肾病综合征高密度脂蛋白组分异常及其对内皮细胞功能的影响

高锐雨[1,2]，陈巧玲[1,2]，叶秋萍[1,2]，熊云峰[1,2]，陈思慧[1]，魏立新[1,2]

摘要： **目的** 探讨肾病综合征(NS)高密度脂蛋白(HDL)组成成分的改变及其对内皮细胞增殖、迁移的影响。 **方法** 纳入确诊为原发性 NS 且经肾脏穿刺病理证实为微小病变性肾病(MCD)或局灶节段性肾小球硬化(FSGS)患者 20 例和健康志愿者 10 例，收集 2 组人群的一般资料以及全血标本。将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分为生理盐水组、正常 HDL 组(N-HDL 组)、肾病综合征 HDL 组(NS-HDL 组)和氧化 HDL 组(Ox-HDL 组)，通过分离、制备不同类型的 HDL 干预并检测内皮细胞的增殖和迁移情况。采用蛋白质组学分析 2 组人群的血浆样本 HDL 组分的差异性。 **结果** 与生理盐水组比较，N-HDL 组可增强内皮细胞的增殖及迁移能力，NS-HDL 组无显著改变，而 Ox-HDL 组则抑制内皮细胞的增殖及迁移能力；与 N-HDL 组比较，NS-HDL 组和 Ox-HDL 组促进细胞增殖及迁移的能力均下降($P<0.05$)。蛋白质组学分析结果提示，NS 患者对比健康志愿者血浆差异蛋白基因本体分类富集于脂蛋白代谢、脂质转运及稳态，而京都基因与基因组百科全书通路富集改变集中在胆固醇代谢等生物过程。HDL 相关差异蛋白筛选结果显示，ApoC3、ApoB、ApoE 和 CETP 等表达均上调($P<0.05$)。 **结论** 正常 HDL 对血管内皮具有多重保护作用，而 NS-HDL 的内皮保护作用明显减弱，表现为促进内皮细胞增殖或迁移的能力下降，可能与 NS 脂质代谢紊乱、炎症状态导致的 HDL 组分改变有关。

关键词： 肾病综合征；高密度脂蛋白；内皮细胞；蛋白质组学
文献标志码： A **文章编号：** 1672-4194(2025)06-0371-11

高脂血症是肾病综合征(nephrotic syndrome，NS)多种并发症的主要危险因素，特别是以动脉粥样硬化(atherosclerosis，AS)为代表的心血管疾病(cardinal vascular disease，CVD)。在美国，非慢性肾病(chronic kidney disease，CKD)人群的 CVD 患病率为男性 13.9%、女性 9.3%；而 CKD 人群的 CVD 患病率为男性 17.9%、女性 20.4%，透析患者的 CVD 患病率更是高达 40%[1]。一项针对 65 岁以上人群心血管健康的前瞻性研究结果显示，50%的肾病患者在进展为终末期肾病之前就已死于 CVD[2]。因此，积极的血脂管理对于降低 NS 患者发生 CVD 的风险具有重要临床意义。

高脂血症在 NS 中可表现为高胆固醇血症及高甘油三酯血症，高密度脂蛋白(high density lipoprotein，HDL)胆固醇的浓度可升高、正常或降低，但 HDL 与总胆固醇的比值常降低[3]。大量流行病学研究已证明，一般人群的 HDL 水平与 CVD 风险之间存在负相关关系[4-5]。NS 状态下，机体内环境存在不同程度的氧化应激和炎症状态，NS-HDL 是否会发生氧化修饰导致其功能发生变化，甚至加速 AS 的进展，目前尚缺乏相关系统研究。本研究拟通过细胞体外实验及蛋白质组学分析，探究 NS-HDL 是否发生功能异常及可能原因，以期为 NS 患者高脂血症的治疗提供新的证据。

收稿日期： 2025-08-11
资助项目： 国家自然科学基金面上项目(82070727)
作者单位： 1. 福建医科大学 附属协和医院肾内科，福州 350001；
2. 福建省临床免疫研究所，福州 350001
作者简介： 高锐雨，男，住院医师，医学硕士
通信作者： 魏立新. Email：lixinwei66@126.com

1 对象与方法

1.1 对象 收集 2021 年 6 月 1 日—2022 年 12 月 31 日初次确诊为原发性 NS 且经肾脏穿刺病理证实为微小病变性肾病(minimal change disease，MCD)或局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis，FSGS)的患者，共 20 例。患者入选前均未使用过糖皮质激素、免疫抑制剂、他汀类药物及利尿剂，并排除有明显继发性因素和遗传肾病家族史的病例。肾脏活检标本均经过苏木精-伊红(hematoxylin-eosin，H-E)、过碘酸希夫(periodic acid-Schiff，PAS)和 PASM-Masson 染色，以及 IgG、IgA、IgM、C3d、C4d、Fib 和 C1q 免疫组织化学染色，并行透射电镜检查，最后由肾病专科病理医师进行诊断。健康志愿者来源于同期体检的健康者 10 例，尿蛋白均阴性，且无慢性病史、长期用药史及吸烟史。2 组人群的年龄、性别匹配，排除有特殊服药、作息不规律等情况的受试者。本研究经福建医科大学附属协和医院伦理委员会批准(〔2020〕-058)，研究对象或家属均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 细胞、试剂与仪器 本实验使用了原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial

cells，HUVECs)(批号：YS0786C，美国 ScienCell 研究实验室)。复苏细胞时，将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管置于 37 ℃下水浴解冻，加入 5 mL 培养基混匀，1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，补加 4～6 mL 完全培养基后吹匀。将细胞悬液加入培养瓶中培养过夜，第 2 天检查时若细胞密度达 80%～90%，则收集生长良好的细胞，置于含 5%胎牛血清(fetal bovine serum，FBS)、1%内皮细胞生长因子补充剂及 1%抗青/链霉素溶液的内皮细胞培养基中培养，在传代 1～5 代内使用。

溴化钾(批号：P816700-500g，上海麦克林生化科技有限公司)；内皮细胞培养基(批号：Cat：1001，美国 ScienCell 研究实验室)；载脂蛋白 AⅠ(apolipoprotein AⅠ，ApoAⅠ)特异性检测试剂盒(批号：SEKH-0093)和丙二醛(malondialdehyde，MDA)试剂盒(批号：BC0025)(北京 Solarbio 公司)；二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay，BCA)蛋白定量试剂盒(批号：P0012S)和细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8，CCK-8)(批号：C0037)(上海碧云天生物技术股份有限公司)。

