应用 SELDI - TOF - MS 筛选多囊卵巢综合征卵泡液中差异蛋白的研究

程 静 卢晓声 张慧娜 池海虹 吕杰强

摘 要 目的 探讨多囊卵巢综合征(PCOS)患者与正常排卵妇女卵泡液中差异蛋白质的表达,建立 PCOS 的卵泡液诊断模型。**方法** 采用表面增强激光解吸 - 电离 - 飞行时间质谱(SELDI - TOF - MS)技术检测 24 例 PCOS 患者的卵泡液和 20 例排卵正常的对照患者卵泡液中的蛋白质,采用支持向量机方法建立 PCOS 的诊断模型,评估诊断模型的预测效能;采用卡方检验检验 PCOS 的卵泡液模型间特异性和敏感度的不同。**结果** PCOS 患者与排卵正常妇女的卵泡液中共检测到 89 个差异的蛋白质,选取前 10 个统计学意义的蛋白质峰($P<0.05$)合并建立诊断模型,获得 5 个差异的蛋白质,其中 2033 和 5828 质荷比(m/z)两个蛋白质峰在 PCOS 组卵泡液中的表达低于对照组($P<0.05$),其余 3 个蛋白质峰 2873、6452、8137m/z 在 PCOS 组卵泡液中呈现高表达($P<0.05$);5 个卵泡液差异蛋白质峰组合所构建的诊断模型的特异性为 99%,敏感度为 97 %。**结论** PCOS 患者的卵泡液与正常排卵妇女卵泡液中存在差异表达的蛋白质,PCOS 患者卵泡液中表达的蛋白质的变化可能与 PCOS 患者的卵泡内卵子发育异常和排卵异常有关。

关键词 表面增强激光解吸 - 电离 - 飞行时间质谱 多囊卵巢综合征 蛋白质 卵泡液

中图分类号 R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.026

Detection of Discrepant Proteins in Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome and Normal Women Using SELDI - TOF - MS. *Cheng Jing, Lu Xiaosheng, Zhang Huina, et al. Reproductive Health Center, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China*

Abstract Objective To detect discrepant specific proteins in follicular fluid from women with and without polycystic ovary syndrome (PCOS) and build diagnostic models. **Methods** Follicular fluid from women with PCOS ($n=24$) and women with normal ovulation as control ($n=20$) were evaluated, with surface - enhanced laser desorption/ionization time - of - flight mass spectrometry (SELDI - TOF - MS) technology. Once biomarkers founded, the diagnostic model was studied and validated by leave - one cross validation. Sensitivity and specificity of different PCOS diagnositic models were evaluated by χ^2 test. **Results** A total of 89 qualified protein peaks were detected in follicular fluid from women with and without PCOS and 10 of them had a significant difference ($P<0.05$). Combined the first 10 protein peaks to set up the diagnositic models, we found five potential biomarkers with m/z of 2033, 5828, 2873, 6452, 8137 with a specificity of 99% and a sensitivity of 97%. **Conclusion** There are differentially expressed proteins in follicular fluid from women with or without PCOS, which may be affect the development of ovum and anovulation of PCOS women.

Key words SELDI - TOF - MS; Polycystic ovary syndrome; Protein; Follicular fluid

多囊卵巢综合征(PCOS),是一种生育年龄的妇女常见的内分泌疾患,典型表现是月经稀发或闭经和高雄激素血症,是育龄妇女排卵障碍性不孕的主要原因之一。近年来的促排卵治疗和辅助生育技术的蓬勃开展,尽管解决了部分 PCOS 妇女的排卵和生育问题,但在体外受精 - 胚胎移植(IVF - ET)过程中,PCOS 患者有较高的获卵率,但卵子的质量却十分低下[1,2]。已有研究表明,卵巢局部的因素直接影响卵泡内颗粒细胞 - 卵丘的相互作用,并最终影响卵子的质量及发育的潜能,因此积极探索卵子发育的局部环境因素——卵泡液已成为深入研究 PCOS 的一个新热点。

本项研究主要采用表面增强激光解离飞行时间质谱技术(SELDI - TOF - MS)结合生物信息学手段对 PCOS 患者的卵泡液与正常排卵妇女的卵泡液进行比较,筛选出差异表达蛋白并构建诊断模型;为探索 PCOS 妇女卵巢局部因素对卵子发育的影响和进一步寻找新的治疗靶点提供新思路。

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20110036)
作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院生殖中心
通讯作者:吕杰强,电子信箱:Jieqianglu@126.com

