

二仙汤对顺铂所致大鼠卵巢早衰模型中卵巢颗粒细胞增殖及周期的影响

赵笛 赵丕文 武虹波 蔡欣悦 孙丽萍 陶仕英 牛建昭 卢迪 齐明月

【摘要】 目的 观察二仙汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** 以不同剂量的二仙汤药理血清作用于体外培养的顺铂损伤卵巢颗粒细胞,并以正常药理血清为空白对照,戊酸雌二醇药理血清为阳性对照,同时对比加入 PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002 后各组的变化。MTT 法检测各组药理血清作用于卵巢颗粒细胞 24 小时、48 小时和 72 小时的增殖情况。流式细胞术检测各组中细胞周期各时相的变化。**结果** (1)二仙汤对顺铂损伤后的卵巢颗粒细胞具有增殖促进作用($P<0.05$);且对于顺铂损伤后并予以 LY294002 抑制剂的颗粒细胞也具有增殖改善作用($P<0.05$)。(2)二仙汤各剂量组及戊酸雌二醇组均能使处于 S 期的顺铂损伤颗粒细胞比例显著增多, G_0/G_1 期细胞相对比例减少($P<0.01$),且增殖指数升高($P<0.01$)。**结论** 二仙汤对卵巢颗粒细胞增殖有显著促进作用,其作用机制可能是激活或增强 AKT 信号通路,抑制细胞凋亡,从而促进细胞增殖;另一方面,也可能是通过促进颗粒细胞从 G_0 期向 S 期转化,增加 S 期细胞比率来实现的。

【关键词】 二仙汤; 卵巢早衰; 卵巢颗粒细胞; 细胞增殖; 细胞周期

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.02.001

Influences of *Erxian* decoction on proliferation and cell cycle of ovarian granulosa cells in premature ovarian failure model caused by CDDP ZHAO Di, ZHAO Piwen, WU Hongbo, et al. Beijing University of Chinese Medicine basic medical college, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHAO Piwen, E-mail: pwzhao@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the influences of *Erxian* decoction on the proliferation and cell cycle ovarian granulosa cells caused by CDDP. **Methods** Different doses of *Erxian* decoction pharmacological serum were injected in ovarian granulosa cells injured by CDDP, normal pharmacological serum was used as blank control, progynova pharmacological serum was used as positive control, and focus on the comparison of changes after joined LY294002 which was PI3K/AKT pathway inhibitor in each group at the same time. Each group of ovarian granulosa cells proliferation was detected by MTT method when pharmacological serum dosing for 24h, 48h and 72h. Cell cycle and phase changes in each group were determined by flow cytometry. **Results** (1) *Erxian* decoction has proliferation promoting effect on CDDP injury ovarian granulosa cells, and has proliferation effect of ovarian granulosa cells after injured by CDDP and added LY294002 inhibitors. (2) *Erxian* decoction each dose group and progynova group can rise the proliferation index by enhancing the proportion of S phase granulosa cells and decreasing G_0/G_1 phase proportion. **Conclusions** *Erxian* decoction has significant proliferation promoting effect of CDDP injury

基金项目: 国家自然科学基金(81273887)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院[赵笛(硕士研究生)、赵丕文、武虹波(硕士研究生)、蔡欣悦(硕士研究生)、孙丽萍、陶仕英、牛建昭、卢迪(硕士研究生)、齐明月(硕士研究生)]

作者简介: 赵笛(1990-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向: 妇科常用中药的作用机制。E-mail: jody201096@163.com

通信作者: 赵丕文(1967-),女,博士,教授。研究方向: 妇科常用中药的作用机制。E-mail: pwzhao@sina.com

ovarian granulosa cells. The possible mechanism on one hand is that it activates or enhances AKT signaling pathways and inhibits cell apoptosis. On the other hand, it perhaps promotes S phase proportion transformation from G₀ phase therefore increases the ratio of S phase cells.