超速冷冻离心机(Optima XE-100，美国 Beckman 公司)；细胞 CO_2 培养箱(STERI-CYCLE il60，美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；高速离心机(5430R，德国 Eppendorf 公司)；倒置显微镜(CKX53，日本 Olympus 公司)；酶标分析仪(SpectraMax ABS，美国 Molecular Device 公司)；超高效液相色谱系统(NanoElute，德国 Bruker Daltonics 公司)。

1.2.2 分组 为探讨 NS-HDL 对细胞功能的影响，使用添加不同 HDL 的培养基处理 HUVECs，观察细胞增殖和迁移变化，并分为 4 组(n=6)，即生理盐水组、正常 HDL 组(N-HDL 组)、NS-HDL 组和氧化 HDL 组(Ox-HDL 组)。为探讨 NS-HDL 的组分改变，将受试者的血浆进行蛋白质组学分析并分组，即 NS 组(n=20)和健康对照组(n=10)。

1.2.3 临床资料收集 收集患者的临床和实验室资料。临床资料包括入院收缩压、舒张压、体质量指数(body mass index，BMI)及慢性病史；实验室资料包括血清白蛋白、24 h 尿蛋白、肌酐、尿素氮、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白(low density lipoprotein，LDL)及 HDL。

1.2.4 HDL 的分离和纯化 患者禁食 12 h，于清晨采集肘静脉血 5 mL 至乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid，EDTA)管。以 10 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，分离上层血浆。HDL 提取流程如下：(1)血浆中加入 EDTA，使 EDTA 的最终质量浓度为 1 mg/mL；(2)参考文献[6]中的公式计算并加入相应质量的溴化钾，调整血浆最终质量浓度为 1.3 g/mL；(3)离心管下层加入 1.3 g/mL 的血浆 3.375 mL，上层加入 10.125 mL 生理盐水，以 10 ℃、6.5×10^5 r/min 离心 150 min，可见脂蛋白从上到下分层，即乳糜微粒(chylomicrons，CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein，VLDL)、LDL、HDL 和无脂血浆，进一步分离 HDL；(4)将 HDL 在4 ℃、含 1 mg/mL EDTA 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline，PBS)中透析 48 h，每隔 8 h 更换 1 次透析液，之后于无 EDTA 的 PBS 中透析 48 h，每隔 8 h 更换 1 次透析液，过滤除菌后保存备用。

1.2.5 HDL 的纯度测定 随机抽取 6 管 HDL 样本，采用免疫比浊法测定 ApoAⅠ、载脂蛋白 B(apolipoprotein B，ApoB)以及含有 ApoAⅠ的脂蛋白含量、含有 ApoB 的脂蛋白含量。按比例稀释载脂蛋白标准品，将 3 μL 样品和 240 μL 试剂 R1 混合，3～5 min 后测定 340 nm 处的吸光度($D1$)，继续添加 60 μL 试剂 R2，5 min 后测定 340 nm 处的吸光度($D2$)，根据吸光度的变化值($D2-D1$)绘制标准曲线，并根据标准曲线测定样品的 Apo 含量。

1.2.6 ApoAⅠ的浓度测定 采用 BCA 法，按 50∶1 的比例混合 BCA 和 Cu 试剂配置 BCA 工作液，按比例稀释牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)标准品和样品，检测孔中加入 200 μL BCA 工作液，避光条件下于 37 ℃孵育 30 min，测定 562 nm 处的吸光度。根据标准曲线测定样品的 ApoAⅠ浓度。

1.2.7 制备 Ox-HDL 将 HDL 按 1 mg/mL 稀释后加入含 5 μmol/L $CuSO_4$ 的 PBS 溶液中，37 ℃下孵育氧化 24 h，于 4 ℃下加入含 0.1% EDTA 的 PBS 溶液中，透析 48 h 终止氧化反应，过滤除菌后保存备用。

1.2.8 Ox-HDL 氧化程度测定 采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid，TBA)法，按比例稀释标准品，将不同浓度的标准品、HDL、PBS、MDA 检测工作液混匀后，100 ℃水浴加热 15 min。冷却至室温后离心 10 min。测定样品 532 nm 处的吸光度。根据标准曲线计算 MDA 含量，确定氧化程度。

1.2.9 细胞增殖功能检测 采用 CCK-8 比色法，用 0.25%胰酶消化细胞并配制成单细胞悬液，用不含 FBS 的内皮细胞培养基以每孔 4 000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，37 ℃下孵育 24 h。吸出原培养基，各处理组分别与含 100 μg/mL ApoAⅠ的

N-HDL、NS-HDL、Ox-HDL 内皮细胞培养基（不含 FBS）共培养 24 h，并设置空白组（添加不含 FBS 的内皮细胞培养基）、对照组（添加不含 FBS 的内皮细胞培养基和 HUVECs 细胞）和生理盐水组（添加生理盐水和内皮细胞培养基）。添加 10 μL CCK-8 试剂，37 ℃下孵育 3 h，测定 450 nm 处的吸光度。

1.2.10　细胞迁移功能检测　采用 Transwell 小室迁移法，用 0.25%胰酶消化细胞并配置成单细胞悬液。将不含 FBS 的内皮细胞培养基、HDL 和细胞悬液共 100 μL 接种在上室；将 600 μL 含 5% FBS 的内皮细胞培养基接种在下室。保证各处理组 HDL 中 ApoA Ⅰ浓度为 100 μg/mL，37 ℃下孵育 24 h。弃去上、下室中的培养基，PBS 冲洗 2 遍，4%多聚甲醛固定 30 min，再用 PBS 冲洗 2 遍。用 1%结晶紫染料避光染色 20 min，PBS 冲洗 2 遍。用棉签擦去小室上层细胞，将小室放在倒置显微镜下，选择×200 物镜，选取膜的 5 个视野（中央、左上、左下、右上、右下）进行观察并拍摄迁移到膜下表面的细胞，采用 ImageJ 软件计数。

1.2.11　肽样本制备和血浆蛋白质组学检测　取等量血浆样本蛋白进行酶解、离心，去除细胞碎片和高丰度蛋白，测定蛋白质浓度。在 56 ℃下加入二硫苏糖醇还原 30 min，加入碘乙酰胺烷基化 15 min。标本送杭州景杰生物科技股份有限公司进行蛋白质组学分析。

1.2.12　液相色谱-质谱联用分析　肽段用液相色谱流动相 A 相溶解后使用超高效液相色谱系统进行分离，分离后注入 Capillary 离子源中进行电离，电离后进行质谱分析。

