

· 临床论著 ·

骨髓增生异常综合征患者多个基因 甲基化状态分析

扈冰 周永明 顾峻 申小惠 余坚 张广社 赵仰星 王伟 孙晋枫

【摘要】 目的 分析 LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a 基因在骨髓增生异常综合征(MDS)患者中的甲基化状态,进而探讨与 MDS 危度及向急性髓系白血病(AML)转化的相关性。方法 采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP),对 37 例 MDS 患者的骨髓进行 LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a 4 种基因甲基化检测,以 11 例正常者和 14 例 AML 患者的骨髓作为对照,分析 MDS 患者基因的甲基化状态。结果 37 例 MDS 患者骨髓 LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a 基因的甲基化水平分别为 0.56 ± 0.18 , 0.37 ± 0.11 , 0.30 ± 0.12 和 0, LMX1A、CDH1、GSTP1 基因间甲基化差异无统计学意义($P > 0.05$),RassF1a 基因与其余 3 基因甲基化水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。在正常者、低危 MDS、中危 MDS、高危 MDS、AML 各组患者骨髓中比较,LMX1A 和 CDH1 基因的甲基化率分别为 18.2%, 41.7%, 86.7%, 100%, 100%; 9.1%, 25%, 73.3%, 100%, 100%, 差异有统计学意义($P < 0.01$),均呈现升高趋势。GSTP1 基因甲基化率(0, 16.7%, 40.0%, 100.0%, 7.1%)差异有统计学意义($P < 0.01$),在正常者、低危 MDS、中危 MDS、高危 MDS 组呈现增高趋势,但在 AML 组仅有 1 例出现甲基化。在各组中,RassF1a 基因未检测到甲基化。结论 LMX1A、CDH1、GSTP1 基因是 MDS 中出现的高甲基化基因,LMX1A、CDH1 基因的甲基化水平从 MDS 的低中高危到 AML 有升高趋势,GSTP1 基因高甲基化在低危到高危 MDS 中有升高趋势,但在 AML 中无特征性出现。RassF1a 基因未检测到甲基化。

【关键词】 骨髓增生异常; DNA 甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应

Detection of methylation levels of multi-genes in patients with myelodysplastic syndrome HU Bing, ZHOU Yong-ming, GU Jun, SHEN Xiao-hui, YU Jian, ZANG Guang-she, ZHAO Yang-xing, WANG Wei, SUN Jing-fen. Yueyang Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China

Corresponding author: ZHOU Yong-ming, Email: yongmingz@sohu.com

【Abstract】 Objective To analyze the promoter methylation levels of LMX1A, CDH1, GSTP1 and RassF1a genes of patients with myelodysplastic syndrome (MDS), and explore association with the risk degree of MDS and transformation to the leukemia. **Methods** MS-PCR was used to detect the methylation of LMX1A, CDH1, GSTP1 and RassF1a genes in 37 MDS, respectively, the methylation was detected in bone marrow samples from 11 health patient and 14 AML patients as normal controls. **Results** The methylation levels of LMX1A, CDH1, GSTP1 and RassF1a were 0.56 ± 0.18 , 0.37 ± 0.11 , 0.30 ± 0.12 and 0 in BM, the difference among the first 3 genes in MDS was not statistically significant ($P > 0.05$), but Respectively, compared with RassF1a gene was statistically significant ($P < 0.01$). Among normal people, low-risk MDS, moderate-risk MDS, high-risk MDS and AML groups, the methylation rates of LMX1A, CDH1 was statistically significant ($P < 0.01$), showed an upward tendency among the five groups, and GSTP1 was also statistically significant ($P < 0.01$), but GSTP1 were hepermethylation genes in only one BM sample of AML, RassF1a had no methylation. **Conclusion** LMX1A, CDH1 gene show an upward tendency among the five groups, GSTP1 is showed an upward tendency among nomal and MDS groups, but hepermethylation in only one BM sample of AML, RassF1a had no methylation.

