

滋肾育胎丸对免疫性不孕模型大鼠卵母细胞生物学行为的调节作用

张晓丽 赵晓勇

摘要 **目的** 探讨滋肾育胎丸对抗精子抗体(AsAb)阳性的不孕大鼠卵母细胞的干预作用。**方法** 采用主动免疫建立 AsAb 阳性的免疫性不孕模型。将 100 只雌性 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组及滋肾育胎丸低、中、高剂量组(简称中药低、中、高剂量组),每组 20 只。造模 22 天开始灌胃给药,模型组给予 5 mL/kg 生理盐水灌胃,中药低、中、高剂量组分别给予 0.075、0.100、0.150 g/mL 滋肾育胎丸灌胃,每天 1 次,至 36 天。分别在造模 21 天及 36 天采用 ELISA 法测定 AsAb 和转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)水平。处死大鼠后取卵母细胞,采用实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)及 Western blot 分别检测 TGF- β mRNA 及其蛋白表达水平;采用流式细胞学(FCM)和末端终止标记(TUNEL)法测定卵母细胞凋亡率;采用细胞计数-8 法(CCK-8)及 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)检测卵母细胞增殖水平;采用划痕实验及侵袭小室(Transwell)测定卵母细胞迁移与侵袭能力。**结果** 与空白对照组比较,模型组卵母细胞凋亡增加,细胞增殖减少,迁移与侵袭能力减弱,TGF- β mRNA 及其蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,中药高剂量组卵母细胞凋亡减少,细胞增殖增加,迁移与侵袭能力增强,TGF- β mRNA 及其蛋白表达水平显著上调(均 $P < 0.05$);且中药高剂量组作用明显优于中药低、中剂量组($P < 0.05$)。**结论** 应用高剂量滋肾育胎丸干预免疫性不孕大鼠可明显上调其卵母细胞 TGF- β 水平,改善卵母细胞功能。

关键词 滋肾育胎丸;免疫性不孕;卵母细胞;生物学行为

Regulatory Effect of Zishen Yutai Pill on the Biological Behavior of Oocytes in Immune Infertility Model Rats ZHANG Xiao-li and ZHAO Xiao-yong Center for Perinatology, Huadu Hospital, Southern Medical University, Guangzhou (510800)

ABSTRACT **Objective** To observe the intervention effect of Zishen Yutai Pill (ZYP) on the oocytes of infertile rats with positive anti-sperm antibody (AsAb). **Methods** AsAb positive immune infertility model was established using active immunity. Totally 100 female SD rats were randomly divided into the blank control group, the model group, low, middle, and high dose ZYP groups, 20 in each group. Different medications were administered to rats in corresponding groups by gastrogavage from the 22nd day of modeling to the 36th day, once per day. Normal saline (5 mL/kg) was administered to rats in the model group by gastrogavage. ZYP at 0.075, 0.100, 0.150 g/mL was respectively administered to rats in low, middle, and high dose ZYP groups. AsAb and transforming growth factor β (TGF- β) levels were measured by ELISA. Oocytes were collected after rats were sacrificed. mRNA and protein expression levels were detected using Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Oocyte apoptosis rate was determined by flow cytometry (FCM) and transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL). The oocyte proliferation level was detected by cell counting kit 8 (CCK-8) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). Oocyte migration and invasion was determined u-

基金项目:广东省科技厅科技项目(No.2015A030302004, No.2015A030302003);广东省中医药局科技项目(No.20161191, No.20151061);广东省自然科学基金资助项目(No.2016A030313419)

作者单位:南方医科大学附属医院围产医学中心(广州 510800)

通讯作者:赵晓勇, Tel:15918699044, E-mail:ace0829@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.03.0351

ing invasion chamber (Transwell) and scratch experiment. Results Compared with the blank control group, the apoptosis of oocytes increased, the proliferation of oocytes was reduced, the capabilities of migration and invasion were enhanced, mRNA and protein expression levels of TGF- β were significantly down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the model group, the apoptosis of oocytes was reduced, the proliferation of oocytes was increased, the capabilities of migration and invasion were enhanced, mRNA and protein expression levels of TGF- β were significantly up-regulated in the high dose ZYP group ($P < 0.05$). Besides, their effects were obviously superior in the high dose ZYP group than in low and middle dose ZYP groups ($P < 0.05$). Conclusion The application of high dose ZYP could obviously up-regulate the level of TGF- β and improve the function of oocytes.

