

益肾调经方对卵巢储备功能减退大鼠颗粒细胞凋亡的影响

严如根¹, 仇 华², 何 静¹, 刘恭雪¹, 曹焕泽¹, 陈 银³, 蔡平平^{4*}, 李长忠^{4*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 济南市中医医院, 山东 济南 250012; 3. 盱眙县中医院, 江苏 淮安 211700; 4. 山东第一医科大学附属省立医院, 山东 济南 250012)

摘要: **目的** 观察益肾调经方对卵巢储备功能减退大鼠颗粒细胞凋亡的抑制作用, 探讨其对凋亡相关基因 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达的影响。**方法** 从适应性喂养 1 周的 60 只 SD 大鼠中随机选取 10 只为空白组, 其余 50 只灌胃雷公藤多苷片混悬液造模后, 随机分为模型组, 益肾调经方高、中、低剂量组 (9.2、4.6、2.3 g/kg), 激素序贯组, 连续给药 15 d, 期间进行阴道涂片检测, 灌胃结束后处死各组大鼠, HE 染色观察卵巢各级生长卵泡的变化及一般情况, TUNEL 染色观察卵巢颗粒细胞凋亡情况, 免疫组化染色和 Western blot 检测卵巢组织中 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达, RT-qPCR 检测卵巢组织中 caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱, 卵巢各级生长卵泡减少, 颗粒细胞凋亡率升高 ($P<0.01$), 卵巢组织 caspase-3、Bax mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.01$), Bcl-2 mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠动情周期明显改善, 卵巢各级生长卵泡增多, 颗粒细胞凋亡率降低 ($P<0.01$), 卵巢组织 caspase-3、Bax mRNA 及蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 益肾调经方能够有效抑制大鼠卵巢颗粒细胞凋亡, 改善卵巢功能, 其机制可能与下调促凋亡因子 caspase-3、Bax 表达, 上调抗凋亡因子 Bcl-2 表达有关。

关键词: 益肾调经方; 卵巢储备功能减退; 颗粒细胞; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1955-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.041

卵巢储备功能减退 (diminished ovarian reserve, DOR) 是女性在 40 岁之前发生的卵巢内卵母细胞质量下降和 (或) 数量减少, 伴随体内性激素紊乱, 最终导致月经异常及生育力下降^[1-2]。DOR 病人如若延误病情, 失治误治可最终演变成为卵巢早衰, 严重干扰了女性的身心健康^[3]。鉴于 DOR 的发病机制尚不明确, 目前西医主要采用激素补充疗法, 虽然短期疗效理想肯定, 但长时间使用会刺激影响到患者的心脏、乳腺、子宫等器官, 增加罹患心脏疾病、子宫内膜癌、乳腺癌、静脉血栓等疾病的机率, 因此患者的可接受度较低^[4-6]。

中医药在调经促孕方面的运用历史悠久、疗效突出, 且无明显毒副作用, 2017 年中国关于早发性卵巢功能不全专家诊治共识中就提到了中医中药可以作为改善卵巢功能的非激素治疗^[7]。益肾调经方作为临床经验用方, 能够有效改善患者的卵巢功能, 保护女性生育力, 但其具体作用

机制尚不明确。本研究使用雷公藤多苷片混悬液灌胃构建 DOR 大鼠模型, 探讨益肾调经方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的抑制作用及其对相关凋亡因子的影响, 以期 DOR 的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 8 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 60 只, 体质量 (180±50) g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 2019-0003。每笼 5 只饲养于山东第一医科大学附属省立医院 SPF 级动物房 (室温 21~25 ℃、相对湿度为 50%~60%), 自由饮水摄食, 室内照明由专人控制 (昼夜 12 h/12 h)。本研究所涉及的动物实验均符合动物伦理委员会的准则 (批准号 2019-014)。

1.2 药物 雷公藤多苷片 (湖南千金协力药业有限公司, 批号 Z43020138); 戊酸雌二醇片 (德国拜耳公司, 批号 J20130009); 黄体酮胶囊 (浙江仙琚制药股份有限公司,

收稿日期: 2021-07-01

基金项目: 李克勤全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2018] 134 号); 山东省重点研发计划项目 (2019GSF108197)

作者简介: 严如根 (1988—), 男, 博士生, 主治医师, 从事中西医结合妇科疾病研究。Tel: (0531) 68777890, E-mail: 13793196710@163.com

