

· 临床论著 ·

基于卵泡液代谢组学的《黄帝内经》 “七七理论”临床研究

孙振高¹ 张兴兴^{2△} 宋景艳² 王爱娟² 杨毅² 王小明² 王天琪² 徐凯月²

摘要 目的 基于卵泡液代谢组学分析“四七”、“五七”女性卵泡液,探讨卵母细胞衰老机制,辨识并确定与高龄不孕肾气虚证有密切关系的差异性化合物。**方法** 回顾性分析 55 例既往行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)或卵母细胞单精子显微注射(ICSI)的不孕患者,按照年龄将其分为两组:高龄组(35~42 岁,27 例,“五七”)和年轻组(28~35 岁,28 例,“四七”),选用拮抗剂超促排卵方案,利用超高效液相色谱-高分辨质谱技术分析两组的卵泡液,最终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以确定差异性化合物。**结果** 与高龄组比较,年轻组获卵数、正常受精卵数、有效胚胎数均增多($P < 0.01$)。两组在 MII 卵数、优质胚胎数、异常受精卵数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组间差异性化合物大致分为激素类、卵磷脂类、溶血磷脂类、蛋白降解片段 4 类,其中上调物有 9 种,下调物有 6 种,仅在高龄组卵泡液中发现的差异性化合物有 2 种。**结论** 高龄组和年轻组相比生殖功能下降比较明显,揭示了中医学“七七”理论的内涵。

关键词 卵泡液代谢组学;“七七”理论;高龄;生物标志物

Clinical Study on the "Seven Seven" Theory Based on Follicular Fluid Metabolomics SUN Zhen-gao¹, ZHANG Xing-xing², SONG Jing-yan², WANG Ai-juan², YANG Yi², WANG Xiao-ming², WANG Tian-qi², and XU Kai-yue² 1 Reproductive and Genetic Center of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan (250011); 2 Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan (250014)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of oocyte aging, identify and determine the differential compounds closely related to the older infertility of Shen qi deficiency syndrome, based on the follicular fluid metabolomics analysis of the "Four Seven" and "Five Seven" female follicular fluids. **Methods** 55 cases of infertility patients with *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were retrospectively selected, they were assigned to two groups according to age: the older group (35-42 years old, 27 cases, "five-seven") and the younger group (28-35 years old, 28 cases, "four-seven"), the antagonist ovulation protocol was selected and the follicular fluids of the two groups were analyzed by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, the fragments were finally identified by fragmentation information from fragment ion scans to identify differential compounds. **Results** Compared with the older group, the number of oocytes obtained, the normal fertilized oocytes and effective embryos were increased in the younger group ($P < 0.05$). There were no significant differences in oocytes of MII, the number of high quality embryos and abnormal fertilized oocytes between the two groups ($P > 0.05$). The differential compounds between the two groups were roughly divided into four categories: hormones, lecithin, lysophospholipids and protein degradation fragments. Among them, there were 9 kinds of up-regulated compounds, 6 kinds of down-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81373676, No. 81674018)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心(济南 250014); 2. 山东中医药大学中医学院(济南 250014)

△ 现在枣庄市妇幼保健院生殖中心(枣庄 277000)

通讯作者: 孙振高, Tel: 13708938621, E-mail: sunzhengao77@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180824.252

regulated compounds, there were two types of differential compounds found only in the older group follicular fluid. Conclusion The decline of reproductive function in older group and younger group is obvious, revealing the connotation of traditional Chinese medical theory of "seven seven".

