

· 基础研究 ·

左归丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢
GDF-9/ Smad2 信号转导的影响朱 玲¹ 章雅琼² 彭艳丽² 任锦锦²

摘要 目的 观察左归丸对免疫性卵巢早衰(premature ovarian failure,POF)模型小鼠卵巢生长分化因子-9(growth differentiation factor-9,GDF-9)/Smad2 信号转导的影响,探讨左归丸治疗 POF 的机制。**方法** 将 84 只雌性 Balb/c 小鼠随机分为空白对照组(12 只)、模型组(24 只)、左归丸组(24 只)及己烯雌酚组(24 只)。除空白对照组外,其余 3 组以小鼠透明带多肽 3(zona pellucida 3, ZP₃)为抗原,皮下多点注射建立 POF 模型,左归丸组及己烯雌酚组分别给予 2.7 g/(kg·d)左归丸及 0.15 mg/(kg·d)己烯雌酚水溶液灌胃,每日 1 次,每周 6 次,连续灌胃 4、8 周。观察各组小鼠卵巢生长卵泡比率;分别采用免疫组化法及 Western blot 法检测小鼠卵巢组织 GDF-9 及 Smad2 蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组比较,模型组造模 4、8 周小鼠卵巢生长卵泡比率及 GDF-9、Smad2 蛋白表达均明显减少($P < 0.05$);与模型组同期比较,左归丸及己烯雌酚组小鼠卵巢生长卵泡比率、GDF-9 蛋白水平表达明显升高($P < 0.05$),左归丸组 8 周 Smad2 蛋白水平表达升高($P < 0.05$)。**结论** POF 的发病可能与卵巢 GDF-9 蛋白表达水平不足,GDF-9/Smad2 信号转导功能低下,导致始基卵泡不能有效募集,原位闭锁有关。左归丸能增加卵泡 GDF-9 蛋白表达,其机制可能是通过 GDF-9/Smad2 信号转导通路对卵泡生长发育进行调节,从而发挥治疗 POF 的作用。

关键词 卵巢早衰;左归丸;生长分化因子-9;Smad2 蛋白;信号转导

Effect of Zuogui Pill on GDF-9/Smad2 Signal Transduction in Premature Ovarian Failure Model Mice
ZHU Ling¹, ZHANG Ya-qiong², PENG Yan-li², and REN Jin-jin² 1 Center for Children and Women, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Zuogui Pill (ZP) on growth differentiation factor-9 (GDF-9)/Smad2 signal transduction in premature ovarian failure (POF) model mice, and to study its mechanism for treating POF. **Methods** Totally 84 female Balb/c mice were randomly divided into the blank control group ($n = 12$), the model group ($n = 24$), the ZP group ($n = 24$), the diethylstilbestrol group ($n = 24$). The POF model was established by subcutaneously multi-point injecting zona pellucida 3 (ZP₃) in mice of all groups except the blank control group. ZP at the daily dose of 2.7 g/kg was administered to mice in the ZP group by gastrogavage, once per day, 6 times per week for 4 or 8 successive weeks. Diethylstilbestrol solution at the daily dose of 0.15 mg/kg was administered to mice in the diethylstilbestrol group by gastrogavage, once per day, 6 times per week for 4 or 8 successive weeks. The ratio of ovarian growth follicles was observed. Protein expressions of GDF-9 and Smad2 in ovarian tissue were detected by immunohistochemical assay and Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the ovarian growth follicle ratio, and protein expressions of GDF-9 significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group at the same time point, ovarian growth follicle ratio and GDF-9 protein expression significantly increased in the ZP group and the diethylstilbestrol group ($P < 0.05$). Smad2 protein expression increased in the ZP group at week 8 ($P < 0.05$). **Conclusions** The

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81674016);广东省教育厅重点实验室 2011 年度开放基金(No. ZF2011102)

作者单位:1. 广州中医药大学第一附属医院妇儿中心(广州 510405);2. 广州中医药大学研究生院(广州 510405)

通讯作者:朱 玲, Tel: 020-36585434, E-mail: 2275898821@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170225.224

incidence of POF might be associated with insufficient expression of GDF-9 protein in ovarian tissue, hypofunction of GDF-9/Smad2 signal transduction pathway, which resulted in ineffectively recruited primordial follicles and follicular atresia. ZP could increase expression of GDF-9 protein possibly via regulating the follicle growth and development through GDF-9/Smad2 signal transduction pathway, thus playing a role in treating POF.

