

高脂血症患者血脂净化治疗的血清蛋白质组学研究

徐东^{1,2}, 杨叶晓青³, 刘容^{1,2}, 胡中瀚^{1,2,4}, 吕定丰³, 唐科奇^{1,2}

(1. 宁波大学材料科学与化学工程学院, 质谱技术与应用研究院, 浙江宁波 315211; 2. 宁波镇海质谱技术研究院, 浙江宁波 315211; 3. 宁波大学附属第一医院, 浙江宁波 315010; 4. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 为深入探索高脂血症患者单次血脂净化治疗后的生物学影响, 本研究采用高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术结合非数据依赖性采集方法, 分别对血脂净化治疗前、治疗后 2 h 的 8 组样本进行血清蛋白质组学分析, 共发现 13 个表达量上调和 7 个表达量下调的蛋白; 同时还对 1 名患者血脂净化治疗前和治疗后 2 h、2 天以及 7 天的蛋白表达量变化进行时间序列追踪, 共筛选出 29 个具有差异表达的蛋白。另外, 分别对筛选出的差异蛋白进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。结果表明: 在治疗前后蛋白质组学中发现的中性粒细胞相关蛋白——中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, ELANE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、乳铁蛋白(lactotransferrin, LTF)和组织蛋白酶 G(cathepsin G, CTSG), 以及在时间序列蛋白质组学中发现的血小板相关蛋白——血小板第 4 因子(platelet factor 4, PF4)和血小板碱性蛋白(pro-platelet basic protein, PPBP), 均与中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)通路相关; 其中, 中性粒细胞相关蛋白表达量均下调, 血小板相关蛋白表达量则呈先升高后下降的趋势。结果表明, 高脂血症患者进行单次血脂净化治疗后, 可能直接或间接影响生物体内 NETs 通路, 并可能缓解由此带来的炎症和血栓风险。

关键词: 高脂血症; 蛋白质组学; 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); 时间序列; 血清

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2026)03-0485-10

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0143

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0143

Serum Proteomic Analysis of Lipoprotein Apheresis in Patients with Hyperlipidemia

XU Dong^{1,2}, YANG Ye-xiao-qing³, LIU Rong^{1,2}, HU Zhong-han^{1,2,4}, LYU Ding-feng³, TANG Ke-qi^{1,2}

(1. Institute of Mass Spectrometry, School of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Zhenhai Institute of Mass Spectrometry, Ningbo 315211, China; 3. The First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, China; 4. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Hyperlipidemia is a chronic disease characterized by elevated cholesterol and triglyceride levels in the blood, and has been identified as a common risk factor for many cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, heart disease, stroke and obesity. Blood, an easily accessible non-invasive specimen that contains a variety of proteins, offers insights into pathological changes. Understanding the protein expression changes in hyperlipidemia patients after lipoprotein apheresis is important for identifying proteins related to hyperlipidemia, which is crucial for preventing or mitigating the progression of hyperlipidemia. In this study, a method of high-performance liquid chromatography-

mass spectrometry (LC-MS/MS) combined with data-independent acquisition (DIA) was used to explore the effects of lipoprotein apheresis on patients with hyperlipidemia. Eight paired serum samples were included, which were collected from eight patients prior to and 2 h after apheresis. To ensure the reliability and sensitivity of proteomic measurements, the sample pretreatment protocol was optimized, with acetone precipitation selected as the optimal method for protein extraction and purification, thus effectively removing interfering substances. Under the optimized pretreatment conditions, a total of 13 up-regulated and 7 down-regulated proteins (two-tailed Student's *t*-test, $p < 0.05$ and $|\log_2 FC| > 0.585$) were identified by proteomic analysis. In addition, the time-series protein expression changes in a single patient were tracked at four points (before, 2 h, 2 days, and 7 days after lipoprotein apheresis) using the same DIA LC-MS/MS approach. A total of 29 differentially expressed proteins were screened out. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were further performed on these proteins. The results showed that neutrophils associated proteins-ELANE (neutrophil elastase), MPO (myeloperoxidase), CTSG (cathepsin G), and LTF (lactotransferrin) found in proteomics before and after apheresis, as well as platelet associated proteins-PF4 (platelet factor 4), PPBP (pro-platelet basic protein) found in time-series proteomic analyses, were all associated with the neutrophil extracellular trap network (NETs) pathway. Furthermore, the expression levels of neutrophil related proteins were uniformly down-regulated, whereas those of platelet related proteins exhibited a trend of first increasing and then decreasing. In conclusion, these results suggested that lipoprotein apheresis in patients with hyperlipidemia may directly or indirectly affect the formation of NETs pathways in the body and alleviate the potential risks of inflammation and thrombosis, which provides a valuable theoretical basis for preventing or mitigating the progression of hyperlipidemia. A major limitation of this study is the relatively small sample size, therefore, additional validation with a larger cohort of clinical samples will be required in future research to confirm these findings.

Key words: hyperlipidemia; proteomics; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); time-series; serum

高脂血症是一种以血液中胆固醇和三酰甘油水平升高为特征的慢性疾病。该疾病的发生可能由多种因素引起,包括高脂肪食物摄入、遗传缺陷及代谢紊乱^[1-2]。高脂血症已被确认为多种心血管疾病的常见危险因素,例如动脉粥样硬化、心脏病、脑卒中、肥胖和2型糖尿病等^[3]。随着人们生活水平的不断提高,膳食结构逐渐向加工食品倾斜,高脂血症愈发成为威胁人类健康的重大隐患,并呈现低龄化趋势。据最新统计数据,全球每年约有1 790万人死于心血管疾病,其中高脂血症患者发生心血管疾病的风险约为非高脂血症患者的2倍^[4]。Wang等^[5]指出,我国高脂血症的发病率高达40%。此外,有研究^[6]表明,高脂血症是一种由多个蛋白靶点共同介导的疾病。因此,寻找与高脂血症相关的蛋白靶点,对预防或缓解高脂血症进展具有重要作用。