【Key words】 *Erxian* decoction; Premature ovarian failure; Ovarian granulosa cells; Cell proliferation; Cell cycle

卵巢功能早衰 (premature ovarian failure, POF) 又称原发性卵巢功能不全, 是指妇女 40 岁以前由于卵巢功能衰退而发生的排卵和分泌激素功能的紊乱或停止, 引起月经失调、性欲减退、性功能下降、不孕、围绝经期综合征等一系列症状的妇科内分泌疾病。呈现低雌激素和高促性腺激素状态^[1], POF 严重危害妇女健康, 导致患者丧失生殖能力, 生殖器萎缩, 长期低雌激素状态还会增加患骨质疏松、脂质代谢紊乱、心血管疾病等的风险^[2]。近年来随着肿瘤发病率的日渐增长, 因化疗导致卵巢功能低下和不孕的患者明显增多, 化疗也因此成为 POF 发病的一个重要原因^[3]。颗粒细胞是卵泡的重要结构组分, 其形态和功能伴随着原始卵泡的生长、增殖、分化、闭锁、排卵以及黄体形成等生理过程, 为研究细胞增殖、分化和细胞间相互作用、信号转导通路的理想细胞模型^[4]。

二仙汤由张伯讷教授创制, 全方由仙茅、淫羊藿、黄柏、巴戟天、当归和知母组成, 对围绝经期综合征的治疗效果显著, 已被载入多部中医方剂学著作, 并得到国内外中医界的广泛认可^[5]。张丽娟等^[6]研究发现, 二仙汤通过调节血清中各激素水平, 改变细胞中凋亡相关蛋白的表达量来降低顺铂对卵巢的损害, 并且具有促进卵泡发育, 改善并增强卵巢功能的作用。本实验以离体卵巢颗粒细胞为研究对象, 通过观察二仙汤对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞增殖及细胞周期的作用, 为二仙汤应用于临床治疗卵巢早衰提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 健康雌性 SD 大鼠, 体质量 50 ~ 70 g, 清洁级, 斯贝福实验技术有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(京)2016-0002。动物饲养在室温、自然光照的清洁级实验室内, 食水充足。

实验药物: 二仙汤组成为仙茅 10 g、淫羊藿 15 g、巴戟天 15 g、当归 10 g、知母 15 g、黄柏 10 g, 药材粉末购自北京东直门医院, 应用时转化为药材饮片的质量, 按本实验用大鼠质量 (60 g) 与成人标准

体质量 (60 kg) 的折算系数折算出灌胃剂量 (总生药材质量) 即 11.25 g/kg。顺铂, 每支 10 mg, 由齐鲁制药有限公司生产, 国药准字: H37021358。戊酸雌二醇 (商品名: 补佳乐), 购自中日友好医院, 1 mg/片, 拜耳医药有限公司生产, 批号: 195A5, 用法与剂量: 成人每日 1 mg, 折算成大鼠所需剂量即 0.15 mg/kg。

实验试剂和仪器: 孕马血清促性腺激素 (Prospec, 批号: hor-272)、LY294002 (MedChem Express, 批号: HY-10108)、胎牛血清 (Hyclone, 南美洲)、DMEM/F-12 培养基 (Hyclone)、Hank's 平衡盐溶液 (solaibio)、青霉素 (solaibio)、链霉素 (solaibio)、甲基四氮唑蓝 (MTT, 迈晨科技公司)、DMSO (ACS Grade)、碘化丙啶 (Sigma); HITACHI 20PR-52D 离心机 (日本)、超净台 (北京亚泰科隆实验科技开发中心)、倒置显微镜 (NIKON TE200-S)、CO₂ 培养箱 (MCO-18AIC, 日本 SANYO)、酶联免疫检测仪 (Epson LX-800)、流式细胞仪 (BD)。

