

补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平和 卵巢 Bcl-2/Bax 表达的影响

梁策¹, 高慧^{2*}, 张腾¹

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:**观察补肾调冲方对雷公藤多苷片所致卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)雌性大鼠卵巢性激素水平和卵巢中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2), 促进凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)蛋白及 mRNA 表达的影响, 探讨补肾调冲方的预防作用。**方法:**SD 雌性大鼠 42 只, 随机分为正常组, 模型组, 结合雌激素组, 补肾调冲方预防高、中、低剂量组。运用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中雌二醇(estradiol, E₂), 卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH), 黄体生成素(luteinizing hormone, LH), 孕酮(progesterone, P)水平。蛋白质免疫印迹(Western blot)法和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测卵巢组织中 Bcl-2, Bax 蛋白和 mRNA 的表达水平。**结果:**与正常组比较, 模型组大鼠 FSH, LH 含量明显升高, E₂ 的含量明显降低, 卵巢组织中 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达明显降低, Bax 蛋白及 mRNA 的表达明显升高($P < 0.01$); 补肾调冲方各给药组和结合雌激素组 E₂ 的含量均高于模型组($P < 0.01$), 其中补肾调冲方低、中、高剂量和结合雌激素组 E₂ 含量与正常组比较, 差异无统计学意义。补肾调冲方各给药组和结合雌激素组 FSH, LH 的含量均低于模型组($P < 0.01$); 低、中、高剂量组和结合雌激素组 FSH, LH 含量与正常组比较, 差异无统计学意义。各组与正常组 P 含量比较差异无统计学意义。补肾调冲方预防低、中、高剂量组和结合雌激素组 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达明显高于模型组($P < 0.01$); Bax 蛋白及 mRNA 的表达明显低于模型组($P < 0.01$)。**结论:**补肾调冲方对卵巢具有一定的保护作用, 可以预防卵巢早衰的发生。其作用机制可能与补肾调冲方中某些中药能够调节卵巢性激素水平, 维持 Bcl-2, Bax 的平衡, 降低卵泡闭锁的速度, 抑制卵泡的过度凋亡, 改善卵巢的功能。

[关键词] 补肾调冲方; 卵巢早衰; 性激素; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0100-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190100

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1058.042.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:58

Effects of Bushen Tiaochong Prescription on Expression of Sex Hormone and Bcl-2/Bax in Ovaries of Rats with Premature Ovarian Failure

LIANG Ce¹, GAO Hui^{2*}, ZHANG Teng¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;

2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Bushen Tiaochong prescription on protein and mRNA expression levels of sex hormone, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in ovaries of rats with premature ovarian failure (POF) induced by tripterygium wilfordii (GTW), and explore the prevention effect of Bushen Tiaochong prescription. **Method:** Forty-two healthy female SD rats were randomly divided into

[收稿日期] 20151021(007)

[基金项目] 河北省省级重大医学科研项目(zyzd2013018);河北省临床医学优秀人才培养项目(2014571024);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(2015048157)

[第一作者] 梁策, 硕士, 从事中医妇科方向研究, Tel: 15613525912, E-mail: 934492432@qq.com

[通讯作者] * 高慧, 博士, 硕士生导师, 从事中医妇科方向研究, Tel: 15633142620, E-mail: gaohuihbcd@163.com

normal group, model group, estrogen group, Bushen Tiaocong prescription low, middle and high dose groups. 17-estradiol (E_2), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and progesterone (P) levels in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expression levels of Bcl-2 and Bax protein and mRNA in rats ovarian were detected by Western blot and RT-PCR methods. **Result:** As compared with the normal group, FSH and LH contents were significantly increased in model group rats; E_2 contents were significantly decreased; Bcl-2 protein and mRNA expression levels in ovarian were significantly decreased; while Bax protein and mRNA expression levels were significantly increased ($P < 0.01$). E_2 content in Bushen Tiaocong prescription groups and estrogen group was higher than that in model group ($P < 0.01$), but middle, high dose groups and estrogen group had no statistically significant differences in E_2 as compared with the normal group. The FSH and LH contents in Bushen Tiaocong prescription groups and estrogen group were lower than those in model group ($P < 0.01$), and there were no statistically significant differences as compared with normal group. All dose groups had no significant difference with normal group in P content. Bcl-2 protein and mRNA expression levels in middle and high dose Bushen Tiaocong prescription groups and estrogen group were significantly higher than those in model group ($P < 0.01$); Bax protein and mRNA expression levels were significantly lower than those in model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** It is indicated that Bushen Tiaocong prescription has some protective effects for ovaries and prevents POF. It can regulate sex hormone level, maintain Bcl-2 and Bax balance to decrease follicles atresia and death speed, and improve ovarian function.

