

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.028

散发性大肠癌血清多肽肿瘤标志物的高通量筛选*

马中女¹ 郑焕强² 王友信³ 郭莉¹ 刁汇玲¹

(1 滨州医学院生理教研室 山东 烟台 264003; 2 滨州学院城市与环境系 山东 滨州 256603;

3 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院 北京 100069)

摘要 目的:以健康体检者和明确诊断的大肠癌患者为研究对象,对其血清进行多肽谱分析,统计分析获得大肠癌特异血清多肽峰,为大肠癌的分子诊断提供理论依据,提高大肠癌的早期诊断水平。**方法:**1)收集研究对象外周非抗凝血并记录其人口学特征,将非抗凝血进行离心分离血清并保存;2)用 Dynabeads RPC18 磁珠分离提取血清蛋白质,Bruker UltraFlex TOF/TOF 采集信号并用分析软件 Clinprot tools 2.2(Bruker)分析筛选出大肠癌血清显著差异峰;3)用 SPSS13.0 分析大肠癌患者和健康人多肽峰的差异,进行 Logistic 回归分析差异多肽对形成大肠癌的影响。**结果:**本次研究共获得 111 名健康人和 94 名大肠癌患者的血清多肽峰信息,其中 109 名健康人和 91 名大肠癌患者同时具有性别、年龄等人口学信息。筛选出差异多肽峰 105 个,其中 76 个多肽在大肠癌患者和健康人间的分布差异有统计学意义($P<0.05$)。运用 Logistic 回归分析,进入回归方程($P<0.05$)的有:年龄,质荷比(m/z)分别为 1061.10、1213.09、1607.32、1867.02、1897.95、2011.67 和 5078.81 的七种多肽。**结论:**液体蛋白芯片飞行时间质谱系统可高效、精确地筛查血清多肽。大肠癌患者与健康人的血清多肽存在差异,筛选得到的质荷比(m/z)分别为 1061.10、1213.09、1607.32、1867.02、1897.95、2011.67 和 5078.81 的七种多肽可能作为早期诊断大肠癌的潜在肿瘤标志物。

关键词:大肠癌;血清;多肽;筛选

中图分类号:R735.35 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)27-5299-05

High-throughput Screening for Tumor Peptide Markers of Sporadic Colorectal Cancer in Serum*

MA Zhong-nv¹, ZHENG Huan-qiang², WANG You-xin³, GUO Li¹, DIAO Hui-ling¹

(1 Department of Physiology, Binzhou Medical College, Yantai, Shandong, 264003, China;

2 Department of Urban and Environmental Science, Binzhou College, Binzhou, Shandong, 256603, China;

3 School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: This research was designed to screen for potential tumor peptide markers in serum in order to provide some evidences for early diagnosis, follow-up and therapy evaluation of colorectal cancer. **Methods:** 1. Fasting blood samples were collected. Plasma was separated and stored. 2. Plasma was pretreated with magnetic beads. Signals of serum peptides were collected by Bruker UltraFlex TOF/TOF. 3. Statistical analysis of the collected data to screen the peptides with statistical significance with Clinprot tools 2.2 (Bruker) and SPSS 13.0. **Results:** The serum peptide information of 111 healthy people and 94 patients was collected. 109 healthy people and 91 patients' information was complete. Of the 105 serum peptides with differential expressions between healthy and patient group, 76 peptides were statistically significant ($P<0.05$). Age and 7 of the peptide profiles (m/z 1061.10, 1213.09, 1607.32, 1867.02, 1897.95, 2011.67, 5078.81) were elected to the logistic regression equation ($P<0.05$). **Conclusions:** Magnetic bead-based sample fractionation method combined with MALDI-TOF-MS shows accurate and stable outcome. The results demonstrate that the screened 7 serum peptides are significantly correlated with occurrence of colorectal cancer and may serve as potential tumor markers for early diagnosis.