蛋白质是生物体的核心组成成分,是基因密

码的效应者,是所有细胞功能的执行分子,同时也是潜在的药物治疗靶点^[7]。血液作为临床检验中最重要的生物样本,具有易获取、无创的优势,且其蛋白质组成非常丰富。近年来,基于血液的蛋白质组学分析已成为疾病研究中检测失调蛋白、了解病理机制和识别疾病生物标志物的有力工具^[7]。Jiang等^[8]采用无标记定量方法鉴定不同饮食模式下高脂血症患者血液中蛋白质的表达量变化,并结合生物信息学分析方法对差异蛋白进行深入解析,有效鉴定了与高脂饮食患者相关的蛋白质。Wang等^[9]采用血浆蛋白质组学技术,研究膳食中补充姜黄素对小鼠高脂血症的预防作用及其潜在机制。

血脂净化技术是近年迅速发展起来的区别于传统调脂治疗的一种微创、高效的治疗手段。该技术通过体外血液循环分离患者血浆,去除其中的有害脂质以及炎症因子等致病物质^[10]。

研究表明, 单次血脂净化治疗可在 3.5~4 h 内使患者体内的胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白(LDL)等脂质指标水平下降 50%~70%, 该技术有望发展成为未来临床广泛采用的调脂治疗手段^[1]。然而, 当前针对血脂净化技术在高脂血症患者中的治疗机制研究仍十分匮乏。

本研究采用高性能液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术结合非依赖性数据采集(data-independent acquisition, DIA)方法, 对血脂净化治疗前、后, 以及单次血脂净化后 7 天内不同时间点的血清进行蛋白质组学分析, 旨在探究高脂血症患者血脂净化治疗后血清中蛋白表达量的变化及可能涉及的生物学功能, 从而为后续相关研究奠定基础。此外, 本研究还将对血清样本的前处理方法进行优化, 以获得更好的鉴定结果。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Eclipse Orbitrap 质谱仪、Vanquish Neo 高效液相色谱仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品, 配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 数据处理系统; Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; Auto R1-Plus 冷冻离心浓缩仪: 北京吉艾姆科技有限公司产品; MonoSpin C18 除盐小柱: 日本 GL Science 公司产品。

1.2 材料与试剂

血脂净化治疗前(8例)、血脂净化治疗后 2 h(8例)、血脂净化后 2 天(1例)以及血脂净化后 1 周(1例)的血清: 由宁波大学附属第一医院提供, 获宁波大学附属第一医院伦理委员会批准(伦理号: 304A 号)和所有供试者的知情同意。

二硫苏糖醇(纯度 >99%)、碘乙酰胺(纯度 ≥99%)、碳酸氢铵(纯度 >99%)、尿素(纯度 ≥99%): 美国 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶(测序级): 美国 Promega 公司产品; LC-MS 级甲醇、三氟乙酸(TFA)、甲酸(FA)和乙腈(ACN)、BCA 蛋白定量试剂盒、肽段定量试剂盒: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; 屈臣氏蒸馏水: 广州长江和记有限公司旗下屈臣氏产品; 丙酮(HPLC 级, 纯度 ≥99%): 中国南京化学试剂股份有限公司产品。

1.3 临床样本收集

分别采集患者的新鲜静脉血样本于真空采血管内, 静置 3 h 后, 在 4 °C 条件下, 将血样以

1 500 r/min 离心 10 min, 取上清液(即血清)于新离心管中, 并根据实验需要对其进行分装, 防止反复冻融影响血清样本质量, 保存于 -80 °C 冰箱中, 备用。

1.4 蛋白酶切

取 100 μg 经 BCA 蛋白检测试剂盒定量的血清蛋白于 1.5 mL 离心管中, 加入 9 倍体积的 8 mol/L 尿素溶液(溶解于 0.1 mol/L 碳酸氢铵溶液中)对蛋白进行变性处理, 用枪头吹匀后, 分别加入 0.1 mol/L 碳酸氢铵溶液将尿素浓度稀释至 1.0 mol/L 以下; 随后加入 1.0 mol/L DTT 溶液使其终浓度为 10 mmol/L, 于 37 °C 孵育 45 min; 然后加入 1.0 mol/L IAA 溶液使其终浓度为 20 mmol/L, 并置于室温避光孵育 30 min; 接着再次加入与前次等量的 1.0 mol/L DTT 溶液, 室温孵育 10 min, 以去除过量的 IAA; 随即加入 6 倍体积经 -20 °C 预冷的丙酮, 并置于 -20 °C 冰箱中过夜沉淀; 于 4 °C 下以 6 236 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 然后加入 300 μL 丙酮, 超声使沉淀分散均匀, 再按照相同的条件离心, 移去上清液; 重复 2 次后, 置于通风处干燥。向干燥后的蛋白中加入 100 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液溶解, 按照蛋白:胰蛋白酶=50:1(w/w)加入胰蛋白酶, 于 37 °C 反应 12 h; 再按蛋白:胰蛋白酶=100:1(w/w)补充胰蛋白酶, 继续于 37 °C 孵育 6 h。酶解结束后, 加入 10%TFA 溶液调至 pH 2~3, 以终止反应。酶解后的肽段经 Monospin C18 小柱除盐后, 采用低温真空离心浓缩仪干燥, 并将其保存于 -80 °C 冰箱中, 备用。

1.5 液相色谱-质谱分析

将除盐后的肽段粉末溶解于 0.1%FA 水溶液中, 配制成 250 mg/L 肽段溶液, 单次进样体积为 1 μL, 每份样品进行 3 次技术重复。

1.5.1 色谱条件 C18 捕获柱(75 μm×2 cm, 3 μm, 100 Å); C18 分析柱(75 μm×25 cm, 2 μm, 100 Å); 流动相 A 为 0.1%FA 溶液, B 为 0.1%FA-80%ACN 溶液; 流速 300 nL/min; 梯度洗脱程序: 0~1 min (2.5%~7%B), 1~76 min(7%~23%B), 76~96 min (23%~32%B), 96~114 min(32%~90%B), 114~120 min(90%B); 柱温箱温度设为 50 °C。

