

胃癌患者血清抑癌基因启动子超甲基化测定的临床意义

朱立岳, 胡雷光, 翁丽贞(上海市静安区中心医院/复旦大学华山医院静安分院检验科 200040)

【摘要】 目的 探讨胃癌患者血清中抑癌基因超甲基化检测的临床意义。**方法** 随机收集 2011~2013 年上海市静安区中心医院进行胃镜检查的患者, 32 例胃癌患者为胃癌组, 29 例萎缩性胃炎为萎缩性胃炎组和 30 例健康者为健康对照组。应用甲基化特异性 PCR(MSP)方法, 测定血清 Ras 相关区域家族基因 1a(RASSF1A)基因、人类相关转录因子 3(Runx3)基因、错配修复蛋白 MutL 同源物 1(hmLH1)基因、多肿瘤抑制基因 1(MTS1)也称 P16 基因、上皮 E 钙粘蛋白(E-Cadherin)基因、组织因子途径抑制物 2(TFPI-2)基因启动子甲基化状态。**结果** 胃癌组血清 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因超甲基化阳性率分别为 21.9%, 40.6%, 21.9%, 34.4%, 28.1%, 28.1%; 萎缩性胃炎组分别为 3.5%, 13.8%, 0.0%, 6.9%, 3.5%, 6.9%; 对照组仅检出 RUNX3 基因启动子甲基化, 阳性率 3.5%; 胃癌组血清 6 种基因启动子甲基化阳性率均明显高于萎缩性胃炎组和健康对照组 ($P < 0.05$)。联合血清中 6 种基因启动子甲基化对胃癌诊断灵敏度为 76.7%, 较单独一个基因明显升高 ($P < 0.05$); 特异性为 86.5%, 与 RUNX3 基因比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与其他 5 个基因单独测定特异性降低 ($P < 0.05$)。**结论** MSP 检测能检测到血清中 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因启动子超甲基化。6 个基因启动子联合测定对胃癌诊断的灵敏度更高, 可为胃癌的诊断、治疗以及判断预后提供新方法或依据。

【关键词】 抑癌基因; 超甲基化; 血清游离 DNA; 胃癌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.19.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)19-2692-04

Significance of tumor suppressor gene promoter hypermethylation in sera of patients with gastric cancer ZHU Li-yue, HU Lei-guang, WENG Li-zhen (Department of Clinical Laboratory, Shanghai Jing'an District Central Hospital/Jing'an Branch of Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To explore the clinical significance of tumor suppressor genes promoter hypermethylation determination in sera of patients with gastric cancer. **Methods** Thirty two patients suffered from gastric cancer (gastric cancer group) and 29 patients with atrophic gastritis (atrophic gastritis group) were randomly recruited in this study, thirty healthy people were recruited as control group. The serum of patients were detected by MSP method for RASSF1A, RUNX3, hmLH1, P16, E-Cadherin and TFPI-2 gene promoter hypermethylation. **Results** The positive rates of RASSF1A, RUNX3, hmLH1, P16, E-Cadherin and TFPI-2 gene promoter hypermethylation in sera were 21.9%, 40.6%, 21.9%, 34.4%, 28.1% and 28.1% respectively in gastric cancer group, as well as 3.5%, 13.8%, 0.0%, 6.9%, 3.5% and 6.9% in atrophic gastritis group. Only RUNX3 gene promoter hypermethylation in serum were detected in the control group, the positive rate was 3.45%. The positive rates of six kinds of gene promoter hypermethylation in gastric cancer were respectively higher than the control group ($P < 0.05$) and atrophic gastritis group ($P < 0.05$). The sensitivity of combined detection of six gene promoter hypermethylation as 76.7% was superior to a single gene for diagnosis of gastric cancer ($P < 0.05$). But the specificity of the combined detection was decreased to 86.44% compared with five other genes except for RUNX3 respectively ($P < 0.05$). There was no significant difference between the combined detection with RUNX3 gene ($P > 0.05$). **Conclusion** RASSF1A, RUNX3, hmLH1, P16, E-Cadherin and TFPI-2 gene promoter hypermethylation in sera can be detected by MSP. The diagnosis sensitivity for gastric cancer of the six gene promoter hypermethylation combined detection was higher than the single detection of these six gene promoter hypermethylation. The research results provided a novel testing method for clinic diagnosis, treatment and prognosis judgment for gastric cancer.

