

左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠卵巢衰老的预防作用

佟 雷¹, 刘金丽², 孙琳林², 侯甲福¹, 于凤波¹, 高月娟^{2*}

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: **目的** 研究左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠卵巢功能及卵巢沉默调节蛋白 (SIRT_s) 表达的影响。**方法** 48 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组 (给予生理盐水)、左归丸及右归丸 4 组, 除正常组外, 其余 3 组动物腹腔注射环磷酸胺建立卵巢早衰模型。给药 8 周后, 采用卵泡计数和血清黄体生成素 (LH)、基础卵泡刺激素 (FSH)、抗苗勒管激素 (AMH)、基础抑制素 B (INHB) 评价卵巢功能。RT-PCR 法和 Western blot 法测定卵巢组织 SIRT_s mRNA 和蛋白的表达。**结果** 模型组小鼠卵巢卵泡计数、SIRT₁、SIRT₃ 及血清 AMH、INHB 显著低于正常组; 血清 LH、FSH 显著高于正常组。左归丸和右归丸组卵泡计数、SIRT₁ 及血清 AMH、INHB 显著高于模型组; 血清 LH、FSH 显著低于模型组。右归丸组原始卵泡数显著高于左归丸组。**结论** 左归丸和右归丸具有显著的抗卵巢衰老作用, 其作用机制与对卵巢 SIRT₁ 表达的上调作用有关。

关键词: 左归丸; 右归丸; 卵巢早衰; 沉默调节蛋白 (SIRT_s)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)02-0260-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.006

Preventive effects of Zuogui Pills and Yougui Pills on ovarian aging of premature ovarian failure mice

TONG Lei¹, LIU Jin-li², SUN Lin-lin², HOU Jia-fu¹, YU Feng-bo¹, GAO Yue-juan^{2*}

(1. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China; 2. Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT: **AIM** To research the effects of Zuogui Pills and Yougui Pills on ovarian function and silence regulatory proteins (SIRT_s) expression of aging mice. **METHODS** Forty-eight C57BL/6 mice were randomly divided into four group [Normal, model (normal saline), Zuogui Pills and Yougui Pills groups]. Premature ovarian failure model was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide. After being administered for eight weeks, follicle counts, serum luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), anti-mullerian hormone (AMH), inhibin B (INHB) were used to evaluate the ovarian function. RT-PCR and Western blot were used to test the ovarian expression of SIRT_s mRNA and protein, respectively. **RESULTS** Follicle counts, serum AMH, INHB and ovarian expression of SIRT₁ and SIRT₃ of mice in the model group were significantly lower than those of the normal group, serum LH and FSH of mice in the model group were significantly higher than those of the normal group. Follicle counts, serum AMH, INHB and ovarian expression of SIRT₁ of mice in Zuogui Pills and Yougui Pills group were significantly higher than those in the model group; serum LH and FSH of mice in Zuogui Pills and Yougui Pills groups were significantly lower than those in the model group. Primordial follicle count of Yougui Pills group was significantly higher than that of Zuogui Pills group. **CONCLUSION** Zuogui Pills and Yougui Pills show significant antiaging effects in premature ovarian failure mice, which may be mediated by the up-regulation of ovarian SIRT₁.

收稿日期: 2016-06-02
基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81403316); 牡丹江医学院科学技术研究项目 (ZS201527); 黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题 (2016-369)

作者简介: 佟 雷 (1982—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为药理学教学与科研。E-mail: tonglei5185@163.com
*** 通信作者:** 高月娟 (1981—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为临床药理学教学与科研。Tel: 15245330830, E-mail: gaoyuejuan-2009@163.com

KEY WORDS: Zuogui Pills; Yougui Pills; premature ovarian failure; SIRTs

卵巢衰老是以卵泡数目减少和卵巢储备功能降低等为标志的生理或病理过程。沉默调节蛋白(sirtuins, SIRTs), 包括 SIRT1~7, 在微生物及动物体内广泛分布, 与细胞分化、凋亡、能量代谢及衰老等多种生理病理过程有关^[1]。其中, SIRT1、2、3、5、6 已在哺乳动物卵巢组织内发现^[2,4]。近年研究表明, SIRTs 与卵巢衰老显著相关^[2]。SIRT1 基因敲除可导致早衰和生育功能丧失^[5]。

