

基于血清代谢组学研究左归丸与右归丸辨证治疗 卵巢储备功能减退

曹莹^{1,2}, 陈思¹, 陈玥¹, 周科达¹, 王佩娟^{1*}, 宋清霞^{2*}

(1. 南京中医药大学 附属中西医结合医院, 江苏 南京 210046;

2. 南京中医药大学 附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009)

[摘要] 基于代谢组学系统分析左归丸与右归丸辨证治疗卵巢储备功能减退(DOR)的代谢物质基础,为中医辨证论治 DOR 提供科学依据。医院门诊收集 DOR 肾阴虚患者给予左归丸治疗 12 周,DOR 肾阳虚患者给予右归丸治疗 12 周,基于非靶向代谢组学研究技术,筛选左归丸治疗 DOR 肾阴虚和右归丸治疗 DOR 肾阳虚的潜在生物标志物,并对其进行代谢通路分析。分别记录和统计患者治疗后的妊娠率及血清激素基础水平[基础卵泡刺激素(bFSH)、基础黄体生成素(bLH)、基础雌二醇(bE₂)、抗缪勒管激素(AMH)]、中医证型评分、Kupperman 评分的改变。结果显示,共收集 DOR 肾阴虚患者 23 例,肾阳虚患者 25 例。左归丸回调 DOR 肾阴虚患者的左旋肉碱、乙酰辅酶 A、辅酶 A、辅酶 Q₁₀(CoQ10)等 26 种差异代谢物,映射到 12 条代谢通路;右归丸回调 DOR 肾阳虚患者的己二酰辅酶 A、L-赖氨酸、赖氨酸精氨酸、 α -生育酚等 22 种差异代谢物,映射到 11 条代谢通路。DOR 肾阴虚和肾阳虚患者治疗后 bFSH、bLH 均明显低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$);虽然 bE₂、AMH 差异没有统计学意义,但有改善趋势;中医证型评分和 Kupperman 评分均明显低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。

[关键词] 卵巢储备功能减退;肾阴虚证;肾阳虚证;左归丸;右归丸;代谢组学

Zuogui Pills and Yougui Pills in differential treatment of diminished ovarian reserve based on metabolomics

CAO Ying^{1,2}, CHEN Si¹, CHEN Yue¹, ZHOU Ke-da¹, WANG Pei-juan^{1*}, SONG Qing-xia^{2*}

(1. *Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;*

2. *Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, China*)

[Abstract] Based on the metabolomics, this paper systematically analyzed the metabolic substance basis of Zuogui Pills and Yougui Pills in syndrome differentiation and treatment of diminished ovarian reserve (DOR), so as to provide a scientific basis for the traditional Chinese medicine (TCM) syndrome differentiation and treatment of DOR. Patients with DOR of kidney-Yin deficiency syndrome were collected from outpatient department of hospitals and treated with Zuogui Pills for 12 weeks. And kidney-Yang deficiency syndrome were treated with Yougui Pills for 12 weeks. Based on the non-targeted metabolomic research techniques, the potential biomarkers of Zuogui Pills and Yougui Pills in the treatment of DOR with kidney-Yin deficiency and kidney-Yang deficiency, respectively, were screened out, and metabolic pathways of biomarkers were analyzed. The pregnancy rate, basic serum hormone levels [basal follicle-stimulating hormone (bFSH), basal-luteinizing hormone (bLH), basal-estradiol (bE₂), and anti-Müllerian hormone (AMH)], TCM syndrome type score, and Kupperman score were recorded and statistically analyzed after treatment. The results

[收稿日期] 2022-09-13

[基金项目] 江苏省省级重点研发计划专项(社会发展)(BE2019766);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX21-0754)

[通信作者] *王佩娟,主任中医师,主要从事中医妇科研究,Tel: (025) 85638721, E-mail: pjwang8222@163.com; *宋清霞,主任中医师,主要从事中医妇科研究, E-mail: 13913536291@163.com

[作者简介] 曹莹,博士,住院医师,主要从事生殖内分泌研究, E-mail: 529714452@qq.com

showed that 23 patients with DOR of kidney-Yin deficiency syndrome and 25 patients of kidney-Yang deficiency syndrome were collected. Twenty-six differential metabolites, including L-carnitine, acetyl-CoA, coenzyme A, and coenzyme Q₁₀ (CoQ10), were mapped to 12 metabolic pathways in patients with kidney-Yin deficiency treated with Zuogui Pills. Twenty-two differential metabolites, such as adipoyl-CoA, L-lysine, lysine arginine, and α -tocopherol, were mapped to 11 metabolic pathways in patients with kidney-Yang deficiency. After treatment, bFSH and bLH of patients with DOR were significantly lower than those before treatment ($P < 0.05$). Although the comparison of bE₂ and AMH had no significant differences, there was a improvement trend. The TCM syndrome type score and Kupperman score of patients with DOR after TCM treatment were significantly lower than those before treatment ($P < 0.05$).
[Key words] diminished ovarian reserve; kidney-Yin deficiency syndrome; kidney-Yang deficiency syndrome; Zuogui Pills; Yougui Pills; metabolomics

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230226.502

卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)是一种与年龄不符的病理性卵巢功能衰退的疾病,主要特征为卵巢内卵母细胞的数量减少或者质量下降,引起生育能力下降,同时伴有窦卵泡数和激素水平异常^[1]。近年来,由于社会的进步和生活方式的改变,女性的工作压力不断增大,发病率不断上升且趋于年轻化,其不仅严重影响育龄期女性的生殖健康和生活质量,而且会增加患者心血管等一系列危害生命健康的疾病。DOR发病机制复杂,发病原因尚不完全明确,所以目前仍无有效的方法恢复卵巢功能,西医最常用的是激素替代治疗。

中医认为肾-天癸-冲任-胞宫生殖轴是女性生殖生理的轴心理论,肾主导着此生殖轴生理功能,若肾精亏虚,天癸匮乏,冲任失养,胞宫无法得到濡养;若肾阳不足,则不能温养胞宫,卵泡也不能获得足够的能量排出,最终导致卵巢功能减退的一系列症状。因此若女性生殖功能发生病理变化,应治病求本,补肾即为根本。中医在补肾治疗的同时讲究辨证,临床见DOR肾阴虚患者,根据药物归经和性味给予滋补肾阴之品;DOR肾阳虚患者给予温补肾阳的药物。左归丸和右归丸辨证治疗DOR,在临床上已经广泛应用了千年,其不仅可以延缓卵巢病理性衰老疾病进程,而且可以延长患者生殖寿命,在改善患者生活质量方面尤为突出。有学者对加味左归丸治疗早发性卵巢功能不全进行临床试验研究,结果表明患者的血清性激素、卵巢双侧基础窦卵泡数(AFC)和中医证候积分有明显的改善^[2]。临床研究发现卵巢功能减退的肾阴虚患者口服左归丸治疗后体外受精-胚胎移植治疗效率明显提高,其作用机制可能是促进了窦前卵泡提前进入激素影响阶段,从而改善卵

巢功能^[3]。唐立明等^[4]研究发现,左归丸可以调节卵巢功能减退大鼠模型血清性激素水平,其分子机制可能促进卵巢血管生成和卵泡的生长、发育、成熟等方面调节卵巢储备功能。临床研究发现右归丸不仅对改善DOR患者的临床症状有良好的治疗效果,而且可以良性调节体内性激素水平,同时通过妇科超声检查患者的卵巢血流和卵巢体积大小以及窦卵泡数量也都有所改善,综上,右归丸是治疗DOR的有效办法^[5-6]。动物实验研究发现右归丸可以促进大鼠卵巢组织血管生成,改善卵巢组织形态学指标,进而改善大鼠卵巢功能^[7]。

综上所述,左归丸和右归丸辨证治疗DOR在调节生殖内分泌功能方面具有不可替代的优势,并且临床疗效已得到广泛验证。然而,中药复方是通过何种物质基础,以及通过何种路径的调节达到治疗效果,现在仍不清楚。

代谢组学是应用高通量技术结合信息学研究方法,定性和定量全面研究生物体的内源性小分子代谢终产物,可以将中药复杂的化学体系在人体疾病复杂的生物体系的代谢差异物变化体现出来,从机体网络代谢角度阐释了左归丸和右归丸辨证治疗DOR的潜在生物代谢标志物,从分子水平研究和阐述左归丸治疗DOR肾阴虚、右归丸治疗DOR肾阳虚药效物质基础。蒋宁等^[8]利用代谢组学研究发现,六味地黄丸及八味地黄丸均能够有效调节和改善快速老化亚系SAM-prone/8(SAMP8)小鼠的葡萄糖、胆碱和脂类等代谢网络的多个节点的血清代谢产物,2剂复方可以通过调节衰老小鼠的代谢途径,改善机体机能。有研究发现六味地黄丸可以通过柠檬酸循环、天冬氨酸代谢等改善卵巢储备功能下降患者异常的代谢^[9]。利用系统生物学技术分析中医辨证治疗和中医基础理论是对中医现代化的推

