

尿液作为新型生物标志物来源的探索*

井 健** 高友鹤**

(北京师范大学生命科学学院, 北京市基因工程药物与生物技术重点实验室, 北京 100875)

摘要 机体各种变化是生物标志物研究的核心内容。因为机体固有的稳态调控机制, 在血液中早期产生的变化容易被清除。而在尿液中不存在稳态调控机制, 允许容纳更多的变化因素存在。尤其在疾病发生的早期阶段, 从尿液中更有可能发现新型的早期生物标志物。在尿液生物标志物研究中, 亦应当考虑药物的影响。使用尿液生物标志物研究路线图, 能够有效规避各种影响因素对于尿液生物标志物研究的干扰; 同时, 结合膜处理新技术, 有利于经济、高效地大规模收集尿液样本, 促进尿液生物标志物的大规模研究。另外, 本文介绍了最容易在尿液中体现出变化的肾脏疾病生物标志物的研究进展。尿液生物标志物的研究, 将赋予人类在疾病预防、诊断、治疗及预后监测等诸多方面实现更多进步的可能性。

关键词 变化, 稳态机制, 尿液, 生物标志物

学科分类号 R363

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0192

生物标志物, 对于疾病的早期诊断、预测、治疗乃至预后监测, 都具有特殊意义。生物标志物对应的英文专业术语——“Biomarker”, 作为一个独立的专业术语, 最早出现于地质学领域研究文献, 指的是地质材料中源自生物有机体的一些有机化合物^[1]。20 世纪 80 年代, 它被正式地引入到生物医学领域。对于“Biomarker”, 有的观点认为, Biomarker 就是生物体在受到损害之前, 在分子、细胞或者个体水平上可能表现出的异常化的信号指标。也有观点认为, Biomarker 是指可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能改变或可能发生改变的生化学指标。2001 年, 美国 NIH “Biomarker” 的定义工作组(Biomarkers Definitions Working Group)专门发表了一篇文章^[2], 对“Biomarker”的学术内涵给出了如下定义: “Biological marker (Biomarker): A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention”。其中文含义可以理解为: 生物标志物(Biomarker)是能够客观反映和评价某一正常生理过程、病理生理过程或者药物治疗反应的特征性指标。从定义本身可以看出, NIH 小组将较多关注度

给予了“characteristic”, 即“特征性指标”。在此基础上, 我们认为, 对于生物标志物, 也许更应该突出的是“变化”这一核心内容, 即那些相关于生理或者病理过程的可监测的变化。发现生物标志物, 就是找到这些变化。生物标志物的研究, 可能更多地是针对某一个过程、而非某一状态的研究。比如, 对于疾病生物标志物的研究, 其实上是一个从健康态到疾病态之间的变化。众所周知, 涉及机体生理或病理状态转变过程中的有些变化, 是能够被监测到的; 但也有很多是无法监测到的。那些能监测到的“变化”, 应该可以被视为生物标志物。而且, 用来监测的指标越容易被检测到, 也就意味着监测病理状态的变化越容易, 作为生物标志物则越具有实际应用价值。

尿液由于其特殊的生理作用角色, 常常在不同个体间、同一个体不同阶段, 表现出较大的波动。正常情况下的较大波动, 则恰恰说明了尿液的敏感

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB517606, 2013CB530805)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58802065, E-mail: jjing@bnu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-08, 接受日期: 2016-09-30

性, 尿液可以反映出很多机体的生理变化. 有理由推测, 能够灵敏反映正常变化的地方, 也极有可能灵敏地反映机体异常的变化, 而且这种反映会更早出现. 基于正常生理状态下人体尿液蛋白质组学的研究鉴定, 发现有些尿液蛋白质是比较稳定的^[3]. 如果这些蛋白质在正常机体表现得比较稳定, 在某些病理性情况下发生了比较大的变化, 而且其变化幅度远高于正常机体, 那么这些正常情况下稳定、但在病理状态下变化剧烈的蛋白质, 就可以被视为良好的生物标志物.

稳定是相对的, 变化是绝对的. 在动态变化的尿液蛋白质组学研究中发现不变的规律, 将有望为生物标志物的研究注入新的动力和希望^[4].

1 尿液是值得重视的新型生物标志物的重要来源

生物标志物研究成为目前广为关注的一个热点. 但一个事实是, 生物标志物的发展明显滞后于治疗技术的进步. 血液, 长期以来, 被认为是生物标志物研究的主要对象. 在这一领域, 也投入了大量的人力物力. 作为一种主要的体液组成部分, 血液蛋白质组学是目前开展得最广泛、研究得最深入的蛋白质组学. 人类蛋白质组组织早在 2003 年就开展了血浆蛋白质组计划, 共鉴定出 9 504 个包含 1 个或 1 个以上肽段的蛋白质, 3 020 个包含 2 个或 2 个以上肽段的蛋白质^[5]. 但是, 就目前现状来看, 血液生物标志物的产出结果远低于预期. 针对近十年来尿液、血液生物标志物研究状况, 我们于 2013 年 7 月基于 PubMed 数据库专门做过一个统计. 血液生物标志物研究论文总计有 316 849 篇, 而尿液生物标志物研究论文总计 33 930 篇^[6]. 从发表论文数量的角度去看, 尿液生物标志物发文量仅占血液方面 10.7% 左右, 很显然, 学术界对于血液生物标志物的关注度, 要远远高于尿液. 作为生物标志物的来源, 尿液难道不具备研究的意义吗? 或者是尿液作为生物标志物的来源, 其意义被严重忽视了?