KEYWORDS Zishen Yutai Pill; immune infertility; oocyte; biological behavior

我国不孕症患者占已婚育龄夫妇的 10% 左右,而免疫性不孕约占不孕的 20% ~ 30%^[1]。中医对不孕症的临床诊疗也不断向规范化、系统化发展。中西医两种学科之间相互渗透,使得治疗方法上能取长补短^[2]。研究表明,滋肾育胎丸具有补肾健脾、益气培元、养血安胎作用。滋肾育胎丸治疗不孕的有效性已经在临床实践中得到一定的证实^[3,4]。但滋肾育胎丸治疗抗精子抗体 (AsAb) 阳性不孕的报道尚不多见^[5,6]。本研究在制备免疫性不孕动物模型的基础上应用滋肾育胎丸进行干预,观察卵母细胞 TGF- β 水平差异及卵母细胞功能变化,为临床免疫性不孕的治疗提供实验依据。

材料及方法

1 动物 7 周龄 SPF 级雌性大鼠 100 只,9 周龄雄性大鼠 20 只,体重 250 ~ 300 g,购于南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号: SYXK (粤) 2003 - 0001,使用许可证号: SCXK (粤) 2005 - 0009。室温 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 45% ~ 65%,适应性饲养 1 周。

2 药物 滋肾育胎丸 (药物组成:人参、菟丝子、续断、巴戟、杜仲、党参、白术、桑寄生、阿胶、熟地、枸杞子、艾叶), 60 g/瓶,批号: 150320 - 03,广州中一药业有限公司生产。

3 仪器与试剂 ELX800 酶联免疫检测仪 (Bio Tek); 720 流式细胞仪 (美国 ABI 公司); JEM-100sx 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); ABI9700 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司); Alpha Innotech 凝胶成像系统 (Bio-RAD); 鼠抗人角蛋白 18、鼠抗人波形蛋白及多克隆一抗和二抗 (美国 Sigma 公司); β -actin (美国 Abcam 公司)。

4 模型制备 参照参考文献 [7,8], 采用主动免疫建立 AsAb 阳性的免疫性不孕模型。20 只雄鼠处

死取附睾组织,剪碎过滤,二硫苏糖醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 提取, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 20 min,将沉淀的精子悬浮于碳酸盐缓冲液中,吸取上清稀释后包被聚苯乙烯板,每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。第 7、14、21 d 予 SD 雌鼠前后足掌、背部正中、左右腹股沟注射精子。第 1 次注射精子密度 $1.3 \times 10^8/\text{mL}$,以后密度为 $5.0 \times 10^7/\text{mL}$ 。造模第 21 d 采用眼眶取血法取静脉血 0.4 mL, 2 000 r/min 离心 3 min,ELISA 法检测血清 AsAb 及 TGF- β 水平。如大鼠 AsAb (+),提示建模成功。

5 动物分组、给药及样本采集 将 100 只 SD 雌鼠随机分为 5 组:空白对照组、模型组及滋肾育胎丸低、中、高剂量组 (简称中药低、中、高剂量组)。模型组及中药各剂量组于 22 天开始灌胃给药,模型组给予生理盐水 5 mL/kg 灌胃,中药低、中、高剂量组分别给予滋肾育胎丸 0.075、0.1、0.15 g 灌胃 (用蒸馏水溶解成 0.1 g/mL 溶液)。每天 1 次,至 36 天。小鼠用药量按照体重 60 公斤的成年人每日常服用药量换算。换算公式: (动物体重/人的体重) \times 人用药量 \times 8.65。空白对照组不予处理。

