：特定的 5 个 miRNA 的组合(miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p 和 miR-6875-5p)用于检测乳腺癌效果最好。该组合在实验组 I 中诊断的灵敏度为 97.3%，特异性为 82.9%，准确

性为 89.7%。此外，该组合可以检测早期乳腺癌(对 Tis 的灵敏度为 98.0%)。Zou 等[50-51]亦发现由几种不同的 miRNA 构成的特定集合可以用于乳腺癌的早期诊断。

因为乳腺癌具有高度异质性，对不同分期的 miRNA 表达谱也有所不同[52]。Yu 等[53]使用 RT-qPCR 研究了来自 113 名早期乳腺癌患者和 47 名健康对照者血清样本中 miRNA 的表达水平，发现 miR-21-3p、miR-21-5p 和 miR-99a-5p 这 3 种 miRNA 的组合具有最佳的辅助诊断效果，其诊断早期乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 97.9%和 73.5%，AUC=0.895。此外，Kim 等[45]开发了一个用于检测早期乳腺癌的 miRNA 组合(miR-9, miR-16, miR-21 和 miR-429)，其具有高灵敏度(96.8%)和特异性(80.0%)，AUC=0.880。Agelaki 等[54]评估了参与肿瘤休眠的 miR-23b 和 miR-190，参与晚期转移的 miR-21 以及参与上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的 miR-200b 和 miR-200c 等在早期和晚期转移性乳腺癌患者的血浆中表达。并从辅助或一线治疗前分别从 84 名早期乳腺癌患者和 57 名转移性乳腺癌患者中获取血浆样本，用 RT-qPCR 评估上述 5 种 miRNA 的表达水平，根据中位值将表达分为高或低。与早期乳腺癌患者相比，miR-21 (AUC=0.772; P<0.001), miR-23b (AUC=0.625; P=0.012), miR-200b (AUC=0.744; P<0.001)和 miR-200c (AUC=0.668; P=0.001)更高，而 miR-190 (AUC=0.629; P=0.013)较低，可以区分早期乳腺癌患者和晚期转移性乳腺癌患者，具有一定的临床有效性。综上所述，miRNA 在乳腺癌的诊断工作中具有相当的分析有效性、临床有效性和临床可用性。

研究发现表明，许多 miRNA 能够特异性地调节乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSC)的靶基因表达和信号通路[54]。它们在乳腺癌细胞的自我更新、生长和转移中起着重要的作用，可作为肿瘤发展、转移和对治疗反应的潜在诊断标志物。例如，miR-24-3p 和 miR-125b-5p 均被确定为早期发现[55]，预后[56]或预测复发的潜在乳腺癌生物标志物[57-58]。因此，差异表达的循环 miRNA 组合是乳腺癌早期检测的潜在生物标志物。

2.6 *BRCA*1/2 突变

乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene 1, *BRCA*1)和乳腺癌易感基因 2 (breast cancer susceptibility gene 2, *BRCA*2)是一种抑癌基因，在调节人体细胞的复制、遗传物质 DNA 损伤修复、细胞的正常生长方面有重要作用。当其突变或表观遗传失活时将导致 *BRCA*1/2 表达降低，乳腺分化受损，进而使患乳腺癌风险增加。

2019 年，Deng 等[59]研究对比了 2 769 名乳腺癌患者血液 DNA 中的 *BRCA*1/2 突变水平，发现乳腺癌患者的 *BRCA*1、*BRCA*2 和 *PALB*2 突变率很低，分别为 2.7% (n=74)、2.7% (n=76)和 0.9% (n=24)。上述研究表明，乳腺癌与 *BRCA*1/2 突变无强关联性，*BRCA* 突变用于乳腺癌早期诊断意义不大。2016 年，Yao 等[60]研究对比了 1 816 名乳腺癌患者和 5 549 名对应患者家族亲属的血液 *BRCA*1/2 突变水平，在前者中鉴定出 125 例 *BRCA*1/2 致病突变，在后者中鉴定出 206 例乳腺癌。患者家族亲属的 *BRCA*1 突变携带者、*BRCA*2 突变携带者和非携带者的乳腺癌发病率分别为 11.0%、12.7%和 3.2%。研究表明 *BRCA*1/2 突变携带者的患者家族亲属患乳腺癌的风险显著高于非携带者的亲属，可用于高风险病人的查找。*BRCA*1 突变携带者与非携带者，风险比(RR)=3.77, 95% CI; 2.34−6.09, P<0.001；*BRCA*2 突变携带者与非携带者，RR=4.42, 95%CI: 2.70−7.25, P<0.001。同样，美

国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)不推荐对普通人群进行 *BRCA* 突变检测，仅建议 *BRCA* 突变检测用于识别患乳腺癌的高风险人群(乳腺癌患者家族亲属)，并进一步帮助其主动预防疾病的发生。对乳腺癌患者而言，*BRCA*1/2 基因突变检测诸多优点：可以帮助阳性患者选择适宜的手术治疗方案(更倾向于选择乳腺全切，而不是保留乳房)，指导其选择疗效更好的化疗药物(铂类药物)和预后监测复发(复查部位不仅局限于乳腺，还应包括卵巢及输卵管)。

2018 年，*Lancet* 刊发了 Copson 等[61]的一项研究，追踪随访了 15 年 2 733 名乳腺癌患者血液 DNA 中的 *BRCA*1/2 突变水平，发现共有 338 例(12%)患者检测出 *BRCA* 突变，*BRCA* 阳性和 *BRCA* 阴性患者的 5 年和 10 年总生存期均无统计学意义差异(5 年：83.8% *vs*. 85.0%; 10 年：73.4% *vs*. 70.1%; P=0.76)，上述结果表明乳腺癌基因并不会增加患者死亡率。因此，*BRCA* 突变检测或存在局限性，即对于检测出 *BRCA* 突变的年轻女性而言，需要谨慎考虑是否有必要进行预防性手术切乳(无论答案如何，都将给检测者带来一定的心理负担或生理创伤)。

3 尿液

除血液来源的生物标志物外，乳腺癌患者尿液、呼出气体和乳头吸出液来源的生物标志物也被发现具有乳腺癌早期诊断的潜力(图 1)。

人体尿液是常规医学检测中最为便捷的生物液体之一。多项研究表明，尿液含有乳腺癌筛查的潜在生物标志物，其分析手段涵盖了代谢组学分析、蛋白质组学分析和外泌体分析等[62–64]。

Mistry 等[65]使用代谢组学分析的手段成功在乳腺癌组织中观察到磷脂代谢增加，特别是磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)或其他前体分子。此外，Moreau 等[66]从分子机制上证明了野生型 *BRCA*1 等位基因的缺失会导致乳腺癌细胞中的脂质产量增加。Kim 等[67]从 3 组不同类别的患者(健康对照组和乳腺癌患者手术前后)中提取尿磷脂(urinary phospholipids, UPLs)，然后对其进行 nLC-ESI-MS-MS 分析。结果发现：乳腺癌患者尿液样本的 PC 和 PE 的总浓度比健康对照组分别增加了 44.0%和 71.0%。以上研究均证明了检测尿液中磷脂含量有助于早期乳腺癌的早期筛查。

