

·博士之窗·

左归丸对小鼠自身免疫性卵巢损伤的保护作用

朱 玲¹ 罗颂平² 许丽绵² 朱初良³

摘要 **目的** 探讨补肾复方左归丸对卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)的影响。**方法** 以 SD 雌性大鼠卵巢组织制备卵巢抗原,皮下多点注射免疫 BALB/C 雌性小鼠,建立卵巢早衰模型。于造模过程中不同时间点用左归丸处理小鼠,以泼尼松为阳性对照,放射免疫法检测外周血卵泡刺激素(FSH)、雌二醇水平(E₂),酶联免疫法检测外周血抗卵巢抗体(AoAb),原位杂交法检测卵巢组织生长分化因子-9(GDF-9) mRNA 的表达。**结果** POF 小鼠卵巢间质可见淋巴细胞浸润,外周血 FSH 升高,E₂ 下降,AoAb 阳性,卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数减少,生长卵泡及成熟卵泡数减少。左归丸能减缓 POF 小鼠外周血 FSH 升高,提高体内 E₂ 水平,抑制 AoAb 产生,提高卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数,使生长卵泡及成熟卵泡数增加,早期用药比后期用药作用显著。**结论** 左归丸能改善卵巢免疫性炎症的损伤,对免疫性卵巢早衰具有治疗作用。

关键词 卵巢早衰;左归丸;抗卵巢抗体;生长分化因子-9

Protective Effect of Zuogui Pill on Ovarian Autoimmune Injury ZHU Ling, LUO Song-ping, XU Li-mian, et al *Department of TCM, Southern Medical University, Guangzhou (510515)*

Abstract Objective To probe the effect of Zuogui pill (ZGP), a Chinese compound recipe for tonifying Shen, on ovarian function in mice with premature ovarian failure (POF). **Methods** BALB/C female mice model of POF was established by multiple sites subcutaneous injection of ovarian antigen elicited with ovarian tissue of SD female rats, and treated with ZGP at different time points in the modeling, with prednisone as positive control. The levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol (E₂) in peripheral blood were measured with radioimmunoassay, and ovarian antibody (AoAb) was determined by enzyme linked immunosorbent assay. The mRNA expression of ovarian growth and differentiation factor-9 was detected with in situ hybridization.

Results POF model mice manifested such abnormalities as increased FSH, decreased E₂, and positive AoAb in peripheral blood, with lymphocytes infiltration in ovarian mesenchyma, reduction of GDF-9 mRNA positive oocytes, and decrease of growing and mature follicles. ZGP could reduce the increase of FSH, increase the level of E₂, inhibit the production of AoAb, raise the GDF-9 mRNA positive cells of oocytes, increase the number of growing and mature follicles. The clinical efficacy was more significant in early stage than in advanced stage.

Conclusion ZGP can improve immune inflammatory injury of ovary, and shows therapeutic effect on POF.

Key words premature ovarian failure; Zuogui pill; ovarian antibody; growth and differentiation factor-9

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是一类严重影响妇女生殖健康及身心健康的疾病,患者于 40 岁前即出现闭经,并常伴烘热、汗出、烦躁等低雌激素症状,较正常人群更易出现抑郁、焦虑、敌对、恐怖、人

际交往困难等情绪和社交方面的心理卫生问题,易患骨质疏松症、心血管疾病、老年性痴呆等疾病。POF 的发病率为 1% ~ 3%,占继发性闭经的 10% ~ 20%^[1-4],由于病因不明,治疗颇为棘手,尚无有效措施,尤其对于特发性或自身免疫性卵巢功能衰竭的患者而言,其发病可能非常之突然,没有预知性而难以进行预防性的干预。POF 具有肾虚血亏血瘀的病机特点^[5],从补肾养血活血入手治疗卵巢早衰取得了令人鼓舞的疗效^[6,7],左归丸具有补肾精、养精血、化瘀血之

基金项目:广东省中医药局课题(No. 403021)

作者单位:1. 南方医科大学中医系(广州 510515);2. 广州中医药大学第一临床医学院妇科;3. 广西柳州市中医院

通讯作者:朱 玲,博士,现在广州中医药大学第一临床医学院(广州 510405);Tel:13570578779, E-mail: zhuling20012001@yahoo.com