1.2 大鼠卵巢颗粒细胞制备

取 25 日龄 SD 雌性大鼠, 腹腔注射孕马血清促性腺激素 (50 U/只), 常规饲养 48 小时后, 10% 水合氯醛麻醉后处死, 无菌条件下取出双侧卵巢, 去除卵巢周围的组织及包膜, 并用预冷的 Hank's 液清洗 3 次。将卵巢移入无血清 DMEM/F-12 培养液中, 用 1 mL 一次性注射器针头刺破卵泡, 释放颗粒细胞。加入 0.25% 胰酶 1 mL, 用吸管反复吹打悬液数次, 使颗粒细胞团块分离, 37℃ 消化 10 分钟 (其间每隔 3 分钟振荡或吹打 1 次)。加入 3 mL DMEM/F-12 培养液 (20% 胎牛血清、100 μ/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素) 终止胰酶消化, 并静置 10 分钟, 取悬液加入离心管离心 (1000 rpm, 10 分钟), 弃上清, 加入 5 mL Hank's 液, 吹散细胞后再离心。弃上清, 加入 1 mL DMEM/F-12 培养液 (20% 胎牛血清、100 μ/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素) 后吹打, 血球计数板计数, 调整细胞悬液浓度至适宜浓度。MTT 法检测细胞增殖实验为: 1×10^5 个/mL, 200 μL/孔, 接种于 96 孔板中, 每组设 6 个复孔。细胞周期检测实验为: 5×10^5 个/mL, 接种于培养瓶中, 设 3 个重复。

在 37℃、5% CO₂ 温箱中培养。

1.3 药理血清制备

取 22~24 日龄, 体质量(60±5) g 的 SD 雌性大鼠, 随机分为五组: (1) 空白对照组: 灌胃生理盐水 2 mL/次每天; (2) 戊酸雌二醇组: 0.15 mg/kg 每天; (3) 二仙汤高剂量组: 药物浓度 0.41 g/mL, 0.4 mL/只每天; (4) 二仙汤中剂量组: 药物浓度 0.21 g/mL, 0.4 mL/只每天; (5) 二仙汤低剂量组: 药物浓度 0.11 g/mL, 0.4 mL/只每天。各组均连续灌胃 4 天, 最后 1 次灌胃 1 小时后心脏取血并分离血清, 无菌滤器过滤, -20℃ 保存。

1.4 颗粒细胞造模及分组

颗粒细胞培养四天后换液, 随机分为六组: 正常组、模型组、戊酸雌二醇组、二仙汤高剂量组、二仙汤中剂量组、二仙汤低剂量组, 每组六个复孔。第七天制备卵巢早衰模型: 除正常组给予无血清 DMEM/F-12 培养基外, 其他各组均给予含 2.5 μg/mL 顺铂的无血清 DMEM/F-12 培养基, 培养 12 小时。正常组加入正常药理血清, 模型组加入正常药理血清, 戊酸雌二醇组加入戊酸雌二醇组药理血清, 高剂量组加入高剂量药理血清, 中剂量组加入中剂量药理血清, 低剂量组加入低剂量药理血清。抑制剂在各组在加入药理血清前 1 小时加入, IC₅₀ 为 0.5 μM。

1.5 MTT 法观察二仙汤对顺铂损伤后大鼠颗粒细胞增殖的影响

颗粒细胞造模分组及加入药理血清后, 分别培养 24 小时、48 小时、72 小时后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 37℃ 孵育 4~6 小时后吸取上清培养液, 每孔加 DMSO 150 μL, 摇床上震荡 10 分钟, 选择波长 490 nm, 读取各孔吸光度 (optical density, OD) 值并记录结果。

