

局部雌激素作用下大鼠阴道萎缩的蛋白质组学及生物信息学分析

李娟¹, 杨佳琦², 苏晓强¹, 茹普霞¹, 李东燕^{1*} (¹山西医科大学第二医院妇产科, 太原 030001; ²大同市第一人民医院妇产科; *通讯作者, E-mail: 13994250124@163.com)

摘要: 目的 采用蛋白质组学联合生物信息学探究大鼠阴道萎缩局部雌激素作用前后改变显著的差异蛋白, 并推测该蛋白发挥作用的可能机制。方法 36只健康6~8周龄雌性生育龄未孕SD大鼠分为去势大鼠组(OVX组)、去势大鼠局部雌激素使用组(OVX+E2组)及假手术组(sham组)。收集三组的阴道标本进行非标记定量蛋白质组学分析, 筛选差异蛋白, 对差异蛋白中与雌激素代谢相关的蛋白进行分析得出局部雌激素作用后改变显著的差异蛋白, 对差异蛋白进行GO及KEGG分析, 推测蛋白发挥作用的可能机制。结果 OVX+E2组与OVX组差异蛋白共102种, 74种上调, 28种下调; sham组与OVX组差异蛋白共655种, 494种上调, 161种下调。在OVX+E2组与OVX组筛选出的差异蛋白中, 与雌激素代谢通路相关的差异蛋白Shc转化蛋白1表达上调。在sham组与OVX组筛选出的差异蛋白中, 与雌激素代谢通路相关的差异蛋白均表达上调, 包括蛋白基质金属蛋白酶9、Shc转化蛋白1及角蛋白14、42、35、33B、23、17。OVX+E2组与OVX组差异蛋白的GO分析发现Shc转化蛋白1参与的差异显著通路是Shc-EGFR复合物, 分子功能分析发现Shc转化蛋白1参与的差异显著通路是磷酸酪氨酸残基结合。KEGG分析中Shc转化蛋白1参与差异显著上调通路是上皮细胞的细菌侵袭通路。差异蛋白相关性分析表明与Shc转化蛋白1关系显著的差异蛋白是伪足富集的非典型激酶1、桩蛋白、MHC II类抗原。结论 局部雌激素可能通过上调Shc转化蛋白1改善去势大鼠阴道萎缩。Shc转化蛋白1可能通过形成Shc-EGFR复合物影响磷酸酪氨酸残基结合、参与上皮细胞的细菌侵袭通路、与非典型激酶1、桩蛋白、MHC II类抗原构成互作网络发挥作用。

关键词: 阴道萎缩; 局部雌激素治疗; Shc转化蛋白1; 非标记定量蛋白质组学; 生物信息学; GO分析; KEGG分析
中图分类号: R711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6611(2026)03-0309-10 **DOI:** 10.13753/j.issn.1007-6611.2026.03.009

Proteomic and bioinformatic analysis of vaginal atrophy in rats under local estrogen treatment

LI Juan¹, YANG Jiaqi², SU Xiaoqiang¹, RU Puxia¹, LI Dongyan^{1*} (¹Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Datong First People's Hospital; *Corresponding author, E-mail: 13994250124@163.com)

Abstract: *Objective* To investigate the differentially expressed proteins (DEPs) in rats with vaginal atrophy before and after the local estrogen treatment using proteomics combined with bioinformatics, and speculate the possible functional mechanism. *Methods* Thirty-six healthy 6-8-week-old female reproductive age non-pregnant SD rats were divided into three groups: ovariectomized (OVX) group, ovariectomized+local estrogen treatment group (OVX+E2), and sham group. Vaginal specimens from the three groups were collected to screen DEPs by non-labeled quantitative proteomics analysis. The significant DEPs related to estrogen metabolism after local estrogen treatment were further screened. GO and KEGG analyses of these proteins were performed to speculate on the possible mechanism.

Results A total of 102 DEPs were screened between OVX+E2 group and OVX group, among which 74 were up-regulated and 28 were down-regulated. A total of 655 DEPs were screened between sham group and OVX group, among which 494 were up-regulated and 161 were down-regulated. Of DEPs between OVX+E2 group and OVX group, Shc-transforming protein 1, a differential protein associated with the estrogen metabolism pathway, was up-regulated. Of DEPs between sham group and OVX group, all identified differential proteins related to estrogen metabolism were up-regulated, including matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), shc-transforming protein 1, and multiple keratins (KRT14, KRT42, KRT35, KRT33B, KRT23, and KRT17). Of the DEPs between OVX+E2 group and OVX group, the significantly different pathway involved in Shc-transforming protein 1 was the Shc-EGFR complex by GO analysis, and the phosphorylation residue binding by molecular function analysis. KEGG pathway analysis indicated the significantly up-regulated pathway involved in Shc-transforming protein 1 was the bacterial invasion pathway of epithelial cells. Furthermore, the protein correlation analysis of DEPs showed that Shc-transforming protein 1 was significantly correlated with pseudopodium-enriched atypical kinase 1, paxillin, and MHC class II antigen. *Conclusion* Local estrogen treatment may improve the vaginal atrophy in castrated

基金项目:山西医科大学第二医院院级博士基金项目(202401-24)

作者简介:李娟,女,1999-12生,在读硕士,E-mail:2235344680@qq.com

收稿日期:2025-09-17

rats by up-regulating Shc-transforming protein 1. The Shc-transforming protein 1 may exert its function by forming the shc-EGFR complex to affect the binding of phosphotyrosine residues, participate in the bacterial invasion pathway of epithelial cells, and form an interaction network with atypical kinase 1, spike protein, and MHC class II antigens.

Keywords: vaginal atrophy; local estrogen treatment; Shc-transforming protein 1; label-free quantitative proteomics; bioinformatics; GO analysis; KEGG analysis

阴道萎缩(vaginal atrophy, VA)是指女性阴道组织因雌激素水平下降引起的阴道黏膜上皮变薄、胶原蛋白变性、黏膜血流减少等萎缩性改变。其发病原因主要包括自然绝经、卵巢早衰、医源性因素(如手术、放疗、化疗等)以及慢性疾病如糖尿病等,其临床表现为外阴干燥、瘙痒、灼热感、性交痛、阴道分泌物减少等,严重影响患者的生活质量^[1-3]。大约40%~54%的绝经后女性和大约15%的绝经前女性会出现这一症状,是中老年女性的常见病^[4]。在中国北京社区的一项调查中,30~75岁女性该病患病率为35%^[5]。但是,部分女性因文化、认知等因素并未进行诊疗,加之全球进入加速老年化,VA实际患病率极有可能被低估^[6]。随着绝经后时间延长,相关症状体征会出现进行性加重,从而严重影响生活质量。随着老龄化和生活水平的提高,该病应该得到进一步重视和发展。雌激素是改善阴道萎缩有效的药物,根据作用方式不同分为口服药物、阴道给药和经皮给药,根据作用范围不同分为全身和局部用药^[7]。全身用雌激素可以对全身多个系统产生作用,但由于其可能增加子宫内膜及乳腺的相关风险,临床更常采用局部给药方式,以降低全身性影响。目前研究结果表明局部雌激素可能通过以下途径发挥作用:①通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导的生长因子通路引起了阴道上皮的增殖及角化;②促使胶原前体合成为胶原,改善组织弹性;③通过抗炎、抗氧化应激使血管舒张,增加血流量,从而提升阴道血供。然而,在上述已知机制之外,局部雌激素在改善阴道萎缩过程中所引起的蛋白质组学变化,目前尚不明确。