【Key words】 Myelodysplastic syndrome; DNA methylation; Methylation specific PCR

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.10.018

基金项目: 国家自然科学基金(81072959;30873342);上海市中医药事业三年行动计划首批重大项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ020)

作者单位: 200437 上海,上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院血液科[扈冰(博士研究生)、周永明、申小惠、张广社];上海交通大学附属医学院仁济医院 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室(顾峻、余坚、赵仰星、王伟、孙晋枫)

通讯作者: 周永明, Email: yongmingz@sohu.com

表1 患者临床资料

组别	例数	性别(例)		年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	病程(例)			分型(例)					
		女	男		<6个月	6~24个月	24~60个月	RA	RARS	RCMD	RAEB-I	RAEB-II	
正常	11	5	6	50.36 ± 13.03									
低危 MDS	12	7	5	55.83 ± 11.71	3	3	6	5	1	6	-	-	
中危 MDS	15	7	8	48.00 ± 13.66	6	4	5	3	2	10	-	-	
高危 MDS	10	4	6	60.68 ± 13.33	4	4	2	0	0	0	5	5	
AML	14	7	7	55.21 ± 12.20	7	3	4	-	-	-	-	-	

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组造血干细胞异质性克隆性恶性血液病,主要特征是病态造血和高危演变为急性髓系白血病(AML)。最新研究表明MDS有多种抑癌基因启动子呈现高甲基化状态,认为可能与MDS的发展、危度及向AML演变有关。

资料和方法

1. 临床标本:37例MDS患者的骨髓液标本取自我院2011年1月至2011年12月住院患者。参照MDS国际预后积分系统(IPSS)^[1]及WHO分型,分为低危MDS组12例[顽固性贫血(RA)5例,环形铁粒幼红细胞性难治性贫血(RARS)1例,难治性血细胞减少伴多系异常(RCMD)6例,其中男5例,女7例,年龄30~70岁,平均56岁];中危MDS组15例(RA 3例,RARS 2例,RCMD 10例,其中男7例,女8例,年龄32~73岁,平均48岁),高危MDS组10例(RAEB II 10例,其中男6例,女4例,年龄45~70岁,平均61岁)。初诊14例AML患者中位年龄51(35~69)岁,正常对照组取自11名健康捐献者骨髓标本。患者入组前4周末使用过去甲基化药物、化疗药物、造血生长因子或糖皮质激素者,无不能控制的活动性感染,无合并其他血液系统或非血液系统肿瘤者。入组前性别、年龄等一般资料比较无统计学意义,具有可比性。所有标本收集均得到患者书面同意,符合医学研究伦理标准,临床标本信息见表1。

2. 主要试剂:培养基(10%胎牛血清,90% 1640培养液,0.05 mg/ml 氨苄西林,100 U/ml 硫酸链霉素)和Ficoll人淋巴细胞分离液(GIBCO公司);Jumpstart™ Taq(SIGMA),dNTP和Taq(申能博彩),柱离心式胶回收试剂盒(博大泰克),NaHSO₃(SIGMA),蛋白酶K(Amresco),M. Sss I(NEB),其他试剂均为国产分析纯。CDH1甲基化特异性引物由杰李生物技术有限公司合成。

3. 骨髓标本单个核细胞制备、基因组DNA提取及亚硫酸氢盐处理:Ficoll密度梯度离心法(2000 r/min, 20 min)分离出骨髓单个核细胞。常规酚/氯仿-无水乙

醇法提取细胞DNA,紫外分光光度法检测DNA浓度和纯度。取1 μg基因组DNA,于20 μl体系,加入3 mol/L NaOH 2.3 μl,37℃反应15 min,加入230 μl NaHSO₃,90℃反应30 min,加入500 μl溶胶液过吸附柱,经漂洗液漂洗后,加入0.3 mol/L NaOH 300 μl反应15 min,再经漂洗液漂洗二次后TE洗脱,-20℃保存备用。

4. MSP扩增:目的基因(LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a)及内参基因(NOS1)引物序列见表2,由杰李生物技术有限公司合成。反应体系20 μl,包括标本DNA 4 μl,10×PCR Buffer 2 μl,dNTP 2 μl,上下游引物各1 μl,Taq酶0.2 μl,双蒸水9.8 μl。反应条件:94℃预变性3 min;94℃ 20 s,56℃ 20 s,72℃ 20 s,35个循环,72℃延伸3 min。以甲基转移酶SssI处理和未处理的正常人骨髓单个核细胞DNA作为阳性对照,以双蒸水作为空白对照,DL2000作为分子量标记。PCR产物应用2%琼脂糖凝胶电泳后,电泳结果经紫外与可见分析仪成像和扫描数据分析,之后对PCR产物符合预期大小的电泳胶回收。

