

• 综 述 •

DNA 甲基化在乳腺癌中的研究进展*

邓长娟¹综述, 谢小兵^{2△}审校

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410001; 2. 湖南中医药大学第一附属医院医学
检验与病理中心, 湖南长沙 410000

摘 要:随着 DNA 甲基化在乳腺癌中的分子机制逐渐被发现, 得到临床的广泛认识和重视。DNA 启动子高度甲基化会引起基因沉默, 进而表达失调, 并以此调控乳腺癌的发生、发展, 并且 DNA 甲基化检测能作为乳腺癌临床诊断及预后的生物标志物, 为乳腺癌的治疗提供新的靶标, 因此, DNA 甲基化在乳腺癌中有重要价值和广阔的应用前景。本文综述 DNA 甲基化在乳腺癌发生、发展中的分子机制及在早期筛查、预后和靶点治疗等方面的研究进展, 并对未来的研究提出建议和展望。

关键词: DNA 甲基化; 乳腺癌; 肿瘤标志物; 靶点治疗; 检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.026 **中图法分类号:** R737.9

文章编号:1673-4130(2021)09-1134-05 **文献标志码:** A

Research progress of DNA methylation in breast cancer*

DENG Changjuan¹, XIE Xiaobing^{2△}

1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410001, China;
2. Department of Medical Laboratory and Pathology Center, the First Affiliated Hospital of Hunan
University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China

Abstract: In recent years, the molecular mechanism of DNA methylation in breast cancer has been gradually discovered, and it has also been widely recognized and valued in clinical practice. DNA promoter hypermethylation can cause gene silencing, and then expression imbalance, and regulate the occurrence and development of breast cancer. DNA methylation detection can be used as a biomarker for clinical diagnosis and prognosis of breast cancer, and provide a new target for the treatment of breast cancer. DNA methylation has important value and broad application prospects in breast cancer. This article reviews the molecular mechanism of DNA methylation in the occurrence and development of breast cancer and its research progress in early screening, prognosis and target therapy, and puts forward suggestions and prospects for future research.

Key words: DNA methylation; breast cancer; tumor marker; target therapy; detection method

根据国际癌症研究机构(IARC)在 2020 年发布的数据, 全球乳腺癌新发病例预计高达 226 万例, 其死亡病例数约为 68 万, 排名第五, 但在女性中排名第一, 同时乳腺癌也是中国女性最常见的癌症, 中国 2020 年的新发病例数预计为 42 万, 占全世界的 18.6%, 死亡约为 12 万, 占全世界的 17.6%^[1]。乳腺癌的发病原因较多, 如饮食习惯、生活方式的改变、肥胖、生殖因素和长期的内源性雌激素接触(初潮早、绝经晚、未产妇或高龄首次足月妊娠)等是女性乳腺癌的重要危险因素^[2-4]。同时, 研究表明, 乳腺癌的发生与表观遗传改变密切相关^[5]。表观遗传学即 DNA

的碱基排列不变, 但是由于某些原因使基因的表达出现了可以遗传的变化。一般认为表观遗传学包括 DNA、RNA 和组蛋白的修饰及染色质三维结构改变等, 现在发现至少有 4 种 DNA 和 16 种组蛋白修饰, 其中对 DNA 甲基化的研究最深^[6]。DNA 甲基化描述了 DNA 甲基化转移酶(DNMT)将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)上的一个甲基与胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)上胞嘧啶残基第 5 位碳原子结合, 生成 5'-甲基胞嘧啶(5mC)的过程^[7]。目前有 5 种与真核生物相关的 DNMTs, 分别为 DNMT1、DNMT2、DNMT3L、DNMT3a、DNMT3b^[8]。本文综述 DNA 甲基

* 基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4481)。

△ 通信作者, E-mail: xxiaobing888@163.com。

本文引用格式: 邓长娟, 谢小兵. DNA 甲基化在乳腺癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1134-1138.

