

文章编号 :1004-0374(2010)02-0119-05

尿蛋白质组学在肾脏疾病研究中的应用

王 燕, 高友鹤*

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院生理与病理生理系, 北京 100005)

摘要: 长期以来, 肾脏病的治疗进展一直十分缓慢, 这是因为目前一些肾脏病在诊断分型上存在很多缺陷, 分型通常只能依靠细微的组织病理学差异, 这使早期诊断、预后追踪以及疗效观察都十分困难。如果能发现像肌钙蛋白一样特异的生物学标志物, 将有助于提高肾脏病的诊疗水平。由于尿液与泌尿系统之间存在着天然的联系, 这使得尿液在反映泌尿系统功能方面具备“地理”优势。因此, 尿蛋白质组学的兴起和发展为肾脏病及其他泌尿系统疾病的研究开启了一扇新的大门。该文综述了尿蛋白质组学技术的发展及其在各种泌尿系统疾病研究中的应用。

关键词: 尿; 蛋白质组; 肾脏疾病; 质谱技术

中图分类号: Q51; Q846; R692 文献标识码: A

The application of urinary proteomics in nephrology

WANG Yan, GAO You-he*

(Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

Abstract: Renal diseases garner less interest as a potential area for therapeutic development because they are often poorly characterized by subtle histopathologic changes on renal biopsy, and difficult to diagnose early, follow progression, and determine response to therapy. A troponin-like marker of renal dysfunction would be extremely helpful for the diagnostic and therapeutic development of renal diseases. As the output of urinary system, urine has the inherent advantage to reflect its condition. It is predicted that urinary proteomics will play an important role in clinical nephrology in the very near future. This article reviews the most promising technological approaches towards deciphering the urinary proteome and applications of the knowledge in clinical nephrology.

Key words: urine; proteome; renal disease; mass spectrum

长期以来, 肾脏病的治疗进展缓慢, 这是因为目前一些肾脏病在诊断分型方面存在很多缺陷, 分型通常只能依靠细微的组织病理学差异, 这使其早期诊断、预后追踪以及疗效观察都十分困难。如果能发现像肌钙蛋白一样特异的生物学标志物, 将有助于提高肾脏病的诊疗水平^[1]。由于尿液与泌尿系统之间存在着天然的联系, 使得尿液在反映泌尿系统功能方面具有“地理”优势, 被称为体外的肾活检。相比血液分析它具有下列优势: 尿液很容易大量地、无创性地获得; 成分简单, 较之血浆蛋白质组相对容易分析; 常规的肘静脉取血距离病

灶较远, 在这个遥远而复杂的地方寻找疾病标志物就如同大海捞针, 而尿液距离病灶近, 对于某些泌尿系疾病能更早反映变化。其实早在 17 世纪, 医

收稿日期: 2009-07-27; 修回日期: 2009-12-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870502; 30725009); 高等学校博士学科点专项科研基金(20070023021); 卫生部行业基金(20082007); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02Z308); 北京市自然科学基金(5072037)

* 通讯作者: Tel: 010-65296407; E-mail: gaoyouhe@pumc.edu.cn

生就已经知道尿液经振荡后产生泡沫这一现象能间接提示患者罹患肾脏疾病,这一早期的临床实践已经把尿蛋白与肾脏疾病联系在一起^[2]。因此,很多研究人员致力于从尿液中寻找肾脏疾病的生物学标志物。随着能对蛋白质进行大规模分离鉴定并能对海量信息进行分析处理的蛋白质组学技术方法的兴起和发展,为肾脏病以及其他泌尿系统疾病的研究开启了一扇新的大门。本文综述了尿蛋白质组学技术的发展及其在各种泌尿系统疾病研究中的应用。

