

DOI: 10.13376/j.cbbls/2025033

文章编号: 1004-0374(2025)03-0321-08

# 面向体外诊断的体液蛋白质组学分析前因素研究进展

李 琦<sup>1,2,3</sup>, 应 超<sup>1,2,3</sup>, 李奇萌<sup>4</sup>, 赵立芳<sup>4\*</sup>, 蔡燕宁<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1 首都医科大学宣武医院神经生物学研究室, 北京 100053; 2 教育部神经变性病重点实验室, 北京 100053;  
3 国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100053; 4 首都医科大学宣武医院临床样本中心, 北京 100053)

**摘要:** 在体外诊断领域, 蛋白质组学研究对于生物标志物的发现、验证和确认至关重要。越来越多证据表明, 不同的样本处理和操作步骤会影响蛋白质的丰度和检测的可靠性。体外诊断中的大多数异常和错误都发生在样本的分析前阶段, 这些变量会对分析物的测定结果产生巨大影响。然而, 目前关于分析前变量对样品采集和储存后蛋白质的稳定性以及完整性的影响尚不完全清楚。本文系统综述了分析前变量对生物体液蛋白质组学研究的影响, 以期蛋白质组学研究提供新的思路。

**关键词:** 蛋白质组学; 分析前因素; 血液; 脑脊液; 尿液

中图分类号: R331.5 文献标志码: A

## Advances in the analysis of pre-analytical factors for *in vitro* diagnostic-oriented proteomics of body fluids

LI Yu<sup>1,2,3</sup>, YING Chao<sup>1,2,3</sup>, LI Qi-Meng<sup>4</sup>, ZHAO Li-Fang<sup>4\*</sup>, CAI Yan-Ning<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1 Neurobiology Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 2 Key Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Ministry of Education, Beijing 100053, China; 3 National Clinical Research Center for Geriatric Diseases, Beijing 100053, China; 4 Clinical Sample Center, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

**Abstract:** In the domain of *in vitro* diagnostics, proteomics research plays a crucial role in the discovery, validation, and confirmation of biomarkers. Increasing evidence suggests that various sample handling and manipulation procedures significantly influence protein abundance and the reliability of assays. The majority of abnormalities and errors in *in vitro* diagnostics are observed during the pre-analytical phase of sample processing, and these variables can significantly influence the outcomes of the analyte assay. Nevertheless, the influence of pre-analytical variables on the stability and integrity of proteins following sample collection and storage remains inadequately comprehended. In this article, we systematically reviewed and analyzed the impact of pre-analytical variables on proteomics research of body fluids, aiming to provide new insights for proteomics research.

**Key words:** proteomics; pre-analytical factors; blood; cerebrospinal fluid; urine

蛋白质组学是检测特定细胞、组织、体液或生物体中的蛋白质表达、结构、功能和相互作用的一种分析技术<sup>[1]</sup>。与基因组不同, 蛋白质组是高度动态的, 可在生物信号、环境条件和外部刺激下发生显著变化, 由于蛋白质组中的变化反映了机体的病理或生理过程, 而通过蛋白质组学技术可以分析蛋白质组成和丰度以确定疾病标志物或治疗机制, 因此蛋白质组学有望成为寻找诊断或治疗生物标志物

以及鉴定和表征基因组编码的蛋白质的首选工具<sup>[2,3]</sup>。值得注意的是, 样本分析前的采集和处理程序的不同可能导致生物标志物研究结果出现显著差异, 因

收稿日期: 2024-12-03; 修回日期: 2024-12-31

基金项目: 科技创新2030—重大项目(2021ZD0201100)

\*通信作者: E-mail: lfzhao2021@163.com (赵立芳);  
yanningcaimailbox@163.com (蔡燕宁)

此,分析前因素的控制是目前蛋白质组学研究的关键点。在常规实验室实践和临床试验中,样本的选择、收集、处理和存储等分析前因素可能会影响蛋白质稳定性,进而对分析物的测定产生巨大影响,并可能影响结果的可重复性和检测的有效性。本文将重点关注生物体液蛋白质组学研究相关的主要分析前变量和考虑因素。

## 1 蛋白质组学概述

蛋白质是由氨基酸组成的多肽,经常被用作筛选和检测各种人类疾病的重要生物标志物<sup>[4]</sup>。蛋白质组的概念最早由澳大利亚的 Marc Wilkins 和 Keith Williams 于 1994 年提出<sup>[5]</sup>,它是指由一种生物体的一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部蛋白质。每个物种都有自己独特的蛋白质组。与基因组不同,蛋白质组的组成随着时间、环境以及整个生物体的变化而不断变化。

蛋白质组学是以蛋白质组为研究对象,分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平和修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律的科学<sup>[1,6]</sup>,其允许在极小的样本量和极快的时间框架内同时分析数百甚至数千种蛋白质<sup>[7]</sup>。与转录组学和基因组学相比,蛋白质组学研究有助于更深入地了解蛋白质水平编码的动态调控层,如翻译后修饰、亚细胞定位、细胞信号转导和蛋白质-蛋白质相互作用等<sup>[8,9]</sup>。蛋白质组学方法已被广泛应用于各种研究,如蛋白质丰度的变化、可能发生的疾病、对治疗性措施的反应以及对血浆蛋白质组的影响等,尤其是可以发现伴随疾病、年龄或治疗性措施而产生的蛋白质丰度的变化<sup>[6]</sup>。蛋白质组学能够从最小体积的样本中以高通量的方式定量数千种蛋白质。利用蛋白质组学,多项研究致力于通过识别疾病模型、患者生物流体以及死后脑组织中差异表达的蛋白质,将其作为潜在生物标志物,以揭示疾病病理机制<sup>[10]</sup>。