KEYWORDS follicular fluid metabolomics; "seven seven" theory; age; biomarkers

中医学“七七”理论出自《素问·上古天真论》,谓女子以“七”为律,并以“七七”为期,论述女性各个年龄阶段的生理变化,同时强调女性生殖机能的维持以肾气为主导,是中医学对女性生殖功能的基本认识,但目前对“七七”理论所蕴含的丰富科学道理缺乏深入研究。高龄女性的生殖功能下降明显,体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)及卵母细胞单精子显微注射(*intra cytoplasmic sperm injection*, ICSI)后的临床结局较差。继蛋白组学后代代谢组学技术得到不断的应用和发展,那么高龄不孕肾气虚女性的与正常生育期女性的卵泡液代谢物是否有差异?能否尝试从卵泡液代谢组学角度初步阐释“七七”理论的内涵?因此本研究旨在从卵泡液代谢组学层面丰富《内经》“七七”理论的科学内涵。

资料与方法

1 诊断标准 (1)夫妻双方正常性生活不避孕1年未孕^[1]; (2)符合中医肾气虚型不孕症诊断标准^[2]。

2 纳入及排除标准 纳入标准: (1)符合上述诊断; (2)年龄在28~42岁的非妊娠期及哺乳期妇女; (3)符合因男方因素导致不孕的病例; (4)既往月经周期21~35天,无生殖道感染,无明显妇科疾病; (5)签署知情同意书。排除标准: (1)近半年内应用激素类药物者; (2)合并有心脑血管、肝、肾及造血系统等严重疾病者,精神病者,甲状腺和肾上腺功能异常者; (3)患有《母婴保健法》规定的不宜生育目前无法行种植前基因诊断(*preimplantation genetic diagnosis*, PGD)的遗传性疾病者; (4)具有吸毒等严重不良嗜好者; (5)接触致畸量的射线、毒物、药品并处于作用期者。

3 一般资料 2015年7月—2015年10月于山东中医药大学附属医院生殖医学中心行IVF/ICSI治疗的患者55例,根据年龄分为高龄组(35~42岁,27例,“五七”)和年轻组(28~35岁,28例,“四七”),分别取卵泡液进行研究。两组一般资料比较可见年轻组年龄、基础窦卵泡数明显优于高龄组($P < 0.01$),高龄组的基础窦卵泡明显少于年轻组,基础FSH水平高龄组明显高于年轻组($P < 0.05$),表明高

龄组患者的卵巢功能有明显的下降。两组在不孕年限、基础LH水平、基础E₂水平、基础P水平、受精方式比较(表1),差异无统计学意义($P > 0.05$)。卵泡液研究通过山东中医药大学生殖伦理委员会通过(No. 201602003)。

表1 两组患者一般情况比较			
项目	年轻组(28例)	高龄组(27例)	P值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	29.57 $\pm$ 2.92	39.19 $\pm$ 2.95	0.000
不孕年限(年, $\bar{x} \pm s$)	3.18 $\pm$ 1.85	3.22 $\pm$ 2.55	0.890
基础窦卵泡数(个, $\bar{x} \pm s$)	7.69 $\pm$ 1.28	3.26 $\pm$ 6.80	0.002
基础FSH(IU/L, $\bar{x} \pm s$)	7.69 $\pm$ 1.28	10.87 $\pm$ 7.40	0.028
基础LH(IU/L, $\bar{x} \pm s$)	4.39 $\pm$ 1.50	5.98 $\pm$ 8.54	0.391
基础E ₂ (ng/L, $\bar{x} \pm s$)	37.69 $\pm$ 16.80	44.15 $\pm$ 20.89	0.222
基础P(ng/L, $\bar{x} \pm s$)	0.37 $\pm$ 0.14	0.43 $\pm$ 0.40	0.545
受精方式	IVF[例(%)]	19(67.86)	13(48.15)
	ICSI[例(%)]	9(32.14)	14(51.85)