2015 年，Erbes 等[68]发现构建特定的尿液 miRNA 谱(miR-21、miR-125b、miR-155 和 miR-451)可以将乳腺癌患者与健康对照组分开，其诊断早期乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 83.3%、87.5% (P<0.001)，AUC=0.887。Hirschfeld 等[69]研究探讨了 69 名乳腺癌患者和 40 名健康对照组的病例，并发现了尿液外泌体 miRNA 具有相当的诊断潜力，他们确定了由 4 种尿 miRNA 类型(miR-424, miR-423, miR-660 和 let7-i)组成的特定小组，可以区分乳腺癌患者和健康对照组，灵敏度为 98.6%，特异性为 100%。以上均证实了早期乳腺癌患者与健康对照者的尿液 miRNA 谱不同，说明其具有一定的分析有效性和临床可用性，但同时也存在着临床有效性(准确预测患者结局)的不足。

尿液蛋白质组学可供挖掘的信息量很大，已成功用于发现癌症诊断和监测的新标志物[62,70-72]。将此项技术与尿液筛查相结合，有助于增加对癌症患者病程状态的了解，并进一步协助临床实践中的评估和治疗。Beretov 等[73]的一项研究分析显示，相比于健康对照组，乳腺癌患者组中有 59 种尿蛋白差异显著(P<0.05，倍数变化>3)，并且其中的 36 种尿蛋白与乳腺癌的分期密切相关。作者经多轮重复验证发现，

亮氨酸重复蛋白 36 (leucine rich repeat containing protein 36, LRC36)、丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员 4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4, MAST4)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HBA)和组织多聚蛋白 2 (Multimerin 2, MMRN2)等 13 种上调蛋白所构成的分析组可用于乳腺癌检测。

尿液也是外泌体的来源之一。Ando 等[74]从 22 名乳腺癌患者和 26 名健康女性中分离出尿液外泌体，并通过 RT-qPCR 测定分离的外泌体中 miR-21 和基质金属蛋白酶-1 (MMP-1)的表达。他们发现，尿液外泌体衍生的 miR-21 和 MMP-1 的表达可以作为癌症检测的诊断标志物，其综合灵敏度为 95.0%，特异性为 79.0%。

尿液标本具有留取方便和无创等优点，有望成为疾病临床诊断、预后及大规模人群筛查的理想媒介。此外，尿液中所含的生物代谢物、miRNA、蛋白质或其他细胞成分含量的变化均与乳腺癌的形成和发展密切相关，具备诊断早期乳腺癌的潜力。

4 呼出气体

呼出气体中含有挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)和半挥发性化合物，数量在 1 000 种以上，它们与人体中的正常新陈代谢和其他病理性生化反应密切相关[75]。有研究表明，癌细胞的存在会影响呼气中化学物质的特性和丰度，其可以作为肿瘤辅助诊断的标志物[76]。呼气挥发性生物标志物的检测和分析被认为是癌症诊断和健康检查的新领域[77]，包括用于乳腺癌、肺癌和胃肠道癌[78–80]。

在一项研究中，Phillips 等[81]对 51 名乳腺癌患者和 42 名健康对照者进行了 VOCs 检测，发现一个由 5 种 VOCs 构成的组合(2-丙醇、2,3-二氢-1-苯基-4(1H)-喹唑啉酮、1-苯基乙酮、庚醛和肉豆蔻酸异丙酯)具有检测乳腺癌疾病的能力，其诊断的灵敏度和特异性分别为 93.8%和 84.6%。

在另一项研究中，宋琪等[82]使用固相微萃取-气相质谱/质谱联用技术对呼气中 VOCs 进行检测，在 33 例乳腺癌患者、27 例乳腺病患者和 36 例正常人的呼气中 VOCs 测试中筛出苯乙酮和十六烷 2 种挥发性标志物，在用于乳腺癌诊断时苯乙酮的灵敏度和特异性分别为 97.0%和 50.0%，十六烷的灵敏度和特异性分别为 75.8%和 61.1%，并且两者的浓度差异均有统计学意义($P<0.05$)。初步证实了 VOCs 具有区分乳腺癌患者和健康对照者的能力。

Yang 等[83]采用随机森林模型，试验组乳腺癌的预测准确率为 91.0% (95%CI: 0.85−0.95)，灵敏度为 86.0%，特异性为 97.0%，阳性预测值为 97.0%，阴性预测值为 97.0%，受试者工作曲线下面积为 0.990 (95%CI: 0.99−1.00)，通过 kappa 值测量的预测可靠性为 0.83。乳腺癌分子表型的交叉验证辨别准确度和可靠性分别为 88.5%±12.1%和 0.77±0.23。该研究展示了 VOCs 试验具有较高的有效性和可靠性。

综上所述，VOCs 试验具有便捷、无创、检测成本低和检测准确率高的特点，在乳腺癌早期筛查中具有广阔的应用前景，并且有望在各级中小医疗机构中普及。

5 乳头吸出液

乳头吸出液(nipple aspirate fluid, NAF)是一种乳腺特异性近端液体，由非哺乳期成年女性乳房中的导管-小叶系统自然分泌[84]，绝经前和绝经后女性均可通过乳房按摩、吸乳泵或催产素鼻喷雾获得，其成功率在 34%−90%之间[85–87]。它含有丰富的蛋白质、激素、脂质和碳水化合物，一般从细胞碎片、导管和小叶上

皮脱落，被认为是生理和病理条件下乳腺微环境中发生的细胞变化镜像[88]。另一方面，由于绝大多数乳腺癌病例起源于导管-小叶系统内衬的上皮细胞，因此 NAF 是癌变前和癌变后的理想生物标志物来源，为乳腺癌的早期筛查提供了有益的参考。

一项研究表明颜色为红色或棕色的 NAF 在导管原位癌的乳房中比非典型增生更常见(P=0.008)[89]，该模型在预测乳腺癌状态方面的灵敏度为 92.0%，特异性为 61.0%。该项研究结果在一定程度上揭示了 NAF 颜色用于乳腺癌评估中的有效性。NAF 中存在癌症蛋白质和 miRNA 等多种生物标志物，其表达谱在乳腺癌患者和健康对照者中存在差异[90-91]。Pawlik 等[92]研究了 18 名低浸润性乳腺癌(早期乳腺癌)女性和 4 名健康对照组的 NAF，并通过蛋白质组学分析发现了 39 种在含瘤乳房和无病乳房之间差异表达的蛋白质。Oda 等[93]研究对比了 26 名早期乳腺癌患者和 63 名健康对照者 NAF 中的 DJ-1 蛋白(*PARK*7 基因编码的肽酶 C56 蛋白家族的一员)浓度，发现早期乳腺癌患者的 DJ-1 蛋白浓度为 18.6 ng/mL，显著高于健康对照组中的 2.7 ng/mL，其诊断早期乳腺癌的灵敏度为 75.0%、特异性为 85.9% (P<0.000 1)。