1 正常尿蛋白质组

在揭示病理状态下尿蛋白质组的变化之前,首先需要建立尿蛋白质组的分析方法及正常尿蛋白谱。Davis等^[3]和Spahr等^[4]是尿蛋白质组研究的早期开拓者,他们用LC-MS/MS方法分析了酶切后的混合尿样,共鉴定出124个蛋白。尽管这项研究没有试图寻找某种疾病的标志物,但是它明确地指出尿蛋白质组蕴藏着丰富的信息以及挖掘这些信息的方法。Thongboonkerd等^[5]完成了第一张人尿蛋白质组2D图,包含67种蛋白及它们的异型体。上述研究鉴定出的蛋白大部分是尿液中的高丰度蛋白,这对于寻找标志物的目标来说是远远不够的,这是因为那些由病变组织漏出、分泌、裂解而释放出的生物标志物很多都是低丰度蛋白,而尿液中存在的高丰度蛋白会抑制低丰度蛋白的鉴定。针对这一问题,Pieper等^[6]、Wang等^[7]和Castagna等^[8]分别采用免疫亲和去除高丰度蛋白、伴刀豆蛋白A富集N型糖蛋白,以及联有配体库的小珠富集低丰度蛋白的方法,对尿中的低丰度蛋白进行了有效地鉴定。Adachi等^[9]用高分辨率质谱LTQ-FT和LTQ-Orbitrap鉴定出了1500个高可信度尿蛋白(或者碎片),囊括了绝大部分以往研究中鉴定到的蛋白,这项研究进一步揭示了尿蛋白质组拥有出人意料的复杂性,并展示出它能够成为生物标志物丰富来源的巨大潜力。另外,与上述主要是针对尿液中可溶性蛋白的研究不同,Zhou等^[10]和Pisitkun等^[11]研究了尿液在超速离心后得到的含有exosome的沉淀物(exosome是由泌尿系上皮细胞分泌的一种胞膜包裹的小泡,直径<80 nm),共鉴定出295个蛋白,其中至少有19个已知报道与肾脏病、高血压病相关。

研究者还注意到尿蛋白质组在个体间存在着明显的差异,并且由于锻炼、饮食、生理节奏等因素的影响,同一个体不同时间段的尿蛋白质组也会发生改变。Khan和Packer^[12]采用乙腈沉淀,2DE

分离的方法观察了1名健康男性在同一天内3个不同时间点,以及6周内不同天数的相同时间段内尿蛋白组的变化,结果表明,尿蛋白组会随时间发生变化,其中晨尿较其他时间点而言包含更多的蛋白点;不同天内所得尿蛋白组间较同一天内不同时间点间差异更大。另外两项涉及更多受试者的研究也得到了同样的结果,他们的结果还显示个体间较个体内存在更明显的差异^[13, 14]。由于个体间以及个体内存在这种生物学变异,使早期小样本试验得到的候选标志物必须经过大样本的验证,才能确定哪些蛋白的变化真正是由疾病导致的,而并非生物学上的变异造成的。

另外,在寻找肾脏疾病标志物的过程中常常需要借助动物模型,比如寻找疾病早期标志物的研究,临床上常常不易找到合适的早期患者(如慢性肾病,患者就诊时常常处于疾病的晚期);研究某些不能直接通过人体试验实施的干预措施的效果等。一些研究者分析了常用试验动物的尿蛋白质组,Wait等^[15]分析了正常WK大鼠的混合尿样,采用TCA/丙酮沉淀,2D-PAGE分离的方法,鉴定出37个蛋白,发现雄性与雌性大鼠的尿蛋白质组有明显不同,其中雄性以 α_{2u} -globulinmultigene家族为主,而雌性则以补体成分为主。Thongboonkerd等^[16]分析了5只正常SD大鼠的非混合尿蛋白质组,5张2D胶结果基本相同,得到350个蛋白点,对其中250进行鉴定,得到111个蛋白(57种独立蛋白),包括转运体、转运调节子、分子伴侣、酶、骨架蛋白、受体等许多以往未在尿液中鉴定出或者没有预料到会出现在尿液里的蛋白。

还有研究者分析了尿蛋白是否可以在较长时间保持内保持稳定,Schaub等^[17]、Theodorescu等^[18]、O'Riordan等^[19]的结果显示保存在4~3d或者室温4~6h,尿蛋白质组不发生明显的变化,在-70℃可以保存数月^[10]乃至数年^[2],但是反复的冻融,会造成某些蛋白的降解,如IgG、 α -1-抗胰蛋白^[10, 17, 20]。尽管这些报道认为尿蛋白质组较之血浆蛋白质组更稳定,但还有一些其他的因素会影响到数据的质量和可比性,收集、储存以及处理过程的不同,都会造成样品间巨大的差异。因此,需要建立一个标准化的处理流程。

