

归肾丸对卵巢储备功能低下小鼠卵巢 Oct-4、MVH 及 Egr-1 表达的影响

崔丹丹¹ 马雯雯¹ 文 露¹ 宋坤琨¹ 丁嘉慧¹ 黄 聪¹ 张明敏²

摘要 **目的** 探索归肾丸对卵巢储备功能低下(DOR)小鼠卵巢 Oct-4、MVH 及 Egr-1 的影响。**方法** 将 40 只 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为正常组、模型组、归肾丸组和脱氢表雄酮(DHEA)组。连续序贯腹腔注射孕马血清(PMSG),人绒毛膜促性腺激素(HCG),前列腺素 F_{2α}(PGF_{2α})产生连续超数排卵,再结合臭氧吸入构建 DOR 模型。其后归肾丸组给予 0.3 mL 归肾丸中药灌胃,DHEA 组给予 0.3 mL DHEA 灌胃,而正常组与模型组均给予相同剂量生理盐水灌胃,21 天。采用 ELISA 法检测血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)和抗苗勒氏管激素(AMH)水平以及 Real time-PCR 检测 Oct-4、MVH、Egr-1 mRNA 的变化。**结果** 与模型组比较,各治疗组血清 E₂、P 及 AMH 水平均明显升高,ER、PR、MVH、Oct-4 mRNA 表达均明显升高,差异有统计学意义(P<0.05)。**结论** 归肾丸能改善 DOR 小鼠 Oct-4、MVH、Egr-1 mRNA 表达,改善卵巢功能。

关键词 卵巢储备功能低下;超促排卵;归肾丸;脱氢表雄酮;早期生长反应基因

Effect of Guishen Pill on Expression Levels of Oct-4, MVH, and Egr-1 in Mice with Diminished Ovarian Reserve CUI Dan-dan¹, MA Wen-wen¹, WEN Lu¹, SONG Kun-kun¹, DING Jia-hui¹, HUANG Cong¹, and ZHANG Ming-min² *1 Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030), China; 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030), China*

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Guishen Pill (GSP) on expression levels of Oct-4, MVH, and Egr-1 in mice with diminished ovarian reserve (DOR). **Methods** Totally 40 female C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups, the normal control group, the model group, the GSP group, and the dehydroepiandrosterone (DHEA) group, 10 in each group. Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), human chorionic gonadotropin (HCG), and prostaglandin F_{2α}(PGF_{2α}) were sequentially administered to produce superovulation. The DOR model was established by exposing to ozone inhalation. Mice in the GSP group were intragastrically administered with GSP at 0.3 mL. Those in the DHEA group were intragastrically administered with DHEA at 0.3 mL. Equal volume of normal saline was intragastrically administered to mice in the normal control group and the model group. All mice were treated for 21 days. Serum levels of estrogen (E₂), progesterone (P), and anti-Müllerian hormone (AMH) were measured by ELISA. Changes of Oct-4, anti-AMH, and early growth response gene-1 (Egr-1) mRNA in ovaries were detected by Real-time PCR. **Results** Compared with the model group, serum levels of E₂, P, and AMH, as well as contents of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), MVH, and Oct-4 mRNA significantly increased in the GSP group and the DHEA group (P<0.05). **Conclusion** GSP could improve expression levels of Oct-4, MVH, and Egr-1 mRNA in DOR mice and their ovarian function.

KEYWORDS diminished ovarian reserve; superovulation; Guishen Pill; dehydroepiandrosterone; early growth response factor

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173396)

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所(武汉 430030);2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院中医科(武汉 430030)

通讯作者:张明敏, Tel:027-83663217, E-mail:mmzhang@tjh.tjmu.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2015.01.0076

