

- 7 Cheung LP, Ma RC, Lam PM, *et al.* Cardiovascular risks and metabolic syndrome in Hong Kong Chinese women with polycystic ovary syndrome[J]. *Hum Reprod*,2008,23(6):1431-1438
- 8 Park HR, Choi Y, Lee HJ, *et al.* The metabolic syndrome in young Korean women with polycystic ovary syndrome[J]. *Diabetes Res Clin Pract*,2007,77(Suppl 1):S243-S246
- 9 Bhattacharya SM. Metabolic syndrome in females with polycystic ovary syndrome and International Diabetes Federation criteria[J]. *Obstet Gynaecol Res*,2008,34(1):62-66
- 10 Glueck CJ, Papanna R, Wang P, *et al.* Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome[J]. *Metabolism*,2003,52(7):908-915
- 11 Apridonidze T, Essah P, Iuorno M, *et al.* Prevalence and characteristics of metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol Metab*,2005,90(4):1929-1935
- 12 Ehrmann D, Liljenquist D, Kasza K, *et al.* Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol Metab*,2006,91(1):48-53
- 13 Dokras A, Bochner M, Hollinrake E, *et al.* Screening women with polycystic ovary syndrome for metabolic syndrome[J]. *Obstet Gynecol*,2005,106(1):131-137
- 14 Coviello AD, Legro RS, Dunaif A. Adolescent girls with polycystic ovary syndrome have an increased risk of the metabolic syndrome associated with increasing androgen levels independent of obesity and insulin resistance[J]. *Clin Endocrinol Metab*,2006,91(2):492-497
- 15 Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG, Kandarakis SA, *et al.* Pathophysiology and types of dyslipidemia in PCOS[J]. *Trends Endocrinol Metab*,2007,18(7):280-285
- 16 Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ, *et al.* Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*,1992,37:115-119
- 17 Pasquali R. Obesity and androgens: facts and perspectives[J]. *Fertil Steril*,2006,85(5):1319-1340
- 18 Phillips G, Jing T, Heymsfield S. Does insulin resistance, visceral adiposity, or a sex hormone alteration underlie the metabolic syndrome? Studies in women[J]. *Metabolism*,2008,57(6):838-844

(收稿:2011-09-14)

(修回:2011-09-23)

蛋白质组学及相关技术或多囊卵巢综合征中的应用

张胜坤 吕杰强 程 静

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种多病因的、涉及多系统的疾病。蛋白质组学及相关技术的不断发展,为对 PCOS 进行深入研究提供了新的途径和思路。本文就蛋白质组学及相关技术以及在 PCOS 中的应用进行综述。

一、蛋白质组学及相关技术

从基因水平上并不能阐明疾病的动态变化,蛋白质组学就应运而生。它以生物体内的全部蛋白质作为研究对象,可以全面的、动态的掌握生物体内不断变化的蛋白质成分及功能状态。目前蛋白质组学研究技术主要有凝胶电泳和质谱技术。二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE)以电荷的差异、蛋白质分子质量的不同为基础,经过蛋白样品的变性、等电聚焦分离等步骤,胶条上会出现不同蛋白质条带。再将胶条放在含十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶上,由于其相对分子质量不同而分离。分离后的蛋白质条带通过差减处理,便可展示出不同蛋白样品之间的差异。

2D-PAGE 只是一种重要的描述性技术,分离出来的蛋白质缺少必要的鉴定工具时,在蛋白质研究中的应用就会受到限制。基质辅助的激光解析电离化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术出现在 20 世纪 70 年代,它是将样品和小分子的基质混合在一块,并且基质包围在样品周围。这样再经过激光脉冲辐射,被结合的蛋白质就解析形成荷电离子。因为质荷比不同,这些离子在真空场中飞行的时间长短不一样,从而绘制出质谱图。20 世纪 90 年代初期, Hutchens 等^[1]提出表面增强激光解析电离化飞行时间质谱技术(surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry technology, SELDI-TOF-MS),蛋白质分离技术又上了新的台阶,这一技术应用了独特的蛋白质芯片系统,使得它可以更广泛的应用在疾病发生机制的研究上,特别是在恶性肿瘤上应用方面。已有不少学者应用 SELDI 等技术来研究前列腺癌、卵巢癌、直肠癌、肺癌的诊断,并筛选肿瘤标志物^[2-5]。近些年来,越来越多的研究者应用质谱技术来研究非恶性肿瘤, Wang 等^[6]