功,临床治疗卵巢早衰有一定的疗效^[8]。所以我们选取左归丸研究补肾中药对 POE 的作用机理。

材料与方

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠 120 只,体重 15~20g,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 左归丸:熟地 24 g 山药 12 g 枸杞子 12 g 山茱萸 12 g 川牛膝 9 g 菟丝子 12 g 鹿角胶 12 g 龟版胶 12 g(南方医科大学附属南方医院中药房提供);泼尼松(广州市市桥药业有限公司生产,批号:2003-04-15);血卵泡刺激素(FSH)及雌二醇水平(E₂)放射免疫试剂盒为深圳拉尔文公司生产。弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂均为美国 Sigma 公司产品,过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京鼎国生物技术有限责任公司,批号:2003-10-30),生长分化因子 9(growth and differentiation factor-9,GDF-9)原位杂交试剂盒、多聚赖氨酸、DEPC、原位杂交专用盖玻片、2×SSC、原位杂交用 PBS,以上试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 SN-682 型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司生产),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新艺科器研究所生产),Sigma Diagnosis 酶标仪(美国 Sigma 公司生产),NIKON ECLIPSE E600 显微镜(日本 NIKON 公司生产),HM505E 型 Microm 冷冻切片(德国 Microm 公司生产)。

2 方法

2.1 卵巢抗原制备 收集 SD 雌性大鼠(体重约 250g)卵巢组织,称重,洗净,于 Tris-HC 缓冲液中剪碎并研磨成匀浆,低温下超声粉碎 5min,低温离心(4 000 r/min,15min;10 000 r/min,5min),取上清液。调整浓度,使每 0.1ml 含卵巢组织 20mg。

2.2 动物造模 参考文献^[9],按每只小鼠 10mg(0.05ml)卵巢抗原皮下多点注射免疫 BALB/C 雌性小鼠,建立卵巢早衰模型。连续 3 次,每 2 周 1 次,第 1 次免疫加入等量弗氏完全佐剂,第 2、3 次免疫加入等量弗氏不完全佐剂。

2.3 分组 小鼠在相同的条件下分笼饲养,每笼 10 只,常规喂养标准颗粒饲料;并随机分为正常组,模型 2 周组,模型 4 周组,模型 7 周组,泼尼松早期治疗 2 周组(泼尼松 2 周组),泼尼松早期治疗 4 周组(泼尼松 4 周组),泼尼松早期治疗 7 周组(泼尼松 7 周组),泼尼松治疗组,左归丸早期治疗 2 周组(左归丸 2

周组),左归丸早期治疗 4 周组(左归丸 4 周组),左归丸早期治疗 7 周组(左归丸 7 周组),左归丸治疗组,每组 10 只。

2.4 给药

2.4.1 中药水煎液制备 左归丸除鹿角胶、龟版胶外,其余药物均水煎后去滓,纳鹿角胶及龟版胶烱化,浓缩为每毫升含生药 1g。

2.4.2 西药水溶液制备 以纯净水溶化强的松片,调整溶液浓度为 17%,使其灌胃体积与中药组相同。

2.4.3 给药方法 给药组的药物剂量,按小鼠与人体表面积转换系数计算(泼尼松按每人每天 20mg 计)。药物组均灌胃给药,每鼠每天灌胃 0.3ml 药液(中药相当于每鼠每天 0.3g,西药相当于每鼠每天 0.05mg),正常组及模型组均灌胃等量生理盐水,每周休息 1 天。早期治疗组(即泼尼松 2 周、4 周、7 周组,左归丸 2 周、4 周、7 周组)于第 1 次免疫后开始给药,治疗组(即左归丸治疗组,泼尼松治疗组)于第 3 次免疫后开始给药(未开始给药前灌胃生理盐水)。

