

研究论文

人血浆脂蛋白(a)的分离纯化

贺佳佳¹, 苏 燕¹, 丁海麦¹, 王雪妍¹, 王安杰¹, 韩润林^{2*}, 刘 治^{1*}(¹包头医学院生物化学与分子生物学教研室, 包头 014040; ²内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010010)

摘要: 血浆脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]的制备是其功能研究的重要基础。高效的分离纯化方法对于Lp(a)的实验室研究及临床检测至关重要。本文在以往研究的基础上, 将不连续密度梯度超速离心技术与阴离子交换层析技术相结合, 建立了一种实验室可行的、快速、简便、稳定的Lp(a)分离纯化方法。结果表明, 该方法分离纯化得到的Lp(a)纯度较高、组分完整、提取效率稳定, 可以为Lp(a)相关的科学研究提供可靠的实验材料。

关键词: 脂蛋白(a); 密度梯度超速离心; 阴离子交换层析

Isolation and purification of human plasma lipoprotein(a)

HE Jiajia¹, SU Yan¹, DING Haimai¹, WANG Xueyan¹, WANG Anjie¹, HAN Runlin^{2*}, LIU Zhi^{1*}(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baotou Medical College, Baotou 014040, China;²College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China)

Abstract: The preparation of plasma lipoprotein(a) [Lp(a)] is an important foundation for its functional research, and efficient separation and purification methods are crucial for laboratory studies and clinical testing of Lp(a). Based on previous research, this paper combined discontinuous density gradient ultracentrifugation with anion exchange chromatography to establish a fast, simple, and stable method for the separation and purification of Lp(a) that was feasible in the laboratory. The results showed that Lp(a) obtained by this method had high purity, complete components, and stable extraction efficiency, providing reliable experimental materials for Lp(a)-related scientific research.

Key Words: lipoprotein(a); density gradient ultracentrifugation; anion exchange chromatography

脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]是一种独特的血浆脂蛋白, 由挪威遗传学家Berg^[1]在检测人低密度脂蛋白胆固醇抗原变异时意外发现。近年来, Lp(a)在病理生理方面的作用被不断揭示, 目前认为是最易致动脉粥样硬化的血浆脂蛋白之一^[2]。尽管如此, 仍有许多关于Lp(a)的问题亟待解决, 包括Lp(a)的代谢、生理功能、临床实验室测量及其在疾病中的作用等^[3]。想要实现对这些问题的深入

探究, 最首要、也是最基础的环节就是人血浆中Lp(a)的分离纯化。对Lp(a)分离和鉴定的尝试已有近60年, 但始终存在纯度低、产量少、操作复杂的局限, 很难从血浆中制备出高产量的纯Lp(a)^[4]。这一过程的难点主要源于Lp(a)独特的结构特征。众所周知, Lp(a)由载脂蛋白(a)[apolipoprotein(a), Apo(a)]和载脂蛋白B-100(apolipoprotein B-100, ApoB-100)组成^[5,6]。其中, Apo(a)的kringle结构域

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2022QN08018); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZZ22063)

第一作者: E-mail: hjj5045@163.com

*通信作者: 刘治, E-mail: liuzhi090126@163.com; 韩润林, E-mail: han-runlin@163.com

和蛋白酶结构域与纤溶酶原(plasminogen, Plg)高度同源, 使得Lp(a)分离过程中极易混杂Plg, 并且还导致了Lp(a)与多种血浆成分和细胞外基质成分(如纤维蛋白原、纤维蛋白等)的潜在结合, 增加了Lp(a)的纯化难度^[7]。此外, Apo(a)在不同人群中表现出高度的多态性, 使不同血浆来源的Lp(a)分子广泛分布于1.027 g/mL~1.1 g/mL的密度范围, 容易混杂多种其他类型脂蛋白, 特别是与Lp(a)所在密度区间存在高度重叠的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)^[8,9]。另外, 由于LDL的主要载脂蛋白是ApoB-100, 其结构与Lp(a)存在高度相似, LDL混杂是Lp(a)纯化中的又一难点问题。为了进一步开展Lp(a)相关研究, 本研究采用密度梯度超速离心结合阴离子交换层析的方法, 建立了一种相对快速简便且可重复的实验室纯化人血浆Lp(a)的方法, 可为后续Lp(a)相关研究的继续深入提供高质量的实验材料与可靠的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

