论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409053

基于蛋白质组学技术筛选唐氏妊娠母体血清蛋白标志物的研究

姚 远[1],张 波[1],蒋 滢[2],罗 娟[1],吴玉娇[1],姚 宏[3] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:检验科,全军检验医学中心[1],妇产科产前诊断中心[3];100091 北京,解放军第309医院检验科[2])

[摘要] **目的** 筛选唐氏(DS)妊娠母体血清蛋白标志物,初步验证其临床应用价值。**方法** 收集确诊为DS妊娠的母体血清(DS组)和正常孕妇血清标本(对照组)各6例(均为16孕周采集),经二维凝胶电泳(2-DE)获得2组血清蛋白电泳图像,比较2组间蛋白含量变化,选取差异显著的蛋白质点进行生物质谱分析与鉴定,并采用Western blot方法验证筛选获得的血清蛋白标志物在DS妊娠母体血清中的变化情况($n=12$)。**结果** 通过2-DE图谱分析,共筛选出29个表达显著差异的血清蛋白质点。从中选取6个表达差异较大的蛋白质点,经生物质谱技术分析和NCBI数据库搜索与匹配,发现CFHR1和Kininogen 1等10个蛋白质与其匹配的可能性较大(匹配分值>66分)。Western blot结果显示,CFHR1和Kininogen 1在DS组的积分光密度值分别为(5 687.0±727.8)和(133 451.8±32 118.8),均明显高于对照组水平[(1 414.1±715.6)($P<0.01$)和(33 073.9±14 390.4)($P<0.05$)]。**结论** 2-DE和生物质谱分析是筛选蛋白质标志物的可靠方法,Western blot结果证实CFHR1和Kininogen 1的异常变化可能与DS妊娠密切相关,有望成为DS早期产前筛查的母体血清蛋白新标志物。

[关键词] 唐氏综合征;CFHR1;Kininogen 1;母体血清;产前筛查
[中图法分类号] R446.112; R596.104; R714.55 [文献标志码] A

Prenatal maternal serum screening for Down's syndrome based on proteomic techniques

Yao Yuan[1], Zhang Bo[1], Jiang Ying[2], Luo Juan[1], Wu Yujiao[1], Yao Hong[3] ([1]Department of Laboratory Medicine, Center of Laboratory Medicine, [3]Center of Prenatal Diagnostics, Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Laboratory Medicine, No. 309 Hospital of PLA, Beijing, 100091, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen serum biomarkers of Down's syndrome (DS) in the maternal serum and evaluate their values in clinical practice. **Methods** Maternal serum samples from 6 pregnant women who were confirmed to be carrying DS fetuses (DS group) and 6 normal pregnant women with non-DS pregnancies (control group) in the second-trimester were collected in our prenatal diagnostic center. The samples were analyzed by 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE) to screen the proteins with different expression for potential predictive biomarkers of DS-affected pregnancies. Then the serum proteins expressed most differentially in DS group were identified by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Differential levels of complement factor H-related protein 1 (CFHR1) and kininogen 1 were further verified by Western blotting. **Results** The analysis of 2-DE results revealed 29 protein spots having significantly differed expression levels between DS and control groups. Then several differentially expressed proteins, including CFHR1 and kininogen 1, were successfully identified by MALDI-TOF-MS. Western blotting indicated the integrated density values of CFHR1 and kininogen 1 were 5 687.0 ±

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2012gg-yyjs10046);第三军医大学成果转化基金(2013XZH04)
[通信作者] 张 波,E-mail: zhangbocq@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.018.html(2015-01-05)

727.8 and 133 451.8 ± 32 118.8 respectively in DS group, significantly higher than those in control group (1 414.1 ± 715.6, $P < 0.01$, 33 073.9 ± 14 390.4, $P < 0.05$). **Conclusion** 2-DE and mass spectrometry analysis is a reliable method for screening protein markers. Western blotting confirms that the differential expression of CFHR1 and kininogen 1 are involved in DS-affected pregnancies, and might serve as potential predictive biomarkers for prenatal screening.