2.5 指标取材

2.5.1 取材时间 各组于不同的时间点取材,分别如下:模型 2 周组、泼尼松 2 周组、左归丸 2 周组于造模开始后 2 周(即第 2 次免疫前)取材;模型 4 周组、泼尼松 4 周组、左归丸 4 周组于造模开始后 4 周(即第 3 次免疫前)取材;模型 7 周组、泼尼松 7 周组、左归丸 7 周组、泼尼松治疗组、左归丸治疗组于造模开始后 7 周(即动物处死时)取材,正常组也于此时取材。

2.5.2 取材内容 眼眶取血,双侧卵巢,胸腺。

2.6 卵巢功能测定

2.6.1 阴道脱落细胞检测 每天下午 3 点各组固定取 4 只小鼠阴道脱落细胞做涂片,置光学显微镜下观察其动情周期变化。

2.6.2 血清 FSH 及 E₂ 检测 小鼠摘眼球采血,离心,取血清,按试剂盒操作要求,采用放射免疫测定法测定 FSH、E₂ 含量(南方医院核医学中心完成)。

2.7 抗卵巢抗体检测 小鼠摘眼球采血,离心,取上清液,按 ELISA 法检测外周血中抗卵巢抗体(AoAb)。用包被液稀释卵巢抗原(蛋白质浓度为 10μg/200μl),加入酶标板 200μl/孔,4℃ 冰箱过夜。弃去酶标板中的液体,加入 PBS-Tween-20 洗 3 次,每次 3min。用含 10% 小牛血清 PBS-Tween-20 适当稀释待测血清,每孔 200μl,置 37℃ 湿盒 1.5h, PBS-Tween-20 洗 3 次,每次 3min。加入二抗 200μl,置 37℃ 湿盒 1.5h, PBS-Tween-20 洗 3 次,每次 3min。加入底物邻苯

二胺 200μl,反应 5min,加入 2mol/L 硫酸 50μl 终止反应,用 Sigma Diagnosis 酶标仪在 450nm 调零,测定 A 值。以大于正常对照血清 AoAb 的 $\bar{x} \pm 2s$ 为阳性。

2.8 卵巢组织形态学观察 卵巢称重后福尔马林固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,常规 HE 染色,置光学显微镜下观察。

2.9 GDF-9 mRNA 原位杂交检测 按试剂盒说明操作。

2.10 统计学方法 采用 F 检验。

结 果

1 一般状态 从第 1 次免疫后的约 25 天开始,模型组小鼠表现易激惹,大便干结,动情期不典型,阴道角化细胞数减少,与上皮细胞、白细胞并见;第 35 天左右出现动情周期紊乱,动情间期延长,渐至无动情周期,仅为动情间期的白细胞,时可见上皮细胞相混杂。小鼠逐渐表现为活动频度减少,对刺激反应淡漠,毛无光泽。左归丸治疗组、泼尼松治疗组较模型 7 周组情况略好,上皮细胞数较多。左归丸早期治疗组、泼尼松早期治疗组出现动情周期紊乱的时间较模型组晚 10 天左右,仍有动情周期性变化,但动情期角化细胞数减少,动情周期延长 8~10 天。小鼠出现易激惹,大便干结的时间也晚,无明显的反应淡漠。

2 卵巢形态学变化 光镜下模型 7 周组见发育卵泡及成熟卵泡数明显减少,颗粒细胞排列紊乱,卵巢间质可见淋巴细胞浸润。泼尼松治疗组与之相似,左归丸治疗组发育卵泡数较之略多,左归丸及泼尼松早期治疗各组与正常组相似,都可见到较多的生长卵泡及成熟卵泡。