1.6 流式细胞仪检测颗粒细胞周期各时相的变化

卵巢颗粒细胞培养及造模分组同 1.4, 接种于培养瓶内。弃去培养基, PBS 清洗 2 次, 0.25% 含

EDTA 胰酶消化 4 分钟, 1200 rpm 离心, 10 分钟后弃上清, 加入 500 μL PBS 配置成单细胞悬液, 将单细胞悬液缓慢加入预冷的 2 mL 70% 冰乙醇中固定, 4℃ 过夜。离心后收集细胞, PBS 洗涤, 1200 rpm 离心 10 分钟后弃上清, 加 RNaseA 溶液, 使之终浓度为 20 μL/mL, 37℃ 作用 40 分钟。再加碘化丙啶染液染色, 使之终浓度为 50 μg/mL, 避光, 1 小时内采用流式细胞仪对样品进行检测, 激发波长 488 nm, Multicycle AV Software 软件读取 G₀/G₁ 期、S、G₂/M 期的数据, 计算细胞增殖指数 (proliferation index, PI)。进行细胞周期分析计算 PI。PI = [S + G₂M / (G₀G₁ + S + G₂M)] × 100%。

1.7 统计学处理

采用 SAS 9.1.3 统计软件进行统计分析, 计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较用单因素方差分析, 组间的多重比较选择 LSD 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不加抑制剂对各组大鼠颗粒细胞增殖的影响

不加 PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002 时, 药理血清作用相同时间内, 模型组和正常组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明顺铂对卵巢颗粒细胞具有显著的增殖抑制作用, 而戊酸雌二醇及二仙汤药理血清与模型组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明其对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞具有一定的增殖改善作用, 且增殖改善作用一直持续到 72 小时, 其中 48 小时效果最为明显 ($P < 0.01$)。药理血清作用 24 小时, 二仙汤中剂量组与模型组相比具有统计学差异 ($P < 0.01$); 药理血清作用 48 小时时, 戊酸雌二醇组和二仙汤高、中剂量组与模型组相比具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$); 药理血清作用 72 小时时, 戊酸雌二醇组及二仙汤高、中剂量组与模型组相比具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。总体来看, 二仙汤中剂量组的增殖改善效果最为显著。见表 1。

表 1 不加抑制剂各组药理血清作用不同时间吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

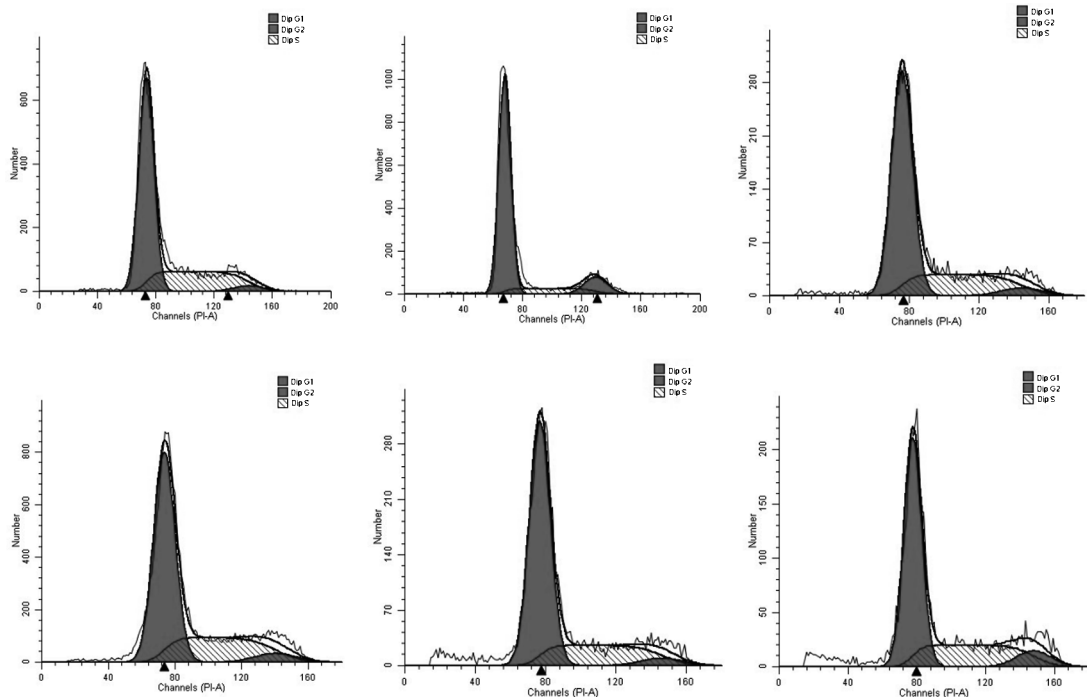
组别	标本数	24 小时	48 小时	72 小时
正常组	6	0.665±0.084	0.652±0.077	0.613±0.103
模型组	6	0.320±0.096 ^c	0.343±0.074 ^c	0.267±0.082 ^c
戊酸雌二醇组	6	0.415±0.100	0.617±0.070 ^b	0.502±0.096 ^b
二仙汤高剂量组	6	0.433±0.124	0.548±0.075 ^b	0.422±0.053 ^b
二仙汤中剂量组	6	0.514±0.134 ^a	0.565±0.079 ^b	0.479±0.124 ^b
二仙汤低剂量组	6	0.364±0.084	0.428±0.091	0.360±0.073