造模第 36 天眼眶采血采用 ELISA 法复测血清 AsAb 和 TGF- β 水平,大鼠脱颈椎处死,打开腹腔后取双侧输卵管,划破输卵管壶腹部,用透明质酸酶消化掉颗粒细胞,PBS 冲洗,获得卵母细胞。

6 观察指标及检测方法

6.1 卵母细胞 TGF- β mRNA 水平检测 采用 Real-time PCR 法。加入 0.3 mL 氯仿, 4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000 r/min 离心 15 min。弃上清,振荡后加入 40 μL 1% DEPC 水溶解 RNA。将 PCR 反应溶液置于实时 PCR 仪上进行 PCR 反应, β -actin 和目的基因同时扩增,建立熔解曲线和扩增曲线,结果以 TaqMan 探针检测积累荧光进行定量。引物设计结果见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)
β-actin	上游:CCTGTACGCCAACACAGTGC	57	211
	下游:ATACTCTGCTTGCTGATCC		
TGF-β	上游:CCTGAAGCTGACCCAGGTAG	58	195
	下游:TTCCAAACTGCATCAATGAAT		

6.2 卵母细胞 TGF-β 蛋白水平检测 采用 Western blot 法。细胞转染处理 48 ~ 72 h 后冰上加蛋白裂解液。SDS-PAGE 电泳,冰上聚偏氟乙烯(PVDF)转膜,并封闭。稀释一抗溶液(1:1 000)摇床上 4 °C 孵育过夜, TBST 冲洗后加入二抗室温孵育 1.5 h,后加显影试剂。应用 Alpha Innotech 凝胶成像检测结果。蛋白表达值以条带灰度值除以 β-actin 来校正。

6.3 卵母细胞凋亡水平检测 分别采用流式细胞及 TUNEL 法测定。(1) 将待检测的细胞调整密度为 6×10^4 /mL ~ 10×10^4 /mL 的单细胞悬液,接种于中型培养皿。2% 不含 EDTA 的胰酶消化, PBS 冲洗重悬,依次加入 $1 \times$ Binding Buffer、Annexin V-FITC 及碘化丙啶(PI),混匀后室温避光反应 15 min,流式细胞仪上机检测早期和晚期凋亡的卵母细胞。(2) 以 4×10^4 /mL 接种于 12 孔板;24 h 后换为无血清 RPMI 1640 培养液,加入适量 DAPI, TdT 标记缓冲液室温孵育 5 min; 37 °C 1 h 后用 TdT 终止缓冲液室温作用 5 min; DAB 显色。封片后荧光显微镜下观察。激发波长 360 nm,发射波长 460 nm。

6.4 转染后卵母细胞增殖水平测定 分别采用 CCK-8 法及 EdU 测定。(1) 细胞转染 48 h 后,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 常规培养,接种于 96 孔板中,调整细胞浓度为 $1 \sim 2 \times 10^3$ 个细胞/孔,贴壁后培养 48 h,加 10 μL CCK-8 试剂,室温孵育 4 h 后振荡,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度值(450 nm)。(2) 取对数生长期细胞,按每孔 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 细胞接种于 96 孔板中。将 EdU 溶

液用细胞培养基稀释浓度至 50 μmol/L,孵育 2 h,4% 多聚甲醛孵育 30 min 后加入 2 mg/mL 甘氨酸反应 5 min,加入 $1 \times$ Apollo 染色反应液,荧光显微镜观察结果。

6.5 划痕实验检测卵母细胞迁移能力 在 6 孔板中加入细胞悬液,贴壁成单层细胞后,用消毒 20 μL 枪头均匀划 4 条横线,用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞。加入无血液培养基,放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。分别在 0、24、48 h 显微镜下拍照,测量划痕闭合宽度。

6.6 Transwell 法测定卵母细胞侵袭能力 细胞铺在 Transwell 侵袭小室(CORNING, USA)上室的纤维聚碳酸酯膜上,翻转,70% 乙醇固定细胞;24 孔板中加入 500 μL 0.1% 的结晶紫,倒置显微镜下每孔随机选择 4 个视野计算 Transwell 膜下室细胞数平均值作为迁移至下室的细胞数,照相。