3 左归丸对 POF 小鼠 FSH、E₂ 含量的影响 见

表 1 左归丸对 POF 小鼠 FSH、E₂、AoAb、GDF-9 mRNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH (mIU/ml)	E ₂ (ng/L)	AoAb (OD)	GDF-9mRNA (个/视野)
正常	10	1.87 ± 0.14	8.40E-02 ± 9.37E-03	1.58 ± 0.15	1.10 ± 0.99
模型 2 周	10	1.88 ± 0.12 ^{△△}	8.34E-02 ± 9.17E-03 ^{△△}	1.54 ± 0.14 ^{△△}	1.00 ± 0.82
模型 4 周	10	1.91 ± 0.15 ^{△△}	7.97E-02 ± 9.02E-03 ^{△△}	1.61 ± 0.27 ^{△△}	1.00 ± 0.67
模型 7 周	10	2.13 ± 0.19* *	5.81E-02 ± 1.07E-02**	2.14 ± 0.20**	0.30 ± 0.48*
泼尼松 2 周	10	1.85 ± 0.15 ^{▲▲}	8.45E-02 ± 8.78E-03	1.52 ± 0.12	0.90 ± 0.99
泼尼松 4 周	10	1.91 ± 0.13 [▲]	8.03E-02 ± 9.17E-03	1.54 ± 0.23	1.00 ± 0.67
泼尼松 7 周	10	1.94 ± 0.16 ^{△△}	6.44E-02 ± 9.55E-03**	1.57 ± 0.26 ^{△△} **	0.90 ± 0.74
泼尼松治疗	10	2.08 ± 0.14**	5.94E-02 ± 9.92E-03**	1.70 ± 0.23 ^{△△} **	0.30 ± 0.48*
左归丸 2 周	10	1.91 ± 0.18**	8.19E-02 ± 7.31E-03**	1.55 ± 0.13**	1.50 ± 1.08
左归丸 4 周	10	1.96 ± 0.14	8.15E-02 ± 9.02E-03**	1.59 ± 0.20**	1.00 ± 1.05
左归丸 7 周	10	1.99 ± 0.14 [△]	7.57E-02 ± 7.44E-03** ^{△△▲▲} **	1.64 ± 0.23 ^{△△} *	1.20 ± 0.92 ^{△▲} *
左归丸治疗	10	2.09 ± 0.20**	5.99E-02 ± 1.11E-03**	1.85 ± 0.21** ^{△△}	0.40 ± 0.52

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型 7 周组比较,[△]P<0.05,^{△△}P<0.01;与泼尼松治疗组比较,[▲]P<0.05,^{▲▲}P<0.01;与左归丸治疗组比较,^{*}P<0.05,^{**}P<0.01。

表 1。

3.1 按造模后同一时间点比较 模型 7 周组、泼尼松治疗组、左归丸治疗组与正常组比较,FSH 明显升高(P<0.01),模型 7 周组较之泼尼松 7 周组、左归丸 7 周组 FSH 显著升高(P<0.01,P<0.05),但与泼尼松治疗组、左归丸治疗组相比无显著差异。同组不同时间点比较,模型 7 周组较模型 2 周组、模型 4 周组 FSH 升高明显(P<0.01);泼尼松治疗组较泼尼松 2 周组、泼尼松 4 周组 FSH 升高明显(P<0.01,P<0.05),但与泼尼松 7 周组比较差异无显著性;左归丸治疗组与左归丸 2 周组比较,FSH 升高明显(P<0.01),但与左归丸 4 周组、左归丸 7 周组比较差异无显著性。

3.2 按造模后同一时间点比较 模型 7 周组、泼尼松 7 周组、泼尼松治疗组、左归丸 7 周组、左归丸治疗组与正常组比较,E₂ 均明显下降,差异有显著性,但左归丸 7 周组下降幅度较模型 7 周组小(P<0.01),其下降幅度也低于左归丸治疗组(P<0.01)、泼尼松 7 周组(P<0.01)、泼尼松治疗组(P<0.01)。同组不同时间点比较,模型 7 周组较模型 2 周组、模型 4 周组 E₂ 下降明显(P<0.01);泼尼松 7 周组、泼尼松治疗组两组比较 E₂ 差异无显著性,但均较泼尼松 2 周组、泼尼松 4 周组降低显著(P<0.01);左归丸治疗组与左归丸早期治疗各组比较 E₂ 也下降明显(P<0.01)。

4 左归丸对 POF 小鼠 AoAb 含量的影响 见表 1。按造模后同一时间点比较,模型 7 周组、左归丸治疗组与正常组比较,AoAb 水平明显升高(P<0.01)。模型 7 周组与左归丸治疗组比较,AoAb 水平上升也显著(P<0.01)。模型 7 周组与左归丸 7 周组、泼尼

