

· 数据挖掘 ·

## 数据挖掘的中药新方对卵巢储备功能下降大鼠干预的实验分析

韩丝银<sup>1</sup>, 李林华<sup>1</sup>, 黄景春<sup>1</sup>, 黎昭君<sup>1</sup>, 陈菁华<sup>1</sup>, 闫强强<sup>2</sup>, 林江<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200;

2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

**[摘要]** 目的: 遴选及评估用于治疗卵巢储备功能下降(DOR)的中药新方及其适宜剂量。方法: 检索中国期刊全文数据库、万方、维普等数据库, 收集有关中医药治疗DOR的文献, 应用中医传承辅助平台V2.5建立数据库并进行数据挖掘得出药物核心组合及中药新方组合, 采用专家小组讨论法确定用于实验评估的中药新方。将SD雌性大鼠分为空白组、DOR模型组、坤泰胶囊组, 中药新方(简称新方)低、中、高剂量组, 每组12只大鼠。坤泰胶囊组, 新方低、中、高剂量组分别给DOR大鼠灌胃坤泰胶囊溶液(按说明书用量折算为 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和 $3.0375, 6.075, 9.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 新方水煎液进行干预治疗。21 d后, 阴道脱落细胞涂片观察大鼠动情周期, 苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织结构, 生化法检测血清中抗穆勒氏管激素(AMH), 卵泡刺激素(FSH), 黄体生成素(LH), 雌二醇( $\text{E}_2$ )含量和卵巢中活性氧(ROS), 丙二醛(MDA), 谷胱甘肽(GSH)含量及超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果: 用于实验评估的中药新方由熟地黄20 g, 鹿角胶12 g, 枸杞子20 g, 山茱萸12 g, 合欢皮9 g, 莲子心3 g, 党参20 g, 黄芪30 g, 白术12 g, 山药30 g, 炙甘草6 g共11味药组成; 与模型组相比, 坤泰胶囊组、新方中、高剂量组动情周期、卵泡发育明显改善, 血清中AMH,  $\text{E}_2$ 含量明显升高( $P<0.05$ ), FSH和LH含量明显降低( $P<0.05$ ), 卵巢中ROS和MDA含量明显降低( $P<0.05$ ), SOD, CAT, GSH-Px活力及GSH含量明显升高( $P<0.05$ )。与坤泰胶囊组相比, 新方中、高剂量组的上述指标没有显著差异, 而动情周期和卵泡发育呈现更好。结论: 通过数据挖掘筛选的中药新方可提高DOR大鼠卵巢抗氧化, 促进卵泡发育, 改善血清激素水平和动情周期, 有效提高卵巢储备功能, 最适浓度可选择为中剂量 $6.075\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**[关键词]** 卵巢储备功能下降; 大鼠; 激素; 抗氧化; 中医传承辅助平台

**[中图分类号]** R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)23-0181-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211411

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210923.1143.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-09-23 19:45

### Intervention Effect of New Chinese Herbal Prescription Selected by Data Mining Against Decreased Ovarian Reserve in Rats

HAN Si-yin<sup>1</sup>, LI Lin-hua<sup>1</sup>, HUANG Jing-chun<sup>1</sup>, LI Zhao-jun<sup>1</sup>, CHEN Jing-hua<sup>1</sup>,

YAN Qiang-qiang<sup>2</sup>, LIN Jiang<sup>1\*</sup>

(1. Basic Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**[收稿日期]** 20210810(029)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82060825); 2020年国家级大学生创新创业训练计划项目(202010600030); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA159039); 中医学广西一流学科项目(桂教科研[2018]12号); 广西中医药大学2019~2021年广西一流学科建设开放课题(2019XK058); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0312); 广西中医药大学博士科研启动基金项目(2018BS013); 广西名中医林江传承工作室项目(桂中医药科教发[2021]6号)

**[第一作者]** 韩丝银, 讲师, 博士, 从事中医药治疗妇科疾病药理研究, E-mail: 1715252639@qq.com

**[通信作者]** \*林江, 二级教授, 博士, 博士生导师, 主任医师, 从事方剂配伍与临床应用研究, E-mail: 1713552545@qq.com

**[Abstract]** **Objective:** To select and evaluate new Chinese herbal prescription for the treatment of decreased ovarian reserve (DOR) and its appropriate dosage. **Method:** The literature concerning the treatment of DOR with traditional Chinese medicine (TCM) was retrieved from such databases as Chinese Journal Full-text Database, Wanfang Data Knowledge Service Platform, and Chongqing Weipu Database for Chinese Technical Periodicals (VIP), based on which a database was established using the Traditional Chinese Medicine Inheritance Support System (TCMISS) V2.5. The data mining was then carried out to obtain the core combinations of Chinese herbs and new Chinese herbal prescription combinations, followed by the determination of the new Chinese herbal prescription by expert group discussion for experiment evaluation. The female SD rats were divided into the normal group, DOR model group, Kuntai capsule group, and low-, medium-, and high-dose new Chinese herbal prescription groups, with 12 rats in each group. Rats in the Kuntai capsule group and low-, medium-, and high-dose new Chinese herbal prescription groups were treated with Kuntai capsule solution ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  determined according to the dosage in the instruction) and  $3.0375$ ,  $6.075$ , and  $9.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  new Chinese herbal prescription, respectively. After 21 days, the estrous cycle was observed by vaginal exfoliated cell smear, and the ovarian structure was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The serum anti-mullerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and estrogen ( $E_2$ ) contents as well as the reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in ovary were detected using biochemical methods. **Result:** The new Chinese herbal prescription subjected to experimental evaluation was composed of 11 Chinese herbs, namely Rehmanniae Radix Praeparata 20 g, Cervi Cornus Colla 12 g, Lycii Fructus 20 g, Corni Fructus 12 g, Albiziae Cortex 9 g, Nelumbinis Plumula 3 g, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma 20 g, Astragali Radix 30 g, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma 12 g, Dioscoreae Rhizoma 30 g, and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle 6 g. Compared with the model group, the Kuntai capsule group and medium- and high-dose new Chinese herbal prescription groups exhibited significantly improved estrous cycle and follicular development, elevated serum AMH and  $E_2$  and ovarian GSH ( $P < 0.05$ ), decreased serum FSH and LH ( $P < 0.05$ ) and ovarian ROS and MDA ( $P < 0.05$ ), and enhanced SOD, CAT, and GSH-Px activities ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the above-mentioned indexes between the Kuntai capsule group and the middle- and high-dose new Chinese herbal prescription groups, but the estrous cycle and follicular development were better in the latter two groups. **Conclusion:** The new Chinese herbal prescription screened by data mining is able to enhance ovarian antioxidation, promote follicular development, ameliorate serum hormone and estrous cycle, and effectively improve ovarian reserve function in DOR rats. The medium dose ( $6.075 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) has been proved optimal.

