

脂蛋白质组学研究进展*

刘培彬^{1, 2)} 叶子璐²⁾ 蔡潭溪²⁾ 戴绍军^{1)**} 杨福全^{2)**}

⁽¹⁾ 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040;

⁽²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 蛋白质组学技术实验室, 蛋白质与多肽药物所重点实验室, 北京 100101)

摘要 脂蛋白质组学(lipoproteomics)是一门应用蛋白质组学技术对脂蛋白(lipoprotein)进行全面、系统地分析和鉴定, 进而了解脂蛋白的组成和功能以及与相关疾病发生、发展之间关系的新兴学科。近些年来, 脂蛋白质组学研究促进了脂蛋白中蛋白质组分的急性期响应、补体激活、免疫响应、炎症响应、蛋白酶抑制等新功能的发现, 显示了广阔的应用前景。本文对脂蛋白的功能和分类, 以及目前应用于脂蛋白质组学研究的脂蛋白分离方法和蛋白质鉴定方法进行了简述, 并综述了高密度脂蛋白、低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白的脂蛋白质组学研究, 及其在冠状动脉疾病、糖尿病、类风湿性关节炎等疾病研究的最新进展。

关键词 脂蛋白质组学, 高密度脂蛋白, 低密度脂蛋白, 极低密度脂蛋白

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00499

脂蛋白(lipoprotein)是一类由富含固醇脂、甘油三酯的疏水性内核和由蛋白质、磷脂、胆固醇等组成的外壳构成的球状微粒^[1]。脂蛋白对于昆虫和哺乳动物细胞外脂质的包装、储存、运输和代谢起着重要作用, 脂蛋白代谢异常(通常伴随着脂质组分和蛋白质组分的改变)与动脉硬化症、糖尿病、肥胖症以及肿瘤发生密切相关。脂蛋白中的脂质组分主要为饮食摄入以及肝脏合成的胆固醇和甘油三酯, 其中胆固醇是生物膜的结构组件, 其含量影响膜的稳定性、透过性和蛋白质机动性, 并且是性激素和胆汁酸生物合成所必需的, 而甘油三酯则是一种新陈代谢能量来源。脂蛋白中的蛋白质组分(也常被称为载脂蛋白, apolipoprotein)主要参与脂质的运输和代谢, 具有急性期响应、补体激活、免疫响应、炎症响应、蛋白酶抑制剂等重要功能^[2]。

目前临床诊断主要把血液中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)以及总胆固醇含量作为脂蛋白水平是否正常的检测指标。通常认为高水平的低密度脂蛋白胆固醇是心肌梗塞和猝死的主要危险因素, 而低水平的高密度脂蛋白胆固醇则会增加心血管疾病的风险。近年的研究表

明, 脂蛋白中的蛋白质组分对于脂蛋白发挥正常代谢功能同样起着重要作用, 脂蛋白结合的脂酶可以将脂质分解为脂肪酸, 从而避免脂毒性^[3]。事实上, 部分临床研究表明这些蛋白质的水平可能比其胆固醇水平更适合用于心血管疾病风险的预测^[4]。然而脂蛋白中蛋白质的组成相对复杂, 需要应用蛋白质组学技术来进一步研究脂蛋白中蛋白质的组分, 脂蛋白质组学于是应运而生。脂蛋白质组学技术可以全面地分析和测定脂蛋白结合蛋白的种类和含量, 对于系统性地研究脂蛋白的结构和功能, 分析脂蛋白中蛋白质组分与脂质代谢以及相关疾病病理过程之间的关系具有重要意义。目前, 脂蛋白质组学研究已广泛应用于冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)、糖尿病(diabetes mellitus)、

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB833703, 2012CB966803)和国家自然科学基金(31100614)资助项目。

** 通讯联系人。

戴绍军. Tel: 15546179693, E-mail: daishaojun@hotmail.com

杨福全. Tel: 13381455861, E-mail: fgyang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2014-04-16, 接受日期: 2014-06-04

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等重要疾病的研究. 因此, 本文对脂蛋白质组学研究方法和研究进展进行了简要综述.

1 脂蛋白分类与功能

1.1 脂蛋白分类

脂蛋白根据密度大小可分为: 乳糜微粒

(chylomicrons, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoproteins, IDL)、低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoproteins, HDL)^[3]. 脂蛋白的理化性质如表 1 所示.

Table 1 The categorization and composition of major lipoproteins^[3]

表 1 脂蛋白分类及性状^[3]

脂蛋白分类	来源	密度/(g·ml ⁻¹)	直径/nm	蛋白质/%	甘油三酯/%	磷脂/%	胆固醇酯/%	胆固醇/%	脂肪酸/%
CM	肠道	< 0.95	100~1000	1~2	85~88	8	3	1	0
VLDL	肝脏	0.95~1.006	30~80	7~10	50~55	18~20	12~15	8~10	1
IDL	VLDL	1.006~1.019	25~50	10~12	25~30	25~27	32~35	8~10	1
LDL	VLDL/ 肝脏	1.019~1.063	18~28	20~22	10~15	20~28	37~48	8~10	1
HDL2	肠道/ 肝脏	1.063~1.125	5~15	33~35	5~15	32~43	20~30	5~10	0
HDL3	肠道/ 肝脏	1.125~1.21	5~15	55~57	3~13	26~46	15~30	2~6	6

脂蛋白也可以根据在琼脂糖凝胶电泳中的分离情况进行分类, 主要分为 α 脂蛋白、 β 脂蛋白前体和 β 脂蛋白, 这些脂蛋白则分别对应于密度分类中的 HDL、VLDL 和 LDL, 而 CM 常停留在电泳的初始位置. 此外, 在哺乳动物中, 脂蛋白也可以按照所含的载脂蛋白的不同分为两类: 含有 ApoB 的脂蛋白(对应于乳糜微粒、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白); 含有 ApoA- I 的脂蛋白(对应于高密度脂蛋白).

1.2 脂蛋白的功能

脂蛋白的主要生物学功能是参与体内脂质的运输和代谢. 人体内脂质运输和代谢可以总结为以下 3 条途径: 外源性代谢途径(exogenous pathway)、内源性代谢途径(endogenous pathway)和胆固醇逆转途径(reverse cholesterol transport pathway)^[3].

外源性代谢途径中, 食物中的脂质在肠腔内被胆盐(由肝脏的胆固醇合成, 并储存在胆囊中)乳化. 乳化作用使脂质与胰脂酶(主要为酯酶和磷脂酶 A2)更好地接触, 将甘油三酯降解为自由脂肪酸、甘油单酯(monoglyceride)和甘油二酯(diglyceride)^[2]. 这些消化后的脂质通过自由扩散作用进入到肠上皮细胞中并重新合成为甘油三酯. 甘油三酯和胆固醇组装为乳糜微粒并释放到淋巴系统

中. 在血液系统中, 乳糜微粒中 ApoC- II 激活目标组织上皮细胞中脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL), 从而将乳糜微粒中甘油三酯分解为脂肪酸和甘油并清除. 在清除脂肪酸的同时, 一部分的磷脂、ApoA 和 ApoC 被转运到 HDL 中. 乳糜微粒残余微粒中 ApoE 与肝脏细胞中乳糜微粒残余微粒受体(chylomicron remnant receptor)相互作用并被肝脏吸收. 在肝脏中甘油三酯以脂滴的形式储存(lipid droplets, LD), 或者以极低密度脂蛋白的形式分泌出去.

内源性代谢途径中, 肝脏主要通过 VLDL 将甘油三酯和胆固醇脂释放到血液中. 与乳糜微粒类似, VLDL 中的甘油三酯也通过脂蛋白脂酶水解并释放自由脂肪酸, 进而转化为 IDL. 血液中大部分的 IDL 通过低密度脂蛋白受体(LDL receptor, LDLR)被肝脏细胞清除^[3]. 剩余的 IDL 通过肝脂酶(hepatic lipase, HL)进一步减少其内甘油三酯的含量, 也可以通过脂蛋白脂酶活性水解甘油三酯, 最终形成富含胆固醇脂的 LDL. LDL 将胆固醇运送到外围组织, LDL 中 ApoB 与 LDLR 结合并通过网格蛋白依赖途径(clathrin-dependent pathway)进入细胞^[4]. 进入细胞后, LDL 中的胆固醇脂降解为胆固醇积累在细胞中或进入新的脂蛋白中.