松 7 周组、泼尼松治疗组比较, AoAb 水平上升明显 ($P < 0.01$), 后 3 组与正常组比较差异无显著性。左归丸治疗组较泼尼松 7 周组、泼尼松治疗组 AoAb 水平上升 ($P < 0.01$)。同组不同时间点比较, 模型 7 周组较模型 2 周组、模型 4 周组 AoAb 水平明显升高 ($P < 0.01$)。泼尼松治疗组较泼尼松 2 周组 AoAb 水平明显升高 ($P < 0.05$), 但与泼尼松 7 周组比较无显著差异。左归丸治疗组较左归丸早期治疗各组 AoAb 水平明显升高 ($P < 0.01, 0.01, 0.05$)。

5 左归丸对 POF 小鼠卵巢 GDF-9 mRNA 表达的影响 见表 1。GDF-9 mRNA 在小鼠卵母细胞胞浆表达。按造模后同一时间点相比, 模型 7 周组、泼尼松治疗组均比正常组、左归丸 7 周组小鼠卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数减少 ($P < 0.05$)。同组不同时间点比较, 左归丸治疗组比左归丸 2 周组、左归丸 7 周组小鼠卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数减少 ($P < 0.01, 0.05$)。

6 POF 小鼠 GDF-9、生殖内分泌、体液免疫间相关性分析 用 Pearson 相关性分析表明 E_2 与 FSH、抗卵巢抗体有显著负相关关系 (Pearson = -0.419, -0.407, $P < 0.01$), 与造模后体重、卵巢比重、胸腺比重、GDF-9 有显著正相关关系 (Pearson = 0.392, 0.281, 0.298, 0.282, $P < 0.01$)。FSH 与抗卵巢抗体有显著正相关关系 (Pearson = 0.345, $P < 0.01$), 与造模后体重、卵巢比重有显著负相关关系 (Pearson = -0.338, -0.254, $P < 0.01$), 与胸腺比重也存在显著负相关关系 (Pearson = -0.223, $P < 0.05$), 与 GDF-9 无明显相关性关系。抗卵巢抗体与造模后体重、胸腺比重也有显著负相关关系 (Pearson = -0.344, -0.362, $P < 0.01$), 与 GDF-9 也有显著负相关关系 (Pearson = -0.193, $P < 0.05$)。

讨 论

POF 患者卵巢活检示淋巴细胞浸润^[10], 体内存在以 AoAb 为主的自身抗体, 且往往是多种器官特异性自身抗体并存, 常并存自身免疫多腺体功能衰竭^[11]。GDF-9 属于 β -转化生长因子 (TGF- β) 家族, 主要在卵巢组织中表达; 对较早期卵泡的卵母细胞生长和有丝分裂具有促进作用, 影响卵母细胞内细胞器的分布和透明带的完整性; 刺激颗粒细胞增殖, 抑制 FSH 诱导的颗粒细胞分化, 调节卵丘膨胀; 促进卵泡膜标志物增加, 刺激卵泡膜层形成; 影响卵巢激素的合成, 与 FSH 共同调节卵泡发育及卵巢激素分泌^[12]。

左归丸是滋肾填精、阳中求阴的代表方, 全方的配
万方数据

伍注重调节肾的阴阳平衡于补肾之中, 以平为期, 虽为补阴血之剂, 然补阴之中寓有补阳之用, 共达补肾精、养精血、化瘀血之功。临床上用此治疗更年期综合征, 可消除烘热汗出、烦躁易怒、口干咽燥等症状, 能增加阴道分泌物, 改善外阴、阴道干涩症状, 并有报道对雌激素水平不足的闭经也有较好的疗效^[13], 可使卵巢早衰患者成功妊娠^[8]。实验研究表明左归丸能提高体内 E_2 含量, 对小鼠子宫、卵巢、睾丸、精囊腺有显著增重作用; 有效改善下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能亢进; 促进骨髓有核细胞增生、使已降低的外周血红细胞、血红蛋白恢复正常, 增加胸腺、脾脏重量, 使肾阴虚大鼠缩小的胸腺体积、减轻的胸腺重量呈现不同程度的增加, 脾脏 T 淋巴细胞对 Con-A 的刺激反应增强, 改善免疫功能; 增强小鼠肝细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性; 提高正常小鼠及 0.5% 腺嘌呤所致肾阳虚大鼠血清睾酮水平; 对去卵巢大鼠骨质疏松症具有一定的治疗作用^[13, 14]。剂量依赖地阻断谷氨酸、低钾所致的大鼠小脑颗粒神经元 (CGNs) 凋亡^[15], 提高老年大鼠海马 DG、CA1 和 CA3 分区低下的糖皮质激素受体 mRNA 的表达, 改善海马对下丘脑-垂体-肾上腺轴的抑制性调控作用, 延缓机体衰老^[16]。

