



根据气相色谱-质谱分析多囊卵巢综合征患者的雄激素、黄体酮和糖皮质激素的代谢组学的研究

GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLIC PROFILING OF ANDROGENS, PROGESTINS AND GLUCOCORTICOIDS IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

© N.V. Vorokhobina¹, L.I. Velikanova¹, O.B. Glavnova², E.V. Malevanaya¹, R.K. Galakhova¹, I.Yu. Matezius¹

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

² The Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology named after D.O. Ott, Saint Petersburg, Russia

For citation: Vorokhobina NV, Velikanova LI, Glavnova OB, Malevanaya EV, Galakhova RK, Matezius IYu. Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolic profiling of androgens, progestins and glucocorticoids in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2020;69(5):27-38. <https://doi.org/10.17816/JOWD69527-38>

Received: July 28, 2020

Revised: September 9, 2020

Accepted: October 12, 2020

■ **研究现实性。** 多囊卵巢综合征是一种常见的疾病。根据诊断标准，10-20%的育龄妇女可见此病，占有形式的高雄激素症综合征的70-80%。多囊卵巢综合征是一种具有多因素病因的异质性疾病，以多种临床、内分泌和代谢紊乱为特征。在这方面，阐明甾体激素的生物合成和代谢特征、甾体生成酶的活性、寻找新的实验室标准以早期诊断和及时治疗是有意义的。

目的： 根据气相色谱-质谱分析研究正常体重肥胖多囊卵巢综合征女性的雄激素、黄体酮和糖皮质激素的代谢组学。

研究材料和方法。 本文对53例多囊卵巢综合征育龄妇女进行了检查。第一组包括30名体重正常、年龄在22至29岁的女性。第二组包括23例肥胖患者，年龄为25-33岁，平均体重指数为 $35.3 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$ 。对照组包括25例健康女性，年龄为 26 ± 0.6 岁，体重指数正常，无高雄激素血症临床及生化体征。采用血清免疫测定方法测定促黄体激素、促卵泡激素、游离睾酮、17-羟孕甾酮和性激素结合球蛋白的水平。采75g的口服葡萄糖耐量试验测定葡萄糖负荷前后的血糖和胰岛素水平。采用气相色谱-质谱分析对尿液中的类固醇成分进行了分析，并对样品制备规则进行了优化。统计数据处理使用STATISTICA软件系统为WINDOWS（10版本）。患者的主要定量特征以中位数（Me）、第25百分位和第75百分位（ $Q_{25}-Q_{75}$ ）的形式表示。为了比较研究组的结果，使用非参数Mann-Whitney *U*检验。置信标准 $p < 0.05$ 认为有统计学意义。

研究成果。 本文对多囊卵巢综合征妇女的雄激素、糖皮质激素和孕激素代谢组学进行分析，并与对照组相应指标进行比较。无肥胖的多囊卵巢综合征患者尿中雄烯二酮、脱氢表雄酮及其代谢产物、17-羟基孕烯醇酮、孕三醇、5-en-孕烷的排泄量增加，而多囊卵巢综合征和肥胖的女性中，尿中雄酮和脱氢表雄酮代谢产物（16-oxo-雄烯二醇和17 β -雄烯二醇）的排泄量较对照组增加。无肥胖的多囊卵巢综合征患者皮质醇和可的松四氢衍生物与11-oxo-孕三醇、孕三醇和17-羟基孕烯醇酮的比值较对照组降低，这是21-羟化酶功能不足的迹象。在患有多囊卵巢综合征和肥胖的女性中，有四种迹象表明5 α -还原酶活性增加，而在体重指数正常的多囊卵巢综合征患者中，这三个指标表明多囊卵巢综合征患者5 α -还原酶活性不同程度，这取决于体重指数。

结果。 气相色谱-质谱分析同时定量测定尿液中类固醇检测中雄激素代谢产物、黄体酮、雄烯二酮和糖皮质激素的5 α 和5 β 代谢产物，为多囊卵巢综合征的诊断开辟了新的机遇。

■ **关键词：** 气相色谱-质谱分析；代谢组学；类固醇激素；多囊卵巢综合征；雄激素过多症；肥胖。

▪ **Hypothesis/aims of study.** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common disease. Depending on the diagnostic criteria, the disease is seen in 10-20% of women of reproductive age and accounts for 70-80% of all forms of hyperandrogenic syndrome. PCOS is a heterogeneous condition of multifactorial etiology characterized by various clinical, endocrine and metabolic disorders. Therefore, it is important to clarify the specific features of steroid hormone biosynthesis and metabolism and steroidogenesis enzyme activity, as well as to search for new laboratory criteria for early diagnosis and prompt treatment. The aim of this study was to perform metabolic profiling of androgens, progestins and glucocorticoids using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in obese and non-obese women with PCOS.

Study design, materials and methods. We examined 53 women of reproductive age diagnosed with PCOS. The first group included 30 women aged 22 to 29 years with normal body weight. The second group comprised 23 obese patients aged 25 to 33 years with an average body mass index (BMI) of $35.3 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$. The control group consisted of 25 healthy women aged 26 ± 0.6 years having a normal BMI without clinical and biochemical signs of hyperandrogenism. Immunoassay methods were used to determine the serum levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, free testosterone, 17-hydroxyprogesterone, and sex hormone-binding globulin. A glucose tolerance test was performed to determine glucose and insulin levels before and after load. Urine steroid profiles were studied by GC-MS with the optimization of the sample preparation schedule. Statistical data processing was performed using the STATISTICA for WINDOWS software system (version 10). The main quantitative characteristics of the patients are presented as the median (Me), the 25th percentile and the 75th percentile (Q_{25} - Q_{75}). To compare the results obtained in the study groups, the nonparametric Mann-Whitney test was used. The 95% confidence interval was considered statistically significant.

