

尿液蛋白质组在膀胱癌临床诊治中的应用*

黄传玺^{1,3)} 马洁^{2,3)} 徐开琨^{2,3)} 吴琛^{1)**} 朱云平^{2,3)**}

⁽¹⁾ 河北大学生命科学学院, 保定 071002; ⁽²⁾ 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206;

⁽³⁾ 蛋白质组学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(北京), 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质药物国家工程研究中心, 北京 102206)

摘要 膀胱癌是一种常见的泌尿系统疾病, 尿细胞学检查与膀胱镜检查是膀胱癌的主要临床诊断手段, 但尿细胞学检查敏感性较差, 膀胱镜检查为侵入性检查, 易给病人带来强烈的不适感; 且膀胱癌具有易复发的特点, 大部分患者必须面临频繁的检查, 临床亟需发展舒适、准确的检查手段。尿液存储是膀胱的主要生理作用, 尿液可以直接接触肿瘤实体, 肿瘤分泌的一些蛋白质分子极可能进入尿液中, 并且患者尿液样本便于足量多次收集。同时, 蛋白质组技术以及尿液蛋白质组研究的快速发展, 为我们利用尿液研究膀胱癌提供了便利的途径。本文系统总结了尿液蛋白质组研究的主要技术手段, 重点关注膀胱癌尿液蛋白质组研究趋势和应用方向, 以期利用尿液蛋白质组研究膀胱癌提供助力。

关键词 膀胱癌, 尿液蛋白质组, 非侵入性, 生物标志物, 临床应用

学科分类号 Q51, Q811.4

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0060

随着人口老龄化加速, 中国癌症的发生率和死亡率呈现上升趋势^[1]。膀胱癌(bladder cancer, BC)是一种常见的泌尿系统疾病, 根据 2017 中国癌症中心发布的数据显示, 在 2013 年, 膀胱癌在中国城市地区男性癌症发病率中排名第 7^[2]。膀胱癌新诊断的病例中, 约 70% 为非浸润性膀胱癌, 其中约有 50%~70% 的患者经过治疗后出现复发, 约 30% 的几率会进一步发展为浸润性膀胱癌, 进而危及生命^[3]。目前, 尿细胞学检查和膀胱镜检查是膀胱癌临床诊断的主要工具, 其中尿细胞学检查敏感性差^[4], 膀胱镜检查一直被认为是检测膀胱癌的金标准^[5], 但膀胱镜检查为有创检查, 易给病人带来不适感。而且, 在膀胱癌预防和预后的诊治过程中, 病人需长期监测, 由此也会产生巨大的医疗费用。膀胱癌临床诊治急需发展舒适、准确的检查手段。

在不同的生理或病理情况下, 生物体分泌的蛋白质会有表达类别或者表达量的差异^[6]。针对膀胱癌, 尿液与膀胱癌实体直接接触, 癌细胞释放的物质极大可能直接进入尿液^[7-8]; 同时, 尿液取样具有无创、非侵入性的特点, 病人愿意长期足量供

给; 此外, 尿蛋白质组相对稳定, 这种稳定性部分归因于尿液在收集前已经在膀胱中“储存”了一定时间, 内源性蛋白酶已经完成了部分蛋白质的水解^[9-10]; 实际应用中, 尿液个体动态范围仍然较大, 但可以通过采用合理的方法, 如利用尿肌酐进行归一化或建立参考尿蛋白质组等^[11-13], 在一定程度上提高各实验间的重现性。虽然尿液蛋白质组的研究仍存在一些问題, 但目前已有一批分子标志物为美国 FDA(Food and Drug Administration)所认可^[5,14]。本文系统总结了尿液蛋白质组研究的主要技术手段, 重点关注膀胱癌尿液蛋白质组研究趋势和应用方向, 以期利用尿液蛋白质组研究膀胱癌提供助力。

1 尿液蛋白质组的基本分析流程

基于质谱的尿液蛋白质组研究获得膀胱癌相关

* 国家重点研发计划 (2017YFC0906600, 2016YFC0901701, 2016YFB0201702)资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 010-61777058

吴琛. E-mail: dawnwuchen@163.com

朱云平. E-mail: zhuyunping@gmail.com

收稿日期: 2018-02-11, 接受日期: 2018-04-04

标志物流程如图 1 所示. 主要包括:

- 尿液样本获取与前处理. 基于合理的实验设计, 正确采样, 妥善存储.
- 质谱技术及平台的选择. 基于不同的实验目的、实验经费, 合理选择质谱技术、质谱平台.
- 质谱数据分析及候选生物标志物的选择. 基于合理的数据质控, 结合生物信息知识, 筛选感兴趣的相关蛋白质等.
- 候选生物标志物表达情况的确认与生物标志物评价. 基于实验验证结果, 结合对应的模型或算法针对独立样本进行生物标志物的评价.
- 临床实用性评价. 基于以上结果, 探索临床应用区间.