对象与方法

1. 一般资料：2011 年 1 月 ~ 2012 年 12 月在温州医科大学附属第二医院生殖中心行 IVF－ET 治疗的 PCOS 患者 24 例。患者均符合 2003 年鹿特丹 PCOS 的诊断标准：排除其他高雄激素病因、先天性肾上腺皮质增生、库欣综合征、分泌雄激素的肿瘤，符合以下条件：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卵巢多囊改变；这 3 项中符合 2 项，则可确诊为 PCOS。所有 PCOS 患者进入研究前 3 个月没有使用过任何激素药物治疗，并排除其他内分泌疾病，患者经术前检查无禁忌，患者年龄 23 ~ 35 岁，不孕年限为 2 ~ 9 年，男方精液常规分析显示正常。对照组为排卵正常的因男方因素在本中心行 IVF－ET 治疗同年龄阶段的不孕妇女。

2. 治疗方案：本中心对于 PCOS 患者均采用避孕药后的长方案，即所有 PCOS 患者于月经或撤退性出血的第 3 天起每日口服妈富隆 1 颗，连用 14 天后，达菲林 0.75mg 肌内注射，14 天后果那芬 150IU 每日皮下注射，促排卵期间根据卵泡直径和生长速度调整剂量，同时密切注意患者的血清激素值和卵泡直径，预防卵巢过度刺激综合征的发生。对照组均于排卵后 7 天给予达菲林 0.75mg 肌内注射，再 14 天后果那芬 150IU，每日两次，皮下注射，同样根据卵泡直径和生长速度调整剂量，同时密切注意患者的血清激素值和卵泡直径。当双侧卵巢最大卵泡平均直径 ＞18mm 超过 1 个时，＞17mm 2 个或 ＞16mm 3 个时，当晚 8:00 时肌内注射 HCG 10000U，36h 后在超声指导下从阴道取卵。

3. 标本采集：所有患者卵泡液均采自最大的成熟卵泡，分离卵丘后，卵泡液置于离心管中 3000r/min 离心 10min 后收集上清液 2ml，迅速放入 －80℃ 冰箱冷冻保存，留待统一测定。

4. SELDI－TOF－MS：该技术核心为蛋白质芯片阅读机，机型为 PBS－IIc 型，蛋白质芯片采用 H4 芯片（Cipher－gen，American）。所有的卵泡液标本冰浴溶解后低温离心 3000r/min 5min，加入 90μl 浓度为 5g/L CHAPS 液中，振荡混匀 10min，然后将上述稀释后的样本加入预先已加入 Cibacron Blue 3GA 的 96 孔板中，然后在 4℃ 摇床上摇 60min。上述样本在 1000r/min，离心 5min 后，取 50μl 上清液，进一步用 150μl 的浓度为 20mmol/L HEPES（pH 7.4）稀释，最后加入有 H4 芯片的生物向量机的孔中。封闭生物向量机各孔，4℃ 平板摇床摇 60min。弃去多余的上清液，取出 H4 芯片，自然晾干，加入 CHCA 固定后，应用蛋白质生物应用系统结合质谱阅读器，检测芯片上的蛋白质。

5. 生物信息学方法：Biomarker Wizard 软件过滤掉 2000m/z 以下的峰。所有样本中质荷比（m/z）的差异小于 0.3% 的峰被聚为同一类，并且过滤除去聚类后只出现在 ＜1/10 的样本中的峰。将上述所得到的峰在所有的样本中的强度再次做均一化处理。利用支持向量机方法建立 PCOS 卵泡液诊断模型，同时采用交叉验证方法评估模型判别效果。典型向量的筛选采用统计过滤与模型依赖性结合的方法确认。对所有的卵泡液的质荷比峰做秩和检验，选出统计学差异最大的 10 个峰来进行下一步分析。最后将所得的 10 个峰的任意两两组合进行支持向量机模型的输入和验证，并用留一法评估模型的预测的特异性和敏感度，最终选出 Youden 指数最高的组合作为模型的候选标志物。

