

急性高山病易感性行前预测的尿蛋白质标志物

徐丽雯^{1†} 马 锦^{1†} 曹妙盈¹ 金静洁¹ 王香洁^{2*} 郑廷锴^{3*} 张 弓^{1,4*}

1. 暨南大学生命与健康工程研究院, 功能蛋白质广东省普通高校重点实验室, 广州 510632
2. 暨南大学苏炳添速度研究与训练中心, 广东省速度能力研究重点实验室, 体育学院, 广州 510632
3. 深圳市像素哲思有限公司, 深圳 518000
4. 深圳承启生物科技有限公司, 深圳 518000

摘要 急性高山病(AMS, 又称高原反应)严重威胁急进高原人群的生命安全与任务执行, 然而目前缺乏有效的行前预测手段. 为实现出发前的无创风险预警, 本研究探索了基于平原期晨尿蛋白质组的 AMS 易感者预测策略. 我们招募了 15 名健康志愿者, 在体能训练后前往高海拔地区登山, 依据 Lake Louise 评分将其分为 AMS 组与非 AMS 组. 通过数据非依赖采集(DIA)蛋白质组学分析, 发现两组人群尿蛋白质组构成存在显著差异, 且差异蛋白所涉功能通路与 AMS 病理生理机制高度吻合. 基于此构建的预测模型(可采用双蛋白自参照或单蛋白方案)展现出优异的判别性能, 曲线下面积(AUC)达 0.97. 研究同时明确, 体能训练虽提升了有氧能力, 但并未改变 AMS 易感性. 前瞻性验证结果显示, 模型预测与受试者的实际高原适应状况高度一致. 本研究证实了基于尿液蛋白质组的行前 AMS 预测策略具备高度可行性与准确性, 且独立于体能因素, 为开发低成本、无创的现场筛查工具奠定了坚实基础.

关键词 急性高山病, 尿液蛋白质组学, 早期预测, DIA

收稿日期: 2025-11-28; 接受日期: 2026-6-6

我国每年有上亿人次因旅游、训练、工程与应急任务短期进入高原. 由于多为“急进高原”的暴露方式, 急性高山病(acute mountain sickness, AMS, 又称高原反应)发病风险显著. AMS 以头痛、恶心、食欲减退、疲倦、眩晕和睡眠障碍为主要表现, 若救治不及时可进展为高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)或高原脑水肿(high altitude cerebral edema, HACE), 而危及生命^[1]. 其触发因素为低压低氧, 而

上升高度、上升速度与个体易感性共同决定发病率与严重程度^[2]. 由于高原地区医疗条件往往有限, 出现明显 AMS 症状后往往需要十几小时甚至几天才能送医, 不但经常出现救治不及时而导致的死亡, 还常常拖累整个团队无法进行预定的任务. 因此在出发前识别高风险人群, 进而针对性地制定计划, 具有重要的现实意义.

从病理生理机制看, AMS 的发生并非单一路径所致, 而是低压低氧诱发的多环节失衡在神经血管单元层面的综合体现. 急性缺氧可引起脑血管扩张、脑血流量增加与静脉回流短暂受限, 进而导致离子

收稿日期: 2000-00-00; 接受日期: 2000-00-00

中央高校基本科研业务费专项资金(批准号:11625115)、广东省科技计划项目(广东省速度能力研究重点实验室, 项目编号: 2023B1212010009)、国家重点研发计划项目(项目编号:2023YFA0915800)资助

† 共同第一作者

* 联系人, E-mail: zhanggong-uni@qq.com; 1129664307@qq.com; 2245700435@qq.com

<https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0389>

与水通量失衡^[3,4]；同时，免疫—炎症轴被快速激活，HIF 驱动的代谢重编程与氧化应激升高，促使内皮细胞活化、选择素与黏附分子上调，补体与凝血级联相互放大 TNF/IL-1/IL-6 等促炎信号增强，引发血脑屏障早期且多为可逆的轻度通透性改变^[5-7]。

与机制认识的进展相比，面向实地应用的行前识别的预警手段仍明显不足。当前几乎所有的研究都需要被试者到达高原一段时间后检测，例如 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score (LLAS) 等症状量表、脉搏血氧、影像学与侵入性检测等。即便不考虑这些方法普遍存在的主观性强、精准度不足、实施困难等问题^[8,9]，因已处高原，AMS 患者已然需要面临送医困难、团队任务被打断等问题。目前尚无筛查检测方案能够在出发前(平原期)可靠预测个体 AMS 风险^[10]。既往虽有研究尝试在上高原前以外周血 miRNA 如 miR-369-3p、miR-449b-3p、miR-136-3p 等构建预测特征^[11]，但缺乏独立前瞻性验证与场景转化，核酸检测的繁琐性和需要专业 PCR 实验室的高成本，使其尚未形成可落地的方案。基于民族和基因的筛查也并不有效：研究显示久居平原地区的汉族人对高原的适应性普遍强于久居高原的藏族人^[12]。

尿蛋白质检测^[13]在 AMS 的行前预测上具备天然的优势，相较于其它检测方法如血液分子检测，尿液采集避免了静脉穿刺，更利于大规模初筛；与影像学评估相比，其对设备与场地要求更低；与到达高原后才出现变化的症状评分或部分生理监测指标相比较，尿蛋白质组更适用于暴露前风险评估。此外尿液可自行居家无创采集，蛋白质检测可采用胶体金试纸、ELISA 等方式，非常方便现场检测。尿蛋白质较少受血中高丰度蛋白干扰；既往跨疾病研究也显示，尿蛋白能够敏感呈现内皮功能受损、免疫/补体激活、氧化应激及能量/脂质代谢重编程等通路的协同波动，与 AMS 的病理生理主轴高度吻合^[14-16]。

基于上述认识，本文将研究窗口前移至上高原前的平原阶段：在未暴露于高原缺氧之前采集晨尿，采用数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)尿蛋白质组系统比较 AMS 易感者与不易感者的分子差异，并提出无需外源参比物质的自参照策略去除个体差异与批次效应。我们旨在筛选可预测 AMS 易感者的尿蛋白标志物，构建适用于行前筛查的无创方案，在上高原前就可以预测其 AMS 易感性，

为高原任务人群的风险分层与资源配置提供新的决策工具。

1 材料与方法

1.1 一般材料

纳入长期居住平原地区的健康受试者 15 名，既往无高原暴露史；入组时无慢性呼吸系统或心血管疾病及活动性感染。登高前统一进行为期 1 个月的动感单车有氧体能训练。训练期间未对受试者实施统一饮食控制，也未要求改变其原有日常生活方式；受试者在维持正常饮食与作息的基础上完成规定的有氧训练，一个月的训练期内按 5-7 天间隔采集晨尿 2-3 次/人且采集避开女性经期；样本于采集当日，立刻 4 °C、3000 ×g 离心 30 min 去除尿沉渣，-80 °C 保存，避免反复冻融。所有受试者和样本均进行匿名化，仅以标号识别。

1.2 体能评估

为评估训练对有氧效率的影响，我们采用固定功率稳态心率作为客观指标。测试分别安排在训练开始一周内(第 0 周)与训练结束后 72 h 内(第 4 周末)各进行一次。成人 100 W、60 W；热身 5 min 后维持 6-8 min 稳态，踏频 80-95 rpm；记录稳态末 3-5 min 的平均心率作为结果。心率由腕式运动手环连续采集。若稳态末出现明显心率漂移或数据缺失，则剔除并在同等条件下重测。所有测试使用同一型号动感单车并保持同一佩戴位置，以确保前后可比性。