进,不仅提高了中医诊断治疗的准确性,也符合国家对中医药继承、发展的战略。本研究通过系统生物学技术研究左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚的潜在代谢物质基础和代谢通路,为中医辨证论治 DOR 提供科学基础。

1 材料

1.1 试剂

甲醇(德国 Merck 公司)色谱纯;乙腈(美国 ThermoFisher Scientific 公司)质谱纯;甲酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)质谱纯;乙酸铵(美国 ThermoFisher Scientific 公司)色谱纯;氨水(美国 ThermoFisher Scientific 公司)色谱纯。

1.2 仪器

移液枪(德国 Eppendorf 公司);Waters ACQUITY UPLC™(美国 Waters 公司);无菌 EP 管(德国 Eppendorf 公司);Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司);Waters Q-TOF-SYNAPT-G2-S 质谱仪(美国 Waters 公司);WH-3 微型涡旋混合仪(上海泸西分析仪器厂);Legend Micro 21R 台式离心机(美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

1.3 软件

MassLynx 4.1(美国 Waters 公司);Progenesis QI 2.3(美国 Waters 公司);SIMCA 14.1(瑞典 Umetrics 公司);Ezinfo 3.0(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 受试者来源与伦理

自 2019 年 12 月 27 日至 2021 年 11 月 26 日通过江苏省中西医结合医院、江苏省中医院、淮安市中医院、苏州中医院、无锡中医院门诊多中心招募所有自愿受试患者。健康组受试者来源于江苏省中西医结合医院体检中心。本研究已于 2019 年 12 月 27 日通过了江苏省中西医结合医院伦理委员会的审查,伦理批号 2019LWKY014,并且于 2019 年 12 月 22 日在中国临床试验注册中心注册,注册号 ChiCTR1900028451。

2.2 研究对象

2.2.1 西医诊断标准 根据《实用妇科内分泌学》、2011 年欧洲人类辅助生殖学会博洛尼亚共识、《卵巢功能检测及其含义解释的专家共识》,以及我国最新专家共识和相关文献制定 DOR 诊断标准^[10-15]:①女性,年龄 21~40 岁;②AFC<5 个;③基础卵泡刺激素(bFSH)10~40 IU·L⁻¹;④基础卵泡刺

激素/基础黄体生成素(bFSH/bLH)>2~3.6;⑤抗缪勒管激素(AMH)<1.1 ng·mL⁻¹。符合①,及②③④⑤中任意 1 条即可。

2.2.2 中医诊断标准 参考《中医妇科学(新世纪第四版)》《中药新药临床研究指导原则》。DOR 肾阴虚:主症为已行经而月经稀发,甚至闭经,闭经前或有月经量少或月经量多、淋漓不尽,或月经先后无定期,色黯有血块,质稀或稠;次症为腰膝酸软、头晕耳鸣、口燥咽干、失眠多梦、骨蒸发热、齿松发脱、潮热盗汗、五心烦热、咽干颧红、舌红少津、脉细数;舌脉为舌红少津、苔薄或光、脉细数。DOR 肾阳虚:主症为已行经而月经稀发,甚至闭经,闭经前或有月经量少或月经量多、淋漓不尽,或月经先后无定期,色黯有血块,质稀或稠;次症为腰膝酸软而痛、头目眩晕、精神萎靡、嗜睡多梦、畏寒肢冷、四肢浮肿、下肢为甚、发齿摇、面色白或黧黑无泽、虚喘气短,小便频数、清长,夜尿多;舌脉为舌淡胖、苔白、脉沉弱而迟。上述主症必备 1 项,次症兼具 2 项及以上,参照舌脉情况,即可诊断。

2.2.3 纳入标准 符合 DOR 的中医和西医诊断标准;患者自愿参加并签署知情同意书。

2.2.4 排除标准 患有恶性肿瘤和血栓形成等严重疾病的患者;患有严重精神障碍的患者;先天性生殖器官发育异常,或后天性器官损伤引起的闭经;需要激素治疗的慢性病患者;孕妇或哺乳期妇女;患者正在服用可能影响月经周期或卵巢功能的药物或针灸,或在近 3 个月内参与了另 1 项可能影响生殖系统的临床试验;患者对体质过敏或对研究药物过敏;饮酒。

2.2.5 剔除标准 未按规定服药(用药依从性低于 80%);自行更换其他治疗方法或者中断治疗;参与者撤回知情同意书。如有以上任意 1 项,则剔除数据。

2.2.6 脱落标准 患者自行退出;失访者(资料收集不全无法评估疗效者)。

2.2.7 终止标准 发生严重不良事件;治疗过程中发生了其他的与本研究无关的严重疾病;由于主、客观原因放弃治疗的患者;受试者对药物表现出过敏反应,如胃痛和腹泻。

2.3 研究方案

2.3.1 分组 根据诊断标准将患者分为 DOR 肾阴虚组 23 例和 DOR 肾阳虚组 25 例,同时纳入健康组

28 人。

2.3.2 治疗方案 DOR 肾阴虚患者给予左归丸加减:龟板胶 10 g,枸杞子 10 g,鹿角胶 10 g(烊化),熟地黄 20 g,菟丝子 15 g,山茱萸 10 g,山药 10 g,川牛膝 10 g。DOR 肾阳虚患者给予右归丸加减:鹿角胶 10 g(烊化),熟地黄 15 g,当归 10 g,附子 6 g,肉桂 5 g,山药 10 g,山茱萸 10 g,菟丝子 10 g,枸杞子 10 g,杜仲 10 g。2 组均为每日 1 剂,早晚温服,连续服用 12 周。

2.3.3 研究周期与观察项目 筛选期 1 周;4 周为 1 个疗程,中药治疗 3 个疗程,共 12 周。患者在中药治疗前、后完成相关项目的测量,见表 1。

表 1 测量项目与数据收集

Table 1 Measurement items and data collection

项目	筛选期	治疗第 4 周	治疗第 8 周	治疗第 12 周
资格筛选	√	-	-	-
纳入、排除标准	√	-	-	-
人口学特征	√	-	-	-
既往病史	√	-	-	-
联合药物治疗	√	√	√	√
性激素	√	-	-	√
AMH	√	-	-	√
中医证型评分	√	-	-	√
Kupperman 评分	√	-	-	√
生命体征	√	√	√	√
实验室检测	√	-	-	√
不良反应	-	√	√	√

注:AMH. 抗缪勒管激素;√. 测量该项目;- 不测量该项目。

2.3.4 不良反应 受试者在临床研究期间,服用中药出现任何不良反应,应仔细观察并询问患者情况,积极对症支持治疗,详细记录不良事件的过程并报告。

2.3.5 安全性 分别检测 DOR 肾阴虚组和 DOR 肾阳虚组治疗前、后受试者的心电图和实验室生化指标(血常规和肝、肾功能),评价中药的安全性。

2.4 样本采集与预处理

2.4.1 采血管 使用一次性负压真空红色管帽采血管采集所有入组受试者静脉血,若样本离心后有溶血现象应重新获取样本,不能用于代谢组学分析。

2.4.2 采样 月经来潮患者于月经周期的第 2~3 天上午 8:00—9:00 空腹检测性激素基础水平;闭经者于评价时间点后 1 周内的任意上午 8:00—9:00

检测。所有受试者采血前 1 天避免剧烈运动或者饮用兴奋类饮品,于第 2 天上午空腹采集肘静脉血 5 mL,室温静置 60 min,无需振摇,4 ℃、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,将分离出的血清分装放入无菌 Eppendorf 管,迅速放入-80 ℃冰箱中保存,用于代谢组学 LC-MS 联合分析,样本应尽量避免反复冻融^[16]。

2.4.3 采取标本时间点 采集健康组、试验组入组前基线期的外周静脉血 5 mL,试验组治疗第 12 周后外周静脉血 5 mL。

2.4.4 血清预处理 所有非靶向代谢组学分析的血清均需预处理,即去蛋白化。从-80 ℃冰箱取出血清样品后,放置 4 ℃冰箱缓慢解冻,待血清融化后进行预处理。吸取 50 μL 血清置于 1.5 mL Eppendorf 管,加入 800 μL 甲醇,置自动涡旋仪剧烈涡旋 1 min 后,4 ℃、15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液置新 1.5 mL Eppendorf 管,4 ℃静置过夜,于相同条件下离心 1 次,取上清液置于新 1.5 mL Eppendorf 管,取上清于进样瓶中上机检测。上述制备的去蛋白化待测样品,将每个样本吸取等量 20 μL 放入新的无菌 Eppendorf 管,混匀,作为血清质量控制(quality control, QC)样本。

