

· 临床论著 ·

子宫内膜异位症相关性不孕肾虚血瘀证患者的 卵泡液代谢组学研究

孙振高¹ 宋景艳² 张兴兴² 王爱娟²

摘要 **目的** 利用超高效液相色谱-质谱技术(HPLC-MS)对接受体外受精-胚胎移植(*In vitro fertilization-embryo transfer*, IVF-ET)肾虚血瘀型子宫内膜异位症(简称内异症)不孕患者卵泡液进行代谢组学分析,辨识并确定与内异症相关性不孕肾虚血瘀证证候发生密切相关的特征性代谢物组的变化。**方法** 将 55 例因不孕行试管婴儿患者分为两组,其中观察组 27 例(中医辨证为肾虚血瘀证)、对照组 28 例(因男方因素行试管婴儿患者)。采用主成分分析法(PCA)和偏最小二乘法-判别分析法(PLS-DA)从整体上对样本进行直观、可靠和有统计学意义的分析,寻找内异症相关性不孕肾虚血瘀证证型标记物,并解释标记物归属及代谢网络变化。**结果** 共发现与内异症肾虚血瘀证候密切相关的差异代谢物 28 种,主要分为脂类、核苷酸类、蛋白降解片段及其他等 4 大类,上调的代谢物主要有 Valyl-Arginine、Methyl-15-cyanopentadecanoate、4-Oxo-13-cis-retinoate 等 15 种;下调的代谢物主要有 Menadiol dibutyrate、3-hydroxy nonanoyl carnitine、Phytosphingosine 等 13 种,这 28 种差异代谢物在内异症相关性不孕肾虚血瘀证与健康妇女卵泡液中的表达结果提示可能是潜在的肾虚血瘀证相关分子标志物。**结论** 肾虚血瘀证是导致不孕的病机核心,差异代谢物组可能是肾虚血瘀证的证候实质的内在根源。

关键词 子宫内膜异位症;卵泡液代谢组学;肾虚血瘀证;不孕症

Follicular Metabolics Study of Endometriosis-Associated Infertility Patients with Shen Deficiency Blood Stasis Syndrome SUN Zhen-gao¹, SONG Jing-yan², ZHANG Xing-xing², and WANG Ai-juan²

1 Reproductive Medicine Center for Integration of Traditional and Western Medicine, Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014); 2 First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011)

ABSTRACT **Objective** To evaluate metabolomics of follicular fluid in patients with endometriosis (EMT) with Shen deficiency blood stasis syndrome (SDBSS) undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) by using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), and to identify the characteristic metabolites closely related to EMT of SDBSS. **Methods** Totally 55 clinical data of females undergoing IVF-ET were retrospectively analyzed. They were assigned to the observation group (27 cases, syndrome typed as SDBSS) and the control group (28 cases, who received tube baby due to male factor). The changes of metabolites were analyzed by PCA and PLS-DA analyses to find the markers of SDBSS, and to interpret the marker attribution and metabolic network changes. **Results** There were 28 metabolites closely related to SDBSS, which were classified as four categories, including lipids, nucleotides, protein degradation fragments, and others. Fifteen up-regulated metabolites mainly covered Valyl-Arginine, Methyl-15-cyanopentadecanoate, and 4-Oxo-13-cis-retinoate, and so on. Thirteen down-regulated metabolites mainly covered Menadiol dibutyrate, 3-hydroxy pentanoyl carnitine, Phytosphingosine, and so on. These 28 metabolites expressed differently in follicular fluid of EMS-associated

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81373676, No. 81674018)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心(济南 250014); 2. 山东中医药大学第一临床学院(济南 250011)

通讯作者: 孙振高, Tel: 13708938621, Email: sunzhengao77@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180119.100

infertility patients from those in healthy women suggested that they might be potential molecular markers of SDBSS. Conclusions SDBSS is the core of the pathogenesis of infertility. Therefore, these differently expressed metabolites might be intrinsic source of SDBSS.

