

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.009
文章编号: 1005-8982(2019)16-0048-06

尿蛋白质组学在心血管疾病生物标志物研究中的应用

张霞¹, 孙长青², 吴红星³, 宋雷³, 赵志云¹, 李振超¹, 管明秀⁴

(天津医科大学宝坻临床学院 1. 心内科; 2. 神经外科, 天津 301800; 3. 北京国家蛋白质科学中心, 北京 102200; 4. 天津医科大学宝坻临床学院 检验科, 天津 301800)

摘要: 当前心血管疾病的患病率及病死率处于上升阶段, 因此筛选出新的心血管疾病生物标志物尤为重要。传统上, 血液一直是研究最广泛的生物标志物来源。近年来, 随着尿蛋白质组学更广泛地应用于临床, 尿液作为生物标志物的来源引起了学术界的广泛关注, 这将有助于更好地了解心血管疾病的病理生理, 定义新的用于预测、诊断和指导治疗的生物标志物, 并有助于确定新的治疗靶点。该综述介绍了当前尿蛋白质组学的研究进展和已知的心血管疾病尿液中特征性标志物研究的主要发现。

关键词: 蛋白质组学; 心血管疾病; 尿

中图分类号: R543.

文献标识码: A

Application of urinary proteomics in study of cardiovascular disease biomarkers

Xia Zhang¹, Chang-qin Sun², Hong-xing Wu³, Lei Song³,

Zhi-yun Zhao¹, Zhen-chao Li¹, Ming-xiu Guan⁴

(1. Department of Cardiology, Baodi College of Clinical Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 301800, China; 2. Department of Neurosurgery, Baodi College of Clinical Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 301800, China; 3. National Center for Protein Sciences, Beijing 102200, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Baodi College of Clinical Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 301800, China)

Abstract: The prevalence and mortality rate of cardiovascular disease in China is still on the rise, so it is especially important to screen out new cardiovascular disease biomarkers. Traditionally, blood has been the most widely studied source of biomarkers. In recent years, urinary proteomics has become more widely used in clinically relevant issues, and the use of urine as a biomarker has attracted widespread attention in academia. This can help to better understand pathophysiological process of cardiovascular disease, allow the definition of new biomarkers for predicting, diagnosing, guide clinical treatment, and help identify new therapeutic targets. This paper describes the current research advance in urinary proteomics and the major finding in the study of characteristic markers in the urine of known cardiovascular diseases, and prospects for future development.

Keywords: proteomics; cardiovascular diseases; urine

收稿日期: 2019-02-27

[通信作者] 管明秀, E-mail: zxtj000@163.com; Tel: 15602109478

心血管疾病是我国目前发病率最高的疾病之一,筛查高危患者、早期诊断是影响疗效的重要因素。随着大规模、高通量技术的发展,促进了利用蛋白质组学分析组织和体液蛋白成分的进程^[1]。尿液可以大量、无创伤获得,因此蛋白组学技术是非常有前景的应用领域之一,可以利用尿液寻找疾病的标志性蛋白。这将有助于为心血管疾病的预测、诊断和指导治疗提供新的途径。

1 尿蛋白质组学概述

尿蛋白质组学的概念于 1996 年 MARSHALL 等^[1]提出,即利用蛋白质组学技术高通量,系统地分析和鉴定尿液中所有蛋白质分子并研究其生物学功能。主要包括 3 个方面的研究:①机体中所有蛋白质的鉴定;②蛋白质间的相互作用;③各种临床情况下(感染、肿瘤及应急等)蛋白质组表达模式的不同。

