

坤宝丸对大鼠实验性卵巢早衰模型的影响

李想, 李嘉

(中国医科大学肿瘤医院、辽宁省肿瘤医院, 辽宁沈阳 110042)

摘要:【目的】探讨坤宝丸对实验性卵巢早衰大鼠模型的防治作用及机制。【方法】将60只大鼠随机分为空白组、模型组、坤宝丸低剂量组($0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、坤宝丸中剂量组($1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、坤宝丸高剂量组($3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、结合雌激素组($0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 每组10只。预防给药14 d后, 除空白组, 其他各组大鼠分别于第14、21天腹腔注射顺铂(4 mg/kg)建立卵巢早衰模型, 持续灌胃给药至实验的第28天。实验期间采用阴道涂片观察大鼠动情周期的变化。给药结束后, 检测大鼠血清促卵泡激素(FSH)、血清雌二醇(E_2)、血清促黄体生成激素(LH)水平, 免疫组织化学法检测大鼠卵巢组织转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 、结缔组织生长因子(CTGF)及干细胞因子(SCF)的表达。【结果】与空白组比较, 模型组大鼠的动情周期均有所延长, 血清FSH、LH, 卵巢组织CTGF、TGF- $\beta 1$ 、SCF水平均升高($P < 0.01$), 血清 E_2 水平降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 坤宝丸低剂量组大鼠大部分出现动情周期紊乱, 坤宝丸中、高剂量组及结合雌激素组大鼠多恢复正常动情周期; 与模型组比较, 坤宝丸低、中、高剂量组及结合雌激素组血清FSH、LH, 卵巢组织TGF- $\beta 1$ 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 坤宝丸中、高剂量组及结合雌激素组血清 E_2 水平显著升高, SCF表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 坤宝丸高剂量组及结合雌激素组卵巢组织CTGF表达显著降低($P < 0.01$)。各治疗组间上述指标比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】坤宝丸对顺铂诱导的大鼠卵巢早衰模型具有积极的干预作用, 其机制可能与减轻卵巢纤维化有关。

关键词: 坤宝丸; 卵巢早衰; 转化生长因子 $\beta 1$; 结缔组织生长因子; 干细胞因子; 卵巢纤维化; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1949-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.028

Effects of *Kunbao* Pills on Premature Ovarian Failure in Rats

Li Xiang, Li Jia

(Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To explore the preventative and therapeutic effect of *Kunbao* Pills for premature ovarian failure in rats. **Methods** Sixty rats were randomly divided into blank group, model group, low-dose *Kunbao* Pills group ($0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), middle-dose *Kunbao* Pills group ($1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), high-dose *Kunbao* Pills group ($3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and estrogen combination group ($0.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 10 rats in each group. After 14 days of prophylactic administration, a rat model of premature ovarian failure in various groups apart from the blank group was established by intraperitoneal administration of cisplatin (4 mg/kg) on experimental day 14 and 21, respectively, and the intragastric administration continued until experimental day 28. During the modeling, the change of rat estrous cycle was observed by vaginal smear. After medication ending, serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E_2) and luteinizing hormone (LH) were determined, and expression levels of transformed growth factor (TGF)- $\beta 1$, connective tissue growth factor (CTGF) and stem cell factor (SCF) in ovarian tissue were detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the blank group, the prolonged estrous cycle was showed in the model group, the levels of FSH, LH in serum and CTGF, TGF- $\beta 1$, SCF in ovarian tissue were increased ($P < 0.01$), level of E_2 in serum was decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the disordered estrous cycle was seen in most rats of the low-dose *Kunbao* Pills group, while the disordered estrous cycle was recovered to normal level in most rats of the middle- and high-dose *Kunbao* Pills groups and estrogen combination group. Compared with the model group, the levels of FSH and LH in serum and

收稿日期: 2020-11-18

作者简介: 李想(1983-), 女, 硕士, 副主任药师; E-mail: 15940112466@163.com

通讯作者: 李嘉(1982-), 女, 主管药师; E-mail: 627868409@qq.com

TGF- β 1 in ovarian tissue in the low-, middle- and high-dose *Kunbao* Pills groups and estrogen combination group were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). the levels of E_2 in serum and SCF in ovarian tissue in the middle- and high- dose *Kunbao* Pills groups and estrogen combination group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression level of CTGF in ovarian tissue in the high-dose *Kunbao* Pills group and estrogen combination group was significantly reduced ($P < 0.01$). There were no significant differences in the above indexes among various groups ($P > 0.05$). **Conclusion** *Kunbao* Pills have positive intervention effects on premature ovarian failure rat model induced by cisplatin, and its mechanism possible is related with fibrosis in ovarian tissue.

