

细菌性阴道病患者阴道微环境中差异蛋白的蛋白组学研究*

张 瑞¹, 李 昶¹, 马爱昕¹, 刘朝晖^{2***}

(1. 北京大学第一医院妇产科, 北京 100034; 2. 首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院妇科, 北京 100026)

【摘要】 目的:用蛋白组学和质谱技术探索细菌性阴道病(BV)患者阴道微环境中的关键蛋白,为探讨BV的发病机制提供新的思路。**方法:**收集2019年1月至2019年10月在北京大学第一医院门诊和体检中心就诊的10例BV女性和10例健康女性的阴道分泌物,采用蛋白分析技术筛选差异蛋白,通过GO(Gene Ontology)富集、KEGG(Gene Ontology Enrichment Analysis)富集和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)筛选与BV相关的关键蛋白。**结果:**鉴定到人源化的蛋白2136个,其中差异蛋白142个,上调蛋白104个,下调蛋白38个,涉及的生物学过程主要包括蛋白折叠、蛋白去乙酰化、细胞质翻译和蛋白结合等。鉴定到细菌源性蛋白760个,其中差异蛋白56个,上调蛋白32个,下调蛋白24个,涉及的生物学过程主要包括葡萄糖代谢、糖酵解、膜转运和ATP水解。BV患者阴道分泌物中的烯醇化酶含量明显高于健康女性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**蛋白组学和质谱技术能筛选出可能参与BV发病机制的相关蛋白和信号通路,如烯醇化酶,为阐明其发生发展的过程提供重要信息,有可能为临床诊断和治疗提供重要的靶标。

【关键词】 烯醇化酶;细菌性阴道病;阴道加德纳菌;阴道乳杆菌

中图分类号:R711.31 文献标志码:A 文章编号:1004-7379(2024)07-0488-06

DOI:10.13283/j.cnki.xdfckjz.2024.07.002

Proteomic study on differential proteins in the vaginal microenvironment of patients with bacterial vaginosis. Zhang Rui, Li Chang, Ma Aixin, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034

【Abstract】 Objective: To explore key proteins in the vaginal microenvironment of bacterial vaginosis(BV) using proteomics and mass spectrometry techniques. **Method:** The vaginal secretions of 10 BV women and 10 healthy women who visited the outpatient and physical examination centers of Peking University First Hospital from January 2019 to October 2019 were collected. Differential protein analysis techniques were used to screen for differential proteins, and key proteins related to BV were screened for GO (Gene Ontology) enrichment, KEGG (Gene Ontology Enrichment Analysis) enrichment, and protein protein interaction (PPI) enrichment. **Result:** 2136 humanized proteins were identified, including 142 differentially expressed proteins, 104 upregulated proteins, and 38 downregulated proteins. The biological processes involved mainly include protein folding, protein demethylation, cytoplasmic translation, and protein binding. 760 bacterial derived proteins were identified, including 56 differential proteins, 32 upregulated and 24 downregulated. The biological processes involved mainly include glucose metabolism, glycolysis, membrane transport, and ATP hydrolysis. The content of enolase in vaginal

* 基金资助:国家自然科学基金资助项目(No:81471420);教育部博士点新教师基金项目(No:20130001120051)

** 通信作者 Email:liuzhaohui@ccmu.edu.cn

secretions of BV patients was significantly higher than that of healthy women, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Proteomics and mass spectrometry techniques can screen for relevant proteins and signaling pathways that may be involved in the pathogenesis of BV, such as enolase, providing important information for elucidating its occurrence and development process, and potentially providing important targets for clinical diagnosis and treatment.