NAF 也是 miRNA 的来源之一，并且比血清含有更多的 miRNA 种类[94]。Zhang 等[95]研究揭示了导管内乳头状瘤患者乳头排出物中 miRNA 的差异表达，并确定 miRNA 作为原发性乳腺癌的新型潜在生物标志物。他们从 3 名导管内癌乳腺癌患者和 3 名导管内乳头状瘤患者中收集乳头溢液样本，先使用微阵列扫描仪对 miRNA 表达进行初步筛选，随后通过 RT-qPCR 对 21 个验证样品(8 个恶性肿瘤和 13 个良性肿瘤)中进一步检查了选自初始筛选的 miRNA 的表达水平。最后结果显示，导管内癌乳腺癌患者组中 3 个 miRNA (miR-4484, miR-K12-5-5p 和 miR-3646)相比乳头状瘤组显著上调，且 RT-qPCR 分析证实了 4 个 miRNA (miR-4484、miR-K12-5-5p、miR-3646 和 miR-4732-5p)可能作为乳腺癌检测的潜在肿瘤生物标志物。

使用 NAF 作为检测早期乳腺癌发生的生物标志物具有诸多优势：因为 NAF 由靠近乳腺导管内层的细胞产生，这些细胞与 85%的乳房恶性肿瘤相关，更靠近病灶和靶细胞，相比更远的液体(如血清和血浆)能更好地代表局部病理过程，是开发筛查诊断工具的理想液体活检；NAF 检测还能提供患者“内部”对照，即将同一女性的患病乳房和另一健康乳房进行自体对照；NAF 通过催产素辅助的真空抽吸以无创方式获得，与其他乳腺癌筛查程序如乳房 X 光检查和磁共振成像相比，不适感更轻；可作为成像的辅助诊断工具，即当成像不太可靠时(成像中存在假阳性可能)或不建议成像时(例如在怀孕和哺乳期间)使用；与血液或尿液相比，NAF 的生物标志物浓缩更高，样品的分析质量也就更好，不存在大量稀释而降低组织衍生蛋白质的检测灵敏度的影响；与组织样本相比，NAF 不需要进一步分离提取，样品制备分析步骤更为简单。NAF 体积小、蛋白质浓度高，足以使用先进的质谱技术进行重复分析。虽然 NAF 具有一定的灵敏度和特异性满足了对分析有效性的要求，也能够在一定程度上检测出早期乳腺癌的疾病状态，但是其在预测结局(临床有效性)和改善患者结局(临床有效性)方面还存在不足，不能作为乳腺癌预后监测和治疗有效标志物。

6 总结与展望

乳腺癌是全球女性中最常见的癌症，每年影响 210 万女性，是 100 多个国家女性癌症相

关死亡的主要原因。研究表明罹患早期非转移性乳腺癌的患者治愈率为 70%−80%，而被诊断为远处器官转移晚期乳腺癌患者尚无公认有效的治疗方法，因此早诊断、早治疗是降低人群中乳腺癌死亡率的关键，开发出一种新型有效的生物标志物对乳腺癌早期筛查和诊断意义重大。本综述总结了乳腺癌早期筛查和诊断生物标志物的研究进展(表 1)。

CA15-3 和 CEA 是乳腺癌生物标志物中应用价值较高的肿瘤生物标志物，但由于其对局部病变的灵敏度较低和特异性较差(表 1)，通常需要将二者联合应用以提高检测癌症复发和转移的灵敏度。ctDNA 和 miRNA，特别是 EV 中和肿瘤相关的 miRNA 具有更长的半衰期和更高的特异性，在早期乳腺癌检测方面具有巨大的前景(表 1)。由于 NAF 靠近疾病区域，并且乳腺癌特异性分子在 NAF 中的浓度要比其他循环体液高得多，因此从理论上讲，NAF 可能

表 1 乳腺癌早期筛查和诊断生物标志物

Table 1 Biomarkers for early screening and diagnosis of breast cancer

Biomarkers	Sources	Sample size	Index	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*P* value or AUC	References
ctDNA	Peripheral blood	BC: 61 HC: 27	BC: 65 ng/mL HC: 13 ng/mL	93.4	NA	$P<0.05$	[16]
ctDNA	Peripheral blood	BC: 102 HC: 50	NA	74.2	92.0	AUC=0.821	[17]
ctDNA	Peripheral blood	BC: 14 HC: 6	NA	93.0	100.0	$P=0.001$	[18]
CEA	Peripheral blood	BC: 47 HC: 40	MBC: 66.4 ng/mL Other cancer patients with metastasis: 33.3 ng/mL	65.0	57.1	$P<0.000\ 1$	[26]
CEA	Peripheral blood	EBC: 115 HC 69	BC: 20.03 ng/mL HC: 11.34 ng/mL	46.1	79.7	$P<0.000\ 1$ AUC=0.620	[27]
CA 15-3	Peripheral blood	EBC: 63 HC: 63	EBC: 19.74 U/mL HC: 16.19 U/mL	85.7	83.3	NA	[33]
CA 15-3	Peripheral blood	BC: 60 HC: 40	BC: 28.68 U/mL HC: 21.35 U/mL	88.3	85.0	$P<0.001$	[35]
CA 15-3	Peripheral blood	BC: 30 HC: 20	BC: 79.15 U/mL HC: 24.34 U/mL	93.3	96.6	$P<0.05$	[36]
EV: miR-9, miR-16, miR-21 and miR-429	Peripheral blood	EBC: 55 HC: 20	NA	96.8	80.0	AUC=0.800	[45]
EV: miR-21-3p, miR-21-5p and miR-99a-5p	Peripheral blood	EBC: 113 HC: 47	NA	97.9	73.5	AUC=0.895	[53]
miR-21, miR-125b, miR-155 and miR-451	Urine	BC: 24 HC: 24	NA	83.3	87.5	$P<0.001$ AUC=0.887	[68]
miR-424, miR-423, miR-660 and let7-i	Urine	BC: 69 HC: 40	NA	98.6	100.0	AUC=0.999	[69]
	VOC	BC: 51 HC: 42	NA	93.8	84.6	AUC=0.900	[81]
Acetophenone	VOC	BC: 33 HC: 36	NA	97.0	50.0	$P<0.05$	[82]
	VOC	BC: 351 HC: 88	NA	86.0	97.0	AUC=0.990	[83]
Deglycase DJ-1 protein	NAF	EBC: 26 HC: 63	EBC: 18.6 ng/mL HC: 2.7 ng/mL	75.0	85.9	$P<0.001$	[93]

BC: Breast cancer; EBC: Early-stage breast cancer; MBC: Metastatic breast cancer; HC: Healthy controls.

