

网络出版时间:2024-11-18 15:38:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1541.008

烯醇化酶和层黏连蛋白在细菌性阴道病模型小鼠阴道中的表达

张瑞¹, 吴益青², 尹海旭¹, 李昶¹, 马爱昕¹, 王君竹³, 白会会⁴, 刘朝晖⁴, 廖秦平⁵

(¹ 北京大学第一医院妇产科, 北京 100034; ² 西北妇女儿童医院, 西安 710061;

³ 北京大学政府管理学院大数据与公共政策实验室, 北京 100091;

⁴ 北京妇产医院妇产科, 北京 100026; ⁵ 北京清华长庚医院妇产科, 北京 102218)

摘要 目的 研究加德纳菌感染的小鼠和未感染的小鼠阴道上皮组织中的烯醇化酶和层黏连蛋白的差异情况, 探讨烯醇化酶和层黏连蛋白与细菌性阴道病的发病关系。方法 用来自细菌性阴道病患者阴道分泌物中分离、纯化、鉴定的加德纳菌菌株, 感染小鼠阴道, 建立细菌性阴道病小鼠模型。将建模成功的小鼠和建模失败的小鼠分别定义为成功组和失败组。Western blot 检测两组小鼠阴道上皮组织中的烯醇化酶和层黏连蛋白的表达。统计建模成功率, 比较两组烯醇化酶和层黏连蛋白的表达差异。结果 1 株阴道加德纳菌菌株感染 10 只 SPF 级 KM 小鼠, 7 只小鼠符合细菌性阴道病诊断标准, 3 只建模失败, 建模成功率 70%。成功组的小鼠阴道上皮组织中的层黏连蛋白和烯醇化酶的含量明显高于失败组 ($P < 0.05$)。结论 烯醇化酶和层黏连蛋白在加德纳菌感染的小鼠和未感染小鼠的表达存在明显差异, 这提示烯醇化酶和层黏连蛋白可能参与了加德纳菌诱发的细菌性阴道病的发生。

关键词 动物模型; 细菌性阴道病; 烯醇化酶; 层黏连蛋白; 阴道加德纳菌; 发病机制

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1939-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.008

烯醇化酶是一种多功能蛋白, 存在于多种病原生物体的细胞内、细胞表面或分泌物中, 能参与到外界环境并与其发生作用^[1-2]。烯醇化酶除了在糖酵解过程中通过调节细胞生产能量的过程来保证细胞 ATP 水平、细胞的存活、细胞生理功能的执行^[3-4], 还能参与各种微生物侵袭宿主, 主要是因为烯醇化酶能与细胞外基质中的某些成份相互结合, 如纤溶酶原、层黏连蛋白, 影响和调控细胞黏附、迁移、分化和增殖^[5-7]。金黄色葡萄球菌的烯醇化酶能与细胞外基质层黏连蛋白相互作用, 当抑制烯醇化酶时, 金黄色葡萄球菌和层黏连蛋白的结合会受到影响^[8-9]。既往未有研究阐明烯醇化酶与细菌性阴道病发生之间的关系, 也未见研究探讨其与层黏连蛋白结合对加德纳菌的黏附性的影响。该研究将采用动物模型探讨烯醇化酶和层黏连蛋白在细菌性阴道病小鼠阴道上皮组织中的表达情况, 旨在为研究烯

醇化酶和层黏连蛋白与细菌性阴道病的发病机制的关系提供前期基础。

1 材料与方法

1.1 加德纳菌菌株来源 人源性阴道加德纳菌菌株 (*Gardnerella vaginalis*, Vh-021) 由北京大学第一医院妇产科微生态实验室提供。该研究获得北京大学第一医院伦理委员会批准 (2023-366)。