表2 目的基因序列和长度

基因名称		目的基因序列5'-3'	长度 (bp)
LMX1A	上游	GTCGTTTTTCGAGATTGTAGTCG	
	下游	TAAAACGTCGCCGAAAAAACC	158
RASSF1A	上游	GTGTTAACGCGGTGCGTATC	
	下游	AACCCCGCGAACTAAAAACGA	95
CDH1	上游	TCGCGGGTTCGTTTTTCGC	
	下游	GACGTTTTTCATTACACACCGG	244
GSTP1	上游	GCGATTTCGGGATTTTA	
	下游	ACGACGACGAAACTCCAA	199
NOS1	上游	GGAGGTTTACTAAGTTTTTTGGATTGTG	
	下游	AAAACCTACTCCTCCCTTAAAAATTAC	235

5. PCR产物的序列分析:切取PCR产物符合预期大小的胶块100 μl进行溶胶回收,连接体系10 μl,包括DNA(胶回收)7.5 μl,10×Buffer 1 μl,T4 ligase 1 μl,T-Vector 0.5 μl,于16~20℃连接4 h,40 μl铺板(X-gal的AMP板),37℃吸收2 h。将感受态细菌置冰

溶解后加入连接好体系,经过转化后,将制备的菌液涂板,置于37℃烘箱过夜,经摇菌和PCR后,选择PCR产物大小相符对应的菌液,送杰李生物技术有限公司测序。

6. 数据分析和统计学处理:利用紫外与可见分析装置中Smart Viewer软件对甲基化电泳条带进行密度扫描和分析,获得目的基因的甲基化条带密度值,并除以相对应标本的用于质控和量控的内参基因的条带密度值,即为目的基因在各个标本中的甲基化程度。以SPSS 18.0软件进行统计,数据采用以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)、百分比率表示,采用方差分析、成组两样本均数比较的t检验及 χ^2 检验。其中若方差齐,使用Bonferroni法分析。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. MSP扩增的结果: MSP扩增结果见图1。用NOS1内参基因对样本模板进行质控和量控,以排除因化学诱变不充分或过分诱变而出现样品甲基化信息失真的可能,并防止因起始模板量不同而对后续实验产生影响。图1可以看出,NOS1内参基因引物在每个样本中扩增出预期大小235 bp的PCR片断,其谱式相同,可以作为MSP对LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a基因甲基化状态分析的PCR模板。

为了证实MSP分析的可靠性,我们挑选了用LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a基因引物扩增的PCR产物,经克隆后测序,甲基化的MSP产物序列见图2,所有的胞嘧啶(C)均与鸟嘌呤(G)相连,且位于其5'端,即CpG岛中的胞嘧啶受甲基保护不发生转换;而未甲基化的MSP产物序列中的胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)所替代,表明其经亚硫酸氢盐修饰后转换为尿嘧啶(U),并在PCR过程中被扩增为胸腺嘧啶(T),并且MSP产物分别是4个目的基因启动子区的部分序列,其分析结果完全可靠。

2. 37例MDS患者不同目的基因间的甲基化水平(表3):37例MDS患者骨髓LMX1A、CDH1、GSTP1基因检测到不同程度甲基化,RassF1a基因未发现甲基化。MDS患者LMX1A、CDH1、GSTP1基因甲基化水平方差齐,使用Bonferroni法进行这3种基因间多重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。故将RassF1a基因的检测结果分别与LMX1A、CDH1、GSTP1各基因甲基化水平分别进行成组两样本均数比较t检验,差异有统计学意义($P < 0.01$)。LMX1A、CDH1、GSTP1、RassF1a基因甲基化水平为 0.56 ± 0.18 , 0.37 ± 0.11 , 0.30 ± 0.12 和0,结果显示MDS患者LMX1A基因甲基化水平最高。