【Key words】 tumor suppressor genes; hypermethylation; free DNA in serum; gastric cancer

胃癌是临床上较常见的恶性肿瘤之一, 学者们一直致力于其发生、发展的研究。近些年来表观遗传学成为胃癌的热点研究领域, 其研究致力于基因序列未发生变化, 而表达水平改变的情况。其中基因启动子超甲基化是导致抑癌基因失活, 表达下降的重要原因, 最终导致癌症的发生, 是表观遗传学重要的研究方向之一^[1-2]。Ras 相关区域家族基因 1a(RASSF1A)基因、人类相关转录因子 3(Runx3)基因、错配修复蛋白 MutL 同

源物 1(hmLH1)基因、多肿瘤抑制基因 1(MTS1)也称 P16 基因、上皮 E 钙粘蛋白(E-Cadherin)基因、组织因子途径抑制物 2(TFPI-2)基因启动子超甲基化与胃癌的关系相继被报道^[3-11], 这些研究发现胃癌组织中这 6 种基因的甲基化检出率较癌旁组织和正常组织高。说明这些基因启动子超甲基化与胃癌的发生、发展密切相关, 是胃癌的重要抑癌基因, 有可能成为胃癌诊断的分子标志物。以往研究在血清游离 DNA 中发现癌症

相关的基因突变,证实了肿瘤细胞释放是血清游离 DNA 的主要来源之一^[14]。如果能从胃癌患者血清中检测到抑癌基因启动子的超甲基化,将是一种无创的检测新方法,对胃癌的诊断及治疗具有重要意义。本文通过甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)方法测定血清游离 DNA 中 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因启动子甲基化状态,分析血清中检出基因超甲基化与胃癌的关系,探讨其在胃癌诊断中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择本院 2011~2013 年进行胃镜检查的患者,32 例为胃癌组,其中男 18 例,女 14 例,年龄 37~75 岁。29 例作为萎缩性胃炎组,其中男 13 例,女 16 例,年龄 34~74 岁。随机选取同期胃镜检查排除浅表性胃炎的其他胃部疾患者 30 例为对照组,其中男 15 例,女 15 例,年龄 33~73 岁。所有研究对象均经病理诊断确诊,且排除其他部位肿瘤,未进行胃癌手术及放化疗。3 组患者在性别、年龄等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有标本取材及测定数据的使用均经研究对象同意并签署知情同意书。

1.2 方法 取所有研究对象血液 4 mL,自然凝固后以相对离心力(RCF)1 000×g 离心 5 min 后分离血清,转移至冻存管中-70 ℃保存。

1.2.1 血清游离 DNA 抽提 使用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物科技有限公司,中国),提取 400 μL 血清中的游离 DNA。取得的 DNA 溶解于去离子双蒸馏水,置-20 ℃保存。

1.2.2 亚硫酸氢盐修饰 DNA 使用紫外分光光度法测定血清游离 DNA 浓度,取 500 ng DNA 使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO RESEARCH,USA),按试剂盒提供的说明书进行亚硫酸氢盐修饰和纯化。经此步骤获得的 DNA 序列被修饰,未甲基化的胞嘧啶(C)转变成尿嘧啶(U),甲基化的胞嘧啶(C)保持原样。修饰后 DNA 用 15 μL 去离子双蒸馏水溶解,置-20 ℃保存备用。

1.2.3 MSP 按照修饰后的序列设计 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因甲基化引物,按照不被修饰的序列设计非甲基化引物。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成引物,序列及 PCR 产物片段大小详见表 1。PCR 反应体系由预混合的日本 TaKaRa 公司生产的 Taq Hot Start Version 试剂盒提供。加入 10 nM 甲基化上下游引物,2 μL 经亚硫酸氢盐修饰后的 DNA 模板,总反应体积 20 μL。同时再取修饰后的 DNA 2 μL,同样的反应体系,加入 10 nM 非甲基化上下游引物。反应均为 94 ℃预变性 5 min;共扩增 40 个循环,变性 94 ℃ 30 s,退火温度详见表 1,退火时间 30 s,延伸 72 ℃ 30 s;最后 72 ℃延伸 5 min。每批测定均使用甲基化酶 SssI 修饰的和未被修饰的正常血清游离 DNA 作为阳性和阴性对照,用无菌双蒸水作为空白对照。最后取 5 μL PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析结果。以甲基化特异性引物扩增出目的条带作为甲基化阳性的标志。将仅非甲基化特异性引物扩增出条带作为甲基化阴性的标志。PCR 仪使用美国应用生物系统公司 ABI 9700。

