

• 研究报告 •

高友鹤 医学博士、理学博士，北京师范大学教授。研究方向为尿液生物标志物，提出由于尿液不像血液那样受身体稳态效应的控制，能够汇集大量的疾病相关变化，可以更好地反映早期微小的变化，是生物标志物的更好体液来源。曾在美国哈佛医学院做博士后训练，并任讲师。曾任中国医学科学院特聘教授。全国生化分子生物学会蛋白质组学专业委员会委员。是全国百篇优秀博士论文指导教师，国家杰出青年基金获得者，*URINE* 杂志创刊主编。



大鼠急性低氧模型尿液蛋白质组的变化

鲍艺今¹，成祥²，朱玲玲²，范明²，高友鹤¹

1 北京师范大学 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室，北京 100875

2 军事认知与脑科学研究所，北京 100850

鲍艺今，成祥，朱玲玲，范明，高友鹤. 大鼠急性低氧模型尿液蛋白质组的变化. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3878-3887.

BAO YJ, CHENG X, ZHU LL, FAN M, GAO YH. Changes in the urine proteome in an acute hypoxic rat model. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3878-3887.

摘要：本研究旨在探究急性低氧对大鼠尿液蛋白质组造成的影响。在该项研究中，大鼠被放置于模拟海拔 5 000 m 高原环境的低氧舱内 24 h。在低氧后 0、12、24 h 收集尿液样本，并使用液相色谱-串联质谱技术 (LC-MS/MS) 对尿蛋白进行分析。与低氧 0 h 相比，低氧 12 h 组共鉴定到 144 个差异蛋白，低氧 24 h 组共鉴定到 129 个差异蛋白。功能分析显示，差异蛋白参与了一系列与低氧应激有关的生物学通路，如抗氧化应激、糖酵解、补体和凝血级联反应等。研究表明，尿液蛋白质组可以反映急性低氧刺激后的显著变化。这些发现可能提供了一种判断机体缺氧状态的方法，有助于辅助检测缺氧状态。

关键词：蛋白质组学；尿液；低氧；动物模型

Received: March 9, 2022; **Accepted:** June 8, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0910202); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2020KJZX002); Beijing Normal University (11100704)

Corresponding author: GAO Youhe. E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn

基金项目：国家重点研发计划 (2018YFC0910202); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2020KJZX002); 北京师范大学项目 (11100704)

Changes in the urine proteome in an acute hypoxic rat model

BAO Yijin¹, CHENG Xiang², ZHU Lingling², FAN Ming², GAO Youhe¹

¹ Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

² Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: The purpose of this study was to explore the effect of acute hypoxia on urine proteome in rats. In this study, rats were placed in a hypoxic chamber simulating a plateau environment at an altitude of 5 000 m for 24 hours. Urine samples were collected at 0, 12, and 24 h after hypoxia. Urinary proteins were profiled using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Compared with the control (before hypoxia), a total of 144 differentially expressed proteins were identified in the hypoxia 12 h group, and 129 differentially expressed proteins were identified in the hypoxia 24 h group. Functional annotation analysis revealed that these differentially expressed proteins were involved in a series of biological pathways related to hypoxic stress, such as anti-oxidative stress, glycolysis, complement and coagulation cascade. Our results suggest that the urinary proteome can reflect significant changes upon acute hypoxic stimulation. These findings may provide an approach to judge the hypoxia state of the body and help to assist the detection of hypoxia state.

Keywords: proteomics; urine; hypoxia; animal model

高原地区具有气温低、温差大和紫外线辐射强等特点^[1], 而低压低氧则是其最主要的特征^[2]。医学上的高原通常是指海拔 3 000 m 以上的地区。随着海拔高度增加, 大气氧分压逐渐下降, 人体血氧饱和度急剧下降, 常出现低氧症状^[3]。

全球有将近 1.4 亿人居住在海拔 2 500 m 以上的高原地区, 每年约有 4 000 万人来到高原地区工作或者休闲旅游^[4]。在中国有 6 000 万人生活在广阔的高原地区^[5]。正是因为特殊的地理居住环境, 也导致了高原人群具有一些特殊的生理特点。与低海拔人群相比, 其脑耗氧量增大, 呼吸系统的肺通气量和肺泡内氧分压增高。此外, 长期居住在低氧环境也会引起红细胞过度增多和血细胞比容升高, 这会导致血液粘度增加和流速减慢, 使得高原地区脑血管病的发病率高于平原地区。另一方面, 对于初次

