

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.15.002

慢性髓系白血病中 let-7a-3 甲基化态势及其临床意义*

吴得红^{1,4}, 姚冬明², 李 云¹, 林 江³, 邓兆群³, 杨 静¹, 陈星星¹, 钱 震¹, 马吉春³, 钱 军^{1△}

(1. 江苏大学附属人民医院血液科, 江苏镇江 212002; 2. 江苏大学附属人民医院检验科, 江苏镇江 212002;

3. 江苏大学附属人民医院中心实验室, 江苏镇江 212002; 4. 江苏省昆山市第三人民医院血液科 215300)

[摘要] 目的 探讨慢性髓系白血病(CML)患者中 let-7a-3 启动子的甲基化态势及其临床意义。方法 建立实时定量甲基化特异性 PCR (RQ-MSP) 分别检测 25 例对照者及 52 例 CML 患者骨髓单个核细胞中 let-7a-3 启动子未甲基化水平。结果 52 例 CML 患者未甲基化 let-7a-3 启动子 (59.6%) 为阳性, 而对照组仅 1 例 (4%) 阳性, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ROC 曲线分析表明, let-7a-3 启动子未甲基化作为辅助诊断 CML 有较好的特异性。未甲基化 let-7a-3 启动子水平与 BCR/ABL 融合基因转录水平呈显著正相关 ($r = 0.641, P = 0.001$), 但与患者的白细胞、血小板计数及血红蛋白水平无明显相关性 ($P > 0.05$)。在慢性期和加速期 let-7a-3 未甲基化水平显著高于急变期。结论 let-7a-3 基因低甲基化水平随疾病进展而降低。

[关键词] 慢性髓系白血病; let-7a-3; 低甲基化; 微小 RNA

[中图分类号] R733.72

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)15-2020-04

Methylation situation of let-7a-3 in chronic myeloid leukemia and its clinical significance*

Wu Dehong^{1,4}, Yao Dongming², Li Yun¹, Lin Jiang³, Deng Zhaoqun³, Yang Jing¹,

Chen Xingxing¹, Qian Zhen¹, Ma Jichun³, Qian Jun^{1△}

(1. Department of Hematology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China;

3. Central Laboratory, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China;

4. Department of Hematology, the Third People's Hospital of Kunshan, Jiangsu 215300, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the methylation situation of let-7a-3 promoter in patients with chronic myeloid leukemia (CML) and its clinical significance. **Methods** The methylation level of let-7a-3 promoter in the bone marrow mononuclear cells of 52 CML patients and 25 controls was detected by using the real-time quantitative methylation-specific PCR (RQ-PCR). **Results** The non-hypomethylation of let-7a-3 promoter was positive in 31 cases (59.6%) of 52 CML patients, while only 1 case (4%, 1/25) in the control group, the difference between the two groups were statistically significant ($P < 0.01$). The ROC curve analysis showed that the non-hypomethylation of let-7a-3 has better specificity for the auxiliary diagnosis of CML. The significantly positive correlation was found between the non-methylation level of let-7a-3 promoter and the BCR/ABL transcription level ($r = 0.641, P = 0.001$). In contrast, there was no obvious correlation between the non-methylation level of let-7a-3 promoter and the WBC count, platelet count and hemoglobin levels ($P > 0.05$). The non-hypomethylation level of let-7a-3 in chronic phase and accelerate phase was significantly higher than that in blastic crisis of CML. **Conclusion** The hypomethylation level of let-7a-3 promoter is decreased with disease progression.

[Key words] chronic myeloid leukemia; let-7a-3; hypomethylation; microRNA

慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种发生在多能造血干细胞的慢性骨髓增殖性肿瘤, 以外周血中大量不成熟粒细胞及脾肿大为主要临床特征。在受累的细胞系中, 可发现 Ph 染色体和 (或) BCR/ABL 融合基因。按病情进展分为慢性期 (CP)、加速期 (AP) 和急变期 (BP/BC)。Ph 染色体和 (或) BCR-ABL 融合基因是诊断 CML 的必要条件。然而 CML 的发生、发展也受其他多种因素的调节, 如表观遗传学修饰等。先前有研究表明死亡相关蛋白激酶 (DAPK)^[1]、降钙素 (CT)^[2-3] 等抑癌基因的高甲基化, 本课题组曾报道过螺旋酶抗原 (HAGE) 低甲基化可能和 CML 的发生、发展有关^[4]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 在 CML 的发病过程中与 BCR/ABL 融合基因一起也发挥着重要作用^[5-7]。