Key words: Colorectal cancer; Serum; Peptide; Screening

Chinese Library Classification: R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5299-05

前言

大肠癌是第三大最常见的癌症类型,全球每年有近 100 万新发病例,有 492000 人死于大肠癌^[1],其在所有恶性肿瘤的死亡顺位为第 3 位^[2-4]。大肠癌早期经手术治疗,5 年生存率可达 95%,但目前大肠癌的早期诊断率仅为 37%,平均 5 年生存率只能达到 20%-25%^[5,6]。因此,早期诊断和早期治疗是影响大肠癌预后的重要因素之一。

目前有多种大肠癌肿瘤相关标志物广泛应用于临床诊断,包括糖类抗原系列(CEA、CA242)、抑癌基因(p53 基因、p16 基因、SYK、结直肠腺瘤性息肉病基因)、血管内皮生长因子、Survivin 基因、磷酸酯酶 PTEN、癌基因(CD44、端粒酶)等。理想的肿瘤标志物应具有灵敏度高,特异性好,具有器官特异性,与病情严重程度、肿瘤大小或分期有关,能监测肿瘤治疗效果和肿瘤的复发并预测预后等特点。现有的大肠癌肿瘤标志物与此还有很大差距^[7,8],诊断的灵敏性或特异性较差,尤其是两者背离。

* 基金项目:滨州医学院科技计划(BY2008KJ11)

作者简介:马中女(1974-),女,硕士,博士研究生,讲师,主要研究方向:神经药理学,E-mail:mazhongnv2008@126.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-12)

运用先进的技术识别更多优良的大肠癌肿瘤标志物已成为临床上的迫切需要。

本研究运用 Clinprot 技术(液体芯片 - 飞行时间质谱技术)对大肠癌患者和健康对照组的血清多肽谱进行分析,该系统由磁珠分离系统、质谱系统、分析软件和可选的液体样品自动处理系统四部分组成,可以对血液等液体中低分子量的蛋白/多肽有效富集和分析,筛选出差具有统计学意义的多肽峰,敏感性、重复性和特异性均较好。筛选出的显著差异多肽对大肠癌临床诊断和治疗提供新的理想肿瘤标志物有重要的理论意义和实践价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究中 111 例健康组人员来自在首都医科大学附属北京

友谊医院进行常规体检的人群。入选标准为:(1)病历中无躯体疾病或精神异常史;(2)两周内无服药史。将明确诊断为严重的心血管、呼吸、泌尿、消化和血液系统具体疾病的个体予以排除。94 例大肠癌患者组来自首都医科大学附属北京友谊医院明确诊断为大肠癌的病人。大肠癌的诊断以病理诊断为金标准,排除患有或曾患糖尿病、心脑血管、肝脏、肾脏、代谢性疾病以及其它肿瘤等重要疾病人群。所有研究对象均签署知情同意,本研究经首都医科大学伦理委员会的批准通过。

1.2 血浆多肽谱分析

多肽谱分析的技术路线见图 1 所示:

1.2.1 血浆样品 供分析使用的血浆样品根据自愿原则,静脉穿刺收集清晨空腹血液,37℃ 环境中半小时凝血。采集的血液以 3000 r/min 离心 15 分钟分离血清并在 -80℃ 下保存以供蛋白组学分析使用。