1.5.2 质谱条件 质谱参数参照本课题组先前报道^[12]: ESI 源电压 2.0 kV; 离子传输管温度 320 °C; 采取 DIA 模式, 循环时间 1.5 s; 一级质量扫描范围 m/z 350~1 500, 分辨率 120 000(m/z 200), 自动增益设为 1×10^6 , 采集时设置可变隔离

窗口, 隔离窗口内所有离子皆被高能碰撞解离方法碎裂, 归一化碰撞能为 30%; MS/MS 分辨率和自动增益分别设定为 30 000 和标准, 动态排除时间 30 s, 最大进样时间设为 AUTO。

1.6 数据库检索

所得数据采用开源软件 DIA-NN (Version 1.8.1) 进行数据库搜索, 具体参数设置如下: 实验所用的人类蛋白库自 Uniprot 下载 (2022 年版本, 共计 20 381 蛋白); 多肽长度 7~45; 前体离子电荷数 2~7; 母离子 m/z 100~1 800; 碎片离子 m/z 200~2 000; 一级质量容差设为 10^{-5} ; MS/MS 质量容差设为 2.0×10^{-5} ; 蛋白酶为胰蛋白酶, 最大漏切位点为 2。固定修饰为半胱氨酸的氨基甲基化 (C, +57.012 5), 动态修饰为蛋氨酸的氧化 (M, +15.995), N 端乙酰化; 肽段水平和蛋白质水平的假发现率 (FDR) 阈值均设置为 1%。同时, 开启 Match Between Run (MBR) 功能。

1.7 数据分析和功能分析

利用 Excel 对 DIA-NN 搜库结果进行归一化处理, 选取同一样本 3 次技术重复的变异系数 (coefficient of variation, CV) < 20% 的蛋白进行蛋白差异表达分析。采用双样本方差齐性 F 检验对 2 组数据进行验证, 结果显示, 2 组方差无显著差异 ($F=0.928$, $df=468$, $p=0.417$), 符合方差齐性假设, 因此采用等方差假设的双尾独立样本 Student's t 检验进行组间比较, 并将显著性阈值设为 $p < 0.05$ 。差异蛋白定义为血脂净化后/净化前蛋白表达量变化倍数 > 1.5, 且未经校正的 p -value < 0.05。质控的皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient, PCC) 分析, 以及对所选取的差异蛋白进行基因本体 (Gene ontology, GO) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集使用 R 语言 (v4.4.2) 的 corrplot、ggplot2 函数包进行分析及可视化, 蛋白质-蛋白质相互作用分析 (protein-protein interaction analysis) 通过 String 平台 (<https://cn.string-db.org>) 进行分析和可视化^[13], 并设定最低交互评分标准为高置信度 (0.700)。

2 结果与讨论

2.1 丙酮沉淀对蛋白鉴定结果的影响分析

为探究血脂净化前后高脂血症患者血清中蛋白的变化情况, 本研究共纳入 8 例医学上具有高脂血症患者的血清, 采用高效液相色谱-质谱

联用技术对其进行分析鉴定。同时, 为探究血脂净化后短期内患者体内的蛋白变化情况, 本研究选取其中 1 名血脂净化患者进行追踪, 并分别采集其净化后 2 h、2 天以及 7 天的血清样品。本研究对收集到的血清样本进行蛋白变性、还原烷基化处理, 再采用胰蛋白酶将其酶解成多肽, 所得产物经纳升液相色谱-质谱 (nano-LC-MS/MS) 检测, 随后使用 DIA-NN 软件进行蛋白质搜库, 并对结果进行差异蛋白筛选和生物信息学分析, 其流程示于图 1。

高脂血症患者血液中含有的大量脂肪极易对后续分析造成干扰, 因此, 样本前处理方案优化直接关系到实验结果的准确性和重复性。据文献^[14-16]报道, 丙酮沉淀法可将蛋白质沉降, 从而达到蛋白质纯化的目的。为尽可能检测到更多种类的蛋白质, 本研究每组实验设置 3 个生物学重复, 分析对比未用丙酮沉淀和利用丙酮沉淀法能鉴定到的蛋白质数量及蛋白质种类, 结果示于图 2a。可见, 未经丙酮沉淀法处理的 3 次生物学重复, 仅能鉴定且定量的蛋白质总数为 305; 经丙酮沉淀后, 可鉴定并定量的蛋白质总数为 325, 相较于前者增加了 20 种, 提升幅度达 6.6%。此外, 考虑到丙酮沉淀可能造成蛋白质种类的丢失, 本研究将两者鉴定到的蛋白质种类进行对比, 结果示于图 2b。可见, 两者共同鉴定到 301 种重复蛋白, 占未经丙酮处理蛋白质总数的 98.7%, 表明采用丙酮沉淀法处理血清蛋白不仅能提高蛋白质鉴定总数, 且不会丢失原本可以鉴定到的蛋白质。基于此, 后续实验将采用丙酮沉淀法进行血清样本的前处理。

2.2 血脂净化治疗前后的血清蛋白质组学分析

为监测分析检测过程中质谱仪的稳定性及所获数据的可靠性, 本研究各取 10 μ L 血清样本混合, 将经酶解后所得的肽段作为质控样品, 每 12 次进样添加 1 个质控。在数据采集期间, 6 个质控样品鉴定到的蛋白质数量为 339 ± 11 , 示于图 3a; 且皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient, PCC) 值均超过 0.99, 示于图 3b。表明本研究的质谱数据具有较高的重复性和可靠性。

本研究共纳入 8 例血脂净化治疗前和 8 例血脂净化治疗后 2 h 的血清, 对每例血清进行 3 次技术重复, 成功鉴定且定量的蛋白质共有 493 种。以血脂净化前 (prior apheresis) 的 8 例血清作为控制组, 血脂净化后 (post-apheresis) 2 h 采