左归丸和右归丸出自明代《景岳全书》, 是传统补肾抗衰方药, 2 种方药配方存在诸多相似之处。文献报道, 二者对衰老相关的骨质疏松^[6]、精弱^[7]、卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF)^[8]等具有调节作用。课题组前期研究表明, 左归丸对衰老小鼠海马损伤具有保护作用^[9]。然而, 目前关于二者抗衰老, 尤其是抗 POF 作用机制的研究多集中于抗氧化应激方面。关于二者对 SIRTs 表达的影响鲜有报道。因此课题组采用 POF 小鼠研究二者对衰老小鼠卵巢功能及卵巢 SIRTs 表达的影响, 为左归丸和右归丸在 POF 领域的应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 体质量 16~19 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (合格证号 SCXK [京] 2012-0001)。饲养环境: 24~25 ℃, 湿度 50%~60%, 12 h/12 h 明暗循环。

1.2 药品、试剂及仪器 左归丸 (熟地黄 24 g、山药 12 g、菟丝子 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、川牛膝 9 g、龟板胶 12 g、鹿角胶 12 g, 批号 Z20150617); 右归丸 (熟地黄 24 g、山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 9 g、菟丝子 12 g、鹿角胶 12 g、杜仲 12 g、当归 9 g、肉桂 6 g、附子 6 g, 批号 Z20150612); 炒山药、制菟丝子、炒山茱萸、炒杜仲、酒蒸川牛膝、炒珠龟板胶、炒珠鹿角胶、制附子等中药饮片购自黑龙江中医药大学, 由本院药剂科制备, 取药材饮片加水没过药材, 煎煮 2 次, 合并煎液, 药液浓缩至 6.3 g 生药/mL^[9]。环磷酰胺 (美国 Sigma 公司); SIRT1、2、3、5、6 蛋白 (英国 Abcam 公司); 小鼠黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、基础卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、抗苗勒管激素 (anti-mullerian hormone, AMH)、基础抑制素 B (inhibin

B, INHB) ELISA 试剂盒 (美国 Life Sciences 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); RT-PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司); OLYMPUS BX-41 显微镜 (日本奥林巴斯公司); 硝酸纤维素膜 (美国 BioTrace 公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 小鼠 48 只随机分为正常组、模型组、左归丸组和右归丸组, 每组 12 只。参考文献方法略作改进建立卵巢早衰模型 (premature ovarian failure, POF)^[2]。环磷酰胺溶于磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), 首次腹腔注射剂量为 100 mg/kg, 随后以 10 mg/kg 每日腹腔注射 1 次, 连续注射 2 周; 正常组腹腔注射等体积磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)。

造模之日起正常组和模型组灌胃给予生理盐水; 左归丸组、右归丸组灌胃给予“1.2”项下水煎液 31.5 g/kg (按照实验动物与人体给药剂量换算, 相当于成人给药剂量为 3.465 g/kg; 按照左/右归丸成人每日口服剂量 18~27 g 计算, 该剂量相当于人体给药剂量的 7.7~11.55 倍)。各组每日给药 1 次, 连续给药 8 周。末次给药后禁食 24 h, 每组随机选取 6 只小鼠, 吸入乙醚处死。取同侧卵巢用于卵泡计数, 剩余小鼠眼眶静脉采血用于卵巢储备功能评价, 后取双侧卵巢用于 SIRTs mRNA 和蛋白含量测定。

2.2 卵泡计数 取卵巢, 去除周围组织, 室温下 10% 福尔马林固定, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 纵向连续切片 (4 μm), 隔 10 张取 1 张, 每只动物取 2 张切片, 每组取 12 张切片; 60 ℃脱蜡, HE 染色, 双人盲法阅片, 光学显微镜下计数各级卵泡数量, 包括原始卵泡 (primordial follicle, PDF)、初级卵泡 (primary follicle, PMF)、次级卵泡 (secondary follicles, SDF)、窦状卵泡 (sinus follicle, SNF) 及闭锁卵泡 (atresic follicle, ASF)。为防止重复, 仅计数卵母细胞核可辨识的卵泡。卵泡计数以每 mm² 卵巢组织中卵泡数计算。