进入高原的人群来说, 低氧是高原对其最大的挑战。不适应高原可能会导致一些高原疾病, 轻者恶心、头晕、失眠、心悸、呼吸急促, 严重的甚至会危及生命如高原肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE)、高原红细胞增多症 (high altitude polycythemia, HAPC) 和高原脑水肿 (high altitude cerebral edema, HACE) 等^[6]。我们希望能够动态监察高原人群的缺氧损伤进展, 准确判断机体高原缺氧程度, 以便对患者进行及时、精准的治疗。同时, 更好地了解低氧引起的细胞或器官功能的改变也为开发新的生理病理候选物以揭示高原缺氧的潜在发病机制并改进对缺氧相关疾病的治疗是重要且必要的。

疾病进程涉及不同的生物过程, 在不同的时间点表现出不同的病理生理状态, 因此在不同的阶段应该有不同的生物标志物。尿液作为

一种理想的疾病生物标志物来源, 由于没有稳态调节机制的影响, 可以敏感、及时地反映病理变化^[7]。我们实验室利用蛋白组学技术已经在多种疾病动物模型中发现, 病理变化出现之前, 尿液蛋白质就发生了变化^[8], 这些结果表明尿液蛋白质组可以富集到机体产生的早期变化。再者尿液收集无创简单并可以连续收集, 从而能够实现疾病的动态监测。

本研究首次利用尿液蛋白质组学研究急性低氧对大鼠的影响, 通过低氧舱模拟海拔 5 000 m 的高原低氧条件, 对低氧后 0、12、24 h 的尿液进行非标记定量蛋白组学分析, 拟探究急性低氧刺激 (即快速进入海拔 5 000 m 低氧环境) 对大鼠尿液蛋白质组造成的影响, 寻找与低氧应激相关的尿蛋白变化。旨在为后续在尿液中寻找低氧的早期特异性生物标志物进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立

1.1.1 大鼠代谢笼的改造

将大鼠放置在小鼠用规格的代谢笼中进行尿液收集, 代谢笼改用直径为 15 cm, 网隙为 1 cm 的筛网滤过食物残渣及粪便。

1.1.2 低氧模型的建立

无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (170–190 g) 5 只, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 所有动物在标准环境 (室温 (22±1) °C, 湿度 65%–70%) 下饲养, 动物实验通过北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准 (编号: CLS-EAW-2020-034)。

建立方法: 实验大鼠放置于低氧舱内, 模拟海拔 5 000 m 高原环境饲养, 低氧舱内氧气浓度为 11.6%。本实验使用自身对照, 常氧条

件下收集的尿液样本即为对照组, 时间记为 T0。低氧 12 h 和 24 h 后收集的尿液样本是实验组, 时间分别记为 T1 和 T2。

1.2 尿液的收集

将大鼠每个个体均单独放置于大鼠改造代谢笼中, 在低氧条件下 0、12、24 h 后分别设置 T0、T1、T2 取样时间点。在尿液收集期间, 提供饮水但不提供食物, 避免污染尿液。最终共计取样 15 份, 尿液用 3 000×g 离心 30 min 后取上清并将上清液放入 -80 °C 冰箱保存。

1.3 尿液蛋白的提取和蛋白酶解

取出 4 mL 尿样解冻, 于 4 °C、12 000×g 条件下离心 30 min, 去除细胞碎片, 取上清用 3 倍体积的乙醇沉淀过夜, 然后 12 000×g 离心 30 min。将蛋白沉淀重悬于裂解液 (8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 25 mmol/L 二硫苏糖醇和 50 mmol/L Tris)。用 Bradford 法测量蛋白浓度。使用滤器辅助样品制备 (filter-aided sample preparation, FASP) 方法进行尿蛋白酶解^[9]。将尿蛋白加载到 10 kDa 超滤管 (PALL 公司) 的滤膜上, 用 UA 溶液 (8 mol/L 尿素、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5)) 和 25 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液洗涤 2 次; 加入 20 mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT, Sigma) 在 37 °C 中变性 1 h, 再与 50 mmol/L 碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAA, Sigma) 在黑暗中烷基化 30 min, 用 UA 溶液和 NH₄HCO₃ 溶液洗涤 2 次, 以 1:50 比例加入胰酶 (Trypsin Gold, Promega), 37 °C 孵育过夜。过夜后离心收集酶解后的滤液即为多肽混合液。将多肽通过 HLB 柱 (Waters) 除盐后用真空干燥仪进行抽干, 置于 -80 °C 保存。

1.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

用 0.1% 的甲酸溶液复溶肽段, 使用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒对肽段浓度进行测定, 将肽段浓度稀释至

0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用 1 μg 多肽样本通过 Thermo EASY-1200 液相系统进行分离, 参数设定如下, 洗脱时间 90 min, 洗脱梯度为 (流动相 A: 0.1%甲酸; 流动相 B: 80%乙腈)。洗脱下来的肽段通过 Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific) 进行检测。对所有样品用数据依赖型采集模式 (data-independent acquisition, DDA) 进行质谱数据采集, 每个样本重复采集 3 次。

