

蛋白质组学在多囊卵巢综合征中的应用进展

寇丽辉 侯丽辉 牛静云 郝松莉 孟小钰

摘要 多囊卵巢综合征(PCOS)是女性常见的生殖内分泌疾病,严重影响女性的身心健康和生活质量,越来越受到广泛关注。目前蛋白质组学在 PCOS 中的应用主要集中在探索 PCOS 的发病机制,筛选诊断标志物,预防远期并发症等方面,研究选用的样本主要是体液、组织和细胞。虽然现在的研究取得了一些成果,但仍存在一些问题,特别是蛋白质组学技术多囊卵巢综合征中医药研究中的应用相对较少。

关键词 多囊卵巢综合征 蛋白质组学 研究进展 综述

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.044

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是女性常见一种的生殖内分泌及代谢紊乱性疾病,大样本的流行病学调查显示我国育龄期女性 PCOS 的发生率为 5.6%^[1]。其临床表现呈高度异质性,主要表现为月经失调、不孕、肥胖、多毛、痤疮、黑棘皮等,远期有发生糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、子宫内膜癌的风险,其发病与遗传因素、环境因素、生活方式等有关。

随着人类基因组学的发展,蛋白质作为机体生理功能的实际执行者也越来越多受到关注。蛋白质组学通过分析细胞内蛋白质的功能活动及相互作用,为探索疾病的发病机制及诊疗方法提供新的技术手段,其研究步骤包括前期的样本提取纯化,中期的蛋白分离鉴定,以及后期的数据处理分析。自 1994 年第一次提出蛋白质组学的概念以来,蛋白质组学已经广泛应用于各个学科中,如消化系统、泌尿系统、心血管疾病、肿瘤等,在妇科疾病中也有应用,如卵巢癌、子宫内膜癌、流产等。本文综述了蛋白质组学在多囊卵巢综合征中的应用。

基金项目:国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项基金资助项目(JDZX2012039);国家中医药行业科研专项基金(201207001);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2014-9-10);黑龙江省中医药科研项目(ZHY16-029);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项基金(JDZX2015059)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学(寇丽辉、牛静云);黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科(侯丽辉、郝松莉、孟小钰)

通讯作者:侯丽辉,教授,博士生导师,电子信箱:houlhui2007@sina.com

一、蛋白质组学在多囊卵巢综合征中的应用

目前蛋白质组学在 PCOS 中的应用主要集中在探索发病机制、寻找生物标志物和药物治疗靶点、预防远期并发症等方面。研究时所选用的样本主要有血清、血浆、卵巢组织、卵泡液、颗粒细胞、淋巴细胞、网膜脂肪组织等,常用的技术有双向凝胶电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)和差异荧光凝胶电泳(differential in-gel electrophoresis, DIGE)等蛋白质分离技术,质谱分析(mass spectrometry, MS)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)和电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)等蛋白质鉴定技术,同位素标记相对定量及绝对定量(iTRAQ)技术以及生物信息学分析^[2,3]。

1. 多囊卵巢综合征发病机制的研究: Ambekar 等^[4]应用 iTRAQ 联合 LC-MS/MS 技术对 26 例 PCOS 患者和正常女性的卵泡液中蛋白质的差异表达进行了研究,结果发现有 186 个差异表达的蛋白质,其中 99 个蛋白质在 PCOS 患者的卵泡液中表达上调,87 个蛋白质表达下调,这些蛋白质涉及纤维蛋白溶解、血管形成、脂质转运、代谢等过程,这些过程在卵泡的生长发育和卵巢类固醇生成中起着重要作用。Li 等^[5]研究了 10 例 PCOS 患者及 10 例正常人的卵巢组织蛋白质的表达,结果共鉴定出 18 个差异蛋白,这些差异蛋白与血栓形成、免疫反应、胰岛素抵抗、低度慢性炎症有关。Ma 等^[6]采用 2-DE 技术和质谱分析也以卵巢为样本进行蛋白质组学研究,得出相似的结果。秦芬等^[7]采用双向凝胶电泳结合质谱分析对 PCOS 正常女性的血清蛋白进行了研究,鉴定出 14