**[Keywords]** decreased ovarian reserve (DOR); rats; hormones; antioxidation; Traditional Chinese Medicine Inheritance Support System (TCMISS)

卵巢储备功能下降(DOR)是指卵巢产生卵子的能力减弱、卵泡的质量下降,从而引起女性性激素缺乏、生育能力下降的一种高度特异质疾病<sup>[1]</sup>。DOR患者的妇女无法正常受孕,如果不及时治疗,可能在1~6年后发展为卵巢早衰,严重影响女性的身心健康<sup>[2]</sup>。流行病学调查显示,DOR发病率约10%,且发病率有逐年上升并呈现年轻化的趋势<sup>[3]</sup>。目前DOR是生殖健康领域研究的热点和难点,国内外学者已进行了广泛的研究,但发病机制尚未完全阐明,多认为与遗传、免疫、环境等多种因素相关<sup>[4]</sup>。

探讨改善卵巢功能的治疗方法成为亟待解决的关键问题,西医常用雌孕激素周期治疗,但是有恶心、胸胀、失眠等副作用,并增加激素依赖性肿瘤的风险<sup>[5]</sup>。还有促排卵疗法、赠卵疗法等,只治“标”不治“本”,且有价格昂贵、成功率低等问题<sup>[6]</sup>。

中医注重整体观念,从病机入手,辨证论治,在DOR卵巢功能的改善中表现出了一定的效果和优势,既能控制、改善DOR症状,又可以预防进一步发展为卵巢早衰,并且无雌孕激素周期治疗所导致的弊端<sup>[2]</sup>。近年来,学者们持续研究定坤丹<sup>[7]</sup>、自拟补

肾通络方<sup>[8]</sup>、寿胎丸合四君子汤加减方<sup>[9]</sup>等一系列中药方治疗DOR,均可改善患者卵巢功能。然而关于治疗DOR的中药用药繁杂,对用药和规律分析的研究甚少,且欠缺完整性和系统性。本研究应用中国中医科学院中药研究所研发的中医传承辅助平台软件V2.5<sup>[10]</sup>,对收集到的治疗DOR的中医药组方用药进行分析,挖掘出其常用药对、配伍使用规律、药物核心组合以及新方组合,并经妇科专家确定治疗DOR的中药新方(简称新方)。然后,在此基础上建立DOR大鼠模型,研究中药新方对DOR大鼠的动情周期、卵巢组织结构、血清激素水平和卵巢氧化应激的影响,采用实验验证中药新方治疗DOR大鼠的有效性及其适宜剂量,经检索,国内外无类似报道。本研究既有效利用文献资料,继承名医精髓得出治疗DOR的中药用药规律和中药新方组合,并得到国医大师班秀文治疗不孕不育学术思想传承工作室中妇科专家的确定,再通过实验验证,确保中药新方治疗效果的准确性,以期为临床遣方用药和新药的开发提供帮助。

## 1 文献资料与分析方法

**1.1 文献数据来源与筛选** 进入中国期刊全文数据库、万方数据库、维普数据库、中国生物医学文献数据库,采用高级检索功能,检索项选“主题”,匹配选“模糊”,检索词选用“卵巢储备功能”或“卵巢储备功能下降”或“卵巢储备功能低下”,检索时间从建库至2020年9月31日,其余为默认。因考虑到难以厘定病种的范围,本研究检索词没有采用中医传统的病名。

**1.2 纳入标准与排除标准** 检索中医药治疗DOR的文献,包括临床试验研究、临床观察、病案报道。纳入标准:①文献中纳入的案例必须明确记录患者全程病情变化、案例数量必须 $\geq 20$ ;②有明确的中医辨证和相对应的治法;③所载处方必须有明确的中药组成及剂量;④有效率在80%以上。排除标准:①合并其他疾病;②联合针刺、激光等治疗方法;③重复出现的中药处方只记为1条,余不纳入。

**1.3 中药名称规范及数据录入与分析** 为避免组方内药物因别名、译名、炮制等因素影响数据挖掘结果,方剂中的药物名称均参考《中药学》<sup>[11]</sup>2015年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)统一规范中药名称,如将“仙灵脾”统一为“淫羊藿”,“山萸肉”统一为“山茱萸”,“丹皮”统一为“牡丹皮”。据数据筛选要求对文献进行初次及二次筛选。将规范化后的数据录入中医传承辅助平台软

件V2.5“平台管理系统”中的“方剂管理”,为保证数据源的准确性,由双人负责统计数据并核对,建立治疗卵巢储备功能下降的方剂数据库。数据库收集处方363个,中药250味。运用“统计报表系统”中的“方剂统计-基本信息统计”对组方药物的气、味、归经进行统计,得出处方中各药用药频次、药物性味归经、药物之间的相互关联。运用“数据分析系统”中的“组方分析”对药物频次统计、关联规则、核心组合、新方组合等数据进行挖掘<sup>[10]</sup>。