机体体液由细胞内液和细胞外液组成, 其中, 细胞外液主要包括占体重 5% 的血浆和占体重 15% 左右的组织液. 内环境由细胞外液构成, 负责为细胞提供物质原料, 同时接受细胞排出物, 以及为细胞各种生命活动提供适宜条件. 内环境理化性质相对恒定, 比如温度、pH、渗透压、化学组成等. 这种使内环境各种理化性质保持相对稳定状态的机

制就是机体稳态调控机制, 它对于维持正常的新陈代谢、对于开展各种生命活动是非常重要的. 机体稳态调控机制有多种, 比如通过神经、体液等因素的调节. 作为内环境的重要组成部分——血液, 依靠稳态调控机制, 维持其稳定性. 但从生物标志物发现的角度看, 机体特有的稳态调控机制, 一方面虽然适应了维持内环境稳定的要求, 但另一方面, 也同时消除了许多潜在的生物标志物, 尤其是许多疾病发生早期的生物标志物. 基于稳态调控机制, 可以预想, 有相当多的生物标志物, 为了避免对机体造成可能的损害或干扰, 并不会在血液中存在较长时间, 在一个非常短暂的时期内, 即被机体固有的稳态调控机制予以清除. 这就造成有的血液生物标志物只存在一个相当短暂的窗口期. 因此, 能否在短暂的窗口期检测、发现这些血液生物标志物, 就成为影响其是否能够成为有效的生物标志物的关键因素. 这就构成血液来源生物标志物研究的一大困难. 在血液生物标志物研究中, 还存在一些其他难以克服的困难. 比如, 用于检测、分析的血液或者血浆样品, 其获取、存储以及后期处理过程, 会对相应蛋白质组学的分析与生物标志物的研究造成不利影响^[7-8]. 这些影响因素有: 凝血时间和条件、贮存温度和时间、样品冻融循环次数、是否加注蛋白酶抑制剂, 等等. 再比如, 血浆中的高丰度蛋白, 也是制约血液蛋白质组学研究的一大困难. 有研究表明, 以血浆白蛋白、球蛋白、转铁蛋白等为主要成分的 22 种血液蛋白, 占整个血浆蛋白质总量的 99% 以上, 部分蛋白质的浓度可高达 mg/ml 以上级别^[9]. 蛋白质成分种类复杂、各组分浓度差异巨大的特点, 给血液生物标志物的研究带来很大困难. 虽然应用蛋白质组学的方法在血液中发现了很多疾病的潜在生物标志物, 但在后期临床验证过程中, 很多标志物表现均不好, 达不到预期效果^[10]. 迄今为止, 以研究最多的癌症生物标志物为例, 有报道, 美国 FDA 批准的用于癌症干预的血清来源生物标志物仅 13 种^[11], 和预期相比, 数量非常少.

尿液虽然不被认为是体液, 但在维护机体健康, 维持生命正常运转方面, 发挥着不可替代的重要作用. 相比于血液, 尿液具有明显的不同, 其中最为显著的一点是, 尿液没有稳态调控机制. 尿液常常被认为是一个废弃物存放的场所, 在生物标志物的研究中, 长期被忽视. 但有意思的是, 尿液中的“废弃物”, 却恰恰是血液稳态调控机制清除的对象, 它恰恰反映了那些被机体产生, 但又不能被

机体容纳的那些“变化”。这些“变化”，因为尿液没有稳态调控机制，而得以保留。所以，在某种意义上说，尿液是一个富含了各种“变化”的地方。同时，尿液本身的物质量，无论是固有体积、还是物质种类，如蛋白质种类，都远少于血液。所以，这意味着尿液代谢组学的信息量可能比血液少得多，也简单得多。而且，尿液蛋白质组复杂性低，便于检测、研究其中的低丰度蛋白质变化规律与特征。这些对于生物标志物的研究来说，是有利条件。通过尿液蛋白质组学的研究，更有可能发现各种相关机体“变化”的生物标志物，从而为生物标志物的研究打开新的领域，构成尿源生物标志物的范畴。尿液是经由泌尿系统与尿路排除体外的液体排泄物，尿液的生成有赖于肾小球的滤过作用和肾小管、集合管的再吸收和分泌。肾单位的所有部分均参与尿液的生成。所以，尿液最能直接反映泌尿系统的功能和状态。作为肾脏疾病生物标志物研究的首选，尿液具有独一无二的优势。从技术层面看，尿液生物标志物研究，相比较于血液，也有独特优势。机体产生的尿液可以实现完全无创、连续地收集，不会对受检者造成额外痛苦，收集过程的安全性也更高，尿液样品获取的成本更低。随着膜技术等技术手段的引进，尿液样品的收集与贮存，也使得大规模尿液生物标志物的研究越来越变得可能^[12]。从以上几点来看，在新型生物标志物研究领域，相比于血液，尿液具有独特的优势，值得重视。

在疾病发病时期，各种病理性症状已经比较明显，检测手段和指标都比较多，对于病理性状态的判断可以做到比较准确。生物标志物的作用和意义，可能更多地应当体现在疾病发病早期，即症状还不明显、对于病理性状态的发生发展都处于不明确的时期。一个良好的生物标志物，应当能够通过简易可行的检测或者监测手段，有效地检出疾病，有效地预测疾病的发生趋势。但在病理症状不明显的疾病早期阶段，机体的稳态调控机制仍在有效发挥各种调节机制，维持机体内环境的稳定性，通过各种途径，将影响机体的各种有害因素从体内清除，将体液，尤其是血液的各种组成与特征维持在正常范围内。因此，这个时期，血液中要么不存在生物标志物，要么可能的生物标志物被迅速清除。随着疾病的发展，基于病因的机体损害已经产生，虽然此时并不严重，甚至采取适当措施，还有可能逆转疾病。但这个早期阶段，难以用“症状”来衡量。而且，不同疾病很可能有着不同的早期特征。