个差异表达蛋白,这些蛋白主要参与了脂代谢,细胞凋亡等。Insenser 等^[8]采用 2D-DIGE 联合 MALDI-MS/MS 技术对 12 例 PCOS 患者和 12 例无高雄激素血症的女性的血浆进行蛋白质组学研究,鉴定出的差异蛋白与炎症反应和铁代谢有关,可作用于胰岛素信号通路,进而引起胰岛素抵抗,从而有助于阐明 PCOS 的发病机制。朱晓鸿等^[9]运用蛋白质芯片结合生物信息学技术检测 PCOS 伴高雄激素血症(HA)患者的血清差异蛋白,结果发现 PCOS 患者与正常对照组之间血清蛋白表达存在差异,PCOS 患者在 HA 状态与非 HA 状态下血清蛋白也存在差异表达,这些差异蛋白可能与 PCOS 及 HA 的发生与发展有关。通过蛋白质组学技术筛选出的这些差异蛋白涉及纤溶系统、免疫系统、血栓形成、细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、胰岛素抵抗、脂肪代谢等,说明 PCOS 的发病机制可能与胰岛素抵抗、免疫反应、脂肪代谢、纤溶系统、血栓形成等有关。

2. 多囊卵巢综合征生物学标志物的研究:Li 等^[5]采用 2-DE 技术和质谱分析对 10 例 PCOS 患者及 10 例正常人的卵巢样本进行蛋白质组学研究,结果在两组卵巢中共发现了 18 种差异表达的蛋白,其中 13 个蛋白质在 PCOS 患者的卵巢中表达上调,另外 5 个蛋白质表达下调,并采用蛋白印记(Western blot, WB)法和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)的方法进行验证,结果显示孕激素膜受体 1、视黄醇结合蛋白 1、热休克蛋白 90B1、钙调蛋白 1、膜联蛋白 A6 和原肌球蛋白 2 在 PCOS 患者的卵巢中显著升高。杭晨等^[10]采用抗体蛋白质芯片检测 PCOS 患者与正常女性的血清,结果发现 7 种生长因子和 6 种炎症反应因子、白细胞介素 1 受体 II(IL-1R II)、胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP-1)、IGFBP-4、血管内皮生长因子受体 2、细胞间黏附分子 1 和泌乳素等 23 种因子在 PCOS 组升高,生长调节癌基因、IL-8 和 Siglec-5 这 3 种因子在 PCOS 组降低,并选择血小板源性生长因子 BB 及脂联素 Acrp30 进行 ELISA 验证,结果显示差异有统计学意义。Choi 等^[11]采用 2-DE 联合 LC-MS/MS 技术对 11 例 PCOS 患者和 14 例正常女性的卵巢颗粒细胞进行蛋白质组学研究,结果共鉴定出 20 个差异蛋白,并通过免疫印迹分析,发现载脂蛋白 AI(apolipoprotein, ApoA-I)可作为 PCOS 患者卵巢颗粒细胞的生物标志物。国内的研究也发现,PCOS 患者与正常女性血清中的 ApoA-I 和热休克蛋白(heat shock protein,

HSP)70 表达存在差异,有可能是 PCOS 的生物标志物^[7]。这些蛋白质的发现不仅提供了诊断 PCOS 的潜在生物学标志物,而且有助于我们认识 PCOS 的分子机制及寻找药物的治疗靶点。

3. 多囊卵巢综合征远期并发症的研究:研究显示 PCOS 患者远期有发生 2 型糖尿病(T2DM)、代谢综合征、心血管疾病、子宫内膜癌等并发症的风险,而蛋白质组学的研究可用于阐明 PCOS 与这些并发症的关系,并且可以预测并发症的发生风险。Galazis 等^[12]的研究结果显示在 PCOS 和子宫内膜癌患者的不同组织中转凝蛋白、丙酮酸激酶 M1/M2、巨噬细胞限制酶、谷胱甘肽 S-硫转移酶 P、亮氨酸氨基肽酶、肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶、亲环素 A、补体 C4A 和过氧化锰歧化酶等 9 种生物学标志物表达相似,或上调,或下调。Galazis 等^[13]发现与正常人相比,PCOS 和 T2DM 患者一共有 8 种相同的差异蛋白,包括过氧化物氧化还原酶 2、丙酮酸激酶 M1/M2、结合珠蛋白、ApoA-I、膜联蛋白 A2、白蛋白、A1BG、钙网蛋白、纤维蛋白原、超氧化物歧化酶、波形蛋白、苹果酸脱氢酶和核纤层蛋白 B2 在内的 6 种生物学标志物表达上调^[14]。这些蛋白质组学的研究结果不仅从分子水平解释了 PCOS 与糖尿病、子宫内膜癌、卵巢癌等疾病之间的联系,也为预防并发症的发生提供了新的思路。