Keywords: *Kunbao* Pills; premature ovarian failure; transforming growth factor β 1 (TGF- β 1); connective tissue growth factor(CTGF); stem cell factor(SCF); ovarian fibrosis; rats

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指卵巢功能衰竭所引起的40岁之前即闭经的现象^[1]。其特点是原发或继发闭经伴随促黄体生成激素(LH)、促卵泡激素(FSH)水平升高以及雌二醇(E_2)水平降低^[2],且伴有不同程度的低雌激素症状如潮热多汗、性欲低下等^[3]。坤宝丸由女贞子(酒炙)、菟丝子、枸杞子、龟甲、熟地黄、当归、白芍等23味中药组成,具有滋补肝肾、养血通络^[4]的功效,适用于肝肾阴虚所致烘热汗出、心烦易怒、少寐健忘、头晕耳鸣、口渴咽干、四肢痠楚等证,临床常用于更年期综合征的治疗。更年期综合征主要表现的卵巢功能减退与卵巢早衰具有诸多相似症状^[5]。为探讨坤宝丸治疗卵巢早衰的潜力作用,本研究拟进一步观察坤宝丸对卵巢早衰大鼠模型的影响,以期对坤宝丸临床治疗卵巢早衰提供药效学依据,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级健康雌性SD大鼠60只,体质量180~220 g,购于辽宁长生生物有限公司,动物质量合格证号:SCXK(辽)2015-0001。大鼠饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,温度22~25℃,湿度55%~60%,每日12 h循环照明,实验期间大鼠自由饮水及摄食。实验动物使用许可证号:SCXK(辽)2019-0001。

1.2 药物与试剂 坤宝丸,北京同仁堂股份有限公司生产,口服,一次50粒,一日2次,每100粒质量为10 g,批号:20180425;结合雌激素片,新疆新姿源生物制药有限责任公司生产,批号:20180115。转化生长因子(TGF)- β 1、结缔组织生长因子(CTGF)、干细胞因子(SCF)检测试剂盒,

北京博奥森生物技术有限公司生产。

1.3 仪器 HHQ-2508型病理切片机(杭州艾普仪器设备有限公司);KD-P型展片机、KD-H型烘片机(北京世纪科信科学仪器有限公司);BX43型奥林巴斯生物显微镜(奥林巴斯中国有限公司);BG-XM496型自动酶标仪(常州三丰仪器科技有限公司);TGL-16.5M型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

1.4 分组、模型制备与给药 60只大鼠适应性饲养1周后,按体质量排序后随机分为空白组、模型组、坤宝丸低剂量组($0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、坤宝丸中剂量组($1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、坤宝丸高剂量组($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、结合雌激素组($0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组10只。预防灌胃给药14 d后,除空白组外,其余5组大鼠建立卵巢早衰动物模型^[6],分别于第14、21天腹腔注射顺铂(将20 mg顺铂溶于20 mL生理盐水中,注射体积为4 mL/kg)4 mg/kg。持续灌胃给药至实验的第28天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 动情周期检测 刮取大鼠阴道分泌物,对阴道涂片进行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察阴道上皮细胞的变化情况,用于监测大鼠动情周期。

1.5.2 血清FSH、 E_2 、LH水平检测 末次给药1 h后,腹腔注射50 g/L水合氯醛生理盐水溶液0.7 mL/kg麻醉大鼠,腹主动脉取血。采集的血液于室温下静置20 min后,以280 × g离心15 min,收集血清。采用酶联免疫吸附分析(ELISA)检测血清FSH^[7]、 E_2 ^[8]、LH^[9]水平。具体操作方法按试剂盒说明进行。应用酶标仪于450 nm波长处测量各指标光密度(OD)值。