通过蛋白质组学研究技术检测尿液中的各种特异性生物标志物具有较强的可行性和操作性。早在 20 世纪 90 年代末就已经开始了尿蛋白质组的鉴定。ADACHI 等^[2]使用高分辨率质谱和二维线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨质谱在正常人的尿样中鉴定出 1 534 个高可信度蛋白。目前,通过各种方法鉴定得到的健康人尿蛋白总数 >2 000 个,随着蛋白质组学技术的进展,尿液作为生物标志物的来源引起了学术界的广泛关注^[3]。尿液作为体液具有优于血液的优点:①尿液样本采集简单、无创,容易连续性获得,可作为临床的低成本检测;②尿液是体内血液的超滤,在一定程度上反映整个机体的状态,某些蛋白或者多肽代谢物入血后很快经肾脏代谢入尿,这时在血液中可能检测不到,但在尿液中却可能检测到;③血液含有 20 种高丰度蛋白质,这些蛋白可能掩盖了其他不太丰富,却有一定临床意义的蛋白质,尿液蛋白质及肽相对稳定且较血蛋白质复杂程度低,因此可以通过液相色谱串联质谱-试验技术(liquid chromatography-mass spectrometry and tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)可靠地测量那些低丰度但功能重要的蛋白质,如外泌体蛋白^[4-5]。其可以提供更有价值的信息而无需对患者进行昂贵且有创的检查,也可以转化为改进的早期筛查项目,以减少疾病和死亡,从而减轻医疗保健系统的负担。

2 尿蛋白质组学在心血管疾病研究中的应用

2.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化初期一般无临床症状,但随着疾病

发展,往往会导致严重后果。因此,早期发现动脉粥样硬化是心血管疾病防治的最佳状态。目前临床缺乏有效的无创动脉粥样硬化早期筛查项目^[6]。

国外研究报道,载脂蛋白 E 敲除小鼠(ApoE^{-/-})是一个成熟的动脉粥样硬化动物模型,ApoE^{-/-}小鼠喂食高脂肪饮食后,检测结果显示尿液有 16 种多肽与健康对照组表达有差异性,之后对上述结果采用盲法测试发现其识别动脉粥样硬化具有 90% 的敏感性和 100% 的特异性^[7]。之后的 7 ~ 12 周监测疾病进展,其中 9 种生物标志物(包括胶原蛋白、主要尿蛋白、尿调节素、肾脏雄激素调节蛋白、表皮生长因子及 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶的片段)能够被鉴定并通过人类动脉粥样硬化的免疫组织学验证^[8]。提示这些生物标志物在动脉粥样硬化初期与已发生严重疾病期相比存在显著差异,可用于筛查不同时期的动脉粥样硬化。

2.2 心绞痛

心绞痛是冠状动脉供血不足,心肌暂时缺血与缺氧所引起的以发作性胸痛或胸部不适为主要表现的临床综合征^[9]。心绞痛可分为稳定型和不稳定型冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病),其中不稳定型心绞痛是由于动脉粥样硬化斑块破裂或糜烂,伴有不同程度的表面血栓形成、血管痉挛,严重时可发展为远端血管栓塞^[10]。

国外早期冠心病的尿蛋白质组学研究中,对 64 例稳定性心绞痛和 115 例不稳定性心绞痛患者使用商业放射免疫测定试剂盒,测量纤维蛋白肽 A 的水平,两组患者血浆中纤维蛋白肽 A 的表达水平无差异,但尿液纤维蛋白肽 A 的水平有差异,不稳定型心绞痛患者尿液纤维蛋白肽 A 高出约 3 倍,结合冠状动脉造影的影像学结果提示冠状动脉内血栓形成患者的尿液纤维蛋白肽 A 的水平更高,之后通过竞争性酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)证实了上述结论^[11]。纤维蛋白肽 A 是在凝血酶作用下,纤维蛋白原 $\alpha(A)$ 链的精-16 和甘-17 之间的肽链裂解,释放出由 1 ~ 16 个氨基酸组成的纤维蛋白肽,是反映体内凝血活性及纤维蛋白最终形成血栓的可靠指标,在鉴定不稳定型心绞痛高危患者时可能更有价值。而尿液的纤维蛋白肽 A 可持续测量 24 h,较血液的单个纤维蛋白肽 A 更有意义。WEINER 等^[12]通过 ELISA 检测 247 例急性胸痛患者的尿纤维蛋白肽 A,发现尿液纤维蛋白肽 A 升高的患者在 1 周内发生急性心脏事件的风险增加了 4.82 倍,在之后的随访

