

卵泡液代谢组学预测卵母细胞发育潜能的研究现状

刘小磊 熊正方

摘要 卵泡液是由颗粒细胞、卵泡膜细胞等分泌物共同形成的,可作为卵母细胞生长发育的微环境或培养基。卵泡液中含有细胞、蛋白质、激素等物质,可以促进卵母细胞完成生长、发育、成熟等一系列生理活动。卵母细胞的质量是影响辅助生殖结局的关键因素,对提高临床妊娠率有重要价值。代谢组学分为靶向和非靶向分析技术,现如今通常利用磁共振成像、质谱检测技术等来检测卵泡液中的代谢物,包括葡萄糖、氨基酸、胆固醇、维生素等成份,进而评估与预测卵母细胞的发育和成熟。本文就卵泡液代谢组学预测卵母细胞发育潜能的研究现状做一综述。

关键词 代谢组学 代谢标志物 卵泡液 卵母细胞 发育潜能

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.07.037

随着生活水平的提高、生育政策开放以及女性生育年龄增大等因素,女性不孕率也在逐年增高,因此,辅助生殖技术就显得越来越重要^[1]。较基因组学和蛋白组学而言,代谢组学具有非侵入性、安全性高、样本易获得等优点,近年来被人们所熟知和应用。通过对不孕女性卵泡液代谢物进行测定及筛选,可以间接反映卵母细胞的代谢水平,从而能够预测卵母细胞的发育潜能。本文就其近年来的研究进展做一介绍。

一、代谢组学研究进展

代谢组是指生物体某种状态下细胞、组织、器官或体内内源性小分子代谢物的总称。代谢组学对中小分子物质进行定性和定量测定与分析,是一门继基因、转录和蛋白组学后,新兴起来的学科,能更加直接、精确地反映生物体的生理状态。生物体代谢组学通常利用磁共振成像或质谱检测技术分析生物体液代谢物,用来反映外界刺激、变化或者细胞代谢应答变化。

卵泡液代谢组学分析技术是一种非侵入的方法,通过测量卵泡液中代谢物种类及含量,找到潜在生物学标志物,对差异代谢物与临床和实验室数据进行统计学分析,从而对卵母细胞质量和发育潜能更好地预测及评估。在检测方式上,分为非靶向分析和靶向分析两类。其中,非靶向分析通常建立在高分辨质谱仪上,依赖高分辨率质量分析器,对各类代谢物进行大

规模、无偏向、系统性检测,最大程度反映生物体代谢水平;而靶向分析建立在单位质量分辨仪的质谱仪上,对感兴趣的代谢物进行选择性和特异性地检测,适用于特定关注的代谢物检测。代谢组学已经广泛应用于疾病诊断、药物治疗等方面,在女性生殖领域,主要代谢物包括卵泡液、卵巢颗粒细胞、胚胎培养液等。有关卵泡液代谢组学在评估和预测卵母细胞质量及发育潜能中的价值还需进一步研究,来探讨其适应性及局限性,为尽早找到更加有效的代谢标志物提供依据。

二、卵泡液代谢物检测对卵母细胞质量及发育潜能评价的价值

细胞、组织、器官和机体的小分子代谢物是保持机体生物活性、维持其正常生理、代谢等必不可少的代谢终产物^[2]。不同机体代谢物存在差异,因此,机体需要调整代谢物的浓度维持稳态。卵泡液是卵泡在发育过程中不可或缺的微环境,包含细胞因子、激素等多种介质,这些与卵母细胞有丝分裂、受精、卵巢功能细胞黄素化等有关,其成分及含量变化影响了卵泡的发育、受精以及胚胎碎片率,可用来反映及预测卵母细胞的成熟及质量^[3,4]。因此,在卵母细胞发育过程中,除了形态学上的成熟评估之外,还可利用代谢标志物来评估卵母细胞质量和发育潜能,以及预测其发育及受精能力,改善临床妊娠结局。取卵的过程中,很容易获得卵泡液,这是其非侵入性和样本易获得等优点的重要体现,且不影响卵母细胞本身质量及功能,因此,能从卵泡液中检测到差异代谢物,有利于评估及预测卵母细胞质量。

1. 葡萄糖代谢:如今,多采用液相色谱-串联质

基金项目:青海省自然科学基金资助项目(面上项目)(2023-0302-ZJC-0159);2020年度中国科学院“西部之光”人才培养计划项目
作者单位:810007 青海大学研究生院
通信作者:熊正方,电子信箱:beareandcow200348@163.com