## 2 蛋白质组学技术发展概况

随着实验技术的快速发展,蛋白质组学方法已经从传统的低通量方法,如酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白质免疫印迹(western blot, WB)、凝胶电泳和基于色谱的方法(离子交换色谱法、尺寸排除色谱法及亲和色谱法等),发展到高通量方法,如蛋白质微阵列、蛋白质通路阵列和质谱分析(mass spectrometry,

MS)<sup>[11-14]</sup>。这些高通量蛋白质组学技术不仅缩短了分析时间,还提高了蛋白质组覆盖的准确性和深度。在过去的几十年中,MS 技术已被成功应用于蛋白质组翻译后修饰、药物筛选、生物标志物发现、靶标验证等研究,是所有涉及蛋白质的生物学研究的支柱<sup>[15-19]</sup>。基于液相色谱质谱(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)的蛋白质组学已被开发为耗时且劳动密集型的基于凝胶的蛋白质组学和免疫测定的替代方法,用于进行不同规模的蛋白质鉴定和定量<sup>[20]</sup>。此外,研究人员近年开发了一种基于超分子探针的方法,使用超分子探针修饰的膜同时捕获和原位高通量分析外泌体。该技术可对低外泌体含量的体液(如尿液)进行蛋白质组学分析,为外泌体的分离和检测一体化提供了有效实用的方法<sup>[21,22]</sup>。随着生物信息学和现代多分析组学技术的发展,蛋白质组学在揭示疾病发病分子机制、发现新的生物标志物方面前景广阔,并可作为特定的诊断检测、预后预测和治疗的靶标,进一步加强个性化医疗。

复杂的蛋白质组学样本通常在不同的条件下获得、存储和处理。这些分析前因素可能会影响测定的蛋白质质量,进而影响相关统计分析和验证的结果。因此,在复杂的蛋白质组学实验中,确定哪些因素影响蛋白质的丰度,并确定受这些因素影响最大的蛋白质种类是非常重要的。

## 3 血液蛋白质组学分析前因素

血液是个体状态或表型的普遍反映,被认为可反映整个人类蛋白质组,是临床研究的首选生物流体,经常被用作生物材料来测量用于诊断及治疗等目的的生物标志物<sup>[23-26]</sup>。通常所说的血液即全血,包含血浆、红细胞、白细胞、血小板以及淋巴细胞等;全血经抗凝处理后再离心沉淀,得到的不含细胞的浅黄色半透明液体称为血浆;不经抗凝处理的血液在一系列凝血因子作用下发生凝血级联反应后,上层析出的清澈液体被称为血清。血浆蛋白质组学关注的是全血中的可溶性蛋白质,这些蛋白质通常是在全血样本离心后获得的。血清蛋白质组学关注的是全血自发或诱导凝块形成并将其清除后剩余的部分,这一过程与凝血和炎症途径的激活有关,可改变样品中的蛋白质含量,这种改变包括去除大量高丰度蛋白质(如纤维蛋白原、活化或形成聚集体的血小板),以及去除参与凝块形成的其他蛋白质<sup>[7]</sup>。在临床指标的检测中,血生化、肿瘤标志物检测

一般选用血清, 而针对凝血因子的检测则需要选用血浆。

血浆和血清蛋白质组学是蛋白质组学研究的一个重要分支, 通过检测选定的目标人群血浆或血清表达的全部蛋白质, 并寻找差异蛋白, 鉴定疾病相关蛋白, 这将为研究重大疾病病理生理学机制、早期诊断特异性标志物、药物作用靶点等开辟新的途径<sup>[27]</sup>。尽管潜力无限, 血浆和血清蛋白质组学在临床和研究中的应用却非常有限, 而且对于如何收集和制备用于蛋白质组学分析的样品没有严格的指导方针<sup>[28]</sup>。因此, 在进行基于蛋白质组学的研究之前, 应该考虑和确定一些分析前变量。

### 3.1 患者准备

患者准备在血液蛋白质组学研究中起着至关重要的作用, 特别是在生物标志物的探索和诊断应用方面, 因此需要对其进行准确的概述和规范。患者准备过程中与蛋白质组学检测结果密切相关的影响因素主要包括:(I) 年龄、性别和种族;(II) 昼夜节律, 其在很大程度上决定了某些分析物的浓度, 如通常需在早上 7~9 点采集禁食患者血液;(III) 可能最终干扰蛋白质代谢的药物的摄入;(IV) 饮食习惯;(V) 个体内部和个体间的特定生物学变异;(VI) 体育锻炼, 特别是抽血前 3 d 的体力活动<sup>[29]</sup>。遗憾的是, 目前很少有研究深入探讨患者准备对血液蛋白质组学的影响。