蛋白质组学的研究方法有芯片法及质谱法,其中非标记的定量蛋白质组学(label-free quantitative proteomics)不需要对比较样本进行标记处理,只需要比较特定肽段/蛋白在不同样品间的质谱信号强弱便可得到组间比较的差异蛋白。差异蛋白可以通过GO及KEGG通路分析,揭示差异蛋白参与的生物学过程及相关调控网络,从而系统阐释差异蛋白在生理或病理过程中的作用,并了解蛋白之间的关系。目前,针对大鼠阴道萎缩的蛋白质组学研究仍

较为有限,且多集中于单一时间点或局部组织的蛋白表达谱描述,缺乏动态、系统的蛋白功能与通路整合分析。因此,本研究拟通过去势大鼠模型阴道标本的非标记定量蛋白质组学分析,寻找局部雌激素在改善阴道萎缩的过程中与雌激素代谢有关的蛋白、基因及通路,并将差异蛋白进行GO及KEGG分析,推测其发挥作用的可能机制,为下一步的基础研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂耗材 阳离子防脱载玻片(ZLI-9506)、中性树胶(ZLI-9555)、苏木精染色液(ZLI-9615)、伊红染色液(ZLI-9612)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)甘油封片剂(ZLI-9557)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,盖玻片(10212432C)购自江苏世泰实验器材有限公司,无水乙醇、二甲苯购自国药集团化学试剂有限公司,用于阴道组织处理与染色;Urea(U5128)、DTT(D0632)、Iodoacetamide(V900335)购自上海Sigma-Aldrich公司,用于蛋白质提取;考马斯亮蓝G-250(C6232)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,ExpressPlus™ PAGE Gel(M81612C)购自南京金斯瑞生物科技有限公司,SDS(436143)、Tris(T1378)购自上海Sigma-Aldrich公司,用于蛋白质定量;胰蛋白酶(V5113)购自北京Promega Corporation公司,NH₄HCO₃(A6141)购自上海Sigma-Aldrich公司,用于蛋白质酶解;Pierce™ High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit(84868)、TMT 6plex kit(90066)、TMT 10plex kit(90111)、TMT-proplex kit(A44522)、Peptide desalting spin column(89851)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,10K超滤管(OD010C35)购自中国Pall Corporation公司,Acetonitrile(1499230-935)、Formic acid(111670)购自上海Merck Millipore公司,Trifluoroacetic acid(T6508)购自上海Sigma-Aldrich公司,用于LC-MS分析。

1.1.2 主要仪器设备 光学显微镜(MZ62)购自广州明美光电技术有限公司;电热恒温水槽(DK-88)

购自上海精宏实验设备有限公司;病理切片机(RM2016)购自上海徠卡显微系统贸易有限公司;色谱仪(Easy-nLC1200)、可见紫外分光光度计(Multi-Skan FC)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;真空离心浓缩仪(Concentrater plus)、离心机(5430R, 5424R)购自上海 Eppendorf AG 公司;脱水机(JJ-12J)、包埋机(JB-P5)购自武汉俊杰电子有限公司;组织摊片机(KD-P)购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;动物呼吸机(TM031-1210-01-010-009)购自成都泰盟软件有限公司;质谱仪(timsTOF)购自美国 Bruker Corporation 公司;电泳系统(Mini-PRO-TEAN Tetra)购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司;超声波系统(150-96)购自 Biosafer 公司;湿盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.1.3 实验动物 选取健康 6~8 周雌性生育龄未孕 SD 大鼠 36 只, 体质量 240~260 g, 动物饲养于山西医科大学实验动物中心, 室内温度为 24~26 °C, 相对湿度为 50%~70%, 12 h/12 h 光暗循环, 自由饮食。本研究经山西医科大学第二医院伦理委员会的审批同意, 伦理批号为 DW2024001。

1.2 动物实验

1.2.1 去势模型的构建 36 只大鼠用七氟烷进行麻醉, 其中, 24 只大鼠进行去势手术, 12 只大鼠进行假手术(sham 组)模拟正常未绝经状态。去势手术: 将七氟烷麻醉成功后的大鼠, 侧卧位固定于无菌手术板, 以最后肋稍后方为中心剪毛备皮, 用碘酒和酒精依次消毒皮肤; 无菌手术刀自腰椎沿背部正中线下做 1~2 cm 纵向切口, 切开皮肤, 依次钝性剥离筋膜及肌肉层进入腹腔, 找到脂肪堆后上下探寻, 可见被包裹于脂肪组织中大鼠卵巢, 卵巢组织呈粉红色“桑葚样”, 绿豆大小, 提起卵巢并分离周围脂肪团, 在输卵管峡部实施结扎, 然后剪掉双侧卵巢组织, 检查无渗血以后, 将脂肪组织和子宫角送回腹腔摆正, 给予青霉素粉局部撒敷, 间断缝合肌肉及皮肤层关腹^[8]。假手术组将大鼠按上述步骤剪开腰肌暴露腹腔, 暴露时间与手术组时间相等, 后将肌层与皮肤缝合, 用碘伏擦拭创口。术后自然喂养。手术后 14 d 开始连续阴道涂片观察动情周期变化。阴道涂片方法: 移液器取 50 μ L 生理盐水于大鼠阴道内吹吸 2~3 次, 吸出后涂于载玻片上。待干燥后, 使用瑞氏染液染色, 光学显微镜下观察。当连续 5 d 没有动情周期改变时, 初步表示模型构建成功^[8]。

1.2.2 分组及给药 将造模成功后去势大鼠采用随机数字表法分为两组, 每组大鼠 12 只: 去势组(OVX 组)和去势大鼠局部雌激素使用组(OVX+E2 组)。OVX+E2 组大鼠每日给药前先分别称重, 按 0.1 g/(kg·d) 剂量将雌激素(红丽来, 14 g/支, 新疆新姿原生物制药有限责任公司)稀释于 0.5 mL 生理盐水中, 注入大鼠的阴道内给予药物局部治疗 21 d。其余两组不予药物干预。