谱法(LC-MS/MS)技术筛选出差异代谢物,进行葡萄糖代谢与卵母细胞质量的相关性研究。有研究证实,在葡萄糖进行无氧氧化时,通过糖酵解生成丙酮酸,为卵母细胞供能,同时,也通过葡萄糖有氧氧化等代谢过程产能来调控卵母细胞生长;合适的葡萄糖浓度提高卵母细胞质量,适宜的代谢途径有利于卵母细胞发育^[5]。卵母细胞体外培养及受精实验也说明了这一点,即合适的葡萄糖浓度下,卵母细胞受精率和胚胎形成率才不会受到影响,而体外受精(in vitro fertilization, IVF)卵裂失败、子宫内膜异位症等患者卵母细胞质量及发育潜能与卵泡液内葡萄糖的下降有关。在卵细胞成熟过程中,碳水化合物相关的代谢酶类及途径会加强,包括三羧酸循环及磷酸戊糖途径^[6]。Xie等^[7]研究发现,在敲低卵丘细胞中与磷酸戊糖途径中相关的酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶后,与只敲低3-磷酸甘油醛脱氢酶比较,卵母细胞质量受到更加显著影响。因此,磷酸戊糖途径可能在卵母细胞成熟中发挥更大作用^[6,7]。卵母细胞在发育过程中,其细胞核、细胞质等成份受到葡萄糖含量的影响,最终降低了卵母细胞受精及胚胎发育能力^[8]。卵母细胞生长、成熟离不开葡萄糖代谢,其是三大营养物质之一,影响并决定了卵母细胞发育,因此,检测卵泡液中代谢物种类及含量,对于卵母细胞发育潜能有重要预测价值。由于目前检测技术的多样性、不统一性以及代谢物种类较多,葡萄糖浓度变化和代谢标志物水平等影响卵母细胞质量下降的具体因果关系,以及葡萄糖分子的代谢和卵母细胞之间的关联还需进一步研究。

2. 氨基酸代谢:氨基酸是蛋白质的主要基本单位,承担生长、发育的不同生命过程,包括卵母细胞成熟和发育。研究发现,氨基酸是通过不同种类的转运系统转运到细胞内发挥作用,如通过能量产生、蛋白合成等。有文献表明,卵泡液中的缬氨酸、丙酮酸、异亮氨酸等含量均与卵母细胞的质量与成熟相关,但是与所含同型半胱氨酸的量无关^[8]。随着卵母细胞不断成熟,氨基酸的代谢发生变化,在其减数分裂的恢复期,组氨酸、丝氨酸的含量显著增加,而在成熟细胞中其含量则不断减少^[6]。现已证实,卵母细胞发育过程中,可以消耗亮氨酸和缬氨酸提供能量,而天冬氨酸的浓度却影响获卵数,相较于高龄女性,年轻女性卵泡液中的水平则相对较高,结果其生育能力也受到很大程度的影响^[9-11]。因此,在女性卵母细胞成熟过程中,天冬氨酸可能发挥很大的作用。经研究,

当天外源性使用人绒毛膜促性腺激素后黄体酮浓度增高,影响了氨基酸代谢使8-羟基鸟苷等水平升高而雌二醇等下降,最终使卵母细胞质量下降^[12]。氨基酸参与多种蛋白质合成,卵母细胞的发育与成熟也与其有很大联系,影响卵母细胞质量及代谢的主要氨基酸代谢途径可能与缬氨酸和谷氨酸等代谢有关。氨基酸种类或水平的改变可能会影响卵母细胞质量和发育,最终影响临床妊娠率,因此,通过探索其代谢过程得到可以预测卵母细胞质量的特异性标志物,从而筛选出高质量的卵母细胞。