**1.4 中药新方的确定** 组织妇科专家基于中医对DOR的病机认识、临床经验对数据挖掘的药物核心组合进行讨论,选定用于实验评估的治疗DOR中药新方。

## 2 实验评估

**2.1 实验动物及药物制备** SPF级SD雌性大鼠(7~8周)80只,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,饲养于广西中医药大学创新综合实验室,饲养环境温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为50%~70%,常规适应喂养2周,期间进行阴道脱落细胞涂片观察,确认所有大鼠动情周期变化规律后进行后续实验处理。本研究涉及的所有动物程序均符合国际伦理原则和《实验动物饲养管理和使用指南》,经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审查通过,审查号为DW20210908-125。雷公藤多苷片(0.01g $\times$ 50片/盒,江苏美通制药有限公司,国药准字Z32021007),坤泰胶囊(规格0.5g $\times$ 24粒/盒,贵阳新天药业股份有限公司,国药准字Z20000083),中药新方为熟地黄20g,鹿角胶12g,枸杞子20g,山茱萸12g,合欢皮9g,莲子心3g,党参20g,黄芪30g,白术12g,山药30g,炙甘草6g。所有药材购于老百姓大药房连锁(广西)有限公司,并由广西中医药大学药学院药用植物学教研室梁子宁教授鉴别均为正品,符合2020年版《中国药典》项下规定。根据《医疗机构中药煎药室管理规范》的相关要求煎煮中药,旋转蒸发器浓缩,浓缩为生药含量2g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>。

**2.2 试剂及仪器** 血清抗穆勒氏管激素(AMH),卵泡刺激素(FSH),黄体生成素(LH),雌激素(E<sub>2</sub>)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(ELK Biotechnology公司,批号分别为17523347310,17523373103,17523207777,16773155310);BCA蛋白质浓度,活性氧(ROS),丙二醛(MDA),谷胱甘肽(GSH)含量及超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒

(南京建成生物工程研究所,批号分别为16731627616, 20200313, 20200314, 20200305, 20200327, 20200305, 20200312);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(美国AspenTech公司,批号16731604137);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(德国Biofrox公司,批号EZ3413A120)。DR-200Bs型酶标仪(Diatek公司);HH-W-600型水浴锅(金坛市江南仪器厂);TGL-16型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器);JT-12K型脱水机,JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

**2.3 SD大鼠造模、分组及给药** 80只动情周期变化规律的SD雌性大鼠,随机分为空白组12只、模型组68只。参照陈淑萍等<sup>[12]</sup>方法,将雷公藤多苷片以生理盐水配成 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量,每日上午9点开始连续给模型组大鼠灌胃14天,空白组大鼠同时予等体积生理盐水。造模第8天起,观察大鼠阴道涂片的细胞变化,第14天后阴道脱落细胞涂片显示62只大鼠出现连续动情周期紊乱,表现为延长与停滞,造模成功率为91.2%;最终选出60只动情周期紊乱的DOR大鼠,分为DOR模型组、坤泰胶囊组、中药新方低、中、高剂量组,每组12只。坤泰胶囊组采用坤泰胶囊水溶液灌胃(按药物说明书剂量换算为 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),中药新方低、中、高剂量组分别以 $3.0375, 6.075, 9.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给予中药新方水煎液灌胃治疗,每天1次,连续灌胃21 d,其中中剂量为 $6.075\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为等效剂量,根据“人与大鼠之间用药剂量换算表”计算。空白组给予等量生理盐水。

**2.4 取样与指标检测** 给药第15天起,观察各组大鼠阴道涂片的细胞变化,第20天,大鼠禁食不禁水,第21天后,通过腹腔注射水合氯醛全身麻醉所有大鼠。腹主动脉取血,25℃放置1 h后,4℃条件下 $1\ 200\times\text{g}$ 离心10 min,分离出血清保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,用于激素分析。取出卵巢组织,部分保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,用于氧化应激分析;部分固定在4%多聚甲醛,用于组织结构分析。

**2.4.1 血清雌激素水平检测** 取保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的各组大鼠血清,按照FSH, LH,  $\text{E}_2$ , AMH的ELISA试剂盒操作说明检测各组血清中FSH, LH,  $\text{E}_2$ , AMH含量。FSH, LH,  $\text{E}_2$ , AMH的含量均采用每毫升相对单位表达。

**2.4.2 卵巢氧化应激水平检测** 取保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的各组大鼠卵巢组织,与冷却的Tris-HCl缓冲液以1:5冰浴匀浆,4℃条件下 $1\ 200\times\text{g}$ 离心10 min,取

出上清液用于样本分析。按照SOD, CAT, GSH-Px, GSH, ROS及MDA试剂盒操作说明检测各组卵巢组织中SOD, CAT, GSH-Px活性及GSH, ROS, MDA含量。ROS的含量表示为每毫克可溶性蛋白的荧光强度, SOD, CAT, GSH-Px活性及GSH, ROS, MDA含量均采用每毫克可溶性蛋白相对单位表达。

**2.4.3 卵巢组织结构检测** 将置于4%多聚甲醛中的大鼠卵巢组织用梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,常规HE染色,光学显微镜下观察卵巢组织结构。

**2.5 统计分析** 数据表示为 $\bar{x}\pm s$ 。采用SPSS 17.0进行统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和最小显著性差异法(LSD)检验分析不同组间的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有数理统计图像均采用Origin 8.6软件生成。

### 3 结果

**3.1 用药频数分析** 对内服治疗DOR的363首方剂中的250味药物进行频次统计,中药频次 $\geq 100$ 次的药物依照由高到低次序排列,见表1。

表1 DOR内服中药频次分析

Table 1 Frequency analysis of oral administration of traditional Chinese medicine for DOR