[**Key words**] Bushen Tiaocong prescription; premature ovarian failure; sex hormone; B-cell lymphoma-2; Bcl-2 associated X protein

卵巢早衰(POF)指女性在 40 岁以前自然绝经,以闭经、不孕、雌激素缺乏,以及促性腺激素水平升高为主要特征的一种疾病^[1]。伴有潮热汗出、失眠、心烦抑郁等症状,严重者可出现性欲减退、生殖器官萎缩等,严重影响了女性身体和心理的健康。因其病因复杂,发病率呈现逐年上升趋势,越来越受到医学界的重视。目前,西医治疗以激素替代疗法为主,疗效显著。但长期使用可导致女性出现心脏病、血栓栓塞、乳腺癌和子宫内膜癌等并发症^[2]。而中药治疗卵巢早衰具有良好的疗效。补肾中药具有激素样作用,能提高卵巢对促性腺激素的反应性和卵巢中性激素受体的含量,从而改善生殖轴功能,促进卵泡子宫发育,使子宫、卵巢质量增加^[3]。研究表明,卵巢早衰的发病机制是由于卵母细胞过快耗竭所致,卵母细胞的活化及持续生长发育依赖于其周围的颗粒细胞的营养及旁分泌作用。B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)参与卵巢颗粒细胞的凋亡过程,影响卵母细胞的存活^[4]。中药补肾调冲方是导师高慧根据中医理论治疗卵巢功能性疾病所创立的自拟方,方中以补肾药和调理冲任药为主,具有补而不滞、滋而不腻、活血而不动血的特点^[5]。实验研究表明,中药补肾调冲方可促使雷公藤致 POF 大鼠卵巢颗粒细胞形态和功能恢复正常,升高雌二醇(E_2),促进各级卵泡

发育;减少卵泡闭锁的发生,减缓卵巢衰竭的速度,阻断不良因素对卵巢的损害^[5]。

本课题通过检测大鼠性激素水平的变化以及凋亡因子 Bcl-2, Bax 在卵巢颗粒细胞中的表达,观察中药补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢 Bcl-2, Bax 表达的影响,探讨其预防卵巢早衰的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雌性 SD 大鼠,12 周龄,体重 250 ~ 270 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2014-0004。自由饮水,室温 25 ℃ 左右,湿度 60% ~ 70%,自然光照,通风良好。纳入标准:购入动物后适应性喂养 7 d,连续 10 d 行阴道涂片检查,选取动情周期正常者为受试动物。

1.2 药物及试剂 雷公藤多苷片(远大医药黄石飞云制药有限公司,批号 20140301),结合雌激素片(新疆新资源生物制药有限责任公司,批号 20130905),补肾调冲方:中药饮片均由承德医学院附属医院药剂科提供,全方由菟丝子 15 g,黄精 15 g,熟地黄 15 g,肉苁蓉 10 g,巴戟天 10 g,当归 10 g,川芎 6 g,紫石英 15 g,五味子 6 g 组成。水煎并浓缩,生物质量浓度相当于 $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,4 ℃ 冰箱中储存备用。兔抗 Bcl-2 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab136285),兔抗 Bax 单克隆抗体(美国 CST 公司,批号 #14796),兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆

抗体(美国 Bioworld Technology 公司,批号 I102), BCA 测定试剂盒(增强型,碧云天生物技术研究,批号 P0010), Bcl-2 和 Bax 引物(美国 Invitrogen 公司,批号 HB1503108098), 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 KR140818);大鼠 E₂, 卵泡刺激素(FSH), 黄体生成素(LH)及孕酮(P)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海联科生物技术有限公司,批号 20150316)。