1.2 主要试剂和仪器 烯醇化酶抗体 (SAB702, 南京川博生物技术有限公司), 层黏连蛋白 $\gamma 1$ 抗体 (HPA001908, Sigma-Aldrich, 美国), 蛋白分子量 Marker (上海碧云天生物技术公司, P0080), GAPDH (Affinity Biosciences, AF7021, 澳大利亚), ECL 发光试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), PVDF 膜 (Millipore, ISEQ00010, 美国)。电泳系统 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像系统 (Universal Vacuum Products Company, GELDOC-IT310, 美国), 发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope6100)。

1.3 建立动物模型 10 只 SPF 级雌性昆明 (KM) 小鼠, 18~22 g, 鼠龄 6~8 周, 获赠于西安交通大学实验动物中心。本研究经北京大学实验动物福利伦理委员会 (IACUS) 审批通过 (S2024-230), 整个实验过程遵循伦理委员会关于动物实验的相关规定。

2024-08-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81471420); 教育部博士学科点专项科研基金新教师类课题 (编号: 20130001120051)

作者简介: 张瑞, 男, 主治医师;

廖秦平, 女, 主任医师, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: qinping_liao@sohu.com

参照 Zhang et al^[10] 建模方法,小鼠进行 1 周的适应性饲养,再进行预处理。于菌液移植当天,将处于对数生长期的阴道加德纳菌菌株稀释至 1×10^8 CFU/ml,取 0.3 ml 缓慢注入小鼠阴道中,拎起鼠尾使其呈头低臀高位保持 3 min,1 次/d,连续重复 5 d。

1.4 分泌物检测及建模成功标准 于接种加德纳菌菌株后第 6 天,小棉签取少量阴道分泌物,检测 pH 值、进行氨试验,做分泌物涂片革兰染色镜检,采用 Amsel 标准和 Nugent 评分结合的方法作为诊断标准^[10],同时符合 Amsel 标准和 Nugent 评分双重诊断标准的小鼠才被认定为建模成功。

1.5 阴道组织取材 麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠,切开阴道,展开后取中段大小约 0.5 cm × 1.0 cm 阴道组织装入 EP 管中,放入液氮中冻存。

1.6 蛋白制备 取小鼠阴道组织标本于液氮中研磨后,移入新 EP 管,加入 RIPA 裂解液 350 μ l,冰上孵育 30 min,10 000 r/min 离心 5 min,留取上清液冻存。

1.7 Western blot 检测层黏连蛋白和烯醇化酶 取上一步中准备好的蛋白标本 10 μ l 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,置于封闭液稀释额的一抗(层黏连蛋白抗体浓度 1:200,烯醇化酶抗体浓度 1:800)及内参 GAPDH(1:10 000)抗体中 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜去除残留的一抗,在置于二抗室温孵育 2 h,洗膜去除残留的二抗,暗室显影。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,计量资料以中位数、四分位数间距表示,采用非参数检验比较两组中位数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加德纳菌感染小鼠阴道建立细菌性阴道病模型的效果 本研究中的实验小鼠共 10 只,其中 7 只小鼠成功建立细菌性阴道病的小鼠模型,3 只失败,成功率 70%,小鼠的阴道微生态评价信息见表 1。其中 7 只小鼠符合两个标准,3 只小鼠(4 号、5 号)不符合任一标准,1 只小鼠(6 号)符合 Amsel 标准而不符合 Nugent 评分标准。

2.2 小鼠阴道上皮组织中层黏连蛋白表达情况 将小鼠分为建模成功组和失败组,分别计算两组层黏连蛋白含量的平均水平,Western blot 检测结果显示,建模成功组的小鼠阴道组织中层黏连蛋白的含量高于建模失败组($P < 0.05$)(图 1)。