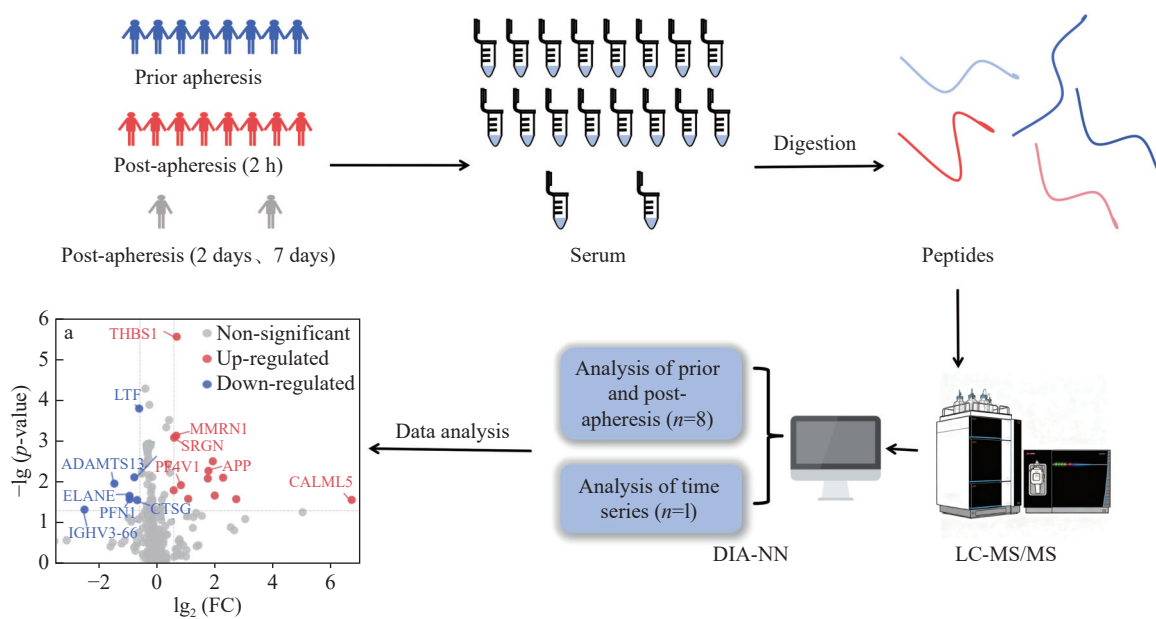
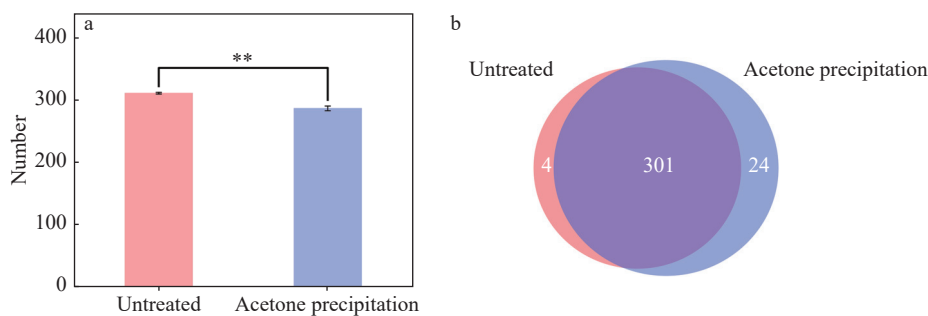


图1 血清样本蛋白质组学研究流程图
Fig. 1 Workflow of serum proteomics analysis



注: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

图2 丙酮沉淀法与未经沉淀处理的3次生物学重复蛋白质鉴定总量(a)和鉴定蛋白质韦恩图(b)
Fig. 2 Number of identified proteins (a) and Venn diagram of protein identification (b) in biological replicates using acetone precipitation method and no-precipitation treatment

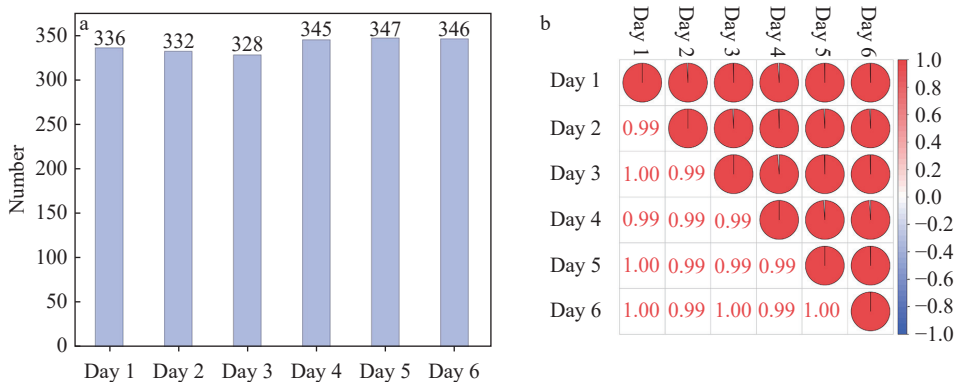


图3 6次质控单独鉴定的蛋白质数(a)和皮尔逊相关系数图(b)
Fig. 3 Number of identified proteins (a) and plot of Pearson's correlation coefficient (b) from 6 quality control replicates

集的8例血清作为实验组,以实验组与控制组鉴定蛋白表达量倍数变化 >1.5 或 <0.67 、且 $p < 0.05$ 为阈值,对所鉴定的蛋白质进行差异分析,共筛选出13个上调蛋白和7个下调蛋白,示于图4a。

为探究差异表达蛋白的生物学功能,本研究对上调和下调蛋白进行GO富集分析和KEGG通路分析,两者FDR值均小于0.05。GO分析包括生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)3个部分,示于图4b。在生物学过程中,差异蛋白在炎症免疫反应相关的酵母应答反应过程显著富集,已有文献^[16]报道,该过程与炎症免疫反应密切相关;从细胞组分角度分析,差异蛋白显著富集于分泌颗粒、细胞外区域、细胞外空间、细胞表面、胞外酶外泌体、嗜天青颗粒腔体和吞噬泡腔等区域;在分子功能层面,差异蛋白显著富集于肝素结合及肽酶活性。此外,KEGG通路分析结果显示,差异蛋白主要显著富集于中性粒细胞胞外诱捕网形成(NETs)和RAP1信号通路,示于图4c。有趣的是,通过对GO和KEGG显著富集通路中差异蛋白进行