1.2.3 样本收集与制备 末次给药后大鼠以颈椎脱臼法安乐死, 并取出大鼠阴道组织。将取下的阴道组织用 PBS 液清洗去除残留血液和污染物, 迅速剥离脂肪和筋皮等结缔组织, 清洗干净。用组织剪或手术刀将阴道组织分离。液氮速冻 5 min, -80 °C 保存, 干冰运输。为进行后续蛋白质组学分析, 本研究采用随机数字表将各组(OVX 组、OVX+E2 组及 sham 组)的 12 个独立样本随机分为 3 个生物学重复。每例生物学重复样本, 均由 4 只大鼠的阴道组织等质量混合后研磨制备而成。

1.2.4 非标记定量蛋白质组学分析 非标记定量蛋白质组学研究的主要步骤包括: 蛋白质提取、蛋白质定量、蛋白质酶解、LC-MS/MS 分析、数据库检索、数据分析等环节。

(1) 蛋白质提取及蛋白质定量。每例样品分别加入适量 SDT 裂解液, 使用匀浆器进行匀浆, 转移到 EP 管中, 然后沸水浴 3 min, 超声破碎 2 min, 4 °C, 16 000g 离心 20 min, 取上清, 使用 BCA 法进行蛋白定量, 每例样品各取 15 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳实验, 电泳结果进行考马斯亮蓝染色。

(2) 蛋白质酶解。每组样品各取 100 μ g 蛋白进行 FASP 酶解, 步骤如下: 每例样品中分别加入适量 1 mol/L DTT 至终浓度 100 mmol/L, 沸水浴 5 min, 冷却至室温。加入 200 μ L UA buffer (8 mol/L Urea, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 混匀, 转入 10 kD 超滤离心管, 12 000g 离心 15 min。加入 200 μ L UA buffer 离心 12 000g 15 min, 弃滤液。加入 100 μ L IAA (50 mmol/L IAA 溶解于 UA), 600 r/min 振荡 1 min, 避光室温 30 min, 12 000g 离心 10 min。加入 100 μ L UA buffer, 12 000g 离心 10 min, 重复 2 次。加入 100 μ L NH_4HCO_3 buffer, 14 000g 离心 10 min 重复 2 次。加入 40 μ L Trypsin buffer (6 μ g Trypsin 溶解于 40 μ L NH_4HCO_3 buffer), 600 r/min 振荡 1 min, 37 °C 孵育 16~18 h。换新收集管, 12 000g 离心 10 min, 收集滤液, 加入适量 0.1% TFA 溶液, 酶解后的肽段使用

C18 Cartridge 脱盐,真空冻干。酶解后的肽段干燥后用 0.1% TFA 复溶,肽段浓度测定,以备 LC-MS 分析。

(3)LC-MS 分析:每例样品取适量肽段使用纳升流速 Easy nLC 1200 色谱系统(Thermo Scientific)进行色谱分离。缓冲液:A 液为 0.1% 甲酸水溶液,B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 80%)。样品直接经商品化色谱分析柱(250 mm×75 μm, 1.6 μm, Ion-Opticks)进行梯度分离,流速为 300 nL/min。液相分离梯度如下:0~45 min,B 液线性梯度从 2% 到 22%;45~50 min,B 液线性梯度从 22% 到 35%;50~55 min,B 液线性梯度从 35% 到 80%;55~60 min,B 液维持在 80%。肽段分离后用 timsTOF 质谱仪(Bruker)进行 DDA-PASEF(数据依赖采集)质谱分析。分析时长为 60 min,检测模式:正离子,母离子扫描范围:100~1 700 m/z , Intensity Threshold: 5 000.00; Ion mobility: 0.6~1.6 $V \cdot s/cm^2$; Ramp Time: 100.0 ms; Accumulation Time: 2.0 ms。达到 20 000 计数目标值的母离子动态排除时间:0.4 min。Quadrupole isolation width: 2 Th ($m/z < 700$)/3 Th ($m/z > 700$)。每一个 TIMS 循环时间为 1.1 s,其中包括 1 个 Full MS 和 10 个 PASEF MS/MS。

1.2.5 蛋白质组学数据分析 本项目对 LC-MS 分析所得的质谱数据进行如下处理:首先,使用 MS-Fragger 3.4 软件,在 Uniprot 中的 *Rattus norvegicus* (Rat) 蛋白质数据库(版本 20230210,共 54 767 条蛋白质序列)中进行检索,以鉴定样品中的蛋白质。在此基础上,筛选出组间差异蛋白。随后,为阐释这些差异蛋白的生物学功能,分别利用 GO 数据库(Gene Ontology Knowledgebase)和 KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)进行功能富集分析:GO 分析从生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)3 个层面揭示差异蛋白的功能归类;KEGG 分析则从信号通路层面阐释差异蛋白的生物学意义^[9,10]。

1.3 统计学分析

在蛋白质的显著性差异分析中,采用 Student *t* 检验结合变化倍数(fold change, FC)的方法,筛选出显著差异蛋白(通常满足 $P < 0.05$,同时 $FC > 1.5$ 或 $< 1/1.5$)。GO 与 KEGG 功能富集显著性通过 Fisher 精确检验评估,并使用 Benjamini-Hochberg 法进行多重检验校正,以控制假发现率(FDR)。结果用 $P < 0.05$ 表示功能显著富集, P 值越小表示功能富集越显著。

2 结果

2.1 去势模型建立情况

24 只大鼠均造模成功。假手术大鼠阴道上皮脱落细胞涂片可见大量角化上皮细胞,形状大而不规则,符合动情期阴道涂片形态学特征,表明大鼠拥有正常动情周期;去势手术大鼠阴道涂片没有动情周期的改变(见图 1),证明造模成功。

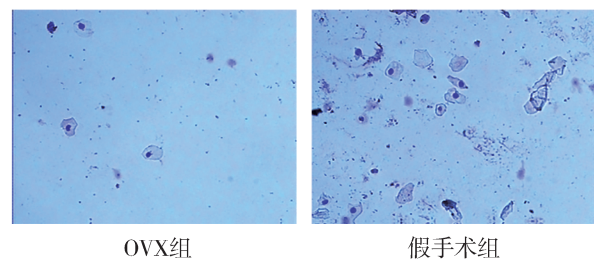


图 1 去势组和假手术组大鼠阴道涂片比较

Figure 1 Comparison of vaginal smears of rats between OVX group and sham group

2.2 非标记定量蛋白质组学结果

每例样品各取 15 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳实验,电泳结果进行考马斯亮蓝染色,扫描结果如图 2 所示。各组蛋白质酶解肽段长度分布见图 3。通过箱线图、小提琴图及直方图对蛋白质表达数据进行质量评估。箱线图与小提琴图结果显示,三组间蛋白质表达量的中位数及分布形态基本一致(见图 4);直方图结果显示,所有样本的蛋白质表达量总体呈近似正态分布(见图 5),表明样本整体质量较高,组内生物学重复的一致性较好。