4. 多囊卵巢综合征产科并发症的研究:PCOS 患者妊娠后发生妊娠期糖尿病、妊娠期高血压、早产、子痫前期等产科并发症的风险会增高,目前蛋白质组学也应用到 PCOS 的产科并发症的研究中^[15]。Khan 等^[16]对 PCOS 和子痫前期蛋白质组学的研究结果进行分析,结果发现与正常人相比,PCOS 患者的血清、卵泡液、卵巢和网膜脂肪组织中以及子痫前期患者的血清、血浆和胎盘中,转铁蛋白、纤维蛋白原、激肽原、膜联蛋白 2 和过氧化物氧化还原酶 2 等蛋白的表达有差异。Nicolas 等^[17]的系统评价结果显示 PCOS 和早产女性有 6 种类似的差异蛋白,包括丙酮酸激酶 M1/M2、波形蛋白、果糖-二磷酸醛缩酶 A、HSP β -1、过氧化物氧化还原酶-1 以及转铁蛋白。

二、蛋白质组学在多囊卵巢综合征中医药研究中的应用

蛋白质组学从分子生物学角度研究机体在蛋白质水平上的定量和相互作用,其核心思想与多靶点的研究方法,同中医的“整体观”和“辨证论治”是相一

致的^[18]。目前蛋白质组学在中医药研究中的应用的集中于中医证候和中药药理研究。已报道的如中医气虚证、血虚证、阴虚证、阳虚证的研究以及肝病、糖尿病、冠心病等的辨证及中医药治疗中^[19~22]。

而蛋白质组学在多囊卵巢综合征中医药研究中的应用相对较少,主要多集中于研究中药的疗效机制。张丽华等^[23]采用基于双向电泳的蛋白质组学技术分析 PCOS 大鼠卵巢的差异蛋白表达谱,成功鉴定 8 个蛋白点,并成功分析出丹梔逍遥散可通过增加 β 抑制蛋白 2(β -arrestin 2, β -arr2) 的表达,调控 β -arr2 介导的信号通路防治 PCOS,并且后续用免疫组化、蛋白免疫印迹和荧光定量 PCR 验证了结果的准确性。孔冉^[24]通过化较分析益肾健脾养血通利方治疗前后患者尿蛋白质表达谱的差异性,发现差异蛋白主要为行使功能的分泌蛋白,以外泌体的形式定位于细胞外,主要涉及 7 条相关通路,其中以 PI_3K-Akt 信号通路最为突出,且此通路和膜胰岛素抵抗有关,是 PCOS 产生胰岛素抵抗的主要机制,因此从尿蛋白质代谢水平上对益肾健脾养血通利方改善 PCOS 的疗效机制进行了阐述。

综上所述,目前蛋白质组学在 PCOS 中的应用主要集中在探索 PCOS 的发病机制,筛选诊断标志物,预防远期并发症等方面,研究选用的样本主要是体液、组织和细胞。虽然现在的研究取得了一些成果,但仍存在一些问题,如样本量较小、操作过程复杂,数据的重复性差,对某些低丰度蛋白识别率低等,而且蛋白质组学技术多囊卵巢综合征中医药研究中的应用相对较少,应更多地利用蛋白质组学以及与其他组学技术相结合,以便更好地利用现代技术阐明 PCOS 中医证候的实质,同时为寻找中医药治疗 PCOS 的作用靶点提供新的途径。