2007 年首次将 SELDI 技术应用于子宫内膜异位症的研究,建立了子宫内膜异位症的血清学诊断模型,子宫内膜异位症的在位内膜的诊断模型和子宫内膜异位症的腹腔积液诊断模型。

二、多囊卵巢综合征

PCOS 是一种遗传异质性内分泌疾病,稀发排卵或无排卵 (anovulation)、高雄激素血症 (hyperandrogenism)、肥胖及胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是其特征。育龄期妇女 PCOS 发病率为 5% ~ 10%, 是引起无排卵性不孕的主要原因。其发病机制涉及内分泌、代谢、遗传因素和胚胎发育等,还受环境因素的影响。PCOS 的诊断一般采用 2003 年欧洲人类生殖和胚胎与美国生殖医学学会的 (ESHRE/ASRM) 鹿特丹专家会议推荐的标准:①稀发排卵或无排卵;②高雄激素的临床表现和(或)高雄激素血症;③超声表现为多囊卵巢[一侧或双侧卵巢有 12 个以上直径为 2 ~ 9mm 的卵泡,和(或)卵巢体积 > 10ml];④上述 3 条中符合 2 条,并排除其他高雄疾病如先天性肾上腺皮质增生 (CAH)、库兴综合征、分泌雄激素的肿瘤。但美国雄激素过多协会 (AES) 也提出了自己的标准。近年来,对多囊卵巢综合征的研究有很大进展, Dunaif 等^[7]发现胰岛素抵抗是很多 PCOS 发病的中心环节,也有学者研究称瘦素和抑制素在多囊卵巢综合征的发生发展中起到了很重要的作用^[8,9]。虽然如此,PCOS 仍面临很多的挑战,不仅其具体发病机制还不清楚,而且在临床上还面临很多的困惑:①至今 PCOS 还没有一个很完美的诊断标准;②多毛的诊断及超声对多囊卵巢的判断带有很大的主观性;③PCOS 病人常常有高雄激素的生化证据,但健康妇女与 PCOS 病人的生化数值有明显的重叠;④不是所有的 PCOS 的妇女都会出现月经稀发或者闭经的原因尚不明确;⑤PCOS 病人,对其长期并发症如 2 型糖尿病、子宫内膜癌及心血管疾病的发病还缺乏有效的预测。

三、蛋白质组学在多囊卵巢综合征中的应用

由于蛋白质组学技术的独特优势,为上述挑战和困惑的解决带来机遇。最近几年,国内外不少学者应用其来研究多囊卵巢综合征。研究材料包括卵巢组织、血清、外周血 T 淋巴细胞、卵泡液、网膜组织、卵巢颗粒细胞^[10~14]。这些研究发现:PCOS 妇女与正常妇女相比,表达出很多差异蛋白。研究者查询相应生物信息库发现:这些差异蛋白涉及纤溶系统、血栓形成、细胞周期调节、细胞凋亡、细胞复制、呼吸和细胞代谢、细胞信号、免疫系统、炎症反应、代谢、氧化应

激、胰岛素抵抗、脂肪代谢、胆固醇及细胞骨架等。

传统的研究方法已经表明多囊卵巢综合征发病机制与胰岛素抵抗、纤溶系统、血栓形成、脂肪代谢和凋亡等有关,而上述应用蛋白质组学的研究方法一方面证明了以前的研究,同时也发现了一些新的可能机制,如抗氧化途径、免疫反应等。