化在乳腺癌发生、发展中的分子机制及在早期筛查、预后和靶点治疗等方面的研究进展,并对未来的研究提出建议和展望。

1 DNA 甲基化与肿瘤

在人体中,CpG 含量较低,而在启动子和第一外显子区域,富集 CpG 位点,这个富集 CpG 位点的区域被称为 CpG 岛(CGI)^[9]。当抑癌基因 CGI 过度甲基化时,DNA 的转录过程被抑制,造成恶性肿瘤的发生,DNA 甲基化可以沉默各种不同类型的基因。同时,致癌基因反常低甲基化也与恶性肿瘤密切相关^[10]。启动子区域的低甲基化使基因处于异常活跃状态,产生一些异常蛋白质,破坏正常细胞结构,使细胞的功能紊乱并由此引发癌症^[11]。GGI 的甲基化过高或过低与癌症的发生关系密切,而全基因组低甲基化也与癌症的发生关系密切。MOORE 等^[12]研究发现,白细胞基因组 DNA 低甲基化会增大膀胱癌风险,全基因组 DNA 低甲基化会引起染色体不稳定并导致癌症发生,此后又有学者发现,在中国血液白细胞 DNA 的特异性核基质蛋白-4(BLCA-4)重复序列中检测到总体甲基化不足的个体患乳腺癌的风险增加,并且表明 BLCA-4 低甲基化可能是乳腺癌患者预后不良的有用生物标志物^[13]。

2 DNA 甲基化与乳腺癌

基因启动子甲基化在乳腺癌中非常普遍,超过 100 个基因启动子被报道有高甲基化现象^[14],包括(1)细胞周期调控基因,如细胞周期蛋白 D2 基因(CCND2)和细胞周期依赖性激酶抑制基因(CDKN2A)^[15-16];(2)DNA 修复基因,如乳腺癌易感基因 1(BRCA1)、乳腺癌易感基因 2(BRCA2)^[17-18]、胱甘肽 S 转移酶 P1 基因(GSTP1)^[19];(3)组织侵袭和转移基因,如 Ras 相关区域家族 1A 基因(RASSF1A)^[20]、视黄醇受体 β 基因(RAR β)^[21];(4)细胞转录基因,如同源框基因 A 基因(HOXA1、HOXA5、HOXA9、HOXA10 等)^[22-23];(5)细胞黏附基因,如钙黏着蛋白 1 基因(CDH1)^[24];(6)激素介导的细胞信号传导基因,如雌激素受体 α 基因(ER α)^[25]。原癌基因启动子低甲基化也会导致癌症发生,如三叶因子 1 基因(TFF1)^[26],这表明基因甲基化在乳腺癌生长和转移中发挥重要作用。

3 DNA 甲基化在乳腺癌早期筛查中的作用

目前,大多数乳腺癌患者在确诊时就已经是晚期或者转移阶段^[27],因此,癌症早期筛查标志物意义重大。乳腺癌的辅助检查手段主要有体格检查、超声检查、钼靶检查、核磁共振检查。超声和钼靶检查具有假阳性高、射线暴露、疼痛、焦虑和负面心理等缺点^[28],假阳性会导致对乳腺癌的过度诊疗^[29],而核磁

共振检查价格昂贵。因此,寻找新的足够灵敏和特异的经济型癌症筛查预后生物标志物意义重大。

DNA 甲基化修饰参与癌症早期过程,并且随着癌症进展,其 DNA 甲基化出现了不同模式。近年来大量文献研究了循环或无细胞 DNA(cfDNA)甲基化状态在包括乳腺癌在内的各种肿瘤诊断与预后中的作用^[30-34],cfDNA 检测具有采集方便、无创、可重复的优点,在检测诊断中具有广阔前景。有研究指出,在三阴性乳腺癌中,BRCA1 启动子在 cfDNA 和组织标本中的甲基化水平差异无统计学意义^[18],在乳腺癌患者外周血中,APC、FOXA1、RASSF1A、BRCA1、ATM 等基因启动子甲基化频率相对于健康者更高^[31,35-39]。因此,cfDNA 作为生物标志物在癌症检测中具有广阔的应用前景。