Results. The article presents a metabolomics analysis of androgens, glucocorticoid hormones and progestins in women with PCOS compared to the control group. It was revealed that non-obese patients with PCOS had increased urinary excretion of androstenedione metabolites, dehydroepiandrosterone and its metabolites, 17-hydroxypregnanolone, pregnantriol, and 5-ene-pregnenes, while obese patients with PCOS had increased that of androsterone and dehydroepiandrosterone metabolites (16-oxo-androstenediol and androstenediol-17 β) compared to the control group findings. Decreased ratios of cortisol and cortisone tetrahydro metabolite amount to the levels of 11-oxo-pregnanetriol, pregnanetriol and 17-hydroxypregnenolone, when compared to the control group, was obtained in non-obese patients with PCOS, which indicates 21-hydroxylase deficiency. In obese patients with PCOS, four signs of increased 5 α -reductase activity were obtained, and in PCOS patients with a normal BMI, three signs were obtained, which indicates varying 5 α -reductase activity in PCOS patients depending on the BMI.

Conclusion. Quantitative evaluation of androgen and progestin metabolites, as well as 5 α - and 5 β -metabolites of androstenedione and glucocorticoids in the study of urine steroid profiles by GC-MS method opens new opportunities for PCOS diagnostics.

▪ **Keywords:** gas chromatography-mass spectrometry; metabolomics; steroid hormones; polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; obesity.

绪论

多囊卵巢综合征 (PCOS) 的诊断和治疗问题与妇科内分泌有关。根据诊断标准, 10-20%的育龄妇女可观察到PCOS, 占各种形式高雄激素血症综合征的70-80%[1, 2]。多囊卵巢综合征的女性约占所有内分泌不孕患者的一半[3]。多囊卵巢综合征患者月经初潮的平均年龄与人群年龄(12-13岁)没有差异。这种疾病通常发生在生育早期。50%的女性月经紊乱发生在月经初潮期间, 表现为闭经、原发(极少)或继发闭经、功能失调性子宫出血[4, 5]。值得注意的是,

在一些多囊卵巢综合征患者中, 月经周期持续排卵, 并可能发生妊娠。70%至75%的妇女患有不孕症。R. Hartet等人(2015)的研究表明多囊卵巢综合征患者不孕的发生率是普通人群的10倍[6]。多囊卵巢综合征的妇女在生殖后期往往会发展为2型糖尿病、心血管疾病和子宫内膜增生[7, 8]。慢性无排卵和多囊卵巢综合征患者患子宫内膜癌的风险平均比健康女性高3倍[9]。多囊卵巢综合征是一种依赖于多种内源性和外源性因素的多因素疾病[10]。激素和代谢紊乱的程度, 以及疾病的临床表现, 取决于多囊卵巢综合征的表型。

目前,于2012年修订美国国家卫生研究院(NIH—National Institutes of Health)的标准、于2003年在鹿特丹批准的美国生殖医学会和欧洲人类生殖与胚胎学学会(ASRM/ESHRE—American Society of Reproductive Medicine and Embryology and European Society of Human Reproduction and Embryology)的标准、于2006年起雄激素过多和多囊卵巢综合征协会(AE-PCOS Society—Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society)的标准用于多囊卵巢综合征的诊断。多囊卵巢综合征的诊断是在下列三种症状中的两种情况下确定的:排卵过少或无排卵,临床或生化性高雄激素血症或两者合并,超声表现为多囊卵巢形态。根据2007年美国生殖医学会和欧洲人类生殖与胚胎学学会(ASRM/ESHRE)国际研讨会的数据,由于临床表现的异质性,多囊卵巢综合征可分为四种主要表型:A—经典型(高雄激素、无排卵、多囊卵巢)、B—无排卵(高雄激素、无排卵)、C—排卵(高雄激素、多囊卵巢)、D—新雄激素(多囊卵巢、无排卵)[11-13]。根据对育龄妇女PCOS表型患病率的研究,A型发生在44-65%的女性,B型—发生在8-33%,C型—发生在3-29%,D型—发生在23%[14,15]。A和B型与月经紊乱、胰岛素耐受性、肥胖、异常血脂症和代谢综合征风险增加相关。在E. M. Neves的研究中,71%的A型表型女性检测到代谢综合征,67.4%的B型表型女性检测到代谢综合征[16]。

肥胖在多囊卵巢综合征的发病机制中起着重要作用。22-65%的女性存在超重和肥胖,是代谢紊乱、糖耐量受损(IGT)、2型糖尿病和血脂异常的主要危险因素[17,18]。根据一些作者的研究,30-40%的多囊卵巢综合征女性会发生糖耐量受损,10%的患者—2型糖尿病[19]。目前,脂肪组织被认为是最重要的内分泌器官,

能够产生类固醇激素和各种生物活性物质。脂肪组织中含以下几种酶:芳香化酶的作用是将雄激素转化为雌激素;5 α -还原酶,将睾酮转化为更活跃的雄激素二氢睾酮。脂肪组织也产生许多羟化类固醇脱氢酶,如11 β -羟基类固醇脱氢酶1型(11 β -HSD1),它催化功能不活跃的的可的松转化为最活跃的糖皮质激素皮质醇,以及17 β -羟化类固醇脱氢酶(17 β -HSD),它能将雄烯二酮转化为睾酮,雌二醇转化为雌二醇。肥胖时,雌二醇与雌二醇的比例向雌二醇转变,这就破坏了正常的排卵所需的正反馈机制的功能。促黄体生成素对卵巢的刺激作用,使卵巢的膜细胞和间质细胞增生,增加雄激素的合成。促卵泡激素(FSH)水平相对较低有助于卵巢芳香化酶的减少,颗粒细胞失去了将雄激素芳香化为雌激素的能力,主要是将睾酮转化为雌二醇。这导致睾酮和雌二醇的积累不足,其高峰分泌是必要的排卵释放促黄体生成素(LH)和正常排卵[20]。