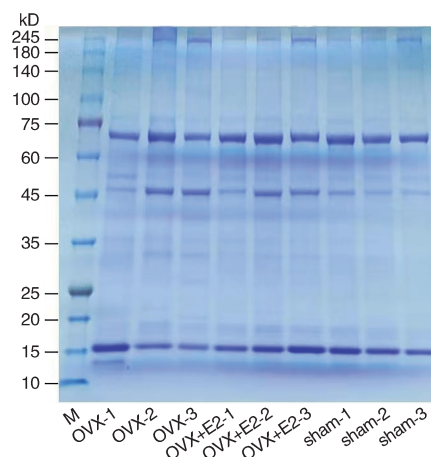


图 2 各组大鼠阴道组织蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图
Figure 2 SDS-PAGE analysis of vaginal tissue proteins from rats in different groups

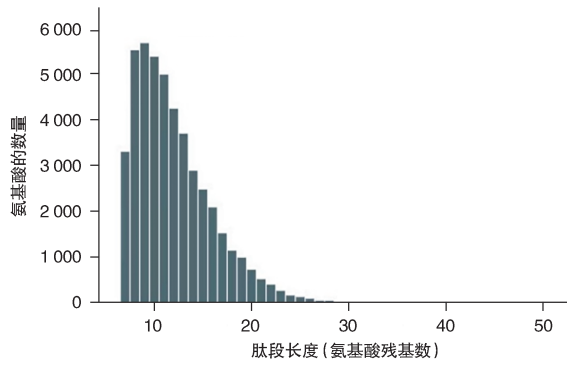


图3 蛋白质酶解后肽段的长度分布

Figure 3 Length distribution of peptides after protein digestion

2.2.1 所有检测蛋白质的亚细胞定位分析 通过LC-MS/MS分析,本研究9例大鼠阴道组织样本的蛋白质酶解肽段中共检测到46 907种蛋白肽段,最终鉴定到5 663个蛋白质,通过数据库比对,这些蛋白质已成功映射到其相应的基因符号。这些蛋白质及基因的亚细胞定位主要位于细胞质(见图6)。

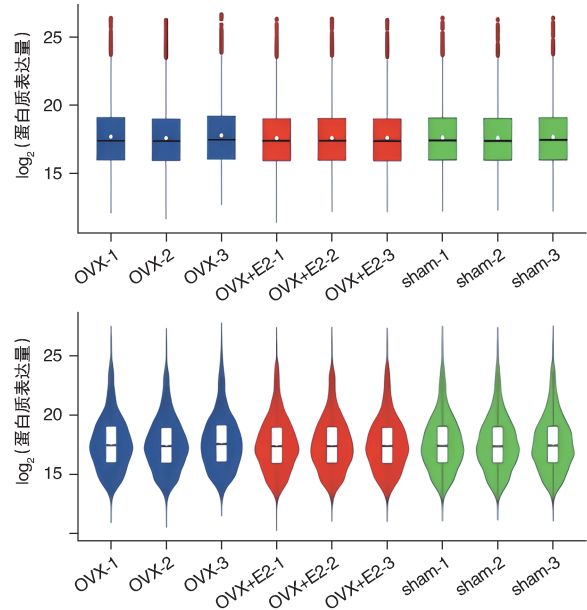


图4 各组大鼠阴道组织蛋白质表达量的组间差异

Figure 4 Comparison of vaginal tissue protein expression levels among groups

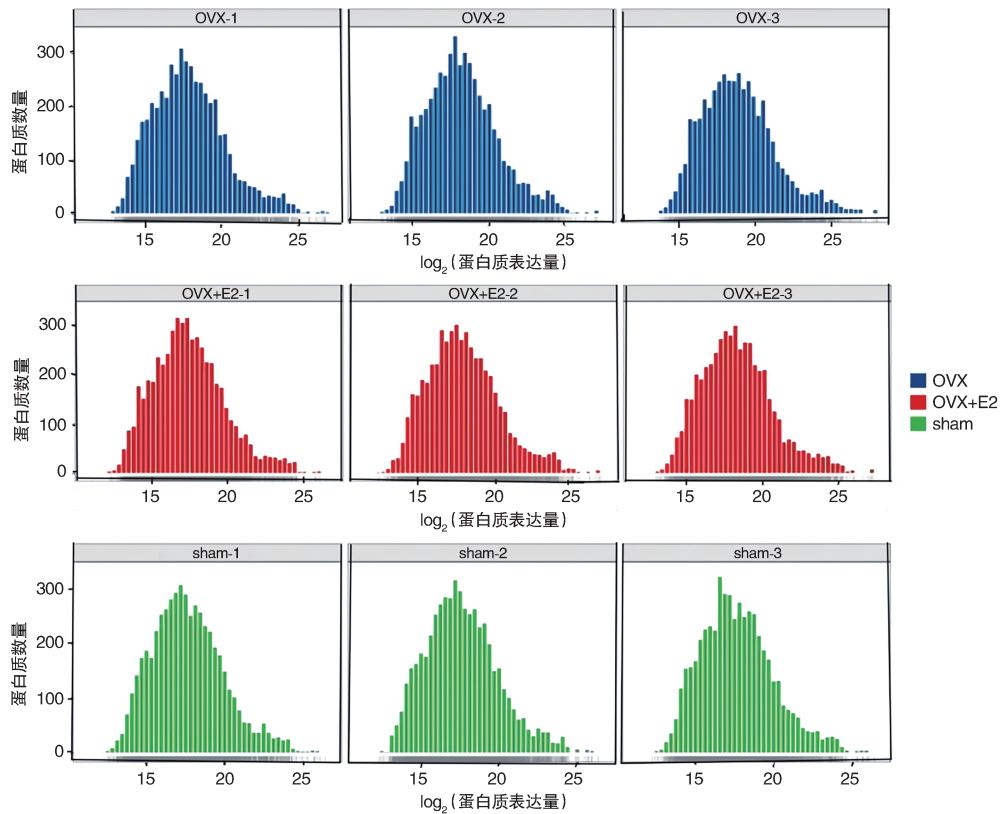


图5 各组大鼠阴道组织蛋白质表达量的分布特征

Figure 5 Distribution of vaginal tissue protein expression levels in rats in each group