【Key words】 Enolase; Bacterial vaginosis; Gardnerella vaginalis; Lactobacillus vaginalis

细菌性阴道病 (bacterial vaginosis, BV) 是女性最常见的下生殖道感染, 与多种不良结局密切相关^[1-2]。BV 的微生物学特征是大量厌氧菌取代了乳杆菌的优势地位, 这种变化引起局部多种免疫调控因子发生变化^[2]。BV 患者阴道微环境中菌群构成的异质性很大, 以针对特定蛋白为靶标的免疫技术不能满足菌群构成及蛋白构成复杂的局面^[2-3]。

蛋白质组学能研究包含多种不同属和种的复杂信息的样品, 除了鉴定样品中的蛋白构成, 还能对样本中的菌群功能进行推断, 分析行使特定功能的菌群种类^[4]。目前蛋白质组学技术在 BV 患者阴道微环境中的研究很少。本研究将采用蛋白质组学和质谱技术结合, 分析 BV 患者阴道微环境中的蛋白质构成和功能与健康女性的区别, 探讨其中差异蛋白在 BV 发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料来源 选取 2019 年 1 月至 2019 年 10 月北京大学第一医院妇产科门诊和体检中心收治的有典型 BV 症状^[5]且 Nugent 评分^[6]大于 6 分的育龄期女性 BV 患者和健康女性各 10 例, 年龄 18~45 岁。本研究获得北京大学第一医院伦理委员会批准[(2017)科研第(92)号], 所有志愿者均自愿签署知情同意书。

1.2 仪器和实验试剂 Enolase 抗体(南京川博生物技术有限公司, SAB702), Albumin Removal Column 和 IgG Removal Column 高丰度蛋白去除试剂盒, 色谱柱, Orbitrap Fusion 质谱系统, Easy-nLC1000 纳升级超高效液相色谱, Proteome Discoverer (PD) 软件 (Perseus 软件), 测序级胰蛋白酶 (Trypsin, Promega 公司, 货号: V5111); 蛋白酶抑制剂 (Roche 公司, 货号: 05892970001)。

1.3 研究方法

1.3.1 阴道取样及取灌洗液 患者取膀胱截石位, 两个无菌棉拭子从阴道侧壁中段取阴道分泌物, 用 10 mL 无菌生理盐水冲洗阴道, 吸取并收集 5 mL 灌洗液, 离心, 取上清, -80°C 保存备用。

1.3.2 微生物学评价 棉拭子涂片行革兰氏染色, 油镜下行微生物学分析^[5-7], 另一棉拭子在灭菌 PBS 液中涮洗, 获取分泌物中的细菌。

1.3.3 蛋白提取 冰上超声裂解 10 min, 4°C 离心取上清。BCA 法蛋白定量。取 $50\mu\text{g}$ 蛋白溶液, 加二硫苏糖醇 56°C 水

浴 1 h, 加碘乙酰胺, 于暗室静置 1 h。加 4 倍于样品溶液体积的预冷丙酮, -20°C 沉淀 3 h 以上。离心, 沉淀物中加 1 mL 50% 丙酮和 50% 乙醇溶液混悬, -20°C 沉淀 3 h 以上。离心保留沉淀。加 ABC 溶液混旋加 Trypsin, 37°C 水浴 12 h。酶解结束后加终浓度 0.1% TFA 终止酶解。酶解后的肽段溶液用 MonoSpin C18 除盐后干燥成粉末。

1.3.4 液相色谱-质谱联用分析 色谱条件: C18 色谱柱, 流速: $300\text{nL}/\text{min}$; 进样量 $2\mu\text{L}$ 。质谱条件: 正离子源喷雾电压为 2.4 kV, 质谱仪加热毛细管设定为 320°C , 采用数据依赖模式自动在 MS 和 MS/MS 间切换采集。全扫描 MS 使用 Orbitrap 进行一级扫描, 随后在 3 s 内使用高能碰撞解离对符合串联 (MS/MS) 碎裂条件的母离子进行碎裂并用 orbitrap 进行扫描。

