

蛋白质组学在急性肾损伤尿液标志物研究中的进展

王来亮 罗群 周芳芳

急性肾损伤 (AKI) 为临床常见危重症, 尽管治疗措施有了明显改善, 但其发病率和病死率仍然很高^[1-7]。早期诊断、早期干预对减少患者并发症、降低病死率有重要意义, 可产生巨大的社会及经济效益^[8-9]。AKI 传统诊断指标血清肌酐 (SCr) 有较大的局限性, 其敏感度、特异度均不高^[10-11]。肾损伤分子-1 (KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)、白细胞介素-18 (IL-18)、胱抑素 C (Cys C) 等是近年来发现具有前景的早期诊断 AKI 的生物学标志物, 单一或联合诊断 AKI 的敏感度、特异度均较传统诊断指标高^[12-17]。但 AKI 病因多、发病机制复杂, 特定病因 AKI 中发现的生物学标志物应用于其他类型 AKI 并不合适^[18-23]。近年来, 无创蛋白质组学技术成为研究 AKI 新型生物学标志物的重要方法, 现就近年来这方面的研究进展进行综述。

1 蛋白质组学在 AKI 尿液标志物研究中的应用

1.1 表面增强激光解吸电离-飞行时间-质谱 (SELDI-TOF-MS): SELDI 蛋白质芯片技术是一种较新的蛋白质分离鉴定技术。蛋白质芯片选择性结合标本蛋白, 被结合的蛋白经激光解离, 离子根据质荷比 (m/z) 差异在电场飞行时间不同, 经信号转换后, 以一系列峰值的形式呈现, 构成某种疾病特有的指纹图谱。SELDI-TOF-MS 鉴定技术的最大优点是快速、标本用量少、高度并行性、高通量、微型化和自动化, 且可直接检测尿液、血液、脑脊液等, 在临床应用方面具有高度的研究价值; 但其为半定量法, 且对相对分子质量 $>20\ 000$ 的蛋白检测敏感度低。

Nguyen 等^[24]选择了 60 例心肺分流术 (CPB) 后 2~3 d 发生 AKI 的患儿, 用 SELDI-TOF-MS 技术于术后 2 h 和 6 h 在尿液中检测到 4 个明显增强的蛋白峰, m/z 分别为 6 400、28 500、43 000 和 66 000。在这个队列研究中 ($n=60$), 后 3 种蛋白作为诊断术后 2 h AKI 的生物学标志物的敏感度和特异度均达 100%, 受试者工作特征曲线 (ROC) 下面积 (AUC) 为 0.98; 串联质谱确定 m/z 6 400 的蛋白为抑肽酶, 是 CPB 术后 AKI 的独立预测因子, 且与 AKI 不良预后相关, 其预测 CPB 术后 2 h 患儿 ($n=106$) AKI 时, 敏感度为 92%, 特异度为 96%, AUC 为 0.98。抑肽酶有抗纤溶作用, 经肾小球滤过、近端小管重吸收, 发生 AKI 时小管上皮细胞损伤, 尿液抑肽酶水平增加, 但其在 AKI 的作用机制及与 AKI 的发病关系尚不明确。另外, Devarajan 等^[25]在一项前瞻性队列

研究 ($n=365$) 中发现, α_1 -微球蛋白 (m/z 28 500)、 α_1 -酸糖蛋白 (m/z 43 000) 和白蛋白 (m/z 66 000) 为诊断 CPB 术后 AKI 的理想标志物, 在术后 6 h 预测 AKI 时, 3 个指标的 AUC 分别为 0.84、0.87 和 0.76, 均与 AKI 严重程度、持续时间及住院时间相关。 α_1 -微球蛋白和 α_1 -酸糖蛋白是急性期糖蛋白, 后者转运内生物质及调节免疫, 与 AKI 早期病理生理相关; 尿白蛋白增多是肾脏急性应激的结果, 往往提示毛细血管通透性增加及炎症损害; 但三者也可出现在其他疾病患者尿液中 (如慢性肾小球疾病), 故限制了其临床应用。此外, 以上均为单中心研究, 研究对象都为正常肾功能患儿, 需在伴有其他 AKI 危险因素患者中进行更大样本的多中心前瞻性研究证实。