No.	中药名称	频数/次	No.	中药名称	频数/次
1	菟丝子	230	7	山药	123
2	当归	222	8	淫羊藿	117
3	熟地黄	216	9	丹参	116
4	枸杞子	155	10	茯苓	114
5	山茱萸	129	11	女贞子	100
6	白芍	128	12		

**3.2 基于关联规则的组方规律分析** 将内服治疗DOR的处方支持度设为72,置信度设为0.7,应用“用药模式”演化出常用药对29组,见表2;应用“规则分析”得到关联规则药物19组,见表3;药物间关联的“网络展示”,见图1。

**3.3 药物核心组合和新方组合** 将“相关度”设置为8,“惩罚度”设置为2,采用复杂系统熵聚类法<sup>[10]</sup>提取,得出治疗DOR的内服药物核心组合,共计22组,见表4;得出治疗DOR的内服新方组合,共计11组,而每组新方组合均为两组核心组合合并构成,见表5。

**3.4 用于实验评估的中药新方** DOR在临床脾肾两虚、心肾不交并见,中医妇科专家小组讨论选定

表2 DOR内服常用药物的用药模式

Table 2 Medication mode of commonly used oral drugs for DOR

No.	药物模式	频数/次	No.	药物模式	频数/次
1	熟地黄, 当归	153	16	菟丝子, 丹参	85
2	熟地黄, 菟丝子	150	17	菟丝子, 山药	85
3	菟丝子, 当归	140	18	熟地黄, 淫羊藿	83
4	菟丝子, 枸杞子	132	19	山茱萸, 当归	83
5	熟地黄, 枸杞子	108	20	淫羊藿, 当归	83
6	熟地黄, 山茱萸	105	21	川芎, 当归	82
7	熟地黄, 菟丝子, 当归	104	22	菟丝子, 当归, 枸杞子	79
8	当归, 白芍	99	23	菟丝子, 白芍	78
9	当归, 枸杞子	97	24	熟地黄, 当归, 白芍	76
10	熟地黄, 菟丝子, 枸杞子	94	25	熟地黄, 丹参	75
11	熟地黄, 山药	93	26	丹参, 当归	75
12	熟地黄, 白芍	88	27	山药, 当归	75
13	山茱萸, 菟丝子	87	28	熟地黄, 山茱萸, 菟丝子	74
14	菟丝子, 淫羊藿	87	29	熟地黄, 当归, 枸杞子	74
15	山茱萸, 山药	85			

表3 DOR内服常用药物的关联规则分析

Table 3 Association rule analysis of commonly used oral drugs for DOR

No.	规则	置信度
1	川芎->当归	0.931 8
2	熟地黄, 枸杞子->菟丝子	0.870 3
3	熟地黄, 白芍->当归	0.863 6
4	枸杞子->菟丝子	0.851 6
5	山茱萸, 菟丝子->熟地黄	0.850 5
6	当归, 枸杞子->菟丝子	0.814 4
7	山茱萸->熟地黄	0.814 0
8	白芍->当归	0.773 4
9	当归, 白芍->熟地黄	0.767 6
10	当归, 枸杞子->熟地黄	0.762 8
11	山药->熟地黄	0.756 1
12	淫羊藿->菟丝子	0.743 6
13	菟丝子, 当归->熟地黄	0.742 9
14	丹参->菟丝子	0.732 8
15	菟丝子, 枸杞子->熟地黄	0.712 1
16	淫羊藿->熟地黄	0.709 4
17	淫羊藿->当归	0.709 4
18	熟地黄->当归	0.708 3
19	熟地黄, 山茱萸->菟丝子	0.704 8

新方组合3与新方组合5共11味药组成实验中药新方, 熟地黄20g, 鹿角胶12g, 枸杞子20g, 山茱萸

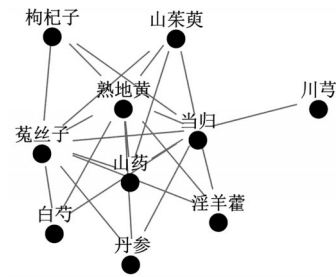


图1 DOR内服常用药物间关联的网络展示

Fig. 1 Network display of association between commonly used oral drugs for DOR

表4 基于复杂系统熵聚类的DOR内服核心组合

Table 4 Core combination of oral drugs based on entropy clustering of complex system for DOR

No.	核心组合1	核心组合2
1	续断-钩藤-桑叶	续断-菟丝子-杜仲
2	龟甲-旱莲草-桑叶	旱莲草-炒白术-北沙参
3	党参-黄芪-白术	熟地黄-山药-山茱萸
4	熟地黄-当归-半夏	薏苡仁-苍术-半夏
5	熟地黄-鹿角胶-枸杞子	莲子心-合欢皮-枸杞子
6	枳壳-麦芽-茨藜	红景天-绞股蓝-麦芽
7	白扁豆-桔梗-浙贝母	乌药-五灵脂-浙贝母
8	黄柏-仙茅-淫羊藿	木香-钩藤-莲子心-淫羊藿
9	浮小麦-女贞子-百合	葛根-女贞子-覆盆子
10	浮小麦-百合-北沙参	石斛-百合-北沙参
11	水蛭-莪术-三棱	莪术-三棱-桑枝

表5 基于复杂系统熵聚类的DOR内服新方组合

Table 5 New formula combination of oral drugs based on entropy clustering of complex system for DOR

No.	新方组合
1	续断-钩藤-桑叶-菟丝子-杜仲
2	龟甲-旱莲草-桑叶-炒白术-北沙参
3	党参-黄芪-白术-熟地黄-山药-山茱萸
4	熟地黄-当归-半夏-薏苡仁-苍术
5	熟地黄-鹿角胶-枸杞子-莲子心-合欢皮
6	枳壳-麦芽-茨藜-红景天-绞股蓝
7	白扁豆-桔梗-浙贝母-乌药-五灵脂
8	黄柏-仙茅-淫羊藿-木香-钩藤-莲子心
9	浮小麦-女贞子-百合-葛根-覆盆子
10	浮小麦-百合-北沙参-石斛
11	水蛭-莪术-三棱-桑枝