### 3.2 血液采集

#### 3.2.1 采集程序

血液采集时应考虑的方面包括血液采集的类型(如静脉穿刺、动脉穿刺、皮肤穿刺)、采集的位置及准备、患者体位、止血带部位等。对于静脉穿刺, 首选的采集部位是肘正中静脉, 因为通常很容易找到并获取血液。采集部位的准备包括用酒精或碘伏擦拭以进行适当清洁。但值得注意的是, 残留的酒精与血液样本混合会导致溶血, 并可能虚假地增加

和干扰某些分析物的水平, 因此需要等酒精蒸发后再进行采血。采集时患者的体位(站立、卧位或坐位)以及患者处于该体位的时间会影响血液循环, 进而影响检测结果, 如从站立位改为卧位会导致血浆中的总蛋白水平降低, 因此血液采集前应指导患者选择正确的体位。此外, 静脉闭塞时间超过 30 s 会影响样本分析, 止血带应在静脉穿刺部位上方 3~4 cm 处, 当血液开始流入导管时应将其取下。长时间使用止血带可能引起静脉闭塞, 导致穿刺部位血液集中, 最终导致多种化学分析物增加<sup>[27, 30]</sup>。

#### 3.2.2 血液采集管类型

目前可用的血液采集管种类较多, 其内壁含有不同的添加剂, 包括柠檬酸钠、肝素钠/锂或乙二胺四乙酸(EDTA)等(表 1)。其中, 柠檬酸钠和 EDTA 通过与血液中的  $\text{Ca}^{2+}$  形成稳定的螯合物, 从而起到抗凝作用, 而肝素主要通过抗凝血酶因子结合, 提高抗凝血酶因子的活性, 增强对凝血因子的抑制作用, 从而抑制凝血酶形成并发挥抗凝作用。采集管添加剂可能会对蛋白质组学研究产生影响, 在一项使用全自动免疫测定法测量不同样本处理程序后血浆  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ ) 水平的研究中发现, 对于除 A $\beta$ 42 和 A $\beta$ 40 外的所有血浆生物标志物, EDTA、肝素锂和柠檬酸钠管的分析物水平基本相当; 与 EDTA 管相比, 使用肝素锂管时, A $\beta$ 42 和 A $\beta$ 40 的中位恢复信号分别增加了 10% 和 9%; 使用柠檬酸钠管时, A $\beta$ 42 和 A $\beta$ 40 的中位回收信号分别下降了 6% 和 4%; 此外, 与 EDTA 和肝素锂管相比, 柠檬酸钠管的 GFAP 和 NFL 呈下降趋势<sup>[31]</sup>。在临床及科研实践中, 建议依据检测目的选用不同的血液采集管, 这些采集管不可互换, 在一项研究中只能使用一种类型的采集管<sup>[27]</sup>。

### 3.3 血液处理

#### 3.3.1 处理时间及温度

由于血细胞代谢和细胞内化合物的逐渐释放,

表1 常见血液收集管及其用途

| 编号 | 颜色  | 添加剂       | 用途                                      |
|----|-----|-----------|---|
| 1  | 红色  | 无添加剂      | 主要用于血清生化、电解质、甲状腺功能、肿瘤标志物、血清免疫学检测        |
| 2  | 橘红色 | 促凝剂       | 主要用于急诊生化检测                              |
| 3  | 黄色  | 惰性分离胶及促凝剂 | 主要用于血清生化、电解质、药物、艾滋病、甲状腺功能、肿瘤标志物、血清免疫学检测 |
| 4  | 绿色  | 肝素        | 主要用于红细胞脆性试验、红细胞压积测定、血液流变学检测、TORCH筛查     |
| 5  | 紫色  | EDTA      | 主要用于血常规检查及血氨、糖化血红蛋白检测                   |
| 6  | 蓝色  | 柠檬酸钠      | 主要用于纤溶系统和凝血功能检测, 如凝血酶原时间、血小板功能、纤维蛋白等    |
| 7  | 黑色  | 枸橼酸钠      | 主要用于血沉检测                                |
| 8  | 灰色  | 草酸钾/氟化钠   | 主要用于血糖检测                                |

全血长期暴露于室温是分析前阶段影响蛋白质稳定性的一个主要风险。显然,样品的收集、处理和之间的时间间隔应该尽可能缩短,以获得高质量的样品并保持成分的完整性。理想情况下,血液应该在采集后立即分离成细胞和液体成分,这对于采血后的血浆制备、细胞因子分析尤为重要。一般而言,离心后应小心吸取血浆上清液,不要直接接触血沉棕黄层,以免被血细胞污染;不建议在处理前将样品冰运或将全血储存在冰箱中,因为这可能会产生凝血因子<sup>[32]</sup>。大量研究表明,离心前全血储存的时间越长,温度越高,血浆蛋白水平越高<sup>[33]</sup>。每种蛋白质的净变化可能是由蛋白质降解与血细胞和血小板的蛋白质渗漏之间的动态平衡引起的,显著上调的蛋白质可能是在血液长期储存期间从血细胞中释放到血浆中的<sup>[34]</sup>。大多数研究认为,血浆应在采集后2 h内与血细胞分离。Kamlage等<sup>[35]</sup>也证明了血液处理时间(即从血液收集、离心到冷冻的时间以及从解冻样品到分析的时间)应尽可能缩短,最好在2 h以内。但是,与上述不同的是,Hassis等<sup>[36]</sup>却发现在不添加蛋白酶抑制剂的情况下,处理前后的血浆蛋白在室温下可稳定数小时。

