

人血液蛋白质组学研究方法进展

杨玉萍¹ 韩生成¹ 黄睿^{2,3*}

(¹北京师范大学抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875; ²西北民族大学口腔医学国家民委重点实验室, 兰州 730030; ³西北民族地区环境生态与人群健康国家民委重点实验室, 兰州 730030)

摘要 血液蛋白质组学在后基因组时代的生物医学研究中起着至关重要的作用, 作为研究生物标志物的重要领域备受关注。研究人员通过高通量的蛋白质组学检测技术, 可以分析血浆/血清中的各种蛋白质成分, 包括总蛋白质组及蛋白质的翻译后修饰, 为新生物标志物的发现和临床诊断方法的开发提供帮助。该文综述了血液蛋白质组学研究的背景和进展, 重点介绍了基于质谱的LC-MS/MS技术及基于亲和性的Olink、SomaScan技术的两大类蛋白质鉴定技术方法, 讨论了血液蛋白质组学领域的最新研究应用进展, 并对其未来发展趋势进行了展望。

关键词 血液蛋白质组学; LC-MS/MS质谱检测; Olink技术; Somascan技术

Progress in Research Methods of Human Blood Proteomics

YANG Yuping¹, HAN Shengcheng¹, HUANG Rui^{2,3*}

(¹Beijing Key Laboratory of Gene Resources and Molecular Development, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²Key Lab of Stomatology of State Ethnic Affairs Commission, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ³Key Laboratory of Environmental Ecology and Population Health in Northwest Minority Areas, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract Blood proteomics plays a crucial role in biomedical research in the post-genomic era and has attracted much attention as an important field for studying biomarkers. Through high-throughput proteomics detection techniques, various protein substances in plasma/serum can be analyzed, including the total proteome and post-translational modifications of proteins, providing assistance for the discovery of new biomarkers and the development of clinical diagnostic methods. This article reviews the background and progress of blood proteomics research, focuses on introducing two major types of protein identification and analysis methods based on mass spectrometry, namely LC-MS/MS technology and affinity-based Olink and SomaScan technologies, discusses the latest research and application progress in the field of blood proteomics, and looks forward to its future development trends.

Keywords blood proteomics; LC-MS/MS mass spectrometry detection; Olink technology; Somascan technology

血液是反映人体健康状态的“晴雨表”。血液样本易获取且无创, 是临床上应用最广泛的液体标本。一般采集的血液样品有三种类型, 即全血、血浆和血

清。全血样本通常用于测定血细胞: 白细胞、血小板和红细胞等。血浆和血清样本是全血的液体部分, 主要用于临床诊断检测, 血清或血浆中的关键蛋白质能

收稿日期: 2024-09-18

接受日期: 2024-12-16

甘肃省教育厅教育科技创新项目(批准号: 2022B-072)、甘肃省自然科学基金(批准号: 22JR5Ra189)和中央高校专项资金项目(批准号: 31920220112)资助的课题

*通信作者。Tel: 15117119103, E-mail: huangrui0813@126.com

Received: September 18, 2024

Accepted: December 16, 2024

This work was supported by Gansu Provincial Department of Education: Gansu Province Educational Technology Innovation Project (Grant No.2022B-072), the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.22JR5Ra189) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Grant No.31920220112)

*Corresponding author. Tel: +86-15117119103, E-mail: huangrui0813@126.com

够实时反映疾病的信息, 常常作为疾病早期诊断和预测预后的关键生物标志物。随着蛋白质组学技术的迅速发展, 特别是高通量和高深度蛋白质组学技术的迭代更新及不断成熟, 研究人员得以灵敏地识别和量化在机体中发挥重要作用的蛋白质, 为疾病的诊断和治疗提供强大助力^[1-2]。现在的蛋白质组学技术已经可以对纳克级微量样品进行高深度分析, 并且新型MS质谱仪器可以在8分钟内分析8 000种细胞蛋白质, 显示了MS分析的极高通量, 使许多之前无法实现的临床血液蛋白质组学研究变得可行, 可以从蛋白质水平揭示更多细节。此外, 非质谱检测技术的突破, 如Olink(proximity extension assay)和SomaScan Assay, 也极大扩展了研究血液蛋白质组学的新途径。

1 血液蛋白质组学介绍

血液蛋白质组学的样品主要包括血浆和血清, 它们在成分上有一些相似之处, 但也存在一定的差异^[3-4](图1和表1)。血浆是血液中加入抗凝剂后, 经过离心分离得到的上层液体部分。常用的抗凝剂包括EDTA、肝素和柠檬酸等。血清是血液在自然凝固后, 经过离心分离得到的上层液体部分。在凝血过程中, 纤维蛋白原等凝血因子被消耗, 形成血凝块, 所以血清中不含有这些凝血因子。血清中的蛋白质组成与血浆中相似, 在大多数检测测试中, 它们是可以互换的。然而, 与血浆相比, 血清的制备过程

可能会导致一些蛋白质的变化或损失, 因此在某些情况下, 血浆可能更适合作为蛋白质组学研究的样品。总的来说, 血浆和血清都是血液蛋白质组学研究中重要的样品来源, 它们各有特点和适用范围。在具体的研究中, 需要根据研究目的、实验条件和样本特点等因素综合考虑, 选择合适的样品进行研究。

1.1 血液蛋白质特征

血浆/血清蛋白质组分析有着巨大的挑战, 血液样本至少包含10 000种不同的蛋白质种类, 浓度变化达到10¹²的数量级, 动态范围极宽^[5-6]。例如, 白细胞介素-6的基础水平约为5 pg/mL, 人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的基础水平约为50 mg/mL。血液中最丰富的蛋白质中有14种, 占血液中总蛋白质组的95%, 如白蛋白、免疫球蛋白、转铁蛋白和纤维蛋白原等, 它们阻碍了对剩余的低丰度蛋白质的检测, 使得常规的蛋白质组学研究限制了血液蛋白质检出通量, 即使基于串联质量标签(tandem mass tag, TMT)和非数据依赖采集(data independent acquisition, DIA)检测通量较高的蛋白质组学技术^[7-8], 大部分检出结果也就在200至800个蛋白质之间。随着分馏和复杂的质谱扫描方法的加入, 可以检测到数千种蛋白质, 但需要较长的分析时间, 无法满足研究者的研究需求。所以为了提高血浆蛋白质组的检测覆盖率, 在分析之前, 通常要进行一个额外维度高丰度蛋白分离。