1.5.3 免疫组织化学法检测卵巢组织 CTGF、TGF-β1、SCF 表达^[10] 将卵巢组织石蜡切片常规脱蜡至水。加体积分数 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min。滴加 10% 山羊血清, 室温孵育 10 min 后倾去血清。分别滴加一抗 (TGF-β1, 稀释比 1:400; CTGF, 稀释比 1:150; SCF, 稀释比 1:350), 于 37 °C 恒温培养箱中孵育 2 h。滴加生物素标记的二抗, 于 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min。滴加辣根酶标记的链霉素工作液, 于 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min。DAB 显色剂显色, 自来水冲洗, 复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。采用 ImageJ 软件检测 CTGF、TGF-β1、SCF 阳性表达的 OD 值, OD 值越大则表示抗体表达程度越强^[11]。

1.6 统计方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 坤宝丸对卵巢早衰大鼠动情周期的影响 表 1 结果表明: 空白组大鼠均表现为规律的动情周期, 模型组大鼠的动情周期均有所延长, 坤宝丸低剂量组大鼠大部分出现动情周期紊乱, 坤宝丸高、中剂量组及结合雌激素组大鼠多恢复正常动情周期。

表 1 各组大鼠动情周期变化比较

Table 1 Comparison of the rat estrus cycle changes of various groups

组别	鼠数(只)	动情周期紊乱鼠数(只)
空白组	10	0
模型组	10	10
坤宝丸低剂量组	10	7
坤宝丸中剂量组	10	4
坤宝丸高剂量组	10	4
结合雌激素组	10	3

2.2 坤宝丸对卵巢早衰大鼠血清 FSH、E₂、LH 水平的影响 表 2 结果显示: 与空白组比较, 模型组血清 FSH、LH 水平显著升高, E₂ 水平显著降低 (均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 坤宝丸低、中、高剂量组及结合雌激素组血清 FSH、LH 水平显著降低, E₂ 水平显著升高, 且呈剂量依赖性, 其中, 除坤宝丸低剂量组血清 E₂ 水平与模型组差异无统

表 2 各组大鼠血清促卵泡激素 (FSH)、雌二醇 (E₂)、促黄体生成激素 (LH) 水平比较

Table 2 Comparison of the levels of FSH, E₂ and LH in rat serum of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	FSH (IU·L ⁻¹)	E ₂ (ng·L ⁻¹)	LH (ng·mL ⁻¹)
空白组	10	0.012 ± 0.002	87 ± 7.58	1.47 ± 0.32
模型组	10	0.092 ± 0.013 ^①	53 ± 5.31 ^①	4.73 ± 0.58 ^①
坤宝丸低剂量组	10	0.063 ± 0.008 ^②	61 ± 5.96	3.88 ± 0.37 ^③
坤宝丸中剂量组	10	0.057 ± 0.006 ^③	65 ± 6.52 ^②	3.16 ± 0.42 ^③
坤宝丸高剂量组	10	0.041 ± 0.006 ^③	69 ± 7.64 ^③	2.56 ± 0.27 ^③
结合雌激素组	10	0.034 ± 0.004 ^③	73 ± 7.37 ^③	2.68 ± 0.38 ^③

① $P < 0.01$, 与空白组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其他各组指标的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各治疗组间 FSH、E₂、LH 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 坤宝丸对卵巢早衰大鼠 CTGF 表达的影响

表 3、图 1 结果显示: 与空白组比较, 模型组卵巢组织 CTGF 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 坤宝丸低、中、高剂量组及结合雌激素组卵巢组织 CTGF 表达水平均降低, 且呈剂量依赖性, 其中, 坤宝丸高剂量组、结合雌激素组差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各治疗组间 CTGF 表达水平比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 坤宝丸对卵巢早衰大鼠 TGF-β1 表达的影响

表 4、图 2 结果显示: 与空白组比较, 模型组卵巢组织 TGF-β1 表达水平显著升高 ($P <$

表 3 各组大鼠卵巢组织结缔组织生成因子 (CTGF) 表达水平比较

Table 3 Comparison of the expression level of CTGF in rat ovarian tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	CTGF OD 值
空白组	10	0.093 ± 0.024
模型组	10	0.238 ± 0.057 ^①
坤宝丸低剂量组	10	0.225 ± 0.036
坤宝丸中剂量组	10	0.199 ± 0.044
坤宝丸高剂量组	10	0.188 ± 0.044 ^②
结合雌激素组	10	0.175 ± 0.065 ^③