参考文献

- Li R, Zhang Q, Yang D, *et al.* Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study[J]. *Human Reprod*, 2013, 28(9): 2562-2569
- Li L, Garden RW, Sweedler JV. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling[J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(4): 151-160
- Scalf M, Westphall MS, Smith LM. Charge reduction electrospray mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(1): 52-60
- Ambekar AS, Kelkar DS, Pinto SM, *et al.* Proteomics of follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome suggests molecular defects in follicular development[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(2): 744-753
- Li L, Zhang J, Deng Q, *et al.* Proteomic profiling for identification of novel biomarkers differentially expressed in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients[J]. *PLoS One*, 2016, 13(8): 527-535
- 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
- 秦芬, 丘彦, 杨曦, 等. 多囊卵巢综合征差异蛋白质组分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(1): 22-24
- Insenser M, Martínez-García MA, Montes R, *et al.* Proteomic analysis of plasma in the polycystic ovary syndrome identifies novel markers involved in iron metabolism, acute-phase response, and inflammation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(8): 3863-3870
- 朱晓鸿, 杨国珍. 基于蛋白质组学技术的 PCOS 伴 HA 患者血清差异蛋白质检测及意义[J]. *广东医学*, 2016, 37(24): 3718-3721
- 杭晨, 杨炜敏, 何善阳, 等. 多囊卵巢综合征患者血清中蛋白因子的变化及其临床意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(12): 2251-2255
- Choi DH, Lee WS, Won M, *et al.* The apolipoprotein A-1 level is downregulated in the granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome and affects steroidogenesis[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4329-4336
- Galazis N, Pang YL, Glazi M, *et al.* Proteomic biomarkers of endometrial cancer risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and biomarker database integration[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29(7): 638-644
- Galazis N, Afxentiou T, Xenophontos M. Proteomic biomarkers of type 2 diabetes mellitus risk in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(2): 33-43
- Galazis N, Olaleye O, Haoula Z, *et al.* Proteomic biomarkers for ovarian cancer risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and biomarker database integration[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6): 1590-1601
- Qin JZ, Pang LH, Li MJ, *et al.* Obstetric complications in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013, 11: 56
- Khan GH, Galazis N, Docheva N, *et al.* Overlap of proteomics biomarkers between women with pre-eclampsia and PCOS: a systematic review and biomarker database integration[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(1): 133-148
- Galazis N, Docheva N, Nicolaides KH, *et al.* Proteomic biomarkers of preterm birth risk in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and biomarker database integration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53801
- Yan SK, Liu RH, Jin HZ, *et al.* "Omics" in pharmaco-utical research: overview, applications, challenges, and future perspectives[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(1): 3-21
- 雒岁芳, 宋小莉, 庞小刚, 等. 蛋白质组学应用于中医虚证研究进展[J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(1): 91-93
- 王学良, 卢秉久. 蛋白质组学在肝病中医辨证及西医诊治中研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(6): 140-143

(转第 164 页)

体,与微小癌组基本一致。而 ΔP_2 、 ΔT_2 代表超声造影时两组病灶内部不同区域峰值增强程度与开始增强时间之间的差异,两组均值对比, ΔP_2 的差异有统计学意义($P < 0.05$,图3、图4),表明乳头状癌组与微小癌组病灶内部超声造影峰值增强程度存在差异,出现这种差异的原因在于乳头状癌肿瘤内血管狭窄或由于内部微血栓闭塞、血管低效率和不完全开放状态,复杂的胶原变性与存在动静脉瘘,都造成了非均质低增强超声造影表现,而微小癌内部结构均匀一致但较为缺乏肿瘤微血管,故表现为均质低增强^[3,18]。本组资料统计两组病灶峰值增强程度(Peak)、开始增强时间(RT)均值之间比较差异无统计学意义,主要因为数据标化问题,每个患者基础代谢不同,故不适宜用Peak、RT两参数作为超声造影参数指标。

虽然乳头状癌与微小癌在超声造影表现尚存在一些差异,但是,在超声造影中其表现与良性结节均存在显著的差异,如低增强、早期廓清等均是甲状腺癌的特异性造影表现,通过这些表现可以增加超声医师对于甲状腺恶性肿瘤的诊断信心。这也显示出超声造影对于甲状腺良恶性结节具备良好的诊断性能;通过超声造影可以提高良恶性结节的诊断准确性,为下一步治疗方案提供更好的选择。

综上所述,甲状腺良恶性结节超声造影表现存在显著差异,表明超声造影可以做为甲状腺结节良、恶性评估的有效影像学手段,但因不同大小的甲状腺乳头状癌超声造影表现有差异,需要根据结节大小分别探讨其超声造影表现。