[**Key words**] Down's syndrome; CFHR1; Kininogen 1; maternal serum; prenatal screening

Supported by the Tackling Project of Science and Technology of Chongqing (CSTC2012gg-yyjs10046) and the Project of Achievement Transformation Foundation of Third Military Medical University (2013XZH04). Corresponding author: Zhang Bo, E-mail: zhangbocq@aliyun.com

唐氏综合征(Down's syndrome,DS),即21三体综合征,是一种由染色体非整倍性异常所致的常见遗传性疾病[1],临床表现为智力低下,体格发育畸形,并伴有多器官功能异常[2]。DS患儿一旦出生,即无有效治疗方法,患者无自理生活能力,生活质量严重下降[3],给社会及家庭造成极大的负担。因此,探讨DS早期妊娠相关的母体血清新标志物,以提高产前筛查效能,尽量减少该类患儿的出生,具有重要的社会意义。本研究以蛋白组学技术和生物质谱分析为基础,在DS母体血清中筛选并鉴定了多个异常表达的蛋白质,进而采用蛋白质印迹Western blot分析法对其中的Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)和Kininogen 1含量变化进行初步验证,以评估其作为DS早期筛查母体血清蛋白标志物的可行性。

1 资料与方法

1.1 标本收集

收集第三军医大学西南医院产前诊断中心的孕中期进行产前筛查的孕妇血液标本(年龄为20~35岁),室温静置待血液凝集后,离心(10 000 r/min)10 min,分离血清置于-80 ℃保存备用。选取其中染色体检查并经引产后病理解剖确诊为唐氏胎儿的18例母体血清标本为实验组(DS组),另外随机挑选18例产后确认为无唐氏综合征的正常孕妇血清作为对照组(Control组),2组的血清标本均取自第16孕周。本研究由第三军医大学西南医院伦理委员会审核同意,其中所有采样患者均已签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 碘乙酰胺(IAA)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(Thiourea)、低熔点琼脂糖、超纯尿素(Urea)、溴酚蓝、考马斯亮蓝G250、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-1-丙磺酸(CHAPS)、载体两性电解质(Carrier ampholyte,pH3-10 NL)、IPG覆盖油、丽春红染色液和彩色预染蛋白质分子量标准均购自碧云天公司;甘油(Glycerol)、甘氨酸(Glycine)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸胺(AP)、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Acrymide,30%)、甲叉双丙烯酰胺(BIS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自博士德公司;牛血清白蛋白购自美国Sigma公司;考马斯亮蓝R350和13 cm (pH 3~10 NL)非线性IPG胶条购自GE healthcare公司;兔抗Complement factor H-related protein 1 (CFHR1)多克隆抗体(ab103162)和兔抗Kininogen 1单克隆抗体(ab124737)购自英国Abcam公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体(A0208)购自碧云天公司。

1.2.2 主要仪器 Hofer SE 600电泳系统(E Amersham, USA),IPGphor等电聚焦电泳仪(mersham pharmacia biotech, USA),干胶仪(Bio-Rad, USA),扫描仪UMax Powerlook 2100XL(E Amersham, USA),MALDI-TOF-MS质谱仪(ABI Company, USA),Western blot电泳转膜仪及发光成像仪(Bio-Rad, USA),Bio-Tek ELX800光吸收酶联免疫检测仪(上海天呈科技)。分析软件:图像分析软件Imagemaster 2D Elite 4.01(Bio-rad, USA)和Imagemaster 5.0(GE healthcare, UK),Western blot光密度分析软件Quantity One (Bio-Rad, USA)。

1.2.3 母体血清蛋白的准备与定量 在对照组和DS组中各选6例标本,分别从各标本中取血清200 μL,混匀成1 200 μL混合样本。而后从2组中各取400 μL血清,12 000 r/min离心10 min(4 ℃),弃除上层脂类,保留中间层稀释成备用样本。0.22 μm滤膜过滤后,除去高丰度蛋白,以5K超滤管浓缩除盐。考马斯亮蓝G250蛋白浓度定量后,标本置-80 ℃保存,备用。

1.3 方法

1.3.1 二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 参照相关文献[4-5]进行血清蛋白2-DE操作,以预处理的血清蛋白120 μg上样,13 cm (pH 3~10 NL)非线性IPG胶条水化后,在30 V→12 h,500 V→1 h,1 000 V→1 h,8 000 V→6 h,500 V→4 h条件下进行第一向等电聚焦电泳。而后速将IPG胶条转移至平衡缓冲液A液(其中含0.2%的二硫苏糖醇)和B液(含3%的碘乙酰胺),分别平衡15 min