温度是蛋白质处理过程中的另一变量。处理过程的温度会影响样品的质量,因为蛋白质稳定性和酶活性与温度有关:降解过程,特别是酶降解过程,在低温下会显著减少,因此在样品处理过程中保持低温可以减少蛋白质降解。研究发现,血液样品在处理前4 °C储存24 h对血浆样品中蛋白质的完整性没有显著影响<sup>[37]</sup>。全血和EDTA血浆可以在4 °C储存24 h,而在常温下应限制在2 h内<sup>[31]</sup>。

### 3.3.2 离心步骤

一般建议采集血液样本后,应在15~24 °C以2 500 g离心10 min<sup>[27]</sup>。此外,研究发现,在相同的实验条件(时间和温度)下,单次离心与双离心血浆的相对蛋白质丰度没有显示出显著差异<sup>[36]</sup>。

### 3.4 血液储存及反复冻融

快速冷冻结合缓慢解冻可能对许多血浆蛋白产生严重损伤,这种损伤主要归因于重结晶过程。因此,Bernini等<sup>[37]</sup>在2011年制定的用于蛋白质组学研究的分析前处理标准操作程序(standard operating procedure, SOP)中明确强调,应避免分析冻融标本。但是,也有证据表明,冻融循环对血浆蛋白质谱的影响微乎其微<sup>[36]</sup>。Mateos等<sup>[38]</sup>也认为,至少在受控解冻时间不超过1 h的情况下,使用多达3次冻融循环的血浆样本可能对临床蛋白质组学研究来说

是潜在可接受的。但对于不稳定的标志物的研究,建议立即分析,或迅速-80 °C冷冻,或将原始样品分成单独的等分试样-80 °C储存,以避免重复冻融和交叉污染。

### 3.5 溶血

溶血是指红细胞破裂或被破坏,导致血红蛋白和其他细胞内容物释放到周围环境中。体外溶血是现代临床实验室中不良样本产生的主要原因,因为溶血与样本中的溶血红细胞含量有关,它改变了人血清的蛋白质组成<sup>[29]</sup>。许多潜在因素会造成体外溶血,如静脉穿刺困难、采血装置使用不当、采血技术不熟练,以及静脉穿刺后样本处理不当(如血液管混合不充分或过度)等。血液采集后造成体外溶血的其他原因还包括不适当的运输方式(长时间运输、暴露于不适当的环境条件、对样本的物理创伤)、分离样本时不适当的离心条件(如离心力过大)或样本的延迟离心等<sup>[39]</sup>。发生溶血后,样品中多种生理成分如血红蛋白、胆红素、磷脂等明显增加,这些成分可能会影响溶血样品的检测,导致检测数据不准确。在实际样品中,不可能保持溶血水平的恒定,因此溶血样品一般不建议应用于蛋白质组学分析<sup>[40]</sup>。

## 4 脑脊液蛋白质组学分析前因素

脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)是由脉络丛产生的一种无色透明的液体,包围并支持着整个脑和脊髓,保护大脑免受冲击,以及避免与头骨接触造成损害<sup>[41]</sup>。除了保护大脑,CSF还通过调节电解质浓度和运输神经递质和激素来维持中枢神经系统(central nervous system, CNS)稳态<sup>[42-44]</sup>。与其他生物体液相比,CSF能更准确地反映脑和脊髓的疾病相关病理:CSF分析,特别是CSF蛋白质组学研究,已成为许多CNS疾病的诊断工具,并广泛应用于神经退行性疾病的生物标志物研究<sup>[10, 45-51]</sup>。

CSF与神经系统疾病的病变部位密切接触,相对容易取样,是寻找分子生物标志物的重要材料来源。然而,CSF的蛋白质组学分析一直具有挑战性:由于蛋白质浓度低,蛋白质丰度动态范围大,导致定量精度低、通量小,蛋白质组研究深度有限<sup>[52]</sup>。为了获得可靠的结果并降低检测错误风险,正确处理样品并控制分析前因素对蛋白质组研究非常重要。因此,CSF蛋白质组学研究的重要注意事项为样本的正确采集和储存,以最大限度地减少血液污染,并最大限度地提高蛋白质的稳定性<sup>[34]</sup>。

#### 4.1 患者准备

临床上一般通过腰椎穿刺、枕下穿刺或通过脑室外引流直接从侧脑室收集 CSF, 最常见的收集方法是腰椎穿刺。在进行腰椎穿刺前, 必须检查适应证和禁忌证, 并得到患者同意。急性或慢性脑膜炎、脑炎、肌炎、神经根炎和(多)神经炎构成了腰椎穿刺的核心适应证, 此外, 怀疑中枢神经系统感染或蛛网膜下腔出血是腰椎穿刺的紧急适应证<sup>[46, 53]</sup>。腰椎穿刺禁忌证包括颅内压增高、出血倾向、败血症、脊柱异常、穿刺部位炎症及妊娠等。