从生物标志物的角度看，在疾病的早期阶段，血液还处于稳态调控机制的控制下，整体处于基本的平衡状态，疾病的早期特征没有在血液中表现出来。机体中最能够容纳各种“变化”的地方，就是尿液^[13]。而尿液，就是最容易发现早期疾病生物标志物的地方。当血液中存在明显的疾病生物标志物时，意味着血液的稳态调控机制已经不能将其有效清除，血液已经处于某种程度的失衡状态了。此时检测出的血液生物标志物，基本已经不能看作是疾病早期生物标志物。所以，从这一点而论，尿液生物标志物的研究极有可能带给人们更多关于疾病早期新型生物标志物研究的思路。

抗凝血药物是目前临床上应用血液血栓类疾病治疗的一类重要的常用药物。抗凝药物影响的是机体内的一种重要生理功能——凝血功能，凝血功能也是血液特有的重要生理功能，在许多生理和病理现象中都发挥着重要的作用。抗凝药物往往直接作用于血液中的凝血因子，通过干预凝血机制，达到拮抗血栓形成的效果。通过实验，研究了两种临床常用的抗凝血药物(肝素和阿加曲班)对于血液和尿液蛋白质组的影响^[6]。研究表明，无论是肝素实验组，还是阿加曲班实验组，血液蛋白质组里前20种高丰度蛋白质都没有变化；而且，对于肝素实验组，实验动物大鼠血液蛋白质组里前40种高丰度蛋白质都没有发生改变。但以同样的检测标准衡量，肝素实验组的大鼠尿液蛋白质组中，位居前10位的高丰度蛋白质就有4种发生变化；阿加曲班实验组中，大鼠尿液蛋白质组里位居前20位的蛋白质，有13种发生变化。从蛋白质组变化的蛋白质种类数目上比较，肝素实验组血液蛋白质组变化数相比于尿液蛋白质组变化数为3:18；阿加曲班实验组相应比例是1:42。研究表明，尿液蛋白质组中鉴定到的变化的蛋白质数目远多于血液蛋白质组^[6]。上述数据表明，抗凝血药物对机体作用效应导致的改变更多地体现在尿液中，这也从一个侧面说明，至少在某些方面，尿液能够更加灵敏地反映机体内环境受到的影响，更加灵敏地反映机体内环境的变化。相比于血液蛋白质组而言，尿液中的蛋白质普遍已经完成修饰与剪切过程，能够较好地保持修饰蛋白的稳定性。不同糖基化、磷酸化甚至酶切修饰的尿液蛋白质，往往相关于各种生理、病理现象。对于尿液修饰蛋白质组学的研究，也有利于发现更多更好的生物标志物信息^[14-15]。总而言之，尿液生物标志物的研究值得重视。

2 尿液生物标志物研究中药物影响的评估

在尿液生物标志物的研究中,尤其是涉及人体或者临床尿液蛋白质组学和生物标志物研究中,需要注意的一个问题是各种临床治疗药物对于生物标志物研究的干扰。为了使机体从疾病状态恢复到健康状态,一个重要的人为干预措施就是使用恰当的治疗药物。通过药物治疗,缓解病理性症状,达到机体部分乃至完全恢复健康状态的效果。就实际临床应用而言,药物治疗也许不是完全有效,导致的变化也许只是将疾病造成的机体变化部分逆转回去^[16]。从某种意义上说,疾病发生发展的过程就是产生生物标志物的过程,药物治疗的过程则是消除疾病、消除生物标志物的过程。

每一种药物都有不同的作用机制,对机体产生不同的作用效应。在利用临床人体尿液样品进行研究时,如果不考虑治疗药物对机体的作用,无论是检测出的变化,还是发现的潜在生物标志物,其实质都是机体病理效应和治疗药物作用效应二者共同作用的结果。所以,药物对于人体临床尿液样品蛋白质组学及相关生物标志物研究的影响不应被忽视。

前文介绍的抗凝血药物对于尿液蛋白质组学作用效应的研究,鲜明地揭示了这一点。相比于正常对照组,肝素实验组尿液蛋白质组中有 27 种蛋白质含量发生改变;阿加曲班实验组有 62 种蛋白质含量变化^[6,17]。因此,对于服用这些抗凝血药物的病人临床尿液样品,其尿液蛋白质组学研究与生物标志物评估中,需要考虑抗凝血药物的影响,将可能的潜在生物标志物有效性进行适当的评估。

通过评估三种临床常用利尿剂 *furosemide*、*hydrochlorothiazide*、*spiro lactone* 对于尿液蛋白质组学的影响^[18],也发现利尿剂引起多种尿液蛋白质的改变。这表明,使用利尿药物的作用效应,在临床相关肾脏疾病尿液蛋白质组学及相关生物标志物的研究中,也应该予以考虑,并给予更多关注与有效评估。

在抗高血压、抗焦虑治疗中使用的药物哌唑嗪(*prazosin*)属于交感神经系统抑制剂($\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist),其对于尿液蛋白质组的影响研究也表明,哌唑嗪会显著改变尿液蛋白质组组成,大约 50% 的尿液蛋白质含量都发生了变化^[19]。通过尿液蛋白质组学的研究,还有助于了解生理状态下交感神经系统与尿液的关系。

当然也应当考虑到,疾病状态下治疗药物对尿

液蛋白质组的影响,很有可能和健康状态下的影响有所不同。但是考虑了治疗药物的尿液蛋白质组学信息,将使临床领域相关研究人员和医务工作者能够提前预知使用的治疗药物对于尿液蛋白质组的作用特征,为研究特定疾病病理机制以及相关生物标志物提供必要的参考和对照,在此基础上增加发现有效的疾病生物标志物的可能性。同时,治疗药物尿液蛋白质组学研究,也有助于揭示药物作用机制,有助于探索、确定生物标志物在反映药物治疗效果方面的作用。