① $P < 0.01$, 与空白组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

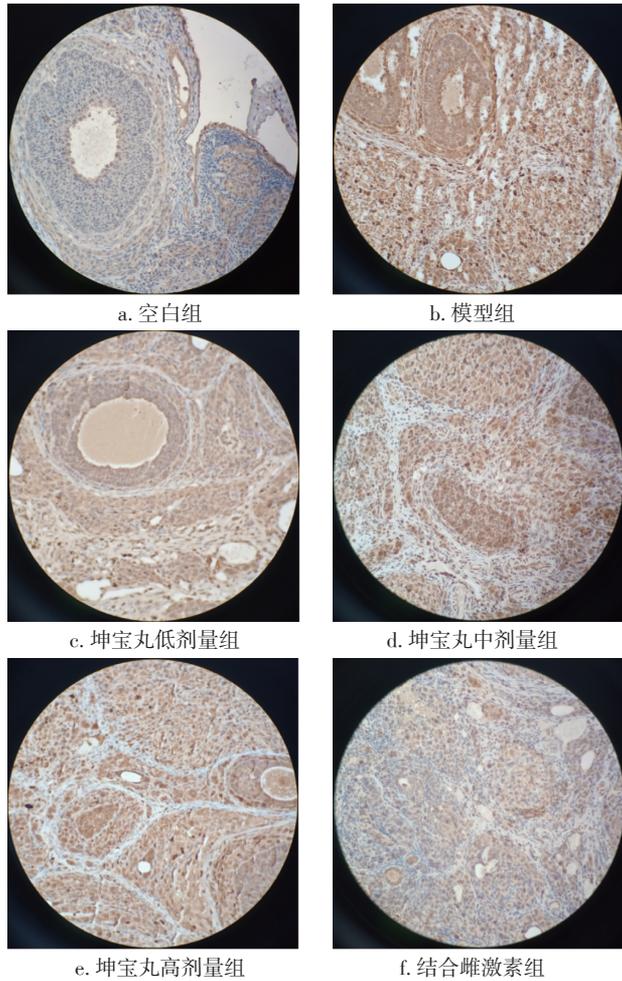


图1 各组大鼠卵巢组织结缔组织生成因子(CTGF)分布比较(免疫组织化学法, ×200)

Figure 1 Comparison of the distribution of CTGF in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×200)

0.01); 与模型组比较, 坤宝丸低、中、高剂量组及结合雌激素组卵巢组织TGF-β1表达水平均降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。各治疗组间TGF-β1表达水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 坤宝丸对卵巢早衰大鼠卵巢SCF表达的影响 表5、图3结果显示: 与空白组比较, 模型组卵巢组织SCF表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 坤宝丸低、中、高剂量组及结合雌激素组卵巢组织SCF表达水平均降低, 且呈剂量依赖性, 除坤宝丸低剂量组, 其他各治疗组与模型组的差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各治疗组间SCF表达水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表4 各组大鼠卵巢组织转化生长因子(TGF)-β1表达水平比较

Table 4 Comparison of the expression level of TGF-β1 in rat ovarian tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	TGF-β1 OD值
空白组	10	0.174 ± 0.038
模型组	10	0.301 ± 0.054 ^①
坤宝丸低剂量组	10	0.259 ± 0.034 ^②
坤宝丸中剂量组	10	0.250 ± 0.032 ^②
坤宝丸高剂量组	10	0.227 ± 0.047 ^③
结合雌激素组	10	0.238 ± 0.055 ^③