12g, 合欢皮9g, 莲子心3g, 党参20g, 黄芪30g, 白术12g, 山药30g, 炙甘草6g。

3.5 中药新方对DOR大鼠动情周期的影响 实验结束后, DOR模型组大鼠动情周期恢复比例0; 坤泰

胶囊组大鼠动情周期恢复比例75%;中药新方低剂量组大鼠动情周期恢复比例50%;中药新方中剂量组大鼠动情周期恢复比例83.33%;中药新方高剂量组大鼠动情周期恢复比例75%。可见,中药新方中剂量组大鼠动情周期恢复效果最好。见表6。

表6 各组大鼠动情周期恢复情况比例(n=12)

Table 6 Proportion of estrous cycle recovery of rats in each group (n=12)

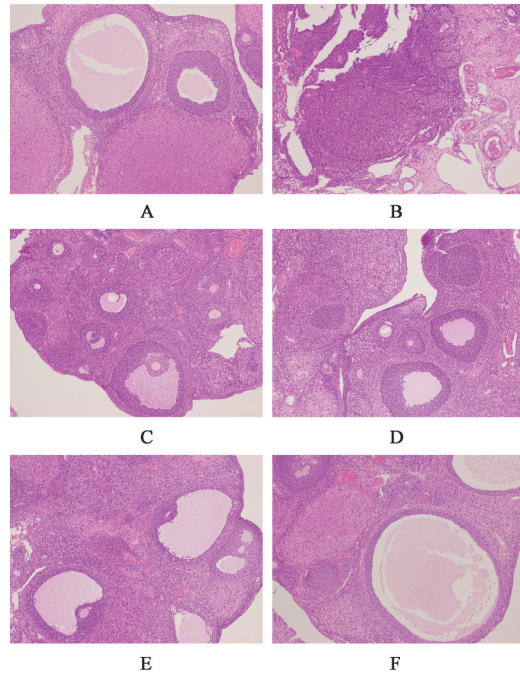
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	周期正常/只	周期紊乱/只	正常比例/%
空白		12	0	100
DOR模型		0	12	0
坤泰胶囊	0.5	9	3	75
中药新方	3.037 5	6	6	50
	6.075	10	2	83.33
	9.12	9	3	75

### 3.6 中药新方对DOR大鼠卵巢组织病理学的影响

空白组大鼠卵巢组织可见各级卵泡,轮廓清晰,卵泡外围包绕的颗粒细胞层数多、排列密集;DOR模型组大鼠卵巢组织可见结构破坏,各级卵泡减少,闭锁卵泡增多,未见优势卵泡,颗粒细胞层数减少、排列疏松,呈现出退行性发育。与模型组相比,坤泰胶囊组大鼠可见各级卵泡增多,闭锁卵泡减少,颗粒细胞层数增多,排列规则,发育程度尚可;中药新方低、中、高剂量组大鼠卵巢组织病变均减轻,且上述发育程度随新方剂量依赖性变好。与坤泰胶囊组相比,中药新方中、高剂量组大鼠的上述发育呈现更好。见图2。

### 3.7 中药新方对DOR大鼠血清激素水平的影响

与DOR模型组大鼠相比,空白组、坤泰胶囊组、中药新方中、高剂量组大鼠血清AMH、E<sub>2</sub>浓度均明显提高(P<0.05);空白组、坤泰胶囊组、中药新方低、



A. 空白组;B. 模型组;C. 坤泰胶囊组;D-F. 中药新方低、中、高剂量组

图2 中药新方对DOR大鼠卵巢组织病理学的影响(HE,×100)

Fig. 2 Effect of new prescription of traditional Chinese medicine on ovarian histopathology of DOR rats after experiment (HE,×100)

中、高剂量组大鼠血清FSH浓度均明显降低(P<0.05);空白组、坤泰胶囊组、中药新方中、高剂量组大鼠血清LH浓度均明显降低(P<0.05)。与坤泰胶囊组大鼠相比,中药新方低剂量组大鼠血清AMH浓度明显降低(P<0.05),空白组、中药新方中、高剂量组大鼠血清AMH浓度均没有显著差异;空白组、中药新方低、中、高剂量组大鼠血清E<sub>2</sub>浓度均没有显著差异;中药新方低剂量组大鼠血清FSH、LH浓度明显升高(P<0.05),空白组、中药新方中、高剂量组大鼠血清FSH、LH浓度均差异无统计学意义。见表7。

表7 中药新方对DOR大鼠血清AMH、E<sub>2</sub>、FSH、LH含量的影响(̄x±s,n=12)

Table 7 Effect of new prescription of traditional Chinese medicine on contents of serum AMH, E<sub>2</sub>, FSH and LH in DOR rats after experiment (̄x±s,n=12)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AMH/ng·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	FSH/μg·L <sup>-1</sup>	LH/ng·L <sup>-1</sup>
空白		6 583.256±920.353 <sup>1)</sup>	1 191.279±353.698 <sup>1)</sup>	18.492±3.720 <sup>1)</sup>	233.847±70.942 <sup>1)</sup>
DOR模型		2 092.473±534.267	378.230±65.280	68.928±10.673	891.634±219.131
坤泰胶囊	0.5	5 770.332±1 010.574 <sup>1)</sup>	874.719±173.984 <sup>1)</sup>	28.456±9.983 <sup>1)</sup>	342.413±117.935 <sup>1)</sup>
中药新方	3.037 5	3 012.772±1 080.115 <sup>2)</sup>	550.196±104.581	43.276±10.315 <sup>1,2)</sup>	674.262±136.056 <sup>2)</sup>
	6.075	5 403.223±679.490 <sup>1)</sup>	755.021±199.151 <sup>1)</sup>	33.067±5.096 <sup>1)</sup>	397.507±33.602 <sup>1)</sup>
	9.12	5 971.788±823.653 <sup>1)</sup>	870.523±142.486 <sup>1)</sup>	30.986±2.240 <sup>1)</sup>	392.279±62.919 <sup>1)</sup>