1.5 数据分析

将从液相-质谱联用采集到的原始数据 (RAW 文件), 导入 Proteome Discoverer (version 2.1, Thermo Scientific) 和 MaxQuant (version 1.6.17.0) 进行处理分析。通过 Xcalibur Qual Browser (version 3.0.63, Thermo Fisher Scientific) 检查基峰总体情况。原始数据由 MaxQuant 使用大部分的默认参数处理。所有 RAW 文件在 MaxQuant 中同一个窗口进行处理, 数据库搜索使用 Andromeda search engine (MaxQuant 中配置的搜索引擎), 数据库采用 UniProt *Rattus norvegicus* (Rat) sequence database (317, 2020; 8 137 sequences)。主搜索中前体母离子的质量容许偏差设置在 0.000 45% 以下, 碎片离子质量容许偏差设置在 0.002% 以下。消化酶设置为 trypsin/P, 最大有 2 个错切位点。最小的肽段至少包括 7 个残基。蛋白质 N 端乙酰化和蛋氨酸的氧化作为可变修饰, 半胱氨酸的脲甲基化 (半胱氨酸碘乙酰化) 作为固定修饰。由于还原烷基化以后, 二硫键被打开, 半胱氨酸会带上 carbamidomethyl 基团 (+57 Da), 在搜库时, 通常把 carbamidomethyl (C) 选为固定修饰。对于没有修饰的肽段不设置 Andromeda 评分阈值, 每一个鉴定到的修饰都有一个评分, 对应参数为 Andromeda score, 最小设为 40。肽段和蛋白的错误发现率设置

为 1% (基于目标-诱饵反相数据库 target-decoy reverse database)。选择无标记定量选项 (label-free quantification, LFQ), 使用来自 MaxQuant 的 MaxLFQ 算法。蛋白质 LFQ 强度根据至少 2 个样本中识别到的多肽的相对强度比值的中位数来进行计算, 并根据样本间的累积强度进行调整。定量使用共有和独有的肽进行, 包括那些经过乙酰化 (蛋白质 N 端) 和氧化 (Met) 修饰的肽。蛋白强度归一化需要最小肽段比为 1, 并启用“Fast LFQ”。

使用 Perseus version (version 1.6.14.0) 对数据进行预处理, 去除污染和鉴别肽段数 <1 的蛋白, 取 LFQ intensity 的 \log_2 进行归一化。缺失值或许是低于质谱检测的低丰度蛋白造成的, 也或许是随机缺失造成的, 有研究为了模拟低丰度 LFQ 值, 用中值以下高斯分布中的随机值代替缺失值, 另外也有些研究中的缺失值以 0 替换^[10-11]。本研究以 0 替换缺失值。

1.6 统计学分析

每个样品均进行了 3 次技术重复, 取 3 次平均值用于统计学分析。将实验组 (低氧 T1 组、T2 组) 鉴定到的尿蛋白分别与对照组 (常氧 T0 组) 鉴定到的尿蛋白进行对比, 筛选差异蛋白。筛选条件如下: 组间变化倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.05 , 双尾非配对 *t* 检验的 *P* 值 < 0.01。

1.7 随机分组分析

将低氧 T1 组 ($n=5$) 和常氧 T0 组 ($n=5$) 共 10 个样本随机分成两组, 在总计 126 次随机组合中, 按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目。

1.8 生物信息学分析

使用悟空平台 (<https://www.omicsolution.org/wkomic/main/>) 进行非监督聚类分析

(hierarchical cluster analysis, HCA)^[12], 使用 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 以大鼠基因组作为基因群体背景, 对 T1 与 T2 时刻鉴定到的差异蛋白进行生物学过程、细胞定位和分子功能 3 个方面的富集分析^[13]。在基于公开数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的报道研究中搜索了差异蛋白的功能。

2 结果与分析

2.1 低氧模型尿蛋白组变化

在低氧模型中, 选取 5 只大鼠的 T0、T1、T2 时刻的尿液蛋白, 进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定。该模型共鉴定到 1 162 个蛋白 (≥ 2 个特异性的多肽, 蛋白水平 FDR $<1\%$), 将其进行非监督聚类分析, 图 1 展示了具体的样本非监督聚类结果。该结果显示, T0 和 T1、T2 区别十分显著, 可以很明显地区分常氧组 (T0) 和低氧组 (T1、T2) 样品, 说明低氧对大鼠机体造成的影响是极大的。