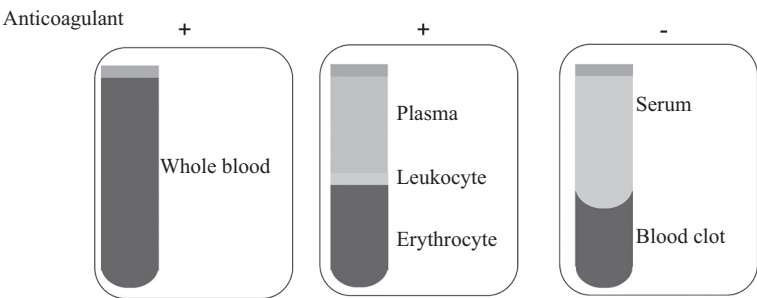


图1 血液、血浆和血清的差异
Fig.1 Differences in blood, plasma and serum

表1 血液、血浆和血清的成分差异

Table 1 Differences in the composition of blood, plasma and serum		
样本	组分	颜色
Sample	Component	Color
Blood	Plasma+blood cells	Red
Plasma	Without blood cells, containing fibrinogen	Translucent, light yellow
Serum	Without blood cells, without fibrinogen	Transparent, yellow

1.2 高丰度蛋白挑战的应对

高丰度蛋白会影响到低丰度蛋白的检出,降低检测通量,从而掩盖一些重要的蛋白信息。很多低丰度蛋白质在生物机体内发挥着非常重要的作用,在蛋白样品中含量却很低,所以在质谱检测前需要进行高丰度蛋白的去除和低丰度蛋白的富集。为克服血浆/血清中高丰度蛋白对蛋白组的检测限制,相关的技术研发创新也层出不穷。免疫耗竭是一种常用的方法,通过使用一次性或可再生的抗体柱/珠,可有效去除高丰度蛋白质^[9]。依赖特异性抗体的方法,可以使用Agilent的MARS柱、ThermoFisher Scientific公司的Pierce Albumin/IgG的试剂盒、SIGMA公司的Human IgY14 and SuperMix Columns操作进行血液中高丰度蛋白的去除。例如,KESHISHIAN等^[10]应用IgY14和SuperMix来去除大量的血浆蛋白,并结合等压标记,平均每个样本鉴定出4 600个血浆蛋白,并对16例患者的3 400个蛋白进行了定量分析。然而,该过程也存在一定的问题,比如过程耗费时间,难以自动化及高通量执行。除了依赖抗体的方法,Bio-Rad公司的ProteoMiner™低丰度蛋白富集系统,以载有六肽文库的微珠为配基,可高特异性亲和样品中低丰度的蛋白质,而没有与结合位点结合的那些过量的高丰度蛋白质就会被去除。通过这个办法处理后,最终能鉴定到的蛋白数有所增加,但是其也有一定局限,如特异性有限且去高丰度有随机性。近期,一

种整合纳米颗粒蛋白冠的Seer创新平台崭露头角,该平台显著提升了LC-MS/MS技术在血浆蛋白质组分析中的深度,利用纳米颗粒独特的表面物化特性与蛋白之间相互作用形成蛋白冠,从而实现血浆蛋白质组的深度检测,达到大多数FDA批准的血浆蛋白生物标记物所在的蛋白质组浓度范围^[11]。在一项关于非小细胞肺癌的研究实验中,通过5种纳米颗粒的联用,在141个血浆样本中检测出2 000多种蛋白质,使得高深度、广覆盖的血浆定量蛋白质组学研究成为现实。

2 血液蛋白质组学研究方法

随着高通量技术的快速发展,目前,许多不同的技术被用于血清或血浆中的蛋白质测量。基于肽段检测的质谱技术(图2)与基于亲和力的Olink(图3)和Somascan(图4)技术是三种主要的技术方法^[12]。质谱蛋白质组学的非偏好性使它非常适合于发现,能够在不需要事先洞察或开发蛋白质特异性试剂的情况下,全面地分析蛋白质组;而亲和和结合技术在蛋白质组检测灵敏度和样品通量方面的检测一直有独特优势。它们各自具有独特的技术原理、性能特点以及应用场景(表2)。

2.1 基于质谱的血液蛋白质组学研究技术

基于质谱的血液蛋白质组学研究技术为揭示血液中蛋白质的组成和功能提供了强大的工具。随着仪器的不断改进和工作流程的持续优化,质谱工

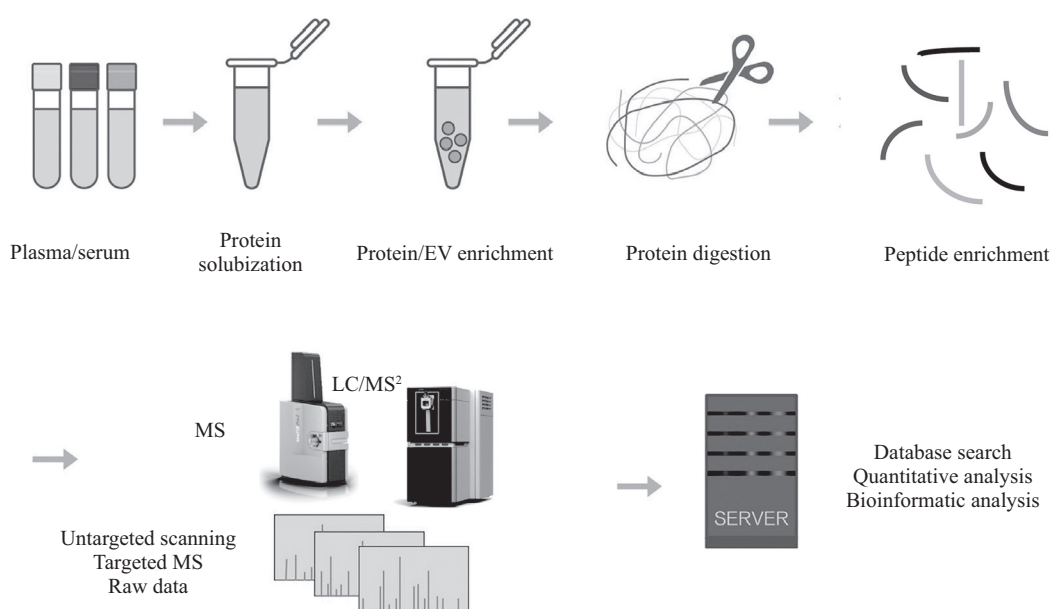


图2 基于质谱的自下而上蛋白质组学工作流程(根据参考文献[26]改编)