卵巢储备功能(ovarian reserve, OR)是指卵巢皮质区卵泡生长、发育、并形成可受精的卵母细胞的能力,此能力取决于卵巢内库存卵泡的数量和质量。若卵巢内存留的可募集卵泡数目减少及卵子质量下降则称为卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve, DOR),会严重影响女性的生育能力。辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)目标之一就是募集适量卵泡、获得高质量卵母细胞并形成较多可移植胚胎,然而 DOR 患者卵巢内可募集的卵泡数目少,对促性腺激素反应不良,妊娠率低,周期取消率高,是 ART 中一个棘手的问题。新生儿的卵巢中约含有 200 万个始基卵泡,而到绝经时,卵巢中还剩下大约 1 000 个卵泡^[1,2]。在小鼠中也发现了同样情况:13~14 月龄的小鼠卵巢中卵泡数量只有 4~5 月龄小鼠的 10% 左右^[3]。流行病学调查显示卵巢早衰发病率在一般人群中占 0.9%~3%,在闭经者中占 2%~10%^[4],而 DOR 的发病率虽然未有报道,但有日益增多的趋势。DOR 对女性的身心健康、家庭幸福影响较大,积极防治十分必要。由于 DOR 可进一步发展为卵巢早衰,而卵巢早衰病因不明^[5,6],治疗颇为棘手^[7],尚无有效治疗措施,如何减缓卵巢功能衰退的速度以恢复卵巢功能,进而提高生活质量,是目前生殖内分泌研究的一项重要课题。

女性体内的抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)是由卵巢中的生长卵泡(初级卵泡、窦前卵泡和小的窦状卵泡)中的颗粒细胞分泌,它能反映卵巢中生长卵泡的数量,从而反映始基卵泡的数量^[7]。而卵巢储备主要与始基卵泡的数量有关,因此可以认为血清 AMH 水平能够反映卵巢储备功能。

本研究在前期实验基础上^[8,9],采用 C57BL/6J 小鼠,通过连续超促排卵及臭氧接触建立生理性卵巢衰老模型,也即是 DOR 模型,进一步研究归肾丸治疗卵巢功能衰退的机制,为临床运用中药治疗卵巢功能衰退提供理论及实验依据。

材料与方法

1 动物 清洁级 6~8 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠,体重 20~25 g,由武汉大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(鄂)2008-0004。所有小鼠均饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心屏障系统。严格保证饲养环境为 12 h 光照,12 h 暗室,温度为 18~22℃,相对湿度为 70%~85%。雌雄分笼饲养,自由饮水和进食(标准饮食)。

2 药物 归肾丸浓缩颗粒由熟地 6 g 山茱萸

1.7 g 山药 1.5 g 菟丝子 0.5 g 枸杞子 4 g 杜仲 0.5 g 茯苓 1 g 当归 3 g 组成,分别相当于生药熟地 20 g 山茱萸 10 g 山药 10 g 菟丝子 10 g 枸杞子 10 g 杜仲 10 g 茯苓 10 g 当归 10 g,各中医药配方颗粒由三九医药制品有限公司提供,配制成含生药量 1.67 g/mL 的无菌中药。

3 试剂及仪器 孕马血清促性腺激素(PMSG)和前列腺 F_{2α}(PGF_{2α})购自杭州动物制药厂,人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自中国丽珠医药公司。AMH ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,雌二醇(E₂)及孕酮(P)的 ELISA 试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司。Trizol 试剂,逆转录(RT)试剂盒,实时荧光定量 PCR 试剂盒及引物均购自 TaKaRa 公司。全能酶标仪(BioTek Synergy2, Vermont, USA),核酸蛋白质分析仪(DU730, BECKMAN COULTER, USA),PCR 扩增仪(Eppendorf 公司, Germany),Step-one 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, California, USA)。

4 方法

4.1 分组及模型建立 小鼠适应性饲养 1 周,其后进行阴道涂片,观察小鼠的动情周期,其后将连续 2 个动情周期正常的小鼠 40 只纳入实验,随机分为正常组、模型组、归肾丸组和脱氢表雄酮(DHEA)组,每组 10 只。参照 Miyamoto K 等^[10]的方法造模,模型组、归肾丸组及 DHEA 组腹腔注射 5 IU PMSG,54 h 后给予 5 IU HCG 腹腔注射,19 h 后再行 25 IU PGF_{2α}腹腔注射。3 次注射为 1 个完整超排周期,12 h 开始下一个周期,共进行 10 个周期。同时,试验期间每晚 21:00~次日 9:00 放入臭氧接触箱中,保持臭氧接触箱中心臭氧浓度稳定在 2.8 mg/m³。而正常组则接受生理盐水腹腔注射,常规饲养。