注:与DOR模型组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与坤泰胶囊组比较<sup>2)</sup>P<0.05(表8同)。

3.8 中药新方对DOR大鼠卵巢氧化应激水平的影响 与DOR模型组大鼠相比,空白组、坤泰胶囊组、中药新方中、高剂量组大鼠血清ROS,MDA含量明显降低( $P<0.05$ );空白组、坤泰胶囊、中药新方中、高剂量组大鼠卵巢SOD,CAT,GSH-Px活力及GSH含量明显提高( $P<0.05$ );与坤泰胶囊组大鼠相比,中药新方低剂量组大鼠卵巢ROS,MDA含量明显升高( $P<0.05$ ),空白组、中药新方中、高剂量组大鼠卵巢ROS,MDA含量差异均无统计学意义;中药新方

低剂量组大鼠卵巢SOD活力明显降低( $P<0.05$ ),空白组、中药新方中、高剂量组大鼠卵巢SOD活力均差异无统计学意义;空白组、中药新方低、中、高剂量组大鼠卵巢CAT活力均差异无统计学意义;空白组大鼠卵巢GSH含量,GSH-Px活力明显提高( $P<0.05$ ),中药新方低剂量组大鼠卵巢GSH含量,GSH-Px活力明显降低( $P<0.05$ ),中药新方中、高剂量组大鼠卵巢GSH含量,GSH-Px活力差异均无统计学意义。见表8。

表8 实验结束后中药新方对DOR大鼠卵巢ROS,MDA,GSH含量及SOD,CAT,GSH-Px活力的影响

Table 8 Effect of new prescription of traditional Chinese medicine on contents of ROS, MDA and GSH and activities of SOD, CAT and GSH-Px in the ovaries of DOR rats after experiment

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ROS /荧光强度·mg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	CAT /U·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>	GSH /μmol·g <sup>-1</sup>
空白		562.655±46.165 <sup>1)</sup>	2.508±0.682 <sup>1)</sup>	40.157±7.901 <sup>1)</sup>	5.984±1.246 <sup>1)</sup>	13.490±0.536 <sup>1)2)</sup>	18.539±1.958 <sup>1)2)</sup>
DOR模型		1 279.623±132.409	10.169±1.445	16.665±5.201	2.174±0.243	4.921±0.456	5.689±2.303
坤泰胶囊	0.5	790.569±133.637 <sup>1)</sup>	4.340±1.250 <sup>1)</sup>	36.926±5.472 <sup>1)</sup>	4.676±0.570 <sup>1)</sup>	10.173±1.620 <sup>1)</sup>	11.870±3.802 <sup>1)</sup>
中药新方	3.037 5	1 071.790±109.930 <sup>2)</sup>	8.184±1.230 <sup>2)</sup>	23.497±5.781 <sup>2)</sup>	3.156±0.528	5.508±1.179 <sup>2)</sup>	7.619±1.721 <sup>2)</sup>
	6.075	752.814±178.907 <sup>1)</sup>	5.602±0.600 <sup>1)</sup>	34.177±7.799 <sup>1)</sup>	3.956±1.216 <sup>1)</sup>	8.670±2.888 <sup>1)</sup>	9.592±0.224 <sup>1)</sup>
	9.12	794.090±147.098 <sup>1)</sup>	4.918±1.487 <sup>1)</sup>	37.220±5.472 <sup>1)</sup>	4.711±1.361 <sup>1)</sup>	8.085±2.183 <sup>1)</sup>	11.204±2.026 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

DOR临床主要表现为40岁以下的女性出现月经稀发、经量减少、闭经以及生育能力下降等。中医并无DOR的病名,据其临床表现,DOR可归属于中医学中的月经后期、月经量少、闭经、不孕、经断前后诸证等范畴。但是除了DOR,诸多其他疾病如卵巢囊肿、卵巢肿瘤、脑垂体病变、慢性疾病也会诱发相似的临床表现。因此,为了规范数据,本研究没有将上述中医病名作为检索词,而是直接选用“卵巢储备功能”或“卵巢储备功能下降”或“卵巢储备功能低下”。中医学认为,肾-天癸-冲任-胞宫轴是女性经孕产乳的中心环节,无论哪个环节失常均会影响生殖轴功能,导致妇科疾病的发生。DOR的病因病机分为虚证和实证,且以虚证为主,尤以肾虚为根本原因,临床常脾肾两虚、心肾不交并见。肾虚是DOR发生的根本原因,肾-天癸-冲任-胞宫轴的生理功能与肾气肾精密切相关<sup>[13]</sup>。学者认为DOR发生的基本病因病机是肾虚,或伴精血不足,或伴运化失常,或伴气机郁滞,治疗应以补肾填精为主,可少佐补肾助阳之品以鼓舞阳气<sup>[14]</sup>。还有研究认为肾气决定卵巢生理功能的实现,但肾气的充盈还需后天脾胃的滋养<sup>[15]</sup>。本文运用中医传承辅助平台(V2.5)对已查阅、整理出的中医药辨治DOR

文献进行药物分析,也得出DOR证候以脾肾两虚型为主,治疗上以温性药物为基调补肾益精,健脾养血,辅以平性、凉性药物兼治。以甘味药为主,佐以辛味、苦味药物为用,甘能补能和,滋养补虚,辛能散能行,行气行血,使补而不滞。常用中药频数≥100次的药物共有11味,分别是菟丝子、当归、熟地黄、枸杞子、山茱萸、白芍、山药、淫羊藿、丹参、茯苓、女贞子,可见治疗DOR药物以补益肾精、健脾益气、益精养血、补气生津为主。