① $P < 0.01$, 与空白组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

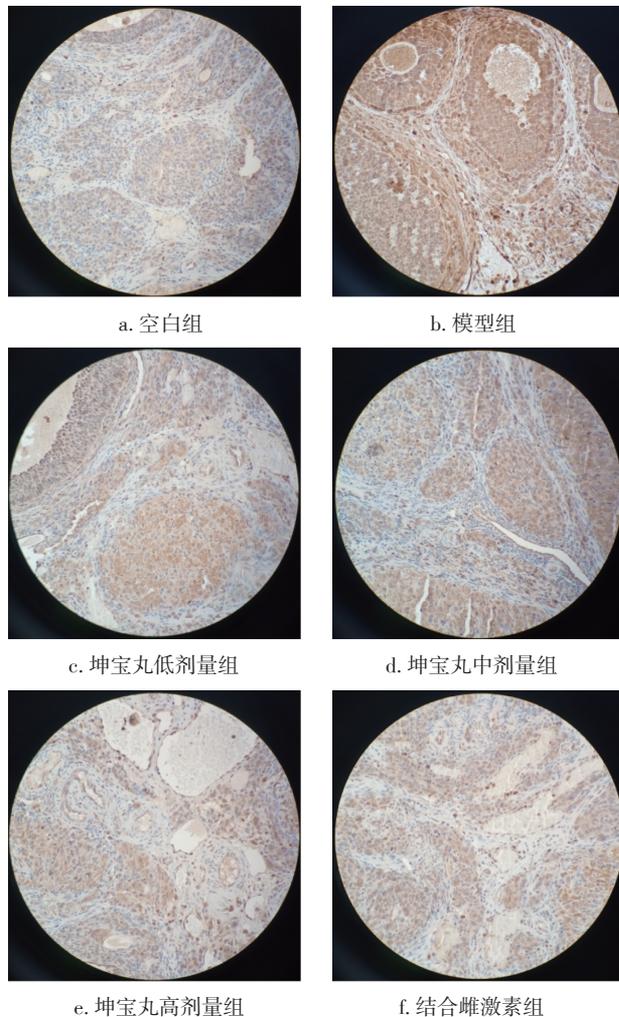


图2 各组大鼠卵巢组织转化生长因子(TGF)-β1分布比较(免疫组织化学法, ×200)

Figure 2 Comparison of the distribution of TGF-β1 in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×200)

表5 各组大鼠卵巢组织干细胞因子(SCF)表达水平比较
Table 5 Comparison of the expression level of SCF in rat ovarian tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	SCF OD值
空白组	10	0.146 ± 0.048
模型组	10	0.256 ± 0.033 ^①
坤宝丸低剂量组	10	0.230 ± 0.005
坤宝丸中剂量组	10	0.208 ± 0.030 ^②
坤宝丸高剂量组	10	0.195 ± 0.050 ^③
结合雌激素组	10	0.203 ± 0.057 ^②

① $P < 0.01$, 与空白组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

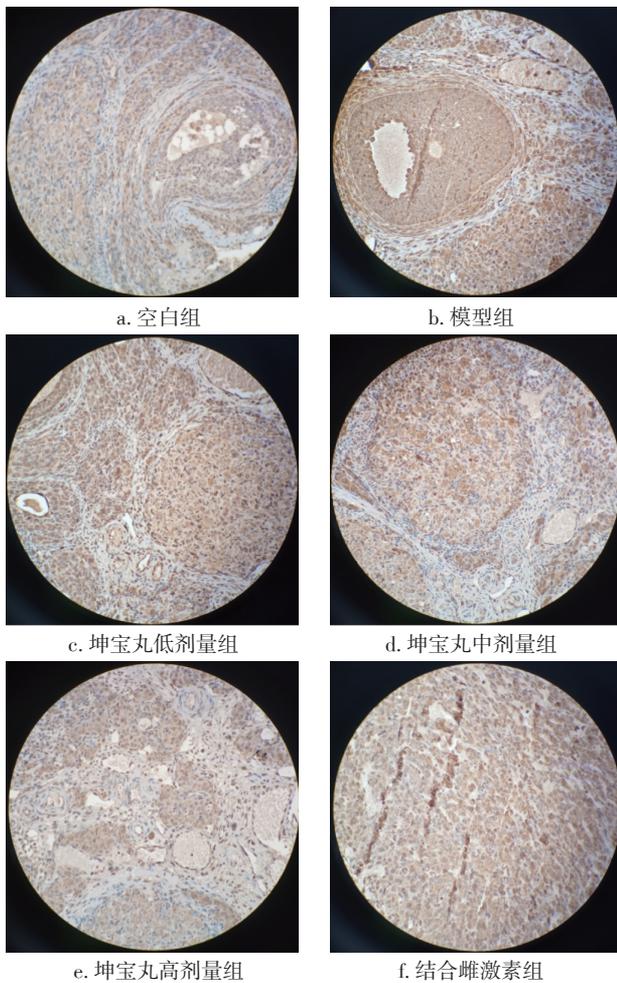


图3 各组大鼠卵巢组织干细胞因子(SCF)分布比较
(免疫组织化学法, ×200)