2.5 液相色谱与质谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLCTM 对血清代谢物进行色谱分离:Waters ACQUITY HSS T3 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温 40 ℃,流速 0.4 mL·min⁻¹。流动相 A:水+25 mmol·L⁻¹ 乙酸铵+25 mmol·L⁻¹ 氨水;B:乙腈。梯度洗脱:0~7 min, 65% B;7~9 min, 65%~62% B;9~15 min, 62%~60% B。分析过程中样品置于 4 ℃自动进样器。

采用 Waters Q-TOF-SYNAPT-G2-S 质谱仪对代谢物进行一级、二级质谱数据采集。在正离子和负离子采集模式下,MassLynx 4.1 软件基于 MSE 功能,对样品进行一级、二级质谱数据采集。控制参数见表 2。

2.6 数据采集与处理

MassLynx 4.1 软件进行数据采集,Progenesis QI 2.3 软件对数据进行峰识别、峰提取、峰对齐及归一化等处理,得到代谢物名称、组别、峰高组成的三维数据集。使用 SIMCA 14.1 软件和 Ezinfo 3.0 软件对数据进行可视化分析和置换检验。根据 $P<0.05$ 、fold change>2 和 VIP>1,筛选健康组与 DOR 肾阴虚组、健康组与 DOR 肾阳虚组治疗前、后的生物标志

表 2 质谱仪数据采集的控制参数

Table 2 Control parameters of data acquisition of mass spectrometer

控制参数	正离子模式	负离子模式
毛细管电压/V	2 500	2 500
去溶剂温度/℃	450	450
锥孔电压/V	24	25
锥孔气流速/L·h ⁻¹	50	10
扫描速度/s/循环	0.2	0.2
离子源温度/℃	120	100
去溶剂气流速/L·h ⁻¹	800	600
质谱扫描范围(<i>m/z</i>)	50~1 500	50~1 500
进样体积/μL	2	2

物。最后采用在线分析工具 MetaboAnalyst 对差异代谢物进行代谢通路分析。统计分析采用 SPSS Version 19.0 软件, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。电喷雾电离模式分为正离子模式 (POS) 和负离子模式 (NEG), 2 种模式联合可以使检测代谢物更完整、性能更高, 在后续 QC 检测结果描述中 2 种模式分别描述。

2.7 统计分析

研究结果采用 SPSS Version 19.0 进行分析。病例报告表 (CRF) 双人、双次录入。描述性分析用于基线变量, 包括人口统计学特征、病史、病程、治疗史、合并疾病、联合用药、生命体征、安全性评估、不良事件。调整后风险差异的估计值以差异的 95% 置信区间 (CI) 表示。正态分布检验用 Shapiro-Wilk 检验方式。每组治疗前、后结果差异的计量资料用 Wilcoxon (秩和检验) 非参数配对检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。统计描述均用中位数 (median, M) [下四分位数 (P25), 上四分位数 (P75)] 表示, 表中描述统一简写为 M (P25, P75)。

表 4 患者治疗前、后血清性激素 bFSH、bLH、bE₂、AMH 的比较

Table 4 Comparison of serum sex hormones of bFSH, bLH, bE₂, and AMH before and after treatment of patients M (P25, P75)

组别	样本量/例	时间	bFSH/IU·L ⁻¹	bLH/IU·L ⁻¹	bE ₂ /pmol·L ⁻¹	AMH/ng·mL ⁻¹
DOR 肾阴虚	23	治疗前	11.53 (10.41, 15.43)	5.78 (3.59, 10.43)	131.35 (106.37, 176.50)	0.16 (0.04, 0.28)
		治疗后	8.71 (7.99, 11.55) ¹⁾	4.03 (3.79, 6.41) ¹⁾	148.48 (87.94, 180.85)	0.09 (0.01, 1.01)
DOR 肾阳虚	25	治疗前	13.50 (11.15, 18.64)	6.18 (3.62, 11.22)	154.00 (77.29, 229.69)	0.21 (0.05, 0.99)
		治疗后	8.89 (6.97, 13.75) ¹⁾	4.02 (2.95, 7.27) ¹⁾	150.47 (74.25, 215.55)	0.56 (0.14, 1.29)

注: 与本组治疗前比较¹⁾ $P<0.05$ (表 5 同)。

3 结果

3.1 基线情况

3.1.1 一般信息 按纳入和排除标准筛选后, 共招募符合标准的 28 名健康人和 52 例患者入组。其中 DOR 肾阴虚组 26 例, 因不能耐受中药脱落 1 例, 试验期间怀孕 2 例; DOR 肾阳虚组 26 例, 试验期间怀孕 1 例。最终, DOR 肾阴虚组有效完成 23 例, DOR 肾阳虚有效完成 25 例, 见表 3。

表 3 受试者收集情况

Table 3 Case collection of examinee 例

组别	纳入	脱落	怀孕	完成
DOR 肾阴虚	26	1	2	23
DOR 肾阳虚	26	0	1	25
健康	28	0	0	28

注: DOR. 卵巢储备功能减退 (表 4、5 同)。

3.1.2 年龄 健康组 28 例, 年龄 [M (P25, P75)] 为 34 (31, 36) 岁; DOR 肾阴虚组 23 例, 年龄 [M (P25, P75)] 为 36 (30, 38) 岁; DOR 肾阳虚组 25 例, 年龄 [M (P25, P75)] 为 33 (31, 38) 岁, 总样本量 76 例。

3.2 左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚临床疗效

3.2.1 血清性激素 bFSH、bLH、基础雌二醇 (bE₂)、AMH 比较 患者治疗前、后对照研究发现, DOR 肾阴虚组、DOR 肾阳虚组患者服用左归丸、右归丸 12 周后血清 bFSH 与 bLH 水平均较治疗前降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 但血清 bE₂ 与 AMH 水平均较治疗前差异无统计学意义。结果表明, 左归丸、右归丸可明显改善 DOR 肾阴虚、DOR 肾阳虚患者血清 bFSH、bLH 水平, 虽然 bE₂、AMH 水平差异无统计学意义, 但 DOR 肾阴虚 bE₂ 和 DOR 肾阳虚 AMH 有改善趋势, 见表 4。

3.2.2 中医证型评分和 Kupperman 评分比较 患者治疗前、后对照研究发现,DOR 肾阴虚、DOR 肾阳虚患者服用左归丸、右归丸 12 周后 Kupperman 评分和中医证型评分较治疗前均有显著下降,差异具有

统计学意义($P<0.05$)。结果表明,左归丸、右归丸可以明显改善 DOR 肾阴虚、DOR 肾阳虚患者 Kupperman 评分和中医证型评分,提高患者的生活质量,见表 5。

表 5 患者治疗前、后中医证型评分和 Kupperman 评分的比较

Table 5 Comparison of traditional Chinese medicine syndrome type score and Kupperman score before and after treatment of patients
M (P25,P75)

组别	样本量/例	时间	中医证型评分/分	Kupperman 评分/分
DOR 肾阴虚	23	治疗前	16.00(11.00,22.00)	4.00(3.00,8.00)
		治疗后	5.00(2.00,10.00) ¹⁾	2.00(0,3.00) ¹⁾
DOR 肾阳虚	25	治疗前	15.00(8.00,20.50)	5.00(2.00,8.00)
		治疗后	5.00(2.00,7.50) ¹⁾	2.00(0.50,4.00) ¹⁾

3.2.3 不良反应与安全性评价 DOR 肾阴虚患者服用左归丸、DOR 肾阳虚患者服用右归丸期间未发生恶心、呕吐、腹泻、皮疹等不良反应,并且分别检测了受试者治疗前和治疗后的心电图、血常规、肝功能、肾功能,进行安全性评价,所有受试者均未发现异常。