4.2 给药方法 第 10 次连续超排 HCG 腹腔注射完成后次日,归肾丸组与 DHEA 组给予相应药物灌胃,小鼠灌胃药物剂量参照《药理学实验》^[11]即:每只小鼠归肾丸灌胃剂量=人剂量(g/kg)×(人的转换因子/小鼠的转换因子)×(鼠平均体重)=90 g/50 kg × 12 × 22.5 g ≈ 0.5 g/0.3 mL;同理,小鼠 DHEA 灌胃剂量为每只 0.4 mg/0.3 mL,正常组及模型组给予相同剂量生理盐水灌胃,每天 1 次。自灌药第 1 天起,每日进行阴道涂片,观察动情周期,每 2 天测 1 次体重。第 21 天灌胃结束后于动情后期经二氧化碳麻醉摘取眼球取血,再颈椎脱臼处死。均从背腹部剖腹,迅速取出双侧卵巢,一侧卵巢放入 4% 多聚甲醛固定液,另一侧卵巢放入冻存管 -80℃ 超低温冰箱保存,备用。

4.3 观察指标及检测方法

4.3.1 血清 E₂、P 及 AMH 水平 采用 ELISA 法测定小鼠血清中 E₂、P 以及 AMH 的浓度,具体操作按试剂盒说明书所提供的实验步骤进行。

4.3.2 卵巢组织 ER、PR、AMH、MVH、Oct-4 及 Egr-1 的水平 采用 Real-time PCR 法检测,首先采用 Trizol 试剂提取卵巢组织总 RNA,根据反转录试剂盒说明书操作,取模板 RNA 2μg 加入反转录试剂盒,采用 20μL 反应体系,37℃,15 min 进行反转录反应,85℃,5s 反转录酶失活,进行 cDNA 的合成。Real time-PCR 时,每个扩增反应用 2μL 的 cDNA。引物序列由大连 TAKARA 合成,具体序列见表 1。采用二步法进行荧光定量 PCR,先进行 95℃,30s 的热启动,再进行 95℃,5s 的预变性,其后为 60℃,20s 40 个循环 PCR 反应。

表 1 引物序列		
基因	引物序列	引物长度 (bp)
ER	上游:5'-AATGATGGGCTTATTGACCAACCTA-3'	138
	下游:5'-AGAATCTCCAGCCAGGCACAC-3'	
PR	上游:5'-GCTCAGCGCTTCTACCAACTC-3'	150
	下游:5'-GGGCAGCAATAACTTCAGACATCA-3'	
AMH	上游:5'-TGGTACTGCTGCTAGCGACTATG-3'	140
	下游:5'-CACCAGGCACAAAGTTCA-3'	
MVH	上游:5'-GTTTGCATCTGTTGACACGAGGA-3'	194
	下游:5'-CAACTGGATTGGGAGCTTGTGA-3'	
Oct-4	上游:5'-CAGACCACCATCTGTCGCTTC-3'	92
	下游:5'-AGACTCCACCTCACACGGTCTC-3'	
Egr-1	上游:5'-TCAGTGGCCACCACCTTTG-3'	126
	下游:5'-AAAGGTCGCTGTCTGTCTGAA-3'	
GAPDH	上游:5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	150
	下游:5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	

4.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 计算机统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠血清 E₂、P 及 AMH 含量比较(表 2)