大多数学者认为, let-7 对人类的肿瘤发挥抑癌基因效应, 其表达增加能够抑制肿瘤的发生和发展。但是大部分研究没

有将其成员区分开来。let-7a-3 作为一种非编码 miRNA 近年来备受关注, 它是 let-7 家族中的一员, 对正常细胞的增殖、分化和凋亡发挥重要作用, 而这种生物学效应, 也与肿瘤的发生、发展有关。作为表观遗传学调控基因表达的一种重要机制——甲基化修饰, 也调控着 let-7a-3 的表达。有研究证实, let-7a-3 在大部分人类正常组织中高度甲基化, 而在肺腺癌中低甲基化^[8]。对于 let-7a-3 在 CML 中的甲基化态势及临床意义目前尚不清楚。因此本研究旨在了解 let-7a-3 在 CML 中的甲基化状况, 并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 52 例 CML 患者均来自江苏大学附属人民医院, 其诊断和分期均参照《血液病诊断及疗效标准》^[9], 且每例患者都检测到 Ph 染色体和 (或) BCR/ABL 融合基因。其中男 29 例, 女 23 例; 年龄 15~83 岁, 平均 (46.3±17.3) 岁。包括

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270630、81172592、SH2013042); 镇江市社会发展项目 (SH2010015、SH2011056); 江苏省“333 工程”科研项目资助计划 (BRA2011085、BRA2013136); 江苏省科技厅临床医学科技专项资金项目 (BL2012056); 镇江市科技基础设施建设项目 (SS2012003)。作者简介: 吴得红 (1982—), 硕士, 主治医师, 主要从事恶性血液病的临床及基础研究。△ 通讯作者, E-mail: qianjun0007@sina.com。

表 1 let-7a-3 RQ-MSP 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
let-7a-3-M 上游引物	5'-GAC GGT ACG TTC GTG AA GTC G-3'	148
let-7a-3-M 下游引物	5'-CAT ACG AAT ACC CAC CCT ACT CG-3'	
let-7a-3-U 上游引物	5'-GTG ATA GTG TTG TAA AAT GTT-3'	148
let-7a-3-U 下游引物	5'-CTA AAA CAC CAA AAC CCT AA-3'	
ALU 上游引物	5'-TTA GGT ATA GTG GTT TAT ATT TGT AAT TTT AGT A-3'	110
ALU 下游引物	5'-ATT AAC TAA ACT AAT CTT AAA CTC CTA ACC TCA-3'	

40 例初诊慢性期、5 例加速期、7 例急变期患者。25 例对照组均为健康供髓者。本研究得到每位患者的知情同意,并获得江苏大学附属人民医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 骨髓单个核细胞(BMNC)分离和基因组 DNA 制备 抽取患者及对照组骨髓液 10 mL,经过肝素抗凝,通过 Ficoll 液(上海试剂二厂)离心分离 BMNC,根据基因组 DNA 试剂盒(美国 Gentra 公司产品)操作说明,提取基因组 DNA,经紫外分光光度仪测定光密度值确定 DNA 水平和纯度,置于-20℃保存备用。

1.2.2 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 对每例研究对象取 1 μg DNA 样本,采用亚硫酸氢钠修饰试剂盒(加拿大 Chemicon 公司),严格按照操作说明进行基因组 DNA 修饰,修饰后的样本 DNA 于-80℃保存,用于甲基化特异性 PCR。