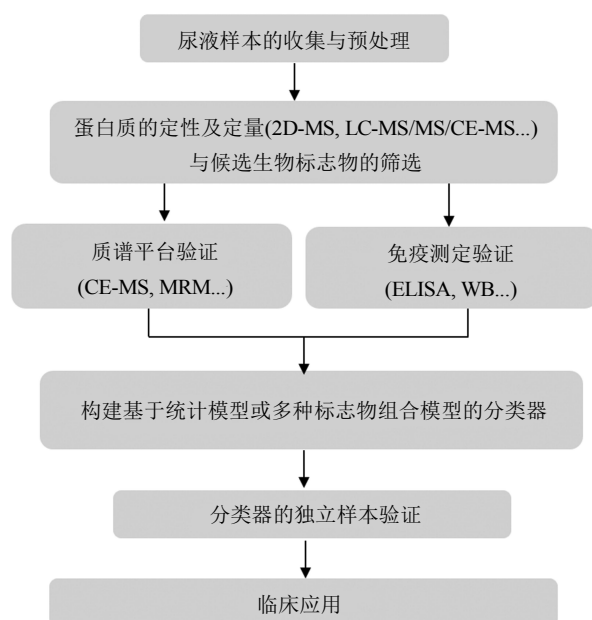


Fig. 1 Overview of the workflow of biomarker discovery from urine based on mass spectrometry platform

图 1 基于质谱平台发现尿液样本生物标志物的工作流程图

2 尿液样本收集方法

基于欧洲肾脏和尿液蛋白质组研究团队 (EuroKUP, <http://eurokup.org/>) 发布的国际尿液收集协议和标准人类尿样收集方法等 (<http://www.molmeth.org>), 我们总结了膀胱癌尿液样本获取的参考方法: 尿液样本一般收集晨尿中段尿, 存储温度为 -80°C 或 -20°C . 连续收集尿液或在 4°C 储存时, 应加入 10 mmol/L NaN_3 或 0.2 mol/L 硼酸抑制

微生物生长. 一般来说, 尿液样本不应该混浊, 如果血液或细胞内容物明显, 需过细胞筛处理, 并以大于 $3\,000\text{ r/min}$ 的离心速度在 4°C 条件下离心 10 min , 或者直接丢弃 (The Molecular Methods database: Acc.nr L8Rvt10; Acc.nr bqQvt10; Acc.nr bSQvt10).

部分研究结果表明, 添加蛋白酶抑制剂对蛋白质提取无明显改善, 而对关注特定蛋白质修饰的研究一般需要添加相应的蛋白酶抑制剂, 如磷酸化蛋白质组研究需要添加磷酸酶抑制剂. 尿液中的蛋白质相对稳定, 但也要避免反复冻融, 蛋白质含量监测和其他临床参数应早于尿液样本冰冻前进行, 防止因低温存储而改变.

3 应用多种蛋白质组学研究技术开展尿液蛋白质组研究

尿液蛋白质组研究随着质谱技术的发展不断进步, 通过结合不同的分离技术和质谱技术手段实现蛋白质混合酶解产物的有效鉴定. 目前, 常见的尿液蛋白质分离方法主要包括: 二维凝胶电泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2DE)、液相色谱 (liquid chromatography, LC), 以及毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 等; 常见的质谱主要是由电喷雾电离或基质辅助激光解吸电离为离子源结合不同的质量检测器及分析器构成, 如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)、表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱, 又称蛋白质芯片技术 (surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS), 在质谱平台的基础上, 又衍生出许多新技术, 例如靶向质谱技术: 选择反应检测 (selective reaction monitoring, SRM)、多反应检测 (multi reaction monitoring, MRM) 等. 本文选择了部分常见的研究方式进行介绍.