溴化钾(KBr)购自上海麦克林生化科技有限公司。羊抗人Apo(a)和ApoB多克隆抗体购自Fitzgerald公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记驴抗羊IgG和鼠抗人Plg单克隆抗体购自R&D Systems公司。HRP标记羊抗鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司。考马斯亮蓝染液购自北京聚合美生物科技有限公司。BCA蛋白定量试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司。内毒素含量检测试剂盒购自Pierce公司。HiTrap Q FF层析柱购自GE Healthcare公司。多功能酶标仪和超速离心机(水平转子TH-641)购自赛默飞世尔科技有限公司。核酸纯化分析系统购自上海嘉鹏科技有限公司。凝胶图像分析系统购自Syngene公司。本研究已通过包头医学院伦理委员会批准(编号: 2023年第20号), 所用血浆样品均采集自健康志愿者, 且所有志愿者均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 超速离心分离Lp(a)

无菌采集健康人血50 mL于负压采血管(含EDTA-K₂)中, 4 000 r/min离心10 min, 得血浆25 mL。用固体KBr调节血浆密度至1.21 g/mL(加入

1 mmol/L EDTA作为抗氧化剂), 每管4 mL铺于超速离心管底。用饱和KBr溶液分别配制1.1 g/mL、1.063 g/mL、1.006 g/mL的密度液(含1 mmol/L EDTA), 依次按3 mL、3 mL、1 mL铺至超速离心管, 以40 000 r/min, 10 °C超速离心3 h, 分别收集1.21 g/mL、1.1 g/mL、1.063 g/mL、1.006 g/mL的密度液。

1.2.2 不同密度液层Lp(a)富集情况检测

通过酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及Western blot检测不同密度液层中Lp(a)的富集情况。将收集的不同密度液层以1:10、1:50、1:100稀释后包被酶标板, 室温孵育90 min, 用1% BSA(TBST配制)室温封闭90 min, 一抗羊抗人Apo(a)多克隆抗体1:4 000稀释后室温孵育90 min, 二抗驴抗羊IgG-HRP 1:1 000稀释后室温孵育90 min。经显色反应后检测不同密度液中Lp(a)的富集情况。

将Lp(a)主要富集的密度液层蛋白制样。电泳(详见1.2.4内容)完毕后, 400 mA恒流湿转2.5 h转至NC膜上, 用5%脱脂奶粉(TBST稀释)室温封闭90 min。清洗后分别加一抗羊抗人Apo(a)及ApoB多克隆抗体(1:20 000), 室温孵育90 min, 洗涤。二抗驴抗羊IgG-HRP(1:5 000), 室温孵育90 min, 洗涤。加入适量发光试剂, 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 阴离子交换层析纯化Lp(a)

收集Lp(a)主要富集的密度液层, 并将其装入透析袋中, 用含150 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA(pH7.4)的平衡液于4 °C透析24 h, 期间更换平衡液3次。随后, 通过阴离子交换层析进行纯化。HiTrap Q FF层析柱经重生及平衡, 至 $D_{280\text{ nm}}$ 达基线后, 将透析24 h的蛋白溶液用0.22 μm 的滤器过滤后上样, 流速1 mL/min。待上样完毕后, 用平衡液洗脱未结合的杂蛋白。待 $D_{280\text{ nm}}$ 降至基线后, 依次用200 mmol/L、300 mmol/L的NaCl(Tris-HCl作为缓冲液, 含1 mmol/L EDTA, pH7.4)进行梯度洗脱。各洗脱组分经0.22 μm 的滤器过滤后, 在超净台内分装保存于4 °C。

1.2.4 SDS-PAGE和Western blot鉴定Lp(a)

使用4%的浓缩胶和6%的分离胶进行电泳实验, 将纯化后的样品制样, 电压初设为100 V, 待样品条带进入分离胶后, 设为120 V恒压电泳。电

泳结束后用考马斯亮蓝染色和脱色,使用凝胶成像系统拍照。对纯化后的样品进行Western blot检测,方法基本同1.2.2。

1.2.5 Lp(a)浓度测定

参照BCA试剂盒说明书测定纯化后Lp(a)和LDL的蛋白质含量。以0、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 和1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度,对试剂盒提供的牛血清白蛋白(BSA)标准品进行稀释,并绘制BCA蛋白浓度标准曲线,根据标准曲线方程计算样品中的蛋白质浓度。