Fig.2 Mass spectrometry-based bottom-up proteomics workflow (modified from reference [26])

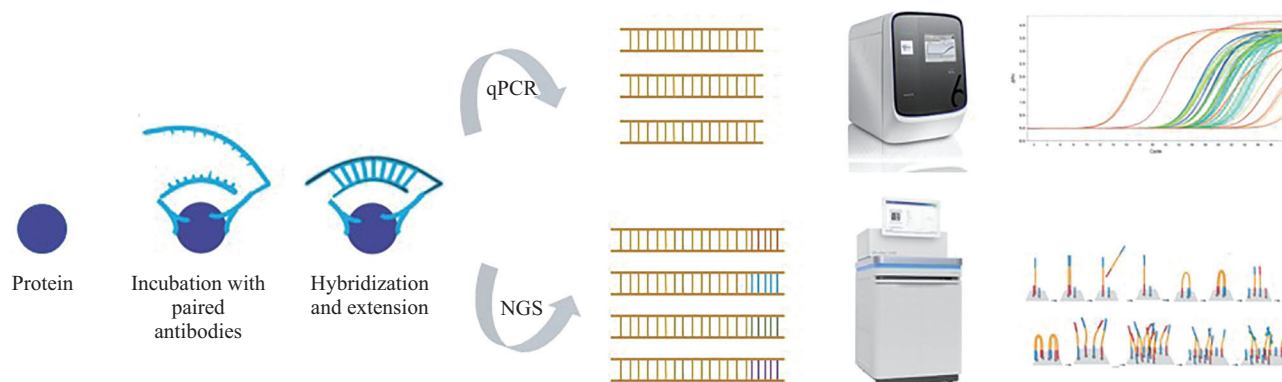
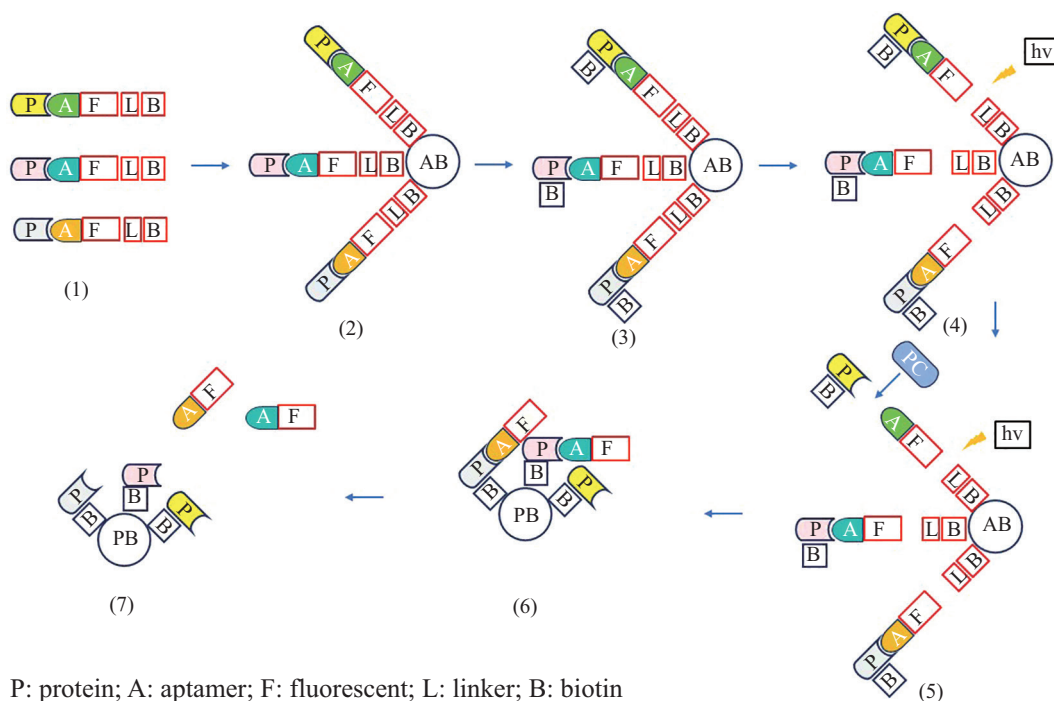


图3 Olink蛋白质组学工作流程示意图(根据参考文献[27]改编)

Fig.3 Schematic overview of Olink Explore proteomics (modified from reference [27])



P: protein; A: aptamer; F: fluorescent; L: linker; B: biotin

(1) 标记的SOMAmers与制备的样品孵育, 与蛋白质结合, 然后结合复合物用生物素(B)和荧光标记(F); (2) 亲和素珠(AB)捕获SOMAmers-蛋白质复合物; (3) 生物素需要标记到蛋白质上; (4) 紫外线裂解基团以释放复合物; (5) 引入聚阴离子竞争对手(PC)去除非特异性SOMAmers; (6) 引物珠(PB)有助于捕获复合物; (7) 捕获的复合物在特定的高pH条件下解离。

(1) The labeled SOMAmers are incubated with prepared samples to bind with proteins (P), and then the binding complexes are tagged with biotin (B) and fluorescent label (F); (2) The avidin beads (AB) are used to capture SOMAmers-protein complexes; (3) The biotin need to tag to the proteins; (4) The ultraviolet light (hv) is utilized to cleave the photocleavable group in order to release the complexes; (5) Polyanionic competitors (PC) are introduced to remove the nonspecific SOMAmers; (6) The primer bead (PB) facilitate the complexes capture; (7) Captured complexes are dissociated in specific high pH condition.