7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠造模情况 造模成功后中药低、中、高剂量组和模型组大鼠表现同空白对照组基本一致,未见异常变化。

2 造模 21 天及 36 天各组大鼠血清 AsAb 及 TGF-β 水平比较(表 2) 造模 21 天模型组 AsAb(+),建模成功;各干预组间 TGF-β 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);造模 36 天,与模型组比较,中药高剂量组 TGF-β 水平升高,亦高于中药低、中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组卵母细胞 TGF-β mRNA 及其蛋白表达水平比较(表 3、图 1) 各组大鼠卵母细胞所有抽提总 RNA 经微量核酸-蛋白定量仪定量, A_{260}/A_{280} 值均在 1.8 ~ 2.0 范围内,表明 RNA 纯度高,无蛋白和 DNA 污染,可用于后续的实验研究。

表 2 21 天(造模后)及 36 天(药物干预后)各组大鼠血清 AsAb 及 TGF-β 水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	21 天		36 天	
		AsAb	TGF-β	AsAb	TGF-β
空白对照	20	-	19.46 ± 1.31	-	19.53 ± 1.25
模型	20	+	7.33 ± 1.02*	+	4.57 ± 1.03*
中药低剂量	20	+	7.35 ± 1.04	+	9.33 ± 1.21 [▲]
中剂量	20	+	7.40 ± 1.03	+	13.35 ± 1.18 ^{▲▲}
高剂量	20	+	7.38 ± 1.03	+	17.36 ± 1.24

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,^{▲▲} $P < 0.05$

与空白对照组比较,模型组 TGF-β mRNA 及其蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,中药各剂量组 TGF-β mRNA 及蛋白表达水平上调($P < 0.05$),且中药高剂量组上调水平明显高于中药低、中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠卵母细胞 TGF-β mRNA 及其蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF-β mRNA	TGF-β 蛋白
空白对照	20	15.69 ± 1.77	2.63 ± 0.25
模型	20	4.62 ± 1.66*	0.77 ± 0.13*
中药低剂量	20	7.01 ± 1.02 ^{△△}	1.55 ± 0.10 ^{△△}
中剂量	20	11.06 ± 1.37 ^{△△}	1.94 ± 0.14 ^{△△}
高剂量	20	13.05 ± 1.33 [△]	2.41 ± 0.27 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,^{△△} $P < 0.05$

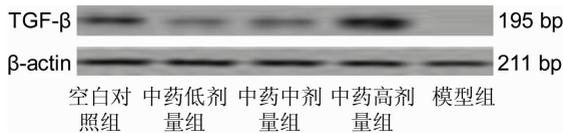


图 1 各组卵母细胞 TGF-β 蛋白表达电泳图

4 各组卵母细胞凋亡水平比较(表 4) 与空白对照组比较,模型组卵母细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与模型组比较,中药各剂量组卵母细胞凋亡率降低,且中药高剂量组明显低于中药低、中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 FCM 及 TUNEL 检测各组大鼠卵母细胞凋亡率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	n	FCM	TUNEL
空白对照	20	2.55 ± 0.04	12.27 ± 6.33
模型	20	20.33 ± 0.53*	38.35 ± 7.02*
中药低剂量	20	15.14 ± 0.30 ^{△△}	33.25 ± 5.14 ^{△△}
中剂量	20	10.30 ± 0.30 ^{△△}	21.05 ± 2.61 ^{△△}
高剂量	20	5.32 ± 0.04 [△]	10.19 ± 1.33 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,^{△△} $P < 0.05$

5 CCK-8 及 EdU 测定卵母细胞增殖能力比较(表 5) 与空白对照组比较,模型组细胞增殖吸光度降低,细胞增殖数目减少($P < 0.05$)。与模型组比较,中药各剂量组卵母细胞增殖水平提高($P < 0.05$),且中药高剂量组明显高于中药低、中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

