

加减益经汤对卵巢功能减退大鼠转化生长因子 β 超家族 相关成员的影响

李丽美¹, 夏建红¹, 黄雪萍¹, 陈婷婷², 和秀魁³

(1. 广东省妇幼保健院妇保科, 广东广州 510095; 2. 广东省妇幼保健院保健部, 广东广州 510095;

3. 广东省妇幼保健院妇科, 广东广州 510095)

摘要:【目的】观察加减益经汤对环磷酰胺所致卵巢功能减退大鼠卵巢转化生长因子 β (TGF- β)超家族相关成员的影响。【方法】将60只成年雌性SD大鼠随机分为空白组, 模型组, 加减益经汤高、中、低剂量组, 补佳乐组, 每组10只。除空白组, 其余各组大鼠采用环磷酰胺75 mg/kg腹腔单次注射法构建卵巢功能减退模型。造模后2 h, 加减益经汤高、中、低剂量组分别给予加减益经汤23.58、11.79、5.895 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹(生药剂量)灌胃, 补佳乐组给予补佳乐混悬液0.09 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹灌胃, 模型组与空白组灌胃等体积蒸馏水, 1次/日, 连续28 d。模型组在造模后2周, 其他治疗组在给药结束后, 于动情间期处死。酶联免疫吸附分析(ELISA)检测血清抗苗勒氏管激素(AMH)、抑制素B(INHB)水平, 免疫组织化学法检测卵巢中AMH、TGF- β 1、转化生长因子 β 1受体(TGF- β 1R)、骨形态发生蛋白15(BMP-15)的表达。【结果】与空白组比较, 模型组大鼠血清AMH、INHB水平, 卵巢组织中AMH、TGF- β 1、TGF- β 1R、BMP-15表达水平均降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 加减益经汤高、中、低剂量组及补佳乐组大鼠血清AMH水平, 卵巢组织中AMH、TGF- β 1、TGF- β 1R、BMP-15的表达水平均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 加减益经汤高、中剂量组血清INHB水平明显升高($P < 0.01$)。【结论】加减益经汤可通过上调TGF- β 超家族中AMH、INHB、TGF- β 1、TGF- β 1R、BMP-15的表达来改善环磷酰胺诱导的卵巢功能减退大鼠卵巢储备功能。
关键词: 加减益经汤; 卵巢功能减退; 转化生长因子 β 超家族; 转化生长因子 β 1; 转化生长因子 β 1受体; 抗苗勒氏管激素; 抑制素B; 骨形态发生蛋白15; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)10-2203-06

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtm.2021.10.027

Effects of Modified *Yijing* Decoction on Transforming Growth Factor β Superfamily-Related Members in Rats with Diminished Ovarian Reserve

LI Li-Mei¹, XIA Jian-Hong¹, HUANG Xue-Ping¹, CHEN Ting-Ting², HE Xiu-Kui³

(1. Dept. of Women Health Care, Guangdong Maternity and Child Care Hospital, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 2. Dept. of Health Care, Guangdong Maternity and Child Care Hospital, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 3. Dept. of Gynecology, Guangdong Maternity and Child Care Hospital, Guangzhou 510095 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of modified *Yijing* Decoction (MYD) on transforming growth factor (TGF) - β superfamily-related members in rats with diminished ovarian reserve (DOR) induced by cyclophosphamide. **Methods** Sixty adult female SD rats were randomly divided into blank group, model group, low-, middle- and high-dose MYD groups, and Progynova group, 10 rats in each group. Apart from the blank group, the rats in the other groups were induced into DOR model by one-off intraperitoneal injection of cyclophosphamide of 75 mg/kg. Hour 2 after modeling, low-, middle- and high-dose MYD groups were given intragastric administration of MYD at the rude drug dosage of 23.58, 11.79, 5.895 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, respectively, the Progynova group was given intragastric administration of Progynova suspension at the dosage of 0.09 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, and the blank group and model group were given intragastric administration of the same volume of distilled water, once a day, the treatment lasting 28 days. The rats in the model group 2 weeks after modeling, and in the other