1.2.13　数据库检索及质控　质谱下机原始数据导入搜库软件并设定分析参数。本次实验二级质谱数据使用 Proteome Discoverer（v2.4.1.15）进行检索。对搜库分析结果进行数据过滤，将谱图、肽段、蛋白 3 个层面鉴定的准确性错误发现率（false discovery rate，FDR）设定为 1%，鉴定蛋白至少需要包含 1 个特异性肽段。质谱下机的数据在搜库完成后进行质控评价。

1.2.14　血浆差异表达蛋白生物信息学分析及 HDL 相关蛋白筛选　使用质谱检测得到的原始数据构建样本特异性蛋白数据库，通过定量分析比较 NS 组和健康对照组组间血浆蛋白表达差异，并进行功能分类统计。采用 Fisher 确切概率法对血浆差异表达蛋白进行基因本体（gene ontology，GO）富集显著性分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析。最后，通过 GO 数据库中的 HDL 相关通路从蛋白数据库中筛选 HDL 相关蛋白。

1.3　统计学处理　采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\overline{X}\pm S$ 表示，采用 t 检验；非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示，采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以 n（%）表示，组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。采用 Pearson 相关分析评估 2 组计量资料的相关性。双侧检验，$P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2　结　果

2.1　临床特点比较　2 组人群的年龄、收缩压、舒张压、BMI、肌酐、尿素氮、HDL 及高血压者等慢性病患者例数的差别均无统计学意义（$P>0.05$）。与健康对照组比较，NS 组的白蛋白水平显著下降，总胆固醇、甘油三酯、LDL 水平显著上升，差别均有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

2.2　NS-HDL 对内皮细胞功能的影响

2.2.1　NS-HDL 对内皮细胞增殖能力的影响　与生理盐水组比较，N-HDL 组的细胞增殖能力显著提高[(143.90±9.66)% *vs* 100%，$P<0.001$]。NS-HDL 组相较生理盐水组可促进细胞增殖，但差别无统计学意义[(113.60±8.26)% *vs* 100%，$P=0.45$]。与之相反，Ox-HDL 组相较生理盐水组明显抑制细胞增殖水平[(13.78±1.56)% *vs* 100%，$P<0.000\ 1$]。NS-HDL、Ox-HDL 相较于 N-HDL 促进细胞增殖能力均显著下降[(113.60±8.26)% *vs* (143.90±9.66)%，$P<0.05$]、[(13.78±1.56)% *vs* (143.90±9.66)%，$P<0.000\ 1$]（图 1）。

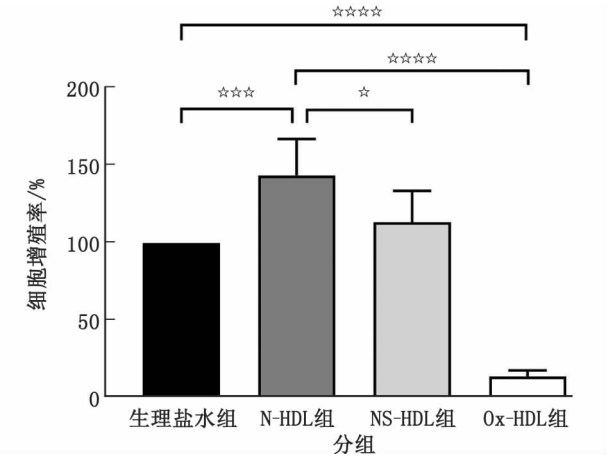
2.2.2　NS-HDL 对内皮细胞迁移能力的影响　与生理盐水组比较，N-HDL 组的细胞迁移能力显著提高[(867.11±44.80) *vs* (605.63±26.34)，$P<0.000\ 1$]。NS-HDL 组相较于生理盐水组内皮细胞迁移能力轻度升高，但差别无统计学意义[(709.47±31.40) *vs* (605.63±26.34)，$P=0.14$]。相反，Ox-HDL 组相较于生理盐水组内皮细胞迁移功能显著抑制[(261.78±24.08) *vs* (605.63±26.34)，$P<0.000\ 1$]。NS-HDL、Ox-HDL 相较于 N-HDL 促进细胞迁移能力均显著下降[(709.47±31.40) *vs* (867.11±44.80)，$P<0.05$]、[(261.78±24.08) *vs* (867.11±44.80)，$P<0.000\ 1$]（图 2）。

表 1 NS 组与健康对照组的一般资料比较

Tab. 1 Comparison of general clinical data between the NS group and the healthy control group

基线资料	NS 组（n=20）	健康对照组（n=10）	统计值	P
年龄/岁	46.3±4.4	41.6±4.7	0.663	0.513
性别				0.461☆
男	13(65.0)	5(50.0)		
女	7(35.0)	5(50.0)		
收缩压/mmHg	123.5(116.0,143.3)	124.0(118.8,129.0)	98.500	0.947
舒张压/mmHg	71.8±1.7	72.4±1.6	−0.224	0.825
BMI/(kg·m^{-2})	22.6(21.9,25.6)	21.9(20.5,22.6)	57.000	0.059
白蛋白/(g·L^{-1})	17.8±0.7	47.9±0.5	−35.364	<0.001
24 h 尿蛋白/g	9.2(5.4,11.2)	—		
肌酐/(μmol·L^{-1})	62.0(54.0,94.8)	62.0(56.8,68.5)	88.500	0.613
尿素氮/(mmol·L^{-1})	5.6(4.6,9.8)	4.3(3.7,5.0)	47.000	0.020
总胆固醇/(mmol·L^{-1})	9.2(7.9,10.6)	4.7(3.9,5.3)	<0.001	<0.001
甘油三酯/(mmol·L^{-1})	2.1(1.6,2.5)	0.9(0.6,1.1)	7.000	<0.001
HDL/(mmol·L^{-1})	1.5±0.1	1.4±0.1	0.580	0.566
LDL/(mmol·L^{-1})	6.9(6.0,8.4)	3.2(2.2,3.3)	<0.001	<0.001
高血压病	5(25.0)	0(0.0)		0.140☆
心血管病	2(10.0)	0(0.0)		0.540☆
糖尿病	0(0.0)	0(0.0)		

表中未标注单位的数据为 n(%)。1 mmHg=0.133 kPa。BMI：体质量指数；HDL：高密度脂蛋白；LDL：低密度脂蛋白。☆：采用 Fisher 确切概率法。



n=6。N-HDL：正常 HDL 组；NS-HDL：肾病综合征 HDL 组；Ox-HDL：氧化 HDL 组；HUVECs：人脐静脉内皮细胞；HDL：高密度脂蛋白。组间比较，☆：P<0.05，☆☆☆：P<0.001，☆☆☆☆：P<0.000 1。

