

· 基础研究 ·

左归丸联合干细胞治疗对化疗后
卵巢早衰大鼠的影响

吴 倩 秦佳佳 杨 静 梁嘉丽

摘要 目的 探讨补肾养阴药左归丸联合干细胞(MSCs)治疗对化疗后卵巢早衰大鼠的影响。**方法** 60 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、干细胞组、补肾养阴组及干细胞+补肾养阴组,每组 12 只。除外空白组,其余各组连续腹腔注射环磷酰胺(CTX)15 日建立卵巢早衰模型。干细胞组:单次尾静脉注射 MSCs($3 \times 10^6/\text{mL}$, 1 mL),之后生理盐水灌胃(2 mL/d)28 日。补肾养阴组:单次尾静脉注射生理盐水 1 mL,之后左归丸灌胃(3 g/kg)28 日。干细胞+补肾养阴组:单次尾静脉注射 MSCs($3 \times 10^6/\text{mL}$, 1 mL),之后左归丸灌胃(3 g/kg)28 日。空白组及模型组:单次尾静脉注射生理盐水 1 mL,之后生理盐水灌胃(2 mL/d)28 日。观察大鼠给药前、给药 14 日及 28 日的体重,左归丸给药结束后称取卵巢、子宫湿重,HE 染色观察卵巢及子宫组织病理变化;ELISA 法检测外周血雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)及黄体生成素(LH)水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠体重随造模时间延长而日趋降低($P < 0.01$);与模型组比较,干细胞组、补肾养阴组、干细胞+补肾养阴组大鼠在左归丸给药 14 日及 28 日体重增加($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组成熟卵泡、黄体细胞及颗粒细胞均增多,子宫内膜增厚、腺体增多,尤以干细胞+补肾养阴组最显著。与空白组比较,模型组卵巢、子宫湿重下降($P < 0.01$), E_2 水平下降,FSH、LH 水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,补肾养阴组和干细胞+补肾养阴组卵巢、子宫湿重增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),干细胞+补肾养阴组 LH 水平降低($P < 0.05$),干细胞组、补肾养阴组、干细胞+补肾养阴组 E_2 水平均升高,FSH 水平均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),治疗组中以干细胞+补肾养阴组各指标改善最为显著($P < 0.05$)。**结论** 左归丸及干细胞治疗可改善化疗所致的卵巢功能损害,其能显著提高 E_2 含量,降低 FSH、LH 含量,且能有效抑制卵巢颗粒细胞凋亡,二者联合应用疗效更佳。

关键词 左归丸;补肾养阴药;干细胞;卵巢早衰

Effect of Combined Treatment of Zuogui Pill and Mesenchymal Stem Cells on Chemotherapy-induced Premature Ovarian Failure in Rats WU Qian, QIN Jia-jia, Yang Jing, and Liang Jia-li
School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou (510632)

ABSTRACT Objective To observe effect of combined treatment of Zuogui Pill (ZGP), prescription of nourishing Shen-Yin, and mesenchymal stem cells (MSCs) on chemotherapy-induced premature ovarian failure (POF) in rats. **Methods** Sixty rats were randomly divided into the blank group, model group, MSCs group, ZGP group and MSCs + ZGP group, 12 in each group. Apart from blank group, rats were daily administered with cyclophosphamide (Cytoxan, CTX) by intraperitoneal injection for 15 days to establish POF model. Then rats in MSCs group were administered with MSCs ($3 \times 10^6/\text{mL}$, 1 mL) by single tail vein injection and daily intragastrically administered with normal saline (2 mL/d) for 28 day. The rats in ZGP group were administered with a single injection of 1 mL normal saline, then were daily intragastrically administered with ZGP (3 g/kg) for 28 day. The rats in MSCs + ZGP group were administered with MSCs ($3 \times 10^6/\text{mL}$, 1 mL) by single tail vein injection, and then were daily intragastrically administered with ZGP (3 g/kg) for 28 day. The rats in blank group and model group were administered with normal saline as above.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373805)

作者单位:暨南大学中医学院(广州, 510632)

通讯作者:秦佳佳, Tel: 020-85226289, E-mail: jjajia_bamboo@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171011.238