1.2.6 Lp(a)内毒素含量测定

按内毒素含量检测试剂盒说明书检测纯化后Lp(a)的内毒素含量。

1.2.7 Lp(a)中Plg含量的测定

采用ELISA测定Lp(a)中Plg的含量。采用不同浓度的Lp(a)及Plg包被酶标板,以LDL作为阴性对照,PBS作为空白对照,室温孵育90 min,用1% BSA(TBST配制)室温封闭90 min,一抗鼠抗人Plg单克隆抗体1:2 000稀释后室温孵育90 min,二抗羊抗鼠IgG-HRP 1:4 000稀释后室温孵育90 min。经显色反应后检测Lp(a)中Plg的含量。

1.2.8 统计学方法

使用GraphPad Prism 9.3软件进行统计学分析。对ELISA实验结果采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)。统计结果表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

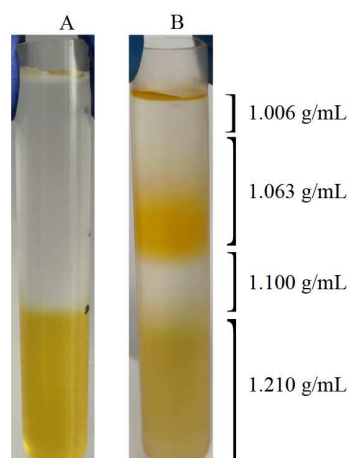
2 结果

2.1 密度梯度超速离心分离人血浆中不同脂蛋白

密度梯度超速离心前后结果见图1。超速离心后,血浆蛋白依密度分布在不同的密度液层中,中间透明层和浅黄色层均为1.063 g/mL的密度液层。

2.2 超速离心后Lp(a)富集情况检测

如图2A所示,各密度液层与羊抗人Apo(a)抗体均有不同程度的结合。其中,不同稀释倍数的1.063 g/mL密度液层与羊抗人Apo(a)抗体均结合较好,显著高于其他组别,结果具有统计学差异($P<0.001$)。进一步使用Western blot对该密度液层所含蛋白质进行检测,结果如图2B所示。稀释后的1.063 g/mL密度液及其原样在大于250 kDa处均可见特异性的Apo(a); LDL及1.063 g/mL原样均可见特异性的



A: 超速离心前; B: 超速离心后

图1 人血浆密度梯度超速离心前后对比图

ApoB-100,说明通过超速离心富集于1.063 g/mL密度液层的Lp(a)组分完整。

2.3 HiTrap Q FF阴离子交换层析纯化Lp(a)

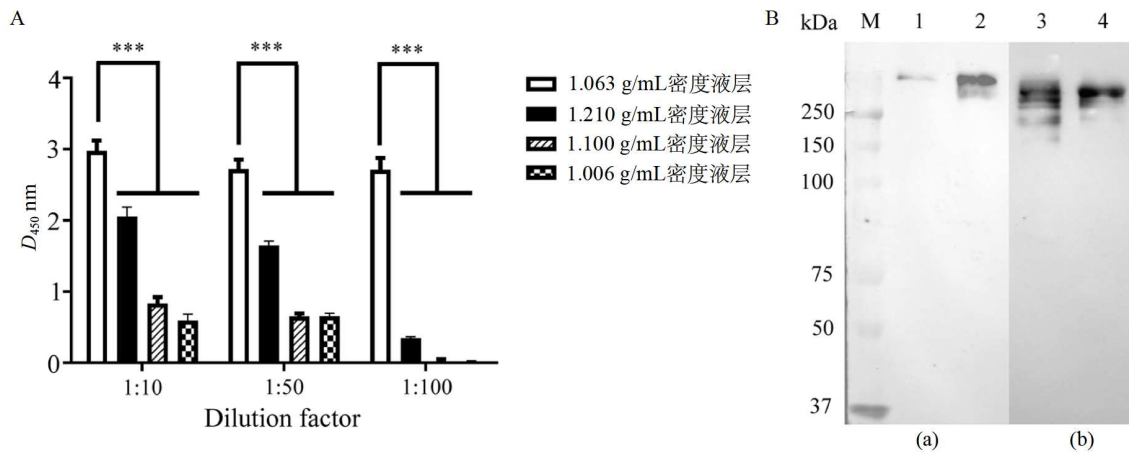
根据以上结果可知,Lp(a)主要富集于1.063 g/mL密度液层,由于该区域亦为LDL所在的主要密度层,需采用阴离子交换层析进一步纯化,通过改变洗脱液的盐浓度,分离样品中的Lp(a)与LDL。将收集到的该层密度液于4 $^{\circ}\text{C}$ 透析24 h,随后进行阴离子交换层析纯化。图3为HiTrap Q FF阴离子交换层析图谱。第I峰为透析后蛋白质样品上样产生;第II峰为200 mmol/L NaCl的洗脱液洗脱产生;第III峰为300 mmol/L NaCl的洗脱液洗脱产生;并进一步对第II峰与第III峰进行成分、纯度及蛋白质含量鉴定。