是开发乳腺癌早期筛查和诊断工具的理想液体来源(表 1)。此外，呼气检测操作快捷无创价廉，并且可能在相对较早的阶段检测到癌症，未来很有希望在各级医疗机构使用中普及使用。VOCs 测试与乳房 X 光检查相结合，将显著减少乳房 X 光检查的假阳性和假阴性诊断概率。遗憾的是，目前并没有真正可用于乳腺癌早期筛查和诊断的生物标志物。一方面，由于肿瘤生物标志物具有多样性和复杂性，同一肿瘤可产生多种生物标志物，不同肿瘤亦细胞可产生相同的生物标志物，若只对单一肿瘤生物标志物进行检测，极易出现误诊或漏诊，缺乏一定的临床有效性和临床可用性；另一方面，由于乳腺癌在组织学、流行病学和分子特性层面是一种高度异质性的疾病。乳腺癌亚克隆肿瘤细胞异质性的存在，导致单一的生物标志物在诊断中会产生高低不一的敏感性和特异性，降低了其在乳腺癌筛查和诊断中的分析有效性。综上所述，由于生物标志物的多样性和复杂性以及乳腺癌肿瘤的高度异质性原因，本文中任何一个生物标志物都不能够同时满足肿瘤生物标志物对分析有效性、临床有效性和临床可用性的 3 个基本要求。因此，发现新型有效的生物标志物并阐明其作用机制有助于肿瘤生物标志物的临床应用。

理想的生物标志物要求具有较强的特异性，并能够在乳腺癌发生的早期阶段被检测到。2020 年，Garrido-Cano 等[96]研究了 125 名乳腺癌患者和 193 名健康对照者的血液 miR-99a-5p 水平，发现乳腺癌患者的血浆中的 miR-99a-5p 水平(median, 95%CI: 21.02, 15.26−28.79)比健康对照者的 miR-99a-5p 水平(median, 95%CI: 7.09, 5.03−9.65)显著高表达。且在使用 12.75 的最佳临界值下，其诊断乳腺癌的准确率、敏感性和特异性分别为 66.7%、68.8%和 65.2%，AUC=0.691 (P<0.000 1)。虽然单一标志物的诊断效果不佳，但多类型生物标志物的联合检测、不同诊断方法的联合使用，可能成为解决上述问题的理想方法[97-98]。如 Cui 等[98]通过对 1 368 例早期乳腺癌患者和 849 名健康者的双变量随机效应 meta 分析发现，多种 miRNA 的组合(AUC，灵敏度和特异性分别为 0.952，87.0%和 88.0%)要比基于单个 miRNA 的测定具有更高的准确性(灵敏度、特异性和 AUC 分别为 79.0%、77.0%和 0.892)。此外，Oncotype DX[99]，即乳腺癌 21 基因检测，通过检测 16 个肿瘤相关基因和 5 个内参基因的表达情况，将检测结果量化为复发评分(RS)，为乳腺癌患者提供预测预后、复发、转移乃至指导治疗等信息，帮助其选择理想的个体化治疗方案。RS 从 0 到 100，分数越高，复发的可能性越大，也越能从化疗中获益。在 2018 年更新的美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第 8 版中，Oncotype DX 成为唯一一种优先级最高的基因检测方法。

针对现有乳腺癌生物标志物体外诊断方法，需要将其进行规范化和标准化，确保提供准确和可靠的方法。具体而言，要对特定生物标志物的样本类型、样品处理、分析方案、临界值和检测流程进行规范化和标准化。目前，B 超、X 光和 MRI 是乳腺癌诊断工作中应用最多的原位技术，但存在 B 超对早期乳腺癌的诊断准确率较差、X 光对致密型乳腺诊断准确率较差以及 MRI 检查费用较为昂贵等不足。乳腺癌早期诊断效果的提高，离不开诊断技术的进步。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)通过荧光标记的 DNA 探针与细胞核内的 DNA 靶序列杂交、利用荧光显微镜观察(细胞、组织)细胞核彩色探针信号、获得特定 DNA 靶序列结构和数目的信息。2021 年，朱晓莹等[100]

采用 IHC 法和 FISH 法分别检测 120 例乳腺癌患者石蜡标本中 HER-2 蛋白表达与基因扩增情况，发现 IHC 33 例阳性(3+)中 FISH 检测阳性 33 例，阳性符合率 100%；IHC 61 例不确定(2+)中 FISH 检测阳性 24 例，阳性符合率 39.3%；IHC 26 例阴性(0/1+)中 FISH 检测阴性 21 例，阴性符合率 80.7%。除 IHC(2+)的阳性符合率较低(39.3%)外，IHC 检测 HER-2 蛋白表达与 FISH 检测 *HER*-2 基因扩增有较好的一致性($P<0.05$)。FISH 具有安全性高、通量高、稳定性高、灵敏度高和特异性高等优点。更重要的是，FISH 在 NCCN 乳腺癌指南中被推荐为 *HER*-2 基因检测的金标准。基于 FISH 的肿瘤原位诊断技术是未来的重要发展方向，但仍需进一步提升其杂交效率。

人工智能和深度学习在各领域已大放异彩，将两者应用在医学影像学诊断不仅能帮助患者更快速地完成包括 X 线、超声、MRI 等检测，同时还可以帮助影像医师提升读片效率，降低误诊概率，并通过提示可能的副作用来辅助诊断。因此，将人工智能和深度学习等前沿技术赋能于影像学诊断将是未来发展的重要方向。在 2016 年举办的国际生物医学成像研讨会(International Symposium on Biomedical Imaging, ISBI)上，基于深度学习的人工智能算法的诊断性能可媲美熟练病理医师，其诊断乳腺癌前哨淋巴结转移的准确度高达 99.5%。2022 年，Witowski 等[101]对 21 537 次双侧乳房动态对比增强磁共振成像结果(dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)建立了 DCE-MRI 人工智能深度学习系统模型。结果发现，在 3 936 次双侧乳房动态 DCE-MRI 的测试组中，该系统受试者工作特性曲线 AUROC=0.920 (95%CI: 0.92−0.93)，具备良好的乳腺癌诊断性能。综上，人工智能深度学习系统可显著提高 MRI 用于乳腺癌诊断的准确率，并进一步减少误诊和不必要的活检。

此外，多组学测序技术及数据分析增加了我们对乳腺癌的了解，有助于开发出新型有效的癌症早期诊断生物标志物。Huang 等[102]通过研究 56 名早期乳腺癌患者和 61 名健康对照者中的血清代谢组水平，并将其 RNA 高通量测序(RNA-sequencing, RNA-seq)结果与 TCGA 进行联合分析，发现两条在乳腺癌早期诊断中的关键代谢通路模型(牛磺酸和次牛磺酸代谢途径，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径)，其诊断早期乳腺癌的灵敏度和特异性分别为 95.4%和 91.8%，AUC=0.934。

随着中国经济和社会的快速发展，人们普遍追求更加健康、长寿的生活，因此降低甚至是消灭影响我国女性健康的头号杀手—乳腺癌已经成为人们的共识。因乳腺癌具有高度异质性的特点，早期筛查和诊断对于提高治疗成功率和降低死亡率至关重要。开发一种灵敏度高、特异性强的无创性乳腺癌生物标志物将是该领域的发展方向。

REFERENCES

[1] XIA CF, DONG XS, LI H, CAO MM, SUN DQ, HE SY, YANG F, YAN XX, ZHANG SL, LI N, CHEN WQ. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chinese Medical Journal, 2022, 135(5): 584-590.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.

[3] CAO W, CHEN HD, YU YW, LI N, CHEN WQ. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chinese Medical Journal, 2021, 134(7): 783-791.