深度分析,发现中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, ELANE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、乳铁蛋白(lactotransferrin, LTF)和组织蛋白酶G(cathepsin G, CTSG)4种蛋白质可参与调控多种生物学功能。同时,这4种蛋白质在血脂净化后均呈现下调趋势,且均为中性粒细胞介导免疫调节的核心参与者^[17-18]。为进一步探究差异表达蛋白间的相互作用关系,本研究对差异蛋白进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析,将交互得分阈值设为0.7,分析结果提示,ELANE、MPO、CTSG及LTF蛋白间可能存在紧密的相互作用关系,示于图4d。

NETs在生物体先天免疫反应中扮演着至关重要的角色,其是由中性粒细胞自身DNA和中性粒细胞颗粒中所含抗菌蛋白质构成的网状结构。颗粒蛋白包括CTSG、MPO、ELANE,以及来自特定(次级)颗粒和三级颗粒的蛋白质,如LTF^[17]。这些胞外结构可捕获病原微生物,阻止其扩散,并在局部形成高浓度抗菌剂,有效分解毒力因子并灭杀微生物,但同时也极易引发炎症^[18]。因此,中性粒细胞胞外诱捕网形成(NETosis)首先需要激活中性粒细胞受体,其激

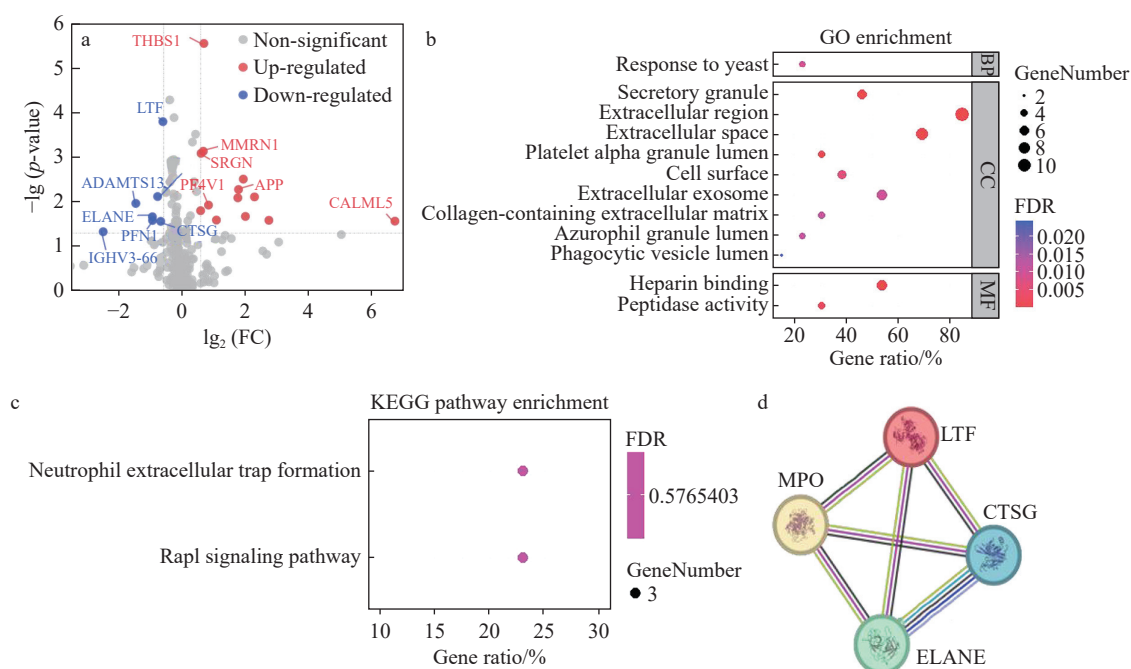


图4 血脂净化前后蛋白质表达火山图(a),血脂净化前后差异蛋白的GO富集图(b)和KEGG通路富集图(c),差异蛋白的PPI网络分析(d)

Fig. 4 Volcano plot of protein expression profiles before and after lipoprotein apheresis (a), GO enrichment (b) and KEGG pathway enrichment (c) plots of differentially expressed proteins before and after lipoprotein apheresis, and PPI network analysis plot of differentially expressed proteins (d)

活途径主要有2种:一种称为自杀性NETosis或者NOX依赖型NETosis,其为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)依赖性激活途径,可通过激活蛋白激酶C(PKC)和NOX的活性,诱导活性氧(ROS)生成,进而进一步激活MPO、ELANE等中性粒蛋白形成NETs;另一种称为活性NETosis,涉及微生物、活化血小板(PLTs)或补体蛋白通过中性粒细胞表面受体刺激释放NETs^[17-21],其中,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)可通过ROS依赖途径,经TLR4和TLR6诱导NETs形成^[17]。高脂血症患者普遍存在脂质代谢异常,Deng等^[22]发现,脂质代谢异常可引发脂毒性,进而导致氧化应激反应,使机体内ROS水平显著升高,促使细胞内LDL氧化生成ox-LDL。Chen等^[18]报道,ox-LDL可被中性粒细胞表面的Toll样受体识别,并由此激发自杀性NETosis。因此可推测,高脂血症患者体内长期存在的脂质代谢异常可能通过升高ox-LDL水平而诱发体内自杀性NETosis,从而使MPO、ELANE、CTSG等中性粒细胞相关蛋白质增加,以进攻病原体、启动人体免疫防护,但长期的脂质代谢异常可能导致NETs失调,进而引发免疫炎症。

本研究发现,在血脂净化后,中性粒蛋白(MPO、ELANE、CTSG和LTF)的质谱检测信号强度均呈下降趋势。考虑到不同患者间可能存在的个体差异,进一步比较每位患者血脂净化前后的目标蛋白强度,示于图5。可见,MPO、CTSG和LTF蛋白质在8名患者中的相对含量相差不大;而ELANE蛋白质含量高于其他3种;上述4种蛋白质在血脂净化后均呈现明显的下降趋势,可能与NETosis过程的减弱或清除加速有关。上述结果表明,高脂血症患者经血脂净化治疗后,可能直接或间接抑制了由NETs失调引发的炎症反应,从而使机体炎症得到缓解。然而,这一假设仍需大样本量的临床研究加以验证。