中出现急性心脏事件的概率也明显高于正常水平。因此,尿纤维蛋白肽 A 水平可能为急性胸痛患者的危险分层提供依据,但尚需更大规模的验证才能用于临床诊断。

除了筛选 1 个或多个蛋白作为候选标志物外,还有一些研究通过毛细管电泳-质谱联用 (capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS) 技术或表面增强激光解析、电离飞行时间质谱技术直接寻找疾病的特征蛋白 (多肽) 表达模式^[13]。ZIMMERLI 等^[14]使用毛细管电泳在线偶联 micro-TOF 质谱 (CE-MS) 检测了 88 例严重心绞痛和 282 例对照的尿样,检测出一个由 15 种肽组成的特征组,在盲法验证时获得了 98% 的敏感性和 83% 的特异性,其中的 5 种被鉴定为胶原片段,并且与对照组相比在心绞痛样品中均被上调。这与动脉粥样硬化引起的动脉血管壁中许多基质成分增加一致^[15]。此外,这些特征组的表达水平在具有规律性体力活动的患者中恢复到正常水平,表明其不仅可用于鉴别心绞痛患者,还可用于监测治疗干预的效果。

在 2015 年进行的一项研究中,应用 LC-MS/MS 技术分析了 73 例不稳定型心绞痛患者和 35 例对照的尿液样本^[16]。与正常对照相比,单核细胞抗原 CD14⁺ 在心绞痛的患者中始终过表达。使用 ELISA 检测尿液和血清中 CD14⁺ 的浓度,证实多支血管和严重单支血管病变患者的尿 CD14⁺ 水平高于正常对照组,这些结果进一步揭示单核细胞抗原 CD14⁺ 过表达与疾病的复杂性成比例增加 (根据 SYNTAX 评分),这表明尿 CD14⁺ 能够作为一种新型非侵入性生物标志物用于大规模诊断、筛查早期心绞痛高危患者。然而,上述研究还不能确认 CD14⁺ 募集增加是否发生在动脉粥样硬化病变之前。

2.3 急性心肌梗死

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,是心血管疾病中最为严重的类型,具有发病急、病情变化快、远期心血管不良事件及病死率高的特点。目前 AMI 常用的检测指标为超敏肌钙蛋白、肌酸激酶及肌酸激酶同工酶等心肌损伤标志物,其中血肌钙蛋白是诊断急性心肌梗死的确证标志物。但这些标志物在血液中被检测到的时间多为心肌梗死发病后 4 ~ 6 h,在识别急性心肌梗死高危患者及超早期、早期诊断中价值有限,因而期望能够发现用于识别急性

心肌梗死高危患者及早期诊断的新的标志物。但目前国内外研究急性心肌梗死中的尿蛋白质组学较少见^[17-18]。

心脏脂肪酸结合蛋白 (heart-type fatty acid-binding protein, H-FABP) 是心肌损伤的早期标志物。国外的相关报道中发现 97 例疑似 AMI 的患者在症状出现后 1 h,通过竞争性 ELISA 测量尿 H-FABP 水平增加。H-FABP 水平在 AMI 发病后 3 ~ 6 h 达峰值,在 24 h 内逐渐下降至正常水平^[19]。因此,HH-FABP 可能在急性心肌梗死超早期发挥辅助诊断作用。