基于关联规则分析得出常用药对29组,主要以熟地黄、当归、菟丝子、枸杞子、白芍、山药、丹参、淫羊藿、山茱萸配伍使用,温补肾精、健脾养血为主,此几味药物药理作用主要是增强免疫力和造血功能、改善微循环、延缓细胞衰老、抗菌,针对脾肾两虚导致的DOR治疗效堪力宏。关联规则分析得出药物19组,可以看出主要以熟地黄(补血滋阴,益精填髓)为中心,与山药、当归、山茱萸、枸杞子、菟丝子、白芍、丹参、淫羊藿、川芎关联度较高,虚证为候,脾肾两虚证多见,治疗以滋补肾精、健脾益气养血贯穿始终,辅以生津安神。运用熵聚类分析提取,得出辨治DOR的药物核心组合22组及其两两合并而得的新方组合11组。22组核心组合不同于29组常用药对,是对363首方剂中出现的250味中

药重新进行数据分析。这些药物核心组合有效利用文献资料,既可继承名医、名家、名方的精髓,又可确保临床疗效的准确性,是中药新药研发的主要来源<sup>[16]</sup>。基于关联规则和熵聚类分析的药物核心组合,林江教授组织妇科专家确定了用于实验的中药新方由熵聚类分析得出的新方组合组成。该配伍以熟地黄补肾益精为君;臣以鹿角胶、枸杞子、山茱萸、黄芪、党参、白术、山药协助君药温肾补血,益气健脾;DOR患者常有心烦失眠潮热等证,佐以合欢皮、莲子心和血宁心、除烦安神;炙甘草为使,调和诸药。纵观全方,共奏温补肝肾、健脾益精、养血宁心,阴阳相济之功。

为了评估基于数据挖掘的中药新方的有效性及其适宜剂量,本实验采用雷公藤多苷复制DOR大鼠模型,坤泰胶囊治疗作为阳性对照,开展了低、中、高剂量中药新方干预DOR大鼠的实验研究。DOR患者常伴激素水平异常,如FSH,LH升高, $E_2$ ,AMH降低,卵泡数减少,这些变化很好地反映了卵巢储备功能,常被用作评估DOR的重要指标<sup>[17-18]</sup>。其中AMH水平下降与DOR密切相关,低水平AMH及其在特定时期迅速下降的特征是DOR的标志<sup>[19]</sup>。卵巢储备功能衰退时,FSH,LH含量升高,卵泡数量和 $E_2$ 则会减少,卵泡和卵子的生长发育则会受到遏制<sup>[20]</sup>。本实验DOR模型组大鼠在造模后出现FSH,LH水平增高, $E_2$ 和AMH水平下降,卵泡闭锁,卵泡数减少,颗粒细胞层数减少的卵巢功能低下状态,提示DOR大鼠模型成功,与文献[12]报道一致。坤泰胶囊组治疗DOR大鼠的效果显著,与诸多学者研究表明坤泰胶囊可以缓解和逆转DOR患者和动物模型的临床症状及生化指标一致<sup>[12,21-22]</sup>。中药新方中、高剂量组大鼠动情周期得到高比例恢复,卵泡数增加,激素水平明显改善,如血清FSH,LH含量明显降低,AMH, $E_2$ 含量显著升高,这些指标的改善作用与坤泰胶囊组相当,而且动情周期和卵泡发育较坤泰胶囊组呈现更好。可见,中、高剂量中药新方能够治疗DOR大鼠,提高卵巢储备功能,发挥保护卵巢的作用。

生理情况下体内存在完善的抗氧化防御机制以保护机体免受氧化应激损伤,主要包括酶和非酶两类抗氧化系统,其中酶类包括SOD,CAT,GSH-Px,非酶包括维生素(C,E),GSH,褪黑素等。近年来研究发现卵巢内氧化与抗氧化物的平衡对卵巢内分泌功能具有重要作用,氧化应激打破平衡状态,卵巢内ROS及脂质氧化产物MDA的积累会导

致卵巢内分泌功能紊乱,诱导颗粒细胞凋亡,进而诱发卵泡闭锁,是引起DOR的重要原因<sup>[23-25]</sup>。杨纪珂等<sup>[20]</sup>报道雷公藤多苷造模DOR大鼠可使大鼠血清ROS,MDA提高,SOD,CAT,GSH-Px活性及GSH含量下降,提示DOR大鼠存在氧化应激状态。本实验的DOR模型组大鼠也证实了氧化应激状态,造模后出现卵巢ROS,MDA含量升高,SOD,CAT,GSH-Px活性及GSH含量下降。坤泰胶囊组通过提高卵巢SOD,CAT,GSH-Px活性及GSH含量,降低卵巢ROS,MDA含量,缓解氧化应激状态。中、高剂量中药新方对氧化应激的改善作用与坤泰胶囊相当。有学者实验表明,坤泰胶囊通过上调小鼠卵巢内SOD等蛋白的表达,发挥抗氧化和抗凋亡的作用,进而改善卵巢组织结构,激活卵巢功能<sup>[26]</sup>。可见,中、高剂量中药新方也有提高卵巢抗氧化,促进卵泡发育,减少卵泡闭锁作用。

综上所述,中药新方可提高DOR大鼠卵巢抗氧化,促进卵泡发育,改善血清激素水平和动情周期,有效提高卵巢储备功能。从经济和效果两方面考虑,最适浓度可选择中剂量 $6.075\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。现代药理研究证实,方中的大部分药物都有抗氧化作用,如熟地黄含有13个抗氧化活性成分<sup>[27]</sup>,枸杞子、黄芪、白术的黄酮、多糖类等化合物具有抗氧化、抗衰老等功用<sup>[28-30]</sup>;山茱萸、党参提取物可清除自由基,具有缓解氧化应激的能力<sup>[31-33]</sup>,这是本方具有抗氧化损伤的生物学基础。因此,数据挖掘技术可以有效地应用于中医药的方剂挖掘,有利于中医药的传承与创新。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2015, 103(3):9-17.
- [2] 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研究探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8):148-157.
- [3] DEVINE K, MUMFORD S L, WU M, et al. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181, 536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System [J]. Fertil Steril, 2015, 104(3):612-619.