3. 不同危型MDS患者基因甲基化水平和甲基化率:在正常者、低危MDS、中危MDS、高危MDS、AML各组患者骨髓中比较,LMX1A和CDH1基因的甲基化率分别为18.2%,41.7%,86.7%,100%,100%;9.1%,25%,73.3%,100%,100%,差异有统计学意义($P < 0.01$),均呈现升高趋势。GSTP1基因甲基化率(0,16.7%,40%,100%,7.1%)差异有统计学意义($P < 0.01$),RassF1a基因未检测到甲基化(表3)。

4. 不同因素和临床分型的MDS甲基化水平分析:对性别、年龄、病程等不同因素的甲基化结果分析,显示本次入组患者在不同性别、年龄、病程中的基因甲基化水平无明显差异($P > 0.05$)。临床分型的甲基化结果分析,显示CDH1、GSTP1基因在RAEB I/II型较RCMD、RA/RAS型有明显差异,有统计学意义($P < 0.01$)。RA/RAS型到RAEB I/II型有升高趋势(表4)。

讨 论

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶催化下,以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体将甲基转移到特定碱基上的过程。肿瘤中的DNA甲基化异常是目前深入研究的

表3 37例不同危型MDS患者目的基因甲基化水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LMX1A	CDH1	GSTP1	RassF1a
MDS($\bar{x} \pm s$)	37	0.56 ± 0.18	0.37 ± 0.11	0.30 ± 0.12	0
低危MDS	12	41.7% (5/12)	25% (3/12)	16.7% (2/12)	0
中危MDS	15	86.7% (13/15)	73.3% (11/15)	40% (6/15)	0
高危MDS	10	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	0
AML	14	100% (10/10)	100% (10/10)	7.1% (1/10)	0
正常	11	18.2% (2/11)	9.1% (1/11)	0	0
χ^2 值		28.629	30.540	29.250	
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	

注:LMX1A、CDH1、GSTP1基因间比较, $F = 0.474$, $P > 0.05$;RassF1a分别与LMX1A、CDH1、GSTP1基因均数比较,t值分别为5.28、5.04、3.79, $P < 0.01$

表4 不同因素和临床分型的MDS甲基化水平分析

项目	例数	LMX1A			CDH1			GSTP1			
		甲基化(%)	χ^2 值	P 值	甲基化(%)	χ^2 值	P 值	甲基化(%)	χ^2 值	P 值	
MDS											
性别	女	18	77.8	0.084	0.772	55.5	0.650	0.420	38.9	1.337	0.248
	男	19	73.7			68.4			57.9		
年龄	30~55岁	15	66.7	1.112	0.292	60.0	0.050	0.823	53.3	0.222	0.638
	55~80岁	22	81.8			63.6			45.5		
病程	<6个月	13	77.4	0.530	0.767	76.9	0.795	0.672	53.8	0.218	0.897
	6~24个月	11	82.3			54.5			55.5		
	24~60个月	13	69.2			53.8			46.2		
分型	RA/RARS	11	54.0	5.389	0.068	36.4	9.437	0.009	18.2	15.439	0.000
	RCMD	16	75.0			56.3			38.0		
	RAEB I/II	10	100			100			100		
AML											
性别	女	7	100		-	100		-	0	0.938	0.333
	男	7	100			100			14.2		
年龄	30~55岁	5	100		-	100		-	0	0.598	0.439
	55~80岁	9	100			100			11.1		
病程	<6个月	7	100		-	100		-	14.2	0.938	0.626
	6~24个月	3	100			100			0		
	24~60个月	4	100			100			0		

表观遗传机制^[2]。在肿瘤细胞中,一些原本在正常细胞中处于低甲基化状态的基因会发生高甲基化的状态而转录失活,引起抑癌基因表达下调,从而引起肿瘤发生^[3-4]。甲基化特异性 PCR(MSP)方法已经成为当前检测 DNA 甲基化的最常用方法之一,是由 Herman 等^[5]于 1996 年首创,其原理是用亚硫酸盐转化未甲基化胞嘧啶成为尿嘧啶,并在随后进行的 PCR 反应过程中转变成胸腺嘧啶,而甲基化胞嘧啶不发生这种转化。MSP 法简单、灵敏、特异性高,需要标本量少,可以检测比例为 1/1000 的甲基化的等位基因片段^[5]。而 MSP 结合测序方法更能明确甲基化的确切位置和甲基化程度,给甲基化检测提供方便。

