

益气养阴方对 cDDP 诱导卵巢颗粒细胞凋亡 线粒体途径的影响

洪艳丽, 谈勇*

(南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046)

[摘要] 目的:探讨益气养阴方对顺铂(cDDP)诱导的大鼠卵巢颗粒细胞(GC)凋亡线粒体途径的影响。方法:采用cDDP诱导建立GC细胞凋亡模型,用低、中、高剂量(10.5,21,31.5 g·kg⁻¹)益气养阴方含药血清干预,另设空白组,原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡率;激光共聚焦显微镜测定线粒体膜电位(MMP)和钙离子(Ca²⁺)荧光强度;逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测mRNA表达;蛋白质免疫印迹(Western blot)检测磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶(PI3K-Akt)表达。结果:与空白组比较,模型组GC凋亡率显著增加,MMP下降,Ca²⁺荧光强度升高,细胞死亡的B淋巴细胞瘤-2基因抑制剂(Bad),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Caspase-9 mRNA表达均显著上调,B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2) mRNA则显著下降;PI3K,p-Akt蛋白表达显著下调($P < 0.05$);中、高剂量组MMP显著升高,Ca²⁺浓度下降,Bad,Caspase-3,Caspase-9 mRNA表达下调,Bcl-2 mRNA表达上调;PI3K和p-Akt蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。结论:益气养阴方抑制cDDP诱导的GC凋亡,其作用机制可能与激活PI3K/Akt,上调抗凋亡因子Bcl-2,抑制下游促凋亡因子Bad,Caspase-9,Caspase-3等表达;稳定MMP,减少Ca²⁺内流等有关。

[关键词] 益气养阴方; 顺铂; 颗粒细胞; 线粒体凋亡途径

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0104-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016060104

Effect of Yiqi Yangyin Formula on Mitochondrial Apoptotic Pathway of Ovarian Granulosa Cells Induced by cDDP

HONG Yan-li, TAN Yong*

(The First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the mechanism of Yiqi Yangyin formula on mitochondrial pathway of granulosa cells apoptosis induced by cDDP. **Method:** Granulosa cells apoptosis model was induced by cDDP. Then drug-containing serum of different concentrations (10.5, 21, 31.5 g·kg⁻¹) were used to intervene in apoptosis. The blank group was also set up. The proliferation and apoptosis were analyzed by MTT assays and flowcytometry. GC apoptosis rate was detected with TUNEL staining. Calcium concentration and mitochondrial membrane potential were detected by confocal laser scanning microscope. The mRNA expressions of Bcl-2, Bad, Caspases-3 and Caspases-9 were detected by RT-PCR; protein levels of PI3K, Akt and p-Akt were detected by western blot, respectively. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed significant increase in GC apoptosis rate and Ca²⁺ fluorescence intensity and decrease in mitochondrial membrane potential (MMP). Besides, the mRNA expressions of Bad, Caspases-3, Caspases-9 were significantly higher in model group than those in control group ($P < 0.05$). Meanwhile, Bcl-2 mRNA expression, PI3K and p-Akt were significantly lower in model group ($P < 0.05$). In middle and high dose groups, calcium concentration, the mRNA expression of Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 were down-regulated significantly ($P < 0.05$), while the mitochondrial membrane

[收稿日期] 20150310(004)

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究面上项目(13KJB360004)

[第一作者] 洪艳丽,博士,讲师,从事内分泌及排卵障碍系疾病研究工作,Tel:025-85811147,E-mail:njutcmhongli@126.com

[通讯作者] *谈勇,博士,教授,从事生殖障碍系疾病研究工作,Tel:025-85811147,E-mail:xijun@126.com

potential, Bcl-2 mRNA expression, and the protein levels of PI3K and p-Akt were up-regulated significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yiqi Yangyin formula can inhibit GC apoptosis induced by cDDP by activating PI3K/Akt signal pathway, up-regulating anti-apoptosis factors (Bcl-2), down-regulating expressions of pro-apoptosis factors (Bad and caspases family), stabilizing the mitochondrial membrane potential and reducing calcium influx.