1.3 仪器 ZF 型紫外透射反射分析仪(上海嘉鹏科技有限公司), iCycler 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂), Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Electron 公司), DU800 型紫外-可见分光光度计(美国 Ckman Coulte 公司), SORVALL Biofuge fresco 型冷冻离心机(德国 Kendro Labrotary 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 SD 雌性大鼠,随机分为正常组、模型组、结合雌激素组、补肾调冲方预防高、中、低剂量组,每组 7 只。正常组正常喂养。模型组用雷公藤多苷片 75 mg·kg⁻¹ ig,每日 1 次,连续造模 14 d,造模后生理盐水 2 mL·kg⁻¹ ig,每日 1 次。根据补肾调冲方临床常用剂量以及每公斤体重用药量的人鼠比例换算^[6-7],预防组高、中、低剂量组于造模前分别以 24, 12, 6 g·kg⁻¹ ig,每日 1 次,共 36 d。之后雷公藤多苷片 75 mg·kg⁻¹ ig,每日 1 次,连续造模 14 d。结合雌激素组以 0.075 mg·kg⁻¹ ig,每日 1 次。方法同预防组。

2.2 ELISA 法定性激素水平 大鼠血清性激素(E₂, FSH, LH, P)检测,按照 ELISA 试剂盒说明书操

作进行。

2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测大鼠卵巢组织中 Bcl-2, Bax 的蛋白表达 取卵巢组织 100 mg 冰上解冻匀浆提取蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,确定蛋白上样量为 80 μg。12% 分离胶和 5% 浓缩胶配成胶板进行电泳,150 mA 稳流转膜 2 h。5% 脱脂奶粉封闭过夜,一抗(Bcl-2 1:5 000, Bax 1:1 000, β-actin 1:3 000)室温孵育 2 h,加入二抗(1:2 000)2 h 后 Super Ecl Plus 超敏发光液显影,X 胶片曝光扫描,采用 Quantity One 凝胶分析软件进行处理,测定各组蛋白条带的积分吸光度 A,以目的条带和 β-actin 条带的 IA 比值作为蛋白的表达水平。

2.4 RT-PCR 法检测大鼠卵巢组织中 Bcl-2, Bax mRNA 表达 取大鼠新鲜的卵巢组 100 mg,采用 Trizol 一步法提取总 RNA。紫外-分光光度计测定总 RNA 纯度,以吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 为基础,介于 1.9 ~ 2.1,纯度良好。并计算 RNA 浓度。取总 RNA 模板量 2 μg 进行反转录成 cDNA,反应体系为 20 μL,反应条件为 42 °C,孵育 3 min;加入反转录反应中的 Mix,42 °C,孵育 15 min;95 °C 孵育 3 min 后低温保存备用。PCR 扩增反应体系为 94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s;各引物不同的退火温度见表 1,退火时间 30 s,72 °C 延伸 1 min,10 °C 保存。94 °C 变性开始循环,共 30 次。取 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,UVP 分析系统拍照,用 Quantity One 软件定量分析,以目的条带和 β-actin 条带的 A 比值作为 mRNA 的表达水平。

表 1 不同目的基因的引物序列、退火温度、产物大小

Table 1 Different purpose genes of primers sequences, annealing temperature, products size

基因	引物序列	产物大小/bp	退火温度/°C
Bcl-2	上游 5'-TGGGATGCTTTGTGGAACATAT-3'	328	57
	下游 5'-GCTGATTGACCATTTGCCTGA-3'		
Bax	上游 5'-GAGCGAGTGTCTCCGGCGAATT-3'	357	56
	下游 5'-GCCACAAAGATGGTCACTGTCTG-3'		
β-actin	上游 5'-TTCCTGGGTATGGAATCCTG-3'	150	56
	下游 5'-CTTCTGCATCTGTACAGAA-3'		