2 疾病状态下的尿蛋白质组

2.1 肾移植

肾移植中一个最严重的问题就是急性排异反

应,如果发现不及时就会带来致命的后果。目前诊断的金标准仍是肾活检,但是对一些危重患者进行肾活检存在着极大的风险,并且还要尽量避免进行连续的肾活检,因此迫切需要一种无创的早期诊断手段。Lapin^[21]最早用2-DE进行了这方面的尝试,虽然发现了一些差异点,但是由于当时蛋白质鉴定技术的限制,他们并没有对差异点进行鉴定。另外,Argiles等^[22]还用2-DE分析了肾脏捐献者的尿液,发现了几种与肾脏代偿性生长相关的蛋白。随着现代蛋白质组技术的出现,研究水平得到了极大的提高。有3个独立的小组分别用SELDI-TOF-MS的方法比较了肾移植后急性排异反应患者与稳定患者间的尿蛋白组^[17, 19, 23, 24]。O'Riordan等^[19]找到相对分子质量为4 756.3、25 665.7和19 018.8的蛋白在两组间存在差异;Clarke等^[23]认为相对分子质量为6 500、6 600、6 700、7 100和13 400的蛋白是潜在的标志物;而Schaub等^[17, 24]报道相对分子质量为5 270~5 550和10 530~11 000的蛋白是差异蛋白,后来Schaub等^[24]又鉴定出这些多肽峰为 β_2 微球蛋白及其酶解片段,并推测它们是由远端小管炎症反应造成局部酸性增高、异位酶酶解作用的产物,但并不能确定这些裂解产物是否是急性排斥反应的特异性标志,在肾移植后其他原因引起的远端小管损伤是否也会出现,如手术造成的缺血性急性肾损伤、神经钙蛋白抑制剂相关性损伤、多瘤病毒BK感染性肾病等。这3项类似的研究得到了完全不同的结果,但这并不意外,因为他们使用了不同的芯片表面,这使得他们的结果间不是相互矛盾的,而是互相补充的;另外,不同免疫抑制疗法的使用也会造成结果间的差异。

由于临床面临的实际问题是肾移植患者术后出现发热、少尿等症状,以及一些早期实验室检查结果的异常,不能帮助临床医生判断出患者究竟是发生了急性排异反应,还是发生了免疫抑制剂中毒、急性肾小管坏死、亦或是泌尿系感染等其他并发症,从而不能迅速采取正确的干预措施。因此,试验最好在病情稳定组、急性排异反应组之外,加设免疫抑制剂中毒组、泌尿系感染组等难与急性排异反应鉴别的并发症。Wittke等^[25]较之前人的研究采用了更完善的实验设计,他们用CE-MS的方法对19名急性排斥反应者、10名术后感染者,以及29名未发生排异和感染者进行分析,并将所得结果在26名患者的小样本中进行了盲法测试,结果显示了较高的准确性:对照组8/10,感染组3/7,排斥组6/9。

但要上述指标应用于临床诊断还需要大样本的临床试验验证;另外对照组的细致设计也是非常必要的,因为仅仅区分肾功能稳定的移植术后患者还远远不够,临床表现难与急性排斥反应鉴别的其他移植手术并发症,如急性肾小管坏死、泌尿系感染、免疫抑制剂造成的肾毒性损害均应考虑在内。

2.2 肾小球疾病

寻找各种肾小球疾病的生物标记物正在成为蛋白质组学在肾脏病领域中最富成果和最具临床价值的应用之一。很多研究仅仅比较了某种肾小球疾病患者与正常人尿液间的差别,这对于临床应用是远远不够的,因为临床上更需要能对不同肾小球疾病进行鉴别诊断的标志物,从而对后续治疗起到指导意义。Mischak小组^[26-30]一直致力于利用CE-MS配合生物信息的方法,构建一个尿液(和其他体液)蛋白质组诊断模型用于各种可以进展为肾衰的小球疾病的诊断和鉴别诊断。他们比较了微小病变(n=16)、膜性肾病(n=18)、局灶节段性肾小球硬化(n=10)与正常尿液(n=57)间的差别,找到173个在90%以上正常人尿液中出现的多肽,690个在50%以上正常人尿液中出现的多肽,用于构建正常组多肽模式,为每种疾病分别构建了含500个以上多肽的模式,这一模型对疾病分类的准确性为:MCD/FSGS 71.4%,MGN 92.9%^[29]。他们还用相同的方法分析了2型糖尿病^[27]和IgA肾病^[30]。

有趣的是人们发现很多在患者尿液里鉴定出来的标志物是一些较大蛋白的酶解片段。最近的一项研究表明,这可能是由于患者尿液中存在特殊的蛋白酶能分解这些蛋白。他们分析了各种肾病综合征患者的尿液,认为尿液中存在特异的蛋白酶能分解白蛋白和 α_1 抗胰蛋白酶,产生大约100个酶切片段,这些片段表现为2D胶上不同位置的点^[31]。这项研究为分析尿蛋白质组结果提供了新的思路。

2.3 肿瘤及其他泌尿系统疾病

实现癌症的早期诊断是医学研究中的重要目标之一。尿蛋白质组学是一条极具吸引力的寻找泌尿系统^[32-34]以及某些系统性恶性肿瘤^[35, 36]早期诊断标志物的途径,旨在寻找比现有标志物以及细胞学检查更特异更敏感的标志物。