表 1 甲基化及非甲基化引物序列、产物片段及退火温度

基因			引物序列(5'-3')	产物(bp)	退火(℃)
RASSF1A	M	F	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	169	64
		R	GATAACAAACGCGAACCG		
	U	F	GGGGTTTTGTGAGAGTGTG	169	59
RUNX3	M	F	TTACGAGGGGCGGTCTGTACGCGGG	212	59
		R	AAAACGACCGACGCGAACGCCTCC		
	U	F	TTATGAGGGGTGTTGTATGTGGG	212	57
hmLH1	M	F	GATAGCGATTTTAAACGC	74	52
		R	TCTATAAATTACTAAATCTCTTCG		
	U	F	AGAGTGATAGTGATTTTAAATGT	115	52
P16	M	F	TTATTAGAGGGTGCGGCGATCGC	150	60
		R	GACCCGAACCGCGACCGTAA		
	U	F	TTATTAGAGGGTGCGGTGGATTGT	151	60
E-Cadherin	M	F	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	116	57
		R	TAACTAAAAATTACCTACCGAC		
	U	F	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT	97	53
TFPI-2	M	F	CGCGGGGTGATAGTTTTTC	106	57
		R	CAAACGACCCGAATACCCGCTTTATACG		
	U	F	GTGGTGCGGTGATAGTTTTTG	109	57
			CCAAACAACCCAAATACCCACTTTATACA		

注:M 表示甲基化引物,U 表示非甲基化引物,F 表示上游引物,R 表示下游引物。

1.3 统计学处理 应用 SAS8.02 统计软件对数据进行分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血清 6 种抑癌基因甲基化检测结果比较 血清 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因启

动子超甲基化在胃癌组阳性率分别为 21.9% (7/32), 40.6% (13/32), 21.9% (7/32), 34.4% (11/32), 28.1% (9/32), 28.1% (9/32); 萎缩性胃炎组分别为 3.5% (1/29), 13.8% (4/29), 0.0% (0/29), 6.9% (2/29), 3.5% (1/29), 6.9% (2/29); 对照组仅有 1 例检出 RUNX3 基因启动子甲基化阳性, 阳性率为 3.5%。6 种基因启动子甲基化阳性率胃癌组均明显高于萎缩性胃炎组及对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 联合 6 个血清抑癌基因超甲基化对胃癌诊断的价值 血清 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 单个

基因启动子超甲基化对胃癌的诊断灵敏度为 21.9%~40.6%; 特异性为 91.5%~100.0%。胃癌组中至少检出 1 个基因甲基化阳性的有 23 例, 联合血清中 6 种基因启动子甲基化可使诊断灵敏度提高, 达到 76.7%。联合 6 种基因启动子超甲基化特异性为 86.4%, 与 RUNX3 启动子超甲基化测定特异性比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 与 RASSF1A、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 单个基因启动子超甲基化测定比较有所降低 ($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 联合检测与单独检测对胃癌诊断性能比较

项目	灵敏度(%)	χ^2	P	特异性(%)	χ^2	P
RASSF1A	21.9	16.062 7	<0.000 1	98.3	5.894 0	0.015 2
RUNX3	40.6	6.349 2	0.011 7	91.5	0.778 0	0.377 8
hmLH1	21.9	16.062 7	<0.000 1	100.0	8.581 8	0.003 4
P16	34.4	9.035 3	0.002 6	96.6	3.933 3	0.047 3
E-Cadherin	28.1	12.250 0	0.000 5	98.3	5.894 0	0.015 2
TFPI-2	28.1	12.250 0	0.000 5	96.6	3.933 3	0.047 3
联合检测	76.7	—	—	86.4	—	—

注:—表示无数据。

3 讨 论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 发病率较高, 严重危害着人类的健康和生命。虽然目前胃癌发生的机制仍不明确, 但陆俊骏等^[2]总结了表观遗传学的多项研究结果显示, 胃癌的发生常伴随抑癌基因启动子的超甲基化, 且早于胃癌病理学的改变。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的催化下, 将活性甲基从 S-腺苷-2-甲硫氨酸转移到胞嘧啶 5 位碳原子上, 形成 5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程。超甲基化在许多肿瘤的发生过程中是一个频发的早期事件, 甲基化使抑癌基因失活, 表达下降, 在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[12]。目前认为抑癌基因启动子的超甲基化是除缺失、突变等 DNA 序列发生变化以外导致基因功能发生变化的重要原因^[2]。