但是 cfDNA 在外周血与正常细胞 DNA 中同时存在,这会导致特异度降低;cfDNA 在健康者外周血中的水平为 5~20 ng/mL,并且通过检测母体中胎儿游离 DNA 发现其半衰期平均为 16.3 min,这些都导致 cfDNA 作为生物标志物灵敏度降低。但是联合检测多种特异性 cfDNA 可以提高检测灵敏度与特异度。

4 DNA 甲基化在乳腺癌预后中的作用

DNA 甲基化除了在乳腺癌早期筛查中发挥作用外,还与患者不良预后密切相关。研究人员发现类成对同源框转录因子 2 基因(PITX2)的甲基化使乳腺癌不良预后风险增大^[40];MEHROTRA 等^[41]研究发现,与乳腺癌远处转移相关的基因 CCD2、RAR- β 、Twist、RASSF1A 和 HIN-1 甲基化频率在转移性乳腺癌组织标本中较原发性乳腺癌高;并且研究表明乳腺癌患者甲基化水平与生存时间密切相关^[42-43]。

5 DNA 甲基化转移酶抑制剂(DNMTi)与乳腺癌治疗

DNA 甲基化的变化是一种动态且可逆转的过程,DNA 去甲基化造成转录激活,重新表达沉默基因,这为癌症提供了一种新思路。DNMTi 下调基因甲基化水平,使由于高甲基化而沉默的基因重新表达以达到治疗癌症的目的。

目前,DNMTi 主要用于治疗骨髓异常增生综合征(MDS)等血液系统恶性肿瘤,而在实体瘤中的临床应用还在研究当中。美国食品药品监督管理局(FDA)已批准地西他滨(5-氮杂胞嘧啶核苷)等 DNMTi 药物用于临床治疗所有亚型的 MDS。DNMTi 能显著改善患者生活质量,提高预期寿命^[44-45],且 DNMTi 与组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)联合用药具有协同作用,治疗效果更好^[46-48]。

DNMTi 单独或联合其他抗肿瘤药物在细胞实验

和动物实验中的效果明显,如地西他滨联合经典抗肿瘤药物聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂(PARPi)对具有野生型或突变型 BRCA 甲基化导致的乳腺癌和卵巢癌有治疗效果^[49],地西他滨可以反转乳腺癌中蛋白激酶 D1(PRKD1)启动子甲基化,恢复 PRKD1 的表达并阻断肿瘤向肺的扩散和转移^[50]。但是一项关于用于地西他滨联合 HDACi(恩替司他)用于治疗晚期乳腺癌临床试验未能达到预期效果的研究表明,DNMT 抑制剂在乳腺癌中的临床治疗效果尚待研究,同时 DNMTi 治疗乳腺癌的最佳剂量和方案尚未得到充分研究^[51]。

6 DNA 甲基化常见的检测方法

6.1 限制性酶切 PCR 法(RE-PCR) RE-PCR 是最早的 DNA 甲基化检测技术。其基本原理为:使用两种专门的限制内切酶处理 DNA 后,这两种酶分别对甲基化灵敏和不灵敏。根据甲基化片段上下游的碱基排列来确定引物的 PCR 扩增。DNA 有甲基化现象,则含有甲基化位点的这段基因将被扩增,否则无法扩增。RE-PCR 操作简单,成本低,但这个方法需要大样本检测且只能检测限制性内切酶识别的 CpG 岛甲基化状态,当酶切不完全时易出现假阳性。

6.2 甲基化特异性 PCR 法(MSP) MSP 是经典的甲基化检测方法,亚硫酸氢钠处理 DNA 后,未甲基化 DNA 序列中的胞嘧啶变成尿嘧啶,而甲基胞嘧啶不改变。按照两种碱基序列,分别设计甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测扩增片段确认基因是否发生甲基化。该方法操作简单、费用较低且特异性较高,但只能对已知甲基化位点的序列进行检测,并且不能定量分析甲基化水平。