6 划痕实验、Transwell 法测定卵母细胞迁移与侵袭水平比较(表 6) 与空白对照组比较,模型组卵母细胞迁移与侵袭能力减弱($P < 0.05$);与模型组比

表 5 各组大鼠卵母细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CCK-8	EdU(增殖后阳性率,%)
空白对照	20	0.89 ± 0.04	21.61 ± 5.25
模型	20	0.29 ± 0.03*	3.02 ± 1.01*
中药低剂量	20	0.35 ± 0.03 ^{△△}	6.54 ± 1.05 ^{△△}
中剂量	20	0.69 ± 0.03 ^{△△}	11.77 ± 2.37 ^{△△}
高剂量	20	0.81 ± 0.04 [△]	18.33 ± 4.21 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与中药高剂量组比较,^{△△} $P < 0.05$

较,中药高剂量组卵母细胞迁移与侵袭能力增强($P < 0.05$),并优于中药低、中剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 6 各组卵母细胞迁移和侵袭水平比较 ($\mu\text{m}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	划痕实验	Transwell 小室
空白对照	20	212.79 ± 12.05	47.54 ± 1.92
模型	20	68.57 ± 8.39*	24.51 ± 1.86*
中药低剂量	20	78.54 ± 8.41 ^{△△}	28.57 ± 1.14 ^{△△}
中剂量	20	137.05 ± 8.55 ^{△△△}	36.87 ± 1.04 ^{△△△}
高剂量	20	188.94 ± 9.27 ^{△△}	40.25 ± 1.23 ^{△△}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与中药高剂量组比较,^{△△} $P < 0.05$

讨 论

近年来随着免疫学发展,发现部分原因不明性流产与自身抗体密切相关,可认为是由抗原的自身免疫或同种免疫所引起的不孕^[9-11]。西医学的免疫反应与祖国医学的“邪正相争”学说关系最为密切^[12,13]。明代《免疫类方》首见“免疫”一词,而有关免疫的相关论述早在《黄帝内经》中就有类似记载^[14,15]。历代医家认为,不孕症的病因病机以肾虚为本,瘀血、湿热(毒)为标,临床常常虚实夹杂,多以肝肾阴虚、脾肾阳虚、湿热邪毒、气滞血瘀为多见^[16]。

AsAb 可通过多种途径对受精的多个环节进行干扰。AsAb 可引起精子凝集,降低精子的活动能力^[17]。血清中的 AsAb 能与受精卵上的精子特异性抗原结合,在补体存在的情况下可引起受精卵溶解,从而导致早期流产^[18,19]。卵母细胞分泌因子在调节卵泡的发育和衰退、影响优势卵泡选择以及闭锁卵泡的形成方面发挥重要作用,其中卵母细胞分泌的 TGF-β 最为重要^[5,20]。

本研究结果显示,21d(建模后)采用 ELISA 法测各组血清 AsAb 水平,结果发现模型组、中药各剂量组 AsAb(+),确定建模成功,TGF-β 以空白对照组最高,模型组及中药各剂量组 TGF-β 水平明显减低且组间比较未见明显差异。36 d 复测 TGF-β 水平,空白对照组同前基本无变化,滋肾育胎丸干预后以中药高剂

量组变化最显著,接近空白对照组水平,考虑与高剂量药物可以改善卵母细胞 TGF- β 分泌水平有关。Real-time PCR 和 Western blot 法测卵母细胞 TGF- β mRNA 及其蛋白表达水平,亦以中药高剂量组变化最显著,模型组基本无变化。FCM 和 TUNEL 测卵母细胞凋亡水平,滋肾育胎丸高剂量组凋亡率最低,基本与空白对照组持平,而模型组凋亡最高。CCK-8、EdU 测定卵母细胞增殖能力,模型组卵母细胞增殖能力明显下降,经高剂量中药干预后改善最显著。划痕实验和 Transwell 测卵母细胞迁移与侵袭,模型组最低,经高剂量组中药干预后明显改善,基本与空白对照组持平。