*** 通信作者:** 蔡平平 (1974—), 女, 博士, 教授, 主任医师, 从事月经病及不孕症研究。Tel: (0531) 68776357, E-mail: pingpingcai@126.com

李长忠 (1970—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 从事中西医结合妇科疾病研究。Tel: (0531) 68777890, E-mail: lichangzhong@163.com

国药准字 H20041902); 益肾调经方由熟地黄 12 g、当归 12 g、醋龟甲 10 g、山药 20 g、酒萸肉 12 g、酒苁蓉 20 g、醋香附 15 g、党参 20 g、丹参 15 g、黄芪 20 g、枸杞子 20 g、淫羊藿 15 g、菟丝子 20 g、八月札 15 g 组成, 本实验主要采用中药颗粒剂, 益肾调经方生药共计 226 g/剂, 根据颗粒剂说明书与生药等量换算, 相当于免煎颗粒 43.5 g/剂, 中药免煎颗粒由江阴天江药业有限公司有偿提供。

1.3 试剂 革兰氏染色液 (批号 G1060)、蛋白提取试剂盒 (批号 BC3710) 均购自北京索莱宝科技有限公司; TUNEL 染色试剂盒 (批号 G1501-50T)、RNA 提取试剂盒 (批号 G3013)、逆转录试剂盒 (批号 G3330-100)、PCR 试剂盒 (批号 G3320-05)、内参一抗 (批号 GB11002) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 蛋白浓度检测试剂盒 (批号 P0012) 购自上海碧云天生物技术有限公司; caspase-3 一抗 (批号 66470-2-Ig)、Bax 一抗 (批号 60267-1-Ig)、Bcl-2 一抗 (批号 26593-1-AP) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器 荧光定量 PCR 仪, 瑞士罗氏公司; 电泳仪、电转仪, 美国伯乐公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 化学发光成像仪, 美国 GE 公司; 全自动真空组织脱水机, 美国 Thermo 公司; 显微镜, 德国徕卡公司。

2 方法

2.1 动物筛选及分组 60 只 8 周龄 SD 大鼠适应性喂养 1 周, 接连 3 个动情周期 (12 d) 阴道涂片, 确定每只大鼠有正常的动情周期后, 随机挑选 10 只设为空白组, 其余 50 只随机分成模型组, 益肾调经方高、中、低剂量组, 激素序贯组, 每组 10 只。

2.2 动物造模 参考文献 [8] 报道, 大鼠连续 14 d 灌胃给予雷公藤多苷片混悬液 (50 mg/kg) 进行造模, 于造模第 8 天起进行大鼠阴道涂片并用革兰氏染色, 如果涂片结果显示动情周期 ≥ 6 天或停滞在某一时期 ≥ 3 天者, 视为动情周期紊乱, 并提示造模成功 [9]。

2.3 给药 建模成功后, 参照人与大鼠之间药物剂量换算方法进行计算 [10], 益肾调经方中剂量组灌胃给予人临床等效剂量, 即 4.6 g/kg; 益肾调经方高、低剂量给予人临床剂量 2、0.5 倍, 即 9.2、2.3 g/kg; 激素序贯组灌胃给予戊酸雌二醇片 (0.1 mg/kg) 联合黄体酮胶囊 (21 mg/kg); 空白组、模型组给予等容量生理盐水灌胃, 连续给药 15 d, 给药结束后进行阴道涂片, 于动情前期采血并取双侧卵巢组织待测。

2.4 检测指标

2.4.1 阴道脱落细胞涂片 将耳鼻喉棉棒蘸取适量 0.9% NaCl 溶液, 轻轻放入大鼠阴道, 顺时针方向轻刮宫颈口 1 周, 将含有阴道脱落细胞的分泌物均匀涂在玻璃载片上, 干燥后使用革兰氏染色镜检。正常大鼠动情周期分为以白细胞为主的动情间期、以有核上皮细胞为主的动情前期、

以角化细胞为主的动情期以及三者兼具的动情后期, 周期为 4~5 d, 规律且稳定。

2.4.2 苏木素-伊红 (HE) 染色 大鼠卵巢组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后脱水、石蜡包埋, 连续切成约 4 μ m 病理切片, 进行漂片、摊片、烤片、HE 染色、透明并封片, 于显微镜下观察。

