

· 临床研究 ·

RASSF1A 基因启动子区甲基化在胃癌阶段性发生及进展中的作用及临床意义*

滕 玥^{1,2}, 戴冬秋^{2△}, 沈文静³, 刘红波⁴

(1. 中国人民解放军沈阳军区总医院急诊科, 沈阳 110840; 2. 中国医科大学附属第四医院胃肠外科, 沈阳 110001; 3. 中国医科大学附属第一医院妇科, 沈阳 110001; 4. 中国医科大学卫生统计学教研室, 沈阳 110001)

摘要:目的 通过检测胃癌癌旁距离原发灶不同距离组织及胃癌原发灶 RASSF1A 基因启动子区甲基化状态的差异, 分析正常胃组织、癌前病变及癌组织中该基因甲基化的动态变化以及 RASSF1A 基因甲基化与胃癌原发灶病理生物学行为的关系, 探讨 RASSF1A 基因启动子区甲基化在胃癌阶段性发生及进展中的作用及临床意义。方法 采用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测距胃癌灶边缘 5、3、1 cm 组织及胃癌原发灶组织中 RASSF1A 基因甲基化状态。结果 RASSF1A 基因启动子区甲基化发生率在距胃癌灶边缘 5、3、1 cm 组织及胃癌组织中分别为 5.0%、7.5%、22.5% 及 42.5%, 从距胃癌灶边缘 5 cm 胃组织至胃癌原发灶组织中的表达中随距胃癌灶边缘距离的减少呈上升趋势, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。从组织病理学角度分析, RASSF1A 基因启动子区甲基化发生率在正常胃组织、癌前病变组织及胃癌原发灶中分别为 0.0%、17.39%、42.5%, 动态上升, 三者间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。RASSF1A 基因甲基化发生率在胃癌患者透浆膜组显著高于未透浆膜组($P < 0.05$); 在转移淋巴结数 7 枚以上组显著高于 0~7 枚组($P < 0.05$), 与胃癌胃壁浸润深度、转移淋巴结数相关, 在不同大体类型、生长方式、分化程度、性别及年龄胃癌患者间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 RASSF1A 基因启动子区异常甲基化可能与胃癌的阶段性发生及临床进展相关。

关键词: 胃肿瘤; RASSF1A 基因; 甲基化

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)17-1689-04

Promotor hypermethylation of RASSF1A gene in stage tumorigenesis and progression of human gastric cancer and its clinical significance*

Teng Yue^{1,2}, Dai Dongqiu^{2△}, Shen Wenjing³, Liu Hongbo⁴

(1. Department of Emergency, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110840, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 4. Department of Health Statistics, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To investigate hypermethylation of RASSF1A gene in stage carcinogenesis and progression of human gastric cancer and its clinical significance through detecting the difference of promoter hypermethylation of RASSF1A gene in gastric cancer tissues and the paracarcinoma tissues, and analyzing the dynamic change of hypermethylation of RASSF1A gene from paracarcinoma normal gastric tissues, precancerous tissues to the cancer site, as well as studying the relationship of hypermethylation of RASSF1A gene and clinico-pathological features of gastric cancer. **Methods** Forty patients with primary human gastric cancers were involved in this study. The methylation state of RASSF1A gene was detected by methylation-specific PCR(MSP). **Results** Promotor hypermethylation of RASSF1A gene in the corresponding 5, 3, 1cm paracarcinoma tissues and gastric cancer tissues was 5%, 7.5%, 22.5% and 42.5% respectively, which exhibited an upgrading tendency with the decrease of distance from 5cm paracarcinoma tissues to the cancer sites, and the difference among them was significant($P < 0.01$). Analyzed histopathologically, hypermethylation of RASSF1A gene of paracarcinoma normal gastric tissues, precancerous tissues and the cancer site itself was 0%, 17.4%, and 42.5% respectively, which increased dynamically, and the difference was significant among the three groups($P < 0.01$). Hypermethylation of RASSF1A was related to the penetration depth of gastric walls and also the number of lymphatic node metastasis of gastric cancer. No statistical difference of hypermethylation of RASSF1A gene was found between different gross types, growth patterns, differentiation degrees, ages and sex of gastric cancer($P > 0.05$). **Conclusion** Promotor hypermethylation of RASSF1A gene is related to stage carcinogenesis and progression of human gastric cancer.