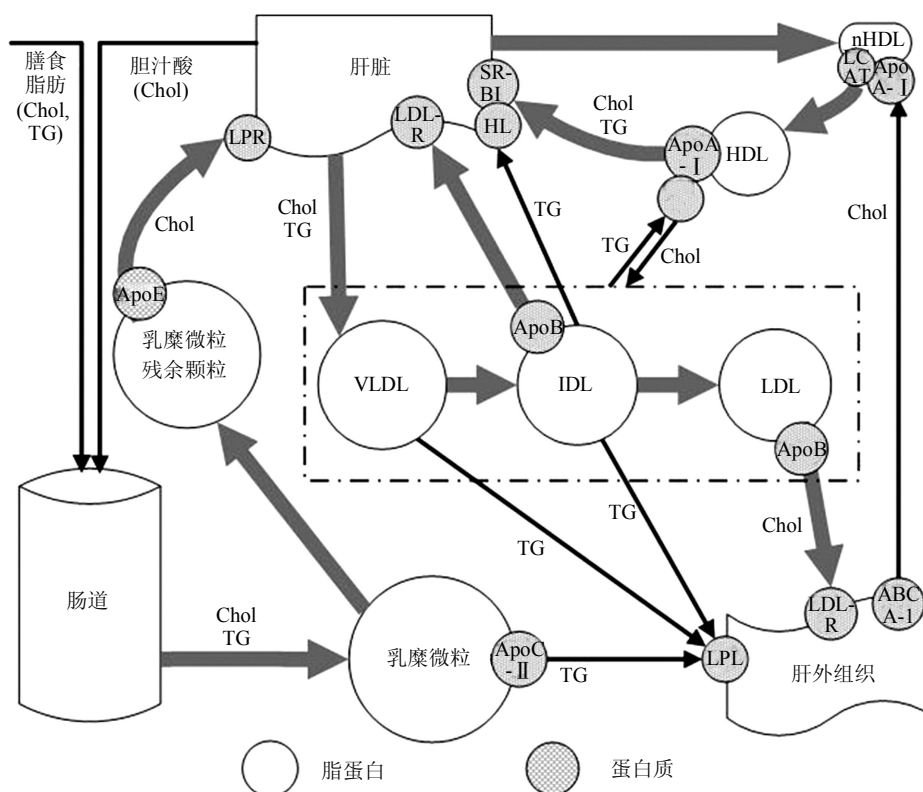


Fig. 1 Overview of transport and metabolism of lipoproteins

图 1 脂蛋白运输与代谢途径一览

TG: 甘油三酯(triglyceride); Chol: 胆固醇(cholesterol); ABCA-1: ATP 结合盒转运载体蛋白 A1(ATP-binding cassette, sub-family A(ABC1), member 1); ApoA-I: 载脂蛋白 A-I (apolipoprotein A-I); ApoB: 载脂蛋白 B(apolipoprotein B); ApoC-II: 载脂蛋白 C-II (apolipoprotein C-II); ApoE: 载脂蛋白 E(apolipoprotein E); CETP: 胆固醇脂转运蛋白(cholesterol ester transfer protein); HL: 肝脂酶(hepatic lipase); LCAT: 卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase); LDL-R: 低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor); LPL: 脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase); LPR: 脂蛋白受体(lipoprotein receptor); SR-BI: 清除受体 B I (scavenger receptor class B type I).

胆固醇逆转运系统中, HDL 将大量的胆固醇从非肝细胞转运到肝脏细胞中. 肝细胞通过清除受体 B I (scavenger receptor class B type I, SR-BI) 与 HDL 中 ApoA-I 直接结合, 或间接通过胆固醇脂转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)将 HDL 中的胆固醇转运到 VLDL 和 LDL 中. CETP 将甘油三酯从含有 ApoB 的脂蛋白转运到 HDL, 这会导致 HDL 中的胆固醇脂含量下降而甘油三酯含量上升. 在肝细胞中, 胆固醇脂被水解为胆固醇, 直接分泌到胆囊中或转化为胆盐后分泌到胆囊中^[2].

目前, 脂蛋白转运方面的研究已经可以体现出其主要运输途径, 在这些运输途径中, 载脂蛋白和受体蛋白质的相互作用起着不可或缺的作用. 因此, 通过脂蛋白质组学技术, 进一步研究脂蛋白中

蛋白质组成和蛋白质修饰与其功能的关系, 对于了解载脂蛋白异常导致疾病的发病机制和发现新的生物标记物具有重大意义.

2 脂蛋白质组学研究方法

2.1 脂蛋白的分离

脂蛋白质组学研究中, 血浆中脂蛋白的分离是至关重要的一步. 目前, 脂蛋白质组学研究中主要采用超速离心法分离脂蛋白. 超速离心法常使用高浓度的溴化钾(KBr)溶液, 由于高浓度盐溶液可能会导致脂蛋白上的蛋白质脱落, 因此也可使用蔗糖和重水(D₂O)代替溴化钾^[3]. 凝胶过滤色谱能够将脂蛋白按照体积大小进行分离, 但可能存在非脂蛋白的污染, 与超速离心法结合使用则可减少该污染. 免疫亲和色谱主要基于脂蛋白中特异的蛋白质(例

如: ApoA- I、ApoB)与相应抗体结合进行分离. 琼脂糖凝胶电泳方法也可以用于脂蛋白的分离, 但这种方法分离的脂蛋白常含有非脂蛋白污染, 不适

用于脂蛋白质组学, 因此本文不做详细介绍. 表 2 简要对比了 4 种脂蛋白分离方法和分离效果.

Table 2 Comparison of lipoprotein separation methods
表 2 脂蛋白分离方法比较

分离方法	分离原理	分离结果		
		分离后的分类	蛋白质损失	污染物含量
超速离心	密度	VLDL / LDL / HDL	高(under high salt)	低
免疫亲和色谱	特异抗原	含 ApoA-I或 ApoB-100 脂蛋白	低	低
凝胶过滤色谱	体积	VLDL / LDL / HDL	低	高
琼脂糖凝胶电泳	电荷和体积	α / pre β / β	低	很高

2.1.1 超速离心法分离脂蛋白

超速离心分离方法(ultracentrifugation)是脂蛋白组学研究中应用最广泛的一种脂蛋白分离方法. 其原理是, 向血浆中加入适量的 KBr 或蔗糖以改变血浆的密度, 然后通过超速离心的方法使血浆中组分按密度分层, 从而达到分离脂蛋白的目的. 改变血浆浓度主要有两种方法: a. 将血浆与高密度的 KBr 或蔗糖溶液混合; b. 向血浆中加入 KBr 或蔗糖来增加密度.

第一种方法, 可以通过以下公式计算需要加入高密度溶剂的体积^[6](V_s : 高密度溶液体积; V_p : 血浆体积; d : 血浆终浓度; d_s 高密度溶液浓度; d_0 血浆初始浓度, 一般为 1.006):

$$V_s = \frac{V_p(d-d_0)}{d_s-d}$$

第二种方法, 可以使用 Radding-Steining 公式计算需要加入溶质的质量^[7](M_s : 溶质 KBr 的质量; V_p : 血浆体积; d : 血浆终浓度; d_0 血浆初始浓度; 0.312 是 KBr 的比容(ml/g)).

$$M_s = \frac{V_p(d-d_0)}{1-0.312d}$$

目前, 应用于脂蛋白组学研究的超速离心方法有两种(以分离 HDL 为例): a. 密度梯度超速离心法(density gradient ultracentrifugation), 将血浆密度调整至 1.21 g/ml(或略高), 用 1.063 g/ml 的 KBr 覆盖于血浆上方, 然后进行超速离心, 离心后密度小于 1.063 g/ml 的 VLDL 和 LDL 将位于最上层, 而 HDL 将位于中间层, 可以用注射器穿刺离心管管壁吸出; b. 连续超速离心法(sequential ultracentrifugation), 先以 10 000 g 离心分离乳糜微

粒(CM), 再将血浆密度依次调整为 1.019、1.063、1.21 g/ml, 则可通过超速离心依次从表层获得 VLDL、LDL、HDL, 为了避免血清白蛋白污染, 可将分离到的 HDL 溶液中加入 KBr 将密度调整为 1.24 g/ml, 通过超速离心进一步提纯 HDL^[8].

