

补肾养血方对卵巢早衰小鼠凋亡调控蛋白 Bcl-2/Bax 的影响

董晓英^{1*}, 柳顺玉², 李冬华¹, 周杰¹, 叶娜¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006)

[摘要] 目的:探讨补肾养血方对免疫性卵巢早衰(POF)小鼠卵巢凋亡调节基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的影响。方法:以小鼠透明带 3(Zp3)为抗原,皮下多点注射免疫 BALB/c 雌性小鼠,14 d 后强化免疫,建立免疫性卵巢早衰模型。设补肾养血方低、中、高剂量(5.1, 10.2, 20.4 g·kg⁻¹)进行治疗,以补佳乐(戊酸雌二醇 0.6 mg·kg⁻¹)为阳性对照,于造模后 15 d 开始灌胃给药 1 次/d,连续 6 周(每 1 周休息 1 d)。放射免疫法检测小鼠血清激素水平,Western 法检测卵巢组织 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果:与空白对照组相比,模型组小鼠卵巢 Bcl-2 蛋白的表达减少,Bax 蛋白表达增加,($P < 0.05$),模型组小鼠卵巢 Bcl-2/Bax 下降($P < 0.01$),提示模型组卵泡 Bcl-2 蛋白的低表达、Bax 蛋白的高表达可能加速了卵泡的凋亡,导致卵巢早衰;与模型组相比,补肾养血方高、中、低剂量组及西药组小鼠卵巢 Bcl-2 蛋白的表达明显增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),卵巢 Bax 蛋白的表达均减少($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 明显降低($P < 0.05$)。结论:卵泡凋亡过快可能导致卵巢早衰,补肾养血方可能通过上调卵泡及卵巢间质 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax 蛋白的表达,抑制卵泡的过快凋亡,从而改善卵巢功能。

[关键词] 补肾养血方; 卵巢早衰; Bcl-2; Bax; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0134-05

[doi] 10.11653/syjf2014010134

Effects of Bushen Yangxue Prescription on Expression of Bcl-2 and Bax Protein in Mice Ovaries with Immune Premature Ovarian Failure

DONG Xiao-ying^{1*}, LIU Shun-yu², LI Dong-hua¹, ZHOU Jie¹, YE Na¹

[收稿日期] 20130605(023)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073096);首都医科大学基础临床合作课题(708016);北京中医药薪火传承“3+3”工程项目(2012-SZ-C-41)

[通讯作者] *董晓英,博士,讲师,主治医师,从事中医证治本质及疗效机制研究,中医诊法现代研究, Tel: 13811944106, E-mail: softsongs@126.com

分会发生变化,相对含量发生了变化,并且产生了新的物质^[2]。但有关药对成分变化的原因及其对药理作用影响的研究尚无报道,有待进一步的深入研究,将有助于该经典药对配伍内涵的科学阐释。

[参考文献]

[1] 叶建红. 荆芥防风配伍的药理与临床应用浅析[J]. 实用中医内科杂志, 2003, 17(4): 257.
[2] 王长林, 王秀君, 浦仕飞. 荆芥与防风的药理作用试验研究[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2009, 29(1): 6.
[3] 朱淑蓉, 唐光菊. 荆芥与防风的药理作用研究[J]. 中药材, 1989, 12(6): 37.

[4] 葛卫红. 荆芥、防风挥发油抗炎作用的实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2003, 25(1): 55.
[5] 王乐, 刘伟, 廖琳玲, 等. 地昔帕明对小鼠内毒素急性肺损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 63.
[6] 裴凌鹏. 叶黄素对脂多糖致小鼠急性肺损伤保护作用[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 461.
[7] 张霞, 剡根强, 王静梅. 细菌内毒素的研究概况[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(4): 4.
[8] 李晓如, 邹桥, 周涛, 等. 药对荆芥-防风挥发油成分的分析[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(18): 1373.