3.3 检测方法过程质控

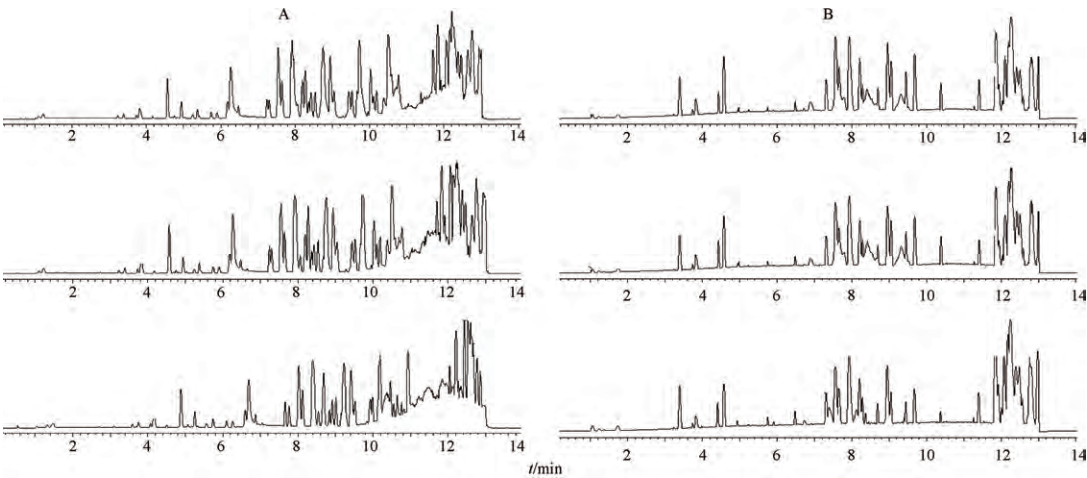
样本上机检测的过程中由于样本量多,检测时间较长,为了及时发现和解决问题,故需要实时监测仪器的稳定性以保证数据质量的可靠性。本研究在正、负离子模式下对 QC 样品进行重复分析,以确证仪器的稳定性和准确性。结果在正离子和负离子模式下的 QC 样品色谱峰信号响应强度和保留时间都高度重叠,说明仪器在检测血清样本的过程中,数据

的采集稳定性非常好,见图 1。

3.4 代谢组学数据模式识别判别分析

3.4.1 主成分分析(PCA) 通常得到的代谢组学原始数据是一种多元的数据集,PCA 采用正交变换的统计方法,通过对原对象进行“投影”,在无监督的多元变量模式下,将上述获得的原始数据相关变量转换为 PCA 模型,这种模型反映了数据的原始状态,有利于区分组间差异,从而从整体的概况了解代谢数据的分布^[17]。

正离子模式下,健康组和 DOR 肾阴虚组治疗前、后,健康组和 DOR 肾阳虚组治疗前、后样本数据 PCA 得分散点二维图见图 2。结果表明,所有的样本基本处于 95%CI 内。健康组与 DOR 肾阴虚组患者治疗前、后样本数据的聚类趋势比较明显。健



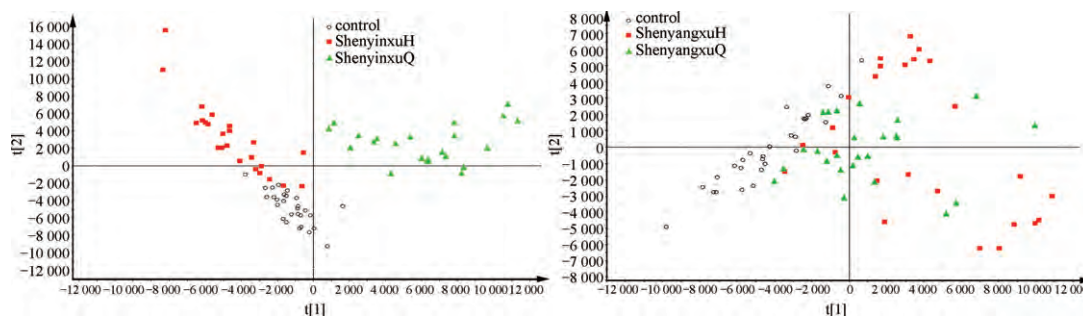
A. 正离子模式;B. 负离子模式。

图 1 人血清 QC 检测 LC-MS EIC 图($n=3$)

Fig. 1 LC-MS EIC of the QC detection of human serum ($n=3$)

康组与 DOR 肾阳虚组治疗前聚类趋势明显, 治疗后样本数据趋向于健康组, 个别样本趋向不明显, 可能

由于存在地域、饮食等因素的影响, 后期会进一步研究相关原因。



control. 健康组; ShenyinxuH. DOR 肾阴虚组治疗后; ShenyinxuQ. DOR 肾阴虚组治疗前; ShenyangxuH. DOR 肾阳虚组治疗后; ShenyangxuQ. DOR 肾阳虚组治疗前 (图 3 同)。

图 2 各组治疗前、后 PCA 散点图

Fig. 2 PCA scatter plots of each group before and after treatment

3.4.2 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 与置换检验 进一步采用有监督多元变量模式 OPLS-DA 对各组进行分析, 建立数学模型, 发掘左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚的潜在生物差异标志物, 并对上述数学模型进行验证, 保证数据可靠性。首先筛选出健康组与 DOR 肾阴虚组治疗前、健康组与 DOR 肾阳虚组治疗前的差异标志物, 进而筛选出 DOR 肾阴虚组经左归丸治疗前后、DOR 肾阳虚组经右归丸治疗前后的差异代谢物, 发掘出经治疗

后中浓度变化趋于健康组的代谢物作为左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者、右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者的潜在生物标志物, 见图 3。分别对上述数学模型进行 200 次置换检验, 见图 4。置换检验对评估模型的统计显著性同样非常重要。 R^2Y 表示模型的解释率, Q^2 表示模型的预测能力。 Q^2 回归线在 Y 轴的截距小于 0, 表明是可靠的监督模型。如果 200 次置换检验结果 R^2Y 与 Q^2 间的差值小于 0.3, 且 Q^2 大于 0.9, 说明模型拟合程度和预测能力非常优秀。

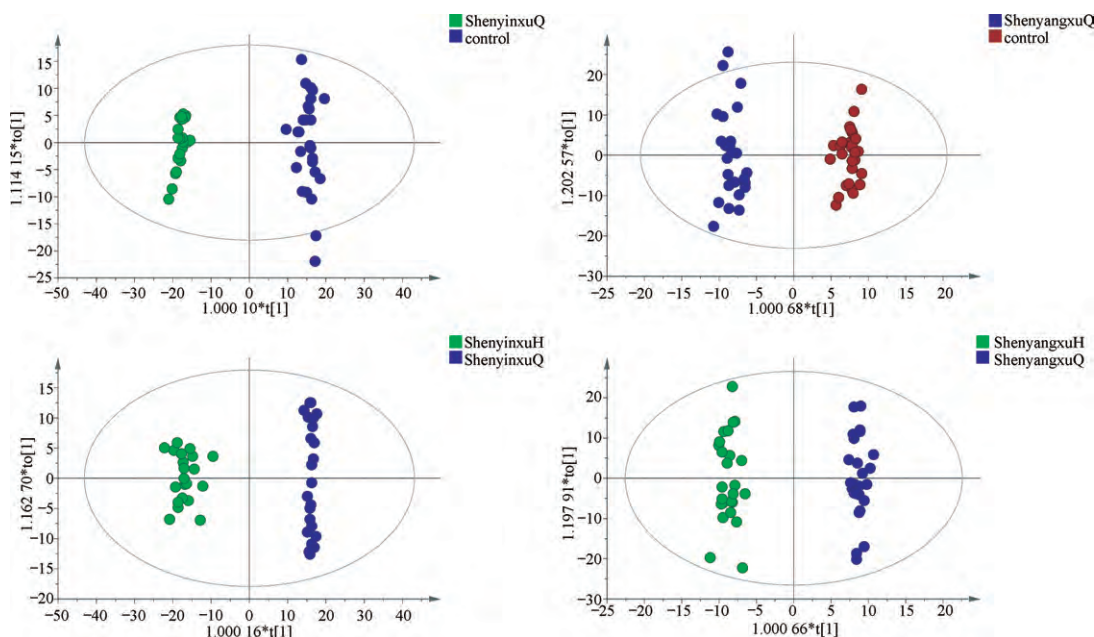
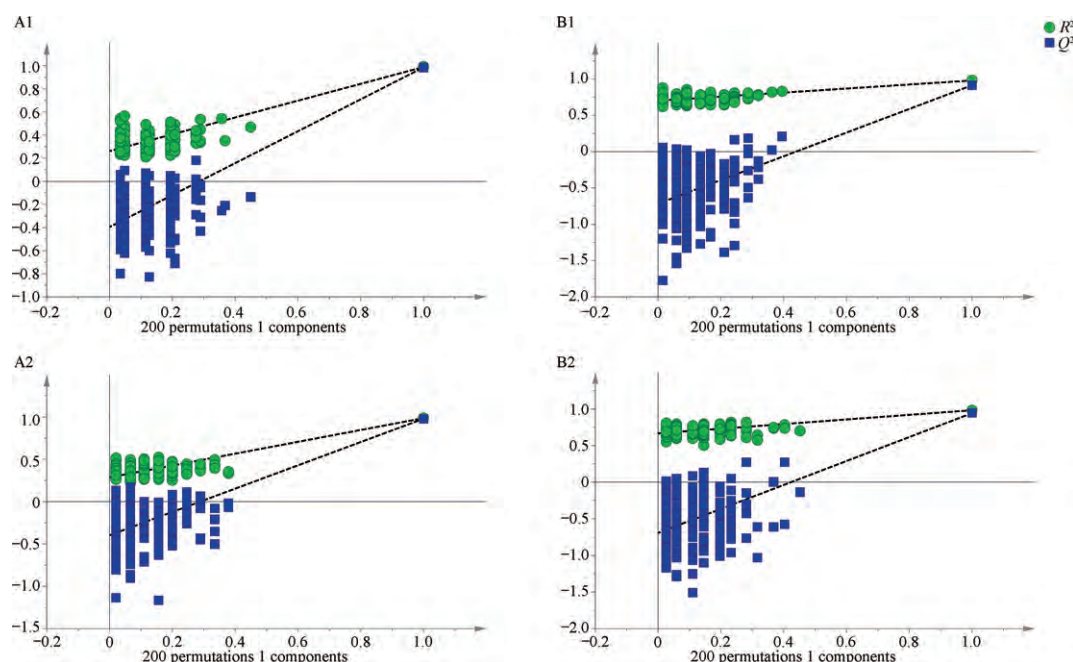