采用自身对照的方法, 将 T1、T2 的尿蛋白分别与 T0 进行比较, 筛选标准, 组间变化倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 , $P < 0.01$, 高丰度组的平均蛋白谱图数 ≥ 3 , 且高丰度组每个样品的蛋白谱图都高于低丰度组。相对于 T0 时刻, T1 时刻鉴定到 144 个差异蛋白, 其中 88 个上调, 56 个下调; 在 T2 时刻鉴定到 129 个差异蛋白, 其中 73 个上调, 56 个下调。不同时间点鉴定到的差异蛋白的详细信息已提交国家微生物科学数据中心 (编号: NMDCX0000142)。此外, 在 T1 时刻鉴定到的差异蛋白中有 67 个是从无到有变化的蛋白, 53 个是从有到无变化的蛋白; T2 时刻鉴定到差异蛋白中 65 个是从无到有变化的蛋白; 49 个是从有到无变化的蛋白。这些从无到有或从有到无变化的差异蛋白占总差异蛋白 85% 以上。

2.2 尿液样本随机分组的结果

鉴于样本中鉴定出的蛋白质组学特征数量高于样本数量, 两组之间的差异可能是随机产生的。开发了随机分组统计分析策略以确认这些差异蛋白是否由低氧引起。将低氧 T1 组 ($n=5$) 和常氧 T0 组 ($n=5$) 共 10 个样本随机分成两组, 在总计 126 次随机组合中, 按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目为 5 (详见已提交国家微生物科学数据中心 (编号: NMDCX0000142))。这些结果表明只能随机生成 5 个差异蛋白, 进一步表明 96.5% 的差异蛋白是可靠的。将 T2 组和 T0 组的尿液样本随机分成两组, 同上操作, 随机可能筛选到的平均差异蛋白数目为 6 (详见已提交国家微生物科学数据中心 (编号: NMDCX0000142))。说明随机生成的差异蛋白为 6 个, 这进一步表明 95.3% 的差异蛋白是可靠的。由此说明, 本研究中发现的这些差异蛋白是由于低氧导致的, 而不是随机差异。

2.3 差异蛋白的功能注释

使用 DAVID 数据库对 T1 时刻鉴定到的总计 144 个差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能 3 个方面进行功能富集分析 (图 2)。生物学过程中 (图 2A), 这些差异蛋白倾向于参与谷胱甘肽代谢、内肽酶活性负调控、血管生成、细胞氧化解毒、糖酵解等。在细胞成分中 (图 2B), 大多数的差异蛋白来源于细胞外的外泌体和细胞外空间。在分子功能中 (图 2C), 这些差异蛋白倾向于钙粘蛋白结合参与细胞间粘附、钙离子结合、蛋白结合和谷胱甘肽转移酶活性等功能。为了鉴定差异蛋白参与的主要代谢通路, 进行了京都基因及基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, KEGG) 通路富集分析。结果显示, 共有 9 个代谢通路被显著富集, 其中包括谷胱甘肽代谢、氮代谢和碳代谢等 (图 2D)。