1.2.3 实时定量甲基化特异性 PCR(PCR,RQ-MSP) 应用 Methyl Primer Express v1.0 软件(美国 ABI 公司)设计甲基化(M)和未甲基化(U)RQ-MSP 引物,选择 ALU 基因作为检测 let-7a-3 未甲基化的内参基因,见表 1。18 μL RQ-MSP 反应体系包含 1×PCR 缓冲液、MgCl₂ 4.0 mmol/L、引物 0.4 μmol/L、1.0 U 热启动 Taq DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司)以及 20 ng 修饰过的样本 DNA。反应条件:95℃ 5 min 预变性,然后 94℃ 变性 30 s、56℃(ALU 为 60℃)退火 30 s、72℃ 延伸 30 s,50 个循环扩增后再 72℃ 延伸 30 s,PCR 荧光收集设为 73℃ 30 s。溶解曲线程序为 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,60℃ 15 s。实验中设立经测序证实序列正确的 M/U 和 ALU 重组质粒作为阳性对照,无模板 DNA 的去离子水作为空白对照。用 30 g/L 琼脂糖凝胶 80 V 电泳扩增产物,1 h 后在 Gene Genius 凝胶成像仪上显像并拍照。

1.2.4 PCR 产物克隆测序 将 let-7a-3 启动子 M、U 以及 ALU 阳性的扩增产物经生工生物(上海)有限公司克隆测序,验证所得序列。

1.2.5 细胞遗传学检查 将采集的骨髓细胞采用 24 h 短期培养法制备染色体标本,然后进行 R 显带处理。按《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN)》进行核型分析。

1.2.6 分析方法 计算未甲基化的 let-7a-3 启动子标准化比率,依据公式:

$$N_{\text{unmethylation-let-7a-3}} = \frac{(E_{\text{unmethylation-let-7a-3}})^{\Delta CT_{\text{unmethylation-let-7a-3}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ALU}})^{\Delta CT_{\text{ALU}}(\text{control-sample})}}$$
$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

(1)

(2)

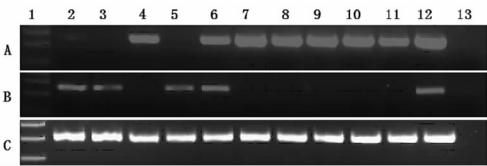
1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。用 Mann-Whitney U 检验分析对照组和 CML 组之间 let-7a-3 启动子未甲基化水平的差异,分析 let-7a-3 未甲基化水平在不同性别、CML 不同分期、不同核型之间的差异;用 Pearsons 卡方检验或者 Fishers 确切概率法分析不同组间 let-7a-3 未甲基化

阳性/阴性概率差异;采用 Spearman 秩相关进行相关性分析。通过 ROC 曲线和曲线下面积(AUC)分析 let-7a-3 未甲基化水平对 CML 的诊断价值。所有分析设定 P 值为双侧分布,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

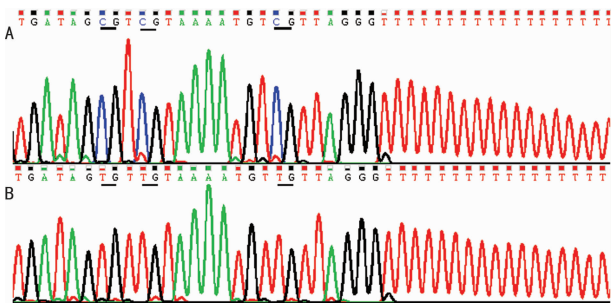
2.1 CML 患者中 let-7a-3 未甲基化态势 52 例 CML 患者中 let-7a-3 未甲基化水平为 0~35.532%(中位为 3.734%,6.427%±8.180%),显著高于对照组(0~3.266%,中位为 0.576%,0.847%±0.903%)。所有标本的 let-7a-3 未甲基化水平均参照公式(1)和公式(2)计算,以 Nunmethylation-let-7a-3≥2.67%(对照组 $\bar{x}+2s$)作为确定 let-7a-3 未甲基化阳性的标准。得出 59.6%(31/52)的 CML 患者 let-7a-3 未甲基化阳性,对照组仅 4.0%(1/25)呈 let-7a-3 未甲基化阳性,两组相比 let-7a-3 未甲基化率差异有统计性意义(P<0.01)。let-7a-3 MSP 电泳结果,见图 1。典型 CML 未甲基化阳性患者 PCR 产物测序图见图 2。