6.3 重亚硫酸盐测序法(BSP) BSP 同样先用亚硫酸氢钠预处理 DNA,接着设计两种引物进行 PCR,再经过克隆、测序等步骤可以得知 DNA 序列中单独 CpG 位点是否发生了甲基化。该方法特异度和灵敏度都很高,但是操作复杂,成本也较高。

6.4 甲基化敏感性高分辨率熔解曲线法(MS-HRM) 高分辨率熔解法(HRM)最初是用来检测单核苷酸多态性基因分型的,后被完善用于 DNA 甲基化检测。其同样经亚硫酸氢盐处理,PCR 扩增得到两种产物。根据两种产物熔解曲线不同并以此检测 DNA 甲基化水平。MS-HRM 操作较简单,灵敏度高且成本较低,但是只能用来检测 DNA 总体甲基化水平,无法检测单个 CpG 位点甲基化状态。

6.5 甲基化荧光检测法 甲基化荧光检测法是高通量检测,该方法同样先用亚硫酸氢钠处理 DNA,接着设计引物和 TaqMan 荧光探针来进行 PCR 扩增,根据获得的荧光信号得知 DNA 甲基化状态。甲基化荧

光检测法具有灵敏度高的特点,能够在超过 10 000 倍未甲基化等位基因的情况下检测甲基化等位基因。甲基化荧光检测法过程比较简单、定量准确、特异度高,能够快速筛查肿瘤,但同时检测成本也较高。

6.6 焦磷酸测序法 焦磷酸测序法是 DNA 甲基化检测结果的“金标准”,是第 3 代测序技术。同样先用亚硫酸氢钠处理 DNA,随后进行焦磷酸测序,最后进行甲基化分析。焦磷酸测序能够定量精确到单个位点。

7 小结

近年来大量研究均证实,DNA 甲基化与乳腺癌的发生、发展、预后等密切相关,DNA 甲基化是一个具有广阔应用前景的研究方向。cfDNA 甲基化改变作为筛查手段,能够对传统乳腺癌筛查起到补充或者改进的作用,并且多项研究表明,联合多种特异性甲基化指标能提高乳腺癌诊断的特异度和灵敏度。此外,肿瘤或邻近组织或外周血中的 DNA 甲基化改变也可以帮助临床医生确定乳腺癌的预后和疗效。同时 DNMTi 在 MDS 中的成功应用也为乳腺癌治疗开拓了新思路,并且已有动物和细胞实验表明 DNMTi 与其他抗肿瘤药物联合使用能得到更好的疗效。但是,DNMTi 在乳腺癌中的临床应用还需要广大研究人员不断深入研究。甲基化检测的方法随着测序技术的发展也越来越先进,极大地推进了甲基化研究进展。总之,DNA 甲基化作为乳腺癌生物标志物的临床应用及实现临床治疗还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] National Cancer Institute. Cancer Stat Facts; cervical cancer[EB/OL][2021-03-19]<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>.
- [2] PLAYDON M C, ZIEGLER R G, SAMPSON J N, et al. Nutritional metabolomics and breast cancer risk in a prospective study[J]. Am J Clin Nutr, 2017, 106(2): 637-649.
- [3] WANG F, TSE L A, CHAN W C, et al. Disparities of time trends and birth cohort effects on invasive breast cancer incidence in Shanghai and Hongkong pre- and post-menopausal women[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 362.
- [4] WEN D, WEN X, YANG Y, et al. Urban rural disparity in female breast cancer incidence rate in China and the increasing trend in parallel with socioeconomic development and urbanization in a rural setting[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(2): 262-272.
- [5] PERREAULT A A, SPRUNGER D M, VENTERS B J. Epigenetic and transcriptional profiling of triple negative breast cancer[J]. Sci Data, 2019, 6: 190033.