[**Key words**] Yiqi Yangyin formula; cis-diamine dichloroplatinum; granulosa cell; mitochondrial apoptotic pathway

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是一种多病因所致的卵巢内卵泡耗竭或被破坏而发生的卵巢功能过早衰竭。患者 40 岁之前即丧失生殖能力,生殖器官萎缩,长期低雌激素易导致骨质丢失、增加心血管疾病等风险,是一种较为严重的威胁生殖健康的疾病。近年来随着肿瘤患者生存率的提高,POF 的发病率亦呈上升趋势。顺铂 (cis-diamine dichloroplatinum, cDDP) 是临床常用的化疗药物,疗效肯定,但有明显的副作用,与其卵巢损害有直接关系^[1]。近年来国内外学者尝试运用促性腺激素释放激素类似物以及组织冷冻保存-自体移植等方法,试图在化疗同时保护女性的卵巢功能及其生殖能力,但目前作用机制尚未阐明且疗效并不理想,难以在临床推广运用^[2-3]。本实验旨在明确益气养阴方对 cDDP 诱导 POF 的预防作用与卵巢颗粒细胞 (granulosacell, GC) 线粒体凋亡途径的相关性,阐明其可能的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用 25 日龄 SPF 级 Wistar 雌鼠,体重 (110 ± 20) g,上海斯莱科动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物及试剂 益气养阴方 (由党参 10 g,白术 10 g,淮山药 10 g,山萸肉 10 g,白芍 10 g,当归 10 g,熟地黄 10 g,菟丝子 10 g,枸杞子 10 g,茺蔚子 10 g,炙甘草 5 g 等组成),由江苏省中医院提供,水煎并浓缩至生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。cDDP (南京制药厂有限公司,批号 H20030675),孕马血清促性腺激素 (PMSG 宁波激素制品厂,批号 110416),噻唑蓝 (MTT,南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20061134),原位末端标记试剂盒 (TUNEL,美国 Biovision 公司),逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司),逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 引物合成 (上海生工生物技术有限公司),罗丹明 123 (Rh123,美国 Sigma 公司);兔抗磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K),兔抗丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt),兔抗磷酸化-Akt (p-Akt) 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克

隆抗体 (美国 Sigma 公司),钙离子荧光探针 (FLUO3/AM,美国 Molecular Probes 公司)。

1.3 仪器 MCO-20AIC 型二氧化碳培养箱 (日本 Sanyo 公司),DMIL 型倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司),2500 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司),FACS calibur 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickson 公司),TCS SP5 型激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司),PowerPac Basic 型电泳仪 (美国伯乐公司),全自动数码成像及分析系统 (英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 含药血清及空白血清制备 按照“人与动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算,给药剂量根据临床等效剂量的 1/2,1 及 2 倍设立益气养阴方低、中、高 ($10.5, 21, 31.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。Wistar 雌鼠按数字表法随机分为空白组、低、中、高剂量组,每组 8 只。空白组用生理盐水灌胃 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,其余各组分别按低、中、高浓度灌服,连续给药 8 d。末次给药后 1 h 股动脉采血,室温下静置 4 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清, $0.22 \mu\text{m}$ 滤过膜滤菌,同组混匀, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴灭活,分装, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 GC 培养^[4]与分组 大鼠 ip G 50 U/只,48 h 后脱颈处死,75% 乙醇浸泡 2 min,取出双侧卵巢, PBS 清洗,去除包膜及脂肪组织,体视显微镜下用针头刺破卵泡,轻轻拍打与挤压,排出 GC,反复轻轻敲打使 GC 释放进入预冷的 DMEM 培养基中,200 目不锈钢细胞筛过滤, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, DMEM 培养基中重悬,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。将细胞悬液分为空白组 (加空白血清),模型组 (根据预实验结果,加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ cDDP 造模),低、中、高剂量组 (用 cDDP 造模后,再加入低、中、高浓度的含药血清)。

2.3 MTT 检测细胞增殖 取对数生长期 GC,调整密度为 1.0×10^4 个/mL,接种至 96 孔板, $200 \mu\text{L}$ /孔, CO_2 培养箱中培养 24 h,加入 MTT $20 \mu\text{L}$ /孔, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,弃上清,加入二甲基亚砜/DMSO $150 \mu\text{L}$ /孔,轻轻振荡 10 min, 570 nm 处酶标仪检测吸光