6. 统计学方法：利用 SPSS 13.0 统计软件包，卡方检验测定模型间特异性和敏感度差异，PCOS 患者和正常排卵妇女的各项临床指标间的差异采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 基本资料：PCOS 组和对照组间的年龄、不孕年限、月经第 3 天的促卵泡生成素（FSH）、泌乳素（PRL）、雌二醇（E_2）、空腹血糖（FGB）等各项基本指标差异无统计学意义（$P>0.05$）；而 PCOS 组的促黄体生成素（LH）、雄激素（T）和空腹胰岛素（FINS）及体重指数（BMI）等指标与对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。胰岛素抵抗的指标采用 HOMA IR 评分，HOMA IR = FINS（mIU/L）× FBS（mmol/L）/22.5，按文献 HOMA IR 的临界点为 ≥2 作为是否存在胰岛素抵抗标准。PCOS 组的 HOMA IR 评分显著高于对照组（$P<0.05$），具体见表 1。

表 1　PCOS 组与对照组各项基本指标

指标	对照组	PCOS 组	P
年龄	28.09 ± 2.54	29.69 ± 3.67	0.43
不孕年限（年）	3.90 ± 2.56	3.73 ± 1.69	0.3
BMI（kg/m^2）	21.94 ± 1.28	24.87 ± 1.45	＜0.01
FSH（IU/L）	7.84 ± 1.56	8.67 ± 2.29	0.28
LH（IU/L）	7.73 ± 2.81	11.29 ± 2.02	＜0.01
T（ng/ml）	0.45 ± 0.26	0.65 ± 0.11	＜0.01
E_2（pg/ml）	53.96 ± 30.94	49.81 ± 18.52	0.22
PRL（ng/ml）	18.11 ± 1.04	19.93 ± 4.15	0.08
FBS（mmol/L）	4.64 ± 0.34	5.21 ± 0.32	0.74
FINS（mIU/L）	6.45 ± 2.10	13.62 ± 4.01	＜0.01
HOMAIR 评分	1.93 ± 0.75	2.47 ± 1.04	＜0.01

BMI = 体重（kg）/身高^2（m^2）

2. PCOS 患者与正常对照组卵泡液中差异的蛋白质：PCOS 患者与排卵正常妇女的卵泡液中共检测到 89 个差异的蛋白质峰，峰值为 2000 ~ 20000m/z。通过 *Wilconxon* 秩和检验得到两组间有统计学意义最大的差异蛋白质峰 10 个（$P<0.05$），10 个峰的任意组合用于支持向量机模型的输入，经过留一法交叉验证，判别分析软件筛选出其中 5 个蛋白质峰，其中 2033m/z 和 5828m/z 两个蛋白质峰在 PCOS 组中的表达低于对照组（$P<0.05$），其余 3 个蛋白质峰

2873、6452、8137m/z 在 PCOS 组呈现高表达（$P < 0.05$）；由此 5 个卵泡液差异蛋白质峰组合所构建的诊断模型的特异性为 99%，敏感度为 97 %，具体见表 2、图 1。

表 2　PCOS 组/对照组有统计学差异的 5 个蛋白质峰（$\bar{x} \pm s$）

质荷比（m/z）	对照组	PCOS 组	P
2033	1119.27 ± 395.18	549.94 ± 324.14	0.000
2873	241.62 ± 235.31	1356.32 ± 1085.44	0.000
5828	565.65 ± 177.82	326.15 ± 91.09	0.000
6452	631.90 ± 520.96	1565.72 ± 655.90	0.000
8137	587.67 ± 1036.13	2281.40 ± 1643.31	0.000