2.4 纯化产物纯度分析

根据SDS-PAGE结果可知(图4),离心后1.006 g/mL、1.100 g/mL、1.210 g/mL层在大于250 kDa的区域几乎没有条带,表明血浆内Lp(a)回收完全。另一方面,200 mmol/L和300 mmol/L NaCl所洗脱的样品在大于250 kDa区域得到目的条带且在其他区域几乎无杂带,表明纯化后的Lp(a)及LDL样品的纯度较高。

2.5 纯化产物完整性分析

对HiTrap Q FF阴离子交换层析纯化后的洗脱样品进行Western blot分析,分别采用羊抗人Apo(a)和ApoB多克隆抗体检测。结果如图5所示,流穿液样品中未见特异性的Apo(a),表明Lp(a)与HiTrap Q FF强阴离子交换层析柱结合能力较好。另外,Lp



A: ELISA检测超速离心后各密度液层Lp(a)富集情况; B: (a): 羊抗人Apo(a)抗体特异性检测结果; (b): 羊抗人ApoB抗体特异性检测结果; M: 标准分子质量蛋白Marker; 1: 10倍稀释1.063 g/mL; 2、4: 1.063 g/mL原样; 3: 购自Alfa Aesar公司的人血浆LDL。*** $P < 0.001$, 与1.063 g/mL密度液层比较

图2 超速离心后Lp(a)富集情况检测

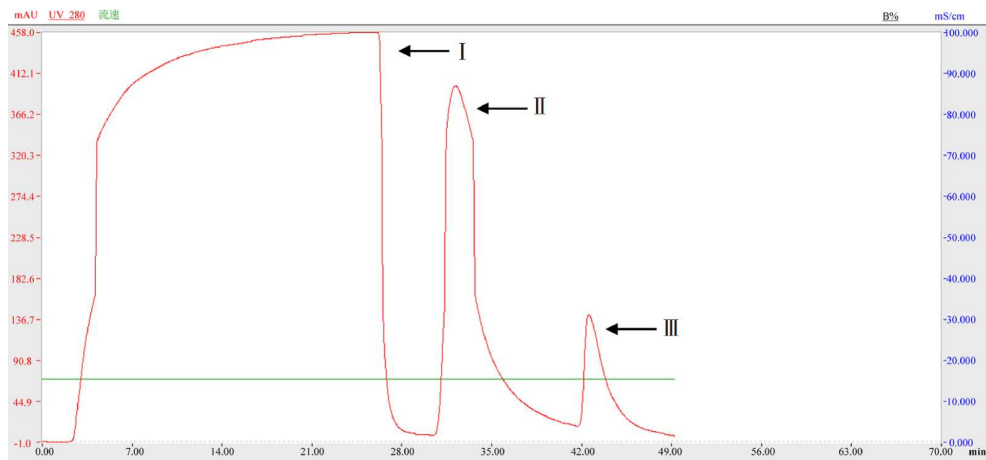
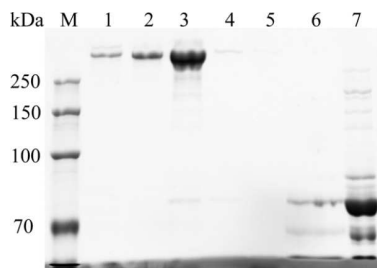