收稿日期: 2020-08-15

作者简介: 李丽美(1985-), 女, 博士, 主治医师; E-mail: 372266894@qq.com

通讯作者: 和秀魁, 女, 博士, 主任医师; E-mail: ama_he@163.com

基金项目: 广东省中医药局资助课题(编号: 20194003, 20193004)

groups after medication in estrum were sacrificed. The serum levels of anti-Müllerian hormone (AMH), inhibin B (INHB) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression levels of AMH, TGF- β 1, TGF- β 1 receptor (TGF- β 1R), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) in ovarian tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, the serum levels of AMH and INHB, and the expression levels of AMH, TGF- β 1, TGF- β 1R, BMP-15 in ovarian tissue were decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the serum level of AMH, and the expression levels of AMH, TGF- β 1, TGF- β 1R, BMP-15 in ovarian tissue were increased in the high-, middle- and low- MYD groups, and Progynova group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the serum level of INHB was significantly enhanced in the high- and middle- MYD groups ($P < 0.01$). **Conclusion** MYD is effective for improving ovarian function by up-regulating the expression of AMH, INHB, TGF- β 1, TGF- β 1R, and BMP-15 in the TGF- β superfamily in rats with DOR induced by cyclophosphamide.

Keywords: modified *Yijing* Decoction; diminished ovarian reserve; transforming growth factor β superfamily; transforming growth factor β 1 (TGF- β 1); transforming growth factor β 1 receptor (TGF- β 1R); anti-Müllerian hormone (AMH); inhibin B (INHB); bone morphogenetic protein 15 (BMP-15); rats

加减益经汤是广州中医药大学第一附属医院妇科张玉珍、陶莉莉教授的临床经验方,用于治疗卵巢功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)引起的月经不调、不孕、性激素不足等疾病,疗效显著。前期临床研究发现,加减益经汤可明显改善肾虚肝郁证卵巢功能减退患者的临床症状、性激素水平及妊娠率^[1-3],可恢复环磷酰胺导致的卵巢功能减退大鼠的动情周期,改善性激素水平^[4],但其机制尚不明确。转化生长因子 β (TGF- β)超家族相关成员对卵泡的生长、发育、成熟、闭锁,甾体激素的产生起着重要的调控作用^[4]。另外,前期实验研究证实,采用单次腹腔注射75 mg/kg环磷酰胺法可成功构建卵巢功能减退大鼠模型^[1,5],因此,本研究同法复制卵巢功能减退大鼠模型,以补佳乐为阳性对照药,观察加减益经汤对TGF- β 超家族中相关成员的影响,以期明确其抗卵巢功能减退的作用机制。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级12周龄健康成年雌性SD大鼠60只,体质量(230 \pm 10)g,由广东省医学实验动物中心提供,动物质量合格证号:SCXK(粤)2013-0002。经阴道脱落细胞涂片筛查,动情周期均正常。室温20~25℃,光照14h,相对湿度45%~55%。

1.2 药物、试剂与仪器 加减益经汤组成包括熟地黄20g,党参20g,菟丝子20g,当归10g,丹参15g,白芍10g,柴胡6g等9味中药^[1,6-7]。将上述中药材水煎并浓缩为每毫升含生药2.358、1.179、0.5895g的药液,装瓶冷藏备用(由广东省中医研究所制备),应用时以蒸馏水调配。戊酸雌二醇(补佳乐),为法国DELPHARM Lille S.A.S公司产品,批号:251A2。环磷酰胺,山西普德药业有限公司产品,批号:04130301;抗苗勒氏管激素(AMH)酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒、抑制素B(INHB)ELISA试剂盒,均为上海西唐生物科技有限公司产品;AMH抗体与TGF- β 1抗体为美国Santa Cruz生物技术公司产品;骨形态发生蛋白15(BMP-15)与转化生长因子- β 1受体(TGF- β 1R)为武汉博士德生物科技有限公司产品。Bio-Rad 680酶标仪,美国伯乐公司产品;Olympus DP2-BSW型病理图像采集系统,日本奥林巴斯公司产品。

