



糖尿病肾病蛋白质组学研究进展

和书航[†], 陈路路[†], 秦亮[†], 戴晓艳, 邱凯笛, 陈涤凡, 王晓东^{*}

中央民族大学生命与环境科学学院, 生物成像与系统生物学研究中心, 北京 100081

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: Xiaodong@muc.edu.cn

收稿日期: 2020-05-17; 接受日期: 2020-08-13; 网络版发表日期: 2020-11-23

国家自然科学基金(批准号: 31770384, 21605164)、中央民族大学一流大学一流学科项目基金(批准号: Y1dxxk201819)和国家民族事务委员会中青年英才培养计划基金(批准号: 10301-0190040110)资助

摘要 糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的主要并发症之一, 严重威胁人类健康与生命. 截至目前, DKD的致病机制尚未阐释清楚, 且临床常用诊断方法的灵敏性和准确性并不十分理想, 从而导致DKD确诊后治疗方案的确比一般性肾脏疾病更为棘手. 蛋白质作为生命活动的主要承担者与体现者, 直接参与和调控各种生命过程. 从蛋白质组学水平开展DKD研究, 能够从整体、动态、互作网络等视角探究该疾病相关分子机制. 针对不同生理病理条件下的DKD临床样本开展蛋白质组学研究, 可全面探查与DKD显著相关的关键蛋白质; 通过对这些蛋白质进行深入分析和验证, 能够更直观地理解DKD发生发展的分子机制, 并获得DKD进程相关候选标志物和后续疾病的潜在治疗靶点, 为DKD的早期诊断和治疗新方法的探究奠定基础. 近年来, 随着蛋白质组学技术的不断发展, 在蛋白质分离、质谱鉴定、生物信息学分析等蛋白质组学核心技术基础上衍生出了许多新兴技术, 进一步推动了蛋白质组学在疾病生物标志物筛选、致病分子机制揭示、药物作用蛋白质靶点等研究中的应用. 本文基于蛋白质组学研究技术, 主要从DKD致病机制研究、早期诊断潜在生物标志物筛选、治疗靶点及效果评估三个方面对蛋白质组学在DKD研究中的应用进展进行了系统性综述. 尽管蛋白质组学在DKD研究中取得了长足的进步, 但仍具有较大的发展空间, 特别是现已识别的大量潜在DKD分子标志物的相关性分析、药物蛋白质作用靶点临床验证与应用将是DKD未来研究的重点.

关键词 糖尿病肾病, 蛋白质组学, 致病机制, 早期诊断, 治疗靶点

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病主要的微血管并发症^[1], 糖尿病能够引起慢性肾脏损伤而导致肾小球病变, 多表现为肾小球系膜增生、基底膜增厚及Kimmelstiel-Wilson(K-W)结节等症状^[2]. DKD易发病于中老年年龄层, 是导致终末期肾衰竭的最主要原因之一. 据国际糖尿病联盟(International Dia-

betes Federation, IDF)统计, 截至2019年底, 全球糖尿病患者(20~79岁)数量已达到4.63亿, 其中1/4的患者来自中国. 在我国, 糖尿病患病率已达11.6%, 糖尿病相关慢性肾病患者占住院总人数的1.1%^[3], 其中DKD的发病率亦呈上升、年轻化趋势, 目前已成为导致终末期肾脏病的第二位诱因, 仅次于肾小球肾炎. 我国属于糖

引用格式: 和书航, 陈路路, 秦亮, 等. 糖尿病肾病蛋白质组学研究进展. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 384-411

He S H, Chen L L, Qin L, et al. Proteomics: recent advances in the analysis of diabetic kidney disease (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 384-411, doi: 10.1360/SSV-2020-0151

尿病高发地区, 目前对于DKD的早期诊断能力相对较差, 导致早期疾病患者部分漏诊, 确诊时已难以逆转。同时, 由于DKD患者存在复杂的代谢紊乱, 一旦发展到终末期肾脏病, 相对其他肾脏疾病, DKD的治疗更加棘手且预后较差^[4]。近年来, 随着全球人口老龄化进程加速, DKD已成为危害人类健康的重大疾病。因此, 及时防治对于缓解糖尿病肾病患病压力意义重大。目前, 已有大量国内外学者对DKD的发病病因、发病进程及治疗过程的分子机制进行了深入研究, 为DKD疾病的预防、诊断、治疗、预后奠定了良好的理论基础。

研究表明, 高血糖、高血压、高血脂及血液动力学改变等致病因素均参与了DKD的发生、发展过程^[5]。目前普遍认为, DKD是由机体长期处于非健康状态而诱发的并发症, 单从基因组学水平进行研究, 较难全面阐释患者体内环境对疾病发展的动态调控过程, 因此需要从新的角度进一步推进DKD的研究。随着人类基因组计划正式落下帷幕, 后基因组学正式登上生命科学的舞台, 研究重心已从揭示生命所有遗传信息转移至从分子整体水平上对生物学功能的深度系统解读^[6]。截至目前, 科研人员已基于转录组学、代谢组学、蛋白质组学等策略与方法, 在整体水平上对DKD进行了深入研究。其中, 转录组学主要研究相关基因在DKD患病不同阶段的转录水平、转录调控规律、基因功能、基因参与的生命过程等, 以揭示特定生物学过程和疾病相关的分子机制。代谢组学通过定量描述DKD条件下人体内源性代谢物质的整体情况和对内外因素变化的应答规律, 寻找糖尿病肾病早期诊断^[7]、风险预测^[8]、预后判断^[9]的生物标志物。蛋白质组学则是对DKD患者的组织细胞及血液、尿液和唾液^[10]等体液的蛋白质组进行全面深入的研究, 以表征DKD蛋白质表达谱并筛选关键的DKD蛋白质生物标志物。蛋白质作为生命功能的主要承担者和执行者, 能够最直接地反映生物性状, 蛋白质组多样性高、复杂度高、修饰程度高, 有明显的组织、细胞特异性, 其表达水平、结构、功能等会伴随相关调控而发生变化。因此, 蛋白质组学可以通过检测特定时间组织样品的蛋白质组表达情况, 反映机体在病理状态下的蛋白质水平的动态变化, 以整体、动态、互作网络的视角, 更加直观地阐述DKD发病的分子机制, 加深人们对复杂疾病的理解, 并为DKD的预防、诊断及治疗提供新思路。

在疾病蛋白质组学研究中, 主要应用蛋白质组学

技术方法研究患者各类样品在不同时期、不同生理状态下蛋白质的差异表达, 全面表征疾病状态下蛋白质各种理化性质, 包括表达水平、结构、分布、功能、翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)等, 解析蛋白质之间、蛋白质与疾病的相互作用关系, 构建疾病状态下的蛋白质分子网络。在DKD研究中, 经典的蛋白质组学研究路径通常先使用双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)等分离技术将样品中的蛋白质分离, 然后通过质谱(mass spectrometry, MS)技术进行蛋白质鉴定及PTMs研究。目前常见的质谱技术有基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight MS, MALDI-TOF MS)^[11]、电喷雾离子化质谱(electrospray ionization MS, ESI-MS)^[12]、液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem MS, LC-MS/MS)^[13]、表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight MS, SELDI-TOF MS)^[14]、毛细管电泳-质谱(capillary electrophoresis MS, CE-MS)^[15]或混合检测手段。随着蛋白质组技术的不断发展, 二维荧光差异电泳(two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)、非标记定量技术(label-free)、酶促的¹⁸O标记定量技术、细胞培养稳定同位素标记(stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC)^[16]、同位素编码亲和标记(isotope coded affinity tag, ICAT)^[17]、相对和绝对定量的等量异位标签(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[18]、数据非依赖性采集(data independent acquisition, DIA)^[19]、四维正交凝胶电泳系统(four-dimensional orthogonal electrophoresis system, 4-DES)^[20]、广谱四维正交凝胶电泳系统(broad-spectrum four-dimensional orthogonal electrophoresis system, BS4-DES)^[21]、离子淌度(ion mobility, IM)4D蛋白质组学技术^[22-25]等技术的出现, 进一步提高了DKD生物标志物筛选和鉴定的效率及精确度, 完善了DKD状态下对机体蛋白质组表达谱的表征, 为探究DKD发病机制, 筛选早期诊断标志物和治疗靶点, 揭示DKD复杂分子调控网络奠定了基础。

1 蛋白质组学研究技术

DKD蛋白质组学研究通常通过比较正常与DKD

疾病状态蛋白质表达水平的差异, 预测与疾病密切相关的蛋白质分子, 并验证其功能, 以确证与疾病相关的靶标分子. DKD蛋白质组学研究的首要任务是构建并完善研究体系, 其工作流程主要包括蛋白质样品的分离、鉴定及定量等^[26]. 此外, 针对一些重要的生物学问题进行功能蛋白质组学研究也是蛋白质组学研究的重要内容之一. 但蛋白质组具有多态性、多样性、时空表达特异性^[27], 数量庞大且结构复杂, 使得精确表征蛋白质组表达谱成为DKD蛋白质组学研究的重点和难点. 随着蛋白质组学不断发展, 以蛋白质分离技术、生物质谱技术、蛋白质互作技术、生物信息技术等为主的蛋白质组学技术体系^[28], 解决了精确表征蛋白质组表达谱的困难, 为DKD研究体系的建立及完善提供了技术支持, 为DKD功能蛋白质组学研究奠定了良好的基础.

1.1 蛋白质分离技术

蛋白质分离是蛋白质组学研究的核心和基础^[29], 常见的蛋白质分离技术可以分为基于凝胶和非凝胶两种手段(图1). 其中, 基于凝胶的技术有2-DE、2D-DIGE、蓝绿温和非变性凝胶电泳(blue native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE)、清澈温和非变性凝胶电泳(clear native polyacrylamide gel electrophor-

esis, CN-PAGE)、高分辨CN-PAGE(high-resolution CN-PAGE, hrCN-PAGE)、4-DES和BS4-DES等. 非凝胶方式的分离技术有高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、二维液相色谱(two dimensional - liquid chromatography, 2D-LC)、CE等.

2-DE技术是基于凝胶分离蛋白质的核心技术. 利用2-DE可在一张凝胶上实现成百上千种蛋白质的分离, 具有高通量、高分辨率、可与MS联用的特点, 因此该技术已被广泛应用于比较蛋白质组学研究. 然而传统的2-DE技术也存在一定的局限性, 如重复性较差、低丰度蛋白难以检测、复杂的样品处理过程容易导致蛋白质的丢失等, 因此, 2D-DIGE技术应运而生^[30]. 在2-DE的基础上, 2D-DIGE在蛋白质电泳分离前需对不同蛋白质样品进行不同荧光标记, 然后即可完成混合样品的一次性电泳分离, 该技术实现了不同实验组蛋白质样品在同一块胶内的一次分离, 不仅避免了2-DE重复性差的问题, 而且荧光内标的引入, 可准确检测不同样品间蛋白质丰度差异^[31], 显著提高蛋白质分离的精确度和灵敏度. 然而对于蛋白质复合体分离表征来说, 以上技术并不适用, 这是由于其严苛的变性条件容易引起蛋白质复合体亚基解离甚至变性, 导致无法获得完整的蛋白质复合体. 相比之下, 非变性电泳技术提供了一种更好的选择, 如BN-PAGE和

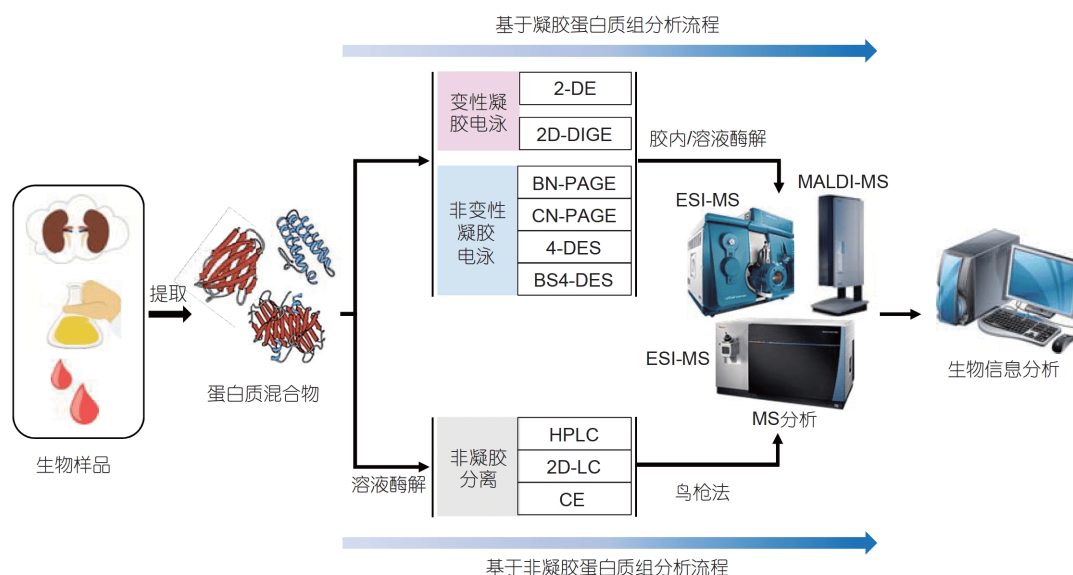


图1 蛋白质组学分析流程图

Figure 1 Schematic workflow for proteomics analysis

其衍生的CN-PAGE, hrCN-PAGE^[32], 其技术要点是在阴极缓冲液中引入外加负离子——考马斯亮蓝染料 (coomassie brilliant blue, CBB) 或阴离子去污剂脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, DOC), 使电泳过程中蛋白质复合体的表面带上大量负电荷, 不仅可以防止蛋白质复合体间的非特异性聚集, 而且可以增加疏水性蛋白质的溶解性, 提高蛋白质复合体样品电泳效率; 同时表面大量的负电荷可消除蛋白质复合体自身电荷差异, 从而实现复合体在胶内的迁移率只由其分子量(体积)决定(在一定范围内, 蛋白质分子量与体积成一定的线性关系), 提高了电泳分辨率。尽管BN-PAGE, CN-PAGE和hrCN-PAGE技术已被广泛应用于膜蛋白质复合体分离分析, 然而额外阴离子的引入对于电泳的温和特性存在不可避免的影响, 不能完全适用于弱相互作用蛋白质复合体。基于此, 2-DE衍生出的4-DES和BS4-DES技术, 在兼顾BN-PAGE和hrCN-PAGE高分辨率和温和分离特性的同时, 突破了对稀释样品兼容性问题和对碱性蛋白质等电点 (protein isoelectric point, pI) 分离范围较窄的局限^[33]。以上两种技术的主要特点是在传统2-DE变性电泳之前增加了两个维度的非变性电泳方法, 包括第一维电泳(1st-DE)——非变性薄层等电聚焦电泳 (native-thin layer Isoelectric focus, native tl-IEF) 和第二维电泳(2nd-DE)——非变性凝胶电泳 (native-PAGE)。其中, native tl-IEF可以在温和非变性条件下实现样品的浓缩富集。基于4-DES衍生的BS4-DES第二维电泳采用温和酸性与碱性非变性凝胶电泳 (acidic-basic-native-PAGE) 技术, 将蛋白质 pI 适用范围扩展到~3.0至11.0, 可顺利实现碱性样品的电泳分离。虽然操作步骤比传统2-DE复杂, 但以上两种技术在保持2-DE优点的同时, 1st-/2nd-DE可最大限度地保证蛋白质复合体或相互作用蛋白质的完整性, 有利于后续第三、四维电泳(3rd-/4th-DE)进一步挖掘更多复杂蛋白质相互作用的信息。

除凝胶技术外, 非凝胶方式的色谱技术为蛋白质和多肽的分离及分析提供了新策略。其原理主要利用各种物质在固定相和流动相之间不同的分配系数, 使其在相对运动的两相之间反复多次分配, 以不同的速度移动, 从而获得分离物质^[34]。常规的液相分离系统有高效液相色谱HPLC, 2D-LC和CE等, 其优势在于可以分离分子大小差异较大的蛋白质、低丰度蛋白质及疏水性蛋白质, 易与质谱联用, 具有灵敏度高、分析速

度快、自动化程度高等特点^[35]。

上述蛋白质分离技术的完善和成熟, 提高了蛋白质组分离能力, 降低了分离操作对蛋白质分子结构的影响, 为解决DKD患者样品蛋白质组中蛋白质种类繁多、性质各异造成的分离困难问题提供了技术支持, 使系统地完成DKD蛋白质组的分离分析成为可能。

1.2 蛋白质鉴定技术

蛋白质分离后的鉴定工作可以确定样品中的蛋白质种类, 是蛋白质组分析的关键步骤。近年来, 生物质谱技术已快速发展成为一种用于鉴定高通量生物大分子的蛋白质组研究技术。质谱技术的基本原理是: 待测分子离子化后, 其在磁场或电场中的运动轨迹和速度依据粒子质荷比 (mass-to-charge ratio, m/z) 的不同而变化, 从而可以用来判断粒子的质量和特性^[36]。随着技术的进步, 离子化从需要将样品气化的“硬电离”方式发展成为不会破坏分子完整性的“软电离”方式, 如ESI和MALDI。软电离方式能够保证生物大分子不会产生过多的碎片离子, 大大简化了谱图的复杂性, 有利于后续进一步分析。按样品分子“软电离”离子化的方式不同, 生物质谱主要可以分为ESI-MS和MALDI-MS两类 (图1)。

