

[药 理]

左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响

阳松威¹，孙晓峰^{2*}，贺又舜²，陈 聰²，龚力民¹

(1. 湖南中医药大学药学院，湖南长沙 410208；2. 湖南中医药大学中医院，湖南长沙 410208)

摘要：目的 通过观察左归丸（熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶）对化疗致卵巢早衰模型小鼠卵巢功能的影响，探讨其作用机制。**方法** 将72只昆明雌性小鼠随机分为空白组，模型组，戊酸雌二醇片组，左归丸低、中、高剂量组。除空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水外，其余各组小鼠腹腔注射环磷酰胺复制卵巢早衰模型，连续灌胃给药30d。每天测小鼠动情周期。末次给药2h后各组小鼠取血，ELISA法测定外周血清雌二醇（E₂）、促卵泡激素（FSH）含有量。子宫称重计算脏器系数。HE染色进行双侧卵巢组织病理学检查。部分卵巢采用DNA末端原位标记法，以TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测卵巢颗粒细胞凋亡。**结果** 左归丸可有效改善化疗致卵巢早衰小鼠动情周期紊乱，有效升高血清E₂含有量，降低FSH含有量，提高子宫、卵巢系数，改善卵巢组织病理学改变，下调卵巢颗粒细胞凋亡。**结论** 左归丸可有效改善化疗致卵巢早衰小鼠衰老进程，恢复卵巢功能。

关键词：左归丸；卵巢早衰；雌二醇（E₂）；促卵泡激素（FSH）；卵巢颗粒细胞凋亡；

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2016)04-0717-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.001

Effect of Zuogui Pills on ovarian function in mice with chemotherapy-induced premature ovarian failure

YANG Song-wei¹，SUN Xiao-feng^{2*}，HE You-shun²，CHENG Cong²，GONG Li-ming¹

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. College of Traditional Chinese Medical, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To study the effect of Zuogui Pills (*Rehmanniae Radix preparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Lycii Fructus*, *Corni Fructus*, *Cyathulae Radix*, *Cuscutae Semen*, *Cervi Cornus Colla*, tortoise-plastron glue) on the ovarian function in mice with chemotherapy-induced premature ovarian failure (POF) and to explore their mechanism. **METHODS** Seventy-two Kunming female mice were randomly divided into the control group, the model group, estradiol valerate tablets group, Zuogui Pills low-, medium-, and high-dose groups, respectively. All mice were intraperitoneal injection of cytoxin to copy POF model except the control group, which was injected with saline. Mice in all treatment groups were consecutively administered orally corresponding drugs for 30 days. The vaginal smear was used to determine estrous cycle. Serum estradiol (E₂)，follicle stimulating hormone (FSH) were measured by ELISA collecting peripheral blood from mice two hours after the last administration. HE staining was performed on bilateral ovarian histopathological examination, in part by DNA *in situ* end labeling. TUNEL apoptosis detection kit was used in ovarian granulosa cell apoptosis. **RESULTS** Zuogui Pills could effectively improve the estrous cycle disorders; elevate serum E₂ level and lower FSH level in POF mice. The uterus and ovaries coefficient increased. The histopathological improvement and the reproductive function recovery of the ovaries and ovarian granulosa cell apoptosis were observed in POF mice. **CONCLUSION** Zuogui Pills can effectively delay the

收稿日期：2015-08-13

基金项目：国家自然科学基金（81303004）；湖南省科技厅资助项目（2009RS3018）；湖南省教育厅资助项目（09C727）；湖南省方剂学重点学科资助项目（2014）

作者简介：阳松威（1990—），男，硕士生，从事中药新药研究与开发。Tel: 15200832653, E-mail: 646972015@qq.com

***通信作者：**孙晓峰（1975—），女，副教授，研究方向为中医药对女性生殖的影响。Tel: 13975139551, E-mail: 2642724115@qq.com

aging process of chemotherapy-induced POF mice and recover the ovarian function.