我们在实验中观察到 POF 小鼠早期出现易激惹、大便秘结, 后期出现反应淡漠, 毛发失去光泽等肾阴虚兼肾阳不足的表现; FSH 升高, E_2 下降; 卵巢间质可见淋巴细胞浸润, 外周血 AoAb 效价明显增高。我们的实验表明对 POF 早期用药, 小鼠卵巢的淋巴细胞浸润并不明显。补肾中药左归丸与免疫抑制剂泼尼松均可减缓 POF 小鼠 FSH 的升高, 但在减缓 E_2 水平下降中, 左归丸的作用更加突出。

免疫抑制剂泼尼松可抑制 POF 小鼠体内 AoAb 的产生, 补肾中药左归丸早期用药也可抑制 AoAb 的产生。后期用药虽外周血 AoAb 值明显高于正常组, 但其升高幅度不及模型 7 周组, 且左归丸治疗组 (即后期用药) 与模型 7 周组比较差异有显著性。

本实验表明, GDF-9 mRNA 主要在发育卵泡的卵母细胞胞浆表达, POF 小鼠卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数减少, 生长卵泡及成熟卵泡数减少; 左归丸可提高卵母细胞 GDF-9 mRNA 阳性细胞数, 使生长卵泡及成熟卵泡数增加。可能与其免疫调节有关, 通过抑制 POF 小鼠外周血 AoAb 产生, 从而抑制抗卵巢抗体对自身卵巢组织的攻击, 对生长卵泡的攻击, 保证卵巢局部的微环境平衡, 使卵巢局部如 GDF-9 等细胞因子正常分泌, 功能协调, 使卵泡得以正常生长、发育、成熟, 分泌雌激素, 促进下丘脑-垂体-卵巢轴的正常反

馈调节,使 FSH 水平下降。也可能与左归丸提高 POF 小鼠体内雌激素水平有关,使 FSH 下降,使 GDF-9 等与卵泡发育有关的细胞因子得以正常分泌,发挥效应,增强卵巢对自身抗原的耐受性,提高机体的免疫协调性,使卵泡得以正常生长、发育、成熟。

GDF-9 与 E₂、AoAb 有相关性,前者为正相关,后者为负相关。表明卵巢局部分泌的细胞因子与内分泌、免疫存在着密切关系,互相影响,共同调节卵泡的发育,调节卵巢的功能。而左归丸可通过影响 GDF-9 mRNA 的表达、提高 E₂ 水平,抑制 FSH 过度升高,抑制抗卵巢抗体产生等,对生殖内分泌—免疫网络起到一定调节而发挥治疗 POF 的作用。