ESI-MS是蛋白质鉴定的主要方法之一, 其特点是易产生多电荷离子, 碎片离子较少, 其所形成的离子可以直接用来确定蛋白质或多肽的分子量, 灵敏度较高, 并且多电荷离子的形成显著降低了 m/z 值, 使得ESI-MS可以在较合适的 m/z 检测范围准确测定大分子量蛋白质^[37]。MALDI-MS是目前另一种发展较为成熟的蛋白质鉴定技术, 常配备飞行时间 (time of flight, TOF) 质量分析器。该技术无需对蛋白质样本进行复杂前处理, 通过基质辅助即可实现待测分子的离子化; 离子化过程中产生的碎片离子较少, 可对蛋白质肽段分子进行高通量快速扫描, 产生蛋白质肽指纹图谱 (peptide mass fingerprint, PMF), 结合搜索引擎 (如MASCOT) 及特定数据库 (如SwissProt和NCBIInr) 即可完成蛋白质搜索匹配与鉴定^[38]。针对PMF匹配不成功或匹配特异性较低的情况, 可以进一步结合MS/MS二级谱图进行联合检索以实现蛋白质多维度精确分析与鉴定^[20,21]。截至目前, 基于MALDI-TOF/TOF MS的蛋白质鉴定策略已被广泛应用于基础医学、动物学、植物学、微生物学等诸多蛋白质组研究领域。

除物质谱鉴定技术外, 选择合适的蛋白质鉴定策略也是蛋白质鉴定工作中的关键. 随着上述物质谱技术的快速发展, 蛋白质鉴定主要策略可以归纳为以下几种: “自底而上”(bottom-up, BU)、“自中而下”(middle-down, MD)及“自顶而下”(top-down, TD)策略(图2)^[39]. 所谓“bottom”一般指的是肽段, “top”指的是完整蛋白质, “up”是指由肽段到蛋白质的推断过程, “down”是指通过串联质谱技术将完整的蛋白质分子碎裂的过程^[40]. 在BU策略中, 基于鸟枪法(shotgun)^[41]的蛋白质组多维色谱-物质谱鉴定方法是最主要的研究方法之一, 其基本路线是: 蛋白质混合物经过简单分离甚至不经过分离就被特定的酶(通常为胰酶, trypsin)酶解成肽段混合物, 肽段混合物经过色谱分析和离子化后, 通过串联质谱进行鉴定, 再从鉴定的肽段中推导可能的蛋白质. 其优势在于能在更短的时间内获得大量的鉴定结果, 被广泛应用于蛋白质组学研究中. 但是该方法的缺陷在于数据量大, 数据分析的复杂性和难度大, 以肽段为中心鉴定到的蛋白质序列覆盖率很低不足20%^[42], 且酶切过程会导致PTMs等重要信息的缺失, 从而阻碍蛋白质的精确功能分析. 针对BU策略蛋白质PTMs易丢这一缺点, MD策略应运而生, 该技

术使用了与BU策略不同的生物酶(如丝氨酸蛋白酶Glu-C、天冬氨酸蛋白酶Asp-N, 其中Glu-C可特异切割天冬氨酸及谷氨酸残基的C末端肽键; Asp-N可特异性水解天冬氨酸和半胱氨酸残基N端肽键), 可以尽可能多地获得保留有PTMs的较长肽段, 以便后续质谱分析能够更全面、准确地表征蛋白质精细结构. TD策略则不需要进行蛋白质酶切处理, 在保持蛋白质结构完整的基础上, 先对其进行分子轮廓扫描(如分子量), 然后运用多种裂解技术^[43-46], 如碰撞诱导/活化裂解(collision-induced/activated dissociation, CID/CAD)、电子捕获裂解(electron capture dissociation, ECD)、电子转移裂解(electron transfer dissociation, ETD), 对完整蛋白质进行碎裂处理以获得丰富的碎片离子谱, 其序列覆盖度可达到100%^[47-49]. 基于TD分析策略可以获得更多的PTMs位点, 但是其局限在于通量性、分析效率及灵敏度仍有待提高, 并且较难全面表征分子量较大的蛋白复合体精细结构. 综上所述, 不同蛋白质鉴定策略各有优劣, 相互补充, 构成了目前蛋白质组研究的主要鉴定策略体系^[39].

随着质谱技术的不断发展, 目前基于BU策略衍生出了新型4D蛋白质组学技术, 打破了传统BU策略的

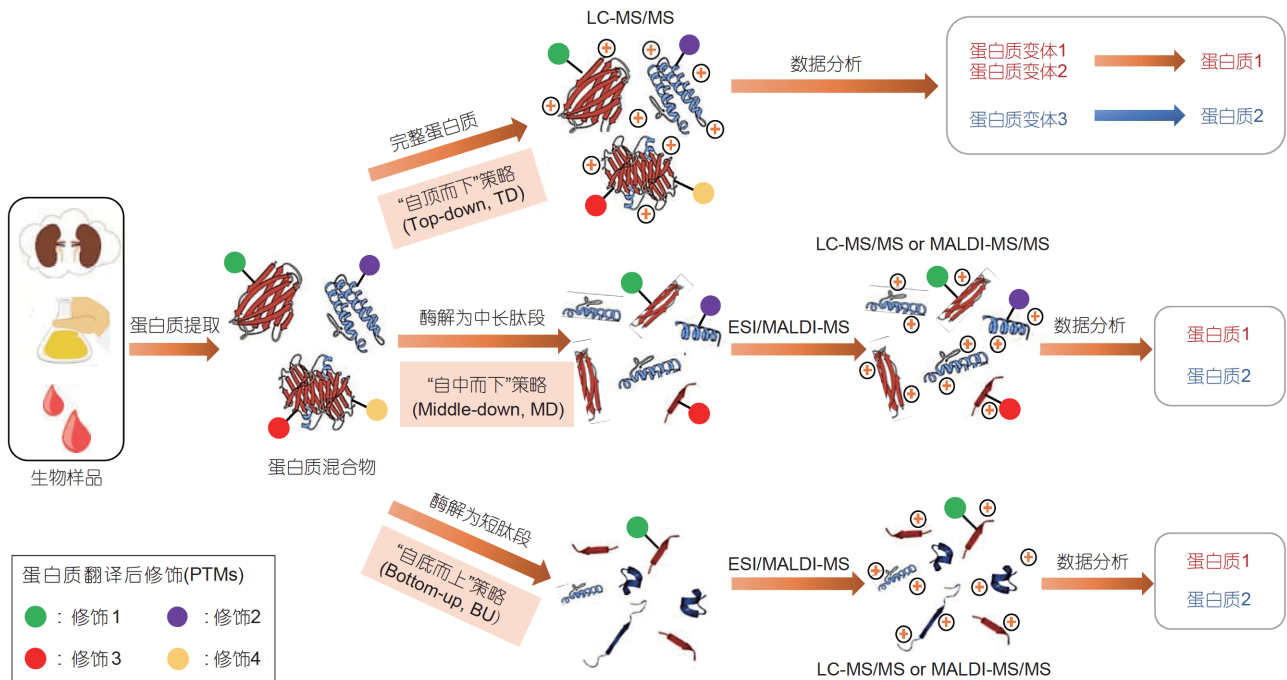


图2 蛋白质组学分析鉴定策略
Figure 2 Proteomics strategies for protein identification

局限,极大提升了样品采集速度和灵敏度,实现了蛋白质组学更深度的覆盖. 4D蛋白质组学在基于保留时间(retention time)、质荷比(m/z)、离子强度(ion intensity)这三个维度对肽段离子进行定性和定量研究的基础上,增加了第四维度——离子淌度的分离(IM,一种主要根据分子自身形状和截面不同而进行分离的新兴技术),极大增强了质谱对于蛋白质组学的分析效能^[50]. Meier等人^[22]成功将捕获离子淌度谱(trapped IM spectrometry, TIMS)与四极杆飞行时间质量分析器(quadropole-TOF, Q-TOF)相整合,形成了全新质量分析器——timsTOF,并结合同步积累连续碎裂(parallel accumulation serial fragmentation, PASEF)扫描模式最终构建了新型4D蛋白质组学分析技术. 其中, timsTOF能够区分 m/z 差值较小的共洗脱肽段或同分异构肽段,极大提高质谱检测分辨率与灵敏度; PASEF技术能对低丰度的母离子进行智能叠加选择裂解,并且MS/MS二级谱实际平均扫描速度可达120 Hz,几乎可以实现100%被分析离子的有效利用率,极大提升了质谱对肽段序列分析及PTMs表征的效能^[51,52]. 基于质谱检测分辨率、灵敏度、扫描速度的大幅提升,这种新型4D蛋白质组学技术能在更少进样量的情况下实现更深层次的蛋白质组学覆盖,进一步提升了现有蛋白质组学研究通量与效能^[24],适用于临床DKD蛋白质组学的研究.

由于DKD的发生发展涉及纷繁复杂的蛋白质分子种类与表达量的变化,因此,全面表征DKD蛋白质组中的蛋白质分子信息是探究DKD分子机制的基础. 上述蛋白质鉴定技术的发展,使得系统、精确地表征DKD相关蛋白质的序列、PTMs等信息成为可能,为后续DKD蛋白质全面的定性定量研究、蛋白质相互作用网络的构建奠定了基础.

1.3 蛋白质定量技术

定量分析蛋白质的动态变化,是目前蛋白质组学研究中解析蛋白质功能、揭示分子机制、寻找疾病生物标志物和药物靶点的重要手段. 随着质谱技术的发展,蛋白质分析已从传统的凝胶定量分析发展到更为精确的质谱定量分析.

基于生物质谱技术的蛋白质定量分析主要包括标记定量和非标记定量(图3)^[53]. 标记定量主要是基于稳定同位素标记,其中,常见的稳定同位素标记主要有酶催化¹⁸O标记、SILAC、ICAT、iTRAQ等^[54]. 酶催化¹⁸O

标记方法通过 $H_2^{18}O$,在蛋白酶催化作用下将羧基端的O替换为¹⁸O,使肽段质量数产生差异^[55]. 该法操作简单,适用于低丰度磷酸化肽段分析,但受酶解过程影响大,¹⁸O原子掺入个数不确定,准确度和精确性有待提高. SILAC方法^[56]通过使用轻型和重型同位素标记必需氨基酸进行细胞培养,获得细胞中蛋白质在不同条件下表达的定量关系. 该方法标记效率高、误差低、无放射性,但仅适用于活体培养细胞,成本较高^[57]. ICAT标记法通过分别加入不同标记的ICAT试剂标记蛋白质样品以定量不同细胞内蛋白质的表达量变化^[58],该方法适用于多种类型的样品,但是局限性在于仅适用于含有半胱氨酸的蛋白分析,且数据检索复杂. iTRAQ标记技术多见于多维液相色谱-串联质谱联用蛋白质定量表征,已成为蛋白质定性和定量研究的重要方法之一^[59-63]. iTRAQ的优势在于对疏水性蛋白质、强酸性蛋白质、强碱性蛋白质、低丰度蛋白质均具有很好的兼容性. 该标记技术具有灵敏度高、重复性好、可最大程度获得蛋白质组信息等特点,可有效地满足蛋白质组学定量研究的需求,在疾病蛋白质组学研究中得到了广泛的应用. 但是,基于iTRAQ标记的定量方法也存在一定缺陷,如样品制备过程复杂、试剂昂贵、数据分析较复杂等.

非标记定量策略通过比较LC-MS相同保留时间信号峰面积或质谱峰强度,分析不同来源样品蛋白质的表达量变化^[57]. 肽段在质谱中被捕获检测的频率与其在混合物中的丰度呈正相关,因此对蛋白质质谱信号强度的检测可以反映蛋白质在样品中的丰度情况. 非标记定量的计算方法按照定量原理的不同可以分为信号强度法和谱图计数法两大类^[64]. 信号强度法根据一级质谱相关的肽段峰强度、峰面积、液相色谱保留时间等进行定量分析;谱图计数法根据二级质谱相关每个蛋白质鉴定到的肽段总次数、所鉴定肽段的离子价位等信息进行定量分析. 相比于标记定量法,非标记定量检测的样品不需要进行标记、样品需求量少、耗材费用低廉和数据分析便捷,适用于大样本量的检测. 许多研究表明,非标记定量法准确度与标记定量法相似^[65],因此被广泛应用在疾病蛋白质定量研究中.

由于在DKD发生发展过程中,除了蛋白质种类发生变化外,患者的蛋白质组表达量的变化也提供了疾病病情和预后信息,因此上述定量蛋白质组技术的发展,有助于精确定量DKD相关差异蛋白质的表达量,

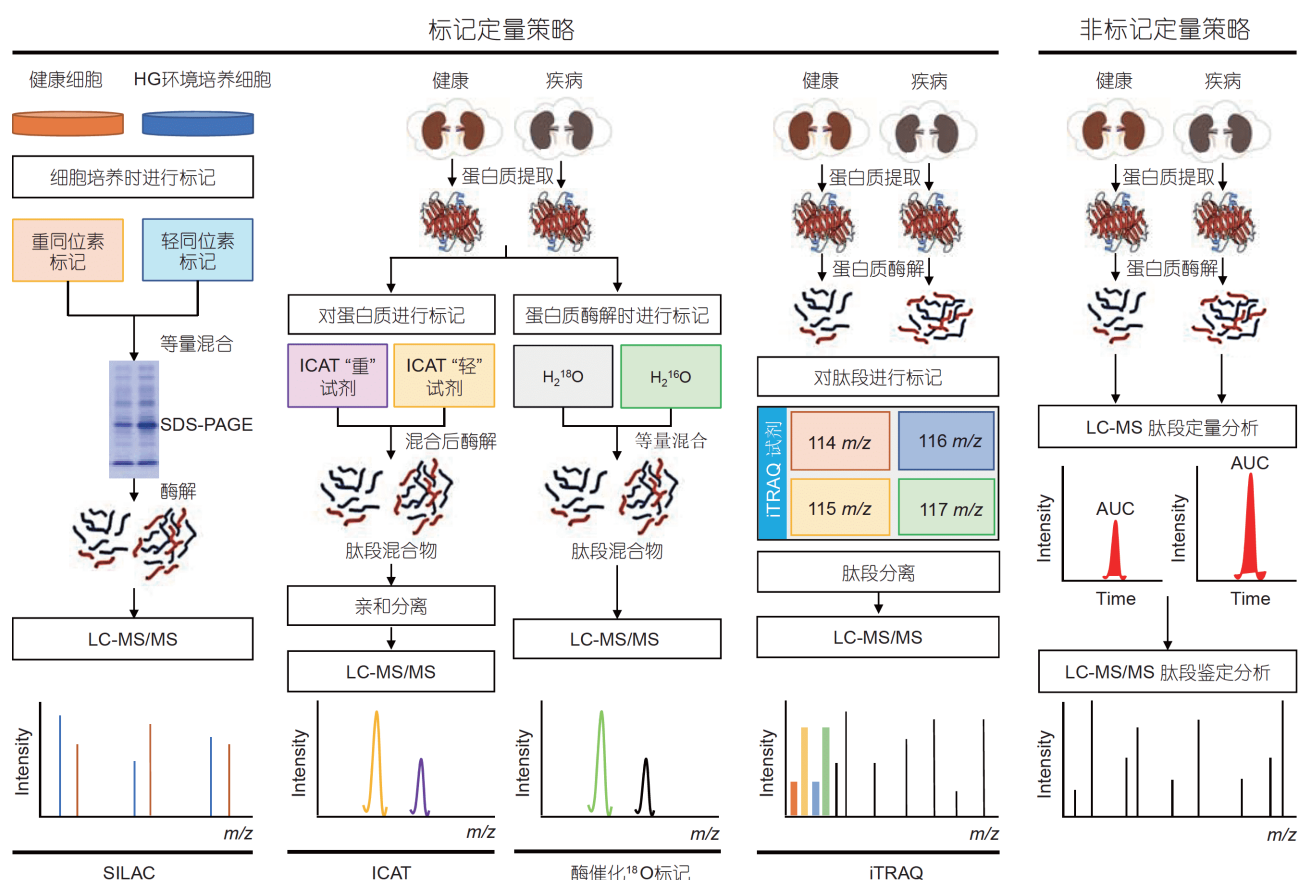


图3 定量蛋白质组学分析策略
Figure 3 Proteomics strategies for protein quantification

使得不同DKD病程患者体内的蛋白质表达差异可以被灵敏地捕捉, 从而尽可能帮助研究者获得敏感的、特异性的疾病候选生物标记物, 有利于DKD早期诊断和预后监测。

1.4 蛋白质相互作用分析技术

蛋白质间的相互作用是生命活动的基础, 生物体的生理功能主要由细胞中的蛋白质控制和调节, 其中, 多数蛋白质是通过与配体结合或是作为蛋白质复合体的一部分而参与细胞代谢。因此, 深入理解蛋白质相互作用, 对理解蛋白质功能、疾病与进化具有重要的意义。

蛋白质相互作用技术根据其原理可分为基于生物物理方法和基于生物化学方法两类。基于生物物理学方法进行的蛋白质相互作用研究包括: 荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance transfer, FRET)、表

面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、原子作用力显微技术(atomic force microscopy, AFM)等, 以上技术主要用于监测和表征蛋白质复合物特定的生化特征和理化性质^[66]。基于生化方法的经典蛋白质互作分析技术包括: 化学交联法(chemical cross-linking)、免疫共沉淀(coimmunoprecipitation, co-IP)、噬菌体展示技术(phage display approach)、融合蛋白亲和色谱法(protein fusion affinity chromatography)、酵母双杂交技术(yeast two-hybrid, Y2H)、串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)、酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白质微阵列(protein microarray)。其中, Y2H、TAP、蛋白质微阵列、噬菌体展示是一类主要集中于筛选大量的蛋白质间相互作用的高通量方法^[67]。然而, 对于多种内源性蛋白质, 上述技术的操作相对繁琐, 容易造成蛋白质复合体亚基的解离甚至变性, 因此, 王晓东等

人^[33]构建了4-DES和BS4-DES技术, 两项技术均包括非变性电泳部分(Part I)和变性电泳部分(Part II), Part I可实现温和分离和高分辨分离, BS4-DES在4-DES的基础上扩大了对碱性蛋白质的适用性, 可使完整的蛋白质复合体及相互作用蛋白质在Part I成功分离. Part II则可以对蛋白质复合体或相互作用蛋白质的组成型亚基进行详细地表征. 此外, 为了实现Part I和Part II部分之间的衔接, 研究团队在4-DES和BS4-DES技术中分别使用了碱-超声蛋白胶内萃取策略和氨水-超声蛋白胶内萃取策略. 实验证明, 以上两种技术适用于微量样品的蛋白质复合体组学系统性研究, 可作为一种简便、常规的技术用于疾病蛋白质组学的研究^[20,21].