雌二醇周期分泌高峰的缺失导致无排卵。肥胖与高雄激素血症之间的关系是胰岛素抵抗和高胰岛素血症介导的。1921年,C. Achard和J. Thiers首次描述了碳水化合物代谢紊乱与高雄激素血症之间的关系,并出现了《大胡子女性糖尿病患者 Diabetes of Bearded Women》术语。G. A. Burgen等人发现多囊卵巢综合征的妇女既有基础高胰岛素血症又有葡萄糖刺激高胰岛素血症,提示存在胰岛素抵抗[21,22]。胰岛素对卵巢激素生成的影响既可通过自身受体实现,也可通过胰岛素样生长因子-1受体间接实现。胰岛素能刺激卵巢促黄体生成素依赖和肾上腺促肾上腺皮质激素依赖的细胞色素p450c17a活性[23]。胰岛素还可以抑制性类固醇结合球蛋白(SSBG)的产生,这会导致血液中游离雄激素水平的增加。根据一些作者的研究,无论是肥胖患者还是体重正常的

的女性，40%–70%的PCOS患者会出现胰岛素抵抗[24]。

对于各种类型的高雄激素血症综合征的诊断，传统的检测方法已经不够，需要新的高特异性、高敏感性的现代诊断方法。这对于PCOS与非经典型先天性肾上腺皮质功能障碍的鉴别诊断尤其重要。近年来，色谱法已被用于甾体激素代谢组学的研究。采用气相色谱-质谱分析（GC-MS analysis）对PCOS肥胖患者的尿液类固醇分析（USA—Urine steroid analysis）进行单次数据分析：妊娠尿量增加，脱氢表雄酮、雄烯二酮代谢物增多，糖皮质激素的 5α 和 5β 代谢物， 11β 羟类固醇脱氢酶1型活性的降低，导致无活性糖皮质激素的积累[25, 26]。Yuying Deng和Yifei Zhang检查了1044名PCOS的妇女，其中350名体重正常，312名超重，382名肥胖[27]。对比分析显示，正常体重的女性与超重、肥胖的女性相比，存在 21 -羟化酶功能不足的迹象，这证实了不同人群中卵巢和肾上腺发生的类固醇生成均发生了破坏。最近的研究显示 21 -羟化酶缺陷的诊断迹象，如尿中 17 -OH-孕烯醇酮（ $17P$ ）及其代谢物—孕三醇（ $P3$ ）的排泄量增加，以及 21 -脱氧皮质醇代谢产物的增加：PCOS和肥胖女性的四氢化- 21 -脱氧皮质醇（ 21 -deoxy-THF）和 11 - α -孕二醇（ 11 - α - $P3$ ）的增加[28]。

材料与方法

对53名育龄妇女进行了多囊卵巢综合征的检查。第一组包括30名妇女，年龄为22–29岁（平均年龄为 25 ± 0.4 岁），体重正常，体重指数（BMI）为 $22.5 \pm 0.7 \text{ kg/m}^2$ 。第二组包括23例肥胖患者，年龄为25–33岁（平均年龄为 28 ± 0.9 岁），BMI为 32.7 – 38.4 kg/m^2 （平均BMI为 35.3 ± 0.4 ）。对照组包括25例妇女，年龄为23–30岁（平均年龄为

$26 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$ ），体重指数为21–24 kg/m^2 （平均体重指数为 $22 \pm 0.8 \text{ kg/m}^2$ ），无高雄激素临床和实验室征象。多囊卵巢综合征的诊断是在下列三种症状中的两种情况下确定的：排卵过少或无排卵，临床或生化性高雄激素血症，超声表现为多囊卵巢形态。免疫法检测血清促黄体生成素、促卵泡激素、游离睾酮（F-TESTO）、 17 -羟孕酮（ 17 -OHP）、性类固醇结合球蛋白的水平。口服75 g葡萄糖，空腹及2小时后测定血清中葡萄糖及胰岛素（INS）水平。采用气相色谱-质谱分析对尿液类固醇分析进行了分析，并对样品制备规程进行了优化。选择了一种不同的液体萃取方法，确定了最佳的衍生剂（甲氧胺与三甲基硅咪唑）用量，并选择了色谱分析条件[41]。共鉴定出了69种类固醇。使用SHIMADZU GCMS-QP2020气相色谱质谱获得尿液类固醇。统计数据处理使用STATISTICA软件系统为WINDOWS（10版本）。患者的主要定量特征以中位数（Me）、第25百分位和第75百分位（ Q_{25} – Q_{75} ）的形式表示。为了比较研究组的结果，使用非参数Mann-Whitney U 检验。置信标准（ p ） < 0.05 被认为有统计学意义。