4 治疗方案 控制性超促排拮抗剂方案(GnRH-ant方案):两组均采用GnRH-ant方案,即入选患者于月经周期第3天行血清性激素水平检测及超声检查,评估卵巢功能,给予注射基因重组卵泡刺激素(r-FSH,果纳芬,Merck Serono SA Aubonne Branch,瑞士,批号:S2013005575)或(和)注射用尿促性腺激素(human menopausal gonadotrophin, HMG, 丽珠集团丽珠制药厂,批号:H10940097),起始剂量300 IU/d,4天后复诊,超声检查监测卵泡发育情况监测卵泡发育情况并调整用量。一旦主导卵泡直径达到13~14 mm时加用西曲瑞克0.25 mg/d (Cetriacetic Acetate for Injection, 思则凯, Merck Serono SA Aubonne Branch,瑞士,批号:H20100369)直至皮下注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, 丽珠集团丽珠制药厂,批号:H44020674,或recombinant-human chorionic gonadotropin, r-HCG, Merck Serono SA Aubonne Branch,瑞士,批号:S20050093)日。注射HCG 36 h后行经阴道超声引导下穿刺取卵术。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。

5 观察指标及方法 对比并观察年轻组与高龄

组两组间的获卵数、成熟卵裂数、有效胚胎数、优胚数、受精率、妊娠率、周期取消率等临床结局,并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,建立基于液相色谱/质谱(LC/MS)的代谢组学平台。

5.1 样品预处理及样品分析 卵泡液样本冰上解冻,在 Sirocco 蛋白沉淀板(Waters)中加入 600 mL 乙腈,再将 200 mL 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 80~100 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 mL 卵泡液加入 300 mL 含有 4 mmol/L 吉非罗齐(宁波大学)和(ZW14)(中国科学院广州生物医药与健康研究院)的甲醇溶液:14 000 ×g 离心 30 min,取 10 mL 上清液进样分析。

5.2 代谢组学分析 采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪对 55 例卵泡液样品进行采集数据,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,采用主成分分析法(principal components analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析法(partial least squares-discriminate analysis, 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 为差异有统计学意义。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。由此研究年轻组与高龄组之间的物质变化规律。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行计算。各组就诊的定量资料符合正态分布将采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。两组治疗前后的变化值符合正态分布的采用独立样本 *t* 检验进行比较,不符合正态分布的用秩和检验进行比较。两组就诊的计数资料采用频数(构成比)进行统计描述,采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组临床结局比较(表 2) 与高龄组比较,年轻组获卵数、正常受精卵数、有效胚胎数均增多(*P* < 0.01)。两组在 MII 卵数、优质胚胎数、异常受精卵数比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2 PCA 结果比较(图 1) 对本次研究的试验样品做数据处理,各卵泡液样品 LC-MS 谱的 PCA 得分图可以看出年轻组与高龄组相比较,很难分辨两组间的差异。

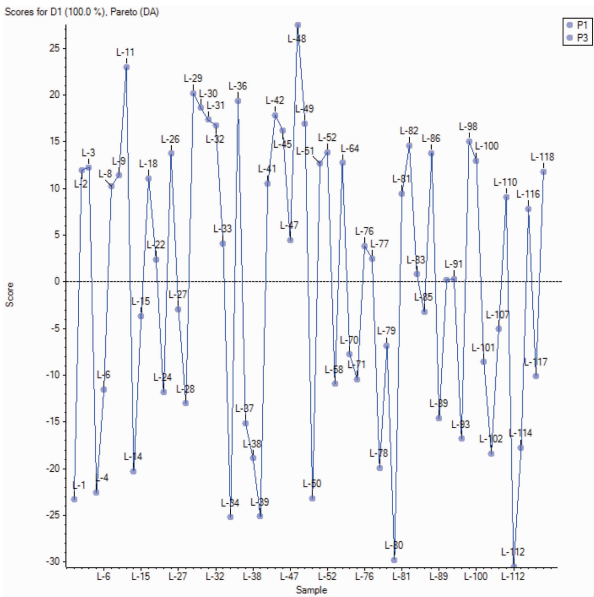


图 1 各卵泡液样品 LC-MS 谱的 PCA 得分

3 PLS-DA 及对模型的验证(图 2) 使用 SIM-CA-P + 软件(V11.0, Umetrics AB, Umea, Sweden)对归一化后的数据进行 PLS 计算。各卵泡液样本间 PLS-DA 排列检验图中可以看出年轻组与高龄组 PLS-DA 排列在上下两侧,说明模型的有效性及其两组间具有群体间的差异。