表 3 各组小鼠卵巢 ER、PR、AMH、MVH、Oct-4、Egr-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)							
组别	n	ER	PR	AMH	MVH	Oct-4	Egr-1
正常	6	1.04 ± 0.05	1.78 ± 0.21	1.66 ± 0.22	1.21 ± 0.23	1.08 ± 0.11	0.97 ± 0.11
模型	5	0.57 ± 0.09 **	1.11 ± 0.20 *	1.00 ± 0.18 *	0.68 ± 0.10 *	0.76 ± 0.07 *	0.69 ± 0.07 *
归肾丸	6	1.02 ± 0.14 Δ	2.10 ± 0.34 Δ	1.92 ± 0.36 Δ	1.19 ± 0.12 $\Delta\Delta$	1.22 ± 0.12 $\Delta\Delta$	1.04 ± 0.10 Δ
DHEA	6	1.14 ± 0.15 Δ	1.75 ± 0.20 Δ	1.21 ± 0.19	1.01 ± 0.10 Δ	1.12 ± 0.15 Δ	0.79 ± 0.11

与正常组比较,模型组 E₂、P 及 AMH 均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,归肾丸组与 DHEA 组 E₂、P 及 AMH 均明显升高,差异亦有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 E ₂ 、P 和 AMH 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	E ₂ (pg/mL)	P (ng/mL)	AMH (pg/mL)
正常	8	145.30 ± 16.06	86.46 ± 11.74	1 490 ± 127
模型	7	85.08 ± 13.62 *	41.92 ± 10.81 *	1 023 ± 110 *
归肾丸	7	152.30 ± 24.23 Δ	96.03 ± 14.56 Δ	1 688 ± 130 $\Delta\Delta$
DHEA	6	141.80 ± 21.88 Δ	96.00 ± 21.04 Δ	1 717 ± 88 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;下表同

2 各组小鼠卵巢 ER、PR、AMH、MVH、Oct-4、Egr-1 mRNA 表达比较(表 3) 与正常组比较,模型组 ER、PR、AMH、MVH、Oct-4、Egr-1 mRNA 水平均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,归肾丸组 ER、PR、AMH、MVH、Oct-4、Egr-1 mRNA 水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),DHEA 组 ER、PR、MVH、Oct-4 mRNA 水平明显升高,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

DOR 是卵巢早衰的前奏,应给予高度的重视和积极的治疗。本实验采用序贯连续超排卵 10 次以及臭氧吸入来造模,旨在观察归肾丸对 DOR 小鼠卵巢局部及卵细胞形成相关分子的影响。

造模根据是基于自由基理论,由活性氧等引起的细胞内氧化损伤是造成衰老的重要因素^[12,13],而连续超排卵能降低始基卵泡池的假说。随着年龄的增长,卵泡数量下降,而卵泡质量亦同时下降,有报道称,35 岁以上妇女自然受孕几率大大下降^[14]。目前有相当多的理论来解释这一现象,如颗粒细胞出现的增龄性损伤而由此引起的功能改变^[15]。目前对这些增龄性损伤最有力的解释来自于自由基衰老理论,此理论是 Harman D 在 1951 年首先提出^[16]。自由基是机体氧化反应中产生的有害化合物,具有强氧化性,可损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病及衰老效应。

自由基包括细胞内正常代谢产生的活性氧族(ROS)等,细胞内氧化应激压力升高是造成细胞衰老的主要原因。研究表明,随着年龄的增长,女性的卵母细胞、卵丘细胞及卵泡液中均出现较高的 ROS 和较低抗氧化物水平,同时在进行人工辅助生殖技术时,那些拥有较高 ROS 水平卵泡液的女性受孕成功率较低。这些结果表明自由基在卵泡质量下降过程中起了相当重要的作用^[17-19]。由于卵巢衰老涉及卵泡数量和质量两方面下降,故本实验利用序贯连续超排卵 10 次来消耗卵巢内始基卵泡数量,同时再结合强氧化剂,即臭氧吸入的方法来增加体内氧化应激压力,而使卵泡质量降低来造模。本实验结果显示,与正常组比较,模型组血清 E_2 、P、AMH 均明显降低($P < 0.05$),且卵巢 ER、PR、AMH mRNA 也显著降低($P < 0.05$)。提示造模成功。