2.2 let-7a-3 未甲基化对 CML 的诊断价值 为了进一步验证 let-7a-3 未甲基化水平能否作为 CML 诊断的一个指标,本研究进行了 ROC 曲线分析(图 3),结果显示,CML 患者的 AUC 为 0.749(95%CI:0.644~0.855),以未甲基化水平为 2.68%,诊断 CML 的灵敏度和特异性分别为 58.5%和 96.0%,虽灵敏度不好,但特异性较强。



A:未甲基化;B:甲基化;C:ALU。1:100 bp DNA Ladder;2:1 例对照标本;3~11:CML 标本;12:阳性对照;13:空白对照。

图 1 let-7a-3 的 MSP 产物电泳结果



A:let-7a-3 启动子甲基化产物测序图,CpG 中的 CG 未被硫化改变,仍为 CG;B:let-7a-3 未甲基化产物测序图,CG 中的 C 均被硫化改变为 T,即为 TG。

图 2 let-7a-3 基因 MSP 产物测序图

2.3 CML 患者 let-7a-3 未甲基化与分期的关系 let-7a-3 未

甲基化频率在不同性别、异常核型之间无明显差异,但在 CML 不同分期之间存在组间差异($P=0.044$),见表 2。进一步分析发现,慢性期和加速期患者未甲基化水平分别明显高于急变期($P=0.012,0.041$),而急变期与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。

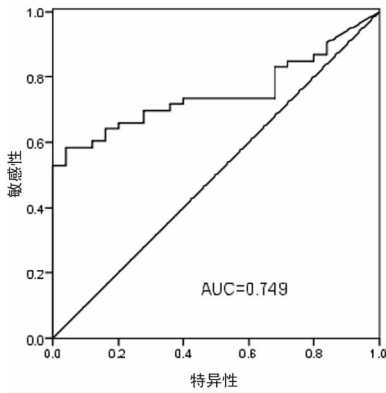
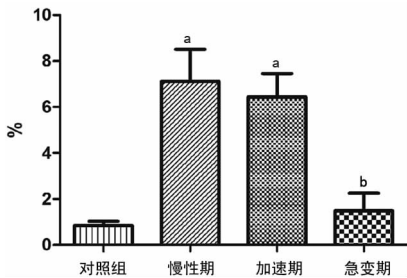


图 3 CML 患者 ROC 曲线



^a: $P<0.05$,与急变期比较;^b: $P>0.05$,与对照组比较。

图 4 对照组与 CML 患者 let-7a-3 未甲基化水平比较

2.4 let-7a-3 未甲基化与 CML 临床参数的相关性 let-7a-3 未甲基化水平与患者的年龄、BCR/ABL 融合基因转录水平之间相关系数(r)分别为 0.233($P=0.052$)、0.641($P=0.001$),揭示主要在慢性期 let-7a-3 未甲基化水平与 BCR/ABL 融合基因转录水平呈显著正相关。低甲基化阳性组中 BCR/ABL 融合基因转录水平明显高于阴性组($P=0.007$),见表 2。let-7a-3 未甲基化水平与患者的白细胞、血小板计数以及血红蛋白水平无明显相关性($P>0.05$)。

表 2 CML 患者 let-7a-3 未甲基化与临床参数的关系

项目	let-7a-3 低甲基化			<i>P</i>
	阳性 (<i>n</i> =31)	阴性 (<i>n</i> =21)	总病例 (<i>n</i> =52)	
年龄(岁)*	48.3 (15~83)	43.3 (15~50)	46.3 (15~83)	0.283
性别(男/女)	19/12	10/11	29/23	0.330
白细胞($\times 10^9/L$)*	90.37 (2.0~188.8)	94.95 (4.0~219.6)	91.86 (2.0~219.6)	0.784
血红蛋白(g/L)*	109.15 (57~180)	97.38 (73~134)	105.33 (57~180)	0.204
血小板($\times 10^9/L$)*	368 (30~963)	364 (92~870)	3 667 (30~963)	0.879
BCR/ABL*	10 209.1 (61.4~87 794.3)	268.7 (0~1 099.78)	4 244.8 (0~87 794.3)	0.007