4 差异代谢物的筛选及鉴定(图 3) 在经过 PLS-DA 分析之后能够得出新的结果,此结果反映的是高龄组与年轻组的载荷对比。从图中可得到年轻组与高龄组两组间存在差异的物质质荷比,以为进一步的分子式精准匹配来完成对匹配信息的过滤筛选。

表 2 两组临床结局比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	获卵数	MIⅡ卵数	正常受精卵数	有效胚胎数	优质胚胎数	异常受精卵数
年轻	28	9.46 ± 4.89	9.21 ± 4.69	7.07 ± 3.71	4.00 ± 2.39	0.92 ± 1.49	2.03 ± 2.28
高龄	27	5.85 ± 4.05	5.48 ± 3.60	3.56 ± 2.50	2.04 ± 1.74	0.66 ± 0.88	1.70 ± 2.13
<i>P</i> 值		0.004	0.082	0.000	0.001	0.725	0.404

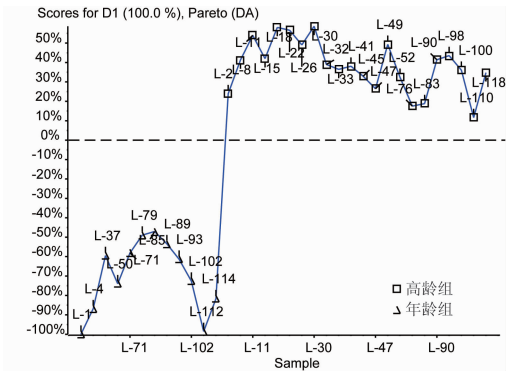


图2 各卵泡液样本间 PLS-DA 排列检验图

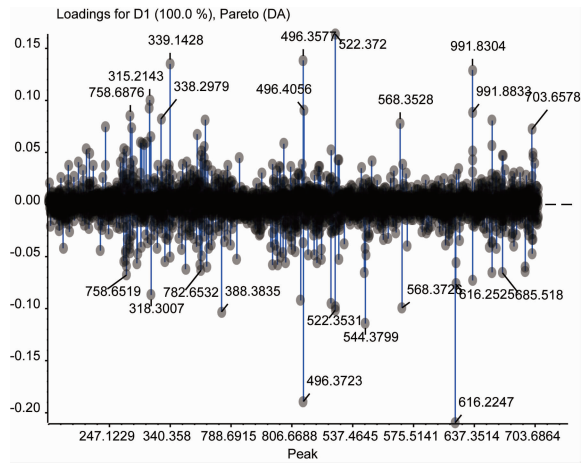


图3 高龄组与年轻组载荷图

5 差异性物质(表3) 其发现两组间差异性化合物大致分为激素类、卵磷脂类、溶血磷脂类、蛋白降解片段等。具体为 15 种差异性化合物,其中上调物有 9 种,下调物 6 种,有 2 种仅在高龄组中存在。

讨 论

“七七”理论分期论述女性各个年龄阶段的生理变化,同时强调女性生殖机能的维持以肾气为主导,指出肾气的盛衰,天癸的至竭,与女性生长、发育、生殖及衰老的过程息息相关。“七七”理论认为,人之盛衰皆本源于肾,肾气盛实则天癸不竭,冲任相资,胎孕有时;肾气衰微则天癸渐竭,冲任虚衰,胎孕无时。强调了肾气、天癸对于女性生殖能力的重要作用。年龄是影响女性生育能力的重要因素,而伴随年龄的增长,女性的肾气渐衰、天癸渐竭。“夫精者,生之本也”,而肾为先天之本,主藏精气,肾中精气的虚衰,主宰着人体的生长发育及生殖功能的成熟和衰退,故肾气盛,天癸至,月经来潮和孕育胎儿才能实现肾气衰,天癸渐竭,月经渐闭,丧失孕育胎儿的能力。因此,肾气的虚衰和天癸的衰竭,生殖功能的衰退都与高龄不孕女性生殖功能逐渐下降的现象相吻合。

