

血清 TMT 标记定量蛋白质组学 对多囊卵巢综合征病因研究

邹颖, 马丹, 穆仪冰, 方超英
湖南省妇幼保健院, 湖南 长沙 410008

摘要: **目的** 通过应用串联质谱标签(tandem mass tag, TMT)联合液相色谱-串联质谱(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术、差异表达蛋白及其相关生物通路对多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者病因研究。**方法** 本研究纳入 20 例 PCOS 患者作为 PCOS 组, 18 例正常女性作为对照组。通过 TMT 联合 LC-MS/MS 检测所有研究对象的空腹血清样本, 对数据进行统计学和生物信息学分析。**结果** 鉴定了 38 个差异表达蛋白质, 其中 21 个蛋白在 PCOS 中表达上调($FC \geq 1.2, P < 0.05$), 17 个在 PCOS 中表达下调($FC \leq 0.83, P < 0.05$)。采用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)和 Reactome 对差异表达蛋白进行富集分析, 分别富集到 18 个和 78 个通路。将两个数据库富集分析结果整合, 均发现补体级联反应的富集通路, 共同涉及的差异表达蛋白为甘露糖结合蛋白(mannose-binding protein, MBL)。**结论** PCOS 患者体内可能存在补体系统的过度激活, 差异蛋白 MBL 可能是其中的关键致病因子。

关键词: 多囊卵巢综合征; 蛋白质组学; 甘露糖结合蛋白; 串联质谱标签

中图分类号: R711.75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2021)11-1311-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.11.008

Study on the etiology of polycystic ovary syndrome using serum tandem mass tag-based quantitative proteomics

ZOU Ying, MA Dan, MU Yi-bing, FANG Chao-ying

Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Changsha, Hunan 410008, China

Author contributions: ZOU Ying and MA Dan contributed equally to this paper

Corresponding author: MU Yi-bing, E-mail: muyibing@126.com

Abstract: **Objective** To study the etiology of patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) by using tandem mass tag (TMT) combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), differentially expressed proteins and associated biological pathways. **Methods** Twenty patients with PCOS were enrolled into this study to serve as the PCOS group, and 18 healthy women were considered as the control group. The statistical and bioinformatics data were analyzed using all fasting serum samples detected by TMT and LC-MS/MS. **Results** Thirty-eight differential expression proteins were identified with 21 up-regulated expression ($FC \geq 1.2, P < 0.05$) and 17 down-regulated expression ($FC \leq 0.83, P < 0.05$) in PCOS. These proteins were enriched using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Reactome to 18 and 78 pathways, respectively. Integrating two databases enrichment analyses found the enrichment pathway of complement cascade reaction, and the differential expression protein common involved in these databases was mannose-binding protein (MBL). **Conclusion** PCOS patients may have overactivation in the complement system in which the differential protein MBL may be a key pathogenic factor.

Keywords: polycystic ovary syndrome; proteomics; mannose-binding protein (MBL); tandem mass tag (TMT)

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是妇科内分泌疾患中一种高发病率、高异质性表现及

基金项目: 长沙市科学技术局科技计划项目(kq1801085); 湖南省自然科学基金-科卫联合项目(2020JJ8056)

作者简介: 邹颖(1976-), 女, 湖南岳阳人, 博士, 副主任医师, 研究方向: 妇科内分泌疾病; 马丹(1990-), 女, 湖南长沙人, 硕士, 医师, 研究方向: 妇科内分泌疾病。邹颖、马丹为本文共同第一作者。

通信作者: 穆仪冰, E-mail: muyibing@126.com。

高风险远期并发症^[1]的疾病。有研究表明, 其在育龄期妇女中的发病率高达 6%~21%^[2]。主要表现为稀发排卵和(或)无排卵、临床和(或)生化表现为高雄激素(hyperandrogenism, HA)、卵巢多囊改变、代谢异常如胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、肥胖、脂代谢异常等, 还存在如心血管疾病、子宫内膜癌前病变及子宫内膜癌等高风险远期并发症^[1]。