The rats were weighted at different time, namely before, on the 14th and the 28th day of ZGP administration. The ovaries and uterus were weighted after ZGP administration. Pathological changes of ovary and uterus were observed by HE staining. The levels of estradiol (E_2), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) in peripheral blood were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with the blank group, the rats' weight in the model group were lost significantly ($P < 0.01$), which became much more serious with time going. While compared with the model group, the rats' weight in 3 treatment groups were increased on the 14th and the 28th day of ZGP administration ($P < 0.01$). Compared with model group, the numbers of mature follicle and luteal cells were increased, the endometrium was thickened and the glands were increased in all treatment groups, especially in the MSCs + ZGP group. Compared with the blank group, the weights of ovary and uterus in the model group were decreased ($P < 0.01$), the E_2 level was down regulated, the FSH and LH levels were up regulated ($P < 0.01$). While after treatment, the weights of ovary and uterus were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in both ZGP group and MSCs + ZGP group, LH level in the MSCs + ZGP group was down regulated ($P < 0.05$); the level of E_2 was increased, while that of FSH was decreased in 3 treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), especially in the MSCs + ZGP group ($P < 0.05$). Conclusions Both ZGP and MSCs are effective on treating chemotherapy-induced POF by increasing the level of E_2 , and decreasing that of FSH and LH, and simultaneously inhibiting the apoptosis of ovarian granulosa cells. The better effect could be got using the combined therapy.

KEYWORDS Zuogui Pill; prescription of nourishing Shen-Yin; mesenchymal stem cells; premature ovarian failure

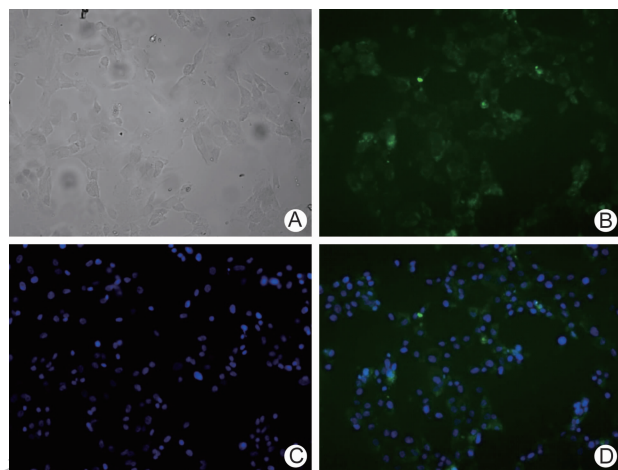
现代应用化疗药物治疗恶性肿瘤已经达到一定水平,随着治愈率的不断提高,化疗所导致的卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 也逐渐被公众所重视^[1]。POF 出现的闭经、不孕等严重影响女性的生活质量。目前,国内外主要应用雌、孕激素^[2,3] 保护化疗所致卵巢损害,但是其长期使用对卵巢肿瘤的发生颇具争议,中医药对于卵巢功能的保护有其独到之处。卵巢为生殖器官,属肾所主。肾藏精,主生殖,为天癸之源,故《傅青主女科》有“经水出诸肾”之说^[4]。肾主宰“肾—天癸—冲任—胞宫轴”,故肾与女子月经及胎孕关系尤为密切。有学者应用补肾养血法治疗卵巢早衰发现临床症状得到明显改善,血清激素水平也有不同程度提高^[5]。本课题组前期实验显示:补肾方药能减轻化疗导致的卵巢功能损害,尤其以补肾阴中药效果更明显^[6]。近年来干细胞移植已成为治疗 POF 的热点之一,并在实验研究中取得一定成就^[7]。本课题组前期研究亦发现补肾方药的引经作用对 POF 模型间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 靶向归巢有一定促进作用。本实验拟从卵巢、子宫的湿重及组织病理变化、内分泌激素水平等指标变化,观察补肾养阴方药联合应用干细胞对化疗后所致卵巢早衰的疗效。

材料及方法

1 动物 纯种 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 雌性,

8~12 周龄, 体重 220~250 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (粤) 2013-0020, No. 44003900000964。伦理审查编号: 20130305001。

2 MSCs 分离培养和鉴定 参考 Wakitani S 等^[8] 和 Pittenger MF 等^[9] 的方法, 分离 SD 大鼠骨髓原代培养获得。免疫荧光鉴定 (图 1) MSCs 表面标志抗原 CD 44 及造血前体细胞标志抗原 CD 34, CD 34 未发现阳性表达, 而 CD 44 阳性表达较多, 符合 MSCs 表面标志表达的特征, 表明获得较高纯度的 MSCs。传