KEYWORDS endometriosis; follicular fluid metabolomics; Shen deficiency blood stasis syndrome; infertility

子宫内膜异位症(简称内异症)是指具有生长功能的子宫内膜组织异位到子宫腔被覆内膜及宫体肌层以外而导致的雌激素依赖性疾病,患有内异症妇女不孕症发病率约为 30%~50%。内异症与生育功能减退之间的关系已被广泛接受。中医学并未记载“子宫内膜异位症”病名,根据其临床表现,于“痛经”、“癥瘕”、“月经不调”、“不孕”等病症中可见散在描述。内异症致不孕的病机为瘀血阻滞冲任、胞宫,多由先天肾气不足或房劳多产伤肾,肾虚冲任失调,气血失和,瘀血阻于胞脉、胞络,冲任不能相资,两精不能相搏,故艰于孕育。本病以肾虚为本,瘀血为标,肾虚血瘀证是其基本证型。

代谢组学是一种整体性的研究模式,是关于生物内源性代谢物质种类、数量及变化规律的科学,它与中医学的“整体观”、“辨证观”、“动态观”等学术思想有较高的趋同性。本研究旨在通过代谢组学的手段,探讨肾虚血瘀证内异症相关不孕患者的卵泡液代谢物谱变化,为科学预测和诊断内异症相关性不孕肾虚血瘀证,探讨其证候本质提供理论和实验依据。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 子宫内膜异位症诊断标准 参照《子宫内膜异位症的诊治指南》^[1],在腹腔镜下见到大量病理所述典型病灶(病理诊断标准:病灶中可见子宫内膜腺体和间质,伴有炎症反应及纤维化)即可确诊。

1.2 不孕症诊断标准 参照《妇产科学》^[2],即夫妇性生活正常,同居至少 12 个月以上,未采取避孕措施而未孕。分为原发和继发不孕两大类,既往从未有过妊娠史,未避孕而未孕者为原发不孕;既往有妊娠史,而后未避孕 12 个月以上未再孕者,称为继发不孕。

1.3 中医辨证标准 主要参照 1990 年中国中西医结合学会妇产科专业委员会第三届学术会议修订的“子宫内膜异位症中西医结合诊疗标准”^[3],由两位副高级专家对入选受试者进行独立辨证,两次辨证相吻合者随即入选;不吻合者剔除,以避免临床上兼夹杂证病例的入选。拟诊断标准如下:主证:经前或经期腹痛;腰骶刺痛;婚久不孕;兼证:头晕耳鸣;性欲减退;脘

酸膝软或足跟痛;舌脉:舌质黯红或有瘀斑、瘀点,苔薄白,脉涩或沉涩。以上 3 证主证必备,兼证具备 1~2 项即可诊断,舌脉不必悉具。

2 纳入标准 (1)符合内异症及不孕症西医诊断标准,子宫内膜异位症临床分期为 I~IV 期;(2)符合中医肾虚血瘀证辨证分型标准;(3)年龄 24~46 岁,非妊娠期及哺乳期妇女;(4)经 B 超检查卵巢异位囊肿直径 <4 cm 者;(5)肝、肾功能正常,无妇科及其他全身疾病者;(5)知情同意,志愿受试者。

3 排除标准 (1)合并多囊卵巢综合征、原发性卵巢功能不全及高泌乳素血症等排卵功能障碍的患者;(2)合并有心、脑血管,肝、肾及造血系统等严重疾病者,精神病患者;(3)近 0.5 年内接受过激素类药物治疗者;(4)对本研究使用药物过敏者;(5)原发性痛经患者;(6)伴子宫腺肌症,子宫肌瘤,卵巢非赘生性囊肿,卵巢恶性肿瘤以及内生殖道结核者。

4 一般资料 55 例均为 2015 年 7—10 月就诊于山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心患者。以行体外受精-胚胎移植(*In vitro fertilization-embryo transfer*, IVF-ET)女性取卵日卵泡液为研究对象,其中观察组 27 例(中医辨证为肾虚血瘀证)、对照组 28 例(因男方因素行试管婴儿患者)。两组基础资料如年龄、不孕年限、体重指数(*body mass index*, BMI)、基础促卵泡激素(*basal FSH*, bFSH)、基础雌二醇(*basal estradiol*, bE₂)、基础窦卵泡数目(*basal antral follicle count*, bAFC)、Gn 使用天数及用量比较(表 1),差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。本研究获本院生殖医学伦理委员会的审议批准(伦理号:20150511037)。