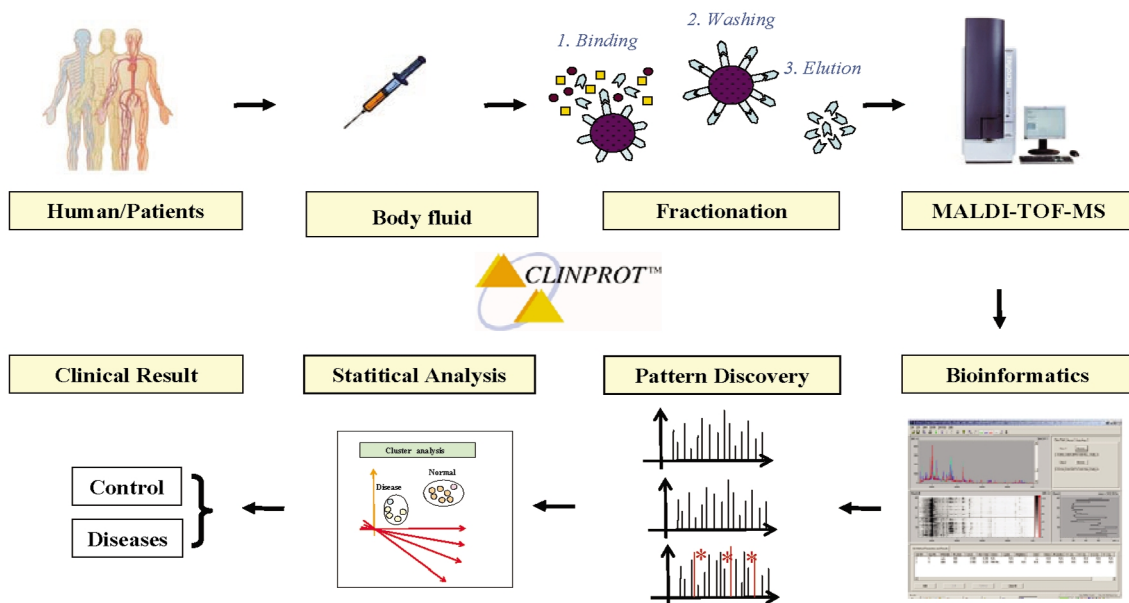


图 1 多肽谱分析技术路线

Fig.1 Technology roadmap of peptide spectrum analysis

1.2.2 血浆的磁珠预处理 根据 ClinProt™ 供应商 (Bruker Daltonics, Billerica, USA) 提供的说明,将所有血浆样品使用弱阳离子交换磁珠 (MB-WCX) 进行分离。通过结合、洗涤和洗脱三个步骤对样品进行纯化和分离。首先,在试管中加入 10 μ L 磁珠、10 μ L MB-WCX 结合液 (BS) 和 5 μ L 血样,充分混合并放置五分钟。第二步,将试管放置在磁珠分离装置上 (Bruker Daltonics, Billerica, USA) 一分钟,使磁珠吸附在管壁上。然后取出上清,加入 100 μ L 磁珠洗涤液 (WS) 充分混匀。洗涤三次后取出上清,加入 5 μ L 磁珠洗脱液 (ES),在分离装置上洗脱管壁上的磁珠两分钟。将上清转移到一个新的试管中,加入 5 μ L 磁珠固定液 (SS) 充分混合。由此产生的洗脱液在 -20℃ 下储存。

1.2.3 AnchorChip 靶芯片点样和蛋白质分析 用 2:1 乙醇和丙酮溶液当天配置 0.3g/L 的 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质溶液,用该基质溶液按 1:10 比例稀释洗脱的样品。例如,在 10 μ L 的基质溶液中加入 1 μ L 的洗脱液,取出 1 μ L 混合液点在基质辅

助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 样品靶上 (AnchorChip™, Bruker Daltonics, Billerica, USA),在室温下干燥后进行分析。使用美国布鲁克道尔顿公司的 Autoflex 飞行时间设备进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱测定。出于质量控制的目的,用 11 个平均分子质量偏差不超过 100 μ g/g 的肽作为外部标准制剂,数据采集前该标准制剂在每第八个样品上进行了再次校准。另外,用 13 个参考血样作为外部标准,变异系数小于 30% 即表示系统性能可接受。每个样品平均激光照射 400 次,每个靶位轰击 100 下,轰击四个不同的区域,检测范围为 600-10000Da,获得多肽质谱图。

1.3 统计分析

用 ClinProTools2.0 软件对样本原始质谱图 (使用总离子流) 正式分析前,先进行基线消减、校正和归一化,确定检测范围为 600-10000Da,设置信噪比 (S/N) 大于 5,质量范围不大于 0.1%。以峰面积作为定量标准,将两组间相关峰值水平的比较,筛选出大肠癌血清显著差异多肽峰。统计学分析使用 SPSS13.0

软件,符合正态分布的数据分析使用独立样本 t 检验,不符合正态分布的连续数据使用 Mann-Whitney 秩和检验。采用 Logistic 回归分析向前条件似然比法(forward conditional),以选入界值 $\alpha \leq 0.05$ 、剔除界值 $\alpha \geq 0.10$ 为标准,分析性别、年龄以及筛选出的 115 个显著差异多肽峰中对发生大肠癌的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌组和健康对照组的血清多肽图谱进行比较

大肠癌组与健康对照组的血清多肽指纹图谱(图 2)经标准化后,用 ClinProTools 软件对 2 组人群血清中多肽峰的峰值或质荷比进行分析比较,结果在 600-10000Da 范围内共筛选到 105 个血清显著差异多肽峰。经独立样本 t 检验或 Mann-Whitney 秩和检验(SPSS13.0),筛选出的 105 个多肽峰中,有 76 个多肽峰在大肠癌组和健康对照组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1,2。