图 3 OPLS-DA 模型散点图

Fig. 3 Scatter plot of OPLS-DA model



A1. 健康组与DOR肾阴虚组治疗前;B1. 健康组与DOR肾阳虚组治疗前;A2. DOR肾阴虚组治疗前、后;B2. DOR肾阳虚组治疗前、后。

图4 置换检验

Fig. 4 Permutation test

3.5 差异代谢物的筛选与鉴定

基于 OPLS-DA 模型 $VIP > 1$ 的筛选条件和基于 t -test 的 $P < 0.05$, 在 Progenesis QI 2.3 软件以 $\text{fold change} > 2$ 进行再次筛选, 得到各组间差异化合物。将以上差异代谢物准确的质荷比匹配在线数据库进行初步鉴定, 然后对差异代谢物的真实二级图谱信息进行数据库匹配用于化合物鉴定和结构表征。通过对筛选出的差异代谢物进行定性, 左归丸回调 DOR 肾阴虚患者的相关代谢物共定性出正离子模式 19 种和负离子模式 7 种差异代谢物, 见表 6。右归丸回调 DOR 肾阳虚患者的相关代谢物共定性出正离子模式 14 种和负离子模式 8 种差异代谢物, 见表 7。

3.6 差异代谢物在各组受试者中的相对含量

以热图形式, 对左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者的 26 种差异代谢物、右归丸治疗肾阳虚患者的 22 种差异代谢物的相对含量进行了可视化展示, 见图 5, 纵坐标为每个样本及对应的组别和编号, 横坐标表示差异代谢物名称, 不同的颜色反映每个患者血清中代谢物的相对含量, 红色代表上调, 蓝色代表下调。结果表明, 健康组、DOR 肾阴虚组治疗前后组内颜色较相近, 而组间颜色差别很大, 说明左归丸明

显影响了 DOR 肾阴虚患者的代谢; 健康组、DOR 肾阳虚组治疗前后组内的颜色较相近, 而组间颜色差别很大, 说明右归丸明显影响了 DOR 肾阳虚患者的代谢。

3.7 代谢通路分析

根据上述差异代谢物, 分析出左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者通过 12 条代谢通路, 分别是硫胺素代谢, 泛酸和 CoA 生物合成, 脂肪酸降解, 柠檬酸循环 (TCA 循环), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 丙酮酸代谢, 丙酸代谢, 糖酵解/糖异生, 脂肪酸伸长率, 色氨酸代谢, 不饱和脂肪酸的生物合成, 类固醇激素生物合成。右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者通过 11 条代谢通路, 分别是硫胺素代谢, 柠檬酸循环 (TCA 循环), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 丙酮酸代谢, 丙酸代谢, 糖酵解/糖异生, 不饱和脂肪酸的生物合成, 鞘脂代谢, 生物素代谢, 赖氨酸降解, 氨酰-tRNA 生物合成。其中纵坐标表示富集通路的 P , 横坐标表示通路的影响值, 见图 6。

4 讨论

本研究基于 LC-MS 非靶向代谢组学技术, 从血清代谢物变化角度, 初步探讨了左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚的物质基础。建立了

表 6 左归丸回调 DOR 肾阴虚患者的相关代谢物

Table 6 Related metabolites of Zuogui Pills in the treatment of DOR of kidney-Yin deficiency

No.	代谢物名称	t_R/min	m/z	FC	VIP	分子式	离子模式
1	3-hydroxytetradecanedioic acid	6. 47	313. 139 7	2. 14	4. 47	$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_5$	正离子
2	L-carnitine	0. 47	162. 112 8	4 806. 16	1. 96	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$	正离子
3	CE[18;2(9Z,12Z)]	12. 89	687. 547 3	53. 62	3. 31	$\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_2$	正离子
4	tetrahydrocortisone	12. 97	347. 221 0	4. 02	1. 28	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$	正离子
5	Cer(d18;1/23;0)	13. 00	658. 606 8	2 965. 55	1. 45	$\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_3$	正离子
6	thiamine pyrophosphate	12. 73	873. 081 9	2. 45	1. 74	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}_2\text{S}^+$	正离子
7	bisnorcholic acid	12. 93	761. 515 5	3. 02	1. 41	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5$	正离子
8	coenzyme A	12. 99	750. 110 2	7. 53	3. 31	$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}$	正离子
9	alpha-tocopherol	12. 69	453. 367 1	3. 78	1. 68	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$	正离子
10	oleamide	8. 73	304. 261 0	2. 55	7. 41	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}$	正离子
11	hexanoyl-CoA	10. 97	866. 194 2	7. 67	1. 32	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$	正离子
12	acetyl tributyl citrate	6. 98	425. 214 8	10. 05	6. 73	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_8$	正离子
13	doristerol	12. 65	369. 351 4	2. 20	7. 42	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	正离子
14	4alpha-carboxy-4beta-methyl-5alpha-cholesta-8-en-3beta-ol	12. 84	445. 364 1	13. 04	1. 18	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$	正离子
15	CerP(d18;0/16;0)	10. 76	1 239. 996 9	15. 02	2. 89	$\text{C}_{34}\text{H}_{70}\text{NO}_6\text{P}$	正离子
16	LysoPE[18;1(9Z)/0;0]	11. 66	462. 295 3	3. 60	1. 55	$\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{NO}_7\text{P}$	正离子
17	11-beta-hydroxyandrosterone-3-glucuronide	12. 76	465. 250 0	5. 41	2. 62	$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_9$	正离子
18	PI[18;2(9Z,12Z)/18;0]	12. 96	863. 566 4	2. 08	3. 77	$\text{C}_{45}\text{H}_{83}\text{O}_{13}\text{P}$	正离子
19	heptadecanoyl carnitine	12. 89	849. 690 2	54. 77	2. 90	$\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_4$	正离子
20	gamma-glutamyl-beta-cyanoalanine	8. 21	531. 177 3	2. 49	1. 15	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	负离子
21	coenzyme Q10	9. 04	883. 677 8	2. 03	6. 33	$\text{C}_{59}\text{H}_{90}\text{O}_4$	负离子
22	stearic acid	10. 39	283. 262 1	2. 02	1. 32	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	负离子
23	cholesterol sulfate	10. 44	465. 303 8	2. 81	1. 15	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{S}$	负离子
24	3-hydroxymugineic acid	3. 82	717. 229 4	3. 28	1. 22	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9$	负离子
25	cholic acid glucuronide	6. 15	583. 308 6	2. 15	1. 57	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_{11}$	负离子
26	megestrol	6. 68	701. 410 4	2. 43	1. 22	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$	负离子