1.3.5 数据库检索 本研究标本同时含有人体组织器官和阴道微生物的分泌物和代谢物, 故使用 Proteome Discoverer 软件 (PD) 分别检索人体蛋白数据库和细菌蛋白数据库。从 UNIPROT 网站下载 Lactobacillus 和 Gardnerella vaginalis 这两个种属的蛋白序列, 合并为本次质谱数据检索用的细菌蛋白数据库 (385336 条序列)。

Proteome Discoverer 提取后的谱图用 Sequest HT 搜索引擎进行搜索。将 Proteome Discoverer 搜库的结果, 用以下标准卡值: 检索结果谱图、肽段及蛋白假阳性率 $\text{FDR} < 1\%$ 。搜索结束后, 根据 PD 软件中给出的蛋白质谱峰丰度进行后续统计定量分析。

使用 Matlab 内置 T-test 算法, 计算蛋白在不同组之间是否有显著差异。差异蛋白需满足 $P < 0.05$ 且 2 倍以上的变化, 当 P 小于 0.05 且倍数大于 2 时为显著上调, 当 P 小于 0.05 且变化倍数小于 0.5 时为显著下调^[8-9]。

经上述分析鉴定出来的差异蛋白, 使用在线工具 DAVID 进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 分析。用 IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 软件或 STRING 进行蛋白-蛋白相互作用分析。

1.3.6 Western blot 法检测 对健康女性和 BV 患者阴道分泌物离心取上清进行电泳、电转, 封闭, 一抗 4°C 孵育过夜, 洗膜后用二抗孵育, 发光试剂盒显影。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较 BV 患者和健康组的年龄、身高、体重和体质量指数 (body mass index, BMI) 比较,

差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 基线资料

基线资料	健康组 ($n=10$)	BV 组 ($n=10$)	P	t
年龄(岁)	26.3±4.5	26.1±2.9	0.908	0.117
身高(cm)	164.5±5.7	164.2±8.6	0.928	0.091
体重(kg)	61.3±8.4	61.5±10.3	0.964	-0.046
BMI(kg/m ²)	22.5±2.2	22.7±3.2	0.894	-0.135

2.2 BV 阴道微环境中差异蛋白表达情况

2.2.1 人体蛋白数据库检索 在鉴定的 2166 个人源性蛋白中可定量的蛋白有 2136 个, 其中差异蛋白 142 个, 上调蛋白 104 个, 下调蛋白 38 个(图 1A)。

2.2.2 细菌蛋白数据库检索 在鉴定的 770 个细菌源性蛋白中可定量的蛋白有 760 个, 其中差异蛋白 56 个, 32 个上调, 24 个下调(图 1B)。

2.3 GO 和 KEGG 分析及蛋白互作网络分析

2.3.1 人源性差异蛋白分析 142 个人源性差异蛋白涉及的生物学过程主要包括蛋白折叠、蛋白质去乙酰化、细胞质翻译、蛋白结合、细菌入侵上皮细胞、蛋白质输出、代谢途径等过程(图 2,3)。通过 IPA 软件分析获得差异蛋白-蛋白相互作用网络(图 4)。