1.3 高海拔 AMS 状态评估

受试者乘车于 4 小时内从海拔 500 m 快速上升至 3200 m，休息一夜后，次日负重徒步爬升 6~8 h，至约海拔 4300 m，到达后 12-24 h 依据 The 2018 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score 自评^[17]，以“头痛≥1 分且总分≥3 分”为 AMS 易感者判定标准，据此将受试者分为 AMS 组与 NAMS 组。

1.4 尿液样本处理与蛋白提取

取 4 mL 尿样完全解冻后，4 °C、12 000 ×g 离心 30 min 去除细胞碎片；取上清加入 3 倍体积乙醇混匀，4 °C 过夜沉淀；再 12 000 ×g 离心 30 min 弃上清。沉淀以裂解液(8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、25 mmol/L DTT、50 mmol/L Tris)重悬并 Bradford 定量。将样品加载至 10 kDa 超滤膜，依次以 UA 缓冲(8 mol/L 尿素、0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5)和 25 mmol/L NH₄HCO₃洗涤；加入 20 mmol/L DTT, 37 °C 变性 1 h；

50 mmol/L IAA 避光烷基化 30 min; 再以 UA 与 NH_4HCO_3 各洗涤两次. 加入质谱级胰蛋白酶(12.5 ng/ μL), 37 °C 消化 18 h; C18 小柱脱盐, 真空干燥, -80 °C 保存.

1.5 LC-MS/MS(DIA)

肽段重溶于 0.1% 甲酸水(A 相), 经 Vanquish Neo UHPLC 联用 Orbitrap Astral 质谱进行采集; 上样体积 0.4 μL ; 分析柱 AUR3-5075C18(5 cm $\times$ 75 μm i.d., 1.7 μm IonOpticks). 采用 8 min 梯度: B 相 4% 起始, 6.6 min 升至 45%, 0.2 min 至 99%, 维持 1.2 min; 流速 2400 nL/min, 柱温 55 °C; ESI 正离子 2 kV. DIA 采集: MS1 m/z 380–980, 分辨率 240 000, Normalized AGC 500%, 最大注入时间 5 ms; MS2 采用静态隔离窗口, Normalized AGC 400%, 最大注入时间 3 ms, HCD 碰撞能 36%.

1.6 谱图检索与定量

原始 DIA 数据采用 Spectronaut 18(Biognosys, BGS Factory Settings, 默认参数)解析. 序列数据库为 UniProt Homo sapiens(2022 版, 20610 entries); 酶切 Trypsin(Specific); 固定修饰 Carbamidomethyl[C]; 可变修饰 Oxidation[M]、Acetylation[Protein N-term]. 采用动态 iRT 进行保留时间预测与校准, 提取窗口由软件依据质量与保留时间校准动态确定. FDR(Q-value) 阈值: precursor 1%、protein 1%; Decoy 为 mutated. 采用 Local normalization; 以通过 1% q 值的肽段/片段离子峰面积汇总至 protein(major) group 进行无标记定量.

1.7 数据预处理与差异筛选

在去除污染库蛋白基础上进行缺失处理. 样本按分组分别统计, 组内缺失 >50% 者按 0 处理(视为极低丰度/缺失), $\leq 50\%$ 者以整个数据矩阵中的最小值填补; 当两组均 >50% 缺失时剔除该蛋白. 组间比较以 $\text{FC} > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为差异初筛标准.

1.8 生物信息学分析

以差异蛋白对应的基因作为输入集, 并以本研究定量到的全部蛋白对应基因为背景集, 采用 clusterProfiler R 包进行 GO 与 KEGG 通路富集分析^[18], 结果以 P 值可视化呈现.

1.9 蛋白对构建

考虑尿蛋白缺乏稳定外源内参, 且样本稀释度波动明显, 采用自参照的对比比值策略^[19]: 从差异蛋白按 q 值(BH-FDR)排序选取 Top50 为候选, 在样本内

两两配对, 并计算每一对蛋白的对数差值 Δ :

$$\Delta = \log_2(A) - \log_2(B) \quad (1)$$

对每一对蛋白的 Δ 在 AMS 组与 NAMS 组间进行组间比较, 先行 Shapiro-Wilk 正态性检验, 不满足正态时采用 Mann-Whitney U 检验并获得 P 值.

1.10 Western blot 与定量

采用 BCA 试剂盒定量, 确保各泳道统一上样量为 10 μg . 蛋白经 SDS-PAGE 分离并转膜至 PVDF 膜, 使用 5% 脱脂奶(TBST 配制)室温封闭 2 h. 膜于 4 °C 加入一抗孵育过夜, 次日于室温加入相应二抗孵育 1 h. 条带信号采用增强化学发光显影并记录. 使用 ImageJ 测量条带灰度值并扣除背景.

1.11 独立前瞻性验证实验

为评估所建模型在真实行前筛查场景中的可用性, 本研究在发现队列之外, 另行纳入 5 例前瞻性未知状态受试者作为独立验证样本. 该部分受试者在样本检测与模型判别时均未参与差异蛋白筛选、候选蛋白排序、蛋白对构建及判定阈值设定, 其 AMS 结局在登高暴露完成前对分析人员保持未知. 其中 1 例用于验证蛋白对自参照判别组合的前瞻性, 4 例用于 MSLN 单指标方案的前瞻性验证.

1.12 统计学方法

连续变量正态性以 Shapiro-Wilk 检验评估; 两组比较采用 Mann-Whitney U 检验, 均为双侧. 显著性阈值为 $q < 0.05$ (校正后) 或 $P < 0.05$. 计算与可视化在 R(3.5) 以及 Graphpad Prism 10.1.2 完成.

2 结果与分析

2.1 受试者、训练执行与研究时间线

本研究共纳入长期居住平原的健康受试者 15 名, 其中包含儿童 2 名和成人 13 名, 基线特征见表 1, 两组在年龄、身高、体重和 BMI 上均无统计学差异. 为提升有氧耐力, 登高前统一实施一个月的动感单车中等强度训练: 以最大心率 60%–70% 控强度, 每次 30–45 min、每周 4–5 次; 为避免过度疲劳, 不安排高强度冲刺, 仅在个别日加入少量 1:1 短间歇. 训练期间的心率由腕式运动手环连续记录. 训练效果采用固定功率稳态心率评估(图 1B)成人在 100 W 下训练后心率显著下降, $P = 1.2 \times 10^{-7}$; 两名儿童在 60 W 下分别下降 8 与 11 bpm. 这表明训练有效提升了有氧运动体能水平. 训练期按 5–7 天间隔采集晨尿, 每人 2–3 次, 共获得出发前样本 44 份.