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与正常组相比, ^c $P < 0.01$ 。

表 2 加抑制剂各组药理血清作用不同时间吸光度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	24 小时	48 小时	72 小时
正常组+LY294002	6	0.740±0.079	0.592±0.095	0.431±0.078
模型组+LY294002	6	0.470±0.094 ^c	0.164±0.048 ^c	0.191±0.058 ^c
戊酸雌二醇组+LY294002	6	0.631±0.082 ^a	0.343±0.078 ^b	0.308±0.110 ^a
二仙汤高剂量组+LY294002	6	0.540±0.115	0.290±0.119 ^a	0.269±0.078
二仙汤中剂量组+LY294002	6	0.557±0.092	0.301±0.049 ^b	0.323±0.062 ^a
二仙汤低剂量组+LY294002	6	0.551±0.109	0.197±0.050	0.196±0.073

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与正常组相比,^c $P<0.01$ 。



注:a. 正常组;b. 模型组;c. 戊酸雌二醇组;d. 二仙汤高剂量组;e. 二仙汤中剂量组;f. 二仙汤低剂量组

图 1 各组周期时相图

2.2 加抑制剂对大鼠颗粒细胞增殖的影响

加入 PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002 后,药理血清作用相同时间内,模型组和正常组相比有统计学差异,说明顺铂和 LY294002 联合作用显著抑制卵巢颗粒细胞的增殖,戊酸雌二醇组和二仙汤药理血清组与模型组相比均具有统计学差异($P<0.05$),说明戊酸雌二醇及二仙汤药理血清对顺铂损伤且 AKT 信号通路被抑制后的卵巢颗粒细胞具有一定的增殖改善作用,其机制可能是通过促进 AKT 信号通路来实现的。药理血清的增殖促进作用一直持续到 72 小时,其中 48 小时效果最为显著。药理血清作用 24 小时,戊酸雌二醇组与模型组相比具有统计学差异($P<0.05$);药理血清作用 48 小时,戊酸雌二醇组和二仙汤高、中剂量组与模型组相比具有显著的统计学意义($P<0.01$);药理血清作用 72 小时,戊酸

雌二醇组及二仙汤中剂量组与模型组相比具有显著的统计学意义($P<0.05$)。总体来看,二仙汤中剂量组的增殖改善效果最为显著。见表 2。

从时间动态上来看,加入抑制剂 24 小时后,各组吸光度值较对应不加抑制剂各组有明显增加,可能是由于细胞启动凋亡,膜的通透性增加的缘故;加入抑制剂 48 小时后,各组吸光度值较对应不加抑制剂各组有明显降低,显微镜下也能看到部分死亡的细胞;加入抑制剂 72 小时后,各组吸光度值较对应不加抑制剂各组有明显降低,显微镜下可看到大量死亡的细胞。