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清性激素(E₂, FSH, LH, P)水平表达

的影响 与正常组比较,模型组大鼠 E₂ 含量明显降低,FSH, LH 的含量明显升高(P < 0.01);与模型组比较,补肾调冲方各给药组和结合雌激素组 E₂ 的含量均显著升高,FSH, LH 的含量明显降低(P < 0.01)。各组 P 含量比较差异无统计学意义。见表 2。

3.2 对大鼠卵巢 Bcl-2, Bax 蛋白和 mRNA 表达的

表 2 补肾调冲方对大鼠血清 E₂, FSH, LH, P 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effects of Bushen Tiaochong prescription on levels of E₂, FSH, LH, P in rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/ng·L ⁻¹	P/pmole·L ⁻¹
正常	-	98.97 ± 7.57	16.29 ± 2.63	18.69 ± 2.86	158.48 ± 3.43
模型	-	51.59 ± 7.49 ²⁾	30.61 ± 1.56 ²⁾	48.35 ± 3.10 ²⁾	154.34 ± 2.86
补肾调冲方	6	88.00 ± 3.00 ¹⁾	19.91 ± 0.83 ¹⁾	24.10 ± 1.73 ¹⁾	155.32 ± 3.22
	12	91.12 ± 6.64 ¹⁾	17.65 ± 1.25 ¹⁾	22.34 ± 1.76 ¹⁾	155.37 ± 3.47
	24	95.23 ± 4.39 ¹⁾	17.71 ± 1.71 ¹⁾	20.57 ± 2.43 ¹⁾	154.31 ± 3.29
结合雌激素	7.5 × 10 ⁻⁵	92.91 ± 5.30 ¹⁾	18.51 ± 0.90 ¹⁾	21.11 ± 1.90 ¹⁾	156.12 ± 2.98

注:与模型组比较¹⁾P < 0.01;与正常组比较²⁾P < 0.01(表 3,4 同)。

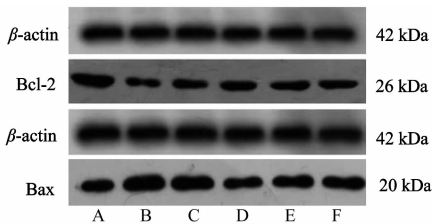
影响 模型组大鼠卵巢中 Bcl-2 蛋白和 mRNA 的表达显著低于正常组,模型组大鼠卵巢中 Bax 蛋白和 mRNA 的表达显著高于正常组 (P < 0.01);与模

型组比较,补肾调冲方各给药组和结合雌激素组显著升高 Bcl-2 蛋白和 mRNA 的表达,显著降低 Bax 蛋白和 mRNA 的表达 (P < 0.01)。见表 3,图 1,2。

表 3 补肾调冲方对各组大鼠 Bcl-2, Bax 蛋白和 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effects of Bushen Tiaochong prescription on levels of Bcl-2, Bax protein and mRNA in rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2		Bax	
		蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
正常	-	1.43 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.86 ± 0.09
模型	-	0.76 ± 0.01 ²⁾	0.19 ± 0.01 ²⁾	1.29 ± 0.01 ²⁾	1.75 ± 0.13 ²⁾
补肾调冲方	6	1.42 ± 0.01 ¹⁾	0.32 ± 0.02 ¹⁾	0.81 ± 0.01 ¹⁾	1.02 ± 0.06 ¹⁾
	12	1.43 ± 0.01 ¹⁾	0.32 ± 0.01 ¹⁾	0.80 ± 0.00 ¹⁾	1.00 ± 0.06 ¹⁾
	24	1.43 ± 0.01 ¹⁾	0.32 ± 0.01 ¹⁾	0.79 ± 0.01 ¹⁾	0.98 ± 0.07 ¹⁾
结合雌激素	7.5 × 10 ⁻⁵	1.42 ± 0.25 ¹⁾	0.32 ± 0.01 ¹⁾	0.80 ± 0.01 ¹⁾	0.98 ± 0.09 ¹⁾