尽管高通量实验方法已获得大量蛋白质相互作用的数据, 但由于此实验方法原理、操作的差异, 结果存在一定的假阳性及偏好性, 且数据并不全面等不足, 因此, 作为实验方法的补充, 基于计算分析和相互作用模型构建等方法逐渐发展起来, 如基因临近(gene neighbor)法、基因簇(gene cluster)法、系统发育谱、网络集成(network integration)、基于GO的关联法等. 实验方法和计算方法的联合使用, 使得蛋白质间相互作用的数据质量和数量有了进一步的提升. 同时, 海量的数据通过收集整理形成了许多不同蛋白质相互作用检索数据库, 如BioGRID数据库^[68]、DIP数据库^[69]、MIPS数据库^[70]、MINT数据库^[71]等.

在DKD疾病发展过程中, 复杂的生物过程涉及多种蛋白质间的相互作用和调控, 但是目前已有的候选DKD标志物之间的相互作用关系却没有得到充分地挖掘, 阻碍了DKD蛋白质分子调控网络的全面构建. 而上述蛋白质互作研究技术的不断发展与完善, 使得研究人员可以通过实验和计算机模拟的方式, 在整体互作水平上阐释DKD相关蛋白质之间的相互作用关系, 有助于揭示DKD发生发展的分子机制.

综上所述, 蛋白质分离技术、蛋白质鉴定技术、蛋白质定量技术、蛋白质互作分析技术的发展, 不断完善了DKD蛋白质组学研究体系(表1), 为后续从蛋白质组学水平研究DKD致病机制、早期诊断标志物、治疗靶点及疗效评估等奠定了良好的技术基础.

2 蛋白质组学在糖尿病肾病中的应用

由糖尿病发展成为糖尿病肾病的过程涉及一系列

复杂的分子调控机制, 蛋白质在该过程中发挥着重要作用. 研究者利用蛋白质组学各种研究方法, 系统地分析了DKD患者生物样本(组织细胞, 尿液、血浆或血清), 揭示了糖尿病肾病的部分发病机制, 并在DKD的早期诊断和治疗中取得了一定的成果, 促进了人们对该疾病发生发展、预测及缓解等过程的理解, 为全面治疗DKD奠定了良好的理论与实验基础.

2.1 蛋白质组学在DKD发病机制研究中的应用

了解DKD发生发展的内在机制, 对于研究者建立新的诊断方法和开发新的治疗思路非常必要. 研究发现, DKD的病因非常复杂, 多种机制参与了糖尿病肾病的发展^[108], 蛋白质是细胞生理生态主要调控因子之一. 利用蛋白质组学方法全面获取蛋白质定性和定量信息将有助于揭示糖尿病并发症的发病机制. 目前, 从蛋白质组学水平解析DKD发病机制的普遍策略是利用比较蛋白质组学的方法, 建立正常样本与DKD样本的差异蛋白表达谱, 以期获得DKD蛋白质标志物, 并以筛选出的潜在蛋白质标志物为研究对象对其进行生物学功能靶向研究.

DKD是复杂的糖尿病并发症, 长期暴露于高糖环境(high-glucose, HG)的糖尿病患者蛋白质和信号通路的异常表达, 易导致肾脏发生严重的形态学改变. 因此研究高糖环境对疾病发展的影响是探索DKD发病机制的基础. DKD的组织学特征是肾小球系膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白的积累, 因此, 系膜细胞可能在糖尿病肾病的发展中起重要作用. Li等人^[109]利用2-DE和MALDI-TOF MS技术确定了大鼠系膜细胞在HG培养基中培养后, 其胞内蛋白表达模式发生显著变化, 且HG能够抑制系膜细胞增殖. 研究表明, 部分差异蛋白质与泛素-蛋白酶体途径有关, 可以介导胞质蛋白质的降解过程, 并参与调控细胞周期蛋白质. 在动物实验中, 蛋白酶体在两种糖尿病大鼠模型的肾皮质中的表达均显著下降, 表明HG可能是通过引发蛋白酶体下调, 使得调控细胞周期的相关蛋白表达升高, 导致糖尿病肾病系膜细胞G1期阻滞, 进一步引发了系膜细胞病变. 除系膜细胞外, 交错的足细胞足突形成肾小球狭缝隔膜是肾小球过滤屏障的重要组分, 但由于足细胞无法分裂, 其病变损伤导致的足细胞数量减少的不可逆性, 被认为是引发DKD的重要因素之一. 为了探究HG是否是引起足细胞变化的主要因素, Schor-

表 1 近年来蛋白质组学在DKD研究中的应用

Table 1 Recent applications of proteomics in DKD research

作者	年份	技术方法	研究内容	研究结果	研究意义	文献
DKD发病机制研究						
Marikanty等人	2016	蛋白质定量技术 (LC-MS/MS)	确定人体中与DKD相关的尿蛋白(2型糖尿病患者: $n=10$, 健康个体: $n=10$)	在患者尿蛋白质组中检测到了53种主要参与补体和凝血途径的差异蛋白质	补体和凝血通路在DKD发展中具有重要作用	[72]
Fu等人	2016	蛋白质鉴定技术 (MALDI-TOF MS)	探究2型糖尿病患者中不同程度肾脏损伤的尿肽生物标志物(2型糖尿病患者: $n=144$)	在不同程度肾脏损伤的糖尿病患者尿液中鉴定出了7个候选标志物, 涉及多种小分子肽	DKD肾脏损伤是一种多因素的进展性疾病, 涉及多种不同细胞、分子和因子	[73]
Aluksanasuwan等人	2017	生物信息学分析 (蛋白质组网络分析)	探究高糖环境引起的犬肾传代细胞蛋白质组网络变化	高糖环境中培养的肾小管细胞热激蛋白质表达升高, 活性氧含量过剩, 过氧化氢酶水平降低, 氧化修饰蛋白质水平升高, 胞内ATP水平升高, 跨上皮 Ca^{2+} 转运存在缺陷	高糖环境通过引发犬肾传代细胞氧化应激反应, 诱导活性氧抗氧化稳态失衡, 干扰能量平衡, 易促进DKD发展	[74]
Clotet等人	2017	蛋白质定量技术 (SILAC)	探究雄性激素对人近端肾小管上皮细胞蛋白质组的影响	双氢睾酮和雌二醇处理的近端小管上皮细胞中检测到76种差异蛋白质, 其中葡萄糖-6-磷酸异构酶、葡萄糖-6-磷酸-N-乙酰转移酶1、线粒体三功能蛋白质 α 显著上调	男性性激素可以引起肾细胞能量代谢紊乱和肾皮质氧化应激反应增加, 加速DKD发展	[56]
Krochmal等人	2017	蛋白质分离定量技术(CE-MS)	探究蛋白水解酶与DKD患者相关尿肽的关系(DKD患者: $n=121$, 糖尿病患者: $n=118$)	比较DKD患者和糖尿病患者尿肽谱, 检测到302种差异表达肽, 分析获得17种差异表达蛋白酶	DKD尿肽谱可以预测上游蛋白酶水解以解析蛋白酶在DKD中的作用机制	[75]
Guillen-Gomez等人	2018	蛋白质分离定量技术(LC-MS)	利用TMT技术对DKD病人尿蛋白质组进行定性定量研究(有DKD症状2型糖尿病患者: $n=9$, 无DKD症状2型糖尿病患者: $n=11$)	DKD患者和对照组患者尿蛋白质组谱有166种差异蛋白质, 其中炎症相关因子血管细胞黏附分子1的表达显著升高	炎症反应与DKD发生发展过程具有相关性	[76]
Rossi等人	2018	蛋白质定量技术 (非标记定量鸟枪(shotgun)质谱法)、生物信息学分析	金属蛋白酶组织抑制剂TIMP3缺失对小鼠DKD的影响	肾脏蛋白质组学数据和血液代谢谱表明, 与野生型小鼠相比, TIMP3敲除小鼠的过氧化物和线粒体脂肪酸氧化酶发生了显著变化	TIMP3缺失可能会诱导DKD的发生	[77]
Miura等人	2019	蛋白质分离技术 (2D-DIGE)	利用动物模型(Goto-Kakizaki大鼠)探究DKD病理生理机制	蛋白质组学分析表明2-氧戊二酸脱氢酶升高、富马酸水合酶降低, 引起富马酸积累, 导致了小鼠肾脏的纤维化	肾脏细胞中参与三羧酸循环的蛋白质表达变化造成延胡索酸积累, 从而引发了肾脏纤维化和DKD	[78]
Liljedahl等人	2019	蛋白质定量技术 (非标记定量鸟枪(shotgun)质谱法)	研究胰高血糖素样肽1受体激动作用对小鼠肾蛋白质组的影响	蛋白质组学数据表明, 胰高血糖素样肽1受体激动剂处理后的小鼠肾脏中谷胱甘肽过氧化物酶3和过氧化氢酶表达上调, Neuroplastin蛋白质和双功能谷氨酸tRNA连接酶表达下调	胰高血糖素样肽1受体激动作用可影响肾脏结构相关蛋白质, 增加氧化应激相关蛋白质的丰度	[79]
Smith等人	2020	蛋白质鉴定技术 (MALDI MSI)	通过人体肾脏组织蛋白质组的变化区分DKD与高血压性肾硬化(DKD患者: $n=9$, 高血压肾硬化患者: $n=9$)	缺氧相关蛋白质和补体相关蛋白质在晚期DKD患者肾脏纤维化组织中表达升高	与组织缺氧和补体激活效应机制具有正向诱导DKD疾病发展的作用	[80]
Lee等人	2020	蛋白质定量技术 (LC-MS/MS)	研究小鼠DKD相关的蛋白质调节因子	在糖尿病肾脏小鼠蛋白质组中发现了N ϵ -赖氨酸(羧甲基)诱导的DKD相关蛋白质参与了肾脏损伤、脂肪酸氧化激活, 证实线粒体肉毒碱棕榈酰转移酶-2的降低导致肾脏纤维化	N ϵ -赖氨酸(羧甲基)通过诱导线粒体肉毒碱棕榈酰转移酶-2表达下调以介导肾脏纤维化和DKD	[81]

(表1续1)

作者	年份	技术方法	研究内容	研究结果	研究意义	文献
DKD早期诊断研究						
Zubiri等人	2015	蛋白质分离定量技术(LC-MS)	探究尿外泌体是否能够预测大鼠DKD的发生	与健康大鼠相比, DKD大鼠肾脏组织和尿液外泌体中Regucalcin蛋白质显著下调	DKD大鼠的尿外泌体能够提供早期诊断DKD的有用信息	[82]
Betz等人	2016	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)	探究人体DKD的尿肽生物标志物(验证组2型糖尿病患者: $n=642$)	蛋白质组学分析发现DKD大鼠尿蛋白质组中有297种上调表达尿肽和15种下调表达尿肽, 其中表皮生长因子/肌酐可作为评估DKD的标志物, 并在2型糖尿病患者肾功能检测中得到验证	低尿表皮生长因子与肌酐比值能作为正常蛋白尿患者肾功能逐渐下降的生物标志物	[83]
Al Hariri等人	2017	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)	分析糖尿病大鼠肾脏的蛋白质组丰度变化和PTMs的特征	与对照组相比, 糖尿病肾病大鼠肾脏中鉴定出233种差异蛋白质, 其中线粒体功能障碍、氧化磷酸化通路相关蛋白质发生显著改变	糖尿病导致肾脏蛋白质氧化、磷酸化和乙酰化显著升高, 引起线粒体功能障碍、氧化磷酸化和急性期反应信号通路改变	[84]
Bringans等人	2017	蛋白质定量技术(iTRAQ)、蛋白质鉴定技术(multiple reaction monitoring, MRM)	DKD患者血浆样本中生物标志物的筛选(发现组有蛋白尿肾病患者: $n=20$, 验证组2型糖尿病患者: $n=572$)	血浆蛋白质组分析得到载脂蛋白A4、补体因子H相关蛋白质2、 β -珠蛋白、免疫球蛋白结合蛋白质3、 α -1-微球蛋白/胰蛋白酶抑制剂前体与DKD显著相关, 能够诊断蛋白尿、早期肾损伤, 并对慢性肾病分期	蛋白质组学方法获得的DKD早期诊断标志物组群能够改善DKD诊断	[85]
Vitova等人	2017	蛋白质分离技术(2-DE) 蛋白质鉴定技术(MALDI-TOF MS)	筛选DKD患者尿液诊断生物标志物(有微量白蛋白尿患者: $n=11$, 无微量白蛋白尿患者: $n=14$)	尿液蛋白质组分析和统计学分析获得了多个早期诊断DKD的生物标志物, 其中kininogen-1与DKD的相关性最高	在尿液蛋白质组中发现了新的DKD生物标志物, 其中激肽原片段与DKD进展密切	[86]
Lindhardt等人	2017	蛋白质分离定量技术(CE-MS)	评估CKD273早期预测DKD的效果(糖尿病患者: $n=737$)	CKD273分类器预测了随访期间微量白蛋白尿的发展, 能够提高对DKD的风险预测能力	CKD273是DKD微量白蛋白尿的独立预测因子	[87]
Liao等人	2018	蛋白质定量技术(iTRAQ)	验证触珠蛋白质早期诊断DKD的能力(非糖尿病性白蛋白尿患者: $n=25$, 无白蛋白尿糖尿病患者: $n=24$, 有白蛋白尿糖尿病患者: $n=16$, 健康个体: $n=35$)	将触珠蛋白质/肌酐(HCR)生物标志物与白蛋白肌酐比值(ACR)结合, 可以显著提高预测终末期肾病的预测曲线下面积(AUC)值	触珠蛋白质能够作为比传统DKD检测方法更灵敏的生物标志物而应用于DKD早期诊断中	[88]
Bellei等人	2018	蛋白质分离及鉴定技术(2-DE、MS)	寻找与DKD发生发展相关的早期生物标志物(2型糖尿病患者: $n=10$, 健康个体: $n=12$, 药物滥用患者: $n=87$)	与健康对照组相比, 2型DKD患者中检测到11种差异表达蛋白质(8种上调, 3种下调). 与对照组相比, 非甾体抗炎药和混合药物滥用者的尿液中发现了21种过度排泄的蛋白质	尿蛋白质组学通过鉴别特征性蛋白质模式, 可在早期对肾脏疾病进行无创评估	[89]
Chen等人	2018	蛋白质鉴定技术(MALDI-TOF MS)	采用 C_{18} -plate MALDI-TOF-MS无创鉴别诊断和预测DKD(有微量白蛋白尿糖尿病患者: $n=53$, 无白蛋白尿糖尿病患者: $n=87$, 非糖尿病性白蛋白尿疾病患者: $n=48$, 健康个体: $n=50$)	在蛋白尿患者的尿液中发现了大量 β 2-微球蛋白和Clara细胞蛋白质, 这两种蛋白质在区分健康个体和肾病患者方面的联合敏感性和特异性分别为77.3%和91.8%	使用 C_{18} -plate MALDI-TOF-MS检测 β 2-微球蛋白和Clara细胞蛋白质能够快速诊断DKD	[90]
Naguib和Rashed	2018	蛋白质定量技术(iTRAQ)	研究自噬机制与DKD发生发展的关系(2型糖尿病肾病患者: $n=70$, 健康个体: $n=20$)	在DKD患者血清蛋白质组中自噬关键调节因子Beclin-1的水平明显低于健康个体, 在单因素分析中, Beclin-1的浓度与肾小球滤过率、尿白蛋白与肌酐比值、糖尿病持续时间有较强的相关性	DKD患者存在自噬功能障碍从而加剧了DKD发展	[91]