注:FC. fold change(表 7 同); $P=0$ 。

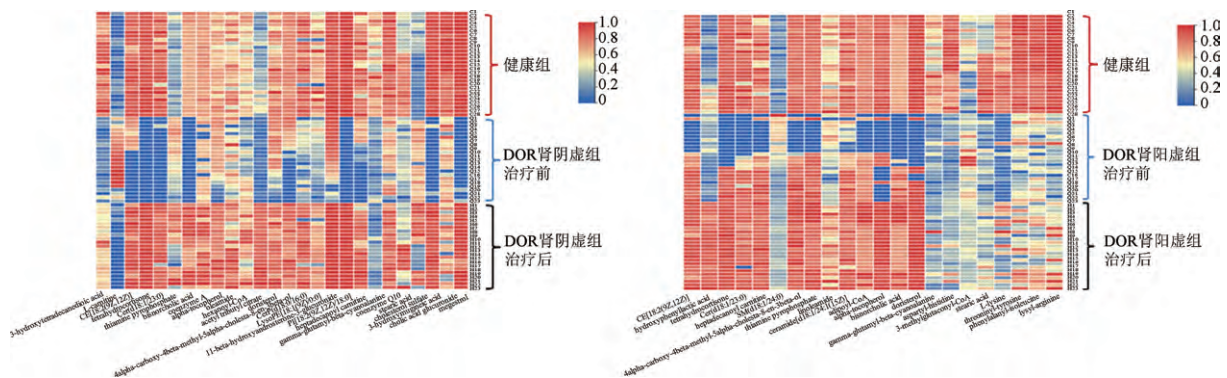
表 7 右归丸回调 DOR 肾阳虚患者的相关代谢物

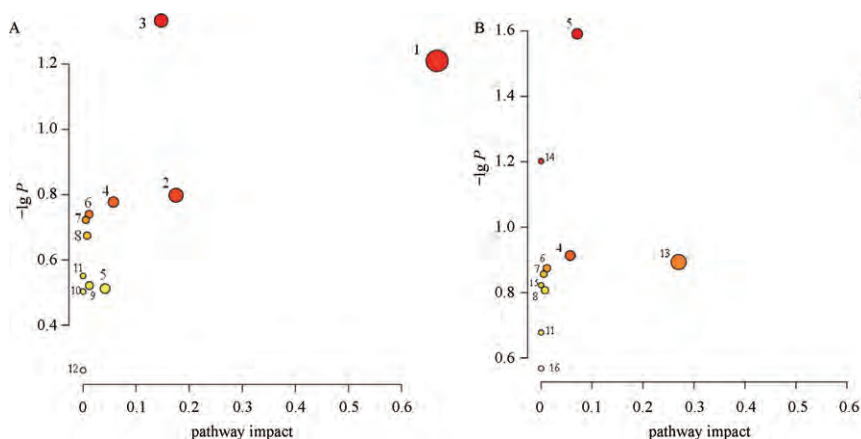
Table 7 Related metabolites of Yougui Pills in the treatment of DOR of kidney-Yang deficiency

No.	代谢物名称	t_R/min	m/z	P	FC	VIP	分子式	离子模式
1	CE[18;2(9Z,12Z)]	12. 89	687. 547 4	0	2. 01	3. 61	$\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_2$	正离子
2	hydroxyphenyllactic acid	2. 30	365. 119 9	0	5. 08	1. 21	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	正离子
3	tetrahydrocortisone	12. 97	347. 221 0	0	2. 26	1. 01	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5$	正离子
4	Cer(d18;1/23;0)	13. 00	658. 606 9	0	2. 53	1. 41	$\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{NO}_3$	正离子
5	heptadecanoyl carnitine	12. 89	849. 690 3	0	2. 08	1. 79	$\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_4$	正离子
6	SM(d18;1/24;0)	9. 72	816. 701 7	0	3. 42	1. 16	$\text{C}_{47}\text{H}_{96}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$	正离子
7	4alpha-carboxy-4beta-methyl-5alpha-cholesta-8-en-3beta-ol	12. 85	445. 364 1	0	2. 46	2. 14	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$	正离子
8	thiamine pyrophosphate	12. 73	873. 081 9	0	2. 74	1. 37	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}_2\text{S}^+$	正离子

续表7

No.	代谢物名称	t_R/min	m/z	P	FC	VIP	分子式	离子模式
9	linoleamide	8.07	302.245 5	0	2.80	2.01	$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}$	正离子
10	ceramide[d18:1/24:1(15Z)]	12.12	630.618 0	0	2.50	1.36	$\text{C}_{42}\text{H}_{81}\text{NO}_3$	正离子
11	adipoyl-CoA	12.58	934.124 8	0	2.16	1.45	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}$	正离子
12	alpha-tocopherol	12.69	453.367 1	0	2.01	1.82	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$	正离子
13	bisnorcholeic acid	12.93	761.515 5	0	2.47	3.86	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5$	正离子
14	doristerol	12.65	369.351 5	0	2.65	7.46	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	正离子
15	gamma-glutamyl-beta-cyanoalanine	8.21	531.177 4	0.04	2.35	1.66	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	负离子
16	aspartyl-histidine	3.97	291.080 6	0.03	2.18	1.05	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$	负离子
17	3-methylglutaconyl-CoA	10.97	874.137 8	0	11.20	1.35	$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}$	负离子
18	stearic acid	10.39	283.262 2	0	2.25	3.80	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	负离子
19	L-lysine	8.36	339.225 3	0	3.02	1.01	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$	负离子
20	threoninyl-tyrosine	5.41	609.244 7	0.03	2.29	1.39	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$	负离子
21	phenylalanyl-isoleucine	5.75	601.321 0	0	2.01	1.66	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$	负离子
22	lysyl-arginine	5.23	301.199 8	0	2.17	3.21	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$	负离子





A. 左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者; B. 右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者; 1. 硫胺素代谢; 2. 泛酸和 CoA 生物合成; 3. 脂肪酸降解; 4. 柠檬酸循环 (TCA 循环); 5. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解; 6. 丙酮酸代谢; 7. 丙酸代谢; 8. 糖酵解/糖异生; 9. 脂肪酸伸长率; 10. 色氨酸代谢; 11. 不饱和脂肪酸的生物合成; 12. 类固醇激素生物合成; 13. 鞘脂代谢; 14. 生物素代谢; 15. 赖氨酸降解; 16. 氨酰-tRNA 生物合成。

图 6 代谢物通路分析

Fig. 6 Analysis of metabolite pathway

的质量以及生殖发育潜能的生物标志物。带有乙酰基的辅酶 A 分子称为乙酰辅酶 A, 由泛酸和半胱氨酸分 5 步合成, 在脂肪酸的合成、氧化, 以及柠檬酸循环中丙酮酸氧化发挥作用, 有助于将脂肪酸从细胞质转移到线粒体。DOR 患者服用左归丸后通过上调乙酰辅酶 A 和辅酶 A, 促进脂肪酸 β -氧化为卵母细胞的生长、发育和成熟提供更多的能量。

左旋肉碱 (L-carnitine) 能够促进脂肪酸穿过线粒体膜进行氧化供能, 其介导的脂肪酸 β -氧化在卵母细胞和胚胎的能量供应中发挥作用, 故肉碱的代谢紊乱也是造成卵巢功能异常减退的重要原因^[19]。羊海涛^[20]通过体外受精-胚胎移植患者卵泡液中的颗粒细胞线粒体活性和血液中的左旋肉碱水平, 结果显示患者血液中左旋肉碱水平会随颗粒细胞线粒体活性的下降而升高。这种改变与女性的年龄和血液中的左旋肉碱呈正相关, 且具有统计学意义^[21-22]。本研究中 DOR 肾阴虚患者年龄中位数 36 岁, 最小年龄 30 岁, 最大年龄 38 岁, 患者血清中左旋肉碱的合成可能受某种机制的调节, 由于年龄或者其他各种病因导致 DOR, 机体和卵泡中的线粒体活性下降时, 可能通过反馈性增加左旋肉碱的合成来满足卵母细胞的生长和发育成熟的需要, 然而机体组织并不能有效利用增加的左旋肉碱, 左归丸可能通过促进机体卵巢组织对左旋肉碱的利用率, 使血液中的左旋肉碱含量下降, 促进脂肪酸的 β -氧化产生大量 ATP, 给予卵母细胞的生长和发育成熟提

供足够的能量, 左旋肉碱的代谢在卵母细胞的发育能力和卵巢功能中发挥重要作用^[23]。其结果与文献研究一致。

辅酶 Q_{10} 是一种脂溶性辅酶, 广泛分布于动物和人类中, 是机体内强抗氧化剂, 主要通过抑制 DNA 氧化和脂肪的过氧化起保护作用, 而且在 ATP 的产生和有氧呼吸中线粒体电子传递同样表现得至关重要。有研究发现辅酶 Q_{10} 水平与性腺功能和生育能力呈正相关, 随着年龄的增长, 辅酶 Q_{10} 水平的降低也同时发生, 说明辅酶 Q_{10} 表达的增高或者降低对卵巢储备功能非常重要。多个学者通过给予育龄期女性补充辅酶 Q_{10} 发现, 其可以通过提高卵巢抗氧化能力和改善线粒体功能, 提高卵巢反应性、卵巢储备功能以及胚胎卵裂和胚泡形成的速率^[24-25]。本研究中辅酶 Q_{10} 上升趋势与上述文献结果一致。6-羟基褪黑激素参与色氨酸的代谢, 色氨酸在机体免疫系统、神经递质的合成以及神经保护方面有重要作用, 同时还具有抗氧化能力, 可能通过抗氧化改善卵巢储备功能。 α -生育酚 (alpha-toco-pherol)、硫胺素焦磷酸盐 (thiamine pyrophosphate) 均可以通过抗氧化改善卵巢功能。上述结果也证实了中医整体观的哲学思想, 左归丸能促进 DOR 肾阴虚患者的脂肪酸 β -氧化, 产生大量 ATP 以满足卵泡细胞生长、发育和成熟的需要, 但脂肪酸 β -氧化的同时会产生过氧化的代谢产物, 过量的活性氧会导致氧化应激, 激活卵泡细胞凋亡路径, 导致卵泡闭锁。左归丸在