度 A。

2.4 TUNEL 检测细胞凋亡 取各组细胞爬片,4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次,加入 0.1% Triton-100,室温放置 15 min, PBS 浸泡 5 min,洗涤 3 次;3% H₂O₂-甲醇溶液处理 15 min, PBS 洗涤 3 次;加蛋白酶 K 100 μL,37 °C 孵育 30 min;加入 100 μL Streptavidin-FITC 标记工作液,37 °C 避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。

$$\text{计算凋亡指数 (AI)} = (\text{凋亡细胞数} \div \text{细胞总数}) \times 100\%$$

2.5 RT-PCR 检测 mRNA 提取各实验组总 mRNA,按照试剂盒说明在 20 μL 体系下完成逆转录。逆转录反应体系为 20 μL,42 °C 下扩增 60 min,95 °C 下变性 5 min,4 °C 保存。聚合酶链反应体系为 25 μL,95 °C 下预变性 5 min,94 °C 下变性 30 s,72 °C 下延伸 30 s;重复变性、退火、延伸 35 个循环;72 °C 下充分延伸 7 min,结束温度为 4 °C。取 8 μL 产物,120 V 下 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,扫描拍照,计算相对积分吸光度比值 = (测得的目的基因的积分吸光度 × 面积) / (GAPDH 的积分吸光度 × 面积),分析 B 淋巴细胞瘤-2 基因抑制剂 (Bad), B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2), 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), Caspase-9 的结果。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

基因名	引物序列	产物大小 /bp
Caspase-3	上游 5'-TTTTTCAGAGGGGATCGTTG-3'	296
	下游 5'-TCAAGCTTGTGGCATACTG-3'	
Caspase-9	上游 5'-CTAGTTTGCCACACCCATG-3'	172
	下游 5'-GCATTAGCGACCCTAAGCAG-3'	
Bcl-2	上游 5'-AGCCACCCAGGGTGATGCAA-3'	304
	下游 5'-GTGGAGGAGCTCTTCAAGGA-3'	
Bad	上游 5'-GAGTGAGCAGGAAGACTCCAGC-3'	341
	下游 5'-TCCACAACTCGTCACTCATCC-3'	
GAPDH	上游 5'-GTGGGCGCCCCAGGCAGGCACCA-3'	540
	下游 5'-CTCCTTAATGTCACGCAGGATTTTC-3'	

2.6 激光扫描共聚焦显微镜检测线粒体膜电位 (MMP) 与钙离子 (Ca²⁺) 荧光强度 收集各组 GC, D-PBS 洗涤 2 次,加入 Rh123 (终质量浓度 5 mg · L⁻¹),37 °C 孵育 1 h, D-PBS 洗涤 3 次,加入 D-PBS 0.5 mL,上机,激光共聚焦显微镜在 488 nm 处激

发,526 nm 处检测荧光强度,间隔 2 s 扫描 1 次,共扫描 16 次,记录并计算平均值,代表该细胞 MMP。预先用 DMSO 将 Fluo-3/AM 配成 1 mmol · L⁻¹ 原液,-20 °C 保存备用。F-127 用 DMSO 配成 20% 溶液备用。用无血清无酚红培养液将 Fluo-3/AM 稀释成终浓度为 10 μmol · L⁻¹,并加入 0.1% 的 Pluronic F-127 备用。吸弃各培养皿中的原培养液, PBS 冲洗 2 次,加入 10 μmol · L⁻¹ 染料液 1 mL,37 °C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL DMEM 后置于 20 倍光学显微镜下,选择 488 nm 氩离子激光,激光共聚焦显微镜扫描,计算机记录结果并分析。

2.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测蛋白表达

提取各组 GC 总蛋白质,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。40 μg 样品蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗孵育,4 °C 静置过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,孵育 2 h,充分洗涤,化学发光,显影,定影,蒸馏水冲洗终止。凝胶图像处理系统分析结果。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 GC 增殖及凋亡率的影响 cDDP 抑制 GC 增殖,与空白组比较,模型组 A 显著降低 ($P < 0.05$)。益气养阴方促进 GC 增殖,其促增殖效应呈现浓度依赖性。中、高剂量组较模型组 A 显著升高 ($P < 0.05$)。凋亡细胞为绿色,正常细胞为蓝色。TUNEL 结果显示,模型组 AI 显著高于空白组 ($P < 0.05$)。中、高剂量组能显著抑制 GC 凋亡,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 益气养阴方对 GC 增殖及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Yiqi Yangyin formula on proliferation and apoptosis rate in GC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	大鼠灌胃剂量 /g · kg ⁻¹	A	AI/%
空白	-	1.27 ± 0.03	10.29 ± 2.21
模型	-	0.48 ± 0.05 ¹⁾	30.05 ± 4.37 ¹⁾
益气养阴方	10.5	0.55 ± 0.03	27.93 ± 3.36
含药血清	21	0.91 ± 0.05 ²⁾	18.52 ± 3.64 ²⁾
	31.5	1.05 ± 0.04 ²⁾	13.59 ± 4.28 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3,图 2,3 同)。