2.3 卵巢储备功能评价 取小鼠血浆, 离心取血清, 采用 ELISA 试剂盒根据试剂盒说明书操作测定血清 LH、FSH、AMH、INHB 含量。

2.4 荧光定量 RT-PCR 法测定卵巢组织 Sirts mRNA 的表达 取左侧卵巢液氮冻存后备用。参考文献方法^[10]采用荧光定量 RT-PCR 法测定卵巢组织

Sirt1、2、3、5、6 mRNA 的表达。测定时取样品加入 Trizol 试剂匀浆提取总 RNA，逆转录为 cDNA (3 μL RNA /10 μL 反应液)，取 2.5 μL 反应产物用于 RT-PCR。*Sirt1* 正、反向引物分别为 5'-TAGC-CTTGTCAGATAAGGAAGGA-3'，5'-ACAGCTTCACA GTCAACTTTGT-3'；*Sirt2* 正、反向引物分别为 5'-TGCGGAACCTATTCTCCCAGA-3'，5'-GAGAGCGAA AGTCCGGGAT-3'；*Sirt3* 正、反向引物分别为 5'-ACCCAGTGGCATTCCAGAC-3'，5'-GGCTTGGGGTT-GTGAAAGAAG-3'；*Sirt5* 正、反向引物分别为 5'-GCCATAGCCGAGTGTGAGAC-3'5'-CAACTCCACAA-GAGGTAC ATCG-3'；*Sirt6* 正、反向引物分别为 5'-CCCACGGAGTCTGGACCAT-3'，5'-CTCTGCCAGTTT-GTCCCTG-3'。内源性 *Gapdh* 作为对照，正、反向引物分别为 5'-AGTCTAGGTGCCTGTGT3'，5'-GAG-GACGCTGAAGTTCGTT-3'。95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 40 循环，60 ℃ 退火 30 s。2^{-ΔΔCT} 法定量分析。

2.5 Western blot 法测定卵巢组织 SIRTs 蛋白含量 取右侧卵巢液氮冻存后备用。参考文献方法^[2]采用 Western blot 法测定卵巢组织 SIRTs 蛋白含量。样品加入 PMSF 和 RIPA 蛋白裂解液，冰浴孵育 30 min，4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液加入二辛可宁酸溶液测定蛋白含量。蛋白分析采用 SDS-PAGE 电泳、硝酸纤维素膜，β-Actin 作为内参 (1：1 000)，SIRT1、2、3、5、6 蛋白稀释度分别为 1：8 000、1：100、1：500、1：100、1：100，加入辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 孵育 30 min，PBST 洗膜 3 次，ECL 显色液孵育 5 min，采用凝胶成像系统进行分析。

2.6 数据统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 15.0 进行分析。组间比较采用单因素 ANOVA 分析。*P* < 0.05 视为差异显著，*P* < 0.01 视为极差异显著。

3 结果

3.1 病理检查与卵泡计数 各组动物卵巢组织典型病理图片见图 1。POF 造模后，模型组小鼠卵巢组织卵泡显著减少。正常组及给药组小鼠卵泡较多，且各阶段卵泡均可发现。

各组不同类型卵泡计数结果见表 1。模型组 PDF、PMF、SDF、SNF 均显著低于正常组 (*P* < 0.01)；左归丸组 PDF、PMF、SDF、SNF 均显著高于模型组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)，其中 PDF、SDF 显著低于正常组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)；右