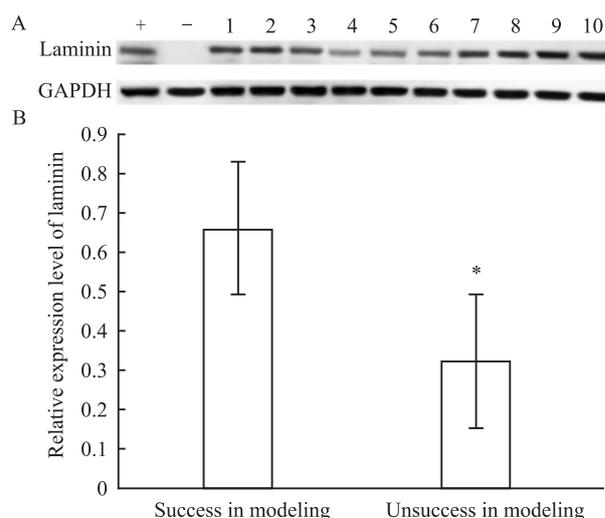


图 1 层黏连蛋白在加德纳菌诱导的细菌性阴道病小鼠阴道上皮组织中的表达情况

Fig. 1 Expression of laminin in vaginal epithelial tissue of *Gardnerella* induced bacterial vaginosis mice

A: 4, 5, and 6 were mice that failed modeling, while the Western blot images of the remaining mice showed low levels of laminin in the modeling failure group; B: Through non parametric testing, the average content of laminin in the successful modeling group was significantly higher than that in the failed modeling group; * $P < 0.05$ vs Successful group.

表 1 实验小鼠的阴道微生态评价情况

Score	The number of each mice									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nugent score	7	8	8	3	2	4	9	8	9	6
Amsel criteria	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Homogeneous thin vaginal Discharge	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
pH over 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amine odor	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Presence of clue cells	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

2.3 小鼠阴道上皮组织中烯醇化酶的表达情况

Western blot 检测结果显示,烯醇化酶在小鼠阴道上皮组织中均能检出,其中成功组小鼠阴道组织中的含量高于建模失败组($P < 0.05$)(图 2)。

3 讨论

动物模型是研究疾病的发病机制、诊治策略乃至开发新药的基础^[10]。虽然在细菌性阴道病的动物模型方面有不少探索,但是一直缺乏突破性的进展,最主要的原因是该病的确切发病机制仍然不清^[10]。在细菌性阴道病动物模型的菌种选择方面,早年常用的菌种有金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、

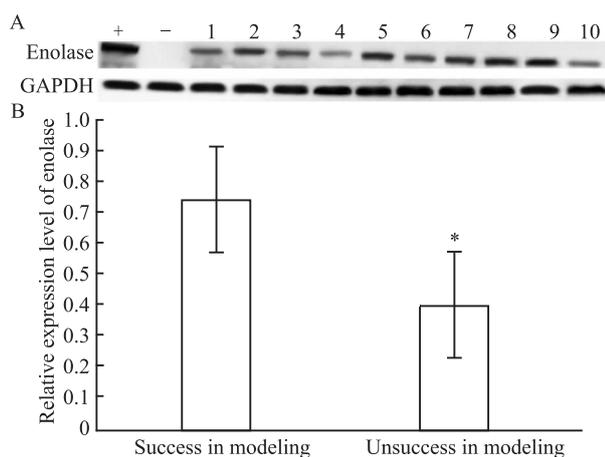


图2 烯醇化酶在加德纳菌诱导的细菌性阴道病小鼠阴道上皮组织中的表达情况

Fig.2 Expression of enolase in vaginal epithelial tissue of *Gardnerella* induced bacterial vaginosis mice

A: 4, 5, and 6 were mice that failed modeling, while the Western blot images of the remaining mice showed low levels of enolase in the modeling failure group; B: The average content of enolase in the successful modeling group was significantly higher than that in the failed modeling group; * $P < 0.05$ vs successful group.