注: A 为 CD 44 形态图; B 为 CD 44 表达图; C 为 CD 44 叠加图; D 为 DAPI 核染

图 1 免疫荧光检测 CD 44

代 3 次备用。

3 药物 左归丸(组成:熟地、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、龟板胶、鹿角胶,按药物说明换成原生药剂量),华润三九制药股份有限公司,批号:1307004S,用蒸馏水调整至合适浓度(0.3 g/mL)备用。

4 试剂及仪器 环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:H32020857。雌二醇(Estradiol, E₂)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)酶联免疫试剂盒,Axygen 公司;TUNEL 试剂盒,江苏碧云天生物公司。酶标仪:Thermo Fisher Scientific,型号 Multiscan MK3;石蜡切片机:德国 Leica,型号 AS-325;CO₂培养箱,Thermo Scientific 公司;倒置显微镜,Olympus 公司。

5 造模及给药方法

5.1 分组及造模 60 只 SD 大鼠按随机数字表随机抽取 12 只为空白组,剩余 48 只按文献[10]建立化疗所致的 POF 动物模型。具体方法为:大鼠首日按 50 mg/kg 腹腔注射 CTX,第 2~15 日按 8 mg/kg 剂量,造模共 15 日,末次给药 24 h 后眼眶后静脉丛采血并分离血清,检测血清性激素水平变化确认成模。造模成功后再随机分为模型组、干细胞组、补肾养阴组和干细胞+补肾养阴组,每组 12 只。过程中各组大鼠均死亡 1 只,原因可能是灌胃或注射操作不当,以及化疗药物的毒副作用。

5.2 给药方法 空白组:单次尾静脉注射生理盐水 1 mL,之后生理盐水灌胃,每次每只动物 2 mL,连续灌胃 28 日。模型组:单次尾静脉注射生理盐水 1 mL,之后生理盐水灌胃,每次每只动物 2 mL,连续灌胃 28 日。干细胞组:根据课题组前期预实验结果,单次尾静脉注射 3×10^6 /mL MSCs 1 mL,之后生理盐水灌胃,每次每只动物 2 mL,连续灌胃 28 日。补肾养阴组:单次尾静脉注射生理盐水 1 mL,之后左归丸灌胃,每次 3 g/kg(左归丸临床剂量为 30 g/d,课题组前期查阅施新猷主编的《现代医学实验动物学》^[11]中不同种类动物间剂量换算表格得知,人与大鼠的体表面积等效剂量换算系数是 0.018,mg/kg 与 mg/m² 相应的转换因子为 6,换算得出大鼠剂量 3 g/kg,并进行预实验验证),溶于 2 mL 生理盐水中,连续灌胃 28 日。干细胞+补肾养阴组:单次尾静脉注射 3×10^6 /mL MSCs 1 mL,之后左归丸灌胃,每次 3 g/kg,溶于 2 mL 生理盐水中,连续灌胃 28 日。

6 检测指标及方法

6.1 治疗前后大鼠体重 分别于左归丸给药

前、给药 14 日、给药 28 日,称取各组大鼠体重,比较各组大鼠给药前后体重变化。

6.2 取材 于给药结束次日上午用戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,行腹主动脉取血,取双侧卵巢、子宫,除去表面脂肪及筋膜,用电子天平称取卵巢及子宫湿重,比较各组大鼠卵巢及子宫湿重。

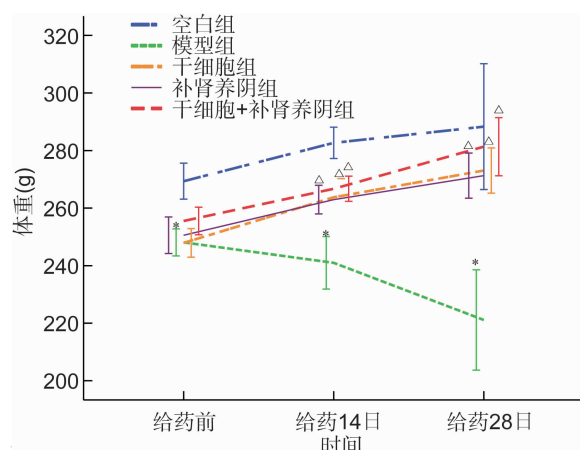
6.3 卵巢、子宫 HE 染色 先肉眼观察卵巢及子宫形态,将其固定于 10% 福尔马林,经过水洗、脱水、浸蜡,包埋做成石蜡切片,切片厚 5 μ m,再行 HE 染色,在光学显微镜(100 倍)下观察卵巢及子宫的病理变化。