PCOS 的诊断标准在全世界范围尚未统一, 其病因和发病机制一直尚未明确。最新的诊断标准有以证

据为基础的 2018 年 PCOS 评估和管理的国际循证指南^[3],以及根据我国患病人群特征修正的 2018 年 PCOS 中国诊疗指南^[4]。两个指南以及既往的一些经典指南对于 PCOS 的诊断各有区别。目前在我国仍以应用 2003 年欧洲人类生殖及胚胎学会/美国生殖医学会提出鹿特丹诊断标准最为普遍。现有研究表明 PCOS 患者外周及卵巢存在炎症细胞因子的异常表达、或存在免疫细胞浸润,进而诱导免疫功能紊乱,免疫紊乱会影响 PCOS 患者性激素水平、妊娠和妊娠结局^[5],也可通过相关途径诱导 IR、高 HA 及肥胖的发生,促进 PCOS 的发生和发展^[6-7]。

随着蛋白质组学技术的发展,越来越多的研究者利用高通量定量蛋白质组学对疾病的发病机制或发生发展过程进行研究,其中串联质谱标签法(tandem mass tag, TMT)可以对肽段进行精确鉴定和定量比较。而 TMT 技术在 PCOS 的研究中应用较少,因此,本研究利用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析联合 TMT 技术,寻找 PCOS 血清特异性蛋白质,探讨 PCOS 可能的发病机制,为临床上 PCOS 的诊断与治疗提供实验室依据。

1 对象与方法

1.1 对象 选择 2019 年 12 月—2020 年 8 月在湖南省妇幼保健院门诊就诊的 21~35 岁共 20 例 PCOS 患者,平均年龄(25.85 ± 4.50)岁。PCOS 诊断参照 2003 年鹿特丹诊断标准^[8]:①稀发排卵或无排卵(月经周期大于等于 35 d);②高雄激素的临床和/或生化表现;③卵巢多囊样改变[超声提示一侧或双侧卵巢直径 2~9 mm 的卵泡 ≥ 12 个,和(或)卵巢体积 ≥ 10 ml];④三项中符合两项并排除其他高雄激素疾病,如先天性肾上腺皮质增生、库欣综合征和分泌雄激素的肿瘤等。选择同期相同年龄范围的 18 例来本院体检的健康正常妇女作为正常对照组,平均年龄为(26.00 ± 4.21)岁,并符合以下标准:月经周期规则,无肥胖、多毛、痤疮及血糖血脂均正常,体质指数正常。所有研究对象均为汉族女性,就诊及测定激素之前 3 个月以上未使用过任何激素类药物和避孕药,既往无肾脏疾病、甲状腺疾病、糖尿病、库欣综合征等病史。两组年龄差异无统计学意义($t=0.11, P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 胰蛋白酶、二硫苏糖醇、IAM 均购于美国 Promega 公司,乙腈、甲醇购于美国 Fisher Scientific 公司,丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、四

甲基乙二胺购于美国 SIGMA 公司,TMT 试剂购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司,C18 液相色谱柱购于美国 Phenomenex 公司。质谱仪购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司,离心机购于德国 Eppendorf 公司。

1.2.2 标本采集及保存 PCOS 组患者于月经来潮的第 2~4 d 或者闭经任意时间段采血,激素水平提示早卵泡期水平,正常对照组为检查当日采血,两组均在禁食 12 h 后于早晨 9:00-10:00 抽取静脉血。所有研究对象抽取的静脉血在 4℃ 静置 1 h,离心半径 13.5 cm、4℃ 下 3 000 r/min 离心 5 min 后分离血清,-80℃ 冰箱保存备用。所有血清标本在质谱分析前避免反复冻融。本研究经湖南省妇幼保健院伦理委员会审批,所有参与者均签署知情同意书。

1.2.3 实验步骤 首先用 ProteinMiner 柱去除血清中高丰度蛋白,提取富集的低丰度蛋白用胰蛋白酶酶解成肽段,然后用乙腈溶解好的标记试剂加入肽段中,不同样品用不同大小的同位素标记。再将标记好的肽段在 C18 离子交换柱中进行分馏,将馏分加入 Q-Exactive 质谱分析仪中进行检测。质谱扫描完毕,得到质谱原始文件,将质谱原始文件输入到 PD (Proteome Discoverer 1.4, thermo) 软件,对质谱图进行筛选。PD 软件提取后的谱图用 Mascot 软件(版本:2.3.01)进行搜索,搜索结束后,PD 软件根据 Mascot 搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定量分析。

1.2.4 实验过程质量控制 为保证蛋白定量准确性,采用适合于样品缓冲体系及浓度范围的定量方法,标准曲线 R^2 应大于 0.99。SDS-PAGE 检测时,样品之间要求相对一致。SDS-PAGE 检测蛋白质量,要求条带清晰,无降解。酶解后大部分肽段长度小于 30 个氨基酸。