#### 4.2 CSF采集

腰椎穿刺采集 CSF 时, 患者一般采取固定体位: 即侧躺, 腿在膝关节处弯曲, 臂在手肘关节处弯曲, 并向胸部靠拢。成年人的腰椎穿刺应在腰椎的第 3 和第 4 或第 4 和第 5 椎间隙之间进行<sup>[54]</sup>。穿刺针的选择取决于解剖条件和采集人员的经验。如果可能, 应使用无创穿刺针, 以减少穿刺后综合征。老年或肥胖患者首选锋利的针头, 必要时也适用于可能出现穿刺困难的情况。为了避免重复腰椎穿刺, 应采集足够量的 CSF (至少 10 mL)。同时, 采集的 CSF 样本应立即送往专业实验室, 以便在 2 h 内进行紧急和基本 CSF 分析。收集和储存 CSF 的容器也会影响结果, 倾向于形成聚集体的蛋白质, 如 A $\beta$ 1-42, 特别容易被某些采集管材料(如玻璃或聚苯乙烯)吸收, 导致 AD 诊断中的假阳性结果, 因此建议使用聚丙烯管, 或使用硅化玻璃制成的无菌管, 但这些材料可能会引起单核细胞的黏附增加<sup>[53, 55]</sup>。

#### 4.3 CSF处理与储存

在一项关于分析前因素对 CSF 蛋白质组稳定性影响的研究中, Rosenling 等<sup>[56]</sup>评估了 CSF 采集后延迟储存、冻融次数、胰蛋白酶消化后 4 °C 储存这三个参数对 CSF 蛋白质组的影响。研究发现, 采集 CSF 后将其置于室温下会导致蛋白质组发生变化, 并且这些变化在采样后的 30 min 内最为明显; 同时, 反复冻融可引起甲状腺素转位肽水平的变化; 此外, 在自动进样器中 4 °C 保存的胰蛋白酶消化样品中, 前列腺素 D 合成酶和血清转铁蛋白的肽峰面积时间依赖性降低。与以上结果类似, Huang 等<sup>[34]</sup>也发现, CSF 中的 cathepsin H、ENTPD5 和 WWP2 的水平在延迟处理(小于 6 h)时也发生了变化。但是也有研究发现, 离心后的人 CSF 蛋白质组在室温下可稳定长达 2 h<sup>[57]</sup>。这些结果总体表明, CSF 样本采集后应立即离心, 快速冷冻, 于 -80 °C 保存, 并尽可能避免反复冻融。

### 5 尿液蛋白质组学分析前因素

尿液是一种容易获得和低成本的非侵入性样本, 可以频繁和无创地大量收集<sup>[58]</sup>, 是反映身体早期变化的敏感疾病标志物的来源。由于体内平衡机制的控制, 血液中的早期微小变化被消除, 而尿液收集来自全身的废物, 成分比血液更丰富, 被认为是更好的生物标志物来源<sup>[59]</sup>。尿液不仅可以用于疾病诊断和预后, 并且可用于长期监测疾病进展和治疗反应。

已有蛋白质组学研究利用尿液及其亚组分来鉴定疾病生物标志物<sup>[60]</sup>, 这种快速发展的新方法被命名为“尿组学”<sup>[61]</sup>。作为一种改良的血浆超滤液, 尿液蛋白质浓度仅为血浆的 1/1 000; 但与血浆蛋白相比, 尿蛋白和肽的复杂性较低, 稳定性较高<sup>[62, 63]</sup>。尿液不仅含有肾脏和尿路蛋白, 还含有来自远端器官(包括大脑)的过滤血浆蛋白, 尿蛋白分析有望为泌尿生殖系统和非肾脏疾病提供诊断和预后指标<sup>[64, 65]</sup>。尿蛋白质组学可以通过鉴定差异表达的蛋白质, 在总或分级尿液中提供与疾病发展相关的线索<sup>[66]</sup>。然而, 目前处理和储存尿液样本的方法尚未有系统标准, 无法为推进尿液生物标志物研究提供最佳条件<sup>[67]</sup>。尿液蛋白质组学分析前因素包括采集方法、短期和长期储存温度和持续时间、加工技术和试剂使用, 了解每个阶段对生物标志物研究的影响, 有望为该领域未来的高质量研究提供信息, 并批判性地审查该领域的其他研究。

#### 5.1 患者准备

影响患者尿液蛋白质组学分析结果的因素如下: (I) 过去 3 d 内是否剧烈运动; (II) 过去一周内是否有药物使用史; (III) 长期吸烟和酗酒史; (IV) 泌尿系统疾病史; (V) 代谢异常史; (VI) 可能影响检查结果的任何其他疾病史<sup>[68]</sup>。