2.2 Logistic 回归

以是否患有大肠癌为因变量,纳入模型分析的影响因素包括性别、年龄、105 种血清显著差异多肽峰。通过 Logistic 回归分析向前条件似然比法(forward conditional)共得出有意义的相关因素 8 项(P 均 < 0.05): 年龄、质荷比(m/z)分别为 1061.10、1213.09、1607.32、1867.02、1897.95、2011.67 和 5078.81 的七种多肽。其中年龄、质荷比(m/z)为 1213.09、1867.02、1897.95 的多肽回归系数(B)为正值,OR 值、95%CI 的上限和下限值均 > 1 ,说明随着年龄增长患大肠癌的危险增高,每增大一岁,患大肠癌危险度增加 2.714 倍,这 3 种多肽在血清中的含量升高提示可能患大肠癌;质荷比(m/z)为 1061.10、1607.32、2011.67 和 5078.81 的多肽回归系数(B)为负值,OR 值、95%CI 的上限和下限值均 < 1 ,说明这 4 种多肽在血清中含量降低提示可能患大肠癌(表 3)。经计算,预测灵敏度为 97.8%,95%可信区间为 96.3%-99.3%,特异度为 97.2%,95%可信区间为 95.7%-98.7%(表 4)。

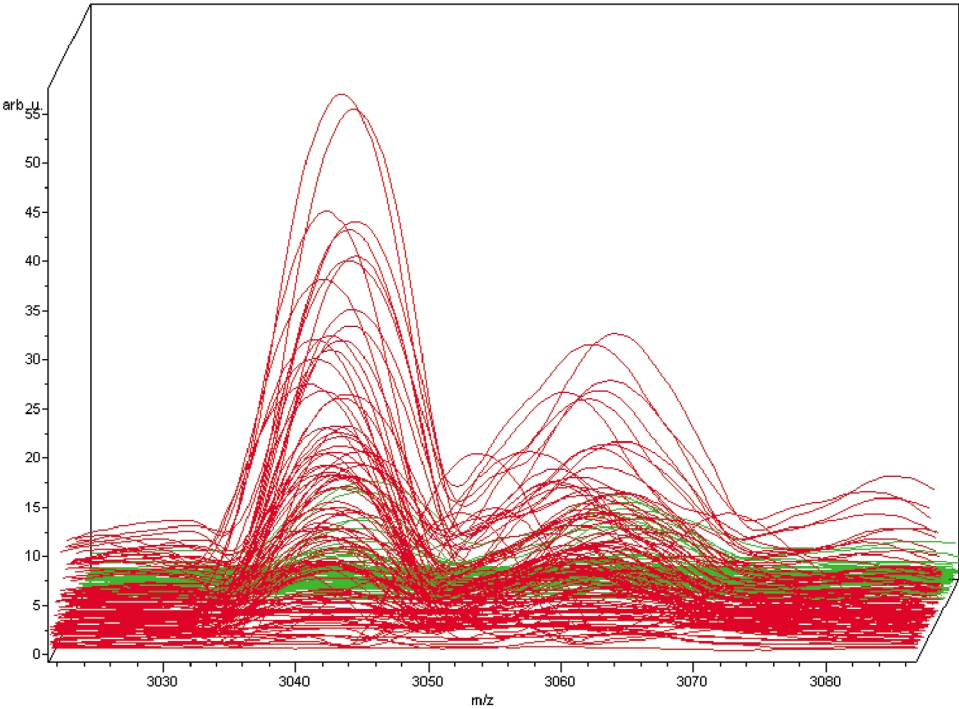


图 2 血清多肽指纹图谱(局部):红色曲线代表大肠癌组;绿色曲线代表健康对照组

Fig.2 Serum peptide fingerprint (partial); The red curve on behalf of the colorectal cancer group; Green curve on behalf of the health control group

表 1 大肠癌特异血清多肽峰(t 检验)
Table 1 Colorectal cancer-specific serum peptide peak (t test)

变量 (Variable)	多肽 (Polypeptide m/z)	P 值 (P-value)	变量 (Variable)	多肽 (Polypeptide m/z)	P 值 (P-value)
X10	1061.10	<0.001	X46	2486.11	0.014
X11	1068.31	<0.001	X49	2881.90	0.001
X14	1083.62	0.001	X50	2899.73	0.001
X17	1279.46	0.022	X89	6086.35	0.010
X43	2367.09	<0.001	X91	6485.20	<0.001
X44	2378.64	<0.001	X94	6629.74	0.008
X45	2388.55	<0.001	X99	7919.92	<0.001