KEY WORDS: Zuogui Pills; premature ovarian failure (POF); estradiol (E₂); follicle stimulating hormone (FSH); ovarian granulosa cell apoptosis

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指妇女在 40 岁之前因环境、心理、疾病等因素引起雌激素分泌失调, 内分泌功能紊乱, 进而引发诸如月经不调、闭经、性欲低下、潮热汗出、心烦失眠等症状的一系列症候群^[1-2]。其主要表现为生殖器官萎缩退化, E₂ 降低, FSH 与黄体生成素 (LH) 升高, 卵巢储备卵泡功能下降, 同时伴有精神情志症状或泌尿生殖道症状, 严重影响女性正常生活与工作^[3]。化疗是治疗恶性肿瘤与自身免疫性疾病重要手段之一, 其对卵巢不可避免的损害作用已成为诱发卵巢早衰的主要原因^[4]。目前常用化疗药物为环磷酰胺 (CTX), 属于烷化剂, 除作为化疗药物作用于肿瘤细胞外, 也作用于正常体细胞与生殖细胞, 引发一系列毒性反应, 是诱发 POF 的重要因素之一^[5]。随着现代医学发展以及对恶性肿瘤与免疫性疾病治疗的深入, 对保护由化疗药物 CTX 导致卵巢早衰的研究已引起人们广泛关注, 对其保护机制与治疗方法的研究显得愈发重要^[6-7]。

本实验以 CTX 腹腔注射小鼠复制 POF 模型, 研究左归丸对化疗致 POF 模型小鼠动情周期、外周血性激素 (E₂、FSH)、卵巢形态病理学改变以及颗粒细胞凋亡的影响, 探讨补肾填精代表方左归丸对 POF 模型小鼠卵巢保护作用与机制, 为研究补肾填精法对生殖功能的保护作用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 昆明小鼠, SPF 级, 雌性, 体质量 18~22 g, 许可证号: SCK (湘) 2011-0003, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.2 药物与试剂 左归丸, 由熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶组成, 由湖南中医药大学附属第一医院提供, 按照 8:4:4:3:4:4:4 比例制成中药浸膏, 每克浸膏含生药量 1 g; 戊酸雌二醇片, 德国拜耳医药保健有限公司提供, 批号 113A; 注射用环磷酰胺, 通化茂祥制药有限公司提供, 批号 131201; 4% 多聚甲醛, 湖南中医药大学组胚教研室提供; 氯化钠注射液, 湖南科伦制药有限公司提供, 批号 D140618H1; 小鼠 ELISA 试剂盒 (E₂), 上海江莱生物科技有限公司提供, 批号 KB11525; 小鼠 ELISA 试剂盒 (FSH), 上海江莱生物科技有限公

司提供, 批号 KB13251; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司提供, 批号 09B18B20。

1.3 仪器 TGL-16 型台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); ST-360 型酶标仪 (上海科华生物工程股份有限公司); JY3002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); FB223 型自动内校电子分析天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅 (上海南洋仪器有限公司); Haier 医用微波炉 (青岛 Haier 集团); S2-93 自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); KD2258 型石蜡切片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); DNP-9162 型电热恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); LEICA DM LB2 型双目显微镜 (德国 Leica 公司); Motic B5 显微摄像图像分析系统 (麦克奥迪实业集团公司)。

2 方法

2.1 卵巢早衰模型建立^[8-9] 参考文献方法与预实验结果, 取昆明雌性小鼠 72 只, 按体质量与随机数字表随机分为空白组, 模型组, 戊酸雌二醇片组, 左归丸低、中、高剂量组, 每组 12 只。除空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水外, 其余 5 组小鼠均以 30 mg/kg 剂量腹腔注射环磷酰胺, 注射体积为 20 mL/kg, 左右腹交替进行, 每天 1 次, 连续注射 20 d, 复制 POF 模型。