“七七”理论中讲述了女性生殖能力衰退的一个过程,也是一个肾气虚、天癸竭的过程,所以临床上根据“七七”理论,临床上提出运用补肾益天癸的方子改善女性的卵巢功能、提高卵母细胞质量,取得了不错的治疗效果^[3],但是仍然缺乏大样本、系统的研究。反观高龄不孕患者所面临的现状,本研究可从卵泡液代谢组学角度为《内经》的“七七”理论提供一些现代科研证据。

在高龄组与年轻组对比发现的差异性化合物中,肾气虚型高龄组的 DAG[14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)/0:0]和 TAG[18:1(11Z)/24:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)]明显下调,而 DG 和 TG 是卵母细胞

表3 差异性物质

分子式	差异性化合物	丰度比(O/Y)	T 检验(P)
C ₅ H ₆ N ₂ O ₄	4,5-二氢乳清酸(4,5-dihydroorotic acid) ↑	4.7	0.007
C ₈ H ₈ O ₆	核苷酸类 (maleylacetoacetic acid) ↑	4.2	0.008
C ₂₀ H ₂₆ O ₃	4-氧代-视黄酸(4-oxo-retinoic acid) ↑	2.4	0.030
C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₂	氧化物(rhazidiqenine Nb-oxide) ↑	1.9	0.040
C ₂₁ H ₃₀ O ₃	脱氧皮质酮(deoxycorticosterone) ↑	1.8	0.040
C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	磷脂类[LysoPC (14:0)] ↓	0.3	0.020
C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	磷脂类[LysoPC (16:0)] ↓	0.5	0.030
C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	磷脂类[LysoPC (18:0)] ↓	0.4	0.040
C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	磷脂类(phytosphingosine) ↓	0.3	0.020
C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₆	5,6-二氢尿苷(5,6-dihydrouridine) ↑	6.0	0.005
C ₁₆ H ₃₁ NO ₅	3-羟基壬酰肉碱(3-hydroxynonanoyl carnitine) ↑	2.5	0.040
C ₃₉ H ₇₀ O ₅	脂类[DG(14:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)/0:0)] ↓	0.6	0.040
C ₆₅ H ₁₁₄ O ₆	脂类[TG(18:1(11Z)/24:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))] ↓	0.3	0.030
C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	尼古丁葡萄糖苷酸(Nicotine glucuronide) ↑	9.6	0.001
C ₄₆ H ₉₄ NO ₇ P	磷脂类[phosphatidylcholine (16:0/22:0)] ↑	7.5	0.001

注:丰度比(O/Y)表示高龄组与年轻组差异物的丰度比,>1 表示上调,<1 表示下调

脂质代谢中的物质,说明高龄组卵母细胞的能量代谢与年轻组有差异。甘油二酯(diacylglycerol,DAG)是油脂代谢的中间体,是第一个被发现的脂质的第二信使。DAG 由磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI-4-P)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5-P₂)被磷脂酶 C(phospholipase C,PLC)裂解产生。并且蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)是其主要效应物。DAG 与 PKC 中保守 C1 结构域的结合导致 PKC 活化,调节细胞周期,细胞存活,恶性转化和细胞凋亡^[4]。研究发现^[5-7]在卵母细胞衰老期间,深色调变得更显著,并且出现不规则的卵泡,而且在卵母细胞成熟期间脂质的性质发生改变。存储在卵母细胞中的最丰富的细胞内脂质显示为三酰基甘油(triacylglycerols,TAG),可用于线粒体 β -氧化,在卵母细胞成熟期间产生能量。TAG 是卵母细胞中含量最丰富的脂质物质,比例构成超过 50%^[7],是卵母细胞的一个巨大的潜在能源储备。高龄组 DAG、TAG 的下调通过影响卵母细胞的能量代谢,从而影响到卵母细胞的发育,推测肾气虚高龄不孕患者卵母细胞储备减少、质量下降与之相关,但具体是如何影响的,仍需进一步研究。