LMX1A 基因定位于染色体 6p24 上,除促进骨发育和骨形成外,与胃肠、心血管等多种器官的发育有关。越来越多的证据表明,LMX1A 基因还与肿瘤的发生发展有密切关系。已有研究^[6-8]表明 LMX1A 基因的高甲基化与膀胱癌、子宫颈癌、胃癌等肿瘤的发生关系密切,对于血液肿瘤尚未见报道。本实验中显示 LMX1A 基因与其余三基因相比,其甲基化水平最高。在正常者、低中高危 MDS、AML 各组患者骨髓中比较,LMX1A 基因甲基化水平、甲基化率有统计学意义($P < 0.01$),呈现增高趋势,推测 LMX1A 基因甲基化与 MDS 的发生发展、危度及向 AML 转化有关。

CDH1 基因定位于染色体 16q22.1,编码糖蛋白 E 钙黏蛋白,能够维持细胞分化、极性和正常组织结构。但许多肿瘤中显示表达下降或缺失,容易引起肿瘤细

胞丧失接触抑制而失去分化,又容易浸润、转移,被认为是一种抑癌基因和肿瘤转移相关基因^[9]。近年来研究表明,其表达下降或缺失的原因多与 CDH1 基因甲基化相关,已在乳腺癌、膀胱癌、胃癌、卵巢癌等多种肿瘤中被证实^[10-13]。在血液肿瘤领域,国外有报道 CDH1 基因的甲基化与 MDS 的预后不良有关^[14]。本实验中 CDH1 基因的甲基化水平、甲基化率在从正常、低危 MDS、中危 MDS、高危 MDS 到 AML 呈现增高趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$),亦证实了 CDH1 基因与 MDS 的发生发展、预后有关。

GSTP1 基因定位于染色体的 11q13,其第 5 外显子的一位点的 A 到 G 突变导致基因产物的活性和底物特异性发生改变,从而可能影响癌症的易感性。已有研究^[15-17]证实此基因在多数恶性肿瘤中高表达,如胃肠癌、食管癌、肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、乳腺癌,有研究者发现白血病中 GSTP1-G 等位基因的个体在慢性淋巴细胞白血病患者中显著高于对照组。目前此基因在 MDS 中的甲基化状况尚少见。本实验中 GSTP1 基因甲基化水平、甲基化率在正常、低中高危 MDS、AML 各组中差异具有统计学意义($P < 0.01$),在低危、中危、高危 MDS 中存在升高趋势,但在 AML 中仅有一例检测到甲基化,可以推测 GSTP1 与 MDS 的发生发展、危型相关,但与 AML 无明显相关性。

RassF1a 基因是近来发现的一个重要肿瘤抑制基因。RassF1a 基因含有外显子 3~6 及 1 α 、2 $\alpha\beta$,长 1873 bp,是从 3 号染色体短臂上克隆出来的。已发现在大