2.2 分组与给药 造模第 1 天开始, 分别将戊酸雌二醇片组 (0.13 mg/kg), 左归丸低、中、高剂量组 (13.65、40.95、122.85 g/kg, 分别相当于临床等效剂量 1、3、9 倍) 以 20 mL/kg 体积灌胃给药, 每天 1 次, 连续给药 30 d。

2.3 指标检测方法

2.3.1 对化疗致 POF 模型小鼠动情周期观察^[10] 每天上午 8:00 进行阴道细胞涂片检查, 观察并比较各组小鼠动情周期变化。动情周期判断依据如下: 动情前期, 大量有核上皮细胞, 少量角化上皮细胞; 动情期, 大量角化上皮细胞; 动情后期, 角化上皮细胞为主, 伴有少量白细胞; 动情间期, 大量白细胞。

2.3.2 对化疗致 POF 模型小鼠外周血清 E₂、FSH

水平测定 于末次给药2 h后,摘眼球取血,室温静置30 min后以3 000 r/min离心20 min,制备血清,液氮保存,参照试剂盒说明要求,以ELISA法测定小鼠外周血清中E₂、FSH含有量。

2.3.3 对化疗致POF模型小鼠卵巢组织病理学切片检查 小鼠采血后,迅速剖开腹腔,摘取双侧卵巢与子宫,剔除周围附着的脂肪与结缔组织,以分析天平称湿重,计算脏器系数;同时将双侧卵巢以4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续切片,HE染色等方法处理后,制作卵巢病理切片进行显微镜观察。

2.3.4 对化疗致POF模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡检测 参照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书,对卵巢颗粒细胞凋亡情况进行检测。具体方法为:切片常规脱蜡入水,H₂O₂处理,标本片加0.01 mol/L TBS 1:200新鲜稀释的蛋白酶K(Proteinase K)消化,标记缓冲液湿润,末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)与地高辛标记的脱氧尿苷三磷酸(DIG-dUTP)标记,封闭液封闭,加入生物素化抗地高辛抗体与链霉亲和素-过氧化物酶(SABC),37℃反应,DAB显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞,采用Motic B5显微摄像图像分析系统进行凋亡细胞平均光密度值分析。

2.4 统计学分析 所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用SPSS 19.0软件分析。组间比较,计量资料首先做正态性和方差齐性检验,满足方差齐性,采用单因素分析法进行方差分析,不满足方差齐性采用非参数法检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸对化疗致POF模型小鼠动情周期的影响 空白组小鼠动情周期稳定在4~5 d左右;模型组小鼠经化疗造模后动情周期出现无规律性紊乱,周期延长至8~11 d;左归丸治疗组小鼠动情周期紊乱状态得到不同程度改善,出现较为规律动情周期交替,时间为6~9 d不等。提示左归丸可较好地调节化疗致POF模型小鼠动情周期紊乱状态,使之趋于正常。

3.2 左归丸对化疗致POF模型小鼠外周血清E₂、FSH含有量的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清E₂含有量明显降低(P<0.01),FSH含有量明显升高(P<0.01)。经左归丸治疗后,与模型

组比较,左归丸高、中、低剂量组小鼠血清E₂含有量均明显升高(P<0.05,P<0.01),FSH含有量均明显降低(P<0.05,P<0.01)。提示左归丸可有效调节化疗致POF模型小鼠血清性激素水平,改善内分泌功能紊乱。结果见表1。

表1 左归丸对化疗致POF小鼠外周血清E₂、FSH含有量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Tab. 1 Effects of Zuogui Pills on the serum E₂, FSH contents in chemotherapy induced mice model of premature ovarian failure (POF) ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	E ₂ / (pg·mL ⁻¹)	FSH/ (pg·mL ⁻¹)
空白组	—	1.141 ± 0.657	0.716 ± 0.024
模型组	—	0.622 ± 0.049 ^{△△}	1.273 ± 0.130 ^{△△}
戊酸雌二醇片组	0.000 13	1.016 ± 0.112 ^{**}	0.900 ± 0.079 ^{**}
左归丸低剂量组	13.65	0.703 ± 0.047 [*]	1.164 ± 0.124 [*]
左归丸中剂量组	40.95	0.853 ± 0.104 ^{**}	1.040 ± 0.135 ^{**}
左归丸高剂量组	122.85	1.042 ± 0.110 ^{**}	0.880 ± 0.098 ^{**}