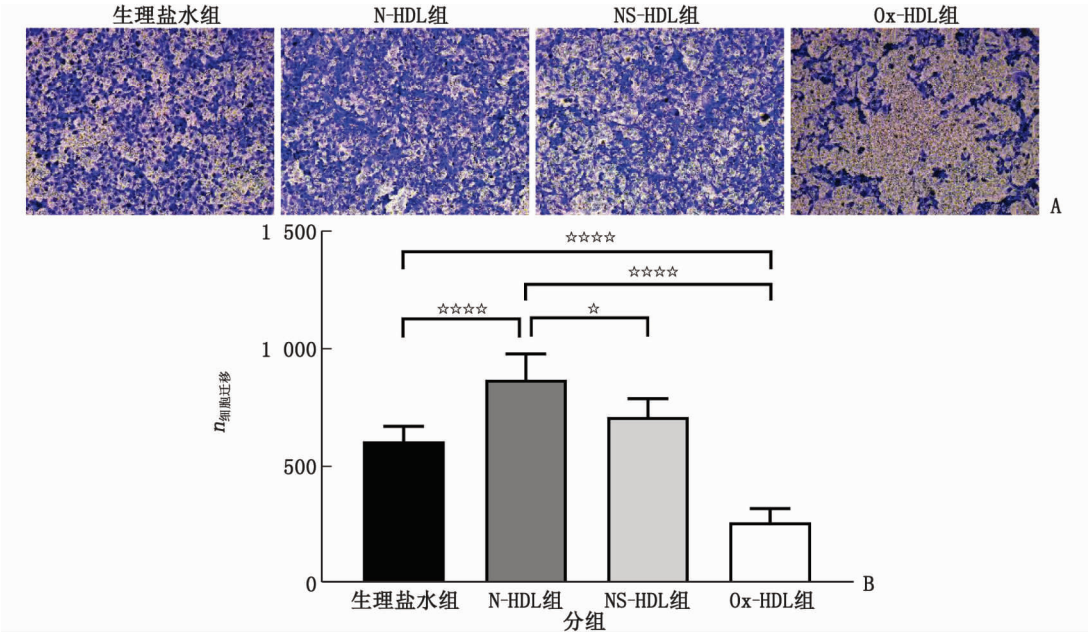
图 1 不同处理组对 HUVECs 增殖能力的影响

Fig. 1 Effects of different treatment groups on the proliferation capacity of HUVECs

2.3 蛋白质组学分析

2.3.1 血浆差异表达蛋白筛选及功能分类统计 共解析得到 1 274 个蛋白，NS 组和健康对照组组间共筛选 452 个差异蛋白，其中表达下调 211 个，表达上调 241 个。GO 通路功能分类统计结果显示（图 3A），差异蛋白显著富集在 23 项，其中与生物过程（biological process，BP）相关的有 13 项，主要参与细胞过程、生物调节、对刺激的反应等；与细胞组分（cellular component，CC）相关的有 3 项，主要定位于细胞、细胞内和蛋白质复合物等；与分子功能（molecular function，MF）相关的有 7 项，主要表达结合、催化活性和分子功能调节活性等。同源蛋白簇/真核生物同源蛋白簇（clusters of orthologous groups/euKaryotic orthologous groups，COG/KOG）功能分类统计结果显示（图 3B），差异蛋白在细胞过程和信号转导中主要参与信号转导机制、翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣等，在信号存储和代谢中主要参与翻译、核糖体结构与生物发生、转录、RNA 加工与修饰等，在代谢中主要参与氨基酸转运与代谢、碳水化合物转运与代谢、能量生产与转换等。亚细胞结构分类统计结果显示，差异蛋白主要定位在细胞外、细胞质、细胞核及质膜等（图 3C）。

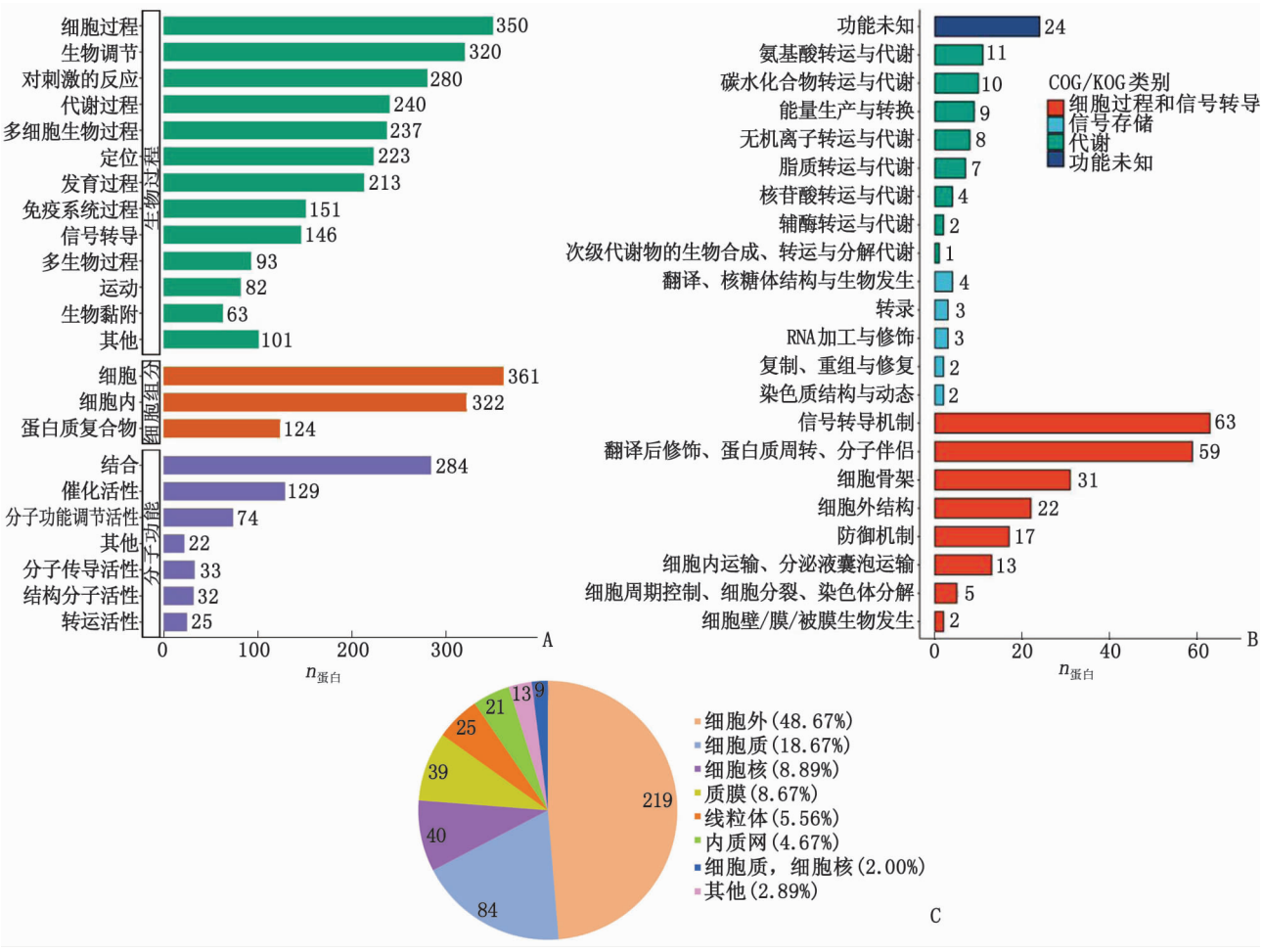
2.3.2 血浆差异蛋白功能富集分析 GO 富集分析结果提示，差异蛋白在 BP 中富集于脂蛋白分解代谢过程、脂质稳态、脂蛋白代谢过程（图 4A），在 CC 中主要定位在侧向质膜、质膜的外在成分、膜的外在成分（图 4B），在 MF 中主要参与脂质转运活性（图 4C）。KEGG 通路富集分析结果提示，差异蛋白主要参与胆固醇代谢等（图 4D）。