1.2.5 差异蛋白筛选及生物信息学分析 设定差异倍数 ≥ 1.2 或差异倍数 ≤ 0.83 且 $P<0.05$ 的蛋白为差异蛋白质^[9]。筛选出的差异蛋白质采用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)^[9]及 Reactome 数据库分析富集通路^[10],找到差异表达蛋白主要参与的生物通路。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对每种蛋白在 PCOS 组和正常对照组的定量值进行 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCOS 患者血清总蛋白及差异蛋白 在人类 UniProt 数据库(172261 序列)中对质谱数据进行蛋白鉴

定和分析,共鉴定出 718 种蛋白,计算各种蛋白在 PCOS 组和正常对照组两组样本间表达量的差异倍数 (fold change,FC)。鉴定了 38 个差异表达蛋白质,见表 1,以差异倍数 ≥ 1.2 且 $P<0.05$ 的蛋白为条件筛选上调蛋白,以差异倍数 ≤ 0.83 且 $P<0.05$ 条件筛选下调蛋白,得到 PCOS 组上调表达蛋白 21 种,下调表达蛋白 17 种。对 718 种鉴定出的蛋白进行分析,分别以 $\log_2(FC)$ 为横轴,以 $-\log_{10}(P. Value)$ 为纵轴,对蛋白绘制火山图,上调蛋白(红色)和下调蛋白(绿色)有明显的区分度。见图 1。

表 1 PCOS 患者血清中的差异表达蛋白

蛋白代码	蛋白名称	差异倍数
D3JV41	C-X-C 基序趋化因子 C-X-C motif chemokine	1.629
Q08380	半乳糖凝集素-3 结合蛋白 Galectin-3-binding protein	1.544
P01859	免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 2$ Immunoglobulin heavy constant gamma 2	1.531
P11226	甘露糖结合蛋白 Mannose-binding protein C	1.445
P07996	血小板反应蛋白-1Thrombospondin-1	1.348
A2J1M8	类风湿因子 RF-IP12(片段) Rheumatoid factor RF-IP12 (Fragment)	1.326
A0A481SHK9	血红蛋白 β 亚单位 Hemoglobin subunit beta	1.309
P02743	血清淀粉样 P 成分 Serum amyloid P-component	1.277
P35443	凝血栓素-4Thrombospondin-4	1.275
B4E1D8	cDNA FLJ51597	1.269
B4DU17	cDNA FLJ55004	1.266
A0A096LPE2	SAA2-SAA4 readthrough	1.254
B2R8I2	cDNA FLJ93914	1.252
P00739	结合珠蛋白相关蛋白质 Haptoglobin-related protein	1.237
A0A1S5UZ39	血红蛋白 α 亚单位 Hemoglobin subunit alpha	1.233
A0A109PSY4	MS-A1 轻链可变区 MS-A1 light chain variable region (Fragment)	1.231
P80108	磷脂酰肌醇聚糖特异性磷脂酶 D Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	1.226
P05154	血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂 Plasma serine protease inhibitor	1.224
P43652	阿法明 Afamin	1.223
C9JEU5	纤维蛋白原 γ 链 Fibrinogen gamma chain	1.221
Q6CMX6	IGH@ 蛋白 IGH@ protein	1.214
F8VV32	溶菌酶 Lysozyme	0.833
O00602	人纤维胶凝蛋白 1 Ficolin-1	0.830
C0JYY2	载脂蛋白 B Apolipoprotein B	0.828
Q13103	分泌型磷蛋白 24 Secreted phosphoprotein 24	0.825
Q08830	类纤维蛋白原蛋白 1 Fibrinogen-like protein 1	0.821
A0A384MDQ7	附睾分泌精子结合蛋白 Epididymis secretory sperm binding protein	0.821
P15924	桥粒斑蛋白 Desmoplakin	0.820
H6VRF8	角蛋白 1 Keratin 1	0.776
A0A0C4DFP6	软骨酸性蛋白 1 Cartilage acidic protein 1	0.773
P05090	载脂蛋白 D Apolipoprotein D	0.769
Q5T985	α -胰蛋白酶抑制剂重链 H2 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0.750
Q9UBX5	腓骨蛋白 5 Fibulin-5	0.730
B4E1B3	cDNA FLJ53950	0.710
A8K1K1	cDNA FLJ76342	0.572
I3L145	性激素结合球蛋白 Sex hormone-binding globulin	0.418
A0A024R6I7	α -1-抗胰蛋白酶 Alpha-1-antitrypsin	0.389
B4DVY2	cDNA FLJ54184	0.321