研究成果

与对照组比较，PCOS患者血清促黄体生成素、 17 -OHP和游离睾酮水平升高，血清中性激素结合球蛋白水平降低，促黄体生成素/促卵泡激素比值升高。值得注意的是，肥胖PCOS患者游离睾酮水平高于正常体重PCOS患者，而 17 -OHP和性类固醇结合球蛋白水平低于正常体重PCOS患者。体重正常和肥胖的PCOS患者血清促黄体生成素、促卵泡激素及促黄体生成素/促卵泡激素比值无显著性差异（ $p > 0.05$ ）。多囊卵巢综合征合并肥胖患者的空腹胰岛素（INS）水平和糖耐量试验后，与对

表1 / Table 1

采用免疫分析法测定正常体重肥胖多囊卵巢综合征患者血清激素含量

Serum hormone levels in normal weight and obese patients with polycystic ovary syndrome (data obtained using immunoassay)

指标	Me (Q_{25} - Q_{75})		
	对照组, <i>n</i> = 25	体重指数 <25 kg/m ² 的PCOS患者, <i>n</i> = 30	体重指数 <30 kg/m ² 的PCOS患者, <i>n</i> = 23
促黄体生成素, IU/L	5.6 (4.8-7.3)	9.0 (5.2-12.7) <i>p</i> = 0.004	9.7 (6.1-17.5) <i>p</i> = 0.009
促卵泡激素, IU/L	5.8 (3.6-6.4)	6.1 (4.6-7.1)	5.8 (5.4-7.0)
促黄体生成素/促卵泡激素的比例	1.1 (0.9-1.3)	1.4 (1.1-2.3) <i>p</i> = 0.02	1.7 (1.0-2.9) <i>p</i> = 0.04
17-羟孕酮, ng/ml	0.7 (0.4-0.8)	2.2 (1.9-3.3) <i>p</i> < 0.0001	1.2 (0.8-1.4) <i>p</i> = 0.003
游离睾酮, pg/ml	1.0 (0.7-2.0)	4.3 (2.8-8.0) <i>p</i> < 0.0001	7.2 (2.6-14.8) <i>p</i> < 0.0001
空腹胰岛素, IU/ml	5.5 (4.0-7.5)	5.1 (4.8-7.1)	15.5 (14.9-25) <i>p</i> = 0.0005
GTT后胰岛素, IU/ml	13.5 (9.9-15.0)	22.6 (17.6-32.5)	75.2 (72.3-146) <i>p</i> < 0.0001
性激素结合球蛋白, nmol/L	66 (50-86)	40 (31-64) <i>p</i> = 0.003	19 (14-23) <i>p</i> < 0.0001

注：*p*—多囊卵巢综合征（PCOS）患者各项指标与对照组（CG）比较的显著性差异；BMI—身体质量指数；GTT—葡萄糖耐量试验。

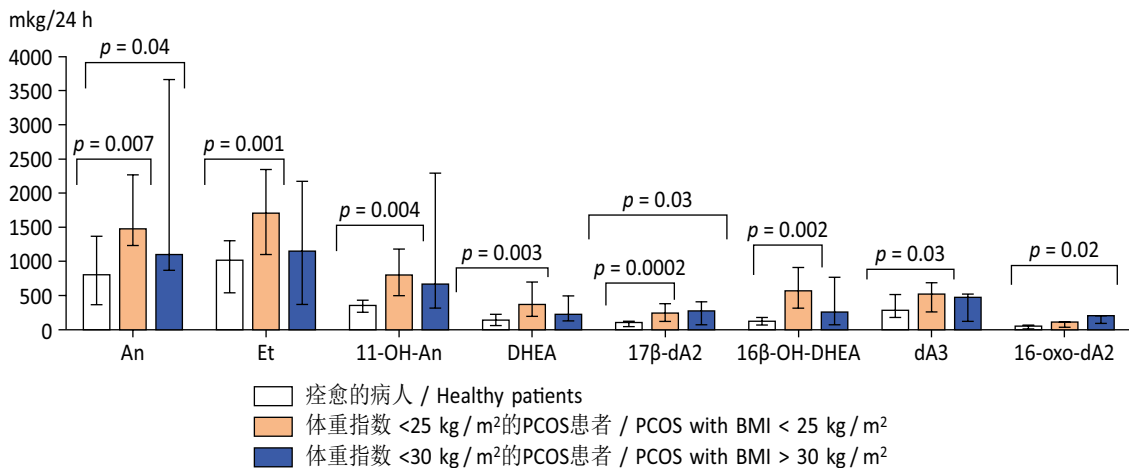


图1. 根据气相色谱-质谱分析体重正常、肥胖多囊卵巢综合征患者雄激素的尿排泄：PCOS—多囊卵巢综合征；BMI—身体质量指数；An—雄酮；Et—本胆烷醇酮；DHEA—脱氢表雄酮；dA2—雄烯二醇；dA3—雄烯三醇

Fig. 1. Urinary excretion of androgens in normal weight and obese patients with polycystic ovary syndrome (data obtained using gas chromatography-mass spectrometry). PCOS, polycystic ovary syndrome; BMI, body mass index; An, androsterone; Et, etiocholanolone; DHEA, dehydroepiandrosterone; dA2, androstenediol; dA3, androstetriol