训练结束后，受试者由广东省前往四川省四姑娘山地区进行登高暴露；抵达 4300 m 大本营 12–24 h 内完成 2018 版 LLAS 评估。以“头痛为必选症状且

总分≥3”判定 AMS，据此分 AMS 组 8 例与 NAMS 组（非 AMS 组）7 例用于后续分析。总体研究流程见图 1A。

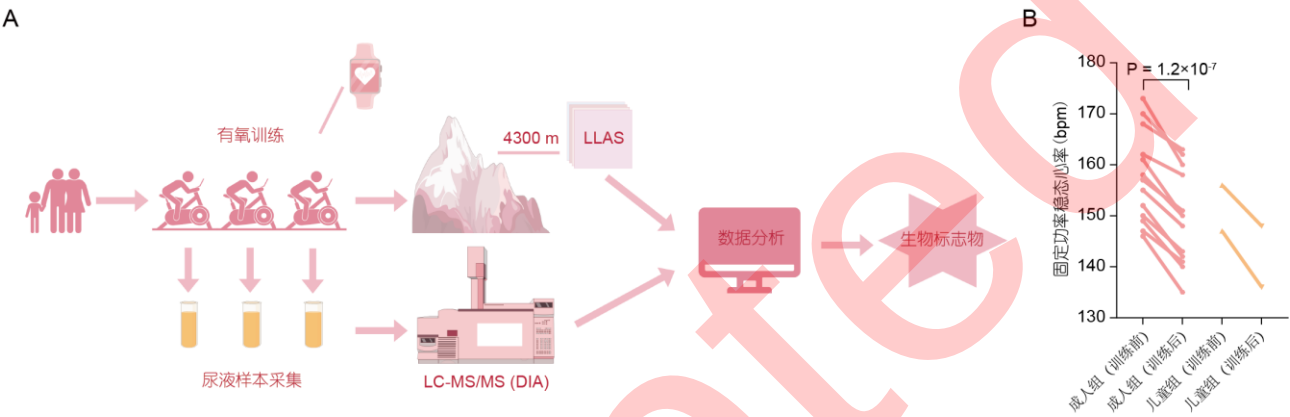


图 1 研究流程及有氧训练效果。A: 总体研究流程示意图；B: 有氧训练效果图，展示固定外部功率下训练前后稳态心率的变化，纵坐标为稳态心率(bpm)，横坐标为训练前后；成人在 100 W 负荷下测量，儿童在 60 W 负荷下测量。
Figure 1 Study workflow and aerobic training effects. A: Overview of the study design; B: Changes in steady-state heart rate before and after aerobic training at fixed workloads. Adults were measured at 100 W power output and children at 60 W. Heart rate (bpm) is shown on the y-axis, and pre- and post-training measurements on the x-axis.

表 1 15 名受试者的基线特征
Table 1 Baseline characteristics of 15 subjects

	AMS(n=8)	NAMS(n=7)	P-value
性别			
男性	5	4	
女性	3	3	
儿童(<18 岁)	1	1	
成人(≥18 岁)	7	6	
年龄(年)			
均值	26.5	29.43	0.595
中位数[最小值、最大值]	26.00[8, 37]	32.00[9,42]	
身高(cm)			
均值	162.38	170.29	0.274
中位数[最小值、最大值]	163.50[138,178]	175.00[156,193]	
体重(kg)			
均值	57.63	63.57	0.515
中位数[最小值、最大值]	53.50[42.5,87.5]	70.00[36,90]	
BMI			
均值	21.66	21.79	0.935

中位数[最小值、最大值]	20.45[18.7,27.5]	22.90[17.0,24.21]	
LLAS			
均值	5.38	1.43	0.00026
中位数[最小值、最大值]	5[4, 9]	1[1, 2]	

2.2 AMS 组 vs NAMS 组差异蛋白谱与全局分型稳健性

为确保组间比较建立在可比的检测深度之上, 我们首先评估各样本的鉴定量. 图 2A 显示, 两组的蛋白条目数分布相对集中, AMS 组中位数为 5325(范围 3945–5931), NAMS 组中位数为 4863(范围 3841–5519). 在同批次上机且上样量一致的条件下, AMS 组的鉴定量略高. 为进一步判断是否存在丰度结构差异, 我们计算每个样本 Top 10% 丰度占比并比较组间分布(图 2B). NAMS 组整体分布显著右移 ($P=0.00388$), 提示其信号更集中于少数高丰度蛋白; 在相同上样量下, 这将降低对中低丰度蛋白的覆盖度, 从而解释其鉴定条目数略少.

采用 direct-DIA 流程并在肽段与蛋白层面均设定 1% FDR 后, 累计共鉴定 6719 个蛋白. 以 $|FC|>1.5$

且 $P<0.05$ (AMS vs NAMS)为阈值, 筛得差异蛋白 713 个, 其中上调 540 个、下调 173 个(图 2C). 对差异蛋白进行双向层次聚类(图 2D)后, 在无监督条件下样本按分组自然聚集. 进一步对全量表达矩阵实施偏最小二乘判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)(图 2E), 两组合在得分空间内清晰分离, 提示整体蛋白质组组成存在系统性差异.

为评估体能训练过程对分组判别的影响, 我们将同一受试者在不同运动阶段获得的尿样纳入同一 PLS-DA 模型(图 2F). 同一人的多次采样稳定落在其所属组团范围, 未见随训练进程向对方组团迁移的趋势, 说明尿蛋白质组组成与有氧体能训练无关. 进一步地, AMS 组与 NAMS 组各包含 1 名儿童个体(图 2G), 其在模型中的位置与对应组团一致, 提示儿童与成人在这方面无异.