6.4 血清性激素水平 取血并分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存,用 ELISA 法测定各组大鼠血清 E₂、FSH、LH 含量,按各试剂盒说明书操作。

7 统计学方法 所有数据采用 SPSS 13.0 软件,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。数据采用单因素方差分析,若方差齐性,组间比较采用 LSD 法,若方差不齐,组间比较采用 Tamhane's T2 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠给药前后体重比较(图 2) 除模型组外,随着给药时间的推移,各组大鼠体重均有不同程度增加,其中空白组体重增加最快。与空白组比较,模型组给药前、给药 14 日及 28 日大鼠体重降低(P < 0.01);与模型组比较,干细胞组、补肾养阴组、干细胞+补肾养阴组给药 14 日及 28 日体重增加(P < 0.01);3 个治疗组间比较,差异无统计学意义(P > 0.05)。



注:与空白组比较,*P < 0.01;与模型组比较, Δ P < 0.01

图 2 各组大鼠给药前后体重比较

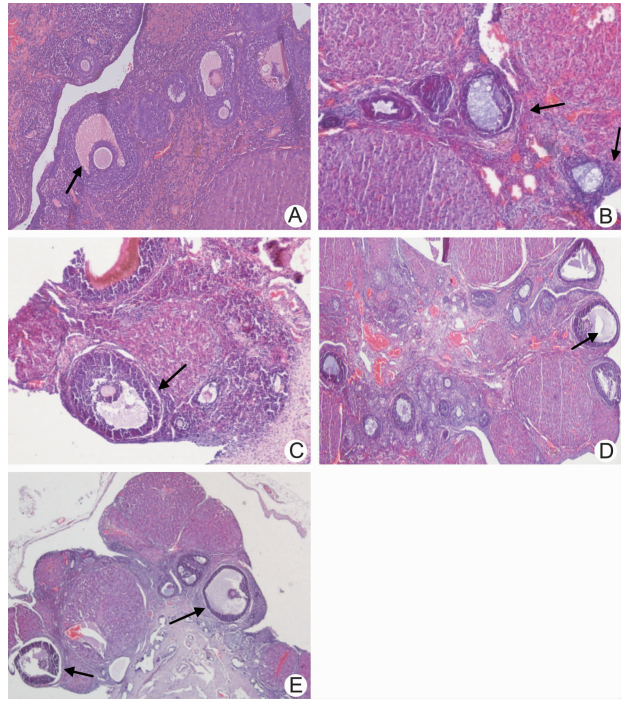
2 各组给药 28 日后卵巢、子宫湿重比较(表 1)与空白组比较,模型组卵巢、子宫湿重下降($P < 0.01$);与模型组比较,补肾养阴组、干细胞 + 补肾养阴组卵巢及子宫湿重均增加($P < 0.05, P < 0.01$);干细胞组、补肾养阴组和干细胞 + 补肾养阴组 3 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组给药 28 日后大鼠卵巢及子宫湿重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	卵巢	子宫
空白	11	0.16 ± 0.04	1.06 ± 0.22
模型	11	0.09 ± 0.01 *	0.59 ± 0.09 *
干细胞	11	0.10 ± 0.03	0.61 ± 0.09
补肾养阴	11	0.12 ± 0.01 $\Delta\Delta$	0.65 ± 0.07 Δ
干细胞 + 补肾养阴	11	0.12 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.75 ± 0.07 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

3 各组给药 28 日后卵巢组织形态学观察与 HE 染色结果比较(图 3) 肉眼观察空白组大鼠子宫呈“Y”字型,两端各分布 1 个呈绿豆样的卵巢,淡红色,质地较软具有弹性;模型组、干细胞组、补肾养阴组、干细胞 + 补肾养阴组大鼠卵巢体积均有不同程度减小,其中模型组最明显,甚至出现与周围筋膜难以剥离。卵巢 HE 染色结果:空白组:各级卵泡数量、形态正常,