图4 SomaScan工作流程示意图

Fig.4 Schematic representation of SomaScan

作流程在速度、成本以及蛋白质组覆盖率等方面都取得了显著的提升。

质谱是唯一一种可以在不用事先了解样品的情况下检测蛋白质及其翻译后修饰的方法。质谱是一种强大的分析技术, 可测量分子的质量-电荷比, 解码

氨基酸序列, 并检测其侧链或末端的修饰^[13]。基于不同的电离源和质量分析器, 质谱仪可分为多种类型。常见的电离源包括基质辅助激光解吸/电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI), 而质量分析器则有飞

表2 质谱DIA、Olink、SomaScan蛋白质组学技术比较

Table 2 Comparison of mass spectrometry DIA, Olink, and SomaScan proteomics technologies

比较项目 Comparison items	质谱DIA Mass spectrometry DIA	Olink技术 Olink	Somascan技术 SomaScan
Basic principle	Detect proteins based on mass spectrometry DIA	Detect proteins by PCR amplification after antibody binding based on PEA technology	Quantify proteins by sequencing after DNA aptamer binding
Detection principle	Proteins are enzymatically digested into peptides, and the mass-to-charge ratio is detected by a mass spectrometer. The DIA mode scans and collects data without bias	A pair of oligonucleotide probes bind to the protein epitope, and the adjacent extension forms a DNA fragment. The DNA content is detected to indirectly reflect the protein amount	Nucleic acid aptamers specifically bind to proteins and are quantified relying on photolysis, fluorescence, and slow inactivation characteristics
Throughput	High, can reach thousands	Relatively high, hundreds to thousands	High, thousands
Sensitivity	Relatively high, reaching femtomolar level	High, picomolar-femtomolar	High, as low as picomolar level
Quantitative accuracy	Relatively accurate, with quality control, calibration, and algorithm guarantee	Relatively accurate, with less interference from nucleic acid amplification	Relatively accurate, assisted by aptamer characteristics and calibration system
New protein discovery	Can discover new proteins	Cannot discover new proteins	Cannot discover new proteins
Modified protein detection	Can conduct modified protein detection	Cannot conduct modified protein detection	Cannot conduct modified protein detection
Sample requirement	Milligram level, complex pretreatment	Microgram level, relatively simple	Microgram level, relatively standardized
Data processing difficulty	High, requiring professional DIA data analysis software or self-built database	Moderate, with mature process and commercial software	Moderate, mainly automatic software processing
Application scenarios	Basic scientific research, clinical diagnosis, drug development	Clinical early screening, drug development	Clinical diagnosis, chronic disease research, etc

行时间(time of flight, TOF)、轨道阱(orbitrap)和四极杆(quadrupole, Q)等^[14-15]。在蛋白质组学研究中, bottom-up蛋白质组学策略是一种常用的工作流程, 首先对蛋白质进行酶切, 然后通过液相色谱-质谱/质谱(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)分析肽段^[16-17]。LC-MS/MS能够在一次运行中测量数千种蛋白质, 具有高分辨率和灵敏度, 适用于生物标志物发现和蛋白质修饰研究。此外, 数据独立采集模式和同位素标记方法(如TMT)的应用提高了蛋白质组学研究的通量和准确性^[7-8]。靶向蛋白质组学则通过多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)和并行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)等技术, 深度扫描目标肽段的前体和产物离子, 实现对特定蛋白质的精准检测^[18]。当然, MS技术也面临一些挑战, 如数据处理的复杂性和对高质量标准品的需求。此外, 不同类型的MS仪器在性能和适用范围上存在差异, 基于MS的工作流具有众多变体, 如对多肽样品进行高效液相的预分离, 提高后续检测的灵敏度; 气相分离技术, 离子淌

度质谱给传统质谱分析增加了新的分离维度; 血液样品涉及的抗体柱及纳米颗粒对样品进行去除或富集操作, 有助于减少样品中的干扰物质, 特异性地富集目标蛋白质或肽段, 提高检测的灵敏度^[11,19-20]。大多数已发布质谱检测前处理流程在步骤上有很多相似之处^[21], 并最终依赖于各种商业和学术软件配套来完成最终的质谱数据解析^[22-23], 如DDA数据分析平台Proteome Discoverer、MaxQuant和PEAKS Studio等^[24]。质谱数据非依赖采集技术DIA被认为最适合大队列及血液蛋白质组学研究, 在DIA软件平台中, 如Spectronaut、DIA-NN和Skyline等^[25], 它们显著提高了数据处理速度, 增加了蛋白质组的覆盖率, 因此在这类研究中得到了广泛的应用。这些软件能够更准确地鉴定和定量蛋白质, 为蛋白质组学研究提供了更强大的工具。

2.2 Olink高通量蛋白质组学研究

基于核酸的蛋白质专利技术, PEA技术即Olink蛋白质组学, 在检测灵敏度方面表现出色, 能够覆盖高、中、低丰度的蛋白质, 与以质谱为基础的蛋白

质组学具有很强的互补性。

PEA为邻位延伸分析,是一种基于抗体识别的免疫分析方法,原理并不复杂,设计巧妙(图4)^[27]。两个匹配的抗体同时与一个靶标蛋白质结合,并以独特的DNA寡核苷酸标记;溶液中蛋白质的存在使两种抗体靠近,特异的DNA寡核苷酸序列杂交形成模板;在DNA聚合酶作用下,模板进行依赖性延伸,进而进行PCR扩增,创建出特异的双链DNA“条形码”,每种蛋白质的“条形码”唯一,且数量与靶蛋白初始浓度成正比;最后通过微流控qPCR或二代基因测序平台NGS对扩增子进行高通量定量^[28]。

Olink邻位延伸技术将PCR的高灵敏度应用于蛋白质组学分析,相比质谱分析,能大大增加蛋白质组覆盖的鉴定深度。Olink检测已广泛应用于临床血液领域,2021年*Nature Communication*杂志上一文^[29],运用Explore 1536平台研究二型糖尿病患者二甲双胍治疗前后血浆蛋白组改变,发现4个蛋白标志物在治疗前/后显著差异表达。随后升级的Olink Explore 3072平台,可从8微升样品中检测超过3 000种蛋白标志物,并覆盖100%主要生物学通路。基于独特的检测原理,Olink邻位延伸技术能提高检测灵敏度,增加鉴定深度,更深入地分析蛋白质组,目前已广泛应用于临床血液领域,为疾病的诊断和研究提供了重要的支持^[30-31]。

2.3 SomaScan高通量蛋白质组学研究

SomaScan也是基于亲和力的高通量蛋白质组学平台,通过结合目标蛋白质进行检测,图4所示^[32]。SomaScan使用单个核酸适配体来检测目标蛋白质^[33-34],而Olink需要结合两种不同抗体进行免疫分析。两个平台之间具有差异,但有时候也会提供有用的互补性信息。

