

尿液标志物学

主 编 黄 山 田晓滨 陈 辉 查 艳



科学出版社

尿液标志物学

主编 黄 山 田晓滨 陈 辉 查 艳

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书全面系统地介绍了尿液标志物学的理论基础、研究与应用进展、与相关交叉学科的关系、与全身多器官和多系统疾病关联的多种尿液生物标志物的生物学特点、最新检验方法及临床应用等相关知识,目的是让广大医学工作者对尿液标志物学的基础研究和临床应用有一个系统的了解,旨在推动尿液标志物学在临床疾病的诊断、治疗和研究方面的发展。本书既注重实用性,也兼顾理论性,可供肾内科、泌尿外科、儿科、急诊科、呼吸与危重医学科、肿瘤科、心内科、神经科、检验科临床工作者参考,也可供基础医学科研工作人员和高等医学院校师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

尿液标志物学/黄山等主编. —北京:科学出版社,2018.6

ISBN 978-7-03-057551-7

I. ①尿… II. ①黄… III. ①尿液检验—生物标志化合物 IV. ①R446.12

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 100464 号

责任编辑:程晓红 / 责任校对:张怡君

责任印制:肖 兴 / 封面设计:吴朝洪

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2018年6月第一次印刷 印张:30

字数:767 000

定价:135.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

编著者名单

主 编 黄 山 田晓滨 陈 辉 查 艳
副主编 许 健 达静静 袁 静 冯勤颖
编 者 (以姓氏笔画为序)

王仕敏	王欲舟	龙艳君	田 禾	田茂露
田晓滨	冉 燕	冯勤颖	皮明婧	达静静
向 丽	刘 丽	刘 璐	许 健	孙 翼
苏凤耘	李 倩	杨 霞	杨宇齐	吴 静
吴立波	何 珊	何平红	佟小雅	余芳芳
沈 燕	宋晓钰	张 茜	张 栋	张维贞
陈 洁	陈 爽	陈 辉	陈立东	陈运芬
林 鑫	林建明	林贵州	周志文	周信忠
周朝敏	赵 强	赵健秋	胡 英	胡杉杉
查 艳	俞佳丽	饶玲玲	贺 蓉	袁 静
聂杰	黄 山	黄 霞	黄斗全	黄芃铖
崔梦笔	彭艳哲	董 蓉	程世平	曾 雯
谢 莹				

序

对于疾病的研究,生物标志物一般是指可供客观测定和评价的一个普通生理或病理或治疗过程中的具有某种特征性的生化指标,通过对其测定可以获知机体当前所处生物学过程中的进程。检查一种疾病特异性的生物标志物,对于疾病的鉴定、早期诊断,以及预防、治疗过程中的监控可能起到帮助作用。寻找和发现有价值的生物标志物已经成为目前研究的一个重要热点。

尿液是人类和脊椎动物为了新陈代谢的需要,经由泌尿系统及尿路排出体外的液体排泄物,蕴藏了人体健康、疾病、饮食与环境污染物接触等方面的关键信息。早在公元前5世纪,Hermogenes就指出尿液的颜色及其他性质可能与某些特定的疾病相关。作为体液重要组成部分之一的尿液,在寻找疾病标志物方面具有很大的理论优势,能反映泌尿系统及整个机体的生理和病理生理状态。

近年来,随着生物组学技术的兴起与发展,使用生物组学的方式在尿液中寻找疾病标志物的研究越来越受到重视。生命信息学已经深入到后基因组时代的蛋白质组学、功能基因组学等,更为广泛地出现了代谢组学、激酶组学、免疫组学等。在尿液这种极其复杂的生物流体中,同样具备上述属性,而且呈现良好的发展势头。大数据时代的到来,生物技术与信息技术的融合,产生了与尿液标志物学有关的海量大数据,为精准医学的发展提供了丰富的数据源,极大地丰富和整合了医学数据信息,为整个人类医学卫生事业的发展提供了良好的数据源保障。

《尿液标志物学》一书从生物化学的角度出发,详细阐述了人体疾病与尿液标志物的关系及临床应用价值,旨在充分挖掘无创性尿液生物标志物在全身各系统疾病的早期诊断、疗效评估及转归结局中的应用价值,提出尿液标志物学这个全新的概念,为全身各系统疾病的诊断和治疗另辟蹊径,值得借鉴。同时,尿液标志物学这门学科必将成为新兴的科学,在不久的将来,必定造福于人类。