[责任编辑 聂淑琴]

(1. Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Bushen Yangxue prescription, on expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) protein in ovaries of mice with immune premature ovarian failure (POF). **Method:** BALB/c female mice model of POF was established by multiple sites subcutaneous injection of zona pellucida 3 of mice, and then the modeled mice were treated with low, middle and high dosage Bushen Yangxue prescription, and positive control medicine of Estradio Valerate. Follicle-stimulating (FSH), 17-estradiol (E_2), lactogenic hormone (LH) were detected by radioimmunoassay method. Expression levels of Bcl-2 and Bax protein in mice ovarian were detected by western blot method. **Result:** Compared to Estradio Valerate group, FSH, E_2 , LH of low, middle and high dosage Bushen Yangxue prescription group were improved. Compared to the black control group, the expression of Bcl-2 protein of model group decreased obviously and the expression of Bax protein of model group increased obviously, Bcl-2/Bax ratio of model group decreased ($P < 0.05$). Compared to the model group, the expression of Bcl-2 protein of high-dosage Bushen Yangxue prescription group and Estradio Valerate group increased obviously ($P < 0.01$); the expression of Bcl-2 protein of low and middle dosage Bushen Yangxue prescription group increased obviously ($P < 0.05$), the expression of Bax protein of different dosage decreased obviously ($P < 0.05$). All the data showed a dose-response relationship to some degree in expression of Bcl-2 protein within low, middle and high dosage Bushen Yangxue prescription group. **Conclusion:** It is indicated that rapid apoptosis of follicle may result in premature ovarian failure, and Bushen Yangxue prescription can improve the function of ovaries by up-regulating the expression of Bcl-2 protein and down-regulating the expression of Bax protein in ovarian.

[Key words] Bushen Yangxue prescription; POF; Bcl-2; Bax; apoptosis

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 系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衰竭,是指月经初潮年龄正常或青春期延迟,第二性征发育正常的女性在 40 岁以前出现持续性闭经和性器官萎缩,并伴有促卵泡生成素 (FSH) 和促黄体生成素 (LH) 升高,而雌激素降低的综合征^[1]。是一类严重影响妇女生殖及身心健康的疾病,发病率呈现出上升趋势。目前,西医治疗以激素替代治疗 (hormone replacement therapy, HRT) 为主,但长期使用 HRT 可使服药女性患脑卒中、心脏病以及栓塞的概率成倍增加,也增加了患乳腺癌和子宫内膜癌的潜在危险,因此不易被患者接受^[2]。而中药治疗卵巢早衰在临床取得了较好的疗效,可提高卵巢对促性腺激素的反应性,促使卵巢功能恢复,已受到众多研究者的密切关注^[3]。

因此,探讨中药防治该病发生的机制,从而对 POF 进行有效地预防和治疗是摆在我们面前亟待解决的课题。越来越多的研究认为^[4-5],颗粒细胞凋亡触发了卵泡闭锁是造成卵巢早衰的根本原因。本实验建立免疫性卵巢早衰模型,选择在临床上得到很好应用的补肾养血古方毓麟珠(《景岳全书·妇人

规》)作为防治药物,观察其对免疫性 POF 模型小鼠卵巢细胞凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响,探讨补肾养血方在细胞水平防治小鼠卵巢早衰的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 BABL/c 雌性小鼠 60 只,7~8 周龄,体重 18~22 g,由北京维通利达实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物与试剂

1.2.1 中药配制 补肾养血方(毓麟珠) 当归 12 g,熟地黄 12 g,菟丝子 12 g 人参 6 g,炒白术 6 g,茯苓 6 g,白芍 6 g,杜仲 6 g,鹿角霜 6 g,川椒 6 g,川芎 3 g,炙甘草 3 g,饮片一次性从北京同仁堂购入,按常规方法进行煎煮、浓缩,一次性煎出,按“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”配成高、中、低浓度药液,质量浓度分别为 2,1,0.5 $\text{kg} \cdot \text{L}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