3. 脂质代谢:脂质是人体重要营养素之一,也是人体细胞组织的组成成分,卵泡液中含有丰富的饱和及不饱和脂肪酸,其中游离脂肪酸是脂质代谢异常的重要生物学指标。有研究表明,卵泡液中的硬脂酸和棕榈酸等浓度的改变,均能影响卵母细胞质量,其中,高浓度的饱和脂肪酸影响卵母细胞的成熟^[13]。已有研究证实,含有高浓度棕榈酸的培养液中,会影响颗粒细胞活力和增殖能力,结果卵母细胞质量受到很大影响^[14]。近年来研究发现,多囊卵巢综合征(polycystic ovarian system, PCOS)患者卵母细胞发育潜能下降和受精率低与甘油三酯和甘油磷酸酯水平下降有关^[15]。而磷脂酸水平升高会影响卵母细胞的发育^[16]。在小鼠卵母细胞的成熟中,脂肪酸 β -氧化起到重大作用,其中,相关的代谢物肉碱是把脂肪酸从卵泡液细胞质转运到线粒体的重要物质,起到抗氧化作用,有利于卵母细胞的成熟与发育^[17]。有实验表明,补充左旋肉碱可以改善因子宫内膜异位症、PCOS等因素引起的卵母细胞质量下降,可以改善辅助生殖的临床妊娠结局^[18]。通过对不同发育程度的动物卵泡分析其脂质方面的代谢,发现卵母细胞的成熟及发育潜能的下降与非脂化脂肪酸和硬脂酸的含量升高有关^[19]。大量研究发现,不孕女性脂质代谢标志物水平与卵母细胞受精、发育等多方面存在密切联系^[20]。通过脂质代谢组学的研究,能够分析不孕女性的脂质代谢标志物水平,从而预测卵母细胞结局,借以改善卵母细胞脂质代谢物浓度以获得高质量卵子,最终提高临床妊娠率。因此,利用卵泡液代谢组学技术,通过检测不同脂质代谢通路及不同发育阶段的代谢物含量,对卵母细胞发育潜能可能有更好的预测价值。

4. 胆固醇代谢:胆固醇是动物组织细胞不可或缺的物质,不仅参与形成细胞膜,而且是合成胆汁酸,维生素D以及甾体激素的原料,影响并调控着女性生

殖系统。有研究发现,影响 PCOS 患者卵母细胞发育、成熟的一个因素可能与 7β - 羟基胆固醇有关^[21]。5 - Dehydroepisterol 甾醇合成和胆固醇合成有密切关系,同样,在合成神经活性固醇、类固醇类激素等均与胆固醇相关联^[22]。因此,5 - Dehydroepisterol 在下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴上起着重大作用,对卵母细胞和卵母细胞膜的成熟及生长发育影响较大。研究证实,反复胚胎移植失败不明原因的患者,其卵泡液中的胆固醇的含量下降,而不孕高龄患者卵母细胞质量下降和其卵泡液中的磷脂酰胆碱和硫脲内酯的含量有密切关系^[23]。Chen 等^[24]研究认为,PCOS 患者卵泡液中的胆固醇产物的量对卵母细胞的发育及成熟具有重要的预测价值。近年来研究发现,所有类固醇激素合成的前提物质均是胆固醇,但其如何通过影响卵巢颗粒细胞激素合成来影响卵母细胞发育仍是以后的研究热点。因此,通过靶向和非靶向检测技术,分析差异标志物胆固醇的含量,一定程度上能够预测卵母细胞质量。

5. 维生素代谢:维生素广泛参与人体的新陈代谢,在女性生殖领域发挥着重要的作用,其中在卵母细胞发育和成熟过程中的重要代谢物就包括维生素 D 和 E 等多种维生素。维生素 D 在卵母细胞成熟中,最主要是以维生素 D_3 的形式参与,其升高有利于卵泡生长,低含量则有助于提高窦前卵泡的成活率^[25]。通过对颗粒细胞 (granule cell, GCs)、促性腺激素释放激素 (gonadotropin - releasing hormone, GnRH)、抗缪勒管激素 (anti - Müllerian hormone, AMH)、卵泡刺激素 (follicular stimulating hormone, FSH) 的影响,维生素 D 可以对卵母细胞产生作用。但有资料表明,卵泡液中过高的维生素 D 水平会影响妊娠率。同时,卵泡液中的低水平 $25OHD_3$ 和 β - 维生素对卵母细胞产生影响,在 IVF 中增加维生素 D 有利于增加获卵数,提高了妊娠率和雌二醇水平^[26]。另外有学者研究认为,在行 IVF 治疗的不孕患者中,高水平的 $25OHD$ 出现在大卵泡的卵泡液中,结局是临床妊娠率也较高^[27]。研究表明,维生素 E 是参与卵母细胞发育过程的重要物质,也是最主要的抗氧化剂之一,影响女性的生育能力,现已证实其水平升高与卵母细胞质量提高有关。在含有一定量维生素 E 的卵泡液中,卵母细胞的成熟度更高,且具有一定水平的维生素 E 的血清中,胚胎的质量也更好。检测卵泡液中的维生素 A 发现卵泡液中含有的视黄醇和全反式维甲酸与卵泡发育有关。而其他种类的维生