Ho 等^[26]发现, CPB 术后非 AKI 患者尿蛋白组图谱出现两个增强蛋白峰 (m/z 2 430 和 m/z 2 780)。 m/z 2 780 蛋白峰为 hepcidin-25, 是重要的铁平衡调节剂。一项前瞻性大规模观察性队列研究^[27] ($n=338$) 表明: CPB 术后 1 d 全部患者尿 hepcidin-25/SCr 比值升高, 其中非 AKI 患者更显著 ($P<0.000\ 5$); 经多变量分析显示, \log_{10} hepcidin-25/SCr 与 AKI 发生率呈负相关 ($P<0.000\ 1$); 术后 1 d 预测非 AKI 时, AUC 为 0.80, 敏感度、特异度均为 68%, 阴性预测值为 96%。已有研究证实, hepcidin-25 可诱导降解铁转运蛋白, 抑制铁在肠道内吸收以及肝细胞与巨噬细胞对铁的释放, 减少含铁自由基对肾脏的毒性^[27]。据此推测, hepcidin-25 在肾缺血/再灌注损伤 (IRI) 中的保护作用机制类似于去铁胺, 主要是通过调节铁平衡实现的。此外, hepcidin-25 为 AKI 的早期治疗提供了新思路, 如 Haase 等^[28]进行了铁螯合剂对 AKI 保护作用的研究, 但该研究为单中心观察性研究, 且 hepcidin-25 与肾脏保护作用间的具体联系未明, 需进一步研究明确。

另外, O'Riordan 等^[29]用 SELDI-TOF-MS 技术在肾移植急性排斥反应 (AR) 患者尿液中发现, 人类 β -防御素-1 和 α_1 -抗糜蛋白酶升高 (均 $P<0.05$), 二者联合诊断 AR 的 AUC 达 0.912。Bennett 等^[30]对行心脏导管术患儿尿液进行蛋白质组学研究, 造影剂急性肾损伤 (CI-AKI) 患儿术前出现一个增强蛋白峰 (m/z 4 631 000), 非 CI-AKI 患儿出现另一个增强蛋白峰 (m/z 4 480 000, 为 β -防御素-1 变体), 其 AUC 分别为 0.89~0.99 和 0.84。据此研究者认为, 尿液中的生物标志物 (m/z 4 631 000) 和 (或) 缺乏 β -防御素-1 (m/z 4 480 000) 可早期预测 CI-AKI。 β -防御素-1 为机体固有的抗微生物系统, 对细胞毒性反应与免疫反应有调节作用, 推测此特性在避免发生 CI-AKI 中具有重要意义。以上均为单中心研究, 且生物学标志物本质尚未明确, 需进一步

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.05.018

基金项目: 浙江省医药卫生科研基金项目 (2013KYB236); 浙江省宁波市自然科学基金 (2013A610266)

作者单位: 315010 浙江宁波, 宁波市第二医院肾内科

通讯作者: 罗群, Email: nbluoqun@163.com

研究证实。

1.2 毛细管电泳-质谱 (CE-MS): CE 指将待分离标本置于毛细管柱,以电场为驱动力,因蛋白移动距离不同完成分离,常与电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 结合使用。CE-MS 联用技术综合了 CE 的高效分离能力、广泛的样品适应性和 MS 的高灵敏度,可提供结构信息等优势,已经发展成为一种重要的分离鉴定手段,但不适合检测相对分子质量较大 (>20 000) 的蛋白。