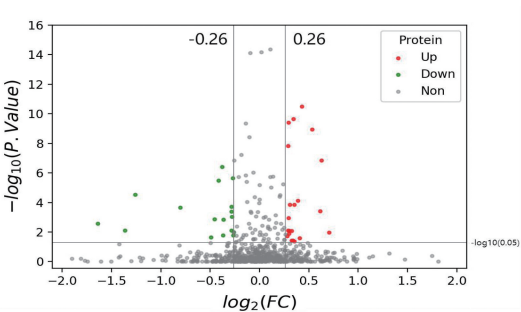


图 1 PCOS 组与正常对照组血清蛋白表达差异

2.2 差异蛋白质的富集通路分析 对 38 个差异表达蛋白进行 KEGG 和 Reactome 富集通路分析,结果显示,在 KEGG 中发现 18 个富集通路,主要涉及补体系统和血液凝固级联活化途径、人类相关疾病(疟疾、人乳头瘤病毒感染、致心律失常性右室心肌病等)、细胞活动相关(吞噬体、粘着斑、细胞外基质受体相互作用等)、信号通路(PI3K-Akt 信号通路、p53 信号通路糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白生物合成等)。在 Reactome 数据库中富集了 78 个通路,结果以参考 P 值($P<0.05$)、富集比例(该通路上注释的差异蛋白数目/该通路上注释的背景蛋白数目)、该通路上注释的差异蛋白数目 3 个条件,共 9 条显著性富集通路。见图 2。

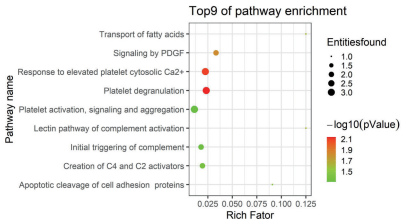


图 2 PCOS 组与正常对照组差异蛋白 Reactome 富集分析的结果

将 KEGG 及 Reactome 两个数据库中发现的富集通路整合,发现均存在补体级联反应通路,在 KEGG 中为上调的差异蛋白甘露糖结合蛋白 (mannose-binding protein, MBL) 及血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂 (plasma serine protease inhibitor, PCI/IPSP) 参与补体级联反应通路,而在 Reactome 数据库中补体级联反应通路涉及的差异蛋白包括 MBL 和免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 2$ (IGHG2)。见图 3。

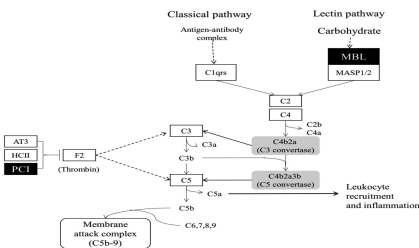


图 3 KEGG 中富集到的 MBL 参与的补体级联反应通路

3 讨论

PCOS 的病因及发病机制一直以来都是研究的热点,研究手段也不尽相同,主要包括基因组学、代谢组学、蛋白质组学等。机体生理功能的实际执行者即蛋白质,其在疾病中的变化,具有提示该疾病的发病机制或病理生理作用,蛋白质组学既是利用这一点,通过探索细胞内蛋白质的功能活动及相互作用,为寻找疾病的发病机制及诊疗方法提供新的技术手段^[11]。在众多标本中,血标本最易采集,故如能在血液中找到 PCOS 临床生物标记物,将为 PCOS 的诊断及治疗有着巨大推进作用。

在本研究中,通过对 PCOS 组和正常对照组的血清进行蛋白质组学分析,共发现 38 种差异蛋白质,将其进行 KEGG 及 Reactome 的反应通路富集分析,均发现补体级联反应信号通路的显著性。既往也有研究者通过定量蛋白质组学对肥胖 PCOS 及非肥胖 PCOS 患者的血清标本进行研究,同样发现其血清差异蛋白显著参与的共同途径为补体和凝血级联信号通路途径^[12],与本文研究结果一致。