2.4.3 TUNEL 染色检测大鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况 取“2.4.2”项下制备的病理切片, 按照 TUNEL 染色试剂盒说明书操作, 染色观察大鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况, 细胞凋亡率 = (凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

2.4.4 免疫组织化学技术 (IHC) 检测大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取“2.4.2”项下制备的病理切片, 经切片、摊片、烤片、脱蜡、柠檬酸抗原修复、封闭、一抗及二抗孵化、DAB 显色、苏木素复染, 封片后于显微镜下观察。根据阳性细胞面积总和占视野面积的百分比进行统计分析。

2.4.5 Western blot 检测大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取部分卵巢组织, 提取蛋白后并检测浓度, 蛋白煮沸变性, 经过配胶、上样、电泳、转膜、封闭后, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗摇床慢摇孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 每次 15 min, ECL 法显影。

2.4.6 RT-qPCR 检测大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达 取部分卵巢组织, 按照试剂盒说明书步骤提取 RNA, 并测得 RNA 浓度, 逆转录后选用 GAPDH 作为内参, 检测 caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达情况, 并通过扩增曲线得到 C_t 值, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析, 引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
GAPDH	正向 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	反向 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
Bax	正向 TGAAGTGGACAACAACATGGAG	148
	反向 AGCAAAAGTAGAAAAGGGCAACC	
Bcl-2	正向 TACGAGTGGGATACATGAGATGA	326
	反向 CTGAAGAGTTCTCCACCACC	
caspase-3	正向 CTGGACTGCGGTATTGAGACA	103
	反向 CGGCTGCGGTAGAGTAAGC	

2.5 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 如果检验样本资料呈现正态性分布且满足方差齐性, 采用方差分析及 t 检验; 不符合则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 益肾调经方对 DOR 大鼠动情周期的影响 由表 2 可知, 与空白组比较, 模型组大鼠动情周期停滞、延长或无明显动情周期 ($P < 0.01$), 说明造模后大鼠体内性激素分泌异常, 抑制了大鼠卵巢功能; 与模型组比较, 经过益肾调经方及激素序贯给药 15 d 后, 大鼠紊乱的动情周期时间缩短, 趋向规律 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。大鼠各动情周期阴道脱落细胞学染色结果见图 1。

表2 各组大鼠动情周期的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	动情周期/天
空白组	4.300±0.483
模型组	8.100±0.876**
益肾调经方高剂量组	5.200±0.789##
益肾调经方中剂量组	6.100±0.738##
益肾调经方低剂量组	7.400±0.516#
激素序贯组	5.900±0.568##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.2 益肾调经方对DOR大鼠卵巢病理变化的影响 如图2所示,空白组大鼠卵巢的皮质和髓质在光镜下清晰可见,皮质下富含结构和形态正常的各级卵泡及黄体,且间质腺少见,髓质内的血管、神经及淋巴管丰富,未见局部充血、变性坏死等病理变化;模型组大鼠可见卵巢皮质增厚,各级生长卵泡均减少,闭锁卵泡增加,间质腺多见,髓质萎缩;经益肾调经方及激素序贯给药后,卵巢皮质增厚减轻,各级生长卵泡均多于模型组,闭锁卵泡及间质腺少见,髓

质略萎缩。

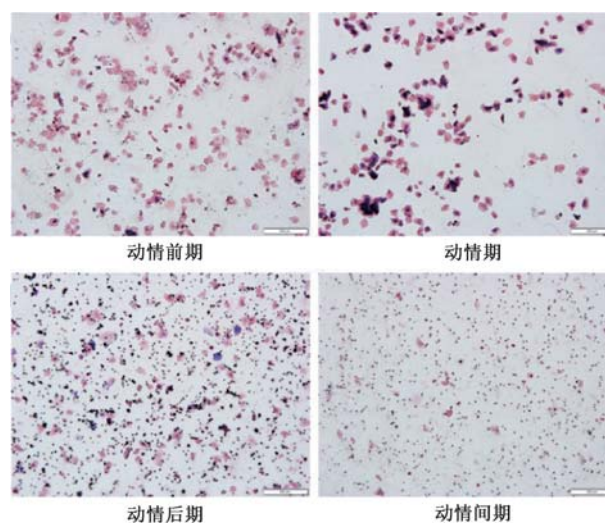


图1 大鼠阴道脱落细胞学 ($\times 50$)