$n=6$。N-HDL：正常 HDL 组；NS-HDL：肾病综合征 HDL 组；Ox-HDL：氧化 HDL 组；HUVECs：人脐静脉内皮细胞；HDL：高密度脂蛋白。A：不同处理组细胞迁移镜下表现（×200，选取中央视野）；B：不同处理组迁移细胞数（每个高倍镜视野）比较。组间比较，☆：$P<0.05$，☆☆☆☆：$P<0.000\ 1$。

图 2　不同处理组对 HUVECs 迁移能力的影响

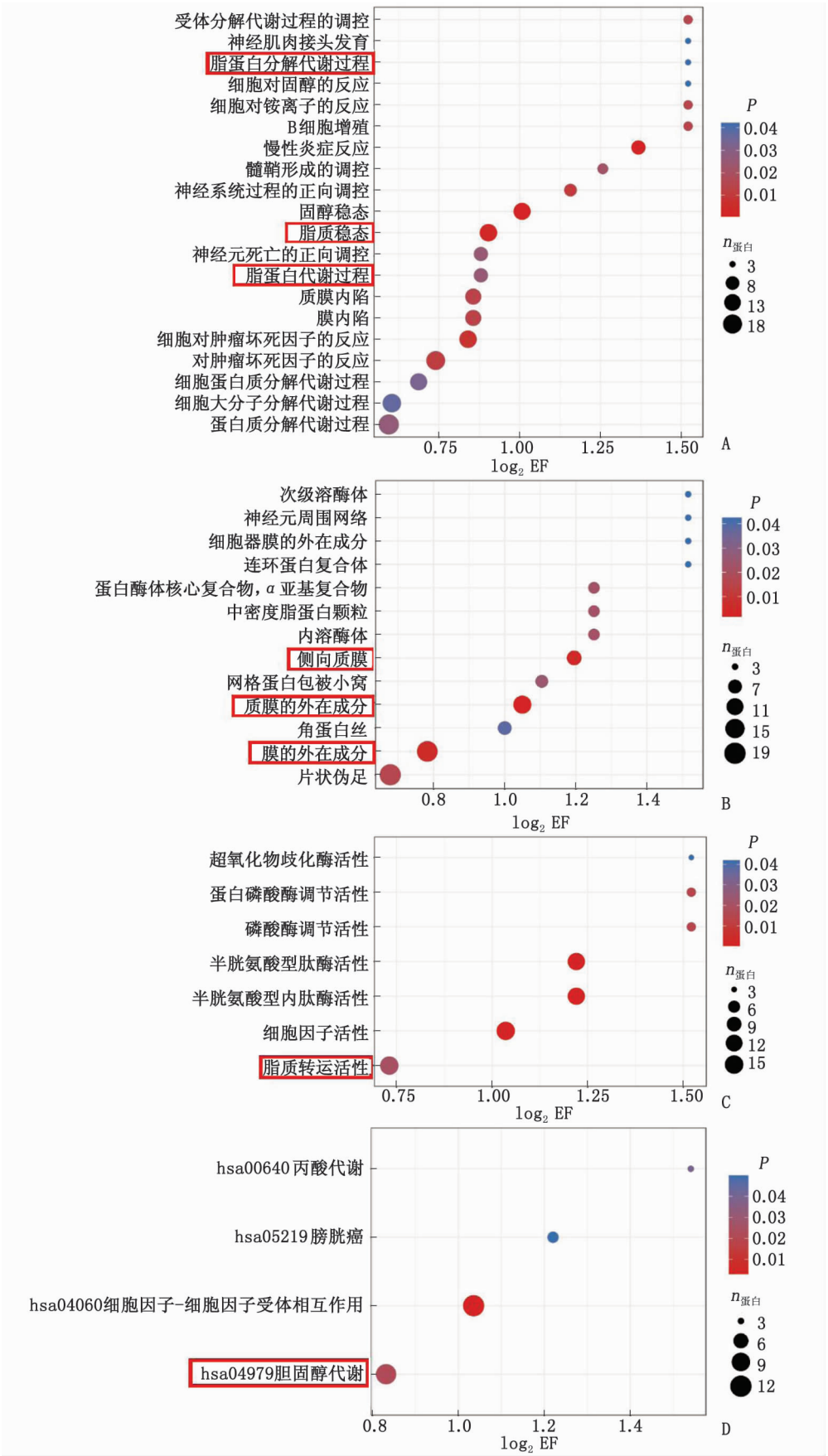
Fig. 2　Effects of different treatment groups on the migration capacity of HUVECs