[4] DESANTIS CE, MA J, GODING SAUER A, NEWMAN LA, JEMAL A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J]. Cancer Journal for Clinicians, 2017, 67(6): 439-448.

[5] MERKER JD, OXNARD GR, COMPTON C, DIEHN M, HURLEY P, LAZAR AJ, LINDEMAN N, LOCKWOOD CM, RAI AJ, SCHILSKY RL, TSIMBERIDOU AM, VASALOS P, BILLMAN BL, OLIVER TK, BRUINOOGE SS, HAYES DF, TURNER NC. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: american society of clinical oncology and college of American pathologists joint review[J]. Journal of Clinical Oncology, 2018, 36(16): 1631-1641.

[6] 杨志, 杨贵生, 李宁, 廖光星, 杨鸿宇, 王洪良, 肖国有. 全身骨显像联合 CA15-3 和 CEA 检测对乳腺癌骨转移的诊断价值[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(18): 1229-1233.
YANG Z, YANG GS, LI N, LIAO GX, YANG HY, WANG HL, XIAO GY. Diagnostic value of whole body bone imaging combined with CA15-3 and CEA in bone metastasis of breast cancer[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2016,23 (18): 1229-1233 (in Chinese).

[7] 申凯凯, 袁建军, 刘祎斐, 李闯, 郭玉娟. 三维剪切波弹性成像在乳腺肿块良恶性鉴别诊断中的应用[J]. 中华超声影像学杂志, 2017, 26(12): 1057-1061.
SHEN KK, YUAN JJ, LIU YF, LI C, GUO YJ Application of three-dimensional shear wave elastography in the differential diagnosis of benign and malignant breast masses[J]. Chinese Journal of Ultrasound Imaging, 2017, 26(12): 1057-1061 (in Chinese).

[8] CARDONA B, RUDEL RA. Application of an *in vitro* assay to identify chemicals that increase estradiol and progesterone synthesis and are potential breast cancer risk factors[J]. Environmental Health Perspectives, 2021, 129(7): 077003.

[9] 王文慧. 不同影像学检查对乳腺癌肿瘤大小测定的临床研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016.
WANG WH. Clinical study of different imaging examinations for the measurement of breast cancer tumor size[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese).

[10] HEIINAVAARA S, SARKEALA T, ANTTILA A. Overdiagnosis due to breast cancer screening: updated estimates of the Helsinki service study in Finland[J]. British Journal of Cancer. 2014, 111(7): 1463-1468.

[11] XU S, LOU F, WU Y, SUN DQ, ZHANG JB, CHEN W, YE H, LIU JH, WEI S, ZHAO MY, WU WJ, SU XX, SHI R, JONES L, HUANG XF, CHEN SY, CHEN J. Circulating tumor DNA identified by targeted sequencing in advanced-stage non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Letters, 2016, 370(2): 324-331.

[12] WANG YH, SONG Z, HU XY, WANG HS. Circulating tumor DNA analysis for tumor diagnosis[J]. Talanta, 2021, 228: 122220.

[13] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY R, KINDE I, AGRAWAL N, BARTLETT B, WANG H, LUBER B, KINZLER K, VOGELSTEIN B, PAPADOPOULOS N. Detection of circulating tumor DNA in early and late stage human malignancies[J]. Neuro-Oncology, 2014, 6(224): 224ra24.

[14] YANG YC, WANG D, JIN L, YAO HW, ZHANG JH, WANG J, ZHAO XM, SHEN CY, CHEN W, WANG XL, SHI R, CHEN SY, ZHANG ZT. Circulating tumor DNA detectable in early- and late-stage colorectal cancer patients[J]. Bioscience Reports, 2018, 38(4): BSR20180322.

[15] LEON SA, SHAPIRO B, SKLAROFF DM, YAROS MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Research, 1977, 37(3): 646-650.

[16] HUANG ZH, LI LH, HUA D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients[J]. Cancer Letters, 2006, 243(1): 64-70.

[17] ZHANG XY, ZHAO WW, WEI W, YOU ZL, OU XH, SUN MM, YIN YL, TANG XY, ZHAO Z, HU CM, LIU FF, DENG JH, MAO LL, ZHOU DY, REN YX, LI XX, ZHANG SF, LIU C, GENG JS, YAO GD, et al. Parallel analyses of somatic mutations in plasma circulating tumor DNA (ctDNA) and matched tumor tissues in early-stage breast cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2019, 25(21): 6546-6553.

[18] OLSSON E, WINTER C, GEORGE A, CHEN YL, HOWLIN J, TANG MH E, DAHLGREN M, SCHULZ R, GRABAU D, WESTEN D, FERNÖ M, INGVAR C, ROSE C, BENDAHL PO, RYDÉN L, BORG Å, GRUVBERGER-SAAL SK, JERNSTRÖM H, SAAL LH. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease[J]. EMBO Molecular Medicine, 2015, 7(8): 1034-1047.

[19] COOMBES RC, PAGE KR, SALARI R, HASTINGS

RK, ARMSTRONG A, AHMED S, ALI S, CLEATOR S, KENNY L, STEBBING J, RUTHERFORD M, SETHI H, BOYDELL A, SWENERTON R, FERNANDEZ-GARCIA D, GLEASON KLT, GODDARD K, GUTTERY DS, ASSAF ZJ, WU HT, et al. Personalized detection of circulating tumor DNA antedates breast cancer metastatic recurrence[J]. Clinical Cancer Research, 2019, 25(14): 4255-4263.

[20] EIGELIENE N, SAARENHEIMO J, JEKUNEN A. Potential of liquid biopsies for breast cancer screening, diagnosis, and response to treatment[J]. Oncology, 2019, 96(3): 115-124.

[21] HREBIEN S, CITI V, GARCIA-MURILLAS I, CUTTS R, FENWICK K, KOZAREWA I, McEWEN R, RATNAYAKE J, MAUDSLEY R, CARR TH, de BRUIN EC, SCHIAVON G, OLIVEIRA M, TURNER N. Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression-free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial[J]. Annals of Oncology, 2019, 30(6): 945-952.

[22] COHEN JD, LI L, WANG YX, THOBURN C, AFSARI B, DANILOVA L, DOUVILLE C, JAVED AA, WONG F, MATTOX A, HRUBAN RH, WOLFGANG CL, GOGGINS MG, DAL MOLIN M, WANG TL, RODEN R, KLEIN AP, PTAK J, DOBBYN L, SCHAEFER J, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J]. Science, 2018, 359(6378): 926-930.

[23] GOLD P, FREEDMAN SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system[J]. Journal of Experimental Medicine, 1965, 122(3): 467-481.

[24] XIANG WW, LV QX, SHI HX, XIE B, GAO L. Aptamer-based biosensor for detecting carcinoembryonic antigen[J]. Talanta, 2020, 214: 120716.

[25] HAO C, ZHANG GQ, ZHANG LJ. Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases[A]//Progress in Molecular Biology and Translational Science[M]. Amsterdam: Elsevier, 2019: 213-227.

[26] MUJAGIĆ Z, MUJAGIĆ H. Diagnostic usefulness of serum carcinoembryonic antigen determinations in breast cancer patients[J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2003, 3(2): 30-34.