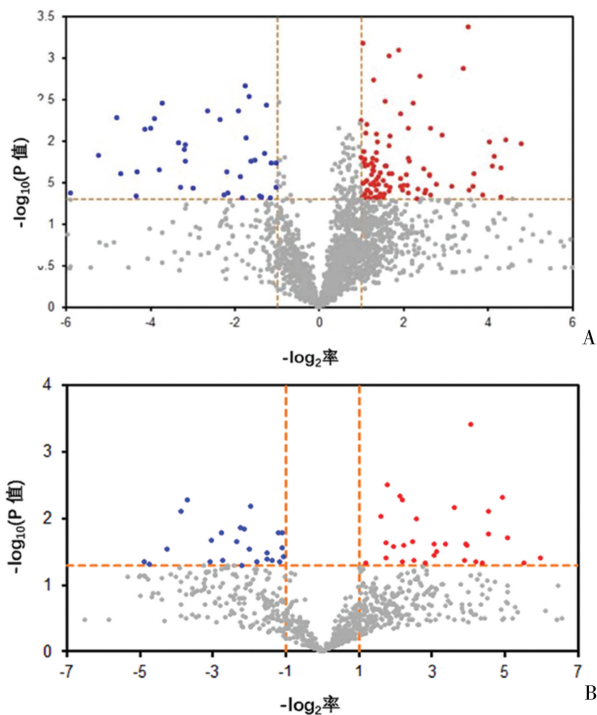


图 1 BV 患者阴道微环境中差异蛋白 A: BV 患者阴道微环境中差异蛋白(人源性); B: BV 患者阴道微环境中差异蛋白(细菌源性); 蓝色表示下调蛋白, 红色表示上调蛋白

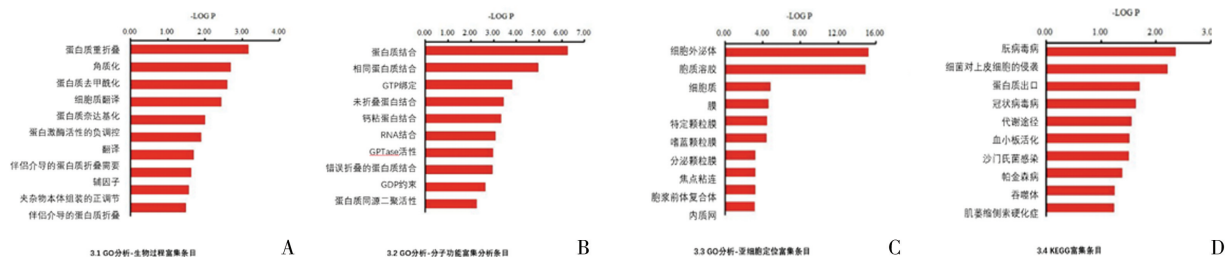


图 2 人源性差异蛋白的 GO 和 KEGG 分析

A: GO 分析-生物过程富集条目; B: GO 分析-分子功能富集条目; C: GO-亚细胞定位富集条目; D: KEGG 富集条目

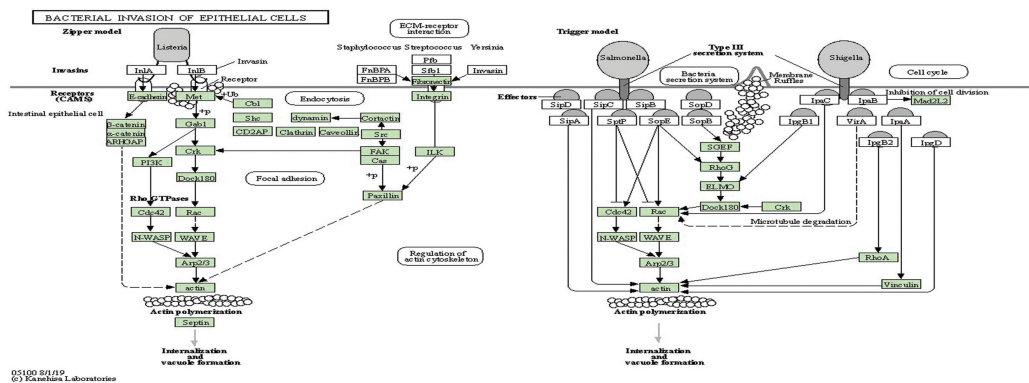


图 3 细菌入侵上皮细胞通路图

2.3.2 细菌源性差异蛋白分析 56 个细菌源性差异蛋白涉及的生物过程包括:葡萄糖代谢、糖酵解、膜转运和 ATP 水解(图 5),通过 STRING 工具分析获得差异蛋白-蛋白相互作用网络(图 6),在本研究鉴定出的 198 个差异蛋白中,与乏氧环境有关、且与微生物侵袭宿主关系最密切的是烯醇化酶(Enolase, Eno)。