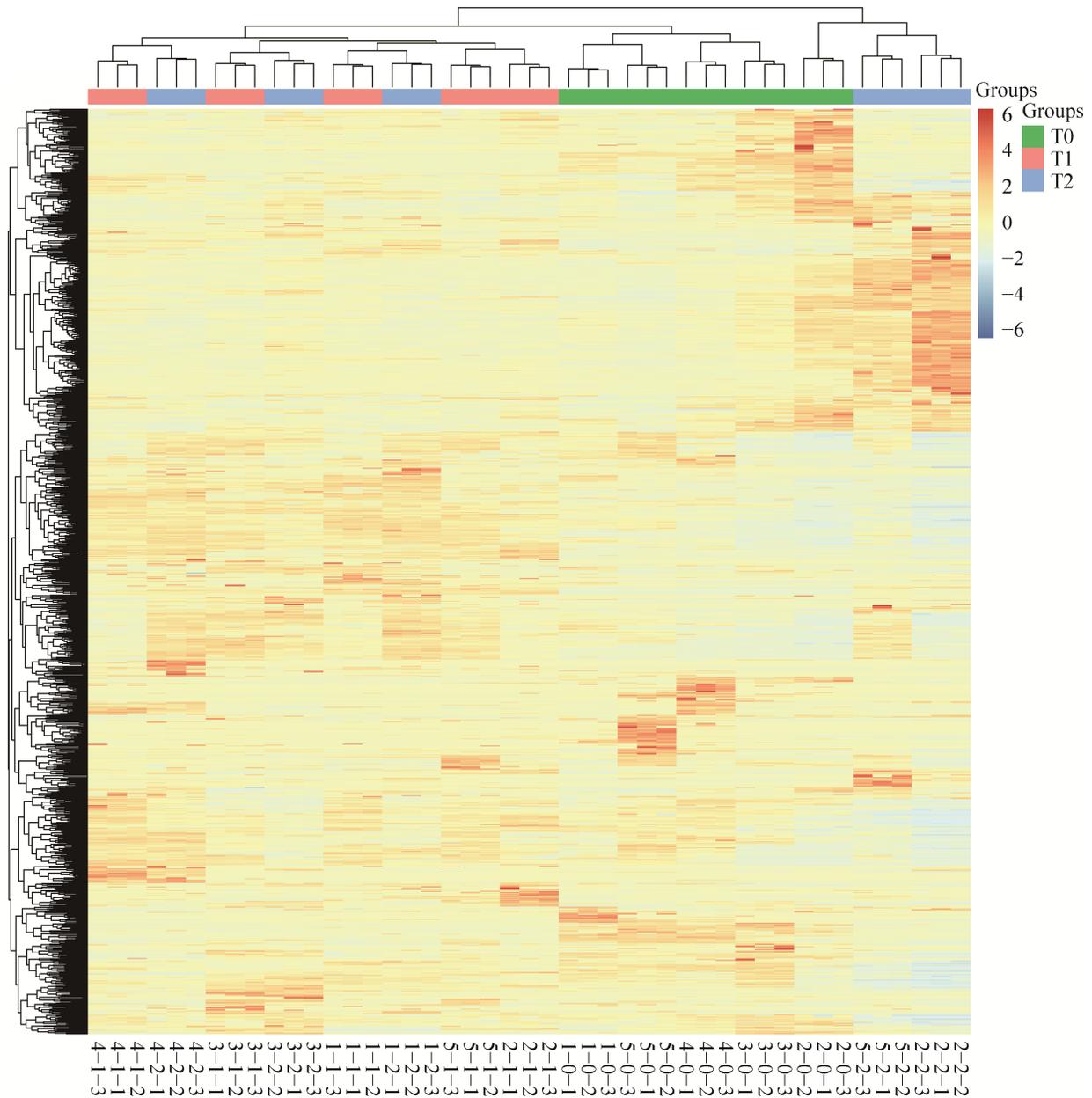


图 1 低氧组与常氧组整体尿液蛋白质组的非监督聚类分析

Figure 1 Hierarchical cluster analysis of all proteins in hypoxic and normoxic groups.

同上，使用 DAVID 数据库对 T2 时刻鉴定到的总计 129 个差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能 3 个方面进行功能富集分析 (图 3)。生物学过程中 (图 3A)，这些差异蛋白倾向于参与内肽酶活性负调控、细胞粘附、血小板聚集、血液凝固等。在细胞成分中 (图 3B)，

大多数的差异蛋白来源于细胞外的外泌体和细胞外空间。在分子功能中 (图 3C)，这些差异蛋白倾向于钙粘蛋白结合参与细胞间粘附、胶原蛋白结合、碳酸盐脱水酶的活性等功能。为了鉴定差异蛋白参与的主要代谢通路，进行了 KEGG 通路富集分析。结果显示，共有 3 个代