(表1续2)

作者	年份	技术方法	研究内容	研究结果	研究意义	文献
Patel和Kalia	2019	蛋白质分离技术(2-DE)	根据不同糖尿病病程和肾脏受损情况构建低分子量蛋白质表达谱(糖尿病患者: $n=390$)	在糖尿病患者尿蛋白研究中发现8种分子量为11、15、17、23、34、38和46 kD蛋白质的表达量随糖尿病持续时间和肾脏损害严重程度的发展而逐渐增加	不同病程的糖尿病患者尿低分子量蛋白质表达分析是早期诊断DKD的有效手段	[92]
Peters等人	2019	蛋白质鉴定技术(质谱多重反应监测技术(MRM))	验证血浆生物标志物组群——Promarker D预测糖尿病肾脏功能下降的效果(2型糖尿病患者: $n=1551$)	由载脂蛋白质、CD5抗原样、胰岛素样生长因子结合蛋白质3、年龄、血清HDL-胆固醇和肾小球滤过率组成的Promarker D模型在预测DKD发病方面表现最佳	Promarker D将一组血浆生物标志物与临床变量结合起来,能够准确预测2型糖尿病患者的肾脏功能下降	[93]
Koziolek等人	2019	蛋白质分离技术(2-DE, 2D-DIGE, HPLC)	探究人DKD早期诊断标志物(伴有微量白蛋白尿2型糖尿病患者: $n=60$, 伴有大量白蛋白尿2型糖尿病患者: $n=60$, 非糖尿病白蛋白尿患者: $n=32$, 验证组糖尿病患者: $n=563$)	非标记质谱定量分析证实了尿液蛋白质组中E-钙黏蛋白质和胰石蛋白质-1- α 具有DKD诊断价值($P<0.05$)	尿E-钙黏蛋白质可以作为DKD早期诊断和预后标志物	[94]
Kaburagi等人	2019	蛋白质定量技术(非标记定量)	识别与人DKD发生发展相关的尿蛋白质(2型糖尿病患者: $n=122$, DKD患者: $n=81$, 健康个体: $n=24$)	与健康对照组相比, DKD患者尿液蛋白质组中有104种蛋白质变化显著. 其中afamin、CD44抗原和溶酶体相关膜糖蛋白质-2的水平与尿白蛋白肌酐比值和肾小球滤过率显著相关. 早期肾功能下降的患者的尿afamin/肌酐比率明显更高	尿蛋白质标志物可预测DKD的进展	[95]
Colombo等人	2019	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)	寻找早期诊断DKD的小型生物标志物组群(糖尿病患者: $n=859$, DKD患者: $n=315$)	CD27抗原、肾损伤分子-1和 α -1微球蛋白与肾功能下降具有强关联,能够提高预测肾小球滤过率的准确性	CD27抗原、肾损伤分子-1能够有效预测早期DKD进展	[96]
Colombo等人	2019	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)	比较不同DKD诊断标志物的预测效果(糖尿病患者血清样本: $n=657$)	肾损伤分子-1和 β 2-微球蛋白能够最为有效地预测肾功能的下降	血清肾损伤分子-1、 β 2-微球蛋白独立预测DKD效果与大型标志物组群相似	[97]
Lu等人	2019	蛋白质定量技术(iTRAQ)	探究2型DKD与健康组的差异蛋白质表达情况(有微量白蛋白尿2型糖尿病患者: $n=82$, 无微量白蛋白尿2型糖尿病患者: $n=82$)	与对照组相比,在有微量白蛋白尿的2型DKD患者血浆中鉴定出57种差异蛋白质(32种上调, 25种下调), ROC分析显示, 差异蛋白质中凝溶胶蛋白质、受体型蛋白酪氨酸磷酸酶、collectin-11和A激酶锚定蛋白质-7是有效的诊断标志物	涉及多途径的蛋白质联合诊断DKD更加准确	[98]
Brondani等人	2020	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)、生物信息分析	对不同阶段DKD患者尿肽进行分类(DKD患者: $n=60$)	Proteasix软件预测48种蛋白酶可能参与糖尿病患者尿液中60种最重要肽的生成, 包括金属蛋白酶、组织蛋白酶和钙蛋白酶	尿肽分类可以应用于DKD风险分层与预后	[99]
DKD治疗研究						
Watanabe等人	2016	蛋白质定量技术 LC-MS/MS	探究在DKD小管损伤中起作用的新的治疗靶点分子(2型糖尿病患者: $n=46$)	2型糖尿病患者尿液蛋白质组中胰岛素样生长因子结合蛋白质-7表达上调, 与微量白蛋白尿的发展有显著相关性	胰岛素样生长因子结合蛋白质-7参与了DKD中肾小管损伤, 可以作为新的治疗靶点	[100]
Lindhardt等人	2016	蛋白质分离定量技术(CE-MS)	测试螺内酯治疗DKD的效果(2型糖尿病患者: $n=3280$)	CKD273能够在微量白蛋白尿发生4年前预测DKD的发展, 以实现对CKD273高风险患者的预防性治疗, 能够提高延缓DKD进展的能力	CKD273有助于评估DKD进展风险和患者对螺内酯治疗的反应	[101]

(表1续3)

作者	年份	技术方法	研究内容	研究结果	研究意义	文献
Qi等人	2017	蛋白质定量技术(LC-MS/MS)	探究未受DKD影响的长期糖尿病患者体内的保护机制(无DKD症状糖尿病患者: $n=7$, 有DKD症状糖尿病患者: $n=11$)	长期无DKD症状的糖尿病患者体内糖酵解、山梨醇、甲基乙二醛和线粒体途径相关酶表达升高。其中丙酮酸激酶M2的表达和活性上调对糖尿病患者的肾脏有保护作用	丙酮酸激酶M2能够改善线粒体功能从而缓解高糖环境引发的肾小球病变, 可以作为治疗DKD的潜在靶点	[102]
Civantos等人	2017	蛋白质分离技术(2D-DIGE)、蛋白质鉴定技术(MALDI-TOF MS)	利用GK小鼠探究药物西格列汀在DKD疾病治疗中的作用机制	糖尿病GK大鼠出现蛋白尿、肾间质炎性浸润和纤维化症状, 西格列汀治疗20周后改善。对糖尿病大鼠的蛋白质组学分析显示, 有39种蛋白质表达具有差异, 主要与氧化应激和分解代谢有关	西格列汀通过调节肾脏的抗氧化反应以延缓DKD疾病的发展	[103]
Liljedahl等人	2017	蛋白质分离定量技术(LC/MS)	研究胰岛素和利拉鲁肽对糖尿病肾脏蛋白质组的潜在影响	胰岛素和利拉鲁肽能使DKD小鼠肾脏蛋白质组发生明显变化, 其中喋呤甲醇胺脱水酶-1、神经前体细胞表达发育下调蛋白质-8、外周血铁调素等蛋白质的表达水平发生变化	胰岛素和胰高血糖素样肽1受体激动剂——利拉鲁肽会导致糖尿病肾脏形成不同的蛋白质谱	[104]
Wu等人	2018	蛋白质定量技术(iTRAQ)	探究组氨酸对DKD的治疗效果和作用机制	定量蛋白质组学和生物信息学分析显示, hispidulin调控的 <i>Pim1</i> 抑制与Rab蛋白质-18、神经母细胞瘤RAS病毒致癌蛋白质、血清人帕金森病蛋白质和线粒体分裂蛋白质-1相关	组氨酸能够通过调节多种与原癌基因 <i>Pim1</i> 相互作用的蛋白质, 诱导自噬调节机制以抑制足细胞凋亡	[105]
Lindhardt等人	2018	蛋白质分离定量技术(CE-MS)	预测白蛋白尿患者对螺内酯治疗的反应(服用螺内酯患者: $n=57$, 服用安慰剂患者: $n=54$)	与安慰剂组相比, 螺内酯治疗能够使患者尿白蛋白/肌酐数值降低50%, CKD273值越高, 螺内酯组的尿白蛋白/肌酐数值下降越显著	CKD273评分能够预测螺内酯治疗白蛋白尿患者的效果	[106]
Tofte等人	2020	蛋白质分离定量技术(CE-MS)	评估CKD273早期预测微量白蛋白尿的效果, 并评估螺内酯疗效(糖尿病患者: $n=1775$)	216例CKD273高风险患者中有61名(28%)发展为微量白蛋白尿, 1559名低风险患者中有139名(9%)发展为微量白蛋白尿。结果显示螺内酯无法阻止DKD发展	CKD273高危评分与微量白蛋白尿有显著相关性, 螺内酯无法阻止高危患者发展成为DKD	[107]

dan等人^[110]使用2-DE和MALDI-TOF-MS技术并结合MASCOT搜索鉴定引擎研究了长期暴露于HG条件下足细胞细胞系的蛋白质表达谱。所鉴定的差异蛋白质主要属于细胞骨架蛋白和特定的膜联蛋白, 在DKD患者体内也证实了膜联蛋白在肾小球中的下调表达。膜联蛋白是参与细胞膜组织和转运的 Ca^{2+} 结合蛋白和磷脂结合蛋白, 且作为膜支架, 膜联蛋白还参与了特定足细胞狭缝隔膜的构建。因此, HG环境通过使膜联蛋白表达下调, 影响了足细胞狭缝隔膜的构建, 破坏了肾小球过滤屏障, 从而诱导DKD的发生发展。此外, Aluksanasuwan等人^[74]对已获得的大量相关数据进行了蛋白质组整合网络分析, 并使用HG处理的远端肾小管细胞进行了多种靶向功能研究。结果显示, HG环境会导致

细胞内蛋白质聚集积累, 诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累, 导致抗氧化稳态失衡, 干扰能量平衡, 造成远端肾小管细胞 Ca^{2+} 吸收障碍, 从而最终导致肾小管损伤和DKD发生发展。该研究在整合蛋白质组网络分析的靶向功能研究基础上, 证实了HG环境对远端肾小管细胞的显著干扰作用, 有助于更好地理解DKD的致病机制。

尽管高血糖环境是诱发糖尿病肾病的重要因素, 但是只有25%~40%的糖尿病患者会发展成DKD^[111], 表明高血糖环境不是致病的唯一触发因素, DKD的发生还涉及其他多种因素的相互作用, 包括氧化应激、细胞因子激活、炎症等。研究表明, DKD患者体内会产生大量ROS, 从而攻击肾脏组织细胞^[112], 因此机体

对氧化应激的适应性能力与糖尿病患者的DKD发展进程密切相关。Barati等人^[113]利用MALDI-TOF MS技术研究了db/db糖尿病鼠的肾小球蛋白表达谱, 鉴定的差异蛋白质主要为抗氧化酶, 如过氧化物酶1(peroxidase 1, POD 1)和POD3, 谷胱甘肽过氧化物酶1(glutathione peroxidase, GSH-Px 1)和超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD-1)等。以上参与细胞氧化还原调节和乙醛酶系统的酶表达上调, 表明对氧化应激的适应性反应与糖尿病肾病发生发展具有一定的相关性, 证实小鼠体内对抗氧化应激机制在DKD的发生发展中发挥了重要作用。除氧化应激外, 细胞因子的激活也促进了DKD发生发展。细胞因子本质是一种多肽, 能够对细胞炎症和免疫反应进行有效调节, 然而对于糖尿病患者来说, 激活过量的细胞因子, 会增加诱发DKD的概率, 例如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种纤维化及炎症因子, 是诱发DKD的重要因素, 因此探究TGF- β 的诱导因素和调节因子对探究DKD的发生具有重要意义。Cummins等人^[114]采用2D-LS-MS/MS方法, 结合非标记定量策略成功检测了转基因OVE26 1型糖尿病小鼠和对照组小鼠肾小管中蛋白质的表达差异, 并对其进行了生物信息学分析。结果表明, 在相关的功能群中, 存在TGF- β 信号转导、细胞连接、氧化应激和葡萄糖代谢等多个调节蛋白质簇, 并证实了表达上调的生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound protein 2, GRB2)相关接头蛋白质(GRB2-related adaptor protein, GRAP)为TGF- β 信号的新成分, 确定了诱发TGF- β 引起糖尿病肾病小管损伤的新介质。除细胞因子的异常表达外, 炎症也被证实与DKD关系密切^[115], 炎症分子通过不同机制引发肾脏损伤, 从而介导DKD的发生发展。Guillen-Gomez等人^[76]使用串联质量标记(tandem mass tag, TMT)对尿蛋白质组进行了分析, 重点研究了涉及DKD病理生理学过程的关键蛋白质, 其中, 血管细胞间黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在尿蛋白组中异常表达。VCAM-1是肾脏病理研究中的候选标志物, 其水平与糖尿病患者肾组织中浸润性免疫细胞的数量有关。研究表明, DKD发展过程包括肾小球和肾小管间质区炎症, 同时伴有黏附分子和趋化因子的表达, 从而导致巨噬细胞浸润肾组织^[116]。VCAM-1黏附分子的过表达, 进一步证实了炎症反应在DKD发生发展过程中的重要作用。

上述研究大都以体外研究、细胞研究或动物模型中识别的生物标志物作为出发点, 此外, 关注肾脏不同结构部位的蛋白质组变化特征也是DKD蛋白质组学研究的重要内容。Smith等人^[80]利用MALDI-MS成像(MALDI-MS imaging, MALDI-MSI)新型分子影像技术分析了DKD患者肾脏组织蛋白质组表达情况, 结果显示, 在广泛硬化或纤维化的DKD组织区域内, 孕酮受体膜组分1(progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)和补体C3(complement C3, CO3)的信号强度在DKD疾病后期显著增加。PGRMC1过表达常由缺氧引起, 研究发现, 在纤维化严重区域PGRMC1表达强度增加, 证实了DKD中存在组织缺氧, 从而介导了肾小管间质损伤。CO3与补体激活相关, 虽然DKD曾被认为是非免疫介导疾病, 但是越来越多的研究证实补体激活是一种效应机制, 有助于DKD发展。因此, 对DKD患者肾脏不同组织部位进行蛋白质组学分析, 有助于在组织水平发现DKD发展造成的损伤, 加深对DKD病理的理解。此外, 为了精确定位不同的肾脏损伤相关标志物, 肾单位(肾小体、肾小管及肾小球)部分的蛋白质组变化研究也获得了重点关注, 包括肾小球部位的糖萼异常、细胞外基质沉积、足细胞损伤或肾细胞纤维化, 或急性/慢性近端/远端肾小管功能障碍。通过分析肾单位不同类型细胞的蛋白质组, 可以进一步明确不同结构损伤所产生的特异性生物标志物, 为后续在尿液、血清等非侵入样品中检测到的DKD相关标志物精确定位其肾脏来源, 并为DKD早期诊断、疾病进展预测、药物靶点和药效评价奠定分子基础。目前, 通过大量实验已经证实, 参与DKD发病机制相关的生物标志物肾脏定位如图4所示^[117]。

上述DKD蛋白组学研究通常侧重肾脏组织的研究, 把肾脏的病变作为糖尿病肾病的驱动因素, 但是随着蛋白质组学研究的进一步深入, 非肾脏因素的致病机制逐渐引起研究人员的关注。Clotet等人^[56]发现, 男性比女性更易患肾脏疾病, 考虑到雄性激素对肾脏内多种细胞都有负面影响, 于是推测双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)能够通过诱导蛋白质组的改变而影响肾小管细胞的生物学特性。研究人员通过使用SI-LAC技术, 分别精确量化了DHT和17 β -雌二醇(17 β -estradiol, 17 β -EST)处理的人类近端小管上皮细胞(proximal tubular epithelial cells, PTEC), 分析显示, 与能量代谢相关的蛋白质在DHT组中显著富集, 说明男