讨　　论

PCOS 以高雄激素血症、慢性无排卵和代谢紊乱

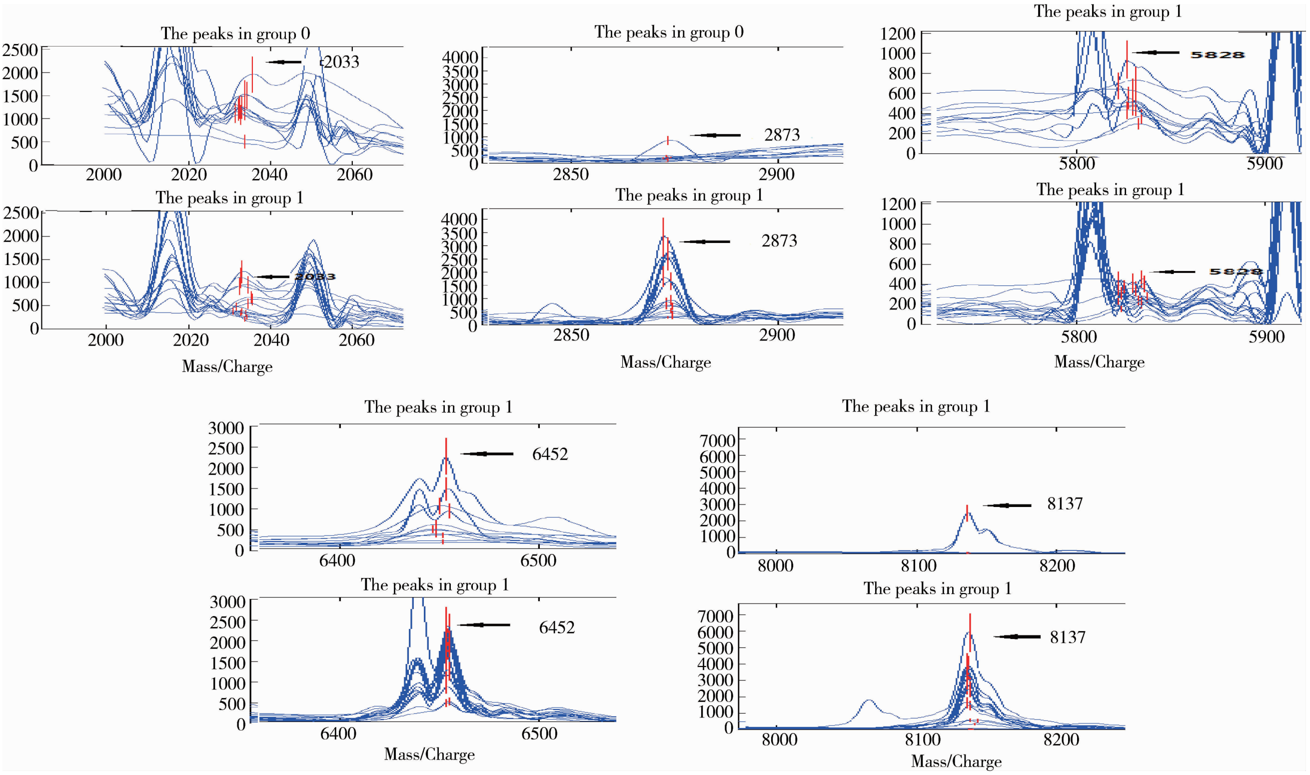

图 1　PCOS 组/对照组卵泡液中差异表达的蛋白质峰

2873、6452、8137m/z 蛋白质峰在 PCOS 患者中高表达，2033、5828m/z 在 PCOS 患者卵泡液中低表达；Group 0. 对照组；Group 1. PCOS 组

为典型特征，严重影响女性的生育功能。近年来的研究发现，PCOS 患者易患 2 型糖尿病、心血管疾病（包括冠心病、动脉粥样硬化、心肌梗死和高血压等），子宫内膜癌等，对妇女的健康造成极大的威胁[3,4]。研究发现，在 PCOS 患者中存在着的影响卵泡发育的自分泌和旁分泌的异常，直接影响了 PCOS 患者的 IVF－ET 的成功率[5]。一些治疗 PCOS 的药物也被确认为治疗效果与其针对卵巢局部治疗作用有关[6~8]。然而由于法律、伦理等因素的限制，直接针对 PCOS 患者卵巢的研究较少，但卵泡液的微环境可以间接反映卵母细胞和颗粒细胞的状态。

表面增强激光解吸－电离－飞行时间质谱（SELDI－TOF－MS）结合了芯片技术和质谱技术，是一种高通量、高效、敏感的检测手段，已被广泛应用到各种肿瘤及子宫内膜异位症及 PCOS 的研究中。然而以往的应用 SELDI－TOF－MS 技术对 PCOS 的研究仅限于 PCOS 的血清蛋白质的研究，本研究首次将此技术应用到 PCOS 的卵泡液的研究中。本研究发现了 PCOS 患者与正常排卵妇女的 5 个蛋白质峰，2033 和 5828m/z 两个蛋白质峰在 PCOS 组中的低表达，其他 3 个蛋白质峰 2873、6452、8137m/z 在 PCOS 组呈现高表达；并且由此 5 个卵泡液差异蛋白质峰组合所构建的诊断模型的特异性为 99%，敏感度为 97%。由此有理由推测 PCOS 卵巢局部确实存在某些蛋白质表达的异常，直接影响了卵母细胞的发育，并进而影响到卵子质量和 IVF－ET 过程中的成功率的下降。这一结果也可能是临床上 PCOS 患者在 IVF－ET 过程中的高获卵率，低妊娠率的主要原因。对这些蛋白峰进行分离、纯化和解码将是下一步的研究工作，以进一步明确这些差异蛋白的来源、功能和定