滋肾育胎丸方补肾健脾,益气培元,养血安胎,强壮身体。用于脾肾两虚,冲任不固,补肾固胎。考虑滋肾育胎丸可以明显改善卵母细胞活性,应用高剂量滋肾育胎丸干预卵母细胞活性明显增强,后续研究中将明确滋肾育胎丸具体的剂量活性曲线。

综上,滋肾育胎丸可提高卵母细胞活性,改善免疫稳定功能,恢复免疫平衡,并可能作用于神经—内分泌—免疫网络,改善生殖内环境,清除外源性致敏因素。应用滋肾育胎丸干预,为基础实验在动物体内验证后转化到临床建立了桥梁,也为免疫性不孕新的研究思路提供了直接的实验支持。

参 考 文 献

- [1] 赵嘉梅,王希浩,张爱华,等. 舒肝补肾法对慢性应激肝郁模型大鼠排卵功能及血清 IL-1 β 和 IL-6 的影响[J]. 现代中医药, 2012, 32(1): 51-55.
- [2] 徐丁洁,杜惠兰,徐洪,等. 逍遥丸对排卵障碍模型大鼠子宫内膜雌孕激素受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2393-2395.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:323.
- [4] 尹巧芝,李利民,黄利,等. 不同“肝郁”大鼠模型生殖激素及卵泡发育的研究[J]. 西南大学学报, 2010, 32(7): 8-12.
- [5] Oron G, Fisch B, Ao A, et al. Expression of growth-differentiating factor 9 and its type 1 receptor in human ovaries [J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(1): 109-117.

- [6] 郭新宇,张金玉,李海霞,等. 中药益气活血方对超促排卵小鼠卵巢生长分化因子表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6): 679-751.
- [7] Koji S, You QS, John JE. Does bone morphogenetic protein6 (BMP6) affect female fertility in the mouse [J]. Biol Reprod, 2010, 83(6): 997-1004.
- [8] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 361-363.
- [9] 国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准·中医临床诊疗术语·证候部分[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 233-279.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997, 124-133.
- [11] 张晓勇. 补肾调周、清利通络法治疗输卵管炎性不孕症的临床研究[J]. 中医学报, 2010, 38(4): 55-57.
- [12] 许振,许子春,吴炳坤. 中医药周期疗法治疗免疫性不孕100例[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4): 368-369.
- [13] 赵嘉梅,王希浩,张爱华,等. 舒肝补肾法对慢性应激肝郁模型大鼠排卵功能及血清 IL-1 β 和 IL-6 的影响[J]. 现代中医药, 2012, 32(1): 51-55.
- [14] 连方,赵斌,吕雪梅,等. 二至天葵方对体外受精-胚胎移植患者卵泡液代谢组学及 Ca²⁺ 浓度的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 22-25.
- [15] 杨鉴冰,刘晓倩. 祛异康对子宫内位症模型大鼠血清 FSH、LH、E₂、P 的影响[J]. 现代中医药, 2011, 31(4): 66-67.
- [16] 张莹,李玛建. 补肾中药在辅助生殖技术中对基础 FSH、E₂、FSH/LH 的干预初探[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(3): 115-117.
- [17] 徐丁洁,杜惠兰,徐洪,等. 逍遥丸对排卵障碍模型大鼠子宫内膜雌孕激素受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2393-2395.
- [18] 王望九,戚沁园,高尔鑫,等. 小鼠 2 种和人 4 种精子抗原免疫对小鼠妊娠的影响[J]. 安徽中医学报, 2008, 27(1): 35-37.
- [19] 尹巧芝,李利民,黄利,等. 不同“肝郁”大鼠模型生殖激素及卵泡发育的研究[J]. 西南大学学报, 2010, 32(7): 8-12.
- [20] 李春燕,陈子江. 生长分化因子-9 及生长分化因子-9B 与卵巢功能调节[J]. 生殖与避孕, 2004, 26(4): 365-399.

(收稿:2016-07-04 修回:2016-12-05)