3.2 对 GC 的 MMP 和 Ca²⁺ 荧光强度的影响 与空

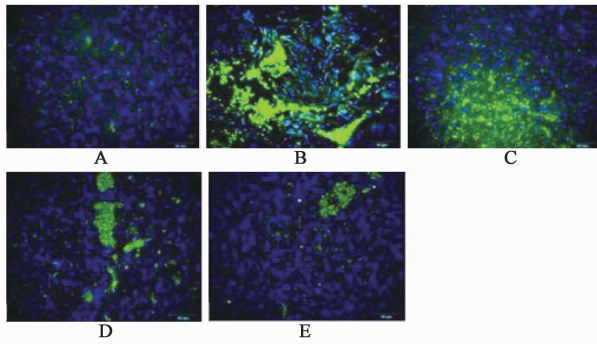


图 1 益气养阴方对 GC 凋亡的影响
A. 空白组; B. 模型组; C. 益气养阴方低剂量组; D. 益气养阴方中剂量组; E. 益气养阴方高剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 益气养阴方对 GC 凋亡的影响
Fig. 1 Effects of Yiqi Yangyin formula on apoptosis in GC

白组比较, 模型组 MMP 降低, Ca^{2+} 荧光强度升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 益气养阴方中、高剂量组 MMP 显著升高, Ca^{2+} 荧光强度则显著降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 益气养阴方对 GC 的 MMP 和 Ca^{2+} 荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Yiqi Yangyin formula on fluorescence intensity of MMP and Ca^{2+} in GC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	大鼠灌胃剂量 /g·kg ⁻¹	MMP	Ca ²⁺
空白	-	40.06 ± 6.08	4.39 ± 0.61
模型	-	16.01 ± 5.76 ¹⁾	10.46 ± 2.23 ¹⁾
益气养阴方	10.5	16.23 ± 5.95	7.99 ± 1.87
含药血清	21	26.89 ± 6.80 ²⁾	5.12 ± 1.04 ²⁾
	31.5	23.52 ± 6.17 ²⁾	5.05 ± 0.88 ²⁾

3.3 对 GC 的 Bcl-2, Bad, Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组 Bad, Caspase-3, Caspase-9 mRNA 均明显升高, Bcl-2 mRNA 则显著降低 ($P < 0.05$)。益气养阴方中、高剂量组 Bad, Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达较模型组显著降低, Bcl-2 mRNA 则显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.4 对 GC 的 PI3K, p-Akt 蛋白表达的影响 模型组 PI3K, p-Akt 表达降低, 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中、高剂量组 PI3K, p-Akt 表达均较模型组显著升高 ($P < 0.05$)。各组间总 Akt 表达无统计学差异。见图 3。

4 讨论

中医学认为“肾主生殖”、“肾藏精”, 天癸由肾中精气化生, 受后天水谷精微资助, 天癸的盛衰调控冲任的通盛, 决定月经的潮止, 生殖功能的盛衰。

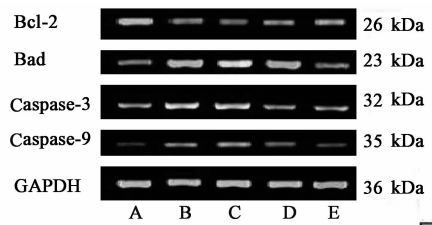


图 2 益气养阴方对 GC 的 Bcl-2, Bad, Caspase-3, Caspase-9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Effects of Yiqi Yangyin formula on Bcl-2, Bad, Caspase-3, Caspase-9 mRNA in GC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

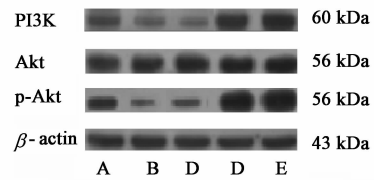


图 3 益气养阴方对 GC 的 PI3K, Akt, p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effects of Yiqi Yangyin formula on PI3K, Akt, p-Akt protein expression in GC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

POF 的产生是卵巢功能减退渐至衰竭的过程, 亦即肾中阴阳精血严重亏虚的病理状态, 故其主因为肾虚, 关乎肝脾, 最终导致生殖轴的功能过早衰竭^[5]。因此, POF 的治疗, 在填补肾精同时, 须加大健运脾胃, 以后天之力助先天之精发育成长。方中熟地黄、枸杞子、山萸肉滋补肝肾, 填精养血, 调补冲任; 菟丝子温肾填精, 于滋补肾阴药中配以补阳药, 旨在阳中求阴, 使“阴得阳升而泉源不竭”; 党参、白术、淮山药健脾益气; 当归、白芍养血调经, 调补冲任; 茺蔚子理气活血, 交通阴阳; 炙甘草补益、调和诸药。全方脾肾双补, 补肾填精, 健脾益气, 后天助先天。