3.1 二维凝胶电泳串联基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

二维电泳是一种传统的蛋白质分离方法, 通过蛋白质理化性质的不同进行分离^[6], 分离效果较好, 在蛋白质组研究早期应用广泛, 但电泳斑点识别率低、定量精度差. MALDI-TOF-MS 一般用于蛋白质等生物大分子的高通量筛选, 具有操作简单、快速、谱图直观、能耐受一定浓度的盐和去垢剂等特点, 适合于多肽、蛋白质及寡核苷酸混合物

的精确质量测定^[15]。Lei 等^[16]通过二维电泳与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱串联,对膀胱癌患者及对照组尿液样品中的蛋白质进行鉴定和比较研究,以期寻找膀胱癌相关的生物标志物。Bryan 等^[17]尝试用大量尿蛋白肽段的 MALDI-TOF-MS 谱图来区分肌肉侵入性(阶段 T2+)和非侵入性(Ta/T1 期)膀胱癌患者。

3.2 液相色谱串联各式质谱

液相色谱与质谱联用,结合了液相色谱仪有效分离热不稳定性及高沸点化合物的分离能力,与质谱仪较强的组分鉴定能力,是一种分离分析复杂有机混合物的有效手段,具有快速分析、样品需求量少的特点^[18]。由于色谱亲和能力的不同,可针对特定蛋白进行分析。Yang 等^[19]针对尿蛋白中的糖蛋白,采用双凝集素亲和层析液相色谱与质谱串联鉴别膀胱癌。Frantzi 等^[20]将固定化金属亲和色谱与高分辨率 LC-MS/MS 结合使用,靶向选择金属结合蛋白,如基质金属蛋白酶,作为相关疾病诊断的生物标志物。

3.3 毛细管电泳串联各式质谱

毛细管电泳是一种基于待分离物淌度和分配行为为差异而实现分离的电泳新技术。相对于传统电泳技术,具有快速、高效、分辨率高、重复性好、易于自动化等优点^[21]。CE/MS 联用技术大大拓宽了 CE 和 MS 本身的应用领域,但 CE/MS 仍存在一些固有的缺陷,如进样量少、CE/MS 接口等问题。早在 2003 年, Wittke 等^[22]利用毛细管电泳(CE)与电喷雾飞行时间质谱耦合建立健康人尿液中的参考蛋白质组及多肽组合,用于肾病的研究。Theodorescu 等^[23]通过 CE/MS 对比健康与患者的尿多肽组成,建立了尿路上皮癌生物标志物的检测和验证的分子模型。Alberice 等^[24]利用 CE/MS 研究膀胱癌复发病人的尿样的非靶向代谢组学。

3.4 表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱

SELDI-TOF-MS 可被看作 MALDI-TOF-MS 技术的延伸, SELDI-TOF-MS 将蛋白质芯片与 MALDI-TOF-MS 结合起来。蛋白质芯片是 SELDI 技术的核心部分,芯片表面具有化学的或生物的“诱饵”将蛋白质选择性地结合在其表面^[25]。蛋白质经激光照射后发生离子化,然后气相离子进入质谱分析仪,每个蛋白质都会产生独特的指纹图谱,通过比较峰的强度就可以获得样本中不同蛋白质的表达模式。Reichelt 等^[26]利用 SELDI-TOF-MS 从确

诊为肾同种异体移植排斥反应患者和无组织学排斥反应患者收集的 23 份尿样蛋白质中,筛选出几种特征性蛋白质谱峰,用于区分肾同种异体移植排斥和不排斥反应。Liu 等^[27]结合决策树算法分析尿液 SELDI 蛋白质谱图,用以区分移行上皮细胞癌(TCC,膀胱癌的一种)和非癌症患者。

3.5 其他

靶向蛋白质研究策略通过靶向选择目标蛋白质或目标肽段的离子区间进行选择检测。其中,最常用的 MRM/SRM 是一种基于已知信息或假定信息有针对性地获取数据^[28],进行特定区间质谱信号采集的技术。在基于蛋白质组学的生物标志物研究、蛋白质翻译后修饰,定量蛋白质组和蛋白质相互作用等研究领域的应用逐渐受到重视,是蛋白质验证的一种常用手段。由于 MRM/SRM 的具有灵敏、准确和特异性等优点,其也被用于生物标志物的发现。Duriez 等^[29]就利用大规模 SRM 技术,结合液相色谱通过尿液进行膀胱癌候选标志物的筛选。