1.2.2 西药配置 补佳乐(拜耳药业,批号 219A2),用三蒸水溶解药片,制成溶液 1 L 溶液含补佳乐 0.009 g。

1.2.3 试剂 小鼠透明带多肽溶液:根据小鼠透明

带 3 (Zp3) 的第 330 ~ 342 个氨基酸序列 (NSSSQFQIHGPR), 合成透明带多肽, 其分析纯度 >90% (杭州多肽生化有限公司生产); 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (美国 Sigma 公司产品)。FSH, LH 及雌二醇 (E₂) 试剂盒 (上海西唐生物技术有限公司提供, 批号 20120624)。

1.3 仪器 高分辨显微镜 (Olympus, 日本), 病理组织切片机 (LEICARM2025, 德国), 电子天平 (FAZ104, 上海), 生物组织自动脱水机 (TS-12F, 湖北), 病理组织包埋机和包埋冷冻台 (BMJ-M, 常州), 自动放免测量仪 (FT-613, 北京), Thermo 酶标仪 (MK3, 上海), 垂直电泳槽 (VE-180, 上海), 转移电泳槽 (VE-186, 上海), 电泳仪 (PowerpacHC, 美国) 等。

2 方法

2.1 动物模型的建立 雌性小鼠均经阴道脱落细胞涂片筛查, 性周期正常。随机挑选 10 只做为空白组, 其余 50 只用于造模。称取 6 mg ZP3 透明带多肽粉末, 加入 6 mL 双蒸水配成溶液, 与弗氏完全佐剂按 1:1 比例配制成免疫试剂, 与弗氏不完全佐剂按 1:1 比例制成免疫强化试剂。按文献 [6] 每鼠予 0.15 mL 免疫试剂注射双后脚掌处及腹部皮下, 14 d 后以免疫强化试剂 0.15 mL 再次注射小鼠双后脚掌处及腹腔皮下加强免疫。空白组每次造模时每只小鼠予以 0.15 mL 的生理盐水注射双后脚掌处及腹腔部皮下。

2.2 分组和给药 造模后的 50 只小鼠, 随机分为模型组、补肾养血方高剂量组、补肾养血方中剂量组、补肾养血方低剂量组、补佳乐组 5 组, 加之造模前挑选出的空白对照组, 共 6 组, 每组 10 只。于造模后 15 d 开始灌胃给药, 空白组和模型组每鼠均予以生理盐水 0.3 mL/次, 1 次/日; 补佳乐组予以补佳乐水溶液 0.6 mg·kg⁻¹ 每鼠 0.3 mL/次, 1 次/日; 补肾养血方低、中、高剂量组予以每鼠中药混悬液 5.1, 10.2, 20.4 g·kg⁻¹, 配制后每鼠给药量均为 0.3 mL/次, 1 次/日, 连续 6 周 (每 1 周休息 1 d)。

2.3 取材 给药前称体重, 之后每周称取体重并记录, 第 61 天标本处理取材前再称体重, 心脏穿刺取血, 处死动物, 常规无菌方法留取卵巢、子宫组织称重, 计算脏器指数 (脏器指数 = 脏器质量/体重)。卵巢组织迅速投入液氮中, 待用。

2.4 检测指标

2.4.1 HE 染色观察小鼠卵巢组织 称取卵巢质量后, 福尔马林固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切

片, 脱蜡, 常规 HE 染色, 置光学显微镜下观察。

2.4.2 检测血清 FSH, LH, E₂ 将小鼠血液标本静置, 离心, 取血清。采用放免试剂盒, 按照试剂盒说明书操作要求, 测定 FSH, LH 及 E₂ 的含量。

2.4.3 检测卵巢中 Bcl-2, Bax 蛋白表达 提取小鼠卵巢组织蛋白, 测定蛋白浓度进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转膜。将 PVDF 膜以 3% BSA 37 °C 封闭 1 h, 再分别用 Bcl-2, Bax 和 β -Actin 兔抗鼠多克隆抗体 (1:200) (Santa Cruz, USA) 37 °C 孵育 1.5 h, 洗膜, 加 ALP 标记的山羊抗兔 IgG (1:500) 37 °C 孵育 1 h。然后加 NBT/BCIP 避光显色。以 β -actin 作为内参照。