中华医学会检验医学分会主任委员
解放军总医院检验中心主任

王成彬 教授

2018年3月

前 言

尿液因获取方便、操作无创、不受稳态调节及生物学信息丰富等优势而成为预警疾病标志物的优质资源。迄今为止,已经在正常尿液中发现了包括蛋白质、核酸、激素,以及体内代谢终产物等 3000 多种化学成分,提示尿液是一种极其复杂的生物流体,能反映泌尿系统及整个机体的生理和病理生理状态。随着生物组学技术的发展和大数据技术的应用,催生了“尿液标志物学”这个学科的诞生,产生了与尿液标志物学有关的海量大数据,尿液标志物学越来越受到临床医学和基础医学的重视。

本书从“尿液标志物学”这个概念出发,结合相关的交叉学科,系统地阐述了尿液标志物的基础和临床相关知识,旨在充分挖掘无创性尿液生物标志物在全身各系统疾病的早期诊断、疗效评估及转归结局中的应用价值,以推动尿液标志物学的发展和应用。本书既注重临床,也不脱离基础,还兼顾相关的检验技术,是一部实用性兼理论性的医学专著。

我们十分感谢为本书写了精彩序言的王成彬教授。感谢贵州省人民医院各位领导对本书的精心指导和关心,感谢贵州省人民医院临床检验中心和肾内科全体工作人员的大力支持。

尽管我们做了最大的努力,但是由于水平有限,书中若存在缺漏之处,敬请各位专家和同行批评指正。

主 编

2018 年 3 月

目 录

第1章 尿液生物标志物概论	(1)
第一节 尿液生物化学的提出	(1)
第二节 尿液生物化学的重要内容	(2)
第三节 尿液生物化学的理论意义	(6)
第四节 大数据及精准医疗在尿液生物化学研究中的作用	(7)
第2章 尿液生物标志物的检测与相关技术	(11)
第一节 尿液常规检验	(11)
第二节 尿液干化学分析技术	(14)
第三节 尿沉渣自动分析技术	(22)
第四节 蛋白电泳分析技术	(27)
第五节 全自动生化分析技术	(29)
第六节 免疫比浊分析技术	(30)
第七节 免疫荧光分析技术	(31)
第八节 基因芯片技术	(31)
第九节 蛋白质芯片技术	(33)
第十节 基因组学技术	(35)
第十一节 蛋白质组学技术	(37)
第十二节 微生物鉴定技术	(40)
第十三节 代谢组学技术	(41)
第十四节 液基细胞学技术	(46)
第3章 尿液生物标志物检测的质量管理规范	(49)
第一节 《尿液标本的收集和处理指南》标准解读	(49)
第二节 尿液标本检测干扰因素分析	(55)
第三节 尿常规检验的质量控制	(58)
第4章 尿液生物标志物的研究与应用进展	(61)
第一节 尿液生物标志物研究	(61)
第二节 应用生物信息学挖掘尿液生物标志物	(64)
第三节 尿液生物标志物的循证医学	(67)
第四节 尿液生物标志物与转化医学	(74)
第5章 心脏尿液标志物概述	(77)
第6章 动脉粥样硬化尿液标志物	(81)
第一节 尿8-羟基-脱氧鸟苷	(81)
第二节 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C	(84)

第三节	尿微量白蛋白	(93)
第四节	高敏 C 反应蛋白	(100)
第 7 章	心肌缺血坏死尿液标志物	(107)
第一节	尿肌红蛋白	(107)
第二节	心脏型脂肪酸结合蛋白	(114)
第三节	缺血修饰白蛋白	(119)
第四节	脱氧核糖核酸酶 I	(125)
第五节	胰岛素样生长因子	(127)
第六节	骨膜蛋白	(129)
第 8 章	血管内皮功能尿液标志物	(133)
第一节	血管内皮功能概述	(133)
第二节	血管内皮生长因子	(137)
第三节	脂联素	(144)
第四节	内皮素	(148)
第五节	血管紧张素(1-7)	(151)
第 9 章	凝血系统尿液标志物	(156)
第一节	组织纤维溶酶原激活物	(156)
第二节	纤溶酶原激活物抑制剂-1	(157)
第三节	纤维蛋白原	(159)
第四节	D-二聚体	(162)
第五节	P 选择素	(165)
第六节	血栓烷 B ₂	(168)
第七节	促红细胞生成素	(169)
第 10 章	心力衰竭尿液标志物	(174)
第一节	利钠肽与心血管疾病	(174)
第二节	脑钠肽	(176)
第三节	C 型利钠肽	(182)
第四节	钠氢交换体 1	(186)
第五节	尾加压素 II	(189)
第六节	肾素-血管紧张素-醛固酮系统	(193)
第 11 章	肾功能尿液标志物	(204)
第一节	概述	(204)
第二节	肌酐	(205)
第三节	尿素氮	(209)
第四节	尿酸	(211)
第五节	低氧诱导因子-1	(215)
第六节	单核细胞趋化蛋白-1	(217)
第七节	巢蛋白	(219)
第 12 章	尿蛋白和血尿标志物	(222)