其中发展最快的莫过于对膀胱癌的研究。膀胱癌大多来源于上皮细胞,其中90%以上为移行细胞癌,鳞状细胞癌和腺癌则较少见,但恶性程度远较移行细胞癌为高;非上皮来源的肿瘤,如横纹肌肉瘤等则非常罕见。因此,移行细胞癌方面的研究较

多, 以往已经发现许多移行细胞癌潜在标志物, 血红蛋白、NMP22、补体因子 H、细胞角蛋白 8 和 18、肿瘤相关胰蛋白酶抑制剂、可溶性钙黏蛋白 E、前胸腺素 α 、透明质酸酶等, 其中一些已经用于临床^[32-34]。其他文献已对这方面进行了很好的综述^[10, 37], 本文不再详述。

Rogers 等^[38]运用神经网络的方法分析了 SELDI-MS 得到的肾细胞癌患者与正常人以及其他泌尿系统疾病患者的尿蛋白质组, 学习集的特异性和灵敏性达到 98%~100%, 但在测试过程中他们发现分类的准确性随时间下降, 他们认为这也许是由于激光和芯片的不稳定造成的。另外一项研究发现患者尿中的激肽原水平增高, 在肾切除后激肽原水平下降^[4]。

先天性肾盂输尿管交界狭窄是一种常见的新生儿疾病, 临床医生需要不断监测利尿性肾图是否达到了某个阈值来决定患儿是否需要接受矫正手术。但在临床监测的拖延中, 暂时的狭窄会造成肾单位的减少, 可能会因此引起后期的高血压、蛋白尿。Decramer 等^[39]开发了一种新方法预测先天性肾盂输尿管交界中度狭窄的新生儿(狭窄程度处于手术组和非手术组之间, 需要临床观察)是否需要接受手术治疗。他们用 CE-MS 分析了正常新生儿、非手术组患儿以及手术组患儿的术前尿液, 得到了一个 51 个多肽的模型对这 3 组新生儿进行了准确的分类, 并用盲法验证了这个模型的准确性。然后他们用这个模型对 36 个中度狭窄的患儿进行预测, 预测结果与 9 个月后的实际临床结果进行比较, 达到了 94% 的准确率。这一个结果说明尿蛋白质组不仅可以用来诊断, 而且可以准确地评估预后。

2.4 非泌尿系疾病

一些非泌尿系统疾病也能够使尿蛋白质组发生改变, 主要基于两种原因: 疾病本身使得血浆中某些蛋白成分增多, 通过肾小球滤过而出现在尿中; 疾病本身会累及到肾脏(继发性肾病)。Kaise 等^[40]和 Weissinger 等^[41]用 CE-MS 分析了骨髓移植后移植物抗宿主疾病的尿蛋白质组, Zimmerli 等^[42]在尿中找到了几个心血管疾病标志物^[42]。研究者认为移植物抗宿主疾病, 心血管疾病会导致内皮系统的功能紊乱(或者是内皮系统功能紊乱的结果), 内皮系统的功能紊乱会改变肾脏的结构和(或)功能, 从而影响肾小球滤过和(或)小管功能, 因此在尿中出现疾病特异性蛋白。这些研究进一步拓宽了尿蛋白质组研究的应用领域。

3 结论

肾脏疾病最早的临床观察就明确地揭示出尿蛋白可以反映肾脏病变, 时至今日蛋白质组技术的出现极大提高了人们对尿蛋白成分的分析能力, 为理解肾脏疾病的发病机理、提高诊疗水平发挥着重要的作用。首批在上百例样本中进行的研究已经清楚地显示出它在无创性临床诊断中的价值^[18, 39], 但仍不能满足人们对这一发展了二十多年的技术的期望。未来尿蛋白质组学的研究目标面临一个选择, 是继续花费几年, 甚至十几年的时间彻底挖掘出完整的尿蛋白质组, 还是应该充分利用包含有价值信息的亚蛋白质组来满足目前的临床需求。

几乎所有的研究都表明不存在“完美的标志物(明确对应某种疾病的单一分子)”, 研究者普遍认为一组标志物更适合疾病的诊断检测和疗效观察。这组标志物必须经过确定和排序, 以及临床样品的盲法验证。遵循这些简单的原则将会极大提高未来蛋白质组研究的价值。另外, 尿蛋白质组学的研究也急需建立一个共同的平台来实现不同实验室间数据的比较。

[参 考 文 献]