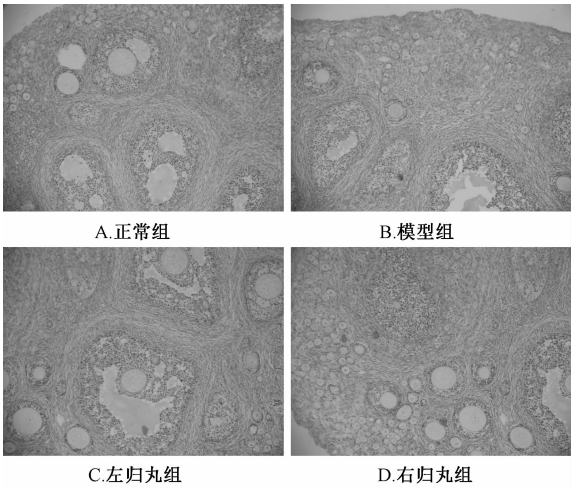


图 1 各组动物卵巢组织切片 (HE, ×100)
Fig. 1 Oarian specimens of different groups (HE, ×100)

归丸组与正常组无显著差异 (*P* > 0.05)，其中 PDF 显著高于左归丸组 (*P* < 0.05)。4 组动物 ASF 无显著差异 (*P* > 0.05)。结果表明左归丸、右归丸对 POF 小鼠卵泡发育具有改善作用，右归丸改善作用优于左归丸。

表 1 各组动物卵巢切片的卵泡计数 (/mm², *n* = 12)
Tab. 1 Follicle counts in ovarian specimens from different groups (/mm², *n* = 12)

指标	正常组	模型组	左归丸组	右归丸组
PDF	1.4 ± 0.4 **▲	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.5 *##	1.2 ± 0.1 **▲
PMF	1.1 ± 0.7 **	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.7 **	1.0 ± 0.6 **
SDF	2.6 ± 0.3 **▲	0.5 ± 0.4	1.8 ± 0.9 **#	2.1 ± 0.5 **
SNF	1.9 ± 0.5 **	0.8 ± 0.4	1.7 ± 0.4 **	2.0 ± 0.9 **
ASF	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1

注：与模型组比较，* *P* < 0.05，** *P* < 0.01；与正常组比较，# *P* < 0.05，## *P* < 0.01；与左归丸组比较，▲ *P* < 0.05

3.2 卵巢储备功能评价 各组小鼠血清 LH、FSH、AMH、INHB 含量测定结果见表 2。模型组小鼠 LH、FSH 显著高于正常组 (*P* < 0.05)，AMH、INHB 显著低于正常组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。左归丸、右归丸组 FSH、INHB 含量与正常组无显著差异 (*P* > 0.05)，LH 均显著低于模型组 (*P* < 0.05)，高于正常组 (*P* < 0.05)；AMH 均显著高于模型组 (*P* < 0.05)，低于正常组 (*P* < 0.05)。表明左归丸、右归丸对 POF 小鼠卵巢储备功能具有改善作用，二者对 LH、FSH、AMH、INHB 的改善作用无显著差异 (*P* > 0.05)。

3.3 卵巢组织 *Sirts* mRNA 表达差异 RT-PCR 测定结果见图 2。由图 2 可见 POF 造模后卵巢 *Sirt1* 及 *Sirt3* mRNA 表达显著降低 (正常组 vs 模型组，

表 2 各组动物血清 LH、FSH、AMH、INHB 含量 (n=6)

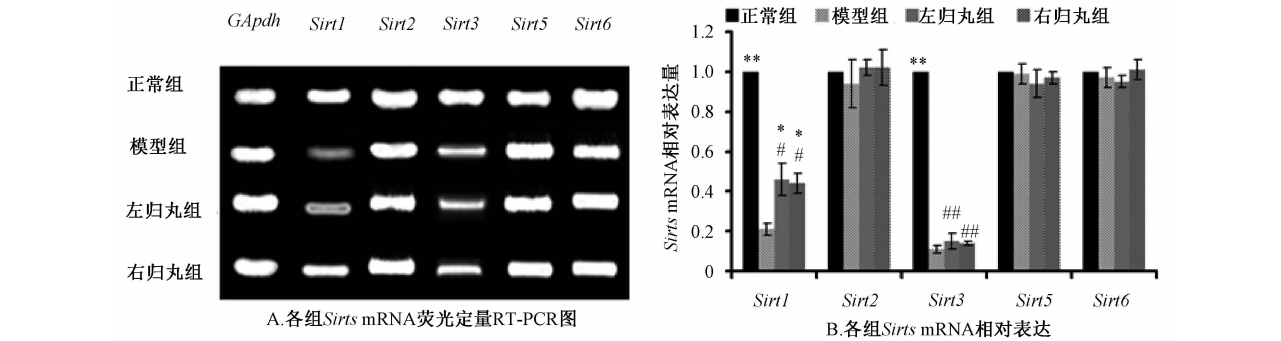
Tab. 2 Serum LH, FSH, AMH and INHB of mice from different groups (n=6)