淋球菌、绿脓杆菌,多数选取其中一个菌种,有的是由多个菌种混合的致病菌^[11-12]。然而这些菌种的最大问题是,在被感染小鼠的阴道中会发生明确的炎症表现,这与细菌性阴道病的疾病特征不符。2017年, Gilbert et al^[13]的研究中用阴道加德纳菌建立细菌性阴道病动物模型时发现:动物阴道组织无明显炎症表现,而其阴道上皮细胞脱落与黏附细菌、感染程度和唾液酸酶活性水平相关,证实了阴道加德纳菌在建立细菌性阴道病方面的优势。2019年, Gilbert et al^[14]用阴道加德纳菌和普雷沃菌共同感染动物建立细菌性阴道病模型,证实了唾液酸酶活性、上皮细胞脱落与细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)发病中的表现。在本研究中,为了阐明阴道加德纳菌在细菌性阴道病发病过程的作用,单独采用了来自BV患者的加德纳菌菌株感染小鼠诱发BV的发生。另外本研究检测了所有小鼠的Amsel特征和Nugent评分,同时满足两个诊断标准才认定为BV发生。结果在7只BV小鼠阴道中均检测到线索细胞阳性,而无急性炎症性表现。这些结果再次证实加德纳菌单独感染小鼠建立BV模型,符合BV的临床特征,适合用于BV的研究。另外组织炎性细胞和炎症因子可能并不参与加德纳菌感染引起的阴道鳞状上皮细胞的脱落。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)包括细

胞间质和基底膜,它的组成成分主要包括以下两大类:经典ECM和非经典ECM。经典ECM主要起支持作用,其中主要包括胶原蛋白、层黏连蛋白、纤维蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖以及硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等;非经典ECM包括骨桥蛋白、骨结合蛋白以及一些小分子的分泌蛋白^[15-17]。层黏连蛋白是细胞外基质的重要调节因子,是由 α 、 β 、 γ 链组成的三聚体^[18]。层黏连蛋白之间、层黏连蛋白与其他基底膜成分之间的相互作用,对基底膜带的形成起非常重要的作用,能稳定IV型胶原形成的网络,加固基底膜的稳定性^[18]。研究^[19]表明层黏连蛋白具有增强细胞间黏附的作用,亦能调控细胞的黏附、迁移、分化和细胞增殖。本研究显示,阴道上皮组织中层黏连蛋白表达量高的小鼠,其阴道加德纳菌建模成功率高。推测可能是层黏连蛋白增加了加德纳菌与小鼠上皮细胞的黏附性,使得阴道加德纳菌的定植增加,促使细菌性阴道病的发生。

烯醇化酶是一种多功能蛋白,基本功能是参与糖酵解反应,故其一般大量表达于细胞质中,而近年来研究发现它也能定位在细胞核和细胞表面上,甚至分泌到胞外。这类在细胞表面或分泌的烯醇化酶参与了病原生物与宿主的相互作用,在病原生物侵袭宿主的过程中起到了重要的作用^[20]。有研究^[21-22]显示肺炎链球菌表面的烯醇化酶能够激活宿主纤溶系统,表现出对组织侵袭相关的特性。将肺炎链球菌的烯醇化酶基因突变,再用突变的菌株感染小鼠,研究者^[23]发现突变后的菌株侵袭力急剧下降,毒力丧失,充分说明了烯醇化酶在肺炎链球菌侵袭宿主过程中的重要作用。A型链球菌、嗜水气单胞菌、白色念珠菌等,其表面都有烯醇化酶的存在,这些烯醇化酶也都能与人的纤溶系统相作用,从而参与感染人体的过程^[24]。本研究显示,建模成功的小鼠阴道上皮组织中的烯醇化酶的含量较建模失败组的含量明显高,提示烯醇化酶可能参与了细菌性阴道病的发生和发展。建模成功组的烯醇化酶和层黏连蛋白均呈高表达,这提示烯醇化酶可能是通过与层黏连蛋白相结合增强了阴道加德纳菌的黏附性、进而增加了加德纳菌在阴道中的定植。如果阴道加德纳菌内有大量的烯醇化酶表达,则有可能提高阴道加德纳菌的糖酵解效率,使阴道加德纳菌的糖酵解效率比阴道乳杆菌的糖酵解效率高。推测上述过程有可能与细菌性阴道病发病机制存在相关性,然而这还需要更多的研究来证实。