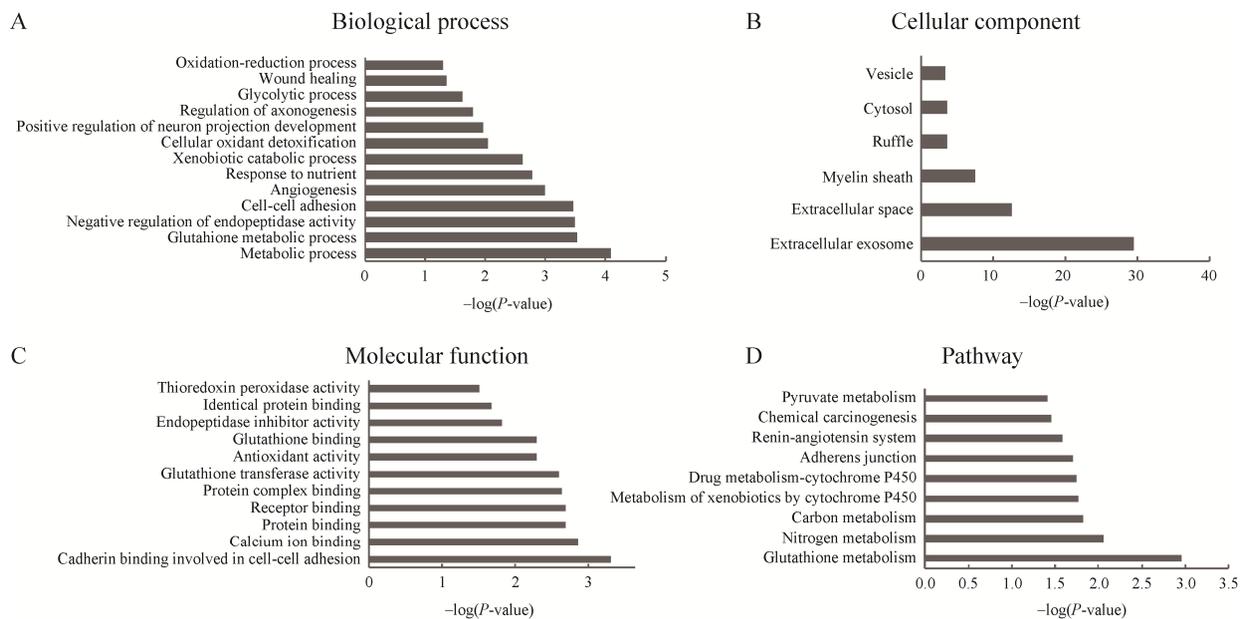


图2 T1时刻差异蛋白的功能注释

Figure 2 Functional analysis of differential proteins at T1. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function. (D) Pathways.

谢通路被显著富集，其中包括氮代谢、血小板激活、肌动蛋白细胞骨架的调节(图3D)。

对上述基于DAVID和KEGG数据库的富集结果检索相关资料后发现某些生物学过程和代谢通路和低氧有关。(1)抗氧化应激。据报道，低压缺氧引起的氧化剂会调节两个主要的抗氧化蛋白家族的活性，即过氧化物酶和硫氧还蛋白^[14]。其中硫氧还蛋白超家族的成员具有硫氧还蛋白折叠和共有活性位点序列(CxxC)，并在氧化还原调节、氧化应激防御、含二硫键蛋白的重折叠和转录因子的调节中发挥作用^[15]。(2)糖酵解。随着高海拔地区O₂水平的降低，ATP的生成从线粒体中依赖氧的氧化磷酸化过程会转变为细胞质中不依赖氧的糖酵解过程^[16]。(3)补体和凝血级联反应。有研究发现，高原地区人口的凝血相关蛋白的血浆水平高于平原地区人口^[17]。(4)血管生成。低氧会引起低氧诱导因子累积增加，从而

诱导血管内皮生长因子表达升高，血管生成增强^[18]。(5)肾素-血管紧张素系统。有研究表明，肾素-血管紧张素系统的激活与肾脏慢性缺氧有关^[19]。

与此同时，我们将两个时刻分别富集到的生物学过程比较后发现，低氧12h后主要表现为物质代谢发生改变，如谷胱甘肽代谢、糖酵解等。而低氧24h后机体从物质代谢变化趋向转为器质性变化，如血管生成、凝血等。

3 讨论

本研究建立了急性低氧大鼠模型，通过对尿液进行非标记LC-MS/MS质谱鉴定，探究海拔5000m的低氧条件对大鼠尿液蛋白质组造成的影响，了解适应低氧的过程中机体的变化，进而为寻找低氧的生物标志物奠定基础，为寻找治疗低氧血症相关疾病的药物干预靶点提供线索。结果显示，低氧12h