图3 Hitrap Q FF阴离子交换层析图谱



M: 标准分子质量蛋白Marker; 1: 300 mmol/L NaCl洗脱液洗脱; 2: 200 mmol/L NaCl洗脱液洗脱; 3: 流穿液; 4: 淋洗液; 5: 超速离心后1.006 g/mL处密度液层蛋白; 6: 超速离心后1.100 g/mL处密度液层蛋白; 7: 超速离心后1.210 g/mL处密度液层蛋白

图4 SDS-PAGE检测超速离心及层析后的蛋白质样品

(a)样品能够特异性检测到Apo(a)和ApoB-100蛋白组分, 表明Lp(a)组分完整。

2.6 蛋白质含量的测定

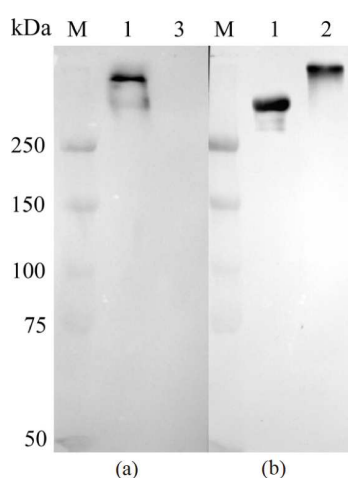
使用BCA蛋白定量法对纯化产物Lp(a)的浓度进行检测, 蛋白质浓度标准曲线如图6所示, 测得Lp(a)溶液的蛋白浓度如表1所示。实验经过多次重复, 且各次实验所得Lp(a)总量基本一致。

2.7 蛋白质溶液内毒素含量的测定

使用内毒素检测试剂盒对Lp(a)溶液中的内毒素含量进行测定, 标准曲线检测范围为0.1~1 EU/mL (图7), 所测溶液内毒素含量低于0.1 EU/mL。

2.8 纯化产物中Plg含量分析

采用ELISA检测Lp(a)溶液中的Plg含量, 并以LDL作为阴性对照。结果如图8所示, 不同浓度的Plg均能够与鼠抗人Plg结合, 并且具有浓度依赖性; 而随着Lp(a)、LDL包被浓度的增加, 两种蛋白质与鼠抗



(a): 羊抗人Apo(a)抗体特异性检测结果; (b): 羊抗人ApoB抗体特异性检测结果; M: 标准分子质量蛋白Marker; 1: 300 mmol/L NaCl洗脱液洗脱产生; 2: 200 mmol/L NaCl洗脱液洗脱产生; 3: 流穿液

图5 纯化产物的Western blot分析

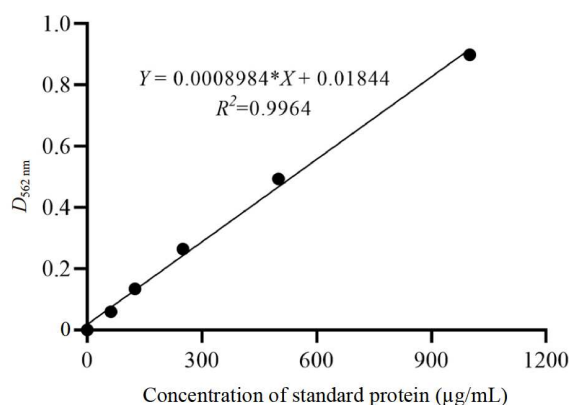


图6 BCA蛋白浓度标准曲线

表1 纯化Lp(a)的总量

纯化次数(次)	血浆体积(mL)	纯化Lp(a)		
		浓度(μg/mL)	体积(mL)	总量(mg)
1	25	265.0	4.5	1.193
2	25	446.3	2.5	1.116
3	25	552.2	2.0	1.104
4	25	448.7	3.0	1.346
5	25	527.5	2.0	1.055
6	50	471.8	4.5	2.123