上调脂肪酸 β -氧化的同时上调大量的抗氧化剂相关代谢物。综上,左归丸在促进卵泡生长发育的同时也有抗氧化应激的作用,从代谢角度阐释了左归丸治疗DOR肾阴虚的机制,也体现了中医整体观和阴阳平衡理论的思想。梁琦等^[26]利用代谢组学研究左归丸对高糖负荷小鼠胚胎的影响,结果发现左归丸通过提高糖的有氧氧化改善胚胎质量,与本研究结果一致。

4.2 右归丸回调DOR肾阳虚代谢物质变化

女性卵泡的激活、成熟及正常功能的维持都需要氨基酸代谢的参与,所以氨基酸的代谢紊乱会引起女性卵泡的生长和发育成熟受到影响,进而导致DOR。氨基酸代谢可能主要通过颗粒细胞自噬和凋亡信号,改变卵巢氧化应激水平调控卵巢功能。有学者发现,如果增加氨基酸摄入量可以明显促进卵泡的生长、成熟及正常功能,延缓卵巢功能的减退^[27]。L-赖氨酸(L-lysine)在体内参与蛋白质、糖和脂肪的代谢,是某些多肽激素蛋白质合成的重要物质,并参与葡萄糖和酮体的代谢。同时也是肉毒碱的前体,肉毒碱在脂肪代谢中至关重要,可以介导长链脂肪酸通过线粒体膜参与ATP的生成。有学者研究发现,兔子的日常饲料中加入适量赖氨酸,可以提高兔子繁殖能力,并调节性激素水平,其机制可能是赖氨酸调节生殖相关基因表达增加^[28]。赖氨酰精氨酸(lysyl-arginine)是由赖氨酸和精氨酸组成的二肽,是蛋白质消化或蛋白质分解代谢的不完全分解产物。二肽含有通过肽键连接的恰好2个 α -氨基酸序列的有机化合物,是进一步蛋白水解的短暂中间体。WANG B等^[29]发现精氨酸的含量下降,生殖细胞的生长会受到抑制,精氨酸可以通过预防脂肪酸过氧化和蛋白质氧化对生殖系统造成损伤。右归丸回调DOR肾阳虚患者上述氨基酸代谢,可能通过影响生殖基因的表达、脂肪酸代谢,以及预防过氧化等多方面、多角度帮助卵泡的生长、发育成熟、卵巢功能恢复正常。

己二酰辅酶A(adipoyl-CoA)作为二羧酸的降解 β -氧化产物(辅酶A酯)形成,二羧酸通过内质网中脂肪酸的氧化形成。尽管线粒体被认为是脂肪酸用于能量利用的 β -氧化的主要位点,但过氧化物酶体在多种脂质的代谢中仍起关键作用。反式-3-甲基谷氨酰辅酶A是一类酰基辅酶的有机化合物,含有与酰基链相连的辅酶A亚结构的有机化合物。

十七酰肉碱(heptadecanoyl carnitine)脂肪酸 β -氧化途径是进化上保守的过程,最初带有长链酰基辅酶A的活性脂肪酸通过肉碱棕榈酰转移酶1向线粒体外膜运输,长链酰基辅酶A转化为肉碱。然后线粒体内膜中的肉碱棕榈酰转移酶2将肉碱转化回长链酰基辅酶A,并将脂肪酸运输到线粒体基质中。右归丸通过上调DOR肾阳虚患者氧化供能相关代谢物,改善卵巢功能。

硫胺素焦磷酸盐(thiamine pyrophosphate)是硫胺素的活性形式,在生物体内主要以辅酶的形式参与氨基酸、核酸前体的戊糖以及细胞成分的合成代谢。硫胺素又称维生素B₁,不仅对机体内正常糖代谢至关重要,在氧化平衡方面也起重要作用,如脂肪酸过氧化产物水平和抗氧化物活性之间调节平衡。硫胺素减少会使机体的抗氧化能力下降,并且影响正常糖代谢^[30]。PATRIE A等^[31]研究表明,硫胺素缺乏引起鱼的生殖失调。羟基苯乳酸(hydroxyphenyllactic acid)是一种酪氨酸代谢物,可降低线粒体和中性粒细胞中活性氧(ROS)的产生,因此可作为天然抗氧化剂发挥作用。 α -生育酚是一种强大的生物抗氧化剂,是人体内最活跃的维生素E形式,维生素E通过抗氧化提高女性生育能力。BAHADORI M H等^[32]研究卵泡液维生素E、血清维生素E与卵母细胞形态和胚胎质量之间的关系,结果发现血清维生素E水平较高的女性,高质量的成熟卵母细胞更容易获得,且胚胎质量更高。本研究中右归丸通过上调DOR肾阳虚患者硫胺素焦磷酸盐、羟基苯乳酸和 α -生育酚抗氧化代谢物,增强机体和组织抗氧化能力,进一步改善卵巢储备功能,研究结果与文献一致。

4.3 左归丸治疗DOR肾阴虚、右归丸治疗DOR肾阳虚临床疗效分析

基于药物真实世界干预性研究设计,检测bFSH、bE₂、bLH、AMH以评价卵巢激素内分泌功能,评估卵巢储备功能。bFSH是DOR的诊断标准之一,对卵巢储备功能的评价是目前医学最为敏感和早期的标志物,临床应用广泛。在月经周期不规则之前,卵泡早期bFSH已经开始上升。bFSH持续上升意味着卵巢储备功能下降^[33]。邵明君等^[34]研究发现DOR患者卵巢颗粒加快凋亡,抑制素B合成减少抑制了卵泡刺激素(FSH)合成,最终导致血清FSH升高;并利用Logistic回归分析,发现辅助生殖

妊娠与 bFSH 呈线性相关,血清 bFSH $>10\text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$ 即可诊断 DOR。本研究结果发现,左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者、右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者后,2 组患者 bFSH、bLH 均明显低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。2 组患者治疗前后 AMH、bE₂ 变化虽然没有统计学意义,但 DOR 肾阴虚 bE₂ 和 DOR 肾阳虚 AMH 有明显的改善趋势。由于 DOR 患者发病最初升高的是垂体激素 bFSH、bLH,但 AMH、bE₂ 并无明显变化,故推测 DOR 患者经左归丸和右归丸治疗后最先改善的也是垂体激素 bFSH、bLH,可能更长时间中药治疗,AMH、bE₂ 也会发生改善。上述结果说明左归丸、右归丸辨证治疗 DOR 患者,可明显改善卵巢功能,与文献结果一致,值得临床推广。

中医证型评分量表包括反应 DOR 肾阴虚相关症状的 12 个条目和 DOR 肾阳虚相关症状的 14 个条目,通过中医整体观论治思维反映 DOR 患者的治疗效果。结果表明,与 DOR 肾阴虚患者、DOR 肾阳虚患者治疗前相比,经左归丸、右归丸治疗后中医证型评分均明显降低,差异具有统计学意义。说明左归丸和右归丸在中医证候改善方面疗效显著。肾阴虚的腰背酸软、头晕耳鸣、失眠多梦等;肾阳虚腰背酸痛、头目眩晕、精神萎靡等正是肾虚天癸竭的相关症状,本研究中左归丸和右归丸可谓对证而治,符合天癸理论的基本内涵。

Kupperman 评分量表是对更年期女性出现更年期症状严重程度的测评,学者认为更年期女性因生殖内分泌轴发生改变,尤其是雌激素降低而引发一系列神经功能紊乱,如潮热出汗、感觉异常、眩晕等。陈文俊等^[35]研究发现中医“心-肾-子宫轴”调控月经周期性节律的变化和生殖周期性节律,与西医“下丘脑-垂体-性腺轴”类似,生物机体是一个整体,通过神经、内分泌和免疫调节共同维持人体稳态,各个系统之间也是相互影响,所以当机体的生殖内分泌开始变化,神经功能也必然会出现异常,如潮热盗汗、感觉异常等。本研究发现,DOR 肾阴虚和肾阳虚患者经左归丸和右归丸治疗 12 周后,Kupperman 评分均明显低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$),说明左归丸和右归丸改善 DOR 肾阴虚和肾阳虚患者潮热盗汗、失眠、焦躁等更年期相关症状有良好疗效。

5 小结

利用代谢组学对左归丸治疗 DOR 肾阴虚患者、右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者进行了代谢物质变化