位。

总之,本研究结果对于 PCOS 患者而言,意味着并不是血清中的内分泌各项指标调节到正常值范围就能够在 IVF - ET 过程中获得与正常排卵妇女一样的卵子,积极改善全身的内分泌失调,结合针对卵巢局部的旁分泌或内分泌异常的治疗也应该成为治疗 PCOS 的策略之一。

参考文献

1 Zhao Y, Du B, Jiang X, *et al*. Effects of combining lowdose aspirin with a Chinese patent medicine on follicular blood flow and pregnancy outcome[J]. Mol Med Rep, 2014 ,10(5):2372 -2376

2 Qiao J, Feng HL. Extra - and intra - ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence[J]. Hum Reprod Update,2011,17(1):17 -33

3 Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, *et al*. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis[J]. Nat Rev Endocrinol,2011, 7(4):219 -231

4 de Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, *et al*. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta - analysis[J]. Hum Reprod Update,2011, 17(4):495 -500

5 Niu Z, Lin N, Gu R, *et al*. Associations between insulin resistance, free fatty acids, and oocyte quality in polycystic ovary syndrome during in vitro fertilization[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014 ,99(11): E2269 - E2276

6 Nestler JE, Jakubowicz DJ. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha acti - vity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome[J]. N Engl J Med,1996, 335(9):617 -623

7 Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells[J]. Fertil Steril,2001,76: 517 -524

8 Tosca L, Solnais P, Ferre′ P, *et al*. Metformin - induced stimulati - on of adenosine 5′ monophosphate - activated protein kinase (PRKA) impairs prog - esterone secretion in rat granulosa cells[J]. Biol Reprod,2006 , 75(3):342 -351

(收稿日期:2015 -03 -17)

(修回日期:2015 -04 -17)

三维超声心动图评估心肌梗死后左心室功能及室壁运动同步性的变化

于志雷　苏丽华　钱芬芬　张宇辉

摘　要　目的　探讨应用实时三维超声心动图(RT - 3DE),评价急性心肌梗死(AMI)患者左心室收缩舒张功能及收缩同步性的价值。**方法**　选择 2013 年 1 月 ~2014 年 5 月于笔者医院心内科住院治疗急性前壁心肌梗死的患者 51 例(A 组),健康志愿者 25 例(B 组),均行常规二维及 RT - 3DE 检查,通过 Qlab 6.0 定量分析软件分析整体及节段容积 - 时间曲线,获取左心室整体和节段舒张末期容积、整体和节段收缩末期容积、左心室整体 - 节段及节段 - 整体的射血分数、左心室最大射血速率和充盈速率以及 Tmsv16 - SD。**结果**　与健康志愿者相比,AMI 患者左心室整体 EDV、ESV、Tmsv16 - SD% 水平均增高,LVEF、PER/EDV、PFR/EDV 水平均下降(*P* 均 <0.05),梗死节段及邻近梗死区域的大部分 rEDV、rESV 增高,rEF、rgEF 均下降(*P* <0.05)。**结论**　RT - 3DE 能够评价 AMI 患者左心室舒缩功能及室壁运动同步性。

关键词　实时三维超声心动图　心肌梗死　左心室功能　室壁同步性

中图分类号　R540.4　**文献标识码**　A　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.027

Assessment of Left Ventricular Function and Wall Motion Synchronization Changes after Myocardial Infarction by Three - dimensional Echocardiography. *Yu Zhilei, Su Lihua, Qian Fenfen, et al. Department of Ultrasound, Shengze Hospital, Jiangsu 215228, China*

Abstract　Objective　To investigate the assessment value of left ventricular systolic and diastolic function and wall motion synchronization in patients with AMI by RT - 3DE. **Methods**　Patients with acute anterior myocardial infarction ($n = 51$) who accepted treatments in our hospital between January 2013 and May 2014, and healthy volunteers ($n = 25$) were recruited. All of them were given conventional two - dimensional and RT - 3DE examination. Overall and segmental volume - time curves were analyzed by Qlab 6.0 Quantita-

基金项目:上海市浦东新区卫生和计划委员会科技项目(面上项目)(PW2013A -4)

作者单位:215228　苏州,江苏盛泽医院超声科(于志雷、苏丽华),儿科(钱芬芬);200120　上海市东方医院超声科(张宇辉)

通讯作者:于志雷,电子信箱:yuzhilei003@126.com