素还需要进一步实验,来探索就代谢方面不同种类维生素对卵母细胞发育潜能的预测价值。

三、展 望

近年来,继转录组学和蛋白质组学之后,代谢组学在女性生殖领域发挥着越来越重要的作用。对卵泡液代谢方面的研究发现,代谢标志物主要在葡萄糖、氨基酸、脂质、胆固醇等方面存在差异。同时,检测手段也从检测不同标本的 1 个或多个差异代谢物,发展到对同一标本检测几种不同代谢物,通过其在代谢图谱上的差异,可以得到差异代谢物的含量及种类,以及在统计学上的差异,从而进一步了解卵母细胞生存及发育状态,得以筛选出高质量卵子。虽然研究代谢组学的样本易获得,但所需要的样本量一般较大,卵泡液代谢物种类繁多,致使后期数据及结果分析成为一大难题。因此,仍然需要技术改进及大量样本的实验与研究。这样,通过卵母细胞卵泡液非靶向与靶向分析技术,得到不同种类代谢物和代谢通路,并进行大量实验验证,未来能够更好地应用于临床来预测卵母细胞发育潜能,从而提高卵母细胞质量,增加辅助生殖的成功率。

参考文献

- Zhou Z, Zheng D, Wu H, *et al.* Epidemiology of infertility in China: a population - based study[J]. BJOG, 2018, 125(4): 432 - 441
- Beloborodova NV, Olenin AY, Pautova AK. Metabolomic findings in sepsis as a damage of host - microbial metabolism integration[J]. J Crit Care, 2018, 43: 246 - 255
- Zhang M, Lu Y, Chen Y, *et al.* Insufficiency of melatonin in follicular fluid is a reversible cause for advanced maternal age - related aneuploidy in oocytes[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101327
- Liu X, Zhang W, Xu Y, *et al.* Effect of vitamin D status on normal fertilization rate following in vitro fertilization[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 59
- 蒋欣, 徐阳. 卵母细胞的葡萄糖代谢研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(4): 295 - 298
- Li L, Zhu S, Shu W, *et al.* Characterization of metabolic patterns in mouse oocytes during meiotic maturation[J]. Mol Cell, 2020, 80(3): 525 - 540, e9
- Xie HL, Zhu S, Zhang J, *et al.* Glucose metabolism during in vitro maturation of mouse oocytes: an study using RNA interference[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6952 - 6964
- Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, *et al.* Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization[J]. Syst Biol Reprod Med, 2019, 65(1): 39 - 47
- Bai Y, Zhang F, Zhang H, *et al.* Follicular fluid metabolite changes in dairy cows with inactive ovary identified using untargeted metabolomics[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 9837543
- Castiglione Morelli MA, Iuliano A, Schettini SCA, *et al.* NMR Metabolic profiling of follicular fluid for investigating the different causes of

- female infertility: a pilot study[J]. *Metabolomics*, 2019, 15(2): 19
- 11 Chen M, Zhang B, Cai S, *et al.* Metabolic disorder of amino acids, fatty acids and purines reflects the decreases in oocyte quality and potential in sows[J]. *J Proteomics*, 2019, 200: 134 - 143
- 12 Sun Z, Song J, Zhang X, *et al.* SWATH^{HM} - based metabolomics of follicular fluid in patients shows that progesterone adversely affects oocyte quality[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1780391
- 13 Mirabi P, Chaichi MJ, Esmailzadeh S, *et al.* The role of fatty acids on ICSI outcomes: a prospective cohort study[J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 18
- 14 Shibahara H, Ishiguro A, Inoue Y, *et al.* Mechanism of palmitic acid - induced deterioration of in vitro development of porcine oocytes and granulosa cells[J]. *Theriogenology*, 2020, 141: 54 - 61
- 15 Liu L, Yin TL, Chen Y, *et al.* Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 185: 142 - 149
- 16 Montani DA, Braga DPAF, Borges E Jr, *et al.* Understanding mechanisms of oocyte development by follicular fluid lipidomics[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(5): 1003 - 1011
- 17 Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L - carnitine in female infertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 5
- 18 Kitano Y, Hashimoto S, Matsumoto H, *et al.* Oral administration of l - carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(8): 684 - 688
- 19 Wen R, Gan X, Hu S, *et al.* Evidence for the existence of de novo lipogenesis in goose granulosa cells[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(2): 1023 - 1030
- 20 姜文晶, 孙振高, 王丹丹, 等. 脂质代谢组学与多囊卵巢综合征发病及 IVF - ET 结局的相关性研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(5): 683 - 686
- 21 Chen X, Lu T, Wang X, *et al.* Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: a UPLC Q - exactive based metabolomic study[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 280 - 286
- 22 Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(1): 6 - 34
- 23 Ferchaud - Roucher V, Barner K, Jansson T, *et al.* Maternal obesity results in decreased syncytiotrophoblast synthesis of palmitoleic acid, a fatty acid with anti - inflammatory and insulin - sensitizing properties[J]. *FASEB J*, 2019, 33(5): 6643 - 6654
- 24 Zhang XX, Yu Y, Sun ZG, *et al.* Metabolomic analysis of human follicular fluid: potential follicular fluid markers of reproductive aging[J]. *J Pak Med Assoc*, 2018, 68(12): 1769 - 1781
- 25 Chen X, Lu T, Wang X, *et al.* Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: a UPLC Q - Exactive based metabolomic study[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 280 - 286
- 26 Antunes RA, Mancebo ACA, Reginatto MW, *et al.* Lower follicular fluid vitamin D concentration is related to a higher number of large ovarian follicles[J]. *Reprod Biomed Online*, 2018, 36(3): 277 - 284
- 27 贾新转, 王聪敏, 刘二缓, 等. 继发性不孕患者卵泡液 25 - (OH)D 水平与 IVF 卵母细胞发育关系的研究[J]. *天津医药*, 2020, 48(12): 1187 - 1192