表 2 大肠癌特异血清多肽峰(t 检验)
Table 2 Colorectal cancer-specific serum peptide peak (t test)

变量 (Variable)	因素 / 多肽 (Factors/polypeptide)(m/z)	P 值 (P-value)	变量 (Variable)	多肽 (Polypeptide)(m/z)	P 值 (P-value)	变量 (Variable)	因素 / 多肽 (Polypeptide m/z)	P 值 (P-value)
X2	年龄	<0.001	X42	2355.09	<0.001	X77	4964.38	0.015
X8	1049.17	<0.001	X47	2646.92	<0.001	X79	5078.81	0.001
X15	1099.58	<0.001	X48	2863.40	<0.001	X80	5173.16	<0.001
X20	1505.5	<0.001	X49	2881.90	0.001	X81	5191.24	<0.001
X23	1607.32	<0.001	X51	2912.28	<0.001	X82	5210.09	0.001
X24	1641.44	<0.001	X52	3040.47	<0.001	X83	5668.16	<0.001
X25	1848.51	<0.001	X53	3060.80	<0.001	X84	5738.11	0.001
X26	1867.02	<0.001	X54	3159.10	0.011	X88	6057.23	0.004
X27	1889.05	0.004	X55	3180.26	0.021	X90	6449.41	<0.001
X28	1897.95	0.001	X56	3198.01	0.001	X92	6540.95	<0.001
X29	1935.67	<0.001	X57	3241.10	0.039	X93	6578.10	<0.001
X30	1981.15	<0.001	X59	3429.20	0.020	X95	6981.22	<0.001
X31	2011.67	<0.001	X61	3473.08	0.001	X96	7002.86	<0.001
X32	2023.05	<0.001	X62	3929.57	0.001	X97	7058.84	<0.001
X33	2033.88	<0.001	X64	4093.64	0.004	X98	7765.05	<0.001
X34	2044.73	<0.001	X71	4558.42	<0.001	X100	8136.02	0.001
X35	2065.83	<0.001	X72	4574.45	0.001	X101	8283.36	0.002
X36	2085.89	<0.001	X73	4591.89	0.016	X104	8764.96	0.007
X37	2190.45	<0.001	X74	4640.28	0.002	X105	8934.72	0.033
X39	2236.10	0.017	X75	4742.92	<0.001	X106	9091.15	<0.001
X40	2256.54	<0.001	X76	4760.94	0.001	X107	9288.24	<0.001
X41	2277.62	<0.001	-	-	-	-	-	-

表 3 Logistic 回归结果
Table 3 Logistic regression results

变量名 (Variable name)	因素 (Variable)	回归系数 (Regression coefficient)	P 值 (P-value)	经验值(B) (Exp B)	经验值的 95%置信区间 Exp(B)的 95%CI	
					下限(Lower limi)	上限(High limit)
	截距	-34.444	0.015	0.000		
X2	年龄	0.998	0.015	2.714	1.214	6.067
X10	多肽 1061.10	-0.086	0.018	0.918	0.855	0.986
X16	多肽 1213.09	0.185	0.015	1.203	1.037	1.396
X23	多肽 1607.32	-0.454	0.017	0.635	0.437	0.923
X26	多肽 1867.02	0.430	0.018	1.537	1.076	2.194
X28	多肽 1897.95	0.068	0.011	1.071	1.016	1.129
X31	多肽 2011.67	-0.050	0.015	0.951	0.913	0.990
X79	多肽 5078.81	-0.221	0.028	0.802	0.659	0.976

表 4 预测模型评价
Table 4 Prediction model evaluation

预测诊断 (Predict the diagnosis)	金标准(Gold standard)		合计 (Total)
	大肠癌患者 (Patients with colorectal cancer)	健康对照者 (Healthy Donor)	
大肠癌患者(Patients with colorectal cancer)	89	3	92
健康对照者(Healthy Donor)	2	106	108
合计(total)	91	109	200

Logistic 回归方程为:

$$\text{LogitP} = -34.444 + 0.998x_2 - 0.086x_{10} + 0.185x_{16} - 0.454x_{23} + 0.430x_{26} + 0.068x_{28} - 0.050x_{31} - 0.221x_{79}$$