磷脂在卵母细胞成熟和胚胎发育过程中发挥着重要作用,此外,在卵母细胞成熟期间磷脂和胆固醇的富集对于在卵母细胞受精后的快速细胞分裂期间形成膜是关键的。在卵母细胞中磷脂酰肌醇占总磷脂的 6%,富含花生四烯酸(20:4n-6)和硬脂酸(18:0)和棕榈酸(16:0)。该膜磷脂的水解产生两个第二信使,肌醇 1,4,5-三磷酸和 DAG,在卵母细胞成熟和单子宫受精的能力中有重要的作用^[8]。而在女性生殖功能中研究最多的是溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid,LPA),其为迄今发现的一种最小、结构最简单的磷脂,已经被认为是参与各种生物过程的重要信号分子,比如在细胞增殖^[9],分化^[10],活化^[11,12]形态发生^[13]和细胞因子分泌^[14]过程中。该分子由膜磷脂通过两种主要途径/酶产生:自分泌运动因子(autotaxin,ATX)和磷脂酶 A2(Phospholipase A₂,PLA₂)^[15,16]。研究发现用 LPA 补充成熟培养基会增加卵母细胞中 FST 和 GDF9 的 mRNA 丰度,并降低卵丘细胞中组织蛋白酶(cathepsin S,CTS)的 mRNA 丰度,从而改善卵母细胞的功能^[16]。Bettgowda A^[16]等发现卵丘细胞中 CTSS 转录丰度与卵母细胞质量及其发育能力之间呈负相关,而 LPA 补充成熟培养基会减少 CTSS,CTSK,CTSS 和 CTSZ 的卵丘细胞转录水平,这再次表明 LPA 可改善卵母细胞的功能。此外,用 LPA 刺激的卵母细胞具有较高的 BCL2

转录水平和较低的 BAX 转录水平,导致明显降低的 BAX / BCL2 比率,而且 LPA 通过几种 LPAR 在颗粒细胞中发挥自分泌和旁分泌作用,并通过增加 FSH 受体和 17 β -羟基类固醇脱氢酶(17 β -HSD)表达来刺激雌二醇(E₂)合成。若阴道内施用 LPARs 拮抗剂可降低妊娠率,延长黄体的寿命,刺激卵母细胞中促乳杆菌前列腺素、E₂ 合成^[18,19],从而在卵母细胞的发育和成熟过程中发挥着重要的作用。研究还发现用 LPA 补充成熟培养基可促进卵母细胞和周围细胞之间的联系,影响胚胎发育、卵母细胞和卵丘细胞凋亡、卵母细胞能力的基因的表达。而溶血磷脂酰胆碱是磷脂质的一种,磷脂被磷脂酶 A 水解生成的一种化合物,PC 通过 PLA₂ 的作用磷脂酰胆碱(PC)的水解产生。在正常生理条件下,在组织中形成的大多数 LPC 被快速代谢或再乙酰化^[20]。PC 和鞘磷脂是功能性 PM 的结构单元,它们的组成决定了细胞膜的大多数物理化学性质,包括流动性、渗透性和热相行为,PC 可以调节各种细胞制备物中的离子通道活性,比如它可以引起持续的细胞内 Ca²⁺ 增加,这或与选择性阳离子通道的活化相关^[21]。本研究通过代谢组学分析发现高龄组与年轻组的差异性化合物中 LysoPC(14:0)、LysoPC(16:0)、LysoPC(18:0)、phytosphingosine 下调,而这四种物质都属于磷脂类物质,仅在高龄组发现的另外一种磷脂是 phosphatidylcholine(16:0/22:0),以上四种磷脂是否同 LPA 一样影响卵母细胞的发育和成熟、卵母细胞和卵丘细胞凋亡和卵母细胞能力的基因的表达,尚不得而知,需要进一步研究。