SomaScan使用的是一种称为SOMAmer的单链DNA适配体(图5)。这些适配体经过筛选和优化,能够与特定的蛋白质靶标高亲和力、高特异性地结合。在检测过程中,将样本与固定有SOMAmer的珠子混合。样本中的蛋白质与相应的SOMAmer结合,使珠子上的SOMAmer标记上生物素。然后,通过光切割将SOMAmer从珠子上释放下来,并使用单体抗生物素蛋白珠子对标记有生物素的SOMAmer进行纯化。释放和纯化后的SOMAmer通过DNA测序技术进行定量分析^[33]。由于每种SOMAmer与特定的蛋白质相对应,因此可以通过检测SOMAmer的数量来确定样

本中蛋白质的浓度。SomaScan能够同时对约7 000种蛋白质进行分析,动态范围可以超过8个数量级,非常适合在少量血液或脑脊液中检测低丰度和高丰度的蛋白质。PENN-NICHOLSON等^[35]研究人员使用SomaScan分析来测量从结核感染的健康青少年中收集的血浆,在这些血浆中分析了超过3 000种蛋白质的水平,并成功验证了不同蛋白质组合可以用来进行一年内的患病预测。目前,SomaScan技术已被应用于多种疾病的研究,包括眼部疾病、糖尿病、神经系统疾病等。通过分析蛋白质水平的变化,有助于揭示这些疾病的发病机制和寻找潜在的治疗靶点。

3 血液蛋白质组学研究在临床医学中的应用进展

随着技术的不断进步,如高灵敏度、高分辨率的质谱技术的发展,Olink和SomaScan新一代蛋白质组学技术的出现,以及多组学数据整合分析方法的应用,血液蛋白质组学研究将为临床医学带来更多的突破和创新。在疾病诊断方面,通过对血液蛋白质组的分析,发现了许多与疾病相关的生物标志物^[36]。例如,在心血管疾病中,特定蛋白质的表达水平变化可用于诊断心肌梗死、心力衰竭等疾病;在癌症领域,血液蛋白质组学有助于发现早期癌症的生物标志物,提高诊断的准确性和及时性^[37-38]。在疾病预后评估中,血液蛋白质组学也发挥着重要作用。通过监测患者治疗过程中蛋白质水平的动态变化,可以评估疾病的进展和治疗效果,为调整治疗方案提供依据。

3.1 质谱蛋白质组学技术研究进展

KNIGHT课题组^[39]利用质谱4D蛋白质组学技术及其他多组学的研究方法,为不同COVID-19严重程度的患者提供了一个综合的多组学血液图谱。MATTHIAS-MANN是蛋白质组学研究领域的一位著名科学家,他在蛋白质组学质谱技术研究方面获得了许多重要的突出成果,2022年该团队使用基于质谱(MS)的蛋白质组学工作流程分析了596个个体(137个对照和459个ALD个体)的血浆样本和79份肝脏活检样本,推断了酒精相关性肝病(alcohol-related liver disease, ALD)的分子病理生理学,并探讨了血浆蛋白质组学的诊断和预后能力^[40]。ASHTON等^[41]采用非靶向蛋白质组学分析方法,进行阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的临床评估,并结合肽分

级和高分辨率质谱定量血浆中蛋白的相对分度, 建立了一个预测A β 阳性受试者的12特征模型, 并证明其具有较高的准确性。TARDIF等^[42]研究者使用质谱蛋白质组学方法, 鉴定了骨关节炎(osteoarthritis, OA)特异性血清生物标志物, 发现CRTAC 1、FBN 1、VDBP以及可能的SERPINF 1这4种蛋白质值得进一步研究, 作为整个OA人群的潜在新生物标志物候选者。QU团队^[43]研究者, 利用DIA质谱蛋白质组学技术, 对362例上尿路上皮癌(upper tract urothelial carcinoma, UTUC)患者和239名健康对照者的血浆样本进行分析, 共鉴定了总共9 336个蛋白质, 描绘了UTUC队列的血浆蛋白质组学景观, 确定了一个10种蛋白分类器, 并建立了一个预测UTUC患者无进展生存期的进展时钟。综上所述, 在蛋白质组学研究中, 鉴定血浆或血清里可用于疾病诊断及监测的蛋白质生物标志物是一项关键内容。尽管高丰度蛋白的去除以及蛋白质的分离技术已普遍应用于生物标志物的鉴定工作, 然而新型质谱仪器(如4D质谱仪、Astral质谱仪等)的不断迭代更新, 即使无需进行预分离和高丰度蛋白去除操作, 也有望实现对疾病相关蛋白质的精准检测。这将进一步优化血液生物标志物的筛选过程, 并最终推动更高效的诊断方法和治疗手段的产生。

3.2 Olink蛋白质组学技术研究进展

Olink蛋白质组学借助高度特异的抗体, 对血清、血浆以及脑脊液等生物样本中的蛋白质进行定量测量。相比质谱技术通过提升灵敏度来识别更多蛋白种类, Olink更专注于一些功能性强且广泛受关注的蛋白, 显示出更明确的目标性。Olink平台有一个涵盖了多个疾病状态和器官特异性标志物的数据库, 研究人员可以根据需要进行具体和有针对性的蛋白质检测。不同的检测panel包括针对炎症、肿瘤生物标志物、心血管疾病、神经退行性疾病等相关的抗体进行相关领域的研究。CARRASCO-ZANINI等^[44]研究团队使用该技术整合了41 931个个体的约3 000种血浆蛋白的测量数据与临床信息, 建立了针对218种常见和罕见疾病的10年发病率预测模型。KONG等^[45]研究人员使用Olink检测92种与炎症相关的蛋白的表达水平, 对99名膀胱癌患者和50名健康对照组的血清和尿液样本进行分析, 确定了一组膀胱癌的生物标志物, 并描述了一种新的非侵入性检测方法, 使用血清和尿液样本来实现膀胱癌的早