超速离心可能会导致少量非共价键结合蛋白质的丢失^[9]. Davidsson 等^[9]使用 D_2O 代替 KBr 进行超速离心, 这是因为 D_2O 可以抵抗自由离子引起的氧化以及更好地维持离子强度和 pH, 此外还可以避免高浓度 KBr 引起蛋白质丢失. Green 等^[10]发现, 通过超速离心方法分离 HDL 和 HDL2 容易含有 ApoB-100 污染, 但 HDL3 不容易受到这一类污染影响.

2.1.2 免疫亲和色谱法分离脂蛋白

免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography, IC)是通过抗体和抗原的特异性结合分离目标组分的色谱分离技术. 现阶段应用于脂蛋白组学研究的免疫亲和色谱分离方法主要是通过抗 ApoA 抗体分离 HDL. Rezaee 等^[11]使用琼脂糖连接的抗 ApoA- I 和 ApoA- I / II 多克隆抗体进行 HDL 分离. Vaisar 等^[12]同样使用抗 ApoA- I 多克隆抗体结合到 HiTrap NHS-activated HP 色谱柱上来分离 Apo- I 复合物(ApoA- I complexes). Burillo 等^[13], 使用了快速蛋白质液相色谱(fast protein liquid chromatography)和免疫色谱结合的方式对血浆中的蛋白质进行了分离. Watanabe 等^[14]使用商品化的抗 HDL 吸附柱(anti-HDL chicken IgY immunocapture spin column)实现了对 HDL 的分离. 免疫亲和色谱具有更容易保留脂蛋白结合蛋白(lipoprotein-

associated proteins)这一优势, 因此对随后的蛋白质组学研究非常有利。然而免疫亲和色谱是基于脂蛋白中的特殊蛋白质组分(如 ApoA- I 或 ApoB 等)对脂蛋白进行亲和分离纯化^[4]。

2.1.3 凝胶过滤色谱法分离脂蛋白

分子排阻色谱(size-exclusion chromatography, SEC)是一种以多孔凝胶作为固定相进行分离的色谱方法, 当采用水溶液作为流动相时也常被称为凝胶过滤色谱(gel filtration chromatography)。目前脂蛋白质组学研究中, 主要使用快速蛋白质液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)系统和凝胶过滤色谱柱(GE Superdex 200 10/300 GL)对脂蛋白进行分离纯化。凝胶过滤色谱能够分离特殊大小的脂蛋白组分, 但是在分离血清和血浆样品时会导致非脂蛋白的蛋白质污染^[4]。因此常被用于进一步分离和纯化超速离心分离所得到的脂蛋白组分。

2.2 脂蛋白的鉴定

目前, 应用于脂蛋白组学研究的鉴定方法主要分为以下三种。

a. 应用 MALDI-TOF-MS 测定脂蛋白中完整蛋白质的分子质量。由于完整蛋白质的分子质量只能提供有限的信息, 因此这一方法主要用于鉴定分子质量已知的蛋白质。然而, 脂蛋白中蛋白质的组成尚未完全明确, 且这些蛋白质在成熟过程中常存在着剪切和修饰, 因此仅通过完整蛋白质的分子质量很难实现对脂蛋白中未知蛋白质的鉴定。

b. 利用双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)将脂蛋白中的蛋白质按照等电点(pI)和分子质量进行分离, 并通过考染或银染进行半定量。蛋白质斑点, 需切取并酶解成肽段后, 经 MS 或 MS/MS 鉴定。然而这一技术存在一些不足: 分析多组样品时, 重现性难以保证; 蛋白质斑点的切取和质谱鉴定费时费力; 蛋白质斑点中可能包含多种蛋白质, 不利于相对定量; 低丰度蛋白质难以染色和鉴定; 受 2-DE 所限, 极酸性、极碱性蛋白质和极大(> 200 ku, 例如 ApoB-100)、极小(< 10 ku)蛋白质难以分离; 疏水性蛋白质在其等电点时易从胶中析出。因此, 该技术不适合对疏水性较强的脂蛋白质组进行相对定量。

c. “鸟枪法蛋白质组学”(shotgun proteomics)是通过 LC-ESI-MS/MS 鉴定酶解后的脂蛋白质。该方法适用于复杂蛋白质样品的鉴定和定量。然而脂蛋白中蛋白质存在着较多由稳定二级结构形成的疏水性结构域, 这些结构域的存在不利于脂蛋白中蛋

白质的溶解和酶解。此外, 脂蛋白中的脂质组分也不利于蛋白质酶解和质谱鉴定。因此破坏脂蛋白中蛋白质的疏水性二级结构和去除脂蛋白中的脂质组分将有利于脂蛋白中蛋白质的酶解和鉴定。该方法与完整蛋白质分子质量测定方法相比, 可以鉴定到精确分子质量未知的蛋白质, 通过 de novo 方法还可以发现未知蛋白质; 与双向凝胶电泳方法相比, 不受蛋白质分子质量大小和疏水性的影响, 因此在脂蛋白质组学研究中应用最为广泛。

附件表 S1 总结了目前脂蛋白质组学研究对象与研究方法, 并对这些研究中涉及的疾病类型、脂蛋白分离方法、定量蛋白质组学方法和鉴定到的蛋白质数量进行了统计。从表 S1 中可以发现, 不同研究采用的分离和鉴定方法不尽相同: Karlsson 等^[8]使用超速离心的方法分离到了 HDL2 和 HDL3, 并应用双向凝胶电泳结合 MALDI-TOF/TOF MS 的方法鉴定到了 13 种 HDL 结合蛋白质; Gordon 等^[7]使用凝胶过滤色谱的方法分离 HDL, 并通过 LC-ESI Q-TOF MS/MS 鉴定到了 47 种 HDL 结合蛋白质; Riwanto 等^[15]使用超速离心结合凝胶过滤色谱方法通过 LC-ESI MS/MS 共鉴定到 78 种 HDL 结合蛋白质。通过目前的研究结果(表 S1)可以总结出, 采用超速离心结合凝胶过滤色谱法分离纯化脂蛋白, 并通过鸟枪法蛋白质组学方法可以鉴定和定量到更多脂蛋白中的蛋白质, 因此该方法在脂蛋白质组学研究中应用最为广泛。

3 脂蛋白质组的组成研究

目前脂蛋白质组学研究涉及人类(*Homo sapiens*)、尤卡坦猪(*Yucatan miniature swine*)以及转基因小鼠(hApoA- II -Tg mice)。附件表 S2 列出了从 VLDL、LDL 和 HDL 中鉴定到的脂蛋白质组及其鉴定到的次数。这些蛋白质主要参与了脂质代谢、急性期响应、补体激活、免疫响应、炎症响应和蛋白酶抑制剂等功能。这些数据也进一步表明脂蛋白具有除脂质运输外的其他功能。下文将进一步阐述脂蛋白的蛋白质组信息以及与疾病的关系。

3.1 HDL 脂蛋白质组及功能分析

高密度脂蛋白主要由肝脏和肠道分泌, 可以清除细胞中过量的胆固醇。最初 HDL 被认为只是胆固醇和脂质运输的工具, 因此将 HDL 中鉴定到的蛋白质命名为载脂蛋白(例如: ApoA- I、ApoA- II、ApoB100……ApoJ)。ApoJ(clusterin)可能是在 HDL 中最先被鉴定到的具有其他功能的蛋白质, 其具有

补体激活功能,而不仅仅是脂质代谢功能^[6].到目前为止,脂蛋白质组学研究已鉴定到181种HDL蛋白质.