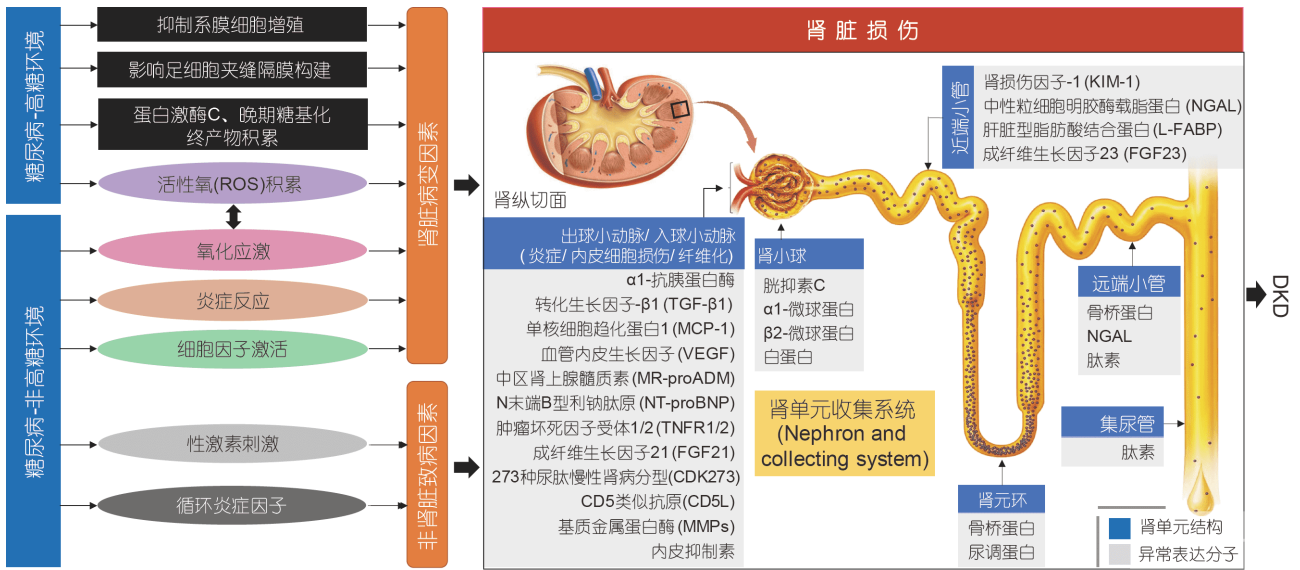


图4 DKD致病分子机制的蛋白质组学研究进展
Figure 4 Recent advances in proteomics studies on the pathogenic molecular mechanism of DKD

性激素刺激引起肾细胞能量代谢紊乱, 进一步导致肾皮质氧化应激反应的增加, 表明性激素可能在病变肾脏的结构和功能变化的发展中起着至关重要的作用. 除性激素以外, Niewczas等人^[118]发现, 非肾脏来源的肾脏风险炎症信号(kidney risk inflammatory signal, KRIS)与DKD的发生发展密切相关. 该研究利用慢速率修饰的蛋白质适体扫描(slow-off rate modified aptamer scan, SOMAscan)技术, 在1型和2型糖尿病患者中鉴定出一组包含17种循环炎症蛋白质的KRIS, 它们能够加速DKD发展为终末期肾病. KRIS成员复杂性高, 富含肿瘤坏死因子受体家族(tumor necrosis factor-receptor superfamily, TNF-RSF)成员, 其中TNF-R1和TNF-R2曾被认为是导致糖尿病终末期肾病进行性肾衰的预测因子, 能够介导与肾脏疾病相关的各种炎症和免疫调节反应. 该研究表明, 在糖尿病肾病中, KRIS蛋白质浓度增加的原因是生产过剩, 并不是肾脏功能失调, 说明KRIS蛋白质并非起源于肾脏, 且与糖尿病无关, 实际上白细胞才是KRIS蛋白质的非肾脏来源. 上述研究表明, 先天和后天免疫反应均参与了DKD的发展, 在DKD发展中存在涉及全身炎症的其他过程, 拓展了人们对循环炎症蛋白质促进DKD发展的理解, 并揭示了KRIS作为未来药物靶点的可行性.

随着研究技术的不断发展, 越来越多的DKD致病

相关生物标志物被识别, 每个生物标志物均有证据表明与肾功能下降相关或参与了其他DKD相关表型的发生. 尽管它们反映了特定的途径或生物过程, 但实际上, 涉及不同代谢途径的生物标志物之间存在很强的相关性. 因此, 挖掘候选标志物之间的关联, 对于深刻地理解DKD涉及的各种病理生理途径之间的关联, 进一步探究DKD复杂的致病机制具有重要意义. Looker等人^[119]多重比对分析了与DKD相关的207个生物标志物. 结果显示, 共有30个生物标志物与肾功能下降显著相关, 并且相关的生物标志物关联指标显示, 参与不同通路的生物标志物之间存在高度相关性.

综上, 利用蛋白质组学方法, 从HG因素、肾脏病变因素、非肾脏致病因素等不同角度探究DKD多种致病因素, 可以更全面地阐明DKD病因和致病机制的复杂性, 为后续DKD诊断和治疗奠定良好的基础.

2.2 蛋白质组学在DKD早期诊断研究中的应用

DKD存在复杂的代谢紊乱情况, 一旦发展到终末期肾病, 往往比其他肾脏疾病的治疗更为棘手, 因此DKD的早期诊断十分必要. 目前, 肾脏疾病的常用诊断方法为肾组织活检(renal biopsies)^[120]、尿白蛋白排泄率检测(urinary albumin excretion rate, UAER)^[121]、肾小球过滤率检测(glomerular filtration rate, GFR)^[122],

但这些诊断方法的灵敏度和准确性有待进一步加强。许多研究显示, 在DKD出现明显病理变化之前, 患者的整体蛋白质组已发生一定的变化^[123~127], 因此蛋白质生物标志物的筛选与发现对DKD早期诊断具有重要意义(图4)。尿液和血液样品的获取方便安全且无痛无创, 已被普遍用于临床生物标志物筛选。目前DKD蛋白质组研究也主要从患者尿液、血清等非侵袭性样品中筛选鉴定蛋白生物标志物, 以期实现DKD的早期诊断。

(1) DKD尿蛋白质组生物标志物研究. 在与肾脏相关的疾病中, 尿液是肾脏相关生物标志物的一个潜在来源。尿蛋白质组学研究是探索肾功能异常相关变化的重要途径。尿蛋白由血浆和肾脏蛋白的混合物组成, 其中约30%为血浆蛋白, 其余70%均在肾脏中产生^[128,129]。由于正常的尿蛋白通常反映正常的肾小管生理学特征, 因此通过检测尿蛋白排泄变化, 可揭示肾小管和肾小球等肾脏组织对生理刺激的反应。

在DKD研究中, 建立完整的尿蛋白质组数据库是开展疾病尿蛋白质组研究的基础。已有研究者尝试在各种临床环境下定义尿蛋白质组^[130~133], 通过各种蛋白质组学方法, 鉴定了大约800种蛋白质, 为从尿蛋白组中发现生物标志物奠定了候选分子基础。在一项使用健康人开展的尿液研究中, Adachi等人^[134]在健康人的尿液中发现了1543多种蛋白质(或肽段), 并建立了尿液蛋白质组数据库, 完善了健康个体的尿液蛋白质组信息。

不同年龄人群之间身体机能存在差异, 研究年龄对尿液蛋白质组的影响是筛选发现相关生物标志物需要综合考虑的因素之一。Zürbig等人^[135]使用CE-MS方法先对不同年龄段健康人的低分子量尿蛋白组进行了分析, 一共检测到5000多种尿肽, 其中有325种相对丰度的变化与年龄相关。这些变化大部分与青春期前后的肾脏发育有关, 有49种多肽与成年人的衰老有关。靶向分析结果显示, DKD患者的尿液与老年人的尿液相似, 证实了生物标志物与衰老和肾病的相关性。此外, 在健康的研究对象中, 在部分测试者尿液中发现了与衰老相关的肽排泄模式, 推测这些人可能有更高的DKD患病风险。以上研究表明, DKD与肾脏的衰老可能有共同的机制, 进一步说明在寻找DKD的生物标志物时, 必须考虑到衰老与肾脏疾病的相关性, 选择能够排除年龄影响的候选生物标志物。

至今为止, 已有众多研究在尿蛋白组中鉴定出可用于早期诊断并预测DKD进展的候选生物标志物, 主要包括反映肾小球损伤、足细胞损伤、肾小管损伤、氧化应激、炎症和肾内肾素血管紧张素系统(intrarenal renin-angiotensin system, RAS)激活等引起的肾脏损伤的生物标志物, 如与肾小球损伤相关的转铁蛋白(transferrin)^[136]、IV型胶原蛋白(collagen IV)^[137], 与足细胞损伤相关的足糖萼蛋白(podocalyxin, PODXL)^[138]、Wilms Tumor-1因子^[139], 与氧化应激相关的8-氧-7,8-二氢-2'-脱氧鸟苷(8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxodG)^[140], 与炎症相关的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[141], 与RAS激活相关的血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)^[142,143]等。随着候选标志物的不断增加, 其在早期诊断中的影响与效果也得到了更深入的分析 and 验证。Liao等人^[88]使用iTRAQ技术识别了潜在的尿液生物标志物, 并用ELISA进行了验证, 结果显示, 触珠蛋白(haptoglobin, HPT)作为含量差异显著的生物标志物能够区分健康个体和DKD患者。因此研究人员将HPT作为一种候选生物标志物, 在台湾地区的DKD患者中评估了触珠蛋白/肌酐(HPT/creatinine, HCR)预测终末期肾病的能力, 数据表明, HCR可能是比尿白蛋白/肌酐比(urine albumin-to-creatinine ratio, UACR)更加敏感的预测DKD进展的临床评价指标。截至目前, HPT已被确定为多种肾脏损伤的潜在重要标志物, 其浓度升高可能是肾小管损伤或者氧化应激的结果, 而该研究进一步在临床上验证了HPT作为DKD早期诊断标志物的潜力。

除临床验证外, 应用生物信息学等手段对已有DKD候选生物标志物进行分析也是深入挖掘其潜在应用价值的重要手段。Brondani等人^[99]基于LC-MS/MS和随机森林(random forest, RF)算法对2型糖尿病患者不同阶段DKD患者的尿肽谱进行了区分。该研究收集并检测了具不同病情的2型糖尿病患者的尿液, 使用生物信息学方法, 先对DKD环境中的重要肽进行排序, 然后通过解析尿多肽序列来预测与DKD相关的蛋白水解特征, 探究DKD中炎症和补体系统的差异调节机制。分析显示, 患者尿肽谱随DKD严重程度的不同而出现不同的变化, 提示其在DKD风险分层评估中具有潜在应用价值, 也充分证明利用生物信息学手段分析尿肽谱信息, 有助于在分子水平上更好地理解DKD, 并进一步准确挖掘特定的DKD治疗靶点。此外, 为了

更早地预测DKD的发生并防止其进一步恶化, 深入探究糖尿病患者尿蛋白质组的变化特征是及时掌握糖尿病患者肾脏损伤情况的有效策略. Patel和Kalia^[92]根据糖尿病病程和肾脏损伤的严重程度, 利用分组策略对样本的尿蛋白组进行2-DE分析, 构建了一个分子量(molecular weight, MW)<50 kD的低MW(low MW, LMW)蛋白质组图谱. 在2-DE图谱中, 研究人员筛选了8种糖尿病患者特有的LMW蛋白质, 利用这些蛋白质, 在血清肌酐(serum creatinine, Scr)、估计肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)、微量白蛋白尿(microalbuminuria, MAU)还处于正常阶段时, 就可以准确预测DKD早期的肾脏改变. 该研究首次基于糖尿病病程研究了蛋白质的不同表达谱, 并结合糖尿病病程不同时间点及肾脏损伤程度构建了多种尿LMWPs表达谱, 结果清晰地表明, 不同病程患者的尿蛋白质表达谱具有各自的特征, 具有应用于DKD早期诊断及易感患者预测的潜在价值. 因此, 上述研究进一步表明, 针对DKD样品开展全面、深入的蛋白质组学分析具有重要且实际的意义.

近年来随着分离技术的不断发展, 除直接分析尿液蛋白质组外, 尿液外泌体(exosome)因其能够携带重要的细胞信号分子, 与疾病的发生进程密切相关, 因而对尿液外泌体进行准确评估已逐渐发展成为一种新的DKD无创诊断和监测的手段. Zubiri等人^[82]通过LC-MS技术表征了人尿外泌体中的蛋白质, 发现在DKD组和健康对照组中的蛋白质组有明显不同程度的表达. 此外, 该研究对早期DKD大鼠肾脏组织蛋白质进行了鉴定分析, 发现钙调蛋白质(calmodulin, CaM)和衰老标记蛋白质(senescence marker protein, SMP)较健康对照组显著下调. 为了评估尿液外泌体是否能反映发生在组织水平的变化, 研究人员收集了大鼠尿液中的外泌体, 研究发现, 外泌体蛋白质组与肾脏组织蛋白质组存在相同的变化趋势. 这些发现在人类样本的初步研究中得到了进一步证实, 即健康供者的肾脏组织和尿外泌体中均可检测到CaM, 但在DKD患者肾脏疾病组织中CaM明显减少, 同时CaM在尿外泌体中无法被成功检测, 表明从尿液中分离得到的尿外泌体可以作为筛选DKD早期诊断生物标志物的潜在分子库.

(2) DKD血清蛋白质组生物标志物研究. 大量研究表明, 血清蛋白质水平可有效反映人体的生理或病理

状态, 可用于疾病的诊断和预后^[144,145]. 尽管血清蛋白质组学在筛选鉴定诊断生物标志物方面有一定的优势, 但目前只有少数研究涉及糖尿病肾病的血清蛋白质组学生物标志物探究.

相比于尿蛋白质组, 除肾脏损伤类标志物外, 血清蛋白质组中通常能发现肾脏保护类的DKD生物标志物. Kim等人^[146]利用ESI-Q-TOF MS/MS技术筛选发现了与对照组样品相比, 在DKD发展阶段明显上调和下调的蛋白质. 其中, 细胞外谷胱甘肽过氧化物酶(extracellular glutathione peroxidase, eGPx)和载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是DKD的早期和进展阶段重要的下调蛋白. eGPx作为一种抗氧化酶, 主要来源于肾脏近端小管^[147], 血浆中的eGPx活性主要来源于肾小管上皮. 在肾脏疾病的演变过程中, 血浆和红细胞eGPx活性均发生变化^[148], 且eGPx的浓度主要取决于肾功能. ApoE和相关的脂质异常在DKD和免疫球蛋白肾病的发展中起重要作用^[149], ApoE能够调节系膜细胞增殖和基质扩张, 起到保护肾脏的作用. 该研究提示, eGPx和ApoE作为肾脏保护因子, 其表达水平的下降可作为DKD早期筛查的预警信号. Naguib和Rashed^[91]认为, 自噬是维持细胞存活和稳态的主要细胞清除机制, 在糖尿病和DKD的发展中发挥了重要作用. 为了探究DKD患者血清自噬关键调节因子Beclin-1的表达水平, 研究纳入了肾小球滤过率程度不同的2型糖尿病合并DKD患者和健康受试者为研究对象, 结果表明, DKD患者血清Beclin-1表达水平显著降低, 并且与DKD分期和尿白蛋白程度有关. 实际上, 糖尿病能够引起肾脏损伤, 而自噬对清除损伤非常重要, 血清Beclin-1浓度的降低说明DKD患者可能存在自噬功能障碍, 且自噬损伤程度与DKD严重程度相关. 除上述研究外, 在DKD血清蛋白质组研究中还发现, 部分肾损伤、炎症和氧化应激相关分子, 如尿酸(uric acid)^[150]、TGF- β 1^[151]、肾损伤因子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)^[152]、成纤维生长因子23(fibroblast growth factor23, FGF23)^[153]等也是潜在的DKD候选生物标志物, 但是由于血清蛋白质组对于DKD肾脏相关因子的特异性不如尿蛋白质组, 所以其敏感性和特异性有待进一步研究.