参考文献

- 张波,姜玉新,戴晴,等. 甲状腺结节灰阶和彩色多普勒超声特征的 Logistic 回归分析[J]. 中华超声影像学杂志,2008,17(12):1061-1065
- Peter J, Chow LC, Jeffrey RB, *et al.* Pictorial essay: the sonographic features of papillary thyroid carcinomas[J]. *Ultrasound Q*, 2005, 21(1):39-45
- Zhang B, Jiang YX, Liu JB, *et al.* Utility of Contrast-enhanced ultrasound for evaluation of thyroid nodules[J]. *Thyroid*, 2010, 20(1):51-57
- 张渊,江泉,赵玉华,等. 超声造影增强模式诊断甲状腺单发结节[J]. 中国医学影像技术,2010,26(11):2057-2059
- 陈立斌,蒋天安,王菁,等. 超声造影及定量分析技术鉴别甲状腺实性肿块良恶性的价值[J]. 中华超声影像学杂志,2012,12(21):1035-1039
- 董海平,李萍,宁春平,等. 超声造影定量分析在甲状腺良恶性结节鉴别诊断中的应用价值[J]. 中华医学超声杂志,2013,2(10):110-114
- 王菁,黄道中,赵莹,等. 超声造影增强模式分析对甲状腺实性结节良恶性鉴别诊断的价值[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(5):406-409
- Kist JW, Nell S, Keizer B, *et al.* The role of qualitative elastography in thyroid nodule evaluation: exploring its target populations[J]. *Endocrine*, 2015, 50(2):265-267
- Garino F, Deandrea M, Motta M, *et al.* Diagnostic performance of elastography in cytologically indeterminate thyroid nodules[J]. *Endocrine*, 2014, 49(1):175-183
- Jiang J, Huang L, Zhang H, *et al.* Contrast-enhanced sonography of thyroid nodules. [J]. *J Clin Ultrasound*, 2015, 43(3):153-156
- Jiang J, Shang X, Wang H, *et al.* Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound in thyroid nodules with calcification. [J]. *The Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(3):138-144
- Zhang Y, Zhou P, Tian SM, *et al.* Usefulness of combined use of contrast-enhanced ultrasound and TI-RADS classification for the differentiation of benign from malignant lesions of thyroid nodules. [J]. *Eur Radiol*, 2017, 27(4):1527-1536
- Bartolotta TV, Midiri M, Galia M, *et al.* Qualitative and quantitative evaluation of solitary thyroid nodules with contrast-enhanced ultrasound: initial results[J]. *Eur Radiol*, 2006, 16(10):2234-2241
- Wu Q, Wang Y, Li Y, *et al.* Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound in solid thyroid nodules with and without enhancement. [J]. *Endocrine*, 2016, 53(2):480-488
- 严佳梅,黄品同,游向东,等. 超声造影结合细针穿刺对甲状腺癌的诊断价值[J]. 中华超声影像学杂志,2014,23(3):222-226
- Moon HJ, Kwak JY, Kim MJ, *et al.* Can vascularity at power Doppler US help predict thyroid malignancy? [J]. *Radiology*, 2010, 255(1):260-269
- 王瑜. 甲状腺乳头状癌的病理解析[J]. 中国实用医药杂志, 2013, 8, (14):99-100
- Yuan Z, Quan J, Yunxiao Z, *et al.* Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of solitary thyroid nodules[J]. *Cancer Res Ther*, 2015, 11(1):41-45
- 张丽华,靖林林,黄璜,等. 丹栀逍遥散防治大鼠多囊卵巢综合征的蛋白质组学研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1):1-4
- 孔冉. 益肾健脾养血通利方治疗多囊卵巢综合征的尿蛋白质组学研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017

(收稿日期:2018-01-01)

(修回日期:2018-01-23)

(接第185页)

- 秦田雨,秦灵灵,吴丽丽,等. 蛋白质组学技术在中医药防治糖尿病及并发症研究中的应用进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(5):764-767
- 张哲宇,王东生. 蛋白质组学在冠心病中医药研究中的应用进展[J]. 辽宁中医杂志,2017, 44(8):1782-1784

(收稿日期:2017-10-24)

(修回日期:2017-11-09)