3 尿液生物标志物研究路线图

尿液能够容留更多变化因素,更能反映体内的代谢特征,这些特点决定了在不同个体之间或者同一个体不同时期,尿液内各组成成分都有可能存在着相当大的差异。正常机体状态和病理性机体状态之间,除了存在着病理、生理机制的不同外,还存在着服用或者不服用治疗药物的影响,这些影响因素都会反映到尿液的构成上。正常个体状态也会因为性别、生活习惯、饮食、运动锻炼的差异,对尿液组成成分造成不同的影响。对于尿液蛋白质组的影响,也是如此^[20]。

因为以上种种原因,本论文提出,可以应用疾病动物模型最大程度地减少大量不确定因素的影响,先找到病理状态和尿液变化的关系,然后再在临床样本上予以验证。这就构成尿液生物标志物研究的路线图^[21]。其特点是便捷、有效。

虽然直接使用人体临床样本做的实验最真实,但相比而言,临床样本的获得困难得多,特别是样本量需要很大的时候,整个实验研究更是艰难。而且人体临床实验的影响因素也有很多,比如,基本的伦理原因使得病理状态和治疗药物是不能分开的,此时,难以将尿液生物标志物的病理性效应与药理性效应区别开。临床研究中,尿液样品还可能受到各种各样的生理、病理因素干扰,要确切找到和病理发生发展直接相关的尿液生物标志物,困难很大。为了解决这一问题,或者减少此方面的实验误差、甚至是错误,就需要扩大实验数据量,引入大数据量的统计分析,研究成本和投入也将随之显著增加。

生物标志物的核心特性是变化。尿液、呼气、汗液,都有大量的变化,血液因为稳态机制变化相对较少。生物标志物的来源应当是富集变化的地方。生物标志物的另一重要特性是必须和病理状态

相关。所以在生物标志物的研究中, 那些能够体现确定相关性的实验, 应该被重视。这就引出一个疑问, 到底临床试验能体现相关性, 还是动物实验更能体现相关性呢? 和人体临床样本相比, 实验动物模型的个体间差异较小, 并且可以在人为干预下, 实现各种外部条件的最大一致化, 消除因为不同外界条件对动物机体造成的差异影响, 从而保证不同个体表现出最大的协同性和一致性。同时, 实验动物模型做的研究可以用严格的对照来评估影响因素和作用效应。这样基于动物模型开展的实验, 找到的尿液变化往往和病理状态具有更为确定的相关性, 这样的尿液生物标志物可能更准确、更有效^[2]。应用动物模型研究尿液生物标志物的另一有利条件是, 目前已经有许多种比较成熟的疾病动物模型建立或者有据可循。当然, 通过摸索条件, 也可以尝试建立新的不同病理、生理条件下的动物模型, 应用于尿液生物标志物的研究中。应用动物模型, 还有一个优势, 就是可以提供早期疾病生物标志物的线索, 为开展人体临床相关早期阶段尿液生物标志物的研究打下基础。对于临床医疗实践, 疾病早期阶段的生物标志物研究在某种程度上更有意义。但临床医疗对于疾病早期阶段的确诊往往存在很大困难, 在具体实践中, 也很难找到很多疾病或者病理状态的早期患者。这也决定了不可能通过临床样本的收集和调研, 达到发现适宜的早期生物标志物的研究目的。应用疾病动物模型, 可以很好地规避这一现实矛盾, 解决这一现实难题。适当的动物模型, 可以辅助研究人员更好地观察疾病的整个发病过程, 对不同病理状态进行准确的判断。同时, 在尿液生物标志物研究中应用有效的动物模型, 可以减少影响因素, 通过较少的样本量, 在尿液中找到和疾病或者病理现象相关的早期变化。基于尿液生物标志物研究路线图, 有望拓展早期疾病尿液生物标志物的研究空间。

通过建立阿霉素肾病(局灶性节段性肾小球硬化)和Thy1.1肾炎模型(系膜增生性肾炎)这两个大鼠疾病模型, 发现在相关病变早期, 两模型间有39种尿液蛋白质变化趋势不同, 7种尿液蛋白质变化趋势相同。这些信息将有助于对这两种疾病的早期鉴别诊断^[23]。通过肾小球疾病大鼠模型的研究, 在病理症状不明显的早期阶段, 即可发现激素敏感性和不敏感性的肾脏综合症早期激素药物应用特征^[23]。这可能有助于以后在人体临床治疗中, 判断哪些病人是激素敏感性的, 哪些病人是激素非敏感

性的。对于激素敏感性的临床病人, 可以进行激素药物的有效治疗。对于激素非敏感性的病人, 则避免使用无效的激素治疗方案, 改用其他治疗方案或者药物。该研究从某种意义上也带给我们关于“精准医学”的某些启示。通过研究败血症诱发的急性肾功能衰竭大鼠模型, 发现了疾病早期一系列尿液蛋白质发生变化, 比如白蛋白、安眠蛋白-1- α 和丝氨酸蛋白酶抑制剂等。其中安眠蛋白-1- α 有望成为可能的药物作用靶点和潜在的疾病早期生物标志物^[24]。

在应用动物模型进行人类尿液生物标志物的研究中, 也应当考虑到以下问题: 某个特定模型是否完全模拟人类疾病? 也许应用同一种疾病的几种不同的动物模型更有助于全面反映人类的疾病状态。因此, 基于动物模型找到的尿液生物标志物线索, 最终还是必须要在人体临床试验上予以验证。这也说明临床样本验证是尿液生物标志物研究路线图上的重要一环, 对于发现的新型尿液生物标志物是否能够应用于人类医疗实践、是否能在改善疾病治疗与预防上起到积极作用、是否能够推进“精准医学”的发展, 具有决定性的意义。总之, 基于尿液生物标志物研究路线图, 将有助于将人体尿液生物标志物的研究推向前进。