A：GO 功能分类分析；B：COG/KOG 功能分类统计；C：亚细胞结构分类统计。

图 3　血浆差异蛋白功能分类统计

Fig. 3　Functional classification statistics of plasma differential proteins

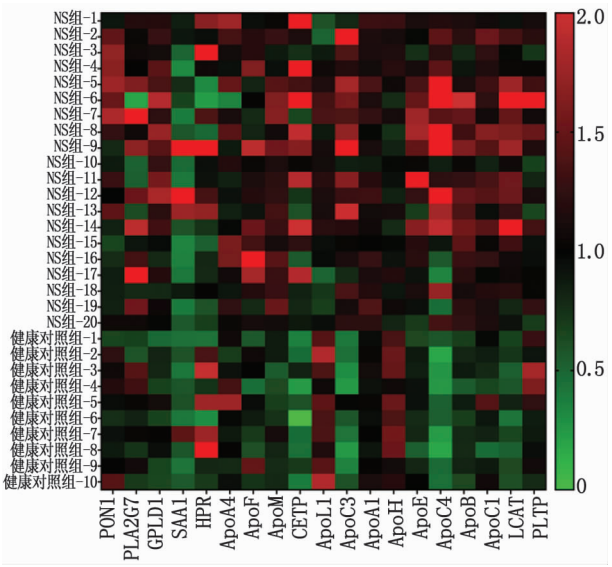


EF：富集倍数；BP：生物过程；CC：细胞组分；MF：分子功能；KEGG：京都基因与基因组百科全书。A：GO-BP 分析；B：GO-CC 分析；C：GO-MF 分析；D：KEGG 通路富集分析。

图 4 血浆差异蛋白功能富集分析

Fig. 4 Functional enrichment analysis of plasma differential proteins

2.3.3　HDL 相关蛋白及差异蛋白的筛选　共筛选出 19 个 HDL 相关蛋白（图 5），与健康对照组比较，NS 组中显著上调的蛋白共 8 种（$P<0.05$，表 2），依次是 GPLD1、ApoM、CETP、ApoC3、ApoE、ApoC4、ApoB 和 LCAT，其表达强度与尿蛋白、胆固醇、甘油三酯及 LDL 水平呈正相关，但与血清白蛋白水平呈负相关（图 6）。



NS：肾病综合征；HDL：高密度脂蛋白。右侧数值为蛋白相对表达强度。

图 5　NS 组与健康对照组 HDL 相关蛋白热图

Fig. 5　NS group *vs* healthy control group HDL related proteomic protein heat map

3　讨　论

本研究结果表明，相较于 N-HDL，NS-HDL 促进内皮细胞增殖和迁移的能力显著下降。HDL 通过胆固醇逆转运（reverse cholesterol transport，RCT）、抑制炎症因子释放、促进内皮 NO 合成、抗血栓形成及抗内皮细胞凋亡等机制发挥血管内皮保护作用[7-8]。然而，相关研究表明，虽然 CETP 抑制剂干预后 HDL 水平升高，但主要心血管事件和心血管死亡率反而增加[9-11]。这提示在针对高脂血症的治疗中，不仅要关注 HDL 水平的改变，还应着眼于改善并恢复 HDL 的功能。