Egr-1 即早期生长反应基因,在体内分布广泛,作用涉及诱导分化,具有促进细胞生长、增殖、分化等多种生物功能^[20]。在女性生殖内分泌系统,如垂体、子宫以及卵巢中的卵泡、黄体表达水平较高^[21]。Das S 等^[18]在研究卵巢排卵的机制中发现,促性腺激素分泌高峰后 6 h 内,颗粒细胞中的 Egr-1 表达骤增。对垂体切除的大鼠贯序给予卵泡刺激素和黄体生成素腹腔注射后在卵巢中可分别出现 Egr-1 表达高峰^[22]。说明 Egr-1 在下丘脑-垂体-卵巢轴(HPO)的调控中起着重要作用。本实验中发现,模型组卵巢 Egr-1 mRNA 表达明显降低,归肾丸组与 DHEA 组表达明显升高($P < 0.05$),说明归肾丸及 DHEA 均能调节 Egr-1 的表达,进而改善卵泡的发育。

Oct-4 是哺乳动物 POU 转录因子家族中重要的一员,为具有较强特异性的干细胞标志物。人类 Oct-4 与小鼠有 87% 基因序列相同^[22]。小鼠 Oct-4 表达于全能性胚胎细胞和生殖细胞中,在细胞全能阶段表达较高,在细胞分化后表达降低^[23]。通过 RT-PCR^[24]和 cDNA 文库 PCR 技术^[25]检测到人类 Oct-4 表达于未受精的卵母细胞以及受精卵母细胞发育到胚泡的整个过程。Oct-4 也表达在人和小鼠的胚胎干细胞^[26,27]以及胚胎性癌细胞中^[28,29]。MVH 是果蝇 vasa 基因的同源类似物,在各个阶段的生殖细胞中均能检测到,有研究表明 MVH 基因缺陷小鼠的生殖细胞出现分化停滞和凋亡现象,并且 Oct-4 的表达也随之降低,小鼠失去生殖能力,因此 MVH 被认为是生殖细胞特异性标志基因^[30]。本实验结果显示,模型组 Oct-4、MVH mRNA 表达水平均较正常组降低($P < 0.05$),而 DHEA 组、归肾丸组与模型组比较,差

异均有统计学意义($P < 0.05$),说明连续超排卵联合臭氧吸入能使卵巢的生殖细胞减少,进而导致卵泡数量减少,引起卵巢功能衰退。DHEA 及归肾丸能改善 Oct-4、MVH 表达,提高卵巢的功能。

到目前为止,对 DOR 的治疗,现代医学尚无确切有效的方法能够恢复卵巢功能,多是以采用性激素治疗为主。中医学上无 DOR 病名,但根据 DOR 的临床表现,该证治当属中医学的“月经不调”、“血枯”、“不孕”、“经断前后诸证”等范畴。由于肾在中医学理论中对于女性生殖生理非常重要,故认为肾虚乃 DOR 的主要病理基础。临床上多从肾论治卵巢储备功能下降以及卵巢早衰^[31,32],如肾藏精,精化血,精足自能盈满而化经水,而归肾丸能填精补髓,益肾养血。本实验结果显示,归肾丸通过改善模型小鼠雌孕激素,AMH、Egr-1、Oct-4、MVH 表达,对卵巢功能衰退小鼠具有明显的治疗作用。

