

论 著

(临床研究)

妊娠合并宫颈癌中唾液内源性磷酸化肽段的诊断价值

江絮萍, 李杰萍, 何拉曼, 黄海燕

【摘要】 目的 研究唾液内源性磷酸化肽段在妊娠合并宫颈癌中的诊断价值, 筛选出可能的诊断标志物。 **方法** 选择 2016 年至 2018 年在武警福建省总队医院、上海第一妇婴和福建省人民医院接受妊娠合并宫颈癌检查的 36 例患者, 按临床分期分为 I 期组 12 例、II 期组 13 例、III 期组 11 例, 同期在武警福建总队医院妇产科生产的健康孕妇 38 例作为健康孕妇组。使用唾液采集管分别采集每位健康孕妇和患者的唾液。使用磷酸化肽段富集试剂盒处理唾液样品, 得到含内源性磷酸化肽段的洗脱液。使用质谱仪分析洗脱液样品中内源性磷酸化肽段的种类及丰度。 **结果** 在全部 74 例受试者的唾液样品中, 共鉴定到 25 条内源性磷酸化肽段。其中, 健康孕妇唾液中鉴定到 22 条 (88%, 22/25), I 期妊娠合并宫颈癌患者唾液中鉴定到 20 条 (80%, 20/25), II 期患者唾液中鉴定到 21 条 (84%, 21/25), III 期患者唾液中鉴定到 19 条 (76%, 19/25)。15 条 (60%, 15/25) 唾液磷酸化肽段的丰度在健康孕妇和妊娠合并宫颈癌患者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。共有 11 条唾液内源性磷酸肽段 (44%, 11/25) 是潜在的妊娠合并宫颈癌诊断标志物, 其质荷比 (m/z) 分别为 1076.4、1230.3、1270.3、1461.4、1589.4、1784.6、2004.7、2119.7、2323.7、2541.8、2722.8。其中, 质荷比为 2119.7 的唾液内源性磷酸化肽段对 I 期妊娠合并宫颈癌患者的诊断准确率最高, 可达 66%。 **结论** 根据特定唾液内源性磷酸化肽段的丰度可以在一定程度上区分健康和 I ~ III 期妊娠合并宫颈癌患者, 唾液内源性磷酸化肽段具有早期诊断妊娠合并宫颈癌的价值。

【关键词】 妊娠合并宫颈癌; 唾液; 内源性磷酸化肽段; 诊断

【中图分类号】 R71

【文献标志码】 A

【文章编号】 1008-8199(2020)02-0172-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.02.013

Diagnostic value of salivary endogenous phosphopeptides in cervical cancer in pregnancy

JIANG Xu-ping¹, LI Jie-ping², HE La-man³, HUANG Hai-yan⁴

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, 2. Department of Clinical Laboratory, Fujian Armed Police Hospital, Fuzhou 350001, Fujian, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Shanghai 200040, China; 4. Department of Gynaecology and Obstetrics, Fujian Provincial People's Hospital, Fuzhou 350004, Fujian, China)

【Abstract】 Objective To study the diagnostic value of salivary endogenous phosphopeptides among cervical cancer in pregnancy, and to screen out possible diagnostic markers. **Methods** A total of 36 women cases who had cervical cancer in pregnancy (12 cases assigned to stage I, 13 cases to stage II and 11 cases to stage III) during 2016 and 2018 from Shanghai First Maternity and Infant Hospital and Fujian Provincial People's Hospital was enrolled. And 38 healthy pregnant women who gave birth in the department of Obstetrics and Gynecology of Fujian Armed Police Hospital in the same years were taken as healthy cases. Saliva of each healthy pregnant woman and patients were collected by saliva collection tubes. Saliva samples were treated with phosphopeptide enrichment kits to obtain eluent containing salivary endogenous phosphopeptides. Elution samples were analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Quantitative and qualitative results of phosphopeptides were obtained. **Results** A total of 25 endogenous phosphopeptides was identified in saliva samples from all 74 volunteers. Among them, 22 phosphopeptides (88%, 22/25) were identified from healthy pregnant women, 20 phosphopeptides (80%, 20/25) were identified from stage I of cervical cancer in pregnancy, 21 phosphopeptides (84%, 21/25) were identified from stage II, and 19 phosphopeptides (76%, 19/25) were identified from stage III. There were 15 (60%, 15/25) endogenous phosphopeptides that had significant difference ($P < 0.05$) between healthy pregnant women and