2.4 Western blot 为了验证烯醇化酶在 BV 女性和健康女性阴道微环境中的存在情况,重新收集两组女性分泌物。Western blot 结果显示,5 份健康女性和 2 份 BV 患者阴道分泌物中均可检出烯醇化酶,BV 阴道分泌物中烯醇化酶平均含量高于健康女性,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 7)。

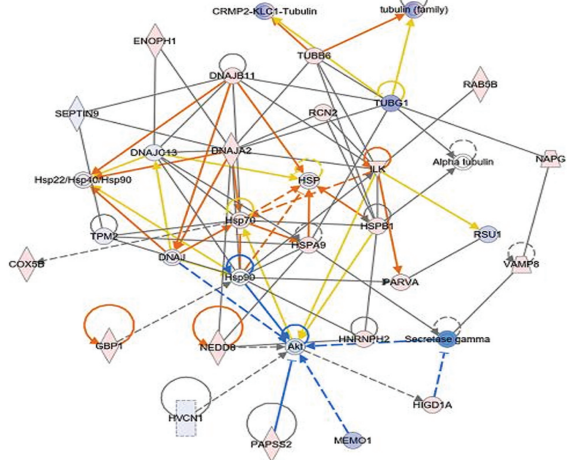


图 4 人源性蛋白-蛋白相互作用网络图(IPA 软件分析)

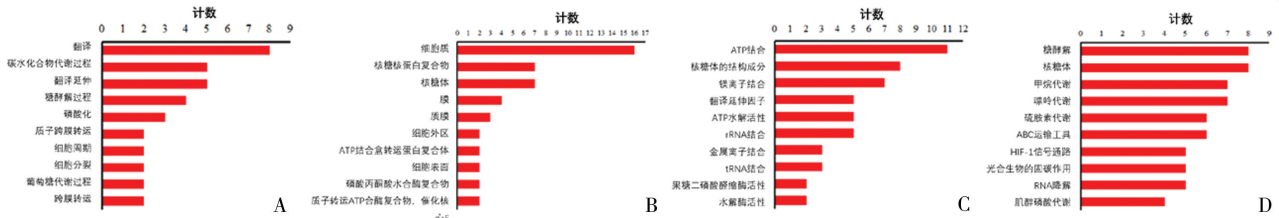


图 5 菌源性差异蛋白的 GO 和 KEGG 分析

A:GO 分析-生物过程富集条目;B:GO-亚细胞定位富集条目;C:GO 分析-分子功能富集条目;D:KEGG 富集条目

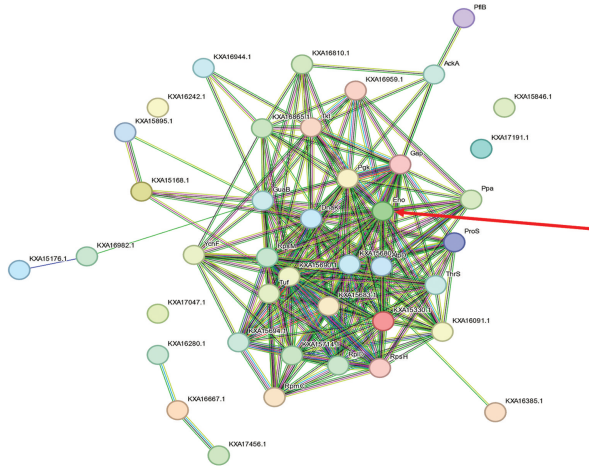


图 6 菌源性蛋白-蛋白相互作用网络图(STRING 分析)