Metzger 等^[20]应用 CE-MS 联用技术分析重症加强治疗病房 (ICU) 30 例患者的尿液,确定了一个由 20 种多肽组成的标志物组,可以作为 AKI 的早期诊断模式,其敏感度为 92%,特异度为 90%,AUC 为 0.91。诊断模式多肽片段源于 β_2 -微球蛋白、白蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶、纤维蛋白原- α 、胶原蛋白-1 α (I) 和胶原蛋白-1 α (III) 6 种蛋白,前 3 种蛋白多肽片段在 AKI 患者尿液中增多,后 3 种蛋白减少。两项盲法的前瞻性验证性研究中所用尿液样品分别来自 ICU 和造血干细胞移植后患者,证实此诊断模式可早期诊断 AKI, AUC 分别为 0.84 和 0.90;这种方法能在 SCr 升高 5 d 前检出 AKI,与新型生物学标志物 Cys C、KIM-1、IL-18 和 NGAL 相比有更好的诊断价值,且不受 AKI 严重程度的影响,在 AKI 恢复期与 SCr 有类似的预后价值。另外, Metzger 等^[31]用 CE-MS 技术分析了肾移植患者 ($n=39$) 的尿液,其中 16 例发生亚临床急性肾小管间质炎,并建立了一个由 13 种多肽组成的诊断模式。研究者应用盲法在肾移植患者 ($n=64$) 中验证,临床组、亚临床组及健康对照组诊断率分别为 100.0% (10/10)、88.9% (16/18) 和 77.8% (28/36),AUC 均达到 0.91,肾活检相关急性肾小管损伤及尿路感染不影响以上诊断模式的准确性。以上研究提示,CE-MS 技术为 AKI 早期诊断模式的研究提供了新途径;若在非特定类型 AKI 患者,通过 CE-MS 联用技术建立尿液 AKI 生物学标志物早期诊断模式,可避免 AKI 具体病因、伴随疾病、治疗药物、疾病严重程度等因素的影响,使诊断模式具有普遍适用性。

1.3 双向凝胶电泳-质谱 (2DE-MS): 根据蛋白等电点与相对分子质量不同,通过等电聚焦及凝胶电泳进行分离,目标蛋白位点用蛋白酶分解,最后通过基质辅助激光解吸/电离飞行时间法 (MALDI-TOF) 分析酶解的多肽。在探索 AKI 新型生物学标志物中,2DE-MS 是一种比较传统的选择,但其效率低,重复性差,费时费力且不能自动化,不适用于临床运用。

Aregger 等^[32]应用 2DE-MS 技术分析了 CPB 术后 AKI 患者的尿液,发现肾上腺髓质激素结合蛋白 (AMBIP) 片段和锌- α_2 -糖蛋白 (ZAG) 减少,修饰性白蛋白增加。验证性队列研究 ($n=68$) 进一步证实了 ZAG 在 AKI 患者尿液中的变化,发生 AKI 时糖皮质激素水平发生变化,诱导了 ZAG 表达变化,表明其可能成为 CPB 术后早期诊断 AKI 的生物学标志物。但 ZAG 与 AKI 的相互关系需进一步研究明确。值得注意的是,ZAG 抑制包括肾小管上皮在内的多种细胞增生,在鼠 IRI 致 AKI 模型中证实,缺乏 ZAG 可促进受损

肾小管上皮增生^[33]。据此推测,ZAG 表达减少可能对减轻 AKI 肾小管损伤、促进损伤修复有重要意义。

另外,Wang 等^[34]用 2DE-MS 技术分析 12 例行冠状动脉 (冠脉) 造影或介入诊疗术患者的尿液样品,发现与甘露糖结合凝集素 (MBL) 和甘露糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶-2 (MASP2) 均显著增加。研究表明,MBL 和 MASP-2 是补体激活凝集素途径的关键蛋白^[35]。据此可以说明,CI-AKI 的发生除了主要与局部缺血有关外,还可能与凝集素途径密切相关,但是具体机制还不明确,需行进一步研究,以明确尿液中 MBL、MASP-2 与 CI-AKI 的关系,以及补体激活凝集素途径的具体机制。