的研究。结果左归丸回调左旋肉碱、乙酰辅酶 A、辅酶 A、辅酶 Q10、 α -生育酚、硫胺素焦磷酸盐等代谢物含量,通过影响 DOR 肾阴虚患者类固醇激素生物合成、色氨酸代谢、脂肪酸降解、不饱和脂肪酸的生物合成、硫胺素代谢对 DOR 肾阴虚患者起到积极治疗作用。右归丸回调 L-赖氨酸、赖氨酰精氨酸、硫胺素焦磷酸盐、 α -生育酚等代谢物的含量,通过影响缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、不饱和脂肪酸的生物合成、赖氨酸降解、丙酸代谢、糖酵解/糖异生、硫胺素代谢对 DOR 肾阳虚患者起到积极治疗作用。左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚患者后,2 组患者 bFSH、bLH、中医证型评分、Kupperman 评分均明显低于治疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。从上述结果可以看出,左归丸和右归丸辨证治疗 DOR 患者的潜在生物标志物,并且治疗后 DOR 患者生化指标的改善和临床症状、社会心理功能,以及焦虑情绪明显缓解,佐证了左归丸和右归丸辨证治疗 DOR 患者存在物质基础。

上述结果也证实了中医整体观的哲学思想,左归丸上调 DOR 肾阴虚患者的脂肪酸 β -氧化相关代谢物,通给卵母细胞提供大量的 ATP,但脂肪酸 β -氧化的同时会产生大量过氧化的代谢产物,导致氧化应激,激活卵泡细胞凋亡路径,导致卵泡闭锁。因此,左归丸在通过增加氧化供能促进卵泡生长发育的同时,也增强了抗氧化应激的作用,从代谢角度阐释了左归丸治疗 DOR 肾阴虚的物质基础,体现了中医整体观和阴阳平衡理论。右归丸回调 DOR 肾阳虚患者氨基酸代谢,可能通过影响生殖基因的表达、脂肪酸代谢以及预防过氧化等,多角度帮助患者卵泡的生长、发育成熟以及卵巢功能恢复正常。同时上调 DOR 肾阳虚患者硫胺素焦磷酸盐、羟苯乳酸和 α -生育酚抗氧化代谢物,增强机体和组织抗氧化能力,进一步改善卵巢储备功能,该研究结果表明上述代谢差异标志物可能是影响左归丸和右归丸辨证治疗 DOR 疾病发展的重要物质基础,为今后探究左归丸和右归丸辨证治疗 DOR 奠定了一定的基础。本研究初步发现左归丸治疗 DOR 肾阴虚、右归丸治疗 DOR 肾阳虚的潜在血清代谢标志物和作用机制,后续需对鉴定出的血清潜在代谢标志物及作用机制进一步验证。

[参考文献]

[1] PENZIAS A, AZZIZ R, BENDIKSON K, et al. Testing and

- interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020, 114(6):1151.
- [2] 邓丽敏. 加味左归丸治疗肾阴虚证早发性卵巢功能不全的临床观察[D]. 南宁:广西中医药大学, 2021.
- [3] 于莎, 李江慧, 匡延, 等. 左归丸加减对卵巢储备功能降低肾阴虚证不孕患者体外受精-胚胎移植治疗的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(9):29.
- [4] 唐立明, 段恒, 肖彩仙, 等. 左归丸对大鼠卵巢血管生成与胎盘生长因子、肝细胞生长因子及其受体关系的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(5):582.
- [5] 张艳军. 右归丸治疗不孕症患者卵巢储备功能下降分析[J]. 光明中医, 2019, 34(3):342.
- [6] 刘晶晶, 马艳华. 右归丸汤剂治疗不孕症患者卵巢储备功能下降临床观察[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(11):115.
- [7] 魏小晶, 段恒, 唐立明, 等. 右归丸通过调节 CXCL8/CXCR1/2 信号通路及 Ang-1, Ang-2 表达促进大鼠卵巢血管生成的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1):50.
- [8] 蒋宁, 周文霞, 张永祥. 应用代谢组学方法研究比较六味及八味地黄汤的作用机理[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5):45.
- [9] XIAO J, SONG J, SA Y, et al. The mechanisms of improving IVF outcomes of Liu-Wei-Di-Huang Pill acting on DOR patients [J]. Evid Based Complement Alter, 2020, 2020:5183017.
- [10] SU H I, HAUNSCHILD C, CHUNG K, et al. Prechemotherapy antimullerian hormone, age, and body size predict timing of return of ovarian function in young breast cancer patients[J]. Cancer Am Cancer Soc, 2014, 120(23):3691.
- [11] KIM S W, KIM Y J, SHIN J H, et al. Correlation between ovarian reserve and incidence of ectopic pregnancy after *in vitro* fertilization and embryo transfer[J]. Yonsei Med J, 2019, 60(3):285.
- [12] LIN S, YANG R, CHI H, et al. Increased incidence of ectopic pregnancy after *in vitro* fertilization in women with decreased ovarian reserve[J]. Oncotarget, 2017, 8(9):14570.
- [13] HIRAOKA T, WADA-HIRAIKE O, HIROTA Y, et al. The impact of elevated thyroid stimulating hormone on female subfertility[J]. Reprod Med Biol, 2016, 15(2):121.
- [14] 孙爱军, 唐旭东, 张巧利, 等. 卵巢储备功能降低不孕症中西医结合治疗的理论与临床试验研究探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8):148.
- [15] 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识专家组, 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(4):425.
- [16] 韩丽颖, 于浩, 李天娇, 等. 基于代谢组学的经典方槐花散治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5):1300.
- [17] 阿基业. 代谢组学数据处理方法:主成分分析[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5):481.
- [18] TSAI J, CHI M M Y, SCHULTE M B, et al. The fatty acid beta-oxidation pathway is important for decidualization of endometrial stromal cells in both humans and mice[J]. Biol Reprod, 2014, 2(90):34.
- [19] VARNAGY Á, BENE J, SULYOK E, et al. Acylcarnitine esters profiling of serum and follicular fluid in patients undergoing *in vitro* fertilization [J]. Reprod Biol Endocrin, 2013, doi: 10.1186/1477-7827-11-67.
- [20] 羊海涛. 左旋肉碱与女性生殖的研究进展[D]. 南宁:广西医科大学, 2010.
- [21] CHIN K M, SCHMIDT M J, HAVIGHURST T C, et al. Correlation of serum L-carnitine and dehydro-epiandrosterone sulphate levels with age and sex in healthy adults [J]. Age Ageing, 1999, 28(2):211.
- [22] 李克, 孙庆宝, 刘小传, 等. 中国(南京地区)成年人血清肉碱水平与年龄及性别的相关性分析[J]. 中华男科学杂志, 2009, 4(15):337.
- [23] DUNNING K R, RUSSEL L D. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation [J]. Reproduction, 2014, 148:R15.
- [24] 赵梦璐. 养卵方联合 DEHA、辅酶 Q10 对肾虚型卵巢储备功能下降患者 IVF 妊娠结局的影响[D]. 济南:山东中医药大学, 2021.
- [25] XU Y, NISENBLAT V, LU C, et al. Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1):29.
- [26] 梁琦, 冯前进, 梁瑜, 等. 左归丸作用于高糖负荷小鼠胚胎的代谢组学分析[J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29(5):70.
- [27] 戚仪雯, 郭路, 李斌. 氨基酸代谢在卵巢早衰中的作用与机制研究[J]. 老年医学与保健, 2021, 27(4):880.
- [28] 井文倩. 赖氨酸对新西兰兔生长和繁殖性能的影响及其分子机制初探[D]. 泰安:山东农业大学, 2007.
- [29] WANG B, FENG L, JIANG W D, et al. Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of of fish: preventive role of arginine[J]. Aquat Toxicol, 2015, 158:125.
- [30] 鲁飞翔, 胡南, 周仙杰, 等. 硫胺素与相关疾病的研究进展[J]. 中华灾害救援医学, 2016, 4(5):287.
- [31] PATRIE A, HANS B, PETER L, 等. 波罗的海鲑鱼 (*Salmo salar*)、鳟鱼 (*Salmo trutta*) 和鲑鱼 (*Gadus morhua*) 体内的硫胺素 (维生素 B1) 浓度[J]. 人类环境杂志, 1999, 28(1):48.
- [32] BAHADORI M H, SHARAMI S H, FAKOR F, et al. Level of vitamin E in follicular fluid and serum and oocyte morphology and embryo quality in patients undergoing IVF treatment [J]. J Family Reprod Health, 2017, 11(2):74.
- [33] 黄晓燕, 武玉蕊, 穆玉兰. 卵巢储备功能指标评价及预警模型建立的研究[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(5):341.
- [34] 邵明君, 叶碧绿. 基础卵泡刺激素水平在判断卵巢储备功能中的作用[J]. 浙江临床医学, 2007, 9(12):1668.
- [35] 陈文俊, 谈勇. 补肾宁心方治疗心肾不交型早发性卵巢功能不全临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(23):76.

[责任编辑 张燕]