2.3 各组周期时相图比较

流式结果显示,模型组与正常组相比, G_0/G_1 期比例明显增加,S 期比例明显降低,PI 值明显减小,均具有显著的统计学差异($P<0.05$);而 G_2/M 期比

例增加,但无统计学差异,说明顺铂损伤后的卵巢颗粒细胞增殖指数的下降可能是通过降低 S 期比例,增加 G_0/G_1 期比例来实现的。戊酸雌二醇组、二仙汤高、中、低剂量组与模型组相比, G_0/G_1 期比例明显降低,S 期比例明显增加,PI 值明显增大,且均具有显著的统计学差异($P<0.01$),而 G_2/M 期比例与模型组相比无统计学差异,说明二仙汤能促进顺铂损伤卵巢颗粒细胞的增殖,其机制可能是通过提高 S 期比例、降低 G_0/G_1 期比例进而提高增殖指数 PI 来实现的。见表 3、图 1。

3 讨论

顺铂作为一种常用的临床化疗药物,在杀死肿瘤细胞的同时对正常细胞也有不同程度的损害。因化疗而导致卵巢功能低下和不孕的报道日渐增多。有文献表明顺铂可诱导卵巢损伤^[7-8]。本实验以顺铂作用于离体培养的卵巢颗粒细胞来模拟化疗所致卵巢早衰中的颗粒细胞。在顺铂作用 12 小时后,模型组与正常组相比具有明显统计学差异,证明造模成功。

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide] 是一种四唑盐,经线粒体琥珀酸脱氢酶裂解后生成 Formazan,Formazan 的生成量与细胞释放出的酶活性成比例,而酶活力与细胞数及细胞活力成比例,因此该方法广泛应用于检测细胞活力。本实验中,戊酸雌二醇组和二仙汤各剂量组对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞具有一定的提高细胞活力作用,其中以二仙汤中剂量组药理血清作用 48 小时效果最为显著。由此看出,二仙汤对于卵巢早衰的治疗作用主要是通过改善颗粒细胞活力来实现的。

LY294002 是 PI3K 可逆、高效的选择性抑制剂,使其 α/β 亚基失活,进而抑制其磷酸化,阻断下游信号传导。加入抑制剂后,各组较其对应的不加抑制剂的各组,吸光度值明显降低,且从 48

小时起在显微镜下即能看到细胞慢慢走向死亡,说明抑制剂对细胞的活力具有显著的抑制作用。而加入抑制剂的戊酸雌二醇组和二仙汤各剂量组较加入抑制剂的模型组相比,吸光度值明显升高,说明戊酸雌二醇及二仙汤对 LY294002 引起的细胞凋亡具有一定的改善作用,其机制可能是通过提高 PI3K/AKT 通路的功能来实现的。

卵泡发育以颗粒细胞的增殖为前提,而颗粒细胞的增殖需要合成大量 DNA,所以颗粒细胞的增殖情况可以通过其 DNA 的水平来反映^[9]。因此,本实验通过流式细胞术检测二仙汤各剂量组卵巢颗粒细胞所处的细胞周期时相。实验结果表明,戊酸雌二醇及二仙汤可以明显缩短 G_0 期细胞的比例,提高 S 期细胞比例,增加细胞的增殖指数。