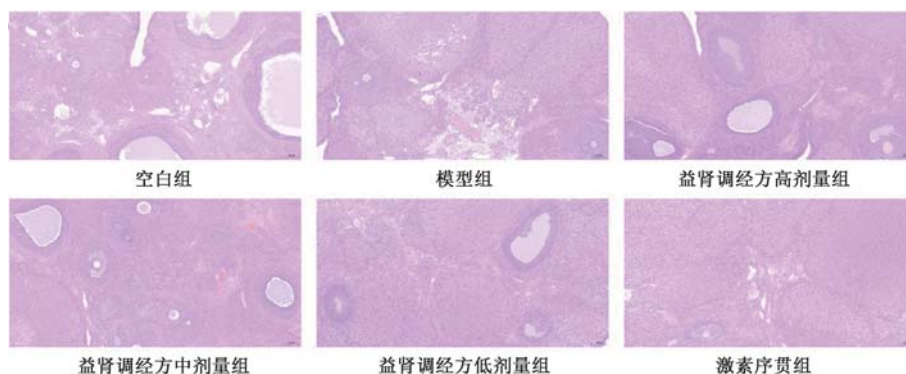


图2 各组大鼠卵巢组织病理变化 (HE, $\times 100$)

3.3 益肾调经方对DOR大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率增加 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率降低 ($P<0.01$),见表3、图3。

表3 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	凋亡率/%
空白组	8.691±0.516
模型组	17.669±0.806**
益肾调经方高剂量组	7.385±0.489##
益肾调经方中剂量组	9.587±0.434##
益肾调经方低剂量组	14.438±0.445##
激素序贯组	14.313±0.526##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

3.4 免疫组化检测大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的变化 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bax 表达均升高 ($P<0.01$), Bcl-2 表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bax 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表4、图4。

3.5 Western blot 检测大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax、Bcl-2

蛋白表达的变化 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,益肾调经方各剂量组大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图5~6。

3.6 益肾调经方对DOR大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织 Bax、caspase-3 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠卵巢组织 caspase-3、Bax mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图7。

4 讨论

卵巢储备功能减退 (DOR) 作为卵巢早衰的已病,而卵巢早衰作为卵巢储备功能减退的未病,深入研究 DOR,对于有效阻止和延缓卵巢早衰的发生具有重要意义,彰显了中医学“未病先防”“既病防变”的重要思想。经验方益肾调经方紧扣 DOR 脾肾亏虚为本,气滞血瘀为标的重要病机,在施诸“补”“舒”法同时,辅以活血化瘀之法,

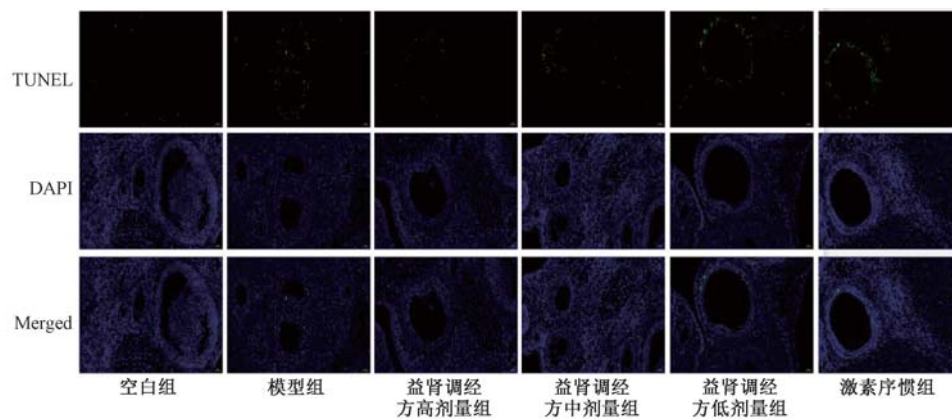


图 3 各组大鼠卵巢组织 TUNEL 染色 ($\times 200$)

表 4 各组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bcl-2、Bax 阳性细胞面积占比 (%) , $\bar{x} \pm s$, $n=10$