近期,国外有学者发现 PCOS 患者补体因子明显高于健康对照组^[13],提示 PCOS 患者体内存在着补体系统的过度激活。补体系统是一种免疫和炎症平衡的调节系统,过度激活将导致大量炎症因子的释放和聚集,从而导致机体炎症损伤^[12]。机体在慢性低度炎症及免疫功能紊乱相互作用的情况下,可能会通过相关途径诱导 PCOS 患者出现 IR、HA 及肥胖^[6-7]。

补体级联反应有三条途径,分别为经典途径、凝集素途径及旁路途径。进一步分析两个数据库中均富集的补体级联反应信号通路,唯一共同注释的差异表达蛋白为 MBL,MBL 是凝集素途径中的重要参与蛋白。MBL 是一种血浆蛋白,其与碳水化合物结构结合后,再与 MBL 相关的丝氨酸蛋白酶 (MBL-associated serine protease, MASP-1)、MASP-2 形成 MBL 复合物并同时活化 MASP, MASP 可水解 C4 和 C2,进一步形成 C3 转化酶^[14],从而引发补体的一系列级联反应。本研究中 MBL 为上调差异表达蛋白,说明 PCOS 组患者体内 MBL 含量是升高的,提示 PCOS 组可能因高 MBL 启动凝集素途径过度激活补体级联通路。

目前 MBL 在 PCOS 患者中的研究尚未见报道,但多项研究表明 MBL 激活的凝集素途径与各种自身免疫性疾病、感染性疾病的病理生理过程密切相关,包括抗凝脂综合征^[15]、风湿性心脏病^[16]、COVID-19 患者的肺损伤等^[17],高 MBL 可能增加炎症损伤的风险^[18]。既往的一项动物实验研究表明,用针对 MBL

的抑制性单克隆抗体阻断补体激活的 MBL 途径,可以通过减少中性粒细胞浸润和衰减原炎基因激活来保护心脏免受缺血再灌注损伤^[19]。

最近有学者总结认为 MBL 受体介导的效应子功能除了补体系统激活外,还能直接调理吞噬作用、MBL 依赖性细胞介导的细胞毒性、细胞凋亡、促炎细胞因子的释放和活性氧的产生^[20]。但 PCOS 患者 MBL 水平增高的具体机制以及 MBL 在 PCOS 患者体内引起炎症的具体靶器官和组织尚不明确,需进一步研究。

综上所述,PCOS 患者体内可能存在补体系统的过度激活,差异蛋白 MBL 可能是其中的关键致病因子。

参考文献

- [1] 袁莹莹,赵君利. 多囊卵巢综合征流行病学特点[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(3): 261-264.
- [2] Zhou J, Yang L, Yu J, et al. Efficacy of acupuncture on menstrual frequency in women with polycystic ovary syndrome[J]. Medicine, 2017, 96(47): e8828.
- [3] Teede HJ, Misso ML, Costello MF, et al. International PCOS Network, recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2018, 110(3): 364-379.
- [4] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53(1): 2-6.
- [5] 梁杨焕,张炯,谢芹. 多囊卵巢综合征不孕患者性激素与外周血 Th1/Th2 的关系[J]. 实用预防医学, 2018, 25(10): 1224-1226.
- [6] Cirillo F, Catellani C, Lazzaroni P, et al. MiRNAs regulating insulin sensitivity are dysregulated in polycystic ovary syndrome (PCOS) ovaries and are associated with markers of inflammation and insulin sensitivity[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 879-879.
- [7] 李子涵,张宁,李菲,等. 多囊卵巢综合征的免疫学发病机制研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(19): 101-104.
- [8] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Hum Reprod, 2004, 19(1): 41-47.
- [9] Zhang X, Xu X, Li P, et al. TMT based proteomic analysis of human follicular fluid from overweight/obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 821.
- [10] 宁龙贵,俞静华,单国栋,等. 蛋白质组学技术筛选缺血性结肠炎与溃疡性结肠炎鉴别诊断的血清学标志物[J]. 中华消化杂志, 2019, 39(12): 840-845.
- [11] 寇丽辉,侯丽辉,牛静云,等. 蛋白质组学在多囊卵巢综合征中的应用进展[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(9): 183-185, 164.
- [12] 谢丽珍. 基于定量蛋白质组学技术的肥胖多囊卵巢综合征患者血清差异蛋白生物信息学分析[D]. 广州: 广州医科大学, 2018: 1-63.