2.2.2 差异蛋白及基因的筛选 OVX+E2组与OVX组共同表达的蛋白及基因5 522种,其中上调的差

异蛋白及基因74种,占比1.31%;下调的差异蛋白及基因28种,占比0.49%(见图7及表1)。sham组

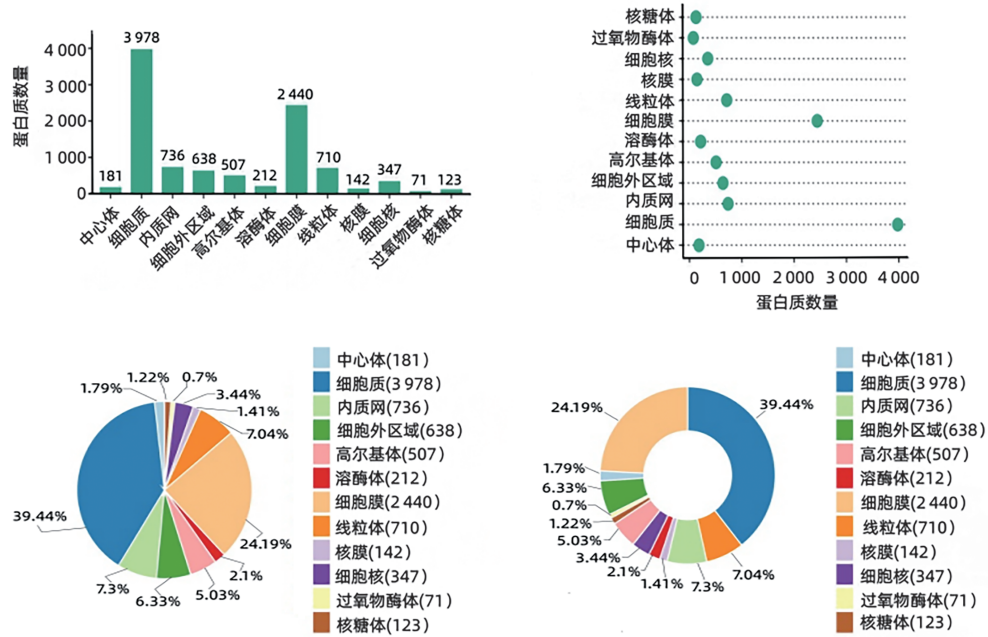


图6 非标记定量蛋白质组学鉴定蛋白质的亚细胞定位分析

Figure 6 Subcellular localization analysis of proteins identified by label-free quantitative proteomics

与OVX组共同表达的蛋白及基因5496种,其中上调的差异蛋白及基因494种,占比8.72%,下调的差异蛋白及基因161种,占比2.84%(见图7及表1)。OVX+E2组与OVX组,以及OVX+E2组与sham组的差异蛋白均以上调为主(见图8)。

表1 三组间差异蛋白数量统计

Table 1 Quantitative analysis of differentially expressed proteins between groups

组间比较 (Group Comparison)	上调 (Upregulated)	下调 (Downregulated)	显著差异蛋白数 (Significantly Different Proteins)
OVX+E2 vs OVX	74	28	102
sham vs OVX	494	161	655

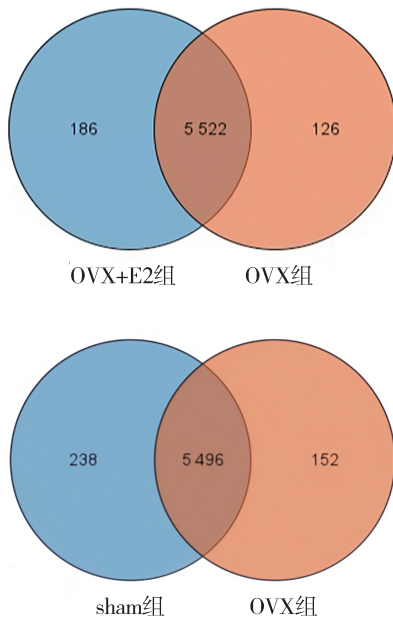


图7 三组间差异蛋白的筛选

Figure 7 Screening of differentially expressed proteins between groups

2.2.3 与雌激素代谢相关的差异蛋白及基因 在OVX+E2组与OVX组共同表达的蛋白中,共鉴定出73个与雌激素代谢相关的差异蛋白。其中,表达上调的蛋白有45个,表达下调的蛋白有28个。根据预设阈值筛选($P < 0.05$ 且 $|FC| > 1.5$),仅有Shc转化蛋白1(Shc1)呈显著上调($P = 0.026$, $FC = 2.56$)。

在sham组与OVX组共同表达的蛋白中,共鉴定出131个与雌激素代谢相关的差异蛋白。其中,表达上调的蛋白有78个,表达下调的蛋白有53个。经相同标准筛选,共有8个蛋白表现为显著上调(见表2)。

2.2.4 差异蛋白之间的相关性分析 差异蛋白间的相互作用网络通过STRING数据库(版本11.5)进行分析,该数据库采用基于朴素贝叶斯的统计框架对不同证据进行加权融合,最终为每对蛋白质生成一个“置信度得分”。对OVX+E2组与OVX组间筛选得到的差异蛋白进行了关联分析,重点考察其与信号衔接蛋白Shc1的互作关系。结果显示,与Shc1关

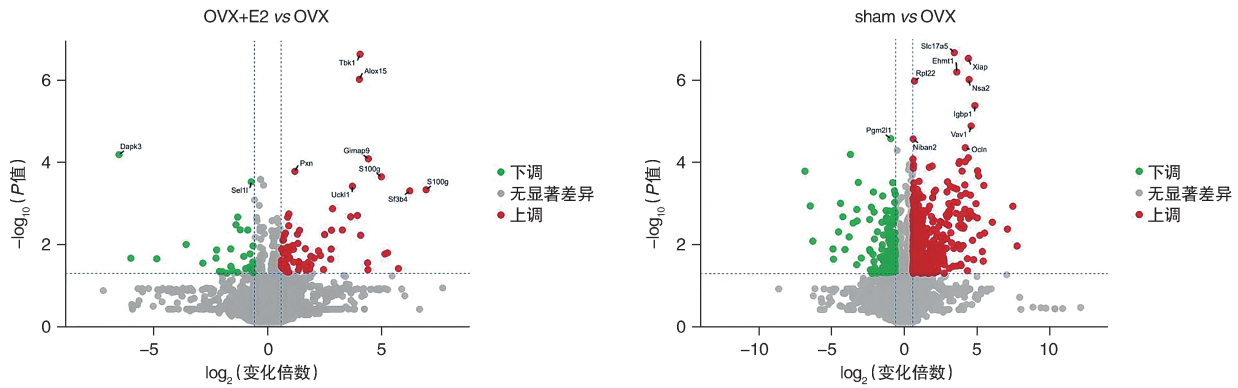


图8 三组间差异蛋白的火山图
Figure 8 Volcano plots of DEPs between groups

表2 sham组与OVX组间差异蛋白中与雌激素代谢有关的蛋白及基因

Table 2 Proteins and genes associated with estrogen metabolism in differentially expressed proteins between sham group and OVX group