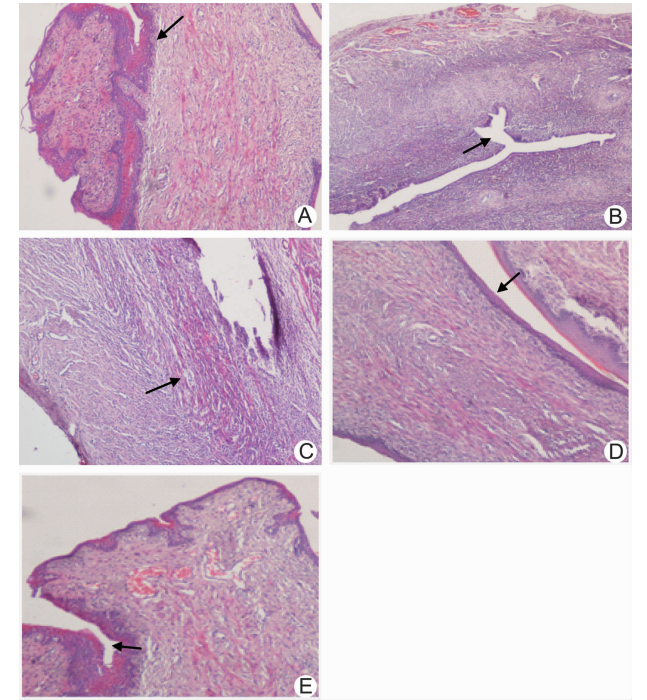


注:A 为空白组,箭头所指为成熟卵泡;B 为模型组,箭头所指为闭锁卵泡;C 为干细胞组,箭头所指为次级卵泡;D 为补肾养阴组,箭头所指为成熟卵泡;E 为干细胞 + 补肾养阴组,箭头所指为成熟卵泡

图 3 各组卵巢组织 HE 染色结果比较 (HE, $\times 100$)

黄体数也较多,间质内未见淋巴细胞浸润及纤维化。模型组:卵巢体积明显缩小,闭锁卵泡较其他组增多,发育成熟的卵泡极少,颗粒细胞层较正常减少且排列紊乱。干细胞组:卵巢体积缩小,各级卵泡可见,成熟卵泡、卵泡内颗粒细胞较模型组有所增多。补肾养阴组:原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡及黄体数均增多,颗粒细胞数增多且呈放射状整齐排列,但仍有部分卵泡发育不良。干细胞 + 补肾养阴组:各级卵泡及黄体数均明显增多,其中发育成熟卵泡、颗粒细胞层较模型组明显增多,在闭锁卵泡减少、颗粒细胞、窦状卵泡增加方面较干细胞、补肾养阴组更显著。

4 各组给药 28 日后子宫组织 HE 染色结果比较(图 4) 空白组:子宫壁及子宫内膜较厚,腺体数量较多,某些腺体扩张形成小囊,上皮细胞复层化,细胞成柱状,无异型性,有大量分泌泡,结缔组织疏松。模型组:子宫壁及子宫内膜变薄,腺体数量较空白组明显减少,结构复杂且不规则,上皮细胞排列紊乱,呈大小不等的核分裂相,胞质中分泌泡少,结缔组织致密,宫腔变小。干细胞组:子宫内膜较厚,腺体较模型组增多,上皮细胞形态趋于正常,结缔组织较疏松。补肾养阴组:子宫壁较丰厚,腺体数较多,排列较规则,上皮细胞



注:A 为空白组,箭头所指为子宫内膜;B 为模型组,箭头所指为子宫腔;C 为干细胞组,箭头所指为腺体;D 为补肾养阴组,箭头所指为子宫内膜;E 为干细胞 + 补肾养阴组,箭头所指为子宫内膜

图 4 各组子宫组织 HE 染色结果比较 (HE, $\times 100$)