人Plg均无结合, 结果具有统计学差异($P < 0.001$), 说明使用本方法分离纯化的Lp(a)中无Plg残留。

3 讨论

Lp(a)在大多数种族中均呈低水平偏态分布, 从血浆中获得足够的样品具有一定难度, 因此以往研究中通常采用多种来源的血浆进行Lp(a)的分

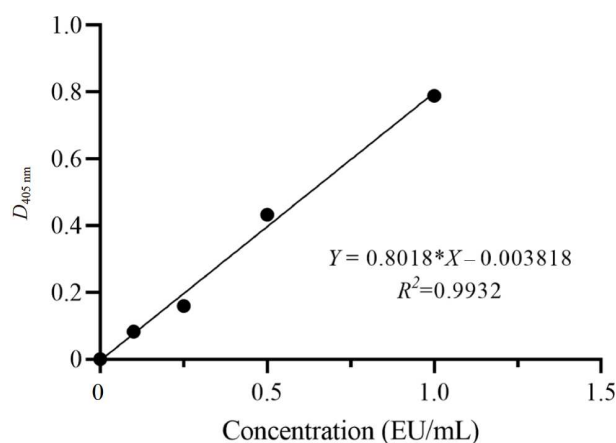
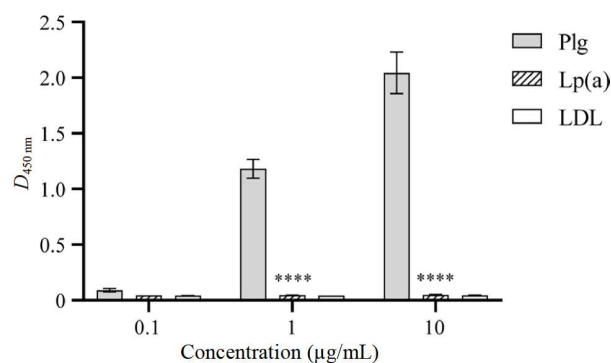


图7 内毒素含量标准曲线



Lp(a)溶液中Plg含量的检测情况: **** $P < 0.001$, 与Plg组比较

图8 ELISA检测Lp(a)中的Plg含量

离纯化^[10]。密度梯度超速离心是Lp(a)分离中使用最为广泛的一种技术, 通常用于不同来源血浆样品中Lp(a)的初步富集。由于混合血浆样本中大小不一的Lp(a)通常呈现出不同的水合密度, 而部分单一个体也存在质量差异显著的多种Lp(a), 以往研究通常会采用长时间、多次的密度梯度超速离心来富集不同密度区域的Lp(a)^[4,11]。例如, Siddiqui等^[12]采用总时长为13 h的超速离心方案; Schnitzler等^[13]通过19 h的密度梯度超速离心对Lp(a)进行分离; Mueller等^[14]在分离Lp(a)时, 使用了2次24 h的超速离心; 而Reblin等^[15]则进行了3次24 h甚至更长时间的超速离心。虽然增加离心次数可以提高分离效果, 但也增加了操作的复杂性和样本的损耗与氧化^[16]。另外, 由于Lp(a)与LDL(1.019 g/mL~1.063 g/mL)的密度区间部分重叠, 单纯依靠密度梯度超速离心法得到的密度层不仅富集了Lp(a), 还混杂有大量的LDL。因此, 在获得富集Lp(a)的密度层后, 通常需要结合其他方法进

一步纯化。赖氨酸-琼脂糖亲和层析是早期纯化Lp(a)的常用方法之一,许多研究者利用Apo(a)中KIV₁₀结构域的强赖氨酸结合特性,通过密度梯度超速离心和赖氨酸-琼脂糖亲和层析以实现Lp(a)的纯化^[17-19]。但是,由于Apo(a)与Plg高度同源,二者的kringle结构域中均含有赖氨酸结合位点,导致此法在使用赖氨酸类似物进行洗脱时,洗脱液中常混有大量Plg,从而影响Lp(a)的纯度^[20,21]。另一种常用亲和层析方法——肝素琼脂糖法纯化Lp(a)也存在此局限^[22]。林春榕等^[23]采用2次超速离心结合Sephacrose 6B凝胶过滤层析法制备Lp(a),由于Lp(a)颗粒大小与LDL相似,层析过程需采用分段式收集,且对于收集技巧要求极高,需要特别仔细才能将二者分离。此外,有研究者基于电洗脱技术从天然聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离纯化Lp(a),但该方法操作步骤繁琐且样本损失风险大^[24]。Diffenderfer等^[25]利用抗体结合的磁珠进行免疫沉淀直接从全血浆中纯化Lp(a),但耗费成本较高。高玉敏等^[26]运用LDL吸附亲和层析代替超速离心,后续结合凝胶过滤层析、离子交换层析进行Lp(a)的批量分离纯化,可获得高纯度的Lp(a),但步骤繁琐,损耗较大。由于目前尚缺乏标准化的Lp(a)参考物,且Lp(a)检测方法、来源人群各不相同,导致无法对纯化前的Lp(a)含量进行准确定量,因此无法在蛋白质回收率、纯度等方面对上述纯化方法进行科学比较。