目前,尿液蛋白质组研究实验方法和技术平台仍存在一定的不足,我们可以结合研究目的进行多种方法的优化组合以得到更全、更精确的蛋白质鉴定结果。如 Guo 等^[30]提出了一种组合型的膀胱癌尿蛋白质组检测策略。该策略由 3 个核心组合组成,筛选来自膀胱癌细胞系分泌蛋白质中的生物标志物,并在患者尿液中通过二维电泳(2DE)和同位素标记验证差异蛋白质,进行 LC-MS/MS 有标定量,并采用 MRM 进行后续验证。

4 尿蛋白质组在膀胱癌研究中的应用

膀胱是泌尿系统的重要组成部分,膀胱癌的发生和发展必然会引起尿液成分的变化,尿液成分的复杂性可以反应膀胱癌患者不同疾病进程和不同恶性程度生理状态的差异,一方面我们可以通过尿液蛋白质组建立正常膀胱尿液蛋白质组参考库,监测身体生理变化,另一方面,通过合理设置不同对照组,可以从不同的角度获得膀胱癌诊断、分级、预后等密切相关的特异性生物标志物。相关的标志物可以是可溶性蛋白质、代谢物或核酸,或可以从膀胱肿瘤脱落并且可以容易地从尿样中回收的尿路上皮细胞的基因组或转录组中可检测的特异性变化等^[4, 31-32]。基于文献调研结果,我们给出近 15 年来部分分子实验验证的生物标志物,如表 1 所示。

Table 1 Part of biomarkers verified by molecular experiments
表 1 部分分子实验验证过的生物标志物

功用	基因列表	文章描述	样本来源	备注
诊断	TACSTD2	TACSTD2 的存在与膀胱癌有无强烈相关 ^[34] .	尿液	☆
诊断	IL-8、VEGF、 APOE、 MMP9, MMP10、 SDC1 ANG, CA9	多种生物标志物及其组合可以用于膀胱癌诊断 ^[35-38] .	尿液	☆
诊断	CXCL-1	CXCL-1 表达量的差异可用于区分正常人与非浸润膀胱癌及浸润性膀胱癌患者 ^[39] .	尿液	☆
诊断	S100P	S100P 的表达水平有助于区分膀胱癌与其他泌尿器官肿瘤 ^[40] .	血液	☆
诊断	SERPINA1	A1AT 糖蛋白表达量的上升与膀胱癌有无强烈相关($P<0.0001$) ^[41] .	尿液	☆
诊断	Apo-A1	Apo-A1 表达水平在膀胱癌与对照组之间显著差异 ^[42] .	尿液	☆
分级	CSTB	Cystatin B 组织表达水平与移行性膀胱癌分级正相关 ($P=0.0008$) ^[43] .	组织	☆
分级	PGAM1	PGAM1 的表达水平与膀胱癌分级正相关 ^[44] .	组织	☆
分级	FABP4(A-FABP)	A-FABP 的表达水平与膀胱癌的发生发展负相关 ^[44] .	组织	
分级	Apo-A1	Apo-A1 不仅可用于膀胱癌诊断, 其表达量还与膀胱癌分级正相关 ^[45] .	尿液	☆
分级	SPINK1(TAT1)	TAT1 的表达水平与膀胱癌分级负相关 ^[46] .	组织	☆

经过分子实验验证的部分生物标志物, 样本来自尿液、组织、血液等."☆" 标记的生物标志物至少有两篇文章独立验证.

4.1 膀胱癌参考尿液蛋白质组研究

系统构建参考尿液蛋白质组表达谱为后续尿液蛋白质相关的研究提供坚实的基础. Zhao 等^[33]利用一维(LC/MS/MS, 不分馏, 直接分析尿肽)、二维(反相高效液相色谱与 LC/MS/MS 结合分析尿肽)、三维(尿蛋白首先通过凝胶洗脱的液体馏分包埋电泳(GELFREE)或液相等电聚焦(LP-IEF)分级, 并将从 GELFREE/LP-IEF 分级消化的尿肽片段通过反相高效液相色谱(RPLC)分馏, 之后进行 2D 分离, 最后通过 LC/MS/MS 进行分析)分离技术鉴定正常人类尿液样本, 三种方式鉴定到的蛋白质达到 6 085 个, 其中 2 001 个未曾报道过, 从广度的角度上建立了正常人类参考尿蛋白质组.