2.3 血脂净化治疗时间序列的血清蛋白质组学分析

为进一步探究单次血脂净化治疗后不同阶段患者血清中的蛋白质变化情况,在征得患者同意后,选取其中1名患者进行为期7天的追踪,具体时间点为治疗前、治疗后2h、治疗后2天和治疗后7天。本研究对以上时间点的血清蛋白进行两两组合对比分析,共筛选出29种差异

表达蛋白。GO分析发现,在生物过程中,差异蛋白显著富集于血小板激活、血小板凝聚、血液凝固以及凝血溶解过程,示于图6a;在细胞成分中显著富集于纤维蛋白原复合物、血微颗粒以及血小板 α 颗粒腔。上述发现均提示血小板活动以及凝血功能的改变。此外,在生物过程层面,差异蛋白主要富集于中性粒细胞趋化、细胞成分分类中的三级颗粒腔室、细胞外分泌体,以及分子功能分类中的丝氨酸型肽酶及其内肽酶活性、趋化因子活性、特异性受体CXCR结合等通路,这些通路均指向免疫与炎症反应,且与中性粒细胞蛋白密切相关。总而言之,时间序列样本中筛选得到的差异蛋白主要与血小板相关反应及中性粒细胞介导的免疫与炎症反应相关。

值得一提的是,本研究在对时间序列差异蛋白进行KEGG通路分析时,NETs再次出现,进一步证实了上文中血脂净化前后差异蛋白分析的可靠性,示于图6b。而血小板相关蛋白质、中性粒细胞相关蛋白质的富集,以及NETs通路的发现,也揭示了NETs形成的另一机制——由活化血小板介导的中性粒细胞胞外陷阱形成,即活性NETosis。

随后,本研究对筛选出的时间序列中差异蛋白进行PPI网络分析,将最低交互得分阈值设为0.7,结果示于图6c。Craestia等^[21]发现,受激血小板可释放血小板第4因子(platelet factor 4, PF4),进而刺激中性粒细胞形成NETs。因此,PF4蛋白以及在PPI网络中与其密切关联的血小板碱性蛋白(pro-platelet basic protein, PPBP)和血小板因子4变体(platelet factor 4 variant, PF4V1)蛋白成为本研究关注的焦点。PPBP和PF4蛋白在血清中的相对表达量随时间变化均呈现先升高后降低的趋势,且两者趋势高度一致,表明这2种蛋白间可能存在相关性;虽然PF4V1蛋白相对含量的变化趋势在治疗后2天内与PPBP和PF4略有差异,但在治疗7天后则基本一致,表明PPBP、PF4和PF4V1极有可能以协同作用方式影响人体患高脂血症的概率,示于图6d。

PPBP与PF4均为血小板 α 颗粒释放蛋白质,其表达量减少可能产生以下两方面影响:其一,作为活性NETosis的重要触发因子,PF4与PPBP表达量的减少可能从源头上抑制NETs形成,进而降低NETs通路被过度触发而导致慢性炎症形成的可能性;其二,本研究中,该例患者的

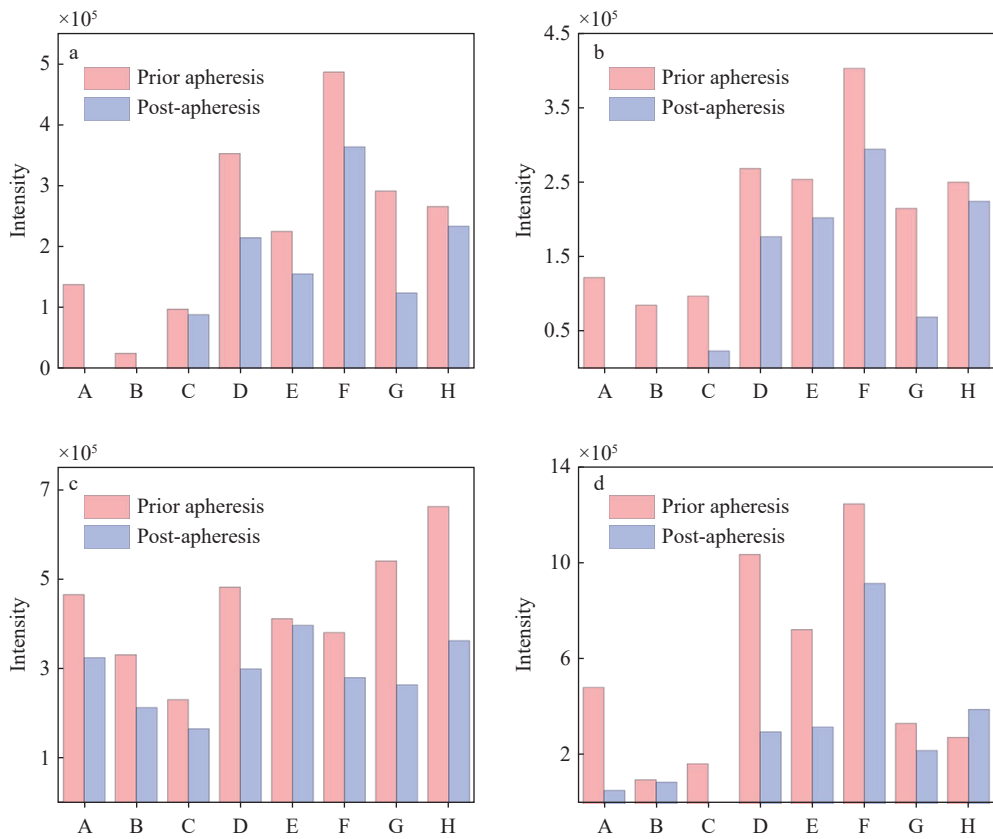


图5 血脂净化前后中性粒细胞蛋白 CTSG(a)、MPO(b)、LTF(c)、ELANE(d)在质谱检测中的表达量
 Fig. 5 Expression levels of neutrophil protein CTSG (a), MPO (b), LTF (c), ELANE (d) detected by mass spectrometry before and after lipoprotein apheresis