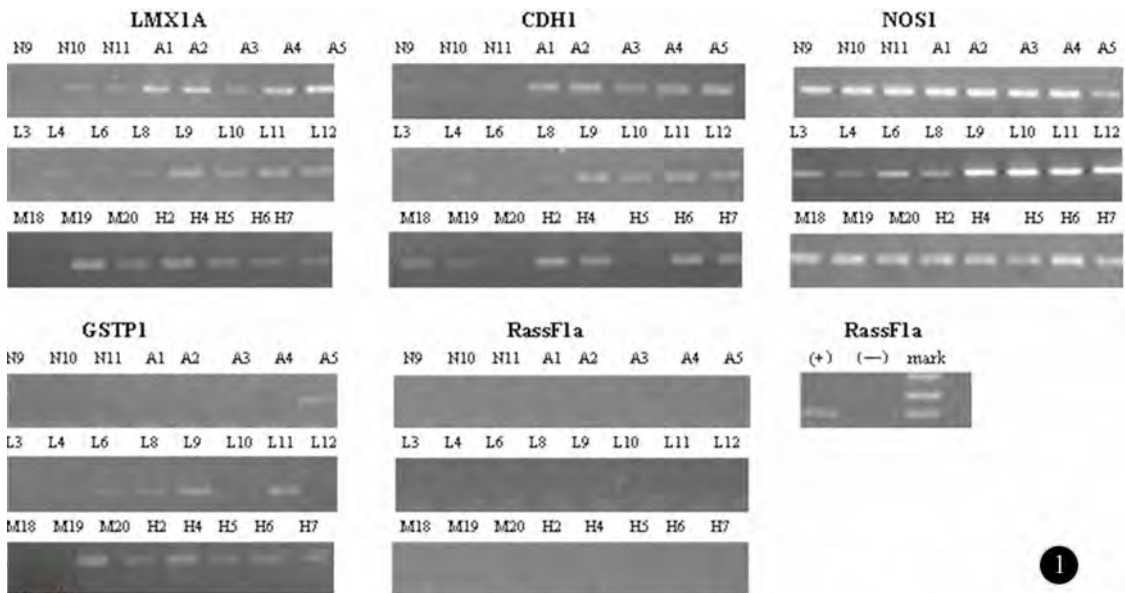


图1 MDS中目的基因及内参基因甲基化谱式。N: 正常对照; A: AML; L: 低危MDS; M: 中危MDS; H: 高危MDS

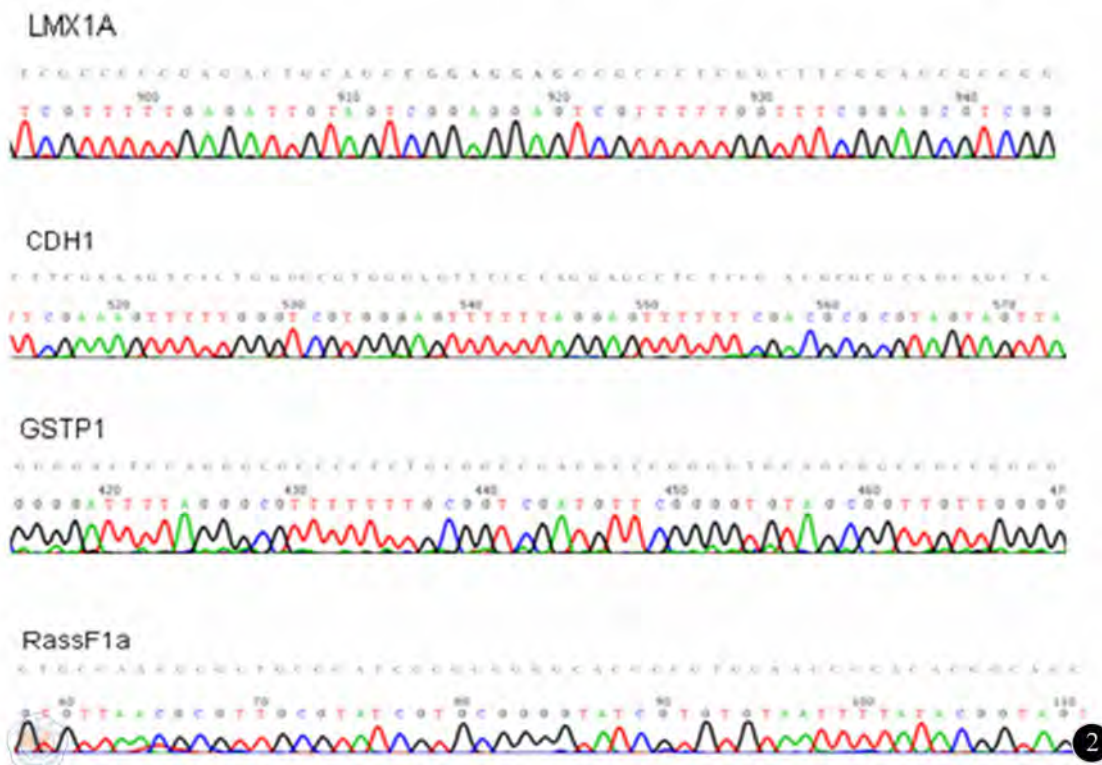


图2 目的基因引物扩增的PCR产物克隆后的基因的测序图, 目的基因上排为野生型, 下排为甲基化修饰后的基因

多数癌症中表达缺失,而在正常组织中均有表达。研究发现 RassF1a 基因的表达缺失与其启动子区高甲基化有关,也发现 DNA 甲基化转移酶升高^[18-19]。已发现的由于 DNA 甲基化导致 RassF1a 基因缺失的肿瘤有淋巴瘤、肺癌、肝癌、前列腺癌、胃癌等。本实验中 RassF1a 基因在低中高危 MDS、正常人和 AML 中均未检测到甲基化,故推测 RassF1a 基因的启动子甲基化与 MDS 的发生发展、预后无相关性。

本实验检测到正常对照组 1 例 CDH1 基因甲基化,这可能与个体差异有关,正常人的骨髓单个核细胞中也可存在甲基化,虽然在病理指标上都属于正常,但在骨髓细胞中也可出现分子水平的变化。

本研究结果提示,LMX1A、CDH1 基因是 MDS、AML 出现的高甲基化基因,其甲基化水平与 IPSS 危险度分型密切相关,呈增高趋势,推测与 MDS 的发生发展、向 AML 转化有关。GSTP1 基因在 MDS 中出现高甲

甲基化,从低危到高危 MDS 呈现增高趋势,但与 AML 无明显相关性。RassF1a 基因在 MDS、AML 中未呈现甲基化,推测与 MDS、AML 的发生无相关性。临床分型上,RAEB I/II 型较 RCMD、RA/RAS 型的甲基化程度明显升高,从 RA/RAS 到 RAEB I/II 型有升高趋势,与 MDS 危度一致。LMX1A、CDH1 及 GSTP1 基因对 MDS 的发生发展的甲基化调控作用有待进一步研究,以期对 MDS 的早期诊断、治疗和转归提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 1997, 89:2079-2088. Erratum in: *Blood* 1998, 91:1100.
- [2] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:107-116.
- [3] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, 349:2042-2054.
- [4] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *Am J Clin Oncol*, 2004, 22:4632-4642.
- [5] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93:9821-9826.
- [6] Zhao Y, Guo S, Sun J, et al. Methylcap-seq reveals novel DNA methylation markers for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer in a Chinese population. *PLoS One*, 2012, 7:e35175.
- [7] Lai HC, Lin YW, Huang TH, et al. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer*, 2008, 123:161-167.