组别	caspase-3	Bcl-2	Bax
空白组	11.69 $\pm$ 0.54	14.41 $\pm$ 0.20	6.14 $\pm$ 0.33
模型组	20.19 $\pm$ 0.10**	5.25 $\pm$ 0.08**	12.86 $\pm$ 0.14**
益肾调经方高剂量组	11.58 $\pm$ 0.23##	13.95 $\pm$ 0.06##	6.28 $\pm$ 0.10##
益肾调经方中剂量组	13.56 $\pm$ 0.21##	9.61 $\pm$ 0.10##	8.24 $\pm$ 0.11##
益肾调经方低剂量组	15.05 $\pm$ 0.13##	5.55 $\pm$ 0.20#	10.13 $\pm$ 0.31##
激素序贯组	14.64 $\pm$ 0.31##	5.28 $\pm$ 0.14	12.30 $\pm$ 0.25#

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

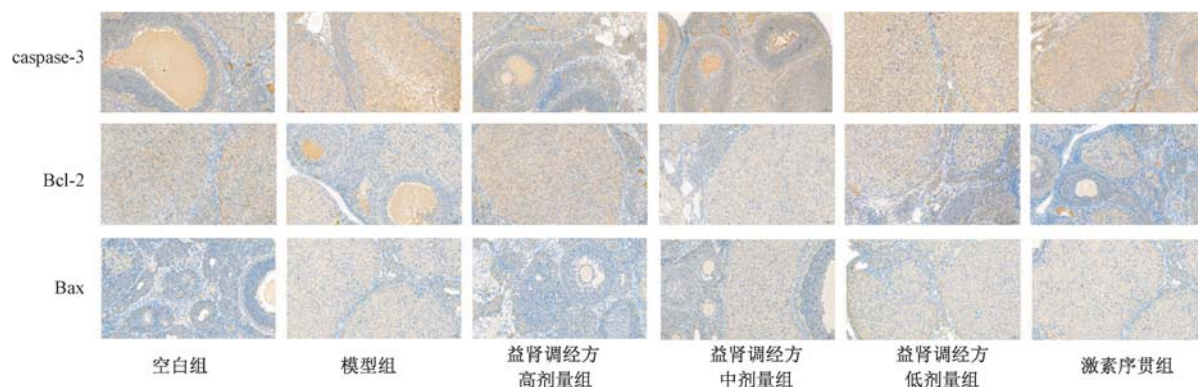
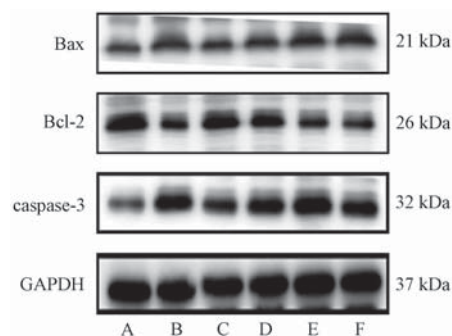


图 4 各组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bcl-2、Bax 表达 (IHC, $\times 200$)