本研究成功建立了一种简便快速分离血浆中Lp(a)的方法,通过单次密度梯度超速离心结合阴离子交换层析,即可得到纯度较高的Lp(a)。研究首先采用KBr密度梯度超速离心法,将采集的受试者空腹血浆通过单次超速离心分为1.006 g/mL、1.100 g/mL、1.063 g/mL及1.210 g/mL四个密度层。经ELISA及Western blot检测发现,1.063 g/mL密度层为Lp(a)主要的富集区域,因此选取该密度层进一步纯化。阴离子交换色谱法分离不同脂蛋白的研究显示,LDL在低盐浓度下优先洗脱,而Lp(a)需在高盐浓度下才能洗脱,表明Lp(a)比LDL与阴离子交换柱的结合能力更强^[27]。另有研究进一步证实,阴离子交换层析能够有效分离LDL与Lp(a),并且所得Lp(a)样品中仅有约2%的LDL残留^[28]。鉴于上述研究结果,后续纯化采用了HiTrap Q FF阴

离子交换层析,使用不同浓度的NaCl对LDL及Lp(a)进行洗脱。纯化后,经SDS-PAGE及Western blot鉴定发现,Lp(a)样品仅在大于250 kDa的区域有两条明显蛋白质条带,且分别能够被羊抗人Apo(a)多克隆抗体、羊抗人ApoB-100多克隆抗体所识别,说明所得Lp(a)成分单一且组分完整。此外,使用ELISA对Lp(a)纯化中常见的杂质成分Plg进行检测,发现纯化后的Lp(a)中无Plg成分残留。经检测,使用本法纯化的Lp(a)内毒素含量可基本稳定在0.1 EU/mL以内,所得样品在仅添加有1 mmol/L EDTA的PBS溶液中可于4 ℃稳定保存4周。

本研究在早期Lp(a)分离纯化方法的基础上进行了优化,提供了一种更为高效的Lp(a)纯化策略,在48 h内即可完成Lp(a)分离纯化的关键步骤,不仅极大地缩短了处理时间,还具备步骤简便、所得Lp(a)纯度高、损耗相对较小且重复性好的优点。同时,此方法所得Lp(a)溶液内毒素含量低,且在短期使用过程中,除EDTA外无需添加任何常用防腐剂(如丁基羟基甲苯、苯甲基磺酰氟、硫柳汞等),能够满足实验室研究的需要。本研究也为与Lp(a)有关的疾病研究和药物开发提供了可靠的实验基础。但是,本纯化方法目前仍存在一些局限。(1)纯形式的Lp(a)属于低温可沉淀蛋白,易自发沉淀,而提高温度则可能造成一定的蛋白质降解,因此,常见于低温透析等步骤中的Lp(a)聚集是本法产生损耗的主要因素^[29]; (2)鉴于实验步骤包含超速离心环节,故本法对实验环境及设备要求较高。综上所述,本研究成功建立了一种高效、稳定的血浆Lp(a)分离纯化方法,可为Lp(a)相关研究提供可靠的实验材料。

作者贡献声明:

贺佳佳: 实验操作, 研究过程的实施, 设计论文框架, 起草论文, 数据收集, 分析数据, 绘制图表;

苏 燕、丁海麦: 论文修改;

王雪妍、王安杰: 实验操作, 研究过程的实施;

刘 治、韩润林: 指导整体实验, 数据分析; 拟定写作思路, 指导撰写文章并定稿。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Berg K. A new serum type system in man—the LP