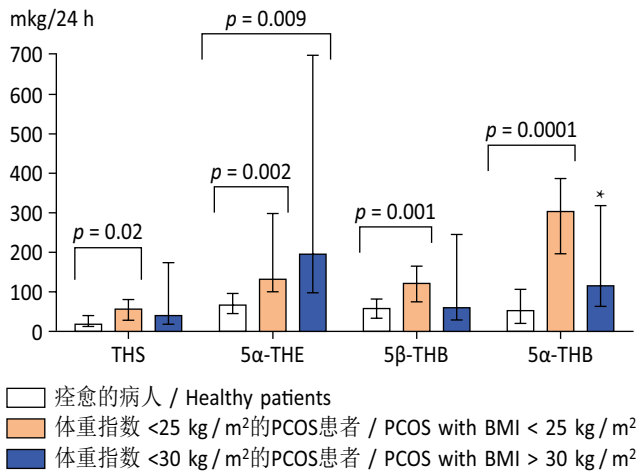


图2。 根据气相色谱-质谱分析体重正常、肥胖多囊卵巢综合征患者糖皮质激素四氢代谢物的尿排泄：PCOS—多囊卵巢综合征；BMI—身体质量指数；THS—四氢化-11-脱氧皮质醇；THE—四氢可的松；THB—四氢皮质酮

Fig. 2. Urinary excretion of glucocorticoid tetrahydro metabolites in normal weight and obese patients with polycystic ovary syndrome (data obtained using gas chromatography-mass spectrometry). PCOS, polycystic ovary syndrome; BMI, body mass index; THS, tetrahydro-11-deoxycortisol; THE, tetrahydrocortisone; THB, tetrahydrocorticosterone

表2 / Table 2

根据气相色谱-质谱分析，体重正常及肥胖的多囊卵巢综合征患者类固醇代谢紊乱

Impaired steroid metabolism in normal weight and obese patients with polycystic ovary syndrome (data obtained using gas chromatography-mass spectrometry)

产品—底物比例	Me (Q_{25} - Q_{75})		
	对照组, $n=25$	体重指数 <25 kg/m ² 的PCOS患者, $n=30$	体重指数 >30 kg/m ² 的PCOS患者, $n=23$
21-羟化酶活性的迹象			
(THE+THF+allo-THF)/P3	5.3 (3.6-7.4)	2.3 (1.3-2.9)***	4.7 (3.5-7.4)
(THE+THF+allo-THF)/11-oxo-P3	162 (129-203)	79 (39-204)*	306 (159-1190)
(THE+THF+allo-THF)/17P	29.6 (12.4-59.1)	10.9 (6.4-14.9)*	18.5 (14.7-37.5)
3β-羟化类固醇脱氢酶活性的迹象			
(THE+THF+allo-THF)/DHEA	17.7 (14.5-34.8)	4.9 (2.9-17.0)**	12.4 (5.6-27.9)
(THE+THF+5α-THF)/dP3	10.9 (8.5-13.1)	6.7 (5.1-8.8)*	11.8 (7.7-16.6)
11β-羟化类固醇脱氢酶活性的迹象			
(5β-THF+5α-THF+皮五醇)/ (5β-THE+5α-THE+皮固醇四醇)	0.51 (0.47-0.60)	0.47 (0.32-0.56)	0.44 (0.30-0.56)*
5β-THF/5β-THE	0.36 (0.34-0.45)	0.28 (0.23-0.35)**	0.29 (0.22-0.35)*
5α-还原酶活性的迹象			
An/Et	1.1 (0.7-1.3)	1.0 (0.7-1.3)	1.5 (1.4-2.4)**
11-OH-An/11-OH-Et	1.4 (1.2-1.5)	2.1 (1.3-3.3)*	4.5 (1.6-6.7)**
5α-THF/5β-THF	0.7 (0.5-1.0)	1.1 (0.9-1.6)**	1.3 (1.1-1.6)**
5α-THB/5β-THB	1.0 (0.7-1.5)	2.2 (1.6-3.3)**	1.8 (1.5-2.7)*

注：* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.0001$ —与对照组比较差异有统计学意义。THE—四氢可的松；THF—四氢可的索；THB—四氢皮质酮；P3—孕三醇；17P—17-羟基孕烯醇酮；DHEA—脱氢表雄酮；dP3—孕烷三醇；dP2—孕烷二醇；An—雄酮；Et—本胆烷醇酮；PCOS—多囊卵巢综合征；BMI—身体质量指数。

对照组和体重正常的多囊卵巢综合征患者的各项指标相比均有升高(表1)。性类固醇结合球蛋白与INS-1、INS-2水平呈负相关。

根据气相色谱-质谱分析的数据与对照组指标比较,正常体重的PCOS患者尿中脱氢表雄酮(DHEA)、DHEA-17β(da2-17β)、16β-OH-DHEA、雄烯二酮(da3)和雄烯二酮的代谢产物增加:雄酮(An),本胆烷醇酮(Et),11-OH-An(图1)。PCOS和肥胖患者尿An、dA2-17β和16-oxo-dA2较对照组升高。

在所有PCOS患者中,四氢可的松(THE)的排尿量增加(图2),四氢可的索(TNF)与TNE的比值降低(表2)。(THF+5α-THF+α-cortol+β-cortol)/(THE+5α-THE+α-cortolon+β-cortolon)比例仅有多囊卵巢综合征和肥胖患者中降低(表2)。获得的数据表明,11β羟类固醇脱氢酶1型活性降低,这导致无活性糖皮质激素的尿排泄增加。

体重正常的PCOS患者尿中17-OH-黄体酮代谢产物与对照组比较增加:17P、P3、

11-oxo-P3、5-ene-孕烷-dP2、16-OH-dP2、dP3(图3)。21-羟化酶活性与对照组数据比较有降低的迹象:(THF+5α-THF+THE)/P3,(THF+5α-THF+THE)/11-oxo-P3与(THF+5α-THF+THE)/17P。与肥胖PCOS患者相比,正常体重PCOS患者11-oxo-P3的尿排泄量较高,(THF+allo-THF+THE)/11-oxo-P3与(THF+allo-THF+THE)/P3的比值较低(表2)。(THF+5α-THF+THE)/DHEA和(THF+5α-THF+THE)/dP3比值的降低可能表明3β-羟化类固醇脱氢酶活性降低。多囊卵巢综合征和肥胖患者,这些指标与对照组无差(表2)。