Figure 3 Comparison of the distribution of SCF in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×200)

3 讨论

目前建立卵巢早衰动物模型的方法主要有自

身免疫模型、化疗药物模型、基因敲除模型、半乳糖模型等。其中,自身免疫模型和化疗药物模型较为成熟,基因敲除模型仅能明确某一基因的作用,但不能完全解释卵巢早衰病因,半乳糖血症为常染色体显性遗传病,可以较好地造成动物卵巢早衰模型,但临床病例很少,缺乏实用的临床意义。化疗药物可造成卵巢细胞DNA结构和功能的损害,最终使细胞死亡或突变,导致卵巢损伤。癌症患者使用顺铂治疗后可能出现卵子形成障碍和卵巢功能损伤等现象。因此,本研究采用临床常用化疗药物顺铂制作卵巢早衰模型,但结果仅适用于化疗药物引起的卵巢早衰,坤宝丸对其他因素引起卵巢早衰模型的影响有待于进一步研究。

卵巢早衰患者雌激素水平是突然下降的,故症状出现快而明显,因此认为其症状出现与雌激素分泌减少的速度和程度相一致^[12]。卵巢早衰患者血中FSH持续在40 IU/L以上, E_2 常低于100 pmol/L^[13]。FSH是垂体前叶嗜碱性细胞分泌的一种激素,主要作用为促进卵泡成熟,其可促进卵泡颗粒层细胞增生分化,并能促进整个卵巢长大。LH由脑垂体前叶嗜碱性细胞分泌,它作用于成熟的卵泡,能引起排卵并生成黄体^[14]。 E_2 是一种甾体雌激素,有 α 、 β 2种类型, α 型生理作用强,如卵巢缺如、发育低下、原发性卵巢衰竭等卵巢疾病血浆 E_2 水平均降低^[15]。而正常的动情周期代表着规律的激素水平变化。本研究结果显示,模型组大鼠的动情周期延长,表明卵巢早衰大鼠卵巢储备功能下降,激素水平紊乱。而坤宝丸治疗可以改善实验性卵巢早衰模型大鼠动情周期,使血清FSH、LH水平降低, E_2 水平显著增加,表明坤宝丸具有调节卵巢早衰模型大鼠激素水平的作用。

卵巢纤维化是造成卵巢功能衰退的原因之一,纤维化可出现在卵巢早衰及多囊卵巢综合症的卵巢组织中^[16]。TGF- β 1、CTGF和SCF等生长因子是刺激卵巢组织发生纤维化的主要因素。研究表明,过度表达TGF- β 1的转基因小鼠会发生广泛的纤维化,抗TGF- β 1或抗Smad的治疗可以阻止纤维化的发生和发展^[17],因此,调控TGF- β 1表达水平对调控卵巢早衰具有重要的意义。CTGF是TGF- β 1的直接下游效应介质,CTGF和TGF- β 1可共同诱导纤维化的发生,在许多纤维化疾病过程

中CTGF和TGF- β 1表达同步增高，TGF- β 1主要表达于组织纤维化病变的早期，CTGF持续表达是纤维化病变缓慢进展的重要因素，且可能是器官纤维化发生发展的中心环节^[18]。SCF是一种多功能细胞因子，参与慢性炎症及肿瘤的血管形成^[19]，卵巢颗粒细胞可产生SCF，而SCF又可以促进卵巢颗粒细胞的生长发育，影响早期卵泡的正常发育。本研究结果显示：卵巢早衰大鼠卵巢组织CTGF、TGF- β 1、SCF表达水平较空白组显著升高($P < 0.01$)，坤宝丸及结合雌激素治疗可使卵巢早衰大鼠卵巢组织CTGF、TGF- β 1、SCF表达水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明坤宝丸可能通过降低卵巢组织CTGF、TGF- β 1、SCF的表达，减轻卵巢纤维化损伤，进而促进早期卵泡的生长发育，防止卵巢早衰的发生。