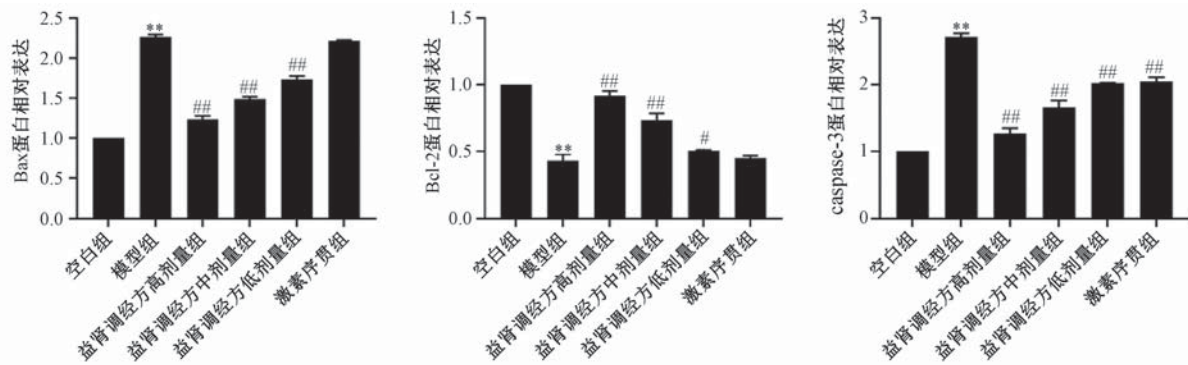


注: A 为空白组, B 为模型组, C 为益肾调经方高剂量组, D 为益肾调经方中剂量组, E 为益肾调经方低剂量组, F 为激素序贯组。

图 5 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白条带图

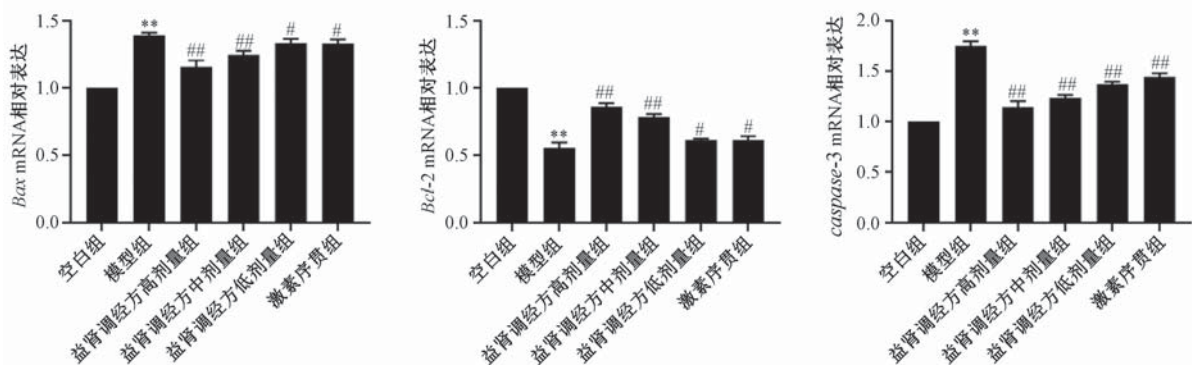
临床疗效显著。方中菟丝子、淫羊藿、肉苁蓉温补肾阳; 龟板、熟地、枸杞子、山药补肾养阴, 寓有阴中求阳, 阳中求阴之意; 黄芪、党参健脾益肾, 益后天而养先天; 丹参、当归温润养血, 化瘀调经; 八月札、香附理气疏肝; 山萸肉补益肝肾, 诸药联用, 共奏补肾健脾, 疏肝活血之功。

颗粒细胞凋亡引发卵母细胞质量下降, 甚则导致卵泡闭锁是形成 DOR 的重要病理基础^[11-12]。颗粒细胞作为卵巢的最主要功能细胞, 其与卵母细胞的相互交流对卵母细胞的发育和成熟起着不可替代的作用^[13]。此外, 颗粒细胞上含有卵泡赖以生长的卵泡刺激素和促黄体生成素受体, 所以颗粒细胞的存在与否直接决定着卵泡的发育和闭锁^[14]。因此, 本实验从颗粒细胞凋亡角度出发探讨益肾调经方治疗 DOR 的作用机制。由于雷公藤多苷片的生殖毒性^[15], 被广泛应用于诱导 DOR 大鼠模型^[16-17], 结果证实其与人类



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠卵巢组织中 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠卵巢组织中 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

DOR 临床及组织学特征较为相符^[18]。本研究采用雷公藤多苷片造模后，与空白组比较，模型组大鼠动情周期明显紊乱，且大鼠各级生长卵泡及卵泡中的颗粒细胞层数明显减少，表明本次实验造模成功。

细胞凋亡指在基因严格控制下，由促凋亡蛋白、抗凋亡蛋白和凋亡调控因子等共同参与的细胞程序性死亡，是机体重要的自我稳态机制^[19-20]。Bcl-2 属于抗凋亡基因，是协调细胞生命和死亡的关键因子^[21]；Bax 大多位于细胞质，属于促凋亡基因。正常情况下，Bax 与 Bcl-2 可产生同源或者异源二聚体来控制细胞凋亡，但如果这种平衡关系被各种凋亡信号刺激破坏，就会发生细胞凋亡^[22-23]。细胞凋亡的线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径都是经过活化 caspase 家族^[24]，继而影响底物蛋白，加速蛋白分解而触发凋亡。caspase-3 作为细胞凋亡中的重要效应因子，其大多位于 I 型细胞程序性死亡有序级联反应下游，是 caspase 家族中最关键的执行者，通常认为 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必由之路，其被激活预示着凋亡步入不可逆阶段^[25]。