第一节	微量白蛋白	(222)
第二节	循环免疫复合物	(225)
第三节	α_1 -酸性糖蛋白	(228)
第四节	α_1 -抗胰蛋白酶	(230)
第五节	β_2 -微球蛋白	(232)
第六节	视黄醇结合蛋白(RBP)	(234)
第七节	谷氨酰转肽酶	(238)
第八节	尿血红蛋白	(241)
第九节	尿肌红蛋白	(244)
第十节	α_2 -巨球蛋白	(246)
第 13 章	急性及早期肾损伤标志物	(250)
第一节	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白	(250)
第二节	肾损伤分子-1	(253)
第三节	白介素-18	(256)
第四节	肝型脂肪酸结合蛋白	(259)
第五节	丛生蛋白	(262)
第六节	三叶因子 3	(264)
第七节	转铁蛋白	(266)
第八节	尿液Ⅳ型胶原	(270)
第九节	α_1 -微球蛋白	(273)
第十节	N-乙酰 β -D 氨基葡萄糖苷酶	(276)
第十一节	尿溶菌酶	(279)
第十二节	碱性磷酸酶	(280)
第十三节	氨基肽酶	(283)
第十四节	穿孔素和颗粒酶 B	(286)
第 14 章	肾脏黏附分子类尿液标志物	(290)
第一节	黏附分子与肾脏疾病	(290)
第二节	整合素	(291)
第三节	细胞间黏附分子	(294)
第四节	血管细胞黏附分子	(296)
第五节	血小板选择素(P-选择素)	(299)
第六节	内皮细胞选择素(E-选择素)	(301)
第七节	白细胞选择素(L-选择素)	(304)
第 15 章	炎性尿液标志物	(307)
第一节	抗链球菌溶血素“O”抗体	(307)
第二节	肾小球基底膜抗体	(309)
第三节	热休克蛋白 72	(311)
第四节	NF- κ B	(313)
第五节	白细胞介素-1	(316)

第六节	白细胞介素-2	(320)
第七节	白细胞介素-6	(322)
第八节	白细胞介素-8	(325)
第九节	白细胞介素-13	(328)
第十节	肿瘤坏死因子	(330)
第 16 章	肾脏纤维化尿液标志物	(334)
第一节	结缔组织生长因子	(334)
第二节	转化生长因子- β	(338)
第三节	骨形态发生蛋白-7	(341)
第四节	热休克蛋白 47	(343)
第五节	胶原蛋白	(346)
第 17 章	肾脏肿瘤尿液标志物	(354)
第一节	p27 基因	(354)
第二节	VHL 基因	(356)
第三节	B7-H1	(358)
第四节	基质金属蛋白酶	(359)
第五节	MN/CA9	(362)
第六节	组织多肽特异性抗原	(364)
第七节	神经特异性烯醇化酶	(365)
第八节	丙酮酸激酶 M2 型同工酶	(367)
第九节	黏多糖	(369)
第十节	免疫抑制酸性蛋白	(370)
第十一节	波形蛋白	(372)
第十二节	CA125	(374)
第十三节	小凹蛋白-1	(375)
第 18 章	膀胱癌尿液标志物	(379)
第一节	膀胱癌概述及分子实验	(379)
第二节	核基质蛋白-22	(381)
第三节	膀胱癌特异性核基质蛋白 4	(382)
第四节	细胞角蛋白 20	(386)
第五节	尿液微小 RNA 类肿瘤标志物	(387)
第六节	端粒酶	(390)
第七节	生存素	(391)
第八节	尿纤维连接蛋白	(391)
第九节	透明质酸和透明质酸酶	(392)
第 19 章	肺癌尿液标志物	(394)
第一节	概述	(394)
第二节	多环芳烃及其羟基代谢产物	(400)
第三节	游离氨基酸	(404)