PCOS患者的11-OH-An/11-OH-Et比值、5α-THB/5β-THB比值、5α-THF/5β-THF比值均较对照组升高,这提示5α-还原酶活性升高。PCOS伴肥胖患者的An/Et比对照组和PCOS伴体重正常的患者升高,说明PCOS合并肥胖患者5α-还原酶活性更高(表2)。PCOS伴肥胖患者中,12例(52.2%)出现轻度至中度多毛,5例(21.7%)—轻度至中度痤疮。PCOS伴体重正常患者中,9例(30%)—轻度多毛,8例(26.7%)—

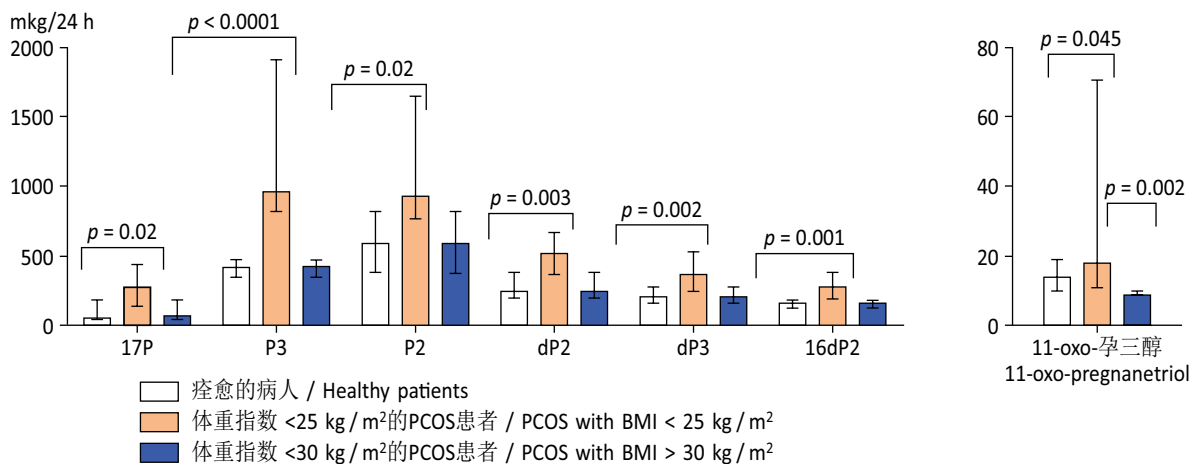


图3. 根据气相色谱-质谱分析,正常体重和肥胖多囊卵巢综合征患者17-羟孕酮和5-ene-孕烯代谢产物的尿排泄:PCOS—多囊卵巢综合征;BMI—身体质量指数;17P—17-羟基孕烯醇酮;P3—孕三醇;P2—孕二醇; dP2—孕烷二醇; dP3—孕烷三醇

Fig. 3. Urinary excretion of 17-hydroxyprogesterone metabolites and 5-ene-pregnenes in normal weight and obese patients with polycystic ovary syndrome (data obtained using gas chromatography-mass spectrometry). PCOS, polycystic ovary syndrome; BMI, body mass index; 17P, 17-hydroxypregnenolone; P3, pregnanetriol; P2, pregnanediol; dP2, pregnenediol; dP3, pregnenetriol

轻度痤疮。在PCOS和肥胖患者中，雄激素皮肤病变的征象更为明显，这证实了该组患者中酶5 α -还原酶活性更高。

讨论成果

多囊卵巢综合征是一种具有多因素病因的异质性疾病，以多种临床、内分泌和代谢紊乱为特征。它在女性高雄激素结构中占据主导地位，成为月经失调、慢性无排卵、不孕症的常见病因[29]。尽管卵巢是PCOS综合征中雄激素产生的主要来源，但20-30%的患者肾上腺雄激素水平升高，如脱氢表雄酮、硫酸脱氢表雄酮[30]。PCOS患者中超过半数的17-OHP水平升高，其是先天性肾上腺皮质功能障碍中肾上腺甾体形成受损的标志。研究发现，大量患有PCOS的妇女具有雄激素分泌过多的混合模式。通过气相色谱-质谱分析对尿液类固醇分析的研究结果，可以研究类固醇激素的代谢组学，并识别不同形式的PCOS中类固醇激素代谢的差异。

分析所得结果时，我们发现PCOS患者和正常体重患者尿中雄烯二酮、脱氢表雄酮、17-OHP、5-en-孕烷代谢物增多，并有21-羟化酶缺乏的迹象。肥胖PCOS患者尿中脱氢表雄酮代谢物和一个An代谢物的排泄量增加。

类固醇生成酶类中最重要的酶之一是3 β -羟化类固醇脱氢酶，它是将 Δ^5 -甾体（孕烯醇酮、17-羟基孕烯醇酮和脱氢表雄酮）转化为相应的 Δ^4 -甾体所必需的酶（孕酮，17-羟孕酮和雄烯二酮）。在我们的研究中，根据气相色谱-质谱分析的数据，对照组与PCOS患者体重正常的指标比较，尿中脱氢表雄酮和孕烷三醇的排泄量增加，皮质醇和可的松四氢衍生物与这些甾体激素的比值下降，说明3 β -羟化类固醇脱氢酶的缺乏。我们的数据与一些作者的数据一致[31]。