注:与空白组比较,^{△△}P<0.01;与模型组比较,^{*}P<0.05,^{**}P<0.01

3.3 左归丸对化疗致POF模型小鼠卵巢、子宫系数的影响 与空白组比较,模型组小鼠卵巢、子宫系数均明显降低(P<0.01)。经左归丸治疗后,与模型组比较,左归丸高、中剂量组小鼠子宫、卵巢系数均明显升高(P<0.05,P<0.01)。提示左归丸可有效增加化疗致POF模型小鼠生殖器官质量,增强生殖功能。结果见表2。

表2 左归丸对化疗致POF小鼠卵巢、子宫系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Tab. 2 Effects of Zuogui Pills on the ovarian factor and uterine factor in chemotherapy induced mice model of premature ovarian failure (POF) ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	卵巢系数/ (g·100 g ⁻¹)	子宫系数/ (g·100 g ⁻¹)
空白组	—	0.135 ± 0.021	0.414 ± 0.077
模型组	—	0.088 ± 0.023 ^{△△}	0.205 ± 0.047 ^{△△}
戊酸雌二醇片组	0.000 13	0.112 ± 0.029 [*]	0.276 ± 0.058 [*]
左归丸低剂量组	13.65	0.098 ± 0.028	0.231 ± 0.094
左归丸中剂量组	40.95	0.119 ± 0.026 [*]	0.296 ± 0.111 [*]
左归丸高剂量组	122.85	0.130 ± 0.041 ^{**}	0.325 ± 0.096 ^{**}

注:与空白组比较,^{△△}P<0.01;与模型组比较,^{*}P<0.05,^{**}P<0.01

3.4 左归丸对化疗致POF模型小鼠卵巢组织病理学改变的影响 与空白组比较,模型组小鼠卵巢原始卵泡和生长、成熟卵泡均明显减少,卵泡闭锁、坏死程度加深,间质纤维化、增厚,血管逐步萎缩;与模型组比较,左归丸治疗组小鼠卵泡组织萎缩病变明显改善,卵泡数量增加,卵泡充盈度良

好,间质纤维化逐步减轻,血管萎缩病变明显改善,并呈现一定剂量相关性。提示左归丸可有效改善化疗所致POF模型小鼠卵巢功能退化,缓解卵巢组织病变,抑制卵泡闭锁与消亡,增加卵泡数目,提高卵泡质量,增强卵巢的储备能力,改善卵巢功能。结果见图1。

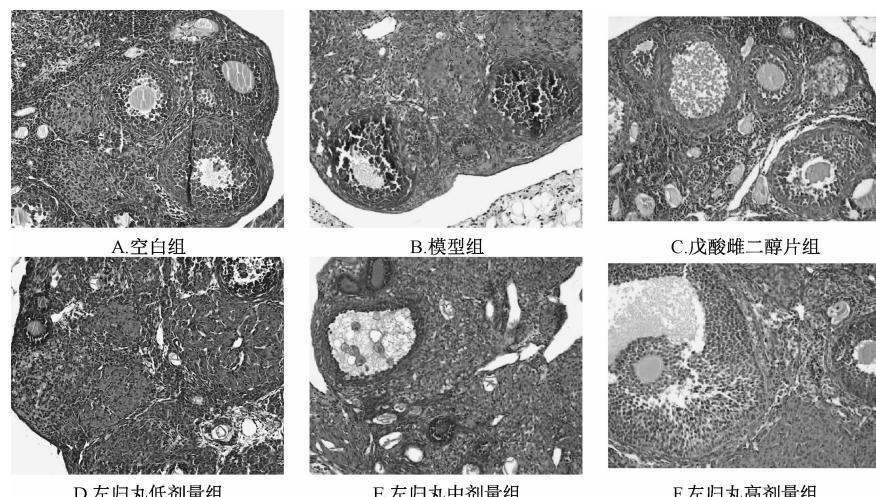


图1 左归丸对化疗致POF小鼠卵巢组织病理学改变的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Zuogui Pills on the ovarian histopathological changes in chemotherapy induced mice model of premature ovarian failure (POF) (HE, $\times 200$)