A. 正常组;B. 模型组;C. 补肾调冲方 6 g·kg⁻¹组;D. 补肾调冲方 12 g·kg⁻¹组;E. 补肾调冲方 24 g·kg⁻¹组;F. 结合雌激素组(图 2 同)

图 1 各组大鼠卵巢 Bcl-2, Bax 蛋白的表达

Fig. 1 Levels of Bcl-2, Bax protein of each rats

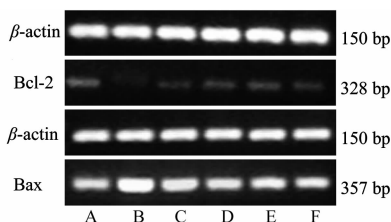


图 2 各组大鼠卵巢 Bcl-2, Bax mRNA 的表达

Fig. 2 Levels of Bcl-2, Bax mRNA of each rats

3.3 对大鼠卵巢 Bcl-2, Bax 蛋白和 mRNA 比值表达的影响 模型组大鼠卵巢中 Bcl-2/Bax 蛋白和 mRNA 的表达显著低于正常组 (P < 0.01)。补肾调冲方各剂量组和结合雌激素组 Bcl-2/Bax 蛋白和

mRNA 的表达极显著高于模型组 (P < 0.01)。见表 4。

表 4 补肾调冲方对各组大鼠 Bcl-2, Bax 蛋白和 mRNA 比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Effects of Bushen Tiaochong prescription on levels of Bcl-2, Bax protein and mRNA ratio in rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2/Bax 蛋白	Bcl-2/Bax mRNA
正常	-	1.815 ± 0.026 ¹⁾	0.372 ± 0.025 ¹⁾
模型	-	0.597 ± 0.021	0.127 ± 0.042
补肾调冲方	6	1.765 ± 0.018 ¹⁾²⁾	0.310 ± 0.021 ¹⁾²⁾
	12	1.797 ± 0.012 ¹⁾	0.323 ± 0.018 ¹⁾
	24	1.802 ± 0.022 ¹⁾	0.333 ± 0.033 ¹⁾
结合雌激素	7.5 × 10 ⁻⁵	1.787 ± 0.021 ¹⁾	0.329 ± 0.037 ¹⁾

4 讨论

关于卵巢早衰,中医无此病名,其相关描述见于“月经过少”、“闭经”、“不孕”等范畴中。其病因病机复杂,历代医家多将本病的发病责之于肾。肾藏精、主生殖,肾中精气的盛衰,与“肾-天癸-冲任-胞宫生殖轴”的功能相关。因此,肾虚肾精亏虚是本病的致病之本^[8]。以补肾养血调经为主要治疗原则,补先天之本不足,养后天之源亏虚,生殖轴功能健旺和调,月事得以时下。

高慧教授根据 POF 中医病因病机和治疗原则,

并根据韩冰教授处方设立补肾调冲方,以补肾填精中药熟地黄、肉苁蓉、巴戟天、黄精、菟丝子和补血活血、调理冲任中药当归、川芎、紫石英、五味子组成。补肾生精,活血调经,使肾气盛而天癸至,故月事以时下而有子。

FSH 与 LH 为促性腺激素,由垂体前叶分泌,二者协同作用,促进卵泡发育成熟,并调节体内 E_2 的分泌^[9]。基础 FSH, LH 水平是反映卵巢储备力的间接指标,FSH, LH 水平升高与卵巢储备力降低有关。 E_2 是在 FSH 的作用下,由窦状卵泡产生,随着卵泡库存的减少, E_2 水平逐渐降低,从而导致 FSH 的升高,因此可作为监测卵巢储备力的直接指标^[10]。

细胞凋亡是最常见的一种细胞程序性死亡。它是生物体自我清除“无用”细胞的主动生命现象^[11]。Bcl-2 和 Bax 是近年研究发现在细胞凋亡的调控中的重要角色^[12],对鼠类卵巢颗粒细胞凋亡起决定性作用^[13]。二者通过形成同源或异源二聚体来调节细胞的凋亡。当 Bax 表达量增多时,同源二聚体增多,引起细胞线粒体通透性增加,加速细胞凋亡^[14]。反之 Bcl-2 表达量增多时,形成的异源二聚体增多,抑制细胞凋亡^[15]。