第四节	游离 RNA	(405)
第五节	尿液自发荧光	(408)
第六节	蛋白质组学与肺癌	(409)
第 20 章	前列腺癌尿液标志物	(413)
第一节	概述	(413)
第二节	前列腺特异性抗原	(417)
第三节	谷胱甘肽 S-转移酶 P1	(418)
第四节	前列腺癌基因 3	(420)
第五节	DD3 基因	(423)
第六节	长链非编码 RNA	(424)
第 21 章	阿尔茨海默病尿液标志物	(430)
第一节	概述	(430)
第二节	神经丝蛋白	(433)
第 22 章	自身免疫相关尿液标志物	(436)
第一节	半乳凝素-1	(436)
第二节	免疫球蛋白	(438)
第三节	补体	(442)
第四节	类风湿因子	(447)
第五节	κ 轻链和 λ 轻链	(449)
第 23 章	尿液外泌体	(453)
第一节	外泌体概述	(453)
第二节	尿液外泌体的研究方法	(458)
第三节	尿液外泌体的临床应用	(460)

第 1 章

尿液生物标志物概论

第一节 尿液生物化学的提出

生物化学(biochemistry)一词出现在约 19 世纪末、20 世纪初,但其起源可追溯得更远,早期是生理学和化学的一部分。例如 18 世纪 80 年代,拉瓦锡证明呼吸与燃烧一样是氧化作用,与此同时科学家又发现光合作用本质上是植物呼吸的逆过程。又如 1828 年,沃勒首次在实验室中合成了一种有机物——尿素,打破了有机物只能靠生物产生的观点,给“生机论”以重大打击。1860 年,巴斯德证明发酵是由微生物引起的,但他认为必须有活的酵母才能引起发酵。1897 年,毕希纳兄弟发现酵母的无细胞抽提液可进行发酵,证明没有活细胞也可进行复杂的生命活动,终于推翻了“生机论”。因此,生物化学被定义为研究生命物质的化学组成、结构及生命活动过程中各种化学变化的基础生命科学。

生物化学对其他各门生物学科的深刻影响首先反映在与其关系比较密切的细胞学、微生物学、遗传学、生理学等领域。通过对生物高分子结构与功能进行深入研究,揭示了生物体物质代谢、能量转换、遗传信息传递、光合作用、神经传导、肌肉收缩、激素作用、免疫和细胞间通信等众多奥秘,使人们对生命本质的认识跃进到一个崭新的阶段。生物化学若以不同的生物为对象,可分为动物生化、植物生化、微生物生化、昆虫生化等。若以生物体的不同组织或过程为研究对象,则可分为肌肉生化、神经生化、免疫生化、生物力能学等。因研究的物质不同,又可分为蛋白质化学、核酸化学、酶学等分支。研究各种天然物质的生物功能的学科称为生物有机化学,研究各种无机物的生物功能的学科则称为生物无机化学或无机生物化学。20 世纪 60 年代以来,生物化学与其他学科融合产生了一些边缘学科,如生化药理学、古生物化学、化学生态学等;或按应用领域不同,分为医学生化、农业生化、工业生化、营养生化等。

迄今为止,在正常尿液中共发现了包括蛋白质、核酸、酶、激素及体内代谢终产物等共 3079 种化学物质,提示尿液是一种极其复杂的生物流体。尿液因获取方便、操作无创、不受稳态调节及生物学信息丰富等优势,已成为预警疾病标志物的优质来源。随着生物组学技术的进步,大规模研究尿液生物分子表达谱及应用生物组学技术研究尿液疾病标志物得到快速发展,发现了很多尿液生物标志物,但目前缺乏对尿液生物化学的系统阐述。因此,本书首次提出“尿液生物化学”,从生物化学的角度出发,详细阐述了尿液的化学组成、尿液生物大分子物质的结构与功能、检测技术及临床应用价值,旨在充分挖掘无创性尿液生物标志物在全身各系统疾病的早期诊断、疗效评估及转归结局中的应用价值,为尿液的整合医学提供理论依据。

第二节 尿液生物化学的重要内容

一、尿液的组成

尿液是人类和脊椎动物为了新陈代谢的需要,经由泌尿系统及尿路排出体外的液体排泄物,蕴藏了人体健康、饮食与环境污染物接触等方面的关键信息。尿液在医学研究方面的历史已有 3000 多年。早在远古时期,人们就了解到尿液的颜色、黏稠度、尿量与疾病的变化有关。古印度的医生将尿液倒在地上观察,如果这种尿液能够招来蚂蚁,说明这种尿液是患病患者排出的“蜜尿”,这可能是人们最早知道尿液中含有糖的检测方法。公元前 400 年,古希腊名医希波克拉底注意到发热时成人及儿童尿液颜色和气味的变化,指出尿液检测对健康人和患者有重要作用。公元 1000 年,波斯名医伊斯梅尔总结了对尿液研究的 7 个方面,包括颜色、黏稠度、尿量、透明度、沉淀物、气味和泡沫等。因此,确定尿液的化学成分,对于有针对性地改善人体健康具有长远影响。