综上所述,随着烯醇化酶在胞膜的研究越来越

多,其参与细菌更多功能的过程可能会逐渐增多。烯醇化酶和层黏连蛋白可能与细菌性阴道病的发生发展有密切相关性,然而,其究竟是通过何种具体的机制引发了该病的发生发展,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Canback B, Andersson S G, Kurland C G. The global phylogeny of glycolytic enzymes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(9):6097-102. doi: 10.1073/pnas.082112499.
- [2] Soultanas P, Janniere L. The metabolic control of DNA replication: mechanism and function[J]. *Open Biol*, 2023, 13(8):230220. doi: 10.1098/rsob.230220.
- [3] Huang C K, Lv L, Chen H, et al. ENO1 promotes immunosuppression and tumor growth in pancreatic cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(7):2250-64. doi: 10.1007/s12094-023-03114-8.
- [4] 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):3981-92. doi: 10.7150/ijbs.63556.
- [5] Almaguel F A, Sanchez T W, Ortiz-Hernandez G L, et al. Alpha-enolase: emerging tumor-associated antigen, cancer biomarker, and oncotherapeutic target[J]. *Front Genet*, 2020, 11:614726. doi: 10.3389/fgene.2020.614726.
- [6] Chung I C, Huang W C, Huang Y T, et al. Unrevealed roles of extracellular enolase-1 (ENO1) in promoting glycolysis and pro-cancer activities in multiple myeloma *via* hypoxia inducible factor 1alpha[J]. *Oncol Rep*, 2023, 50(5):205. doi: 10.3892/or.2023.8642.
- [7] Cappello P, Principe M, Bulfamante S, et al. Alpha-enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22(5):944-59. doi: 10.2741/4526.
- [8] Ghosh A K, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of plasmodium and other pathogens[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011, 106 Suppl 1(1):85-90. doi:10.1590/s0074-0276201100090011.
- [9] Mathivanan S, Simpson R J. ExoCarta; a compendium of exosomal proteins and RNA[J]. *Proteomics*, 2009, 9(21):4997-5000. doi: 10.1002/pmic.200900351.
- [10] Zhang Q N, Lu H X. Advances in animal model of bacterial vaginosis[J]. *Hainan Med J*, 2021, 32(1):2246-9. doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2021.17.019.
- [11] Kim D E, Kim J K, Han S K, et al. Lactobacillus plantarum NK3 and Bifidobacterium longum NK49 alleviate bacterial vaginosis and osteoporosis in mice by suppressing NF-kappaB-linked TNF-alpha expression[J]. *J Med Food*, 2019, 22(10):1022-31. doi: 10.1089/jmf.2019.4419.
- [12] Chen Y W, Lee M L, Chiang C Y, et al. Effects of systemic bifidobacterium longum and lactobacillus rhamnosus probiotics on the ligature-induced periodontitis in rat[J]. *J Dent Sci*, 2023, 18(4):1477-85. doi: 10.1016/j.jds.2023.04.013.
- [13] Gilbert N M, Lewis W G, Lewis A L. Clinical features of bacterial vaginosis in a murine model of vaginal infection with Gardnerella vaginalis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59539. doi: 10.1371/journal.pone.0059539.
- [14] Gilbert N M, Lewis W G, Li G, et al. Gardnerella vaginalis and prevotella bivia trigger distinct and overlapping phenotypes in a mouse model of bacterial vaginosis[J]. *J Infect Dis*, 2019, 220(7):1099-108. doi: 10.1093/infdis/jiy704.
- [15] Kai F, Drain A P, Weaver V M. The Extracellular matrix modulates the metastatic journey[J]. *Dev Cell*, 2019, 49(3):332-46. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
- [16] Yumoto K, Eber M R, Wang J, et al. Axl is required for TGF-beta2-induced dormancy of prostate cancer cells in the bone marrow[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36520. doi: 10.1038/srep36520
- [17] Dai D Y, Mutailifu M, Zhang Y N, et al. Extracellular matrix and tumor dormancy[J]. *Chem Life*, 2023, 43(7):1108-17. doi: 10.13488/j.smhx.20230386.
- [18] 刘金丽, 张学军. 层粘连蛋白研究进展[J]. *国外医学皮肤性病学分册*, 2000, 26(6):352-4.
- [18] Liu J L, Zhang X J. Research progress on laminin[J]. *Foreign Med Sci (Dermatol Venereol)*, 2000, 26(6):352-4.
- [19] Mou Y, Sun Q. The long non-coding RNA ASMTL-AS1 promotes hepatocellular carcinoma progression by sponging miR-1343-3p that suppresses LAMC1 (laminin subunit gamma 1)[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1):746-58. doi: 10.1080/21655979.2021.2012628.
- [20] Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2014, 29(6):270-83. doi: 10.1111/omi.12078.
- [21] Ghosh A K, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of plasmodium and other pathogens[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011, 106 Suppl 1(0 1):85-90. doi: 10.1590/s0074-0276201100090011.
- [22] Bergmann S, Rohde M, Chhatwal G S, et al. alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface[J]. *Mol Microbiol*, 2001, 40(6):1273-87. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x.
- [23] Bergmann S, Wild D, Diekmann O, et al. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of Streptococcus pneumoniae[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 49(2):411-23. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03557.x.
- [24] Liu H, Zeng H M, Qiu D W. Role of enolase in host infection of pathogens[J]. *Chin J Biol Control*, 2012, 28(1):128-32. doi: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2012.01.002.