从附件表S2中可以看出鉴定次数最多的蛋白质主要具有脂质代谢功能.其中最具代表性的是ApoA-I, ApoA-I在胆固醇逆转运过程中起着重要作用,此外ApoA-I还具有将胆固醇从巨噬泡状细胞移出的功能,这说明HDL具有预防动脉粥样硬化的功能^[4]. ApoA-I可以与ATP结合盒式蛋白质(ABCA1、ABCG1)相互作用将组织中的磷脂和胆固醇转运到HDL中,并且可以作为卵磷脂-胆固醇酰基转移酶的辅酶将其内的胆固醇合成为胆固醇酯^[4]. ApoA-I还可以与SR-B I结合将胆固醇脂和其他脂质释放到肝脏细胞中. HDL中的磷脂和甘油三酯也可以在肝脏表面被肝脏脂酶消化分解,最终形成小HDL和低脂的ApoA-I,从而在胆固醇逆转运途径中再循环. ApoA-II与脂质结合作为HDL的结构骨架有助于增加HDL的稳定性; ApoA-IV是HDL和CM中主要的组成部分,可以激活LCAT,也可以提高ApoC-II激活脂蛋白脂酶(LPL)的效率. ApoC-I可以与ApoE相互作用抑制VLDL与LDL受体相关蛋白质结合,也可以与自由脂肪酸结合减少细胞内脂化作用^[7]; ApoC-II可以激活一些甘油三酯脂酶,其含量在富含甘油三酯的脂蛋白中变化较快; ApoC-III在VLDL组分中占50%,而在HDL中仅含2%,具有抑制脂蛋白脂酶和肝脂酶的功能,并且可以降低肝细胞对淋巴内乳糜微粒的吸收,这表明ApoC-III可以延迟富含甘油三酯微粒的代谢;而ApoC-IV的功能尚未明确. ApoD主要存在于HDL的LCAT大分子复合体中,可以参与胆汁三稀(bilin)结合和转运. ApoL1、ApoM也可能参与脂质的反向运输. 胆固醇脂转运蛋白(CETP)位于HDL中, CETP可以调节HDL中胆固醇脂和VLDL、IDL、LDL中甘油三酯的交换. 磷脂转运蛋白(PLTP)可以促进VLDL和CM中的磷脂转运到HDL中^[8]. LCAT主要由肝脏合成并分泌到血浆中,在HDL或LDL表面将胆固醇和卵磷脂转化成胆固醇脂和溶血磷脂胆碱(lysophosphatidylcholine),随后胆固醇脂被运输回肝脏. LCAT与ApoE和ABCA1在空HDL(nascent HDL)重构为成熟球形HDL的过程中起着重要作用. PON具有水解有机磷底物、内酯和芳香族羧基酯的功能,其还能防止LDL被氧化修饰和抑制粥样斑块的形成. 血清淀粉样蛋白A

(SAA)也存在于HDL复合体内,是主要的急性响应反应物; Beta-2-glycoprotein 1(ApoH)也可以通过与受损细胞表面磷脂结合防止血液凝集^[9]. 补体激活功能方面, Clusterin(Apo J)同工型1具有防止非自身蛋白质凝集,以及预防胁迫诱导下的血浆蛋白质凝集的功能.

目前血清白蛋白、免疫球蛋白以及角蛋白常被认为是污染蛋白^[20], Gundry等^[21]使用了7种方法分离脂蛋白,结果在每种组分中可以检测到血清白蛋白的存在,说明在血液中ApoA-I和血清白蛋白可能存在相互作用. Heller等^[22]发现血清白蛋白与ApoA-I的比例在HDL中比较保守,这同样说明了二者之间可能存在相互作用. 然而,目前仍没有明确的证据表明血清白蛋白就是脂蛋白中的蛋白质.

3.2 LDL和VLDL脂蛋白质组及功能分析

从附件表S2可以看出,目前脂蛋白质组学研究中共鉴定到61种LDL蛋白质,这些蛋白质主要具有脂质代谢功能. 其中, ApoB-100主要存在于LDL中作为结构支撑物,允许其内形成一个大的疏水性脂质核心. 同时,作为与细胞结合的信号分子,通过与LDL受体结合将LDL微粒运输到细胞内,这对于外周组织和肝细胞吸收血液中的LDL是至关重要的. 除此之外, ApoB也是LDL中主要的抗动脉粥样硬化蛋白质^[23]. ApoC-II是一个脂蛋白脂酶的辅酶,存在于含有ApoB的富含甘油三酯的脂蛋白中,可以将微粒中的甘油三酯水解成脂肪酸. ApoE可以与肝脏上LDL(ApoB/E)受体以及乳糜微粒残余微粒ApoE特异性受体结合. ApoF结合在LDL上(也少量结合在VLDL、ApoA-I和ApoA-II),具有抑制CETP活性的功能,是胆固醇转运重要的调节因子. 此外,脂蛋白(a)(lipoprotein(a), Lp(a))存在于LDL中,通过二硫键与ApoB-100结合,具有丝氨酸蛋白酶活性以及分解自身的功能^[24-25]. 目前,有关VLDL的脂蛋白质组学研究较少,仅鉴定到22种VLDL蛋白质. VLDL的主要载脂蛋白是ApoB-100. Sun等^[26]应用鸟枪法蛋白质组学鉴定到了ApoB-100. 而Mancone等^[27]采用2-DE并未鉴定到ApoB-100,这可能与ApoB-100的分子质量过大不容易进入分离胶内有关. 在这两个研究中共同鉴定到的VLDL蛋白质有: ApoA-I、ApoA-IV、ApoC-III、ApoC-IV、ApoE、ApoL1、ApoM和PCYOX1(prenylcysteine oxidase 1, 异戊烯半胱氨酸氧化酶1). 这些蛋白质同样具有脂类代谢功能,其中异戊烯半胱氨酸氧化

酶 1 具有通过打开异戊二烯基 -L-半胱氨酸上的二硫键降解含有异戊烯基的蛋白质, 并分解出胆固醇生物合成的中间产物异戊烯醛的功能。

4 脂蛋白质组学在疾病研究中的应用

4.1 冠状动脉疾病

病理研究表明, HDL 可以将其他组织的胆固醇转运回肝脏。HDL 胆固醇(HDL-C)水平与冠状动脉疾病风险呈负相关, 因此常被称为“好胆固醇”^[28]。与此相对, 高浓度的 LDL 胆固醇(LDL-C)易诱发动脉粥样硬化和心血管疾病, 而低浓度的 LDL-C 可以降低心血管疾病的发病机率, 因此 LDL-C 常被称为“坏胆固醇”^[2]。目前, 应用于脂蛋白临床诊断的指标主要为 HDL-C、LDL-C 和总胆固醇含量。而目前的脂蛋白质组学研究可能为临床诊断提供更多参考信息。

Riwanto 等^[15]研究发现, 冠状动脉疾病病人体内的 HDL 不但不会激活内皮细胞的抗凋亡途径, 反而会激活潜在的内皮细胞凋亡途径。其中 HDL 脂蛋白组的改变对于其功能的改变起着重要作用。基于定量蛋白质组学方法, Riwanto 等共鉴定到了 78 种差异表达的蛋白质, 其中从生蛋白(clusterin)和 ApoC-III 具有调节细胞凋亡的功能。Clusterin 在冠状动脉疾病患者血清中表达下调, 经验证 clusterin 抗体孵育的健康人 HDL 会使内皮细胞的抗凋亡活性下降, 而附加有 clusterin 的冠状动脉疾病患者的 HDL 会使内皮细胞的抗凋亡活性上升, 该研究进一步使用人工重组高密度脂蛋白(recostituted HDL, rHDL)结合 clusterin 进行研究, 发现了纯的 clusterin 对内皮细胞凋亡没有明显影响, 而 clusterin 与 rHDL 结合后对内皮细胞凋亡有明显抑制, 这一系列研究都证明了与冠状动脉疾病患者的 HDL 结合的 clusterin 含量降低, 从而影响了 HDL 抑制内皮细胞凋亡能力。ApoC-III 在冠状动脉疾病患者血清中表达上调, 该实验使用了类似的方法验证了与冠状动脉疾病患者的 HDL 结合的 ApoC-III 会促进内皮细胞凋亡。Riwanto 等还分析了 HDL 对于内皮细胞凋亡的信号传导机制, 健康人的 HDL 会经由磷酸肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)、Akt、Bcl-x1 途径抑制 Caspase-3 的表达, 进而抑制内皮细胞凋亡, 而冠状动脉疾病患者的 HDL 会经由丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、tBid 途径促进 Caspase-3 的表达, 从而促