表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组(28 例)	内异症组(27 例)
年龄(年)	36.07 ± 5.58	34.19 ± 6.17
不孕年限(年)	2.79 ± 1.90	3.89 ± 2.68
BMI(kg/m ²)	23.79 ± 4.21	23.70 ± 3.24
bFSH(mIU/mL)	9.89 ± 7.30	7.17 ± 3.86
bE ₂ (pg/mL)	35.46 ± 14.50	43.37 ± 18.78
bAFC(个)	10.18 ± 5.75	12.70 ± 8.20
Gn 使用天数(天)	11.18 ± 2.84	11.37 ± 3.27
Gn 用量(U)	2 946.70 ± 11 52.00	2 802.31 ± 1 194.27

5 研究方案 采用促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)黄体期长方案,促排卵前 1 周期监测卵泡发育,于排卵后 7 天(黄体中期)开始每日注射短效 GnRH-a(0.1 mg 或 0.05 mg),达到垂体降调节标准(阴道 B 超检测卵泡直径 ≤ 0.5 cm,子宫内膜厚度 < 5 mm;血 FSH、LH < 10 U/L, $E_2 < 40$ pg/mL 或 146 pmol/L),即降 14~17 天后启动 Gn 超促排卵,根据患者体重及卵巢反应性确定启动剂量,根据 B 超和血激素水平监测卵泡发育情况,酌情调整药量,并适时注射 HCG。注射 HCG 后 36~37 h 进行 B 超引导下穿刺取卵,收集第一管淡黄色、无血、透明卵泡液,显微镜下确认有 MII 期卵母细胞存在。收集的卵泡液予以离心,3 000 $\times g$, 15 min;将上清液分装于 Eppendorf 管,标记后直接冻存于液氮贮存罐中,8 周内实验备用。

6 检测指标及方法 通过对卵泡液使用除蛋白方法、色谱柱选择、色谱质谱仪参数的设置优化等步骤,建立基于 LC/MS 的代谢组学平台。

6.1 样品预处理 卵泡液样本冰上解冻,在 Sirocco 蛋白沉淀板中加入 600 μL 乙腈,再将 200 μL 卵泡液加入孔中(乙腈:卵泡液=3:1),混匀后涡旋 5 min,经真空抽滤(压力保持在 8~10 mmHg),将过滤后的液体收集于洁净的 96 孔板中,准备上样分析样品处理取 100 μL 卵泡液加入 300 μL 含有 4 $\mu mol/L$ 吉非罗齐和 ZW14 的甲醇溶液,14 000 $\times g$ 离心 30 min,取 10 μL 上清液进样分析。

6.2 实验条件 色谱柱为 BEHC18 柱。条件:流动相 A 由乙腈和水以 5/95(v/v)的比例组成,流动相 B 为乙腈和水 95/5(v/v),流速为 0.4 mL/min。起始梯度为 5%,并维持 0.5 min,然后从 1.0~6.0 min 线性增加至 100%并维持 3.5 mL/min,然后从 9.0~9.2 min 恢复至 5%,运行时间为 13 min,平衡色谱 2 min。进样量为 5 μL ,柱温 40 $^{\circ}C$,自动进样器温度维持在 4 $^{\circ}C$ 。

6.3 质谱条件 负离子模式条件为:毛细管电压 3 100 V、锥孔电压 30 V、离子源温度 120 $^{\circ}C$ 、电喷雾器(脱溶剂气)温度 300 $^{\circ}C$ 、电喷雾气流量(脱溶剂气流量)600 L/h、锥孔气流量 50 L/h、数据采集范围(m/z) 100~920。

6.4 代谢组学分析 利用代谢组学分析方法对获取的多维色谱数据转化为一个矩阵,采用 PCA 和 PLS-DA 从整体上对样本进行直观、可靠和有统计学意义的分析。在得分图中每个点代表一个对应的样本,载荷图中离散点代表得分图分离的变量,离散度越高,对得分图贡献越大。通过 t 检验对每个变量进行计算求出 P

值, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。由此可得到组间有差异性的物质质荷比,由获得的精确质量数得到匹配的分子式,通过数据库搜索得到匹配的信息。再通过碎片离子扫描得到的碎片信息对这些物质进行结构鉴定。

7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行计算。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组差异代谢物原始色谱图比较(图略) 内异症组与对照组比较,原始色谱图上很难分辨两者间的差异。