KEYWORDS premature ovarian failure; Zuogui Pill; growth differentiation factor-9; Smad2 protein; signal transduction

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是指女性 40 岁之前出现月经稀发或闭经,伴有高卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)和低雌激素水平^[1]。临床可表现为烘热汗出、烦躁、眠差、性欲减退及生殖道萎缩等,其发病率为 1%~3%。目前,POF 的病因尚不清楚。研究表明,染色体和基因异常^[2,3]、酶源因素、医源性因素、自身免疫性因素、感染、环境、精神应激等均可导致本病的发生。临床发现,5%~30% 的 POF 患者同时患有其他自身免疫性疾病如桥本甲状腺炎等^[4]。

中医学认为,POF 以肾虚血亏血瘀为病机特点^[5]。左归丸治疗卵巢早衰,可使患者成功妊娠^[6],其出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,寓调节肾的阴阳平衡于补肾之中,具有补肾精、养精血、化瘀血之功,可提高 POF 小鼠外周血始基卵泡生长促进因子——生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)水平^[7,8],对卵泡凋亡、卵巢超微结构均有一定的改善作用^[9,10]。GDF-9 与信号转导蛋白 Smad2 共同调控卵泡发育成熟。本研究通过观察左归丸对 POF 小鼠 GDF-9/Smad2 的影响,探讨左归丸治疗卵巢早衰的作用机理。

材料与方法

1 实验动物 98 只 8 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠,经检疫合格。雌鼠 84 只,雄鼠 14 只,体重 16~19 g,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0002,动物饲养环境合格证号:SCXK(粤)2008-0092。雌、雄小鼠按 6:1 比例用有分隔的饲养笼饲养,以诱导小鼠的正常发情周期。筛选有规律动情周期的雌鼠进行实验。

2 药物 左归丸由河南省宛西制药股份有限公司生产(由熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、山茱萸、枸杞子组成,每 10 粒重 1 g,批号:110602)。己烯雌酚片购自合肥久联制药有限公司(1 mg/片,批号:20100920)。

3 试剂与仪器 小鼠透明带 3(zona pellucida

3, ZP₃)多肽粉剂的第 330~342 个氨基酸序列(NS-SSSQFQIHGPR),其分析纯度为 96.2%,杭州中肽生物有限公司生产(批号:CK-07-00801);弗氏完全佐剂及不完全佐剂购自美国 Sigma 公司(批号:075K8925,105K8917);小鼠 GDF-9、Smad2 蛋白检测抗体均由北京博奥森生物技术有限公司提供(批号分别为 980695W、990391W)。

4 POF 动物模型制备 参照参考文献[11],取 2 mg ZP₃ 透明带多肽粉末,加入 5 mL 三蒸水配成 0.4 mg/mL 溶液,与弗氏完全佐剂按 1:1 比例配制成免疫试剂,与弗氏不完全佐剂按 1:1 比例配制成免疫强化试剂。随机取 SPF 级 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠,每鼠注射免疫试剂 0.15 mL(含 0.075 mL 弗氏完全佐剂,0.03 mg ZP₃)。2 周后以免疫强化试剂 0.15 mL 皮下多点注射小鼠双后脚掌及腹腔加强免疫,5 周后同法行第二次加强免疫。

5 分组及给药 将 Balb/c 小鼠按随机数字表法分为空白对照组(12 只)、模型组(24 只)、左归丸组(24 只)及己烯雌酚组(24 只),后 3 组设造模 4、8 周不同时间点观察。除空白对照组外,其余小鼠均按上述方法造模,空白对照组在造模的同一时间皮下多点注射三蒸水 0.15 mL。建模后(第二次加强免疫后第二天)各药物组开始灌胃给药。根据小鼠与人用药剂量公式:B 种动物剂量(mg/kg) = W × A 种动物的剂量(mg/kg)进行换算(人与小鼠的折算系数 W 为 9.01)^[12]。己烯雌酚临床成人剂量 1 mg/60(kg·d),左归丸临床成人剂量为 18 g/60(kg·d),均以蒸馏水溶解药片,制成溶液,调整浓度,使每毫升溶液含己烯雌酚 0.01 mg,含左归丸 0.18 g[按小鼠平均体重 20 g 计算得出小鼠用量分别为 0.15 mg/(kg·d)及 2.7 g/(kg·d)],每只小鼠灌胃量均为 0.3 mL。模型组及空白对照组小鼠灌胃等量蒸馏水,每日灌胃 1 次,各组分别连续灌胃 4、8 周,每周 6 天。