(收稿日期: 2022 - 07 - 28)

(修回日期: 2022 - 08 - 11)

(上接第 183 页)

- 11 Gore M, Narvekar A, Bhagwat A, *et al.* Macromolecular cryoprotectants for the preservation of mammalian cell culture: lessons from crowding, overview and perspectives[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(2): 143 - 169
- 12 Yong KW, Laouar L, Elliott JAW, *et al.* Review of non - permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues [J]. *Cryobiology*, 2020, 96: 1 - 11
- 13 Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, *et al.* Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(1 - 2): 23 - 28
- 14 Tian Y, Visser JC, Klever JS, *et al.* Orodispersible films based on blends of trehalose and pullulan for protein delivery[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 133: 104 - 111
- 15 Stanishevskaya O, Silyukova Y, Pleshanov N, *et al.* Role of mono - and disaccharide combination in cryoprotective medium for rooster semen to ensure cryoresistance of spermatozoa[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5920
- 16 Angel - Velez D, De Coster T, Azari - Dolatabad N, *et al.* New alternative mixtures of cryoprotectants for equine immature oocyte vitrification[J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11(11): 3077
- 17 张小刚, 王臻, 李浩, 等. 不同浓度海藻糖对奶山羊睾丸组织冷冻保存效果的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(4): 25 - 29
- 18 杜天奇, 迟令龙, 赵淑芹, 等. 不同冷冻保护剂在羊卵巢整体冻存中的效果比较[J]. *解剖学报*, 2015, 46(3): 415 - 421
- 19 张啸龙, 张杰平, 王金玉, 等. 不同冻存保护剂对未性成熟小鼠睾丸生精细胞冻存的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2022, 31(3): 366 - 372
- 20 李方舟, 王艳华, 温飞, 等. 海带多糖和枸杞多糖对山羊精液冷冻保存效果的影响[J]. *家畜生态学报*, 2018, 39(3): 48 - 52
- 21 Linlin L, Yongsheng T, Zhentong L, *et al.* Cryopreservation of embryos of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) using combinations of non - permeating cryoprotectants[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737524
- 22 李振通, 田永胜, 唐江, 等. 星斑川鲷胚胎的玻璃化冷冻保存[J]. *安徽农业大学学报*, 2020, 47(3): 373 - 379
- 23 Fujihara M, Kaneko T, Inoue - Murayama M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3970
- 24 Ordóñez - León EA, Martínez - Rodero I, García - Martínez T, *et al.* Exopolysaccharide ID1 improves post - warming outcomes after vitrification of in vitro - produced bovine embryos[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7069
- 25 蔡玉芳, 王燕蓉, 孔斌, 等. 枸杞多糖对胎儿卵巢组织冷冻保存的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(40): 7475 - 7479
- 26 周树兰, 王成. 附子多糖对深低温保存腹主动脉线粒体结构和功能的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2022, 53(2): 221 - 226

(收稿日期: 2022 - 07 - 24)

(修回日期: 2022 - 08 - 19)