相较于尿液蛋白质组, 血清蛋白质组与肾脏组织蛋白质组的关联性较弱, 但是血清中包含着除肾脏外多种血管组织的信息, 使得研究者可以通过血清蛋白

质组获取同时能够预测糖尿病患者血管并发症和肾脏并发症的生物标志物, 利于糖尿病并发症的早期诊断。血清可溶性晚期糖基化终产物受体(soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE)可反映晚期糖基化终产物(advanced GE products, AGEs)的活性, 被认为是糖尿病高血糖与血管并发症之间的潜在联系机制分子。Kerkeni等人^[154]在研究中纳入健康对照者, 将糖尿病患者分为两个亚组: 糖尿病视网膜病变患者和DKD患者。采用ELISA测定AGEs、sRAGE和戊糖苷水平的波动。结果显示, 与对照组相比, 糖尿病视网膜病变和DKD患者的AGEs、sRAGE和戊糖苷水平显著升高, 并证实2型糖尿病患者的AGEs、sRAGE和戊糖苷水平与微血管并发症呈正相关, 表明三种物质可能是2型糖尿病患者微血管并发症的生物标志物。Bjornstad等人^[155]为了更好地预测1型糖尿病的冠状动脉钙化(coronary artery calcification, CAC)和DKD并发症, 在12年间持续评估了血清尿调素(serum uromodulin, SUMOD)与CAC和DKD进展的关系。SUMOD是一种与抗炎症和肾脏保护相关的生物标志物, CAC则是动脉粥样硬化的重要标志。研究人员借助全基因组相关研究发现, SUMOD基因的突变会诱发肾小管病变, 并进一步导致糖尿病患者肾功能下降从而引发DKD, 也间接证明SUMOD具有潜在的肾脏保护作用^[156]。在12年的长期随访中, 研究人员发现, SUMOD浓度升高可以降低CAC和DKD进展的概率, 而低SUMOD浓度与血压调节异常及肾小球过滤受损有关, 三者关系密切。研究结果提示, 在临床实践中对于SUMOD的评估有助于CAC和DKD的风险分层, 并且低SUMOD浓度DKD患者应该更积极地控制血管危险因素以防止动脉硬化发生。此外, 在未来的研究中, 研究者需更深入探究SUMOD浓度和DKD与CAC发病机制的关系, 进一步将SUMOD浓度变化和CAC、DKD的治疗策略联系起来。

(3) 多代谢途径的多种蛋白质联合诊断DKD研究。尽管DKD的蛋白质标志物研究已经取得了较多的进展, 但以单一代谢途径的一种或多种蛋白质为诊断依据, 往往呈现出特异性和敏感性不稳定状态, 大大限制了其早期诊断能力。据此, 有研究者认为, 将涉及多个代谢途径的蛋白质整合起来以共同诊断DKD是更为有效的早期诊断策略。

Lu等人^[98]首次将蛋白质组学iTRAQ技术用于2型

早期DKD血浆蛋白质的鉴别与定量。通过蛋白质功能分析发现, 差异表达蛋白质中的离子结合蛋白、酶调节活性蛋白、结构蛋白、蛋白酶占比较大, 影响了免疫反应、抗逆应激、物质转运、信号转导等多种生物学过程(图5)。此外, 基于ROC分析, 利用Western blotting技术证实了凝溶胶蛋白(gelsolin)、胶原凝集素11(collectin-11)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体J(tyrosine phosphatase receptor type J, PTPRJ)和蛋白激酶A锚定蛋白7(a-kinase anchoring protein 7, AKAP-7)可以作为2型DKD的候选生物标志物。上述蛋白质分别涉及抗炎症反应、补体激活途径、细胞迁移途径、肿瘤信号通路等生物学过程。基于ROC分析表明, 虽然单个蛋白质也能作为DKD标志物, 但是将这几种蛋白结合在一起综合诊断DKD时, 表现出最好的诊断效果。因此, 在一定程度上说明将涉及多途径的蛋白质组合起来用以共同诊断DKD, 比以单个蛋白质为依据诊断疾病更为准确可靠。基于整合多蛋白质联合诊断DKD的思路, CKD273分类模型在DKD早期诊断中显示出了良好的敏感性和特异性。Good等人^[157]最早提出了CKD273分类模型, 通过CE-MS技术对230名慢性肾病患者和379名健康受试者进行了对比分析, 发现尿液中有273条多肽在患者和健康者之间存在显著差异, 并涉及多条代谢途径, 研究者将273条多肽结合为一个分类模型, 并在独立测试组中进行验证, 结果表明, CKD273的敏感性为85.5%, 特异性为100%, 能有效区分慢性肾病患者与健康人, 提示CKD273在肾脏类疾病(包括DKD)的早期诊断和预后以及疗效评估中可能有重要价值。据此, Zürbig等人^[158]将CKD273模型应用于正常蛋白尿患者, 经过长期随访, 发现CKD273模型能比微量白蛋白尿方法提早1.5年发现DKD。Argilés等人^[159]和Lindhardt等人^[87]发现, CKD273能够独立地预测微量白蛋白尿的发生, 可早期发现DKD高风险患者。Tofte等人^[107]在5年内登记随访1775名来自欧洲的2型糖尿病患者, 通过CKD273尿蛋白质组学分类器评分, 其中88%呈低风险尿蛋白质组学模式, 12%呈高风险模式; 在随访过程中, 低危参与者中有9%进展为微量白蛋白尿, 高危参与者中有28%进展为微量白蛋白尿, 验证了CKD273高危评分与DKD早期症状的风险增加相关。上述研究均证实了CKD273模型在DKD早期诊断和疾病进展预测领域的优越性。

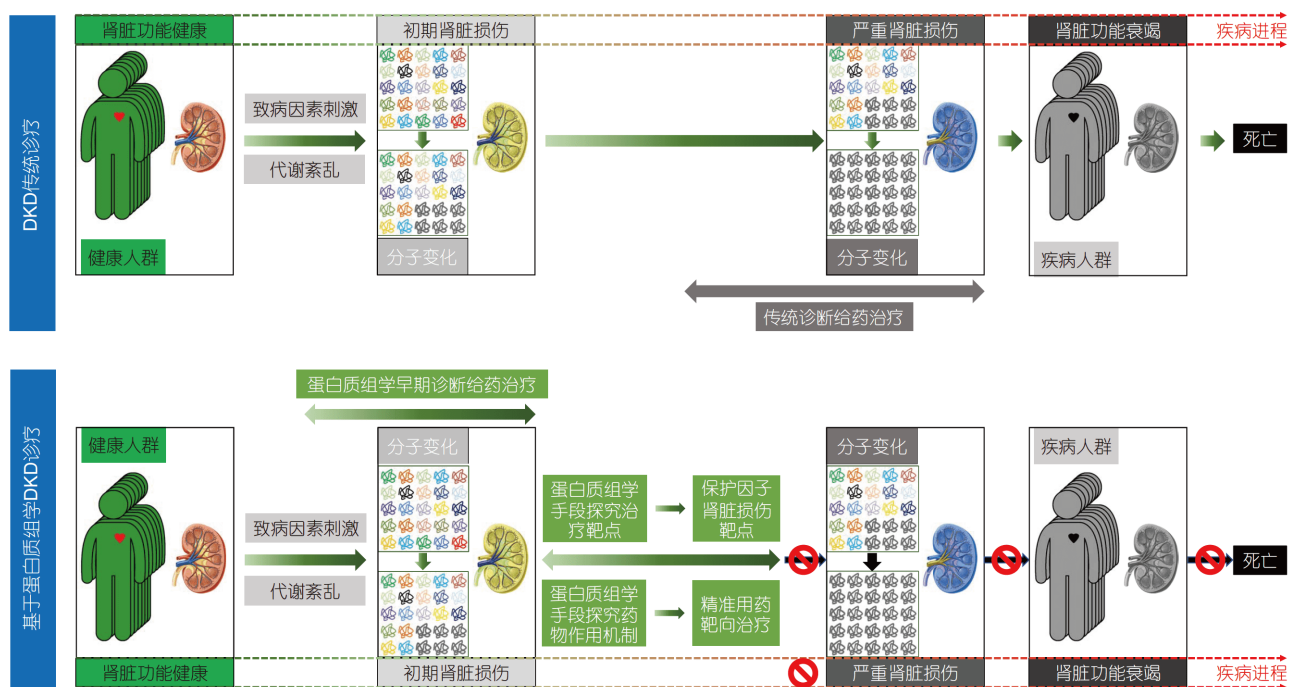


图5 蛋白质组学在DKD早期诊断和治疗中的应用
Figure 5 Applications of proteomics in early diagnosis and therapy of DKD

2.3 蛋白质组学在DKD治疗研究中的应用

DKD疾病治疗的研究旨在通过识别并抑制有害途径来阻止DKD疾病的发生和发展。目前研究工作主要集中在识别DKD的易感性因素，并阐明内质网应激、线粒体活性氧生成、蛋白激酶C激活、血管紧张素II及内皮素-1信号通路的增加，多醇糖酵解通路的诱导以及晚期糖基化终产物的形成等途径^[160-164]。

除通过抑制有害途径来治疗DKD外，还可通过探究未发展成为DKD的糖尿病患者来研究潜在保护因素，以期获得能够缓解DKD发展的治疗靶点(图5)。Qi等人^[102]为了确定未受DKD影响的长期糖尿病患者的保护机制，对DKD和病程极长(≥ 50 岁)的无DKD糖尿病患者的肾脏组织进行了蛋白质组分析，详细评估了未受DKD影响的糖尿病患者肾小球的差异蛋白质组特征。与DKD患者对比，无DKD糖尿病患者上调蛋白质信号中有7种蛋白质参与了细胞内葡萄糖代谢，其中糖酵解酶——丙酮酸激酶M2(pyruvate kinase M2, PKM2)表达活性具有上调趋势。通过动物试验和药理实验验证，激活PKM2能够改善线粒体功能障碍。而线

粒体功能障碍被认为是HG引起的多种血管组织细胞功能障碍和病变的主要原因。在干预研究中，研究人员发现，使用选择性激活剂TEPP-46(6-((3-Aminophenyl)methyl)-4-methyl-2-methylsulfanylthieno[3,4]pyrrolo[1,3-d]pyridazin-5-one)激活PKM2时，可恢复HG培养条件下引起的线粒体呼吸减弱和糖酵解抑制。此外，使用TEPP-46治疗的糖尿病小鼠与未治疗的糖尿病小鼠相比，治疗组小鼠蛋白尿减少，组织学改善，足细胞数量增加。综上，该研究表明，PKM2激活可以保护胰岛素缺陷糖尿病小鼠，避免HG引发的肾小球病变，从而证明PKM2可以作为治疗DKD的潜在靶点。为了进一步在人体内验证这一发现，Gordin等人^[165]研究了1型糖尿病和2型糖尿病患者血浆蛋白质组和代谢组的变化，发现糖酵解酶——PKM1、PKM2、烯醇化酶1(enolase, ENO1)和线粒体酶在未发展为肾脏疾病的糖尿病患者体内表达上调，同时相应的有毒代谢物表达下调，表明在糖尿病患者体内，肾小球中糖酵解和线粒体酶系的升高与肾脏功能的维持有关。糖酵解酶的上调和葡萄糖代谢中有毒物质的下调，反映了肾脏中的代谢循环途径发生变化，一定程度上证实了糖酵解

酶可以作为糖尿病患者肾脏内源性保护因子的生物标志物及潜在治疗靶点。

DKD的蛋白质组学研究除了能够帮助探究该疾病的治疗靶点,还可以为新型药物作用机制的揭示提供必要的分子信息。对药物使用期间蛋白质组变化的全面系统的表征将有助于深入了解药物作用分子机制(图5)。Gong等人^[166]使用iTRAQ技术比较研究了非糖尿病大鼠、糖尿病大鼠和经三亚乙基四胺(triethylenetetramine, TETA)处理的糖尿病大鼠肾脏的蛋白质组。结果表明,经TETA治疗后,D-氨基酸氧化酶-1(D-amino acid oxidase 1, DAO1)、环氧化物水解酶-1(epoxide hydrolases-1, EH1)、水通道蛋白(aquaporin 1, AQP1)及大量线粒体蛋白水平恢复正常,蛋白尿随之改善,说明TETA能够通过调节与肾小管间质功能、足细胞结构和线粒体凋亡相关的蛋白表达,从而缓解DKD引发的肾脏损伤,该研究阐释了TETA作为治疗药物的分子机制。在我国,中药在DKD疾病治疗中取得了较好的效果,但由于其成分和作用靶点复杂,因此,其治疗机制仍不清楚。利用蛋白质组学方法,分析中药等复方药剂成分对治疗靶点蛋白的作用效果,有助于进一步理解复方中药的分子治疗机制,促进DKD治疗药物的发展。Wang等人^[167]通过蛋白质组学研究发现,应用中药提取物白藜芦醇(resveratrol, RSV)可使HG诱导的人肾近端小管上皮细胞氧化应激状态得到明显改善。值得注意的是,RSV能使细胞中沉默信息调节蛋白1(silent information regulator protein type 1, SIRT1)的活性水平升高。SIRT1是一类组蛋白去乙酰化酶,参与细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、能量代谢等生物学过程,在代谢类疾病中有重要功能,SIRT1通过调节这些内源途径参与DKD的发生,能够发挥保护肾脏的作用。但是RSV不能改善沉默SIRT1引发的氧化应激,表明RSV通过增加SIRT1去乙酰化酶活性来调节SIRT1/叉头框蛋白O3a(fork head box protein O3a, FOXO3a)途径,从而改善肾小管氧化应激损伤。此外,除了阐释药物作用机制,探究DKD靶向治疗新方法也是DKD蛋白质组学研究的重要任务之一。Wu等人^[105]在最近的一项研究中揭示了组氨酸在HG诱导的足细胞损伤中潜在的自噬调节机制,该研究利用定量蛋白质组学和生物信息学分析技术,发现组氨酸通过调节多种与原癌基因*Pim1*相互作用的蛋白质,参与了*Pim1*-p21-mTOR信号通路的调节,发挥了自噬激活剂和凋亡抑制剂的作用,

从而抑制了HG的诱导小鼠足细胞损伤和凋亡。这一发现表明,组氨酸能够诱导自噬机制以抑制HG诱导的足细胞凋亡,提示诱导自噬可能成为DKD治疗的一种新方法,为DKD靶向治疗提供了新思路。

评价药物治疗效果是疾病治疗研究中的重要内容,由于不同个体的患者对药物的反应存在很大差异,因此获取关于个体对药物反应的信息,确定容易发生副作用的患者,对于药物评价来说至关重要^[168,169]。在DKD研究中,蛋白质组学方法为药效评价提供了新的思路,能够更直接有效地评价药物治疗效果,对于预警药物治疗中可能出现的特殊副作用具有一定意义。Lindhardt等人^[101]使用CKD273对3280例伴有正常白蛋白尿的2型糖尿病患者进行风险分类,并测试了螺内酯治疗在早期干预高危患者发展为DKD的能力。结果表明,CKD273有助于判断疾病进展的风险并能够对螺内酯治疗进行分层。但是DKD患者对螺内酯治疗反应相差较大,因此该团队在另一研究^[106]中继续探究了CKD273能否预测白蛋白尿对螺内酯治疗的反应。结果显示,CKD273评分值的降低与螺内酯治疗后UACR(urine albumin-to-creatinine ratio)的大幅度降低相关,说明CKD273可用于预测螺内酯治疗促使白蛋白表达水平的下降。因此,在药效评价中研究蛋白质组学的变化来评估药物的反应,能够帮助研究人员对药物机制有更深入的了解。在一项随机双盲交叉试验中,研究者观察了DKD用不同剂量坎地沙坦治疗后尿肽的变化,发现大量蛋白尿患者治疗后显著改善^[170]。在另一研究中^[171],研究者用坎地沙坦治疗2型糖尿病,随访2年后发现,坎地沙坦给药组CKD273评分有显著变化,而安慰剂组无变化。然而在这一研究中,蛋白质组的变化仅在随访2年后才被检测到。目前尚不清楚干预治疗后最初几周患者蛋白质组是否已经出现变化。对此,有研究者观察到在橄榄油短期饮食干预后尿蛋白组确实发生了一定的变化^[172],表明蛋白质组学研究确实可以作为一种DKD治疗监测的有效手段。

3 总结与展望

蛋白质组学作为后基因时代的重要组成部分,已被广泛应用在DKD的发病机制、诊断、治疗等方面。在DKD发病机制研究中,相关报道利用蛋白质组学的

方法从高血糖环境诱导、肾脏因素诱导、非肾脏因素诱导等方面探究其发病机制。在DKD诊断研究中,研究者遵照无创诊断的原则,利用尿蛋白质组和血清蛋白质组探究了DKD早期诊断的生物标志物。在DKD治疗研究中,研究者们使用蛋白质组学手段研究了DKD的治疗靶点、药物作用机制,并在蛋白质组学水平对治疗效果进行评价。显然,蛋白质组学以其研究的高通量、整体性、全面性的优势及其易于多学科结合的特点,为糖尿病肾病分子水平研究提供了新的视角。

蛋白质组学作为研究疾病分子机制的理想工具,截至目前已经取得众多研究进展,但是其仍面临诸多挑战。在DKD肾脏组织蛋白质组、血浆蛋白质组、尿液蛋白质组中均存在蛋白质组动态范围宽泛(7~12个数量级)、PTMs复杂多样、实验数据重现性不足而导致较高的错误率等问题,限制了蛋白质组学技术在DKD蛋白质组的分离、鉴定和定量分析中的应用。此外,DKD生物样品来源多样,包括肾脏组织、血液、尿液等,但目前对于不同样品的处理和保存方法缺乏统一标准,使蛋白质组研究质量和准确性受到影响。尽管许多研究表明多种候选的生物标志物与DKD有显著的相关性,具有一定潜在应用价值,但在一个或一组生物标志物用于临床实践之前,需要对其进行广泛的验证,以评估其在诊断、治疗过程中的效果和副作用。然而DKD候选蛋白质生物标志物的临床应用少有提及,一定程度上反应出基于蛋白质组学筛选的生物标志物从发现到临床的转化仍有一段艰难的路程需要进行,且由于受到样本量小、结果异质性大和缺乏综合验证研究的限制,多数DKD生物标志物仍未被识别,因此难以开展生物标志物验证和临床评价的系统性工作。

针对上述问题,DKD蛋白质组学研究工作可从以下3个方面进行深入探究。(i)全面识别DKD相关生物标志物是DKD蛋白质组学研究发展的基础。这依赖蛋白质研究技术的发展和DKD生物样品处理方法的进一步优化,从而建立更加可靠和完善的蛋白质组研究体系,使得后续的研究成果具有较高的可信度和准确度。技术的发展,如4D蛋白质组学、质谱成像等技术的出现,大大提升了临床生物标志物检测、鉴别、验证能力。其中,质谱成像技术已被证实是筛选发现