后进行第二向电泳，条件为：15 mA/胶电泳 30 min，接着 30 mA/胶继续电泳至溴酚蓝离胶下缘 0.5 cm 为止。2 份混合样本均重复电泳 3 次以降低组内误差，硝酸银染色凝胶胶片[6]，干后保存备用。

1.3.2 2-DE 的图像分析 凝胶胶片经扫描和软件处理后获得血清蛋白图像。以图像分析软件 Imagemaster 2D Elite 4.01 对 Control 组和 DS 组的凝胶图像分别进行信号强度检测，背景消减与匹配、校正，生成平均凝胶图像，以 Labworks™ Analysis 软件扫描蛋白点相应光密度值。2 组间蛋白差异采用 t 检验进行分析，以 $P<0.05$ 且 2 组间蛋白量相差 1.5 倍以上视为差异具有统计学意义。

1.3.3 生物质谱分析与蛋白鉴定 切取 2-DE 胶片上的差异蛋白质点，经脱色、脱水、还原等处理后，与基质液混合充分，取 3 μL 混合液点样，自然风干。MALDI-TOF-MS 质谱仪对点样板进行分析处理，得到相应蛋白的肽指纹质谱图，并通过蛋白序列数据库（NCBI，美国生物技术信息中心）进行蛋白搜索与匹配，匹配得分值≥66 分视为该蛋白质序列同数据库中某条蛋白序列的匹配可能性较大，具有统计学意义（$P<0.05$）。

1.3.4 Western blot 检测 从对照组和 DS 组中各取 12 例标本，依次经 12% SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后，以兔抗 CFHR1 多克隆抗体（ab103162，1∶1 000）和兔抗 Kininogen 1 单克隆抗体（ab124737，1∶10 000）为一抗，以辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（H + L）抗体（A0208）为二抗，Western blot 条带用发光成像仪扫描获得蛋白带积分光密度值，对已鉴定的 CFHR1 和 Kininogen 1 蛋白水平变化进行比较和验证。

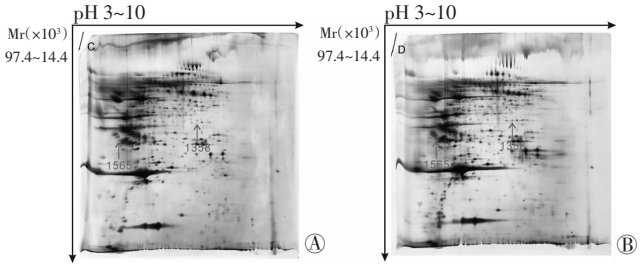
1.4 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 GraphPad Prism 5.0（GraphPad Software，San Diego，CA）进行统计分析，2 组间比较采用非配对 t 检验，多组间显著性检验用单因素方差分析（one-way ANOVA）。

2 结果

2.1 血清蛋白 2-DE 图谱分析

由对照组和 DS 组 3 次 2-DE 图谱所产生的平均凝胶图像结果（图 1）显示，2 组蛋白质图谱类似，斑点清晰可见，对照组的蛋白质点数为 612～754 之间，DS 组蛋白点约为 648～731 之间。2 组蛋白质点主要集中在相对分子质量（35～85）×10^3、pI 4.5～7.5 区域，蛋白质斑点分布比较集中，提示大部分血清蛋白质的相对分子质量和 pH 都分布在弱酸弱碱性范围内，极碱性、极酸性和相对分子质量过大或较小的蛋白质均较少。将 2 组 2-DE 图像中的蛋白质点进行组内统计和组间比较，共筛选出 29 个表达有显著差异的血清蛋白，其强度灰度值见表 1。



对照组（A）和 DS 组（B）蛋白总上样量均为 100 μg，SDS-PAGE 电泳凝胶浓度为 12.5%；红色箭头和数字分别标示 CFHR1 和 Kininogen 1 两蛋白质点在 2-DE 电泳图谱上的位置