由于雄激素过多的影响，妇女可能会出现各种临床表现，如痤疮、多毛、脱发。酶5 α -还原酶将真皮和其他雄激素依赖组织中的睾酮转化为最活跃的雄激素—双氢睾酮，其负责雄激素皮肤病的表现。5 α -还原酶有两种亚型：5 α -还原酶第1型和第2型（SRD5A1, SRD5A2）。5 α -还原酶1型-在头皮、肝脏、卵巢、子宫、肾脏和大脑中表达，而5 α -还原酶-2型在肝脏中表达，在头皮和皮肤中表达程度较低[32]。由于女性5 α -还原酶1型高活性，在没有其他高雄激素血症表现的情况下，有明显的高雄激素源性皮肤病的迹象。对照组一至三岁女孩的调查结果与患有PCOS母亲所生的结果比较表明，后者的5 α -还原酶活性增加。这些数据证实了高雄激素症的遗传倾向，这可能会导致未来的PCOS发展[33]。

我们发现PCOS患者尿中5 α -代谢物及糖皮质激素和雄激素的5 β -代谢物比值均有5 α -还原酶活性升高的迹象，但不同组女性的5 α -还原酶活性程度不同。在PCOS和肥胖患者中，有四种迹象显示5 α -还原酶活性增加，而BMI正常的PCOS患者中—3种征象，表明PCOS患者的5 α -还原酶活性不同程度取决于BMI。PCOS和肥胖的女性雄激素皮肤病临床表现更为明显，表现为面部、背部和胸部多毛和痤疮。

肥胖被认为是PCOS的临床变型之一。内脏和皮下脂肪组织中均存在大量的类固醇生成酶。内脏脂肪组织主要含有11 β -羟基类固醇脱氢酶1型(11 β -HSD1)酶，它能催化无生物活性的可的松转化为最活跃的糖皮质激素—皮质醇。雄激素诱导的脂肪组织功能障碍是PCOS的重要特征。此前有研究发现PCOS和肥胖的女性尿中5 α -四氢可的松和皮固醇四醇的排泄量增加，并11 β HSD1的活性也有降低的迹象[34, 35]。在我们的研究中，在体重正常的患者中也获得了类似的数据，但PCOS患者伴肥胖有更多11 β HSD1活动减少的迹象。

5 α -还原酶活性升高或11 β HSD1活性降低均可增加皮质醇代谢, 导致促肾上腺皮质激素分泌代偿性增加, 刺激肾上腺甾体生成, 这也证实了PCOS妇女高雄激素血症的混合性。已知腹部内脏脂肪的发育程度与胰岛素抵抗的严重程度有直接关系。在我们的研究中, 肥胖患者诊断多囊卵巢综合征的最大信息价值被证明与空腹血清胰岛素的增加, 糖耐量受损, 性类固醇结合球蛋白水平降低有关。

使用气相色谱-质谱分析评估尿液类固醇谱, 为PCOS的各种表现的诊断和鉴别诊断开辟了新的可能性。

结论

1. 根据气相色谱-质谱分析的数据, 无肥胖的PCOS患者尿中雄烯二酮、脱氢表雄酮及其代谢产物、17-羟基孕烯醇酮、孕三醇和11-oxo-孕三醇、5-en-孕烷的排泄增加, 出现21-羟化酶和3 β -羟化类固醇脱氢酶功能不足, 这都表明高雄激素作用的混合成因, 而在PCOS和肥胖的女性中, 尿中代谢产物脱氢表雄酮和雄烯二酮的一种代谢产物的排泄增加。
2. 在PCOS和肥胖患者中记录了5 α -还原酶活性升高的4种体征, 在BMI正常的PCOS患者中记录了3种体征, 这表明PCOS患者的5 α -还原酶活性不同程度取决于BMI。
3. 不论体重指数如何, PCOS患者尿中5 α -四氢可的松和皮固醇四醇的排泄量增加, 以及11 β -羟基类固醇脱氢酶1型活性降低的迹象, 这表明功能性皮质醇增多症。

References

1. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(5):270-284. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.24>.

2. March WA, Moore VM, Willson KJ, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010;25(2):544-551. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep399>.
3. Манухин И.Б., Геворкян М.А., Кушлинский Н.Е. Синдром поликистозных яичников. – М.: МИА, 2004. – 190 с. [Manukhin IB, Gevorkyan MA, Kushlinskiy NE. Sindrom polikistoznykh yaichnikov. Moscow: MIA; 2004. 190 p. (In Russ.)]
4. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 2006;113(10):1148-1159. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.00990.x>.
5. Соболева Е.Л., Потин В.В., Тарасова М.А. Гирсутизм: пособие для врачей. – СПб., 2007. – 49 с. [Soboleva EL, PotinVV, Tarasova MA. Girsutism: posobie dlya vrachey. Saint Petersburg; 2007. 49 p. (In Russ.)]
6. Hart R, Doherty DA. The potential implications of a PCOS diagnosis on a woman's long-term health using data linkage. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(3):911-919. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3886>.
7. Trimble CL, Method M, Leita M, et al. Management of endometrial precancers. *Obstet Gynecol.* 2012;120(5):1160-1175. <https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31826bb121>.
8. Papadakis G, Kandaraki E, Papalou O, et al. Is cardiovascular risk in women with PCOS a real risk? Current insights. *Minerva Endocrinol.* 2017;42(4):340-355. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.17.02609-8>.
9. Haoula Z, Salman M, Atiomo W. Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1327-1331. <https://doi.org/10.1093/humrep/des042>.
10. Setji TL, Brown AJ. Polycystic ovary syndrome: Update on diagnosis and treatment. *Am J Med.* 2014;127(10):912-919. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.04.017>.
11. Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, et al. The polycystic ovary syndrome: An update on metabolic and hormonal mechanisms. *J Med Life.* 2015;8(2):142-145.
12. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81(1):19-25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.004>.
13. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril.* 2012;97(1):28-38. e25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024>.
14. Moran C, Arriaga M, Rodriguez G, Moran S. Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:317241. <https://doi.org/10.1155/2012/317241>.