Key words: gastric neoplasms; ras associated domain family gene 1A; methylation

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 国内外大量研究显示, 表遗传学机制在胃癌的发生及进展中起重要作用^[1-3]。

肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSG)功能丧失可通过多种途径, 现已证实 DNA 甲基化是基因突变及缺失之外 TSG

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572162, 30271477); 教育部高校博士点基金资助项目(20050159001, 20102210411001)。

△ 通讯作者, Tel: (8624)62043110; E-mail: daidq63@163.com。

失活的第 3 种机制,而且在某些情况下是其失活的惟一机制^[4]。Ras 相关结构域家族基因 1A(ras associated domain family gene 1A,RASSF1A)是已经确认的抑癌基因,与细胞周期调控、微管的稳定性、细胞的黏附和运动性以及细胞凋亡相关,可以通过多种途径抑制细胞生长、促进细胞凋亡和衰老^[5-8]。有研究表明,RASSF1A 基因启动子区发生甲基化可以引起表达缺失,进而导致肿瘤的发生,这在胃癌中已有报道^[9-10]。但是,RASSF1A 基因启动子区 CpG 甲基化在胃癌阶段发生及进展中的作用有待探讨。本研究通过检测癌旁距胃癌原发灶不同距离组织及胃癌原发灶本身 RASSF1A 基因异常甲基化的差异,结合病理学角度分析,探讨 RASSF1A 基因启动子区甲基化在胃癌阶段性发生及进展中的作用,为胃癌浸润扩散范围的评估提供新的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2006 年 1 月~8 月在中国医科大学肿瘤医院手术治疗的胃癌患者 40 例,每例患者分别采取距胃癌原发灶边缘 5、3、1 cm 组织及胃癌原发灶组织。标本取材两份,一份液氮中速冻后放入 -70 °C 冰箱冻存,另一份用甲醛固定、石蜡包埋后保存。40 例患者,其中男 30 例,女 10 例,男女比例为 3:1;年龄最大者 78 岁,最小者 29 岁,平均(61.5±11.7)岁。病例按 UICC 新 TNM 分期标准、日本胃癌处理规约及中国医科大学肿瘤医院胃癌外科分型进行分期、分型,术后经病理诊断证实,术前均未经放疗及化疗。组织病理学检查:将 40 例胃癌患者术后距癌灶边缘 5、3、1 cm 处及胃癌原发灶取材的 160 枚组织块标本制作作为石蜡切片,由 2 位病理医师按 UICC 新 TNM 分期标准、日本胃癌处理规约及中国医科大学肿瘤医院胃癌外科分型标准读片报告。

1.2 甲基化特异性 PCR 组织 DNA 提取:常规酚-氯仿-异戊醇法提取组织 DNA,紫外分光光度法检测 DNA 浓度和纯度。DNA 修饰及纯化:氢醌(hydroquinone)和亚硫酸氢钠(sodium bisulfite)购自 Sigma 公司;DNA Clean-up System 购自 Promega 公司。按文献方法进行 DNA 修饰及纯化^[11]。甲基化特异 PCR 反应:反应体系 25 μL,包括样品 DNA 2 μL,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,引物各 0.5 μL,dNTP 2 μL,Taq 酶 0.2 μL,双蒸水 17.3 μL。反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;72 °C 延伸 10 min,退火温度依据不同基因而定。以甲基转移酶 Sss I 处理和未处理的健康人外周血细胞 DNA 作为阳性对照和阴性对照,以双蒸水作为空白对照。1 000 bp DL2000 作为相对分子质量标记。引物序列,甲基化引物:上游引物 5'-GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC -3',下游引物 5'-AAC CCC GCG AAC TAA AAA CGA -3',扩增产物 94 bp;非甲基化引物:上游引物 5'-TTT GGT TGG AGT GTG TTA ATG TG -3',下游引物 5'-CAA ACC CCA CAA ACT AAA AAC AA -3',扩增产物 108 bp。电泳:取 PCR 产物 5 μL,应用 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 100 V,电泳时间 40 min,结果经激光密度扫描仪(Pharmacia LKB Ultrosan)照相进行分析。