#### 5.2 尿液采集

大多数尿液生物标志物研究会规定尿液采集的时间和方式。通常情况下, 一般建议避免第一次晨尿样本, 虽然第一次晨尿样本由于其浓缩性质而被认为提供了最丰富的尿液特征, 但这些样本对于测量尿液生物标志物并不理想, 因为它们容易受到细菌和上皮细胞污染。女性尿液样本尤其如此: 女性首次排尿尿液与中段尿液样本的比较表明蛋白质的比例存在显著差异。因此, 第二次晨尿或随机中段尿样更适合研究蛋白质生物标志物。尿液采集建议采集清洁中段尿液于无菌标本杯中, 并记录采集

时间<sup>[69]</sup>。

### 5.3 尿液处理与储存

通常,尿液样本采集后应立即处理。如果无法做到这一点,应将样品在4 °C下短期储存(少于24 h)并记录保存时间,尽量减少室温下的储存。长期储存是另一个重要的考虑因素,与-20 °C储存相比,-80 °C储存的尿液样品中蛋白质的稳定性显著提升。此外,在储存之前,应将样品低速离心,收集上清液并将其等分,于-80 °C冷冻,并记录冷冻时间<sup>[69, 70]</sup>。但是,有报道指出,在离心过程中,显示聚集和沉淀趋势的蛋白质可能会被去除,特别是在尿液蛋白质含量显著升高的患者中,除去的沉淀物中可能存在标志物蛋白或潜在疾病标志物蛋白,因此为了进行可靠的分析,此类研究应使用未离心和充分混合的全尿液样品<sup>[58]</sup>。

### 5.4 尿液添加剂

对于蛋白质组学研究,一般不建议使用蛋白酶抑制剂或添加防腐剂以防止细菌过度生长,但目前还存在争议。由于尿液中的蛋白酶相对缺乏,因此尿液样本不需要蛋白酶抑制剂。研究表明,蛋白酶抑制剂对储存的尿液样本中的蛋白质类型或含量没有显著影响<sup>[69]</sup>。其他防止细菌过度生长的试剂,如叠氮化钠和硼酸,虽然不建议使用,但应根据目的生物标志物的作用机制仔细斟酌<sup>[65]</sup>。

## 6 小结

本文主要总结了以血液、CSF及尿液为代表的体液蛋白质组学研究的分析前因素。除此之外,唾液及泪液等其他体液蛋白质组学也不断发展,从唾液和泪液样本中提取独特生物标志物已成为诊断病情和监测疾病进展的一种手段<sup>[71,72]</sup>。

选择最合适的样品进行蛋白质组学研究是非常必要的,而在确定样品类型时,还必须考虑目标化合物的稳定性。大量研究表明,样品的稳定性受到分析前变量的影响,如样品采集、处理和储存程序。在临床蛋白质组学研究中,分析前因素对化合物稳定性和完整性的影响至关重要。减少检测过程中不确定性的主要方法之一是引入SOP,这可以有效地减少可能危害样本质量和检测可靠性的随机错误。此外,标准化操作可以比较实验室之间的数据,有助于确认和改进检测方法。特别值得注意的是,在临床及实验室操作中,不仅要关注分析前因素,更要注重分析及分析后阶段。因此,研究设计、实验操作和数据分析每个阶段都很重要,这将促进以蛋

白质为基础的生物标志物研究不断向前发展。

### [参 考 文 献]

- [1] Duong VA, Lee H. Bottom-up proteomics: advancements in sample preparation. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 5350
- [2] Han J, Agarwal A, Young JN, et al. Proteomic profiling of a patient with cutaneous melanoma metastasis regression following topical contact sensitizer diphenylprone and immune checkpoint inhibitor treatment. *Sci Rep*, 2022, 12: 22364
- [3] La Y, Xu C, Wang B, et al. Proteomic characterization of gastric cancer response to chemotherapy and targeted therapy reveals potential therapeutic strategies. *Nat Commun*, 2022, 13: 6749
- [4] Uversky VN, Alghamdi MF, Redwan EM. A bird's-eye view of proteomics. *Curr Protein Peptide Sci*, 2021, 22: 574-83
- [5] Wilkins M. Proteomics data mining. *Expert Rev proteomics*, 2009, 6: 599-603
- [6] Letunica N, Van Den Helm S, Mccafferty C, et al. Proteomics in thrombosis and hemostasis. *Thromb Haemost*, 2021, 122: 1076-84
- [7] Bruzek S, Betensky M, Di Paola J, et al. What can the plasma proteome tell us about platelets (and vice versa)? *Platelets*, 2023, 34: 2186707
- [8] Gonçalves E, Poulos RC, Cai Z, et al. Pan-cancer proteomic map of 949 human cell lines. *Cancer Cell*, 2022, 40: 835-49
- [9] Martinez-Val A, Guzmán UH, Olsen JV. Obtaining complete human proteomes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2022, 23: 99-121
- [10] Raghunathan R, Turajane K, Wong LC. Biomarkers in neurodegenerative diseases: proteomics spotlight on ALS and Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 9299
- [11] Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, et al. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. *Methods Mol Biol*, 2021, 2228: 85-116
- [12] Ding Z, Wang N, Ji N, et al. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. *Mol Cancer*, 2022, 21: 53
- [13] Mund A, Brunner AD, Mann M. Unbiased spatial proteomics with single-cell resolution in tissues. *Mol Cell*, 2022, 82: 2335-49
- [14] Duong VA, Park JM, Lee H. A review of suspension trapping digestion method in bottom-up proteomics. *J Sep Sci*, 2022, 45: 3150-68
- [15] Rotello RJ, Veenstra TD. Mass spectrometry techniques: principles and practices for quantitative proteomics. *Curr Protein Peptide Sci*, 2021, 22: 121-33
- [16] Cao Z, Yu LR. Mass spectrometry-based proteomics for biomarker discovery. *Methods Mol Biol*, 2022, 2486: 3-17
- [17] Florens L, Dong MQ, Labaer J. Second special issue on methods for omics research: proteome research and beyond. *J Proteome Res*, 2023, 22: 1381-4
- [18] Mendes ML, Dittmar G. Targeted proteomics on its way to discovery. *Proteomics*, 2022, 22: e2100330
- [19] Lu K, Li H. Proteomics and autophagy research. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1208: 373-86