2.5 统计学方法 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件, 多组比较用方差分析, 组间比较用 LSD 和 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。采用 GSG2000 核酸/蛋白图像分析系统对琼脂糖凝胶和 PVDF 膜进行图像扫描与条带灰度分析。以目的基因蛋白灰度与相应的 β -actin 灰度的比值来表示目的基因的蛋白相对表达量。

3 结果

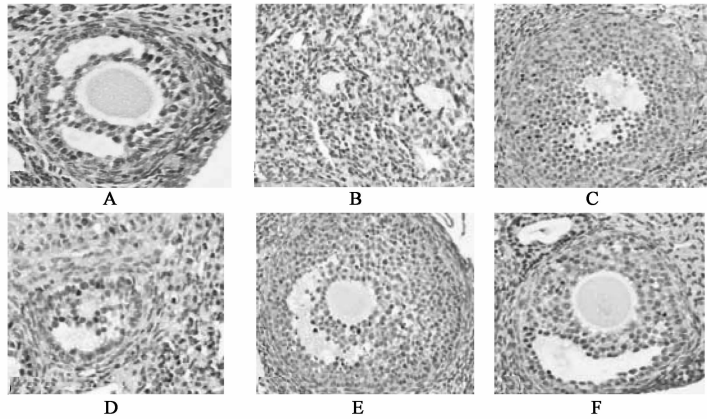
3.1 对免疫性 POF 模型小鼠卵巢指数及 FSH, LH, E₂ 含量的影响 灌胃 6 周后, 通过 ANOVA 方法分析, 与空白组相比较, 模型组小鼠卵巢指数有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示 POF 小鼠卵巢萎缩; 与模型组相比较, 补肾养血方中、高剂量组及西药组有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示用药后小鼠卵巢质量得到了不同程度的改善。与空白对照组比较, 模型组的 FSH, LH, E₂ 均有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示造模成功; 与模型组相比较, 补肾养血方低、中、高剂量组 FSH 降低, E₂ 升高有显著性差异 ($P < 0.05$), 西药组的 FSH, LH, E₂ 与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 各组小鼠卵巢大体观察及病理变化 肉眼观察: 造模后卵巢体积明显较空白组缩小, 且形态细长, 模型组更可见部分卵巢组织与周围组织粘连。光学显微镜观察: 造模后与空白组比较可见发育中的卵泡及成熟的卵泡数目明显减少, 依序为: 西药组、补肾养血方高、中、低剂量组、模型组, 颗粒细胞排列紊乱, 且卵巢间质可见淋巴细胞浸润, 严重程度依序为: 模型组、补肾养血方低、中、高剂量组、西药组, 部分透明带缩小或增厚, 形态不规整, 甚至断裂, 周围颗粒细胞排列紊乱无序。卵母细胞形态畸形, 缩小或消失, 畸形程度由重至轻依序为: 模型组、补肾养血方低、中、高剂量、西药组。见图 1。

表1 补肾养血方对卵巢早衰小鼠卵巢指数及血清 E₂, FSH, LH 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	卵巢指数/mg·g ⁻¹
空白对照	-	17.52 ± 2.04	31.19 ± 2.17	29.23 ± 2.32	0.42 ± 0.13
模型	-	23.01 ± 1.26 ¹⁾	36.69 ± 2.96 ¹⁾	17.97 ± 1.76 ¹⁾	0.23 ± 0.09 ¹⁾
补肾养血方	5.1	19.30 ± 0.93 ²⁾	32.11 ± 1.98	22.04 ± 2.01 ^{1,2)}	0.31 ± 0.07 ¹⁾
	10.2	18.32 ± 1.01 ²⁾	31.45 ± 2.13	28.39 ± 2.73 ²⁾	0.34 ± 0.11 ²⁾
	20.4	14.88 ± 0.92 ²⁾	31.27 ± 3.56	23.64 ± 1.79 ²⁾	0.34 ± 0.06 ²⁾
补佳乐	6 × 10 ⁻⁴	17.65 ± 0.91 ²⁾	29.97 ± 2.23 ²⁾	26.18 ± 2.14 ²⁾	0.36 ± 0.17 ²⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B. 模型组; C. 补肾养血方 5.1 g·kg⁻¹组; D. 补肾养血方 10.2 g·kg⁻¹组; E. 补肾养血方 20.4 g·kg⁻¹组; F. 补佳乐 0.6 mg·kg⁻¹组