迄今为止,加拿大艾伯塔大学戴维·威舍特研究小组利用多种先进的分析化学技术,经过 7 年多的研究并结合文献资料,对 22 名健康志愿者的尿液进行分析检测,共发现了 3079 种化学物质,包括蛋白质、核酸及体内代谢的最终产物等。戴维·威舍特教授指出:“尿液是一种极其复杂的生物流体。我们没想到会有这么多不同的化学物质进入尿液。”他说,目前多数尿检只检测六七种化学成分,多数医学教科书也仅列出尿液中的 50~100 种化学成分,而这项研究则将名单扩充了 30 倍。研究人员表示,这一成果将使利用尿液而非血液或组织切片的新一代医学检测技术成为可能,从而降低检测成本,耗时变短。现在,针对结肠癌、前列腺癌、腹腔疾病、溃疡性结肠炎、肺炎与器官移植排斥等新一代尿液诊断技术已进入开发过程或即将进入医院。

从这个分析来看,尿液的组成除水及无机盐外,主要还包括蛋白质、核酸及多种有生物学活性的小分子化合物,如维生素、激素、氨基酸及其衍生物、肽、核苷酸等。若从分子种类来看,就更复杂了。以蛋白质为例,人体内的蛋白质分子,据估计不少于 100 000 种。这些蛋白质分子中,极少与其他生物体内的相同。每一类生物都各有其一套特有的蛋白质,它们都是些大而复杂的分子。其他大而复杂的分子,还有核酸、糖类、脂类等,它们的分子种类虽然不如蛋白质多,但也是相当可观的。这些大而复杂的分子称为“生物分子”,经过人体新陈代谢或疾病状态时的丢失或消耗,汇聚在尿液中。生物体不仅由各种生物分子组成,也由各种各样有生物学活性的小分子所组成,足见生物体在组成上的多样性和复杂性。

大而复杂的生物分子在体内也可降解到非常简单的程度。当生物分子被水解时,即可发现构成它们的基本单位,如蛋白质中的氨基酸、核酸中的核苷酸、脂类中的脂肪酸及糖类中的单糖等。这些小而简单的分子可以看作是生物分子的构件,或称作“构件分子”,亦可存在于尿液之中,与大分子物质共存。它们的种类为数不多,在每一种生物体内基本一样。实际上,生物体内的生物分子仅仅由几种构件分子借共价键连接而成。由于组成一个生物分子的构件分子的数目多,它的分子就大;因为构件分子不止一种,而且其排列顺序又可以是各种各样,由此而形成的生物分子的结构就相对复杂。不仅如此,某些生物分子在不同情况下还会具有不同的立体结构。构件分子在生物体内的新陈代谢中按一定的组织规律,互相连接,依次逐步形成

生物分子、亚细胞结构、细胞组织或器官,最后在神经及体液的沟通和联系下,形成一个有生命的整体。

二、尿液的代谢与调控

新陈代谢由合成代谢和分解代谢组成,前者是生物体从环境中取得的物质,转化为体内新的物质的过程,也称为同化作用;后者是生物体内的原有物质转化为环境中的物质,也称为异化作用。同化和异化的过程都由一系列中间步骤组成。中间代谢就是研究其中的化学途径。如糖原、脂肪和蛋白质的异化是各自通过不同的途径分解成葡萄糖、脂肪酸和氨基酸,然后再氧化生成乙酰辅酶A,进入三羧酸循环,最后生成二氧化碳。新陈代谢是在生物体的调节控制下有条不紊地进行的。这种调控有3条途径:①通过代谢物的诱导或阻遏作用控制酶的合成。这是在转录水平的调控,如乳糖诱导乳糖操纵子合成有关的酶。②通过激素与靶细胞的作用,引发一系列生化过程,如环腺苷酸激活的蛋白激酶通过磷酸化反应对糖代谢的调控。③效应物通过别构效应直接影响酶的活性,如终点产物对代谢途径第一个酶的反馈抑制。生物体内绝大多数调节过程是通过别构效应实现的。

尿液代谢是关于定量描述生物内源性代谢物质的整体及其对内因和外因变化应答规律的研究。其中心任务包括:①对内源性代谢物质的整体及其动态变化规律进行检测、量化和编录;②确定此变化规律和生物过程的有机联系。就细胞系统而言,不仅存在细胞自身的代谢物质组成问题和细胞之间代谢物质交换的问题,也存在代谢过程中所发生的位点问题。因此,简单地分析代谢物质的总组成(即代谢组)缺乏“整体论”所要求的全面性,其意义有一定的局限性。研究代谢产物谱变化的代谢组学可提供生物过程中的完整信息。