轻度复层化,宫腔增大。干细胞+补肾养阴组:子宫壁丰厚,腺体、血管丰富,上皮异型细胞较少,结缔组织疏松,宫腔较模型组明显变大。

5 各组给药 28 日后血清 E_2 、FSH、LH 水平比较(表 2) 与空白组比较,模型组 E_2 水平下降,FSH、LH 水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,干细胞组、补肾养阴组、干细胞+补肾养阴组 E_2 水平升高,FSH 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),干细胞+补肾养阴组 LH 水平降低($P < 0.05$);与干细胞组、补肾养阴组比较,干细胞+补肾养阴组 E_2 水平升高、FSH 和 LH 水平降低更显著($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清中 E_2 、FSH、LH 水平比较 (U/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2	FSH	LH
空白	11	174.92 $\pm$ 3.41	5.23 $\pm$ 0.30	3.35 $\pm$ 0.13
模型	11	142.50 $\pm$ 2.00 *	9.45 $\pm$ 0.25 *	6.15 $\pm$ 0.14 *
干细胞	11	153.40 $\pm$ 1.82 $\Delta\Delta$	7.58 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta$	5.03 $\pm$ 0.18 Δ
补肾养阴	11	155.03 $\pm$ 1.33 $\Delta\Delta$	7.19 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	4.73 $\pm$ 0.16 Δ
干细胞+补肾养阴	11	164.44 $\pm$ 3.48 $\Delta\Delta\Delta$	6.28 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta\Delta$	4.03 $\pm$ 0.11 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与干细胞+补肾养阴组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

讨 论

本实验中补肾养阴方药左归丸出自《景岳全书》卷五十一新方八阵之补阵,“左归丸治真阴肾水不足,不能滋养营卫,渐至衰弱,或虚热往来,自汗,盗汗,或神不守舍,血不归原,或虚损伤阴,或遗淋不禁,或气虚昏运,或眼花耳聋,或口燥舌干,或腰酸腿软,凡精髓内亏,津液枯涸等证……宜此方主之”。化疗后绝大多数患者表现为肝肾阴虚,以肾阴不足为主。方用熟地为君,补肾阴益精血养冲任;山药健脾养阴,山茱萸收涩补肝为臣;配以枸杞、川牛膝补益肝肾,用鹿角胶、龟板胶二药阴阳参合,调督任之元,故能大补肾阴肾阳,加之菟丝子补肾中阳气,虽名曰左归,其实三阴并补,又有“阴中求阳”之意,乃水火交济之方也。同时,化疗后患者大多气阴两伤,累及气血、脏腑,表现为低热盗汗、乏力纳差、脱发、咽干、鼻衄、腰膝酸软、手足心热、舌红、苔少、脉细数等一派肝肾阴虚之症,盖因化疗属致病热邪,热势由内达外,灼伤阴液。卵巢为女性内生殖器官,因“肾主生殖”,主宰着“肾—天癸—冲任—胞宫轴”之间的协调,使其“有子”或“无子”。故防护化疗导致的卵巢功能损害应从调补肾阴入手,本方又取张景岳:“善补阴者,必于阳中求阴,则阴得阳升而泉源不竭”之义使配伍纯补无泻、阳中求阴,与化疗所导致的卵巢早衰病症相符,证药叩合。

研究发现,左归丸可通过上调卵泡及卵巢间质

Bcl-2 蛋白及下调 Bax 蛋白的表达,从而抑制卵泡的过快凋亡^[12];左归丸还能减缓 POF 小鼠外周血 FSH 升高,提高体内 E_2 水平,抑制抗卵巢抗体(anti-ovarian antibody, AoAb)产生,促进卵巢卵母细胞生长分化因子-9(growth differentiation 9, GDF-9)蛋白阳性表达,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^[13]。而左归丸加用黄芪后可对化疗后小鼠卵巢生殖内分泌功能的损害有保护作用,并可增强化疗对肿瘤的抑制作用^[14]。

左归丸在方药组成上有补肾养阴之效,切合化疗后卵巢早衰的病证特点;而诸多的实验研究亦证实了左归丸对 POF 动物模型具有卵巢保护功能^[15-18]。结合课题组前期研究成果^[6],笔者选取左归丸为补肾养阴的代表方剂,以之作为研究的切入点,观察补肾养阴药联合干细胞靶向归巢治疗卵巢早衰的疗效。