Leng 等^[11]利用大规模的尿蛋白质组数据(497 份正常尿液样本, 154 份各癌症尿液样本), 建立了尿液样本分析常用工作流程及一个泛 - 人类参考尿蛋白质组, 从而为使用尿蛋白质组进行健康监测和疾病筛查提供了一个可靠的参考标准. 泛 - 人类参考尿蛋白质组覆盖了尿蛋白质正常变异情况, 不仅可用于监测时序生理变化, 也可辅助筛选癌症相关异常蛋白质表达, 如膀胱癌.

4.2 尿液蛋白质组-膀胱癌诊断

由于尿液成分的复杂性、膀胱癌不同的恶性程度, 我们可以从不同的角度得到所需的标志物. Chen 等^[34]利用从疝气和膀胱癌患者分离的尿微粒

发现膀胱癌生物标志物, 结果发现尿微粒中 TACSTD2 蛋白的存在与膀胱癌的有无强烈相关.

从基因组的角度观察疾病时, 某些 Driver 基因对疾病的成因、发展具有重大影响, 而在蛋白质组的研究中, 某些关键蛋白质也可能对膀胱癌的生存发展具有重大作用. Goodison 等^[35]分析了 127 名癌症患者(其中 63 名为膀胱癌, 其余为其他癌症)尿样, 通过酶联免疫测定了 14 种生物标志物(IL-8、MMP-9、 MMP-10、 SDC1、 CCL18、 PAI-1、 CD44、 VEGF、 ANG、 CA9、 A1AT、 OPN、 PTX3 和 APOE), 其中 8 种生物标志物的组合(IL-8、MMP-9、 PAI-1、 VEGF、 ANG、 CA-9、 APOE、MMP-10)提供了最准确的膀胱癌诊断(敏感性为 92%, 特异性为 97%), 进一步的统计分析发现, 8 个生物标志物组合中 IL-8、 VEGF 和 APOE 这 3 个蛋白质贡献了最多的累积解释率, 经独立检验, 发现这 3 个生物标志物组的总体准确度达到 93%, 并具有高灵敏度(90%)和高特异性(97%), 这 3 个分子也在多个独立实验研究结果中得以验证.

4.3 尿液蛋白质组-膀胱癌分级

膀胱癌最常见的类型是移行细胞癌, 其起始于膀胱内部排列的尿路上皮细胞, 大致可分为尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺癌, 其中尿路上皮癌最为常见. 临床根据癌细胞分布位置与恶性程度, 将尿路上皮癌分期定义为原位癌(非浸润性膀胱癌)、非侵

入性膀胱癌(非浸润性膀胱癌)、侵入性固有层或侵入肌层膀胱癌(浸润性膀胱癌),基于不同的分类情况,可以提供重要的预后信息并指导进一步治疗。利用尿液蛋白质组对膀胱癌的分级进行研究可以帮助我们进一步认识膀胱癌,获得不同类型、不同分期肿瘤的特异性信息,辅助临床治疗。

Ohlsson 等^[44]全面检查了由 153 个膀胱标本(46 个非恶性组织, 11 个 pTa G1、40 个 pTa G2、10 个 pTa G3、13 个 pT1 G3、23 个 pT2-4G1 和 10 个 pT2)组成的大样本组的蛋白质表达谱,联合使用免疫组织化学(IHC),蛋白质组学分析显示 A-FABP 表达水平在侵袭性病变中的下降明显,其后来组织微阵列(TMA)实验也证实了 IHC 结果, A-FABP 的放松管制可能在膀胱癌进展中起作用。Li 等^[45]测试了来自健康志愿者和低恶性或侵袭性膀胱癌患者的尿液样本,纤维蛋白原、乳酸脱氢酶 B、载脂蛋白 A1、聚集蛋白和触珠蛋白在低恶性和浸润性膀胱癌中表达,其中载脂蛋白 A1 的表达与膀胱癌恶性程度正相关。