肾脏组织生物标志物的新兴理想工具。在生物样品处理方面,虽然目前没有统一标准,但在肾脏组织蛋白质提取中,应针对不同肾脏部位或不同类型的纯系肾脏细胞选取合适的提取方法:在血液样品的处理中,由于血浆蛋白质组复杂、丰度差异大、酶解片段多,应注意高丰度蛋白质的去除、血浆蛋白质的分级和低丰度蛋白质的富集;在尿液样品制备中,由于尿液含盐量高,蛋白质含量较低,不同蛋白质丰度差异大,处理过程应注意除盐、除高丰度蛋白质、浓缩富集低丰度蛋白质。(ii)在充分识别DKD相关生物标志物的基础上,深入挖掘已识别DKD生物标志物的潜在相关性和价值将是未来研究的重点。随着蛋白质组学研究技术的不断进步,利用生物信息学和系统生物学方法,大尺度、高通量评估众多生物标志物错综复杂的互作关系,以明确其在临床的应用价值,将是DKD蛋白质组学研究的有效策略。与专注于受糖尿病影响单个蛋白或通路的还原论策略截然相反,该研究策略的目标是整合所有相互联系的蛋白质和代谢物,并基于内源性分子功能组学,为DKD疾病研究提供全新的视角。(iii)在实现DKD生物标志物的全面识别和相关信息的深度挖掘后,临床验证和临床应用将分别成为DKD蛋白质组学研究的核心环节和重要目标。基于完善的基础研究积累,对大量患者进行长期监测、随访和记录,所获得的临床数据对DKD疾病蛋白质组学研究来说将具有重要意义。

综上所述,蛋白质组学技术为高效、快速、准确地筛选潜在生物标志物提供了有力手段。尽管DKD蛋白质组学研究所获得的生物标志物潜在价值尚未被充分挖掘,但蛋白质组的变化一定程度上反映了有关疾病进展状态。实践证明,基于蛋白质组学水平的研究,为深度解析DKD致病机制提供了新的视角,有助于从蛋白质角度阐述DKD致病分子机制,筛选发现有效的治疗靶点以及推进DKD的早期诊断与治疗。目前DKD蛋白质组学研究所存在的局限也说明,蛋白质组学仅是疾病研究中的一个方面。可以预见,同时整合基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等复杂数据集对疾病开展系统性研究,将更加全面、深刻地阐释DKD发生发展所涉及的生物学过程,实现从整体的视角更为系统地认识DKD这一复杂糖尿病并发症的病理生理机制,推动DKD精准靶向干预与治疗。

参考文献

- 1 Liu B C, Liu Y R. Research advances in the pathogenesis of diabetic nephropathy (in Chinese). *Mod Pract Med*, 2014, 26: 921–923 [刘必成, 刘怡然. 糖尿病肾病发病机制研究进展. 现代实用医学, 2014, 26: 921–923]
- 2 Tervaert T W C, Mooyaart A L, Amann K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 556–563
- 3 Sun L, Zhao H. The present status and challenges of diabetic nephropathy (in Chinese). *Chin J Kidney Dis Invest*, 2019, 8: 49–54 [孙林, 赵浩. 糖尿病肾病现状与挑战. 中华肾病研究电子杂志, 2019, 8: 49–54]
- 4 Fan W J, Zhu J J, Huang Y Y, et al. Prevalence and risk factors of diabetic nephropathy in China (in Chinese). *Chin J Prev Contr Chron Dis*, 2013, 21: 748–751 [范文君, 祝菁菁, 黄韻宇, 等. 我国糖尿病肾病的流行现状及其危险因素. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21: 748–751]
- 5 Ding Z Z, Chen W D. Research advances in the pathogenesis of diabetic nephropathy (in Chinese). *Chin J Gen Pract*, 2011, 9: 284–285 [丁志珍, 陈卫东. 糖尿病肾病发病机制研究进展. 中华全科医学, 2011, 9: 284–285]
- 6 Li B L, Li L, Wu J R. Functional proteomics (in Chinese). *China Biotechnol*, 1999, 4: 15–16 [李伯良, 李林, 吴家睿. 功能蛋白质组学. 生物工程进展, 1999, 4: 15–16]
- 7 Han L D, Xia J F, Liang Q L, et al. Plasma esterified and non-esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography-mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy. *Anal Chim Acta*, 2011, 689: 85–91
- 8 Wang T J, Larson M G, Vasani R S, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*, 2011, 17: 448–453
- 9 Salek R M, Maguire M L, Bentley E, et al. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics*, 2007, 29: 99–108
- 10 Muller G A, Muller C A, Dihazi H. Clinical proteomics—On the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22: 1297–1300
- 11 Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*, 2017, 138: 20–29
- 12 Grandori R, Santambrogio C, Brocca S, et al. Electrospray-ionization mass spectrometry as a tool for fast screening of protein structural properties. *Biotechnol J*, 2009, 4: 73–87
- 13 Rockwood A L, Lowenthal M S, Bystrom C. Harmonization of liquid chromatography-tandem mass spectrometry protein assays. *Clin Lab Med*, 2018, 38: 499–513
- 14 Schlichtemeier S M, Nahm C B, Xue A, et al. SELDI-TOF MS analysis of hepatocellular carcinoma in an Australian cohort. *J Surg Res*, 2019, 238: 127–136
- 15 Latosinska A, Siwy J, Mischak H, et al. Peptidomics and proteomics based on CE-MS as a robust tool in clinical application: The past, the present, and the future. *Electrophoresis*, 2019, 40: 2294–2308
- 16 Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 376–386
- 17 Gygi S P, Rist B, Gerber S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 994–999
- 18 Ross P L, Huang Y N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 1154–1169
- 19 Zhang W. Progress in mass spectrometry acquisition approach for quantitative proteomics (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2014, 42: 1859–1868 [张伟. 定量蛋白质组学质谱采集技术进展. 分析化学, 2014, 42: 1859–1868]
- 20 Wang X, Chen G, Liu H, et al. Four-dimensional orthogonal electrophoresis system for screening protein complexes and protein-protein interactions combined with mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2010, 9: 5325–5334
- 21 Wang X, Li F, Song G, et al. Broad-spectrum four-dimensional orthogonal electrophoresis: A novel comprehensively feasible system for protein complexomics investigation. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: 786–799
- 22 Meier F, Brunner A D, Koch S, et al. Online parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17: 2534–2545
- 23 Prianichnikov N, Koch H, Koch S, et al. Maxquant software for ion mobility enhanced shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19: 1058–1069

- 24 Sandow J J, Infusini G, Dagley L F, et al. Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timstof pro. *bioRxiv*, 2019: 657908
- 25 Meier F, Brunner A D, Frank M, et al. Parallel accumulation—Serial fragmentation combined with data-independent acquisition (diaPASEF): Bottom-up proteomics with near optimal ion usage. *bioRxiv*, 2020: 656207
- 26 Guo C Y, Zhan K H. Research progress and application in technology of proteome (in Chinese). *J Yunnan Agric Univ (Nat Sci)*, 2010, 25: 583–591 [郭春燕, 詹克慧. 蛋白质组学技术研究进展及应用. 云南农业大学学报(自然科学版), 2010, 25: 583–591]
- 27 Anderson N L, Anderson N G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 1998, 19: 1853–1861
- 28 Huang L J, Wang J H. Proteome technologies and its progresses (in Chinese). *Bull Biol*, 2005, 8: 8–10 [黄丽俊, 王建华. 蛋白质组研究技术及其进展. 生物学通报, 2005, 8: 8–10]
- 29 Wan J H, He F C. Advances in proteome technologies (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 1999, 44: 904–911 [万晶宏, 贺福初. 蛋白质组技术的研究进展. 科学通报, 1999, 44: 904–911]
- 30 Unlü M, Morgan M E, Minden J S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2071–2077
- 31 Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the dige system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382: 669–678
- 32 Meng Q S, Zhang G X, Pan Y H. The technology and the application of native polyacrylamide gel electrophoresis in protein complex research (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2010, 6: 57–64 [孟庆石, 张光祥, 潘映红. 蛋白质复合体非变性凝胶电泳技术及其应用新进展. 生物技术通报, 2010, 6: 57–64]
- 33 Wang X D. Chemical cross-linking and mass spectrometry for investigation of protein complex structures and protein-protein interactions (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Peking Union Medical College, 2012 [王晓东. 蛋白质复合体及蛋白质相互作用研究新策略——化学交联结合质谱分析法. 博士学位论文. 北京: 北京协和医学院, 2012]
- 34 Chang J L, Yang G X, He G Y. Progress regarding techniques of separation and detection in proteomics (in Chinese). *J Wuhan Bot Res*, 2006, 3: 261–266 [常俊丽, 杨广笑, 何光源. 蛋白质组学分离检测技术研究进展. 武汉植物学研究, 2006, 3: 261–266]
- 35 Smyth W F, Brooks P. A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1413–1446
- 36 Huang L Y, Zhao H P, Ding Q X, et al. Applications of biological mass spectrometry in proteomics studies (in Chinese). *Mod Instrum*, 2004, 1: 7–12 [黄凌云, 赵和平, 丁勤学, 等. 生物质谱在蛋白质组学研究中的应用. 现代仪器, 2004, 1: 7–12]
- 37 Ying W T, Qian X H. Applications and progress of bio-mass spectrometry (in Chinese). *Mil Med Sci*, 2000, 2: 146–150 [应万涛, 钱小红. 生物质谱技术应用及进展. 军事医学科学院院刊, 2000, 2: 146–150]
- 38 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422: 198–207
- 39 Moradian A, Kalli A, Sweredoski M J, et al. The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. *Proteomics*, 2014, 14: 489–497
- 40 Sun R X, Luo L, Chi H, et al. Top-down proteomics: the large-scale proteoform identification. *Prog Biochem Biophys*, 2015, 42: 101–114 [孙瑞祥, 罗兰, 迟浩, 等. “自顶向下(top-down)”的蛋白质组学——蛋白质变体的规模化鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42: 101–114]
- 41 Yates Iii J R. Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2004, 33: 297–316
- 42 Kelleher N L. A cell-based approach to the human proteome project. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, 23: 1617–1624
- 43 Kellie J F, Tran J C, Lee J E, et al. The emerging process of top down mass spectrometry for protein analysis: Biomarkers, protein-therapeutics, and achieving high throughput. *Mol Biosyst*, 2010, 6: 1532–1539
- 44 Zhou H, Ning Z, E. Starr A, et al. Advancements in top-down proteomics. *Anal Chem*, 2012, 84: 720–734
- 45 Lanucara F, Eyers C E. Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications. *Mass Spectrom Rev*, 2013, 32: 27–42
- 46 Siuti N, Kelleher N L. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat Methods*, 2007, 4: 817–821
- 47 Kelleher N L. Top-down proteomics. *Anal Chem*, 2004, 76: 197A–203A
- 48 Pan J, Zhang S, Parker C E, et al. Subzero temperature chromatography and top-down mass spectrometry for protein higher-order structure

- characterization: Method validation and application to therapeutic antibodies. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 13065–13071
- 49 Pan J, Han J, Borchers C H, et al. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry with top-down electron capture dissociation for characterizing structural transitions of a 17 kDa protein. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 12801–12808
- 50 Vissers J P C, McCullagh M. An analytical perspective on protein analysis and discovery proteomics by ion mobility-mass spectrometry. In: Paglia G, Astarita G, eds. *Ion Mobility-Mass Spectrometry. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2020. 161–178
- 51 Vasilopoulou C G, Sulek K, Brunner A D, et al. Trapped ion mobility spectrometry and pascif enable in-depth lipidomics from minimal sample amounts. *Nat Commun*, 2020, 11: 331
- 52 Koch H, Kruppa G, Thakur R. Plasma proteomics with nanoLC-MS. *Genet Eng Biotech News*, 2019, 39: 52–54
- 53 Schubert O T, Röst H L, Collins B C, et al. Quantitative proteomics: Challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc*, 2017, 12: 1289–1294
- 54 Chahrour O, Cobice D, Malone J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 113: 2–20
- 55 Sakai J, Kojima S, Yanagi K, et al. ^{18}O -labeling quantitative proteomics using an ion trap mass spectrometer. *Proteomics*, 2005, 5: 16–23
- 56 Clotet S, Soler M J, Riera M, et al. Stable isotope labeling with amino acids (SILAC)-based proteomics of primary human kidney cells reveals a novel link between male sex hormones and impaired energy metabolism in diabetic kidney disease. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16: 368–385
- 57 Zhu J L, Zhang K, He X W, et al. New development of quantitative mass spectrometry-based proteomics (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2010, 38: 434–441 [朱金蕾, 张轶, 何锡文, 等. 基于质谱技术蛋白质定量方法的研究进展. *分析化学*, 2010, 38: 434–441]
- 58 Shii Y, Aebersold R. Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2006, 1: 139–145
- 59 White F M. On the itraq of kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 994–996
- 60 Tonack S, Jenkinson C, Cox T, et al. Itraq reveals candidate pancreatic cancer serum biomarkers: Influence of obstructive jaundice on their performance. *Br J Cancer*, 2013, 108: 1846–1853
- 61 Xie X Z, Wang X, Liu L H, et al. Itraq technology and its application in proteomics (in Chinese). *Chin J Biochem Mol Biol*, 2011, 27: 616–621 [谢秀枝, 王欣, 刘丽华, 等. Itraq技术及其在蛋白质组学中的应用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27: 616–621]
- 62 Unwin R D, Griffiths J R, Whetton A D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1574–1582
- 63 Luo Z W, Zhu L, Xie W F. Advances in isobaric tags for relative and absolute quantitation techniques research (in Chinese). *China Biotechnol*, 2006, 10: 83–87 [罗治文, 朱樑, 谢谓芬. 同位素标记相对和绝对定量技术研究进展. *中国生物工程杂志*, 2006, 10: 83–87]
- 64 Wu P, He F C, Jiang Y. Label-free methods in quantitative proteomics (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2013, 40: 281–292 [武鹏, 贺福初, 姜颖. 定量蛋白质组学无标记定量方法的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40: 281–292]
- 65 Ryu S, Gallis B, Goo Y A, et al. Comparison of a label-free quantitative proteomic method based on peptide ion current area to the isotope coded affinity tag method. *Cancer Inform*, 2008, 6: CIN.S385
- 66 Sun Y, Jia L Y, Ren J. Development of analytical techniques for protein-protein interaction (in Chinese). *Chin J Anal Chem*, 2007, 5: 760–766 [孙宇, 贾凌云, 任军. 蛋白质相互作用的研究方法. *分析化学*, 2007, 5: 760–766]
- 67 Pang E L. Research advances of protein interactions (in Chinese). *Bull Biol*, 2012, 47: 11–14 [庞尔丽. 蛋白质相互作用研究进展. *生物学通报*, 2012, 47: 11–14]
- 68 Chatr-aryamontri A, Breitkreutz B J, Oughtred R, et al. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D470–D478
- 69 Salwinski L, Miller C S, Smith A J, et al. The database of interacting proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 449D–451
- 70 Mewes H W, Dietmann S, Frishman D, et al. Mips: Analysis and annotation of genome information in 2007. *Nucleic Acids Res*, 2007, 36: D196–D201
- 71 Ceol A, Chatr Aryamontri A, Licata L, et al. Mint, the molecular interaction database: 2009 update. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: D532–D539
- 72 Marikanty R K, Gupta M K, Cherukuvada S V B, et al. Identification of urinary proteins potentially associated with diabetic kidney disease. *Ind J Nephrol*, 2016, 26: 434–445
- 73 Fu G, Du Y, Chu L, et al. Discovery and verification of urinary peptides in type 2 diabetes mellitus with kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241: 1186–1194
- 74 Aluksanasuwan S, Khamchun S, Thongboonkerd V. Targeted functional investigations guided by integrative proteome network analysis