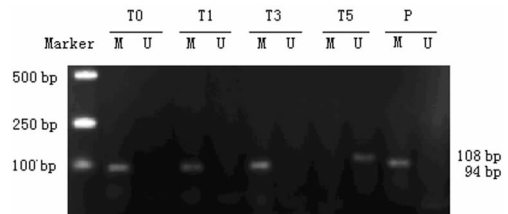
1.3 结果判断 (1)甲基化:甲基化特异引物(M)扩增出目的条带,而非甲基化特异引物(U)无条带扩出;(2)非甲基化:非甲基化特异性引物(U)扩增出目的条带,而甲基化引物(M)无条带扩出;(3)半甲基化:两对引物均扩增出目的条带,统计分析结果时将甲基化与半甲基化均计为甲基化阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。各组甲基化频率进行比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌癌旁不同距离组织及原发癌灶中 RASSF1A 基因甲基化差异 在距胃癌原发灶边缘 5、3、1 cm 组织及原发灶中的 RASSF1A 基因甲基化阳性率分别为 5.0%、7.5%、22.5% 及 42.5%,在距原发灶边缘 5、3 cm 组织的阳性率均显著低于原发灶中($\chi^2 = 15.53, P < 0.05; \chi^2 = 13.06, P < 0.05$);距原发灶边缘 1 cm 组织的 RASSF1A 基因甲基化阳性率为低于原发灶中阳性率,但差异无统计学意义($\chi^2 = 3.05, P = 0.056$)。距原发灶边缘 5 cm 组织中阳性率显著低于原发灶边缘 1 cm 组织中($\chi^2 = 5.16, P = 0.023$);距原发灶边缘 3 cm 组织中阳性率低于距原发灶边缘 1 cm 组织的阳性率,但差异无统计学差异($P > 0.05$)。由距原发灶边缘 5、3、1 cm 组织至胃癌原发灶,随距癌灶边缘距离的减少,RASSF1A 基因启动子区甲基化阳性率呈增高趋势,差异有统计学意义($\chi^2 = 22.85, P < 0.01$)。见图 1、表 1。



Marker:DNA 标准参照物 DL2000; M: 甲基化反应,U:非甲基化反应; P: 甲基化阳性对照;T0:胃癌原发灶组织;T1、T3、T5:距胃癌原发灶边缘 1、3、5 cm 组织;T0、T1、T3 甲基化阳性,94 bp;T5 甲基化阴性,108 bp;病理检测,T0、T1:胃腺癌;T3:慢性胃炎;T5:正常胃组织。

图 1 不同胃组织 RASSF1A 基因启动子区甲基化检测图

表 1 距胃癌原发灶边缘 5、3、1 cm 组织及原发癌灶中 RASSF1A 基因甲基化的差异

组织来源	n	RASSF1A		
		M+(%)	χ^2	P
C5	40	2(5.0)	22.85	<0.01
C4	40	3(7.5)		
C1	40	9(22.5)		
C0	40	17(42.5)		