续表 2 CML 患者 let-7a-3 未甲基化与临床参数的关系

项目	let-7a-3 低甲基化			<i>P</i>
	阳性 (<i>n</i> =31)	阴性 (<i>n</i> =21)	总病例 (<i>n</i> =52)	
染色体[<i>n</i> (%)]				0.650
单纯 t(9;22)	20(57.1)	15(42.9)	35	
t(9;22)合并其他异常	8(80.0)	2(20.0)	10	
核型检测阴性	1(50.0)	1(50.0)	2	
无数据	2(40.0)	3(60.0)	5	
分期[<i>n</i> (%)]				0.044
慢性期	24(60.0)	16(40.0)	40	
加速期	5(100.0)	0(0.0)	5	
急变期	2(28.6)	5(71.4)	7	

*:中位数(范围)。

3 讨 论

miRNA 是一种仅包含 19~25 个核苷酸序列的非编码蛋白质 RNA,其作用是在转录后水平调节靶基因的表达^[10]。已知一种 miRNA 最多能调控大约 200 种靶基因的功能。对正常细胞的增殖、分化及凋亡,miRNA 发挥至关重要的作用。因此,如果 miRNA 的表达失调,将可能导致包括肿瘤在内许多疾病的发生^[11-12]。

miRNA let-7a-3 属于 let-7 家族成员之一,目前对其在肿瘤形成中的作用还存在着争议。多数研究认为 let-7 通过抑制癌基因的表达而发挥抑癌作用,例如对 RAS 信号通路的调节^[13],以及下调 c-MYC 蛋白表达等^[14]。然而 Brueckner 等^[8]发现在健康人类胎盘、大脑、骨髓、结肠、皮肤以及肺组织中 let-7a-3 呈高度甲基化状态,而肺腺癌细胞中 let-7a-3 呈低甲基化改变,肺腺癌细胞经去甲基化药物处理后 let-7a-3 发生去甲基化而表达上调,且 let-7a-3 过表达可促进肿瘤细胞集落形成。Lu 等^[15]发现,在卵巢上皮细胞癌中,let-7a-3 低甲基化患者预后较高甲基化患者差,从而揭示 let-7a-3 可能有促进肿瘤进展的功能,并且这种功能部分是通过调节胰岛素样生长因子(IGF)系统实现的。因此从另一方面揭示了 let-7a-3 的致癌特性。对于 let-7a-3 在髓系白血病中的作用,本实验组曾经报道过,获得缓解的 AML 患者中,高表达的 let-7a-3 患者总体生存率(OS)以及无复发生存率(RFS)明显低于低表达的 let-7a-3 患者^[16]。

本实验研究结果发现在 CML 患者 BMNC 中,let-7a-3 启动子也处于显著低甲基化状态,这与 Brueckner 等^[8]在肺腺癌中的研究结果相一致,而且 let-7a-3 低甲基化水平与 BCR/ABL 转录水平呈显著正相关。因此在 CML 中 let-7a-3 低甲基化水平是伴随 BCR/ABL 融合基因转录水平增加的分子事件。众所周知,BCR/ABL 融合基因是诊断 CML 的重要依据,其扩增及转录水平有助于监测病情以及判断预后^[17-18]。本研究通过 ROC 曲线分析发现,let-7a-3 低甲基化改变对 CML 诊断的灵敏度和特异性分别为 58.5%和 96.0%,提示具有辅助诊断价值。但随着 CML 疾病进展 let-7a-3 低甲基化水平进行性下降,与 BCR/ABL 转录本水平随疾病进展而增高相反,提示 let-7a-3 低甲基化改变是 BCR/ABL 融合基因致 CML 发病过程中的一个早期事件,可能并不参与 CML 的疾病进展过程,而 let-7a-3 过甲基化的白血病细胞经过药物选择得以生存、克隆性扩

增并发生急性变。正如 Du 等^[19]发现在胃肠肿瘤形成的早期过程中 SOX17 基因发生表达上调以保护性抑制肿瘤细胞的恶性转化,但在肿瘤形成的晚期阶段则发生表达下调而促进肿瘤进展。当然,这还有待于将来的进一步研究加以证实。

总之,本研究发现 let-7a-3 低甲基化改变是 CML 慢性期的一个常见分子事件,可用于 CML 的分子辅助诊断,并且随 CML 疾病进展 let-7a-3 低甲基化水平进行性下降。

参考文献

[1] 钱军,姚冬明,林江,等.慢性粒细胞白血病患者死亡相关蛋白激酶基因甲基化[J].中华血液学杂志,2008,29(12):850-851.