4.4 尿液蛋白质组-膀胱癌预后

癌症患者经过治疗就面临癌症预后的问题,治疗后尿液会产生一些可检测的特异性变化。Majewski 等^[47]利用正常与病患尿液蛋白质谱图对比获得 41 个蛋白质差异峰,对膀胱癌进行预后监测判断。运用该分类模型分析 127 位有膀胱癌病史患者尿样,将之分为良性、恶性两组。结果显示,恶性组的肿瘤转移能力更高,耐药性更强。膀胱癌的预后标志物与膀胱癌的诊断标志物存在巨大的交叉,临床诊断中,通常结合诊断标志物达到肿瘤预后监测的目的。

目前,膀胱癌研究的热点主要集中于生物标志物的发现与临床诊断,与此同时,越来越多的实验证据表明,生物标志物的组合模型,往往比单个生物标志物取得更好的结果,更好的分子模型依旧需要重点关注。虽然患者随访的困难,但是由于膀胱癌易复发的特点,膀胱癌预后的监测将会成为膀胱癌研究的重要领域。膀胱癌尿液蛋白质组研究依然有着巨大的前景。

5 展 望

尿液蛋白质组的研究进展随着技术的不断发展而深入。在过去的几年,人们不仅运用各种技术手段分析尿液蛋白质组,还对各种方法的影响因素、分析流程、模型分类手段等做了进一步的探索,如

尿液获取的时间、仪器差异、有无癌症史、有无尿路感染、有无尿路结石、质谱谱图与蛋白质分类模型的对比等^[10, 17, 19, 36, 48-50]。虽然多种蛋白质分析技术可以应用于尿液蛋白质的研究,但是尿液受个体的影响仍然很大,各实验结果的重复并不是很让人满意,从而影响已发现的生物标志物的临床应用,研究尿液蛋白质组的新技术、新的实验流程、适合的分类模型都是值得深入探讨的。

膀胱癌患者在中国、世界癌症患者中占有相当大的比率,尿液检测作为一种非侵入样本,具有巨大的潜力,尿液蛋白质组的发展为我们进一步研究膀胱癌提供了可能,相关生物标志物的发现也带来了减低医疗成本的希望。由于尿液来源于血液,人体其他癌症以及泌尿系统涉及的另一重要器官——肾脏相关的癌症都有望用过尿液蛋白质组的发展来解决。

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. CA: Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2013. Cancer Letters, 2017, **401**: 63-71
- [3] Rosser C J, Chang M, Dai Y, *et al.* Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2014, **23**(7): 1340-1345
- [4] Urquidí V, Rosser C J, Goodison S. Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis. Current Medicinal Chemistry, 2012, **19**(22): 3653-3663
- [5] Schmitz-Dräger B J, Droller M, Lokeshwar V B, *et al.* Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. Urologia Internationalis, 2015, **94**(1): 1-24
- [6] 周育斌, 周文霞, 张永祥, 等. 基于双向电泳技术的体液蛋白质组学研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2003(04): 292-297
Zhou Y B, Zhou W X, Zhang Y X, *et al.* Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2003(04): 292-297
- [7] Frantzi M, Latosinska A, Fluhe L, *et al.* Developing proteomic biomarkers for bladder cancer: towards clinical application. Nature Reviews Urology, 2015, **12**(6): 317-330
- [8] D'costa J J, Goldsmith J C, Wilson J S, *et al.* A systematic review of the diagnostic and prognostic value of urinary protein biomarkers in urothelial bladder cancer. Bladder Cancer, 2016, **2**(3): 301-317
- [9] Rodriguez-Suarez E, Siwy J, Zurbig P, *et al.* Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, **1844**(5): 884-898
- [10] Schaub S, Wilkins J, Weiler T, *et al.* Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Kidney International, 2004, **65**(1): 323-332
- [11] Leng W, Ni X, Sun C, *et al.* Proof-of-concept workflow for