- [20] Pedde RD, Li H, Borchers CH, et al. Microfluidic-mass spectrometry interfaces for translational proteomics. *Trends Biotechnol*, 2017, 35: 954-70
- [21] Feng X, Jia SN, Ali MM, et al. Proteomic discovery and array-based validation of biomarkers from urinary exosome by supramolecular probe. *J Proteome Res*, 2023, 22: 2516-24
- [22] Feng X, Shen A, Zhang W, et al. High-throughput capture and *in situ* protein analysis of extracellular vesicles by chemical probe-based array. *Nat Protoc*, 2024, doi: 10.1038/s41596-024-01082-z
- [23] Vignoli A, Tenori L, Morsiani C, et al. Serum or plasma (and which plasma), that is the question. *J Proteome Res*, 2022, 21: 1061-72
- [24] Deutsch EW, Omenn GS, Sun Z, et al. Advances and utility of the human plasma proteome. *J Proteome Res*, 2021, 20: 5241-63
- [25] Cavalcante JDS, De Almeida DEG, Moraes MS, et al. Challenges and opportunities in clinical diagnostic routine of envenomation using blood plasma proteomics. *Toxins (Basel)*, 2023, 15: 180
- [26] Soni RK. High-throughput plasma proteomic profiling. *Methods Mol Biol*, 2022, 2546: 411-20
- [27] McCafferty C, Letunica N, Swaney E, et al. Blood collection processing and handling for plasma and serum proteomics. *Methods Mol Biol*, 2023, 2628: 33-40
- [28] Radović MK, Ljubičić J, Očić T, et al. Blood collection failures from a blood establishment perspective. *Transfus Med*, 2021, 31: 88-93
- [29] Huang J, Olsson T, Kockum I. Overlapping protein profile of first-episode psychosis patients and common handling markers may indicate presence of preanalytical variability. *Brain Behav Immun*, 2023, 113: 302
- [30] Rai AJ, Vitzthum F. Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3: 409-26
- [31] Kurz C, Stockl L, Schruers I, et al. Impact of pre-analytical sample handling factors on plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2023, 165: 95-105
- [32] Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, et al. International council for standardization in haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*, 2021, 43: 1272-83
- [33] Daniels JR, Cao Z, Maisha M, et al. Stability of the human plasma proteome to pre-analytical variability as assessed by an aptamer-based approach. *J Proteome Res*, 2019, 18: 3661-70
- [34] Huang J, Khademi M, Lindhe Ö, et al. Assessing the preanalytical variability of plasma and cerebrospinal fluid processing and its effects on inflammation-related protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100157
- [35] Kamlage B, Maladonado SG, Bethan B, et al. Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem*, 2014, 60: 399-412
- [36] Hassis ME, Niles RK, Braten MN, et al. Evaluating the effects of preanalytical variables on the stability of the human plasma proteome. *Anal Biochem*, 2015, 478: 14-22
- [37] Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR*, 2011, 49: 231-43
- [38] Mateos J, Carneiro I, Corrales F, et al. Multicentric study of the effect of pre-analytical variables in the quality of plasma samples stored in biobanks using different complementary proteomic methods. *J Proteomics*, 2017, 150: 109-20
- [39] Lippi G, Plebani M, Di Somma S, et al. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2011, 48: 143-53
- [40] Mitra V, Govorukhina N, Zwanenburg G, et al. Identification of analytical factors affecting complex proteomics profiles acquired in a factorial design study with analysis of variance: simultaneous component analysis. *Anal Chem*, 2016, 88: 4229-38
- [41] Johnson ECB, Bian S, Haque RU, et al. Cerebrospinal fluid proteomics define the natural history of autosomal dominant Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2023, 29: 1979-88
- [42] Van Zalm PW, Ahmed S, Fatou B, et al. Meta-analysis of published cerebrospinal fluid proteomics data identifies and validates metabolic enzyme panel as Alzheimer's disease biomarkers. *Cell Rep Med*, 2023, 4: 101005
- [43] Proulx ST. Cerebrospinal fluid outflow: a review of the historical and contemporary evidence for arachnoid villi, perineural routes, and dural lymphatics. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78: 2429-57
- [44] Mazzitelli JA, Smyth LCD, Cross KA, et al. Cerebrospinal fluid regulates skull bone marrow niches via direct access through dural channels. *Nat Neurosci*, 2022, 25: 555-60
- [45] Naseri Kouzehgarani G, Feldsien T, Engelhard HH, et al. Harnessing cerebrospinal fluid circulation for drug delivery to brain tissues. *Adv Drug Del Rev*, 2021, 173: 20-59
- [46] Dammer EB, Ping L, Duong DM, et al. Multi-platform proteomic analysis of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid and plasma reveals network biomarkers associated with proteostasis and the matrisome. *Alzheimers Res Ther*, 2022, 14: 174
- [47] Shuken SR, Rutledge J, Iram T, et al. Limited proteolysis-mass spectrometry reveals aging-associated changes in cerebrospinal fluid protein abundances and structures. *Nat Aging*, 2022, 2: 379-88
- [48] Pinnell JR, Cui M, Tieu K. Exosomes in Parkinson disease. *J Neurochem*, 2021, 157: 413-28
- [49] Petyuk VA, Yu L, Olson HM, et al. Proteomic profiling of the substantia nigra to identify determinants of lewy body pathology and dopaminergic neuronal loss. *J Proteome Res*, 2021, 20: 2266-82
- [50] Chelliah SS, Bhuvanendran S, Magalingam KB, et al. Identification of blood-based biomarkers for diagnosis and prognosis of Parkinson's disease: a systematic review of