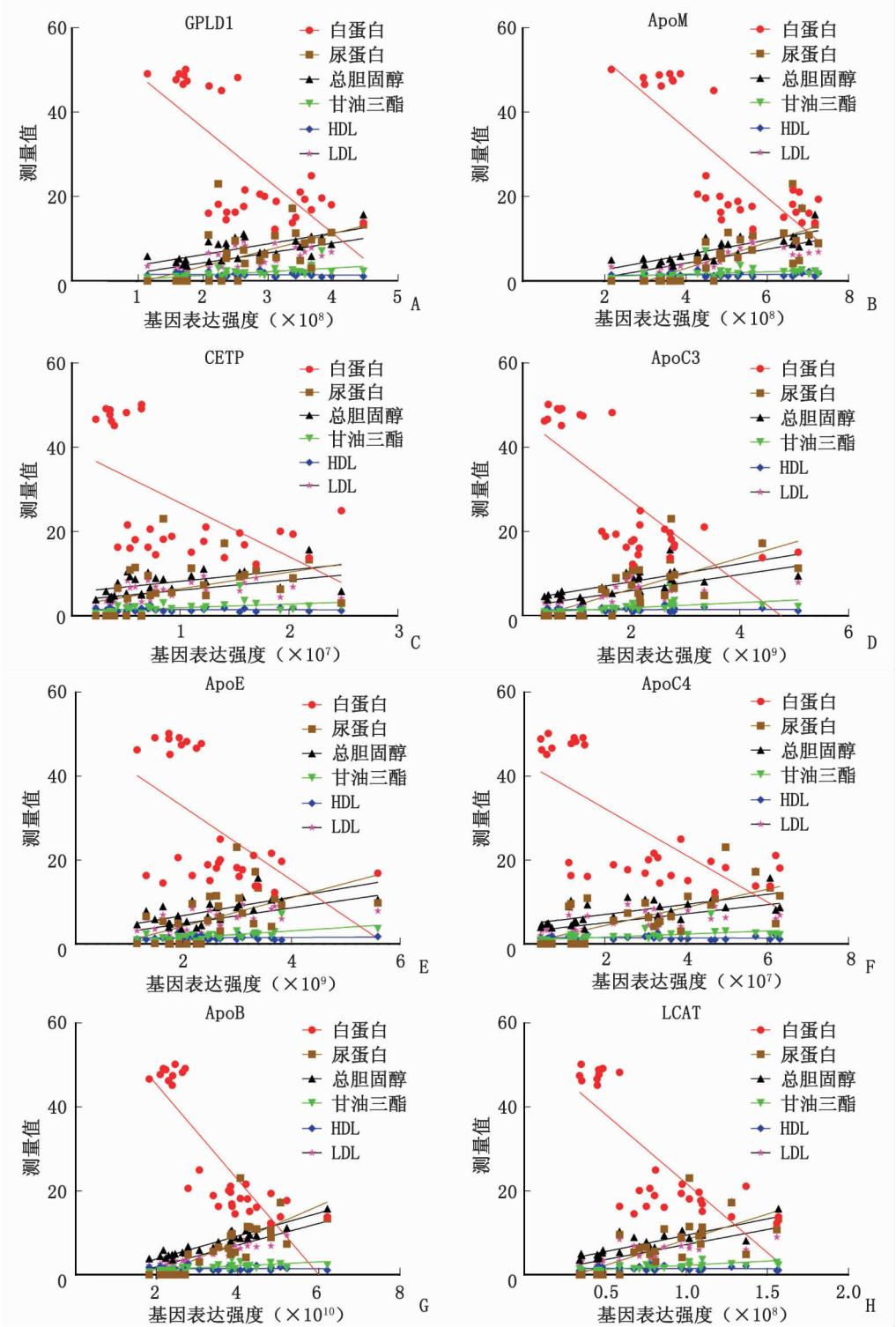
表 2　HDL 相关关键蛋白

Tab. 2　HDL-related key proteins

蛋白质登录号	蛋白质描述	NS 组/健康对照组比值	*P*
P80108	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*GPLD1*，PE=1，SV=3	1.627	0.000 016
O95445	Apolipoprotein M，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*ApoM*，PE=1，SV=2	1.610	<0.000 001
P11597	Cholesteryl ester transfer protein，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*CETP*，PE=1，SV=2	2.690	0.000 033
P02656	Apolipoprotein C-Ⅲ，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*ApoC3*，PE=1，SV=1	3.075	<0.000 001
P02649	Apolipoprotein E，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*ApoE*，PE=1，SV=1	1.531	0.001 809
P55056	Apolipoprotein C-Ⅳ，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*ApoC4*，PE=1，SV=1	3.981	<0.000 001
P04114	Apolipoprotein B-100，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*ApoB*，PE=1，SV=2	1.709	<0.000 001
P04180	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase，OS=Homo sapiens，OX=9606，GN=*LCAT*，PE=1，SV=1	2.169	<0.000 001

HDL：高密度脂蛋白。

GO 和 KEGG 分析提示，NS 组和健康对照组在 BP 中存在显著差异，NS 组上调的蛋白质主要富集于脂蛋白代谢、脂质稳态、脂质转运及胆固醇代谢等关键途径。血脂代谢异常可引起动脉内膜脂质浸润，从而增加 AS 的可能性[12]。AS 的发生、发展涉及多因素、多环节，目前有包括“损伤-反应学说”和“脂质浸润学说”等解释其病理改变，其中内皮细胞损伤贯穿于各个学说，常被认为是 AS 的始动环节[13]。传统观点认为，HDL 具有内皮细胞保护作用，HDL 每升高 0.026 mmol/L，患者远期 CVD 发生风险降低 2%～3%[14]。HDL 作为 RCT 的主要介质，能摄取并转运外周组织（如 AS 斑块中的泡沫细胞）的胆固醇至循环系统并最终通过粪便排泄，从而在延缓斑块进展和促进斑块消退中发挥关键作用[15-16]。然而，研究表明，在 2 型糖尿病、代谢综合征、类风湿关节炎和 CKD 等慢性疾病中，HDL 常发生修饰性改变并失去其正常的抗 AS 活性。Ox-HDL 已被证实可抑制内皮细胞增殖和迁移功能，并促进细胞凋亡[17-18]。研究表明，CKD 患者的 HDL 结构常发生多种改变并出现功能异常：（1）介导胆固醇流出能力减弱；（2）抑制内皮细胞释放 NO，并释放炎症因子抑制内皮增殖、迁移和血管生成；（3）促进血小板聚集和活化并促进血栓形成[19]。结合体外实验结果提示，NS 疾病状态下，HDL 的组



A:GPLD1;B:ApoM;C:CETP;D:ApoC3;E:ApoE;F:ApoC4;G:ApoB;H:LCAT。

图 6 HDL 相关关键蛋白与临床参数相关性分析

Fig. 6 Correlation between HDL-related key proteins and clinical parameters

分发生了类似修饰性改变，导致其正常的脂质转运功能、抗氧化活性和抗栓活性等功能受损，从而削弱了对血管内皮的保护功能。

HDL 由载脂蛋白、脂质转移蛋白和代谢酶组成，在结构、化学和生物学特性上具有高度异质性，其功能与蛋白质、脂质种类及构成密切相关[20]。本研究结果提示，以 ApoC3、ApoE 及 ApoB 为代表的载脂蛋白和 CETP 等脂质转移蛋白在 NS 患者中显著高表达，上述蛋白与尿蛋白、胆固醇、甘油三酯及 LDL 水平呈正相关，但与血清白蛋白水平呈负相关。

本研究结果显示，NS 组中 8 种显著上调的 HDL 相关蛋白与肾脏损伤存在相关性，提示 HDL 在 NS 的发生发展及脂质代谢紊乱中起着重要作用。

ApoE 主要通过促进肝细胞摄取 CM 和 VLDL 介导含 ApoB 脂蛋白的清除[21]，而 ApoC3 则通过促进肝脏生成和分泌 VLDL、抑制含 ApoB 脂蛋白的水解提高循环中含 ApoB 脂蛋白的浓度[22]。ApoE 和 ApoC3 反向调节含 ApoB 脂蛋白的代谢，而 ApoB 可促进脂质沉积在血管中，并加速 AS 的发生和发展。多项研究发现，HDL 常同时表达 ApoE 和 ApoC3，仅在包含 ApoE 且不包含 ApoC3 时，HDL 水平与 CVD 发生风险呈负相关[23-24]。本研究中 ApoC3 和 ApoE 在 NS 患者中同时高表达，提示 NS 患者循环中可能存在同时表达 ApoC3 和 ApoE 的 HDL 亚种，这种 HDL 可能失去保护内皮细胞的功能进而降低 CVD 风险的功效。

NS 患者中以 CETP 为代表的脂质转移蛋白的高表达同样值得关注。CETP 促进胆固醇从 HDL 转移至含 ApoB 的脂蛋白[25]。这引发了研究人员对高 CETP 水平可能增加 CVD 风险的猜想。在一些动物模型上已成功验证 CETP 能够促进 AS 的发生和进展。小鼠天然缺乏 CETP，对饮食诱导的 AS 具有相对抵抗力，将人的 *CETP* 基因导入小鼠后，会呈剂量依赖性降低 HDL 水平，并轻微升高 VLDL、LDL 和 ApoB 水平[26]。与小鼠不同，兔通常高表达 CETP 且极易发生饮食诱导的 AS。RITTERSHAUS 等[27]通过外源性抑制兔血浆的 CETP 活性，结果显示，动物模型 AS 的发生率显著降低。在人体中，CETP 与 AS 之间的关系更加复杂。近年一项针对具有更高 CETP 抑制活性的 anacetrapib 的Ⅲ期临床研究中显示，anacetrapib 组相对安慰剂组的 HDL 水平升高 1.12 mmol/L，并且显著降低了 CVD 的发生率[28]。该结果佐证了血浆中高水平 CETP 可能通过影响 HDL 的正常脂质代谢过程而损害其抗 AS 的功能。本研究发现，NS 患者血浆高表达 CETP，可能通过介导胆固醇转移从而干扰 HDL 清除胆固醇的过程，进而导致 NS-HDL 失功能并加速 AS 的进展。

综上所述，NS-HDL 促内皮细胞增殖和迁移功能下降，可能与特定载脂蛋白和脂质转移蛋白等组分改变相关，为 NS 患者高脂血症的治疗提供了新的证据。本研究仍存在局限性：首先，蛋白质组学分析基于全血浆，未能通过功能干预实验验证特定差异蛋白对 HDL 功能的影响；其次，部分实验方法单一，MCD 和 FSGS 病例数有限；最后，所有结论均源于体外实验，缺乏动物模型在体验证，下一步将建立肾病模型，在体内水平评估 HDL 的功能及相关机制。

参考文献：

[1] CULLETON B F, LARSON M G, WILSON P W, et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency[J]. Kidney Int, 1999, 56(6): 2214-2219.