- [8] Dong W, Feng L, Xie Y, et al. Hypermethylation-mediated reduction of LMX1A expression in gastric cancer. *Cancer Sci*, 2011, 102:361-366.
- [9] Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*, 2002, 109:987-991.
- [10] Sebova K, Zmetakova I, Bella V, et al. RASSF1A and CDH1 hypermethylation potential epimarkers in breast cancer. *Cancer Biomark*, 2011-2012, 10:13-26.
- [11] Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 2013, 10:327-335.
- [12] Wu PY, Zhang Z, Wang JM, et al. Germline promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2012, 18:70-78.
- [13] Montavon C, Gloss BS, Warton K, et al. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2012, 124:582-588.
- [14] Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, et al. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol*, 2006, 76:23-32.
- [15] Hauser S, Kogej M, Fechner G, et al. Serum DNA hypermethylation in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res*, 2013, 33:779-784.
- [16] Song MA, Tiirikainen M, Kwee S, et al. Elucidating the landscape of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013, 8:e55761.
- [17] Ekmekci CG, Gutiérrez MI, Siraj AK, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 2004, 77:233-240.
- [18] Yaqinuddin A, Qureshi SA, Pervez S, et al. Frequent DNA Hypermethylation at the RASSF1A and APC Gene Loci in Prostate Cancer Patients of Pakistani Origin. *ISRN Urol*, 2013.
- [19] Murray PG, Qiu GH, Fu L, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 2004, 23:1326-1331.

(收稿日期:2013-04-03)

(本文编辑:梁雷)

扈冰,周永明,顾峻,等.骨髓增生异常综合征患者多个基因甲基化状态分析[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(10):4338-4343.

中 华 临 床 医 师 杂 志