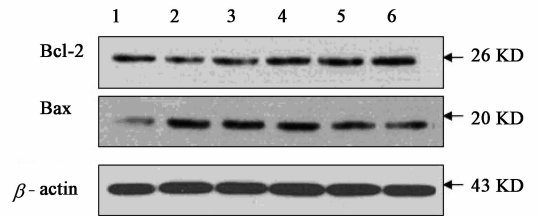
图1 补肾养血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢组织形态学的影响(HE, ×200)

3.3 Bcl-2, Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 变化

Western blot 结果显示,与空白对照组相比,模型组小鼠卵巢 Bcl-2 蛋白的表达减少, Bax 蛋白表达增加,差异显著($P < 0.05$),模型组小鼠卵巢 Bcl-2/Bax 下降,有极显著差异($P < 0.01$),提示模型组卵泡 Bcl-2 蛋白的低表达、Bax 蛋白的高表达可能加速了卵泡的凋亡,导致卵巢早衰;与模型组相比,补肾养血方高剂量组及西药组小鼠卵巢 Bcl-2 蛋白的表达明显增加,有极显著性差异($P < 0.01$),补肾养血方中、低剂量组小鼠卵巢 Bcl-2 蛋白的表达均增加,有显著性差异($P < 0.05$),补肾养血方高、中、低剂量及西药组小鼠卵巢 Bax 蛋白的表达均减少,有显著性差异($P < 0.05$),补肾养血方高、中、低剂量及西药组小鼠卵巢 Bcl-2/Bax 明显降低,有显著性差异($P < 0.05$)。见图 2,表 2。

4 结论

卵巢早衰可归属中医“血枯”、“血隔”、“闭经”、“月经后期”、“脏燥”、“不孕”等。本病的病因病机各医家认识虽有所不同,但总以肾虚为主导。卵巢早衰与肾、冲任关系最为密切^[7]。本病的发生



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 补肾养血方 5.1 g·kg⁻¹组;
4. 补肾养血方 10.2 g·kg⁻¹组; 5. 补肾养血方 20.4 g·kg⁻¹组;
6. 补佳乐 0.6 mg·kg⁻¹组

图2 补肾养血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响

的主要病机为肾虚胞阻,而又与心、肝、脾密切相关。主要的治疗原则是补肾养血通络。补肾以补先天之本,养血以化后天之源,络通则冲任健,血海足,胞宫得养,肾气-天癸-冲任-胞宫之轴渐旺,月经得复。

毓麟珠方出自《景岳全书·妇人规》,医家张景岳在此篇中论述了孕育的机制和证治,在学术思想上重脾肾,提出“调经种子之法,亦惟以填补命门,顾借阳气为之主,然精血之都在命门,而精血之源又在二阳心脾之间,方用毓麟珠,该方由人参、白术、茯

表 2 补肾养血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax 蛋白相对表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/Bax
空白对照	-	0.37 ± 0.02	0.17 ± 0.01	2.41 ± 0.23
模型	-	0.19 ± 0.03 ¹⁾	0.38 ± 0.02 ¹⁾	0.58 ± 0.09 ²⁾
补肾养血方	5.1	0.30 ± 0.03 ³⁾	0.29 ± 0.02 ³⁾	1.01 ± 0.23 ¹⁾
	10.2	0.34 ± 0.04 ³⁾	0.20 ± 0.01 ³⁾	1.78 ± 0.16 ^{1,3)}
	20.4	0.32 ± 0.02 ³⁾	0.22 ± 0.02 ³⁾	1.42 ± 0.13 ^{1,3)}
补佳乐	6 × 10 ⁻⁴	0.33 ± 0.03 ³⁾	0.21 ± 0.03 ³⁾	1.89 ± 0.19 ^{1,3)}