- [4] 李晓晓,齐丽红,仝瑞晓,等. 卵巢储备功能下降病因及治疗的中西医研究进展[J]. 医学综述,2021(13):2612-2618.
- [5] 辛明蔚,李玛建,何军琴,等. 资坤汤治疗卵巢储备功能下降月经后期阴虚血燥证的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(13):138-143.
- [6] 白俊. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路研究补肾活血法调控大鼠卵巢颗粒细胞自噬的分子机制[D]. 成都:成都中医药大学,2018.
- [7] 陈燕霞,袁苑,马堃,等. 定坤丹对雷公藤多苷诱导卵巢储备功能低下小鼠性激素和卵泡计数的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):78-84.
- [8] 王带林,匡继林. 匡继林治疗卵巢储备功能下降所致不孕经验[J]. 湖南中医杂志,2020,36(6):23-24.
- [9] 吕孝丽,郝洁,周月希,等. 罗颂平治疗卵巢储备功能下降不孕症经验[J]. 中医杂志,2020,61(13):1139-1141.
- [10] 唐仕欢,申丹,卢朋,等. 中医传承辅助平台应用评述[J]. 中华中医药杂志,2015,30(2):329-331.
- [11] 高学敏. 中药学[M]. 7版. 北京:中国中医药出版社,2002:51-611.
- [12] 陈淑萍,孙玉英,谈勇. 坤泰胶囊对卵巢储备功能下降大鼠的影响[J]. 中成药,2019,41(9):2229-2232.
- [13] 蔡光霞,田维萍,何雨聪,等. 吴克明教授治疗卵巢储备功能下降经验撷菁[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(7):664-665,678.
- [14] 马丽爽,许琳,金哲. 金哲教授诊治卵巢储备功能下降经验[J]. 世界中西医结合杂志,2019,14(2):185-187.
- [15] 宋帅华,李淑萍. 李淑萍治疗卵巢储备功能下降的经验[J]. 江苏中医药,2014,46(8):15-17.
- [16] 唐仕欢,陈建新,杨洪军,等. 证-病-方-中医药研究的新领域[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(4):267-270.
- [17] XIA J Y, YAN-QIN T U, ZUO Y H. Therapeutic effect of DHEA on patients with decreased ovarian reserve at different ages[J]. J Reprod Med, 2019, 28(10): 1207-1211.
- [18] 陆星星,任豆豆,徐华洲,等. 资癸益冲方对卵巢储备功能下降模型大鼠卵巢氧化损伤的影响及其作用机制[J]. 北京中医药大学学报,2020,43(7):561-568.
- [19] JAMIL Z, FATIMA S S, AHMED K, et al. Anti-mullerian hormone: above and beyond conventional ovarian reserve markers[J]. Dis Markers, 2016, 2016(3):5246217.
- [20] 杨纪珂,刘雁峰. 补肾疏肝法对卵巢储备功能低下大鼠卵巢功能及氧化应激功能影响的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2020,29(8):835-839.
- [21] 阿茹娜,罗云瑶,李思聪,等. 坤泰胶囊治疗早发性卵巢功能不全有效性和安全性的Meta分析[J]. 中国循证医学杂志,2019,19(8):953-959.
- [22] 柳肃芬. 坤泰胶囊对早期卵巢储备功能降低的育龄期患者临床疗效分析[J]. 中国现代药物应用,2021,15(12):165-168.
- [23] LUDERER U. Ovarian toxicity from reactive oxygen species[J]. Vitam Horm, 2014, 94:99.
- [24] JINHWAN L, NAKAMURA B N, ISAAC M, et al. Glutamate cysteine ligase modifier subunit (gclm) null mice have increased ovarian oxidative stress and accelerated age-related ovarian failure [J]. Endocrinology, 2015, 156(9):3329-3343.
- [25] SHI L Y, ZHANG J J, LAI Z W, et al. Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e162194.
- [26] ZHANG J, FANG L, SHI L, et al. Protective effects and mechanisms investigation of Kuntai capsule on the ovarian function of anovel model with accelerated aging ovaries [J]. J Ethnopharmacol, 2017 (195): 173-181.
- [27] 沈华旦,方江济,郭鹏程,等. 基于HPLC-UV-DPPH法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究[J]. 中草药,2018,49(3):582-588.
- [28] 曹清华. 白术抗氧化活性成分的提取及鉴定研究[D]. 贵阳:贵州师范大学,2018.
- [29] 周旋,梁晓婕,王亚军,等. 枸杞提取液主要成分含量与体外抗氧化活性的相关性[J]. 食品工业,2020,41(5):211-214.
- [30] 刘靖丽,于海东,梁艳妮. 中药黄芪中黄酮类化合物抗氧化活性的DFT研究[J]. 化学与生物工程,2019,36(1):36-40.
- [31] 马铭,白瑞斌,刘景龙,等. 3种党参提取物体外抗氧化活性探究[J]. 中成药,2020,42(9):2514-2517.
- [32] 张培全,胡继藤,张超. 山茱萸提取物清除DPPH·自由基作用的研究[J]. 海峡药学,2019,31(2):32-35.
- [33] 范琳,沈颖昕,严铭铭,等. 葛根不同提取物体外抗氧化性及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 粮食与油脂,2021,34(6):150-154.

[责任编辑 顾雪竹]