代谢组学属于全局系统生物学研究方法,便于对复杂体系的整体进行认识。系统生物学研究就是要将给定生物系统的基因、转录、蛋白质和代谢水平所发生的事件、相关性及其对所涉及生物过程的意义进行整体性认识。我们已经发现,DNA、mRNA等核酸分子及蛋白质的存在为生物过程的发生提供了物质基础(但这个过程有可能不发生),而尿液代谢物质所反映的是已经发生了的生物学事件。因此,研究尿液的代谢是对一个生物系统进行全面认识不可或缺的一部分,是全局系统生物学的重要基础,也是系统生物学的一个重要组成部分。

例如,一个正常工作的人体包括“人体”本身和与之共同进化而来且共生的消化道微生物群体(或称菌群),孤立地研究“人体”本身的基因、转录子及蛋白质当然可以为人们认识人体生物学提供重要信息,但无法提供使人体正常工作不可缺少的菌群的信息。人体尿液的代谢组却携带着包括菌群在内的每一个细胞的信息,因此代谢组学方法对研究如人体这样复杂的进化杂合体十分有效。正因为如此,尿液代谢组学已经广泛应用到了包括药物研发、分子生理学、分子病理学、基因功能组学、营养学、环境科学等重要领域。

三、尿液生物大分子的结构与功能

生物大分子的功能多样性与它们特定的结构关系密切。蛋白质的主要功能有催化、运输和储存、机械支持、运动、免疫防护、接受和传递信息、调节代谢和基因表达等。由于结构分析技术的进展,使人们能在分子水平上深入研究它们的各种功能。酶的催化原理的研究是这方面突出的例子。蛋白质分子的结构分为4个层次,其中二级和三级结构间还可有超二级结构,三、四级结构之间可有结构域。结构域是一个较紧密的具有特殊功能的区域,连结各结构域之

间的肽链有一定的活动余地,允许各结构域之间有某种程度的相对运动。蛋白质的侧链更是无时无刻不在快速运动之中。蛋白质分子内部的运动性是它们执行各种功能的重要基础。20 世纪 80 年代初出现的蛋白质工程,通过改变蛋白质的结构基因,获得在指定部位经过改造的蛋白质分子。这一技术不仅为研究蛋白质的结构与功能的关系提供了新的途径,而且也开辟了按一定要求合成具有特定功能的、新的蛋白质的广阔前景。

核酸的结构与功能研究为阐明基因的本质,了解生物体遗传信息的流动作出了贡献。碱基配对是核酸分子相互作用的主要形式,这是核酸作为信息分子的结构基础。脱氧核糖核酸的双螺旋结构有不同的构象,J. D. 沃森和 F. H. C. 克里克发现的是 B-结构的右手螺旋,后来又发现了称为 Z-结构的左手螺旋。DNA 还有超螺旋结构。这些不同的构象均有其功能上的意义。核糖核酸包括信使核糖核酸(mRNA)、转移核糖核酸(tRNA)和核糖体核糖核酸(rRNA),它们在蛋白质生物合成中起着重要作用。新近发现个别的 RNA 有酶的功能。

基因表达的调节控制是分子遗传学研究的一个中心问题,也是核酸的结构与功能研究的一个重要内容。人体内估计超过 1/3 的细胞转录组受 miRNA 调节,虽然数目相对不多(< 2000 种),但在常见的组织和体液中 miRNA 有很高的稳定性,miRNA 表达增殖的潜力可准确辅助定量分析与分散的组织类型和疾病状态有定位关系的 miRNA,从而作为一个诊断新工具。有研究认为外泌体是转运 miRNA 的细胞结构基础。外泌体是纳米级别的细胞单层膜结构,可由机体多种类型细胞释放,并广泛分布于尿液、唾液、血浆、乳汁等体液中(图 1-1)。外泌体可携带多种 mRNA、miRNA 和蛋白质,参与细胞间通信,重启免疫系统、血管新生、肿瘤细胞生长等过程。在肿瘤或疾病中,这些分子都可以作为生物标志物。miRNA 也是重要的调节分子,涉及细胞生长全过程,如时序发育、干细胞分化和凋亡,可作为一种“肿瘤信号”。研究显示,miRNA 在病理发展中会快速从组织中释放入血,在血清、血浆、唾液和尿液中,这些胞外 miRNA 与肿瘤的不同病理状态有关。