1.4 高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS): HPLC 进样后,经高压液体在固定相中移动,由于不同成分与固定相的相互作用不同,不同成分先后离开色谱柱,经检测器转变成电信号。HPLC-MS 联用技术将 HPLC 对复杂样品的高分离能力与 MS 的高灵敏度、可提供结构信息等优势结合起来,在生物学标志物研究中被证实具有重要作用,但不适于临床应用。Sigdel 等^[36]用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术对肾移植患者尿液进行分析发现,AR 与非 AR 患者间尿液差异蛋白达 284 种;用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测尿调素 (UMOD)、色素上皮源性因子 (PEDF) 和 CD44 发现,AR 患者的 UMOD 和 CD44 较非 AR 患者减少, PEDF 增加;检测 UMOD、PEDF、CD44 可提示 AR, AUC 分别为 0.85、0.93 和 0.97,其准确性不受尿液其他蛋白、机体免疫情况、年龄和性别的影响。PEDF 为丝氨酸蛋白酶抑制剂,与肾损伤的关系尚未明确,但尿 PEDF 可提供一种监测肾移植患者健康状况的新途径。另外, Maddens 等^[37]用 LC-MS/MS 技术在一个小样本研究中发现,脓毒性 AKI 与非 AKI 间尿液几丁质酶-3 样蛋白 (chitinase 3-like protein) 及酸性哺乳动物壳多糖酶 (acidic mammalian chitinase) 水平存在差异,但因样本量较小,无法得出确切结论。此外,几丁质酶对脓毒性 AKI 特异度不高,容易受到其他疾病 (如哮喘、炎症性肠疾病、肝纤维化等) 干扰,将其作为一种诊断脓毒性 AKI 的生物学标志物存在不足。

2 小结与展望

综上所述,蛋白质组学技术的迅速发展对 AKI 生物学标志物的研究产生了巨大影响。其通过分析特定类型 AKI 患者的尿液蛋白/多肽组,全面呈现 AKI 与非 AKI 患者尿液蛋白/多肽的分布差异来筛选出 AKI 新型生物学标志物,具有较强的可行性与可操作性,是研究 AKI 生物学标志物的关键技术,在未来 AKI 早期诊断及发病机制研究中有较大的潜力。但现行研究存在明显不足,如有研究将 SCr 作为诊断 AKI 的主要指标,缺乏病理结果;评估新型生物学标志物诊断效能采用单一 AUC;新型生物学标志物与 AKI 关系以及内在机制未阐明等等。目前,蛋白质组学对生物学标志物的研究处于发现、验证阶段,确认合格的生物学标志物,降低检测成本并运用于临床成为未来的检测工具,对科学工作者是一个巨大的挑战。