此外,尿微量白蛋白 30 ~ 300 mg/d 是肾损伤的标志,但现在也被证明是冠心病患者预后不良的标志^[20]。早期研究报道 AMI 和非 AMI 组的尿白蛋白与肌酐比值 (albumin/creatinine ratio, ACR) 增加,分别对入院后第 1、3 及 7 d 的患者通过放射免疫测定法测定 3 次 24 h 尿液,显示尿微量白蛋白为早期 (院内) 死亡率及中长期死亡率的强预测因子^[21]。其他的相关研究也发现蛋白尿可以用于 AMI、心力衰竭的诊断及评估远期死亡率^[22]。

在 2012 年发表的一份报告中,探讨了尿肝型脂肪酸结合蛋白在急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 中的临床意义;该研究连续收集了 50 例 ACS 患者,其中 37 例 AMI 患者,13 例不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP),47 例无冠心病患者 (对照组);在入院时和经皮冠状动脉介入治疗后应用 ELISA 实验测量 24 h 尿肝型脂肪酸结合蛋白水平,尿白蛋白 (U-Alb) 和其他血清参数,结果发现 AMI 患者尿肝型脂肪酸结合蛋白水平高于对照组^[23];尿肝型脂肪酸结合蛋白也可用于预测主要不良心脑血管事件,患者随访时间中位数为 42 个月,发现在此期间合并主要不良心脑血管事件患者的尿肝型脂肪酸结合蛋白水平高于对照组,是主要不良心脑血管事件的独立危险因素;这些数据表明,ACS 患者,尤其是 AMI 患者的尿肝型脂肪酸结合蛋白水平较高,可以被用于筛选高风险 ACS 患者,这是第一份证明尿肝型脂肪酸结合蛋白在急性冠脉综合征中的重要性报告,但是小样本量限制了其显著性^[23]。

最近一项研究中分析了来自澳大利亚、欧洲和北美 4 项前瞻性研究的 252 例个体的蛋白质组学数据,其中 126 例在尿液取样后的 5 年内患有 ACS,同时对 84 例患者和对照组进行蛋白质组学分析,结果发现 75 种 ACS 相关的尿肽,并建立了一种名为 Acute Coronary Syndrome Predictor 75 (以下简称 ACSP75)

的预后评估生物标志物,之后的研究结果提示,ACSP75 预后评估的准确性与 Framingham 风险评分非常相似^[24]。证明尿肽生物标志物具有预测无症状患者未来 ACS 事件的潜力,当然尚需要进一步的大规模临床试验研究来进行验证。

2.4 心力衰竭

心力衰竭是指由于心脏的收缩功能和/或舒张功能发生障碍,不能将静脉回心血量充分排出心脏,导致静脉系统血液淤积,动脉系统血液灌注不足,而引起心脏循环障碍症候群。心力衰竭并不是一个独立的疾病,而是心脏疾病发展的终末阶段^[25],目前临床诊断心力衰竭需要依靠体格检查、病史采集及影像学等综合数据。

FARMAKIS 等^[26]应用毛细管电泳在线耦合微量飞行时间质谱法获得的尿蛋白质组谱分析了一组 59 例心力衰竭患者和 67 例年龄、性别及肾功能相匹配的对照组,共鉴定出了 107 种显著的鉴别肽,用于建立基于支持载体机器的分类器,该分类器应用于 25 例心力衰竭患者和 33 例对照的测试中,实现 84% 的敏感性和 91% 的特异性;这 107 种肽中,35 种对应于胶原片段,其与心室细胞外基质的重塑相关,该研究提示尿液蛋白质组分析能够在慢性肾脏病的背景下鉴定一组心力衰竭特征性尿肽生物标志物,并成功用于建立综合征的分类器。

在一项非常相似的研究中,使用 CE-MS 研究 33 例心力衰竭患者和 29 例健康对照者的尿蛋白质组,鉴定出 103 种差异表达的蛋白质,其中包括胶原蛋白片段;使用该组 103 个蛋白质建立的基于支持向量机的分类器对 94 例心力衰竭患者和 552 个对照进行队列验证,得出非常准确的鉴别结果,其敏感性为 93.6%,特异性为 92.9%^[27]。尽管 CE-MS 需要专门的仪器并且价格昂贵,但其具有高度敏感性并且可以区分翻译后修饰形式的蛋白质。