C0:胃癌原发灶组织;C1:距胃癌原发灶边缘 1 cm 组织;C3:距胃癌原发灶边缘 3 cm 组织;C5:距胃癌原发灶边缘 5 cm 组织;M+:甲基化阳性。

2.2 胃癌癌灶旁正常胃组织、癌前病变组织及胃癌原发灶中 RASSF1A 基因甲基化差异 对实验所取标本进行组织病理学检查,40 例胃癌癌旁 5 cm 取材标本中正常胃组织 24 例,距胃癌原发灶边缘 5、3、1 cm 组织中癌前病变类型组织(如慢性胃炎及萎缩性胃炎等)23 例。以距胃癌原发灶边缘 5 cm 病理检测的 24 例正常胃组织作为胃正常组织组,以病理检测确定的癌前病变组织(如慢性胃炎及萎缩性胃炎等)23 例作为癌前病变组,以胃癌原发灶 40 例作为胃癌组,3 组 RASSF1A 基因甲基化阳性率分别为 0%、17.39%、42.5%,正常胃组织组 RASSF1A 基因甲基化显著低于癌前病变组及胃癌组($\chi^2 = 4.56, P < 0.05; \chi^2 = 13.39, P < 0.05$),癌前病变组 RASSF1A 基因甲基化显著低于胃癌组($\chi^2 = 4.14, P < 0.05$)。3 组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

2.3 RASSF1A 基因启动子区甲基化与胃癌临床病理学特征的关系 见表 3。

表 2 病理确定的胃正常组织、胃癌癌前病变组织及胃癌原发灶中 RASSF1A 基因甲基化差异

组织来源	n	RASSF1A		
		M+(%)	χ^2	P
C0	40	17(42.50)	24.17	<0.01
W	23	4(17.40)		
N	24	0(0.00)		

C0:胃癌组织;W:胃癌癌前病变组织;N:胃正常组织。

表 3 胃癌原发灶 RASSF1A 基因启动子区甲基化与临床病理因素的关系

临床病理因素	RASSF1A 基因			
	n	甲基化阳性(%)	χ^2	P
组织学分化程度				
分化	16	5(31.25)	1.38	>0.05
未分化	24	12(50.00)		
大体类型				
局限型	6	2(33.30)	0.82*	>0.05
浸润型	33	14(42.40)		
生长方式				
团块状/巢状	16	5(31.30)	1.38	>0.05
弥漫状	24	12(50.00)		
浸润深度				
未透浆膜	26	4(15.40)	16.30*	<0.05
透浆膜	14	13(93.80)		
转移淋巴结数				
0	12	6(22.20)	11.50*	<0.05
>0~7	15			
>7~15	7	11(84.60)		
>15	6			
年龄(岁)				
<60	14	5(35.70)	0.41	>0.05
≥60	26	12(46.20)		
性别				
男	30	12(40.00)	0.31	>0.05
女	10	5(50.00)		

*:Fisher 精确概率法。

3 讨 论

胃癌的发生是表遗传学和遗传学两大类机制共同作用的过程^[1],DNA 甲基化是表遗传学机制最常见的形式,基因启动子区异常甲基化可抑制基因表达而使其功能丧失,最终导致肿瘤的发生,DNA 异常甲基化与胃癌的发生及发展密切相关。研究发现,RASSF1A 基因启动子区异常甲基化可以引起表达缺失,进而导致肿瘤的发生,这在包括乳腺癌和肺癌在内的多种人类肿瘤中已被证实^[12-13],RASSF1A 基因启动子区异常甲基化与胃癌的发生相关^[9-10],在胃癌原发灶组织、正常组织、转

移灶组织及癌前病变组织中启动子区 CpG 岛异常甲基化已有报道。但是,正常胃组织以及与距胃癌原发灶边缘不同距离的胃组织中 RASSF1A 基因启动子区甲基化状态及与胃癌癌灶之间距离的关系还没有相关报道。

本研究从胃癌患者距癌灶边缘不同距离组织及与胃癌原发癌灶进行比较的角度分析了 RASSF1A 基因启动子区甲基化情况。结果显示,随着从癌旁组织到胃癌癌灶距离的减少,RASSF1A 基因启动子区甲基化阳性率呈现上升趋势,且不同距离组织中 RASSF1A 基因甲基化阳性率差异显著,表明 RASSF1A 基因甲基化从距癌灶边缘 5、3、1 cm 组织至胃癌癌灶中呈现逐渐升高的动态变化,这种变化趋势与胃癌患者从癌旁组织到癌灶本身临床病变变化趋势相一致,距胃癌癌灶越近的组织中异常甲基化率越高,并且在胃癌癌灶中呈现高甲基化状态,这说明 RASSF1A 基因启动子区甲基化与胃癌的发生密切相关,参与了胃癌的阶段性发生。Byun 等^[9]与 Ye 等^[10]的研究表明 RASSF1A 基因启动子区异常甲基化及导致的表达下降与胃癌的发生相关。