参考文献

- [1] Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes [J]. *Kidney Int*, 2012, 81 (9): 819-825.
- [2] James MT, Wald R, Bell CM, et al. Weekend hospital admission, acute kidney injury, and mortality [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (5): 845-851.
- [3] Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (2): 345-352.
- [4] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury [J]. *Lancet*, 2012, 380 (9843): 756-766.
- [5] 陆任华, 方燕, 高嘉元, 等. 住院患者急性肾损伤发病情况及危险因素分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23 (7): 413-417.
- [6] 方艺, 丁小强, 钟一红, 等. 住院患者急性肾损伤的发病情况调查[J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23 (7): 417-421.
- [7] 李家瑞. 重症监护病房的急性肾损伤[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (3): 238-240.
- [8] 胡鹏华, 陈源汉, 梁馨苓, 等. 术后早期使用 ACEI/ARB 或利尿剂对老年心脏术后急性肾损伤发生的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (7): 394-398.
- [9] 林钦汉, 张明, 陈军, 等. 早期连续性肾脏替代治疗对严重脓毒症患者的治疗意义[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (1): 46-49.
- [10] Waikar SS, Betensky RA, Emerson SC, et al. Imperfect gold standards for kidney injury biomarker evaluation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23 (1): 13-21.
- [11] Haase M, Kellum JA, Ronco C. Subclinical AKI—an emerging syndrome with important consequences [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8 (12): 735-739.
- [12] 付燕, 赵斌. 急性肾损伤早期诊断的生物标志物[J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24 (9): 571-573.
- [13] Luo Q, Zhou F, Dong H, et al. Implication of combined urinary biomarkers in early diagnosis of acute kidney injury following percutaneous coronary intervention [J]. *Clin Nephrol*, 2013, 79 (2): 85-92.
- [14] 罗群, 周芳芳, 董虹, 等. 尿 KIM-1、NGAL 和 IL-18 联合检测在冠状动脉介入术后造影剂肾损伤的早期诊断[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27 (1): 57-58.
- [15] 周芳芳, 罗群, 兰凯, 等. 尿 KIM-1、NGAL 和 IL-18 联合检测在缺血再灌注急性肾损伤的早期诊断[J]. *浙江医学*, 2010, 32 (8): 1012-1014.
- [16] 李家瑞, 张红燕, 尚跃丰, 等. 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白对社区获得性肺炎伴发急性肾损伤早期诊断及预后的判断[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (4): 269-271.
- [17] 李立斌, 严静. 急性肾损伤的早期诊治: 路在何方? [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (4): 209-211.
- [18] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54 (6): 1012-1024.
- [19] Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. Biological markers of acute kidney injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22 (5): 810-820.
- [20] Metzger J, Kirsch T, Schiffer E, et al. Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2010, 78 (12): 1252-1262.
- [21] 蔡靛, 刘占国, 常平. 脓毒症致急性肾损伤的机制及治疗研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (7): 444-446.
- [22] 赵娜, 田焕焕, 李志, 等. 脓毒症并发急性肾损伤的危险因素分析与早期诊断[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (9): 542-545.
- [23] 王来亮, 罗群. 缺血性急性肾损伤病理生理研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14 (10): 924-926.
- [24] Nguyen MT, Dent CL, Ross GF, et al. Urinary aprotinin as a predictor of acute kidney injury after cardiac surgery in children receiving aprotinin therapy [J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23 (8): 1317-1326.
- [25] Devarajan P, Krawczeski CD, Nguyen MT, et al. Proteomic identification of early biomarkers of acute kidney injury after cardiac surgery in children [J]. *Am J Kidney Dis*, 2010, 56 (4): 632-642.
- [26] Ho J, Lucy M, Krokhn O, et al. Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 53 (4): 584-595.
- [27] Ho J, Reslerova M, Gali B, et al. Urinary hepcidin-25 and risk of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6 (10): 2340-2346.
- [28] Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Novel biomarkers, oxidative stress, and the role of labile iron toxicity in cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55 (19): 2024-2033.
- [29] O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, et al. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts [J]. *Am J Transplant*, 2007, 7 (4): 930-940.
- [30] Bennett MR, Ravipati N, Ross G, et al. Using proteomics to identify preprocedural risk factors for contrast induced nephropathy [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2008, 2 (7-8): 1058-1064.
- [31] Metzger J, Chatzikyrkou C, Broecker V, et al. Diagnosis of subclinical and clinical acute T-cell-mediated rejection in renal transplant patients by urinary proteome analysis [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2011, 5 (5-6): 322-333.
- [32] Aregger F, Pilop C, Uehlinger DE, et al. Urinary proteomics before and after extracorporeal circulation in patients with and without acute kidney injury [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 139 (3): 692-700.
- [33] Schmitt R, Marlier A, Cantley LG. Zag expression during aging suppresses proliferation after kidney injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19 (12): 2375-2383.
- [34] Wang L, Ni ZH, Xie ZS, et al. Differentially expressed urine protein of contrast induced acute kidney injury by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, 91 (32): 2250-2253.
- [35] Wallis R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway [J]. *Immunobiology*, 2007, 212 (4-5): 289-299.
- [36] Sigdel TK, Kaushal A, Gritsenko M, et al. Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2010, 4 (1): 32-47.
- [37] Maddens B, Ghesquiere B, Vanholder R, et al. Chitinase-like proteins are candidate biomarkers for sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11 (6): M111.013094.

(收稿日期: 2015-03-13)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代,符合动物伦理学标准;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析。