3 讨论

大肠癌是消化系统常见恶性肿瘤,发病率和死亡率无论在

发达国家还是发展中国家均呈上升趋势。早期诊断和复发的早期检测是有效治疗大肠癌的关键。肿瘤标志物检测是继影像诊断和病理诊断后临床上最常用的肿瘤诊断方法之一,血清中肿瘤标志物的检测有助于大肠癌患者的早期发现和预后评估。目前已有大量血清肿瘤标志物广泛应用于临床诊断,但是至今未发现灵敏性和特异性均较高的理想肿瘤标志物。

高通量蛋白质组学技术的出现,尤其是质谱技术的高速发展,为检测、识别出更多新的生物标志物提供了技术上的保证,对提高恶性肿瘤早期诊断率有重要价值。表面增强激光解析飞行时间质谱技术(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)最早应用于肿瘤的早期诊断^[9,10],是一种新兴的蛋白质组学研究方法。该技术使用蛋白芯片技术分离纯化蛋白,并应用飞行时间质谱和软件分析来寻找肿瘤的早期标志物。SELDI-TOF-MS技术已用于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤早期诊断研究^[11-13]。但该技术还需要进一步的完善^[14,15],如重复性较差,目标蛋白结合在芯片上不能用于直接鉴定,对血清中低浓度的标志物检测灵敏度低。

目前应用最广泛的CEA对大肠癌诊断的灵敏度仅为67.2%,特异度为80.4%,合理选择多种肿瘤标志物联合检测可以提高诊断的准确性,也是大肠癌诊断的必然趋势。冀子中^[16]等采用4种肿瘤标志物(CA50, CA199, CA242和CA242)联合检测在大肠癌,灵敏度为82.5%,特异性为67.6%。何庆泗^[17]等联合检测4种肿瘤标志物(SA, PA, CA242和CA242)对大肠癌进行定性诊断,SA, PA, CA242联合检测的灵敏度为100%,特异性为63.46%。不同种类肿瘤标志物的联合诊断不同程度上提高了大肠癌诊断的灵敏度和特异度,但距离理想肿瘤标志物相去尚远。

为提高灵敏度和特异度,德国Bruker公司的ClinProt技术应运而生,将本来固定住芯片上进行的样品纯化和富集过程改为用磁珠进行,有疏水磁珠、金属螯合磁珠、阴离子和阳离子交换磁珠等不同功能的磁珠,而且磁珠颗粒小,总表面积大,可与样品充分接触,可捕获血清中多种类、低丰度的蛋白^[18]。ClinProt系统操作简单、快速,只需几次简单的混匀、洗涤和洗脱过程即可完成前处理。此外, ClinProt质谱系统中,样品靶采用最新的AnchorChip专利技术,表面具有疏水作用基团,中央具有亲水基团,溶剂蒸发时样品液滴可浓缩锚定至600um,大大增加了分析浓度,相对于一般金属靶灵敏度可提高10-100倍,进一步提高了质谱检测的灵敏度和分辨率^[19]。ClinProTools软件易于应用后台处理,可进行数据可视化、归纳和采集,同时可以利用蛋白质表达谱数据建立预测模型,与一般质谱检测结果处理软件相比具有可视化的直观性和各种不同的数学算法等特点^[20]。

本研究应用液体芯片-飞行时间质谱技术对血清中的多肽肿瘤标志物进行高通量筛查,可以涵盖血清中小分子(<20kd),痕量(<1000 μL/L)蛋白或多肽,增加了大肠癌肿瘤标志物的选择范围,敏感性和重复性良好。大肠癌组与健康对照组血清多肽存在差异,筛选出105个显著差异血清多肽峰。经统计分析,76个血清多肽在两组间的差异有统计学意义,7个血清多肽进入Logistic回归方程,具有潜在的诊断意义,为进一步的序列鉴定和生物学意义的研究奠定了基础。

本研究采用回归预测方法,可筛选出与结果变量有密切关系的解释变量。建立的预测诊断模型将多种大肠癌肿瘤标志物联合起来,灵敏度为97.8%,特异度为97.2%,均远高于此前的诊断方法。本研究结果具有一定的时间价值,可以为进一步提高大肠癌诊断率提供基础。由于样本有限,预测模型的优化需继续收集血样以进行检测验证。另外,在最终确定预测模型后还需对特异多肽进行鉴定以应用于临床实践。