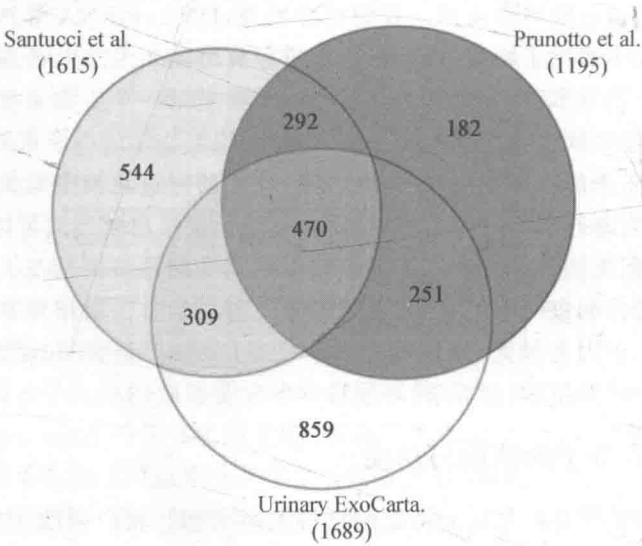


图 1-1 ExoCarta 数据库中已经发现的外泌体

注:图中数据显示 ExoCarta 数据库中已经发现的外泌体与 Santucci 等学者和 Prunotto 等学者发现的外泌体的交集

四、尿液中的“组学”

(一) 尿液蛋白质组学

最新数据的人类尿蛋白质组数据库(Human Urinary Database, <http://mosaiques-diagnostics.de/diapatpcms/mosaiquescms/front.content.Php?id-cat=257>)收录了13 020个尿液样品。其中发现人的生物标志物涉及的疾病主要有移植相关疾病(造血干细胞移植、肾移植、肝移植等),泌尿系统疾病(膀胱输尿管逆流、输尿管连接部梗阻、肾脏疾病、膜性肾小球肾炎、肾结石、IgA肾病、局灶节段性肾小球硬化、糖尿病肾病、多囊性肾病、急性肾损伤、范科尼综合征、微小病变性肾病等),生殖系统疾病(良性前列腺增生症、先兆子痫、多囊卵巢综合征等),脑血管疾病(脉管炎、血栓形成、高血压、心力衰竭、1型与2型糖尿病、冠状动脉疾病等),肿瘤(嗜铬细胞瘤、卡波西肉瘤、膀胱癌、肾癌、前列腺上皮内瘤变、前列腺癌、法布里病、动脉瘤、结肠癌、肺癌、卵巢癌等),免疫性疾病(系统性红斑狼疮、获得性免疫缺陷综合征、过敏性紫癜等),神经系统疾病及其他一些疾病(肺炎、丙型肝炎、胆道闭锁、老年痴呆症、目盲、重症监护病房患者)等。而在这些疾病中,每一种疾病相关的蛋白标志物少则几种,多则1000多种,而这些标志物并不特异地代表某一种疾病,有研究者从肾移植慢性移植肾功能障碍的18个生物标志物中筛选出了一种诊断肾移植慢性移植肾功能障碍的蛋白,其敏感性和特异性也只有93%和65%。

目前,国内外关于病理情况下尿液中蛋白质的数据已经非常丰富,但由于个体间及个体内存在差异;早期小样本试验须经过大样本验证才能确定;再者由于试验条件所限,单个研究机构研究的样本数和疾病种类都比较有限,很难解决生理和疾病相关标志物的可信度和特异性的问题,因此需要建立数据共享平台。如上面提及的人类尿蛋白质组数据库,还有尿液蛋白质生物标志物数据库(Urinary Protein Biomarker Database, <http://122.70.220.102/biomarker/>),它是基于PubMed数据库公布的可以用于标记疾病的蛋白质建立的,其中涉及人类的10种癌症、31种泌尿外科疾病和15种非泌尿道疾病;涉及动物的21种泌尿道疾病和4种非泌尿道疾病。再有胞外囊泡与外泌体数据库(Urinary Exosome Protein Database, <http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/exosome/>),它是基于肾脏与电解质代谢实验室(Laboratory of Kidney and Electrolyte Metabolism, NHLBI)用两种质谱方法鉴定的外泌体蛋白质而建立的,其中包括1600种蛋白质。这些数据库的建立不仅可以解决数据的可靠性问题,通过数据的比较还可以确定某种疾病的特异性蛋白。