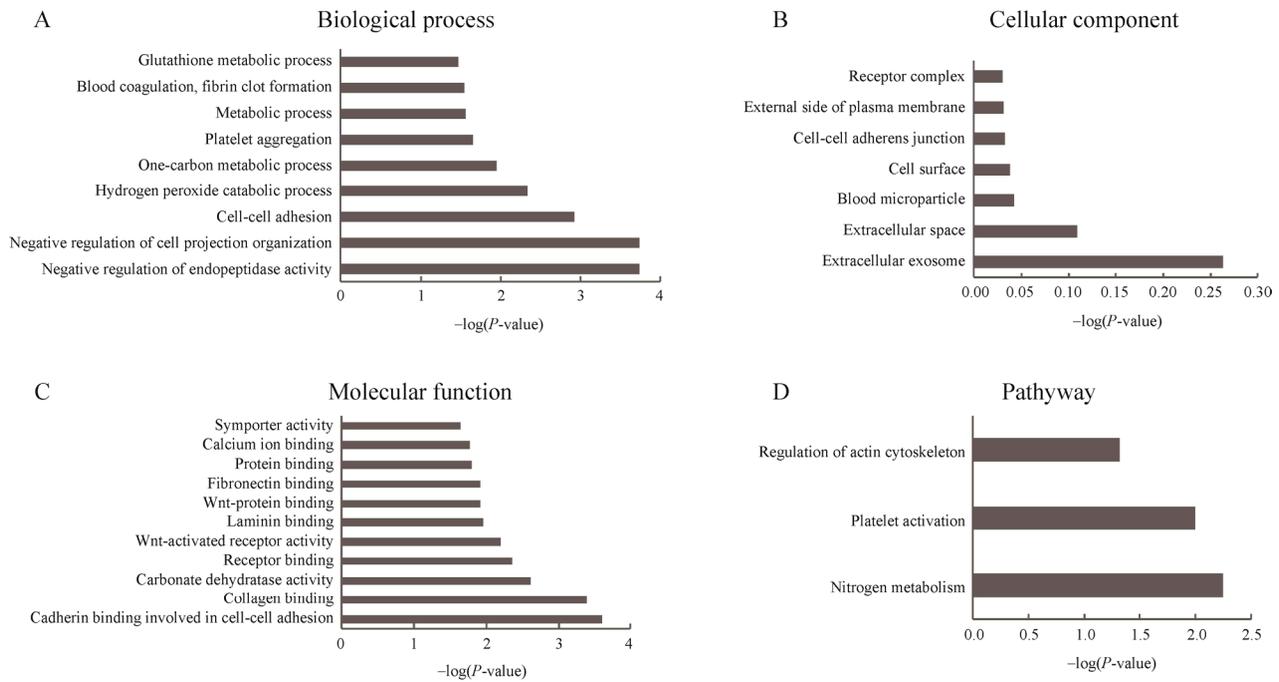


图 3 T2 时刻差异蛋白的功能注释

Figure 3 Functional analysis of differential proteins at T2. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function. (D) Pathways.

后共鉴定到 144 个差异蛋白，低氧 24 h 后共鉴定到 129 个差异蛋白，其中 104 个为两个时刻共有差异蛋白，这说明机体暴露于低氧环境后发生急性高原反应，导致生理机能发生变化。随后，随着暴露时间的延长，机体通过调动一系列代偿性低氧调节反应，如肺通气量增加^[20]、红细胞和血红蛋白增加^[21]、能量代谢方式改变^[22]等，改善机体氧的供应和利用，恢复稳态以适应高原缺氧环境，这种过程称为高原习服。

此外，在这些差异蛋白中大部分是从无到有或从有到无的变化，在我们以往做过的研究中，如高血脂、肿瘤注射^[23]、肺纤维化^[24]、阿尔茨海默病^[25]等，没有一类病理生理变化能够对尿蛋白产生如此大的影响，这表明低氧对机体所产生的影响在尿液蛋白质组中的变化是十分显著的，也体现了尿液的敏感性。

我们对每条代谢通路富集到的蛋白做进一步分析也得到了治疗低氧血症的药物干预线索。我们发现有些蛋白被多次富集出现在代谢通路中，其中以谷胱甘肽相关蛋白最为显著。谷胱甘肽转移酶和羧酰基谷胱甘肽水解酶多次被富集出现在不同的代谢通路中，包括谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、化学致癌作用。

有研究发现，大鼠在 9 000 m 海拔的环境下 24 h 后与对照组相比，缺氧会显著加剧氧化型谷胱甘肽 (glutathiol, GSSG) 的表达水平，并抑制谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 表达^[26]。缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 作为细胞对缺氧反应的中心调节因子，诱导许多缺氧适应反应。有学者认为，细胞内的 GSSG/GSH 比率的变化可能在缺氧期间调节 HIF-1 的诱导^[27]。谷胱甘肽转移酶 (glutathione

S-transferase, GST) 是重要的解毒酶,可催化谷胱甘肽与多种有毒氧化剂的结合。有研究表明,谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1) 在细胞对氧化应激的反应中起决定作用,并保护肿瘤细胞免受各种细胞毒剂,如 H_2O_2 、紫外线、顺铂和三氧化二砷引起的细胞凋亡^[28]。此外,也有证据表明 GST 在调节氧化应激期间血管内皮细胞的细胞反应和信号通路中发挥作用^[29-30]。

因此,我们猜测人为干预谷胱甘肽相关蛋白能够对低氧血症起到改善作用。目前这项猜测也在相应的文献中得到证实,有研究证明补充外源性 GSSG 能够减少缺氧对离体大鼠心肌细胞的负面影响,延长细胞耐受缺氧的时间,维持心肌细胞的收缩功能^[31]。此外,也有研究证明了重组 GSTP1 蛋白在抑制炎症损伤方面的治疗潜力。通过补充重组 GSTP1 蛋白可有效抑制与急性炎症相关的细胞因子和酶的产生,表明外源性补充重组 GST 对细胞抗氧化和炎症反应有积极影响。这些发现可能为治疗全身性和局部炎症综合征提供一种新的策略^[32]。由此说明尿液可以应用于寻找药物靶标的相关研究以此来指导用药。

4 结论

我们的研究表明,尿液蛋白质组可以反映急性低氧刺激后的显著变化。这些发现可能提供一种判断机体高原缺氧程度的方法,有助于检测或辅助检测缺氧状态,方便无创,容易为病人接受,更便于动态监察高原人群的缺氧损伤进展。