进内皮细胞凋亡。

Alwaili 等^[20]研究了急性冠状动脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)、冠状动脉疾病和健康男性 HDL 的蛋白质组差异。共鉴定到 67 种 HDL 结合蛋白质, 并通过 Western blot 和 ELISA 对 ApoA-IV 的表达下调, SAA 和补体因子 C3(C3)的表达上调进行了验证。SAA、C3 和其他炎症响应蛋白质在急性冠状动脉综合征患者体内 HDL 中表达上调说明其可能具有促炎症的特性。此外, 该研究还发现, 在急性冠状动脉综合征患者体内 HDL 胆固醇含量和 ApoA-I 含量降低, 蛋白质组成也发生改变, 但 ABCA1、ABCG1 和 SR-B I 调节的胆固醇运输能力并没有降低。Vaisar 等^[29]对冠状动脉疾病患者体内 HDL2 的研究发现, ApoA-I 中含有氧化修饰的甲硫氨酸残基以及 ApoC-III 水平上升, 并发现 ApoA-I、ApoC-II、Lp(a)和 ApoC-I 的 MALDI-MS 质谱峰可以准确地诊断出冠状动脉疾病患者。Green 等^[10]研究在接受他汀类药物(statin)和尼克酸(niacin)治疗的冠状动脉疾病患者体内 HDL3 变化情况时, 发现 ApoE 表达丰度下调而 ApoF 和 PLTP 表达丰度上调, 这表明胆固醇进行着反向运输, 而且冠状动脉疾病患者在接受治疗后 HDL3 的脂蛋白质组更接近于健康人。

Vaisar 等^[12]使用 Shotgun 蛋白质组学方法研究了冠状动脉疾病患者体内 HDL 组成, 鉴定到了多种补充物调节蛋白质, 多种不同的蛋白酶抑制剂, 以及许多急性响应蛋白质。这说明 HDL 在补充物系统、预防组织被蛋白酶分解、抗炎症和抗动脉硬化方面起着重要作用。并且质谱数据和生化研究都表明冠状动脉疾病患者体内 HDL3 会选择性地增高。

4.2 II 型糖尿病

Davidsson 等^[9]研究了 II 型糖尿病患者和代谢综合征患者的 LDL 蛋白质组, 与健康人相比其 ApoC-III 表达上调而 ApoC-I、ApoA-I 和 ApoE 表达下调。糖尿病病人血清内形成的 LDL 复合体含有动脉蛋白聚糖, 而 ApoC-III 的含量与此密切相关, 这一现象可能与胰岛素抵抗脂质代谢异常有关, 并有可能增加心血管疾病的风险。

Richardson 等^[30]将糖尿病脂质异常的尤卡坦猪(Yucatan pigs)与健康型和非糖尿病高血脂异常的猪进行比较, 发现有氧运动可以预防冠状血管功能失调, 但不会改变总 LDL 含量。通过蛋白质组学方法研究, 共鉴定到 28 种蛋白质, 其中 ApoA-I、B、C-III、D、E 和 J 丰度发生改变。此外一种

ApoE 的同工型可能与冠状动脉疾病有密切关系。

4.3 类风湿性关节炎

Watanabe 等^[14]应用免疫亲和色谱方法从类风湿性关节炎患者(RA)的血浆中分离出 HDL, 并鉴定到 78 种蛋白质, 其中 12 种在类风湿病人体内的促炎症 HDL 中表达明显上升, 这些蛋白质包含一些急性响应蛋白质, 包括: ApoJ、纤维蛋白原、SAA 和补体因子(B、C3、C9)。这一发现表明, 类风湿病人体内的促炎症 HDL 的蛋白质组成发生明显改变, 其中急性响应蛋白质和补体因子级联反应蛋白质的表达上调, 使 HDL 变得具有慢性炎症特性, 这一分子水平上的联系表明类风湿病人可能具有患心血管疾病的风险。

4.4 肾脏疾病

晚期肾脏疾病(end-stage renal disease, ESRD)患者经历长期的血液透析后会导致 HDL 胆固醇(HDL-C)水平下降, 这会增加心血管疾病的风险。Mange 等^[15]使用了基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学方法, 对这一现象进行了研究, 在 HDL 组分中鉴定到 122 种蛋白质, 并发现 40 种具有显著性差异, 其中 ApoC-II、ApoC-III 表达显著上升而血清铁传递蛋白(serotransferrin)显著下调, 这些蛋白质参与了脂质运输、急性期响应、补体激活、脂蛋白氧化和金属阳离子平衡。

4.5 其他疾病相关研究

ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3 poly-unsaturated fatty acids, ω -3 PUFAs)有益于预防心血管疾病。Burillo 等^[13]研究了 6 位吸烟者在食用富含 ω -3 多不饱和脂肪酸食物 5 周后的蛋白质组差异, 发现从生蛋白、对氧磷酶和 ApoA-I 表达上调, 而纤维连接蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶、补体因子 C1r 和 H 表达下调, 并使用免疫检测芯片确认了这一结果。表达上调的蛋白质主要具有抗氧化、抗炎症和抗动脉粥样硬化的功能, 而表达下调的蛋白质主要参与补体激活和急性响应。

Levels 等^[32]研究了静脉注射内毒素 LPS 对较高水平(1.9 ± 0.4) mmol/L 和较低水平(0.7 ± 0.1) mmol/L HDL 胆固醇的健康男性蛋白质组的影响, 这两组人在注射 LPS 后, 急性响应蛋白质 SAA-1/2 都有明显上升, 然而这两组间的蛋白质组变化没有明显差异。

Rubinow 等^[33]对性腺机能减退的男性患者进行了研究, 发现性激素替代三个月后并没有影响 HDL-C 水平, 但 HDL 上结合的 PON1 和纤维蛋白

原 α 链(FGA)明显上调, 而 ApoA-IV 明显下调。因此说明使用外源性激素不会影响胆固醇的运输功能, 但是会使 HDL 脂蛋白质组发生改变。

Rubinow 等^[34]在另一个研究中, 向正常男性注射促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)拮抗剂使血液中雄性激素浓度降低 95%, 发现男性急性性激素降低会使胆固醇运输能力增强以及 HDL 结合的 clusterin 含量上升, 并且改变 HDL 结合蛋白质的组成。