3.5 左归丸对化疗致POF模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 空白组颗粒细胞凋亡程度较轻,凋亡阳性细胞数较少。与空白组比较,模型组小鼠凋亡阳性细胞明显增多,凋亡平均光密度值明显升高($P < 0.01$)。经左归丸治疗后,与模型组比较,左归丸高、中剂量组小鼠凋亡颗粒细胞数量明显减少,凋亡平均光密度值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示左归丸可有效抑制化疗致POF模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡,延缓卵巢过早衰老进程,改善与恢复卵巢功能。结果见表3及图2。

表3 左归丸对化疗致POF小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响

($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Tab. 3 Effects of Zuogui Pills on the ovarian granulosa apoptosis in chemotherapy induced mice model of premature ovarian failure (POF) ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/($g \cdot kg^{-1}$)	平均光密度值
空白组	—	0.500 ± 0.326
模型组	—	$0.900 \pm 0.319^{\Delta\Delta}$
戊酸雌二醇片组	0.000 13	0.710 ± 0.136
左归丸低剂量组	13.65	0.839 ± 0.141
左归丸中剂量组	40.95	$0.671 \pm 0.178^*$
左归丸高剂量组	122.85	$0.511 \pm 0.116^{**}$

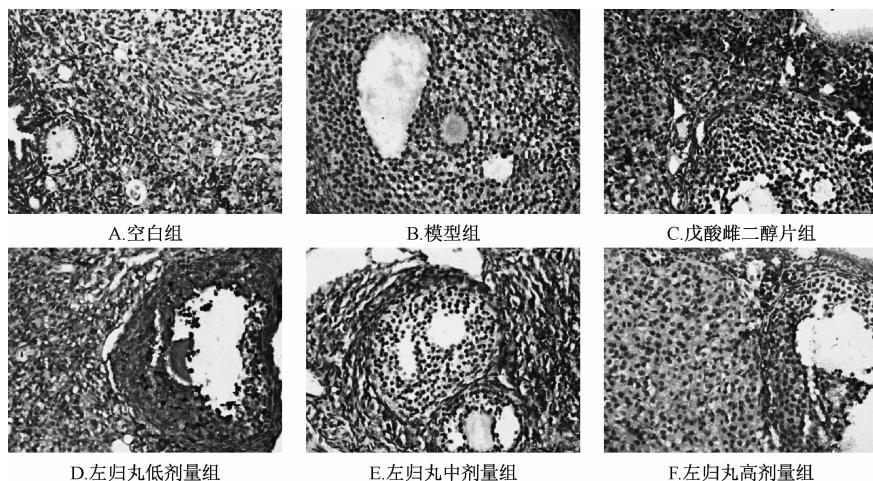
注:与空白组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

4 讨论

卵巢早衰(POF)致病因素较多,目前了解的

有遗传异常、自身免疫性疾病、感染、医源性、环境以及心理等,其中医源性因素包括盆腔手术、放化疗、免疫抑制药物(如环磷酰胺)、子宫动脉栓塞等^[11]。随着化疗药物的应用,患者的存活率和治愈率得到了提高,但是化疗药物对靶组织及细胞的选择性差,在杀灭病变细胞的同时,对正常组织和细胞也有不同程度的损伤。在女性生殖系统中,卵巢对化疗药物尤为敏感,化疗会破坏卵巢组织,导致卵泡闭锁和卵巢组织纤维化,引起卵巢的萎缩,成为POF发生的一个重要原因^[12]。环磷酰胺(CTX)是一种广泛使用的免疫抑制剂,对恶性肿瘤(如乳腺癌)与免疫性疾病(如红斑狼疮)具有较好的治疗作用,研究发现80%的儿童和青春期癌症患者使用CTX可明显延长存活期,但是长期使用CTX等烷化剂可影响女性卵巢的正常储备功能,损害生殖功能,并与服药年龄、给药剂量与方式有密切关系,特别对于青年妇女,虽化疗后有正常月经出现,但同样面临卵巢早衰的风险^[13-14]。