4 尿液保存新方法

尿液一般是在生成以后、在膀胱中于37℃体温条件下保存了几个小时后才排出体外的。此时, 蛋白质的降解和修饰都达到了一个相对稳定的阶段。尿液排出体外后, 在室温或者4℃条件, 其体积和状态不会像其他体液、组织或器官那样产生显著的改变。比如, 活着的组织器官, 存在一个重要的前处理阶段、血液通常会很快凝固、活细胞的胞内环境有可能发生显著改变。相比而言, 尿液收集过程、前处理过程相对简单, 尿液成分相对比较稳定, 这些为尿液作为人体生物标志物的优质来源打下了实验基础。

基于开发的膜吸附方法^[12], 可以更好地实现尿液样品的收集、后期处理与保存。结合在膜上的尿液蛋白质是干燥状态, 有利于保持蛋白质稳定性, -80℃条件贮存, 保存时间可达数年, 为尿液蛋白质组学及相关生物标志物的研究积累样本量。该方法也能较好地解决在尿液蛋白质组学及生物标志物研究中, 常常遇见的诸如尿液体积较大、不易存放、存在大量的盐分、许多蛋白质的浓度较低等问

题, 实现较少的存放占用空间、除盐、有效富集尿液蛋白质的目的。如果将尿液蛋白质保存膜完善标记, 标注诸如尿液收集对象、数量、日期、时间、医疗编号、服药前后等信息, 可以为后期的实验研究和数据分析提供依据。该方法显著特点是简单、廉价、环保, 可以有效、长期保存各种实验或者临床采集的尿液样本, 也可作为一种全面系统地保存病人生物样品的方法, 提高尿液蛋白质组学及相关生物标志物研究的科学性与准确率。同时, 也会使得保存患者每一病情阶段的尿液样本成为可能, 促进包括“精准医学”在内的临床医学实践的进步。

另一方面, 在尿液蛋白质组学研究中, 常常因为处理方法不同, 对尿液蛋白质组分析和数据比对造成较大的影响。基于此类膜技术, 可以实现尿液样品采集、储存和制备的标准化流程, 有利于各实验室研究结果间的比较, 促进尿液生物标志物的研究。

5 肾脏疾病尿液蛋白质组学与生物标志物研究进展

2002 年, 围绕着尿液蛋白质组开展的研究, 观察到近 1 400 个蛋白点, 对其中 420 个点进行质谱鉴定, 得到 150 种非冗余蛋白^[25]。本研究组利用相对二维电泳自动化程度更强的 LC-MS/MS 开展尿液蛋白质组学研究, 首次利用计算机自动处理客观方法进行质量控制, 鉴定出 226 种高可信度尿液蛋白^[26]。后期随着质谱技术的进步, 鉴定出高可信度的正常人尿液蛋白达 1 534 种^[27]。现在已经可以鉴定到 6 000 多种尿液蛋白(未发表数据)。另外, 本研究组采用伴刀豆蛋白 A(conA)富集糖蛋白的方法, 较早地开展了尿液蛋白质组糖基化翻译后修饰的研究, 鉴定出正常人尿液中 N 型糖蛋白 225 种^[24]。尿液磷酸化修饰的蛋白质组学研究揭示了 31 种尿液蛋白具有磷酸化修饰^[28]。研究表明, 虽然尿液里存在磷酸酶, 但尿液中存在有磷酸化修饰的蛋白质。我们推测, 这些剩下的尿液磷酸化蛋白质应普遍具备抗磷酸酶的特性。磷酸化蛋白质组在肿瘤相关疾病生物标志物的研究中尤其值得关注和重视^[15]。在 2004 年, 首次发现在人尿液中存在一种特殊的有膜结构小体——exosome^[29]。目前, 尿液 exosome 蛋白质已被鉴定出 1 132 种, 包括 14 种磷酸化的蛋白质^[30]。

有相当一部分肾脏疾病, 目前无任何蛋白质生

物标志物应用于诊断与疗后观察。但尿液蛋白质组技术, 有助于理解肾脏疾病的发病机理, 提高相应诊疗水平^[31-32]。

IgA 肾病是成年人中最常见的慢性肾小球肾炎, 除了肾活检以外, 目前尚无其他可靠的诊断方案。Haubitz 等^[33]用 CE-MS 比较了 IgA 肾病、膜性肾病患者和健康人的尿液多肽组, 鉴定了 IgA 肾病的特征性多肽表达谱。这组生物标志物的诊断灵敏度与对照组和膜性肾病组相比, 分别达到了 100% 和 77%, 特异性分别达到了 90% 和 100%。与之前鉴定的微小病变、局灶节段性肾小球硬化(PSCS)和糖尿病肾病的表达谱相比, 诊断的灵敏度和特异性均达到了 100%。糖尿病肾病、局灶节段性肾小球硬化及 V 型狼疮性肾炎患者的尿液蛋白质组研究表明, 这些疾病的尿液蛋白质图谱与正常人尿液相比存在着明显差异, 共鉴定出 25 种差异表达的蛋白质分子^[34]。肾移植后稳定和急性排异、急性肾小管坏死和复发(或原发)肾小球病 4 组患者和正常对照组的尿样研究, 鉴定出 m/z 在 5 270~5 550、7 050~7 360 和 10 530~111 003 域的若干信号峰, 可作为鉴别急性排异的特征模式, 这些峰是 $\beta 2$ 微球蛋白在 pH<6 的条件下, 被天冬氨酸蛋白酶酶切的片段^[35-36]。肾移植后慢性移植物失功的患者, 其尿调素和激肽原这些特定多肽在对照组中的含量明显高于疾病组^[37]。在急性肾损伤方面, 白介素 18、肾损伤分子 1 和外来胎球蛋白 A 被认为是非常有希望的生物标志物检测指标, 相关临床试验研究已经开始进行^[38-39]。在进行早期肾小球损伤相关疾病研究中, 发现 3 种血浆蛋白升高(白蛋白、转铁蛋白、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶), 这一结果具有普遍性, 但用来反映疾病特异性较困难^[40]。还有观点认为, 这些漏出的血浆蛋白, 其不同带电形式可能具有疾病特异性, 可以作为疾病生物标志物参考^[41]。正常白蛋白尿、微量蛋白尿和大量白蛋白尿的 II 型糖尿病肾病患者尿液蛋白质组学研究表明, 有 7 种尿液蛋白质的表达水平逐渐升高, 另有 4 种蛋白质的表达水平逐渐下降, 且这些尿液蛋白质来源多为血浆中的糖蛋白^[42]。还有观点认为, 上皮型钙黏着蛋白(E-cadherin)的 80 ku 可溶性片段可作为 II 型糖尿病肾病患者的潜在生物标志物, 其诊断的灵敏度和特异性分别为 78.8% 和 80.0%^[43]。研究膀胱癌患者、随访患者和正常人的尿液蛋白质组表达谱, 发现 2 种可能作为疾病生物标志物的尿液蛋白质, 分别是血清类黏蛋白(orosomucoid)和锌 - $\alpha 2$ 糖蛋白