心力衰竭患者常合并肾小管损伤,并且尿液中性粒细胞炎症蛋白脂质运载蛋白-2、N-乙酰-β-葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-glucosaminidase, NAG)和肾损伤分子 1 浓度增加明显。中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)是急性肾损伤的早期诊断标志物,可在肌酐升高前检测到。然而,其也被证明是从受损的心肌中释放,作为炎症过程的一部分^[28]。近期的一项研究中,使用心脏肥大和心力衰竭的多基因模型、宫内生长受

限模型和 Lcn2 敲除小鼠 3 个实验模型培养的心肌细胞,与 114 例 2 型糖尿病患者和 2 064 例健康受试者组成的人类群组在心力衰竭发生前后行对比研究,发现在培养的心肌细胞中,中性粒细胞炎症蛋白脂质运载蛋白-2 激活分子肥大途径并增加细胞大小,但减少增殖和细胞数量^[29]。增加的中性粒细胞炎症蛋白脂质运载蛋白-2 与糖尿病中的心脏肥大和舒张功能障碍相关。中性粒细胞炎症蛋白脂质运载蛋白-2 表达与体重指数、心脏功能及炎症标志物水平相关。该研究揭示 LCN2 中性粒细胞炎症蛋白脂质运载蛋白-2 在心脏肥大和心力衰竭的个体发育中的核心作用^[29]。

在另一些研究中,共有 2 413 例参与者,发现心力衰竭患者的尿 NAG 和肾损伤分子 1 水平增加,并且与住院次数和死亡率相关,而与肾小球滤过率无关^[30]。此外,对标准口服袪塞米治疗的慢性心力衰竭患者进行的一项研究表明,当治疗被撤消时,尿液 NAG 和肾损伤分子 1 的浓度显著增加,并且一旦恢复治疗就恢复正常^[31]。这提示其能被用于监测这些患者对治疗的反应。然而,这项研究仍是小样本研究,尚需在更大的队列中进行验证。

3 存在问题及应用前景

由于尿蛋白质组的生理波动性和个体间差异很大以及缺乏在健康人群中对这些波动性和差异的长期监测和系统性评估,致使基于尿蛋白的生物标志物研究的假阳性发现很高,基本无法通过后续的大规模临床验证。同时由于各种实验条件的限制,单中心研究所提供的样本量及疾病种类有限,很难建立疾病标志物的可信度和特异性,因此开展大数据研究,建立数据共享平台,将有助于发现新的疾病标志物,从而可以更全面地分析疾病的病理生理。

北京蛋白质组研究中心的研究团队,开发了一站式蛋白质组学数据分析云平台 Firmiana^[32-34]。利用该系统可以实现一体化蛋白质组原始文件收集和存储—元数据管理—定性定量分析—多维度组学生物信息学分析—知识挖掘和分享。同时该中心通过国际 2 中心(中国—美国)的方式采集了来自 167 例健康自愿者的 500 个尿蛋白质组数据,对健康人尿蛋白质组的生理波动性和个体间差异进行系统性评估,在此基础上建立了世界上首个蛋白质组规模的健康人尿蛋白定量参考范围,回答了临床尿蛋白质组研究领域的关键问题,为尿蛋白生物标志物研究中的假阳性问题找到了