作者单位: 350001 福州, 中国人民武装警察部队福建省总队医院妇产科 (江絮萍), 检验科 (李杰萍); 200040 上海, 上海第一妇婴保健院妇产科 (何拉曼); 350004 福州, 福建省人民医院妇产科 (黄海燕)

cervical cancer in pregnancy. There were 11 phosphopeptides (44%, 11/25) are potential diagnostic markers of cervical cancer in pregnancy. Their m/z were 1076.4, 1230.3, 1270.3, 1461.4, 1589.4, 1784.6, 2004.7, 2119.7, 2323.7, 2541.8 and 2722.8, respectively. Among those phosphopeptides, the phosphopeptide 2119.7 had the highest accuracy in differentiating cancer clinical stage I (66%). **Conclusion** Based on the abundance of specific salivary endogenous phosphopeptides could to a certain extent, to distinguish among healthy and I-III stage cervical cancer in pregnancy. It demonstrated that the salivary endogenous phosphopeptides had the ability of early diagnosis of cervical cancer in pregnancy.

[Key words] cervical cancer in pregnancy; saliva; endogenous phosphopeptides; diagnosis

0 引言

宫颈癌是女性发生频率很高的恶性肿瘤,仅次于乳腺癌^[1-3]。国际上通常把妊娠期、产褥期和产后 6 个月内发生的宫颈癌称为妊娠合并宫颈癌,也称妊娠相关性宫颈癌^[4]。目前,宫颈癌筛查和诊断的方法主要分为三步:首先是初筛,即进行阴道分泌物或脱落细胞涂片;初筛阳性患者再进行阴道镜检;镜检结果怀疑癌变患者则最后通过镜下取活组织做病理切片确诊^[5-6]。对于妊娠期妇女而言,由于担心宫颈检查或取活组织产生的创伤引起流产,部分患者在产前检查时不检查宫颈或不进行宫颈细胞学检查,从而导致漏诊和误诊。此外,阴道流血容易被误认为与妊娠有关,从而忽略上述检查^[7]。因此,寻找一种新的既无创简便,同时又准确高效的妊娠合并宫颈癌诊断方法是十分有意义的。

唾液作为一种极易取得,且成分同身体健康状况高度相关的体液,在近 10 余年中已经成为很多肿瘤诊断技术研究中的诊断液^[8-9]。唾液的成分复杂^[10],蛋白/肽段种类极其丰富^[11]。肿瘤的发生、发展和转移同异常的蛋白/肽段的磷酸化水平通常有很强的关联性,而体内蛋白/肽段的磷酸化水平变化会直接在唾液中表现出来^[12-14]。因此,可以通过直接分析唾液中内源性磷酸化肽段(不用酶解而直接存在的磷酸化肽段)来进行疾病的早期诊断。目前,唾液中内源性磷酸化肽段的表达种类与表达量用于妊娠合并宫颈癌诊断的相关研究还不完善。为此,本研究采集 I~III 期妊娠合并宫颈癌患者和健康孕妇的唾液,对其中的内源性磷酸化肽段进行富集后,再利用基质辅助激光解析(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)质谱进行定性定量检测。根据质谱数据分析其中的差异,初步探究唾液内源性磷酸化肽段在妊娠合并宫颈癌中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年至 2018 年期间在武警福建省总队医院妇产科生产的健康孕妇(38 例),