总之,归肾丸具有增强卵巢功能,改善性激素分泌的功能,对 DOR 有较好的治疗作用,其可能的作用机制是通过调整 DOR 模型鼠 Egr-1、Oct-4、MVH 表达,影响雌孕激素及 AMH 的分泌,进而提高卵巢的功能,达到肾之阴精充盛,冲任气血通调。由于 Oct-4、MVH 也来自于骨髓,是干细胞的共同标志物,因此,中医学理论肾主骨生髓是否与肾主生殖有内在的关联,还有待进一步深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(5): 461-471.
- [2] Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, et al. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause [J]. Hum Reprod, 2008, 23(3): 699-708.
- [3] Gosden R, Laing S, Felicio L, et al. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice [J]. Biol Reprod, 1983, 28(2): 255-260.
- [4] 庞震苗,易颖,陈凯佳. 卵巢早衰发病的流行病学调查及可能性预测的数学模型的构建 [J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(28): 4257-4258.
- [5] 龚萍,张明敏. 卵巢早衰的中西医治疗进展 [J]. 中西医结合研究, 2010, 2(6): 321-322, 324.
- [6] 王珂. 卵巢早衰的治疗进展 [J]. 中国妇幼保健, 2004, 19(12): 112-113.
- [7] Stubbs SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, et al.

- Anti-Müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(10): 5536–5543.
- [8] 崔丹丹, 马雯雯, 文露, 等. 归肾丸对 DOR 小鼠卵巢超微结构的影响[J]. *中西医结合研究*, 2014, 6(3): 137–140.
 - [9] 崔丹丹, 马雯雯, 文露, 等. 归肾丸对卵巢储备功能低下小鼠学习记忆能力和骨密度的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2014, 43(3): 243–248.
 - [10] Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(4): 674–681.
 - [11] 章元沛主编. *药理学实验*[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 268.
 - [12] Harman D. The free radical theory of aging[J]. *Antioxidants Redox Signaling*, 2003, 5(5): 557–561.
 - [13] Alexeeff SE, Litonjua AA, Wright RO, et al. Ozone exposure, antioxidant genes, and lung function in an elderly cohort: VA normative aging study[J]. *Occup Environ Med*, 2008, 65(11): 736–742.
 - [14] Cetin MT, Kumtepe Y, Kiran H, et al. Factors affecting pregnancy in IVF: age and duration of embryo transfer[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(3): 380–386.
 - [15] Broekmans F, Soules M, Fauser B. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences[J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5): 465–493.
 - [16] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298–300.
 - [17] Oyawoye O, Gadir AA, Garner A, et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(11): 2270–2274.
 - [18] Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(9): 2403–2407.
 - [19] Hammadeh M, Al Hasani S, Rosenbaum P, et al. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2008, 277(6): 515–526.
 - [20] Calogero A, Lombardi V, De Gregorio G, et al. Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma[J]. *Cancer cell* Int, 2004, 4(1): 1.
 - [21] Sayasith K, Brown KA, Lussier JG, et al. Characterization of bovine early growth response factor-1 and its gonadotropin-dependent regulation in ovarian follicles prior to ovulation[J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37(2): 239–250.
 - [22] Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(17): 4613–4620.
 - [23] Palmieri SL, Peter W, Hess H, et al. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation[J]. *Dev Biol*, 1994, 166(1): 259–267.
 - [24] Abdel-Rahman B, Fiddler M, Rappolee D, et al. Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos[J]. *Mol Hum Reprod*, 1995, 1(8): 401–406.
 - [25] Verlinsky Y, Morozov G, Verlinsky O, et al. Isolation of cDNA libraries from individual human preimplantation embryos[J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(6): 571–575.
 - [26] Reubinooff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro* [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 399–404.
 - [27] Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo[J]. *Nature*, 1990, 345(6277): 686–692.
 - [28] Pera MF, Herszfeld D. Differentiation of human pluripotent teratocarcinoma stem cells induced by bone morphogenetic protein-2[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10(8): 551–555.
 - [29] Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells[J]. *Cell*, 1990, 60(3): 461–472.
 - [30] Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, et al. The mouse homolog of *Drosophila vasa* is required for the development of male germ cells[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(7): 841–853.
 - [31] 卢晓男, 徐向荣, 林丽君. 补肾二仙汤治疗卵巢早衰的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(7): 594–596.
 - [32] 徐碧红, 李茂清, 骆宇戟. 补肾调经方配合激素替代疗法治疗卵巢早衰患者的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(10): 1332–1335.

(收稿: 2014-04-04 修回: 2014-09-15)