1.3 动物模型的制备、分组与给药 将60只大鼠按随机数字表分出10只作为空白组,给予1mL生理盐水腹腔注射;其余50只大鼠给予环磷酰胺75 mg/kg(加生理盐水配制成1mL药液)单次腹腔注射构建卵巢功能减退模型^[1,5,8]。环磷酰胺造模后,大鼠出现精神差、蜷卧少动、脱毛、易激惹等表现,提示造模成功。将造模成功的大鼠采用完全随机分组法分为加减益经汤高、中、低剂量

组, 补佳乐组, 模型组, 每组10只。加减益经汤高、中、低剂量组参考《中药药理研究方法学》分别给予加减益经汤23.58、11.79、5.895 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (生药剂量)灌胃; 补佳乐组参考《中药药理研究方法学》给予补佳乐(与生理盐水配成混悬液)0.09 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃; 模型组与空白组灌胃10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 蒸馏水。造模后2 h开始灌胃给药, 1次/日, 连续4周。

1.4 观察指标与方法 模型组在造模后2周, 其余组在结束给药后, 筛查出处于动情间期的大鼠, 断颈处死。腹主动脉采血, 室温静置30 min后离心分离血清置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。以双抗体夹心ELISA法测定血清AMH、INHB水平。卵巢组织切片后, 采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法按试剂盒说明书分别测定AMH、TGF- β 1、TGF- β 1R、BMP-15蛋白表达。采集免疫组织化学图像, 用Image-Pro Plus分析软件进行图像分析, 每张切片于400倍镜下随机选取5个视野, 进行积分光密度(IOD)测定。IOD代表目的蛋白表达强度。

1.5 统计方法 采用SPSS 21.0 For Windows 统计分析软件进行数据处理。所有计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组比较采用单因素方差分析

方法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清AMH、INHB水平的比较 表1结果显示: 与空白组比较, 模型组大鼠血清AMH、INHB水平明显降低($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组血清AMH水平明显升高($P<0.01$), 加减益经汤高、中剂量组血清INHB水平明显升高($P<0.01$), 且各治疗组之间AMH、INHB比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠血清AMH、INHB水平的比较

Table 1 Comparison of the serum levels of AMH and INHB in various groups ($\bar{x}\pm s$, $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	鼠数(只)	AMH	INHB
空白组	10	17.32 \pm 1.96	150.54 \pm 19.05
模型组	10	9.87 \pm 1.72 ^①	87.89 \pm 17.97 ^①
补佳乐组	10	15.97 \pm 1.87 ^②	111.25 \pm 13.84
加减益经汤高剂量组	10	14.75 \pm 2.06 ^②	120.14 \pm 22.96 ^②
加减益经汤中剂量组	10	14.66 \pm 2.33 ^②	124.11 \pm 19.96 ^②
加减益经汤低剂量组	10	14.10 \pm 1.76 ^②	111.14 \pm 20.81

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

2.2 各组大鼠卵巢TGF- β 1、TGF- β 1R表达水平的比较 表2, 图1~2结果显示: 与空白组比

表2 各组大鼠卵巢TGF- β 1、TGF- β 1R表达水平的比较

Table 2 Comparison of the expression levels of TGF- β 1 and TGF- β 1R in rat ovarian tissue of various groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	TGF- β 1 IOD值	TGF- β 1R IOD值
空白组	10	39 520.25 \pm 3 034.53	10 930.35 \pm 1 089.87
模型组	10	20 976.87 \pm 3 385.54 ^①	6 086.16 \pm 1 366.70 ^①
补佳乐组	10	27 811.26 \pm 1 889.68 ^②	8 327.58 \pm 500.56 ^③
加减益经汤高剂量组	10	29 793.98 \pm 3 566.76 ^③	8 663.30 \pm 585.01 ^③
加减益经汤中剂量组	10	28 565.70 \pm 3 198.38 ^③	8 352.32 \pm 665.88 ^③
加减益经汤低剂量组	10	27 342.17 \pm 1 991.62 ^②	8 055.16 \pm 640.42 ^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