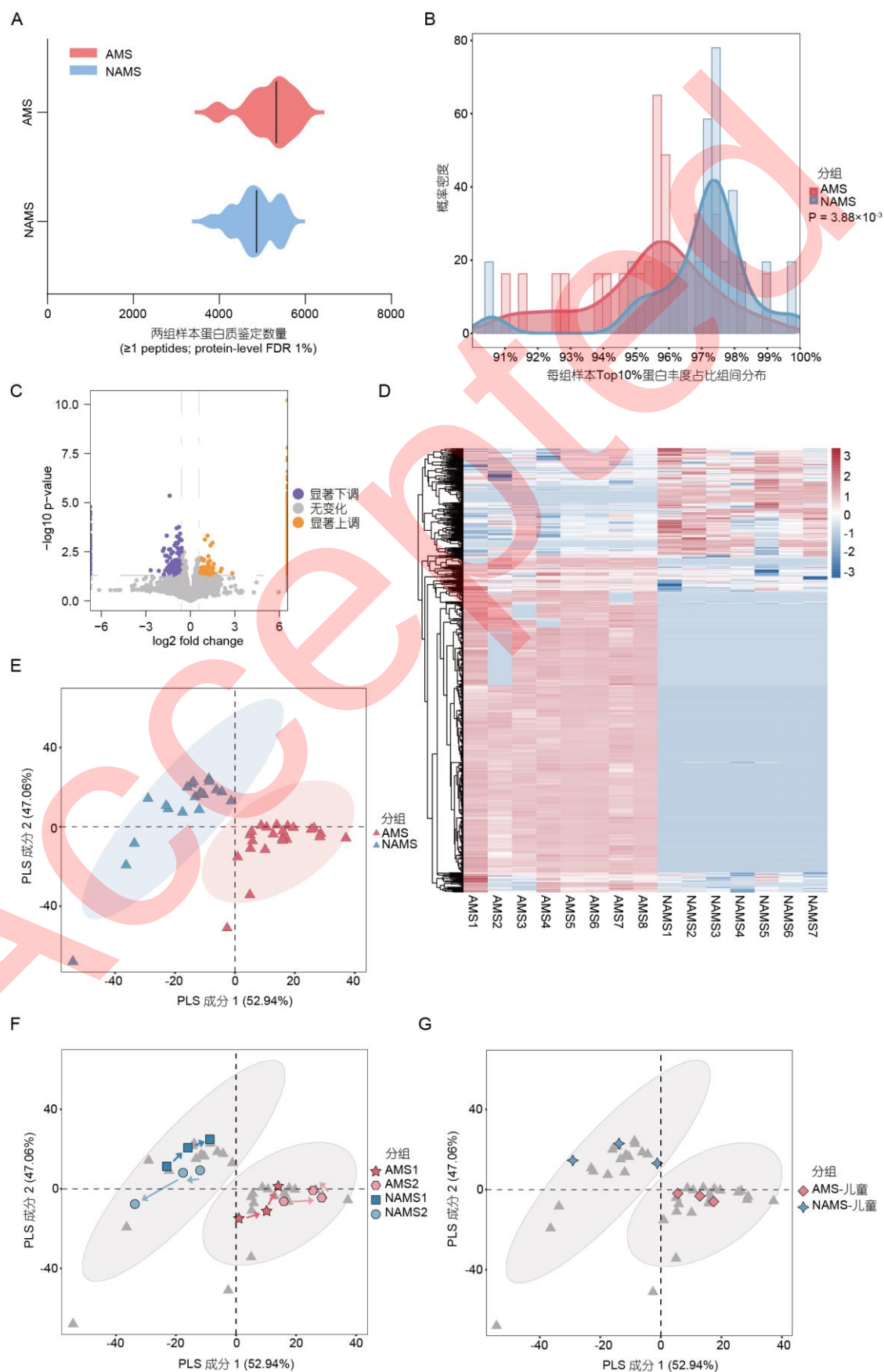


图 2 AMS 组与 NAMS 组尿蛋白的检测深度、丰度分布与分型. A: 各样本的蛋白质鉴定数量图, 横坐标为每个样本鉴定到的蛋白质条目数, 在肽段和蛋白质层面均将假阳性发现率控制在 1%; B: 尿蛋白质组丰度结构的组间分布图, 横轴为 Top 10% 丰度占比, 纵轴为概率密度, 并叠加直方图与密度曲线; C: AMS vs NAMS 差异蛋白质分析火山图; D: 差异蛋白质的无监督双向层次聚类热图; E: PLS-DA 降维图; F: 在(E)的 PLS-DA 模型中标注同一受试者随运动进展的不同时间点样本, 箭头为时间顺序; G: 在(E)的 PLS-DA 模型中标注儿童个体样本

Figure 2 Detection depth, abundance distribution, and classification of urinary proteins in AMS and NAMS groups. A: Number of proteins identified per sample. The x-axis represents the number of protein entries identified in each sample, with false discovery rate controlled at 1% at both peptide and protein levels; B: Group-wise distribution of urinary proteome abundance structure. The x-axis shows the proportion of the top 10% abundant proteins, the y-axis represents probability density, with overlaid histogram and kernel density curves; C: Volcano plot showing differentially expressed proteins between AMS and NAMS groups; D: Unsupervised bidirectional hierarchical clustering heatmap of differential proteins; E: PLS-DA score plot; F: PLS-DA plot annotated with samples from the same participants at different time points during training; arrows indicate temporal progression; G: PLS-DA plot highlighting samples from child participants.

2.3 差异蛋白的生物学功能

对差异蛋白进行富集分析. GO 结果(图 3A)显示: 在生物学过程(BP)层面, 富集主要落在小分子有机酸与脂质的分解/代谢, 如羧酸分解代谢、有机酸分解代谢、脂质代谢及小分子代谢等, 指向能量供给与膜脂重塑的整体差异; 在分子功能(MF)层面, 氧化还原酶活性与水解酶活性占主导, 并出现脂质结合以及依赖 NAD/NADP 的视黄醇脱氢酶活性, 提示氧化还原稳态及维生素 A/视黄醇转换的潜在调控; 在细胞组分(CC)层面, 信号主要定位于内质网腔、细胞器腔、溶酶体/溶酶体样液泡与线粒体等内膜与能量代谢相关区室, 提示蛋白变化集中发生在承担蛋白折叠/分泌、囊泡转运与氧化代谢的细胞器网络内.

KEGG 结果(图 3B)可概括为两个相互耦合的功能模块. 其一是代谢与氧化还原模块, 代谢通路、碳

代谢构成代谢骨架, PPAR 信号、视黄醇代谢与鞘脂代谢指向脂肪酸氧化及膜脂信号的差异, 过氧化物酶体提示脂质 β -氧化与活性氧清除过程的参与. 其二是先天免疫与囊泡模块: 溶酶体、吞噬体指向内吞降解与抗原加工差异, 而 NOD-like 受体、胞质 DNA 感知、NF- κ B 信号提示模式识别与炎症转录程序的放大, 中性粒细胞胞外陷阱形成提示粒细胞效应臂可能被激活. 与此同时, 核-胞质转运、嗅觉转导及利什曼病等条目多见于先天免疫与应激背景下的伴随富集.

AMS 组相较 NAMS 组呈现脂质与小分子代谢重编程、氧化还原调控、先天免疫与囊泡通路并行的富集格局. 这一图景与高海拔缺氧情境下能量代谢、炎症反应耦合的生理背景相吻合, 并为后续标志物筛选与蛋白对模型的构建提供了功能学依据.

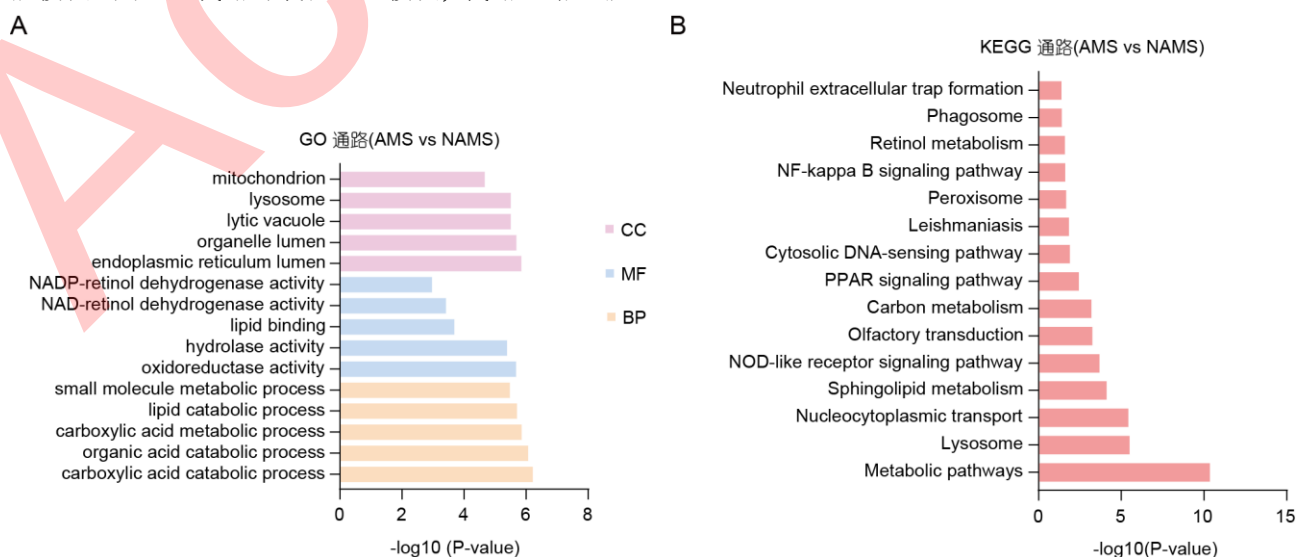


图 3 AMS 组与 NAMS 组差异蛋白的功能富集分析. A: 差异蛋白的 GO 富集, 显示生物学过程(BP)、分子功能(MF)与细胞组分(CC)的代表性条目, 及其 $-\log_{10}(P\text{-value})$; B: 差异蛋白的 KEGG 通路富集, 展示显著通路及其 $-\log_{10}(P\text{-value})$

Figure 3 Functional enrichment analysis of differentially expressed proteins between the AMS and NAMS groups. A: Gene

Ontology(GO) enrichment of the differentially expressed proteins, highlighting representative terms from the Biological Process(BP), Molecular Function(MF), and Cellular Component(CC) ontologies together with their $-\log_{10}(\text{P-value})$; B: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway enrichment of the differential proteins, showing significant pathways and their $-\log_{10}(\text{P-value})$

2.4 蛋白对自参照判别组合的构建与评估

鉴于尿液缺乏稳定外参且稀释度波动明显, 我们采用蛋白对自参照策略在候选差异蛋白中两两配对, 计算同一样本内的配对蛋白的对数差值 Δ 作为判别指标, 不考虑功能相关性. 这种自参照的配对比值策略在无稳定内参的情境中可得到稳健结果^[19]. Shapiro-Wilk 检验提示多数 Δ 不服从正态分布, 因此组间比较采用 Mann-Whitney U 检验. 将所有可配对组合逐一检验, 并以 P 值绘制显著性热图(图 4A), 可见多个显著簇, 其中以 Mesothelin(MSLN)为一端的配对最为集中.