研究认为先天性卵子数量减少,正常卵泡闭锁过程加速致使卵泡过早耗竭是发生 POF 的主要机制^[6]。细胞凋亡为卵泡闭锁的前提,它所累及的主要是颗粒细胞。大量研究证实^[7-8],化疗药物的细胞毒性对卵巢所产生的影响主要在于,卵泡发育停止,闭锁加速,cDDP 诱导的 GC 凋亡主要是细胞内途径(即线粒体依赖的凋亡途径)。目前文献证实^[9],线粒体可整合跨膜转位蛋白和钙流信号,使动态的微管网络发生聚合和分离,改变线粒体形态。凋亡刺激信号使线粒体外膜通透性增加,线粒体内促凋亡蛋白释放入胞质,启动 Caspases 级联反应,诱发细胞凋亡。因此线粒体外膜通透性的增加允许膜间隙蛋白释放是凋亡过程中的关键步骤。促凋亡蛋白 Bad 可促进线粒体膜通透性转换孔开放,诱导凋亡。Bcl-2 则通过稳定线粒体内外膜与离子通道或与凋亡蛋白,酶激活因子结合而抑制凋亡。Bcl-2 家族促进/抑制凋亡蛋白的平衡决定细胞的最终命运。钙超载可引起线粒体功能障碍及酶的激活,促进膜磷脂酶分解,产生脂肪酸、白三烯、溶血磷脂等,对细胞产生毒害作用。同时 Ca^{2+} 还可激活钙依赖蛋白酶,促使胞内许多重要酶降解,同时也促进细胞骨架成分的降解,细胞塌陷,从而诱导细胞发生凋亡。

PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要的信号传导通路,在细胞增殖、凋亡等方面发挥重要生物学功能。研究证实,AKT 能磷酸化 Bad,抑制其构象改变和线粒体膜转位,下调细胞色素 C 释放,抑制凋亡;解离 Bcl-2,进而发挥抗凋亡作用。近年文献报道^[10],AKT 还可直接磷酸化 Caspase-9,灭活 Caspase-3,抑制 Caspases 级联反应。

本实验结果显示,益气养阴方能抑制 cDDP 所诱导的 GC 凋亡,主要通过以下途径:①抑制线粒体转化孔开放,稳定 MMP,减少 Ca^{2+} 内流;②激活 PI3K/AKT 通路,一方面抑制 Bad 蛋白活化,抑制线粒体转化孔的开放,并上调抗凋亡因子 Bcl-2 表达;另一方面下调 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达,抑制

Caspases 级联反应。综上所述,中药为 POF 患者的治疗提供了新思路、新方法,具有临床实际价值与意义,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Chatterjee R, Helal M, Mobberley M, et al. Impaired steroidogenesis and apoptosis of granulosa-luteal cells in primary culture induced by cisplatinum[J]. Am J Obstet Gynecol,2014,210(3):252-257.
- [2] Meirou D, Assad G, Dor J, et al. The GnRH antagonist Cetrorelix reduce cyclophamide-induced ovarian follicular destruction in mice [J]. Hum Report, 2014, 19 (6): 1294-1299.
- [3] 肖娟,邹静,屠迪,等. 大鼠卵巢颗粒细胞的分离培养与鉴定[J]. 中国老年保健医学杂志,2012,10(1): 8-11.
- [4] 杨涓,高慧,夏天,等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵泡发育的影响[J]. 中医杂志,2011,52(7):592-595.
- [5] 刘鹏,李向臣,姚雅馨,等. 卵巢颗粒细胞凋亡的调控因素[J]. 现代生物医学进展,2009,9(13):2562-2564.
- [6] Morgan S, Lopes F, Gourley C, et al. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin[J]. PLoS One,2013,8(7):e70117.
- [7] Yucebilgin M S, Terek M C, Ozsaran A, et al. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure infertility[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol,2004,44(1):6-9.
- [8] 罗娇,张小雨,王钰莹,等. 不同剂量顺铂诱导小鼠卵巢功能早衰程度的差异[J]. 遵义医学院学报,2013, 36(1):1-4.
- [9] Choi H, Park H H, Koh S H, et al. Conezyme Q10 protects against amyloid beta-induced neuronal cell death by inhibiting oxidative stress and activating the PI3K pathway [J]. Neurotoxicology,2012,33(1):85-90.

[责任编辑 周冰冰]