6 观察指标及检测方法

6.1 动情周期观察 从小鼠第一次免疫起,每日 7:30—8:00 取阴道脱落细胞,观察小鼠动情周期

变化。小鼠动情周期一般为 4~6 天,即每 4~6 天内出现动情前期、动情期、动情后期、动情间期的周期性变化,则计为一次规则的动情周期,如杂乱无章,或持续某一个时期无变化,则计为无规则动情周期。

6.2 卵巢生长卵泡比率 分别于灌胃 4、8 周后处死 12 只小鼠,留取卵巢,光学显微镜下取卵巢最大切面,观察卵泡生长情况,计算卵巢生长卵泡比率(卵巢最大径切面的总卵泡数目中生长卵泡数所占的比率)。

6.3 卵巢组织 GDF-9 及 Smad2 蛋白水平检测 卵巢经福尔马林固定、脱水、石蜡包埋、连续切片,厚 4 μm,免疫组化法检测卵巢组织 GDF-9、Smad2 蛋白表达。抽提卵巢蛋白,采用 Western blot 法检测卵巢组织 GDF-9、Smad2 蛋白表达水平。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Levene 检验方差齐性。方差齐采用单因素方差分析;方差不齐采用多个样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis 法,即 H 值检验)。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠一般情况比较 从第 1 次免疫后的约第 25 天开始,模型组小鼠表现易激惹,大便干结,动情期不典型,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。每组均有不同数量的小鼠死亡,其中空白对照组 2 只;模型组灌胃 4 周后死亡 3 只,灌胃 8 周

后死亡 5 只;左归丸组、乙烯雌酚组灌胃 4 周、8 周时各死亡 3 只,考虑可能由于灌胃误灌入肺或 MTX 的骨髓抑制等不良反应所致。

2 各组小鼠性周期比较 模型组小鼠动情周期停滞,以动情间期为主,阴道细胞涂片主要表现为大量白细胞及少量上皮细胞。左归丸组小鼠动情周期轻度紊乱,动情间期长。己烯雌酚组小鼠以动情期为主,阴道细胞涂片主要表现为大量角化上皮细胞。

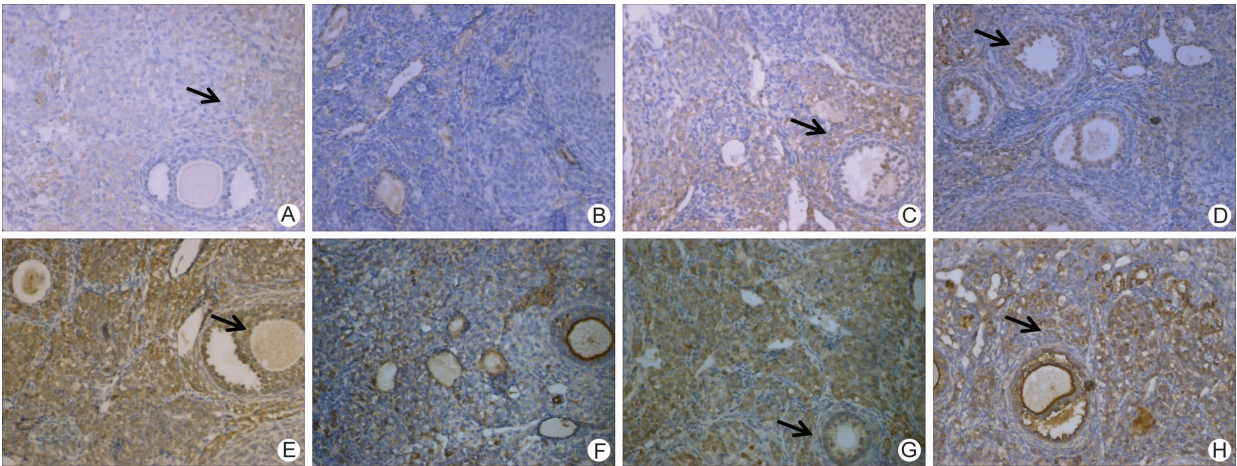
3 各组小鼠卵巢生长卵泡比率比较(表 1) 与空白对照组比较,模型组 4、8 周时小鼠卵巢生长卵泡比率明显降低(P<0.01);与模型组同期比较,左归丸及己烯雌酚组 4、8 周小鼠卵巢生长卵泡比率均明显升高(P<0.01)。