指标	正常组	模型组	左归丸组	右归丸组
LH/(IU·L ⁻¹)	314.9±57.2 [*]	544.8±90.1	401.6±43.0 ^{**}	392.1±61.3 ^{**}
FSH/(IU·L ⁻¹)	7.5±2.4 [*]	11.3±1.6	8.3±2.9 [*]	7.9±3.1 [*]
AMH/(ng·mL ⁻¹)	6.1±2.6 ^{**}	2.5±0.4	4.4±0.7 ^{**}	4.7±1.8 ^{**}
INHB/(mg·mL ⁻¹)	17.0±4.1 [*]	13.1±5.3	17.9±2.3 [*]	18.5±4.6 [*]

注：与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01；与正常组比较，#*P*<0.05

P<0.01)。左归丸组和右归丸组 *Sirt1* mRNA 表达水平显著低于正常组 (*P*<0.05)，但高于模型组 (*P*<0.05)。左归丸组和右归丸组 *Sirt3* mRNA 表达水平显著低于正常组 (*P*<0.01)，与模型组无

显著差异 (*P*>0.05)。结果表明环磷酰胺 POF 模型可导致小鼠卵巢 *Sirt1*、*Sirt3* mRNA 表达降低，左归丸和右归丸可显著提高 POF 小鼠卵巢 *Sirt1* mRNA 表达水平。



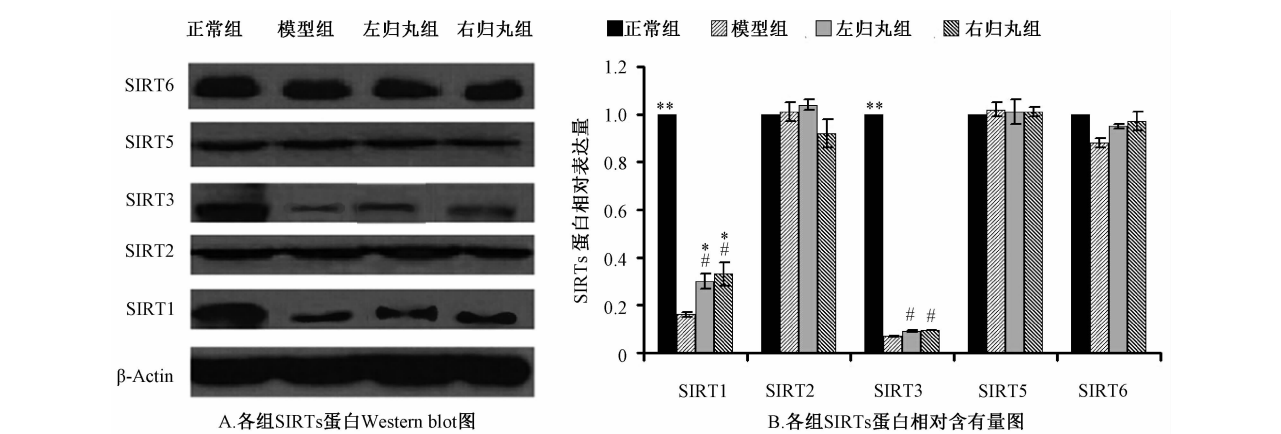
注：与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01；与正常组比较，#*P*<0.05，##*P*<0.01