综上所述，坤宝丸对注射顺铂诱导的大鼠卵巢早衰具有积极的干预作用，我们认为其可以作为治疗卵巢早衰的候选中成药。其机制可能与降低CTGF、TGF- β 1、SCF的表达从而减轻卵巢纤维化有关。

参考文献:

- [1] 王亚如, 苏健, 狄晓倩, 等. 卵巢早衰的研究进展[J]. 医学综述, 2019(19): 3895-3899.
- [2] 张诗雪, 王轶蓉. 卵巢早衰中医认识和中医药治疗概况[J]. 中医药临床杂志, 2019(8): 1410-1413.
- [3] 刘彩霞. 卵巢早衰的病因学研究进展[J]. 中国处方药, 2019, 17(8): 27-29.
- [4] 张敏, 杜敏, 王文莹. 卵巢早衰的中医药治疗进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(43): 69-70.
- [5] 李晓倩, 米艳荣, 任宁卫, 等. 加味逍遥丸合坤宝丸治疗绝经综合症[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(72): 104.
- [6] LEE E H, HAN S E, PARK M J, et al. Establishment of effective mouse model of premature ovarian failure considering treatment duration of anticancer drugs and natural recovery time [J]. J Menopausal Med, 2018, 24(3): 196-203.
- [7] 张高, 周琴, 季丹丹, 等. 联合抗苗勒氏管激素、卵泡刺激素、雌二醇检测在诊断卵巢早衰中的应用价值分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(11): 1381-1383.
- [8] 高宇云. 激素治疗方案用于卵巢早衰的疗效观察及预后评定[J]. 中国实用医药, 2019, 14(21): 104-105.
- [9] 王秀文. 卵巢早衰应用四物合剂治疗的临床有效性分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(30): 102-103.
- [10] 罗文姬, 李瑞珍, 罗清平, 等. 全自动免疫组化法与手工免疫组化法检测卵巢癌ALK蛋白表达的对比分析[J]. 罕少疾病杂志, 2019, 26(5): 35-37.
- [11] ABBASS M, TROUGHT K, LONG D, et al. Automated immunohistochemical method to analyze large areas of the human cortex[J]. J Neurosci Methods, 2018, 294(15): 81-90.
- [12] 刘艳红, 崔艳萍, 董秋燕. 高龄备孕二胎妇女性激素、AMH水平检测临床意义[J]. 中国医药科学, 2018, 8(16): 79-81.
- [13] 邱明英, 龚卫玲, 钟伟苑, 等. 促进卵泡发育成熟的中西医疗效分析[J]. 心电图杂志(电子版), 2019, 8(3): 70-71.
- [14] 曹秋红, 马春芹. 低剂量激素替代治疗对围绝经期妇女雌二醇、促卵泡素、黄体生成素水平的影响及安全性[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版), 2019, 6(7): 36.
- [15] 张瑜, 王志红, 张海玲, 等. 龙鹿丸联合重组人促卵泡激素治疗多囊卵巢综合征不孕症的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(8): 2420-2424.
- [16] 张玉莹, 徐玲玲. 毓麟合剂对肾阳虚型排卵障碍大鼠卵巢功能的影响研究[J]. 中国药师, 2017, 20(4): 621-623.
- [17] 温云花, 吴学明, 史春, 等. 保妇康栓治疗宫颈柱状上皮异位疗效及对子宫颈组织ICMI-1mRNA、TGF- β 1mRNA及炎症细胞因子水平的影响[J]. 中国药师, 2017, 20(8): 1400-1402.
- [18] 赵丹, 吕春梅, 朱辉, 等. 卵巢纤维化影响因素及相关疾病研究进展[J]. 解剖科学进展, 2016, 22(5): 523-525.
- [19] XU K, SUN Y, KH AL-ANI M, et al. Synergistic promoting effects of bone morphogenetic protein 12/connective tissue growth factor on functional differentiation of tendon derived stem cells and patellar tendon window defect regeneration [J]. J Biomech, 2018, 66(3): 95-102.

【责任编辑：侯丽颖】