图 1 2 组母体血清总蛋白 2-DE 电泳结果（$n=6$）

表 1 差异蛋白质点的灰度值比较（$n=3, \bar{x} \pm s$）

蛋白质点编号	对照组	DS 组
1358	0.006 0 ± 0.001 0	0.023 7 ± 0.003 4
1565	0.026 5 ± 0.000 3	0.066 2 ± 0.003 1
1864	0.035 4 ± 0.002 5	0.1203 ± 0.013 6
1773	0.099 7 ± 0.029 4	0.3373 ± 0.019 5
1724	0.055 3 ± 0.008 4	0.177 7 0.029 3
828	0.031 8 ± 0.000 1	0.064 8 ± 0.005 0
1955	0.119 1 ± 0.048 0	0.027 4 ± 0.002 5
830	0.061 3 ± 0.009 2	0.030 1 ± 0.000 4
2199	0.007 3 ± 0.003 0	0.027 2 ± 0.005 5
827	0.007 9 ± 0.003 9	0.028 4 ± 0.006 8
638	0.021 4 ± 0.003 4	0.010 1 ± 0.000 2
967	0.023 9 ± 0.003 6	0.047 1 ± 0.003 1
1770	0.059 3 ± 0.017 5	0.149 3 ± 0.014 0
1527	0.052 8 ± 0.002 8	0.097 4 ± 0.008 1
1013	0.073 5 ± 0.007 5	0.035 5 ± 0.003 9
1438	0.032 9 ± 0.003 1	0.058 8 ± 0.001 5
1073	0.039 4 ± 0.006 3	0.019 8 ± 0.000 7
850	0.046 4 ± 0.004 1	0.023 4 ± 0.003 9
749	0.054 6 ± 0.003 9	0.021 0 ± 0.011 0
1713	0.261 9 ± 0.047 6	0.610 8 ± 0.139 3
872	0.008 6 ± 0.001 4	0.025 3 ± 0.003 8
2270	0.049 1 ± 0.001 4	0.072 5 ± 0.003 4
1751	0.034 5 ± 0.002 3	0.021 1 ± 0.002 5
1705	0.297 4 ± 0.083 7	0.592 7 ± 0.027 1
1234	0.004 8 ± 0.001 2	0.012 5 ± 0.002 9
1777	0.099 5 ± 0.000 5	0.174 5 ± 0.031 0
1192	0.056 8 ± 0.006 0	0.035 9 ± 0.002 6
2329	0.354 4 ± 0.009 2	0.247 3 ± 0.016 7
2037	0.125 9 ± 0.014 4	0.201 3 ± 0.018 7

2.2 生物质谱分析与差异蛋白质鉴定

从已筛选出的蛋白质中选取表达差异最大的 6 个蛋白质点，经质谱分析技术获得其肽指纹图谱（PMF）（以 1358 号的 PMF 为例，见图 2），并将质谱分析信息输入 Mascot 数据库进行分析与比对，经 NCBI 数据库搜索匹配蛋白及匹配分值。结果显示，差异蛋白质点与 10 个蛋白的匹配得分值均 >66 分，这些匹配蛋白分别为 CFHR1、Kininogen 1、β2-糖蛋白Ⅰ A 链、β2-糖蛋白Ⅰ 前体、dGTP 酶、人补体因子 C3c B 链、人补体因子 C3b B 链、人补体因子 C 前体、丝氨酸蛋白酶功能区因子 B A 链和人载脂蛋白 A-I A 链，其中 1358 和 1565 号分别与 CFHR1 和 Kininogen 1 蛋白匹配。