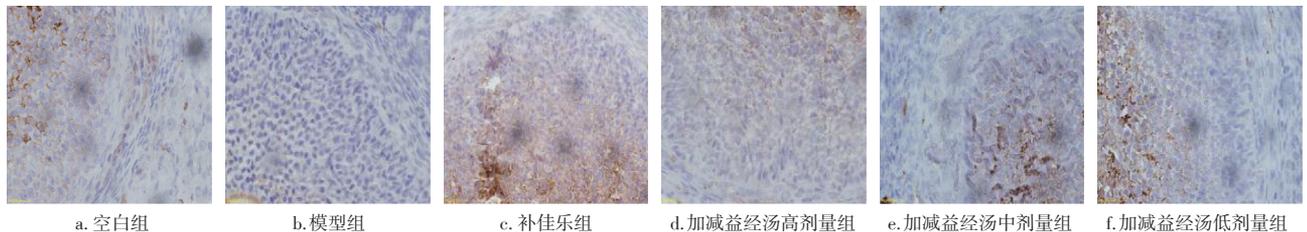


图1 各组大鼠卵巢TGF- β 1阳性表达分布的比较(免疫组织化学法, $\times 400$)

Figure 1 Comparison of the distribution of positive expression of TGF- β 1 in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, $\times 400$)

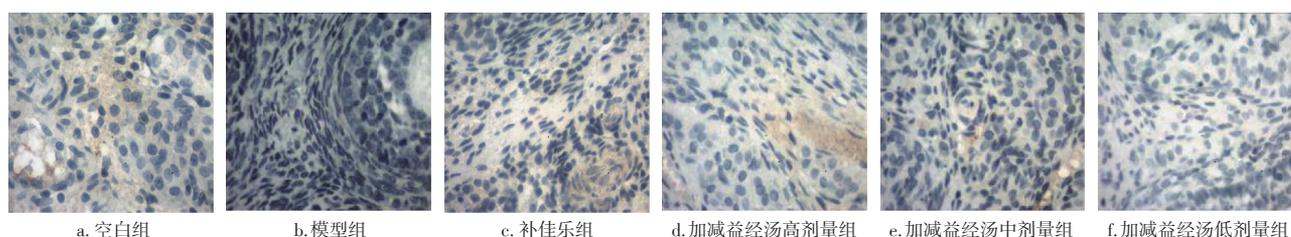


图2 各组大鼠卵巢TGF-β1阳性表达分布的比较(免疫组织化学法, ×400)

Figure 2 Comparison of the distribution of positive expression of TGF-β1 in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×400)

较, 模型组大鼠卵巢TGF-β1、TGF-β1R IOD值明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠卵巢TGF-β1、TGF-β1R IOD值明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且各治疗组之间TGF-β1、TGF-β1R比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢AMH、BMP-15表达水平的

比较 表3, 图3~4结果显示: 与空白组比较, 模型组AMH、BMP-15的IOD值明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组AMH、BMP-15 IOD值明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且各治疗组之间AMH、BMP-15 IOD值比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 各组大鼠卵巢AMH、BMP-15表达水平的比较

Table 3 Comparison of the expression levels of AMH and BMP-15 in ovarian tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	AMH IOD值	BMP-15 IOD值
空白组	10	24 276.68 ± 3 122.93	340 535.46 ± 27 495.48
模型组	10	12 083.57 ± 1 396.84 ^①	222 745.08 ± 20 023.42 ^①
补佳乐组	10	20 237.66 ± 1 276.56 ^③	278 137.75 ± 34 202.27 ^②
加减益经汤高剂量组	10	21 201.72 ± 1 544.98 ^③	294 423.19 ± 22 992.96 ^③
加减益经汤中剂量组	10	21 208.65 ± 2 483.95 ^③	290 052.26 ± 20 929.47 ^③
加减益经汤低剂量组	10	19 479.61 ± 2 019.62 ^③	282 033.55 ± 25 234.15 ^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