2 两组差异代谢物得分图比较(图 1) 采用 PCA 分析,用 PLS-DA 建模,内异症组和对照组样本基本处于 PLS-DA 得分图上下两侧,具有群体间的差异。

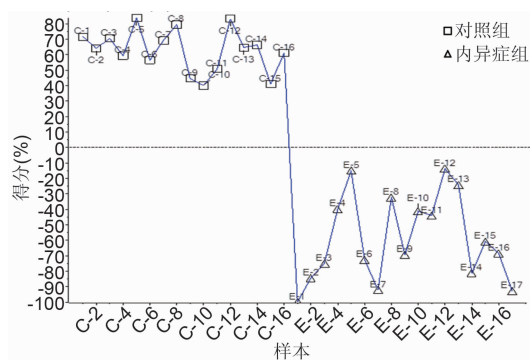


图 1 两组差异代谢物得分图比较

3 两组差异代谢物种类比较(表 2) 共发现差异代谢物 28 种,主要分为脂类、核苷酸类、蛋白降解片段及其他等 4 大类,其中上调的代谢物主要有 15 种;下调的代谢物主要有 13 种。

讨 论

本研究利用 HPLC-MS 技术首次定性、定量分析了接受 IVF-ET 的内异症组和对照组卵泡液代谢物组的差异;发现并描绘出两组差异代谢物谱,于肾虚血瘀证患者卵泡液中共发现 28 种差异性代谢物,共分为 4 类,即脂类、核苷酸类、蛋白质降解片段以及其他不明类别,涉及细胞增殖与凋亡、能量代谢、炎症反应以及血管生成等诸多路径,对内异症肾虚血瘀证的诊断具有一定的参考意义。

1 脂质代谢改变 子宫内膜细胞在子宫体腔以外增殖显著增加了生物合成和生物能量的需求,内源合成的脂肪酸被酯化为磷脂,其充当结构和信号分子以及能

表 2 两组差异代谢物种类比较

化合物名称	分子式	EMT/Control	P 值
Valyl-Arginine(蛋白质降解片段)	C ₁₁ H ₂₃ N ₅ O ₃	190.3000	0.003
Methyl 15-cyanopentadecanoate(其他)	C ₁₇ H ₃₁ NO ₂	2.9700	0.040
Menadiol dibutyrate(脂类)	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	0.0077	0.003
4-Oxo-13-cis-retinoate(脂类)	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	2.7000	0.020
Rhazidigenine Nb-oxide(其他)	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₂	1.6000	0.030
3-hydroxynonanoyl carnitine(脂类)	C ₁₆ H ₃₁ NO ₅	0.5500	0.030
Phytosphingosine(脂类)	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	0.4000	0.020
Imidazoleacetic acid ribotide(核苷酸类)	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₉ P	0.0440	0.008
AICAR(核苷酸类)	C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₈ P	0.2200	0.040
O-Methylsterigmatocystin(其他)	C ₁₉ H ₁₄ O ₆	0.2400	0.030
Kinetensin 1-3(蛋白质降解片段)	C ₁₅ H ₃₀ N ₆ O ₄	4.8000	0.040
2,4,14-Eicosatrienoic acid isobutylamide(其他)	C ₂₄ H ₄₃ NO	120.6000	0.002
LysoSM(d18:1)(脂类)	C ₂₃ H ₅₀ N ₂ O ₅ P	0.6200	0.040
LysoPC(16:0)(脂类)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	0.5300	0.050
LysoPC[18:2(9Z,12Z)](脂类)	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	1.8500	0.050
LysoPC[18:1(9Z)](脂类)	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	0.5900	0.050
LysoPC(18:0)(脂类)	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	1.5300	0.050
LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)](脂类)	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	0.6000	0.040
LysoPC[20:3(5Z,8Z,11Z)](脂类)	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	2.0000	0.020
PA(16:0e/18:0)(脂类)	C ₃₇ H ₇₅ O ₇ P	0.6800	0.020
DG[18:2(9Z,12Z)/24:1(15Z)/0:0](脂类)	C ₄₅ H ₈₂ O ₅	3.3000	0.020
CerP(d18:1/26:0)(脂类)	C ₄₄ H ₈₈ NO ₆ P	0.5300	0.040
Glucosylceramide(d18:1/22:0)(脂类)	C ₄₆ H ₈₉ NO ₈	5.3000	0.030
PC[o-18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)](脂类)	C ₄₆ H ₈₆ NO ₇ P	5.1000	0.020
PC(o-16:0/22:0)(脂类)	C ₄₆ H ₉₄ NO ₇ P	1.4500	0.050
Glucosylceramide[d18:1/24:1(15Z)](脂类)	C ₄₈ H ₉₁ NO ₈	7.9000	0.040
TG[18:1(11Z)/24:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)](脂类)	C ₆₅ H ₁₁₄ O ₆	0.5300	0.030
TG[22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)](脂类)	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₆	1.4000	0.040