Eno:enolase, 烯醇化酶

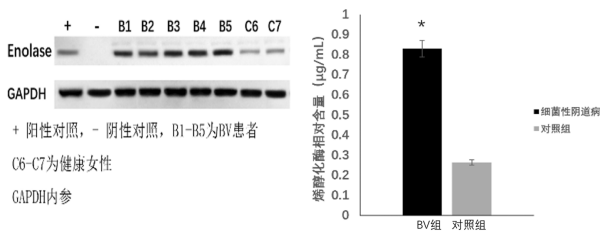


图 7 Western blot 检测 BV 和健康女性阴道分泌物中的烯醇化酶

* $P < 0.05$

3 讨论

3.1 BV 患者阴道微环境中的差异蛋白 蛋白质组学可全面描述微环境中蛋白质组成及其在疾病状态或药物治疗前后的变化特征,提供来自包含很多不同种属的复杂样本的功能信息^[4-10]。然而,蛋白质组学技术分析阴道分泌物在妇产科疾病的应用很少^[11-13]。Carolina 在其研究中对 29 例健康女性和 9 例 BV 女性的阴道分泌物进行蛋白质组学分析,共鉴定了 74 种蛋白质,其中在 BV 中富集到的蛋白包括:中性粒细胞弹性蛋白酶、Kaliciocin-1、中性粒细胞防御素-1、Ig lambda-2 链 C 区和蛋白 S100-A7^[2]。另一项研究用基因组学、蛋白质组学技术研究 BV 发现,加德纳菌与宿主上皮屏障破坏和免疫激活增强有关,而乳杆菌与维持上皮完整性的宿主蛋白表达有关^[14]。本研究中,采用蛋白质组学和质谱技术结合鉴定了 142 个人源性差异蛋白和 56 个细菌源性差异蛋白,这些差异蛋白涉及了复杂的生物功能和信号通路,其中与 BV 乏氧环境关系最为密切的蛋白是烯醇化酶,其在 BV 患者阴道中的平均含量明显高于健康女性,这一结果提示烯醇化酶可能参与了 BV 的发生或发展过程。

3.2 烯醇化酶在微生物中的作用 作为一种广泛

存在于各种生物体内的高度保守的酶^[15], 烯醇化酶通常存在于胞浆, 通过调控糖酵解过程控制细胞能量供应^[16]。随着研究不断深入, 烯醇化酶被证实也定位在细胞膜和细胞核表面, 有的甚至能分泌到细胞外^[17]。本研究中的亚细胞定位富集分析结果也表明, 细胞质、胞膜和质膜均与 BV 有关, 而排名第一的是胞浆, 胞膜和质膜的数量相对较小。烯醇化酶在胞膜和胞外的表达, 能参与多种病原微生物对宿主组织的入侵^[17], 如金黄色葡萄球菌的烯醇化酶与宿主的层粘连蛋白和胶原蛋白 I 结合, 参与纤连蛋白和胶原蛋白 IV 结合^[18-19]。变形链球菌的烯醇化酶能与人纤溶酶原和唾液黏蛋白 MG2 结合^[20-22]。在脊椎动物中, 病原体表面的烯醇化酶可与动物细胞膜上的血纤维溶酶原相结合, 操控细胞的纤溶系统, 协助微生物侵袭宿主。用重组的恶性疟原虫烯醇化酶免疫人体, 96% 的人会产生抗体。兔产生的对重组恶性疟原虫烯醇化酶的抗体, 能在体外抑制恶性疟原虫的生长。而当小鼠被免疫之后, 恶性疟原虫攻击小鼠的不良结局被得到有效的保护^[23-25]。用表达烯醇化酶的肺炎球菌突变体与纤溶酶原结合力大为降低, 并且在鼻内感染的小鼠模型中, 这些突变体的毒力也减弱了, 这表明烯醇化酶作为纤溶酶原黏合剂在肺炎球菌疾病的发病机制中具有重要意义^[26-27]。

烯醇化酶与乳杆菌的功能有密切关系。植物乳杆菌表面的烯醇化酶能与细胞外基质的主要成分之一纤连蛋白结合。加氏乳杆菌表面的烯醇化酶能抑制淋病奈瑟菌与上皮细胞的黏附。卷曲乳杆菌表面的烯醇化酶能与层粘连蛋白、胶原蛋白 I 结合, 不与纤连蛋白和 IV 型胶原结合^[28-29]。本研究中, 通过功能富集分析发现, 与 BV 最相关的两个生物学过程是糖酵解和 ATP 结合, 而烯醇化酶的最重要功能是通过调控糖酵解过程、控制 ATP 的产生和供应过程, 从而实现其调控生物过程的。