综上所述, ClinProt系统可生成高质量的血清多肽表达谱、可区分癌症患者和健康人的蛋白质组指纹,结合MALDI-TOF/TOF鉴定差异蛋白质,具有高效、快速、高通量、高灵敏度和高特异度的特点,对筛选、鉴定肿瘤标志物带来了新的希望。

参考文献(References)

- [1] Weitz J, Koch M, Debus J, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2005, 365: 153-165
- [2] 姜艳红, 李小平. 多种血清标志物联合检测在大肠癌诊断中的应用[J]. 中外医疗, 2010, 33: 18-19
Lou Yan-hong, Li Xiao-ping. Diagnosis values of combined detection of serum tumor markers in large intestinal cancer [J]. China Medical Treatment, 2010, 33: 18-19
- [3] Li XP, Xie ZY, Fu YF, et al. Colorectal cancer concealment predicts a poor survival: a retrospective study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7): 4157-4160
- [4] Hwang H. Colorectal Cancer Screening among Asian Americans[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7): 4025-4032
- [5] 邹鸿志, 郝宝铭, 赵认, 等. 大肠癌患者血清中p16基因启动子畸变甲基化的检测[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(7): 499-501
Zou Hong-zhi, Yu Bao-ming, Zhao Ren, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients [J]. Chin J Surg, 2002, 40(7): 499-501
- [6] Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D, Binczak-Kuleta A, et al. Thymidylate Synthase Gene Polymorphism and Survival of Colorectal Cancer Patients Receiving Adjuvant 5-Fluorouracil[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013[Epub ahead of print]
- [7] Duffym, Van Dalen A, Haglund C, et al. IGF I and IGF II in relation to colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 1999, 83(1): 15
- [8] Schenk JM, Riboli E, Chatterjee N, et al. Serum retinol and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(4): 1227-1231
- [9] Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomic approaches to tumor marker discovery[J]. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126(12): 1518-1526
- [10] Strenziok R, Hinz S, Wolf C, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: serum protein profiling in seminoma patients[J]. World J Urol, 2010, 28(2): 193-197
- [11] Hlavaty JJ, Patin AW, Shue MJ, et al. Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8kDa serum marker for Prostate cancer[J]. Urology, 2003, 61: 1261
- [12] Cho WC, Yip TT, Yip C, et al. Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 43-52

从表 3 可以看出,个人有无病史对该基因突变的耳聋也没有直接的关系。这都说明这类耳聋都是先天的基因决定的,与出生方式及后来生活的外部因素无明显关联。同时也说明对新生儿进行听力筛查的同时融入耳聋基因筛查是非常必要的。

临床上很多耳聋患者的父母听力都是正常的,这说明大部分耳聋基因都是隐性遗传的,父母仅是易感基因的携带者,但很可能会生育先天性耳聋的患儿。若先证者聋病基因检测结果为阳性,多数情况下其父母再生育聋儿的风险为 25%,再次怀孕时必须进行胎儿的产前诊断,这对优生优育具有深刻指导意义。

通过上述的听力筛查与研究,儿童和青少年患有遗传性耳聋的比率超出了我们的想象,这些耳聋需要早筛查和早治疗,有利于儿童的语言学习和生活能力的培养等。虽然我们在黑龙江做耳聋基因筛查是部分的人群,由于他们是随机来我院就诊,在某种程度上也能反映出黑龙江地区耳聋致病基因的情况。这对今后做好黑龙江地区婴幼儿听力筛查和早期诊断十分有意义,为今后基因致聋的预防和控制提供了很好的途径。因此,要积极开展耳聋的产前诊断,这必将为我国聋人家庭及通过聋病基因筛查出的携带者家庭中防止聋儿的出生做出它应有的贡献。需要指出的是黑龙江是一个多民族的地区,有研究表明致聋基因突变有着明显的地域性和种族差异,全面而准确的描绘黑龙江省地区耳聋基因的概况,还需要进一步调查研究。

参考文献(References)