以及同期在武警福建省总队医院(10 例)、上海第一妇婴(18 例)和福建省人民医院(8 例)接受妊娠合并宫颈癌检查的患者。妊娠合并宫颈癌患者的纳入标准:①按照 2009 年 FIGO 临床分期标准划分,经病理检查证实为 I~III 期宫颈癌;②具有完整的诊疗记录;③采样前未接受肿瘤切除手术;④采样前未接受放疗或化疗。排除标准:除宫颈癌外,还患有其他重大疾病的患者。健康孕妇的纳入标准为未诊断出患有重大疾病。共有 74 例受试者纳入本研究,年龄(33.9 ± 14.3)岁。其中,健康孕妇 38 例(健康孕妇组),年龄(33.1 ± 13.5)岁。妊娠合并宫颈癌患者 36 例,年龄(36.1 ± 12.1)岁,按临床分期分为:I 期组 12 例,年龄(32.4 ± 8.4)岁;II 期组 13 例,年龄(34.1 ± 14.1)岁;III 期组 11 例,年龄(35.2 ± 10.7)岁。本研究经医院伦理委员会批准(批准号:第 12 号),所有受试者均签署知情同意书。

1.2 唾液采集方法 每位健康孕妇在妊娠中期(20~28 周)内采集唾液样品 2 份,每位患者在确诊为妊娠合并宫颈癌后 3 d 内采集唾液样品 2 份。所有受试者均在上午 10~11 点之间采集唾液。采集前 2 h 内禁止饮食,采集前 10 min 清洗口腔。使用德国萨斯特公司(Sarstedt)的唾液采集管,并按照其推荐步骤采集唾液。每份获得的唾液样品各取 200 μ L 置于离心管中,冷冻离心干燥后存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

1.3 唾液内源性磷酸化肽段富集方法 使用美国赛默飞世尔公司(ThermoFisher)的磷酸化肽段富集试剂盒(High-Select TiO_2 Phosphopeptide Enrichment Kit),并按照试剂盒的推荐步骤依次操作,完成对上述干燥后的唾液样品的富集。最终得到的含磷酸化肽段的洗脱液为质谱测试样品。

1.4 质谱测试方法 使用美国爱博才思公司(AB SCIEX)的 5800 MALDI-TOF/TOF 质谱分析样品。具体步骤为取 1 μ L 洗脱液点在 MALDI 靶板上,干燥后再点上 0.7 μ L DHB(25 mg/mL)基质,再次干燥后进行质谱分析。质谱检测质荷比(m/z)范围 1000~3000。每份洗脱液均按上述方法在靶板上点 2 个样品点,每个点进行 2 次质谱分析。除正常的质谱

测试外,在健康孕妇及I/II/III期妊娠合并宫颈癌患者的洗脱液样品中各随机选取一份,分别进行7次重复性实验(内源性磷酸化肽段+质谱分析)。

1.5 质谱数据分析 定性分析方法:首先选出一张谱图中所有信噪比(S/N) ≥ 10 的一级质谱峰,依次进行串联质谱分析;如主要碎片离子同母离子相差98 Da(丢失 H_3PO_4),则证明母离子中含有磷酸根,母离子对应肽段为磷酸化肽段;后续的谱图中,如发现同之前鉴定到的磷酸化肽段质荷比数相差 ± 0.1 Da以内的一级质谱峰,即认为是同一磷酸化肽段,不用再次进行串联质谱分析。

定量分析方法:直接使用质谱信号强度代表谱图中的磷酸化肽段丰度;未鉴定到的磷酸化肽段丰度记为0;每例受试者的唾液磷酸化肽段丰度使用全部8张谱图(2份唾液样品 \times 每份样品2个样品点 \times 每个样品点质谱分析2次)的平均值。

各组受试者中各条唾液内源性磷酸化肽段的相对丰度的计算方法为:首先计算各条磷酸化肽段在各组受试者唾液样品中的平均丰度;然后将所有磷酸化肽段在各组中的平均丰度分别在各组之间进行归一化(令最大值为100),得到最终表内数据。相对丰度为0即为在该组中未鉴定到该条肽段。