(zinc- α 2-glycoprotein)^[44]. 还有观点将 polo 样激酶 2 (polo-like kinase2, PLK2)^[45] 和双库尼茨抑制剂 (bikunin)^[46] 作为潜在的膀胱癌标志物. 有研究通过 CE-MS 或 SELDI-TOF-MS 方法寻找疾病的特征性蛋白质或多肽表达模式, 建立膀胱癌患者与正常人尿液的差异表达蛋白谱, 对另外同类样本进行验证, 体现出一定的特异性与灵敏度 (约为 50%~60%左右), 但尚不能达到 100%^[47]. 有研究鉴定了肾细胞癌患者与正常人以及其他泌尿系统疾病患者的尿液蛋白质组, 得到其特征蛋白质表达谱. 但在临床验证时, 灵敏度和特异性呈现不稳定性, 最高时达 83%左右, 最低则为 41%^[48]. 对于此类肾脏疾病, 也有研究报道, 通过其他方法建立了尿液的差异蛋白质表达谱^[49-50]. 但其临床验证的结果同样呈现出不稳定的灵敏度和特异性, 且不同谱系差别较大.

针对某一特定肾脏疾病具有某一特定疾病生物标志物, 从目前的研究来看, 似乎还难以达到. 但我们认为, 可能更有意义的是一组尿液生物标志物的综合使用, 经过确定和排序后, 更适合于对肾脏疾病的诊断、监测和疗效观察.

6 器官离体灌流液

肾脏疾病往往会导致许多血液成分进入尿液, 这一点较之正常脏器状态会加剧. 所以, 肾脏疾病的尿液蛋白质组学研究, 往往不能真实反映脏器本身病变导致的特异性蛋白质改变情况. 为了解决这一问题, 我们在此引入离体器官灌流的技术与方法, 研究相关脏器蛋白质组学变化规律, 为相应疾病生物标志物的研究提供新的思路.

离体脏器, 比如离体肾脏、离体肝脏, 其灌流液往往能直接反映出脏器本身蛋白质组的变化, 具有很好的脏器特异性. 研究人员通常希望能够找到与尿液相关的、同时又是脏器来源的特异性疾病生物标志物. 我们认为, 离体器官灌流液研究在这方面是一个很好的补充与辅助. 在此结合本研究组的实验研究, 略作介绍.

比如, 离体大鼠肝脏灌流液的蛋白质组学研究, 揭示了关于肝脏损伤的某些潜在生物标志物^[51]. 离体大鼠肝脏灌流技术, 能够保持肝脏器官结构和功能的完整性达 3~4 h 之久, 在这一点上, 兼具体外实验和在体动物研究的双重优点^[52-53]. 灌流液模拟血液灌注通过肝脏血管系统, 在特定时间窗收集的灌流液. 由于灌流操作将不可避免地引起

肝脏细胞破裂, 且随时间这种现象呈增强趋势. 所以相比于正常肝脏生理状态, 灌流液中含有较多肝脏损伤的信息. 鉴定出常见损伤相关蛋白, 如天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷胱甘肽 S- 转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH), 这些已经作为肝脏损伤生物标志物广泛应用于临床. 鉴定出的如硫氧还蛋白 1 (thioredoxin-1)、转酮酶 (transketolase)、醇脱氢酶 1 (alcohol dehydrogenase-1)、脂肪酸结合蛋白质 1 (fatty acid binding protein-1)、碳酸酐酶 3 (carbonic anhydrase-3) 这 5 种灌流液蛋白质, 其谱图数要远高于谷草转氨酶, 结果暗示这些灌流液蛋白质也有可能是肝脏损伤的潜在生物标志物^[51]. 另外, 在灌流液中鉴定到视黄醇结合蛋白 (retinol-binding protein)^[54-55]、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor)^[56]、胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding protein)^[56]、成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21)^[57]、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase)^[58] 这几种蛋白质, 可以作为营养不良状态下的生物标志物. 因为此状态条件下, 肝脏合成分泌蛋白的速率将受到影响, 其脏器蛋白质谱呈现出以上变化规律. 其中, 视黄醇结合蛋白^[54, 59]与胰岛素样生长因子^[56, 60]已经用于临床营养状态监测. 后 3 种蛋白质将也有可能应用为潜在的营养不良早期诊断生物标志物.

同样, 我们相信, 离体肾脏灌流液蛋白质组学的研究也将给研究人员带来更多关于肾脏疾病生物标志物的新信息. 这将是尿液生物标志物研究的有益补充.