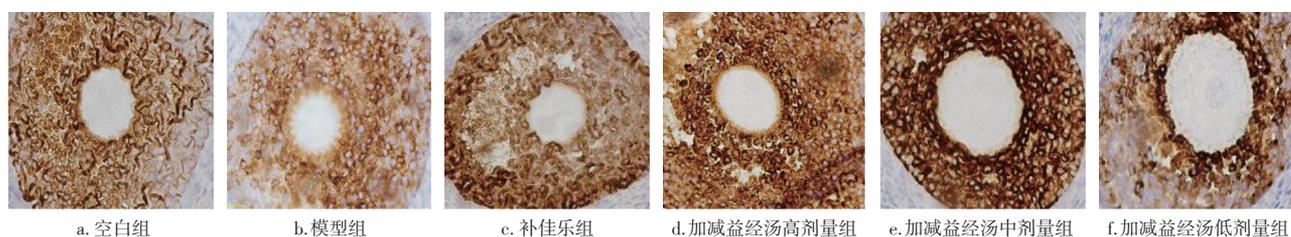


图3 各组大鼠卵巢AMH阳性表达分布的比较(免疫组织化学法, ×400)

Figure 3 Comparison of the distribution of positive expression of AMH in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×400)

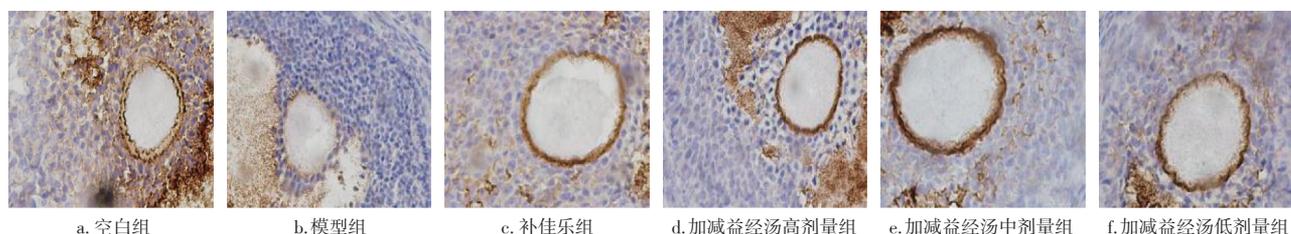


图4 各组大鼠卵巢BMP-15阳性表达分布的比较(免疫组织化学法, ×400)

Figure 4 Comparison of the distribution of positive expression of BMP-15 in rat ovarian tissue of various groups (by immunohistochemistry, ×400)

3 讨论

中医学将卵巢功能减退归属于“经水早断”“血枯”“不孕”等病证范畴。《傅青主女科》将其描述为“年未老而经水断”，采用益经汤治疗。张玉珍教授^[9]认为本病病机为脾肾亏虚，肝郁血瘀，治法为补肾健脾、疏肝活血，采用加减归肾丸治疗。陶莉莉教授认为此病肾虚乃是根本，情志因素是诱发卵巢功能减退的重要病因，采用加减益经汤治疗^[11-3]。加减益经汤是在益经汤的基础上加减化裁而来，方中：以熟地黄、菟丝子、党参为君，补肾健脾；以杜仲、丹参、北沙参为臣，补肾活血，补而不燥；当归、白芍为佐，补血柔肝；柴胡为使，疏肝气。全方配伍合理、简洁，肾、脾、肝、心、肺五脏同调，共奏补肾健脾，疏肝活血之功。前期临床研究发现，加减益经汤可改善肾虚肝郁证卵巢功能减退患者的临床症状，提高妊娠率，降低卵泡刺激素(FSH)、促黄体素(LH)水平，升高雌二醇(E_2)含量^[11-3]；动物实验证实，加减益经汤可恢复环磷酰胺导致的卵巢功能减退大鼠的动情周期，改善各级卵泡数目，降低FSH、LH水平，升高 E_2 含量，但机制尚不明确^[1]。