全新的解决方案,为今后利用尿蛋白质组进行健康管理及疾病筛查奠定了基础。

由于心血管疾病的发病机制涉及许多途径,单一生物标志物不太可能具有足够的敏感性和特异性,因此需要多标记物策略^[35]。尿蛋白质组学正成为用于诊断和监测心血管疾病的强大的非侵入性工具。毛细管电泳耦合质谱可能是最有前途的策略,因为其允许在一次运行中对数千种蛋白质进行高分辨率分析。这一研究领域仍处于早期阶段,但在识别和治疗高风险的个体方面已经取得了重大进展。目前已经在尿液中鉴定出的有意义的心血管疾病的生物标志物,例如胶原片段,ACR 和 NGAL 等可能具有很大的临床潜力,但需要在大型盲法队列中进行更广泛的验证。对大批患者的几项尿蛋白质组学研究表明,考虑到差异表达蛋白构建的基于支持载体机器的分类可以超过 Framingham 风险评分的预后判别能力。而在未来几年内,可以开始以同样的方式探索其他心血管疾病,如炎症心脏病、先天性心脏病和风湿性心脏病的尿生物标志物。

参 考 文 献:

- [1] MARSHALL T, WILLIAMS K. Two-dimensional electrophoresis of human urinary proteins following concentration by dye precipitation[J]. *Electrophoresis*, 1996, 17(7): 1265-1272.
- [2] ADACHI J, KUMAR C, ZHANG Y, et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins[J]. *Genome Biol*, 2006, 7(9): R80.
- [3] 陈东辉, 丘余良. 同位素标记定量技术评估肾病综合征尿液蛋白质谱变化的初步探讨[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(23): 63-67.
- [4] JAKOBSEN K R, PAULSEN B S, BAEK R, et al. Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 26659.
- [5] SARAH RÖTHLISBERGER and JOHANNA PEDROZA-DIAZ. Urine protein biomarkers for detection of cardiovascular disease and their use for the clinic[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2017, 14(12): 1091-1103.
- [6] BACHORZEWSKA-GAJEWSKA H, TOMASZUK-KAZBERUK A, JAROCKA I, et al. Does neutrophil gelatinase-associated lipocalin have prognostic value in patients with stable angina undergoing elective PCI? A 3-year follow-up study[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 37(4/5): 280-285.
- [7] EKELUND U, NILSSON H J, FRIGYESI A, et al. Patients with suspected acute coronary syndrome in a university hospital emergency department: an observational study[J]. *BMC Emerg Med*, 2002, 2(1): 1.
- [8] AMSTERDAM E A, WENGER N K, BRINDIS R G, et al. AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2014, 130(25): 2354-2394.
- [9] OTA H, TAKEUCHI T, SATO N, et al. Dipstick proteinuria as a surrogate marker of long-term mortality after acute myocardial infarction[J]. *J Cardiol*, 2013, 62(5): 277-282.
- [10] MCMAHON B A, MURRAY P T. Urinary liver fatty acid-binding protein: another novel biomarker of acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2010, 77(8): 657-659.
- [11] CONTI C R, BAVRY A A, PETERSEN J W, et al. Silent ischemia: clinical relevance[J]. *Am Coll Cardiol*, 2012, 59(5): 435-441.
- [12] WEINER D A, RYAN T J, MCCABE C H, et al. Risk of developing an acute myocardial infarction or sudden coronary death in patients with exercise-induced silent myocardial ischemia. A report from the Coronary Artery Surgery Study (CASS) registry[J]. *Am J Cardiol*, 1988, 62(17): 1155-1158.
- [13] MUELLER J, von EGGELING F, DRIESCH D, et al. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients[J]. *Eur Urol*, 2005, 47(6): 885-893.
- [14] ZIMMERLI L U, SCHIFFER E, ZURBIG P, et al. Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7(2): 290-298.
- [15] TASKIRAN M, FELDT-RASMUSSEN B, JENSEN G B, et al. Urinary albumin excretion in hospitalized patients with acute myocardial infarction. Prevalence of microalbuminuria and correlation to left ventricle wall thickness[J]. *Scand Cardiovasc J*, 1998, 32: 163-166.
- [16] LEE M Y, HUANG C H, KUO C J, et al. Clinical proteomics identifies urinary CD14 as a potential biomarker for diagnosis of stable coronary artery disease[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): DOI: 10.1371/journal.pone.0117169.
- [17] MILLIONI R, TOLIN S, PURICELLI L, et al. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0019603.
- [18] 张丽, 谢建洪, 劳迪波, 等. 应用蛋白质组学技术筛选急性心肌梗死早期标志蛋白的研究[J]. *浙江医学*, 2014, 36(24): 1985-1989.
- [19] GISTERA A, HANSSON G K. The immunology of atherosclerosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(6): 368-380.
- [20] COLLINS G S, ALTMAN D G. Predicting the 10 year risk of cardiovascular disease in the United Kingdom: independent and external validation of an updated version of QRISK2[J]. *BMJ*, 2012, 344: DOI: 10.1136/bmj.e4181.
- [21] LINSSEN GCM, DAMMAN K, HILLEGE H L, et al. Urinary N-terminal prohormone brain natriuretic peptide excretion in patients with chronic heart failure[J]. *Circulation*, 2009, 120(1): 35-41.