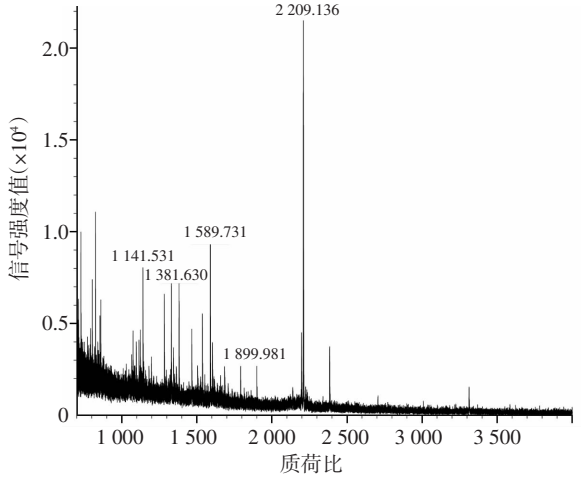
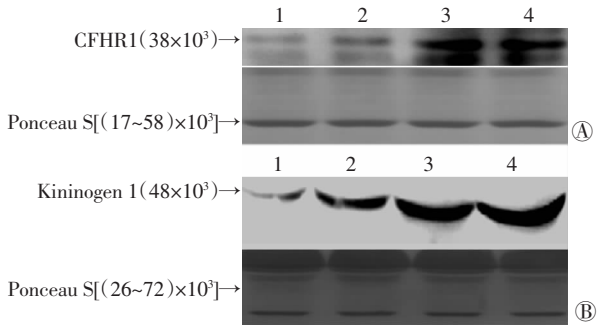


图 2 1358 号 CFHR1 的肽指纹图谱

2.3 CFHR1 和 Kininogen 1 的 Western blot 结果分析与验证

采用 Western blot 方法对已鉴定的 CFHR1 和 Kininogen 1 2 种蛋白在对照组和 DS 组的母体血清中的表达差异进行分析，2 种蛋白表达情况如图 3 所示。2 组血清标本在 CFHR1 和 Kininogen 1 蛋白相应相对分子质量处均有条带，提示 2 种蛋白在正常妊娠和 DS 妊娠母体血清中均有表达，但 DS 组的蛋白条带明显强于对照组。以 Western blot 胶片蛋白条带扫描的光密度值代表蛋白的相对水平，结果显示，CFHR1 和 Kininogen 1 光密度值在 2 组中呈正态分布，DS 组 CFHR1 的光密度值 = 5 687.0 ± 727.8，显著大于对照组的（1 414.1 ± 715.6）（$P < 0.01$），Kininogen 1 在 DS 组的光密度值 = 133 451.8 ± 32 118.8，也显著大于对照组的（33 073.9 ± 14 390.4）（$P < 0.05$）。Western blot 分析结果与 2-DE 图谱分析结果一致，提示 CFHR1 和 Kininogen 1 与唐氏妊娠密切相关，有望作为 DS 早期产前筛查的母体血清标志物。



A：CFHR1；B：Kininogen 1 1、2：对照组；3、4：DS 组；以丽春红染色的蛋白条带作为评估各组总蛋白上样量均一性标准

图 3 对照组和 DS 组母体血清 CFHR1 和 Kininogen 1 含量 Western blot 检测结果

3 讨论

DS 是一种常染色体异常性遗传病，其产前诊断主要通过羊膜穿刺、绒毛取材术，结合分子遗传学方法予以确诊，结果虽然准确，但在推广应用上存在着诸多弊端[7]：由于我国地广人多，孕妇数量大，加上 DS 产前确诊方法相对较复杂，难以向所有孕妇全面推广；同时羊膜穿刺、绒毛取材等技术存在 1% 左右的致流产风险[8]，也不宜在妊娠妇女内全面展开。因此，当前围产医学研究焦点主要集中在妊娠早期的无创产前筛查。DS 中多余的那条 21 号染色体可能诱导妊娠期唐氏胎儿体内部分蛋白表达水平的显著变化，差异表达蛋白有可能通过胎盘屏障与母体血液发生物质交换，进而导致母体血清中的部分蛋白含量呈现异常改变，后者可能成为唐氏筛查的标志蛋白。利用母体血清蛋白标志物进行 DS 产前筛查属于无创性检测，对母体和胎儿均无损伤，孕妇的可接受度高，标本易得，方法简便。因此，利用母体血浆或血清进行 DS 早期产前筛查越来越受到重视。目前，DS 产前筛查通常采用母体血清蛋白标志物结合超声胎儿颈项透明层厚度（NT）以及孕周、孕龄、孕妇体质量等多种因素进行综合分析，评估 DS 妊娠的风险，对于筛查出的 DS 妊娠高风险孕妇，再穿刺取材进行分子生物学或遗传学的确诊[9-10]。尽管该方法的检测率可达到 80% ~90%，但同时伴随着 5% 的假阳性率，这意味着初筛结果中呈现假阳性的正常孕妇可能需要接受羊膜穿刺或绒膜取样等侵入性诊断措施，进而导致一定的流产风险[8]，可见，临床上需要探索更为特异的 DS 产前检测