卵巢衰老的机制是由多种生理及外界因素相互作用和逐渐积累的生物学现象，卵泡数目减少、卵泡质量降低是导致卵巢衰老而引起生育问题以及绝经的关键原因。卵泡启动、生长发育、退化及甾体激素合成除受下丘脑-垂体-卵巢轴(HPOA)调节外，还受多种卵巢局部分泌的生长因子、细胞因子和激素等所构成的复杂调控网络调节^[10]。近年来，许多研究表明，TGF- β 超家族中的AMH、INHB、TGF- β 1、BMP-15参与了卵巢生理和病理过程的调控，对卵泡的发育起着重要的调控作用^[11]。因此，本研究从TGF- β 超家族中对卵巢发育起重要作用的细胞因子与受体入手，以环磷酰胺诱导的卵巢功能减退模型大鼠为研究对象，观察卵巢功能减退大鼠TGF- β 超家族中AMH、INHB、BMP-15、TGF- β 1、TGF- β 1R的变化以及高、中、低剂量加减益经汤干预的作用机制。

AMH主要由卵巢窦前卵泡及小的窦状卵泡的颗粒细胞分泌，它可以相对真实地反映原始卵泡库存量^[11,12]。它的作用是维持原始卵泡持续处于静止状态，抑制其向初级卵泡的转化，可作为预测

卵巢储备功能及促排卵过程中卵巢反应性的血清学标记物^[13]。AMH作为评估卵巢储备功能的指标，对卵巢损伤的评估具有意义^[14-15]。本研究结果显示，卵巢功能减退模型大鼠血清AMH与卵巢AMH的表达降低，经加减益经汤治疗后，卵巢功能减退大鼠血清与卵巢AMH的表达升高。表明加减益经汤可通过上调AMH的表达而促进卵泡发育，抑制卵泡过度闭锁，提高卵巢储备力。

INHB作为早期预测卵巢储备功能下降的指标，是诊断卵巢功能减退的敏感指标之一^[16]。Yong等^[17]发现，INHB的上升与卵巢颗粒细胞功能的恢复呈正相关，推测INHB可作为评估卵泡发育或预测卵母细胞恢复的标志物。研究发现，补肾中药可增加血清INHB水平，改善卵巢储备功能，抑制卵泡过度闭锁^[18]。本研究结果显示，卵巢功能减退模型大鼠卵巢INHB分泌减少，经加减益经汤干预后，血清INHB分泌增加，且呈现出剂量依赖性，高、中剂量组明显，而补佳乐作用不大。表明加减益经汤可通过上调INHB的分泌而提高卵巢储备功能。

TGF- β 1在原始卵泡的募集及原始卵泡池的维持方面起重要调控作用^[19]。TGF- β 1R是TGF- β 1发挥作用的重要组成部分。有研究发现，卵巢功能减退和POF患者血清中TGF- β 1的水平较正常人明显降低^[20]。本研究结果显示，卵巢功能减退模型大鼠卵巢TGF- β 1、TGF- β 1R表达水平降低，经加减益经汤干预后，卵巢TGF- β 1与TGF- β 1R的表达水平升高。表明加减益经汤可通过上调卵巢TGF- β 1、TGF- β 1R的表达，促进卵泡的生长、发育。

BMP-15是X染色体上首个被证实的对维持卵巢储备及决定绝经年龄有着关键作用的剂量效应基因^[21]。BMP-15对卵泡的早期发育极其重要，其基因突变可能是卵巢功能减退或POF发生、发展的机制之一^[22]。本研究结果显示，卵巢功能减退模型大鼠卵巢BMP-15表达降低，经加减益经汤干预后，卵巢BMP-15的表达升高。表明加减益经汤可通过上调卵巢BMP-15的表达促进卵泡早期发育，从而提高卵巢储备功能。