在组织病理学检查的基础上,本研究系统分析了正常胃组织、癌旁慢性胃炎、萎缩性胃炎等胃癌前病变组织及胃癌组织中 RASSF1A 基因启动子区甲基化率的差异。结果显示,RASSF1A 基因甲基化率在正常胃组织、癌旁胃癌前病变及胃癌组织 3 者之间差异显著,进一步说明了 RASSF1A 基因的异常甲基化参与了由正常胃组织发展为癌前病变组织以及进一步癌变的过程,是胃癌形成和演变过程中的重要事件,表明 RASSF1A 基因启动子区甲基化与胃癌的阶段性发生相关。本研究显示,RASSF1A 基因在胃癌患者的正常胃组织中呈非甲基化状态,在癌灶中呈现肿瘤特异性的甲基化改变,并且在癌前病变阶段出现,参与胃癌前病变发生,提示 RASSF1A 基因异常甲基化可能用于胃癌早期诊断及临床筛查。To 等^[14]的研究 RASSF1A 基因异常甲基化率在胃癌组织及胃肠型化生组织中分别为 25.8%及 11.1%,支持 RASSF1A 基因异常甲基化参与胃癌癌前病变发生。

本研究进一步分析 RASSF1A 基因启动子区甲基化与胃癌患者临床生物学特征的关系,结果表明 RASSF1A 基因甲基化与胃癌患者胃壁浸润深度及淋巴结转移程度相关,因而可能与胃癌患者的临床进展及转移相关。有研究表明 RASSF1A 可通过降低 JNK 与 c-Jun 的磷酸化水平及下调细胞周期素 1 阻断 JNK 通路,从而抑制肿瘤细胞的生长及浸润转移^[5]。这提示 RASSF1A 基因启动子区甲基化不仅与胃癌的阶段性发生相关,而且可能与临床进展相关。但是,RASSF1A 基因启动子区甲基化与胃癌患者癌灶的大体类型、生长方式、分化程度、患者的性别及年龄无关。Byun 等^[9]分析 RASSF1 基因在 90 例早期胃癌中的表达,结果 53.3%的胃癌患者有 RASSF1A 和(或)RASSF1B 表达缺失或降低,且 RASSF1A 表达缺失或异常降低在进展期胃癌显著高于早期癌,在低分化癌中比高分化或中分化胃癌中更常见。但是,RASSF1A 甲基化改变和胃癌的病理类型及扩散无关,揭示 RASSF1A 甲基化改变在胃癌癌变过程中常见,可能促进恶变进程,并可能与胃癌的临床分期及病理学分级密切相关。

本研究与其他研究者胃癌原发癌灶中 RASSF1A 基因甲基化阳性率相近^[15-16],但胃癌癌前病变组织中阳性率略高于其他学者研究结果。可能是标本取材来源不同,其他研究中所取癌前病变组织多是胃镜下所取单纯的胃癌癌前病变组织^[14],RASSF1A 基因呈现一定程度的异常甲基化;本研究中

所取标本为胃癌患者癌灶旁组织,这体现出 RASSF1A 基因异常甲基化是这些癌前病变组织演变为癌的重要因素。同时,本研究取癌前病变组织与胃癌原发癌灶距离较近,可能受原发癌灶直接侵袭、淋巴及血行侵袭等因素影响。另外,由于取材胃癌人群地方及种族差异、实验方法和实验条件差异也可能影响实验结果。

参考文献:

- [1] 滕玥,戴冬秋.胃癌表遗传学的研究进展[J].世界华人消化杂志,2005,13(19):2289-2293.
- [2] 沈文静,戴冬秋,滕玥,等.5-Aza-CdR 体外诱导胃癌细胞系 p16 基因去甲基化及表达增强[J].世界华人消化杂志,2007,15(19):2082-2086.
- [3] Shen WJ,Dai DQ,Teng Y,et al. Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB [J]. World J Gastroenterol,2008,14(4):595-600.
- [4] Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer [J]. Genes Dev,2004,18:2315-2335.
- [5] Whang YM,Kim YH,Kim JS,et al. RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression [J]. Cancer Res,2005,65(9):3682-3690.
- [6] Agathangelou A,Cooper WN,Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers [J]. Cancer Res,2005,65(9):3497-3508.
- [7] Shivakumar L,Minna J,Sakamaki T,et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation [J]. Mol Cell Biol,2002,22(12):4309-4318.
- [8] Song MS,Song SJ,Ayad NG,et al. The tumor suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex [J]. Nat Cell Biol,2004,6(2):129-137.
- [9] Byun DS, Lee MG, Chae KS, et al. Frequent epigenetic in-

activation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2001,61(18):7034-7038.

- [10] Ye M,Xia B,Guo Q,et al. Association of diminished expression of RASSF1A with promoter methylation in primary gastric cancer from patients of central China [J]. BMC Cancer,2007,7:120.
- [11] Herman JG, Graff JR, Myöhönen S, et al. Methylation-specific PCP: A novel PCP assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18):9821-9826.
- [12] Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours [J]. Oncogene, 2001,20(12):1509-1518.
- [13] Endoh H, Yatabe Y, Shmizu S, et al. RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication [J]. Int J Cancer, 2003,106(1):45-51.
- [14] To KF, Leung WK, Lee TL, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer [J]. Int J Cancer, 2002,102(6):623-628.
- [15] Kang GH, Lee S, Kim JS, et al. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis [J]. Lab Invest 2003,83(4):519-526.
- [16] Kang GH, Lee S, Kim WH, et al. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma [J]. Am J Pathol, 2002,160(3):787-794.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-22)

(上接第 1688 页)

- [4] 张小芳.不同剂量米索前列醇与催产素对晚期引产的效果比较 [J].延安大学学报:医学科学版,2009,7(4):63,66.
- [5] Dalenda C, Ines N, Fathia B, et al. Two medical abortion regimens for late first-trimester termination of pregnancy: a prospective randomized trial [J]. Contraception, 2010,81(4):323-327.
- [6] Fjerstad M, Sivin I, Lichtenberg ES, et al. Effectiveness of medical abortion with mifepristone and buccal misoprostol through 59 gestational days [J]. Contraception, 2009, 80(3):282-286.
- [7] Chen CY, Wang KG. Late postpartum hemorrhage after hemostatic square suturing technique: a case report [J]. J Reprod Med, 2009,54(7):454-456.
- [8] Leduc D, Senikas V, Lalonde AB, et al. Active management of the third stage of labour: prevention and treatment of postpartum hemorrhage [J]. J Obstet Gynaecol

Can, 2009,31(10):980.

- [9] Esteve JL, Gallego FG, Llorente MP, et al. Late second-trimester abortions induced with mifepristone, misoprostol and oxytocin: a report of 428 consecutive cases [J]. Contraception, 2008,78(1):52-60.
- [10] Saha S, Bal R, Ghosh S, et al. Medical abortion in late second trimester—a comparative study with misoprostol through vaginal versus oral followed by vaginal route [J]. J Indian Med Assoc, 2006,104(2):81-82.
- [11] Godinjak Z, Imsirija L, Imsirija N. Vaginal application of misoprostol for labor induction after 36 weeks of pregnancy [J]. Med Arh, 2007,61(4):218-220.
- [12] Napolitano R, Thilaganathan B. Late termination of pregnancy and foetal reduction for foetal anomaly [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2010,24(4):529-537.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-28)