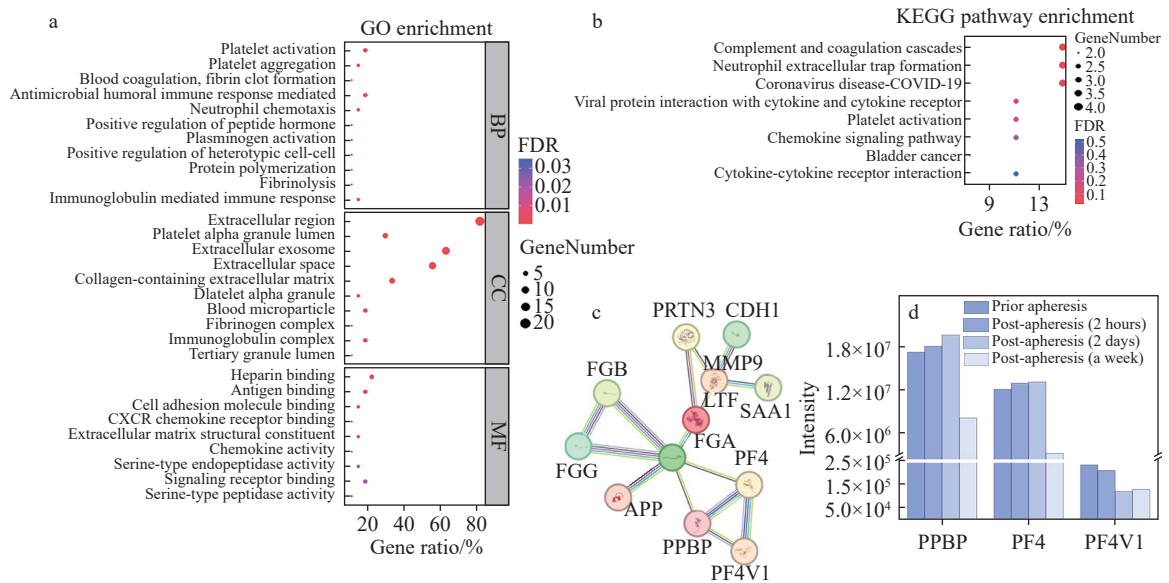


图6 时间序列差异蛋白 GO 富集分析(a), KEGG 通路分析(b)和 PPI 网络分析(c), 以及 PPBP、PF4、PF4V1 在时间序列中的表达量(d)

Fig. 6 GO enrichment analysis (a), KEGG pathway analysis (b) and PPI (c) network analysis of time-series differentially expressed proteins, and expression levels of PPBP, PF4 and PF4V1 in the time-series (d)

数据分析提示,其体内致栓微环境可能发生了改变。Mosso-pani 等^[23-24]指出,当血小板因子激活中性粒细胞释放 MPO 等蛋白质后,血小板与中性粒细胞通过 P-选择素与中性粒细胞表面的 P-选择素粒细胞配体(PSGL)-1 结合,形成血小板-中性粒细胞复合物(platelet-neutrophil aggregates, PNAs),该复合物不仅增强了中性粒细胞功能,同时构成了致栓微环境,驱动病理学血栓的形成。伴有心肌梗死的血栓患者主要由血小板活化、中性粒细胞及邻近血小板的 NETs 导致,而高脂血症患者是血栓等心血管疾病的高发人群。因此,血脂净化治疗后,病人体内 PF4 等血小板相关蛋白质的减少,可能预示着其发生血栓的风险降低。

2.4 研究局限性与展望

本研究提出的 NETs 抑制假设主要基于差异蛋白的生物信息学关联,缺乏直接有力的实验验证。在未来研究中,将从以下几方面开展验证工作:1)采用免疫印迹法(western blot)、酶联免疫吸附(ELISA)等实验技术,验证本研究发现的差异蛋白在血脂净化治疗前后的表达量是否发生显著变化;2)检测经典炎症因子和血栓标志物,以验证血脂净化技术是否能够缓解炎症、降低血栓风险,进而验证本研究提出的假设的可靠性;3)鉴于时间序列样本的采集难度较高,本研究仅基于单个患者进行时间序列分析,其结果虽然揭示了个体内的动态变化,但普适性受到限制。目前,本课题组已在搜集更多时间序列样本,可为后续深入研究提供数据支撑。

3 结论

本研究采用 LC-MS/MS 技术结合 DIA 采集方法,对高脂血症患者单次血脂净化治疗前后的血清蛋白进行检测。分析发现,中性粒细胞相关蛋白 ELANE、MPO、CTSG 和 LTF 在血脂净化治疗后的表达量均呈下调趋势;生物信息学分析表明,这 4 种蛋白均在 NETs 通路中显著富集,由此推测单次血脂净化治疗在降低低密度脂蛋白的同时,可能缓解了中性粒细胞相关蛋白质参与 NETs 所引发的炎症反应。同时,本研究选取其中 1 名患者血脂净化治疗后 2 h、2 天以及 7 天血清中的蛋白质进行深度分析,共筛选出 29 种差异表达蛋白。其中,PF4 和 PPBP 在治疗 7 天后的表达量显著下降,且两者变化趋势高度

一致。生物信息学分析结果显示,PF4 和 PPBP 均由血小板 α 颗粒释放,且可启动 NETs 通路;同时,血小板与中性粒细胞可共同作用形成 PNAs,进而构建致栓微环境。因此,上述 2 种蛋白质的表达下调可能预示血脂净化技术不仅能缓解 NETs 介导的免疫炎症反应,同时可降低高脂血症患者的血栓发生风险,为阐释该治疗手段的长期调控提供了初步线索。此外,本研究纳入的时间序列样本数量有限,且缺乏验证性实验,后续将收集更大数量及多中心样本,以验证本文中的发现。