综上所述，加减益经汤改善卵巢储备功能可能与调节卵巢TGF- β 超家族成员AMH、INHB、BMP-15、TGF- β 1、TGF- β 1R的表达有关。

参考文献:

- [1] 李丽美. 加减益经汤干预卵巢功能减退的疗效与机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [2] 李丽美, 陶莉莉, 和秀魁, 等. 加减益经汤改善卵巢功能减退肾虚肝郁证患者临床症状与妊娠率[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(2): 312-315.
- [3] 李丽美, 和秀魁, 陶莉莉, 等. 加减益经汤改善肾虚肝郁证DOR患者卵巢功能的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 125-127.
- [4] ELVIN J A, YAN C, MATZUK M M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 159(1-2): 1-5.
- [5] 李丽美, 陶莉莉, 和秀魁, 等. 环磷酰胺建立SD大鼠DOR模型的研究[J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2180-2183, 2188.
- [6] 和秀魁. 加减益经汤对卵巢功能减退大鼠模型TscmTORC1信号通路的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [7] 吴碧辉. 加减益经汤治疗DOR的临床观察及对DOR大鼠卵巢全基因表达差异的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [8] 刘惠芬, 杨冬梓, 罗亦娟. 环磷酰胺对大鼠卵巢功能的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(4S): 99-102.
- [9] 刘昱磊, 刘新玉, 滕辉. 张玉珍中西医结合分阶段治疗卵巢早衰经验介绍[J]. 新中医, 2017, 49(10): 187-189.
- [10] 丁艳. TGF- β 1/Smads 信号通路在卵巢功能衰退中的表达及意义[D]. 张家口: 河北北方学院, 2018.
- [11] MC NATTY K P, SMITH P, MOORE L G, et al. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 234(1-2): 57.
- [12] LI H W, LEE V C, LAU E Y, et al. Role of baseline antral follicle count and anti-mullerian hormone in prediction of cumulative live birth in the first in vitro fertilisation cycle: a retrospective cohort analysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61095.
- [13] KNAUFF E A, EIJKEMANS M J, LAMBALK C B, et al. Anti-mullerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(3): 786-792.
- [14] 李晓林, 刘思旋, 黄润. AMH对暴露于化疗毒性下卵巢功能损伤的评估价值[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(3): 100-104.
- [15] 吕向阳, 孙海梅, 路欣. 抗苗勒氏管激素作为预测化疗后卵巢储备功能状态的实验性研究 [J]. 生殖与避孕, 2011, 31(6): 369-373.
- [16] 赖爱鸾, 朱海燕, 孙艳格, 等. 绝经过渡期妇女性激素变化的特点及月经模式的改变[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(5): 368-370.
- [17] YONG P, BAIRD D T, THONG K J, et al. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(1): 35-44.
- [18] 夏天, 柴淑娟, 马灵芝, 等. 补肾调冲方对半乳糖致POF大鼠卵巢储备力及其相关因子INHB、AMH表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2714-2716.
- [19] 杨书红. MicroRNAs在始基卵泡募集过程中的表达模式和调控机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [20] 谢江燕, 何畏, 赵俪梅, 等. 卵巢早衰患者CD4⁺、CD25⁺调节性T细胞的变化及干扰素- γ 、转化生长因子- β 1的表达[J]. 华西医学, 2013, 28(3): 44-46.
- [21] 余雁, 周丽, 全进毅. 骨形态发生蛋白15(BMP15)/生长分化因子9(GDF9)在卵巢功能及女性生育过程中的作用[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(6): 409-414.
- [22] 马丽丽, 刘春莲, 徐仙. 卵巢早衰患者骨形态发生蛋白15基因突变的研究[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(12): 1019-1022.

【责任编辑: 侯丽颖】