- [22] SONG J, LI P, LI H, et al. The clinical significance of a urinary B-type natriuretic peptide assay for the diagnosis of heart failure[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(17-18): 1632-1636.
- [23] MATSUMORI R, SHIMADA K, KIYANAGI T, et al. Clinical significance of the measurements of urinary liver-type fatty acid binding protein levels in patients with acute coronary syndrome[J]. *J Cardiol*, 2012, 60(3): 168-173.
- [24] HTUN N M, MAGLIANO D J, ZHANG Z Y, et al. Prediction of acute coronary syndromes by urinary proteome analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): DOI: 10.1371/journal.pone.0172036.
- [25] KIRBIS S, GORENJAK M, SINKOVIČ A. The role of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in acute heart failure in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015, 15: 49.
- [26] FARMAKIS D, KOECK T, MULLEN W, et al. Urine proteome analysis in heart failure with reduced ejection fraction complicated by chronic kidney disease: feasibility, and clinical and pathogenetic correlates[J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18(7): 822-829.
- [27] ANDERSON J L, ADAMS C D, ANTMAN E M, et al. 2012 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACCF/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(23): 179-347.
- [28] DAMMAN C, NG KAM M, MACFADYEN R, et al. Volume status and diuretic therapy in systolic heart failure and the detection of early abnormalities in renal and tubular function[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(22): 2233-2241.
- [29] MARQUES F Z, PRESTES P R, BYARS S G, et al. Experimental and Human Evidence for Lipocalin-2 [Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)] in the Development of Cardiac Hypertrophy and heart failure[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(6): DOI: 10.1161/JAHA.117.005971.
- [30] HOU L, LI F, ZENG Q, et al. Excretion of urinary orosomucoid 1 protein is elevated in patients with chronic heart failure. Beltrami AP, editor[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): DOI: 10.1371/journal.pone.0107550.
- [31] KOYAMA S, SATO Y, TANADA Y, et al. Early evolution and correlates of urine albumin excretion in patients presenting with acutely decompensated heart failure[J]. *Circ Hear Fail*, 2013, 6(2): 227-232.
- [32] FENG J, DING C, QIU N, et al. Firmiana: towards a one-stop proteomic cloud platform for data processing and analysis[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5): 409-412.
- [33] LENG W, NI X, SUN C, et al. Proof-of-concept workflow for establishing reference intervals of human urine proteome for monitoring physiological and pathological changes[J]. *EBio Medicine*, 2017, 18: 300-310.
- [34] ZHANG C, LENG W, SUN C, et al. Urine proteome profiling predicts lung cancer from control cases and other tumors[J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 120-128.
- [35] COHN J N. Identifying the risk and preventing the consequences of cardiovascular disease[J]. *Hear Lung Circ*, 2013, 22(7): 512-516.

(李科 编辑)