抗氧化途径:有 3 个研究涉及抗氧化通路^[12,13], 这些抗氧化因子是过氧化物酶基因 - 1 (peroxidase gene - 1)、过氧化物酶基因 - 2 异构体 (peroxidase gene - 2 isoform), 谷胱甘肽 S 转移酶 M3 (glutathione transferase, GSTM3), 热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27)。过氧化物酶基因 - 1 是一种抗氧化酶,参与控制细胞内的氧化还原反应。在 Borro 等^[12]的研究中,PCOS 妇女的 T 淋巴细胞中过氧化物酶基因 - 1 是上调的,这表明氧化应激参与了 PCOS 的发生发展。过氧化物酶基因 - 2 异构体具有抗氧化活性,在 PCOS 妇女网膜组织中的表达下降,这使得过氧化氢浓度增高,考虑到过氧氢具有引起的 DNA 破坏的作用,这或许可以部分解释多囊卵巢患者容易发展成子宫内膜癌的原因。与过氧化物酶基因 - 2 异构体表达下降相反, GSTM3 的表达却是增高的, GSTM3 也是一种抗氧化酶,在细胞中,不仅参与细胞毒性物质的降解,而且还与白三烯、前列腺素、睾酮及孕酮的合成有关。另外,在脂肪细胞的过氧化中可以通过解毒作用起到保护细胞的作用。HSP27 可以抑制活性氧的产生,它在 PCOS 妇女的卵巢中是减少的^[10]。我国学者秦芬等在利用质谱技术研究 PCOS 时也有类似发现: HSP70 在 PCOS 妇女血清中的表达下降。

最近的研究还发现参与免疫、炎症反应的某些因子在 PCOS 妇女身上也发生了变化。诺丁汉大学 Matharoo - Ball 等,利用一种新型反相固相提取技术结合聚丙烯酰胺凝胶电泳并借助双相凝胶电泳、MALDI - TOF - MS 等蛋白质组平台及人工神经网络来研究 PCOS 病人,发现补体 C4a3c 链、C4 链和触珠蛋白的表达与正常妇女的表达不同。补体 C4a3c 链的表达是上升的,并且其后的 Western blotting 验证了这一点。这表明,这 3 个胰蛋白酶片段可能属于补体 C4 途径,当然,这还需要更进一步验证和研究。还有一些因子,如 Raf 激酶抑制蛋白、Rho 鸟苷二磷酸盐解离抑制因子 - 1、过氧化物酶基因 - 1、F - 肌动蛋白 α_1 亚基抗体、人肌动蛋白素 - 1、膜联蛋白 V 也直接或间接与免疫及炎症反应有关^[12,14]。

蛋白质组学技术既可以应用于 PCOS 发病机制的研究,还可以用于筛选生物标志物,并应用这些标志物来诊断 PCOS。乔杰等^[11]以血清为标本,利用 SELDI 质谱技术,建立了有胰岛素抵抗的 PCOS 妇女与正常妇女、无胰岛素抵抗 PCOS 与正常妇女及有胰岛素抵抗与无胰岛素抵抗 PCOS 诊断模型来诊断 PCOS。这些模型的精确性、特异性、敏感性和阳性预测值均在 80% ~ 90% 之间,其中有胰岛素抵抗和无胰岛素抵抗的 PCOS 妇女中存在 19 个差异蛋白,其中 M/Z 为 6629d 差别最明显,仅这一差异蛋白用来区别有胰岛素抵抗的病人与正常妇女,其精确性、特异性、敏感性和阳性预测值分别为 63.33%、70.00%、56.67%、68.18%; Matharoo - Ball 等的研究得出的结果也证实了质荷比 (m/z) 为 8674、8668、1351、8727、8673、6871 的 6 个生物标志物用来区分 PCOS 妇女和正常妇女,其敏感性为 90.4%,质荷比为 2924、3025、1977 的敏感性更是达到了 100%。对这些质荷比值做进一步研究,理论上说会发现一种或数种因子可以有效的诊断 PCOS,甚至可以代替目前主观性很高的诊断标准。