- system. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 1963, 59(3): 369-382
- [2] Kronenberg F, Mora S, Stroes ESG, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *Eur Heart J*, 2022, 43(39): 3925-3946
- [3] Kostner KM, Kostner GM. The 10 essential questions regarding lipoprotein(a). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2024, 27(2): 136-143
- [4] Kostner K, Kostner GM, Toth PP. Lipoprotein(a)[M]. Cham: Springer International Publishing, 2023. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-24575-6>
- [5] Ma Z, Zhong J, Tu W, et al. The functions of apolipoproteins and lipoproteins in health and disease. *Mol Biomed*, 2024, 5(1): 53
- [6] Youssef A, Clark JR, Marcovina SM, et al. Apo(a) and ApoB interact noncovalently within hepatocytes: implications for regulation of Lp(a) levels by modulation of ApoB secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(3): 289-304
- [7] McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 1987, 330(6144): 132-137
- [8] Duarte Lau F, Giugliano RP. Lipoprotein(a) and its significance in cardiovascular disease. *JAMA Cardiol*, 2022, 7(7): 760-769
- [9] Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 111-188
- [10] Kronenberg F. Human genetics and the causal role of lipoprotein(a) for various diseases. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2016, 30(1): 87-100
- [11] Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. Heterogeneity of human plasma lipoprotein(a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J Biol Chem*, 1984, 259(18): 11470-11478
- [12] Siddiqui H, Deo N, Rutledge MT, et al. Plasminogen receptors promote lipoprotein(a) uptake by enhancing surface binding and facilitating macropinocytosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(10): 1851-1866
- [13] Schnitzler JG, Hoogeveen RM, Ali L, et al. Atherogenic lipoprotein(a) increases vascular glycolysis, thereby facilitating inflammation and leukocyte extravasation. *Circ Res*, 2020, 126(10): 1346-1359
- [14] Mueller PA, Yerkes E, Bergstrom P, et al. A method for lipoprotein(a) Isolation from a small volume of plasma with applications for clinical research. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 9138
- [15] Reblin T, Niemeier A, Meyer N, et al. Cellular uptake of lipoprotein[a] by mouse embryonic fibroblasts via the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *J Lipid Res*, 1997, 38(10): 2103-2110
- [16] Napoli C, Mancini FP, Corso G, et al. A simple and rapid purification procedure minimizes spontaneous oxidative modifications of low density lipoprotein and lipoprotein (a). *J Biochem*, 1997, 121(6): 1096-1101
- [17] Fless GM, Snyder ML. Quantitation of lipoprotein(a) after lysine-sepharose chromatography and density gradient centrifugation. *Methods Enzymol*, 1996, 263: 238-251
- [18] Rader DJ, Mann WA, Cain W, et al. The low density lipoprotein receptor is not required for normal catabolism of Lp(a) in humans. *J Clin Invest*, 1995, 95(3): 1403-1408
- [19] Edelberg JM, Lee YJ, Young TN, et al. Lipoprotein (a): purification and kinetic analysis. *Methods Enzymol*, 1993, 223: 272-288
- [20] Kostner KM, Kostner GM. Lp(a) and the risk for cardiovascular disease: focus on the Lp(a) paradox in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3584
- [21] Kalaivani V, Jaleel A. Apolipoprotein(a), an enigmatic anti-angiogenic glycoprotein in human plasma: a curse or cure? *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104858
- [22] Naruszewicz M, Giroux LM, Davignon J. Oxidative modification of Lp(a) causes changes in the structure and biological properties of apo(a). *Chem Phys Lipids*, 1994, 67-68: 167-174
- [23] 林春榕, 吴学东, 狄勇. 人血浆脂蛋白(a)的分离纯化. 大理医学院学报, 2001, (03): 3-5
- [24] Chellan B, Appukuttan PS, Jayakumari N. Electroelution of lipoprotein(a) [Lp(a)] from native polyacrylamide gels: a new, simple method to purify Lp(a). *J Biochem Biophys Methods*, 2006, 68(1): 43-53
- [25] Diffenderfer MR, Lamon-Fava S, Marcovina SM, et al. Distinct metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein(a). *Metabolism*, 2016, 65(4): 381-390
- [26] 高玉敏, 赵瑞东, 呼和巴特尔. 一种从血浆中分离纯化脂蛋白(a)的方法. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2009, 30(2): 1-4
- [27] Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, et al. Analysis of cholesterol levels in lipoprotein(a) with anion-exchange chromatography. *J Lipid Res*, 2010, 51(5): 1237-1243
- [28] Armstrong VW, Walli AK, Seidel D. Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a). *J Lipid Res*, 1985, 26(11): 1314-1323
- [29] Kostner GM, Ibovnik A, Holzer H, et al. Preparation of a stable fresh frozen primary lipoprotein[a] (Lp[a]) standard. *J Lipid Res*, 1999, 40(12): 2255-2263