手段。

当前,利用母体血浆胎儿游离DNA或者母体血液中游离的胎儿细胞进行DS的非侵袭性产前诊断(non-invasive prenatal testing, NIPT)技术获得了较大的发展,并在该遗传病的产前诊断方面展现了极好的筛查性能[11-12]。NIPT主要采用整体基因组或目的基因组测序、多通路平行鸟枪法测序分析、母子间单核苷酸多态性差异评估等方法[11,13],在唐氏产前诊断方面的敏感性和特异性分别高达100%和99.7%[11],并显著降低了侵入性诊断手段的应用及其所导致的正常妊娠妇女的流产概率[12],提示NIPT是一种非常有效的DS产前筛查手段。不过该检测方法费用较高,耗时较长,不适合在发展中国家的广大人群中普遍推广,而利用母体血清特异性生物标志物进行普遍的DS产前筛查是目前较为经济且可行的方法。然而,现在临床上应用于唐氏筛查的母体血清标志物,包括甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)及游离雌三醇(uE3)等,都是在各自独立的实验研究中发现的[14-15],并非DS的特异性生化指标,其中单一标志物检测的假阳性和假阴性率均较高,结果可比性差。因此,探索从母体血清蛋白质整体水平筛选更为敏感、特异的DS妊娠相关蛋白标志物尤为重要。

近年来,国内外研究者先后报道了多种DS妊娠相关的母体血清潜在特异性蛋白质,其中包括补体因子C、血浆铜蓝蛋白[16]、锌指蛋白485、丛生蛋白[17]、血浆C1蛋白酶抑制因子、血清淀粉样物质P[18]等,与同样胎龄孕妇血清中的相应蛋白比较,其水平均发生显著变化,这为新型DS妊娠相关的母体血清特异性蛋白标志物的探讨及后续的研究工作提供了思路。

本研究在前期工作基础上,利用二维凝胶电泳技术筛选DS妊娠和正常妊娠母体血清间的差异表达蛋白,共获得29个具有显著表达差异的蛋白质。采用生物质谱分析对表达差异最显著的蛋白质进行鉴定,通过NCBI数据库搜索发现这些蛋白质点分别与CFHR1、Kininogen 1、β2-糖蛋白Ⅰ A链、β2-糖蛋白Ⅰ前体、dGTP酶、人补体因子C3c B链、人补体因子C3b B链、人补体因子C前体、丝氨酸蛋白酶功能区因子B A链和人载脂蛋白A-I A链的匹配得分较高(>66分)。同时,采用Western blot分析技术在独立的对照组和DS组中对其中的CFHR1和Kininogen 1蛋白表达水平进行了验证。结果发现,与正常孕妇相比,DS母体血清中这2种蛋白的含量均显著升高,提示CFHR1和Kininogen 1的表达水平与DS妊娠密切相关。

目前,CFHR1和Kininogen 1对应的抗体已经商品化,容易获得,故本研究选择性地对这2种蛋白进行了Western blot验证,其他数种蛋白质在下一步研究中我们将逐一验证。现有研究表明,CFHR1是补体因子H(CFH)家族成员,在血浆中以糖基化形式与高密度脂蛋白(HDL)结合,并参与补体活化及补体介导的免疫反应等生物学过程[17,19]。由于其羧基末端的保守性,该蛋白呈现与CFH相似的表面结合活性,但它不具有CFH的补体调节活性,可能与其缺乏氨基末端的补体调节区域有关[20]。有研究显示,DS母体血清中CFHR1含量明显高于正常怀孕组[17],同时在唐氏怀孕的早期及中期,母体血清中CFH水平也显著升高[16],该结果与本研究一致,提示CFH系统可能与DS的发病有关[17,19]。Kininogen 1是巯基蛋白酶的抑制剂,属于激肽释放酶-激肽系统家族,在凝血、炎症反应及氧化应激等方面中发挥着重要作用[21],并参与着脓毒症、溃疡性结肠炎、阿尔茨海默病等多种病理过程。Kininogen 1具有诱导细胞凋亡的潜能,这依赖于内源性活性氧簇的产生,且与脂质过氧化反应有关[22]。前期研究也发现,DS母体血清中Kininogen 1含量与正常孕妇相比显著升高。因此,现有研究均提示:CFHR1和Kininogen 1可能参与了DS发生和发展,有可能作为潜在的DS妊娠母体血清蛋白标志物。