四、问题及展望

近些年来,蛋白质组学及相关技术蓬勃发展,但作为新兴的学科还面临很多问题和挑战。从技术本身来说,SELDI 或者 MALDI 可能存在假阳性的问题,也就是说发现的差异蛋白也许不是疾病本身造成的,而是受到了其他因素的影响。在临床应用中也存在很多问题,例如在 PCOS 的研究应用中,技术方面不仅有双向电泳凝胶技术,还有 SELDI、MALDI 质谱技术;研究的材料来更是包括血清、网膜组织、卵巢组织、外周血 T 淋巴细胞、卵泡液等,多种技术和多种组织缺乏统一的标准,也就缺乏强有力的说服力。另外,他们所研究对象数目比较少(实验对象数目 3 ~ 30 个),目前还缺乏大规模的研究数据。总体上蛋白质组学在 PCOS 中的研究还处在起步阶段,但随着生物信息学等相关技术的进步,蛋白质组学及相关技术将在 PCOS 中有更多的、更深入的应用。相信 Atiomo 等^[10]关于建立 PCOS 专用蛋白质组学生物信息库的设想也会实现。

参考文献

- Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules[J]. Rapid Commun Mass Spec-

- trom, 1993, 7: 576 - 580
- Jr GW, Cazares LH, Leung SM, *et al.* Protein chip surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 1999, 2 (5/6): 264 - 276
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt B A, *et al.* Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. Lancet, 2002, 359 (9306): 572 - 577
- Tatyana A, Zhuk Rohoz J, Ma L, *et al.* Protein profiles in colon cancer by SELDI - TOF mass spectrometry[J]. Proc AACR, 2002, 43(7): 37 - 43
- Roy A, Johanson Alan B, Cantor Robert A, *et al.* Tockman. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre - malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry[J]. Lung Cancer, 2003, 40 (3): 267 - 279
- Wang L, Zheng W, Ding W Y, *et al.* Identification biomarkers of eutopic endometrium in endometriosis using artificial networks and protein fingerprinting[J]. Fertil Steril, 2010, 93(7): 2460 - 2462
- Dunaif A, Thomas A. Current concepts in the polycystic ovary syndrome[J]. Ann Rev Med, 2001, 52(1): 401 - 419
- Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, *et al.* Leptin and leptin binding activity in the preovulatory follicle of polycystic ovary syndrome patients[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2000, 60(8): 649 - 655
- Welt CK, Taylor AE, Fox J, *et al.* Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(10): 5582 - 5587
- Ma X, Fan L, Meng Y, *et al.* Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(8): 527 - 535
- Zhao SY, Qiao J, Li MZ, *et al.* Discovery of distinct protein profiles for polycystic ovary syndrome with and without insulin resistance by surface - enhanced laser adsorption/ionization time of flight mass spectrometry[J]. Fertil Steril, 2007, 88(1): 145 - 151
- Borro M, Gentile G, Stigliano A, *et al.* Proteomic analysis of peripheral T lymphocytes, suitable circulating biosensors of strictly related diseases[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 150(3): 494 - 501
- Choi, BC, Kim YS, Kim MS, *et al.* Identification of overexpressed proteins by proteomic analysis using human follicular fluids derived from polycystic ovary syndrome (PCOS) patients[J]. Fertil Steril, 2007, 88(S1): S180
- Corton M, Botella - Carretero JI, Lopez JA, *et al.* Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two - dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Hum Reprod, 2008, 23(3): 651 - 661

(收稿:2011 - 05 - 03)

(修回:2011 - 05 - 17)