健康-妊娠合并宫颈癌 P 值的计算方法为:对于任意一条唾液磷酸化肽段,将38例健康孕妇组中每例受试者的对应唾液磷酸化肽段丰度数据,同36例

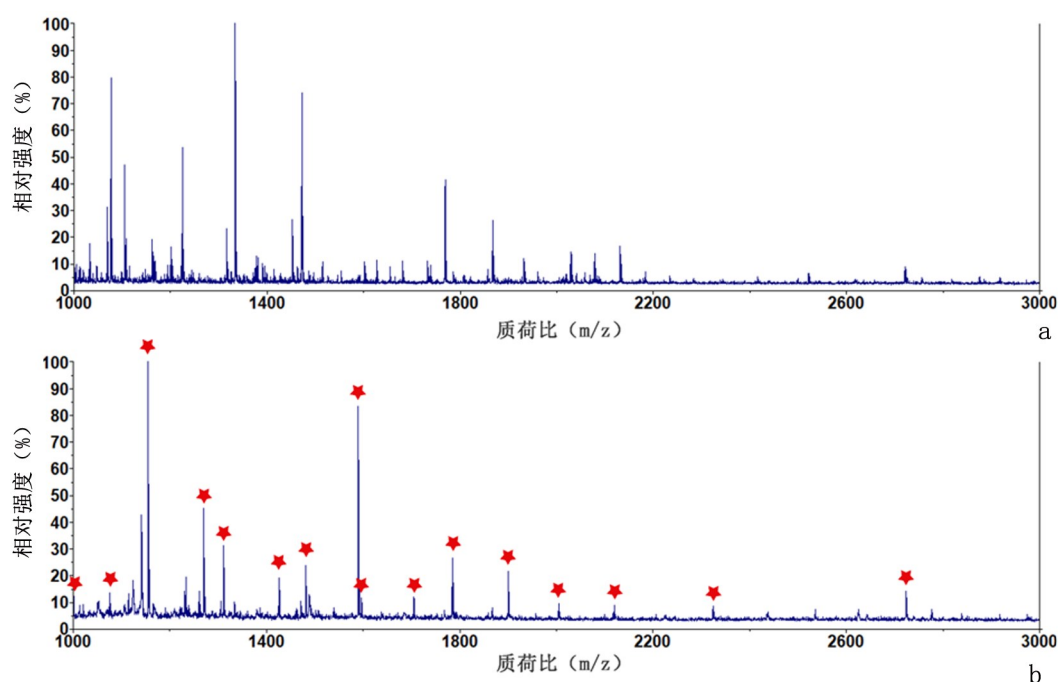
I~III期宫颈癌患者组中每例受试者的对应唾液磷酸化肽段丰度数据相比较,使用 t 检验的方法计算 P 值。

按照每条磷酸化肽段的相对丰度同该条磷酸化肽段在各组受试者唾液样品中的平均丰度的哪个值最接近就判断为对应的疾病状态,再同实际临床诊断结果相对比,统计得到各条磷酸化肽段在不同组癌症患者中的诊断准确率。

1.6 统计学分析 使用SPSS 22.0软件进行统计学处理。计量资料采用平均数表示,组间比较采用 t 检验。计数资料以例数(百分率)表示,采用卡方检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 唾液内源性磷酸化肽段检测方法的验证 不经过富集,直接进行MALDI质谱分析的唾液样品的质谱谱图中无磷酸化肽段质谱信号峰。经过富集后,再进行MALDI质谱分析的唾液样品的质谱谱图中磷酸化肽段质谱峰清晰可见。典型的受试者的唾液样品在进行磷酸化肽段富集前后的MALDI质谱图见图1。在所有24条信噪比大于10的质谱峰中有16条磷酸化肽段,比例高达67%(16/24)。重复性实验结果发现,4组唾液样品在7次重复性实验中鉴定磷酸化肽段种类的重合度均大于90%,相同质谱峰的信号强度的相对标准偏差(RSD)均小于10%。



a:富集前(无磷酸化肽段信号);b:富集后(磷酸化肽段,使用星号标记)