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

苓、芍药、川芎、甘草、当归、熟地黄、菟丝子、杜仲、鹿角霜、川椒 12 味药物组成。全方温补先天肾气以生精,培补后天脾胃以养血,佐以活血调经补冲任,使精气充盛,冲任通畅能相滋,自能摄精成孕。后世临床应用此方加减治疗卵巢早衰取得了很好的疗效,尤其对于卵巢早衰所致的不孕效果更佳^[8]。

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。具有周期性发育特点的卵巢是少有的充分体现细胞凋亡的器官,可以说细胞凋亡是调节、维持和决定卵巢正常功能和卵泡正常发育的关键机制^[9]。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中发挥主要调控作用的一类因子,根据其功能分为两类:一类抑制细胞凋亡,以 Bcl-2 为代表;另一类促进细胞凋亡,以 Bax 为代表。Bcl-2 家族成员对各阶段卵泡的生长发育具有调节作用,调控着卵巢颗粒细胞的凋亡^[10]。

本研究首先观察到 POF 小鼠血清激素水平的变化,提示模型成功;同时又观察到用药后各族血清激素水平的变化,肯定了补肾养血方的治疗效果;进一步观察到 POF 小鼠模型组卵巢颗粒细胞 Bax 蛋白表达相对于正常组增高,Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比例下降,表明促进了卵泡过早、过快的凋亡,可能是导致卵巢早衰的机制之一。实验结果提示,不同剂量补肾养血方和补佳乐均能上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,从而使 Bcl-2/Bax 比例增高,而抑制卵泡的过早、过多凋亡,使卵泡向发育成熟方面发展,起到调控卵巢颗粒细胞凋亡的作用,达到防治卵巢早衰的目的。

综上所述,补肾养血方可以通过上调 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax 蛋白的表达,调节 Bcl-2/Bax 系统平衡,抑制卵泡的过早、过快凋亡,可能是其改善

卵巢的功能,治疗卵巢早衰的机制之一。因此,补肾养血方是一种具有良好应用前景的防治 POF 的药物,还要继续进一步研究它的临床治疗效果,并对 POF 的发生机制进行更深入的探讨,为 POF 的有效防治奠定基础。

[参考文献]

[1] Cameron M, Grover S, Moore P, et al. Non-chromosomal, non-ia-trogenic premature ovarian failure in an adolescent population; a caseseries [J]. *Pediatr Adolesc Gynecol*, 2008, 21(1):3.

[2] Leite-Silva P, Bedone A, Pinto-Neto A M, et al. Factors associated with bone density in young women with karyotypically normal sponta-neous premature ovarian failure [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, 2809(3):177.

[3] 王海丹, 朱莹莹. 中医药治疗卵巢早衰的研究进展 [J]. *中华中医药刊*, 2009, 27(10):2102

[4] 马晓芃, 戴明, 吴焕溢, 等. 针刺对围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. *中国针灸*, 2007, 27(5):357.

[5] 尤劲松. 卵泡闭锁与颗粒细胞凋亡 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2000, 20(6):487.

[6] 付莉, 赵怡璇, 李守柔. 卵巢早衰实验动物模型的建立 [J]. *生殖医学杂志*, 2006, 15(3):179.

[7] 王锡珍, 赖毛华. 中医对卵巢早衰的认识证治体会 [J]. *浙江中医学院学报*, 2003, 27(5):21.

[8] 孔昭东. 毓麟珠妇科验案举隅 [J]. *江西中医药*, 2009, 40(5):21.

[9] 王雪峰, 何援丽. 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.

[10] 卿晨, 丁健. Bcl-2 基因家族在调节细胞凋亡中的作用 [J]. *国外医学:分子生物学分册*, 2000, 22(1):17.

[责任编辑 聂淑琴]