[2] Nelkin BD,Przepiorka D,Burke PJ,et al. Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia [J]. Blood, 1991, 77(11): 2431-2434.

[3] Malinen T, Palotie A, Pakkala S, et al. Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation[J]. Blood, 1991, 77(11): 2435-2440.

[4] 陈芹,钱军,王翠竹,等.慢性粒细胞白血病患者 HAGE 基因启动子的低甲基化[J].江苏大学学报:医学版,2012,22(1):43-45.

[5] Sukanya S,Lynn M,Wanhua L,et al. MicroRNAs 130a/b are regulated by BCR-ABL and downregulate expression of CCN3 in CML[J]. J Cell Commun Signal, 2011, 5(3): 183-191.

[6] Xu C, Fu H, Gao L, et al. BCR-ABL/GATA1/miR-138 mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia[J]. Oncogene, 2014, 33(1): 44-54.

[7] Liu Y, Zheng W, Song Y, et al. Low expression of miR-196b enhances the expression of BCR-ABL1 and HOXA9 oncogenes in chronic myeloid leukemogenesis[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68442.

[8] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human Let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function[J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1419-1423.

[9] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科

学出版社,2007:134-138.

[10] Bartel DP. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.

[11] Png KJ,Yoshida M,Zhang XH,et al. MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer[J]. Genes Dev, 2011,25(3):226-231.

[12] Alvarez-Garcia I,Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. Development, 2011,132(21):4653-4662.

[13] Johnson SM,Grosshans H,Shingara J,et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120(5):635-647.

[14] Lyu S,Yu Q,Ying G,et al. Androgen receptor decreases CMYC and KRAS expression by upregulating Let-7a-3 expression in ER-,PR-,AR+ breast cancer[J]. Int J Oncol,2014,44(1):229-237.

[15] Lu LG,Dionyssios K,Irene A. Rigault de la Longrais,et al. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor- II expression and favorable prognosis[J]. Cancer Res,2007, 67(21):10117-10122.

[16] Li Y,Lin J,Yang J,et al. Overexpressed Let-7a-3 is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res,2013,37(12):1642-1647.

[17] Gaiger A,Henn T,Hörth E,et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression [J]. Blood,1995,86(6):2371-2378.

[18] 杨沛,谢小红,邓少丽. bcr/abl 融合基因在慢性粒细胞白血病中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2008,37(3): 252-253.

[19] Du YC,Oshima H,Oguma K,et al. Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis[J]. Gastroenterology,2009,137(4):1346-1357.

(收稿日期:2014-10-18 修回日期:2015-02-25)

(上接第 2019 页)

et al. Discordance between karyotype from amniotic fluid and postnatal lymphocyte cultures [J]. J Prenat Med, 2012,6(2):34-35.

[9] 高雪峰,邵敏杰,杨丽萍,等.羊水细胞培养染色体核型分析在产前诊断中的意义[J].中国优生与遗传杂志,2009, 17(2):45-46.

[10] 侯巧芳,吴东,楚艳,等.孕妇外周血中游离胎儿 DNA 检测在无创产前诊断中的临床应用[J].中华妇产科杂志, 2012,47(11):813-817.

[11] Shalev E,Zalel Y,Weiner E,et al. The role of cordocentesis in assessment of mosaicism found in amniotic fluid cell culture[J]. Acta Obstet Gynecol Scand,1994,73(2):119-

122.

[12] 潘小英,钟燕芳,傅文婷,等.3 405 例产前诊断的指征及其结果评价[J].生殖与避孕,2008,28(5):268-272.

[13] Breman A,Pursley AN,Hixson P,et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1 000 cases and review of the literature [J]. Prenat Diagn,2012,32(4):351-361.

[14] South ST, Lee C, Lamb AN, et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis,including postnatal and prenatal applications; revision 2013[J]. Genet Med,2013,15(11):901-909.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2015-02-13)