表 1 各组小鼠卵巢生长卵泡比率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	百分比(%)
空白对照		10	0.619 0 ± 0.108 8
模型	4 周	9	0.234 4 ± 0.020 7 *
模型	8 周	7	0.257 1 ± 0.019 8 *
己烯雌酚	4 周	9	0.432 2 ± 0.029 5 Δ
己烯雌酚	8 周	9	0.414 0 ± 0.033 4 Δ
左归丸	4 周	9	0.458 9 ± 0.063 9 Δ
左归丸	8 周	9	0.471 1 ± 0.052 3 Δ

注:与空白对照组比较,*P<0.01;与模型组同期比较,ΔP<0.01

4 各组小鼠卵巢组织 GDF-9、Smad2 蛋白表达 免疫组化结果比较(图 1,表 2) 免疫组化结果显示,GDF-9、Smad2 均在卵泡颗粒细胞胞浆表达。与空白对照组比较,模型组小鼠造模 4、8 周卵巢 GDF-9、Smad2 蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01);与模型组同期比较,左归丸、己烯雌酚组小鼠卵巢 GDF-9、Smad2 蛋白表达水平均升高(P<0.05, P<0.01)。



注:A~D 为 GDF-9 蛋白表达;A 为空白对照组;B 为模型组 8 周;C 为左归丸组 8 周;D 为己烯雌酚组 8 周;E~H 为 Smad2 蛋白表达;E 为空白对照组;F 为模型组 8 周;G 为左归丸组 8 周;H 为己烯雌酚组 8 周;箭头所示 GDF-9、Smad2 在颗粒细胞阳性表达

图 1 造模 8 周卵巢 GDF-9 及 Smad2 蛋白表达 (免疫组化 DAB 显色, ×200)

表 2 各组小鼠卵巢组织 GDF-9 及 Smad2 蛋白表达水平比较 (免疫组化法, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	IOD (GDF-9)	IOD (Smad2)
空白对照		10	0.041 ± 0.014	0.055 ± 0.009
模型	4 周	9	0.030 ± 0.012 *	0.026 ± 0.004 **
模型	8 周	7	0.029 ± 0.007 *	0.030 ± 0.006 **
己烯雌酚	4 周	9	0.045 ± 0.011 Δ	0.048 ± 0.006 $\Delta\Delta$
己烯雌酚	8 周	9	0.048 ± 0.009 $\Delta\Delta$	0.049 ± 0.004 $\Delta\Delta$
左归丸	4 周	9	0.043 ± 0.013 Δ	0.053 ± 0.009 $\Delta\Delta$
左归丸	8 周	9	0.040 ± 0.013 Δ	0.052 ± 0.012 $\Delta\Delta$

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

5 各组小鼠卵巢组织 GDF-9、Smad2 蛋白表达 Western blot 结果比较 (表 3、图 2) 与空白对照组比较,模型组造模 4、8 周小鼠卵巢 GDF-9、Smad2 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组同期比较,左归丸及己烯雌酚组 4、8 周时小鼠卵巢 GDF-9 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),Smad2 蛋白表达虽也升高,但左归丸组仅 8 周时,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠卵巢组织 GDF-9、Smad2 蛋白表达比较 (Western blot 法, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	β -actin (标准值)	GDF-9/actin	Smad2/actin
空白对照		0.930	0.618 ± 0.000	1.585 ± 0.581
模型	4 周	0.684	0.264 ± 0.890 *	0.280 ± 0.087 *
模型	8 周	0.721	0.290 ± 0.085 *	0.386 ± 0.555 *
左归丸	4 周	0.734	0.447 ± 0.064 Δ	0.503 ± 0.068
左归丸	8 周	0.670	0.502 ± 0.797 Δ	0.959 ± 0.214 Δ
己烯雌酚	4 周	0.698	0.491 ± 0.087 Δ	0.478 ± 0.035
己烯雌酚	8 周	0.846	0.541 ± 0.100 Δ	0.701 ± 0.466