- [1] Hewitt SM, Dear J, Star RA, Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(7): 1677-89
- [2] Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(4): 1057-71
- [3] Davis MT, Spahr CS, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses. *Proteomics*, 2001, 1(1): 108-17
- [4] Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, et al. Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest. *Proteomics*, 2001, 1(1): 93-107
- [5] Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1461-9
- [6] Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*, 2004, 4(4): 1159-74
- [7] Wang L, Li F, Sun W, et al. Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(3): 560-2
- [8] Castagna A, Cecconi D, Sennels L, et al. Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads. *J Proteome Res*, 2005, 4(6): 1917-30

- [9] Adachi J, Kumar C, Zhang Y, et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*, 2006, 7(9): R80
- [10] Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int*, 2006, 69(8): 1471-6
- [11] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(36): 13368-73
- [12] Khan A, Packer NH. Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J Proteome Res*, 2006, 5(10): 2824-38
- [13] Oh J, Pyo JH, Jo EH, et al. Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics*, 2004, 4(11): 3485-97
- [14] Lafitte D, Dussol B, Andersen S, et al. Optimized preparation of urine samples for two-dimensional electrophoresis and initial application to patient samples. *Clin Biochem*, 2002, 35(8): 581-9
- [15] Wait R, Gianazza E, Eberini I, et al. Proteins of rat serum, urine, and cerebrospinal fluid: VI. Further protein identifications and interstrain comparison. *Electrophoresis*, 2001, 22(14): 3043-52
- [16] Thongboonkerd V, Klein JB, and Arthur JM, Proteomic identification of a large complement of rat urinary proteins. *Nephron Exp Nephrol*, 2003, 95(2): e69-78
- [17] 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(1): 219-27
- [18] Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, et al. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol*, 2006, 7(3): 230-40
- [19] O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, et al. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(12): 3240-8
- [20] Tencer J, Thysell H, Andersson K, et al. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, κ - and lambda-chain immunoreactivity, orosomuroid and α 1-antitrypsin in urine stored at various conditions. *Scand J Clin Lab Invest*, 1994, 54(3): 199-206
- [21] Lapin A, Kopsa H, Smetana R, et al. Modified two-dimensional electrophoresis of urinary proteins for monitoring early stages of kidney transplantation. *Transplant Proc*, 1989, 21(1 Pt 2): 1880-1
- [22] Argiles A, Mourad G, Basset N, et al. Acute adaptative changes to unilateral nephrectomy in humans. *Kidney Int*, 1987, 32(5): 714-20
- [23] Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, et al. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg*, 2003, 237(5): 660-4; discussion 4-5
- [24] Schaub S, Wilkins JA, Antonovici M, et al. Proteomic-based identification of cleaved urinary β 2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. *Am J Transplant*, 2005, 5(4 Pt 1): 729-38
- [25] Wittke S, Haubitz M, Walden M, et al. Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 2005, 5(10): 2479-88
- [26] Kaiser T, Hermann A, Kielstein JT, et al. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry to establish polypeptide patterns in dialysis fluids. *J Chromatogr A*, 2003, 1013(1-2): 157-71
- [27] Mischak H, Kaiser T, Walden M, et al. Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin Sci: Lond*, 2004, 107(5): 485-95
- [28] Weissinger EM, Kaiser T, Meert N, et al. Proteomics: a novel tool to unravel the patho-physiology of uraemia. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(12): 3068-77
- [29] Weissinger EM, Wittke S, Kaiser T, et al. Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2426-34
- [30] Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, et al. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int*, 2005, 67(6): 2313-20
- [31] Candiano G, Musante L, Bruschi M, et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 3139-48
- [32] Mueller LN, Brusniak MY, Mani DR, et al. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res*, 2008, 7(1): 51-61
- [33] Saito M, Kimoto M, Araki T, et al. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. *Eur Urol*, 2005, 48(5): 865-71
- [34] Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol*, 2001, 158(4): 1491-502
- [35] Tantipaiboonwong P, Sinchaikul S, Sriyam S, et al. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics*, 2005, 5(4): 1140-9
- [36] Ye B, Skates S, Mok SC, et al. Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 432-41
- [37] van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH, Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*, 2005, 47(6): 736-48
- [38] Rogers MA, Clarke P, Noble J, et al. Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6971-83
- [39] Decramer S, Wittke S, Mischak H, et al. Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med*, 2006, 12(4): 398-400
- [40] Kaiser T, Kamal H, Rank A, et al. Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2004, 104(2): 340-9
- [41] Weissinger EM, Schiffer E, Hertenstein B, et al. Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2007, 109(12): 5511-9
- [42] Zimmerli LU, Schiffer E, Zurbig P, et al. Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(2): 290-8