综合显著性与稳健性, 我们选取四个代表性蛋白对进行展示: Immunoglobulin lambda variable 1-40(IGLV1-40)-MSLN、RNA-binding motif protein 39(RBM39)-MSLN、Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2(LILRA2)-MSLN, 以及 MSLN-ADAMTS-like protein 5(ADAMTSL5). 任取两对联合绘制二维散点, AMS 组与 NAMS 组在二维平面上分离良好(图 4B-D). 我们在此基础上纳入

1 例前瞻性未知样本, 其在图 4B 和图 4C 中与 NAMS 簇高度重叠; 在图 4D 中落点位于两簇边缘、视觉分离度略低, 但该样本在相应单对 Δ 的秩次与预置阈值判别中均归入 NAMS 组. 按照这一判别结果, 我们为其制定了个体化登高策略, 即可承受快速海拔上升而无显著 AMS 症状. 该受试者随后在 20 小时内从海拔 3200 m 登顶海拔 5025 m 的四姑娘山大峰, 其 LLAS 评分归于 NAMS 组, 提示本判别方案具备前瞻性可用性.

进一步以单个蛋白对的 Δ 值绘制 ROC 曲线(图 4E-H), 四对均表现出较高判别力: LILRA2-MSLN 的 AUC 为 0.965, MSLN-ADAMTSL5 为 0.960, RBM39-MSLN 为 0.950, IGLV1-40-MSLN 为 0.971. 上述结果表明, 基于蛋白对的自参照在单对水平已具有充分区分度; 而任意两对联合使用能进一步拉大 AMS 与 NAMS 的组间距离, 并能在前瞻情境下对未知个体给出稳定、可操作的判别, 为形成由少量指标构成的简洁检测组合、判别方案提供了实证依据.

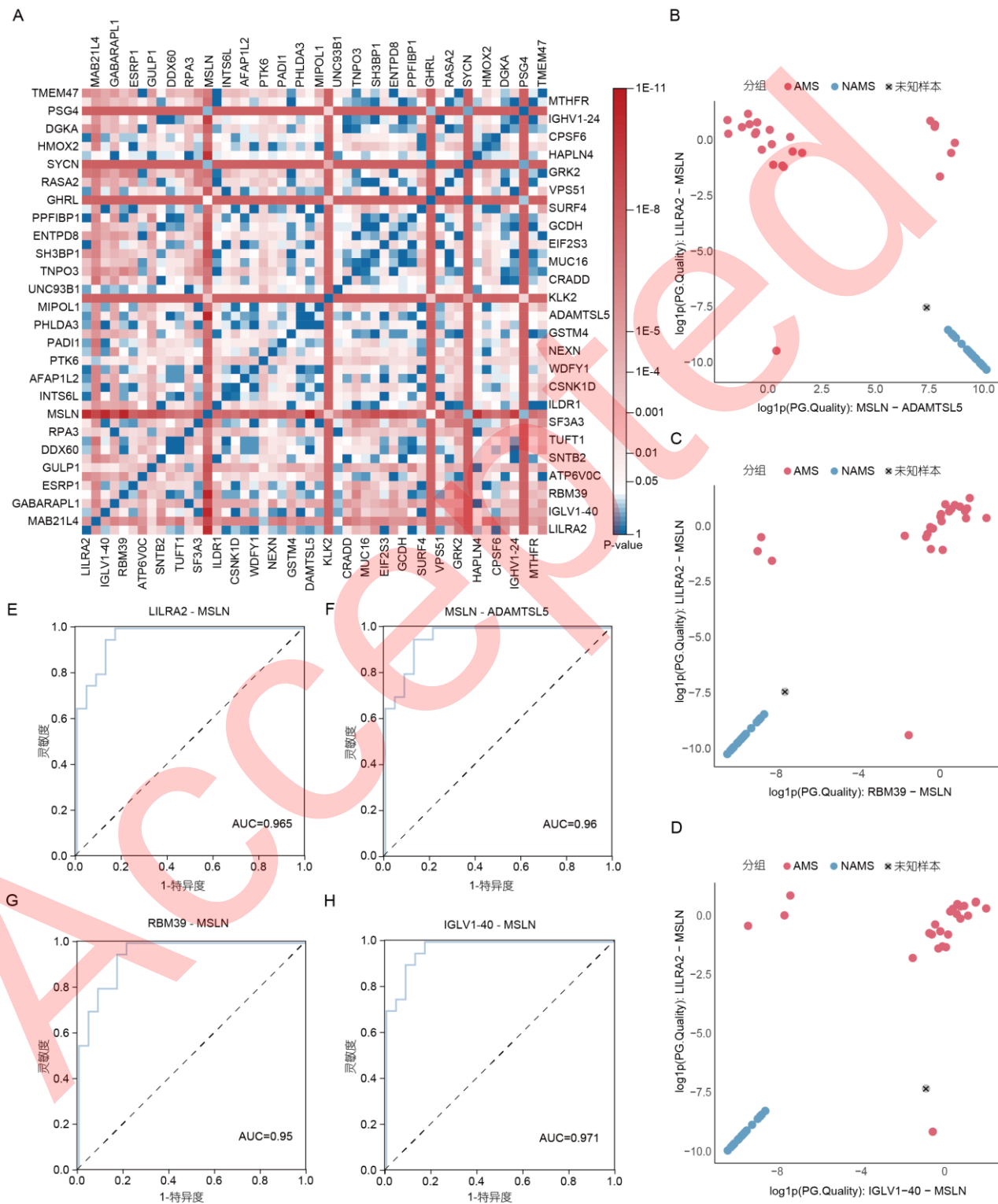


图 4 蛋白对 Δ 的显著性热图、二维散点图与 ROC 评估。A:在候选差异蛋白中进行两两配对, 计算同一样本内各蛋白对的对数差值,并以 Mann-Whitney U 检验比较组间差异, 以 P 值绘制显著性热图, 用于展示各蛋白对 Δ 值的组间区分能力; B~D: IGLV1-40-MSLN、RBM39-MSLN、LILRA2-MSLN、MSLN-ADAMTSL5 四对蛋白对, 任取两对作为二维坐标(Δ_1 , Δ_2)的散点图, 并引入 1 例未知样本; E~H: 基于(B-D)蛋白对的单个配对 Δ 值绘制 ROC 曲线。