- [6] DAWSON M A, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy [J]. *Cell*, 2012, 150 (1): 12-27.
- [7] SCHMITZ R J, LEWIS Z A, GOLL M G. DNA Methylation: shared and divergent features across eukaryotes [J]. *Trends Genet*, 2019, 35(11): 818-827.
- [8] GU T, LIN X, CULLEN S M, et al. DNMT3A and TET1 cooperate to regulate promoter epigenetic landscapes in mouse embryonic stem cells [J]. *Genome Biol*, 2018, 19 (1): 88.
- [9] HUGHES A L, KELLEY J R, KLOSE R J. Understanding the interplay between CpG island-associated gene promoters and H3K4 methylation [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(8): 194567.
- [10] ZHANG Y Y, ZHOU J D, YANG D Q, et al. Intragenic hypomethylation of DNMT3A in patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56 (3): 485-491.
- [11] NERI F, RAPELLI S, KREPELOVA A, et al. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 72-77.
- [12] MOORE L E, PFEIFFER R M, POSCABLO C, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(4): 359-366.
- [13] JI H X, ZHAO Q, PAN J H, et al. Association of BLCA-4 hypomethylation in blood leukocyte DNA and the risk of bladder cancer in a Chinese population [J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(2): 205-210.
- [14] JOVANOVIĆ J, RONNEBERG J A, TOST J, et al. The epigenetics of breast cancer [J]. *Mol Oncol*, 2010, 4 (3): 242-254.
- [15] KLAJIC J, BUSATO F, EDVARDSEN H, et al. DNA methylation status of key cell-cycle regulators such as CDKN2A/p16 and CCNA1 correlates with treatment response to doxorubicin and 5-fluorouracil in locally advanced breast tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6357-6366.
- [16] HUNG C S, WANG S C, YEN Y T, et al. Hypermethylation of CCND2 in lung and breast cancer is a potential biomarker and drug target [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 1569-1589.
- [17] VOS S, MOELANS C B, VAN DIEST P J. BRCA promoter methylation in sporadic versus BRCA germline mutation-related breast cancers [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 64.
- [18] PRAJZENDANC K, DOMAGALA P, HYBIAK J, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood is associated with the risk of triple-negative breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 146: 1293-1298.
- [19] EVANS D G R, VAN VEEN E M, BYERS H J, et al. A Dominantly inherited 5' utr variant causing methylation-associated silencing of BRCA1 as a cause of breast and ovarian cancer [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 103(2): 213-220.
- [20] SPITZWIESER M, HOLZWEBER E, PFEILER G, et al. Applicability of HIN-1, MGMT and RASSF1A promoter methylation as biomarkers for detecting field cancerization in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17: 125-138.
- [21] BAE Y K, SHIM Y R, CHOI J H, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients [J]. *Cancer Res Treat*, 2005, 37(4): 233-240.
- [22] PILATO B, PINTO R, DE SUMMA S, et al. HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer [J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(1): 51-53.
- [23] MAKIYAMA K, HAMADA J, TAKADA M, et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(4): 673-679.
- [24] HUANG R, DING P, YANG F. Clinicopathological significance and potential drug target of CDH1 in breast cancer: a meta-analysis and literature review [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5277-5285.
- [25] ZHANG J, ZHOU C, JIANG H, et al. ZEB1 induces ER-alpha promoter hypermethylation and confers antiestrogen resistance in breast cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (4): e2732.
- [26] FLEISCHER T, EDVARDSEN H, SOLVANG H K, et al. Integrated analysis of high-resolution DNA methylation profiles, gene expression, germline genotypes and clinical end points in breast cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(11): 2615-2625.
- [27] ANDERSON B O, CAZAP E, EL SAGHIR N S, et al. Optimisation of breast cancer management in low-resource and middle-resource countries; executive summary of the Breast Health Global Initiative Consensus, 2010 [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(4): 387-398.
- [28] LEE C H, DERSHAW D D, KOPANS D, et al. Breast cancer screening with imaging: recommendations from the society of breast imaging and the ACR on the use of mammography, breast MRI, breast ultrasound, and other technologies for the detection of clinically occult breast cancer [J]. *J Am Coll Radiol*, 2010, 7(1): 18-27.
- [29] PACE L E, KEATING N L. A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions [J]. *JAMA*, 2014, 311(13): 1327-1335.
- [30] VISVANATHAN K, FACKLER M S, ZHANG Z, et al. Monitoring of serum DNA methylation as an early independent marker of response and survival in metastatic breast cancer: TBCRC 005 prospective biomarker study [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(7): 751-758.