注: EMT/Control 即两组代谢物丰度比, >1 表示 EMT 组上调, <1 则为下调

量供应的来源以支持异位内膜细胞的快速增殖。此外,最近的研究已经表明,内异症可能与内源性脂质代谢改变相关。两项独立研究证实,涉及鞘脂,醚和溶血磷脂代谢的内源性脂质信号传导途径在内异症患者在位子宫内膜组织中受到影响^[4,5]。而且早期研究发现,内异症妇女血清中磷脂酰胆碱(PC)呈上调趋势^[6]。

1.1 溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(16:0)、LysoPC[18:2(9Z,12Z)]、LysoPC[18:1(9Z)]、LysoPC(18:0)、LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]、LysoPC[20:3(5Z,8Z,11Z)]等共6种都属于溶血磷脂酰胆碱(LysoPCs)。LysoPC(16:0),它由在C-1位置处的一个棕榈酸链组成。

文献表明 lysoPC 通过 GR 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-aetivated protein kinase, MAPK)通路作用于 HeLa 细胞,人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和 H9C2 心肌细胞,诱导细胞凋亡^[7]。目前,其对卵母细胞质量的影响尚未见明确报道。此外,棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸、花生四烯酸、鳕鱼酸等主要由饮食获得,人体自身无法合成。因此应进行两组患者饮食习惯的详细调查及评价。同时研究结果也揭示了内异

症患者卵母细胞质量提高的新途径(sPLA2-lysoPC)。本研究发现 lysoPC 在内异症肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达。

1.2 磷脂酰胆碱 PC[O-18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)]、PC(o-16:0/22:0)皆是磷脂酰胆碱(PC或GPCho),特别是PC[O-18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)],它是由在C-1位置的一个硬脂醇链和在C-2位置的1个二十碳四烯酸链组成。

Vouk K 等^[4]选择40例接受腹腔镜手术的卵巢子宫内异症患者作为观察组和52名接受绝育手术的健康妇女作为对照组,通过电喷雾串联质谱法对两组血浆脂质代谢物进行定量分析。共发现超过140种目标代谢物,包括甘油磷脂,鞘磷脂和酰基肉碱三类。最终8种脂质代谢物鉴定为内异症相关生物标志物,即羟基鞘磷脂SMOH C16:1和SMOH C22:2,鞘磷脂SMC16:1和五种醚-磷脂(酰基-烷基磷脂酰甘油):三种不饱和2-酰基-1-(1-烯基)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱,PCae C32:2,PCae C34:2和PCae C36:1以及两种饱和2-酰基-1-烷基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱,PCae C34:0和PCae C30:0。研究结果最终表明内异症与鞘磷脂和磷脂酰胆碱

血浆浓度的增加明显相关,这可能有助于抑制细胞凋亡和影响脂质代谢相关的信号通路,这提示通过特异性阻止高度上调的磷脂酶 A2 和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 4 可能是内异症潜在的治疗方式。本研究发现 PC 在内异症肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达,而 3-羟基壬酰肉碱和 D-赤式-鞘氨醇磷酸胆碱(鞘磷脂合成底物)则相反。