[27] JIA L, LI GH, MA N, ZHANG AM, ZHOU YL, REN L, DONG D. Soluble POSTN is a novel biomarker complementing CA153 and CEA for breast cancer diagnosis and metastasis prediction[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 1-10.

[28] WU SG, HE ZY, ZHOU J, SUN JY, LI FY, LIN Q, GUO L, LIN HX. Serum levels of CEA and CA15-3 in different molecular subtypes and prognostic value in Chinese breast cancer[J]. The Breast, 2014, 23(1): 88-93.

[29] UEHARA M, KINOSHITA T, HOJO T, AKASHI-TANAKA S, IWAMOTO E, FUKUTOMI T. Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer[J]. International Journal of Clinical Oncology, 2008, 13(5): 447-451.

[30] EBELING FG, STIEBER P, UNTCH M, NAGEL D, KONECNY GE, SCHMITT UM, FATEH-MOGHADAM A, SEIDEL D. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer[J]. British Journal of Cancer, 2002, 86(8): 1217-1222.

[31] ROY LD, SAHRAEI M, SUBRAMANI DB, BESMER D, NATH S, TINDER TL, BAJAJ E, SHANMUGAM K, LEE YY, HWANG SL, GENDLER SJ, MUKHERJEE P. MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition[J]. Oncogene, 2011, 30(12): 1449-1459.

[32] ZHU HY, DALE PS, CALDWELL CW, FAN XD. Rapid and label-free detection of breast cancer biomarker CA15-3 in clinical human serum samples with optofluidic ring resonator sensors[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(24): 9858-9865.

[33] BAYO J, CASTAÑO MA, RIVERA F, NAVARRO F. Analysis of blood markers for early breast cancer diagnosis[J]. Clinical and Translational Oncology, 2018, 20(4): 467-475.

[34] FU YJ, LI H. Assessing clinical significance of serum CA15-3 and carcinoembryonic antigen (CEA) levels in breast cancer patients: a meta-analysis[J]. Medical Science Monitor, 2016, 22: 3154-3162.

[35] 马玲, 焦大海, 张培新, 王坤. 血清标记物 CA15-3、HSP90A、OPN、SLPI 对乳腺癌的早期预测作用[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(1): 20-23.
MA L, JIAO DH, ZHANG PX, WANG K. The early predictive effect of serum markers CA15-3, HSP90A, OPN, SLPI on breast cancer[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2022, 26(1): 20-23 (in Chinese).

[36] ALI H, MAHDI NK, AL-JOWHER MH. The value of CA15-3 in diagnosis, prognosis and treatment response in women with breast cancer[J]. 2013, 63(9): 1138-1141.

[37] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PRM, ANDREU Z, BEDINA ZAVEC A, BORRÀS FE, BUZAS EI,

BUZAS K, CASAL E, CAPPELLO F, CARVALHO J, COLÁS E, CORDEIRO-DA SILVA A, FAIS S, FALCON-PEREZ JM, GHOBRIAL IM, GIEBEL B, GIMONA M, GRANER M, GURSEL I, GURSEL M, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2015, 4(1): 27066.

[38] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. Cell, 2016, 164(6): 1226-1232.

[39] van NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(4): 213-228.

[40] OSTROWSKI M, CARMO NB, KRUMEICH S, FANGET I, RAPOSO G, SAVINA A, MOITA CF, SCHAUER K, HUME AN, FREITAS RP, GOUD B, BENAROCH P, HACOHEN N, FUKUDA M, DESNOS C, SEABRA MC, DARCHEN F, AMIGORENA S, MOITA LF, THERY C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway[J]. Nature Cell Biology, 2010, 12(1): 19-30.

[41] BENDIX JOHNSEN K, GUDBERGSSON JM, LARS ANDRESEN T, SIMONSEN JB. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2019, 1871(1): 109-116.

[42] CHOI D, LEE TH, SPINELLI C, CHENNAKRISHNAIAH S, D'ASTI E, RAK J. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 67: 11-22.

[43] SATO S, WEAVER AM. Extracellular vesicles: important collaborators in cancer progression[J]. Essays in Biochemistry, 2018, 62(2): 149-163.

[44] TIAN F, ZHANG SH, LIU C, HAN ZW, LIU Y, DENG JQ, LI YK, WU X, CAI LL, QIN LL, CHEN QH, YUAN Y, LIU Y, CONG YL, DING BQ, JIANG ZF, SUN JS. Protein analysis of extracellular vesicles to monitor and predict therapeutic response in metastatic breast cancer[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2536.

[45] KIM MW, PARK S, LEE H, GWAK H, HYUN KA, KIM JY, JUNG HI, IL KIM S. Multi-miRNA panel of tumor-derived extracellular vesicles as promising diagnostic biomarkers of early-stage breast cancer[J]. Cancer Science, 2021, 112(12): 5078-5087.

[46] GALINDO-HERNANDEZ O, VILLEGAS-COMONFORT S, CANDANEDO F, GONZÁLEZ-VÁZQUEZ MC, CHAVEZ-OCAÑA S, JIMENEZ-VILLANUEVA X, SIERRA-MARTINEZ M, SALAZAR EP. Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients[J]. Archives of Medical Research, 2013, 44(3): 208-214.

[47] KHAN S, BENNIT HF, TURAY D, PEREZ M, MIRSHAHIDI S, YUAN Y, WALL NR. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 1-10.

[48] LAURETTI E, DABROWSKI K, PRATICÒ D. The neurobiology of non-coding RNAs and Alzheimer's disease pathogenesis: pathways, mechanisms and translational opportunities[J]. Ageing Research Reviews, 2021, 71: 101425.

[49] SHIMOMURA A, SHIINO S, KAWAUCHI J, TAKIZAWA S, SAKAMOTO H, MATSUZAKI J, ONO M, TAKESHITA F, NIIDA S, SHIMIZU C, FUJIWARA Y, KINOSHITA T, TAMURA K, OCHIYA T. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage[J]. Cancer Science, 2016, 107(3): 326-334.

[50] ZOU RY, LOKE SY, TANG YC, TOO HP, ZHOU LH, LEE ASG, HARTMAN M. Development and validation of a circulating microRNA panel for the early detection of breast cancer[J]. British Journal of Cancer, 2022, 126(3): 472-481.

[51] ZOU X, XIA TS, LI MH, WANG TS, LIU P, ZHOU X, HUANG ZB, ZHU W. MicroRNA profiling in serum: potential signatures for breast cancer diagnosis[J]. Cancer Biomarkers, 2021, 30(1): 41-53.

[52] EVANGELISTA AF, OLIVEIRA RJ, O SILVA VA, D C VIEIRA RA, REIS RM, C MARQUES MM. Integrated analysis of mRNA and miRNA profiles revealed the role of miR-193 and miR-210 as potential regulatory biomarkers in different molecular subtypes of breast cancer[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1-13.

[53] YU XK, LIANG JS, XU JR, LI XS, XING S, LI HL, LIU WL, LIU DD, XU JH, HUANG LZ, DU HL. Identification and validation of circulating microRNA signatures for breast cancer early detection based on large scale tissue-derived data[J]. Journal of Breast Cancer, 2018, 21(4): 363.