基因	蛋白名称	P	FC
Krt14	角蛋白14	0.001	1.58
Shc1	shc转化蛋白1	0.001	2.46
Mmp9	基质金属蛋白酶9	0.002	20.74
Krt17	角蛋白17	0.005	1.59
Krt23	角蛋白23	0.015	3.23
Krt33b	角蛋白33B	0.027	1.94
Krt35	角蛋白35	0.027	1.94
Krt42	角蛋白42	0.029	1.86

表3 OVX+E2组与OVX组差异蛋白之间的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of differential proteins between OVX+E2 group and OVX group

来源蛋白	目标蛋白	置信度得分
Shc1	Peak1	668
Gbf1	Pxn	404
Shc1	Pxn	600
Wasl	Pxn	699
Wasl	Scrib	458
Wasl	Sh3yl1	780
RT1-Db1	Shc1	624
Wasl	Trip10	897
Srgap2	Wasl	653

系显著的蛋白有3种,分别是桩蛋白(Paxillin, Pxn)、MHC II类抗原(MHC class II antigen, RT1-Db1)、伪足富集的非典型激酶1(pseudopodium-enriched atypical kinase 1, Peak1)。Shc1与Pxn、RT1-Db1、Peak1构成蛋白网络发挥作用(见图9及表3)。

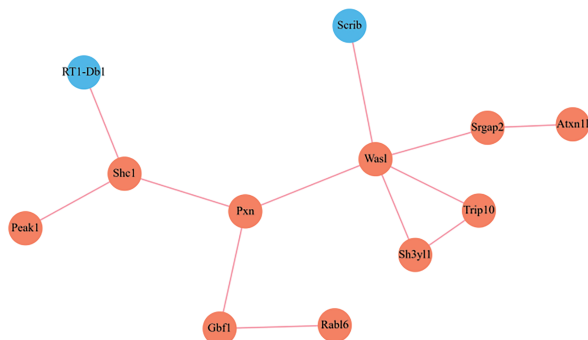


图9 OVX+E2组与OVX组差异蛋白间的相关性分析
Figure 9 Correlation analysis of differential proteins between OVX+E2 group and OVX group

2.2.5 OVX+E2组与OVX组差异蛋白的GO分析

对OVX+E2组与OVX组间差异蛋白进行GO富集分析发现,Shc1在3个类别中均呈现显著富集。在BP类别中,共发现200条显著富集通路,其中Shc1参与了5条,分别为:细胞组分组织或生物发生、细胞黏附、骨髓细胞增殖的正向调节、细胞骨架组织以及骨髓细胞增殖的调控;在CC类别中,共发现24条显著富集通路,Shc1参与1条,即Shc-EGFR复合物;在MF类别中,共发现42条显著富集通路,Shc1参与1条,即磷酸酪氨酸残基结合(见表4)。综合分析表明,细胞组分组织或生物发生和Shc-EGFR复合物这两个条目,在Shc1的功能注释中占据重要地位(见图10)。

2.2.6 OVX+E2组与OVX组相比差异蛋白的KEGG分析

对OVX+E2组与OVX组差异蛋白的KEGG富集分析,共鉴定出104条上调通路,其中6条通路差异显著。按富集程度(P值由小到大)排列,分别

表4 OVX+E2组与OVX组差异蛋白Shc1的GO分析
Table 4 GO analysis of differentially expressed protein Shc1 between OVX+E2 group and OVX group

条目描述	P	富集因子	GO类别
细胞组分组织或生物发生	0.005	1.29	BP
细胞黏附	0.017	1.76	BP
骨髓细胞增殖的正向调节	0.018	54.41	BP
细胞骨架组织	0.024	1.60	BP
骨髓细胞增殖的调控	0.036	27.20	BP
Shc-EGFR复合物	0.019	52.48	CC
磷酸酪氨酸残基结合	0.039	3.85	MF

是:上皮细胞的细菌侵袭通路、内吞作用、戊糖磷酸途径、耶尔森菌感染、剪接体以及谷胱甘肽代谢。其中上皮细胞的细菌侵袭通路为P值最小、富集程度最高的通路,且有Shc1参与(见表5)。

在KEGG数据库的一级类别中,这些显著富集通路主要归属于细胞过程、遗传信息处理和人类疾病三大类;其二级类别则涵盖碳水化合物代谢、细菌性传染病、其他氨基酸代谢、运输和分解代谢以及转录(见图11)。

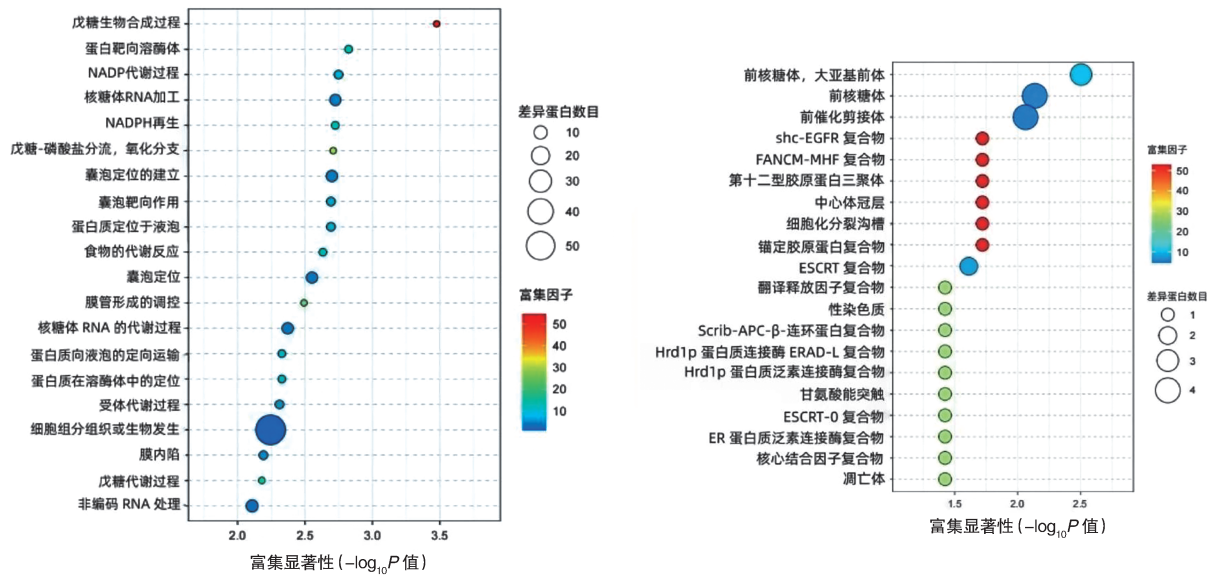


图10 OVX+E2组与OVX组差异蛋白的GO富集分析气泡图

Figure 10 Bubble plot of GO enrichment for DEPs between OVX+E2 group and OVX group