图1 一位受试者的唾液样品在进行磷酸化肽段富集前后的质谱图

2.2 唾液内源性磷酸化肽段的检测结果 在全部 74 例受试者的唾液样品中,共鉴定到 25 条内源性磷酸化肽段。其中,健康孕妇 22 条(88%, 22/25), I 期妊娠合并宫颈癌患者 20 条(80%, 20/25), II 期患者 21 条(84%, 21/25), III 期患者 19 条(76%, 19/25)。4 组受试者的唾液样品中鉴定到的内源性磷酸化肽段及其相对丰度见表 1。15 条(60%, 15/25)唾液磷酸化肽段的丰度在健康孕妇和妊娠合并宫颈癌患者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。健康孕妇及 I/II/III 期妊娠合并宫颈癌患者之间共同存在的内源性磷酸化肽段有 13 条,占总共鉴定到的 52%(13/25)。仅存在于健康孕妇唾液中有 3 条肽段(12%, 3/25),质荷比为 1270.3、1589.4 和 2004.7。仅存在于妊娠合并宫颈癌患者唾液中有 3 条肽段(12%, 3/25),质荷比为 1076.4、2119.7 和 2722.8。从健康孕妇唾液同妊娠合并宫颈癌患者唾液中肽段含量的差异来看,健康孕妇唾液同 I ~ III 期妊娠合并宫颈癌患者唾液最高的质谱信号强度之比大于 2 的磷酸化肽段有 3 条(12%, 3/25),质荷比为 1270.3、1589.4、2004.7。健康孕妇唾液同 I ~ III 期妊娠合并宫颈

癌患者唾液最低的质谱信号强度(不含 0)之比小于 0.5 的有 7 条(28%, 7/25),质荷比为 1076.4、1230.3、1461.4、2119.7、2323.7、2541.8、2722.8。从肽段含量的变化趋势来看,从健康孕妇到 I/II/III 期妊娠合并宫颈癌患者唾液中含量依次增加的磷酸化肽段有 2 条(8%, 2/25),质荷比为 1461.4 和 2722.8;依次下降的磷酸化肽段有 1 条(4%, 1/25),质荷比为 1784.6。综上,共有 11 条唾液内源性磷酸肽段(44%, 11/25)是潜在的妊娠合并宫颈癌诊断标志物。它们的质荷比分别为 1076.4、1230.3、1270.3、1461.4、1589.4、1784.6、2004.7、2119.7、2323.7、2541.8、2722.8。仅存在于癌中的 3 条磷酸化肽段(质荷比为 1076.4、2119.7 和 2722.8)能够最方便的区分出健康孕妇与妊娠合并宫颈癌患者。统计这 3 条磷酸化肽段在不同组癌症患者中的诊断准确率。结果为质荷比为 1076.4 的诊断准确率分别为 I 期 45%、II 期 43%、III 期 52%;质荷比为 2119.7 的诊断准确率分别为 I 期 66%、II 期 56%、III 期 51%;质荷比为 2722.8 的诊断准确率分别为 I 期 44%、II 期 40%、III 期 48%。

表 1 各组受试者中各条唾液内源性磷酸化肽段(使用质荷比表示)的相对丰度

质荷比(m/z)	健康孕妇组(n=38)	I 期组(n=12)	II 期组(n=13)	III 期组(n=11)	P 值
1000.2	47	100	0	73	<0.01
1076.4	0	76	33	100	<0.01
1114.3	37	77	100	59	0.042
1155.3	100	48	70	34	0.091
1230.3	19	49	100	0	<0.01
1270.3	100	0	0	0	<0.01
1311.4	98	100	83	81	0.25
1386.4	52	93	100	43	0.19
1426.4	94	37	90	100	0.092
1461.4	19	69	79	100	0.047
1481.5	99	0	100	67	<0.01
1538.5	31	100	39	89	0.074
1589.4	100	0	0	0	<0.01
1596.5	83	13	97	100	0.081
1637.6	45	67	100	13	0.061
1704.4	98	85	100	0	<0.01
1752.6	76	23	100	65	0.087
1784.6	100	98	73	20	0.054
1899.6	37	100	26	0	<0.01
2004.7	100	0	0	0	<0.01
2119.7	0	30	100	72	<0.01
2323.7	23	100	67	72	0.032
2541.8	15	0	100	69	<0.01
2722.8	0	79	81	100	<0.01
2837.8	82	77	15	100	0.053