[54] AGELAKI S, PAPADAKI C, STOUPIS I, TSALIKIS L, PAPADAKI MA, MONASTIRIOTI A, MARKAKIS G, MAVROUDIS D. Role of circulating miRNAs in detecting metastasis and having prognostic significance in metastatic breast cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2018, 36(15_suppl): 1086.

[55] MATAMALA N, TERESA VARGAS M, GONZÁLEZ-CÁMPORA R, MIÑAMBRES R, ARIAS JI, MENÉNDEZ P, ANDRÉS-LEÓN E, GÓMEZ-LÓPEZ G, YANOWSKY K, CALVETE-CANDENAS J, INGLADA-PÉREZ L, MARTÍNEZ-DELGADO B, BENÍTEZ J. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection[J]. Clinical Chemistry, 2015, 61(8): 1098-1106.

[56] INCORONATO M, GRIMALDI AM, MIRABELLI P, CAVALIERE C, PARENTE CA, FRANZESE M, STAIBANO S, ILARDI G, RUSSO D, SORICELLI A, CATALANO OA, SALVATORE M. Circulating miRNAs in untreated breast cancer: an exploratory multimodality *Morpho*-functional study[J]. Cancers, 2019, 11(6): 876.

[57] BAŠOVÁ P, PEŠTA M, SOCHOR M, STOPKA T. Prediction potential of serum miR-155 and miR-24 for relapsing early breast cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(10): 2116.

[58] WANG H, PENG R, WANG JJ, QIN ZL, XUE LX. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage[J]. Clinical Epigenetics, 2018, 10(1): 1-10.

[59] DENG M, CHEN HH, ZHU X, LUO M, ZHANG K, XU CJ, HU KM, CHENG P, ZHOU JJ, ZHENG S, CHEN YD. Prevalence and clinical outcomes of germline mutations in *BRCA1/2* and *PALB2* genes in 2 769 unselected breast cancer patients in China[J]. International Journal of Cancer, 2019, 145(6): 1517-1528.

[60] YAO L, SUN J, ZHANG J, HE YJ, OUYANG T, LI JF, WANG TF, FAN ZQ, FAN T, LIN BY, XIE YT. Breast cancer risk in Chinese women with *BRCA*1 or *BRCA*2 mutations[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2016, 156(3): 441-445.

[61] COPSON ER, MAISHMAN TC, TAPPER WJ, CUTRESS RI, GREVILLE-HEYGATE S, ALTMAN DG, ECCLES B, GERTY S, DURCAN LT, JONES L, EVANS DG, THOMPSON AM, PHAROAH P, EASTON DF, DUNNING AM, HANBY A, LAKHANI S, EELES R, GILBERT FJ, HAMED H, et al. Germline *BRCA* mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study[J]. The Lancet Oncology, 2018, 19(2): 169-180.

[62] BERETOV J, WASINGER VC, GRAHAM PH, MILLAR EK, KEARSLEY JH, LI Y. Proteomics for breast cancer urine biomarkers[A]//Advances in Clinical Chemistry[M]. Amsterdam: Elsevier, 2014: 123-167.

[63] HESARI A, ALI GOLROKH MOGHADAM S, SIASI A, RAHMANI M, BEHBOODI N, RASTGAR-MOGHADAM A, FERNS GA, GHASEMI F, AVAN A. Tumor-derived exosomes: potential biomarker or therapeutic target in breast cancer?[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(6): 4236-4240.

[64] SLUPSKY CM, STEED H, WELLS TH, DABBS K, SCHEPANSKY A, CAPSTICK V, FAUGHT W, SAWYER MB. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers[J]. Clinical Cancer Research, 2010, 16(23): 5835-5841.

[65] MISTRY DAH, FRENCH PW. Circulating phospholipids as biomarkers of breast cancer: a review[J]. Breast Cancer: Basic and Clinical Research, 2016, 10: BCBCR.S40693.

[66] MOREAU K, DIZIN E, RAY H, LUQUAIN C, LEFAI E, FOUFELLE F, BILLAUD M, LENOIR GM, DALLA VENEZIA N. *BRCA*1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(6): 3172-3181.

[67] KIM H, MIN HK, KONG G, MOON MH. Quantitative analysis of phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines in urine of patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(6/7): 1649-1656.

[68] ERBES T, HIRSCHFELD M, RÜCKER G, JAEGER M, BOAS J, IBORRA S, MAYER S, GITSCH G, STICKELER E. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 1-9.

[69] HIRSCHFELD M, RÜCKER G, WEIß D, BERNER K, RITTER A, JÄGER M, ERBES T. Urinary exosomal microRNAs as potential non-invasive biomarkers in

breast cancer detection[J]. Molecular Diagnosis & Therapy, 2020, 24(2): 215-232.

[70] HUSI H, STEPHENS N, CRONSHAW A, MACDONALD A, GALLAGHER I, GREIG C, FEARON KCH, ROSS JA. Proteomic analysis of urinary upper gastrointestinal cancer markers[J]. PROTEOMICS-Clinical Applications, 2011, 5(5/6): 289-299.

[71] LEI T, ZHAO XH, JIN S, MENG Q, ZHOU H, ZHANG M. Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis[J]. Clinical Genitourinary Cancer, 2013, 11(1): 56-62.

[72] HASSANEIN M, CALLISON JC, CALLAWAY-LANE C, ALDRICH MC, GROGAN EL, MASSION PP. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer[J]. Cancer Prevention Research, 2012, 5(8): 992-1006.

[73] BERETOV J, WASINGER VC, MILLAR EKA, SCHWARTZ P, GRAHAM PH, LI Y. Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141876.

[74] ANDO W, KIKUCHI K, UEMATSU T, YOKOMORI H, TAKAKI T, SOGABE M, KOHGO Y, OTORI K, ISHIKAWA S, OKAZAKI I. Novel breast cancer screening: combined expression of miR-21 and MMP-1 in urinary exosomes detects 95% of breast cancer without metastasis[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13595.

[75] FILIPIAK W, MOCHALSKI P, FILIPIAK A, AGER C, CUMERAS R, DAVIS CE, AGAPIOU A, UNTERKOFLER K, TROPPMAIR J. A compendium of volatile organic compounds (VOCs) released by human cell lines[J]. Current Medicinal Chemistry, 2016, 23(20): 2112-2131.

[76] AHMED WM, LAWAL O, NIJSEN TM, GOODACRE R, FOWLER SJ. Exhaled volatile organic compounds of infection: a systematic review[J]. ACS Infectious Diseases, 2017, 3(10): 695-710.

[77] KABIR KMM, DONALD WA. Cancer breath testing: a patent review[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018, 28(3): 227-239.

[78] TSOU PH, LIN ZL, PAN YC, YANG HC, CHANG CJ, LIANG SK, WEN YF, CHANG CH, CHANG LY, YU KL, LIU CJ, KENG LT, LEE MR, KO JC, HUANG GH, LI YK. Exploring volatile organic compounds in breath for high-accuracy prediction of lung cancer[J]. Cancers, 2021, 13(6): 1431.