本实验结果表明，益肾调经方可以有效改善 DOR 大鼠的动情周期，增加 DOR 大鼠各级生长卵泡及颗粒细胞。同时，其能提高 DOR 大鼠卵巢组织中抗凋亡因子 Bcl-2 的表达，降低促凋亡因子 caspase-3、Bax 的表达。综上所述，益肾调经方可能通过影响 DOR 大鼠卵巢中相关凋亡指标抑制

颗粒细胞凋亡，阻止并延缓卵泡发生闭锁，从而实现改善 DOR 大鼠卵巢功能的目的。

参考文献：

- [1] Pastore L M, Christianson M S, Stelling J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35 (1): 17-23.
- [2] Devine K, Mumford S L, Wu M E, et al. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181, 536 cycles from the society for assisted reproductive technology clinic outcomes reporting system [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(3): 612-619.
- [3] Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve--should we perform tests of ovarian reserve routinely? [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(11): 2729-2735.
- [4] 叶咏菊, 何富乐. 益肾调经法联合人工周期治疗卵巢功能减退临床疗效及对子宫内膜容受性的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(11): 2730-2733.
- [5] Lledó B, Llácér J, Turienzo A, et al. Androgen receptor CAG repeat length is associated with ovarian reserve but not with ovarian response [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(4): 509-515.
- [6] Eisenberger A, Westhoff C. Hormone replacement therapy and

- venous thromboembolism [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142: 76-82.
- [7] 吴洁, 陈蓉. 早发性卵巢功能不全的激素补充治疗专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(12): 881-886.
- [8] 陈思, 樊耀华, 李婧, 等. 滋肾育胎丸对DOR大鼠模型Bcl-2、Bax表达的影响[J]. 重庆医学, 2018, 47(14): 1853-1856; 1861.
- [9] Cruz G, Fernandois D, Paredes A H. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation[J]. *Reproduction*, 2017, 153(2): R59-R68.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1861.
- [11] Almeida C P, Ferreira M C F, Silveira C O, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells—A review[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(10): 1276-1281.
- [12] Murase T, Iwase A, Komatsu K, et al. Follicle dynamics: visualization and analysis of follicle growth and maturation using murine ovarian tissue culture[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(2): 339-343.
- [13] Komatsu K, Masubuchi S. Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(3): 527-535.
- [14] 曹婧. Aurora B及其SUMO修饰对小鼠卵泡发育和颗粒细胞生长的影响及调控机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [15] 徐颖, 樊媛芳, 赵元, 等. 近40年雷公藤生殖毒性研究概述[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3406-3414.
- [16] 汪倩, 卢鸽, 解子婧, 等. 艾灸对卵巢储备功能减退大鼠Nr2/HO-1信号通路的影响[J]. 中国针灸, 2021, 41(1): 53-58.
- [17] 金洵, 吕兴, 韦艳会, 等. 不同时间艾灸预处理对卵巢储备功能减退大鼠卵巢功能的影响[J]. 针刺研究, 2019, 44(11): 817-821.
- [18] 何国珍, 杨美春, 谢桂珍, 等. 雷公藤多苷诱导大鼠卵巢功能低下模型的实验研究[J]. 广西中医药大学学报, 2017, 20(4): 9-11.
- [19] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 796-801.
- [20] 钟大仓, 陈超, 李桐, 等. 胡椒碱诱导人胰腺癌PANC-1细胞凋亡的Caspase 3/Bax/Bcl-2信号通路机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1687-1691.
- [21] Levy M A, Claxton D F. Therapeutic inhibition of BCL-2 and related family members[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(3): 293-301.
- [22] 姜丹, 宫丽鸿. 稳斑汤对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和Caspase-3表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5): 1215-1218; 1311.
- [23] 冯嘉昆, 刘伟, 李正发, 等. 半夏提取物调节Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达诱导白血病细胞凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(31): 5023-5029.
- [24] Fossati S, Cam J, Meyerson J, et al. Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls[J]. *FASEB J*, 2010, 24(1): 229-241.
- [25] 何泽, 成光宇, 吕美香, 等. 解毒通络保肾法对实验性DM大鼠肾足细胞凋亡相关因子Bax、Bcl-2、Caspase-3的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(6): 1414-1417.