期检测。这些蛋白质与膀胱癌的发展有关, 有希望用于临床检测以及药物开发以改善膀胱癌患者的预后。JIANG等^[46]团队人员使用Olink PEA技术筛选和验证了AD队列样本中的1 160种血浆蛋白, 并做了系统全面的分析, 鉴定出19种与AD相关的血浆核心蛋白标志物, 并据此开发了生物标志物模型, 其有望应用于AD的临床诊断并确定AD患者疾病严重程度。ÁLVEZ等^[47]相关人员使用Olink Explore 1536对来自1 400多名癌症患者的1 463种蛋白质的血浆谱进行量化, 来探索代表许多主要癌症类型的患者血液中的蛋白质组特征。ZHONG等^[29]研究者使用Olink Explore 1536, 对2型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)和对应的健康人队列进行检测, 研究T2D患者二甲双胍治疗前/后的蛋白质组差异, 经过系统分析后发现了一系列的标志物, 未来这些标志物可应用于开发糖尿病液态活检诊断标志物, 对糖尿病患者分型, 进一步加速慢性代谢类疾病的精准治疗。

3.3 SomaScan蛋白质组学技术研究进展

SomaScan技术能够同时测量大量蛋白质的水平, 这提供了对血液蛋白质组的全面洞察。SomaScan蛋白质组学技术在生物标志物发现、队列研究和药物研发等领域有广泛应用, 该技术已被应用于多种疾病的研究, 包括眼部疾病、糖尿病、神经系统疾病等。通过分析蛋白质水平的变化, 可揭示疾病的发病机制和寻找潜在的治疗靶点。OH等^[48]研究人员利用该技术对来自5个队列的5 676名参与者进行了血浆蛋白质组学分析, 确定了器官衰老和疾病的血清学指标, 器官衰老能够用于预测健康和疾病, 并利用血浆蛋白质组学建立了器官健康和生物衰老模型的框架。MOIN等课题组^[49]使用SomaScan检测了64个血液样本, 比较了长期轻度低血糖和深度短暂性低血糖对T2D患者和非糖尿病对照组患者的13种血小板相关蛋白(platelet-rich plasma, PRP)的影响, 探讨了糖尿病患者在低血糖状态下血小板激活的变化及其机制。轻度低血糖和深度低血糖均显示出持续长达24小时的显著PRP变化, 表明低血糖的严重程度和持续时间可能都很重要, 任何程度的低血糖都可能通过PRP变化增加心血管风险事件。CARRASCO-ZANINI等^[50]研究团队使用SomaScan蛋白质组学技术分析11 546名参与者血液样本中近5 000种蛋白质的表达水平。通过机器学习深度计算, 发现RTN4R、CBPM和GHR三种蛋白的组合

可显著提高对孤立性葡萄糖耐量受损 (isolated impaired glucose tolerance, iIGT) 个体的辨识能力, 这些候选蛋白的血浆水平升高与未来 T2D 风险增加相关。ROONEY 等^[51]研究者采用 SomaScan 技术对对照组 1 214 名, 糖尿病组 624 名的队列进行血浆蛋白质检测, 对 4 955 种血浆蛋白质与糖尿病发病机制的相关性进行了分析, 鉴定了 47 种预测糖尿病发生发展的血浆蛋白质, 建立了 3 种蛋白质的因果效应并确定了对诊断和治疗具有潜在意义的糖尿病相关炎症和脂质通路。

4 展望与讨论

人血液蛋白质组学研究作为蛋白质组学领域的一个重要分支, 近年来在技术和应用方面都取得了显著的进展。随着研究的不断深入, 我们对血液蛋白质组的复杂性有了更深刻的认识, 这些研究和认识同时也为疾病的诊断、治疗和药物研发提供了新的思路和方法。

质谱法在识别体液生物标志物方面具有潜力, 质谱是测量血浆和血清蛋白强大且有价值的技术, 而且质谱还适用于研究亲和技术难以触及的其他蛋白质组学方面, 包括蛋白质的异构体、多肽和翻译后修饰等^[52-53]。虽然受到技术和概念上的限制, 但通过吞吐量、流线型、稳健性和研究设计等方面的改进, 逐步克服了这些限制。已有技术将所有的样品制备步骤都整合到一个平台上并实现自动化, 包括使用液体处理机器人、新型高分辨质谱仪、全自动的数据分析流程, 这都将是非常有帮助的。这一领域的发展将为人类生物学和病理生理学研究提供更多重要信息, 有望在未来改善临床诊断和治疗^[54]。在临床应用中, 高分辨率、高质量准确度、高扫描速度的液质联合仪器变得越来越重要。构建一个强大且全面的生物标志物发现、验证及检测开发体系, 尤其是针对血浆/血清中的各类蛋白质靶点开展相关工作, 将极大地有助于新血液检测的出现, 这将最终有助于实现精确和个性化的医学。

亲和结合蛋白质组学研究在几年前仅限于数百个样本, 而近几年的迅速发展, 使亲和结合的蛋白质组学方法有望实现更大的规模, 并可能在未来几年解决目前对特异性的担忧^[55-56]。来自 Olink 的 3 000 多种蛋白检测技术和来自 SomaLogic 的 7 000 种蛋白检测技术, 未来会有更为广阔的发展空间, 检测种类未

来会更多。在这些平台技术之间, 蛋白质靶标有相当高的重叠。与目前使用质谱构建的人血浆肽图谱相比, 通过结合质谱这三个平台 (质谱、Olink、SomaLogic), 超过 8 000 种蛋白质可以在血浆中进行潜在的检测, 为迄今为止最大的血液蛋白分析提供了机会。

然而, 不同分析技术之间的相关性有限, 相同的蛋白质测量可能在蛋白质组分析方法之间有所不同, 这将影响蛋白质组模型的可转移性和通用性^[31,57-58]。最近的一项研究发现, 使用 SomaScan 和 Olink 这两种技术测量的重叠蛋白质之间, 斯皮尔曼相关性呈现出微弱的相关性, 这种相关性反映了两种技术在测量同一蛋白质时的相似性和差异性。而在另一项研究 ELDJARN 等^[31]根据 SomaScan 和 Olink 两个平台的研究结果, 发现两个平台之间的水平相关性为 0.33, 分布呈现两种模式。从传统 ELISA 方法测量的候选方法来看, 与 SomaScan 方法相比, Olink 方法获得的蛋白与 ELISA 的结果一致性更高, 这可能反映了 Olink 和 ELISA 都是使用抗体作为捕获试剂, 而不是适配体。SomaScan 的平台使用单个适体来测量目标蛋白, 而 Olink 的平台则需要结合两种不同抗体进行免疫分析, 这两个平台在测量蛋白质方面具有一定的差异, 也是近年来科学家们关注的重点问题。