[79] HANNA GB, BOSHIER PR, MARKAR SR. Clinical application of volatile organic compound-based exhaled breath tests for cancer diagnosis—in reply[J]. JAMA Oncology, 2019, 5(7): 1069.

[80] XIANG LJ, WU SH, HUA QL, BAO CY, LIU H. Volatile organic compounds in human exhaled breath to diagnose gastrointestinal cancer: a meta-analysis[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 606915.

[81] PHILLIPS M, CATANEO RN, DITKOFF BA, FISHER P, GREENBERG J, GUNAWARDENA R, STEPHAN KWON C, TIETJE O, WONG C. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2006, 99(1): 19-21.

[82] 宋琪, 刘虎, 高署, 王宏志, 徐珍琴, 潘跃银, 熊福星, 顾康生, 孙国平, 陈振东. 乳腺癌患者呼气中挥发性标志物的筛选与定量分析[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(01): 76-79.
SONG Q, LIU H, GAO S, WANG HZ, XU ZQ, PAN YY, XIONG FX, GU KS, SUN GP, CHEN ZD. Screening and quantitative analysis of volatile markers in breath of breast cancer patients[J]. Anhui Medical University, 2010, 45(01): 76-79(in Chinese).

[83] YANG HY, WANG YC, PENG HY, HUANG CH. Breath biopsy of breast cancer using sensor array signals and machine learning analysis[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 103.

[84] PATULEIA SIS, SUIJKERBUIJK KPM, van der WALL E, van DIEST PJ, MOELANS CB. Nipple aspirate fluid at a glance[J]. Cancers, 2021, 14(1): 159.

[85] PORTER P. “westernizing” women’s risks? Breast cancer in lower-income countries[J]. New England Journal of Medicine, 2008, 358(3): 213-216.

[86] SANKARANARAYANAN R, SWAMINATHAN R, BRENNER H, CHEN KX, CHIA KS, CHEN JG, LAW SC, AHN YO, XIANG YB, YEOLE BB, SHIN HR, SHANTA V, WOO ZH, MARTIN N, SUMITSAWAN Y, SRIPLUNG H, BARBOZA AO, ESER S, NENE BM, SUWANRUNGRUANG K, et al. Cancer survival in Africa, Asia, and Central *America*: a population-based study[J]. The Lancet Oncology, 2010, 11(2): 165-173.

[87] MARMOT MG, ALTMAN DG, CAMERON DA, DEWAR JA, THOMPSON SG, WILCOX M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review[J]. British Journal of Cancer, 2013,

108(11): 2205-2240.

[88] SHARMA N, MCMAHON M, HAIGH I, CHEN Y, DALL BJG. The potential impact of digital breast tomosynthesis on the benign biopsy rate in women recalled within the UK breast screening programme[J]. Radiology, 2019, 291(2): 310-317.

[89] SAUTER ER, WINN JN, DALE PS, WAGNER-MANN C. Nipple aspirate fluid color is associated with breast cancer[J]. Cancer Detection and Prevention, 2006, 30(4): 322-328.

[90] QIN WY, GUI G, ZHANG K, TWELVES D, KLIETHERMES B, SAUTER ER. Proteins and carbohydrates in nipple aspirate fluid predict the presence of atypia and cancer in women requiring diagnostic breast biopsy[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 1-6.

[91] BRUNORO GVF, CARVALHO PC, TEIXEIRA da SILVA FERREIRA A, PERALES J, VALENTE RH, do MOURA GALLO CV, PAGNONCELLI D, da COSTA NEVES-FERREIRA AG. Proteomic profiling of nipple aspirate fluid (NAF): exploring the complementarity of different peptide fractionation strategies[J]. Journal of Proteomics, 2015, 117: 86-94.

[92] PAWLIK TM, HAWKE DH, LIU YN, KRISHNAMURTHY S, FRITSCHE H, HUNT KK, KUERER HM. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein[J]. BMC Cancer, 2006, 6(1): 1-10.

[93] ODA M, MAKITA M, IWAYA K, AKIYAMA F, KOHNO N, TSUCHIYA B, IWASE T, MATSUBARA O. High levels of DJ-1 protein in nipple fluid of patients with breast cancer[J]. Cancer Science, 2012, 103(6): 1172-1176.

[94] MOELANS CB, PATULEIA SIS, van GILS CH, van der WALL E, van DIEST PJ. Application of nipple aspirate fluid miRNA profiles for early breast cancer detection and management[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22): 5814.

[95] ZHANG K, ZHAO S, WANG Q, YANG HS, ZHU J, MA R. Identification of microRNAs in nipple discharge as potential diagnostic biomarkers for breast cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2015, 22(3): 536-544.

[96] GARRIDO-CANO I, CONSTÂNCIO V, ADAM-ARTIGUES A, LAMEIRINHAS A, SIMÓN S, ORTEGA B, TERESA MARTÍNEZ M, HERNANDO C, BERMEJO B, LLUCH A, LOPES P, HENRIQUE R, JERÓNIMO C, CEJALVO JM, EROLES P. Circulating miR-99a-5p expression in plasma: a potential biomarker for early diagnosis of breast cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19): 7427.

[97] XIN H, LI XL, YANG B, ZHANG LN, HAN ZF, HAN CS. Blood-based multiple-microRNA assay displays a better diagnostic performance than single-microRNA assay in the diagnosis of breast tumor[J]. Tumor Biology, 2014, 35(12): 12635-12643.

[98] CUI ZL, LIN DH, SONG WF, CHEN MH, LI D. Diagnostic value of circulating microRNAs as biomarkers for breast cancer: a meta-analysis study[J]. Tumor Biology, 2015, 36(2): 829-839.

[99] CURTIT E, MANSI L, MAISONNETTE-ESCOT Y, SAUTIÈRE JL, PIVOT X. Prognostic and predictive indicators in early-stage breast cancer and the role of genomic profiling: focus on the Oncotype DX® breast recurrence score assay[J]. European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2017, 43(5): 921-930.

[100] 朱晓莹, 林洁, 王兴枝子, 苏群英, 黄云美, 黄炳臣, 龙喜带. IHC 与 FISH 检测浸润性乳腺癌患者 HER2 蛋白表达和基因扩增的差异性分析[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(8): 1320-1324.
ZHU XY, LIN J, WANG XZZ, SU QY, HUANG YM, HUANG BC, LONG XD. Difference and correlation between IHC and FISH in detecting HER2 protein expression and gene amplification in invasive breast cancer[J]. Journal of Modern Oncology, 2021, 29(8): 1320-1324 (in Chinese).

[101] WITOWSKI J, HEACOCK L, REIG B, KANG SK, LEWIN A, PYSARENKO K, PATEL S, SAMREEN N, RUDNICKI W, ŁUCZYŃSKA E, POPIELA T, MOY L, GERAS KJ. Improving breast cancer diagnostics with deep learning for MRI[J]. Science Translational Medicine, 2022, 14(664): eabo4802.

[102] HUANG SJ, CHONG N, LEWIS NE, JIA W, XIE GX, GARMIRE LX. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis[J]. Genome Medicine, 2016, 8(1): 1-14.

(本文责编　陈宏宇)