近年来,卵巢早衰在育龄妇女中的发生率逐年升高且有向年轻化发展的趋势^[10],虽然各医家对 POF 病因的认识有所不同,但总体看来以肾虚为主^[11]。二仙汤是治疗肾精不足、相火偏旺所致更年期综合征、更年期高血压病的现代名方,方中温补与寒泻同施,壮阳与滋阴并举,温而不燥,寒而不滞,共奏调和阴阳之功效^[12]。二仙汤及其拆方能通过“下丘脑—腺垂体—卵巢”性腺轴调节衰老,且能增进该轴功能^[5]。艾浩等^[13]研究表明,二仙汤能促进卵巢性激素的分泌,提升颗粒细胞、卵泡膜内层细胞的功能,对抗顺铂的破坏与氧化损伤效应影响;能改善卵巢组织的稳态内环境,从而发挥促进卵泡发育,解除闭锁状态,促进卵巢甾体激素分泌的作用。本实验初步探究证明,二仙汤对于卵巢早衰具有明显的改善作用,主要是通过促进颗粒细胞增殖,促使其由 G_0 期向 S 期转化,增强 PI3K/AKT 信号通路的表达,抑制颗粒细胞凋亡来实现的。这与相关研究结果具有一致性。而二仙汤作为补肾名方,对于其在治疗卵巢早衰中的具体分子机制还有待于进一步的深入探究。

表 3 各组周期时相表($\bar{x}\pm s$)

组别	标本数	细胞周期分布			PI 值
		G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	
正常组	3	67.10±2.18	29.41±2.35	3.49±0.38	32.91±2.18
模型组	3	80.83±3.91 ^c	11.32±0.75 ^c	7.85±3.29	19.17±3.91 ^c
戊酸雌二醇组	3	66.35±0.63 ^b	26.63±1.39 ^b	7.03±2.02	33.66±0.77 ^b
二仙汤高剂量组	3	66.95±2.23 ^b	28.16±2.25 ^b	4.89±0.61	33.05±2.23 ^b
二仙汤中剂量组	3	67.93±1.22 ^b	26.46±1.18 ^b	5.61±2.02	32.07±1.22 ^b
二仙汤低剂量组	3	64.19±2.47 ^b	27.84±2.50 ^b	7.97±0.24	35.81±2.47 ^b

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与正常组相比,^c $P<0.01$ 。

参 考 文 献

- [1] 杨静,梁嘉丽,秦佳佳. PI3K/Akt 信号通路与卵巢早衰相关性的研究进展[J]. 现代妇产科进展,2016,25(2):156-158.
- [2] 马丽灵,阮祥燕. 卵巢早衰病因及治疗研究进展[J]. 医学综述,2008,14(23):3557-3660.
- [3] 蔡品均,金哲,黄文玲. 补肾调肝法对治疗自身免疫性卵巢早衰小鼠的实验研究[J]. 天津中医药,2010,27(1):56-58.
- [4] 高萍,钟玉宜,张爱玲. 母猪卵巢颗粒细胞的分离培养及鉴定[J]. 广东农业科学,2014,41(4):131-135.
- [5] 刘永胜,赵丽慧. 二仙汤的研究及临床应用[J]. 光明中医,2010,25(4):741-742.
- [6] 张丽娟,陶仕英,赵丕文,等. 细胞凋亡途径探讨二仙汤治疗大鼠卵巢早衰实验研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(4):812-817.
- [7] 齐聪. 顺铂腹腔内给药对大鼠卵巢的毒性作用[J]. 上海医科大学学报,2000,27(4):324.
- [8] 艾浩,牛建昭,薛晓鸥,等. 顺铂致小鼠卵巢功能早衰肝肾阴虚证机制研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(6):401-403.
- [9] 李楠,刘艳霞,金哲. 育泡饮对大鼠卵巢颗粒细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 北京中医药,2012,31(2):148-150.
- [10] 张莉. 卵巢早衰发病因素探讨[D]. 南京:南京中医药大学,2014:1-7.
- [11] 艾浩. 顺铂致卵巢功能早衰发病机制与金雀异黄素调节作用的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007:35-36.
- [12] 成芳平,杨洪艳,张春玲,等. 中医对更年期综合征的认识及研究[J]. 天津中医药,2005,22(3):216-219.
- [13] 艾浩,张海英,张玉立,等. 二仙汤对顺铂损伤后小鼠卵巢功能调节作用研究[J]. 天津中医药,2013,30(5):298-300.

(收稿日期: 2015-10-22)

(本文编辑: 董历华)