- establishing reference intervals of human urine proteome for monitoring physiological and pathological changes. *EBioMedicine*, 2017, **18**: 300–310
- [12] Thomas S, Hao L, Ricke W A, *et al.* Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. *Proteomics Clinical Applications*, 2016, **10**(4): 358–370
- [13] Schiffer E, Mischak H, Novak J. High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics*, 2006, **6**(20): 5615–5627
- [14] Lotan Y, Shariat S F, Schmitz-Drager B J, *et al.* Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urologic Oncology*, 2010, **28**(4): 441–448
- [15] Cornett D S, Reyzer M L, Chaurand P, *et al.* MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods*, 2007, **4**(10): 828–833
- [16] Lei T, Zhao X, Jin S, *et al.* Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. *Clinical Genitourinary Cancer*, 2013, **11**(1): 56–62
- [17] Bryan R T, Wei W, Shimwell N J, *et al.* Assessment of high-throughput high-resolution MALDI-TOF-MS of urinary peptides for the detection of muscle-invasive bladder cancer. *Proteomics Clinical Applications*, 2011, **5**(9–10): 493–503
- [18] Niessen W M. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of Chromatography A*, 2003, **1000**(1–2): 413–436
- [19] Yang N, Feng S, Shedden K, *et al.* Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification. *Clinical Cancer Research*, 2011, **17**(10): 3349–3359
- [20] Frantzi M, Zoidakis J, Papadopoulos T, *et al.* IMAC fractionation in combination with LC-MS reveals H2B and NIF-1 peptides as potential bladder cancer biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 2013, **12**(9): 3969–3979
- [21] 周志贵, 李珉, 白玉, 等. 毛细管电泳 - 质谱联用技术的新进展. *色谱*, 2009, (05): 598–608
Zhou Z G, Li M, Bai Y, *et al.* *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, (05): 598–608
- [22] Wittke S, Fliser D, Haubitz M, *et al.* Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers. *Journal of Chromatography A*, 2003, **1013**(1–2): 173–181
- [23] Theodorescu D, Wittke S, Ross M M, *et al.* Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *The Lancet Oncology*, 2006, **7**(3): 230–240
- [24] Alberice J V, Amaral A F, Armitage E G, *et al.* Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry metabolomics approach. *Journal of Chromatography A*, 2013, **1318**: 163–170
- [25] Liu C. The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, **2011**: 245821
- [26] Reichelt O, Muller J, Von Eggeling F, *et al.* Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using ProteinChip Arrays (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). *Urology*, 2006, **67**(3): 472–475
- [27] Liu W, Guan M, Wu D, *et al.* Using tree analysis pattern and SELDI-TOF-MS to discriminate transitional cell carcinoma of the bladder cancer from noncancer patients. *European Urology*, 2005, **47**(4): 456–462
- [28] Chang C, Wu S-F, Ma J, *et al.* Methods and progress of mass spectrometry-based selected reaction monitoring. *Progress In Biochemistry And Biophysics*, 2012, **39**(11): 1118–1127
- [29] Duriez E, Masselon C D, Mesmin C, *et al.* Large-scale SRM screen of urothelial bladder cancer candidate biomarkers in urine. *Journal of Proteome Research*, 2017, **16**(4): 1617–1631
- [30] Guo J, Ren Y, Hou G, *et al.* A Comprehensive investigation toward the indicative proteins of bladder cancer in urine: from surveying cell secretomes to verifying urine proteins. *Journal of Proteome Research*, 2016, **15**(7): 2164–2177
- [31] Mao Y, Zhao X, Wang S, *et al.* Urinary nucleosides based potential biomarker selection by support vector machine for bladder cancer recognition. *Analytica Chimica Acta*, 2007, **598**(1): 34–40
- [32] Putluri N, Shojai A, Vasu V T, *et al.* Metabolomic profiling reveals potential markers and bioprocesses altered in bladder cancer progression. *Cancer Research*, 2011, **71**(24): 7376–7386
- [33] Zhao M, Li M, Yang Y, *et al.* A comprehensive analysis and annotation of human normal urinary proteome. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 3024
- [34] Chen C L, Lai Y F, Tang P, *et al.* Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. *Journal of Proteome Research*, 2012, **11**(12): 5611–5629
- [35] Goodison S, Chang M, Dai Y, *et al.* A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer. *Plos One*, 2012, **7**(10): e47469
- [36] Shimizu Y, Furuya H, Bryant Greenwood P, *et al.* A multiplex immunoassay for the non-invasive detection of bladder cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2016, **14**: 31
- [37] Huang S, Kou L, Furuya H, *et al.* A nomogram derived by combination of demographic and biomarker data improves the noninvasive evaluation of patients at risk for bladder cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2016, **25**(9): 1361–1366
- [38] Goodison S, Ogawa O, Matsui Y, *et al.* A multiplex urinary immunoassay for bladder cancer detection: analysis of a Japanese cohort. *Journal of Translational Medicine*, 2016, **14**(1): 287
- [39] Shirodkar S P, Lokeshwar V B. Potential new urinary markers in the early detection of bladder cancer. *Current Opinion in Urology*, 2009, **19**(5): 488–493
- [40] Higgins J P, Kaygusuz G, Wang L, *et al.* Placental S100(S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2007, **31**(5): 673–680