国内外学者汇总以往研究, 总结了包括本实验研究的 6 个基因等数十个基因的超甲基化与胃癌有关, 在胃癌组织中的阳性率较高, 对胃癌的发生和演化过程意义重大^[2, 11, 13]。本实验研究的 RASSF1A 基因有多个结构域, 被认为是一种潜在的 Ras 癌蛋白效应分子, 能与活化的 Ras 结合, 通过调节凋亡及细胞周期信号通路作用, 具有抑制细胞生长、促进细胞凋亡和衰老的作用^[4]。RUNX3 基因通过调节转化生长因子 β (TGF- β) 的生物活性, 参与细胞分化、周期调控、凋亡和阻止细胞向恶性转化^[5]。hmLH1 基因作为 DNA 错配修复的重要基因, 其表达下降导致错配修复缺陷, 产生 DNA 微卫星参与癌症的发生^[6]。p16 基因在细胞增殖中起到负反馈调节的作用, 其表达下降可使细胞无限制地过度增殖, 使 G1 期末充分发育的细胞提前进入 S 期, 导致癌症的发生^[11]。E-Cadherin 基因对维持细胞形态和调节细胞黏附具有重要作用, 通过限制肿瘤细胞的侵袭行为来抑制肿瘤转移^[8]。TFPI-2 基因能抑制肿瘤细胞分泌的多种丝氨酸蛋白酶, 从而抑制细胞外基质的降解, 具有抗肿瘤和抑制肿瘤侵袭转移等生物学功能^[9]。以上 6 种抑癌基因与胃癌的关系相继被报道, 这些基因启动子超甲基化多见于胃癌组织, 引起基因表达下降, 进而影响肿瘤发生、发展^[4-11]。

肿瘤相关的突变基因通过肿瘤细胞凋亡释放或肿瘤细胞直接入血的方式, 被释放到外周血中, 因此能从血清中能检测

到肿瘤相关的特异性 DNA^[14]。较多学者采用 MSP 方法检测超甲基化, 其具有较高灵敏度, 是一种简便有效的方法^[15]。本实验结果显示, 能通过 MSP 方法测定胃癌患者血清中抑癌基因启动子的超甲基化。在胃癌组血清中检出 RASSF1A、RUNX3、hmLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因启动子超甲基化的阳性率分别为 21.9%, 40.6%, 21.9%, 34.4%, 28.1%, 28.1%, 明显高于萎缩性胃炎组和对照组中的检出率, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。6 种基因启动子甲基化检测在萎缩性胃炎的阳性率很低, 与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。而以往的研究显示, 抑癌基因甲基化从正常、萎缩性胃炎、胃癌的发展逐渐增加, 是胃组织发生癌变前的早期事件^[16]。但萎缩性胃炎患者血清中的检出率较低, 推测这种现象可能与血清超甲基化的抑癌基因量少有关。而肿瘤细胞的凋亡速度比较快及肿瘤细胞随血液转移进入血循环, 导致释放到循环血液中的 DNA 量较多。推测血清中抑癌基因甲基化的测定, 受到抑癌基因超甲基化的发生和组织细胞释放 DNA 进入血循环的量的影响。陆俊骏等^[2]认为晚期肿瘤释放到循环血液中的 DNA 更多, 且与肿瘤转移相关, 说明血清抑癌基因超甲基化在肿瘤转移和病情监测方面的应用前景不容忽视。

本实验检测的血清 6 种抑癌基因超甲基化在胃癌组中的阳性率为 21.9%~40.6%, 单独 1 个基因超甲基化对胃癌诊断的灵敏度不高。陆俊骏等^[2]也认为胃癌及其癌前病变存在多个基因的变化, 单个基因的改变只存在于一部分肿瘤中, 这与本实验的结果相符。但有 76.7% 的胃癌组患者至少检出 1 个抑癌基因启动子甲基化, 多个基因超甲基化联合检测明显提高了对胃癌诊断的灵敏度。联合 6 项血清抑癌基因超甲基化诊断的特异性降为 86.4%, 说明 6 项基因启动子超甲基化联合检测更具使用价值, 是一种无创的, 有效的肿瘤筛选新方法。

目前通过 5-氮胞苷(5-Aza-CdR)等去甲基化药物恢复抑癌基因的甲基化状态, 恢复抑癌基因功能越来越得到临床重视^[17]。Yamashita 等^[18]的研究筛选启动子超甲基化的胃癌细胞株, 通过 5-Aza-CdR 处理后, DNA 的甲基化均得到逆转, 抑癌基因重新表达。但 5-Aza-CdR 不良反应大, 临床应用应谨

慎。血清抑癌基因的测定,能为选择靶向药物,监测药物疗效提供新的依据,在胃癌个性化治疗和疗效监测方面意义重大。

综上所述,通过 MSP 能从胃癌患者血清中检测到 RASSF1A、RUNX3、hMLH1、P16、E-Cadherin、TFPI-2 基因启动子超甲基化,阳性率高于萎缩性胃炎患者及健康对照者。6 个基因启动子超甲基化联合测定较单独测定灵敏度更高,可作为筛选肿瘤的分子标志物进行胃癌早期诊断。在甲基化药物疗效预测和监测方面也具有很大的应用前景。为胃癌的诊断、治疗以及预后判断提供了新的方法或依据。

参考文献

[1] 张丽丽,吴建新. DNA 甲基化--肿瘤产生的一种表观遗传学机制[J]. 遗传,2006,28(7):880-885.