Figure 4 Significance heatmap, two-dimensional scatter plots, and ROC evaluation of pairwise protein Δ values. A: All possible

pairs were generated from the candidate differentially expressed proteins. For each protein pair, a within-sample log-transformed abundance difference Δ was calculated, and group differences in Δ were compared between AMS and NAMS using the Mann–Whitney U test. A heatmap of statistical significance based on the P-value is shown; B~D: For four selected protein pairs (IGLV1-40–MSLN, RBM39–MSLN, LILRA2–MSLN, and MSLN–ADAMTSL5), any two pairs were used as orthogonal coordinates (Δ_1 , Δ_2) to construct two-dimensional scatter plots, into which one additional sample with unknown status was projected; E~H: Receiver operating characteristic (ROC) curves based on the single Δ value of each protein pair shown in panels (B~D)

2.5 MSLN 单指标的可行性评估

为兼顾检测成本与现场可操作性, 我们进一步评估单指标方案. 鉴于在蛋白对分析中 MSLN 多次入选且方向一致, 遂将其作为验证靶标. Western blot(图 5A、5B)显示, 在控制上样量均为 10 μg 蛋白质时, AMS 组的 MSLN 表达整体高于 NAMS 组, 仅以 MSLN 即可在定量层面区分两组. 随后纳入 4 个前瞻性未知样本, 按预设的 MSLN 判定阈值进行分类,

其定位都与与 NAMS 簇一致, 并被判定为 NAMS 组; 后续随访结果亦证实其为高反不易感者.

为量化单指标的判别效能, 我们绘制了 MSLN 的 ROC 曲线(图 5C), 得到 $\text{AUC}=0.969$, 与上述自对照方案的判别效能近似, 提示 MSLN 单独即可提供较高的区分度. MSLN 作为单指标具有良好的可转化潜力, 检测流程简洁、阈值明确、判读直观、结果准确, 体现出稳定可靠的判别表现.

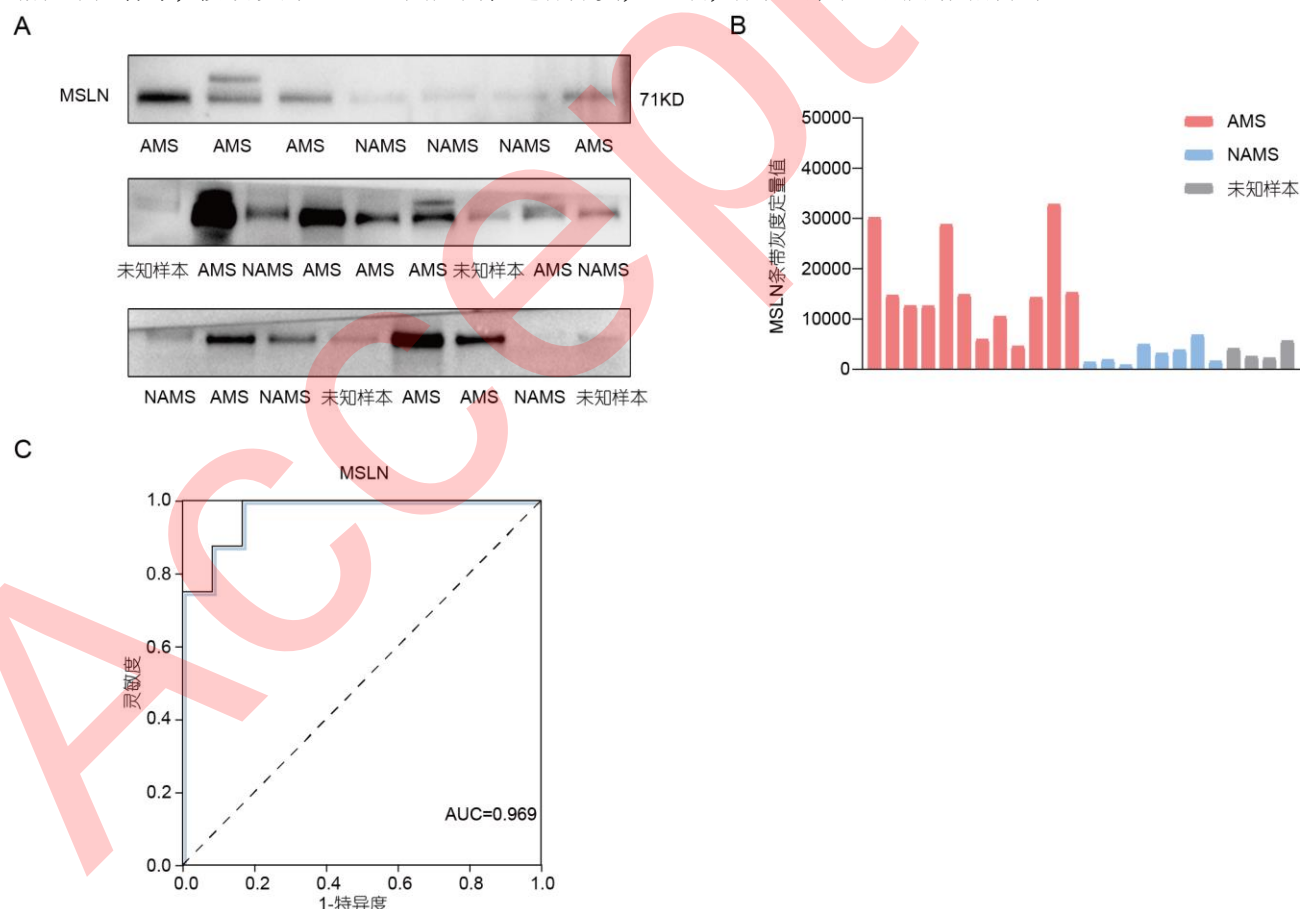


图 5 MSLN 蛋白的 WB 验证, 定量分析及 ROC 评估. A: AMS 组与 NAMS 组及 4 个前瞻性未知样本尿样中 MSLN 的 Western blot 结果; B: 对(A)中 MSLN 条带进行灰度值定量分析; C: 依据(B)的 MSLN 定量结果绘制 ROC 曲线, 用于评估 MSLN 单指标区分 AMS 组与 NAMS 组的判别效能

Figure 5 Western blot validation, quantitative analysis, and ROC evaluation of urinary MSLN. A: Western blot of MSLN in urine samples from the AMS group, the NAMS group, and four prospectively collected samples with unknown status; B: Densitometric quantification of the MSLN bands shown in (A); C: Receiver operating characteristic (ROC) curve based on the quantitative MSLN values in (B), evaluating the performance of MSLN as a single marker for discriminating AMS from NAMS

3 讨论

本研究显示, 平原期晨尿蛋白质组已能区分随后发生急性高山病易感者(AMS)与急性高山病不易感者(NAMS), 把风险识别的时间窗从到达高原后前移到出发前, 为行前分子分型提供了直接方案. 尿蛋白质组质谱检测可非常准确地做到区分, 本研究也给出了双蛋白甚至单蛋白(MSLN)的检测方案, 可采用 Western blot、ELISA 等方式进行筛查, 成本低、速度快, 在未来甚至可望做成胶体金试纸而实现居家自测. 需要澄清的是, 本研究筛选出的标志物与 AMS 发生之间有显著的关联性, 其机制联系尚待后续研究揭示, 但这并不影响本文发现的标志物用于对急进高原人群的分层与行程规划决策.

本研究在训练期间未对受试者实施统一饮食控制, 而是允许其维持日常饮食和生活方式, 仅额外增加规定的有氧训练. 这样的设计希望使研究场景更接近普通人群前往高原前的真实生活状态, 从而评估该预测策略在实际应用中的可行性. 即便在未统一饮食的条件下, AMS 组与 NAMS 组之间仍观察到较为明显的尿蛋白质组差异, 提示该方法在很大程度上可以规避个体差异, 鲁棒性较高, 有利于广泛应用.