图 2 各组动物卵巢组织 Sirts mRNA 相对表达量

Fig. 2 Relative expression of Sirts mRNA in ovarian tissues of different groups

3.4 卵巢组织 SIRTs 蛋白含量差异 采用 Western blot 法测定卵巢组织 SIRTs 蛋白含量，结果见图 3。由图 3 可见 POF 模型组卵巢组织 SIRT1、SIRT3 显著低于正常组 (*P*<0.01)。左归丸及右归丸组 SIRT1 蛋白含量显著高于模型组 (*P*<

0.05)。左归丸及右归丸组 SIRT2、3、5、6 蛋白含量与模型组无显著差异 (*P*>0.05)。结果表明环磷酰胺 POF 模型可导致小鼠卵巢 SIRT1 蛋白含量降低，左归丸和右归丸可显著提高 POF 小鼠卵巢组织 SIRT1 蛋白含量。



注：与模型组比较，**P*<0.05，***P*<0.01；与正常组比较，#*P*<0.05

图 3 各组动物卵巢组织 SIRTs 蛋白相对含量 (n=6)

Fig. 3 Relative contents of SIRTs protein in ovarian tissues of different groups (n=6)

4 讨论及结论

卵巢衰老是年龄、遗传因素、自身免疫、外部刺激等多重因素导致的女性生殖功能退化过程。目前关于卵巢衰老的具体机制尚不明确^[11]。分子生物学研究显示,多种基因(如 ALOX12、BRKS1)、化疗药物(如环磷酰胺、顺铂)及蛋白质(如 SIRT6、SOD)与卵巢衰老进程有关^[12]。中医学认为该病属于血枯、闭经等范畴,与肾气不足、情志郁结等有关,因此在卵巢衰老的治疗中补肾方药属于常用中药^[8,13]。SIRT6 是近年发现的参与衰老进程的调控因子。早期研究认为,SIRT6 能够促进卵泡发育、改善卵巢储备功能,延长卵巢寿命^[10]。最近 Zhang 等^[2]通过多种 POF 模型研究显示,多种 SIRT6 中 SIRT6、3、6 均与卵巢衰老有显著关联。

课题组采用环磷酰胺建立小鼠 POF 模型,研究了左归丸、右归丸 2 种常用抗衰方药对 POF 小鼠卵泡计数、卵巢储备功能及 SIRT6 mRNA 和蛋白表达的影响。由表 1~2 可见,环磷酰胺注射可显著降低小鼠卵泡计数和卵巢储备功能。该结果与文献报道结果相似^[2,14]。但采用荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法研究显示,卵巢 SIRT6 对环磷酰胺的相应存在显著差别,POF 造模后卵巢 SIRT6、SIRT3 mRNA 及蛋白均显著低于正常组,而 SIRT6 蛋白虽呈现降低趋势,但与正常组相比无显著差异。该结果与 Zhang 等^[2]报道的结果相似,但 SIRT6 蛋白对环磷酰胺的响应存在差异。由于本研究与文献报道所采用的动物品系及周龄相同,造成结果差异的原因可能与环磷酰胺剂量及 Western blot 法的方法差异有关。

卵泡计数、卵巢储备功能、卵巢体积等是目前常用的卵巢功能评价指标。其中卵泡计数及用于评价卵巢储备功能 LH、FSH、AMH、INHB 及雌二醇等指标用于预测卵巢功能准确性尚待验证。由表 1 可见,左归丸、右归丸组小鼠 PDF、PMF、SDF、SNF 计数均显著高于模型组,其中右归丸组 PDF 计数显著高于左归丸组,提示右归丸对小鼠卵泡计数的改善作用可能高于左归丸。2 种补肾方药的组方相似,主要在于左归丸含有牛膝、龟板胶,右归丸含有当归、肉桂、附子。当归本身对辐射导致的卵泡发育损伤具有改善作用^[15],因此推测右归丸中的当归可能是造成导致二者对卵泡计数影响差异的主要因素。从中医角度比较,左归丸功效为滋阴补肾,填精益髓;右归丸功效为温补肾阳,填精益

髓。而环磷酰胺小鼠腹腔注射已被用于建立小鼠肾阳虚模型^[16]。因此,2 种补肾方药对环磷酰胺致小鼠卵巢早衰模型卵泡计数的影响差异也可能与模型本身属于肾阳虚模型有关。但具体原因仍待拆方研究验证。

荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法研究表明(图 2~3),左归丸和右归丸均可显著提高 POF 小鼠卵巢组织 SIRT6 mRNA 及蛋白的表达,对其他 SIRT6 无显著影响。但左归丸和右归丸组 SIRT6 mRNA 及蛋白含有量显著低于正常组。对比该实验条件下,二者对小鼠卵泡计数和卵巢储备功能指标的影响可见,二者对 PDF、SDF 卵泡计数及血清 LH、AMH 的改善作用存在相似的趋势。因此,对 SIRT6 的表达上调作用可能是左归丸和右归丸抗卵巢衰老的作用机制之一。

综合上述实验结果,左归丸和右归丸对 POF 模型具有显著的抗卵巢衰老作用,其作用机制与卵巢 SIRT6 有关。

参考文献:

[1] Guarente L. Sirtuins, aging, and medicine[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(23): 2235-2244.

[2] Zhang J, Fang L, Lu Z, et al. Are sirtuins markers of ovarian aging? [J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 3): 680-686.

[3] Du Y H, Zhang H Y, Sun H. Reduced expression of SIRT2 in serous ovarian carcinoma promotes cell proliferation, migration and invasion [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2015, 31(7): 1209-1213.

[4] Pacella-Ince L, Zander-Fox D L, Lane M. Mitochondrial SIRT5 is present in follicular cells and is altered by reduced ovarian reserve and advanced maternal age[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 26(8): 1072-1083.

[5] Seifert E L, Caron A Z, Morin K, et al. SirT1 catalytic activity is required for male fertility and metabolic homeostasis in mice [J]. *FASEB J*, 2012, 26(2): 555-566.

[6] Lai N, Zhang Z, Wang B, et al. Regulatory effect of traditional Chinese medicinal formula Zuo-Gui-Wan on the Th17/Treg paradigm in mice with bone loss induced by estrogen deficiency [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 166(2015): 228-239.

[7] Jiang X H, Yie S M, Zhen X, et al. Effect of You Gui Wan on mouse sperm fertilising ability *in vivo* and *in vitro* [J]. *Andrologia*, 2014, 46(3): 283-289.

[8] 赵锦秀,黄 燕. 左归丸、右归丸对卵巢早衰前期患者卵巢储备功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 128-131.

[9] 孙琳林,王书惠,卢 林,等. 左归丸与六味地黄丸对衰老大鼠抗氧化能力及海马区超微结构影响的比较研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(3): 140-143.

[10]

Tao X, Zhang X, Ge S Q, *et al.* Expression of SIRT1 in the ovaries of rats with polycystic ovary syndrome before and after therapeutic intervention with exenatide [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7): 8276-8283.

[11]

Ebrahimi M, Akbari Asbagh F. The role of autoimmunity in premature ovarian failure[J]. *Iran J Reprod Med*, 2015, 13(8): 461-472.

[12]

Meattini I, Saieva C, Meacci F, *et al.* Impact of age on cytotoxic-induced ovarian failure in breast cancer treated with adjuvant chemotherapy and triptorelin[J]. *Future Oncol*, 2016, 12(5): 625-635.

[13]

陈玉梅, 余志惠, 黄桂花, 等. 补肾调肝方抗卵巢衰老的作

[14]

Deti L, Uhlmann R A, Lu M, *et al.* Serum markers of ovarian reserve and ovarian histology in adult mice treated with cyclophosphamide in pre-pubertal age[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(11): 1421-1429.

[15]

张端莲, 王松山, 余墨声, 等. 当归对辐射损伤后小鼠卵泡影响的定量研究[J]. *中草药*, 1997, 28(3): 156-158.

[16]

罗少波, 贾金铭. 腹腔注射环磷酰胺制作小鼠“肾阳虚”型少弱精症模型[C] //第七次全国中西医结合男科学术会议及全国中西医结合男科提高班论文汇编及讲义. 2011.

用机制的研究[J]. *中国实用医药*, 2013, 8(16): 14-16.