本实验研究发现,补肾调冲方各给药组和结合雌激素组 E_2 的含量高于模型组;FSH, LH 的含量低于模型组。补肾调冲方中、高剂量组和结合雌激素组 E_2 , FSH, LH 含量与正常组比较,差异均无统计学意义。造模前给予补肾调冲方对大鼠卵巢组织中 Bcl-2, Bax 均产生一定的影响。补肾调冲方各剂量组 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达显著高于模型组;Bax 蛋白和 mRNA 表达显著低于模型组。补肾调冲方中、高剂量组 Bcl-2 蛋白和 mRNA 的表达与正常组比较,差异无统计学意义;补肾调冲方中、高剂量组 Bax 蛋白和 mRNA 的表达比较差异无统计学意义。补肾调冲方各剂量组和结合雌激素组 Bcl-2/Bax 蛋白和 mRNA 的表达极显著高于模型组。中、高剂量组和结合雌激素组 Bcl-2/Bax 蛋白和 mRNA 的表达与正常组比较,差异无统计学意义。由上述实验结果可知,补肾调冲方能够调节卵巢性激素水平,上调 Bcl-2/Bax,尤其以高、中剂量效果最明显,可以维持卵巢中 Bcl-2, Bax 含量表达的平衡,抑制卵泡的过早凋亡,可能是其能够预防卵巢早衰发生的机制之一。研究表明,中药可能在卵巢早衰早期的作用更为明显,可降调卵巢早老化患者的激素水平,其作用较激素人工周期疗法效果更优^[16]。因此,补肾调冲

方具有能够预防 POF 的作用。接下来需要进一步结合临床治疗效果,完善 POF 的发病机制,为更有效的防治 POF 提供理论和临床依据。

[参考文献]

- [1] 高慧,杨涓,夏天,等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平和卵巢组织形态学的影响[J]. 国医论坛, 2008, 23(1): 35-39.
- [2] Leite-Silva P, Bedone A, Pinto-Neto A M, et al. Factors associated with bone density in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure [J]. Arch Gynecol Obstet, 2009, 2809(3): 177-181.
- [3] 龚晓,郑锦. 中医药防治卵巢早衰研究现状[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(12): 86.
- [4] 王雪峰,何援利. 凋亡调节基因 bcl-2/bax 与卵巢早衰的关系[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(8): 487-489.
- [5] 高慧,杨涓,夏天,等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢相关细胞因子 TNF- α , IFN- γ 蛋白和基因表达的影响[J]. 国医论坛, 2008, 23(3): 32-39.
- [6] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 145.
- [7] Meirou D, Lewis H, Nugent D, et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool [J]. Hum Reprod, 1999, 14(7): 1903-1907.
- [8] 陈颖异,蔡宇萍. 中医治疗卵巢早衰的思路与方法[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(6): 526-527.
- [9] 孙夕平. 四二乌杞方对卵巢早衰模型大鼠血清抗苗勒管激素的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2014.
- [10] 夏天,柴淑娟,马灵芝,等. 补肾调冲方对半乳糖致 POF 大鼠卵巢储备力及其相关因子 INHB、AMH 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2714-2716.
- [11] 董晓英,柳顺玉,李东华,等. 补肾养血方对卵巢早衰小鼠凋亡调控蛋白 Bcl-2/Bax 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 134-138.
- [12] 徐丽丽,高世勇,季宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(11): 1361-1363.
- [13] 李洁,杨菁. 卵巢早衰动物模型建立的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2006, 26(9): 550-553.
- [14] Huang X, Choi J K, Park S R, et al. GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins [J]. Neurosci Res, 2007, 58(1): 50-57.
- [15] Xu D, Wang Z N, Zhu W J, et al. Effects of local testicular heating on Bcl-2 and Bax protein expression in spermatogenic cells in rats [J]. J Reprod Contracept, 2005, 16(1): 23-28.
- [16] 杨洪艳,邝敏,王小云. 中药治疗卵巢衰老有效作用时机的探讨[J]. 广东医学, 2011, 32(14): 1924-1926.

[责任编辑 周冰冰]