3.3 首次验证了 BV 患者阴道分泌物中存在高含量烯醇化酶 本研究表明, BV 患者和健康女性阴道微环境中均存在烯醇化酶, BV 患者烯醇化酶含量明显大于健康女性。蛋白质组技术和质谱技术能为探索 BV 患者阴道微环境蛋白与疾病关系奠定基础。深入研究烯醇化酶与 BV 的关系, 有助于阐明发病机制, 可能成为治疗疾病和预防复发的靶标。

参 考 文 献

[1] Ruiz-Perez D, Coudray MS, Colbert B, et al. Effect of metronidazole on vaginal microbiota associated with asymptomatic bacterial vaginosis [J]. *Access Microbiol*, 2021, 3 (5):000226

[2] Ferreira C, Da SM, de Pontes LG, et al. Protein content of cervicovaginal fluid is altered during bacterial vaginosis [J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2018, 22(2):147-151

[3] Das S, Konwar BK. Influence of connatal factors in shaping vaginal microflora and ensuring its health [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2024, 309(3):871-886

[4] Lee EM, Srinivasan S, Purvine SO, et al. Optimizing meta-proteomics database construction: lessons from a study of the vaginal microbiome [J]. *mSystems*, 2023, 8(4):e0067822

[5] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 细菌性阴道病诊治指南(2021 修订版) [J]. *中华妇产科杂志*, 2021, 56(1):3-6

[6] Carey JC, Klebanoff MA, Hauth JC, et al. Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(8):534-540

[7] Zhang R, Liu Z, Zhang Y, et al. Natural progress history of asymptomatic bacterial vaginosis in Chinese Han women and associated risk factors [J]. *Postgrad Med*, 2022, 134(7):659-667

[8] Hao-Long Z, Di C, Jingjun Y, et al. Proteomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in critical COVID-19 patients [J]. *FEBS J*, 2021, 17(288):5190-5200

[9] Hanwen N, Wenqi P, Qi J, et al. Label-free proteomic analysis of serum exosomes from paroxysmal atrial fibrillation patients [J]. *Clin Proteomics*, 2021, 18(6):1-14

[10] Monin L, Whettlock EM, Male V. Immune responses in the human female reproductive tract [J]. *Immunol*, 2020, 160(2):106-115

[11] Parry S, Leite R, Esplin MS, et al. Cervicovaginal fluid proteomic analysis to identify potential biomarkers for preterm birth [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, 222(5):491-493

[12] Yan Y, Gu Z, Li B, et al. Metabonomics profile analysis in inflammation-induced preterm birth and the potential role of metabolites in regulating premature cervical ripening [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1):135

[13] Ozdian T, Vodicka J, Dostal J, et al. Proteome mapping of cervical mucus and its potential as a source of biomarkers in female tract disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2):1038

[14] Kyrgiou M, Moscicki A. Vaginal microbiome and cervical cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86:189-198

[15] So B, Ji LL, Imdad S, et al. Proteomic analysis of the effect of high-fat-diet and voluntary physical activity on mouse liver [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8):e0273049

[16] Qiao G, Wu A, Chen X, et al. Enolase 1, a moonlighting protein, as a potential target for cancer treatment [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14):3981-3992

[17] Schofield Lachlan, Lincz Lisa F, Skelding Kathryn A. Unlikely role of glycolytic enzyme α -enolase in cancer metastasis and its potential as a prognostic biomarker [J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2020, 6:10

[18] Korshunov DA, Sereda EE, Kondakova IV. Multifunctional proteins and their role in the vital activity of cells [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2023, 49(3):448-461