MSCs 具有多向分化潜能,因此对损伤组织的修复能力强大,临床应用前景广阔。既往动物实验研究表明,骨髓、脂肪、羊水、脐带等多种来源的间充质干细胞可通过促进卵巢血管生成、改善卵巢颗粒细胞凋亡情况、改善内分泌水平等表现部分改善化疗所致的卵巢早衰^[19-24],本实验研究中干细胞组的大鼠卵巢各级卵泡及黄体数均增加,闭锁卵泡数减少, E_2 、FSH、LH 等性激素水平改善,结果与之相符。单独使用干细胞或补肾养阴药,大鼠卵巢功能得到一定的改善,而干细胞联合补肾养阴药干预时,卵巢功能的改善情况更加显著,提示补肾养阴法切合化疗所致卵巢早衰的病机,中西医结合干预对化疗所致卵巢功能损伤的修复效果可能更为理想。虽然本课题组以中医药结合干细胞干预化疗所致 POF 的治疗方式较为新颖,但是,同目前研究大多数一样,仅从卵巢组织形态、内分泌水平变化等方面反映干细胞及补肾养阴药对卵巢功能的影响,未能从信号转导通路、蛋白表达等更深层次揭示其治疗作用的具体机制,为临床治疗提供更有力的理论依据,此待后续进一步研究解决。

综合上述实验结果,可见补肾养阴药、干细胞、干细胞+补肾养阴药对化疗所致的 POF 有一定的治疗作用,能不同程度改善 POF 大鼠卵巢、子宫组织病理,增加其体重、卵巢及子宫湿重,有效提高血清中 E_2 含量,降低 FSH、LH 含量,其中以干细胞联合应用补肾养阴药疗效更佳。

参 考 文 献

- [1] Blumenfeld Z. Chemotherapy and fertility [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012, 26 (3): 379-390.

- [2] Blumenfeld Z, Eckman A. Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a[J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005, (34): 40-43.
- [3] Del Mastro L, Catzeddu T, Venturini M. Infertility and pregnancy after breast cancer: current knowledge and future perspectives [J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(6): 417-422.
- [4] 蔡竟, 屈杰. 南振军治疗月经失调病的思路和经验[J]. 四川中医, 2013, 31(3): 7-9.
- [5] 杨家林, 刘艺, 彭卫东. 中药补肾养血治疗卵巢早衰 54 例[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 1-3.
- [6] 秦佳佳, 李瑞满, 吴倩. 不同补肾方法减轻化疗后卵巢功能损害的比较研究[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(10): 1847-1850.
- [7] 刘炜, 周围, 童晓文, 等. 干细胞治疗卵巢早衰的实验研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(7): 92-94.
- [8] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-1426.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [10] 付霞霏, 何援利. 化疗所致卵巢早衰动物模型的建立 [J]. 广东医学, 2008, 29(12): 1952-1954.
- [11] 施新猷主编. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 334.
- [12] 朱玲, 罗颂平, 许丽绵, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(4): 381-386.
- [13] 李红梅, 朱玲, 钟志勇, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 GDF-9、BMP-15 表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(19): 1517-1518.
- [14] 吴璇, 彭萍, 关婷, 等. 左归丸加黄芪对 S180 小鼠化疗后卵巢功能损害和抑瘤作用的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(23): 2526-2529.
- [15] 朱玲, 罗颂平, 许丽绵, 等. 左归丸对小鼠自身免疫性卵巢损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(10): 920-924.
- [16] 阳松威, 孙晓峰, 贺又舜, 等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响[J]. 中成药, 2016, 38(4): 717-722.
- [17] 盛温温, 杜志斌. 补肾法防治化疗致卵巢早衰实验研究 [J]. 山西中医, 2017, 33(1): 55-56, 62.
- [18] 佟雷, 刘金丽, 孙琳林, 等. 左归丸及右归丸对卵巢早衰小鼠卵巢衰老的预防作用[J]. 中成药, 2017, 39(2): 260-265.
- [19] Fu X, He Y, Xie C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage [J]. Cytotherapy, 2008, 10(4): 353-363.
- [20] 付霞霏, 何援利, 王雪峰, 等. 骨髓间充质干细胞移植修复化疗所致卵巢损伤的实验研究[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(6): 410-414.
- [21] Liu T, Huang Y, Guo L, et al. CD44⁺/CD105⁺ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. Int J Med Sci, 2012, 9(7): 592-602.
- [22] Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function [J]. Lab Invest, 2013, 93(2): 181-193.
- [23] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue [J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 1294-1301.
- [24] 吕晓丹. 脐带间充质干细胞移植治疗卵巢早衰的实验研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.

(收稿: 2016-03-01 修回: 2017-08-25)

责任编辑: 汤 静