- [1] Zhu Yu-hua, Zhai Suo-qiang, Dai Pu, et al. Relevance Chinese population GJB2 gene variation and the genetic susceptibility to age-related hearing loss analysis [J]. Chinese Journal of Otolaryngology, 2008, 6(4): 375-380
- [2] Jiang Lu, Fengn Yong, Chen Hong-sheng, et al. Hunan area China non syndromic deafness patients with mutations of the SLC26A4 gene[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2010, 24(13): 587-591
- [3] Liu Ming, Xu Zhi-yong, Gao Guo-feng, et al. The mutation analysis of SLC26A4 IVS7-2A>G gene of hereditary deafness pedigrees [J]. Chinese Journal of Otolaryngology, 2009, 7(3):234-236
- [4] Shi Ming, Yang Yi-bing, Zhao Mei, et al. Deafness gene analysis of cochlear implant children parents hearing normal phenotype [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2012, 26(19)
- [5] Bo Yun-fei, Lv Xiao-guang, Wang Yang, e al.Site analysis of 22 cases of pathogenic genes in patients with non syndromic hearing loss mutation [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2010, 30 (3): 390-393
- [6] Prez and TR, Agapian JV, Bohlman MC. RNA mutation associated with both antibideafness[J]. Nat Genet, 1993, 4(3): 289-292
- [7] Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss [J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(10): 1589-1597
- [8] Li Z, Li R, Chen J, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss [J]. Hum Genet, 2005, 117 (1): 9-15
- [9] Zhang Yan, Dai Pu, Xue Xi-jun, et al.Study on mtDNA gene mutation and GJB2 military noise induced hearing loss group [J]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2009, 17(6): 137-139
- [10] Morton CC. Genetics,genomics and gene discovery in the auditory system[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(10): 1229-1240
- [11] Abe S, Usami S, Shinkawa H, et al. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese[J]. J med Genet, 2000,37(1):37-41
- [12] Zhu Yi-ming, Guo Yu-fen, Liu Xiao-wen, et al. The susceptible gene of deafness deaf mute Students in Shanxi Province, epidemiological studies[J]. Journal of Audiology and Speech Pathology, 2010, 18 (3): 225-228
- [13] Li Qi, Fang Ru-ping, Huang De-liang, et al. A comparative study of "Xinjiang Han and Uighur deafness gene mutations [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2010, 24 (1): 11-15
- [14] Tao Zheng, Ma Yan, Ouyang Zhi-guo, et al. 205 cases of congenital non syndromic deafness in children with GJB2 gene mutation analysis [J].Journal of Audiology and Speech Pathology, 2010, 18 (1):67-68
- [15] Hui Pei-lin, Guo Yu-fen, Bao Xiao-lin, et al. The frequency of mutation analysis of GJB2 China northwest deafness pedigrees gene [J]. Chinese Journal of Otolaryngology, 2008, 6 (4):385-388
- [16] Wang Bing, Yao Hong-bing, Xu Jie, et al. Syndromic deafness in children with GJB2 235delC and 12S rRNA mitochondrial DNA A1555G mutation analysis [J]. Journal of Third Military Medical University, 2009, 15: 1451-1452
- [17] 何庆泗, 张楠, 姜希宏. 4 种肿瘤标记物对大肠癌定性诊断价值的研究[J]. 山东医科大学学报, 2000, 38(1): 23-25
- [18] He Qing-si, Zhang Nan, Jiang Xi-hong. Value of 4 tumor markers in diagnosis of colorectal cancer [J]. Acta Academiae Medicinae Shandong, 2000, 38(1): 23-25
- [19] Hartwig S, Kotzka J, Müller H, et al. Enhancing mass spectrometry based serum profiling by a combination of free flow electrophoresis and ClinProt[J]. Arch Physiol Biochem, 2009, 115(5): 259-266
- [20] Du J, Yang S, Lin X, et al. Use of anchorchip-time-of-flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer[J]. Diagn Pathol, 2010, 5: 60
- [21] He A, Bai J, Huang C, et al. Detection of serum tumor markers in multiple myeloma using the CLINPROT system [J]. Int J Hematol, 2012,95(6): 668-674

(上接第 5303 页)

- [13] Okamoto A, Yamamoto H, Lmei A, et al. Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions[J]. Oncol Rep, 2009, 21(1): 73-79
- [14] Diamandis EP. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems [J]. J Nat Cancer Inst, 2004, 96(5): 353-356
- [15] Ruan SL,Wang R, Chen XY, et al. Initial research on FTIR spectroscopy of lyophilized serum from colorectal cancer patients [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(2): 354-358
- [16] 冀子中, 詹利永. 肿瘤标记物联合检测在大肠癌诊断及随访中的价值[J]. 中华消化杂志, 2004, 24: 237-238
- [17] Ji Zi-zhong, Zhan Li-yong. Combined detection of tumor markers in colorectal cancer diagnosis and follow-up value[J]. Chin J Dig, 2004,