- [31] SALTA S, S P N, FONTES-SOUSA M, et al. A DNA methylation-based test for breast cancer detection in circulating cell-free DNA[J]. *J Clin Med*, 2018, 7(11): 420-428.
- [32] NUNES S P, MOREIRA-BARBOSA C, SALTA S, et al. Cell-free DNA methylation of selected genes allows for early detection of the major cancers in women[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(10): 357-345.
- [33] OSUMI H, SHINOZAKI E, YAMAGUCHI K, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(4): 1148-1155.
- [34] JIN S, ZHU D, SHAO F, et al. Efficient detection and post-surgical monitoring of colon cancer with a multi-marker DNA methylation liquid biopsy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(5): e2017421118.
- [35] IWAMOTO T, YAMAMOTO N, TAGUCHI T, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 129(1): 69-77.
- [36] WONG E M, SOUTHEY M C, FOX S B, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(1): 23-33.
- [37] GUPTA S, JAWORSKA-BIENIEK K, NAROD S A, et al. Methylation of the BRCA1 promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148(3): 615-622.
- [38] FLANAGAN J M, MUNOZ-ALEGRE M, HENDERSON S, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(7): 1332-1342.
- [39] BRENNAN K, GARCIA-CLOSAS M, ORR N, et al. Intra-genic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(9): 2304-2313.
- [40] HARBECK N, NIMMRICH I, HARTMANN A, et al. Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(31): 5036-5042.
- [41] MEHROTRA J, VALI M, MCVEIGH M, et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(9): 3104-3109.
- [42] LIU L, TOUNG J M, JASSOWICZ A F, et al. Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(6): 1445-1453.
- [43] HUO H, YE X, YANG H, et al. RSK4 inhibits breast cancer cell proliferation and invasion in vitro, and is correlated with estrogen receptor upregulation in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2777-2787.
- [44] FENAUX P, MUFTI G J, HELLSTROM-LINDBERG E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(3): 223-232.
- [45] SEYMOUR J F, DÖHNER H, BUTRYM A, et al. Azacitidine improves clinical outcomes in older patients with acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes compared with conventional care regimens[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 852.
- [46] BLAGITKO-DORFS N, SCHLOSSER P, GREVE G, et al. Combination treatment of acute myeloid leukemia cells with DNMT and HDAC inhibitors: predominant synergistic gene downregulation associated with gene body demethylation[J]. *Leukemia*, 2019, 33(4): 945-956.
- [47] BRUYER A, MAES K, HERVIOU L, et al. DNMTi/HDACi combined epigenetic targeted treatment induces reprogramming of myeloma cells in the direction of normal plasma cells[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(8): 1062-1073.
- [48] SU Y, HOPFINGER N R, NGUYEN T D, et al. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 314.
- [49] PULLIAM N, FANG F, OZES A R, et al. An effective epigenetic-PARP Inhibitor combination therapy for breast and ovarian cancers independent of BRCA mutations[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(13): 3163-3175.
- [50] BORGES S, DOPPLER H, PEREZ E A, et al. Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks breast tumor cell invasion and metastasis[J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(2): R66.
- [51] CONNOLLY R M, LI H, JANKOWITZ R C, et al. Combination epigenetic therapy in advanced breast cancer with 5-azacitidine and entinostat: a phase II national cancer institute/stand up to cancer study[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(11): 2691-2701.