- revealed significant perturbations of renal tubular cell functions induced by high glucose. *Proteomics*, 2017, 17: 1700151
- 75 Krochmal M, Kontostathi G, Magalhães P, et al. Urinary peptidomics analysis reveals proteases involved in diabetic nephropathy. *Sci Rep*, 2017, 7: 15160
- 76 Guillen-Gomez E, Bardaji-de-Quixano B, Ferrer S, et al. Urinary proteome analysis identified neprilysin and vcam as proteins involved in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 6165303
- 77 Rossi C, Marzano V, Consalvo A, et al. Proteomic and metabolomic characterization of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in TIMP3-deficient mice. *Acta Diabetol*, 2018, 55: 121–129
- 78 Miura Y, Hayakawa A, Kikuchi S, et al. Fumarate accumulation involved in renal diabetic fibrosis in Goto-Kakizaki rats. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 678: 108167
- 79 Liljedahl L, Pedersen M H, McGuire J N, et al. The impact of the glucagon-like peptide 1 receptor agonist liraglutide on the streptozotocin-induced diabetic mouse kidney proteome. *Physiol Rep*, 2019, 7: e13994
- 80 Smith A, Iablokov V, Mazza M, et al. Detecting proteomic indicators to distinguish diabetic nephropathy from hypertensive nephrosclerosis by integrating matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging with high-mass accuracy mass spectrometry. *Kidney Blood Press Res*, 2020, 45: 233–248
- 81 Lee J, Hyon J Y, Min J Y, et al. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 2 is involved in N ϵ -(carboxymethyl)-lysine-mediated diabetic nephropathy. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104600
- 82 Zubiri I, Posada-Ayala M, Benito-Martin A, et al. Kidney tissue proteomics reveals regucalcin downregulation in response to diabetic nephropathy with reflection in urinary exosomes. *Transl Res*, 2015, 166: 474–484.e4
- 83 Betz B B, Jenks S J, Cronshaw A D, et al. Urinary peptidomics in a rodent model of diabetic nephropathy highlights epidermal growth factor as a biomarker for renal deterioration in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int*, 2016, 89: 1125–1135
- 84 Al Hariri M, Elmedawar M, Zhu R, et al. Proteome profiling in the aorta and kidney of type 1 diabetic rats. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0187752
- 85 Bringans S D, Ito J, Stoll T, et al. Comprehensive mass spectrometry based biomarker discovery and validation platform as applied to diabetic kidney disease. *EuPA Open Proteom*, 2017, 14: 1–10
- 86 Vitova L, Tuma Z, Moravec J, et al. Early urinary biomarkers of diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus show involvement of kallikrein-kinin system. *BMC Nephrol*, 2017, 18: 112
- 87 Lindhardt M, Persson F, Zúrbig P, et al. Urinary proteomics predict onset of microalbuminuria in normoalbuminuric type 2 diabetic patients, a sub-study of the direct-protect 2 study. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 32: 1866–1873
- 88 Liao W L, Chang C T, Chen C C, et al. Urinary proteomics for the early diagnosis of diabetic nephropathy in taiwanese patients. *J Clin Med*, 2018, 7: 483
- 89 Bellei E, Monari E, Bergamini S, et al. Urinary proteomics in biomarker discovery of kidney-related disorders: Diabetic nephropathy and drug-induced nephrotoxicity in chronic headache. *EJIFCC*, 2018, 29: 290–297
- 90 Chen C J, Liao W L, Chang C T, et al. Urine proteome analysis by C₁₈ plate-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry allows noninvasive differential diagnosis and prediction of diabetic nephropathy. *PLoS ONE*, 2018, 13: e0200945
- 91 Naguib M, Rashed L A. Serum level of the autophagy biomarker beclin-1 in patients with diabetic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 143: 56–61
- 92 Patel D N, Kalia K. Characterization of low molecular weight urinary proteins at varying time intervals in type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy patients. *Diabetol Metab Syndr*, 2019, 11: 39
- 93 Peters K E, Davis W A, Ito J, et al. Validation of a protein biomarker test for predicting renal decline in type 2 diabetes: The fremantle diabetes study phase II. *J Diabetes Complications*, 2019, 33: 107406
- 94 Koziolok M, Mueller G A, Dihazi G H, et al. Urine E-cadherin: A marker for early detection of kidney injury in diabetic patients. *J Clin Med*, 2020, 9: 639
- 95 Kaburagi Y, Takahashi E, Kajio H, et al. Urinary afamin levels are associated with the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 147: 37–46
- 96 Colombo M, Valo E, McGurnaghan S J, et al. Biomarker panels associated with progression of renal disease in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2019, 62: 1616–1627
- 97 Colombo M, Looker H C, Farran B, et al. Serum kidney injury molecule 1 and β 2-microglobulin perform as well as larger biomarker panels for

- prediction of rapid decline in renal function in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2019, 62: 156–168
- 98 Lu H, Deng S, Zheng M, et al. Itraq plasma proteomics analysis for candidate biomarkers of type 2 incipient diabetic nephropathy. *Clin Proteomics*, 2019, 16: 33
- 99 Brondani L A, Soares A A, Recamonde-Mendoza M, et al. Urinary peptidomics and bioinformatics for the detection of diabetic kidney disease. *Sci Rep*, 2020, 10: 1242
- 100 Watanabe J, Takiyama Y, Honjo J, et al. Role of IGFBP7 in diabetic nephropathy: TGF- β 1 induces IGFBP7 via Smad2/4 in human renal proximal tubular epithelial cells. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0150897
- 101 Lindhardt M, Persson F, Currie G, et al. Proteomic prediction and renin angiotensin aldosterone system inhibition prevention of early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients with normoalbuminuria (priority): Essential study design and rationale of a randomised clinical multicentre trial. *BMJ Open*, 2016, 6: e010310
- 102 Qi W, Keenan H A, Li Q, et al. Pyruvate kinase M2 activation may protect against the progression of diabetic glomerular pathology and mitochondrial dysfunction. *Nat Med*, 2017, 23: 753–762
- 103 Civantos E, Bosch E, Ramírez Bustillo E, et al. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2017, 10: 207–222
- 104 Liljedahl L, Norlin J, McGuire J N, et al. Effects of insulin and the glucagon-like peptide 1 receptor agonist liraglutide on the kidney proteome in db/db mice. *Physiol Rep*, 2017, 5: e13187
- 105 Wu F, Li S, Zhang N, et al. Hispidulin alleviates high-glucose-induced podocyte injury by regulating protective autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 307–314
- 106 Lindhardt M, Persson F, Oxlund C, et al. Predicting albuminuria response to spironolactone treatment with urinary proteomics in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 33: 296–303
- 107 Tofte N, Lindhardt M, Adamova K, et al. Early detection of diabetic kidney disease by urinary proteomics and subsequent intervention with spironolactone to delay progression (priority): A prospective observational study and embedded randomised placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8: 301–312
- 108 Dronavalli S, Duka I, Bakris G L. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Endocrinol*, 2008, 4: 444–452
- 109 Li Z, Zhang H, Dong X, et al. Proteomic profile of primary isolated rat mesangial cells in high-glucose culture condition and decreased expression of PSMA6 in renal cortex of diabetic rats. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88: 635–648
- 110 Schordan S, Schordan E, Endlich N, et al. Alterations of the podocyte proteome in response to high glucose concentrations. *Proteomics*, 2009, 9: 4519–4528
- 111 Reutens A T, Atkins R C. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 1–7
- 112 Jha J C, Banal C, Chow B S M, et al. Diabetes and kidney disease: Role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25: 657–684
- 113 Barati M T, Merchant M L, Kain A B, et al. Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end-product metabolism in glomeruli of *db/db* diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293: F1157–F1165
- 114 Cummins T D, Barati M T, Coventry S C, et al. Quantitative mass spectrometry of diabetic kidney tubules identifies GRAP as a novel regulator of TGF- β signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 653–661
- 115 Lian Y X, Zhang J L, Li J. Research advances in the pathogenesis of diabetic nephropathy (in Chinese). *Chin J Convalescent Med*, 2012, 21: 515–516 [廉永昕, 张嘉莉, 李兢. 糖尿病肾病发病机制研究进展. 中国疗养医学, 2012, 21: 515–516]
- 116 Navarro-González J F, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7: 327–340
- 117 Colhoun H M, Marcovecchio M L. Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetologia*, 2018, 61: 996–1011
- 118 Niewczas M A, Pavkov M E, Skupien J, et al. A signature of circulating inflammatory proteins and development of end-stage renal disease in diabetes. *Nat Med*, 2019, 25: 805–813
- 119 Looker H C, Colombo M, Hess S, et al. Biomarkers of rapid chronic kidney disease progression in type 2 diabetes. *Kidney Int*, 2015, 88: 888–896
- 120 Gong Y X, Chen P S, Yang W Y. The application of immunohistochemical combined with PAS staining of paraffin sections in the pathological diagnosis of renal biopsy (in Chinese). *Chin J Clin Exp Pathol*, 2020, 36: 108–110 [弓玉祥, 陈平圣, 杨旻宇. 石蜡切片免疫组化套染PAS在肾活检组织病理诊断中的应用. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36: 108–110]

- 121 Nikolaidou B, Gkaliagkousi E, Anyfanti P, et al. The impact of hyperglycemia on urinary albumin excretion in recent onset diabetes mellitus type II. *BMC Nephrol*, 2020, 21: 119
- 122 Bragadottir G, Redfors B, Ricksten S E. Assessing glomerular filtration rate (GFR) in critically ill patients with acute kidney injury—True GFR versus urinary creatinine clearance and estimating equations. *Crit Care*, 2013, 17: R108
- 123 Knepper M A. Proteomics and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 1398–1408
- 124 O’Riordan E, Orlova T N, Mei J J, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 3240–3248
- 125 Schaub S, Rush D, Wilkins J, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 219–227
- 126 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: 398–400
- 127 Dihazi H. Clinical proteomics: An insight into the urinary proteome. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3: 481–482
- 128 Thongboonkerd V, McLeish K R, Arthur J M, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*, 2002, 62: 1461–1469
- 129 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: 1159–1174
- 130 Davis M T, Spahr C S, McGinley M D, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics*, 2001, 1: 108–117
- 131 Spahr C S, Davis M T, McGinley M D, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics*, 2001, 1: 93–107
- 132 Thongboonkerd V, Klein J B, Arthur J M. Proteomic identification of a large complement of rat urinary proteins. *Nephron Exp Nephrol*, 2003, 95: e69–e78
- 133 Thongboonkerd V, Klein J B, Pierce W M, et al. Sodium loading changes urinary protein excretion: a proteomic analysis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: F1155–F1163
- 134 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: R80
- 135 Zürgbig P, Decramer S, Dakna M, et al. The human urinary proteome reveals high similarity between kidney aging and chronic kidney disease. *Proteomics*, 2009, 9: 2108–2117
- 136 Narita T, Hosoba M, Kakei M, et al. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006, 29: 142–144
- 137 Cawood T J, Bashir M, Brady J, et al. Urinary collagen IV and α GST: Potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes—A pilot study. *Am J Nephrol*, 2010, 32: 219–225
- 138 Hara M, Yamagata K, Tomino Y, et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: Establishment of a highly sensitive elisa to detect urinary podocalyxin. *Diabetologia*, 2012, 55: 2913–2919
- 139 Kalani A, Mohan A, Godbole M M, et al. Wilm’s tumor-1 protein levels in urinary exosomes from diabetic patients with or without proteinuria. *PLoS ONE*, 2013, 8: e60177
- 140 Broedbaek K, Weimann A, Stovgaard E S, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51: 1473–1479
- 141 Timoshanko J R, Sedgwick J D, Holdsworth S R, et al. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 1785–1793
- 142 van den Heuvel M, Batenburg W W, Jainandunsing S, et al. Urinary renin, but not angiotensinogen or aldosterone, reflects the renal renin-angiotensin-aldosterone system activity and the efficacy of renin-angiotensin-aldosterone system blockade in the kidney. *J Hypertens*, 2011, 29: 2147–2155
- 143 Persson F, Lu X, Rossing P, et al. Urinary renin and angiotensinogen in type 2 diabetes. *J Hypertens*, 2013, 31: 1646–1652
- 144 Anderson N L, Anderson N G. The human plasma proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 845–867
- 145 Thadikkaran L, Siegenthaler M A, Crettaz D, et al. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics*, 2005, 5: 3019–3034

- 146 Kim H J, Cho E H, Yoo J H, et al. Proteome analysis of serum from type 2 diabetics with nephropathy. *J Proteome Res*, 2007, 6: 735–743
- 147 Avissar N, Ornt D B, Yagil Y, et al. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol*, 1994, 266: C367–C375
- 148 Ozden M, Maral H, Akaydin D, et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and capd patients. *Clin Biochem*, 2002, 35: 269–273
- 149 Joss N, Jardine A, Gaffney D, et al. Influence of apolipoprotein E genotype on progression of diabetic nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*, 2005, 101: e127–e133
- 150 Jalal D I, Maahs D M, Hovind P, et al. Uric acid as a mediator of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*, 2011, 31: 459–465
- 151 Shaker Y M, Soliman H A, Ezzat E, et al. Serum and urinary transforming growth factor beta 1 as biochemical markers in diabetic nephropathy patients. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*, 2014, 3: 16–23
- 152 Alter M L, Kretschmer A, Von Websky K, et al. Early urinary and plasma biomarkers for experimental diabetic nephropathy. *Clin Lab*, 2012, 58: 659–671
- 153 Titan S M, Zatz R, Gracioli F G, et al. Fgf-23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6: 241–247
- 154 Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, et al. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res*, 2013, 10: 239–245
- 155 Bjornstad P, Wiromrat P, Johnson R J, et al. Serum uromodulin predicts less coronary artery calcification and diabetic kidney disease over 12 years in adults with type 1 diabetes: The CACTI study. *Dia Care*, 2019, 42: 297–302
- 156 Kemter E, Fröhlich T, Arnold G J, et al. Mitochondrial dysregulation secondary to endoplasmic reticulum stress in autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease—UMOD (ADTKD-UMOD). *Sci Rep*, 2017, 7: 42970
- 157 Good D M, Zürbig P, Argilés A, et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9: 2424–2437
- 158 Zürbig P, Jerums G, Hovind P, et al. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2012, 61: 3304–3313
- 159 Argilés Á, Siwy J, Duranton F, et al. Ckd273, a new proteomics classifier assessing CKD and its prognosis. *PLoS ONE*, 2013, 8: e62837
- 160 Chavers B M, Bilous R W, Ellis E N, et al. Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type I diabetes without overt proteinuria. *N Engl J Med*, 1989, 320: 966–970
- 161 Bangstad H J, Osterby R, Dahl-Jørgensen K, et al. Early glomerulopathy is present in young, type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia*, 1993, 36: 523–529
- 162 Fioretto P, Steffes M W, Mauer M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria. *Diabetes*, 1994, 43: 1358–1364
- 163 Caramori M L, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: Is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*, 2000, 49: 1399–1408
- 164 Candiano G, Musante L, Bruschi M, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and α 1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 3139–3148
- 165 Gordin D, Shah H, Shinjo T, et al. Characterization of glycolytic enzymes and pyruvate kinase M2 in type 1 and 2 diabetic nephropathy. *Dia Care*, 2019, 42: 1263–1273
- 166 Gong D, Chen X, Middleditch M, et al. Quantitative proteomic profiling identifies new renal targets of copper(II)-selective chelation in the reversal of diabetic nephropathy in rats. *Proteomics*, 2009, 9: 4309–4320
- 167 Wang X, Meng L, Zhao L, et al. Resveratrol ameliorates hyperglycemia-induced renal tubular oxidative stress damage via modulating the SIRT1/FOXO3a pathway. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 126: 172–181
- 168 Joo W A, Lee D Y, Kim C W. Development of an effective sample preparation method for the proteome analysis of body fluids using 2-D gel electrophoresis. *Biosci Biotech Biochem*, 2003, 67: 1574–1577
- 169 Shoshan S H, Admon A. Proteomics in clinical laboratory diagnosis. *Adv Clin Chem*, 2005, 39: 159–184
- 170 Rossing K, Mischak H, Parving H H, et al. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int*, 2005, 68: 193–205
- 171 Andersen S, Mischak H, Zürbig P, et al. Urinary proteome analysis enables assessment of renoprotective treatment in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *BMC Nephrol*, 2010, 11: 29

- 172 Silva S, Bronze M R, Figueira M E, et al. Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): A randomized, parallel, controlled, double-blind study. *Am J Clin Nutr*, 2015, 101: 44–54

Proteomics: recent advances in the analysis of diabetic kidney disease

HE ShuHang, CHEN LuLu, QIN Liang, DAI XiaoYan, QIU KaiDi,
CHEN DiFan & WANG XiaoDong

Centre for Imaging & Systems Biology, College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Diabetic kidney disease (DKD) is one of the major complications of diabetes, which has been an increasingly serious threat to human health. Despite the enormous progress that has been made in the studies of DKD pathological mechanism, there is still a lack of clinical analysis methods suitable for the accurate diagnosis of DKD, which makes it difficult for doctors to decide the treatment plan for DKD compared to other general kidney diseases. Proteins play critical roles in various life processes, therefore proteomics analysis is very important for disease early diagnosis, accurate prognosis, and monitoring of disease progression. The proteomics studies of DKD can explore the molecular mechanisms associated with proteins from the perspectives of global, dynamic, and interaction networks. Many studies were performed on clinical specimens under different physiological and pathological conditions to screen proteins that are closely related to DKD. The comprehensive characterization of these proteins will help us to find potential biomarkers and understand more intuitively the occurrence and progression of DKD. With the development of proteomics, new emerging technologies have been drawing more and more attention due to their powerful analytical capabilities. The wide use of these techniques has further promoted the application of proteomics in the screening of disease biomarkers, the revelation of pathogenic molecular mechanisms, and the evaluation of protein-drug interactive targets. This review provides an overview of proteomics technologies, describes the applications of proteomics in DKD research, and highlights the studies of DKD pathogenesis, the screening of protein biomarkers for early diagnosis, and the evaluation of therapeutic targets and efficacy. Although great progress has been made in the proteomics study of DKD, the correlation analysis of potential biomarkers and the clinical verification of drug targets will still be the focus of DKD research.

diabetic kidney disease, proteomics, pathological mechanism, early diagnosis, therapeutic targets

doi: [10.1360/SSV-2020-0151](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0151)