研究发现CTX导致卵巢早衰的主要机制为CTX破坏了卵泡颗粒细胞增殖,激活活性氧(ROS)介导的细胞凋亡信号通路,加快生长卵泡的凋亡,导致卵巢分泌性激素减少,反馈性引起下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)、垂体促性腺激素(FSH、LH)分泌增加,加速了卵巢内原始卵泡向生长卵泡的转化,同时转化后的生长卵泡又

图2 左归丸对化疗致 POF 模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 200$)Fig. 2 Effects of Zuogui Pills on the ovarian granulosa apoptosis in chemotherapy induced mice model of premature ovarian failure (POF) (TUNEL, $\times 200$)

受到CTX的损害,从而加速了卵泡的耗竭,最终导致卵巢早衰(POF)的发生^[15-17]。在对POF不同角度的病因研究中,发现无论从组织水平、分子水平甚至是基因水平,都存在卵巢颗粒细胞凋亡现象^[18-19]。女性卵巢储备功能总量从出生就已确定,卵母细胞数量处于不断耗竭的过程,其中99.9%的卵泡在发育不同阶段即发生闭锁,仅有少数卵泡可发育成熟并排卵。早期卵泡发生闭锁时,卵母细胞发生凋亡,其次卵泡颗粒细胞由内层开始逐渐凋亡;卵泡发育晚期发生闭锁,则是颗粒细胞先发生凋亡,再诱导卵母细胞凋亡,完成卵泡闭锁过程。同时,POF对细胞凋亡的调控可发生于转录、翻译、修饰、转运等不同阶段,也可在细胞核、细胞质、线粒体、质膜等不同区域,并通过死亡受体途径和线粒体途径实现。其中死亡受体途径起始于死亡受体与配体的结合,如凋亡诱导配体(TRAIL)与死亡受体4(DR4)和DR5结合可促进颗粒细胞凋亡,而线粒体途径是通过介导B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)相关X蛋白基因表达,启动半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspases)相关反应促进细胞凋亡^[20]。卵巢颗粒细胞是合成雌激素的重要场所,可调节机体内分泌功能,而化疗通过激活特定信号通路导致卵泡颗粒细胞异常凋亡,进而引发卵泡提前闭锁,破坏卵巢功能^[21]。

中医认为肾为先天之本与五脏阴阳之本,肾在“肾气-天癸-冲任-胞宫”的月经与生殖机制中具有核心推动作用,是人生、长、壮、老、已的根本,肾气亏虚,精血衰少,是卵巢早衰的主要机制之

一^[22]。研究发现中医药在防治化疗损伤性POF具有独特优势,通过补肾填精等多系统、多环节的整体调节作用,能明显调动人体机能,提高卵巢对化疗环境的适应性,进而恢复和改善卵巢功能,比单纯应用西药针对雌激素水平降低的干预措施有着明显优势,并且能够避免性激素带来的不良反应与依赖性。补肾填精之代表方剂左归丸出自张介宾的《景岳全书》,由熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、鹿角胶、龟板胶、菟丝子组成,具有滋阴补肾,填精益髓之功,在临幊上常用于卵巢早衰、围绝经期综合征等病症的治疗^[23]。研究发现左归丸的补肾填精作用可明显改善骨质疏松,调节性激素分泌,促进卵巢损伤修复,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、分化和修复^[24]。前期研究已证实左归丸对增龄小鼠卵巢具有明显保护作用^[25]。