[2] Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, MATSUSHITA K, VAN DER VELDE M, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: A collaborative Meta-analysis [J]. Lancet, 2010, 375 (9731): 2073-2081.

[3] VAZIRI N D, LIANG K, PARKS J S. Down-regulation of hepatic lecithin: Cholesterol acyltransferase gene expression in chronic renal failure[J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2192-2196.

[4] CASTELLI W P, GARRISON R J, WILSON P W, et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study[J]. JAMA, 1986, 256(20): 2835-2838.

[5] DEGOMA E M, LEEPER N J, HEIDENREICH P A. Clinical significance of high-density lipoprotein cholesterol in patients with low low-density lipoprotein cholesterol[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(1): 49-55.

[6] CHUNG B H, WILKINSON T, GEER J C, et al. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: Rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor[J]. J Lipid Res, 1980, 21(3): 284-291.

[7] KHERA A V, CUCHEL M, RODRIGUES A, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis[J]. N Engl J Med, 2011, 364(2): 127-135.

[8] TABET F, RYE K A. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(2): 87-98.

[9] KASTELEIN J J, VAN LEUVEN S I, BURGESS L, et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia[J]. N Engl J Med, 2007, 356 (16): 1620-1630.

[10] NISSEN S E, TARDIF J C, NICHOLLS S J, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis[J]. N Engl J Med, 2007, 356(13): 1304-1316.

[11] BARTER P J, CAULFIELD M, ERIKSSON M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events[J]. N Engl J Med, 2007, 357(21): 2109-2122.

[12] SKÅLÉN K, GUSTAFSSON M, RYDBERG E K, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 417(6890): 750-754.

[13] TABAS I, WILLIAMS K J, BORÉN J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications[J]. Circulation, 2007, 116(16): 1832-1844.

[14] GORDON D J, PROBSTFIELD J L, GARRISON R J, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: Four prospective American studies[J]. Circulation, 1989, 79(1): 8-15.

[15] GLOMSET J A. The plasma lecithins: Cholesterol acyltransferase reaction[J]. J Lipid Res, 1968, 9(2): 155-167.

[16] RADER D J, TALL A R. The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? [J]. Nat Med, 2012, 18(9): 1344-1346.

[17] MORGANTINI C, NATALI A, BOLDRINI B, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2011, 60(10): 2617-2623.

[18] HUANG Y, DIDONATO J A, LEVISON B S, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma[J]. Nat Med, 2014, 20(2): 193-203.

[19] SPEER T, RIDKER P M, VON ECKARDSTEIN A, et al. Lipoproteins in chronic kidney disease: From bench to bedside[J]. Eur Heart J, 2021, 42(22): 2170-2185.

[20] RYSZ-GÓRZYŃSKA M, BANACH M. Subfractions of high-density lipoprotein (HDL) and dysfunctional HDL in chronic kidney disease patients[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(4): 844-849.

[21] TOMIYASU K, WALSH B W, IKEWAKI K, et al. Differential metabolism of human VLDL according to content of ApoE and ApoC-Ⅲ[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(9): 1494-1500.

[22] MENDIVIL C O, ZHENG C, FURTADO J, et al. Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-Ⅲ and not other small apolipoproteins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(2): 239-245.

[23] FURTADO J D, YAMAMOTO R, MELCHIOR J T, et al. Distinct proteomic signatures in 16 HDL subspecies[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(12): 2827-2842.

[24] MORTON A M, KOCH M, MENDIVIL C O, et al. Apolipoproteins E and C Ⅲ interact to regulate HDL metabolism and coronary heart disease risk[J]. JCI Insight, 2018, 3(4): e98045.

[25] BROWN M L, INAZU A, HESLER C B, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins[J]. Nature, 1989, 342(6248): 448-451.

[26] JIANG X C, MASUCCI-MAGOULAS L, MAR J, et al. Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein: Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles[J]. J Biol Chem, 1993, 268(36): 27406-27412.

[27] RITTERSHAUS C W, MILLER D P, THOMAS L J, et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity *in vivo* and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(9): 2106-2112.

[28] HPS3/TIMI55-Reveal Collaborative Group, BOWMAN L, HOPEWELL J C, et al. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease[J]. N Engl J Med, 2017, 377(13): 1217-1227.

Abnormal HDL Components in Nephrotic Syndrome and Its Effect on Endothelial Cell Function

GAO Ruiyu[1,2], CHEN Qiaoling[1,2], YE Qiuping[1,2], XIONG Yunfeng[1,2], CHEN Sihui[1], WEI Lixin[1,2]

1. Department of Nephrology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou **350001**, China

2. Fujian Institute of Clinical Immunology, Fuzhou **350001**, China

ABSTRACT: **Objective** To explore the changes in the components of high-density lipoprotein (HDL) in nephrotic syndrome (NS) and its effects on endothelial cell proliferation and migration. **Methods** A total of 20 patients diagnosed with primary NS and confirmed by renal biopsy as minimal change disease (MCD) or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), along with 10 healthy individuals from physical examinations were enrolled. General clinical data and whole blood samples were collected from both groups. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into the saline group, normal HDL group (N-HDL), HDL in nephrotic syndrome group (NS-HDL), and oxidized HDL group (Ox-HDL). Different types of HDL were isolated and prepared to treat the cells, and the proliferation and migration of endothelial cells were detected. Additionally, proteomic analysis was performed on the HDL components of plasma samples from both groups to investigate differences in protein composition. **Results** Compared to the saline group, the N-HDL group enhanced both the proliferation and migration abilities of endothelial cells, while NS-HDL group showed no significant effects, and Ox-HDL

(下转第 395 页)