参考文献:

- [1] 孙露,赵桂峰. 中医治疗高脂血症研究进展[J]. *光明中医*, 2025, 40(1): 212-215.
SUN Lu, ZHAO Guifeng. Research progress on treatment of hyperlipidemia with traditional Chinese medicine[J]. *Guangming Journal of Chinese Medicine*, 2025, 40(1): 212-215(in Chinese).
- [2] MINIC-NOVCIC M, PARK A. Hyperlipidaemia[J]. *Medicine*, 2025, 53(10): 702-708.
- [3] 武欢,张照庆,居诗如,王小飞,刘志刚,周丽,张红星,林威. 电针干预缓解高脂血症模型大鼠肝脏脂质积累和肠黏膜损伤[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2025, 54(2): 166-171.
WU Huan, ZHANG Zhaoqing, JU Shiru, WANG Xiaofei, LIU Zhigang, ZHOU Li, ZHANG Hongxing, LIN Wei. Electroacupuncture alleviates hepatic lipid accumulation and intestinal mucosal injury in hyperlipidemia model rats[J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2025, 54(2): 166-171(in Chinese).
- [4] LI G, HAN R, LIN M, WEN Z, CHEN X. Developing a core outcome set for clinical trials of Chinese medicine for hyperlipidemia[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 847 101.
- [5] 王小刚,赵娴,李悦,屈艳伟,张娇娇,王梦静,武珊. 高脂血症发病机制及治疗研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(12): 196-200.
WANG Xiaogang, ZHAO Xian, LI Yue, QU Yanwei, ZHANG Jiaojiao, WANG Mengjing, WU Shan. Research progress of pathogenesis and treatment of hyperlipidemia[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 22(12): 196-200(in Chinese).
- [6] CHENG X, SUN G, MENG L, LIU Y, WEN J, ZHAO X, CAI W, XIN H, LIU Y, HAO C. Exploring the molecular mechanisms of herbs in the treatment of hyperlipi-

- demia based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2024, 27(11): 1 092-1 105.
- [7] 付莉霞, 程子倩, 王洪, 牛明明. 基于质谱的血液蛋白质组学: 血液学研究的新焦点[J]. *中国细胞生物学学报*, 2022, 44(1): 204-213.
FU Lixia, CHENG Ziqian, WANG Hong, NIU Mingming. MS-based blood proteomics: emerging research focus in hematology[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2022, 44(1): 204-213(in Chinese).
- [8] JIANG M, LI W, WANG D, WU X, CHEN D, FENG Y. Hyperlipidemia using label-free combined with bioinformatics analysis[J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2023, 69(13): 230-237.
- [9] WANG M, WANG R, LI L, YAN Y, JIA S, JIANG H, DU Z. Quantitative proteomics of plasma and liver reveals the mechanism of turmeric in preventing hyperlipidemia in mice[J]. *Food & Function*, 2021, 12(21): 10 484-10 499.
- [10] JIAO Y, YANG Q, YE T, ZHU J, LI Q, HAN X, DONG Q. Delipid extracorporeal lipoprotein filter from plasma system: a new intensive lipid lowering therapy for patients with acute ischemic stroke[J]. *Frontiers in Neurology*, 2024, 15: 1 342 751.
- [11] 康利娟. 血脂净化治疗心血管合并高脂血症疗效分析[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2021, 9(32): 26-28.
KANG Lijuan. Analysis of therapeutic effect of blood lipid purification on cardiovascular complicated with hyperlipidemia[J]. *Cardiovascular Disease Electronic Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2021, 9(32): 26-28(in Chinese).
- [12] LIU R, LU G, HU X, LI J, ZHANG Z, TANG K. Capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry for in-depth proteomics analysis *via* data-independent acquisition[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2024, 416(26): 5 805-5 814.
- [13] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, NAS-TOU K, MEHRYARY F, HACHILIF R, GABLE A L, FANG T, DONCHEVA N T, PYYSALO S, BORK P, JENSEN L J, von MERING C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [14] SANTA C, ANJO S I, MANADAS B. Protein precipitation of diluted samples in SDS-containing buffer with acetone leads to higher protein recovery and reproducibility in comparison with TCA/acetone approach[J]. *Proteomics*, 2016, 16(13): 1 847-1 851.
- [15] BAGHALABADI V, DOUCETTE A A. Mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides isolated by acetone precipitation[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1 138: 38-48.
- [16] GALLART-PALAU X, SERRA A, WONG A S W, SANDIN S, LAI M K P, CHEN C P, KON O L, SZE S K. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PReotein Organic Solvent PReiprecipitation (PROSPR)[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14 664.
- [17] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS D S, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5 663): 1 532-1 535.
- [18] CHEN T, LI Y, SUN R, HU H, LIU Y, HERRMANN M, ZHAO Y, MUÑOZ L E. Receptor-mediated NETosis on neutrophils[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 775 267.
- [19] YIPP B G, KUBES P. NETosis: how vital is it[J]. *Blood*, 2013, 122(16): 2 784-2 794.
- [20] THIAM H R, WONG S L, WAGNER D D, WATERMAN C M. Cellular mechanisms of NETosis[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2020, 36: 191-218.
- [21] CARESTIA A, KAUFMAN T, RIVADENEYRA L, LANDONI V I, POZNER R G, NEGROTTO S, D'ATRI L P, GÓMEZ R M, SCHATTNER M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016, 99(1): 153-162.
- [22] DENG C, ZHU N, ZHAO T, LI H, GU J, LIAO D, QIN L. Involvement of LDL and ox-LDL in cancer development and its therapeutical potential[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 803 473.
- [23] MOSSO-PANI M A, BARREDA D, SALAZAR M I. Dynamic regulation of neutrophil immunometabolism by platelet-derived metabolites[J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16: 1 542 438.
- [24] HERRERO-CERVERA A, SOEHNLEIN O, KENNE E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2022, 19(2): 177-191.

(收稿日期: 2025-11-10; 修回日期: 2026-01-05)