1.3 甘油二酯与甘油三酯 DG[18:2(9Z,12Z)/24:1(15Z)/0:0]是甘油二酯或二酰基甘油(DAG)。它是由通过酯键共价键合到甘油分子上的两个脂肪酸链组成的甘油酯。甘油三酯(TGs)也称为三酰基甘油, TG[18:1(11Z)/24:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]是单二十四烷酸甘油三酯, TG[22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]是二十二碳五烯酸甘油三酯。TG[18:1(11Z)/24:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]分别由 C-1 位上的一个十八碳烯酸链、C-2 位置上的一个廿四酸以及 C-3 位置上的一个二十碳五烯酸组成, TG[22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)]分别由 C-1 位上的一个二十二碳五烯酸链、C-2 位置上的一个廿二烷酸链以及 C-3 位置上的一个二十二碳五烯酸链组成。TG 是植物油和动物脂肪的主要成分,同时也是极低密度脂蛋白(VLDL)和乳糜微粒的主要组分,在作为能量来源和膳食脂肪转运蛋白的代谢中起重要作用。

现有数据表明,与健康女性比较,内异症患者具有血浆脂质分布异常。伴有内异症的妇女的非高密度脂蛋白(低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白、乳糜微粒等)、TC、TG 水平更高(分别为 37%,30%和 27%)^[8]。氧化的 LDL 可以引起内皮损伤,促进白细胞和巨噬细胞迁移,这些单核细胞与细胞因子(IL-6)的释放相关(这一事实也可能在内症中发生)^[9]。本研究发现 DG 在肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达,而 TG 则为低表达。

1.4 醚脂代谢中间产物 2-十八酰基-1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸[PA(16:0e/18:0)]是醚脂代谢中的中间体。其通过 1-酰基甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶从 1-十八烷基-甘油-3-磷酸酯转化。醚脂质是其中甘油上的一个或多个碳原子通过醚键与烷基链键合的脂质,与通常的酯键不同。PAF 是炎症和血管生成的介质,其在与其受体结合时触发介质或细胞因子以及促血管生成因子如血管内皮生长因子的释放^[10]。卵泡液中醚脂代谢中间产物 PA(16:0e/18:0)水平降低说明醚脂可能存在代谢障碍,推测内异症卵

泡液中醚脂浓度可能也是升高的。本研究发现 PA(16:0e/18:0)在肾虚血瘀证患者卵泡液中呈低表达。

1.5 鞘脂代谢改变 CERP(D18:1/26:0)是属于神经鞘脂类分子——神经酰胺 1 磷酸(C1P),由特定的神经酰胺激酶磷酸化神经酰胺产生。葡萄糖神经酰胺(d18:1/22:0)与葡萄糖神经酰胺[d18:1/24:1(15Z)]都是鞘脂或寡糖基神经酰胺,其糖链上连接着一个或多个唾液酸(即正乙酰神经氨酸)。

因此,促进细胞增殖和抗凋亡的异位子宫内膜细胞中 GlcCer 的显著增加表明固有的细胞内代谢功能失调有利于增强细胞增殖和潜在异位病灶生长。最近的研究还表明内异症妇女无论异位还是在位子宫内膜,鞘氨醇-1-磷酸受体呈上调状态^[11],并导致其暴露于鞘氨醇类似物时存活力增加,进一步表明失调的鞘脂代谢在这种疾病中的重要作用。

植物鞘氨醇(phytosphingosine, PHS)结构类似于鞘氨醇,植物鞘氨醇在类鞘氨醇长链碱基的 C-4 处具有羟基。Gomez-Torres MJ 等^[12]研究发现 COC 和精子孵育 17 h 后,在培养基中检测到大量 PHS,证实卵母细胞的旁分泌效应对精子顶体反应有重要作用。本研究发现 GlcCer 在肾虚血瘀证患者卵泡液中高表达,而 PHS 则呈低表达。

1.6 其他脂类 本研究发现内异症患者卵泡液中甲萘氢醌二丁酸酯水平显著低于对照组,提示可能内异症可能存在维生素 K 缺乏性的凝血异常,至于其与卵母细胞质量之间的关系有待进一步研究。本研究发现甲萘氢醌二丁酸酯在肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达。

4-氧代-9-顺式视黄酸酯(4-Oxo-9-cis-retinoate, 4-氧代-9-cRA)被鉴定为 4-氧代-9-cRA 的主要血浆代谢物,属于类视黄醇代谢产物之一。类视黄醇可调节上皮细胞生长和分化。动物研究表明生殖损害的程度取决于类视黄醇缺乏的程度和时间^[13]。4-氧代-9-cRA 作为类视黄醇相关代谢产物,本研究发现其在内异症患者卵泡液中的浓度显著高于健康育龄女性,考虑相关代谢通路异常,导致 AT-RA 消耗过多所致,与卵母细胞成熟度及受精能力下降可能相关。本研究发现 4-氧代-9-cRA 在肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达。