- proteomics studies. *Ageing Res Rev*, 2022, 73: 101514
- [51] Johnson ECB, Dammer EB, Duong DM, et al. Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation. *Nat Med*, 2020, 26: 769-80
- [52] Karayel O, Virreira Winter S, Padmanabhan S, et al. Proteome profiling of cerebrospinal fluid reveals biomarker candidates for Parkinson's disease. *Cell Rep Med*, 2022, 3: 100661
- [53] Tumani H, Petereit HF, Gerritzen A, et al. S1 guidelines "lumbar puncture and cerebrospinal fluid analysis" (abridged and translated version). *Neurol Res Pract*, 2020, 2: 8
- [54] Czarniak N, Kamińska J, Matowicka-Karna J, et al. Cerebrospinal fluid-basic concepts review. *Biomedicines*, 2023, 11: 1461
- [55] Dursun E, Alaylıoğlu M, Bilgiç B, et al. Amyloid beta adsorption problem with transfer plates in amyloid  $\beta$  1-42 IVD kits. *J Mol Neurosci*, 2019, 67: 534-9
- [56] Rosenling T, Slim CL, Christin C, et al. The effect of preanalytical factors on stability of the proteome and selected metabolites in cerebrospinal fluid (CSF). *J Proteome Res*, 2009, 8: 5511-22
- [57] Bischoff R, Luider TM, Van Gool AJ, et al. The impact of delayed storage on the measured proteome and metabolome of human cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, 2011, 57: 1703-11
- [58] Garbicz D, Pilżys T, Wiśniowski I, et al. Replacing centrifugation with mixing in urine analysis enriches protein pool in the urine samples. *Anal Biochem*, 2021, 628: 114284
- [59] Gao Y. On research and translation of urinary biomarkers. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1306: 101-8
- [60] Bruschi M, Ravera S, Santucci L, et al. The human urinary exosome as a potential metabolic effector cargo. *Expert Rev Proteomics*, 2015, 12: 425-32
- [61] Vaidyanathan K. Urinary proteomics and metabolomics in the diagnosis of pediatric disorders. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9: 482-9
- [62] Danilova EY, Maslova AO, Stavrianidi AN, et al. CKD urine metabolomics: modern concepts and approaches. *Pathophysiology*, 2023, 30: 443-66
- [63] Spasovski G, Rambabova-Bushljetik I, Trajceska L, et al. Urinary proteomics in kidney transplantation. *Pril (Makedon Akad Naukite Umet Odd Med Nauki)*, 2021, 42: 7-16
- [64] Virreira Winter S, Karayel O, Strauss MT, et al. Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease. *EMBO Mol Med*, 2021, 13: e13257
- [65] Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM. Sample treatment for urine proteomics. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1073: 125-35
- [66] Raimondo F, Cerra D, Magni F, et al. Urinary proteomics for the study of genetic kidney diseases. *Exp Rev Proteomics*, 2016, 13: 309-24
- [67] Chang C, Obeid W, Thiessen-Philbrook H, et al. Sample processing and stability for urine biomarker studies. *J App Lab Med*, 2021, 6: 1628-34
- [68] Jiang J, Liu H, Ni W, et al. Variable control and its influence before urine sample analysis in a field environment. *Biopreserv Biobank*, 2024, 22: 145-56
- [69] Kowalewski NN, Forster CS. Collection, processing, and storage consideration for urinary biomarker research. *J Vis Exp*, 2021, doi: 10.3791/62453
- [70] Moatamed NA. Biobanking of urine samples. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 115-24
- [71] Shen A, Feng X, Wang DX, et al. High-throughput proteomic analysis of extracellular vesicles from saliva by chemical probe-based array. *Anal Chim Acta*, 2024, 1309: 342699
- [72] George CT, Kurien B, Scofield RH, et al. The potential utility of salivary and tear proteomics to discriminate Sjögren's disease from non-Sjögren's sicca. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 17497