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

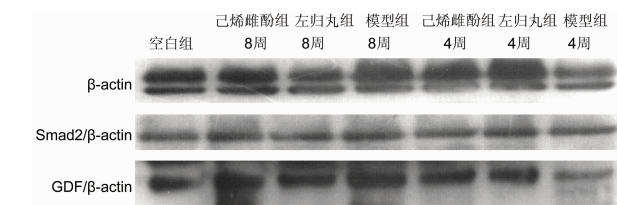


图 2 各组 Smad2 及 GDF-9 蛋白表达电泳图

讨 论

原始卵泡是卵巢的内分泌和生殖的主要单位,其数量确定女性的生殖潜能和生殖寿命^[13]。卵泡的生长发育经历募集、生长、优势选择、成熟、排卵、黄体形成等过程。卵泡闭锁发生在整个生育年龄,直到更年期卵泡储备耗尽。颗粒细胞凋亡是卵泡闭锁的中心环节^[14],卵泡募集是非常精细的调节过程,始基卵泡的启动募集阶段不依赖促性腺激素,与 FSH、LH 无关,

主要受存在于卵母细胞和颗粒细胞间的多种信号传递途径调节。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族/Smads 信号转导是调控卵泡发育的重要传导通路,其对细胞生长调节的基本过程是:信号沿 TGF- β 族配体—受体—Smads 蛋白—转录因子—DNA 表达。转导途径中任一过程的异常都可能引起信号转导紊乱,导致卵泡募集障碍,抑制卵泡生长发育,加速卵泡闭锁,发生卵巢早衰。

GDF-9 是卵母细胞来源的生长因子^[15],存在于除原始卵泡外所有卵泡的卵母细胞中。在卵泡发育的早期阶段,GDF-9 通过旁分泌的方式促进卵母细胞的有丝分裂^[16],促进始基卵泡生长和发育。在卵泡的进一步生长中,GDF-9 可刺激颗粒细胞增殖和卵丘膨胀^[17],进而促进窦前卵泡的发育,亦能调节 FSH 对颗粒细胞的激素分泌水平,抑制 FSH 诱导的颗粒细胞过早黄素化;并能与 FSH 协同刺激卵泡的生长,对卵泡的早期增生和发育极为重要。GDF-9 可诱导始基卵泡募集,促进窦前卵泡向窦卵泡的转化,提高卵泡存活率。Orisaka M^[18] 等研究表明 GDF-9 对颗粒细胞和膜细胞类固醇的生物合成起调节作用,可阻滞细胞凋亡途径。因此,GDF-9 在卵泡发育成熟过程中起着重要的作用,如 GDF-9 降低,则卵泡生长发育障碍,除影响卵泡发育,GDF-9 表达降低还可能使颗粒细胞凋亡加剧,卵泡闭锁,进而导致 POF。

本实验研究观察到 GDF-9 及其信号转导蛋白 Smad2 均在小鼠卵泡颗粒细胞胞浆表达。应用免疫组化法及 Western blot 法检测 GDF-9、Smad2 蛋白的表达水平一致。模型组小鼠卵巢 GDF-9、Smad2 蛋白表达水平低于空白对照组,提示免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 GDF-9 蛋白表达减弱,并可能通过影响 GDF-9/Smad2 信号转导的调节,导致卵泡生长发育障碍,颗粒细胞凋亡加剧,卵泡闭锁,进而导致卵巢早衰。

《素问·上古天真论》说:“女子七岁,肾气盛,齿更发长;二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子;……七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”POF 者肾气的早衰与天癸的早竭导致月经停闭,生殖能力衰退。卵巢早衰的病机特点是肾气亏虚,天癸匮乏,血亏血瘀,虚实夹杂而以肾虚天癸竭为主导,血虚为基础^[5]。左归丸以熟地为君药,滋肾阴养精血;臣以山茱萸养肝滋肾、山药补脾益阴、枸杞子补肾益精,并在此草木并补肾肝脾三阴的基础上配伍龟、鹿二胶血肉有情之品,以填精补髓,滋生真阴,共助熟地滋肾阴养精血;佐以菟丝子温阳益