人血液蛋白质组学研究正处于快速发展的阶段, 新技术的不断涌现和多学科的交叉融合为其带来了广阔的发展前景。单细胞组学技术作为新兴的研究方向和技术, 近年来也取得了一定的进展, 单细胞蛋白质组学尽管在血液研究中的应用仍面临诸多挑战, 但已经展现出巨大的潜力。单细胞蛋白质组学可以从单个细胞层面解析蛋白质的表达、修饰及功能, 探究细胞异质性, 这对于深入理解复杂生物体系具有非常重要的意义。基于质谱的单细胞蛋白质组学技术通过不断地优化样品制备流程和仪器性能, 已经能够在单细胞水平检测到多种种类的蛋白质^[59]。液滴微流控芯片技术与蛋白质组学的结合, 实现了对单细胞的精确操控和蛋白质分析, 提高了分析效率^[60]。在血液研究中, 单细胞蛋白质组学有望为血液疾病的发病机制解析、诊断和治疗提供全新的视角。在血液肿瘤研究中, 通过分析单个肿瘤细胞的蛋白质表达谱, 可以更精准地对肿瘤细胞进行分型, 有助于深入理解肿瘤异质性, 从而为个性化治疗提供依据^[61-62]。然而, 目前单细胞蛋白质组学

在血液研究中的应用仍处于起步阶段,面临着诸多技术难题,如极低样本量下蛋白质的高效提取和检测、单细胞蛋白质组数据的准确分析和解读等。因此单细胞蛋白质组学的应用仍然有很长的一段路要走,至少我们需要发展一种足够灵敏的检测细胞内极少量的蛋白质的技术。我们也应该认识到目前研究中仍然存在的挑战,需要进一步加强技术创新、方法优化和跨学科合作,以推动血液蛋白质组学研究在临床医学中的广泛应用。

参考文献 (References)

- [1] MACKLIN A, KHAN S, KISLINGER T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research [J]. *Clin Proteomics*, 2020, 17: 17.
- [2] LI X, WANG W, CHEN J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(10): 1093-113.
- [3] VIGNOLI A, TENORI L, MORSIANI C, et al. Serum or plasma (and which plasma), that is the question [J]. *J Proteome Res*, 2022, 21(4): 1061-72.
- [4] 胡伟, 江广志, 付涌水, 等. 血液成分的制备、使用和质量保证指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021.
- [5] MUTHUSAMY B, HANUMANTHU G, SURESH S, et al. Plasma proteome database as a resource for proteomics research [J]. *Proteomics*, 2005, 5(13): 3531-6.
- [6] PRINGELS L, BROECKX V, BOONEN K, et al. Abundant plasma protein depletion using ammonium sulfate precipitation and protein affinity chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1089: 43-59.
- [7] 常乘, 朱云平. 基于质谱的定量蛋白质组学策略和方法研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*(CHANG C, ZHU Y P. Research progress on strategies and methods of quantitative proteomics based on mass spectrometry [J]. *Scientia Sinica Vitae*), 2015, 45(5): 9-22.
- [8] GUAN S, TAYLOR P P, HAN Z, et al. Data dependent-independent acquisition (DDIA) proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(8): 3230-7.
- [9] CAO X, SANDBERG A, ARAÚJO J E, et al. Evaluation of spin columns for human plasma depletion to facilitate MS-based proteomics analysis of plasma [J]. *J Proteome Res*, 2021, 20(9): 4610-20.
- [10] KESHISHIAN H, BURGESS M W, GILLETTE M A, et al. Multiplexed, quantitative workflow for sensitive biomarker discovery in plasma yields novel candidates for early myocardial injury [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(9): 2375-93.
- [11] BLUME J E, MANNING W C, TROIANO G, et al. Rapid, deep and precise profiling of the plasma proteome with multi-nanoparticle protein corona [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3662.
- [12] SUN B B, SUHRE K, GIBSON B W. Promises and challenges of populational proteomics in health and disease [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2024, 23(7): 100786.
- [13] ZHANG Z, WU S, STENOEN D L, et al. High-throughput proteomics [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2014, 7: 427-54.
- [14] WOODS A G, SOKOLOWSKA I, NGOUNOU WETIE A G, et al. Mass spectrometry for proteomics-based investigation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1140: 1-26.
- [15] FENN J B, MANN M, MENG C K, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules [J]. *Science*, 1989, 246(4926): 64-71.
- [16] DUONG V A, PARK J M, LIM H J, et al. Proteomics in forensic analysis: applications for human samples [J]. *Appl Sci*, 2021, 11: 3393.
- [17] LIANG Y, ZHANG L, ZHANG Y. Chromatographic separation of peptides and proteins for characterization of proteomes [J]. *Chem Commun*, 2023, 59(3): 270-81.
- [18] Method of the Year 2012 [J]. *Nat Methods*, 2013, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2329>.
- [19] CORBETT J R, ROBINSON D E, PATRIE S M. Robustness and ruggedness of isoelectric focusing and superficially porous liquid chromatography with fourier transform mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32(1): 346-54.
- [20] LUDWIG C, GILLET L, ROSENBERGER G, et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial [J]. *Mol Syst Biol*, 2018, 14(8): e8126.
- [21] MIRZAEI H C M M. Proteomics-sample preparation, ANAL APPL [J]. Springer, 2016, doi:10.1007/978-3-319-41448-5.
- [22] ELIAS J E, GYGI S P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 207-14.
- [23] CHOI H, NESVIZHSHKII A I. False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(1): 47-50.
- [24] AUDAIN E, USZKOREIT J, SACHSENBERG T, et al. In-depth analysis of protein inference algorithms using multiple search engines and well-defined metrics [J]. *J Proteomics*, 2017, 150: 170-82.
- [25] DEMICHEV V, MESSNER C B, VERNARDIS S I, et al. DIANN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 41-4.
- [26] ZHU Y. Plasma/serum proteomics based on mass spectrometry [J]. *Protein Pept Lett*, 2024, 31(3): 192-208.
- [27] WIK L, NORDBERG N, BROBERG J, et al. Proximity extension assay in combination with next-generation sequencing for high-throughput proteome-wide analysis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100168.
- [28] ASSARSSON E, LUNDBERG M, HOLMQUIST G, et al. Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95192.
- [29] ZHONG W, EDFORS F, GUMMESSON A, et al. Next generation plasma proteome profiling to monitor health and disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2493.
- [30] GAGNON D, BARRY H, BARHDADI A, et al. A dataset of proteomic changes during human heat stress and heat acclimation [J]. *Sci Data*, 2023, 10(1): 877.
- [31] ELDJARN G H, FERKINGSTAD E, LUND S H, et al. Large-scale plasma proteomics comparisons through genetics and disease associations [J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 348-58.
- [32] LI Y, TAM W W, YU Y, et al. The application of aptamer in bio-