REFERENCES

- [1] Hartman-Ksycińska A, Kluz-Zawadzka J, Lewandowski B. High altitude illness. *Przegl Epidemiol*, 2016, 70(3): 490-499.
- [2] Meier D, Collet TH, Locatelli I, et al. Does this patient have acute mountain sickness? : the rational clinical examination systematic review. *JAMA*, 2017, 318(18): 1810-1819.
- [3] Ahmad Y, Sharma NK, Ahmad MF, et al. Proteomic identification of novel differentiation plasma protein markers in hypobaric hypoxia-induced rat model. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98027.
- [4] Murray AJ. Energy metabolism and the high-altitude environment. *Exp Physiol*, 2016, 101(1): 23-27.
- [5] Luo H, Zhou DJ, Chen Z, et al. Establishment and evaluation of an experimental rat model for high-altitude intestinal barrier injury. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 475-482.
- [6] Du X, Zhang R, Ye SL, et al. Alterations of human plasma proteome profile on adaptation to high-altitude hypobaric hypoxia. *J Proteome Res*, 2019, 18(5): 2021-2031.
- [7] Gao YH. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 2013, 56(12): 1145-1146.
- [8] Gao YH. Now is the time to test early urinary biomarkers in large-scale human samples. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(6): 851-853.
- [9] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [10] Goldman AR, Bitler BG, Schug Z, et al. The primary effect on the proteome of ARID1A-mutated ovarian clear cell carcinoma is downregulation of the mevalonate pathway at the post-transcriptional level. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15(11): 3348-3360.
- [11] Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc*, 2016, 11(12): 2301-2319.
- [12] Wang SS, Zheng W, Hu LQ, et al. MixProTool: a powerful and comprehensive web tool for analyzing and visualizing multigroup proteomics data. *J Comput Biol*, 2018, 25(10): 1123-1127.
- [13] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [14] Felberbaum-Corti M, Morel E, Cavalli V, et al. The redox sensor TXNL1 plays a regulatory role in fluid phase endocytosis. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1144.
- [15] Liu F, Rong YP, Zeng LC, et al. Isolation and

- characterization of a novel human thioredoxin-like gene hTLP19 encoding a secretory protein. *Gene*, 2003, 315: 71-78.
- [16] Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(10): 3436-3444.
- [17] Wang ZK, Liu H, Dou MM, et al. The quality changes in fresh frozen plasma of the blood donors at high altitude. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176390.
- [18] Xu K, Sun XY, Benderro GF, et al. Gender differences in hypoxic acclimatization in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Physiol Rep*, 2017, 5(4): e13148.
- [19] Nangaku M, Fujita T. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res*, 2008, 31(2): 175-184.
- [20] Böning D, Rojas J, Serrato M, et al. Extracellular pH defense against lactic acid in untrained and trained altitude residents. *Eur J Appl Physiol*, 2008, 103(2): 127-137.
- [21] Schmidt W, Prommer N. Effects of various training modalities on blood volume. *Scand J Med Sci Sports*, 2008, 18(Suppl 1): 57-69.
- [22] Holloway CJ, Montgomery HE, Murray AJ, et al. Cardiac response to hypobaric hypoxia: persistent changes in cardiac mass, function, and energy metabolism after a trek to Mt. Everest Base Camp. *FASEB J*, 2011, 25(2): 792-796.
- [23] Wei J, Meng WS, Gao YH. Urine proteome changes in rats subcutaneously inoculated with approximately ten tumor cells. *PeerJ*, 2019, 7: e7717.
- [24] Wu J, Li X, Zhao M, et al. Early detection of urinary proteome biomarkers for effective early treatment of pulmonary fibrosis in a rat model. *Proteomics Clin Appl*, 2017, 11(11/12): 2017Dec; 11(11-2017Dec; 11(12).
- [25] Zhang FS, Wei J, Li XD, et al. Early candidate urine biomarkers for detecting Alzheimer's disease before amyloid- β plaque deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis*, 2018, 66(2): 613-637.
- [26] Hou Y, Wang XB, Chen XR, et al. Establishment and evaluation of a simulated high altitude hypoxic brain injury model in SD rats. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2758-2766.
- [27] Tajima M, Kurashima Y, Sugiyama K, et al. The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1. *Eur J Pharmacol*, 2009, 606(1/2/3): 45-49.
- [28] Gaté L, Tew KD. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, 2001, 5(4): 477-489.
- [29] Xu Y, Gong B, Yang Y, et al. Glutathione-S-transferase protects against oxidative injury of endothelial cell tight junctions. *Endothelium*, 2007, 14(6): 333-343.
- [30] Yang YZ, Yang YS, Trent MB, et al. Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2004, 173(2): 211-221.
- [31] Poluektov YM, Petrushanko IY, Undrovinas NA, et al. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4872.
- [32] Luo L, Wang Y, Feng Q, et al. Recombinant protein glutathione S-transferases P1 attenuates inflammation in mice. *Mol Immunol*, 2009, 46(5): 848-857.

(本文责编 陈宏宇)