DS属于常染色体异常性遗传病,其发病率在1/600~1/800之间,DS妊娠母体血清标本获得比较困难。鉴于本研究标本例数有限,所得结果需要增加临床样本量和采用其他实验方法予以进一步证实。

参考文献:

[1] Pope B D, Gilbert D M. Genetics: Up and down in Down's syndrome[J]. Nature, 2014, 508(7496): 323-324.

[2] Roizen N J, Patterson D. Down's syndrome[J]. Lancet, 2003, 361(9365): 1281-1289.

[3] Kamalakar A, Harris J R, McKelvey K D, *et al*. Aneuploidy and Skeletal Health[J]. Curr Osteoporos Rep, 2014, 12(3): 376-382.

[4] 蒋滢, 张波, 李维, 等. 早期诊断唐氏综合征的母体血清蛋白新标志物筛选与初步验证[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 328-332.

[5] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of

two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037 – 1053.

[6] Yan J X, Wait R, Berkelman T, *et al*. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3666 – 3672.

[7] Klase Z A, Van-Duyne R, Kashanchi F. Identification of potential drug targets using genomics and proteomics: a systems approach[J]. Adv Pharmacol, 2008, 56: 327 – 368.

[8] Tabor A, Philip J, Madsen M, *et al*. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women[J]. Lancet, 1986, 1(8493): 1287 – 1293.

[9] Nicolaides K H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks[J]. Prenat Diagn, 2011, 31(1): 7 – 15.

[10] Malone F D, Canick J A, Ball R H, *et al*. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome [J]. N Engl J Med, 2005, 353(19): 2001 – 2011.

[11] Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, *et al*. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting[J]. Am J Obstet Gynecol, 2011, 204(3): 205.e1 – 205.e11.

[12] Song K, Musci T J, Caughey A B. Clinical utility and cost of non-invasive prenatal testing with cfDNA analysis in high-risk women based on a US population[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(12): 1180 – 1185.

[13] Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013, 42(1): 15 – 33.

[14] Yamamoto R, Ohkouchi T, Tabata K, *et al*. A study of oligosaccharide variants of alpha-fetoproteins produced by normal fetuses and fetuses with trisomy 21[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84(12): 1145 – 1149.

[15] Wenstrom K D. Evaluation of Down syndrome screening strategies[J]. Semin Perinatol, 2005, 29(4): 219 – 224.

[16] Nagalla S R, Canick J A, Jacob T, *et al*. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers[J]. J Proteome Res, 2007, 6(4): 1245 – 1257.

[17] Yu B, Zhang B, Wang J, *et al*. Preliminary proteomic-based identification of a novel protein for Down's syndrome in maternal serum[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(5): 530 – 539.

[18] Heywood W, Mills K, Wang D, *et al*. Identification of new biomarkers for Down's syndrome in maternal plasma[J]. J Proteomics, 2012, 75(9): 2621 – 2628.

[19] Kolla V, Jeno P, Moes S, *et al*. Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ) [J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 952047.

[20] Hellwage J, Jokiranta T S, Koistinen V, *et al*. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin[J]. FEBS Lett, 1999, 462(3): 345 – 352.

[21] Lalmanach G, Naudin C, Lecaille F, *et al*. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors [J]. Biochimie, 2010, 92(11): 1568 – 1579.

[22] Sun D, McCrae K R. Endothelial-cell apoptosis induced by cleaved high-molecular-weight kininogen (HKa) is matrix dependent and requires the generation of reactive oxygen species[J]. Blood, 2006, 107(12): 4714 – 4720.

(收稿:2014-09-17;修回:2014-11-26)

(编辑 邓强庭)