3 讨 论

3.1 唾液内源性磷酸化肽段检测方法的合理性

唾液成分复杂,且内源性磷酸化肽段丰度极低^[15]。直接用 MALDI 质谱进行分析所得到的谱图杂乱,高丰度成分将磷酸化肽段信号完全抑制,导致无磷酸化肽段信号。因此,需要先使用富集材料(如 TiO_2) 抓取唾液中的内源性磷酸化肽段,然后通过洗涤富集材料将绝大部分非目标物质去除,最终得到杂质较少、浓度较高的磷酸化肽段洗脱液后再进行 MALDI 质谱分析。本研究使用的磷酸化肽段富集试剂盒可以保证富集方法的有效性。实验结果显示在富集后的唾液 MALDI 质谱图中,大部分信噪比大于 10 的质谱峰为磷酸化肽段。与相关富集分析唾液中内源性磷酸化肽段文献相对比,本文中的富集效果(67%)同国内外的研究水平相近^[16-17]。使用商用唾液采集管和磷酸化肽段富集试剂盒还可以保证整个方法的重复性。重复性实验结果显示,在各组受试者的唾液样品中,本研究采用的方法在定性和定量方面均具有较好的重复性和稳定性。这为使用唾液内源性磷酸化肽段作为指标对妊娠合并宫颈癌患者进行诊断打下了基础。

3.2 唾液内源性磷酸化肽段的诊断价值 唾液内源性磷酸肽段在健康孕妇及 I/II/III 期妊娠合并宫颈癌患者之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过这些差异,在本研究的结果部分共分析总结出 11 条可能成为妊娠合并宫颈癌诊断标志物的唾液内源性磷酸肽段,表明唾液内源性磷酸化肽段对妊娠合并宫颈癌具有一定的诊断价值。对于诊断指标而言,首要目的是区分健康与疾病状态。在上述 11 条肽段中,3 条仅存在于健康孕妇唾液中(m/z : 1270.3、1589.4 和 2004.7)和 3 条仅存在于妊娠合并宫颈癌患者唾液中(m/z : 1076.4、2119.7 和 2722.8)的内源性磷酸化肽段能最清楚的区分健康孕妇和 I 期妊娠合并宫颈癌患者。同时,根据仅存在于癌中的 3 条肽段的量的差异,还可以进一步区分具体的 I/II/III 期。对于癌症而言,早期癌症患者有更高的几率可以治愈,而晚期的癌症患者则通常难以治愈^[18]。因此癌症的早期诊断具有更重要意义。值得注意的是,质荷比为 2119.7 的唾液内源性磷酸化肽段诊断

I/II/III 期妊娠合并宫颈癌患者的准确率均超过了 50%,且诊断 I 期妊娠合并宫颈癌患者的准确率达到 66%。说明该唾液内源性磷酸化肽段可以较准确的区分出 I/II/III 期(特别是 I 期)妊娠合并宫颈癌患者,具有诊断早期妊娠合并宫颈癌的能力。这一准确率水平同现有文献中报道的通过检测血清 miRNA^[19-22],或者联合检测组织中蛋白标志物^[23],从而进行宫颈癌早期诊断的方法相近。当然,由于使用的样品为唾液,因此本文的方法更加简便,对患者无伤害。

综上所述,唾液内源性磷酸化肽段在妊娠合并宫颈癌中有很高的诊断价值。本研究共发现 11 条唾液内源性磷酸肽段是潜在的妊娠合并宫颈癌诊断标志物。其中,质荷比为 2119.7 的磷酸化肽段还可以较准确的区分具体的癌症临床阶段。特别是利用该磷酸化肽段区分 I 期妊娠合并宫颈癌的准确率达到 66%,具有重要的研究意义和早期诊断价值。当然,这些唾液内源性磷酸化肽段诊断妊娠合并宫颈癌的可靠性还有待未来更多的临床样本进行验证。