5 总结与展望

作为蛋白质组学的一个新兴分支, 脂蛋白质组学研究仍面临着诸多有待解决的问题。首先, 脂蛋白的分离和纯化仍是脂蛋白质组学研究方法中的重点和难点。目前基于超速离心法、免疫亲和色谱法或凝胶过滤色谱法单步分离出脂蛋白的纯度难以保证, 因此无法判定在脂蛋白质组学研究中鉴定到血液中的高丰度蛋白质(如血清白蛋白、免疫球蛋白)是否为污染物所致还是实际存在。为进一步提高脂蛋白的纯度, 需要二维或多维分离方法, 如采用超速离心法-超速离心法、超速离心法-凝胶过滤色谱法结合的两步提取法, 或采用超速离心法-凝胶过滤色谱法-免疫亲和色谱法结合的三步提取法。第二, 脂蛋白质组学研究中利用不同方法所鉴定的蛋白质的种类和数量存在一定差异。由于脂蛋白中的蛋白质多为疏水性脂结合蛋白质, 因此脱脂和采用 LysC/Trypsin 双酶酶解将提高其酶解效率, 将有助于采用鸟枪法蛋白质组学技术对脂蛋白质组进行鉴定和定量。第三, HDL 中有 80 余种蛋白质被至少两次脂蛋白质组学研究报道, 但在一个直径 5~15 nm 的 HDL 微粒中很难同时包含如此多样的蛋白质, 有研究推测这些种类的蛋白质可能分布于不同的 HDL 亚种类中, 因此进一步研究脂蛋白亚类的脂蛋白质组将对了解脂蛋白的组成和分子机制具有重要意义。第四, 降脂药物对于患者血浆中脂蛋白的组成和功能具有一定影响, 而该类药物对脂蛋白中蛋白质组成的具体影响尚未明确, 因此需要深入开展这方面研究。脂蛋白质组学技术是研究脂蛋白中蛋白质组成和变化最有效的方法之一, 利用比较/定量脂蛋白质组学技术可以发现疾病相关的差异脂蛋白、特异的翻译后修饰, 以及降解等, 这对于相关疾病的病理、分子机制研究、早期诊断、预后疗效评估等具有重要意义。

附件 表 S1、S2 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>).

参 考 文 献

- [1] Fredrickson D S, Levy R I, Lees R S. Fat transport in lipoproteins--an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med*, 1967, **276**(1): 34-42
- [2] Schittmayer M, Birner-Gruenberger R. Functional proteomics in lipid research: lipases, lipid droplets and lipoproteins. *J Proteomics*, 2009, **72**(6): 1006-1018
- [3] Alonzi T, Mancone C, Amicone L, *et al.* Elucidation of lipoprotein particles structure by proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics*, 2008, **5**(1): 91-104
- [4] Hoofnagle A N, Heinecke J W. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res*, 2009, **50**(10): 1967-1975
- [5] Stahlman M, Davidsson P, Kanmert I, *et al.* Proteomics and lipids of lipoproteins isolated at low salt concentrations in D₂O/sucrose or in KBr. *J Lipid Res*, 2008, **49**(2): 481-490
- [6] Havel R J, Eder H A, Bragdon J H. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 1955, **34**(9): 1345-1353
- [7] Gordon S M, Deng J Y, Lu L J, *et al.* Proteomic characterization of human plasma high density lipoprotein fractionated by gel filtration chromatography. *J Proteome Res*, 2010, **9**(10): 5239-5249
- [8] Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, *et al.* Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2005, **5**(5): 1431-1445.
- [9] Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, *et al.* A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J Lipid Res*, 2005, **46**(9): 1999-2006
- [10] Green P S, Vaisar T, Pennathur S, *et al.* Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome. *Circulation*, 2008, **118**(12): 1259-1267
- [11] Rezaee F, Casetta B, Levels J H M, *et al.* Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics*, 2006, **6**(2): 721-730
- [12] Vaisar T, Pennathur S, Green P S, *et al.* Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*, 2007, **117**(3): 746-756
- [13] Burillo E, Mateo-Gallego R, Cenarro A, *et al.* Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome. *Lipids Health Dis*, 2012, **11**(1): 1186-1476
- [14] Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y A, *et al.* Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2012, **64**(6): 1828-1837
- [15] Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, *et al.* Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*, 2013, **127**(8): 891-904
- [16] Vaisar T. Proteomics investigations of HDL: challenges and promise. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, **10**(4): 410-421
- [17] Westerterp M, Berbee J F, Delsing D J, *et al.* Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *J Lipid Res*, 2007, **48**(6): 1353-1361
- [18] Francis G A. The complexity of HDL. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1801**(12): 1286-1293
- [19] Schousboe I. Beta-2-Glycoprotein-I—a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood-coagulation Pathway. *Blood*, 1985, **66**(5): 1086-1091
- [20] Alwaili K, Bailey D, Awan Z, *et al.* The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1821**(3): 405-415
- [21] Gundry R L, Fu Q, Jelinek C A, *et al.* Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl*, 2007, **1**(1): 73-88
- [22] Heller M, Stalder D, Schlappritzi E, *et al.* Mass spectrometry-based analytical tools for the molecular protein characterization of human plasma lipoproteins. *Proteomics*, 2005, **5**(10): 2619-2630
- [23] Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *J Intern Med*, 2006, **259**(5): 493-519
- [24] Salonen E M, Jauhiainen M, Zardi L, *et al.* Lipoprotein(a) binds to fibronectin and has serine proteinase activity capable of cleaving it. *EMBO J*, 1989, **8**(13): 4035-4040
- [25] Mclean J W, Tomlinson J E, Kuang W J, *et al.* Cdna sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987, **330**(6144): 132-137
- [26] Sun H Y, Chen S F, Lai M D, *et al.* Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin Chim Acta*, 2010, **411**(5-6): 336-344
- [27] Mancone C, Amicone L, Fimia G M, *et al.* Proteomic analysis of human very low-density lipoprotein by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF. *Proteomics*, 2007, **7**(1): 143-154
- [28] Heinecke J W. HDL's protein cargo friend or foe in cardioprotection?. *Circulation*, 2013, **127**(8): 868-869
- [29] Vaisar T, Mayer P, Nilsson E, *et al.* HDL in humans with cardiovascular disease exhibits a proteomic signature. *Clin Chim Acta*, 2010, **411**(13-14): 972-979
- [30] Richardson M R, Lai X Y, Dixon J L, *et al.* Diabetic dyslipidemia and exercise alter the plasma low-density lipoproteome in Yucatan pigs. *Proteomics*, 2009, **9**(9): 2468-2483
- [31] Mange A, Goux A, Badiou S, *et al.* HDL proteome in hemodialysis patients: a quantitative nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e34107
- [32] Levels J H M, Geurts P, Karlsson H, *et al.* High-density lipoprotein proteome dynamics in human endotoxemia. *Proteome Sci*, 2011, **9**(1): 1186-1477

- [33] Rubinow K B, Vaisar T, Tang C R, *et al.* Testosterone replacement in hypogonadal men alters the HDL proteome but not HDL cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*, 2012, **53**(7): 1376–1383
- [34] Rubinow K B, Tang C R, Hoofnagle A N, *et al.* Acute sex steroid withdrawal increases cholesterol efflux capacity and HDL-associated clusterin in men. *Steroids*, 2012, **77**(5): 454–460

The Research Advances in Lipoproteomics*

LIU Pei-Bin^{1,2)}, YE Zi-Lu²⁾, CAI Tan-Xi²⁾, DAI Shao-Jun^{1)**}, YANG Fu-Quan^{2)**}

⁽¹⁾ Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China;

²⁾ Laboratory of Protein and Peptide Pharmaceuticals & Laboratory of Proteomics, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Lipoproteomics is the proteomic analysis of lipoproteins. Recent lipoproteomics research revealed that lipoprotein-associated proteins have more functions rather than simply being structural molecules and parts of lipid metabolism. Firstly, we summarized the biological functions and categorization of lipoproteins, as well as methods for lipoprotein isolation and discovery proteomics that were recently applied in lipoproteomics. In addition, we analyzed the lipoproteome datasets of high density lipoproteins, low density lipoproteins and very low density lipoproteins. Lastly, we reviewed the contributions of lipoproteomics in our understanding of coronary artery disease, diabetes and rheumatoid arthritis. Given the extensive description of lipoproteomics technical methods and the application for lipoproteome datasets, we believe that this review will be beneficial to researchers intent to contribute to the field of lipoproteomics.

Key words lipoproteomics, HDL, LDL, VLDL

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00499

* This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB833703, 2012CB966803) and The National Natural Science Foundation of China (31100614).