本研究中“五七”高龄肾气虚(高龄组)及“四七”生育阶段正常女性(年轻组)相比生殖功能下降比较明显,反映了中医学“七七”理论“五七,阳明脉衰,面始焦,发始堕”。研究发现的差异性化合物与女性生殖功能密切相关,影响女性卵母细胞的发育、成熟、衰老和女性生殖功能的衰退,揭示了中医“七七”理论的内涵。但研究纳入的符合筛选标准的患者缺乏客观的观察指标,而且由于卵泡液检测费用较高,获取的样本量少,缺乏大样本、多中心的研究,需要进一步研究。此外,本研究所筛选的差异性化合物只是初步的筛选,化合物具体的影响机制仍需要进一步研究。实验研究中所获得卵泡液虽然是收集第一管淡黄色、无血、透明卵泡液,但无法做到单卵泡单针取卵,混合后的卵泡液是否会影响结果,不得而知,仍需进一步探索新的方法,以提供全面可靠的依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 沈铿, 马丁主编. 妇产科学. 第 3 版[M]. 人民卫生出版社, 2015: 395.
- [2] 张玉珍主编. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2005: 320.
- [3] 王伟, 吴效科, 姚美玉. 天癸与妊娠异常的关系[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(2): 158–159.
- [4] Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos[J]. J Reprod Fertil, 1999, 116(2): 373–378.
- [5] Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes [J]. Reproduction, 2001, 122(1): 131–138.
- [6] Homa ST, Racowsky C, Mcgaughey RW. Lipid analysis of immature pig oocytes [J]. J Reprod Fertil, 1986, 77(2): 425–434.
- [7] Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, et al. Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 1999, 59(20): 5370–5375.
- [8] Honda M, Ishimaru T, Itabashi Y. Lipid classes, fatty acid composition, and glycerolipid molecular species of the red alga gracilaria vermiculophylla, a prostaglandin-producing seaweed [J]. J Oleo Sci, 2016, 65(9): 723–732.
- [9] Spohr TC. Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(12): 7470.
- [10] Weiner JA, Chun J. Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(9): 5233–5238.
- [11] Ye X, Skinner MK, Kennedy G, et al. Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling [J]. Biol Reprod, 2008, 79(2): 328–336.
- [12] Härmä V, Knuutila M, Virtanen J, et al. Lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate promote morphogenesis and block invasion of prostate cancer cells in three-dimensional organotypic models [J]. Oncogene, 2012, 31(16): 2075–2089.
- [13] Huang MC, Lee HY, Yeh CC, et al. Induction of protein growth factor systems in the ovaries of transgenic mice overexpressing human type 2 lysophosphatidic acid G protein-coupled receptor (LPA2) [J]. Oncogene, 2004, 23(1): 122–129.
- [14] Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production [J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(5): 477–489.
- [15] Nakamura K, Kishimoto T, Ohkawa R, et al. Suppression of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylcholine formation in the plasma *in vitro*: proposal of a plasma sample preparation method for laboratory testing of these lipids [J]. Anal Biochem, 2007, 367(1): 20–27.
- [16] Bettgowda A, Patel OV, Lee KB, et al. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications [J]. Biol Reprod, 2012, 79(2): 301–309.
- [17] Woclawek-Potocka I, Kowalczyk-Zieba I, Skarzynski DJ. Lysophosphatidic acid action during early pregnancy in the cow: *in vivo* and *in vitro* studies. [J]. J Reprod Dev, 2010, 56(4): 411–420.
- [18] Woclawek-Potocka I, Kondraciuk K, Skarzynski DJ. Lysophosphatidic acid stimulates prostaglandin E₂ production in cultured stromal endometrial cells through LPA1 receptor [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(8): 986–993.
- [19] Schilling T, Lehmann F, Rückert B, et al. Physiological mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced de-ramification of murine microglia [J]. J Physiol, 2004, 557(Pt 1): 105–120.
- [20] Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(5): 414–418.
- [21] Mahony S. Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis [J]. Genome Biol, 2011, 12(1): R2.

(收稿: 2017-07-22 在线: 2018-09-29)

责任编辑: 汤 静