【参考文献】

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 季春燕. 派特灵治疗宫颈持续人乳头瘤病毒感染的临床研究 [J]. *东南国防医药*, 2017, 19(5): 492-495.
- [3] 朱皓峰, 于晓红, 杜丽英, 等. 宫颈癌中激活蛋白 1 通路的活化及临床意义 [J]. *东南国防医药*, 2014, 16(2): 128-131.
- [4] Kato T, Takashima A, Kasamatsu T, et al. Clinical tumor diameter and prognosis of patients with FIGO stage I B1 cervical cancer (JCOG0806-A) [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 137(1): 34-39.
- [5] 耿建祥, 黄华艺, 刘建华, 等. HPV 感染疾病相关问题专家共识(2017) [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(12): 1238-1241.
- [6] 周 琦, 吴小华, 刘继红, 等. 宫颈癌诊断与治疗指南(第四版) [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(6): 613-622.
- [7] 彭立平, 张国楠. 妊娠合并宫颈癌的治疗 [J]. *实用妇产科杂志*, 2007, 23(9): 519-521.
- [8] Pfaffe T, Cooperwhite J, Beyerlein P, et al. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(5): 675-687.
- [9] Liu J, Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(7): 569-577.
- [10] Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, et al. Saliva specimen: A new la-

- boratory tool for diagnostic and basic investigation[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 383(1-2): 30-40.
- [11] Bandhakavi S, Stone MD, Onsongo G, *et al.* A Dynamic Range Compression and Three-Dimensional Peptide Fractionation Analysis Platform Expands Proteome Coverage and the Diagnostic Potential of Whole Saliva[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(12): 5590-5600.
- [12] 王兴蕾. 唾液用于肿瘤诊断的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(2): 335-338.
- [13] 李倩, 张平, 陈娇, 等. 唾液组学在口腔癌诊断中的应用[J]. *国际口腔医学杂志*, 2018, 45(6): 710-715.
- [14] 李娟, 姜武辉, 徐晓颖. 二氧化钛结合超滤膜富集和分离肿瘤患者唾液中的磷酸化肽和唾液酸化糖肽[J]. *高等学校化学学报*, 2014, 35(10): 2073-2077.
- [15] Lin H, Chen H, Shao X, *et al.* A capillary column packed with a zirconium(IV)-based organic framework for enrichment of endogenous phosphopeptides[J]. *Microchim Acta*, 2018, 185(12): 562.
- [16] Barbera GL, Capriotti AL, Cavaliere C, *et al.* Saliva as a source of new phosphopeptide biomarkers: development of a comprehensive analytical method based on shotgun peptidomics[J]. *Talanta*, 2018, 183: 245-249.
- [17] Liu Q, Sun N, Gao M, *et al.* Magnetic Binary Metal - Organic Framework As a Novel Affinity Probe for Highly Selective Capture of Endogenous Phosphopeptides[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 6(3): 4382-4389.
- [18] Zhang X, Shi S, Zhang B, *et al.* Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 332-353.
- [19] Wang X, Wang HK, Li Y, *et al.* micro RNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(11): 4262-4267.
- [20] Wang WT, Zhao YN, Yan JX, *et al.* Differentially expressed microRNAs in the serum of cervical squamous cell carcinoma patients before and after surgery[J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7(1): 6-15.
- [21] Yu J, Wang Y, Dong R, *et al.* Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 671-674.
- [22] Tian QF, Li Y, Wang FF, *et al.* MicroRNA Detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women[J]. *J Natl Cancer Ins*, 2014, 106(9): 241-248.
- [23] 李莹, 刘颖群, 方兆武. P16、Ki67 和 cyclinD1 在宫颈癌中的表达及 TCT 与 HPV-DNA 检查在宫颈癌早期诊断中的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(4): 829-831.

(收稿日期: 2019-08-13; 修回日期: 2019-09-08)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一起)