[2] 陆俊骏,钱烨,连强. 胃癌遗传学及表遗传学研究进展[J]. 中国医药导报,2013,10(19):43-46.

[3] Sato F, Meltzer SJ. CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer[J]. Cancer, 2006,106(3):483-493.

[4] Wang YC, Yu ZH, Liu C, et al. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(19):3074-3080.

[5] 赵丹,郑威强,张万里. 外周血 RUNX3 基因甲基化在胃癌中的临床价值[J]. 检验医学与临床,2013,10(18):2451-2452,2453.

[6] 吴安城,刘希双,杨堃. 错配修复基因 hMLH1 甲基化与胃癌的关系[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(13):1407-1411.

[7] Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(2):192-198.

[8] 姜蕊,赵春明,宋美娟,等. 胃癌组织中 E-cadherin 基因启

动子异常甲基化状态观察[J]. 山东医药,2011,51(50):4-6.

[9] Takada H, Wakabayashi N, Dohi O, et al. Tissue factor pathway inhibitor 2(TFPI2) is frequently silenced by aberrant promoter hypermethylation in gastric cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010,197(1):16-24.

[10] 吕萍,凌志强,余江流,等. 胃癌组织中 p16 基因甲基化状态及临床意义[J]. 肿瘤学杂志,2013,19(5):332-335.

[11] 赵成海,张宁,卜献民,等. 胃癌多基因甲基化状态分析[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(10):1004-1007.

[12] 朱正纲,傅国辉,刘炳亚,等. 分子标志物在胃癌发病机制及转化医学研究中的应用[J]. 上海交通大学学报:医学版,2012,32(9):1185-1197.

[13] Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, et al. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors[J]. 2008,9:1917-1928.

[14] 马晓杰,李景鹏,赵勇. 血浆中游离核酸:分子诊断的新靶点[J]. 生命的化学,2006,26(2):147-149.

[15] 范保星. DNA 甲基化检测方法[J]. 国外医学. 遗传学分册,2002,25(2):99-101.

[16] Qu YP, Dang SW, Hou P. Gene methylation in gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2013,42(4):53-65.

[17] 周建生,杨生生,繆明永,等. DNA 甲基化/去甲基化与癌症[J]. 生命的化学,2013(4):381-388.

[18] Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, et al. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray[J]. Cancer Sci, 2006,97(1):64-71.

(收稿日期:2014-03-26 修回日期:2014-05-29)

(上接第 2691 页)

[4] Weiss IA, Bloomgarden N, Frishman WH. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk; recommendations for treatment[J]. Cardiol Rev, 2011,19(6):291-299.

[5] Mcquade C, Skugor M, Brennan DM, et al. Hypothyroidism and moderate subclinical hypothyroidism are associated with increased all-cause mortality Independent of coronary heart disease risk factors; a PreCIS database study[J]. Thyroid, 2011,21(8):837-843.

[6] Gencer B, Collet TH, Virgini V, et al. Subclinical thyroid dysfunction and the risk of heart failure events; an individual participant data analysis from 6 prospective cohorts[J]. Circulation, 2012,126(9):1040-1049.

[7] Khandelwal D, Tandon N. Overt and subclinical hypothyroidism; who to treat and how[J]. Drugs, 2012,72(1):17-33.

[8] Setian N, Tanaka CM, Damiani D, et al. Hypopituitarism,

deficiency of factors V and VIII and von Willebrand factor; an uncommon association[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2002,15(3):331-333.

[9] Erem C, Kavgaci H, Ersöz HO, et al. Blood coagulation and fibrinolytic activity in hypothyroidism[J]. Int J Clin Pract, 2003,57(2):78-81.

[10] Gullu S, Sav H, Kamel N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism[J]. Eur J Endocrinol, 2005,152(3):355-361.

[11] Canturk Z, Cetinaraslan B, Tarkun I, et al. Duman, hemostatic system as a risk factor for cardiovascular disease in women with subclinical hypothyroidism[J]. Thyroid, 2003,13(3):971-977.

(收稿日期:2013-11-23 修回日期:2014-05-03)