7 结 语

尿液不是体液, 是一个容易被忽视的生物信息聚集体. 相比于血液等其他体液, 在尿液中, 不存在稳态调控机制, 因而富集了许多变化, 是一个富含变化信息的地方, 尤其适用于疾病早期生物标志物的研究与发现. 我们相信, 随着越来越多的关注与重视, 随着越来越多的投入与调查, 尿液生物标志物的研究将不仅仅局限于尿液蛋白质组学的研究, 其研究对象和领域还将扩大到除蛋白质外的其他物质, 如核酸. 这些都将为未来的尿液生物标志物研究, 赋予更多的信息与希望. 尿液生物标志物的研究, 也一定会在诸多方面体现出重要意义, 比

如, 人类疾病的早期诊断及预后监测. 我们在此大胆地预计, 尿液生物标志物的研究, 也许会掀开人类疾病生物标志物研究的新篇章!

参 考 文 献

- [1] 杨 群. 分子古生物学原理与方法. 北京: 科学出版社, 2003: 96-148
Yang Q. Principles and Methods of molecular paleontology. Beijing: Science Publishing Company, 2003: 96-148
- [2] NIH Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther, 2001, **69**(3): 89-95
- [3] Sun W, Chen Y, Li F X, *et al.* Dynamic urinary proteomic analysis reveals stable proteins to be potential biomarkers. Proteom Clin Appl, 2009, **3**(3): 370-382
- [4] Gao Y H. Opinion: surfing the wave of urine. MOJ Proteomics Bioinform, 2015, **2**(3): 48-48
- [5] Omenn G S, States D J, Adamski M, *et al.* Overview of the HUPO plasma proteome project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. Proteomics, 2005, **5**(13): 3226-3245
- [6] Li M, Zhao M D, Gao Y H. Changes of proteins induced by anticoagulants can be more sensitively detected in urine rather than plasma. Sci China Life Sci, 2014, **57**(7): 649-656
- [7] Rai A J, Gelfand C A, Haywood B C, *et al.* HUPO Plasma proteome project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. Proteomics, 2005, **5**(13): 3262-3277
- [8] Tammen H, Schulte I, Hess R, *et al.* Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. Proteomics, 2005, **5**(13): 3414-3422
- [9] Anderson N L, Aderson N G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics, 2002, **1**(11): 845-867
- [10] Ransohoff D F. Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. Nat Rev Cancer, 2005, **5**(2): 142-149
- [11] Comunale M A, Lowman M, Long R E, *et al.* Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. J Proteome Res, 2006, **5**(2): 308-315
- [12] Jia L L, Liu X J, Liu L, *et al.* Urimem, a membrane that can store urinary proteins simply and economically, makes the large-scale storage of clinical samples possible. Sci China Life Sci, 2014, **57**(3): 336-339
- [13] Gao Y H. Opinion: define the early biomarker. MOJ Proteomics Bioinform, 2016, **3**(2): 78-78
- [14] Wang L J, Li F X, Sun W, *et al.* Concanavalin A captured glycoproteins in healthy human urine. Molecular & Cellular Proteomics, 2006, **5**(3): 560-562
- [15] Zhao M D, Liu K H, Gao Y H. Phosphoproteins with stability against all urinary phosphatases as potential biomarkers in urine. Protein Peptide Lett, 2015, **22**(9): 795-800
- [16] Gao Y H. Opinion: are urinary biomarkers from clinical studies biomarkers of disease or biomarkers of medicine? MOJ Proteomics Bioinform, 2014, **1**(5): 28-28
- [17] Li X D, Gao Y H. Effect of low-dose aspirin on candidate biomarkers in the urine proteome. MOJ Proteomics Bioinform, 2016, **3**(3): 87-87
- [18] Li X D, Zhao M D, Li M L, *et al.* Effects of three commonly used diuretics on the urinary proteome. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2014, **12**(3): 120-126
- [19] Zhao M D, Wu J Q, Li X D, *et al.* The specific α 1-adrenergic receptor antagonist prazosin influences the urine proteome. PLoS ONE, 2016, **11**(10): e0164796
- [20] Wu J Q, Gao Y H. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. Expert Review of Proteomics, 2015, **12**(6): 623-636
- [21] Gao Y H. Opinion: Roadmap to the urine biomarker era. MOJ Proteomics Bioinform, 2014, **1**(1): 5-5
- [22] Gao Y H. Are human biomarker studies always more valuable than animal ones? MOJ Proteomics Bioinform, 2015, **2**(1): 35-35
- [23] Wang Y, Chen Y, Zhang Y, *et al.* Differential ConA-enriched urinary proteome in rat experimental glomerular diseases. Biochem Biophys Res Commun, 2008, **371**(3): 385-390
- [24] Holly M K, Dear J W, Hu X, *et al.* Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. Kidney Int, 2006, **70**(3): 496-506
- [25] Pieper R, Gatlin C L, McGrath A M, *et al.* Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. Proteomics, 2004, **4**(4): 1159-1174
- [26] Sun W, Li F X, Wang J, *et al.* AMASS: Software for automatically validating the quality of MS/MS spectrum from SEQUEST results. Mol Cell Proteomics, 2004, **3**(12): 1194-1199
- [27] Adachi J, Kumar C, Zhang Y, *et al.* The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. Genome Biol, 2006, **7**(9): 91-96
- [28] Li Q R, Fan K X, Li R X, *et al.* A comprehensive and non-prefractionation on the protein level approach for the human urinary proteome: touching phosphorylation in urine. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, **24**(6): 823-832
- [29] Pisitkun T, Shen R F, Knepper M A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(36): 13368-13373
- [30] Gonzales P A, Pisitkun T, Hoffert J D, *et al.* Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. J Am Soc Nephrol Jasn, 2009, **20**(2): 363-379
- [31] Theodorescu D, Wittke S, Ross M M, *et al.* Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. Lancet Oncol, 2006, **7**(7): 230-240
- [32] Decramer S, Wittke S, Mischak H, *et al.* Predicting the clinical

- outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med*, 2006, **12**(4): 398–400
- [33] Haubitz M, Wittke S, Weissinger E M, *et al.* Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int*, 2005, **67**(6): 2313–2320
- [34] Hongbeonkerd V, Klein J B, Jevans A W, *et al.* Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib Nephrol*, 2004, **141**(2): 292–307
- [35] Schaub S, Wilkins J, Weiler T, *et al.* Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int*, 2004, **65**(1): 323–332
- [36] Schaub S, Wilkins J A, Antonovici M, *et al.* Proteomic-based identification of cleaved urinary β 2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant*, 2005, **5**(4): 729–738
- [37] Quintana L F, Campistol J M, Alcolea M P, *et al.* Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics*, 2009, **8**(7): 1658–1673
- [38] Devarajan P, Mishm J, Supavekin S, *et al.* Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab*, 2003, **80**(4): 365–376
- [39] Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, *et al.* Exosomal fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*, 2006, **70**(10): 1847–1857
- [40] Ngai H, Sit W, Jiang P, *et al.* Markedly increased urinary preprohaptoglobin and haptoglobin in passive heyman nephritis: a differential proteomics approach. *J Proteome Res*, 2007, **6**(8): 3313–3320
- [41] Varghese S A, Brian-Powell T, Budisavljevic M N, *et al.* Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 2007, **18**(3): 913–922
- [42] Rao P V, Lu X F, Standley M, *et al.* Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 2007, **30**(3): 629–637
- [43] Jiang, H J, Guan, G J, Zhang, R, *et al.* Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, **25**(3): 232–241
- [44] Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, *et al.* Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics*, 2005, **5**(16): 4296–4304
- [45] Tan L B, Chen K T, Liao P C, *et al.* Identification of urine PLK2 as a marker of bladder tumors by proteomic analysis. *World J Urol*, 2010, **28**(1): 117–122
- [46] Tsui K H, Tang P, Lin C Y, *et al.* Bikunin loss in urine as useful marker for bladder carcinoma. *J Urol*, 2010, **183**(1): 339–344
- [47] Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, *et al.* Protein chip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol*, 2005, **47**(6): 885–893
- [48] Rogers M A, Clarke P, Noble J, *et al.* Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility. *Cancer Res*, 2003, **63**(20): 6971–6983
- [49] Bosso N, Chinello C, Picozzi S C M, *et al.* Human urine biomarkers of renal cell carcinoma evaluated by ClinProt. *Proteom Clin Appl*, 2008, **2**(7–8): 1036–1046
- [50] Wu D L, Zhang W H, Wang W J, *et al.* Proteomic evaluation of urine from renal cell carcinoma using SELDI-TOF-MS and tree analysis pattern. *Technol Cancer Res Treat*, 2008, **7**(3): 155–160
- [51] Zhang Y, Wang Y, Sun W, *et al.* Strategy for studying the liver secretome on the organ level. *J Proteome Res*, 2010, **9**(4): 1894–1901
- [52] Gores G J, Kost L J, Larusso N F. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology*, 1986, **6**(3): 511–517
- [53] Bessems M, Hart N A T, Tolba R, *et al.* The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim*, 2006, **40**(3): 236–246
- [54] Robinson M K, Trujillo E B, Mogensen K M, *et al.* Improving nutritional screening of hospitalized patients: the role of prealbumin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2003, **27**(6): 389–395, quiz 439
- [55] Serge G, Goin A, Enzi G, *et al.* Role of visceral proteins in detecting malnutrition in the elderly. *Eur J Clin Nutr*, 2006, **60**(2): 203–209
- [56] Axelsson J, Qureshi A R, Divino-Filho J C, *et al.* Are insulin-like growth factor and its binding proteins 1 and 3 clinically useful as markers of malnutrition, sarcopenia and inflammation in end-stage renal disease?. *Eur J Clin Nutr*, 2006, **60**(6): 718–726
- [57] Inagaki T, Lin V Y, Goetz R, *et al.* Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone fgf21. *Cell Metab*, 2008, **8**(1): 77–83
- [58] Dhansay M A, Benadé A J, Donald P R. Plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity and plasma lipoprotein composition and concentrations in kwashiorkor. *Am J Clin Nutr*, 1991, **53**(2): 512–519
- [59] Sergi G, Coin A, Enzi G, *et al.* Role of visceral proteins in detecting malnutrition in the elderly. *Eur J Clin Nutr*, 2006, **60**(2): 203–209
- [60] Caregaro L, Favaro A, Santonastaso P, *et al.* Insulin-like growth factor 1, a nutritional marker in patients with eating disorders. *Clin Nutr*, 2001, **20**(3): 251–257

Urine as a Source of Novel Biomarkers*

JING Jian**, GAO You-He**

(College of Life Sciences, Beijing Key Laboratory of Genetic Engineering and Biotechnology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract Change is the soul of biomarker. Early changes *in vivo* are subject to be removed from blood because of homeostasis mechanisms of the body. Without homeostasis mechanisms, urine can accommodate more changes and therefore is an excellent source of biomarkers. Especially in the early stage of disease occurrence, the new biomarkers are more likely to be found in the urine. In biomarker studies, the effects of the therapeutic drugs must be taken into account. Various confounding factors can be effectively circumvented interference on urinary biomarker studies based on urine biomarker roadmap research. A novel membrane storage technique enables large-scale urine sample collection and storage economically and efficiently. Biomarkers discovery of kidney diseases are introduced and discussed also here. It can be expected that urine biomarker studies will greatly promote the development of medical technology such as human disease diagnosis, prevention, treatment or prognosis.

Key words change, homeostasis, urine, biomarker

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0192

* This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (2012CB517606, 2013CB530805).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-58802065, E-mail: jjing@bnu.edu.cn

Received: June 8, 2016 Accepted: September 30, 2016