表5 OVX+E2组与OVX组差异蛋白KEGG分析的差异显著上调的通路

Table 5 Significantly up-regulated pathways of DEPs between OVX+E2 group and OVX group by KEGG analysis

通路名称	代表基因	富集因子	P
上皮细胞的细菌侵袭通路	Pxn(1.19)/Wasl(0.95)/Shc1(1.36)	9.12	0.004
内吞作用	Zfyve16(2.49)/Wasl(0.95)/Mvb12a(2.78)/Gbf1(0.82)/Hgs(0.92)	4.27	0.006
戊糖磷酸途径	Pgd(0.93)/G6pd(0.59)	15.60	0.007
耶尔森菌感染	Tbk1(4.05)/Pxn(1.19)/Wasl(0.95)	5.20	0.020
剪接体	Sf3b4(6.23)/Prpf38b(5.14)/Prpf6(0.80)	4.62	0.027
谷胱甘肽代谢	Pgd(0.93)/G6pd(0.59)	6.59	0.037

注:表中基因后面括号内数值表示变化倍数。

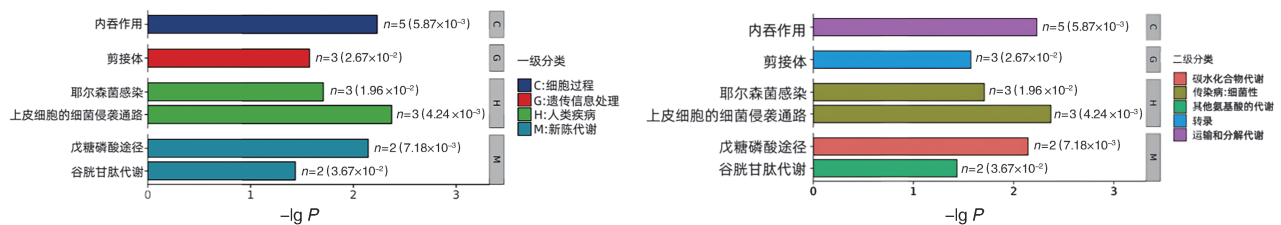


图11 OVX+E2组与OVX组差异蛋白中显著富集的KEGG通路

Figure 11 KEGG pathways significantly enriched in differentially expressed proteins between OVX+E2 group and OVX group

3 讨论

阴道萎缩严重影响绝经女性的生活质量,随着老龄化和生活水平的提高,该病应该得到进一步重视和发展。目前,阴道萎缩的一线治疗方式是激素治疗,其中局部雌激素给药因全身影响较小而成为常用方案。尽管其临床有效性得到确认,但关于局部雌激素如何改善阴道萎缩的具体分子机制,尤其是在蛋白质组学层面的动态改变,尚不明确。阐明这一机制,对于深入理解治疗原理、优化治疗策略具有重要意义。

非标记定量蛋白质组学技术通过直接比较肽段质谱信号强度,能够识别组间差异表达的蛋白,并借助GO与KEGG分析系统解析其潜在作用机制。本研究采用该策略,旨在从蛋白质层面揭示雌激素改善阴道萎缩的分子基础。

本研究结果显示,阴道萎缩时下调的蛋白并非全部在局部雌激素治疗后上调。其原因可能在于,绝经状态时下降的不光是雌激素,还包括孕激素和雄激素。此外,对与雌激素代谢通路相关蛋白的分析也表明,阴道萎缩时Shc1、角蛋白及基质金属蛋白酶9的表达均发生改变,而局部雌激素治疗后仅改变了Shc1的表达。这或许可以解释为何局部雌激素治疗虽能改善症状,却无法完全代替全身雌激素治疗,以致当效果不好时仍需使用全身给药方案。这间接证实了先前研究提出的观点,即在改善阴道萎缩的过程中雄激素和孕激素可能也有一定的作用^[11]。

雌激素通过ErbB生长因子家族促进阴道上皮增殖是其经典作用途径。有研究发现,雌激素与受体结合后,需借助ErbB生长因子配体介导,才能引起阴道上皮增殖及角化^[12]。本研究虽未在OVX+E2组与OVX组差异蛋白筛选中发现ErbB生长因子配体表达的差异,但ErbB生长因子配体下游的Shc1表达上调。这提示局部雌激素可能通过上调Shc1发挥改善去势大鼠阴道萎缩的作用。为验证该推论,本研究进一步的GO分析提示存在“Shc-EGFR复合物”通路,表明Shc1可能与表皮生长因子共同发挥作用。已知表皮生长因子能促进包括阴道在内的多种上皮组织增殖。Gao等^[13]的研究证实,雌激素可通过调节表皮生长因子受体(EGFR)来影响细胞的生长、增殖与凋亡。在分子机制上,EGFR被激活后,其信号可通过接头蛋白Shc1向下游的p21-

Ras通路传递。Ras蛋白作为一种GTP酶分子开关,通过在其活性(GTP结合)与非活性(GDP结合)状态间循环,转导细胞外生长因子信号,进而调控细胞增殖、存活、生长、迁移、分化或细胞骨架活力^[14,15]。本研究中观察到OVX+E2组Shc1表达上调,这一发现与上述信号通路的激活机制高度吻合,提示局部雌激素可能通过上调Shc1介导的信号传导改善阴道萎缩。除增殖相关通路外,局部雌激素治疗还可通过抗炎、抗氧化应激的作用促进阴道血管舒张、增加血流量,从而改善阴道萎缩状态^[16]。Shc1已被证实参与调节细胞活性氧水平和氧化应激反应^[17,18]。综上,推测局部雌激素的抗氧化应激作用亦可能通过Shc1实现,这为理解局部雌激素多途径改善阴道萎缩提供了新的线索。