Expression of enolase and laminin in the vagina of bacterial vaginosis of mice

Zhang Rui¹, Wu Yiqing², Yin Haixu¹, Li Chang¹, Ma Aixin¹, Wang Junzhu³,
Bai Huihui⁴, Liu Zhaohui⁴, Liao Qiping⁵

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034;

²Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710061;

³Big Data and Public Policy Laboratory, School of Government, Peking University, Beijing 100091;

⁴Dept of Obstetrics and Gynecology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Beijing 100026;

⁵Dept of Obstetrics and Gynecology, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, Beijing 102218)

Abstract Objective To investigate the differences in enolase and laminin levels in vaginal epithelial tissues between mice successfully infected with *Gardnerella* and mice not infected with *Gardnerella*, providing information for further exploration of the correlation between enolase and laminin levels and the incidence of bacterial vaginosis.

Methods *Gardnerella* strains isolated, purified, and identified from vaginal secretions of patients with bacterial vaginosis were used to infect the vagina of mice and establish a mouse model of bacterial vaginosis. Successful and failed mice was defined as successful and failed groups, respectively. Differential expression of enolase and laminin in the vaginal epithelial tissue of two groups of mice was detected by Western blot. Modeling success rate was statistically analyzed, and the expression differences of enolase and laminin was compared between two groups. **Results**

One strain of *Gardnerella vaginalis* infected 10 SPF grade KM mice, 7 mice met the diagnostic criteria for bacterial vaginosis, and 3 mice failed to model, with a success rate of 70%. Western blot was used to detect protein expression levels, and the levels of laminin and enolase in the successfully modeled mouse vaginal epithelial tissue were significantly higher than those in the failed modeling group, with statistical differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Enolase and laminin may be involved in the occurrence of bacterial vaginosis, however, further research is needed to determine the mechanisms through which they trigger the occurrence and development of the disease.

Key words animal mode; bacterial vaginosis; enolase; laminin; *Gardnerella vaginalis*; pathogenesis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81471420); Ministry of Education of The People's Republic of China (No. 20130001120051)

Corresponding author Liao Qiping, E-mail: qinping_liao@sohu.com