**Corresponding author.

DAI Shao-Jun. Tel: 15546179693, E-mail: daishaojun@hotmail.com

YANG Fu-Quan. Tel: 13381455861, E-mail: fqyang@ibp.ac.cn

Received: April 16, 2014 Accepted: June 4, 2014

附录

Table S1 Objects and strategies in lipoproteomics studies
表 S1 脂蛋白质组学研究对象与方法

Species	Lipoprotein Category	Disease	Separation method	Proteomic Approaches	Identified proteins	Ref
<i>Homo sapiens</i>	HDL	CAD & ACS	UC, GFC	LC-ESI MS	78	[1]
	HDL	ACS & CAD	UC(KBr)	1DE & ESI Q-TOF MS	67	[2]
	HDL		UC(KBr)	2DE & MALDI-TOF/TOF MS	13	[3]
	HDL	Testosterone	UC(KBr)	ESI I-trap MS	42	[4]
	HDL	Steroid withdrawal	UC(KBr)	ESI LTQ-I-trap MS	8*	[5]
	HDL		UC(KBr)	LC-ESI Q-TOF MS	28	[6]
	HDL	HD	UC(KBr)	nanoLC & MALDI TOF/TOF MS	122	[7]
	HDL	Endotoxin (LPS)	UC(KBr)	SELDI-TOF MS	16*	[8]
				2DE & MALDI-TOF/TOF MS		
	HDL		IC	2DE MALDI-TOF/TOF MS	56	[9]
	HDL		GFC	LC-ESI Q-TOF MS	47	[10]
	HDL	ω-3 PUFAs	FPLC-AC	2DE & MALDI-TOF/TOF MS	13*	[11]
			(anti-ApoAI)	ESI LTQ-Orbitrap MS		
	HDL	RA	IC	SDS-PAGE	78	[12]
				LC-ESI Q-TOF MS		
	HDL/HDL3	CAD	UC(KBr)、IC	nanoLC-ESI LTQ I-trap MS	48	[13]
				2D LC-ESI LCQ I-Trap MS		
	HDL2	CAD	UC	MALDI-TOF/TOF MS	6*	[14]
				LC MALDI-TOF/TOF MS		
	HDL3	CAD	UC(KBr)	LC-ESI LTQ-FT MS	27	[15]
	HDL/LDL/VLDL		UC(KBr)	Native PAGE & 2D-PAGE	26*	[16]
				LC-MS/MS & MALDI-TOF MS		
	HDL/LDL/VLDL		UC(D ₂ O/sucrose/KBr)	SELDI-TOF MS & 1DE & 2DE	9*	[17]
				MALDI-TOF/TOF MS		
	LDL	type 2 diabetes	UC	1DE & MALDI-TOF/TOF MS	7*	[18]
	LDL		UC	2DE & MALDI-TOF/TOF MS	11	[19]
	LDL		UC	LC-ESI Q-TOF MS/MS	15	[20]
	LDL(+)/LDL(-)		UC	nanoHPLC-ESI I-Trap MS	29*	[21]
	LDL/VLDL		UC(iodixanol/NaBr)	2DE & LC-ESI Q-TOF MS	15	[22]
	VLDL		UC(NaBr)	2DE & MALDI-TOF/TOF MS	11	[23]
	Lp(a)		UC & GFC	LC-ESI LTQ Orbitrap MS	35	[24]
hApoA- II -Tg mice	HDL		UC	2DE & MALDI-TOF/TOF MS	8*	[25]
<i>Yucatan miniature swine</i>	LDL	Diabetic dyslipidemia	FPLC	2DE & LC-ESI LTQ MS	31	[26]

UC: 超速离心 Ultracentrifugation; GFC: 凝胶过滤色谱 Gel filtration chromatography; IC: 免疫亲和色谱 Immunoaffinity chromatography; FPLC-AC: 快速蛋白质色谱 - 亲和色谱 Fast protein liquid chromatography-affinity cromatography; CAD: 冠状动脉疾病 Coronary artery disease; ACS: 急性冠状动脉综合征 Acute coronary syndromes; RA: 类风湿关节炎 Rheumatoid arthritis; CVD: 心血管疾病 Cardiovascular disease; HD: 血液透析患者 Hemodialysis patients; ω-3 PUFAs:ω-3 多聚不饱和脂肪酸 Omega-3 poly-unsaturated fatty acids; LPS: 大肠杆菌脂多糖 *Escherichia coli* lipopolysaccharide; Identified proteins: 鉴定到蛋白质的数量 The count of identified proteins, *: 原文未明确指出, 经阅读统计得出的结果.

Table S2 The Overview of identified lipoproteome

表 S2 脂蛋白质组鉴定结果总览

Protein Name	Identified times by lipoproteomics			Protein Name	Identified times by lipoproteomics		
	VLDL	LDL	HDL		VLDL	LDL	HDL
14-3-3 protein zeta/delta			1	Ig γ -2 chain C region *			1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2			1	Ig γ -3 chain C region *			1
5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit α -2			1	Ig κ chain C region *			3
Actin, cytoplasmic 1	1			Ig κ chain V-I region AG *			1
Actin, cytoplasmic 2			1	Ig κ chain V-II region RPMI 6410 *		1	
Adiponectin		1		Ig κ chain V-III region VG *			1
Afamin			3	Ig κ chain V-IV region B17 *			1
α -1-acid glycoprotein 1(Orosomucoid-1)		1	3	Ig λ chain V-I region HA *			1
α -1-acid glycoprotein 2(Orosomucoid-2)		1	4	Ig λ chain V-III region LOI *			1
α -1-antichymotrypsin			2	Ig λ -1 chain C regions *		1	1
α -1-antichymotrypsin 1		1		Ig μ chain C region *			3
α -1-antichymotrypsin 3		1		IgA heavy chain constant region *		1	
α -1-antitrypsin	1	2	10	IgD heavy chain constant region *		1	
α -1B-glycoprotein			5	IgG heavy chain *		1	
α -2-antiplasmin			3	IgM heavy chain constant region *		1	
α -2-HS-glycoprotein			5	Immunoglobulin heavy chain variant *			1
α -2-macroglobulin		1	2	Immunoglobulin λ -like polypeptide 1 *			1
α -actinin-4			1	Immunoglobulin λ -like polypeptide 5 *			1
α -amylase 1			1	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit			1
Aminopeptidase N			1	Insulinoma-associated protein 2			1
Angiotensinogen			3	Integrin α -IIb			2
Antithrombin-III			3	Integrin β -3			1
Apolipoprotein A-I	2	5	12	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H1		1	1
Apolipoprotein A-II	1	2	11	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H2			3
Apolipoprotein A-IV	2	5	11	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H4			4
Apolipoprotein B-100	1	3	4	Kallistatin			2
Apolipoprotein C-I	1	2	8	Kininogen-1			4
Apolipoprotein C-II	1	3	10	Latent-transforming growth factor β -binding protein 2			1

Apolipoprotein C-III	2	4	9	Latent-transforming growth factor β-binding protein 4	1		
Apolipoprotein C-IV	2	2	4	Leucine-rich α-2-glycoprotein	2		
Apolipoprotein D	1	4	8	Lipopolysaccharide-binding protein			
Apolipoprotein E	2	5	11	Lipoprotein lipase	1		
Apolipoprotein F	1	2	5	Lumican	1		
Apolipoprotein L1	2	2	10	Lymphocyte antigen	1		
Apolipoprotein M	2	3	10	Lysozyme C	1	1	
Apolipoprotein R		1		Myosin-9		1	
Apolipoprotein(a)	1	2	2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		3	
Band 3 anion transport protein			1	Neurogenic locus notch homolog protein 1		1	
β-2-glycoprotein 1		1	5	Ovarian and testicular Apolipoprotein N	1		
β-2-microglobulin			2	PCTK3 protein		1	
Bifunctional protein NCOAT			1	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase		4	
C-reactive protein			1	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D		1	
C-type lectin domain family 3 member A			1	Phospholipid transfer protein		5	
C4b-binding protein α chain			2	Pigment epithelium-derived factor		3	
C4b-binding protein β chain			1	Plasma kallikrein		2	
Carbonic anhydrase 1			1	Plasma protease C1 inhibitor		4	
Carboxypeptidase N subunit 2			1	Plasminogen		1	
Cathelicidin antimicrobial peptide	1		1	Plastin-2		1	
Ceruloplasmin			2	Platelet basic protein	1	2	
Cholesteryl ester transfer protein			3	Platelet factor 4	1		
Cipl1-interacting zinc finger protein			1	Platelet factor 4 variant		1	
Clusterin	1	4	10	Platelet glycoprotein Ib β chain		1	
Coagulation factor X		1		Platelet glycoprotein IX		1	
Coagulation factor XII			1	Platelet-activating factor acetylhydrolase	1	1	
Complement C1q subcomponent subunit B		1		Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit α		1	
Complement C1r subcomponent			2	Plectin		1	
Complement C1s subcomponent			2	POU domain transcription factor OCT4-pg4		1	
Complement C2			1	Prenylcysteine oxidase 1	2	2	2
Complement C3			6	Profilin-1		1	
Complement C4-A			1	Prostaglandin-H2 D-isomerase		1	
Complement C4-B			5	Protein AMBP		4	
Complement C5				Protein MENT	1	1	
Complement component C8 α chain			1	Protein S100-A8	1		
Complement component C8 β chain			1	Protein S100-A9	1		