(二) 尿液代谢组学

目前,代谢组学被认为是系统生物学的重要学科之一。严格地说,代谢组学是指某一生物体或细胞所有的代谢产物与基因组学、转录组学和蛋白质组学相对应,是一门通过对某一生物或细胞所有低相对分子质量的代谢产物进行定性和定量分析,并用以监测活细胞中化学变化的学科。其研究对象为体内所有相对分子质量小于1000的小分子代谢产物。著名学者 German 等曾在其文章中写道:“基因组学反映了什么是可以发生的,转录组学反映的是将要发生的,蛋白质组学指出了什么是赖以发生的,只有代谢组学才真正反映已经发生的。”

常用于代谢组学分析的生物分析技术包括光谱方法,如磁共振(NMR)、液相色谱(LC)、气相色谱(GC)、毛细管电泳(CE)和质谱(MS)联用的技术。其中NMR和MS是目前最常见的两种检测技术。应用生物分析技术获得原始数据后,需要对其进行分析,其一般模式识别方

法主要包括主成分分析(PCA)、聚类分析(HCA)、偏最小二乘法(PLS)、偏最小二乘法-显著分析(PLS-DA)等。

第三节 尿液生物化学的理论意义

一、尿液含有丰富的疾病生物信息分子

尿液中包含了丰富的疾病标志物信息,在临床诊断中具有重要价值。尿液的颜色、性状、pH 常被用于辅助某些疾病的诊断与鉴别诊断。早在公元前 5 世纪,Hermogenes 就指出尿液的颜色及其他性质可能与某些特定的疾病相关。近年来,随着生物组学技术的兴起与发展,使用生物组学的方式在尿液中寻找疾病标志物的研究逐渐受到重视。

目前在尿液中寻找标志物的研究主要集中在泌尿系统疾病,如急性肾损伤、急性肾移植排斥反应、肾癌、膀胱癌、前列腺癌等。2003 年,有研究者用 SELDI-TOF-MS 的方式比较了正常人和肾细胞癌患者的尿液,发现了一些潜在的具有鉴别意义的蛋白信号。2004 年,也有学者使用二维凝胶电泳的方式比较了经前列腺按摩后的前列腺癌患者和良性前列腺增生患者的尿液蛋白质组,发现钙粒蛋白 Calgranulin B/MRP-14 可能是前列腺癌的潜在标志物。尿液蛋白质组学不仅在泌尿系统疾病标志物的研究中发挥了重要意义,在其他疾病的研究中也逐渐受到关注。2008 年,另外一位学者采用 CE-MS 的方式比较了冠心病患者和正常人的尿液蛋白质组,发现多种尿液多肽组合可以鉴别冠心病,敏感性和特异性分别为 98% 和 83%。2009 年有学者用二维凝胶电泳分别分析了急性戊型肝炎与正常人的尿液蛋白质组,发现 α_1 -微球蛋白(α_1 -microglobulin)可能是潜在的疾病标志物。尿液蛋白的翻译后修饰信息(PTMs),如糖基化和磷酸化亦是潜在的疾病标志物信息。

此外,已有报道指出对于某些疾病而言,特定的标志物在尿液比在血液中有更好的诊断意义。如尿液中的 ADAM 12 和 MMP-9 水平可能与女性患乳腺癌的风险相关;尿液中锁链素(desmosine,DES)的升高可能与慢性阻塞性肺疾病的恶化相关。这些研究提示在尿液中寻找疾病标志物有着较好的应用前景。

二、尿液生物化学研究的优势

作为体液重要组成部分之一的尿液,在寻找疾病标志物方面具有很大的理论优势。尿液能反映泌尿系统及整个机体的生理和病理生理状态。与常用的研究样本——血液相比,尿液具有以下优势:①尿液可以完全无创、连续、大量收集。而血液收集是有创的,一般只在某个时间点采集,并且采血量有限制。这样在尿液中就更容易监测随时间改变的生物标志物量的变化。②血液有严格的稳态调节,理论上血液中发生的变化会通过各种各样的机制,如肝脏降解、肾脏或者其他器官排出被清除,大部分的变化信息在血液中存在时间不长。而变化的信息正是疾病标志物的本质。尿液则没有稳态调节,它可以累积种类更多、幅度更大的变化,机体的很多变化在尿液中很可能得到体现,这样更容易在尿液中找到疾病标志物。③尿液生物组信息含量丰富。尿液是最接近泌尿系统的体液,尿液生物组一部分来源于泌尿系统,一部分来源于血浆经肾小球滤过的产物。所以,尿液生物组不仅能直接反映泌尿系统的功能状态,还能够保留血浆的一些信息,并在一定程度上反映血液和整个机体的状态。④尿液蛋白质组的组