阴,合鹿角胶,“阳中求阴”,使肾中阴精的产生有阳气作为化生动力而源源不绝,佐川牛膝通利血脉,活血化瘀,补肾强腰。全方的配伍注重寓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。左归丸的组方符合经后期阴生阳长而以阴生为主的特点,可治疗更年期综合征,对雌激素水平不足的闭经也有较好的疗效^[19],能抑制免疫性 POF 小鼠 FSH 的过高水平,增加体内 E2 水平^[7],左归丸含药血清对未成熟卵母细胞体外核成熟具有明显促进作用^[20],能降低 POF 大鼠血清升高的 FSH、LH 水平,升高血清 E2 水平^[21,22]。左归丸能抑制小鼠抗透明带抗体产生,调节 CD4⁺/CD8⁺ 比例恒定,增加卵母细胞 GDF-9 mRNA 表达,使生长卵泡及成熟卵泡数增加,调节 Fas/FasL 系统平衡,增强 Bcl-2 蛋白表达,减弱 Bax 蛋白表达,抑制卵泡凋亡,改善卵巢功能^[7,9]。

本研究结果显示左归丸能上调 POF 小鼠卵巢 GDF-9 及其信号传导蛋白 Smad2 的蛋白表达水平,促进 POF 小鼠生长卵泡的发育。与模型组比较,左归丸组小鼠卵巢 GDF-9 与 Smad2 蛋白表达增加,卵巢生长卵泡比率提高($P < 0.01$),表明左归丸可能通过改善 GDF-9/Smad2 信号转导的调节,从而促进始基卵泡的募集,促进卵泡发育,抑制卵泡闭锁,调节卵巢功能。

参 考 文 献

- [1] 徐苓,宋亦军. 卵巢早衰的临床表现和诊断标准[J]. 实用妇产科杂志, 2003, 19(4): 195-196.
- [2] Jiao X, Qin YY, Li GY, et al. Novel NR5A1 missense mutation in premature ovarian failure: detection in Han Chinese indicates causation in different ethnic groups[J]. PLoS One, 2013, 8(9): 430-436.
- [3] Gao F, Zhang J, Wang XN, et al. Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation [J]. Human Molec Genetics, 2014, 23(2): 333-341.
- [4] 沈杨,任慕兰. 卵巢储备功能的影响因素[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 9(29): 643-645.
- [5] 朱玲,罗颂平. 卵巢早衰的病因病机及其证治[J]. 中医药学刊, 2003, 21(1): 143-144.
- [6] Chao SL, Huang LW, Yen HR. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy using Chinese herbal medicine [J]. Chang Gung Med J, 2003, 26(6): 449-452.
- [7] 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.

- [8] 李红梅,朱玲,钟志勇,等. 左归丸对免疫性 POF 小鼠卵巢 GDF-9、BMP-15 表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 10(11): 1517-1518.
- [9] 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.
- [10] 朱玲,罗颂平,许丽绵. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢超微结构影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 42-44.
- [11] 付莉,赵怡璇,李守柔. 卵巢早衰实验动物模型的建立[J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(3): 179-183.
- [12] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法(第3版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:202.
- [13] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles [J]. Endocr Rev, 2000, 21(2): 200-214.
- [14] Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(2): 162-177.
- [15] Huang HY, Wang HS, Chan SH, et al. Granulosa lutein cell growth differentiation factor-9 (GDF-9) messenger RNA and protein expression in *in vitro* fertilization (IVF) cycles: relation to characteristics of ovulation induction and IVF [J]. Fertil Steril, 2009, 91(4): 1583-1585.
- [16] Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(39): E3723-E3729.
- [17] Peng J, Li Q, Wigglesworth K, et al. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(8): E776-E785.
- [18] Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, et al. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage [J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(10): 2456-2468.
- [19] 朱玲,陈彬彬,黄泉智,等. 左归丸临床与实验研究进展[J]. 国医论坛, 2003, 18(2): 51-53.
- [20] 孙晓峰,罗令,孙启春,等. 左归丸促进小鼠未成熟卵母细胞体外核成熟的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 444-447.
- [21] 李红梅,苗竹林. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠性激素的影响[J]. 中国现代应用药学, 2011, 27(13): 1161-1164.
- [22] 刘秀云,秦佳佳. 左归丸对大鼠化疗导致的卵巢早衰防治作用的研究[J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(1): 5-9.

(收稿:2014-10-02 修回:2016-07-13)

责任编辑:田琳

英文责编:张晶晶