2 核苷酸类 AICAR 又称 ZMP 是 AMP 的类似物,它能够刺激 AMP 依赖性蛋白激酶活性。Morishita M 等^[14]在研究 AICAR 对骨肉瘤的作用时,发现 AICAR 可激活 AMPK 以调节细胞能量代谢,并促

进线粒体凋亡。本研究发 AICAR 在肾虚血瘀证患者卵泡液中呈高表达。

3 尚未发现具体作用机制的代谢物组 本研究尚发现与肾虚血瘀证相关上调代谢物 5 种,即戊氨酰精氨酸、15-氧基十五烷、Rhazidigenine Nb-氧化物、运动升压素 1-3、2,4,14-二十碳三烯酸异丁酰胺;下调代谢物 3 种,包括咪唑乙酸核苷酸、O-甲基黄曲霉毒素、2,4,14-二十碳三烯酸异丁酰胺,但目前其机制还不清楚,仍需进一步研究探索。

基于色谱-质谱联用技术的代谢组学方法,发现内异症相关性不孕肾虚血瘀证与健康妇女卵泡液之间的差异代谢物组。肾虚血瘀证与健康妇女卵泡液代谢物组间存在差异,这些差异可能是证候实质的内在根源,即证型特异性相关代谢物。由于本研究标本来自于内异症患者取卵日卵泡穿刺后抽吸的卵泡液,因此卵泡液是来源于所有卵泡的集合体,部分学者认为将其作为鉴定卵母细胞发育潜能的检测本并不可靠,可能遗漏某些差异代谢物。然而,考虑到每次卵泡穿刺后使用培养基大量冲洗穿刺针以及多次阴道穿刺后增加的阴道出血风险,目前仍无两全其美的方法,故仍需进一步改善。而且本次试验仅为探索性研究,并未纳入内异症临床常见的所有证型,对其他证型的研究将在下一步研究中进行。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(3): 161-169.
- [2] 沈铿, 马丁主编. 妇产科学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 395.
- [3] 中国中西医结合学会妇产科专业委员会. 内异症、妊娠高血压综合征及女性不孕症的中西医结合诊疗标准[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(6): 376-379.
- [4] Vouk K, Hevir N, Ribic-Pucelj M, et al. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis[J]. Hum Reprod, 2012, 27(10): 2955-2965.
- [5] Lee YH, Tan CW, Venkatratnam A, et al. Dysregulated sphingolipid metabolism in endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(10): 1913-1921.
- [6] Dutta M, Joshi M, Srivastava S, et al. A metabolomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis[J]. Mol Biosyst, 2012, 8(12): 3281-3287.
- [7] Chen HM, Hsu JH, Liou SF, et al. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways[J]. BMC Complement Alternat Med, 2014, 14(1): 1-10.
- [8] Melo AS, Rosa-e-Silva JC, Rosa-e-Silva AC, et al. Unfavorable lipid profile in women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2010, 93(7): 2433-2436.
- [9] Martinez S, Garrido N, Coperias JL, et al. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis[J]. Hum Reprod, 2007, 22(3): 836-842.
- [10] Ko HM, Jung HH, Seo KH, et al. Platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation enhances VEGF expression through a decrease in p53 activity[J]. FEBS Lett, 2006, 580(13): 3006-3012.
- [11] Santulli P, Marcellin L, Noel JC, et al. Sphingosine pathway deregulation in endometriotic tissues[J]. Fertil Steril, 2012, 97(4): 904-911.
- [12] Gomez-Torres MJ, Garcia EM, Guerrero J, et al. Metabolites involved in cellular communication among human cumulus-oocyte-complex and sperm during *in vitro* fertilization[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13(1): 1-12.
- [13] Clagett-Dame M, Deluca HF. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development[J]. Annu Rev Nutr, 2002, 22(22): 347-381.
- [14] Morishita M, Kawamoto T, Hara H, et al. AICAR induces mitochondrial apoptosis in human osteosarcoma cells through an AMPK-dependent pathway[J]. Int J Oncol, 2017, 50(1): 23-30.

(收稿: 2017-02-05 在线: 2018-05-02)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