本研究通过实验发现,左归丸可有效改善CTX致POF模型小鼠动情周期改变,调节外周血性激素(E_2 、FSH)含有量,增加生殖器官质量,保护并修复卵巢病变组织,增加卵泡数量充盈度,并通过抑制卵巢颗粒细胞凋亡延缓卵巢衰老进程,从而改善卵巢功能,调节并恢复生殖功能,提示补肾填精法可有效治疗化疗致卵巢早衰,为其临床使用提供一定实验依据,但对其抑制卵巢细胞凋亡具体机制,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡晓华,陈冬梅,贾磊.卵巢功能早衰的实验研究概述[J].中国中医药现代远程教育,2013,11(22):164-165.

- [2] 包 蕾, 张绍芬, 张月萍. 卵巢功能早衰的研究进展 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2011, 30(6): 479-483.
- [3] Bricaire L, Laroche E, Bourcigaux N, et al. Premature ovarian failures [J]. *Presse Med*, 2013, 42(11): 1500-1507.
- [4] 刘秀云, 秦佳佳. 左归丸对大鼠化疗导致的卵巢早衰防治作用的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(1): 5-9.
- [5] Desmeules P, Devine P J. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 90(2): 500-509.
- [6] Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2008, 27(12): 901-910.
- [7] Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, et al. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow derived mesenchymal stem cells during puberty [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(2): 135-140.
- [8] 付霞飞, 何援利. 化疗所致卵巢早衰动物模型的建立 [J]. 广东医学, 2008, 29(12): 1952-1954.
- [9] 杨 颖, 蔡 玟, 黄志彪, 等. 环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(5): 581-583.
- [10] Mclean A C, Valenzuela N, Fai S, et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification [J]. *J Vis Exp*, 2012, (67): e4389.
- [11] Venkatesh S, Kumar M, Sharma A, et al. Oxidative stress and ATPase6 mutation is associated with primary ovarian insufficiency [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 282(3): 313-318.
- [12] Hudson M M. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2010, 16(5): 1171-1183.
- [13] Carré-Pigeon F, Schubert B. Female fertility preservation in autoimmune diseases: possibilities and practises in France [J]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2007, 35(9): 853-860.
- [14] Del Mastro I, Boni L, Michelotti A, et al. Effect of the gona- dotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial [J]. *JAMA*, 2011, 306(3): 269-276.
- [15] Kishk E A F, Ali M H M. Effect of a gonadotropin-releasing hormone analogue on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in adult mice [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 287(5): 1023-1029.
- [16] 王雪峰, 何援利. 慢病毒介导 Bcl-2 基因保护化疗大鼠卵巢损伤的作用及机制 [J]. 广东医学, 2013, 34(2): 187-191.
- [17] 谷毅鹏, 张云波, 刘华忠, 等. 乌贼墨多糖对环磷酰胺致小鼠卵巢损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 358-361.
- [18] 刘慧萍, 尤昭玲, 雷 磊, 等. 补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡调控基因 (Bcl-2/Bax) 蛋白的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5): 1036-1038.
- [19] Massin N, Meduri G, Bachelot A, et al. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 282(1-2): 95-100.
- [20] 叶 娜, 董晓英, 李冬华. 卵巢早衰的颗粒细胞凋亡机制研究进展 [J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(3): 379-383.
- [21] 孙海芸, 陈云芝, 薛晓鸥. 四物汤合剂对化疗后大鼠卵巢形态及颗粒细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 256-259.
- [22] 康艳南, 满玉晶, 冷杨阳, 等. 卵巢早衰中西医发病机制探究 [J]. 光明中医, 2015, 30(2): 358-359.
- [23] 李红梅, 朱 玲, 钟志勇, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 GDF-9、BMP-15 表达的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(19): 1517-1518.
- [24] 孙琳琳, 康广盛, 韩海荣, 等. 左归丸实验研究概况 [J]. 中成药, 2010, 21(3): 477-480.
- [25] 孙晓峰. 左归丸促进小鼠未成熟卵母细胞体外核成熟的实验研究 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 444-447.