与传统依赖抵达后症状评分或血气及血流动力学指标的做法相比^[20], 这一路径为高原行动提供了全新的应用范式. 对军事行动和高海拔紧急救援等节奏刚性强、时间窗口短、后撤代价高的场景, 可在平原时期就筛选出一批 AMS 不易感个体, 有突发紧急任务时, 这些人可以作为先锋队, 以单日上 1000~2000 m 甚至更高的快速节奏登高执行任务. 而对于 AMS 易感个体, 则可以作为第二梯队缓慢上升, 并配置更多的预防用药和备用给氧等支持措施. Wilderness Medical Society 最新指南^[21]以及 CDC《Yellow Book 2025》高原旅行章^[10]的推荐: 当行程进入约 2700~3000 m 以上的海拔带时, 应避免在一天内直接大幅提高睡眠海拔; 其后应将睡眠海拔的日上升幅度控制在 ≤ 500 m, 并每 3~4 天安排 1 天不再上升的休息日, 这样缓慢的上升方案下几乎所有人均不会出现 AMS. 这种分层方案可以在行前即平衡任务紧急度和人力资源供给, 大大减少因为突发 AMS 而导致的意外损失. 同样的思路亦适用于普通旅行与工程施工人群, 所谓易感并不等同

于不能前往, 只是需要更缓和地进行渐进登高, 例如避免乘飞机直接飞抵高原机场, 在路线设计上尽可能考虑快速就医的可能性等; 而不易感者则可利用更短的时间急速上升而完成任务. 这可以改善普通民众的旅游体验, 减少意外, 促进高原地区经济的发展.

本研究中纳入了 8~10 岁儿童, 其尿蛋白质组分情况与成人相同, 这与国际高山医学协会 (ISMM)2001 年国际专家共识及其后 UIAA 2008 更新文件中“儿童与成人在 AMS 易感性和病理表现方面无差异”的结论相符合^[22]. 由于儿童发生 AMS 之后对医疗资源的需求更为迫切, 父母对其更加担心, 因而行前 AMS 易感性筛查更能显示其在旅行方案决策中的意义.

值得强调的是, 尿液并非仅反映泌尿系统状态, 它可以折射全身免疫与代谢活动的截面^[23]; 既往尿蛋白质组学研究亦提示, 在缺氧或炎症情境中, 尿蛋白谱能够提前呈现风险信号^[13,24,25]. 我们的结果与这一认识一致, 在检测深度可比的前提下, AMS 组与 NAMS 组的蛋白质组构型存在稳定而可重复的差异^[26]. 从整体特征看, 两组在丰度结构上并不完全相同. NAMS 组的 Top 10% 丰度占比整体右移, 提示信号更集中于少数高丰度蛋白; 相对地, AMS 组的丰度更铺开, 中低丰度层出现更广泛信号. 这样的定量分布差异为后续比值化策略提供了依据, 也提示两类个体在平原期已处于不同的分子稳态^[27]. 在此基础上, 我们通过功能富集分析进一步加深了对差异蛋白生物学功能的整体认识. 一方面, 胞质 DNA 感知通路、NOD-like 受体及囊泡/溶酶体加工相关条目提示先天免疫警觉处于较易被激活的状态, 这与既往研究中缺氧条件下 mtDNA 外泄激活 cGAS-STING 以及高原模型中 NOD-like 受体介导炎症损伤的观察相一致^[28]. 另一方面, PPAR 与脂质氧化轴同步富集, 指向代偿性抗炎节能制动^[29,30]. 二者相互牵制, 可概括为“敏感而受抑”的基线设定点: AMS 组个体在模式识别与吞噬加工更易被轻度刺激放大, 而 NAMS 组的基线较低且制动有效, 因此外周炎症表型相对温和. 这一推断与高山医学领域的临床经验相一致, 例如当处于感冒等上呼吸道感染状态时不宜登山, 因为较高的炎症基础会放大登高诱发的应激反应^[31,32]. 基于此可推

论：登高后 12–24 小时内，AMS 个体炎症相关转录及蛋白反应的幅度与持续时间应显著高于 NAMS 组个体。这一推论与目前的研究资料相符^[33,34]。

需要厘清的是，体能改善与 AMS 属于两个不同层面的问题。本研究显示体能训练并不能改变 AMS 易感性。这一结果并不否认体能提升的实践意义。更好的有氧供能能力和疲劳耐受性，有助于完成既定行程并减轻主观不适^[35]。尤其在高海拔登山运动中，往往需要在天黑前到达指定位置，否则将面临致命危险。更充沛的体能可以更游刃有余地应对路程中的突发意外状况，也可背负更多物资以完成相应的任务或保障安全。相对地，临近出发前进行高强度训练可能诱发骨骼肌微损伤并抬高系统性炎症水平^[36]，以我们上述“炎症水平与 AMS 的关联”理论，这不利于早期高原适应，这一点与高山运动和野外作业人群中既往实践及研究证据所支持的登高前“避免大强度力量训练”的策略相一致^[37]。

当然，本研究仍存在若干局限。首先，样本量及纳入中心数目有限；发现阶段主要基于 LC-MS DIA 平台，尽管 MSLN 已通过 WB 得到初步支持，仍需在 ELISA、LFA、电化学等免疫学检测体系中

开展方法学比对和批间校准，并进一步明确采样 SOP 与质控材料，以尽可能降低不同应用场景之间的系统性差异。在此基础上，推进小型化检测平台的工艺放大、耐温稳定性及现场可用性评估，力求形成覆盖行前风险预测、到达后复核以及任务期监测的成体系解决方案。其次，本研究所依据的高原暴露模式为登山过程中的快速登高，兼具急性低压低氧暴露与较高体力活动负荷，因此其对乘机快速进入高原等不同的暴露方式待在相应人群中进一步验证。

综上所述，我们的研究为登高前的个体化风险分层提供了一条可行且具有扩展潜力的技术路径；“少指标—比值化—自参照”的判别策略与尿液这一样本类型高度契合，也便于后续工程化实现与推广应用。通过将风险识别前移至出发前阶段，即“行前先把一件事做到位”，有望减少到达高海拔后的被动处置和资源浪费。我们期望该方法今后能够在部队、高海拔救援以及大众登山与高原旅行等场景中获得应用，并发挥切实的实践价值。