参 考 文 献

- 1 王 莉,胡 玮,孔德诚,等. 卵巢早衰与自然绝经妇女骨密度的对比观察. 中国骨质疏松杂志 2002;8(1):41—42.
Wang L, Hu W, Kong DC, et al. Comparison of BMD between women with premature ovarian failure and natural menopausal women. Chin J Osteoporos 2002;8(1):41—42.
- 2 Orshan SA, Furniss KK, Forst C, et al. The lived experience of premature ovarian failure. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 2001;30(2):202—208.
- 3 Pasquali EA. The impact of premature menopause on women's experience of self. J Holist Nurs 1999;17(4):346—364.
- 4 曾 勇,冯玉昆,欧阳虹,等. 卵巢早衰患者的婚姻质量调查. 中国心理卫生杂志 1997;11(4):227—229.
Zeng Y, Feng YK, Ouyang H, et al. The investigation of marriage quality in women with premature ovarian failure. Chin J Psychol hygiene 1997;11(4):227—228.
- 5 朱 玲,罗颂平. 卵巢早衰的病因病机及其证治. 中医学刊 2003;21(1):143—144.
Zhu L, Luo SP. The etiology and pathogenesis and syndrome and treatment of premature ovarian failure. Chin Archives TCM 2003;21(1):143—144.
- 6 许 昕,腾秀香,佟 庆. 补肾养血调经法治疗有卵泡型卵巢早衰—附 12 例临床资料分析. 北京中医 2001;20(4):21—24.
Xu X, Teng XX, Tong Q. The therapeutic method of tonifying the kidneys in treating premature ovarian failure with follicles—the analysis of 12 clinical cases. Beijing J TCM 2001;20(4):21—24.
- 7 陈秀芳. 辨证治疗卵巢早衰 22 例. 四川中医 2000;18(1):35.
Chen XF. Treating 22 cases with premature ovarian failure according by the differentiation of syndrome. Sichuan J TCM 2000;18(1):35.

- 8 Chao SL, Huang LW, Yen HR. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy using Chinese herbal medicine. Chang Gung Med J 2003;26(6):449—452.
- 9 林建华,严隽鸿,林其德,等. 自身免疫性卵巢功能衰退小鼠体液免疫和细胞免疫的测定. 中华妇产科杂志 1998;33(12):735—736.
Lin JH, Yan JH, Lin QD, et al. Determination of cellular and humoral immunity in mice of autoimmune ovarian failure. Chin J Obstet Gynecol 1998;33(12):735—736.
- 10 Kauffman RP, Castracane VD. Premature ovarian failure associated with autoimmune polyglandular syndrome: pathophysiological mechanisms and future fertility. J Women's Health (Larchmt) 2003;12(5):513—520.
- 11 朱 玲,罗颂平,欧汝强. 卵巢早衰的免疫学研究进展. 生殖医学杂志 2005;12(2):70—74.
Zhu L, Luo SP, Ou RQ. Research progress of immunology of premature ovarian failure. J Repro Med 2005;12(2):70—74.
- 12 朱 玲,罗颂平,欧汝强. 生长分化因子-9 在卵泡发育中的作用. 国外医学计划生育分册 2005;24(2):76—79.
Zhu L, Luo SP, Ou RQ. Functions of GDF-9 in the growth of follicles. Foreign Med Sci (Family Planning Fascicie) 2005;24(2):76—79.
- 13 朱 玲,陈彬彬,黄泉智,等. 左归丸临床与实验研究进展. 国医论坛 2003;18(2):51—53.
Zhu L, Chen BB, Huang QZ, et al. General clinical application and pharmacological research of pill ZuoGui. Forum TCM 2003;18(2):51—53.
- 14 陈彬彬,朱 玲,李长征,等. 左归丸对雌性阴虚小鼠模型生殖内分泌的影响. 现代中西医结合杂志 2003;12(13):1362—1364.
Chen BB, Zhu L, Li CZ, et al. Effect of Zuogui pill on reproductive endocrine of female Yin-Deficiency mice. Modern J Integr Tradit Chin West Med 2003;12(13):1362—1364.
- 15 张涛涛,苏兴文,江伟健,等. 左归丸加减方对谷氨酸诱导的体外培养大鼠小脑颗粒神经元凋亡影响. 中国实验方剂学杂志 2003;9(5):15—18.
Zhang TT, Su XW, Jiang WJ, et al. Zuogui pill protects rat cerebellar granule neurons from apoptosis induced by glutamate. Chin J Exp Tradit Med Formulae 2003;9(5):15—18.
- 16 戴薇薇,金国琴,张学礼,等. 左归丸、右归丸对老年大鼠海马糖皮质激素受体 mRNA 表达的影响. 中药药理与临床 2003;19(1):1—3.
Dai WW, Jin GQ, Zhang XL. et al. Effects of Zuogui Wan and Yougui Wan on GR mRNA expression in the aging rat hippocampus. Pharma Clin Chin Materia Med 2003;19(1):1—3.

(收稿:2004-12-20 修回:2005-04-01)