- marker discovery [J]. *Biomark Res*, 2023, 11(1): 70.
- [33] GOLD L, AYERS D, BERTINO J, et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15004.
- [34] FREDOLINI C, BYSTRÖM S, PIN E, et al. Immunocapture strategies in translational proteomics [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13(1): 83-98.
- [35] PENN-NICHOLSON A, HRAHA T, THOMPSON E G, et al. Discovery and validation of a prognostic proteomic signature for tuberculosis progression: a prospective cohort study [J]. *PLoS Med*, 2019, 16(4): e1002781.
- [36] PENG L, CANTOR D I, HUANG C, et al. Tissue and plasma proteomics for early stage cancer detection [J]. *Mol Omics*, 2018, 14(6): 405-23.
- [37] DEY K K, WANG H, NIU M, et al. Deep undepleted human serum proteome profiling toward biomarker discovery for Alzheimer's disease [J]. *Clin Proteomics*, 2019, 16: 16.
- [38] JOSHI S K, NECHIPORUK T, BOTTOMLY D, et al. The AML microenvironment catalyzes a stepwise evolution to gilteritinib resistance [J]. *Cancer cell*, 2021, 39(7): 999-1014.e8.
- [39] CONSORTIUM. C-M-O B A C C E A J K W O A U C-M-O B A C. A blood atlas of COVID-19 defines hallmarks of disease severity and specificity [J]. *Cell*, 2022, 185(5): 916-38.e58.
- [40] NIU L, THIELE M, GEYER P E, et al. Noninvasive proteomic biomarkers for alcohol-related liver disease [J]. *Nat Med*, 2022, 28(6): 1277-87.
- [41] ASHTON N J, NEVADO-HOLGADO A J, BARBER I S, et al. A plasma protein classifier for predicting amyloid burden for pre-clinical Alzheimer's disease [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(2): eaau7220.
- [42] TARDIF G, PARÉ F, GOTTI C, et al. Mass spectrometry-based proteomics identify novel serum osteoarthritis biomarkers [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 120.
- [43] QU Y, YAO Z, XU N, et al. Plasma proteomic profiling discovers molecular features associated with upper tract urothelial carcinoma [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(9): 101166.
- [44] CARRASCO-ZANINI J, PIETZNER M, DAVITTE J, et al. Proteomic signatures improve risk prediction for common and rare diseases [J]. *Nat Med*, 2024, doi: 10.1038/s41591-024-03142-z.
- [45] KONG T, QU Y, ZHAO T, et al. Identification of novel protein biomarkers from the blood and urine for the early diagnosis of bladder cancer via proximity extension analysis [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 314.
- [46] JIANG Y, ZHOU X, IP F C, et al. Large-scale plasma proteomic profiling identifies a high-performance biomarker panel for Alzheimer's disease screening and staging [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(1): 88-102.
- [47] ÁLVEZ M B, EDFORS F, VON FEILITZEN K, et al. Next generation pan-cancer blood proteome profiling using proximity extension assay [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4308.
- [48] OH H S, RUTLEDGE J, NACHUN D, et al. Organ aging signatures in the plasma proteome track health and disease [J]. *Nature*, 2023, 624(7990): 164-72.
- [49] MOIN A S M, SATHYAPALAN T, ATKIN S L, et al. The severity and duration of hypoglycemia affect platelet-derived protein responses in caucasians [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 202.
- [50] CARRASCO-ZANINI J, PIETZNER M, LINDBOHN J V, et al. Proteomic signatures for identification of impaired glucose tolerance [J]. *Nat Med*, 2022, 28(11): 2293-300.
- [51] ROONEY M R, CHEN J, ECHOUFFO-TCHEUGUI J B, et al. Proteomic predictors of incident diabetes: results from the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *Diabetes Care*, 2023, 46(4): 733-41.
- [52] LAI Y H, WANG Y S. Advances in high-resolution mass spectrometry techniques for analysis of high mass-to-charge ions [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2023, 42(6): 2426-45.
- [53] BRODBELT J S. Deciphering combinatorial post-translational modifications by top-down mass spectrometry [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, 70: 102180.
- [54] GEYER P E, AREND F M, DOLL S, et al. High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(8): e14167.
- [55] FRASER D D, CHEN M, REN A, et al. Novel severe traumatic brain injury blood outcome biomarkers identified with proximity extension assay [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2021, 59(10): 1662-9.
- [56] FRASER D D, CEPINSKAS G, PATTERSON E K, et al. Novel outcome biomarkers identified with targeted proteomic analyses of plasma from critically ill coronavirus disease 2019 patients [J]. *Crit Care Explor*, 2020, 2(9): e0189.
- [57] KATZ D H, ROBBINS J M, DENG S, et al. Proteomic profiling platforms head to head: leveraging genetics and clinical traits to compare aptamer- and antibody-based methods [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(33): eabm5164.
- [58] ABE K, BEER J C, NGUYEN T, et al. Cross-platform comparison of highly-sensitive immunoassays for inflammatory markers in a COVID-19 cohort (1) [J]. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.10.24.563866.
- [59] TAJIK M, BAHARFAR M, DONALD W A. Single-cell mass spectrometry [J]. *Trends Biotechnol*, 2022, 40(11): 1374-92.
- [60] SHANG Y, WANG Z, XI L, et al. Droplet-based single-cell sequencing: strategies and applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2024, 77: 108454.
- [61] DUTTA A K, ALBERGE J B, SKLAVENITIS-PISTOFIDIS R, et al. Single-cell profiling of tumour evolution in multiple myeloma-opportunities for precision medicine [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(4): 223-36.
- [62] CAMPILLO-MARCOS I, ALVAREZ-ERRICO D, ALANDES R A, et al. Single-cell technologies and analyses in hematopoiesis and hematological malignancies [J]. *Exp Hematol*, 2021, 98: 1-13.