参 考 文 献

- 1 Gatterer H, Villafuerte F C, Ulrich S, et al. Altitude illnesses. *Nat Rev Dis Primer*, 2024, 10: 43
- 2 Burtcher J, Swenson E R, Hackett P H, et al. Flying to high-altitude destinations: Is the risk of acute mountain sickness greater? *J Travel Med*, 2023, 30: taad011
- 3 West J B, Richalet J P, Denis Jourdanet (1815-1892) and the early recognition of the role of hypoxia at high altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305: L333-340
- 4 Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 2012, 148: 399-408
- 5 Julian C G, Subudhi A W, Wilson M J, et al. Acute mountain sickness, inflammation, and permeability: new insights from a blood biomarker study. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985, 2011, 111: 392-399
- 6 Li Y, Zhang Y, Zhang Y. Research advances in pathogenesis and prophylactic measures of acute high altitude illness. *Respir Med*, 2018, 145: 145-152
- 7 Simka M, Latacz P, Czaja J. Possible Role of Glymphatic System of the Brain in the Pathogenesis of High-Altitude Cerebral Edema. *High Alt Med Biol*, 2018, 19: 394-397
- 8 Goves J S L, Joyce K E, Broughton S, et al. Pulse oximetry for the prediction of acute mountain sickness: A systematic review. *Exp Physiol*, 2024, 109: 2057-2072
- 9 Kallenberg K, Bailey D M, Christ S, et al. Magnetic resonance imaging evidence of cytotoxic cerebral edema in acute mountain sickness. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27: 1064-1071
- 10 CDC. High-Altitude Travel and Altitude Illness. (2025-06-18).
- 11 Liu B, Huang H, Wu G, et al. A Signature of Circulating microRNAs Predicts the Susceptibility of Acute Mountain Sickness. *Front Physiol*, 2017, 8: 55
- 12 He Y, Cui C, Guo Y, et al. High Arterial Oxygen Saturation in the Acclimatized Lowlanders Living at High Altitude. *Phenomics*, 2023, 3: 329-332
- 13 Joshi N, Garapati K, Ghose V, et al. Recent progress in mass spectrometry-based urinary proteomics. *Clin Proteomics*, 2024, 21: 14
- 14 Kovacevic L, Lu H, Caruso J A, et al. Urinary proteomics reveals association between pediatric nephrolithiasis and cardiovascular disease. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50: 1949-1954
- 15 Zhao L, Zhang Y, Liu F, et al. Urinary complement proteins and risk of end-stage renal disease: quantitative urinary proteomics in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44: 2709-2723
- 16 Huo S, Wang H, Yan M, et al. Urinary Proteomic Characteristics of Hyperuricemia and Their Possible Links with the Occurrence of Its Concomitant Diseases. *ACS Omega*, 2021, 6: 9500-9508
- 17 Roach R C, Hackett P H, Oelz O, et al. The 2018 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score. *High Alt Med Biol*, 2018, 19: 4-6
- 18 Yu G, Wang L G, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J Integr Biol*, 2012, 16: 284-287
- 19 Jia H L, Liu C W, Zhang L, et al. Sets of serum exosomal microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for Kawasaki disease. *Sci Rep*, 2017, 7: 44706
- 20 Hartman-Ksycińska A, Kluz-Zawadzka J, Lewandowski B. High altitude illness. *Przegl Epidemiol*, 2016, 70: 490-499
- 21 Luks A M, Beidleman B A, Freer L, et al. Wilderness Medical Society Clinical Practice Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Acute Altitude Illness: 2024 Update. *Wilderness Environ Med*, 2024, 35: 2S-19S.
- 22 Pollard A J, Niermeyer S, Barry P, et al. Children at high altitude: an international consensus statement by an ad hoc committee of the International Society for Mountain Medicine, March 12, 2001. *High Alt Med Biol*, 2001, 2: 389-403
- 23 Wu J, Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. *Expert Rev Proteomics*, 2015, 12: 623-636
- 24 Fan K, Wang J, Zhu W, et al. Urinary proteomics for noninvasive monitoring of biomarkers of chronic mountain sickness in a young adult population using data-independent acquisition (DIA)-based mass spectrometry. *J Proteomics*, 2024, 302: 105195
- 25 Sun Y, Wang F, Zhou Z, et al. Urinary Proteomics Identifying Novel Biomarkers for the Diagnosis of Adult-Onset Still's Disease. *Front Immunol*, 2020, 11: 2112
- 26 Julian C G, Subudhi A W, Hill R C, et al. Exploratory proteomic analysis of hypobaric hypoxia and acute mountain sickness in humans. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985, 2014, 116: 937-944
- 27 Guo H, Wang Q, Li T, et al. Potential plasma biomarkers at low altitude for prediction of acute mountain sickness. *Front Immunol*, 2023, 14: 1237465
- 28 Wei H, Chen D, Zhang E, et al. Hypoxia-induced mitochondrial DNA release promotes proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells via activating cGAS-STING pathway(in Chinese). *J Army Med Univ*, 2022, 44: 117-124. [韦汉南, 陈德伟, 张二龙, 高钰琪. 缺氧诱导线粒体 DNA 释放后激活 cGAS-STING 通路促进肺动脉平滑肌细胞增殖. 陆军军医大学学报, 2022, 44(2): 117-124.]
- 29 Wang M, Yan Y, Zhang Z, et al. Programmed PPAR- α downregulation induces inflammaging by suppressing fatty acid catabolism in monocytes. *iScience*, 2021, 24: 102766
- 30 Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*, 2021, 114: 154338
- 31 Luks A M, Swenson E R, Bärtsch P. Acute high-altitude sickness. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*, 2017, 26: 160096
- 32 Basnyat B, Cumbo T A, Edelman R. Infections at high altitude. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*, 2001, 33: 1887-1891
- 33 Hartmann G, Tschöp M, Fischer R, et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine*, 2000, 12: 246-252
- 34 Wang C, Jiang H, Duan J, et al. Exploration of Acute Phase Proteins and Inflammatory Cytokines in Early Stage Diagnosis of Acute Mountain Sickness. *High Alt Med Biol*, 2018, 19: 170-177
- 35 Khodaei M, Grothe H L, Seyfert J H, et al. Athletes at High Altitude. *Sports Health*, 2016, 8: 126-132
- 36 Cerqueira É, Marinho D A, Neiva H P, et al. Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise-A Systematic Review. *Front Physiol*, 2019, 10: 1550
- 37 Roach R C, Maes D, Sandoval D, et al. Exercise exacerbates acute mountain sickness at simulated high altitude. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985, 2000, 88: 581-585

Urinary proteomic biomarkers for pre-ascent prediction of susceptibility to acute mountain sickness

XU LiWen^{1†}, MA Jin^{1†}, CAO MiaoYing¹, JIN JingJie¹, WANG XiangJie^{2*},
ZHENG TingKai^{3*}, ZHANG Gong^{1,4*}

¹Key Laboratory of Functional Protein Research of Guangdong Higher Education Institutes and Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China

²Su Bingtian Center for Speed Research and Training, Guangdong Key Laboratory of speed capability research, School of physical education, Jinan University, Guangzhou 510632, China

³Shenzhen Pixelphil Co., Ltd. Shenzhen 518000, China

⁴CHI BIOTECH CO., LTD, Shenzhen 518000, China

* Corresponding authors, E-mail: zhanggong-uni@qq.com; 1129664307@qq.com; 2245700435@qq.com

Acute mountain sickness (AMS), also known as high-altitude illness, poses a serious threat to the life safety and task performance of individuals who rapidly ascend to high altitude, yet effective pre-ascent prediction tools remain lacking. To achieve noninvasive risk warning before departure, we explored a urinary proteomics-based strategy for predicting AMS susceptibility using morning urine collected during the lowland baseline period. We enrolled 15 healthy volunteers who underwent physical training and then traveled to a high-altitude region for mountaineering; according to the Lake Louise Score, they were classified into AMS and non-AMS groups. Data-independent acquisition (DIA)-based urinary proteomics revealed significant differences in urinary proteome composition between the two groups, and the functional pathways involving the differentially expressed proteins were highly consistent with the known pathophysiological mechanisms of AMS. On this basis, we constructed prediction models using either a two-protein self-referenced panel or a single-protein scheme, both of which showed excellent discriminative performance, with an area under the curve (AUC) of 0.97. The study also demonstrated that although physical training improved aerobic capacity, it did not alter susceptibility to AMS. Prospective validation showed a high concordance between model predictions and the actual high-altitude adaptation status of the participants. Together, these findings confirm that a pre-ascent AMS prediction strategy based on the urinary proteome is highly feasible and accurate and is independent of physical fitness, thereby laying a solid foundation for the development of low-cost, noninvasive, point-of-care screening tools.

acute mountain sickness, urinary proteomics, early prediction, DIA