15. Panidis D, Tziomalos K, Misichronis G, et al. Insulin resistance and endocrine characteristics of the different phenotypes of polycystic ovary syndrome: A prospective study. *Hum Reprod.* 2012;27(2):541-549. <https://doi.org/10.1093/humrep/der418>.
16. Neves EM, Fonseca AM, Bagnoli VR, et al. Polycystic ovary syndrome: Correlation between phenotypes and metabolic syndrome. *J Steroids Horm Sci.* 2014;5(2):132. <https://doi.org/10.4172/2157-7536.1000132>.
17. Goverde AJ, van Koert AJ, Eijkemans MJ, et al. Indicators for metabolic disturbances in anovulatory women with polycystic ovary syndrome diagnosed according to the Rotterdam consensus. *Hum Reprod.* 2009;24(3):710-717. <https://doi.org/10.1093/humrep/den433>.
18. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, et al. Erratum. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2019;34(2):388. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey363>.
19. Ehrmann DA. Metabolic dysfunction in PCOS: Relationship to obstructive sleep apnea. *Steroids.* 2012;77(4):290-294. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.12.001>.
20. Pasquali R, Casimirri F. The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin Endocrinol.* 1993;39(1):1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1993.tb01744.x>.
21. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50(1):113-116. <https://doi.org/10.1210/jcem-50-1-113>.
22. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0318>.
23. Qin KN, Rosenfield RL. Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145(1-2):111-121. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00177-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00177-4).
24. Bremer AA, Miller WL. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: A unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1039-1048. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.091>.
25. Ворохобина Н.В., Татарина М.В., Великанова Л.И., и др. Особенности метаболизма стероидных гормонов у женщин репродуктивного возраста с различными формами гиперандрогении // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2016. – Т. 8. – № 3. – С. 42–49. [Vorokhobina NV, Tatarinova MV, Velikanova LI, et al. Features of steroid hormone metabolism in fertile age females with various forms of hyperandrogenism. *Herald of the Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov.* 2016;8(3):42-49. (In Russ.)]
26. Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, et al. Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2295-2302. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2222>.
27. Yuying D, Yifei Z, Shengxian L, et al. Steroid hormone profiling in obese and non obese women with polycystic ovary syndrome. *Sci Rep.* 2017;7(1):14156. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14534-2>.
28. Матюшко М.В. Нарушения метаболизма стероидных гормонов у женщин репродуктивного возраста с ожирением и гиперандрогенией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2018. – 23 с. [Matyushko MV. Narusheniya metabolizma steroidnykh gormonov u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta s ozhireniem i giperandrogeniey. [dissertation] Saint Petersburg; 2018. 23 p. (In Russ.)]
29. Setji TL, Brown AJ. Polycystic ovary syndrome: Update on diagnosis and treatment. *Am J Med.* 2014;127(10):912-919. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.04.017>.
30. Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;145:213-225. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.06.003>.
31. Dhayat NA, Marti N, Kollmann Z, et al. Urinary steroid profiling in women hints at a diagnostic signature of the polycystic ovary syndrome: A pilot study considering neglected steroid metabolites. *PLoS One.* 2018;13(10):e0203903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203903>.
32. Fassnacht M, Schlenz N, Schneider SB, et al. Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2760-2766. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021875>.
33. Torchen LC, Idkowiak J, Fogel NR, et al. Evidence for Increased 5 α -reductase activity during early childhood in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(5):2069-2075. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3926>.
34. Dhayat NA, Marti N, Kollmann Z, et al. Urinary steroid profiling in women hints at a diagnostic signature of the polycystic ovary syndrome: A pilot study considering neglected steroid metabolites. *PLoS One.* 2018;13(10):e0203903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203903>.
35. Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, et al. Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2295-2302. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2222>.

■ 作者信息 (Information about the authors)

Natalya V. Vorokhobina — MD, PhD, DSci (Medicine), Professor, Head of the Department of Endocrinology named after academician V.G. Baranov. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-9574-105X>. SPIN-code: 4062-6409. **E-mail:** natalya.vorokhobina@szgmu.ru.

Lyudmila I. Velikanova — PhD, DSci (Biology), Professor, Head of the Research Laboratory of Chromatography. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-9352-4035>. **E-mail:** velikanova46@gmail.com.

Olga B. Glavnova — MD. The Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology named after D.O. Ott, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-6087-252X>.

E-mail: o.glavnova@mail.ru.

Ekaterina V. Malevanaya — PhD, Senior Researcher. The Research Laboratory of Chromatography. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-0880-0814>. **E-mail:** obedkovaev@gmail.com.

Ravilya K. Galakhova — MD, PhD, Associate Professor. The Department of Endocrinology named after academician V.G. Baranov. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-3599-3199>. SPIN-code: 1865-2310. RSCI Author ID: 882213. **E-mail:** rgalakhova@gmail.com.

Irina Yu. Matezius — MD, PhD, Associate Professor. The Department of Endocrinology named after academician V.G. Baranov. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-8694-9756>. SPIN-code: 7421-1610. RSCI Author ID: 755269. **E-mail:** imatezius@rambler.ru.