Complement component C9	3	Protein Shroom2	1	
Complement factor B	3	Protein zyg-11 homolog B		1
Complement factor D	1	Prothrombin	1	4
Complement factor H	4	Putative trypsin-6		1
Complement factor I	1	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B		1
Complement regulator factor H	1	Retinol-binding protein 4	1	4
Cystatin-C	1	Ryanodine receptor 3		1
Dermeidin	1	Selenoprotein P		1
Desmocollin-1	1	Serotransferrin	1	5
DJ675G8.1 (Novel zinc finger protein)	1	Serum albumin *	2	4 9
Dynein heavy chain 2, axonemal	1	Serum amyloid A-1 protein	1	2 9
E3 ubiquitin-protein ligase PDZRN3	1	Serum amyloid A-2 protein		2
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	1	Serum amyloid A-4 protein	1	4 10
Fermitin family homolog 3	1	Serum amyloid P-component		3
Fibrinogen α chain	3	Serum paraoxonase/arylesterase 1	1	2 11
Fibrinogen β chain	1	Serum paraoxonase/lactonase 3		4
Fibrinogen γ chain	1	SH3 and cysteine-rich domain-containing protein	1	
Fibronectin	1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3		1
Ficolin-1	1	Talin-1		1
Filamin-A	2	TBC1 domain family member 10B		1
Gelsolin	3	Thrombospondin-1		2
Growth arrest-specific protein 6	1	Thyroxine-binding globulin		1
GTP-binding protein 1	1	Tissue factor pathway inhibitor		1
Haptoglobin	3	Titin	1	1
Haptoglobin	1	Transthyretin		6
Haptoglobin-related protein	6	Tropomyosin α -4 chain		1
Hemoglobin subunit α	2	Trypsin-1		1
Hemoglobin subunit β	3	Tubulin α -1A chain		1
Hemopexin	4	Tubulin β -1 chain		1
Heparin cofactor 2	3	Tubulin β -4B chain		1
Hepatocyte growth factor-like protein	1	Vinculin		1
Histidine-rich glycoprotein	2	Vitamin D-binding protein		5
HLA-A protein	1	Vitamin K-dependent protein S		1
Hyaluronan-binding protein 2	2	Vitronectin		5
Ig α -1 chain C region *	1	Zinc finger		1
Ig γ -1 chain C region *	1	Zinc- α -2-glycoprotein		2

Identified times by lipoproteomics:被脂蛋白质组学研究鉴定到的次数; *: 血液中的高丰度蛋白质,是否属于脂蛋白中蛋白质仍需进一步验证.

参 考 文 献

- [1] Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, *et al.* Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*, 2013, **127**(8): 891-904
- [2] Alwaili K, Bailey D, Awan Z, *et al.* The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1821**(3): 405-415
- [3] Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, *et al.* Lipoproteomics II : Mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2005, **5**(5): 1431-1445
- [4] Rubinow K B, Vaisar T, Tang C R, *et al.* Testosterone replacement in hypogonadal men alters the HDL proteome but not HDL cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*, 2012, **53**(7): 1376-1383
- [5] Rubinow K B, Tang C R, Hoofnagle A N, *et al.* Acute sex steroid withdrawal increases cholesterol efflux capacity and HDL-associated clusterin in men. *Steroids*, 2012, **77**(5): 454-460
- [6] Davidson W S, Silva R, Chantepie S, *et al.* Proteomic Analysis of Defined HDL Subpopulations Reveals Particle-Specific Protein Clusters Relevance to Antioxidative Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, **29**(6): 870-876
- [7] Mange A, Goux A, Badiou S, *et al.* HDL proteome in hemodialysis patients: a quantitative nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach. *PLoS One*, 2012, **7**(3) :e34107
- [8] Levels J H M, Geurts P, Karlsson H, *et al.* High-density lipoprotein proteome dynamics in human endotoxemia. *Proteome Sci*, 2011, **9**(1): 1186-1477
- [9] Rezaee F, Casetta B, Levels J H M, *et al.* Proteomic analysis of high-density lipoprotein. *Proteomics*, 2006, **6**(2): 721-730
- [10] Gordon S M, Deng J Y, Lu L J, *et al.* Proteomic Characterization of Human Plasma High Density Lipoprotein Fractionated by Gel Filtration Chromatography. *J Proteome Res*, 2010, **9**(10): 5239-5249
- [11] Burillo E, Mateo-Gallego R, Cenarro A, *et al.* Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome. *Lipids Health Dis*, 2012, **11**(1): 1186-1476
- [12] Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y A, *et al.* Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2012, **64**(6): 1828-1837
- [13] Vaisar T, Pennathur S, Green P S, *et al.* Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*, 2007, **117**(3): 746-756
- [14] Vaisar T, Mayer P, Nilsson E, *et al.* HDL in humans with cardiovascular disease exhibits a proteomic signature. *Clin Chim Acta*, 2010, **411**(13-14): 972-979
- [15] Green P S, Vaisar T, Pennathur S, *et al.* Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome. *Circulation*, 2008, **118**(12): 1259-1267
- [16] Heller M, Stalder D, Schlappritzi E, *et al.* Mass spectrometry-based analytical tools for the molecular protein characterization of human plasma lipoproteins. *Proteomics*, 2005, **5**(10): 2619-2630
- [17] Stahlman M, Davidsson P, Kanmert I, *et al.* Proteomics and lipids of lipoproteins isolated at low salt concentrations in D₂O/sucrose or in KBr. *J Lipid Res*, 2008, **49**(2): 481-490
- [18] Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, *et al.* A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J Lipid Res*, 2005, **46**(9): 1999-2006
- [19] Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, *et al.* Lipoproteomics II : mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2005, **5**(5): 1431-1445
- [20] Banfi C, Brioschi M, Barcella S, *et al.* Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme. *Proteomics*, 2009, **9**(5): 1344-1352
- [21] Bancells C, Canals F, Benitez S, *et al.* Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res*, 2010, **51**(12): 3508-3515
- [22] Sun H Y, Chen S F, Lai M D, *et al.* Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin Chim Acta*, 2010, **411**(5-6): 336-344
- [23] Mancone C, Amicone L, Fimia G M, *et al.* Proteomic analysis of human very low-density lipoprotein by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF. *Proteomics*, 2007, **7**(1): 143-154
- [24] Von Zychlinski A, Kleffmann T, Williams M J A, *et al.* Proteomics of Lipoprotein(a) identifies a protein complement associated with response to wounding. *J Proteomics*, 2011, **74**(12): 2881-2891
- [25] Julve J, Escola-Gil J C, Rotllan N, *et al.* Human Apolipoprotein A-II Determines Plasma Triglycerides by Regulating Lipoprotein Lipase Activity and High-Density Lipoprotein Proteome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, **30**(2): 232-238
- [26] Richardson M R, Lai X Y, Dixon J L, *et al.* Diabetic dyslipidemia and exercise alter the plasma low-density lipoproteome in Yucatan pigs. *Proteomics*, 2009, **9**(9): 2468-2483