- [41] Li H, Li C, Wu H, *et al.* Identification of Apo-A1 as a biomarker for early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma. *Proteome Science*, 2011, **9**(1): 21
- [42] Feldman A S, Banyard J, Wu C L, *et al.* Cystatin B as a tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression. *Clinical Cancer Research*, 2009, **15**(3): 1024–1031
- [43] Peng X C, Gong F M, Chen Y, *et al.* Proteomics identification of PGAM1 as a potential therapeutic target for urothelial bladder cancer. *Journal of Proteomics*, 2016, **132**: 85–92
- [44] Ohlsson G, Moreira J M, Gromov P, *et al.* Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP, 2005, **4**(4): 570–581
- [45] Li C, Li H, Zhang T, *et al.* Discovery of Apo-A1 as a potential bladder cancer biomarker by urine proteomics and analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **446**(4): 1047–1052
- [46] Patschan O, Shariat S F, Chade D C, *et al.* Association of tumor-associated trypsin inhibitor (TATI) expression with molecular markers, pathologic features and clinical outcomes of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *World Journal of Urology*, 2012, **30**(6): 785–794
- [47] Majewski T, Spiess P E, Bondaruk J, *et al.* Detection of bladder cancer using proteomic profiling of urine sediments. *Plos One*, 2012, **7**(8): e42452
- [48] Court M, Garin J, Masselon C D. Urine sample preparation and fractionation for global proteome profiling by LC-MS. *Methods in Molecular Biology*, 2015, **1243**: 175–186
- [49] Peng J, Chen Y T, Chen C L, *et al.* Development of a universal metabolome-standard method for long-term LC-MS metabolome profiling and its application for bladder cancer urine-metabolite-biomarker discovery. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(13): 6540–6547
- [50] Zhang H, Fan Y, Xia L, *et al.* The impact of advanced proteomics in the search for markers and therapeutic targets of bladder cancer. *Tumor Biology*, 2017, **39**(3): 101042831769118

Application of Urine Proteomics in The Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer*

HUANG Chuan-Xi^{1,3)}, MA Jie^{2,3)}, XU Kai-Kun^{2,3)}, WU Chen^{1)**}, ZHU Yun-Ping^{2,3)**}

⁽¹⁾ College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

⁽²⁾ State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Beijing 102206, China;

⁽³⁾ Beijing Institute of Life Omics, Beijing 102206, China)

Abstract Bladder cancer (BC) is one of the most common urologic diseases. Currently, urinary cytology and urinary cystoscopy are the main clinical diagnostic approaches to BC. However, the sensitivity of urinary cytology test is poor and cystoscopy is an invasive and uncomfortable procedure. Meanwhile, patients with BC are plagued by frequent recurrences, making BC one of the most expensive malignancies to monitor. There is an urgent need for a comfortable and accurate examination method. As urine storage is the main physiological function of the bladder, urine can be exposed to the tumor entity and some of the proteins secreted by tumor are most likely to enter urine. In addition, its sampling is truly non-invasive and most patients are willing to provide urine samples. The development of proteomics technology, especially the rapid development of urine proteomics, can enable us to study urinary bladder cancer easily. This paper summarizes the main technical approaches to urine proteomics researches on BC, and focuses on its application to clinical diagnosis and treatment in order to contribute to the development of urinary bladder proteomics.

Key words bladder cancer, urine proteomics, no-invasive, biomarkers, clinical application

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0060

* This work was supported by grants from The National Key R&D Program of China (2017YFC0906600, 2016YFC0901701, 2016YFB0201702).

**Corresponding author. Tel: 86-10-61777058

WU Chen. E-mail: dawnwuchen@163.com

ZHU Yun-Ping. E-mail: zhuyunping@gmail.com

Received: February 11, 2018 Accepted: April 4, 2018