本研究的KEGG通路功能分析显示,Shc1在“上皮细胞的细菌侵袭”通路中显著富集。该通路中同时上调的桩蛋白、Shc1、肌动蛋白成核促进因子均已能增强上皮细胞抵御细菌入侵的能力^[19,20]。提示Shc1上调可能通过上皮细胞的细菌侵袭通路强化阴道黏膜免疫屏障功能。本研究差异蛋白相关性分析进一步揭示了Shc1的作用网络,其与伪足富集非典型激酶1(PEAK1)、桩蛋白和MHC II类抗原关联。PEAK1是调控EGFR下游细胞增殖与迁移的关键节点^[21,22];桩蛋白是局部黏着斑结构蛋白之一,是细胞内信号传导途径中的关键节点,与血管形成、细胞-细胞外基质相互作用、酪氨酸蛋白激酶信号传导、IL-3信号通路及IL-6信号通路有关,可促进细胞的增殖、黏附与侵袭^[23,24];MHC II类抗原与细菌感染、抗原处理和呈递、Th1和Th2细胞分化、免疫稳态相关^[25,26]。这一互作网络提示,Shc1的上调可能作为一个枢纽,同时协调局部雌激素对阴道上皮的增殖、分化以及免疫稳态维护等多重效应,从多维度共同促进阴道组织的整体健康。

综上所述,局部雌激素可能通过上调Shc1改善去势大鼠的阴道萎缩。生物信息学分析提示,Shc1可能通过形成Shc-EGFR复合物调控酪氨酸磷酸化信号,进而影响细胞组分组织或生物发生、细胞黏附、骨髓细胞增殖的正向调节、细胞骨架组织、骨髓细胞增殖的调控等生物过程;同时,其可能参与上皮细胞的细菌侵袭通路,并与非典型激酶1、桩蛋白、MHC II类抗原构成相互作用网络发挥作用。这些发现为深入理解局部雌激素治疗阴道萎缩的分子机制提供了新的线索,并可能为未来药物研发提

供潜在靶点。然而,本研究存在一定局限性。首先,结论基于动物模型,其与人类阴道萎缩的病理生理学可能存在物种差异。其次,蛋白质组学筛选出的关键差异蛋白 Shc1 及其预测通路,尚未在功能层面进行实验验证。未来研究可在人类萎缩阴道组织中验证 Shc1 的表达与功能,并利用细胞或动物模型通过基因敲减、过表达等手段,在体内外深入阐明 Shc1 在雌激素作用下调控阴道上皮细胞增殖与分化的具体信号转导通路,以推动其应用向临床转化。

参考文献:

- [1] Hassanein MM, Huri HZ, Baig K, *et al.* Determinants and Effects of Vitamin D supplementation in postmenopausal women: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 727-742.
- [2] Comini ACM, Carvalho BM, Moreira MJB, *et al.* Safety and serum estradiol levels in hormonal treatments for vulvovaginal atrophy in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Breast Cancer*, 2023, 23(8): 835-846.
- [3] Pérez-López FR, Phillips N, Vieira-Baptista P, *et al.* Management of postmenopausal vulvovaginal atrophy: recommendations of the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(8): 746-752.
- [4] Constantine GD, Simon JA, Pickar JH, *et al.* The REJOICE trial: a phase 3 randomized, controlled trial evaluating the safety and efficacy of a novel vaginal estradiol soft-gel capsule for symptomatic vulvar and vaginal atrophy[J]. *Menopause*, 2017, 24(4): 409-416.
- [5] Zhu Y, Wei J, Yang X, *et al.* Investigation on prevalence and risk factors associated with genitourinary syndrome of menopause in middle-aged and older women in Beijing community: a cross sectional study[J]. *BMC Womens Health*, 2022, 22(1): 558.
- [6] Woods NF, Shaver JF, Berg JA. Genitourinary syndrome of menopause: prevalence and predictors[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2024, 67(1): 27-42.
- [7] Crandall CJ, Mehta JM, Manson JE. Management of menopausal symptoms: a review[J]. *JAMA*, 2023, 329(5): 405-420.
- [8] 杨丽雅, 宋涛, 何佳璘, 等. 阴道萎缩大鼠模型的建立及在药效评价中的应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2022, 42(6): 531-540.
- [9] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(12): 1367-1372.
- [10] Cox J, Hein MY, Luber CA, *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ [J]. *Mol Cell Proteom*, 2014, 13(9): 2513-2526.
- [11] The NAMS 2020 GSM Position Statement Editorial Panel. The 2020 genitourinary syndrome of menopause position statement of The North American Menopause Society[J]. *MENOPAUSE*, 2020, 27(9): 976-992.
- [12] Hirano YU, Suzuki K, Iguchi T, *et al.* The role of Fgf signaling on epithelial cell differentiation in mouse vagina [J]. *In Vivo*, 2019, 33(5): 1499-1505.
- [13] Gao X, Cai Y, Wang Z, *et al.* Estrogen receptors promote NSCLC progression by modulating the membrane receptor signaling network: a systems biology perspective [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 308.
- [14] Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(11): 827-837.
- [15] Lin CC, Suen KM, Stainthorp A, *et al.* Targeting the Shc-EGFR interaction with indomethacin inhibits MAP kinase pathway signalling[J]. *Cancer Lett*, 2019, 457: 86-97.
- [16] Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 116: 135-170.
- [17] Ma H, Wang C, Liu X, *et al.* Src homolog and collagen homolog 1 isoforms in acute and chronic liver injuries [J]. *Life Sci*, 2021, 273: 119302.
- [18] Jeannot P, Besson A. Cortactin function in invadopodia [J]. *Small GTPases*, 2020, 11(4): 256-270.
- [19] 贺飞明, 董丹, 陈宇婷, 等. 细粒棘球蚴囊液通过 WASP/Arp2/3/F-actin 通路抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的初步研究 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(2): 231-235.
- [20] López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, *et al.* Paxillin: a crossroad in pathological cell migration [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 1-10.
- [21] Wang Y, Kelber JA, Tran Cao HS, *et al.* Pseudopodium-enriched atypical kinase 1 regulates the cytoskeleton and cancer progression [corrected] [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(24): 10920-10925.
- [22] Bristow JM, Reno TA, Jo M, *et al.* Dynamic phosphorylation of tyrosine 665 in pseudopodium-enriched atypical kinase 1 (PEAK1) is essential for the regulation of cell migration and focal adhesion turnover [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 123-131.
- [23] Ma X, Hammes SR. Paxillin actions in the nucleus [J]. *Steroids*, 2018, 133: 87-92.
- [24] Turner CE. Paxillin interactions [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(23): 4139-4140.
- [25] Rossjohn J, Gras S, Miles JJ, *et al.* T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 169-200.
- [26] Harton JA. Class II MHC cytoplasmic domain-mediated signaling in B cells: a tail of two signals [J]. *Hum Immunol*, 2019, 80(1): 32-36.

(责任编辑:阮爱萍)